

잔대(*Adenophora triphylla* var. *japonica*)순 아세트산에틸 분획물의 피부 미백 효과

유슬기¹, 박선경², 강진용², 김종민², 박상현², 권봉석², 이창준², 강정은², 박수빈², 이욱³, 허호진^{1,2*}

¹경상대학교 농업생명과학대학 농화학식품공학과, ²경상대학교 응용생명과학부(BK21 plus), 농업생명과학연구원,
³국립산림과학원 특용사원연구과

Skin Whitening Effect of Ethyl Acetate Fraction of *Adenophora triphylla* var. *japonica* Sprout

Seul Ki Yoo¹, Seon Kyeong Park², Jin Yong Kang², Jong Min Kim², Sang Hyun Park²,
Bong Seok Kwon², Chang Jun Lee², Jeong Eun Kang², Su Bin Park², Uk Lee³ and Ho Jin Heo^{1,2*}

¹Department of Food Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

²Division of Applied Life Science (BK21 plus), Institute of Agriculture and Life Science,
Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea

³Division of Special Purpose Trees, National Institute of Forest Science, Suwon 16631, Korea

Abstract - To investigate skin-whitening effect of *Adenophora triphylla* var. *japonica* sprout extract, antioxidant activity, inhibitory effect on tyrosinase and melanin synthesis in B16/F10 melanoma cell were examined. Total phenolic content (246.25 mg GAE/g) and total flavonoid content (303.94 mg RE/g) of ethyl acetate fraction from *Adenophora triphylla* sprout (EFAT) showed the highest contents than other fractions (*n*-hexane, chloroform and distilled water). Antioxidant activities of EFAT has been evaluated using ABTS, DPPH radical scavenging activities, FRAP and inhibitory effect of lipid peroxidation. EFAT showed excellent radical scavenging activity and inhibitory effect on MDA production. Inhibitory effect of tyrosinase as a major enzyme of melanin synthesis was also measured. In these results, EFAT showed higher inhibitory effect against L-DOPA (51.27%) than L-tyrosine. IC₅₀ value on α -glucosidase was 41.93 μ g/ml. In B16/F10 melanoma cells, EFAT inhibited melanin synthesis at 200 μ g/ml concentration (about 42% decrease). Finally, main physiological compounds of EFAT were identified as a rutin and a chlorogenic acid using high performance liquid chromatography.

Key words - *Adenophora triphylla* var. *japonica* sprout, Antioxidant, α -glucosidase, Melanin, Tyrosinase

서 언

오랫동안 햇빛에 노출된 피부에서 관찰되는 광노화(photo-aging)는 자외선에 의한 영향이 크게 미치는 것으로 알려져 있으며, 자외선 조사에 의해 피부 조직 내에 높은 농도의 여러 활성 산소가 생성되며 색소 침착의 주요 원인으로 알려져 있다 (Han and Park, 2006). 활성산소(reactive oxygen species,

ROS)에는 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂), 초과산화음 이온(superoxide anion, ·O₂⁻), 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical, ·OH) 등이 있으며, 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 주변의 분자와 높은 반응성을 나타내어 단백질, 세포막, 효소 및 DNA 등에 산화적 손상을 일으킨다(Papa and Skulachev, 1997). 이러한 활성산소는 피부 조직 내에 높은 농도로 생성되어 피부 노화를 촉진시키는데, 세포 방어 기전으로 멜라닌이 생성되는 것으로 알려져 있다(Tobin and Thody, 1994). 멜라닌은 자외선과 같은 외부 자극으로부터 활성산소와 프리라디칼(free

*교신저자: hjher@gnu.ac.kr

Tel. +82-55-772-1907

radical)을 제거해 주고, 자외선을 흡수 차단시켜 피부를 보호하기 위하여 생성되지만, 과도한 멜라닌 생합성은 그 자체가 산화적 스트레스를 발생시켜 피부 노화를 가속화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 피부에 기미, 주근깨와 같은 색소 침착을 발생시키고, 더 나아가 피부암의 원인이 될 수 있는 것으로 보고된다(Hill *et al.*, 1977).

멜라닌 생성을 조절하는 효소에는 tyrosinase, tyrosinase related protein-1 (TRP-1), tyrosinase related protein-2 (TRP-2)가 있으며, tyrosinase는 copper-binding glycoprotein이며 멜라닌 합성의 가장 중요한 초기 속도결정단계에 관여하는 효소로써, asparagine의 side chain에 있는 NH₂기에 당을 붙이는 N-linked glycosylation 과정에 의해 생성된다(Kobayashi *et al.*, 1994). 단백질이 번역된 후 endoplasmic reticulum (ER)에 들어가면 oligosaccharide transfer가 세포질에서 만들어진 Glc₃Man₉GlcNA₂의 당을 붙여주게 되고, 당에 존재하는 3개의 glucose를 α-glucosidase I 과 II가 끊어줌으로써 N-glycosylation 과정이 시작된다(Mikami *et al.*, 2013). 그러므로 α-glucosidase를 저해하게 되면 tyrosinase의 glycosylation이 저해되어 구조는 변형되고 불활성 형태로 멜라노솜으로 이동하게 되어 결과적으로 melanogenesis가 억제되고, 결과적으로 α-glucosidase 저해제는 멜라닌 생합성을 저해할 수 있는 것으로 알려져 있다(Petrescu *et al.*, 1997).

최근 오존층의 파괴와 이에 따른 자외선의 유해성은 날로 증가하고 있으며, 이러한 원인들에 의하여 발생하는 과도한 산화적 스트레스는 피부상태를 더욱 악화시킴에 따라, 맑고 하얀 깨끗한 피부가 새로운 경쟁력의 하나로 자리매김하면서 미백 기능성 화장품의 필요성이 증가하게 되었다(Han and Park, 2006). 미백기능을 가지는 소재에 대한 연구는 tyrosinase 효소 활성 혹은 발현 양 증가 억제이다(Jeon *et al.*, 2013). 현재 tyrosinase 저해제로서 kojic acid, arbutin과 같은 물질들이 미백제로 사용되고 있으나, 부작용이 보고되면서 안전하면서도 미백활성이 높은 천연유래 물질의 개발이 요구되고 있다(Han and Jung, 2003).

잔대(*Adenophora triphylla* var. *japonica*)는 사삼, 딱주, 제니 등 여러 이름으로 불려지고 있으며, 몸에 털이 있고 굵은 뿌리를 가지는 여러해살이풀로 한국, 일본 및 중국 등지에 분포되어 있다. 봄에는 어린새싹을 이용하여 나물로 먹고, 뿌리를 이용해서 구워먹거나 주로 약재로 사용되어져 오고 있으며, 그 중 뿌리는 가장 많이 이용되고 있는 부위로써 터덕, 도라지와 비슷한 약효가 있는 것으로 알려져 있고, 주요 성분은 saponin과

inulin으로 알려져 있다(Kim *et al.*, 1995). 잔대에 관한 연구는 잔대 뿌리를 시료로 하여 함유 성분 분석과 항산화 효과(Choi *et al.*, 2010), 간 보호 효과(Gum *et al.*, 2007), 비만 마우스에서 항비만 효과(Choi *et al.*, 2010)와 작용기전 등이 이루어져 있다. 식품의약품안전처의 식품원료목록에 따르면 잔대는 뿌리와 순이 식용 가능한 소재로 등록되어 있으나, 잔대 순에 관한 연구는 현재까지 매우 미비한 실정이다. 그러므로 본 연구에서는 잔대 순을 이용하여 미백 기능성을 함유한 향장소재로의 산업화가 가능성을 확인하고자 *in vitro* 항산화 활성과 α-glucosidase, tyrosinase 저해 효과 및 B16/F10 melanoma cell에서의 melanin 생합성 저해 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

시약

Folin-Ciocalteu's phenol reagent, gallic acid, 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), 2,4,6-tripyridyl-S-triazine (TPTZ), trichloroacetic acid, thiobarbituric acid, ascorbic acid, cetechin, 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA) 제품을 구입하였다. Sodium bicarbonate, fetal bovine serum, Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM) media는 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, penicillin과 streptomycin 및 나머지 시약은 Sigma-Aldrich Chemical Co. 제품을 모두 구입하여 사용하였다. 그 외 사용된 용매 및 시약은 모두 일급 이상의 등급을 사용하였다.

