



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0088165
(43) 공개일자 2016년07월25일

- | | |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A61K 36/8962 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
A23L 1/3002 (2013.01)
A61K 36/8962 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0007566</p> <p>(22) 출원일자 2015년01월15일
심사청구일자 2015년01월15일</p> | <p>(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
농업회사법인우포의아침 주식회사
경상남도 창녕군 대지면 대지농공단지길 40, 대지
농공단지</p> <p>(72) 발명자
허호진
경상남도 진주시 금산면 중장로 154번길 49 두산
위브아파트 107동 901호</p> <p>박선경
경남 진주시 진주대로 501 경상대학교 응용생명과학부
(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
최규환</p> |
|---|---|

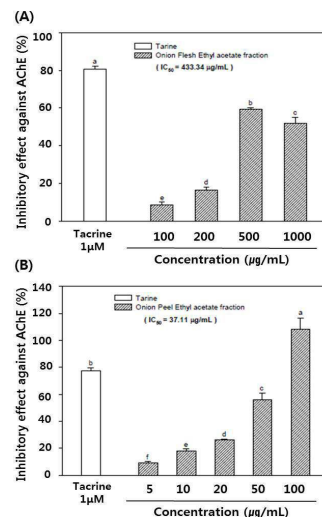
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 양파 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억능력 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 양파 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물 및 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 본 발명의 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물은 항산화 작용, 지질과산화 억제작용, 아세틸콜린 분해효소(AChE) 억제효과, 뇌신경 스트레스 저해효과 및 신경세포 보호효과를 지니므로써, 상기 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억능력 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

C12N 9/18 (2013.01)

C12Y 301/01007 (2013.01)

(72) 발명자

이영숙

경상남도 창원시 의창구 두대로 19 경남아파트 1동 409호

박중협

경상남도 창원시 성산구 신촌로 130 동원로얄듀크 아파트 106동 1501호

김태완

경상남도 창원군 대지면 대지농공단지길 40

최성길

경상남도 진주시 금산면 중천로 82 금산아이파크아파트 106동 1801호

진동은

경남 진주시 진주대로 501 경상대학교 응용생명과학부

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 113023-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 2013 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 신수요 창출을 위한 양파 무취화 기술 및 고효율 추출 기술 개발과 이를 이용한 고부가가치 제품화

기 여 율 1/1

주관기관 농업회사법인 우포의아침

연구기간 2013.07.16 ~ 2016.07.15

명세서

청구범위

청구항 1

양파(*Allium cepa*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 양파 추출물은 양파의 과육, 껍피 또는 이들의 혼합물로부터 추출한 것을 특징으로 하는 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 양파 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매를 이용하여 추출한 것을 특징으로 하는 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 분획물은 양파 추출물의 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 아세틸콜린 분해효소(Acetylcholinesterase)를 저해하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 항산화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 지질 과산화물의 생성을 저해하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

양파(*Allium cepa*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 양파 추출물은 양파의 과육, 껍피 또는 이들의 혼합물로부터 추출한 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 양파 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합 용매를 이용하여 추출한 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 분획물은 양파 추출물의 에틸아세테이트 분획물인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌신경 질환

환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌신경 질환은 알츠하이머성 치매(Alzheimer's disease)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 추출물 또는 이의 분획물 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 양파 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억능력 개선용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 약학 또는 건강기능식품 조성물로 이용될 수 있는 양파 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억능력 개선용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 생활수준의 향상과 의학기술의 발달에 따라 노령 인구가 증가하여 인구의 고령화 현상이 두드러지고 있으며, 조직사회의 치열한 경쟁화에 따른 극심한 스트레스로 인한 성인병의 발병률 또한 급격한 증가 추세를 보이고 있다. 사망원인의 경우 과거 주원인이었던 감염성 질환에서 대표적인 성인병인 순환기계 질환, 암 등에 의한 사망이 전체의 절반을 넘기기에 이르렀다. 이에 건강한 삶을 누리하고자 하는 '웰빙(wellbeing)' 이 하나의 큰 관심사로 대두하게 되고 장수에 대한 욕구 증가로 일상생활을 통한 성인병 및 노인성 질환에 대한 예방에 관심이 고조되고 있다. 최근 식품성분에 대해 새로운 관점에서의 체계적인 연구가 발전함에 따라 식품기원의 특정 성분들이 인체의 신경계, 생체 방어계, 세포분화(cell differentiation) 등 각종 생리기능 조절계 등에 작용하여 직·간접적으로 생체조절기능 효과를 나타낸다는 사실들이 밝혀지고 있다. 이들 특정성분들에 의한 생체 조절계 및 생체 방어계에 대한 적절한 조절이 가능하게 된다면 그것은 가장 자연스러운 건강유지를 위한 최적의 수단이 될 수 있음을 의미한다. 식품에 도입되고 있는 생체 조절성 3차 기능은 '질병 발병의 전 단계에서 식품을 통하여 예방한다'는 적극적인 식품의 개념으로, 향후 고령화 사회에서 건강기능식품 및 식품의약품의 수요가 합성의약품을 상회할 것으로 예측되고 있기도 하다. 또한 2011년도 교육과학기술부의 '기초연구 100대 미래유망 분야' 에 의하면 '뇌신경기능과 질환', '신경계 질환' 및 '의약품 소재 추출 및 합성' 분야 등이 선정되었다.

[0003] 노인성 치매의 일종인 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)로부터 유발되는 기억력 및 학습능력의 상실 등 인지 기능 장애는 대뇌 기저부의 아세틸콜린(Acetylcholine)성 신경세포의 손상에서 비롯된다는 연구결과에 의해 무스카린성 아세틸콜린 수용체(muscarinic acetylcholine receptor)에 대한 효능제(agonist), 아세틸콜린 생성촉진제, 아세틸콜린 분해효소(Acetylcholinesterase, AChE) 저해제 등 여러 가지 작용기전에 따라 아세틸콜린성 신경세포의 기능을 강화시켜줄 수 있는 약물들이 개발되어 왔다. 실제로 현재 각국에서 사용되고 있는 알츠하이머병 치료제는 이러한 아세틸콜린 분해효소 억제제가 대부분이며, 타크린(tacrine)과 도네페질(donepezil) 등이 이에 속한다. 이 밖에도 리바스티그민(rivastigmin), 갈라타민(galatamine) 등이 사용되고 있다.

[0004] 현재 퇴행성 뇌신경 질환으로서의 인지기능 또는 기억능력 저하 현상 개선을 위한 더욱 효과적인 제제(건강기능성 식품 소재 포함)의 개발 수요가 어느 때보다 높은 시기이다. 결국 치매 발병에 대한 뇌신경 세포의 기작을 대상으로 새로운 다중 기능성 효과(multi-functional effect)를 갖는 소재 개발을 위한 연구가 필요한 실정이다.

[0005] 한편, 양파 (*Allium cepa*)는 백합과에 속하는 다년생 식물로, 오랜 재배역사와 더불어 특유의 맛과 향을 적용한 식품, 향신료 및 약제 등으로 이용되고 있다. 양파 100g에는 수분 90g, 탄수화물 약 7.2g, 단백질 1.1g, 비타민 C 10~20mg, 칼슘, 인, 철 등이 함유되어 있으며, 양파껍질에는 당질 50.4%, 섬유질 29.24%, 지방 1.48%, 회분

4.99% 등이 함유되어 있다. 양파의 효능으로는 항산화, 혈액 지질 저하, 항고혈압, 항염증, 항균, 항종양, 혈당 저하 등이 알려져 있다. 양파 내에 함유된 주요 생리활성물질로는 유기 황화합물과 플라보노이드 화합물을 들 수 있으며, 특히 양파에는 항산화 작용을 나타내는 케르세틴(quercetin)이 다른 야채나 과일에 비해 매우 높게 함유되어 있다. 케르세틴은 식물유래 플라보노이드계(flavonoid)계의 페놀화합물로서, 강력한 항산화제(antioxidant)일 뿐만 아니라 항동맥경화, 항균작용, 콜레스테롤 저하, 항암, 항바이러스 및 항알러지 활성을 지니고 있으면서 독성은 거의 나타나지 않는 것으로 알려져 있다. 따라서 케르세틴이 많이 함유되어 있는 식품을 섭취 하면 혈압 강하와 당뇨, 체중감소 등의 다이어트, 면역기능 강화, DNA 손상억제효과 및 적혈구 막의 지질과산화 저해효과 등에 효과가 있다. 기존 양파의 생리활성 효과는 과피에 함유된 케르세틴에 의한 효과에 집중되어 왔 기 때문에 정작 가식부인 과육에 대한 생리활성 연구는 미비하였다.

