

## 닥나무 뿌리껍질의 항산화 성분

이화진 · 박재현 · 장동일\* · 류재하<sup>#</sup>

숙명여자대학교 약학대학, \*태평양기술연구원

(Received May 24, 1997)

### Antioxidant Components from *Broussonetia kazinoki*

Hwa-Jin Lee, Jae-Hyun Park, Dong-Il Jang\* and Jae-Ha Ryu<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

\*Pacific R & D Center, Yong In 449-900, Korea

**Abstract**—From the root bark of *Broussonetia kazinoki* (Moraceae) two antioxidant components were identified. Their structures were determined as kazinol A (**1**) and kazinol E (**2**) (isoprenylated flavan and isoprenylated 1,3-diphenyl propan derivatives) by comparing NMR data with those of the reported compounds from relative plants. The antioxidant activity of **1** and **2** were monitored by the method of DPPH radical scavenging activity, whose  $SC_{50}$  values were  $41.4 \mu\text{M}$  and  $33.4 \mu\text{M}$ , respectively. These compounds also exhibited inhibitory activity against tyrosinase, which is the sole key enzyme for the melanin biosynthesis and play a role in conversion of tyrosine to dopa, and dopa to dopaquinone. The antioxidant effect and the suppression of melanin biosynthesis are useful for anti-aging, increasing vitality in the incidence of major degenerative diseases, and cosmetic products in relation to hyperpigmentation.

**Keywords** □ *Broussonetia kazinoki*, Moraceae, antioxidant, isoprenyl flavonoid, kazinol A, kazinol E, DPPH radical scavenging, tyrosinase.

닥나무 (*Broussonetia kazinoki*, 뽕나무과)는 한국, 중국, 대만과 일본에 널리 자생하고 있는 낙엽성 활엽관목으로 강장, 명목(明目)작용, 음위, 수종(水腫), 익기(益氣) 등의 약효를 나타내며, 인피섬유는 제지의 원료로 사용되는 식물이다.<sup>1)</sup> 닥나무 및 동속식물인 꾸지뽕 나무의 줄기와 뿌리의 성분으로 Nomura 등이 isoprenyl기를 가진 페놀성 성분들을 보고하였다.<sup>2-8)</sup> 이 페놀성 성분들은 강력한 항산화활성을 가지는 것으로 알려져 있으며, 이들은 생성된 자유라디칼을 효과적으로 제거하여 유독한 과산화 지질의 생성을 억제한다. 과산화 지질은 호흡을 하는 모든 생물의 생체 내에서 산소 소모량에 비례하여 생성되는 찌꺼기로서 체내에 축적되어 노화(aging) 및 활력(vitality)감소의 원인이 된다.<sup>9,10)</sup>

그런데, 자외선에 의해 체내에 생성된 자유라디칼은 체내방어기전에 의해 멜라닌에 흡수됨으로써 제거되는데, 멜라닌은 tyrosinase 의해 tyrosin에서 dopa로, dopa에서 dopaquinone으로 산화되어 생성되며 피부나 체내에서 색소침착의 주요원인이 된다.<sup>11)</sup> 따라서 항산화성분들은 과산화지질의 생성억제를 통해 노화와 활력 감소의 원인을 제거해 줌으로서 최상의 활력을 가지고 각종 스트레스에 저항하는 능력을 유지할 수 있도록 한다.<sup>9,10)</sup> 또한 장등은<sup>11)</sup> isoprenyl기를 가진 페놀성 화합물들이 생성된 자유라디칼을 제거하는 동시에 tyrosinase활성을 저해함으로써 멜라닌의 형성을 억제하여 과도한 색소침착의 원인을 제거할 수 있는 것으로 보고하였다.<sup>12, 13)</sup> 이에 본 연구에서는 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼소거(radical scavenging) 방법을 이용하여<sup>14, 15)</sup> 항산화활성을 추적한 결과 닥나무 뿌리껍질로부터 강력한 항산화활성을 나타내는 2개의

