

Physiological activities of *Agrimonia pilosa* extract

Hyun-Soo Kim*

Department of Food Science and Technology, Jungwon University, Goesan 367-805, Korea

쑥신나물(*Agrimonia pilosa*) 추출물의 생리활성

김현수*

중원대학교 식품공학과

Abstract

In this study, we investigated the applicability of functional materials by examining various physiological activities with an extract from the *Agrimonia pilosa* root. The *A. pilosa* extract showed low cytotoxicity against murine melanoma B16F10 cells. With little or no cytotoxicity at various concentrations, the *A. pilosa* extract showed high levels of DPPH radical scavenging activity (IC_{50} , 20.70 mg/L) and anti-microbial activity against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans*. In particular, it had a high level of anti-microbial activities against Gram-positive bacteria. These results suggest that the *A. pilosa* extract can be used as a natural preservative. It also showed inhibition of tyrosinase activity (IC_{50} , 90.18 mg/L), as does kojic acid (IC_{50} , 89.13 mg/L), and especially, a higher decrease in melanin content (IC_{50} , 62.5 mg/L) than the arbutin level (IC_{50} , 100.7 mg/L) as a positive control. These findings suggest that the *A. pilosa* extract inhibits melanin synthesis by suppressing the intracellular tyrosinase expression. These results indicate that the *A. pilosa* extract may be an effective material for functional cosmetics, such as skin whitening materials.

Key words : *Agrimonia pilosa*, antioxidant, antimicrobial activity, melanin, tyrosinase

서 론

쑥신나물(*Agrimonia pilosa*)은 한국·일본·중국·인도 등지에 분포하는 여러해살이풀이다. 생육환경은 토양의 비옥도에 관계없이 양지 혹은 반그늘에서 자란다. 키는 30~100 cm 정도이고, 잎은 긴 타원형이며 길이가 3~6 cm, 폭이 1.5~3.5 cm로 어긋나고 표면은 녹색이며 양면에 털이 있다. 꽃은 황색으로 길이가 10~20 cm이며 원줄기 끝과 가지 끝에 달린다. 열매는 8~9월경에 달리고 윗부분에 갈고리와 같은 가시들이 많이 나 있는 특성을 나타내며, 어린잎을 식용으로 하고 전초는 한방에서 약용으로서 사용되고 있다 (1). 쑥신나물은 다양한 생리적 기능이 알려져 있으며 우선

풍부하게 함유되어 있는 폴리페놀 성분에 의한 항산화 활성이 보고(2,3)되었으며, 종양억제 활성(4) 및 항바이러스 활성(5), 항균작용(6)에 대한 연구도 이루어져 있다. 또한, 당뇨를 유발한 쥐에서 쑥신나물 추출물을 투여했을 때 혈당개선효과를 확인(7)하였으며, lipopolysaccharide로 활성화된 RAW 264.7 세포에서 쑥신나물 추출물이 염증유발 사이토카인 및 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 reactive oxygen species(ROS)의 발현을 억제하여 항염효과가 있는 것으로 보고되었다(8).

현대사회에서 증가하는 건조 환경 및 사회적 스트레스 등으로 악화되고 있는 피부장벽손상(건조피부, 민감성피부, 노인성 건성피부, 아토피피부)을 개선하기 위한 천연소재 개발에 대한 연구가 많이 진행되고 있으며 특히, 하얀색 피부를 선호하는 아시아권 여성들을 중심으로 미백효과를 볼 수 있는 소재개발에 대한 관심이 증가하고 있다(9). 피부색은 멜라닌 생성세포가 합성하는 멜라닌(melanin)의 양과 종류에 따라 결정되며 자외선과 같은 외부자극으로부터 피부를 보호하기 위해 멜라닌 생성을 하게 된다. 그러나

*Corresponding author. E-mail : hyun1006@jwu.ac.kr
Phone : 82-43-830-8616, Fax : 82-43-830-8679
Received 22 January 2015; Revised 10 March 2015; Accepted 11 March 2015.
Copyright © The Korean Society of Food Preservation. All rights reserved.

