



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0037072
(43) 공개일자 2011년04월13일

(51) Int. Cl.

A61K 36/39 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01) *A61K 31/05* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0094340

(22) 출원일자 2009년10월05일

심사청구일자 2009년10월05일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

신동훈

서울시 강남구 대치동 670 동부센트레빌 101동 2103호

조흥연

서울시 성북구 돈암1동 동부센트레빌아파트 103동 1002호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

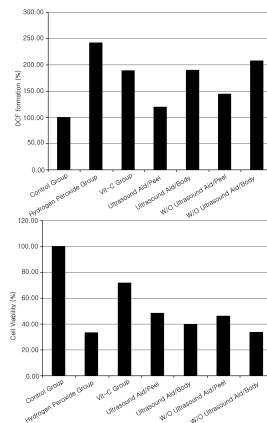
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 뇌 신경 세포 보호 활성을 갖는 고구마 추출물 및 그의 용도

(57) 요약

본 발명은 고구마(*Ipomoea batatas*) 추출물 또는 그로부터 분리된 2,4-다이-tert-부틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol)을 포함하는 뇌 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 알츠하이머 등의 뇌질환에 대해 우수한 효과를 발휘한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

김영준

서울시 강남구 도곡동 역삼한신아파트 1동 502호

김혜경

충남 서산시 해미면 대곡리 360 한서대학교 식품생물공학과

허호진

경상남도 진주시 가좌동 900 경상대학교 식품공학과

최수정

서울시 서대문구 연희3동 88-25 리치빌 301호

김재겸

서울시 구로구 개봉3동 거성아파트 5동 102호

조창희

경기도 성남시 분당구 판교동 552 판교원마을 102 2동 403호

구봉성

서울시 도봉구 방학4동 신동아2단지아파트 101동 1507호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KRF-2008-313-F00165

부처명 한국학술진흥재단

연구관리전문기관

연구사업명 기초연구과제지원사업(이공분야)

연구과제명 노인성 치매의 예방 및 개선을 위한 고구마 추출물 유래 기능성 물질의 개발
기여율

주관기관 고려대학교

연구기간 2008년 11월 01일 ~ 2009년 10월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

고구마 추출물 또는 그의 분획물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 추출물은 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출한 것인 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 분획물은 물 분획물, 헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 또는 에틸 아세테이트 분획물인 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 고구마 추출물은 고구마의 껍질로부터 추출된 것인 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 뇌질환은 알츠하이머, 노인성 치매, 전두측두성 치매, 혈관성 치매, 헌팅턴 무도병, 파킨슨병, 편두통, 우울증, 신경쇠약, 정신분열병, 양극성 증후군, 범불안장애, 스트레스 관련 질환, 공황장애, 강박신경증, 외상후 스트레스 장애, 주의력결핍과다활동장애, 식이장애, 공포증, 자폐증, 주의력 장애 또는 각성 장애인 조성물.

청구항 6

고구마 추출물 또는 그의 분획물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 개선용 건강식품 조성물.

청구항 7

2,4-다이-테르트-부틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 화합물은 고구마로부터 분리된 것인 조성물.

청구항 9

2,4-다이-테르트-부틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 뇌질환 개선용 건강식품 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고구마(*Ipomoea batatas*) 추출물 또는 그로부터 분리된 2,4-다이-tert-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol)을 포함하는 뇌 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 아밀로베타 펩티드(amyloid β peptide; A β)는 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein; APP)의 비이상적 분열로 인해 생성된 40-42개의 펩티드 물질로서 알츠하이머 병(Alzheimer's disease; AD)의 중요한 병원물질(pathogenetic material)로 추정되고 있다.

[0003] 알츠하이머 병에서의 뇌 신경 세포 괴사의 원인은 산소 자유 라디칼(oxygen free radical)의 생성, 활성산소(reactive oxygen species ;ROS)에 의한 산화적 손상에 따른 뇌 신경 세포 파괴 및 병인(pathogenesis)과 관련되어 있을 것으로 추정된다. 알츠하이머 병 환자의 뇌를 관찰한 결과 산화 스트레스 (ROS, lipid peroxidation, protein modification, mitochondrial DNA oxidation)의 증가를 보였다. 이러한 생리적 대사 이상이 아밀로이드 플라크(amyloid plaques) 및 신경섬유 농축체(neurofibrillary tangles ;NFT)와 같은 알츠하이머 환자 뇌 고유의 임상적 결과를 초래한다.

[0004] 또한, 아밀로베타 펩티드는 내부-세포의 자유 라디칼 상태(intra-cellular free radical status)를 만들고 궁극적으로 세포괴사를 유도하는바, 아밀로베타 펩티드와 뇌 신경 세포 파괴는 서로 상관성이 있을 것으로 추정된다.

[0005] 아밀로이드 베타에 의한 뇌세포 파괴, 그리고 이들 단백질의 구조, 생리작용, 뇌 안에서의 축적에 의한 아세틸콜린(acetylcholine ;ACh, neuro-transmitter)의 수준 감소 등이 최근의 알츠하이머 병에 대한 연구의 중심이 되고 있다.

[0006] 또한, 알츠하이머 병의 치료는 주로 환자의 증세를 가볍게 하고, 병의 진행속도를 지연시키는데 주안을 두고 있다. 알츠하이머 환자가 보이는 주요 증세에는 기억력, 인지능력, 학습능력의 감퇴가 있고, 이어서 감정 장애와 이상행동을 나타낸다. 이 중에서 가장 보편적인 증세인 기억력과 인지능력 장애에 대한 증세를 가볍게 해주는 간접 치료가 유일한 치료법이 되었다.

[0007] 이에, 현재까지 보고된 항치매 활성화 성분은 주로 식물기원성 저분자로 특히 노인성 치매 환자들에게 인지적 증상을 호전시키는 약물로서 cholinesterase inhibitors (ChEIs)를 많이 사용하고 있다. 제1세대 ChEIs로서 최초로 항치매 작용에 있어 적용 승인을 받은 tacrine은 작용지속 기간이 짧아 하루 4번 투여해야 하며, 간 독성이 있어 관찰의 번거로움이 있다. 요즘 주목받고 있는 제2세대 ChEIs들로는 일본 예자이사에서 개발되어 96년 말 미국 FDA 승인을 받고 97년부터 세계 30여국에서 판매되고 있는 Donepezil로 하루 한번 복용할 수 있고, 선택적인 저해로 말초 부작용을 줄였다. 또한, Rivastigmine은 미국 노바티스사에서 개발한 약물로, 스위스에서 1997년 12월에 승인받아 EU와 남아메리카 국가들에서 사용되고 있고, 미국, 캐나다에서도 승인 준비 중이며, 우리나라에는 97년 9월 도입되었다. Rivastigmine은 하루 2번 복용이 가능하고 중추신경계에 특이성이 높아 말초 부작용을 크게 감소시켰고 신장에서 대사되므로 간 독성이 거의 없는 것으로 보고되고 있다. Metrifonate가 치매환자에 3상 임상시험이 진행 중이며, 이는 비가역적인 AChEIs로서 작용기간이 길다.