시료의 추출 및 분획

본 연구에 사용한 잔대(*Adenophora triphylla* var. *japonica*)순은 초롱꽃과(Campanulaceae)에 속하는 식물로 강원도 화천군 화천가시오갈피 농장에서 2015년 4월에 재배된 것을 구입하였으며, 국립산림과학원 특용자원연구과 이욱 박사의 동정을 거쳤다. 실험에 사용한 시료의 확증표본(표본번호 NIBRVPO00586797)은 국립생물자원관에 보관되고 있다. 동결건조기를 이용하여 건조시킨 후 파쇄하여 -20°C에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 건조시킨 시료 60 g에 80% 에탄올 3L를 첨가하여 환류 냉각 하에 2시간 동안 추출하였다. 추출물은 증류수 300 ml로 정용하고 같은 양의 노말 헥세인(*n*-hexane), 클로로포름

(chloroform) 및 아세트산에틸(ethyl acetate) 용매를 이용하여 순차적으로 분획을 시행하였다. 분획을 통해 얻어진 각각의 분획물은 농축 및 동결건조를 통해 용매를 모두 제거한 뒤 -20°C에 냉동 보관하여 각 실험에 사용하였다.

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀 함량 분석은 Kim (Kim *et al.*, 2003) 등의 실험 방법을 변형하여 실험하였다. 시료 1 ml에 3차 증류수 9 ml를 첨가한 후 Folin & Ciocalteu's phenol reagent 1 ml를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 반응용액에 7% Na₂CO₃ 용액 10 ml를 넣어 다시 혼합한 다음 3차 증류수로 25 ml 정용하였다. 상온에서 2시간 동안 혼합 용액을 반응시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 gallic acid를 이용하여 시료와 같은 방법으로 작성된 검량선으로 총 페놀화합물 함량을 계산하였다(Kim *et al.*, 2003).

총 플라보노이드 분석은 Lee (Lee *et al.*, 2001) 등의 실험 방법을 변형하여 실험하였다. 시료 1 ml에 diethylene glycol 10 ml와 1 N NaOH 1 ml를 혼합하여 30°C에서 60분 동안 방치시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도는 rutin을 이용하여 시료와 같은 방법으로 작성된 검량선으로 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

항산화 활성 측정

2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) 용액은 150 M NaCl이 포함된 100 mM phosphate buffer (pH 7.4)에 2.5 mM ABTS와 1.0 mM [2,2'-azobis-(2-amidinopropane)HCl] (AAPH)을 혼합한 후 68°C water bath에서 30분 동안 반응하여 실온에서 10분 동안 냉각하였다. 만들어진 ABTS 용액을 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 나오도록 3차 증류수를 희석해서 사용하였다. 시료 20 µl에 조정된 ABTS 용액을 980 µl를 혼합하여 37°C에서 10분간 반응시키고, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다(Kim *et al.*, 2003).

DPPH 라디칼 소거 활성 측정 방법은 0.1 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)를 80% 메탄올에 용해하여 흡광도 값이 517 nm에서 1.00±0.02가 나오도록 80% 메탄올을 희석해서 사용하였다. 시료 50 µl에 조정된 DPPH 용액 1.45 ml를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시키고, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(Blois, 1958).

0.3 mM sodium acetate buffer (pH 3.6)와 2,4,6-tri(2-pyridyl)-1,3,5-triazine (TPTZ) reagent in 40 mM HCl, 20

mM FeCl₃을 혼합(10 : 1 : 1, v/v/v)하여 37°C에서 15분간 반응시켜 FRAP 용액을 준비하였다. 시료 50 µl에 FRAP 용액 1.5 ml를 실온에서 30분간 반응하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였다(Benzie and Strain, 1996).

지질과산화물 함량 측정

마우스 뇌 조직을 이용한 지질과산화물 생성 억제 활성 측정을 위하여 ICR (수컷, 4주령)을 실험 동물 공급업체(Samtako, Osan, Korea)로부터 구입 한 후, 항온(22°C), 항습(50-55%)을 유지하며, 12시간 간격으로 낮과 밤을 교대시키는 환경에서 사육하였다(경상대학교 동물실험 인가번호 GNU-131105-M0067). 상기 환경에서 사육한 ICR 마우스의 뇌를 적출한 후 뇌 조직 무게 10 배의 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)를 첨가하여 균질화시켜 원심분리 (12,000×g, 15분, 4°C)한 후 상등액을 실험에 사용하였다(Chang *et al.*, 2001). 시료 0.2 ml에 뇌 조직 상등액 0.1 ml, 10 µM FeSO₄ 0.1 ml, 0.1 mM ascorbic acid 0.1 ml를 혼합하여 37°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 1시간 후, 30% trichloroacetic acid 0.1 ml와 1% thiobarbituric acid 0.3 ml를 첨가하여 80°C water bath에서 20분간 가열한 후, 반응액을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

α-glucosidase 및 Tyrosinase 억제 활성 측정

α-glucosidase 억제 활성은 시료와 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.9) 및 0.5 unit/ml α-glucosidase 효소액을 혼합하여 37°C에서 10분 동안 배양한 후 5 mM *p*-nitrophenyl-α-D-glucopyranosidase를 가하여 37°C에서 5분간 반응시킨 후, 405 nm에서 흡광도를 측정하였다(Aportolidis *et al.*, 2007).

Tyrosinase 저해 활성을 측정하기 위하여 Mason (Mason and Peterson, 1965) 등의 방법을 변형하여 사용하였으며, L-tyrosine과 L-DOPA의 두 가지 기질을 이용하였다. L-tyrosine을 기질로 이용한 방법은 96 well plate에 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 넣고, 시료와 tyrosinase (1,100 units/ml), 1.5 mM L-tyrosine을 순서대로 넣은 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. 반응 후 ELISA microplate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-DOPA를 이용한 tyrosinase의 저해 활성은 67 mM sodium phosphate buffer (pH 6.8)과 시료 40 µl, tyrosinase (125 unit/mL) 40 µl, 10 mM L-DOPA 용액 40 µl를 순서대로 첨가하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. L-tyrosine를 기질로 사용하였을 때는 arbutin을, L-DOPA를 기질로 사용할 경우에는 ascorbic acid를 양성대조구로 사용하

였다.

세포배양 및 세포 생존율 측정

B16/F10 melanoma 세포는 25 mM sodium bicarbonate, 10% fetal bovine serum, 50 units/ml penicillin 및 100 µg/ml streptomycin이 포함하는 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) 배지를 배양액으로 하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

B16/F10 세포를 96 well plate에 1×10⁴ cell/ml의 농도로 분주하고, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하여 세포를 부착시킨다. 여기에 시료를 농도별로 각 well에 처리하여 48시간 배양 후, 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 용액을 첨가 하여 배양기에서 반응시킨 후, 3시간 뒤 DMSO를 이용하여 세포를 용해시켜 ELISA microplate reader에서 570 nm를 측정하였다. 세포 생존율은 시료 무침가군을 100%로 하여 상대적인 세포 성장률을 측정하였다(Sohn *et al.*, 1989).

