(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0048710
(43) 공개일자 2009년05월15일

(51) Int. Cl.
A61K 31/7048 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61K 36/8964 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0114702
(22) 출원일자 2007년11월12일
심사청구일자 2007년11월12일

(71) 출원인
김동현
서울시 강남구 압구정동 369-1 현대아파트 20-902
(72) 발명자
김동현
서울시 강남구 압구정동 369-1 현대아파트 20-902
한상준
서울시 도봉구 창5동 상아 2차 아파트 8동 402호
정강식
서울시 관악구 신림 12동 1717 두영아파트 1001호
(74) 대리인
유수미

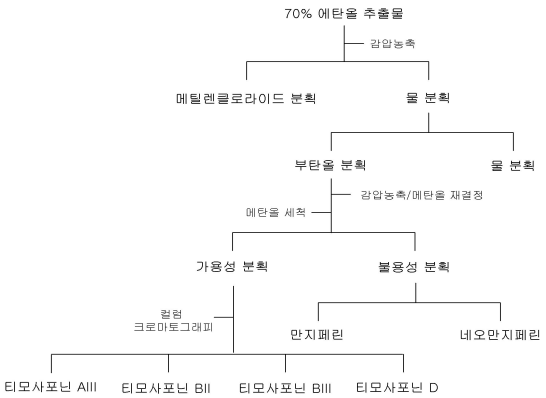
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 지모 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물을 포함하는콜린신경계 손상 개선제

(57) 요 약

본 발명은 지모 추출물; 만지페린(mangiferin), 네오만지페린(neomangiferin) 및 티모사포닌 AIII(timosaponin AIII)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물; 또는 노라티리올(norathyriol)을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제에 관한 것이다. 본 발명의 지모 추출물 및 화합물은 콜린신경계 손상으로 인한 기억력 감퇴 및 뇌손상의 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

만지페린(mangiferin), 네오만지페린(neomangiferin) 및 티모사포닌 AIII(timosaponin AIII)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제.

청구항 2

제1항에 있어서, 만지페린, 네오만지페린, 또는 만지페린과 네오만지페린의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 콜린신경계 손상 개선제.

청구항 3

노라티리올(norathyriol)을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제.

청구항 4

지모의 알코올, 물, 또는 알코올과 물의 혼합용매 추출물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제.

청구항 5

제4항에 있어서, 추출물이 70% 에탄올 추출물인 것을 특징으로 하는 콜린신경계 손상 개선제.

청구항 6

(i) 지모를 알코올, 물, 또는 알코올과 물의 혼합용매로 추출하고 감압농축시키는 단계;

(ii) 생성된 추출물을 물에 재현탁하고 메틸렌클로라이드로 분획하여 물 분획을 수득하는 단계; 및

(iii) 수득된 물 분획을 부탄올로 분획하여 부탄올 분획을 제조하는 단계를 포함하여 제조된 지모의 부탄올 분획물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제.

청구항 7

(i) 지모를 알코올, 물, 또는 알코올과 물의 혼합용매로 추출하고 감압농축시키는 단계;

(ii) 생성된 추출물을 물에 재현탁하고 메틸렌클로라이드로 분획하여 물 분획을 수득하는 단계;

(iii) 수득된 물 분획을 부탄올로 분획하여 부탄올 분획을 수득하는 단계; 및

(iv) 수득된 부탄올 분획을 감압농축하고 메탄올에서 재결정을 유도한 후, 생성된 침전물을 메탄올로 세척하여 메탄올 불용성 분획을 수득하는 단계를 포함하여 제조된 지모의 메탄올 불용성 분획물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제.

청구항 8

제7항에 있어서, 지모의 메탄올 불용성 분획물이 만지페린 및 네오만지페린을 주성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 콜린신경계 손상 개선제.

청구항 9

(i) 지모를 알코올, 물, 또는 알코올과 물의 혼합용매로 추출하고 감압농축시키는 단계;

(ii) 생성된 추출물을 물에 재현탁하고 메틸렌클로라이드로 분획하여 물 분획을 수득하는 단계;

(iii) 수득된 물 분획을 부탄올로 분획하여 부탄올 분획을 수득하는 단계;

(iv) 수득된 부탄올 분획을 감압농축하고 메탄올에서 재결정을 유도한 후, 생성된 침전물을 메탄올로 세척하여 메탄올 가용성 분획을 수득하는 단계; 및

(v) 수득된 메탄올 가용성 분획을 컬럼 크로마토그래피하여 티모사포닌 AIII를 주성분으로 함유하는 분획을 수득하는 단계를 포함하여 제조된 티모사포닌 AIII 함유 분획물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상

개선제.

