

## RP-HPLC를 이용한 감초에서 Glabridin의 분리

정용안 · 이광진 · 권문주 · †노경호  
† 초정밀생물분리기술연구센터, 인하대학교 화학공학과  
(접수 : 2003. 7. 15. 게재승인 : 2003. 10. 26.)

## Separation of Glabridin from Licorice by RP-HPLC

Yong-An Jung, Kwang-Jin Lee, Moon-Ju Kwun, and Kyung Ho Row†  
† Center for Advanced Bioseparation Technology and Dept. of Chem. Eng.,  
Inha University, Incheon 402-751, Korea  
(Received : 2003. 7. 15. Accepted : 2003. 10. 26.)

By reversed-phase high-performance liquid chromatography, the extraction and separation of glabridin by from licorice root was performed in this work. The column efficiencies and resolutions of glabridin were investigated with mobile phase composition on the reversed-phase chromatographic system. The glabridin collected from licorice root was identified by LC/MS. The mobile phase used to extract glabridin were composed of ethanol, methanol, acetone, and ethyl acetate. For one-hour ultrasonic extraction with solvent of ethyl acetate, the favorable content of glabridin was obtained as 1.26g/kg. The glabridin was well separated in the mobile phase composition of 50/50 vol. % (acetonitrile/water).

**Key Words** : HPLC, glabridin, licorice, extraction, separation

### 서론

최근 의약품 제조에서는 식물성의 천연물질들이 각광을 받고 있다. 천연식물의 줄기, 뿌리, 열매 등에는 여러 가지 필수적인 성분들이 존재하는데, 과거에는 화학적 합성품들을 사용했지만 지금은 인체나 피부에 자극이 없는 천연의 약재로 쓰이던 생약 등의 선호도가 증가하고 있으며, 그 역할이 향후 주목되어지고 있다. 감초는 대략 6000년 전부터 약방식물로 동·서양에서 쓰여져 왔으며(1), 중국 내몽고, 감숙, 신강, 흑룡강성 등의 지역에서 주로 재배되고 있으며, 이 중 내몽고에서 생산되는 것이 품질이 가장 좋다고 한다. 종류로는 신과감초 *Glycyrrhiza inflata* Batal 및 광과감초 *Glycyrrhiza glabra* L. 등이 있다. *Glycyrrhiza glabra* L.의 뿌리와 줄기인 감초는 동양과 서양에서 자연약재로 빈번하게 쓰이고 있는 약 중의 하나이며(2-3), 많은 연구자들이 감초의 구성성분들에 대한 의학적인 효능에 대해 많은 연구를 하여 왔다. Licorice는 원산지에 따라 그 이름이 다른데 가장 많이 쓰이는 것으로 시베리아가 원산지인 *Glycyrrhiza glabra* L. 을 사용한다.

감초는 예로부터 한방에서나 민간약으로 아주 중요한 생약으로 널리 쓰이는데, 주로 모든 중독의 해독제로 이용되고 진해거담제, 완화제 등으로 쓰이고 있다. 감초에는 근육이나 조직의 급격한 긴장에 의하여 생기는 통증을 풀어주는 작용, 체중의 증가, 백혈구의 증가, 이뇨작용, 항염작용 등이 있다(4). 또한 소화성 궤양 치료제 및 위궤양 치료제의 신약 처방에도 들어가 있어 의약품 쪽으로의 개발도 기대되어진다. 이 밖에도 부신피질 호르몬과 유사한 glycyrrhizin의 배당체인 글루쿠론산이 함유되어 있어 장을 조절하고 대사를 완만하게 하며 신경을 편안하게 하는 작용을 한다. 자연 상태의 licorice는 여러 가지 flavonoids로 구성되어 있는데, 그 중 단맛을 내는 부분이 glycyrrhizin이다(5). Glycyrrhizin은 현재 생약제 등에서 감초의 지표성분으로서 HPLC에 의한 정량분석법이 고시되어 있으며, 2.0% 이상을 함유하도록 규정하고 있다. 이 밖에도 Hispaglabridin A, Hispaglabridin B, Glabridin, 4-O-methylglabridin, isoprenylchalcone derivative, Isoliquiritigenin, Formononetin 등이 있다(6). 이 중 가장 많은 양을 차지하는 것은 glabridin이다. Glabridin은 체내에서 인체에 해로운 low density lipoprotein(LDL)의 산화를 억제시키는 효과가 있다(7). Low density lipoprotein은 콜레스테롤을 운반에 전달시키는 역할을 하는데 이 LDL의 양이 많아져 산화가 일어나면 동맥 경화, 당뇨병, 성인병 등의 원인이 된다(8). 이를 방지하려면 콜레스테롤의 농도를 낮추어서 동맥에 지질이 침착되는 것을 막고 혈관세포의 기능을 유지시켜 줄 수 있다. 또한 glabridin은 피부에 중요한 영향을 끼치는

