

## 구아바 잎 추출물의 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량 및 항염증 억제 효과

이정선 · 김춘득<sup>†</sup>

남부대학교

(2017년 12월 15일 접수: 2018년 3월 19일 수정: 2018년 3월 22일 채택)

### Total Phenolic Compound, Total Flavonoid Compound And Anti-Inflammatory Inhibitory Effects of *Psidium Guajava* Leaf Extract

Jeong-Seon Lee · Chun-Dug Kim<sup>†</sup>

<sup>a</sup>Department of Cosmetology Science, Nambu University, 23 advanced Jungang-ro,  
Gwangsan-gu, Gwangju, 62271, Korea

(Received December 15, 2017; Revised March 19, 2018; Accepted March 22, 2018)

**요약** : 구아바 잎 추출물의 항산화 활성과 항염증 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다. 구아바 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드함량, RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성 및 NO 생성 억제를 통한 항염증 효과, 피부에 대한 안전성 평가를 실시하였다. 본 실험 결과, 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 각 126.4 mg/g, 223.17 mg/g으로 높은 함량을 확인하였다. 대식세포인 RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성이 나타나지 않았으며 NO 생성을 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 구아바 잎 추출물을 함유한 크림을 제조하여 1차 첩포 테스트를 실시하여 피부 안전성을 확인한 결과 첩포 24 시간 후와 첩포 제거 24 시간 후에도 피부에 대한 자극은 확인되지 않았다. 이러한 결과를 종합해 볼 때 높은 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량으로 인한 항산화 활성이 우수하고, 세포에 대한 피부 독성이 적고 NO 생성 억제 효과가 확인됨에 따라 항산화 및 항염증 효과를 가진 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

**주제어** : 세포 독성, 폴리페놀, 산화질소, 플라보놀, 구아바 잎

**Abstract** : It was intended to check a possibility of activity of *Psidium guajava* leaf extract as anti-oxidant and anti-inflammatory material. Total polyphenol and total flavonoid content of *Psidium guajava* leaf extract was checked. Cream having inhibitory effect on inflammation through toxicity and NO production inhibition in RAW 264.7 cell was manufactured, and skin safety was evaluated. It was confirmed that total polyphenol and flavonoid content of *Psidium guajava* leaf extract was 126.4 mg/g and 223.17 mg/g respectively, which was high content. According to the results of checking toxicity through cell viability in RAW 264.7 cell, cytotoxicity was not shown.

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: chun@nambu.ac.kr)

And NO production indicating inflammatory disease was inhibited concentration-dependently. According to the results of carrying out single patch test after manufacturing the cream containing the *Psidium guajava* leaf extract, skin irritation did not occur for 24 h to put patch on skin or for 24 h after removing the patch. Putting these results together, it was verified that there was possibility of application as raw materials for cosmetics, which would have anti-oxidant activity owing to the high polyphenol and flavonoid content of *Psidium guajava* leaf extract and anti-inflammatory material through NO production inhibition.

*Keywords* : cytotoxicity, flavonoids, nitric oxide, polyphenol, *Psidium guajava* leaf,

## 1. 서론

염증은 조직의 손상이나 외부로부터의 자극이나 다양한 병원균 침입에 의해 일어나는 생체 내 방어 반응 중의 하나로서, 다양한 면역 세포에 의해 생체 내에서 진행되는 복합적인 과정이다 [1,2]. 이때 생체 내 염증성 인자들이 활성화 되면서 nitric oxide (NO)와 interleukin-1 beta (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), prostaglandin (PG)등 다양한 염증 매개 인자들이 분비된다[3,4]. 특히 대식세포인 RAW 264.7 세포에서 cytokines, (TNF- $\alpha$ ), lipopolysaccharide (LPS)와 같은 자극에 의해 염증 반응의 전사 인자인 NF- $\kappa$ B를 활성화시키며, 그 결과 inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2)를 발현시켜 NO와 prostaglandin E2 (PGE2)를 생성하고, 염증을 일으키는 것으로 알려져 있다[5,6]. 생체 내에서 신호 전달을 하는 물질로서 NO는 생리적 과정에 관여하지만, 세포 독성을 나타낸다[7,8]. 또한, NO 생성이 필요 이상으로 증가하게 되면, 염증 반응의 항진, 과도한 혈관 확장에 의한 패혈성 쇼크 유발, 상처 치유 억제, 신경 조직의 손상을 일으켜 생체에 유해한 작용을 일으킨다[9]. 이와 같이 생체 내의 NO 생성을 조절하는 것은 염증을 억제하는 중요한 방법으로 보고되고 있다[10]. 현재, 다양한 염증성 질환에 사용되는 스테로이드와 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs)가 주로 사용되지만, 부작용에 대한 문제가 보고됨에 따라 피부에 대한 독성과 부작용이 적고, 효과가 우수한 천연 소재를 활용한 다양한 연구가 진행되고 있다[11-13]. 특히 약재로 주로 사용되고 있는 천연 식물들의 생리활성 물질에 대한 연구와 유효 성분을 농축하거나 다양한 용매를 이용하여

