

시호 추출물의 화장품 생리활성에 관한 연구

조일영^{1,*} · 이용섭² · 이용화^{2,†}

¹호서대학교 화장품과학과, 대학원생

²호서대학교 화장품생명공학부, 교수

(2023년 3월 21일 접수: 2024년 2월 28일 수정: 2024년 2월 29일 채택)

A Study on the Physiological Activity of Cosmetics in *Bupleurum falcatum* L. Extract

Il-Young Cho ^{1,*} · Yong-Sub Yi² · Yong-Hwa Lee^{2,†}

¹Department of Cosmetic science, Hoseo University

²Department of Cosmetic biotechnology, Hoseo University

(Received March 21, 2023; Revised February 28, 2024; Accepted February 29, 2024)

요약 : 시호는 약용작물의 하나로 해열, 진정, 간 장애 억제, 항염, 항암 등 우수한 약리 활성을 지니고 있다. 현재 식품 또는 약용으로 사용되고 있지만 화장품으로서의 사용은 미비하여 화장품 소재로서의 적합성 및 이용 가치를 검토하였다. 시호 추출물을 이용하여 폴리페놀, 플라보노이드, 항산화, 항염 실험을 진행하였다. 폴리페놀 함량은 14.71 ± 0.16 mgTAE/g, 플라보노이드 함량은 1.42 ± 0.05 mgQE/g를 나타내었다. 항산화 활성은 농도 의존적으로 우수한 활성을 보였으며, NO 발현 억제능은 $1,000 \mu\text{g/mL}$ 에서 61.21%의 저해율을 나타내어 항염 활성이 뛰어난 것을 확인하였다. 본 연구를 통해 시호 추출물의 항산화, 항염 효능이 뛰어나기에 화장품의 천연 소재로서 충분한 가치가 있다고 본다.

주제어 : 시호, 항산화, 항염, 폴리페놀, 플라보노이드, 화장품

Abstract : *Bupleurum falcatum* L. is one of the medicinal crops and has excellent pharmacological activities such as reducing fever, sedation, inhibition of hepatopathy, anti-inflammatory, and anticancer. Currently, it is used for food or medicine, but the use as a cosmetic is insufficient, so the suitability and use value as a cosmetic material were reviewed. Using the *Bupleurum falcatum* L. extract, polyphenol, flavonoid, antioxidant, and anti-inflammatory tests were conducted. The total polyphenol content was 14.71 ± 0.16 mg·TAE/g, and the total flavonoid content was 1.42 ± 0.05 mg·QE/g. The antioxidant activity showed excellent activity in a concentration-dependent activative, and the NO expression inhibition ability was 61.21% at $1,000 \mu\text{g/mL}$, confirming that the anti-inflammatory activity was excellent. Through this study, the antioxidant and anti-inflammatory

[†]Corresponding author
(E-mail: yhleef@hoseo.edu)

effects of *Bupleurum falcatum* L. extract are excellent, so it is considered to be of sufficient value as a natural material for cosmetics.

Keywords : *Bupleurum falcatum* L., antioxidants, anti-inflammatory, Polyphenol, Flavonoid, Cosmetic

1. 서론

시호(柴胡, *Bupleuri Radix*)는 주요 약용작물의 하나로 *Bupleurum falcatum* Linné 또는 그 변종(미나리아과, Umbelliferae)의 뿌리를 약용으로 사용하는 다년생초본이다. 키는 60-100 cm 이상이고, 암갈색을 띠는 뿌리는 지름 5-15 mm, 길이 10-20 cm의 단일 또는 갈라진 긴 원뿔~원기둥 모양이며 이들 뿌리를 모두 약용으로 쓴다. 산형과의 시호속(*Bupleurum*) 식물은 전 세계적으로 약 150여 종이 우리나라를 비롯하여 몽골, 일본, 중국, 시베리아, 유럽 등지에 분포하고 있으며, 일부 북미와 아프리카에도 분포하고 있는 것으로 알려져 있다[1-3].

