

짝자래나무 추출물의 항산화 및 미백 효과

서은중 · 홍은숙 · 최민희 · 김기선 · 이성준*

(주)더페이스샵 기술연구소

Antioxidant and Skin Whitening Effects of *Rhamnus yoshinoi* Extracts

EunJong Seo, EunSuk Hong, MinHee Choi, KiSun Kim, and SungJun Lee*

THEFACESHOP R&D Center

Abstract The purpose of this study was to investigate the antioxidant and skin whitening effects of *Rhamnus yoshinoi* extracts. *Rhamnus yoshinoi* was extracted with 100% ethanol and water. The antioxidative and skin whitening effects of extracts were determined by *in vitro* assays using the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) method and inhibitory effects against tyrosinase activity and melanogenesis in B16F1 melanoma cells. The radical scavenging activities of the *Rhamnus yoshinoi* extracts were tested by DPPH assay and showed high DPPH radical scavenging activities (SC50; 21.6 ppm in EtOH, 40.5 ppm in water). As for tyrosinase inhibitory activity, the *Rhamnus yoshinoi* ethanol extract had the highest inhibition activity (IC50; 256.3 ppm). In B16F1 mouse melanoma cells, the *Rhamnus yoshinoi* ethanol extract significantly inhibited melanin synthesis by 53.36% at the concentration of 50 ppm. These results suggest that *Rhamnus yoshinoi* ethanol extract has significant antioxidant activity and whitening activity.

Key words: *Rhamnus yoshinoi*, antioxidative, whitening, tyrosinase

서 론

유해 산소라 불리는 활성 산소란 미토콘드리아, 식세포 또는 세포질에서 정상적인 대사 과정 중 여러 가지 생물학적 반응에 의해 생성되는 일중항산소, 과산화수소(H₂O₂)나 superoxide anion (•O₂⁻) 및 hydroxyl 라디칼(•OH) 등과 같은 짝짓지 않은 상태의 전자를 갖는 유리라디칼들을 말한다(1). 이러한 유리라디칼들은 반응성과 파괴성이 매우 높아 생체내의 세포막, 단백질, DNA 및 효소 등을 손상시키는 등 세포와 조직에 해로운 반응을 일으켜 암 및 동맥경화 등의 질병을 유발하며 노화와 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(2-8). 따라서 이러한 활성 산소를 제거하거나 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며 여러 항산화제에 대한 연구결과들이 보고되어 있다(9-13). 연구결과에 의하면 식물에 존재하는 비타민 E, 비타민 C 등의 비타민과 플라보노이드류, 카로티노이드류, 폴리페놀과 같은 천연 항산화제와 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase 등과 같은 항산화 효소 및 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT), butylated hydroxyanisole(BHA) 등 여러 가지 물질이 항산화 효과가 있는 것으로 알려졌다(9,13-16). 그러나 기존에 개발된 식물 유래 천연 항산화제의 경우 항산화 효과가 비교적 낮고 원료 수급의 문제, 낮은 수율 및 안정성 등의 문제점으로 상업용 추출물에 대한 효과가 확인된 보고

는 없으며 항산화 효소는 단백질로 구성되어 온도나 pH에 영향을 많이 받아 산업적 이용에 어려움이 있다(15-17). 또한 합성 항산화제 경우에는 생체 효소, 지방의 변이 및 독성으로 인해 인체에 암을 유발할 수 있다는 보고가 있어 보다 안전하고 활성이 높은 항산화제의 연구가 요구되고 있다(18-20).

멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 역할을 하나 과도하게 생성될 경우 피부에 색소가 침착되어 기미, 주근깨를 형성하며, 이와 같은 병변은 나아가 피부암의 원인이 되기도 한다(21). 따라서, 이러한 색소 침착 현상을 방지하기 위해서는 멜라닌 생성 과정의 일부분을 저해하여 멜라닌의 생성을 감소 시켜야 한다. 멜라닌은 피부에 존재하는 색소로서, 표피의 기저층에 존재하는 멜라노사이트 내의 멜라노솜이라는 소포체에서 먼저 Tyrosinase, tyrosinase related protein-1(TRP-1)과 dopachrome tautomerase(DCT) 등의 효소에 의해 멜라닌이 생성되게 된다(22). 특히 tyrosinase는 멜라닌 생성 첫 단계를 일으키는 효소로, 티로신이 도파(DOPA)를 거쳐 도파퀴논(dopaquinone)으로 전환되고, 도파퀴논으로부터 자동 산화 반응과 효소 반응으로 도파크롬(dopachrome)을 거쳐 흑갈색의 공중합체인 멜라닌이 생성되게 된다. 현재 미백제의 개발에 있어서, 생성된 멜라닌 색소를 환원시켜 탈색하는 방법과 멜라닌 색소를 형성하는 효소인 tyrosinase의 활성을 억제하는 방법이 알려져 있다(23,24). 기존 화장품 분야에서는 미백성분으로서, 코지산(kojic acid), 알부틴(arbutin) 등과 같은 tyrosinase 효소활성을 억제하는 물질, 하이드로퀴논(hydroquinone), 비타민 C(L-ascorbic acid) 및 이들의 유도체와 각종 식물 추출물이 사용되어 왔다(25). 그러나, 이런 물질들은 불안정하여 분해나 착색, 이취, 효과의 불분명 및 안전성 문제 등으로 그 사용이 제한되고 있는 실정이다. 따라서 기존미백제가 갖고 있는 여러 단점을 극복하고자 최근에는 피부에 안전한 천연물을 이용한 미백제 개발에 많은 연구가 진행되고 있다.

*Corresponding author: SeongJun Lee, THEFACESHOP R&D Center, Incheon 403-200, Korea
Tel: 82-32-870-7401
Fax: 82-32-870-7400
E-mail: sjleec@thefaceshop.com
Received August 23, 2010; revised October 4, 2010;
accepted October 12, 2010

따라서 본 연구는 천연 식물로서 인체에 안전하고 항산화 및 미백 효과를 갖는 소재를 개발하고자 수행되었다. 본 연구에 사용된 짜자래나무(*Rhamnus yoshinoi*)는 쌍떡잎식물 갈매나무목 갈매나무과의 낙엽활엽 관목이며 한국의 특산종으로 경기, 충남을 제외한 전역에 분포하나 생리활성 및 항산화, 미백 등과 같은 효능에 대해서는 알려진 바가 전혀 없다. 이런 짜자래나무 추출물의 신규 미백소재로서의 효능을 확인하고자 유효 성분으로 알려진 폴리페놀 및 플라보노이드의 함량 측정 및 항산화 효과, tyrosinase 저해효과, 멜라닌 생합성 저해효과를 수행하였다.

재료 및 방법

재료

본 연구에서 사용된 짜자래나무(*Rhamnus yoshinoi*)는 한국생명공학연구원 한국식물추출물은행(Daejeon, Korea)에서 건조분쇄되어 있는 것을 구입하여 4°C에 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

시약

본 연구의 사용된 tannic acid, rutin hydrate, sodium metabisulfite, sodium carbonate, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH), ascorbic acid, L-tyrosine, tyrosinase, 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, diethylene glycol은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

추출

짜자래나무 추출을 위해 용매로 에탄올과 물을 이용하였으며 추출은 시료의 10배의 용매를 가한 후 30°C에서 초음파(Asia industry, Incheon, Korea)를 이용하여 3회 반복 추출하였다. 100% 에탄올을 이용하여 추출한 시료는 40°C 이하에서 감압농축(rotary vacuum evaporator, N-N series, Eyela, Tokyo, Japan)을 하였으며 물을 이용하여 추출한 시료는 동결건조(FD8508, Ilshin Lab Co., Yangju, Korea)하여 중량법으로 수율을 계산하였다. 각각의 추출물은 밀봉하여 -80°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 함량 측정

총 폴리페놀 함량은 Gutfinger(26)의 방법을 변형하여 측정하였다. 각각의 한약재 추출물을 0.1-1 mg/mL 농도로 희석하여 준비한 후 실험에 사용하였다. 시료 0.2 mL와 Folin-ciocalteu reagent 0.2 mL를 혼합한 후 상온에서 3분간 반응하였다. 반응 후 2 M Na₂CO₃ 0.4 mL와 증류수 0.2 mL를 혼합한 다음 상온에서 30분간 반응 후 각각의 시료를 96 well plate에 0.2 mL씩 분주하여 725 nm에서 흡광도(SpectraMAX Plus 384, Molecular devices Inc., Sunnyvale, CA, USA)를 측정하였다. 표준물질로 tannic acid를 이용하였으며 표준물질의 표준곡선으로부터 총 폴리페놀 함량(mg/g)을 계산하였다.

