

선학초 추출물의 항여드름균 효능 연구

김 현 주 · 임 혜 원 · 김 보 현* · 김 학 수* · 최 신 욱 · 윤 창 순[†]

(주)래디안, *소망화장품(주)
(2006년 1월 20일 접수, 2006년 2월 13일 채택)

Studies on the Anti-acne Effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb.

Hyun Ju Kim, Hye Won Lim, Bo Hyeon Kim*, Hack Soo Kim*, Shin Wook Choi, and Chang-Soon Yoon[†]

Radiant Inc. Bioindustry Foundation, 198-53, Hupyung-dong, Chunchon-si, Gangwon-do 200-160, Korea
*Somang Cosmetics Co. Ltd.

(Received January 20, 2006; Accepted February 13, 2006)

요약 본 연구는 우리나라의 야산이나 길가, 들판 등에 흔히 자라는 여러해살이 풀이며, 오래 전부터 민간요법 및 한방에 유용한 약재로 사용되어 지고 있는 선학초(*Agrimonia pilosa* Ledeb.)를 이용하여 여드름 유발균에 대한 항균활성을 평가하고, 이를 토대로 항여드름 관련 화장품 소재를 개발하는데 그 목적이 있다. 선학초를 methanol로 추출한 후, 이 추출물을 여드름 유발균주인 *P. acne*를 이용하여 minimum inhibitory concentration (MIC) 및 paper disk diffusion assay로 항균 효과를 측정하였으며, 추출물에 대한 온도 및 pH 변화에 따른 안정성을 평가하였다. 추출물을 이용하여 *P. acne*에 대한 MIC 값은 0.005 mg/mL로 측정되었으며, 이는 대조군으로 사용한 항생제인 triclosan의 MIC 값(0.004 mg/mL)과 비교했을 때 시료가 선학초 전초에 대한 crude extract임을 고려하면 매우 항균활성이 높은 것으로 평가되었다. 추출물에 대한 paper disk diffusion assay를 수행한 결과, 대조군으로 사용한 triclosan처럼 높은 활성을 나타내는 것으로 측정되었으며, *Staphylococcus aureus*를 비롯한 여러 종의 호기성 균주에도 선학초추출물은 항균활성이 우수한 것으로 평가되었다. 선학초 추출물의 온도, pH 안정성을 평가한 결과, 70, 80, 90, 100, 121°C 등 다양한 온도 조건과 pH 2 ~ pH 11의 변화에 있어서도 그 효능이 변하지 않고 안정된 상태로 유지되는 것으로 관찰되었다.

Abstract: *Agrimonia pilosa* Ledeb. is a perennial plant, which naturally habitats in whole area of Korea, and where it is popularly used for the traditional remedies. In the present study, *A. pilosa* Ledeb. extract was prepared to determine the anti-acne effects and application possibility as a cosmetic resource. *A. pilosa* Ledeb. was extracted with methanol and its anti-acne effect against *Propionibacterium acnes* was investigated via minimum inhibitory concentration (MIC) and paper disk diffusion method. The MIC of *A. pilosa* Ledeb. extract and triclosan was 0.05 mg/mL and 0.04 mg/mL, respectively. This implies that *A. pilosa* Ledeb. extract may be an efficient anti-acne ingredient for cosmetics, considering that it is a crude extract. The paper disk diffusion assay showed that its anti-acne effect was similar to that of triclosan. Furthermore, *A. pilosa* Ledeb. extract effectively inhibited the growth of several aerobic microorganisms including *Staphylococcus aureus*. Finally, we examine the stability of the extract to temperature and pH. The extract was very stable to high temperatures (70 ~ 121°C) and to pH (pH 2 ~ 11), suggesting its utilization for cosmetics.

Keywords: *Agrimonia pilosa* Ledeb., anti-acne activity, MIC, *Staphylococcus aureus*, stability

1. 서 론

여드름(acne vulgaris)은 거의 모든 연령층에서 공통적으로 발병되는 피부질환의 하나로써 청소년층의 약 80 ~ 95%, 25세 이상에서 약 40~50% 그리고 중년층의 3%(남

성)~12%(여성)가 여드름으로 고민하고 있으며[1], 특히 청소년기에 있어서 증상이 심하면서 지속적인 경우에는 스트레스 및 심각한 임상적 후유증에 시달리고 있는 실정이다.

