

桃仁 껍질의 화장품약리활성 및 항염 효과

조우아^{#1}, 장민정, 천순주, 성지연, 최은영, 강보연, 정수현, 정연숙²,
김영선³, 안봉전, 이창언, 이진태*

대구한의대학교 화장품약리학과, 1: 남부대학교 향장미용학부,
2: Department of Genetic Resources Technology Kyushu University, 3: (주) 이지함 코스메틱

Cosmeceutical activities and Anti-inflammatory effects of Shell from *Persicae semen*.

Woo-A Joe^{#1}, Min-Jung Jang, Soon-Ju Cheon, Ji-Yeun Sung, Eun-Young Choi,
Bo-Yeon Kang, Su-Hyun Jung, Yeun-Suck Jeung², Young-Sun Kim³, Bong-Jeun An,
Chang-Eon Lee, Jin-Tae Lee*

Department of Cosmeceutical Science, Daegu Haany University,
1: Department of Cosmetology Science, Nambu University,
2: Department of Genetic Resources Technology, Kyushu University, 3: LJH Cosmetic Co., Ltd.

ABSTRACT

Objectives : In this paper, we tested the applicability of shell from *Persicae semen* in cosmetics through cosmeceutical activities including anti-oxidant, tyrosinase inhibition and anti-inflammatory effects.

Methods : *Persicae semen*, which had been extracted, concentrated, and freeze drying with water and ethanol, have been used for the experiment. The effects on electronic donating ability, SOD-like activity, xanthine oxidase inhibition, whitening effect have been investigated in the cosmeceutical activity measurement of function experiment.

Results : In the electron donating ability test, 1,000 ppm of EPS (ethanol extract of shell from *Persicae semen*) showed an effect of 87%. SOD-like activities showed 93% at the 10,000 ppm of WPS (water extract of shell from *Persicae semen*). In the xanthine oxidase inhibition test, 1,000 ppm of BHA showed an effect of 27%, while EPS showed an effect of 62%. We were able to get an effect of 95% from EPS at 10,000 ppm in the tyrosinase inhibition test. In the anti-inflammatory test, the EPS inhibited the generation of nitric oxide. In the case of the EPS, there were no signs of cytotoxicity against raw 264.7 and anti-inflammatory effects could be identified when the manifestation of iNOS was decreased.

Conclusion : Therefore, the EPS has potential as an effective raw materials for cosmetic.

Key words : *Persicae semen*, Cosmeceutical activity, Anti-inflammatory effects

*교신저자 : 이진태, 대구한의대학교 화장품약리학과
E-mail : jtlee@dhu.ac.kr Tel : 053-819-1430 Fax : 053-819-1430
제1저자 : 조우아, 남부대학교 향장미용학부
E-mail : swoana@nambu.ac.kr Tel : 062-970-0138 Fax : 062-970-0138
· 접수 : 2006년 4월 25일 · 수정 : 2006년 5월 20일 · 채택 : 2006년 6월 24일

서론

노화의 원인 중 하나인 자유 라디칼 혹은 활성산소에 의한 생체 내 산화는 암과 각종 성인병을 유발한다¹⁾. 활성산소를 제거해주는 대표적인 합성 항산화제인 BHT(butylated hydroxytoluene)와 BHA(butylated hydroxyanisole) 등은 경제적이지만 생체효소의 활성을 억제하고 암을 유발시키는 등 인체 독성을 가지고 있어 최근에는 이를 대체할 수 있는 천연 생물자원의 개발이 다양하게 이루어지고 있다^{2,3)}. 개인 소득 및 삶의 질의 향상은 건강에 대한 관심을 유도함으로써 야외 활동량이 증가하고 기미, 주근깨 등 melanine 색소의 피부침착에 기인한 흑화 현상 및 광노화가 증가하고 있으며 이에 따라 화장품 업계는 미백제와 같은 기능성 화장품에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다⁴⁾. 2001년 7월 식품의약품안전청에서는 기능성화장품 기준 및 시험방법 등을 고시하였으며 미백에 도움을 주는 물질로 다나무추출물, 유평성 감초 추출물 등을 고시성분으로 등재하였고, 피부의 주름개선에 도움을 주는 물질로는 레티놀, 아데노신을 등재하였다⁵⁾. 최근에는 녹차, 상백피, 빈랑자, 황금, 산삼 등의 다양한 천연물 등이 화장품의 성분으로 사용되고 있다^{6,7)}. 이처럼 화장품 소재 및 항산화제로 많은 천연물들이 연구되고 있으며, 특히 한의학에서 사용되는 한약재들을 응용한 한방 화장품 및 항산화제가 다양하게 연구·생산되고 있다.