총 플라보노이드 함량 측정

총 플라보노이드 함량은 다음과 같은 방법으로 측정하였다(27). 각각의 한약재 추출물을 0.1-2 mg/mL 농도로 희석한 시료를 조제한 후 시료 0.2 mL, diethylene glycol 2 mL, 1 N NaOH 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 rutin hydrate를 이용하였으며 표준물질의 표준곡선으로부터 총 플라보노이드 함량(mg/g)을 계산하였다.

전자공여능

전자공여능은 DPPH의 환원력을 이용하여 측정하였다(28). 96 well plate에 400 μM 농도가 되도록 에탄올에 용해한 DPPH 0.2 mL와 희석된 추출물 시료 0.2 mL를 분주한 다음 실온에서 30분간 반응시키고 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 에탄올이 첨가하였으며 비교를 위하여 대표적인 항산화제인 ascorbic acid를 사용하였다.

Tyrosinase 활성 저해효과

Bernard(29)법을 변형하여 사용하였다. 96 well plate에 0.1 M phosphate buffer(pH 6.5) 210 μL를 넣고 여기에 기질(L-tyrosine) 40 μL과 tyrosinase 20 μL, 추출물 30 μL를 넣고 37°C에서 10분간 반응시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조군은 시료 대신 완충액을 넣은 것으로 하였으며 비교를 위하여 ascorbic acid를 사용하였다.

세포배양

Mouse immortalized fibroblast(NIH3T3 cell)와 mouse melanoma melanocyte(B16F1 cell)를 각각 10%의 fetal bovine serum 이 함유된 DMEM배지에서 5% CO₂에서 37°C로 배양하여 실험에 사용하였다.

세포 독성

MTT 시험은 Mosmann법(30) 이용하였다. Mouse immortalized fibroblast(NIH3T3 cell)를 96 well plate에 well당 1×10⁴ cells을 접종하고 24시간 배양하였다. 여기에 짜자래나무 추출물을 각 well에 첨가하여 24시간 배양 후 배지를 버리고 새로운 배지와 함께 MTT 용액을 10 μL씩 첨가하였다. 4시간 후 배지를 버리고 DMSO를 넣어 formazan을 용해 시키고 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포내 멜라닌 생합성 억제효과

Tsuboi의 방법(31)을 변형하여 이용하였다. 사람의 정상 섬유아 세포 mouse melanoma melanocyte(B16F1 cell)를 6well plate에 접종하고(1×10⁵ cells/well), 24시간 배양하였다. 짜자래나무 추출물을 DMEM 배지에 첨가하여, 상기 배지로 교체한 후 24시간 동안 더 배양하였다. 배지를 모두 제거하고 trypsin을 처리하여 세포를 회수한다. 회수한 세포에 1 N NaOH(10% DMSO 포함)를 첨가하여 60°C 항온조에서 1시간 방치하여 멜라닌을 녹여내었다. 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계분석

모든 실험은 3반복으로 측정하여 측정치를 평균치±표준편차로 나타내었으며 실험 결과의 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 고찰

한약재 추출물의 수율

짜자래나무의 추출 수율은 Table 1과 같다. 추출 수율은 초기 건조중량과 추출 후 건조중량의 백분비로 계산하였다. 그 결과 물을 이용한 추출에서 수율이 8%로 에탄올 수율 6%에 비하여 높게 나타난 것을 확인하였으며 이는 기존의 Park(32)의 논문에서 8종류의 한약재를 에탄올과 물을 이용하여 열수추출을 하였

Table 1. Yield of extraction from *Rhamnus yoshinoi* using 100% EtOH and water

	Yield (%)	
	100% EtOH	Water
<i>Rhamnus yoshinoi</i>	6±0.5	8±1.5

을 때 물에서 추출 수율이 더 높은 것과 동일한 결과가 얻어지는 것을 확인하였다.

