



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월10일

(11) 등록번호 10-1511233

(24) 등록일자 2015년04월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/49 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0126790

(22) 출원일자 2012년11월09일

심사청구일자 2013년09월24일

(65) 공개번호 10-2014-0060104

(43) 공개일자 2014년05월19일

(56) 선행기술조사문헌

BRAIN RESEARCH 1445. pp.73~81 (2012)*

Biochimica et Biophysica Acta. 1762

pp.575-586. (2006)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자

김종평

대전광역시 유성구 과학로 125

함민수

대전광역시 유성구 과학로 125

배미정

대전광역시 유성구 과학로 125

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 4 항

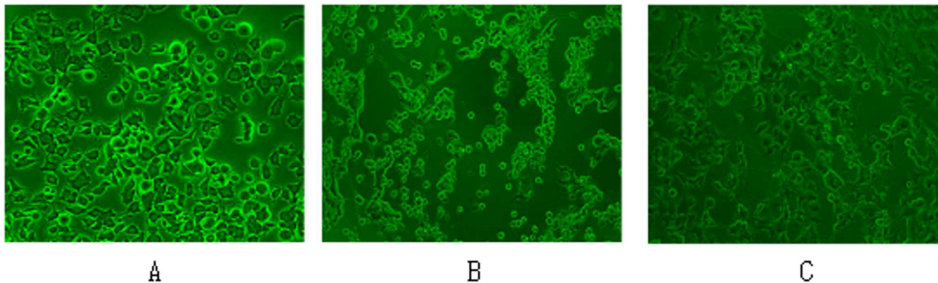
심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 차파랄 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 차파랄 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명의 차파랄 추출물 또는 이의 분획물이 뇌세포의 특성을 지닌 N18-RE-105 세포주에 글루타메이트(glutamate) 독성 억제 활성에 따른 뇌신경세포의 보호효과 및 낮은 세포독성을 가짐으로써, 신경보호용 약학적 조성물, 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물 또는 상기 목적의 건강식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



A

B

C

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 2011-0028
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 교육과학기술부
 연구사업명 과학기술국제화사업
 연구과제명 해외식물의 추출물은행 구축
 기여율 1.2/2
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2011.10.01 ~ 2012.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
 과제고유번호 KGS1221211
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 기초기술연구회
 연구사업명 주요사업(연구개발과제)
 연구과제명 미생물유래 의약활성물질 탐색
 기여율 0.8/2
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2012.01.01 ~ 2012.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

차파랄 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 헌팅턴병, 혈전증(thrombosis), 색전증(embolism), 두부손상(head trauma), 뇌순환대사장애 및 뇌 기능혼수로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 추출물은 물, C₁ 내지 C₂ 저급 알코올 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출하는 것을 특징으로 하는 헌팅턴병, 혈전증(thrombosis), 색전증(embolism), 두부손상(head trauma), 뇌순환대사장애 및 뇌 기능혼수로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

삭제

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 분획물은 차파랄 추출물은 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나로 추가적으로 추출하여 제조된 것을 특징으로 하는 헌팅턴병, 혈전증(thrombosis), 색전증(embolism), 두부손상(head trauma), 뇌순환대사장애 및 뇌 기능혼수로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

차파랄 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 헌팅턴병, 혈전증(thrombosis), 색전증(embolism),

두부손상(head trauma), 뇌순환대사장애 및 뇌 기능혼수로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 뇌질환 예방 및 개선용 건강기능식품.

청구항 12

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 차파탈(*Larrea divaricata*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 조성물 또는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 글루타메이트(glutamate)는 중추신경계(CNS)에서 주된 흥분성 신경전달물질(excitatory neuro-transmitter)로 작용하며 대사성 수용기(metabotropic receptor)와 이온성 수용기(ionotropic receptor)들(NMDA-, quisqualate-, kainate-type)과 결합하여 여러 가지 신경 생리학적 효과를 나타낸다. 신경세포 외로 방출된 글루타메이트는 시냅스 전 말단(presynaptic terminal)으로 직접 재흡수되거나 Na^+ -dependent high affinity transporter에 의해 성상세포(astrocyte)(교질세포(glial cell))내로 흡수된 후, ATP를 요구하는 글루타민 합성효소(glutamine synthase)에 의해 글루타민(glutamine)으로 전환되어 시냅스 전 말단으로 이동하게 된다.