여드름 발병 원인은 유전학적 및 환경학적 원인을 제외하면 1) 체내 호르몬 분비의 변화로 인한 활발한 피지 생성 2) 모낭 피지선의 비정상적인 각질화 3) 여드름균의

[†] 주 저자 (e-mail: cro@eradiant.co.kr)

활성화 4) 염증반응의 4가지로 구분되어 지는데, 여드름균에 의한 피부 염증반응이 가장 중요한 원인으로 알려져 있다. 피부 표면에는 *Propionibacteria*, *Staphylococci*, *Coryneform bacteria* 등의 혐기성, 호기성 세균들과 yeast인 *Malassezia furfur* 등이 정상세균총(normal flora)으로 존재하는데, 이들 중 피부질환인 여드름을 생성하게 하는 가장 중요한 세균은 여드름균(*Propionibacterium acnes*)으로 알려져 있다[2]. *P. acnes*가 분비하는 리포아제와 leukocyte chemotatic 인자들이 피지를 지방산으로 분해하고 모낭벽을 자극하여 여드름을 형성하게 하며, 이들의 상호작용에 의해 여러 경로를 거쳐 최종적으로 염증반응을 유도하여 피부에 구진, 농포, 낭종, 결절 및 반흔(Scar)을 형성하게 한다[3].

여드름 치료에는 피지 생성을 억제하는 항안드로겐제를 비롯한 스테로이드 제제와 다양한 항생제 및 레티노익산 등의 비타민 A 유도체를 이용한 방법 등이 많이 사용되고 있으며, 특히 항생제가 여드름에 대해 가장 많이 사용되고 있는 치료제로 알려져 있으며 매년 경구용 항생제에 대한 처방이 수백만건 이상 이루어지고 있는 것으로 보고되고 있지만 그에 따른 부작용이 큰 문제점으로 대두되고 있는 실정이다[4]. Benzoyl peroxide, azelaic acid 및 sodium sulfacetamide 등의 국소 도포제를 과다 처치했을 때 진피건조증, 피부 자극성, 접촉성 피부염 및 과민반응 등의 부작용이 나타나고, erythromycin, tetracycline 및 doxycycline 등의 경구용 항생제를 오랫동안 복용하게 되면 내성균의 출현과 간 조직 등 기관의 손상 등을 나타내는 것으로 보고되고 있다[6-8]. 최근 수년 동안 식물성 천연물질을 이용하여 생리활성을 조절하는 물질을 찾거나 기존의 항생제에서 나타나는 여러 가지 부작용은 없지만, 항균작용은 강한 물질을 찾기 위한 연구가 여러 곳에서 활발히 진행되고 있다. 현재 천연추출물을 이용한 항여드름 효과에 대한 연구는 감초, 목련, 호두나무, 황련, 버드나무, 삼백초, 계피, 산탄나무 추출물 등 다양한 목초분류를 이용하여 국내외 여러 연구자들에 의해 진행되고 있거나 제품화되고 있는 실정이다[8-12].

선향초(*A. pilosa* L.)는 장미과에 속하는 다년생 속근초로서 용아, 용아초, 황아초, 지선초, 짚신나물 등으로 부르기도 하며, 예로부터 녹즙을 만들어 음용하였으며, 폐암, 간암, 식도암, 종양, 장염 및 통증제거 등 민간요법에 이용되어 왔다[13]. 특히 선향초 추출물을 이용하여 항바이러스 기작에 대한 보고[14-16], 분획을 이용한 항염 효능에 관한 연구[17], 다양한 종류의 세균의 항균 효과에 대한 연구[18-19]가 이루어져 왔다.

본 연구에서는 항바이러스, 항염, 항균 효능이 있는 것으로 보고된 선향초 추출물을 이용하여 일반 호기성 세균과 여드름균에 대한 항균효능을 비교 검토하였고 추

출물에 대한 안전성을 평가한 결과 항여드름 효능 및 안정성이 우수하였음을 확인하였고, 그에 따른 연구 결과를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시료

본 실험에 사용한 선향초(*A. pilosa* L.)는 강원도 춘천 대광약업사에서 건조 상태의 전초를 구입하여 분쇄기를 이용하여 분말로 만들고 메탄올(1:20, w/v)로 추출한 후 농축하여 필요한 실험에 사용하였다.

