

추출 방법에 따른 비파엽 추출물의 미백 및 항염활성에 관한 연구

박정옥[†]·박진오·주철규

대봉엘에스(주) 천연물소재응용연구소
(2014년 7월 11일 접수, 2015년 6월 16일 수정, 2015년 6월 18일 채택)

A Study on Whitening and Anti-inflammatory Effects of *Eriobotrya Japonica* Leaf Extracts with Different Extraction Methods

Jung Ok Park[†], Jin Oh Park, and Chul Gue Joo

Department of Natural Product Laboratory, Daebong LS, Ltd., 123, Nenghudaero,
649 Beon-gil, Namdong-ku, Incheon, 405-820, Korea
(Received July 11, 2014; Revised June 16, 2015; Accepted June 18, 2015)

요약: 본 연구에서는 기능성 화장품 소재 개발을 위하여 비파엽 추출물을 제조하고 효소 및 세포 활성평가를 진행하였다. 활성평가는 tyrosinase 측정법을 이용한 미백 효능, NO 측정법을 이용한 항염 효능에 대한 활성 등을 분석하였다. 미백 효능 관련 tyrosinase 활성 저해는 10% 농도의 비파엽 초임계 추출물에서 미약한 활성을 나타내었다. 항염 효능 관련 NO 활성 저해 분석 결과, 초임계 추출물, 에탄올 환류 추출물, 열수 추출물의 순서로 NO 억제 활성을 나타내었다. MTT assay를 실시한 결과, 70% 에탄올 환류 추출물 5% 처리를 제외하고는 모든 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 미백 효능 관련 멜라닌 생성 저해는 5% 처리 농도에서 30%, 70% 에탄올 환류 추출물이 강하게 멜라닌 생성을 억제하는 결과를 보였다. 이상의 연구결과들로부터 비파엽 추출물 제조를 통한 우수한 항염 효능 및 미백 효능 관련 활성을 나타내는 추출조건을 도출하였으며, 향후 기능성 화장품 소재 개발을 위한 기초 연구용 자료로서의 역할을 제시할 수 있을 것이다.

Abstract: In this study, we prepared *Eriobotrya japonica* leaf extracts by several extraction processes and then evaluated their biological activities for their potential application as a new raw material of functional cosmetic. Their whitening effects were measured by tyrosinase inhibitory activities, and anti-inflammatory effects were determined by inhibitory activities of nitric oxide (NO) production. Among the several extracts obtained from *E. japonica* leaf, supercritical fluid extract showed tyrosinase inhibitory activities at the concentration of 10%. Inhibitory activity on NO production effect related to anti-inflammatory efficacy was in the order: supercritical fluid extract > ethanol extract > hot water extract. According to the results of MTT assay, cell cytotoxicity was not observed at all concentrations except for a 5% concentration of the 70% ethanol extract. For whitening effects, 30% ethanol and 70% ethanol extract showed mushroom tyrosinase inhibitory activity at the concentration of 5%. These results indicated that *E. japonica* leaf extracts could have the functional effects when they are added as ingredients in cosmetics.

Keywords: *Eriobotrya japonica* leaf, whitening, anti-inflammation, cosmetics

[†] 주 저자 (e-mail: ok0414@daebongls.co.kr)
call: 032)712-8842

1. 서 론

피부에 존재하는 흑색색소인 멜라닌은 색소 침착과 피부의 흑화현상의 원인물질이며, 머리카락의 색상을 결정하는 주요한 인자로서 자외선으로부터 피부세포를 보호하기 위한 역할을 가지고 있다[1]. 그러나 과도한 멜라닌의 축적은 주근깨, 기미, 검버섯 등의 원인이 된다[2,3]. 멜라닌 형성과정은 melanocyte specific enzymes인 tyrosinase와 tyrosinase-related proteins (TRPs) 등에 의해 조절되며[4,5] 크게 두 가지 타입의 멜라닌이 만들어지는데, 노란색에서 붉은색의 색소를 보이는 pheomelanin과 검은색에서 갈색을 띠는 eumelanin이다[6]. Tyrosinase는 phenylalanine의 한 종류인 tyrosine을 DOPAquinone과 DOPAchrome으로 산화시켜 각각 멜라닌의 종류인 eumelanin, pheomelanin으로의 합성을 활성화 시키는 효소이다[7]. 미백은 항산화, 항노화 효능과 함께 기능성 화장품의 대부분을 차지하고 있으며 이러한 미백효능을 갖는 화장품 소재로서 최근에는 천연물을 이용한 소재가 부각되고 있다[8].

