

Scopolamine 처리에 의한 인지 및 기억력 손상 마우스에서 박하의 효과

이지혜¹ · 김혜정¹ · 장귀영² · 서경혜² · 김미려³ · 최윤희⁴ · 정지욱^{1*}

¹대구한의대학교 약리학연구소, ²농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부
³대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, ⁴원광디지털대학교 한방건강학과

Mentha arvensis Attenuates Cognitive and Memory Impairment in Scopolamine-treated Mice

Jihye Lee¹, Hye-Jeong Kim¹, Gwi Yeong Jang², Kyung Hye Seo², Mi Ryeo Kim³,
Yun Hee Choi⁴, and Ji Wook Jung^{1*}

¹Department of Pharmacology, Daegu Haany University, Gyeongsan 38578, Korea

²Department of Herbal Crop Research, NIHHS, RDA, Eumseong 27709, Korea

³Department of Herbal Pharmacology, Daegu Haany University, Daegu 42158, Korea

⁴Department of Oriental Medicine & Healthcare, WonKwang Digital University, Iksan 54538, Korea

Abstract – *Mentha arvensis* is used traditional medicine to treat various disorders. In the present study, *M. arvensis* were extracted by the solid-phase microextraction (SPME) method and analyzed by gas chromatograph-mass spectrometry (GC-MS). We investigated the protective effects and mechanisms of a *M. arvensis* extract on scopolamine-induced cognitive and memory impairment. Mice were orally pretreated with a *M. arvensis* extract or normal saline, and then behavior tests were conducted 30 min after scopolamine injection. The antioxidant capacities were analyzed by free radical scavenging (DPPH and ABTS). Acetylcholinesterase (AChE) activity were also measured using Ellman's method ex vivo test. In behavior tests, percent of spontaneous alteration, escape latency and swimming time in target quadrant were improved by the administration of the *M. arvensis* extract, which suggests that the *M. arvensis* extract improves memory function in the scopolamine-treated mice model. In addition, *M. arvensis* extract showed inhibition of the free radical and AChE activity. The results of the present study suggest that the *M. arvensis* extract ameliorates scopolamine-induced cognitive and memory deficits through the inhibition of free radicals and AChE activity. Therefore, *M. arvensis* may be a promising neuroprotective agent for management of learning and memory improvements in human dementia patients.

Keywords – *Mentha arvensis*, Scopolamine, Memory, Essentail oil, Dementia

정유란 방향성 식물의 잎, 꽃, 뿌리, 줄기, 열매 등에서 이차 대사 산물로 얻어진 방향성 물질로 중세시대 아랍에서 소독제로 사용되기 시작하여 최근 향균,^{1,2} 항산화,³ 항염,^{3,4} 진통,⁵ 우울,⁶ 인지,⁷ 항비만,⁸ 항암,⁹ 상처 치유,¹⁰ 진정,¹¹ 항당뇨¹² 등 다양한 약리 효과로 제약, 농업, 식품, 위생, 화장품 등 다양한 산업에 이용되고 있다.¹³ 정유를 사람 또는 동물에게 노출하는 대표적인 방법으로는 코로 흡입하거나 경구 복용 및 피부에 바르는 도찰 요법이 있는데 특히 뇌 질환과 관련하여 흡입 요법으로 감국 정유가 혈압을 낮추

고 정신과 육체 이완시키고,¹⁴ 편백나무 정유의 기억 개선 작용,¹⁵ 카난가 오도라타로부터 추출한 일랑일랑 오일의 1-(3-chlorophenyl) piperazine 유도 불안 억제 효과,¹⁶ *Salvia multicaulis*의 항건망, 불안, 항우울 효과,¹⁷ 로마 카모밀레화 정유의 항우울 효과,¹⁸ 세신 정유의 항우울 효과¹⁹ 등이 보고 되었고, 투여 요법으로 침향 나무 정유의 구속 스트레스에 의한 불안 및 우울 효과,²⁰ 단삼 정유의 항불안 효과,²¹ 계피 나무 정유의 간독성 완화 효과²² 등이 보고 되었다.

뇌는 체내 다른 조직에 비하여 불포화 지방이 많고, 미토콘드리아, 칼슘, 글루타메이트, 항산화 방어의 취약, redox 활성 전이 금속, 신경전달물질 자동 산화 등의 이유로 산화적 스트레스에 민감하여,²³ 알츠하이머 질환(Alzheimer's

*교신저자(E-mail): jwjung@dhu.ac.kr
(Tel): +82-53-819-1337

disease, AD)과 파킨슨 질환(Parkinson's disease), 뇌졸중과 같은 퇴행성 뇌 질환에서 산화적 스트레스가 중요한 기전으로 알려져 있다. 특히 AD 환자의 뇌척수액에는 산화/질산염 단백질, 지질 과산화물, DNA의 산화적 손상으로 8-hydroxyguanosin의 농도가 증가되고 항산화 방어 시스템에 변화가 관찰된다.²⁴⁾ AD 연구에 주로 사용하는 scopolamine 유발 기억 손상 모델에서도 자유 radical에 의하여 지질 과산화와 관련된 malondialdehyde의 수치를 증가시키고, 세포의 항산화 방어 시스템에 손상을 주어 catalase, glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione reductase, superoxide dismutase(SOD) 등을 변화시켜²⁵⁾ 이를 억제하기 위하여 결명자,²⁶⁾ 당귀, 천궁 혼합물,²⁷⁾ 원지²⁸⁾ 등 다양한 천연물에서 항산화 효과로 인한 AD 억제에 대한 연구가 진행되고 있다.

