

## 실시간 활성시스템을 접목한 감초의 유효성분에 대한 표준화 연구

홍재승<sup>1†</sup>, 강범구<sup>2†</sup>, 장영수<sup>2</sup>, 김선하<sup>2</sup>, 왕지강<sup>2</sup>, 박윤하<sup>3</sup>, 박종혁<sup>3</sup>, 임순성<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>한림대학교 체육학부, <sup>2</sup>한림대학교 식품영양학과, <sup>3</sup>한림대학교 천연의약연구소

## Studies on Standardization of Licorice Based on Its Active Components with On-line HPLC Bioassay System

Jae Seung Hong<sup>1†</sup>, Bum Gu Kang<sup>2†</sup>, Young Soo Jang<sup>2</sup>, Seon Ha Kim<sup>2</sup>, Zhiqiang Wang<sup>2</sup>, Yoon Ha Park<sup>3</sup>, Jong Hyuk Park<sup>3</sup> and Soon Sung Lim<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Physical Education, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Nutrition, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

<sup>3</sup>Institute of Natural Medicine, Hallym University, Chuncheon 200-702, Korea

**Abstract** - In an attempt to evaluate licorice quality based on its biological activity, we grafted an on-line high-performance liquid chromatography (HPLC) bioassay method into the previously established HPLC analysis method. The common antioxidant peaks in licorices of various origin were observed through an on-line HPLC/DPPH system leading to a decrease in absorbance at 517 nm for 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). Among them, the licorice from Youngju possessed the highest activity. Therefore, three active standard compounds from the dehydroglyasperin C, dehydroglyasperin D, and isoangustone A, were isolated and elucidated by medium pressure liquid chromatography (MPLC) and instrumental analysis such as nuclear magnetic resonance (NMR), respectively. On-line HPLC/ABTS analysis method with the simultaneous determination of three standard compounds and their radical scavenging activity was established for the quality evaluation of licorices. 2,2'-azinobis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid radicals (ABTS) which is stable and effective was used in replace of DPPH. The radical scavenging activity of three standards is compared with that of Trolox, known as antioxidant, showing a negative peak with a decrease in absorbance at 734 nm for ABTS. This on-line HPLC/ABTS analysis method was validated for specificity, linearity, precision and accuracy in compliance with international conference on harmonization (ICH) guideline.

**Key words** - Glycyrrhizae radix, HPLC bioassay, Antioxidant, DPPH, ABTS

### 서 언

식품소재의 안정성 평가 및 규제를 위해서는 원료 내 기능성 물질의 함유량, 섭취 용량, 독성연구가 선행되어야 한다(Johamnsen, 1990). 특히, 원료의 채취시기, 원산지, 채취부위, 가공 및 제조 공정에 따라 기준 물질의 함량이 변화될 수 있어 표준화 연구를 통한 품질의 규격화가 필요하다.

감초(Licorice)는 중국의 내몽고와 흑룡강성, 시베리아, 스페인과 이태리 남부, 이란과 이라크 등의 건조한 사막 기후 지

역에서 자생하거나 기후와 토양의 조건에 맞는 지역에서 주로 재배되고 있으며, 한약 재료로 사용되면서부터 부가가치와 응용 가치가 매우 높은 고소득 약용작물로서 알려지게 되었다(Akao *et al.*, 1991). 감초는 약 30여 종이 있다고 알려져 있으나 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), 신과 감초(*G. inflata* Bat.), 광과 감초(*G. glabra* L.)가 주로 사용되고 있고, 우리나라의 경우 최근 강원도 태백지역에서 농림부와 농촌진흥청이 기후와 토양의 적응성을 고려하여 감초를 약용 재료로서 시험재배하고 있지만 매년 한방재료와 한방식품의 재료로서 사용되고 있는 단맛을 내는 한약 감초와 한방화장품의 재료로서 쓴맛을 내는 신과 감초는 매년 수천 톤 이상이 중국으로부터 수입되어 사

\*교신저자(E-mail) : limss@hallym.ac.kr

† JS Hong and BG Kang contributed equally to this work.