시호는 항산화, 항염, 간 장애 억제, 진통, 해열, 진정 작용 등 우수한 생리활성 기능을 지니고 있어 식품 또는 약용으로 활용되고 있다. 주요 성분으로는 oleanane계 saponin 계열의 saikosaponin A, C, D 및 다양한 유도체가 함유되어 있다. 지방산으로 stearic acid, palmitic acid, oleic acid, linolenic acid가 함유되어 있고, 그 중 생리활성을 나타내는 물질은 saikosaponin A와 D에 의한 것으로 알려져 있다. 이러한 시호 사포닌은 면역기능 강화, 해열작용, 간장해독작용, 항염증, 항암, 항 HBV 활성 등 다양한 약리활성이 많은 연구에 의해 입증되고 있다[4-9].

현재 시호에 대한 연구가 계속 진행되고 있으나 화장품 소재로서의 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구는 시호 추출물에 대한 생리활성능을 평가하고 천연 화장품 소재로서의 범용적 활용 여부를 과학적으로 검증하고자 연구를 진행하였다.

2. 실험

2.1. 추출물 제조

본 실험에 사용한 시호 뿌리는 1월에 채취하여 말린 것을 서울약령시장 동의한재(Korea)에서 구

매 후 완전히 분쇄하여 추출하였다. 시료 부피 10배의 70% ethanol을 가하여 상온에서 24 hr 동안 침지 추출하였으며, 이후 추출물을 2회 여과하고 rotary evaporator (EYELA, Japan)로 4-5°C에서 진공 농축하여 ethanol을 완전히 제거하였다. 최종적으로 동결 건조(Alpha 1-4 LDplus, MARTIN CHRIST, Germany)한 분말은 -4°C에 보관하며 실험의 재료로 사용하였다.

2.2. 총 폴리페놀 함량 측정

항산화력을 결정하는 데 매우 중요한 인자로 작용하는 폴리페놀은 Folin-Denis법을 응용하여 측정하였다[10]. 희석한 시료 용액 200 μ L와 Folin-Ciocalteu phenol reagent (Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A) 50 μ L 및 증류수 400 μ L 혼합액을 37°C에서 5 min 간 방치하였다. 여기에 Na_2CO_3 용액 100 μ L를 가하여 암실에서 1 hr 간 반응시킨 후 752 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 폴리페놀 함량은 tannic acid (Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A)를 표준물질로 하여 추출물 g당 tannic acid equivalents (mg·TAE/g)로 나타내었다.

2.3. 총 플라보노이드 화합물 함량 측정

항산화제, free radical 소거제, 양이온의 킬레이트제로 작용하는 플라보노이드는 Moreno 등의 방법에 따라 측정하였다[11, 12]. 희석한 시료 용액 200 μ L에 methanol 760 μ L, aluminum nitrate nonahydrate (Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A) 20 μ L 및 1 M potassium acetate (Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A) 20 μ L를 가하여 혼합하고 암실에서 40 min 간 반응시켰다. 반응 후 415 nm에서 흡광도를 확인하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin (Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A)을 표준물질로 하여 추출물 g당 quercetin equivalents (mg·QE/g)로 나타내었다.

2.4. 전자공여능 측정

전자공여능(electron donating ability)은 Blois

방법을 응용하여 실시하였다[13]. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH, Alfa Aesar (U.S.A) 시약은 methanol에 녹여 제조하였으며, 시료 10 μ L에 DPPH 용액 90 μ L와 용매를 가한 혼합액을 암실에서 30 min 간 방치하였다. 반응 후 517 nm에서 흡광도를 확인하였다. 전자공여능은 아래의 식을 이용하여 백분율(%)로 나타내었으며, 50% 소거 활성을 나타내는 농도 (inhibitory concentration, IC₅₀)를 산출하였다.

전자공여능(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.5. ABTS⁺ radical 소거능 측정

2'-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)⁺ radical 측정은 Re 등의 방법을 응용하여 실시하였다[14]. 7 mM ABTS (Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A)와 2.45 mM potassium persulfate (Sigma-Aldrich, Inc., U.S.A)를 일정 비율로 혼합 후 암실에서 24 hr 동안 방치하여 ABTS⁺ radical을 형성시킨 후 진행하였다. 시료 10 μ L에 희석된 ABTS⁺ 용액 190 μ L를 혼합하여 암실에서 10 min 간 반응시킨 후 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS⁺ radical 소거 활성은 아래의 식을 이용하여 백분율(%)로 나타내었으며, IC₅₀을 계산하였다.

