

교맥 에탄올 추출물의 멜라닌생성 억제효과

Inhibitory Effect of the Ethanol Extract of *Fagopyrum esculentum* on Melanin Synthesis

김대성 · 노성택 · 이장천¹ · 임규상² · 신미란³ · 우원홍 · 문연자

Dae-Sung Kim · Seong-Taek No · Jang-Cheon Lee¹ · Kyu Sang Lim² · Mee-Ran Shin³
Won-Hong Woo · Yeun-Ja Mun

원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, 1: 상지대학교 한의과대학 본초방제학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 안이비인후피부과교실, 3: 한림대학교 한강성심병원 보철학과교실
Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University. 1: Department of Oriental Medical Prescription, Sangi University, 2: Department of Ophthalmology, Ophthalmology Otolaryngology and Dermatology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University 3: Dept. of Prosthodontics, Hangeled Sacred Heart Hospital, Hallym University Medical Center

-Abstract-

The aim of this study was to investigate the effect of ethanol extract of *Fagopyrum esculentum*(FE) on the melanogenesis. To determine whether ethanol extract of FE suppress melanin synthesis in cellular level, B16F10 melanoma cells were cultured in the presence of different concentrations of FE ethanol extract. In the present study, the author examined the effects of FE ethanol extract on cell proliferation, melanin contents, tyrosinase activity. Cell proliferation was slightly increased by treatment with ethanol extract of FE (25-200 µg/ml). The ethanol extract of FE effectively suppressed melanin contents at a dose of 100 µg/ml. It was observed that the color of cell pellets was totally whitened compared with the control. The ethanol extract of FE inhibited tyrosinase activity, regulate melanin biosynthesis as the key enzyme in melanogenesis.

These results suggest that the ethanol extract of FE exerts its depigmenting effects through the suppression of tyrosinase activity. And it may be a potent depigmentation agent in hyperpigmentation condition.

Key words : *Fagopyrum esculentum*, melanin, tyrosinase, depigmentation

I. 緒論

기미·주근깨 등 피부에 생기는 색소침착은 표피 내에서 melanin의 증가에 기인하고, 있고 mel-anin은 표피 기저층에 존재하는 melanocyte

내의 melanosome에서 합성되어 수지상 돌기를 통하여 표피의 각질형성세포로 이동되어 피부의 색을 나타낸다.

Melanin은 tyrosine을 기질로 tyrosinase, tyro-sinase-related protein 1 (TRP-1) 및 tyrosinase-related protein 2 (TRP-2) 효소에 의한 일련의 반응을 통해 생성 된다¹⁻³⁾. 또한

* 교신저자: 문연자, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과, Tel: 063-850-6941, Email: yjmun@wonkwang.ac.kr

Melanin 생합성에 관여하는 인자에는 tyrosinase 이외에도 dopachrome conversion factor, prostaglandin(PG), interferon(IFN) 또는 melanocyte stimulating hormone(MSH), Vit D3, histamine 등이 보고되어 있다⁴⁻⁶⁾.

인체 내에서 합성된 melanin은 자외선⁷⁾이나 외부 자극 물질 등으로부터 피부를 보호하는 긍정적인 기능이 있는 반면, 과도한 색소 침착은 기미와 주근깨를 형성하고 피부노화를 촉진하는 등 부정적인 기능을 나타낸다⁸⁾. 따라서 과색소침착을 치료하기 위해 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 억제하는 hydroquinone, resorcinol등의 페놀 유도체나, L-ascorbic acid와 그 유도체 및 kojic acid, arbutin 등이 개발되었으나, 효과가 충분치 않거나 피부자극 또는 안정성에 문제가 있어 제한적으로 사용되고 있다^{9,10)}.

