

원산지별 감초추출물의 항산화활성 증가를 위한 효율적인 추출조건 탐색

하지훈·이혜미·권순식·김해수·김문진·전소하·정유민·황준필·박종호*·
최영기*·박진오*·박수남[†]·박동식^{**†}

서울과학기술대학교 정밀화학과 화장품종합기술연구소, *(주)대봉엘에스,
**농촌진흥청 국립농업과학원 농식품자원부 기능성식품과
(2013년 7월 1일 접수, 2013년 7월 4일 수정, 2013년 7월 10일 채택)

Screening of Effective Extraction Conditions for Increasing Antioxidant Activities of Licorice Extracts from Various Countries of Origin

Ji Hoon Ha, Hye Mi Lee, Soon Sik Kwon, Hae Soo Kim, Moon Jin Kim, So Ha Jeon, Yoo Min Jeong, Jun Pil Hwang,
Jong-Ho Park*, Yung-key Choi*, Jino Park*, Soo Nam Park[†], and Dong-Sik Park^{**†}

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and Technology,
232 Gongneungro, Nowon-gu, Seoul 139-743, Korea

*DAEBONG LS, Ltd, Incheon, Korea

**Functional Food & Nutrition Division, Department of Agrofood Resources, 160 Nokjiro, Gwonseon-gu,
Suwon, Gyeonggi-do 441-853, Korea

(Received July 1, 2013; Revised July 4, 2013; Accepted July 10, 2013)

요약: 본 연구에서는 한국 및 중국산 감초(*Glycyrrhiza uralensis*), 그리고 우즈베키스탄산 감초(*Glycyrrhiza glabra*)를 대상으로 추출용매, 추출온도, 추출시간 등 추출조건별 추출물을 제조하고 이들 추출물들의 추출 수율과 항산화 활성을 비교하여 최적의 추출조건을 선정하였다. 항산화 활성 중 자유 라디칼(1,1-phenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) 소거활성은 85% 에탄올로 60 °C에서 6 h 동안 추출한 조건에서 한국 감초로부터 얻은 추출물이 가장 높은 활성(46.05%)을 나타내었다. 루미놀 발광법을 이용한 추출물들의 총 항산화능 측정 실험과 피부 광노화에 중요한 ¹O₂으로 유도된 세포막 손상에 대한 추출물들의 세포 보호 효과를 측정한 실험 모두에서도 위의 조건에서 가장 높은 항산화 활성을 나타내었다. 특히, 한국 감초는 τ_{50} 이 116.4 min으로 비교 물질인 (+)- α -tocopherol (28.5 min)보다 약 4 배나 높은 세포 보호 효과를 나타내었으며, 추출 수율은 18.75%로 우즈베키스탄 및 중국 감초보다 각각 1.2 배 및 2.5 배의 추출 수율을 나타내었다. 따라서, 본 연구 결과는 항산화 소재로 화장품에 응용하기 위하여 감초로부터 추출물을 얻기 위한 최적의 조건은 85% 에탄올로 60 °C에서 6시간 동안 추출하는 것임을 보여주었다.

Abstract: In this work, licorice extracts were prepared using various extraction conditions such as extraction solvent, temperature, and time from *Glycyrrhiza uralensis* (*G. uralensis*) produced in Korea and China and *Glycyrrhiza glabra* (*G. glabra*) in Uzbekistan. The optimum extraction condition was selected from the extraction yields and antioxidative activities of extracts. Korea licorice extracts showed the highest free radical (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH) scavenging activity (46.05%) under the extraction condition of 85% ethanol at 60 °C for 6 hours. The prominent ROS (reactive oxygen species) scavenging activity using luminol-dependent chemiluminescence assay and the cellular protective effect against ¹O₂ induced cellular membrane damage were also shown from the extracts obtained from the same

† 주 저자 (e-mail: dpark@korea.kr, snpark@seoultech.ac.kr)

condition. Especially, Korea *G. uralensis* extracts exhibited the higher prominent protective effect ($\tau_{50} = 116.4$ min) than (+)- α -tocopherol ($\tau_{50} = 28.5$ min) and the extraction yield of Korea licorice extract was 18.75%, which is 1.2 times and 2.5 times higher than that of Uzbekistan and China, respectively. These results indicate that the extraction condition of 85% ethanol at 60 °C for 6 hours is optimal to prepare licorice extracts, which can be applicable as anti-oxidative cosmetic materials.

Keywords: *Glycyrrhiza uralensis*, *Glycyrrhiza glabra*, DPPH assay, luminol chemiluminescence assay, cellular protective effect

1. 서 론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 노화, 특히 피부노화의 원인 물질로 작용하고 있다. ROS는 정상적인 대사과정에서도 생성되며, 질병상태나 스트레스를 받을 때는 과잉으로 생성된다. 특히 피부는 자외선에 노출되어 있어 ROS를 만드는 광화학적 반응들이 계속해서 일어나고 있다. 또한 흡연, 공해 및 세균 감염 등도 ROS를 생성시킨다[1-3].

피부 세포 및 조직 손상을 주도하는 것은 반응성이 가장 큰 $^1\text{O}_2$ 와 $\cdot\text{OH}$ 등을 비롯한 ROS이다. 이들은 항산화효소와 비효소적 항산화제들로 구성된 항산화 방어망을 파괴함으로써 산화제/항산화제 균형을 산화상태 쪽으로 기울게 한다. 결과적으로 계속된 산화적 스트레스는 지질 과산화, 단백질 산화, 간질 성분을 파괴시키는 단백질분해효소의 활성화, 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합, 히알루론산 사슬의 절단, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화와 같은 생체 구성 성분들의 손상을 야기한다. 결국에는 탄력감소, 주름살 및 기미·주근깨 등으로 특징지어지는 피부노화가 가속화된다. 따라서 피부노화를 지연시키고 억제하기 위해서는, 생체 내 뿐만 아니라 피부에서 과잉의 ROS 생성을 억제하고 또한 생성된 ROS를 효율적으로 제거할 수 있는 항산화 방어시스템의 구축이 필요하다[4-7].