ABTS⁺ radical 소거능(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.6. 세포 독성 시험(WST assay)

본 실험에 사용한 세포주는 마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 Korean Cell Line Bank (KCLB, Korea)에서 구입 후 사용하였다. 세포배양은 100 mm cell culture dish에 10% FBS 및 1% penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator 조건으로 배양하였다. Confluence에 도달한 세포는 scraper를 사용하여 계대 배양하여 유지하였다.

시호 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 확인하기 위해 water soluble tetrazolium salt

(WST) assay에 따라 측정하였다[15]. 96 well cell culture plate에 1×10⁴ cells/well 농도의 RAW 264.7 세포를 10% FBS (Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A), 1% penicillin/streptomycin (Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A)이 첨가된 DMEM 배양액으로 24 hr 배양하였다. 그 후 농도별 시료 100 μ L가 포함된 DMEM 배지로 교체하여 24 hr 배양하였다. 10% EZ-CYTOX 시약(DoGenBio Co., LTD., Korea)을 배양이 끝난 세포에 처리하여 2 hr 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 생존율 (%) =

$$\left(\frac{\text{시료첨가구의 흡광도}}{\text{무첨가구의 흡광도}}\right) \times 100$$

2.7. Nitric oxide (NO) assay 측정

RAW 264.7 cell은 24 well plate에 2×10⁵ cells/well의 density로 분주하여 24 hr 동안 plate에 부착시킨다. 염증반응을 유발하기 위해 1 μ g/mL 농도의 lipopolysaccharide (LPS)와 시료 1 mL를 함유한 새로운 배지를 처리하여 24 hr 배양하였다.

Griess 반응을 기본으로 하는 NO detection kit (iNtRON Biotechnology, Inc., Korea)를 사용하여 RAW 264.7 세포에서 생성되어 배양액에 존재하는 NO의 양을 측정하였다[16]. 96 well plate에 배양액을 100 μ L씩 분주한 후 N1 buffer (sulfanilamide) 50 μ L 넣어 10 min 동안 암실에서 반응시킨다. 이어서 N2 buffer (naphthylethylenediamine) 50 μ L를 넣고 10 min 동안 암실에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도 측정하였다. 각 NO 생성량은 nitrite standard 측정값을 바탕으로 표준곡선을 이용하여 산출하였으며, positive control은 N(G)-monomethyl L-arginine (L-NMMA) 50 μ M을 사용하였다.

2.8. 자료분석 및 통계처리

모든 실험 결과의 통계학적 유의성 검정은 Microsoft사의 office excel 2007의 independent t-test (양측검정, 이분산가정)를 적용하였으며, *p* < 0.05 수준에서 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다. 선형회귀분석을 통하여 시료 농도별 결과값에 대한 IC₅₀ 을 구하였고, 통계처리 프로그램

은 power of advanced statistical analysis (PASW) statistics 18을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 총 폴리페놀(polyphenol) 함량 측정

페놀성 화합물은 식물체에 널리 분포되어 있으며 활성산소를 제거하는 항산화 작용을 비롯하여 항암 및 항염증 등 생리적 효능이 있는 것으로 밝혀졌다[17]. 총 폴리페놀 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdate와 반응하여 몰리브덴 청색으로 발색하는 원리를 이용하여 측정하였다[18].

표준물질로 대표적인 폴리페놀 성분인 tannic acid를 사용하여 추출물의 총 폴리페놀 함량을 산출한 결과 Table 1과 같이 총 14.71 mg·TAE/g의 함량이 확인되었다. 이는 Jang의 선행 연구에서 시호 비가열 초음파 추출물이 약 5.71 mg·TAE/g, 환류 추출물이 약 10.58 mg·TAE/g, 열처리 초음파 추출물이 약 11.86 mg·TAE/g으로 측정된 결과와 유사한 경향을 나타내었다[19].

