

## 하수오 추출물, 분획물 및 주성분의 항산화, 세포 보호 및 항균 활성에 관한 평가

신혁수·김민우\*·송제리\*·이준석\*·하윤정\*·전영희\*·김지웅·이윤주·박수남<sup>†</sup>

서울과학기술대학교 정밀화학학과, 화장품융합기술연구소, 코스메틱 융·복합산업 지원 센터  
\*한성과학고등학교

(2018년 9월 10일 접수, 2018년 10월 15일 수정, 2018년 10월 22일 채택)

## Evaluation of Antioxidant, Cytoprotective and Antimicrobial Properties of *Polygoni multiflori Radix* Extract, Fractions and Its Major Constituent

Hyuk Soo Shin, Minwoo Kim\*, Jerry Song\*, Junseok Lee\*, Yoonjeong Ha\*, Young Hee Jeon\*, Ji Woong Kim, Yun Ju Lee, and Soo Nam Park<sup>†</sup>

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center and Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center, Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

\*Hansung Science High School, Seoul 03732, Korea

(Received September 10, 2018; Revised October 15, 2018; Accepted October 22, 2018)

**요약:** 본 연구에서는 하수오를 이용하여 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획물을 제조하고, 추출물 및 분획물의 항산화, 세포 보호 및 항균 효능을 평가하여 기능성 소재로서의 가능성을 확인하였다. 또한, 하수오에 주요하게 존재하는 성분의 활성도 검증하였다. HPLC-DAD, LC-EIS-MS를 통해 분석한 결과, 하수오의 주성분은 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene 2-O- $\beta$ -D-glucoside (THSG)이었다. 페놀류 및 THSG 함량은 에틸아세테이트 분획물이 에탄올 추출물 보다 각각 11.1 및 3.0배 높게 나타났다. DPPH 자유 라디칼 및  $Fe^{3+}$ -EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 시스템에서 생성된 ROS에 대한 소거 활성 평가에서, 에틸 아세테이트 분획물은 에탄올 추출물 보다 뛰어난 소거 활성을 나타냈다. 특히 ROS 소거 활성 평가에서 에틸 아세테이트 분획물과 THSG은 L-ascorbic acid와 동등한 소거 활성을 나타냈다. 이러한 결과를 바탕으로 수행된 광증감 반응으로 유도된 적혈구의 산화적 손상에 대한 세포 보호 활성은 에틸아세테이트 분획물, 에탄올 추출물, THSG 순서로 나타났으며, 모든 실험군이 양성 대조군으로 사용한 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다 우수한 활성을 나타냄을 확인하였다. 항균 활성 평가는 *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* 균주를 대상으로, disc diffusion assay와 broth microdilution assay를 이용하여 수행하였다. 그 결과 추출물, 분획물 및 THSG 모두 모든 균주에 대해 항균 활성을 나타냈으며, 특히 그람 양성균인 *S. aureus*에 대해 methyl paraben보다 우수한 항균력을 나타냄을 확인하였다. 본 연구의 결과는 하수오가 항산화, 세포 보호 및 항균력에 관한 천연 소재로의 활용될 수 있는 가능성을 시사한다.

**Abstract:** In this study, the antioxidant, cytoprotective and antimicrobial activities of 50% ethanol extract of *Polygoni multiflori Radix* (PMR) and its ethyl acetate fraction were evaluated to confirm the applicability as a functional ingredient. The activities of the major constituent of PMR were verified and 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene 2-O- $\beta$ -D-glucoside (THSG) was confirmed to be the main component of extract and fraction using HPLC-DAD, LC-EIS-MS

<sup>†</sup> 주 저자 (e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)

call: 02)970-6451

analysis. The phenolic and THSG contents of the ethyl acetate fraction were 11.1- and 3.0-folds higher than those of the ethanol extract, respectively. As a result of the DPPH assay and that of luminol dependent chemiluminescence assay in  $Fe^{3+}$ -EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system, the ethylacetate fraction was superior to the ethanol extract in free radical and ROS scavenging activities. Especially, the ethyl acetate fraction and THSG exhibited the similar scavenging activity like L-ascorbic acid in ROS scavenging activity. The ethyl acetate fraction perceived the most potent cytoprotective effect against oxidative damage of erythrocytes induced by photosensitization reaction, followed by the ethanol fraction, THSG and that of (+)- $\alpha$ -tocopherol, which was used as a positive control. Antimicrobial activities were evaluated by disc diffusion and broth microdilution assay against *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. In particular, the antibacterial activity of the extract and fraction against *S. aureus* was superior to that of methyl paraben. Taken together, our results suggest that PMR could be used as a natural ingredient for antioxidant, cytoprotective and antimicrobial activities.

**Keywords:** antioxidant, antimicrobial, cytoprotective, *Polygoni multiflori Radix*, 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene

## 1. 서 론

활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)은 호기성 대사과정에서 지속해서 생성되고 소멸하는 산소 분자의 화학적 혹은 물리적으로 들뜬 형태로서, singlet oxygen (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), lipid peroxide (ROOH) 등이 존재한다. 이러한 분자는 체내에서 세포 주기, 분화 및 사멸 등에 관한 신호 전달 경로에 관여하는 등 체내 생리학적 기능에 영향을 미친다. 하지만 ROS는 큰 반응성을 가지고 있어 DNA, 세포 및 단백질을 손상할 수 있기 때문에 내인성 항산화제에 의해 항상성이 유지되고 있다. 하지만 이러한 균형이 붕괴하면 체내 산화적 스트레스가 유발될 수 있고, 이는 동맥경화, 당뇨병, 신경퇴화 등 다양한 질병 및 노화를 유발할 수 있다[1-4].

특히 피부는 인체에서 가장 큰 면적을 차지하는 기관으로, 외부 자극에 쉽게 노출될 수 있으므로 ROS에 의한 산화적 손상의 주요 대상이 된다[5,6]. 피부에 영향을 미치는 주요 자극원은 자외선으로, 자외선에 노출시 피부에 존재하는 포르피린류와 같은 광증감제는 에너지를 흡수한 뒤, 이를 산소에 직, 간접적으로 전달하여 다양한 형태의 ROS가 형성될 수 있다. 이렇게 생성된 ROS는 mitogen activated protein kinases (MAPKs), activated protein (AP-1) 신호 전달 경로를 활성화해 matrix metalloproteinase (MMP)의 발현을 증가시킨다. 이러한 MMP는 콜라겐 및 엘라스틴 같은 세포외기질 성분을 파괴하여, 피부의 손상을 가져온다[6,7]. 또한, 미생물의 침입 또한 피부 및 기타 조직의 손상, 다양한

염증 반응 및 질병을 매개할 수 있다. 이 과정에서 미생물을 제거하기 위해 백혈구에서 생성된 다량의 superoxide anion radical 및 hypochlorite와 같은 ROS는 침입 미생물 및 손상 세포를 파괴하는 것뿐만 아니라 정상 세포에도 영향을 미칠 수 있다[8,9]. 따라서 이러한 산화적 스트레스로부터 인체를 보호하기 위해서 화장품, 식품, 의약품 등에 적용을 위한 합성 혹은 천연물 유래의 항산화제 및 항균제에 관한 연구가 지속해서 진행되고 있다[10-12].