감초는 콩과 식물에 속하는 다년생 초본으로 아시아계에서 한약재로 많이 이용되는 약용 식물로 알려져 있다[8,9]. 현재 우리나라에서 이용되는 감초는 크게 두 종류(*G. uralensis* 및 *G. glabra*)가 있다. 국내에서 재배되는 감초(*G. uralensis*)는 식품분야에서 주로 사용되는 것으로 알려져 있고, 약용 및 식품에서 이용되는 대부분의 감초는 중국산(*G. uralensis*)인 것으로 보고되고 있다. 최근 우즈베키스탄 감초(*G. glabra*)도 그 수입량이 증가하는 추세에 있다. 감초의 주성분으

로는 glycyrrhizin이 알려져 있고, liquiritin 및 isoliquiritin 등의 플라보노이드 배당체, 그리고 아이소플라보노이드인 licoricidin 등이 보고되고 있다. 우즈베키스탄 감초인 *G. glabra*에는 glabridin 성분이 함유되어 있다[10,11]. 감초는 항산화, 면역 증강 및 항균 효과 등이 있는 것으로 보고되고 있다[12-14].

본 연구에 앞서 저자들은 원산지별(한국, 중국 및 우즈베키스탄) 감초의 항산화활성을 측정하여 비교 분석한 바 있다. Free radical 소거활성을 측정한 결과, 한국 감초는 50% 에탄올 추출물(21.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 에틸아세테이트 분획(29.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 아글리콘 분획(3.26 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 모두에서 중국 및 우즈베키스탄 감초보다 높은 항산화활성을 나타냈다. 또한 $^1\text{O}_2$ 으로 유도된 세포 손상 실험에서도 한국 감초추출물의 아글리콘 분획(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 세포보호 활성($\tau_{50} = 847.4$ min)은 동일한 종(*G. uralensis*)인 중국 감초($\tau_{50} = 194.3$ min)보다 약 4 배 이상 더 높은 세포보호 효과를 나타내었다[15]. 이어서 저자들은 원산지별 감초추출물에 대하여 피부 상재균(*P. acnes*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* 및 *E. coli*)에 대한 항균활성을 측정하였다. 항균활성을 측정된 결과 감초추출물의 에틸아세테이트 분획에서 여드름균(*P. acnes*)에 대한 최소저해농도(MIC)가 한국 감초의 경우는 156 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였고 중국과 우즈베키스탄은 각각 625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 및 2,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 한국 감초의 에틸아세테이트 분획이 중국 및 우즈베키스탄 감초보다도 각각 4 배, 16 배 높은 항균활성이 있음을 알았고, 화장품에서 방부제로 사용되는 methyl paraben (2,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다도 높은 항균활성이 있음을 확인하였다. 또한 다른 균에 대해서도 한국 감초추출물은 보다 높은 항균활성을 나타내었다. 따라서 한국 감초 에틸아세테이트 분획은 항여드름 제제에 또는 파라벤류를 대체할 수 있는 천연 방부제로서의 가능성이 있음을 알 수 있었다[16]. 이어서 저자들은 항산화 및 항균활성이 우수한 한국산 감초추출물을 제품에 응용하기

위하여 감초추출물 에틸아세테이트 분획을 함유한 크림을 제조하고 이 크림에 대하여 온도별 저장 조건과 태양광선 하에서의 총 12주 동안 제품 안정성(pH, 점도, 흡광도 및 색도 변화)을 평가하였다. 제품 안정성 평가 결과, 감초추출물은 제품에서 안정성을 나타냈으며, 온도 및 태양광선 하에서 일부는 제품의 안정화에도 기여함을 알 수 있었다[17].

감초와 같이 다양한 생리활성을 갖는 성분들을 함유하고 있는 식물로부터 제품에 응용하기 위한 추출물을 제조할 때는, 추출물의 수율, 생물활성을 나타내는 유효 성분의 양 및 효능에 미치는 영향이 크기 때문에 재배 지역, 채취 시기, 추출조건 및 방법 등이 고려되어야 한다[18-20]. 본 연구에서는 감초추출물을 화장품의 소재로 이용할 목적으로, 항산화활성이 우수한 추출물을 얻기 위한 추출조건을 확립할 목적으로 원산지별(한국, 중국 및 우즈베키스탄), 추출용매별(30% 및 85% 에탄올), 추출온도별(40 °C 및 60 °C), 추출시간별(6 h 및 12 h) 조건으로 감초추출물을 제조하고 각각의 조건별 추출물에 대하여 추출 수율 및 항산화활성을 측정함으로써 수율과 항산화활성이 가장 우수한 최적의 추출조건을 확립하였으며 이를 보고하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

Free radical 소거활성에 사용한 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical과 화학발광 실험에 사용한 luminol과 EDTA, 적혈구 광용혈 실험에서 광증감제로 사용된 rose-bengal 및 비교물질로 사용된 (+)- α -tocopherol과 L-ascorbic acid는 Sigma (USA)에서 구입하였다. 또한 화학발광 실험에 사용한 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan)에서, H_2O_2 는 Daejung Chemical & Metals (Korea)에서 구입하였다. 완충 용액 제조에 사용된 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl 그리고 에탄올, 에틸아세테이트, n-헥산 등 각종 용매는 시판 특급 시약을 사용하였다. UV-VIS spectrophotometer는 Varian (Australia), 화학발광 실험에 사용된 6-channel LB9505 LT는 Berthold (Germany)사의 제품을 사용하였다. Milton Roy Co. (USA)의 Spectronic 20D는 적혈구 광용혈 실험에 사용되었으며 pH meter는 Hanna

(Korea)사 제품을 사용하였다.

