

개나리꽃의 항산화효과 및 화장품소재에 관한 연구

정수현[#], 조우아, 손준호, 최은영, 박찬익,
이인철, 안봉진, 손애량¹, 김세기², 김영선², 이진태*

대구한의대학교 화장품 약리학과, 1: 거창도립대학 뷰티디자인과, 2: (주)이지함코스메틱

A Study on the Application of Cosmetic Materials and the Physiological Activities of *Forsythia koreana* Nakai

Su-Hyun Jung[#], Woo-A Jo, Jun-Ho Son, Eun-Young Choi, Chan Ik Park, In-Chul Lee,
Bong-Jeun An, Ae-Ryang Son¹, Sae-Ki Kim², Young-Sun Kim², Jin-Tae Lee*

Dept. of Cosmeceutical Science Daegu Haany University, 1: Dept. of Beauty & Make up
Geochang provincial college, 2: LJH Cosmetic Co. Ltd.

ABSTRACT

Objectives : This is the study of the application as the ingredients of cosmetics through the examination of the function for physiological activity of *Forsythia koreana* Nakai.

Methods : *Forsythia koreana* Nakai, 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, nitric oxide inhibition have been investigated in the physiological activity measurement of function experiment.

Results : According to the physiological activity measurement of function experiment, it had been found that the electron donating ability, at over 100ppm of water extract and ethanol extract showed relatively high donating ability by more than 80%. and as a result of measuring. In the xanthine oxidase inhibition test, 500ppm of water extract showed an effect of 18% and ethanol extract showed an effect of 31.5%. In the tyrosinase inhibition test, 5000ppm of water extract showed an effect of 60% and ethanol extract showed an effect of 85%. In the anti-inflammatory test, the water extract and ethanol extract inhibited the generation of nitric oxide.

Conclusions : The results indicated that extract of *Forsythia koreana* Nakai can be used as a natural ingredients with biological function in cosmetics ingredients.

Key words : *Forsythia koreana* Nakai, DPPH, SOD-like activity, Xanthine oxidase, Tyrosinase, Nitric oxide

*교신저자 : 이진태, 경북 경산시 유곡동 대구한의대학교 화장품약리학과
Phone : 82-53-819-1430 Fax : 82-53-819-1430 E-mail :jtlee@dhu.ac.kr

[#]제1저자 : 정수현, 경북 경산시 유곡동 대구한의대학교 화장품약리학과
Phone : 82-53-819-1435 E-mail : murea@paran.com

· 접수 : 2005년 4월 7일 · 수정 : 2005년 6월 15일 · 채택 : 2005년 6월 20일

서론

개나리(*Forsythia koreana* Nakai)는 물푸레나무과(Oleaceae)의 낙엽성 소교목으로 잎은 장타원형 또는 주걱모양으로, 꽃은 노란색이며 4월경에 피고, 열매는 난상 타원형이며 9월에 성숙한다. 생약명은 연교(連翹)이며 망춘(望春), 개나리꽃나무, 신리화, 개나리나무, 금강방물개나리 등의 속명이 있다. 이 밖에 지역에 따라 다른 이름이 있으며 이 나무의 열매를 조제한 것을 연교라 하여 약재로 쓰인다. 연교(連翹) *Forsythiae Fructus*는 의성개나리(*Forsythiae viridissima*), 개나리(*F. koreana*) 또는 중국개나리(*F. suspensa*)의 열매로서 난원형 삭과로, 이 열매를 조제해 약재로 쓴다¹⁻³⁾. 연교는 항균작용⁴⁾과 항염증⁵⁾ 및 혈압강하작용⁶⁾등의 연구들이 이루어 졌으나 개나리꽃에 대한 연구는 미비한 실정이다. 최근 자연주의와 천연성분을 선호하며 다양한 한방 및 천연원료로 한 화장품의 개발이 잇따르고 있다. 이러한 한방이나 천연물을 사용한 화장품은 장기간 사용하여도 부작용이 없고 그 효과가 지속적이며, 전반적으로 피부를 좋게 한다는 것이 가장 큰 장점이라고 할 수 있다⁷⁾. 이와 같이 천연성분인 개나리의 꽃을 이용해 생리활성 및 염증억제능을 실험해 화장품 신소재로서의 가능성을 탐색하였다.

