(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0029546
(43) 공개일자 2010년03월17일

(51) Int. Cl.
A61K 31/37 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0088370
(22) 출원일자 2008년09월08일
심사청구일자 2008년09월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내
(72) 발명자
신동훈
서울시 강남구 대치동 670 동부센트레빌 101-2103
최수정
서울시 서대문구 연희3동 88-25 리치빌 301호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
손민

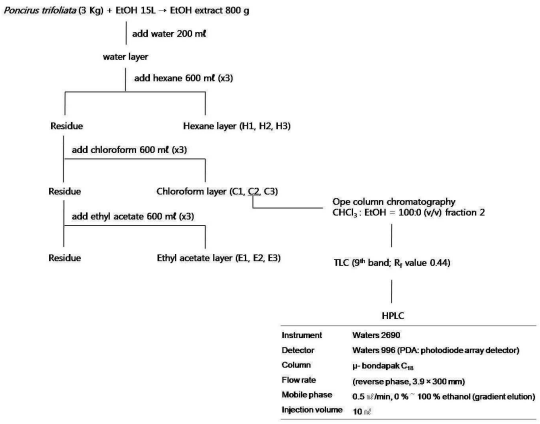
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 탱자로부터 분리한 8-메톡시소랄렌을 포함하는 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 화합물의 분리방법

(57) 요 약

본 발명은 탱자로부터 분리한 8-메톡시소랄렌을 포함하는 알츠하이머 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 화합물의 분리방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 탱자를 에탄올로 추출하여 추출물을 제조하고 상기 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트의 유기용매로 분획하여 분획물을 얻은 다음 이로부터 8-메톡시소랄렌을 분리하는 방법 및 상기 분리된 화합물을 유효성분으로서 함유함으로써 뇌 신경세포 함유 아세틸콜린 에스터라아제 저해능을 나타내어 알츠하이머병을 예방 또는 치료시킬 수 있는 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

배혜리

인천광역시 남구 주안6동 981-6

조홍연

서울시 성북구 돈암1동 633 동부센트레빌 아파트 103동 1002호

김영준

충남 연기군 조치원읍 208 고려대학교 과학기술대학 식품생명공학과

황한준

서울특별시 광진구 구의1동 239-60

김혜경

충남 서산시 해미면 대곡리 360 한서대학교 식품생물공학과

허호진

경상남도 진주시 가좌동 900 경상대학교 식품공학과

김명옥

경상남도 진주시 가좌동 경상대학교 생명과학부

특허청구의 범위

청구항 1

8-메톡시소랄렌(8-methoxypsoralen)을 유효성분으로 함유하는 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 8-메톡시소랄렌은 탱자로부터 분리된 것임을 특징으로 하는 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적 조성물임을 특징으로 하는 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물은 식품 조성물임을 특징으로 하는 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

탱자로부터 에탄올 추출물을 제조하는 단계;

상기 탱자의 에탄올 추출물을 헥산, 클로로포름 및 에틸 아세테이트로 환류 추출하여 각 용매 분획물을 얻는 단계;

상기 클로로포름 분획물에 대해 용매 $CHCl_3$-EtOH로 실리카 젤 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 소분획하는 단계;

상기 소분획물 중에서 아세틸콜린 에스터라아제 저해활성이 가장 높은 획분에 대하여 얇은 막 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 수행하여 활성 밴드를 수득하는 단계; 및

상기 활성 밴드를 HPLC로 분리하여 8-메톡시소랄렌(8-methoxypsoralen)을 얻는 단계를 포함하는 탱자로부터 8-메톡시소랄렌을 분리하는 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 탱자로부터 분리한 8-메톡시소랄렌을 포함하는 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물 및 상기 화합물의 분리방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 탱자를 에탄올로 추출하여 추출물을 제조하고 상기 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트의 유기용매로 분획하여 분획물을 얻은 다음 이로부터 8-메톡시소랄렌을 분리하는 방법 및 상기 분리된 화합물을 유효성분으로서 함유함으로써 뇌 신경세포 함유 아세틸콜린 에스터라아제 저해능을 나타내어 알츠하이머 병을 예방 또는 치료시킬 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알츠하이머 병(Alzheimer's disease, AD)은 중추신경, 특히 전뇌(fore brain), 소뇌편도(amygdala), 해마(hippocampus) 및 대뇌피질 같은 피질과 변연계(limbic system)의 신경을 파괴하는데 이들은 뇌에서 학습, 기억, 사고, 행동, 감정조절 등과 관련된 부위이다. 특히 AD에서 아세틸콜린과 같은 신경전달물질의 부족이 가장 중요한 지표이며 이것을 회복시키는 것이 AD 치료목표의 하나가 되고 있다.

[0003] 부교감신경성 약물은 muscarinic 또는 nicotinic agonist, cholinesterase inhibitors (ChEIs), 간접적으로 아세틸콜린 유리를 조절하는 약물들로 나눌 수 있다. 상기 ChEIs로서 많은 약물들이 개발되어 사용되어지고 있는데 tacrine, physostigmine, physostigmine, donepezil, ENA 713, metrifonate, galanthamine, eptastigmine,

rivastigmin이 대표적이며 최근 들어 사용되고 있는 memantin이 있다.