[0003] 이러한 시냅스 전 말단과 성상세포의 작용으로 세포 외부의 글루타메이트 농도는 0.3 μ M의 저농도로 유지되게 된다. 그러나, 뇌가 뇌허혈(ischemia), 저산소증(hypoxia), 발작(seizure), 저혈당증(hypoglycemia), 뇌외상(trauma) 등에 걸리면 글루타메이트 수송에 필요한 에너지 공급이 부족하게 되어, 세포 외 글루타메이트 농도는 정상상태의 10,000배인 3 mM 정도로 증가하며, 이로 인해 중추신경 세포가 죽게 된다. 이러한 글루타메이트에 의한 신경 세포사는 글루타메이트로 유도된(glutamate-induced) 신경독성(neurotoxicity)으로 불리고 있으며, 세포 내의 자유 라디칼(free radical)의 발생에 의한 산화 스트레스(oxidative stress)와 매우 밀접한 관계가 있다. 따라서, 글루타메이트 독성에 의한 신경세포의 사멸이 세포 내에 과량으로 발생한 자유 라디칼에 의한 지질, 당, 핵산, 단백질 등의 세포구성성분의 파괴에 의한 것임이 밝혀짐으로써 이를 억제할 수 있는 자유 라디칼 제거제(free radical scavenger)와 같은 지질과산화 저해물질은 뇌세포를 보호할 수 있는 새로운 치료소재로서 매우 중요한 의미가 있다.

[0004] 글루타메이트의 세포 외 농도 증가는 뇌허혈, 뇌졸중, 뇌외상, 저산소증, 저혈당증, 발작 등의 급성질환뿐만 아니라, 헌팅턴 병(Huntington's disease, HD), 파킨슨 병(Parkinson's disease, PD), 근위축성 측색 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)과 같은 만성질환에도 관여하는 것으로 알려져있다. NIH의 조사 결과에 의하면 급성질환의 하나인 뇌졸중(stroke)은 미국인의 세 번째 사망 원인이며, 성인불구의 가장 큰 원인이 되고 있다. 매년 50만 명의 환자가 발생하며, 이중 30%는 사망하고 20 ~ 30%는 영구 불구자가 되고 나머지는 신체 불구, 신체마비, 시력감퇴, 기억상실 등의 고통을 받고 있다. 또한, 우리나라에서도 암에 이어서 사망 원인 2위의 중요한 질병으로 대두하여, 이러한 질병에 대한 치료제가 강력히 요구되고 있다.

[0005] 글루타메이트는 이온성 수용기(ionotropic receptor), 대사성 수용기(metabotropic receptor)의 두 가지 수용기(receptor)와 결합한다. 이온성 수용기는 이온 채널(ion channel)과 연관되어 있으며, 신경세포에 독립적으로 작용하여 흥분독성 손상(excitotoxic damage)을 주게 된다. 반면, 대사성 수용기의 경우는 이온성 수용기와는 달리 글루타메이트가 직접적인 신경 세포사를 야기하지는 않는다.

