

과제구분	기본연구	수행시기		전반기	
증장기 Code		RIMS Code			
연구과제 및 세부과제		연구분야(Code)	수행기간	연구실	책임자
비타민나무 추출물에서 활성물질의 탐색		물질소재(LS1005)	'08~'10	생물소재연구실	임상현
1) 비타민나무 유래 생리활성물질의 분리 및 효능구명		물질소재(LS1005)	'08~'09	생물소재연구실	임상현
2) 비타민나무를 이용한 가공식품 개발연구		농촌자원개발(LS1005)	'08~'10	식품가공연구실	최병곤
색인용어	식물추출물, 혈당강하				

## ABSTRACT

The objective of this study was to isolate and identify anti-inflammatory chemicals in *Hippophae rhamnoides* L. which was grown in Chuncheon, Korea. Treatment of ethanol extracts from stems, leaves, roots, and fruits to RAW 264.7 cells reduced amounts of nitrite by 56.0, 31.9, 49.1, and 18.9% respectively, compared to only lipopolysaccharide (LPS) treatment well-known as a inflammation-inducing agent. The stems were extracted with hexane, dichloromethane, ethylacetate, butanol, and water and their nitrite contents in RAW 264.7 cells were measured. The dichloromethane extracts showed the highest inflammatory activity, exhibiting 80% reduction of the nitrite content at 1 mg/ml treatment. Activity-directed fractionation of dichloromethane extracts led to the identification of  $\beta$ -sitosterol as the anti-inflammatory chemical. 1 mg/ml treatment of  $\beta$ -sitosterol inhibited strongly the production of nitrite by 86%, compared to only LPS treatment. These results suggested that stem of *H. rhamnoides* L. may be useful for treatment of inflammation.

### 1. 연구목표

비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.)는 중국, 몽골 등이 원산지인 보리수나무과 (Elaeagnaceae)의 관목으로 유럽과 중앙아시아에서 폭넓게 자생하고 있으며 (Rousi, *et al.*, 1977) 척박한 토양에서 생육이 가능하고 질소고정 능력이 뛰어나서 토양 유실방지와 토양 개간 목적으로도 활용되고 있다 (Kato *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2009). 비타민나무의 잎과 열매에는 비타민과 아미노산의 함량이 매우 높고, 면역, 항염, 항산화 등의 생리활성도 뛰어난 것으로 알려져 있어서 북유럽, 러시아, 북미, 중국 등에서 열매음료, 종자유를 이용한 건강보조제, 차와 같은 기능성 식품으로 개발되어 있다 (Chauhan *et al.*, 2007; Padwad *et al.*, 2006). 비타민나무 종자유에는 필수 지방산인 linoleic acid와  $\alpha$ -linoleic acid가 다량 함유되어 있으며 (Chen *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1999), 비타민 E가 많이 포함되어 있어 신진대사에 도움을 주고 아스코르빈산과 페놀이 균형 있고 풍부하게 포함되어 있어 노화방지에 탁월한 것으로 알려져 있

다 (Tiffany *et al.*, 2005). 비타민나무에 관하여 많은 연구가 발표 되었는데, Kim (2009) 등이 비타민나무 잎과 뿌리에서 높은 항산화 활성이 있음을 보고 하였고, Jeong (2007) 등과 Han (2007) 등은 각각 비타민나무 뿌리와 줄기 추출물로부터 알코올 분해능 (ADH 활성 측정법) 과 숙취해소 (ALDH 활성 측정법) 활성을 측정한 결과 대조군인 aspartic acid 보다 6~10배 정도 높은 수치를 나타내었다고 보고 하였다. Upadhyay (2009) 등은 초임계장치로 추출한 비타민나무 오일의 화상치료에 대한 효과를 보고 하였으며, Ganju (2005) 등이 비타민나무 잎 추출물이 관절염 치료와 염증치료에 높은 효과를 나타내고 있다고 보고 하였고, Yang (2007) 등은 비타민나무 가지 껍질의 acetone 추출물에서 2-O-caffeoyl-maslinic acid의 항염 활성효과를 보고 하였다.

최근 국내에서 비타민나무는 식품재료로 활용 가능성이 커지면서 재배가 활성화되기 시작 하였지만 국내에서의 연구는 많지 않은 편이다. 면역과 염증 관련 연구가 국외에서 수행되었으나 부위별 항염활성효과 및 활성물질의 분리에 관한 연구는 없었다. 또한 식품의약품안전청 식품원재료에 열매, 씨앗, 잎이 식용으로 등록되어 있어 가공식품원료로 활용할 수 있으나 줄기와 뿌리는 등록되어있지 않은 실정이다.