2.2. 사용균주

본 실험에 사용된 균주는 여드름의 원인균인 *Propionibacterium acnes* KCTC3314와 호기성 그람 양성 균주인 *Staphylococcus epidermidis* KCTC1917, *Staphylococcus aureus* KCTC1927, *Bacillus subtilis* KCTC1021, *Bacillus cereus* KCTC1012를 한국유전자 은행에서 분양 받아 사용하였다.

2.3. 배지 및 배양 조건

*P. acnes*의 배양 배지는 Reinforced clostridial (RC) 배지(Merck, Germany)를 사용하였으며 *P. acnes*는 4°C에서 보관하면서 실험 3일전에 활성화 시켰으며, 균을 배양 배지에 접종한 후 anaerobic jar에서 Gaspack system (Merck Anaerocult® Gaspack system, Germany)을 이용하여 밀봉하여 37°C incubator에서 3일 동안 혐기성 배양하였다. 호기성 균주들은 Mueller-Hinton 배지 (Merck, Germany)를 사용하였으며 균을 접종한 후 37°C incubator에서 24 h 배양하면서 사용하였다.

2.4. Paper Disk Diffusion Method

선향초 추출물의 항균활성 평가는 paper disk diffusion 방법을 이용하였다. *P. acnes* 균주를 RC 액체배지에서 3일간 배양한 후, 균 현탁액을 일정한 농도(optical density 620 nm에서 흡광값 0.5)로 조절한 후 멸균된 면봉을 이용하여 RC agar plate에 균일하게 균을 도말해 주었다. Plate를 건조시킨 후, paper disk (Φ 8 mm, Adventec, USA)를 균주를 접종한 plate 표면 위에 올려놓고 선향초 추출물을 농도별로 희석하여(62.5 ~ 500 µg/mL of DMSO) 50 µL씩 흡수시켰다. 시료가 처리된 plate를 anaerobic jar에서 Gaspack system을 이용하여 3일간 배양한 후 disk 주위의 생육 억제환의 크기로 항균 활성을 측정하였다. 호기성 균주에 대한 항균활성 평가는 Mueller-Hinton 배지를 사용하여 여드름균과 동일한 방법을 사용하였으며 37°C incubator에서 24 h 배양 후 측정하였다.

2.5. 최소억제농도(Minimum Inhibitory Concentration : MIC)

MIC 평가는 96-well plate를 이용한 broth-dilution법을 일부 변형하여 수행하였다[20]. 72 h 배양한 *P. acnes*를 McFarland standard 0.5의 값으로 조절하여 1.5×10^8 cells/mL로 희석된 균주를 배지 160 μ L가 들어 있는 각 well에 20 μ L씩을 접종해 주었다. 선향초 추출물(20 mg/mL of DMSO)을 RC 액체 배지를 이용하여 2배수씩 희석(two-fold serial dilution)하여 농도별로 균주와 배지가 들어있는 96-well plate에 20 μ L씩 넣어 주고 잘 섞어 주었다. 대조군으로 선향초 추출물이 들어 있지 않은 10% DMSO를 사용하였다. 균 희석액 및 시료를 접종한 96-well plate를 anaerocult[®] Gaspack system을 이용하여 3일간 배양한 후 균의 생육이 나타나지 않는 최소 농도를 MIC로 결정하였다. 호기성 균주에 대한 MIC 평가는 Mueller-Hinton 배지를 사용하여 여드름균과 동일한 방법을 사용하였으며 37°C incubator에서 24 h 배양 후 결정하였다.

2.6. 미생물의 생육 곡선 측정

72 h 전 배양한 *P. acnes*균 현탁액을 5 mL의 RC broth배지에 100 μ L (배지의 2%)씩 접종한 tube에 대조군으로 DMSO 200 μ L를 넣어주고 시험군에는 DMSO에 다양한 농도(7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250 μ g/mL)로 준비한 선향초 추출물을 각 농도별로 200 μ L씩을 넣어주고 잘 섞어 주었다. 시료처리 후, 바로 96-well plate에 각 tube 별로 200 μ L씩 취하여, ELISA reader를 이용하여 620 nm의 파장에서 흡광을 측정하였고, 각 tube는 anaerobic jar에서 gas pack system을 이용하여 37°C에서 혐기성 배양하여 주면서 12 h 간격으로 흡광을 측정하여 시간경과에 따른 농도별 균 성장 억제정도를 측정하였다.