박하(*Mentha arvensis*, 薄荷)는 아시아가 원산지인 꿀풀과(Lamiaceae)에 속하는 다년생 초본식물로 고려 때는 방하(芳荷), 조선시대에는 영생(英生)으로 불렸으며 예로부터 소화불량, 감기, 두통, 치통 등에 사용하였으며 현재 전세계적으로 약 600종 이상의 박하 속이 존재하고 그 중에서 약 25종이 재배되고 있다. Cornmint로 알려진 동양 박하의 잎에는 주요성분으로 산화된 monoterpene류인 menthol과 isomenthone, menthofurane으로,^{29,30)} 독특한 풍미로 향신료, 방향제 등에 이용되고 있으며 박하 정유는 항균 효과,³¹⁾ 항산화 효과,³²⁾ 아세틸콜린에스테라아제 억제 효과,³⁰⁾ 항진균 효과³³⁾ 등에 대하여 보고 되어 있으나 박하 정유 성분의 경구 투여로 인한 기억 개선 효과에 대한 연구는 보고되지 않았다.

따라서 본 연구에서는 유기 용매를 사용하지 않아 본래의 향과 유사한 향을 포집할 수 있고 시료 손실 없이 소량의 시료로 신속하게 분석할 수 있는 SPME-GC-MS 법을 이용하여 성분을 분석하고, 박하 추출물의 항산화 효과 및 콜린 수용체의 길항제로 사람과 동물에게 AD 또는 노화로 인한 인지 및 행동 결손을 유발하여 기억 관련 실험에 많이 사용되는 표준 물질인 scopolamine으로 건망증을 유도한 마우스에서 기억 개선 효과를 확인한 결과 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료 - 연구에 사용된 *M. arvensis*은 국내에서 생산된 것을 한국생약협회(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. *M. arvensis* 500 g에 hexane 5 L를 가하여 상온에서 24시간 동안 침출시켰으며, 추출액은 여과지(Advantec No.2)로 여과하여 여액을 회수하고 걸러진 추재에 다시 동량의 용매를 가하여 총 3회 반복 추출하였다. 추출물은 30°C에서 감압 농축하여 용매를 제거하고 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다(수득율:1.83%).

Solid-phase Microextraction-gas Chromatograph-mass Spectrometry(SPME-GC-MS)를 이용한 향기성분 분석 - 박하 추출물의 향기성분 분석은 GC-MS(Gas chromatography-mass spectrometry, GCMS-QP2020, Shimadzu Co., Japan)를 이용하였으며, 시료로부터 휘발성 성분의 추출은 SPME(Solid phase microextraction, AOC-6000, Shimadzu Co., Japan)를 사용하였다. SPME는 65 μ m -PDMS/DVB(Polydimethylsiloxane/divinylbenzene) fiber를 이용하여 60°C에서 10분 동안 추출, 흡착하였다. GC-MS 분석은 HP-5MS 컬럼(30 m \times 0.25 mm, 0.25 μ m, Agilent Technologies, CA, USA)을 사용하여 80°C에서 5분 동안 유지하고 240°C까지 10°C/min으로 승온 후 34분 동안 유지하였다. 정유성분의 동정은 NIST 14 mass spectral library를 이용하였다.

DPPH Radical 소거능 측정 - 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) radical 소거능은 화학적으로 안정화된 자유 radical인 짙은 보라색의 DPPH를 방향족 아민류 등에 의해 환원되어 색이 탈색되는 것을 이용하여 항산화 물질의 활성을 측정하는 것으로 각 시료를 증류수에 녹인 후 0.2 mM DPPH 용액과 100 μ L씩 동량으로 혼합하여 암실에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교 분석하였고 자유 radical 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH radical 소거활성(\%)} = 100 - [(\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100]$$

ABTS Radical 소거능 측정 - 2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)(ABTS) radical 소거능은 ABTS와 potassium persulfate와 반응시켜 짙은 청록색의 안정화된 ABTS 자유 radical을 생성하여 항산화 물질에 의해 탈색되는 것을 이용하여 항산화 물질의 활성을 측정하는 것으로 7 mM ABTS와 2.4 mM potassium persulfate를 1:1(v:v)로 혼합하여 냉암소에서 12~16시간 반응시켜 ABTS+를 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도를 0.7 \pm 0.03으로 에탄올로 희석한 ABTS 기질용액을 사용하였다. 각 시료를 증류수에 녹인 후 ABTS+ 용액과 100 μ L씩 동량으로 혼합하여 암실에서 7분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군은 ascorbic acid를 사용하여 비교 분석하였고 자유 radical 소거능은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{ABTS radical 소거활성(\%)} = 100 - [(\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도}) \times 100]$$

실험동물 - 4주령 수컷 ICR mouse를 대한바이오링크(Chungbuk, Korea)로부터 공급받아 1주일 동안 순화 후 실험에 사용하였다. 사육기간 중 식이와 물은 자유 섭취시켰으며 사육실 온도는 23 \pm 1°C, 습도 50 \pm 5%, 조명시간 07:00-19:00(12시간 주기)로 환경을 유지하였다. 순화 기간을 거친

실험 동물에게 행동 실험 1시간 전 박하 추출물 50, 100 또는 200 mg/kg를 단회 경구 투여하고 30분 뒤 scopolamine 1 mg/kg을 복강 투여하여 기억 손상을 유발하였다. 본 연구에서 진행된 동물실험 절차는 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 사전심사와 윤리 규정을 준수하여 수행하였다(승인번호:DHU2019-043).

Y-미로 시험 - 단기 기억력을 측정하는 실험으로 순차적으로 행동하는 능력을 평가하기 위한 방법으로 Y-maze test 실시하였다. 측정 장비는 세 개의 가지로 구성되어 있으며 각 가지의 길이는 42 cm, 넓이는 3 cm, 높이는 12 cm이고 세 가지가 접히는 각도는 120°이다. 이 장치는 검정색의 polyvinyl plastic으로 구성되어 있고, 세 개의 가지를 각각 A, B, C로 정한 뒤에 실험을 진행하였다. 실험동물을 넣고 8분 동안 각 가지에 실험동물의 꼬리까지 가지에 들어갈 때의 횡수와, 각 가지에 차례로 들어간 경우를 헤아려 1점(실제변경, actual alternation)씩 부여하였다. 변경 행동력(alternation behavior)은 세 가지 모두에 걸치지 않게 들어가는 것으로 정의되며, 다음의 수학적식에 의해 계산하였다.

