

## 속수자의 멜라닌 생성 억제 물질

김청택,\* 정민환,<sup>o</sup> 김현식,<sup>o</sup> 김호정, 강상진, 강세훈

엘지화학 화장품 연구소, <sup>o</sup>엘지화학 분석센터

### Inhibitors of melanogenesis from Euphorbiae Lathyridis Semen

Cheong-Taek Kim,\* Min-Hwan Jung<sup>o</sup>, Hyun-Sik Kim<sup>o</sup>, Ho-Jeong Kim,

Sangjin Kang and Se-Hun Kang

Cosmetics R&D Center, LG Chem., Taejon 305-343, Korea

<sup>o</sup>Analytical R&D Center, LG Chem./Research Park(E), Taejon 305-343, Korea

**Abstract** – Two diterpenes and one new sucrose isovaleryl ester having inhibitory effects on melanogenesis in B16 mouse melanoma were isolated from Euphorbiae Lathyridis Semen which has been used in traditional medicine for cancer, tumors and warts. New sucrose isovaleryl ester was identified as  $\alpha$ -D-glucopyranoside, 3,4,6-tris-O-(3-methyl-1-oxobutyl)- $\beta$ -D-fructofuranosyl, 2,6-bis(3-methylbutanoate) and two diterpenes were identified as ingenol-20-palmitate and 5,10-diacetyl-3-benzoyllathyrol(Euphorbia factor L<sub>3</sub>) from their spectral data.

**Key words** – Euphorbiae Lathyridis Semen;  $\alpha$ -D-glucopyranoside, 3,4,6-tris-O-(3-methyl-1-oxobutyl)- $\beta$ -D-fructofuranosyl, 2,6-bis(3-methylbutanoate); ingenol-20-palmitate; 5,10-diacetyl-3-benzoyllathyrol(Euphorbia factor L<sub>3</sub>); B16 mouse melanoma; melanogenesis; melanin

기미, 주근깨 등 피부에 생기는 색소침착은 표피 내에서의 melanin색소의 이상적 증가에 기인하며, 표피기지층에 존재하는 melanocyte라고 불리는 색소 세포내의 melanosome에서 생합성된다. 멜라닌의 주된 생성과정은 아미노산의 일종인 tyrosine이 tyrosinase에 의해 산화되어 dopa, dopaquinone이 되고 이것이 다시 5,6-dihydroxy indole, indole 5,6-quinone로 자동 산화되고 최종적으로 중합에 의해 melanin polymer를 생성하는 것으로 되어있다.<sup>1,2)</sup> 상기의 색소침착을 치유하기 위해 tyrosinase의 활성을 억제하여 멜라닌 생성을 억제하는 hydroquinone, resorcinol등의 페놀 유도체나, L-ascorbic acid와 그 유도체 및 kojic acid, arbutin, lactic acid, glucosamin, tunicamycin 등이 개발되었으나, 피부자극성이나 안정성에 문제가 있어 극히 제한된 양만 사용되고 있다.<sup>3-5)</sup>

본 실험에서는 피부의 과색소침착에 의한 기미, 주근깨 등의 치료제를 개발하고자 멜라노마 세포 시험

법(B16 mouse melanoma assay)을 이용하여 50여종의 생약을 대상으로 멜라닌 생성 억제 효능을 검색한 결과, 속수자 추출물이 우수한 활성을 나타냄을 알 수 있었다. 속수자는 *Euphorbia lathyris* L.의 성숙 종자를 사용하며, 예로부터 이노, 완하약으로서 변비, 부중에 사용되었으며, 속수자경중백즙(續隋子莖中白汁)은 피부 미백용으로도 이용되었으며, 근래의 연구에 의하면 속수자 추출물이 관절염, 기관지염, 면역 억제등의 효과가 있다고 밝혀졌으며, 또한 항암성분인 ingenol-3-hexadecanoate가 함유되어 있다고 보고 되어 있다.<sup>6,7)</sup>

속수자를 분쇄, 압착하여 얻은 속수자 오일에 cyclohexane과EtOH를 가하여 잘 섞은 후, 용매 분획하여 cyclohexane 엑스(지방류)와 EtOH엑스를 얻고, 각각의 분획에 대해 멜라닌 생성 억제 시험을 한 결과, EtOH 분획에서 강한 활성을 관찰하였다. 따라서 EtOH 분획을 각종 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 멜라닌 생성 억제 물질들을 분리하였으며, 각종 spectral 데이터를 바탕으로 각각의 구조를 동정하여 이를 보고하고자 한다.

