

## 유기노의 항산화 활성 및 멜라닌 생성 억제 효과

조영호\* · 이범천 · 김진화 · 김진희 · 표형배 · Yong He Zhang<sup>1</sup> · 박흠대<sup>2</sup>  
한불화장품(주) 기술연구소, <sup>1</sup>Peking University, <sup>2</sup>대구대학교 공과대학 생물공학과

### Effect of *Artemisia anomala* S. Moore on Antioxidant Activity and Melanogenesis

Young Ho Cho\*, Bum Chun Lee, Jin Hwa Kim, Jin Hui Kim, Hyeong Bae Pyo,  
Yong He Zhang<sup>1</sup>, and Hum Dai Park<sup>2</sup>

R&D Center, Hanbul Cosmetics Corporation, Chungbuk 369-834, Korea  
<sup>1</sup>Department of Pharmacology, Peking University, Beijing 100083, China  
<sup>2</sup>Department of Biotechnology, Daegu University, Gyeongsan 712-714, Korea

**Abstract** – In mammalian melanocytes, melanin synthesis is controlled by tyrosinase, the key enzyme in the pigment synthesis. In this study, to develop a new whitening agent, we have investigated the antioxidant activity and the inhibitory effect of *Artemisia anomala* extract on tyrosinase activity and melanogenesis in the B16/F1 melanoma cells. The inhibition ratio of tyrosinase activity of butanol fraction from *A. anomala* was higher than that of arbutin (97.5±0.5% at the concentration of 2 mg/ml). The butanol fraction was shown scavenging activities of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radicals and superoxide anion radicals in a dose dependent manner. The highest inhibitory activity of melanogenesis was also butanol fraction (25.0±3% at the concentration of 200 µg/ml). From these results, we suggest that the *A. anomala* extract might be used to be a potential agent for skin whitening.

**Key words** – *Artemisia anomala*, antioxidant, melanogenesis, tyrosinase

국화과 (Compositae)에 속하는 유기노는 다년생 초본식물인 기호 (*Artemisia anomala* S. Moore)의 전초이다. 싹과 줄기가 쭉과 같고 잎이 푸르러 비늘과 같으며 줄기가 네모나고 작은 황백색의 꽃이 피며 기장과 같은 열매가 열린다. 중국의 강소성, 절강성, 강서성 등지에 분포한다. 8~9월경에 베어 햇볕에 건조하여 사용되는 생약으로서 혈액순환 개선, 월경불순, 빈혈, 염증, 타박상, 창상출혈 등의 치료제로 사용되어져 왔다.<sup>1)</sup> 유기노의 함유 성분에는 umbelliferone 등의 coumarin계 성분, austrin 등의 sesquiterpenoids계 성분과 scutellarein 등의 flavonoids계 성분들이 보고되어져 있다.<sup>2)</sup>

인간의 피부 색깔은 내적, 외적 요인에 의해 달라지게 되는데 그 중 피부색을 결정하는 근본적인 내적 인자는 천연 피부 색소인 멜라닌이다. 멜라닌은 동물, 식물 및 미생물에 널리 존재하는 페놀성 고분자 물질로 자외선, 건조, 극한 온

도 등의 외부 자극에 대한 생존능력을 높여주지만, 국소적으로 과도하게 합성되면 피부 표면에 침착되어 기미, 주근깨 및 다양한 색소침착을 유발하게 되는 것으로 알려져 있다.<sup>3,4)</sup> 멜라닌의 생합성은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte의 melanosome에서 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), dopachrome tautomerase (DCT) 등의 특이적인 효소의 연속적 산화반응에 의해 일어난다.<sup>5)</sup> 멜라닌은 갈색-흑갈색의 Eu-Melanin과 노란색-붉은색의 Pheo-Melanin으로 나누어 지는데, tyrosinase는 이들 두 가지 타입의 멜라닌 합성에 관여하며, 특히 TRP-1과 DCT는 Eu-Melanin의 합성에 더 많이 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>6)</sup> 지금까지 미백 관련 연구동향에 의하면 자외선 흡수제나 산란제, arbutin,<sup>7)</sup> kojic acid<sup>8)</sup> 등과 같은 tyrosinase 활성 저해제, 활성 산소종 (reactive oxygen species)을 소거하는 ascorbic acid 및 유도체, coenzyme Q10 등<sup>9)</sup>이 미백효과가 있는 것으로 알려져 있으나, 피부 안전성, 제형 안정성 등의 문제로 사용되지 않거나 제한된 양만 사용되고 있다. 특히 최근에는 안전성을