변경 행동력(Spontaneous alteration, %) = 실제변경(actual alternation)/최고변경(maximum alternation) × 100(최고변경: 총 입장횟수 - 2)

수동 회피 시험 - 해마의 조건화된 기억과 변연계와 관련 있는 기억에 관한 영향 및 working memory ability를 평가하기 위해 회피학습상자(JEING DO BIO&PLANT CO., LTD., Seoul, Korea)를 이용하여 실험을 하였다. 수동회피상자는 어두운 방과 밝은 방으로 나누어져 있으며, 밝은 방에 실험동물을 넣으면 어두운 방으로 넘어가는데 그 순간 5초간 0.5 mA의 전기충격을 가한다. 전기충격을 가한 다음 날 실험동물을 밝은 방에 다시 넣었을 때 어두운 방에서의 전기충격을 기억하여 밝은 방에 머무르게 되는데, 이때 체류하는 시간(step-through latency)을 측정하여 기억력을 평가하였다.

모리스 수중 미로 시험 - 해마 의존적 공간학습 및 장기 기억력 개선에 대한 실험으로 원형으로 된 지름 90 cm, 높이 45 cm의 수조의 사분면 한 구역에 지름 9 cm, 높이 25 cm의 도피대를 설치하고 20±2°C 깨끗한 물을 도피대 보다 1 cm 정도 위로 채운 뒤 실험 동물이 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간을 측정하였다. 원형 수조에서 4개의 표지판을 설치하여 4분면으로 나누어 입수하는 위치를 다르게 하여 하루 4번씩 반복하여 60초간 진행하였으며 실험 동물이 60초 안에 도피대를 찾으면 실험을 완료하였고 찾지 못한 경우 손으로 위치를 안내해주어 10초간 머무르게 하였다. 실험 마지막 날 도피대를 제거하고 학습능력을 측정하기 위해 60초간 도피대가 있었던 구역에 머무르는 시간을 측정하였고 모든 실험은 Ethovision program(Noldus, Netherlands)을

이용하여 기록 및 측정하였다.

Acetylcholinesterase 활성 시험 - AChE 활성 억제능을 확인하기 위해서 Ellman GL 등³⁴⁾의 방법인 acetylthiocholine iodide(ASCh)를 기질로 사용한 비색분석법으로 실험하였다. 실험에 사용하지 않은 실험 동물을 경추 탈골 후 전체 뇌를 적출하여 차가운 sodium phosphate buffer(100 mM, pH 8.0)를 이용하여 균질화하고, 12,500 rpm, 20분간 원심분리 후 얻은 상층액을 이용하여 AChE 활성을 측정하는데 효소로 사용하였다. 시료와 양성 대조군으로 사용한 donepezil (Sigma-aldrich, USA)을 단계별 희석하여 사용하였다. Sodium phosphate buffer 134 µL, 75 mM ASCh 1 µL, 10 mM Ellman's 용액(5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) 5 µL, 시료 또는 donepezil을 50 µL 넣고 25°C에서 10분간 반응 후 효소원 10 µL를 넣고 25°C에서 5분간 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군으로는 효소를 첨가하지 않고 sodium phosphate buffer를 첨가한 반응액을 사용하였고, ASCh를 첨가하지 않은 반응액으로 시료와 효소 활성용 시약간의 비특이적 반응이 일어나지 않았음을 확인하였다. 시료를 첨가하지 않은 반응액을 AChE의 활성도를 100%로 하였을 때 각 시료를 첨가한 반응액의 AChE 활성 저해도를 그래프로 나타내었다.

통계 처리 - 본 연구의 모든 실험 결과는 Prism 5(GraphPad Software, Inc., San Diego, USA)를 사용하여 산출하였다. 그룹 간 유의성 검정은 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)를 실시하고 Newman-Keuls test에 의해 유의수준 $p < 0.05$ 이상에서 사후 검정을 실시하였다. 모든 결과는 mean±standard error of mean(SEM)으로 표시하였다.

결과 및 고찰

박하의 잎에는 많은 유세포가 있어 다량의 정유를 함유하는데 그 중 70~90%가 menthol이고 정유의 성분은 성장 단계, 토양 조건, 수확 시기 및 사용 부위 등에 따라 변한다. 본 연구에서 박하 추출물의 휘발성 성분을 GC-MS로 분석한 결과, 주요 향기 성분은 menthyl acetate, menthol, cyclohexanone, cyclohexanol 및 caryophyllene oxide로 추정되었으며(Fig. 1), menthyl acetate와 menthol은 박하 특유의 향기성분으로 알려져 있으며^{35,36)} menthol은 amyloid-β(Aβ)에 유도된 기억 손상을 개선시킨다.³⁷⁾ Alzheimer's disease(AD)는 산화적 스트레스에 의하여 세포의 기능이나 구조가 변화고, 단백질과 DNA의 손상을 받아 인지 및 기억력 감퇴 등의 장애가 발생한다. 따라서 본 연구에서는 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 통하여 박하 추출물의 항산화 효과를 확인하였다. DPPH는 안정한 자유 radical로 항산화 활성을 측정하는데 사용하는 대표적인 방법으로 간단하고 빠르게 정확한 항산화 물질의 양을 측정하는데