\*교신저자 : Fax : 042-863-2076

**재료 및 방법**

**실험재료** - 본 실험에서 사용된 속수자는 서울 경동시장에서 구입하여 사용하였다.

**시약 및 기기** - 칼럼크로마토그래피는 silica gel 60(230-400mesh, Merck)과 Sephadex LH-20(20-100 μ, Pharmacia)을, 박층크로마토그래피용 precoated plates는 silica gel 60F<sub>254</sub>(Merck Art.5715)를 사용하였다. HPLC column은 YMC pack-sil column을, mass spectra는 AutoSpec mass spectrometer(Micromass, Manchester, UK)를, NMR spectra는 Bruker DMX-600 FT-NMR spectrometer를, IR spectra는 Shimadzu IR-435를 사용하여 얻었다. 세포배양을 위해 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS(fetal bovine serum), antibiotics와 Trypsin(2.5%)을 Gibco에서 구입하였으며, 그의 각종 시약은 특급 시약을 사용하였다.

**세포배양** - B16 mouse melanoma를 10% FBS, 1% antibiotics를 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.<sup>8)</sup>

**시험물질조제** - 0.3% DMSO를 음성대조군으로, 1 mM arbutin을 양성대조군으로 사용하였으며, compound I, compound II, compound III의 농도는 1 mM arbutin과 유사한 정도의 멜라닌 생성 억제 효과를 보이는 농도인 5 μg/ml, 1 μg/ml, 5 μg/ml의 농도로 각각 조제하였다.

**멜라닌 생성 억제 효능 평가(B16 mouse melanoma assay)** - 60 mm Petri dish에 dish당 3×10<sup>4</sup>개의 세포를 깔아준 후, 각 시험물질을 처리하고, 시료처리 3일 후 0.25% Trypsin-EDTA용액을 처리하여 세포를 수확하고, 원심 분리하여 cell pellet을 얻고, cell pellet의 색깔은 육안으로 판정하였다. 또한, cell pellet을 phosphate buffered saline용액에 현탁하여 세포수를 coulter counter (ZM, Coulter Co.)로 측정하여 1×10<sup>6</sup> 세포수당 1N NaOH용액 1ml을 넣고 세포를 녹인다음, 490 nm에서 흡광도(A<sub>490</sub>/10<sup>6</sup> cells)를 측정하고, 멜라닌양을 합성멜라닌을 사용하여 작성된 표준직선에서 구했다. 시험물질을 처리하지 않은 세포의 멜라닌양과 비교하여 각 시험물질이 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보았다.<sup>9)</sup>

**추출 및 분리** - 속수자 2 Kg을 분쇄하고, 압착기로 압착하여 속수자 오일(680 g)을 얻었다. 속수자 오일에 cyclohexane와 EtOH을 각각 3L 가하고, 용매 분획하여 cyclohexane엑스와 EtOH엑스(32 g)를 얻었

다. EtOH엑스를 실리카겔 칼럼크로마토그래피(CHCl<sub>3</sub>:MeOH=100:1-0:100) 하여 5개의 소분획(Fr.I-Fr.V)으로 나누어 멜라닌생성 억제 효과를 검색한 결과, Fr.I과 Fr.III에서 강한 활성을 확인하였다. Fr.I을 실리카겔 칼럼크로마토그래피 (n-hexane:EtOAc=10:1---1:1)를 반복하여 활성 성분인 compound I(5.4 mg)를 분리하였다. 또한, Fr.III를 실리카겔 칼럼크로마토그래피 (n-hexane:EtOAc=8:1---1:1)와 Sephadex LH-20칼럼크로마토그래피(MeOH)를 반복하여 활성 성분인 compound II(320 mg)와 compound III(1.3 g)를 분리하였다.(Scheme I)