본 연구에서는 피부의 과색소침착에 의한 기미 주근깨 등의 치료제를 개발하고자 B16 mouse melanoma 세포를 이용하여 교맥의 에탄올 추출물이 tyrosinase 억제 활성이 있는지 알아보았다. 교맥(蕎麥, Fagopyrum esculentum)은 마디풀과의 한해살이 쌍자엽 식물인 메밀(Fagopyrum esculentum Moench)의 종자를 햇볕에 말린 것으로, 혈압강화 효능을 가진 rutin을 많이 함유하여 동맥경화증, 폐출혈 궤양성 질환, 동상 치질, 감기치료 등에 효과가 인정되어 임상적으로 이용되고 있다^{11,12)}. 또한 교맥 추출물에 대한 보고로는, 항고혈압기능, 혈당조절, 소화효소 저해활성, ACE 저해활성, 항산화, 알러지 유발 억제활성, 혈전증 예방효과 등이 보고되었으나, 미백효과에 대한 연구 보고는 접하지 못하였다. 이에 교맥 추출물의 미백효과를 조사 하였고, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

교맥 200 g에 에탄올 2000 ml을 가하여 48시간 동안 냉침 시킨 후 1시간 동안 25℃이하에서 Sonication 시킨 것을 여과지로 여과하여 감압 농축 하여 3.3 g의 시료를 얻었다. 이것을 DMSO (Dimethylsulfoxide)에 400 mg/ml로 녹였고, 다시 각각의 농도로 희석하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포주 및 세포배양

B16/F10 mouse melanoma 세포를 10 % FBS(fetal bovine serum)와 1 % antibiotics가 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM)을 사용하여 5 % CO₂, 37℃ 조건에서 배양하였다.

2) MTT assay

MTT 정량은 Mosmann¹³⁾의 방법을 변형하여 실시하였다. 교맥 추출물을 여러 농도로 처리하고 72시간 동안 배양한 후 0.05 % MTT를 배양액에 분주하고, 3시간 배양하였다. 상층액을 버리고 DMSO에 녹인 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

3) B16/F10세포의 형태학적 관찰

B16/F10세포를 6 cm 배양용기에 5×10⁴ 개씩 분주하여 tyrosinase 활성 측정 방법과 동일한 방법으로 교맥 에탄올 추출물과 α-MSH(100 nM)을 각각 처리하여 72시간 동안 배양한 후 위상차도립현미경(inverted phasecontrast microscope, Leica)를 이용하여 수지상 돌기의 변화를 관찰하였다.

4) Tyrosinase 활성 억제 측정

세포내 tyrosinase 활성은 Matinez-Esparza¹⁴⁾ 등의 방법으로 측정하였다. B16/F10세포를 6-well 배양용기에 5×10⁴ 개씩 분주하여 24시간 배양 후 교맥 에탄올 추출물과 α-MSH(100 nM)을 각각 처리하고 72시간 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 PBS로 2번 세척하고, lysis buffer[5 nM EDTA, 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.0), triton X-100, 0.1 M PMSF]로 세포를 용해하였다. 이것을 4℃, 13,000rpm에서 30분간 원심분리 하여 얻은 상층액을 tyrosinase 활성 측정 용액으로 사용하였다. Protein assay 용액(Bio Rad)과 시료를 혼합하여 흡광도를 측정, 동량의 단백질 양을 계산하였다. 시료 50μl와 0.1 M SPB(sodium phosphate buffer, pH 7.0) 100

μl 그리고 L-DOPA 50 μl를 혼합하여 ELISA reader로 37°C, 405nm에서 1시간 동안 30분 간격으로 흡광도의 변화를 측정하였다.

5) DOPA stain

B16/F10세포를 chamber slide(Nunc)에 1×10⁴ 개씩 분주하여 24시간 배양 후 교맥 에탄올 추출물과 α-MSH(100 nM)을 각각 처리하고 72시간 배양 하였다. PBS로 세척 하고, 5 % formalin으로 고정하여 DOPA로 4시간 동안 암실에서 반응시켰다. 10 % formalin으로 고정, 에탄올로 탈수, 그리고 봉입하여 광학현미경으로 관찰 하였다.