† Corresponding Author : Center for Advanced Bioseparation Technology and Dept. of Chem. Eng., Inha University, Incheon 402-751, Korea

Tel : +82-32-860-7470, Fax : +82-32-872-0959

E-mail : rowkho@inha.ac.kr

hydrophobic 한 물질 중의 하나로 피부 미백에 탁월한 효과를 지니고 있다. 따라서 최근 이러한 유용성 감초추출물을 원료로 하여 기능성 화장품을 제조하는 예가 증가하고 있다(9).

Glabridin은 체내에서 인체에 해로운 low density lipoprotein (LDL)의 산화를 억제시키는 항산화 효과가 있음이 많은 연구를 통해 밝혀지고 있다(10). 외국의 경우 동물에 의한 임상실험을 통해 Low density lipoprotein (LDL)의 항산화 효과의 효능을 확인하고 있다. 현재 국내에서는 거의 대부분 중국산 감초를 수입하여 사용하고 있는 실정이나, 최근에는 국내에서도 감초 재배에 성공을 하여 국산 감초의 연구를 가능케 하였다. 이를 바탕으로 천연물질에 대한 연구를 계속 한다면, 의약품과 함께 국내 화장품 원료 개발의 주요한 부분으로써 우리나라가 경쟁력을 가질 수 있는 부분이 될 것이다. 특히 우리나라 고부가가치의 생물분리공정 제품에 대한 국제 경쟁력의 우위, 정밀화학 및 의약품과 화장품에 관련된 산업분야의 활성화에 크게 기여할 것이며, 앞으로도 지속적인 특허출원이 예상된다.

본 연구의 목적은 주변에서 손쉽게 구할 수 있는 감초 중의 한 성분인 glabridin의 추출공정을 확립함으로써 이들 물질에 대한 상용공정의 기초 자료를 제공하고자 하는 것이다. 또한 액체크로마토그래피를 이용하여 glabridin의 최적 분리 조건을 찾아 앞으로의 이 분야 연구에 많은 도움을 주고자 한다.

**실 험**

**실험재료 및 시약**

본 연구에서는 중국 내몽고산 지방에서 재배, 건조되어 수입된 감초 (*Glycyrrhiza glabra*)를 구입하여 사용하였고, glabridin 표준시약 (97.0% 이상)은 Wako Pure Chemical Industries, Ltd. 제품을 사용하였으며, 구조식은 Fig. 1과 같다. 또한 추출시 사용된 메탄올, 에탄올, 에틸아세테이트 등은 Showa Chemical Inc. 특급시약을 사용하였고 HPLC 이동상으로 쓰인 아세토나이트릴 및 물은 Mallinckrodt (미국) 제품을 사용하였다.

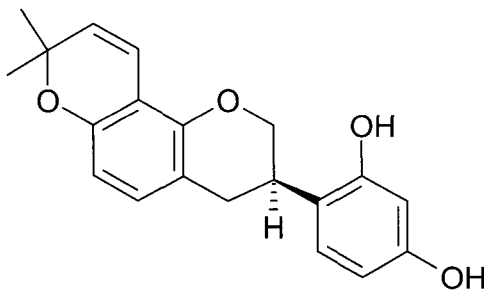


Figure 1. Structure of glabridin.

**감초의 표준시료**

Glabridin 표준시료 (97.0% 이상) 10 mg을 10 ml 메스플라스크에 취하여 메탄올로 녹여 표준원액을 제조하였다.