천연물을 이용한 생리활성에 관한 연구에는 식물체가 주요하게 사용되며, 식물체의 다양한 생리활성은 식물체에서 생성되는 2차 대사 산물에서 기인하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 2차 대사 산물에는 알칼로이드류, 테르펜류, 페놀류 등이 존재하며, 이들은 항산화 및 항균 활성을 나타내 식물체의 생존에 관여한다. 이 중 페놀류는 가장 다량 존재하는 2차 대사 산물로, 한 개 이상의 수산화기가 포함된 방향족 고리를 포함하는 화합물을 지칭하며, 이러한 페놀류에는 flavonoid, stilbene, phenolic acid, anthraquinone, tannin lignin 등이 존재한다[13,14].

하수오(*Radix polygoni multiflori*)는 마디풀과에 속하는 하수오(*Polygonum multiflorum* Thunb)의 건조된 덩이뿌리를 지칭하는 라틴 생약명으로, 심혈관 질환 개선, 면역 기능 증대, 항염증, 항암 및 항노화 효능으로 인해 중국을 비롯한 여러 나라에서 전통적으로 사용되어온 약재이다[15,16]. 하수오의 생리 활성에 관한 다양한 연구가 수행되었지만[17],  $Fe^{3+}$ -EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 시스템에서 생성된 ROS에 대한 소거 활성 및 광증감 반응에 의해 생성된 <sup>1</sup>O<sub>2</sub>으로 유도된 세포 손상에 대한 보호

효능에 관한 평가는 아직 수행된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 하수오 및 주성분의 자유 라디칼 및 다양한 ROS에 대한 소거 활성과 광증감 반응으로 유도된 적혈구 세포 손상에 대한 보호 효능에 관한 평가를 비롯하여 다양한 피부 상재균에 대한 항균 활성 평가에 관한 연구를 수행하여 기능성 소재로서의 가능성을 확인하였다.

## 2. 재료 및 실험

### 2.1. 시약

Sodium sulfate ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), Folin & Ciocalteu's phenol reagent, sodium carbonate ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical, 5-Amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione (luminol), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), heparin, rose Bengal (4, 5, 6, 7-Tetrachloro-2', 4', 5', 7'-tetraiodo-fluorescein disodium salt), L-ascorbic acid, (+)- $\alpha$ -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), emodin (> 95%), gallic acid (> 97%)은 Sigma (USA)에서 구매하였다.  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan)에서 구매하였다. Tryptic soy broth는 Merck (Germany)에서 구매하였다. THSG (>98%)는 Chem Faces (China)에서 구매하였다. 이외 실험에 사용된 용매 및 시약은 시판 특급 시약을 사용하였다.

### 2.2. 하수오 추출물 및 분획물 제조

실험에 사용된 중국산 하수오는 2018년 4월경 삼흥 건재약업사(Korea)를 통해 구매하였다. 원물 200 g을 잘게 분쇄하여 상온에서 72 h 동안 50% 에탄올 (Daejung, Korea) 3 L에 침적한 뒤 이를 여과하였다. 여과액 중 일부를 감압 농축하였고, 24 h 동안 동결 건조하여 50% 에탄올 추출물을 얻었다. 이 추출물에서 에틸아세테이트(Daejung, Korea)에 우세하게 용해되는 성분을 추출하고자 여과액 500 mL를 감압 증류하여 에탄올을 제거한 뒤, 에틸아세테이트 500 mL를 이용하여 3회 반복 분획하였다. 이렇게 얻은 에틸아세테이트 분획에  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 를 처리하여 미량의 물을 제거한 뒤 여과하였다. 이 여과액을 감압 농축하여 에틸아세테이트 분획물을 얻었다. 각 추출물 및 분획물은 4 °C 조건에서 보관하며 실험에 사용하였다.

### 2.3. 총 페놀류 함량 측정

총 페놀류 함량은 페놀성 화합물이 기존에 알려진 Folin & Ciocalteu 방법을 이용하여 측정하였다[18]. 96-well microplate에 측정 시료 80  $\mu\text{L}$ , Folin & Ciocalteu's phenol reagent (50% v/v) 20  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2% w/v) 200  $\mu\text{L}$ 를 순서대로 넣어주었다. 반응물을 상온에서 30 min 동안 방치 후 microplate reader (Infinite 200 pro, Tecan, Austria)를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료들의 총 페놀류 함량은 gallic acid를 표준 물질로 사용하여 검량선을 작성 후(6.25-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,  $R^2 = 0.9994$ ), 시료 g당 mg gallic acid equivalent (GAE)로 나타냈다.

### 2.4. HPLC-DAD와 LC-ESI-MS를 이용한 분석

분석 시료는 에탄올에 용해한 뒤, 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter (Merck, Darmstadt, Germany)를 이용하여 여과한 뒤 사용하였다. HPLC-DAD 분석은 Shim-pack GIS C18 column (5  $\mu\text{m}$ , 4.6  $\times$  250 mm, Shimadzu, Japan)을 사용하여 Shimadzu LC-20A HPLC system (Shimadzu, Japan)을 통해 40 °C 조건에서 기울기 용리(A 용매, 2% acetic acid in  $\text{H}_2\text{O}/\text{B}$ 용매, 0.5% acetic acid in 50% acetonitrile aqueous solution)를 사용하여 분석하였다. B 용매 조성 변화에 따른 기울기 용리 조건은 다음과 같다. 0-5 min, 0% (v/v); 5-40 min, 0-60% (v/v); 40-50 min, 60% (v/v); 50-55 min, 60-0% (v/v); 55-60 min, 0% (v/v).

