

http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.3.261

JCCT 2018-8-34

과채류껍질 추출물의 학습능력수행 및 기억력증진에 미치는 효과

The Effects of Fruit and Vegetable Bark Extract on Learning Ability and Memory Improvement

김현경*

Hyun Kyoung Kim*

요약 본 연구는 광범위한 식품 용도에서 독성을 일으키지 않고 오랫동안 사용되어 온 과일껍질은 질기고 거친 식감과 떫은 맛이 많은 관능성의 문제로 껍질의 섭취를 꺼려하여 폐기물로서 버려지고 있지만, 과일껍질은 무기질, 비타민, 폴리페놀과 같은 유용한 생리활성 성분이 다량 함유되어 있다. 따라서 우리나라 국민들이 가장 일반적으로 소비하는 과일류 중 과일껍질 유래의 과피 부분을 쉽게 분리할 수 있는 사과 또는 배의 과채류 껍질추출물을 활용하여 최근 문제시 되고 있는 알츠하이머성 치매를 예방 및 치료 할 수 있는 학습능력 수행 또는 기억력 증진에 미치는 효과에 대해 평가하였다. 그 결과, 사과껍질과 배껍질의 혼합 추출물은 사과껍질과 배껍질의 추출물 각각에 비하여 아세틸콜린에스테라제의 억제활성이나 스코폴라민 유도 동물 모델의 수미로 실험에서 학습능력 수행방 및 기억력 증진 효과가 더욱 현저하였다. 이는 추출물에 함유된 성분들 간의 상호작용에 의한 상승효과에 기인한 것으로 해석할 수 있었다. 이를 통하여 볼 때 과채류 껍질 추출물은 아세틸콜린에스테라제 억제, 단기기억, 장기기억 활성 촉진으로 콜린성 신경계를 자극하여 기억 및 학습증진에 매우 효과적으로 작용하는 향치매 물질로 사료된다.

주요어 : 기억력 증진, 아세틸콜린에스테라제, 학습수행, 스코폴라민, 과채류 껍질

Abstract In the present study, we assessed the effects of fruit and vegetable bark resources rich in beneficial substances on the learning ability and memory improvement. It functions to inhibit the activity of acetylcholinesterase in brain tissue and improve cognitive functions in a simulation model of cognitive impairment induced by scopolamine. Hence, it can promote memory and learning ability. The formulation of the fruit and vegetable bark uses the extract of fruit and vegetable peels, which has long been used without causing toxicity in a wide range of food applications. Therefore, it can be used safely without a risk of side effects, even in the case of a long-term administration for the preventive purpose. Furthermore, the present study is a very beneficial study in the environment-friendly aspect in association with recycling of resources as it is based on the novel efficacies of fruit and vegetable barks which have been conventionally disposed as a refuse of fruits due to their poor sensory qualities despite the content of beneficial substances.

Key words : Memory improvement, Acetylcholinesterase, Learning ability, Scopolamine, Fruit and vegetable bark

*정회원, 서원대학교 식품공학과
접수일: 2018년 5월 11일, 수정완료일: 2018년 6월 14일
게재확정일: 2018년 7월 2일

Received: May 11, 2018 / Revised: June 14, 2018

Accepted: July 2, 2018

*Corresponding Author: Kimhk4@seowon.ac.kr

Dept. of Food Science and Engineering, Seowon Univ, Korea

I. 서 론

최근 현대 사회에서 기하급수적으로 늘어나는 정보의 홍수 속에서 인지기능과 기억력은 청소년에서 노인에 이르기까지 중요한 관심의 대상이 되고 있다. 기억력 감퇴와 인지기능 장애는 정상적인 개인생활은 물론 사회생활 자체를 불가능하게 만들며, 많은 사회적 비용 증가를 유발 시킨다. 특히 치매 환자의 경우 사회생활 가능 여부는 기억력 저하가 주된 영향을 미치는 것으로 알려져 있다[1, 2, 3, 4]. 최근 들어서는 노인성 치매 뿐 아니라 휴대전화나, PDA, 컴퓨터 등 다양한 디지털 기기에 의존한 나머지 기억력이나 계산능력과 같은 인지 기능이 크게 감소한 디지털 치매가 젊은 사람들에게도 흔히 나타나고 있다. 현재의 치매 치료제로는 갈란타민, 도네페질, 리바스티그민 등이 사용되고 있으나, 위장관계 부작용이나, 어지러움, 두통과 같은 부작용을 수반한다. 이중 갈란타민은 불가리아산 야생초인 스노드롭에서 추출한 생약성분으로 도네페질, 리바스티그민과 함께 콜린에스테라제 억제 효능을 갖는 대표적인 치매 치료제이다. 그러나 최근 미국 FDA 등은 가벼운 인지 기능 장애 치료에 이 약을 이용한 두 개의 임상연구 결과, 이 약을 처방 받은 사람들의 사망률이 더 높다는 연구결과를 토대로 안전성을 재검토하고 있다.

