

청보리 추출물과 분획물의 항산화, 항염 및 미백활성 연구

박 채 희 · 박 장 호 · 민 선 영 · 김 경 민* · 김 수 영* · 박 영 진†

건국대학교 의료생명대학 바이오융합과학부

*주식회사 아미코스메틱 제주연구소

(2019년 8월 7일 접수, 2019년 9월 11일 수정, 2019년 9월 24일 채택)

Studies on Antioxidant, Anti-inflammation and Whitening Activities of *Hordeum vulgare* L. Extracts and Their Fractions

Che Hwon Park, Jang Ho Park, Seon Young Min, Kyungmin Kim*, Suyeong Kim*, and Young Jin Park†

Department of Integrated Biosciences, College of Biomedical and Health Science, Konkuk University,
268 Chungwon-daero, Chungju-si 27478, Korea

*Jeju R&D Center, AMI Cosmetics Co., Ltd.,

(Received August 7, 2019; Revised September 11, 2019; Accepted September 24, 2019)

요 약: 본 연구는 청보리 추출물 및 용매 분획물의 항산화 활성, 항염활성 및 미백 활성을 평가하기 위해 수행하였다. 청보리의 용매별 분획물의 총 폴리페놀 함량은 13.58 ~ 40.06 mg GAE/g, 총 플라보노이드 함량은 7.67 ~ 13.67 mg CE/g으로 확인되었다. 청보리 용매 분획물의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거활성을 평가한 결과 클로로폼 분획물 400 µg/mL 처리 시 대조구인 ascorbic acid (30 µM)와 유사한 DPPH 라디칼소거능이 확인되었다. RAW 264.7 세포를 대상으로 한 NO생성 억제 활성 평가에서는 클로로폼 및 헥산 분획물이 대조구인 quercetin (15 µM)과 유사한 활성이 확인되었으며, 클로로폼 분획물 100 µg/mL 처리 시 IL-6, iNOS 및 COX2 유전자의 발현이 대조구 (lipopolysaccharide 1 µg/mL) 보다 통계적으로 유의한 수준으로 감소함이 확인되었다. 청보리 용매 분획물 중 클로로폼 분획물은 RBL-2H3 세포의 β-hexosaminidase 탈과립, IL-4 및 IL-13 유전자의 발현을 유의한 수준으로 억제하는 것이 확인되었다. 청보리 용매 분획물은 tyrosinase활성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 헥산 분획물 50 µg/mL 및 클로로폼 분획물 100 µg/mL은 유의한 수준으로 B16F10 세포의 멜라닌 생성을 억제하는 것이 확인되었다. 이러한 결과들은 청보리가 항염 및 미백 활성을 가지는 효과적인 화장품 소재로 활용 가능하다는 것을 시사한다.

Abstract: This study was carried out to evaluate the antioxidant, anti-inflammation, and whitening effect of *Hordeum vulgare* L. extracts and their fractions. Total polyphenol and flavonoid contents in fractions were varied from 13.58 to 40.06 mg GAE/g and 7.67 ~ 13.67 mg CE/g, respectively. Among the three fractions(chloroform, hexane, and water), 400 µg/mL of the chloroform fraction showed similar antioxidant activity to ascorbic acid (30 µM) against the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical. The chloroform and hexane fractions inhibited the NO production of RAW 264.7 cells similar to quercetin (15 µM) and the chloroform fraction of 100 µg/mL significantly reduced IL-6, iNOS and COX2 gene expression. Additionally, the chloroform fraction inhibited β-hexosaminidase degranulation, IL-4, and IL-13 gene expression in RBL-2H3 cells. All of the fractions inhibited tyrosinase activity in a concentration-dependent manner, and the hexane fraction at 50 µg/mL and the chloroform fraction at 100 µg/mL significantly inhibited melanin production of B16F10 cells. These results indicated that *H. vulgare* L. can be used as an effective cosmetic ingredient having anti-inflammation and whitening activity.

† 주 저자 (e-mail: yjpark@kku.ac.kr
call: 043)840-3601

Keywords: antioxidant, anti-inflammation, tyrosinase, *Hordeum vulgare* L., whitening activity

1. 서 론

현재까지 다양한 천연소재로부터 인체에 효과적인 생리활성을 가지는 활성 성분을 찾고자 하는 연구가 활발히 수행되고 있다. 이러한 이유 중 하나는 기존의 합성 소재보다 부작용이 적은 천연 유래 소재에 관한 관심이 높아지기 때문이다. 천연소재로부터 분리된 다양한 활성 성분에 관한 연구를 통하여 인체에 효과적인 생리활성물질을 발굴하고 이를 활용한 기능성 화장품의 개발도 활발히 진행되고 있다[1,2]. 이러한 활성 성분은 다양한 요인에 의해 생성되는 인체 내의 불안정하고 반응성이 높은 자유라디칼과 같은 산화 촉진물질의 과생성을 억제하여 돌연변이 및 세포 독성 등을 방지하는 역할을 한다[3]. 산화적 스트레스는 또한 피부세포 및 조직의 손상을 유발하여 피부 노화를 촉진한다는 연구결과가 다수 보고되어 산화적 스트레스를 줄이기 위한 다양한 소재의 발굴이 광범위하게 이루어지고 있다[4-6].

감염 혹은 조직의 상처로 인해 발생하는 염증은 다양한 인체질환을 유발하는데, 면역세포 중 호중구(neutrophil)는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)과 활성질소종(RNS, reactive nitrogen species) 및 대표적인 염증 유발 매개체로 알려진 nitric oxide (NO)를 생성한다[7]. 현재 다양한 피부질환 중 내인적, 외인적 요인에 의해 아토피 환자가 점차 증가하고 있으며 아토피피부염(atopic dermatitis)은 피부의 선천적 혹은 후천적 요인에 의해 발생한다. 선천적 혹은 후천적 요인에 의해 손상된 피부로 다양한 알레르기 유발 물질이 쉽게 체내로 침투하여 결과적으로 알레르기 염증반응이 더욱 증가하게 된다[8-10]. 아토피피부염과 관계된 다양한 염증 매개 인자 중 IL-4와 IL-13의 역할에 대한 연구가 가장 많이 이루어졌으며, 이들은 immunoglobulin E (IgE) 생성을 유도하고, 알레르기 피부염과 아토피피부염 환자에서 발현이 증가하는 것으로 보고되었다[11]. 또한, 비만세포에서 분비되는 베타-헥소사미니다제(β -hexosaminidase)는 염증반응을 유발하는 주요 전달물질이다. 따라서, β -hexosaminidase의 분비를 억제할 수 있는 물질은 일반적인 염증반응은 물론 아토피성 피부염 등과 같은 피부염 완화에도 효과적으로 활용될 수 있다[12-14].