총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량

천연물에서 얻어지는 폴리페놀류와 플라보노이드류의 화합물은 항산화 효과를 나타내는 등 생리활성 기능을 가지는 것으로 알려져 있다(33). 식물의 2차 대사산물 중 하나인 페놀성 화합물은 분자 내 phenolic hydroxyl기가 존재하여 전자를 수용하는 기작으로 항산화 효과를 가지며 그 외 항돌연변이, 항암, 혈중 콜레스테롤 감소 등의 다양한 생리활성을 가지는 것으로 알려져 있다(34,35). 또한, 식물에 널리 분포하는 노란색 계통의 색소인 플라보노이드는 항균, 항암, 항바이러스, 항알레르기, 지질저하작용, 면역증강작용, 모세혈관강화 작용 및 항염증 활성을 지니며 모든 질병의 원인이 되는 생체 내 산화작용을 억제하는 항산화 효과를 지니는 것으로 알려져 있다(36). 짝자래나무 추출물에 존재하는 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량을 측정된 결과는 Table 2와 같다. 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량은 에탄올 추출물에서 384.51, 120.39 mg/g으로 물 추출물의 265.56, 80.72 mg/g보다 높게 나타난 것을 확인하였으며 짝자래나무의 에탄올 추출물과 물 추출물 모두 200 mg/g 이상의 높은 폴리페놀을 함유하여 항산화 효과 및 다른 생리활성 효과가 우수할 가능성이 높을 것으로 생각된다.

전자공여능

전자공여능은 항산화작용의 지표로 사용되고 있으며 식물 추출물의 항산화능 측정에 많이 사용되고 있다. 전자공여작용은 인체 내에서 생성되는 프리라디칼의 전자를 공여하여 프리라디칼에 의한 노화와 질병을 억제하는 작용으로 이용되고 있다(37). 전자공여능 측정은 DPPH 라디칼 소거법을 이용하여 측정하였다. DPPH는 비교적 안정한 라디칼을 가지고 있는 화합물로 항산화 능력을 가지고 있는 물질과 만나면 라디칼이 소거되어 탈색이 되는 점을 이용하여 항산화 효과를 검증한다(33). 짝자래나무 추출물의 라디칼 소거능을 비교한 결과 Fig. 1과 같다. 짝자래나무 추출물의 50% 라디칼 소거능을 가지는 농도(SC₅₀)를 비교한 결과 짝자래나무 추출물 중 총 폴리페놀 함량이 높은 에탄올 추출물이 21.6 ppm으로 물 추출물의 40.5 ppm보다 약 2배 높은 것을 확인하였다. 이는 폴리페놀의 함량이 증가하면 DPPH 라디칼 소거능이 비례적으로 증가하는 기존 연구들과 동일한 결과를 나타내었으며(38,39) 대조구인 ascorbic acid의 SC₅₀의 7.20 ppm과 비교하여 낮은 전자공여능을 나타내었으나 항산화 효과가 좋다고 잘 알려진 인삼, 갈근, 창출, 약쑥 그리고 느타리버섯의 70% 에탄올 추출물의 100 µg/mL를 처리한 결과와 비교하

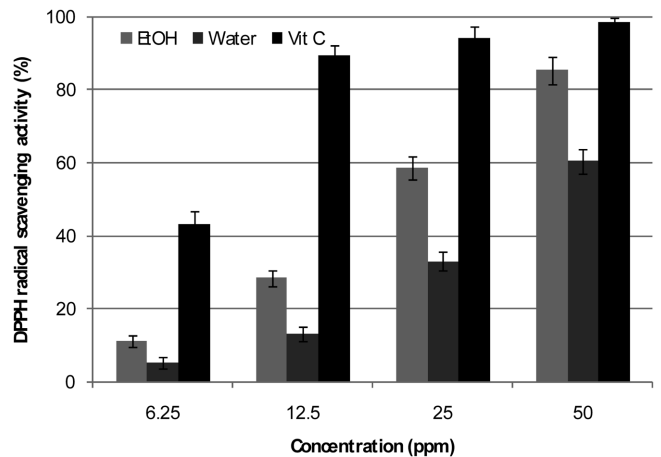


Fig. 1. DPPH radical scavenging effect of *Rhamnus yoshinoi* extracts. Results are expressed as mean±SD of data obtained from three independent experiments.