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-710-9568 (팩스) 02-714-0745

단일 성분을 분리하여 그 구조를 확인하였고, 항산화성분에 대해 tyrosinase의 효소 억제 활성을 평가하여 멜라닌 색소의 생합성 저해효과를 검토하였다.<sup>11, 16-18)</sup>

## 실험방법

### 시약 및 기구

실험에 사용한 식물재료는 경기도 수원근교에서 채집한 닥나무의 뿌리껍질 (4.4 kg)을 건조한 후 세절하여 사용하였다. 칼람크로마토그래피용 실리카겔 (230~400 mesh, Merck, 9385), TLC 판은 실리카겔 60F<sub>254</sub> (Merck, 5715)를 사용하였으며, TLC 검출은 1% 에탄올성 FeCl<sub>3</sub>시액, 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액 및 UV lamp (254 nm, Spectroline)를 사용하였다. 식물을 추출할 때에는 공업용 용매를 종류하여 사용하였으며, 그 외 칼람크로마토그래피 및 HPLC에는 특급용매 및 HPLC용 용매를 각각 사용하였다. 항산화활성을 측정하기 위해 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 Sigma사 제품을 사용하였으며, 흡광도측정은 UV-spectrophotometer (Perkin-Elmer사, Lambda 4A)를 사용하였고, NMR 및 Mass 측정은 Bruker AMX 500 Spectrometer (500 MHz) 와 VG TRIO-II GC/MS System을 각각 사용하였다. Tyrosinase 활성은 mushroom tyrosinase (2000 unit/ml, Sigma), 0.03% L-tyrosine (Sigma)를 사용하였고, 0.1 M 인산완충액은 pH 6.8로 조절하여 사용하였으며, 그외 시약은 특급시약을 사용하였다.

### 항산화활성의 측정 및 활성성분의 분리

**항산화활성의 측정** - 100 µM의 DPPH 자유라디칼의 에탄올 용액 1.9 ml에 시료용액 0.1 ml을 가하여 37°C 에서 30분간 정지한 후 515 nm에서 흡광도를 측정하였다.<sup>14, 15)</sup> 흡광도의 감소정도로 DPPH 라디칼 소거활성을 평가하였으며, 시료의 DPPH 라디칼 소거활성은 시료를 가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는 시료의 농도 (SC<sub>50</sub>)로 나타내었다.

**Tyrosinase 저해활성측정** - 0.1 M 인산완충액 (pH 6.8) 0.5 ml에 시료용액과 tyrosinase (100 unit)를 가하고 (총 반응용액 : 1.5 ml), 기질 L-tyrosine (0.03%) 0.5 ml을 가하여 효소반응을 시작한 후 5분동안 475 nm에서 흡광도의 변화율을 측정하였다. 효소활성은 직선성을 나타내는 흡광도의 초기증가율을 이용하여

tyrosine이 dopaquinone을 경유하여 dopachrome으로 변화되는 속도로 평가하였다. 시료의 tyrosinase 저해활성은 시료를 가하지 않은 대조군에 대한 흡광도 변화율의 50%를 저해하는 시료의 농도(IC<sub>50</sub>)로 나타내었다.<sup>16-18)</sup>

**활성성분의 분리** - 닥나무의 뿌리껍질 4.4 kg을 에탄올로 3회 반복 환류 추출하였다. 극성에 따른 용매분획을 얻기 위하여 374 g의 에탄올추출물을 물에 분산하고 에틸아세테이트로 추출하여 수층(125 g)과 에틸아세테이트 가용 분획 (250 g)을 각각 얻었다. 125 g의 에틸아세테이트 가용분획에 대해 클로로포름과 메탄올의 혼합용매를 이동상으로 실리카겔 칼람크로마토그래피하여 fr. 1 (53.5 g), fr. 2 (13.5 g), fr. 3 (2.1 g)을 각각 얻었다. 이들 중 DPPH 라디칼 소거활성을 강하게 나타내는 fr. 1에 대하여 헥산과 에틸아세테이트의 혼합용매를 이동상으로 실리카겔 칼람크로마토그래피를 반복하고 HPLC로 순도를 평가하여 (칼람 µ-Bondapak C<sub>18</sub>, 메탄올 : 물 = 75:25, 유속 1 ml/min, 검출기 254 nm) 단일 활성성분 compound I (1, 3.2 mg, kazinol A), compound II (2, 7.2 mg, kazinol E)를 각각 분리하였다.

