

지치 초고압 추출물의 미백활성 증진

김지선* · 정명훈* · 최운용** · 서용창* · 마충제** · 안주희** · 김남성*** · 황 백*** · 조정섭**** · 이현용****†

*강원대학교 의료 · 바이오신소재융복합연구사업단, **강원대학교 바이오산업공학부,
전남대학교 생물학과, *두산에코비즈넷

Enhancement of Whitening Effects of *Lithospermum erythrorhizon* Extracts by Ultra High Pressure

Ji Seon Kim*, Myoung Hoon Jeong*, Woon Yong Choi**, Yong Chang Seo*, Choong Je Ma**, Ju Hee Ahn**, Nam Seong Kim***, Baik Hwang***, Jeong Sub Cho**** and Hyeon Yong Lee****†

*Medical & Bio-Material Research Center and College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

**College of Bioscience and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

***Department of Biology, Chonnam National University, Kwangju 520-830, Korea.

****DooSan EcoBizNet, Chunchon 200-161, Korea.

ABSTRACT : In this study, whitening activity of *Lithospermum erythrorhizon* extracts were investigated according to several extraction processes: water extraction at 100 °C (WE100) and 60 °C (WE60), 70% ethyl alcohol extraction (EE) and ultra high pressure extraction (HPE) at 500 MPa for 30 minutes at 60 °C. The extracts from ultra high pressure extraction showed the highest tyrosinase inhibition and melanogenesis inhibition activities as 52% and 79.5%, respectively, in adding 1 mg/ml than others extraction processes. HPE extracts also showed the strong reducing power as 3.19 that absorbance at 450 nm. The contents of polyphenol in WE100, we measured as 10.1 µg/ml in adding 1 mg/ml. Extracts have a high total flavonoid contents by HPE as 4.1 µg/ml at 1 mg/ml. We can conclude that better whitening activity of extracts from high pressure extraction was due to high antioxidant activities which could be extracted by higher polyphenol and flavonoid contents in HPE than others.

Key Words : *Lithospermum erythrorhizon*, High Pressure, Whitening Activity

서 언

지치 (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)는 지치과의 다년생 초본 식물로서 우리나라의 강원도, 체천 등의 야산에 주로 자생하고 지치 뿌리는 예로부터 우리나라, 중국과 일본에서 한약재와 식용색소로 이용되었다. 한방에서 혈액순환 촉진, 해열, 해독 작용에 주로 이용하거나 토혈, 혈뇨, 변비, 화상, 습진, 요로 감염 등을 치료하는데 사용하였다 (Lee et al., 1998).

현재까지 지치의 성분으로서는 shikonin (Kim, 2001; Kim et al., 2006), acetylshikonin 등이 보고되었다 (Yoon et al., 1988; Hwang et al., 2000). 약리 작용으로는 shikonin에 의한 신진대사의 산화환원반응 조절 및 창상과 화상의 신생촉진 (Min et al., 2005), acetylshikonin과 shikonin에 의한 항염

증 작용 (Kang, 2005)이 알려져 있다.

생활수준이 점점 향상되고 의학기술의 발전 등으로 인간의 평균수명이 증가되고 고령화 사회가 되면서 사람들의 관심은 건강하게 오래 살며 아름답게 늙어가는 것으로 집중이 되고 있다. 이러한 시대와 관심에 부응하여 기능성 식품 및 화장품 분야의 시장 규모가 확대되고, 특히 천연물을 활용한 분야의 연구는 급속히 진행되고 있다 (Cho, 2007).

