



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 36/488 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2007-0002279

(43) 공개일자

2007년01월05일

(21) 출원번호 10-2005-0057720

(22) 출원일자 2005년06월30일

심사청구일자 2005년06월30일

(71) 출원인 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 신동훈
서울 강남구 일원동 716 목련아파트 106-304
조홍연
서울 성북구 돈암1동 633 동부센트레빌아파트 103-1002
홍범식
서울 종로구 혜화동 15-162
김혜경
경기 용인시 죽전동 새터마을 현대아파트 708-901
김미정
서울 은평구 불광3동 421-7
최수정
서울 서대문구 창천동 5-68 201호
서영민
인천 남구 용현5동 627-268 9/5
허호진
전남 순천시 매곡동 315 순천대학교 산학협력관 205호전남전략산업기
확단

(74) 대리인 이문섭
양부현
윤여강

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제 활성화 기능을 갖는칩 추출물

(57) 요약

본 발명은 칩 추출물의 새로운 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제 (cholineacetyltransferas, ChAT) 활성화 기능을 갖는 칩 추출물, 상기 칩 추출물에서 분리된 콜린아세틸트랜스퍼라제 활성화 기능을 갖는 저분자성 flavonoid류인 다이드제인(Daidzein) 및 그의 정제 방법에 관한 것이다.

본 발명은 뇌 신호세포 관련 연구가 전무한 국내 식용 생물자원인 칩으로부터 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제 활성화 물질인 다이드제인(daidzein)을 분리 및 정제하였고 그 정제공정의 효율성을 제고하였다. 따라서, 칩 추출물에 포함된 저분자성 유효 성분은 뇌신경 질환의 치료 및 예방을 위한 기능성 식품 또는 의약품의 신소재로서 유용하게 이용될 수 있다.

대표도

도 5

특허청구의 범위

청구항 1.

칩 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase, ChAT) 활성화 조성물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 칩 추출물은 메탄올 또는 에탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 칩 추출물은 활성성분으로서 저분자성 플라보노이드류인 4',7-디하이드록시이소플라본(4', 7-dihydroxyisoflavone, daidzein)을 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4.

저분자성 플라보노이드류인 4',7-디하이드록시이소플라본(4', 7-dihydroxyisoflavone, daidzein)을 유효성분으로 함유하는 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase, ChAT) 활성화 조성물.

청구항 5.

- i) 건조한 칩을 분말화 하여 메탄올 또는 에탄올로 추출하는 단계;
- ii) 상기 칩의 메탄올 또는 에탄올 추출물을 헥산, 클로로포름 및 에틸아세테이트를 이용하여 순차적으로 분획하는 단계;
- iii) 상기에서 수득한 에틸아세테이트 분획을 순차적인 1, 2차 오픈 실리카겔 칼럼(open silica gel column)을 통해서 활성 분획을 수득하는 단계;
- iv) 상기의 수득한 활성 분획을 TLC (thin layer chromatography)를 통해서 활성 분획을 수득하는 단계; 및
- v) 상기의 수득한 활성 분획을 역상 HPLC (high pressure liquid chromatography)를 사용하여 활성 분획을 분리하는 단계를 포함하는, 칩 추출물로부터 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase, ChAT) 활성화 저분자성 플라보노이드류를 정제하는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 칩 추출물의 새로운 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제(cholineacetyltransferase, ChAT) 활성화 기능을 갖는 칩 추출물, 상기 칩 추출물에서 분리된 콜린아세틸트랜스퍼라제 활성화 기능을 갖는 저분자성 flavonoid류인 다이드제인(Daidzein) 및 그의 정제 방법에 관한 것이다.

Cholineacetyltransferase (ChAT)는 뇌에서 신호전달을 원활하게 해주는 신경전달 물질인 acetylcholine의 생성을 활성화시켜주는 인자로 알려져 있다. 뇌의 전두엽(basal forebrain)은 cholinergic neuron을 상당수 포함하고 있고, 이 부위에 있는 cholinergic neuron이 인지능력을 관장하고 있는 것으로 보인다. 노인성 치매환자에 있어서 ChAT의 양은 급격히 감소되는 것을 볼 수 있고, ChAT의 활성화도 감소되어 acetylcholine의 농도가 낮아진다. ChAT는 신경의 pre-synaptic 부분에서 choline과 acetyl-CoA로부터 acetylcholine을 생성하는 효소로 활성을 증진시켜주기 위해 신경성장인자(nerve growth factor, NGF)나 신경영양물질(neurotrophin)을 투여하기 위한 연구도 진행중이지만, 이는 drug delivery에서 문제점을 갖고 있다. 인간의 두뇌는 강력한 뇌막(blood brain-barrier)으로 보호를 받고 있고, 이 막은 특정물질에 대한 선택성을 보이기 때문에 생리적으로 단백질과 지방과 같은 큰 분자량을 갖는 물질의 투과가 쉽지 않다. 그러므로 뇌막을 투과할 수 있는 저분자 물질을 탐색하여 drug delivery의 문제점을 해결해야 하는 필요성이 있다.