3.2. 총 플라보노이드(flavonoid) 함량 측정

플라보노이드는 페놀계 화합물의 총칭으로 식물체에 다양하게 존재하는 노란색의 색소이며 항균, 항산화, 항염증에 효과가 있고, 염증 반응 시

에 free radical 억제 및 효소 활성 억제 효과 등이 있다고 보고되어 있다[20, 21]. 따라서 총 플라보노이드 함량은 활성산소를 제거하는 항산화력에 매우 중요한 인자로 작용할 수 있다.

표준물질로 대표적인 플라보노이드 성분인 quercetin을 사용하여 추출물의 총 플라보노이드 함량을 산출한 결과 Table 2와 같이 총 1.42 mg·QE/g의 함량이 확인되었다. 이는 Jang의 선행 연구에서 시호 비가열 초음파 추출물이 1.02 mg·QE/g, 환류 추출물이 2.64 mg·QE/g, 열처리 초음파 추출물이 1.19 mg·QE/g으로 측정된 결과와 유사한 경향을 나타내었다[22].

3.3. 전자공여능 측정

활성산소는 인체의 질병과 노화를 일으키는 원인 물질로, 라디칼 소거 작용은 노화 억제에 대단히 중요한 역할을 한다[23]. DPPH는 비교적 안정한 free radical로 항산화력을 갖는 물질에 환원되어 radical이 탈색되는 점을 이용하여 항산화 활성을 측정하는 물질이다[20].

농도별 시호 추출물의 free radical 소거 효과를 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 시호 추출물 50~2,500 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 4.56, 17.21, 61.84, 92.34, 95.20%의 DPPH free radical 소거 효과를 확인하였다. 시료 농도가 증가함에 따라 free radical 소거 활성이 유의하게 증가하였

Table 1. Total polyphenol contents in *Bupleurum falcatum* L. extract

sample	polyphenol (mg·TAE/g)	average*
lot 1	14.57	14.71±0.16
lot 2	14.67	
lot 3	14.88	

*Mean values were determined with three measurements.

Table 2. Total flavonoid contents in *Bupleurum falcatum* L. extract

sample	flavonoid (mg·QE/g)	average*
lot 1	1.37	1.42±0.05
lot 2	1.47	
lot 3	1.42	

*Mean values were determined with three measurements.

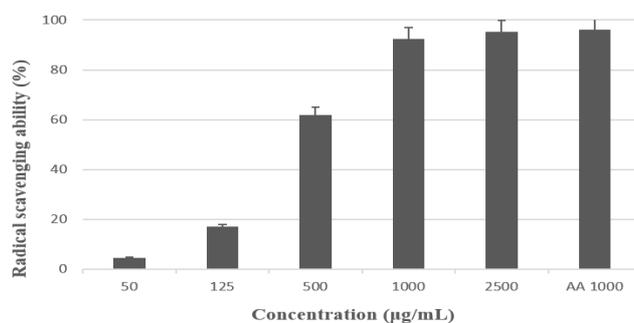


Fig. 1. Electron donating ability of *Bupleurum falcatum* L. extract. Mean values were determined with three measurements.

*AA: ascorbic acid

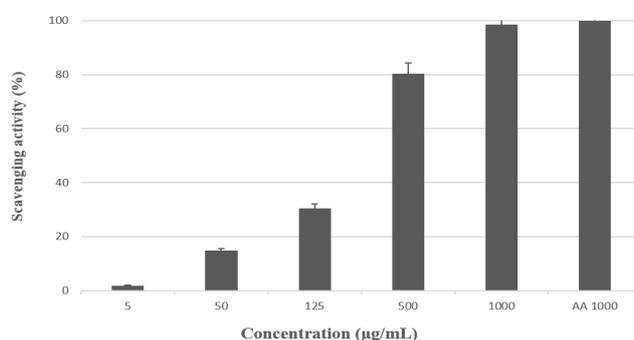


Fig. 2. ABTS⁺ radical scavenging activity of *Bupleurum falcatum* L. extract. mean values were determined with three measurements.

*AA: ascorbic acid

으며, 대조군인 ascorbic acid(1,000 µg/mL)와 비교했을 때 유사한 활성을 나타내었다. 50% 저해 농도를 의미하는 IC₅₀ 값은 0.57 mg/mL로 나타났다.