피부의 멜라닌(melanin) 생성 과다로 인한 피부 색소 침

착 및 피부 노화 또한 활성 산소 종 및 활성 질소 종의 생성으로도 촉진된다고 보고되었으며, 이로 인해 항산화 물질에 의한 산화적 스트레스의 저감이 인체의 질병 예방 및 피부 건강에 중요한 것으로 보고되었다[15,16]. 멜라닌은 인간의 피부, 모발 및 눈동자 등의 색을 결정하는 색소 성분으로 인체 표피층의 멜라닌세포(melanocyte)에서 생성되어 자외선으로부터 피부세포를 보호하는 역할을 한다[17,18]. 멜라닌세포에서 합성되는 멜라닌은 tyrosinase가 tyrosine을 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)로, 또는 L-DOPA를 L-DOPA quinone으로 전환하는 산화 및 중합 반응으로 합성이 유도된다[19,20]. 과도한 멜라닌의 생성은 피부의 색소 침착을 일으키고 피부암을 유발할 가능성이 있다고 보고되었다[21]. 건강한 피부와 미용상의 측면에서 tyrosinase 및 멜라닌 합성 억제 활성을 가지는 새로운 소재를 발굴하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다[22-25].

보리(*Hordeum vulgare* L.)는 벼과(Poaceae/Gramineae)에 속하는 세계 4대 작물 중 하나이며, 특히 보리잎에는 비타민C, 비타민E, catechin, kaempferol, quercetin과 β -carotene 등의 다양한 생리활성물질이 풍부하게 들어있다고 보고되었다. 청보리는 누른빛을 띠는 일반 보리와는 달리 푸른빛을 띠는 보리를 의미하고 풋보리 또는 청맥이라고도 불리며 주로 가축의 사료로 활용되고 있다. 보리에 대한 영양학적 가치 및 다양한 생리활성에 관한 연구는 알려져 있으나, 청보리에 대한 체계적인 효능 검증은 매우 미흡한 실정이다[26-29]. 따라서 본 연구에서는 청보리 분획물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 분석과 DPPH radical 소거능 분석을 통한 항산화 효과와 nitric oxide 생성 및 염증 인자 발현 억제를 통한 항염 활성을 확인하고자 하였다. 또한, tyrosinase 억제 및 B16F10 세포의 멜라닌 생성 억제 능을 평가하여 향후 미백, 염증 억제 혹은 완화를 통한 아토피피부염 개선을 위한 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 청보리 추출물 및 분획물 제조

본 연구에서 사용된 청보리(*H. vulgare* L.)는 제주식물자원 연구소(Korea)에서 구매하였으며, 분쇄된 20 g의 청보리를 70%

에탄올 400 mL과 혼합하고 75 °C에서 2 h 동안 2회 환류 추출하였다. 추출물을 여과지(Whatman No.2, GE Health care, UK)를 이용하여 여과 후 감압 농축하여 추출물을 확보하였다. 또한, 추출 농축물을 100 mL의 증류수로 현탁 시키고 용매 분획하여 hexan, chloroform 및 물 분획물을 추가로 확보하였다.

2.2. 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 평가

각 용매별 추출물 및 분획물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 Dewanto et al.[30]에 의해 기술된 방법을 이용하여 분석하였다. 용매별 분획물 40 μ L (1 mg/mL)를 20% 탄산나트륨(Na_2CO_3 , Sigma, Korea) 수용액 60 μ L과 folin-ciocalteu (FC) (Sigma, Korea) 20 μ L와 혼합하여 10 min 동안 반응하였다. 반응 후 microplate reader (TECAN, Switzerland)로 700 nm에서 흡광도를 측정하여 건조 추출물 무게(g)에 대한 gallic acid equivalents (GAE)의 무게(mg)로 총 페놀 함량을 표현하였다. 또한, 용매별 분획물 25 μ L (1 mg/mL)를 5% NaNO_2 용액 8 μ L와 125 μ L의 멸균증류수를 혼합하여 5 min 동안 반응하였다. 반응 후 10% AlCl_3 15 μ L (Sigma, Korea)를 첨가하고, 6 min 동안 추가 반응하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 건조 추출물 무게(g)에 대한 catechin equivalents (CE)의 무게(mg)로 총 플라보노이드 함량을 표현하였다.

2.3. 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 평가

용매별 분획물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거 활성을 평가하였다. 100 μ L의 DPPH 용액(0.2 mM in methanol, Santa cruz Biotechnology, USA)과 메탄올에 희석된 용매별 추출물 및 분획물 100 μ L (100 μ g/mL)를 혼합 후, 실온에서 10 min 동안 반응시킨 뒤 microplate reader (TECAN, Switzerland)로 517 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군을 기준으로 free radical 소거 정도를 백분율로 나타내고, 양성 대조군으로 ascorbic acid (Sigma, Korea)를 사용하여 비교 분석하였다.

2.4. RAW 264.7 세포생존율 및 nitric oxide 생성 억제능 평가

항염증 활성 분석에 사용된 RAW 264.7 murine macrophage 는 american type culture collection (ATCC, USA)로부터 분양받아 사용하였다. 세포를 DMEM (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)배지에 10% fetal bovine serum (FBS) 및 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)를 첨가하고 37 °C (5% CO_2)에서 배양하였다. 배양된 세포를

10% FBS가 함유된 DMEM으로 24-well plate에 3×10^3 cells/well로 37 °C, 5% CO_2 조건에서 24 h 동안 부착시킨 후 시료를 농도별로 처리하여 72 h 배양 후 배지에 MIT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, Korea)를 첨가하고 암 조건에서 3 h 동안 추가 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고, dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma, Korea) 100 μ L를 첨가하여 570 nm 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다. 또한, 세포 생존율 평가와 같은 방법으로 배양된 세포에 다양한 농도의 청보리 용매별 분획물을 처리하여 37°C 에서 30 min 반응하였다. 반응 후 1 μ g/mL의 lipopolysaccharides (LPS) (Sigma, Korea)를 처리하고 37 °C 에서 24 h 추가 배양하여 nitric oxide (NO) 생성을 유도하였다. 530 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하고 nitrite 표준 검량 곡선과 비교하여 청보리 용매별 분획물의 NO 생성 억제 능을 평가하였다.

