

버드나무 속 식물 추출물의 항산화, 항염 및 콜라게나제 저해 활성 연구

정 용 운 · 박 영 진[†]

건국대학교 의료생명대학 바이오융합과학부, 의료생명연구소
(2018년 8월 7일 접수, 2018년 9월 10일 수정, 2018년 9월 12일 채택)

Studies on Antioxidant, Anti-Inflammation, and Collagenase Inhibitory Effects of Extracts from Plants of The *Salix* genus

Yong Un Jeong and Young Jin Park[†]

Department of Integrated Biosciences, Research Institute for Biomedical & Health Science,
College of Biomedical and Health Science, Konkuk University, 268 Chungwon-daero, Chungju-si 27478, Korea
(Received August 14, 2018; Revised September 16, 2018; Accepted September 28, 2018)

요약: 본 연구는 버드나무 속 식물의 화장품 소재로서의 활용 가능성을 평가하기 위해 수행하였다. 버드나무 속 식물 중 갯버들, 능수버들 및 키버들 70% 에탄올 추출물의 DPPH radical 소거능 분석을 통한 항산화 활성을 평가한 결과 모든 추출물이 대조군에 비해 DPPH radical 소거능이 유의적으로 증가하였다. 또한 3종의 버드나무 속 식물 추출물 처리는 RAW 264.7 세포의 nitric oxide (NO) 생성을 유의적으로 억제하여 항염 활성이 있는 것으로 확인되었으며, 모두 콜라게나제 저해 활성이 있는 것으로 확인되었다. 그 중 갯버들 추출물이 가장 높은 콜라게나제 저해활성을 나타내어 갯버들 추출물의 용매 분획물에 대한 추가적인 콜라게나제 저해활성을 분석한 결과, 물 및 부탄올 분획물이 가장 높은 콜라게나제 저해활성이 있는 것으로 확인되었다. 결과적으로 버드나무 속 식물 중 갯버들은 높은 콜라게나제 저해활성이 있는 것으로 확인되어 향후 효과적인 기능성 화장품 소재로 활용 가능 할 것으로 사료된다.

Abstract: This study was carried out to evaluate the possibility of willow plants (the genus *Salix*) as a cosmetic material. DPPH radical scavenging abilities of 70% ethanol extracts of *S. gracilistyla*, *S. pseudolasiogyne*, and *S. koriyanagi* were significantly increased compared to control. In addition, the treatment of three species of willow plant extracts significantly inhibited the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells, indicating that they had anti-inflammatory activity, and all of them had collagenase inhibitory activity. Among them, the extracts of *S. gracilistyla* extracts exhibited the highest collagenase inhibitory activity. As a result of analyzing the collagenase inhibitory activity against the solvent fraction of *S. gracilistyla* extracts, water and butanol fractions showed the highest collagenase inhibitory activity. These results suggested that *S. gracilistyla* among the willow plants had high collagenase inhibitory activity, and thus it can be utilized for cosmetics as an effective functional cosmetic material in the future.

Keywords: willow plant, the *Salix* genus, antioxidant, anti-inflammation, collagenase

1. 서 론

피부의 노화 및 주름은 여러 가지 미적 혹은 기능적 변화를 일으킬 수 있는 복잡한 과정이다. Type I collagen은 가장 풍부한 섬유상 형태의 콜라겐(fibrillar type

[†] 주 저자 (e-mail: yjpark@kku.ac.kr)
call: 043)840-3601

collagen)으로 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)의 주요 구조적 성분이다. Type I collagen의 수용성 전구체인 type I procollagen은 섬유아세포에서 합성되어 분비되며, procollagen N-protease와 C-protease에 의해 분해되어 콜라겐 섬유로 형성된다[1]. 다양한 matrix metalloproteases (MMPs, homogeneous zinc-dependent endopeptidases) 계열의 효소는 ECM의 모든 구성 성분을 분해할 수 있으며, 그중 콜라게나제는 ECM의 콜라겐 섬유를 분해할 수 있다. 따라서 콜라게나제는 정상적인 결합 조직에서 콜라겐을 분해하는 핵심 효소이며, 특히 피부의 주름을 형성하는데 주요한 원인이 되는 효소이다. 이러한 이유로 콜라게나제 활성을 억제할 수 있는 소재는 피부의 주름형성을 방지할 수 있는 기능성 화장품 소재로 활용될 수 있다[2,3]. 현재까지 주로 식물의 다양한 플라보노이드류가 피부 항노화와 관련된 활성 성분으로 분리되어 보고되었으나, epicatechin gallate (ECG)와 epigallocatechin gallate (EGCG) 등의 몇몇 성분을 제외하고는 콜라게나제의 활성을 직접적으로 저해하는 효과적인 성분은 많이 밝혀지지 않은 실정이다[4-6].