따라서 본 연구는 비타민나무의 활용범위를 확대하고자 생리활성물질의 분리를 목표로 하고 있으며 식품원재료로 등재되어 있지 않은 부위의 활용가능성을 점검해 보고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 실험에 소요된 재료

#### 1) 시료 채취 및 추출물 조제

본 실험에 사용된 비타민나무(*Hippophae rhamnoides* L.) 시료는 중국 흑룡강성에서 2005년 9월에 도입한 HS-12 계통을 모본으로 강원도 춘천시 신북읍 농산물이용시험장에서 재배하였다. Kim (2003) 등의 방법에 따라서 2008년 8월 중순에 비타민나무의 줄기, 잎, 뿌리, 열매를 채취하여 50℃에서 원적외선 건조한 후 0.6 mm 이하로 마쇄하여 추출에 사용하였다.

#### 2) 유기용매를 이용한 분획물 조제

마쇄된 비타민나무 줄기, 잎, 뿌리, 열매 건조시료 100 g을 취하여 H<sub>2</sub>O와 ethanol (EtOH) 2 l 가 담겨 있는 5 l erlenmeyer flask에 넣고 120 rpm의 진탕기에서 12 시간씩 2회 반복 추출하였다. 추출물을 여과지(No. 40, Whatman)가 깔려있는 Buchner funnel을 통과시켜 잔재물을 제거한 후 rotary vacuum evaporator (EYELA N-21NS)를 이용하여 40℃에서 완전 농축한 다음, d-H<sub>2</sub>O를 50 ml 첨가하였다. Flask 내의 건조물을 d-H<sub>2</sub>O를 이용하여 용해시킨 다음 동결건조기 (ILSHIN Lab Co. Ltd.)를 이용하여 건조하여 수율을 계산하였다. 조추출물을 d-H<sub>2</sub>O에 현탁시킨 후 용매의 극성에 따라 분획하여 n-hexane층, dichloromethane (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) 층, ethyl acetate (EtOAc) 층, n-butanol (BuOH)층 및 d-H<sub>2</sub>O층을 얻고 감압 농축하여 각각의 용매별 수율을 측정하였으며, -20℃의 냉동고에 보관하면서 항염활성 검정 및 분리·정제를 위한 시료로 사용하였다.

#### 나. Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO 소거활성은 한국 세포주 은행에서 분양받은 마우스의 대식세포 세포주인 Raw264.7 세포를 이용하여 측정하였다. 세포는 10%의 FBS가 함유된 DMEM media에서 계대배양 하였다. NO 소거활성을 측정하기 위하여 세포를 24 well plate에 각 well당  $2 \times 10^5$  cells을 분주한 후, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 그리고 final 농도를 1mg/ml로 한 비타민나무 sample을 세포배양 well에 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 24시간 배양하였다. 시료에 대한 대조구로는 1µg/ml의 lipopolysaccharide (LPS)를 20µl 처리하여 활성화된 세포를 사용하였다. 배양 후 상등액 100µl를 회수하고 여기에 2-naphthylamine이 포함된 Griess solution (Fluka)을 첨가하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 상등액의 발색도를 ELISA reader (ASYS UVM-340)를 사용하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포가 생산한 NO는 sodium nitrate를 사용하여 표준곡선을 작성한 후 NO 함량을 정량하였다.

#### 다. PGE<sub>2</sub> Immunoassay

Parameter™ PGE<sub>2</sub> systems kit (R&D system, USA)를 이용하여 측정하였다. 상기에서 배양된 대조구, LPS 처리구, sample 처리구의 상등액 50µl를 96 well plate에 각각 분주한 다음 Parameter™ PGE<sub>2</sub> systems kit에 포함된 RD5-39 용액 150µl와 Primary antibody 용액 50 µl씩을 첨가하고, 추가적으로 PGE<sub>2</sub> conjugate 50µl를 넣고 adhesive strip으로 덮은 다음 25°C 상온에서 2시간동안 교반하였다. 각 well을 세척 한 후 substrate solution 200µl를 넣고 25°C 상온에서 30분간 교반하였으며, 교반 후에는 stop solution 50µl를 첨가하여 ELISA reader (ASYS UVM-340)로 450nm와 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 라. Real-time PCR을 이용한 iNOS 단백질 발현

Real-time PCR (CFX 96™ Real-time system, BIO-RAD)을 이용하여 iNOS 단백질 발현을 알아보았다. 비타민나무로부터 분리한 MCD 추출물이 포함된 Raw264.7 세포를 RNeasy Plus Mini Kit (QIAGEN, USA)를 사용하여 total RNA를 추출하였다. 순수 분리한 MCD 추출물의 total RNA로부터 cDNA를 합성하기 위하여 iScript cDNA Synthesis kit (BIO-RAD, USA)를 사용하였다. 최종 부피 20 µl로 45분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 본 연구에서는 표 1 에서와 같은 PCR Primers가 사용되었다.