ChEIs(Cholinesterase inhibitors)와는 달리, 환자의 인지능력을 향상시켜 주기 위한 ChAT activator로 보고된 FDA 승인 약품은 아직 없으나 최근 일본 Kitasato 연구소에서 한약재로부터 NGF-like factor를 찾아냈고, 이 물질이 ChAT 활성을 증진시킨다는 보고가 있었다. 현재까지의 치매의 치료는 증상완화 또는 질병의 진행속도를 늦추는 것에 지나지 않고 질병자체를 치료하지는 못하고 있다. 노인성 치매는 대부분 65세 이상의 고령인구에서 발병하고 고령인구의 증가 추세에 따라 향후 노인성 치매환자를 돌보는 보호자들의 고통과 치료비용을 포함한 경제적인 손실까지 고려한다면 노인성 치매는 점차 공중보건문제에 있어 더욱 중요한 위치를 차지하게 될 것이다. 현재까지 보고된 항치매 활성화 성분은 주로 식물유래 저분자로 특히 노인성 치매 환자들에게 인지적 증상을 호전시키는 약물로서 ChEIs를 많이 사용되고 있다. 제1세대 ChEIs로서 최초로 항치매 작용에 있어 적용 승인을 받은 tacrine은 작용지속 기간이 짧아 하루 4번 투여해야 하며, 간 독성이 있어 monitoring의 번거러움이 있다. 요즈음 주목받고 있는 제2세대 ChEIs들로는 일본 에자이사에서 개발되어 96년말 미국 FDA 승인을 받고 97년부터 세계 30여국에서 판매되고 있는 donepezil로 하루 한번 복용할 수 있고, 선택적인 저해로 말초 부작용을 줄였다. Rivastigmine은 미국 노바티스에서 개발한 약물로, 스위스에서 1997년 12월에 승인 받아 EU와 남아메리카 국가들에서 사용되고 있고, 미국, 캐나다에서도 승인 준비중이며, 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 임상실험이 진행중이며, 비가역적인 AChEIs로서 작용기간이 길다. 또 하나의 항치매 활성화 성분으로 ChAT activator가 있지만 ChEIs처럼 많은 물질들이 개발되어 있지는 않고 현재 FDA 승인 약품은 없다. 일본에는 한약재에서의 ChAT activator가, 우리나라의 경우 원광대 한의대에서 개발된 '치매단'이 있을 뿐 국내 항치매 성분의 연구는 아직 체계적으로 진행되지 않고 있는 실정이다. 현재 노인성 치매에 있어 완전한 치료는 불가능하지만 초기-중기의 치매환자에서 인지적, 비인지적 증상을 개선하기 위한 노력은 계속되고 있다.

최근에 세계적으로 식물체를 이용한 각종 토닉류(tonics), botanical medicine, dietary supplement 등이 이미 큰 시장을 형성하고 있으며 녹차를 이용한 각종 식품들이 개발되고 있다. 이들에 대한 소비자의 수요가 증가하는 현상은 이들의 효과가 의약품과 같이 신속하게 나타나지는 않지만 꾸준한 섭취를 통하여 치매와 같은 퇴행성 만성질환 등 고령화병의 예방에 효험이 있다는 인식을 갖기 때문이다. 우리 국민들은 전통적으로 차, 채소류를 비롯한 각종 식·약용류를 즐겨 섭취해 왔을 뿐만 아니라 이들의 약리, 생리활성에 대한 많은 구전과 보고들이 있어 왔다. 따라서 식·약용 생물자원에 함유된 유효 성분에 관한 연구는 향후에도 활발히 진행될 것이며, 특히 이 분야 연구는 타 생물소재에 비하여 비교적 미개척 분야로 특이한 구조와 기능을 가진 신규화합물이 발견될 가능성이 높다. 생리, 약리활성을 함유한 식·약용류 식물로부터의 추출물의 산업적 응용은 정제도에 따라 의약품으로부터 기능성 식품에까지 다양한 형태를 취할 수 있기 때문에 산업화가 용이한 장점을 가지고 있기도 하다. 이와 같이 ChAT 활성화 기능을 갖는 저분자성 flavonoid류는 뇌 기능향상 및 치매 예방제로 기능성 식품 및 보조요법제의 소재로 사용될 수 있다.

본 발명자들은 식품소재로 사용되는 식·약용류 식물소재의 기능성 식품으로의 이용가능성을 연구하던 중 쑥 추출물에서 높은 ChAT 활성화 기능을 확인하고 쑥 추출물로부터 활성물질을 정제함으로써 본 발명을 이루게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명의 주요 목적은 쑥 추출물을 뇌 신경세포에 존재하는 ChAT 활성화제로써의 용도로 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 쑥 추출물로부터 정제된 ChAT 활성화 flavonoid를 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 쑥 추출물로부터 상기 ChAT 활성화 flavonoid의 정제방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성

본 발명자들은 수집 종의 국내산 식·약용류를 대상으로 뇌 신경세포에 포함되어 있는 ChAT 활성화능을 탐색하던 중 쑥 추출물로부터 높은 활성을 발견하였다. 이에 상기 쑥 추출물에 포함된 활성 저분자를 분리하고자 solvent fractionation과 open column chromatography, thin layer chromatography 등을 실시한 결과 분자량 254을 갖는 저분자 flavonoid류를 HPLC를 통하여 확인하였다. 또한 *in vivo* 실험을 통하여 그 효과를 증명하였으며 *in vivo*/ *vitro* 상에서의 독성 또한 일정 양까지는 없는 것으로 나타났다.

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 쑥 추출물을 유효성분으로 함유하는 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase, ChAT) 활성화 조성물을 제공한다.