2.7. 추출물의 온도 및 pH 안정성 평가

2.7.1. 온도

선향초 추출물을 20 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹인 후, 1.5 mL microfuge tube에 넣어 주고, 70, 80, 90, 100°C의 항온수조에서 70 min간, autoclave (121°C)에서 15 min간 정치한 후, 이들 시료를 이용하여 paper disk diffusion method를 수행하였다.

2.7.2. pH

선향초 추출물을 10 mg/mL의 농도로 DMSO에 녹인 후, 15 mL conical tube에 넣어주고 pH를 2 ~ 12의 범위로 조절하여 30 min간 정치한 후, 이들 시료를 이용하여 paper disk diffusion method를 수행하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 선향초의 항균 활성

3.1.1. Paper Disk Dilution법에 의한 항균 활성 평가

여드름균과 호기성균에 대한 선향초 추출물의 항균활성을 평가하여 다음과 같은 결과를 얻을 수가 있었다. Paper disk 법을 사용한 *P. acnes*균에 대한 항균활성은 선향초 추출물의 농도가 증가할수록 inhibition zone의 크기가 증가하였는데, 0.006%의 농도에서 25 mm였던 것이 농도가 증가할수록 항균활성이 높아져 최대처리 농도였던 0.05%의 농도에서는 36 mm로 커지는 것을 볼 수 있었다. 대조군으로 사용한 triclosan은 0.025%의 농도에서 선향초 0.05%의 농도와 비슷한 항균활성을 나타냈다 (Table 1). 호기성 균주들과의 항균활성 비교를 위해 0.05%의 농도를 각 균주에 처리해 준 결과 선향초 추출물은 여드름균에 가장 높은 항균활성을 보였는데, *S. epidermidis*는 14 mm의 크기로 활성이 비교적 낮았으며, 나머지 균주들은 모두 20 mm의 범위내에 있는 것으로 관찰되었다(Figure 1).

3.1.2. *P. acnes* 균에 대한 MIC 평가

여드름균에 대한 선향초 추출물의 MIC를 측정한 결과 0.005% (50 μ g/mL)의 농도임을 알 수 있었으며, 호기성 균주들의 선향초 추출물의 MIC 측정 결과는 paper disk dilution 법에 의한 결과와 유사하였는데 *S. epidermidis*의 MIC는 0.2% 였으며 나머지 균주들은 0.01% (100 μ g/mL) ~ 0.05% (500 μ g/mL)로 관찰되었다(Table 2). 항균 대조군으로는 triclosan과 방부제로 사용하고 있는 methyl paraben (MP)을 사용하였는데 triclosan에 대한 MIC는 0.004% (40 μ g/mL), MP에 대한 MIC는 실험에 사용한 모든 균주에서 0.2% (2 mg/mL)로 측정되었다. MIC 결과들이 paper disk법에 의한 실험결과와 약간씩의 차이를 보이는 것은 두 실험방법에 따른 살균원리의 차이에서 생겨나는 오차이기 때문에 큰 유의성을 갖고 있지는 않은 것으로 여겨진다. Paper disk diffusion법과 MIC 평가에서도 선향초 추출물이 여드름에 대해 높은 항균 활성을 갖고 있는 것으로 확인되었으며, 이는 추출물에 포함되어 있는 항균물질들이 각 균주의 세포막에 강한 투과성을 가지고 있어서 세포막을 파괴하게 되고 이로 인해 세포내부 환경의 변화를 주게 되고 결국 세균은 사멸하게 되는 것으로 여겨진다. 특히 hexane 등을 이용한 선향초 추출물의 일부 분획에서는 crude extracts 보다 여드름균에 대한 항균활성이 더 강력한 것을 관찰할 수 있었지만(data not shown), 분획 추출에 따른 여러 공정과 회수율의 저하 등 실제적인 화장품 원료로서의 개발에는

