



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0130706
(43) 공개일자 2015년11월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/03 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0057619

(22) 출원일자 2014년05월14일

심사청구일자 2014년05월14일

(71) 출원인

한밭대학교 산학협력단

대전광역시 유성구 동서대로 125 (덕명동)

(72) 발명자

이봉호

대전광역시 유성구 은구비남로 13 SK허브 1104

최병욱

대전광역시 유성구 배울2로 134 대우프루지오 10
3동 201호

이혜숙

대전광역시 동구 용운로 155-1 (용운동)

(74) 대리인

특허법인 플러스

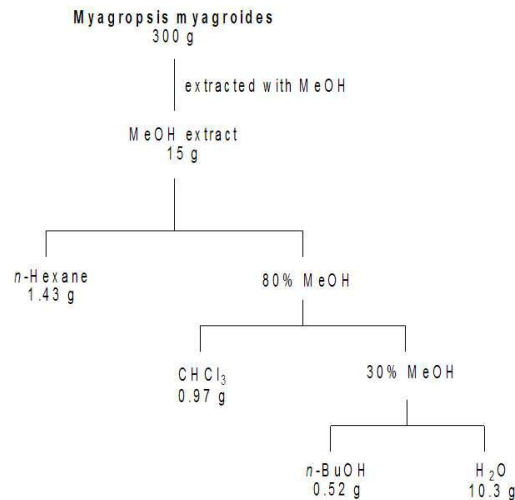
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 콜린에스터라제 억제활성을 가진 외톨개모자반 추출물 및 그 추출방법

(57) 요약

본 발명은 외톨개모자반으로부터 인지능력 개선에 효과적인 성분을 추출하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 외톨개모자반의 용매 추출물을 유효성분으로 함유하고 콜린에스터라제의 억제 활성이 있는 인지 능력 개선용 조성물 및 기능성 식품을 제공한다. 상기 조성물 및 식품을 통해 치매 등의 예방 등에 기여할 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 111089033SB010

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 수산실용화 기술개발사업

연구과제명 갈조류를 이용한 집중력 및 인지기능 개선 응용제품 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한밭대학교

연구기간 2013.09.22 ~ 2014.09.21

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)을 세척한 후 분쇄하는 단계;
- (b) 메탄올로 추출한 후 여과하여 메탄올 추출물을 제조하는 단계;
- (c) 상기 메탄올 추출물을 75~85% 메탄올에 녹인 후 n-헥산(n-hexane)을 이용하여 용매 분획을 실시하고, 이를 1~3회 반복하여 n-헥산 추출물을 제거하는 단계;
- (d) 상기 n-헥산 추출물을 제거하고 남은 용액을 농축 후 25~35% 메탄올에 녹이고, 동일한 부피의 클로로포름(chloroform)을 사용하여 용매 분획을 실시하고, 이를 1~3회 반복하여 클로로포름 추출물을 제거하는 단계; 및
- (e) 상기 클로로포름을 제거하고 남은 용액을 농축 후, 동일한 부피의 n-부탄올(n-butanol)과 증류수에 분배시키고, 각각의 용액을 분리한 후 감압 농축하여 n-부탄올 추출물을 제조하는 단계;
- 로 구성되는 것을 특징으로 하는 외톨개모자반으로부터 추출물 제조방법.

청구항 2

제 1항의 (a)~(e)까지의 제조방법에 의해 외톨개모자반으로부터 제조된 n-부탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지능력 개선용 조성물.

청구항 3

제 1항의 (a)~(d)까지의 제조방법에 의해 외톨개모자반으로부터 제조된 클로로포름 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지능력 개선용 조성물.

청구항 4

제 2항 또는 제 3항에 있어서,

상기 조성물은 콜린에스터라제 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 인지능력 개선용 조성물.