용되고 있다(Sung, 2006).

감초와 같은 콩과 식물로 알려진 갈근(*Puerariae radix*)은 항알러지 효과가 보고되어 있으며(Jeong *et al.*, 2013), 호지라 불리는 싸리(*Lespedeza bicolor* Turcz.) 역시 콩과 식물로서 항산화 효과가 보고되어 있다(Yang *et al.*, 2011). 감초의 생리활성작용으로는 항염, 해독, 항암, 항당뇨, 항혈전, 항궤양, melanin 형성 억제 작용 등이 알려져 있다(Aarsen, 1973; Tanaka *et al.*, 1991). 감초의 주성분은 뿌리와 줄기에 함유된 triterpenoid saponin 계통인 glycyrrhizin 또는 glycyrrhizinate는 천연 감미료로 사용된다(Hayashi, 1993). 주요 생리활성 성분으로는 flavonoid 계열인 liquiritigenin, liquiritin과 isoflavonoid 계열인 glabridin, glabrene 등이 있으며 기타 coumarin계열인 herniarin, umbelliferone 등의 성분이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(Shibata and Saito, 1968; Somjen *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009). 천연물 내 활성 성분의 상당 부분을 차지하고 있는 flavonoid는 항암, 항균, 항염증 등의 다양한 생리작용을 가지고 있으며 특히, 항산화능과 깊은 연관성이 있는 계열의 물질이다(Fua *et al.*, 2005). 감초의 경우 표준화 지표성분으로 glycyrrhizin이 사용되고 있으나 최근 보고에 따르면 고혈압, 저칼륨혈증, 알칼리혈증, 레닌과 알도스테론억제와 같은 부작용으로 인해 감미료 대상의 표준화가 아닌 생리활성을 기반으로 한 감초의 품질 평가 성분으로서는 다소 무리가 있는 것으로 판단된다(Francini-pesenti *et al.*, 2008). 따라서, 천연물 및 한약재 원료의 품질평가를 위해 기존의 표준화법에 실시간 활성 측정법을 접목시킨 활성 성분을 기반으로 한 분석법을 제시하고자 한다. 최근 HPLC와 아세틸콜린가수분해효소, 엔지오텐신전환효소(ACE) 등과 같은 효소 활성을 병용한 실시간 활성 분석법이 천연물 소재에 많이 활용되고 있다(van Platerink *et al.*, 2006; Musilek *et al.*, 2008). 특히 DPPH 및 ABTS 라디칼을 이용한 실시간 항산화 측정법은 *in vitro* 상의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능과 상관관계가 높은 것으로 알려져 있으며 항산화제에서 천연추출물에 이르기까지 그 적용 범위가 확대 응용되고 있다(Wu, 2008).

본 연구에서는 천연물 소재로서 산지가 다른 아홉 종류의 감초로부터 생리활성물질을 기반으로 한 실시간 HPLC-DPPH 및 ABTS 라디칼소거분석법을 접목시킨 새로운 표준화 방법을 제시하고, 정량분석법의 검증을 위해 ICH 가이드라인에 따라 특이성(Specificity), 직선성(Linearity), 정확도(Accuracy), 정밀도(Precision)를 평가하여 이 분석법에 대한 유효성 검사(Validation)를 수행하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 시약 및 기기

실시간 활성 측정법을 위한 HPLC는 Thermo Electron Finnigan Spectra SYSTEM HPLC 시스템을 사용하였으며 컬럼은 Agilent 사의 Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm i.d., 3.5 μm)을 사용하였다. NMR은 Bruker Advance 600 분광기를 이용하여 TMS를 내부표준물질로써 사용하여 측정하였으며, chemical shift는 δ 단위로 나타내었다. UV는 UVKONxs SECOMAN 분광계를 ELISA reader는 EL 800 Universal Microplate Reader를 사용하였다. 지표성분 분리를 위한 순상 컬럼크로마토그래피용 실리카 겔은 Kieselgel 60 (입자크기 70–230 mesh, ASTM, Merck)을 사용하였고 성분 확인용 TLC plate는 Kiesel gel 60F<sub>254</sub> (ART. 5715, Merck)를 사용하였다. 또한, medium pressure liquid chromatography 용 충전제는 Lichroprep RP-18 (입자크기 40–63 μm, Merck)를 사용하였다. Ascorbic acid, DPPH, 과황화칼륨은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA), ABTS는 Fluka (Buchs, Germany), trolox는 Calbiochem (Darmstadt, Germany)에서 각각 구입하여 사용하였다. HPLC 분석용 용매인 MeCN과 MeOH은 J. T. Baker사 제품을 TFA는 Applichem GmbH (Darmstadt, Germany)를 각각 사용하였고, 증류수는 3차 증류수를 여과하여 사용하였으며 그 외의 시료 추출을 위한 용매는 특급 시약을 사용하였다.

