

이팝나무 잎으로부터 항산화 및 항갈변물질의 분리

이영남 · 정창호 · 심기환[†]

경상대학교 대학원 응용생명과학부 · 농업생명과학연구원

Isolation of Antioxidant and Antibrowning Substance from *Chionanthus retusa* Leaves

Young Nam Lee, Chang Ho Jeong and Ki Hwan Shim[†]

Division of Applied Life Sciences, Graduate School, Institute of Agricultural &
Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

This study was performed to examine *in vitro* antioxidative activities such as DPPH radical scavenging activity, reducing power and tyrosinase inhibitory effect of various solvent fractions from *Chionanthus retusa* leaves. Ethyl acetate fraction showed potent antioxidative activity and tyrosinase inhibitory effect. The active compound was isolated from the butanol fraction by silica gel column chromatography and MPLC. The isolated compound was luteolin-4'-O-glucoside determined by ¹H, ¹³C-NMR and 2D NMR. Compared with several antioxidant compounds, luteolin-4'-O-glucoside exhibited effective DPPH radical scavenging activity and reducing power in a concentration dependent manner. Bioassay with pure luteolin-4'-O-glucoside showed a dose-independent inhibitory effect on L-DOPA oxidation by mushroom tyrosinase and its IC₅₀ values were established as 23.2 µg/mL. Therefore, we may suggest that luteolin-4'-O-glucoside can be used as a food additive possessing the potent antioxidative activity and skin-whitening cosmetic material.

Key words: *Chionanthus retusa*, DPPH radical scavenging activity, reducing power, tyrosinase inhibitory effect, luteolin-4'-O-glucoside

서 론

수퍼옥사이드 라디칼(O₂⁻), 하이드록시 라디칼(·OH), 과산화수소(H₂O₂), 일중항산소(¹O₂) 등과 같은 반응성이 매우 큰 활성산소는 세포구성성분들인 지질, 단백질, 당 및 DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 암을 비롯한 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 질병 및 노화를 일으키는 것으로 알려져 있다(1-4). 이러한 활성산소에 의해 야기되는 free radical을 소거할 수 있는 또는 과산화물 생성을 억제하기 위하여 합성 항산화제인 BHT, BHA, PG, TBHQ 등과 천연 항산화제인 α-tocopherol, ascorbic acid, polyphenol 등이 사용되고 있다. 합성 항산화제는 가격이 싸고 효과가 탁월하여 식품가공 및 의약품에 널리 사용되고 있으나 안전성 문제가 있고(5-7), *in vitro*에서 항산화력이 강한 천연항산화제인 α-tocopherol 및 ascorbic acid 등은 *in vivo*에서는 항산화력이 떨어지는 문제가 있다(8,9). 따라서 식품산업에서는 안전성에 문제가 없고, 가격이 저렴하면서 *in vitro* 및 *in vivo*에서 항산화력이 강한

천연물 유래 천연항산화제에 대한 수요가 날로 증가하고 있다. 항산화 물질의 개발과 함께 tyrosinase 저해활성을 가진 물질 개발 또한 매우 중요한 역할을 한다. Tyrosinase는 polyphenol oxidase(PPO)라고도 알려진, 구리가 함유된 효소로서 L-tyrosine을 L-3,4-dihydroxyphenylalanine(DOPA)으로, DOPA를 L-dopaquinone으로 그리고 5,6-dihydroxyindole을 melanochrome으로 전환시켜, 산소와 전자를 전달하는 phenol 산화효소이며, 이어서 자동적으로 일어나는 일련의 반응을 통하여 melanin이 형성된다(10,11). 이 효소는 미생물과 동, 식물에서 발견되며, 과일, 채소와 감각류의 갈변에 관여한다. 이러한 melanin색소가 과잉생산될 경우 인체에 기미, 주근깨, 피부노화 촉진과 피부암을 유발하는 것으로 알려져 있다(12). 따라서 tyrosinase 저해제 개발은 과잉 색소 침착, 기미, 주근깨 치료 및 예방에 사용되어 현재 tyrosinase 저해 활성 물질을 이용한 기능성 화장품 개발에 매우 높은 관심이 집중되고 있다.

이팝나무(*Chionanthus retusa* L.)는 물푸레나무과에 속하는 다년생 낙엽교목으로, 일본·중국·대만 및 우리나라 제주도·남부지방·중부지방의 산야지에서 자생하며, 육도복(六

[†]Corresponding author. E-mail: khshim@nongae.gsnu.ac.kr
Phone: 82-55-751-5479, Fax: 82-55-753-4630

道木)·류수수(流菜樹)·다엽수(茶葉樹)·우근자(牛筋子)·조금자(烏金子)·니암나무·뱀나무 등으로도 불리운다(13).