치매란 가벼운 기억장애로부터 전반적인 인지기능의 저하, 정서장애, 성격장애 및 행동장애 등으로 직업, 사회생활 및 대인관계에서 정상적인 일상생활을 할 수 없게 하는 질병을 말한다. 알츠하이머성 치매는 전체 치매의 50% 정도를 차지하는데, 알츠하이머성 치매에 의한 인지기능 장애는 학습과 기억에 있어서 중요한 역할을 수행하는 부교감신경의 심각한 손상과 신경전달물질인 아세틸콜린의 감소에 기인하는 것으로 알려져 있다[3, 4]. 이에, 콜린성 기능저하 유도는 사람의 인지력 저하를 위한 효과적인 실험모델로 제시되었다. Scopolamine은 체내 아세틸콜린 수용체에 대하여 항무스카린성 효과를 내는 약물로, 아세틸콜린에스테라제의 활성을 증가시켜 신경접합부에 있는 아세틸콜린을 분해하여 인지력을 감소시키므로 새로운 항치매 약물의 평가를 위한 실험모델에 많이 사용되고 있다[5, 6, 7, 8].

과일은 여러 식물 자원중 가장 항산화능이 뛰어난 천연 자원으로 특히 유리기를 소거하는 능력이 탁월한 것으로 보고되어 왔다[9, 10, 11]. 이들 성분의 종류에는

플라보노이드, 탄닌, 카테킨 등의 폴리페놀 성분 뿐 아니라 비타민 C, 토코페롤, 카로티노이드 등의 항산화 비타민 성분 등이 관련된다. 특히 과일 중량의 10-32%를 차지하고, 폐기물로서 버려지는 과일껍질은 무기질, 비타민, 폴리페놀과 같은 유용한 생리활성 성분이 다량 함유되어 있어, 과일껍질 부산물을 활용한 약학 또는 기능성 식품 조성물의 개발 가능성이 열려있다. 과일껍질 유래의 제품 개발은 폐기물 처리에 소요되는 막대한 손실 비용을 절감하며, 폐기물 처리과정에서 발생하는 지구 환경 오염 요소를 감소시키는 효과 역시 기대할 수 있다[12, 13, 14].

따라서 본 연구에서는 우리나라 국민들이 가장 일반적으로 소비하는 과일류 중 과피 부분을 쉽게 분리할 수 있는 사과 또는 배의 과일류 껍질추출물을 활용하여 학습능력 수행 및 기억력 증진 효과에 대해 알아 보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 실험 재료는 농수산물 도매시장에서 국내산 사과와 배를 구입하여 세척한 후 껍질만 벗겨 사용하였다.

2. 과채류 껍질의 추출물 제조

사과와 배는 2017년 2월~6월 사이 농수산물 도매시장에서 구입하였으며, 세척 후 물기를 제거하고 껍질만 벗겨 건조하였다. 건조된 시료는 10 kg/cm²의 압력에서 견딜 수 있는 열처리장치(JISCO, Korea)의 내부 용기에 5배에서 10배의 물과 함께 넣고 150°C에서 2시간동안 열처리 하였다. 열처리장치는 외부 용기에 열매를 넣고 정해진 온도와 시간으로 가열하도록 하여, 직접적인 열전달에 의한 시료의 탄화를 방지하였다. 2시간 후 추출물을 일정 농도로 농축한 후, 동결건조하여 냉장고에 보관하며 사용하였다.