피부표면에 과도한 멜라닌 합성과 축적은 기미, 주근깨와 같은 과색소 침착 증상이 나타나게 된다(10). 멜라닌 생성은 tyrosinase, tyrosinase related protein-1(TRP-1), TRP-2 효소에 의해 조절되며 tyrosinase는 구리를 포함한 효소로서 멜라닌 형성에 중요한 역할을 하고 있다(11). Tyrosinase는 멜라노솜(melanosome)내에서 tyrosine을 산화시켜 DOPA를 생성하는 tyrosine hydroxylase로서, 또한, DOPA를 산화시켜 DOPA quinone을 만드는 DOPA oxidase로서 작용하여 멜라닌 중합체를 합성하는 핵심 효소로 작용한다(11). 따라서 멜라닌 생합성을 억제하여 미백효과를 가져올 수 있는 독성이 없는 천연소재 물질에 대한 개발이 요구되고 있다(12).

본 연구의 재료인 쥔신나물(*A. pilosa*)은 어린잎과 전초에 대한 다양한 생리활성의 보고에 따른 기능성 소재 응용가능성을 기대할 수 있음에도 불구하고 상대적으로 뿌리부분에 대한 생리활성 연구가 부족하며 특히, 미백활성 등 피부개선 효과를 비롯한 기능성 화장품소재에 활용하기 위한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 쥔신나물 뿌리를 추출한 시료를 가지고 항산화 및 항균활성, 안전성 시험을 비롯한 생리활성 시험과 미백시험을 비롯한 피부효능 개선 시험을 조사하여 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

쥔신나물(*A. pilosa*) 뿌리에 대한 추출물은 국립원예특작과학원 인삼특작부 추출물은행에서 분양받은 시료를 실험에 이용하였으며 제시된 추출방법은 시료 200 g에 70% 에탄올 1 L를 첨가하여 실온에서 2일간 2회 추출하고 이를 여과, 감압농축, 동결건조 하는 것이다.

세포독성평가

세포독성 시험은 세포내의 미토콘드리아 탈수소효소에 의해 water soluble tetrazolium salts(WST-1)에서 불용성의 formazan결정으로 변환되는 원리를 이용한다(13). Formazan이 많이 생성될수록 세포 활성이 커지는 것을 의미한다. Formazan은 dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹아서 보라색 빛을 띄는데 spectrophotometer로 540 nm 파장에서 OD값을 재어서 정량한다. 미국 세포주은행(ATCC)에서 분양 받은 멜라노마 세포(murine melanoma B16F10)를 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS, Gibco, USA)이 포함된 Dulbecco's Modified Eagle's medium(DMEM)에서 배양하고 24 well plate에 2×10^4 cells/well의 농도로 세포를 접종한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양한다. 이후 배양세포에 추출물을 농도별로 처리하고 72시간 배양하였다. 결과는 %로 환산하였다. 각 처리농도에서의 결과 수치로 50% 저해

농도(ID₅₀)를 계산하여 세포 독성 정도를 표현하였다.

항산화력 측정

DPPH radical 소거능 실험은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 의한 전자공여능(electron donating ability, EDA)을 측정하였다(14). 즉, 0.2 mM의 DPPH용액 0.8 mL에 식물추출물 시료 0.2 mL를 첨가하여 혼합한 다음 실온에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화력은 $[1 - (\text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도})] \times 100$ 의 계산식에 의해 전자공여능(%)을 구하였으며, 대조구는 시료 대신 메탄올을 첨가하였고, positive control로 L-ascorbic acid를 사용하였다. 각 처리농도에서의 결과 수치로 50% 저해 농도(ID₅₀)를 계산하여 DPPH 소거 활성 정도를 표현하였다.