이팝나무의 어린잎은 나물로 무쳐져 식용되어지기도 하며, 차(茶) 대용으로 이용되어지기도 하고, 관상용·공업용·약용에 쓰이고 관상수 및 염료제·기구재로 쓰이며 민간에서 지사(止瀉), 진위, 중풍, 강장제, 해열제 및 이뇨제 등으로 사용되었다(14).

따라서 본 연구에서는 국내에서는 많이 연구되지 않은 이팝나무 잎에 존재하는 활성성분을 분리하여 그 활성물질이 현대인의 가장 큰 고민인 피부노화 및 기미·주근깨를 예방하기 위한 기초 실험을 수행하기 위해 항산화 및 tyrosinase 저해활성 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용한 이팝나무(*Chionanthus retusa*) 잎은 2002년 5월 초경에 경남 진주 근교에 서식하는 것을 채취하여 음건·세절하여 실험재료로 사용하였다.

시약 및 기기

식물체의 추출 및 유효성분의 분리에 사용된 methanol, chloroform, butanol, dichloromethane 및 ethanol 등의 용매는 특급 또는 일급을 사용하였고, column chromatography용 silica gel 60(70~230, 230~400 mesh ASTM), precoated silica gel 60 GF254 TLC plate(20×20 cm, 0.25 mm, glass)는 Merck 社, NMR 용매는 기준 물질인 TMS(tetra methyl silane)가 함유된 DMSO(dimethyl-d₆-sulfoxide)를 사용하였으며, 유효성분의 확인을 위한 발색시약은 10% H₂SO₄를 사

용하였다.

¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 2D-NMR 스펙트럼은 Bruker AW-500 spectrophotometer(Germany)를 사용하여 측정하였으며, 내부 기준물질 TMS(tetra methyl silane)를 사용하였다. MPLC는 Eyla(Japan) USP-3050펌프와 UV-D2 검출기를 사용하였다.

추출물의 분획

음건·세절한 이팝나무 잎 2 kg을 상온에서 1주일 동안 methanol(8 L)에 침지하였다. 추출액을 감압 농축한 다음 증류수에 용해시켜 n-hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol로 극성에 따라 순차적으로 용매분획을 실시하였으며, 각각의 분획물과 최종적으로 물층을 분획하여 농축하였다.

물질의 분리

이팝나무 잎으로부터 활성물질을 분리하기 위한 과정은 Fig. 1과 같이 잎 1 kg을 메탄올(8 L)로 추출한 후, 감압농축하여 진초록색의 혼합물 130 g을 얻었다. 이 혼합물 130 g에 증류수 200 mL를 넣어 용해시킨 후, 클로로포름 300 mL, 부탄올 300 mL를 첨가하여 3회 분획한 후에 활성이 높게 나타난 부탄올 분획물을 감압 농축하여 분획물 41 g을 얻었다. 부탄올 분획물 41 g을 silica gel(70~230 mesh)을 충전시킨 column(5×15 cm, 800 g)에 loading 한 후 CHCl₃/MeOH 혼합용매(8 L)에서 MeOH 비율(99% CHCl₃ → 100% MeOH)을 순차적으로 높여가며 column chromatography를 실시하였다. 용리액은 250 mL씩 회수하였으며, 분획물의 분류기준은 precoated TLC plate를 사용하여 상승 1차원법으로 전개시킨 후 UV_{254nm} 조사와 10% H₂SO₄으로 발색시키면서 나타나는 용출액의 TLC pattern에 따라 9개의 분획물(Fr.1~Fr.