\*교신저자(E-mail) : cyh@hanbul.co.kr  
(FAX) : 043-881-2128

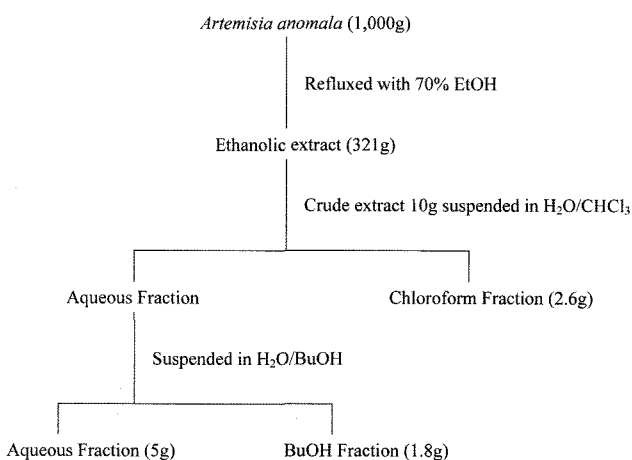
고려하여 상백피,<sup>10)</sup> 감초,<sup>11)</sup> 녹차<sup>12)</sup> 등 천연물로부터 미백연구가 활발히 이루어지고 있다.

본 연구는 기존에 연구 개발되어진 천연 미백제보다 안전하고 우수한 활성을 나타내는 미백제를 천연물로부터 개발하기 위한 연구의 일환으로<sup>13)</sup> 유기노가 멜라닌 생성에 미치는 영향을 조사하고자 각 용매별 분획에 의한 tyrosinase 활성 저해 효과와 free radical 소거 활성을 검색하였으며, 활성이 가장 높게 나타난 BuOH 분획을 B16/F1 melanoma 세포에 처리하여 멜라닌 생성 저해 효과를 측정하였다.

## 재료 및 방법

**재료 및 시약** - 본 실험에 사용한 유기노는 *Artemisia anomala* S. Moore의 전초로 중국 북경대학에서 제공받아 사용하였으며, 표본은 북경대학교 의과대학 천연물 표본실에 보관중이다. Tyrosinase 활성 저해 측정을 위해 사용된 mushroom tyrosinase, tyrosine 및 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sigma-Aldrich사(USA)에서 각각 구입하여 사용하였다. 추출 및 분획에 사용된 유기 용매들과 그 외 각종 시약은 일급 및 특급 시약을 구입하여 사용하였다.

**시료의 추출 및 분리** - 건조된 유기노 1 kg을 분쇄하여 70% EtOH로 3회 환류 추출하여 여과한 후, 감압 농축하여 EtOH 추출물 (321 g)을 얻었다. 얻어진 EtOH 추출물의 일부 (10 g)를 물에 분산시킨 후, chloroform (CHCl<sub>3</sub>) 1 L로 분배 추출하여 CHCl<sub>3</sub> 분획을 얻고, 포화 NaCl 용액으로 back washing하고, 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수한 후, 감압 농축하여 2.6 g의 분획을 얻었다. 남은 물층에 대하여 수포화 부탄올 (aq. BuOH)을 이용하여 CHCl<sub>3</sub> 분획과 같은 방법으로 탈수, 농축하여 1.8 g의 분획을 얻었다. 남은 물층을 농축하여 5 g의 분획을 얻었다 (Scheme 1). 각각의 건조 분획을 DMSO에 녹여 농도를 조정하여 다음 시료로 사용하였다.