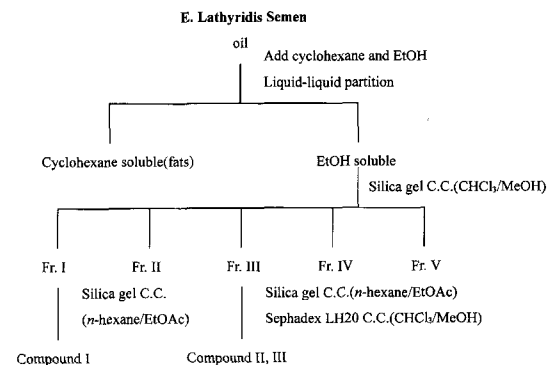
**Compound I** - colorless oil; HRESIMS *m/z* 762.4051 (calcd. for C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>, 762.4038); <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data, see Table I.

**Compound II** - white powder, HRESIMS *m/z* 586.4246 (calcd. for C<sub>38</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub>, 586.4233); <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data, see Table II.

**Compound III** - white powder, HRESIMS *m/z* 522.2640 (calcd. for C<sub>31</sub>H<sub>38</sub>O<sub>7</sub>, 522.2618); <sup>1</sup>H-NMR, see Table II; <sup>13</sup>C-NMR data, see Table III.

**결과 및 고찰**

**compound I의 구조분석** - compound I은 무색 오일상이며, 가수분해물의 mass spectrum으로부터 sucrose와 isovaleric acid를 확인하였다. High resolution electrospray ionization(ESI) mass spectrum에서 분자식이 C<sub>37</sub>H<sub>62</sub>O<sub>16</sub>임을 확인하였으며, [M+Na]<sup>+</sup>는 *m/z* 785.3949 (이론적 계산치와 1.4 mD의 오차)였다. <sup>1</sup>H-NMR spectrum에서 나타난 3종의 피크(5 methylene proton signals[δ<sub>H</sub> 2.22, 2H\*5, m], 5 methi-



**Scheme I.** Extraction and isolation of compounds I, II, III from Euphorbiae Lathyridis Semen.

**Table I.**  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -NMR, COSY and HMBC data for compound I ( $\text{CDCl}_3$ )

	Atom	DEPT	$^1\text{H}(\text{ppm})$	$^{13}\text{C}(\text{ppm})$	COSY	HMBC(H->C, 10Hz)
Glucose	1	CH	4.01	70.7	H-2, 11	C-2, 5
	2	CH	3.32	70.4	H-1,3	C-1, 3, 11
	3	CH	3.93	70.9	H-2, 4	C-1, 2, 4
	4	CH	4.75	71.9	H-3, 5	C-3, 6, 1'
	5	CH	5.48	90.2	H-4	C-1, 3, 4, 6
	11	$\text{CH}_2$	4.54, 4.28	62.7	H-1	C-1, 2, 1'
Fructose	6	Q	-	104.7		
	7	CH	5.46	75.5	H-8	C-6, 8, 10, 1'
	8	CH	5.45	74.0	H-7, 9	C-7, 9, 12, 1'
	9	CH	4.17	78.5	H-8, 12	C-6, 8, 12
	10	$\text{CH}_2$	3.55	63.6		C-6
	12	$\text{CH}_2$	4.39, 4.28	64.1	H-9	C-8, 9, 1'
Isovaleryl	1'	Q	-	171.9		
				172.5		
				172.7		
				172.9		
				174.3		
	2'	$\text{CH}_2 \times 5$	2.29~2.17	43.0~42.7	H-3'	C-1', 3', 4'
3'	$\text{CH} \times 5$	2.09~2.05	25.6~25.5	H-2', 4'	C-1', 2', 4'	
4'	$(\text{CH}_3 \times 2) \times 5$	1.0~0.9	22.3~22.2	H-3'	C-1', 2', 3'	

**Table II.**  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -NMR, COSY and HMBC data for Compound II ( $\text{CDCl}_3$ )