쑥(*Pueraria thunbergiana*)은 콩과에 딸린 여러해살이 덩굴나무이다. 우리나라 각지의 산 양지쪽이나 골짜기 같은데 흔히 자란다. 줄기는 길이 6~10m쯤 자라고 잎은 큼지막한 달걀 모양이며 8월에 좋은 향기가 나는 보라색 꽃이 피어 가을철에 꼬투리 열매가 익는다. 쑥 뿌리는 70%쯤이 물로 되어 있으나 그 밖에 당분, 섬유질, 단백질, 철분, 인, 비타민 등이 골고루 들어 있다. 쑥 뿌리는 감기, 머리 아픈 데, 땀이 잘 나지 않고 가슴이 답답하고 갈증이 나는 데, 당뇨병, 설사, 이질 등에 약으로 사용되어 왔으나, 뇌 신경세포의 전달물질의 합성효소인 콜린아세틸트랜스퍼라제(ChAT) 활성화 기능에 대해서는 전혀 알려져 있지 않았으며, 이것을 본 발명자들이 새로운 발견하였다.

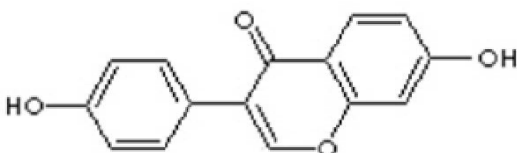
본 발명의 조성물에 있어서, 상기 쑥 추출물은 종래 천연물 추출에 널리 알려진 추출용매인 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 추출될 수 있으나, 바람직하게는 쑥의 메탄올 또는 에탄올과 같은 알코올 추출물인 것을 특징으로 한다. 여기서, 메탄올 또는 에탄올은 50%~100%로 물에 희석하여 사용할 수도 있으나, 바람직하게는 100% 메탄올 또는 에탄올로 추출하는 것이 활성성분의 용출에 유리하다. 상기 메탄올 또는 에탄올 추출물은 극성이 다른 유기용매를 이용하여 더욱 분획할 수 있으며, 각종 크로마토그래피를 이용하여 더욱 정제할 수도 있다.

본 발명의 조성물에 있어서, 상기 쑥 추출물은 활성성분으로서 저분자성 플라보노이드류인 4',7-디하이드록시이소플라본(4', 7-dihydroxyisoflavone, daidzein)을 함유하는 것을 특징으로 한다.

또한, 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 저분자성 플라보노이드류인 4',7-디하이드록시이소플라본(4', 7-dihydroxyisoflavone, daidzein)을 유효성분으로 함유하는 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase, ChAT) 활성화 조성물을 제공한다.

상기 4',7-디하이드록시이소플라본(4',7-dihydroxyisoflavone, daidzein)(C₁₅H₁₀O₄, CAS No.: 486-66-8)은 하기 화학식 1을 가지는 분자량 254.24의 백색 결정분말이다.

[화학식 1]



다이드제인 (Daidzein)은 daidzin의 genin으로서, 콩(soybeans)에 많이 함유되어 있다. 다이드제인은 호르몬-유도된 암(cancers)을 예방하는 기능을 갖는 phytoestrogen로 알려져 있다. 다이드제인은 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate에서 hydrogen peroxide의 생성과 benzo[a]pyrene의 대사 활성화를 저해한다. 그것은 고혈압과 폐경기 증후군 뿐만 아니라 알콜 중독의 치료에 유용한 것으로 알려져 있다.

또한, 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 i) 건조한 칩을 분말화 하여 메탄올 또는 에탄올로 추출하는 단계; ii) 상기 칩의 메탄올 또는 에탄올 추출물을 hexan, 클로로포름 및 에틸아세테이트를 이용하여 순차적으로 분획하는 단계; iii) 상기에서 수득한 에틸아세테이트 분획을 순차적인 1, 2차 오픈 실리카겔 칼럼(open silica gel column)을 통해서 활성 분획을 수득하는 단계; iv) 상기의 수득한 활성 분획을 TLC (thin layer chromatography)를 통해서 활성 분획을 수득하는 단계; 및 v) 상기의 수득한 활성 분획을 역상 HPLC (high pressure liquid chromatography)를 사용하여 활성 분획을 분리하는 단계를 포함하는, 칩 추출물로부터 뇌 신경세포 콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase, ChAT) 활성화 저분자성 플라보노이드류를 정제하는 방법을 제공한다.

본 발명에 있어서, 상기 칩 추출물 또는 그 활성성분은 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease)과 같은 노인성 치매의 예방 및 치료에 효과적으로 사용될 수 있다. 노인성 치매환자에 있어서 ChAT의 양과 활성이 급격히 감소되어 acetylcholine의 농도가 낮아지는데, 본 발명의 칩 추출물 또는 그 활성성분은 뇌 신경세포의 ChAT를 활성화하기 때문이다.

본 발명에 있어서, 칩 추출물에는, 추출, 분획 및 정제 처리의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그 희석액 또는 농축액, 또는 그 건조물 중 어느 하나도 포함하는 것으로 한다.

본 발명의 원료인 칩 추출물은 당업계에 알려진 통상의 방법에 의해 과립, 정제, 캡슐 또는 드링크제 등의 형태로 제제화될 수 있다. 또한, 보존이나 취급을 용이하게 하기 위하여 텍스트린, 사이클로텍스트린 등의 통상 제제화에 사용되는 캐리어, 그 밖의 임의의 조제를 부가하여도 좋다.

또한, 본 발명의 칩 추출물은, 성인 하루당 섭취량이 1~3000mg이 되도록 투여하는 것이 적당하다. 또한, 투여량은 연령, 증상 등에 따라 적당히 증감하는 것이 가능하다.