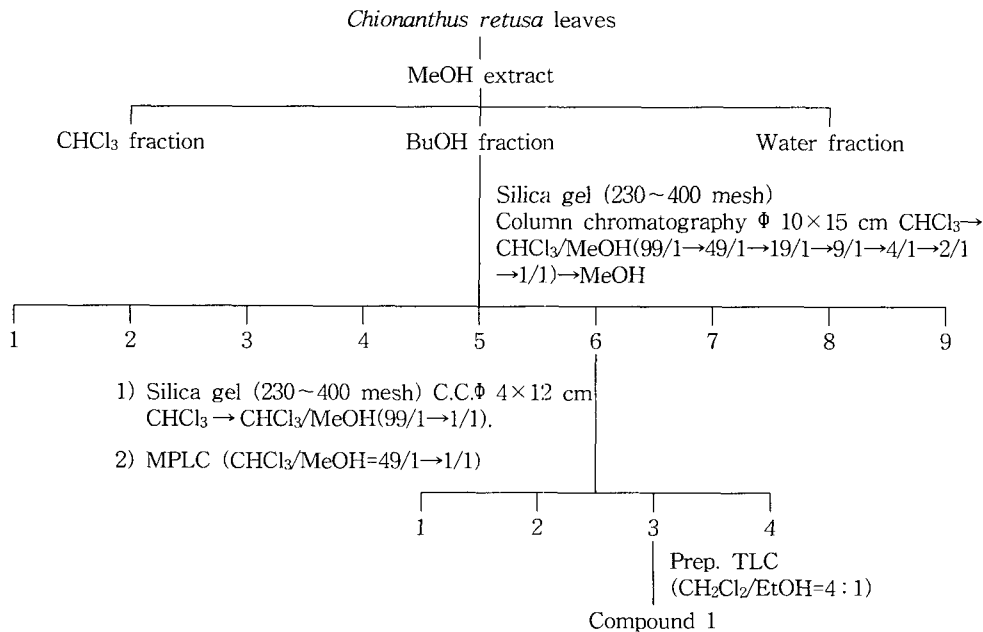


Fig. 1. Procedure of compound 1 from the leaves of *Chionanthus retusa*.

9)을 나누었다. 9개의 분획물 중에서 UV_{254nm}에서 active하며 Rf가 0.35(CH₂Cl₂/EtOH=4/1)인 화합물을 분리하기 위해 분획물(Fr. 6) 18 g을 silica gel(230~400 mesh)을 충전시킨 칼럼(4×12 cm, 100 g)에 loading 한 후, CHCl₃/MeOH 혼합 용매에서 methanol의 비율을 순차적으로 높여가며(99/1→1/1) 2차 column chromatography를 실시하여 분리하고자 하는 목표화합물의 순도를 높여갔다. 이에 fraction 6은 4개의 분획물로 나누어졌으며(Fr.1'~Fr.4'), CHCl₃/MeOH 혼합 용매에서 용리되는 물질(Fr. 2') 158 mg을 CHCl₃/MeOH 혼합 용매에서 methanol의 비율을 순차적으로 높여가며(49/1→1/1) MPLC를 이용하여 4개의 분획물(Fr.1~Fr.4)을 얻었다. 90 mg의 fraction 2를 TLC plate로 prep.법(CH₂Cl₂/EtOH=4/1)을 이용하여 최종 목표화합물 노란색 분말 37 mg을 얻었으며, 순도 확인은 precoated TLC 1차원 상승법으로 확인하였고, 이 화합물을 compound 1이라고 명명하였다(Fig. 6).

DPPH radical 소거활성

용매별로 분획하여 획득한 시료에 대한 DPPH radical 소거활성은 Blois 방법(15)에 따라 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)의 환원성을 이용하여 516 nm에서 UV/Vis-spectrophotometer(Shimadzu UV-1601, Japan)로 측정하였다. 즉, 각 추출물과 대조구로 사용한 BHT 및 tocopherol의 농도를 0.1%되게 조제하여 조제시료 1 mL와 4×10⁻⁴ M DPPH 용액 4 mL를 5초 동안 vortex mixer로 혼합하여 증류수에 대한 흡광도를 측정하고, 대조구는 시료 대신 시료를 희석시켰던 용매만을 1 mL 첨가하여 대조구에 대한 흡광도의 감소 비율로 나타내었다.

Reducing power

이팝나무 잎에서 순수 분리한 화합물 1의 reducing power는 Oyaizu의 방법(16)에 따라 측정하였다. 농도를 각각 달리 하여(0, 50, 200, 300, 400 µg/mL) 첨가한 화합물 1에 sodium phosphate buffer(2.5 mL, 200 mm, pH 6.6)와 potassium ferricyanide(2.5 mL, Sigma)를 혼합시켰다. 그리고 혼합물을 50°C에서 20분 동안 incubation시킨 후 trichloroacetic acid(2.5 mL, 10%, w/v)를 첨가시킨 후 10분 동안 650×g로 원심분리를 시켜 상정액(5 mL)에 탈이온수(5 mL)와 1% ferric chloride(1 mL, Sigma)를 첨가시켰고, UV/Vis-spectrophotometer(Shimadzu UV-1601, Japan)를 사용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Tyrosinase의 활성 저해능 측정

효소의 활성 저해능 측정은 Baek 등(17)의 방법을 변형하여 실험을 실시하였고 멜라닌 생합성 저해활성은 관련 효소인 tyrosinase에 의해 생성되는 dopachrome의 측정량을 흡광도로 측정하는 방법으로서, 먼저 96 well plate에 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5) 150 µL를 첨가한다. 그리고 여기에 1.5 mM L-tyrosine(0.1 M phosphate buffer, pH 6.5) 25 µL, sample solution 15 µL를 넣고 마지막으로 2100 unit/mL에

해당하는 mushroom tyrosinase(Sigma, 0.05 M phosphate buffer, pH 6.5) 7 µL를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 생성되는 dopachrome의 양을 microplate reader(Bio-Rad 3550)를 사용하여 흡광도 490 nm에서 측정하였으며, positive control로는 현재 미백제의 원료로 사용되고 있는 arbutine과 kojic acid를 사용하였고, 다음과 같은 식에 의하여 각각의 tyrosinase 활성 저해율(%)과 시료를 첨가하지 않은 시료의 흡광도를 1/2로 감소시키는데 필요한 시료의 양을 IC₅₀값으로 나타내었다.