2.2. 추출 조건별 감초추출물 제조

실험에 사용된 원산지별 감초는 제천에서 재배된 한국 감초(*G. uralensis*), 수입된 중국 감초(*G. uralensis*) 및 우즈베키스탄 감초(*G. glabra*)로, 추출용매별(30% 및 85% 에탄올 용액), 온도별(40 °C 및 60 °C)와 시간별(6 h 및 12 h) 조건으로 추출된 것을 동결건조하여 얻은 총 24개의 추출물을 (주)대봉엘에스로부터 제공받아 실험에 사용하였다. 각각의 추출 조건에 따라 A부터 H까지 총 8개의 군으로 분류하였고, 각 군에는 나라별(한국, 우즈베키스탄, 중국) 감초추출물이 포함되어 있다(Table 1).

2.3. 감초추출물의 항산화 효과 측정

2.3.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거활성

DPPH법은 시료의 라디칼 소거 능력을 확인할 수 있는 실험법으로서, 비교적 안정한 라디칼인 DPPH에 대한 전자 주개를 통하여 시료의 환원력을 측정한다. 실험 방법은 메탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 1 mL에 에탄올 1 mL를 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 추출조건별 감초추출물 1 mL를 첨가하여 섞은 후 실온에서 10 min 동안 반응시킨 다음 spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 감초추출물을 첨가하지 않았고, 공시험(blank)은 DPPH를 첨가하지 않고 시료의 영향을 보정하였다. 라디칼 소거활성은 다음 식에 의해 DPPH의 농도를 감소시키는 시료의 저해율(%)로 표기하였다.

$$\text{Inhibition (\%)} = \left\{ 1 - \left[\frac{(A_{\text{Experiment}} - A_{\text{Blank}})}{A_{\text{Control}}} \right] \right\} \times 100$$

2.3.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거활성(총항산화능)

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계는 각종 ROS ($\text{O}_2^{\cdot-}$, $\cdot\text{OH}$ 그리고 H_2O_2)를 생성시키며 철과 같은 전이금속은 특히 반응성이 큰 $\cdot\text{OH}$ 를 생성시키는데 중요한 역할을 한다. 이 실험에서는 이러한 ROS에 의해 루미놀이 나타내는 빛을 화학발광기로 검출하여 측정하였다. 실험 방법은 화학발광 측정용 튜브에 증류수 1.78 mL를 넣고 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 추출조건별 감초추출물을 50 μL 첨

Table 1. Conditional Extracts of Licorices (Various Countries, Time, Temperature, and Solvent)

Group	Sample	Extraction Condition			
		Country	Extraction time (h)	Extraction temperature (°C)	Extraction solvent
A	1	Korea	6	40	30% EtOH
	2	Uzbekistan			
	3	China			
B	1	Korea	12	60	30% EtOH
	2	Uzbekistan			
	3	China			
C	1	Korea	6	60	30% EtOH
	2	Uzbekistan			
	3	China			
D	1	Korea	12	60	30% EtOH
	2	Uzbekistan			
	3	China			
E	1	Korea	6	40	85% EtOH
	2	Uzbekistan			
	3	China			
F	1	Korea	12	60	85% EtOH
	2	Uzbekistan			
	3	China			
G	1	Korea	6	60	85% EtOH
	2	Uzbekistan			
	3	China			
H	1	Korea	12	60	85% EtOH
	2	Uzbekistan			
	3	China			

가한 후, 2.5 mM EDTA 40 μ L, 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 μ L, 35 mM 루미놀 80 μ L를 넣고 섞은 후 5 min 동안 항온시켰다. 그 후 Fenton 반응을 일으키기 위해 150 mM H₂O₂ 40 μ L를 넣고 25 min 동안 화학발광 정도를 측정하였다. 대조군(control)은 추출물 대신 증류수를 첨가하였고, 공시험(blank)은 FeCl₃ · 6H₂O와 H₂O₂ 대신 증류수를 첨가하였다. 활성산소 소거활성은 다음 식에 의해 화학 발광의 세기를 감소시키는 저해율(%)로 표기하였다.

$$Inhibition (\%) = \frac{(Control\ 의\ cpm - Sample\ 의\ cpm)}{(Control\ 의\ cpm - Blank\ 의\ cpm)} \times 100$$

2.4. Photohemolysis법을 이용한 세포보호 효과 측정

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

적혈구는 건강한 성인 남녀 3명으로부터 채혈하였고, 즉시 heparin이 첨가된 시험관에 넣었다. 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 혈구와 혈장을 분리하

였고, 분리한 혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9.6 mM, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.6 mM)로 3회 반복해서 세척하여 원심분리하고 흰 색의 백혈구 층은 제거하였다. 분리한 적혈구는 4 °C의 냉장고에 보관하면서 사용하였고, 모든 실험은 채혈 후 12 h 이내에 행하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O.D. 값이 0.6이었으며, 이때 적혈구 수는 1.5×10^7 cells/mL이었다.