2.5. RBL-2H3 세포 생존율 및 β -Hexosaminidase 탈과립 억제능 평가

RBL-2H3 세포(ATCC, USA)를 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin를 포함한 DMEM 배지에 24-well plate에 2×10^5 cells/well로 분주하고 0.5 μ g/mL DNP-IgE를 첨가하여 37 °C (5% CO_2)에서 24 h 배양하였다. 배양 후 siraganian buffer(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 5.6 mM Glucose, 0.4 mM MgCl_2 , 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 1 mM CaCl_2 , 0.1% BSA, pH 7.2)로 2회 세척 후 다양한 농도의 청보리 용매별 분획물이 첨가된 siraganian buffer로 37°C에서 10 min 반응시켰다. 반응 후 DNP-BSA (100 ng/mL)로 37°C에서 30 min 처리 후 4°C에서 10 min 배양하여 반응을 정지시켰다. 반응이 완료된 시료를 12,000 rpm에서 2 min 원심분리 후 20 μ L의 상층액을 새로운 96 well plate에 분주하고 1 mM p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D- glucosaminidase (NAG)를 첨가하여 37°C에서 1 h 반응시켰다. 반응 후 정지액 (0.1M Na_2CO_3 , 0.1M NaHCO_3)을 첨가하고 405 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하여 β -hexosaminidase 탈과립 억제 능을 평가하였다. 청보리 용매별 분획물이 RBL-2H3 세포의 생존율에 미치는 영향은 RAW 264.7 세포 생존율 분석과 같은 방법으로 평가하였다.

2.6. 염증성 사이토카인 발현 억제능 평가

청보리 용매별 분획물 처리에 따른 RAW 264.7의 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, iNOS, COX2 및 IL-1 β 와 RBL-2H3 세포의 IL-4

Table 1. Primers Used in This Study

Cell	Target	Forward (5'-3')	Reverse (5'-3')
Raw 264.7	TNF- α	CCTGTAGCCACGTCGTAGC	TTGACCTCAGCGCTGAGTTG
	IL-6	TGCTGGTGACAACCACGGCC	GTACTIONCAGAAGACCAGAGG
	iNOS	CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC	GGCTGTCAGAGCCTCGTGGCTTTGG
	COX2	CACTACATCCTGACCCACTT	ATGCTCCTGCTTGAGTATGT
	IL-1 β	CAGGATGAGGACATGAGCACC	CTCTGCAGACTCAAACCTCCAC
	GAPDH	TGGCCTTCCGTGTTCCTAC	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA
RBL-2H3	IL-4	GGATGTAACGACAGCCCTCT	GTGTTCTTGTGGCCGTAAG
	IL-13	GCTCTCGCTTGCCTTGGTGGTC	CATCCGAGGCCCTTTGGTTACAGA
	GAPDH	TGCCACTCAGAAGACTGTGG	GGATGCAGGGATGATGTTCT

및 IL-13 사이토카인 발현 분석을 위해 RotorGene 6000 (Qiagen, Seoul, Korea)을 이용하여 정량 PCR 분석을 수행하였다. 다양한 농도의 청보리 용매별 분획물이 처리된 RAW 264.7 및 RBL-2H3 세포의 total RNA는 TRIzol 시약 (Invitrogen Life Technologies, USA)을 사용하여 추출하였으며, 1 μ g의 RNA를 oligo-dT 프라이머 및 ImProm-II reverse transcriptase (Promega, Korea)와 혼합하고 42 °C에서 60 min 반응하여 cDNA를 합성하였다. cDNA 1 μ L를 12.5 μ L의 Sensi-FAST SYBR No_ROX (Bioline, Australia) 및 10 pmol의 유전자 특이 프라이머(Table 1)와 혼합한 후 최종 25 μ L의 반응액으로 95 °C에서 3 min 1 회, 95 °C에서 5 s, 60 °C에서 10 s 로 40회 및 최종 72 °C에서 15 s 반응하여 정량 PCR 분석을 수행하였다. 각 사이토카인의 발현량은 대조구인 GAPDH 유전자 발현량을 기준으로 표준화하고 IgE 처리구와 비교하여 상대적인 발현량으로 표현하였다.

2.7. Tyrosinase 활성 저해능 평가 및 멜라닌 생성 저해능 평가

Tyrosinase 활성 측정은 mushroom tyrosinase (Sigma, Korea)와 기질인 L-tyrosine (Sigma, Korea)을 사용하였다. 2 mM L-tyrosine 35 μ L과 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 40 μ L를 다양한 농도의 시료와 혼합하고 250 U/mL의 mushroom tyrosinase 5 μ L를 첨가하여 37 °C에서 10 min간 반응하였다. Microplate reader로 475 nm에서 흡광도를 측정하여 tyrosinase 저해 활성을 평가하였으며, 상대적 tyrosinase 저해 활성을 양성 대조군(arbutin)과 비교하였으며, 다음의 공식에 의해 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase 저해율 (\%)} = [1 - (\frac{C-D}{A-B})] \times 100$$

A: 티로시나아제를 처리하여 반응한 시료 무처리군의 흡광도

B: 티로시나아제를 처리하지 않은 시료 무처리군의 흡광도

C: 티로시나아제를 처리하여 반응한 시료 처리군의 흡광도

D: 티로시나아제를 처리하지 않은 시료 처리군의 흡광도

2.8. B16F10 세포생존 및 멜라닌 생성 저해능 평가

흑색종 B16F10 세포주는 ATCC (CRL-6475)로부터 분양 받아 10% FBS (Gibco, Ireland)와 1% penicillin/streptomycin (Gibco, Ireland)이 포함된 DMEM (Gibco, Ireland)을 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 배양된 세포를 10% FBS가 함유된 DMEM으로 96-well plate에 3 x 10³ cells/well로 100 μ L 씩 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 24 h 동안 배양하였다. 청보리 용매별 분획물이 B16F10 세포의 생존율에 미치는 영향은 RAW 264.7 세포 생존율 분석과 동일한 방법으로 평가하였다. 청보리 용매별 분획물의 멜라닌 생성에 미치는 영향 평가를 위해 배양된 B16F10 세포를 10% FBS와 1% penicillin/streptomycin 이 포함된 DMEM 배지를 이용하여 6 well plate에 5 x 10⁵ cells/well로 2 mL 씩 분주하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 24 h 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배지로 교환하고 다양한 농도의 추출물과 100 nM의 α -MSH를 각 3회 반복 처리하여 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 72 h 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 PBS로 2회 세척한 후 각 well당 1 mL의 0.25% Trypsin EDTA (Gibco, Ireland)를 분주하여 세포를 회수하였다. 세포 pellet을 회수하기 위해 14,000 rpm으로 20 min 동안 원심 분리한 후 상등액을 제거하였으며, 상등액이 제거된 세포 pellet을 60 °C에서 1 h 동안 건조하였다. 건조된 세포 pellet에 10% DMSO가 함유된 1 N NaOH 150 μ L를 첨가하고 추가로 1 h 동안 60 °C 항온조에서 처리하여 세포 내의 멜라닌을 용해했다. 처리 후 각 시료 100 μ L를 96-well plate에 분주한 후 405 nm 파장에서 흡광도를

측정하여 멜라닌 함량을 분석하였다. 멜라닌 함량은 멜라닌 표준액을 이용한 표준정량곡선과 비교하여 분석하였다.