- [0006] 이온성 수용기에 글루타메이트가 결합하여 일으키는 신경 세포사는 Na^+ 와 Cl^- 의존성과 Ca^{2+} 의존성의 두 가지로 나눌 수 있다. Na^+ 와 Cl^- 의존성 신경 세포사는 글루타메이트에 노출된 후, 수 분 안에 일어나며 감극 물질(depolarizing agent)을 처리한 것과 유사한 신경 세포사를 보인다. 글루타메이트가 퀴스퀼산 수용기(quisqualate receptor)를 자극하여 Na^+ 이온이 세포 내로 과량 유입되며, Na^+ 이온의 유입과 함께 Cl^- , H_2O 가 세포 내부로 들어와 세포가 팽창(swelling)하여 결국 용해(lysis)된다.
- [0007] Ca^{2+} 의존성 신경 세포사는 딜레이드 신경 손상(delayed neuronal damage)로 글루타메이트 처리 후 수 시간이 지나서 일어나며, Ca^{2+} 이온투과담체(ionophore)인 A23187을 처리하였을 때와 유사하다. Na^+ 이온의 유입은 세포막의 탈분극(depolarization)을 야기하며 이로 인해 전압 민감성 있는 Ca^{2+} 채널(voltage sensitive Ca^{2+} channel, VSCC)과 Mg^{2+} 에 의해서 닫혀 있던 NMDA 수용체 Ca^{2+} 채널이 열리게 된다. 이로 인해 다량의 Ca^{2+} 이 세포 내로 유입되게 된다. 이렇게 유입된 Ca^{2+} 이온은 포스포리파아제(phospholipase A_2 , PLA_2), 산화질소 합성효소(nitric oxide synthetase, NOS), 프로테아제(protease), 엔도뉴클레아제(endonuclease)등의 Ca^{2+} 의존성 효소들을 활성화한다. 특히 PLA_2 는 인지질(phospholipid)를 분해하여 아라키돈산(arachidonic acid)을 생성시키며, 아라키돈산의 대사과정 중에 과산화물(superoxide)과 같은 자유라디칼이 발생한다.
- [0008] 또한, 아라키돈산과 과산화물은 시냅스전 뉴런(presynaptic neuron)에서의 글루타메이트 분비를 촉진시켜 세포 외의 글루타메이트 농도를 더욱 증가시킨다. 크산틴산화효소(Xanthine oxidase)의 작용으로 과산화물들이 생성되며, NOS의 작용으로 생성된 산화 질소(nitric oxide)는 과산화물과 반응하여 페록시나이트라이트(peroxynitrite)를 거쳐 반응성이 큰 히드록실 라디칼(hydroxyl radical)이 생성된다. 즉, PLA_2 , NOS, 크산틴산화효소(xanthine oxidase) 등의 효소 작용 결과 세포 내에 자유 라디칼이 과다하게 생성되어 이로 인한 산화 스트레스(oxidative stress)로 인하여 DNA, 단백질(protein), 지질(lipid) 등이 비선택적으로 파괴되어 신경세포가 죽게 되며 또한 엔도뉴클레아제(endonuclease)의 작용으로 세포자멸사(apoptosis)가 일어나기도 한다.
- [0009] 이러한 글루타메이트의 독성기작을 연구하기 위하여 글루타메이트 독성에 민감한 N18-RE-105 세포주가 이용되고 있다. 상기 N18-RE-105 세포주는 마우스 신경모세포종 클론(mouse neuroblastoma clone) N18TG-2와 18일 된 피셔 랫(Fisher rat)의 배아의 신경 망막 세포(embryonic neural retina)의 세포융합에 의해서 제작된다.
- [0010] N18-RE-105 세포주는 해마(hippocampus)에 존재하는 글루타메이트 수용기(glutamate receptor)와 유사한 수용기가 있고, 세포내 자유 라디칼의 축적을 통한 산화적 손상에 의한 세포 사멸을 일으키는 딜레이드 칼슘 의존성 세포 사멸(delayed calcium dependent cell death)을 보이며, 이는 글루타메이트 독성에 의한 실제 뇌신경 세포 사멸과 매우 유사한 특징을 가진다. 따라서, 이러한 특성으로 인해 상기 N18-RE-105 세포주는 시험관 내 허혈 모델(*in vitro* ischemic model) 및 글루타메이트 독성 기작에 이용된다.
- [0011] N18-RE-105 세포주에서의 글루타메이트 독성은 글루타메이트에 의한 시스테인 흡수(cystein uptake)의 저해에서 기인하는 것으로 알려져 있다. 시스테인은 세포 내에서 글루타시온(glutathione)을 구성하는 중요한 아미노산이다. N18-RE-105 세포에서는 상기 시스테인과 글루타메이트는 세포막을 통하여 서로 연관하면서 서로 반대방향으로 수송된다. 세포 외의 글루타메이트 농도가 증가하여 시스테인이 세포내로 유입되지 않으면 글루타시온의 농도가 감소하게 되며 세포 내에 자유 라디칼이 축적되어 결국 신경세포는 죽게 된다. 이러한 사실은 또한 배아의 대뇌피질성 신경(embryonic cortical neuron)의 초대 배양(primary culture)에서도 확인되어 퀴스퀼산-형 글루타메이트 독성(quisqualate-type glutamate toxicity)은 주로 산화 스트레스(oxidative stress)에 의한 것임이 시사되었다.
- [0012] 이상과 같이 글루타메이트가 뇌졸중(stroke), 뇌외상(trauma) 등과 같은 급성 뇌신경질환의 원인이 되며, 또한 PD, AD, HD와 같은 만성 뇌질환에서도 글루타메이트 독성에 의한 산화적 스트레스가 그 원인 중 하나라고 알려져 있다. 이에 따라 글루타메이트 독성에 의한 산화적 스트레스를 억제 또는 완화할 수 있는 지질과산화 억제 물질과 같은 항산화 활성물질은 급성, 만성 뇌신경 질환의 치료제로 기대된다. 이에 따라 *in vivo*에 가까운

조직(tissue) 또는 배양세포를 이용하여 글루타메이트 독성 억제물질을 탐색하면 지금까지 알려진 표적에 작용하는 물질뿐만 아니라, 새로운 신경세포 보호기작을 갖는 새로운 물질의 창출도 가능하리라 기대된다.

[0013] 글루타메이트에 의해서 야기되는 뇌졸중이 세계적으로 심각한 질병으로 대두하면서 이에 대한 치료제 개발이 활발히 진행되고 있다. 특히, 자유 라디칼이 글루타메이트 독성에 의한 신경 세포사의 주된 최종 원인 물질이기 때문에 새로운 자유 라디칼 제거제 또는 지질과산화 억제제와 같은 항산화 물질에 대한 연구가 활발히 진행되어 왔다. Upjohn사가 개발한 21-아미노 스테로이드(21-amino steroid)의 아민 단위(amine unit)와 비타민 E(vitamin E)의 테트라메틸-크로만 링(tetramethyl-chroman ring)으로 구성된 지질과산화 저해물질 U78517F 화합물은 in vivo 실험에서 강한 뇌졸중 치료효과를 보인다고 보고되었으며, 벤조푸란(benzofuran)을 기본골격으로 하는 항산화 활성물질 IRFI-016은 뇌허혈후 재환류시 뇌세포의 손상을 크게 억제하는 효과를 나타낸다고 보고되었다. 또한 자유 라디칼 소거물질로 알려진 퀴논(quinone)계의 이데베논(idebenone)은 N18-RE-105 세포에서의 글루타메이트 세포독성을 강력하게 저해하는데, in vivo 실험에서도 뇌동맥경화증 및 뇌혈관 장애성 치매에 대하여 치료효과를 나타내어, 현재 일본에서 심장수술 후, 장기이식 후의 뇌대사 부활제로서 임상시험중인 물질로 알려져 있다. 1996년 6월에 일본 Takeda사에서 개발한 과산화 저해제인 TAK-218 화합물은 자유 라디칼과 비정상적인 자유 도파민(free dopamine)을 소거함으로써 신경보호(neuroprotective)와 항-허혈(anti-ischemic) 효과를 보인다고 보고되었다.