청구항 5

제 2항 또는 제 3항의 조성물을 포함하는 인지능력 개선용 기능성식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 콜린에스터라제 억제활성을 가진 외톨개모자반의 용매 추출물 및 그 추출방법에 관한 것으로, 상세하게는 아세틸콜린에스터라제 또는 부틸콜린에스터라제 억제활성을 가진 외톨개 모자반의 용매 추출물 및 그 추출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

갈조류(褐藻類, Phaeophyceae 또는 Brown algae)는 보통 해양성이고 다세포 조류에 속하는 커다란 군을 말한다. 전 세계에 약 250속의 1,500종이 알려져 있는데 그 대부분이 바다에서 산다. 조류 중 가장 발달된 체제를 가지고 있으며, 단세포나 군체인 것은 거의 없고 대부분이 사상체 또는 막대기, 나뭇가지 모양 등의 형태로 나뉜다. 작은 것은 육안으로 겨우 보이는 정도이지만, 큰 것은 10 m 가까이 되는 것도 있다. 갈조강에 속하는 목 목록으로는 타래가죽채적말목(Ascoseirales), 채적말목(Cutleriales), 산말목(Desmarestiales), 그물바탕말목(Dictyotales), 디스크스포랑기움목(Discosporangiales), 솜털목(Ectocarpales), 뜸부기목(Fucales), 패목(Ishigeales), 다시마목(Laminariales), 바위딱지목(Ralfsiales), 고리매목(Scytosiphonales), 쇠털목

(Sphacelariales), 털비말목(Sporochnales) 등이 있다.

[0003] 의학산업의 발달과 급속한 경제성장에 따른 삶의 질이 향상됨과 동시에 각종 질병과 노인 인구가 증가하고 있다. 인간의 평균 수명은 연장되었지만 이에 따른 경제적 부담금이 가중되고 있다. 그 중 하나가 바로 노인성 치매병이다. 그 중 50% 이상이 알츠하이머성(Alzheimer type, AD) 치매이다. 병리학적으로 치매가 어떻게 오는 지에 대해서는 완전하게 규명하지 못한 상태이며, 이에 따른 치료제도 없는 실정이다. 하지만 간접적으로 치매 환자들의 뇌에서 정상적인 사람보다 아세틸콜린(Ach)을 합성하는 콜린아세틸트랜스퍼라제(ChAT)가 20-30%로 감소된 것으로 알려졌으며, 또한 신경(neuron) 전달체인 아세틸콜린 농도가 16-30% 정도 감소한 것으로 확인되었다. 따라서 치매환자에게 전구체인 콜린농도를 증가시키기 위해 콜린을 직접 주입하는 방식은 별다른 효과를 얻지 못하였다.

[0004] 그로 인해 간접적인 치료방법으로 신경 전달체인 아세틸콜린을 가수분해하는 효소인 콜린에스터라제(ChE)를 억제하는 억제제를 이용하는 연구가 진행되어 왔다. 콜린에스터라제는 아세틸콜린에스터라제(AChE)와 부틸콜린에스터라제(BuChE)의 두 가지 형태를 갖는다.

[0005] 신경계의 시냅스(synapse)에 존재하는 아세틸콜린에스터라제는 신경세포와 신경근접합부를 지나는 신경세포간 접합부위 회로 후막 등의 신경전달신경계에서 중요한 효소로 신경전달물질인 아세틸콜린(ACh, acetylcholine)을 아세테이트(acetate)와 콜린(choline)으로 가수분해시키는 역할을 한다.

[0006] 종래 기술로서, 부틸콜린에스터라제(BuChE)는 해양식물 갈조류에서 분리한 플라스토퀴논(Plastoquinone)화합물이 콜린에스터라제 형태 중 선택적으로 부틸콜린에스터라제 활성을 억제할 수 있음이 밝혀졌다(대한민국 등록특허공보 0701798).

[0007] 이전에는 아세틸콜린에스터라제 억제제에 대한 합성이나 개발이 주가 되어 왔지만 최근 연구에서는 알츠하이머성 뇌에서 부틸콜린에스터라제가 증가된다고 알려져 있어 치료제 개발에 높은 관심을 모으고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 0701798.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명에서는 갈조류인 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)의 용매 추출물에서 콜린에스터라제(cholinesterase), 특히 아세틸콜린에스터라제(acetylcholinesterase, AChE) 및 부틸콜린에스터라제(butylcholinesterase, BuChE)의 활성을 저해하는 효과가 뛰어난 것을 확인하고, 이들 물질이 포함된 추출물을 수득하고자 하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은

[0011] (a) 외톨개모자반(*Myagropsis myagroides*)을 세척한 후 분쇄하는 단계;

