

어성초 추출물 및 분획물의 항균, 항산화 및 세포보호활성

윤민음 · 이예슬 · 이윤주 · 박영민 · 박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구원, 코스메틱 융·복합산업 지원센터
(2018년 3월 28일 접수, 2018년 4월 24일 심사, 2018년 5월 6일 채택)

Antimicrobial, Antioxidant and Cellular Protective Effects of *Houttuynia cordata* Extract and Fraction

Mid Eum Yun, Ye Seul Lee, Yun Ju Lee, Young Min Park, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center,
Seoul National University of Science and Technology, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
(Received March 28, 2018; Revised April 24, 2018; Accepted May 6, 2018)

초 록

본 연구에서는 어성초(*Houttuynia cordata*)의 추출물 및 분획물을 제조하고 이들에 대한 생리활성과 성분분석을 하였다. 어성초는 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획물을 제조하여 실험에 사용하였다. 항균활성 측정결과, *S. aureus*, *B. subtilis*에 대한 에틸아세테이트 분획의 MIC 값은 각각 78, 312 µg/mL로 나타나 그람 양성균에 대하여 높은 활성을 보이는 것으로 나타났다. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)에 대한 자유라디칼 소거활성(FSC₅₀)은 50% 에탄올 추출물(27.15 µg/mL) 및 에틸아세테이트 분획(12.00 µg/mL)을 측정 한 결과 에틸아세테이트 분획에서 활성이 더 크게 나타났다. Luminol-의존성 화학발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 대한 총항산화능(OSC₅₀)은 50% 에탄올 추출물(2.91 µg/mL), 에틸아세테이트 분획(0.983 µg/mL) 측정 결과 DPPH에 대한 소거활성과 같은 경향성을 보였다. 어성초 추출물의 HaCaT 세포보호효과를 확인하기 위해 UVB 조사 후 세포 내 ROS 소거활성을 확인한 결과, 어성초 에틸아세테이트 분획은 1.6 µg/mL부터 농도 의존적으로 ROS 소거활성을 나타내었으며, 최고 농도인 12.5 µg/mL에서 54.3%의 감소율을 보였다. 과산화수소로 유도된 세포보호효과 또한, 어성초 에틸아세테이트 분획은 0.8 µg/mL부터 세포생존율을 유의적으로 증가시켜 최대 86.9%까지 증가시켰다. 실험에 사용된 어성초 추출물의 에틸아세테이트 분획을 가지고 TLC와 HPLC를 이용한 성분분석을 수행하였다. 그 결과 quercitrin, isoquercitrin, hyperoside, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin 및 afzelin이 있음을 확인하였다. 이상의 결과들로부터, 어성초 추출물 및 분획물은 ROS를 소거하고 항균효과를 나타냄으로써 외부 환경으로부터 세포막을 보호할 수 있는 천연 항산화제 및 천연 방부제로서 화장품 분야에서 응용가능성이 있음을 시사하였다.

Abstract

This study was conducted to investigate the physiological activities of *Houttuynia cordata* extracts and fractions. *H. cordata* extracts were extracted with 50% ethanol and the ethyl acetate fractions were obtained from the extracts. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of the ethyl acetate fraction for *S. aureus* and *B. subtilis* were 78 µg/mL and 312 µg/mL, respectively, indicating the high activity against gram-positive bacteria. The free radical scavenging activity (FSC₅₀) for 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) was higher in the ethyl acetate fraction with 12.00 µg/mL compared to that of 27.15 µg/mL for 50% ethanol extract. The total antioxidant activity (OSC₅₀) values for reactive oxygen species (ROS) produced in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by a luminol-dependent chemiluminescence method were 2.91 and 0.983 µg/ml for the 50% ethanol extract and ethyl acetate fraction, respectively. To investigate cellular protective effects on the HaCaT cell, the intracellular ROS scavenging activity was measured after UVB irradiation and the ethyl acetate fraction of *H. cordata* showed the activity in a concentration-dependent from 1.6 µg/mL and a reduction rate of 54.3% at a maximum concentration of 12.5 µg/mL. Also, HaCaT cell protective effect against H₂O₂-mediated decreased the cell viability of the ethyl acetate fraction of *H. cordata* which significantly increased the cell viability from 0.8 µg/mL and the maximum cell viability showed 86.9%. The ethyl acetate fraction of the *H. cordata* extracts was analyzed by TLC and HPLC. As a result, quercitrin, isoquercitrin, hyperoside, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin and afzelin were identified. From the above results, it was suggested that the extracts and fractions of *H. cordata* have a potential to be applied in the field of cosmetics as a natural antioxidant/preservative capable of protecting the cell membrane from the oxidative stress by eliminating ROS and exhibiting the antimicrobial effect.

Keywords: *Houttuynia cordata*, antimicrobial activity, antioxidative activity, cellular protective, component analysis

1. 서 론

사람의 피부는 인체의 길 부분을 덮고 있는 조직으로, 체내의 근육들과 피부를 보호하며 여러 가지 생명활동이 일어나는 중요한 기관이다. 피부의 기능은 보호기능, 호흡기능, 저장기능, 감각기능, 분비기능으로 크게 5가지로 나뉘는데 특히 피부는 자외선이나 미생물, 공해와

[†] Corresponding Author: Seoul National University of Science and Technology, Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Cosmetic Industry Coupled Collaboration Center, 232 Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea
Tel: +82-2-970-6451 e-mail: snpark@seoultech.ac.kr

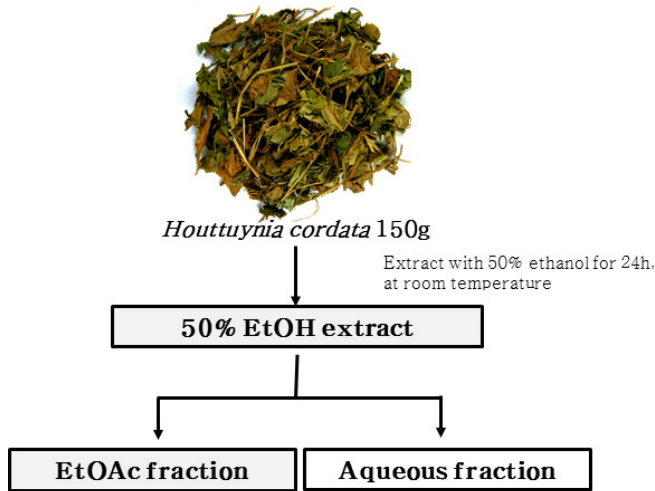


Figure 1. Preparation of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from *H. cordata*.