염증반응은 피부손상 및 노화의 주요 원인의 일종으로서 발생하며, 이 과정은 체내 세포 조직에 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때, 생체가 재생이나 회복 등을 하기 위한 방어적 반응을 나타내는 것이다[9,10]. 이 과정에서 활성산소종(reactive radical species)의 일종인 nitric oxide (NO)는 대식세포와 같은 면역세포에 의해 생성되어 각종 생리 및 병리적 과정에 있어 중요한 역할을 한다[11-13]. 하지만 과도하게 생성된 NO는 부작용을 일으켜 혈관투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 급성과 만성 염증에 대한 반응으로 조직의 손상 및 유전자 변이 등을 일으킬 수 있다[14-16]. Cytokines, lipopolysaccharide (LPS)와 같은 염증성 물질의 자극을 받은 세포는 cyclooxygenase-2 (COX-2)와 inducible NO synthase (iNOS)의 발현양이 증가한다. 이 효소들의 발현증가는 prostaglandins (PGs)와 NO의 생성을 증가시켜 다양한 염증성 질환을 일으키는 중요한 역할을 한다[26]. 염증반응에서 NO 생성은 대부분 iNOS가 원인으로서, PGs도 대부분 COX-2에 의하여서 생성된다[17,18].

비파엽(*Eriobotrya japonica* L.)은 장미과의 상록 교목으로 우리나라에서는 제주도, 경남 및 전남지방 등

온화한 기후 조건에서 고루 자생하고 예로부터 민간요법으로 청폐, 진해, 거담, 건위, 이뇨, 패혈해소, 기관지염, 구역질, 딸꾹질 및 부종 등에 효능이 있다고 알려져 있다[19]. 비파엽의 성분으로는 quercetin, ursolic acid, oleanolic acid, tannin, chlorogenic acid, caffeoylquinic acid 등이 보고되어 있다[20].

현재 비파엽을 이용한 다양한 기능성에 관한 연구가 보고되고 있으나 화장품 소재로 이용할 수 있는 미백활성과 항염활성의 연구결과는 미비하다. 본 연구에서는 비파엽을 이용하여 추출물을 제조하고 이에 대한 미백, 항염 효능을 분석하고 평가하여 기능성에 적합한 추출조건을 탐색하고 향후 기능성 화장품 소재 개발을 위한 기초 연구용 자료를 제공하고자 한다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

효능 평가 기기로는 ELISA reader (iMark microplate reader, BIO-RAD, USA)를 사용하였다. L-tyrosine은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 완충용액제조에 사용된 potassium phosphate monobasic, potassium phosphate dibasic 역시 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 그리고 그 외 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 효소로 사용된 tyrosinase (1000 units/mg solid)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다.

Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)은 Gibco에서 구입하였다. Lipopolysaccharide (LPS), griess 시약 (1% (w/v) sulfanilamide, 0.1% (w/v) naphylethylenediamine in 2.5% (v/v) phosphoric acid), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT), dimethyl sulfoxide (DMSO)은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 비교물질로 사용한 L-ascorbic acid, arbutin, sodium nitrate (NaNO₂)은 Sigma (USA)에서 구입하였다.

2.2. 비파엽 추출물 제조

비파엽은 전남생약농업협동조합의 완도 농가에서 건조한 것을 구입하여 사용하였다. 열수추출은 비파엽 10 g을 정제수 1 L를 이용하여 환류냉각기추출기로 60 °C 및 90 °C 온도조건으로 각각 24 h 동안 추출하

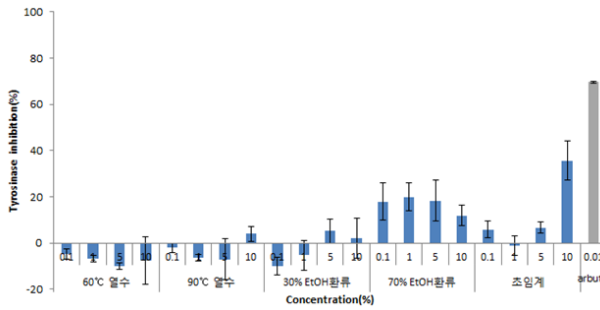


Figure 1. Inhibitory activity of extracts from *E. japonica* leaf on tyrosinase.