2.9. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 측정하고 평균값 ± 표준편차로 결과를 나타내었으며, 통계분석은 Prism (GraphPad Software Inc., USA) 프로그램을 사용하였다. 처리구간 유의성 검증은 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA) 및 Tukey's test에 의한 사후검정을 통해 수행하였다. 또한, 대조 구와 처리 구의 통계학적 유의성 검증은 Student's t-test를 사용하였으며 표준편차(p-value < 0.05) 수준에서 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 청보리 용매별 분획물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 및 DPPH Radical 소거 활성

용매에 따른 청보리 분획물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량을 Table 2에 나타내었다. 우선 folin-ciocalteu 시약을 사용하여 분석한 청보리의 70% 에탄올, 헥산, 클로로폼 및 물 분획물의 총 폴리페놀 함량은 순서대로 13.58, 21.86, 40.06 및 29.97 mg GAE/g로 클로로폼 분획물이 가장 많은 것으로 확인되었다. 그러나 총 플라보노이드 분석에서는 청보리의 70% 에탄올 및 물 분획물은 플라보노이드가 검출되지 않았으나, 헥산 및 클로로폼 분획물에서는 각각 7.67 및 13.67 mg CE/g로 분석되었다. 청보리 분획물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량은 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 많은 것으로 보고된 녹차의 총 폴리페놀 함량 (16.02 - 233.68 mg GAE/g)과 총 플라보노이드 함량 (44.90 mg CE/g)보다 상대적으로 낮은 수준인 것으로 확인되었다[31]. 청보리 용매별 분획물의 항산화 활성을 DPPH 라디칼소거능을 통하여 분석한 결과, 70% 에탄올

추출물 및 헥산 분획물을 제외하고 클로로폼 및 물 분획물에서 농도 의존적으로 DPPH 라디칼을 소거하는 것이 확인되었다(Figure 1). 또한, 청보리 클로로폼 분획물이 상대적으로 가장 많은 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량이 확인된 비와 같이 실제로 DPPH 라디칼 소거 활성도 청보리 클로로폼 분획물이 상대적으로 가장 높게 확인되었다. 청보리 클로로폼 분획물 400 µg/mL의 농도가 가장 우수한 소거 활성(42.72%)을 나타내었으며, 일반적으로 항산화능이 우수하다고 알려진 30 µM의 ascorbic acid와 유사한 수준(45.67%)으로 DPPH 라디칼을 소거하는 것이 확인되었다. 일반적으로 다양한 천연소재로부터 유래한 다양한 폴리페놀과 플라보노이드는 활성 산소 및 free radical을 효과적으로 제거하여 질병을 예방하거나 개선할 수 있다고 보고되었다[32,33]. 비록 청보리 70% 에탄올, 헥산, 클로로폼 및 물 분획물의 농도별 처리에 따른 DPPH 라디칼 소거 활성이 통계적으로 유의한 수준에서 양성 대조구인 ascorbic acid (30 µM)보다 우수하지는 않지만, 청보리 또한 효과적인

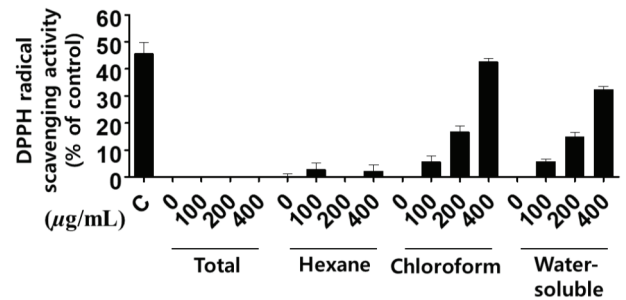


Figure 1. DPPH radical scavenging activities of *H. vulgare* L. extracts (Total) and their fractions (hexane, chloroform, and water). C: ascorbic acid (30 µM). Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test.

Table 2. Total Polyphenol and Flavonoid Contents of *Hordeum vulgare* L. Extracts and their Fractions

Extraction methods	Solvents	Fractions	Total polyphenol concentrations (mgGAE/gExt.)*	Total flavonoid concentrations (mgCE/gExt.)**
Reflux extraction	70% EtOH	Total	13.58 ± 0.62	-
		Hexane	21.86 ± 0.27	7.67 ± 3.33
		Chloroform	40.06 ± 0.56	13.67 ± 0.76
		Water-soluble	29.97 ± 0.72	-

*Expressed as milligram gallic acid equivalents (GAE) per gram extract.

**Expressed as milligram catechin equivalents (CE) per gram extract.

인 소재로 사용될 가능성이 크다고 사료된다.

3.2. 청보리 용매별 분획물이 NO 생성에 미치는 영향

청보리 용매별 분획물의 항염 활성 평가에 앞서 이들이 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 평가했다(Figure 2A). 용매별 분획물을 농도별(50, 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$)로 처리하여 RAW 264.7 세포 생존율에 미치는 영향을 평가한 결과, hexan 분획물 200 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도와 클로로폼 분획물 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 제외하고 모든 처리에서 LPS단독 처리 구보다 높거나 유사한 세포 생존율을 확인하였다. 청보리 용매별 분획물 처리에 따른 RAW 264.7 세포의 NO 생성 억제 활성을 평가한 결과, 세포 생존율을 저해하지 않는 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 70% EtOH 추출물, 50 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 hexan 분획물, 100 및 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 클로로폼 분획물이 LPS단독 처리 구보다 유의적인 수준에서 RAW 264.7 세포의 NO생성을 억제하는 것이 확

인되었으며, 일반적으로 NO 생성 억제 활성이 우수하다고 알려진 양성 대조구인 quercetin [34] 처리 구와 유사한 수준으로 RAW 264.7 세포의 NO생성을 억제하는 것이 확인되었다(Figure 2B). 청보리 물 분획물은 모든 농도에서 RAW 264.7 세포의 NO생성을 효과적으로 억제하지 못하였으나, hexan 및 클로로폼 분획물이 상대적으로 가장 효과적으로 RAW 264.7 세포의 NO생성을 억제하는 것이 확인되었다.