버드나무 속(the genus *Salix*)에 속하는 식물은 전 세계에 약 400여 종이 분포하며[7], 한국에서는 일반적으로 버드나무(*S. koreensis*)가 가장 대표적인 종이며, 그 외에도 수양버들(*S. babylonica*), 갯버들(*S. gracilistyla*), 능수버들(*S. pseudolasiogyne*), 키버들(*S. koriyanagi*) 등 총 30여 종이 분포한다 [8]. 주로 유럽에 많이 분포하는 *S. alba* (White willow)의 껍질은 해열·진통 작용을 한다는 것으로 잘 알려져 있다[9,10]. 살리신(salicin)이 대표적인 활성 성분이며, 이외에도 다양한 배당체 등도 확인되었다[11]. 버드나무는 항산화[12], 항염[13], 항비만[14], 항암[15] 등 다양한 생리활성이 있는 것으로 보고되었다. 이러한 버드나무 속 식물 중 갯버들(*S. gracilistyla*)은 한국, 일본, 중국의 강 연안에서 분포하며, 높이는 1-2 m이고 뿌리 근처에서 가지가 많이 나온다. 어린 가지는 노란빛이 도는 녹색으로 털이 있으며, 잎은 양 끝이 뾰족하고 톱니가 있으며, 잎자루의 길이는 3-10 mm이다[16]. 능수버들(*S. pseudolasiogyne*)은 한국 및 중국에 분포하며, 높이는 20 m이고 잎은 피침형이며 길이 7-12 cm, 폭 10-17 mm로서 췌기모양이다 [17]. 키버들(*S. koriyanagi*)은 한반도 고유종으로 주로 강원도, 황해도 및 평안남북도에 분포하며, 높이는 2-3 m이고 잎은 어긋나기하며 선상 피침형이다 [17]. 이 중

갯버들 나무껍질은 오래전부터 한방에서는 진통제로 사용되었다. 또한, 줄기와 잎은 피부병과 상처치료를 위한 약재로 사용되었으며, 뿌리는 관절염에 효능이 있는 것으로 알려져 있다[16,18]. 그러나 국내의 다양한 지역에 널리 분포하고 있는 버드나무 속 식물에 대한 연구는 미흡한 실정이며, 특히 피부 기능 개선을 위한 생리활성 연구도 거의 이루어지지 않은 실정이다. 따라서 본 연구에서는 버드나무 속 식물 중 갯버들, 능수버들 및 키버들 추출물의 DPPH radical 소거능 분석을 통한 항산화효과, 항염 효과 및 collagenase 억제활성 평가를 통하여 새로운 기능성 화장품 소재로서의 활용가능성을 확인하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 추출물 제조 및 용매분획

본 연구를 위하여 사용된 갯버들(*S. gracilistyla*), 능수버들(*S. pseudolasiogyne*) 및 키버들(*S. koriyanagi*)은 JW 파마켄에서 제공받아 사용하였다. 100 mL 플라스크에 분쇄된 버드나무 속 식물 줄기(20 g)를 나누어 넣고 70% 에탄올 50 mL와 혼합하여 2 h 동안 75 °C에서 2회 환류 추출하였다. 추출물은 여과지(Whatman No.2, GE Health care, UK)를 이용하여 여과한 후 감압농축하여 추출물을 확보하였다. 또한 갯버들에 대한 추가적인 분석을 위해 갯버들 추출물을 3배의 증류수로 현탁시키고 용매 극성에 따라 순차적으로 hexan, dichloromethan, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 분획물을 확보하였다.