멜라닌 생성 저해 활성 측정

B16/F10 melanoma 세포를 24 well plate에 well 당 4×10⁴ cell을 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 시료 200, 500, 1000 µg/ml와 1 µM의 α-MSH를 처리하여 37°C에서 48시간 동안 배양하였다. 배지를 모두 제거하고 trypsin을 처리하여 세포를 회수하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상등액을 제거한다. 물에 불용성을 나타내는 멜라닌을 액화시키기 위하여 1 N-NaOH in 10% DMSO를 첨가하고 80°C water bath에서 20분간 방치하여 멜라닌을 완전히 녹인 후 96 well plate에 100 µl 씩 옮겨 490 nm에서 흡광도를 측정하였다(Hosoi *et al.*, 1985).

HPLC를 통한 생리활성물질 분석

잔대 순 아세트산에틸 분획물의 생리활성 물질을 동정하기 위하여 High-Performance liquid chromatography (HPLC, Ultramate 3000 series, Dionex, CA, USA) 분석을 수행하였다. 시료는 1000 µg/ml로 메탄올에 용해한 후 0.45 µm filter를 이용하여 여과한 뒤 분석에 사용하였다. C₁₈ column (250×4.6 mm, 5.0 µm, Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 이용하였고, 이동용매는 0.1% formic acid (A)와 100% MeOH (B)의 조성비를 0-100% (0-30 min)로 총 30분간 분석하였다. 시료의 주입량은 20 µl, 이동상의 유속은 1.0 ml/min이며 UV 검출장치의 파장은 diode array detector (DAD)로 310 nm에서 분석하였다. 검출 파

장에 대한 UV 스펙트럼은 분석 파장을 저장하고 표준물질의 파장과 비교하여 유사성을 판단하였고, 검출된 생리 활성물질의 정량 분석을 위해 시료와 같은 방법으로 표준물질의 검량선을 통해서 페놀성 화합물의 정량분석을 수행하였다.

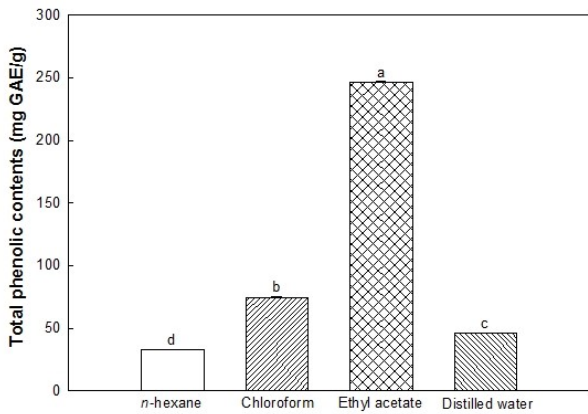
통계처리

모든 실험은 3회 반복 실행하여 mean±SD로 나타냈으며, 각 평균값에 대한 유의성 검증은 SAS software (version 9.1, SAS institute, Cary, NC, USA)를 이용하여 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 실시하고, Duncan의 다중범위검정법 (Duncan's multiple range test)으로 각 시료간의 유의차를 5% 수준에서 검증하였다.

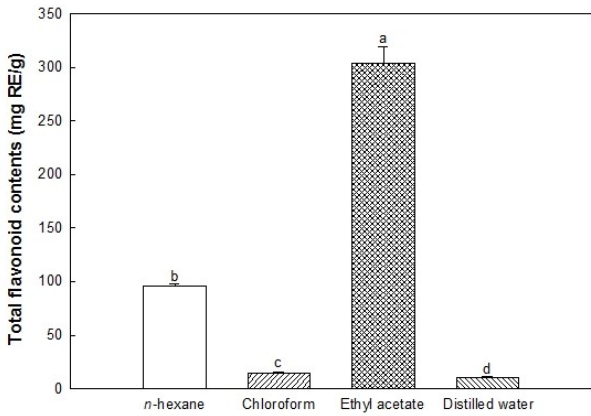
결과 및 고찰

총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

페놀산(phenolics) 및 플라보노이드(flavonoids) 등을 포함하는 폴리페놀 화합물은 식물의 2차 대사산물로서 대다수의 고등식물에 가장 많은 비율로 함유되어 있는 항산화 물질이다. 폴리페놀 화합물은 산화적 스트레스를 저해하여 항산화 활성 및 라디칼 소거 활성을 가지는 것으로 알려져 있으며, 플라보노이드는 자외선 차단, 항돌연변이 및 항염증의 효능을 나타내는 것으로도 보고되고 있다(Woo *et al.*, 2012). 잔대 순의 총 페놀성 화합물 함량은 노말 헥세인(*n*-hexane), 클로로포름(chloroform), 아세트산에틸(ethyl acetate) 및 물 분획물(distilled water)에서 각각 33.00, 74.67, 246.25, 45.83 mg Gallic Acid Equivalent/g (mg GAE/g)으로 아세트산에틸 분획물이 유의적으로 가장 높은 함량을 나타내었다(Fig. 1A). 각 분획물의 총 폴리페놀 함량은 아세트산에틸, 클로로포름, 물, 노말 헥세인 순서로 낮아졌다. 총 플라보노이드 함량을 분석한 실험의 결과는 총 폴리페놀 함량의 결과와 유사하게 아세트산에틸 분획물에서 303.94 mg Rutin Equivalent/g (mg RE/g) 으로 다른 분획물과 비교하여 상대적으로 높은 함량을 나타내었다. 아세트산에틸 분획물 이외의 노말 헥세인산, 클로로포름, 물 층에서는 각각 95.54, 14.31, 10.60 mg RE/g의 총 플라보노이드 함량을 나타내었다(Fig. 1B). Kim *et al.* (2009)등의 연구에서 잔대 잎 에탄올 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 146.7 mg TE/g, 99.4 mg QE/g으로 나타났다. 이에 비해 본 연구에서 사용된 EFAT (ethyl acetate fraction from *Adenophora triphylla* var. *japonica* sprout)는 잔대 잎의 에탄올 추출물보다 비교적으로 다량의 폴



(A)



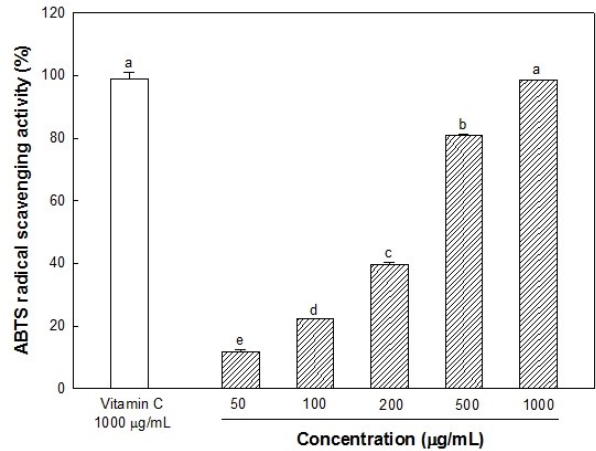
(B)

Fig. 1. Total phenolic contents (A) and total flavonoid contents (B) of each fraction from *Adenophora triphylla* var. japonica sprout. Data were statistically considered at $p < 0.05$, and different small letters in graph represent statistical difference.