### 실험재료 및 추출

본 실험에 사용한 아홉 종류의 산지가 다른 건조 감초는 내몽고의 신강산(I: Monggo Shingang), 내몽고 재배(II: Monggo Cultivated), 키르기스스탄공화국의 키르기스스탄산(III: Kyrgyzstan), 내몽고의 야생(IV: Monggo Wild), 중국의 요령성·길림성산(V: Yoryungseong · gilymseong), 중국의 신강산(VI: Shingang), 경북 영주에서 재배한 영주산(VII: Youngju), 우즈베키스탄공화국의 우즈베키스탄산(VIII: Uzbekistan), 중국 신강의 자감초(IX: Jagamcho)이며 경동시장으로부터 출처를 확인한 후 구입하여 사용하였다. 분쇄한 아홉 종류의 감초 30 g에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 L를 가한 다음 한 시간 초음파 추출을 실시하였다. 이를 세 번 반복하여 얻은 여과액을 감압 농축기로 농축한 다음 완전히 분말 형태로 만들어 분석시료로 사용하였다.

### 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀의 함량은 Folin-Ciocalteu법을 사용해 측정하

였다(Folin and Ciocalteu, 1927). Gallate을 표준시약으로 하여 표준검량곡선을 작성한 후 시료 0.25 ml에 Folin-Ciocalteu 시약(Reagent)을 0.75 ml 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 다음 7.5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2.0 ml를 첨가하고 증류수 7 ml를 넣어 최종 부피를 10 ml로 만든 후, 암실에서 한 시간 반응시킨 뒤 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

총 플라보노이드의 함량은 비색분석법(Colorimetric assay)을 이용하여 측정하였다(Kim *et al.*, 2002). (+)-Catechin을 표준시약으로 하여 표준검량곡선을 작성한 후 시료 1 ml에 증류수 4 ml를 첨가하여 묽히고 5% NaNO<sub>2</sub> 0.3 ml를 가하여 5분간 실온에서 반응시킨 다음 10% AlCl<sub>3</sub> 0.3 ml를 넣어 6분간 실온에서 반응시킨 뒤 1 M NaOH 2 ml를 넣고 증류수 2.4 ml를 가하여 완전히 반응시킨 다음 UV 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 항산화활성 측정

각각의 추출물을 10 mg/ml MeOH 농도로 용해하여 묽혀 사용하였으며, DPPH 용액은 0.32 mM 농도로 MeOH에 녹여 준비하였다. 추출물 30 µl와 DPPH 용액 180 µl를 섞어 실온에서 20분간 반응시킨 후 UV 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 용액은 3.5 mM 과황화칼륨이 포함된 2 mM 농도로 모액 (Stock solution)을 만든 다음 30배로 묽힌 후 overnight 하여 ABTS 라디칼 용액으로 하였다. 추출물 10 µl와 ABTS 라디칼 용액 290 µl를 넣어 실온에서 10분간 반응시킨 후 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 추출물의 라디칼 소거활성은 DPPH 및 ABTS 라디칼을 50% 소거시키는데 필요한 농도를 계산하여 IC<sub>50</sub>값으로 나타내었다.