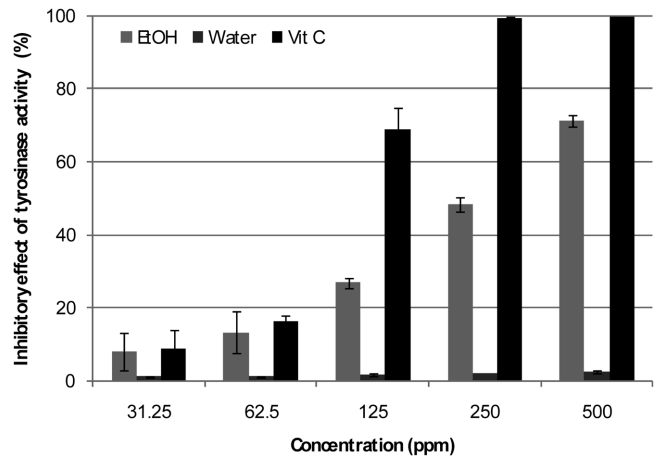


Fig. 2. Inhibitory effect of *Rhamnus yoshinoi* extracts against tyrosinase. Results are expressed as mean±SD of data obtained from three independent experiments.

였을 때 짝자래나무 추출물의 전자공여능이 현저히 높은 것을 확인하였다(40).

Tyrosinase 활성 저해효과

멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 효소인 tyrosinase의 억제 활성 효과는 기질인 L-tyrosine과 효소인 mushroom tyrosinase에 의해 산화되어 생성되는 멜라닌의 흡광도를 측정하여 tyrosinase 억제 효과를 알아본 결과는 Fig. 2와 같다. 실험 결과 짝자래나무의 에탄올 추출물의 tyrosinase 활성 억제 효과는 농도의존적으로 증가하고 50% tyrosinase 활성억제농도(IC₅₀)가 256.3 ppm으로 확인하였으나 기존에 미백 효과가 있다고 알려진 ascorbic acid의 IC₅₀ 102.4 ppm과 비교하였을 때 낮은 것으로 확인되었다. 또한 짝자래나무 물 추출물에서 tyrosinase 활성억제효과는 실험 최고

Table 2. Concentration of total polyphenol and total flavonoid in *Rhamnus yoshinoi* extracts

	Total polyphenol (mg/g)		Total flavonoid (mg/g)	
	100% EtOH	Water	100% EtOH	Water
<i>Rhamnus yoshinoi</i>	384.51±20.4	265.56±11.2	120.39±13.7	80.72±4.1

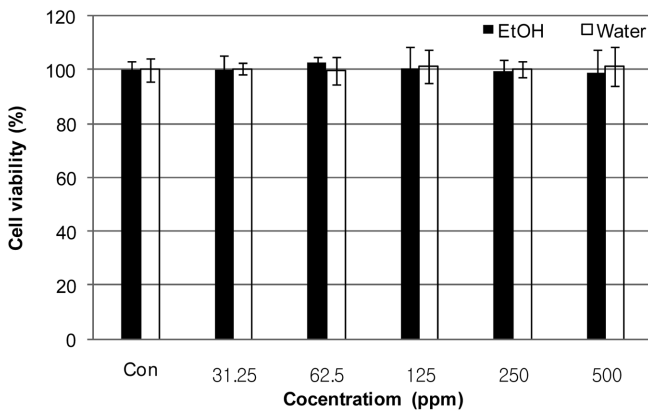


Fig. 3. Effect of *Rhamnus yoshinoi* extracts on cell viability of mouse immortalized fibroblast. Results are expressed as mean \pm SD of data obtained from three independent experiments.

Table 3. Inhibitory activity of *Rhamnus yoshinoi* extracts (50 ppm) on melanin biosynthesis

	Inhibitory effect of melanin biosynthesis (%)		
	100% EtOH	Water	Ascorbic acid
<i>Rhamnus yoshinoi</i>	53.36 \pm 2.81	-	17.40 \pm 3.19

농도인 1000 ppm까지 유의한 결과를 확인할 수 없었다. 이는 에탄올과 물을 이용하여 짜자래나무를 추출하였을 때 서로 다른 성분이 추출되어 물 추출물에서는 효과가 나타나지 않은 것으로 생각된다.

세포독성

MTT assay는 살아 있는 세포에서 탈수소 효소 작용에 의하여 노란색의 수용성 기질은 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 짜자래나무 추출물의 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보았다. 세포독성 실험 결과 짜자래나무 추출물은 추출 용매에 상관없이 500 ppm까지 독성이 없는 것으로 나타났다 (Fig. 3).