추출물 및 분획물에 존재하는 주성분의 분리는 Thin layer chromatography (105789, Merck, Darmstadt, Germany) 분석을 통해 수행하였다. Ethyl acetate-formic acid-chloroform-water (8 : 1 : 1 : 1, v/v)를 혼합하여 제조한 전개용매를 통해 추출물과 분획물을 전개하였다. TLC 판에서 주요하게 나타나는 밴드( $R_f = 0.49$ )의 실리카 겔을 긁어내어 무수 에탄올에 주요 성분을 용해한 후, 원심 분리기(416, Labogene, Korea)를 이용해 실리카 겔을 침전시켰다. 그리고 상층액을 0.45  $\mu\text{m}$  syringe filter에 통과시켜 불순물을 제거한 뒤 LC-ESI-MS 분석에 사용하였다. LC/MS를 통한 분석은 Thermo fisher scientific Inc. (USA)의 Dionex UltiMate 3000 rapid separation liquid chromatography (RSLC)와 결합된 Q-Exactive Focus Orbitrap mass spectrometry system을 통해 수행되었다. 전개 용매는 0.1% formic acid가 포함된  $\text{H}_2\text{O}$ 와 acetonitrile을 사용하였고, MS parameter는 다

음과 같은 조건을 사용하였다. Capillary temperature = 300 °C, source voltage = 3.5 kV (positive)/2.7 kV (negative), Ionization mode = electrospray ionization (ESI), scan mode = Full MS/ddMS<sup>2</sup> mode (positive and negative switching mode), scan range = 100-2,000 m/z, resolution = MS : 70,000, MS/MS : 17,500, loop count = 10

에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 THSG의 함량은 HPLC-DAD system을 이용하였다. 32.15-1,000 µg/mL 농도(주입 용량, 20 µg/mL)로 제조된 THSG 시료를 상기 조건을 이용해 분석하였고, 320 nm에서의 크로마토그램 peak 면적을 통해 검량 곡선(R<sup>2</sup> = 0.9954)을 작성한 뒤 함량을 결정하였다.

## 2.5. DPPH Assay를 이용한 자유라디칼 소거 활성 측정

자유 라디칼 소거 활성은 DPPH 라디칼 농도를 50% 감소시키는데 필요한 시료의 농도(FSC<sub>50</sub>)를 비교하여 평가하였다[19]. 다양한 농도로 제조한 분석 시료 0.4 mL에 에탄올 0.4 mL와 0.2 mM DPPH 라디칼 용액 0.4 mL를 섞어주었다. 이 혼합액을 상온에서 10 min 동안 암소에서 반응시킨 후, UV-vis spectrometer (Cary 50, Agilent, USA)를 이용하여 517 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 각 농도에서의 자유 라디칼 소거 활성은 아래의 식 (1)을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Free Radical Scavenging (\%)} = \left\{ 1 - \left( \frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sampleblack}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100 \dots \text{식 (1)}$$

## 2.6. Luminol 화학발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 시스템에서 생성된 활성산소 소거 활성 측정

활성산소 소거 활성 평가는 luminol을 이용한 화학발광법을 이용하여 측정하였다[19]. 시험관에 다양한 농도로 제조한 분석 시료 50 µL, 증류수 1.78 mL, 2.5 mM EDTA 용액 40 µL, 5 mM FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 용액 10 µL, 35 mM luminol 용액 80 µL를 순서대로 넣은 후 섞어 주었다. 각 시료를 luminometer (6-channel LB9505 LT, Berthold, Germany)에 넣어준 뒤 35 °C에서 5 min 동안 인큐베이션 한 후, 150 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 40 µL를 첨가하였다. 그리고 25 min 동안 루미놀과 활성산소의 화학발광에 의해 발생한 발광을 측정하였다. ROS 소거 활성은 아래와 같은 식 (2)로 계산하였고, ROS 소거 활성은 ROS를 50% 저해하는데 필요한 시료의 농도(OSC<sub>50</sub>)

를 구하여 비교하였다.

$$\text{ROS Scavenging (\%)} = \left( \frac{\text{cpm}_{\text{control}} - \text{cpm}_{\text{experiment}}}{\text{cpm}_{\text{control}} - \text{cpm}_{\text{blank}}} \right) \times 100 \dots \text{식 (2)}$$

## 2.7. Singlet Oxygen으로 유도된 적혈구 광용혈을 이용한 세포 보호 효과 측정

광증감 반응으로 유도된 적혈구 광용혈 저해 활성은 기존에 보고된 방법을 사용하여 측정하였다[20]. 혈액 1 mL를 3000 rpm으로 5 min 동안 원심 분리한 뒤 혈장을 제거하였다. 그리고 남은 혈구에 4 mL의 PBS를 이용하여 반복하여 세척하였다. 이 과정을 통해 얻은 적혈구는 PBS를 이용하여 OD 값이 약 0.6이 되도록 희석하여 사용하였고, 투광도의 측정은 vis-spectrometer (Spectronic 20D system, Milton Roy Co., USA)를 이용하였다. 이렇게 준비한 적혈구 현탁액 3.45 mL와 시료 50 µL를 pyrex tube (No. 9820)에 넣어준 뒤 30 min 동안 인큐베이션 하였다. 이 시료에 15 µM의 rose bengal 용액 0.5 mL를 넣고 parafilm으로 입구를 밀봉한 뒤, 15 min 동안 광조사 하였다. 광원은 20 W의 형광등으로, pyrex tube와 광원까지의 거리는 5 cm였다. 이후 15 min 간격으로 시료의 투광도를 측정하였고, 적혈구가 50% 용혈되는 시간을 통해 시료의 적혈구 용혈 저해 활성을 비교 평가하였다.

## 2.8. 항균활성 평가

항균 활성 평가에 사용된 균주는 *S. aureus* (ATCC6538), *E. coli* (ATCC23736), *P. aeruginosa* (ATCC29336), *C. albicans* (ATCC10231)로 한국 미생물 보존센터(KCCM, Korea)에서 분양받았다. 실험에 사용된 균주는 tryptic soy broth에서 37 °C 조건으로 배양기에서 24 h 배양하였다. Disc diffusion assay에서 균주는 1 × 10<sup>7</sup> colony forming unit (CFU)/mL의 농도로 균액을 제조하여 항균 활성 평가에 사용하였다. 제조한 균액 100 µL를 평판 배지에 균일하게 도말한 뒤 건조하였고, 각 시료 5 mg을 포함한 paper disc (8 mm diameter, Roshi Kaisha Ltd., Japan)를 배지에 밀착시켜 24 h 동안 배양한 뒤 clear zone을 비교하여 항균 활성을 평가하였다. 실험 균주에 대한 각 시료들의 Minimum inhibitory concentration (MIC)와 minimum bactericidal concentration (MBC)/minimum fungicidal concentration

**Table 1.** Weight Yields, Total Phenolic (TP) Contents and 2, 3, 5, 4'-Tetrahydroxystilbene 2-O-β-D-lucoside (THSG) Contents of the Extract and Fraction from PMR

Sample	Yields (wt%)	TP Contents (mg GAE/g)	THSG Contents (mg/g)
50% EtOH extract	28.4	80.0 ± 1.8	79.4 ± 0.5
EtOAc fraction	2.1	239.6 ± 3.3	880.5 ± 8.4

\* Values for TP and THSG contents are presented as mean ± SD (n = 3).