2.4.2. 감초추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후 DPPH법과 루미놀 발광법에서 우수한 항산화 효능을 보인 G군(No. 4, 12, 20)의 추출물 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 50 μL 씩 첨가한 후 암소에서 30 min 동안 pre-incubation시켰다. 그 후 광증감제로 사용된 10 μM rose-bengal 0.5 mL를 가하고 12 min 동안 광조사하여 광증감 반응을 일으켰다. 12 min의 광조사가 끝난 후 암반응 시간에 따른 적혈구의 용혈 정도를 15 min 간격으로 700 nm에서 투광도(transmittance, %)를 측정하였다. 이 700 nm의 파장에서 적혈구 현탁액의 투광도 증가는 적혈구의 용혈 정도에 비례하였다. 모든 실험은 20 °C 항온을 유지하며 진행하였다. 데이터는 다음 식에 의해 적혈구의 50%가 용혈되는데 걸리는 시간인 τ_{50} 으로 나타내었다. 대조군(control)은 τ_{50} 이 28.5 min으로 오차범위 ± 0.3 min 이내로 모든 경우의 실험에서 재현성이 양호하게 나타났다. Rose-bengal을 첨가하고 광조사를 안 했을 경우와 Rose-bengal을 첨가하지 않고 광조사만 했을 경우는 모두 암반응 120 min까지는 용혈이 거의 일어나지 않았다. 모든 실험은 3회 반복하여 평균하였다.

$$\text{Relative protective effects} = \frac{\text{Sample } \tau_{50}}{\text{Control } \tau_{50}}$$

3. 결과 및 고찰

3.1. 추출조건별 감초 추출물의 수득율

건조한 원산지별(한국, 중국, 우즈베키스탄) 감초 전초로부터 600 g을 잘게 잘라 추출 용매(30% EtOH 및 85% EtOH) 12 kg에 넣고 온도별(40 °C 및 60 °C), 시간별(6 h 및 12 h)로 달리하여 침적시킨 후 추출하

여 감압 여과한 후 총 24개의 추출물 파우더를 얻었다 (Table 1). 모든 파우더는 (주)대봉엘에스에서 제공받아 사용하였고, 이때 수득율은 아래의 식으로 계산하였다(Table 2).

$$\text{Yield (\%)} = \frac{\text{Dry Extract (g)}}{\text{Raw Material (g)}} \times 100$$

추출 조건별 감초추출물의 추출 수율은 5.67%로부터 21.95%에 이르기까지 다양한 추출 수율을 나타내었다. 30% 에탄올 추출물의 평균 추출 수율은 16.12%로 85% 에탄올 추출물(11.81%)보다 추출 수율이 4.31% 높게 나타났다. 이는 극성 추출물이 비극성 추출물보다 더 많이 추출된 결과로 보인다. 항산화활성과 더 밀접한 관련이 있는 85% 에탄올 추출물에서는 보다 높은 온도인 60 °C에서의 수율(12.99%)이 40 °C에서의 수율(10.63%)보다 약간 높게 나타났다. 또한 같은 85% 에탄올 추출물에서 추출시간별 추출 수율은 6 h 추출 시 12.11%이고 12 h 추출 수율은 11.50%로 비슷한 수율을 나타내었다.

3.2. 추출조건별 감초추출물의 항산화활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 자유라디칼 소거활성

피부가 자외선에 노출되어 생성되는 ROS 중에는 $\cdot\text{OH}$, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 과 같은 라디칼 종이 포함되어 있다. 이러한 라디칼 종은 짝을 이루지 않은 홀 전자를 가지고 있기 때문에 에너지가 높고 반응성이 크다. 이러한 불안정한 라디칼 종과 이온에 의해 생성된 ROS는 자동산화 반응을 개시한다. 자동산화 반응이 개시되면, 생체 내의 지질, 단백질 및 DNA 등의 산화를 통하여 피부 노화가 일어나게 된다. (+)- α -tocopherol, flavonoid 등과 같은 항산화제는 ROS 및 이온 유도된 지질 라디칼에 의해 개시된 지질과산화 연쇄 반응에서 라디칼에 수소 주개로 작용하여 연쇄반응을 종결시킨다. 때문에 라디칼 소거활성은 이러한 피부노화를 막는 중요한 요인이다. 이와 같이 라디칼 소거 능력을 확인하기 위하여 추출조건별 감초추출물과 DPPH를 반응시켰으며 비교 물질로는 (+)- α -tocopherol을 사용하였다.

원산지별(한국, 우즈베키스탄, 중국) 감초에 대해 추출용매별(30% 및 85% 에탄올), 온도별(40 °C 및 60 °C), 추출시간별(6 h 및 12 h) 추출조건을 달리하여 동