[0008] 즉, 아밀로베타 펩티드의 생성과 아밀로베타 펩티드-유도된 산화 스트레스를 저해 또는 억제시키기 위한 연구가 계속되고 있으나 개발된 신소재나 약은 없는 실정이다. 또한, 현재까지 알츠하이머 병 약물개발의 주 표적은 병에서 나타나는 신경전달물질 이상으로 콜린성 신경 세포를 표적으로 한 콜린에스테라제 억제제들(Aricept, Exelon, Reminyl 등)과 글루타메이트 길항제인 Memantine이 FDA 승인을 얻어 현재 시판 중에 있는 것이 전부이다. 하지만 상기 언급한 바와 같이 이들 약물은 일시적으로 증상만 완화시킬 뿐이므로 병을 근원적으로 치료하거나 병의 진행 자체를 억제하는 약물 개발 기술이 절실히 요구되고 있다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 고령화 질환 중 그 심각성이 날로 증대되는 알츠하이머 병을 포함한 뇌질환의 예방 및 치료용 파이토케미컬(phytochemicals)을 탐색하고 이를 의약, 식품의약 및 건강기능식품의 원료로 소재화하기 위한 방법을 모색하였다. 그 결과, 오랫동안 식품으로 이용되어 온 고구마로부터 아밀로베타 캡티드-유도된 산화 스트레스에 따른 뇌 신경 독성을 저해하는 미량소재를 검색하고 이를 분리 정제함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 고구마(*Ipomoea batatas*) 추출물 또는 그로부터 분리된 2,4-다이-틸트-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol)을 포함하는 뇌 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 고구마(*Ipomoea batatas*) 추출물 또는 그로부터 분리된 2,4-다이-틸트-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol)을 포함하는 뇌 질환 개선용 건강식품 조성물을 제공하기 위한 것이다.

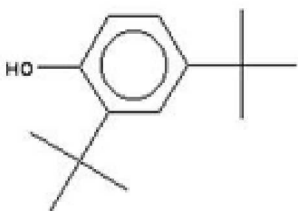
과제 해결수단

[0012] 하나의 양태로서, 본 발명은 고구마 추출물 또는 그의 분획물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0013] 또 다른 양태로서, 본 발명은 2,4-다이-틸트-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0014] 본 발명자는 고구마 추출물이 산화 스트레스(활성산소(ROS), 지질 퍼옥시데이션, 단백질 변경, 미토콘드리아 DNA 산화 등)에 의한 독성으로부터 뇌 신경 세포 보호 활성을 가짐을 발견하였다. 또한, 추가적으로 그러한 고구마 추출물 중 특히 뇌 신경 세포 보호 활성을 나타내는 유효 성분을 밝히고자 하였다. 이를 위하여, 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 본 발명자는 고구마를 에탄올 등의 유기 용매로 추출하여 조추출물을 얻은 후, 이를 다양한 유기 용매로 분획하여 각 분획물의 DCF (2',7'-dichlorofluorescein)-formation 및 세포 생존율을 측정하여 뇌 신경 세포 보호 활성을 측정하였다. 다양한 유기 용매로 추출한 각각의 분획물 모두가 뇌 신경 세포 보호 활성을 나타냈으나, 그 중에서 뇌 신경 세포 보호 활성이 가장 높게 나타난 클로로포름 분획물을 선택하여 이로부터 여러 단계의 크로마토그래피를 수행함으로써 활성을 나타내는 화합물을 분리 및 정제하였다. 분리된 화합물의 구조 및 화학적 특성을 분석하기 위해, 전자충격 질량 분석, 탄소 핵자기 공명스펙트럼 등의 분석을 수행하였다. 그 결과, 뇌 신경 세포 보호 활성을 가지는 유효성분이 2,4-다이-틸트-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol)임을 알 수 있었다.

[0015] 2,4-다이-틸트-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol)의 화학식은 하기와 같다.



[0016]

[0017] 본원에서의 용어, "뇌 신경 세포 보호 활성"은 산화 스트레스로 인해 뇌 신경 세포가 파괴되는 것을 차단 또는

그 효율을 감소시키는 것을 말한다. 아밀로베타 펩티드는 산화 스트레스를 유발시켜 내부-세포의 자유 라디칼 상태(intra-cellular free radical status)를 만들고 궁극적으로 뇌 신경 세포의 괴사를 유도한다. 따라서 산화 스트레스의 제거 여부 및 뇌 신경 세포 생존 여부가 아밀로 펩티드에 대한 뇌 신경 세포 보호의 중요한 지표가 된다.

[0018]

[0019] 본 발명자들은 아밀로베타 펩티드에 의한 신경 세포 괴사 과정이 활성기 산소종의 발생을 증가시켜 산화 스트레스를 유발하고 있으며, 고구마 추출물은 이러한 산화 스트레스에 따른 손상을 효과적으로 저해함으로써 궁극적으로 신경 세포 보호 작용을 나타냄을 확인하였다. 이로서, 고구마 추출물은 아밀로이드 베타 펩티드에 의해 유도되는 산화 스트레스를 효과적으로 감소시켜 줌으로써, 세포 안에서 과도하게 발생한 산화 스트레스에 의한 신경 세포 괴사 기전을 효과적으로 차단하여 높은 세포생존율을 유지시키고, 그 결과 신경 세포의 손상을 효과적으로 방어한 것임을 알 수 있었다.

[0020]

본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명자들은 인 비보 상에서 고구마 추출물의 뇌 신경 세포 보호 활성 효과를 확인하였는바 보다 구체적으로, 아밀로베타 펩티드를 이용하여 알츠하이머 질환을 유발한 모델에 고구마 추출물을 주사한 결과 기억 학습 능력이 정상 수준으로 유지된다는 것을 알 수 있었으며(도 7), 뇌를 적출하여 뇌 함유 지질의 산화 정도를 측정된 결과 산화적 손상정도가 정상군에 비해서도 오히려 감소 되었음을 알 수 있었다(도 8).

[0021]

뇌 신경 세포 보호 활성을 갖는 상기 고구마 추출물은 천연, 잡종, 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 뿌리, 줄기, 잎, 꽃, 열매의 몸통, 열매의 껍질 뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터 추출 가능하며 고구마의 껍질에서 추출하는 것이 가장 바람직하다.

[0022]

본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명자들은 고구마 추출 기관을 열매의 몸통과 열매의 껍질로 구분하여 고구마 추출물을 수득하였고 이들의 뇌 신경 세포 보호 활성을 측정하였다. 그 결과, 모든 경우가 뇌 신경 세포 보호 활성을 나타내나 고구마 껍질로부터 고구마 추출물을 수득하는 경우 뇌 신경 세포 보호 활성도가 가장 현저함을 알 수 있었다(도 2).

[0023]

또한, 본 발명에 따른 뇌 신경 세포 보호 활성을 갖는 2,4-다이-테르트-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol)은 천연물질, 바람직하게 상기 고구마로부터 분리할 수 있고, 고구마 추출물은 상기 언급한 바와 같이 천연, 잡종, 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있으며 고구마 껍질로부터 추출하는 것이 가장 바람직하다. 또한, 당 분야의 공지된 방법으로 화학적 합성법에 의해 제조될 수도 있다.

[0024]

본원에서의 용어, "약제학적으로 허용되는 염"은 통상적인 방법으로 제조한 염을 의미하며, 당업자에게 공지되어 있다. "약제학적으로 허용되는 염"은 약리학적 또는 생리학적으로 허용되는 다음 무기산과 유기산 및 염기로부터 유도된 염을 포함하지만 이것으로 한정되지는 않는다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 톨루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 포함할 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 알칼리 금속, 예를 들어, 나트륨, 알칼리금속, 예를 들어, 마그네슘, 암모늄 등을 포함할 수 있다.

[0025]

고구마 추출물을 제조하는 방법 그로부터 활성성분인 2,4-다이-테르트-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol)을 분리하는 방법은 하기와 같다.