표 1. Primer sequences of β-actin and iNOS gene.

Primer Name	Sequence
β-Actin	forward 5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3'
	reverse 5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3'
iNOS	forward 5'-ATT GGC AAC ATC AGG TCG GCC ATC ACT-3'
	reverse 5'-GCT GTG TGT CAC AGA AGT CTC GAA CTC-3'

### 마. 비타민나무 줄기로부터 항염활성물질 분리 및 정제

비타민나무 줄기 에탄올 추출물로부터 분획된 5개의 분획층 중 가장 항염활성이 높은 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획층을 medium pressure liquid chromatography system (Buchi 620, Switzerland) 을 사용하여 분리하였다. Silica gel (0.040-0.063mm, Merck)이 충전 되어 있는 26 × 460 mm glass column에 비타민나무 추출물 1 g을 주입하고 혼합용매 (Hexane : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc : BuOH = 1.5 : 7 : 1 : 0.5, v/v/v/v)를 분당 5 ml씩 용출시킨 다음 UV detector를 사용하여 흡광도 254 nm에서 측정하였으며, MCA-MCK까지 총 11개의 fraction으로 분리되었고 분리 조건과 회수율은 표 2와 같다.

표 2. Dichloromethane층에 대한 11개 분리층, 분리조건 및 회수율

	min	A%	B%	Fraction	Yield (mg)	
Gradient	130	100	0	MCA	10	
	20	80	20	MCB	29	
	10	80	20	MCC	18	
	20	60	40	MCD	38	
	10	60	40	MCE	44	
	20	40	60	MCF	46	
	10	40	60	MCG	158	
	20	20	80	MCH	37	
	10	20	80	MCI	447	
	20	0	100	MCJ	50	
	90	0	100	MCK	25	

† solvent A: Hexane : CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : EtOAc : BuOH = 1.5 : 7 : 1 : 0.5, solvent B: Methanol

### 바. 비타민나무 줄기에서 단리된 물질의 구조·동정

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획층으로부터 단리된 MCD의 구조는 GC/MS (CP-3800, Varian), <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, Bruker Avance 600), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, Bruker Avance 600)로 분석한 다음, 그 데이터를 해석하여 결정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 가. 추출물 조제

비타민나무를 줄기, 잎, 뿌리, 열매로 나누어 물과 에탄올로 추출한 수율은 물 추출이 에탄올 추출보다 전반적으로 높았다(표 3). 또한 부위별 에탄올 추출 수율은 뿌리 (15.6%) > 잎 (15.2%) > 열매 (10.2%) > 줄기 (9.5%)로 나타났다.

표 3. 비타민나무의 잎, 줄기, 뿌리, 열매에 대한 물과 에탄올 추출시 회수율 비교

수확부위	H <sub>2</sub> O (%)	Ethanol (%)
줄 기	10.8 ± 0.8 <sup>†</sup>	9.5 ± 0.4
잎	24.5 ± 0.7	15.2 ± 0.5
뿌 리	15.2 ± 0.7	15.6 ± 0.9
열 매	11.5 ± 0.6	10.2 ± 0.6

<sup>†</sup> All values are Mean±SD (n=3).

#### 나. 유기용매를 이용한 분획물 조제

항염활성효과가 높았던 비타민나무 줄기 에탄올 추출물을 유기용매를 이용하여 극성에 따라 분획하였을 때 추출 수율은 d-H<sub>2</sub>O (32.2%) > BuOH (18.3%) > EtOAc (4.6%) > n-hexane (3.1%) > CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.1%)의 순으로 나타났으며(그림 1), 극성이 높은 용매에서 수율이 높았다.