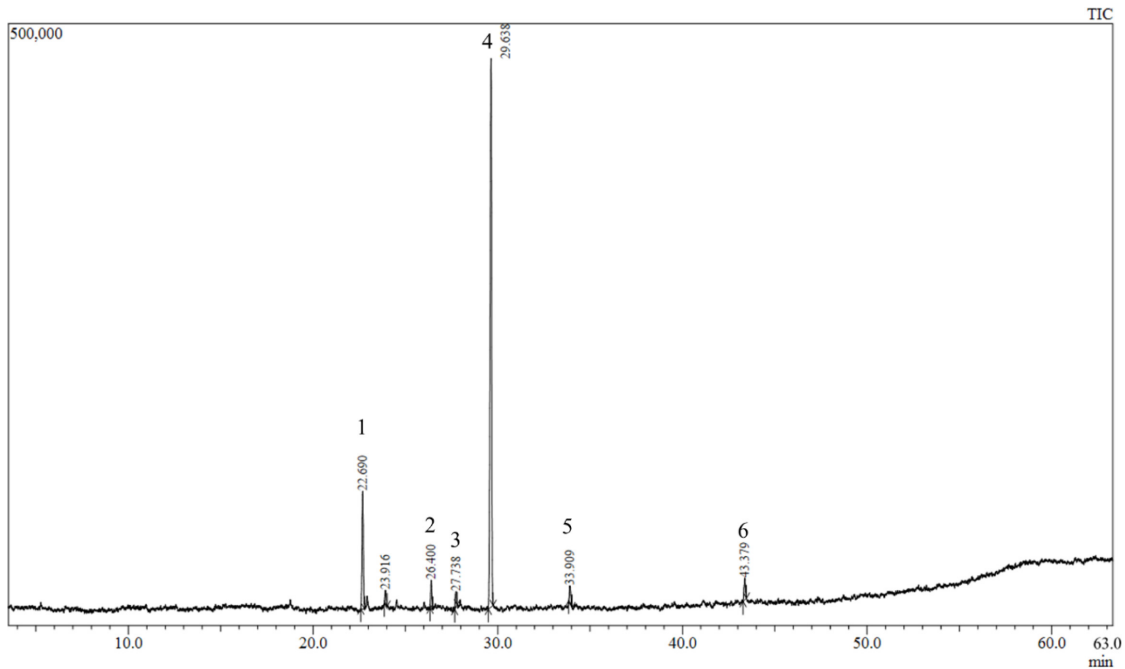


Fig. 1. GC-MS chromatogram (total ion current) of hexane extract from *M. arvensis*. Peaks: 1; cyclohexanone, 2; menthyl acetate, 3; menthol, 4; cyclohexanol, 5; cyclohexenone, 6; caryophyllene oxide.

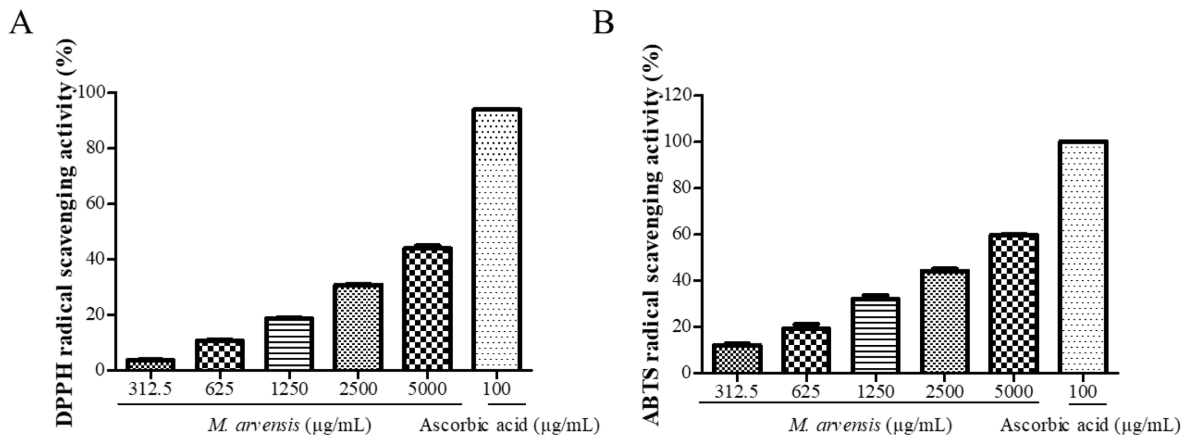


Fig. 2. Quantitative percentage scavenging activity of *M. arvensis* extracts at different concentrations. Ascorbic acid was used as a positive control. Data are presented as mean \pm SEM (n = 3).

2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl의 안정한 자유 radical이 수소를 공유하며 보라색에서 노란색으로 탈색되는 원리를 이용한다. 박하 추출물 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/mL 농도로 처리한 결과 농도 의존적으로 DPPH radical 소거능이 증가하였고 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid에 비교하여 박하 추출물 5000 µg/mL에서 약 50% 수준의 DPPH radical 소거능을 확인하였다(Fig. 2A). ABTS는 생물학적으로 비활성 항산화물질을 포함하여 항산화 물질의 농도를 측정하는데 potassium persulfate와 반응하여 청록색의 ABTS 양이온을 생성한 뒤 항산화 물질에 의해 탈색되는 원리를

이용하여 측정하는데 항산화 물질의 농도와 반응시간에 영향을 많이 받는다.³⁸⁾ 박하 추출물 312.5, 625, 1250, 2500, 5000 µg/mL 농도로 처리한 결과 농도 의존적으로 ABTS radical 소거능이 증가하였고 양성대조군으로 사용한 ascorbic acid에 비교하여 박하 추출물 5000 µg/mL에서 약 50% 수준의 ABTS radical 소거능을 확인하였다(Fig. 2B). 최 등³⁹⁾이 박하 물 추출물과 80% 에탄올 추출물의 항산화 및 항염증 효능을 비교한 결과 80% 에탄올 추출물이 유의한 결과를 나타냈고, 이 등⁴⁰⁾이 다른 종의 박하를 이용하여 물 추출물과 메탄올 추출물에서 항산화 효과를 비교한 결과 메

탄을 추출물에서 총 페놀 함량 및 DPPH radical 소거능이 우수한 결과를 보고하였다. 이는 본 연구와 마찬가지로 농도 의존적인 결과를 나타냈으며 이들의 결과로 박하의 항산화 성분이 소수성 용매에 추출이 잘 되는 것으로 판단된다. Scopolamine은 muscarinic antagonist로 산화적 스트레스를 유발하고 A β 와 인산화된 tau단백질의 수치를 증가시키며 사람과 설치류에서 기억력을 손상시키는 약물로 AD에 대한 연구에 많이 사용된다.²⁵⁾ 따라서 본 연구에서는 scopolamine으로 유도한 인지 및 기억 손상 마우스에서 박하 추출물의 효과를 연구하였다. 설치류의 working short-term memory를 시험하는 비교적 간단한 행동 실험⁴¹⁾인 Y-maze를 수행한 결과 scopolamine 투여한 CON군(control군)의 변경 행동력이 55.0 \pm 1.8%로 정상인 NOR군(normal군)의 78.8 \pm 2.1%와 비교하였을 때 유의하게 감소하여 기억 손상