$$\text{Inhibition}(\%) = 1 - \frac{A - B}{C} \times 100$$

A: 저해제를 넣은 것의 반응 전 흡광도

B: 저해제를 넣지 않은 것의 반응 전 흡광도

C: 저해제를 넣지 않은 것의 반응 후 흡광도

결과 및 고찰

분획물의 항산화 및 tyrosinase 저해활성 검색

이팝나무 잎의 기능성을 살펴보고자 5개의 용매로 분획, 추출했던 조추출물을 이용하여 DPPH radical 소거 활성 및 tyrosinase 저해 활성에 대한 실험 결과는 Fig. 2 및 3과 같다. 이팝나무 잎의 용매분획물 중 ethyl acetate 분획물과 butanol 분획물에서 DPPH radical 소거 활성이 높게 나타났으며, 클로로포름, 물 및 헥산 순으로 나타났다. 그리고 tyrosinase 저해 활성도 butanol과 ethyl acetate 분획물에서 높게 나타났으며, 분획물의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase 저해 활성도 높게 나타났다. 이에 butanol이 ethyl acetate 용매보다 극성이 높은 점을 이용하여 ethyl acetate 용매에 용해되는 성분을 butanol에 함유되도록 분획하여 활성물질을 분리하고자 하였다.

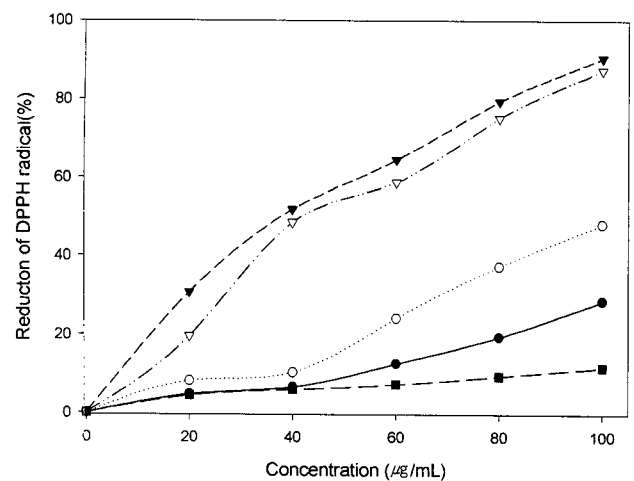


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities of various solvent fraction of methanol extracts from *Chionanthus retusa* leaves.

●: Hexane fr., ○: Chloroform fr., ▼: Ethyl acetate fr., ▽: Butanol fr., ■: Water fr.

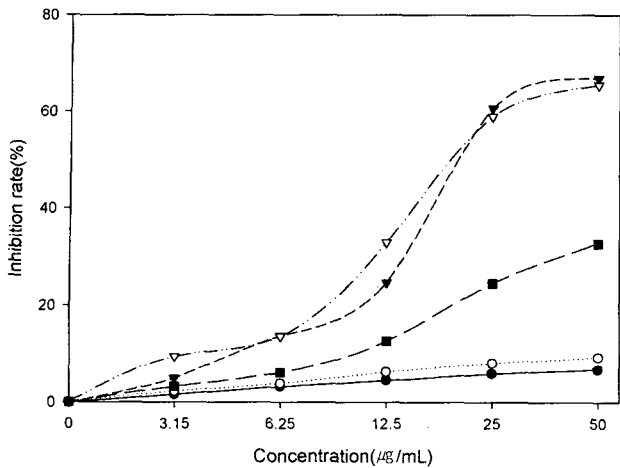


Fig. 3. Inhibitory effects of various solvent fractions from methanol extracts against mushroom tyrosinase. Symbols are the same as Fig. 2.

활성물질의 분리 및 구조동정

이팝나무 잎으로부터 flavonoid로 예상되는 1개의 활성 화합물(compound 1: 37 mg)을 분리하였다. 이 화합물은 10% H₂SO₄에 발색하였을 때 노란색을 띄었으며, UV_{254nm}에서 강한 흡수를 보였고, CH₂Cl₂/EtOH=4/1의 비율의 전개 용매에서 Rf값은 0.35였다. ¹³C-NMR spectrum(Fig. 4)에서는 총 21개의 carbon signal이 관찰되었고, δ178.65에서 한 개의 carbonyl기에 기인하는 signal이 관찰되었다.