**Compound I (kazinol A) : C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>O<sub>4</sub>**

FAB-Mass (*m/z*) : 395 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, ppm) : δ1.72 (3H, s, H-17), 1.76 (3H, s, H-18), 1.77 (3H, s, H-13), 1.77 (3H, s, H-12), 2.10 (2H, m, H-3), 2.77 (1H, m, H-4), 2.89 (1H, m, H-4), 3.35 (2H, d, J=7.2Hz, H-14), 3.43 (2H, d, J=6.7Hz, H-9), 4.65 (brs, OH), 5.09 (1H, dd, J=10.6, 2.3Hz, H-2), 5.18 (1H, t, J=6.7Hz, H-10), 5.34 (1H, t, J=7.2Hz, H-15), 5.48 (2×OH, s), 6.37 (1H, d, J=2.5Hz, H-8), 6.38 (1H, dd, J=8.0, 2.5Hz, H-6), 6.82 (1H, s, H-6'), 6.94 (1H, d, J=8.0Hz, H-5).

<sup>13</sup>C-NMR (CDCl<sub>3</sub>, ppm) : δ18.1 (q, C-13), 18.2 (q, C-17), 25.3 (t, C-3), 25.5 (t, C-9), 25.9 (q, C-18), 26.0 (q, C-12), 29.6 (t, C-14), 29.9 (t, C-4), 75.6 (d, C-2), 103.9 (d, C-8), 108.1 (d, C-6), 114.5 (s, C-4a), 119.2 (d, C-6'), 122.3 (d, C-15), 122.7 (d, C-10), 123.7 (s, C-5'), 125.2 (s, C-2'), 130.4 (d, C-5), 131.4 (s, C-1'), 133.8 (s, C-11), 134.8 (s, C-16), 142.2 (s, C-4'), 142.6 (s, C-3'), 155.0 (s, C-7), 156.6 (s, C-8a).

**Compound II (kazinol E) : C<sub>30</sub>H<sub>38</sub>O<sub>4</sub>**

FAB-Mass (*m/z*) : 463 [M+H]<sup>+</sup>

<sup>1</sup>H-NMR (acetone-d<sub>6</sub>, ppm) : δ1.45 (3H, s, H-10), 1.45 (3H, s, H-11), 1.66 (3H, s, H-17), 1.66 (3H, s, H-23), 1.70 (3H, s, H-18), 1.75 (3H, s, H-22), 1.84-2.08 (2H, m, H-3), 2.67-2.88 (2H, m, H-4), 3.29 (2H, bd, J=6.7Hz, H-14), 3.36 (2H, bd, J=6.7Hz, H-19), 4.94 (1H, dd, J=10.7, 1.5Hz, H-13), 5.00 (1H, dd, J=17.4, 1.5Hz, H-13), 5.03 (1H, m, H-2), 5.03 (1H, t, J=6.7Hz, H-15), 5.12 (1H, t, J=6.7Hz, H-20), 6.28 (1H, s, H-8), 6.28 (1H, dd, J=17.4, 10.7Hz, H-12), 6.87 (1H, s, H-2'), 6.89 (1H, s, H-5), 6.96, 7.90, 8.24 (3×OH, s each)

