

국산 소나무껍질추출물(파인엑솔®)을 함유한 제제의 피부흡수 평가

최준호 · 최민구 · 한완택* · 한선정* · 정석재 · 심창구 · 김대덕†

서울대학교 약학대학, *뉴트라팜(주)
(2007년 10월 12일 접수 · 2007년 12월 8일 승인)

Evaluation of Skin Absorption of Catechin from Topical Formulations Containing Korean Pine Bark Extract (Pinexol®)

Joon-Ho Choi, Min-Koo Choi, Ohantaek Han*, Sungjeong Han*, Suk-Jae Chung, Chang-Koo Shim and Dae-Duk Kim†

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*NutraPharm Co. Ltd., Namyangju 472-908, Korea

(Received October 12, 2007 · Accepted December 8, 2007)

ABSTRACT – Pine bark extract is well-known as a very powerful antioxidant, anti-inflammatory, and antibiotic material. French maritime pine bark extract (Pycnogenol®) of Horphag Research has monopolized the world market over 30 years. Korean red pine bark extract (Pinexol®) was first manufactured by the patent technology of NutraPharm in Korea in 2006. Feasibility of topical gel and patch formulations of Pinexol was systematically investigated by evaluating the skin absorption of catechin as a reference compound. *In vitro* hairless mouse skin absorption of catechin from gel formulation was higher than that from patches. However, significant amount of catechin was also deposited inside the skin from patch formulations, which were dependent on the types of pressure sensitive adhesives. Thus, it seems to be feasible to control the topical delivery of Pinexol by using both gel and patch formulations, and be necessary to conduct further systematic investigation.

Key words – Pine bark extracts, Pinexol, Skin permeation, Wrinkle care patch

소나무껍질추출물은 강력한 항산화활성과 다양한 피부미용활성을 갖고 있는 것으로 알려져 있고 미국, 유럽 및 일본에서 식품과 화장품 등 다양한 제품에 사용되고 있다. 국내에서도 뉴트라팜(주)에서 2006년도에 중소기업기술혁신사업을 통하여 국산 소나무껍질로부터 항산화활성이 우수한 소나무껍질추출물(상품명: 파인엑솔, Pinexol)을 성공적으로 개발하였다. Pinexol은 임업 및 목재산업의 부산물로 대부분 폐기되어 왔던 소나무껍질을 위생적으로 가공하여 제조한 제품으로 강력한 항산화활성, 항염활성, 항히스타민활성 및 콜라겐합성활성 등을 나타내는 것으로 알려져 있다.¹⁻¹³⁾

그런데, 이 추출물은 다양한 성분이 혼합된 crude한 상태의 것이므로, 이로부터 주름개선(콜라겐합성활성 관련)에 효능을 나타내는 분획만을 분리하여 주름진 피부에 국부적으로 적용한다면 더욱 강력한 주름개선 활성을 지닌 경피흡수 제제 형태의 기능성 화장품으로 개발할 수 있을 것이다. 겔이나 패치형태는 주름 부위에 부착할 경우, 장시간 동안 원하는 양만큼 작용부위에 재현성있게 주름개선제를 목적 부

위에 적용할 수 있는 장점이 있다.

그러나, 피부의 원래 목적은 외부로부터 이물질의 침입을 막아주고 체액이 외부로 유출되는 것을 막는 장벽의 역할을 하고 있으므로 주름개선 물질이 이를 극복하고 피부내부로 흡수되어야만 콜라겐의 합성을 촉진하여 본래의 역할을 나타낼 수 있을 것이다. 따라서, 신규 주름개선 제제를 개발하고자 할 경우, 그 효능을 생화학적인 방법뿐 만 아니라 피부의 투과를 함께 고려하여 객관적이고 과학적으로 평가하는 것이 중요하다. 이에 본 연구에서는 국산 소나무껍질로부터 추출한 분획물의 피부흡수를 관찰하고 제제화하여 주름개선용 기능성화장품으로의 개발 가능성을 연구하고자 하였다.

실험 방법

시약

실험에 사용한 국산 소나무껍질은 강원도 청정지역에서 벌채된 50년 이상의 적송으로부터 채집하였고, 뉴트라팜(주)에서 개발한 공정(추출, 여과, 농축, 건조, 분쇄)을 사용하며 crude한 소나무껍질추출물을 제조하여 분획물의 분리공정개발의 원료로 사용하였다. 이에 대한 대조군으로는 스위스

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : (02)880-7870, E-mail : ddkim@snu.ac.kr

Horphag사 제품인 프랑스해송껍질추출물(상품명: Pycnogenol)을 사용하였다. 패치를 제작할 때 사용한 adhesive polymer(Acryl계 접착제, Duro-Tak, National Starch & Chemical Company)는 아이큐어(주)에서 공급받았다. 에탄올, catechin, ether, carbomer, tetrahydrofuran은 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HPLC용 methanol, acetonitrile과 acetic acid는 Merck (Darmstadt, FRG)에서 구입한 후 0.2 µm 필터로 여과하고 사용하였다.