기능성 식품 및 화장품 분야 중에서도 미백효능을 가진 제품의 관심이 높아지고 있다. 피부 내 색소의 형성은 자외선이나 신호전달물질 등의 내외부적 인자들에 의해 멜라닌 생성량이 증가되면서 나타난다. 현재까지 미백제 개발은 주로 tyrosinase를 억제하거나 멜라닌 세포 생성량의 감소 등을 통하여, 멜라닌 세포에 직접적으로 작용하는 기전으로 이루어졌다. 그러나 멜라닌 세포생성에 관여하는 여러 경로와 그와

†Corresponding author: (Phone) +82-33-250-6455 (E-mail) hyeonl@kangwon.ac.kr

Received 2010 October 2 / 1st Revised 2010 November 5 / 2nd Revised 2011 February 10 / Accepted 2011 April 13

관련한 인자들이 밝혀지면서, 멜라닌 세포 생성경로와 이와 관련된 인자들의 작용 억제에도 관심을 두게 되었다. 특히 피부색소형성의 주요원인인 자외선에 의해 생성된 활성산소가 피부색소의 형성을 촉진하는 기작이 밝혀지면서 이러한 활성산소를 제거하는 것이 멜라닌 색소 형성억제에 효과적이라는 연구보고가 있다 (Tobin *et al.*, 1994; Bernadette *et al.*, 1998).

피부는 기능적, 구조적으로 변화되어 노화를 시각적으로 나타내어 준다. 피부는 항상 산소와 접촉하고 자외선에 노출되어 있어 활성산소 종에 의한 피부의 광산화적 손상 위험이 항상 존재한다. 인간의 생체 내에서 필요한 에너지 공급을 위해 끊임없이 일어나는 생화학적 반응 과정에서 발생하는 활성산소는 자기 방어 기구인 생체 내 제거기작에 의해 대부분 소멸되지만, 이러한 활성산소가 정상적으로 소거되지 않았을 때, 유리기로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에 가해지면 이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA, 효소 및 T세포와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 뇌졸중, 파킨슨씨병 등의 뇌질환과 심장질환, 허혈, 동맥경화 등과 같은 성인병과 암 등의 각종 질병을 일으키는 원인이 된다 (Park *et al.*, 2007; Halliwell, 1991).

또한, 활성산소가 다량 생성 시 체내에서는 자외선에 의한 활성산소의 생성을 막기 위해 멜라닌 색소를 분비한다 (Park, 1997). 체내의 활성 산소를 제거하면 노화방지와 동시에 미백 효과가 동반될 것이라고 사료된다.

초고압 기술은 약용식물의 유용 성분을 추출하는데 적용할 수 있는데 그에 목적을 두고 사용하는 추출 공정을 초고압 추출 공정이라고 한다. 기존의 열수 추출 공정은 열처리에 의해 추출물의 화학변화가 일어나는 반면, 초고압 추출 공정은 열처리가 아닌 압력처리를 이용하여 화학변화가 거의 일어나지 않는 장점이 있다 (Kim *et al.*, 2007). 초고압 기술을 통한 추출은 약용식물의 중요 구성 성분의 추출이 단시간 내에 가능하며, 불순물이 거의 없고, 높은 순도의 단일 성분을 쉽게 얻을 수 있다. 이는 초고압 하에서 단백질이 변성되고, 세포막이 파괴 (Bennett, 1998) 되어 세포 안으로 용매가 들어가 보다 많은 성분이 세포 밖으로 쉽게 용출되어 나오는 것으로 추정하고 있다. 또한 초고압 추출을 통하여 에너지 수준이 제한된 수소결합, 전기적 결합, 반데르발스 결합, 수소결합과 같은 약한 결합들에 의한 결합은 분리되어 신물질 용출이 가능한 것으로 보인다 (Kwon *et al.*, 2007).

따라서 본 연구에서는 이러한 초고압 추출을 통한 지치의 생리활성을 기존의 열수추출 및 에탄올 추출과의 비교를 통하여 기능성화장품 분야와 기능성 식품 소재로서 활용 가능성을 검토하였으며, 더 나아가 본 연구 자료들이 선행연구 결과가 많지 않은 지치의 향장소재와 관련된 분야의 기초 자료로서

활용될 수 있도록 하기 위해 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료 및 시약

본 실험에서 사용된 지치 (*Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc.)는 2009년 11월에 경북 영천에서 생산된 것으로 시중 약재상 (대광약업사, Chuncheon, Korea)에서 구입하였다.