세포내 멜라닌 생합성 억제효과

멜라닌 생성세포인 멜라노사이트를 배양하여 시료를 처리함으로써 멜라닌 생성에 어떠한 영향을 미치는가에 대하여 알아보았다. 마우스 유래의 멜라노사이트 세포(B16F1 cell)에 짜자래나무 에탄올 및 물 추출물 50 ppm을 첨가하여 배양한 후 세포내 멜라닌 양을 측정하였다. 대조구로 ascorbic acid를 사용하였다. 실험 결과 짜자래나무 에탄올 추출물에서 멜라닌 생합성 억제효과는 53.36%로 대조구인 ascorbic acid 50 ppm의 17.4%보다 높게 나타났으나 물 추출물에서는 효과가 없는 것을 확인하였다(Table 3). 이는 tyrosinase 억제효과와 결과가 같았으며 tyrosinase가 멜라닌 생성에 중요한 역할을 하는 것으로 확인되었다.

요약

본 연구는 짜자래나무의 항산화 및 미백제로서의 유효성을 알아보기 위해 100% 에탄올과 물을 이용한 추출물의 폴리페놀 함량, 플라보노이드 함량, 전자공여능, tyrosinase 활성 저해효과 및 세포내 멜라닌 생합성 억제효과를 조사하였다. 유용한 생리활성

을 가질 것으로 예상되는 폴리페놀 및 플라보노이드 함량을 실험한 결과 총 폴리페놀과 플라보노이드의 함량은 에탄올 추출물에서 384.51, 120.39 mg/g으로 물 추출물의 265.56, 80.72 mg/g보다 높게 나타난 것을 확인하였으며 짜자래나무의 에탄올 추출물과 물 추출물 모두 200 mg/g 이상의 높은 폴리페놀을 함유하는 것을 확인하였다. 항산화능을 평가하기 위해 DPPH를 이용한 전자공여능 실험 결과 짜자래나무의 추출물 중 총 폴리페놀 함량이 높은 에탄올 추출물이 21.6 ppm으로 물 추출물의 40.5 ppm보다 약 2배 높은 것을 확인하였다. 미백제로의 효능을 알아보하고자 실험한 tyrosinase 활성 저해 및 세포내 멜라닌 생합성 억제에 관한 결과 짜자래나무의 에탄올 추출물에서 tyrosinase 활성억제농도(IC₅₀)는 256.3 ppm, 멜라노사이트에 50 ppm 농도로 처리하였을 때 멜라닌 생성억제 효과가 53.36%로 높은 효과를 가지는 것을 확인하였다. 이상의 결과에 따르면 짜자래나무의 에탄올 추출물의 경우 항산화제 및 미백제로서 큰 가능성을 가지는 것으로 나타났다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업(과제고유번호: A092055)의 지원에 의해 이루어진 연구의 일부이며 지원에 감사드립니다.

문헌

- Papa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell Biochem.* 174: 305-319 (1997)
- Block G. Vitamin C, cancer, and aging. *Age* 16: 55-58 (1993)
- Feskanich D, Ziegler RG, Michaud DS, Giovannucci EL, Speizer FE, Willett WC, Colditz GA. Prospective study of fruit and vegetable consumption and risk of lung cancer among men and women. *J. Natl. Cancer I.* 92: 1812-1823 (2000)
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: An overview. *Method Enzymol.* 186: 1-85 (1990)
- Regnstrm J, Nilsson J, Tornvall P, Landou C, Hamsten A. Susceptibility to low-density lipoprotein oxidation and coronary atherosclerosis in man. *Lancet* 339: 1183-1186 (1992)
- Gey KF, Puska P, Jordan P, Moser UK. Inverse correlation between plasma vitamin E and mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 326-334 (1991)
- Abuja PM, Albertini R. Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* 306: 1-17 (2001)
- Ames BN. Endogenous DNA damage as related to cancer and aging. *Mutat. Res.* 214: 41-46 (1989)
- Nho JW, Hwang IG, Joung EM, Kim HY, Chang SJ, Jeong HS. Biological activities of *Magnolia denudata* Desr. flower extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 38: 1478-1484 (2009)
- Lee WC, Kim AJ, Kim SY. The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. *Food Sci. Ind.* 36: 2-14 (2003)
- Cerutti PA. Oxy-radicals and cancer. *Lancet* 344: 862-863. (1994)
- Cort WM. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate, and ascorbic acid and their mode of action. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51: 321-325 (1974)
- Coleman MD, Fernandes S, Khanderia L. A preliminary evaluation of a novel method to monitor a triple antioxidant combination (vitamins E, C, and α -lipoic acid) in diabetic volunteers using *in vitro* methaemoglobin formation. *Environ. Toxicol. Phar.* 14: 69-75 (2003)
- Namiki MO. Antioxidants and antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci.* 29: 273-300 (1990)
- Cort WM. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate,