[0006] 한국등록특허 제0895969호에는 천연조향제를 함유하는 양파를 가열농축 추출하여 얻은 양파농축액의 항산화 활성 및 항콜레스테롤 활성에 대해 개시되어 있고, 한국공개특허 제2011-0089904호에 항산화 활성을 갖는 규조토 와 양파껍질의 아임계 수 추출물을 유효성분으로 하는 조성물에 대해 개시되어 있다. 하지만 본 발명의 양파 추출물 또는 이의 에틸아세테이트 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억능력 예방, 개선 또는 치료 용 조성물에 대해서는 언급된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 양파 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억능력 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명에 따른 양파 추출물 또는 이의 분획물은 아세틸콜린 분해효소(AChE) 억제효과, 뇌신경 스트레스 저해효과 및 신경세포 보호능 력이 우수하여, 인지기능 또는 기억능력 개선 등에 이용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 양파(*Allium cepa*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 양파(*Allium cepa*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 양파 추출물 또는 이의 분획물은 항산화 작용, 지질과산화 억제작용, 아세틸콜린 분해효소(AChE) 억 제효과, 뇌신경 스트레스 저해효과 및 신경세포 보호효과를 지니므로써, 인지기능 또는 기억능력 예방, 개선 또 는 치료 조성물에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 양파 추출물로부터 얻은 분획물들의 ABTS 라디칼 소거활성 측정결과이다. (A)는 양파의 과육 추출물로부터 얻은 분획물; (B)는 양파의 과피 추출물로부터 얻은 분획물이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 양파 추출물로부터 얻은 분획물들의 DPPH 라디칼 소거활성 측정결과이다. (A)는 양파의 과육 추출물로부터 얻은 분획물; (B)는 양파의 과피 추출물로부터 얻은 분획물이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 양파 추출물로부터 얻은 분획물들의 환원력 측정결과이다. (A)는 양파의 과 육 추출물로부터 얻은 분획물; (B)는 양파의 과피 추출물로부터 얻은 분획물이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 농도별 처리에 따른 아세 틸콜린 분해효소(AChE) 저해활성을 나타낸 것이다. (A)는 양파의 과육 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획 물; (B)는 양파의 과피 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 농도별 처리에 따른 지질 과산화 중간생성물인 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA) 억제활성을 나타낸 것이다. (A)는 양파의 과육

추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물; (B)는 양파의 과피 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 농도별 처리에 따른 산화적 스트레스(oxidative stress) 저해활성을 나타낸 것이다. (A)는 양파의 과육 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물; (B)는 양파의 과피 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 농도별 처리에 따른 PC12 신경 세포의 세포생존율(cell viability)을 나타낸 것이다. (A)는 양파의 과육 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물; (B)는 양파의 과피 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 농도별 처리에 따른 뇌 신경 세포막 보호효과를 나타낸 것이다. (A)는 양파의 과육 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물; (B)는 양파의 과피 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 트리메틸틴(Trimethyltin, TMT)로 인한 단기 기억력 상실 마우스에 대한 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 회복 능력 평가시험 결과이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 트리메틸틴(Trimethyltin, TMT)로 인한 장기 기억력 상실 마우스에 대한 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 회복 능력 평가시험 결과이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물을 섭취한 마우스의 뇌 조직 중의 아세틸콜린 분해효소(AChE) 활성 측정 결과이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물을 섭취한 마우스의 뇌 조직 중의 말론디알데하이드(malondialdehyde, MDA) 함량 측정결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 양파 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 인지 기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명에서 사용되는 "양파"는 백합과에 속하는 다년생 식물로 오랜 재배역사와 더불어 특유의 맛과 향을 적용한 식품, 향신료 및 약재 등으로 이용되고 있다. 품종은 비늘줄기가 둥근 모양과 납작하게 둥근 모양, 비늘줄기의 겹질이 붉은빛인 것과 노란 것, 그리고 흰 것 등으로 나뉜다. 일반적으로 식용하는 양파 품종은 노란 양파, 붉은 양파, 흰 양파, 작은 양파의 4가지 품종이 주류를 이루고 있다.
- [0014] 본 발명의 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물에서, 상기 양파 추출물은 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 가열 추출, 초음파 추출, 냉각 추출 등의 다양한 추출법을 이용하여 추출할 수 있으나, 바람직하게는 환류 냉각 추출이 바람직하다. 상기 추출방법은 유효성분이 파괴되지 않고, 양파 추출물로부터 활성이 높은 분획물을 얻을 수 있다.
- [0015] 또한, 본 발명의 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물에서, 상기 양파 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매, 바람직하게는 물, 메탄올, 에탄올, 또는 부탄올의 용매를 이용하여 추출한 것을 포함하며, 더 바람직하게는 에탄올을 용매로 이용하여 환류 냉각 추출한 것이다. 상기 환류 냉각 추출은 1) 양파의 과육과 과피 각각 60g에 70%(v/v) 에탄올을 3L를 첨가하는 단계; 2) 2시간 동안 환류냉각 추출하는 단계; 3) 상기 환류 냉각 추출물을 여과하는 단계를 거쳐 수행하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.
- [0016] 또한, 상기 양파 추출물은 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 조정제물 또는 정제물 중 어느 하나를 포함하는 것으로 한다.
- [0017] 본 발명의 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물에서, 상기 양파 추출물로부터 얻은 분획물은 1) 양파의 과육과 과피 각각 60g에 70%(v/v) 에탄올을 3L를 첨가하는 단계; 2) 2시간 동안 환류냉각 추출하는 단계; 3) 상기 추출한 양파의 과육 및 과피 에탄올 추출물을 에틸아세테이트로 분획하여 에틸아세테이트 분획물을 얻는 단계를 포함할 수 있다.
- [0018] 또한, 본 발명의 양파 추출물 또는 이의 분획물은 정제과정을 추가적으로 적용하여 얻은 것도 포함될 수 있다. 예컨대, 상기 추출물을 일정한 분자량 컷-오프(cut-off) 값을 갖는 한외 여과막을 통과시켜 얻은 분획, 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로

실시된 다양한 정제 방법을 통해 얻어진 분획도 본 발명의 양과 추출물 또는 이의 분획물에 포함된다.

- [0019] 본 발명의 인지기능 또는 기억능력 개선용 건강기능식품 조성물에서, 인지기능 또는 기억능력의 퇴화로 인해 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 유발되는 질환은 퇴행성 뇌신경 질환으로, 대표적인 퇴행성 뇌신경 질환에는 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 다계통 위축증(Multiple system atrophy), 감람핵-뇌교-소뇌 위축증(Olivopontocerebellar atrophy: OPCA), 샤이-드래거 증후군(Shy-Drager syndrome), 선조체-흑질 퇴행증(Striatonigral degeneration), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis: ALS), 본태성 진전증(Essential tremor), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico-basal ganglionic degeneration), 미만성 루이 소체 질환(Diffuse Lewy body disease), 파킨슨-ALS-치매 복합증(Parkinson-ALS-dementia complex of Guam) 또는 픽병(Pick's disease)이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 상기 건강기능식품 조성물은 인지기능 또는 기억능력을 개선 시키기 위해 섭취할 수 있는 것이면 특별히 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 상기 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 추출물 또는 이의 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 분획물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0022] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 추출물 또는 이의 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0023] 본 발명의 조성물을 건강음료로 사용할 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100g당 일반적으로 약 0.01~0.04g, 바람직하게는 약 0.02~0.03g이다.
- [0024] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 중점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물은 100 중량부당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0025] 또한, 본 발명은 양과 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 약학조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물 또는 이의 분획물을 0.02 내지 80 중량%, 바람직하게는 0.02 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하여 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수도 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명에 따른 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자

일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조 혼합물을 들 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 약학 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우진지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0030] 본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 분획물은 1일 0.0001 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 (intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 1) 60g의 양과 과육 또는 과피에 대하여 70%(v/v)의 에탄올을 3L를 첨가하는 단계;

[0033] 2) 상기 단계 (1) 이후에, 2시간 동안 환류냉각 추출하는 단계;

[0034] 3) 상기 추출한 양과 추출물을 에틸아세테이트로 분획하여 에틸아세테이트 분획물을 얻는 단계;를 포함하여 제조하는 것을 특징으로 하는 아세틸콜린 분해효소(AChE) 저해 활성이 증진된 양과 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 제조방법을 제공한다.