[0012] (b) 메탄올로 추출한 후 여과하여 메탄올 추출물을 제조하는 단계;

[0013] (c) 상기 메탄올 추출물을 75~85% 메탄올에 녹인 후 n-헥산(n-hexane)을 이용하여 용매 분획을 실시하고, 이를 1~3회 반복하여 n-헥산 추출물을 제거하는 단계;

[0014] (d) 상기 n-헥산 추출물을 제거하고 남은 용액을 농축 후 25~35% 메탄올에 녹이고, 동일한 부피의 클로로포름(chloroform)을 사용하여 용매 분획을 실시하고, 이를 1~3회 반복하여 클로로포름 추출물을 제거하는 단계; 및

[0015] (e) 상기 클로로포름을 제거하고 남은 용액을 농축 후, 동일한 부피의 n-부탄올(n-butanol)과 증류수에 분배시키고, 각각의 용액을 분리한 후 감압 농축하여 n-부탄올 추출물을 제조하는 단계;

- [0016] 로 구성되는 것을 특징으로 하는 외톨개모자반으로부터 추출물 제조방법에 관한 것이다.
- [0017] 본 발명은 또한 상기 (a)~(e)까지의 제조방법에 의해 외톨개모자반으로부터 제조된 n-부탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지능력 개선용 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명은 또한 상기 제조방법에 의해 외톨개모자반으로부터 제조된 클로로포름 추출물을 유효성분으로 포함하는 인지능력 개선용 조성물에 관한 것이다.
- [0019] 본 발명에서 상기 조성물은 제한되지는 않으나 콜린에스테라제 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 아세틸콜린(acetylcholine: ACh)은 중추신경계 및 말초신경계에서의 신경전달물질로 알려져 있으며, 신경세포의 시냅스 크뉴의 세포질에서 생합성되어 교감 또는 부교감 신경계의 시냅스 전 섬유 및 시냅스 후 섬유에서 분비되며, 부교감 신경섬유의 신경절후(post ganglion)에 존재하는 무스카린 수용체(muscarin receptor)에 자극(impulse) 신호를 반응시키고, 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase, AChE)에 의하여 분해된다. AChE에 의해 아세틸콜린은 콜린(choline)과 아세테이트(acetate)로 분해되는데, 분해되어진 콜린은 운반자(carrier)에 의해 다시 신경계로 부분 흡수되어진다. 이러한 과정을 cholinergic system이라고 하며 이 과정에 AChE가 결정적 역할을 한다. 치매 환자의 경우는 ACh의 양은 적는데 반해 AChE의 작용은 계속 유지되어 신경전달에 이상이 생기게 되면서 결국 학습 능력 및 기억력 감퇴와 인지력 저하 등과 같은 대표적인 치매의 병리현상이 발생하게 된다.
- [0021] 치매는 기억상실, 지능의 퇴보, 성격의 변화, 행동이상 등 복합 인지장애가 특징인 증후군을 말한다. 이 증상은 중추신경계인 뇌와 관련이 있는 퇴행성 뇌신경질환으로서 중추신경계 퇴행성 질환을 유발시키는 서행적인 신경세포의 사멸에 의해 신경회로망에 비가역적인 기능장애가 초래하게 되고, 결국에는 해당 인체 기능의 영구적인 손실을 초래하게 된다. 퇴행성 뇌신경질환의 공통된 특징은 전반적인 혹은 특정한 세포의 사멸을 가져오는데, 분화된 신경세포는 재생 능력이 없어서 신경세포의 사멸은 결과적으로 비가역적인 뇌 기능의 손실로 나타나게 된다.
