

## 비타민나무 잎 추출물의 항산화 및 타이로시네이즈 저해활성

김정은·채교영·박수남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 자연생명과학대학 정밀화학학과  
나노바이오화장품연구실, 화장품종합기술연구소  
(2011년 9월 9일 접수, 2011년 9월 14일 수정, 2011년 9월 15일 채택)

### Antioxidative and Inhibitory Activities on Tyrosinase of *Hippophae rhamnoides* Leaf Extracts

Jung Eun Kim, Kyo Young Chae, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, and Cosmetic R&D Center,  
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongreung-ro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea  
(Received September 9, 2011; Revised September 14, 2011; Accepted September 15, 2011)

**요약:** 본 연구에서는 비타민나무 잎 추출물의 항산화 활성과 tyrosinase 및 elastase 저해 활성에 관한 연구를 실시하였다. 비타민나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획은 우수한 free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성(FSC<sub>50</sub> = 4.68 µg/mL)을 나타내었다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에서 생성된 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 아글리콘 분획의 총항산화능(OSC<sub>50</sub>)은 0.19 µg/mL이었다. 비타민나무 잎 추출물에 대하여 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 사람 적혈구의 광용혈 실험 결과 아글리콘 분획은 10 µg/mL의 낮은 농도에서 τ<sub>50</sub>이 133.3 min으로 매우 큰 세포 보호 효과를 나타내었다. 비타민나무 추출물 아글리콘 분획의 tyrosinase 저해활성(IC<sub>50</sub>)은 54.86 µg/mL로, 미백제로 알려진 arbutin보다도 큰 활성을 나타내었다. 이상의 결과들은 비타민나무 잎 추출물이 <sup>1</sup>O<sub>2</sub> 혹은 다른 ROS를 소광시키거나 소거함으로써, 그리고 ROS에 대하여 세포막을 보호함으로써, 생체계 특히 태양 자외선에 노출된 피부에서 항산화제로서 작용할 수 있음을 가리키며, 화장품 소재로서의 응용 가능성이 있음을 확인하였다.

**Abstract:** In this study, the antioxidative and inhibitory effects on tyrosinase and elastase of *Hippophae rhamnoides* (*H. rhamnoides*) leaf extracts were investigated. The ethyl acetate fraction of *H. rhamnoides* extracts showed more effective free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (FSC<sub>50</sub> = 4.68 µg/mL). Reactive oxygen species (ROS) scavenging activity (OSC<sub>50</sub>) of the aglycone fraction in the luminol-dependent Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system was 0.19 µg/mL. The aglycone fraction exhibited more prominent cellular protective effects (τ<sub>50</sub>, 133.3 min at 10 µg/mL) in the <sup>1</sup>O<sub>2</sub>-induced photohemolysis of human erythrocytes. The inhibitory effect (IC<sub>50</sub>) of the aglycone fraction on tyrosinase was 54.86 µg/mL, and more effective than arbutin known as whitening agent. These results indicate that fractions of *Hippophae rhamnoides* extract can be used as antioxidants in biological system, particularly skin exposed to UV radiation by quenching and/or scavenging <sup>1</sup>O<sub>2</sub> and other ROS, and protecting cellular membranes against ROS.

**Keywords:** *Hippophae rhamnoides*, antioxidant, tyrosinase, elastase, cellular protective effect

## 1. 서 론

지구 표면에 도달하는 태양광선 중 56%가 적외선(780

~ 5,000 nm)이고, 39%는 가시광선(400 ~ 780 nm), 5%는 자외선(280 ~ 400 nm)으로 알려져 있다. 이 자외선 영역은 또한 UVB (280 ~ 320 nm) 및 UVA (320 ~ 400 nm)로 나뉘어진다. UVB와 UVA는 피부암을 포함하는 다양한 피부 질환을 유발하기도 한다[1,2]. 자외

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

선은 피부에 존재하는 자외선 흡수 물질(DNA, 단백질, 멜라닌 및 포르피린 등)에 의해 흡수되며[3], 이로 인해 피부 세포 또는 조직을 손상시키는 광화학적 반응들과 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 경유한 이차적인 반응들에 의해 홍반, 부종, 과색소침착, 일광화상 세포 증가, 면역억제, 광노화, 광발암 등을 유발한다[4, 5]. 태양광선에 노출된 피부에서 자외선의 영향으로 생성되는 활성산소종은 반응성이 매우 큰  $^1O_2$  및  $\cdot OH$ 를 비롯하여  $O_2^{\cdot -}$ ,  $H_2O_2$ ,  $ROO\cdot$ ,  $RO\cdot$ ,  $ROOH$  및  $HOCl$  등을 포함한다. 이러한 활성산소종으로 유도된 피부의 광산화적 손상 위험은 실질적으로 증가하고 있다. 이들 활성산소 중에서  $^1O_2$  및  $\cdot OH$ 은 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질 및 DNA 산화, 결합조직 성분(콜라겐, 히아루론산 등)의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합에 의한 주름 생성, 멜라닌 생성 과정 등에 참여하여 피부노화를 가속화시킨다[6,7]. 사람 피부 세포에 있어서 지질, 단백질 및 DNA 등 생체 구성 성분의 산화 손상뿐만 아니라 UVA (320 ~ 380 nm) 의존성 세포사멸이나 유전자 활성화에도 활성산소종이 포함되는 것으로 기술되고 있다. 콜라겐은 피부 진피층의 매트릭스를 이루는 성분 중 가장 많은 성분이기 때문에 콜라겐의 생합성과 분해의 조절은 피부노화 과정 중 핵심이 되고 있다. 사람 피부 섬유아세포에서  $^1O_2$ 를 비롯한 ROS가 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 유발시키며, UVA로 유도된 MMP-1 (collagenase)의 합성을  $^1O_2$ 이 매개할 수 있다는 보고도 있다[8-12]. 이는 광노화를 방어하고 자외선으로부터 보호제를 개발하는데 있어서  $^1O_2$ 을 비롯한 ROS의 중요한 역할을 시사하는 것이다.  $^1O_2$ 을 비롯한 ROS가 광노화와 연관되기 때문에 항산화제에 의한 자외선 노출 후 ROS의 감소는 광노화를 예방하고 최소화시키기 위한 촉망되는 전략임은 분명하다[13-17].

