(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0165175
(43) 공개일자 2023년12월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/52 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 25/16 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/52 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0164400(분할)
(22) 출원일자 2023년11월23일
심사청구일자 2023년11월23일
(62) 원출원 특허 10-2020-0138254
원출원일자 2020년10월23일
심사청구일자 2020년10월23일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
경상북도 김천시
경북 김천시 신음동 1284번지
(72) 발명자
허호진
경상남도 진주시 초장로 120, 504동 501호 (초전동, 이지더원 아파트)
김종민
경상남도 창원시 의창구 반계로 101, 104동 205호 (팔용동, 대동중앙아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 23 항

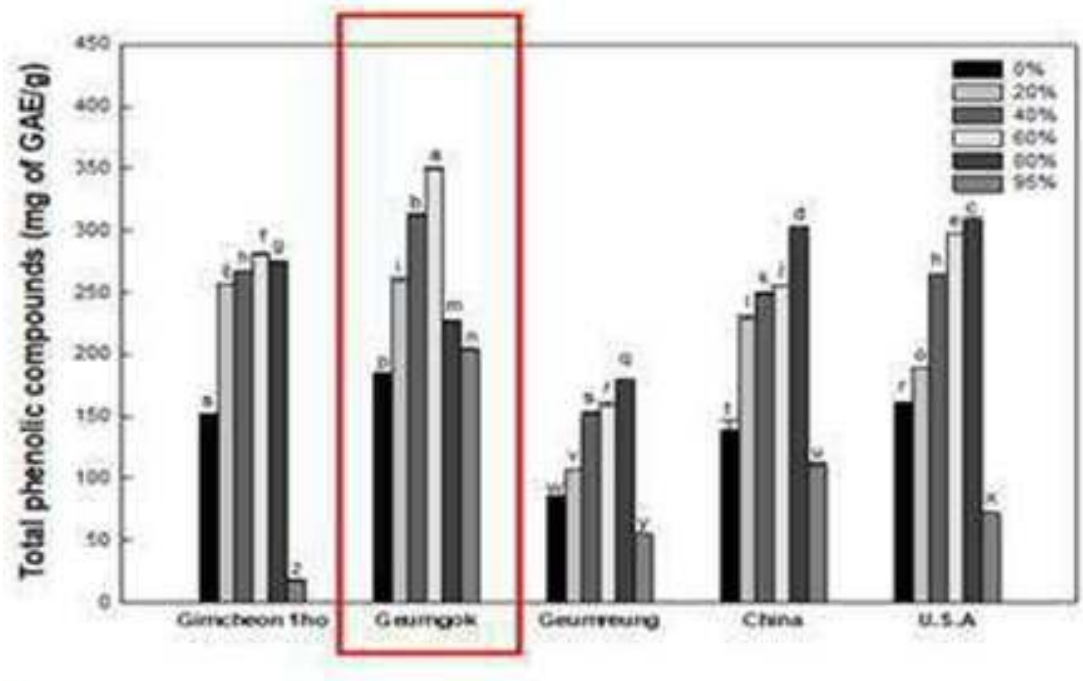
(54) 발명의 명칭 **호두 추출물을 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 호두 추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 대한민국의 호두 품종에 대하여 베타아밀로이드 투여에 의한 산화적 스트레스에 대한 마우스의 기억력 개선 및 인지기능 보호효과를 나타냄으로서 호두 유래 소재의 치료제 및 건강기능식품 개발에 대한 가능

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도1



성을 확인하였다. 본 발명에 따른 호두 추출물을 포함하는 조성물은 ABTS 라디칼, DPPH 라디칼 소거 활성, 신경세포 생존율 향상, ROS 소거 활성, 기억력 향상, 아세틸콜린(Acetylcholine) 분비 향상, 아세틸콜린에스테라아제(Acetylcholine esterase) 활성 억제, 말론알데히드(malondialdehyde) 생성 억제, SOD 함량 증가, reduced GSH 함량 증가, 혈뇌장벽(blood brain barrier) 기능 개선, 신경 염증 개선 및 신경세포 사멸 억제 효과를 가지고 있기 때문에, 본 발명의 호두 추출물을 이용하여 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61P 25/16 (2018.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A61P 39/06 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)

(72) 발명자
신태종
경상북도 김천시 혁신2로 76, 101동 1901호 (율곡동, 김천혁신도시골드클래스)
이우중
경상북도 김천시 어모면 어모문화3길 31-11

임현권
경상북도 김천시 신음새동네길 110, 103동 1002호 (신음동, 김천주공 해돋이타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20200021
과제번호	20200021
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	김천시
연구사업명	김천 호두의 효능 평가에 관한 연구용역
연구과제명	김천 호두의 효능 평가에 관한 연구용역
기 여 율	1/1
과제수행기관명	농업생명과학연구원
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.20

명 세 서

청구범위

청구항 1

호두 추출물을 유효성분으로 포함하는, H2O2 또는 Aβ로 유도된 산화스트레스; 및 신경 염증;을 원인으로 하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 호두는 금곡 품종인 것인, 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌신경 질환은 신경세포 손상으로 야기되는 치매(Dementia), 알츠하이머병(Alzheimer disease), 픽병(Pick disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis) 및 헌팅턴병(Huntington's disease) 중에서 선택되는 질환인 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 호두 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, n-헥산, 벤젠 또는 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 추출물은 호두씨의 외피 또는 과육으로부터 추출되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 H2O2로 유도된 산화스트레스 상태에서, 신경세포인 MC-ISC 세포 및 HT22 세포의 생존율을 향상시키는 것인, 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 H2O2로 유도된 산화스트레스 상태에서, 활성산소종(ROS)의 생성을 억제하는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 Aβ에 의해 유도된 ACh의 함량을 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 Aβ에 의해 감소된 occludin의 함량을 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 Aβ에 의해 증가된 TNF-α, tumor necrosis factor receptor 1(TNFR1), phosphorylated c-Jun N-terminal kinase(p-JNK), phosphorylated nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor(p-IκB), cyclooxygenase-2(COX-2), 및 interleukin 1 beta(IL-1β)의 발현을 감소시키는 것

인, 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 호두 추출물은 HHDP-glucose isomer 1, pedunculagin/casuariin isomer (bis-HHDP-glucose) 2, praecoxin A/platycariin (trigalloyl-HHOP-glucose) 2 및, ellagic acid derivative 의 증진된 함량을 갖는 것인, 약학적 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 Aβ에 의해 감소된 phosphorylated protein kinase B(p-Akt) 및 heme oxygenase-1 (HO-1)의 발현을 증가시키고; Aβ에 의해 증가된 caspase-3의 발현을 감소시키는 것인, 조성물.

청구항 12

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 인지기능을 개선하여 퇴행성 뇌신경 질환을 예방 또는 치료하는 것인, 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 약학적 조성물은 ABTS 라디칼, DPPH 라디칼 소거 활성, 말론알데히드(malondialdehyde) 생성 억제, SOD 함량 증가, reduced GSH 함량 증가, 혈뇌장벽(blood brain barrier) 기능 개선, 신경 염증 개선 및 신경세포 사멸 억제 효과를 갖는 것인, 약학적 조성물.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계;를 포함하는, 퇴행성 뇌신경 질환 치료 방법.

청구항 15

호두 추출물을 투여하는 단계;를 포함하는, H2O2로 유도된 산화스트레스 상태에서 신경세포인 MC-ISC 세포 및 HT22 세포의 생존율을 향상시키는 방법으로서, 상기 호두는 금곡 품종인 것인, 방법.

청구항 16

제 15항에 있어서,

상기 추출물은 활성산소종(ROS)의 생성을 억제하는 것인, 방법.

청구항 17

호두 추출물을 투여하는 단계;를 포함하는, Aβ로 유도된 산화스트레스 상태에서 Aβ에 의해 유도된 ACh의 함량을 감소시키는 방법으로서, 상기 호두는 금곡 품종인 것인, 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 추출물은 Aβ에 의해 감소된 occludin의 함량을 증가시키는 것인, 방법.

청구항 19

호두 추출물을 투여하는 단계;를 포함하는, Aβ를 원인으로 하여 활성이 증가된 신경 염증 관련 단백질인 TNF-α, TNFR1, p-JNK, p-IκB, COX-2, 및 IL-1β의 발현을 감소시키는 방법으로서, 상기 호두는 금곡 품종인 것인, 방법.

청구항 20

호두 추출물을 투여하는 단계;를 포함하는, Aβ를 원인으로 하여 활성이 감소된 신경세포 사멸 억제 관련 단백질인 p-Akt, caspase-3, 및 HO-1의 발현을 증가시키는 방법으로서, 상기 호두는 금곡 품종인 것인, 방법.

청구항 21

호두 추출물을 투여하는 단계;를 포함하는, 혈뇌장벽(blood brain barrier; BBB)의 기능을 개선하는 방법으로서, 상기 호두는 금곡 품종인 것인, 방법.

청구항 22

제 21항에 있어서, 상기 추출물은 Aβ를 원인으로 하여 활성이 감소된 ZO-1 및 occludin의 함량을 증가시키는 것인, 방법.

청구항 23

호두 추출물을 유효성분으로 포함하는, H2O2 또는 Aβ로 유도된 산화스트레스; 및 신경 염증;을 원인으로 하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물로서, 상기 호두는 금곡 품종인 것인, 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 호두 추출물을 포함하는 뇌신경 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인지기능 장애, 기억력 개선 및 뇌손상 보호효과를 갖는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 한국인의 기대수명은 세계은행에 의하면 2017년 기준 82.63세로 나타났으며, 통계청의 기대 수명에 의하면 2030년 기준 남성은 79.79세, 여성은 86.27세로 점차 증가할 것으로 추정된다.

[0003] 통계청의 기대 수명에 대한 예측은 지난 2000년 발표에서 '2010년 78.8세, 2020년 80.7세, 2030년 81.5세로 늘어날 것'이라고 예측하였으나. 이미 2008년에 기대수명이 '80세'를 넘어 선 것으로 보고되어 상향된 자료를 제시하였다.

[0004] 뿐만 아니라 출산율의 감소와 사망률의 하락에 따라 80세 이상의 인구 및 90세 이상의 인구는 지속적으로 증가할 것으로 예측된다.

[0005] 이러한 고령화는 다양한 질병의 발생이 증가되고 있는데, 특히 신경퇴행성 질환인 치매 인구의 증가를 증가시키고 있으며, 60세 이상의 노년층들을 대상으로 진행한 설문조사 결과에서 가장 두려운 질병으로 치매를 꼽았다.

[0006] 중앙치매센터에 따르면 2015년 국내 치매환자는 약 65만명으로 65세 이상의 노년층의 10%를 차지하는 것으로 나타났으며, 2030년에는 127만명에 육박할 것으로 예측하였다.

[0007] 국내뿐만 아니라 세계보건기구(WHO) 보고에 의하면 현재 전 세계적으로 약 5,000만 명의 인구가 치매를 앓고 있으며 매년 1,000만 명씩 증가해 2030년에는 8,200만 명에 도달할 것으로 전망하였다.

[0008] 이에 보건복지부와 과학기술정보통신부가 공동으로 '2019년도 제2차 국가치매관리위원회'에서 2028년까지 1,987억 원을 투입하여 '치매극복연구개발사업'에 착수하였으며, 정부는 2020년 '치매안심센터'를 설립하는 법적 근거를 마련하기 위한 '치매관리법 일부개정법률안'을 5월 통과시켰다.

[0009] 이러한 치매 환자의 치료에 대한 치료제가 부재중이며, 현재 의학기술로는 완치가 어려운 질병으로, 사회적인 비용에 대한 부양자의 부담도 증가하고 있는 실정이다.

[0010] 한국보건산업진흥원에 따르면 '지난 1997년부터 진행된 수많은 치료제가 개발에 실패했다'고 전했으며, '국내에서도 치매치료제로 개발 또는 연구 중인 물질이 아주 많이 보고되고 있지만 신약으로 개발되는 물질은

전무하다'고 밝혔다.

[0011] 이러한 치매는 알츠하이머병과 혈관성 치매, 전두 측두엽 장애와 다양한 유형이 섞여 있는 혼합형 치매 등이 있으며, 이들 치매의 원인은 아직 명확하게 밝혀지지 않은 상태이다.

[0012] 이들 치매 질환 중 알츠하이머병은 가장 잘 알려진 흔한 병으로 뇌 신경세포가 다양한 원인에 의해 손상되어 기억력 감퇴와 인지기능 장애가 나타나는 퇴행성 뇌질환이다.

[0013] 다양한 연구를 통해 알츠하이머병의 원인 물질로 베타아밀로이드(Amlyoid beta)와 타우(tau) 단백질, 다양한 중금속의 축적이 주원인으로 보고되고 있으며, 베타아밀로이드의 독성에 대해서 가장 연구가 활발히 일어났다.

[0014] 2019년 2월 다국적 제약사 머크는 치매 치료제 후보물질 베루베세스타트의 임상 3을 진행하였으나, 치매 환자의 베타아밀로이드를 최대 90%까지 감소시켰지만, 저하된 인지기능을 개선시키는 효과는 없어 개발을 중단하였다.

[0015] 또한 일라이일리도 2016년 11월 솔라네주맙도 뇌 영상을 통해 베타아밀로이드의 소거를 확인했지만 인지기능을 회복시키지 못하여 개발을 중단하였다.

[0016] 베타아밀로이드를 표적하여 치료제를 개발하던 수많은 치료제의 개발이 잇따라 실패하였다.

[0017] 또한 알츠하이머병은 혈뇌장벽(Blood-Brain Barrier, BBB)의 기능의 저하와도 연관이 있는데, 혈뇌장벽은 뇌 조직에서 뇌 척수액과 혈액을 분리하여 혈액 내 불필요한 물질을 뇌 조직으로 통과하지 못하게 하는 장벽으로 베타아밀로이드 축적으로부터 손상 받기 쉽다. 혈뇌장벽의 손상은 신경염증을 초래하여 뇌 신경세포의 사멸을 초래하며 이는 결국 알츠하이머병의 진행을 촉진시키게 된다.

[0018] 미국 서던 캘리포니아대학 의대 신경유전자 연구소(Neurogenetic Institute)에 의하면 알츠하이머병의 초기 신호는 혈뇌장벽 유출이라고 보고하였으며, 161명의 노인을 대상으로 실험을 진행한 결과에서 인지기능 저하와 혈뇌장벽 누출이 상호간의 연관이 있는 것으로 발표하였다(Nature Reviews Neurology volume 14, pages133-150(2018)).