DEPT 90과 DEPT 135에서는 11개의 CH와 8개의 4차 탄소, 1개의 CH₂가 존재함을 알 수 있었다. 또한 화합물 1에서의 ¹H-NMR spectrum(Fig. 5)의 적분비로 수소수가 16개

로 관찰되었으며, δ2.86과 δ5.66에서 flavonoid의 2번과 3번 위치에 존재하는 전형적인 수소 peak를 관찰할 수 있었다. 그리고 δ5.94와 δ7.55 ppm 사이에서 aromatic ring에 결합된 5개의 수소 peak를 관찰할 수 있었다. ¹³C-NMR spectrum에서 100 ppm 이상에서 모든 CH는 이중결합을 가지고 있음을 알 수 있었으며, ¹³C-¹H COSY spectrum에서 탄소와 수소와의 상관관계를 찾았다.

이상의 분광적인 자료를 종합하여 분석하여 볼 때 화합물 1의 분자식은 C₂₁H₁₆O₁₁로 추정되었으며, flavonoid 골격의 C5, C7, C3' 위치에 OH기를 가지고 있는 5, 7, 3', 4'-tetrahydroxyflavone-4'-O-glucoside 즉, luteolin-4'-O-glucoside임을 알 수 있었다(Fig. 6).

DPPH radical 소거활성

이팝나무 잎에서 분리한 luteolin-4'-O-glucoside의 항산화 활성을 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)의 환원성을 이용하여 positive control로는 α-tocopherol과 BHT로 사용하여 실험한 결과는 Fig. 7과 같다. 즉, luteolin-4'-O-glucoside과 positive controls은 저 농도에서도 높은 DPPH radical 소거활성을 나타내었으며, 농도가 증가함에 따라 free radical 소거활성이 증가하는 경향을 나타내었고, 25 µg/mL의 농도에서부터는 각 시료마다 항산화 활성이 완만하게 나타났다.

Luteolin-4'-O-glucoside의 RC₅₀값이 6.3 µg/mL로, 천연 항산화제인 α-tocopherol과 합성 항산화제인 BHT의 RC₅₀이 3.8 µg/mL과 4.2 µg/mL에 비교하여 다소 낮은 활성을 나타내었다. Flavonoid 화합물의 항산화력은 B ring의 hydroxy-

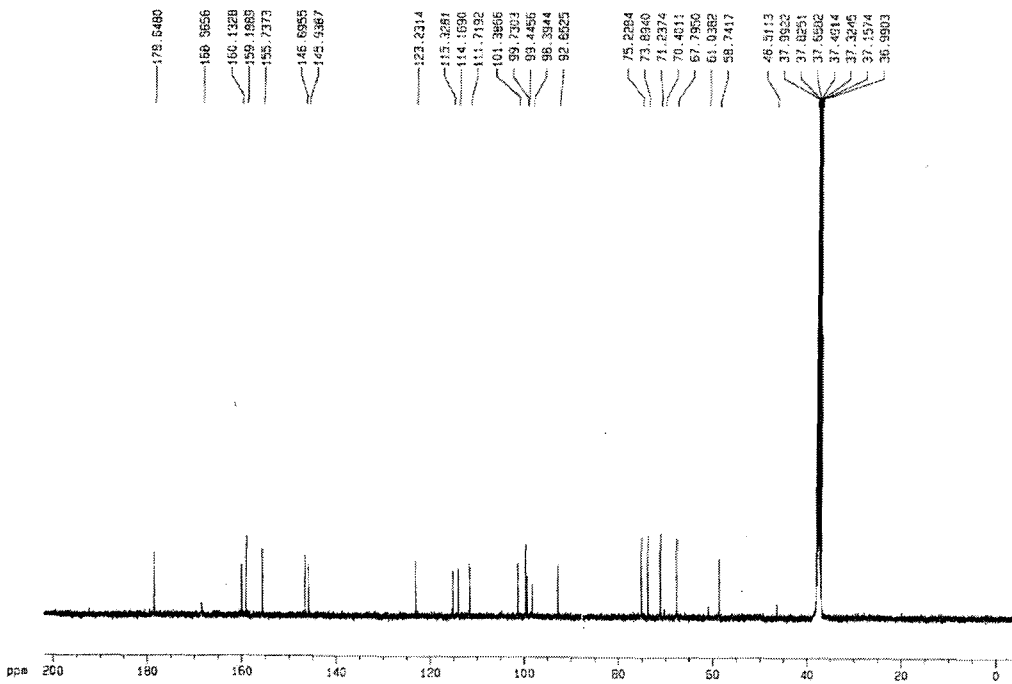


Fig. 4. ¹³C-NMR spectrum of luteolin-4'-O-glucoside (125 MHz, DMSO-d₆).