분획물에 따른 조추출물의 용해도 측정 및 분획물 제조

국산 소나무껍질의 조추출물(crude extract, 0.3 g)을 다양한 농도의 에탄올 용액 10 mL에 넣고 3가지 온도조건(4°C, 25°C, 40°C)의 shaking water bath에 장치한 후, 24시간 동안 포화하였다. 포화된 조추출물과 에탄올 용액의 혼합물은 1차 원심분리 (Hanil HA-12, 3500 rpm for 5 min)한 후에, 2차 원심분리 (Hanil Micro-12, 13,000 rpm for 5 min)하여 불용성물질을 제거하였다. 상등액을 취하여 aluminum boat에 계량하고 105°C에서 2시간 동안 완전히 건조한 후, 건조된 조추출물의 질량을 정확히 측정함으로써 각 에탄올 용액에 함유된 조추출물의 용해도를 계산하였다.

소나무껍질의 조추출물을 30% 및 60%의 ethanol용액으로 40°C에서 24시간 동안 포화시킨 후, 여과하여 미세 불용성물질을 제거하였다. 추출여과액을 진공농축기로 건조하여 에탄올과 물을 제거하고 얻은 건조 분획물을 "Pinexol 3-1"(수용성이 높은 물질), "Pinexol 3-2"(중간적인 물질)로 각각 명명하였으며, 60%에 용해되지 않는 불용성 물질은 따로 분리하여 건조하여 분말화하고 "Pinexol B"(난수용성물질)로 구분하였다.

소나무껍질 추출분획물을 함유한 gel 제제의 제조

추출분획물 시료 3가지(Pinexol 3-1, Pinexol 3-2, Pinexol B)와 스위스 Horphag사 제품인 프랑스해송껍질추출물(상품명: Pycnogenol)을 각각 1.5%(w/v) 함유한 gel을 다음과 같이 제조하였다. 각 분획물 150 mg을 5 mL의 증류수에 녹이고, 따로 5 mL의 증류수에 carbomer 50 mg을 녹인 후, 두 용액을 섞고 20분간 가열하면서 stirring 하였다. 여기에 triethanolamine 을 소량씩 떨어뜨리며 pH를 5~6으로 맞추어 gel을 형성하였다.

소나무껍질 추출분획물을 함유한 패치 제제의 제조

추출분획물 시료 3가지 (Pinexol 3-1, Pinexol 3-2, Pinexol B)와 Pycnogenol을 1.5%(w/v) 함유한 패치를 제조하였다. 소량의 ethanol 에 각 분획물을 녹인 후, pressure-sensitive adhesive(PSA) polymer(Duro-Tak 87-2516, 2677

& 4098) 와 섞어 주었다. 이를 폐색한 상태에서 mechanic stirrer(EZ stir™)를 이용하여 깨끗한 액 상태가 될 때까지 혼합한 후 (30 minute, 800 rpm), ultrasonicator를 이용하여 혼합액 안의 기포를 제거해 주었다. 이 혼합물을 micrometer adjustable lab coaters (LC-100, Chemsultants Inc, OH, USA)를 이용하여 release liner (3M Scotchpak® 1020 low adhesive polyester film) 위에 고루 펴서 발라주었다. 이를 상온의 후드안에서 24시간 동안 건조시켜 패치를 제작하였다. 제작된 패치는 Backing layer (3M Scotchpak® 1109)로 덮은 후 2×2 cm²로 잘라 보관하였다.

In vitro 피부투과 및 잔류량 측정 실험

Hairless mouse (18~20 g, male) 피부를 통한 소나무 껍질 추출물의 피부투과 및 잔류량은 Keshary-Chien permeation cells 을 사용하여 측정하였다. Hairless mouse는 ether로 마취시켰으며 대략 3 cm×3 cm면적으로 등 부위에서 피부를 적출한 후 피하지방 등의 조직들을 피부가 상하지 않도록 조심스럽게 제거하였다. 각질 부분이 위로 향하도록 하여 donor phase 와 receptor phase 사이에 피부를 고정시켰다. Donor phase에 노출되는 피부의 면적은 2.14 cm²이었다. Receptor phase로 PBS (50 µM, 12 mL)를 사용하여 37 ±0.5°C로 유지하면서 600 rpm으로 계속 일정하게 교반하였다. 각 patch를 donor phase의 피부표면에 부착한 후, 일정 시간 간격으로 8시간 동안 1.0 mL의 receptor phase를 채취하였고 즉시 동량의 PBS 로 보충하였다. 각 시간별로 receptor phase에 있는 catechin의 양을 HPLC로 정량하여 피부를 통한 시간별 누적 투과량을 계산하였다.