재료 및 방법

1. 공시재료

본 실험에 사용된 개나리는 4월 개화기에 경북 경산시 유곡동 대구한의대 야산에서 채집하여 사용하였다. 시료의 추출은 열수 추출물의 경우 개나리를 10배 양의 증류수를 가하여 85°C에서 3시간 환류냉각 추출하여 상등액과 침전물을 분리하여 3회 반복 추출하였다. 시료의 에탄올 추출은 80%에탄올 10배의 양을 가하여 실온에서 24시간 침지하여 상등액과 침전물을 분리하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 각 추출물을 원심분리 및 여과, 농축하여 동결건조 후 냉장실에 보관하면서 본 실험의 시료로 사용하였다.

2. 사용 시약 및 기기

실험에 사용된 시약은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma chemical Co., USA), Pyrogallol (sigma chemical Co., USA), Xanthine (sigma chemical Co., USA), xanthine oxidase (sigma chemical Co., USA), Butylated hydroxyanisole (sigma chemical Co., USA), Mushroom tyrosinase (sigma chemical Co., USA), L-3,4-dihydroxyphenyl-alanine (L-DOPA, sigma chemical Co., USA), Kojic acid (sigma chemical Co., USA), Sodium nitrite (Junsei chemical Co., Japan), Griess reagent (sigma chemical Co., USA) 에서 구입하여 사용하였다. 그 외의 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

실험에 사용된 기기는 UV/vis spectrophotometer (Hitachi 200-10, Japan), ELISA reader (Bio rad, Co., Japan), Rotary vacuum evaporator (Tokyo, Rikakikai Co., Japan), Centrifuge (Hitachi, Japan), Freeze drier (Ilsin, Korea), Microscope (Olympus, Japan), CO₂ Incubator (Hanbaek Scientific Co., Korea), pH meter (Metrohm, Switzerland), B.O.D Incubator (Hanbaek Co., Korea), Autoclave (Hanbaek Scientific Co., Korea) 등을 사용하여 측정하였다.

3. 전자공여능 측정

전자공여능 (EDA; electron donating abilities)은 Blois⁸⁾의 방법을 따라 측정하였다. 각 시료용액 2mL에 0.2mM의 1, 1-diphenyl- 2-picryl-hydrazyl (DPPH) 1mL 넣고 교반한 후 30분간 방치한 다음 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여능은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{전자공여능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

4. Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SOD 유사활성은 Marklund⁹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.2mL에 Tris-HCl 완충용액 (50mM tris+10mM EDTA, pH 8.5) 2.6mL와 7.2mM pyrogallol 0.2mL 가하여 25℃에서 10분간 반응시킨 후 1N HCl 0.1mL를 가하여 반응을 정지시키고 반응액 중 산화된 pyrogallol의 양을 420nm에서 측정하였다. SOD 유사활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{SOD유사활성능(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

5. Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase 저해활성 측정은 Stirpe와 Corte¹⁰⁾의 방법에 따라 측정하였다. 각 시료용액 0.1mL와 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 0.6mL에 xanthine (2mM)을 녹인 기질액 0.2mL를 첨가하고 xanthine oxidase (0.2U/mL) 0.1mL를 가하여 37℃에서 5분간 반응시킨 후 1N HCl 1mL를 가하여 반응을 종료시킨 다음 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292nm에서 측정하였다. Xanthine oxidase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{반응구의 uric acid 생성량}}{\text{대조구의 uric acid 생성량}} \right) \times 100$$

6. Tyrosinase 저해 활성 측정

Tyrosinase 저해활성 측정은 Yagi 등¹¹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 반응구는 0.175M sodium phosphate buffer (pH 6.8) 0.5mL에 10mM

L-DOPA을 녹인 기질액 0.2mL 및 시료용액 0.1mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase(110U/mL) 0.2mL 첨가하여 25℃에서 2분간 반응시켜 반응액 중에 생성된 DOPA chrome을 475nm에서 측정하였다. tyrosinase 저해활성은 시료용액의 첨가구와 무첨가구의 흡광도 감소율로 나타내었다.