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

실시예 1: 뇌 신경세포 함유 ChAT 활성화능을 갖는 칩 추출물의 확인

칩 추출물이 뇌 신경세포 함유 ChAT 활성화능을 갖는지 여부를 확인하기 위하여, 우선 칩(0.5 kg)를 메탄올(2.5L)에 넣고 24시간씩 5회 진탕한 후 1 회 여과하여 칩 추출물을 얻었다. 이 칩 추출물을 가지고 하기와 같이 Fonnum의 방법(Fonnum F. 1975. A rapid radiochemical method for the determination of choline acetyltransferase. *J. Neurochem.* **24**: 407-409.)을 사용하여 ChAT 활성화능을 측정하였다.

Choline acetyltransferase를 생성해 내는 MC-IXC cell(human brain neuroblastoma cell)을 culture dish 에 키운 후 80%~90% confluent가 일어났을 때 cell을 Trypsin-EDTA를 처리하여 cell을 dish에서 제거한 후 cell lysis buffer (0.5% Triton X-100, 10 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, pH 7.5)를 넣고 homogenization하여 crude enzyme (choline acetyltransferase)extract를 얻는다. 이러한 crude enzyme extract(choline acetyltransferase)와 각 sample의 methanol 추출물을 substrate (50 mM K-phosphate buffer 82μl, 0.1 mM Eserine 4μl, 8 mM choline chloride 4μl, 25 M Coenzyme A[acetyl-1-14C] 10μl)와 함께 상온에서 60분 동안 반응시킨다. 5 mg/ml Sodium tetraphenylborate 을 이용하여 효소 반응을 정지시키고 acetylcholine을 추출하기 위하여 toluene과 aquasol을 1:250으로 혼합한 용액을 넣고 mixing 한 다음 3,000 rpm에서 10분 동안 centrifugation한다. 상등액 1 ml과 순수한 acetylcholine만을 추출하기 위하여 toluene과 aquasol을 1:250으로 혼합한 용액과 특급 ethanol의 혼합비가 7:3인 용액 1 ml을 scintillation vial에 넣고 liquid scintillation counter로 2분 동안 counting 한다.

$$\text{Activation (\%)} = 100 * \left[\frac{(\text{sample reaction} - \text{enzyme reaction})}{\text{enzyme reaction}} \right]$$

상기와 같이 측정된 침 methanol 추출액의 ChAT 활성화능은 1.0 mg/ml의 농도에서 34.1 %의 높은 활성을 나타내었으며 이는 낮은 정제도에서도 고활성을 갖는 것으로 보조요법제로의 사용 가능성을 제시한다.

실시에 2: 침 추출물로부터 ChAT 활성화 flavonoid류의 정제

2-1. 순차적 유기용매 분획화

침 추출물로부터 ChAT active component를 분리하기 위해, 우선 상기 실시예 1에서 얻은 침 methanol 추출물을 극성에 따라 hexane, chloroform, ethyl acetate 순으로 유기용매를 이용하여 분획하였다. 도 1은 침으로부터 본 발명의 활성물질을 획득하기 위한 유기용매를 이용한 분획의 순서도이다. Ethyl acetate layer에 있는 ChAT active component를 다음의 방법에 따라 1, 2차 silica gel column 크로마토그래피를 이용하여 분리, 정제 하였다.

2-2. 1차 Silica gel column chromatography

30.6 g의 silica gel을 2.4배의 CHCl_3 73.4 ml로 swelling 하여 $3.0 \times 40\text{cm}$ 의 column에 sample 1.7 g을 loading하였다. Chloroform 과 methanol 의 비율을 각각 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100 으로 만들어 3회 반복하여 2.3 ml/min 의 속도로 흐르게 하였다 (3 bed vol). 각각의 fraction을 ChAT activation effect를 측정하였다. 도 2는 1차 open silica-gel chromatography에 의한 본 발명의 활성성분의 분획물별 ChAT 활성화 효과를 나타낸 그래프이다. chloroform과 methanol의 비율이 100:0 내지 70:30에서 상대적으로 높은 활성을 보였으며, 특히 90:10의 2번째fraction인 분획번호 5번에서 유의적인 ChAT activation effect를 보였다.

2-3. 2차 Silica gel column chromatography

상기 유의적인 ChAT activation effect를 보인 chloroform과 methanol의 비율이 90:10의 3번째 fraction인 분획번호 5 번을 농축하여 3.7 g의 silica gel을 50배의 CHCl_3 로 swelling 하여 $1.5 \times 30\text{ cm}$ 의 column에 sample 0.7 g을 loading하였다. Chloroform 과 methanol의 비율을 각각 100:0, 96:4, 92:8, 90:10, 88:12, 85:15, 80:20, 0:100으로 만들어 3회 반복하여 2.3 ml/min 의 속도로 흐르게 하였다 (3 bed vol). 각각의 fraction을 ChAT activation effect를 측정하였다. 도 3은 2차 open silica-gel chromatography에 의한 본 발명의 활성성분의 분획물별 ChAT 활성화 효과를 나타낸 그래프이다. chloroform 과 methanol 의 비율이 90:10 내지 80:20에서 상대적으로 높은 활성을 보였으며, 특히 85:15의 1, 2, 3번째 fraction인 16, 17, 18번에서 가장 높은 ChAT activation effect (약370%)를 보였다.

2-4. Thin layer chromatography

가장 높은 ChAT activation effect (약370%)를 보인 chloroform 과 methanol 의 비율이 85:15의 1, 2, 3번째 fraction인 16, 17, 18번을 가지고 단일 물질을 분리 해내기 위하여 chloroform 과 methanol 의 비율을 85:15으로 혼합한 용매로 silica-gel Thin layer chromatography (TLC)에서 전개시켰다. 각각의 band를 긁어 methanol로 우려내어 40℃에서 evaporation을 실시 한 다음 ChAT activity를 측정하였다. 그 결과 R_f value가 0.3 내지 0.4, 특히 0.36인 band가 가장 높은 활성을 나타내었고 이를 40℃에서 evaporation을 실시하였다.