항균활성 측정

항균효과는 agar disc diffusion방법(15)을 이용하여 측정하였다. 즉, 시료액을 0.22 µm membrane filter로 여과하여 제균하고 멸균된 paper disc에 흡수시킨 후 시험용 평판배지 표면에 놓아 밀착시키고 각 균주(*B. subtilis*, *E. coli*, *C. albicans*)의 배양조건에 따라 24~48시간 동안 배양한 다음 paper disc 주위의 clear zone 및 inhibition zone의 크기로 항균성을 조사하였다. 또한, 시간별로 항균작용이 어떤 변화를 보이는지 알아보기 위해 time-curve를 작성하였다. 각각 균주 배양액에 쥔신나물 뿌리 추출물 최종농도가 100 mg/L이 되도록 처리한 후, 일정 시간별로 배양액을 채취하였다. 채취한 배양액을 심진회석법으로 희석하고 각각 균주평판배지에 접종하여 배양한 후, 생성되는 군락(colony)의 수를 측정하고 CFU/mL로 환산하였다.

Tyrosinase 저해활성측정

Melanin 합성에 중요한 단백질인 tyrosinase 저해활성 측정은 효소 작용 결과 형성되는 DL-β-3,4-dihydroxyphenyl alanine(DOPA) chrome을 비색법에 의해 측정하는 Masamoto 등의 방법(16)을 변형하여 측정하였다. 기질로서 5 mM DL-DOPA 용액 0.2 mL, 0.1 M 인산완충용액(pH 6.8) 0.2 mL 및 시료용액 0.5 mL의 혼합액에 mushroom tyrosinase (Sigma Chemical CO., 250 unit/mL) 0.1 mL을 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 475 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 아래 식에 따라 tyrosinase 저해활성을 산출하였다. 각 처리농도에서의 결과 수치로 50% 저해 농도(ID₅₀)를 계산하여 tyrosinase 저해 활성 정도를 표현하였다.

$$\text{Tyrosinase 저해 활성(\%)} = 1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{대조구의 흡광도}) \times 100$$

멜라닌 생성 저해 측정

멜라닌 정량은 Hosoi 등의 방법(17)을 변형하여 사용하

였다. 24 well plate에 2×10^4 cells/well로 멜라노마 세포를 분주하였고, 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)으로 멜라닌 생성을 유도한 후, 상기 세포독성 실험에서 관찰된 짙은 나물 추출물시료 농도를 처리하고 48시간 동안 37°C CO_2 배양기에서 배양하였다. 세포를 수집하여 세포수를 측정하고, 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리하여 침전한 후, 1 mL homogenization buffer(50 mM sodium phosphate pH 6.5, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF)로 용해시켰다. 여기서 얻은 pellet에 1 N NaOH(10% DMSO) 200 μL 를 첨가하고 vortex 후 405 nm에서 흡광도값을 측정하였다. 추출물을 처리하지 않은 시료군을 대조군으로 하고 미백제로 알려진 합성물질인 arbutin을 표준시료로 사용하였으며 결과는 %로 환산하였다. 각 처리농도에서의 결과 수치로 50% 멜라닌 생성 저해 농도(ID_{50})를 계산하여 멜라닌 생성 저해 활성을 표현하였다.

통계처리

모든 실험은 독립적으로 3회 반복 시행하고 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 표기하였으며, 통계적 유의성은 Student's t-test로 하였으며 $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

결과 및 고찰

짚신나물 추출물의 세포독성시험

멜라노마 세포에 짚신나물 뿌리 추출물(*A. pilosa* extract, APE) 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L, 1,000 mg/L의 농도로 처리한 후, WST-1 분석법(13)을 이용하여 세포독성을 측정하였다(Fig. 1). 대조군과 대비하여 250 mg/L, 500 mg/L, 750 mg/L, 1,000 mg/L의 APE 농도에서 각각 0%, 0.59%,

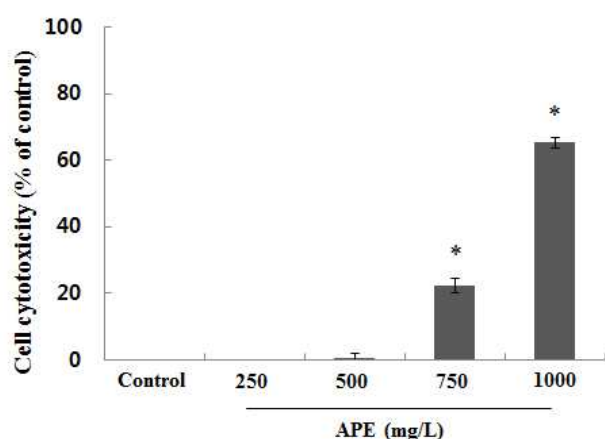


Fig. 1. Cell cytotoxicity of the *Agrimonia pilosa* extract (APE) on the murine melanoma B16F10 cell.

