

천마(*Gastrodia elata*)추출물로부터 분리된 페놀성 물질의 멜라닌 생성 억제작용

김경태[†]·김진국·박선희·이정하·이수희·김기호·박수남*

(주)바이오랜드 생명공학연구소, *서울산업대학교 정밀화학과

Anti-melanogenesis Effect of Phenolic Compounds Isolated from *Gastrodia elata*

Kyoung Tae Kim[†], Jin Guk Kim, Sun Hee Park, Jeong Ha Lee, Soo Hee Lee, Ki Ho Kim, and Soo Nam Park*

R&D Center, Bioland Ltd., 39-4, Byongchon-myun, Chonan-si, Chungnam 330-860, Korea

*Department of Fine Chemistry, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743, Korea

요약: 본 연구에서는 천마(*Gastrodia elata*)추출물의 분획과 butanol 분획층의 연속적인 silicagel column chromatography를 통하여 유효성분인 4-hydroxybenzyl alcohol **1**, bis(4-hydroxyphenyl)methane **2**, gastrodin(4- β -D-glucopyranosyloxybenzyl alcohol) **3**을 분리하였다. 4-Hydroxybenzyl alcohol **1**과 gastrodin(4- β -D-glucopyranosyloxybenzyl alcohol) **3**은 tyrosinase에 대한 저해작용은 없으나 B16 melanoma 세포의 melanin 생성을 억제한다는 것을 발견하였다. Bis(4-hydroxyphenyl)methane **2** ($IC_{50} = 400 \mu\text{g/mL}$)은 arbutin ($IC_{50} = 114 \mu\text{g/mL}$)보다 약 1/4의 tyrosinase 활성 저해작용을 나타내었지만 B16 melanoma 세포의 melanin 생성 억제는 오히려 arbutin보다 높게 나왔다. 또한 butanol 분획층($IC_{50} = 46 \mu\text{g/mL}$)의 tyrosinase에 대한 활성 저해작용이 arbutin ($IC_{50} = 114 \mu\text{g/mL}$)보다 높은 억제 작용을 나타내었고 B16 melanoma 세포의 melanin 생성 억제도 arbutin보다 높게 나왔다. 특히 butanol 분획층으로부터 분리된 페놀성 혼합물($IC_{50} = 2.37 \mu\text{g/mL}$)은 arbutin보다 약 50배 가까운 매우 높은 tyrosinase 활성 억제 작용을 나타내었다. 이러한 결과로부터 천마추출물로부터 분리된 유효성분들이 tyrosinase에 대한 저해작용 뿐만 아니라 B16 melanoma 세포의 melanin 생성을 억제하는 것을 알 수 있었다.

Abstract: Melanin pigmentation in human skin is a major defense mechanism against ultraviolet light of the sun, but abnormal pigmentation such as freckles, liver spot could be a serious aesthetic problem. Nearly all studies are mainly concentrated on searching for the materials that have inhibitory activities on tyrosinase. In this work, to isolate phenolic compounds from *Gastrodia elata*, we purified the extract through solvent fractionation, column chromatography, and recrystallization. They were identified as 4-hydroxybenzyl alcohol **1**, bis(4-hydroxyphenyl)methane **2**, gastrodin (4- β -D-glucopyranosyloxybenzyl alcohol) **3** on the base of spectroscopic evidences. In order to investigate their depigmentation effect, inhibitory activity against mushroom tyrosinase and inhibitory activity of melanin synthesis in B16 melanoma cells were evaluated *in vitro*. We have found that 4-hydroxybenzyl alcohol **1** and gastrodin (4- β -D-glucopyranosyloxybenzyl alcohol) **3** have no tyrosinase inhibitory activity, but inhibit the melanin synthesis in B16 melanoma cells. Tyrosinase inhibitory activities of bis(4-hydroxyphenyl)methane **2** ($IC_{50} = 400 \mu\text{g/mL}$) and butanol fraction ($IC_{50} = 46 \mu\text{g/mL}$) were lower/higher than that of arbutin ($IC_{50} = 114 \mu\text{g/mL}$), but inhibitory activities of melanin synthesis in B16 melanoma cells were much higher than that of arbutin. Especially, tyrosinase inhibitory activities of isolated phenolic fraction ($IC_{50} = 2.37 \mu\text{g/mL}$) from butanol fraction was very higher than that of arbutin ($IC_{50} = 114 \mu\text{g/mL}$). Therefore, these results suggest that isolated phenolic compounds from *Gastrodia elata* have inhibitory activity against mushroom tyrosinase and inhibitory activity of melanin synthesis in B16 melanoma cells *in vitro*.