Table 1. The Size of Inhibition Zone of *P. acnes* by *A. pilosa* L. Extracts

Strain	<i>Agrimonia pilosa</i> L.				Triclosan
	0.00625%	0.0125%	0.025%	0.05%	0.025%
<i>P. acnes</i>	25 ¹⁾	30	33	36	36

¹⁾ inhibition zone size : mm

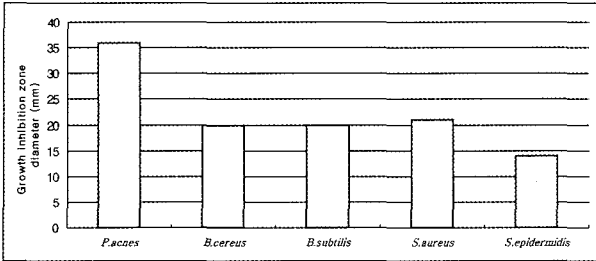


Figure 1. The size of inhibition zone of various bacteria against *A. pilosa* L.

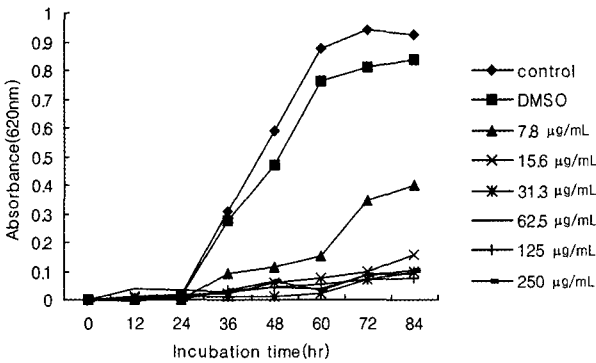


Figure 2. Effect of *A. pilosa* L. extracts on the growth of *P. acnes*.

장애가 될 수 있을 것으로 여겨진다. 이상의 결과로 보았을 때 선학초 추출물은 우수한 항여드름균 활성을 갖고 있는 것으로 사료되어 여드름 관련 화장품 원료로서의 개발가능성을 시사하고 있다.

여드름균처럼 특정 세균을 기능을 약화시키거나 생리 활동을 억제하고, 세균자체를 사멸시키기 위한 목적의 항균제 이외에도 화장품 자체의 변질이나 오염을 막기 위해 다양한 종류의 방부, 항균제가 사용되어 지고 있다. 일반적으로 세균의 세포막을 파괴하여 세균을 사멸시키는 기작을 응용하여 화장품에 응용되고 있는 방부제나 항균제들은 직접적으로 인체 피부와 접촉하여 반응하게 되므로 인체 피부에 영향을 주지 않는 가능한 한 최소량을 사용하여 최대의 효과를 얻을 수 있는 물질을 선택 사용하는 것이 중요하다. 이런 관점에서 살펴보면 본 실험에 대조군으로 사용된 호기성 균주들의 경우에도 여드름균에 비해 항균활성은 떨어지지만 비교적 우수한 항균활성

Table 2. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *A. Pilosa* L. Extracts Against Various Bacteria

Strains	<i>Agrimonia pilosa</i> L.	Methyl paraben
<i>P. acnes</i>	0.005%	0.2%
<i>B. cereus</i>	0.0125%	0.2%
<i>B. subtilis</i>	0.1%	0.2%
<i>S. aureus</i>	0.05%	0.2%
<i>S. epidermidis</i>	0.2%	0.2%

Table 3. Temperature Stability of *A. pilosa* L. Extracts

온도(°C)	70	80	90	100	121
Inhibition zone (mm)	33	34	33	32	31.5

을 나타내고 있으며, 현재 사용되고 있는 방부제나 항균제가 평균적으로 0.2~0.4% 정도의 농도 범위 내에서 사용하고 있는 것을 감안하면 균주에 따라 보다 더 적은 농도를 사용하여도 우수한 천연 방부제나 항균제로서 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

