

## 구절초 꽃 추출물의 항산화, 항염증 및 멜라닌 생성 억제 효과에 관한 연구

유선희<sup>a</sup> · 문지선<sup>b†</sup>

건국대학교 생물공학과<sup>a</sup>, 중원대학교 뷰티헬스학과<sup>b†</sup>  
(2016년 10월 20일 접수; 2016년 12월 7일 수정; 2016년 12월 27일 채택)

### A Study on Anti-oxidative, Anti-inflammatory, and Melanin Inhibitory Effects of Chrysanthemum Sibiricum Extract

Seon-hee You<sup>a</sup> · Ji-sun Moon<sup>b†</sup>

<sup>a</sup>Department of Bioengineering, Konkuk University,  
120, Neungdong-ro, Gwangjin-gu, Seoul, 05029, Korea

<sup>†b</sup>Department of Beauty Health, Jungwon University,  
85, Munmu-ro, Goesan-eup, Goesan-gun, Chungbuk, 28024, Korea  
(Received October 20, 2016; Revised December 7, 2016; Accepted December 27, 2016)

**요약** : 본 연구는 구절초 꽃 추출물이 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 관찰하기 위하여 항산화 활성과 피부세포에 대한 세포독성, 항염증, 멜라닌 생합성 억제능에 미치는 영향을 관찰하였다. 본 연구 결과 구절초 꽃 추출물에서 폴리페놀과 플라보노이드의 높은 함량과 뛰어난 DPPH radical 소거작용을 확인하였고, Raw 264.7세포와 B16F10세포에 대해 유의한 세포독성을 나타나지 않았으며, Raw 264.7세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 유의하게 억제함으로써 항염증 효과를 확인하였다. 구절초 꽃 추출물이 B16F10세포에  $\alpha$ -MSH로 멜라닌 생성을 유도한 후 멜라닌 생합성 억제능을 측정한 결과 멜라닌의 생성 증가를 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과로 보아 구절초 꽃 추출물은 세포에 대한 독성이 낮고, 높은 항산화 활성과 항염증, 미백효과를 가진 기능성 화장품소재로서의 활용 가능성이 있을 것으로 사료된다.

**주제어** : 구절초, 기능성 화장품, 멜라닌, 항산화, 항염증

**Abstract** : The purpose of this study is to observe how Chrysanthemum Sibiricum Extract has anti-oxidant activity, cytotoxicity for skin cells, and anti-inflammatory and melanin inhibitory effects in order to find the development possibility of Chrysanthemum Sibiricum Extract as the ingredient of a functional cosmetic product. According to the analysis, Chrysanthemum Sibiricum Extract was found to have high contents of polyphenols and flavonoids and excellent DPPH radical scavenging activity. The extract had no significant cytotoxicity for Raw 264.7 cell and B16F10 cell

<sup>†</sup>Corresponding author  
(E-mail: mjs@jwu.ac.kr)

and significantly inhibited the creation of NO induced LPS in Raw 264.7 cell so as to present anti-inflammatory effect. In B16F10 cell, melanin creation was induced with  $\alpha$ -MSH, and then melanin biosynthesis inhibition was measured. As a result, melanin creation was inhibited in the concentration dependence way. Given the results, it is considered that Chrysanthemum Sibiricum Extract is applicable as the ingredient of a functional cosmetic product that has low cytotoxicity for skin cells, high anti-oxidant activity, anti-inflammatory effect, and whitening effect.

*Keywords* : antioxidative activity, Chrysanthemum zawadskii, Functional cosmetics Melanin, Nitric oxide