### On-line HPLC 분석

감초 추출물의 표준화 연구를 위한 분석 조건은 다음과 같이 확립하였다. 분석컬럼은 Agilent Zorbax SB-C18 (4.6×150 mm i.d., 3.5 µm)을 사용하였고, 컬럼 온도는 30°C, 검출기는 UV 254 nm, 이동상으로는 용매 A (0.03% TFA)와 용매 B (MeCN)를 사용하여 55분간 농도기울기(40% B → 100% B)로 실시하였고 유속은 0.8 ml/min로 하였다. 실시간 활성 측정법에서 라디칼 용액과 컬럼 용출물간 안정화될 수 있는 최적 반응 시간을 확인하기 위해 DPPH 및 ABTS 라디칼 용액을 아홉 종류의 감초 추출물과 반응시켜 각각 UV 517, 734 nm에서 7분간 time scan을 실시하여 HPLC 분석시 필요로 한 반응조 용량을 결정하였다. 최종 분석시 DPPH와 ABTS 용액은 총 반응기 부피가 1.4 ml인 코일이 장착된 pinnacle pump를 이용하였고 유속 0.3 ml/min, 반응 온도 30°C(DPPH)와 40°C(ABTS)로 설정하였다. 컬럼을 통해 순차적으로 분리되어 나오는 용출물은 UV 254 nm에서 1차적으로 검출된 다음 pinnacle pump로부터 제공되는 라디칼과 실시간으로 반응하여 라디칼 소거능을 갖는 활성 부분이 2차적으로 UV 517 nm (DPPH) 및 UV 734 nm (ABTS)에서 검출되어 크로마토그램을 통해 negative peak로 나타난다(Fig. 1). 최종적으로 분석시료의 정량적 분석과 활성능 비교를 위해서 내부표준 (Internal standard)과 양성대조군(Positive control)으로서 trolox를 첨가하였으며 trolox와 감초 시료 분석물과의 간섭을 피하기 위해 분석 조건(용매 B 30%→100%, 58분 농도기울기)을 맞추었다.

### 영주감초 추출물로부터의 지표성분의 분리

영주 감초를 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 추출하여 감압 농축한 추출물을 silica gel column에서 이동상 hexane과 EtOAc를 100:0에서 0:100으

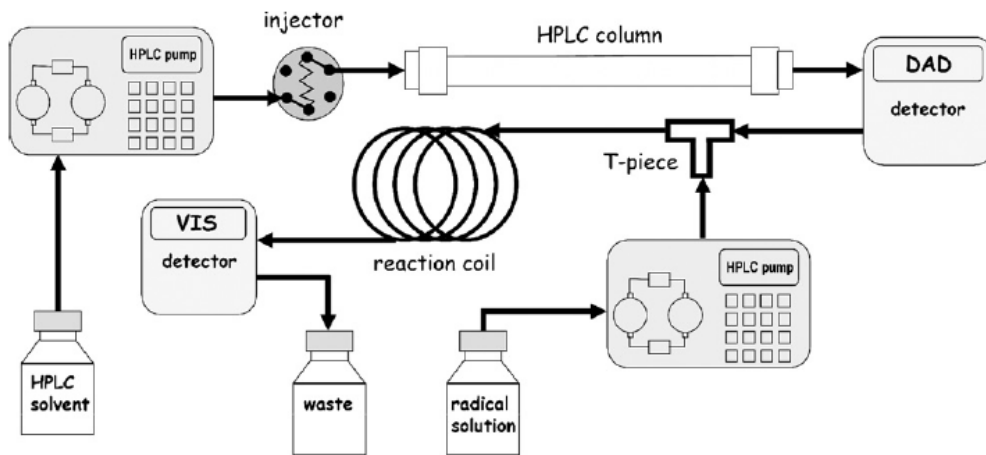


Fig. 1. Instrumental set-up for the on-line HPLC-DPPH/ABTS detection of radical scavenging compounds.

로 극성을 높여 용매를 용리하여 총 20개의 분획으로 나누었으며, 13번 분획물을 RP-18 column에서 이동상 60% MeOH부터 단독 MeOH을 단계별로 용리시켜 감초의 지표 성분인 화합물 1 (23.51 mg), 2 (19.78 mg), 3 (18.33 mg)을 분리하였다.