3.2. 선학초 추출물이 *P. acnes*의 증식에 미치는 영향

선학초 crude 추출물을 농도별(7.8, 15.6, 31, 62, 125, 250 µg/mL)로 RC 배지에 첨가하고, *P. acnes* 균을 접종하여 3일간 배양하면서 12 h 간격으로 균주의 성장 정도를 측정하여 Figure 2와 같은 성장곡선을 구할 수 있었다. 대조군으로는 아무 것도 처리하지 않은 여드름균과 시료를 희석할 때 사용한 DMSO를 여드름균에 처리한 2 종류를 사용하여 측정하였는데, 이들 대조군 모두 배양 24 h 후부터 균이 기하급수적으로 증식하기 시작하였으며, 약 60 h 배양하면 대수기(log phase)에 도달하는 것을 관찰할 수 있었다. 시험균의 경우 시료를 농도별로 처리하여 보면 24 h 배양할 때까지는 전체적으로 균의 증식이 억제되었지만 36 h 배양하게 되면 저농도(7.8 µg/mL)에서는 증식이 점차 증가되기 시작하였고, 60 h 배양 이후부터는 대부분의 농도범위에서 조금씩 증가하는 것으로 관찰되었지만 고농도의 시료가 포함되어있는 경우에는 증가폭이 그다지 크지 않은 것을 확인할 수 있었다.

Table 4. pH Stability of *A. pilosa* L. Extracts

pH	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Inhibition zone (mm)	33.5	34	33	38	32.5	33	32.5	34	33.5	34	34

3.3. 선향초 추출물의 온도 및 pH에 대한 안정성 평가
 선향초 추출물이 온도 및 pH의 변화에 안정성이 있는지를 확인하여 보았다. 다양한 범위로 온도(70, 80, 90, 100, 121℃)나 pH(2~12)를 변화시켜서 시료를 반응시킨 후 paper disk diffusion 법에 의해 항균활성을 측정 한 결과, 이들 추출물들은 온도(Table 3) 및 pH (Table 4)의 변화에 높은 안정성을 보여주는 것으로 나타났다으며 이 결과는 선향초 추출물이 화장품 원료로 유용하게 쓰일 수 있음을 시사하고 있다.

4. 결 론

1990년대 이후 급속한 산업의 발달과 이에 따른 경제수준의 향상은 화장품 산업에도 큰 영향을 끼치게 되었고, 화장품 원료로 사용되는 여러 가지 유효성분들도 기존의 화학합성 물질 뿐만 아니라 생약을 포함한 식물성 원료에서부터 해양원료에 이르기까지 다양한 종류의 천연물들이 주류를 이루는 추세이다. 특히 식물성 천연물을 이용하여 인체 피부에 유용한 생리활성을 조절하는 물질이나 항산화, 광보호, 항염, 항균 효능 등 기능성 원료를 탐색하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 본 연구에서는 여드름 유발 균주에 대한 항균 활성이 우수한 천연물질을 탐색하기 위하여 민간 및 한방 요법의 약재로서 오래 전부터 사용되어 온 선향초를 이용하여 여드름 균에 대한 항균 활성을 평가하여 보았다. 선향초 추출물을 이용하여 *P. acnes*에 대한 MIC 값은 0.05 mg/mL로 측정되었으며, paper disk diffusion법에서도 높은 활성을 보였는데, 시료가 선향초 전초에 대한 crude extract임을 고려하면 매우 항균활성이 높은 것으로 평가되었다. 선향초 추출물의 온도, pH 안정성을 평가한 결과, 70, 80, 90, 100, 121℃ 등 다양한 온도 조건과 pH 2~pH 12의 변화에 있어서도 그 효능이 변하지 않고 안정된 상태로 유지되는 것으로 관찰되었다. 따라서 선향초 추출물은 여드름 균 억제제 및 치료제에 관련된 기능성 화장품 원료로서의 개발 가능성이 높은 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. L. Cordain, S. Lindeberg, M. Hurtado, K. Hill, S. B. Eaton, and J. Brand-Miller, *Acne vulgaris: A dis-*