## 1. 서론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)는 주로 피부노화와 질병의 원인으로 알려져 있다. ROS의 반응성은 산소분자처럼 매우 낮은 것에서부터 superoxide radical( $O_2 \cdot^-$ ), hydroxyl radical( $OH \cdot$ ), hydrogen peroxide( $H_2 O_2$ ), singlet oxygen( $^1 O_2$ )과 같이 매우 높은 것에 이르기까지 다양하다[1]. 이들은 생체에서 치명적인 산소독성을 일으키며, DNA 변성, 지질 산화, 단백질과 세포막 분해 등을 초래하여 세포의 기능 장애와 암을 비롯한 뇌졸중, 파킨슨 병 등의 뇌질환, 동맥경화, 심장질환, 자가면역질환, 염증, 노화 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다[2-4]. 이러한 활성 산소를 제거하거나 조절할 수 있는 물질로 알려진 비타민C, 비타민E, 플라보노이드류, 카로티노이드류, 폴리페놀과 같은 천연항산화제와 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase등과 같은 항산화 효소, 합성 항산화제인 butylated hydroxytoluene (BHT), butylated hydroxyanisole(BHA)등이 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있으며, 항산화제의 개발에 관한 연구가 활발하게 진행되어 여러 항산화제에 대한 연구결과들이 보고되고 있다 [5-12]. 하지만 합성 항산화제의 경우 생체 효소와 지방의 변이, 독성으로 인해 인체에 암을 유발할 수 있다는 보고가 되고 있어서 보다 인체에 안전하고 높은 활성을 가진 천연 항산화제의 연구가 요구되고 있다[13-15]. 이에 더하여 자외선으로 인하여 생성되는 ROS는 멜라닌 세포에 멜라닌을 합성을 증가시키는 것으로 보고되고 있다 [16]. 멜라닌은 피부에 존재하는 색소로서, 여러 효소에 의해 합성되며 tyrosinase는 L-tyrosine을 L-dihydroxy phenylalanin (L-DOPA)으로,

L-DOPA을 DOPA Aquinone으로 변화시킨다. tyrosinase-related protein-1(TRP-1)은 black과 brown 색소인 eumelanin 생성에 관하여 microphthalmia-associatedtranscription factor(MITF)는 멜라닌 생성에 관여하는 tyrosinase와 TRP-1, TRP-2등의 발현에 관여하는 전사인자로 이들 효소의 유전자 발현을 증가시켜 멜라닌을 합성하게 된다[17]. 멜라닌이 과도하게 생성될 경우 피부에 색소가 침착되면서 기미와 주근깨를 형성하고, 나아가 피부암의 원인이 되기도 한다[18].

현재까지 사용 중인 미백성분으로서 알부틴(arbutis), 하이드로퀴논(hydroquinone), 코지산(kojic acid), 비타민C 및 이들의 유도체와 여러 식물 추출물이 있으나, 이러한 물질은 불안정하여 착색, 분해, 이취, 효과의 불분명 및 안정성 문제 등으로 화장품에 사용이 제한되고 있는 실정이다 [19,20]. 이에 따라 최근 생리활성물질을 다량 함유하고, 인체에 대한 부작용이 적은 식물유래 천연물에 대한 연구가 활발해지고 있으며, 특히 부작용이 낮은 천연물을 활용한 화장품에 대한 연구가 산업적 선호도가 증가하고 있는 추세이다 [21].

본 연구에 이용된 구절초(*Chrysanthemum zawadskii* var. latilobum)는 국화과에 속하는 다년생 쌍떡잎식물로[22], 전초의 생약명은 선모초(仙母草), 구절초(九折草)라 하며, 종류는 매우 다양하여 가는잎구절초, 산구절초, 포천구절초, 한라구절초, 낙동구절초 등이 있다[23,24]. 예로부터 구절초의 전초와 꽃이삭은 폐렴, 기관지염 등의 호흡기 질환성 염증, 방광질환, 부인병, 위장병 및 고혈압 등에 사용되어 왔다[25-27]. 현재까지 구절초에 관한 생리활성 연구로는 항균활성에 관한 연구[28-30], 항산화 효과[31-34], 구

절초 정유에 관한 분석[35], HPLC에 의한 구절초의 Chlorogenic 및 분석에 관한 연구[36], 구절초의 세포독성 연구[37] 등이 보고되어 있다. 하지만 화장품 소재로서의 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구서는 구절초 꽃 추출물의 항산화 효과와 피부 세포에서의 독성 및 항염증, 멜라닌 생합성 저해효과에 대하여 측정하여 기능성 화장품 소재로서의 응용 가능성을 검토하고자 하였다.

## 2. 시료 준비 및 방법

### 2.1. 시료 준비

본 실험에 사용된 구절초 꽃은 건조하여 증류수에 10배의 무게를 가한 후 37°C 인큐베이터 안에서 72시간 추출하였다. 추출 후 고형분은 여과지(Whatman No.2)를 이용하여 여과한 후 rotary evaporator를 이용하여 감압 농축하여 용매를 완전히 휘발시킨 후 동결건조하여 본 실험에 사용하였다.

### 2.2. 세포주 및 세포 배양

본 실험에 사용한 세포주인 B16F10세포, RAW 264.7세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 구입하여 사용하였으며, High glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, USA) 배지에 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma, USA)과 1% antibiotic-antimycotic (Sigma, USA)를 첨가하여, 37°C, 5%의 CO<sub>2</sub>가 공급되는 습윤 배양기에서 배양하였다.