[0035] 본 발명의 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 제조방법은 바람직하게는, 1) 60g의 양과 과육 또는 과피에 대하여, 70%(v/v)의 에탄올을 3L를 첨가하는 단계; 2) 2시간 동안 환류냉각 추출하는 단계; 3) 상기 추출한 양과 추출물을 에틸아세테이트로 분획하여 에틸아세테이트 분획물을 얻는 단계를 포함할 수 있다.

[0036] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0037] 제조예 1. 양과 추출물 또는 이의 분획물의 제조

[0038] 본 발명에 이용된 양과는 경상남도 창녕군 농업회사법인 우포의 아침으로부터 제공받아 재료로 사용하였다. 60g의 양과 과육 및 과피를 각각 분쇄하여 70%(v/v)의 에탄올 3L를 첨가하여 2시간 동안 환류 냉각 추출하여 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0039] 이어서, 상기 에탄올 추출물을 No. 2 여과지(Whatman plc., Kent, UK)로 여과한 후 농축하였다. 양과의 에탄올 추출물을 헥산과 물을 1:1 비율로 분획 깔때기에 넣고 헥산층과 물층으로 분획하였고, 물층을 다시 클로로포름과 1:1 비율로 분획 깔때기에 넣고 클로로포름과 물층을 분획하였다. 이 과정과 동일하게 에틸아세테이트를 추가하여 물층과 분획을 실시한 후 농축하여 동결건조기로 동결건조하였다.

[0040] 실시예 1. 양과 추출물로부터 얻은 용매 분획물들의 총 페놀성 화합물 측정

[0041] 양과의 총 페놀성 화합물 함량측정은 70%(v/v) 에탄올을 이용하여 환류냉각 추출을 실시하여 n-헥산(n-hexane), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 부탄올(buthanol), 증류수(distilled water)로 각각

의 분획물을 얻어 총 페놀성 화합물을 분석하였다.

[0042] 그 결과, 양파 과육(Onion Fresh, OF)의 총 페놀성 화합물 함량은 70%(v/v) 에탄올 9.67mg GAE/g, n-헥산 32.33mg GAE/g, 클로로포름 21.00mg GAE/g, 에틸아세테이트 94.67mg GAE/g, 부탄올 64.67mg GAE/g, 증류수 9.67mg GAE/g으로 에틸아세테이트 분획물에서 가장 높은 phenolics 함량을 나타내었다. 이는 분획 전(60% 에탄올 추출물)과 후를 비교 했을 때, 에틸아세테이트 분획물에서 약 10배의 총 페놀성 화합물 함량이 증가한 것을 나타내었다. 양파 과피(Onion Peel, OP)의 총 페놀성 화합물 함량을 측정한 결과는 70% 에탄올 429.33(mg of GAE/g), n-헥산 19.75(mg of GAE/g), 클로로포름 229.58(mg of GAE/g), 에틸아세테이트 555.83(mg of GAE/g), 부탄올 205.33(mg of GAE/g), 증류수 19.92(mg of GAE/g)로 분석되었다. 상기 분획물 중에서 에틸아세테이트 분획물에서의 총페놀성 함량이 가장 높았다. 또한, 70% 에탄올 추출물(분획 전)과 에틸아세테이트 분획물의 총 페놀성 함량을 비교하면, 에틸아세테이트 분획물이 70% 에탄올 추출물(분획 전)보다 약 1.3 배의 총 페놀성 함량이 높았다(표 1).

[0043] 표 1. 양파 추출물의 분획물에 대한 총 페놀성 화합물의 함량 분석

	Onion Flesh					
	60% EtOH 추출물	n-hexane	chloroform	ethyl acetate	buthanol	distilled water
Total phenolic content (mg of GAE/g)	9.67 ±0.38	32.33 ±0.72	21.00 ±1.09	94.67 ±0.14	34.67 ±0.38	9.67 ±1.15

	Onion Peel					
	70% EtOH 추출물	n-hexane	chloroform	ethyl acetate	buthanol	distilled water
Total phenolic content (mg of GAE/g)	429.33 ±0.14	19.75 ±0.43	229.58 ±0.52	555.83 ±0.52	205.33 ±0.29	19.92 ±0.29

[0044]

[0045] **실시예 2. 양파 추출물로부터 얻은 용매 분획물들의 ABTS 라디칼 소거활성 측정**

[0046] 2.5mM ABTS(2,2'-아지노-비스(3-에틸벤즈티졸린-6-술폰산)디아모늄염)와 1.0mM AAPH(2,2'-아조비스-(2-아미디노프로판)염산염)을 100mM 인산 완충용액(pH 7.4)에 혼합하여, 734nm에서 대조군의 흡광도 값이 0.7 ± 0.002 가 되도록 조정된 ABTS 용액을 사용하였다. 제조예에서 제조한 양파의 추출물로부터 얻은 분획물(이하 '시료용액'이라 함) 20 μ l와 ABTS 용액 980 μ l를 혼합하여 10분간 반응시키고, UV-형광광도계(UV-1601, Shimadzu Co., Japan)를 이용하여 734nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거활성을 계산하였다.

[0047] 그 결과, 도 1에서 확인할 수 있듯이 양파 과육(Onion Flesh, OF)과 과피(Onion Peel, OP)의 용매 분획물 모두 에틸아세테이트 분획물의 ABTS 라디칼 소거활성이 가장 높았으며, 특히 양파 과피 추출물의 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 경우 500 μ g/ml 이상의 농도에서 양성 대조구(positive control)로 사용된 1000 μ g/ml의 비타민 C와 비교하였을 때, 통계적으로 유의하며, 거의 유사한 소거활성을 보였다.

[0048] **실시예 3. 양파 추출물로부터 얻은 용매 분획물들의 DPPH 라디칼 소거활성 측정**

[0049] 농도별 시료 용액 0.1ml에 100% 메탄올로 용해시킨 1.5×10^{-4} M DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 2.9 ml를 가한 후 교반기(vortex mixer)로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하여 라디칼 소거활성을 계산하였다.

[0050] 그 결과, 도 2에서 확인할 수 있듯이 ABTS 라디칼 소거활성을 측정한 결과와 유사하게 나타났으며, 역시 농도의존적으로 소거활성이 증가하는 경향을 볼 수 있었다. 또한 양파의 과피 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물 1000 μ g/ml에서는 같은 농도의 과육 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물에 비해 약 5배의 높은 소거활성을 보여주었다.

[0051] **실시예 4. 양과 추출물로부터 얻은 용매 분획물들의 환원력 측정**

[0052] FRAP(Ferric Reducing Antioxidant Power) 시험은 유색 페러스 트리피리딜 트리아진 복합체(colored ferrous tripyridyl triazine complex)에 의해 제2 철이온(ferric ion)이 제1 철(ferrous)로 전환되는 과정을 분석함으로써 시료 내의 총 항산화력을 측정하는 방법이다. 사용한 시약은 300mM 아세트산 나트륨 완충용액(pH 3.6)과 2,4,6-트리(2-피리딜)-1,3,5-트리아진(TPTZ) 시약 및 20mM 염화철(FeCl_3)이며, TPTZ 시약은 10mM의 TPTZ를 40mM 염산에 용해시켰다. 아세트이트 완충용액, TPTZ 시약 및 염화철(FeCl_3) 용액을 혼합하여(10:1:1, v/v/v) 37°C에서 10 내지 15분간 인큐베이션시켰다. 시료용액 50 μl 와 예열작업한 FRAP 시약 1.5mM를 혼합하여 15분간 빛이 들지 않는 곳에서 반응시키고 593nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0053] 그 결과, 도 3에 개시한 바와 같이, ABST 라디칼 소거활성 패턴과 유사하게 추출물의 농도가 증가함에 따라 흡광도가 증가하는 농도 의존적인 경향을 보였다. 특히 양과의 과피 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물은 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 흡광도 2.33으로 가장 높은 흡광도를 보였으며, 이는 양성 대조구인 1mg/ml의 비타민 C의 항산화력 대비 약 74% 수준의 항산화력을 나타낸 것이다. 본 실험 결과를 토대로, 양과 추출물의 분획물 중에서 항산화 활성이 우수한 에틸아세테이트 분획물을 이용하여 이하 실험들을 실시하였다.