6) 멜라닌 합성 양의 측정 및 육안적 관찰

멜라닌 정량은 Hosei¹⁵⁾ 등의 방법을 변형하여 사용하였다. B16/F10세포를 10 cm 배양용기에 2×10⁵ 개씩 분주하여 24시간 동안 안정화 시킨 후 교맥 에탄올 추출물과 α-MSH(100 nM)을 각각 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 3일 후 각 군당 2×10⁶ 개의 세포를 수거하였다. Lysis buffer[5 mM EDTA, 0.1 M SPB(sodium phosphate buffer, pH 7.0), triton X-100]로 세포를 용해하고, 원심분리 하여 얻은 세포침전물에 에탄올로 세척한 후 다시 원심분리 하여 건조시켰다. 이렇게 얻어진 melanin은 10 % DMSO가 첨가된 1 N Na OH 용액으로 90°C에서 2시간 동안 멜라닌을 용해시키고, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 육안으로 멜라닌세포의 색깔을 관찰하기 위하여 96시간 동안 배양하여 각 군당 5×10⁶ 개의 세포를 수거하여 관찰 하였다.

III. 實驗 結果

1. 세포 생존율에 미치는 영향

교맥 추출물이 B16세포에 미치는 영향 조사하기 위하여 교맥 에탄올 추출물을 25~200 μg/ml의 농도로 처리하고 3일 동안 배양한 후 MTT 방법으로 생존율을 측정 하였다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 교맥 에탄올 추출물의 농도가 증가함에 따라 세포생존율이 증가함을 보였다

(Fig. 1).

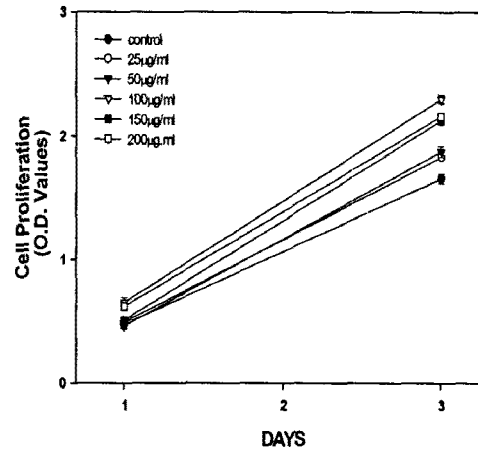


Fig. 1. Effect of FE on cell proliferation. Cells were plated at 1×10⁴ cells/dish and incubated in media containing from 25 to 200 μg/ml of FE for 3 days. Cell proliferation was determined by MTT assay as described in Materials and Methods. Data are means ± S.D. of three experiments performed in triplicate.

2. B16세포의 형태학적 관찰

교맥이 B16세포의 형태에 미치는 영향을 조사 하였다. 교맥 에탄올 추출물을 50 μg/ml, 100 μg/ml 농도로 각각 처리하여 3일 동안 배양 후 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과 Fig. 2에서 보이는바와 같이 50 μg/ml, 100 μg/ml은 대조군과 비교하여 변화가 없었다.

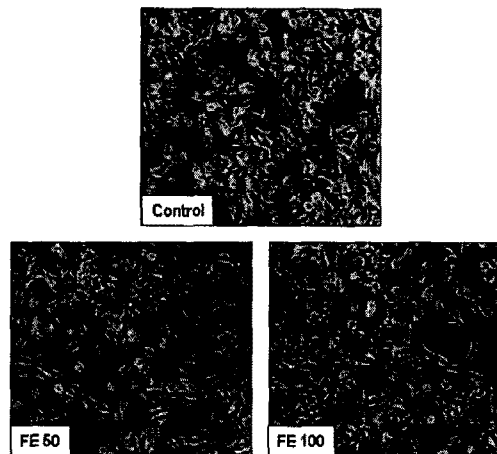


Fig. 2. Light micrographical observation of B16 cells after treatment with FE. Cells were incubated with FE. After 3 days, cells were photographed with phase contrast inverted microscope. Control, FE 50: FE 50 μg/ml, FE 100: FE 100 μg/ml (200×).