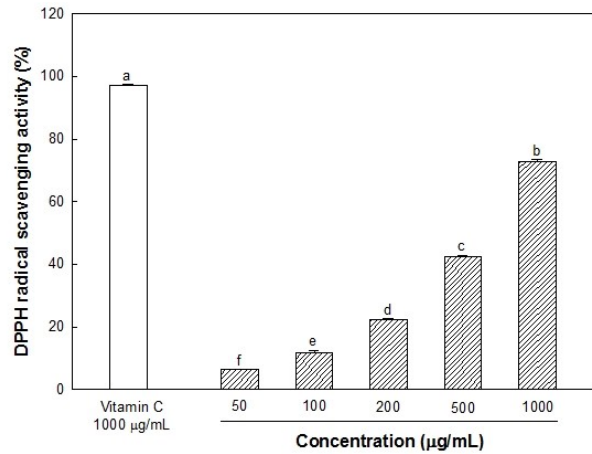
리페놀과 플라보노이드 함량을 가지는 것으로 판단되며, 이로 인해 상대적으로 우수한 항산화 효과를 나타낼 것으로 사료된다. 각 분획물별 결과에 따라 가장 높은 총 페놀과 총 플라보노이드 함량을 나타낸 잔대 순 아세트산에틸 분획물(EFAT)을 이용하여 이후 실험을 진행하였다.

항산화 활성 효과

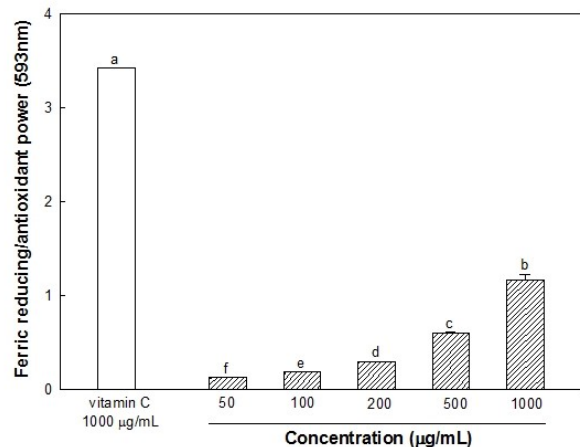
ABTS 라디칼 소거 활성은 ABTS와 과황산칼륨에 의해 생성된 청록색의 ABTS 라디칼이 시료에 포함된 항산화 물질에 의해 라디칼이 제거되어 탈색되는 색 변화를 이용한 방법이다 (Roberta *et al.*, 1999). EFAT의 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정 한 결과는 Fig. 2A와 같으며 농도가 증가함에 따라 라디칼 소거



(A)



(B)



(C)

Fig. 2. ABTS radical scavenging activity (A), DPPH radical scavenging activity (B) and Ferric reducing/antioxidant power assay (C) of EFAT. Data were statistically considered at $p < 0.05$, and different small letters in graph represent statistical difference.

활성이 증가하는 경향을 나타내었다. EFAT 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 98.98%의 라디칼 소거 활성을 나타내었으며 이는 동일한 농도의 양성대조군인 vitamin C와 유사한 활성을 나타내며 EFAT이 vitamin C와 비슷한 라디칼 소거능이 있다는 것을 확인하였다. DPPH 라디칼 소거 활성을 측정된 결과는 농도 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서 72.85%로써 vitamin C와 비교하였을 때 다소 낮은 활성을 나타냈다(Fig. 2B). 그러나 ABTS 라디칼 소거활성과 유사하게 분획물의 처리농도가 증가함에 따라 점차적으로 라디칼 소거활성이 증가하는 경향을 보였다. ABTS 라디칼 소거활성이 DPPH 라디칼 소거활성 보다 높게 나타난 이유는 ABTS 법은 소수성과 친수성 모두를 측정할 수 있는 장점을 가지고 있기 때문에 ABTS 라디칼 소거 활성이 더 감도 높게 나타난 것으로 판단된다(Roberta *et al.*, 1999). 라디칼 소거 활성 결과들을 종합하면 EFAT의 라디칼 소거 활성은 농도가 증가함에 따라 항산화 능력이 증가하는 경향을 보여주었다.

FRAP를 이용하여 총 항산화력을 측정하는 방법은 colored ferrous tripyridyl triazine complex에 의해 ferric ion이 ferrous로 전환되어지는 과정을 분석하여 샘플의 항산화 능력을 측정하는 방법이다. 낮은 pH에서 환원제에 의해 ferric tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) 복합체가 ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ)으로 환원되는 원리에 기초하여 대부분의 항산화제가 환원력을 가지고 있다는 점에 착안하여 고안되어진 방법이다(Benzie and Strain, 1996). EFAT을 이용하여 FRAP assay에 의한 항산화 활성을 측정된 결과는 Fig. 2C와 같으며 분획물의 농도가 증가함에 따라 활성이 증가하는 농도의존적인 경향을 보였으며 농도 1000 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 1.17의 가장 높은 흡광도 값을 나타냈다. Osawa (1994)는 식물로부터 얻어진 페놀성 화합물의 항산화 효과 및 생리학적 기능은 주로 산화환원력에 의한 것이라고 보고하였다. 또한 Woo *et al.* (2012) 등은 천연식물자원에 포함된 총 페놀 및 플라보노이드 화합물이 라디칼 소거 활성을 나타낸다고 보고하였다. 이들 연구 결과를 고려할 때, EFAT에 함유되어 있는 우수한 항산화 효과는 다양한 페놀성 화합물과 플라보노이드 성분에 의한 것으로 판단된다.

지질과산화물 함량

다량의 자외선에 노출되면 피부조직 및 세포에서 생물학적 반응에 의해 활성산소가 생성되고 세포막의 구성성분인 불포화 지방산을 공격하여 지질과산화 반응을 일으켜 체내 지질과산화물의 축적을 일으킨다. 이는 결국 피부의 효소적, 비효소적 항산화 방어 체계를 붕괴시켜 염증반응, 색소침착, 노화를 유발하

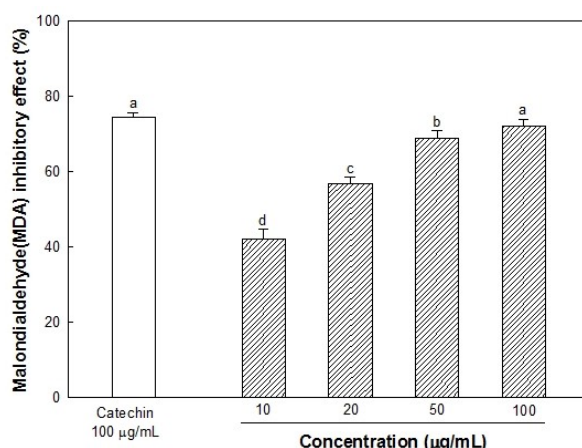


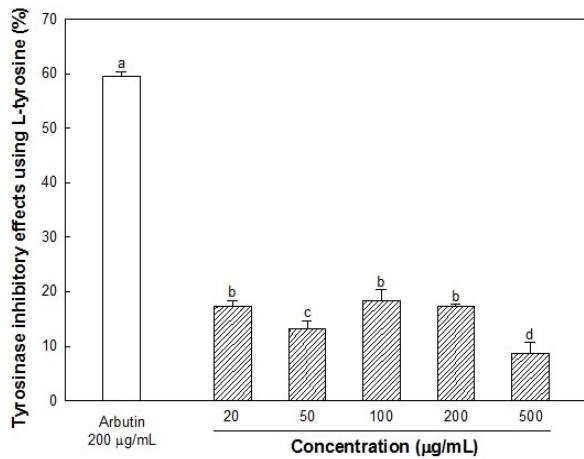
Fig. 3. Malondialdehyde (MDA) inhibitory of EFAT. Data were statistically considered at $p < 0.05$, and different small letters in graph represent statistical difference.