2-5. HPLC

가장 높은 activity를 나타낸 TLC 밴드로부터 active compound를 분리 해내기 위하여 HPLC assay를 실시하였다. μ -bondapakTM C_{18} column($3.9 \times 300\text{ mm}$)을 이용하여 1.0 ml/min의 속도로 methanol을 0 ~ 100%의 gradient elution을 통하여 200nm부터 800nm에서 scanning을 하였고 injection volume은 20 μl 로 하였다. 도 4는 본 발명의 최종 활성물질인 저분자 flavonoid의 HPLC (high pressure liquid chromatography)를 이용한 정제 확인을 나타낸 크로마토그램이다. 도 4에서 X축은 지연시간(min)이고 Y축은 왼쪽이 PDA detector로 측정한 absorbance 값이고 오른쪽이 methanol %이다. 지연시간이 약 39 min이고 메탄올 농도 57 내지 67%, 특히 62%에서 가장 높은 피크가 검출되었다.

2-6. 최종활성물질의 동정

최종활성물질을 확인하기 위해 도 4의 가장 높은 피크를 농축하여 Electron ionization (EI-MS) spectroscopy와 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy를 실시하였다. EI-MS spectroscopy를 위하여, HPLC에서 나온 peak을 농축하여 MeOH에 용해시키고, positive ion EI mass spectrometer (JMS AX505WA, JEOL, Japan)상에서 스펙트럼을 기록하였다. EI-MS 스펙트럼에서 피크가 관찰되었으며, 그 활성성분의 분자량은 254 m/z 로 밝혀졌다. 도 5은 본 발명의 최종 활성 물질의 EI-MS 스펙트럼이다. ^{13}C -NMR spectroscopy를 위하여, HPLC에서 나온 peak을 농축하여 MeOD (methyl-d3 alcohol-dl)에 용해시키고, 600 MHz 및 25°C에서 작동하는 high resolution NMR spectrometer (Avance-600, Bruker, German)상에서 스펙트럼을 기록하였다. 도 6a는 본 발명의 최종 활성 물질의 ^{13}C -NMR 스펙트럼이다. ^1H -NMR spectroscopy를 위하여, HPLC에서 나온 peak을 농축하여 MeOD (methyl-d3 alcohol-dl)에 용해시키고, 600 MHz 및 25°C에서 작동하는 high resolution NMR spectrometer (Avance-600, Bruker, German)상에서 스펙트럼을 기록하였다. 도 6b는 본 발명의 최종 활성 물질의 ^1H -NMR 스펙트럼이다. 상기 실험 결과 본 발명의 최종활성물질은 분자량이 254 m/z 정도의 저분자성 flavonoid류($4'$, 7 -dihydroxyisoflavone, daidzein)로 확인되었다.

실시에 3: 칩에서 분리한 ChAT 활성화 flavonoid류의 작용

ChAT 활성능을 갖는 최종물질($4'$, 7 -dihydroxyisoflavone) 함유한 칩 methanol 추출물을 가지고 mouse를 대상으로 *in vivo* behavioral test를 실시하였다. 즉, Mouse를 이용하여 기억 및 학습능력을 저해하는 약물을 투여하여 인위적으로 기억 및 학습능력 저하를 유발한 후 본 발명의 활성물질을 투여하여 그 효과를 검증하였다(Passive Avoidance Test).

ICR-male mouse와 최종선택 시료를 농도별로 variation을 두어 준비하였다. 시료는 각 group당 준비된 10마리의 mouse에 자유롭게 제공하고, ICR-male mouse는 20-24°C, 30-70%의 상대습도를 갖는 12-photoperiod chamber에서 food를 ad lib의 상태로 공급하였다. ICR-male mouse는 food와 선택시료를 약 3주간 ad lib의 상태로 공급하였다. 기억력저하 유도 약물로는 scopolamine을 intraperitoneally (IP) injection 하여 ①, ②, ③ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 behavioral test를 실시하였다. 도 7은 기억 학습능력 저해 약물 투여한 마우스에 대한 본 발명의 칩 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다. 1: 정상대조군, 2: 기억력저하 유도 약물 투여, 3: 기억력저하 유도 약물 투여 + 칩 추출물 (0.15%), 4: 기억력저하 유도 약물 투여 + 칩 추출물 (0.32%), 5: 기억력저하 유도 약물 투여 + 칩 추출물 (0.53%). 도 7로부터, 본 발명의 칩 추출물이 기억 및 학습능력의 회복 및 향상에 효과가 있음을 알 수 있다.

발명의 효과

이상 설명한 바와 같이, 본 발명은 칩 추출물로부터 분리한 뇌 신경세포 함유 ChAT 활성화 flavonoid류 및 그의 정제방법을 제공한다. 본 발명의 ChAT 활성화 flavonoid류는 유기용매 분획화, silica gel column 크로마토그래피, TLC (thin layer chromatography)를 통한 일련의 공정으로 칩 methanol추출물에서 순수 분리한다. 이렇게 분리한 ChAT 활성화 flavonoid류는 저분자성 flavonoid류로 *in vivo* 실험에서와 같이 기억 및 학습 증진 효과를 갖고 있으므로 노인성 치매나 기억력 감퇴 등에 약물로 이용할 수 있고 기능성 식품으로의 이용도 유용하다.

도면의 간단한 설명

도 1은 칩으로부터 본 발명의 활성물질을 획득하기 위한 유기용매를 이용한 분획의 순서도이다.