$$\text{저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

7. Nitric oxide 저해활성 측정

Raw 264.7 cell line으로부터 생성된 nitric oxide의 양은 Green¹²⁾의 방법을 통하여 다음과 같이 실험하였다. 세포 배양액 중에 존재하는 NO²를 gress 시약 100μl을 혼합하여 반응하여 10분 동안 반응시킨 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다. NO²의 양은 NaNO₂의 표준곡선을 이용하여 정량하였다.

$$\text{생장저해율(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}} \right) \times 100$$

결과 및 고찰

1. 전자공여능확인

생체막 구성성분을 파괴하며 각종 산화작용을 나타내는 활성산소를 소거하여 줄 수 있는 활성을 알아보기 위하여 측정에 사용된 DPPH는 안정한 자유라디칼로서 시료가 항산화활성을 갖고 있다면, DPPH가 갖고 있는 지질산화에 관여하는 free radical의 비공유결합을 소거하여 DPPH의 환원성을 높일 것이고, 보라색의 DPPH가 환원이 많이 될수록 보라색을 잃게 되어 UV 측정시 그 수치도 낮아진다⁸⁾. 시료가 free radical을 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화활성 및 활성산소를 비롯한 다른 라디칼에 대한 소거활성을 기대할 수

있고 인체 내의 활성 산소에 의한 노화를 억제하는 척도로 이용될 수 있다.

개나리 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성 영향을 측정된 결과는 Fig. 1과 같이 나타내었다. 열수 추출물과 에탄올추출물 모두 100ppm에서부터 80% 이상의 효과를 나타내었다. 이것은 Jung 등¹³⁾의 연구결과에서 1000ppm 일때 박하(*Mentha arvensis*) 87.7%, 비파엽(*Eriobotrya japonica*) 84.9%, 초과(*Arnoomum costatum*) 82.9%를 나타내었던 것보다 높은 효과를 나타내었고, Kim 등¹⁴⁾의 국내산 생약 추출물의 전자공여능의 관찰에서 목단, 황금, 산수유, 작약의 100ppm의 농도에서 각각 65.0%, 57.1%, 45.8%, 36.7%로 나타난 결과와 비교해 볼 때 개나리 추출물이 다른 식물 추출물에 비하여 높은 항산화력을 가지고 있음을 알 수 있었다.

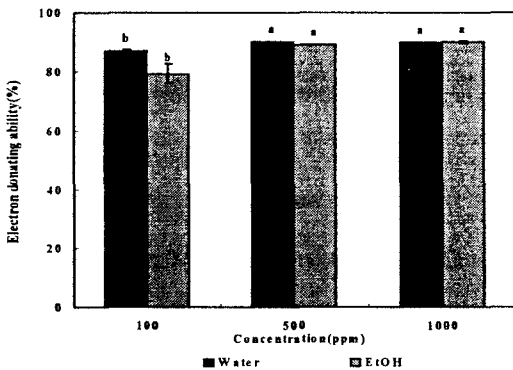


Fig. 1. Electron donating ability of *Forsythia koreana* Nakai extracts.

water: water extract, EtOH: ethanol extract. values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

2. Superoxide dismutase (SOD)

유사활성

SOD는 항산화 효소로서 세포에 해로운 환원 산소종을 과산화수소로 전환 시키는 반응 ($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매하는 효소이며, SOD에 생성된 H_2O_2 는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환시켜 산소상해로부터 생체를 보호하는 기능으로 알려져 있다^{15,16)}. 산화방지는 물론 노화 억제와도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있는 SOD 유사활성 측정을 위해 산

화효소인 pyrogallol과 개나리추출물을 반응시켰다. 생체내에서 superoxide radical을 과산화수소로 전환시키는 SOD의 유사능은 Fig. 2에서와 같이 1000ppm 일때 개나리 에탄올추출물이 9%정도의 효과를 나타내었다. 이는 Hong 등¹⁷⁾의 사과 착즙액 14.6%, 케일 농축액 26.7%, 키위 착즙액 27.6% 무착즙액 24.1%의 활성과 비교할 때 개나리의 유사활성 효과가 낮게 나타났다.