The values are presented as mean \pm SEM. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

22.45%, 65.46% 세포독성을 나타냈으며, 50% 세포독성을 나타내는 농도(ID_{50})는 881.11 mg/L로 나타났다. 따라서 이후의 실험은 독성이 거의 없는 500 mg/L 이하의 농도에서 진행하였으며 멜라닌 생성 억제효과로서 보고된 백합뿌리 추출물(18)의 경우는 세포독성이 거의 없는 농도가 100 mg/L 이하인 것과 비교하였을 때 천연물시료 중 독성이 없는 더 안전한 물질로 판단된다.

짚신나물 추출물의 DPPH 라디칼 소거 활성

짚신나물 뿌리 추출물에 대해서 대조구로 아스코르브산(ascorbic acid)를 이용하여 DPPH 라디칼 소거 활성법(14)으로 항산화 활성을 측정하였다. 추출물 시료와 대조구 시료를 각각 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L의 농도로 제조하여 DPPH 라디칼 소거활성을 측정한 결과 (Fig. 2), APE 농도 10 mg/L, 50 mg/L 경우 56.8%, 88.7%의 소거능 활성을 보였으며 따라서 추출물 시료의 농도가 증가할수록 라디칼 소거능 활성이 증가하였다. APE 각각에 대한 같은 시료농도 대조구인 아스코르브산과 비교 하였을 때는 소거활성이 다소 낮았으나, 100 mg/L의 추출물 농도에서는 대조구와 거의 같은 라디칼 소거활성을 보였다(91.3%). 또한, APE의 경우, 50% 라디칼 소거활성 농도는 20.70 mg/L 였으며 대조군 표준시료인 비타민 C(ascorbic acid)의 경우는 5.65 mg/L 였다. 또한, 기존 보고된 짚신나물 잎 열수추출물의 50% 라디칼 소거활성 농도 13 mg/L과 비교해 볼 때(2,3) 짚신나물 뿌리 부분의 추출물에도 항산화 활성을 나타내는 물질이 함유되어 있음을 의미하며 항산화 소재로서의 가능성을 지니고 있음을 확인할 수 있다.

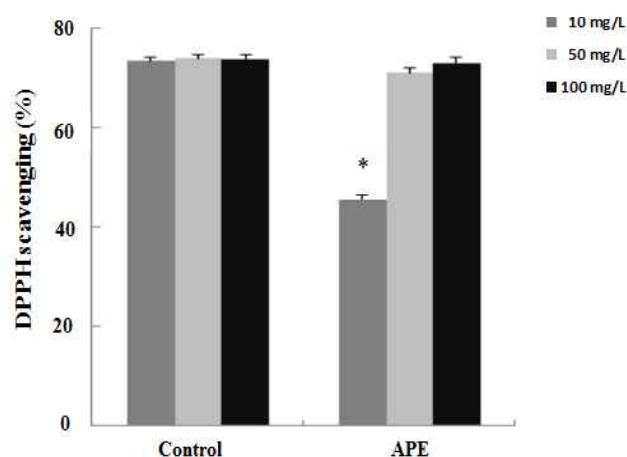


Fig. 2. DPPH radical scavenging activities of the *Agrimonia pilosa* extract (APE). Ascorbic acid was used as a positive control.

The values are presented as mean \pm SEM. Differences were considered statistically significant when * $p < 0.05$.