마지막 8시간째의 시료를 채취한 직후, 피부를 장비로부터 분리하여 피부표면에 남아있는 제제를 methanol로 씻어내어 제거하였다. Cellophane adhesive tape (CuDerm corporation, Dallas, USA)를 10회 반복하여 붙였다 떼어내어 각질층을 제거한 후, 남은 피부조직(진피층)에 methanol 2 mL을 첨가하고 homogenizing 한 후 filter (0.22 µm)하여 진피층에 남아있는 catechin의 양을 HPLC로 정량하였다. 피부투과 실험이 끝난 후 patch에 남아 있는 소나무 껍질 추출물의 양을 측정하기 위해서, patch에 THF/MeOH 혼합액 (1:4, v/v) 10 mL를 가하고 1시간 vortexing하여 녹인 후, catechin의 양을 HPLC로 정량하였다.

Catechin의 정량

국산 소나무껍질추출물에 함유된 성분은 주로 polyphenol 계 항산화물질로 구성되어 있으며, 예비시헬결과 taxifolin, catechin 등의 단일물질을 함유하고 있고, 그외 catechin과

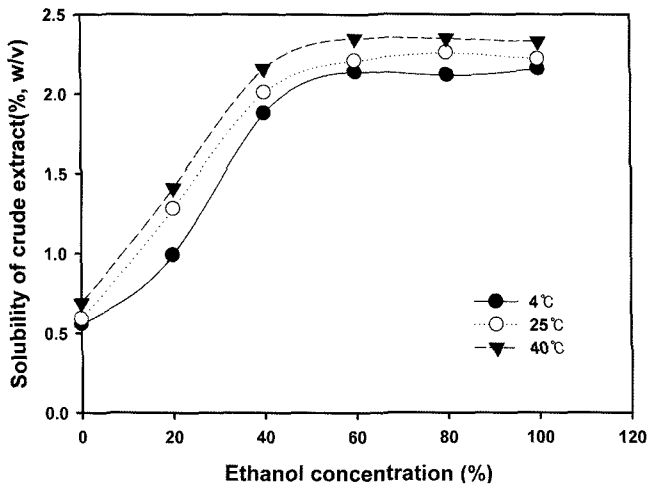


Figure 1—Effect of temperature and ethanol concentration on the solubility of crude pine bark extract.

epicatechin 등이 dimer, oligomer, 또는 polymer 형태로 결합된 것으로 알려졌다. 이에 따라 HPLC로 분석이 가능한 기준물질을 catechin, epicatechin 으로 선정하고 이에 대한 분석법을 확립하였으나, 초기 실험시 소나무껍질 추출물 중 epicatechin 의 양이 미량이므로 catechin 만을 기준물질로 삼았다.

Catechin의 농도는 문헌에 나온 방법을 약간 변형하여 Waters HPLC를 사용하여 정량하였다.¹⁴⁾ 칼럼은 Capcell pak C18 cat No. 90104 (4.6×250 mm, Shiseido)을 사용하였으며, 이동상은 물과 methanol의 70:30 (v/v) 혼합액을 사용하였으며 유속 1.0 mL/min로 흘렸다. 형광검출기(Perkin Elmer Series 200)의 파장은 excitation 280 nm, emission 310 nm로 하였고 시료의 주입량은 50 µL로 하였다.

결과 및 고찰

소나무껍질 추출분획물의 용해도 및 항산화 활성

상온에서 조추출물과 에탄올 용액을 혼합한 후 각 온도에서 24시간 동안 용해시킨 결과, 에탄올 농도가 높을수록 용해도가 증가하였고, 60% 에탄올 농도에서 최대 용해도를 나타내었지만, 그 이상의 에탄올 농도 이상에서는 용해도가 일정하였다 (Figure 1). 같은 에탄올 농도에서는 온도가 높을수록 조추출물의 용해도는 증가하는 경향을 보였다. 그러나, 조추출물의 물에 대한 용해도는 약 0.6%(w/v) 정도로 가장 낮았다.