였고, 환류에탄올 추출은 동량을 30% 및 70% 에탄올 1 L를 이용하여 60 °C에서 24 h 동안 각각 추출하였다. 비파엽 초임계 추출은 분쇄한 비파엽 100 g을 50 °C, 400 bar의 압력으로 170 min 동안 추출하였다. 추출 6 min 후 보조용매인 주정을 3 mL/min의 유량으로 주입하였다. 각 추출물은 Whatman NO.1002-185 여과지를 사용하여 감압 여과하여 불순물 정제 후 시험분석하였다.

2.3. 비파엽 추출물의 *in vitro* tyrosinase 활성 저해 분석

Tyrosinase는 L-Tyrosine으로부터 멜라닌 생성과정에서 전체 반응 속도를 결정하는데 작용하는 핵심효소이다. 따라서 tyrosinase의 활성 저해 분석은 미백활성을 측정하는데 매우 중요하다. 96 well plate에 농도별로 시료 75 μ L를 분주 후 1.5 mM L-tyrosine 25 μ L를 첨가한다. 효소인 300 unit/mL tyrosinase를 25 μ L 첨가 후 37 °C에서 15 min 동안 반응 시킨 후 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군은 arbutin을 사용하였다.

2.4. 세포활성 평가

2.4.1. 세포배양

실험에 사용한 마우스 대식세포인 Raw 264.7, mouse melanoma 세포인 B16F10을 10%의 FBS (fetal bovine serum, Gibco)와 1% antibiotic-antimycotic (Gibco)이 첨가된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco)으로 37 °C, 5% CO₂조건에서 배양하였다.

2.4.2. 항염 효능 평가(NO 생성 억제 효과)

48 well plate에 1.8×10^5 cells/mL의 Raw 264.7 세포를 넣고 18 h 동안 배양하였다. 염증 반응 유도 인자

인 lipopolysaccharide (LPS)를 1 μ g/mL의 농도로 처리한 후 시료를 농도별로 처리하여 24 h 동안 배양하였다. 생성된 NO의 양은 griess 시약(1 % (w/v) sulfanilamide, 0.1 % (w/v) naphylethylenediamine in 2.5 % (v/v) phosphoric acid)을 이용하여 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로 측정하였다. 세포 배양 상등액 100 μ L와 griess 시약 100 μ L를 혼합하여 10 min 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 생성된 NO의 양은 sodium nitrite (NaNO₂)를 standard로 비교하였다.

2.4.3. 미백 효능 평가(멜라닌 합성 저해 효과)

멜라닌 형성 세포주의 하나인 B16F10 melanoma를 24 well plate에 2.0×10^4 cells/mL씩 분주하여 24 h 동안 배양시킨 후, 10 nM의 melanocyte stimulating hormone (α -MSH)와 함께 시료를 배지에 농도별로 처리하여 72 h 동안 추가 배양하였다. 배지를 제거하고 세포를 trypsin-EDTA로 회수한 후 10,000 rpm에서 10 min 동안 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 1N NaOH 용액을 첨가하고 55 °C에서 1 h 동안 용해시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. α -MSH만 처리한 대조군과 비교하여 상대적인 멜라닌 함량을 측정하였다.

2.4.4. MTT assay

세포독성은 3-(4,5-dimethylthazo-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 시약을 이용하여 세포 생존율을 측정하는 방법을 변형하여 측정하였다. 96 well plate에 Raw 264.7 세포를 1.0×10^5 cells/mL로 분주하여 18 시간 동안 전배양 하였다. LPS (1 μ g/mL)와 농도별로 희석한 시료(μ g/mL)를 동시처리한 후 24 h 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 MTT용액을 각 well에 0.2 mg/mL 농도로 처리하여 4 h 동안 배양한 후, 배양액을 제거한 다음 dimethyl sulfoxide (DMSO) 용액 500 μ L 넣고, 10 min 동안 흔들어 준 후 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하였고 통계분석을 하여 평균 표준편차(S.D)로 표기하였다.