3.3. 청보리 용매별 분획물이 β -hexosaminidase 탈과립에 미치는 영향

청보리 용매별 분획물의 RBL-2H3 세포에 대한 β -hexosaminidase 탈과립 억제 활성 평가에 앞서 이들이 세포 생존율 평가를 수행한 결과, hexan 및 클로로폼 분획물 100 - 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도와 물 분획물 100, 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도를 제외하고 모든 처리에서 LPS단독 처리 구보다 높거나 유사한 세포 생존율을 확인하였다(Figure 3A). 청보리 용매별 분획물 처리에 따른 RBL-2H3 세포의 β -hexosaminidase 탈과립 억제 활성을 평가한 결과, 세포 생존율을 저해하지 않는 200 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 70% EtOH 추출물, 25 및 50 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 hexan 및 클로로폼 분획물 처리는 양성 대조구인 cyclosporin A[35] 처리 구보다 효과적이진 않았으나, immunoglobulin E (IgE) 단독 처리구보다 유의적인 수준에서 RBL-2H3 세포의 β -hexosaminidase 탈과립을 억제하는 것이 확인되었다(Figure 3B). 그러나 RBL-2H3 세포의 생존율을 저해하지 않는 200 $\mu\text{g/mL}$ 농도 및 세포 생존율을 저해하나 이보다 낮은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 물 분획물은 RBL-2H3 세포의 β -hexosaminidase 탈과립율이 IgE 단독 처리구 보다 상대적으로 높게 나타나는 것이 확인되었다(Figure 3B).

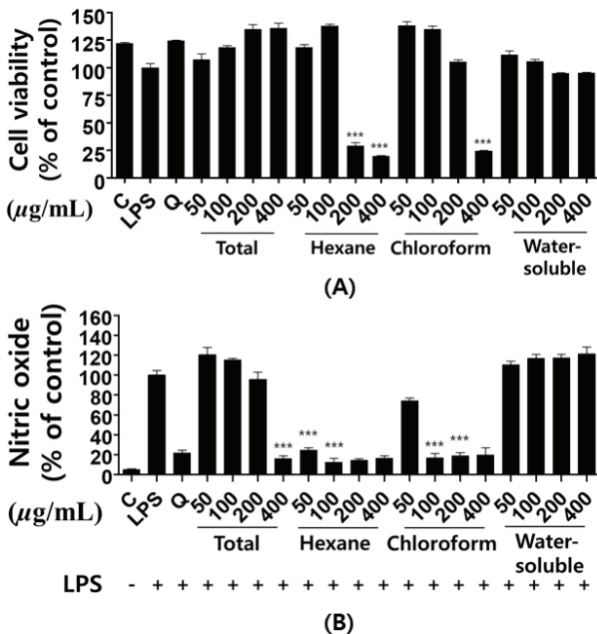
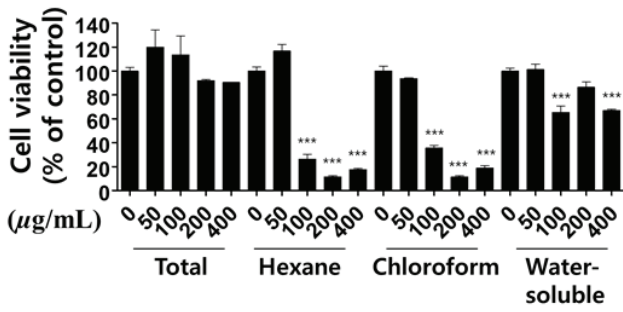


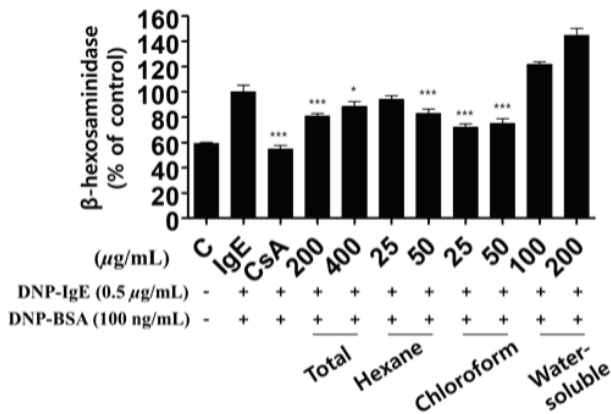
Figure 2. Effects of *H. vulgare* L. extracts (Total) and their fractions (hexane, chloroform, and water) on Raw 264.7 cell viability (A) and nitric oxide production (B). LPS induced Raw 264.7 cells were treated with various concentration of LPS of samples (50 ~ 400 $\mu\text{g/mL}$). C: non-treated control, LPS: lipopolysaccharide treated control, Q: quercetin (5 μM) treated control. Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. *** $p < 0.001$ versus LPS treated control sample.

3.4. 청보리 용매별 분획물이 사이토카인 발현에 미치는 영향

청보리 분획물이 RAW264.7 및 RBL-2H3 세포에 대한 사이토카인 발현에 미치는 영향 평가는 NO생성 및 β -hexosaminidase 탈과립 억제 활성이 가장 우수한 클로로폼 분획물을 사용하여 평가하였다. 우선 LPS 처리에 의해 RAW264.7 세포의 TNF- α , IL-6, iNOS, COX2, IL-1 β 는 LPS를 처리하지 않은 대조군에 비해 증가하였으며, 청보리 클로로폼 분획물 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 처리는 IL-6, iNOS, COX2 사이토카인의 발현을 유의적인 수준에서 억제하는 것이 확인되었다(Figure 4A). 그러나, 청보리 클로



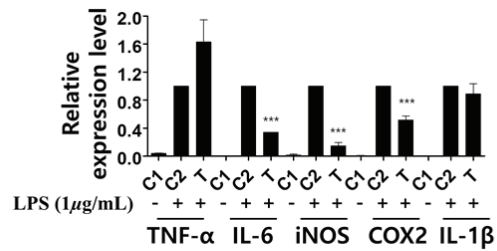
(A)



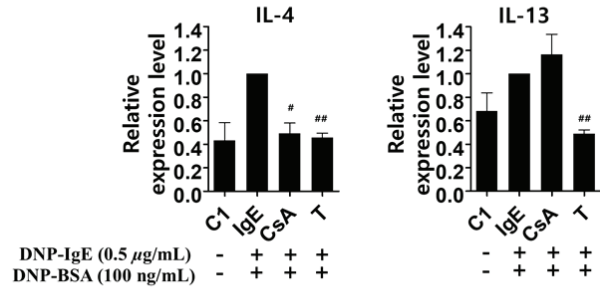
(B)

Figure 3. Effects of *H. vulgare* L. extracts (Total) and their fractions (hexane, chloroform, and water) on RBL-2H3 cell viability (A) and β -hexosaminidase release (B). RBL-2H3 cells were treated with various concentration of samples (25 ~ 400 μ g/mL). C: non-treated control, IgE: immunoglobulin E treated control, Csa: Cyclosporin A (1 μ g/mL) treated control. Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. *** p < 0.001 and * p < 0.05 versus IgE treated control sample.