소나무껍질의 조추출물 중 30% 및 60% 에탄올 용액에 녹는 분획물(Pinexol 3-1 및 Pinexol 3-2) 및 60% 에탄올에 용해되지 않는 물질(Pinexol B)의 항산화 활성을 비교하기 위해 한국생명공학연구원의 국가지정 항산화소재연구실에 시료분석을 의뢰하였다. Pycnogenol과 비교하여, 각 추출분획

Table I—Antioxidant Activities of Each Fraction of Pine Bark Extraction¹⁾

Activity	Pinexo 13-1	Pinexol 3-2	Pinexo 1B	Pycnogenol
DPPH (EC50, µg/mL)	5.0	4.6	11.7	7.2
ABTS+ (EC50, µg/mL)	1.0	1.7	3.9	3
Relative activity(DPPH, %)	144	157	62	100
Relative activity (ABTS+, %)	300	176	77	100
Average Relative activity	222	166	69	100

¹⁾Data from National Research Institute of Antioxidants

물에 대해 항산화 활성(DPPH 라디칼 소거활성 및 ABTS 라디칼 소거활성)을 측정된 결과는 Table I과 같았다. 항산화 활성은 기준물질인 Pycnogenol에 비하여 Pinexol 3-1은 2.2배, Pinexol 3-2는 1.7배 높고, 불용성물질로 구성된 Pinexol B는 기준물질보다 항산화 활성이 낮게 측정되었다.

소나무껍질 추출 분획물의 피부투과도 평가

항산화 활성 시험결과, Pinexol B는 난수용성 물질로써 패치 제작에 부적합할 뿐아니라 항산화 활성이 Pycnogenol 보다 낮기 때문에, Pinexol 3-1과 Pinexol 3-2로 피부투과 실험을 진행하였다.

예비실험으로써, 기준물질로 선정한 catechin의 함량을 측정된 결과, Pinexol 3-1에 catechin이 0.86±0.28% (w/w) 함유되어 있는 반면 Pycnogenol 에는 0.44±0.12% (w/w) 함유되어 있음을 알 수 있었다. 우선, catechin 자체의 피부투과 정도를 관찰하기 위해 catechin 수용액(0.05%, 0.15%, 0.30%, w/v)을 만들어 피부투과 실험을 하였고 이에 대한 결과는 Figure 2 및 Table II과 같았다. 일반적으로, catechin의 농도가 증가할수록 피부흡수속도가 증가할 것

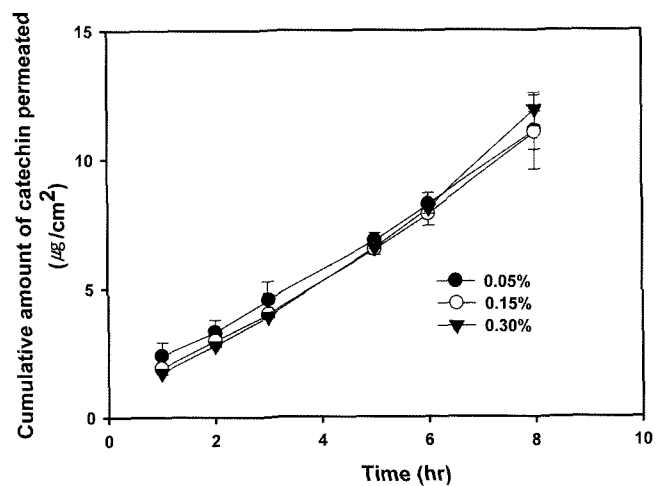


Figure 2—Hairless mouse skin permeation profiles of various concentrations of catechin in aqueous solution (mean±S.D., n=3).

Table II—Hairless Mouse Skin Permeation Parameters of Catechin in Aqueous Solution (mean ±S.D., n = 3)

Concentration of catechin (%)	Permeation rate (μg/cm ² /hr)	Lag time (hr)	Skin deposition after 8 hr (μg/cm ²)
0.05	1.41 (±0.15)	0.14 (±0.35)	6.41 (±0.29)
0.15	1.52 (±0.49)	0.06 (±2.59)	7.14 (±0.52)
0.30	1.59 (±0.20)	0.83 (±0.52)	9.87 (±0.92)

Table III—Hairless Mouse Skin Permeation Parameters of Catechin from 1.5%(w/v) Aqueous Solution of Pinexol and Pycnogenol (mean ±S.D., n = 3)

Compound	Permeation rate (μg/cm ² /hr)	Lag time (hr)
Pinexol	0.08 (±0.01)	3.35 (±2.37)
Pycnogenol	0.07 (±0.02)	3.45 (±2.87)

로 예상하였으나 본 실험에서는 농도에 관계없이 흡수속도는 유의성 있는 차이를 보이지 않았고 8시간 후의 피부잔류량은 농도의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 이에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 생각된다.