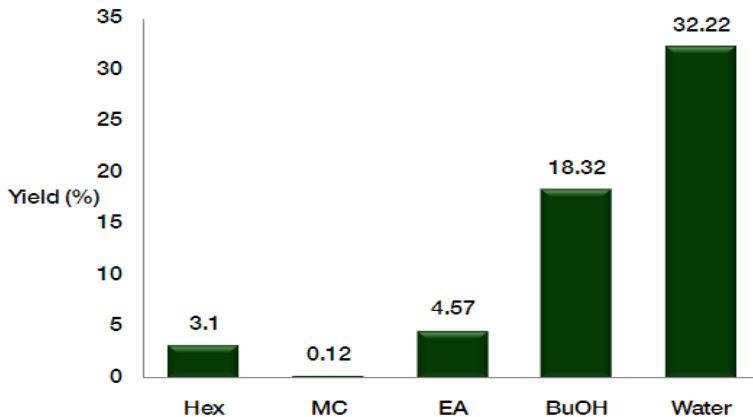


그림 1. 비타민나무 에탄올추출물에 대한 분획증별 회수율

#### 다. 항염활성 검정

##### 1) 비타민 나무 부위별 시료의 Nitric oxide (NO) 생성량 측정

비타민나무 부위별 시료의 nitric oxide (NO) 생성량 측정을 통해 항염효과를 확인한 결과, 모든 시료에서 물 추출물보다 에탄올 추출물이 더 높은 활성을 보였다. 그 중 비타민나무의 줄기 (에탄올 추출물)가 가장 높은 56.0%의 nitric oxide (NO) 생성억제효과를 보였으며, 그 다음으로는 뿌리 (에탄올 추출물)와 잎 (에탄올 추출물), 열매 (에탄올 추출물)가 각각 49.1%, 31.9%, 18.9%의 순으로 나타났다. 특히 줄기 (에탄올 추출물)의 경우에는 항염유발물질인 LPS 단독 처리군과 비교하여 높은 NO생성 억제효과를 보였다(표 4).

표 4. 비타민나무 부위별 추출물의 RAW 264.7 cell에 대한 NO소거능 비교

	Sample <sup>†</sup>	Nitrite ( $\mu\text{M}$ )
	Control	$1.7 \pm 0.3^{\ddagger}$
	LPS	$18.6 \pm 0.4$
줄기	H <sub>2</sub> O	$20.4 \pm 0.7$
	Ethanol	$9.1 \pm 0.4$
잎	H <sub>2</sub> O	$16.5 \pm 0.7$
	Ethanol	$13.2 \pm 0.6$
뿌리	H <sub>2</sub> O	$16.4 \pm 1.1$
	Ethanol	$10.8 \pm 0.4$
열매	H <sub>2</sub> O	$15.8 \pm 0.4$
	Ethanol	$15.4 \pm 0.8$

<sup>†</sup> Treatment concentration of samples : 1 mg/ml

<sup>‡</sup> All values are mean $\pm$ SD (n=3).

## 2) 분획물의 Nitric oxide (NO) 생성량 측정

항염 효과가 우수했던 비타민나무 줄기 에탄올 추출물을 다시 극성 용매로 순차 분획하여 NO 소거능을 측정한 결과 LPS 대비 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (80%) > EtOAc (39%) > H<sub>2</sub>O (21%) > BuOH (16%) 순으로 항염활성이 나타났다(그림 2). 이러한 결과는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획층의 NO 생성억제 효과가 탁월하였기 때문에 NO의 생성과 밀접한 관계가 있는 유도형 NO synthase (iNOS) 에도 많은 영향을 줄 것이라 추론된다.

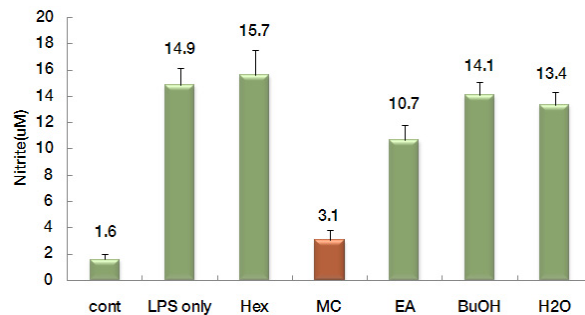


그림 2. 비타민나무 에탄올추출물의 분획층별 NO소거능 비교 (0.1 mg mL<sup>-1</sup>)

## 3) CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물로 부터 분리된 물질의 Nitric oxide (NO) 생성량 측정

MCA-MCK까지 총 11개 fraction에 대해서 nitric oxide (NO) 생성량을 측정하였다. 그 결과, MCD, MCE, MCF fraction에서 대조군에 비하여 높은 항염활성이 나타났다. 그 중에서 MCD는 0.1 mg/ml 농도에서 LPS 단독 처리군 대비 65%의 가장 높은 저해활성을 나타내었다(그림 3).