피부에는 활성산소종에 대하여 세포 및 조직을 보호하기 위해 superoxide dismutase (SOD), 카탈라아제, 글루타치온퍼옥시다제 등의 항산화 효소와  $\alpha$ -tocopherol, ascorbic acid 등의 비효소적 항산화들로 이루어진 피부 항산화 방어망이 구축되어 있다. 그러나 지속적인 자외선에 의한 노출로 과잉의 활성산소종이 생성되고 이들 활성산소종은 실질적으로 피부의 효소적, 그리고 비효소적 항산화 방어를 위태롭게 한다. 따라서 피부 항산화 방어망 구축을 위해 적합한 항산화제의 개발은 피부노화를 억제하고 지연시키는 데 매우 필요하다고 생각된다[6,7].

비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.)는 중국, 몽골 등이 원산지인 보리수과(Elaeagnaceae)에 속하는 낙엽성 관목으로 러시아, 유럽, 캐나다, 중국, 몽골 등에 폭넓게 자생하고 있다. 비타민 나무의 잎과 열매에는 비타민과 아미노산 등이 포함 되어있으며, 면역강화, 항염작용 등의 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 열매에는 폴리페놀류, 토코페롤, 카로티노이드, 플라보노이드 등이 함유되어 있고, 잎에는 quercetin, gallic acid, tannin 등의 생리활성물질이 함유되어 있는 것으로 알려졌다[18-21]. 비타민나무의 잎과 열매의 알코올 추출물은 쥐의 대식세포에서 크롬으로 유도된 자유 라디칼 생성과 세포사멸을 억제하고, DNA 분열을 감소시키는 효과가 있고, 상처 부위의 콜라겐 합성과 안정화를 증가시킴으로써 피부 상처 치료 효과가 있는 것으로 보고되고 있다[22].

그러나 피부 광노화를 반영하는  $^1O_2$ 을 비롯한 ROS로 유도된 세포 손상에 있어서의 세포 보호효과나 생체 시스템의 암반응으로 진행되는 활성산소종 생성계인  $Fe^{3+}$ -EDTA/ $H_2O_2$ 계에 의해 생성된 각종 ROS ( $O_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot OH$ ,  $H_2O_2$  등)에 대한 활성산소 소거활성(총항산화능)에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없다. 따라서 저자들은 비타민나무 잎의 각종 추출물 및 분획에 대하여  $^1O_2$ 으로 유도된 세포손상에 대한 보호작용, 총 항산화능 및 free radical 소거활성과, 그리고 tyrosinase 및 elastase의 저해활성에 대하여 조사하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 적혈구 광용혈에 사용한 Spectronic 20D는 Milton Roy Co. (USA) 제품, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT를, pH meter는 Hanna (Korea)사 제품을 사용하였다.

(+)- $\alpha$ -Tocopherol, L-ascorbic acid, arbutin, EDTA, luminol, 광증감제로 사용된 rose-bengal, free radical 소거 활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical은 Sigma (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을,  $H_2O_2$ 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 완충용액제조에 사용된  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ ,  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ , NaCl, 그리고 에탄올, 메탄올, 에틸아세테이트, 헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 기질로 사용된 L-tyrosine과 효소로 사용된

tyrosinase (9.3 mg solid, 5,370 units/mg solid)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 실험에 사용한 비타민나무 잎은 2010년 강원도 춘천시 동면에서 채배되고 건조시킨 것을 강원비타민나무영농조합으로부터 제공받아 사용하였다.

## 2.2. 비타민나무 잎의 분획 및 추출

건조된 비타민나무 잎 100 g을 잘게 자른 후, 50 % 에탄올 2 L를 이용하여 일주일 동안 침적시킨 후 여과하였다. 이 중 50 % 에탄올 추출물은 감압·농축한 후 헥산을 이용하여 지방, 엽록소 등 비극성 성분을 제거하고 에틸아세테이트로 추출한 분획을 다시 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 에틸아세테이트 분획에서 얻은 파우더의 일부는 산 가수분해 반응을 이용해서 당을 제거시킨 후, 아글리콘(aglycone) 파우더를 얻어 실험에 사용하였다. 아글리콘 분획의 제조 방법은 에틸아세테이트 가용분 일정량에 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 및 아세톤 용액을 넣고, 4 h 동안 중탕 가열하면서 환류·냉각시켰다. 환류 시킨 용액을 5 % KOH-MeOH 용액으로 중화 적정하고 증류수로 세척하여 산, 염기 및 당 등을 모두 제거한 후에 다시 에틸아세테이트로 성분을 추출하여 이를 감압·농축한 후 실험에 사용하였다.