[0004] 제 2세대 제약(donepezil, ENA 713, metrifonate, galanthamine, eptastigmine, rivastigmin)은 제 1세대 제약(tacrine, physostigmine, physostigmine)에 비해 작용시간이 길고 안정적이며 있으며 blood-brain barrier (BBB) 투과율이 높아서 중추신경 내 농도가 높은 경향이 있다. 제 1세대 제약은 AChE, butyrylcholinesterase, 다른 말초 cholinesterase를 비 선택적으로 억제하는 반면, 몇몇 새로운 제약은 AChE에 대한 선택성이 높아 말초부작용의 발생이 감소한다고 한다. 이러한 제제의 작용기전은 acetylcholine (ACh)의 분해를 억제함으로써 synapse 내의 ACh 농도를 증가시키는 것에 기인하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 이와 같이 대부분의 치료제는 그 효과가 탁월하나 장기간 사용으로 인한 부작용 또한 간과할 수 없으므로 기존의 효능과 유사하거나 더 좋으면서 그 부작용은 적은 물질의 개발이 필요하다고 여겨진다.

[0006] AD의 치료는 근본적 병변의 치료 보다는 환자의 증세를 가볍게 하고, 병의 진행속도를 지연시키는데 주안을 두고 있다. AD 환자의 뇌에서는 basal forebrain 있는 mynert nucleus 신경세포가 대부분 죽어 있어서 이 뇌신경세포가 지배하는 synapse와 대뇌피질과의 연결이 퇴화되어 있다. 이들 신경세포는 신경전달 물질인 ACh를 생산하는 cholinergic nerve cell인데, 그 사멸로 인해서 AD 환자 뇌에서는 ACh 생산량이 현저하게 감소되어 있다. 이러한 이유로 뇌에서의 ACh 농도를 높게 유지시키면 환자의 기억력, 인지능력이 크게 회복된다고 보고된 바 있다. 실제로 임상에서는 이를 위해서 뇌 안에 있는 ACh를 분해시키는 enzyme inhibitor를 사용하고 있다.

[0007] 현재 각국에서 사용되고 있는 AD치료제는 ACh 분해효소 억제제가 대부분이며 tacrine, 그리고 aricept 등이 이에 속한다. 이밖에도 머크, 바이엘 등의 제약회사가 이와 비슷한 약제를 시장에 내놓고 있다. Tacrine의 경우 간 독성의 부작용이 커서 치료중지의 경우가 많은데, 최근에 개발된 aricept는 이러한 부작용이 덜하다고 한다. ACh의 합성을 촉진시키기 위해서 그 전구체인 콜린, 레시틴 아세틸 카니틴 등을 투여하는 임상실험이 여러 번 시도되었으나, 이들 물질이 blood-brain barrier를 통과하지 못하고 그 효력이 단기간이라는 결점으로 현재는 주목을 받지 못하고 있다. 현재 AD 환자를 치료하는 데 사용되고 있는 대중요법을 종합해보면 ACh 보충요법이 가장 효과적이며, 다른 치료약제는 별로 효능을 나타내지 못하고 있다.

[0008] 이와 같이 치매 치료제 개발과정에 있어서 전 세계적으로 AChE가 가장 많이 약리작용점으로 채택되고 있는 연구추세에 따라 여러 천연물을 이용하여 부작용이 적고 그 효과가 우수한 AChE inhibitor의 약제 및 기능성 소재를 개발할 필요가 있다.

[0009] 이에 본 발명자들은 상기와 같은 점을 감안하여 국내산 식약용류 식물을 대상으로 뇌 신경세포 함유 AChE (아세틸콜린 에스터라아제) 저해능을 갖는 천연신소재를 탐색하던 중 고유의 식용식물자원인 탱자로부터 AChE 억제 기능성 소재를 개발 미량소재를 검색하고 이를 소재화 시킬 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 탱자로부터 분리한 8-메톡시소랄렌을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 탱자로부터 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 화합물인 8-메톡시소랄렌을 분리하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0012] 하나의 양태로서, 본 발명은 탱자로부터 분리한 8-메톡시소랄렌을 유효성분으로 포함하는 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에서, 상기 탱자로부터 분리한 8-메톡시소랄렌(8-methoxypsoralen)은 뇌 신경세포 함유 AChE(아세틸콜린 에스터라아제) 저해능을 가짐으로써 알츠하이머 병을 예방 또는 개선시킬 수 있음이 확인되었다.

[0014] 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 탱자로부터 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 화합물을 분리하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명에서, 탱자로부터 분리한 알츠하이머 병 예방 또는 치료용 화합물은 8-메톡시소랄렌이다.

[0016] 바람직한 양태로서, 탱자로부터 8-메톡시소랄렌을 분리하는 방법은 하기 단계를 포함할 수 있다:

[0017] 탱자로부터 에탄올 추출물을 제조하는 단계;

[0018] 상기 탱자의 에탄올 추출물을 헥산, 클로로포름 및 에틸 아세테이트로 환류 추출하여 각 용매분획물을 얻는 단계;

[0019] 상기 클로로포름 분획물에 대해 용매 $CHCl_3$-EtOH로 실리카 젤 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 소분획하는 단계;

[0020] 상기 소분획물 중에서 아세틸콜린 에스터라아제 저해활성이 가장 높은 획분에 대하여 얇은 막 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 수행하여 활성 밴드를 수득하는 단계; 및

[0021] 상기 활성 밴드를 HPLC로 분리하여 8-메톡시소랄렌(8-methoxypsoralen)을 얻는 단계.

[0022] 본 발명의 바람직한 양태로서, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물이다.

[0023] 본 발명의 조성물이 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하며, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0024] 본 발명의 약제학적 조성물은 임상 투여 시에 경구로 투여할 수 있으며, 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 바람직한 약제학적 제제는 산제, 과립제, 정제, 경질 또는 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 에어로졸 등과 같은 경구투여용 제제가 있다.