짚신나물 추출물의 항균 활성

짚신나물 뿌리 추출물에 대한 항균활성 측정은 디스크 확산법(disc diffusion method)을 이용하였다. DMSO 10 μL

에 10 mg이 되도록 만든 후, DMSO만을 함유한 disc를 대조군으로 하고, 각 농도의 시료액을 포함한 disc를 시험군으로 그람양성균 대표로서 *B. subtilis*, 그람음성균 대표로서 *E. coli*, 효모균 대표로서 *C. albicans*를 균일하게 접종된 배지 위에 올려 놓고 30°C에서, *E. coli* 만 37°C에서 48시간 동안 배양하여 disc주변의 투명환을 관찰하여 항균활성을 측정하였다(Fig. 3). 대조군에서는 균의 증식이 억제되지 않았으나 쥘신나물 뿌리 추출물에 대하여는 항균활성이 나타났으며, 특히, 그람양성균에 대한 항균활성이 가장 높게 나타났다. 또한, 추출물 시료 최종농도가 100 mg/L가 되도록 처리한 후, 시간별로 각각 시험군에 대한 항균작용을 알아보기 위해, time curve를 작성하였다(Fig. 3). 대조군의 경우 시간이 경과함에 따라 균의 증식에 변함이 없었으나 추출물 시료처리 경우는 배양 12시간 경과 후, *B. subtilis*, *E. coli*, *C. albicans* 각각 대조군에 대하여 50.5%, 40.2%, 33.7%의 증식 억제가 확인되었다. 즉, 모든 시험군의 증식이 억제됨을 확인 할 수 있었으며 disc 확산법과 마찬가지로 그람양성균인 *B. subtilis*에 대한 증식억제 효과가 가장 높게 나타났다. 따라서 쥘신나물 추출물(APE)은 항균력이 우수하며, 특히 포자를 형성하여 살균이 상대적으로 어려운 그람양성균에 대한 항균력이 탁월함을 보임으로써 원인균에 대한 천연방부제로서의 소재개발 가능성을 기대할 수 있을 것으로 생각한다.

쥘신나물 추출물의 tyrosinase 저해활성

Tyrosinase는 구리를 포함한 효소로서 멜라닌 형성에 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 멜라닌 중합체 생합성을 효과적으로 저해하기 위한 tyrosinase 저해활성을 측정하기 위하여 쥘신나물 뿌리 추출물에 대한 mushroom유래의

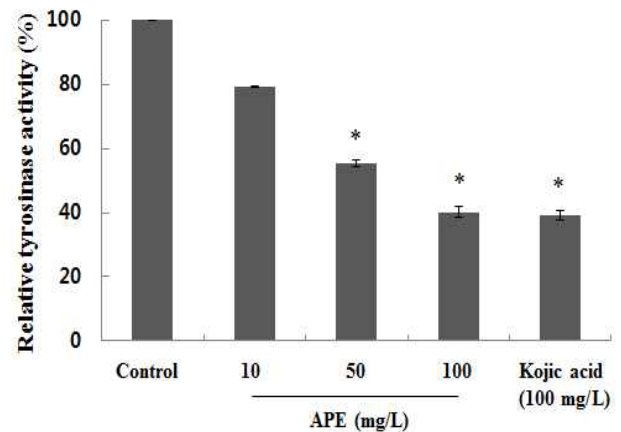


Fig. 4. Inhibitory effect of the *Agrimonia pilosa* extract (APE) on tyrosinase. The tyrosinase activity assay was performed with mushroom tyrosinase.

The values are presented as mean±SEM. Differences were considered statistically significant when *p<0.05.