## 2.3. 비타민나무 잎 추출물의 항산화 효과 측정

### 2.3.1. DPPH 법을 이용한 Free Radical 소거 활성

Free radical은 노화, 특히 피부 노화의 원인 물질로 간주되고 있다. 비타민나무 잎 추출물에 대한 free radical 소거활성 측정은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 이용하였다. 실험방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후, spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군으로 하여 다음 식에 의해 DPPH의 활성 저해율을 구하였다. 소거활성은 DPPH의 농도가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(free radical scavenging activity, FSC<sub>50</sub>, µg/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[ \frac{A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}}}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

### 2.3.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에 의해 각종 ROS (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, •OH, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등)가 생성되고, 이때 철이나 구리와 같은 전이금속은 반응성이 가장 큰 hydroxyl radical (•OH)을 생성시키는 촉매로 작용한다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있다. 이 총 항산화능에는 활성산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용도 포함될 수 있다. Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS간의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 알 수 있다.

화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL을 넣고 다양한 농도의 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 µL 및 5 mM FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 10 µL를 가한 후 35 mM luminol 80 µL를 넣고 흔들어 섞어 주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 µL를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군은 시료용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험은 시료군과 조건이 동일하나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O를 첨가하지 않은 것으로 하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 저해율은 다음 식으로 구하였고, 이를 이용해서 활성산소 소거활성의 크기는 화학발광의 세기가 50 % 감소되는데 필요한 시료의 농도(reactive oxygen species scavenging activity, OSC<sub>50</sub>, µg/mL)로서 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

## 2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포 보호 효과 측정

### 2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀로부터 얻었다. 채혈 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣은 후, 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 적혈구와 혈장을 분리하고, 분리한 적혈구는 0.9 % saline phosphate buffer로 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 3회 반복하여 세척, 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 광용혈 방법은 이미 확립된 방법에 따라 수행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D.가 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5 × 10<sup>7</sup> cell/mL이었다.

#### 2.4.2. 비타민나무 잎 추출물의 광용혈 억제 효과

$1.5 \times 10^7$  cells/mL 적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후, 추출물 용액을 첨가 하였다. 추출물을 농도별로 각각 50  $\mu$ L씩 첨가하였다. 암소에서 30 min간 pre-incubation시킨 후, 광증감제로 rose-bengal (12  $\mu$ M) 0.5 mL를 가하고 파라필름으로 입구를 봉한 후 15 min 동안 광조사하였다.

광용혈에 필요한 광조사는 내부를 검게 칠한 50 cm  $\times$  20 cm  $\times$  25 cm 크기의 상자 안에 20 W 형광등을 장치하고, 형광등으로부터 5 cm 거리에 적혈구 현탁액이 담긴 파이렉스 시험관을 형광등과 평행이 되도록 배열한 후 15 min 간 광을 조사하였다. 광조사가 끝난 후 암반응 (post-incubation) 시간에 따른 적혈구의 파괴정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(% transmittance)로부터 구하였다. 이 과정에서 적혈구 현탁액 투광도의 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례한다. 모든 실험은 20  $^{\circ}$ C 항온실에서 행하였다. 비타민나무 잎 추출물이 광용혈에 미치는 효과는 암반응 시간과 용혈 정도로 구성된 그래프로부터 적혈구의 50 %가 용혈되는 시간인  $\tau_{50}$ 을 구하여 비교하였다.

대조군은  $\tau_{50}$ 이 31 min으로 오차 범위  $\pm 1$  min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안했을 경우와 rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

#### 2.5. Tyrosinase 저해활성

멜라닌 생성과정에서 타이로시네이스(tyrosinase)는 L-tyrosine에서 3,4-dihydroxy-L-phenyl ananine (DOPA)를 걸쳐 DOPA-quinone으로 산화되는 과정의 전체 반응 속도를 결정하는 핵심효소로 작용한다. 따라서 타이로시네이스의 저해활성은 미백활성을 측정하는 데 매우 유용하다. L-Tyrosine (0.3 mg/mL) 1.0 mL, potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 6.8) 1.85 mL, 시료 0.05 mL를 혼합한 후 37  $^{\circ}$ C에서 10 min동안 항온 배양한 다음, 반응혼합물을 얼음 수조에 넣어 반응을 종결시키고, 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 타이로시네이스 저해활성은 0.1 mL 타이로시네이스의 활성을 50 % 감소시키는 데 필요한 시료의 농도(IC<sub>50</sub>,  $\mu$ g/mL)로 표기하였다.

#### 2.6. Elastase 저해활성

피부노화, 특히 주름생성에는 활성산소에 의한 작용과

matrix metalloproteinases (MMPs : collagenase, elastase 등)에 의한 세포외 매트릭스의 파괴가 주원인으로 간주되고 있다. 따라서 MMPs의 저해활성 측정은 피부 노화 억제 평가에 대단히 중요하다.

Tris HCL (pH 8.0) 0.13 M에 엘라스테이스(elastase) 기질인 N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide 1.0 mM이 용해된 buffer 92.5  $\mu$ L를 첨가하여 25  $^{\circ}$ C에서 10 min동안 pre-incubation 한 뒤 여기에 엘라스테이스 용액을 100  $\mu$ L첨가(최종농도 0.0025 U/mL)하여 25  $^{\circ}$ C 수욕상에서 10 min 동안 항온배양한 후 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료대신 시료용액으로 사용된 용매를 100  $\mu$ L 첨가하였다. Blank는 N-succinyl-(Ala)<sub>3</sub>-p-nitroanilide가 용해된 완충용액 대신 0.12 M Tris HCl buffer 1,300  $\mu$ L를 첨가하였으며, 농도는 실험군과 동일하였다.