다른 연구 결과와 비교해 볼 때 시호 뿌리 ethanol 추출물의 전자공여능은 Song의 연구에서 속새 줄기 70% ethanol 추출물이 500 µg/mL에서 33.57%의 활성을 보인 것과, Park의 연구에서 ethanol 추출물의 경우, 5,000 µg/mL에서 감소 63.8%, 국화 30.2%, 천궁 15.3%, 대추 48.8%, Park의 연구에서 ethanol 추출물의 경우, 1,000 µg/mL의 농도에서 목통 87%, 골담초 87%, 당귀 43%의 활성을 보인 결과보다 높은 경향을 나타내 여타 시료에 비해 활성이 우수함을 확인하였다[18, 24, 25].

3.4. ABTS⁺ radical 소거능 측정

ABTS⁺ free radical 소거 활성 측정은 친수성 및 지용성 물질의 항산화 활성을 측정하기 위해 사용되는 방법으로, potassium persulfate와의 반응에 의하여 생성된 양이온 radical이 항산화 물질에 의해 소거되어 청록색이 탈색되는 정도를 측정하는 원리이다[26].

농도별 시호 추출물의 ABTS⁺ radical 소거 효과를 측정하여 Fig. 2에 나타내었다. 시호 추출물 5-1,000 µg/mL 농도에서 1.92, 14.92, 30.62, 80.40, 98.48%의 ABTS⁺ free radical 소거 효과를 확인하였다. 시료 농도가 증가함에 따라 활성도가 유의하게 증가하였으며, 대조군인 ascorbic acid(1,000 µg/mL)와 비교했을 때 유사한 활성을 나타내었다. 50% 저해 농도를 의미하는 IC₅₀ 값은 0.31 mg/mL로 나타났다.

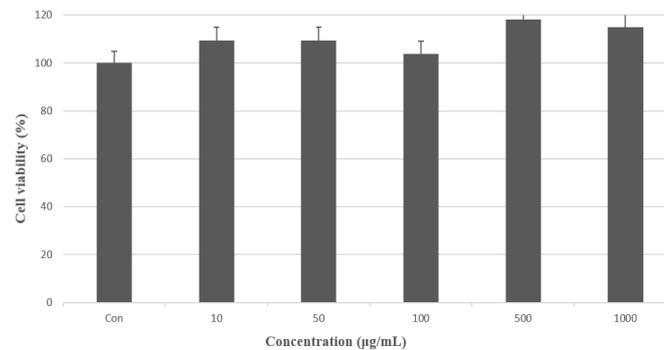


Fig. 3. Effect of *Bupleurum falcatum* L. extract on viability of RAW 264.7 cell. RAW 264.7 cell were treated with in the presence of various concentrations of *Bupleurum falcatum* L. extract for 24 hr. Mean values were determined with three measurements.

다른 연구 결과와 비교해 볼 때 시호 뿌리 ethanol 추출물의 ABTS⁺ radical 소거 활성은 Song의 연구에서 속새 줄기 70% ethanol 추출물이 500 µg/mL에서 77.23%의 활성을 보인 것과, Woo의 연구에서 곰취 ethanol 추출물의 경우, 500 µg/mL에서 62.69%, Shin의 연구에서 뽕나무 잎 ethanol 추출물이 500 µg/mL에서 76.21%의 활성을 보인 결과보다 높은 경향을 나타내 여타 시료에 비해 활성이 우수함을 확인하였다[24, 27, 28].

3.5. WST assay 측정

WST는 미토콘드리아 호흡사슬에 존재하여 살아있는 세포에서만 활성이 있는 탈수소효소에 의해 환원되어 formazan이라는 유색 물질을 형성한다. 따라서 시료 중의 생존 세포 수가 증가하면 미토콘드리아의 탈수소효소의 활성도 증가하고 formazan 형성이 증가하는 직선 상관관계를 가지며, 이는 흡광도 측정으로 알 수 있다[29].