- [0022] 치매가 어떻게 발생하는지에 대해서는 완전하게 규명하지 못한 상태이고, 다양한 병인학적, 병태생리학적 요소를 가지고 있으므로 단독으로 투여하는 치매치료제는 없는 실정이다. 그러나 간접적으로 치매환자들의 뇌에서 정상적인 사람보다 아세틸콜린(ACh)을 합성하는 콜린아세틸트랜스퍼라제(ChAT)가 20~30%로 감소된 것으로 알려졌다. 또한 신경 전달체인 아세틸콜린 농도가 16~30% 정도 감소하는 것으로 알려져 있다. 그로 인해, 간접적인 치료방법으로 신경 전달체인 아세틸콜린을 가수분해하는 효소인 콜린에스테라제(ChE)를 억제하는 저해제를 이용하는 연구가 진행되어 오고 있다. 콜린에스테라제는 아세틸콜린에스테라제(AChE)와 부틸콜린에스테라제(BuChE)의 두 가지 형태를 갖는다. 상기의 아세틸콜린에스테라제는 체내 부교감 신경의 활성을 매개하는 신경전달물질을 중의 하나인 아세틸콜린을 콜린과 아세테이트로 가수분해하는 효소로서, 소포체 막에서 형성되어 세포막으로 이동하여 그 기능을 수행한다. 상기의 효소는 콜린 신경과 그 주위, 특히 근신경 접합부에 가장 많이 분포되어 있고, 혈장, 간 및 다른 조직에서도 발견되는 중요한 효소이다.
- [0023] 따라서 아세틸콜린에스테라제 억제물질(acetylcholinesterase inhibitor)을 사용하여 치매를 예방 또는 치료할 수 있을 것으로 생각되고 있다. AChE는 신경전달물질 ACh을 퇴화시키는 효소이므로, AChE 억제제는 이 퇴화 과정을 억제함으로써 ACh 신경전달물질을 증가된 시간 동안 신경 클레프트(cleft)에 남게 하고 신경전달물질의 화학적 및 기능적 효과를 상승시켜, 기억력 증진 및 인지 작용을 향상시킬 수 있기 때문이다.
- [0024] 현재 사용되고 있는 알츠하이머성 치매치료제는 아세틸콜린 분해효소인 아세틸콜린에스테라제 저해제가 대부분이며, 도네페질(Donepezil, 상품명:아리셉트), 리바스티그민(Rivastigmin, 상품명:엑셀론), 갈란타민(Galantamine, 상품명:레미닐) 등이 이에 속한다. 상기 아세틸콜린에스테라제 저해제 중 도네페질은 1996년 미국 식품의약국(FDA)로부터 치매환자에 대한 사용허가를 받은 것으로 알츠하이머성 치매의 경증 및 중등증 이상의 치매 치료에 사용된다. 상기 도네페질은 아세틸콜린에스테라제와 부틸콜린에스테라제라는 아세틸콜린 분해효소를 가역적으로 억제하는 효능을 지닌 약물로서, 상기의 억제 기능을 통해 신경전달 물질인 아세틸콜린이 정상인에 비해 저하되어 있는 알츠하이머 환자의 뇌 속에 아세틸콜린을 증가시켜 뇌 속의 콜린 작동성 신경을 활성화한다.
- [0025] 본 발명은 또한 상기 조성물을 포함하는 인지능력 개선용 기능성식품에 관한 것이다.
- [0026] 본 발명에서 상기 식품 중 추출물의 양은 제한되지는 않지만 전체 식품 중량의 0.01 내지 50 중량%로 가할 수 있다. 상기 식품은 제한되지는 않지만 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경우