#### 2.7. 통계 처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석은 5 % 유의수준에서 Student's *t*-test를 행하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 비타민나무 잎 추출물의 수득률

건조한 비타민나무 잎 100 g을 잘게 잘라 50 % 에탄올 2 L에 일주일 동안 침적시킨 후 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 이때 수득률은 17.58 %이었다. 에틸아세테이트 분획은 50 % 에탄올로 추출한 것을 1차 헥산으로 비극성물질을 제거한 뒤 에틸아세테이트 분획을 얻었으며, 이때 수득률이 약 2.87 %이었다. 이 에틸아세테이트 분획을 산 가수분해시켜서 당을 제거한 후 아글리콘 분획을 얻었고, 이때 수득률은 0.26 %로 나타났다. 에틸아세테이트 분획은 플라보노이드 배당체가 주 성분으로 함유되어 있고, 아글리콘 분획에는 플라보노이드 배당체가 관찰되지 않았다. 본 연구에서는 50 % 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획, 아글리콘 분획을 실험에 사용하였다.

#### 3.2. 비타민나무 잎 추출물의 항산화 활성

##### 3.2.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

DPPH는 화합물 내 질소 중심의 radical로 이 free radical은 실온에서도 안정화된 구조로 존재한다. 따라서 시료와 반응 후 DPPH의 흡광도 감소는 free radical의 소거 반응의 결과이며, 이는 생체막 등에서 일어나는 지질과산화 반응의 억제를 반영하는 항산화능을 나타내준

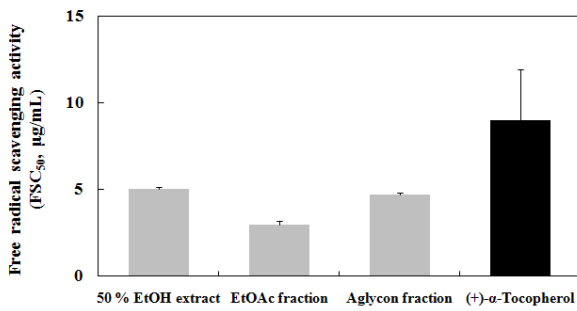


Figure 1. Free radical scavenging activities of extract/fractions of *Hippophae rhamnoides* and (+)-α-tocopherol.

다[15].

비타민나무 잎 추출물과 비교물질인 (+)-α-tocopherol의 free radical 소거활성(FSC<sub>50</sub>) 측정 결과는 Figure 1과 같다. 비타민나무 잎 추출물은 50 % 에탄올 추출물인 경우 FSC<sub>50</sub>이 5.02 µg/mL, 에틸아세테이트 분획은 2.95 µg/mL, 아글리콘 분획은 4.68 µg/mL를 나타내었다. 비타민나무 잎 추출물 중 특히 에틸아세테이트 분획에서 free radical 소거활성이 큰 것으로 나타났고, 이들은 모두 비교물질로 사용된 (+)-α-tocopherol 보다도 더 큰 라디칼 소거활성을 보여주고 있다.

3.2.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>계에 있어서 활성산소 소거 활성(총 항산화능)

Luminol은 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 계에서 생성된 ROS에 의해 산화되어 들뜬 상태의 아미노프탈산이 된 후 발광(420 ~ 450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. Figure 2에서 보는 바와 같이 비타민나무 잎 추출물의 활성산소 소거 활성(총항산화능, OSC<sub>50</sub>)은 50 % 에탄올 추출물인 경우 OSC<sub>50</sub>이 0.51 µg/mL, 에틸아세테이트 분획은 0.33 µg/mL, 아글리콘 분획은 0.19 µg/mL를 나타내었다. 비타민나무 잎의 모든 분획은 비교물질로 사용된 L-ascorbic acid (OSC<sub>50</sub> = 1.5 µg/mL)보다도 3배 이상의 큰 활성을 보였다.

3.3. <sup>1</sup>O<sub>2</sub>로 유도된 사람 적혈구의 파괴에 대한 세포 보호 효과

활성산소에 대한 비타민나무 잎 추출물의 세포 보호 효과는 rose-bengal 존재 하에서 사람 적혈구 현탁액에 15 min 광 조사 후 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>로 유도된 적혈구의 용혈정도를 암반응 시간에 따라 측정함으로써 구하였다. 대조군의 경우 적혈구 세포가 50 % 용혈되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)은 약 31 min으로 나타났다. 비타민나무 잎 추출물의 활성

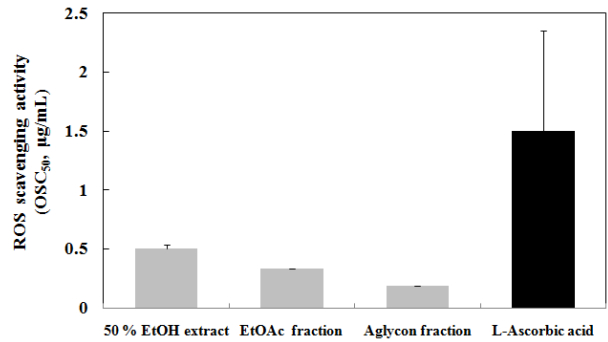


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activities of *Hippophae rhamnoides* extracts and reference in Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system by luminol-dependent chemiluminescence assay.