### HPLC 분석을 위한 표준용액 및 검액의 제조

감초로부터 분리한 지표성분인 화합물 1-3을 표준물질로 하여 MeOH에 용해시켜 농도를 0.1 mg/ml로 만들었으며, 이 용액을 단계적으로 희석하여 농도가 각각 6.25, 12.5, 25, 50 µg/ml 이 되도록 시료를 만들고, 15초간 vortexing 한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 사용하였다.

감초 추출 50 mg을 각각 50% MeOH 10 ml에 녹이고 15초간 vortexing 한 후 0.45 µm membrane filter로 여과하여 검액으로 하였다.

### 분석 방법의 검증

HPLC를 이용한 분석법의 신뢰도와 재현성을 검증하기 위해서 ICH 가이드라인에 의한 분석을 수행하였다.

특이성(specificity)은 불순물, 분해 산물, 기질 물질과 같이 예상할 수 없는 구성 성분의 존재 하에서 분석 물질을 확실하게 분석하는 능력으로, 다른 물질과의 간섭 없이 성분이 분리되는 것에 의해 특이성을 확인하였다.

직선성(linearity)은 다섯 개의 농도(6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml) 별로 피크 면적비를 구하여 표준품 농도(X축)와 피크 면적비(Y 축)에 대한 검량선을 작성하였고, 검량선으로부터 직선성의 상관계수를 구하여 확인하였다.

정밀성(precision)은 농도의 표준액을 일간 및 일내 변동을 알아보기 위해 설정한 다섯 가지 농도를 하루에 다섯 번씩 3일간 반복하여 측정된 결과를 피크 면적비의 변이계수(%)로 확인하였다.

정확성(accuracy)은 표준품의 농도별로 각각 세 번씩 주입하여 얻은 결과를 검량선에 대입하여 얻은 결과와 참값의 오차 정도(회수율, %)로서 정확성을 평가하였다.

## 결과 및 고찰

### 감초추출물의 추출 용매 및 수율

감초의 주요 구성 성분이며 천연 감미료로 사용되는 glycyrrhizin 은 부종, 고혈압 등의 부작용 등이 알려져 있다. 따라서, 우선 감초 내 glycyrrhizin 추출율을 최소화하면서 항산화물질인

Table 1. Comparison of the extraction yield from Licorice of various origin

Samples	Yield	
	(g/30 g)	(%)
Monggo Shingang	0.45 ± 0.07	1.50 ± 0.10
Monggo Cultivated	0.87 ± 0.11	2.90 ± 0.12
Kyrgyzstan	0.68 ± 0.06	2.27 ± 0.08
Monggo Wild	0.79 ± 0.10	2.63 ± 0.11
Yoryungseong-gilymseong	0.93 ± 0.12	3.10 ± 0.15
Shingang	0.95 ± 0.08	3.17 ± 0.08
Youngju	1.01 ± 0.11	3.37 ± 0.12
Uzbekistan	0.50 ± 0.10	1.67 ± 0.10
Jagamcho	0.78 ± 0.09	2.60 ± 0.11

flavonoid를 효율적으로 추출해낼 수 있는 용매로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 선정하였으며 아홉 종류의 산지별 감초에 대한 수율을 확인하였다. 아홉 종류의 감초 중 영주산 감초가 3.37%로 가장 높은 수율을 보였으며 신강산(3.17%), 요령성·길림성산(3.10%), 내몽고산 재배(2.90%), 내몽고산 야생(2.63%), 신강산 자감초(2.60%), 키르키즈스탄산(2.27%), 우즈베키스탄산(1.67%), 내몽고산 신강 감초(1.50%) 순으로 나타났다(Table 1).