[0025] 본 발명의 약제학적 조성물에서, 8-메톡시소랄렌의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있지만 일반적으로는 성인 기준으로 1-30 mg/kg, 바람직하기로는 4-12 mg/kg의 양으로 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물은 알츠하이머 질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 다른 약물 치료와 병용하여 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 바람직한 양태로서, 본 발명의 조성물은 식품 조성물이다.

[0028] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로서 탱자 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 다이사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 사이클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등]) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.

[0029] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 탱자 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

효 과

[0030] 본 발명은 탱자로부터 분리한 8-메톡시소랄렌을 유효성분으로서 함유함으로써 뇌 신경세포 함유 아세틸콜린 에스터라아제 저해능을 나타내어 알츠하이머 병을 예방 또는 치료시킬 수 있는 조성물을 제공할 수 있는 매우 뛰어난 효과를 가진다.

[0031] 또한, 본 발명은 탱자를 에탄올로 추출하여 추출물을 제조하고, 상기 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트의 유기용매로 분획하여 분획물을 획득한 다음, 상기 분획물에 대하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 및 HPLC를 수행함으로써 탱자로부터 뇌 신경세포 함유 아세틸콜린 에스터라아제 저해능을 나타내는 화합물인 8-메

톡시소랄렌을 효율적으로 분리정제할 수 있는 방법을 제공하는 효과가 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 실시 예를 통해 본 발명의 구성 및 효과를 보다 더 구체적으로 설명하고자 하나, 이들 실시 예는 본 발명의 예시적인 기재일 뿐 본 발명의 범위가 이들 실시 예에만 한정되는 것은 아니다.

[0033] **실시 예 1: 탱자 추출물, 분획물 및 화합물의 분리**

[0034] 탱자(*Poncirus trifoliata*)를 hand mixer로 곱게 마쇄한 후 3 kg의 조말을 ethanol 5배 부피로 24시간 동안 shaking하여 5회 추출한 후 감압 농축하여 탱자 ethanol 추출물을 조제하였다. 추출물로부터 ethanol을 완전히 제거한 후 hexane, chloroform, ethyl acetate를 각각 3배 부피로 환류 추출하여 1차적인 물질 분리를 실시하였다. 추출된 crude ethanolic extract는 극성도에 따라 solvent partitioning을 실시하여 저해 활성을 확인하였다. 저해 활성이 높게 나온 chloroform 2 부분을 가지고 open silica gel column chromatography를 시행하여 33개의 소분획 ($CHCl_3$: EtOH = 100:0, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100)으로 분획 하였다. Open silica gel column chromatography의 획분 중 저해활성이 좋은 $CHCl_3$: EtOH = 100:0 (v/v) 2번째 획분을 TLC로 분리한 결과 12개 밴드 중 가장 활성이 좋은 9^{th} 밴드 (R_f value 0.44)를 얻었다. 이 활성 밴드를 HPLC로 분리하여 분자량 216 m/z를 갖는 활성물질을 획득하였다. 도 1에 상기 분리정제 과정을 간략히 나타내었다.

[0035] **실험 예 1: 탱자 에탄올 추출물의 신경세포 함유 AChE 저해능 확인**

[0036] 상기 실시 예 1에서 얻은 탱자 에탄올 추출물의 AChE 저해능을 확인하기 위하여 종래 그 효과가 입증된 타크린(tacrine)으로 활성비교를 수행하였다.

[0037] 타크린은 100 nM(T100), 200 nM(T200), 300 nM(T300), 400 nM(T400), 500 nM(T500) 및 600 nM(T600)로 농도를 달리하였다.

[0038] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이 탱자 에탄올 추출물은 300 nM의 타크린보다도 더욱 우수한 억제활성을 나타내었다.

[0039] **실험 예 2: 탱자 유기용매 분획물의 AChE 저해능 확인**

[0040] 상기 실시 예 1에서 탱자 crude ethanolic extract를 극성도에 따라 분획함으로써 얻은 각 분획에 대하여 AChE에 대한 효소 활성을 검색하였다. Hexane, chloroform, ethyl acetate의 순으로 분획한 결과 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이 두 번째 chloroform layer (C2)에서 가장 높은 활성을 보였다.

[0041] 도 3에서, H1은 첫 번째 헥산 층, H2는 두 번째 헥산 층, H3은 세 번째 헥산 층, C1은 첫 번째 클로로포름 층, C2는 두 번째 클로로포름 층, C3은 세 번째 클로로포름 층, E1은 첫 번째 에틸 아세테이트 층, E2는 두 번째 에틸 아세테이트 층, E3은 세 번째 에틸 아세테이트 층을 의미한다.

[0042] **실험 예 3: Solvent partition을 통해 분리된 chloroform 2 분획을 open silica gel column을 수행하여 얻은 소분획물에 대한 AChE 저해능 확인**

[0043] 상기 실시 예 1에서와 같이, 두 번째 chloroform layer (C2) 분획을 대상으로 silica gel open column chromatography를 실시하고 선정된 분획을 감압 농축하여 sample을 준비한 다음 silica를 가열하여 활성화 시킨 후, 이 silica를 chloroform으로 현탁하여 column에 충전시켰다. 충전된 column에 선정된 분획의 sample을 loading하고, 에탄올과 chloroform의 농도 기울기를 이용하여 정제를 실시하였다. 각각 분리된 분획 (총 33개의 분획)을 일정량(1 mg/㎖)씩 취하여 acetylcholinesterase 저해 활성을 측정하고 그 중 가장 높은 저해활성을 보이는 분획을 선정하였다. 도 4와 같이, 두 번째 분획에서 54%의 가장 높은 acetylcholinesterase 저해 활성도가 나타났다.