같은 외부자극으로부터 신체 내부를 보호하는 데 있어 중요한 역할을 하게 된다. 피부는 이렇듯 자체적으로 보호기능을 가지기는 하지만, 외부 자극에 지속적으로 노출되어 있기 때문에 손상을 받기 쉽다 [1-2]. 따라서 사람은 외부 환경으로부터 피부를 보호하여 노화를 억제시키고 아름다움을 유지하기 위해 화장품을 사용하게 되었다. 그러나 화장품에 사용되는 수분함량은 제형에 따라 적게는 30%에서 많게는 95% 정도로 다량의 물이 함유되어 있어 미생물에 의한 오염이 일어나기 쉽다. 화장품은 접촉되는 사용방법에 따라 사람의 손 및 피부 등 신체와 공기 중의 다양한 미생물에 의해 쉽게 오염될 수 있으며, 이러한 미생물 오염은 화장품을 사용하는 소비자에게 치명적인 영향을 끼칠 수 있다[3-5]. 이에 화장품에는 화장품이 추구하는 본래의 목적 외에 보조성분으로 미생물의 생육을 억제하는 방부제가 첨가되어야 한다. 화장품에 사용되는 방부제의 종류는 매우 다양하나 일반적으로 파라벤류, 페녹시에탄올 등을 많이 사용한다. 그러나 기존에 널리 사용되었던 이러한 화학 방부제들이 피부 알러지와 환경호르몬 및 자극을 일으킬 수 있음이 밝혀지면서 피부에 안전한 방부시스템의 필요성이 증가되고 있다. 이에 화학 방부제를 대신할 수 있는 천연 방부제에 대한 관심이 높아지면서 천연 소재 개발 연구가 증가하고 있다[6-8].

또한, 피부는 자외선과 공기에 항상 노출이 되어 있기 때문에, 이로 인해 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 생성된다. 활성산소종(ROS)에는 superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$)과 hydroxyl radical ($\cdot OH$)과 같은 라디칼종, singlet oxygen (1O_2) 및 hydrogen peroxide (H_2O_2)와 같은 비라디칼종, 그리고 이러한 ROS와 생체 내 분자들과의 반응으로 생성되는 peroxy radical ($ROO\cdot$), alkoxy radical ($RO\cdot$) 등이 포함된다[9-11]. 이러한 ROS는 피부 항산화제의 파괴, 지질 과산화의 개시, 단백질의 산화, DNA 산화, 콜라겐 및 히아루론산 등의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합을 일으켜 주름과 멜라닌을 생성하는 등 피부 노화를 가속시킨다[12-14]. 이러한 피부 손상을 막기 위해 피부에는 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase (GSHPx)와 같은 효소적 항산화제와 비타민C, E와 같은 비효소적 항산화제로 이루어진 피부 항산화 방어계가 있다. 그러나 자외선량이 너무 많게 되면 방어계가 압도당할 수 있고 이로 인하여 ROS가 피부의 항산화 방어시스템을 붕괴시킨다. 따라서 피부 노화를 억제하기 위해서는 피부에서 생성되는 과잉의 활성산소 생성 억제 및 생성된

활성산소의 효율적인 제거를 위한 적절한 항산화제의 개발과 보충이 필요하다[15-18]. 항산화제로는 BHA (butylated hydroxy anisole)와 BHT (butylated hydroxy toluene) 등의 합성 항산화제와 천연물에서 유래된 천연 항산화제가 있다. 하지만 합성 항산화제의 경우 과량으로 사용 시 독성을 나타내는 것으로 보고되고 있기 때문에 보다 안전하고 효과가 뛰어난 천연 항산화제 개발을 위하여 다양한 천연물에 대한 연구가 증가하고 있다[19].

어성초(*Houttuynia cordata*)는 삼백초과(*Saururaceae*)에 속하는 다년생 초본으로, 우리나라를 비롯하여 중국, 일본, 베트남 등에 자생하며 특유의 생선 비린내가 난다고 하여 이름이 붙여졌다[20]. 전통약용 식물로서 광범위한 분야에서 효능을 나타내고 있는 어성초는 항산화, 항균, 항알러지, 면역력 증진 등의 효과가 보고된 바 있다[21-25]. 그러나 화장품 소재로의 적용을 위한 항균활성이나 각종 ROS (H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$ 등)가 생성되는 계에서의 이들 ROS에 대한 총항산화능에 대해서는 아직 연구가 되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 어성초 추출물을 제조하여 이들 추출물과 분획물의 항균활성, 항산화 활성 및 세포보호활성을 측정하고 그 성분을 밝혀냄으로써 화장품 소재로서의 개발 가능성을 검토하였다.

2. 재료 및 실험

2.1. 기기 및 시약

UV-visible spectrophotometer는 Varian (Australia)사의 Cary 50, 화학발광기는 Berthold (Germany)사의 6-channel LB9505 LT 제품을 사용하였고, HPLC는 Shimadzu (Japan)사의 Shim-pack VP-ODS C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 제품을 사용하였다. ROS 소거 활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), EDTA, luminol, (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g), L-ascorbic acid 는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 기타 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan) 제품을, H_2O_2 는 Dae Jung Chemical & Metals (Korea)사 제품을 사용하였다. 에탄올(EtOH), 메탄올(MeOH), 에틸아세테이트(EtOAc) 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. 비교물질로 사용한 quercitrin, isoquercitrin, hyperoside, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin 및 afzelin은 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하였다. 실험에 사용한 어성초는 경상북도 영천시 원산지로 (주)갑당약초에서 구매하여 사용하였다.

2.2. 어성초의 추출/분획 및 수율

실험에 사용한 어성초는 다음과 같은 방법으로 추출 및 분획을 실시하였다(Figure 1). 어성초(잎 + 줄기) 150 g을 잘게 자른 후 50% 에탄올 3 L에 24 h 동안 침적시킨 후 여과하였다. 여과 후 여액을 감압 건조하여 파우더를 얻었다. 그리고 50% 에탄올 추출물을 에틸아세테이트를 이용하여 3회 분획하여 얻은 에틸아세테이트 분획을 감압·농축하여 파우더를 얻었다. 수율은 100 g을 기준으로 계산하였다. 건조된 어성초의 수율은 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획에서 각각 24.18, 2.14%로 나타났다.

2.3. 어성초 추출물의 항균활성 측정

2.3.1. 사용균주, 배지 및 배양 조건

본 실험에 사용된 균주는 Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association (CTFA) challenge test에서 사용되는 호기성 그람 양성 균주인 *S. aureus* ATCC 6538 (황색포도상구균), *B. subtilis* ATCC 6051

Table 1. List of Strains and Cultivation Condition Used for Antimicrobial Experiment

Strains		Media	Temperature (°C)	Time (h)
Gram (+) bacteria	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	TSA ¹⁾ , TSB ²⁾	37	24
	<i>B. subtilis</i> ATCC 6051	TSA ¹⁾ , TSB ²⁾	37	48
Gram (-) bacteria	<i>E. coli</i> ATCC 23736	TSA ¹⁾ , TSB ²⁾	37	24
	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 29336	TSA ¹⁾ , TSB ²⁾	37	48
Fungi	Yeast <i>C. albicans</i> ATCC 10231	TSA ¹⁾ , TSB ²⁾	30	48
	Mold <i>A. niger</i> ATCC 16404	PDA ³⁾ , PDB ⁴⁾	30	72

¹⁾TSA : Tryptic soy agar (Difco, USA), ²⁾TSB : Tryptic soy broth (Difco, USA), ³⁾PDA : Potato dextrose agar (Difco, USA), ⁴⁾PDB : Potato dextrose broth (Difco, USA).

