



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년02월06일
(11) 등록번호 10-1357674
(24) 등록일자 2014년01월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/343 (2006.01) A61K 31/045 (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01) A61K 36/65 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0081165(분할)
(22) 출원일자 2013년07월10일
심사청구일자 2013년07월10일
(65) 공개번호 10-2013-0083428
(43) 공개일자 2013년07월22일
(62) 원출원 특허 10-2010-0079356
원출원일자 2010년08월17일
심사청구일자 2011년09월23일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020090078939 A
전체 청구항 수 : 총 11 항

(73) 특허권자
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
(72) 발명자
김영섭
대전 유성구 구죽로 25, 310동 502호 (송강동, 송강그린아파트)
유시용
대전 유성구 노은동로87번길 19 (노은동)
(74) 대리인
이원희
(뒷면에 계속)

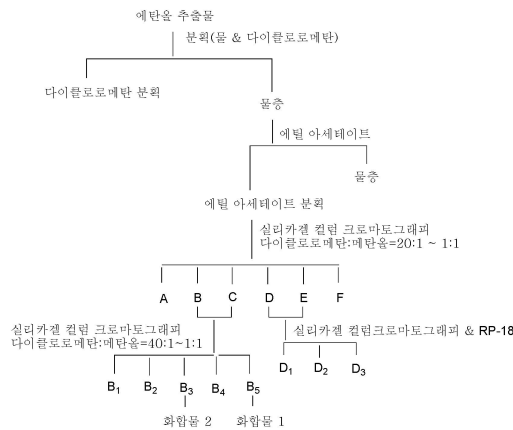
심사관 : 김용

(54) 발명의 명칭 **작약 종자 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명에 따른 작약 종자의 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 BACE-1 활성을 저해시켜 알츠하이머형 치매, 파킨슨 병, 진행성 핵상마비 등 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

홍경식

대전 동구 동구청로 67, 101동 1804호 (가오동, 은
어송마을1단지)

최춘환

대전광역시 유성구 장동 한국화학연구원 창조관
103호

차미란

경남 거제시 연초면 임전길 11-2

박우규

충청북도 청주시 흥덕구 분평동 현대-대우아파트
803동 803호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 SK-0909

부처명 산업기술연구회

연구사업명 협동연구사업

연구과제명 건강수명연장을 위한 기능성식품/천연물 의약소재의 산업화연구(2단계2차년도)

기여율 80/100

주관기관 한국화학연구원

연구기간 2009.11.01 ~ 2010.07.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KK-0904-C1

부처명 산업기술연구회

연구사업명 기관고유사업

연구과제명 미래형 바이오소재 및 유기소재 후보물질 개발(Sub)

기여율 20/100

주관기관 한국화학연구원

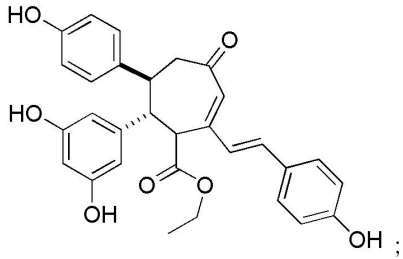
연구기간 2010.01.01 ~ 2010.12.31

특허청구의 범위

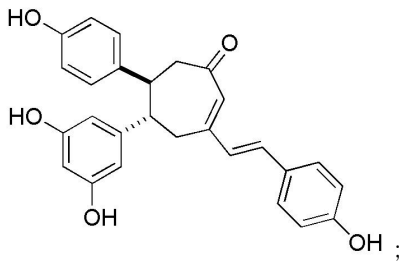
청구항 1

하기 화학식 2, 화학식 5, 화학식 6, 화학식 7 및 화학식 8로 표시되는 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물:

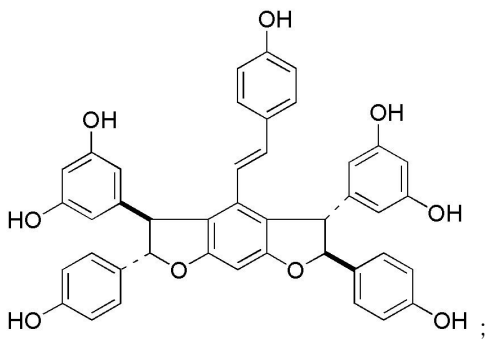
[화학식 2]



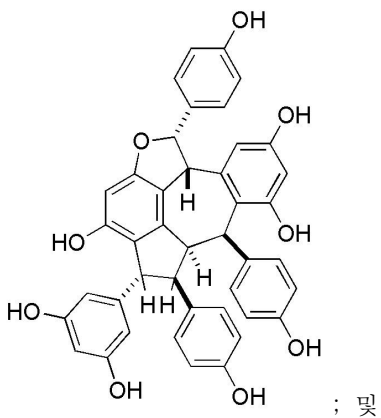
[화학식 5]



[화학식 6]

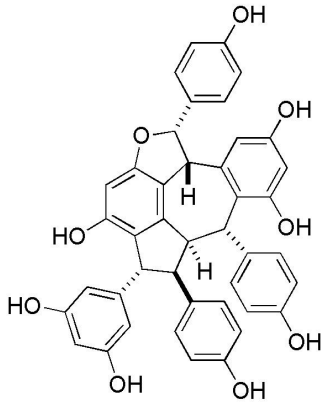


[화학식 7]



[화학식 8]

; 및



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머형 치매(AD), 파킨슨 병 또는 진행성 핵상마비인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

작약(*Paeonia lactiflora*) 종자를 물, C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합물을 가하여 작약 종자 추출물을 수득하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 수득한 추출물을 물, 다이클로로메탄 및 에틸아세테이트로 분획하여 분획물을 얻는 단계(단계 2) 및;

상기 단계 2에서 수득한 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물을 분리하고 정제하는 단계(단계 3);를 포함하는 제 1항의 화학식 2, 화학식 5, 화학식 6, 화학식 7 또는 화학식 8로 표시되는 화합물의 제조방법.

청구항 4

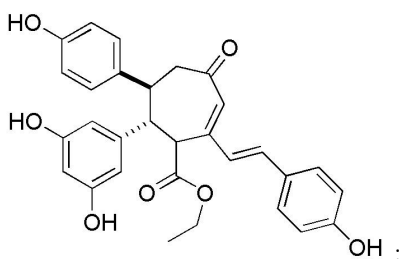
제 3항에 있어서,

상기 단계 1의 C₁-C₄의 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 제조방법.