### 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 측정

총 폴리 페놀성 화합물은 항산화 효과와 밀접한 관계가 있으며 항산화 이외에도 항균, 항암 등의 생리 활성 기능을 가지는 것으로 보고되어 있다(Xu *et al.*, 2007). 산지가 다른 아홉 종류의 감초 추출물 내 총 폴리페놀 함량과 총 플라보노이드 함량은 gallic acid와 catechin을 각각 표준품으로 하여 비교하였다. 총 폴리페놀 함량은 영주산 감초가 206.93 mg/g으로 다른 감초에 비해 높게 나타났으며 내몽고산 재배(150.04 mg/g), 내몽고산 야생(141.16 mg/g), 요령성·길림성산(135.23 mg/g), 신강산(132.86 mg/g), 신강산 자감초(131.23 mg/g), 내몽고산 신강(123.38 mg/g), 우즈베키스탄산(118.04 mg/g), 키르키즈스탄산 감초(108.56 mg/g) 순의 경향을 보였다. 총 플라보노이드 함량은 영주산 감초에서 124.15 mg/g으로 가장 높게 나타났고 내몽고산 재배(96.78 mg/g), 신강산(95.89 mg/g), 요령성·길림성산(91.48 mg/g), 신강산 자감초(78.23 mg/g), 내몽고산 신강(72.94 mg/g), 우즈베키스탄산(64.99 mg/g), 내몽고산 야생(64.11 mg/g), 키르키즈스탄산 감초(49.98 mg/g) 순으로 나타났다. 따라서 영주산 감초의 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능에 의한 항산화 효능은 총 폴리

Table 2. Total polyphenol content, total flavonoid contents, and scavenging effect of 9 extracts of various origin on DPPH and ABTS radical

Samples	DPPH	ABTS	Total flavonoids <sup>z</sup>	Total polyphenols <sup>y</sup>
	(IC <sub>50</sub> , µg/ml)			
Trolox	29.22 ± 0.53	2.56 ± 0.04	-	-
Ascorbic acid	31.59 ± 0.66	2.31 ± 0.04	-	-
Monggo Shingang	261.65 ± 2.70	6.32 ± 0.14	72.94 ± 2.46	123.38 ± 2.32
Monggo Cultivated	126.41 ± 1.83	7.29 ± 0.21	96.78 ± 1.68	150.04 ± 3.11
Kyrgyzstan	552.31 ± 3.65	10.99 ± 0.45	49.98 ± 2.30	108.56 ± 1.80
Monggo Wild	467.92 ± 2.25	7.64 ± 0.99	64.11 ± 2.91	141.16 ± 2.33
Yoryungseong:gilymseong	130.51 ± 1.38	8.79 ± 0.30	91.48 ± 3.40	135.23 ± 3.06
Shingang	333.33 ± 2.84	7.07 ± 0.15	95.89 ± 1.24	132.86 ± 2.17
Youngju	92.29 ± 1.35	4.62 ± 0.38	124.15 ± 2.87	206.93 ± 3.22
Uzbekistan	315.96 ± 3.30	10.68 ± 0.35	64.99 ± 1.56	118.04 ± 2.25
Jagamcho	352.29 ± 3.62	7.72 ± 0.20	78.23 ± 2.23	131.08 ± 2.78

<sup>z</sup>(+)-Catechin equivalents (CE, mg/g of each extract) for the total flavonoid content.

<sup>y</sup>Gallic acid equivalents (GAE, mg/g of each extract) for the total polyphenol content.

페놀 함량 및 플라보노이드 함량과 연관성이 있는 것으로 보인다(Table 2).

### DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 측정

아홉 종류의 산지가 다른 감초 추출물을 대상으로 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였으며 항산화제인 trolox와 ascorbic acid를 대조 물질로 측정한 결과 영주산 감초의 IC<sub>50</sub> 값이 92.29 µg/ml로 가장 강한 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, 내몽고산 재배(126.41 µg/ml), 요령성·길림성산(130.51 µg/ml), 내몽고산 신강(261.65 µg/ml), 우즈베키스탄산(315.96 µg/ml), 신강산(333.33 µg/ml), 신강산 자감초(352.29 µg/ml), 내몽고산 야생(467.92 µg/ml), 키르기스스탄산 감초(552.31 µg/ml) 순으로 나타났다. ABTS 라디칼 소거능에서도 영주산 감초의 IC<sub>50</sub> 값이 4.62 µg/ml로 가장 높은 항산화능을 보였으며 키르기스스탄산 감초가 10.99 µg/ml로 가장 낮은 항산화능을 보였다(Table 2).