(MFC) 은 broth microdilution assay를 통해 측정하였다. 96-well plate에 각 시료를 연속적으로 2배씩 희석하여 20 μL씩 넣어주었고, 각 균주는 3- 5 × 10<sup>6</sup> CFU/mL의 농도가 되도록 제조하여 20 μL씩 넣어주었다. 각 well에 160 μL의 배지를 추가로 주입하였고, 0.072-10.00 mg/mL 농도 범위에서 항균 활성을 평가를 수행하였다. 이렇게 준비된 microplate를 48 h 동안 배양하였고, 배양 후 육안으로 관찰하여 균이 증식되지 않은 최소 농도를 MIC로 결정하였다. MBC 및 MFC는 균의 성장이 억제된 well의 균액을 평판 배지에 도말하여 48 h 동안 배양 후 colony가 형성되지 않은 최소 농도로 결정하였다.

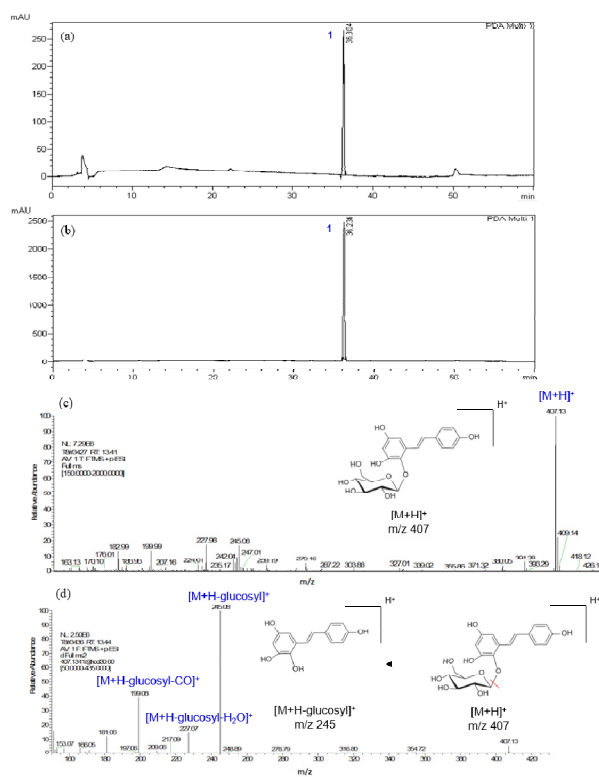
### 2.9. 통계처리

본 실험의 모든 데이터는 3회 이상 반복하여 측정하였으며, 평균과 표준편차로 표시하였다. 데이터의 유의성 평가에 사용된 소프트웨어는 Graphpad Prism v.6.01 (GraphPad Software Inc., USA)이며, one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 분산분석 후 Tukey's honestly significant difference (HSD) test를 통한 사후 검증을 통해 p < 0.05 수준에서 유의성 분석을 수행하였다.

## 3. 결과 및 고찰

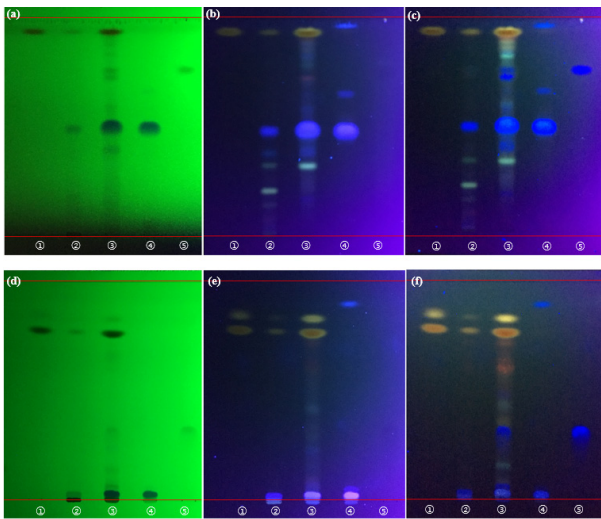
### 3.1. 하수오 추출물, 분획물의 제조 및 분석

50% 에탄올을 이용하여 하수오에서 유효 성분을 추출 후 측정된, 원물 대비 수율은 28.4%였다. 에틸아세테이트를 이용한 추가적인 분획을 수행하였고, 분획물의 수율은 2.1%였다. 이렇게 얻은 추출물 및 분획물에 대한 페놀류 함량은 각각 원물 g당 80.0 mg GAE와 239.6 mg GAE로 나타났다(Table 1).



**Figure 1.** HPLC-DAD chromatograms of the (A) 50% ethanol extract (2.00 μg injected in 20 μL) and (B) ethyl acetate fraction (2.00 μg injected in 20 μL) of PMR acquired at 250-400 nm. (C) the ESI-MS spectrum of isolated compound (1) from the ethyl acetate fraction of PMR. (D) the MS<sup>2</sup>-spectrum of the [M+H]<sup>+</sup> ions at m/z 407.13.

하수오의 주성분은 상기 실험 방법의 조건으로 HPLC-DAD 및 LC-MS를 이용하여 분석하였다. 에탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물의 HPLC-DAD 분석 결과 36 min에서 강한 세기의 피크가 나타났고(Figure 1A, B), 이 피크의 성분은 320 nm에서 최대 흡광도를 나타냈다. 이 성분을 LC-MS 분석을 통해 분석한 결과, negative ion mode의 m/z 405에서 [M-H]<sup>-</sup> (data not shown), positive ion mode의 m/z 407에서 [M+H]<sup>+</sup> 형태의 분자 이온 피크가 나타났다(Figure 1C)[16]. 이 성분의 구조를 확인하기 위해 m/z 407 피크에 대해 MS/MS 분석을 수행하였다. m/z 245에서 glucosyl group이 이탈된 [M+H-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>]<sup>+</sup> [21], m/z 227 및 199에서 각각 hydroxystilbene 골격에서 H<sub>2</sub>O와 CO가 이탈된 [M+H-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>-H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> 및 [M+H-C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>-CO]<sup>+</sup> 형태의 피크를 확인하였다(Figure 1D)[22]. 상기의 최대 흡수 파



**Figure 2.** TLC chromatograms (UV-254 (A, D), 365 nm (B, E) and NP-PEG reagents; UV-365 nm (C, F)). (A-C) the eluent system was ethyl acetate: chloroform: formic acid: water = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v), (D-F) the eluent was *n*-hexane : ethyl acetate : acetic acid = 21 : 14 : 5 (v/v). ① emodin ② 50% EtOH extract ③ EtOAc fraction ④ THSG ⑤ gallic acid.