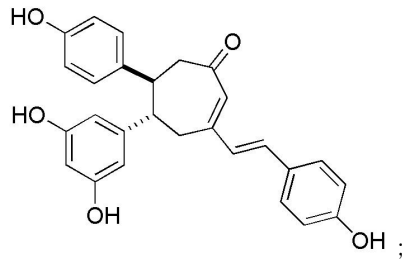
청구항 5

하기 화학식 2, 화학식 5, 화학식 6, 화학식 7 및 화학식 8로 표시되는 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물:

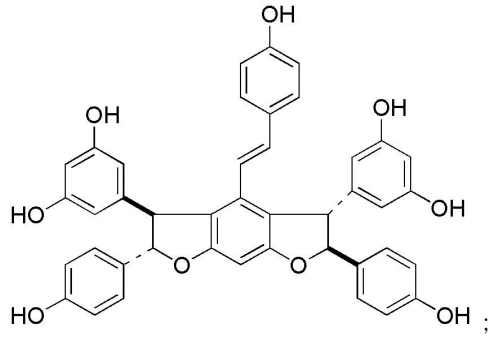
[화학식 2]



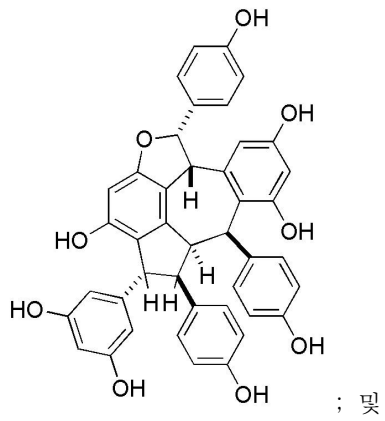
[화학식 5]



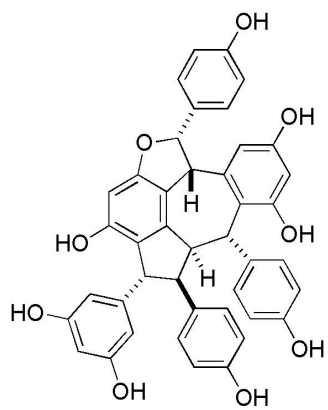
[화학식 6]



[화학식 7]



[화학식 8]



청구항 6

제5항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머형 치매(AD), 파킨슨 병 또는 진행성 핵상마비인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물.

청구항 7

작약(*Paeonia lactiflora*) 종자를 물, C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합물을 가하여 작약 종자 추출물을 수득하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 수득한 추출물을 물, 다이클로로메탄 및 에틸아세테이트로 분획하여 분획물을 얻는 단계(단계 2) 및;

상기 단계 2에서 수득한 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물을 분리하고 정제하는 단계(단계 3);를 포함하는 제 5항의 화학식 2, 화학식 5, 화학식 6, 화학식 7 또는 화학식 8로 표시되는 화합물의 제조방법.

청구항 8

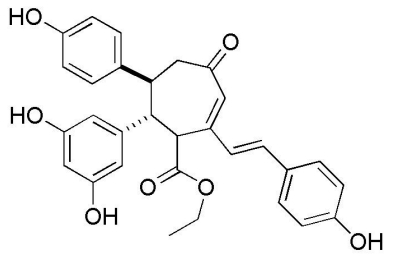
제7항에 있어서,

상기 단계 1의 C₁-C₄의 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

하기 화학식 2로 표시되는 화합물:

[화학식 2]



청구항 10

작약(*Paeonia lactiflora*) 종자를 물, C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합물을 가하여 작약 종자 추출물을 수득하는 단계(단계 1);

상기 단계 1에서 수득한 추출물을 물, 다이클로로메탄 및 에틸아세테이트로 분획하여 분획물을 얻는 단계(단계 2) 및;

상기 단계 2에서 수득한 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물을 분리하고 정제하는 단계(단계 3);를 포함하는 제 9항의 화학식 2로 표시되는 화합물의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 단계 1의 C₁-C₄의 알코올은 메탄올 또는 에탄올인 것을 특징으로 하는 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 작약 종자 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 건강식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 본 발명은 알츠하이머 병 등 노인성 치매를 유발하는 원인물질로 잘 알려진 베타-아밀로이드의 생성을 촉진하는 효소 BACE-1(베타-시크리타제)의 활성을 저해하는 작약종자의 유기용매 추출물 및 이로부터 분리정제된 활성물질 트랜스-레스베라트롤(trans-resveratrol), 시스-입신론-비니페린(cis-ε-viniferin), 7a,8a-시스-입신론-비니페린(7a,8a-cis-ε-viniferin), 비티시놀 C(vitisinol C), 비티시놀 F(vitisinol F), 그네틴 H(gnetin H), 서프루티코솔 A(suffruticosol A) 및 서프루티코솔 B(suffruticosol B)를 유효성분으로 함유하는 BACE-1 저해제에 관한 것이다.

[0003] 치매(dementia)는 일상생활에 장애를 주는 기억과 인지 능력의 점차적인 악화로 정의되며, 크게 혈관성 치매와 알츠하이머형 치매로 나눌 수 있다. 혈관성 치매는 주로 혈관 내에 형성된 혈전에 의해 뇌경색 또는 뇌졸중 등이 발생하는 경우에 해당되며 발병 주변의 뇌세포가 손상을 입어 기억력 상실 등의 증상이 유발되는 것으로 알려져 있다. 반면, 혈관성 치매보다 훨씬 더 많은 비중을 차지하고 있는 알츠하이머형 치매(Alzheimer's Diseases : AD)는 서서히 진행되는 뇌 질환으로서 처음에는 기억력 감퇴, 성격의 변화 그리고 사고력이 감소하는 질병으로서 대부분의 환자는 8-10년 내에 폐렴 등으로 사망한다. 전 세계적으로 65세 이상의 노인 중 3.5-10% 가량이 이 질환을 앓고 있으며 미국에서만 400만 명의 환자가 있는 것으로 추정된다. 이 질환을 치료하기 위하여 소요되는 사회적 비용만도 미국에서만 연 1000억불이 지출되고 있는 노인의 대표적인 질병이다. 알츠하이머형 치매의 특징적인 병변으로 뇌조직 중에 베타-아밀로이드가 포함된 아밀로이드 플라크(amyloid plaques), 신경섬유 농축체(neurofibrillary tangles) 등이 형성되어 면역세포에 염증반응을 일으키고, Ca²⁺ 채널을 파괴할 뿐 아니라, 신경전달물질인 아세틸콜린의 양을 감소시킴으로써 기억력, 인지능의 감퇴증상이 서서히 나타나는 것으로 보고되고 있으나 아직 정확한 병인이나 치료법은 알려지지 않고 있는 실정이다. 또한, 최근의 역학 연구에 의하면 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 및 심장질환 등 뇌혈관 질환의 위험인자들이 혈관성 치매뿐만 아니라 알츠하이머형 치매의 발병율을 증가시킨다는 보고도 있다.

[0004] 알츠하이머형 치매(AD)로 인한 인지기능저하현상에 대한 현대 의학적 관점은 대부분 뇌 콜린성 신경세포의 광범위한 변성 및 소실을 인지기능감퇴의 가장 주요한 원인으로 간주하고 있으며, 이를 극복하기 위한 방편으로 손상되지 않고 남아있는 콜린성 신경계의 활성을 증가시켜 손상된 인지기능을 부분적으로 회복시킬 수 있는 약물들을 개발하고자 하는 연구가 주종을 이루고 있다. 현재 미국 식품의약국(FDA)으로부터 알츠하이머형 치매의 치료제로 공인 받은 네가지 약물(타크린, 리바스티그민, 도네페질, 갈란타민) 모두 아세틸콜린 분해 효소의 활성을 저해함으로써 인지기능을 향진시키고자하는 일명 아세틸콜린에스테라제 저해제(acetylcholinesterase inhibitors)들이다.