(고초균), 호기성 그람 음성 균주인 *E. coli* ATCC 23736 (대장균), *P. aeruginosa* ATCC 29336 (녹농균), 효모균인 *C. albicans* ATCC 10231, 곰팡이균인 *A. niger* ATCC 16404 총 6가지 균주를 한국 미생물 보존센터에서 분양 받아 사용하였다. 해당 균주를 배양하는 데 필요한 배지 및 배양 조건을 Table 1에 나타내었다.

2.3.2. Disc diffusion assay에 의한 항균활성 측정

각 추출물의 항균활성을 disc diffusion assay로 측정하였다. 배양된 균주는 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ CFU/mL로 맞추어 본 실험에 사용하였으며, 각 균주는 평판배지에 100 μ L씩 멸균 면봉을 사용하여 도말하였다. 시료는 disc 당 5 mg이 되도록 paper disc (diameter 8mm, Roshi Kaisha., Tokyo, Japan)에 천천히 흡수시킨 뒤, 건조과정을 거쳐 용매를 휘발시켰다. 각 시료를 흡수시킨 paper disc를 균주를 도말한 평판배지 위에 밀착시킨 후 배양시켜 disc 주변에 생성된 저해환(clear zone, mm)을 측정하여 항균활성을 비교하였다.

2.3.3. 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정

각 추출물의 정확한 최소저해농도를 조사하기 위하여 broth-dilution method를 사용하였다. 음성 대조군으로는 50% DMSO를, 양성 대조군으로는 화장품에 방부제로 널리 사용되는 methyl paraben을 사용하였다. 각 실험군을 96-well plate에 20 μ L 주입한 후 50% DMSO를 사용하여 2배 희석법을 이용하여 농도를 희석하였다. 각각의 균주는 $1 \times 10^6 - 1 \times 10^7$ CFU/mL로 농도를 맞추어 본 실험에 사용하였다. 균주를 함유한 배지 180 μ L를 실험군이 주입된 각각의 well에 접종한 후 30-37 °C대의 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 농도를 최소저해농도로 결정하였다.

2.4. 어성초 추출물의 항산화 활성 측정

2.4.1. DPPH법을 이용한 free radical 소거활성

자유라디칼은 피부 노화의 주된 원인 물질로 간주되고 있다. DPPH법은 시료의 라디칼 소거능을 평가할 수 있는 실험법으로서, 비교적 안정한 라디칼에 속하는 DPPH에 대한 시료의 환원력을 측정하는 실험법이다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 1 mL에 에탄올 1 mL를 첨가하고 여러 농도의 추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 다음 실온에서 10 min 동안 방치 후 spectrophotometer로 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 활성의 크기는 시료를 넣지 않은 경우를 대조군(control)으로 하고 시료를 넣은 것을 실험군(experiment)으로 하였다. DPPH의 소거율(%)은 다음 식과 같이 나타내었고, 자유라디칼 소거활성(free radical scavenging activity, FSC₅₀)은 DPPH의 농

도가 50% 감소되는데 필요한 시료의 농도로 표기하였다.

$$\text{Radical Scavenging (\%)} = \left\{ 1 - \left(\frac{A_{\text{experiment}} - A_{\text{sample blank}}}{A_{\text{control}}} \right) \right\} \times 100$$

2.4.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성 산소 소거활성(총 항산화능)

본 실험에서 사용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서는 철이 촉매로 작용하여 Fe²⁺과 H₂O₂에 의해 Fenton 반응이 일어나게 되며 각종 ROS(O₂^{·-}, ·OH 그리고 H₂O₂)를 생성시키게 된다. 따라서 이 계를 이용하면 ROS에 대한 총 항산화능을 측정할 수 있고, 이 총 항산화능에는 활성 산소의 생성을 막아주는 킬레이트 작용 또한 포함될 수 있다. 이렇게 생성된 ROS의 검출은 luminol과 ROS와의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 확인할 수 있다. 먼저 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 다양한 농도의 추출물을 넣었다. 여기에 2.5 mM EDTA 40 μ L 및 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 μ L를 가한 후 35 mM luminol 80 μ L를 넣고 흔들어 섞어주었다. 이어서 화학발광기의 cell holder에 튜브를 넣고 5 min 동안 항온시킨 후 150 mM H₂O₂ 40 μ L를 넣고 화학발광을 25 min 동안 측정하였다. 대조군(control)은 시료 용액 대신에 증류수를 넣고, 공시험(blank)은 시료군과 조건이 동일하나 H₂O₂와 FeCl₃ · 6H₂O 대신 증류수를 첨가하였다. 화학발광기 6-channel LB9505 LT의 각 채널은 실험 전에 보정하여 채널 간의 차이가 거의 없도록 하였다. 화학발광으로 측정된 ROS 소거율(%)은 다음 식과 같이 나타내었고, ROS 소거활성(reactive oxygen species scavenging activity, OSC₅₀)은 ROS를 50% 소거시키는데 필요한 시료의 농도로 표기하였다.

$$\text{ROS Scavenging (\%)} = \left(\frac{C_{pm_control} - C_{pm_experiment}}{C_{pm_control} - C_{pm_blank}} \right) \times 100$$

2.5. 어성초 추출물의 HaCaT 세포보호효과 측정

2.5.1. HaCaT 세포 배양

사람 각질형성 세포주인 HaCaT 세포는 Dr. Fusenig (German Cancer Research Center, DKFZ)로부터 분양받아 사용하였다. 세포배양에 사용된 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium, DMEM, Capricorn, Germany)는 10% fetal bovine serum (FBS, PAA, Austria), 1% penicillin/streptomycin, (P/S, PAA, Austria)을 혼합하여 사용하였고, 37 °C, 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

Table 2. TLC Mobile Phase for Separation of EtOAc Fraction of *H. cordata*

Eluent system	
Ethyl acetate : chloroform : formic acid : D · W = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v)	

Table 3. HPLC Condition for Separation of EtOAc Fraction of *H. cordata*

Condition of HPLC analysis				
Column	Shim-pack VP-ODS C ₁₈ column (L : 250 mm, LD : 4.6 mm, 5 μm)			
Detector	UVD 170s DIONEX			
Detection wavelength	254-400 nm			
Flow rate	1.0 mL/min			
Injection volume	20 μL			
	Program order	Time (min)	2% AA ¹⁾ in water (%)	0.5% AA ¹⁾ in 50% ACN ²⁾ (%)
	1	0	100	0
Mobile phase conditions for gradient-elution	2	10	100	0
	3	100	70	30
	4	150	85	15
	5	160	100	0
	6	165	100	0

¹⁾AA : Acetic acid, ²⁾ACN : Acetonitrile.