Table 2. Yields Obtained from Extraction Conditions

Sample	Extraction condition	Raw material (g)	Solvent (g)	Extract (g)	Dry Extract (g)	Yield (%)
A-1	Korea, 30% EtOH, 40 °C, 6 h	600	12,000	11,047	93.00	15.50%
A-2	Uzbekistan, 30% EtOH, 40 °C, 6 h	600	12,000	11,448	108.39	18.07%
A-3	China, 30% EtOH, 40 °C, 6 h	600	12,000	11,113	103.19	17.20%
B-1	Korea, 30% EtOH, 40 °C, 12 h	600	12,000	11,261	119.11	19.85%
B-2	Uzbekistan, 30% EtOH, 40 °C, 12 h	600	12,000	11,252	104.01	17.34%
B-3	China, 30% EtOH, 40 °C, 12 h	600	12,000	10,926	106.67	17.78%
C-1	Korea, 30% EtOH, 60 °C, 6 h	600	12,000	11,239	82.00	13.67%
C-2	Uzbekistan, 30% EtOH, 60 °C, 6 h	600	12,000	11,294	131.67	21.95%
C-3	China, 30% EtOH, 60 °C, 6 h	600	12,000	10,984	77.37	12.90%
D-1	Korea, 30% EtOH, 60 °C, 12 h	600	12,000	11,137	55.00	9.17%
D-2	Uzbekistan, 30% EtOH, 60 °C, 12 h	600	12,000	11,119	64.04	10.67%
D-3	China, 30% EtOH, 60 °C, 12 h	600	12,000	10,936	115.80	19.30%
E-1	Korea, 85% EtOH, 40 °C, 6 h	600	12,000	11,717	69.00	11.50%
E-2	Uzbekistan, 85% EtOH, 40 °C, 6 h	600	12,000	11,624	80.00	13.33%
E-3	China, 85% EtOH, 40 °C, 6 h	600	12,000	11,652	34.00	5.67%
F-1	Korea, 85% EtOH, 40 °C, 12 h	600	12,000	11,359	72.00	12.00%
F-2	Uzbekistan, 85% EtOH, 40 °C, 12 h	600	12,000	11,577	44.50	7.42%
F-3	China, 85% EtOH, 40 °C, 12 h	300	6,000	5,717	41.50	13.83%
G-1	Korea, 85% EtOH, 60 °C, 6 h	600	12,000	11,311	112.50	18.75%
G-2	Uzbekistan, 85% EtOH, 60 °C, 6 h	600	12,000	11,438	95.50	15.92%
G-3	China, 85% EtOH, 60 °C, 6 h	600	12,000	11,439	45.00	7.50%
H-1	Korea, 85% EtOH, 60 °C, 12 h	600	12,000	11,265	114.00	19.00%
H-2	Uzbekistan, 85% EtOH, 60 °C, 12 h	600	12,000	11,328	46.50	7.75%
H-3	China, 85% EtOH, 60 °C, 12 h	300	6,000	5,595	27.00	9.00%

일한 농도인 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 추출조건별 감초추출물의 자유 라디칼 소거활성을 비교하고 그 결과를 나타내었다(Figure 1). 85% 에탄올 추출물(E, F, G, H군)이 30% 에탄올 추출물(A, B, C, D군)보다도 전반적으로 free radical 소거활성이 훨씬 더 높게 나타났다. 한국 감초의 경우, 85% 에탄올 추출조건에서 6 h 추출군인 E-1, G-1이 각각 41.84%, 46.05%의 라디칼 소거활성(%)을 나타낸 반면, 12 h 추출군(F-1, H-1)에서는 각각 19.38%, 38.54%의 소거활성을 나타냈다. 위의 자유라디칼 소거활성(%) 비교 평가를 통해 한국 감초는 85%

에탄올 용매에 온도가 높고(60 °C), 추출시간이 비교적 짧을수록(6 h) 우수한 소거활성(추출 조건: G군)을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 우즈베키스탄 감초의 경우 85% 에탄올 추출군에서 40 °C 추출군인 E-2, F-2가 각각 37.32%, 44.44%의 소거활성을 나타냈고, 60 °C 추출군인 G-2, H-2는 각각 26.93%, 72.34% 소거활성을 나타냈다. 이를 통해 우즈베키스탄 감초는 85% 에탄올 추출군에 대하여 같은 온도조건하에서 추출시간이 증가함에 따라 라디칼 소거활성이 증가함을 확인할 수 있었다. 중국산 감초의 경우 85% 에탄올

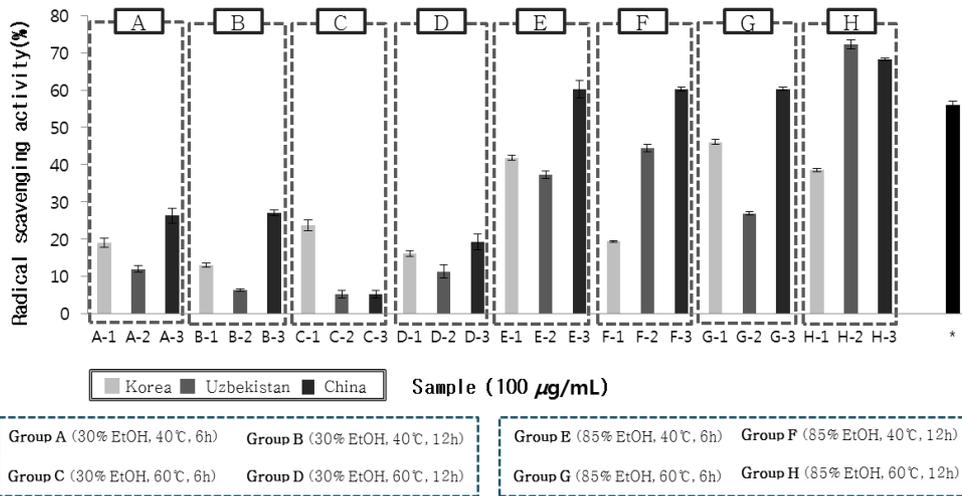


Figure 1. Free radical scavenging activities of extracts of *G. uralensis* (from Korea and China), *G. glabra* (from Uzbekistan) and reference.

Reference (*); (+)- α -tocopherol (radical scavenging activity = $56 \pm 1.1\%$)