로폼 분획물 100 μ g/mL 농도의 처리가 TNF- α 및 IL-1 β 발현을 효과적으로 억제하지 못하였으며, TNF- α 발현은 오히려 증가시키는 것이 확인되었다. 또한, 청보리 클로로폼 분획물 50 μ g/mL 농도의 처리는 RBL-2H3의 IL-4 및 IL-13 발현을 유의적인 수준으로 감소시키는 것이 확인되었다(Figure 4B). TNF- α , IL-6, iNOS, COX2 및 IL-1 β 는 면역세포의 염증반응 조절 및 선천 면역반응과 만성염증반응에 관여하는 중요한 인자로 알려져 있으며, 특히 IL-4 및 IL-13은 급성 및 만성 아토피 발생에 중요한 역할을 하는 염증 매개 인자로 보고되었다[36-38]. 본 연구결과에서 확인된 청보리 분획물의 항염 및 염증 인자 발현 억제 활성



(A)



(B)

Figure 4. Effect of *H. vulgare* L. on various cytokines productions in RAW 264.7 (A) and RBL-2H3 cells (B). Raw 264.7 and RBL-2H3 cells were treated with 100 and 50 μ g/mL *H. vulgare* L. chloroform fraction, respectively. C1: non-treated control, C2: lipopolysaccharide treated control, Csa: Cyclosporin A (1 μ g/mL) treated control, T: *H. vulgare* L. chloroform fraction treated samples. Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. *** p < 0.001 versus LPS treated control sample. # p < 0.05 and ## p < 0.01 versus IgE treated control sample by Student's *t*-test.

을 바탕으로 향후 추가적인 연구를 통하여 실제 이러한 활성을 가지는 활성 성분의 규명 등이 필요하며, 이를 통해 청보리가 염증 억제 및 아토피 개선을 위한 소재로 활용 가능할 것으로 사료된다.

3.5. 청보리 용매별 분획물이 tyrosinase 활성 및 멜라닌 생성에 미치는 영향

청보리 용매별 분획물의 tyrosinase 억제 활성 평가를 수행한 결과, 모든 분획물이 농도 의존적으로 tyrosinase 활성을 억제하는 것이 확인되었다(Figure 5A). 청보리 물 분획물 400 μ g/mL 농도의 처리는 tyrosinase 활성을 56.63% 수준으로 억제하였으며, 양성대조구인 0.5 mM의 arbutin 처리구의 억제 활성인 56.21%와 유사한 것이 확인되었다.

Tyrosinase는 멜라닌 생합성에 중요한 역할을 하는 효소로 tyrosinase 활성 억제 활성을 평가하여 다양한 잠재적 미백 소재의 발굴이 가능하다[39]. 따라서 본 연구에서도 항염 활성이 우수한 청보리 핵산 및 클로로폼 분획물의 B16F10 세포에 대한 멜라닌 생성 억제 활성을 평가하였다. B16F10 세포에 대한 멜라닌 생성 억제 활성 평가에 앞서 청보리 용매별 분획물이 세포 생존율에 미치는 영향을 분석한 결과, 50 µg/mL의 핵산 분획물 및 50 - 100 µg/mL의 클로로폼 분획물 처리는 B16F10세포의 생존율에 영향을 미치지 않는 것이 확인되었다(Figure 5B). 따라서 세포 생존율에 영향을 미치지 않는 이들 분획물의 농도로 B16F10세포에

대한 멜라닌 생성 억제 활성을 평가한 결과, 50 µg/mL의 핵산 분획물 처리는 α-MSH가 처리된 대조구와 비교하여 28.96%로 멜라닌 생성을 억제하였으며, 양성 대조 구인 arbutin 처리구의 억제 활성인 79.52% 보다 통계적으로 유의한 수준에서 효과적으로 B16F10세포의 멜라닌 생성을 억제하는 것이 확인되었다(Figure 5C). 또한, 50 - 100 µg/mL의 청보리 클로로폼 분획물 처리된 B16F10세포에서 α-MSH가 처리된 대조구 및 arbutin 처리구 보다 낮은 수준의 멜라닌 생성량이 확인되었으며, 100 µg/mL의 청보리 클로로폼 분획물 처리는 20.32%로 arbutin 처리구 보다 통계적으로 유의한 수준으로 B16F10세포의 멜라닌 생성을 억제하는 것이 확인되었다(Figure 5C). 현재까지 가장 잘 알려진 arbutin은 tyrosinase 활성 억제 및 미백 활성을 가지는 소재로 보고되었으나, 안정성이 떨어져 사용이 제한된 것으로 보고되었다[40]. 비록 B16F10세포의 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하는 농도의 클로로폼 및 핵산 분획물 처리가 tyrosinase의 활성을 효과적으로 억제하지는 않았으나, 청보리에도 멜라닌 생성을 효과적으로 억제하는 활성 성분이 존재한다고 판단되며, 향후 추가적인 분석을 통하여 이미 개발된 미백 소재의 단점을 극복할 수 있는 효과적인 신규 미백 활성 물질의 발굴이 가능할 것으로 사료된다.