본 연구의 세포배양 시 필요한 배지로 RPMI 1640 (GIBCO, USA)을 사용하였고, 그 밖에 배양에 필요한 시약으로 hepes buffer (SIGMA, USA)와 fetal bovine serum (GIBCO, USA), gentamycin sulfate (SIGMA, USA), Trypsin-EDTA (SIGMA, USA)를 사용하였다.

2. 시료 추출 조건

초고압 추출은 지치 80 g씩 비닐 팩에 70% ethyl alcohol 과 함께 넣어 공기가 들어가지 않도록 잘 밀봉한 후, 초고압 추출장치 (Ilshin autoclave, Korea)를 이용하여 500 MPa의 압력을 가해 30분간 추출을 실행하였다. 초고압 추출을 통해 수득한 시료를 수직 환류 냉각기에 부착된 추출 flask에 시료 증량에 대하여 10배의 ethyl alcohol을 추출용매로 사용하여 60 °C에서 24시간 추출하였다.

일반 열수추출은 증류수와 ethyl alcohol을 추출 용매로 각각 사용하였으며, ethyl alcohol을 용매로 사용 시 60°C, 증류수를 용매로 사용 시 각각 60°C와 100°C에서 24시간 추출하였다. 얻어진 각각의 추출물들을 감압여과장치 (Rotary Vacuum Evaporator N-N series, EYELA, Germany)로 여과하여 농축을 하였고, 동결건조를 한 후 분말로 제조하여 실험에 사용하였다(Kim *et al.*, 2008).

3. 세포주 및 세포 생육 배지

실험에 이용된 세포주로 마우스 흑색종 세포인 Clone M-3 (Cloudman S91 melanoma, mouse, KCLB 10053.1, KOREA)를 사용하였으며, 세포배양에 필요한 배지로 RPMI 1640 (GIBCO, USA)을 사용하였고 그 밖의 세포 배양에 필요한 시약으로 hepes buffer (SIGMA, USA)와 fetal bovine serum (GIBCO, USA), gentamycin sulfate (SIGMA, USA), trypsin-EDTA (SIGMA, USA)를 사용하였다. 실험에 사용된 세포는 RPMI 1640배지 90%에 FBS를 10%로 적용시켜 배양하여 실험에 이용하였다.

4. Tyrosinase 억제활성 실험

기초 향장 활성 실험 중 하나로 피부내의 미백 효과를 측정하는 실험으로서 실험은 dopachrome방법 (Pomerantz, 1963)을 이용하여 측정하였다. 150 μ l의 mushroom tyrosinase-150

unit (SIGMA, USA), 225 μ l 의 2.5 mM L-tyrosine (FLUKA, JAPAN), 225 μ l 의 0.4 M hepes buffer (SIGMA, USA) (pH 6.8), 그리고 300 μ l 의 ethanol 용액 혹은 시료 (1 mg/ml) 용액을 섞은 후 배양 전과 15분간 배양을 한 후 475 nm 에서 흡광도를 각각 측정하였다.

Tyrosinase 억제 정도는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Tyrosinase inhibition (\%)} = \frac{(C - D) - (A - B)}{(C - D)} \times 100$$

A는 시료를 가지는 용액의 배양 후의 흡광도이며, B는 시료를 가지는 용액의 배양 전의 흡광도, C는 시료를 가지지 않는 용액의 배양 전의 흡광도, D는 시료를 가지지 않는 용액의 배양 후의 흡광도이다.

5. Clone M-3세포로부터 Melanin 생성량을 측정

가시광선 영역대의 흡광도를 측정함으로써 Melanin의 생성량을 비교할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 Clone M-3 세포를 plate에 1×10^5 cells/well로 접종한 후 CO₂ incubator (5%, 37°C)에서 세포가 well 바닥에 80% 이상 부착될 때까지 배양하였다. 배지를 제거한 세포를 phosphated buffer saline (SIGMA, USA)로 세척하고 이것을 Trypsin-EDTA로 처리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포는 5,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거하여 pellet을 얻어 60°C에서 건조하였다. 10% DMSO가 함유된 1M NaOH 100 μ l 를 넣어 60°C 항온조에서 세포내 멜라닌을 얻었다. Microplate reader (Thermo max, Molecular Devices, USA)로 490 nm 에서 흡광도를 측정하여 세포 일정수당 멜라닌의 양을 구하였다. 지치 추출물의 농도를 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml 의 농도로 처리하여 멜라닌 생성량을 측정하였다. 대조군은 ascorbic acid (SIGMA, USA)를 사용하였으며 추출물과 동일 농도로 처리하여 측정하였다 (Kim *et al.*, 2008).