<sup>13</sup>C-NMR (acetone-d<sub>6</sub>, ppm) : δ18.1 (q, C-17 및 C-22), 25.8 (t, C-3), 25.8 (q, C-23), 26.1 (t, C-19), 26.1 (q, C-18), 27.5 (t, C-14), 27.5 (q, C-11), 27.7 (q, C-10), 31.1 (t, C-4), 40.6 (s, C-9), 75.6 (d, C-2), 105.1 (d, C-8), 110.2 (d, C-2'), 111.7 (t, C-13), 113.0 (s, C-4a), 124.7 (d, C-15), 125.5 (d, C-20), 127.1 (s, C-6), 127.6 (s, C-6'), 128.6 (d, C-5), 129.9 (s, C-5'), 131.1 (s, C-1'), 131.1 (s, C-21), 132.2 (s, C-16), 143.3 (s, C-4'), 143.8 (s, C-3'), 149.3 (d, C-12), 155.3 (s, C-7), 155.6 (s, C-8a).

**실험결과 및 고찰**

**활성성분의 동정**

Compound I은 실리카겔 TLC상에서 FeCl<sub>3</sub>에 의해 갈색으로 발색되는 물질로써, FAB-Mass에서 [M+H]<sup>+</sup> 395로써 분자량 394를 확인하였다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 4개의 방향족 수소피크 δ6.37 (1H, d, J=2.5Hz, H-8), δ6.38 (1H, dd, J=8.0, 2.5Hz, H-6), δ6.82 (1H, s, H-6'), δ6.94 (1H, d, J=8.0Hz, H-5)와 5개의 지방족 수소피크 δ2.10 (2H, m, H-3), δ2.77 (1H, m, H-4), δ2.89 (1H, m, H-4), δ5.09 (1H, dd, J=10.6, 2.3Hz, H-2)들을 각각 관찰하였다. 또한 2개의 3, 3-dimethylallyl 기에 해당하는 methyl기 수소피크 δ1.72 (3H, s, H-17), δ1.76 (3H, s, H-18), δ1.77 (3H, s, H-13), δ1.77 (3H, s, H-12)을 확인하였고, <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY 스펙트럼에서 δ3.35 (2H, d, J=7.2Hz)와 δ3.43 (2H, d, J=6.7Hz)

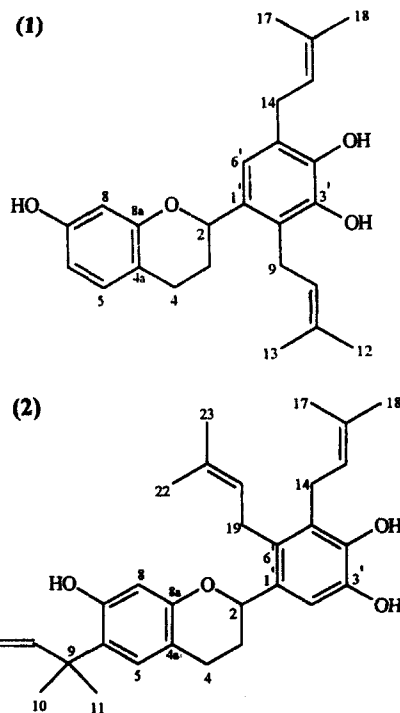


Fig. 1 - Chemical structures of compound I (1) and compound II (2).

에서 나타나는 isoprenyl기의 H-14 및 H-9의 수소피크들과 coupling하는 δ5.34 (1H, t, J=7.2Hz), δ5.18 (1H, t, J=6.7Hz)의 수소피크를 H-15 및 H-10으로 각각 동정하였다.<sup>5,6)</sup> <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼에서 flavan의 C-2, C-3, C-4에 해당하는 전형적인 피크를 δ75.6, δ25.3, δ29.9에서 각각 관찰하였으며<sup>2,4,6)</sup>, δ25.5, δ29.6에서 관찰되는 피크를 문헌에서 각각 C-9, C-14로 동정하였다.<sup>5,6)</sup> 이상과 같은 <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR 자료를 근거로 하여 compound I의 구조를 isoprenylated flavan인 kazinol A로 동정하였으며, 이는 1985년에 Nomura등이 *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent. 에서 분리하여 보고한 구조와 동일하였다.<sup>6)</sup>