청구항 10

제1항 내지 제9항중 어느 한 항에 있어서, 콜린신경계 손상 개선제가 콜린신경계 손상으로 인한 기억력 감퇴 및 뇌손상의 치료 또는 예방용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 콜린신경계 손상 개선제.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 지모 추출물 또는 그로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 지모 추출물; 만지페린(mangiferin), 네오만지페린(neomangiferin) 및 티모사포닌 AIII(timosaponin AIII)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물; 또는 노라티리올(norathyriol)을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 지모 (*Anemarrhena asphodeloides* Bunge)는 껍질째 말린 모지모(毛知母)와 껍질을 벗겨 말린 뿌리 줄기인 광지모(光知母)를 약재로 사용하며, 주요 약효로는 혈당강하작용, 해열작용, 혈소판응집 억제작용, 이뇨작용, 항암작용 등이 알려져 있다 (참고문헌 [2], [6] 및 [13] 참조). 지모의 주성분으로는 근경에 총 사포닌이 약 6% 함유되어 있으며, 그 중에서 티모사포닌 AI, 티모사포닌 AII, 티모사포닌 AIII, 티모사포닌 AIV와 티모사포닌 BI, 티모사포닌 BII 등이 알려져 있고, 최근에는 아네마르사포닌(anemarsaponin) F, G 등이 새로이 보고되었다 (참고문헌 [8] 참조). 이들 사포게닌은 주로 사르사르사포게닌(sarsarsapogenin)이고, 마르코게닌(markogenin), 네오기토게닌(neogitogenin), 릴라게닌(lilagenin) 등이다 (참고문헌 [8] 참조). 크산톤(xanthone) 계열의 화합물로 만지페린과 네오만지페린이 함유되어 있으며 항당뇨 효능이 알려져 있다 (참고문헌 [5], [9] 및 [10] 참조). 지모의 주성분으로 스테로이드계 사포닌이 있으며 이들 사포닌의 모핵인 사르사사포게닌(sarsasapogenin)은 Ren 등 (참고문헌 [12])에 의해 높은 항우울 효과가 입증되었다.

<3> 현재까지 알려진 지모의 기억과 관련한 기능은 모두 허혈에 의해 유발된 이상증상의 개선효과에 관한 것으로, 오 등(참고문헌 [11])은 지모의 물추출물이 허혈에 의해 유발된 경색부위와 부종을 완화시키는 효과가 있다고 하였고, Li 등(참고문헌 [7])은 허혈에 의해 유발된 염증이 티모사포닌 BII에 의해 완화되어 기억 및 학습능력 이상이 개선되었음을 보고하였다. 아울러, Gottlieb 등(참고문헌 [4])에 의해서도 뇌허혈에 기인한 흥분 독성과 자유라디칼 형성이 신경계에 미치는 영향을 완화하는 만지페린의 효과가 입증되었다.

<4> 그러나, 콜린신경계 이상에 기인하는 기억력 이상에 대한 지모의 개선 효과는 현재까지 보고된 바가 없다. 전뇌 기저부위의 콜린신경계는 기억 및 인지기능을 담당하며, 따라서 기억 및 인지능력의 감퇴는 노화에 의한 뇌의 콜린신경계의 손상에 기인하는 것으로 알려져 있다 (참고문헌 [1] 참조). 또한 스코폴라민은 항콜린계 물질로 아세틸콜린의 농도에 영향없이 시냅스에서 아세틸콜린의 기능을 감소시키는 물질로 기억이상을 유발하는 것으로 알려져 있다 (참고문헌 [3] 참조).

<5>

<6> 참고문헌:

<7> [1] Beatty, W. W., Butters, N., Janowsky, D. S., 1986. Patterns of memory failure after scopolamine treatment: implications for cholinergic hypotheses of dementia. Behav Neural Biol 45, 196-211.

<8> [2] Dong, J. X., Han, G. Y., 1991. A new active steroidal saponin from Anemarrhena asphodeloides. Planta Med 57, 460-462.

<9> [3] Ebert, U., Kirch, W., 1998. Scopolamine model of dementia: electroencephalogram findings and cognitive performance. Eur J Clin Invest 28, 944-949.

<10> [4] Gottlieb, M., Leal-Campanario, R., Campos-Esparza, M. R., Sanchez-Gomez, M. V., Alberdi, E., Arranz, A., Delgado-Garcia, J. M., Gruart, A., Matute, C., 2006. Neuroprotection by two polyphenols

following excitotoxicity and experimental ischemia. Neurobiology of disease 23, 374-386.