**Scheme 1.** Procedure for extraction and fractionation of *A. anomala*.

**세포배양** - B16/F1은 생쥐의 melanoma 세포주로 서울대학교 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 구입한 세포는 5% fetal bovine serum (Bio Whittaker, USA), 1% penicillin-streptomycin (Gibco BRL, USA), 200  $\mu$ M  $\alpha$ -MSH (Sigma-Aldrich Co.)를 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

**Tyrosinase 활성 저해 측정** - Tyrosinase 활성 저해 측정은 Choi 등<sup>14)</sup>의 방법을 변형시켜 사용하였다. 96-well plate에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH6.5), 1.5 mM tyrosine solution 및 시료용액의 혼합액에 tyrosinase 효소액 (1200 units/ml)을 첨가하여 37°C에서 25분간 반응시켜 micro-plate reader (ELx 800, Bio-Tek Instruments, USA)로 490 nm에서 흡광도를 측정 후 tyrosinase 활성 저해율을 구하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

**DPPH Radical 소거 활성 측정** - Free radical의 소거 작용은 Blois<sup>15)</sup>가 사용한 방법을 약간 변형하여 각 시료의 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH)에 대한 소거 효과를 측정하였다. 0.1 mM DPPH 메탄올 용액(100  $\mu$ l)에 시료 (100  $\mu$ l)를 가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 실온에서 10분 동안 반응시켰다. 이후 micro-plate reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical의 소거 활성을 구하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

**Superoxide Radical 소거 활성 측정** - Superoxide radical의 소거작용은 Furuno 등<sup>16)</sup>의 방법에 따라 각 시료의 xanthine-xanthine oxidase system에 의해 생성된 superoxide radical을 소거하는 효과를 측정하였다. 0.05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer에 3 mM xanthine, 3 mM EDTA, 0.72 mM nitroblue tetrazolium (NBT) 및 0.15% bovine serum albumin (BSA) solution과 시료를 각각 첨가하여 혼합한 다음, 25°C에서 10분간 반응하였다. 이후 각 tube에 xanthine oxidase (0.25 units/ml) 용액을 첨가하여 25°C에서 30분간 반응시킨 후 micro-plate reader 565 nm superoxide radical의 소거 활성을 구하였다. 각 반응은 3회 이상 측정하였다.

**세포 생존율 측정** - 세포독성은 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 Mosmann<sup>17)</sup>의 방법을 변형하여 측정하였다. 96-well plate에 B16/F1 melanoma 세포를 2 $\times$ 10<sup>4</sup> cells/well 농도로 접종한 후 각 well에 시료를 투여하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 24시간 배양하였다. MTT 용액 (5  $\mu$ g/ml)을 첨가하고 4시간 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 100  $\mu$ l acid-isopropanol (0.04 N HCl in isopropanol)를 첨가한 후 푸른색의 formazan이 용출되도록 하여 micro-plate reader로 565 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

**멜라닌 정량** - 멜라닌 정량은 Hosoi 등<sup>18)</sup>의 방법을 변형하여 사용하였다. 6-well plate에 3 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/well 농도로 세

포를 접종한 후 시료를 처리하고 48시간 동안 37°C, CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 5분간 원심분리하여 얻은 세포 침전물을 1 ml homogenization buffer (50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.5, 1% triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1 N NaOH (+10% DMSO) 용액을 200 µl를 첨가하여 용해시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 멜라닌 양은 합성 멜라닌 (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 작성된 표준 검량선에서 구하고, 실험군의 멜라닌 양은 대조군의 멜라닌 양에 대한 백분율로 계산하였다. 멜라닌은 단위 세포 (10<sup>4</sup> cells)에서의 멜라닌 생성량을 비교하였다.

**자료분석 및 통계처리** - 모든 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였으며, 각 실험군을 대조군에 대한 백분율로 나타내었다. 각 군간의 통계적 유의성 검증은 Student's *t*-test로 하였으며, *p* 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

**결과 및 고찰**

**Tyrosinase 활성 저해 효과** - 유기노 70% EtOH 추출물의 용매별 분획에 대한 tyrosinase 활성 저해 효과는 tyrosine을 기질로 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 Table I에 나타내었다. Table I에서 보는 바와 같이 유기노 70% EtOH 추출물의 tyrosinase 활성 저해는 75.5±1.5%로 우수하였다.