분리한 후 효과를 입증하고 있으며[14-16], 이를 활용한 미백 활성 효과[17-19], 주름 개선 효과 [20,21], 자외선 차단 효과[22, 23]등의 천연 식물 소재를 활용한 기능성 화장품 개발 연구에 대한 관심이 증가하면서 이와 관련한 연구도 활발히 진행되어 지고 있다.

본 연구에 사용된 구아바(*Psidium guajava*)는 전 세계적으로 아열대성 기후대에 널리 분포하고 있는 도금양과(*Myrtaceae*)에 속하는 아열대성 식물로서[24], 구아바의 주요 성분으로는 과실에는 페놀성 화합물인 anthocyanin, myricetin, apigenin, ellagic acid등과 카로티노이드, 비타민 C가 다량 함유되어 있으며[25-27], 잎에는 alkaloid, tannin, flavonoid, sesquiterpene, triterpenoid, coumarin등이 다량 함유되어 있어서[28-32], 기능성 소재로서 활용 가치가 매우 높은 천연 식물 소재이다[33]. 하지만 현재까지 기능성 화장품 소재로서 구아바 잎에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이에 따라 본 연구에서는 구아바 잎 추출물이 항산화 지표가 되는 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 통해 항산화 활성을 확인하고자 하였다. 세포 실험으로 구아바 잎 추출물이 RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성을 확인하였고, 염증 활성화에 중요한 인자인 NO 생성 억제 효과를 통해 항염증 효과와 구아바 잎 추출물이 함유된 크림을 제조하여 피부에 대한 1차 첩포 테스트를 통한 안전성을 평가하여, 구아바 잎 추출물이 항산화 활성과 항염증 활성을 가진 기능성 화장품 소재로서의 활용가능성을 확인하고자 하였다.

## 2. 연구과정 및 방법

## 2.1. 시료

건조된 구아바 잎(약초명가, Korea) 100g에 10배의 70% ethanol을 가한 뒤, 37°C 인큐베이터 안에서 72 h 동안 추출하였다. 72 h 후 여과하여, Rotary evaporator (EYELA, Japan)로 감압 농축하였고, 감압 농축을 통해 ethanol을 제거한 뒤 최종 extract를 얻어 냉장고에 보관하여 본 실험에 사용하였다.

## 2.2. 구아바 잎 추출물을 함유한 크림 제형

Table 1과 같이 구아바 잎 추출물을 함유한 크림을 제조하였다. A상과 B상을 각각 측량 후 70°C이상의 가온으로 모든 성분을 용해시킨 후, A상에 B상을 넣고 10 min 동안 3,000 RPM에서 유회하였다. 이후 50°C까지 온도를 떨어뜨린 후 C상을 첨가하여 5 min 동안 2,500 RPM에서 유회하였으며, 교반이 완료된 후 밀봉하여 24 h 숙성시킨 후 본 실험에 사용하였다.