**추출 및 전처리**

감초 분말 20 g에 에틸아세테이트를 100 ml 첨가하여 실온에서 1시간동안 초음파 추출하였다. 이 추출액을 거름종이 (Advantec 5C)로 거른 후 감압 농축하여 용매를 증발시키고 메탄올에 녹여 20 ml로 정용하여 millipore 거름종이 (0.45µm)로 걸러 시험용액으로 하였다.

**실험 장치**

본 실험에서 glabridin을 분리하기 위해 사용된 HPLC는 Varian (미국) 제품으로 solvent delivery system은 ProStar 230 ternary gradient pump이며, 검출기는 ProStar 310 UV/VIS Detector, injection module은 ProStar 410 Autosampler를 사용하였고, data acquisition system은 Star LC workstation(Ver. 5.52)을 사용하였다. 또한 HPLC에서 분리한 glabridin 성분을 확인하기 위해서 LC/MS를 다음과 같은 조건에서 사용하였다. HPLC/MSD는 Agilent 1100 series (미국)로 quaternary pump, 검출기는 Diode Array Detector (DAD)를 사용하였으며, autosampler로 주입하여 Mass Selective Detector (MSD)로 확인하였다. Data acquisition system은 Agilent LC/MSD ChemStation Rev.A.08.03 (847)을 사용하였다.

실험은 에틸아세테이트 추출물과 표준원액을 각각 메탄올로 100배 희석하여 시험시료로 사용하였으며, 컬럼은 Varian C<sub>18</sub> 역상 컬럼 (Chrompack Omnispher 5 C<sub>18</sub>, 250×4.6 mm, 미국), 주입량 20 µl, 유속 1.0 ml/min에서 검출기 파장을 230 nm로 고정하여 이동상을 아세토나이트릴/물 및 메탄올/물을 사용하여 일정용매조성법으로 실험하였다.

**결과 및 고찰**

감초의 가장 많은 성분인 glabridin은 인체내의 LDL를 억제하는 데 중요한 역할을 하며 각종 성인병의 원인이 되는 콜레스테롤의 전달을 억제하기 때문에 향후 상업성이 매우 높은 물질이다. 또한 감초는 주변에서 쉽게 구할 수 있는 생약물질이기 때문에 현재 많은 연구가 진행되고 있다. 본 실험에서는 역상 컬럼을 이용하여 아세토나이트릴과 물을 이동상으로하여 glabridin의 분리실험을 하였다.

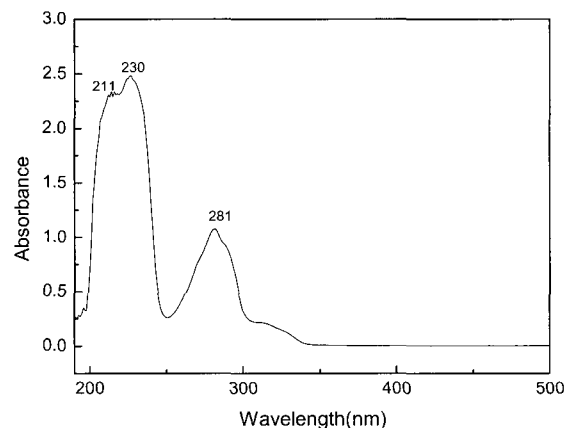


Figure 2. UV/VIS Spectrophotometer spectrum of glabridin standard.

Glabridin의 최대흡수 파장을 알아보기 위하여 표준원액을 메탄올로 100배 희석하고 다시 이 용액을 10배 희석하여 UV/VIS 흡수스펙트럼을 측정하였다. Fig. 2에서와 같이 glabridin은 210, 230, 280 nm부근에서 강한 흡수대를 보였다. 이 중 230 nm에서 가장 큰 흡광도를 나타내었으며, HPLC 분석조건에서 확인한 결과 UV/VIS 흡수스펙트럼 측정에서와 같이 230 nm에서 가장 큰 피크의 검출을 나타내었다. 따라서 본 실험의 HPLC를 이용한 모든 glabridin의 정량분석에 있어서 파장을 230 nm로 고정하였다.