**Table I.** Inhibition of tyrosinase activity by extracts from *A. anomala*

Samples (2 mg/ml)	Inhibition of tyrosinase activity (%)
Arbutin <sup>1)</sup>	90.2±1.3*
70% EtOH ext.	75.5±1.5*
CHCl <sub>3</sub> fraction	15.0±2.0
BuOH fraction	97.5±0.5*
H <sub>2</sub> O fraction	44.0±1.1*

<sup>1)</sup> Positive control.  
 Results were expressed as % of control and data were mean ±SD of the minimum three determinations.  
 \*Significantly different from control group (\**p*<0.05).

유기노 70% EtOH 추출물을 chloroform, BuOH, H<sub>2</sub>O 순으로 분획한 유기용매 분획물의 tyrosinase 활성 저해는 각각 15.0±2.0, 97.5±0.5 및 44.0±1.1%로 나타나 사용한 유기용매 중 BuOH 분획물이 가장 우수한 활성 저해 효과를 나타내었으며, 동일 농도의 arbutin의 90.2±1.3%와 비슷한 tyrosinase 활성 저해 효과를 나타내었다 (Table I).

**DPPH radical 소거 효과** - DPPH는 free radical의 안정된 모델로 반응 중 DPPH의 감소는 free radical의 소거반응이 진행됨을 알 수 있고 지질과산화의 초기반응의 억제 정도를 예측 할 수 있다. 기존에 널리 알려진 합성 항산화제인 3-*t*-butyl-4-hydroxyanisole (BHA)를 대조군으로 하여 유기노 분획물에 대하여 DPPH법에 의한 free radical 소거 활성을 측정된 결과, Table II에 나타낸 바와 같이 유기노 70% EtOH 추출물의 DPPH radical 소거 활성은 10, 100, 1000 µg/ml에서 각각 30.0±0.5%, 60.2±2.0%, 95.0±1.5%로 우수하였으며, 대조군으로 사용된 동일 농도의 BHA의 25.0±0.1%, 58.0±0.5%, 85.0±3.0%와 비슷하거나 우수한 DPPH radical 소거 활성을 나타내었다. 또한 유기노 70% EtOH 추출물을 chloroform, BuOH, H<sub>2</sub>O 순으로 분획한 유기용매 분획물들은 투여 농도 의존적으로 DPPH radical 소거 활성을 나타내었으며, 사용한 유기용매 중 BuOH 분획이 가장 우수한 소거 활성을 나타내었다 (Table II). 상기의 결과로 볼 때 유기노 BuOH 분획의 free radical 소거 활성은 단일 성분인 BHA보다 우수한 효과를 가지는 것으로 밝혀졌다.

**Superoxide radical 소거 효과** - Xanthine/xanthine oxidase에 의해 생성되는 superoxide anion의 저해 작용은 superoxide anion 소거 작용과 xanthine oxidase 효소 저해에 의해 나타난다.<sup>19)</sup> Xanthine oxidase에 의해 형성되는 superoxide anion에 대한 유기노 70% EtOH 추출물의 소거 효과는 Table III에 나타내었다. Table III에 나타낸 바와 같이 유기노 70% EtOH 추출물은 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거 효과를 나타내었다. 즉 유기노 70% EtOH 추출물을 10, 100, 1000 µg/ml의 농도로 처리한 경우 각각의 superoxide radical 소거능은 30.0±1.3%, 55.0±1.5%, 98.0±1.0%로 대조군으로 사용된 동일농도의 BHA의 35.0±2.0%, 65.8±1.6%,

**Table II.** Scavenging effects of various solvent extracts from *A. anomala* on DPPH radical

Concentration (µg/ml)	BHA <sup>1)</sup>	70% EtOH ext.	Solvent		
			CHCl <sub>3</sub>	BuOH	H <sub>2</sub> O
10	25.0±0.1	30.0±0.5	5.0±0.3	30.0±1.3	25.0±1.5
100	58.0±0.5*	60.2±2.0*	17.7±2.0	47.9±1.0*	37.1±0.8*
1000	85.0±3.0*	95.0±1.5*	92.5±1.4*	95.0±1.5*	89.1±1.8*

<sup>1)</sup> Positive control.  
 Results were expressed as % of control and data were mean±SD of the minimum three determinations.  
 \*Significantly different from control group (\**p*<0.05).