이 유발된 것을 확인하였고, 박하 추출물 50, 100 및 200 mg/kg를 투여한 실험군에서 53.4 \pm 2.1%, 63.7 \pm 1.4%, 76.1 \pm 1.9%로 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 3A). 또한 각 가지에 들어간 총 입장 횟수에는 모든 군간의 차이가 없어 약물이 마우스의 행동에 변화를 주지 않고 기억력을 개선시키는 것을 알 수 있었다(Fig. 3B). 설치류의 semantic, spatial working memory를 시험하는 모리스 수중 미로를 수행한 결과 기억을 습득하는 과정 동안 도피대를 찾아가는데 걸리는 시간이 NOR군에서 감소하는 반면 CON군은 첫째날과 비슷한 수준으로 나타났고, 박하 추출물 200 mg/kg를 투여한 군에서 훈련이 진행됨에 따라 NOR군과 비슷하게 감소하였다(Fig. 4A). 도피대를 제거한 후 수행한 probe test에서 도피대가 있던 구역에서 머무른 시간이 NOR군 17.8 \pm 0.5초에 비하여 CON군에서 14.4 \pm 0.8초로 유의하게 감소하였으

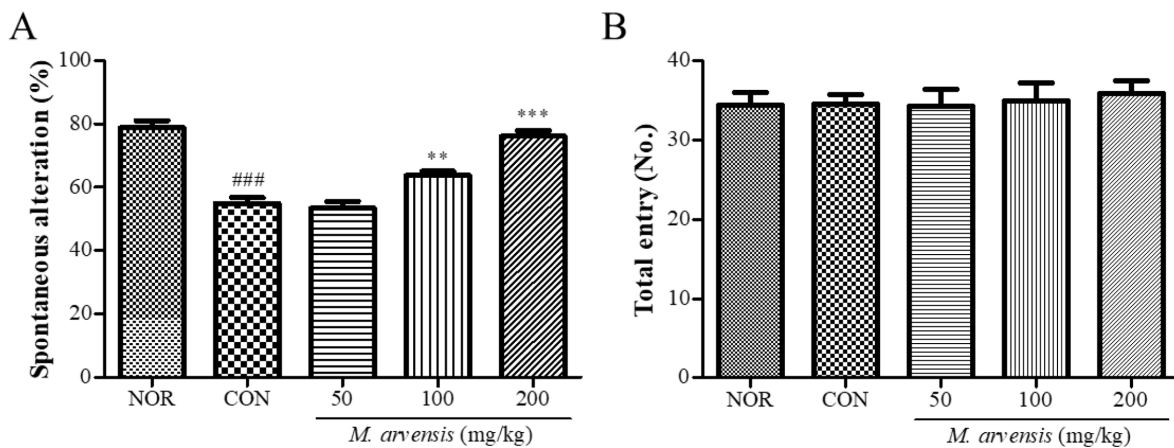


Fig. 3. Effect of *M. arvensis* on scopolamine-induced cognitive and memory impairment in the Y-maze test. Spontaneous alteration (%) (A) and the total entry (B) were monitored for an 8-min session. Values are expressed as mean \pm SEM (n = 10). ### P <0.001 vs NOR group, ** P <0.01; *** P <0.001 vs CON group. Statistical level of significance analysis by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls tests.

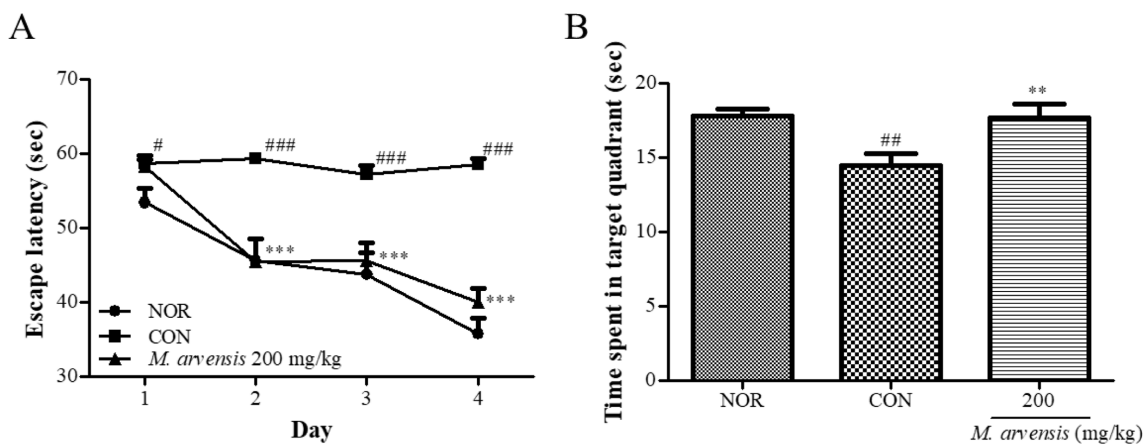


Fig. 4. Effect of *M. arvensis* on scopolamine-induced cognitive and memory impairment in the Morris water maze test. Escape latency (A) and exploration time in target quadrant (B) were monitored. The values shown the mean \pm SEM. # P <0.05; ## P <0.01; ### P <0.001 vs NOR group, ** P <0.01; *** P <0.001 vs the CON group. Statistical level of significance analysis by one-way ANOVA followed by Newman-Keuls tests.

