

비타민나무 추출물 및 착즙 분말의 항산화 활성 및 Nitric Oxide 생성과 Elastase에 대한 저해활성

박주희* · 이찬옥** · 유지혜** · Nguyen Thi Lan An*** · 유남호*** · 김명조***†

*삼성생약(주)부설 바이오생명공학연구소, **강원대학교 한방바이오연구소, ***강원대학교 생물자원과학과

Antioxidative and Inhibitory Activities of Extract and Juice Powder from *Hippophae rhamnoides* L. against Nitric Oxide and Elastase Production

Ju Hee Park*, Chan Ok Lee**, Ji Hye Yoo**, Nguyen Thi Lan An***, Nam Ho Yoo*** and Myong Jo Kim***†

*Institute of Samsung Herb Medicine, Chuncheon 24232, Korea.

**Bioherb Research Institute, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

***Department of Bio-Resource Sciences, Kangwon National University, Chuncheon 24341, Korea.

ABSTRACT

Background: The flowering plant *Hippophae rhamnoides* L. has been used for many studies on fruit or leaf extracts. This study was conducted to investigate the development of a new cosmetic material from *H. rhamnoides* fruits and leaves that have by antioxidant, anti-inflammatory and wrinkle improvement activities.

Methods and Results: The antioxidant abilities of *H. rhamnoides* extracts, including of a water-soluble fruit powder (FW), a fat-soluble fruit powder (FF), a supercritical extract of fruit by-product (BS), and a mixture of leaf and fruit (MIX), were investigated in vitro. A DPPH radical assay for antioxidant activity was performed for these fractions alongside assay to evaluate the total phenolic and flavonoid content (TPC and TFC). As expected, the MIX had the highest DPPH radical scavenging activity ($RC_{50} = 10.27 \mu\text{g}/\text{mL}$), and the TPC and TFC also were highest in MIX (225.7 $\text{mg}\cdot\text{GAE}/\text{g}$, and 25.18 $\text{mg}\cdot\text{QE}/\text{g}$, respectively). Nitric oxide (NO) production in LPS-induced RAW264.7 cells was estimated and the results indicated an over 75% decrease of NO production in FF and MIX. In other assays, the highest elastase inhibitory activity was found in FW.

Conclusions: These results revealed that *H. rhamnoides* extracts have a high potential for antioxidant, anti-inflammatory and anti-wrinkle activities. *H. rhamnoides* products are suggested to be applied as the functional materials of cosmetic ingredients.

Key Words: *Hippophae rhamnoides*, Antioxidative Activities, Elastase Inhibitory Activity, Functional Materials, Nitric Oxide Inhibitory Activity

서 언

천연을 지향하는 추세에 따라 많은 천연소재, 특히 식물성 추출물이 기능성 원료로 많이 사용되고 있다. 이들 식물성추출물은 피부생리활성 효능이 알려지면서 최근 화장품소재로 부각되고 있으며 (Ann *et al.*, 2004), 피부노화, 보습, 미백활성 등에 영향을 미치는 생물학적 부분에 특이적으로 작용하여 적은 양으로도 높은 활성을 나타내는 소재의 발굴에 많은 관

심이 집중되고 있다 (Jung and Choe, 2014).

환경오염, 미생물, 화학 산화제 및 자외선 등 피부가 외부적 요인에 노출되면서 노화의 주범인 산화적 스트레스를 받는다 (Rahimuddin *et al.*, 2007). 특히 자외선에 지속적으로 노출된 피부는 반응성이 큰 활성산소종이 생성되어 피부노화를 촉진 시키며, 염증유발, 홍조, 색소 침착 등 피부과 질환을 유발하게 된다 (Imokawa, 2009; Um *et al.*, 2017b).

최근 이러한 활성산소종에 의한 손상이 항산화제에 의해 억

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6413 (E-mail) kimmjo@kangwon.ac.kr

Received 2018 February 6 / 1st Revised 2018 February 21 / 2nd Revised 2018 March 28 / 3rd Revised 2018 April 4 / Accepted 2018 April 5

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

제되는 것이 알려지면서 천연물로부터 항산화 및 항염증 활성을 가지는 물질을 찾기 위한 연구가 꾸준히 진행되고 있다 (Ko *et al.*, 2017). 특히 식물에 다량 함유되어있는 페놀성화합물은 페놀성 하이드록실 그룹이 활성산소를 소거하는데 있어 중요한 역할을 하며, 항산화, 항염증, 항암 활성 등 다양한 생리활성을 나타낸다고 알려져 있다 (Rahman *et al.*, 2006).

북아시아와 유럽이 원산지인 비타민나무 (*Hippophae rhamnoides* L.)는 산자나무라고도 불리며, 항산화, 면역조절, 피부보호, 인플루엔자 감염 및 심장병 예방 효과 등이 알려져 있으며, 화학성분으로는 polyphenol, flavonoid, flavonoid 배당체, carotenoid, β -sitosterol 및 ursolic acid 등이 알려져 있고 (Maheshwari *et al.*, 2011; Wani *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013; Jeong *et al.*, 2015), 열매 및 종자 오일에는 palmitoleic acid와 linoleic acid의 함량이 높은 것으로 나타났다 (Yang and Kallo, 2001).