Keywords: *Gastrodia elata*, melanin pigmentation, anti-melanogenesis, phenolic compound

1. 서 론

사람의 피부색은 멜라닌, 케라틴 및 헤모글로빈의 양에 따라 결정되어 지는데 이중 melanin이 가장 결정적인 요

소이다. 멜라닌은 피부내의 기저층에 존재하는 색소세포인 melanocyte에서 합성되며 주변 각질세포로 전이되어 사람의 피부색을 나타낸다. 멜라닌이 비정상적으로 적게 생산되면 백반증과 같은 피부 병변이 유발된다. 반대로 외부 환경 요인에 의해 과잉 생산되어 기미, 주근깨와 같은 색소 침착이 일어나기도 하고[1] 피부암과도 밀접한

[†] 주 저자 (e-mail: biolandrnd@biolandltd.com)

관계가 있다[2,3]. 특히, 자외선에 의해 피부 세포가 자극 되면 멜라닌 합성에 있어서 중요한 효소인 tyrosinase에 의해 멜라닌 색소 생성을 위한 신호가 생성되고, 이들은 melanocyte에 직접 또는 간접적 영향을 주어 멜라닌 색소의 생성을 유발한다[4]. 이 단계는 tyrosinase 기질유사체를 사용함으로써 저해할 수 있다. 최근에는 멜라닌의 생합성에 관여하는 중요한 효소로 tyrosinase[5] 뿐만 아니라 tyrosinase-related protein 1 (TRP-1)[6] 및 tyrosinase-related protein 2 (TRP-2, dopachrome tautomerase)[7]에 의해서도 멜라닌이 생성된다는 것이 새로이 밝혀져, 이러한 효소들을 저해할 수 있는 물질을 개발하는 것도 피부색소침착을 방지할 수 있는 방법이 될 수 있다[8-10].

천마(*Gastrodia elata*)는 수세기 동안 동양권에서 전통적인 초본약재로써, 항간질제로 사용되었으며 진통제와 현기증에 대한 안정제, 고혈압, 일반적인 마비와 과상풍에 사용되어져 왔다. 천마의 성분 중 vanilly alcohol과 gastrodin은 항간질 효과를 가지는 것으로 알려져 있으며 최근에 천마의 구성 성분이 신경세포에서 glutamate 유도성 apoptosis를 저해한다고 보고되었다[11]. 또한 천마의 ester 분획이 GABA(γ -aminobutyric acid)의 감소를 줄이고 glutamate 함량의 증가를 감소시키며 pentylene tetrazole 유도성 간질에서 항간질 효과를 나타낸다고 보고된 바 있다[12].

종래에 천마의 항간질 등의 의약분야에서는 많은 보고가 있었으나 이러한 유효성분들의 멜라닌 생성억제에 관한 연구는 진행되지 않았다. 본 연구에서는 천마추출물로부터 유효 성분인 4-hydroxybenzyl alcohol **1**, bis(4-hydroxyphenyl)methane **2**, gastrodin (4- β -D-glucopyranosyloxybenzyl alcohol) **3**을 분리하였고(Figure 1), 이러한 유효성분과 butanol 분획층으로부터 분리된 페놀성 혼합물을 *in vivo*와 *in vitro* 실험법을 통해 tyrosinase 억제 효과 및 B16 melanoma cell에서의 멜라닌 생합성 억제 효과에 대해 논의 하였다.

2. 실험 방법

2.1. 시 약

천마는 국내산(경동시장에서 구입)을 사용하였고, NMR 용매는 Sigma-Aldrich사의 DMSO- d_6 , $CDCl_3$, D_2O 등을 사용하였으며 내부기준물질로는 TMS를 사용하였다. 그 외의 시약은 모두 특급으로 사용하였으며, 활성실험에 사용된 시약들은 배지 이외의 것들은 Sigma-Aldrich사의 것을 구입하여 그대로 사용하였으며 배지는 DIFCO의 것을 사용하였다.

2.2. 측정기기

NMR 측정은 Varian-Gemini 200 spectrometer를 사용하였고 chemical shift는 TMS를 기준물질로 하여 δ 값(ppm)으로 나타내었다. UV 흡광도는 Hewlett Packard HP-8453을 사용하여 측정하였다.