Compound II는 실리카겔 TLC 상에서 FeCl<sub>3</sub>에 의해 암녹색으로 발색되는 물질이며, FAB-Mass에서 [M+H]<sup>+</sup> 463으로써 분자량 462를 확인하였다. <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼에서 2개의 3, 3-dimethylallyl 기에 해당하는 methyl기 수소피크 δ1.66 (3H, s, H-17), δ1.66 (3H, s, H-23), δ1.70 (3H, s, H-18), δ1.75 (3H, s, H-22)와 한 개의 1, 1-dimethylallyl 기에 해당하는 methyl기 수소피크 δ1.45 (3H, s, H-10), δ1.45 (3H, s, H-11)를 각각 관찰하였고, δ6.28

(1H, s, H-8),  $\delta$ 6.87 (1H, s, H-2') 및  $\delta$ 6.89 (1H, s, H-5)에서 3개의 방향족 수소피크들을 관찰하였다. 또한  $\delta$ 1.80~2.08 (2H, m, H-3),  $\delta$ 2.67~2.88 (2H, m, H-4) 의 4개의 지방족 수소피크를 관찰하였으며,  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY에서 H-3와 수소피크와 coupling 하며 H-15의 수소피크와 겹쳐서 관찰되는  $\delta$ 5.03 (1H, m) 를 H-2로 동정하였다. 그리고, H-22, H-23의 수소피크들과 allylic coupling 하는  $\delta$ 5.12 (1H, t, J=6.7Hz)를 H-20으로, 이 H-20과 coupling 하는  $\delta$ 3.36 (2H, bd, J=6.7Hz)을 H-19로 각각 확인하였다. 같은 방법으로 H-17 및 H-18의 수소피크들과 allylic coupling 하는  $\delta$ 5.03 (1H, t, J=6.7Hz)을 H-15로, 이 H-15와 coupling하는  $\delta$ 3.29 (2H, bd, J=6.7Hz)를 H-14로 동정하였다. 그리고 H-13의 methylene 수소피크들인  $\delta$ 4.94 (1H, dd, J=10.7, 1.5Hz) 및  $\delta$ 5.00 (1H, dd, J=17.4, 1.5Hz)과 coupling하는  $\delta$ 6.28 (1H, dd, J=17.4, 10.7Hz)를 H-12로 확인하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR과 DEPT스펙트럼에서 12개의 4급 탄소를 관찰하고, 2급탄소인  $\delta$ 25.8,  $\delta$ 26.1,  $\delta$ 27.5,  $\delta$ 31.1,  $\delta$ 111.7에 해당하는 피크들을 문헌에서 C-3, C-19, C-14, C-4, C-13으로 각각 동정하였다.<sup>2, 4, 6, 8)</sup> 이상과 같은 NMR 스펙트럼의 해석결과로 compound II의 구조를 isoprenyl기를 가진 flavan인 kazinol E로 최종 동정하였으며, 이는 1986년에 Nomura등이 *Broussonetia kazinoki* Sieb.에서 분리하여 보고한 구조와 동일하였다.<sup>2)</sup>