### 2.3. Total phenolic compound 함량 측정

구절초 꽃 추출물의 총 폴리페놀 함량의 측정은 Folin-Denis 방법으로 정량하였다[38]. 시료를 1, 2.5, 5, 10 mg/mL가 되도록 농도별로 희석한 후 시료 400 μL와 Folin-Denis reagent 400 μL를 혼합하여 3분간 반응시킨 후, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 400 μL를 혼합하여, 암실에서 반응시켰다. 60분 후 96 well plate에 상등액 200 μL를 취하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.4. Total flavonoid 함량 측정

구절초 꽃 추출물의 총 플라보노이드 함량은 Moreno방법을 이용하여 측정하였다[39]. 시료를 1, 2.5, 5, 10 mg/mL가 되도록 희석한 후 시료

100 μL와 10% aluminum nitrate 20 μL, 1M potassium acetate 20 μL, ethanol 860 μL를 혼합하여, 실온에서 40분간 방치 후 원심분리로 부유물을 가라앉힌 후 96 well plate에 200 μL씩 분주하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.5. 전자공여능

구절초 꽃 추출물의 전자공여능(electron donating ability, EDA)은 blois의 방법[40]을 이용하여 DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl)에 대한 수소공여효과를 측정하였다. 시료를 1, 2.5, 5, 10 mg/mL가 되도록 희석한 후 96 well plate에 10 mM DPPH용액 180 μL와 시료액 20 μL를 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로는 Ascorbic acid을 사용하였다.

$$\text{DPPH radical 소거활성(\%)} = 100 - ((\text{첨가군 흡광도} / \text{무첨가군 흡광도}) \times 100)$$

### 2.6. Neutral red assay를 이용한 세포독성 측정

구절초 꽃 추출물이 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 neutral red (NR) assay를 이용하여 측정하였다. Raw 264.7세포와 B16F10세포를 96 well plate에 well 당  $3 \times 10^4$  cells/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양기에서 배양하였다. 24시간 후 시료를 10, 20, 50, 100 μg/mL의 농도로 희석하여 처리한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양한 세포 배양액을 NR solution이 1% 포함된 무 혈청배지로 교환하여, 3시간 동안 배양한 다음 현미경하에서 NR의 결정화 유무를 확인하였다. phosphate buffered saline (PBS)에 10% formaldehyde 용액을 첨가하여 각 well에 100 μL씩 분주하여 20분간 고정하였다. NR desorb solution (1% glacial acetic acid, 49% ethanol, 50% distilled water)을 각 well에 100 μL로 분주하여 세포 내의 NR을 추출하고 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포 생존율은 다음의 식에 따라 산출하였다.

세포 생존율(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

## 2.7. Nitric oxide (NO) 생성 저해능 측정

구절초 꽃 추출물의 NO 생성 억제능을 측정하기 위해 세포 배양액내 NO양을 측정하였다. RAW 264.7세포를 96 well plate에 well당  $5 \times 10^4$  cell/well의 농도로 분주한 후 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 LPS (lipopolysaccharide) 1 µg/mL 농도로 처리된 배지에 시료를 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도별로 가하여 48시간 동안 배양하였다. 새로운 96 well plate에 griess reagent 100 µL와 배양된 세포 배양 상층액 100 µL을 가하여 차광된 상태에서 10분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

NO 생성 저해능(%) =

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 540 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 540 nm}} \times 100$$

## 2.8. 멜라닌 생성 저해능 측정

구절초 꽃 추출물의 멜라닌 생성 저해능을 측정하기 위하여 B16F10세포를 이용하여 측정하였다. B16F10세포를 96 well plate에 well당  $2 \times 10^3$  cell/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 공급되는 배양기에서 배양하였다. 세포 부착 확인 후 멜라닌 생성을 촉진하기 위하여 혈청 5%와 α-MSH 100 nM이 포함된 배지로 갈아준 후, 시료를 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 72시간 배양하였다. 분비된 멜라닌의 양은 405 nm에서 흡광도를 측정하였고, 멜라닌 생합성 억제율을 α-MSH 100 nM을 처리한 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

멜라닌 생합성 억제율(%) = 100 -

$$\frac{\text{시료첨가군의 O.D. at 405 nm}}{\text{시료무첨가군의 O.D. at 405 nm}} \times 100$$

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 구절초 꽃 추출물의 항산화 활성

#### 3.1.1. 총 폴리페놀 함량

구절초 꽃 추출물의 폴리페놀 함량을 알아보기 위하여 1, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도를 사용하여 폴리페놀 함량을 측정하였다. 본 연구 결과 구절초 꽃 추출물은 농도 의존적으로 폴리페놀 함량이 증가하였으며, 10 mg/mL 농도에서 124.48 mg/g의 높은 폴리페놀 함량을 확인하였다(Fig. 1).