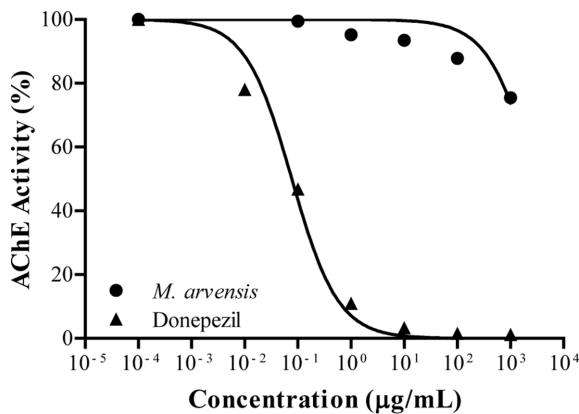


Fig. 5. Effect of *M. arvensis* on the AChE activity. The AChE inhibition rate of *M. arvensis* and donepezil was analyzed. Donepezil was used as a positive control. Data are presented as mean \pm SEM (n = 3).

나 박하 추출물 200 mg/kg 투여군에서 17.6 ± 0.9 초로 증가하여 박하 추출물이 장기 공간 기억도 증가시키는 것을 알 수 있었다(Fig. 4B). 대부분 scopolamine 유도 인지 및 기억 손상 동물 모델에서 효과를 나타낸 약물은 choline 신경계에도 영향을 미치는데 박하 추출물이 acetylcholinesterase(AChE)의 활성에 미치는 효과를 확인하였다. 현재 AD 치료제로 사용되는 약물은 AChE inhibitor인 donepezil, rivastigmine, galantamine과 N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor antagonist인 memantine, donepezil과 memantine을 혼합한 약물로 그 중 donepezil은 모든 AD 치료제에서 나타나는 설사, 메스꺼움, 구토, 어지러움 뿐만 아니라 불면증, 생생한 꿈 등 많은 부작용을 초래하지만 모든 단계의 AD에서 사용할 수 있고 가장 오랜 기간 사용할 수 있는 약물이다.⁴²⁾ Donepezil을 양성대조군으로 사용하여 AChE 억제 효과를 측정된 결과 donepezil과 박하 추출물의 IC50 값이 0.08 µg/mL과 2819 µg/mL으로 각각 나타났다(Fig. 5). 엄 등⁴³⁾이 박하 열수 추출물에서 낮지만 AChE 저해 활성을 확인하였고, A. Benabdallah 등³⁰⁾의 다양한 박하 종의 정유 중 *M. arvensis*에서 가장 우수한 AChE 저해 활성을 보고하였는데 이는 생약의 재배 조건, 추출 용매, 추출 시간 등에 따른 결과로 판단된다. 최근 *Sideritis*,⁴⁴⁾ *Origanum syriacum*,⁴⁵⁾ *Zataria Multiflora*⁴⁶⁾ 등 정유의 AChE 억제 효과에 대해 보고되었다. 본 연구 결과는 박하 추출물이 항산화 및 AChE 억제를 통하여 scopolamine 유도 인지 및 기억 손상을 개선시키는 것으로 판단된다.

결론

본 연구는 박하 추출물을 SPME-GC-MS법을 이용하여 성분 분석 및 DPPH와 ABTS radical 소거능을 통하여 항산화

능을 확인하고 scopolamine으로 유도한 기억 감퇴모델에서 Y-미로, 모리스 수중 미로 시험을 통하여 기억 개선 효과를 측정하였다. 그 결과 농도 의존적으로 항산화 효과를 나타냈으며, 단기 및 장기 기억뿐만 아니라 공간 기억을 개선시키는 것을 확인 할 수 있었다. 따라서 박하 추출물이 항산화 효과를 통하여 기억을 개선시켜 향후 인지 및 기억력 개선 기능성 식품 또는 약물로 사용 가능성이 있는 것으로 사료된다.

사사

본 성과물은 농촌진흥청 연구사업(세부과제번호: PJ01389502)의 지원에 의해 이루어진 것임.

인용문헌

1. Sim, J. X. F., Khazandi, M., Chan, W. Y., Trott, D. J. and Deo, P. (2019) Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. *Vet. Dermatol.* **30**: 524-e159.
2. Kim, S.-H., Yi, M.-R., Kim, C.-S., Kim, J.-M. and Bu, H.-J. (2018) 제주산 로즈마리 에센셜 오일의 항염 및 피부 상재균에 대한 항균 활성. *한국응용과학기술학회지* **35**: 744-756.
3. Souissi, M., Azelmat, J., Chaieb, K. and Grenier, D. (2019) Antibacterial and anti-inflammatory activities of cardamom (*Elettaria cardamomum*) extracts: Potential therapeutic benefits for periodontal infections. *Anaerobe* 102089.
4. Alolga, R. N., Chavez Leon, M., Osei-Adjei, G. and Onoja, V. (2019) GC-MS-based metabolomics, antibacterial and anti-inflammatory investigations to characterize the quality of essential oil obtained from dried *Xylopia aethiopica* fruits from Ghana and Nigeria. *J. Pharm. Pharmacol.* **71**: 1544-1552.
5. Oliveira de Veras, B., Melo de Oliveira, M. B., Granja da Silva Oliveira, F., Queiroz Dos Santos, Y., Saturnino de Oliveira, J. R., Lucia de Menezes Lima, V., Guedes da Silva Almeida, J. R., Maria do Amaral Ferraz Navarro, D., Ribeiro de Oliveira Farias de Aguiar, J. C., Aguiar, J. D. S., Gorch-Lira, K., Dias de Assis, C. R., Vanusa da Silva, M. and Catarina de Souza Lopes, A. (2020) Chemical composition and evaluation of the antinociceptive, antioxidant and antimicrobial effects of essential oil from *Hymenaea cangaceira* (Pinto, Mansano & Azevedo) native to Brazil: A natural medicine. *J. Ethnopharmacol.* **247**: 112265.
6. Hashikawa-Hobara, N., Otsuka, A., Ishikawa, R. and Hashikawa, N. (2019) Roman chamomile inhalation combined with clomipramine treatment improves treatment-resistant depression-like behavior in mice. *Biomed. Pharmacother.*