또한 열매로부터 추출된 오일은 피부개선, 항염증효과 및 광보호효과를 나타내며 (Bat and Tannert, 1993), 잎의 물 추출물이 화상으로 생긴 상처에 높은 치료효과를 보이고, 상처부위의 콜라겐 합성과 안정화를 증가시켰다고 보고하였다 (Upadhyay *et al.*, 2011). 또한 초임계 추출법으로 추출된 비타민나무 종자오일 역시 높은 상처 치료효과를 나타내는 것으로 보고하였다 (Upadhyay *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010).

최근 비타민나무에 대한 관심이 증가되며 많은 피부효능 연구가 진행되고 있으나 주로 열매와 잎 추출물에 한정되어 있어, 비타민나무를 이용한 다양한 제품 활용에 제약이 있었다. 따라서 본 연구에서는 비타민나무 열매와 잎을 이용한 새로운 소재를 개발하고, 항산화, 항염증 및 주름개선 효능을 평가하여 화장품 원료로서의 활용가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

비타민나무 (*Hippophae rhamnoides* L.)의 열매와 잎은 강원비타민나무영농조합 (Chuncheon, Korea) 농장에서 7월에 수확한 것을 제공받아 사용하였고, 착즙기 (galaxy premium juicer GJ-120, NUC Co., Ltd., Daegu, Korea)로 비타민나무 열매를 착즙한 후 inline-mixer [IM002 (YSY), K&S Co., Ltd., Hwaseong, Korea]를 이용하여 균질화 시키고, micro filter (1 μ m)를 통과시켜 여과하였다. 이후 분액여두를 이용하여 여과액을 수용성 (FW)과 지용성 (FF)분획으로 나누고, 동결건조 (Ilshin Biobase Co., Ltd., Seoul, Korea)를 실시하여 각각 3.86과 5.73%의 수율로 분말 (juice powder)을 획득하였다.

또한 비타민나무열매를 착즙하고 남은 부산물을 동결 건조하여 분말화한 후에 초임계추출장치 (SFE-2&5LF-2-FMC-50, Waters, Milford, MA, USA)에 넣어 total flow rate (CO₂

flow rate, co-solvent rate)를 50 g/min으로 흘려주었고, co-solvent로는 ethyl alcohol (Daejung Chemicals and Metals Co., Ltd., Siheung, Korea)을 사용하였다. 추출온도는 60°C, 압력은 350 bar 조건에서 3 시간동안 추출하였다. 추출물을 40°C에서 감압농축하고, 동결 건조하여 5.26%의 수율로 초임계 추출물 (BS)을 얻을 수 있었다.

또한 잎과 열매 혼합처리 시 높은 활성을 나타낸 연구 (Han *et al.*, 2009)를 참고하여 진행한 선행연구결과, 높은 DPPH 소거활성을 나타낸 비타민나무 잎과 열매 혼합분말을 실험에 사용하였다 (data not shown).

건조된 비타민나무 잎은 70% EtOH로 추출하여, 감압 농축하였고 열매는 착즙하여, 여과한 후 동결건조 하였다. 28.19% 수율의 건조된 잎 분말과 9.59% 수율의 열매 착즙 분말을 6:4의 비율로 혼합한 혼합물 (MIX)을 실험에 사용하였다.

2. 총 phenol성 화합물 함량

총 phenol성 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다 (Singleton and Rossi, 1965).

각 시료 0.1 ml 를 0.05 ml 의 Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 시약과 혼합하고, 5 분 반응 후에 20%의 탄산나트륨 0.3 ml 를 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 15 분 동안 안정화시킨 후 증류수 1 ml를 첨가하여 725 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

시료의 총 phenol성 화합물함량은 표준물질로 사용된 gallic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)의 표준검량곡선을 이용하여 gallic acid equivalents (GAE)로 나타내었다.

3. 총 flavonoid 함량

총 flavonoid 함량은 Moreno 등 (2000)의 방법을 변형하여 측정하였다.

80% ethanol로 희석한 시료 0.1 ml 에 10% aluminium nitrate (Yakuri Pure Chemicals Co., Ltd., Osaka, Japan) 0.02 ml, 1 M potassium acetate (Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan) 0.02 ml 와 80% ethanol 0.86 ml 을 가하여 실온에서 40 분 반응시켰다. 반응이 끝난 후 415 nm에서 흡광도를 측정 하였으며, 총 flavonoid 함량은 표준물질인 quercetin (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 검량곡선을 이용하여 정량한 후 quercetin equivalents (QE)로 나타내었다.

4. DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거 활성은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 측정하였다.

다양한 농도의 시료 0.1 ml 를 0.15 mM의 DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma-Aldrich Co., St. Louis,

MO, USA) 0.1 ml 와 혼합하여 상온, 암조건에서 30 분간 반응시킨 후, UV/VIS spectrophotometer (V530, Jasco Inc., Tokyo, Japan)를 이용하여 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

농도에 따른 radical 소거능의 기울기를 구하여 50%가 되는 시점의 시료의 농도를 IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)로 나타내었고, 양성대조군으로는 ascorbic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

5. 환원력 측정

환원력은 Oyaizu (1986)의 방법을 변형하여 실험하였다.