3. Cell culture

American Type culture collection에서 얻은 마우스의 신경세포주(미세아교세포) BV2 cell을 37C, 5 % CO2 조건에서 8% FBS, 100IU/ml penicillin, 100µg/ml

streptomycin sulfate가 첨가된 DMEM 배지에 배양하였다.

4. Nitric oxide (NO) assay

Nitric oxide는 Griess reaction assay에 의해 측정하였다. 24well plate에 접종한 BV2 cell에 총명당 가미방 추출물을 전 처리하고/하지 않고, LPS(0.1 µg/ml)를 처리한후 18시간동안 배양하였다. 배양 후 얻은 상층액에 Griess reagent를 처리하고 5분동안 실온에서 반응시킨 뒤 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. Cell Viability (MTT) assay

추출물의 독성효과 측정하기 위해서 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide 시약을 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 접종한 세포에 0.1mg/ml의 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide 시약을 처리하고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 4시간 배양 하고 microplate reader를 이용하여 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 뇌조직에서의 아세틸콜린에스테라제 억제활성 평가

제조한 사과껍질 추출물(AB, Apple Bark), 배곱질 추출물(PB, Pear Bark), 사과껍질과 배곱질의 1:1(w/w) 혼합 추출물(BF, Bark Formulation)의 뇌조직에 대한 아세틸콜린에스테라제(AchE, Acetylcholinesterase) 억제활성을 AchE assay kit(abcam, ab138871)를 사용하여 평가하였다. 마우스의 뇌조직을 얻기위하여 assay buffer를 뇌조직이 잠기도록 가하여 분쇄한 후 1500×g로 5분간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 뇌상층액에 과일껍질 추출물을 5~500 µg/ml의 농도로 가한 후 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 제조자의 매뉴얼에 따라 반응액에 assay 시료를 처리한 후 차광하여 실내에서 30분간 반응하고 410 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 하기 식에 의해 측정된 흡광도로부터 AchE 억제율(%)을 계산하였다.

억제율(%) = 1 - (시료군의 흡광도/무첨가군의 흡광도) × 100

7. 스코폴라민으로 유도된 학습수행 및 기억력감퇴 생쥐 모델에 대한 수미로 테스트

7.1. 실험동물

7주령의 C57b1/6계 생쥐를 대한바이오링크로부터 분양받아 사용하였다. 분양 받은 실험동물은 표준식이(조단백질 22.1%이상, 조지방 8.0%이하, 조섬유 5.0%이하, 조회분 8.0%이하, 칼슘 0.6%이상, 인 0.4%이상, 삼양사 Co. Korea)와 물을 자유롭게 공급하면서 1주일 간 실험실 환경에 순화시킨 후 실험에 사용하였다.

7.2. 반복 학습 및 약물투여

선별된 C57b1/6계 생쥐에 1주일간의 순화 후 건강상태가 양호한 생쥐를 선별하여 1주일간 모리스 수미로(Morris water maze)에서 1일 1회 5일간 반복학습을 실시하였다. 모리스 수미로는 직경이 90cm이고 높이가 약 30cm인 수조로 수온이 27°C인 수돗물을 2/3정도 채우고, 그 안에 생쥐가 올라갈 수 있는 직경이 10cm인 원통형 platform을 설치하여 제작하였다. 1일 1회 학습시 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별하고, 선별된 생쥐 10마리씩을 한 군으로 하여 대조군과 과일껍질 추출물 투여군(200 mg/kg)으로 분류하였다. 이후, 과일껍질 추출물 투여군에는 경구투여로 1주일간 사과껍질 추출물, 배곱질 추출물 또는 사과껍질과 배곱질의 혼합추출물을 각 군에 따라 매일 투여하면서, 1주에 3회 platform에 오르는 반복훈련을 실시하였다[15, 16].

7.3. 기억력 측정

총 14일의 훈련과 7일의 약물 투여가 종료된 C57b1/6계 생쥐에 최종약물 투여 30분 후 각 실험군에 scopolamine(1mg/kg)을 복강 주사하고 30분 후에 모리스 수중미로에 생쥐를 한 마리씩 넣고, VIDEOTRACK으로 행동을 측정하였고, 이를 videotrack software로 분석하였다[17, 18].