Table 1. Cellular Protective Effects of Extract/Fraction from *Hippophae rhamnoides* and Reference Compound on the Rose-Bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

Concentration, µg/mL	τ <sub>50</sub> (half time of hemolysis*)			
	5	10	25	50
<i>Hippophae rhamnoides</i> extract (50 % EtOH)	50.3 ± 1.05	66.0 ± 0.83	140.9 ± 1.35	226.8 ± 2.70
<i>Hippophae rhamnoides</i> extract (EtOAc fraction)	49.1 ± 0.56	60.6 ± 1.95	92.2 ± 1.65	114.8 ± 1.70
Deglycosylated fraction from <i>Hippophae rhamnoides</i> extract (Aglycone fraction)	67.0 ± 0.65	133.3 ± 0.95	136.2 ± 2.20	110.9 ± 1.10
(+)-α-Tocopherol	-	38.00 ± 1.80	-	74.33 ± 6.35

\* Control. τ<sub>50</sub> = 31 ± 1.0 min

산소에 의한 세포손상에 있어서 보호 효과를 측정할 결과가 Table 1에 나와 있다.

적혈구 세포가 50 % 파괴되는데 걸리는 시간(τ<sub>50</sub>)은 세포 보호 활성이 클수록 크게 나타난다. 비타민나무 잎의 50 % 에탄올 추출물은 5, 10, 25, 50 µg/mL의 농도에서 농도 의존적(τ<sub>50</sub>이 각각 50.3, 66.0, 140.9, 226.8 min)으로 세포 파괴를 억제하였다. 에탄올 추출물에 있어서 활성산소에 대한 세포막 보호효과는 지용성 항산화제이자 지질과산화반응의 라디칼 연쇄반응에서 차단제로 알려진 (+)-α-토코페롤의 세포 보호 효과보다도 훨씬 큼을 알 수 있다. 에틸아세테이트 분획의 세포 보호 활성은 5 ~ 50 µg/mL의 농도 범위에서 에탄올 추출물보다

낮게 나타났으나( $\tau_{50}$ 이 각각 49.1, 60.6, 92.2, 114.8 min), 여전히 (+)- $\alpha$ -토코페롤보다는 큰 세포 보호활성을 나타내었다. 에탄올 추출물보다 낮은 보호효과는 아마도 추출용매에 따른 각 분획에 함유된 성분들의 차이에 기인된 것으로 세포막에의 상호작용의 차이로 나타난 결과로 사료된다. 아글리콘 분획의 경우는 5 ~ 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위에서  $\tau_{50}$ 이 각각 67.0, 133.3, 136.2, 110.9 min으로 5  $\mu\text{g/mL}$ 와 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 에탄올 추출물이나 에틸아세테이트 분획보다도 큰 세포보호 활성이 보여주었다. 하지만 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서는 에틸아세테이트 분획과 비슷한 보호 활성을 나타냈으나 에탄올 추출물보다는 낮은 활성을 나타내었다. 아글리콘의 농도가 클 때 아글리콘 성분들이 세포막에 대한 교란작용을 나타내는지는 더 연구가 필요하다고 생각된다. (+)- $\alpha$ -Tocopherol은 10, 50  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서  $\tau_{50}$ 이 각각 38.0, 74.3 min으로 나타났고, 세포막의 지질성분과 유사하여 세포막에 침투가 용이해 세포의 용혈을 억제한 것으로 알 수 있다. 비타민나무 잎 추출물/분획의 활성산소에 대한 세포 보호 활성은 비교물질인 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다도 월등함을 알 수 있다.

### 3.4. Tyrosinase 저해활성

멜라닌 생성에 관계된 핵심 효소는 타이로시네이스(tyrosinase)이다. 이 효소는 타이로신(tyrosine)으로부터 시작되는 멜라닌 생합성 과정 중, 타이로신에서 DOPA, DOPA에서 DOPA quinone, 그리고 DHI로부터 eumelanin으로의 전환을 촉매하는데 관여한다. 타이로시네이스의 활성억제 작용을 통해 미백활성을 측정할 수 있다.

비타민나무 잎 추출물 중 에틸아세테이트 분획으로부터 당을 제거하여 얻은 아글리콘 분획은 타이로시네이스 저해활성( $\text{IC}_{50}$ )이 54.86  $\mu\text{g/mL}$ , 에틸아세테이트 분획은 108.5  $\mu\text{g/mL}$ 로 아글리콘 분획이 에틸아세테이트 분획보다 훨씬 큰 저해활성을 보였다. 하지만 비타민나무 잎의 50% 에탄올 추출물은 타이로시네이스 저해활성이 크게 나타나지 않았다. 비교물질로는 기능성 화장품의 미백 원료로써 잘 알려진 arbutin의 타이로시네이스 저해활성( $\text{IC}_{50} = 226.88 \mu\text{g/mL}$ )을 측정하였으며, 비타민나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 타이로시네이스 저해활성이 매우 뛰어남을 알 수 있었다(Figure 3). 아글리콘 분획의 경우 에틸아세테이트 분획보다 피부 침투가 더 용이할 것으로 미루어 보아 이를 미백 화장품에 응용할 경우, 우수한 효과를 나타낼 것으로 사료된다.

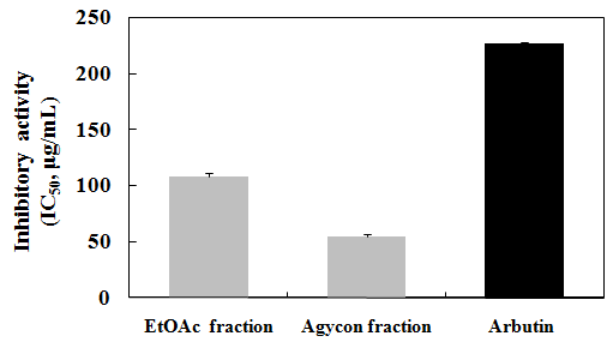


Figure 3. The inhibitory effects of extract/fractions obtained from *Hippophae rhamnoides* and reference compound on tyrosinase.