2.5.2. 세포 독성 평가

본 실험에서 사용된 MTT assay는 실험에 사용될 시료의 농도범위를 결정하기 위하여 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide를 이용하여 세포 생존율을 측정하는 실험 방법이다. 추출물이 HaCaT 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위해 먼저 세포를 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 분주하여 60-80%까지 배양하였다. 무혈청 배지에 추출물을 농도별로 희석하여 24 h 동안 처리한 후, 배지를 모두 제거하고 0.5 mg/mL MTT용액을 각 well에 첨가하여 2 h 동안 37 °C에 반응시켰다. 생성된 formazan을 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 녹이고 ELISA reader (Tecan, Austria)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2.5.3. 세포 내 ROS 소거활성 평가

세포 내 ROS 소거활성 평가를 위하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate H₂DCF-DA)를 사용하여 fluorescence를 측정하는 방법을 이용하였다. HaCaT 세포를 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 분주하여 24 h 동안 배양한 후, 농도별로 희석한 시료를 처리하여 24 h 동안 다시 배양하였다. 배양 후 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)를 이용하여 세포를 2회 세척하였다. 20 μM H₂DCFH-DA로 30 min 동안 37 °C에서 처리한 후, CL-1000 ultra-violet crosslinker를 이용하여 DPBS 상태에서 200 mJ/cm² UVB를 조사하여 세포 내 ROS를 생성시켰다. 형광의 세기는 fluorescence ELISA reader (excitation, 490 nm emission, 530 nm) 기기를 통하여 측정하였다.

2.5.4. 과산화수소로 유도된 세포손상에 대한 보호효과

HaCaT 세포를 96-well plate에 1 × 10⁴ cells/well로 분주하고 24 h 동안 배양하였다. 배양 후, 배지를 모두 제거하고 무혈청 배지에 추출물을 농도별로 희석하여 24 h 동안 다시 배양하였다. PBS 100 μL로 1회 세척한 후, 과산화수소 2 mM (in PBS)로 30 min 처리하였다. 과

산화수소를 모두 제거 후, PBS 100 μL로 2회 세척하였다. 세척 후, 무혈청 배지로 바꿔 24 h 배양하였다. 배양 후, MTT assay로 세포 생존율을 확인하여 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 세포보호효과를 확인하였다.

2.6. TLC 및 HPLC를 이용한 어성초 추출물의 성분분석

어성초의 에틸아세테이트 분획을 100% 에탄올에 녹인 후, syringe filter (Milopore 0.45 μm)를 이용하여 여과시키고 이 여액을 극성 TLC (normal phase) 및 비극성 HPLC (C₁₈) 분석을 위한 시료로 이용하였다. TLC 분석 시 사용한 전개 용매는 Table 2에 나타내었다. 성분 확인은 이미 보고된 분광학적 자료 및 표준물질의 R_f 값과 자외선 및 NP-PEG (natural products-polyethylene glycol, 2-aminoethyl diphenylborinate) 발색법을 이용한 분리된 띠의 색상 등을 통해 확인하였다. HPLC 분석은 2% acetic acid 수용액과 0.5% acetic acid를 함유한 50% acetonitrile 수용액을 이용해 기울기 용리법으로 분석하였고, HPLC 분리조건은 Table 3에 나타내었다.

2.7. 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 3회 반복 실시하였으며, 통계분석은 GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA) 프로그램을 이용하였다. One-way ANOVA 검정을 적용하여 p < 0.05 이상의 유의수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 어성초 추출물의 항균활성

3.1.1. Disc Diffusion Assay에 의한 항균활성

어성초 추출물에 대한 항균활성은 화장품의 방부력 평가를 위해 대표적으로 사용되는 호기성 그람 양성 균주인 *S. aureus* (황색포도상구

Table 4. Antimicrobial Activity of 50% EtOH Extract/EtOAc Fraction from *H. cordata* Against Bacteria and Fungi. Zones of Inhibition Include Diameter of Disc (8 mm)

Strains	Size of clear zone (diameter, mm)			
	Methyl paraben	50% EtOH extract	EtOAc fraction	
Gram (+) bacteria	<i>S. aureus</i>	20	10	18
	<i>B. subtilis</i>	18	13	24
Gram (-) bacteria	<i>E. coli</i>	20	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	12	-	10
Fungi	<i>C. albicans</i>	20	-	9
	<i>A. niger</i>	30	-	11

- : No inhibition.

Table 5. Minimum Inhibitory Concentration (MIC, µg/mL) of 50% EtOH Extract/EtOAc Against Bacteria and Fungi

Strains	MIC (µg/ml)			
	Methyl paraben	50% EtOH extract	EtOAc fraction	
Gram (+) bacteria	<i>S. aureus</i>	2,500	1,250	78
	<i>B. subtilis</i>	1,250	2,500	312
Gram (-) bacteria	<i>E. coli</i>	2,500	-	-
	<i>P. aeruginosa</i>	2,500	10,000	1,250
Fungi	<i>C. albicans</i>	1,250	10,000	5,000
	<i>A. niger</i>	625	-	10,000

- : No inhibition.

균), *B. subtilis* (고초균), 호기성 그람 음성 균주인 *E. coli* (대장균), *P. aeruginosa* (녹농균), 효모균인 *C. albicans*, 곰팡이균인 *A. niger* 총 6종의 균주에 대하여 disc diffusion assay로 실시하였으며, 실험 결과는 Figure 2와 Table 4에 나타내었다. 어성초 50% 에탄올 추출물은 그람 양성균(*S. aureus*, *B. subtilis*)에서만 저해환을 나타내었다. 에틸아세테이트 분획은 *E. coli*를 제외한 5가지 균주에서 모두 저해환을 나타내었으며 특히 그람 양성균(*S. aureus*, *B. subtilis*)에 대하여 대조군으로 사용된 methyl paraben과 비슷하거나 더 넓은 범위의 저해환을 보여 그람 양성균에 대하여 높은 항균활성을 가지는 것으로 나타났다.

3.1.2. 최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC) 측정
어성초 추출물에 대하여 성장 억제제의 경향성을 확인하기 위해 broth-dilution method를 사용하여 각 추출물의 정확한 최소저해농도(MIC)를 조사하였으며 그 결과를 Table 5에 나타내었다. 어성초 50% 에탄올 추출물의 MIC 값은 *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*에 대하여 각각 1250 µg/mL, 2500 µg/mL, 10000 µg/mL, 10000 µg/mL에서 MIC를 나타냈으며, *E. coli*와 *A. niger*는 실험에서 사용된 최고 농도인 10000 µg/mL에서도 항균활성이 나타나지 않았다. 에틸아세테이트 분획은 *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger*에 대하여 각각 78, 312, 1,250, 5,000, 10,000 µg/mL에서 MIC를 나타냈으며 *E. coli*에 대해서는 항균활성을 나타내지 않았다. MIC 측정 결과는 어성초 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획이 그람 양성균에 대하여 대조군으로 사용된 methyl paraben과 비교하여 비슷하거나 더 높은 항균활성을 나타냄을 보였으며, 이는 disc diffusion assay 실험 결과와도 경향성이 일치하였다. 또한 에틸아세테이트 분획은 *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* 균주에 대해서도