[0026]

본 발명에 따른 고구마 추출물은 물, 유기 용매 또는 이의 혼합용매를 이용하여 추출함으로써 수득할 수 있고, 바람직하게는 일정 시간 건조시켜 분쇄한 고구마를 당 분야에서 공지된 바와 같은 냉침 추출, 가열 추출, 초음파 추출, 냉각 추출 등 다양한 추출법에 따라 추출할 수 있다. 추출 방법은 특별히 제한되지 않고, 유효 성분이 파괴되지 않거나 최소화된 조건에서 실온 또는 가온하여 추출할 수 있다. 이로부터 추출된 고구마의 추출물로부터

터 활성이 높은 분획을 얻고, 이를 크로마토그래피 등의 방법에 따라 더 분리함으로써 본 발명에 따른 뇌 신경 세포 활성을 갖는 2,4-다이-테르트-부틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol)을 분리할 수 있다.

[0027] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명자들은 추출법으로 초음파를 이용하는 경우와 이용하지 않는 경우로 구분하여 고구마 추출물을 수득하였고 이들의 뇌 신경 세포 보호 활성을 측정하였다. 그 결과, 모든 경우에서 뇌 신경 세포 보호 활성을 나타내나 초음파를 이용하여 고구마 추출물을 수득하는 경우 뇌 신경 세포 보호 활성도가 보다 우수함을 알 수 있었다(도 2).

[0028] 상기 고구마의 추출에 사용될 수 있는 유기 용매에는, 에탄올, 메탄올, 이소프로판올, 부탄올, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, N, N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합용매가 있으며, 바람직하게는 알코올, 보다 바람직하게는 메탄올, 에탄올 등의 저급 알코올 사용하여 추출할 수 있으며, 가장 바람직하게는 에탄올을 사용하여 추출할 수 있다.

[0029] 또한, 보다 구체적으로 a) 고구마를 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매로 추출하여 추출물을 얻는 단계; b) 얻은 추출물로부터 물 또는 비극성 유기 용매를 이용하여 분획물을 얻는 단계; 및 c) 상기 분획물을 분리, 정제하는 단계를 포함하여 고구마 추출물을 제조할 수 있다.

[0030] 1차 추출된 고구마 추출물로부터 활성이 높은 분획물을 얻기 위하여, 유기용매를 사용하여 분획물을 얻었다. 상기 유기용매로는 비극성 유기 용매가 바람직하며, 특히 바람직한 것으로, 헥산, 에테르, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합 용매 등이 있다.

[0031] 본 발명의 구체적인 실시예에서 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트를 사용하여 각각의 분획물을 얻었으며, 모든 분획물이 활성을 나타냈으나 이 중 클로로포름 분획물이 가장 높은 활성을 나타내었으며 헥산 분획물이 가장 낮은 활성을 나타냈다(도 3).

[0032] 이와 같이 얻은 비극성 용매 분획물, 즉 비극성 용매 가용층에 대해 크로마토그래피를 1회 이상 순차적으로 수행함으로써 활성 성분을 분리할 수 있으며, 크로마토그래피의 컬럼의 종류와 전개 용매는 다양하게 조절될 수 있다.

[0033] 본 발명의 구체적 실시예에서, 본 발명자는 고구마 추출물로부터 상기 화합물을 분리하였다. 비극성 용매 분획물을 감압농축하고 2번에 걸쳐 크로마토그래피를 수행하였다. TLC (thin layer chromatography)를 수행하여 가장 활성이 탁월한 밴드 (R_f value = 0.28)를 분리하고(도 4), 이 활성 밴드를 고성능액체크로마토그래피(HPLC)로 분리하여(도 5) 총 2번의 크로마토그래피를 수행함으로써 분자량 206 m/z를 갖는 활성물질들을 분리하였다.

[0034] 상기 방법으로 분리된 활성물질인 화합물을 전자충격 질량분석, 탄소 핵자기 공명스펙트럼 등으로 분석한 결과, 상기 화합물은 2,4-다이-테르트-부틸페놀인 것으로 밝혀졌다. 상기 화합물은 뇌 신경 세포 보호 활성을 가진다.

[0035] 상기한 바와 같이, 고구마 추출물은 우수한 뇌 신경 세포 보호 활성을 가지며, 이들 추출물에서 분리 정제한 활성물질인 2,4-다이-테르트-부틸페놀 역시 동일한 활성을 가질 것으로 충분히 예측할 수 있다.

[0036] 따라서, 고구마 추출물 또는 이로부터 분리한 2,4-다이-테르트-부틸페놀은 상기에서 살펴본 이유로 뇌질환에 대한 우수한 예방 및 치료 활성을 갖는다.

[0037] 상기 고구마 추출물 및 2,4-다이-테르트-부틸페놀은 인공적으로 합성된 화합물이 아니라 천연 추출물로부터 획득한 성분을 기초로 하므로 안전하고 독성, 부작용이 거의 없으므로 장기간의 복용이 가능하다는 장점이 있다. 또

한, 상기 조성물은 인간 뿐만 아니라, 뇌 질환이 발생할 수 있는 소, 개 등의 동물에게 사용될 수도 있다.

- [0038] 따라서 본 발명은 고구마 추출물 또는 그의 분획물, 및 고구마 추출물로부터 분리한 2,4-다이-테르트-뷰틸페놀 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물로 이용될 수 있다.
- [0039] 산화 스트레스로 인해 뇌 신경 세포가 파괴됨으로써 문제되는 다양한 뇌 질환이 있다. 특히, 상기 산화 스트레스는 아밀로베타 펩티드로 인해 유발될 수 있다.
- [0040] 구체적으로 상기 뇌질환에는 하기와 같은 질병이 포함된다.
- [0041] 신경변성질환(알츠하이머 병, 헌팅턴 무도병, 파킨슨 질환), 노인성 치매, 전두측두성 치매, 혈관성 치매, 편두통, 중추기원의 신경병변성 동통과 같은 신경계 질환;
- [0042] 우울증(내인성, 저항성, 반응성 또는 원인불명성 우울증), 신경쇠약, 정신분열병, 양극성 증후군, 범불안장애, 스트레스-관련 질환, 공황장애, 강박신경증, 외상후 스트레스 장애, 주의력결핍과다활동장애, 식이장애(특히 폭식증, 식욕부진), 공포증(특히 광장공포증), 자폐증과 같은 정신 질환;
- [0043] 신경계 또는 정신 질환에 관련된 기억, 주의력 및 각성 장애.
- [0044] 바람직하게는 알츠하이머 병이다. 배경기술에서 언급한 바와 같이 알츠하이머 병의 경우 알츠하이머에서는 뇌 신경 세포 피사가 일어나며 이의 원인은 산화 스트레스에 따른 것이다. 알츠하이머 병 환자의 뇌에서는 산화 스트레스의 증가를 보이며 이러한 생리적 대사 이상은 아밀로이드 플라크(amyloid plaques) 및 신경섬유 농축체(neurofibrillary tangles ;NFT)와 같은 알츠하이머 환자 뇌 고유의 임상적 결과를 초래한다.
- [0045] 따라서, 본 발명의 고구마 추출물 및 2,4-다이-테르트-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol) 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도되는 산화 스트레스를 효과적으로 감소시켜 줌으로써, 세포 안에서 과도하게 발생한 산화 스트레스에 의한 신경 세포 피사 기전을 효과적으로 차단하여 높은 세포생존율을 유지시키고, 그 결과 신경 세포의 손상을 효과적으로 방어하는바 상기 산화 스트레스로 인해 뇌 신경 세포가 파괴됨으로써 문제되는 뇌질환의 예방 및 치료에 효과적이다.
- [0046] 본원에서의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 고구마 추출물 또는 그로부터 분리된 2,4-다이-테르트-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol) 또는 그 약제학적 염을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [0047] 본원에서의 용어, "치료"는 본 발명에 따른 추출물 또는 상기의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0048] 본 발명의 뇌질환 예방 및 치료용 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있고, 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의하여 투여될 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 사용되는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의하여 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 유효량은 바람직한 효과를 주기 위해 요구되는 화합물의 양이다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 투

여의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다.