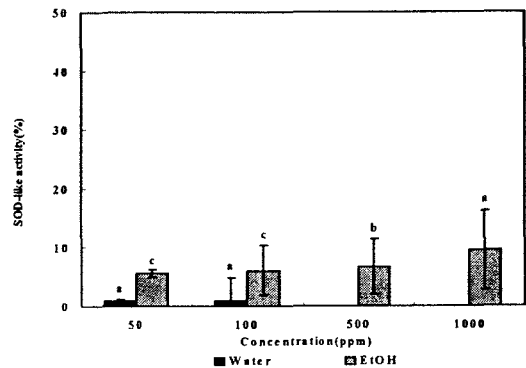


Fig. 2. SOD-like activity of *Forsythia koreana* Nakai extracts.

water: water extract, EtOH: ethanol extract. values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

3. Xanthine oxidase 저해활성

Xanthine oxidase는 purine 대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthine으로부터 urate를 형성하며 urate가 혈장 내에 증가되면 골절에 축적되므로 통증을 동반하는 통풍을 일으키는 효소로 알려져 왔다¹⁸⁻²¹⁾. 또한, xanthine oxidase는 분자상의 산소를 수소 수용체로 이용하여 xanthine을 uric acid형으로 산화하는 반응을 촉매 한다. 따라서 xanthine oxidase의 저해효과는 유리 라디칼의 생성 억제와 더불어 생물학적으로 중요한 의의를 가진다고 할 수 있다.

이러한 요산을 생성하는 xanthine oxidase에 대한 활성저해능을 측정된 결과 Fig. 3에서와 같이 500ppm일때 개나리열수추출물은 18%의 효과를 나타냈고, 에탄올추출물의 경우 31%의 효과를 보여 에탄올 추출물이 열수추출물보다 유의적으로 높게 나타났다. 이는 Kim 등²²⁾의 해조류 추출물의 저해

올과 비교하여 감태, 곰피의 76.1, 63.9%의 저해 효과보다 낮은 결과를 보였지만, An 등²³⁾의 산사자 추출물 연구결과인 1000ppm일때 10% 와 비교할 때 높음을 알 수 있어 개나리 추출물의 xanthine oxidase에 대한 활성저해능을 확인할 수 있었다.

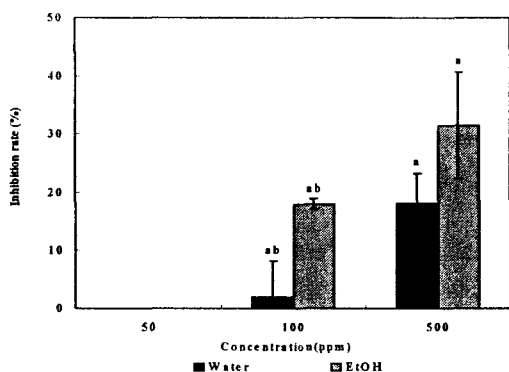


Fig. 3. Inhibition effect of *Forsythia koreana* Nakai extracts on xanthine oxidase. water: water extract, EtOH: ethanol extract. values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

4. Tyrosinase 저해 활성

기미, 주근깨 등 피부에 생기는 색소침착은 표피 내에서의 melanin 색소의 증가에 기인하고 있고 melanin 색소는 표피 기저층에 존재하는 melanocyte라고 불리는 색소세포 내의 melanosome에서 생합성 된다. 자외선에 의하여 melanocyte의 유사분열이 일어나고 이어서 melanocyte가 활성화 된다. 활성화된 melanocyte에서는 tyrosinase 합성이 촉진되고 melanin의 생성이 향진되어 이를 표피 밖으로 운반 배출하게 되어 기미, 주근깨와 같은 색소침착이 일어나게 된다. 그러므로 tyrosine 활성억제제는 피부 내에서의 melanin polymer 합성을 효과적으로 저해할 수 있어 피부 미백제의 개발에 있어서 tyrosinase 활성억제 실험은 유용한 일차 평가법으로 인정되고 있다^{24,25)}.