는 것으로 알려져 있다(Jeong, 1991). 따라서, EFAT의 지질과산화 중간생성물인 MDA 생성 억제 효과를 알아본 결과는 Fig. 3과 같다. EFAT은 농도가 증가함에 따라 지질과산화물 생성을 유의적으로 억제하는 경향을 나타내었으며, 최고농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 과 동일한 농도의 양성 대조군인 카테킨은 각각 72.08%, 74.37%로 유사한 저해 효과를 보였다. 이러한 결과로 볼 때 EFAT은 체내의 활성산소에 의해 발생하는 지질과산화물을 억제시킬 수 있는 효과가 뛰어난 것으로 사료된다.

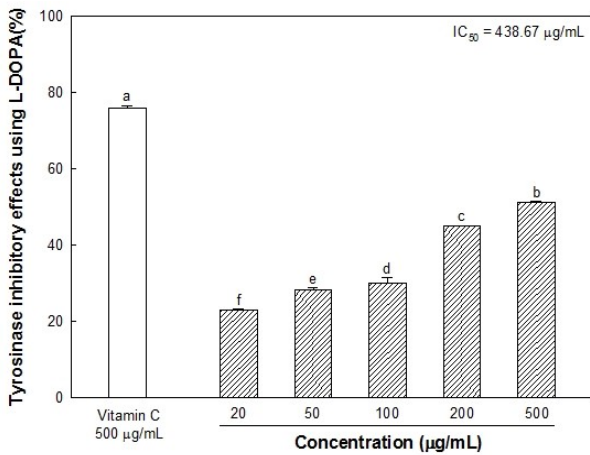
자외선에 의해 생성된 활성산소가 피부에 색소 침착을 촉진한다는 메커니즘에 대하여 Tobin and Thody (1994) 등은 활성산소를 제거하면 멜라닌 생합성을 억제하는데 효과적이라는 연구를 보고하였고, Han and Jung (2003) 등은 활성산소를 제거하는 항산화 효과를 가진 식물들은 멜라닌 생합성의 주요 효소인 tyrosinase를 억제할 수 있는 유효 성분이 다량 함유되어 있다고 보고하였다. 본 실험에서 EFAT가 나타내는 뛰어난 항산화 효과는 연속적인 산화과정에 의해 발생하는 멜라닌 형성을 억제하는데 도움이 될 수 있는 소재라고 사료되어진다. 따라서 tyrosinase의 glycosylation에 작용하는 α -glucosidase, 멜라닌 생성의 주요 효소인 tyrosinase 억제 활성 및 B16/F10 세포에서의 멜라닌 생성 억제효과를 평가함으로써 EFAT의 미백효과와 함께 개략적인 기작을 알아보려 한다.

Tyrosinase 억제 활성 효과

Tyrosinase는 멜라노솜 내에서 멜라닌 생성을 조절하는 산화 효소로서, 2 단계의 멜라닌 합성 반응에 관여하는 것으로 알



(A)



(B)

Fig. 4. Tyrosinase inhibitory effect of EFAT using L-tyrosine (A) and L-DOPA (B). Data were statistically considered at $p < 0.05$, and different small letters in graph represent statistical difference.

려져 있다. 첫 번째 단계는 tyrosine을 산화시켜 dihydroxy-phenylalanine (DOPA)을 생성하며, 두 번째 단계에서는 생성된 DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 만드는 DOPA 산화효소로서 산화되는 과정을 촉매 함으로써 멜라닌 생합성을 촉진하는 핵심 효소이다(Kobayashi *et al.*, 1994). 본 연구에서 멜라닌 합성 과정의 가역적 산화반응에 대한 억제 활성을 측정하기 위하여 L-tyrosine과 L-DOPA를 기질로 사용하여 측정된 결과는 각각 Fig. 4A와 Fig. 4B와 같다. 먼저 L-tyrosine에 hydroxylation을 시키는 EFAT의 tyrosinase 저해 활성 측정된 결과, 양성 대조군인 arbutin 200 µg/ml 처리 시 59.47%로 나타났으며 동일한 농도의 EFAT 처리 시 17.37%로 상대적으로 낮은 저해효

과를 나타내었다(Fig. 4A). 또한 모든 농도에서 양성대조군인 arbutin 대비 유의적인 tyrosinase 저해 효과가 나타나지는 않았다. L-DOPA를 사용하여 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과는 Fig. 4B와 같다. L-tyrosine의 tyrosinase 저해 활성과는 다소 다르게 농도 의존적인 경향을 보였으며 IC_{50} 값은 438.67 µg/ml로 나타났다. 최고 농도인 500 µg/ml에서 51.27%의 저해 활성을 보여주며 양성대조군인 vitamin C 보다는 낮은 활성을 나타내지만 시료가 천연 소재 추출물임을 감안하면 비교적 높은 저해 활성을 나타낸 것으로 판단된다. 결국 두 가지 기질을 사용하여 tyrosinase 저해 활성을 측정된 결과를 바탕으로 판단할 때, EFAT의 tyrosinase 저해효과는 melanogenesis의 L-tyrosine이 L-DOPA로 산화되는 반응보다 DOPA가 L-DOPA quinone으로 산화되는 반응에 관여함으로써 일정 수준의 미백 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단된다.

선이질풀(*Geranium kramerii*) 추출물은 직접적인 tyrosinase 활성 저해 및 세포 내 tyrosinase 발현을 억제시킴으로써 멜라닌 생합성을 저해하는 것으로 나타났다(Kim, 2016). 우수한 피부 미백 개선 효과로 보고되어진 선이질풀의 tyrosinase 저해 활성의 IC_{50} 은 456.86 µg/ml이며 이와 비교하여 EFAT의 경우, 50% tyrosinase 저해 활성 농도는 438.67 µg/ml로써 선이질풀 추출물 보다 뛰어난 저해 효과를 보여줌으로써 미백 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인하였다.

α-glucosidase 억제 활성 효과

Tyrosinase는 당단백질을 만드는 glycosylation을 통해 생성되며, 이 과정에 관여하는 여러 가지 효소 중 α-glucosidase를 저해함으로써 tyrosinase를 급속하게 folding시켜 copper가 없는 불활성화된 형태를 이루게 된다(Mikami *et al.*, 2013). 따라서 tyrosinase는 멜라노솜으로 이동하지 못하거나 이동하더라도 변형된 구조로 이동하여 tyrosinase 활성을 나타내지 못하므로 멜라닌을 생성할 수 없게 된다(Petrescu *et al.*, 1997). EFAT을 이용한 α-glucosidase 억제 활성 측정 결과는 Fig. 5와 같으며, 분획물의 농도가 높아짐에 따라 α-glucosidase 억제 활성이 증가하는 경향을 나타내었다. 농도 500 µg/ml에서는 97.35%로 양성대조군인 acarbose과 유사한 저해효과를 나타냈고, α-glucosidase 억제 활성의 IC_{50} 값은 41.93 µg/ml로 나타났다.