2.3. 천마추출물 제조 및 유효성분 분리

건조된 천마를 95% EtOH에서 7일간 상온숙성 하였고, 여과 후 진공건조 하였다. 정제수에 분산시킨 후 n-hexane, ethylacetate, butanol로 연속적으로 분획하였다. Butanol 분획층을 취하여 감압농축하고 silicagel column chromatography (CH_2Cl_2 :MeOH = 10:3)를 실시하고 반복적인 silicagel column chromatography (CH_2Cl_2 :MeOH = 9:1)를 실시하여 4-hydroxybenzyl alcohol **1**과 bis(4-hydroxyphenyl)methane **2** 및 gastrodin(4- β -D-Glucopyranosyloxybenzyl alcohol) **3**을 분리 하였다(Figure 1).

2.4. Tyrosinase의 저해 효과(tyrosinase inhibitory activity)

Tyrosinase의 저해활성은 일반적으로 분광학적인 방법으로 측정되며 본 실험에서는 Vanni 등의 방법에 따라 측정하였다[13]. 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.8) 1.0 mL, 0.3 mg/mL L-tyrosine 수용액 1.0 mL, 1250 unit/mL mushroom tyrosinase 0.1 mL를 혼합 한 후 여기에 시료용액을 농도에 따라 각각 0.2 mL를 첨가하여 37°C에서 10분간 효소반응을 진행 시켰다. 반응용액의 흡광도를 480 nm에서 측정하여 시료의 효소 저해활성을 다음 식에 따라 구하고 효소활성의 50%를 저해하는 값을 IC_{50} 으로 나타내었다.

$$\text{Tyrosinase Inhibition rate(\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 475 nm에서 흡광도

B : 시료를 첨가한 반응용액의 475 nm에서 흡광도

2.5. B16 melanoma 세포를 이용한 멜라닌 생합성 억제 효과 측정

B16 melanoma 세포를 이용한 melanogenesis 저해 효과는 Maeda와 Fukuda[14]의 방법을 변형하여 측정하였다. 멜라닌 생성량과 세포수를 동시에 측정하기 위하여 두 set를 준비하였으며 모든 농도에 따른 well 수는 triplet으로 준비하였다. B16 melanoma 세포(ATCC CRL6323)를 10% 소혈청과 1%의 항생제를 첨가한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에 1×10^5 세포의 밀도로 접종하고 하루 동안 5% CO_2 , 37°C에서 배양시켰다. 그 후 α -MSH(0.34 ug/mL, Sigma)가 처리된 DMEM 10% 배지로 갈아준 후 천마로부터 분리된 유효성분들을 농도별로

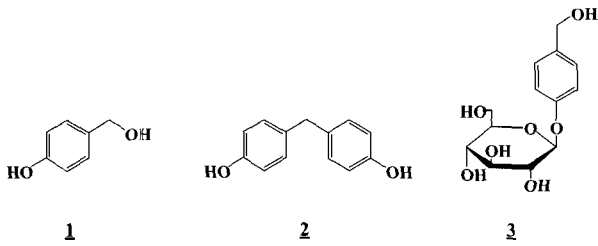


Figure 1. Chemical structures of isolated phenolic compounds.

well에 처리하여 3일간 배양하였고. 3일 후 멜라닌 양을 측정할 set는 15 mL flask tube에 배지를 수거하고 세포들은 typsin을 처리하여 떼어낸 후 배지를 수거한 tube로 옮겼다. 3,000 rpm에서 30분 동안 원심 분리하여 상층액을 버리고 1N NaOH 250 μ L를 처리하여 끓는 물에서 10분 처리 후 가볍게 원심 분리하였다. 다시 10분간 sonication하여 완전히 멜라닌을 용해하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 수 측정용 set는 배지를 제거하고 0.33 mg/mL의 MTT (Sigma M5655)를 1 mL 처리하여 37°C에서 4시간 반응시키고, 그 후 MTT를 제거한 후 DMSO를 1 mL 첨가하여 발색 정도를 575 nm에서 흡광도로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

천마추출물로부터 분리된 유효성분은 4-hydroxybenzyl alcohol **1**, bis(4-hydroxyphenyl)methane **2**, gastrodin (4- β -D-glucopyranosyloxybenzyl alcohol) **3**임을 밝혀냈다.