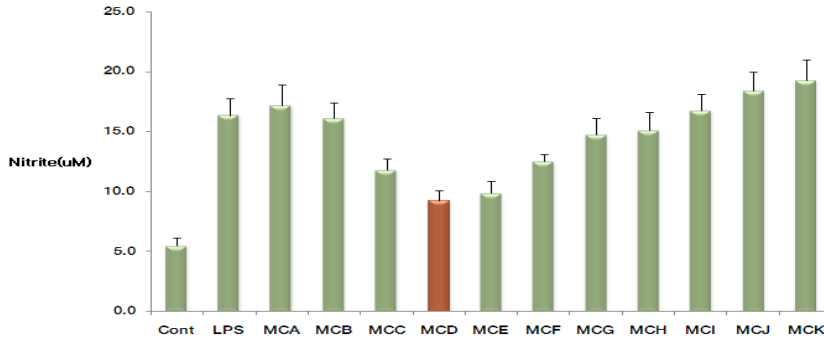


그림 3. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 층으로부터 분리된 11개 분획층(MCA-MCK)에 대한 NO소거능 비교

#### 4) MCD의 항염활성검정

가장 활성이 높았던 MCD에 대하여 염증 유발 매개체인 Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)의 생성 억제 효능을 평가하였다. LPS로 활성화된 세포에서 PGE<sub>2</sub>의 생합성이 증가하는 것을 확인하였으며, 비타민나무로부터 분리된 MCD를 0.1 mg/ml 농도로 처리 시 LPS 단독 처리군 대비 약 75% 정도 PGE<sub>2</sub> 생성이 감소된 것을 확인하였다(그림 4). 이는 현삼과 (Scrophulariaceae) 오동나무 잎 추출물의 PGE<sub>2</sub> 생성 억제 효능 평가 결과 오동나무 추출물을 0.1 mg/ml 농도로 처리 시 약 40% 정도 PGE<sub>2</sub> 생성이 감소된 것과 비교 했을 때 MCD가 PGE<sub>2</sub> 생성억제에 상당히 효과적임을 알 수 있었고(Kim *et al.*, 2006), MCD는 NO 생성에 관련된 메카니즘뿐만 아니라 PGE<sub>2</sub>의 생성 경로에도 영향이 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 체내 염증과정에서 PGE<sub>2</sub> 염증 인자는 cyclooxygenase (COX-2)에 의해 형성되는데, COX-2는 arachidonic acid를 prostaglandins (PGs)으로 전환시키는 효소이다. COX-1은 체내에서 혈소판의 형성, 위벽 보호, 신장 기능의 유지 등 정상적 생체기능에 작용하지만 COX-2는 염증매개물질인 PGE<sub>2</sub>를 형성 시킨다 (Duerksen *et al.*, 1992). 비타민나무 추출물에 의한 PGE<sub>2</sub>의 생성 저해는 염증전구물질의 형성억제를 나타내는 것으로 향후 비타민나무에서 분리된 MCD의 COX-2에 미치는 영향에 대해 평가되어야 한다.

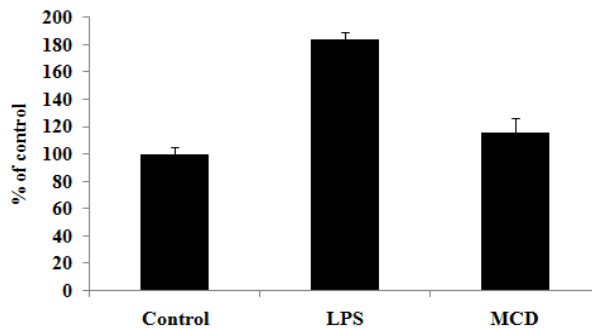


그림 4. 비타민나무 줄기의 dichloromethane 추출물에서 분리한 MCD(0.1mg/ml) PGE<sub>2</sub>생성 억제능. All values are mean±SD (n=3).

MCD를 Real-time PCR을 이용하여 iNOS 단백질 발현을 알아보았다. 현재 많은 정량분석 연구에 이용되고 있는 Real-time PCR은 PCR의 각 증폭주기마다 만들어지는 amplicon의 생성량을 형광의 변화를 관찰하여 시료 중 mRNA의 함량을 평가하는 것이다. 본 연구의 결과 MCD는 LPS 단독 처리군 대비 약 91% 정도 iNOS mRNA 발현을 억제함을 확인할 수 있었다 (그림 5). iNOS는 상대적으로 일부세포에서 LPS, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 type II인 유도형 NOS (iNOS)로 (Nathan, 1992) NOS들은 L-arginine을 L-citrulline으로 전환시키면서 NO를 형성한다. 이들 NOS 중 iNOS에 의한 NO 생성이 대부분을 차지한다. MCD의 경우 NO 소거능이 높았던 것과 마찬가지로 iNOS 단백질 발현을 효과적으로 저해하였다는 것을 알 수 있다.