본 실험에서는 감초뿌리 중 glabridin 성분을 추출하기 위해서 역상 컬럼을 이용하여 이동상 조성을 변화시켜 glabridin을 추출하였다. Glabridin의 가장 우수한 추출용매를 선정하기 위해서 메탄올, 에탄올, 아세톤 및 에틸아세테이트 등 4가지 용매를 사용하여 실온에서 1시간동안 초음파 추출을 하였으며, 각각의 용매로부터 추출된 추출액을 동일한 HPLC 조건으로 분석하여 실험결과를 Fig. 3에 나타냈다. 실험결과 glabridin 함량은 추출용매가 각각 에틸아세테이트일 때 1260.0 mg/kg, 에탄올 1213.4 mg/kg, 메탄올 990.2 mg/kg, 및 아세톤일 때 886.8 mg/kg으로 4가지 추출용매 중 glabridin에 대한 추출효율은 에틸아세테이트가 가장 높았으며, 아세톤에서 가장 낮았다. 또한 감초에 대해서 가장 높은 추출효율을 보인 에틸아세테이트에 대해서 초음파로 추출하였을 때와 실온에서 방치하였을 때 시간에 따른 추출 정도를 알아보기 위하여 1, 2, 4, 6 및 8시간동안 추출하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 실험결과 1시간 후 glabridin 함량은 초음파 추출에서 1289.7 mg/kg으로 실온에서 방치했을 때보다 더 높게 나타났으며, 2시간에서는 거의 비슷한 수준이었고 실온에서 4시간정도 방치하였을 경우 1282.0 mg/kg으로 1시간동안 초음파 후 추출된 glabridin 양과 비슷하게 나타났다. 8시간에서는 초음파 추출에서 876.7 mg/kg, 실온에서 방치한 경우에는 1357.7 mg/kg으로 481 mg/kg의 함량 차이를 보여 초음파 추출시간이 증가함에 따라 glabridin 추출량은 감소 추세를 보였고, 실온에 방치한 경우에는 반대로 시간이 경과함에 따라 더 많은 양의 glabridin이 추출되는 것으로 나타났다. 따라서 실온에서 오랜 시간 방치하여 추출하는 것보다 초음파로 1시간 동안 추출하는 것이 경제적인 측면을 고려해 볼 때 더 효과적이라 생각된다.

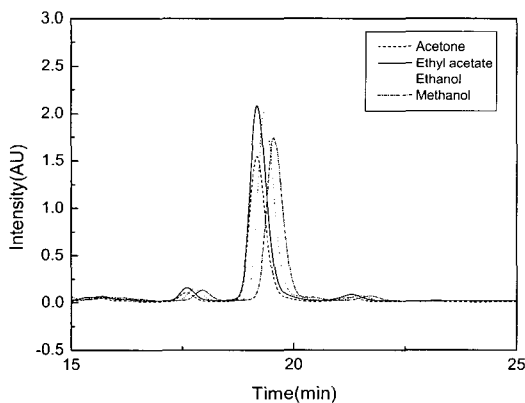


Figure 3. Comparison of chromatogram by extract solvent variation.

추출용매 중 glabridin에 대해서 가장 우수한 용해력을 보인 에틸아세테이트를 추출용매로 사용하여 감초뿌리로부터 추출한 추출액에서 glabridin을 분리하기 위하여 추출액을 C<sub>18</sub> (Varian, 미국) 역상 컬럼을 사용하여 HPLC에서 분리하였다. HPLC 분석조건은 검출파장 230 nm, 유속 1.0 ml/min, 주입량을 20 $\mu$ l로 고정하고 이동상 조성을 변화시켰다. 이동상으로 물과 메탄올을 사용하여 표준용액을 HPLC에서 분석한 결과 glabridin이 분리되지 않았으며 극성용매인 물과 아세트나이트릴을 이동상으로 하였을 때 glabridin이 잘 분리되었다. 이는 아세트나이트릴의 함량이 증가함에 따라 이동상의 극성이 감소되고 glabridin이 C<sub>18</sub> 표면에 흡착하여 glabridin이 더 잘 분리됨을 볼 수 있었다. 따라서 에틸아세테이트 추출액으로부터 glabridin을 추출하기 위하여 이동상으로 메탄올/물 대신에 아세트나이트릴/물을 이동상으로 하여 분리실험을 실시하였다.

