



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0041879  
(43) 공개일자 2011년04월22일

(51) Int. Cl.

A61K 36/49 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01) A61K 31/353 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0098897

(22) 출원일자 2009년10월16일

심사청구일자 2009년10월16일

(71) 출원인

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

허호진

경상남도 진주시 이현동 이현하이클래스웰가아파트 109동 601호

최성길

경상남도 진주시 금산면 장사리 956-1 북진주아파트 106동 1801호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

손민

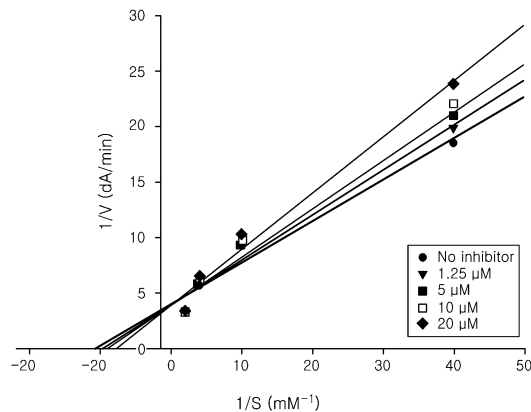
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 뇌신경 세포 보호 활성 및 아세틸콜린에스테라제 저해 활성을 갖는 율피 추출물 및 그의 용도

### (57) 요약

본 발명은 율피 추출물로부터 카테킨, 에피카테킨, 및 갈릭 에시드를 분리하는 방법 및 율피 추출물과 이로부터 분리된 카테킨, 에피카테킨, 및 갈릭 에시드의 신규한 용도에 관한 것이다. 보다 구체적으로 율피 추출물 또는 이로부터 분리된 카테킨, 에피카테킨, 및 갈릭 에시드 중에서 선택된 1 이상의 폴리페놀 성분을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물 및 뇌질환 개선용 기능성 건강 식품 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물 및 기능성 건강 식품 조성물은 알츠하이머성 질환 등을 포함한 퇴행성 뇌신경 질환에 특히 우수한 효과를 발휘한다.

대표도 - 도9



(72) 발명자

**정창호**

경상남도 진주시 가좌동 900

**곽지현**

경상남도 진주시 신안동 흥한1차아파트 103동 100  
1호

**김지혜**

경상남도 진주시 문산읍 삼곡리 고려맨션 508호

**최귀남**

경상남도 진주시 가좌동 900 경상대학교 식품공학  
과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KRF-2008-521-F00074

부처명 한국연구재단

연구관리전문기관

연구사업명 지역대학우수과학자지원사업

연구과제명 폐기용 율피(밤내피)의 생리활성 성분 분석과 뇌 신경세포 손상 예방에 대한 보호 소재  
연구

기여율

주관기관 경상대학교

연구기간 2008년 07월 01일 ~ 2009년 06월 30일

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

울피 추출물을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물.

### 청구항 2

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

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 뇌질환은 알츠하이머성 질환인 조성물.

### 청구항 4

울피 추출물을 포함하는 뇌질환 개선용 기능성 건강 식품 조성물.

### 청구항 5

갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 폴리페놀 성분 또는 이의 약제학 적으로 허용되는 염을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서, 상기 폴리페놀 성분은 울피에서 분리된 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 7

제5항에 있어서, 상기 뇌질환은 알츠하이머성 질환인 조성물.

### 청구항 8

제5항에 있어서, 상기 뇌질환은 뇌 세포 내 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 뇌질환인 조성물.

### 청구항 9

제5항에 있어서, 상기 조성물은 뇌신경 세포 손상 저해 활성 또는 아세틸콜린에스테라제 저해 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

### 청구항 10

갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 폴리페놀 성분 또는 이의 약제학 적으로 허용되는 염을 포함하는 뇌질환 개선용 기능성 건강 식품 조성물.

## 청구항 11

- a) 율피로부터 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 율피 추출물을 얻는 단계;
  - b) 얻은 추출물로부터 물 또는 비극성 유기 용매를 이용하여 분획물을 얻는 단계;
  - c) 상기 분획물에서 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 폴리페놀 성분을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는,
- 제5항의 조성물을 제조하는 방법.

## 청구항 12

제11항에 있어서, 단계 b)의 비극성 유기용매는 에틸아세테이트인 방법.

## 청구항 13

제11항에 있어서, 단계 c)의 분리 및 정제는 크로마토그래피 과정을 포함하는 것인 방법.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술분야

- [0001] 본 발명은 율피 추출물 또는 이로부터 분리된 카테킨, 에피카테킨, 및 갈릭 에시드 중에서 선택된 1 이상의 폴리페놀 성분을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물 및 뇌질환 개선용 기능성 건강 식품 조성물에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [0002] 최근 WTO 체제 출범과 칠레, 미국과의 FTA 체결 이후 우리나라의 농업은 여러 가지 면에서 위기에 처하여 있고, 기존의 농업 작물만으로는 이미 한계에 이르게 되어 우리나라 농업의 생산 기반은 총체적으로 붕괴 위기에 있다.
- [0003] 특히, 밤은 임산물 가운데 가장 중요한 품목으로 수출을 통한 소득증대에 크게 기여해 왔으나 2002년과 2003년 연속적인 태풍으로 인해 생산량이 급감하였으며, 주된 수출 시장인 일본으로의 수출량이 급감하고, 중국산 밤의 수입이 급증하는 등 산업 전체가 상당한 위기에 맞고 있는 실정이다. 한국농촌경제연구원 연구에 따르면, 현재와 같은 시장 조건이 그대로 유지될 경우 밤 전체 생산량은 약 21% 감소하며, 조제 밤의 수입이 증가하여 공급량에 대한 전체 수입량의 비율이 약 6.7% 포인트 증가한 14.4% 정도 될 것으로 예상되고 있다. 또한, 1인당 밤 소비량은 약 24% 감소한 0.99kg에 머물 것으로 보이며, 생산자 가격의 상승 폭은 62%가 될 것으로 전망되고 있다. 따라서, 생산자 가격 상승에 따른 재배자의 수익은 ha당 122% 증가할 것으로 예측되고 있다.
- [0004] 밤나무(*Castanea crenata* S.)는 참나무과에 속하는 낙엽교목으로 우리나라 전 지역에 걸쳐 널리 자생 또는 재배되고 있는 식물이다. 주로 열매는 율자(栗子)라 하여 수확한 후 식용하거나 일부를 한약재 및 양금 등의 가공식품으로 이용하고 있으며, 과일 이외에도 수피, 뿌리, 꽃 및 잎을 달인 액이나 분말은 창상 및 염증의 치료에 효과가 있고, 잎은 우리나라와 유럽 등지에서 옷나무에 의한 알레르기 질환이나 천식성 기침에 민간약으로 사용하였다.
- [0005] 그러나 과거는 물론 현재까지 율피는 사용하지 않고 폐기해왔다. 따라서 밤의 율피는 불가식부이기 때문에 율피

를 지역 가공 공장 등에서 확보하는 것은 크게 어려운 과정이 아니며, 특히 율피는 가공 중 전체 밤 함량의 약 25%를 차지하고 있을 뿐만 아니라 전국에 조업 중인 밤 가공 공장은 약 20여개로 추산되며 이들 공장으로부터 폐기되는 율피의 양도 1996년도 가공량을 기준으로 볼 때 약 15,000톤으로 추정된다. 따라서, 율피를 이용하여 고부가가치 제품 개발을 위한 소재화 연구를 수행한다면 이에 따른 생산적 가치 및 경제적 가치는 매우 클 것이다.

[0006] 또한, 지금까지의 밤에 대한 연구는 과육을 이용한 통조림으로 가공하는 연구나 그 전분을 이용하는 가공연구 목적으로 진행되어 왔고, 상대적으로 율피의 영양성분 및 기능성 물질 등은 과학적으로 규명이 되어 있지않은 상태이다.