피부 내에서 melanin 생성에 key enzyme으로 알려져 있는 tyrosinase에 대한 활성을 억제하는 물질을 탐색할 목적으로 각 추출물의 농도별 tyrosinase 효소활성의 저해효과를 측정하였고 그 결과는 Fig. 4와 같이 나타났다. 열수추출물은 1000ppm에서

19% 에탄올추출물은 59%의 효과를 나타내었고, 고농도인 5000ppm에서는 각각 60%, 85%의 효과를 나타내어 농도 의존적으로 효소 활성 저해가 있었다. 이는 Jung 등²⁶⁾의 콩나물, 케일, 취나물이 10% 이하의 낮은 저해능과 비교할 때 개나리 추출물의 저해활성이 높았고, Lee 등²⁷⁾의 약용식물류의 tyrosinase 저해활성의 탐색에서 오매, 계피, 상백피, 작약, 산사자의 순서로 높은 저해 활성을 보였다. 오매와 계피는 80%이상의 높은 저해활성을 나타냈고, 상백피와 측배엽은 63%, 작약과 산사자는 각각 44%, 43%로 나타나 개나리 추출물과 비교해 볼때 오매와 계피보다는 낮았지만 상백피와 측배엽, 작약과 산사자 보다는 높아 개나리 추출물의 미백효과 있음을 알 수 있다.

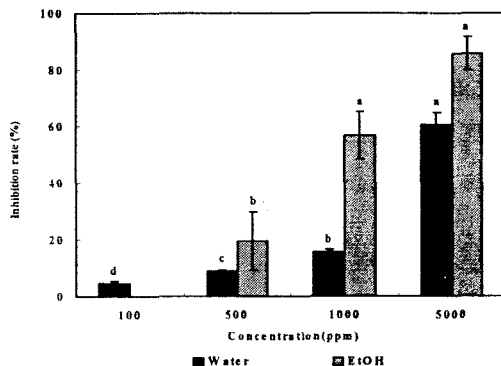


Fig. 4. Inhibition effect of *Forsythia koreana* Nakai extracts on tyrosinase. water: water extract, EtOH: ethanol extract. values are means of 3 replicates and those with different alphabet letters are significantly different at $p < 0.05$.

5. Nitric oxide 저해활성 측정

Nitric oxide는 무기 저분자 라디칼로서 과거에는 대기오염에 관계하는 오염 물질 정도로 인식되었다²⁸⁾. 그러나 현재는 EDRF(endothelium-derived relaxing factor)로서 혈관 평활근의 이완작용뿐 아니라 중추·말초 신경계에도 신경정보를 전달하는 물질로 밝혀짐으로써 그 기능이 다각도로 연구되고 있다²⁹⁾. 최근에는 혈액응고 및 혈압조절기능, 암세포에 대항하는 면역기능, 세포사에 영향 등이 밝혀졌다³⁰⁻³²⁾.

Nitric oxide는 물리 화학적 성상에 따라 type I, II, III 의 3종류의 동종 효소로 나뉘어진다³³⁾.

이중 type II인 유도형 NOS(iNOS)는 LPS, cytokine 같은 자극에 의해 급격하게 유도되어, 과량의 nitric oxide를 생성하는 것으로 알려져 있다. 염증 반응에서의 nitric oxide 생성은 거의 iNOS에 의한 것이라 할 수 있다^{34,35}. 특히 iNOS에 의해 생성된 nitric oxide는 병리적인 혈관확장, 세포독성, 조직손상 등 생체에 유해한 작용을 나타낸다. 이에 천연물인 개나리를 이용하여 nitric oxide 저해를 나타내는 것을 확인하여 항염효과를 살펴보았다.

Mouse macrophage인 Raw 264.7에 LPS (lipopolysaccharide)와 개나리 추출물을 각각 처리하여 12시간마다 nitric oxide양을 측정된 결과, 개나리의 에탄올 및 열수 추출물 모두 Fig. 5, 6에서 보는 것과 같이 0.05%일때 반응시간 12시간 이후부터 nitric oxide 생성을 억제하는 것을 볼 수 있는데, 열수 추출물의 0.5%농도에서는 반응값이 약간 높게 나왔는데 이는 반응물의 색에 의한 것으로 판단된다. 개나리 추출물은 과다한 nitric oxide생성에 대한 각종 염증반응을 억제할 수 있음을 확인하였다.