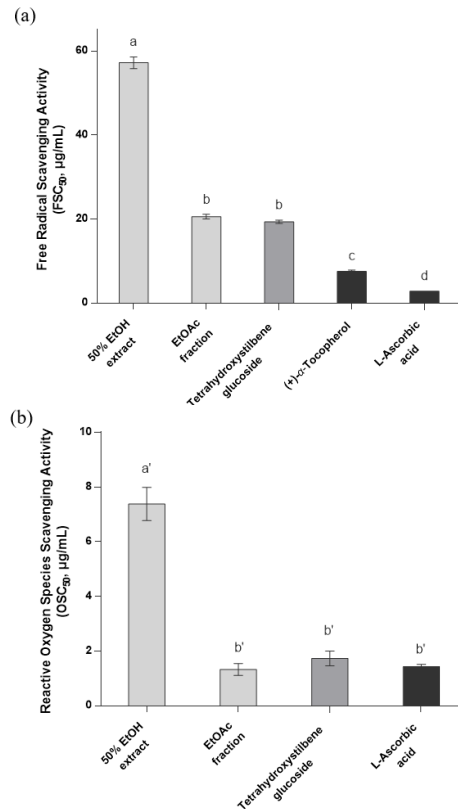
장 및 LC-MS/MS 정보를 통해 에탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물에 주요하게 존재하는 성분은 THSG임을 확인하였고, 각각의 THSG의 함량은 시료 g 당 79.4 및 880.5 mg이었다(Table 1). 이외에도 선행 연구와 TLC 분석을 통해 추출물 및 분획물에는 emodin 과 gallic acid와 같은 성분이 일부 존재하는 것을 확인 하였다(Figure 2).

### 3.2. 항산화 활성 측정

#### 3.2.1 DPPH Assay를 이용한 자유 라디칼 소거 활성 측정

DPPH assay는 항산화제에 의해 DPPH 라디칼이 환원이 되는 정도를 측정하여 소거 활성을 평가하게 된다[10]. 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물에 대한 자유 라디칼 소거 활성 평가는 각 시료에 주요하게 존재하는 THSG 및 대표적인 지용성 항산화제인(+)- $\alpha$ -tocopherol과 수용성 항산화제인 L-ascorbic acid와 비교하여 진행하였다.

하수오 에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 THSG의 자유 라디칼 소거 활성(FSC<sub>50</sub>)은 각각 57.2, 20.53 및 19.3  $\mu$ g/mL으로 확인되었다. 양성 대조군으로는 대표적인 지용성 항산화제인  $\alpha$ -tocopherol과 수용



**Figure 3.** (A) Free radical scavenging and (B) ROS scavenging activities of the 50% ethanol extract and ethyl acetate fraction of PMR and that of THSG, (+)- $\alpha$ -tocopherol and L-ascorbic acid. the FSC<sub>50</sub> and OSC<sub>50</sub> of the different samples were determined using DPPH assay and luminol-dependent chemiluminescence assay in the Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system, respectively. values are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3). a-d/a'-b', different letters on the top of the bars denote significant differences ( $p < 0.05$ ).

성 항산화제인 L-ascorbic acid를 이용하였고, 이들의 FSC<sub>50</sub> 값은 각각 7.54 및 2.81  $\mu$ g/mL이었다(Figure 3A). 에틸 아세테이트 분획물과 THSG는 동등한 자유 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 하수오의 추가적인 항산화 활성을 알아보기 위해 다양한 활성 산소종에 대한 소거 활성 평가를 수행하였다.

#### 3.2.2 Luminol 화학발광법을 이용한 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 시스템에서 생성된 활성산소 소거 활성 측정

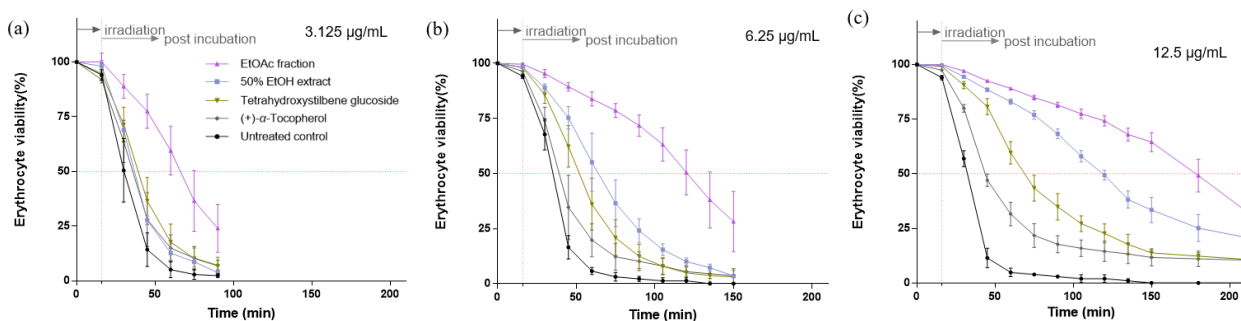
본 실험에서는 활성을 luminol을 이용한 화학 발광법을 이용하여 Fe<sup>3+</sup>-EDTA/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 시스템에서 생성된 O<sub>2</sub><sup>•-</sup>,

**Table 2.** Cytoprotective Effects of the 50% Ethanol Extract and Ethyl Acetate Fraction of PMR and that of THSG and (+)- $\alpha$ -Tocopherol against  $^1\text{O}_2$ -Induced Photohemolysis in Erythrocytes

	$\tau_{50}$ (half time of hemolysis) <sup>1)</sup> (min)		
	3.125 $\mu\text{g/mL}$	6.25 $\mu\text{g/mL}$	12.5 $\mu\text{g/mL}$
50% EtOH Extract	36.6 $\pm$ 0.2 <sup>A, b</sup>	65.1 $\pm$ 7.4 <sup>B, b</sup>	119.2 $\pm$ 2.6 <sup>C, a</sup>
EtOAc Fraction	67.0 $\pm$ 7.2 <sup>A, a</sup>	122.5 $\pm$ 10.2 <sup>B, a</sup>	179.4 $\pm$ 11.2 <sup>C, b</sup>
THSG	39.2 $\pm$ 3.2 <sup>A, b</sup>	52.2 $\pm$ 4.8 <sup>B, bc</sup>	68.7 $\pm$ 4.6 <sup>C, c</sup>
(+)- $\alpha$ -Tocopherol	36.1 $\pm$ 4.2 <sup>A, b</sup>	39.8 $\pm$ 3.7 <sup>AB, c</sup>	46.8 $\pm$ 3.7 <sup>B, d</sup>

1) Untreated control,  $\tau_{50}$  = 32.6  $\pm$  2.0 min. Different superscripts denote significant differences in the same raw (A-C) and column (a-d), respectively ( $p < 0.05$ ).

2) Values are presented as mean  $\pm$  SD (n = 3).



**Figure 4.** Inhibition of rose bengal sensitized photohemolysis by the 50% ethanol extract and ethyl acetate fraction of PMR and that of THSG and (+)- $\alpha$ -tocopherol. (a-c) Time-dependent cell viability of erythrocyte treated different concentration of the samples; 3.125, 6.25 and 12.5  $\mu\text{g/mL}$ , respectively.