피부미백효과를 나타내는 것으로 알려진 연자육(*Nelumbo nucifera* Gaertner) 추출물의 미백 효과는 tyrosinase 활성을 직접적으로 저해 하는 것보다 α-glucosidase 저해효과에 의한 tyrosinase의 glycosylation을 억제함으로써 미백 효과를

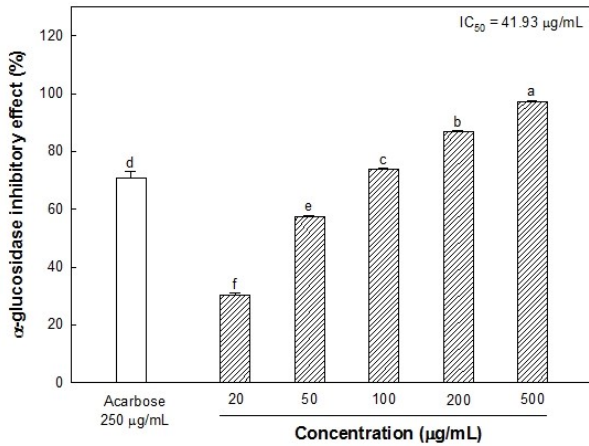
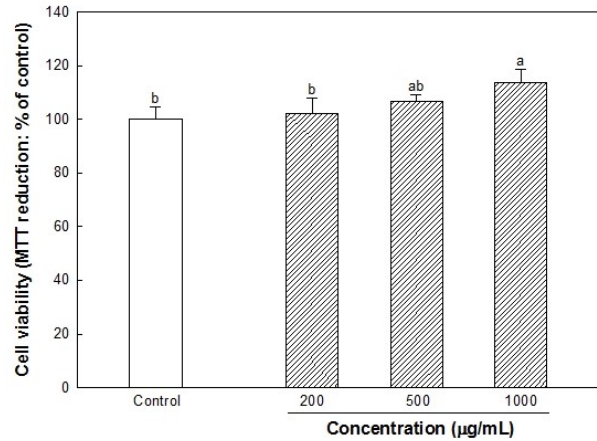


Fig. 5. α -glucosidase inhibitory effect of EFAT. Data were statistically considered at $p < 0.05$, and different small letters in graph represent statistical difference.

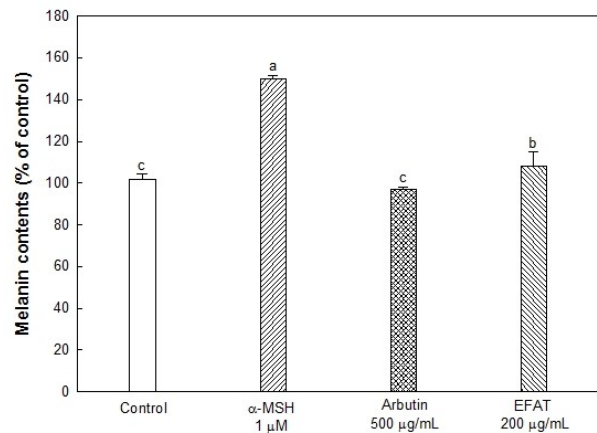
나타내는 것으로 보고하였다(Lee *et al.*, 2013). 또한, 갈근 (*Pueraria lobata*) 추출물의 미백효과는 tyrosinase의 α -glucosidase 저해제로 작용하여 tyrosinase의 번역 후 수식되는 과정을 억제함으로써 멜라닌 생성을 저해한다고 보고하였다(Kim *et al.*, 2016). 이러한 결과를 바탕으로 볼 때, 갈근 아세트산에틸 분획물의 IC_{50} 값은 247.8 $\mu\text{g/ml}$ 로 EFAT 값과 비교했을 때 약 6배 더 우수한 α -glucosidase 저해 활성을 나타내는 것으로 판단된다. 이러한 결과들을 종합해 볼 때, EFAT의 경우 DOPA가 L-DOPA quinone으로 산화되는 과정에서의 tyrosinase 저해효과 뿐만 아니라, 뛰어난 α -glucosidase 저해효과를 나타냄에 따라 다양한 기작을 갖는 미백소재로의 가능성을 제시할 수 있다고 사료된다.

멜라닌 생성 저해 활성 효과

멜라닌 생성을 조절하는 것에는 자외선, cytokine 및 호르몬 등의 다양한 촉진인자들이 존재하며, 그 중 α -MSH (melanocyte stimulating hormone)가 중요한 역할을 하는 호르몬으로 알려져 있다. α -MSH는 피부를 포함한 여러 말초조직에서 분비되는 pleiotropic molecule로써 뇌하수체에서 분비되며 3-isobutyl-1-methyl-xanthine (IBMX), forskolin, dibutyryl cAMP와 마찬가지로 cAMP 의존형 신호전달 경로인 PKA (cAMP-dependent protein kinase) 경로로 멜라닌 합성을 자극한다(Hosoi *et al.*, 1985). 멜라닌 생성 저해효과를 측정하기에 앞서 EFAT가 B16/F10 melanoma cell의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 세포 생존율을 측정된 결과는 Fig. 6A와 같다. EFAT을 처리



(A)

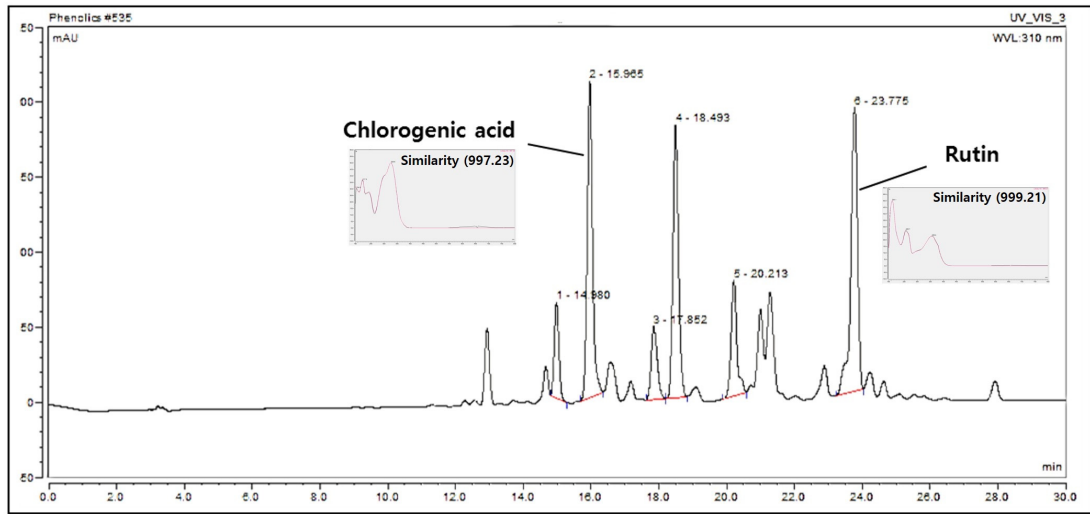


(B)

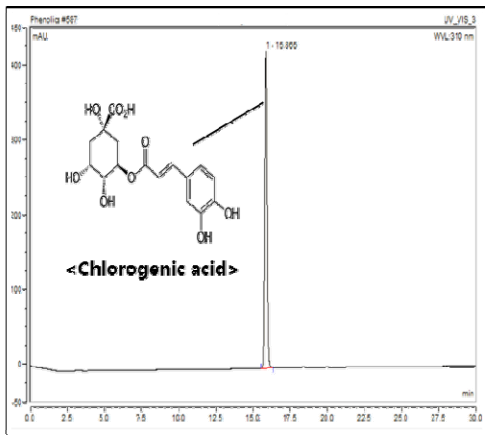
Fig. 6. Cell viability (A) and melanin contents (B) of EFAT. Data were statistically considered at $p < 0.05$, and different small letters in graph represent statistical difference.

하였을 때 전체 처리농도(200–10,000 $\mu\text{g/ml}$)에서 세포 생존율에 영향이 없음을 확인함에 따라, 최소 농도 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포 내 멜라닌 생성 저해효과를 측정하였다.