Pinexol(분획물 3-1)을 증류수에 15 mg/mL (1.5%, w/v)로 녹여 피부투과 실험을 한 결과는 Figure 3과 같았다. Pinexol의 농도는 일반적인 미백물질제제의 용액을 고려하여 1.5%(w/v)로 정하였다. 현재 시판되고 있는 Pycnogenol을 같은 농도로 비교실험을 한 결과, 두 물질로부터의 catechin의 피부투과속도는 유의성 있는 차이가 없었다 (Table III). 피부투과에 사용된 1.5%(w/v)의 Pinexol(분획물 3-1)과 Pycnogenol에는 catechin이 각각 0.0129% 및 0.0066% 함유되어 있었다. Catechin만을 0.05% 함유한 용액의 permeation rate와 비교해보면 (Table II), 약 10%에 못 미치는 낮은 값을 나타낸 것은 소나무껍질 추출물 중 다른 성분에 의해 catechin의 피부투과가 영향을 받았기 때문인 것으로 생각된다. 그러나, Pinexol과 Pycnogenol 사이에는 catechin의 농도가 거의 2배 차이가 나는 것에도 불구하고 catechin자체의 흡수속도에는 차이가 없는 이유에 대한 추가 실험이 필요할 것으로 생각된다.

수분을 많이 함유하고 있는 gel 타입은 사용 후 당김 현상 없기 때문에 어떤 피부 타입에도 잘 맞는다 것과 제작이 용이하다는 장점이 있다. Pinexol(분획물 3-1) 및 Pycnogenol을 1.5%(w/v) 함유한 겔을 제작하여 피부투과실험을 한 결과는 Figure 4와 같았다. Pinexol과 Pycnogenol에서의 catechin의 피부투과속도에는 유의성 있는 차이가 없었다 (Table IV). 그러나, 같은 농도를 사용한 solution에 비하여 피부투과속도가 낮았는데 (Table III), 이는 gel에 의한 점도의 증가로 인해 열역학적인 에너지가 감소하였기 때문인 것

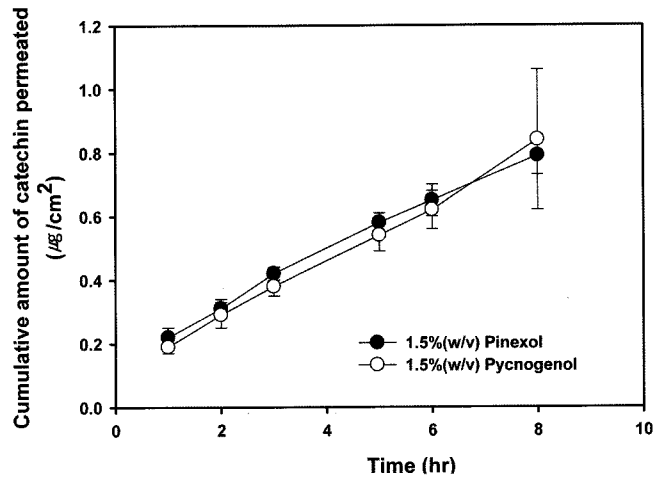


Figure 3—Hairless mouse skin permeation profiles of catechin from 1.5%(w/v) of Pinexol or Pycnogenol in aqueous solution (mean ±S.D., n = 3).

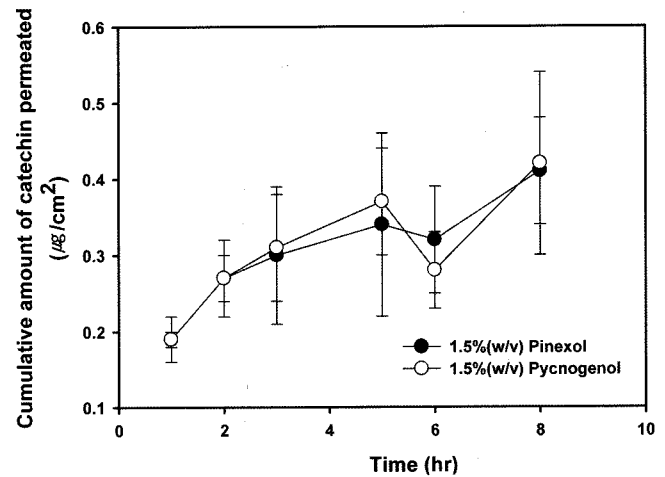


Figure 4—Hairless mouse skin permeation profiles of catechin from 1.5%(w/v) of Pinexol or Pycnogenol in gel formulation (mean ±S.D., n = 3).

Table IV—Hairless Mouse Skin Permeation Parameters of Catechin from 1.5%(w/v) Gel Formulation of Pinexol and Pycnogenol (mean ±S.D., n = 3)

Compound	Permeation rate (μg/cm ² /hr)	Lag time (hr)	Skin deposition after 8 hr (μg/cm ²)
Pinexol	0.05 (±0.04)	-4.31 (±8.39)	1.00 (±0.19)
Pycnogenol	0.07 (±0.04)	1.41 (±1.52)	0.89 (±0.25)

으로 생각된다.