3. 최종 멜라닌 합성 양의 측정

교맥 에탄올 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하고 3일 동안 배양하였다. 각 군당 2×10^6 개의 세포를 수집한 다음 멜라닌 양을 측정하였다. 그 결과 대조군의 0.086(O.D.값, 100%)에 비해 교맥 에탄올 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 은 0.076(88%), 그리고 100 $\mu\text{g/ml}$ 은 0.07(81.4%)로 감소하였다.

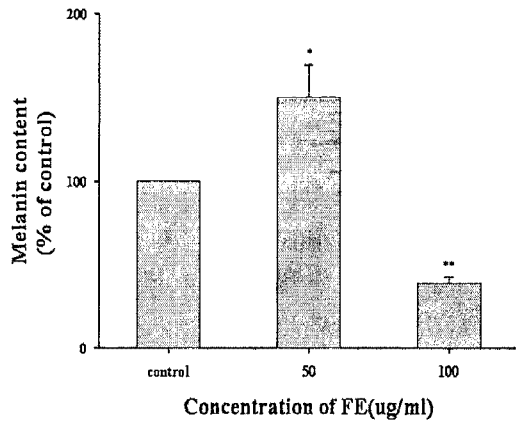


Fig. 3. Effect of FE on melanin contents of B16 cells. Cells were seeded at 2×10^5 cells/dish. After 24 hours, cells were treated with several concentrations of FE for 3 days. Then, melanin contents were measured as described in Materials and Methods. Data are mean \pm S.D. of three experiments performed in triplicate. * $p < 0.01$: compared with control.

4. 멜라닌 색소 침착의 육안적 관찰

멜라닌 색소 침착의 변화를 육안으로 확인하기 위하여 교맥 에탄올 추출물을 처리하여 5일 동안 배양하여 얻은 세포 침전물을 관찰 하였다. 그 결과 대조군에 비하여 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리군은 현저한 색의 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

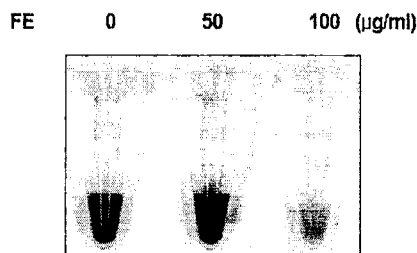


Fig. 4. Formation of melanin on the B16 cells after treatment with FE. B16 cells seeded at 2×10^5 cells/dish. The cells were treated with FE for 5 days. Cells pellets containing 5×10^6 cells were photographed.

5. Tyrosinase 활성에 미치는 영향

Tyrosinase는 tyrosine을 DOPA로 전환 시키는 tyrosine hydroxylase와 DOPA quinone으로 전환 시키는 DOPA oxidase로서 처음 두 단계의 반응을 촉매하는 역할을 한다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 교맥 에탄올 추출물 50 $\mu\text{g/ml}$ 과 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 대조군에 비해 $74 \pm 2.1\%$, $50 \pm 9.0\%$ 로 tyrosinase의 활성이 감소하였다. (Fig. 5).

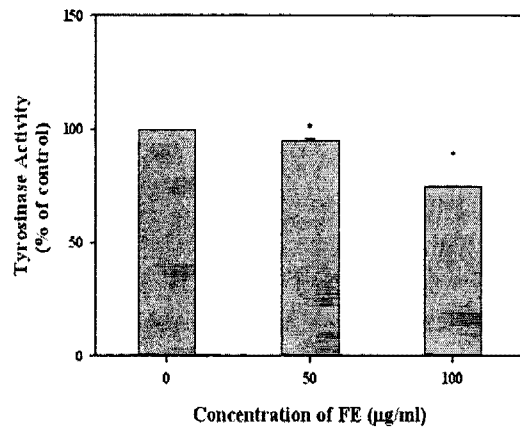


Fig. 5. Effect of FE on the tyrosinase activity. The effect on tyrosinase activity was tested with various doses of FE for 3 days. Data are expressed as percent(%) of control and each column represents the mean \pm S.D. of at least three experiments performed in triplicate. * $p < 0.01$: compared with control.