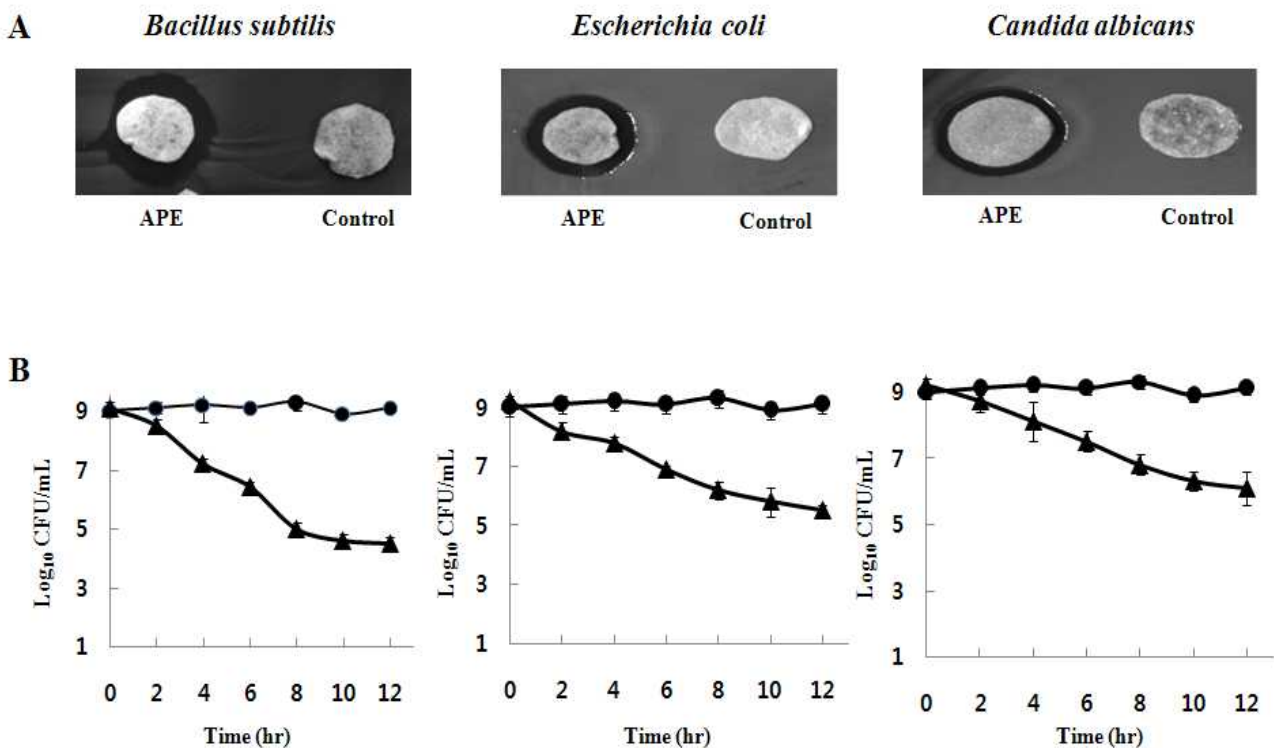


Fig. 3. Anti-microbial effect of the *Agrimonia pilosa* extract (APE). A clear zone was examined around paper disc.

10% DMSO was used as a negative control; B, time-curve of APE against *B. subtilis*, *E. coli* and *C. albicans*. 10% DMSO was used as a negative control (●) and APE was dissolved in 10% DMSO to a final concentration of 100 mg/L (▲).

tyrosinase 저해활성을 관찰하였다(Fig. 4). 추출물시료 10 mg/L, 50 mg/L, 100 mg/L의 경우, 각각 20.8%, 44.7%, 59.8%의 tyrosinase 저해활성을 나타내었다. 한편, 미백활성의 표준시료로서 kojic acid 100 mg/L의 경우 60.8%의 저해활성을 나타내었다. 또한, APE의 경우, 50% tyrosinase 저해활성 농도는 90.18 mg/L 였으며 대조군 표준시료인 kojic acid의 경우는 89.13 mg/L 임을 고려하면, 쑥신나물 뿌리 추출물시료가 대조군 kojic acid와 비교했을 때도 동일한 수준으로 우수하게 나타났으며 또한, 다른 천연소재 중 우수한 미백 활성 효과로서 보고된 바(19) 있는 녹나무과 추출물 100 mg/L의 경우 52.8% tyrosinase 저해활성을 보이는 것과 비교하였을 때, 향후 미백 기능성 소재로서의 활용 가능성이 매우 높다고 생각된다.