분획물 Pinexol 3-1, 분획물 Pinexol 3-2, 혹은 Pycnogenol을 각각 Duro-Tak 87-2677에 분산시켜 제조한 패치를 사용하여 피부투과실험을 진행한 결과는 Figure 5와 같았다. 초기에 각 패치 내에 함유되어 있는 catechin의 양을 측정하였으며 (A), 쥐 피부에 적용하여 8시간 후에 피부에 남아있는

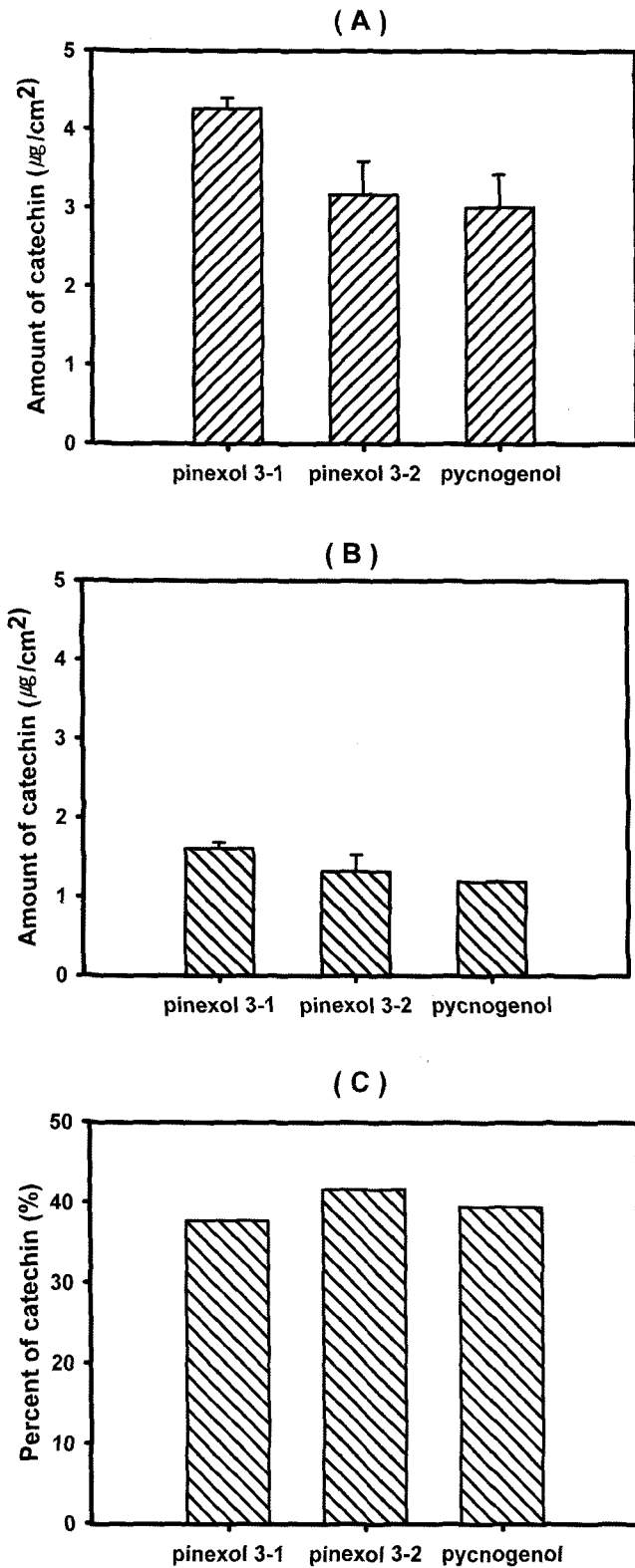


Figure 5—(A) Initial amount of catechin in each patch containing Pinexol 3-1, Pinexol 3-2, or Pycnogenol, (B) Amount of catechin remaining in skin after 8 hours of *in vitro* skin permeation study, (C) Percentage of catechin amount remaining in skin compared to the initial amount in each patch.