- 118:** 109263.
7. Baluchnejadmojarad, T., Mohamadi-Zarch, S. M. and Roghani, M. (2019) Safranal, an active ingredient of saffron, attenuates cognitive deficits in amyloid beta-induced rat model of Alzheimer's disease: underlying mechanisms. *Metab. Brain Dis.* **34:** 1747-1759.
 8. Ali-Shtayah, M. S., Jamous, R. M., Abu-Zaitoun, S. Y., Khasati, A. I. and Kalbouneh, S. R. (2019) Biological properties and bioactive components of *Mentha spicata* L. essential oil: Focus on potential benefits in the treatment of obesity, Alzheimer's disease, dermatophytosis, and drug-resistant infections. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2019:** 3834265.
 9. Xing, X., Ma, J. H., Fu, Y., Zhao, H., Ye, X. X., Han, Z., Jia, F. J. and Li, X. (2019) Essential oil extracted from *Erythrina corallodendron* L. leaves inhibits the proliferation, migration, and invasion of breast cancer cells. *Medicine (Baltimore)* **98:** e17009.
 10. Seyed Ahmadi, S. G., Farahpour, M. R. and Hamishehkar, H. (2019) Topical application of *Cinnamon verum* essential oil accelerates infected wound healing process by increasing tissue antioxidant capacity and keratin biosynthesis. *Kaohsiung J. Med. Sci.* **35:** 686-694.
 11. Dougnon, G., Ito, M. (2020) Sedative effects of the essential oil from the leaves of *Lantana camara* occurring in the Republic of Benin via inhalation in mice. *J. Nat. Med.* **74:** 159-169.
 12. Hichri, F., Omri Hichri, A., Maha, M., Saad Mana Hossan, A., Flamini, G. and Ben Jannet, H. (2019) Chemical composition, antibacterial, antioxidant and in vitro antidiabetic activities of essential oils from *Eruca vesicaria*. *Chem. Biodivers.* **16:** e1900183.
 13. Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008) Biological effects of essential oils--a review. *Food Chem. Toxicol.* **46:** 446-475.
 14. Kim, D. S., Goo, Y. M., Cho, J., Lee, J., Lee, D. Y., Sin, S. M., Kil, Y. S., Jeong, W. M., Ko, K. H., Yang, K. J., Kim, Y. G., Kim, S. G., Kim, K., Kim, Y. J., Kim, J. K. and Shin, E. C. (2018) Effect of volatile organic chemicals in *Chrysanthemum indicum* Linne on blood pressure and electroencephalogram. *Molecules* **23:** 1-14.
 15. Sadiki, F. Z., Idrissi, M. E., Cioanca, O., Trifan, A., Hancianu, M., Hritcu, L. and Postu, P. A. (2019) *Tetraclinis articulata* essential oil mitigates cognitive deficits and brain oxidative stress in an Alzheimer's disease amyloidosis model. *Phytomedicine* **56:** 57-63.
 16. Zhang, N., Zhang, L., Feng, L. and Yao, L. (2018) *Cananga odorata* essential oil reverses the anxiety induced by 1-(3-chlorophenyl) piperazine through regulating the MAPK pathway and serotonin system in mice. *J. Ethnopharmacol.* **219:** 23-30.
 17. Bagci, E., Akbaba, E., Maniu, C., Ungureanu, E. and Hritcu, L. (2019) Evaluation of anti-amnesic activity of *Salvia multicaulis* essential oil on scopolamine-induced amnesia in rats: *in vivo* and *in silico* approaches. *Heliyon* **5:** e02223.
 18. Kong, Y., Wang, T., Wang, R., Ma, Y., Song, S., Liu, J., Hu, W. and Li, S. (2017) Inhalation of Roman chamomile essential oil attenuates depressive-like behaviors in Wistar Kyoto rats. *Sci. China Life Sci.* **60:** 647-655.
 19. Park, H. J., Lim, E. J., Zhao, R. J., Oh, S. R., Jung, J. W., Ahn, E. M., Lee, E. S., Koo, J. S., Kim, H. Y., Chang, S., Shim, H. S., Kim, K. J., Gwak, Y. S. and Yang, C. H. (2015) Effect of the fragrance inhalation of essential oil from *Asarum heterotropoides* on depression-like behaviors in mice. *BMC Complement. Alternat. Med.* **15:** 43.
 20. Wang, S., Wang, C., Yu, Z., Wu, C., Peng, D., Liu, X., Liu, Y., Yang, Y., Guo, P. and Wei, J. (2018) Agarwood essential oil ameliorates restrain stress-induced anxiety and depression by inhibiting HPA axis hyperactivity. *Int. J. Mol. Sci.* **19:** 1-14
 21. Liu, A. D., Cai, G. H., Wei, Y. Y., Yu, J. P., Chen, J., Yang, J., Wang, X., Che, Y. W., Chen, J. Z. and Wu, S. X. (2015) Anxiolytic effect of essential oils of *Salvia miltiorrhiza* in rats. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8:** 12756-12764.
 22. Niknezhad, F., Sayad-Fathi, S., Karimzadeh, A., Ghorbani-Anarkooli, M., Yousefbeyk, F. and Nasiri, E. (2019) Improvement in histology, enzymatic activity, and redox state of the liver following administration of *Cinnamomum zeylanicum* bark oil in rats with established hepatotoxicity. *Anat. Cell Biol.* **52:** 302-311.
 23. Cogley, J. N., Fiorello, M. L. and Bailey, D. M. (2018) 13 reasons why the brain is susceptible to oxidative stress. *Redox Biol.* **15:** 490-503.
 24. Valis, M., Herman, D., Vanova, N., Masopust, J., Vysata, O., Hort, J., Pavelek, Z., Klimova, B., Kuca, K., Misik, J. and Zdarova Karasova, J. (2019) The concentration of memantine in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients and its consequence to oxidative stress biomarkers. *Front. Pharmacol.* **10:** 943.
 25. Tang, K. S. (2019) The cellular and molecular processes associated with scopolamine-induced memory deficit: A model of Alzheimer's biomarkers. *Life Sci.* **233:** 116695.
 26. Ravi, S. K., Narasingappa, R. B., Prasad, M., Javagal, M. R. and Vincent, B. (2019) *Cassia tora* prevents Abeta1-42 aggregation, inhibits acetylcholinesterase activity and protects against Abeta1-42-induced cell death and oxidative stress in human neuroblastoma cells. *Pharmacol. Rep.* **71:** 1151-1159.
 27. Lu, J., Guo, P., Liu, X., Zhang, Y., Guo, X., Gao, X. and Chen, Y. (2019) Herbal formula Fo Shou San attenuates Alzheimer's disease-related pathologies via the Gut-Liver-Brain axis in APP/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* **2019:** 8302950.
 28. Park, H., Kang, S., Nam, E., Suh, Y. H. and Chang, K. A. (2019) The protective effects of PSM-04 against beta amyloid-induced neurotoxicity in primary cortical neurons and an