다양한 농도의 시료 0.1 ml 에 0.2 M의 sodium phosphate buffer (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.1 ml (pH 6.6)와 1% potassium ferricyanide (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.1 ml 를 혼합하여 50°C에서 20 분 동안 반응시킨 후, 10% trichloroacetic acid (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan) 0.1 ml 를 첨가하여 동량의 증류수와 0.1% ferric chloride (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 0.05 ml 를 첨가하여 700 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

6. 세포배양 및 세포독성 측정

RAW264.7 세포는 한국 세포주 은행 (Seoul, Korea)에서 구입 하였으며, 세포배양에 사용한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin solution (PS), phosphate buffered saline (PBS)는 HyClone사 (Logan, UT, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 10% FBS와 1% 항생제 (PS, 100 U/ml)가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

시료에 대한 세포독성은 96 well plate에 RAW264.7 세포를 1×10^5 cells/well로 분주하여 24 시간 동안 배양한 후, LPS와 시료가 첨가된 배지에서 24 시간 배양하고, phosphate-buffered saline (PBS)에 녹인 MTT (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 0.5 mg/ml 의 농도로 처리하여 4 시간 더 배양시킨 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μl 의 DMSO를 처리하여 ELISA (Model 680, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다 (Mosmann, 1983).

7. Nitric oxide (NO) 생성율

Nitrite oxide (NO)생성은 griess reagent system을 이용하여 측정하였고, griess reagent에 사용되는 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

96 well plate에 RAW264.7 세포를 1×10^5 cells/well로 분주하여 24 시간동안 배양하고, LPS와 시료가 첨가된 배지로

교체하여 24 시간 배양 후, 상등액 50 μl 와 griess reagent (A reagent; 1% sulfanilamide, B reagent; 5% phosphoric acid에 녹인 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride) 50 μl 를 혼합하여 10 분간 반응 시킨 후 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다 (Green, 1982).

8. Elastase 저해활성

Elastase 저해활성은 Cannell 등 (1988)의 방법에 따라 측정하였으며, 실험에 사용되는 모든 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

각 시료를 일정농도가 되도록 조제하고, 100 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 porcine pancreas elastase (0.25 U/ml) 용액을 첨가하여, 100 mM tris-HCl buffer (pH 8.6)에 녹인 기질 N-succinyl-(L-Ala)3-p-nitroanilide를 가하고, 37°C에서 20 분간 반응시킨 후, 기질로부터 생성되는 p-nitroanilide의 생성량을 415 nm에서 측정하였다. Elastase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

9. 통계처리

모든 데이터는 최소 3 반복 수행하여 평균 $\pm$ 표준편차로 나타냈으며, 각 실험군의 통계처리는 Minitab (version17.2; Minitab Inc., State College, PA, USA)을 사용하여 One-way ANOVA를 실시하였으며, 유의적 차이가 있는 항목에 대해서는 Tukey's Honest Significant Difference (HSD)를 이용하여 통계학적 유의성을 분석하였다 ($p < 0.05$).

결과 및 고찰

1. 총 phenol성 화합물 및 flavonoid 함량

비타민나무 (*Hippophae rhamnoides* L.) 열매와 잎으로 제조한 4 종 sample의 총 phenol성 화합물 및 flavonoid 함량은 Table 1에 나타내었다. 열매와 잎의 혼합물인 MIX의 경우 225.7 mg·GAE/g으로 가장 높은 phenol성 화합물 함량을 나타냈으며, 그 다음으로 FW (14.08 mg·GAE/g) > BS (10.99 mg·GAE/g) > FF (8.96 mg·GAE/g)의 순이었다. 총 flavonoid 함량도 총 phenol성 화합물과 같이 MIX (25.18 mg·QE/g)가 가장 높은 함량을 나타냈고, FW (5.86 mg·QE/g) > BS (1.91 mg·QE/g) > FF (0.29 mg·QE/g)의 순이었다.

Yogendra 등 (2013)에 의하면 비타민나무 부위별 phenol성 화합물의 함량은 잎이 가장 많고, 열매와 과육이 그 다음을 차지한다고 하였다. 또한 대표적인 polyphenol 화합물인 플라보노이드 함량은 건조된 잎 100 g당 310 - 2,100 mg 함유되어 있다고 보고되었다 (Barl et al., 2003).

Phenol성 화합물은 다른 화합물과 쉽게 결합하는 특성을 가진 히드록시기 (-OH)를 포함하고 있어 항산화, 항암, 항콜레

Table 1. Total phenol and flavonoid contents of functional materials from *Hippophae rhamnoides*.