6. 환원력 측정

환원력은 여러 농도의 추출물 2.5 ml 에 200 mM sodium phosphate buffer (SIGMA, USA) (2.5 ml, 6.6)와 1% potassium ferricyanide (HAYASHI PURE CHEMICAL, JAPAN) 2.5 ml 를 혼합시킨 후 혼합물을 50°C에서 20분 동안 incubation 시킨 다음 2.5 ml trichloroacetic acid (SIGMA, USA) (10%, w/v)를 첨가하여 650 \times g에서 10분간 원심분리 하였다. 원심분리한 상정액 5 ml 에 탈이온수 5 ml 와 1% ferric chloride (SIGMA, USA) 1 ml 를 첨가시킨 후 UV - vis Spectrophotometer (852A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard)를 이용하여 700 nm 에서 흡광도를 측정하였다 (Oyaizu, 1986).

7. 총 페놀 함량과 플라보노이드 함량 분석

총 페놀 함량은 Folin-Denis법에 따라 추출물 1 ml에 Folin-Ciocalteu (SIGMA, USA) 시약 및 10% Na₂OH₃ 용액을 각 1 ml 씩 차례로 가한다음 실온에서 1시간 정치한 후 UV-vis spectrophotometer (852A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard)를 이용하여 700 nm 에서 흡광도를 측정하였다. Caffeic acid (SIGMA, USA)를 0~100 μ g/ml 의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량 곡선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 측정하였다 (Singleton and Rossi, 1966).

총 플라보노이드는 Moreni 등의 방법 (Moreni *et al.*, 2000)에 따라 추출물 0.5 ml 에 10% aluminum nitrate (SIGMA, USA) 0.1 ml 및 1 M potassium acetate (SIGMA, USA) 0.1 ml, ethanol 4.3 ml 를 가하여 혼합한 후 실온에서 40분간 정치한 다음 UV-vis spectrophotometer (852A Diode Array Spectrophotometer, Hewlett Packard)를 이용하여 415 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

8. 통계처리

데이터의 통계처리는 각 시료를 3회 반복으로 행해졌으며, 실험값의 통계는 SAS (Statistical Analysis System) 프로그램을 사용하여 실험 간의 평균을 구하였으며, 각 처리구간의 최소 유의차 (P < 0.05) 수준에서 통계처리 하였다.

결과 및 고찰

1. Tyrosinase 억제활성

Tyrosinase는 피부의 멜라닌 색소를 생성하는 효소로 tyrosinase의 저해활성을 측정함으로써 추출물의 미백효과를 알아 볼 수 있다. 추출 공정별 지치 추출물들의 농도를 각각 달리하여 tyrosinase의 저해 활성을 Fig. 1에 나타내었다. 실험 결과를 보면 모든 추출물에서 추출물의 농도가 증가함에 따라 tyrosinase의 저해 활성도 증가하는 경향을 보였으며, 그 중 초고압 공정 추출물이 모든 조건의 농도에서 가장 높은 저해 활성을 나타냈다. 지치의 열수 추출물과 ethyl alcohol solvent 추출물의 tyrosinase 저해 활성 수치는 각각 42%, 37%로 나타났다. 이와 비교하여 황기, 백출 및 오가피의 항산화성 및 미백효과에 관한 연구 (Kim and Heo, 2009)에서는 1 mg/ml 의 황기, 백출, 오가피 추출물을 첨가한 결과 6.0%, 31.2%, 42.1%을 나타내어 지치의 열수 추출물과 ethyl alcohol solvent 추출물에 비해 높은 수치를 보였다. 그러나 지치의 초고압 공정을 통한 추출물의 tyrosinase 저해 활성 수치는 52%로 황기, 백출, 오가피 추출물의 수치보다 높은 것으로 나타났다. 이것으로 보아 초고압 공정에 의한 지치 추출물이 다른 공정의 지치 추출물뿐만 아니라 황기, 백출, 오가피 추출물과