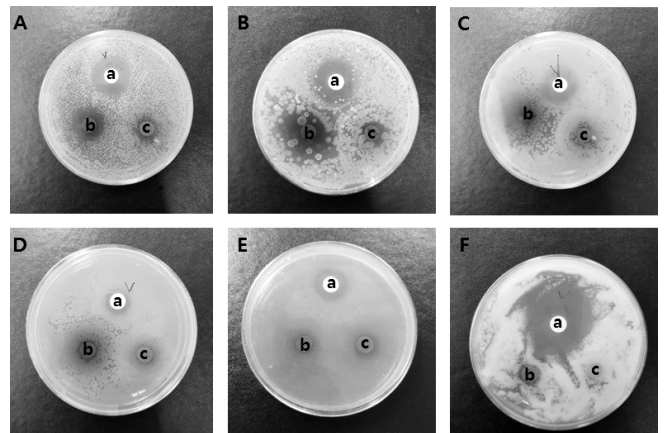


Figure 2. Antimicrobial activity of 50% EtOH extract/EtOAc fraction from *H. cordata* against bacteria and fungi. A : *S. aureus*, B : *B. subtilis*, C : *E. coli*, D : *P. aeruginosa*, E : *C. albicans*, F : *A. niger* a : methyl paraben (control), b : EtOAc fraction, c : 50% EtOH extract.

methyl paraben보다는 낮은 농도이지만 MIC 값을 나타내었기 때문에 화학적 방부제의 함량을 줄이거나 다른 천연물과의 시너지 효과를 이용하여 화학적 방부제를 대신할 수 있을 것으로 사료된다.

3.2. 어성초 추출물의 항산화 활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

피부가 자외선에 노출되었을 때 생성되는 활성산소에는 O₂⁻, ·OH, ROO·와 같은 자유라디칼이 포함되어있다. 이들은 홀 전자를 가지기

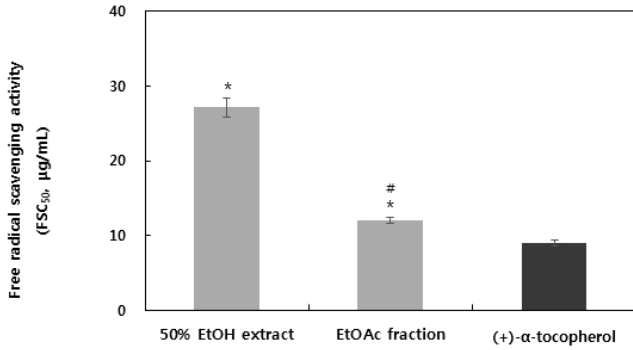


Figure 3. Free radical scavenging activities of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from *H. cordata* and (+)- α -tocopherol. Data are presented as mean \pm S.D. * p < 0.05 compared with (+)- α -tocopherol, # p < 0.05 compared with 50% EtOH extract.

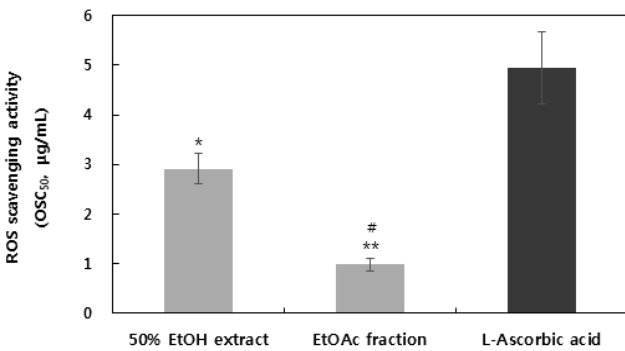


Figure 4. ROS scavenging activities of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from *H. cordata* and L-ascorbic acid in Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ system by luminol-dependent chemiluminescence assay. Data are presented as mean \pm S.D. * p < 0.01 and ** p < 0.001 compared with L-ascorbic acid, # p < 0.01 compared with 50% EtOH extract.

때문에 반응성이 매우 커서 생체막에서 지질과산화반응의 자동산화 반응을 개시시킬 수 있다. 생체 내에 존재하는 항산화제인 (+)- α -tocopherol은 지질과산화 연쇄 반응에서 생성된 지질 라디칼에 수소 주개로 작용함으로써 연쇄반응을 종결시켜 세포막을 보호한다. 이와 같이 수소주개로 작용하여 라디칼을 소거하는 능력인 환원력을 측정하기 위하여 비교적 안정한 라디칼로 존재하는 DPPH와의 반응을 통하여 시료의 자유라디칼 소거활성(FSC₅₀)을 측정하였다. 본 실험에서는 어성초 추출물 및 분획의 라디칼 소거활성을 측정하였고 지용성 항산화제로 잘 알려진 (+)- α -tocopherol의 자유라디칼 소거활성과 비교하였다. 자유라디칼이 50% 소거되는 농도인 FSC₅₀은 어성초 50% 에탄올 추출물이 27.15 μ g/mL, 에틸아세테이트 분획이 12.00 μ g/mL로 나타났다(Figure 3). 이들은 항산화제로 알려진 (+)- α -tocopherol (8.98 μ g/mL)보다는 낮은 활성을 보였으나 에틸아세테이트 분획에서 50% 에탄올 추출물보다 통계적으로 유의하게 더 높은 자유라디칼 소거활성을 나타냄을 확인하였다.

3.2.2. Luminol 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성 산소 소거 활성(총 항산화능)

본 실험에서 사용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서는 철이 촉매로 작용하여 Fe²⁺과 H₂O₂에 의해 Fenton 반응이 일어나게 되며 각종 ROS (O₂⁻, \cdot OH 그리고 H₂O₂)를 생성시키게 된다. 이렇게 생성된 ROS의 검출

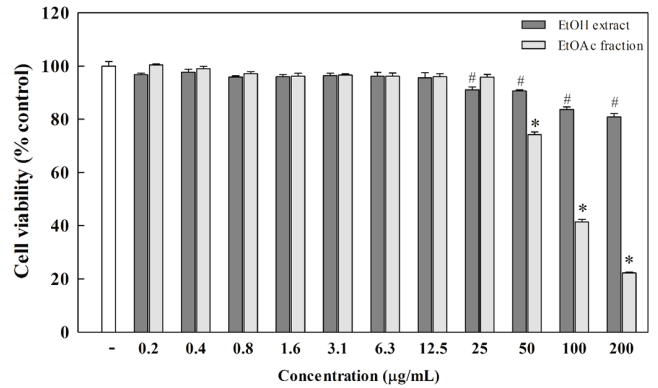


Figure 5. Effect of *H. cordata* 50% EtOH extract and EtOAc fraction treatment on HaCaT cell viability. HaCaT cells were treated with various concentrations of samples for 24 h and cell viability was determined using the MTT assay. Data are presented as the mean \pm SD. * p < 0.05, # p < 0.05 compared with untreated control.

은 luminol과 ROS와의 반응을 통한 화학발광을 측정함으로써 확인할 수 있다. Luminol은 ROS와 반응하여 들뜬 상태의 아미노프탈산이 되고, 이어서 아미노프탈산이 바닥상태로 되면서 발광(420-450 nm)을 하는 것으로 알려져 있다. 이 계에 항산화제를 첨가하면 ROS가 감소되어 화학발광이 감소하는데 이를 이용하여 총 항산화능(ROS scavenging concentration, OSC₅₀)을 평가하였다. 활성산소가 50% 감소하는 농도인 OSC₅₀은 어성초 50% 에탄올 추출물이 2.910 μ g/mL, 에틸아세테이트 분획이 0.983 μ g/mL로 나타났다(Figure 4). 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획은 수용성 항산화제로 잘 알려진 L-ascorbic acid (1.50 μ g/mL)보다 각각 약 1.7, 5배 높은 활성을 나타내었으며 통계적으로도 유의하게 더 높은 총 항산화능을 나타냄을 확인하였다.