또한 DOPA 염색을 이용하여 tyrosinase의 DOPA oxidase 활성을 관찰한 결과(Fig. 6), 대조군에 비하여 교맥 에탄올 추출물 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 처리 군에서 tyrosinase의 활성이 감소하였다.

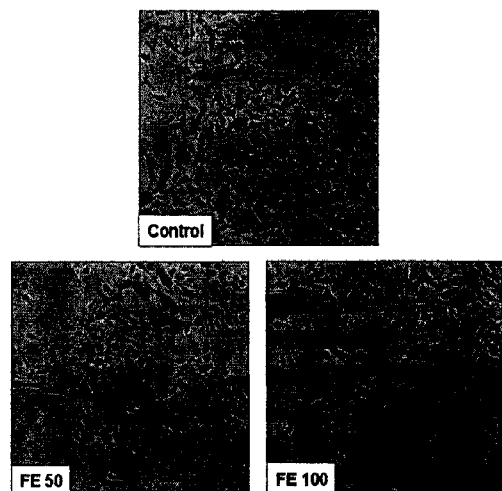


Fig. 6. Observation of tyrosinase activity by DOPA

stain after treatment with FE. Cells were incubated with FE. After 3 days, cells were stained with DOPA as described in Materials and Methods. Control, FE 50: FE 50 $\mu\text{g/ml}$, FE 100: FE 100 $\mu\text{g/ml}$ ($\times 200$).

IV. 考 察

교맥은 脾胃·大腸經과 肺經에 歸經하며 開胃寬腸, 下氣消積의 효능이 있어 絞腸痧(Cholera), 腸胃積滯, 慢性下痢, 噤口痢疾, 赤游丹毒, 癰疽發背, 湯火傷, 瘰癧를 치료한다고 나타나 있다¹⁶⁾. 그리고 『本草綱目』¹⁷⁾에서 “性平寒味甘無毒. 實腸胃益氣力 雖動諸病 能鍊五臟滓穢 續精神, 作飯食 壓丹石毒 甚良, 以醋調紛 除小兒丹毒赤腫熱瘡한다” 하였고, 전통적으로 홍역, 케양성 위장병 등 내과적 치료용과 타박상, 악성종기 등 외과적 치료용으로 사용되어 왔고, 기력을 도와주며, 독소를 해독시키며 노폐물을 제거하는 생리적 기능이 보고되어 있다¹¹⁾.

피부의 과색소침착을 일으키는 대표적인 요인은 일광이며, 기미 등은 일광 노출에 의해 악화된다. 피부를 구성하고 있는 각질형성세포, 멜라닌세포, 섬유아세포는 물론 염증세포, prostaglandin, 여러 가지 cytokine, 그리고 α -MSH의 변화 등이 서로 연관되어 종합적으로 색소침착을 조절한다¹⁸⁻²¹⁾. 이러한 색소침착을 보이는 피부질환은 hydroquinone, kojic acid, azelaic acid, corricos-teroid, retinoic acid 등 많은 약제가 개발되어 단일 또는 복합제제로서 치료에 이용되어 왔다²²⁻²⁸⁾. 그러나 이들 대부분이 치료 효과 면에서 만족스럽지 못할 뿐만 아니라 가장 효과가 좋다고 알려져 있는 hydroquinone은 제제가 불안정하고, 홍반이나 피부건조증, 피부자극, 그리고 조직흑변증(ochronosis) 등 많은 부작용이 있어 사용상 제한이 있다^{29,30)}. 또한 kojic acid 역시 최근 발암 논란이 일고 있다^{31,32)}. 따라서 부작용이 적은 많은 천연 물질이 기미 치료제 또는 미백 화장품의 성분으로 각광을 받고 있지만 대부분의 천연 물질은 그 효능에 있어서 검증받지 못하였으며 작용기전 또한 밝혀져 있지 않은 것이 많다.