2.2. DPPH Radical 소거능 평가

버드나무 속 식물 추출물의 항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능을 분석하여 평가하였다. 100 μ L의 DPPH 용액(0.2 mM in methanol, Santacruz Co.)과 메탄올에 희석된 시료 100 μ L를 혼합하여 10 min간 반응시킨 뒤 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 소거 활성은 다음의 공식에 의해 나타내었다.

$$DPPH\ radical\ 소거능(\%) = \left[1 - \left(\frac{\text{실험군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

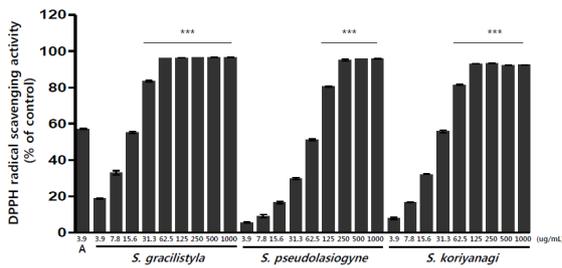


Figure 1. DPPH radical scavenging activities of *S. gracilistyla*, *S. pseudolasiogyne*, and *S. koriyanagi* extracts. A, ascorbic acid. Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. *** $p < 0.001$.

2.3. RAW 264.7 세포배양 및 세포 생존율 평가

쥐 유래 대식세포(RAW 264.7)는 American type culture collection (ATCC, USA)로부터 분양받아 10% FBS 및 1% 항생제(페니실린 및 스트렙토마이신)를 함유하는 RPMI (Thermo Fisher Scientific Inc., USA) 배지를 사용하여 37 °C (5% CO₂)에서 배양하여 사용하였다. RAW 264.7 세포 생존율 분석은 *in vitro* toxicology assay kit (Sigma, Korea)를 사용하여 평가하였다. 세포를 다양한 농도의 시료를 처리하여 37 °C (5% CO₂) 조건에서 24 h 배양한 후 neutral red를 처리한 후, 빛을 차단하여 1 h 반응하였다. 반응 후 neutral red가 포함된 배지를 제거하고, 고정액을 사용하여 고정시킨 뒤 용해액 500 µL를 가하여 neutral red crystal을 용해시키고, 용해액 200 µL를 취해 96-well plate에 옮긴 뒤, 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존율을 확인하였다. 세포 생존율은 다음의 공식에 의해 나타내었다.

$$\text{세포 생존율}(\%) = \frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

2.4. RAW 264.7 세포의 NO 생성 억제 평가

버드나무 속 식물 추출물의 항염 활성은 RAW 264.7의 NO 생성 억제율로 평가하였다. RAW 264.7를 10% FBS가 함유된 RPMI를 사용하여 24-well plate에 5×10^4 cells/well로 500 µL씩 분주하고 37 °C (5% CO₂)에서 24 h 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 다양한 농도의 시료를 처리하여 37 °C에서 30 min 반응하였다. 반응 후 Lipopolysaccharides (LPS, Sigma, USA)를 1 µg/mL 처리하여 37 °C에서 24 h 추가 배양하였다. 배

양 후 96-well plate에 세포 배양액을 100 µL씩 옮겨 담은 뒤, 동량의 Griess reagent를 첨가하여 상온에서 10 min간 반응 후 530 nm에서 흡광도를 측정하여 nitrite 표준 검량 곡선과 비교하여 NO 생성량을 측정하였다.

2.5. In Vitro 콜라게나제 저해 활성 평가

4 mM의 CaCl₂를 함유하는 0.1 M Tris-HCl 용액(pH 7.5)에 4-phenylazobenzoyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg (0.3 mg/mL)과 콜라게나제(0.2 mg/mL)를 각각 첨가하여 기질액과 효소액을 조제하였고 콜라게나제 실험 최적 조건 평가에 따라, 효소액을 8배 희석하여 기질액 125 µL, 효소액 75 µL 및 시료 50 µL를 혼합한 후 37 °C에서 20 min 반응하였다. 반응 후 6% citric acid를 250 µL 첨가하여 반응을 정지시키고, 에틸아세테이트 750 µL를 첨가하였다. 상등액 200 µL를 취하여 96-well plate에 옮기고 320 nm에서 흡광도를 측정하여 콜라게나제 저해 활성을 평가하였다. 콜라게나제 저해 활성은 다음의 공식에 의해 나타내었다.

$$\text{콜라게나제 저해율}(\%) = \left[1 - \left(\frac{\text{실험군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \right] \times 100$$