Gastrodin(4- β -D-glucopyranosyloxybenzyl alcohol) **3** (m.p. 156~157°C)은 methanol과 H₂O에서 재결정하여 백색결정을 얻었다. ¹H-NMR은 Figure 2에 나타내었으며 IR, ¹H-NMR 그리고 ¹³C-NMR spectrum은 이미 발표된 data와 비교 동정하였다[15-17]. 4-Hydroxybenzyl alcohol **1** (m.p. 116~117°C)은 methanol과 chloroform에서 재결정하여 백색결정을 얻었다. 4-Hydroxybenzyl alcohol **1**과 bis(4-hydroxyphenyl)methane **2**의 IR, ¹H-NMR 그리고 ¹³C-NMR spectra는 이미 발표된 data와 비교 분석하였고 일치함을 보였다[17,18].

이러한 유효성분의 분리와 더불어 페놀성 물질들이 혼합되어 있는 형태의 화합물을 얻을 수 있었다. 이 혼합물이 어떤 종류의 물질인지 알아보기 위한 UV spectrum을 얻었다. 또한, 색 변화로써 알 수 있는 여러 가지 정색 반응을 실시하였다. UV spectrum 결과, 280 nm에서 최대 흡광을 나타내었고 이것으로 aromatic-ring을 가진 혼합

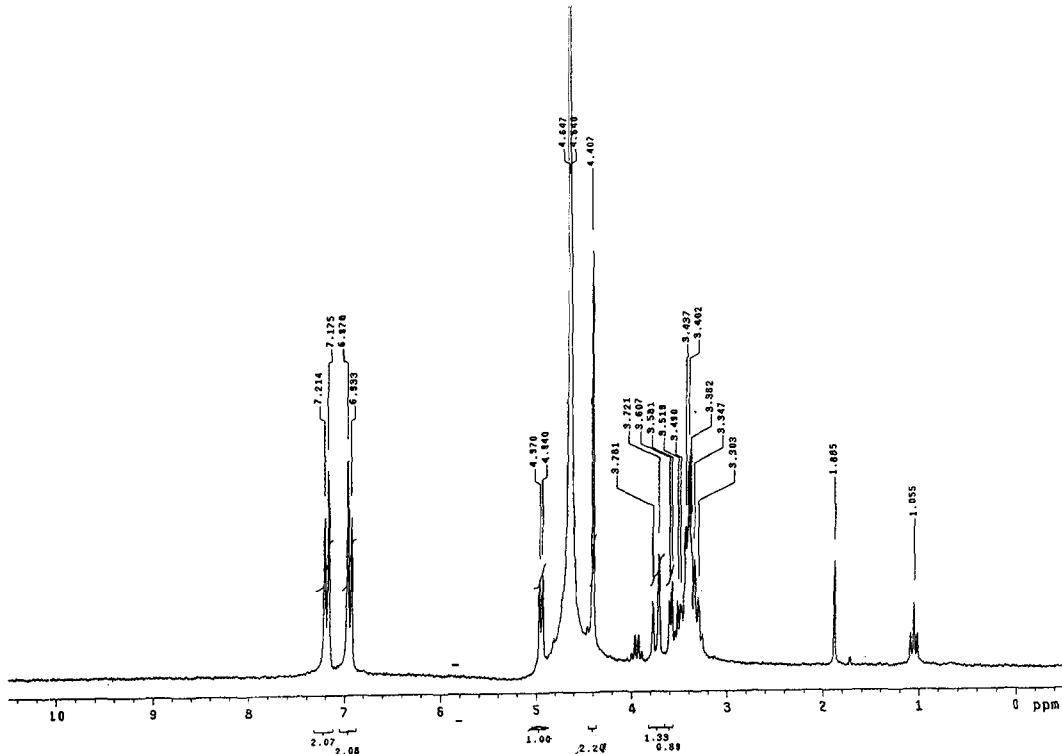


Figure 2. ¹H-NMR spectrum of Gastrodin in D₂O.