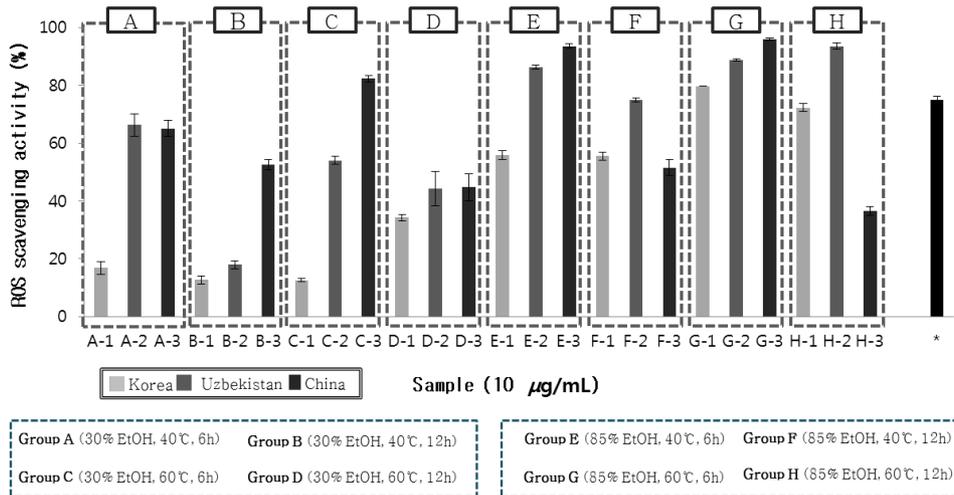


Figure 2. Reactive oxygen species scavenging activities of extracts of *G. uralensis* (from Korea and China), *G. glabra* (from Uzbekistan) and reference.

Reference(*); L-ascorbic acid (ROS scavenging activity = $75 \pm 1.2\%$)

추출군에 대하여 E-3, F-3, G-3, H-3가 각각 60.20%, 60.31%, 60.29%, 68.29%로 유사한 소거활성을 나타냈다.

결론적으로 free radical 소거활성에서 한국산 감초의 가장 적합한 추출조건은 G군(85% EtOH, 60 °C 및 6 h)임을 확인하였다. Figure 2는 추출조건이 비교적 양호한 E, F, G, H 조건에서 한국산 감초가 중국이나 우즈베키스탄 감초보다도 free radical 소거활성이 비

교적 낮은 이유는 실험에 사용한 감초 원재료의 상태에 기인된 것으로 간주된다. 추출조건별 항산화활성 측정에 사용한 한국 감초는 재배 지역 제천에서 제공 받은 원재료 상태 그대로 추출물을 제조하였다. 제천 감초는 중국이나 우즈베키스탄 감초와는 달리 잔가지가 너무 많고 감초의 크기도 매우 작았으며 색상도 중국과 우즈베키스탄 감초와는 차이가 많이 났다. 이런 이유로 한국산 감초추출물의 항산화활성이 본 연구에

앞서 저자들이 보고한 결과와는 차이는 것으로 보인다. 본 연구에 앞서 보고한 한국 감초, 중국 감초 및 우즈베키스탄 감초의 추출물 및 분획에 대한 항산화 활성 비교 측정에서는 라디칼 및 활성산소 소거활성에 있어서 한국 감초가 중국 및 우즈베키스탄 감초보다도 월등한 항산화활성을 나타냈었다[15]. 이때 저자들은 한국산 감초에서 잔가지를 제거하여 한국 감초 상태를 중국 및 우즈베키스탄 감초와 유사한 상태로 표준화시켜서 사용하였었다.

3.2.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어서 활성산소 소거활성(총항산화능)

Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에서는 Fe^{3+} 에 의해 촉매되는 Fenton 반응을 통해 $\cdot OH$, $O_2^{\cdot -}$, H_2O_2 와 같은 ROS가 생성된다. 활성산소에 의해 루미놀이 산화되면 루미놀은 들뜬 상태로 되고 이어서 바닥 상태로 떨어지면서 발광을 일으킨다. 이 실험에서는 다양한 종류의 활성산소가 생성되기 때문에 이들 활성산소종들에 대한 총항산화능을 측정할 수 있다. 추출조건별 감초추출물의 총 항산화능을 알기 위해 루미놀의 화학발광 정도를 측정하여 ROS 소거활성(총항산화능)을 확인하였다. Figure 2은 추출조건별 감초추출물 총 24종의 ROS 소거활성을 보여주고 있다. 다시 말해 원산지별(한국, 우즈베키스탄 및 중국) 감초에 대한 추출조건으로는 추출용매별(30% 및 85% 에탄올), 온도별(40 °C 및 60 °C), 시간별(6 h 및 12 h)로, 각 샘플 농도는 10 $\mu g/mL$ 에서 총항산화능을 측정한 결과이다. 전반적으로 DPPH법에서와 같이 85% 에탄올 추출군(E-H군)이 30% 에탄올 추출군(A-D군)보다 우수한 활성산소 소거활성을 나타냈다. 특히 G군(G-1, G-2 및 G-3)의 원산지별 감초추출물 모두는 다른 군에 비하여 가장 높은 활성산소 소거활성을 나타내었다. 즉, G-1(한국), G-2(우즈베키스탄) G-3(중국)의 경우 각각 79.76%, 88.69%, 95.89%의 활성산소 소거활성을 나타냈다. 이는 비교물질인 L-ascorbic acid의 ROS 소거활성인 75%와 비교해도 보다 더 높은 소거활성임을 보여주고 있다. 결론적으로 free radical 소거활성에서와 같이, 총항산화능 측정에서도 한국산 감초의 가장 적합한 추출 조건은 G군(85% EtOH, 60 °C 및 6 h)임을 확인하였다. 앞에서 나온 DPPH 결과와 마찬가지로 총항산화능 측정에서도 한국산 감초가 중국과 우즈베키스탄 감초에

비하여 그 활성이 비교적 낮은 이유는 한국산 감초의 상태가 중국과 우즈베키스탄 감초에 비하여 양호하지 못한 결과와도 일치하는 것으로 판단된다. 한국산 감초도 수입산에 대하여 경쟁력을 갖기 위해서는 적어도 외관상 상태라도 유사하게 원재료를 관리할 경우 저자들이 이미 보고한 연구에서와 같이 더 우수한 효과를 가져올 수 있을 것으로 생각된다[15].