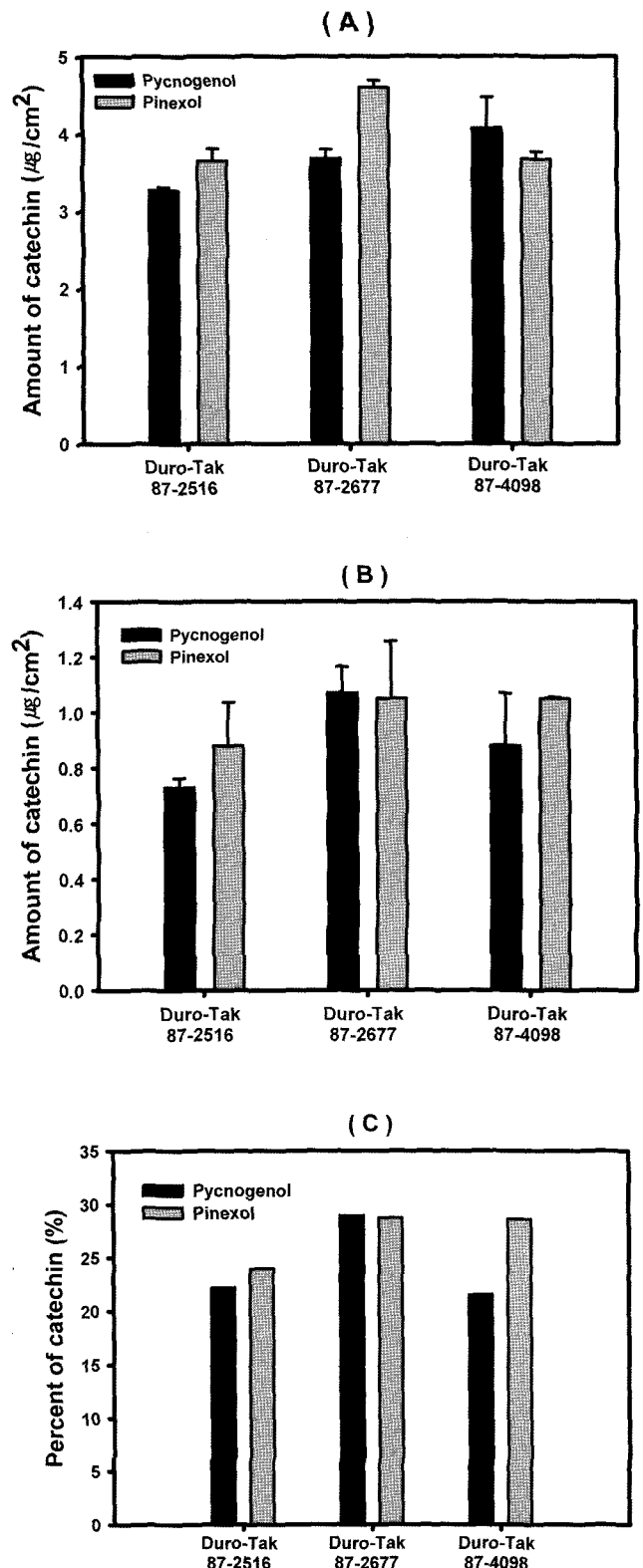


Figure 6—(A) Initial amount of catechin in each patch prepared by various pressure-sensitive adhesives, (B) Amount of catechin remaining in skin after 8 hours of *in vitro* skin permeation study, (C) Percentage of catechin amount remaining in skin compared to the initial amount in each patch.

catechin의 양을 측정 후 (B), 초기의 패치 중 catechin의 함량에 대해 투과실험이 끝난 후 피부에 남아있는 catechin 양의 비율을 계산하였다 (C). 패치 중의 catechin양에 대해 피부에 남아있는 양의 비율은 별다른 차이가 없었으나 (Figure 5C), 패치 제작 과정에서 Pinexol 3-2가 PSA와 잘 섞이지 않는 문제가 있었으므로 항산화 활성이 높은 Pinexol 3-1을 사용하여 PSA의 영향을 관찰하였다.

다양한 종류의 PSA (Duro-Tak 87-2516, 2677, 4098)를 사용하여 패치를 제작한 후, 8시간 동안 피부투과실험을 한 결과는 Figure 6과 같았다. 초기의 패치 중 catechin의 함량 (A)과 투과실험이 끝난 후 피부에 남아있는 catechin의 양 (B)을 측정한 결과로부터, 초기의 패치 중 catechin의 함량에 대해 피부에 남아있는 catechin의 양을 계산한 결과 (C), DuroTak 87-2516을 사용한 패치의 값이 Pinexol 과 Pycnogenol 모두에서 가장 낮았다. DuroTak 87-4098을 사용한 패치는 Pinexol은 피부내에 남는 비율이 높았으나 Pycnogenol은 상대적으로 낮은 값을 보였다. 그러나, DuroTak 87-2677을 사용한 패치에서는 Pinexol 과 Pycnogenol 모두에서 높은 값을 보였다. 이는 PSA 자체의 점착력의 차이와 추출 물과의 친화도의 차이 등이 복합적으로 작용한 결과인 것으로 생각된다. 따라서, Pinexol의 패치제 제작에는 Duro-Tak 87-2677이 가장 적합한 점착제인 것으로 생각되었다.