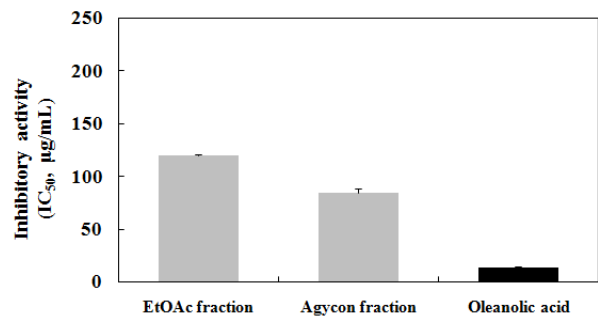


Figure 4. The inhibitory effects of extract/fractions obtained from *Hippophae rhamnoides* and reference compound on elastase.

### 3.5. Elastase 저해활성

자외선 및 활성산소 등에 의해 유발되는 피부 진피층에 존재하는 matrix-metalloproteinases (MMPs)는 피부노화, 특히 주름생성과 밀접한 관계가 있다. MMPs를 이루는 주요 성분으로는 콜라게네이스(collagenase), 젤라티네이스(gelatinase) 및 엘라스테이스 등이 있으며 피부의 탄력감소 및 주름생성에 있어서 엘라스테이스의 활성감소는 매우 중요하다.

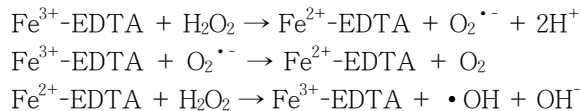
비타민나무 잎 추출물의 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획의 엘라스테이스 저해활성( $\text{IC}_{50}$ )은 각각 120.3, 84.33  $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 50% 에탄올 추출물의 경우 저해활성을 나타내지 않았다. 비교물질로 사용된 oleanolic acid의 저해활성( $\text{IC}_{50} = 13.7$ )과 비교해 보았을 때, 비타민나무 잎 추출물의 저해활성이 높지는 않지만, 피부노화에 관계되는 다른 메커니즘에 대한 연구가 추가적으로 진행될 경우 항노화 기능성 소재로서 가능성이 있다고 생각되어진다(Figure 4).

#### 4. 고 찰

자외선 노출 후 활성산소종의 생성은 생체 내 광증감제 분자에 의한 자외선의 흡수로 시작된다. 광증감반응은 주 생성물인  $^1\text{O}_2$ 을 비롯하여  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\cdot\text{OH}$  등을 포함하는 활성산소종을 생성시킨다. SOD는  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 을  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 전환시킨다.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 모든 세포막들을 쉽게 통과할 수 있다. 그러나, 이들은 반응성이 약하며 직접적으로 조직 손상에 참여하는 경우는 드물다. 따라서,  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 은  $\cdot\text{OH}$ 과 같은 보다 반응성이 큰 라디칼종의 생성에 참여한다. 다시 말해,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 은 Fe(III)와 Cu(II)를 환원시킬 수 있고, 환원된 Fe(II)와 Cu(I)는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 환원시켜서 결과적으로는  $\cdot\text{OH}$ 을 생성시킨다. 특히 태양 자외선에의 피부를 노출시키면 피부에 있어서 비헴 철 수준이 증가된다. 따라서 Fenton 반응에 의해  $\cdot\text{OH}$ 이 생성될 수 있다.

$^1\text{O}_2$ 과  $\cdot\text{OH}$ 은 피부 광손상에 있어서 중요한 역할을 하고 있다. 이들은 피부 항산화제 파괴, 지질 과산화반응의 개시, 단백질 산화, DNA 산화, 결합조직 성분인 콜라겐, 히아루론산 등의 절단 및 비정상적인 교차 결합에 의한 주름 생성, 멜라닌 생성 과정의 촉진 등에 참여하여 피부노화를 가속화시킨다.

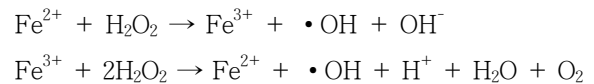
저자들이 활성산소 소거활성(총항산화능) 측정에 이용한 활성산소 생성 시스템인  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  계의 반응 과정은 다음과 같다.



상기의 반응에서와 같이  $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA/ $\text{H}_2\text{O}_2$  계에 존재하는 활성산소종은  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$  및  $\cdot\text{OH}$ 이 존재하게 된다. 따라서 이 계에서 측정된 활성산소 소거활성은 다양한 활성산소의 소거작용과 철이온과의 킬레이팅 작용에 의한 활성산소 생성 억제 작용까지 포함되기 때문에 총항산화능으로 표현될 수 있다. 비타민나무 잎 추출물, 즉 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 모두 비교 물질인 강력한 수용성 항산화제인 비타민 C인 ascorbic acid보다도 훨씬 큰 총항산화능을 보여주었다(Figure 2). 따라서 이들 추출물들은 모두 수용성 비타민 C를 대신하여 화장품에 응용 가능성이 높음을 시사한다. 앞으로 각 추출물 또는 분획들의 이들 작용에 대한 성분 규명이 필요하다고 사료된다.

적혈구의 주요한 역할은 산소를 폐로부터 몸 전체에

퍼져있는 다양한 세포들에 운반하는 일을 담당한다. 따라서 적혈구는 지속적으로 산소와 접하고 있고 산소로부터 유도된 활성산소(산소라디칼)에 노출되어 있어 산화적 손상을 받기 쉽다. 특히 적혈구에 존재하는  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ 의 작용으로 Fenton 반응이 일어나  $\cdot\text{OH}$ 와 같은 강력한 활성산소가 다음의 반응에서와 같이 생성될 수 있다.