- [0050] 본 발명의 뇌질환 예방 및 치료용 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 뇌질환 예방 및 치료용 조성물은, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 약학적 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 활성 성분을 담체와 함께 혼합 또는 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시키는 것이 바람직하다.
- [0052] 따라서, 본 발명의 뇌질환 예방 및 치료용 조성물은, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있고, 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0053] 예를 들어, 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0054] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들어, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0055] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되고, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들어 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0056] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0057] 또한, 다른 양태로서, 본 발명은 고구마 추출물 또는 그의 분획물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 개선용 건강 식품 조성물을 제공한다.
- [0058] 또 다른 양태로서, 본 발명은 고구마 추출물로부터 분리한 2,4-다이-틸트-뷰틸페놀 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 개선용 건강 식품 조성물을 제공한다.
- [0059] 본 발명의 건강 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0060] 본 발명의 건강 식품 조성물에서 포함할 수 있는 필수 성분으로서 상기 고구마 추출물 또는 그의 유기 용매 분획물을 포함하는 뇌 신경 세포 보호 활성을 갖는 조성물, 또는 고구마 추출물로부터 분리한 2,4-다이-틸트-뷰틸페놀 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의

식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0061] 상기 건강 식품 조성물은 매실, 천마, 오미자, 감초, 결명자, 석창포, 오적골, 원지, 황기, 산조인, 시호, 창출, 당귀, 지자, 안육, 복령 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 생약 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

[0062] 또한, 상기 언급한 바와 같이 식품보조첨가제를 추가로 첨가할 수도 있는바 식품보조첨가제는 당업계에 통상적인 식품보조첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 증진제, 안정화제 등을 포함한다.

[0063] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0064] 상기 외에 본 발명의 건강 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

효 과

[0065] 이상에서 살펴본 바와 같이, 고구마 추출물은 뇌 신경 세포 보호 활성을 가지므로 약제학적 조성물 뿐만 아니라 일상 생활에서 간편하게 복용할 수 있는 건강식품 형태로도 효과적으로 이용될 수 있다. 또한, 이들 고구마 추출물로부터 분리, 정제된 화합물 역시 상기와 동일한 활성을 가지므로 알츠하이머 등과 같은 뇌 질환의 예방 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0066] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예를 통하여 상세하게 설명한다. 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0067] 실시예 1. 활성 물질의 분리 및 정제

[0068] 1-1. 고구마 추출물 조제

[0069] 고구마(*Ipomoea batatas*) 껍질을 건조 후 곱게 마쇄하였다. 2.4 kg의 고구마 조말을 80% 에탄올(DUKSAN, Korea) 60 ℓ 로 20분 동안 초음파처리(sonication)하여 2회 추출한 후 감압 농축하여 고구마 에탄올 추출물을 조제하였다.

[0070] 1-2. 고구마 추출물의 분획물 조제

[0071] 추출물로부터 에탄올을 완전히 제거한 후 헥산(hexane, DUKSAN, Korea), 클로로포름(chloroform, DUKSAN, Korea), 에틸 아세테이트(ethyl acetate, DUKSAN, Korea)를 각각 3배 부피로 환류 추출하여 1차 물질 분리를 하였다.

[0072] 1-3. 분획물의 분리 및 정제

[0073] 1-3-1. 클로로포름 1(C1) 분획물을 TLC를 이용해 분리

[0074] C1층에 대하여 preparative silica-gel plate (20 cm × 20 cm, Merck, Germany)를 사용하여 preparative thin layer chromatography (PTLC)를 실시하였다. 선정된 획분을 감압 농축하여 얻은 시료를 스팟팅(spotting)하여 건조시켰다. 클로로포름과 에탄올(94:6, v/v)로 전개시킨 후 밴드를 분리하였다.

[0075] **1-3-2. HPLC를 이용한 활성물질 분리**

[0076] PTLC로부터 분리한 밴드의 활성을 확인한 후 활성이 가장 좋은 5번째 밴드를 획득해 μ -bondapakTM C₁₈ column (Waters, MA, USA)을 이용한 HPLC를 통하여 활성 물질을 분리하였다. 0-100%의 에탄올 (Merck, Germany)과 물의 직선농도 구배로 변화를 주어 95분간 실행하였다. 파장 범위는 190-800 nm로 설정하고 flow rate는 분당 0.5 ml로 하였으며 한번에 10 μ l씩 시료 주입을 하였다. 사용 용매는 특급 에탄올과 3차 증류수를 사용하였다. 그 결과, 분자량 206 m/z를 갖는 활성물질을 획득하였다.

[0077]	기구(Instrument)	Waters 2690
	탐지체(Detector)	Waters 996 (PDA: photodiode array detector)
	컬럼(Column)	μ -bondapak C ₁₈ (reverse phase, 3.9 × 300 mm)
	유속(Flow rate)	0.5 ml/min
	이동상(Mobile phase)	0 % ~ 100 % 에탄올 (gradient elution)
	주사 부피(Injection volume)	10

[0078] **실험예 1. 고구마 추출물의 산화 스트레스에 의한 뇌 신경 독성으로부터 뇌 신경 세포 보호 활성 확인**

[0079] 고구마의 껍질 및 뿌리를 대상으로 초음파 처리를 하는 경우와 하지 않는 경우를 구별하여 추출한 후 신경 세포괴사 저해능을 측정하였다. PC12 세포 (ATCC, CRL-1721)를 antimycotics/antibiotics를 함유한 RPMI-1640 배지 (GIBCO-Invitrogen Corp., Grand Island, NY, USA)에서 배양하여 세포수가 10^4 - 10^6 cell/ml가 되었을 때 100 μ M의 과산화수소를 처리하여 산화 스트레스를 유도하였다. 산화적 손상 정도를 DCF-DA (2',7'-dichlorofluorescein diacetate) (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA) 분석법을 이용하여 형광분광광도계 (spectrofluorometer)를 통해서 측정함으로써 고구마 추출물의 산화적 스트레스로 인한 독성에 대한 뇌 신경 세포 보호활성을 확인하였다.

[0080] PC12 cell을 이용하여 세포 수가 10^5 cells/ml일 때 96 well에 100 μ l 씩 분주(seeding) 한 후 하루밤 경과 (overnight) 후에 추출물을 증류수(distilled water; DW)로 녹여 1 mg/ml로 20 μ l씩 전처리하였다. 이를 (48시간) 후 세포에 상해를 줄 수 있는 과산화수소(H₂O₂), (최종 농도: 100 μ M)를 처리하고 2시간 후 DCF-DA용액을 제조하여 세포에 처리해주어 어두운 조건 하에 인큐베이터(incubator)에서 50분 배양하고 spectrofluorometer (파장: excitation 485 nm, emission 535 nm)를 이용하여 측정한다. 과산화수소(H₂O₂)의 독성을 견뎌낸 세포가 있다면 DCF-DA는 세포 내부의 슈퍼옥사이드(superoxide)와 반응하여 diacetate (DA)가 떨어져 나가면서 형광을 나타내게 된다. 이를 이용한 DCF-DA assay로 이 형광의 정도로 세포 독성(cell cytotoxicity)을 측정하였다(도 2 상단).