<11> [5] Ichiki, H., Miura, T., Kubo, M., Ishihara, E., Komatsu, Y., Tanigawa, K., Okada, M., 1998. New antidiabetic compounds, mangiferin and its glucoside. Biol Pharm Bull FIELD Full Journal Title:Biological & pharmaceutical bulletin 21, 1389-1390.

<12> [6] Iida, Y., Oh, K. B., Saito, M., Matsuoka, H., Kurata, H., Natsume, M., Abe, H., 1999. Detection of antifungal activity in Anemarrhena asphodeloides by sensitive BCT method and isolation of its active compound. J Agric Food Chem 47, 584-587.

<13> [7] Li, T. J., Qiu, Y., Yang, P. Y., Rui, Y. C., Chen, W. S., 2007. Timosaponin B-II improves memory and learning dysfunction induced by cerebral ischemia in rats. Neurosci Lett 421, 147-151.

<14> [8] Ma, B. P., Wang, B. G., Dong, J. X., Yan, X. Z., Zhang, H. J., Tu, A. P., 1997. New spirostanol glycosides from Anemarrhena asphodeloides. Planta Medica 63, 376-379.

<15> [9] Miura, T., Ichiki, H., Hashimoto, I., Iwamoto, N., Kato, M., Kubo, M., Ishihara, E., Komatsu, Y., Okada, M., Ishida, T., Tanigawa, K., 2001a. Antidiabetic activity of a xanthone compound, mangiferin. Phytomedicine 8, 85-87.

<16> [10] Miura, T., Ichiki, H., Iwamoto, N., Kato, M., Kubo, M., Sasaki, H., Okada, M., Ishida, T., Seino, Y., Tanigawa, K., 2001b. Antidiabetic activity of the rhizoma of Anemarrhena asphodeloides and active components, mangiferin and its glucoside. Biol Pharm Bull FIELD Full Journal Title:Biological & pharmaceutical bulletin 24, 1009-1011.

<17> [11] Oh, J. K., Hyun, S. Y., Oh, H. R., Jung, J. W., Park, C., Lee, S. Y., Park, J. H., Kim, S. Y., Kim, K. H., Kim, Y. K., Ryu, J. H., 2007. Effects of Anemarrhena asphodeloides on focal ischemic brain injury induced by middle cerebral artery occlusion in rats. Biological & pharmaceutical bulletin 30, 38-43.

<18> [12] Ren, L. X., Luo, Y. F., Li, X., Wu, Y. L., 2007. Antidepressant activity of sarsasapogenin from Anemarrhena asphodeloides Bunge (Liliaceae). Pharmazie 62, 78-79.

<19> [13] Takahashi, M., Konno, C., Hikino, H., 1985. Isolation and Hypoglycemie Activity of Anemarans A, B, C and D, Glycans of Anemarrhena asphodeloides Rhizomes1. Planta Med 51, 100-102.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<20> 본 발명자들은 지모 추출물의 약리활성에 대하여 연구하던 중, 지모 추출물 및 이에 포함된 크산톤계 화합물인 만지페린 및 네오만지페린과 스테로이드계 사포닌인 티모사포닌 AIII가 콜린신경계 이상으로 유발된 기억력 장애에 개선 효과가 있음을 알아내고 본 발명을 완성하게 되었다.

<21> 따라서, 본 발명의 목적은 지모의 알코올, 물, 또는 알코올과 물의 혼합용매 추출물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제를 제공하는 것이다.

<22> 본 발명의 다른 목적은 지모의 알코올, 물, 또는 알코올과 물의 혼합용매 추출물로부터 분리된 분획물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제를 제공하는 것이다.

<23> 본 발명의 또 다른 목적은 지모 추출물로부터 분리, 정제된 만지페린(mangiferin), 네오만지페린(neomangiferin) 및 티모사포닌 AIII(timosaponin AIII)으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제를 제공하는 것이다.

<24> 본 발명의 또 다른 목적은 지모 추출물로부터 유도된 노라티리올(norathyriol)을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제를 제공하는 것이다.

과제 해결수단

<25> 본 발명은 지모의 알코올, 물, 또는 알코올과 물의 혼합용매 추출물을 유효성분으로 함유하는 콜린신경계 손상

개선제에 관한 것이다.

<26> 본 명세서에서 알코올은 탄소수 1 내지 4개의 직쇄형 또는 분지형 알코올을 의미하며, 예를 들어 메탄올, 에탄올, 부탄올 등이 포함되나 이에 한정되는 것은 아니다.

<27> 상기 추출물은 지모를 그대로 또는 거피하여 건조시킨 후, 바람직하게는 에탄올과 물의 혼합용매, 가장 바람직하게는 70% 에탄올을 이용하여 상온 또는 그보다 높은 100℃ 이하의 조건에서 추출하여 제조한다.