Samples	Total phenol (mg·GAE/g) ¹⁾	Total flavonoid (mg·QE/g) ²⁾
FW	14.08±0.87 ^{b*}	5.86±0.89 ^b
FF	8.96±1.47 ^c	0.29±0.05 ^b
BS	10.99±1.57 ^{bc}	1.91±0.27 ^b
MIX	225.70±0.73 ^a	25.18±4.55 ^a

FW; water-soluble fruit powder, FF; fat-soluble fruit powder, BS; by-product supercritical extract of fruit, MIX; mixture of leaves and fruit. ¹⁾mg·GAE/g; mg·gallic acid equivalent per sample 1 g, ²⁾mg·QE/g; mg·quercetin equivalent per sample 1 g. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *The data were statistically analyzed using Tukey's Honest Significant Difference (HSD), and differences were assessed to be significant at 5% level of probability ($p < 0.05$).

Table 2. DPPH¹⁾ radical scavenging activity of functional materials from *Hippophae rhamnoides*.

Samples	RC ₅₀ ²⁾ (μg/ml)
FW	743.10±73.86 ^{b*}
FF	999.12±92.42 ^c
BS	1105.97±10.80 ^c
MIX	10.27±0.21 ^a
Ascorbic acid	2.91±0.33 ^a

FW; water-soluble fruit powder, FF; fat-soluble fruit powder, BS; by-product supercritical extract of fruit, MIX; mixture of leaves and fruit. ¹⁾DPPH; 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, ²⁾RC₅₀; concentration required for 50% reduction of DPPH at 30 min after starting the reaction. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *The data were statistically analyzed using Tukey's Honest Significant Difference (HSD), and differences were assessed to be significant at 5% level of probability ($p < 0.05$).

스테롤 작용을 하며, 식이성 polyphenol 화합물을 많이 섭취하는 경우 암, 심혈관 질환, 염증, 신경변성 질환 등 여러 질병의 위험을 감소시킨다 (Vauzour *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2017). 또한 체내조직을 보호하며 생리적 효율성을 높임으로써, 식물에 phenol성 화합물의 함량이 많을수록 높은 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Duval and Shetty, 2001).

2. DPPH radical 소거능

DPPH는 전자 또는 수소를 받으면 radical이 소거되어, 517 nm 부근에서 흡광도가 감소한다. 이러한 DPPH를 이용한 측정법은 항산화 작용기작과 연관성이 높고 항산화 활성을 빠르게 측정할 수 있어, 식물추출물의 전자 공여능 연구에 많이 이용되고 있다 (Ahn *et al.*, 2015).

비타민나무 열매와 잎으로 제조한 4 종 sample의 DPPH

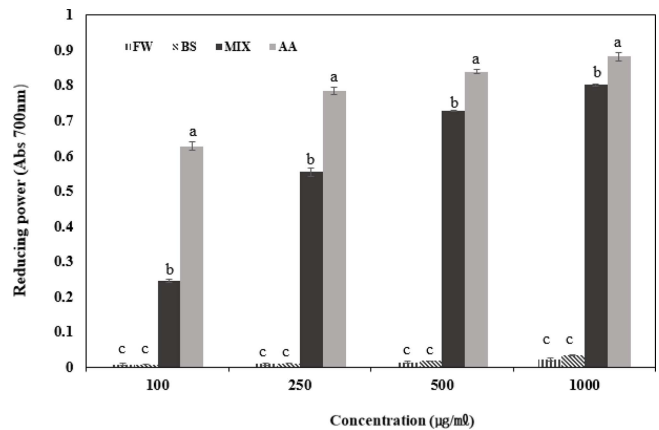


Fig. 1. Reducing power of functional materials from *Hippophae rhamnoides* by different concentrations. FW; water-soluble fruit powder, FF; fat-soluble fruit powder, BS; by-product supercritical extract of fruit, MIX; mixture of leaves and fruit. Mean values ± SD from triplicate separated experiments are shown. *The data were statistically analyzed using Tukey's Honest Significant Difference (HSD), and differences were assessed to be significant at 5% level of probability ($p < 0.05$).

radical 소거능은 Table 2에 나타났다. MIX가 10.27 μg/ml의 RC₅₀ 값으로 가장 높은 radical 소거 활성을 나타냈으며, 그 다음으로 FW > FF > BS 순으로 소거활성이 감소했다. 이 결과는 총 phenol성 화합물 및 flavonoid 함량과 유사한 것으로 DPPH radical 소거활성이 폴리페놀의 함량과 상관관계가 있다는 Dudonné 등 (2009)의 보고와 일치한다. 또한 Kumar 등 (2013)은 비타민나무 잎의 용매별 추출물의 항산화 활성 연구에서 총 phenol성 화합물함량이 높은 추출물일수록 DPPH radical소거능이 증가하는 것을 확인하였으며, 75% ethanol 추출물이 가장 높은 활성을 나타는 것으로 보고하였다.

3. 환원력

환원력은 항산화활성을 나타내는 물질이 ferric-ferricyanide (Fe³⁺)를 ferrous (Fe²⁺)로 전환시키는 전자전달 능력을 측정하는 방법으로 시료에 포함된 총 phenol성 화합물로부터 수소원자를 공여 받음으로써 Fe³⁺의 감소가 일어나며, Fe³⁺에서 Fe²⁺로 환원시키는 강도가 클수록 발색의 정도가 증가하여 높은 흡광도 수치를 나타낸다. (Meir *et al.*, 1995; Yildirim *et al.*, 2001).