·OH와 같은 다양한 ROS에 대한 시료들의 소거 활성을 평가하였다 [20,23]. 이 반응계에서 ROS는 luminol과 반응하여 luminol을 들뜬 상태의 3-aminophthalate로 산화시키고, 이 산화물이 에너지를 방출할 때 425 nm 부근에서 발광을 나타내게 된다[24]. 이러한 화학 발광은 시료가 ROS를 소거하는 정도가 클수록 감소하게 된다[19,20].

에탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물 및 THSG의 ROS 소거 활성(OSC<sub>50</sub>)은 각각 7.38, 1.33 및 1.73  $\mu\text{g/mL}$ 로 확인되었다(Figure 3B). 에틸 아세테이트 분획물과 THSG은 양성 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid (1.44  $\mu\text{g/mL}$ )과 동등한 ROS 소거 활성을 나타내 우수한 항산화 소재로 응용할 가능성을 확인 하였다.

자유 라디칼 및 ROS 소거 활성 평가에서 에틸 아세테이트 분획물은 에탄올 추출물 보다 우수한 소거 활성을 나타냈으며, 이러한 결과는 에틸 아세테이트 분획물

에서 더 높은 페놀류 및 THSG 함량을 나타냈기 때문인 것으로 판단된다. 하수오의 우수한 항산화 활성 평가 결과를 바탕으로, 하수오 추출물 및 분획물이 세포 수준에서도 항산화 활성을 나타내는지 확인하기 위해 적혈구 산화적 손상에 대한 보호 활성 평가를 수행하였다

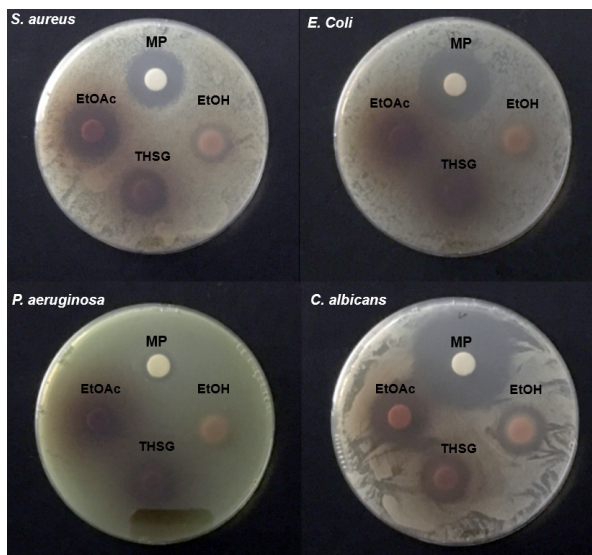
### 3.3. Singlet Oxygen으로 유도된 적혈구 광용혈을 이용한 세포 보호 효과 측정

본 실험 결과를 확보하기 위한 적혈구의 산화적 손상의 유도는 rose bengal을 이용한 광증감반응을 이용하였다. Rose bengal은 480-550 nm 영역의 파장의 빛을 강하게 흡수한 뒤, type 2 광증감 반응을 통해 산소 분자에 에너지를 전달하여 높은 수율로 singlet oxygen의 생성을 유도한다[25]. 생성된 singlet oxygen은 세포막의 불포화 지방산을 산화시켜 지질 과산화물의 형성을 촉진하게 된다. 이러한 지방산의 산화는 세포 손상을

**Table 3.** Values of MIC and MBC/MFC of the 50% Ethanol Extract, and Ethyl Acetate Fraction of PMR and that of THSG and Methyl Paraben by Broth Microdilution Assay (n = 3)

	PC <sup>1)</sup>				PMR			
	Methyl paraben		50% EtOH extract		EtOAc fraction		THSG	
Gram positive bacteria	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>S. aureus</i>	2.50	2.50	1.25	1.25	0.16	0.32	1.25	1.25
Gram negative bacteria	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>E. Coli</i>	1.25	1.25	10.00	10.00	5.00	10.00	5.00	<10.00
<i>P. aeruginosa</i>	2.50	2.50	2.50	5.00	1.25	2.50	2.50	2.50
Fungi	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC	MIC	MFC
<i>C. albicans</i>	1.25	1.25	10.00	10.00	2.50	5.00	5.00	5.00

1) Positive control.

**Figure 5.** Photographs of the antibacterial test results of the 50% ethanol extract, and ethyl acetate fraction of PMR and that of THSG and methyl using the disk diffusion method against (a) *S. aureus*, (b) *E. coli*, (c) *P. aeruginosa* and (d) *C. albicans*.

유발할 뿐만 아니라, 세포 내의 철이온에 의한 Fenton 반응을 통해 hydroxyl radical의 형성에 관여할 수 있으며[26], 자동 산화 반응 과정에서 생성되는 hydrogen peroxide는 세포막에 대한 높은 투과성으로 주변 세포의 연쇄적인 산화적 손상을 유도하게 된다[27]. 이렇듯 singlet oxygen으로 유도된 적혈구의 용혈은 피부의 일광 손상 메커니즘과 밀접한 연관성을 가지고 있으므로, 시료의 광용혈 저해 활성은 피부의 일광 손상에 대한 보호 활성을 확인할 수 있는 지표로 작용할 수 있다.

본 실험에서는 적혈구에 여러 농도의 시료를 처리한 후, singlet oxygen에 의해 손상된 적혈구가 50% 용혈되는 시간 ( $\tau_{50}$ )을 통해 시료들의 활성을 확인하였다. Figure 4 및 Table 2에 나타난 것과 같이 실험을 수행한 농도(3.125, 6.25, 12.5  $\mu\text{g/mL}$ )에서 추출물(36.6, 65.1, 119.2 min), 분획물(67.0, 122.5, 179.4 min) 및 THSG (39.2, 52.2, 68.7 min)의 세포 보호 활성은 농도 의존적으로 증가하였다. 또한 추출물과 분획물은 모두 양성 대조군으로 사용한 (+)- $\alpha$ -tocopherol (36.1, 39.8, 46.8 min) 보다 뛰어난 세포 보호 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 선행 연구 결과에서 적혈구의 산화적 손상에 대해 폐놀성 화합물은 자유 라디칼 및 ROS 소거 활성을 바탕으로 세포 보호 효능을 나타낸다고 보고되었다[10,28,29]. 본 실험의 결과에서 폐놀류 및 THSG의 함량이 높은 에틸 아세테이트 분획물이 에탄올 추출물보다 높은 세포 보호 활성을 나타내는데, 이는 기존의 보고에 부합하는 결과로 판단된다.

THSG의 경우 세포 보호 활성이 농도 의존적으로 증가하였을 뿐만 아니라 (+)- $\alpha$ -tocopherol과 비교하여 유의적인 세포 보호 활성을 나타냈지만, 에탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물 보다는 낮은 보호 효능을 나타냈다. 따라서 하수오의 우수한 세포 보호 작용에 관여하는 추가적인 활성 물질이 존재할 것으로 판단되기에 이에 관한 규명이 필요할 것으로 보인다.