도 2는 1차 open silica-gel chromatography에 의한 본 발명의 활성성분의 분획물별 ChAT 활성화 효과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 2차 open silica-gel chromatography에 의한 본 발명의 활성성분의 분획물별 ChAT 활성화 효과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 최종 활성 물질인 저분자 flavonoid의 HPLC (high pressure liquid chromatography)를 이용한 정제 확인을 나타낸 크로마토그램이다.

도 5은 본 발명의 최종 활성 물질의 EI-MS 스펙트럼이다.

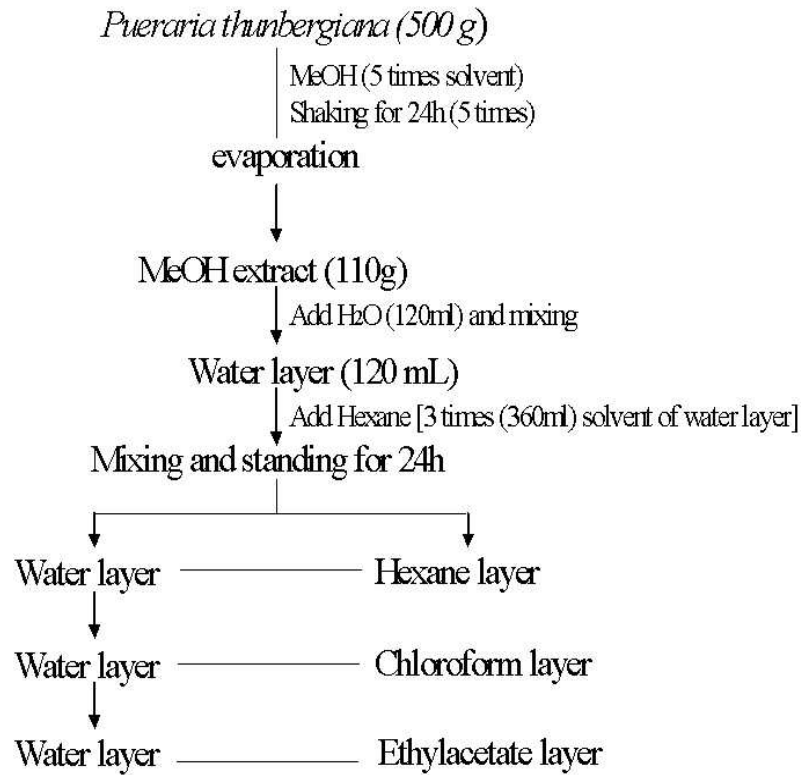
도 6a는 본 발명의 최종 활성 물질의 ^{13}C -NMR 스펙트럼이다.

도 6b는 본 발명의 최종 활성 물질의 ^1H -NMR 스펙트럼이다.

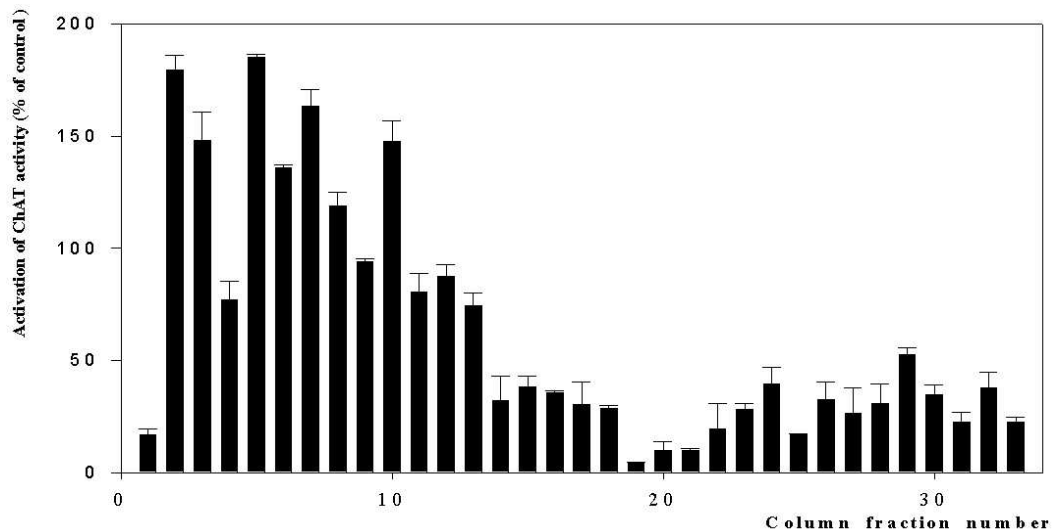
도 7은 기억 학습능력 저해 약물 투여한 마우스에 대한 본 발명의 침 추출물의 효과를 나타낸 그래프이다.