## 2.3. 실험 방법

### 2.3.1. 총 폴리페놀 함량

구아바 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 방법[34]을 수정하여 비색 정량하였다. 본 실험에 사용된 구아바 잎 추출물을 각 농도별로 희석한 후 추출물 400  $\mu$ L와 Folin-Denis reagent (Sigma-Aldrich, USA) 400  $\mu$ L를 혼합하여 3 min 동안 실온에서 반응시킨 후 400  $\mu$ L의 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Samchun, Korea) 용액을 혼합하여 암실에서 60 min 반응시켰다. 60 min

반응 후 상등액 200  $\mu$ L를 96 well plate에 분주하여, 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 조건을 이용하여 3회 반복적으로 실험한 후 평균값을 사용하였으며, 표준물질 caffeic acid (Sigma-Aldrich, USA)를 사용하여, 표준 검량선을 구한 후, 구아바 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

### 2.3.2. 총 플라보노이드 함량

구아바 잎 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Moreno방법[35]을 이용하여 측정하였다. 구아바 잎 추출물을 농도별로 희석한 후 추출물 100  $\mu$ L와 10% aluminum nitrate (Sigma-Aldrich, USA) 20  $\mu$ L, 1M potassium acetate (Sigma-Aldrich, USA) 20  $\mu$ L, ethanol (Duksan, Korea) 860  $\mu$ L를 순서대로 혼합하여 실온에서 40 min 동안 반응시켰다. 40 min 후 원심 분리기로 부유물을 가라앉힌 후 96 well plate에 200  $\mu$ L씩 분주하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동일한 조건을 이용하여 3회 반복적으로 실험한 후 평균값을 사용하였으며, 표준물질 quercetin (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여, 표준 검량선을 구한 후, 구아바 잎 추출물의 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

### 2.3.3. 세포 배양

한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, Korea)에서 대식세포인 RAW 264.7 Cell을 구입하여, High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma-Aldrich, USA) 배지에

Table 1. Formula of *psidium guajava* L. extract cream

No.	ingredients	composition (%)
A	distilled water	63.6
	glycerine	15
	EDTA 2Na	0.05
	cyclomethicone (DC345)	2.3
B	cetearyl alcohol/cetearyl glucoside	1
	glyceryl stearate/PEG 300 stearate	1
	butyl hydroxy toluene	0.05
C	butylene glycol dicaprylate	2
	<i>psidium guajava</i> L. extract	5
	sodium polyacrylate/ethylhexyl stearate/trideceth-6	10
	total	100

10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, USA)과 1% penicillin (100 IU/mL, GE Healthcare Life Sciences, USA), 1% streptomycin (50  $\mu$ g/mL, GE Healthcare Life Sciences)를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 인큐베이터 안에서 세포 주기 36~48 h으로 유지하며, 계대 배양을 진행하였다.

#### 2.3.4. Neutral red assay를 이용한 세포 독성 측정

구아바 잎 추출물의 세포 독성을 확인하고자 neutral red (NR) assay를 이용하여 측정하였다. 96 well plate에 well 당  $3 \times 10^4$  cells/well의 농도로 RAW 264.7 cell을 분주하여, 24 h 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 24 h 후 구아바 잎 추출물을 10, 20, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도로 희석하여 처리한 후 48 h 동안 배양하였다. 배양된 세포 배양액을 NR solution이 1% 포함된 무 혈청배지로 교환하여, 3 h 배양 후 현미경하에서 NR의 결정화 유무를 결정하였다. phosphate buffered saline (PBS)에 10% formaldehyde 용액을 첨가하여 각 well에 100  $\mu$ L씩 분주하여 20 min 동안 고정될 수 있도록 처리한 후, NR desorb solution (50% distilled water, 49% ethanol, 1% glacial acetic acid)을 각 well에 100  $\mu$ L로 분주하여 세포 내의 NR을 추출하였다. microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 본 실험의 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

세포 생존율(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

#### 2.3.5. Nitric oxide (NO) 생성 저해능 측정

구아바 잎 추출물이 항염증 효과와 관련이 있다고 알려진 NO 생성 억제 활성을 측정하기 위해 세포 배양액 내 NO 양을 측정하였다. RAW 264.7 세포를 96 well plate에 well당  $5 \times 10^4$

cell/well의 농도로 분주한 후 24 h 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 24 h 후 배양된 배지를 제거하고 LPS 1  $\mu$ g/mL 농도가 처리된 배지에 추출물을 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도별로 처리하여 48 h 동안 배양하였다. 48 h 후 새로운 96 well plate에 griess reagent 100  $\mu$ L와 배양된 세포 배양 상층액 100  $\mu$ L을 가하여 10 min 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 2.3.6. 1차 첩포 테스트 시험 평가