비타민나무 4 종 sample의 환원력은 농도가 증가함에 따라 흡광도 값이 증가하였다 (Fig. 1). 전체적으로 항산화제인 ascorbic acid에 비해 낮은 환원력을 보였으나, 비타민나무 4 종 sample 중 잎과 열매의 혼합물인 MIX의 경우 가장 높은 환원력을 나타냈고, FF는 흡광도 값을 얻을 수 없었다.

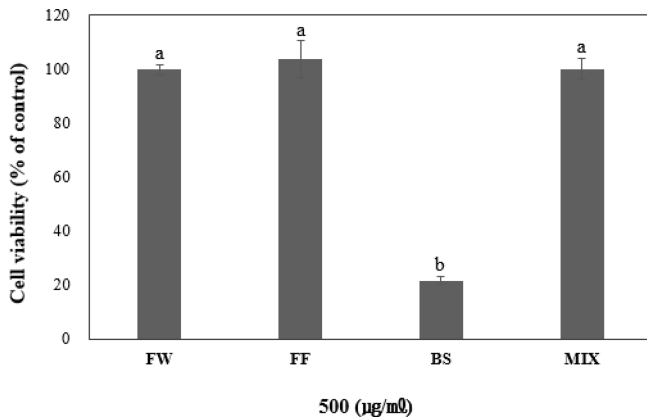


Fig. 2. Effects of functional materials from *Hippophae rhamnoides* on cell viability in RAW264.7 cells. FW; water-soluble fruit powder, FF; fat-soluble fruit powder, BS; by-product supercritical extract of fruit, MIX; mixture of leaves and fruit. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. *The data were statistically analyzed using Tukey's Honest Significant Difference (HSD), and differences were assessed to be significant at 5% level of probability ($p < 0.05$).

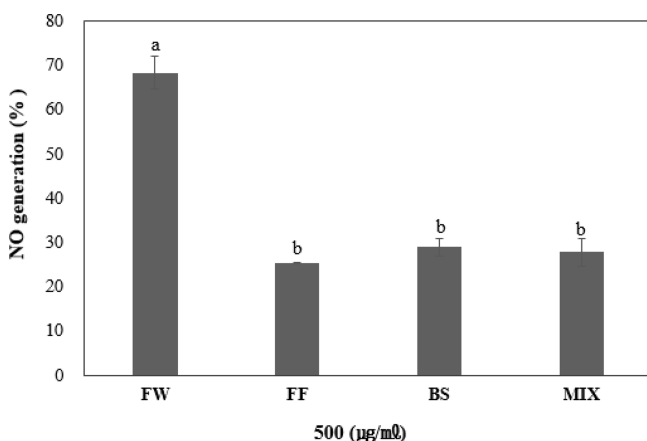


Fig. 3. Effects of functional materials from *Hippophae rhamnoides* on LPS-induced NO production in RAW 264.7 cell. FW; water-soluble fruit powder, FF; fat-soluble fruit powder, BS; by-product supercritical extract of fruit, MIX; mixture of leaves and fruit. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. *The data were statistically analyzed using Tukey's Honest Significant Difference (HSD), and differences were assessed to be significant at 5% level of probability ($p < 0.05$).

4. Nitric oxide (NO) 생성율

MTT 를 이용하여 비타민나무 4 종 sample의 세포 생존율에 대한 효과를 측정하였다. RAW264.7 cell에 500 µg/ml의 농도로 sample을 처리하였을 때, FW, FF, MIX 모두 99% 이상의 세포 생존율을 나타냈으나 BS의 경우 21%의 생존율을 보였다 (Fig. 2). LPS로 유도된 RAW264.7 cell에서 NO 생성 억제에 대한 결과는 Fig. 3에 나타났다.

대식세포는 외부 병원체가 침입했을 경우, 백혈구보다 빠른 반응을 보임으로써 면역, 염증 반응에 중요한 역할을 한다 (Kim *et al.*, 2014). 대식세포인 RAW264.7 cell에 박테리아성 내독소인 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하였을 때, proinflammatory cytokine이 증가 하면서 NO, PGE2 등 염증 매개 물질의 분비가 증가 한다 (Kamata *et al.*, 2002).

이러한 염증 매개 물질들의 과도한 생성은 다양한 만성 염증성질환의 발병에 원인이 되며, 특히 과도한 NO의 생성은 염증반응을 촉진하고 염증매개체의 생합성을 유도함으로써 세포손상, 유전자변이를 일으키고 알츠하이머와 파킨슨병 같은 퇴행성 질환의 원인이 된다 (Hippeli and Elstner, 1999; Park and Yang, 2008).