[0019] 이러한 알츠하이머병은 국민의 건강과 생명에 큰 위협을 주며, 의료비지출에 큰 부담을 주어 사회적, 경제적으로 큰 문제점을 야기한다.

[0020] 한편, 사람의 뇌 조직은 그 기능 유지를 위해 다른 조직에 비해 불포화지방산의 함량이 높으며, 항산화제의 함량이 낮기 때문에 다양한 스트레스에 대해서 매우 취약한 구조를 가지고 있으며, 이러한 스트레스에 의해 단백질 변성 및 노화가 일어나 신경세포의 사멸이 일어나기 쉬운 구조를 가지고 있다.

[0021] 이에 다양한 전문가들은 이러한 알츠하이머병과 같은 치매가 발병하기 전 질병 예방에 도움이 되는 기능성 소재가 함유되어 있는 식품을 꾸준히 섭취하는 것이 기억력 개선에 도움을 줄 수 있다고 강조한다.

[0022] 특히, 이러한 산화적 스트레스는 천연소재의 섭취로부터 충분히 제거될 수 있으며, 비타민 E. 탄닌, 플라보노이드 화합물 등과 같은 물질들이 다양한 연구를 통해 동물실험에서 인지 및 기억능력의 개선을 나타낸다고 보고되었다.

[0023] 결국 생물학적인 안전성이 입증되고 우수한 활성을 가지는 천연 생물자원으로부터 퇴행성 뇌신경 질환에 대한 예방 및 개선 효과를 나타낼 수 있는 천연 소재에 대한 수요가 지속적으로 증가하고 있는 실정이다.

[0024] 호두(Walnut, Juglans regia L.)는 전 세계에 널리 분포하는 천연소재로서 호두의 열매에는 불포화 지방산 omega-3인 알파 리놀레인산(alpha-linoleic acid, ALA)가 풍부하다고 보고었으며, vitamin B1, B2 등이 풍부하다고 알려져 있다.

[0025] 호두 효능 중 다양한 지방산과 비타민E는 우수한 항산화 활성을 가지고 있어 피부 미백에 도움을 준다고 보고되고 있으며, 비만 및 당뇨에 대한 개선 효과 또한 뛰어나다.

[0026] 또한, 과피, 껍질, 알맹이, 나무껍질 및 잎에 각각 다양한 생리활성 물질이 존재하며 항균, 항산화 및 항암 활성을 나타낸다.

[0027] 최근 산림청이 집계한 견과류 수입 통계에 따르면 2016년 기준으로 호두 수입량 14,042 ton으로 5년 전인 2011년 9431 ton에 비해 48.9% 늘었으며, 같은 기간 아몬드는 50.7% 늘어난 23,330 ton이 수입되었고 캐슈넛·피스타치오도 39.1%와 83.4% 늘어난 1,856 ton, 508 ton이 수입되었다.

[0028] 반면, 한·미 자유무역협정 체결 이후 미국 캘리포니아산 호두 수입이 급증하면서 국내선 호두의 가격 급락을

보였다.

[0029] '2016년 산림청 임산물 생산조사'에 따르면 국내산 호두의 총 생산량의 증가는 거의 없었고, 생산액은 2012년 235억 원에서 2016년 167억 원으로 감소되었다.

[0030] 따라서 본 발명자들은 국내산 호두의 경쟁력을 확인하고자, 국내산 호두 품종 3종(김천1호(Gimcheon 1ho), 금곡(Geugok), 금릉(Geumreung))과 수입산 품종 2종(중국산 및 미국산)을 이용하여 품종 간 항산화 실험과 영양학적 대사체 비교 분석을 진행하였고, 활성이 가장 우수한 금곡(Geumgok) 품종이, 베타아밀로이드의 투입을 통해 타나나는 기억력 감퇴와 인지기능 장애에 대한 보호효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0031] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2015-0035141호

(특허문헌 0002) 미국 공개특허 2016/0067295호

비특허문헌

[0032] (비특허문헌 0001) Nature Reviews Neurology volume 14, pages133-150(2018)

(비특허문헌 0002) Neurochem Res (2012) 37:1829-1842

발명의 내용

해결하려는 과제

[0033] 따라서, 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 안출된 본 발명의 목적은, 퇴행성 뇌신경 질환 치료제로서, 호두 추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0034] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

[0035] 또한, 본 발명의 다른 목적은 호두 추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0036] 이상에서의 본 발명에서 해결하고자 하는 다양한 과제들은 이에 한정하는 것이 아니라, 후술할 실시예 및 청구범위에 기재된 사항을 통하여 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 분명하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0037] 전술한 목적을 달성하기 위해 본 발명에 따르면, 호두 추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0038] 여기서 퇴행성 뇌신경 질환은 상기 퇴행성 뇌신경 질환은 신경세포 손상으로 야기되는 치매(Dementia), 알츠하이머병(Alzheimer disease), 픽병(Pick disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis) 및 헌팅턴병(Huntington's disease)일 수 있다.

[0039] 여기서, 상기 호두 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 에틸아세테이트, n-헥산, 벤젠 또는 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출되는 것일 수 있다.

[0040] 또한, 상기 호두 추출물은 호두씨의 외피 또는 과육으로부터 추출될 수 있다.

[0041] 또한, 상기 호두는 김천1호(Gimcheon 1ho), 금곡(Geugok), 금릉(Geumreung) 으로 이루어진 품종 중에서 선택되는 것 일 수 있다.

[0042] 또한, 본 발명의 호두 추출물은 ABTS 라디칼, DPPH 라디칼 소거 활성, 신경세포 생존율 향상, ROS 소거 활성, 기억력 향상, 아세틸콜린(Acetylcholine) 분비 향상, 아세틸콜린에스테라아제(Acetylcholine esterase) 활성 억제, 말론알데히드(malondialdehyde) 생성 억제, SOD 함량 증가, reduced GSH 함량 증가, 혈뇌장벽(blood brain barrier) 기능 개선, 신경 염증 개선 및 신경세포 사멸 억제 효과를 가질 수 있다.

[0043] 또한, 호두 추출물은 HHDP-glucose isomer 1, pedunculagin/casuariin isomer (bis-HHDP-glucose) 2, praecoxin A/platycariin (trigalloyl-HHOP-glucose) 2 및, ellagic acid derivative 의 증진된 함량을 갖는다.

[0044] 한편, 본 발명의 일실시예에서 상기 약학적 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0045] 또한, 호두 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌행성 뇌신경 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0046] 전술한 바와 같은 본 발명에 따르면, 베타아밀로이드 투여에 의한 산화적 스트레스에 대한 마우스의 기억력 개선 및 인지기능 보호효과를 나타냄으로서 호두 유래 소재의 치료제 및 건강기능식품 개발에 대한 가능성을 확인하였다.

[0047] 본 발명에 따른 호두 추출물을 포함하는 조성물은 ABTS 라디칼, DPPH 라디칼 소거 활성, 신경세포 생존율 향상, ROS 소거 활성, 기억력 향상, 아세틸콜린(Acetylcholine) 분비 향상, 아세틸콜린에스테라아제(Acetylcholine esterase) 활성 억제, 말론알데히드(malondialdehyde) 생성 억제, SOD 함량 증가, reduced GSH 함량 증가, 혈뇌장벽(blood brain barrier) 기능 개선, 신경 염증 개선 및 신경세포 사멸 억제 효과를 가지고 있기 때문에, 본 발명의 호두 추출물을 이용하여 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[0048] 이상에서의 본 발명에 따른 효과는 상기에 한정되는 것은 아니며, 기타 본 발명의 효과들은 후술할 실시예 및 청구범위에 기재된 사항을 통하여 본 발명이 속하는 분야의 통상의 지식을 가진 자에 의하여 분명하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 5 가지 품종의 *Juglans regia L.* 호두 에탄올 추출물의 총 페놀 화합물을 나타낸 것이다.

도 2는 5 가지 품종의 *Juglans regia L.* 호두 에탄올 추출물의 총 플라보노이드 화합물을 나타낸 것이다.

도 3은 5 가지 품종의 *Juglans regia L.* 호두 에탄올 추출물의 ABTS 라디칼 소거 활성을 나타낸 것이다.

도 4는 5 가지 품종의 *Juglans regia L.* 호두 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성을 나타낸 것이다.

도 5는 5 가지 품종의 *Juglans regia L.* 호두 에탄올 추출물의 철 환원 / 항산화력 (FRAP)을 나타낸 것이다.

도 6은 5 가지 품종의 *Juglans regia L.* 호두의 크로마토 그램 (A) 및 히트 맵 (B) 비교 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 MC-IXC 세포 (A) 및 HT22 세포 (B)의 5 가지 품종 Juglans regia L. 호두 에탄올 추출물의 신경 세포 생존율을 나타낸 것이다.

도 8은 MC-IXC 세포 (A) 및 HT22 세포 (B)의 5 가지 품종 Juglans regia L. 호두 에탄올 추출물의 ROS 생성을 나타낸 것이다.

도 9는 Aβ 유도 마우스에서 Y- 미로 테스트에 대한 호두 금곡의 보호 효과를 나타낸 것이다. (A) 자발적 교대 행동; (B) 팔 항목의 수; (C) 3D 이동 경로이다. 표시된 결과는 평균 ± SD (n = 5)이다. PC : Angelica gigas (참 당귀; 10 mg / kg B.W.); GG : 호두 금곡 60 % 에탄올 추출물.

도 10은 Aβ 유도 생쥐에서 수동 회피 테스트에 대한 호두 금곡의 보호 효과를 나타낸 것이다. (A) 습관화 중 지연 시간; (B) 단계별 대기 시간이다. PC : Angelica gigas (참 당귀; 10 mg / kg B.W.); GG : 호두 금곡 60 % 에탄올 추출물.

도 11은 호두 금곡이 Aβ 유도 마우스에서 Morris water maze test에 미치는 보호 효과를 나타낸 것이다. (A) 훈련 시험에서 탈출 지연; (B) 프로브의 각 그룹에 대한 프로브 시험 (C) 경로 추적에서 W 영역의 머무름 시간을 나타낸다. PC : Angelica gigas (참 당귀; 10 mg / kg B.W.); GG : 호두 금곡 60 % 에탄올 추출물.

도 12는 Aβ 유도 생쥐에 대한 호두 금곡의 보호 효과를 나타낸 것이다. (A) ACh 수준; (B) AChE 활동; (C) AChE를 표시한 것이다. PC : Angelica gigas (참 당귀; 10 mg / kg B.W.); GG : 호두 금곡 60 % 에탄올 추출물.

도 13은 Aβ 유도 마우스 뇌에서 MDA 함량에 대한 금곡의 보호 효과를 나타낸 것이다. PC : Angelica gigas (참 당귀; 10 mg / kg B.W.); GG : 호두 금곡 60 % 에탄올 추출물.

그림 14. Aβ 유도 마우스 뇌에서 SOD 함량에 대한 금곡의 보호 효과를 나타낸 것이다. PC : Angelica gigas (참 당귀; 10 mg / kg B.W.); GG : 호두 금곡 60 % 에탄올 추출물.

도 15는 Aβ 유도 마우스 뇌에서 GSH 감소에 대한 금곡의 보호 효과를 나타낸 것이다. PC : Angelica gigas (참 당귀; 10 mg / kg B.W.); GG : 호두 금곡 60 % 에탄올 추출물.

도 16은. Aβ 유도 혈액 뇌 장벽 (BBB) 기능 장애에 대한 호두 (*Juglans regia L.*) 추출물의 보호 효과를 나타낸 것이다. (A) 단백질 발현 수준; (B) 마우스 뇌 조직에서 총 단백질 및 ZO-1 (C)의 발현 및 폐색 (D)에 대한 대표적인 웨스턴 블롯 결과이다.

도 17은 호두 (*Juglans regia L.*) 추출물이 Aβ 유발 신경 염증에 미치는 보호 효과를 나타낸 것이다. 마우스 뇌 조직에서. (A) 단백질 발현 수준; (B) TNF-α (B), TNFR1 (C), p-JNK (D), p-IκB (E), COX-2 (F) 및 IL-1β (G)의 총 단백질 및 발현에 대한 대표적인 웨스턴 블롯 결과이다.

도 18은. Aβ- 유도 Aβ 관련 Akt 단백질 발현 변화에 대한 호두 (*Juglans regia L.*) 추출물의 보호 효과를 나타낸 것이다. (A) 단백질 발현 수준; (B) 마우스 뇌 조직에서 총 단백질 및 p-Akt (B), caspase-3 (C) 및 HO-1 (D)의 발현에 대한 대표적인 웨스턴 블롯 결과이다.

도 19는 음이온 모드에서 Q-TOF UPLC / MS 크로마토그래피 스펙트럼 분석결과를 나타낸 것이다.

도 20은 갈릭산 표준 검량선은 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세하게 설명하도록 한다.

[0051] 본 발명은 호두 추출물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0052] 본 발명에서 호두(Walnut, Juglans regia L.)는 전 세계에 널리 분포하는 천연소재로서 호두의 열매에는 불포화 지방산 omega-3인 알파 리놀레인산(alpha-linoleic acid, ALA)가 풍부하다고 보고었으며, vitamin B1, B2 등이 풍부하다고 알려져 있다. 호두 효능 중 다양한 지방산과 비타민E는 우수한 항산화 활성을 가지고 있어 피부 미백에 도움을 준다고 보고되고 있으며, 비만 및 당뇨에 대한 개선 효과도 보고되고 있다. 또한 호두의 과피, 껍질, 알맹이, 나무껍질 및 잎에 각각 다양한 생리활성 물질이 존재하며 항균, 항산화 및 항암 활성을 나타낸다.

[0053] 본 발명에서 호두는 대한민국 품종으로서, 김천1호(Gimcheon 1ho), 금곡(Geugok), 금릉(Geumreung) 중에 하나를 이용할 수 있으며, 바람직하게는 금곡(Geugok) 품종일 수 있다. 본 발명에서 금곡(Geugok) 품종 호두의 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료 가능성을 확인하였다.

[0054] 본 발명에서 호두를 이용하는 방법은 특별히 한정되는 것은 아니나, 건조 후 분쇄한 분말을 이용하거나, 보다 바람직하게는 추출물의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명에서는 호두 추출물의 형태로 약학적 조성물 또는 식품 조성물에 포함될 수 있다.

[0055] 본 발명에서 사용되는 용어 "추출물"은 호두의 추출 처리에 의하여 얻어지는 추출액, 상기 추출액의 희석액이나 농축액, 상기 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 상기 추출액의 조정제물이나 정제물, 또는 이들의 혼합물 등, 추출액 자체 및 추출액을 이용하여 형성 가능한 모든 제형의 추출물을 포함한다.