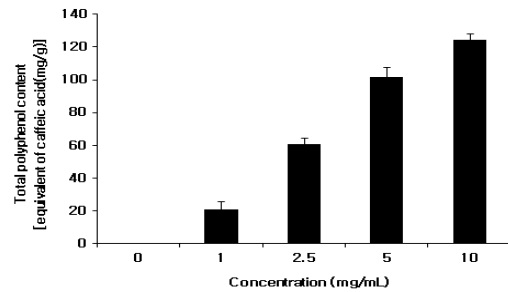


Fig. 1. Change of total polyphenol concentration of *Chrysanthemum zawadskii* extract.

#### 3.1.2. 총 플라보노이드 함량

구절초 꽃 추출물의 총 플라보노이드 함량을 알아보기 위하여 1, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도를 사용하여 총 플라보노이드 함량을 측정하였다. 본 연구 결과 구절초 꽃 추출물은 농도 의존적으로 총 플라보노이드 함량이 증가하였으며, 10 mg/mL 농도에서 236.39 mg/g의 높은 총 플라보노이드 함량을 확인하였다(Fig. 2). 식물 유래 페놀성 화합물은 단순한 phenol류, phenolic acid류, phenylpropanoid류, flavonoid류 등이 대부분 항산화, 항균, 항 알러지에 효과가 있는 것으로 보고되고 있으며[41], 일반적으로 총 폴리페놀과 플라보노이드 함량이 높을수록 항산화 활성도 우수한 경향이 있다고 보고되고 있다[42,43]. 이는 구절초 꽃 추출물의 높은 폴리페놀과 플라보노이드의 함량이 뛰어난 항산화 활성이 있을 것으로 사료되어 진다.

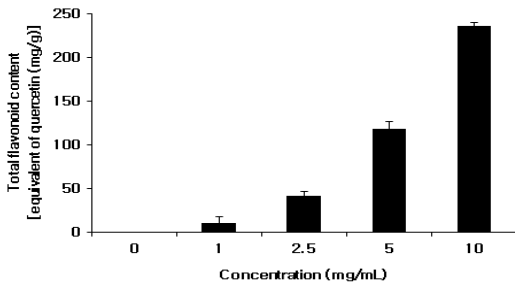


Fig. 2. Change of total flavonoid concentration of *Chrysanthemum zawadskii* extract.

3.1.3. 전자공여능

구절초 꽃 추출물의 전자공여능을 측정하기 위하여 1, 2.5, 5, 10 mg/mL의 농도를 사용하여 측정하였다. 본 연구 결과 구절초 꽃 추출물은 농도에 따라 각각 40.43%, 48.13%, 62.44%, 73.04%의 높은 DPPH radical 소거능을 확인하였으며, 농도가 높아질수록 DPPH radical의 소거능도 증가하였다(Fig. 3). 선행 연구에서는 구절초의 전자공여능과 항산화 측정에서 추출물의 농도가 높아질수록 활성이 증가한다고 보고하였으며 [44], 감국, 국화, 구절초 추출물 중 구절초 추출물이 가장 높은 항산화 활성이 나타났다고 보고하였다[45]. 또한 구절초 추출물의 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량이 높은 추출물에서 DPPH radical 소거능이 높게 나타난다고 보고되고 있다 [46]. 이는 본 연구와 비슷한 결과를 나타내었다.

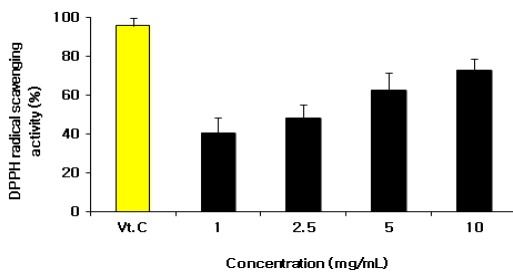


Fig. 3. Change of DPPH radical scavenging activity of *Chrysanthemum zawadskii* extract.