3.3. 1O_2 로 유도된 사람 적혈구 파괴에 대한 추출 조건별 추출물의 세포보호 효과

사람 적혈구 세포를 이용하여 활성산소(1O_2)로 유도된 산화적 세포 손상은 천연물 등의 소재에 대한 세포 수준에서의 활성산소에 대한 세포보호 효과(항산화능)를 평가하는데 매우 적합한 모델로 평가받고 있다 [1-4]. 특히 생체에는 porphyrin이나 riboflavin과 같은 광증감제가 존재하며, 이러한 광증감제는 자외선 노출시 광증감반응(photosensitization)이라고 하는 광화학적 반응이 일어나 주 활성산소인 1O_2 를 비롯하여 다양한 종류의 ROS 생성을 유발시킨다. 특히 1O_2 는 반응성이 매우 큰 산화제로서 자외선을 받은 피부에서 주로 생성되지만, 생체 내에는 이를 처리할 수 있는 효소는 존재하지 않는다. 1O_2 는 일차적으로 비효소적 항산화제를 파괴하여 피부 항산화 방어체계를 무너뜨리며 또한 세포막에 침투하여 지질 또는 세포막 구성 성분들의 자동산화 반응을 개시시킨다. 이러한 연쇄반응으로 인하여 세포는 파괴되고 피부노화는 가속화된다. 따라서 본 실험에서는 rose-bengal의 광증감반응으로 생성된 1O_2 로 유도된 세포 손상에 있어서 추출 조건별 감초추출물이 어느 정도 세포보호 작용이 있는지 세포 수준에서의 항산화능을 평가 비교하였다. 추출조건별 감초추출물의 비교물질로서 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol을 사용하였다. 실험에 사용된 시료의 농도는 10 $\mu g/mL$ 로 하였다. 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})으로 나타내어 추출물 간 비교하였다(Table 3). 이 값은 시료의 세포보호 활성이 높을수록 큰 값을 나타낸다. 시료를 넣지 않은 대조군의 경우 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간은 약 28.5 ± 0.3 min으로 재현성은 양호하게 나타났다. DPPH법과 루미놀 화학발광법을 통해 확인한 최적의 항산화 효능을 갖는 G군 추출조건(G-1, G-2, G-3)에서 한국, 우즈베키스탄 및 중국 감초

Table 3. Cellular Protective Effects of Extracts from *G. wralensis* (from Korea and China) and *G. glabra* (from Uzbekistan) and Reference on the Rose-bengal Sensitized Photohemolysis of Human Erythrocytes

τ_{50} (Half time of hemolysis*)			
G-1 (Korea)	G-2 (Uzbekistan)	G-3 (China)	(+)- α -Tocopherol
116.4 (\pm 3.3)	142.3 (\pm 2.1)	141.6 (\pm 1.1)	38.00 (\pm 1.80)

*Control (τ_{50} = 28.5 \pm 0.3 min)
 Concentration of extracts and reference = 10 μ g/mL

에 대하여 $^1\text{O}_2$ 로 유도된 사람 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과를 확인하였다. G군의 추출조건별 감초추출물 한국, 우즈베키스탄 및 중국 감초는 10 μ g/mL의 농도에서 τ_{50} 이 116.4, 142.3 및 141.6 min으로 나타났으며, 이는 비교물질로 사용된 (+)- α -tocopherol 보다 각각 4.08 배, 4.99 배, 4.96 배로 활성산소($^1\text{O}_2$)로 유도된 세포 손상에 있어서 우수한 세포보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 감초추출물을 화장품의 소재로 이용할 목적으로, 항산화활성이 높은 추출물을 얻기 위한 추출 조건을 확립할 목적으로 원산지별(한국, 중국 및 우즈베키스탄), 추출용매별(30% 및 85% 에탄올), 추출온도별(40 $^{\circ}\text{C}$ 및 60 $^{\circ}\text{C}$), 추출시간별(6 h 및 12 h) 조건으로 감초추출물을 제조하고 각각의 조건별 추출물에 대하여 추출 수율 및 항산화활성을 측정함으로써 수율과 항산화활성이 가장 높은 최적의 추출 조건을 확립하였다.

1) 추출 조건별 감초추출물의 추출 수율은 5.67 ~ 21.95%의 범위를 나타내었으며, 30% 에탄올 추출물의 평균 추출 수율은 16.12%로 85% 에탄올 추출물(11.81%)보다 4.31% 높게 나타났다. 특히 항산화활성 실험에서 최적의 추출 조건으로 선정된 G군의 한국 감초의 추출물 수율은 18.75%로 매우 높은 추출 수율을 나타내었다. 기타 온도별 및 추출 시간별로 측정된 수율에서는 비슷한 추출 수율을 나타내었다.

2) 추출 조건별 free radical 소거활성 측정에서는 85% 에탄올 추출물(E, F, G, H군)이 30% 에탄올 추출물(A, B, C, D군)보다도 전반적으로 free radical 소거활성이 훨씬 더 높게 나타났다. 이는 항산화활성을 나

타내는 성분들이 비교적 비극성이 강한 85% 에탄올에 잘 용해되는데 기인된 것으로 간주된다. 실험결과 free radical 소거활성에서 한국산 감초의 가장 적합한 추출 조건은 G군(85% EtOH, 60 $^{\circ}\text{C}$ 및 6 h)임을 확인하였다.

3) 루미놀 발광법을 이용한 Fe^{3+} -EDTA/ H_2O_2 계에 있어 활성산소 소거활성(총항산화능, %)은 DPPH법에서와 같이 85% 에탄올 추출물이 30% 에탄올 추출물보다도 더 높은 활성산소 소거활성을 나타내었다. 추출 조건별 총항산화능도 한국산 감초의 가장 적합한 추출 조건은 G군(85% EtOH, 60 $^{\circ}\text{C}$ 및 6 h)임을 확인하였다.