형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 또한 상기 식품은 제한되지는 않지만 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있으며, 바람직하게는 락토오스(lactose), 텍스트로즈, 수크로스(sucrose), 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있다.

[0027]

상기 식품을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제에는 정제, 환(丸)제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제에는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 상기 조성물은 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0028]

상기 식품은 지시된 비율의 필수 성분으로서 상기 조성물을 함유하는 것 외에는 다른 성분에는 제한이 없으며 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 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. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 추출물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다. 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지는 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 바람직하다.

[0029]

상기 물질의 첨가를 통해, 본 발명을 통해 제조된 용매 추출물을 이용한 식품의 풍미를 개선하고, 추가적인 영양소의 보완을 할 수 있으며, 이를 통해 인지능력 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0030]

본 발명은 외톨개모자반으로부터 인지능력 개선에 효과적인 성분을 추출하는 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 외톨개모자반의 용매 추출물을 유효성분으로 함유하고 콜린에스터라제의 억제 활성이 있는 인지 능력 개선용 조성물 및 기능성 식품을 제공한다. 상기 조성물 및 식품을 통해 치매 등의 예방 등에 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0031]

도 1은 외톨개모자반으로부터 콜린에스터라제의 활성을 억제하는 용매 추출물의 추출 흐름도이다.

도 2는 외톨개모자반으로부터 얻은 용매 추출물의 TLC 패턴이다.

(고정상-실리카겔; 이동상- CHCl_3 : MeOH = 9:1, I_2 chamber).

도 3은 외톨개모자반으로부터 얻은 클로로포름 추출물의 TLC 패턴이다.

(크로마토그래피 조건, 이동상- CHCl_3 :MeOH = 9.8:0.2, 9:1, 8.5:1.5, 8:2, 7:3; 고정상-실리카겔).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032]

이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 그러나, 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시

하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0033] (acetylcholinesterase inhibitory activity assay - AChE 저해 활성 측정)

[0034] AChE 억제 활성 측정은 Ellman's coupled enzyme assay 방법으로 효소(AChE)는 0.10 M 인산염 완충용액(pH 7.3)에 용해하여 10 unit/mL로 제조하였고, 기질과 발색시약 또한 인산염 완충용액(pH 7.3)에 용해하여 각각 5 mM로 제조하였다. AChE 억제활성 측정에 관한 구체적인 방법은 아래와 같이 하였다.

[0035] Cuvette 안에 인산염 완충용액(pH 7.3) 880 μ L, 메탄올에 녹인 시료 50 μ L, 5 mM ATCh 20 μ L, 5 mM DTNB 40 μ L를 각각 혼합하여 25 $^{\circ}$ C에서 3분간 반응시킨 후 10 unit AChE 용액 10 μ L를 가하여 412 nm에서 60초 동안 측정하였다. 이때의 기준 값(control)은 $1.5 \times 10^{-3} \sim 2.5 \times 10^{-3}$ Au/sec 범위가 되도록 하였다. 억제활성은 퍼센트(%) 단위로 표기하며, 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{control의 흡광도}} \right] \times 100$$

[0036]

[0037] (Butyrylcholinesterase inhibitory activity assay - BuChE 저해 활성 측정)

[0038] BuChE 억제 활성 측정은 Ellman's coupled enzyme assay 방법으로 효소(BuChE)는 0.10 M 인산염 완충용액(pH 7.3)에 용해하여 10 unit/mL로 제조하였고, 기질(BuTCh)과 발색시약 또한 인산염 완충용액(pH 7.3)에 용해하여 각각 5 mM로 제조하였다. AChE 억제활성 측정에 관한 구체적인 방법은 아래와 같이 하였다.

[0039] Cuvette 안에 인산염 완충용액(pH 7.3) 880 μ L, 메탄올에 녹인 시료 50 μ L, 5 mM BuTCh 20 μ L, 5 mM DTNB 40 μ L를 각각 혼합하여 25 $^{\circ}$ C에서 3분간 반응시킨 후 10 unit BuChE 용액 10 μ L를 가하여 412 nm에서 60초 동안 측정하였다. 이때의 기준 값(control)은 $1.5 \times 10^{-3} \sim 2.5 \times 10^{-3}$ Au/sec 범위가 되도록 하였다. 억제활성은 퍼센트(%) 단위로 표기하며, 다음과 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left[1 - \frac{\text{시료의 흡광도}}{\text{control의 흡광도}} \right] \times 100$$

[0040]

[0041] (실시예 1) 외톨개모자반의 용매 추출물 제조

[0042] 외톨개모자반으로부터 하기와 같이 용매를 이용하여 추출물을 분리하고 감압농축하였다.

[0043] 1) 외톨개모자반을 정제수로 세척하고 건조한 다음, 파쇄기를 이용하여 잘게 부순다.

[0044] 2) 부서진 외톨개모자반 약 300 g을 2 L의 순수한 메탄올에 넣고 상온에서 교반기 150 rpm에서 3 일 동안 교반하여 추출하였다. 추출액은 Buchner 깔대기를 이용하여 여과하였다. 상기 추출액을 상온에서 회전증발기를 사용하여 감압건조한 후 농축하였다.

[0045] 3) 상기 메탄올 추출물을 80% 메탄올 1 L에 용해시키고 n-헥산 1 L로 3회 용매 분획하여 n-헥산에 용해되는 비극성 물질을 분리한 후 감압 건조하여 n-헥산 용매 추출물을 확보하였다.