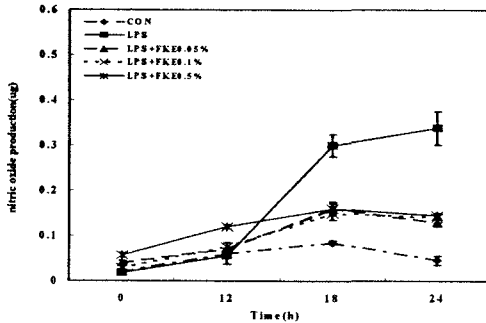


Fig. 5. Inhibition rate of nitric oxide production by FKE in Raw 264.7 cells.

LPS : lipopolysaccharide, FKE : *Forsythia koreana* Nakai ethanol extract. values are of 3 replicates.

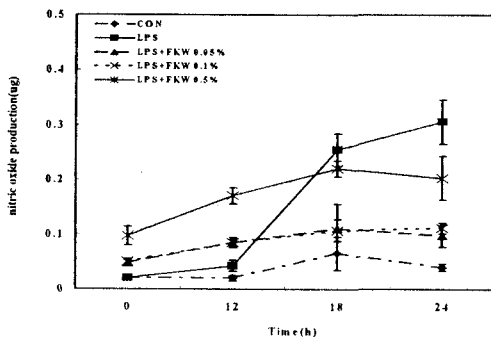


Fig. 6. Inhibition rate of nitric oxide production by FKW in Raw 264.7 cells.

LPS : lipopolysaccharide, FKW : *Forsythia koreana* Nakai water extract. values are of 3 replicates.

결론

우리 주위에서 흔히 볼수 있는 식물인 개나리를 이용해 생리활성 측정을 통한 화장품 소재로서의 응용에 대한 연구로 개나리꽃을 물, 에탄올로 추출, 농축 및 동결건조하여 실험에 사용하였다. 생리활성 측정실험에서 전자공여능, SOD 유사활성, 미백효과, xanthine oxidase 저해활성, 항염능력을 조사하였고, 생리활성 측정실험에서 개나리 추출물의 전자공여능은 100ppm에서부터 각각 80% 이상으로 매우 높게 나타났고 SOD 유사활성과 xanthine oxidase 저해활성의 결과는 농도가 증가함에 따라 저해효과가 향상되는 경향을 나타내었으나 그 효과가 낮았고 미백과 관련된 tyrosinase 저해활성은 1000ppm에서 열수추출물은 19% 에탄올추출물은 59%의 효과를 나타내었고, 고농도인 5000ppm에서는 각각 60%, 85%의 효과를 나타내었다. 항염실험 nitric oxide 억제에서는 열수 및 에탄올 추출물 모두 0.05% 일때 12시간 이후부터 nitric oxide를 억제해 항염능력이 높음을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단의 연구비 지원(과제번호: R12-2003-002-05002-0(2004))에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1.약품식물연구회. 신 약품식물학. 서울:학창사. 1991: 340.
2. 한국 약용식물학 연구회. 종합 약용식물학. 서울:학창사. 2004:257.
3. 김태정. 약용식물. 서울:대원사 1995:53-54.
4. Ozaki Y, Rui J, Tang YT. Anti-inflammatory effect of *Forsythia suspensa* V (AHL) and its active principle. Biol. pharm. Bull. 2000; 23(3):365-367.