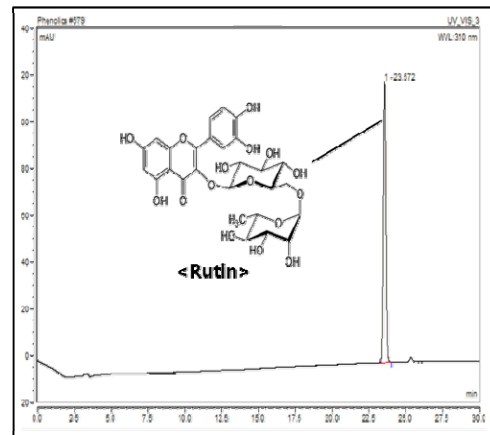
B16/F10 melanoma cell을 이용하여 멜라닌 생성 저해효과를 측정된 결과는 Fig. 6B와 같다. α -MSH 처리군의 멜라닌 함량은 대조군 대비 약 48%가 증가하였으며, 양성대조군으로 사용된 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 arbutin은 control과 유사한 멜라닌 생성량을 보였다. α -MSH 처리군 대비 EFAT의 200 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 108.04% 수준으로 양성 대조군인 α -MSH 대비 유의적으로 우수한 멜라닌 합성 저해 효과를 나타내었으며, 약 40% 정도 감소하는 효과를 나타냈다. Kim *et al.* (2015) 등의 연구에서는 바위수염(*Myelophycus simplex* Papenfuss) 추출물의 300 $\mu\text{g/ml}$ 농



(A)



(B)



(C)

Fig. 7. HPLC chromatogram of the EFAT (A) and chlorogenic acid as a standard (B) and rutin as a standard (C) at 310 nm. Phenolics were analyzed by comparing their retention time (RT) and UV spectra of standards.

도에서 41%의 멜라닌 생합성 억제 효과를 나타냈으며, 천연 미백 소재로서의 가능성을 보고하였다. 바위수염 추출물에 비해 상대적으로 더 낮은 EFAT 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 41%의 저해 효과를 나타내었으며, 이러한 결과를 고려할 때 EFAT의 α -glucosidase 저해 활성 및 L-DOPA 산화과정에서의 tyrosinase 저해 효과에 의한 B16/F10 세포에서의 멜라닌 생성 억제로 판단되어진다.

HPLC를 통한 생리활성물질 분석

항산화 활성 및 melanin 생성 억제효과를 통하여 미백 활성을 나타내는 EFAT의 주요 생리활성물질을 분석한 결과는 Fig.

7A와 같다. HPLC 분석 결과 310 nm의 UV-VIS 파장에서 15.96분과 23.77분에서 확인된 피크는 EFAT의 주요 생리 활성 물질인 것으로 판단되며, 시료와 같은 방법으로 표준물질인 chlorogenic acid와 rutin의 retention time과 UV 스펙트럼을 비교하였을 때 similarity가 매우 높은 것으로 확인되었다(Fig. 7B & 7C). EFAT의 주요 생리 활성 물질로 확인된 chlorogenic acid ($y=0.21x+5.99$, $R^2=0.99$)와 rutin ($y=0.64x+1.41$, $R^2=0.99$)을 정량 분석한 결과 각각 181.83 ± 26.11 , 57.20 ± 6.22 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of dried weight로 나타났다.

Chlorogenic acid는 caffeic acid와 quinic acid의 에스테르 결합으로 형성된 페놀성 화합물의 일종이다. 항산화 효과를 바

탕으로 자유 라디칼 제거 및 과산화물 형성에 관여하는 효소를 억제한다고 알려져 있고, 생체 내에서는 산화적 손상의 원인으로 발생하는 암이나 심혈관계 질환을 예방할 수 있는 가능성이 있다고 보고되고 있다(Chen *et al.*, 1997). 또한 Li *et al.* (2014) 등에 의하면 chlorogenic acid는 8-methoxypsoralen에 의해 활성화된 B16/F10 melanoma cell에서 diphenol의 효소 산화를 억제함으로써 멜라닌 생성을 억제할 수 있다고 보고하였고 Cha *et al.* (2014) 등의 연구에서는 chlorogenic acid가 UVB 방사선에 의해 유도된 산화 스트레스로부터 세포를 보호한다고 보고하였다. 퀴세틴의 배당체인 rutin은 천연 항산화제로 잘 알려진 플라보노이드의 일종으로, Lee *et al.* (2003) 등의 연구에 따르면 UV-B에 조사된 HM3KO 세포의 멜라닌 생성에 rutin이 멜라닌 생성억제 및 tyrosinase 저해 활성이 감소시키는 것으로 보고하였다. 또한, Lee (2014)의 연구에 따르면 rutin은 콜라겐, 엘라스틴을 합성하는 인간진피섬유아세포(normal human dermal fibroblasts)에서 활성 산소 생성억제효과를 제거하는 역할 이외에도 세포 내의 항산화 유전자의 발현을 조절할 수 있는 것으로 보고하였다. 이러한 결과들을 종합하여 볼 때, 잔대 순이 갖는 *in vitro* 항산화 활성, α -glucosidase, tyrosinase 저해활성 및 B16/F10 melanoma cell에서의 멜라닌 생성 억제 효과는 주요 생리활성물질인 chlorogenic acid와 rutin에 의한 효과로 사료되어진다. 이러한 물질들은 세포노화와 직접적인 관련성을 나타냄에 따라 피부 미백효과를 나타낼 수 있는 기능성 원료로서의 가능성이 있을 것으로 사료되며, 따라서 이러한 물질들을 함유하는 잔대 순은 한 피부미백효과에 도움을 줄 수 있는 소재가 될 것으로 판단되어진다. 하지만, HPLC 분석에 의해 확인되지 않은 상대적 미량 물질들 분석을 위해 LC/MS/MS 등의 추가적인 연구와 함께, EFAT가 나타내는 미백효과에 대한 분자생리학적 기작 연구가 향후 필요하다고 사료된다.

적 요

본 연구에서는 잔대(*Adenophora triphylla* var. *japonica*)순 아세트산에틸 분획물의 *in vitro* 미백 효과에 대하여 연구하였다. EFAT는 다른 분획물과 비교하여 뛰어난 총 폴리페놀 함량(246.25 mg GAE/g)과 총 플라보노이드 함량(303.94 mg RE/g)을 나타내었으며, ABTS, DPPH 라디칼 소거 활성, FRAP assay 및 MDA 억제 활성에서 상대적으로 우수한 항산화 활성을 보였다. EFAT는 α -glucosidase 억제 활성에서 41.93 μ g/ml의 IC₅₀ 값을 나타내었으며, L-DOPA를 기질로 이용한 tyrosinase 억

제 활성의 IC₅₀은 438.67 μ g/ml로 tyrosinase의 산화 반응을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다. 또한 B16/F10 melanoma 세포에서 α -MSH에 의해 유도된 멜라닌을 200 μ g/ml의 농도에서 108.04%로 높은 저해 효과를 보여주었다. 따라서 EFAT는 α -glucosidase 억제 효과를 통한 tyrosinase의 glycosylation을 저해 작용과 tyrosinase의 가역적인 산화반응 저해를 통한 멜라닌의 생성을 억제하는 것으로 사료된다. 마지막으로 EFAT의 생리활성 물질을 확인하기 위해 HPLC 분석을 실시한 결과, 주요 생리활성 물질은 chlorogenic acid와 rutin으로 추정되었다. 이러한 연구 결과를 바탕으로 볼 때, EFAT는 자외선 등으로부터 발생하는 산화적 스트레스로 발생하는 멜라닌의 생합성 저해 효과를 통하여, 미백 기능성을 함유한 향장소재로의 이용 가능성이 높다고 판단되어진다.