쑥신나물 추출물의 멜라닌 생성 저해활성

쑥신나물 뿌리 추출물(APE)에 대한 세포독성 실험 측정에서 정한 독성이 없는 농도에서 멜라닌 생성 저해 활성을 측정하였다(Fig. 5). 대조군 대비하여 50 mg/L, 100 mg/L, 250 mg/L, 500 mg/L의 APE 농도에서 각각 51.7%, 72.2%, 91.3%, 100%의 멜라닌 생성 억제 활성을 확인하였다. 또한, APE의 경우, 50% 멜라닌 저해활성 농도는 62.5 mg/L 이었으며 또한, 대조군 표준시료로서 tyrosinase 경쟁적 저해제로 작용한다고 알려져 있는(12) arbutin의 경우는 100.7 mg/L 임을 고려하면 멜라닌 생성 저해 활성이 매우 우수함을 의미한다. 즉, 시험재료에 있어서 피부미백효과는 멜라닌 생성 저해에 따른 tyrosinase 저해효과가 나타나야 한다. 본 연구의 쑥신나물 뿌리 추출물(APE)의 경우도 멜라닌 저해 활성이 우수하였으며 이에 따른 tyrosinase 저해활성도

높았다. 따라서 쑥신나물 뿌리 추출물의 경우, 직접적인 tyrosinase 활성저해에 의한 기작으로 멜라닌 생성이 억제된 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서 쑥신나물(*A. pilosa*)의 뿌리부분에 대한 다양한 생리활성을 조사하여 기능성소재 응용가능성을 검토하였다. 쑥신나물 뿌리 추출물은 멜라노마 세포에 대하여 낮은 세포독성을 나타냈다. 세포독성이 거의 없는 농도에서 쑥신나물 뿌리 추출물 처리 시 항산화(ID₅₀, 20.70 mg/L) 및 항균활성이 매우 우수하게 나타났으며 특히 그람양성세균에 대한 항균활성이 높았다. 또한, 쑥신나물 뿌리 추출물 처리시 높은 tyrosinase 활성저해(ID₅₀, 90.18 mg/L) 및 멜라닌 함량 저하를 보여주었다. 이는 쑥신나물 추출물이 세포 내 tyrosinase 발현을 억제시킴으로서 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 판단된다. 이와 같은 결과로 미루어 볼 때 쑥신나물 뿌리 추출물은 피부미백 소재 등 피부개선 효과를 비롯한 기능성 화장품에 활용하기 위한 매우 효과적인 재료가 될 수 있다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 산업통상자원부와 한국산업기술진흥원의 지역특화산업육성사업(R&D)의 지원(R-0002327)에 의해 수행되었으며, 국립원예특작과학원 인삼특작부 추출물은행(과제번호 PJ009629)으로부터 제공받은 추출물을 재료로 사용하였으므로 이에 감사드립니다.

References

1. Hsu MF, Young JH, Wang JP, Teng CM (1987) Effect of hsien-ho-t'sao (*Agrimonia pilosa*) on experimental thrombosis in mice. *Am J Chin Med*, 15, 43-51
2. Zhu L, Tan J, Wang B, He R, Liu Y, Zheng C (2009) Antioxidant activities of aqueous extract from *Agrimonia pilosa* Ledeb and its fractions. *Chem Biodivers*, 6, 1716-1726
3. Kato H, Li W, Koike M, Wang Y, Koike K (2010) Phenolic glycosides from *Agrimonia pilosa*. *Phytochem*, 71, 1925-1929
4. Koshiura R, Miyamoto K, Ikeya Y, Taguchi H (1985) Antitumor activity of methanol extract from roots of *Agrimonia pilosa* Ledeb. *Japan J Pharmacol*, 38, 9-16