[0054] **실시예 5. 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 AChE 저해활성**

[0055] 아세틸콜린 분해효소 저해활성 측정은 아세틸콜린 요오드화물(acetylcholine iodide)을 기질로 사용하여 측정하였다. 효소는 PC12 세포배양액 1ml에 균질화를 위한 버퍼(1M NaCl, 50mM MgCl_2 , 1% Triton X-100 혼합액에 10mM Tris-HCl로 pH 7.2로 조정) 5ml를 첨가하여 Glass-Col homogenizer로 균질화한 후 균질화된 세포배양액을 10,000 rpm에서 30분 동안 원심분리하였으며, 그 상층액을 효소실험을 위하여 사용하였다. 모든 추출공정은 4°C에서 수행하였으며, 추출한 효소액의 단백질 함량을 측정하기 위하여 Quant-iTTM Protein Assay kit(Invitrogen, St. Oregon, Eugene, USA)를 이용하여 측정하였다. 10 μl 의 정제효소에 10 μl 의 추출물을 넣어 37°C에서 15분간 프리인큐베이션(pre-incubation) 시킨 후, 반응 혼합물에 50mM 인산나트륨 완충용액(pH 8.0)에 용해시킨 70 μl 의 Ellman's 반응 혼합물[0.5mM acetylthiocholine, 1mM 5,5'dithiobis(2-nitro benzoic acid)]을 첨가한 후 405nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

[0056] 알츠하이머성 치매로부터 유발되는 기억력 상실 및 학습력 저하 등 각종 인지장애는 주로 대뇌기저부의 아세틸콜린 신경세포의 손상으로부터 기인한다는 가설을 바탕으로 본 발명에서는 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 아세틸콜린 분해효소(AChE) 저해활성을 살펴보았으며, 결과는 도 4에 개시한 바와 같이, 양성 대조구로서 타크린 1 μM 을 처리한 군의 아세틸콜린 분해효소 저해활성은 약 80% 정도였으며, 양과 과육 추출물의 분획물에서는 AChE 저해활성이 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지는 농도 의존적으로 증가하는 그래프를 나타냈다. 양과 과육 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 저해활성(IC_{50})은 433.34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 분석되었다. 양과 과피 추출물의 분획물에서는 AChE의 저해활성이 농도 의존적으로 증가하였고, IC_{50} 값은 37.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 양과 과육 추출물의 AChE 분획물의 저해활성에 비해 약 11배 정도 높은 수준임을 알수 있었다.

[0057] **실시예 6. 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 MDA 생성 억제 효과**

[0058] 마우스 뇌 세포막 지질과산화 억제활성을 살펴보기 위하여 지질과산화 생성물인 말론디알데하이드(MDA)의 생성 억제활성 측정을 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 마우스 뇌 부위 조직을 10배 부피의 차가운 Tris-HCl 완충액(20mM, pH 7.4)에 균질화시킨 후 4°C에서 15분간 12,000g으로 원심분리하였다. 상등액 0.1ml에 10 μM 의 황산철 0.1ml, 0.1mM의 아스코르브산(ascorbic acid) 1ml 및 시료용액 0.2ml를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 상기 반응액에 28% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid) 0.1ml를 첨가하여 반응을 종결시키고, 1% 티오바르비투릭산(thiobarbituric acid) 0.3ml를 첨가하여 80°C에서 30분간 가열한 후, 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0059] 그 결과, 도 5에 개시한 바와 같이 양과 과육 추출물의 분획물에서 농도 의존적인 경향을 나타내었다. 양성 대조구로 사용된 카테킨이 MDA 생성을 75.31% 억제하는 것과 비교하였을 때, 양과 과육 분획물의 경우에는 농도간의 유의적인 차이는 존재 하였으며, 50~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 10~50% 정도의 억제효과가 나타났다. 양과 과피 추출물의 분획물의 경우, 농도에 따라 변화가 거의 없으며, 50~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 35~45% 정도의 억제효과가

나타났다.

[0060] 실시예 7. 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 산화적 스트레스에 대한 신경세포 보호효과

[0061] 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물이 과산화수소에 의한 PC12 신경세포의 산화적 스트레스 손상을 보호하는 효과를 측정하기 위하여 DCF-DA(2',7'-디클로로로플루오레산 디아세테이트) 방법을 실시하였다. 먼저 세포를 96웰 플레이트(well plate)에 2.5×10^5 세포/웰로 분주하고, 양과의 에틸아세테이트 분획물을 농도별로 처리한 후 37℃, 5% CO₂의 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거한 다음, phosphate buffered saline(PBS) 버퍼로 세척한 후, 200 μM 과산화수소(H₂O₂)를 가하고, 3시간 동안 배양한 후 50 μM DCFH-DA를 가하고, 형광 마이크로플레이트 리더(Infinite 200, Tecan Co., San Jose, CA, USA)를 사용하여 여기(excitation) 파장 485nm와 방출(emission) 파장 535nm에서 형광강도를 측정하였다.

[0062] 과산화수소로 세포의 산화적 손상을 유도하여 플루레센트 디클로로로플루오레세인(fluorescent dichlorofluorescein, DCF) 형광강도를 관찰한 결과는 도 6과 같다. 그 결과 과산화수소를 단독 처리한 군에서는 150%로 대조구(Control) 100% 대비 약 50%의 형광강도 증가를 보이는 반면, 양과 과육 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서는 농도의존적으로 감소하였으나, 감소율이 비교적 낮은 경향을 보였으며, 비타민 C와 비교하면, 1000 μg/ml의 농도로 처리한 경우 거의 유사한 효과를 보이고 있으며, 양과 과피 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 경우 농도 의존적인 경향을 보였으며, 특히 농도 200 μg/ml에서는 양성 대조구의 200 μM의 비타민 C보다 높은 스트레스 저해 활성을 보여주었다.

[0063] 실시예 8. 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 MTT 분석에 의한 세포 생존율 측정

[0064] 과산화수소에 의해 유도된 PC12 세포에 대한 보호효과는 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) reduction assay로 측정하였다. 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물을 이용하여 농도별로 PC12 세포에 처리하여 24시간 동안 프리인큐베이션(pre-incubation)하였고, 그 후 과산화수소는 200 μM의 농도로 증류수에 녹여 첨가한 후 3시간 동안 배양하였다. 이 상태의 PC12 세포에 MTT 저장 용액(10 μl/웰)을 처리하여 37℃에서 3시간 동안 배양한 후, MTT solubilization solution(10% Triton X-100 in acidic isopropanol) 100 μl를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 마지막으로 흡광도는 마이크로플레이트 리더(680, Bio-rad, Japan)에서 570nm(determination wave)와 630 nm(reference wave)에서 측정하였다. 양성 대조구(positive control)는 비타민 C(200 μM)를 사용하였고, 세포 생존율(cell viability)은 대조구 그룹(control group)에 대한 % 농도로 나타냈다.

[0065] 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물이 과산화수소에 유도된 산화적 스트레스 상태에서 PC12 신경세포에 대한 보호효과를 측정한 결과는 도 7에 개시하였다. 세포 생존율(cell viability)은 과산화수소를 처리한 처리구에서는 대조구 100% 대비 77%의 생존율을 나타냈고 과산화수소와 비타민 C를 동시에 처리한 구에서는 113%의 생존율로 과산화수소 처리군 대비 약 36% 정도의 신경세포 보호효과를 보여주었다. 양과 과육 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 경우, 농도 의존적인 경향을 나타내었고, 특히 200 μg/ml의 농도에서 양성 대조구로 사용된 200 μM의 비타민 C와 유사한 생존율을 나타내었다. 또한 양과 과피 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서는 낮은 농도 처리구에서 농도 의존적인 경향이 나타나지 않았으며, 50 μg/ml 농도 이상에서는 200 μM의 비타민 C보다 높은 생존율을 나타내었다.