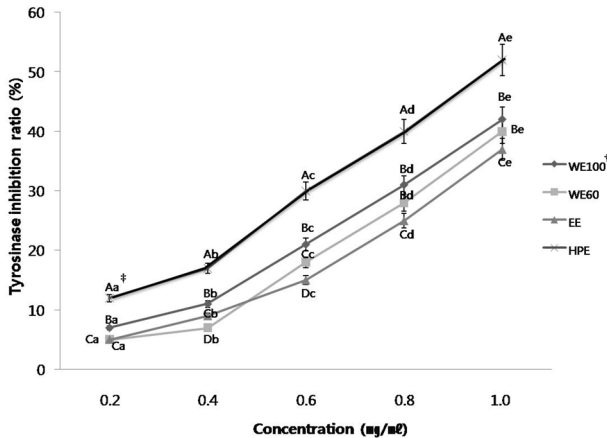


Fig. 1. Tyrosinase inhibitory activity of the extracts of *L. erythrorhizon* by different extraction processes. †WE100: water extraction at 100°C; WE60: water extraction at 60°C; EE: 70% ethyl alcohol extraction at 60°C; HPE: high pressure extraction for 30 minutes at 60°C with 70% ethyl alcohol solvent. ‡Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-D) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-e) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

비교하여 높은 tyrosinase 저해활성을 나타낸다고 볼 수 있다. 멜라닌 색소를 생성하는 효소인 tyrosinase의 활성이 적을수록 좋은 미백효과를 가진다고 볼 수 있으므로 초고압 공정 추출물이 상대적으로 미백효능이 우수한 것으로 추측 할 수 있다.

2. Clone M-3세포로부터 Melanin 생성량

추출 공정별 지치 추출물들이 Clone M-3 세포주로부터 melanin 생성량에 미치는 영향을 알아보기 위해서 추출물들의 농도를 각각 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mg/ml의 농도로 처리하여 멜라닌 생성량을 측정하였다. Ascorbic acid는 대조군으로 티

로시니아제 활동 억제 및 활성산소 제거하여 멜라닌 생성을 저해하는 물질로 추출물과 같은 농도로 처리하여 실험하였다.

Table 1에서 볼 수 있듯이 물 100°C, 물 60°C, ethyl alcohol solvent, 초고압 공정을 통한 추출물의 멜라닌 생성율은 각각 80.4%, 86.1%, 87.5%, 79.5%로 초고압 공정을 통한 추출물이 가장 낮게 나타났다. 대조군인 ascorbic acid는 같은 농도에서 77.4%의 멜라닌 생성율을 나타내었다. 초고압 추출 공정에 의한 당귀 추출물의 미백 및 자외선 차단 효과 (Kim *et al.*, 2008)에 관한 연구에서 초고압 공정을 이용하여 추출한 당귀 추출물의 멜라닌 생성율은 1.0 mg/ml의 농도에서 82.4%로 같은 농도의 지치 추출물이 더 낮은 생성율을 보였다.

초고압 공정을 통한 지치 추출물은 대조군으로 쓰인 ascorbic acid와 비교하여 다소 낮은 멜라닌 저해효과를 나타냈으나 큰 차이가 없었으며 다른 연구에서 보고된 당귀 추출물보다는 더 높은 억제효과를 보였다. 이것으로 보아 추출 공정 시 지치에 함유되어 있는 멜라닌 억제 물질의 손상을 줄일 수 있는 구체적인 초고압 공정 조건이 확립된다면 멜라닌 생합성 억제제로서 기능성 화장품의 미백제로도 쓰일 수 있는 가능성을 지닌다고 사료된다.

3. 환원력

환원력은 활성산소에 전자를 제공할 수 있는 활성 수소의 수치를 측정한 것으로 환원력의 수치가 높으면 활성산소 제거 능력이 높아진다.