### 항산화활성

닥나무 뿌리껍질로부터 분리한 compound I 및 compound II의 DPPH 자유라디칼 소거활성 결과를 Table I에 나타내었다. DPPH 자유라디칼 소거활성은 시료의 농도에 의존적으로 증가하였으며 compound II가 compound I보다 강한 활성을 나타내었다. 시료의 DPPH 라디칼 소거활성 (%)은 시료를 가하지 않은 대조군에 대하여 대조군과 시료를 가했을 때의 흡광도의 차를 백분율로 나타내었으며,  $\text{SC}_{50}$ 은 시료를 가하지 않은 대조군의 흡광도를 50% 감소시키는 시료의 농도로 표시하였다. 그 결과 compound I 및 compound II의  $\text{SC}_{50}$ 은 각각 41.4  $\mu\text{M}$ , 33.4  $\mu\text{M}$  이었으며, compound II는  $\alpha$ -tocopherol ( $\text{SC}_{50}$ =37.0  $\mu\text{M}$ ) 보다, compound I은 ferulic acid ( $\text{SC}_{50}$ =66.0  $\mu\text{M}$ )보다 우수한 항산화활성을 각각 나타내었다.<sup>14)</sup>

**Table I**—DPPH radical scavenging activity of compound I and compound II

conc. ( $\mu\text{M}$ )	radical scavenging activity (%) <sup>*</sup>	
	compound I	compound II
10	13.7	18.5
20	27.5	30.2
30	37.3	46.0
40	45.5	58.0
50	61.4	73.6

<sup>\*</sup> radical scavenging activity (%) =  $\{(\text{OD}_{\text{control}} - \text{OD}_{\text{sample}}) / \text{OD}_{\text{control}}\} \times 100$

**Table II**—Tyrosinase inhibitory activity of compound II

conc. ( $\mu\text{M}$ )	inhibition (%) <sup>*</sup>
50	16.1
100	28.3
200	45.7
300	59.7
400	74.9

<sup>\*</sup> inhibition (%) =  $\{(\Delta\text{OD}_{\text{control}} - \Delta\text{OD}_{\text{sample}}) / \Delta\text{OD}_{\text{control}}\} \times 100$ ,  $\Delta\text{OD}$  is the initial rate of linear increase in optical density at 475 nm.

### Tyrosinase 저해활성

강력한 항산화활성을 가지는 compound II에 대한 tyrosinase 효소 저해활성결과를 Table II에 나타내었다. 시료의 tyrosinase 활성저해정도는 시료를 가하지 않은 대조군의 멜라닌 생성속도의 50%를 저해하기 위해 필요한 농도 ( $\text{IC}_{50}$ )로 나타내었다. 그 결과 compound II의  $\text{IC}_{50}$ 은 241.3  $\mu\text{M}$ 로서 vitamin C ( $\text{IC}_{50}$  = 398.0  $\mu\text{M}$ )보다 우수한 tyrosinase 저해활성을 나타내는 것으로서 평가되었다.<sup>11)</sup>

### 결 론

닥나무 (*Broussonetia kazinoki*) 뿌리껍질의 에탄올 추출물로부터 2개의 강력한 항산화성분을 분리하여 NMR, Mass등의 분광학적 분석법을 이용하여 isoprenyl기를 가진 flavan인 kazinol A와 kazinol E로 그 구조를 확인하였다. 이 중 kazinol E는  $\alpha$ -tocopherol 보다, kazinol A는 ferulic acid 보다 우수한 항산화활성을 나타내었다. 강력한 항산화활성을 가지는 kazinol E에 대해 tyrosinase 저해활성을 평가한 결과,  $\text{IC}_{50}$ 이 241.3  $\mu\text{M}$ 으로 vitamin C 보다 우수한 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. Kazinol A는 *Broussonetia kazinoki*에서는 아직 보고되지 않은 구조

이었으며, 이들 항산화성분들은 자유라디칼 소거에 의한 노화방지 및 체내 활력증강 뿐만 아니라, tyrosinase 저해활성을 통한 미백제 및 각종 질병으로 인한 색소의 과도한 침착을 방지하는 데 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