[0081] 세포 생존율(Cell viability)은 MTT Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)reduction assay를 통해 측정하였다. PC12 cell을 이용하여 세포 수가 10^5 일 때 96 well에 100 μ l 씩 분주(seeding) 한 후 하루밤 경과 (overnight) 후에 추출물을 증류수로 녹여 1 mg/ml로 30 μ l씩 전처리하였다. 이를 (48시간) 후 세포에 상해를 줄 수 있는 과산화수소(H₂O₂)를 처리하고 2시간 후 MTT 용액을 2.5 mg/ml로 제조하여 세포에 처리해주어 어두운

조건하에 인큐베이터(incubator)에서 3시간 배양하였다. 그 후에 DMSO를 처리한 후 microplate reader (파장: measurement 570 nm, reference 630 nm)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 살아있는 세포들은 호흡을 통하여 NADH를 생성하게 되고 이 NADH는 MTT와 반응하여 보라색의 formazan crystal을 형성한다. MTT reduction assay를 통하여 이 보라색의 formazan crystal의 흡광도를 측정하였다(도 2 하단).

[0082] 상기 실험 결과를 종합해 보건대, 초음파처리하여 추출한 고구마 껍질의 산화적 손상 저해 활성이 가장 탁월하였다.

[0083] **실험예 2. 고구마 분획물의 뇌 신경 세포 보호 활성 확인**

[0084] 에탄올 조추출물(crude ethanolic extract)은 극성도에 따라 용매 분획(solvent partitioning)을 실시하여 저해 활성을 확인하였다. 이때, 대조군은 어떤 처리도 하지 않았고, 하이드로젠 퍼옥사이드 그룹(hydrogen peroxide group)은 2시간 동안 100 μ M 과산화수소(H_2O_2 , Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA)로 처리하였다. Vit-C group은 100 μ M 과산화수소(H_2O_2)를 처리하기 전에 48시간 동안 100 μ M의 비타민 C를 사전 처리한 것이다. 샘플 그룹 (H1-H3; *n*-hexanefractions, C1-C3; chloroform fractions, E1-E3; ethyl acetate fractions)은 100 μ M 과산화수소(H_2O_2)를 처리하기 전에 48시간 동안 각 샘플(1 mg/ml) 20 μ l로 사전 처리한 것이다. 도 3에 나타난 데이터는 평균 ($n=4$) $\pm$ S.D를 나타낸 것이다. 그룹 간 통계적 유의성은 one-way ANOVA에 의해 계산된 것이다(* $p<0.01$ vs. 대조군, # $p<0.01$ vs. 하이드로젠 퍼옥사이드 그룹).

[0085] 그 결과, 고구마의 에탄올 추출물을 클로로포름(chloroform)으로 분획한 것이 가장 높은 저해 활성을 보였으며, 이로부터 클로로포름 1층(C1)을 획득하였다(도 3).

[0086] **실험예 3. 클로로포름 분획물의 활성물질 분리 및 활성물질(2,4-다이-테르트-**

[0087] **뷰틸페놀)의 뇌 신경 세포 보호 활성 확인**

[0088] 수득한 클로로포름 분획물의 활성물질을 분리하여 이의 저해 활성을 확인하기 위해 분리된 밴드를 대상으로 DCF-DA 및 MTT reduction assay를 수행하였다.

[0089] 이때, 대조군은 어떠한 처리도 하지 않은 것이고, 하이드로젠 퍼옥사이드 그룹(hydrogen peroxide group)은 2시간 동안 100 μ M 과산화수소(H_2O_2)로 처리한 것이다. Vit-C group은 100 μ M 과산화수소(H_2O_2)를 처리하기 전에 48시간 동안 100 μ M의 비타민 C를 사전 처리한 것이다. 샘플 그룹은 100 μ M 과산화수소(H_2O_2)를 처리하기 전에 48시간 동안 각 샘플(1 mg/ml) 20 μ l로 사전 처리한 것이다. 데이터는 평균 ($n=4$) $\pm$ S.D를 나타낸 것이다. 그룹 간 통계적 유의성은 one-way ANOVA에 의해 계산된 것이다(* $p<0.01$ vs. 대조군, # $p<0.01$ vs. 하이드로젠 퍼옥사이드 그룹). 그 결과, 가장 활성이 좋은 밴드 (R_f value = 0.28)를 얻었다.

[0090] 그 결과, 수득한 클로로포름 분획물의 활성물질 대부분이 산화적 손상 저해 활성이 탁월함을 알 수 있었으며 특히, 가장 활성이 우수한 밴드 (R_f value = 0.28)를 수득하였다(도 4).

[0091] 또한, 활성이 우수한 활성물질의 구조 및 화학적 특성을 분석하기 위해, 전자충격 질량 분석 (JMS-AX505WA, JEOL, Tokyo, Japan), 탄소 핵자기 공명스펙트럼(Avance-600, Bruker, Karlsruhe, Germany)을 사용하였다.

[0092] **실험예 4. 인 비보 상에서의 동물을 이용한 활성 효과 확인**

[0093] **4-1. 기억 학습 능력 시험**

- [0094] 기억 학습능력 시험을 위해 쥐를 총 5그룹으로 나누었다.
- [0095] 대조군 그룹과 아밀로베타 그룹은 4주간 일반 사료를 먹였고, 나머지 세 그룹은 하루에 추출물을 400, 800, 1,200 mg/kg의 농도로 먹게 하였다. 실험에 앞서 뇌에 아밀로이드 베타를 주사하여 치매 모델을 확립하였다. 대조군 그룹은 A β (42-1), 나머지 그룹은 A β (1-42)를 투여하였고 실험을 진행하였다. 보다 구체적으로, 대조군은 non-toxic reverse A β ₄₂₋₁을 주사하였다. 아밀로이드 베타 펩티드 그룹은 마우스마다 410 pmol의 A β ₁₋₄₂를 주사하였다. 샘플 그룹은 고구마 추출물(400 mg/kg, 800 mg/kg, 및 1,200 mg/kg, 1일당)을 처리한 후에 410 pmol의 A β ₁₋₄₂를 주사하였다. 데이터는 평균 (n=4) $\pm$ S.D를 나타낸 것이다. 그룹 간 통계적 유의성은 one-way ANOVA에 의해 계산된 것이다(* p <0.01 vs. 대조군 그룹, # p <0.01 vs. 아밀로이드 베타 펩티드 그룹).
- [0096] 인 비보 실험의 전체적인 실험 순서는 도 6과 같으며, 구체적인 실험 방법 및 그 결과는 하기와 같다.
- [0097] <Y-maze test>
- [0098] ICR-male mice는 샘플을 섞은 사료를 약 3주간 ad lib의 상태로 공급하였다. 치매 유발성 물질로 A β 를 ICV (intracerebroventricular) 주입하여 각각 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 행동실험을 실시하였다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록하였다. Mouse를 maze에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 두었다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다.
- [0099] 그 결과인 alternation behavior은 도 7 상단에 도시하였다. 고구마 추출물을 주입한 쥐의 경우 기억능력이 정상군에 근접함을 알 수 있었다.
- [0100] < Passive avoidance test>
- [0101] 위의 조건처럼 ICR-male mice는 food와 선정사료를 약 3주간 ad lib의 상태로 공급하였다. 치매 유발성 물질로는 A β 를 각각 test 전에 ICV 주입하여 기억력 실험을 실시하였다. 이 실험은 실제 실험에 들어가기 전날에 기억상자와 같은 장소에서 훈련을 시킨 다음 행동실험을 실시하였다. 모든 mice를 실험 전날 실험 상자에서 적응 훈련 (명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 뒤에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300초 동안 실험하였다.
- [0102] 그 결과인 step-through latency은 도 7 하단에 도시하였다. 고구마 추출물을 주입한 쥐의 경우 학습능력은 정상군보다 오히려 우수해졌음을 알 수 있다.
- [0103] **4-2. 뇌 함유 지질에 대한 산화 정도 측정 시험**
- [0104] 상기와 동일한 방법으로 실험을 진행한 후에, 아밀로이드 베타로 인한 뇌의 산화적인 손상 정도 및 샘플의 효과를 확인하기 위해 실험 종료 후 뇌를 적출하여 뇌 함유 지질에 대한 산화 정도를 측정하였다.
- [0105] 그 결과, 대조군 군에 비해 A β ₁₋₄₂ 군이 산화적인 손상 정도가 심해졌으나 고구마 추출물을 섭취한 군은 산화적인 손상이 억제됨을 확인하였다(도 8).