[0066] 실시예 9. 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 세포막 손상 억제 효과

[0067] 농도별 추출물을 48시간 동안 프리인큐베이션(pre-incubation)시킨 후, 200 μM 과산화수소(H₂O₂)를 처리하여 3시간 동안 배양한 후, 5분간 원심분리(250g)하여 침전시키고, 100 μl의 상등액을 새로운 웰(well)로 옮긴 후 세포막 손상효과 측정은 LDH(lactate dehydrogenase) 분석 키트(Sigma Chemical Co, St. Louis MO., USA)로 측정하였다.

[0068] 과산화수소로 유도된 신경세포막 손상에 대한 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 보호효과를 확인하기 위해 신경세포 중에 함유되어 있는 세포질 성분의 LDH 방출량을 측정한 결과는 도 8에 개시하였다. 정상 대조구의 LDH 방출량은 25% 정도인데 반해 과산화수소 처리한 시료에서는 43%의 방출량을 보여 과산화수소에 의

해 LDH 방출량이 약 18% 정도 증가하는 것을 알 수 있었다. 양성 대조구인 200 μ M의 비타민 C를 처리한 실험군은 약 17%의 LDH 방출량을 보였고, 50~1000 μ g/ml의 농도로 처리한 양파 과육 추출물의 에틸아세테이트 분획물의 경우, 10~17%의 LDH 방출량을 보여 200 μ M의 비타민 C와 유사한 효과를 보이고 있음을 확인하였다. 또한, 양파 과피 추출물의 에틸아세테이트 분획물에서도 유사한 정도의 LDH 방출 저해 효과를 나타내었다.

[0069] 실시예 10. 트리메틸틴(Trimethyltin, TMT)로 인한 단기 기억력 상실 마우스에 대한 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 회복 능력 평가

[0070] 본 실험에 사용된 동물은 4주령의 ICR-수컷 마우스를 사용하였으며, 5일간의 환경 적응기간을 거치게 하였고, 2마리씩 한 개의 사육케이스에 넣고 항온(22 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C), 항습(50~55%)이 유지되며, 12시간 간격으로 낮과 밤을 교대시키는 동일한 실험실 환경에서 사육하였다. 이들 흰쥐들은 정상 대조구 그룹(Control), TMT 주입 그룹, 샘플(Onion Fresh, Onion Peel)을 10, 20mg/kg body weight(OF10, OF20, OP10 및 OP20)로 처리한 그룹으로 나누어 실험을 진행하였다.

[0071] TMT 주입 2일 후 Y-maze 실험을 실시하였고, 실험에 사용되는 Y-maze는 검은색 플라스틱 재질로 3개의 암(arm)으로 구성되어 있으며, 각 암(arm)의 길이, 높이, 너비는 33cm, 15cm, 10cm이다. 각 암(arm)을 A, B, C로 정한 후 한쪽 암(arm)에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 마우스가 들어간 암(arm)의 이동경로를 기록하였다. 3개의 서로 다른 암(arm)에 차례로 들어간 경우 1점(실제 변경, actual alternation)씩 부여하고, 교체 행동(alternation behavior)은 총 통과횟수(Number of arm entries)와 점수를 이용하여 다음의 식을 통해 계산하였다.

[0072] 교체 행동(%) = (실제변경/최대변경) $\times$ 100

[0073] (최대변경 = 총 통과횟수 - 2)

[0074] 본 발명에서는 뇌의 해마부위에 비가역적인 손상을 일으킴으로써 알츠하이머성 치매와 유사한 증상을 나타내는 TMT를 이용하여 기억력과 학습능력이 감퇴된 마우스 모델을 대상으로 Y-maze를 실시하였으며 그 결과는 도 9에 개시하였다. 8분 동안 Y-maze에서의 마우스의 행동을 관찰한 결과, TMT 그룹은 대조구(Control) 대비 16.34%로 현저한 기억력 저하를 보였다. 이에 반해 OF10, OF20, OP10 및 OP20 그룹은 각각 64.62%, 66.04%, 55.20%, 66.29%로 TMT 그룹과 비교하였을 때, 모든 그룹에서 유의적으로 기억력을 개선시킬 뿐만 아니라, OP10 그룹을 제외한 그룹에서는 대조구 그룹(정상군)과 유사한 수준으로 나타났다. 그리고 8분 동안 마우스들이 Y-maze의 각 arm을 통과한 총 횟수(Number of arm entries)의 결과에서는 마우스의 기본적인 운동능력에는 큰 문제를 보이지 않는 것으로 나타났다. 따라서 마우스의 교체 행동(alternation behavior)에서 보여준 결과는 TMT 주입에 의한 인지결함으로부터 유도된 행동 장애임을 뒷받침하였다.

[0075] 실시예 11. 트리메틸틴(Trimethyltin, TMT)로 인한 장기 기억력 상실 마우스에 대한 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물의 회복 능력 평가

[0076] 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물을 섭취한 마우스의 인지기능 및 장기 기억력 회복능을 확인하기 위해 수동회피시험(Passive avoidance test)을 실시하였다. 수동회피 실험기구는 조명이 있는 밝은 챔버와 어두운 챔버, 2개의 구역으로 구분되어 있으며 바닥은 철망으로 이루어져 있다. TMT 주입 3일 후 수동회피 학습 시험(Passive avoidance training trial)을 실시하였다. 각 마우스는 조명이 있는 챔버에서 조명을 켜지 않은 채 1분 동안 적응시킨 후 조명을 켜고 2분 동안 적응시킨 다음 마우스가 어두운 챔버로 이동하자마자 전기충격을 0.5 mA, 1초 동안 가하였다. 학습 시험을 시킨 다음날 각 마우스들을 대상으로 기억 시험(test trial)을 실시하였고, 조명을 켜 챔버에 마우스의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time: 머무름 시간)을 300초까지 측정하였다.

[0077] 양파 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물을 섭취한 마우스의 인지기능 및 장기 기억력 회복을 확인하기 위해 수동회피시험(Passive avoidance test)을 실시하였다. TMT 그룹의 머무름 시간(Latency time)은 39%로 대조구 그룹(100%)에 비하여 학습 및 인지기능이 현저히 감소하였다(61% 감소). 이에 반해 OF10, OF20, OP10 및 OP20 그룹은 각각 62.86%, 98.78%, 104.62%, 103.46%로 TMT 그룹과 비교하였을 때, 유의적으로 기억력을 개선시킬 뿐만 아니라, OF10 그룹을 제외한 그룹에서는 대조구 그룹과 유사한 수준으로 나타났다. 본 실시예 11에서의 OF 그룹은 농도 의존적인 경향을 나타내었으며, 높은 농도인 20mg/kg에서는 정상군과 유사하였으며, OP 그룹

에서는 유의적으로 대조구 그룹(정상군)과 유사한 값을 나타내어 인지기능이 크게 회복되는 것을 나타내었다. 이러한 결과를 통해 양과 과육(OF)과 과피(OP) 추출물의 에틸아세테이트 분획물 모두 알츠하이머병(Alzheimer's disease)과 같은 퇴행성 뇌신경 질환에 대한 활용가능성이 뛰어날 것으로 판단된다(도 10).

실시예 12. 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물을 섭취한 마우스 뇌 조직 중의 AChE 활성 측정

수동 회피(passive avoidance) 실험 종료 후 마우스의 뇌를 적출하여 10배 부피의 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer)를 넣고 글라스-콜 호모게나이저(Glass-Col homogenizer)로 균질화한 후 12,000rpm에서 30분 동안 원심 분리하였으며, 그 상등액을 효소실험을 위하여 사용하였다. 모든 추출공정은 4℃에서 수행하였으며, 추출한 효소액의 단백질 함량을 측정하기 위하여 Quant-iTTM Protein Assay Kit(Invitrogen Co., Carlsbad, Ca., USA)를 이용하여 측정하였다. 효소 5 μ l에 50mM 인산나트륨 버퍼(sodium phosphate buffer) 65 μ l을 넣고 37℃에서 15분간 프리인큐베이션(pre-incubation) 시킨 후, 반응 혼합물에 Ellman's reaction mixture 70 μ l를 첨가한 후 405nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다. 마우스 뇌 조직중의 AChE 활성은 대조구(Control) 대비 % 활성으로 나타내었다.