3.3. 어성초 추출물의 HaCaT 세포보호활성

3.3.1. 세포 독성 평가

본 실험에서는 MTT assay를 이용하여 어성초 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획의 HaCaT 세포에 대한 독성을 확인하여 실험에 사용될 시료의 농도 범위를 결정하였다. 0.2-200.0 μ g/mL 농도의 어성초 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획을 HaCaT 세포에 24 h 처리 후 세포 생존율을 확인하였다. 실험 결과, 아무것도 처리하지 않은 군에 비해 어성초 50% 에탄올 추출물은 12.5 μ g/mL, 에틸아세테이트 분획은 25 μ g/mL의 농도까지 세포 독성을 나타내지 않았다(Figure 5). 이에 따라 세포보호효과를 확인하기 위한 시료의 최고 농도를 12.5 μ g/mL으로 설정하여 사용하였다.

3.3.2. 세포 내 ROS 소거활성

피부의 제일 바깥층인 표피에 자외선을 처리하게 되면 세포 내에서 ROS가 생성되고, 이는 세포 구성 성분인 단백질, DNA 및 지질을 손상시킬 뿐 아니라 콜라겐, 엘라스틴과 같은 세포외기질을 분해시키는 matrix metalloproteinases (MMPs)의 발현을 촉진시켜 피부 노화를 가속화시킨다. 그러므로 세포 내 ROS 소거활성을 가지는 항산화 물질은 피부 노화를 억제할 수 있다. 본 실험에서는 어성초 50% 에탄올 추출물 및 에틸아세테이트 분획의 각질 형성 세포 내 UVB로 유도된 ROS 소거 활성을 H₂DCF-DA를 이용하여 측정하였다. 실험 결과, UVB를 조사한 실험군은 조사하지 않은 군에 비해 ROS가 3배가량 증

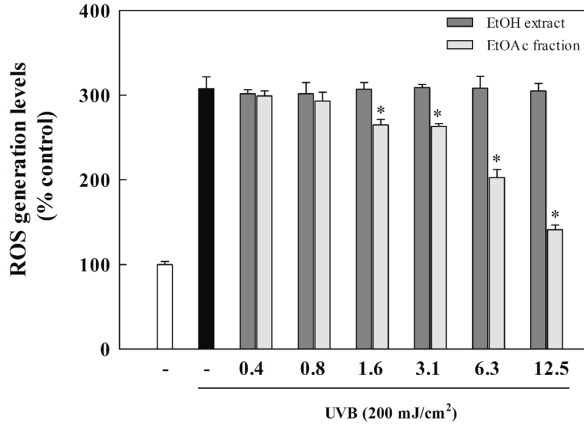


Figure 6. Effects of *H. cordata* 50% EtOH extract and EtOAc fraction on UVB-induced oxidative stress in HaCaT. *H. cordata* 50% EtOH extract and EtOAc fraction scavenged UVB-induced upregulation of intracellular ROS production. The 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) probe was used to investigate intracellular ROS levels. Data are presented as the mean ± SD. * $p < 0.05$ compared with UVB treated control.

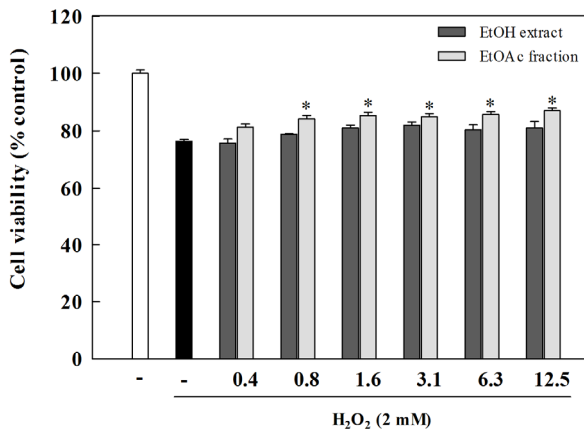


Figure 7. Treatment of 50% EtOH extract and EtOAc fraction from *H. cordata* protects HaCaT cells against H₂O₂-mediated decreased cell viability. HaCaT cells were treated with different concentration of *H. cordata* 50% EtOH extract and EtOAc fraction for 24 h after being exposed to oxidative stress. Data are presented as the mean ± SD. * $p < 0.05$ compared with H₂O₂ treated control.

가하였다. 어성초 50% 에탄올 추출물의 경우 UVB를 조사한 실험군과 유의한 차이를 보이지 않아 ROS 소거활성을 나타내지 않았다. 이에 반해, 에틸아세테이트 분획의 경우 1.6 µg/mL 이상에서 유의적인 감소를 나타냈으며, 각각 14, 15.7, 24.1, 54.3%의 감소율을 나타내어 농도 의존적으로 ROS 소거활성을 나타내었다. 이러한 결과로 어성초 에틸아세테이트 분획이 50% 에탄올 추출물보다 뛰어난 세포 내 ROS 소거활성을 보임을 확인하였다(Figure 6).

3.3.3. 과산화수소로 유도된 세포손상에 대한 보호효과

과산화수소는 세포 내에서 SOD로 촉매되는 반응에서 O₂^{·-}로부터 생성되며 다른 활성산소 중에 비해 수명이 길다. 이렇게 생성된 과산화수소는 세포막을 통과하여 Fe²⁺, Ca²⁺ 등과 같은 생체 내 미량으로 존재하는 금속 이온과 반응하여 ·OH를 생성시켜 산화적 손상을 야

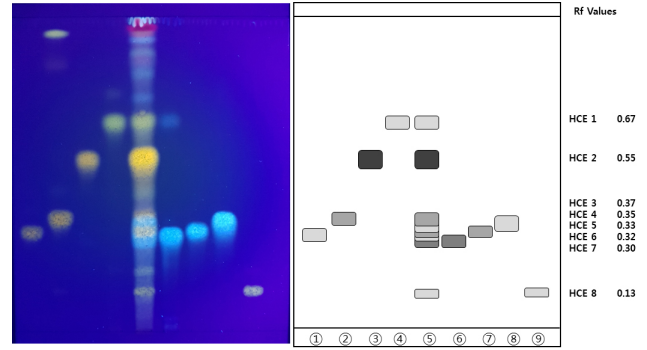


Figure 8. TLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *H. cordata* extract and references (NP-PEG reagents; UV-365 nm). Eluent system ; ethyl acetate : chloroform : formic acid : D.W = 8 : 1 : 1 : 1 (v/v), ① hyperoside ② isoquercitrin ③ quercitrin ④ afzelin ⑤ *H. cordata* EtOAc fraction ⑥ chlorogenic acid ⑦ neochlorogenic acid ⑧ cryptochlorogenic acid ⑨ rutin.