[0044] **실험 예 4: TLC를 이용하여 분리된 활성 밴드의 AChE 저해능 확인**

[0045] 실시 예 1에서 언급한 바대로, Open column chromatography를 통해 얻은 $CHCl_3$: EtOH = 100:0 (v/v) 2번째 획분을 preparative silica-gel plate (glass, 200 × 200 mm)를 사용하여 preparative thin layer chromatography (PLC)를 실시하였다. 선정 획분을 2 × 0.1 mg/㎖ 농도로 methanol에 녹이고 0.5 ㎕씩 8회 spotting하여 건조시켰다. Chloroform과 ethanol(99.5:0.5, v/v)로 전개시킨 후 band를 분리하여

acetylcholinesterase 저해 활성을 측정하였다. 분리된 밴드의 순서대로 acetylcholinesterase 저해활성을 확인한 결과, 도 5와 같이 9번째 밴드 (Rf value 0.44)에서 가장 높은 활성을 보였다.

[0046] 이때 각 밴드별 Rf 값은 다음과 같았다. Rf value = 밴드1: 0.08, 밴드2: 0.12, 밴드3: 0.15, 밴드4: 0.17, 밴드5: 0.24, 밴드6: 0.28, 밴드7: 0.34, 밴드8: 0.41, 밴드9: 0.44, 밴드10: 0.51, 밴드11: 0.63, 밴드12: 0.77.

[0047] **실험 예 5: HPLC를 통해 분리된 활성 물질의 AChE 저해능 확인**

[0048] 상기 실시 예 1에서 언급한 바대로, 실험 예 4에서 가장 높은 activity를 나타낸 9th 밴드 부분의 active compound를 분리 해내기 위하여 HPLC assay를 실시하였다. HPLC 조건은 하기 표 1과 같았으며 도 6과 같은 결과를 얻었다. 수득한 활성물질인 8-메톡시소랄렌(8-methoxypsoralen)으로 확인되었다.

표 1

[0049]

Instrument	Waters 2690
Detector	Waters 996 (PDA: photodiode array detector)
Column	μ- bondapak C_{18} (reverse phase, 3.9 × 300 mm)
Flow rate	0.5 mℓ/min
Mobile phase	0 %~100 % ethanol (gradient elution)
Injection volume	10 mℓ

[0050] **실험 예 6: 동물을 이용한 Y-maze test를 통한 AChE 저해능 확인**

[0051] 본 발명에서 최종적으로 얻은 화합물인 8-메톡시소랄렌의 AChE 저해효과를 생체내 실험으로 증명하기 위하여 Y-maze test를 실시하였다. ICR-male mice와 8-메톡시소랄렌을 투여량별로 variation을 두어 준비하였다. ICR-male mice는 시료 즉, 8-메톡시소랄렌를 섞은 물을 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급하였다. 치매 유발성 물질로 trimethyltin (TMT)을 injection하여 각각 ⓐ, ⓑ, ⓒ 세 개의 arms를 갖는 Y-maze에서 행동실험을 실시하였다. Y-maze는 길이 32.5 cm, 높이 15 cm 그리고 넓이 4 cm로써 각각의 arm을 A, B, C로 정한 다음 들어간 arms를 기록하였다. Mouse를 maze에 넣고 아무런 자극 없이 8 분 동안 자유롭게 움직이도록 두었다. 꼬리를 제외하고 arm에 두 뒷발이 들어간 것을 측정하여 그 수치를 계산하였다.

[0052] 그 결과, 도 7에서와 같이 TMT 및 sample이 mouse의 운동능력에는 영향을 주지 않았으며, sample이 공급된 group에서 기억력이 향상되었음을 알 수 있다.

[0053] 도 7에서, C는 시료 무첨가 식이만 공급한 대조구, TMT는 시료 무첨가 식이 공급 후 TMT를 처리한 구, Pt 400은 본 발명의 화합물인 8-메톡시소랄렌을 400 mg/kg per day로 첨가한 식이를 공급한 후 TMT를 처리한 구, Pt 800은 본 발명의 화합물인 8-메톡시소랄렌을 800 mg/kg per day로 첨가한 식이를 공급한 후 TMT를 처리한 구, Pt 1200은 본 발명의 화합물인 8-메톡시소랄렌을 1,200 mg/kg per day로 첨가한 식이를 공급한 후 TMT를 처리한 구이다.

[0054] **실험 예 7: 동물을 이용한 수동 회피 테스트를 통한 AChE 저해능 확인**

[0055] 본 발명의 화합물인 8-메톡시소랄렌의 저해효과를 생체내 실험으로 증명하기 위하여 수동 회피 테스트(Passive avoidance test)를 실시하였다. ICR-male mice와 8-메톡시소랄렌을 투여량별로 variation을 두어 준비하였다. ICR-male mice는 시료를 섞은 물을 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급하였다. 치매 유발성 물질로 trimethyltin (TMT)을 injection하며 이 실험은 실제 실험에 들어가기 하루 전, 기억상자와 같은 장소에서 training을 시킨 다음 행동실험을 실시하였다. 모든 mice를 실험 상자에서 적응 훈련(명(明)실-명(明)실, 쇼크 없음-명(明)실, 쇼크 있음)을 실시한 후에 24시간 후에 쇼크는 없고 빛은 있는 상태에서 1 마리당 300 sec 동안 실험하였다.

[0056] 본 실험에서 sample과의 효과를 비교했을 때, 도 8에서와 같이 TMT투여한 군에서 현격히 학습능력이 떨어짐을 보였으나 시료투여로 인한 학습능력 보호 및 증진 효과가 나타났다.