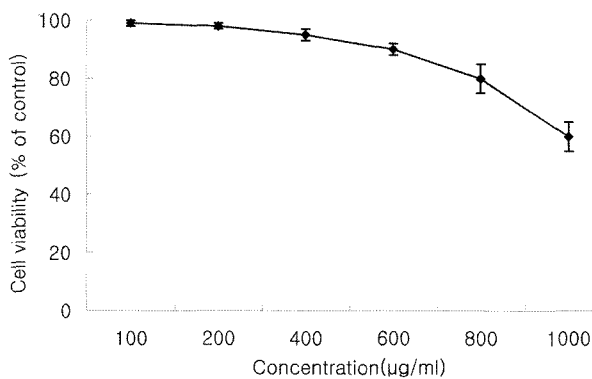
**Table III.** Scavenging effects of various solvent extracts from *A. anomala* on superoxide radical

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	BHA <sup>1)</sup>	70% EtOH ext.	Solvent		
			CHCl <sub>3</sub>	BuOH	H <sub>2</sub> O
10	35.0 $\pm$ 2.0	30.0 $\pm$ 1.3	33.9 $\pm$ 2.3	45.5 $\pm$ 1.8*	27.6 $\pm$ 2.0
100	65.8 $\pm$ 1.6*	55.0 $\pm$ 1.5*	56.0 $\pm$ 2.1*	91.7 $\pm$ 1.9*	77.5 $\pm$ 1.1*
1000	90.0 $\pm$ 1.5*	98.0 $\pm$ 1.0*	90.0 $\pm$ 1.6*	98.0 $\pm$ 1.5*	90.0 $\pm$ 0.5*

<sup>1)</sup>Positive control.

Results were expressed as % of control and data were mean $\pm$ SD of the minimum three determinations.

\*Significantly different from control group (\* $p$ <0.05).

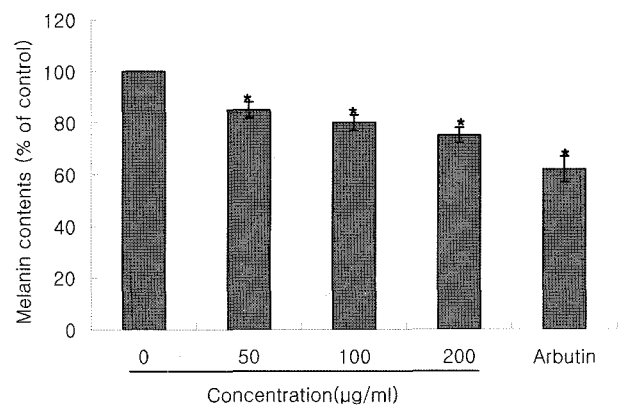


**Fig. 1.** Effects of butanol fraction from *A. anomala* on the viability of B16/F1 melanoma cells. Results were expressed as % of control and data were mean $\pm$ SD of the minimum three determinations.

90.0 $\pm$ 1.5%와 비슷한 우수한 superoxide radical 소거 효과를 나타내었다. 또한, 유기농 70% EtOH 추출물의 유기용매 분획들도 투여 농도 의존적으로 superoxide radical 소거 활성을 나타내었으며, 사용한 유기용매 중 BuOH 분획이 가장 우수한 소거 활성을 나타내었다 (Table III).

**세포독성** - 가장 강한 활성을 보인 BuOH 분획을 100  $\mu\text{g/ml}$ 에서 1000  $\mu\text{g/ml}$ 까지 다양한 농도로 처리하고, 24시간 배양한 후에 MTT 방법으로 세포의 생존율을 관찰하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 BuOH 분획을 최고 600  $\mu\text{g/ml}$  처리 시에도 세포 생존율이 90% 이상으로 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 생존율이 저하되었다. 따라서 이 농도 범위에서 BuOH 분획은 세포독성이 거의 없는 것으로 사료되어 이 농도 범위를 기준으로 실험을 실시하였다.