[0046] 4) 여분의 80% 메탄올 활성 분획 층은 다시 30% 메탄올 1L에 용해시키고, 클로로포름 1 L로 3회 용매분획한 후 감압 건조하여 클로로포름 용매 추출물을 확보하였다.

[0047] 5) 마찬가지로, 상기 30% 메탄올 활성 분획 층은 1 L의 물에 용해시키고, n-부탄올 1 L로 3회 용매분획한 후 감압 건조하여 n-부탄올 용매 추출물을 확보하였다.

[0048] 상기 과정을 통하여 표 1과 같은 용매 추출물을 확보하여 추후 실험에 이용하였다. 도 1은 상기 추출 과정의 모식도를 나타내었다.

[표 1]

	n-헥산	클로로포름	n-부탄올	H ₂ O
무게 (g)	1.43	0.97	0.52	10.3
수득률 (%)	9.5	6.5	3.4	68.8

(실시에 2) 외톨개모자반 용매 추출물의 콜린에스터라제 활성 측정

상기 콜린에스터라제 활성 측정 방법을 이용하여, 상기 실시예 1의 수득물에 대한 활성을 측정한 결과는 표 2와 같다.

[표 2]

	AChE 억제활성	BuChE 억제활성
MeOH추출물	8.20	58.63
Hexane분획물	-	51.82
CHCl ₃ 분획물	-	86.38
BuOH분획물	54.01	33.73
H ₂ O분획물	1.83	-

(실시에 3) 외톨개모자반 용매 추출물의 TLC 패턴 측정

용매 추출물의 TLC 패턴 측정

상기 표 1에서와 같이 확보한 용매 추출물에 대하여 실리카겔 상에서의 TLC를 실시하였다(도 2).

도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 클로로포름 분획이 BuChE 억제 활성이 매우 우수한 것을 확인하였다.

클로로포름 분획에 대한 TLC 패턴 측정

이에 따라, 클로로포름 분획(10-MMC)에 대하여 클로로포름과 메탄올의 부피비를 조절하여 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 시행하여 총 10 개의 분획으로 나누었으며 이들의 무게와 BuChE 억제활성을 측정하여 표 3에 나타내었고, 이에 대한 TLC 패턴을 도 3에 도시하였다.

[0061]

[표 3]

fraction	10-MM C-S1	10-MM C-S2	10-MM C-S3	10-MM C-S4	10-MM C-S5	10-MM C-S6	10-MM C-S7	10-MM C-S8	10-MM C-S9	10-MM C-S10
무게 (mg)	190	33	25	216	8	24	105	106	31	186
BuChE억 제 (%)	83.13	89.85	81.53	70.07	57.35	36.57	40.37	57.86	18.11	32.91

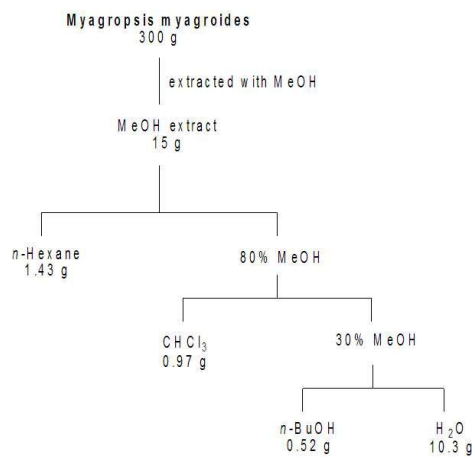
[0062]

[0063]

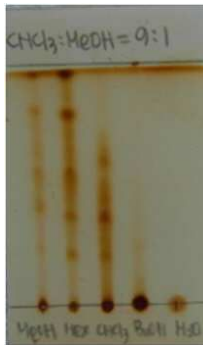
본 발명의 추출방법에 의해 외톨개모자반으로부터 얻은 용매 추출물은 BuChE를 포함하는 콜린에스터라제 억제 활성이 뛰어나므로 인지 능력 개선을 위한 조성물로서 식품 등에 유효성분으로 포함될 수 있다.

도면

도면1



도면2



도면3