[0057] 도 8에서, C는 시료 무첨가 식이만 공급한 대조구, TMT는 시료 무첨가 식이 공급 후 TMT를 처리한 구, Pt 400은 본 발명의 화합물인 8-메톡시소랄렌을 400 mg/kg per day로 첨가한 식이를 공급한 후 TMT를 처리한 구, Pt 800은 본 발명의 화합물인 8-메톡시소랄렌을 800 mg/kg per day로 첨가한 식이를 공급한 후 TMT를 처리한 구, Pt

1200은 본 발명의 화합물인 8-메톡시소랄렌을 1,200 mg/kg per day로 첨가한 식이를 공급한 후 TMT를 처리한 구이다.

[0058] **실험 예 8: 본 발명 8-메톡시소랄렌의 독성 평가**

[0059] 본 발명에서 최종적으로 수득한 화합물인 8-메톡시소랄렌의 독성을 평가하기 위하여 ICR-male mice와 8-메톡시소랄렌을 투여량별로 variation을 두어 준비하였다. ICR-male mice는 시료를 섞은 물을 약 3주간 *ad lib*의 상태로 공급하였다. 치매 유발성 물질로 trimethyltin (TMT)을 injection한 후 GPT(glutamic pyruvic transaminase) 및 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase)로 간독성을 확인하였다.

[0060] 그 결과, 도 9 및 도 10을 통해 알 수 있는 바와 같이 8-메톡시소랄렌 처리 시 대조군과 비교하여 GPT 및 GOT에 있어 유의적인 변화가 없음을 확인할 수 있었으며 이로써 본 발명 8-메톡시소랄렌이 독성을 가지지 않음을 알 수 있었다.

[0061] 도 9 및 도 10에서, CON은 시료 무첨가 식이만 공급한 대조구, TMT는 시료 무첨가 식이 공급 후 TMT를 처리한 구, Pt 400은 본 발명의 화합물인 8-메톡시소랄렌을 400 mg/kg per day로 첨가한 식이를 공급한 후 TMT를 처리한 구, Pt 800은 본 발명의 화합물인 8-메톡시소랄렌을 800 mg/kg per day로 첨가한 식이를 공급한 후 TMT를 처리한 구, Pt 1200은 본 발명의 화합물인 8-메톡시소랄렌을 1,200 mg/kg per day로 첨가한 식이를 공급한 후 TMT를 처리한 구이다.

산업이용 가능성

[0062] 이상 상기 실시 예 및 실험 예를 통해 설명한 바와 같이, 본 발명은 탱자로부터 분리한 8-메톡시소랄렌을 유효성분으로서 함유함으로써 뇌 신경세포 함유 아세틸콜린 에스터라아제 저해능을 나타내어 알츠하이머 병을 예방 또는 치료시킬 수 있는 조성물을 제공할 수 있고, 탱자를 에탄올로 추출하여 추출물을 제조하고, 상기 추출물을 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트의 유기용매로 분획하여 분획물을 획득한 다음, 상기 분획물에 대하여 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피 및 HPLC를 수행함으로써 탱자로부터 뇌 신경세포 함유 아세틸콜린 에스터라아제 저해능을 나타내는 화합물인 8-메톡시소랄렌을 효율적으로 분리 정제할 수 있는 방법을 제공할 수 있는 매우 뛰어난 효과를 가지므로 제약산업 및 식품산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 본 발명에 따라 탱자로부터 아세틸콜린 에스터라아제 저해 활성 에탄올 추출물, 이의 용매분획물 및 8-메톡시소랄렌 화합물을 얻는 과정을 간략히 나타낸 흐름도이다.

[0064] 도 2는 본 발명의 탱자 에탄올 추출물이 가지는 AChE 저해능을 타크린과 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0065] 도 3은 탱자 에탄올 추출물에 대하여 극성이 다른 유기용매로서 헥산, 클로로포름 및 에틸 아세테이트를 이용하여 분획함으로써 얻은 각 용매분획물이 나타내는 AChE 저해능을 나타내는 그래프이다.

[0066] 도 4는 상기 두 번째 클로로포름 층을 실리카 겔 컬럼 크로마토그래피로 소분획하여 얻은 총 33개의 소분획물이 가지는 AChE 저해능을 나타내는 그래프이다. 이때, T300은 타크린 300 nM을 처리한 경우이다.

[0067] 도 5는 상기 총 33개의 소분획물 중 두 번째 소분획물에 대하여 TLC를 수행하여 얻은 활성 밴드가 가지는 AChE 저해능을 나타내는 그래프이다. 이때, T300은 타크린 300 nM을 처리한 경우이다.

[0068] 도 6은 상기 활성 밴드 중 9번째 밴드 부분의 활성 화합물을 분리하기 위하여 HPLC를 수행한 결과를 보여주는 그래프이다.

[0069] 도 7은 마우스에 대하여 8분 동안 자발적 변경 행동력(spontaneous alternation behavior)을 측정한 결과를 나타내는 그래프이다(*P < 0.05, #P < 0.05 *vs.* Control group, #P < 0.05 *vs.* TMT group). 이때 데이터는 평균(n=8) ± S.D.로 나타내었다.