추출 공정별 지치 추출물의 농도를 각각 달리하여 첨가한 후 금속이온을 환원시키는 환원력을 측정한 결과는 Fig. 2와 같았다.

실험 결과를 보면 추출물 농도가 점차적으로 증가함에 따라 환원력이 증가하는 경향을 보였으며, 그 중 12.5 mg/ml의 농도에서 초고압 공정 추출물의 O.D.값은 3.19로 가장 강한 환원력을 나타내었고, 물 100°C 추출물이 3.12, 물 60°C 추출물

Table 1. Melanin production of the extracts of *L. erythrorhizon* by different extraction processes in Clone M-3 cells.

Concentration (mg/ml)	Melanin production (%) [†]				Standard Ascorbic acid
	WE100 ¹⁾	WE60 ²⁾	EE ³⁾	HPE ⁴⁾	
0.2	99.5±0.4 ^{Aa}	99.7±0.7 ^{Aa}	99.1±0.7 ^{Aa}	98.5±0.8 ^{Aa}	92.1±0.5 ^{Ba}
0.4	91.5±1.1 ^{Ab}	96.1±1.2 ^{Bb}	96.4±0.7 ^{Bb}	95.4±1.0 ^{Bb}	87.1±0.4 ^{Cb}
0.6	90.4±0.8 ^{Ab}	94.5±1.2 ^{Bb}	95.1±0.9 ^{Bb}	90.1±1.1 ^{Ac}	85.6±0.5 ^{Cc}
0.8	88.5±1.3 ^{Ab}	90.1±0.8 ^{Ac}	89.2±1.0 ^{Ac}	84.1±0.9 ^{Bd}	79.5±0.6 ^{Cd}
1.0	86.1±0.9 ^{Ac}	86.1±1.6 ^{Ad}	87.5±0.8 ^{Ad}	79.5±1.6 ^{Be}	77.4±0.6 ^{Ce}

[†]Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-e) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

¹⁾WE100: water extraction at 100°C.

²⁾WE60: water extraction at 60°C.

³⁾EE: 70% ethyl alcohol extraction at 60°C.

⁴⁾HPE: high pressure extraction for 30 minutes at 60°C with 70% ethyl alcohol solvent.

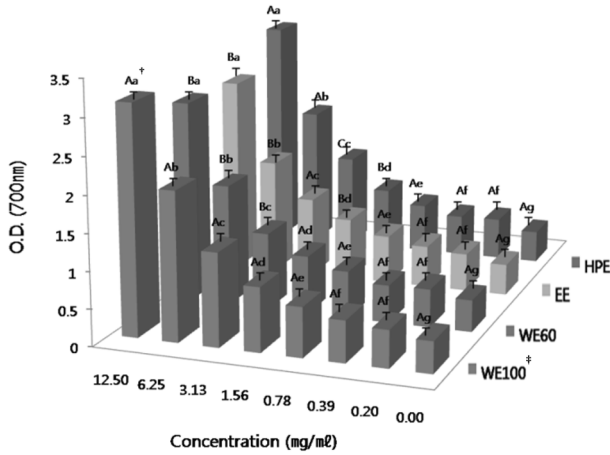


Fig. 2. Reducing power of the extracts of *L. erythrorhizon* by different extraction processes and concentration.

[†]Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter (A-C) within same concentration are significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter (a-g) within same sample are significantly different at $p < 0.05$.

[‡]WE100: water extraction at 100°C; WE60: water extraction at 60°C; EE: 70% ethyl alcohol extraction at 60°C; HPE: high pressure extraction for 30 minutes at 60°C with 70% ethyl alcohol solvent.

2.76, ethyl alcohol solvent 추출물에서 2.70의 O.D.값이 측정되었다. 이러한 수치로 보아 까마중 추출물의 항산화 활성 연구 결과 (Jeong *et al.*, 2008)에서 까마중 추출물의 환원력 O.D.값이 2.0 이하로 측정된 것과 비교하여 상당히 높게 나타낸 것을 알 수 있다. 활성산소를 제거하는 것이 멜라닌 색소 형성억제에 효과적이라는 연구보고 (Tobin *et al.*, 1994; Bernadette *et al.*, 1998)에 근거하여 추측해보면 본 실험 결과 나타난 높은 환원력은 피부 내 활성산소를 소거함으로써 이에 연속적인 기작으로 인하여 미백작용을 나타낼 수 있을 것이라 사료된다.