본 실험에서 교맥 에탄올 추출물의 미백효능을 조사하기 위하여 세포독성이 있는지 MTT 방법을

로 조사한 결과 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도까지 B16/F10세포의 증식을 저해하지 않았으며, 오히려 촉진하는 것으로 나타났다(Fig. 1). 또한 교맥 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 멜라닌 생성을 감소시켰다(Fig. 3). 이는 기존의 hydroquinone, 그리고 kojic acid와 같은 미백물질이 세포독성을 나타낸 사실과 비교해 볼 때 교맥 에탄올 추출물은 매우 안정적인 후보물질로 생각된다.

교맥 에탄올 추출물이 tyrosinase 활성에 미치는 효과를 조사한 결과 교맥 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 tyrosinase의 활성을 50 %로 억제하는 것으로 나타났다(Fig.5). DOPA 염색을 이용한 tyrosinase의 DOPA oxidase 활성을 관찰한 결과도 같은 경향으로 나타났다(Fig. 6).

이상의 연구 결과, 교맥 에탄올 추출물은 세포독성이 없으며, tyrosinase 활성 억제를 통해 멜라닌 생성을 감소시키는 것으로 보인다.

V. 結 論

교맥 에탄올 추출물이 멜라닌 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 B16/F10세포를 이용하여 멜라닌과 tyrosinase 활성을 조사하였다.

- 1) 교맥 에탄올 추출물은 B16/F10세포의 증식을 촉진하였다.
- 2) 교맥 에탄올 추출물은 B16/F10세포에서 멜라닌 합성을 억제 하였다.
- 3) 교맥 에탄올 추출물은 B16/F10세포에서 tyrosinase의 활성을 억제하였다.

이상의 결과 교맥 에탄올 추출물은 tyrosinase 활성을 억제함으로써 멜라닌합성을 감소시킴을 알 수 있었으며, 세포독성을 보이지 않았다. 향후 교맥 추출물에 포함된 다양한 물질 중 어떤 물질이 이러한 효과를 갖고 있는지 밝히는 연구가 필요할 것이라 생각된다.

參 考 文 獻

- 1) Curto EV, Kwong C, Hermersdorfer H, Glatt H, Santis C, Virador V, Hearing VJ