시호 추출물에 의한 세포 독성을 평가하기 위해 RAW 264.7 세포에 농도별 시료를 처리하고 WST assay를 측정한 결과는 Fig. 3과 같다. 시료를 처리하지 않은 세포와 비교하였을 때, 10-1,000 µg/mL을 처리한 세포에서 각각 109.54, 109.53, 103.92, 118.30, 115.11%로 세포 생존율을 나타내었으며 80% 이하의 세포 생존율의 감소는 나타나지 않았다. 따라서 시호 추출물 10-1,000 µg/mL의 농도에서 세포 독성은 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이후 RAW 264.7 세포를 대상으로 하는 NO assay에서는 10-1,000

µg/mL 농도의 시호 추출물을 사용하여 실험을 진행하였다.

3.6. Nitric oxide (NO) assay 측정

NO는 면역기능에 관여하지만, 과도하게 존재할 경우 인체에 심각한 영향을 미치게 되어 조직 손상 및 유전자 변이 등 염증 반응으로 이어진다. 또한 superoxide와 빠르게 반응하여 매우 반응성이 높고 독성이 강력한 산화제인 peroxynitrite를 생성한다[30].

시호 추출물이 염증을 유발하는 NO의 소거 활성을 확인하기 위하여 LPS로 유발된 RAW 264.7 세포에서 NO의 저해능을 확인하였다. 시호 추출물의 NO 저해 활성을 측정한 결과는 Fig. 4로 나타내었으며, LPS 처리구는 LPS 무처리구에 비해 NO 발현량이 높았음을 확인하였다. 시호 추출물 10-1,000 µg/mL을 처리한 cell에서는 각각 3.75, 10.09, 18.46, 30.42, 66.91%로 시료의 농도가 증가함에 따라 NO의 발현이 감소하는 것을 확인하였으며, 양성대조군인 L-NMMA는 50 µM 농도로 처리 시 49.75%의 NO 생성 억제 효과를 나타내어 실험에 문제가 없음을 확인하였다. LPS로 유발된 RAW 264.7 세포에서 시호 추출물은 50-1,000 µg/mL 범위에서 통계적으로 유의한 수준 ($p < 0.05$)으로 NO 생성을 억제하는 것으로 확인되었다. 특히, 1,000 µg/mL 농도 처리 시 시료 무처리구 대비 66.91% NO 생성을 억제한 것을 확인하여 시호 추출물에 항염증과 관련된 활성물질이 다량 존재하는 것으로 사료된다.

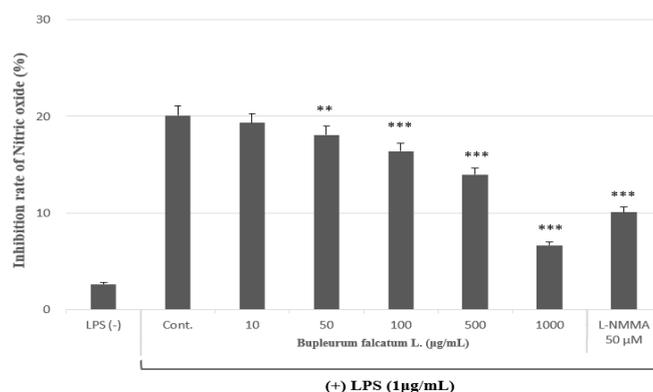


Fig. 4. Effect of *Bupleurum falcatum* L. extract on nitric oxide production in RAW 264.7 cell. The production of NO was assayed in the culture medium of cells treated with LPS (1 μ g/mL) for 2 hr in the presence of the samples. Mean values were determined with three measurements. (Significant value compared to control. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

4. 결론

유해한 화학 성분을 배제하고 동물성 원료 대신 자연 유래 원료를 이용한 화장품을 구매하는 소비자들이 늘고 있다. 이러한 비건 화장품의 열풍은 천연 소재에 대한 연구개발과 활성화로 이루어지고 있다. 시호는 해열, 진정, 간 장애 억제, 항염, 항암 등 우수한 약리 활성으로 식품 또는 약용으로 활용되고 있지만, 화장품 소재로의 연구는 현재 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 시호 추출물의 다양한 생리활성을 평가하고 시호를 천연 화장품 소재로써 개발하고자 연구를 진행하였다.