[0005] 실제로 지금까지 알려진 알츠하이머형 치매의 치료제로 승인된 의약품은 아세틸콜린에스테라제 저해제가 유일한 실정이나, 이들 약제들은 일부 알츠하이머형 치매 환자(40-50%)에서 일시적인 병증 완화 효과만을 보이고 그 약효 역시 오래 지속되지 못하는 단점이 있다. 또한 질환의 특성상 장기 복용을 요하는데, 지금까지 개발된 아세틸콜린에스테라제 저해제는 간독성을 비롯한 여러 가지 부작용을 수반하는 것 또한 문제점으로 드러나고 있다. 알츠하이머형 치매에 대한 치료제의 개발이 힘들었던 가장 큰 이유는 알츠하이머형 치매의 발병원인이 정확히 밝혀지지 않았기 때문이다. 그러나 최근의 유전학적, 세포생물학적 및 분자생물학적인 진보에 따라, 알츠하이머형 치매의 발병 기전에 대한 가설로서 아밀로이드 가설이 제시되고 있다. 즉, 아밀로이드 전구 단백질(APP)에서 베타-아밀로이드가 유리되고 유리된 베타-아밀로이드는 서로 응집되어 불용성 아밀로이드 플라크를 생성하는데, 이 베타-아밀로이드의 응집 및 아밀로이드 플라크의 생성이 신경 세포의 퇴행을 일으키게 되고, 그 결과로 이차적으로 신경섬유 농축체(neurofibrillary tangle)의 생성이 유발된다는 것이다. 이와 같이 베타-아밀로이드의 뇌내 축적과 그로 인한 신경독성이 알츠하이머형 치매의 매우 중요한 발병원인으로 작용하고 있음이 밝혀짐에 따라 BACE-1 저해제와 같이 베타-아밀로이드의 생성저지, 응집저지 또는 독성저지 효과를 지니면서 상대적으로 부작용이 적은 물질의 탐색연구가 전 세계적으로 집중적으로 연구되어지고 있다.

[0006] 베타-아밀로이드는 아밀로이드 단백질의 전구체인 APP(베타-아밀로이드 전구 단백질)가 감마-시크리타제 및 베타-시크리타제는 단백질분해효소들의 작용을 받아 생성된 아밀로이드 전구 단백질의 절편이다. 또, 베타-아밀로이드의 생성에 가장 주요한 역할을 하고 있는 효소 베타-시크리타제는 일반적으로 BACE로 불리우고 있으며 BACE-1과 BACE-2 두 개의 타입이 알려져 있다. 이 중 BACE-1은 베타-시크리타제의 대부분의 활성 (약 90%)을 지니고 있어 베타-아밀로이드 생성과정에 있어 BACE-2에 비하여 훨씬 더 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있다. 따라서 BACE-1의 활성을 선택적으로 저해하는 물질들은 알츠하이머형 치매의 유발물질인 베타-아밀로이드의 생성과정을 근본적으로 차단함으로써 알츠하이머형 치매의 치료제로 활용될 수 있는 가치를 충분히 인정받고 있다.

[0007] 한편, 작약 (*Paeonia lactiflora*)는 작약과에 속하는 작약속의 여러해살이풀이며, 작약의 꽃은 아름다워 관상용으로 재배되고 있다. 뿌리는 한방에서 사용하는 약재(백작약, 적작약)로 빈혈, 진통제, 혈압 및 해열제로 이용한다. 그러나 현재까지 작약속 식물 추출물에서 BACE-1 저해활성과 관련된 연구는 거의 없는 실정이다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 작약 종자의 추출물 및 이의 분획물이 BACE-1 저해효과를 나타냄을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 작약 종자 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 작약 종자 추출물로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공하는 데 있다.

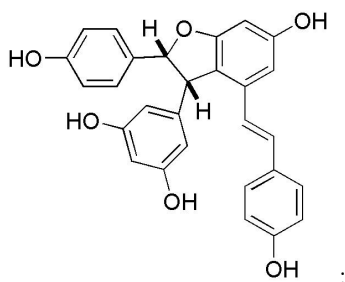
[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 작약 종자 추출물로부터 분리한 신규한 화합물의 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 화합물의 제조방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

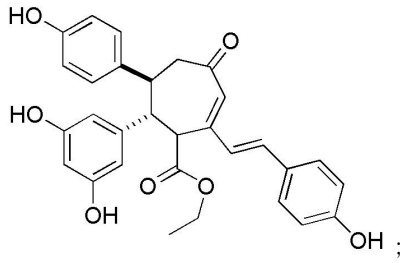
[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1 내지 화학식 8로 표시되는 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0014] [화학식 1]



[0015]

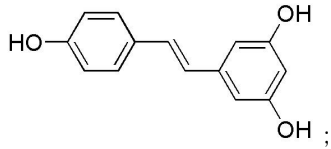
[0016] [화학식 2]



[0017]

[0018]

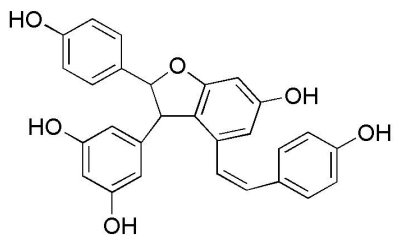
[화학식 3]



[0019]

[0020]

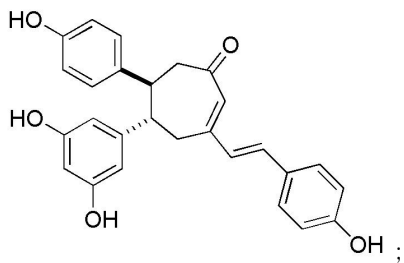
[화학식 4]



[0021]

[0022]

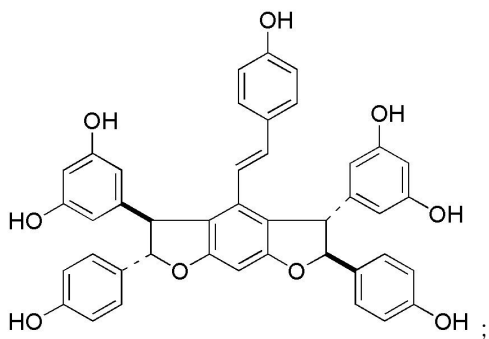
[화학식 5]



[0023]

[0024]

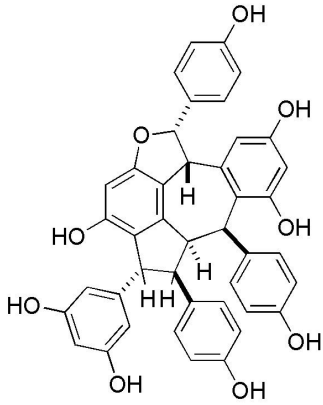
[화학식 6]



[0025]

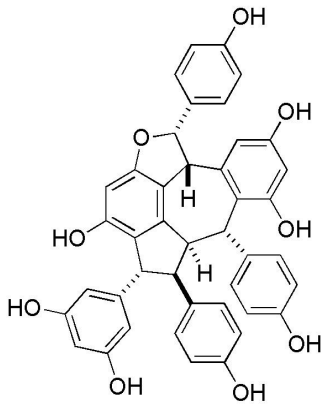
[0026]

[화학식 7]



[0027] ; 및

[0028] [화학식 8]



[0029]

[0030] 또한, 본 발명은 상기 화학식 1 내지 화학식 8로 표시되는 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0031] 나아가, 본 발명은 상기 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 신규한 화합물을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 작약(*Paeonia lactiflora*) 종자를 물, C₁-C₄의 알코올 또는 이들의 혼합물을 가하여 작약 종자 추출물을 수득하는 단계(단계 1);

[0033] 상기 단계 1에서 수득한 추출물을 물, 다이클로로메탄 및 에틸아세테이트로 분획하여 분획물을 얻는 단계(단계 2) 및;