<28> 다른 한편으로, 본 발명은 알코올, 물, 또는 알코올과 물의 혼합용매 추출물로부터 분리된 분획물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제에 관한 것이다. 상기 분획물의 제조공정을 도 1을 참고로 자세히 설명하면 다음과 같다:

<29> (i) 지모를 알코올, 물, 또는 알코올과 물의 혼합용매, 가장 바람직하게는 70% 에탄올로 추출하고 감압농축시키는 단계;

<30> (ii) 생성된 추출물을 물에 재현탁하고 메틸렌클로라이드로 분획하여 물 분획을 수득하는 단계;

<31> (iii) 수득된 물 분획을 부탄올로 분획하여 부탄올 분획을 수득하는 단계;

<32> (iv) 수득된 부탄올 분획을 감압농축하고 메탄올에서 재결정을 유도한 후, 생성된 침전물을 메탄올로 세척하여 메탄올 불용성 분획과 메탄올 가용성 분획을 수득하는 단계; 및

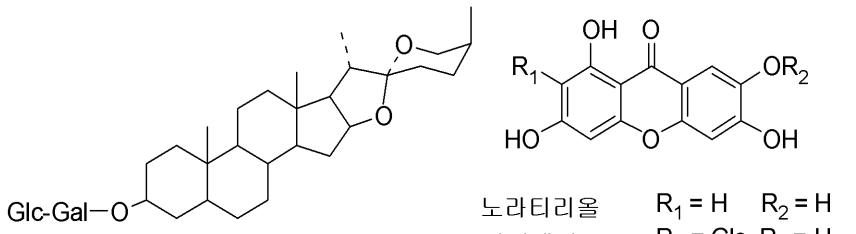
<33> (v) 수득된 메탄올 가용성 분획을 컬럼 크로마토그래피하여 티모사포닌 AIII를 주성분으로 함유하는 분획을 수득하는 단계에 의해, (iii) 단계에서는 부탄올 분획물을, (iv) 단계에서는 크산톤계 화합물인 만지페린과 네오만지페린을 주성분으로 함유하는 메탄올 불용성 분획물과 스테로이드계 사포닌을 주성분으로 함유하는 메탄올 가용성 분획물을, (v) 단계에서는 티모사포닌 AIII 함유 분획물을 각각 제조할 수 있다.

<34> 상기 단계 (v)에서, 컬럼 크로마토그래피는 바람직하게는 실리카겔 컬럼 상에서 메틸렌클로라이드, 메탄올 및 물의 혼합용매를 사용하여 수행한다. 상기 혼합용매는 메틸렌클로라이드:메탄올:물이 7:1:0.5~7:3:1인 것이 바람직하다.

<35> 또 다른 한편으로, 본 발명은 지모 추출물로부터 분리, 정제된 만지페린, 네오만지페린 및 티모사포닌 AIII으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 화합물을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제에 관한 것이다. 상기 만지페린 및 네오만지페린은 상기 단계 (iv) 에서 수득한 메탄올 불용성 분획물로부터, 상기 티모사포닌 AIII는 상기 단계 (v) 에서 수득한 티모사포닌 AIII 함유 분획물로부터 컬럼 크로마토그래피 등 통상적인 분리, 정제 방법에 의해 제조할 수 있다.

<36> 또 다른 한편으로, 본 발명은 노라티리올을 유효성분으로 포함하는 콜린신경계 손상 개선제에 관한 것으로, 노라티리올은 상기 단계 (iv) 에서 수득한 만지페린과 네오만지페린을 주성분으로 함유하는 메탄올 불용성 분획물을 사람의 장내세균으로 처리하여 제조할 수 있다.

<37> [화학식 1]



티모사포닌 **AIII**

노라티리올 $R_1 = H$ $R_2 = H$
만지페린 $R_1 = Glc$ $R_2 = H$
네오만지페린 $R_1 = Glc$ $R_2 = Glc$

<38>

<39> 본 발명의 콜린신경계 손상 개선제는 콜린신경계 손상으로 인한 기억력 감퇴 및 뇌손상의 치료 또는 예방용 약제학적 조성물로 사용될 수 있다.

<40> 본 발명의 약제학적 조성물은 경구적으로 (복용 또는 흡입) 또는 비경구적으로 (예를 들면, 정맥주사, 피하주사, 경피흡수, 직장투여) 투여될 수 있으며, 사용목적에 따라 정제, 캡슐제, 과립제, 파인 서브틸래(fine subtilae), 분제, 설하 정제, 좌약, 연고, 주사제, 유탁액제, 현탁액제, 약물처리된 시럽제 등 여러 형태

로 제형화될 수 있다. 상기 여러 형태의 약제는 부형제, 결합제, 붕해제 (disintegrator), 윤활제, 방부제, 항산화제, 등장제 (isotonic agent), 완충제, 피막제, 감미제, 용해제, 기제 (base), 분산제, 안정제, 착색제 등 상기 형태의 약제에 관용적으로 사용되는 약제학적으로 허용되는 담체 (carrier)를 사용하는 공지기술에 의해 제조된다.