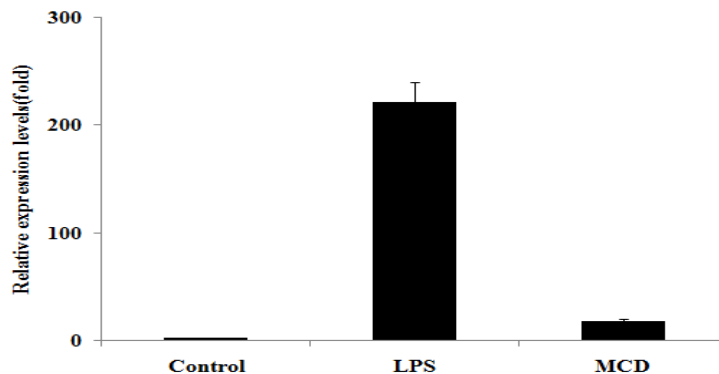


그림 5. 비타민나무 줄기의 dichloromethane 추출물에서 분리한 MCD(0.1 mg/ml) PGE<sub>2</sub>생성 억제능. All values are mean±SD (n=3).

#### 라. 비타민나무 줄기에서 단리된 물질의 구조 동정

비타민나무 줄기 에탄올 추출물의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 분획물에서 분리된 MCD의 구조를 구명하기 위하여 GC/MS (CP-3800, Varian), <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, Bruker Avance 600), <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, Bruker Avance 600)을 이용하여 분석하였다.

비타민나무 줄기에서 분리된 MCD의 MS peak를 NIST library search한 결과 특징적인 fragment ion은 m/z 414, 396, 329, 303, 273, 255, 231, 213에 나타났다. 물질의 구조를 구명하기 위하여 <sup>1</sup>H-NMR (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>)을 실시한 결과 δ 5.35에서 1H분의 olefinic proton signal이 관찰되었다. δ 3.52에서는 C-3에서 1H분의 proton signal이 multiplet으로 관찰되었다. δ 0.68과 1.01에서 3H분의 methyl proton signal이 각각 singlet으로 관찰되었다. <sup>13</sup>C-NMR (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) spectrum에서는 총 29개의 carbon signal을 관찰할 수 있었으며, δ 71.81에서 나타나는 탄소 signal은 hydroxyl기에서 기인하는 것이고, δ 140.75, 121.72에서는 C-5,6의 이중결합이 있는 것으로 추정되었다. 이상의 spectral data와 mass spectrum 및 문헌 (Moghaddam *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 1990)과 비교하여 MCD는 β-sitosterol로 동정하였다.

비타민나무 줄기로부터 분리된 β-sitosterol은 식물세포막의 구성성분인 스테롤 (phytosterol)

이다. 대표적인 식물스테롤로는  $\beta$ -sitosterol,  $\beta$ -sitostanol, campesterol, stigmasterol 등이 있으며, 특히 옥수수과 대두에 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. Kahn (1991) 등은 개똥쭉 (*Artemisia annua*)에서 분리된  $\beta$ -sitosterol이 항바이러스 효과가 있음을 보고 하였으며, Gupta (1980)등은 향부자 (*Cyperus rotundus*)에서 분리한  $\beta$ -sitosterol이 류머티즘 염증성 관절염 치료제인 hydrocortisone와 유사한 항염효과가 있음을 보고 하였으며, 이는 비타민나무에서 추출한  $\beta$ -sitosterol의 높은 항염활성효과와 유사한 결과임을 알 수 있었다.

본 연구를 통하여 구명된 항염활성물질인  $\beta$ -sitosterol은 향후 *in vivo* 실험과 독성평가를 통하여 관절염이나 다양한 염증질환을 대상으로 주요 염증매개물질들의 생성이나 활성을 억제할 수 있는 염증 질환치료제, 기능성 식품 개발에 활용될 수 있을 것이라 사료된다. 현재 비타민나무의 활용은 열매를 이용한 음료, 잎을 활용한 차 등이 대부분이지만 이번 연구 결과 비타민나무 줄기는 항염활성이 높음을 확인 할 수 있었고 줄기 부산물을 이용한 가축사료, 가공품 등 다양한 기능성 소재로 활용 될 가능성이 높은 것으로 나타났다.

#### 4. 적 요

본 연구는 2008년과 2009년 2년 동안 강원산간지역으로 재배면적이 확산되고 있는 비타민나무에 대한 생리활성을 구명하고, 활성물질 분리를 통하여 기능성과 새로운 활용방안을 모색하고자 수행되었다.