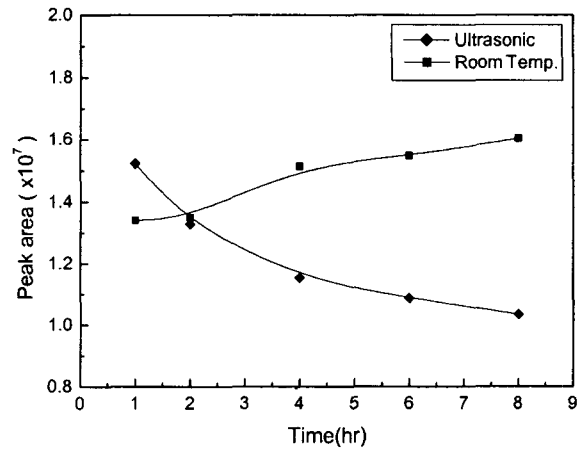


Figure 4. Comparison of the glabridin content by extraction time.

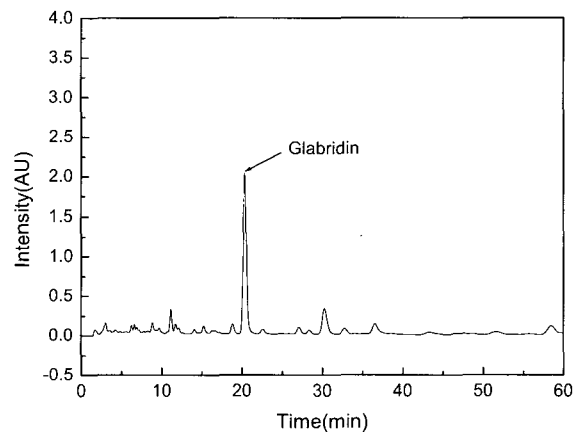


Figure 5. Separation of glabridin in ethyl acetate extract (acetonitrile/water, 50/50 vol. %).

Fig. 5는 이동상 조성이 아세트나이트릴/물 (50/50, vol. %) 이고 검출파장 230 nm, 유속 1.0 ml/min에서 추출액 20  $\mu$ l를 주입하여 분리하였을 때의 크로마토그램을 나타낸 것이다.

크로마토그램에서 기준선이 안정되고 주변 물질 피크와 glabridin의 분리가 잘 되었으며 20분대에서 분리되어 glabridin의 HPLC 최적 분석조건을 확립할 수 있었다. 또한 이동상 조성이 아세트나이트릴/물 (55/45, vol. %)일 때 glabridin은 약 13분대에 검출되었으나 완전히 분리되지 않았으며, 아세트나이트릴/물 (45/55, vol. %)일 때 glabridin은 약 31분대에서 완전히 검출되었지만 Fig. 5에서보다 검출시간이 약 10분정도 늦었다.

이상과 같이 에틸아세테이트로 추출하고 HPLC를 사용하여 분리한 시험용액을 LC/MS를 이용하여 분석조건에 따라 glabridin을 확인 및 검증하였다. 표준원액 및 에틸아세테이트 추출액을 100배 희석한 표준용액과 시험용액을 분석한 DAD 크로마토그램과 MSD 크로마토그램에 대한 결과를 Fig. 6, 7에 나타내었다. HPLC를 사용하여 분리한 glabridin을 표준원액과 비교 및 확인한 결과 glabridin이 HPLC 분리 조건에서 잘 분리되었음을 알 수 있었다.

따라서 본 실험에서는 추출용매로 에틸아세테이트를 사용하고 1시간동안 실온에서 초음파 추출하여 감초로부터 glabridin을 추출하였으며, 추출액을 HPLC의 분석조건에서 이동상으로 아세트나이트릴/물을 사용하여 순수한 glabridin을 분리할 수 있었다.

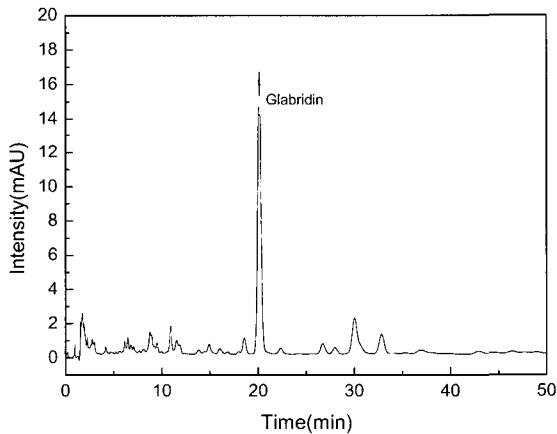


Figure 6. DAD Chromatogram of ethyl acetate extract.