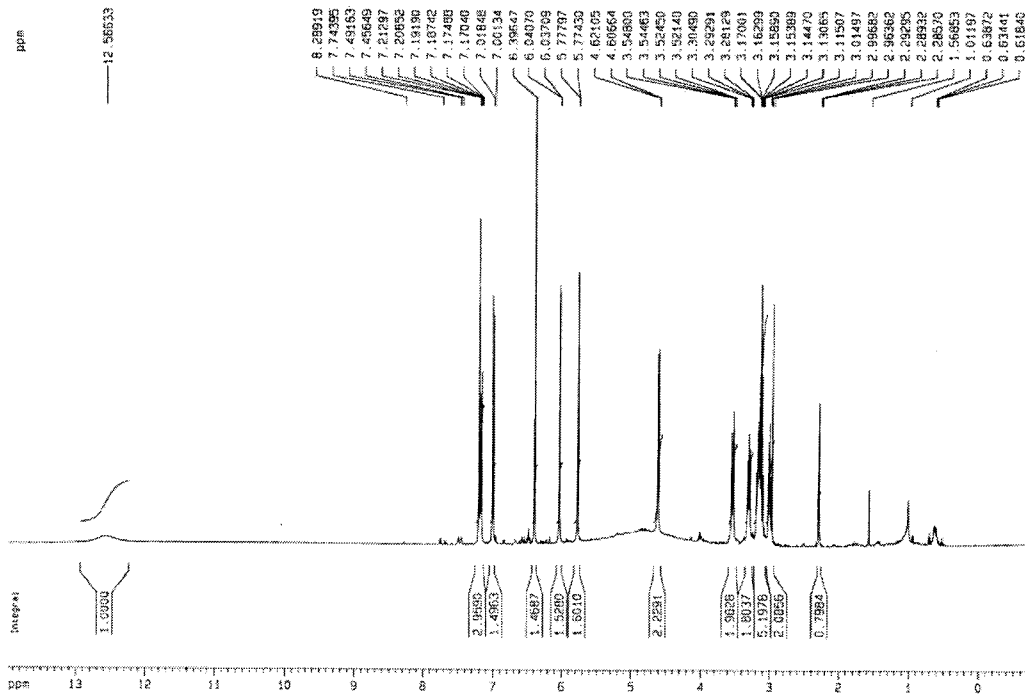


Fig. 5. ¹H-NMR spectrum of luteolin-4'-O-glucoside (500 MHz, DMSO-d₆).

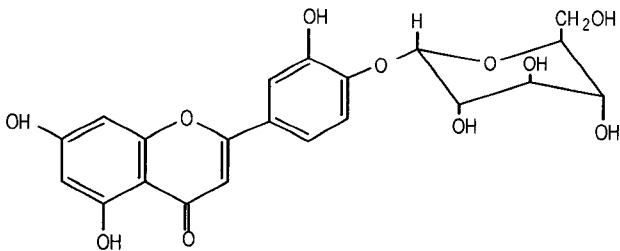


Fig. 6. Structure of luteolin-4'-O-glucoside (Compound 1).

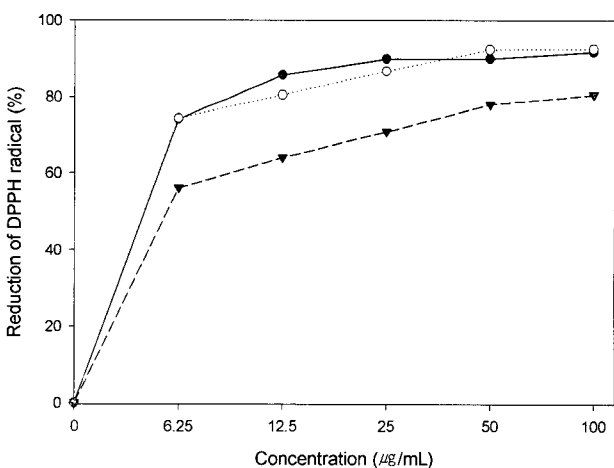


Fig. 7. DPPH radical scavenging activities of isolated luteolin-4'-O-glucoside from *Chionanthus retusa* leaves. ●: tocopherol, ○: BHT, ▼: luteolin-4'-O-glucoside.

lation의 위치와 수에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있으며, 특히 3' 4'-dihydroxyl group을 가질 때 항산화력이 높은

것으로 알려져 있다. 부가적으로 4위치에 carbonyl group을 가지고, 3 또는 5 위치에 free hydroxyl group을 가지며, 2와 3위치에 double bond를 가질 때 항산화력이 증가되는 것으로 보고되어(18) 이팝나무 잎에서 분리한 화합물도 유사한 구조를 나타내어 천연 항산화제로서의 활용가치가 높음을 알 수 있었다.