5. Li ZX, Wang XH, Zhao JH, Yang JF, Wang X. Investigation on antibacterial activity of *Forsythia suspense* Vahl in vitro with Mueller-Hinton agar. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*. 2000;25(12):742-745.
6. Lee EB, Keum HJ. Pharmacological studies on *Forsythae Fructus*. *Kor. J. Pharmacogn*. 1988; 19(4):262-269.
7. Eom JN, Kim JD. An empirical study on the oriental herbal cosmetic purchase behavior in women in the Metropolitan area. *J. SOC. Cosmet Scientists Korea*. 2004;30:93-102.
8. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958; 26:1198-120.
9. Marklund S. and Marklund G. involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxidation dismutase. *Eur. J. Bioche*. 1974; 47(3):469-74.
10. Stirpe F. and Corte ED. The Regulation of Rat Liver Xanthine oxidase. *J. Biol. Chem*. 1969;244:3855-3861.
11. Yagi A, kanbara T. and Morinobu N. The effect of tyrosinase inhibition for aloe. *Planta Medica*. 1986;3981:517-9.
12. Green KC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS. Tannenbaum, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem*. 1982;126: 1849-1857.
13. Jung SJ, Lee JH, Song HN, Seong NS, Lee SE, Baek NI. Screening for Antioxidant activity of Plant medicinal extracts. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem*. 2004;47:135-140.
14. Kim HK, Kim YE, Do JR, Lee YC. and Lee BY. Antioxidative activity and physiological activity of some korean medical plants. *Korean J. Food Sci. Technol*. 1995;27:80-85.
15. Pryor WA. Pxo-radicals and related species: their formation, lifetimes and reactions. *Annu Rev. Physiol.*, 1986;48:657-67.
16. Radiation and aging : free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Med Hypotheses*. 1933;4(5):473-82.
17. Hong HD, Kang NK, Kim SS. Superoxide dismutase-like activity of apple juice mixed with some fruits and vegetable. *Korean J. Food Sci. Technol*. 1996;30(6):1484-7.
18. Wyngaarden JB, Holmes EW Jr. Molecular nature of enzyme regulation in purine biosynthesis. *Ciba Found Symp*. 1977;(48):43-64.
19. Storch J. and Ferber E. Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Anal. Biochem*. 1988;169(2):262-7.
20. Kelley WN. and Wyngaarden JB. Enzymology of gout. *Adv. Enzymol*. 1974;41:23-28.
21. Hatano T, Yasuhara T, Fukuda T, Noro T. and Okuda T. Phenolic constituents of Licorce. II. Structures of Licopyranocoumarin, Licoaryl-coumarin and Glisoflavone, and inhibitory effects of Licorice phenolics on xanthine oxidase. *Chem. Pharm. Bull*. 1989;37(11):3005-9.
22. Kim OK, Lee TG, Park YG, Park DC, Lee YW., Yeo SG, Kim IS, Park Y H, Kim SB,. Inhibition of xanthine oxidase by seaweed extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 1996;25(6):1069-73.
23. An, BJ, Lee JT. Studies on Biological Activity from Extract of *Crataegi Fructus*. *Kor. J. Herbology* 2002;17(2):29-38.
24. Imokawa G, Mishima Y. Biochemical characterization of tyrosinase inhibitors using tyrosinase binding affinity chromatography. *Br. J. Dermatol*. 1981;104(5):531-9.
25. Imokawa G, Mishima Y. Isolation and characterization of tyrosinase inhibitors and their differential action on melanogenic subcellular compartments in amelanotic and melanomas. *Br. J. Dermatol*. 1980;103(6):625-33.
26. Jung SW, Lee NK, Kim SJ, Han DS. Screening of tyrosinase inhibitor from plants. *Korean J. Food Sci. Technol*. 1984;219(1):1-14.
27. Lee SH, Park JS, Kim JJ. and Chung SR. The screening of the inhibitory compounds on tyrosine activity from the natural product. *Yakhak Hoeji*. 1997;41(4):456-461.
28. Dimmeler S, Zeiher AM. (1997) Nitric oxide

- and apoptosis. Another paradigm for the double edged role of nitric oxide. Nitric oxide, 1997;1(41):275-281.
29. Chung HT, Pae HO, Choi BM, Billiar T R, Kim YM. Nitric oxide as a bioregulator of apoptosis. Biochem biophys rescommum. 2001; 282:1075-1079.
 30. Monocada S, Higgs A. (1993) L-arginine nitric oxide pathway. NEng. J. Med. 1993; 329:2002-2012.
 31. Kim YM, Bombeck CA. (1999) Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. Circ. res. 1999;1(4):253-256.
 32. Kim HY. Statistical study of acne vulgaris in korean adolescence. Kor. J. Dermatol. 1978;16: 471-476.
 33. Nathan C. Nitric oxide ad a secertory product of mammalian cell. ASEB. J. 1992;6:3051-3064.
 34. Liang YC, Huang YT, Tsai SH, Lin-Shiau SY, Chen CF, Lin JK. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apingenin and related flavonoids in mouse macrophage. Cacinogenesis. 1999;20: 1945-1952.
 35. Huang YC, Guh JH, Cheng ZJ, Chang YL, Hwang TL, Liao CH, Tzeng CC, Teng CM. Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cylooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives, involvement of I kappaB-alpha stabilization. Eur. J. Pharmacol. 2001;418:133-139.