적혈구에는 SOD나 catalase와 같은 항산화 효소나 토코페롤과 같은 비효소적 항산화제가 비교적 풍부한 것으로 알려져 있다. 하지만 계속된 과잉의 활성산소에 노출되면 항산화효소 또는 비효소적 항산화제는 파괴되고 이어서 세포막이 파괴되어 적혈구는 용혈되는 과정을 통해 파괴된다.

적혈구 광용혈 실험은 바로 광노화의 모델로 적합한 점이 많다. 이 실험에서는 광증감 물질로서 로즈-벵갈 또는 생체 내 증감물질로 작용하는 포르피린을 사용하여 자외선 조사로  $^1\text{O}_2$ 을 발생시킨다. 매우 약한 빛으로도  $^1\text{O}_2$ 을 발생시킬 수 있으며, 이 때 광조사 시간은 적혈구 세포에 있어서 자동산화반응을 개시시킬 정도면 충분하다. 광조사로 생성된  $^1\text{O}_2$ 은 세포의 여러 성분들에 대하여 자동산화반응을 개시시킨다. 이들 반응으로는 적혈구 세포막의 지질 과산화반응을 일으키고, 막단백질의 산화, 구조 단백질의 절단, 불포화 지방산의 손실, 막 투과성의 변질, 막과 관련된 효소에 대한 영향, 이온 전달의 변화, 지질 히드로과산화물로부터의 세포 독성 대사 산물의 생성 등을 포함한다. 이러한 반응들에는  $\cdot\text{OH}$ 도 참여한다. 광증감 반응으로 또는 자동산화반응 과정 중에 생성된  $\text{O}_2^{\cdot-}$ 은 SOD에 의해  $\text{H}_2\text{O}_2$ 로 된다. 특히 적혈구는 SOD 등의 항산화효소 수준이 다른 조직의 세포에 비해 높다.  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 수명이 길고 또한 막을 가로질러 세포 안으로 들어갈 수 있다. 이 과산화 수소는 헤모글로빈의 산화반응으로부터 방출된 철이온과의 Fenton 반응으로  $\cdot\text{OH}$ 을 생성시킨다. 또한 지질 과산화 반응의 산물인 히드로과산화물은 헴철과 반응하여 반응성이 큰 2차 라디칼인 알콕실 라디칼, 과산화 라디칼 혹은 히드록실 라디칼을 생성시킨다. 이 라디칼들은 적혈구 또 다른 구성 성분들의 자동산화반응을 개시시키고 이어서 적혈구는 파괴 과정이 진행된다.

적혈구의 광용혈 실험에서 비타민나무 잎의 50 % 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획은 5 ~ 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의

농도에서 농도 의존적으로 세포 파괴를 억제하였다. 이 두 가지 추출물과 분획은 모두 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -토코페롤보다는 큰 세포 보호활성을 나타내었다. 한편 아글리콘 분획의 경우는 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 에탄올 추출물이나 에틸아세테이트 분획보다도 훨씬 큰 세포보호 활성이 보여주었다. 아마도 아글리콘은 당이 제거된 구조로 지용성이 커져 낮은 농도에서도 세포막에로의 침투가 용이하여 세포막 불포화지질의 자동산화반응을 효율적으로 억제함으로써 세포막을 보호하는 효과를 나타낸 것으로 사료된다. 비타민 나무 추출물, 에틸아세테이트 분획 및 아글리콘 분획은 모두  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 적혈구 광용혈을 억제하였다. 이들 세포 보호 작용은  $^1\text{O}_2$ 의 소광, 그리고 상기의 반응식에서와 같이 이차적으로 암반응에서 생성된  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ,  $\cdot\text{OH}$  등의 활성산소의 소거작용, 철이온과의 킬레이팅에 의한 활성산소의 생성 억제, 항산화 성분의 세포막으로의 침투 및 라디칼 연쇄반응의 차단, 세포막의 안정화 등 다양한 요인들이 복합적으로 일어난 결과라고 사료된다. 이러한 모든 작용에 있어서 비타민나무 추출물/분획은 활성산소에 대한 세포 보호 활성에 있어서 비교물질인 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다도 월등함을 알 수 있었다.

## 5. 결 론

1) 비타민나무 잎 추출물의 수득률은 50 % 에탄올 추출물이 17.57 %, 에틸아세테이트 분획이 2.87 %, 에틸아세테이트 분획에서 당을 제거시킨 아글리콘 분획이 0.26 % 이었다.

2) 비타민나무 잎 추출물의 free radical 소거능력 (FSC<sub>50</sub>)은 DPPH법을 이용하여 측정하였으며, 소거활성 (FSC<sub>50</sub>)은 에틸아세테이트 분획(2.95  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) > 아글리콘 분획(4.68  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 50 % 에탄올 추출물의 순으로 나타났다.

3) 화학발광법을 통한 총항산화능 측정결과, 활성산소 소거활성(OSC<sub>50</sub>)은 아글리콘 분획(0.19  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서 가장 높게 나타났고, 에틸아세테이트 분획(0.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 50 % 에탄올 추출물(0.51  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 비타민나무 잎 추출물이 전체적으로 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid보다도 높은 활성산소 소거활성을 나타냈다.