	Atom	DEPT	$^1\text{H}(\text{ppm})$	$^{13}\text{C}(\text{ppm})$	COSY	HMBC(H->C, 10 Hz)
Macrocyclic	1	CH	5.92(a)	130.3	-	C-2, 3, 4, 10, 19
	2	Q	-	138.7	-	-
	3	CH	4.40(s)	80.6	-	C-1, 2, 4, 5, 10, 19
	4	Q	-	84.3	-	-
	5	CH	3.63(s)	73.8	-	C-6, 7
	6	Q	-	136.8	-	-
	7	CH	6.06(d)	128.4	H-8	C-5, 6, 9, 14, 20
	8	CH	4.07(s)	44.1	H-7, 14	C-6, 7, 9, 13, 14
	9	Q	-	206.6	-	-
	10	Q	-	72.5	-	-
	11	CH	2.29	39.8	H-12, 18	C-9, 10
	12	$\text{CH}_2$	1.75, 2.27	31.0	H-11, 13	C-10, 11, 13, 14, 18
	13	CH	0.68	23.1	H-12, 14	C-8, 16(17)
	14	CH	0.95	23.0	H-8, 13	C-7, 13
	15	Q	-	23.9	-	-
	16,17	$\text{CH}_3 \times 2$	1.09, 1.04	28.5, 15.4	-	C-13, 14, 15, 16(17)
	18	$\text{CH}_3$	0.95	17.3	H-11	C-10, 11, 12
19	$\text{CH}_3$	1.83	15.4	-	C-1, 2, 3, 9, 10	
20	$\text{CH}_2$	4.69, 4.50	66.3	-	C-5, 6, 7, 1'	
Palmitate	1'	Q	-	174.0	-	-
	2'	CH	2.28	34.3	H-3'	C-1', 3', n
	3'	$\text{CH}_2$	1.57	24.9	H-2', 4'	C-1', 2', n
	4'-13'(n)	$\text{CH}_2$	1.23	29.7, 29.1		
	14'	$\text{CH}_2$	1.23	31.9		
	15'	$\text{CH}_2$	1.23	22.7	H-14', 16'	
	16'	$\text{CH}_3$	0.85	14.1	H-15'	C-14', 15'
	a	OH				
b	OH					
c	OH					

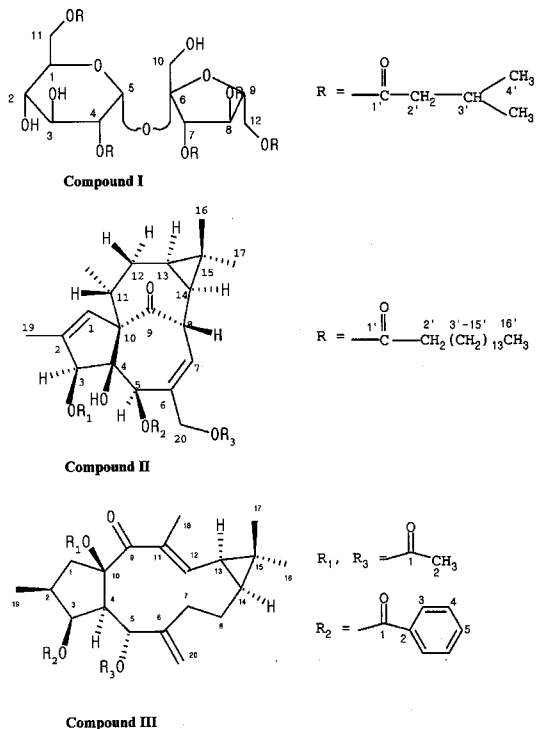
**Table III.**  $^{13}\text{C}$ ,  $^1\text{H}$ -NMR, COSY and HMBC data for Compound III ( $\text{CDCl}_3$ )