구아바 잎 추출물이 함유된 크림을 이용하여 피부 1차 첩포 테스트를 통해 피부 안전성을 평가하고자 화장품 인체적용시험 및 효력시험 가이드라인에 의거하여 20~30대 여성 10명을 대상으로 진행하였다[36]. 본 연구의 임상 대상자의 상박 안쪽에 피부 손상이나 착색이 없는 부위에 24 h 동안 첩포 하였다. 24 h 첩포 제거 후와 24 h 경과 후의 피부 자극 정도를 연구자가 육안 평가를 실시하였으며, 피부 홍반 반응을 10점 만점의 척도로 Table 2와 같이 평가하였다.

#### 2.4. 통계 처리

본 실험 결과는 모두 동일한 조건에서 독립적으로 3회 이상 측정한 후 실험 결과를 얻어 사용하였으며, 평균  $\pm$  표준편차(Mean  $\pm$  SD)로 표기하였다. 통계 처리는 SPSS Window Version 17.0 (SPSS Inc., Illinois, USA)을 이용하여 분석하였고, 유의성 검증은 Student t-test로 실시하였다. 실험 결과 p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판정하여 표기하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 총 폴리페놀 함량 측정

구아바 잎 추출물의 항산화 활성을 확인하기 위하여, 페놀류 화합물들의 함량이 높아질수록 항

Table 2. Level of erythema and value

	No erythema	Very weak erythema	Weak erythema	Erythema	Strong erythema
Value	10	7	5	3	1

산화 활성이 높다는 연구 결과에 따라[37,38], 항산화 활성에 지표가 되고 있는 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 본 실험 결과 구아바 잎 추출물의 총 폴리페놀 함량은 18.3, 28.28, 66.9, 126.4 mg/g의 높은 총 폴리페놀 함량을 나타내었다 (Fig. 1). 선행연구에서 Park & Onjo (2008)은 구아바 잎 추출물의 총 페놀 화합물은 19.0(g/100 g, D.W.)로 높은 함량으로 인한 강한 항산화 활성과 천연 항산화제 소재로서의 가능성이 높다고 보고하고 있다[39]. 또한, 현재까지 구아바 잎 추출물의 항산화 관련 선행 연구에 의하면 폴리페놀 함량과 항산화능은 유의적인 상관관계가 있음이 보고됨에 따라[40,41], 구아바 잎 추출물의 높은 폴리페놀 함량이 항산화 활성을 나타낼 것으로 사료된다.

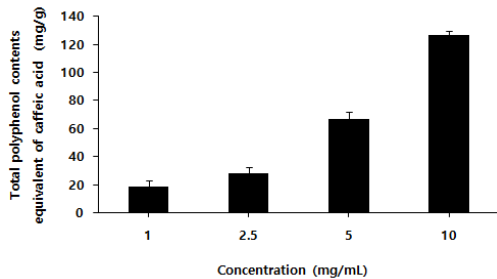


Fig. 1. Change of total polyphenol of *Psidium guajava* leaf extract. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

### 3.2. 총 플라보노이드 함량 측정

본 연구에서 구아바 잎 추출물의 총 플라보노이드 함량을 Fig. 2에 나타내었다. 본 실험 결과, 구아바 잎 추출물의 플라보노이드 함량은 농도가 증가할수록 높아지는 것을 확인하였으며, 10 mg/mL 농도에서 223.17 mg/g의 총 플라보노이드의 높은 함량이 확인되었다. 이와 같은 결과는 Fransworth & Bunyaphatsara (1990)의 선행 연구에서 구아바 잎 추출물에서 플라보노이드 (flavonoid), 탄닌(tannin)계의 페놀성 화합물들이 다량 함유되어 있다고 보고되고 있으며[42], 본 연구에서도 높은 플라보노이드의 함량이 확인됨에 따라 비슷한 연구 결과가 확인되었다.