- and Dooley P. Inhibitors of mamalian melanocytes tyrosinase : In vitro comparisons of alkylesters of gentisic acid with other putative ingibitors. *Biochemical pharmacology*. 57: 663-672, 1999.
- 2) Imokawa G, Mishima Y. Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glucosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res*. 42: 1994-2002, 1982.
- 3) Kobayashi T, Urabe K, Winder AJ et al. Tyrosinase related protein 1(TRP-1) functions as a DHICA oxidase activity in melanin biosynthesis. *EMBO* 13: 5818-5825, 1994.
- 4) Pilar A, U Kazunori, K Takeshi, T Katsuhiko and hearing, V.J. Melanin biosynthesis patterns following hormonal stimulation. *J. Biol. Chem*. 268: 25650-25655, 1993.
- 5) Schallreuter, K. U, J Moore, K. J. Tobin, N.J. Gibbons, H. S. Marshall, T. Jenner, W. D. Beazley and J. M. Wood. α -MSH can control the essential cofactor 6-terahydrobiopterin in melanogenesis. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 885: 329-341, 1999.
- 6) Roser B and B Robert. Cyclic AMP a key messenger in the regulation of skin pigmentation. *Pigment Cell Res*. 13: 60-69, 2000.
- 7) A. H. Chalmers, Martin Lavin, Som Atisoontornkul, Jonathan Mansbridge, and Chev Kidson. Resistance of human melanoma cells to ultraviolet radiation. *Cancer Res*. 36: 1930-1934, 1976.
- 8) Maeda K, Fukuda M. In vivo effectiveness of several whitening cosmetic components in human melanocytes. *J. Soc. Cosmet. Chem*. 42: 361-368, 1991.
- 9) Ando S, Ando O, Suemoto Y, and Mishima Y. Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. *J. Invest Dermatol*. 100: 150-155, 1993.
- 10) Masuda M, Tejima T and Suzuki T. Skin lighteners. *Cosmetics & Toiletries* 111: 65-77, 1996.
- 11) Lee JS, Ra KS, Son H. Extraction and component sugar analysis of polysaccharides from buckwgeat. *Korean J Food Sci Technol* 27: 860-865, 1995.
- 12) Lee GD, Yun SL, Kim JO, Heo SS, Seo GI. Monitoring on the tea with steaming and drying process of germinated byck wheat. *J korean Soc Food Sci Nutr* 33: 212-217, 2004.
- 13) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Methods* 65: 55-63, 1983.
- 14) Matinez-Esparza, M. Mechanisms and melanogenesis inhibition by tumor necrosis factora in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem*. 225: 139-146, 1998.
- 15) Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvi-tamin D3 and retinoic acid. *Cancer Research* 45: 1474-1478, 1985.
- 16) 김창민 외. *中藥大辭典*. 정담. 1997.
- 17) 明, 李時珍. *本草綱目*. pp1459. 人民衛生出版社校点本.
- 18) 박경아 외. *조직학*. pp405-411. 고려의학. 서울. 1999.
- 19) 은희철 외. *피부면역학*. pp148. 서울대학교출판부. 1999.
- 20) 대한피부과학회. *피부과학*. pp 1-9, 409-412. 여문각. 서울. 2001
- 21) 국홍일. *고운피부 젊은피부*. pp17, 18. 아침나라. 서울. 1999.
- 22) Arndt K, Fitzpatrick TB. Topical use of hydroquinone as a depigmenting agent. *J Am Med Assoc*. 194: 117-119, 1965.
- 23) Kligman AM, Willis I. A new formula for depigmenting human skin. *Arch Dermatol*. 111: 40-48, 1975.
- 24) Mishima Y, Hatta S, Ohyama y, Inazu M. Induction of melanogenesis suppression: cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment cell Res*. 1: 367-374, 1988.
- 25) Breathnach AC, Nassaro-Porro M, Passi S. Azelaic acid therapy in disorders of pigmentation. *Clin Dermatol*. 7: 106-119,

- 1989.
- 26) Kanwar AJ, Dhar S, Kaur S. Treatment of melasma with potent topical corticosteroids. *Dermatology* 188: 170, 1994.
- 27) Griffiths CE, Finkel LT, Ditré CM, Hamilton TA, Ellis CN, Voorhees JJ. Topical tretinoin (retinoic acid) improves melasma. A vehicle-controlled, clinical trial. *Br J Dermatol* 129: 415-421, 1993.
- 28) Pathak MA, Fitzpatrick TB, Kraus EW. Usefulness of retinoic acid in the treatment of melasma. *J Am Acad Dermatol* 15: 894-899, 1986.
- 29) Engasser PE, Maibach HI. Cosmetic and dermatology: bleaching creams. *J Am Acad Dermatol* 5: 143-147, 1981.
- 30) Findley GH, Morrison JGL, Simon IW. Exogenous ochronosis and pigmented colloid milium from hydroquinone bleaching creams. *Br J Dermatol* 93: 613-622, 1975.
- 31) Fujiwara N, Watanabe H, Nakatani T, Roy G, Ito A. Induction of thyroid tumours in (C57BL/6NxC3H/N) F1 mice by oral administration of kojic acid. *Food Chem Toxicol Sci.* 73: 287-293, 1998.
- 32) Takizawa T, Mitsumori K, Tamura T, Nasu M, Ueda M, Imai T, et al. Hepatocellular tumor induction in heterozygous p53-deficient CBA mice by a 26-week dietary administration of kojic acid. *Toxicol Sci* 73: 287-293, 2003.