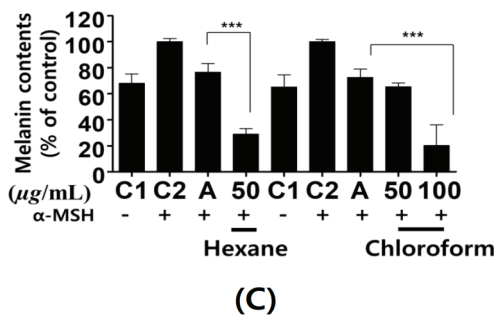
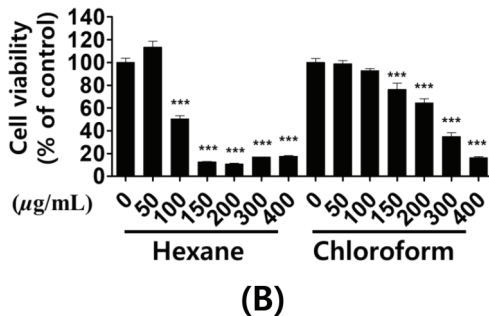
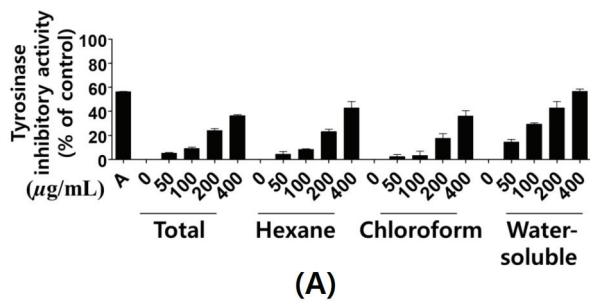


Figure 5. Tyrosinase inhibitory activities (A), B16F10 cytotoxicities (B), and anti-melanogenesis effects (C) of *H. vulgare* L. A: arbutin (0.5 mM) treated control. C1: non-treated control. C2: α-MSH treated control. Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. ****p* < 0.001 versus arbutin treated control sample.

4. 결 론

본 연구에서는 청보리(*Hordeum vulgare* L.) 분획물의 기능성 화장품 소재로서의 이용 가능성을 확인하고 향후 추가적인 연구를 통하여 새로운 기능성 화장품 개발을 모색하고자 수행하였다. 현재까지 다양한 식물로부터 비타민 C, 비타민 E 및 카로티노이드 및 페놀계 산화 방지제 등의 다양한 항산화 성분이 보고되었다[41-43]. 본 연구에서는 청보리를 대상으로 다양한 용매 분획물을 대상으로 항산화, 항염 및 미백 효과를 규명하고자 하였다. 청보리 70% EtOH추출물과 용매별 분획물의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 클로로폼 분획물에서 가장 높게 분석되었으며, 실제로 DPPH 라디칼 소거 활성도 청보리 클로로폼 분획물이 상대적으로 가장 높게 확인되었다. 또한, 청보리 클로로폼 분획물 400 µg/mL의 농도는 30 µM의 ascorbic acid와 유사한 수준으로 DPPH 라디칼을 소거하는 것이 확인되었다. 청보리 용매별 분획물의 항염활성 평가에서 세포 생존율을 저해하지 않는 농도에서 70% EtOH 추출물, 핵산 분획물, 클로로폼 분획물이 quercetin 처리 구와 유사

하게 유의적인 수준에서 RAW 264.7 세포의 NO생성을 억제하는 것이 확인되었다. 또한, 청보리 클로로폼 분획물은 IL-6, iNOS, COX2 사이토카인의 발현을 유의적인 수준에서 억제하는 것이 확인되었다. 청보리 핵산 및 클로로폼 분획물 처리는 IgE 단독 처리 구보다 유의적인 수준에서 RBL-2H3 세포의 β -hexosaminidase 탈과립을 억제하였고, 급성 및 만성 아토피 발생에 중요한 역할은 하는 IL-4 및 IL-13 발현을 감소시키는 것이 확인되었다. 마지막으로 청보리 용매별 분획물이 농도 의존적으로 tyrosinase 활성을 억제하는 것이 확인되었으며, 핵산 및 클로로폼 분획물 처리는 통계적으로 유의한 수준에서 α -MSH가 처리된 대조구와 arbutin 처리 구보다 효과적으로 B16F10 세포의 멜라닌 생성을 억제하는 것이 확인되었다. 이러한 결과는 향후 청보리가 미백 기능성 화장품 소재 및 아토피 개선을 위한 소재로써 활용 가능성이 크다는 것을 시사하는 것이다.

Acknowledgment

본 연구는 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원이 지원하는 광역협력권산업 육성사업으로 수행된 연구결과입니다(P0002201).

Reference

1. T. Xie, S. Song, S. Li, L. Ouyang, L. Xia, and J. Huang, Review of natural product databases, *Cell Prolif.*, **48**(4), 398 (2015).
2. E. C. Milam and A. R. Evan, An approach to cosmetics, *J Drugs Dermatol*, **15**(4), 452 (2016).
3. H. Sies, Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, *Redox Biol*, **4**, 180 (2015).
4. G. Bjørklund and S. Chirumbolo, Role of oxidative stress and antioxidants in daily nutrition and human health, *Nutrition*, **33**, 311 (2017).
5. E. D. Lephart, Skin aging and oxidative stress: Equol's anti-aging effects via biochemical and molecular mechanisms, *Ageing Res. Rev.*, **31**, 36 (2016).
6. K. Kandola, A. Bowman, and M. A. Birch-Machin, Oxidative stress—a key emerging impact factor in health, ageing, lifestyle and aesthetics, *Int J Cosmet Sci*, **37**(S2), 1 (2015).
7. R. Medzhitov, Origin and physiological roles of inflammation, *Nature*, **454**(7203), 428 (2008).
8. C. N. Palmer, A. D. Irvine, A. Terron-Kwiatkowski, Y. Zhao, H. Liao, S. P. Lee, D. R. Goudie, A. Sandilands, L. E. Campbell, F. J. Smith, G. M. O'Regan, R. M. Watson, J. E. Cecil, S. J. Bale, J. G. Compton, J. J. DiGiovanna, P. Fleckman, S. Lewis-Jones, G. Arseculeratne, A. Sergeant, C. S. Munro, B. El Houate, K. McElreavey, L. B. Halkjaer, H. Bisgaard, S. Mukhopadhyay, and W. H. McLean, Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis, *Nat. Genet.*, **38**(4), 441 (2006).
9. E. H. Choi and N. Y. Yoon, Pathogenesis of atopic dermatitis, *J. Korean Med. Assoc.*, **57**(3), 218 (2014).
10. N. Y. Yoon, H. Y. Wang, M. Jun, M. Jung, D. H. Kim, N. R. Lee, K.-W. Hong, S. J. Seo, E. Choi, J. Lee, H. Lee, and E. H. Choi, Simultaneous detection of barrier-and immune-related gene variations in patients with atopic dermatitis by reverse blot hybridization assay, *Clin. Exp. Dermatol.*, **43**(4), 430 (2018).
11. M. Neis, B. Peters, A. Dreuw, J. Wenzel, T. Bieber, C. Mauch, T. Krieg, S. Stanzel, P. Heinrich, and H. Merk, Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis, *J. Allergy Clin. Immunol.*, **118**(4), 930 (2006).
12. S. Tewtrakul and A. Itharat, Anti-allergic substances from the rhizomes of *Dioscorea membranacea*. *Bioorg. Med. Chem.*, **14**(24), 8707 (2006).
13. H. Matsuda, T. Morikawa, H. Managi, and M. Yoshikawa, Antiallergic principles from *Alpinia galanga*: structural requirements of phenylpropanoids for inhibition of degranulation and release of TNF- α and IL-4 in RBL-2H3 cells, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**(19), 3197 (2004).
14. A. Chukaew, C. Pongimanont, C. Karalai, and S. Tewtrakul, Potential anti-allergic acridone alkaloids from the roots of *Atalantia monophylla*. *Phytochemistry*, **69**(14), 2616 (2008).
15. S. Pillai, C. Oresajo, and J. Hayward, Ultraviolet

- radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation—a review, *Int J Cosmet Sci*, **27**(1), 17 (2005).
16. U. Panich, T. Onkoksoong, K. Kongtaphan, K. Kasetsinsombat, P. Akarasereenont, and A. Wongkajornsilp, Inhibition of UVA-mediated melanogenesis by ascorbic acid through modulation of antioxidant defense and nitric oxide system, *Arch. Pharm. Res.*, **34**(5), 811 (2011).
 17. S. Ito and K. Wakamatsu, Quantitative analysis of eumelanin and pheomelanin in humans, mice, and other animals: a comparative review, *Pigment Cell Res.*, **16**(5), 523 (2003).
 18. Y. M. Yoon, S. H. Bae, S. K. An, Y. B. Choe, K. J. Ahn, and I. S. An, Effects of ultraviolet radiation on the skin and skin cell signaling pathways, *Kor. J. Aesthet. Cosmetol.*, **11**(3), 417 (2013).
 19. J. W. Kim, H. I. Kim, J. H. Kim, O. C. Kwon, E. S. Son, C. S. Lee, and Y. J. Park, Effects of ganodermanondiol, a new melanogenesis inhibitor from the medicinal mushroom *Ganoderma lucidum*, *Int J Mol Sci*, **17**(11), 1798 (2016).
 20. Y. U. Jeong and Y. J. Park, Studies on antioxidant and whitening activities of *Salix gracilistyla* extracts, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **44**(3), 317 (2018).
 21. M. Brenner and V. J. Hearing, The protective role of melanin against UV damage in human skin, *Photochem. Photobiol.*, **84**(3), 539 (2008).
 22. S. Parvez, M. Kang, H. S. Chung, C. Cho, M. C. Hong, M. K. Shin, and H. Bae, Survey and mechanism of skin depigmenting and lightening agents, *Phytother Res*, **20**(11), 921 (2006).
 23. N. Baurin, E. Arnoult, T. Scior, Q. T. Do, and P. Bernard, Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity, *J Ethnopharmacol*, **82**(2-3), 155 (2002).
 24. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *FASEB J.*, **5**(14), 2902 (1991).
 25. G. Prota, The chemistry of melanins and melanogenesis, *Prog Chem Org Nat Prod*, **64**, 93 (1995).
 26. C. S. Eun, E. Y. Hwang, S. O. Lee, S. A. Yang, and M. H. Yu, Anti-oxidant and anti-inflammatory activities of barley sprout extract. *J. Life Sci.*, **26**(5), 537 (2016).
 27. S. H. Jo, C. Y. Cho, K. S. Ha, E. J. Choi, Y. R. Kang, and Y. I. Kwon, The antioxidant and antimicrobial activities of extracts of selected barley and wheat inhabited in Korean Peninsula, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **42**(7), 1003 (2013).
 28. G. Nirupama, B. H. Mohammad, K. R. Dilip, and P. B. Nigel, A Review of extraction and analysis of bioactives in oat and barley and scope for use of novel food processing technologies, *Molecules*, **20**(6), 10884 (2015).
 29. S. J. Park, J. S. Lee, Y. H. Hoe, E. Y. Moon, and M. H. Kan, Physiology activity of barley leaf using different drying methods, *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **37**(12), 1627 (2008).
 30. V. Dewanto, X. Wu, K. K. Adom, and R. H. Liu, Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.*, **50**(10), 3010 (2002).
 31. M. S. Stankovic, N. Niciforovic, M. Topuzovic, and S. Solujic, Total phenolic content, flavonoid concentrations and antioxidant activity, of the whole plant and plant parts extracts from *Teucrium montanum* L. var. *montanum*, f. *supinum* (L.) Reichenb, *Biotechnol. Biotechnol. Equip.*, **25**(1), 2222 (2011).
 32. N. Nakatani, Recent advances in the study on natural antioxidants, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**, 569 (1990).
 33. K. Nozaki, Current aspect and future condition of phytogetic antioxidants, *Fragrance Journal*, **6**, 99 (1986).
 34. F. Perez-Vizcaino, and J. Duarte, Flavonols and cardiovascular disease, *Mol. Aspects Med.*, **31**(6), 478 (2010).
 35. A. Laupacis, P. A. Keown, R. A. Ulan, N. McKenzie, and C. R. Stiller, Cyclosporin A: a powerful

- immunosuppressant, *Can Med Assoc J*, **126**(9), 1041 (1982).
36. K. Ishihara and T. Hirano, IL-6 in autoimmune disease and chronic inflammatory proliferative disease, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **13**(4-5), 357 (2002).
37. J. M. Sforcin, J. T. Amaral, A. Jr. Fernandes, J. P. Sousa, and J. K. Bastos, Lemongrass effects on IL-1 β and IL-6 production by macrophages, *Nat. Prod. Res.*, **23**(12), 1151 (2009).
38. K. H. Hanel, C. Cornelissen, B. Luscher, and J. Baron, Cytokines and the skin barrier, *Int J Mol Sci*, **14**(4), 6720 (2013).
39. A. Slominski, D. J. Tobin, S. Shibahara, and J. Wortsman, Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation, *Physiol. Rev.*, **84**(4), 1155 (2004).
40. K. Maeda and M. Fukuda, Arbutin: mechanism of its depigmenting action in human melanocyte culture, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **276**(2), 765 (1995).
41. Y. Cao and R. Cao, Angiogenesis inhibited by drinking tea, *Nature*, **398**(6726), 381 (1999).
42. H. L. Madsen and G. Bertelsen, Spices as antioxidants, *Trends Food Sci. Technol.*, **6**(8), 271 (1995).
43. F. Shahidi, P. K. Janitha, and P. D. Wanasundara, Phenolic antioxidants, *Crit Rev Food Sci Nutr*, **32**(1), 67 (1992).