물임을 추정할 수 있었다. 또한 가시광선 파장에서도 약간의 흡수를 나타냈는데 이것은 혼합물의 색이 갈색을 띠고 있는 것을 설명해 줄 수 있다(data not shown). 이 혼합물의 UV spectrum 결과로부터 280 nm에서의 흡광이 tyrosine, tryptophan, phenylalanine과 같은 방향족 아미노산에 의한 것인지를 확인해 볼 필요가 있었다. 그래서 이 혼합물로 ninhydrin 반응[19]을 실시하였고 ninhydrin 반응에서는 아미노산이 존재할 경우 자색으로 정색되는데, 시험 결과 색 변화 없이 음성 반응을 관찰하였다. 이 결과로부터 혼합물은 아미노산이나 단백질이 아님을 확인할 수 있었다. 플라보노이드나 탄닌을 포함한 페놀성 물질은 2.5% FeCl₃ 용액을 가하면 짙은 녹색, 자주색, 청색 또는 흑색으로 정색되는데, 이 혼합물은 암녹색으로 변화하고 농도가 높을 경우에는 암녹색의 침전물을 형성했다. 이것으로 이 혼합물이 페놀성 물질임을 확인할 수 있었고 triterpenoid나 saponin인 경우는 무수 초산을 가한 다음 황산을 가하면 적갈색을 나타내는데, 이 실험 결과에서는 색 변화가 없어 혼합물이 triterpenoid나 saponin은 아님을 확인할 수 있었다. 이와 같은 것들로부터 페놀성 물질들이 혼합되어 있는 형태의 화합물임을 알 수 있었다.

천마추출물로부터 분리된 유효성분들이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 mushroom tyrosinase 저해 효과와 melanoma 세포에서의 멜라닌 합성저해 효과를 측정하였다. 유효성분들의 멜라닌 합성저해 효과를 비교할 수 있는 화합물로서는 이미 효과가 알려져 있는 arbutin을 사용하였다. 먼저 tyrosinase 효소에 의한 tyrosine의 산화에 대한 영향을 조사한 결과, 천마 butanol 분획(50%억제 농도, 즉 IC₅₀ = 46 µg/mL)은 arbutin (IC₅₀ = 114 µg/mL)보다 높은 억제 작용을 나타냄을 알 수 있었다(Table 1). Butanol 분획층에서 분리된 bis(4-hydroxyphenyl)methane 2(IC₅₀ = 400 µg/mL)은 arbutin (IC₅₀ = 114 µg/mL)보다 약 1/4의 tyrosinase 활성 저해 작용을 나타내었다. 특히, 유효성분을 밝히지 못한 페놀성 혼합물(IC₅₀ = 2.37 µg/mL)에서는 arbutin보다 약 50배 가까운 매우 높은 억제 작용을 나타내었다. 4-Hydroxybenzyl alcohol 1과 gastrodin 3에서는 tyrosinase 저해 효과가 없는 것으로 밝혀졌다.

B16 melanoma 세포에서의 멜라닌 합성 저해 효과에 대한 영향을 조사한 결과 gastrodin 3과 butanol 분획물은 arbutin에 상응하는 저해 효과를 보이며 4-hydroxybenzyl alcohol 1과 bis(4-hydroxyphenyl)methane 2은 arbutin보다 더욱 강한 멜라닌 저해 작용을 나타냈다(Figure 3). 특히 bis(4-hydroxyphenyl)methane 2은 100 µg/mL의 농도에서 세포독성을 보이는 하나 1 µg/mL에서 50 µg/mL까지는 매우 높은 멜라닌 생성 저해 효과

Table 1. Inhibitory Activity against Mushroom Tyrosinase

Compounds	IC ₅₀ (µg/mL)
Arbutin	114
Butanol fraction	46
4-Hydroxybenzyl alcohol	> 1,000
bis(4-Hydroxyphenyl)methane	400
Gastrodin	> 1,000
Phenolic fraction	2.37

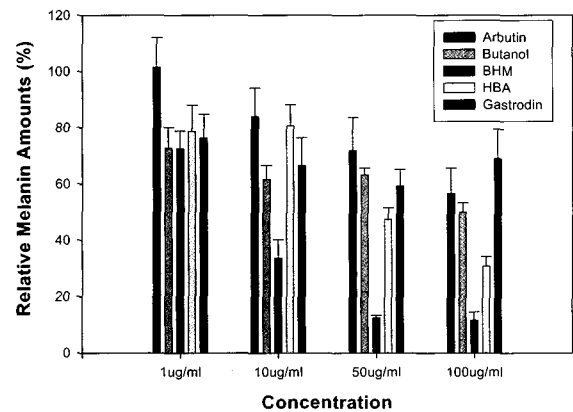


Figure 3. Inhibitory activity of melanin synthesis on B16 melanoma cell (butanol : butanol fraction, BHM : bis(4-hydroxyphenyl)methane HBA : 4-hydroxybenzyl alcohol).