Y-maze와 수동회피(passive avoidance) 실험 종료 후 마우스의 뇌를 적출하여 AChE 활성을 측정한 결과는 도 11에 개시하였다. TMT 그룹은 대조구 그룹(100%) 대비 128.32%로 나타나, TMT가 마우스 뇌 조직에 존재하는 해마 영역의 AChE의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. OF10, OF20, OP10 및 OP20에서는 111.19%, 108.51%, 104.07%, 98.82% 로써, 모든 그룹에서 TMT 그룹 대비 AChE 활성이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, OF 그룹의 경우 높은 농도에서 대조구 그룹과 유사한 값을 나타내었으며 OP의 그룹에서는 OP10, OP20 모든 그룹에서 대조구 그룹과 유사한 값을 나타내는 것으로 나타났다. 따라서, 실험 결과 TMT로 유도된 학습 및 인지기능 결함 마우스에서 효과적으로 AChE의 활성을 감소시키는 것으로 생각된다.

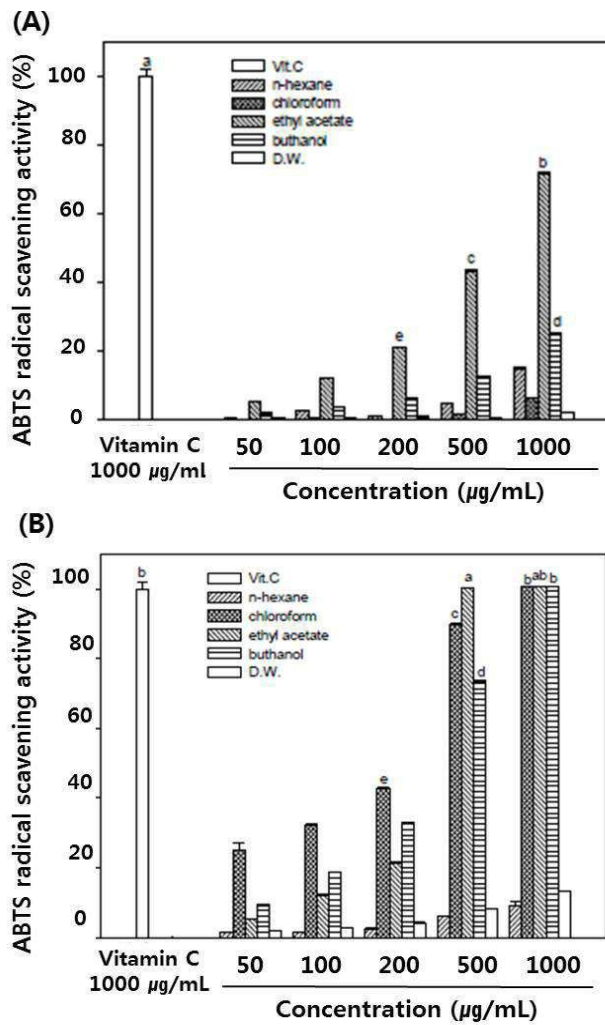
실시예 13. 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물을 섭취한 마우스 뇌 조직 중의 MDA 함량 측정

인산완충식염수(phosphate buffered saline)를 이용하여 추출한 마우스 뇌조직 균질액 160 μ l에 1% 인산 960 μ l을 혼합한 후 0.67% 티오바르비투릭산(thiobarbituric acid) 320 μ l을 넣고 95℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액은 5,000rpm에서 10분간 원심분리하고, 532nm에서 상등액의 흡광도를 측정하였다.

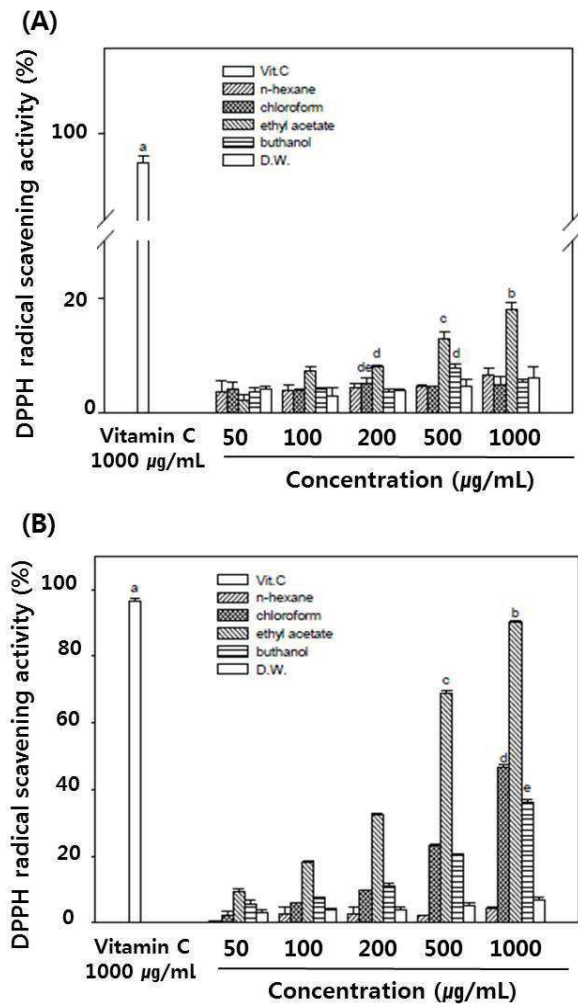
본 발명에서는 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물을 섭취한 마우스의 뇌 조직에 존재하는 지질과산화 중간생성물인 MDA의 함량을 측정하였다. 대조구는 1.24nmole/mg 단백질이었으며, TMT 그룹은 이보다 증가한 1.46nmole/mg으로 뇌 조직에서의 MDA 함량을 증가시키는 것으로 나타났다. OF10, OF20, OP10 및 OP20에서는 TMT 그룹 대비 MDA 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있었고, OF 그룹의 경우 높은 농도에서 대조구 그룹과 유사한 값을 나타내었으며, OP 그룹에서는 대조구 그룹과 유사한 값을 나타내는 것으로 나타났다. 따라서 본 실시예 13의 결과에서 TMT는 뇌 특정부위의 신경세포 손상 및 아포토시스(apoptosis)에 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며 TMT에 의해 생성된 활성산소종(reactive oxygen species)을 양과 추출물로부터 얻은 에틸아세테이트 분획물이 효과적으로 저해하는 것으로 판단된다(도 12).