[0056] 본 발명에서 호두 추출물은 호두의 천연, 잡종 또는 변종 식물의 다양한 기호두로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 호두의 열매 중에 호두 씨 내부의 과육 부분으로부터 추출이 가능하다. 본 발명에서는 바람직하게는 호두의 씨앗의 내부 과육을 사용할 수 있다.

[0057] 본 발명의 상기 호두 추출물의 추출하는 방법은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술분야에서 통상적으로 사용하는 방법에 따라 추출할 수 있다. 본 발명에서 사용될 수 있는 추출 방법의 비제한적인 예로는, 열수 추출법,

초음파 추출벌, 여과법, 환류 추출법, 침출법 등을 들 수 있으며, 이들은 단독으로 수행되거나 2 종 이상의 방법을 병용하여 수행될 수 있고, 바람직하게는 냉침 환류법을 이용하여 수행할 수 있다.

[0058] 본 발명의 상기 호두를 추출하는 데에 사용하는 추출 용매의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 공지된 임의의 용매를 사용할 수 있다. 상기 추출 용매의 비 제한적인 예로는 물, 증류수, 에탄올, 메탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 벤젠, 클로로포름, 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, n-헥산, 염산, 초산, 포름산, 디에틸에테르 및 사이클로헥산으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 용매 등을 들 수 있으며, 알코올을 용매로 사용하는 경우에는 바람직하게는 탄소수 1 내지 4의 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올)을 사용할 수 있다. 본 발명에서 상기 호두의 추출 용매로서 바람직하게는 물, 에탄올, 에틸아세테이트, n-헥산, 벤젠 또는 이의 혼합물을 사용할 수 있고, 더욱 바람직하게는 에탄올을 사용할 수 있다.

[0059] 본 발명에서 에탄올은 20, 40, 60, 80 및 95% 농도의 에탄올 또는 주정을 이용할 수 있고, 바람직하게는 40 또는 60% 에탄올일 수 있고, 더욱 바람직하게는 60% 농도의 에탄올일 수 있다.

[0060] 본 명세서에서 사용된 용어 "치료"는 유익하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 접근법으로서, 본 발명의 목적을 위해 유익하거나 바람직한 임상적 결과를 감지 가능하거나 가능하지 않거나를 불문하고, 또한 부분적이든 전체적이든 상관없이 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 더 나빠지지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 속도감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감을 포함한다. 또 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 상기 약학 조성물을 이용하여 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명은 치료법적 치료 및 예방적인 차원의 것들 모두를 가리키며, 치료할 필요가 있는 것들은 이미 질환을 가지고 있는 상태뿐만 아니라 질환이 예방되어야 할 상태를 포함한다. 또한 본 발명의 약학 조성물을 개체에 투여하여 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0061] 본 발명에서 상기 호두 추출물을 포함하는 조성물은 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 또는 치료용 일 수 있다.

[0062] 본 발명에서 퇴행성 뇌신경 질환은 신경세포의 손상으로 야기되는 치매(Dementia), 알츠하이머병(Alzheimer disease), 픽병(Pick disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 루게릭병(amyotrophic lateral sclerosis) 및 헌팅턴병(Huntington's disease) 일 수 있으며, 바람직하게는 기억력 개선 및 인지기능 개선과 관련한 치매 또는 알츠하이머 병일 수 있다.

[0063] 본 발명에서는 신경세포 실험 및 동물실험에서 기억력 개선 및 인지기능 개선 효과를 확인하였으며, 또한, ABTS 라디칼, DPPH 라디칼 소거 활성, 신경세포 생존율 향상, ROS 소거 활성, 아세틸콜린(Acetylcholine) 분비 향상, 아세틸콜린에스테라아제(Acetylcholine esterase) 활성 억제, 말론알데히드(malondialdehyde) 생성 억제, SOD 함량 증가, reduced GSH 함량 증가, 혈뇌장벽(blood brain barrier) 기능 개선, 신경 염증 개선 및 신경세포 사멸 억제 효과를 확인하였다.

[0064] 본 발명의 약학 조성물은, 호두 추출물을 유효성분으로 단독으로 포함할 수도 있으나, 이외 제형 및 사용 목적에 따라 약제학적으로 허용된 담체, 부형제, 희석제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0065] 또한, 본 발명의 약학적 조성물의 경우, 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 등을 더 포함할 수 있으며, 비경구, 경구 모두 사용할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당 되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포

함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 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.

[0066] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.

[0067] 본 발명은 약학 조성물은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학 조성물은 1~10,000㎎/㎏/day, 바람직하게는 1~600㎎/㎏/day의 양으로 투여할 수 있으며, 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회에 나누어 투여할 수도 있다.

[0068] 본 발명에 따른 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 및 치료용 조성물의 투여량은, 투여방법, 복용자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 일예로, 본 발명의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 호두 추출물을, 0.0001 mg/kg 내지 1,000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.1 mg/kg 내지 800 mg/kg일 수 있고, 보다 바람직하게는 10 mg/kg 내지 500 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0069] 또한, 본 발명의 호두 추출물은 조성물 중 0.001 내지 99%의 유효 농도로 조성물 내에 포함될 수 있으며, 바람직하게는 0.001 내지 90%로 포함되는 것이 바람직하다. 구체적으로 상기 호두 추출물은 조성물 중 1 ㎍/mL 이상, 바람직하게는 1 내지 1000 ㎍/mL, 더욱 바람직하게는 1 내지 500 ㎍/mL 범위로 함유되는 것이 세포독성의 최소화, 예방 및 치료 측면에서 좋다.

[0070] 본 발명의 약학 조성물은 개체에게 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 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0071] 또한 본 발명의 조성물은 퇴행성 뇌신경 질환 또는 합병증의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 또는 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0072] 또한, 본 발명의 일실시예에서 상기 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환 치료 방법을 제공한다. 여기서 상기 약학적 조성물은 인간을 제외하여 투여될 수도 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0073] 본 발명에서, 개체는 퇴행성 뇌신경 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0074] 본 발명의 상기 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 퇴행성 뇌신경 질환 이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 투여하는 방법은 상기에 전술한 바와 같다.

[0076] 또한 본 발명은 호두 추출물을 포함하는 퇴행성 뇌신경 질환의 예방 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0077] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태의 식품에 대한 조성물을 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다. 예를 들면, 건강식품으로는 호두 추출물이 함유된 껌, 비타민 복합체, 차, 주스 및 드링크 형태로 제조 할 수 있으며, 호두 추출물을 유효성분으로 하는 식품 조성물을 과립화, 캡슐화 또는 분말화하여 섭취할 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양

소 및 조미제를 포함할 수 있다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 호두 추출물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함 시킬 수 있고, 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강음료 조성물 100ml 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 구체적으로 약 0.02 ~ 0.03 g이 될 수 있다.

[0078] 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(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 과일쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 추출물을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0080] 이하, 본 발명의 실시예를 첨부된 도면을 참고하여 보다 상세하게 설명하도록 한다. 그러나, 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐, 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아닐 것이다.

[0082] <실시예 1> 재료 및 방법

[0083] 1-1 재료 준비

[0084] 본 발명에 사용된 호두(Juglans sinensis)는 각각 김천에서 재배되는 품종으로서 김천1호(Gimcheon 1ho), 금곡(Geugok), 금릉(Geumreung) 품종을 이용하여 실험을 진행하였으며, 수입산 품종으로는 중국산(Yantai, China)과 미국산(linden, CA, USA)을 각각 구입하여 실험에 사용하고, 구입한 시료는 -20℃에서 냉동 보관하여 사용하였다.

[0086] 1-2 추출물의 제조

[0087] 항산화 활성 및 신경세포 보호효과를 평가하기 위해서 시료를 50배의 0, 20, 40, 60, 80 및 95% 에탄올 용매를 이용하여 40℃에서 환류 냉각 하에 2시간 동안 추출하였다. 추출물을 No. 2 여과지(Whatman PLC, Kent, UK)로 여과하여 진공농축기(N-N series, Eyela Co., Tokyo, Japan)로 농축하였고, 이를 동결건조기(Operon, Gimpo, Korea)를 이용하여 건조시킨 후 실험에 사용하였다.

[0089] <실시예 2> 품종 간 항산화 활성 비교

[0090] 2-1 총 폴리페놀성 화합물 함량 측정

[0091] 시료 용액 1 mL를 증류수 9 mL에 혼합한 후 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 mL를 넣고 혼합하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 7% Na_2CO_3 용액 10 mL를 반응용액에 넣고, 이를 다시 혼합한 후 증류수 4 mL를 첨가하였다. 이 혼합용액을 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 시료와 같은 방법으로 작성된 검량선으로 총 페놀성 화합물 함량을 계산하였고, 이를 gallic acid equivalents (mg GAE/g extract)로 나타내었다.

[0093] 2-2 총 플라보노이드 화합물 함량 측정

[0094] 시료 1 mL에 diethylene glycol 10 mL과 sodium hydroxide 1mL을 혼합하여 30℃에서 1시간 동안 반응시키고 분광광도계(spectrophotometer, Shimadzu UV-1601, Tokyo, Japan)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 rutin를 이용하여 시료와 같은 방법으로 작성된 검량선으로 총 플라보노이드 함량을 계산하였고, 이를 rutin equivalents (mg RE/g extract)로 나타내었다.

[0096] 2-3 ABTS 라디칼 소거활성

[0097] 2.5 mM ABTS[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]와 1.0 mM AAPH[2,2'-azobis-(2-

amidinopropane) HCl]는 150 mM NaCl이 포함된 100 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 혼합한 후 70℃ water bath에서 30분 동안 반응하여 실온에서 10분 동안 냉각하였다. 이를 syringe filter를 이용하여 여과시켜 24시간 동안 4℃ 에서 냉장보관 후 사용하였다. ABTS 라디칼 용액은 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 나오도록 증류수로 희석해 사용하였다. 시료용액 20 μL에 흡광도 값이 조정된 ABTS 라디칼 용액 980 μL를 혼합하여 37° C에서 10분간 반응시키고, 반응용액을 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0099] 2-4 DPPH 라디칼 소거활성

[0100] DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거 활성은 80% 메탄올에 용해한 0.1 mM DPPH를 517 nm에서 흡광도 값이 1.00±0.02가 나오도록 80% 메탄올에 희석해 사용하였다. 시료용액 0.05 mL에 흡광도 값을 맞춘 DPPH 용액 1.45 mL를 첨가하여 실온에서 30분 방치한 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0102] 2-5 FRAP

[0103] TPTZ 용액[300 mM sodium acetate buffer(pH 3.6), 10 mM 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine(TPTZ) in 40 mM HCl 및 20 mM FeCl]을 제조하여 FRAP 실험에 사용하였다. Sodium acetate buffer, TPTZ 용액 및 $FeCl_3$을 혼합하여 37℃에서 15분간 반응시킨 FRAP 반응액을 준비하였다. FRAP 반응액 1.5 mL에 추출물 50 μL를 반응시켜 실온 에서 30분간 방치한 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0105] <실시예3> 품종 간 영양학적 대사체 비교 분석

[0106] 대사체 물질 비교 분석은 시료 0.5 g에 internal standard가 포함된 80% 메탄올을 첨가하여 균질화 시켜준 뒤, 이를 13,000 x g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이를 동일 volume의 n-hexane을 넣어 다시 원심분리하여 물층을 얻은 뒤, 0.45 μm syringe filter를 이용하여 여과한 후, UPLC Q-TOF/MS^2(Waters Corp., Milford, MA, USA)로 분석하였다.

[0108] <실시예 4> 신경세포에 대한 세포 보호효과 검증

[0109] 4-1 신경세포 생존율

[0110] 신경세포에 대한 보호 효과는 MTT (3-(4,5-dimethyl- thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay로 측정한다. 시료를 신경세포에 처리하여 24시간동안 preincubation 하고, 그 후 toxicant로 일정 시간 배양한다. 이 상태의 배양된 신경세포에 MTT stock solution (10 μL/well)을 처리하여 37℃에서 3시간 incubation 시킨 후, MTT solubilization solution (10% Triton X-100 in acidic isopropanol) 100 μL를 첨가하여 반응을 종결시키며, 마지막으로 흡광도는 microplate reader (680, Bio-rad, Japan)를 활용하여 570 nm (determination)와 630 nm (reference)에서 측정한다.

[0112] 4-2 신경세포 생존율

[0113] 세포 내 oxidative stress 생성 억제효과는 신경세포 내 ROS 함량을 측정을 통하여 확인한다. 시료를 신경세포에 처리하여 24시간동안 pre-incubation 하고, 그 후 H_2O_2를 3시간 동안 처리한다. 실험 직전 50 μM 농도로 희석하여 사용하고, 빛을 차단한 상태에서 DCF-DA(40 μL/well)를 처리하여 5분 간격으로 fluorescence strength (DCF content)를 측정한다. Fluorescence는 fluorometer (infinite F200, TECAN, NC, USA)을 이용하여 485 nm (excitation filter)와 535 nm (emission filter)의 파장에서 측정한다.

[0115] <실시예 5> 신경 염증성 모델 동물실험 모델 구축

[0116] 4 주령의 ICR male mouse를 이용하여 실험을 진행하며, 온도(24±1℃)와 습도(55%)를 일정하게 유지하고, 12시간 채광/차광 조건에서 충분한 양의 식수와 사료를 공급한다. 일주일간 적응 시킨 mouse를 3주간 시료를 음용수

에 녹여 공급하고, 식이가 완료되었을 때, 각각의 mouse는 25 μL Hamilton microsyringe with a 26-gauge needle (depth of 2.5 mm)을 활용하여, 0.85% sodium chloride solution (v/v)에 녹인 Aβ peptide (410 pmole, 10 μL)을 브레그마(bregma)에 ICV injection 한다.

[0117] 기억력 개선 평가를 위해 항산화활성 및 신경세포 보호효과를 통해 가장 우수한 활성이 나타난 금곡의 60% 에탄올 추출물을 이용하여 실험을 진행하였다.

[0119] <실시예 6> 기억에 미치는 행동검사

[0120] 6-1 Y-maze test

[0121] 검은색 플라스틱 재질로 3개의 arm으로 구성되어 있으며, 각 arm의 길이, 높이, 너비는 33 cm, 15 cm, 10 cm이다. 각 arm을 A, B, C로 정한 후 한쪽 arm에 마우스를 조심스럽게 놓고 8분 동안 마우스가 들어간 arm의 이동경로를 기록. 3 개의 서로 다른 arm에 차례로 들어간 경우 1점 (실제 변경, actual alternation)씩 부여하고, 변경 행동력 (alternation behavior)은 총 통과횟수 (total arm entry)와 점수를 이용하여 계산 한다.