도면의 간단한 설명

- [0106] 도 1은 고구마로부터 활성 물질을 분리하는 방법을 나타낸 모식도이다.
- [0107] 도 2는 고구마 추출물의 산화 스트레스로 인한 독성에 대한 뇌 신경 세포 보호 활성을 확인한 그래프이다. 상단

은 DCF(2',7'-dichlorofluorescein) -형성 결과를 분석한 것이고 하단은 세포 생존율을 분석한 것이다.

[0108] 도 3은 고구마 추출물에 비극성 유기 용매를 이용하여 수득한 분획물의 산화 스트레스로 인한 독성에 대한 뇌 신경 세포 보호 활성을 비교한 그래프이다. 상단은 DCF(2',7'-dichlorofluorescein) -형성 결과를 분석한 것이고 하단은 세포 생존율을 분석한 것이다.

[0109] 도 4는 클로로포름 분획물(도면 3의 C1)을 TLC (thin layer chromatography)를 이용해 분리한 밴드들의 산화 스트레스로 인한 독성에 대한 뇌 신경 세포 보호 활성을 비교한 그래프이다. 상단은 DCF(2',7'-dichlorofluorescein) -형성 결과를 분석한 것이고 하단은 세포 생존율을 분석한 것이다.

[0110] 도 5는 활성이 탁월한 밴드 (R_f value = 0.28)를 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 수행하여 활성물질을 분리해 내는 것을 나타낸 것이다. 하단은 분리한 활성물질인 2,4-다이-테르트-뷰틸페놀(2,4-di-tert-butylphenol)의 화학식이다.

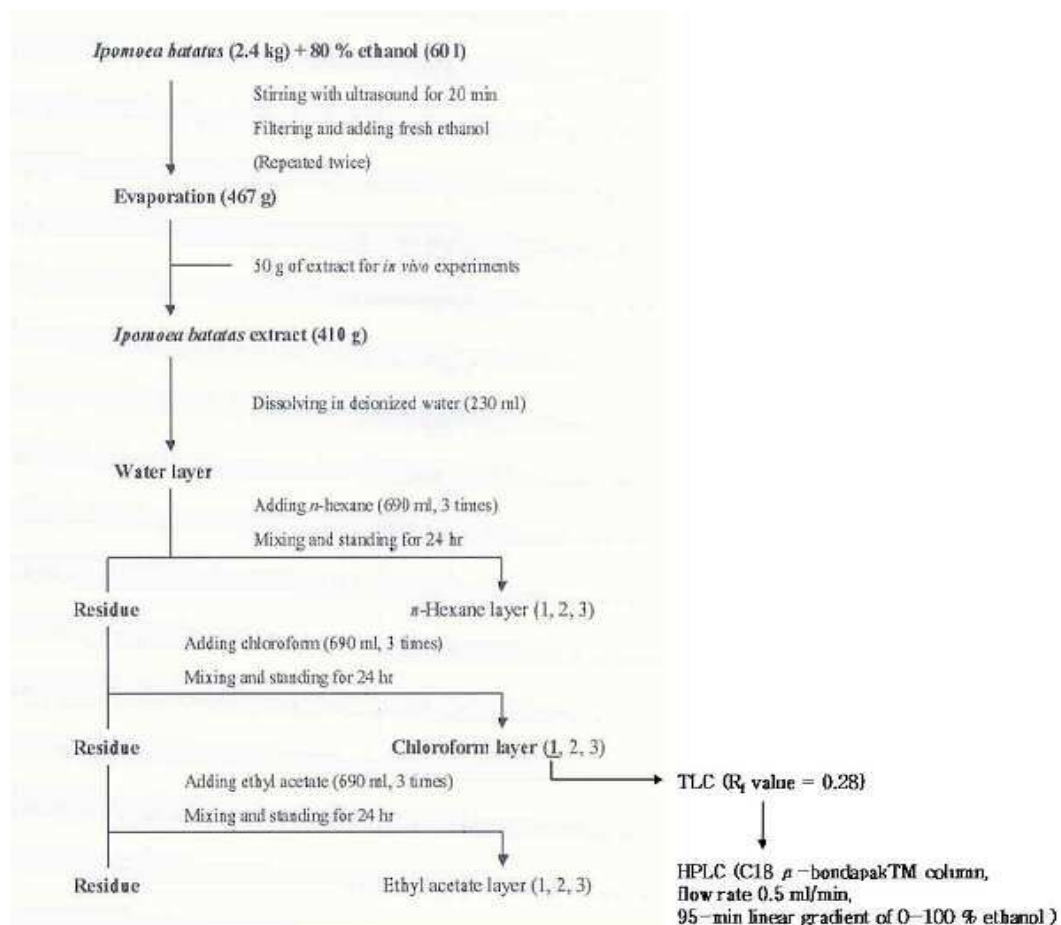
[0111] 도 6은 인 비보 실험 디자인을 나타낸 것이다.

[0112] 도 7는 인 비보 상에서 고구마 추출물의 기억능력 및 학습 능력에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다. 상단의 alternation behavior는 Y-maze test를 통해 고구마 추출물이 기억능력에 미치는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다. 또한 하단의 step-through latency는 passive avoidance test를 통해 고구마 추출물이 학습능력에 미치는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