8. 통계분석

실험에서 얻은 결과는 mean±standard error로 기록하였다. 유의성 검증은 Student's t-test 분석 방법을 이용하여 p<0.05 수준에서 검정하였다.

III. 실험결과

1. LPS로 유도된 염증반응에서 과일껍질추출물의 염증 억제효과

LPS는 Gram negative bacteria의 immunostimulatory factor로써 NO의 유도물질로 잘 알려져 있으며, 염증반응을 유도한다. 과일껍질혼합추출물의 효과에 대해서 측정하기 위해서 BV2 세포에서 LPS로 염증반응을 유도하였다. 실험결과 사과껍질과 배껍질 혼합추출물은 LPS에 유도된 염증반응을 상당히 억제하는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 세포생존을 검사에서 아무런 독성을 띄지 않는 것으로 나타났다(Figure 1, 2).

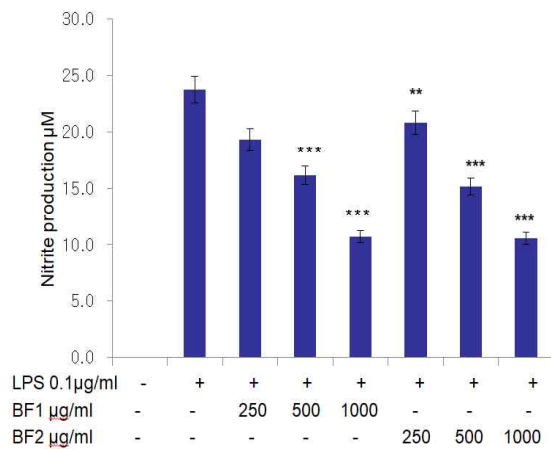


그림 1. LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 염증반응에서 과일껍질추출물의 산화질소 (NO)억제활성 효과.

Figure. 1. Fruit and vegetable bark extracts suppressed lipopolysaccharide(LPS)-mediated nitric oxide(NO) release without showing cytotoxicity.

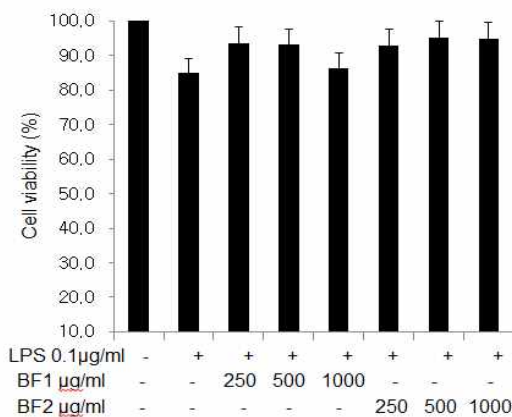


그림 2. LPS(lipopolysaccharide)로 유도된 염증반응에서 과일껍질추출물의 세포생존력(cell viability) 효과.

Figure. 2. The cell viability of fruit and vegetable bark extracts.

2. BV2세포에서 과일껍질추출물의 proinflammatory cytokines 발현 억제 효과

Proinflammatory cytokines의 발현은 염증반응에서 생물학적 시스템 반응으로 잘 알려져 있다. 그래서 본 실험에서는 BV2세포를 이용하여 proinflammatory cytokines의 발현에서 과일껍질추출물의 효과에 대해서 측정해보았고, 실험결과 과일껍질 추출물이 iNOS, COX-2, IL-1 β , IL-6, TNF- α 의 mRNA 발현이 확연히 억제되는 것을 확인하였다(Figure 3).

3. 뇌조직에서의 아세틸콜린에스테라제 억제활성 평가

열처리 사과껍질 추출물의 AchE 억제활성은 농도에 따라 큰 차이가 없는 것에 반해 배껍질 추출물의 AchE 억제활성은 농도 의존성을 나타내었다. 5~50 $\mu\text{g/ml}$ 의 낮은 농도에서는 사과껍질 추출물의 AchE 억제활성이 배껍질 추출물에 비해 우수하였으나, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 배껍질 추출물의 AchE 억제활성이 현저하였다. 특히 배껍질과 사과껍질의 혼합 추출물은 사과껍질 또는 배껍질 단독의 추출물에 비해 AchE 억제활성이 높아 혼합에 의한 성분간의 상호작용에 의한 상승 효과가 있음을 시사하였으며, 농도가 높아질수록 상승 효과는 더욱 증가함을 확인할 수 있었다(Figure 4).

4. Stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과

Figure 4의 실험결과에 의하면 scopolamine (1 mg/kg)으로 학습과 기억력이 감퇴된 건망증 생쥐모델을 이용하여 Morris water maze에서 videotracking으로 과일류 껍질추출물 투여에 대한 효과를 관찰하였다. 실험전 1주일중 (7일) 동안 5일간 Morris water maze pool에서 platform으로 올라가는 반복학습을 계속 실시하여 30초 이내에 pool에서 platform으로 올라가는 생쥐를 선별한 후, 1주일간 약물 투여 후 Scopolamine 투여 30분 후에 videotracking으로 분석한 결과가 Fig.1이다. Fig.2에서 같이 14일 동안 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라가는 시간은 scopolamine을 처리한 대조군은 30분 후에 43.5 ± 10.9 (초)로 현저한 기억력 감퇴를 나타내었고, 대조약물인 Galanthamine(3 mg/kg) 처리군은 14.5 ± 3.8 sec.으로 대조군에 비하여 현저한 기억력 감퇴 억제를 관찰할 수 있었다 ($p < 0.01$).

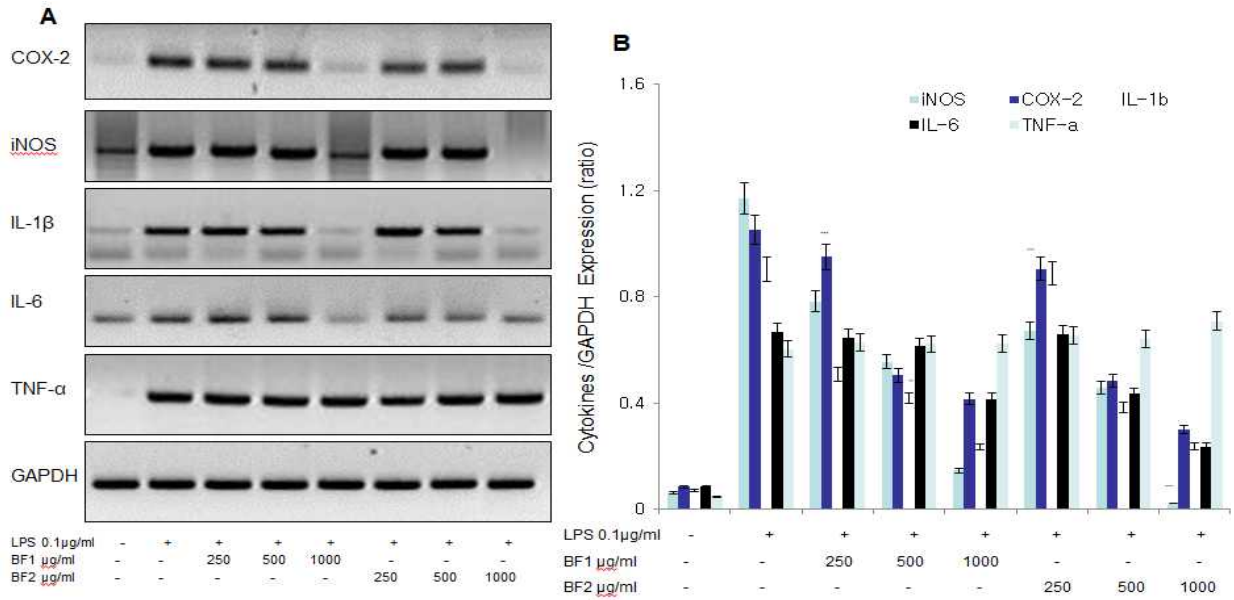


그림 3. 과일껍질추출물의 BV2 세포에서 proinflammatory cytokines 발현 억제 효과(nitric Oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase (COX-2), interleukin-1β), IL-6, TNF-α).
Figure. 3. Fruit and vegetable bark extracts inhibited messenger RNA(mRNA) expressions of inducible nitric Oxide synthase(iNOS), cyclooxygenase(COX-2), interleukin-1β), IL-6 and tumor necrosis factor-α(TNF-α) in BV2 cell.