<41> 상기 약제의 제조에 있어서 본 발명의 추출물 또는 화합물의 함량은 약제의 형태에 따라 다르지만, 대략 0.01 내지 100 중량%의 농도이다.

<42> 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 치료되는 사람을 포함한 포유동물의 종류, 질환의 정도 및 의사의 판단 등에 따라 넓은 범위에서 다양하게 변화된다. 그러나, 일반적으로 경구투여의 경우에는 체중 1kg당 하루에 활성성분 0.01 내지 500 mg이 투여될 수 있고, 비경구투여의 경우에는 체중 1kg당 하루에 활성성분 0.01 내지 100 mg이 투여될 수 있다. 상술한 일일 투여량은 한번에 또는 나누어서 사용될 수 있으며, 질환의 정도 및 의사의 판단에 따라 임의로 변화될 수 있다.

<43> 한편, 본 발명의 콜린신경계 손상 개선제는 기억력 감퇴의 치료 또는 예방용 건강기능식품으로도 사용될 수 있다. 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액제, 에멀젼, 시럽제 등의 경구형 제제 형태이거나, 캔디, 과자, 껌, 아이스크림, 면류, 빵, 음료 등 일반적인 식품에 첨가될 수 있다.

<44> 본 발명의 건강기능식품은 형태에 따라 통상적인 방법으로 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 감미제, 방향제, 보존제, 계면활성제, 윤활제, 부형제 등을 적절히 사용하여 제조될 수 있다.

<45> 상기 건강기능식품의 제조에 있어서 본 발명의 추출물 또는 화합물의 함량은 건강기능식품의 형태에 따라 다르지만, 대략 0.01 내지 100 중량%의 농도이다. 본 발명의 건강기능식품은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

효 과

<46> 본 발명의 지모 추출물 및 그로부터 분리된 화합물인 만지페린, 네오만지페린, 티모사포닌 AIII 및 노라티리올은 우수한 아세틸콜린에스테라제 저해 활성과 콜린신경계 손상에 의한 기억력 감퇴 및 뇌손상 완화 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 지모 추출물 및 그로부터 분리된 화합물은 기억력 감퇴의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물 또는 건강기능식품으로 사용될 수 있다.

<47>

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<48> 이하, 실시예 및 실험예에 의해 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 이들 실시예 및 실험예는 오직 본 발명을 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예 및 실험예에 국한되지 않는다는 것은 당업자에게 있어서 자명하다.

<49> 하기 실시예 및 실험예에서, NMR 분광분석은 브루커(Bruker) AM-500 (500 MHz)를 이용하였고, TLC는 머크사(Merck)의 실리카겔 $60F_{254}$를 사용하였으며, 시약은 시그마사(Sigma, USA)로부터 구입한 타크린(Tacrine: 9-amino-1,2,3,4-tetrahydroacridine hydrochloride) 및 (-) 스코폴라민(scopolamine hydrobromide)를 사용하였고, 기타 시약은 모두 초고순수 특급 시약을 사용하였다.

<50> 실시예 1: 지모의 70% 에탄올 추출물의 제조

<51> 지모를 그대로 또는 거피하여 잘 말린 후, 70% 에탄올을 이용해 수욕상에서 추출한 후 완전 건조시켜 지모의 70% 에탄올 추출물을 제조하였다.

<52> 실시예 2: 지모의 70% 에탄올 추출물로부터 활성성분의 분리

<53> 실시예 1에서 수득한 지모의 70% 에탄올 추출물을 물에 재현탁한 후 CH_2Cl_2로 분획하고, 물층을 BuOH로 추출한 다음 감압농축하였다. 그런 다음, 농축된 BuOH 추출물을 MeOH로 재결정을 유도하고 결정화되어 침전된 침전물을 MeOH로 세척하여, 메탄올 불용성 분획과 메탄올 가용성 분획을 수득하였다. 그런 다음, 메탄올 불용성 분획을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(클로로포름:메탄올:물 = 65:35:10의 상층)하여 만지페린 및 네오만지페린을 분리하였다. 한편, 메탄올 가용성 분획은 메틸렌클로라이드, 메탄올 및 물의 혼합용매를 사용하여 실리카겔 컬럼 크

로마토그래피 (CH_2Cl_2:MeOH:H_2O = 7:1:0.5 -> 7:2:0.5 -> 7:3:1)하여 티모사포닌 AIII, 티모사포닌 BII, 티모사포닌 BIII, 및 티모사포닌 D를 분리하였다.