결 론

본 실험의 목적은 항산화활성과 피부미용활성(주름개선 등)을 가진 소나무 껍질 추출물을 함유한 피부투과 제제의 개발 가능성을 시험하는 것이다. 소나무 껍질 추출물인 Pinexol 및 Pycnogenol에 함유되어 있는 catechin을 기준물질로 하여 피부투과실험을 정량적으로 평가하는 것이 가능하였다. Pinexol 및 Pycnogenol을 함유한 주름개선제제를 개발하고자 할 때, 패치 제제보다는 겔 제제로부터 catechin의 흡수가 더욱 용이함을 알 수 있었다. 그러나, 패치제로부터도 catechin이 어느 정도 피부로 흡수됨을 알 수 있었고, 패치는 피부적용이 편리하고 장시간 동안 일정속도로 유효성분을 피부내로 흡수시킬 수 있는 장점이 있기 때문에 용량의 조절이나 흡수촉진제의 첨가 등을 통해서 주름개선제제로 개발이 가능할 것으로 판단되었다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부의 연구비(A06-0268-A41102-06N1-00020B) 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Z.T. Kamuren, C.G. McPeck, R.A. Sanders and J.B. Watkins, 3rd. Effects of low-carbohydrate diet and Pycnogenol treatment on retinal antioxidant enzymes in normal and diabetic rats, *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, **22**, 10-18 (2006).
- 2) G. Belcaro, M.R. Cesarone, B.M. Errichi, A. Ledda, A. Di Renzo, S. Stuard, M. Dugall, L. Pellegrini, P. Rohdewald, E. Ippolito, A. Ricci, M. Cacchio, I. Ruffini, F. Fano and M. Hosoi, Venous ulcers: microcirculatory improvement and faster healing with local use of Pycnogenol, *Angiology*, **56**, 699-705 (2005).
- 3) M.A. Torras, C.A. Faura, F. Schonlau and P. Rohdewald, Antimicrobial activity of Pycnogenol, *Phytother. Res.*, **19**, 647-648 (2005).
- 4) D. Segger, F. Schonlau, Supplementation with Evelle improves skin smoothness and elasticity in a double-blind, placebo-controlled study with 62 women, *J. Dermatolog. Treat.*, **15**, 222-226 (2004).
- 5) G. Blazso, M. Gabor, F. Schonlau and P. Rohdewald, Pycnogenol accelerates wound healing and reduces scar formation, *Phytother. Res.*, **18**, 579-581 (2004).
- 6) S. Sime, V.E. Reeve, Protection from inflammation, immunosuppression and carcinogenesis induced by UV radiation in mice by topical Pycnogenol, *Photochem. Photobiol.*, **79**, 193-198 (2004).
- 7) X. Liu, J. Wei, F. Tan, S. Zhou, G. Wurthwein and P. Rohdewald, Pycnogenol, French maritime pine bark extract, improves endothelial function of hypertensive patients, *Life Sci.*, **74**, 855-862 (2004).
- 8) Z. Ni, Y. Mu and O. Gulati, Treatment of melasma with Pycnogenol, *Phytother. Res.*, **16**, 567-571 (2002).
- 9) N. Hasegawa, Inhibition of lipogenesis by pycnogenol, *Phytother. Res.*, **14**, 472-473 (2000).
- 10) P. Arcangeli, Pycnogenol in chronic venous insufficiency, *Fitoterapia*, **71**, 236-244 (2000).
- 11) F.J. Liu, Y.X. Zhang and B.H. Lau, Pycnogenol enhances immune and haemopoietic functions in senescence-accelerated mice, *Cell Mol. Life Sci.*, **54**, 1168-1172 (1998).
- 12) F. Virgili, H. Kobuchi and L. Packer, Procyranidins extracted from *Pinus maritima* (Pycnogenol): scavengers of free radical species and modulators of nitrogen monoxide metabolism in activated murine RAW 264.7 macrophages, *Free Radic. Biol. Med.*, **24**, 1120-1129 (1998).
- 13) J.M. Tixier, G. Godeau, A.M. Robert and W. Hornebeck, Evidence by in vivo and in vitro studies that binding of pycnogenols to elastin affects its rate of degradation by elastases, *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 3933-3939 (1984).
- 14) M.A. Rodriguez-Delgado, S. Malovana, J.P. Perez, T. Borges and F.J. Garcia Montelongo, Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection, *J. Chromatogr. A.*, **912**, 249-257 (2001).