본 연구에서는 한국, 중국, 일본 등에서 오래전부터 여성의 질환과 퇴행성 질환 등에 사용되었으며, 최근 anti-tumor promoter, anti-Oketsu(항 혈혈작용)⁸⁻¹⁰⁾ 등이 보고되고 있는 도인(*Persicae semen*)을 선정하여 cosmeceutical activity에 대해 살펴보았다. 도인은 *Rosaceae*에 속하는 낙엽, 활엽, 소교목인 복숭아 나무(*Prunus persica* BATSCH), 개복숭아 나무(*Prunus persica* BATSCH var. *davidiana Maximovicz*)¹¹⁾의 씨로써 생리적인 효능에 대한 구체적인 연구는 현재까지도 많이 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이에 도인 껍질의 기능성 화장품 소재 및 각종 응용제품에 대한 탐색 연구로서 도인의 항산화, 미백, 항염 등에 대해 연구하였다.

재료 및 방법

1. 시료

본 실험에 사용된 桃仁(*Persicae semen*)은 경북 영천시 (주)동우당 제약에서 구입하여 사용하였다. 도인의 껍질 (SP, Shell from *Persicae semen*)을 벗겨 열수 추출과 에탄올 추출하여 동결건조 후 실험의 시료

로 사용하였다.

2. 전자공여능 측정

전자공여능(Electron donating ability)는 Blois¹²⁾의 방법으로 측정하였다. 2 ml의 시료와 1 ml의 0.2 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)를 넣고 30분 후에 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군에 대한 흡광도 감소치를 DPPH 라디칼 소거활성으로 하여 항산화 활성도로 나타내었다.

3. Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

Superoxide dismutase(SOD) 유사활성은 Marklund¹³⁾의 방법으로 실험하였다. 각 시료 0.2 ml에 Tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6 ml과 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml을 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 1.0 N HCl 0.1 ml을 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420 nm에서 측정하였다. 대조군에 대한 첨가군의 흡광도 감소율로 SOD 유사활성도를 항산화 활성도를 나타내었다.

4. Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Stripe와 Corte¹⁴⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 0.1 M phosphate buffer (pH 7.5) 0.6 ml에 시료 0.1 ml과 1 mM의 xanthine 0.2 ml를 넣는다. 0.2 unit/ml의 xanthine oxidase를 0.2 ml를 넣어 37°C에서 5분간 반응시킨 후, 20% TCA를 넣어 반응을 종료하였다. 이를 원심분리하여 단백질을 제거한 후, 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292nm에서 측정하여 저해율을 구하였다.

5. Tyrosinase 저해활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 tyrosinase의 작용 결과 생성되는 DOPA chrome을 비색법에 의해 측정하는 Yagi¹⁵⁾등의 방법에 실험하였다. 1/15 M phosphate buffer (pH 6.8) 0.5 ml에 시료 0.1 ml, 10 mM와 L-DOPA 0.2 ml를 넣는다. 여기에 mushroom tyrosinase (110 unit/ml)를 첨가하여 25°C에서 2분간 반응하여 반응액 중 생성된 DOPA chrome을 475 nm에서 측정하였다. 대조군에 대한 첨가군의 DOPA chrome 감소율로 tyrosinase 저해활성을 나타내었다.

6. Nitric oxide 저해활성 측정

Raw 264.7 cell line으로부터 생성된 nitric oxide의 양은 Ding¹⁶⁾등의 방법을 통하여 실험하였다. 세포 배양액 중에 존재하는 NO²를 griess 시약을 이용하여 측정하였다. 세포배양 상등액 100 µl와 griess시약 100 µl을 혼합하여 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO²의 양은 NaNO₂의 표준 곡선을 이용하여 정량하였다.