사과껍질 추출물과 배껍질 추출물 투여군은 각각 19.8 ± 7.6 sec.과 14.5 ± 5.7 (sec.)으로 대조군에 비하여 54.4%과 66.6%의 유의성 있는 현저한 기억력 감퇴 억제효과가 있었다 ($p < 0.05$).

5. Distance movement-through latency 측정에서의 기억력 감퇴 억제 효과

Figure 5은 반복 학습된 생쥐가 pool에서 platform으로 올라갈 때까지 pool에서 움직이는 운동량을 threshold로 지정하여 적은 운동량 (small movement; Smdist)과 많은 운동량 (large movement; Lardist)을 분석한 결과이다. 운동량은 대조군에 비하여 현저히 감소되었고, 생쥐가 수조에서 움직인 총 운동량 중에서 적은 운동량 (Smdist)과 많은 운동량 (Lardist)의 비율은 대조군에 비하여 상대적으로 과일껍질추출물 투여군에서 많은 운동량 (Lardist)의 비율이 감소됨을 알 수 있었다 (Figure 4). 이는 scopolamine으로 유도된 기억력 감퇴 생쥐와 운동량과의 상관관계가 있음을 추측할 수 있었다.

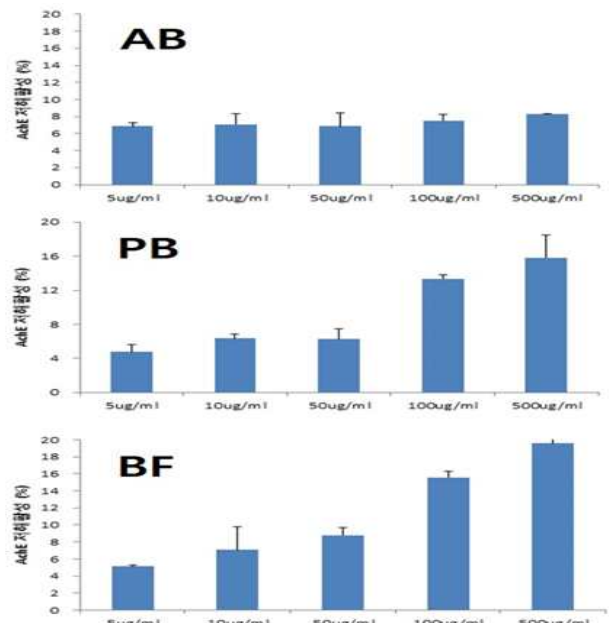


그림 4. 과일껍질추출물의 스코폴라민 처리한 쥐 뇌에서 acetylcholinesterase 저해 활성에 미치는 영향.
Figure. 4. The Effect of fruit and vegetable bark extract on acetylcholinesterase activity in rat brain treated with scopolamine.

V. 결 론

본 연구에서는 폐기물로서 버려지는 과일껍질은 무기질, 비타민, 폴리페놀과 같은 유용한 생리활성 성분이 다량 함유되어 있고, 사과와 배는 질기고 거친 식감과 신맛과 떫은 맛이 많은 관능성의 문제로 껍질의 섭취를 꺼려하여 과육으로부터 껍질을 제거하여 식용하는 것을 선호하기는 하지만, 고대로부터 식용해온 것으로 안전성에 대한 우려없이 사용할 수 있다.