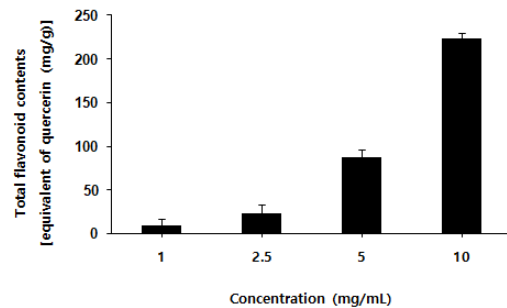


Fig. 2. Change of total flavonoid of *Psidium guajava* leaf extract. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

### 3.3. 세포 생존율

본 연구에서 구아바 잎 추출물의 세포 독성을 확인하기 위하여 RAW 264.7 세포에 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도를 처리하여 세포 독성을 확인하였으며, Fig. 3에 나타내었다. 본 실험 결과, RAW 264.7 세포에 구아바 잎 추출물을 처리한 결과 모든 농도에서 세포 독성이 나타나지 않았으며, 무 처리군인 control 생존율 100%와 비교하면, 구아바 추출물을 처리하였을 때 농도가 증가할수록 세포 증식 효과가 나타나는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통하여 구아바 잎 추출물의 세포 독성은 나타나지 않은 것으로 확인되었으며, 추후 최고 농도 100  $\mu$ g/mL으로 희석하여 다음 실험을 진행하였다.

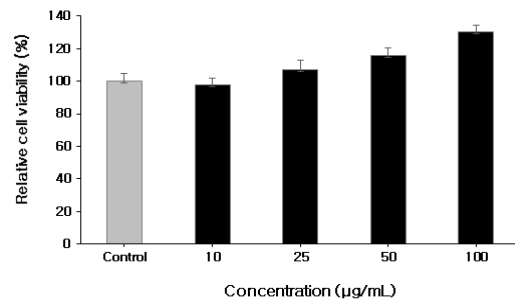


Fig. 3. Cytotoxicity in RAW 264.7 cells. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments.

### 3.4. NO 생성 억제

본 연구에서 구아바 잎 추출물이 염증성 질환을 나타내는 NO 생성 억제 활성화에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 대식세포인 RAW 264.7 세포에 염증 매개 물질인 LPS를 처리하여 염증을 유도한 후 구아바 잎 추출물 10, 25, 50, 100  $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 NO 생성 억제 효과를 확인한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 본 실험 결과, RAW 264.7 세포에 LPS는 유의하게 염증을 증가시켰으며, 구아바 잎 추출물을 처리 하였을 때 농도 의존적인 NO 생성 억제 효과를 나타내었다. 특히 100  $\mu$ g/mL에서 50.4 %의 유의한 NO 억제 효과를 나타내었다. Kim (2014)의 선행 연구에서 구아바 잎 MeOH 추출물이 최고 농도인 100  $\mu$ g/mL에서 83.0% 의 NO 생성 억제 효과를 통해 Basal 군과 유사한 수준까지 NO 생성을 억제시키는 것으로[43], 본 연구와 비슷한 연구 결과가 보고되고 있으며, 염증 반응시 NO 생성에 큰 역할을 하는 iNOS 와 COX-2 단백질 발현도 감소시킨다고 보고되고 있다. 이와 같은 연구 결과를 통하여 구아바 잎 추출물이 염증 반응을 억제하는데 효과가 있을 것으로 사료되어 진다.

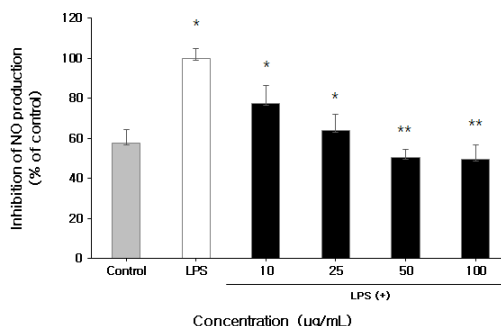


Fig. 4. Inhibition of nitric oxide production in RAW 264.7 cell treated with *Psidium guajava* leaf extract. The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments (\* $p$ <.05, \*\* $p$ <.01).