[0007] 뿐만 아니라, 밤나무의 주산지로는 경남 (하동, 산청, 진주, 함천 등), 전남 (광양, 순천, 구례 등), 충남 (공주, 부여), 충북 충주 등을 들 수 있는데 이들 지역에서 생산된 밤은 2005년 전국 생산량의 85%를 차지한다. 그 중 경남은 전국에서 가장 많은 재배 면적을 확보하고 있어 율피 관련 연구는 지역적 필요성 또한 내포하고 있다.

[0008] 한편, 최근의 알츠하이머성 질환 연구는 아밀로이드 베타 단백질(amyloid  $\beta$  protein)에 의한 뇌세포 파괴, 그리고 이들 단백질의 구조, 생리작용, 뇌 안에서의 축적에 의한 아세틸콜린(acetylcholine, ACh; neurotransmitter)의 레벨(level) 감소 등이 중심이 되고 있다. 알츠하이머성 질환의 치료는 주로 환자의 증세를 가볍게 하고, 병의 진행 속도를 지연시키는데 주안을 두고 있다.

[0009] 현재까지 보고된 항 알츠하이머성 질환 활성화 성분은 주로 식물기원성 저분자이다. 특히, 노인성 치매 환자들에게 인지적 증상을 호전시키는 약물로서 콜린 에스테라제 저해제(choline esterase inhibitors ; ChEIs)가 많이 사용되고 있다. 제1세대 ChEIs로서 최초로 항치매 작용에 있어 적용 승인을 받은 tacrine은 작용지속 기간이 짧아 하루 4번 투여해야 하며, 간 독성이 있어 모니터링에 번거로움이 있다. 요즘 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 노바티스사에서 개발한 약물로, 스위스에서 1997년 12월 승인받아 EU와 남아메리카 국가들에서 사용되고 있고, 미국, 캐나다에서도 승인 준비 중이며, 우리나라에서는 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 진행 중이며, 비가역적인 AChEIs로서 작용기간이 긴 것으로 보고되고 있다.

[0010] 그러나 상기 약물들은 일시적으로 증상만 완화시킬 뿐이므로 병을 근원적으로 치료하거나 병의 진행 자체를 억제하는 약물 개발 기술이 절실히 요구되고 있다. 또한, 아밀로이드 베타 단백질의 생성과 아밀로이드 베타 단백질-유도된 세포독성(cytotoxicity)을 저해 또는 차단(blocking) 시켜주는 연구가 계속되고 있으나 이를 실현시켜 주는 신소재나 약은 현재 전무한 실정이다.

[0011] 이에, 본 발명자들은 그 심각성이 날로 증대되는 알츠하이머 병을 포함한 뇌질환의 예방 및 치료용 파이토케미컬(phytochemicals)를 탐색하고 이를 의약, 식품의약 및 기능성 건강 식품 조성물의 원료로 소재화하기 위한 방법을 모색하였다. 그 결과, 우리나라 고유의 임산물 중 하나인 율피로부터 아밀로이드 베타에 의해 유도된 뇌신경 독성을 저해하는 미량소재를 탐색하고 이를 분리 정제함으로써 본 발명을 완성하였다. 이는 현재 폐기되고 있는 율피 자원의 활용방안이 될 수 있으며 이는 자원낭비 방지와 밤 재배 농가의 소득증대에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 율피 추출물 또는 그로부터 분리된 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨으로 이루어진 군에서

선택된 하나 이상의 폴리페놀 성분을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 율피 추출물 또는 그로부터 분리된 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 폴리페놀 성분을 포함하는 뇌질환 개선용 건강식품 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 율피 추출물로부터 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨을 분리하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

### 과제 해결수단

[0015] 하나의 양태로서, 본 발명은 율피 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0016] 또 다른 양태로서, 본 발명은 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 폴리페놀 성분 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0017] 본 발명자는 율피 추출물이 산화 스트레스(활성산소(ROS), 지질 과산화, 단백질 변경, 미토콘드리아 DNA 산화 등)에 대한 항산화활성을 가지며, 이로부터 뇌신경 세포 보호 활성을 가짐을 발견하였다. 또한, 추가적으로 그러한 율피 추출물 중 특히 뇌신경 세포 보호 활성을 나타내는 유효 성분을 밝히고자 하였다. 이를 위하여, 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면 본 발명자는 율피를 물로 추출하여 물 추출물을 얻은 후(실시예 1), 이를 에틸아세테이트로 분획하고 이로부터 크로마토그래피를 수행함으로써 활성을 나타내는 폴리페놀화합물을 분리 및 정제하였으며, 이들 폴리페놀 화합물은 구체적으로 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨 이었다.(실시예 2, 도 1).

[0018]

[0019] 율피 추출물은 항산화 활성에 의한 뇌신경 세포 보호 활성을 가진다.

[0020] 본원에서의 용어, "율피"는 참나무과에 속하는 낙엽교목인 밤나무(*Castanea crenata* S.) 열매에서 과육(노란색) 및 외피를 제외한 부분을 말하는 것으로 밤 내피라고도 칭하며, 상기 밤나무에는 천연, 잡종, 변종 식물이 모두 포함되는바, 율피 추출물은 천연, 잡종, 및 변종 밤나무에서 추출될 수 있다.

[0021] 본 발명자들은 아밀로이드 베타 단백질에 의한 신경 세포 괴사 과정 중 산화 스트레스가 유발되며, 율피 추출물은 이러한 아밀로이드 베타 단백질에 의한 손상을 효과적으로 저해함으로써 궁극적으로 뇌신경 세포 보호 작용을 나타냄을 확인하였다. 이로서, 율피 추출물은 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도되는 산화 스트레스를 효과적으로 감소시켜 줌으로써, 세포 안에서 과도하게 발생한 산화 스트레스에 의한 신경 세포 괴사 기전을 효과적으로 차단하여 높은 세포생존율을 유지시키고, 그 결과 신경 세포의 손상을 효과적으로 방어한 것임을 알 수 있었다.

[0022] 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 본 발명자들은 율피 물 추출물의 뇌신경 세포 보호 활성 효과를 확인하였는바 보다 구체적으로, DPPH 라디칼 소거활성효과를 측정한 결과, 항산화활성이 우수함을 알 수 있었고, 율피 물 추출물의 농도가 증가함에 따라 그 활성도 증가함을 알 수 있었다(실험예 1).

[0023] 또한, 율피 추출물로부터 분리한 폴리페놀 화합물인 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨은 뇌신경 세포 보호 활성 및 아세틸콜린에스터레이즈 저해 활성을 가진다.