과채류껍질 유래의 제품 개발은 폐기물 처리에 소요되는 막대한 손실 비용을 절감하며, 폐기물 처리과정에서 발생하는 지구 환경 오염 요소를 감소시키는 효과 역시 기대할 수 있다. 사과와 배는 질기고 거친 식감과 신맛과 떫은 맛이 많은 관능성의 문제로 껍질의 섭취를 꺼려하여 과육으로부터 껍질을 제거하여 식용하는 것을 선호하기는 하지만, 고대로부터 식용해온 것으로 안전성에 대한 우려없이 사용할 수 있다. 따라서 우리나라 국민들이 가장 일반적으로 소비하는 과채류 중 과피 부분을 쉽게 분리할 수 있는 사과 또는 배의 과채류 껍질추출물을 활용하여 최근 문제시 되고 있는 알츠하이머성 치매를 예방하고 치료할 수 있는지 효과를 알아본 결과, 사과껍질과 배껍질의 혼합 추출물은 사과껍질과 배껍질의 추출물 각각에 비하여 아세틸콜린에스테라제의 억제활성이나 스코폴라민 유도 동물 모델의 수중미로 실험에서 학습능력 수행 및 기억력 증진 효과가 더욱 현저하였다. 이는 추출물에 함유된 성분들 간의 상호작용에 의한 상승효과에 기인한 것으로 예측된다. 이를 통하여 볼 때 과채류껍질 혼합 추출물은 단기기억 활성 촉진, 장기기억 활성 촉진, AChE 억제활성, ACh의 활성을 촉진하므로 기억 및 학습 개선에 영향을 주는 것으로 사료된다.

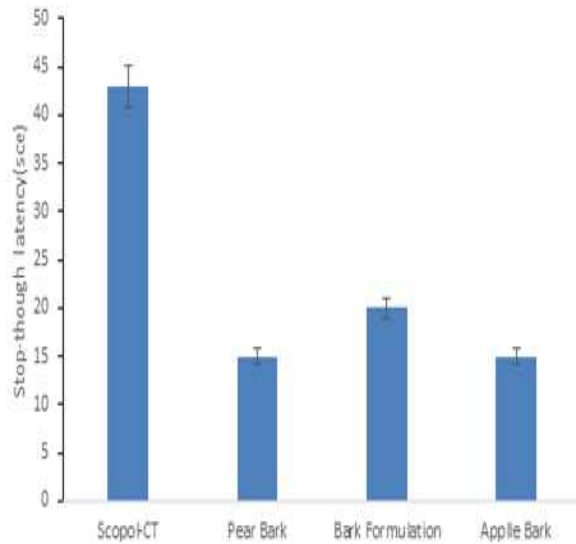


그림 5. 과일껍질추출물의 수중미로 실험에서 Stop-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과.
Figure. 5. The Effect of fruit and vegetable bark extract on the stop-through latency in a water maze test.

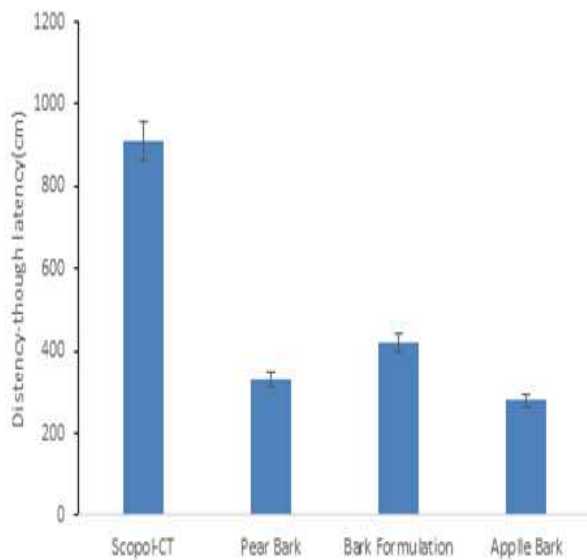


그림 6. 과일껍질추출물의 수중미로 실험에서 distance-through latency 측정에서의 기억력감퇴 억제 효과.
Figure. 6. The Effect of fruit and vegetable bark extract on the distance-through latency in a water maze test.

References

- [1] Kim DB, Ahn EY, and Kim EJ, "Improvement of insulin resistance by curcumin in high fat diet fed mice", The Journal of the Convergence on Culture Technology, Vol. 4(1), pp. 315-323, 2018.
<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.1.315>.
- [2] Kim HK, "The functional effects of anti-microbial activity and anti-inflammatory