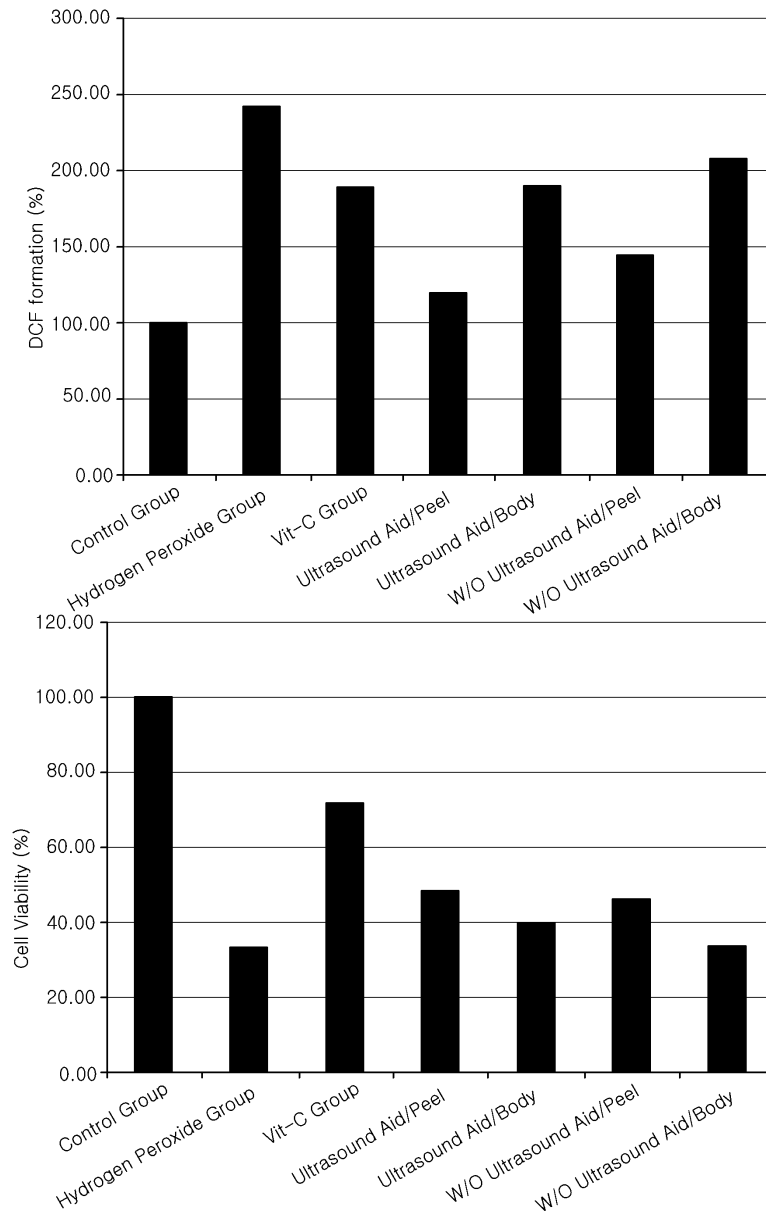
[0113] 도 8는 TBARS를 측정하여 인 비보 상에서 고구마 추출물의 농도에 따라 뇌 함유 지질의 산화에 미치는 효과를 비교한 그래프이다.