- 가. 비타민나무 부위별 시료의 nitric oxide (NO) 생성량 측정을 통해 항염효과를 확인한 결과, 모든 시료에서 물 추출물보다 에탄올 추출물이 더 높은 활성을 보였으며, 그 중 비타민나무의 줄기의 에탄올추출물에서 가장 높은 56.0%의 nitric oxide (NO) 생성억제효과를 보였다.
- 나. NO소거능을 활성실험법으로 항염활성물질분리를 시도한 결과 MCD층이 0.1 mg/ml 농도에서 LPS 단독 처리군 대비 65%의 가장 높은 저해활성을 나타내었으며, MCD층은 NO 생성에 관련된 메카니즘뿐만 아니라 PGE<sub>2</sub>의 생성 경로에도 영향이 미치는 것을 알 수 있었다. 또한 NO 소거능이 높았던 것과 마찬가지로 iNOS 단백질 발현을 효과적으로 저해하였다는 것을 알 수 있다
- 다. spectral data와 mass spectrum 및 문헌 (Moghaddam *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 1990)과 비교하여 MCD는  $\beta$ -sitosterol로 동정하였다.  $\beta$ -sitosterol은 향후 *in vivo* 실험과 독성평가를 통하여 관절염이나 다양한 염증질환을 대상으로 주요 염증매개물질들의 생성이나 활성을 억제할 수 있는 염증 질환치료제, 기능성 식품 개발에 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

#### 5. 인용문헌

Chauhan AS, Negi PS and Ramteke RS. 2007. Antioxidant and antibacterial activities of aqueous extract of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. Fitoterapia.

78:590-592.

- Chen Y, Jiang Z, Qin W, Ni M, Li X and He Y. 1990.** Chemical composition and characteristics of Seabuckthorn fruit and its oil. *Chemistry and Industry of Forest Products.* 10:163-175.
- Duerksen-Hughes PJ, Day D, Laster SMA, Zacharidaes NA, Aquino L and Gooding LR. 1992.** Both tumor necrosis factor and nitric oxide participate in lysis of simian virus 40-transformed cells by activated macrophages. *The Journal of Immunology.* 149:2114-2122.
- Feldmann M, Brennan FM and Maini RN. 1996.** Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annual Review of Immunology.* 14:397.
- Fenton MJ and Golenbock DT. 1998.** LPS-binding proteins and receptors. *Journal of Leukocyte Biology.* 64:25-32.
- Ganju L, Padwad Y and Singh R. 2005.** Anti-inflammatory activity of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides*) leaves. *International Immunopharmacology.* 5:1675-1684.
- Glauser MP. 1996.** The inflammatory cytokines. New developments in the pathophysiology and treatment of septic shock. *Drugs* 52:9-17.
- Gupta MB, Nath R, Srivastava N, Shanker K, Kishor K, Bhargava KP. 1980.** Anti-inflammatory and antipyretic activities of  $\beta$ -sitosterol. *Planta Medica.* 39:157.
- Han SN, Lee JW, Jeong JH, Lee CO, Kim JK, Yu CY and Kim MJ. 2007.** Alcohol dehydrogenase activities from *Hippophae rhamnoides* L. stem. *The Korean Society of Medicinal Crop Science (supplement I).* 15:197-198.
- Harada A, Swkido N, Akahoshi T, Wada T, Mukaida N and Matsushima K J. 1994.** Essential involvement of interleukin-8 in acute inflammation. *Journal of Leukocyte Biology.* 56:559.
- Jeong JH, Lee CO, Lee JW, Choi EY, Kim JH, Han SN, Yu CY and Kim MJ. 2008.** Biological activities of extract and fractions from *Hippophae rhamnoides* L. root and stem. *The Korean Society of Medicinal Crop Science (supplement I).* 16:240-241.
- Kahn MMAA, Jain DC, Bhakuni RS, Mohd Z, Thakur RS. 1991.** Occurrence of some antiviral sterols in *Artemisia annua*. *Plant Science.* 75:161.
- Kato K, Kanayama Y and Ohkawa W. 2007.** Nitrogen fixation in Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) root nodules and effect of nitrate on nitrogenase activity. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science.* 76:185-190.
- Kim HK, Na GM, Ye SH and Han HS. 2004.** Extraction characteristics and anti-oxidative activity of *Schiznadra chinensis* extracts. *Journal of the Korean Society of Food Culture.* 19:484-490.
- Kim HY, Choi HJ, Lim SH, Heo SJ, Han SS, Kim DS, Hwang KH and Kim S. 2003.**

Herbicidal activity of Korean native plants (I). The Korean Journal of Pesticide Science. 7:248-257.