<54>

<55> 티모사포닌 AIII : 백색 무정형 분말. FAB-MS *m/z*: 763.5 $[M+Na]^+$

<56> ^{13}C NMR (125 MHz) 30.971 (C-1). 27.031 (C-2), 75.522 (C-3), 30.971 (C-4), 36.963 (C-5), 26.833 (C-6), 26.833 (C-7), 35.557 (C-8), 40.260 (C-9), 35.278 (C-10), 21.174 (C-11), 40.341 (C-12), 42.503 (C-13), 56.483 (C-14), 32.183 (C-15), 81.376 (C-16), 62.216 (C-17), 16.622 (C-18), 24.040 (C-19), 40.907 (C-20), 14.941 (C-21), 109.7 (C-22), 26.434 (C-23), 26.229 (C-24), 27.573 (C-25), 69.882 (C-26), 16.308 (C-27), 102.588 (3-Gal C-1'), 81.879 (C-2'), 75.263 (C-3'), 71.753 (C-4'), 76.650 (C-5'), 62.824 (C-6'), 106.167 (O-3 Glu C-1"), 76.987 (C-2"), 78.459 (C-3"), 72.987 (C-4"), 78.064 (C-5"), 65.129 (C-6").

<57> 만지페린 : 연한 녹색 무정형 분말.

<58> ^{13}C NMR (100 MHz) 162.254 (C-1), 108.04 (C-2), 164.295 (C-3), 93.813 (C-4), 103.088 (C-5), 154.606 (C-6), 144.228 (C-7), 108.489 (C-8), 179.551 (C-9), 156.697 (C-4a), 151.286 (C-4b), 112.128 (C-8a), 101.772 (C-8b), 82.025 (2-glc C-1'), 73.564 (C-2'), 71.103 (C-3'), 70.724 (C-4'), 79.449 (C-5'), 61.961 (C-6').

<59> 네오만지페린

<60> ^{13}C NMR (100 MHz) 162.5 (C-1), 108.3 (C-2), 164. 5 (C-3), 94.0 (C-4), 103.3 (C-5), 156.9 (C-6), 144.4 (C-7), 112.4 (C-8), 179.8 (C-9), 154.7 (C-4a), 151.5 (C-4b), 108.8 (C-8a), 102.0 (C-8b), 73.8 (2-glc C-1'), 71.3 (C-2'), 79.7 (C-3'), 71.0 (C-4'), 82.2 (C-5'), 61.4 (C-6'), 103.4 (7-glc C-1'') 73.5 (C-2''), 76.1 (C-3''), 69.6 (C-4''), 77.3 (C-5''), 60.7 (C-6'').

<61> 실시예 3: 메탄올 불용성 분획으로부터 노라티리올의 제조

<62> 실시예 2에서 수득한 메탄올 불용성 분획(100mg)을 TS 브로스(broth) 배지(100ml)에 넣어 멸균하고, 건강한 한국 사람의 분변 현탁액 (분변 1그램을 TS 배지 20 ml에 넣어 현탁하고 1시간 방치하였다가 상징액을 취해 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하고, 침전물을 다시 같은 배지 10 ml로 현탁한 액)을 넣어 24-72시간 배양하였다. 그리고 에틸 아세테이트 100ml로 2회 추출하여 농축한 다음, 농축물(90 mg)을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(3x20 cm; 클로로포름:MeOH = 10:1)하여 노라티리올 21 mg을 분리하였다.

<63> 노라티리올 : 노란색 결정. EIMS 260.049 $[M]^+$

<64> UV λmax(EtOH) nm 238 (3.98), 256 (3.99), 311 (3.93), 362 (3.86).

<65> ^{13}C NMR (100 MHz) : 162.7 (C-1), 97.7 (C-2), 164.7 (C-3), 93.6 (C-4), 102.7 (C-5), 154.1 (C-6), 143.8 (C-7), 108.1 (C-8), 178.9 (C-9), 157.3 (C-4a), 151.0 (C-4b), 111.8 (C-8a), 101.6 (C-8b).