- [0024] 본 발명에 따른 뇌신경 세포 보호 활성 및 아세틸콜린에스테라제 억제 활성을 갖는 "갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨"은 천연물질, 바람직하게 율피로부터 분리할 수 있고, 당 분야의 공지된 방법으로 화학적 합성법에 의해 제조될 수도 있다.
- [0025] 본원에서의 용어, "약제학적으로 허용되는 염"은 통상적인 방법으로 제조한 염을 의미하며, 당업자에게 공지되어 있다. "약제학적으로 허용되는 염"은 약리학적으로 또는 생리학적으로 허용되는 다음 무기산과 유기산 및 염기로부터 유도된 염을 포함하지만 이것으로 한정되지는 않는다. 적합한 산의 예로는 염산, 브롬산, 황산, 질산, 과염소산, 푸마르산, 말레산, 인산, 글리콜산, 락트산, 살리실산, 숙신산, 툴루엔-p-설폰산, 타르타르산, 아세트산, 시트르산, 메탄설폰산, 포름산, 벤조산, 말론산, 나프탈렌-2-설폰산, 벤젠설폰산 등을 포함할 수 있다. 적합한 염기로부터 유도된 염은 알칼리 금속, 예를 들어, 나트륨, 알칼리금속, 예를 들어, 마그네슘, 암모늄 등을 포함할 수 있다.
- [0026] 본원에서의 용어, "뇌신경 세포 보호 활성"은 산화 스트레스로 인해 뇌신경 세포가 파괴되는 것을 차단 또는 그 효율을 감소시키는 것을 말한다. 아밀로이드 베타 단백질은 산화 스트레스를 유발시켜 내부-세포의 자유 라디칼 상태(intra-cellular free radical status)를 만들고 궁극적으로 뇌신경 세포의 괴사를 유도한다. 따라서 산화 스트레스의 제거 여부 및 뇌신경 세포 생존 여부가 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 세포독성에 대한 뇌신경 세포 보호의 중요한 지표가 된다.
- [0027] 본원에서의 용어, "아밀로이드 베타 단백질"은 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein ;APP)의 비정상적 분열로부터 생성된 40-42개의 단백질 물질이고, 이것이 뇌신경의 불활성화와 괴사의 원인임은 물론 퇴행성 질환의 하나인 알츠하이머성 질환에서도 중요한 병리학 물질(pathogenetic material)로 생각되고 있다. 또한, 아밀로이드 베타 단백질은 내세포의 자유 라디칼 상태(intracellular free radical status)를 유발시키고, 궁극적으로 세포 사멸을 유도하는바 아밀로이드 베타와 뇌신경세포 파괴는 상관성이 있을 것으로 추정되고 있다. 아밀로이드 베타 단백질에 의한 ROS 자유 라디칼 등의 생성은 아밀로이드 베타-유도된 자유 라디칼-매개된 신경독성(neurotoxicity)으로 이어질 것으로 예측된다.
- [0028] 본 발명에서의 용어, "아세틸콜린에스테라제 억제 활성"이란 아세틸콜린에스테라제를 억제함으로써 시냅스(synapse) 내의 아세틸콜린(acetylcholine) 농도를 증가시키고, 신경보호작용(neuroprotective effect) 및 신경손상을 회복시키는 작용을 의미한다. 예를 들어, 알츠하이머성 질환의 경우 뇌 안에서의 아밀로이드 베타 단백질의 축적에 의한 아세틸콜린(acetylcholine, ACh; neurotransmitter)의 레벨(level) 감소가 그 원인의 하나로 지목되고 있는바 아세틸콜린에스테라제 억제 활성이 알츠하이머성 질환의 치료를 위한 핵심요소가 될 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 "아세틸콜린에스테라제"란 아세틸콜린 가수 분해 효소를 말한다. 뇌조직의 모든 신경세포에서 발견되는 신경전달물질로서 아세틸콜린(Acetylcholine ;ACh)은 시냅스(synapse)와 시냅스 사이의 신경전달에 관계하는 중요한 신경전달물질로 알려져 있다. 뇌신경계의 특정부위에서 아세틸콜린(ACh)이 시냅스 전 말단에서 분비되면 그것이 시냅스 후 수용체와 결합하여 신경세포 사이의 자극을 전달한다. 그러나 제 2의 자극이 시냅스를 통해 전달하기 전에 제 1의 자극 시에 분비된 아세틸콜린(ACh)은 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase ;AChE)에 의하여 가수분해 되어야한다. 그런데 아세틸콜린(ACh)의 합량과 합성효소로서 콜린아세틸트랜스퍼라제(choline acetyltransferase ;ChAT)의 활성이 대부분의 사람 및 설치동물에서 연령과 함께 감소하는 것으로 알려져 있다. 또한 아세틸콜린에스테라제의 활성도 아세틸콜린(ACh)과 마찬가지로 감소한다는 사실도 밝혀지고 있다.
- [0030] 본 발명의 구체적 실시예에서, 본 발명자들은 율피 추출물로부터 분리한 폴리페놀 화합물인 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨의 뇌신경 세포 보호 활성 및 아세틸콜린에스테라제 억제 활성을 확인하였다.

- [0031] 보다 구체적으로 하기 실험예들을 통해 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨의 뇌신경 세포 보호 활성을 확인하였다.
- [0032] 갈릭엑시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 ABTS 라디칼 소거활성 및 VCEAC(vitamin C equivalent antioxidant capacity) 측정한 결과 화합물의 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼의 흡광도가 감소하는 경향을 보였으며, 모든 농도에서 양성 대조군으로 사용된 아스코르브산 보다 높은 라디칼 소거능을 나타냄을 알 수 있었다(실시예 2, 도 4).
- [0033] 또한, 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서 신경 세포에 대한 보호 효과를 측정한 결과 특히 카테킨 및 에피카테킨의 효과가 우수함을 알 수 있었다(실시예 3, 도 5).
- [0034] 신경세포의 경우 상대적으로 많은 지질 성분을 함유하고 있고 이로 인해 산화적 스트레스에 매우 취약하게 된다. 따라서, 신경 세포 보호효과와 신경 세포막 손상과의 관계를 알아보고자 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨의 아밀로이드 베타 단백질로 유도된 신경세포막 손상에 대한 보호효과를 확인하기 위하여 신경세포 중에 함유되어 있는 세포질 성분의 LDH(lactate dehydrogenase) 방출량을 측정하였다. 그 결과, 본 발명의 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨을 처리하면 LDH 방출량이 감소함을 알 수 있었으며 즉 이는 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨이 신경세포 보호 효과는 물론 신경세포막 손상 보호 효과도 탁월함을 보여주는 것이다(실시예 4, 도 6).
- [0035] 뿐만 아니라, 산화적 스트레스에 의해 유도된 신경 세포에 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨을 처리한 결과 세포독성이 저하됨을 통해 이들의 신경 세포 보호 효과를 알 수 있었다(실시예 5, 도 7). 특히 카테킨 및 에피카테킨의 효과가 우수하였다.
- [0036] 또한, 실험예 6 및 7을 통해 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨의 아세틸콜린에스터레이즈 저해 활성을 확인한 결과, 특히 갈릭 에시드가 높은 저해 활성을 나타냈으며(도 8), 농도를 달리하여 기질농도 및 초기 효소반응 속도와의 관계를 특정한 결과 갈릭 에시드가 아세틸콜린에스터레이즈의 경쟁적 저해제로써 작용함을 알 수 있었다(도 9).
- [0037] 상기한 바와 같이, 율피 추출물로부터 분리한 폴리페놀 화합물, 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨이 우수한 뇌신경 세포 보호 활성 및 아세틸콜린에스터레이즈 저해 활성을 가짐을 확인함으로써, 이들 화합물이 분리된 율피 추출물 역시 동일한 활성을 가질 것으로 충분히 예측할 수 있다.
- [0038] 따라서, 율피 추출물 또는 이로부터 분리한 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨은 상기에서 살펴본 이유로 뇌질환에 대한 우수한 예방 및 치료 활성을 갖는다.
- [0039] 상기 율피 추출물 및 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨은 인공적으로 합성된 화합물이 아니라 천연 추출물로부터 획득한 성분을 기초로 하므로 안전하고 독성, 부작용이 거의 없으므로 장기간의 복용이 가능하다는 장점이 있다. 또한, 상기 조성물은 인간 뿐만 아니라, 뇌질환이 발생할 수 있는 소, 개 등의 동물에게 사용될 수도 있다.
- [0040] 따라서 본 발명은 율피 추출물 및 율피 추출물로부터 분리한 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물로 이용될 수 있다.
- [0041] 예를 들어, 아밀로이드 베타 단백질로 인해 유발되는 다양한 뇌질환이 있으며, 이들 아밀로이드 단백질로 인해 산화 스트레스가 생기고 궁극적으로 뇌신경 세포가 파괴되는 등이 문제되는 뇌질환이 본 발명에 따른 치료 또는 예방의 대상이 되는 질환에 속한다.