Fig. 3에서와 같이 500 µg/ml의 농도로 sample을 처리하였을 경우, 모든 sample에서 NO 생성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 FF와 MIX의 경우 세포독성은 나타나지 않았으나, 각각 25.26, 27.75%의 낮은 NO 생성율을 나타내며, RAW264.7 cell 내에서 NO 생성을 억제하는 것을 알 수 있었다. 또한 BS의 경우 28.93%로 낮은 NO 생성율을 보였으나 이는 세포 독성에서 기인된 결과로 설명할 수 있다. 이상의 결과를 통해 LPS로 유도된 RAW264.7 cell에서 FF와 MIX가 NO 생성을 효과적으로 억제함으로써, 염증을 조절할 수 있는 천연소재로 이용이 가능함을 확인할 수 있었다.

5. Elastase 저해활성

Elastase는 동물결합 조직의 불용성 탄성 단백질 elastin을 분해하는 백혈구 과립효소로 진피조직의 그물망 구조결합을 파괴하여 피부의 주름 및 탄력성 감소를 유발한다 (Yoo *et al.*, 2010). 따라서 피부노화의 중요한 원인 중의 하나인 elastase의 활성을 억제함으로써 피부노화를 억제할 수 있다 (de Witt *et al.*, 1981; Um *et al.*, 2017a).

비타민나무 4 종 sample의 elastase 저해 활성을 측정한 결과 모든 sample이 50, 100, 200, 500 µg/ml 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 500 µg/ml의 농도에서 FW가 43.69%의 억제율을 보이며 가장 높은 활성을 나타냈으며, FF가 22.31%로 가장 낮은 elastase 저해활성을 나타냈다.

비타민나무 열매에는 수용성 vitamin인 vitamin C가 약 695 mg/100 g 함유되어 있다고 알려져 있으며 (Christaki, 2012), Yang 등 (2016)은 0.1 mg/ml 농도에서 vitamin C가 65.1%의 elastase 저해율을 나타냈다고 보고하였다. 즉, 수용성 열매 분말인 FW의 elastase 저해 활성은 vitamin C의 활성에서 기인된 것으로 예측할 수 있다.

본 연구에서는 비타민나무 (*Hippophae rhamnoides* L.)를 이용한 화장품 신소재를 개발하기 위해 열매와 잎을 이용한 4 종의 sample을 제조하여 항산화 활성, NO 생성억제, elastase

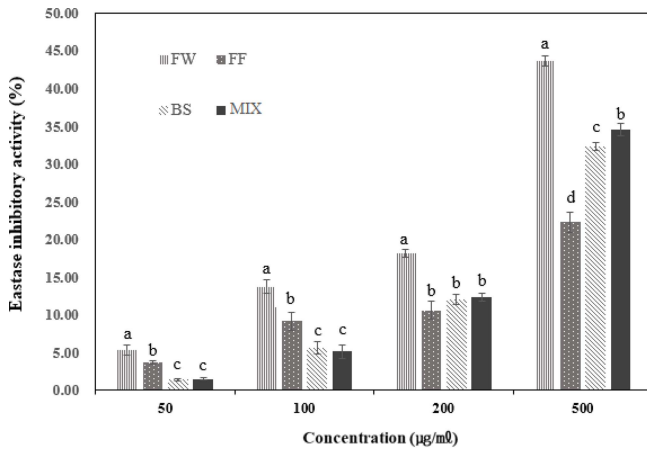


Fig. 4. Inhibitory effects on elastase activity by functional materials from *Hippophae rhamnoides* by different concentrations. FW; water-soluble fruit powder, FF; fat-soluble fruit powder, BS; by-product supercritical extract of fruit, MIX; mixture of leaves and fruit. Mean values $\pm$ SD from triplicate separated experiments are shown. *The data were statistically analyzed using Tukey's Honest Significant Difference (HSD), and differences were assessed to be significant at 5% level of probability ($p < 0.05$).

저해 활성을 측정하였다. 비타민나무열매와 잎을 이용한 4 종 sample의 총 phenol성 화합물과 총 flavonoid 함량은 MIX가 가장 높은 것으로 나타났다. DPPH radical 소거능도 MIX가 가장 높은 활성을 나타냈으며, 환원력측정 결과 모든 sample 이 농도 의존적으로 증가하였고, MIX가 가장 높은 환원력을 보였다. 이러한 결과는 높은 총 phenol성 화합물 및 flavonoid 의 함량에서 기인한 것으로 예상할 수 있다. 또한 LPS로 유도된 RAW264.7 cell에서 MIX와 FF가 500 µg/ml 의 농도에서 NO의 생성을 억제하고, 세포독성도 나타나지 않았다. 이상의 결과로 볼 때, 비타민나무 잎과 열매 혼합물인 MIX는 항산화 및 염증 조절하는 천연소재로 가능성이 있음을 시사한다.

BS의 경우 NO 생성을 억제하였으나 세포생존율이 감소하는 결과를 보임으로써, 향후 연구를 진행할 때 세포독성을 나타내지 않으며 NO 생성 억제효과를 보이는 적정농도의 선정이 요구된다.