**멜라닌 생합성 저해 효과** - 유기농 BuOH 분획이 멜라닌 합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 B16/F1 melanoma 세포를 이용하여 최종 산물인 멜라닌 양을 측정하였다. B16/F1 melanoma 세포에 유기농 BuOH 분획을 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 48시간 배양한 다음 멜라닌 생성량을 측정하였다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 BuOH 분획 처리군에서 투여 농도 의존적으로 멜라닌 합성이 저해됨을 확인하였다. 특히 양성 대조군으로 사용된 arbutin은 2 mg/ml



**Fig. 2.** Inhibitory effects of butanol fraction from *A. anomala* on melanin production in B16/F1 melanoma cells. Results were expressed as % of control and data were mean $\pm$ SD of the minimum three determinations. \*Significantly different from control group (\* $p$ <0.05).

농도에서 38.0 $\pm$ 5%의 멜라닌 생성 저해 효과를 나타낸 반면에 유기농 BuOH 분획의 경우 arbutin 처리 농도보다 10배 정도 낮은 200  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 25.0 $\pm$ 3%의 멜라닌 생성 저해 효과를 나타내었다. Melanocytes와 melanoma cells에서의 멜라닌 합성은 tyrosinase에 의해 조절되는 일련의 효소적 반응에 의해 관리되며, tyrosine을 기질로 하여 dopa를 생성시키고 다시 dopaquinone으로 산화시키는 연속적인 효소적 산화가 진행된 후 각 생성물의 중합반응에 의해 이루어진다.<sup>20)</sup> 유기농 BuOH 분획을 B16/F1 melanoma 세포에 처리시 대조군에 비해 멜라닌 생성이 감소하는 경향을 보였다. 이것은 BuOH 분획의 tyrosinase 활성 저해와 우수한 항산화 작용에 의해 멜라닌 합성의 초기 단계인 일련의 산화 반응이 억제되어 최종 산물인 멜라닌 합성이 감소되는 것으로 사료된다.

따라서 유기농 BuOH 분획이 양성 대조군으로 사용된 arbutin과 비슷한 tyrosinase 활성 저해 및 우수한 B16/F1 melanoma 세포의 melanogenesis 저해 효과를 나타내어 향후 유기농 성분의 분리정제 및 임상 시험을 통해 유기농을 이용한 새로운 미백원료 개발이 가능할 것으로 사료된다.

## 결 론

본 연구에서는 천연물로부터 미백제를 개발하기 위한 연구의 일환으로 유기노가 멜라닌 생성에 영향을 주는지를 조사하고자 유기노 70% EtOH 추출물과 각 용매별 분획에 의한 tyrosinase 활성 저해 효과, free radical 소거 활성 및 melanogenesis 저해 효과등을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 유기노 용매별 분획물 중에서 BuOH 분획 처리군이 가장 높은 tyrosinase 활성 저해 효과를 보였다.

2. DPPH법, NBT법으로 유기노 용매별 분획물의 항산화 활성을 측정한 결과, 처리 농도 의존적으로 radical 소거 활성을 나타내었으며, BuOH 분획물이 가장 우수한 항산화 효과를 나타내었다.

3. B16/F1 melanoma 세포에 유기노 BuOH 분획을 농도별로 처리하고 멜라닌 생성 정도를 측정한 결과 투여 농도 의존적으로 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 나타났다. 특히, 양성 대조군인 arbutin이 2 mg/ml 농도에서  $38.0 \pm 5\%$ 의 멜라닌 생성 저해 효과를 보인 반면에 유기노 BuOH 분획의 경우 arbutin 처리 농도 보다 10배 정도 낮은 200  $\mu\text{g/ml}$  농도에서도 멜라닌 생성을  $25.0 \pm 3\%$  저해하는 우수한 효과를 나타내었다.