3.2. 구절초 꽃 추출물의 항염증 효과

3.2.1. Raw264.7세포에 대한 세포독성 측정

구절초 꽃 추출물이 대식세포인 Raw 264.7세포에 대한 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 Raw 264.7세포에 구절초 꽃 추출물을 농도별로 처리한 후 NR assay를 실시하였다. 실험 결과 100µg/mL의 농도에서도 2.72%의 낮은 세포독성을 보였으나, 모든 농도에서 유의한 세포독성이 나타나지 않았다(Fig. 4). 따라서 본 실험의 결과로 구절초 꽃 추출물이 Raw 264.7세포에 대한 세포독성이 없는 것을 확인하였으며, 다음 실험을 진행하였다.

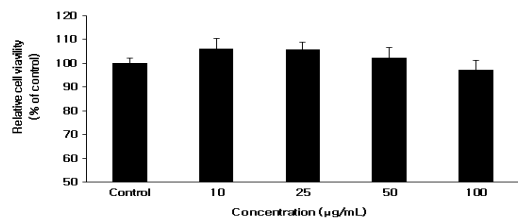


Fig. 4. Effects of *Chrysanthemum zawadskii* extract on cell viability in RAW 264.7 cells.

3.2.2. Raw 264.7세포에 대한 Nitric oxide(NO) 생성 억제능 측정

구절초 꽃 추출물이 자가 면역 질환과 염증성 질환을 초래하는 NO 생성 억제에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 10, 25, 50, 100 µg/mL의 농도를 사용하여 염증 매개 물질인 LPS를 처리한 후 Raw 264.7세포의 신경소교세포에서 생성되어 배양액 중에서의 nitrite (NO<sup>2-</sup>)와 nitrate (NO<sup>3-</sup>)형태로 측정하였다. 본 연구 결과 Raw 264.7세포에 LPS를 처리하여 NO 생성을 유의하게 증가시켰으며, 구절초 꽃 추출물을 농도별로 처리하여 측정한 결과 LPS 처리군에 비해 모든 농도에서 뛰어난 NO 생성 억제효과가 확인되었으며, 10 µg/mL 농도에서 38.8%의 억제 효과를 확인하였다(Fig. 5). 선행 연구에서 구절초 꽃 추출물이 NO 함량을 농도 의존적으로 감소시키는 경향을 나타내었으며 [47], 구절초의 생리활성물질로 알려진 linarin이 항염증 작용이 있다고 보고됨에 따라 [48], 본 연구에서도 linarin이 NO 생성을 억제하여 항염증 효과를 나타내었을 것으로 사료된다.

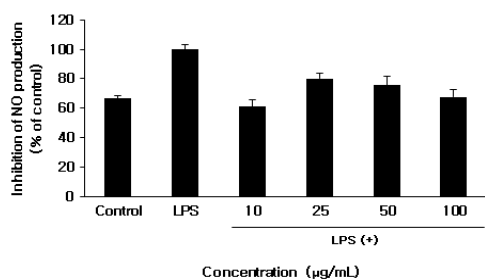


Fig. 5. Inhibition of nitric oxide production in RAW 264.7 cell treated with *Chrysanthemum zawadskii* extract.

### 3.3. 구절초 꽃 추출물의 항 멜라닌 효과

#### 3.3.1. B16F10세포에 대한 세포독성 측정

마우스 피부 유래 멜라닌 형성 세포인 B16F10 세포에 대한 구절초 꽃 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 구절초 꽃 추출물을 농도별로 처리한 후 NR assay를 시행하여 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과, 구절초 꽃 추출물 50 mg/mL 농도까지 13% 이하의 감소율이 나타났으며, 100 mg/mL에서 16.7% 감소됨을 확인하였다(Fig. 6). 따라서 본 실험의 결과로 구절초 꽃 추출물이 B16F10세포에 대한 유의한 세포독성이 없는 것을 확인하였으며, 다음 시험을 진행하였다.

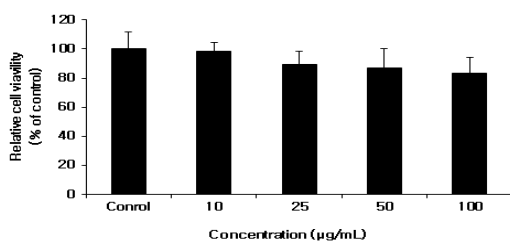


Fig. 6. Effect of *Chrysanthemum zawadskii* extract on cell viability in B16F10 cells.