2.6. 통계처리

모든 실험은 3회 반복하여 평균값 ± 표준편차로 나타내었으며, Prism (GraphPad Software Inc., USA) 프로그램을 사용하여 분산분석(one-way analysis of variance, ANOVA) 및 Tukey's test에 의한 사후검정을 통해 통계 분석을 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 버드나무 속 식물 추출물의 DPPH Radical 소거활성

일반적으로 항산화제의 DPPH에 대한 수소공여능 또는 라디칼 소거능을 통하여 항산화능 평가를 수행한다 [20]. 본 연구에서도 3종의 버드나무 속 식물 추출물의 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거능을 통하여 분석 하였다(Figure 1). 3종의 버드나무 속 식물 70% 에탄올 추출물 모두 높은 DPPH radical 소거 활성을 나타내었으며, 갯버들 추출물 62.5 µg/mL, 능수버들 250 µg/mL 및 키버들 125 µg/mL 이상의 처리 농도는 대조구인 ascorbic acid 처리 보다 약 2배 높은 DPPH radical

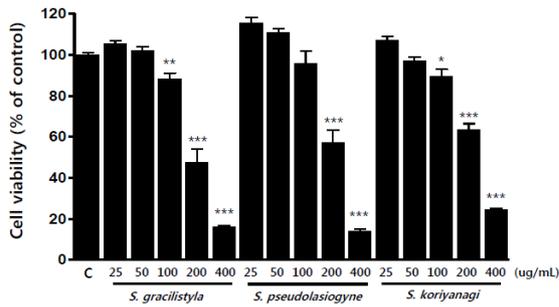


Figure 2. Effects of *S. gracilistyla*, *S. pseudolasiogyne*, and *S. koriyanagi* extracts on RAW 264.7 cell viability. Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. ****p* < 0.001, ***p* < 0.01, and **p* < 0.05. C, non-treated control.

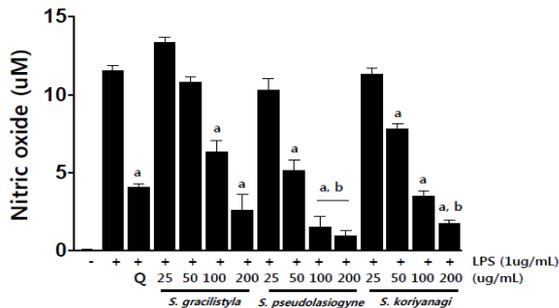


Figure 3. Effects of *S. gracilistyla*, *S. pseudolasiogyne*, and *S. koriyanagi* extracts on nitric oxide production of RAW 264.7 cells. Q, quercetin (15 μ M). Statistical significance of differences was evaluated using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. a, 0.001 < *p* versus non-treated sample treated with LPS. b, 0.001 < *p* versus quercetin.

소거능을 나타내었다. 그중 갯버들 추출물이 가장 낮은 농도(3.9 μ g/mL)에서 가장 높은 DPPH radical 소거 활성(19.68%)을 나타내었다(Figure 1A). 이러한 버드나무 속 식물 추출물의 높은 DPPH radical 소거활성은 이들 식물의 다양한 항산화 활성 물질이 있다는 것을 의미하며, 특히 식물 유래 항산화 활성 성분 중 가장 잘 알려진 페놀화합물 및 플라보노이드 성분이 많이 존재할 것으로 사료된다[21]. 이러한 페놀화합물 및 플라보노이드 성분은 활성 산소 제거 및 free radical 소거로 다양한 질병을 예방하거나 개선할 수 있다고 보고되었다[22,23]. 따라서 버드나무 속 식물 추출물의 높은 DPPH radical 소거 활성은 향후 항산화 효과를 가지는 기능성

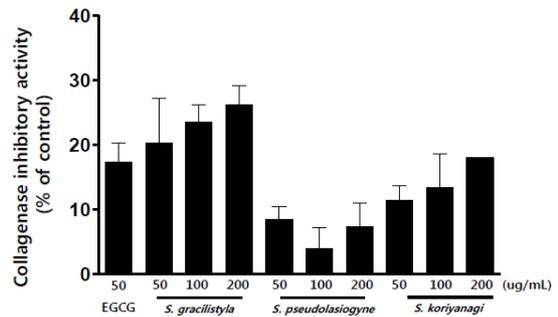


Figure 4. Effects of *S. gracilistyla*, *S. pseudolasiogyne*, and *S. koriyanagi* extracts on collagenase inhibitory activities. EGCG, epigallocatechin gallate.