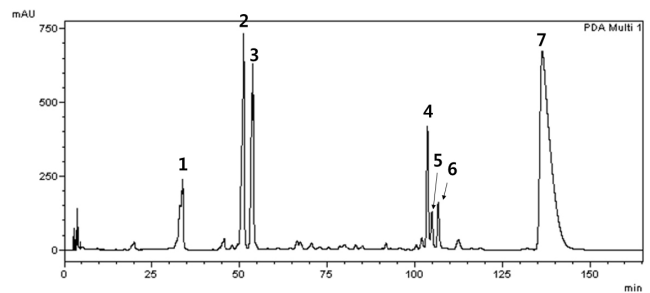


Figure 9. HPLC chromatogram of ethyl acetate fraction from *H. cordata* at $\lambda = 254-400$ nm, 1 : neochlorogenic acid, 2 : chlorogenic acid, 3 : cryptochlorogenic acid, 4 : hyperoside, 5 : rutin, 6 : isoquercitrin, 7 : quercitrin.

기한다. 본 실험에서는 이러한 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 어성초 50% 에탄올 추출물과 에틸아세테이트 분획의 세포보호효과를 확인하였다. 실험 결과, 과산화수소를 처리한 실험군은 처리하지 않은 군에 비하여 약 76.3%의 생존율을 나타내었다. 50% 에탄올 추출물을 처리한 군은 실험에 사용된 모든 농도에서 과산화수소를 처리한 실험군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 그러나 에틸아세테이트 분획을 처리한 군은 0.8 µg/mL 이상의 농도에서 세포 생존율을 유의적으로 증가시켰으며 최대 86.9%까지 증가시켰다. 이러한 결과로 어성초 에틸아세테이트 분획이 50% 에탄올 추출물보다 과산화수소로 유도된 세포 손상에 대한 보호 효과가 뛰어남을 확인하였다(Figure 7).

3.4. 어성초 추출물의 TLC 및 HPLC 성분분석

본 실험에서 사용한 어성초 에틸아세테이트 분획은 50% 에탄올 추출물에 비하여 더 높은 생리활성을 나타내었다. 따라서 이러한 효과를 나타내는 유효성분에 대한 동정이 필요한 것으로 판단하여 성분분석을 진행하였다. 어성초 에틸아세테이트 분획에 대한 TLC 크로마토그램은 Figure 5에 나타내었고, HPLC 크로마토그램은 Figure 6와 Table 6에 나타내었다.

Figure 5의 ⑤번에 나타난 어성초 에틸아세테이트 분획의 여러 띠 중 주요 성분이라 판단되어지는 8개의 띠(HCE1, HCE2, HCE3, HCE4, HCE5, HCE6, HCE7, HCE8)를 확인하였다. 8개의 띠를 다양한 표준 물질을 사용하여 R_f value, 자외선, NP (natural products, 2-aminoethyl

Table 6. HPLC Analysis Data and UV-visible Absorption Spectrum (λ_{max}) of Ethyl Acetate Fraction from *H. cordata*

Peak No.	Compound	λ_{max} , EtOH (nm)	Ret. time (min)
1	Neochlorogenic acid	236, 326	33.733
2	Chlorogenic acid	245, 323	51.142
3	Cryptochlorogenic acid	235, 325	53.741
4	Hyperoside	255, 355	103.633
5	Rutin	255, 348	104.950
6	Isoquercitrin	255, 355	106.740
7	Quercitrin	254, 348	136.440

diphenylborinate) 발색시약으로 비교하여 확인하였다. 그 결과 HCE1 ($R_f = 0.67$)은 afzelin, HCE2 ($R_f = 0.55$)은 quercitrin, HCE8 ($R_f = 0.13$)은 rutin으로 확인하였다. 그러나 HCE3~7에 해당하는 성분은 띠의 명확한 구별이 어려워 좀 더 정확한 분석을 위하여 HPLC로 분석을 진행하였다.

Figure 6에 나타난 어성초 에틸아세테이트 분획의 HPLC 크로마토그램에서 7개의 높은 peak를 확인하였다. 각각의 peak를 TLC 분석에서 사용한 표준물질의 retention time과 UV-visible 흡수스펙트럼을 비교하여 분석을 진행하였다. 각각의 peak를 분석한 결과, peak 1은 neochlorogenic acid, peak 2는 chlorogenic acid, peak 3은 cryptochlorogenic acid, peak 4는 hyperoside, peak 5는 rutin, peak 6은 isoquercitrin, peak 7은 quercitrin으로 나타났다. 따라서 peak 5와 peak 7은 TLC에서 확인한 HCE2, HCE8과 일치하는 것으로 확인하였으며 TLC에서 명확하게 구별하지 못한 HCE3 - 7에 해당하는 성분은 peak 1, peak 2, peak 3, peak 4, peak 6번으로 확인되어진 성분으로 HCE3 ($R_f = 0.37$)은 isoquercitrin, HCE4 ($R_f = 0.35$)은 cryptochlorogenic acid, HCE5 ($R_f = 0.33$)은 neochlorogenic acid, HCE6 ($R_f = 0.32$)은 hyperoside, HCE7 ($R_f = 0.30$)은 chlorogenic acid임을 각각 확인하였다.

4. 결 론

1) 어성초 추출물의 수율은 50% 에탄올 추출물의 경우 24.18%, 에틸아세테이트 분획의 경우 2.18%이었다.

2) 어성초 추출물의 disc diffusion method를 사용한 항균활성 측정 결과 50% 에탄올 추출물은 그람 양성균인 *S. aureus*, *B. subtilis*에 저해환을 나타내었다. 에틸아세테이트 분획은 *E. coli*를 제외한 모든 균주에서 저해환을 나타내어 50% 에탄올 추출물에 비하여 높은 항균활성을 나타내었다.

3) 어성초 추출물의 MIC 측정 결과 두 추출물 모두 그람 양성균인 *S. aureus*, *B. subtilis*에 대하여 기존의 방부제와 유의하거나 더 낮은 MIC 값을 나타내어 높은 항균효과를 보였으며, 에틸아세테이트 분획은 *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *A. niger* 균주에 대해서도 MIC 값을 나타내었기 때문에 50% 에탄올 추출물에 비하여 높은 항균효과를 나타내었다.

4) 어성초 추출물의 DPPH free radical 소거활성 측정 결과, FSC₅₀ 값은 50% 에탄올 추출물(27.15 $\mu\text{g/mL}$), 에틸아세테이트 분획(12.00 $\mu\text{g/mL}$), (+)- α -tocopherol (8.98 $\mu\text{g/mL}$)로 나타나 어성초 추출물은 대조군보다는 낮은 활성을 보였으나 에틸아세테이트 분획이 50% 에탄올 추출물보다 더 높은 활성을 나타내었다.

5) 어성초 추출물의 활성산소 소거활성 측정 결과, 총 항산화능 OSC₅₀ 값은 50% 에탄올 추출물(2.910 $\mu\text{g/mL}$), 에틸아세테이트 분획

(0.983 $\mu\text{g/mL}$)으로 나타나 에틸아세테이트 분획이 50% 에탄올 추출물보다 더 높은 활성을 나타내었으며, 두 추출물 모두 대조군으로 사용된 L-ascorbic acid (4.946 $\mu\text{g/mL}$)보다도 더 높은 활성을 나타내었다.