#### 3.3.2. B16F10세포에 대한 멜라닌 생합성 억제능 측정

본 실험을 통하여 구절초 꽃 추출물의 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하기 위해 B16F10세포에  $\alpha$ -MSH를 처리하여 멜라닌 생성을 유도하였으며, 구절초 꽃 추출물을 농도별로 처리하여 멜라닌 생합성 억제능을 측정하였다. 본 실험이

positive control로 arbutin을 사용하여 멜라닌 세포에 의해 생산된 멜라닌 생성량을 비교하였다. 본 실험 결과 구절초 꽃 추출물은 10, 25, 50, 100 mg/mL 농도에서 11.81%, 13.2%, 15.6%, 22.51%의 억제 효과를 나타내었으며, 구절초 꽃 추출물의 농도 의존적으로 멜라닌 생합성 억제 효과를 확인하였다(Fig. 7). 위의 결과를 토대로 합성 미백제인 arbutin에 비해 미백 활성을 낮지만, 세포에 대한 독성이 거의 없고 멜라닌 생성을 줄여줄 수 있는 미백제로서 긍정적인 소재로 구절초의 활용 가능성이 매우 높을 것으로 사료된다.

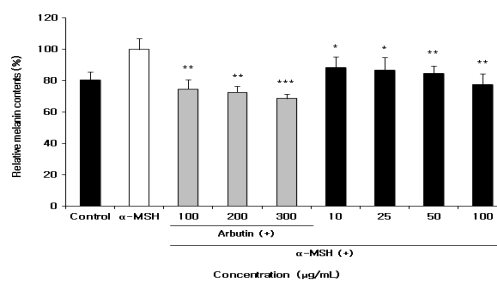


Fig. 7. Inhibition of melanin synthesis in B16F10 melanoma cells treated with *Chrysanthemum zawadskii* extract.

## 4. 결론

본 연구는 구절초 꽃 추출물이 기능성 화장품 소재로서의 개발 가능성을 확인하기 위하여 항산화 작용과 피부세포에 대한 독성, 항염증 효과, 멜라닌 생합성 억제능에 미치는 영향을 관찰하였다. 구절초 꽃 추출물은 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 10 mg/mL 농도에서 124.48 mg/g, 236.39 mg/g의 높은 함량을 나타내었으며, 농도 의존적으로 DPPH radical 소거작용이 확인됨에 따라 뛰어난 항산화 활성을 확인하였다. 구절초 꽃 추출물의 피부 세포에 대한 독성결과 Raw 264.7세포와 B16F10세포에 대하여 유의한 세포독성을 나타내지 않는 것으로 보아 피부 세포에 대한 안전성이 확인되었다. 항염증 효과를 확인하기 위해 Raw 264.7세포에서 LPS에 의해 유도된 NO 생성을 유의하게 억제하였으며, B16F10세포에  $\alpha$ -MSH로 멜라닌 생성을 유도한 후 멜라닌 생합성 억제능을 측정한 결과 멜라

닌의 생성 증가를 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다. 이러한 결과를 고려하여 볼 때 본 연구에 사용된 구절초 꽃 추출물은 피부세포에 대한 독성이 나타나지 않는 것으로 보아 향후 부작용이 적고, 뛰어난 항산화 활성과 항염증 및 미백 효과를 가진 기능성 화장품 소재로서의 활용될 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2016년 중원대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행되었으므로, 이에 감사드립니다. (과제관리번호:2016-059)