화장품 소재로 활용 가능하다는 것을 의미한다.

3.2. 버드나무 속 식물 추출물의 항염 활성

버드나무 속 식물 추출물의 항염 활성 평가에 앞서 RAW 264.7 세포의 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위해 추출물을 농도별(25, 50, 100, 200 μ g/mL)로 처리하였다. 그 결과 갯버들, 능수버들 및 키버들 추출물 모두 100 μ g/mL의 처리농도에서 각각 88.19%, 96.02% 및 89.39%의 세포 생존율이 확인되었다(Figure 2). 그러나 3종의 버드나무 속 식물 추출물 모두 200 μ g/mL 이상의 처리는 RAW 264.7 세포의 생존율이 80% 이하로 감소시키는 것이 확인되었다. 3종의 버드나무 속 식물 추출물의 RAW 264.7 세포 NO 생성 억제능을 평가한 결과, 갯버들, 능수버들 및 키버들 추출물은 각 100, 50 및 50 μ g/mL 이상의 처리농도에서 유의적인 수준으로 NO 생성이 억제되는 것을 확인하였다(Figure 3). 3종의 버드나무 속 식물 추출물 중 능수버들 추출물은 가장 낮은 농도(50 μ g/mL)에서 가장 높은 NO 생성 억제능을 나타내었다. 또한 능수버들 추출물 100 및 200 μ g/mL의 처리는 대조구인 quercetin (15 μ M)과 대비하여 유의한 수준의 억제능을 보였다. 이와 유사하게 200 μ g/mL 농도의 키버들 추출물 처리도 quercetin과 대비하여 효과적인 NO 생성 억제능을 나타내었다. 결과적으로 3종의 버드나무 속 식물 추출물은 모두 RAW 264.7 세포의 80% 이상의 세포 생존율을 보이는 100 μ g/mL 농도에서 유의한 수준으로 NO 생성을 억제하여 향후 효과적인 항염 활성 소재 및 기능성 화장품 소재로 활용가능성이 높다고 사료된다.

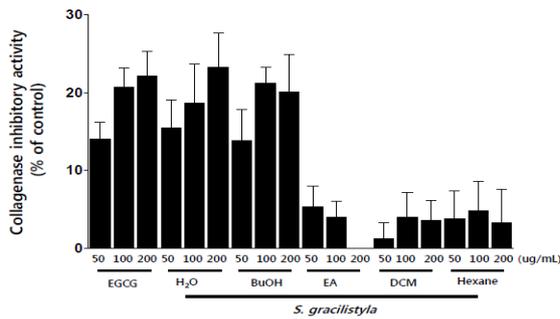


Figure 5. Effects of *S. gracilistyla* solvents fractions on collagenase inhibitory activities. EGCG, epigallocatechin gallate. H₂O, water fraction. BuOH, butanol fraction. EA, ethyl acetate fraction. DCM, dichloromethane fraction. Hexane, *n*-hexane fraction.

3.3. 버드나무 속 식물 추출물 및 갯버들 용매 분획물이 콜라게나제 활성에 미치는 영향

버드나무 속 식물 추출물이 콜라게나제 활성에 미치는 영향을 분석하기 위해 각 추출물의 50, 100 및 200 µg/mL 농도로 콜라게나제 저해 활성을 분석하였다 (Figure 4). 우선 갯버들 추출물을 처리한 결과, 50, 100 및 200 µg/mL 처리 농도에서 대조구인 epigallocatechin gallate (EGCG)보다 높은 수준인 20.29%, 23.51% 및 26.15%로 콜라게나제 활성을 저해하는 것으로 나타났다. 키버들 추출물 또한 농도 의존적으로 콜라게나제 활성을 저해 하는 것으로 나타났으며, 200 µg/mL 농도에서 가장 높은 17.97%의 저해 활성을 보였다. 그러나 능수버들 추출물은 3종의 버드나무 속 식물 추출물 중 모든 처리농도에서 가장 낮은 수준의 콜라게나제 저해 활성을 나타내었다. 갯버들 추출물은 다른 2종의 버드나무 속 식물 추출물 보다 2배 이상의 콜라게나제 저해 활성을 나타내었으며, EGCG의 저해 활성인 17.28% 보다 더 높은 콜라게나제 저해 활성을 나타내었다. 따라서 갯버들 추출물의 용매분획을 수행하고 이들에 대한 추가적인 콜라게나제 저해 활성을 분석하였다 (Figure 5). 갯버들 물, 부탄올, 에틸아세테이트, 디클로로메탄 및 헥산 분획물의 콜라게나제 저해 활성을 평가한 결과, 물 및 부탄올 분획물의 콜라게나제 저해 활성이 가장 높은 것으로 확인되었으며, 동일한 농도의 대조구인 EGCG와 유사한 콜라게나제 저해 활성을 나타내었다. 특히 200 µg/mL 농도의 물 분획물 처리는 동일한 농도의 EGCG보다 다소 높은 콜라게나제 저해 활성을 나타내었다. 그러나 에틸아세테이트, 디클로로