도면

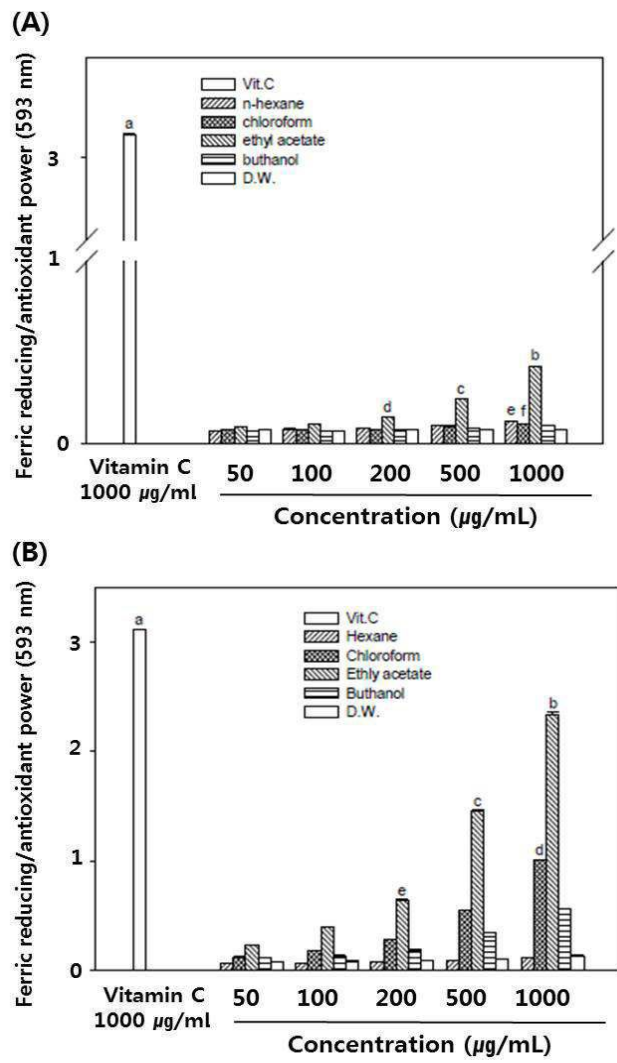
도면1



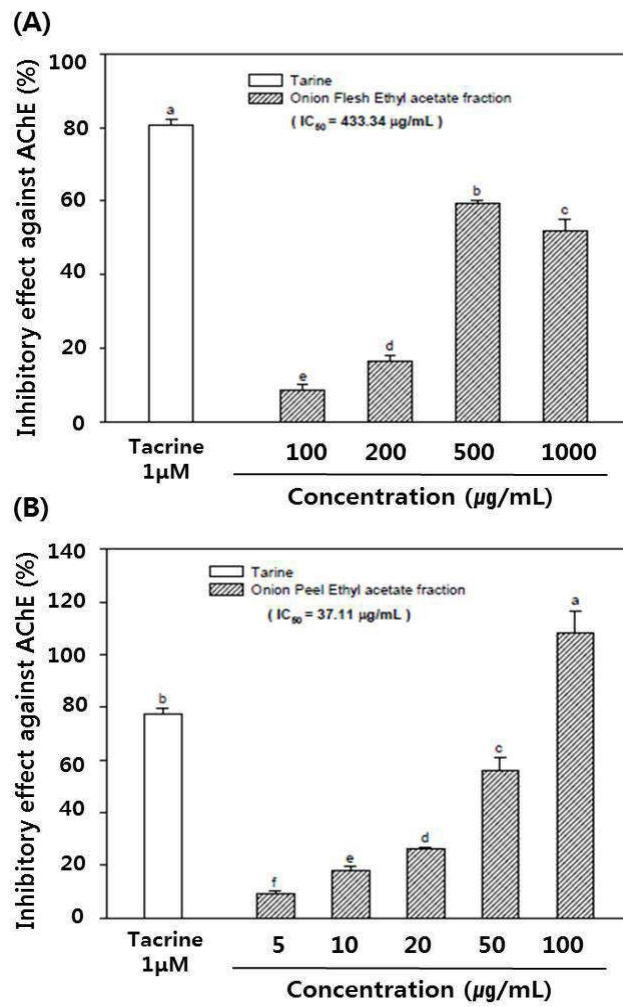
도면2



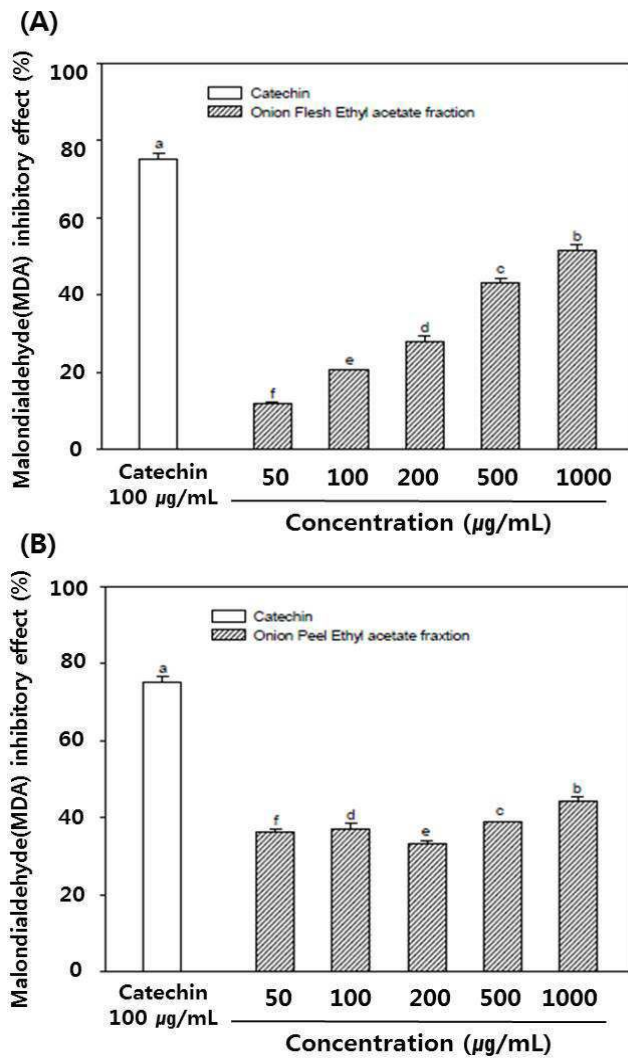
도면3



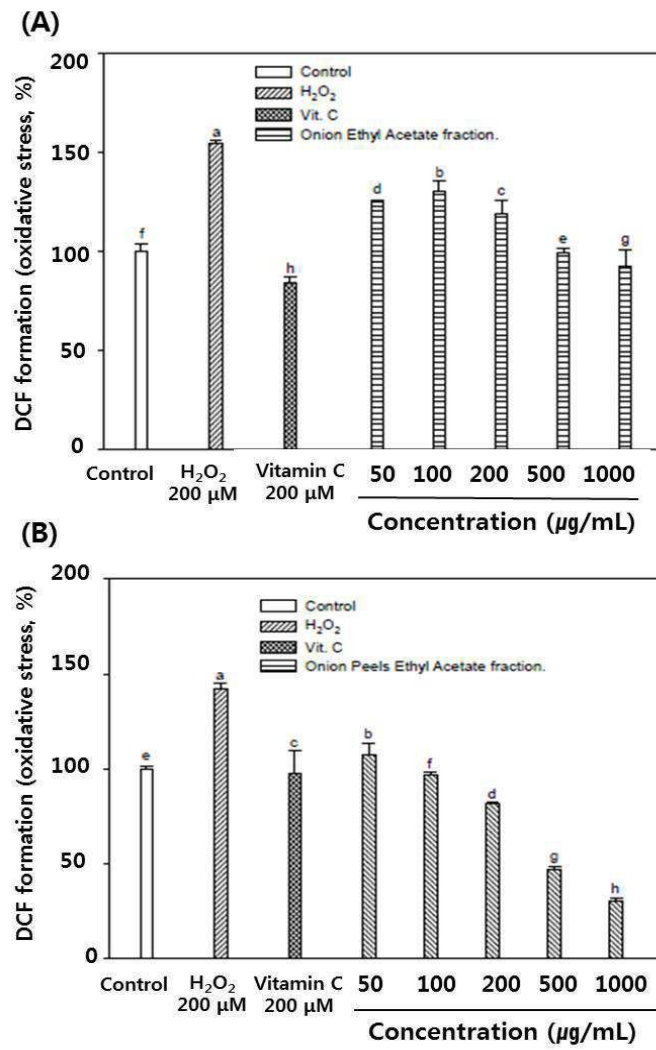
도면4



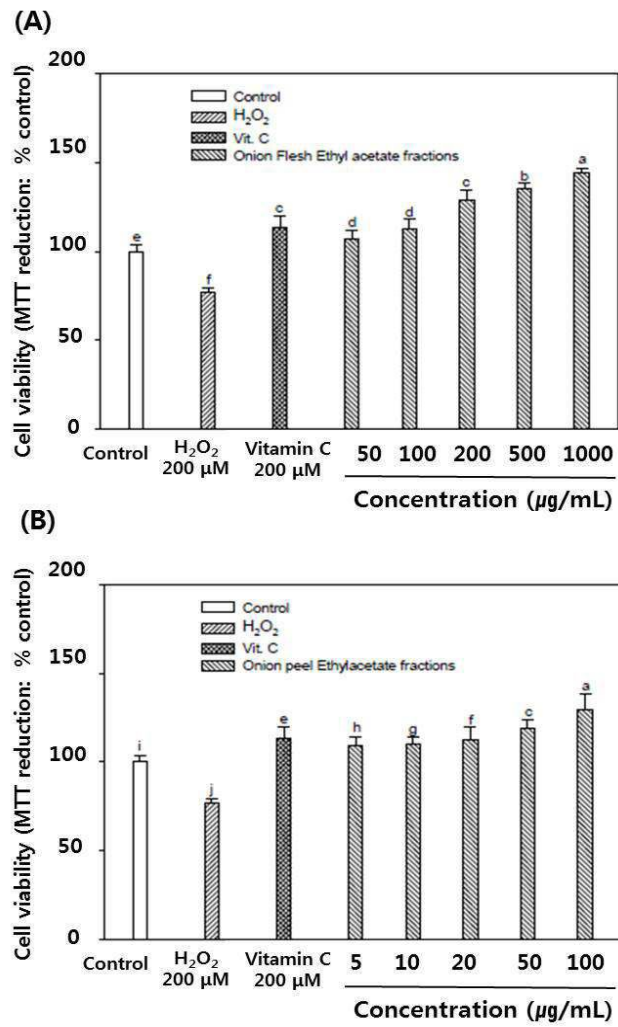