[0123] 6-2 수동회피실험

[0124] 조명이 있는 light chamber와 dark chamber, 2개의 구역으로 구분되어 있으며 바닥은 stainless steel로 이루어져 있는 것을 이용한다. 마우스는 light chamber에서 조명을 켜지 않은 채 1분 동안 적응시킨 후 조명을 켜고 2분 동안 적응시킨 후 마우스가 dark chamber로 이동하자마자 electric shock을 0.5 mA, 3초 동안 가한다. 학습 시험을 시킨 다음날 각 마우스들을 대상으로 기억 시험 (test trial)을 실시한다. 조명을 켠 chamber에 마우스를 놓고 마우스의 네 발이 다 들어가는데 걸리는 시간 (latency time)을 300 s까지 측정한다.

[0126] 6-3 Morris water maze test

[0127] 원형 수조(직경 150 cm, 높이 60 cm) 안에 물을 30 cm 높이로 채우고(23±2° C), 수조 4분면의 한 구역에 escape platform을 설치하고 탈지분유를 풀어준다. 실험 첫날은 수조에서 실험동물이 platform 없이 60초간 자유롭게 수영하도록 하여 적응훈련을 시킨 후, 4일 동안은 platform을 수면 아래로 1 cm로 놓고 보이지 않게 설정한 수조에서 매번 입수하는 위치(N, S, E, W zone)를 다르게 하고 하루 4 번씩 반복하여 훈련시키며 video-tracking system을 이용하여 기록한다(hidden trial). 실험동물이 60초 안에 platform에 도달하는 경우에는 15초 동안 platform에 머물게 하였으며, platform을 찾지 못할 경우에는 손으로 위치를 안내해주어 platform에 위치하도록 하고 20초 동안 있도록 훈련시키며. 실험 5일째(probe trial)에는 platform을 제거하고 working memory를 측정하기 위하여 60 초 동안 platform이 있었던 구역(W zone)에 머무르는 시간을 기록하는 probe test를 실시한다.

[0129] <실시예 7> Cholinergic system 개선 효과

[0130] 7-1 AChE 저해효과 측정

[0131] 마우스 뇌의 조직 중의 acetylcholinesterase (AChE) 활성 측정은 behavioral test 종료 후, 마우스의 뇌를 적출하여 10 volume의 PBS를 넣고 Glass-Col homogenizer로 균질화한 후, 12,000 rpm에서 30 분 동안 원심 분리하였으며, 그 상등액을 효소실험을 위하여 사용함. 효소 5 μL에 50 mM sodium phosphate buffer 65 μL을 넣고 37° C에서 15분간 pre-incubation 시킨 후, 반응 혼합물에 Ellman' reaction mixture 70 μL를 첨가한 후 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정한다. 마우스 뇌 조직 중의 AChE 활성은 정상군 대비 % 활성으로 나타낸다.

[0133] 7-2 ACh 함량 측정

[0134] 마우스 뇌 조직 중에서의 acetylcholine(ACh) 함량 측정은 상등액에 alkaline hydroxylamine reagent [3.5 N sodium hydroxide and 2 M hydroxylamine in HCl]를 첨가하고 1분 동안 상온에서 반응 시킨 후, 0.5 N HCl (pH

1.2) 와 0.37 M $FeCl_3$ in 0.1 N HCl을 첨가하고 540 nm 파장에서 흡광도를 측정한다.

[0136] <실시예 8> Antioxidant system 개선 효과

[0137] 8-1 MDA 함량 측정

[0138] 마우스 뇌 조직 중의 malondialdehyde (MDA) 함량 측정은 PBS를 이용하여 추출한 마우스 뇌 조직 균질액 160 μL에 1% phosphoric acid 960 μL을 혼합한 후 0.67% thiobabituric acid 320 μL을 넣고 95° C에서 1시간 동안 반응시킨다. 반응액은 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리하고, 532 nm에서 상등액의 흡광도를 측정하며, MDA 함량은 mg protein 당 μmole의 농도로 나타낸다.

[0140] 8-2 SOD 함량 측정

[0141] 마우스 뇌 조직 중의 superoxide dismutase (SOD) 함량 측정은 마우스의 뇌를 10 volume의 lysis buffer를 넣고 균질화한 후 12,000 rpm에서 30분간 원심분리하여, 상등액을 버리고 pellet을 취한다. 1XCell Extraction Buffer[10X SOD Buffer 1 mL, 20% triton X-100 0.2 mL, 증류수 8.8 mL, 200 mM PMSF 10 μL]을 넣고 30 분간 5 분 단위로 vortexing 해준 후, 1,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 상등액을 실험에 이용한다. SOD 함량 측정은 SOD determination kit (Sigma-Aldrich Chemical Co.) 를 사용하였으며 SOD(U/mg protein)로 나타낸다.

[0143] 8-3 GSH 함량 측정

[0144] 마우스 뇌 조직 중의 GSH 함량은 마우스 뇌에 10 volume의 phosphate buffer를 넣고 균질화한 후 15 분간 원심분리(10,000 g) 하여 상등액을 얻어 실험에 사용한다. 이 상등액에 동일한 양의 5% metaphosphoric acid을 넣어 간섭효과를 주는 단백질을 2,000 g에서 spin down하여 제거하였고, 다시 한 번 상등액을 얻어 0.26 M tris-HCl (pH 7.8)과 0.65 N NaOH, 1 mg/mL 농도의 OPT(in methanol)을 넣고 15분간 상온에서 빛을 차단하여 반응시킨 후, 1분 간격으로 fluorescence strength를 측정하였다. Fluorescence는 fluorometer (infinite F200)을 이용하여 320 nm (excitation filter)와 420 nm (emission filter)의 파장에서 측정하였다. Reduced GSH의 함량은 표준곡선에 대입하여 나타내었다.

[0146] <실시예 9> 뇌 조직에서의 신경염증성 사멸에 대한 개선 기작 확인

[0147] 뇌 조직을 10배의 1% protease inhibitor가 함유된 RIPA buffer에 넣어 homogenization 한 뒤, 13,000 g에서 원심분리하여 상등액을 얻고, 동일한 단백질 함량이 되도록 맞춘다. 이를 Western blot analysis를 통한 염증인자의 발현을 측정한다. monoclonal antibody들을 활용하여 콜린성 시스템 관련 단백질(ChAT, AChE), BBB 기능 관련 단백질(ZO-1, occludin), 신경 염증 관련 인자(TNF-α, TNFR1, p-JNK, p-IκB, COX-2, IL-1β), 신경세포 사멸 억제 관련 인자(p-Akt, caspase-3, HO-1) 등과 같은 단백질 발현 함량을 검출한다.

[0149] <실시예 10> 생리활성 물질 분석

[0150] 생리활성 물질을 동정하기 위해 BEH C_{18} column (100×2.1 mm, 1.7 μm; Waters, Milford, MA, USA)이 장착된 ultra performance liquid chromatography-quadrupole-time of flight (UPLC-Q-TOF) tandem mass spectrometry (MS2) (Xevo G2-S, Waters)를 이용하여 분석을 진행 하였다. 대사물질의 MS/MS 스펙트럼은 10-40 eV, m/z 50-1500에서 분석하였다.

[0152] <실시예 11> 표준화

[0153] 1-1 분석법 유효성 검증

[0154] 본 연구에서 진행한 분석법의 유효성 검증(validation)은 식약청 의약품 증 시험방법 validation에 대한 가이드라인 적용을 위한 해설서(KFDA, 2008), ICH harmonized tripartite guideline (ICH Expert Working Group,

2005), IUPAC technical report (Thomsom et al., 2002) 그리고 AOAC guideline (AOAC Committee report, 1989)에 의해 수행되었다. 분석법의 유효성 검증을 위해 선택성, 직선성, 검출한계와 정량한계, 회수율 실험을 통한 정확성 및 정밀성을 평가하였다. 유효성 검증에 관련된 실험은 모두 3반복으로 수행하였다. gallic acid 표준물질은 0.1, 1, 10, 100 μg/mL의 5개의 표준물질을 이용하여 직선성을 평가하였으며, 각 농도별로 intensity를 측정하여 검량선을 작성하였다 직선성의 결과는 상관계수(correlation coefficient, R2)로 표현하였다.

[0155] 검출한계와 정량한계를 평가하기 위해 gallic acid 표준용액을 적정농도로 희석하여 크로마토그램 상에서 Signal to noise ration (S/N ratio)이 3.3일 때의 농도를 검출한계로, 10일 때의 농도를 정량한계로 설정하였다. gallic acid를 원물에 존재할 수 있는 수준인 100 μg/mL의 농도를 인위적으로 첨가하여 첨가 전/후의 회수율을 비교함으로써 회수율을 평가하였다. 일내 정확성을 특정하기 위해 하루에 5반복 실험을 하였으며, 일간 정확성을 측정하기 위해 3일간 반복 실험하였다. 정확성과 종일하게 일내 정밀성과 일간 정밀성을 측정하였으며, 결과 값은 gallic acid의 피크에 대한 면적의 표준편차를 면적의 평균값으로 나눈 비의 백분율(%)로서 구하였다.

[0156] 호두는 60% 에탄올 추출물을 이용하여 50배의 5% HCl에서 40℃, 2시간 추출하여 분석을 진행하였다.

[0157] 모든 실험은 3회 반복 실행하여 mean±SD로 나타냈으며, 각 평균값에 대한 유의성 검증은 SAS software (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 실시하고, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 각 시료 간의 유의차를 5% 수준에서 검증하였다.

[0159] <실시예 12> 결과 및 고찰

[0160] 12-1 품종 간 항산화 활성 비교

[0161] 12-1-1 총 폴리페놀성 화합물 함량 측정

[0162] Phenolics 및 flavonoids 등을 포함하는 폴리페놀 화합물은 식물의 2차 대사산물로써 대다수의 고등식물에 가장 많은 비율로 함유되어 있는 항산화 물질이다. 폴리페놀 화합물은 산화적 스트레스를 저해하여 항산화 활성 및 라디칼 소거 활성을 가지는 것으로 알려져 있으며, 플라보노이드는 자외선 차단, 항 돌연변이 및 항염증의 효능을 나타내는 것으로 보고되고 있다.

[0163] 김천 호두(김천1호, 금릉, 금곡) 및 수입산 호두(중국산 및 미국산)의 총 폴리페놀성 화합물의 함량을 알아보기 위해 0, 20, 40, 60, 80, 95%의 에탄올을 이용하여 실험을 진행하였다(도 1).

[0164] 금곡 품종이 다른 품종에 비해 다소 높은 총 페놀성 화합물 함량을 가지는 것으로 나타났으며, 특히 60% 에탄올 추출물에서 349.50 mg of GAE/g으로 나타났다.

[0166] 12-1-2 총 플라보노이드 화합물 함량 측정

[0167] 김천 호두(김천1호, 금릉, 금곡) 및 수입산 호두(중국산 및 미국산)의 총 플라보노이드 화합물의 함량을 알아보기 위해 0, 20, 40, 60, 80, 95%의 에탄올을 이용하여 실험을 진행하였다(도 2).

[0168] 금곡 품종과 미국산 품종이 다른 품종에 비해 다소 높은 총 플라보노이드 화합물 함량을 가지는 것으로 나타났으며, 특히 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물과 미국산 품종 40% 에탄올 추출물에서 각각 86.92, 86.49 mg of RE/g으로 나타났다.

[0170] 12-1-3 ABTS 라디칼 소거활성

[0171] ABTS 라디칼 소거 활성은 ABTS와 과황산칼륨에 의해 생성된 청록색의 ABTS 라디칼이 시료에 함유된 항산화 물질에 의해 라디칼이 제거되어 탈색되는 색 변화를 이용한 방법으로서, 수용성 및 지용성 화합물의 항산화 활성 측정하는데 효과적으로 적용할 수 있어 널리 사용되는 방법이다.

[0172] 김천 호두(김천1호, 금릉, 금곡) 및 수입산 호두(중국산 및 미국산)의 ABTS 라디칼 소거활성을 확인하기 위해 0, 20, 40, 60, 80, 95%의 에탄올을 이용하여 실험을 진행하였다(도 3).

[0173] 금곡 품종과 미국산 품종이 다른 품종에 비해 다소 높은 ABTS 라디칼 소거활성을 가지는 것으로 나타났으며, 특히 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물과 미국산 품종 80% 에탄올 추출물에서 각각 71.55, 71.84%로 나타났다.

[0175] 12-1-4 DPPH 라디칼 소거활성

[0176] DPPH법은 α, α-diphenyl-β-pycrylhydrazyl 라디칼의 소거 특성을 이용한 것으로 가장 널리 이용되는 항산화 효과 측정 방법 중 하나이며, DPPH는 안정한 라디칼로 cysteine, glutathione과 같은 함유황 아미노산과 아스코르브산, 토코페롤, hydroquinone, pyrogallol, phenylenediamine, aminophenol과 같은 aromatic amine등에 의해서 환원되어 짙은 자색이 탈색되므로 수소공여능 또는 유리기 소거작용을 측정하는데 널리 이용되고 있다.

[0177] 김천 호두(김천1호, 금릉, 금곡) 및 수입산 호두(중국산 및 미국산)의 DPPH 라디칼 소거활성을 확인하기 위해 0, 20, 40, 60, 80, 95%의 에탄올을 이용하여 실험을 진행하였다(도 4).

[0178] 다른 품종에 비해 미국산 품종의 60, 80% 에탄올 추출물이 각각 93.94, 39.55%로 다소 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 가지는 것으로 나타났으며, 다음으로 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물이 89.45%의 라디칼 소거 활성을 보였다.

[0180] 12-1-5 FRAP

[0181] FRAP을 이용하여 총 항산화력을 측정하는 방법은 Colored ferrous tripyridyl triazine complex에 의해 ferric ion이 ferrous로 전환되는 과정을 분석하여 시료의 항산화 능력을 측정하는 방법이다. 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyl trizaine (Fe^{3+}-TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyl triazine (Fe^{2+}-TPTZ)으로 환원되는 원리에 기초하여 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안되어진 방법이다. 환원된 Fe^{2+}-TPTZ의 양이 증가하게 하게 되면 흡광도 값이 증가되며, 이러한 흡광도 값의 증가는 시료의 항산화능이 높다는 것을 의미할 수 있다.

[0182] 김천 호두(김천1호, 금릉, 금곡) 및 수입산 호두(중국산 및 미국산)의 DPPH 라디칼 소거활성을 확인하기 위해 0, 20, 40, 60, 80, 95%의 에탄올을 이용하여 실험을 진행하였다(도 5).