7. Macrophage cell의 생존률 측정

도인 추출물에 의한 macrophage cell Raw 264.7에 미치는 영향은 Carmichael¹⁷⁾등의 MTT assay를 통해 평가하였다. 96well plate에 5×10⁴ cells/well로 분주한 후 도인 추출물을 농도별로 처치하였다. 배양 후 생존세포에 MTT (5 mg/ml)을 4시간 처리 한 후, 배지를 제거하고 생성된 formazan crystal을 DMSO에 녹여 그 흡광도를 540 nm에서 측정하였다. 대조구에 대한 백분율로 도인 추출물에 의한 macrophage cell의 생존률을 나타내었다.

8. Western blot에 의한 iNOS 발현 측정

iNOS의 발현 측정은 Towbin¹⁸⁾등의 western blot를 이용하여 다음과 같이 실험하였다. Raw 264.7 세포에 LPS(lipopolysaccharide)와 각 농도의 시료를 처리한 후 lysis buffer를 이용하여 cell를 lysis하여 15,000 rpm으로 15분간 원심 분리하여 protein을 얻었다. protein의 농도는 bradford 방법¹⁹⁾으로 정량하였다. 얻어진 protein은 SDS-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동 시킨 후, nitrocellulose membrane으로 transblotting하였다. iNOS polyclonal antibody를 이용하여 membrane에 처리한 후 horseradish peroxidase가 부착되어 있는 anti-rabbit IgG를 가하여 enhanced chemiluminescence detection을 이용하여 iNOS의 발현을 측정하였다.

9. 통계처리

각 실험의 결과 통계처리는 SPSS package Ver. 10.0 을 사용하였으며, 유의차 검증은 분산분석(ANOVA : analysis of variance)을 한 후 α=0.05 수준에서 Duncan의 다중검증법(DMRT : Duncan's multiple range test)에 따라 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 전자 공여능 측정

DPPH는 항산화 물질에 의해 전자를 받아 비가역적으로 안정한 분자를 형성하여 탈색이 되어 항산화 정도를 측정하는 대표적인 실험방법²⁰⁾으로 김 등²⁰⁾이 왕대나무 부위별 열수 추출물의 전자 공여능을 살펴 보았을 때 1,000 ppm에서 즉력 86%, 줄기 51.7%을 나타내었다. 도인 껍질의 경우 1,000 ppm에서 열수 추출물은 89%, 에탄올 추출물은 87%의 전자 공여능을 나타내었으며 같은 조건하에서 BHA는 94%의 전자 공여능을 나타내었다. 이를 통해 도인 껍질 추출물이 다른 천연물질에 비해 우수한 전자 공여능을 가지고 있으며 표준물질인 BHA에 대체 할만 한 항산화제로서 가능성을 확인할 수 있었다.

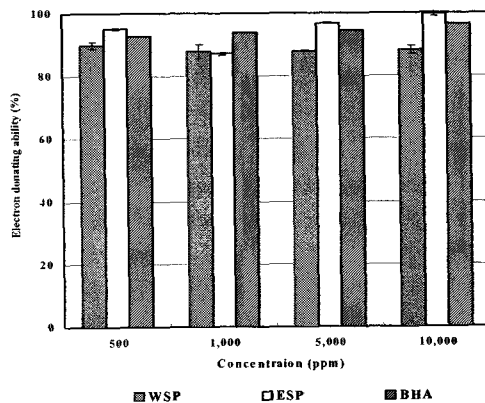


Fig. 1. Electron donating ability of shell from Persicace semen. WSP: water extract from shell of Persicace semen, ESP: ethanol extract from shell of Persicace semen. Values are of 3 replicates.

2. SOD 유사활성

superoxide dismutase(SOD)는 항산화 효소중 하나이며 30KDa 이상의 분자량을 가진 단백질 물질로 체내에 쉽게 흡수되지 못하며²¹⁾열과 pH에 불안정하다²²⁾. SOD와 유사한 활성을 가지며 SOD의 단점을 보완 할 수 있는 SOD 유사활성 물질을 탐색하고자 본 실험을 진행하였다. 1,000 ppm의 BHA는 80%의 SOD 유사활성을 나타내었고 도인 껍질 열수 추출물에서는 32%, 에탄올 추출물에서는 13%의 SOD 유사활성을 나타내어 BHA에 비해 낮은 활성을 나타내었다. 그러나 10,000 ppm에서는 BHA가 89%의 활성을 나타내는데 비해 도인 껍질 열수 추출물은 93%, 에탄올 추출물은 91%의 활성을 나타내어 도인 껍질 추출물은 고농도에서 높은 SOD유사활성을 나타내는 것을 알 수