	Atom	DEPT	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)	COSY	HMBC(H->C, 10 Hz)
	1	$\text{CH}_2$	3.52(m), 1.70(m)	4805	H-2	C-2, 3, 4, 9, 10, 19
	2	CH	2.35(m)	37.9	H-1, 3, 19	?
	3	CH	5.82(dd)	80.9	H-2, 4	C-1, 10, 1"
	4	CH	2.90(dd)	52.2	H-3, 5	C-5, 6, 9, 10
	5	CH	6.21(d)	65.4	H-4	C-4, 6, 7, 10, 20, 1"
	6	Q	-	144.5	-	-
	7	$\text{CH}_2$	2.10(m), 2.06(m)	34.9	H-8	C-5, 6, 8, 14, 20
	8	$\text{CH}_2$	1.94(m), 1.75(m)	21.6	H-7, 14	C-6, 14
	9	Q	-	196.7	-	-
Macrocyclic	10	Q	-	92.5	-	-
	11	Q	-	134.2	-	-
	12	CH	6.54(d)	146.5	H-13	C-9, 11, 14, 18
	13	CH	1.41(dd)	28.5	H-12, 14(?)	C-11, 14, 16(17)
	14	CH	1.16(m)	35.4	H-8, 13	?
	15	Q	-	25.3	-	-
	16,17	$\text{CH}_3$	1.17(s)	2.90, 16.8	-	C-13, 14, 15, 16(17)
	18	$\text{CH}_3$	1.72(s)	12.4	H-2	C-9, 11, 12
	19	$\text{CH}_3$	0.94(d)	14.2	-	C-1, 2, 3
	20	$\text{CH}_2$	5.01(s), 4.78(s)	115.4	-	C-5, 6, 7,
R1	1'	Q	-	169.7	-	-
	2'	$\text{CH}_3$	2.21(s)	22.0	-	C-10, 1'
	1"	Q	-	166.1	-	-
	2"	Q	-	130.1	-	-
R2	3"	$\text{CH}_2$	8.03(d)	129.6	H-4"	C-1", 3", 4", 5"
	4"	$\text{CH}^*2$	7.45(t)	128.3	H-3", 5"	C-1", 2", 4", 5"
	5"	$\text{CH}^*2$	7.57(t)	133.1	H-4"	C-3", 4"
R3	1'''	Q	-	170.1	-	-
	2'''	$\text{CH}_3$	1.93(s)	20.9	-	C-5, 1'''

ne proton signals [ $\delta_{\text{H}}$  2.07, 1H\*5, m]과 10 methyl proton signals [ $\delta_{\text{H}}$  0.93, 3H\*10, m]는  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY spectrum에서 isobutyl group으로 확인하였고,  $^1\text{H}$ -NMR과 HMQC spectra에서 8 oxymethine proton signals [ $\delta_{\text{H}}$  3.32, 3.93, 4.01, 4.17, 4.75, 5.45, 5.46, 5.48]과 3 oxymethylene proton signals [ $\delta_{\text{H}}$  3.55, 4.39/4.28, 4.54/4.28]을 확인하였다.  $^{13}\text{C}$ -NMR과 DEPT spectra에서 10 methyls, 8 methylenes, 13 methines와 6 quaternary carbons의 signals을 확인하였다.  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY, HMQC spectra로부터 각 protons과 carbons간의 connectivity를 확인하였으며, 3개의 구조단 [-CH<sub>2</sub>-CH-CH-CH-CH-(A), -CH-CH-CH-CH<sub>2</sub>-(B), (CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-CH-CH<sub>2</sub>-(C)]이 있음을 알 수 있었고, HMBC spectrum에서 나타나는 long-range  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  correlations으로부터 각 구조단의 connectivity를 확립하였다(Table I, Fig. 1). Ester carbonyl carbon peaks [ $\delta_{\text{C}}$  171.9, 172.5, 172.7, 172.9, 174.3]는 상기의 구조단(C)에 기인한 isovalerate의 carbonyl car-

bon peaks이며, ester groups의 위치는 HMBC spectrum에서 oxymethine protons, oxymethylene protons과 ester carbonyl carbons사이의  $^3\text{J}(\text{C}, \text{H})$  couplings 값을 통해 결정하였다. 따라서 상기의 데이터와 기존의 문헌 데이터<sup>10)</sup>와의 비교 검토를 통해 compound I이  $\alpha$ -D-glucopyranoside, 3,4,6-tris-O-(3-methyl-1-oxobutyl)- $\beta$ -D-fructofuranosyl, 2,6-bis(3-methylbutanoate)임을 동정하였다.