<66> 실험예 1: 아세틸콜린에스테라제 저해 활성 측정

<67> 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase: AChE) 저해 활성은 엘만(Ellman) 법을 변형시킨 마이크로플레이트 분석법(microplate assay)을 사용하여 측정하였다. 3 mM DTNB(5,5'-dithiobis-[2-nitrobenzoic acid]) 125 μl, 15 mM 아세틸티오콜린(acetylthiocholine) 25 μl, 완충용액에 녹인 시험물질 25 μl, 및 완충용액 50 μl를 96 웰의 각각에 첨가하였다. 그런 다음, 마이크로플레이트 리더(microplate reader; uQuant MQX200, BioTek)로 405 nm에서 40초 간격으로 10번 측정하였다. 그 후, 효소(0.226 U/ml의 AChE 25 μl)를 첨가한 후 같은 방법으로 측정하였다. 그런 다음, 효소 첨가 전후의 반응 속도를 계산하여, 시험물질을 첨가하지 않은 군과 비교하여 백분율로 아세틸콜린에스테라제 저해 활성을 나타내었다.

<68> 표 1: 아세틸콜린에스테라제 저해 활성

<69>

그룹	농도	저해율 (%)
비이클 단독	-	-
지모의 70% 에탄올 추출물	1 mg/ml	14.17 ± 3.11
	10 mg/ml	57.11 ± 2.51
메탄올 불용성 분획 (만지페린 및 네오만지페린 함유 분획)	0.1 mg/ml	23.22 ± 1.49
	1 mg/ml	79.92 ± 2.99
티모사포닌 AIII 함유 분획	0.1 mg/ml	18.12 ± 1.81
	1 mg/ml	60.19 ± 3.18
만지페린	0.01 mM	14.86 ± 3.18
	0.1 mM	76.89 ± 1.40
네오만지페린	0.01 mM	7.51 ± 1.19
	0.1 mM	55.19 ± 3.21
노라티리올	0.01 mM	25.21 ± 2.19
	0.1 mM	80.11 ± 2.31
티모사포닌 AIII	0.01 mM	9.07 ± 4.19
	0.1 mM	57.11 ± 2.44

<70> 각각의 값들은 평균값 ± S.E.M (n=5)

<71> 실험예 2: 콜린 신경계 손상 생쥐에서의 기억력 개선 효과 측정

<72> 실험에 사용된 모든 동물은 28~30 g의 수컷 ICR(Institute of Cancer Research)계 마우스로 실험동물 사용 및 관리에 관한 지침 (NIH publication No. 85-23)에 의거하여 수행하였다. 실험동물들을 우리(cage) 당 5~6 마리 유치하고 먹이 섭취는 자유롭게 방치하였다. 사육장내 온도는 23 ± 1 ℃, 습도는 60 ± 10 %이고, 12 시간 (07:30 ~ 19:30) 일장을 항시 유지하였다.

<73> 실험예 2-1: 수동 회피 실험법을 이용한 활성 측정

<74> 시험군은 시험물질을 10% 트윈(tween) 80에 녹인 후 경구 투여하였고 (5 ml/kg), 대조군은 10% 트윈 80을 같은 용량으로 경구 투여하였다. 경구 투여 30분 후에 증류수에 녹인 콜린신경계 손상 약물인 스코폴라민을 1 mg/kg의 용량으로 복강 투여하고, 스코폴라민 투여 30분 후에 마우스를 조명을 비춘 밝은 쪽 구획(50 W 전구)에 놓고 10초간 탐색시킨 후, 길로틴문(gillotin door, 5x5 cm)을 열어 어두운 구획으로 들어갈 수 있게 하였다(Gemini Avoidance System; San Diego, USA). 각 구획은 20x20x20 cm의 공간이었다. 길로틴문이 열린 후 마우스가 어두운 쪽으로 들어갈 때까지의 시간을 측정하였다(acquisition trial : 습득 시험). 일단 마우스가 어두운 쪽으로 4발이 다 들어가면 길로틴문이 닫히고, 0.5 mA의 전기 충격이 3초 동안 그리드(grid) 바닥을 통해 흐르게 되고, 마우스는 이를 기억하게 된다.

<75> 습득 시험이 끝난 지 24시간 후에 시험물질의 효과를 확인하고자 수동 회피 실험을 시행하였다. 10초의 탐색시간 후 길로틴문이 열리고 어두운 쪽으로 마우스의 4발이 다 들어가는데 걸리는 시간(latency time : 머무름 시간)을 300초까지 측정하였다(retention trial : 기억 시험). 어두운 쪽으로 가는데 걸리는 시간이 길수록 기억력이 좋음을 나타낸다.