본 연구에서 시호를 70% ethanol 추출하여 추출물을 제조하였고 이를 이용하여 폴리페놀, 플라보노이드, 항산화, 항염 실험을 진행하였다. 시호 추출물의 폴리페놀 함량은 14.71 ± 0.16 mg-TAE/g, 플라보노이드 함량은 1.42 ± 0.05 mg-QE/g를 나타내었다. 전자공여능을 측정한 결과 1,000 μ g/mL에서 90.89%의 항산화 활성을 나타내었다. ABTS⁺ radical에 대한 소거 활성 측정 결과, 1,000 μ g/mL에서 98.89%의 효능을 보였다. 또한 WST assay를 통해 RAW 267.4 cell의 세포 생존율을 확인한 결과, 1,000 μ g/mL에서 100%의 생존율을 보여 세포 성장에 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다. 항염증 활성을 탐색하기 위해 NO 발현 억제능을 측정한 결과, 1,000

μ g/mL에서 61.21%의 저해율을 나타내 항염 활성이 뛰어난 것을 확인하였다.

이상의 실험 결과로 우수한 항염증 및 항산화 효능을 갖춘 시호 추출물은 한약재뿐만 아니라 천연 및 기능성 화장품 소재로 활용할 수 있는 범용성을 확인할 수 있었다. 이를 통해 기존 화학성분 화장품의 부작용을 보완하고자 하는 데 충분한 가치가 있다고 판단된다.

References

1. Rural Development Administration. Agricultural Technology Guide 007, pp. 127-133, (2019).
2. BC Moon, BK Choo, YI Ji, TS Yoon, AY Lee, MS Cheon, BB Kim and HK Kim. "Molecular Authentication and Phylogenetic Relationship of *Bupleurum* Species by the rDNA-ITS Sequences" *Kor. J. Herbology*, Vol.24, No.3, pp. 59-68, (2009).
3. National Institute of Food and Drug Safety Evaluation. A casebook of ingredient profile by main ingredient of herbal medicine preparation, 220-01, pp. 95-101, (2022).

4. BM Kim, KD Yoon, KR Han and JW Kim. "Determination of saikosa ponin derivatives in Bupleuri Radix using HPLC-ELSD" *J. Kor. Pharm. Sci.*, Vol.38, No.1, pp. 57-61, (2008).
5. DH Kim, TS Park and JH Son. "Anti-wrinkle Activities Verification of *Bupleurum falcatum* Extracts on CCD-986sk" *J. Appl. Biol. Chem.*, Vol.52, No.2, pp. 183-187, (2015).
6. KS Kim, ST Lee, NS Seoung, JI Lee and YA Chae. "Comparison of Analytical Methods for Saikosaponins in *Bupleurum falcatum* L." *Korean J. Medicinal Crop. Sci.*, Vol.3, No.3, pp. 226-232, (1995).
7. KS Kim, ST Lee and YA Chae. "Medicinal Components in *Bupleurum* Species" *Korean J. Crop Sci.*, Vol.41, No.1, pp. 123-144, (1996).
8. DS Han and DK Lee. "Separation and Determination of Saikosaponins in Bupleuri Radix with HPLC" *Kor. J. Pharmacogn.*, Vol.16, No.3, pp. 175-179, (1985).
9. HJ Jeong. "Comparison on Morphology and saikosaponin Contents of *Bupleurum falcatum* Produced in Korea and China" *Korean J. Plant. Res.*, Vol.11, No.3, pp. 283-289, (1998).
10. FJ Baur and LG Ensminger. The Association of Official Analytical Chemists (AOAC). *Journal of the American Oil Chemists' Society*. Vol.54, No.4, pp. 171-172, (1977).
11. JS Park. "Application of Pine Needle Extract as Cosmetic Material" *J. Digit. Converg.*, Vol.17, No.7, pp. 395-400, (2019).
12. MIN Moreno, MI Isla, AR Sampietro and M Vattuone. "Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina" *J. Ethnopharmacol.*, Vol.71, No.1-2, pp. 109-114, (2000).
13. MS Blois. "Antioxidant determination by the use of a stable free radical" *Nature*, Vol.181, No.4617, pp. 1199-1200, (1958).
14. R Re, N Pellegrini, A Proteggente, A Pannala, M Yang, and RC Evans. "Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay" *Free radical biology & medicine*, Vol.26, No.9-10, pp. 1231-1237, (1999).
15. P Ngamwongsatit, PP Banada, W Panbangred and AK Bhunia "WST-1-based cell cytotoxicity assay as substitute for MTT-based assay for rapid detection of toxigenic *Bacillus* species using CHO cell line" *J. Microbiol. Methods*, Vol.73, No.3, pp. 211-215, (2008).
16. LC Green, DA Wagner, J Glogowski, PL Skipper, JS Wishnok, and SR Tannenbaum. "Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids" *Analytical Biochemistry*, Vol.126, No.1, pp. 131-139, (1982).
17. EB Byun, WY Park, DH Ahn, YC Yoo, C Park, WJ Park, BS Jang, EH Byun and NY Sung. "Comparison Study of Three Varieties of Red Peppers in Terms of Total Polyphenol, Total Flavonoid Contents, and Antioxidant Activities" *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.45, No.5, pp. 765-770, (2016).
18. YS Park. "Antioxidative Activities and Contents of Polyphenolic Compound of Medicinal Herb Extracts" *J. East Asian Soc. Diet. Life*, Vol.12, No.1, pp. 23-31, (2002).
19. GY Jang, HY Kim, SH Lee, YR Kang, IG Hwang, KS Woo, TS Kang, JS Lee and HS Jeong. "Effects of Heat Treatment and Extraction Method on Antioxidant Activity of Several Medicinal Plants" *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.41, No.7, pp. 914-920, (2012).
20. YJ Moon and CD Kim. "Antioxidant, antiinflammatory and antimicrobial activity of *Sophora flavescens* ethanol and hydrothermal extracts" *J. Korea Soc. Beauty Art.*, Vol.18, No.1, pp. 91-103, (2017).