- [0042] 구체적으로 상기 뇌질환에는 하기와 같은 질병이 포함된다.
- [0043] 신경변성질환(알츠하이머 병, 헌팅턴 무도병, 파킨스 질환), 노인성 치매, 전두측두성 치매, 혈관성 치매, 편두통, 중추기원의 신경병변성 동통과 같은 신경계 질환;
- [0044] 우울증(내인성, 저항성, 반응성 또는 원인불명성 우울증), 신경쇠약, 정신분열병, 양극성 증후군, 범불안장애, 스트레스-관련 질환, 공황장애, 강박신경증, 외상후 스트레스 장애, 주의력결핍과다활동장애, 식이장애(특히 폭식증, 식욕부진), 공포증(특히 광장공포증), 자폐증과 같은 정신 질환;
- [0045] 신경계 또는 정신 질환에 관련된 기억, 주의력 및 각성 장애.
- [0046] 뇌신경의 불활성화와 괴사의 원인은 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein ;APP)의 비정상적 대사산물인 아밀로이드 베타 단백질에 의한 세포 독성(cytotoxicity)으로 생각되고 있다. 그것의 신경 독성은 산화적 스트레스(ROS 등)로 인한 뇌신경 세포 파괴에서 시작된다.
- [0047] 특히, 알츠하이머성 질환의 원인은 매우 다양하지만 전반적인 발병 스킴(scheme)은 다음과 같다; Presenilin 1, 2 gene(PS 1, 2)의 돌연변이 →  $\beta$ -secretase에 의한 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein ;APP)의 비정상적 분열 → 아밀로이드 베타 단백질의 생성 → 아밀로이드 베타 단백질에 의한 뇌신경 세포의 괴사 → 알츠하이머성 질환 발병.
- [0048] 알츠하이머성 질환에서의 뇌신경 세포 괴사의 원인은 아직 불분명하지만 산소 자유 라디칼의 생성, reactive oxygen species (ROS)와 같은 산화적 손상이 뇌신경세포 파괴 및 병인과 관련되어 있을 것으로 추정된다. 알츠하이머 환자의 뇌에서 산화적 스트레스(활성산소, 지질과산화, 단백질변성, 미토콘드리아 DNA 산화)가 증가 된다는 것이 여러 가지 실험을 통해서 증명되고 있으며, 이러한 생리적 대사 이상이 아밀로이드 플라크(amyloid plaques) 및 신경섬유 농축체(neurofibrillary tangles ;NFT)와 같은 알츠하이머 뇌 고유의 임상적 결과를 초래한다.
- [0049] 따라서, 본 발명의 유효 추출물 및 유효 추출물로부터 분리한 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염은 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도되는 산화 스트레스를 효과적으로 감소시켜 줌으로써, 세포 안에서 과도하게 발생한 산화 스트레스에 의한 신경 세포 괴사 기전을 효과적으로 차단하여 높은 세포생존율을 유지시키고, 그 결과 신경 세포의 손상을 효과적으로 방어하며, 아세틸콜린에스터라제를 저해함으로써 상기 아밀로이드 베타 단백질에 의해 뇌신경 세포가 파괴됨으로써 문제되는 뇌질환의 예방 및 치료에 효과적이다.
- [0050] 본원에서의 용어, "예방"은 본 발명에 따른 유효 추출물 또는 그로부터 분리된 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨 또는 그 약제학적 염을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.
- [0051] 본원에서의 용어, "치료"는 본 발명에 따른 추출물 또는 상기의 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 말한다.
- [0052] 본 발명의 뇌질환 예방 및 치료용 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있고, 예를 들어, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의하여 투여될 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 사용되는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의하여 적절하게 선택될 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니

다. 유효량은 바람직한 효과를 주기 위해 요구되는 화합물의 양이다. 유효량은 당업자에게 인식되어 있듯이 투여의 경로, 부형제의 사용 및 다른 약제와 함께 사용할 수 있는 가능성에 따라 변할 수 있다.

- [0054] 본 발명의 뇌질환 예방 및 치료용 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약제학적으로 허용되는 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 뇌질환 예방 및 치료용 조성물은, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 약학적 제형으로 제조될 수 있다. 제형의 제조에 있어서, 활성 성분을 담체와 함께 혼합 또는 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시키는 것이 바람직하다.
- [0056] 따라서, 본 발명의 뇌질환 예방 및 치료용 조성물은, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있고, 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0057] 예를 들어, 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.
- [0058] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들어, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.
- [0059] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되고, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들어 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0060] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로스테라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0061] 또한, 다른 양태로서, 본 발명은 율피 추출물을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 개선용 기능성 건강식품 조성물을 제공한다.
- [0062] 또 다른 양태로서, 본 발명은 율피 추출물로부터 분리한 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 폴리페놀 성분 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 뇌질환 개선용 기능성 건강 식품 조성물을 제공한다.
- [0063] 본 발명의 건강 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 드링크제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 견, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0064] 본 발명의 건강 식품 조성물에서 포함할 수 있는 필수 성분으로서 상기 율피 추출물 또는 율피 추출물로부터 분

리한 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨 또는 그의 약제학적으로 허용 가능한 염을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0065] 상기 건강 식품 조성물은 매실, 천마, 오미자, 감초, 결명자, 석창포, 오적골, 원지, 황기, 산조인, 시호, 창출, 당귀, 지자, 안육, 복령 등으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 생약 추출물을 추가로 포함할 수 있다.

[0066] 또한, 상기 언급한 바와 같이 식품보조첨가제를 추가로 첨가할 수도 있는바 식품보조첨가제는 당업계에 통상적인 식품보조첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제 등을 포함한다.

[0067] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0068] 상기 외에 본 발명의 건강 식품 조성물은 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, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0069] 또한, 다른 양태로 본 발명은 a) 율피로부터 물, 유기용매 또는 이들의 혼합용매를 이용하여 율피 추출물을 얻는 단계, b) 얻은 추출물로부터 물 또는 비극성 유기 용매를 이용하여 분획물을 얻는 단계, c) 상기 분획물에서 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 폴리페놀 성분을 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 상기 본 발명에 따른 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 폴리페놀 성분 등을 포함하는 뇌 질환 예방 및 치료용 조성물을 제조하는 방법을 제공한다.

[0070] 보다 구체적으로 율피 추출물을 제조하는 방법 그로부터 활성성분인 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨을 분리하여 뇌 질환 예방 및 치료용 조성물을 제조하는 방법은 하기와 같다.

[0071] 본 발명에 따른 율피 추출물은 물, 유기 용매 또는 이의 혼합용매를 이용하여 추출함으로써 수득할 수 있고, 바람직하게는 일정 시간 건조시켜 분쇄한 율피를 당 분야에서 공지된 바와 같은 냉침 추출, 가열 추출, 초음파 추출, 냉각 추출 등 다양한 추출법에 따라 추출할 수 있다. 추출 방법은 특별히 제한되지 않고, 유효 성분이 파괴되지 않거나 최소화된 조건에서 실온 또는 가온하여 추출할 수 있다. 이로부터 추출된 율피의 추출물로부터 활성이 높은 분획을 얻고, 이를 크로마토그래피 등의 방법에 따라 더 분리함으로써 본 발명에 따른 폴리페놀 화합물인 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨을 분리할 수 있다.

[0072] 상기 율피의 추출에 사용될 수 있는 유기 용매에는, 에탄올, 메탄올, 이소프로판올, 부탄올, 에틸렌, 아세톤, 헥산, 에테르, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, N, N-디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO), 1,3-부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 또는 이들의 혼합용매가 있다.

[0073] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 율피 분말에 물을 첨가하여 환류 냉각 추출법을 이용하여 율피 물 추출물을 수득하였다 (실시예 1).

[0074] 1차 추출된 율피 추출물로부터 활성이 높은 분획물을 얻기 위하여, 유기용매를 사용하여 분획물을 얻었다. 상기 유기용매로는 비극성 유기 용매가 바람직하며, 특히 바람직한 것으로, 헥산, 에테르, 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 이들의 혼합 용매 등이 있으며 가장 바람직하게는 에틸아세테이트이다.