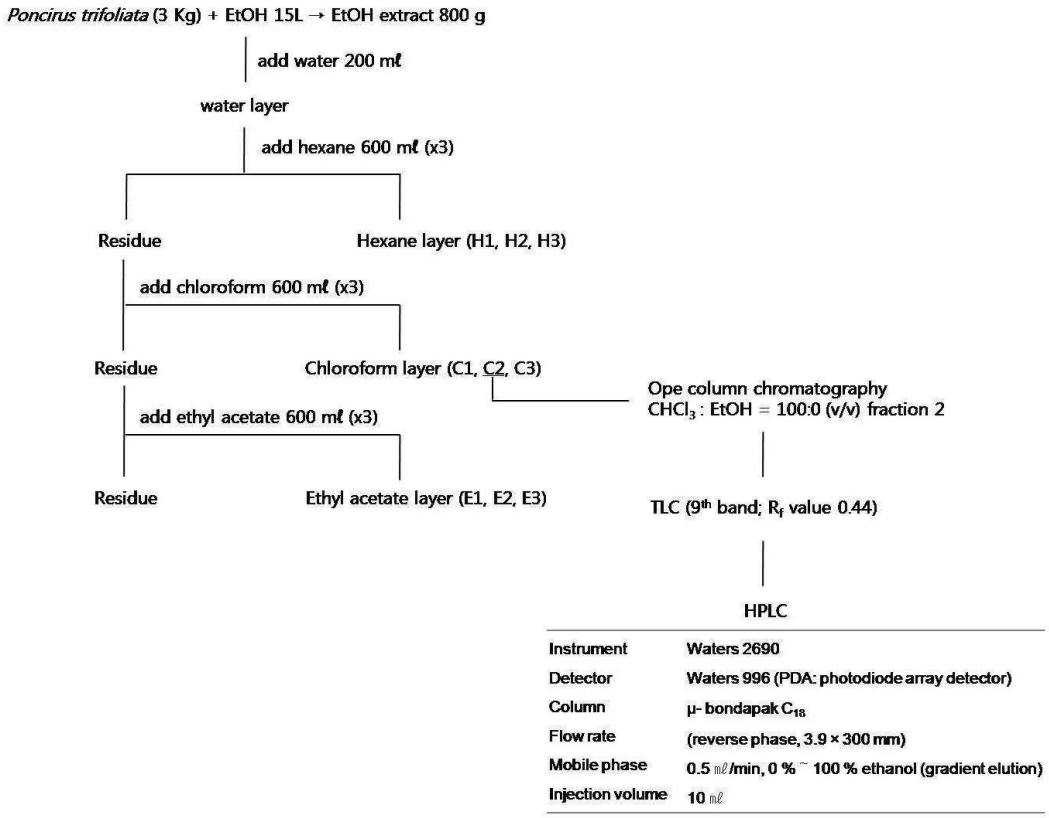
[0070] 도 8은 마우스에 대하여 1일 전 training을 시킨 다음 행동 실험을 실시한 결과를 나타낸 그래프이다(*P < 0.05, #P < 0.05 *vs* Control group, #P < 0.05 *vs.* TMT group). 이때 데이터는 평균(n=8) ± S.D.로 나타내었다.

[0071] 도 9는 본 발명 8-메톡시소랄렌 화합물 처리시 대조구와 GPT 수치를 비교한 결과를 보여주는 그래프이다.

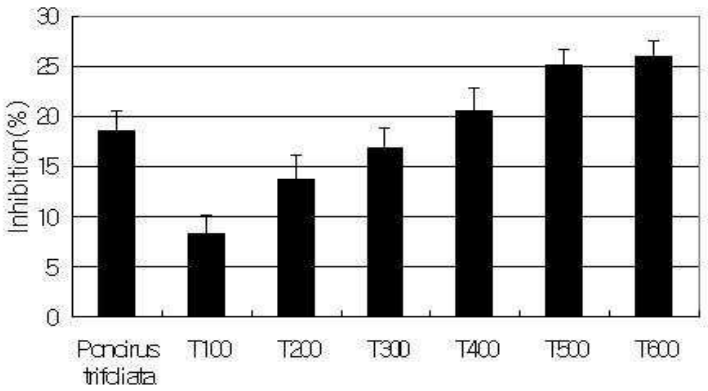
[0072] 도 10은 본 발명 8-메톡시소랄렌 화합물 처리시 대조구와 GOT 수치를 비교한 결과를 보여주는 그래프이다.

도면

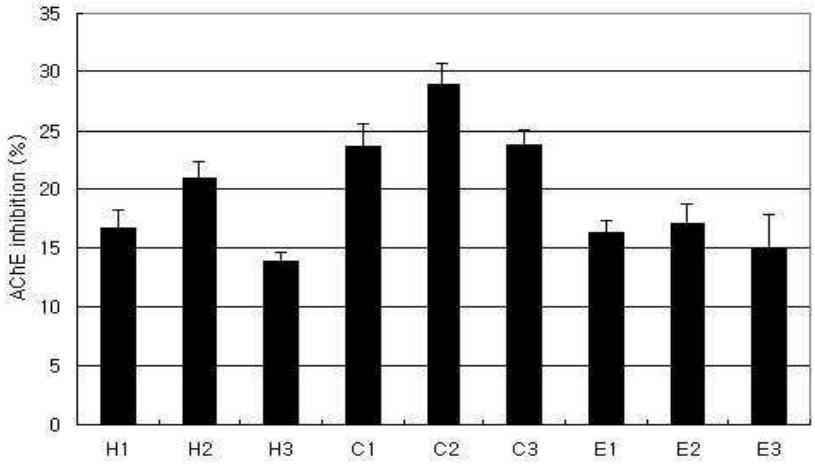
도면1


Poncirus trifoliata (3 Kg) + EtOH 15L → EtOH extract 800 g
add water 200 mℓ
water layer
add hexane 600 mℓ (x3)
Residue
Hexane layer (H1, H2, H3)
add chloroform 600 mℓ (x3)
Residue
Chloroform layer (C1, C2, C3)
Ope column chromatography
$CHCl_3$: EtOH = 100:0 (v/v) fraction 2
add ethyl acetate 600 mℓ (x3)
Residue
Ethyl acetate layer (E1, E2, E3)
TLC (9th band; R_f value 0.44)
HPLC
Instrument Waters 2690
Detector Waters 996 (PDA: photodiode array detector)
Column μ-bondapak C_{18}
Flow rate (reverse phase, 3.9 × 300 mm)
Mobile phase 0.5 mℓ/min, 0 % ~ 100 % ethanol (gradient elution)
Injection volume 10 mℓ