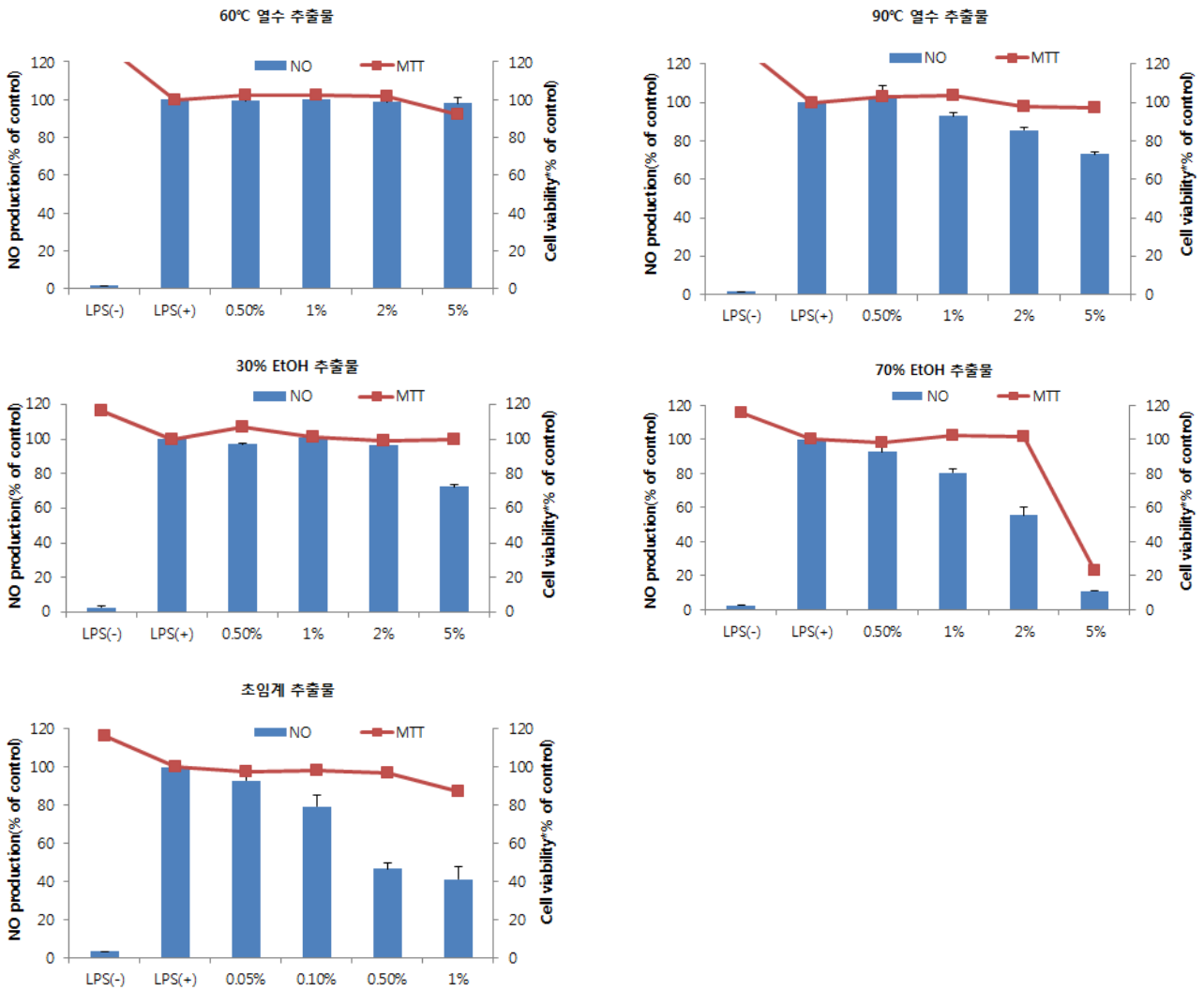


Figure 2. Inhibitory activity of extracts from *E. japonica* leaf on NO production.

3. 결과 및 고찰

3.1. Tyrosinase 활성 저해

비파엽의 각 추출물에 대한 흡광도를 측정, 분석하여 비교 하였다. 70% 에탄올환류 추출물에서 약간의 tyrosinase 저해활성이 나타났다. 10% 농도의 초임계 추출물에서 $35.6 \pm 8.5\%$ 의 tyrosinase 활성 저해 효능을 나타내는 것으로 확인되었다. 나머지 추출물에서는 미약하거나 활성이 관찰되지 않았다(Figure 1).

3.2. NO 생성 억제 효과

일반적인 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을

제거시키는 중요한 역할을 하지만, 염증상태에서 iNOS에 의해 생성된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.