[0014] 아울러, 글루타메이트 독성과 관련하여, 글루타메이트로 독성을 유발한 생쥐의 해마 유래 세포주인 HT22 세포주를 대상으로 백두산 자생식물 추출물이 세포생존율에 대한 증가 여부를 관찰하여 뇌 세포 보호 활성을 평가한 논문이 보고된바 있다(생약학회지, Kor. J. Pharmacogn. 39(3) : 213~217(2008)). 또한, 국내·외에서 자생하고 있는 435가지의 약용식물 추출물을 대상으로 뇌신경세포계 hybridoma N18-RE-105 세포주를 이용하여 신경세포 보호효과를 갖는 천연물의 탐색을 시도한 결과, 제비꽃(*Viola mandshurica*)으로부터 강력한 신경세포 보호효과를 확인하고 이에 대한 내용이 등록된바 있다(대한민국 등록특허 10-0982022). 아울러, 둥근마 조추출물 및 비극성 용매 가용추출물이 글루타메이트 및 과산화수소 신경 독성에 의한 세포사멸을 차단하여 뇌신경 세포 보호활성에 유의적인 효과를 확인한바 있다(대한민국 등록특허 10-0776347).

[0015] 차파랄(*Larrea divaricata*)은 사막의 상록관목으로 키작은 떡갈나무라고 알려져 있으며, 미국 캘리포니아 남서부 지역에 많이 자라고 있다. 또한, 차파랄은 항산화 기능 및 항균 활성이 알려져 있어, 이전부터 암, 감기, 상처, 기관지염, 백선 등을 치료하는데 사용되어 왔으나, 신경보호 및 뇌질환 보호효과에 대해서는 알려진 바 없다.

[0016] 이에 본 발명자들은 신경세포 보호효과를 갖는 천연물질 개발에 노력하던 중, 차파랄 추출물 또는 이의 분획물이 신경세포에 대하여 글루타메이트 독성을 억제하고, 세포독성이 거의 없으므로 신경보호용 조성물 또는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명의 목적은 차파랄(*Larrea divaricata*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 약학적 조성물 및 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 차파랄(*Larrea divaricata*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 차파랄 추출물 또한 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 차파랄 추출물 또한 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 건강식품을 제공한다.

[0021] 아울러, 본 발명은 차파랄 추출물 또한 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명의 차파랄(*Larrea divaricata*) 추출물 또는 이의 분획물은 신경세포의 독성을 유의적으로 억제하는 효과가 뛰어나고, 세포 독성이 없어 인체에 안전하므로, 상기 차파랄 추출물 또는 이의 분획물은 신경보호용 조성물 또는 뇌질환 예방 및 치료용 조성물의 유효성분으로 효과적으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 글루타메이트(glutamate)로 매개된 신경세포 사멸 경로를 나타낸 도이다.

VSCC: 전압-민감성 칼슘 채널(voltage-sensitive calcium channel);

NOS: 산화 질소 합성효소(nitric oxide synthase);

PLA₂: 포스포리파아제 A₂(phospholipase A₂);

AA: 아라키돈산(arachidonic acid);

DG: 디아실글리세롤(diacyl glycerol);

Glut: 글루타메이트(glutamate); 및

IP₃: 이노시톨 3인산염(inositol triphosphate).

도 2는 차파랄 추출물의 N18-RE-105 신경세포 보호효과를 나타낸 도이다;

A. 글루타메이트를 처리하지 않은 N18-RE-105 세포;

B. 글루타메이트를 처리한 N18-RE-105 세포; 및

C. 글루타메이트와 차파랄 추출물을 처리한 N18-RE-105 세포.

도 3은 차파랄 추출물 및 이의 분획물의 신경세포 보호활성을 나타낸 도이다;

(-) Glut: 글루타메이트를 처리하지 않은 N18-RE-105세포군;

(+) Glut: 글루타메이트를 처리한 N18-RE-105세포군;

Chap Ext: 차파랄 추출물;

CHCl₃ Ext: 차파랄 추출물의 클로로포름 분획물;

EtOAc Ext: 차파랄 추출물의 에틸아세테이트 분획물; 및

BuOH Ext: 차파랄 추출물의 부탄올 분획물.