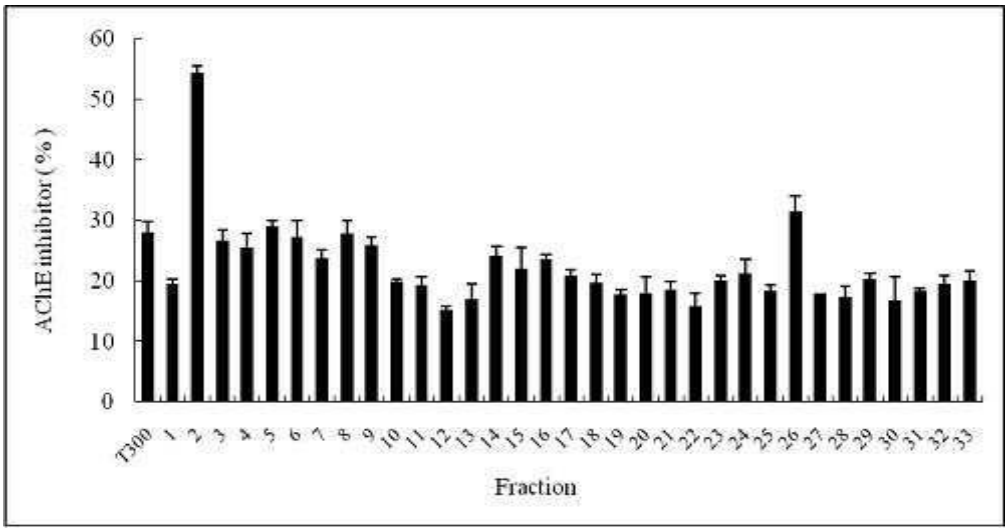
도면2


Inhibition(%)
30
25
20
15
10
5
0
Poncirus trifoliata
T100
T200
T300
T400
T500
T600