도면

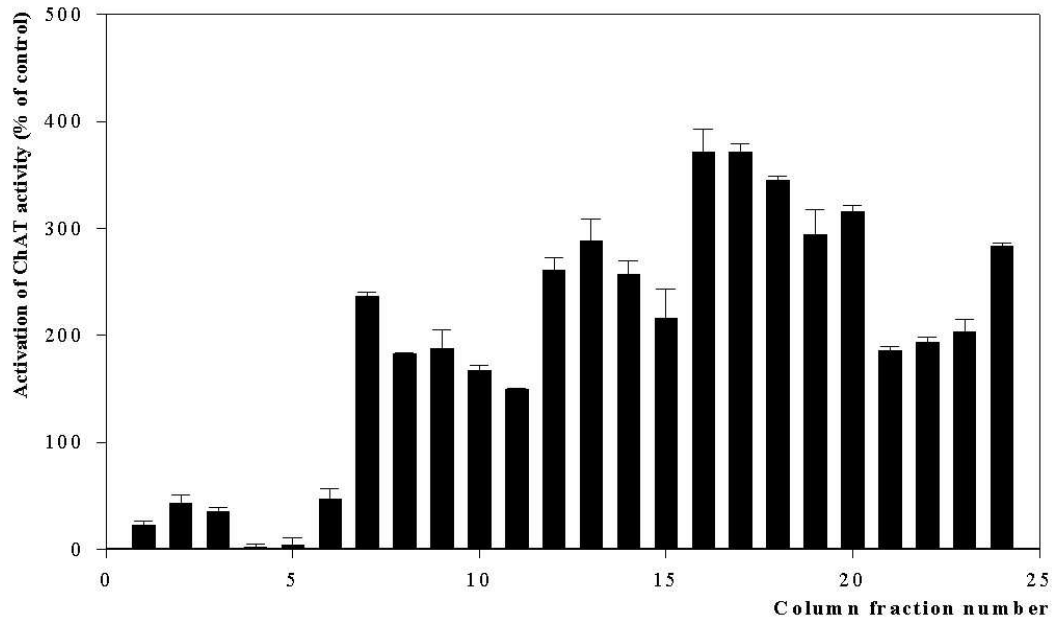
도면1



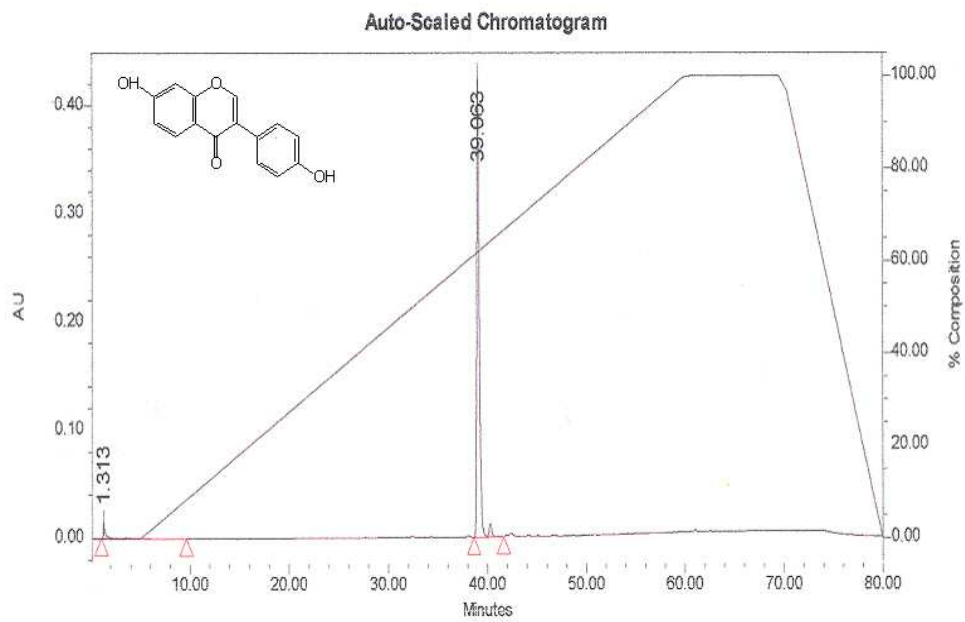
도면2



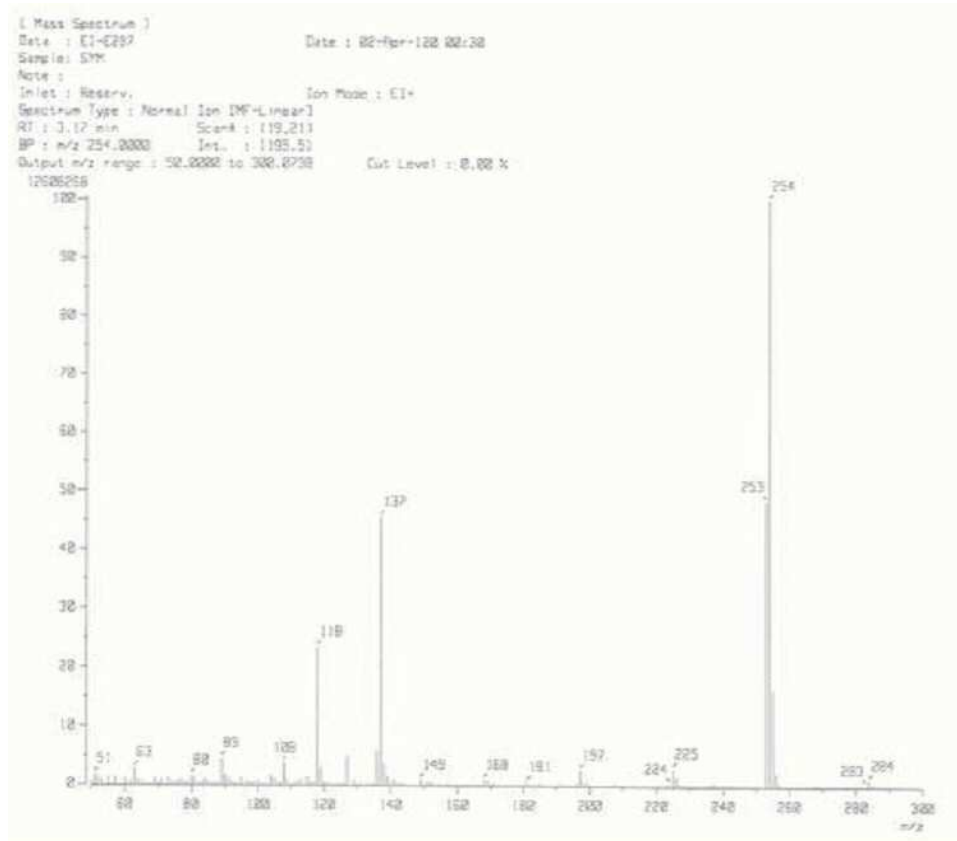