도 4는 차파랄 분획물을 제조하는 과정을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명은 차파랄(*Larrea divaricata*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 약학적 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 차파랄 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않

는다:

- [0027] 1) 차과랄에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0028] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;
- [0029] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 차과랄의 추출물을 제조하는 단계; 및
- [0030] 4) 단계 3)의 차과랄 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 차과랄 분획물을 제조하는 단계.
- [0031] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 차과랄은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 차과랄은 잎, 줄기 또는 뿌리가 모두 이용가능하고, 잎인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂ 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 차과랄 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 2 내지 3배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 20℃ 내지 100℃ 인 것이 바람직하고, 20℃ 내지 40℃인 것이 더욱 바람직하고, 실온인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하고, 24시간인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0034] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 유기용매는 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 차과랄 추출물을 물에 현탁시킨 후 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 상기 차과랄 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회, 바람직하게는 3회 반복하여 수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 차과랄을 이용하여 차과랄 추출물 및 이의 분획물을 제조하였다(도 4 참조)
- [0036] 또한, 본 발명자들은 차과랄 추출물 또는 이의 분획물의 신경세포 보호효과를 확인하기 위하여, 고농도의 글루타메이트를 처리한 N18-RE-105 세포주에 차과랄 추출물 또는 이의 분획물을 처리한 결과, 세포사멸을 유의적으로 억제하여 신경세포 보호활성이 우수한 것을 확인하였다(도 2 참조).
- [0037] 또한, 본 발명자들은 차과랄 추출물 또는 이의 분획물의 농도에 따른 글루타메이트 독성억제효과를 확인하기 위하여, N18-RE-105 신경세포주에 차과랄 추출물 및 이의 분획물의 농도(13.6, 22.7, 및 45.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리하였을 때, 글루타메이트에 의한 N18-RE-105의 세포사멸을 억제하는 것을 확인하였다(도 3 참조).
- [0038] 또한, 글루타메이트 독성을 50% 억제하는 차과랄 추출물 또는 이의 분획물의 농도를 확인한 결과, 차과랄 추출물의 농도(IC₅₀)는 12.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 양성 대조군인 비타민 E의 21.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 비하여 2배 정도의 높은 신경세포 보호활성을 나타내었고, 차과랄 클로로포름 분획물 및 에틸아세테이트 분획물은 각각 5.1 및 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 현저한 신경세포 보호활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 1 참조).
- [0039] 또한 본 발명자들은 차과랄 추출물 및 이의 분획물의 세포독성을 확인한 결과, 차과랄 추출물 및 이의 분획물은 활성유효농도보다 10배 높은 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 고농도에서도 세포독성이 나타나지 않는 것을 확인하였다.
- [0040] 따라서, 차과랄 추출물 및 이의 분획물이 N18-RE-105 세포주에 글루타메이트(glutamate) 독성 억제 활성에 따른 신경세포의 보호효과 및 낮은 세포독성 효과를 나타냄으로서 신경보호용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

- [0041] 본 발명의 차과랄 추출물 또는 이의 분획물을 함유하는 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 차과랄 추출물 또는 이의 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 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, 비수용액, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수용액, 현탁용제로는 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. 본 발명의 조성물은 비경구 투여시 피하주사, 정맥주사 또는 근육내 주사를 통할 수 있다.
- [0044] 투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배를 함유하거나 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배를 함유할 수 있다. 개별 투약량은 구체적으로 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다. 본 발명의 조성물의 유효용량은 0.0001 ~ 10 g/kg일 수 있고, 구체적으로 0.001 ~ 1 g/kg일 수 있으며, 하루 1 ~ 6회 투여될 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0045] 또한, 본 발명은 차과랄(*Larrea divaricata*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0046] 상기 차과랄 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [0047] 1) 차과랄에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0048] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;
- [0049] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 차과랄의 추출물을 제조하는 단계; 및
- [0050] 4) 단계 3)의 차과랄 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 차과랄 분획물을 제조하는 단계.
- [0051] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 차과랄은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 차과랄은 잎, 줄기 또는 뿌리가 모두 이용가능하고, 잎인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0052] 상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂ 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 차과랄 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 2 내지 3배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 20℃ 내지 100℃ 인 것이 바람직하고,

20℃ 내지 40℃인 것이 더욱 바람직하고, 실온인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하고, 24시간인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0053] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0054] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 유기용매는 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 차과랄 추출물을 물에 현탁시킨 후 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 상기 차과랄 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회, 바람직하게는 3회 반복하여 수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0055] 상기 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병, 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob)병, 혈전증(thrombosis), 색전증(em-bolism), 일과성 허혈 발작(transient ischemic attack), 소경색(lacune), 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상(head trauma), 뇌순환대사장애 및 뇌 기능혼수로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0056] 본 발명의 차과랄 추출물 및 이의 분획물이 N18-RE-105 세포주에 글루타메이트(glutamate) 독성 억제 활성에 따른 신경세포의 보호효과 및 낮은 세포독성 효과를 나타냄으로서 뇌질환 예방 및 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명은 차과랄(*Larrea divaricata*) 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 신경보호용 건강식품을 제공한다.

[0058] 상기 차과랄 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:

[0059] 1) 차과랄에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0060] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;

[0061] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 차과랄의 추출물을 제조하는 단계; 및

[0062] 4) 단계 3)의 차과랄 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 차과랄 분획물을 제조하는 단계.