- seaweed polysaccharide extracts," *The Journal of the Convergence on Culture Technology*, Vol. 4(2), pp. 155-163, 2018.
<http://dx.doi.org/10.17703/JCCT.2018.4.2.155>.
- [3] Nordberg A, "Pharmacological treatment of cognitive dysfunction indementia disorders", *Acta. Neurol. Scand. Suppl.*, Vol. 168, pp. 87-92, 1996.
- [4] Giovannini MG, Casamenti F, Bartolini L, and Pepeu G, "The brain cholinergic system as atarget of cognition enhancers", *Behav. Brain. Res.*, Vol 83, pp. 1-5, 1997.
- [5] Fodale V, Quartrone D, Trecroci C, Caminiti V, and Scantamaria LB, "Alzheimer's disease and anaesthesia: implications for the central cholinergic system", *Br. J. Anaesth.*, Vol. 97, pp. 445-452, 2006.
- [6] Bartus RT, "On neurodegenerative disease, model and treatment strategies: lessons learned and lessons forgotten a generation following the cholinergic hypothesis", *Exp. Neurol.*, Vol. 163, pp. 495-529, 2000.
- [7] Mishima K, Iwasaki K, Tsukikawa H, Matsumoto Y, Egashira N and Abe K, "The Scopolamine-induced impairment of spatial cognition parallels the acetylcholine release in the ventral hippocampus in rats", *Jpn. J. Pharmacol.*, Vol. 84, pp. 163-173, 2000.
- [8] Yamada N, Hattori A, Hayashi T, Nishikawa T, Fukuda H, and Fujino T, "Improvement of scopolamine-induced memory impairment by Z-ajoene in the water maze in ice", *Pharmacol. Biochem. Behav.*, Vol. 78, pp. 787-791, 2004.
- [9] Sun J, Chu YF, Wu X, and Liu RH, "Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits", *J. Agr. Food Chem.*, Vol. 50, pp. 7449-7454, 2002.
- [10] Liehtentha, R., and Marx, F., "Total oxidant scavenging capacitie of common european fruit and vegetable juices". *J. Agr. Food. Chem.*, 53, 103-110 (2005).
- [11] Contreras-Calderron J, Calderon-James L, Guerra-Hernandez E, and Garcia-Villanova B, "Antioxidant capacity, phenolic content, and vitamin C in pulp, peel, and seed from 24 exotic fruits from Colombia", *Food. Res. Int.*, Vol. 44, pp. 2047-2053, 2011.
- [12] Maritess C, Small S, and Waltz-Hill M, "Alternative nutrition therapies in cancer patients", *Semin. Oncol. Nurs.*, Vol. 21, pp. 173-176, 2005.
- [13] Khonkarn R, Okonogi S, Ampasavate C, and Anuchapreeda S, "Investigation of fruit peel extracts as sources for compounds with antioxidant and antiproliferative activities against human cell lines", *Food. Chem. Toxicol.*, Vol. 48, pp. 2122-2129, 2010.
- [14] Canal N, and Imbimbo BP, "Relationship between pharmacodynamic activity and cognitive effects of eptastigmine in patients with Alzheimer's disease", *Clin. Pharmacol. Ther.*, Vol. 60, pp. 218-228, 1996.
- [15] Davies P, and Maloney AJ, F, "Selective loss of central cholinergic neuros in Alzheimer type disease", *Lancet.*, Vol. 2, pp. 1403-1408, 1976.
- [16] Morris RG, "Development of a water maze procedure for studying spatial learning in the rat", *Neurosci. Meth.*, Vol. 11, pp. 47-60, 1984.
- [17] Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr, V and Featherstone RM, "A new and rapid colormetric determination of acetylcholinesterase activity", *Biochem. Pharmacol.*, Vol. 7, pp. 88-95, 1961.
- [18] Rappaport F, Fischi J, and Pinto N, "An improved method for the estimation of cholinerase activity in serum", *Clinica. Chimica. Acta.*, Vol. 4, pp. 227-230, 1959.
- [19] Hestrin S, "The reaction of acetylcholine and other carboxylic acid derivatives with hydroxylamine, and its analytical application", *Journal of Biological chemistry.*, Vol. 180, pp. 249-261, 1949.
- [20] Dawson GR, and Iversen SD., "the effects of novel choinesterase onhibitors and selective muscarinic receptor agonists in tests of reference and working memory", *Behavioural. Brain. Researc.*, Vol. 57, pp. 143-153, 1993.