있었다(Fig. 2). 또한, 홍 등²³⁾은 사과, 키위, 케일, 무 착즙액 24.1%~27.6%, 임 등²⁴⁾은 감초, 35.63%, 연자육 28.7%, 지황 28.43%의 SOD 유사활성을 나타내었다는 결과와 비교하여 본다면 기존에 보고되었던 천연물 보다 도인 껍질 열수 추출물이 항산화 활성이 우수함을 확인 할 수 있었다.

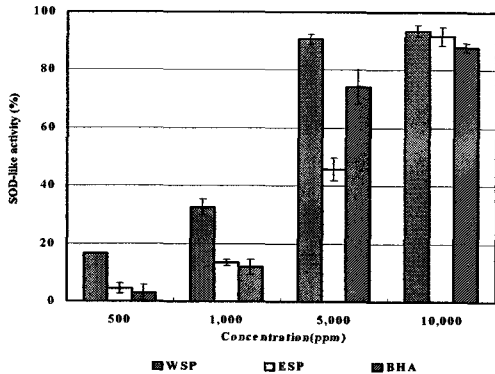


Fig. 2. SOD - like activity of shell from Persicae semen. WSP: water extract from shell of Persicae semen, ESP: ethanol extract from shell of Persicae semen. Values are of 3 replicates.

3. Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase는 purine의 terminal oxidation에서 rate-limiting enzyme으로 작용하며 superoxide radical이나 hydrogenperoxide와 같은 산화제의 source로서 작용하는 효소이다²⁵⁾. 분자상의 산소를 수소 수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid형으로 산화하는 반응을 촉매하며 uric acid는 관절염의 일종인 통풍의 원인이 되기도 한다²⁶⁾. Xanthine oxidase 저해는 통풍 억제 및 유리 라디칼의 생성억제를 통해 생물학적으로 중요한 의미를 가진다고 할 수 있다. 1,000 ppm의 도인 껍질 열수 추출물은 46%, 도인 껍질 에탄올 추출물은 62%의 xanthine oxidase 저해활성을 나타내었다. 같은 조건하에서 BHA 1,000 ppm은 27%의 효과를 나타내었다(Fig. 3). 안 등²⁷⁾의 산사자는 1,000 ppm일 때 10%의 활성을 보고하였으며, 정 등²⁸⁾은 개나리 에탄올 추출물 500 ppm일 때 31%의 효과를 보고하였다. 도인 껍질 추출물은 BHA와 다른 천연물에 비하여 우수한 xanthine oxidase 저해활성을 나타냄을 알 수 있었다.

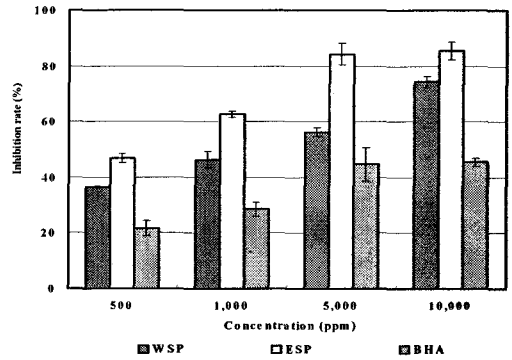


Fig. 3. Inhibition rate of shell from Persicae semen on xanthine oxidase. WSP: water extract from shell of Persicae semen, ESP: ethanol extract from shell of Persicae semen. Values are of 3 replicates.

4. Tyrosinase 저해활성 측정

자외선에 의해 형성되는 기미, 주근깨 등은 주로 tyrosinase라는 key enzyme을 이용하여 생성된 melanine에 의한 피부 색소침착이다²⁹⁾. 그러므로 tyrosinase의 활성을 억제하는 물질을 탐색하여 피부 미백제 및 기능성 화장품을 개발할 수 있다. 1,000 ppm의 도인 껍질 에탄올 추출물은 36%의 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 그러나 10,000 ppm에서 98% tyrosinase 저해활성을 나타내어 고농도의 도인 껍질 에탄올 추출물이 tyrosinase 저해활성을 통해 미백활성을 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 4). 같은 실험조건하에서 표준 물질로 사용한 kojic acid는 1,000 ppm에서 99%의 tyrosinase 저해활성을 나타내었으며 향후 도인 껍질의 미백성분을 분리·분석하여 kojic acid를 대체할 수 있는 미백제로서 개발 가능성을 확인 할 수 있었다.