[0183] 금곡 품종과 미국산 품종이 다른 품종에 비해 다소 높은 환원력을 가지는 것으로 나타났으며, 특히 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물과 미국산 품종의 80% 에탄올 추출물에서 각각 1.76, 1.72로 나타났다.

[0185] 12-1-6 호두의 항산화 활성 비교 분석 요약

[0186] 총 페놀성 화합물 함량과 총 플라보노이드 화합물 함량, ABTS와 DPPH 라디칼 소거 활성, FRAP 분석 결과에서 금곡 품종이 가장 높은 항산화 활성을 보였다.

[0188] 12-2 품종 간 영양학적 대사체 비교 분석

[0189] 12-2-1 품종 간 영양학적 대사체 비교 분석

[0190] 도 6A는 대사체(metabolite) 분석을 위해 진행한 각 품종의 크로마토그램 (chromatogram) 결과이며 각각의 물질의 차이에 대한 정도를 heatmap을 이용하여 도 6B에 나타내었다. 유의적으로 차이가 나는 물질을 통계분석을 통해 나타내었고, 이들 중 차이나는 물질은 Hexahydroxydiphenic acid (HHDP)-glucose isomer 3종, silibinin, pedunculagin/casuariin isomer (bis-HHDP-glucose) 2종, praecoxin A/platycariin (trigalloyl-HHOP-glucose) 4종, tellimagrandin 1 isomer (digalloyl-HHDP-glucose), casuarinin/casuarictin isomer 2종, ellagic acid derivative, labetalol로 확인되었다. 일부 품종에서 gentamicin가 검출되었다.

[0191] 품종별로 비교하였을 때, 김천1호 품종은 labetalol이 상대적으로 가장 많은 함량을 나타내었으며, 금곡 품종은 HHDP-glucose isomer 1, pedunculagin/casuariin isomer (bis-HHDP-glucose) 2, praecoxin A/platycariin (trigalloyl-HHOP-glucose) 2, ellagic acid derivative의 함량이 높았고, 금릉 품종은 pedunculagin/casuariin isomer (bis-HHDP-glucose) 1, labetalol의 함량이 가장 높았으며, 중국산 품종은

praecoxin A/platycariin (trigalloyl-HHOP-glucose) 1, praecoxin A/platycariin (trigalloyl-HHOP-glucose) 2, casuarinin/casuarictin isomer 1과 ellagic acid derivative의 함량이 가장 높았고, 미국산 품종은 HHDP-glucose isomer 3종, silibinin, tellimagrandin 1 isomer (digalloyl-HHDP-glucose), praecoxin A/platycariin (trigalloyl-HHOP-glucose) 3, praecoxin A/platycariin (trigalloyl-HHOP-glucose) 4, casuarinin/casuarictin isomer 2 함량 등이 가장 높은 것으로 나타났다.

[0193] 12-2-2 품종 간 영양학적 대사체 비교 분석 의미

[0194] 호두에 다량 함유되어 있는 엘라지탄닌 계열의 기본구조는 HHDP와 단당류의 에스테로 결합으로 구성된 고분자 이합체로, 인체 내 섭취 시 직접 흡수되지는 않지만 생체 내에서 가수분해 과정을 통해 엘라그산과 그 유도물질이 생성된다. 가수분해된 엘라그산은 항산화제 및 신경세포 보호효과를 보이며, HHDP 그룹을 가지는 엘라지탄닌 계열은 우수한 라디칼 소거활성을 보이며, 특히 pedunculagin과 같은 HHDP 그룹을 가지는 엘라지탄닌은 지질과산화를 강력하게 억제한다고 보고되었다. 따라서 우수한 활성을 가지는 HHDP를 함유하는 금곡(Geumgok) 품종은 우수한 in vitro 항산화 활성 및 뇌 신경세포 보호효과를 보여준 것으로 판단된다.

[0196] 12-3 신경세포에 대한 세포 보호효과 검증

[0197] 12-3-1 신경세포 생존율

[0198] 활성산소종의 과도한 생성으로 산화적 스트레스가 발생하면 뇌신경세포에 손상을 일으켜 알츠하이머와 같은 신경퇴행성 질환이 발생한다고 알려져 있고, 이러한 뇌신경세포는 특이적인 신호 전달을 위해 다른 세포들에 비해 상대적으로 민감하다. 천연 항산화 소재인 flavonoids 및 polyphenols 등은 산화적 스트레스로부터 신경세포의 보호효과가 뛰어난 것으로 알려져 있다.

[0199] 신경세포를 이용한 MTT, DCF-DA assay는 항산화 활성에서 가장 활성이 뛰어난 품종의 에탄올 추출물을 선별하여 실험을 진행하였다. H_2O_2로 유도된 산화적 스트레스 상태에서 호두의 품종에 따른 MC-IXC 세포와 HT22 세포의 신경세포의 생존율을 MTT assay로 측정한 결과는 도 7과 같다.

[0200] H_2O_2로 유도된 산화적 스트레스 상태의 MC-IXC 세포에서 전체 품종 중 김천1호 품종의 60% 에탄올 추출물과 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물이 상대적으로 높은 신경세포 보호효과를 나타내었으며, 20 μg/mL 농도에서 중국 품종의 80% 에탄올 추출물이 가장 높았다(도 7A). 과육의 H_2O_2로 유도된 산화적 스트레스 상태에서 HT22 신경세포의 생존율을 MTT assay로 측정한 결과는 도 7B와 같다. 20 μg/mL 농도에서 금곡의 60% 에탄올 추출물에서 가장 높은 세포생존율을 나타내었으며 다음으로는 중국산 품종의 80% 에탄올 추출물이 우수한 신경세포 보호효과를 보여주었다.

[0202] 12-3-2 신경세포 생존율

[0203] 인체 내 산화방지 균형이 무너지게 되면 지방질 및 단백질이 산화되고 DNA가 손상됨으로써 다양한 질병을 유발할 수 있다. 과산화수소와 같은 활성산소(ROS)로 인해 발생되는 산화 스트레스로 인한 신경세포의 손상은 퇴행성 뇌신경 질환의 유발과 연관될 수 있기 때문에 신경세포에서 나타내는 세포 수준의 산화 스트레스 억제 효과를 DCF-DA 측정방법으로 확인하였다. DCFH-DA는 세포 내로 비교적 자유롭게 투과되어 세포 내 esterase에 의해 DCFH로 전환되며, 이는 세포 투과성이 낮아 세포 내에 축적되며 세포내 활성산소종이 존재할 경우 이와 반응하여 형광물질로 전환된다.

[0204] H_2O_2로 유도된 산화적 스트레스 상태에서 호두 품종에 따른 신경세포에서의 활성산소종(ROS)의 생성에 대한 억제 활성을 DCF-DA assay로 측정한 결과는 도 8과 같다. MC-IXC 신경세포에서 20 μg/mL 농도에서 미국산 품종의 40% 에탄올 추출물이 가장 높은 활성산소종의 억제 활성을 보여주었고, 다음으로는 김천1호 품종의 60% 에탄올 추출물이 높은 억제 활성을 보였다(도 8A). HT22 신경세포에서의 활성산소종의 생성에 대한 억제 활성은 김천1호 품종의 60% 에탄올 추출물과 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물이 활성산소의 생성에 대하여 가장 높은 억제 활성을 나타내었다(도 8B).

[0206] 12-3-3 호두의 신경세포 보호효과 확인

[0207] MC-IXC 세포와 HT22 세포의 신경세포 생존율 분석 결과는 금곡 품종과 중국산 품종이 가장 높은 신경세포 생존율을 보였다. MC-IXC 세포와 HT22 세포의 ROS 소거활성 능력 분석 결과는 김천1호 품종, 금곡 품종, 중국산 품종이 높은 ROS 소거활성을 보였다.

[0209] 12-4 기억에 미치는 행동검사

[0210] 12-4-1 Y-maze test

[0211] Y-maze 실험은 단기기억 형태의 순간 공간인 지력을 평가하기 위한 방법으로, 뇌의 해마 부위에 비가역적인 손상을 일으킴으로써 알츠하이머성 치매와 유사한 증상을 나타내는 베타아밀로이드(Aβ)를 이용하여 기억력과 학습능력이 감퇴된 마우스 모델을 대상으로 8분 동안 Y-maze에서의 마우스 행동을 관찰한 결과는 도 9와 같다.

[0212] Aβ 그룹은 대조(44.36%)군과 대비하여 공간 인지기능에 대하여 35.58%의 triplet을 나타내었다. 이에 반해 금곡의 60% 에탄올 추출물을 섭취한 그룹은 각각 41.27%, 44.85%로 Aβ 그룹과 비교하여 농도가 증가함에 따라 유의적으로 기억력이 개선될 뿐만 아니라 대조군과 유사하게 나타났다(도 9A). 도 9B는 8분 동안 마우스들이 Y-maze의 각 구역을 통과한 총 횟수를 나타낸 것으로 마우스의 기본적인 운동능력에는 유의적 차이가 없는 것을 보여주었다. 도 9C는 각 군들의 움직임을 표현하였으며, Aβ 그룹은 과잉행동 장애를 다른 그룹에 비해 나타난 것으로 사료된다.

[0214] 12-4-2 수동회피실험

[0215] Passive avoidance 실험은 설치류의 working memory ability를 측정하는 방법이며 편도체와 관련된 단기간 학습 및 기억력 측정을 평가하는 방법이다. 이는 N-methyl-d- aspartic acid (NMDA) 수용체의 역할과 관련이 있으며, 산화적 스트레스는 편도체에서 신경세포 손상과 사멸을 유발하고 인지기능 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0216] 금곡 60% 에탄올 추출물에 대한 단기기억 개선 효과를 평가하기 위해 passive avoidance test를 진행한 결과는 도 10과 같다. 도 10A는 첫째 날 학습시험을 시킨 결과로 그룹간의 아무런 차이가 없는 것을 보여준다. 도 10B는 학습시험을 시킨 다음날 수행한 결과로 Aβ 그룹은 대조군에 비하여 90.60 sec의 단기기억력 저하를 보여주었다. PC 그룹은 274.00 sec로 기억력을 개선시키는 것을 보여주었고, GG 10, GG 20 그룹은 각각 231.75 sec, 292.60 sec로 Ab 그룹에 대비하여 단기 기억력을 상당하게 개선시키는 것을 나타났다.

[0218] 12-4-3 Morris water maze test

[0219] Morris water maze 실험은 설치류의 공간학습과 기억력을 평가하기 위해 사용되는 실험으로써 공간 정보 외에 다른 시각적 후각적 정보들을 쉽게 차단하거나 제어 할 수 있는 장점이 있다. 이는 주로 장기기억 능력을 측정하는 과제로써 동물의 주변에 있는 단서들을 사용하여 기억하는 능력인 공간기억을 측정하는 것이다. 수면 아래 숨겨진 플랫폼으로 주변의 단서를 이용하여 찾아가는 hidden test와 플랫폼을 제거하여 학습 능력 및 기억력을 평가하는 probe test로 진행되는 실험 방법이다.

[0220] 학습 및 장기기억 개선을 평가하기 위하여 Morris water maze test를 실시하였다(도 11). Hidden test 동안 Aβ 그룹을 제외하고는 모두 시간의 경과와 더불어 플랫폼을 찾아가는데 소요되는 시간이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. Aβ 그룹은 대조군과 비교하여 항상 플랫폼에 찾아가는 시간이 길었고 4일차에서 대조군(30.36 sec)과 대비하여 35.58 sec로 현저하게 장기기억 및 학습능력이 저하됨을 나타냈다. 이에 반해 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물을 섭취한 그룹은 32.04, 31.49 sec로 학습기억력 개선이 나타난 것을 확인 할 수 있었다.

[0222] 12-4-4 기억력 개선 평가 요약

[0223] 이러한 behavioral test 결과들을 종합해 볼 때, 금곡의 60% 에탄올 추출물은 뛰어난 인지기능 개선효과가 있음을 보여주었으며, 이는 알츠하이머성 치매와 같은 신경 퇴행성 질환에 대한 뛰어난 기능성 소재가 될 것이라고

판단된다.

[0225] 12-5 Cholinergic system 개선 효과

[0226] 12-5-1 ACh 함량 측정

[0227] 전뇌 기저부에 위치하는 것으로 알려진 cholinergic 체계는 다양한 뇌 영역에 축삭을 분포시켜 신경전달물질인 아세틸콜린(Acetylcholine, ACh)을 분비한다. Aβ로 유도된 산화적 스트레스에 의한 cholinergic 신경세포의 사멸은 대뇌 피질과 해마에서의 신경전달물질인 아세틴콜린의 감소로 알츠하이머와 같은 신경퇴행성질환을 유발하는 것으로 보고되고 있다. 뇌 조직의 신경전달이 원활하게 이루어지려면 ACh 수준에 영향을 미치는 콜린 아세틸트랜스페라제(Choline acetyltransferase, ChAT)와 아세틴콜린 에스테라아제(Acetylcholine esterase, AChE) 활성이 매우 중요하다. 그러나 AChE의 과도한 증가는 아세틸콜린 함량을 감소시키고 amyloid 화합물의 신경독성을 증가시킨다. 이러한 이유로 퇴행성 치매 환자의 치료에 있어 AChE 효소를 억제하여 ACh의 농도를 증가시키는 방법도 이용되고 있다.

[0228] 뇌에서 신경전달 물질로 이용되는 아세틸콜린(Acetylcholine, Ach)은 신경 말단에서 분비되며, 신경의 자극을 근육에 전달하는 화학물질이다. ACh가 분비되면 혈압강하, 심장박동억제, 장관 수출 등의 생리 작용을 나타낸다. 신경 말단에서 분비된 ACh는 자극의 전달이 끝나면 ChAT에 의해 choline과 acetate로 분해된다. choline은 ChAT의 작용에 따라 효소적으로 합성되어 다시 ACh가 된다.

[0229] Aβ를 통해 인지기능 장애가 유발된 마우스의 뇌를 적출하여 ACh 함량을 측정한 결과는 도 12A와 같다. 대조군의 ACh 함량은 2.53 mM/mg of protein으로 나타났으며 Aβ 그룹은 1.87 mM/mg of protein으로 나타내었다. 이는 Aβ에 의해 활성화된 AChE가 신경전달물질인 ACh의 함량을 감소시켰을 것으로 판단된다. 반면에 금곡 품종의 10과 20을 섭취한 그룹들은 각각 2.64, 2.59 mM/mg of protein을 나타내었으며, Aβ 그룹의 뇌 조직에서 상대적으로 높은 ACh 함량을 나타내었다.