Reducing power

Reducing power는 potassium ferricyanide reduction method(16)를 이용하여 시료의 환원력을 평가하는 것으로 첨가되는 시료의 농도 변화에 따라 흡광도의 차이를 나타낸다. 이팝나무 잎에서 분리한 luteolin-4'-O-glucoside에 대한 reducing power를 실험한 결과는 Fig. 8과 같다. 농도가 증가할수록 흡광도 수치가 일정하게 증가하는 것으로 나타났으며, luteolin-4'-O-glucoside을 50 µg을 첨가하였을 때 positive control로 사용한 α-tocopherol과 BHT와 비교하여 다소 낮은 환원력을 나타내었다. 또한 luteolin-4'-O-glucoside의 환원력은 농도의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 특히 400 µg을 첨가하였을 때 환원력이 현저하게 증가하는 경향을 나타내었다. 환원력은 positive control로 사용한 α-tocopherol 및 BHT가 우수하였으나, luteolin-4'-O-glucoside도 비슷한 경향으로 농도에 비례하여 환원력이 증가하는 경향을 나타내었다. 항산화 반응과 같은 환원력은 reductions이 제공하는 수소 원자가 free radical 사슬을 분해함으로써 시작되며, 흡광도 수치 자체가 시료의 환원력을 나타내고, 높은 환원력을 가지는 물질일수록 흡광도 수치가 높게 나타난다고 보고하여 본 실험의 결과와 유사한 결과를 나타

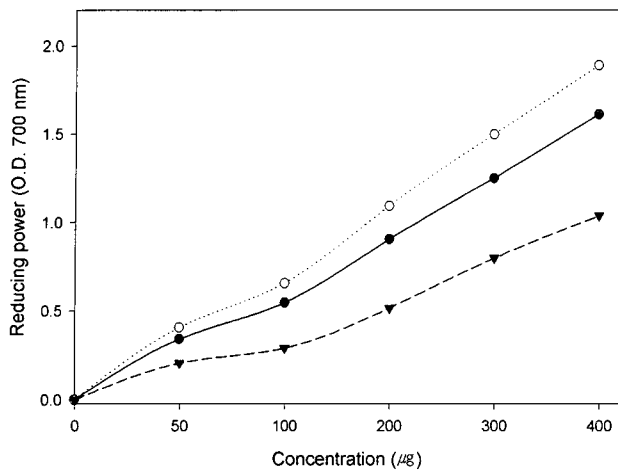


Fig. 8. Reducing power of isolated luteolin-4'-O-glucoside from *Chionanthus retusa* leaves.

●: tocopherol, ○: BHT, ▼: luteolin-4'-O-glucoside.

내었다(19).

Tyrosinase 저해 활성 측정

천연물에서 피부의 미백효과를 가지는 물질을 탐색하고자 이팝나무 잎에서 분리한 luteolin-4'-O-glucoside를 멜라닌 생합성 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 tyrosinase의 저해 활성에 대해 positive control로 arbutin과 kojic acid를 사용하여 0, 3.15, 6.25, 12.5, 25, 50 µg/mL씩 각각 첨가하여 실험한 결과 화합물의 첨가농도가 증가함에 따라 tyrosinase 저해 활성이 점차적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 50 µg/mL의 농도로 kojic acid, arbutin 및 luteolin-4'-O-glucoside를 첨가하였을 때 92.8, 64.4 및 58.8%의 tyrosinase 저해율을 나타내었다. 또한 luteolin-4'-O-glucoside의 IC₅₀은 23.2 µg/mL이었으며, positive control인 arbutin 15.6 µg/mL 및 kojic acid는 6.8 µg/mL로 나타났다(Fig. 9). Yun 등(20)은 적채 분획물 성분이 멜라닌 합성 억제에 미치는 영향을 조사

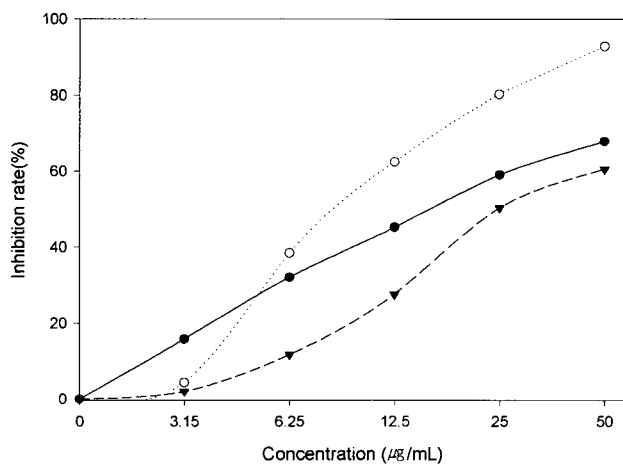


Fig. 9. Inhibitory effects of luteolin-4'-O-glucoside and positive controls against mushroom tyrosinase.

●: arbutin, ○: kojic acid, ▼: luteolin-4'-O-glucoside.