메탄 및 헥산 분획물은 물 및 부탄올 분획물 보다 상대적으로 낮은 저해 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 갯버들의 콜라게나제 저해 활성을 가지는 활성성분이 극성용매에 함유되어 있는 것을 의미하며, 이들 용매에 함유된 물질의 분리 및 동정으로 향후 콜라게나제 저해 활성을 가지는 새로운 활성 성분의 발굴이 가능할 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 버드나무 속 식물의 기능성 화장품 소재로서의 이용가능성을 확인하고자 수행하였다. 많은 식물 중에는 페놀산 및 플라보노이드 등의 다양한 항산화 성분이 있다고 보고되었으며, 이들의 활성 산소 중 (1O_2 , H_2O_2 , OH)을 제거 능력으로 인해 많은 연구가 이루어 졌다[24-26]. 버드나무의 성분 중에는 다양한 생리활성 작용을 하는 활성성분이 있다고 보고되었으며[12-15], 이 중에는 살리신(salicin), 배당체, 탄닌 및 방향족 알데히드류가 확인되었다[11]. 본 연구에서 도 버드나무 속 식물인 갯버들, 능수버들 및 키버들 추출물이 높은 DPPH radical 소거능을 나타내었으며, RAW 264.7 세포 처리 시 농도 의존적으로 NO 생성을 억제하는 것을 확인하였다. 3종의 버드나무 속 식물 추출물의 콜라게나제 저해 활성을 평가한 결과 갯버들 추출물이 가장 높은 저해 활성을 나타내었으며, 갯버들 추출물의 용매 분획물 중 물 및 부탄올 분획물이 대조구인 EGCG보다 상대적으로 높은 콜라게나제 저해 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 버드나무 속 식물 추출물이 항산화 및 미백활성을 갖는 기능성 화장품 소재로 활용 가능하다는 것을 의미한다. 또한 갯버들 추출물은 향후 추가적인 연구로 콜라게나제 저해 활성을 가지는 활성성분의 분리 및 동정이 가능할 것으로 사료되며, 이를 통한 새로운 기능성 화장품 소재의 개발도 가능하다고 사료된다.

Acknowledgement

본 연구는 중소벤처기업부의 기술혁신개발사업의 일환으로 수행하였음[S2447548, 영지버섯 군사체를 이용한 발효 갯버들 함유 항노화 화장품 개발 및 사업화].