6) 어성초 추출물의 세포 독성 평가 결과, 어성초 50% 에탄올 추출물은 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 에틸아세테이트 분획은 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도까지 세포 독성을 나타내지 않았으며, 이에 따라 0.4-12.5 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 범위를 설정하여 HaCaT 세포보호효과를 측정하였다.

7) 어성초 추출물의 세포 내 ROS 소거활성 측정 결과, 어성초 50% 에탄올 추출물의 경우 ROS 소거활성을 나타내지 않은 반면, 에틸아세테이트 분획의 경우 1.6 $\mu\text{g/mL}$ 이상에서 농도 의존적으로 ROS 소거활성을 나타내었다.

8) 어성초 추출물의 과산화수소로 유도된 세포손상에 대한 보호 효과 측정 결과, 50% 에탄올 추출물은 유의한 효과를 나타내지 않은 반면, 에틸아세테이트 분획은 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서 세포 생존율을 유의적으로 증가시켰다.

9) 실험을 통해 더 높은 생리활성을 보인 어성초 에틸아세테이트 분획에 대하여 TLC와 HPLC 크로마토그램을 이용한 성분분석을 진행하였으며, quercitrin, isoquercitrin, hyperoside, chlorogenic acid, neochlorogenic acid, cryptochlorogenic acid, rutin, afzelin을 확인하였다. 위 결과를 통하여 어성초 추출물의 항균 및 항산화 활성과 세포보호효과를 확인할 수 있었으며, 기능성 화장품 원료로서 응용 가능성이 있음을 시사하였다.

References

1. Y. Mizutani, S. Mitsutake, K. Tsuji, A. Kihara, and Y. Igarashi, Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function, *Biochimie*, **91**(6), 784-790 (2009).
2. H. J. Kim, J. Y. Bae, H. N. Jang, and S. N. Park, Comparative study on the antimicrobial activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts with various countries of origin as natural antiseptics, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **41**(3), 358-366 (2013).
3. Y. H. Yeo and C. H. Park, Cosmetics preservation and moisturizing effect by methanol extracts of *Scutellaria baicalensis* George and *Liriope platyphylla*, *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.*, **29**(5), 372-379 (2014).
4. C. N. Smith and B. R. Alexander, The relative cytotoxicity of personal care preservative systems in Balb/C 3T3 clone A31 embryonic mouse cells and the effect of selected preservative systems upon the toxicity of a standard rinse-off formulation, *Toxicol. in Vitro*, **19**, 963-969 (2005).

5. E. Y. Choi, Effect of phenoxyethanol and alkane diol mixture on the antimicrobial activity and antiseptic ability in cosmetics, *Korean J. Aesthet. Cosmetol.*, **13**(2), 213-220 (2015).
6. J. P. Routledge, J. Odum, J. Ashby, and J. P. Sumpter, Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabens) are estrogenic, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **153**, 12-19 (1998).
7. J. Nishihara, T. Nishikawa, T. Kanayama, F. Dakeyama, K. Saito, M. Imagawa, S. Takatori, Y. Kitagawa, S. Hori, and H. Utsumi, Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two hybrid assay, *J. Health Sci.*, **46**(4), 282-298 (2000).
8. F. A. Anderson, Final amended report on the safety assessment of methylparaben, ethylparaben, propylparaben, isopropylparaben, butylparaben, isobutylparaben and benzylparaben as used in cosmetic products, *Int. J. Toxicol.*, **27**(4), 1-82 (2008).
9. S. N. Park, Skin aging and antioxidants, *J. Soc. Cosmet. Sci. Korea*, **23**(1), 75-132 (1997).
10. E. H. Witt, P. Motchnik, and L. Packer, Evidence for UV light as an oxidative stressor in skin. In: J. Fuchs and L. Packer (eds.), *Oxidative Stress in Dermatology*, 29-47, Dekker, NY, USA (1993).
11. L. Packer, Ultraviolet radiation (UVA, UVB) and skin antioxidants. In: C. A. Rice-Evans and R. H. Burdon (eds.), *Free Radical Damage and Its Control* 239-255, Elsevier, NY, USA (1994).
12. H.-U. Simon, A. Haj-Yehia, and F. Levi-Schaffer, Role of reactive oxygen species (ROS) in apoptosis induction, *Apoptosis*, **5**(5), 415-418 (2000).
13. V. Afonso, R. Champy, D. Mitrovic, P. I. Collin, and A. Lomri, Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases, *Joint Bone Spine*, **74**(4), 324-329 (2007).
14. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510-518 (2003).
15. T. F. Slater, Free radical mechanisms in tissue injury, *Biochem. J.*, **222**, 1-15 (1984).
16. S. I. Oh, Effect of melatonin on rat skeletal muscles of oophorectomized rat : oxidative stress and anti of oophorectomized rat : oxidative stress and antioxidative enzyme activities, *Korean J. Gerontol.*, **12**, 1-10 (2002).
17. R. Kohen, Skin antioxidants: their role in aging and in oxidative stress - New approaches for their evaluation, *Biomed. Pharmacother.*, **53**(4), 181-192 (1999).
18. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissues of skin: Its prevention and therapy, *Adv. Pharmacol.*, **38**, 639-655 (1996).
19. H. Masaki, S. Sakaki, T. Atsumi, and H. Sakurai, Active oxygen scavenging activity of plants extracts, *Biol. Pharm. Bull.*, **18**(1), 162-166 (1995).
20. D. Bown, *Royal Horticultural Society Encyclopedia of Herbs and Their Uses*, p. 424, Dorling Kindersley, London, UK (1995).
21. H. R. Jeong, J. H. Kwak, J. H. Kim, G. N. Choi, C. H. Jeong, and H. J. Heo, Antioxidant and neuronal cell protective effects of an extract of *Houttuynia cordata* Thunb (a culinary herb), *Korean J. Food Preserv.*, **17**(5), 720-726 (2010).
22. K. Y. Kim, D. O. Chung, and H. J. Chung, Chemical composition and antimicrobial activities of *Houttuynia cordata* thumb, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**(3), 400-406 (1997).
23. G. S. Kim, D. H. Kim, J. J. Lim, J. J. Lee, D. Y. Han, W. M. Lee, W. C. Jung, W. G. Min, C. G. Won, M. H. Rhee, H. J. Lee, and S. Kim, Biological and antibacterial activities of the natural herb *Houttuynia cordata* water extract against the intracellular bacterial pathogen *Salmonella* within the RAW 264.7 macrophage, *Biol. Pharm. Bull.*, **31**(11), 2012-2017 (2008).
24. J. H. Song, M. J. Kim, H. D. Kwon, and I. H. Park, Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **32**, 1053-1058 (2003).
25. J. Kim, H. S. Ryu, J. H. Shin, and H. S. Kim, *In vitro* and *ex vivo* supplementation of *Houttuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **34**, 167-175 (2005).