[0034] 상기 단계 2에서 수득한 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물을 분리하고 정제하는 단계(단계 3);를 포함하는 상기 화학식 1 내지 화학식 8로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0035] 본 발명에 따른 작약 종자의 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 BACE-1 저해효과를 나타내므로, 알츠하이머형 치매, 파킨슨 병, 진행성 핵상마비와 같은 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 작약 종자 추출 및 분획에 관한 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0038] 본 발명은 작약(Paeonia lactiflora) 종자의 추출물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0039] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 작약 종자는 재배한 것, 채취한 것 또는 시판되는 것 등이 제한 없이 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 작약 종자 추출시 추출 용매는 메탄올, 메탄올 수용액, 에탄올, 에탄올 수용액, 부탄올 또는 이들의 혼합 용매를 사용하는 것이 바람직하며, 80 내지 100%의 에탄올이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 상기 추출 용매의 양은 작약 종자 중량의 2 내지 200배로 함이 바람직하고, 10 내지 30배로 하는 것이 더 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 상기 작약 종자의 추출물을 추출하는 방법은 열수 추출, 침지 추출, 초임계 추출, 아임계 추출, 고온 추출, 고압 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출장치를 이용한 방법 또는 XAD 및 HP-20을 포함한 흡착 수지를 이용하는 방법 등 당 업계의 통상적인 추출방법을 사용할 수 있으며, 가온하며 환류 추출 또는 상온에서 추출하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 추출 시 온도는 10 내지 30 °C인 것이 바람직하고, 상기 추출 시간은 1일 내지 20일인 것이 바람직하며, 5 내지 10일인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0043] 또한, 본 발명은 작약 종자의 분획물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0044] 본 발명에 따른 분획물은

[0045] 작약 종자를 물, C₁~C₄의 알코올 또는 이들의 혼합물을 가하여 작약 종자 추출물을 수득하는 단계(단계 1); 및

[0046] 상기 단계 1에서 수득한 추출물을 물, 다이클로로메탄 및 에틸아세테이트로 순차적으로 분획하여 분획물을 얻는 단계(단계 2)를 포함하여 이루어지는 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명에 따른 상기 제조방법을 도 1을 참조하여 단계별로 더욱 구체적으로 설명한다.

[0048] 먼저, 본 발명에 따른 상기 단계 1은 추출용매로 작약 종자 추출물을 수득하는 단계이다.

[0049] 상기 작약 종자 추출물은 상술한 방법으로 제조될 수 있다.

[0050] 다음으로, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 수득한 추출물을 물, 다이클로로메탄 및 에틸아세테이트로 분획하여 분획물을 수득하는 단계이다.

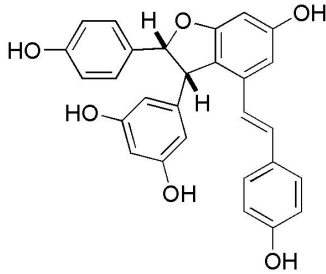
[0051] 구체적으로, 상기 분획물은 상기 단계 1에서 얻은 작약 종자 추출물을 물에 현탁 시킨 후, 다이클로로메탄을 첨가하여 물층과 유기층으로 분리한 다음 유기층을 감압 농축 및 건조시켜 다이클로로메탄 분획물을 수득하고, 상기 물층에 에틸아세테이트를 첨가하여 물층과 유기층으로 분리한 다음 유기층을 감압 농축 및 건조하여 에틸아세테이트 분획물을 수득하는 것이 바람직하다.

[0052] 이 때, 상기 감압 농축은 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압 건조, 진공 건조, 비등 건조, 분무 건조, 상온 건조 또는 동결 건조를 하는 것이 바람직하고 동결 건조를 하

는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

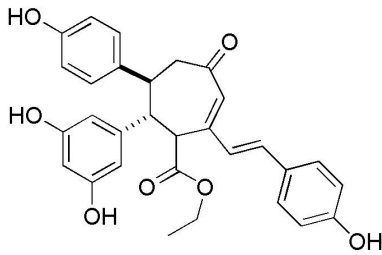
[0053] 나아가, 본 발명은 화학식 1 내지 화학식 8의 화합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

화학식 1



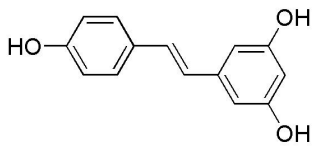
[0054]

화학식 2



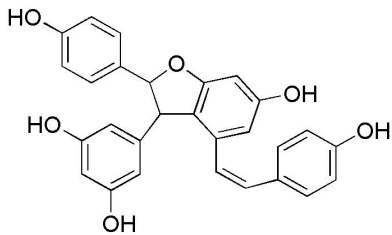
[0055]

화학식 3



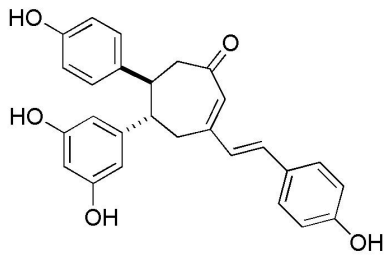
[0056]

화학식 4



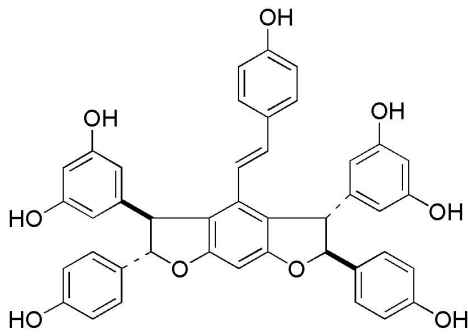
[0057]

화학식 5



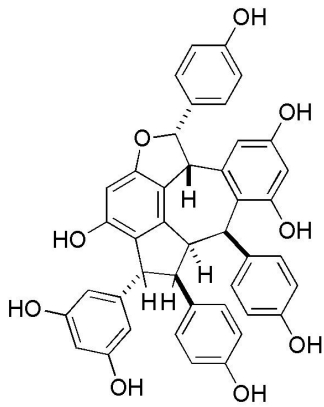
[0058]

화학식 6



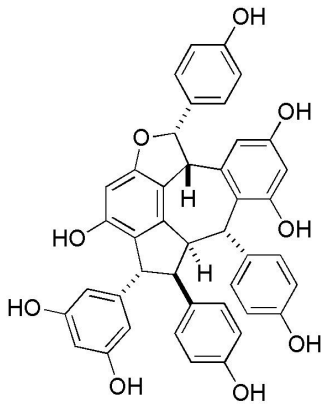
[0059]

화학식 7



[0060]

화학식 8



[0061]

[0062]

상기 화학식 1 내지 화학식 2의 화합물은 상기 단계 2에서 수득한 분획물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 수행하여 화합물을 분리하고 정제하는 단계를 추가로 진행하여 이루어지는 제조방법에 의해 제조될 수 있다.

[0063]

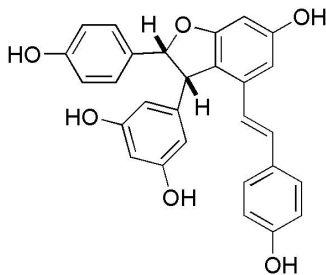
구체적으로, 상기 실리카겔 컬럼 크로마토그래피는 역상 또는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 1 내지 수회 수행하는 것이 바람직하다. 이동상으로는 다이클로로메탄 : 메탄올 (40 : 1 - 1 : 1) 또는 메탄올 : 물 (1 : 5 - 1 : 0)을 사용할 수 있다. 이 때, 사용한 용매는 비극성에서 극성 또는 극성에서 비극성으로 순차적으로 올려주는 농도구배 용출방식으로 용출 분리하며, 수집된 분리물의 BACE-1 저해효과를 측정하여 원하는 활성 분획을 얻는다.