### 3.4. 1차 첩포 테스트 시험 결과

구아바 잎 추출물을 함유한 크림의 피부 안전성을 평가하고자 1차 첩포 실험한 결과를 Table 3에 나타내었다. 본 실험 결과 A. 정제수, B. 글리세린 C. 구아바 잎 추출물을 함유하지 않은 크림 D. 구아바 잎 추출물을 함유한 크림에 대하여

Table 3. Result of patch test after 24 hours and 48 hours, A: water, B: glycerin, C: control cream, D: *Psidium guajava* leaf extract cream

No.	Time	A		B		C		D	
		24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
1		10	10	10	10	10	10	10	10
2		10	10	10	10	10	10	10	10
3		10	10	10	10	10	10	10	10
4		10	10	10	10	10	10	10	10
5		10	10	10	10	10	10	10	10
6		10	10	10	10	10	10	10	10
7		10	10	10	10	10	10	10	10
8		10	10	10	10	10	10	10	10
9		10	10	10	10	10	10	10	10
10		10	10	10	10	10	10	10	10
Total		100	100	100	100	100	100	100	100
Mean		10	10	10	10	10	10	10	10

24 h 동안 측정된 결과 1차 첩포 테스트에서 모두 홍반 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였고, 이후 첩포를 제거한 24 h 후에서도 모든 항목에서 홍반 반응이 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과는 1차 첩포 테스트를 통해 구아바 잎 추출물이 피부에서 비자극성으로 판단되었으며, 피부에 대한 안전성을 확인할 수 있었다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 구아바 잎 추출물을 70% 에탄올로 추출하여 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량을 확인하고, 대식 세포인 RAW 264.7 세포에서의 세포 독성과 NO 생성 억제 효과를 확인하였다. 또한 구아바 잎 추출물이 함유된 크림을 제조하여 피부에 대한 안전성을 평가하여, 구아바 잎 추출물이 화장품 소재로서의 활용 가능성을 평가하고자 하였다. 본 실험 결과, 구아바 잎 추출물은 10 mg/mL 농도에서 총 폴리페놀 함량 126.4 mg/g과 총 플라보노이드 함량 223.17 mg/g의 높은 페놀성 화합물들이 다량 함유되어 있는 것을 확인하였다. 대식세포인 RAW 264.7 세포에서의 세포 생존율을 통한 세포 독성을 확인한 결과, 추출물의 농도가 증가할수록 세포 증식의 효과가 확인되었으며, 세포 독성이 나타나지 않아, 추후 실험에서는 최고 농도 100  $\mu$ g/mL로 희석하여 실험을 진행하였다. 염증성 질환을 나타내는 NO 생성 억제 활성을 측정된 결과 농도 의존적인 NO 생성 억제 효과를 나타내었으며, 특히 100  $\mu$ g/mL에서 50.4%의 유의한 NO 생성 억제 효과를 확인하였다. 구아바 잎 추출물이 화장품 소재로서의 안전성을 평가하고자 구아바 잎 추출물이 함유된 크림을 제조하여 1차 첩포 테스트를 실시하였다. 실험 결과, 피부에 첩포한 24 h과 첩포를 제거하여 24 h 동안 방치한 후에도 모든 항목에서 홍반 반응은 확인되지 않음으로서 피부에 비자극성으로 판단되었으며, 피부에 대한 안전성을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과를 종합해 볼 때 구아바 잎 추출물에 항산화 활성에 지표가 되는 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 높고, NO 생성 억제 효과로 인한 항염증 효과와 피부에 대한 비자극성으로 확인됨에 따라 천연소재로서 독성이나 부작용이 없고, 항산화 및 항염증 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

#### References

1. Maines MD. "The oxygenase system: a regular of second messenger gases". *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.* Vol.37, pp. 517-554, (1997).
2. Zedler S, Faist E. "The impact of endogenous triggers on trauma associated inflammation". *Curr Opin Crit Care.* Vol.12. pp. 595-601, (2006).
3. Guha M, Mackman N. "The phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway limits lipopolysaccharide activation of signaling pathways and expression of inflammatory mediators in human monocytic cells". *J. Biol chem.* Vol.277, No. 35, pp. 32124-32132, (2002).
4. Nathan PA. "Review of ergonomic studies of carpal tunnel syndrome". *AM. J. Ind. Med.* Vol.2, No.6, pp. 895-897, (1992).
5. Shew RL, Papka RE, McNeill DL, Yee JA. "NADPH-diaphorase- positive nerves and the role of nitric oxide in CGRP relaxation of uterine contraction". *Peptides.* Vol.14, pp. 637, (1993).
6. Kwqagkmata H, Ochiai H, Mantani N, Terasawa K. "Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS activated RAW 264.7 cells". a murinemacrophage cell line. *Am. J. Chin. Med.* Vol.28, pp. 217, (2000).
7. Iyengar R, Sutehr DJ, Marletta MA. "Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines : Precursors and cytotoxic activities of pomegranate (*Punica granatum*) leaves". *Food and Chem. Toxicol.* Vol.55, pp. 470-475, (1987).
8. Snyder SH, Bredt DS. "Biological roles of nitric oxide". *Sci. Am.* Vol.266, 68-77, (1992).
9. Weller R. "Nitric oxide-a newly discovered chemical transmitter in human skin". *Br. J. Dermatol.* Vol.137. pp. 665, (1997).
10. Brown GC. "NO says yes to mitochondria". *Cell Biol.* Vol.299,