4. 총 페놀 및 플라보노이드 함량

위에서 실시한 환원력 측정 실험에서 강한 환원력이 측정된 요인을 탐색하기 위하여 총 페놀 및 플라보노이드의 함량을 조사하였다. 공정별 지치 추출물의 총 페놀 및 플라보노이드의 함량을 측정된 결과를 Table 2에 나타내었다. 추출물들의 총 페놀 함량은 물 100°C 추출물에서 10.1 µg/mg로 가장 높은 함량을 나타내었고, 초고압 공정 추출물에서 9.1 µg/mg의 함량을 나타내었다.

지치 추출물들의 플라보노이드 함량은 초고압 공정 추출물에서 4.1 µg/mg로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 물 100°C와 60°C 추출물에서도 각각 4.0, 3.9 µg/mg로 높은 함량을 나타내었다. 이 결과로 보아 각 공정별 플라보노이드의 함량이 크게 차이가 나지 않지만, 고로쇠 수피 초고압 추출물의 함량

Table 2. Total polyphenol contents and total flavonoid contents of extracts of *Lithospermum erythrorhizon* according to different extraction processes.

Extraction condition	Total polyphenol contents [†] (µg/mg)	Total flavonoid contents [†] (µg/mg)
WE100 ¹⁾	10.118±0.360 ^A	4.064±0.170 ^a
WE60 ²⁾	8.174±0.300 ^B	3.936±0.220 ^a
EE ³⁾	7.742±0.550 ^B	3.264±0.290 ^b
HPE ⁴⁾	9.627±0.280 ^A	3.328±0.210 ^b

[†]Mean values±SD from triplicate separated experiments are shown. Mean with difference letter(A-B) within total polyphenol contents column is significantly different at $p < 0.05$ and mean with difference letter(a-b) within total flavonoid contents column is significantly different at $p < 0.05$

¹⁾WE100: water extraction at 100°C.

²⁾WE60: water extraction at 60°C.

³⁾EE: 70% ethyl alcohol extraction at 60°C.

⁴⁾HPE: high pressure extraction for 30 minutes at 60 with 70% ethyl alcohol solvent.

활성 증진(Jeong *et al.*, 2009) 연구 결과에 의하면 초고압 공정을 이용한 추출물이 수율이 높았고, 플라보노이드의 함량이 높으므로 일반 열수 추출에 비해 유용성이 높을 것으로 사료된다. 플라보노이드와 폴리페놀은 페놀성 화합물을 함유하고 있다. 이러한 페놀성 화합물은 가용성 식물류에 널리 분포하는 것으로 항산화능을 포함한 다양한 생물학적 효능을 나타내며, 이들의 효능은 주로 산화환원력에 의한 것이라고 밝혀졌다 (Osawa, 1994). 이와 같이 총 페놀 및 플라보노이드 함량의 측정 결과 지치 추출물의 환원력이 높은 이유를 뒷받침하는 근거자료로서 사용될 수 있을 것으로 사료되며 총체적으로 지치의 항산화 효능에 대한 기초 생리활성 자료로 쓰일 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 결과물은 2011년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구임 (지역거점연구단육성사업/의료·바이오신소재융복합연구사업단).

LITERATURE CITED

Bennett P.B, Marquis RE and Demchenko I. (1998). High pressure biology and medicine. University of Rochester Press. New York, USA.

Cho WG (2007). Comparison of drug delivery using hairless and pig skin. Journal of The Korean Oil Chemists Society. 24:410-415.

Bernadette EK, Marianne D and Bernhard P. (1998). Protective effect against sunburn of combined systemic ascorbic acid and a-tocopherol. Experimental Dermatology. 38:45-48.