Nitric oxide (NO) 생성에 대한 비파엽 추출물의 효과를 알아보기 위하여 RAW264.7 세포에 LPS로 자극을 주고, 다양한 추출방법의 비파엽 추출물을 처리하여 실험을 진행하였다. 생성된 NO 양은 griess 시약을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^- 의 형태로 측정하였다. 그 결과, 적용한 추출방법 중 초임계추출물, 에탄올환류 추출물, 그리고 열수추출물 순서로 NO 억제 활성을 나타내었다. 또한, 비파엽 90 °C 열수추출물이

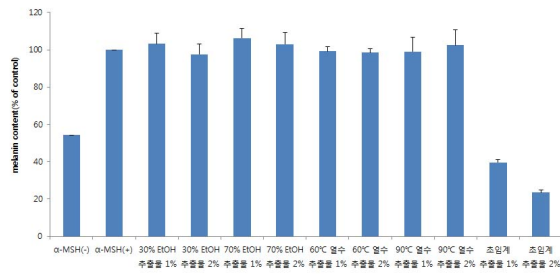


Figure 3. Inhibitory effects of several extracts from *E. japonica* leaf on melanin synthesis in α -MSH stimulated B16/F10 mouse melanoma cell.

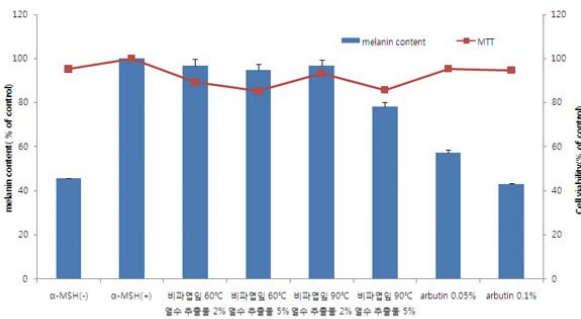


Figure 4. Inhibitory effects of hot-water extracts from *E. japonica* leaf on melanin synthesis in α -MSH stimulated B16/F10 mouse melanoma cell.

60 °C 열수추출물에 비하여 NO 억제 활성이 높게 나타났으며, 70% 에탄올환류 추출물이 30% 에탄올환류 추출물에 비해 높은 억제 활성을 나타내었다(Figure 2).

실험에 사용된 비파엽 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과, 70% 에탄올환류 추출물 5% 처리를 제외하고는 처리한 모든 농도에서 세포독성을 관찰할 수 없었다. 특히 초임계추출물의 경우 농도별 처리에서 독성이 관찰되지 않았으며, 이는 비파엽 추출물의 NO 생성억제가 독성으로 인한 cell population의 저하에서 기인하지 않는다는 것을 확인하는 결과이다(Figure 2).

3.3. 멜라닌 합성 저해 효과

멜라닌(melanin)은 사람의 피부색을 결정하는 주요 인자 중 하나로, 피부 기저층에 존재하는 멜라닌 생성 세포(melanocyte)에 의해 생합성되며 각질형성세포(keratinocyte)로 수송되어 피부 바깥층으로 이동하게

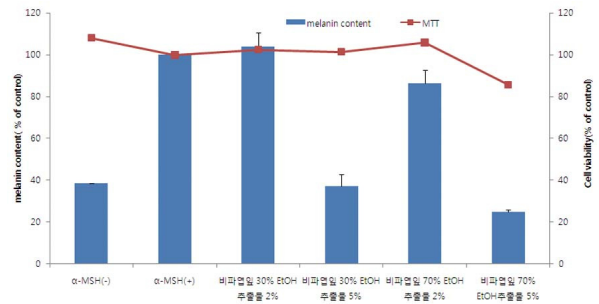


Figure 5. Inhibitory effects of ethanol extracts from *E. japonica* leaf on melanin synthesis in α -MSH stimulated B16/F10 mouse melanoma cell.

된다. 멜라닌은 일정량 이상의 자외선을 흡수하여 자외선이 인체 내로 침투하는 것을 차단하는 역할을 하지만, 과도하게 생성이 되거나 피부의 기능이 떨어지면 피부표면에 침착되어 기미와 주근깨 및 피부반점 등을 유발한다.

비파엽 추출물이 세포수준에서의 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, B16/F10 mouse melanoma cell에서 α -MSH로 자극을 주고, 다양한 추출방법으로 얻은 비파엽 추출물을 처리하여 생성되는 멜라닌 양을 측정하였다. α -MSH로 자극을 주었을 경우, 무처리군에 비하여 멜라닌 생성량이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 비파엽 추출물을 같이 처리하였을 경우 다양한 추출방법 중 초임계 추출물을 처리하였을 때 생성되었던 멜라닌 생성량이 농도별로 감소하는 것을 확인하였다(Figure 3).