- 838-839, (2003).
11. You HJ, Hong SU. "A Case of Urticarial Drug Eruption Assumed to be Caused by non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)". *J Korean Med. Ophthalmol Otolaryngol Dermatol.* Vol.20, No.1, pp. 256-264, (2007).
  12. You SH, Moon JS. "A Study on Anti-oxidative, Anti-inflammatory and Melanin Inhibitory Effects of Chrysanthemum Sibiricum Extract". *J. of Korean Oil Chemists's Soc.* Vol.33, No.4, pp. 762-770, (2016).
  13. You SH, Pyo YH, "Antioxidant and Anti-inflammatory Activities of Ethanol Extracts from Wheat Sprout". *J Invest Cosmetol.* Vol.11, pp. 231-238, (2015).
  14. Kim MJ, Lee SP, Choi JH, Kwon SH, Kim HD, Bang MH, Yang SA. "Characteristics of fermented dropwort extract and vinegar using fermented dropwort extract and its protective effects on oxidative damage in rat glioma C6 cells". *Kor. J. Food Sci. Technol.* Vol.45, pp. 350-355, (2013).
  15. Cho YJ. "Study on the tyrosinase activity inhibition and free radical scavenging activity of natural materials". *SookMyung University Msater's thesis.* (2004).
  16. Kim JH. "The Study on the Physiological Activities of Liriope platyphylla Flower Extract". *Daegu Haany University Msater's thesis.* (2013).
  17. Han HS, Kim SY, Lim DJ, Hwang WK. "Development of Whitening Cosmetic Ingredients from Cudrania tricuspidata Stem Extract". *Asian J Beauty Cosmetol.* Vol.14, No.3, pp. 317-328, (2016).
  18. Choi MH. "Whitening effects screening of Chenopodium album var. centrorubrum extracts as a functional cosmetics material". *WonKwang University Doctorate thesis.* (2014).
  19. Kim EH. "A Study of Whitening Cosmetics from natural products". *Asian J Beauty Cosmetol.* Vol.4, No.2, pp. 195-203, (2006).
  20. Lee EJ, Hwang WK. "Research Paper : The Development of Anti-wrinkle Cosmeceutical Ingredients from Glehnia Radix cum Rhizoma". *J. Kor. Soc. Cosm.* Vol.17, No.1, pp. 127-133, (2011).
  21. Lee MY, Kim BA, Yang JC. "Effects of Extracts Derived from Red Ginseng Residue on Antioxidant Activity and Elastase Inhibition". *J. of Korean Oil Chemists's Soc.* Vol.33, No.4, pp. 658-666, (2016).
  22. Kim MJ, You MJ. "Inhibition of Melanogenesis and Anti-UV properties Reynoutria elliptica". *Asian J Beauty Cosmetol.* Vol.10, No.4, pp. 961-968, (2012).
  23. Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi KP, Park WY, Lee HY. "Skin-Whitening and UV-Protective Effects of Angelica gigas Nakai Extracts on Ultra High Pressure Extraction Process". *KJMCS.* Vol.16, No.4, pp. 255-260, (2008).
  24. Begum S, Hassa SI, Siddiqui BS, Shaheen F, Ghayur MN, Gilani AH. "Triterpenoids from the leaves of Psidium guajava". *Phytochemistry.* Vol.61, pp. 399-403, (2002).
  25. Mercadante AZ, Steck A, Pfander H. "Carotenoids from guava (*Psidium guajava* L.) : isolation and structure elucidation". *J Agric Food Chem.* Vol.47, pp. 145-151, (1999).
  26. Miean KH, Mohamed S. "Flavonoid (myricetin, quercetin kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants". *J Agric Food Chem.* Vol.49, pp. 3106-3112, (2001).
  27. Meckes M, Calzada F, Tortoriello J, Gonzalez JL, Martinez M. "Terpenoids isolated from Psidium guajava hexane extract with depressant activity on central nervous system". *Phytother Res.* Vol.10, pp. 600-603, (1996).
  28. Lozoya X, Meckes M, Abou-Zaid M, Tortoriello J, Nozzolillo J, Arnason JT.