Halliwell B. (1991). Drug antioxidant effect. A basis for drug

- selection Drugs. Karger. 42:569-605.
- Hwang SY, Hwang BY, Kang SS, Kim CM, Park JI, Bae KH, Son KH, Lee SH, Chang SY, Kang SJ, Ro JS and Lee KS.** (2000). Isolation and quantitative analysis of acetylshikonin from *Lithospermi* Radix. Korean Journal of Pharmacognoc 31:295-299.
- Jeong MH, Kim SS, Ha JH, Kim Y, Lee HJ, Kang HY, Park SJ and Lee HY.** (2009). Enhancement of anticancer activity of acer mono by high pressure extraction process. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 38:1243-1252
- Kang JH.** (2005). The anti-inflammatory effect of *Lithospermi* Radix and suppression of iNOS and TNF-alpha production. Kyunghee University.
- Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, Park UY and Lee HY.** (2007). Toxicity reduction and improvement of anticancer activities from *Rhodiola sachalinensis* A. Bor by ultra high pressue extracts process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:411-416
- Kim CH, Kwon MC, Han JG, Na CS, Kwak HG, Choi GP, Park UY and Lee HY.** (2008). Skin-whitening and UV-protective effects of *Angelica gigas* Nakai extracts on ultra high pressure extraction process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 16:255-260.
- Kim IC and Hur SS.** (2009). Antioxidative properties and whitening effects of the *Astragali* Radix, *Atractylodis rhizoma*, Alba and *Acanthopanaxis* Cortex. Journal of The Korean Oil Chemists Society. 26:110-116.
- Kim JS, Han YS and Kang MH.** (2006). Identification of shikonin and its derivatives from *Lithospermum erythrorhizon*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition. 35:177-181.
- Kim MN.** (2001). Studies on the constituents of *Lithospermum erythrorhizon*. The Journal of Sun Moon University Natural Science. 4:25-39.
- Kwon MC, KIM CH, Na CS, Kwak HG, KIM JC and LEE HY.** (2007). Comparison of immuno-modulatory regulatory activities of *Rubus coreanus* Miquel by ultra high pressure extracts process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 15:398-404.
- Lee KS, Ahn DK, Shin MK and Kim CM.** (1988). The Encyclopedia of Oriental Herbal Medicine, Jungdam Publishing Co. Seoul, Korea. p. 381-383.
- Min DH, Kim DK, Lim JP and Yang JH.** (2005). Transdermal drug delivery & therapeutic effect of the preparations of *Lithospermi* Radix and *Gardeniae* extracts on the burn & wound healing. Journal of Korean Pharmaceutical Science. 35:255-263.
- Moreni MI, Isla MI, Sampietro AR and Vattuone MA.** (2000). Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of Ethnopharmacology. 71:109-114.
- Osawa T.** (1944). Novel natural antioxidants for utilization in food and biological systems. In I. Uritani, V. V. Garcia, & E. M. Mendoza (Eds). Postharvest Biochemistry of Plant Food Materials in the Tropics. Japan Scientific Societies Press. Tokyo, Japan. p. 241-251.
- Oyaizu M.** (1986). Studies on products of browning reaction: antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. Japanese Journal of Nutrition. 44:307-315.
- Park SN.** (1997). Skin aging and antioxidants. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea. 23:75-132
- Park YJ, Kim HJ and Heo BG.** (2007). Anti-microbial, anti-oxidant and anti-inflammation effect with of the flower and the young seaf extracts in oriental cherry plant. Korea Society for People, Plants and Environment. 10:43-49.
- Pomerantz SH.** (1963). Separation, purification and properties of two tyrosinases from hamster melanoma. The Journal of Biological Chemistry. 238:2351-2357.
- Singleton VL and Rossi JA.** (1966). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture. 16:144-158.
- Tobin D and Thody AJ.** (1994). The superoxide anion may mediate short but not long term effects of ultraviolet radiation on melanogenesis. Journal of the American Academy of Dermatology. 3:99-105.
- Yoon KJ, Park, Lee HW and Yook CS.** (1988). Studies on the constituents and their antibacterial effect of the root of *Lithospermum erythrorhizon* Sieb. et Zucc. Bulletin KyungHee Pharmaceutical Sciences. 16:155-161.