[0064]

또한, 본 발명은 화학식 1 또는 화학식 2로 표시되는 약약 종자 추출물로부터 분리된 신규 화합물을 제공한다.

[0065]

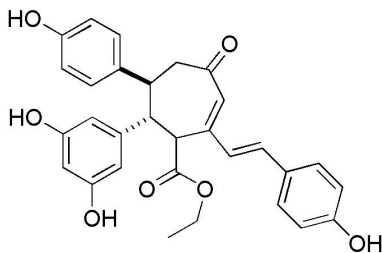
[화학식 1]



[0066]

[0067]

[화학식 2]



[0068]

[0069]

상기 약약 종자 추출물로부터 분리된 신규 화합물은 상술한 방법으로 제조될 수 있다.

[0070]

본 발명에 따른 상기 약약 종자 추출물, 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 BACE-1에 대한 억제 활성 값

(IC₅₀)이 0.34~11.90 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타나(표 5 참조) BACE-1 활성을 효과적으로 저해시키므로 상기 BACE-1로부터 유도되는 알츠하이머형 치매 등의 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

- [0071] 상기 본 발명의 작약 종자 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 작약 종자 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 0.1 내지 50 중량%로 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0072] 본 발명의 조성물은 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0073] 본 발명에 따른 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0074] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태, 체중, 연령, 성별, 식이, 배설율, 질환의 중증도, 약물형태, 투여시간, 투여방법, 투여경로 및 투여기간 등에 따라 그 범위가 다양하다. 1일 투여량은 본 발명에 따른 추출물, 분획물을 동결건조하였을 때의 양으로 0.0001 mg/kg 내지 500 mg/kg, 바람직하게는 0.001 mg/kg 내지 100 mg/kg 이며, 필요에 따라 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.
- [0075] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0076] 또한, 본 발명은 작약 종자 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 뇌질환 예방 또는 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0077] 본 발명의 작약 종자 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물이 알츠하이머 형 노인성 치매를 유발하는 원인 물질인 베타-아밀로이드 생성을 억제함으로써 BACE-1 저해효과를 가져와 노인성 치매 등 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강식품으로 사용될 수 있다.
- [0078] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강 식품을 모두 포함한다.
- [0079] 본 발명의 작약 종자 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.1 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나

또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0080] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 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, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0081] 상기 외에 본 발명의 작약 종자 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 대황 추출물, 이의 분획물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 작약 종자 추출물, 이의 분획물 또는 이로부터 분리한 화합물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0082] 이하 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다,

[0083] 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0084] <실시예 1> 작약 종자 추출물의 제조

[0085] 건조된 작약종자 2 kg을 상온에서 에탄올 20 l 에 일주일간 냉침시킨 후 여과하고 여액을 감압 농축하여 에탄올 추출물 214 g을 얻었다.

[0086] <실시예 2> 작약 종자 분획물의 제조

[0087] 상기 실시예 1의 에탄올 추출물을 증류수 10 l 에 현탁시킨 후, 동량의 다이클로로메탄을 첨가하여 물층과 유기층으로 분리하여 다이클로로메탄 분획물을 21.9 g 수득하였다. 상기 물층을 10 l 의 에틸아세테이트로 분획하고 얻은 분획액을 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획물 128.6 g을 수득하였으며, 남은 물층을 동결 건조시켰다.

[0088] <실험예 1> 작약 종자 추출물의 BACE-1 저해효과 측정

[0089] BACE-1 저해효과는 BACE-1 FRET Assay Kit (PanVera®)를 이용하여 측정하였으며, 자세한 시험 방법은 하기와 같다. 먼저, 10 µl의 BACE-1 기질 용액 (최종농도 250 nM)에 10 µl의 에탄올 추출물을 가하고 BACE-1 효소 (최종농도 0.3 unit/ml) 용액 10 µl를 첨가한 후 실온에서 60분간 인큐베이션을 하였다. 인큐베이션 완료 후 즉시, 반응액에 10 µl의 고정 용액 (stop solution)을 가한 후 플렉스테이션 (FlexStation)을 이용하여 545 nm (excitation) 및 585 nm (emission)에서 그 형광을 측정하여 효소 활성도를 측정하였다. 반응 혼합물의 총 부피는 40 µl이며 384 블랙 마이크로웰 접시 (black microwell plate)상에서 실시하였다. 실험에 사용된 효소, 기질 및 시험 버퍼 (assay buffer) 등의 자세한 조성은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0090]		조성물
	BACE-1 효소	인형 재조합 BACE-1 (0.3 U/ml)

BACE-1 기질	로다민(Rhodamine)-EVNLDAEFK-쿼엔처(Quencher) 250 nM
BACE-1 고정 용액	2.5 M 소듐 아세테이트
BACE-1 시험 버퍼	50 mM 소듐 아세테이트(pH 4.5)

[0091] BACE-1 효소활성은 효소반응 종료 시 기질이 분해된 양을 형광분석법으로 측정하였으며 검체를 첨가하지 아니한 대조군의 효소활성과 검체를 첨가한 시험군의 효소활성을 비교하여 검체의 효소저해율을 환산하였다. 먼저 10 ug/ml 및 100 ug/ml 농도에서 검체의 BACE-1 저해율을 측정하고, 각 농도에서 50% 이상의 저해효과를 나타낸 검체에 대해서는 검체를 단계적으로 희석하여 7-8단계의 농도 구배에 따른 효소저해율을 구하였으며, 용량-반응 곡선에 대한 선형회귀분석을 통하여 각 검체의 IC₅₀ (50% 효소저해농도) 값을 구하였다. 작약 종자 에탄올 추출물의 IC₅₀ 값은 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

성분	IC ₅₀ (μg/ml)
작약 종자 에탄올 추출물	18.0

[0093] 표 2에 나타난 바와 같이,

[0094] 작약 종자 에탄올 추출물의 IC₅₀의 값은 18.0 μg/ml으로 나타나는 것을 확인하였다.

[0095] <실험예 2> 작약 종자 분획물의 BACE-1 저해효과 측정

[0096] 에틸아세테이트 분획물 10 μl를 가한 것을 제외하고는 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 수행하여 에틸아세테이트 분획물의 IC₅₀ 값을 구하여 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

성분	IC ₅₀ (μg/ml)
에틸아세테이트 분획물	10.2

[0098] 표 3에서 나타난 바와 같이,

[0099] 작약 종자의 에틸아세테이트 분획물은 IC₅₀의 값이 10.2 μg/ml로 나타나는 것을 확인하였다.

[0100] <실시예 3> 작약 종자의 에틸아세테이트 분획물로부터 다이클로로메탄/메탄올 분획물의 제조

[0101] 상기 실시예 2에서 수득한 에틸아세테이트 분획물 128.6 g을 다이클로로메탄/메탄올 혼합용액을 이동상으로 사용하여 3 ml/분의 유속으로 흘려주면서 다이클로로메탄/메탄올의 혼합비를 20:1에서부터 1:1까지 순차적으로 올려주는 농도구배 용출방식의 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography)를 실시하여 총 6개의 분획(분획물 A 내지 F)으로 나누었다.