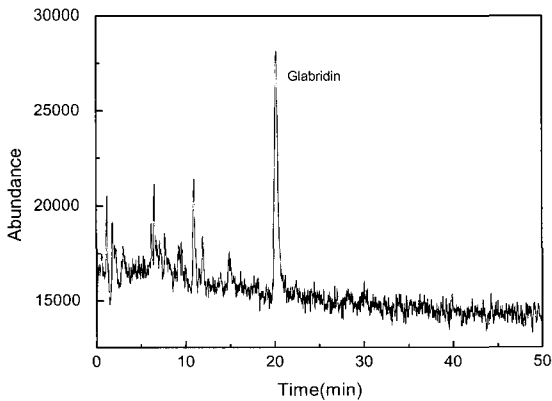


Figure 7. MSD Chromatogram of ethyl acetate extract.

## 요약

피부미백효과 및 항산화물질로 알려진 glabridin은 감초뿌리 (*Glycyrrhiza glabra*)에 포함되어 있는 성분으로서 추출 및 HPLC에 의한 분리에 관한 연구 결과는 다음과 같다. 용매에 따른 추출정도를 알기위하여 메탄올, 에탄올, 에틸아세테이트 및 아세톤 등 4가지 용매로 1시간동안 초음파 추출하여 HPLC에서 비교 분석하였다. 그 결과 에틸아세테이트의 추출 용매가 1260.0 mg/kg으로 가장 함량이 높았으며, 에탄올, 메탄올, 아세톤 순으로 나타났다. HPLC의 역상 컬럼에서 이동상의 조성을 아세트나이트릴/물 (50/50, vol. %)으로 사용했을 때 체류시간은 20.3분이었으며, 에틸아세테이트로 추출한 시험용액을 LC/MS로 확인하였다.

## 감사

본 연구는 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비지원에 의해서 수행되었습니다.

## REFERENCES

1. Tamir, S., M. Eizenberg, D. Somjen, S. Izael, and J. Vaya (2001), Estrogen-like activity of glabrene and other constituents isolated from licorice root, *J. Mol. Biol.* **78**, 291-298.
2. Hayashi, H., N. Hiraoka, Y. Ikeshiro, and H. Yamamoto (1996), Organ specific localization of flavonoids in *Glycyrrhiza glabra* L., *J. Plant Sci.* **116**, 233-238.
3. Akamatsu, H., J. Komura, Y. Asada, and Y. Niwa (1991), Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin : effect on neutrophil functions including reactive oxygen species generation, *J. Planta Med.* **57**, 119-121.
4. Hatano, T., Y. Aga, Y. Shintani, H. Ito, T. Okuda, and T. Yoshida (2000), Minor flavonoids from licorice, *Phytochemistry* **55**, 959-963.
5. Hansen, H. K., S. H. Hansen, M. Kraunsoe, and G. M. Petersen (1999), Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis methods for quantitative determination of glycyrrhizinic acid in pharmaceutical preparations, *J. Euro. Pham. Sci.* **9**, 41-49.
6. Vaya, J., P. A. Belinky, and M. Aviram (1997), Antioxidant constituents from licorice roots : isolation, structure elucidation and antioxidative capacity toward LDL oxidation, *J. Free Radic. Biol. Med.* **23**, 302-313.
7. Belinky, P. A., M. Aviram, B. Fuhrman, M. Rosenblat, and J. Vaya (1998), The antioxidativ effects of the isoflavan glabridin on endogenous constituents of LDL during its oxidation, *Atherosclerosis* **137**, 49-61.
8. Aviram, M. (1993), Modified forms of low density lipoprotein and atherosclerosis, *Atherosclerosis* **98**, 1-9.
9. Nishioka, K. and T. Seguchi (1999), Contact allergy due to oil-soluble licorice extracts in cosmetic products, *Contact Dermatitis* **40**, 56-61.
10. Borrelli, F. and A. A. Izzo (2000), The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies, *Phytother. Res.* **14**, 581-591.