[0231] 12-5-2 AChE 저해효과 측정

[0232] 본 실험에서는 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물을 식이 하였을 때 아세틸콜린에스테라아제(Acetylcholine esterase, AChE) 활성 정도를 측정하였다. Aβ로 유도된 마우스의 뇌를 적출하여 AChE 활성을 측정한 결과는 도 12B와 같다. 대조군의 활성을 100%로 나타내었고 이에 대비해 Aβ 그룹은 118.34%로 유의적인 차이를 보여주었으며 Aβ의 주사가 마우스 뇌 조직에 존재하는 cholinergic system의 장애를 유발할 수 있을 것으로 사료된다. 반면 금곡 품종의 10과 20을 섭취한 그룹들은 각각 117.42%, 94.87%로 Aβ 그룹 대비 AChE의 활성 억제를 유도하는 것으로 나타났다. 또한, 도 12C에 나타낸 바에 의하면 AChE 발현 정도를 측정한 결과, 대조군(1.00) 대비 Aβ 그룹(1.27)에서 발현량의 증가를 확인하였으며 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물을 섭취한 그룹(0.85)에서 AChE의 발현량을 감소시켜 주었다.

[0234] 12-5-3 cholinergic system 개선 효과 요약

[0235] 이러한 결과는 Aβ 유도에 의한 cholinergic 장애에 대하여 금곡 품종의 추출물의 섭취가 효과적으로 이를 개선해줌에 따라 인지기능 개선 효과를 나타냈을 것으로 판단된다.

[0237] 12-6 Antioxidant system 개선 효과

[0238] 12-6-1 MDA 함량 측정

[0239] 조직을 구성하는 세포에서의 과산화 현상은 세포막 주요구성 성분인 인지질을 구성하는 불포화지방산에 산소 유리기와 결합하여 생기게 되며, 과산화지질은 세포막의 불포화지방산과 지단백질에서 유리기와 연쇄 반응하여 부산물로 말론알데히드(Malondialdehyde, MDA)를 생성한다. MDA는 산화적 스트레스 시 뇌조직의 각 영역에서 증가하는 것으로 알려져 있다. 특히 뇌세포는 다른 장기에 비하여 불포화 지방산의 함량이 높아 산화적 손상을 받기 쉬우며, 뇌 신경세포에 산화적 스트레스를 가하게 되면 염증반응에 이은 신경독성을 일으켜 신경세포의 사멸이 촉진된다. 결국 이런 산화적 스트레스가 뇌 조직 조직을 구성하는 세포에서의 과산화 현상은 세포막 주요구성

성분인 인지질을 내에서 지속되면 기억 손상 및 손실에 의한 장애를 일으킬 것으로 예상하고 있다. MDA 양의 감소는 시료의 항산화 작용으로 인해 산화적 스트레스가 감소한 결과로 해석할 수 있으며, 본 실험에서는 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물을 섭취한 마우스의 뇌 조직에 존재하는 지질과산화 중간생성물인 MDA의 함량을 비교해 보기 위해 각 그룹의 MDA 함량을 측정하였다(도 13).

[0240] 대조군은 3.22 nM/mg protein이었으며, Aβ 그룹은 이보다 증가한 5.49 nM/mg protein로 나타났다. 금곡 품종의 10, 20 추출물을 섭취한 그룹들은 각각 3.97, 3.11 nM/mg protein으로 나타났으며 Aβ 그룹과 비교하여 모든 샘플 그룹에서 MDA 생성을 억제하였다.

[0242] 12-6-2 SOD 함량 측정

[0243] SOD는 superoxide anions와 같은 활성 산소들은 hydrogen peroxide로 변화시키는 항산화 효소이며, 산소와 물 분자로 분해시켜 독성을 없애주는 역할을 하여 뇌 조직을 보호할 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0244] 마우스의 뇌를 적출하여 SOD의 활성을 측정해본 결과는 도 14와 같다. 뇌의 SOD 함량에서 대조군은 26.92 U/mg of protein으로 나타났으며, Aβ 그룹은 이보다 감소한 24.39 U/mg of protein으로 Aβ와 같은 산화적 스트레스에 의하여 뇌 조직에서의 SOD 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 금곡 품종의 10, 20 추출물을 섭취한 그룹들은 각각 25.94, 26.57 U/mg of protein으로, Aβ 그룹과 비교하여 SOD 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0246] 12-6-3 GSH 함량 측정

[0247] GSH는 세포 내 항산화 시스템을 조절하는 중요한 비단백질성 thiol 그룹으로, 산화 반응에 의하여 hydrogen과 peroxides를 환원하여 활성산소를 소거하며 oxidized GSH로 변환된다. oxidized GSH는 미토콘드리아 DNA의 산화와 연관되어 세포의 노화나 세포사(apoptosis)를 유발하는 것으로 알려져 있다. 즉 뇌 조직의 산화적 스트레스에 대한 산화적 지표로서 reduced GSH 함량을 측정한 결과는 도 15와 같다.

[0248] 대조군 대비 Aβ 그룹은 80.92%로 상대적으로 reduced GSH 함량을 감소시키는 것으로 나타났다. 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물을 섭취한 그룹들은 각각 81.16, 91.99%로 Aβ 그룹과 비교하여 유의적으로 reduced GSH 함량이 증가된 것을 보였다.

[0250] 12-6-4 Antioxidant system 개선 효과 요약

[0251] 따라서 동물실험 후, 적출된 뇌 조직에서의 항산화 활성 결과들을 고려해볼 때 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물의 경우 실제 in vivo 상에서도 우수한 항산화 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단되며 이에 따라 인지기능 개선 효과에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

[0253] 12-7 호두의 인지기능 개선 기작 평가

[0254] 12-7-1 BBB 개선 효과 검증

[0255] 본 실험에서는 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물을 식이 하였을 때 혈뇌장벽(blood brain barrier; BBB) 기능 개선 평가를 측정하였다. Aβ로 유도된 마우스의 뇌를 적출하여 ZO-1과 occludin의 활성을 측정한 결과는 도 16과 같다. 대조군(100%)과 비교하였을 때, Aβ 그룹은 각각 34.70%와 53.09%의 감소를 나타내었으며, Aβ의 주사가 마우스 뇌 조직의 BBB 기능 장애를 유발할 수 있을 것으로 사료된다. 반면 금곡 품종의 10과 20을 섭취한 그룹들은 각각 Aβ 그룹 대비 143.91%와 142.68%의 증가를 나타내었다.

[0257] 12-7-2 신경 염증 개선 효과 검증

[0258] 본 실험에서는 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물을 식이 하였을 때 신경 염증 개선 평가에 대하여 측정하였다. Aβ로 유도된 마우스의 뇌를 적출하여 신경 염증을 증가시키는 TNF-α, tumor necrosis factor receptor 1(TNFR1), phosphorylated c-Jun N-terminal kinase(p-JNK), phosphorylated nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor(p-IκB), cyclooxygenase-2(COX-2) and interleukin 1

beta(IL-1β) 활성을 측정한 결과는 도 17과 같다. 대조군(100%)과 비교하였을 때, Aβ 그룹의 이들 단백질은 각각 40.64%, 57.13%, 67.81%, 47.86%, 13.54%, 31.57%가 증가되어 Aβ의 주사가 마우스 뇌 조직에서 신경의 염증을 촉진시키는 인자의 활성을 증가시킨 것으로 사료된다. 반면 금곡 품종의 10과 20을 섭취한 그룹들은 각각 Aβ 그룹 대비 이들 단백질 발현을 각각 20.35%, 11.33%, 19.86%, 24.33%, 13.71%, 22.39%를 감소시켜 주었다.

[0260] 12-7-3 신경세포 사멸 억제 경로 개선 효과 검증

[0261] 본 실험에서는 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물을 식이 하였을 때 신경세포 사멸 억제 경로를 측정하였다. Aβ로 유도된 마우스의 뇌를 적출하여 phosphorylated protein kinase B(p-Akt), caspase-3, heme oxygenase-1 (HO-1)의 활성을 측정한 결과는 도 18과 같다. 대조군(100%)과 비교하였을 때, Aβ 그룹의 단백질 발현은 p-Akt와 HO-1 단백질은 22.60%와 34.37%가 감소하였고(도 18B, D), caspase-3의 활성은 41.05% 증가하여(도 18C) 신경세포 사멸 억제 경로가 저해됨을 확인하였다. 반면 금곡 품종의 10과 20을 섭취한 그룹들은 p-Akt와 HO-1 단백질 발현을 Aβ 그룹 대비 각각 46.19%와 30.00% 증가되었으며, caspase-3의 발현은 22.52% 감소되었다.

[0263] 12-7-4 호두의 인지기능 개선 기작 평가

[0264] 따라서 동물실험 후, 적출된 뇌 조직을 이용하여 Aβ로 유도된 독성에 대한 개선 기작을 평가한 결과, 금곡 품종의 60% 에탄올 추출물은 BBB의 기능에 대한 개선을 나타내었으며, 신경 염증의 독성에 대한 보호효과를 나타내었다. 뿐만 아니라, 신경세포 사멸 억제 경로를 저해함으로써 뇌 조직을 보호하였다. 이는 in vivo 실험 상 인지기능이 개선된 경로를 구체화함으로써 실제 호두 추출물의 생리활성 능력 평가와 인지기능 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

[0266] 12-8 생리활성 물질 분석

[0267] 금곡 품종의 생리활성 물질 분석을 진행한 결과는 도 19와 표 1과 같이 나타났다. 금곡 품종의 UPLC-Q-TOF chromatogram 결과는 도 19에 나타내었다.

표 1

표 1. Compounds identified from walnut extract.

No.	RT [a] (min)	Parent ion [b] (m/z)	MS^2 ions [c] (m/z)	compound
1	2.55	783	481, **301**, 275	Pedunculagin/casuariin isomer (bis-HHDP-glucose)
2	2.71	783	481, **301**, 275	Pedunculagin/casuariin isomer (bis-HHDP-glucose)
3	2.88	951	907, 783, **301**, 275	Praecoxin A/platycariin isomer (trigalloyl-HHDP-glucose)
4	2.90	785	633, 483, **301**, 275	Tellimagrandin I isomer (digalloyl-HHDP-glucose)
5	3.03	935	785, 633, 481, **301**, 275 301	Casuarinin/casuarictin isomer
6	3.06	433	**301**	Ellagic acid pentoside
7	3.22	1,085	633, 451, **301**	Eucalbanin A/cornusiin B isomer
8	3.39	592	**567**, 403, 343, 283, 241, 197	Glansreginin A

[a] RT means retention time

[b] Ions are presented at m/z $[M-H]^-$

[c] **Bold** indicates the main fragment of MS^2

[0268]

[0269] UPLC-Q-TOF 분석 결과 금곡 품종에서 pedunculagin/casuariin isomer (bis-HHDP-glucose) 2종, praecoxin A/platycariin isomer (trigalloyl-HHDP-glucose), tellimagrandin I isomer (digalloyl-HHDP-glucose),

casuarinin/casuarictin isomer, ellagic acid pentoside, eucalbanin A/cornusiin B isomer, glansreginin A 가 검출되었다.

[0271] 12-9 표준화

[0272] 호두의 원료 중에서 gallic acid를 선택적으로 분리하여 HPLC에서 분리되는 크로마토그램과 PDA 스펙트럼은 표준물질에 대한 retention time은 9.43분이고, 분리된 피크 정점에서의 PDA 스펙트럼의 특이파장은 217.5 nm로 확인되었다. 호두 원물의 gallic acid의 retention time은 9.43분이고 분리된 피크 정점에서의 PDA 스펙트럼은 217.5 nm로 표준물질과 동일한 머무름 시간 및 PDA 스펙트럼을 확인할 수 있었다. 원물에서 검출된 gallic acid와 표준물질의 library hit은 976.51로 높은 일치율을 보였다. LOD (limit of detection)는 0.5556 μg/mL, LOQ (limit of quantification)은 0.9611 μg/mL로 확인할 수 있었다.

[0273] Gallic acid가 검출되는 농도 범위를 중간 값으로 설정하여 총 4개 농도 0.1, 1, 10, 100 μg/mL에 대한 직선성과 정량곡선을 구한 다음 상관계수 값을 검토하였다. 각 농도의 표준용액은 3반복 실험을 하였다. 시험결과 검량선의 R2은 0.9999 이상의 높은 유의수준으로 보였으며, 본 농도를 범위 (range)로 설정하였다 (도 20).

[0274] 정밀성을 확인하기 위하여 하루에 실험을 5회 반복 시행하여 반복시험의 재현성(repeatability)과 3일간 실험을 반복 수행하여 일간 정밀도(intermediate precision)를 측정 하였다. 반복시험의 재현성은 시험농도의 100%에 해당하는 농도를 분석법의 전조작을 5회 반복 측정하였으며 %RSD(상대표준편차)는 0.74%로 나타났다. Gallic acid의 매트릭스 영향을 파악하고자 spiking/recovery 방법으로 정확성(accuracy) 을 평가하였다. 표준용액의 검량선 범위 이내에서 취한 검체량에 표준물질인 gallic acid를 100 μg/mL를 가하여 회수율을 측정하였다. 표준물질을 가한 질량에 따른 회수율을 비교한 결과 104.39%의 회수율을 보였다(표 2).

표 2

표 2. The linearity, correlation coefficient (R^2), limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and recovery rate of the compounds studied.

[0275]

Compounds	Regression equation	R^2	LOD (μg/mL)	LOQ (μg/mL)	Recovery rate (%)
Gallic acid	y = 0.4989x - 0.1905	0.9999	0.5556	0.9611	104.39±6.11

[0276] 일간 정밀성(intermediate precision) 을 확인하기 위하여 시험농도의 100%에 해당하는 농도를 제조하여 4℃냉장고에서 보관하면서 3일간 3회 반복 조작하여 측정한 %RSD의 결과는 각각 0.8%로 나타났다(표 3).

표 3

표 3. Analytical results of inter- and intra-day test

[0277]

Inter-day (n=5)		Intra-day (n=3)	
Mean±SD	Precisions (%RSD)	Mean±SD	Precisions (%RSD)
100.05±0.74	0.74	100.85±0.80	0.8

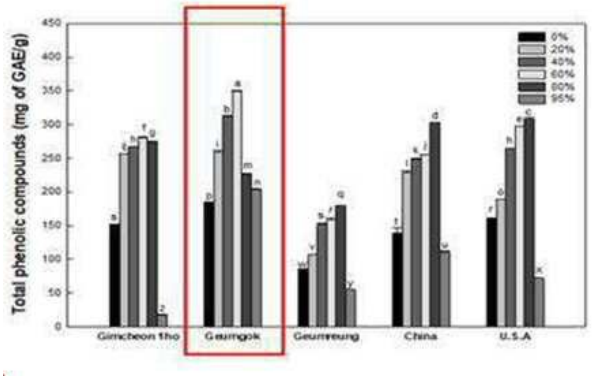
[0278] 이러한 결과는 개발된 분석법이 정량분석에 가능한 재현성을 가지고 있다는 것을 증명해준다고 할 수 있다.