비타민나무 착즙액은 vitamins, fatty acids, free amino acids 등 유효성분이 포함되어 있으며, 특히 vitamin C와 carotenoids의 함량이 매우 높은 것으로 보고되었다. Carotenoid의 함량은 종자 (67.5 mg/100 g)에 비해, 과육 (350 mg/100 g)에서 높게 나타나며, vitamin E의 경우 착즙액이 216 mg/100 g으로 종자 (92.7 mg/100 g)보다 높은 함량을 나타냈다 (Zed, 2004). Chemat 등 (2012)은 착즙 부산물의 초음파추출물의 경우 총 carotenoids 함량이 63.84 mg/l, β -carotene의 함량이 18.06 mg/l 이라고 보고하였다.

Elastase 저해활성을 측정한 결과 모든 sample이 농도가 증가함에 따라 억제활성이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 FW의 경우 가장 높은 elastase 억제활성을 나타내, 주름 개선 기능성 소재로 이용 가능성이 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 비타민나무 기능성 소재를 대상으로 항산화, 항염, 주름개선 효과의 관련기전의 연구를 진행한다면, 기능성 화장품 소재로서의 활용 가치가 높아질 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 중소기업청의 2016년도 현장수요형 기술개발사업(과제번호: S2421548)의 지원 및 2017년도 강원대학교 대학회계 학술연구조성비(관리번호: 520170186)의 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn HY, Choe DJ, Kim BK, Lee JH and Cho YS. (2015). Bioactive materials and antioxidant properties of fermented rice-bran extract. *Journal of Life Science*. 25:1014-1020.
- Ann GW, Kang TW, Jeong JH and Jo BK. (2004). Clinical studies on the anti-irritation effects of mung bean(*Phaseolus aureus*) extract in cosmetics. *Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea*. 30:23-28.
- Bart B, Akhlov L, Dunlop D, Jana S and Schroeder WR. (2003). Flavonoid content and composition in leaves and berries of Sea buckthorn(*Hippophae* spp.) of different origin. *Acta Horticulturae*. 626:397-405.
- Bat S and Tannert U. (1993). Sanddornöle: Ein neues lipid für die kosmetik. *Seifen Öle Fette Wachse Journal*. 119:29-31.
- Blois MS. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 181:1199-1200.
- Cannell RJP, Kellam SJ, Owsianka AM and Walker JM. (1988). Results of a large scale screen of microalgae for the production of protease inhibitors. *Planta Medica*. 54:10-14.
- Chemat F, Issartier SP, Loucif L, Elmaataoui M and Mason TJ. (2012). Enrichment of edible oil with Sea buckthorn by-products using ultrasound assisted extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 114:453-460.
- Christaki E. (2012). *Hippophae rhamnoides* L.(Sea buckthorn): A potential source of nutraceuticals. *Food and Public Health*. 2:69-72.
- de Witt DL, Rollins TE, Day JS, Gauger JA and Smith WL. (1981). Orientation of the active site and antigenic determinants of prostaglandin endoperoxide synthase in the endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*. 256:10375-10382.
- Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M and Mérillon JM. (2009). Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:1768-1774.
- Duval B and Shetty K. (2001). The stimulation of phenolics and antioxidant activity in pea(*Pisum sativum*) elicited by genetically