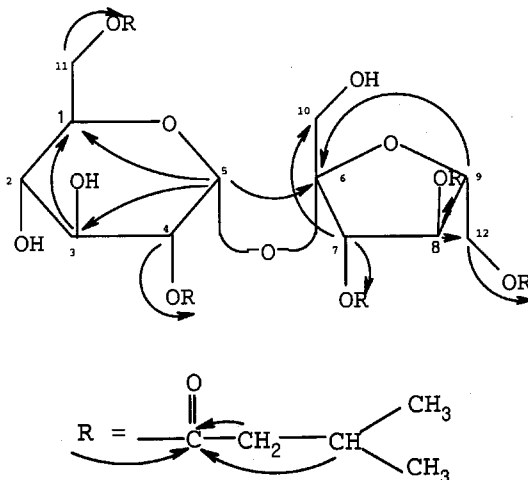
**compound II의 구조분석** - compound II는 흰색의 분말로, High resolution electrospray ionization (ESI) mass spectrum에서 분자식이  $\text{C}_{38}\text{H}_{58}\text{O}_6$ 임을 확인하였으며,  $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ 가  $m/z$  604.4564 (이론적 계산치와 1.3 mD의 오차)였다. Palmitate group의 결합부위는 C-1' [ $\delta_{\text{C}}$  174.0]과 H-2' [ $\delta_{\text{H}}$  2.28, 2H, palmitic protons], H-20 [ $\delta_{\text{H}}$  4.69, 4.50]의 long-range connectivities로부터 확인하였다. Compound II의 가수분해물의 mass spectrum으로부터 ingenol과 hexadecanoate를 확인하였다. 상기의 데이터와 문헌<sup>11)</sup>과의



**Fig. 1.** Structures of compound I, compound II and compound III from *E. Lathyridis* Semen.

비교로부터 compound II가 ingenol-20-palmitate임을 동정하였다.

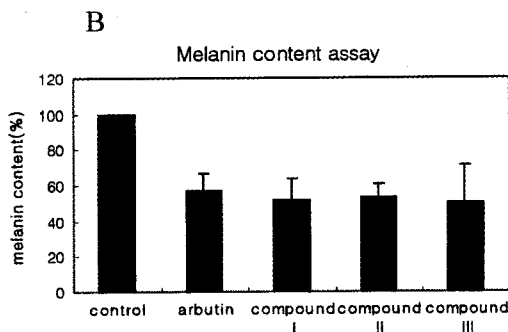
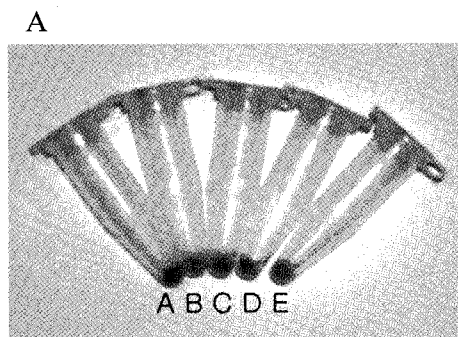
**compound III의 구조분석** - compound III는 흰색의 분말로, High resolution electrospray ionization(ESI) mass spectrum에서 분자식이  $C_{31}H_{38}O_7$ 임을 확인하였으며,  $[M+Na]^+$ 가  $m/z$  545.2493 (이론적 계산치와 2.2 mD의 오차)였다. 각각의 에스터결합 위치는  $^1H$ - $^{13}C$  long-range COSY spectrum으로부터 확인하였다. Benzoyl group의 결합부위는 C-2 $[\delta_c$



**Fig. 2.** Long-range  $^1H$ - $^{13}C$  HMBC correlations for Compound I ( $^1H \rightarrow ^{13}C$ ).

166.1]과 H-3", H-4" [ $\delta_H$  8.03, 7.45, respectively benzoyl protons] H-3 [ $\delta_H$  5.82]의 long-range connectivities로부터 확인하였다. 그리고, C-1" $[\delta_c$  170.1]에서 H-2" $[\delta_H$  1.83, acetyl methyl protons], H-5 [ $\delta_H$  6.21]와 C-5 $[\delta_c$  65.4]로의 long-range connectivities로부터 acetyl group의 결합 위치를 확인하였으며, 나머지 하나의 acetyl group의 결합 위치는 C-1 $[\delta_c$  169.7]에서 H-2 $[\delta_H$  2.21, acetyl methyl protons]로의 coupling과 H-2 $[\delta_H$  2.21]과 C-105 $[\delta_c$  92.5]간의 coupling으로부터 확인하였다. 상기의 데이터<sup>12)</sup>와 문헌과의 비교로부터 compound III가 5,10-diacetyl-3-benzoyllathyrol임을 동정하였다.