### References

1. M. Wettasinghe, F. Shahidi. Scavenging of reactiveoxygen species and DPPH free radicals by extracts of borage and evening primrose meals. *Food Chem.* **70**, 17-26 (2000).
2. D. T. Sawyer, J. S. Valentine. How super is superoxide? *ACC. Chem. Res.* **14**, 393 (1981).
3. I. Fridorich. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biophys.* **247**, 1-11 (1986).
4. B. N. Ames, M. K. Shigenaga, T. M. Hagen. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *National Acad Science.* **90(17)**, 7915-7922 (1993).
5. J. W. Nho, I. G. Hwang, E. M. Joung, H. Y. Kim, S. J. Chang, H. S. Jeong. Biological activities of *Magnolia denudata* Desr. flower extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 1478-1484 (2009).
6. W. C. Lee, A. J. Kim, S. Y. Kim. The study on the functional materials and effects of mulberry leaf. *Food Sci. Ind.* **36**, 2-14 (2003).
7. P. A. Cerutti. Oxy-radicals and cancer. *Lancet.* **344**, 862-863 (1994).
8. W. M. Cort. Antioxidant activity of tocopherols, ascorbyl palmitate, and ascorbic acid and their mode of action. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **51**, 321-325 (1974).
9. M. D. Coleman, S. Fernandes, L. Khanderia. A preliminary evaluation of a novel method to monitor a triple antioxidant combination (vitamins E, C, and  $\alpha$ -lipoic acid) in diabetic volunteers using in vitro methaemoglobin formation. *Environ. Toxicol. Phar.* **14**, 69-75 (2003).
10. M. O. Namiki. Antioxidants and antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci.* **29**, 273-300 (1990).
11. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, H. Sakurai. Active-oxygen scavenging activity of plant extracts. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 162-166 (1995).
12. K. B. Kim, K. H. Yoo, H. Y. Park, J. M. Jeong. Anti-oxidative activities of commercial edible plant extracts distributed in Korea. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **49**, 328-333 (2006).
13. G. M. Williams, C. X. Wang, M. J. Iatropoulos. Toxicity studies of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. II. Chronic feeding studies. *Food Chem. Toxicol.* **28**, 799-806 (1990).
14. A. L. Branen. oxicological and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **52**, 59-63 (1975).
15. H. M. Seog, M. S. Seo, H. M. Kim, M. S. Ahn, Y. T. Lee. Antioxidative activity of barley polyphenol extract (BPE) separated from pearling by-products. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 889-892 (2002).
16. J. Yamakoshi, F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pigment. Cell Research.* **16**, 629 (2003).
17. A. Snchez-Ferre, J. N. Rodriguez-Lopez, F. Garcia-Cánovas, F. Garcia-Carmona. Tyrosinase: A comprehensive review of its

- mechanism, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1247(1)**, 1 (1995).
18. J. Cabanes, S. Chazarra, F. Garcia-Carmona. Kojic acid, a cosmetic skin whitening agent, is a slow-binding inhibitor of catecholase activity of tyrosinase. *J. Pharm. Pharmacol.* **46**, 982-985 (1994).
  19. J. Yamakoshi, F. Otsuka, A. Sano, S. Tokutake, M. Saito, M. Kikuchi, Y. Kubota. Lightening effect on ultraviolet-induced pigmentation of guinea pig skin by oral administration of a proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Pigm. Cell Res.* **16**, 629-638 (2003).
  20. E. J. Seo, E. S. Hong, M. H. Choi, K. S. Kim, S. J. Lee. The Antioxidant and skin whitening effect of artemisia iwayomogi extract, *Korean J. Food sci. Technol.* **44(1)**, 89-93 (2012).
  21. Y. A. Jang, H. N. Kim, J. C. Yang, J. W. Lee, B. A. Kim, J. T. Lee. A study on the possibility of extracts from *Sparassis crispa* for cosmetic ingredients. *J. of Korean Oil Chemists Soc.* **32(4)**, 721-739 (2015).
  22. Y. Y. Kim, S. Y. Lee, D. S. Yim. Biological Activities of Linarin from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*. *Yakhak Hoeji.* **45(6)**, 604-610 (2001).
  23. S. H. Lee, J. S. Lee. Production and characteristics of antidandruff compound from *Chrysanthemum zawadskii*. *Kor J Microbiol Biotechnol.* **35**, 220-225 (2007).
  24. C. S. Yook. Colored medicinal plants of Korea. *Academybook.* Korea. p. 588-589 (1997).
  25. R. J. Lim. Korean Flora. *Agricultural publisher.* Seoul. p.186 (1998).
  26. D. H. Won, K. W. Ha. Medicinal Plants. *Ministry of Food and Drug safety.* p. 72 (1997).
  27. Y. Y. Kim, S. Y. Lee, D. S. Yim. Biological activities of linarin from *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum*. *Yakhak Hoeji.* **45**, 604-610 (2001).
  28. D. S. Jang, K. H. Park, S. W. Choi, S. H. Nam M. S. Yang. Antibacterial Substances of the Flower of *Chrysanthemum zawadskii* var. *latilobum* Kitamura. *Agri cultural Chemistry and Biotechnology.* **40(1)**, 85-88 (1997).
  29. D. S. Jang, K. H. Park, J. R. Lee, T. J. Ha, Y. B. Park, S. H. Nam, M. S. Yang. Antimicrobial activities of Sesquiterpene lactones isolated from *Hemisteptia lyrata*, *Chrysanthemum zawadskii* and *Chrysanthemum boreale*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol.* **42**, 17-179 (1999).
  30. S. H. Lee, J. S. Lee. Production and characteristics of antidandruff compound from *Chrysanthemum zawadskii*. *Kor J Microbiol Biotechnol.* **35**, 220-225 (2007).
  31. M. R. Hyun, Y. S. Lee, Y. H. Park. Antioxidative Activity and Flavonoid Content of *Chrysanthemum zawadskii* Flowers. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **29(1)**, 68-73 (2011).
  32. J. H. Woo, S. L. Shin, Y. D. Chang, C. H. Lee. Antioxidant Effect according to Extraction Method in extract of *Dendranthema zawadskii* var. *yezoense* and *Cosmos bipinnatus*. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **28(3)**, 462-468 (2010).
  33. S. H. Lee, I. G. Hwang, J. W. Nho, Y. D. Chang, C. H. Lee, K. S. Woo, H. S. Jeong. Quality Characteristics and Antioxidant Activity of *Chrysanthemum indicum* L., *Chrysanthemum boreale* M. and *Chrysanthemum zawadskii* K. Powdered Teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **38(7)**, 824-831 (2009).
  34. J. H. Woo, C. H. Lee. Effect of Harvest Date on Antioxidant of *Dendranthema zawadskii* var. *latilobum* (Maxim.) Kitamura and *D. zawadskii* var. *yezoense* (Maek.). *Korean J. Plant Res.* **21(2)**, 128-133 (2008).
  35. S. H. Sin, Y. Y. Choi. Analysis of Essential Oil from *Chrysanthemum sibiricum* and the Comparison with Essential Oils from Some *Chrysanthemum*