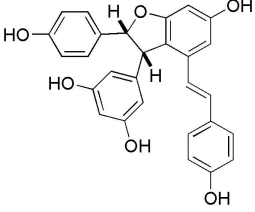
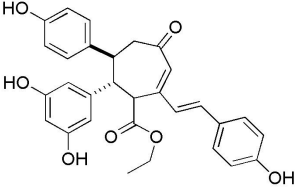
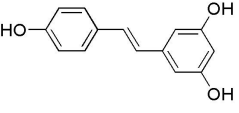
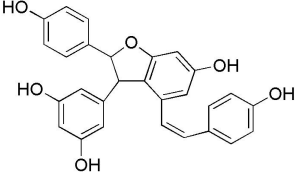
[0102] <실시예 4> 작약 종자의 다이클로로메탄/메탄올 분획물로부터 화합물의 제조

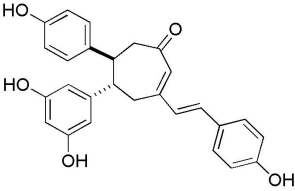
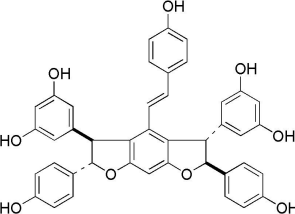
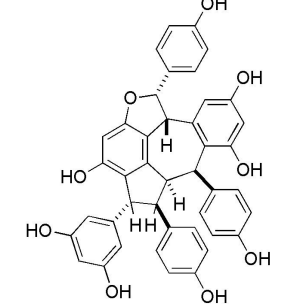
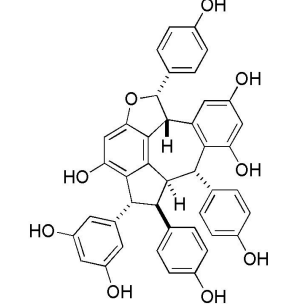
[0103] 상기 실시예 3에서 얻은 6개의 분획물 중 분획물 B 및 C로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(이동상으로서 다이클로로메탄/메탄올 40:1 - 1:1, 유속 3 ml/분)를 실시하여 트랜스-레스베라트롤(B₁), 비티시놀 C(B₂), 비티시놀 F(B₃), 시스-입신론-비니페린(B₄), 7a, 8a-시스-입신론-비니페린(B₅)을 분리하였다. 신규한 화합물인 7a, 8a-시스-입신론-비니페린 및 비티시놀 F는 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, HMQC, HMBC, DEPT 및 NOE를 사용하여 구조를 동정하였으며 화학식 1 및 화학식 2로 나타내었다.

[0104] 또한 분획물 D 및 E로 실리카겔 컬럼 크로마토그래피와 RP-18 컬럼 크로마토그래피 기법을 이용하여 서프루티코솔 A(D₁), 서프루티코솔 B(D₂) 및 그네틴 H(D₃)를 분리하였다.

[0105] 상기 분획물 B, C, D 및 E로부터 분리한 화합물들의 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 분석 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

표 4

화합물 구조	데이터
 <p>[화합식 1]</p>	<p>¹H-NMR (500 MHz, acetone-d₆) : δ 7.04 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2a, 6a), 6.63 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3a, 5a), 5.87 (1H, d, J = 8.0 Hz, H7a), 4.70 (1H, d, J = 8.0 Hz, H-8a), 5.82 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-10a), 5.98 (1H, t, J = 2.1 Hz, H-12a), 5.82 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-14a), 7.24 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-2b, 6b), 6.78 (2H, d, J = 8.6 Hz, H-3b, 5b), 6.78 (1H, d, J = 16.4 Hz, H-7b), 6.97 (1H, d, J = 16.4 Hz, H-8b), 6.39 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-12b), 6.75 (1H, d, J = 2.0 Hz, H-13b).</p> <p>¹³C-NMR (125MHz, acetone-d₆) : δ 162.5 (C-11b), 159.9 (C-11a, 13a), 159.6 (C-13b), 158.2 (C-4b), 158.2 (C-4a), 147.5 (C-9a), 134.4 (C-9b), 133.9 (C-1a), 130.1 (C-7b), 129.9 (C-1b), 128.7 (C-2b, 6b), 128.0 (C-2a, 6a), 123.5 (C-8b), 119.9 (C-10b), 116.3 (C-3b, 5b), 116.2 (C-3a, 5a), 107.0 (C-10a, 14a), 104.4 (C-14b), 102.1 (C-12a), 96.8 (C-12b), 93.9 (C-7a), 57.1 (C-8a).</p>
 <p>[화합식 2]</p>	<p>¹H-NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ : 7.36 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2b, 6b), 6.99 (1H, d, J=16.0 Hz, H-8a), 6.94 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3b, 5b), 6.82 (2H, d, J=8.5 Hz, H-2a, 6a), 6.71 (1H, d, J=16.0 Hz, H-7a), 6.68 (2H, d, J=8.5 Hz, H-3a, 5a), 6.34 (1H, s, H-3), 6.11 (2H, d, J=2.0 Hz, H-2c, 6c), 6.10 (1H, d, J=2.0 Hz, H-4c), 4.17 (1H, br s, H-1), 3.86 (1H, d, J=11.0 Hz, H-7), 3.15 (1H, t, J=11.0 Hz, H-6), 2.95 (1H, dd, J=11.0, 17.5 Hz, H-5a), 2.27 (1H, d, J=17.5 Hz, H-5b), 1.23 (5H, t, J=7.2 Hz, -OCH₂CH₃).</p> <p>¹³C-NMR (125 MHz, acetone-d₆) d: 201.6 (C-4), 173.3 (C=O), 159.3 (C-4a), 159.3 (C-3c), 159.3 (C-5c), 156.7 (C-4b), 148.7 (C-2), 147.4 (C-1c), 136.6 (C-1b), 135.2 (C-7a), 131.8 (C-3), 129.8 (C-2a), 129.8 (C-6a), 129.7 (C-8a), 129.4 (C-1a), 129.3 (C-2b), 129.3 (C-6b), 116.6 (C-3a), 116.6 (C-5a), 116.0 (C-3b), 116.0 (C-5b), 107.4 (C-2c), 107.4 (C-6c), 101.9 (C-4c), 62.3 (-OCH₂), 45.5 (C-7), 48.9 (C-5), 53.3 (C-6), 50.8 (C-1), 14.5 (-CH₃)</p>
 <p>[화합식 3]</p>	<p>¹H-NMR (300 MHz, acetone-d₆) : δ 7.33 (2H, d, J = 8.5, H-2', 6'), 6.94 (2H, d, J = 16.5, H-7'), 6.79 (2H, d, J = 16.5, H-8'), 6.75 (2H, d, J = 8.5, H-3', 5'), 6.43 (2H, d, J = 2.5, H-2, 6), 6.14 (2H, d, J = 2.5, H-4).</p> <p>¹³C-NMR (75MHz, acetone-d₆) : δ 159.7 (C-3, 5), 158.4 (C-10), 141.3 (C-1), 131.4 (C-7), 130.4 (C-13), 129.4 (C-8), 128.8 (C-12), 127.0 (C-14), 116.5 (C-11), 115.8 (C-9), 108.2 (C-6), 105.8 (C-2), 102.6 (C-4).</p>
 <p>[화합식 4]</p>	<p>¹H-NMR (300 MHz, acetone-d₆) δ : 7.12 (2H, d, J=8.0 Hz, H-2, 6), 7.09 (2H, d, J=8.0 Hz, H-2', 6'), 6.74 (2H, d, J=8.0 Hz, H-3, 5), 6.64 (3H, br s, H-10, 12, 14), 6.35 (1H, d, J=1.8 Hz, H-14'), 6.31 (1H, d, J=4.0 Hz, H-7'), 6.07 (1H, d, J=4.0 Hz, H-8'), 6.04 (1H, d, J=1.8 Hz, H-12'), 5.33 (1H, d, J=5.3 Hz, H-7), 4.09 (1H, J=5.3 Hz, H-8).</p> <p>¹³C-NMR (75 MHz, acetone-d₆) δ : 161.9 (C-11b), 158.9 (C-11a, 13a), 158.9 (C-13b), 157.5 (C-4b), 157.0 (C-4a), 146.4 (C-9a), 136.4 (C-9b), 133.1 (C-1a), 130.6 (C-7b), 130.3 (C-2b), 130.3 (C-6b), 128.7 (C-1b), 127.6 (C-2), 127.6 (C-6), 125.5 (C-8b), 119.4 (C-10b), 115.4 (C-3), 115.4 (C-5), 115.2 (C-3b), 115.2 (C-5b), 107.8 (C-14b), 106.2 (C-10), 106.2 (C-14), 101.2 (C-12), 96.0 (C-12b), 93.5 (C-7), 56.3 (C-8).</p>