2% 이하의 농도에서 활성을 확인할 수 없었던, 비파엽 열수추출물을 농도를 높여 멜라닌 생성에 미치는 영향을 확인한 결과, 비파엽 90 °C 열수추출물을 5% 농도로 처리하였을 때 약간의 활성을 확인할 수 있었으며, 60 °C 열수추출물에서는 멜라닌 억제활성을 확인할 수 없었다(Figure 4).

또한, 비파엽 에탄올환류 추출물을 농도를 높여 멜라닌 생성에 미치는 영향을 알아본 결과, 5% 처리농도에서 30% 및 70% 에탄올환류 추출물이 강하게 멜라닌 생성을 억제하는 결과를 보였으며, 이때 세포독성은 관찰되지 않았다(Figure 5).

4. 결 론

비파엽 추출물의 미백 관련 tyrosinase 활성 저해 분석 결과, 10% 농도의 초임계 추출물에서 $35.6 \pm 8.5\%$ 의 tyrosinase 활성 저해 효능을 나타내는 것으로 확인되었다. 나머지 추출물에서는 미약하거나 활성을 나타내지 않았다. 비파엽 추출물의 항염 관련 NO 활성 저해 분석결과, 초임계 추출물, 에탄올 환류 추출물, 그리고 열수 추출물 순서로 NO 억제 활성을 나타내었다. 또한 비파엽 90 °C 열수 추출물이 60 °C 열수 추출물에 비하여 NO 억제 활성이 높게 나타났으며, 70% 에탄올 환류 추출물이 30% 에탄올 환류 추출물에 비해 높은 억제 활성을 나타내었다. 비파엽 추출물의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시한 결과, 70% 에탄올 환류 추출물 5% 처리를 제외하고는 처리한 모든 농도에서 세포독성이 관찰되지 않았다. 비파엽 추출물의 미백 관련 멜라닌 생성 저해 분석결과, 5% 처리농도에서 30% 에탄올 환류 추출물과 70% 에탄올 환류 추출물이 강하게 멜라닌 생성을 억제하는 결과를 보였으며, 이때 세포독성은 관찰되지 않았다.

이상의 연구결과들로부터 추출방법에 따른 비파엽 추출물의 항염 및 미백 관련 효능 평가를 수행하였으며, 향후 기능성 화장품 소재 개발을 위한 기초 연구용 자료로서의 역할을 제시할 수 있을 것이다.

Reference

1. B. A. Gilchrist and M. S. Eller, DNA photodamage stimulates melanogenesis and other photoprotective responses, *J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.*, **4**(1), 35 (1999).
2. J. A. Kim, J. Y. Choi, A. R. Son, S. H. Park, G. H. Xu, J. G. Lee, I. S. Oh, J. J. Kim, H. W. Chang, S. R. Chung, T. S. Jang, and S. H. Lee, Inhibitory effect of some natural polyphenols isolated from *Euphobiaceae* plants on melanogenesis, *Kor. J. Pharmacogn.*, **35**, 157 (2004).
3. Y. Mishima, S. Hattai, and Y. Ohyama M. Inazu Induction of melanogenesis wuppression: cellular pharmacology and mode of differential action. *Pigment Cell Res.*, **1**(6), 367 (1988).
4. V. J. Hearing and M. Jimenez, Analysis of mammalian pigmentation at the molecular level, *Pigment Cell Res.*, **2**(2), 75 (1989).
5. V. J. Hearing and K. Tsukamoto, Enzymatic control of pigmentation in mammals, *FASEB J.*, **5**(14), 2902 (1991).
6. T. Kobayashi, W. D. Vieira, B. Potterf, C. Sakai, G. Imokawa, and V. J. Hearing, Modulation of melanogenic protein expression during the switch from euto-pheomelanogenesis, *J. Cell Sci.*, **108**(6), 2301 (1995).
7. L. D. P. Uyen, D. H. Nguyen, and E. K. Kim, Mechanism of skin pigmentation, *B-iotechnology and Bioprocess Engineering*, **13**(4), 383 (2008).
8. D. H. Nguyen, D. T. M. Nguyen, L. H. La, S. H. Yang, H. B. Lee, R. J. Kim, J. H. Shin, D. M. Kim, and E. K. Kim, Depigmenting effect of *Cinnamomum cassia* Presl in B16F10 melanoma cells, *Korean J. Chem. Eng.*, **24**(5), 827 (2007).
9. H. Kawamata, H. Ochiai, N. Mantani, and K. Terasawa, Enhanced expression of inducible nitric oxide synthase by Juzen-taiho-to in LPS-activated RAW 264.7 cells, a murine macrophage celline, *Am. J. Chin Med.*, **28**(2), 217 (2000).
10. The newest immunology, ed. Y. T. Lee, Jipmoondang, 355, Seoul (1989).
11. B. G. Lee, S. H. Kim, O. P. Zee, H. Y. Lee, J. W. Han, and H. W. Lee, Suppression of inducible nitric oxide synthase expression in RAW 264.7 macrophages by two b-carboline alkaloids extracted from *Melia azedarach*, *Eur. J. Pharmacol.*, **406**, 301 (2000).
12. C. F. Nathan and J. B. Hibbs J, Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity, *Curr. Opinion. Immunol.*, **3**(1), 65 (1991).
13. B. H. Lee, D. S. Baik, S. U. Yun, J. M. Shin, J. H. Kim, S. Y. Yun, B. H. Kim, S. B. Kim, J. E. Shin, and I. H. Song, Peripheral nitric oxide activity in patients with liver cirrhosis. *Korean. J. Med.*, **73**(3), 251 (2007).
14. M. M. Mu, D. Chakravortty, T. Sugiyama, N. Koide, K. Takahashi, L. Mori, T. Yoshida, and T. Yokochi,