도면

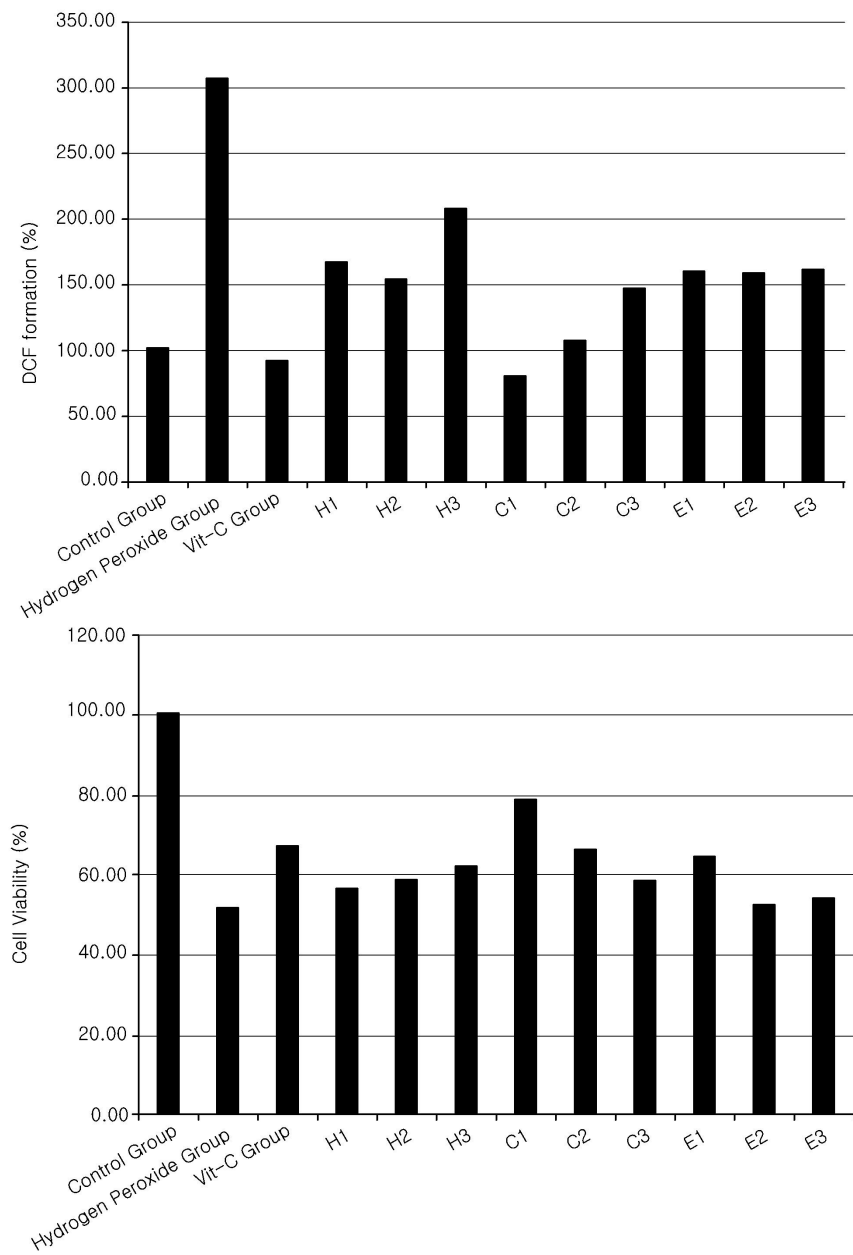
도면1



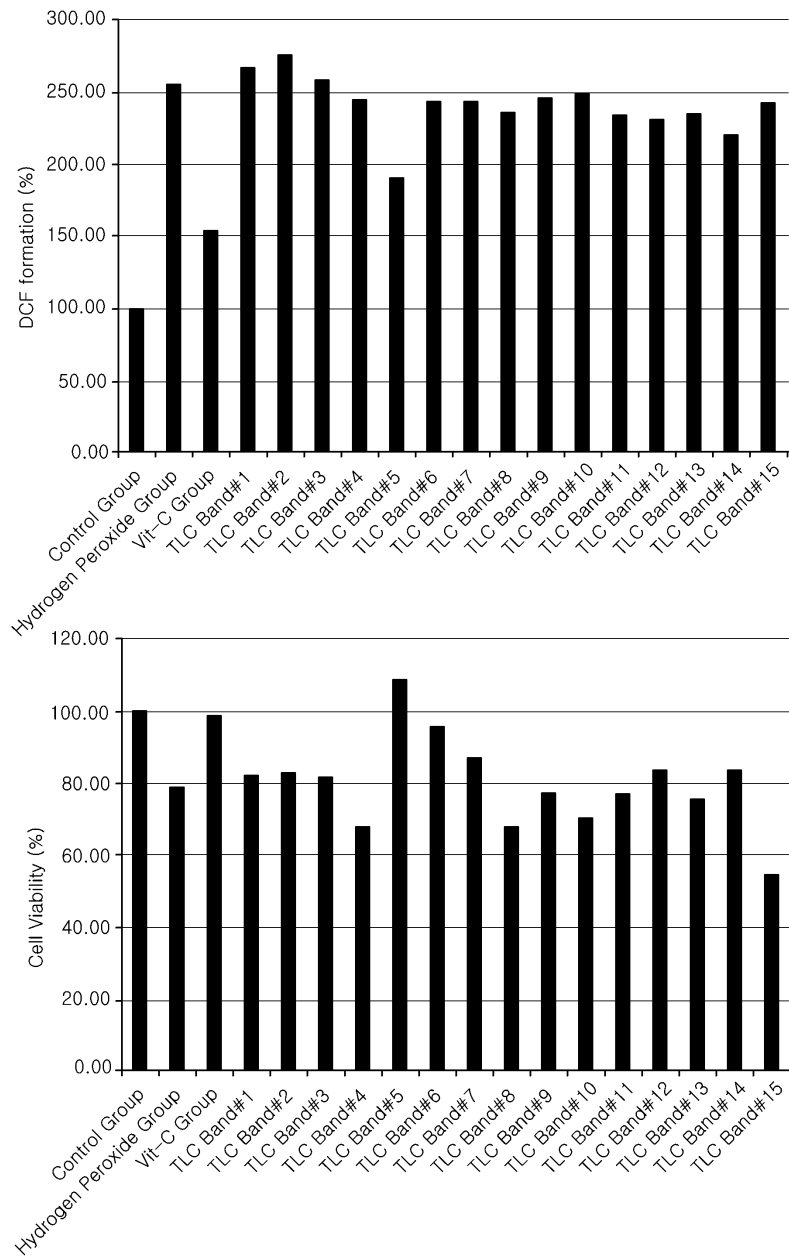
도면2



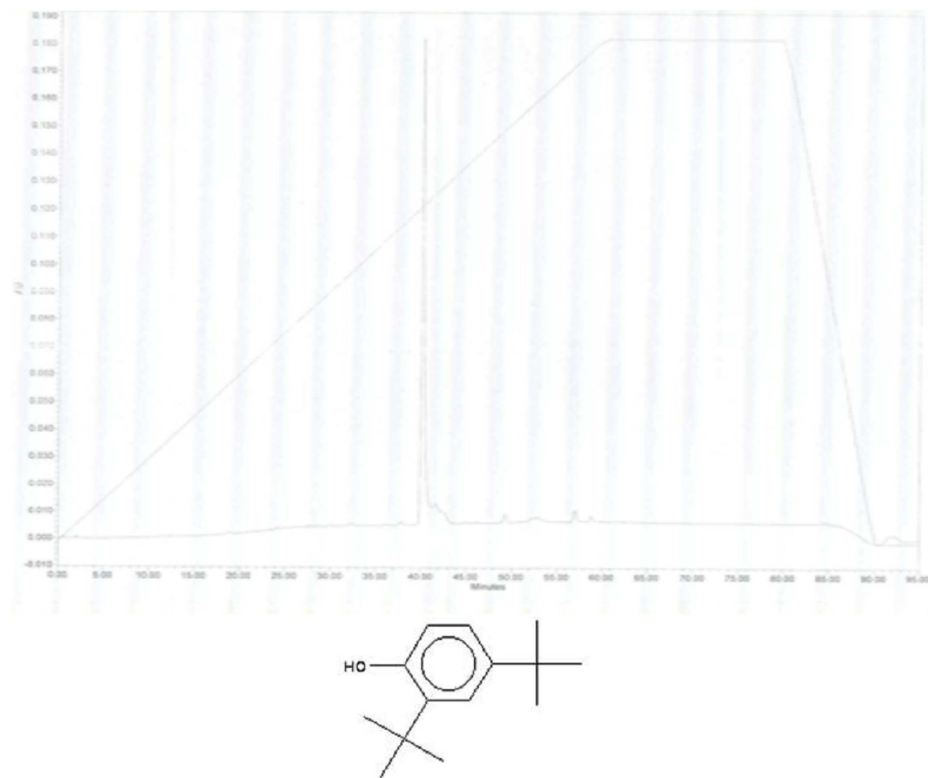
도면3



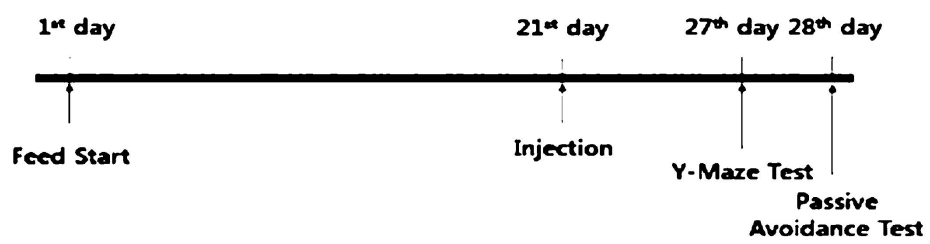
도면4



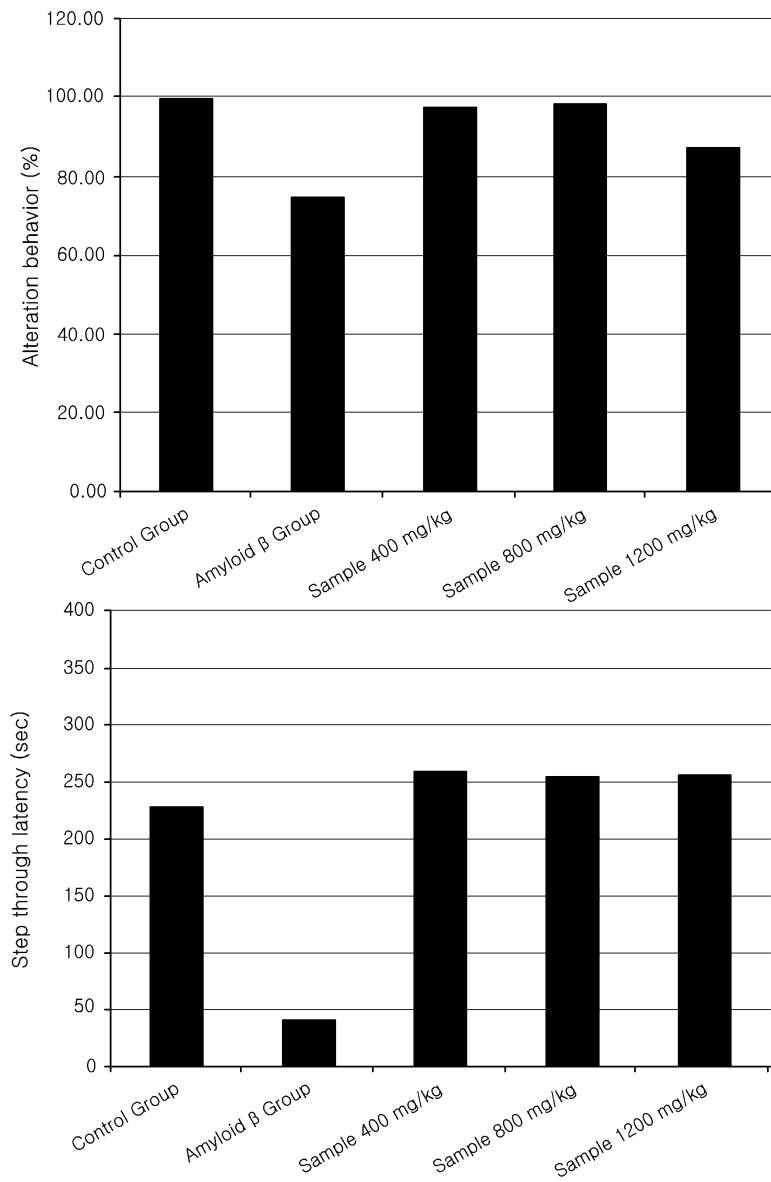
도면5



도면6



도면7



도면8