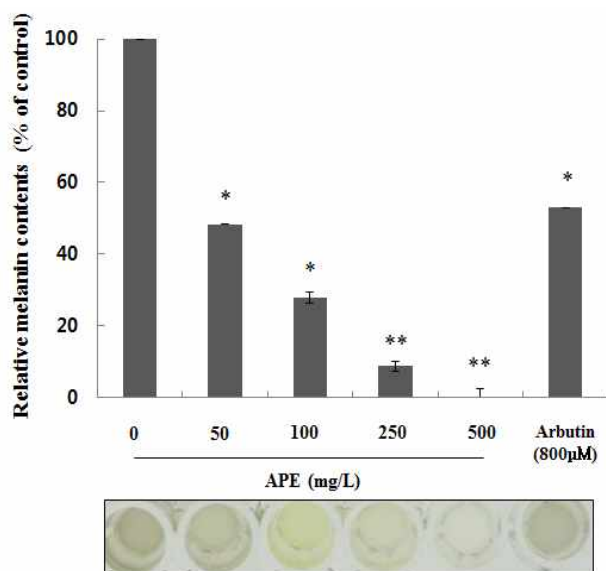


Fig. 5. Anti-melanogenic effects of the *Agrimonia pilosa* extract (APE). Arbutin was used as a positive control.

Values are presented as mean±SEM. Differences were considered statistically significant when *p<0.05, **p<0.01.

5. Shin WJ, Lee KH, Park MH, Seong BL (2010) Broad-spectrum antiviral effect of *Agrimonia pilosa* extract on influenza viruses. *Microbiol Immunol*, 54, 11-19
6. Yamaki M, Kashihara M, Ishiguro K, Takagi S (1989) Antimicrobial principles of Xian he cao (*Agrimonia pilosa*). *Planta Med*, 55, 169-170
7. Jung CH, Zhou S, Ding GX, Kim JH, Hong MH, Shin YC, Kim GJ, Ko SG (2006) Anti-hyperglycemic activity of herb extracts on streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem*, 70, 2556-2559
8. Jung CH, Kim JH, Park S, Kweon DH, Kim SH, Ko SG (2010) Inhibitory effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb. on inflammation by suppression of iNOS and ROS production. *Immunol Invest*, 39, 159-170
9. Sohn ES, Kim SW, Kang JS, Lee SP (2004) Technology trend patent information analysis of cosmetic materials derived from natural products. *Appl Chem*, 8, 466-469
10. Hill HZ, Li W, Xin P, Michell DL (1997) Melanin : a two edged sword ? *Pigment Cell Res*, 10, 158-161
11. Kobayashi T, Urabe K, Winder AJ, Jimenez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, Garcia-Borrón JC, Hearing VJ (1994) Tyrosinase related protein-1 (TRP-1) function as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. *EMBO J*, 3, 5818-5825
12. Briganti S, Camera E, Picardo M (2003) Chemical and instrumental approaches to treat hyperpigmentation. *Pigment Cell Res*, 16, 101-110
13. Ranke J, Mölter K, Stock F, Bottin-Weber U, Poczarbut J, Hoffmann J, Ondruschka B, Filser J, Jastorff B (2004) Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicol Environ Saf*, 58, 396-404
14. Miliauskas G, Venskutonis PR, van Beek TA (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chem*, 85, 231-237
15. Farag RS (1989) Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. *J Food Prot*, 52, 665-670
16. Masamoto Y, Ando H, Murata Y, Shimoishi Y, Tada M, Takahata K (2003) Mushroom tyrosinase inhibitory activity of esculetin isolated from seeds of *Euphorbia lathyris* L.. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67, 631-634
17. Hosoi J, Abe E, Suda T, Kuroki T (1985) Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D3 and retinoic acid. *Cancer Res*, 45, 1474-1478
18. Yoon HS, Yang KW, Kim JE, Kim JM, Lee NH, Hyun CG (2014) Hypopigmenting effects of extracts from bulbs of *Lilium* Oriental Hybrid 'Siberia' in murine B16/F10 melanoma cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 43, 705-711
19. Jin KS, Lee JY, Kwon HJ, Kim BW (2013) Anti-oxidative, anti-inflammatory, and anti-melanogenic activities of *Endlicheria anomala* extract. *Korean J Microbiol Biotechnol*, 41, 433-441