- animal model of Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* **10**: 2.
29. de Sousa Guedes, J. P., da Costa Medeiros, J. A., de Souza, E. S. R. S., de Sousa, J. M., da Conceicao, M. L. and de Souza, E. L. (2016) The efficacy of *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in reducing pathogenic bacteria and maintaining quality characteristics in cashew, guava, mango, and pineapple juices. *Int. J. Food Microbiol.* **238**: 183-192.
30. Benabdallah, A., Boumendjel, M., Aissi, O., Rahmoune, C., Boussaid, M. and Messaoud, C. (2018) Chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory of wild *Mentha* species from northeastern Algeria. *S. Afr. J. Bot.* **116**: 131-139.
31. de Sousa Guedes, J. P., de Souza, E. L. (2018) Investigation of damage to *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Enteritidis exposed to *Mentha arvensis* L. and *M. piperita* L. essential oils in pineapple and mango juice by flow cytometry. *Food Microbiol.* **76**: 564-571.
32. Ahmad, N., Fazal, H., Ahmad, I. and Abbasi, B. H. (2012) Free radical scavenging (DPPH) potential in nine *Mentha* species. *Toxicol. Ind. Health* **28**: 83-89.
33. Scartazzini, L., Tosati, J. V., Cortez, D. H. C., Rossi, M. J., Flores, S. H., Hubinger, M. D., Di Luccio, M. and Monteiro, A. R. (2019) Gelatin edible coatings with mint essential oil (*Mentha arvensis*): film characterization and antifungal properties. *J. Food Sci. Technol.* **56**: 4045-4056.
34. Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Jr. and Featherstone, R. M. (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*; **7**: 88-95.
35. Shasany, A. K., Khanuja, S. P., Dhawan, S. and Kumar, S. (2000) Positive correlation between menthol content and in vitro menthol tolerance in *Mentha arvensis* L. cultivars. *J. Biosci.* **25**: 263-266.
36. Machale, K. W., Niranjan, K. and Pangarkar, V. G. (1997) Recovery of dissolved essential oils from condensate waters of basil and *Mentha arvensis* distillation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **69**: 362-366.
37. Bhadania, M., Joshi, H., Patel, P. and Kulkarni, V. H. (2012) Protective effect of menthol on beta-amyloid peptide induced cognitive deficits in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **681**: 50-54.
38. Moniruzzaman, M., Khalil, M. I., Sulaiman, S. A. and Gan, S. H. (2012) Advances in the analytical methods for determining the antioxidant properties of honey: a review. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* **9**: 36-42.
39. Choi, D.-H., Seung, O. T. and Lim, M.-H. (2019) 열수 및 80% 에탄올로 추출한 박하의 생리활성 비교연구. *한국응용과학기술학회지* **36**: 208-216
40. 이승은, 한희선, 장인복, 김금숙, 신유수, 손영득, 박충범 and 성낙술. (2005) 박하의 in vitro 항산화활성. *韓國藥用作物學會誌* **13**: 255-260.
41. Wahl, D., Coogan, S. C., Solon-Biet, S. M., de Cabo, R., Haran, J. B., Raubenheimer, D., Cogger, V. C., Mattson, M. P., Simpson, S. J. and Le Couteur, D. G. (2017) Cognitive and behavioral evaluation of nutritional interventions in rodent models of brain aging and dementia. *Clin. Interv. Aging* **12**: 1419-1428.
42. Arvanitakis, Z., Shah, R. C. and Bennett, D. A. (2019) Diagnosis and management of dementia: review. *JAMA.* **322**: 1589-1599.
43. 엄민영, T. A. U. M. Y., 하태열, T. A. H. T.-Y., 성기승, T. A. S. K.-S. and 김용식, T. A. K. Y.-S. (2013) 생약추출물의 acetylcholinesterase 저해, 항산화 및 신경세포보호 효과 in vitro 탐색. *한국식품저장유통학회지* **20**: 840-845
44. Deveci, E., Tel-Cayan, G., Usluer, O. and Emin Duru, M. (2019) Chemical composition, antioxidant, anticholinesterase and anti-tyrosinase activities of essential oils of two sideritis species from Turkey. *Iran. J. Pharm. Res.* **18**: 903-913.
45. Lopez, V., Pavela, R., Gomez-Rincon, C., Les, F., Bartolucci, F., Galiffa, V., Petrelli, R., Cappellacci, L., Maggi, F., Canale, A., Otranto, D., Sut, S., Dall'Acqua, S. and Benelli, G. (2019) Efficacy of *Origanum syriacum* essential oil against the mosquito vector culex quinquefasciatus and the gastrointestinal parasite anisakis simplex, with Insights on acetylcholinesterase inhibition. *Molecules* **24**: 1-15.
46. Eskandari-Roozbahani, N., Shomali, T. and Taherianfard, M. (2019) Neuroprotective effect of *Zataria multiflora* essential oil on rats with Alzheimer disease: A mechanistic study. *Basic Clin. Neurosci.* **10**: 85-97.

(2019. 11. 15 접수; 2019. 12. 6 심사;
2020. 1. 17 게재확정)