[0063] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 차과랄은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 차과랄은 잎, 줄기 또는 뿌리가 모두 이용가능하고, 잎인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0064] 상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂ 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 차과랄 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 2 내지 3배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 20℃ 내지 100℃ 인 것이 바람직하고, 20℃ 내지 40℃인 것이 더욱 바람직하고, 실온인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하고, 24시간인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0065] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

- [0066] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 유기용매는 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 차과랄 추출물을 물에 현탁시킨 후 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 상기 차과랄 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회, 바람직하게는 3회 반복하여 수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0067] 상기 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병, 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob)병, 혈전증(thrombosis), 색전증(em-bolism), 일과성 허혈 발작(transient ischemic attack), 소경색(lacune), 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상(head trauma), 뇌순환대사장애 및 뇌 기능혼수로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0068] 본 발명의 차과랄 추출물 및 이의 분획물이 N18-RE-105 세포주에 글루타메이트(glutamate) 독성 억제 활성에 따른 신경세포의 보호효과 및 낮은 세포독성 효과를 나타냄으로서 신경보호용 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0069]
- [0070] 본 발명의 건강식품은 차과랄 추출물 또는 이의 분획물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0071] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 차과랄 추출물 또는 이의 분획물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0072] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스나 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.
- [0073] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0074] 또한, 본 발명은 차과랄 추출물 또는 이의 분획물을 유효성분으로 함유하는 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0075] 상기 차과랄 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [0076] 1) 차과랄 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0077] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;
- [0078] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 차과랄의 추출물을 제조하는 단계;
- [0079] 4) 단계 3)의 차과랄 추출물을 추가적으로 유기용매로 추출하여 차과랄 분획물을 제조하는 단계; 및
- [0080] 5) 단계 4)의 분획물을 감압농축한 후 건조하는 단계.

- [0081] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 차과탈은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다. 상기 차과탈은 잎, 줄기 또는 뿌리가 모두 이용가능하고, 이에 한정되지 않는다.
- [0082] 상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 추출용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C₁ 내지 C₂ 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 차과탈 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 2 내지 3배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 20℃ 내지 100℃ 인 것이 바람직하고, 20℃ 내지 40℃인 것이 더욱 바람직하고, 실온인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하고, 24시간인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 회수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0083] 상기 방법에 있어서, 단계 3)의 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0084] 상기 방법에 있어서, 단계 4)의 유기용매는 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트 또는 부탄올인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 차과탈 추출물을 물에 현탁시킨 후 n-헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 순차적으로 계통 분획하여 수득한 n-헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 또는 물 분획물인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 상기 분획물은 상기 차과탈 추출물로부터 분획 과정을 1 내지 5회, 바람직하게는 3회 반복하여 수득할 수 있고, 분획 후 감압 농축하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.
- [0085] 상기 뇌질환은 뇌졸중, 중풍, 치매, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 피크(Pick)병, 크로이츠펠트-야콥(Creutzfeldt-Jakob)병, 혈전증(thrombosis), 색전증(em-bolism), 일과성 허혈 발작(transient ischemic attack), 소경색(lacune), 뇌졸중, 뇌일혈, 뇌경색, 두부손상(head trauma), 뇌순환대사장애 및 뇌 기능손상으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0086] 본 발명의 차과탈 추출물 및 이의 분획물이 N18-RE-105 세포주에 글루타메이트(glutamate) 독성 억제 활성화에 따른 신경세포의 보호효과 및 낮은 세포독성 효과를 나타냄으로서 뇌질환 예방 및 개선용 건강식품의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.
- [0087] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0088] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0089] **<실시예 1> 차과탈 추출물의 제조**
- [0090] 한국생명공학연구원 의 해외식물추출물은행 (대전)으로부터 입수한 차과탈 건조분말 40 g을 메탄올 수용액(메탄올 80%, 물 20%) 400 ml로 추출한다음 감압건조하여 차과탈 추출물 2.7 g을 제조하였다.
- [0091] **<실시예 2> 차과탈 용매 분획물 제조**
- [0092] 상기 <실시예 1>에서 제조된 차과탈 추출물 2.7 g 을 물 1 리터에 현탁시키고, n-헥산, 클로로포름(CHCl₃), 에틸아세테이트(EtOAc), 부탄올(C₄H₉OH)을 각 용매 500 밀리리터(ml)를 사용하여 순차적으로 추출하여 클로로포름 분획물 0.6 g, 에틸아세테이트 분획물 0.7 g, 부탄올 분획물 0.7 g을 제조하였다(도 4).
- [0093] **<실시예 3> 차과탈 추출물 또는 이의 분획물의 신경세포 보호활성 확인**
- [0094] 상기 <실시예 1> 및 <실시예 2>에서 제조한 차과탈 추출물 또는 이의 분획물의 신경세포 보호활성을 확인하기