한 결과 적채 분획물의 첨가량이 증가함에 따라 tyrosinase 활성 억제율이 농도 의존적으로 증가하였으며, 이는 적채 분획물에 tyrosinase 저해력이 높은 물질이 함유되어 있다고 보고하였고, 현재까지 천연물에서 분리된 tyrosinase 활성억제 물질로서는 kojic acid, salicylhydroxamic acid, catechins, hydroquinone, resveratrol, oxyresveratrol, kaempferol, quercetin 및 nobilitin 등이 알려져 있다. 따라서 본 실험에 사용한 luteolin-4'-O-glucoside는 positive control인 arbutin과 kojic acid보다는 다소 낮은 활성을 나타내었지만 *in vivo* 실험과 같은 더 많은 연구를 수행하여 기능성 화장품의 소재로 이용하기 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

요 약

본 연구는 이팝나무 잎의 용매분획물을 이용하여 DPPH 소거 작용, 환원력과 같은 항산화 활성과 tyrosinase 저해 활성을 실험한 결과 에틸 아세테이트 분획물에서 높은 항산화 및 tyrosinase 저해 활성을 나타내었다. 따라서 silica gel column chromatography와 MPLC를 이용하여 그 활성물질을 분리하였으며, 분리한 화합물은 ¹H, ¹³C-NMR 및 2D-NMR을 이용하여 luteolin-4'-O-glucoside로 구조동정을 하였다. 분리한 luteolin-4'-O-glucoside와 기존 항산화제와의 비교실험에서 DPPH 라디칼 소거 활성과 환원력은 시료의 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하였다. 순수하게 분리한 luteolin-4'-O-glucoside를 이용하여 tyrosinase 저해 활성도 농도 의존적이었으며, IC₅₀ 값은 23.2 µg/mL로 나타났다. 그러므로 luteolin-4'-O-glucoside는 식품첨가물로 항산화제로서의 활용도 및 미백효과를 지니는 기능성 화장품원료로서 이용가치가 높을 것으로 생각된다.

문 헌

- Greenwald RA, Roy WW. 1985. Effect of oxygen-derived free radicals on hyaluronic acid. *Arthritis and Rheumatism* 23: 455-463.
- Mcbride TJ, Preston BD, Loeb LA. 1991. Mutagenic spectrum resulting from DNA damage by oxygen radicals. *Biochemistry* 30: 207-213.
- Dreher D, Junod F. 1996. Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 32A: 30-38.
- Griffiths HR, Lunec J. 1996. The C1q binding activity of IgG is modified *in vitro* by reactive oxygen species: implications for rheumatoid arthritis. *FEBS Lett* 388: 161-164.
- Barlow SM. 1990. Toxicological aspects of antioxidants used as food additives. In *Food Antioxidants*. Hudson BJJ, ed. Elsevier, Amsterdam. p 253-307.
- Ito N, Hirose M, Fukeshima S, Tsuda H, Shirai T, Tatematsu M. 1986. Studies on antioxidants; their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. *Food Chem Toxicol* 24: 1099-1102.
- Boterweck AAM, Verhagen H, Goldbohm RA, Kleinjans J, Brandt PA. 2000. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results

- from analyses in the Netherlands cohort study. *Food and Chem Toxicol* 38: 599-605.
8. Elliott JG. 1999. Application of antioxidant vitamins in foods and beverages. *Food Tech* 53: 46-48.
 9. Yamamoto K, Niki E. 1988. Prooxidant effect of α -tocopherol. *Biochim Biophys Acta* 958: 19-23.
 10. Hearing VJ, Ekel TM. 1976. Mammalian tyrosinase. *Biochem J* 157: 549-557.
 11. Ando S, Ando O, Suemoto Y, Mishima Y. 1993. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. *J Invest Dermatol* 100: 150-155.
 12. Prota G, Thompson RH. 1976. Melanin pigmentation in mammals. *Endeavor* 35: 32-38.
 13. 고경식. 1995. 한국동·식물검색도감. 아카데미서적, 서울. p 255.
 14. 김태경. 1996. 한국의 자원식물. 서울대학교 출판부, 서울. p 255.
 15. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
 16. Oyaizu M. 1986. Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr* 44: 307-315.
 17. Baek SH, Kim JH, Kim HA, Lee SM, Lee CY, Kho YH, Lee CH. 2003. Melanin biosynthesis inhibitory activities of coumarins isolated from *Angelica polymorpha* Maxim. *Kor J Microbiol Biotechnol* 31: 135-139.
 18. Ohigashi H, Osawa T, Terao J, Watanabe S, Yoshikawa T. 1997. *Food factors cancer prevention*. Springer, Tokyo. p 613-616.
 19. Gordon MH. 1990. The mechanism of antioxidant action *in vitro*. In *Food antioxidants*. Hudson B, ed. Elsevier Applied Science, London/New York. p 1-18.
 20. Yun KA, Park YJ, Bae SJ. 2004. Antioxidant and tyrosinase inhibitory effects of *Brassica oleracea* L. fractions. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 7-15.

(2004년 8월 5일 접수; 2004년 10월 27일 채택)