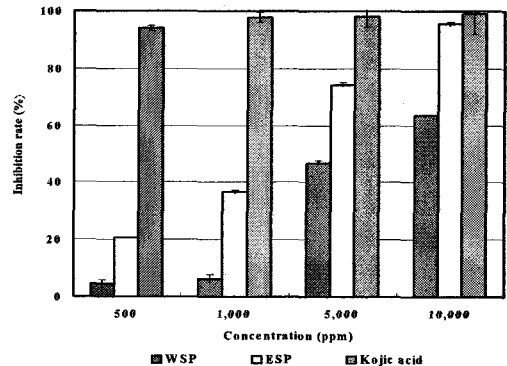


Fig. 4. Inhibition rate of shell from Persicae semen on tyrosinase. WSP: water extract from shell of Persicae semen, ESP: ethanol extract from shell of Persicae semen. Values are of 3 replicates.

5. Nitric oxide 생성저해효과

염증부위의 활성화된 macrophage는 cytokine 뿐 아니라 arachidonic acid 대사체 그리고 nitric oxide 등을 대량 생산함으로써 염증 매개에 큰 역할을 한다. Nitric oxide는 물리 화학적 성상에 따라 type I, II, III 의 3종류의 동종 효소로 나누어진다. Type I (neuronal NOS, nNOS)와 type III(endothelial NOS, eNOS)는 세포 속에 계속적으로 존재하기 때문에 구성 NOS(constitutive cNOS)라고 하며, 일부 세포에서 lipopolysaccharide, cytokines 및 박테리아 독소 같은 특수한 자극제들에 노출되는 경우에만 발현되는 type II인 유도형 NOS(iNOS)로 나눈다. iNOS는 LPS, cytokine 같은 자극에 의해 급격하게 유도되어, 과량의 NO를 생성하는 것으로 알려져 있다. 염증 반응에서의 nitric oxide 생성은 거의 iNOS에 의한 것이라 할 수 있다³⁰⁾. 특히 iNOS에 의해 생성된 nitric oxide는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직 손상 등 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 또한 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO가 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진 시킬 뿐 아니라, cyclooxygenase를 활성화하여 prostaglandins과 같은 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다. 따라서 iNOS에 의한 nitric oxide생성을 저해하는 새로운 염증치료를제를 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다³¹⁾.

Mouse macrophage인 raw 2647에 LPS(lipopolysaccharide)와 도인 껍질 추출물을 각각 처리하여 nitric oxide양을 측정한다. 결과, LPS 처리 시 대조군에 비교하여 nitric oxide 생성량이 증가하였다. 도인 껍질 에탄올 추출물의 경우 5,000ppm과 10,000 ppm의 농도에서 nitric oxide의 생성을 저해하였다.

도인껍질의 에탄올 추출물이 LPS로 유도된 nitric oxide의 생성을 감소시킨 것인지, 추출물의 세포독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하는 것인지 관찰하기위해 MTT assay를 통해 cell의 viability를 측정하였다. 실험결과 Fig. 5와 같이 도인 껍질 에탄올 추출물의 경우 세포독성이 나타나지 않았다. 이에 도인 껍질 에탄올 추출물의 nitric oxide 생성 저해는 도인 껍질 에탄올 추출물의 세포독성에 의한 것이 아니라 nitric oxide 생성자체를 저해한 것을 확인할 수 있었다.