위하여, N18-RE-105 세포주(동경대학교, 일본)는 Dulbesco's modified Eagle's medium(DMEM)에 HAT supplement(0.1 mM hypoxanthin, 0.04 mM aminopterin, 0.14 mM thymidine)와 열처리한 10% 우태 혈청(fetal calf serum, FCS)을 넣은 배지를 사용하여 배양하였다. 그런 다음, N18-RE-105 세포주를 T-25 플라스크에서 48 시간 배양한 후 트립신(trypsin) 용액(3 ml)을 사용하여 배양기에 2분간 배양시켜 세포를 플라스크에서 분리하였다. 그 후, 1 ml의 배지를 넣어 트립신을 중화시킨 후, 1000 rpm에서 3분간 원심분리한 다음 상등액을 제거한 후, 세포를 배지로 현탁한 다음, 혈구계산기(hemocytometer)를 이용하여 세포 수를 계산하여 웰(well) 당 세포 수가 5×10^4 개가 되도록 96 웰 마이크로플레이트에 100 μ l씩 분주했다. 세포를 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양한 후, 인산완충액(Phosphate Buffered Saline, PBS)에 녹인 글루타메이트(400 mM) 용액 5 μ l와 DMSO에 녹인 차파랄 추출물 또는 이의 분획물을 PBS 용액으로 10배 희석하여 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1.0 mg/ml 농도의 시료를 제조한 다음 각 농도별 차파랄 추출물 또는 이의 분획물 용액 5 μ l를 처리하였다. 이것을 배양기에서 24 시간 배양한 다음 시료의 글루타메이트 독성억제활성을 통한 뇌신경세포 보호활성을 위상차 현미경(phase contrast microscope)을 이용해 관찰하였다.

[0095] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 본 발명의 차파랄 추출물은 글루타메이트 독성을 억제하여 신경세포를 보호하는 것을 확인하였다. 특히, N18-RE-105 세포에 글루타메이트를 처리하지 않은 대조군에 비하여 글루타메이트를 처리한 세포들에서는 팽윤(swelling), 수포(blebbing) 및 용해(lysis)가 일어나 약 60%의 세포가 사멸하였으나, 차파랄 추출물(최종농도 23 μ g/ml)이 첨가된 시료구의 세포들은 세포의 모양이 변하지 않았으며, 사멸이 줄어들어 90% 이상의 세포가 살아있는 것을 확인하였다(도 2).

[0096] 또한, 신경융합(neuronal hybridoma) 세포인 N18-RE-105 세포주에 대하여 글루타메이트 독성을 50% 억제하는 차파랄 추출물의 농도(IC₅₀)는 12.5 μ g/ml로서 양성 대조구인 비타민 E의 21.5 μ g/ml에 비하여 2배 정도의 높은 신경세포 보호활성을 나타내었고, 차파랄 클로로포름 분획물 및 에틸아세테이트 분획물은 각각 5.1, 5.0 μ g/ml로 현저한 신경세포 보호활성을 나타내는 것을 확인하였다(표 1).

표 1

차파랄 추출물 또는 이의 분획물의 신경세포 보호 활성

시료	IC ₅₀ (μ g/ml)
차파랄 추출물	12.5
클로로포름 분획물	5.1
에틸아세테이트 분획물	5.0
부탄올 분획물	40.2
비타민 E	21.5

[0098]

[0099] <실시예 4> 차파랄 추출물 또는 이의 분획물의 신경세포주에 대한 글루타메이트 독성억제활성 확인

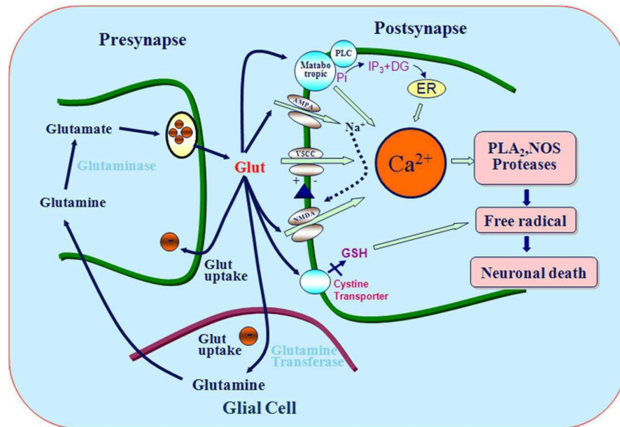
[0100] N18-RE-105 세포를 웰(well) 당 5×10^4 개가 되도록 96 웰 마이크로플레이트에 100 μ l씩 분주했다. 세포를 5% CO₂, 37°C에서 24시간 배양한 후, DMSO에 녹인 차파랄 추출물 또는 이의 분획물을 PBS 용액으로 10배 희석하여 만든 1.0 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 0.3 mg/ml 농도의 차파랄 추출물 또는 이의 분획물 용액 5 μ l를 처리한 다음 30 분 후 인산완충액(Phosphate Buffered Saline, PBS)에 녹인 글루타메이트(400 mM) 용액 5 μ l를 처리하였다. 이것을 배양기에서 24시간 배양한 다음, EZ-Cytox assay(대일랩서비스, 서울)로 살아있는 세포를 측정하여 정량하였다. EZ-Cytox assay(dehydrogenase assay)는 시료 처리 후 배양한 세포에 플레이트 웰(plate well) 당 반응 배양액 70 μ l씩을 세로운 96 웰 플레이트에 옮긴 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Molecular devices사)로 450nm에서의 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 하기 수학적 식 1을 이용하여 세포 생존력(cell viability)을 산출하였으며, 그 결과값을 다시 하기의 수학적 식 2를 이용하여 신경세포 보호활성을 산출하였다.