도면5



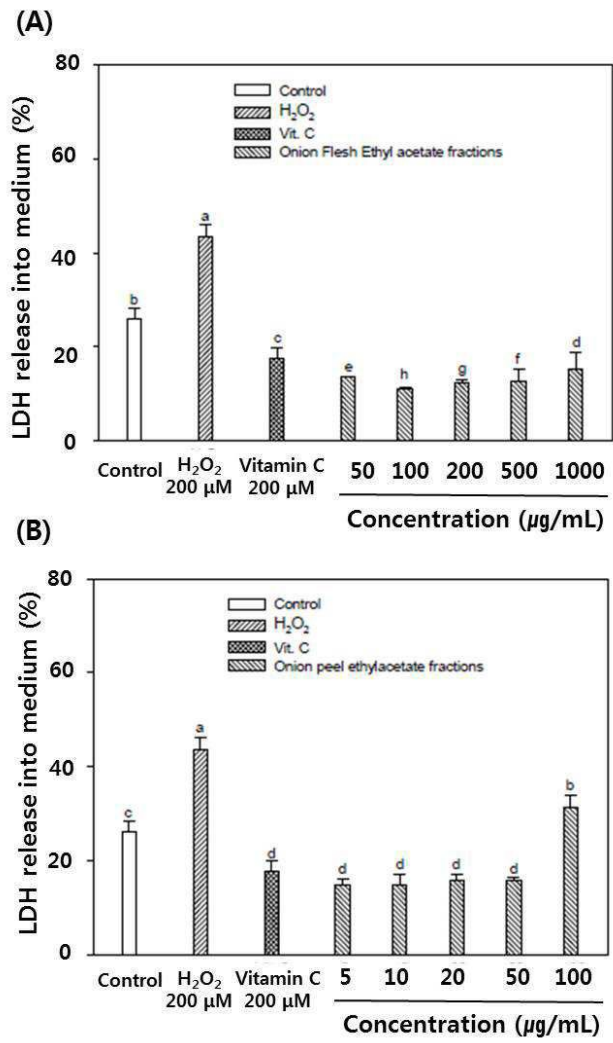
도면6



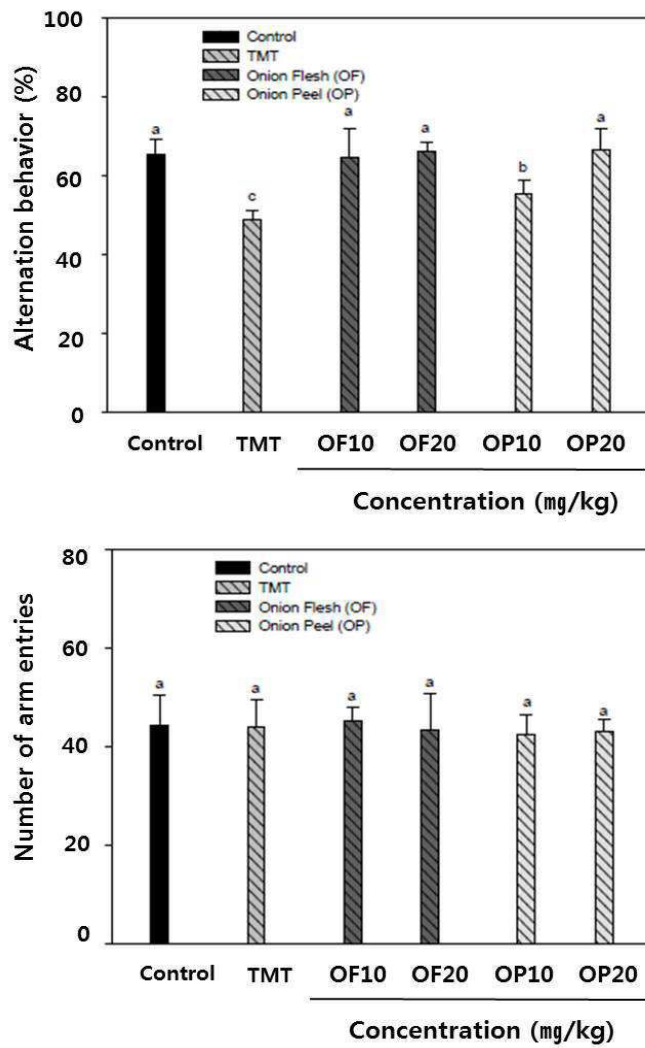
도면7



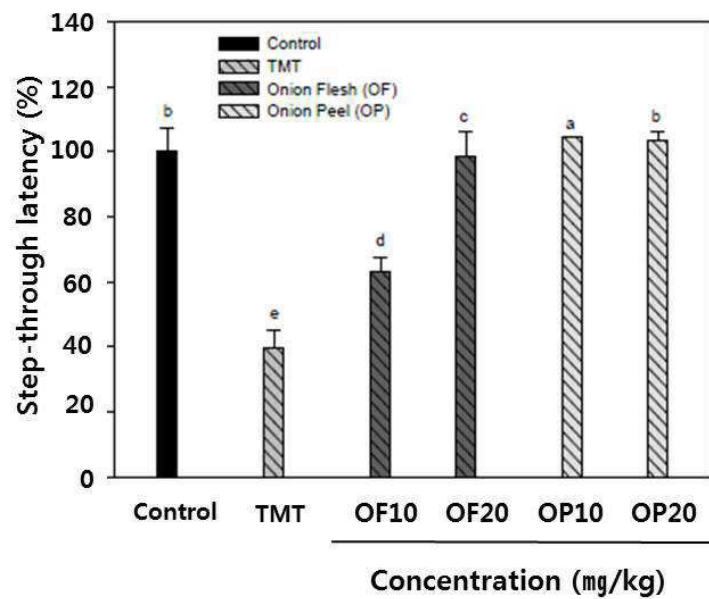
도면8



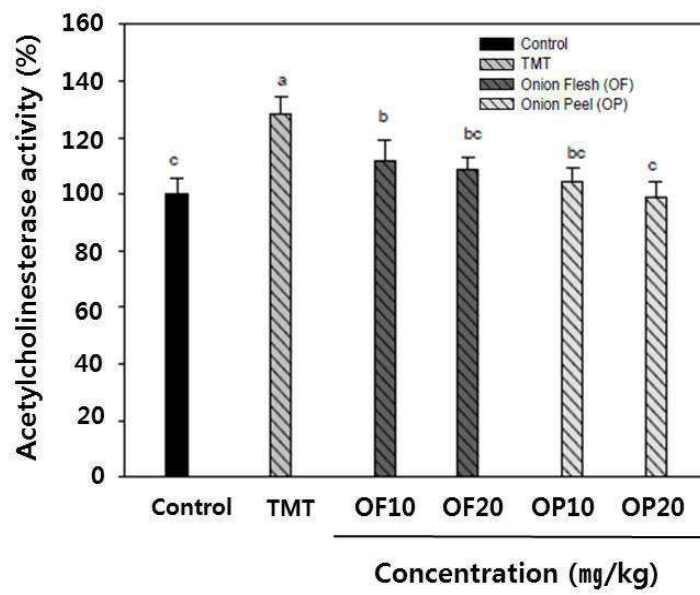
도면9



도면10



도면11



도면12