를 보여주었다(Figure 4). Gastrodin 3과 4-hydroxybenzyl alcohol 1은 고농도에서 세포독성이 없으면서도 melanin 생성 저해 효과를 보이므로 이상적인 미백물질이라고 볼 수 있겠다. Butanol 분획층과 4-hydroxybenzyl alcohol 1 역시 고농도에서도 세포 독성을 나타내지 않았다.

이러한 결과로부터 천마추출물의 유효성분들이 비록 tyrosinase에 대한 저해 작용은 낮았으나 B16 melanoma 세포에서는 강하게 멜라닌 생성을 억제한다는 사실을 알 수 있었다. 본 연구에서는 멜라닌 생성억제에 대한 천마추출물의 유효성분들의 효과를 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 통하여 밝혀내고자 하였다. 이러한 유효성분들이 세포에서는 강하게 멜라닌 합성을 억제하였지만 *in vitro*에서 tyrosinase에 대한 억제효과가 낮은 것으로 나타났으며 이를 통해 유효성분들이 tyrosinase 억제작용에 의한 것이 아님을 알 수 있었다. 멜라닌 합성 과정은 크게 tyrosinase[3]와 TRP-1(tyrosinase-related protein 1 : DHICA oxidase)[6] 그리고 TRP-2 (tyrosinase-related protein 2 : dopachrome tautomerase)[7]에 의해 진행된다. Tyrosinase는 멜라닌 합성의 기질인 tyrosine을 Dopa (3,4-dihydroxy phenylalanine)로 만들어주는 tyrosine

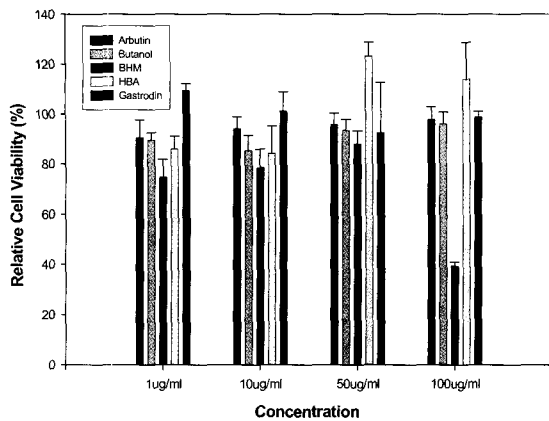


Figure 4. Cell viability using B16 melanoma (butanol : butanol fraction, BHM : bis(4-hydroxyphenyl)methane HBA : 4-hydroxybenzyl alcohol).

hydroxylase 기능과 Dopa를 dopaquinone으로 만드는 dopaoxidase의 기능을 가지고 있다. 또한 DHI (5,6-dihydroxyindole)oxidase 기능이 있어 DHI를 indol-5,6-quinone으로 만든다. 또한 tyrosinase에 의해 생성된 dopaquinone이 dopachrome으로 산화되어 eu-melanin을 생성하는 과정에서 dopachrome을 DHICA (5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid)로 만드는 최초가 TRP-2이며, DHICA는 다시 TRP-1에 의해 산화되어 eu-melanin을 생성시킨다. 천마추출물의 유효성분들은 *in vitro*에서 tyrosinase 활성 저해 효과가 낮았으나(Table 1) B16 melanoma 세포에서는 높은 미백 효과를 보였다(Figure 3). 이 결과들로 미루어 볼 때 이러한 유효성분들은 멜라닌 생성과정에서 직접적인 tyrosinase 활성이 아닌 TRP-1 또는 TRP-2의 작용을 억제함으로써 세포에서의 미백 효과를 보이는 것으로 추정할 수 있다. 또한 tyrosinase의 활성이 아닌 tyrosinase 유전자 발현에 관련된 메커니즘에 대한 가능성도 배제할 수 없다.

이상의 결과에서 천마추출물의 유효성분들은 색소침착의 방지와 개선에 효과 있는 원료로서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다. 새로운 미백물질의 개발은 미백 효과의 증가와 동시에 독성에 대한 고려가 동시에 이루어져야 할 것이다. 또한 미백 메커니즘에 대한 보다 완전한 이해는 유전자 및 분자수준에서 이루어져야 할 것이다. 본 연구에서 규명하지 못했던 페놀성 혼합물의 유효성분에 대한 분리가 현재 진행 중이며 더 나아가 천마추출물로부터 분리된 유효성분들의 작용 기작을 밝혀내기 위하여 유전자수준에서의 연구가 진행 중이며 그 결과는 다음 논고에 보고하고자 한다.