문 헌

- 1) 陸昌洙 : 原色 韓國 藥用植物 圖鑑, 아카데미 서적, 서울 (1989).
- 2) Ikuta, J., Hano, Y., Nomura, T., Kawakami, Y. and Sato, T. : Components of *Broussonetia kazinoki* SIEB. I. Structures of two new isoprenylated flavans and five new isoprenylated 1, 3-diphenylpropane derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **34**, 1968 (1986).
- 3) Kato, S., Fukai, T., Ikuta, J. and Nomura, T. : Components of *Broussonetia kazinoki* SIEB. (2). Structures of four new isoprenylated 1, 3-diphenylpropane derivatives. *kazinols J. L. M and N. Chem. Pharm. Bull.* **34**, 2448 (1986).
- 4) Kato, S., Hano, Y., Fukai, T., Kosuge, Y. and Nomura, T. : Kazinol P, A novel isoprenylated spiro-compound from *Broussonetia kazinoki* SIEB. *Heterocycles* **24**, 2141 (1986).
- 5) Matsumoto, J., Fujimoto, T., Takino, C., Saitoh, M., Hano, Y., Fukai, T. and Nomura, T. : Components of *Broussonetia papyrifera* (L.) VENT. I. Structures of two new isoprenylated flavonols and two chalcone derivatives. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 3250 (1985).
- 6) Ikuta, J., Hano, Y. and Nomura, T. : Components of *Broussonetia papyrifera* (L.) VENT. 2. Structures of two new isoprenylated flavans, *kazinols A and B. Heterocycles* **23**, 2835 (1985).
- 7) Fukai, T., Ikuta, J. and Nomura, T. : Components of *Broussonetia papyrifera* (L.) VENT. III. Structures of two new isoprenylated flavonols, *brousofoavonols C and D. Chem. Pharm. Bull.* **34**, 1987 (1986).
- 8) Fukai, T. and Nomura, T. : Revised structures of *brousoflavonols C and D*, and the structure of *brousoflavonol E. Heterocycles* **29**, 2379 (1989).
- 9) Larson, R.A. : The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry* **27**, 969 (1988).
- 10) Lee, D. W., Sohn, H. O., Lim, H. B., Lee, Y. G., Aprikian, A. G. and Aprikian, G. V. : Antioxidant action of ginseng : an hypothesis. *Korean J. Ginseng Sci.* **19**, 31 (1995).
- 11) Jang, D. I., Lee, B. G., Jeon, C. O., Jo, N. S., Park, J. H., Cho, S. Y., Lee, H. and Koh, J. S. : Melanogenesis inhibitor from paper mulberry. *Cosmetics & Toiletries Magazine* **112**, 59 (1997).
- 12) Tomita, K., Oda, N., Ohbayashi, M., Karnei, H., Miyaki, T. and Oki, T. : A new screening for melanin biosynthesis inhibitors using *Streptomyces bikiniensis*. *J. Antibiotics* **18**, 1601 (1990).
- 13) Maeda, K. and Fukuda, M. : *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **42**, 739 (1994).
- 14) Fujita, Y., Uehara, I., Morimoto, Y., Nakashima, M., Hatano, T. and Okuda, T. : Studies on inhibition mechanism of autoxidation by tannins and flavonoids. II. Inhibition mechanism of caffeetannin isolated from leaves of *Artemisia* species on lipoxygenase dependent lipid peroxidation. *Yakugaku Zasshi* **108**, 129 (1988).
- 15) Blois, M.S. : Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199 (1958).
- 16) Kubo, I., Yokokawa, Y. and Kinst-Hori, I. : Tyrosinase inhibitors from bolivian medicinal plants. *J. Nat. Prod.* **58**, 739 (1995).
- 17) Kubo, I., Kinst-Hori, I. and Yokokawa, Y. : Tyrosinase inhibitors from *Anacardium occidentale* fruits. *J. Nat. Prod.* **57**, 739 (1994).
- 18) Kubo, I. and Yokokawa, Y. : Two tyrosinase inhibiting flavonol glycosides from *Buddleia coriacea*. *Phytochemistry* **31**, 1075 (1992).