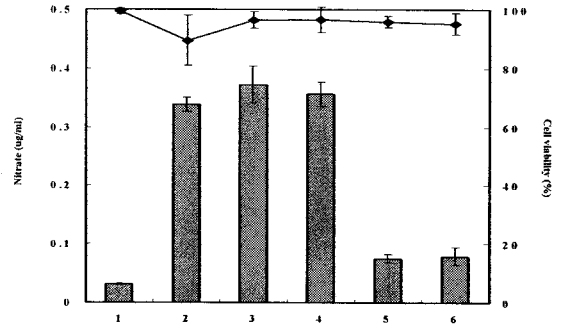


Fig. 5. Effects of EPS-induced nitrite accumulation in the cultured medium and cell viability of Raw 264.7 cells. ESP: ethanol extract from shell of Persicae semen. Lane 1: negative control (without LPS treatment), Lane 2: positive control (with 10 ug/ml LPS treatment), Lane 3: EPS 500ppm + 10 ug/ml LPS, Lane 4: EPS 1,000 ppm + 10 ug/ml LPS, Lane 5: EPS 5,000 ppm + 10 ug/ml LPS, Lane 6: EPS 10,000 ppm + 10 ug/ml LPS, NO production is presented as the mean ± SD of triplicate independent experiment.

6. Western blot에 의한 iNOS 발현 확인

염증에 관련된 nitric oxide 생성 저해기작에 대한 iNOS 단백질의 관련성을 조사하기 위해 western blot를 이용하여 세포질 내에서의 iNOS 단백질의 발현양을 조사하였다. Fig. 6와 같이 LPS 단독 처리 시에는 iNOS 단백질이 강하게 유도되었으나, 도인 껍질 에탄올 추출물을 5,000 ppm과 10,000 ppm을 처리한 실험군에서는 iNOS의 발현양이 줄어들었다. 이를 통해 도인 껍질 에탄올 추출물이 세포독성 없이 nitric oxide 생성을 억제하고 또한 염증과 관련된 nitric oxide를 생성하는 iNOS의 발현양을 줄였음을 확인함으로써 도인 껍질 에탄올 추출물의 항염효과를 확인할 수 있었다.

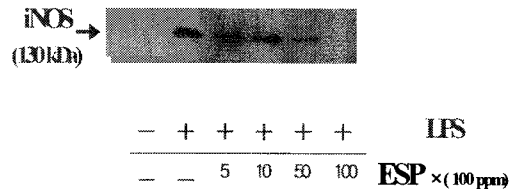


Fig. 6. Modulation by the EPS of LPS-induced iNOS expression in raw 264.7 cells. EPS: ethanol extract from shell of Persicae semen.

결 론

본 논문은 도인 껍질(shell from *Persicae semen*)의 항산화 효과, tyrosinase 억제효과, 항염 효과 등의 화장품 약리활성을 살펴보았다.

전자 공여능(electron donating ability) 실험에서 1,000 ppm의 도인 껍질 에탄올 추출물은 87%의 효과를 나타내었다. SOD 유사활성실험에서 10,000 ppm의 도인 껍질 열수 추출물이 93%의 효과를 나타내었다. Xanthine oxidase 억제실험에서는 1,000 ppm의 BHA가 27%의 효과를 나타내었고, 도인 껍질 에탄올 추출물은 62%의 효과를 나타내었다. Tyrosinase 억제실험에서 도인 껍질 에탄올 추출물 10,000 ppm에서 95%의 효과를 나타내었다. 항염 실험에서 도인 껍질 에탄올 추출물은 nitric oxide 생성을 저해하였다. 도인 껍질 에탄올 추출물의 경우 raw 264.7에 대해 세포독성을 나타내지 않고 iNOS의 발현량을 줄여 항염 효과를 확인 할 수 있었다. 도인 껍질이 화장품의 효과적인 천연 자원으로서의 가능성을 확인 할 수 있었다.