[0075] 상기와 같이 얻은 비극성 용매 분획물, 즉 비극성 용매 가용층에 대해 크로마토그래피를 1회 이상 순차적으로 수행함으로써 활성 성분을 분리할 수 있으며, 크로마토그래의 컬럼의 종류와 전개 용매는 다양하게 조절될 수 있다.

[0076] 본 발명의 구체적 실시예에서, 본 발명자는 율피 물 추출물로부터 에틸아세테이트를 첨가 혼합하여 에틸아세테이트 분획물을 분리하고, HPLC 크로마토그래피를 이용하여 활성물질을 분리하였다. 상기 방법으로 분리된 활성 물질인 화합물은 갈릭 에시드, 카테킨, 및 에피카테킨인 것으로 밝혀졌다.

## 효 과

[0077] 이상에서 살펴본 바와 같이, 율피 추출물은 산화적 스트레스로부터 뇌신경 세포 보호 활성을 가지므로 약제학적 조성물 뿐만 아니라 일상 생활에서 간편하게 복용할 수 있는 기능성 건강 식품 조성물 형태로도 효과적으로 이용될 수 있다. 또한, 이들 율피 추출물로부터 분리, 정제된 폴리페놀 성분 역시 아밀로이드 베타(amyloid  $\beta$ )에 의한 뇌신경 세포 독성 저해 활성 및 아세틸콜린에스테라아스(acetylcholinesterase; AChE) 저해 활성을 가지므로 알츠하이머 등과 같은 뇌질환의 예방 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있다. 또한, 사용하지 않고 폐기해왔던 불 가식부인 율피의 폐자원을 재활용하여 뇌신경 보호 소재를 개발함으로써 보호 소재 생산비를 줄일 수 있고, 밤 생산 농가의 소득 증대 및 지역 경제발전에 도움이 될 것으로 기대된다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0078] 실시예 1 : 율피 물 추출물의 제조

[0079] 2008년 9월 경남 하동에서 재배되고 있는 밤을 구입하여 선별 및 세척하여 외피를 제거한 후 속껍질을 제거한 다음 벗겨낸 속껍질을 다시 선별, 세척한 후 열풍건조기를 이용하여 40℃의 온도로 건조하여 수분을 10%이하가 되게 하였다. 건조한 속껍질을 분쇄하여 율피 분말 50 g에 물을 500 mL 첨가하여 환류 냉각 추출한 추출물을 No. 2 여과지 (Whatman plc., Kent, UK) 여과한 후 동결건조기로 동결건조하여 사용하였다.

[0080] 실시예 2 : 율피 물 추출물로부터 갈릭 에시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 분리

[0081] 율피 10 g에 증류수 100 mL를 첨가하여 2시간 동안 환류냉각 추출하였다. 이 추출물에 동량의 에틸아세테이트를 첨가, 혼합한 후 에틸아세테이트 층의 분리와 추출을 3회 반복하였다. 이 추출물을 진공회전농축기를 이용하여 감압농축한 후 시험액{0.2 M 인산완충액(pH 3.0) : 메탄올 : 증류수 = 2 : 3 : 15, v/v/v} 10 mL에 완전히 용해시킨 후 0.45  $\mu$ m 시린지 필터(syringe filter)로 여과하여 HPLC(Agilent 1100 series, Santa Clara, CA, U.S.A)를 이용하여 분리하였다(도 1참조). 사용한 HPLC 분석조건은 다음과 같다. 검출기는 DAD(Diodarray detector)로 280 nm, column은 ODS(250 mm  $\times$  4.9 mm, 5  $\mu$ m), 이동상은 메탄올(methanol) : 아세트산(acetic acid) : 아세토니트릴(acetonitrile) : ddH<sub>2</sub>O (20 : 5 : 113 : 862 = v/v/v/v) 및 유속은 1 mL/min으로 분석하였다.

[0082] 율피 물 추출물에서 분리한 갈릭 에시드, 카테킨 및 에피카테킨의 함량은 각각 31.04, 7.54 및 6.60 mg/100 g이었다.

[0083] 실험예 1: 율피 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성 측정

[0084] 농도별 율피 물 추출물 1 mL에 에탄올로서  $1.5 \times 10^{-4}$  M 농도가 되게 한 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 4 mL씩을 혼합기(vortex)로 균일하게 혼합한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 517 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)를 측정하였다.

[0085] 율피 물 추출물을 이용하여 항산화 활성의 측정방법 중의 하나인 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과는 도 3과

같다. 율피 물 추출물의 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 보였으며, 1 mg/mL의 농도의 물 추출물에서 91.07%의 매우 높은 DPPH 라디칼 소거활성을 나타냈다.

[0086] 실험예 2: 갈릭 에시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 ABTS 라디칼 소거활성 및 VCEAC(vitamin C equivalent antioxidant capacity) 측정

[0087] PBS(Phosphate-buffered saline, pH 7.4; 100 mM potassium phosphate buffer containing 150 mM NaCl)에 1.0 mM 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride (AAPH) 와 2.5 mM ABTS를 섞어 68 ° C에서 약 13분 간 반응시킨 후, 청록색의 ABTS 용액을 734nm에서 PBS(phosphate-buffered saline)로 흡광도 값이 0.650±0.020이 되도록 조정한 ABTS 용액을 사용하였다. 농도별 화합물 20 µL와 ABTS 용액 980 µL씩을 혼합기(vortex)로 균일하게 혼합한 다음 37℃에서 10분간 방치한 후 734 nm에서 흡광도(optical density, O.D.)감소를 측정하였으며, 또한 각 순수화합물의 항산화 활성은 VCEAC(mg/100mL)값으로 표현하였다.

## 표 1

[0088] 율피 물추출물에서 분리한 화합물들의 VCEAC(mg/100mL)값

| Compounds | VCEAC (mg/100 mL) <sup>a</sup> |           |            |            |            |
|-----------|--------------------------------|-----------|------------|------------|------------|
|           | 2                              | 4         | 6          | 8          | 10         |
| 갈릭 에시드    | 5.54±0.03                      | 8.56±0.16 | 13.37±0.25 | 14.53±0.04 | 14.38±0.21 |
| 에피카테킨     | 4.38±0.20                      | 7.84±0.35 | 11.40±0.10 | 14.27±0.24 | 14.47±0.05 |
| 카테킨       | 4.29±0.22                      | 7.71±0.34 | 11.81±0.80 | 14.46±0.04 | 14.49±0.01 |

[0089] 율피 물 추출물에서 분리한 갈릭엑시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 ABTS 라디칼 소거활성 및 VCEAC(vitamin C equivalent antioxidant capacity) 측정한 결과는 도 4와 같다. 화합물의 농도가 증가함에 따라 ABTS 라디칼의 흡광도가 감소하는 경향을 보였으며, 모든 농도에서 양성 대조군으로 사용된 아스코르브산 보다 높은 라디칼 소거능을 나타냈다. 6 mg/100mL의 농도에서는 갈릭 에시드(gallic acid) 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 VCEAC 값이 각각 13.37, 11.81, 11.40 (VCEAC mg/100 mL)으로 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 세 가지 화합물들의 흡광도 감소차이가 유사하였다(도 4 및 표 1).