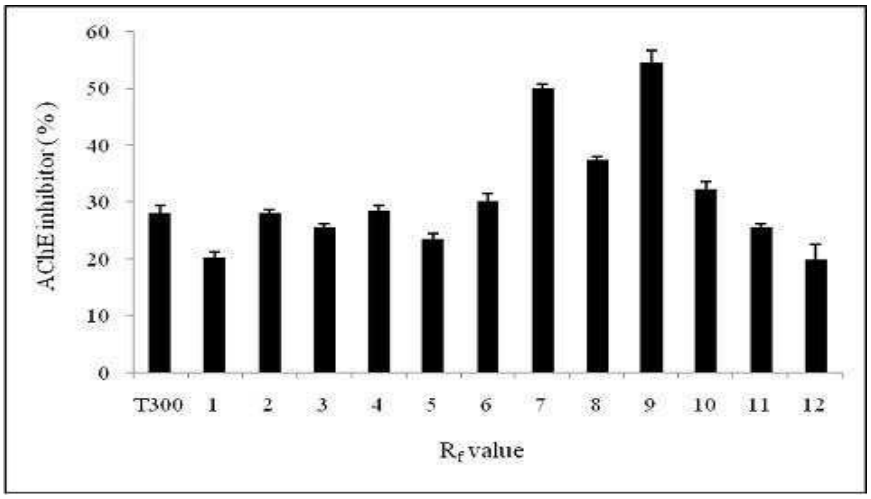
도면3


AChE inhibition (%)
35
30
25
20
15
10
5
0
H1
H2
H3
C1
C2
C3
E1
E2
E3

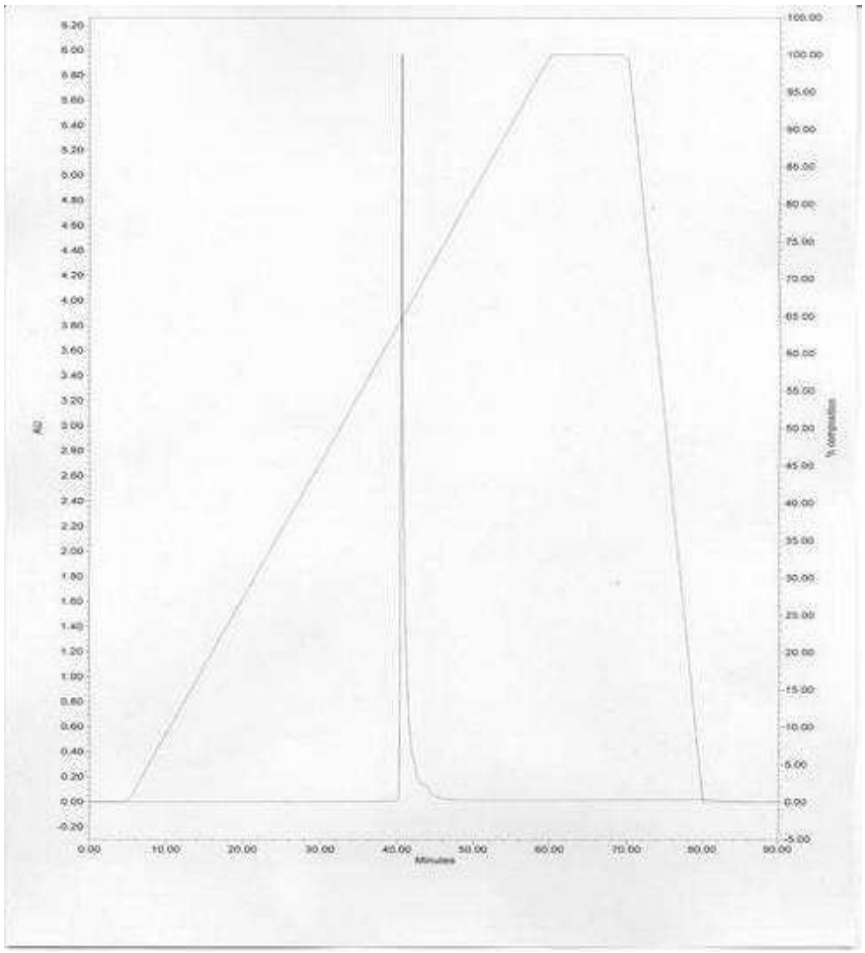
도면4


AChE inhibitor (%)
60
50
40
30
20
10
0
T300
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33
Fraction

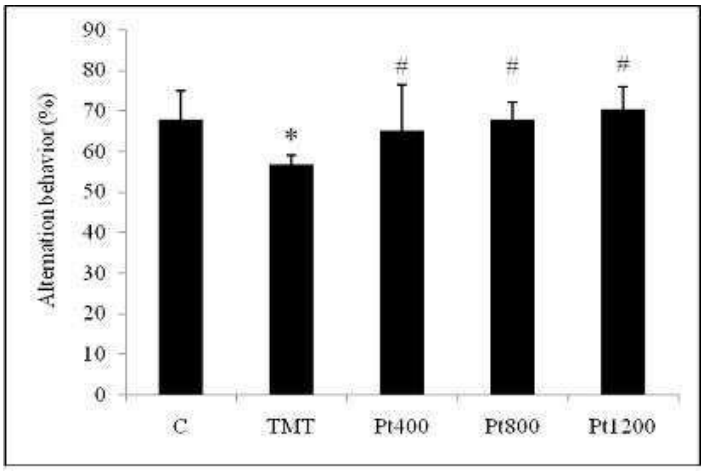
도면5


AChE inhibitor (%)
60
50
40
30
20
10
0
T300
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
R_f value

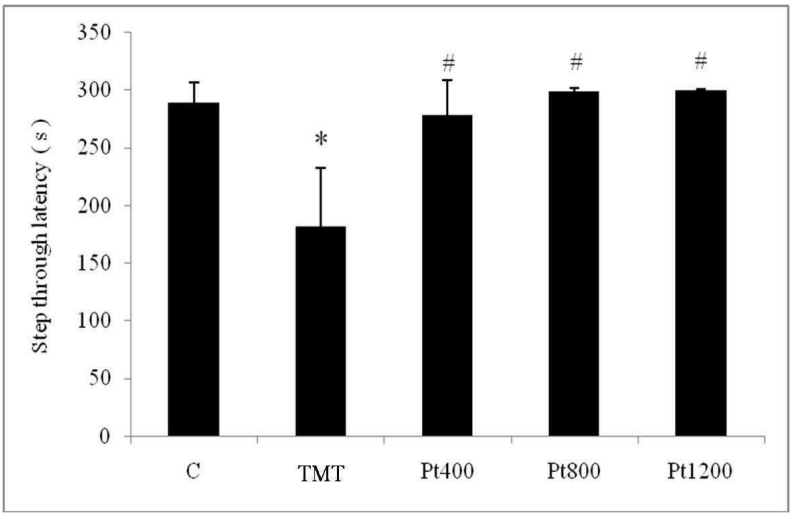
도면6



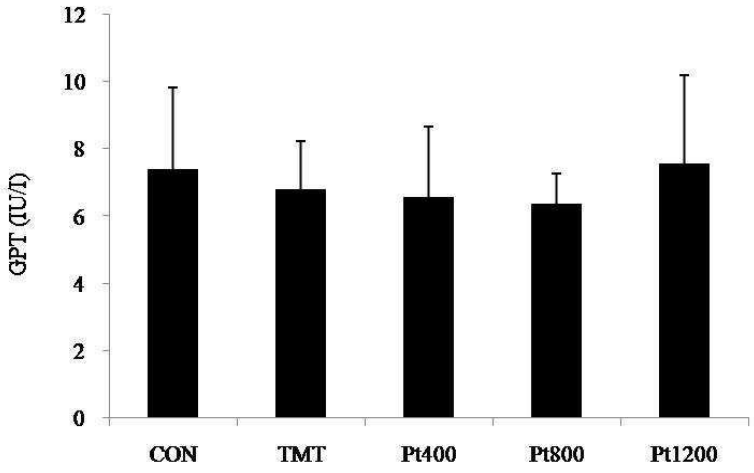
도면7


Alternation behavior (%)
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
*
#
#
#
C
TMT
Pt400
Pt800
Pt1200

도면8


Step through latency (s)
350
300
250
200
150
100
50
0
*
#
#
#
C
TMT
Pt400
Pt800
Pt1200

도면9


GPT (IU/l)
12
10
8
6
4
2
0
CON
TMT
Pt400
Pt800
Pt1200

도면10