- sibiricum spp. *Kor. J. Pharmacog.* **13(4)**, 153-156 (1982).
36. T. J. Kim, T. R. Lee, H. K. Park. Simultaneous Determination of Chlorogenic Acid and Linarin in Chrysanthemum Sibiricum Fisherby Liquid Chromatography. *Journal of the Korea Chemical Society.* **35(6)**, 720-724 (1991).
  37. H. S. Kwon, T. J. Ha, S. W. Hwang, Y. M. Jin, S. H. Nam, K. H. Park, M. S. Yang. Cytotoxic Flavonoids from the whole Plants of Chrysanthemum Zawadskii Herbich var. latilobum Kitamura. *Journal of life science.* **16(5)**, 746-749 (2006).
  38. T. Gutfinger. Polyphenols in olive oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **58(11)**, 966-968 (1981).
  39. M. I. Moreno, M. I. Isla, A. R. Sampietro, M. A. Vattuone. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several region of argentina. *J. Ethnopharmacol.* **71(1-2)**, 109-114 (2000).
  40. M. S. Blois. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature.* **181**, 1199-1200 (1958).
  41. K. Azuma, M. Nakayama, M. Koshica, K. Lppoushi, Y. Yamaguchi, K. Kohata Y. Yamaguchi, H. Ito, H. Higashio. Phenolic antioxidants from the leaves of Corchorus oltiorius L. *J. A. gric. Food Chem.* **47**, 3963-3966 (1999).
  42. B. Halliwell, R. Aeschbach, J. Loliger, O. I. Aruoma. The characterization of antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **33(7)**, 601-617 (1995).
  43. J. Imai, N. Ide, S. Nagae, T. Moriguchi, H. Matsuura, Y. Itakura. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Plant. Med.* **60(5)**, 417-420 (1994).
  44. M. R. Hyun, Y. S. Lee, Y. H. Park. Antioxidative Activity and Flavonoid Content of Chrysanthemum zawadskii Flowers. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* **29(1)**, 68-73 (2011).
  45. K. S. Woo, J. S. Yu, I. G. Hwang, Y. R. Lee, C. H. Lee, H. S. Yoon, J. S. Lee, H. S. Jeon. Antioxidative Activity of Volatile Compounds in Flower of Chrysanthemum indicum, C. morifolium, and C. zawadskii. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **37(6)**, 805-809 (2008).
  46. H. J. Chung, I. S. Jeon. Antioxidative activities of methanol extracts from different parts of Chrysanthemum zawadskii. *Kor. J. Food Preserv.* **18**, 739-745 (2011).
  47. J. Y. Han, Y. H. Kim, J. H. Sung, Y. R. Um, Y. Lee, J. S. Lee. Suppressive Effects of Chrysanthemum zawadskii var. latilobum Flower Extracts on Nitric Oxide Production and Inducible Nitric Oxide Synthase Expression. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* **38(12)**, 1685-1690 (2009).
  48. Y. Y. Kim, S. Y. Lee, D. S. Yim. Biological activities of linarin Chrysanthemum zawadskii var. latilobum. *Yakhak Hoeji.* **45**, 604-610 (2001).