### 3.4. 항균 활성 평가

항균 활성 평가를 위하여 첫번째로 disc diffusion assay를 이용하여 확인하였다. 이 실험에 사용된 균주는



식품, 의약품 및 화장품 분야에서 검출이 제한되고 있는 균주인 *S. aureus*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*를 사용하였으며, 양성 대조군은 항균 작용을 통해 방부력을 나타내는 methyl paraben을 사용하였다[30]. Figure 5에서 볼 수 있는 것과 같이, 에틸 아세테이트 분획물 및 methyl paraben은 실험에 사용된 모든 균주에 대해 저해환을 형성하였으며, 에탄올 추출물과 THSG는 *S. aureus*와 *C. albicans*에 대해서만 저해환을 나타냈다. 특히 에틸 아세테이트 분획물은 *S. aureus* 및 *P. aeruginosa*에 대해 육안 관찰을 통해 methyl paraben과 비교한 항균 활성이 동등 혹은 이상인 것으로 판단되었기에, 정량적인 비교를 위해 상기 균주들에 대해 시료들의 MIC 및 MBC/MFC 값을 추가로 측정하였다.

Table 3에서 볼 수 있는 것과 같이 *S. aureus*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*에 대한 MIC는 50% 에탄올 추출물이 각각 1.25, 10.00, 2.50, 10.00 mg/mL, 에틸 아세테이트 분획물이 0.16, 5.00, 1.25, 2.50 mg/mL으로, 추출물 및 분획물은 실험에 사용한 모든 균주에 대해 항균 활성을 나타냈으며, 에틸 아세테이트 분획물은 에탄올 추출물 보다 낮은 MIC를 나타내 더 우수한 항균 활성을 보이는 것을 확인하였다. 또한 추출물 및 분획물은 그람 양성균인 *S. aureus*에 대한 활성 측정 결과에서 methyl paraben 보다 높은 항균 활성을 나타냈다. 특히 에틸아세테이트 분획물의 경우는 그람 음성균인 *P. aeruginosa*에 대해서도 동등 혹은 그 이상의 활성을 나타냈는데, 이러한 경향성은 앞선 disc diffusion assay와 동일한 결과이다. 시료들의 MBC 및 MFC는 MIC와 유사한 값을 나타내거나 더 높은 농도를 나타냈는데, 이것은 기존의 연구들의 경향성과 일치하는 것으로 확인되었다[10,31].

THSG 또한 실험에 사용한 모든 균주에 대해 항균 활성을 나타냈으며, *S. aureus*에 대해서는 methyl paraben보다 우수한 활성을 나타냈다. 하지만, THSG는 *E. Coli*를 제외한 모든 균주에 대해 에틸 아세테이트 분획물보다 낮은 항균 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 선행 연구에서 하수오에 존재하는 emodin 및 gallic acid는 상기 균주에 대한 항균 활성을 나타낸다고 보고하였다[32-36]. 따라서 이러한 결과는 THSG를 비롯한 하수오에 존재하는 다양한 성분들이 항균 작용에 관여했기 때문인 것으로 사료된다.

## 4. 결론

본 연구에서는 하수오의 50% 에탄올 추출물 및 에틸 아세테이트 분획물을 제조하였고, 이들의 항산화 및 항균 소재로서의 응용 가능성을 평가하였다. HPLC-DAD, LC-MS/MS 분석을 통해 추출물 및 분획물에 주요하게 존재하는 성분은 THSG인 것을 확인하였고, THSG의 활성 평가도 수행하였다. 에틸 아세테이트 분획물은 에탄올 추출물 보다 더 높은 페놀류와 THSG 함량을 나타냈으며, 자유 라디칼 및  $O_2^{\cdot -}$ ,  $\cdot OH$ 와 같은 ROS에 대해서도 더 우수한 소거 활성을 나타냈다. 특히 ROS 소거 활성 평가에 대해서 에틸 아세테이트 분획물 및 THSG는 뛰어난 수용성 항산화제로 알려진 L-ascorbic acid와 동등한 활성을 나타냈다. 이러한 결과를 바탕으로 수행된  $^1O_2$ 으로 유도된 적혈구 산화적 손상에 대한 세포 보호 효능 평가에서 추출물, 분획물 및 THSG는 (+)- $\alpha$ -tocopherol보다 우수한 활성을 나타냈다. 항균 활성 평가에 있어서 하수오 추출물 및 분획물은 실험에 사용된 모든 균주(*S. aureus*, *E. Coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*)에 대해 항균 활성을 나타냈고, 특히 에틸아세테이트 분획물은 그람 양성균인 *S. aureus*에 대해서 methyl paraben 보다 뛰어난 항균 활성을 나타냈다. 하지만 하수오의 우수한 세포 보호 및 항균 활성에 관한 활성 물질은 THSG이외에도 추가적으로 존재할 것으로 판단된다. 따라서 추후 연구에서 하수오의 추가적인 활성 물질에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 결론적으로 상기의 실험 결과, 하수오는 우수한 항산화 효능 및, 세포 보호, 항균 활성을 보유한 소재인 것으로 판단되며, 본 연구를 통해 관련된 분야에서 천연 소재로서 사용될 가능성을 제시하고자 한다.

## Reference

1. B. C. Dickinson and C. J. Chang, Chemistry and biology of reactive oxygen species in signaling or stress responses, *Nat. Chem. Biol.*, 7(8), 504 (2011).
2. J. Zhang, X. Wang, V. Vikash, Q. Ye, D. Wu, Y. Liu, and W. Dong, ROS and ROS-Mediated cellular signaling, *Oxid. Med. Cell Longev.*, 4350965 (2016).
3. B. D'Autreaux and M. B. Toledano, ROS as signalling

- molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**(10), 813 (2007).
4. C. K. Chow, Antioxidant nutrients and environmental health: introduction, *Toxicology*, **180**(1), 1 (2002).
  5. K. J. Trouba, H. K. Hamadeh, R. P. Amin, and D. R. Germolec, Oxidative stress and its role in skin disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **4**(4), 665 (2002).
  6. V. T. Natarajan, P. Ganju, A. Ramkumar, R. Grover, and R. S. Gokhale, Multifaceted pathways protect human skin from UV radiation, *Nat. Chem. Biol.*, **10**(7), 542 (2014).
  7. Z. Sun, S. Y. Park, E. Hwang, M. Zhang, S. A. Seo, P. Lin, and T. H. Yi, Thymus vulgaris alleviates UVB irradiation induced skin damage via inhibition of MAPK/AP-1 and activation of Nrf2-ARE antioxidant system, *J. Cell Mol. Med.*, **21**(2), 336 (2017).
  8. D. R. Bickers and M. Athar, Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease, *J. Invest. Dermatol.*, **126**(12), 2565 (2006).
  9. Y. Belkaid and S. Tamoutounour, The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity, *Nat. Rev. Immunol.*, **16**(6), 353 (2016).
  10. H. S. Shin, Y. J. Lee, J. W. Kim, B. R. Song, S. L. Lee, and S. N. Park, Evaluation of antioxidant, cytoprotective and antimicrobial activities of the extract and fractions obtained from young shoots of *Nypa fruticans* Wurmb, *Kor. J. Pharmacogn.*, **49**(2), 155 (2018).
  11. M. Al-Fatimi, M. Wurster, G. Schroder, and U. Lindequist, Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen, *J. Ethnopharmacol.*, **111**(3), 657 (2007).
  12. C. L. Dicastillo, F. Bustos, X. Valenzuela, G. Lopez-Carballo, J. M. Vilarino, and M. J. Galotto, Chilean berry *Ugni molinae* Turcz. fruit and leaves extracts with interesting antioxidant, antimicrobial and tyrosinase inhibitory properties, *Food Res. Int.*, **102**, 119 (2017).
  13. J. Dai and R. J. Mumper, Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties, *Molecules*, **15**(10), 7313 (2010).
  14. Y. Cai, Q. Luo, M. Sun, and H. Corke, Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer, *Life Sci.*, **74**(17), 2157 (2004).
  15. L. Lv, Y. Cheng, T. Zheng, X. Li, and R. Zhai, Purification, antioxidant activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb, *Carbohydr. Polym.*, **99**, 765 (2014).
  16. Z. W. Zhu, J. Li, X. M. Gao, E. Amponsem, L. Y. Kang, L. M. Hu, B. L. Zhang, and Y. X. Chang, Simultaneous determination of stilbenes, phenolic acids, flavonoids and anthraquinones in *Radix polygoni multiflori* by LC-MS/MS, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **62**, 162 (2012).
  17. L. Lin, B. Ni, H. Lin, M. Zhang, X. Li, X. Yin, C. Qu, and J. Ni, Traditional usages, botany, phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Polygonum multiflorum* Thunb: a review, *J. Ethnopharmacol.*, **159**, 158 (2015).
  18. E. S. S. Abdel-Hameed, Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian *Ficus* species leaf samples, *Food Chem.*, **114**(4), 1271 (2009).
  19. J. S. Seong, S. H. Xuan, S. H. Park, K. S. Lee, Y. M. Park, and S. N. Park, Antioxidative and antiaging activities and component analysis of *Lespedeza cuneata* G. Don extracts fermented with *Lactobacillus pentosus*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**(11), 1961 (2017).
  20. S. N. Park, M. J. Kim, J. H. Ha, N. H. Lee, J. Park, J. Lee, D. Kim, and C. Yoon, Protective effects of TES trioleate, an inhibitor of phospholipase A2, on reactive oxygen species and UVA-induced cell damage, *J. Photochem. Photobiol. B*, **164**, 30 (2016).
  21. T. Yi, K. S. Y. Leung, G. H. Lu, H. Zhang, and K. Chan, Identification and determination of the major constituents in traditional Chinese medicinal plant *Polygonum multiflorum* thunb by HPLC coupled with PAD and ESI/MS, *Phytochemical. Analysis*, **18**(3), 181 (2007).

22. V. Jerkovic, F. Nguyen, S. Nizet, and S. Collin, Combinatorial synthesis, reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography elution data and liquid chromatography/positive atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectra of methoxylated and glycosylated resveratrol analogues, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**(15), 2456 (2007).
23. J. M. Gutteridge, L. Maidt, and L. Poyer, Superoxide dismutase and fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron(II), *Biochem. J.*, **269**(1), 169 (1990).
24. R. L. Chen, C. H. Lin, C. Y. Chung, and T. J. Cheng, Determination of tannin in green tea infusion by flow-injection analysis based on quenching the fluorescence of 3-aminophthalate, *J. Agric. Food Chem.*, **53**(22), 8443 (2005).
25. M. C. DeRosa and R. J. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coord. Chem. Rev.*, **233-234**, 351 (2002).
26. C. Papuc, G. V. Goran, C. N. Predescu, and V. Nicorescu, Mechanisms of oxidative processes in meat and toxicity induced by postprandial degradation products: a review, *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **16**(1), 96 (2017).
27. T. G. Nam, B. H. Lee, H. K. Choi, A. R. Mansur, S. G. Lee, and D. O. Kim, *Rhus verniciflua* Stokes extract and its flavonoids protect PC-12 cells against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **27**(6), 1090 (2017).
28. K. A. Youdim, B. Shukitt-Hale, S. MacKinnon, W. Kalt, and J. A. Joseph, Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: *in vitro* and *in vivo*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1523**(1), 117 (2000).
29. A. S. Magalhaes, B. M. Silva, J. A. Pereira, P. B. Andrade, P. Valentao, and M. Carvalho, Protective effect of quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit against oxidative hemolysis of human erythrocytes, *Food Chem. Toxicol.*, **47**(6), 1372 (2009).
30. K. Hirakawa, H. Umemoto, R. Kikuchi, H. Yamaguchi, Y. Nishimura, T. Arai, S. Okazaki, and H. Segawa, Determination of singlet oxygen and electron transfer mediated mechanisms of photosensitized protein damage by phosphorus(V)porphyrins, *Chem. Res. Toxicol.*, **28**(2), 262 (2015).
31. Y. Fu, Y. Zu, L. Chen, X. Shi, Z. Wang, S. Sun, and T. Efferth, Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination, *Phytother. Res.*, **21**(10), 989 (2007).
32. M. M. Cowan, Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**(4), 564 (1999).
33. S. Basu, A. Ghosh, and B. Hazra, Evaluation of the antibacterial activity of *Ventilago madraspatana* Gaertn., *Rubia cordifolia* Linn., and *Lantana camara* Linn.: isolation of emodin and physcion as active antibacterial agents, *Phytother. Res.*, **19**(10), 888 (2005).
34. W. J. Kong, J. B. Wang, C. Jin, Y. L. Zhao, C. M. Dai, X. H. Xiao, and Z. L. Li, Effect of emodin on *Candida albicans* growth investigated by microcalorimetry combined with chemometric analysis, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**(6), 1183 (2009).
35. X. Ding, B. Yin, L. Qian, Z. Zeng, Z. Yang, H. Li, Y. Lu, and S. Zhou, Screening for novel quorum-sensing inhibitors to interfere with the formation of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm, *J. Med. Microbiol.*, **60**(12), 1827 (2011).
36. A. Borges, C. Ferreira, M. J. Saavedra, and M. Simoes, Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria, *Microb. Drug Resist.*, **19**(4), 256 (2013).