21. EH Park and IH Lee. "The Effect of Consumer Decision Type on the Consumption Value of Vegan Cosmetics" *J. Kor. Soc. Cosmetol.*, Vol.27, No.2, pp. 442-454, (2021).
22. GY Jang, HY Kim, SH Lee, YR Kang, IG Hwang, KS Woo, TS Kang, JS Lee and HS Jeong. "Effects of Heat Treatment and Extraction Method on Antioxidant Activity of Several Medicinal Plants" *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.41, No.7, pp. 914-920, (2012).
23. SA Kang, JA Han, KH Jang and R Choue. "DPPH Radical Scavenger Activity and Antioxidant Effects of Cham-Dang-Gui (*Angelica gigas*)" *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, Vol.33, No.7, pp. 1112-1118, (2004).
24. JH Song, HS Song and GL Lee. "Antioxidant and Elastase Inhibitory Effects of Equisetum hyemale Extract" *Journal of Naturopathy*. Vol.10, No.2, pp. 86-92, (2021).
25. CS Park. "Antioxidative and Nitrite Scavenging Abilities of Medicinal Plant Extracts" *Korean J. Food Preserv.*, Vol.12, No.6, pp. 631-636, (2005).
26. JY Choi, MK Jo, YM Goo, HK Kim, JW Shin, DY Kim, HJ Kim, EJ Lee, NH Kim and YJ Cho. "Antioxidant Activities of Phenolic Compounds from Medicinal Plants (*Hibiscus esculentus*, *Cirsium japonicum*, *Zizania latifolia* and *Kalopanax pictus*)" *Current research on agriculture and life sciences*, Vol.33, No.2, pp. 57-63, (2015).
27. YJ Woo, SR Shin and JY Hong. "Study on antioxidant and physiological activities of extract from *Ligularia fischeri* by extraction methods" *Korean J. Food Preserv.*, Vol.24, No.8, pp. 1113-1121, (2017).
28. JH Shin, JR Kang, MJ Kang and JH Shin. "Physiological Activity of Five Kinds of Medicinal Plant Extracts with Various Solvents and Their Composites" *J. Life Sci.*, Vol.28, No.3, pp. 320-330, (2018).
29. DoGenBio Co., LTD. EZ-CYTOX cell viability, proliferation, cytotoxicity assay kit.
30. JH Yoon, SG Park, JY Park, KS Seo, KC Woo and Lee CE Lee. "Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of *Bletilla striata Reichenbach fil.* Fractions as Cosmetic" *J. Life Sci.*, Vol.23, No.9, pp. 1073-1078, (2013).