사 사

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업(NRF-2015R1D1A3A01015931) 및 2017년도 산림청의 산림생명자원 소재발굴연구사업(2017028A00-1719-BA01)의 지원을 받아 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

References

- Apostolidis, E., Y.I. Kwon and K. Shetty. 2007. Inhibitory potential of herb, fruit, and fungal-enriched cheese against key enzymes linked to type 2 diabetes and hypertension. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 8:46-54.
- Benzie, I.F. and J.J. Strain. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 239:70-76.
- Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181:1199-1200.
- Cha, J.W., M.J. Piao, K.C. Kim, C.W. Yao, J. Zheng, S.M. Kim and J.W. Hyun. 2014. The polyphenol chlorogenic acid attenuates UVB-mediated oxidative stress in human HaCaT keratinocytes. *Biomol. Ther.* 22(2):136-142.
- Chang, C.C., M.H. Yang, H.M. Wen and J.C. Chen. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10:178-182.
- Chang, S.T., J.H. Wu, S.Y. Wang, P.L. Kang, N.S. Yang and L.F. Shyur. 2001. Antioxidant activity of extracts from

- Acacia confusa* bark and heartwood. J. Agr. Food Chem. 49:3420-3424.
- Chen, J.H. and C.T. Ho. 1997. Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. J. Agr. Food Chem. 45:2374-2378.
- Choi, H.J., M.J. Chung and S.S. Ham. 2010. Antiobese and hypocholesterolaemic effects of an *Adenophora triphylla* extract in HepG2 cells and high fat diet-induced obese mice. Food Chem. 119:437-444.
- Gum, S.I., D.U. Lee and M.K. Cho. 2007. Protective effects of water extracts composed of *Adenophora triphylla* var. japonica Hara on the acetaminophen-induced hepatotoxicity. Korean J. Food Sci. Technol. 39:688-693 (in Korean).
- Han, D.H. and K.S. Park. 2006. Analysis on the changes and the using condition of functional cosmetics. Res. J. Costume. 14:1056-1068 (in Korean).
- Han, Y.S. and E.S. Jung. 2003. A study of correlation between antioxidant activity and whitening effect of plant extract. Korean Aesthetic. Soc. 1:11-22.
- Hill, H.Z., W. Li, P. Xin and D.L. Mitchell. 1997. Melanin: a two edged sword?. Pigment Cell Melanoma Res. 10:158-161.
- Hosoi, J., E. Abe, T. Suda and T. Kuroki. 1985. Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 α , 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. Cancer Res. 45:1474-1478.
- Jeon, Y.S., Y.J. Jung, J.K. Youm, Y.K. Kim and S.N. Kim. 2013. Inhibitory effect of *Endarachne binghamiae* extract on melanin synthesis. Korean J. Plant Res. 26:526-532 (in Korean).
- Jeong, H.Y. 1991. Aging· free radical· arteriosclerosis. J. Life Sci. 1:2-14.
- Kim, D.E., Y.S. Hang, B.Y. Chang, J.H. Han, D.S. Kim, H.S. Kim, H.K. Cho and S.Y. Kim. 2016. Whitening effect and mechanism of aerial part of *Pueraria lobata*. Korean J. Pharmacogn. 47:343-351.
- Kim, D.O., S.W. Jeong and C.Y. Lee. 2003. Antioxidant capacity of phenolic phytochemicals from various cultivars of plums. Food Chem. 81:321-326.
- Kim, H.S. 2016. The anti-melanogenic effect of *Geranium krameri* extract. Korean J. Food Sci. Technol. 48:72-76.
- Kim, H.S., D.H. Kwon, J.M. Cheon, E.O. Choi, J.H. Kim, M.H. Han, Y.H. Choi and H.J. Hwang. 2015. Effects of *Myelophycus simplex* Papenfuss methanol extract on adipocyte differentiation and adipogenesis in 3T3-L1 preadipocytes. J. Life Sci. 25:62-67 (in Korean).
- Kim, S., M.S. Park, H.K. Park and Y.S. Jang. 1995. Studies on the seed development and germination of *Adenophora triphylla* DC. Korean J. Medicinal Crop. Sci. 3:66-70 (in Korean).
- Kim, S.S., J.H. Ha, M.H. Jeong, J.H. Ahn, W.B. Yoon, S.J. Park and H.Y. Lee. 2009. Comparison of biological activities of fermented *Codonopsis lanceolata* and fresh *Codonopsis lanceolata*. Korean J. Med. Crop. Sci. 17:280-285 (in Korean).
- Kobayashi, T., K. Urabe, A. Winder, C. Jimenez-Cervantes, G. Imokawa, T. Brewington and V.J. Hearing. 1994. Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. EMBO J. 13:5818-5825.
- Lee, J.M., E.S. Son, S.S. Oh and D.S. Han. 2001. Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. J. Korean Soc. Food Cult. 16:504-514 (in Korean).
- Lee, J.Y., K.R. Im, T.K. Jung and K.S. Yoon. 2013. The inhibitory effects of *Nelumbo nucifera* Gaertner extract on melanogenesis. Korean J. Soc. Cosmet. Sci. 28:137-145 (in Korean).
- Lee, S.N. 2014. The antioxidant effect of rutin in human dermal fibroblasts damaged by reactive oxygen species. Asian J. Beauty Cosmetol. 12:831-836.
- Lee, S.Y., Y.M. Kim, J.K. Lee, S.J. Yoo, Y.J. Mun and W.H. Woo. 2003. The effect of rutin on the melanogenesis and nitric oxide in UVB-irradiated HM3KO human melanoma. Korean J. Anat. 36:49-56 (in Korean).
- Li, H.R., M. Habasi, L.Z. Xie and H.A. Aisa. 2014. Effect of Chlorogenic Acid on Melanogenesis of B16 Melanoma Cells. Mol. 1(9):12940-12948.
- Mason, H.S. and E.W. Peterson. 1965. Melanoproteins I. Reactions between enzyme-generated quinones and amino acids. Biochim. Biophys. Acta. 111:134-146.
- Mikami, M., T. Sonoki, M. Ito, Y. Funasaka, T. Suzuki and Y. Katagata. 2013. Glycosylation of tyrosinase is a determinant of melanin production in cultured melanoma cells. Mol. Med. Rep. 8:818-822.
- Osawa, T. 1994. Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In Uritani, I., V.V. Garcia and E.M. Mendoza (eds.), Postharvest biochemistry of plant food-materials in the tropics, Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan. pp. 241-251.
- Papa, S. and V.P. Skulachev. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. Mol. Cell Biochem. 174:305-319.
- Petrescu, S.M., A.J. Petrescu, H.N. Titu, R.A. Dwek and F.M.

- Platt. 1997. Inhibition of N-glycan processing in B16 melanoma cells results in inactivation of tyrosinase but does not prevent its transport to the melanosome. *J. Biol. Chem.* 272:15796-15803.
- Roberta, R., N. Pellegrini, A. Protagente, A. Pannala, M. Yang and C. Rice-Evans. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26:1231-1237.
- Sohn, H.J., J.Y. Bock, S.O. Baik and Y.H. Kim. 1989. Determination of lignan compounds in fruits of *Schisandra chinensis* Baillon by capillary-GC (FID). *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 32:350-356 (in Korean).
- Tobin, D. and A.J. Thody. 1994. The superoxide anion may mediate short-but not long-term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis. *Exp. Dermatol.* 3:99-105.
- Woo, K.S., H.I. Seo, Y.H. Lee, H.Y. Kim, J.Y. Ko, S.B. Song and H.S. Jeong. 2012. Antioxidant compounds and antioxidant activities of sweet potatoes with cultivated conditions. *Prev. Nutr. Food Sci.* 41:519-525 (in Korean).

(Received 20 June 2017 ; Revised 10 August 2017 ; Accepted 17 August 2017)