- transformed anise root extract. Journal of Food Biochemistry. 25:361-377.
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS and Tannenbaum SR.** (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N] nitrate in biological fluids. Analytical Biochemistry. 126:131-138.
- Han CK, Kim SS, Choi SY, Park JH and Lee BH.** (2009). Effects of rice added with mulberry leaves and fruit on blood glucose, body fat and serum lipid levels in rats. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 38:1336-1341.
- Hippeli S and Elstner EF.** (1999). Inhibition of biochemical model reactions for inflammatory processes by plant extracts: A review on recent developments. Free Radical Research. 31:81-87.
- Imokawa G.** (2009). A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis: Expression of a deacylase enzyme that cleaves the *N*-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. Journal of Dermatological Science. 55:1-9.
- Jeong HJ, Park JH and Kim MJ.** (2015). Ethanol extract of *Hippophae rhamnoides* L. leaves inhibits adipogenesis through AMP-activated protein kinase(AMPK) activation in 3T3-L1 preadipocytes. Korean Journal of Plant Resources. 28:582-590.
- Jung EJ and Choe JB.** (2014). Study on the bioactive characteristics of *Curcuma longa* extract and curcumin as a cosmetic raw material. Korean Journal of Aesthetic and Cosmetology. 12:425-433.
- Kamata H, Manabe T, Kakuta J, Oka S and Hirata H.** (2002). Multiple redox regulation of the cellular signaling system linked to AP-1 and NF- κ B: Effects of *N*-acetylcysteine and H₂O₂ on the receptor tyrosine kinases, the MAP kinase cascade, and I κ B kinases. Annals of the New York Academy of Sciences. 973:419-422.
- Kim BW, Kim JI, Kim HR and Byun DS.** (2014). Anti-inflammatory effect of an ethyl acetate fraction from *Myagropsis yendoii* on lipopolysaccharides-stimulated RAW264.7 cells. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 47:527-536.
- Kim JS, Yu CY and Kim MJ.** (2010). Pharmacological effect and component of Sea buckthorn(*Hippophae rhamnoides* L.). Journal of Plant Biotechnology. 37:47-56.
- Ko HM, Eom TK, Song SK, Jo GY and Kim JS.** (2017). Tyrosinase and α -glucosidase inhibitory activities and antioxidant effects of extracts from different part of *Hypochaeris radicata*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 25:139-145.
- Kumar SA, Paul AD and Tanveer N.** (2013). Bioactivity guided extraction of Sea buckthorn(*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *turkestanica*) leaves. Journal of Scientific and Industrial Research. 72:307-311.
- Lee YM, Kim IS, Ghosh M, Hong SM, Lee TH, Lee DH and Lim BO.** (2017). Antioxidant activity and NO inhibitory effect of bioconverted medicinal material using germinated green rice and *Hericium erinaceus* mycelium. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 25:305-314.
- Maheshwari DT, Kumar MS, Verma SK, Singh VK and Singh SN.** (2011). Antioxidant and hepatoprotective activities of phenolic rich fraction of Sea buckthorn(*Hippophae rhamnoides* L.) leaves. Food and Chemical Toxicology. 49:2422-2428.
- Meir S, Kanner J, Akiri B and Hadas SP.** (1995). Determination and involvement of aqueous reducing compounds in oxidative defense systems of various senescing leaves. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43:1813-1819.
- Moreno MIN, Isla MI, Sampietro AR and Vattuone MA.** (2000). Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of Ethnopharmacology. 71:109-114.
- Mosmann T.** (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of Immunological Methods. 65:55-63.
- Oyaizu M.** (1986). Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics. 44:307-315.
- Park EY and Yang KS.** (2008). Inhibition of nitric oxide production by the extracts of *Hibiscus manihot*. Yakhak Hoeji. 52:259-263.
- Rahimuddin SA, Khoja SM, Zuhair MM, Howell NK and Brown JE.** (2007). Inhibition of lipid peroxidation in UVA-treated skin fibroblasts by luteolin and its glucosides. European Journal of Lipid Science and Technology. 109:647-655.
- Rahman I, Biswas SK and Kirkham PA.** (2006). Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. Biochemical Pharmacology. 72:1439-1452.
- Singleton VL and Rossi JA.** (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16:144-158.
- Um JN, Min JW, Joo KS and Kang HC.** (2017a). Antioxidant, anti-wrinkle activity and whitening effect of fermented mixture extracts of *Angelica gigas*, *Paeonia Lactiflora*, *Rehmannia chinensis* and *Cnidium officinale*. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 25:152-159.
- Um JN, Min JW, Joo KS and Kang HC.** (2017b). Nitric oxide production and elastase inhibitory activities of extract and its fraction from phellodendri cortex. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 25:22-28.
- Upadhyay NK, Kumar R, Mandotra SK, Meena RN, Siddiqui MS, Sawheny RC and Gupta A.** (2009). Safety and healing efficacy of Sea buckthorn(*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats. Food and Chemical Toxicology. 47:1146-1153.
- Upadhyay NK, Kumar R, Siddiqui MS and Gupta A.** (2011). Mechanism of wound-healing activity of *Hippophae rhamnoides* L. leaf extract in experimental burns. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 659705. <http://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep189> (cited by 2018 March 23).
- Vauzour D, Rodriguez-Mateos A, Corona G, Oruna-Concha MJ and Spencer JPE.** (2010). Polyphenols and human health: Prevention of disease and mechanisms of action. Nutrients. 2:1106-1131.
- Wani TA, Wani SM, Shah AG and Masoodi FA.** (2013). Optimizing conditions for antioxidant extraction from Sea buckthorn leaf(*Hippophae rhamnoides* L.) as herbal tea using response surface methodology(RSM). International Food Research Journal. 20:1677-1681.
- Yang B and Kallio HP.** (2001). Fatty acid composition of lipids in Sea buckthorn(*Hippophae rhamnoides* L.) berries of different origins. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49:1939-1947.

- Yang WT, Kim KS, Kwon YS, Kim DH and Kim DH.** (2016). Whitening and anti-aging effects of *Cistanche deserticola* extract. Journal of Plant Biotechnology. 43:492-499.
- Yang ZG, Wen XF, Li YH, Matsuzaki K and Kitanaka S.** (2013). Inhibitory effects of the constituents of *Hippophae rhamnoides* on 3T3-L1 cell differentiation and nitric oxide production in RAW264.7 cells. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 61:279-285.
- Yildirim A, Mavi A and Kara AA.** (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49:4083-4089.
- Yogendra Kumar MS, Tirpude RJ, Maheshwari DT, Bansal A and Misra K.** (2013). Antioxidant and antimicrobial properties of phenolic rich fraction Sea buckthorn(*Hippophae rhamnoides* L.) leaves *in vitro*. Food Chemistry. 141:3443-3450.
- Yoo JM, Kang YJ, Pyo HB, Choung ES, Park SY, Choi JH, Han GJ, Lee CH and Kim TJ.** (2010). Anti-wrinkle effects of Korean rice wine cake on human fibroblast. Journal of Life Science. 20:1838-1843.
- Zed A.** (2004). Chemical and nutritional constituents of Sea buckthorn juice. Pakistan Journal of Nutrition 3:99-106.