유기노 추출물은 tyrosinase 활성 저해 효과와 우수한 항산화 활성을 가져 멜라닌 생성의 초기 단계인 효소적 산화 반응을 억제하여 멜라닌 생성을 저해하는 것으로 보인다. 따라서 유기노 추출물을 새로운 미백 원료로 개발할 수 있을 것으로 사료된다.

## 인용문헌

- 구본홍(1995) 한글동의보감, 1436. 한국교육문화사, 서울.
- 장일무(2003) 동양의약과학대전 I, 327. 서울대학교 천연물과학연구소 문헌정보학연구소, 서울.
- Lee, J. K., Jung, H. M. and Kim, S. Y. (2003) 1,8-Dihydroxynaphthalene (DHN)-melanin biosynthesis inhibitors increase erythritol production in *Torula corallina*, and DHN-melanin inhibits erythrose reductase. *Appl. Envir. Microbiol.* **69**: 3427-3434.
- Hill, H. Z., Li, W., Xin, P. and Mitchell, D. L. (1997) Melanin: a two edged sword? *Pigment Cell Res.* **10**: 158-161.
- Marmol, V. del. and Beermann, F. (1996) Tyrosinase and related proteins in mammalian pigmentation. *FEBS Lett.* **381**: 165-168.
- Hearing, V. J. (1999) Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **4**: 24-28.
- Chakraborty, A. K., Funasaka, Y., Komoto, M. and Ichihashi, M. (1998) Effect of arbutin on melanogenic proteins in human. *Pigment Cell Res.* **11**: 206-212.
- Cabanes, J., Chazarra, S. and Garci-Carmona, F. (1994) Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**: 982-985.
- Fujiware, Y., Sahashi, Y., Artro, M., Hasegawa, S., Akimoto, K., Ninomiya, S., Sakaguchi, Y. and Seyama, Y. (2004) Effect of simultaneous administration of vitamin C, L-cysteine and vitamin E on the melanogenesis. *Biofactors.* **21**: 415-418.
- Lee, S. H., Choi, S. Y., Kim, H., Hwang, J. S., Lee, B. G., Gao, J. J. and Kim, S. Y. (2002) Mulberroside F isolated from the leaves of *Morus alba* inhibits melanin synthesis. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 1045-1048.
- Jung, G. D., Yang, J. Y., Song, E. S. and Par, J. W. (2001) Stimulation of melanogenesis by glycyrrhizin in B16 melanoma cells. *Exp. Mol. Med.* **33**: 131-135.
- No, J. K., Soung, D. Y., Kim, Y. J., Shim, K. H., Jun, Y. S., Rhee, S. H., Yokozawa, T. and Chung, H. Y. (1999) Inhibition of tyrosinase by green tea components. *Life Sciences.* **65**: 241-246.
- Lee, K. E., Sim, K. S., Kim, J. H., Park, S. M., Lee, B. C., Yun, Y. P., Zhang, Y. H. and Pyo, H. B. (2004) Effects of the *Scirpi rhizoma* on antioxidation and melnogenesis. *Yakhak Hoeji* **48**: 323-327.
- Choi, B. W., Lee, B. H., Kang, K. J., Lee, E. S. and Lee, N. H. (1998) Screening of the tyrosinase inhibitors from marine algae and medicinal plants. *Kor. J. Pharmacogn.* **29**: 237-242.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature.* **181**: 1199.
- Furuno, K., Akasako, T. and Sugihara, N. (2002) The contribution of the pyrogallol moiety to the superoxide radical scavenging activity of flavonoids. *Biol. Pharm. Bull.* **25**: 19-23.
- Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. *J. Immunol. Methods.* **65**: 55-63.
- Hosoi, J., Abe, E., Suda, T. and Kuroki, T. (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**: 1474-1478.
- Kuppusamy, P. and Zweier, J. L. (1989) Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.* **264**: 9880-9884.
- Englaro, W., Rezzonico, R., Durand-Clement, M., Lallemand, D., Ortonne, JP. and Ballotti, R. (1995) Mitogen-activated protein kinase pathway and AP-1 are activated during cAMP-induced melanogenesis in B-16 melanoma cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 24315-24320.

(2005년 8월 23일 접수)