[0280] 이상에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 구체적인 실시예를 상세하게 설명되었으나, 본 발명의 사상을 이해하는 당업자는 동일한 사상의 범위 내에서 다른 구성요소를 추가, 변경, 삭제 등을 통하여, 퇴보적인 다른 발명이나 본 발명 사상의 범위 내에 포함되는 다른 실시예를 용이하게 제안할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상술한 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야

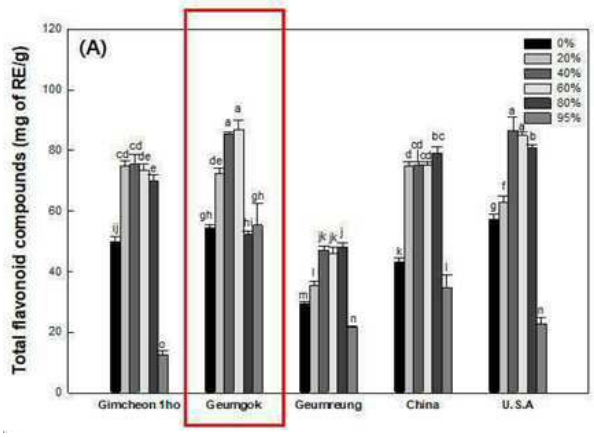
한다.

도면

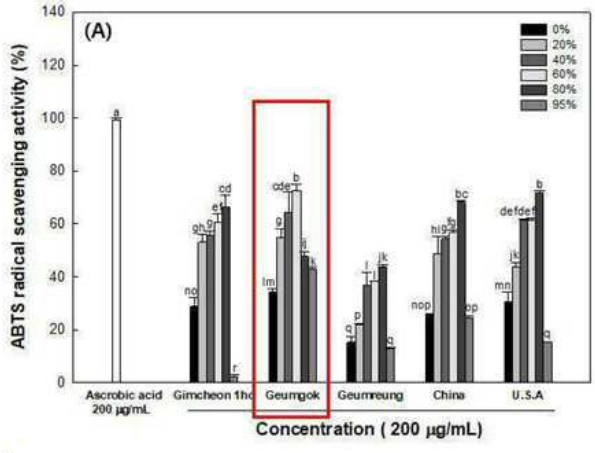
도면1



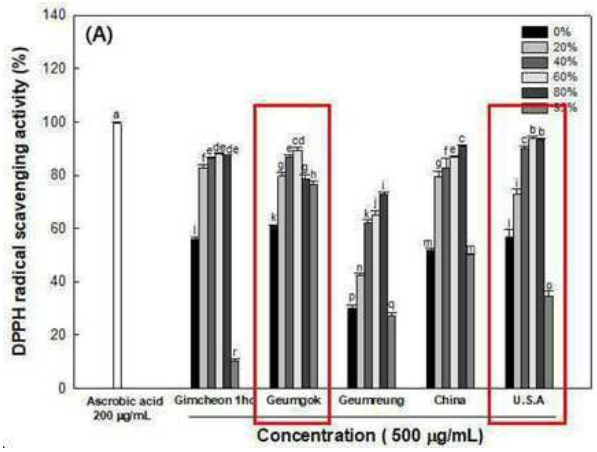
도면2



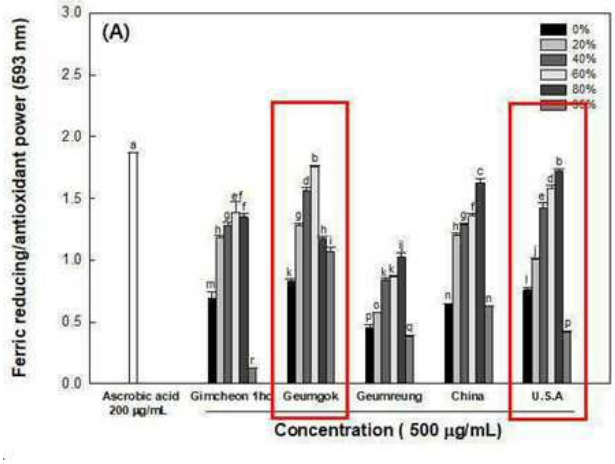
도면3



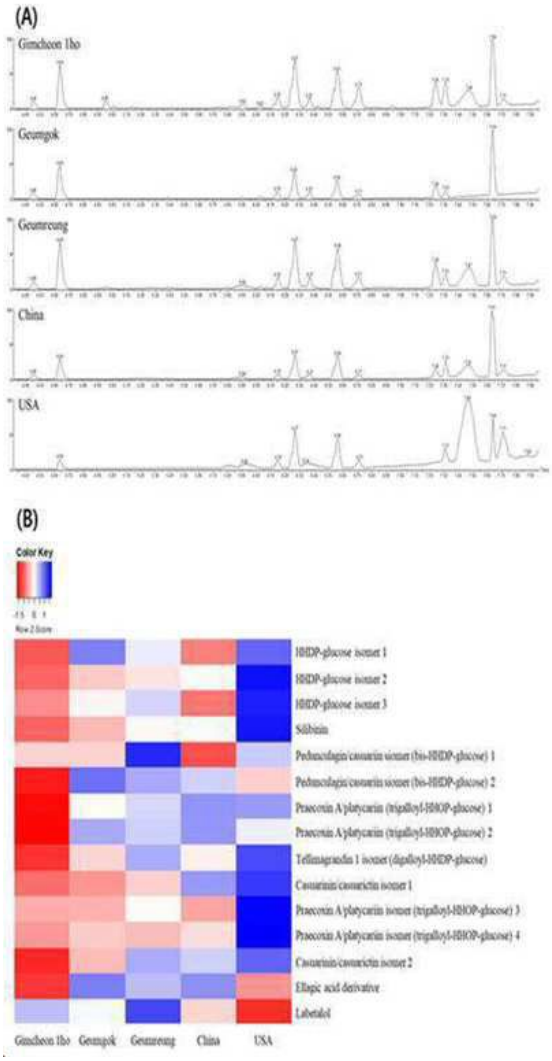
도면4


(A)
DPPH radical scavenging activity (%)
0%
20%
40%
60%
80%
Ascrobic acid 200 μg/mL
Gimcheon 1hc
Geumgok
Geumreung
China
U.S.A
Concentration (500 μg/mL)

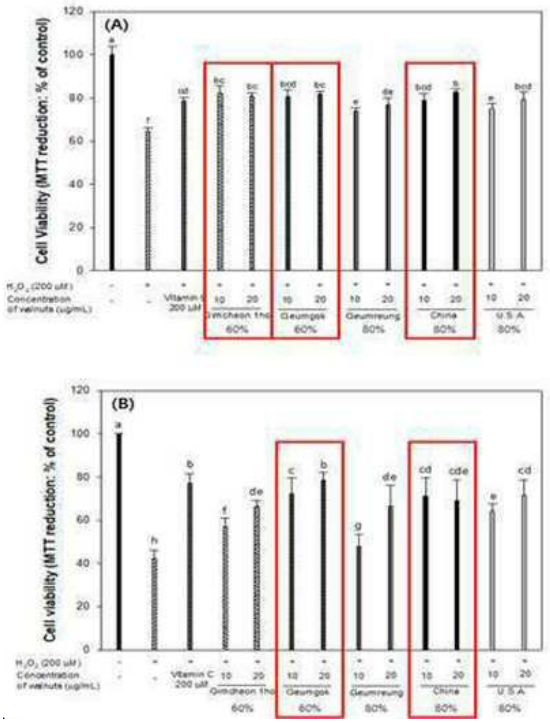
도면5


(A)
Ferric reducing/antioxidant power (593 nm)
0%
20%
40%
60%
80%
Ascrobic acid 200 μg/mL
Gimcheon 1hc
Geumgok
Geumreung
China
U.S.A
Concentration (500 μg/mL)

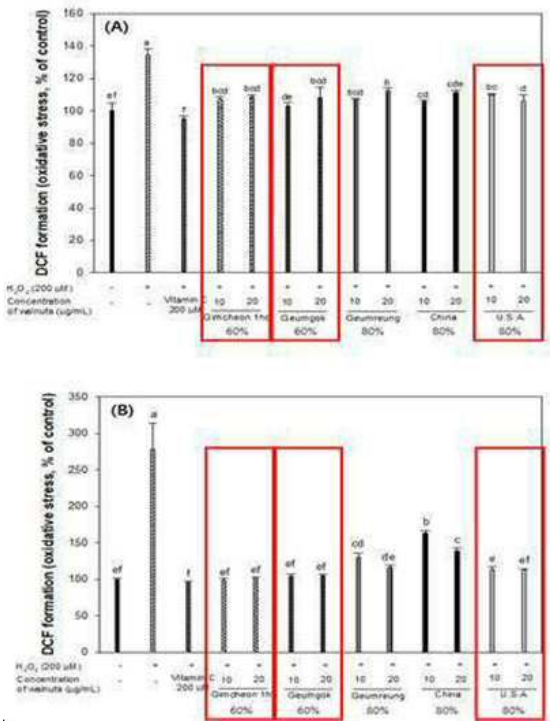
도면6


(A)
Gimchoon 1ho
Geumgok
Geumreung
China
USA
(B)
Color Key
HHDP-glucose isomer 1
HHDP-glucose isomer 2
HHDP-glucose isomer 3
Silibinin
Pedunculagin/casuarinin isomer (bis-HHDP-glucose) 1
Pedunculagin/casuarinin isomer (bis-HHDP-glucose) 2
Praecoxin A/platycarin (trigalloyl-HHDP-glucose) 1
Praecoxin A/platycarin (trigalloyl-HHDP-glucose) 2
Tellimagrandin I isomer (digalloyl-HHDP-glucose)
Casuarinin/casuarictin isomer 1
Praecoxin A/platycarin isomer (trigalloyl-HHDP-glucose) 3
Praecoxin A/platycarin isomer (trigalloyl-HHDP-glucose) 4
Casuarinin/casuarictin isomer 2
Ellagic acid derivative
Labetalol
Gimcheon 1ho
Geumgok
Geumreung
China
USA

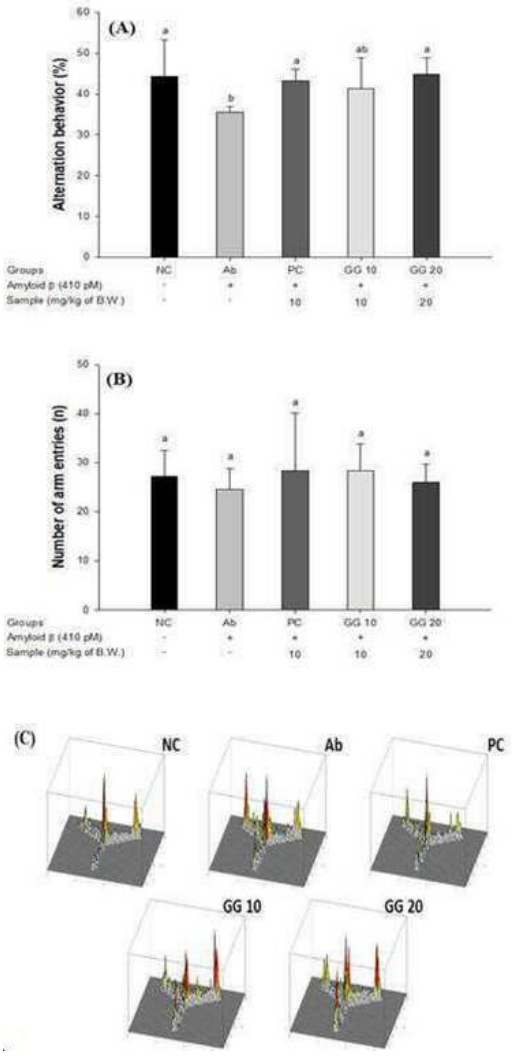
도면7


(A)
Cell Viability (MTT reduction: % of control)
(B)
Cell viability (MTT reduction: % of control)
Gwicheon 1ho
Geumgok
Geumreung
China
U.S.A
60%
80%

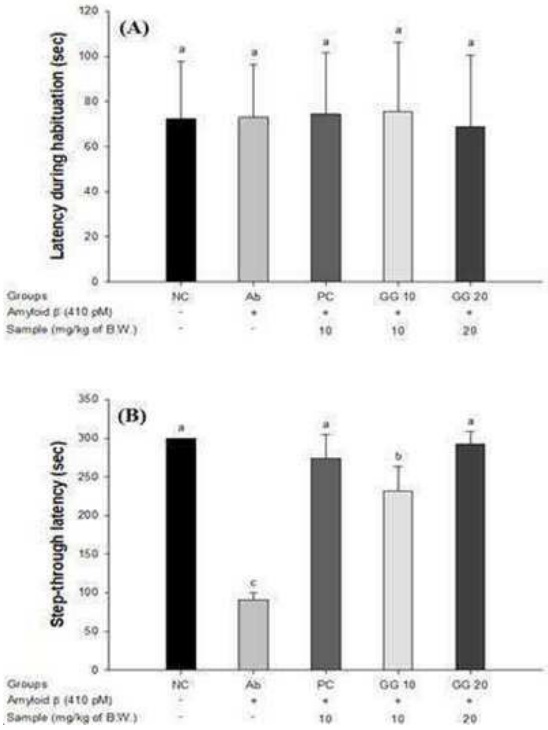
도면8


(A)
DCF formation (oxidative stress, % of control)
(B)
DCF formation (oxidative stress, % of control)
Gwicheon 1ho
Geumgok
Geumreung
China
U.S.A
60%
80%