참고문헌

- Lee, S. H., Park, J. S., Kim, S. Y., Kim, J. J. and Chung, S. R. Inhibitory component on tyrosinase activity from the bark of *Paeonia moutan*. *Yakhak Hoeji* 1998;42:353-358.
- Halliwell, G. H. and Gutteridge, J. M. C. Role of free radical and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Methods Enzymol* 1990;186:1-85.
- Ramarthnam, N., Osawa, T., Ochi, H. and Kawakishi, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends Food Science*. 1995;6:75-82.
- Branch, A. L. Toxicological and biochemistry of butylated hydroxytoluene, butylated hydroxyanisole. *J. Am. Oil. Chem. Soc.* 1975;52:59-63.
- 화장품 관련 정책 종합설명회, 식품의약품안전청. 2003:243-250.
- 김영중:천연물연구의 최근 동향, 대한화장품학회지. 2003:29:1-15.
- 안덕균:피부미용의 한의학적 이론, 대한화장품학회지. 2003:29:79-87.
- Ge, R. Y., Zhou, C. H., She, Y. C. Influences of stigma croci and semen persicae on function of ovary-uterus in pseudopregnant rats, *J. Tra. Chinese. Med.*, 1983;3:23-26.
- Sakamoto, S., Kudo, H., Kawasaki, T., Kuwa, K., Kasahara, N., Sassa, S., Okamoto, R. Effects of a chinese herbal medicine, keishi-bukuryo-gan on the gonadal of rats, *J. Ethnopharmacol.*, 1988;23:151-158.
- Kosuge, T., Ishida, H., Ishii, M. Studies on active substances in the herbs used for oketsu in chinese medicine. II. On the anticoagulative principle in *Persicae semen*, *Chem. Pharm. Bull.*, 1985;33:1496-1498.
- 서부일, 정국영: 알기쉬운 본초학, 대구한의대학교 출판부 2004:294.
- Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958;181:1199-1200.
- Marklund S. and Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 1974;47:468-474.
- Stirpe F. and Corte ED. The regulation of rat liver xanthine oxidase, *The Journal of Biological Chemistry*. 1969;244:3855-3861.
- Yagi A, Kanbara T, Morinbu N. The effects of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica*. 1986;3981:517-519.
- Ding, A. J., Nathan, C. F., Stuehr, D. J. J. *Immunol*. 1988;144:2407-2413.
- Carmichael, J., Degraff, W. G., Gazdar, A. F., Minna, J. D., Michell, J. B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay. *Cancer Res.*, 1987;47:936-942.
- Towbin, J., Staehlin, T., Gordon, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1979;76:4350-4354.
- Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*.

- 1976;72:248-254.
20. Kim, N. K., Cho, S. H., Lee, S. D., Ryu, J. S., Shim, K. H. Functional properties and antimicrobial activity of bamboo(*phyllostachys* sp.) extracts. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 2001;8:475-480.
 21. Kim, S. J., Han, D. S., Moon, K. D. and Rhee, J. S. Measurement of superoxide dismutase-like activity of natural antioxidants. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 1995;59:822-826.
 22. Korycka-Dahl M., Richardson T. and Hicks C. L. Superoxide dismutase activity in bovine milk serum. *J. Food Prot.* 1979;42:867-871.
 23. Hong, H. D., Kang, N. K. and Kim, S. S. Superoxide dismutase-like activity of apple juice mixed with some fruits and vegetables. *Korean Journal Food Sci. Technology.* 1998;30:1484-1487.
 24. Lim, J. D., Yu, C. Y., Kim, M. J., Yun, S. J., Lee, S. J., Kim N. Y. and Chung, I. M. Comparison of SOD activity and phenolic compound contents in various Korean medicinal plants. *Korean Journal Medicinal Crop Sci.* 2004;12: 191-202.
 25. Elion, G. B. and George, H. H. Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase, *Biochem.Pharm.* 1966;15:863-880.
 26. Kelly, W. N. and Wyngarden, J. B. Enzymeology of gout, *Adv. Enzymol.* 1974;41:23-28.
 27. An, B. J. and Lee, J. T. Studies on biological activity from extract of *Crataegi Frutus*. *Kor. J. Herbology.* 1974;17:29-38.
 28. Jung, S. H., Jo, W. A., Son, J. H., Choi, E. Y., Park, C. I., Lee, I. C., An, B. J., Son, A. R., Kim, S. K., Kim, Y. S. and Lee, J. T. A study on the application of cosmetic materials and the physiological activities of *Forsythia koreana* Nakai. 2005;20:61-68.
 29. Imokawa, G. and Mishima, Y. Biochemical characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. *Br. J. Dermatol.* 1981;104:531-539.
 30. Nathan, C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *RASEB. J.* 1992;6: 3051-3064.
 31. Huang, Y. C., Guh, J. H., Cheng, Z. J., Chang, Y. L. Hwang, T. L., Liao, C. H. Tzeng, C. C. and C. Teng, M. Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives:involvement of I kappaB-alpha stabilization. *Eur. J. Pharmacol.* 2001;418:133-139.