Reference

1. T. Quan, T. He, S. Kang, J. J. Voorhees, and G. J. Fisher, Solar ultraviolet irradiation reduces collagen in photoaged human skin by blocking transforming growth factor-type II receptor / Smad signaling, *Am. J. Pathol.*, **165**, 741 (2004).
2. S. Chakraborti, M. Mandal, S. Das, A. Mandal, and T. Chakraborti, Regulation of matrix metalloproteinases: an overview, *Mol. Cell. Biochem.*, **253**, 269 (2003).
3. W. D. Shingleton, T. E. Cawston, D. J. Hodges, and P. Brick, Collagenase: a key enzyme in collagen turnover, *Biochem. Cell Biol.*, **74**, 759 (1996).
4. E. Tripoli, M. La Guardia, S. Giammanco, D. Di Majo, and M. Giammanco, Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review, *Food Chem.*, **104**, 466 (2007).
5. M. Makimura, M. Hirasawa, K. Kobayashi, J. Indo, S. Sakanaka, T. Taguchi, and S. Otake, Inhibitory effect of tea catechins on collagenase activity, *J. Periodontol.*, **64**, 630 (1993).
6. Z. Liu, F. Li, L. Zhang, H. Yu, F. Yu, and J. Chen, The effect of active components from citrus fruits on dentin MMPs, *Arch. Oral Biol.*, **83**, 111 (2017).
7. D. Mabberley, *Mabberley's plant-book: a portable dictionary of plants, their classification and uses*, Cambridge university press, Cambridge (2017).
8. M. H. Kim, Antioxidant activity and anti-inflammatory effects of *Salix Koreensis* andersson branches extracts, *J. Korean Soc. Food Cult.*, **33**, 104 (2018).
9. Q. Du, G. Jerz, L. Shen, L. Xiu, and P. Winterhalter, Isolation and structure determination of a lignan from the bark of *Salix alba*, *Nat. Prod. Res.*, **21**, 451 (2007).
10. A. Freischmidt, G. Jrgenliemk, B. Kraus, S. N. Okpanyi, J. Mller, O. Kelber, D. Weiser, and J. Heilmann, Contribution of flavonoids and catechol to the reduction of ICAM-1 expression in endothelial cells by a standardised willow bark extract, *Phytomedicine*, **19**, 245 (2012).
11. R. S. Shivatare, M. L. Phopase, D. H. Nagore, S. U. Nipanikar, and S. S. Chitlange, Development and validation of HPLC analytical protocol for quantification of salicin from *Salix alba* L., *Inventi Rapid: Pharm Analysis & Quality Assurance*, **2015**, 61 (2015).
12. M. S. Alam, G. Kaur, Z. Jabbar, K. Javed, and M. Athar, Evaluation of antioxidant activity of *Salix caprea* flowers, *Phytother. Res.*, **20**, 479 (2006).
13. X. Li, Z. Liu, X. F. Zhang, L. J. Wang, Y. N. Zheng, C. C. Yuan, and G. Z. Sun, Isolation and characterization of phenolic compounds from the leaves of *Salix matsudana*, *Molecules*, **13**, 1530 (2008).
14. L. K. Han, M. Sumiyoshi, J. Zhang, M. X. Liu, X. F. Zhang, Y. N. Zheng, H. Okuda, and Y. Kimura, Anti-obesity action by polyphenols of *Salix matsudana* in high fat-diet treated rodent animals, *Phytother. Res.*, **17**, 1188 (2003).
15. S. Sultana and M. Saleem, *Salix caprea* inhibits skin carcinogenesis in murine skin: inhibition of oxidative stress, Ornithine decarboxylase activity and DNA synthesis, *J. Ethnopharmacol.*, **91**, 267 (2003).
16. S. K. Kim, Ph. D. Dissertation, Nambu Univ., Gwangju, Korea (2017).
17. Korea Biodiversity Information System (<http://www.nature.go.kr/ekbi/SubIndex.do>).
18. J. H. Seo, Master's Thesis, Andong National Univ., Andong, Korea (2001).
19. G. Repetto, A. D. Peso, and J. L. Zurita, Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity, *Nature protocols*, **3**, 1125 (2008).
20. C. C. Wei, C. W. Yu, P. L. Yen, H. Y. Lin, S. T. Chang F. L. Hsu, and V. H. Liao, Antioxidant activity, delayed aging, and reduced amyloid- β toxicity of methanol extracts of tea seed pomace from *Camellia tenuifolia*, *J. Agric. Food Chem.*, **62**, 10701 (2014).
21. Y. S. Velioglu, G. Mazza, L. Gao, and B. D. Oomah, Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products, *J. Agric. Food Chem.*, **46**, 4113 (1998).
22. N. Nakatani, Recent advances in the study on natural antioxidants, *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **37**,

- 569 (1990).
23. K. Nozaki, Current aspect and future condition of phyto-genic antioxidants, *Fragrance Journal*, **6**, 99 (1986).
24. Y. H. Cao and R. H. Cao, Angiogenesis inhibited by drinking tea, *Nature*, **398**, 381 (1999).
25. H. L. Madsen and G. Bertelsen, Spices as anti-oxidants, *Trends Food Sci. Technol.*, **6**, 271 (1995).
26. M. P. Kahkonen, A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J. P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala, and M. Heinonen, Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.*, **47**, 3954 (1999).