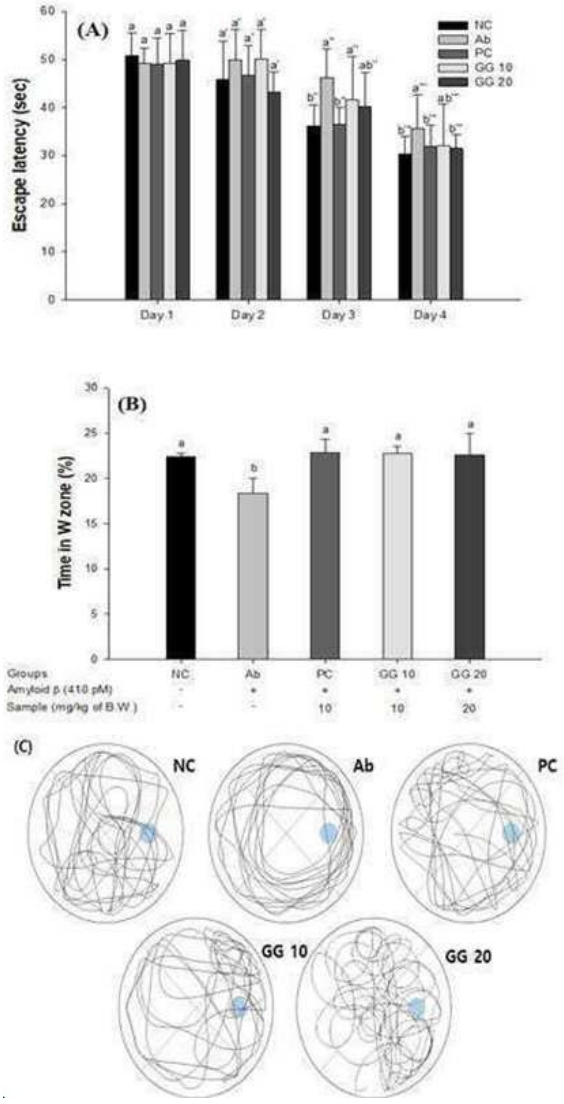
도면9


(A)
Alternation behavior (%)
a
b
a
ab
a
Groups
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20
Amyloid β (410 pM)
Sample (mg/kg of B.W.)
10
10
20
(B)
Number of arm entries (n)
a
a
a
a
a
Groups
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20
Amyloid β (410 pM)
Sample (mg/kg of B.W.)
10
10
20
(C)
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20

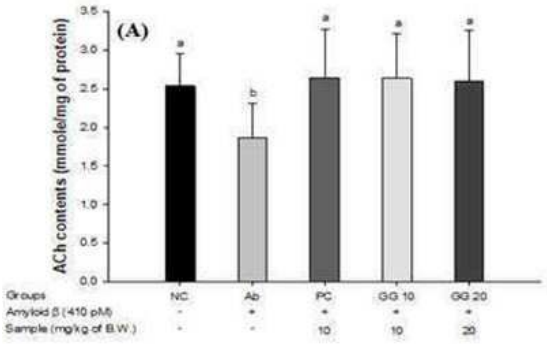
도면10

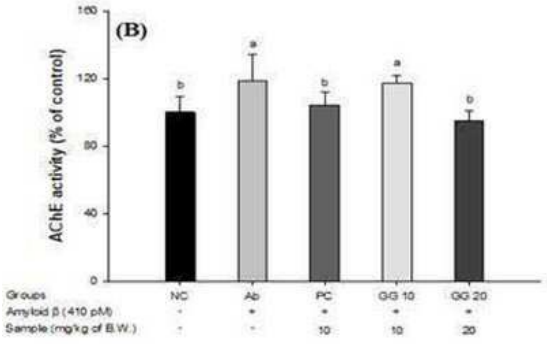

(A)
Latency during habituation (sec)
120
100
80
60
40
20
0
a
a
a
a
a
Groups
Amyloid β (410 pM)
Sample (mg/kg of B.W.)
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20
-
+
+
+
+
-
-
10
10
20
(B)
Step-through latency (sec)
350
300
250
200
150
100
50
0
a
c
a
b
a
Groups
Amyloid β (410 pM)
Sample (mg/kg of B.W.)
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20
-
+
+
+
+
-
-
10
10
20

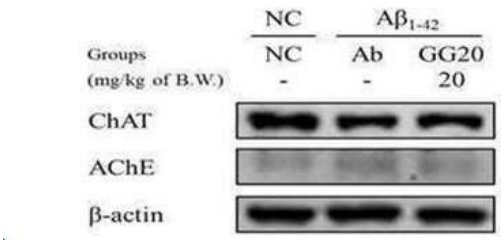
도면11


(A)
Escape latency (sec)
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
(B)
Time in W zone (%)
Groups
Amyloid β (410 pM)
Sample (mg/kg of B.W.)
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20
(C)
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20

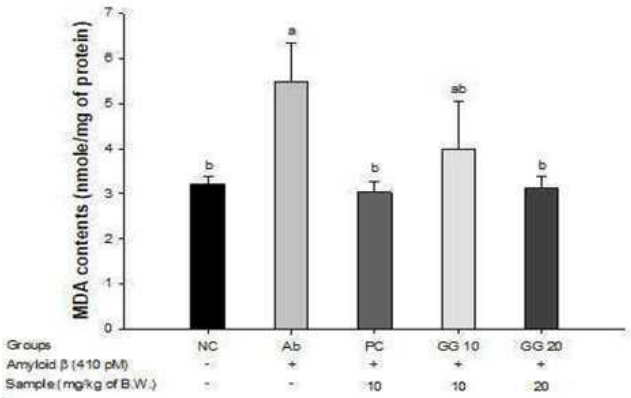
도면12


(A)
ACh contents (mmole/mg of protein)
Groups
Amyloid β (410 pM)
Sample (mg/kg of B.W.)
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20

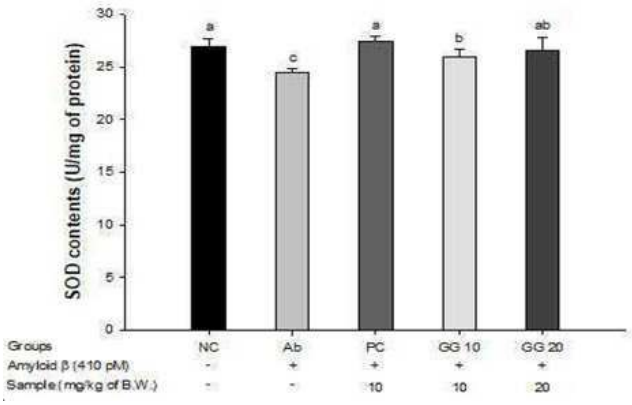

(B)
AChE activity (% of control)
Groups
Amyloid β (410 pM)
Sample (mg/kg of B.W.)
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20


NC
Aβ1-42
Groups
(mg/kg of B.W.)
NC
Ab
GG20
20
ChAT
AChE
β-actin

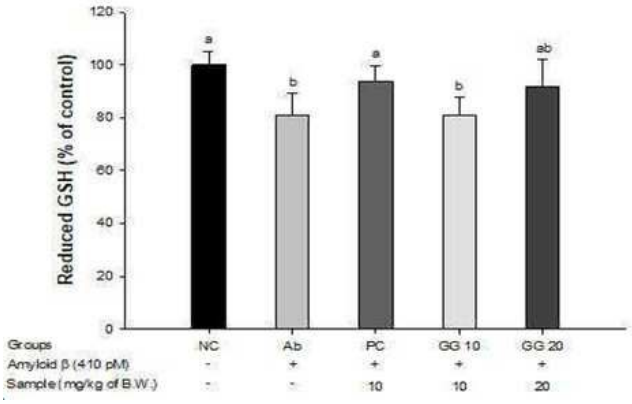
도면13


MDA contents (nmole/mg of protein)
Groups
Amyloid β (410 pM)
Sample (mg/kg of B.W.)
NC
Ab
PC
GG 10
GG 20

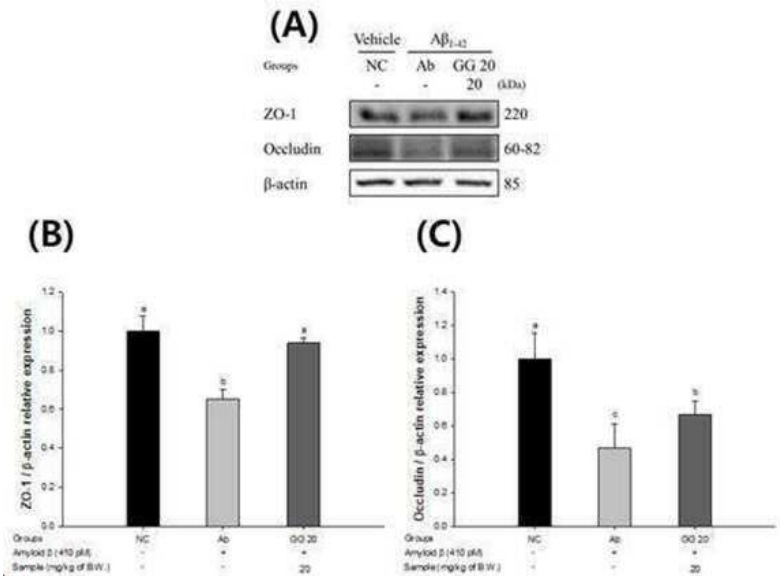
도면14



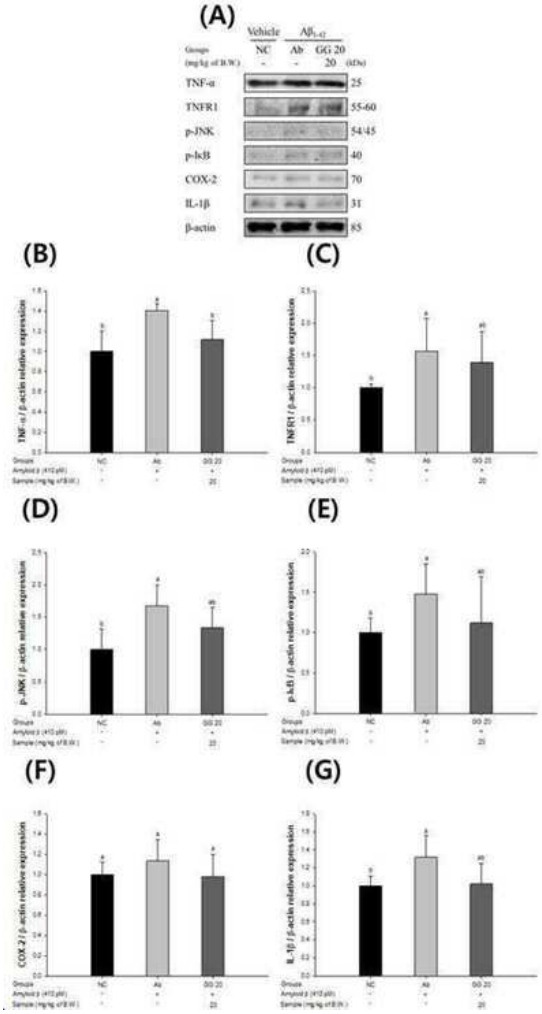
도면15



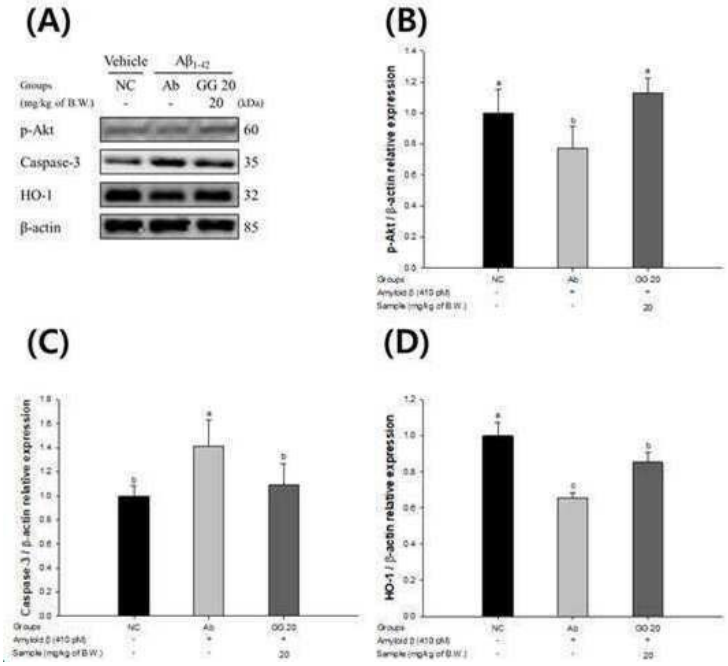
도면16



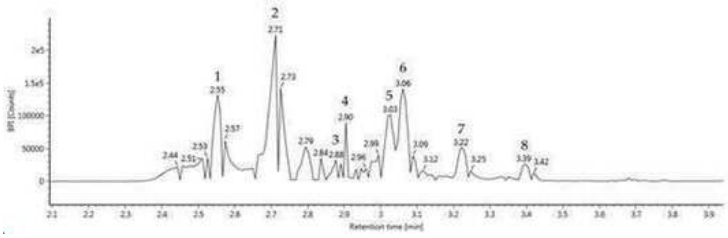
도면17


(A)
Vehicle
Aβ1-42
Groups
NC
Ab
GG 20
(mg/kg of B.W.)
20
(kDa)
TNF-α
25
TNFR1
55-60
p-JNK
54/45
p-IκB
40
COX-2
70
IL-1β
31
β-actin
85
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
(G)

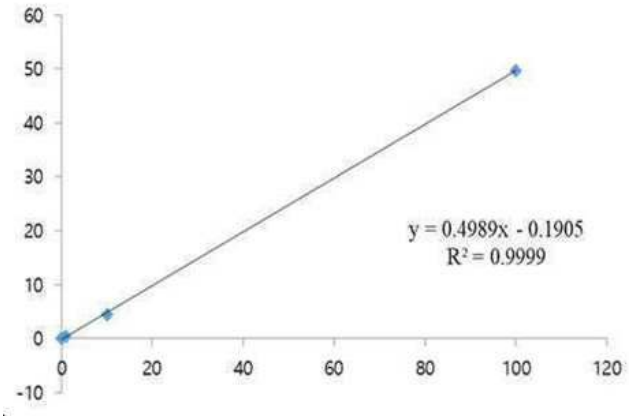
도면18


(A)
Vehicle
Aβ1-42
Groups
NC
Ab
GG 20
(mg/kg of B.W.)
20
(kDa)
p-Akt
60
Caspase-3
35
HO-1
32
β-actin
85
(B)
p-Akt / β-actin relative expression
(C)
Caspase-3 / β-actin relative expression
(D)
HO-1 / β-actin relative expression

도면19


1
2
3
4
5
6
7
8

도면20


y = 0.4989x - 0.1905
R² = 0.9999
60
50
40
30
20
10
0
-10
0
20
40
60
80
100
120