**멜라닌 생성 억제 효과 평가(B16 mouse melanoma assay)** - Compound I, II, III의 농도가 각각 5  $\mu g/ml$ , 1  $\mu g/ml$ , 5  $\mu g/ml$ 에서 positive control로 사용된 1 mmol arbutin과 비슷한 정도로 B16



**Fig. 3.** A. Effects of 0.3% DMSO(A:control), 1 mM Arbutin(B), 5  $\mu g/ml$  compound I(C), 1  $\mu g/ml$  compound II(D), 5  $\mu g/ml$  compound III(E) on B16 melanoma. B. Melanin contents in samples in A (n=3).

melanoma의 멜라닌 양을 감소시키는 것을 알 수 있었다. 또한, 육안 관정의 결과를 보다 명확히 하고자  $10^6$  cells 당 멜라닌양을 측정 한 결과, 1 mM arbutin 이 43%의 멜라닌생성을 감소시켰으나, compound I, II, III는 각각 5  $\mu$ g/ml, 1  $\mu$ g/ml, 5  $\mu$ g/ml의 농도에서 48%, 47%, 50%의 멜라닌 생성을 억제하였음을 알 수 있었다(Fig. 3).

## 결 론

기미, 주근깨 등의 색소침착의 치료제를 개발하고자 한방에서 피부미용에 사용한 것으로 알려진 약제들을 대상으로 B16 melanoma assay를 한 결과, 속수자 추출물이 멜라닌생성 억제 효과가 우수함을 알 수 있었으며, 이로부터  $\alpha$ -D-glucopyranoside, 3,4,6-tris-O-(3-methyl-1-oxobutyl)- $\beta$ -D-fructofuranosyl, 2,6-bis(3-methylbutanoate), ingenol-20-palmitate와 5, 10-diacetyl-3-benzoyllathyrol (Euphorbia factor L<sub>3</sub>)가 멜라닌 생성 억제 효능을 나타냄을 확인하였다.

## 인용문헌

- Hearing, V. J., Ekel, T. M. (1976) Mammalian tyrosinase. *Biochem. J.* 157: 549-557.
- Prota, G. (1992) Melanin and melanogenesis. Academic Press, New York.
- Ando, S., Ando, O., Suemoto, Y. and Mishima, Y. (1993) Tyrosinase gene transcription and its control by melanogenetic inhibitor. *J. Invest Dermatol.* 100: 150-155.
- Imokawa, G. and Mishima, Y. (1982) Loss of melanogenic properties in tyrosinase induced by glycosylation inhibitors within malignant melanoma cells. *Cancer Res.* 42:1994-2002.
- Masuda, M., Tejima, T. and Suzuki, T. (1996) Skin lighteners. *Cosmetics & Toiletries* 111: 65-77.
- Namba, T. (1993) 和漢藥百科圖鑑I, 269-270. Hoi-kusha Publishing Co., Japan
- Itokawa, H., Ichihara, Y., Watanabe, K. and Takeya, K. (1989) An antitumor principle from *Euphorbia lathyris*. *Planta Medica* 55: 271-272.
- Anna, M. M. and Elizabeth, M. (1989) Differential radiosensitivity in cultured B16 melanoma cells following interrupted melanogenesis induced by glucosamine. *Pigment Cell Res.* 2: 167-170.
- Gordon, P. R., Mansur, C. P. and Gilchrest, B. A. (1989) Regulation of human melanocyte growth, dendricity, and melanization by keratinocyte derived factors. *J. Invest. Dermatol.* 92: 566-572.
- Yamamoto, K., Yamashita, K. and Hitomi, N. (1993) Studies on the constituents of *Atractylodes Rhizome*; constituents in the Rhizome of *Atractylodes japonica* and TLC analysis of Jutsu. *Shoyakugaku Zasshi* 47(1): 12-16.
- Jia, Z. and Ding, Y. (1991) New diterpenoids from *Euphorbia sieboldiana*. *Planta Medica* 57: 569-571.
- Appendino, G., Tron, G. C., Cravotto, G., Palmisano, G. and Jakupovic, J. (1999) An expeditious procedure for the isolation of ingenol from the seeds of *Euphorbia lathyris*. *J. Nat. Prod.* 62: 76-79.

(2000년 4월 18일 접수)