- “Quercetin glycosides in *Psidium guajava* L. leaves and determination of spasmolytic principle“. *Arch. Med. Res.* Vol.25, pp. 11–15, (1994).
29. Jaiarj P, Wongkrajang Y, Thongpraditchote S, Peungvicha P, Bunyapraphatsara N, Opartkiattikul N. “Guava leaf extract and topical haemostasis“. *Phytother Res.* Vol.14, pp. 388–391, (2000).
  30. Tanaka T, Ishida N, Ishimatsu M, Nonaka G, Nishioka I. “Tannins and related compounds. CXVI. Six new complex tannins, guajavins, psidinins and psiguavin from the bark of *Psidium guajava* L“. *Chem. Pharm. Bull.* Vol.40, pp. 2092–2098, (1992).
  31. Kim MJ, Choi HY, Kim SI. “Quality Characteristics and Antioxidative Activities of Guavapyun Added Korean Guava Fruit Extract“. *Korean J. Food Cookery sci.* Vol.26, pp. 246–251, (2010).
  32. Jeong SA. “Antioxidant and Antimicrobial Activities of Guajava Leaf (*Psidium guajava*) depending on Extract Solvent“. *International University.* (2012).
  33. You SH. “Antioxidant Activity and Whitening activity of *Psidium guajava* leaf extract. *J. of Korean Oil Chemists’s Soc.* Vol.34, No.2, pp. 296–304, (2017).
  34. Folin O, Denis W. “On phosphotungstic-phosphomolybdic compounds as color reagents“. *J. Biolchem.* Vol.12, pp. 239–243, (1912).
  35. Moreno MI, Isla MI, Sampietro AR, Vattuone MA. “Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina“. *J Ethnopharmacol.* Vol.71, pp. 109–114, (2000).
  36. Agudelo Maria, Rodriguez Carlos A, Zuluaga Andres F, Vesga Omar, “Guidelines on in vivo tests and in vitro tests of cosmetic products“. *Korea. food. and drug. adminstr ation.* (2011).
  37. Chen HY, Yen GC. “Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava leaves“. *Food Chemistry.* Vol.101, pp. 686–694, (2007).
  38. Choi SY, Lim SH, Kim JS, Ha TY, Kim SR, Kang KS, Hwang IK. “Evaluation of the estrogenic and antioxidant activity of some edible and medicinal plants“. *Korean J. Food Sci. Technol.* Vol.37, pp. 549–556, (2005).
  39. Park BJ, Onjo M. “Anti-oxidant activities and tyrosinase inhibitory effects of guava (*Psidium guajava* L.) leaf“. *Korean J. Plant Res.* Vol.21, No.5, pp. 408–412, (2008).
  40. Chen HY, Yen GC, “Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leaves“. *Food Chem.* Vol.101, pp. 686–694, (2007).
  41. Tachakittirungrod S, Okonogi S, “Chowwanapoonpahn S. Study on antioxidant activity of oertain plants in Thailand: Mechanism of antioxidant action of guava leaf extract“. *Food Chem.* Vol.103, No.2, pp. 381–388, (2007).
  42. Fransworth NR, Bunyapraphatsara N. “Thia Medicinal Plants Recommended for Primary Health Care in Thailand“. *Mahidol University. Bangkok.* pp. 202–207, (1990).
  43. Kim MH. “Anti-inflammatory effects of psidium guajava leaf extracts and its compounds in RAW 264.7 macrophages“. *Catholic University Msater’s thesis.* (2014).