4)  $^1\text{O}_2$ 로 유도된 적혈구의 광용혈 실험에서, 비타민나무 잎 추출물은  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도범위(5 ~ 50)에서 농도 의존적으로  $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 용혈을 크게 억제하였다. 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획, 그리고 아글리콘

분획은 모두 지용성 항산화제인 (+)- $\alpha$ -토코페롤보다는 큰 세포 보호활성을 나타내었다. 특히 아글리콘 분획의 경우는 5 및 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서는 에탄올 추출물이나 에틸아세테이트 분획보다도 훨씬 큰 세포보호 활성이 보여주었다.

5) 미백효능을 관찰하기 위해 실시한 타이로시네이즈 저해활성(IC<sub>50</sub>)은 비타민나무 잎의 아글리콘 분획에서 54.86  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 매우 큰 활성을 나타내었고, 에틸아세테이트 분획도 108.50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 비교적 큰 저해활성을 나타냈다. 이들 모두 비교물질인 arbutin보다도 저해활성이 높게 나타났다.

6) 피부노화 중 특히 주름생성에 관여하는 엘라스테이즈 효소의 저해활성(IC<sub>50</sub>)은 아글리콘 분획이 84.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 에틸아세테이트 분획이 120.33  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 비교물질인 oleanolic acid보다는 활성이 작게 나타났다.

결과로 미루어 볼 때 향후 비타민나무 잎 추출물을 대상으로 주름개선 작용이나 항노화 효과의 메커니즘을 알아보기 위한 체계적인 연구가 더 필요하다고 생각된다.

이상의 결과들로부터 비타민나무 잎 추출물의 항산화 작용과 더불어 항노화 작용을 평가한 결과, 비타민나무 잎 추출물의 기능성 화장품으로의 응용가능성이 있음을 시사한다.

## 참 고 문 헌

1. F. Afaq, V. M. Adhami, and H. Mukhtar, Photochemoprevention of ultraviolet B signalling and photocarcinogenesis, *Mutat. Res.*, **571**, 153 (2005).
2. M. A. Bachelor and G. T. Bowden, UVA-mediated activation of signaling pathways involved in skin tumor promotion and progression, *Semin. Cancer Biol.*, **14**, 131 (2004).
3. V. M. Adhami, D. M. Syed, N. Khan, and F. Afaq, Phytochemicals for prevention of solar ultraviolet radiation induced damages, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 489 (2008).
4. F. Afaq and H. Mukhtar, Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging, *Exp. Dermatol.*, **15**, 678 (2006).
5. G. T. Bowden, Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling, *Nat. Rev. Cancer.*, **4**, 23 (2004).



6. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalein, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics(I), *J. Korean Ind. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
7. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photochemical of human erythrocytes, *Korean. J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
8. K. Scharffetter-kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin : Its prevention and therapy, antioxidants in disease mechanism and therapy, ed. H. Sies, Academic Press, California, **8**, 639 (1997).
9. R. M. Tyrrell and M. Pidoux, Singlet oxygen involvement in the inactivation of cultured human fibroblasts by UVA (334 nm, 365 nm) and near-visible (405 nm) radiations, *Photochem. Photobiol.*, **49**, 407 (1989).
10. G. F. Vile and R. M Tyrrell, UVA radiation-induced oxidative damage to lipids and proteins *in vitro* and in human skin fibroblasts is dependent on iron and singlet oxygen, *Free Radical Biology & Medicine*, **18**, 721 (1995).
11. K. Scharffetter-Kochanek, M. Wlaschek, K. Briviba, and H. Sies, Singlet oxygen induces collagenase expression in human skin fibroblasts, *FEBS Lett.*, **331**, 304 (1993).
12. M. Wlaschek, K. Briviba, G. P. stricklin, H. Sies, and K, Singlet oxygen may mediate the ultraviolet A-induced synthesis of interstitial collagenase, Scharffetter-Kochanek, *J. Invest. Dermatol.*, **104**, 194 (1995).
13. J. W. Choi, S. I. Kim, J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Lee, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju native plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**, 181 (2006).
14. H. J. Yang and S. N Park, Evaluation of anti-oxidant potential of extract/fractions of *Equisetum arvense* (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**, 61 (2007).
15. H. J. Yang and S. N. Park, Component analysis and study on anti-elastase activity of *Equisetum arvense* extracts (II), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**, 139 (2007).
16. S. M. Jeon, S. I. Kim, J. Y. Ahn, and S. N. Park, Antioxidative properties of extract/fraction of *Suaeda asparagoides* and *Salicornia herbacea* extracts (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **33**, 145 (2007).
17. J. Y. Kim, H. J. Yang, K. H. Le, S. M. Jeon, Y. J. Ahn, B. R. Won, and S. N. Park, Antioxidative and cellular protective effects of Jeju native plant extracts against reactive oxygen species (I), *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **32**, 181 (2006).
18. K. M. Kim, M. H. Park, K. H. Kim, S. H. Im, Y. H. Park, and Y. N. Kim, Analysis of chemical composition and *in vitro* anti-oxidant properties of extracts from sea buckthorn, *J. Appl. Boil. Chem.*, **52**(2), 58 (2009).
19. A. S. Chauhan, P. S. Negi, and R. S. Ramteke, Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds, *Fitoterapia*, **78**, 590 (2007).
20. Y. Padwad, L. Ganju, and M. Jain, Effect of leaf extract of seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages, *Int Immunopharmacol*, **6**, 46 (2006).
21. T. Y. G. Tiffany, C. Stefan, and H. Arnie, Effect of drying on the nutraceutical quality of seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. sse. sinensis) leaves, *J. Food. Sci.*, **70**, 514 (2005).
22. J. S. Kim, C. Y. Yu, and M. J. Kim, Phamalogical effect and component of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.), *J. Plant Biotechnol.*, **37**, 47 (2010).