4) 한국 감초추출물의 추출 조건별 항산화능이 가장 뛰어난 추출 조건인 G군에서 $^1\text{O}_2$ 로 유도된 사람 적혈구 파괴에 대한 세포보호 효과를 측정된 결과, 한국산, 중국산 및 우즈베키스탄의 G군 추출물은 모두 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol보다도 4 ~ 5 배 정도의 매우 우수한 세포보호 활성이 있음을 확인하였다.

결론적으로 본 연구에서는 원산지별, 추출 조건별(용매, 온도 및 시간) 추출물을 제조하고 이들 추출물의 수율과 항산화활성을 측정하였다. 한국산 감초에 대하여 가장 적합한 추출 조건은 G군(85% EtOH, 60 $^{\circ}\text{C}$ 및 6 h)임을 확인하였다. 한국산 감초가 경쟁력을 가지려면 본 실험결과와 고찰 과정에서 논의한 바와 같이 한국산 감초의 품질 표준화가 요구된다. 한국산 감초의 품질 표준화가 이뤄질 경우 항산화활성 및 항균 활성 등에서 수입산 감초보다 우수한 효능을 나타낼 수 있다고 판단되며 이는 수입대체 등 파급효과도 기대할 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: PJ008489)의 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

Reference

1. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(1), 75 (1997).
2. S. N. Park, Antioxidative properties of baicalin, component from *Scutellaria baicalensis* Georgi and its application to cosmetics(I), *J. Korean Int. Eng. Chem.*, **14**(5), 657 (2003).
3. S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photo-hemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **35**(3), 510 (2003).
4. S. N. Park, Effects of flavonoids and other phenolic compounds on reactive oxygen-mediated biochemical reactions, Ph. D. Dissertation, Seoul National Univ., Seoul, Korea (1989).
5. K. Scharffetter-Kochanek, Photoaging of the connective tissue of skin: its prevention and therapy, In: Antioxidants in disease mechanisms and therapy, Advances pharmacology, (H. Sies, eds), 639 (1997).
6. S. N. Park, S. Y. Kim, G. N. Lim, N. R. Jo, and M. H. Lee, *In vitro* skin permeation and cellular protective effects of flavonoids isolated from *Suaeda asparagoides* extracts, *J. Ind. Eng. Chem.*, **18**(2), 680 (2012).
7. N. R. Jo, H. A. Gu, S. A. Park, S. B. Han, and S. N. Park, Cellular protective effect and liposome formulation for enhanced transdermal delivery of isoquercitrin, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **38**(2), 103 (2012).
8. T. S. Yoon, M. S. Cheon, S. J. Kim, A. Y. Lee, B. C. Moon, J. M. Chun, B. K. Choo, and H. K. Kim, Evaluation of solvent extraction on the anti-inflammatory efficacy, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, **18**(1), 28 (2010).
9. E. Y. Ahn, D. H. Shin, N. I. Back, and J. A. Oh, Isolation and identification of antimicrobial active substance from *G. uralensis*, *Korea J. Food Sci. Technol.*, **30**(3), 680 (1998).
10. J. H. Park, Q. Wu, K. H. Yoo, H. I. Yong, S. M. Cho, I. S. Chung, and N. I. Back, Cytotoxic effect of flavonoids from the roots of *G. uralensis* on human cancer cell lines, *J. Appl. Biol. Chem.*, **54**(1), 67 (2011).
11. K. Kenji, S. Mao, N. Rie, M. Takashi, and S. Yukihiro, Constituent properties of licorice derived from *G. uralensis*, *G. glabra*, and *G. inflata* identified by genetic information, *Biol. Pharm. Bull.*, **30**, 1271 (2007).
12. S. J. Kim, D. H. Kwoen, and J. H. Lee, Physiological activity/nutrition : Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of licorice root (*G. glabra*), *Korean J. Food Sci. Technol.*, **38**, 584 (2006).
13. H. K. Shim, M. H. Park, C. Choi, and M. J. Hae, Effect of *G. glabra* extracts on immune response, *Korean J. Food Nutr.*, **10**, 533 (1997).
14. J. He, L. Chen, D. Heber, W. Shi, and Q. Lu, Antibacterial compounds from *G. uralensis*, *J. Nat. Prod.*, **69**, 121 (2006).
15. S. B. Han, H. A. Gu, S. J. Kim, S. S. Kwon, H. S. Kim, S. H. Jeon, J. P. Hwang, and S. N. Park, Comparative study on antioxidative activity of *G. uralensis* and *G. glabra* extracts by country of origin, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **39**(1), 1 (2013).
16. H. J. Kim, J. Y. Bae, H. N. Jang, and S. N. Park, Comparative study on the antimicrobial activity of *G. uralensis* and *G. glabra* extracts with various countries of origin as natural antiseptics, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **41**(3), 358 (2013).
17. H. J. Kim, H. N. Jang, J. Y. Bae, and S. N. Park, A study on the stability of the cream containing *G. uralensis* extract, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **39**(2), 117 (2013).
18. S. L. Shin and C. H. Lee, Screening of effective extraction conditions for increasing antioxidant activ-

- ities from fronds of *Osmunda japonica*, *Korean J. Plant Res.*, **24**(2), 174 (2011).
19. M. M. Cowan, Plant products as antimicrobial agents, *Clin. Microbiol. Rev.*, **12**, 564 (1999).
20. J. H. Woo, S. L. Shin, Y. D. Chang, and C. H. Lee, Comparison of antioxidant effects by different extraction methods in flowers of *Aster scaber*, *Aster maackii*, *Coreopsis lanceolata* and *Coreopsis tinctoria*, *Kor. J. Plant. Res.*, **22**, 381 (2009).