[0090] 실험예 3: 갈릭 에시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 뇌신경 세포 손상 억제 활성

[0091] 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 PC12 세포에 대한 보호효과는 MTT(3-(4,5-dimethyl- thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay로 측정하였다. 율피에 함유되어 있는 3가지 화합물(gallic acid, catechin 및 epicatechin)을 농도별로 PC12 세포주에 처리하여 48시간 동안 사전부화(pre-incubation) 하였고, 그 후 아밀로이드 베타 단백질을 80 µM의 농도로 증류수에 녹여 첨가한 후 3시간 동안 부화하였다. 이 상태의 PC12 세포에 MTT stock 용액(10 µL/well)을 처리하여 37℃에서 3시간 동안 부화시킨 후, MTT 가용화 용액(10% Triton X-100 in acidic isopropanol) 100 µL를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 마지막으로 흡광도는 microplate reader(680, Bio-rad, Japan)에서 570 nm(determination)와 630 nm (reference wave)에서 측정하였다. 양성 대조군은 비타민 C(200 µM)를 사용하였고, 세포 생존력(cell viability)은 대조군에 대한 % 농도(concentration)로 나타냈다.

[0092] 아밀로이드 베타 단백질(Aβ)에 의해 유도된 산화적 스트레스 상태에서, 율피에서 분리한 주요 화합물인 카테킨(catechin), 에피카테킨(epicatechin) 및 갈릭 에시드(gallic acid)의 PC12 신경세포에 대한 보호 효과를 MTT reduction assay 방법을 이용하여 측정한 결과는 도 5와 같다. 세포 생존력(Cell viability)을 측정한 결과, 아밀로이드 베타 단백질을 처리한 처리구에서는 대조군 100% 대비 20.1%의 생존율을 나타냈고 아밀로이드 베타 단백질과 비타민 C를 동시에 처리한 처리구에서는 43.2%의 생존율로 약 23% 정도의 신경세포 보호효과를

보였다. 정제물 중 카테킨을 50  $\mu$ M의 저농도로 처리한 처리구에서는 높은 93.7%로 양성 대조군으로 사용한 비타민 C의 43.2% 보다 50% 높은 신경세포 보호효과를 보였으며, 카테킨의 농도가 증가할수록 뚜렷한 농도 의존적인 보호효과를 보여주었다.

[0093] 에피카테킨을 처리한 처리구는 50  $\mu$ M의 저농도에서 비타민 C와 유사한 결과를 보였고, 역시 에피카테킨의 농도가 증가할수록 뚜렷한 농도 의존적인 보호효과를 보여주었다. 특히 200  $\mu$ M의 농도에서의 카테킨과 에피카테킨의 생존율은 각각 242.7%와 187.8%를 나타내어 카테킨이 에피카테킨 보다 55% 정도의 높은 신경세포 보호효과를 나타내었다.

[0094] 실험예 4: 갈릭 에시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 뇌신경 세포막 손상 억제 효과

[0095] 율피에 함유되어 있는 3가지 화합물(gallic acid, catechin 및 epicatechin)을 이용하여 농도별로 PC12 세포주에 처리하여 48시간 동안 사전부화시킨 후, 80  $\mu$ M 아밀로이드 베타 단백질을 처리하여 3시간 배양한 후, 5분간 원심분리(250  $\times$  g)하여 침전시키고, 100  $\mu$ L의 상등액을 새로운 웰로 옮긴 후 세포막 손상효과 측정은 LDH assay kit (Sigma Chemical Co., St. Louis MO., U.S.A)로 측정하였으며, neutral red 분석실험은 neutral red assay kit (Sigma Chemical Co., St. Louis MO., U.S.A)를 사용하여 측정하였다.

[0096] 아밀로이드 베타 단백질로 유도된 신경세포막 손상에 대한 카테킨, 에피카테킨 그리고 갈릭 에시드 정제물의 보호효과를 확인하기 위하여 신경세포 중에 함유되어 있는 세포질 성분의 LDH(lactate dehydrogenase) 방출량을 측정한 결과는 도 6과 같다.

[0097] 대조군의 방출량은 30.3% 정도인데 반해 아밀로이드 베타 단백질을 처리한 구에서는 50.5%의 방출량을 나타냈을 바, 아밀로이드 베타 단백질로 인해 LDH 방출량이 20.2%정도 증가했음을 알 수 있다. 비타민 C 200  $\mu$ M 처리군은 19.3%의 LDH 방출량을 보였고 카테킨, 에피카테킨 그리고 갈릭 에시드를 처리한 처리구는 50  $\mu$ M의 농도로 처리했을 때는 각각 56.8%, 54.8% 및 69.1%의 LDH 방출량을 나타내어 400  $\mu$ M 농도로 처리했을 경우 각각 24.6%, 40.3%, 34.1%를 나타내는 것과 비교하건대 농도 의존적으로 LDH 방출량이 감소하는 경향을 알 수 있었다. 특히 카테킨의 경우 고농도에서의 LDH 방출량이 대조군 수준으로 회복됨으로서 신경세포막 보호효과가 있다는 것을 보여주었다.

[0098] 실험예 5. 갈릭 에시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 뇌신경 세포 보호 효과

[0099] 산화적 스트레스에 의해 유도된 PC12 세포주에 카테킨, 에피카테킨 및 갈릭 에시드를 처리하여 NRU(neutral red uptake) 분석 방법으로 세포독성을 평가한 결과는 도 7과 같다. 아밀로이드 베타 단백질을 처리한 처리구에서는 대조군 100% 대비 72.5%의 생존율을 나타냈고 아밀로이드 베타 단백질과 비타민 C를 동시에 처리한 처리구에서는 137.9%의 생존율로 약 65%정도의 신경세포 보호효과를 보였다.

[0100] 카테킨과 에피카테킨을 처리한 처리구에서는 81~100%의 생존율을 나타내어 아밀로이드 베타 단백질을 처리한 구보다 20% 정도 높은 신경세포 보호효과를 나타내었다.

[0101] 실험예 6: 갈릭 에시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase, AChE) 저해 활성

[0102] 아세틸콜린에스테라제 저해 활성 측정은 아세틸콜린 아이오다이드(acetylcholine iodide)를 기질로 사용하여 측정하였다. 효소는 PC12 세포배양액 1 mL에 균질화를 위한 버퍼(1 M NaCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100 혼합액에 10 mM Tris-HCl로 pH 7.2로 조정) 5 mL를 첨가하여 글라스-콜 호모게나이저(Glass-Col homogenizer)로 균질화하였다. 균질화된 세포배양액을 10,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하였으며, 그 상등액을 효소실험을 위하여 사용하였다. 모든 추출공정은 4℃에서 수행하였으며, 추출한 효소액의 단백질 함량을 측정하기 위하여 BCA kit (bicin-choninic acid; Sigma Co., St. Louis, Mo, USA)를 이용하였고, 소혈청 알부민(vine serum albumin)으로 작성한 검량곡선에 준하여 함량을 환산하였다. 정제효소 (단백질 함량: 2.38 mg/mL) 10  $\mu$ L에 추출물 10  $\mu$ L를 넣어 37℃에서 15분간 반응시켰으며, 반응 혼합물에 50 mM 소듐 포스페이트 버퍼(sodium

phosphate buffer ; pH 8.0)에 용해시킨 Ellman's reaction mixture [0.5 mM acetylthiocholine, 1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitro benzoic acid)] 70  $\mu$ L를 첨가한 후 405 nm에서 10분 동안 2분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

[0103] 율피에서 분리, 동정한 3가지 화합물을 이용하여 아세틸콜린에스테라제의 저해활성을 측정한 결과는 도 8과 같다.

[0104] 카테킨과 에피카테킨의 아세틸콜린에스테라제의 저해활성은 6.25~400  $\mu$ M의 농도에서는 40% 내외의 저해활성으로 보였고, 농도의존적인 경향은 보이지는 않았다. 그리고, 갈릭 에시드는 농도가 증가함에 따라 저해활성이 증가하는 농도의존적인 경향을 보였으며, 특히 농도 400  $\mu$ M에서 94.77%로 가장 높은 아세틸콜린에스테라제의 저해활성을 보여 양성 대조군 보다 높은 저해활성을 보였다. 또한 율피의 주요 화합물 중 저해활성이 가장 높게 나타난 갈릭 에시드를 이용하여 IC<sub>50</sub>값을 측정한 결과 16.8  $\mu$ M이었다.