참고 문헌

1. A. Dorner and J. Pawelek, Dopachrome conversion: a possible control point in melanin biosynthesis, *J. Invest. Dermatol.*, **75**, 192 (1980).
2. M. Kubo and H. Matsuda, Development studies of cuticle and medicinal drugs from natural sources on melanin biosynthesis, *Fragrance J.*, **8**, 48 (1995).
3. T. P. Dooley, R. C. Gadwood, K. Kilgore, and L. M. Thomasco, Development of an *in vitro* primary screen for skin depigmentation and antimelanoma agents, *Skin Pharm.*, **7**, 188 (1994).
4. M. Seiji, K. Shima, M. S. Birbeck, and T. B. Fitzpatrick, Subcellular localization of melanin biosynthesis, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **100**, 497 (1963).
5. P. Bernard and J. Y. Berthon, *International J. Cosmetic Science*, **22**, 2219 (2000).
6. V. Marmol, S. Ito, I. J. Jackson, J. Vachtenheim, P. Berr, G. Ghanem, R. Morandini, K. Wakamatsu, and G. Heuz, TRP-1 expression correlates with eumelanogenesis in human pigment cells in culture, *FEBS Letter*, **327**, 307 (1993).
7. A. J. Winder, A. Wittbjer, G. Odh, E. Rosengren, and H. Rosman, The mouse brown (b) locus protein functions as a dopachrome tautomerase, *Pigment Cell Research*, **7**, 305 (1994).
8. T. Cohen, R. M. Muller, Y. Tomita, and S. Shibahara, Nucleotide sequence of the cDNA encoding human tyrosinase-related protein, *Nucleic Acids Res.*, **18**, 2807 (1990).
9. K. Tsukamoto, I. J. Jackson, K. Urabe, P. M. Montague, and V. J. Hearing, A second tyrosinase-related protein, TRP-2, is a melanogenic enzyme termed DOPACHROME tautomerase, *EMBO J.*, **11**, 519 (1992).
10. Y. Mishima, S. Hatae, and H. Kondoh, Overview for development of future innovative skin whitening agents : 1996, *Fragrance J.*, **1**, 13 (1996).
11. Y. S. Lee, J. H. Ha, C. S. Yong, D. U. Lee, K. Huh, Y. S. Kang, S. H. Lee, M. W. Jung, and J. A. Kim, Inhibitory effects of constituents of *Gastrodia elata* Bl. on glutamate-induced apoptosis in IMR-32 human neuroblastoma cells, *Arch. Pharm. Res.*, **22**, 404 (1999).
12. J. H. Ha, D. U. Lee, J. T. Lee, J. S. Kim, C. S. Yong, J. A. Kim, J. S. Ha, and K. Huh, 4-Hydro-

- xybenzaldehyde from *Gastrodia elata* Bl. is active in the antioxidation and GABAergic neuromodulation of the rat brain, *J., Ethnopharmacol.*, **73**, 329 (2000).
13. A. Vanni, *Annali di Chimica*, **80**, 35 (1990).
 14. K. Maeda, and M. Fukuda, *In vitro* effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **42**, 361 (1991).
 15. R. M. Silverstein, G. C. Bassler, and T. C. Morill, *Spectrometric identification of organic compounds*, John Wiley & Sons, London, New York, Vol. **7**, 110 (1991).
 16. J. P. Charles and B. Jacquelyn, *The Aldrich library of ^{13}C and ^1H FTNMR spectra*, Aldrich Chemical Company, **2**, 353B (1993).
 17. H. Taguchi, I. Yosioka, K. Yamasaki, and I. H. Kim, Studies on the constituents of *Gastrodia elata*, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 55 (1981).
 18. X. Z. Feng, Y. W. Chen, and J. S. Yang, Studies on constituents of Tian-Ma (*Gastrodia elata* Bl.), *Acta Chem. Sin.*, **37**, 175 (1979).
 19. R. M. C. Dawson, D. C. Elliott, W. H. Elliott, and K. M. Jones, *Data for biochemical research*, Oxford University Press, **2**, 509 (1969).