<76> 표 2: 수동 회피 실험법에 의한 활성 측정 결과

<77>

그룹	습득 시험 점수 (평균값 ± SEM)	기억 시험 점수 (평균값 ± SEM)
비이클 단독	23.6 ± 2.2	271.5 ± 13.6
스포폴라민 단독	31.8 ± 6.9	29.4 ± 7.0
지모의 70% 에탄올 추출물 (50mg/kg) 및 스코폴라민	29.5 ± 5.9	65 ± 29.0
메탄올 불용성 분획 (만지페린 및 네오만지페린 함유 분획) (50mg/kg) 및 스코폴라민	26.9 ± 5.0	125.4 ± 26.2

티모사포닌 AIII 함유 분획 (50mg/kg) 및 스코폴라민	26.2 ± 4.7	99.1 ± 29.0
만지페린 (20mg/kg) 및 스코폴라민	23.7 ± 5.0	160.4 ± 26.2
네오만지페린 (20mg/kg) 및 스코폴라민	24.5 ± 3.9	71.1 ± 22.1
티모사포닌 AIII (20mg/kg) 및 스코폴라민	27.4 ± 5.4	73.2 ± 16.26
노라티리올 (20mg/kg) 및 스코폴라민	26.1 ± 4.1	170.8 ± 20.9

<78> 실험예 2-2: 모리스 워터 메이즈 실험법을 이용한 활성 측정

<79> 모리스 워터 메이즈 실험법(Morris water maze test)은 20 ± 1 ° C, 약한 조명에서 직경 90 cm, 높이 45 cm인 원형 수조에 30 cm 깊이로 500 ml 우유가 들어 있는 수조에서 수행하였다. 수조는 4 부분의 가상영역으로 나누고, 그중 한 곳에 직경 6 cm 크기의 발판을 1 cm 정도 잠기도록 29 cm 높이로 설치하였다. 훈련 첫 날은 60초간 발판 없이 수영훈련을 시키고, 나머지 4일 동안은 매일 4회씩 발판을 찾는 훈련을 수행하였다(훈련 시험 : training trial). 발판에는 10초간 머무를 수 있도록 하며 60초 동안 발판을 찾지 못할 경우 10초간 발판 위에서 쉴 수 있도록 하였다. 훈련이 끝난 후 실험 동물은 자외선 램프로 건조시켰다. 훈련은 30초 마다 반복되며, 발판을 찾는데까지 소요되는 시간을 비디오 카메라로 측정하였다. 최종 실험은 수조의 발판을 제거한 후 실험 동물을 수조에 넣고 발판이 있었던 곳에서 머무는 시간을 측정하였다(프로브 시험 : probe trial). 양성 대조 약물로 타크린(10 mg/kg)을 경구투여하고 1시간 뒤에 실험을 수행하였다. 기억력 장애는 0.8 mg/kg 수준의 스코폴라민의 복강투여로 유도하였고, 대조군은 10% 트윈 80만을 복용하도록 하였다.

<80> 표 3: 프로브 시험에 의한 활성 측정 결과

<81>

그룹	수영 시간 (평균값 ±SEM)
비히클	25.4 ±1.4
스코폴라민	14.8 ±0.7
만지페린 (20mg/kg) 및 스코폴라민	20.3 ±1.4
네오만지페린 (20mg/kg) 및 스코폴라민	17.3 ± 1.2
티모사포닌 AIII (20mg/kg) 및 스코폴라민	18.1 ± 1.0
노라티리올 (20mg/kg) 및 스코폴라민	22.3 ± 1.3

<82> 표 4: 훈련 시험에 의한 활성 측정 결과

<83>

그룹	수영 시간 (평균값 ±SEM)			
	1 일	2 일	3 일	4 일
비히클	44.3 ± 3.5	19.0 ± 3.1	12.2 ± 2.2	7.5 ± 1.7
스코폴라민	54.9 ± 2.4	44.9 ± 2.7	37.5 ± 3.0	33.2 ± 3.2
만지페린 (20mg/kg) 및 스코폴라민	40.1 ± 3.4	30.6 ± 3.7	26.9 ± 3.6	20.5 ± 3.0
네오만지페린 (20mg/kg) 및 스코폴라민	43.9 ± 3.6	35.1 ± 3.6	31.1 ± 3.2	26.1 ± 3.3
티모사포닌 AIII (20mg/kg) 및 스코폴라민	41.9 ± 3.5	34.9 ± 3.4	26.5 ± 3.0	19.8 ± 2.9
노라티리올 (20mg/kg) 및 스코폴라민	37.3 ± 2.7	27.4 ± 2.5	22.8 ± 3.4	16.7 ± 3.1
타크린	47.7 ± 3.3	34.0 ± 3.8	24.1 ± 3.4	16.2 ± 2.9

도면의 간단한 설명

<84> 도 1은 지모의 70% 에탄올 추출물로부터 유효성분을 분리하는 공정을 나타낸 도면이다.

도면

도면1