- [0121] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0122] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0123] **<1-3> 캡슐제의 제조**
- [0124] 본 발명의 차파랄 추출물 100 mg
- [0125] 옥수수전분 100 mg
- [0126] 유 당 100 mg
- [0127] 스테아린산 마그네슘 2 mg
- [0128] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0129] **<1-4> 환의 제조**
- [0130] 본 발명의 차파랄 추출물 1 g
- [0131] 유당 1.5 g
- [0132] 글리세린 1 g
- [0133] 자일리톨 0.5 g
- [0134] 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- [0135] **<1-5> 과립의 제조**
- [0136] 본 발명의 차파랄 추출물 150 mg
- [0137] 대두추출물 50 mg
- [0138] 포도당 200 mg
- [0139] 전분 600 mg
- [0140] 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- [0141] **<제조예 2> 건강식품의 제조**
- [0142] **<2-1> 밀가루 식품의 제조**
- [0143] 본 발명의 차파랄 추출물 또는 이의 분획물 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.
- [0144] **<2-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조**
- [0145] 본 발명의 차파랄 추출물 또는 이의 분획물 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.
- [0146] **<2-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조**
- [0147] 본 발명의 차파랄 추출물 또는 이의 분획물 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

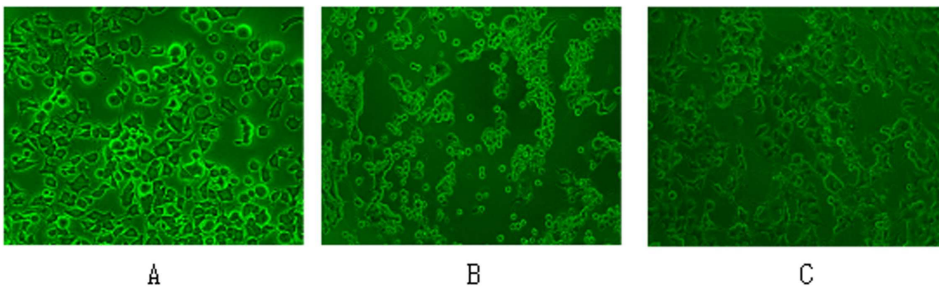
- [0148] <2-4> 유제품(dairy products)의 제조
- [0149] 본 발명의 차과랄 추출물 또는 이의 분획물 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0150] <2-5> 선식의 제조
- [0151] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0152] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- [0153] 본 발명의 차과랄 추출물 또는 이의 분획물을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.
- [0154] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 차과랄 추출물 또는 이의 분획물을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.
- [0155] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),
- [0156] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
- [0157] 본 발명의 차과랄 추출물 또는 이의 분획물(3 중량부),
- [0158] 영지(0.5 중량부),
- [0159] 지황(0.5 중량부)
- [0160] <제조예 3> 음료의 제조
- [0161] <3-1> 건강 음료의 제조
- [0162] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 차과랄 추출물 또는 이의 분획물 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.
- [0163] <3-2> 야채 주스의 제조
- [0164] 본 발명의 차과랄 추출물 또는 이의 분획물 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 야채 주스를 제조하였다.
- [0165] <3-3> 과일 주스의 제조
- [0166] 본 발명의 차과랄 추출물 또는 이의 분획물 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ml에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

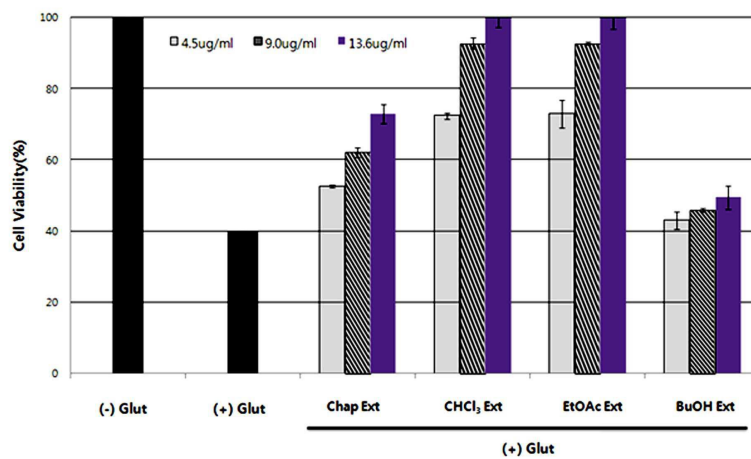
도면1



도면2



도면3



도면4