도면3



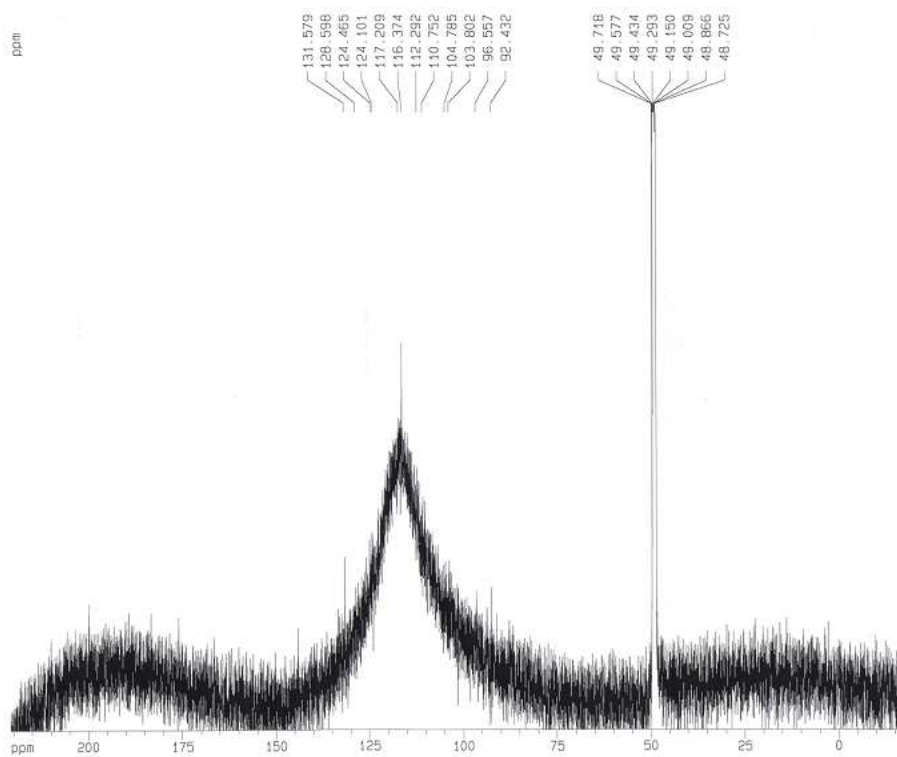
도면4



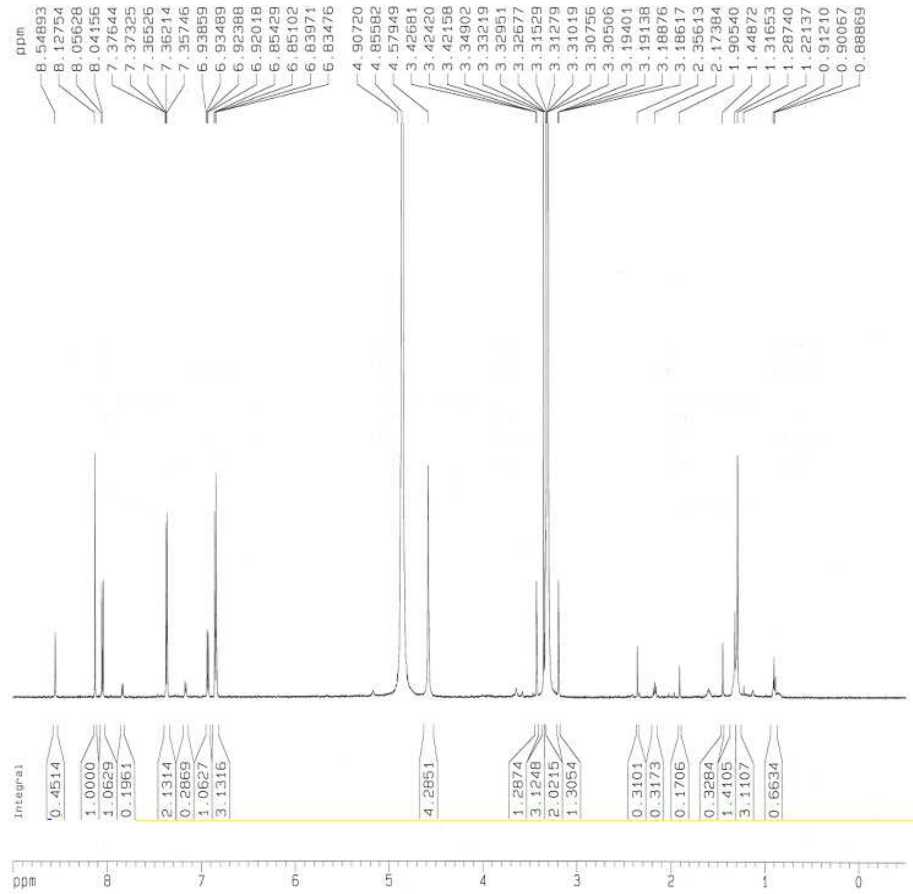
도면5



도면6a



도면6b



도면7