- The inhibitory action of quercetin on lipopolysaccharide- induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophage cells, *J. Endotoxin. Res.*, **7**(6), 431 (2001).
15. K. Y. Stokes, D. Cooper, A. Taylor, and D. N. Granger, Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide, *Free Radical. Biol. Med.*, **33**(8) (2002).
 16. J. H. Ryu, H. Ahn, J. Y. Kim, and Y. K. Kim, Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages, *Phytother. Res.*, **17**(5), 485 (2003).
 17. X. Jin, X. H. Zhang, and N. C. Zhao, Effects of petroleum ether extract of *Peucedanum praeruptorum* Dunn on rabbit trachea smooth muscles, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, **19**(6), 365 (1994).
 18. Y. C. Huang, J. H. Guh, Z. J. Cheng, Y. L. Chang, T. L. Hwang, C. H. Liao, C. C. Tzeng, and C. M. Teng, Inhibition of the expression of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in macrophages by 7HQ derivatives : Involvement of IkappaB- alpha stabilization, *Eur. J. Pharmacol.*, **418**(1-2), 133 (2001).
 19. S. T. Reddy and H. R. Herschman, Ligand-induced prostaglandin synthesis requires expression of the TIS10/ PGS-2 prostaglandin synthase gene in murine fibroblasts and macrophages, *J. Biol. Chem.*, **269**(22), 15473 (1994).
 20. Y. S. Jeong, H. K. Jung, K. S. Youn, M. O. Kim, and J. H. Hong, Physiologocal activities of the hot water extract from *Eriobotrya japonica* Lindl, *J. Korean Soc. Food Sci. Nitr.*, **38**(8), 977-982 (2009).
 21. S. J. Kim, J. O. Park and S. N. Park, Antioxidative effect and component analysis of *Eriobotrya japonica* leaf extracts, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **38**(1), 57 (2012).
 22. X. G. He, L. Z. Lin, L. Z. Lian, and M. Lindenmaier, Liquid chromatography- electrospray mass spectrometric analysis of curcuminoids and sesquiterpenoids in turmeric (*Curcuma longa*), **818**(1), 127 (1998).
 23. M. Seiberg, Keratinocyte-melanocyte interaction during melanosome transfer. *Pigment Cell Res.*, **14**(4), 236 (2001).
 24. W. Tang and G. Eisenbrand, Chinese drugs of plant origin, chemistry, pharmacology, and use in traditional and modern medicine, **401**, Springer, Berlin (1992).
 25. S. B. Han, S. S. Kwon, B. J. Kong, K. J. Kim, and S. N. Park, Antioxidative effect and tyrosinase inhibitory activity of the unripened fruit extract of *Rubus coreanus* Miquel, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **39**(4), **295** (2013).