[0105] 실험예 7: 갈릭 에시드(gallic acid)의 경쟁적 저해제로써 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase, AChE) 저해 활성

[0106] 율피에서 분리한 3종류의 화합물 즉, 갈릭 에시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)를 이용하여 아세틸콜린에스테라제 저해활성을 측정한 결과 높은 저해활성을 보인 갈릭 에시드(저해제)의 농도를 달리하여(1.25~20  $\mu$ M) 기질농도, 초기 효소반응속도와의 관계 및 라인위버-버크(Lineweaver-Burk, LB) plot의 결과는 도 9와 같다.

[0107] 라인위버-버크(Lineweaver-Burk, LB) plot은 역수값을 취한 초기효소반응속도와 기질의 농도간의 상관관계를 나타낸 것으로 기질(아세틸티오콜린 아이오다이드)의 농도는 0.025 mM~0.5 mM을 사용하였다. K<sub>m</sub>= 0.094 mM, V<sub>max</sub> = 0.253 dA/min이었다.

[0108] 갈릭 에시드의 농도가 증가할수록 K<sub>m</sub> 값은 증가하는 경향을 보인데 반해, V<sub>max</sub>값은 증가하지 않고 일정한 값을 나타내었다. 이는 율피의 주요 화합물로 분리된 갈릭 에시드가 아세틸콜린에스테라제에 대하여 경쟁적 저해제로써 작용함을 알 수 있다. 참고로 FDA에서 알츠하이머 치료제로 승인받아 임상에서 사용되는 의약품인 아세틸콜린에스테라제 저해제 탁트린(tacrine)의 경우는 비경쟁 저해제인 것으로 보고되었다.

## 도면의 간단한 설명

[0109] 도 1은 율피로부터 활성물질을 분리하기 위한 순서도를 나타낸 것이다.

[0110]

[0111] 도 2는 율피 물 추출물로부터 분리한 갈릭 에시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것으로 1은 갈릭 에시드, 2는 카테킨, 3은 에피카테킨이다.

[0112] 도 3은 율피 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 것으로 ● 은 율피 물 추출물이다.

[0113] 도 4는 율피 물 추출물에서 분리한 화합물들의 ABTS 라디칼 흡광도 감소(A)와 VCEAC(B) 측정값을 나타낸 것이다. 각각 ● 은 아스코르브산, ○ 은 카테킨(Catechin), ▼ 은 에피카테킨(Epicatechin), △ 은 갈릭 에시드(Gallic acid)를 나타낸 것이다. 값은 VCEAC (mg/100 mL)의 mg 및 평균  $\pm$  SD (n = 3)으로 표현되었다.

[0114] 도 5는 아밀로이드 베타 단백질 유도성 세포독성에 대한 카테킨(catechin), 에피카테킨(epicatechin)의 신경세포 보호효과를 나타낸 것이다.

[0115] 도 6은 갈릭 에시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 아밀로이드 베타 단백질 유도성 세포막 손상에 대한 LDH 방출 저해효과를 나타낸 것이다.

[0116] 도 7은 neutral red assay을 이용한 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)의 아밀로이드 베타 단백질 유도성 세포 사멸에 대한 세포 보호 효과를 나타낸 것이다.

[0117] 도 8은 율피 물 추출물에서 분리한 갈릭 에시드(gallic acid), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)

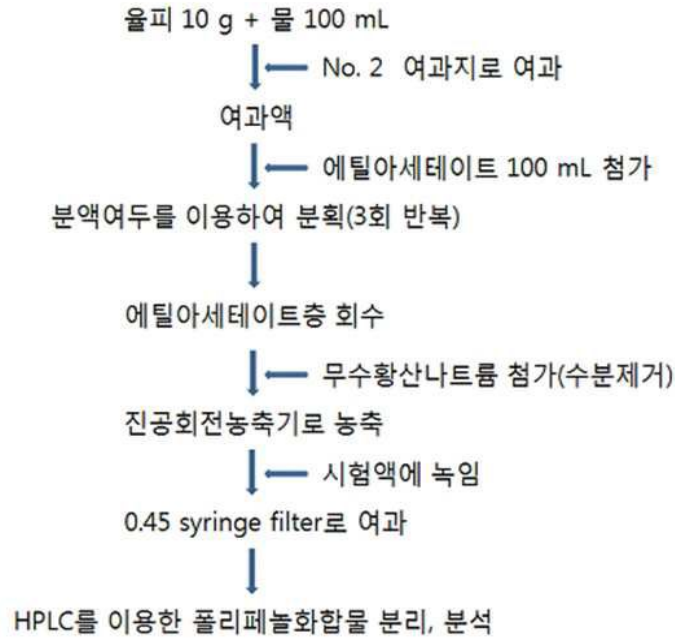
의 아세틸콜린에스터레이즈 저해효과를 나타낸 것이다.

[0118]

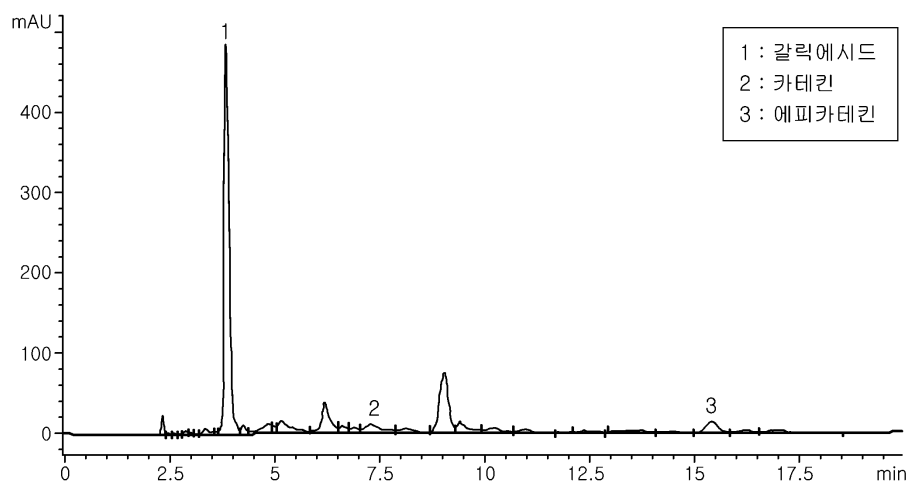
도 9는 율피 물 추출물에서 분리한 갈릭 에시드(gallic acid)의 아세틸콜린에스터레이즈(acetylcholinesterase, AChE) 저해패턴 분석한 결과를 나타낸 것이다.