- Kim KM, Park MH, Kim KH, Lim SH, Park YH and Kim YN. 2009.** Analysis of chemical composition and *in vitro* anti-oxidant properties of extracts from SeaBuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). The Korean Society for Applied Biological Chemistry. 52:58-64.
- Kim NK, Kim MH, Yoon CS and Choi SW. 2006.** Studies on the anti-inflammatory activity of *Paulownia coreana* Uyeki leaf extract. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea. 32:241-247.
- Kim RG, Shin KM, Chun SS, Ji SY, Seo SH, Park HJ, Choi JW and Lee KT. 2002.** *In vitro* anti-inflammatory activity of the essential oil from *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. Journal of the Pharmaceutical Society of Korea. 46:343-347.
- Kim SA, Oh SI and Lee MS. 2007.** Antioxidative and cytotoxic effects of solvent fractions from *Elaeagnus multiflora*. The Korean Journal of Food and Nutrition. 20:134-142.
- Lee SJ, Lee IS and Mar W. 2003.** Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 activity by 1,2,3,4,5-penta-O-galloyl- $\beta$ -D-glucose in murine macrophage cells. Archives of Pharmacal Research. 26:832-839.
- Moghaddam FM, Farimani MM, Salahvarzi S and Amin G. 2006.** Chemical constituents of dichloromethane extract of cultivated *Satureja khuzistanica*. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. 26:1-4.
- Nathan C. 1992.** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 6:3051-3064.
- Padwad Y, Ganju L and Jain M. 2006.** Effect of leaf extract of Seabuckthorn on lipopolysaccharide induced inflammatory response in murine macrophages. International Immunopharmacology. 6:46-52.
- Rousi A. 1977.** The genus *Hippophae* L. a taxonomic study. Annales Botanici Fennici. 8:177-227.
- Talhok RS, Karam C, Fostok S, El-Jouni W and Barbour EK. 2007.** Anti-inflammatory bioactivities in plant extracts. Journal of Medicinal Food. 10:1-10.
- Tiffany TYG, Stefan C and Arnie H. 2005.** Effect of drying on the nutraceutical quality of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L. ssp. *sinensis*) leaves. Journal of Food Science. 70:514-518.
- Upadhyay NK, Kumar R and Mandotra SK. 2009.** Safety and healing efficacy of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seed oil on burn wounds in rats. Food and Chemical Toxicology. 47:1146-1153.

Yang B, Heikki K and Raija T. 1999. Effects of dietary supplementation of Seabuckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) oils on fatty acids in patients with atopic dermatitis. The Journal of Nutritional Biochemistry. 10:622-630.

Yang ZG, Li HR, Wang LY, Li YH, Lu SG, Wen XF, Wang J, Daikonya A and Kitankak S. 2007. Triterpenoids from *Hippophae rhamnoides* L. and their nitric oxide production-inhibitory and DPPH radical-scavenging activities. Chemical and Pharmaceutical Bulletin. 55:15-18.

Yoon WJ, Lee JA, Kim KN, Kim JY and Park SY. 2007. In vitro anti-inflammatory activity of the *Artemisia fukudo* extracts in murine macrophage RAW 264.7 Cells. Korean Society of Food Science and Technology. 39:464-469.

Yu YP, Kang SS and Kim CM. 1990. A study on the chemical constituents of *Tilia koreana* Nakai. The Korean Society of Pharmacognosy. 21:265-269.

## 6. 연구결과 활용

연도 (연차)	활용구분	제 목
2009	특허출원	비타민나무 줄기추출물에서 항염활성물질 $\beta$ -sitosterol의 분리
	논문게재	비타민나무 추출물의 이화학적 성분분석과 항산화활성효과

## 7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도	
					08	09
과제책임자	농산물이용시험장	농업연구사	임상현	과제 총괄 수행	○	○
공동연구자	농산물이용시험장	농업연구관	김경희	연구지원	○	○
공동연구자	농산물이용시험장	농업연구사	정햇님	시료관리		○
공동연구자	농산물이용시험장	농업연구사	이광재	생리활성 스크린	○	○
공동연구자	농산물이용시험장	농업연구사	김희연	활성물질 분리	○	○
연구보조원	농산물이용시험장	농업연구사	김경대	연구지원	○	○
연구보조원	농산물이용시험장	연구원	박유화	생리활성 스크린		○
연구보조원	농산물이용시험장	연구원	이기연	활성물질 분리	○	○