- and ascorbic acid and their mode of action. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 51: 321-325 (1974)
16. Masaki H, Sakaki S, Atsumi T, Sakurai H. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* 18: 162-166 (1995)
 17. Kim KB, Yoo KH, Park HY, Jeong JM. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 49: 328-333 (2006)
 18. Williams GM, Wang CX, Iatropoulos MJ. Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies. *Food Chem. Toxicol.* 28: 799-806 (1990)
 19. Brannen AL. Oxidological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 52: 59-63 (1975)
 20. Seog HM, Seo MS, Kim HM, Ahn MS, Lee YT. Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 889-892 (2002)
 21. Iwata M, Corn T, Iwata S, Everett MA, Fuller BB. The relationship between tyrosinase activity and skin color in human fore-skins. *J. Invest. Dermatol.* 95: 9-15 (1990)
 22. Cabanes J, Chazarra S, Garcia-Carmona F. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 982-985 (1994)
 23. Chang YH, Kim C, Jung M, Lim YH, Lee S, Kang S. Inhibition of melanogenesis by selina-4(14),7(11)-dien-8-one isolated from *Atractylodis Rhizoma Alba*. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 719-723 (2007)
 24. Hearing VJ, Jimnez M. Mammalian tyrosinase--the critical regulatory control point in melanocyte pigmentation. *Int. J. Biochem.* 19: 1141-1147 (1987)
 25. Yamakoshi J, Otsuka F, Sano A, Tokutake S, Saito M, Kikuchi M, Kubota Y. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pigm. Cell Res.* 16: 629-638 (2003)
 26. Gutfinger T. Polyphenol in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 966-972 (1981)
 27. Woo JH, Shin SL, Lee CH. Antioxidant effects of ethanol extracts from flower species of compositae plant. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 39: 159-164 (2010)
 28. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200 (1958)
 29. Baurin N, Arnoult E, Scior T, Do QT, Bernard P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. *J. Ethnopharmacol.* 82: 155-158 (2002)
 30. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55-63 (1983)
 31. Tsuboi T, Kondoh H, Hiratsuka J, Mishima Y. Enhanced melanogenesis induced by tyrosinase gene-transfer increases boron-uptake and killing effect of boron neutron capture therapy for amelanotic melanoma. *Pigm. Cell Res.* 11: 275-282 (1998)
 32. Park YS. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of medicinal herb extracts. *J. East Asian Soc. Dietary Life* 12: 22-31 (2002)
 33. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr. Rev.* 56: 317-333 (1998)
 34. Lee KD, Kim JS, Bae JO, Yoon HS. Antioxidative effectiveness of water extract and ether in wormwood (*Artemisia montana* pampan). *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21: 17-22 (1992)
 35. Jeong HJ, Park SB, Kim S, Kim HK. Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*Vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 1491-1496 (2007)
 36. Cha JY, Kim SY, Jeong SJ, Cho YS. Effects of hesperetin and naringenin on lipid concentration in orotic acid treated mice. *Korean J. Life Sci.* 9: 389-394 (1999)
 37. Lee KD, Chang HK, Kim HK. Antioxidative and nitrite-scavenging activities of edible mushrooms. *Korean J. Food Sci. Technol.* 29: 432-436 (1997)
 38. Hong JH, Kim HJ, Choi YH, Lee IS. Physiological activities of dried persimmon, fresh persimmon, and persimmon leaves. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 37: 957-964 (2008)
 39. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, Lee JS. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 723-727 (2003)
 40. Shin JY. Screening of natural products that have activities against skin-aging. *Korean J. Food Nutr.* 14: 568-572 (2001)