## 도면

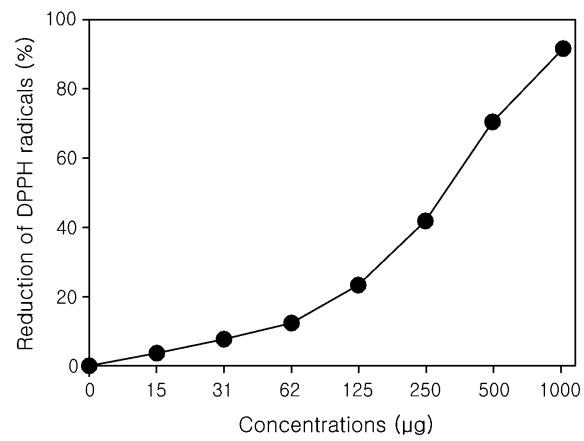
### 도면1



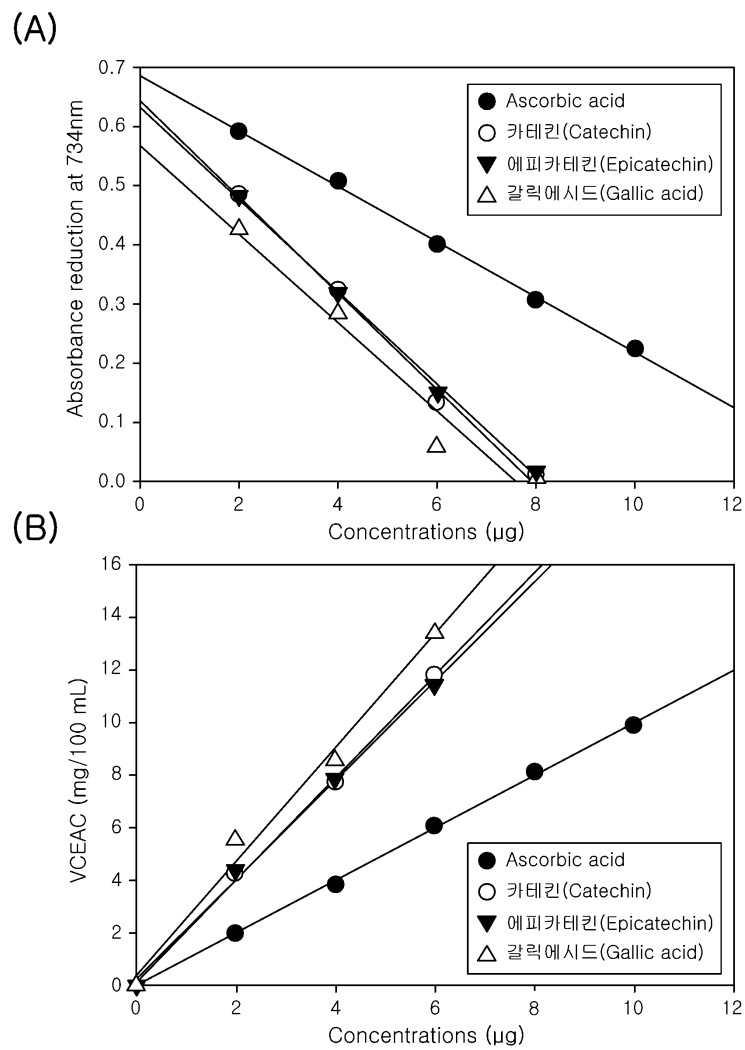
### 도면2



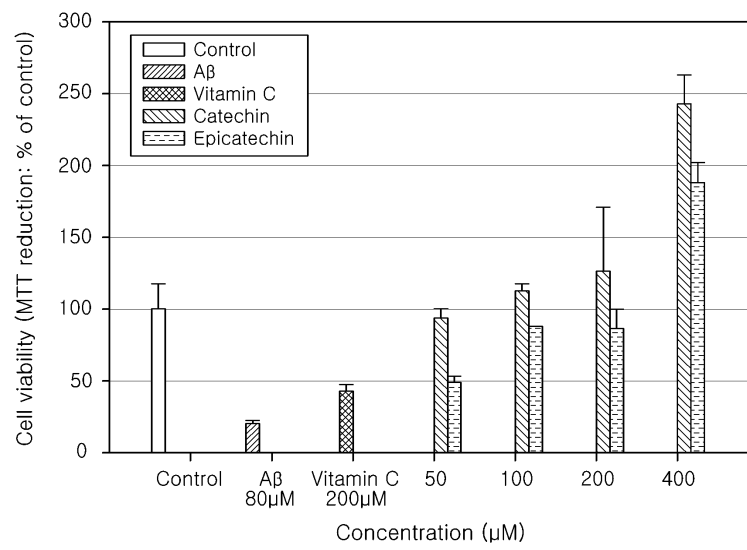
도면3



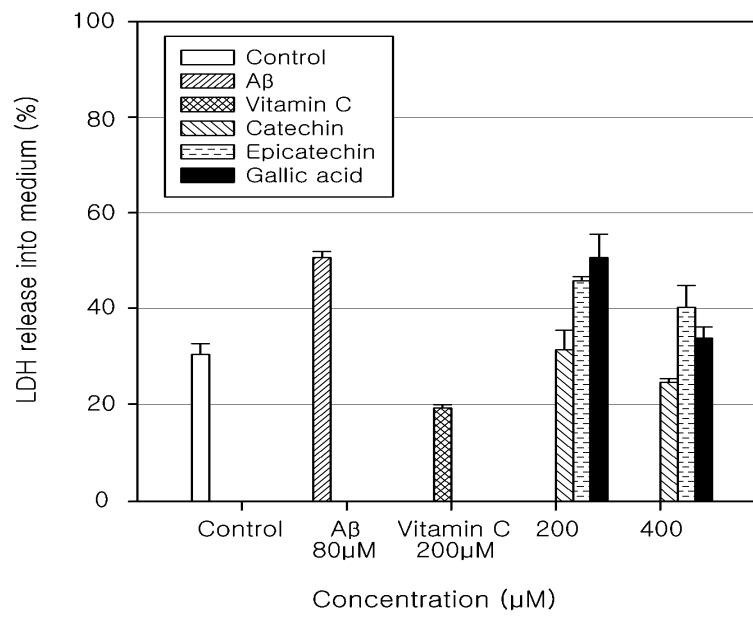
도면4



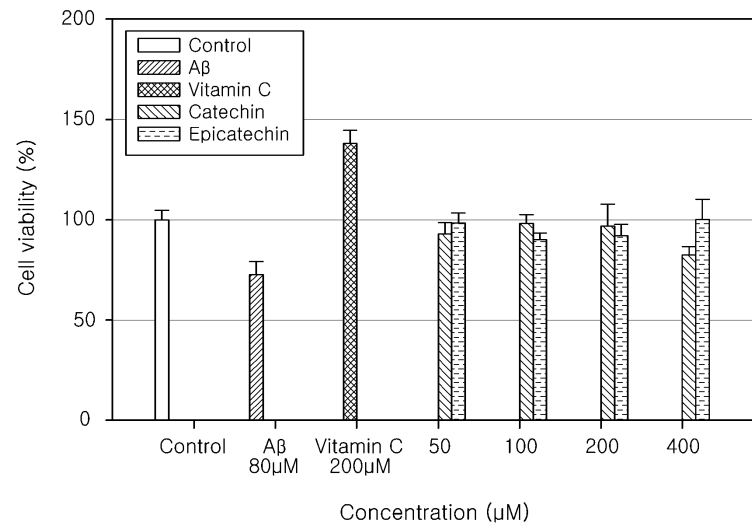
도면5



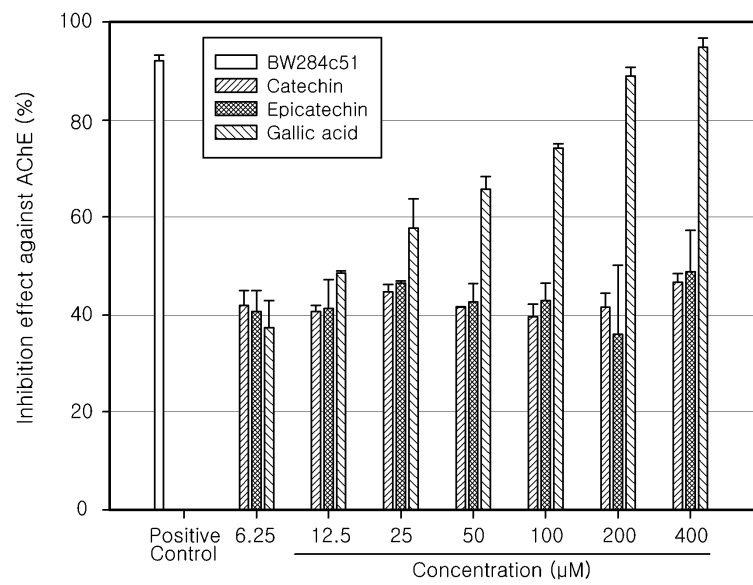
도면6



도면7



도면8



도면9