ease of western civilization, *Arch. Dermatol.*, **138** (12), 1584 (2002).
 2. W. J. Cunliffe and H. Gollnick, *Acne: diagnosis and management*, London, Dunitz Ltd. (2001).
 3. A. M. Layton, A review on the treatment of acne vulgaris, *Int. J. Clin. Pract.*, **60**(1), 64 (2006).
 4. P. Coates, S. Vyaknam, E. A. Eady, C. E. Jones, J. H. Cove, and W. J. Cunliffe, Prevalence of antibiotic-resistant propionibacteria on the skin of acne patients: 10-year surveillance data and snapshot distribution study, *British J. Dermatol.*, **146**, 840 (2002).
 5. R. S. Stern, Medication \$ medical service utilization for acne 1995-1998, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **43**(6), 1042 (2000).
 6. H. H. Tan, Antibacterial therapy for acne, *Am. J. Clin. Dermatol.*, **4**(5), 307 (2003).
 7. J. K. Swanson, Antibiotic resistance of Propionibacterium acnes in acne vulgaris, *Dermatol. Nursing*, **15**(4), 359 (2003).
 8. J. Park, J. Lee, E. J. Y. Park, K. Kim, B. Park, K. J. E. Park, J. Kim, and D. Park, *In vitro* antibacterial and anti-inflammatory effects of honokiol and magnolol against Propionibacterium sp., *Europ. J. Pharmacol.*, **496**, 189 (2004).
 9. C. Nam, S. Kim, Y. Sim, and I. Chang, Anti-acne effects of oriental herb extracts: a novel screening method to select anti-acne agents, *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **16**(2), 84 (2003).
 10. M. T. Chomnawang, S. Surassmo, V. S. Nukoolkarn, and W. Gritsanapan, Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acne-inducing bacteria, *J. Ethnopharmacol.*, **101**, 330 (2005).
 11. S. Higaki, S. Morimatsu, M. Morohashi, T. Yamagishi, and Y. Hasegawa, Susceptibility of Propionibacterium acnes, Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis to 10 Kampo formulations, *J. Int. Med. Res.*, **25**(6), 318 (1997).
 12. F. Qadan, A. J. Thewaini, D. A. Ali, R. Afifi, A. Elkhawad, and K. Z. Matalaka, The antimicrobial

- activities of *Psidium guajava* and *Juglans regia* leaf extracts to cane-developing organism, *Am. J. Clin. Med.*, **33**(2), 197 (2005).
13. Y. Lee, M. Kim, and D. Chung, Effect of extract *Agrimonia pilosa* L. on biological activity in rats, *Korean J. Medicinal Crop. Sci.*, **10**(3), 167 (2002).
 14. B. Min, Y. Kim, M. Tomiyama, N. Nakamura, H. Miyashiro, T. Otake, and M. Hattori, Inhibitory effects of Korean plants on HIV-1 activities, *Phytother Res.*, **15**(6), 481 (2001).
 15. D. Kwon, H. Kwon, H. Kim, E. Chang, M. Kim, S. Yoon, E. Song, D. Yoon, Y. Lee, I. Choi, and Y. Choi, Inhibition of hepatitis B virus by an aqueous extract of *Agrimonia pilosa* L., *Phytother Res.*, **19**(4), 355 (2005).
 16. Y. Li, L. Ooi, H. Wang, P. But, and V. Ooi, Antiviral activities of medicinal herbs traditionally used in southern mainland China, *Phytother Res.*, **18**(9), 718 (2004).
 17. H. Correia, A. Gonzalez-Paramas, M. Amaral, C. Santos-Buelga, and M. Batista, Polyphenolic profile characterization of *Agrimonia eupatoria* L. by HPLC with different detection devices, *Biomed. Chromatogr.*, **20**(1), 88 (2006).
 18. A. Copland, L. Nahar, C. Tomlinson, V. Hamilton, M. Middleton, Y. Kumarasamy, and S. Sharker, Antibacterial and free radical scavenging activity of the seeds of *Agrimonia eupatoria*, *Fitoterapia*, **174**, 133 (2003).
 19. J. Bae, M. Sohn, Effect of *Agrimonia pilosa* Ledeb extract on the growth of food-borne pathogens, *Korean Nutrition Society*, **38**(2), 112 (2005).
 20. K. Yasunaka, F. Abe, A. Nagayama, H. Okabe, L. Lozada-Perez, A. Aguilar, and R. Reyes-Chilpa, Antibacterial activity of crude extracts from mexican medicinal plants and purified coumarins and xanthenes, *J. Ethnopharmacol.*, **97**, 293 (2005).