 <p>[화학식 5]</p>	<p>$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, acetone-d_6) δ : 7.38 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2b, 6b), 6.93 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-8a), 6.90 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-2a, 6a), 6.83 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3b, 5b), 6.80 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H-7a), 6.67 (2H, d, $J=8.5$ Hz, H-3a, 5a), 6.64 (1H, s, H-3), 6.16 (2H, d, $J=2.0$ Hz, H-2c, 6c), 6.13 (1H, m, H-4c), 3.21-3.00 (6H, m, H-1, 5, 6, 7).</p> <p>$^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, acetone-d_6) δ : 201.7 (C-4), 159.2 (C-4a, 3c), 156.6 (C-5c), 155.2 (C-4b, 2), 148.8 (C-1c), 136.9 (C-1b), 135.6 (C-7a), 131.7 (C-3), 129.8 (C-2a, 6a), 129.5 (C-2b, 6b, 1a), 129.3 (C-8a), 116.5 (C-3a, 5a), 115.8 (C-3b, 5b), 107.2 (C-2c, 6c), 101.6 (C-4c), 52.6 (C-7), 50.5 (C-5), 46.5 (C-6), 34.7 (C-1).</p>
 <p>[화학식 6]</p>	<p>$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, acetone-d_6) δ : 7.28 (4H, dd, $J = 1.8, 8.6$ Hz, H-2a, 6a, 2c, 6c), 6.90 (2H, dd, $J = 1.8, 8.7$ Hz, H-2b, 6b), 6.86 (4H, dd, $J = 1.8, 8.6$ Hz, H-3a, 5a, 3c, 5c), 6.64 (2H, dd, $J = 1.8, 8.7$ Hz, H-3b, 5b), 6.63 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-7b), 6.55 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, H-8b), 6.49 (1H, s, H-12b), 6.26 (4H, d, $J = 2.1$ Hz, H-10a, 14a, H-10c, 14c), 6.22 (2H, d, $J = 2.1$ Hz, H-12a, 12c), 5.48 (2H, d, $J = 5.1$ Hz, H-7a, H-7c), 4.57 (2H, d, $J = 5.1$ Hz, H-8a, 8c).</p> <p>$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, acetone-d_6) δ : 161.9 (C-11a, 11c, 13b), 159.1 (C-4a, 13a, 4c, 13c), 157.4 (C-4b, 11b), 146.8 (C-9a, 9c), 133.5 (C-9b), 133.3 (C-7b), 132.5 (C-1a, 1c), 129.7 (C-1b), 128.1 (C-2a, 6a, 2c, 6c), 127.5 (C-2b, 6b), 121.7 (C-8b), 119.5 (C-10b, 14b), 115.8 (C-3a, 5a, 3b, 5b, 3c, 5c), 106.7 (C-10a, 14a, C-10c, 14c), 101.7 (C-12a, 12c), 93.4 (C-8c), 93.4 (C-8a), 91.0 (C-12b), 57.4 (C-7a, 7c).</p>
 <p>[화학식 7]</p>	<p>$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 7.10 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'', 6''), 6.95 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2, 6), 6.68 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5''), 6.48 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, 2', 6'), 6.37 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, 5), 6.25 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-12''), 6.19 (1H, d, $J = 0.8$ Hz, H-12'), 6.12 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.06 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-12), 5.98 (2H, d, $J = 2.2$ Hz, H-10, 14), 5.93 (1H, d, $J = 1.8$ Hz, H-14''), 5.68 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-7''), 4.23 (1H, d, $J = 3.2$ Hz, H-7'), 4.74 (1H, s, H-8), 4.35 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-8''), 3.93 (1H, m, H-8'), 3.68 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-7).</p> <p>$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD) δ : 160.2 (C-11''), 159.3 (C-11, 13), 158.9 (C-4''), 156.7 (C-13''), 156.5 (C-4), 155.1 (C-13'), 154.9 (C-11'), 154.5 (C-4'), 148.4 (C-9), 144.7 (C-9'), 141.8 (C-9''), 135.5 (C-1), 133.9 (C-1'), 130.8 (C-1''), 130.7 (C-2', 6'), 130.7 (C-2, 6), 130.5 (C-2''), 6''), 126.9 (C-10''), 123.0 (C-14'), 117.3 (C-10'), 116.2 (C-3'', 5''), 115.4 (C-3, 5), 114.2 (C-3', 5'), 106.8 (C-10, 14), 105.9 (C-14''), 101.9 (C-12''), 101.4 (C-12), 96.2 (C-12'), 91.5 (C-7''), 61.0 (C-7), 54.6 (C-8), 48.8 (C-8''), 48.6 (C-8'), 39.8 (C-7').</p>
 <p>[화학식 8]</p>	<p>$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, CD_3OD) δ : 7.58 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2'', 6''), 6.92 (2H, brd, 2', 6'), 6.91 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3'', 5'), 6.50 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3', 5'), 6.29 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-3, 5), 6.27 (2H, d, $J = 8.8$ Hz, H-2, 6), 6.24 (1H, s, H-10), 6.23 (1H, s, H-14), 6.22 (1H, s, H-12'), 6.18 (1H, d, $J = 2.2$ Hz, H-12''), 6.15 (1H, t, $J = 2.2$ Hz, H-12), 5.95 (1H, d, $J = 2.4$ Hz, H-14'), 5.86 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-7''), 5.09 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-8''), 4.23 (1H, d, $J = 11.2$ Hz, H-7'), 4.10 (1H, m, H-8'), 4.09 (1H, s, H-8), 3.81 (1H, d, $J = 6.0$ Hz, H-7).</p> <p>$^{13}\text{C-NMR}$ (75MHz, CD_3OD) δ : 160.2 (C-11'), 159.4 (C-11, 13), 159.1 (C-4''), 158.4 (C-13''), 157.2 (C-11''), 156.1 (C-4'), 156.0 (C-4), 155.7 (C-13'), 147.5 (C-9'), 147.5 (C-9), 142.4 (C-9''), 135.5 (C-1), 133.8 (C-1'), 133.0 (C-2', 6'), 130.9 (C-1''), 130.5 (C-2'', 6''), 129.5 (C-2, 6), 123.6 (C-14'), 122.9 (C-10''), 118.5 (C-10'), 116.5 (C-3'', 5''), 115.2 (C-3, 5), 114.7 (C-3', 5'), 107.4 (C-10, 14), 105.0 (C-12''), 103.7 (C-14''), 101.5 (C-12), 96.3 (C-12'), 91.1 (C-7''), 63.1 (C-7), 56.9 (C-8), 49.1 (C-8''), 47.8 (C-8'), 46.5 (C-7').</p>

[0107] <실험예 3> 작약 종자 분획물로부터 얻은 화합물들의 BACE-1 저해 효과 측정

[0108] 상기 실시예 4에서 얻은 트랜스-레스베라트롤 (trans-resveratrol), 시스-입신론-비니페린 (cis-ε-viniferin), 7a,8a시스입신론비니페린 (7a,8a-cis-ε-viniferin), 비티시놀시 (vitisinol C), 비티시놀에프 (vitisinol F), 그네티에이치 (gnetin H), 서프루티코솔에이 (suffruticosol A) 및 서프루티코솔비 (suffruticosol B) 각각의 BACE-1 저해효과를 측정하였다.

[0109] 에탄올 추출물 대신 각 화합물들을 10 μl씩 사용한 것을 제외하고는 상기 실험예 1과 동일한 방법으로 수행하여 각 화합물들의 IC₅₀ 값을 구하여 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

성분	IC ₅₀ (μg/ml)
7a, 8a-시스-입신론-비니페린 (화학식 1)	11.90
비티시놀 F (화학식 2)	2.21
트랜스-레스베라트롤 (화학식 3)	1.29
시스-입신론-비니페린 (화학식 4)	4.01
비티시놀 C (화학식 5)	1.43
그네티 H (화학식 6)	0.34
서프루티코솔 A (화학식 7)	5.99
서프루티코솔 B (화학식 8)	0.88

[0111] 표 5에 나타난 바와 같이,

[0112] 작약 종자 분획물로부터 얻어진 화합물인 트랜스-레스베라트롤, 시스-입신론-비니페린, 7a,8a-시스-입신론-비니페린, 비티시놀 C, 비티시놀 F, 그네티 H, 서프루티코솔 A, 서프루티코솔 B는 IC₅₀의 값은 18.0 μg/ml 이하로 모두 BACE-1 활성을 농도 의존적으로 저해하고 있는 것으로 나타났다. 특히, 그네티 H, 서프루티코솔 B의 경우 1 이하의 IC₅₀값을 가지는 매우 좋은 활성을 나타내었고, 신규한 화합물인 7a,8a-시스-입신론-비니페린 및 비티시놀 F 또한 각각 IC₅₀값이 1.29, 1.43로 좋은 활성을 나타내었다. 따라서, 상기 화합물들은 BACE-1 활성을 저해하는 능력이 뛰어나므로 퇴행성 뇌질환의 예방 및 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

[0113] <제제예 1> 약학적 제제의 제조

[0114] 1-1. 산제의 제조

[0115]	작약 종자 추출물	500 mg
[0116]	유당	100 mg
[0117]	탈크	10 mg

[0118] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0119] 1-2. 정제의 제조

[0120]	작약 종자 추출물	500 mg
[0121]	옥수수전분	100 mg
[0122]	유당	100 mg
[0123]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0124] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0125] **1-3. 캡슐제의 제조**

[0126]	작약 종자 추출물	500 mg
[0127]	옥수수전분	100 mg
[0128]	유당	100 mg
[0129]	스테아린산 마그네슘	2 mg

[0130] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0131] **1-4. 주사제의 제조**

[0132]	작약 종자 추출물	500 mg
[0133]	주사용 멸균 증류수	적량
[0134]	pH 조절제	적량

[0135] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0136] **1-5. 액제의 제조**

[0137]	작약 종자 추출물	100 mg
[0138]	이성화당	10 g
[0139]	만니톨	5 g
[0140]	정제수	적량

[0141] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬 향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색 병에 충전하여 멸균시켜 액체를 제조한다.

[0142] **제조예2: 건강식품의 제조**

[0143]	작약 종자 추출물	1000 mg
[0144]	비타민 혼합물	적량
[0145]	비타민 A 아세테이트	70 µg
[0146]	비타민 E	1.0 mg
[0147]	비타민	0.13 mg
[0148]	비타민 B ₂	0.15 mg
[0149]	비타민 B ₆	0.5 mg
[0150]	비타민 B ₁₂	0.2 µg

[0151]	비타민 C	10 mg
[0152]	비오틴	10 μ g
[0153]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0154]	엽산	50 mg
[0155]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0156]	무기질 혼합물	적량
[0157]	황산제1철	1.75 mg
[0158]	산화아연	0.82 mg
[0159]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0160]	제1인산칼륨	15 mg
[0161]	제2인산칼슘	55 mg
[0162]	구연산칼륨	90 mg
[0163]	탄산칼슘	100 mg
[0164]	염화마그네슘	24.8 mg

[0165] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0166] **제조예 3: 건강 음료의 제조**

[0167]	작약 종자 추출물	1000 mg
[0168]	구연산	1000 mg
[0169]	올리고당	100 g
[0170]	매실농축액	2 g
[0171]	타우린	1 g
[0172]	정제수를 가하여 전체	900 ml

[0173] 통상의 건강 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 건강 음료 조성물 제조에 사용하였다.

[0174] 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호 도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0175] **제조예 4: 기타 건강식품의 제조**

[0176] **4-1. 음료의 제조**

[0177]	꿀	522 mg
[0178]	치옥토산아미드	5 mg

[0179]	니코틴산아미드	10 mg
[0180]	염산리보플라빈나트륨	3 mg
[0181]	염산피리독신	2 mg
[0182]	이노시톨	30 mg
[0183]	오르트산	50 mg
[0184]	작약 종자 추출물	0.48~1.28 mg
[0185]	물	200 ml

[0186] 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 음료를 제조하였다.

[0187] **4-2. 츄잉껌의 제조**

[0188]	껌베이스	20 %
[0189]	설탕	76.36~76.76 %
[0190]	작약 종자 추출물	0.24~0.64 %
[0191]	후르츠향	1 %
[0192]	물	2 %

[0193] 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 츄잉껌을 제조하였다.

[0194] **4-3. 캔디의 제조**

[0195]	설탕	50~60 %
[0196]	물엿	39.26~49.66 %
[0197]	작약 종자 추출물	0.24~0.64 %
[0198]	오렌지향	0.1 %

[0199] 상기 조성 및 함량으로 하여 통상적인 방법을 사용하여 캔디를 제조하였다.

[0200] **4-4. 밀가루 식품의 제조**

[0201] 작약 종자 추출물 0.5 내지 5 중량부를 밀가루 100 중량부에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0202] **4-5. 유제품(dairy products)의 제조**

[0203] 작약 종자 추출물 5 내지 10 중량부를 우유 100 중량부에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0204] **4-6. 선식의 제조**

[0205] 현미, 보리, 참쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화 시켜서 건조한 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메시의 분말로 제조하였다. 검은콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조한 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메시

의 분말로 제조하였다. 상기에서 제조한 곡물류 및 종실류와 본 발명의 작약 종자 추출물을 다음과 같은 비율로 배합하여 제조하였다.

[0206]	현미	30 %
[0207]	울무	15 %
[0208]	보리	20 %
[0209]	들깨	7 %
[0210]	검정콩	7 %
[0211]	검은깨	7 %
[0212]	작약 종자 추출물	3 %
[0213]	영지	0.5 %
[0214]	지황	0.5 %

도면

도면1