### 실시간 활성측정을 위한 조건 확립

DPPH 및 ABTS 라디칼을 이용한 항산화능을 평가하기 위해 실시간 활성 분석 시스템 조건을 확립하였다. 실시간 활성 시스템은 분석 컬럼으로부터 실시간으로 용출된 물질이 1차 UV 검출기를 통하여 크로마토그램으로 나타나고 이들은 연속적으로 라디칼(DPPH 혹은 ABTS<sup>+</sup>)과 반응하여 2차 UV 검출기를 통해

라디칼 소거능을 갖는 경우 라디칼의 특정 파장에서 negative peak로 나타나게 된다(Fig. 1). 안정한 자유라디칼인 DPPH는 가시광선 영역인 517 nm에서 매우 강한 흡수 파장을 보이며 ABTS는 과황화칼륨 등에 의해 산화되어 안정한 라디칼 양이온인 ABTS<sup>+</sup>를 생성하게 되므로 ABTS 라디칼의 시간 경과에 따른 최대 흡수파장 및 감도 변화를 확인하였다. ABTS<sup>+</sup>는 최대 흡수 파장이 734 nm이며 24시간 경과시 흡광 감도가 가장 높았으며 시간 경과에 따라 점차 감소하는 경향을 나타내었고 컬럼으로부터 분리된 용출물과 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 사이의 반응시간을 설정하였다(Fig. 2). 또한 200초 이상에서 DPPH 및 ABTS<sup>+</sup>와의 반응이 안정화되었으므로 반응조내 용량을 1.5 ml로 설정하였다. 이 과정에서 time scan을 통해 실제 HPLC 장비에서 적용될 200초 내외의 시간대에서의 항산화 경향을 확인하였다. 각각의 시료는 70 µg/ml농도에서 DPPH 라디칼 소거능은 영주산 감초가 76%로 가장 높게 나타났으며 내몽고산 재배(68%), 신강산(55%), 내몽고산 신강(53%), 우즈베키스탄산(51%), 내몽고산 야생(47%), 신강산 자감초(44%), 요령성·길림성산(43%), 키르기스스탄산 감초(37%) 순으로 나타났다. ABTS 라디칼의 경우에는 키르기스스탄산 감초가 29%로 가장 낮고 영주산 감초가 55%로 가장 높았으며 나머지 감초 추출물의 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능은 큰 차이를 보이지 않았다. 이는 앞서 *in vitro* 상에서 IC<sub>50</sub> 값을 측정한 DPPH와 ABTS<sup>+</sup> 라디칼 소거능 결과와 거의 유사하게 나타났으며 HPLC 장비 시스템 접목

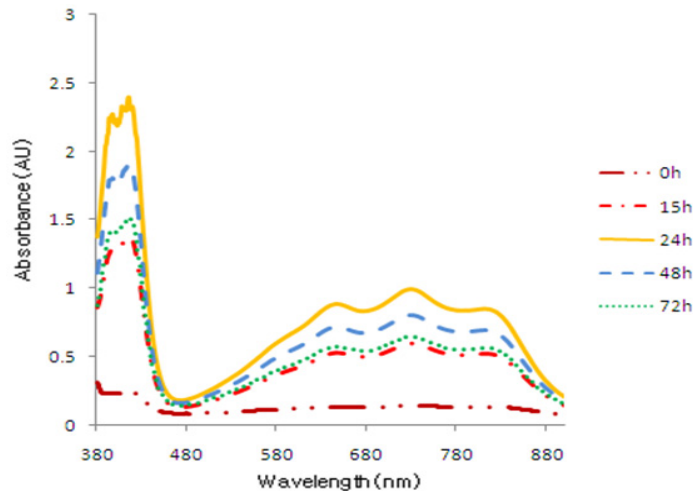


Fig. 2. The effects of time on the suppression of the absorbance of the ABTS in itself.

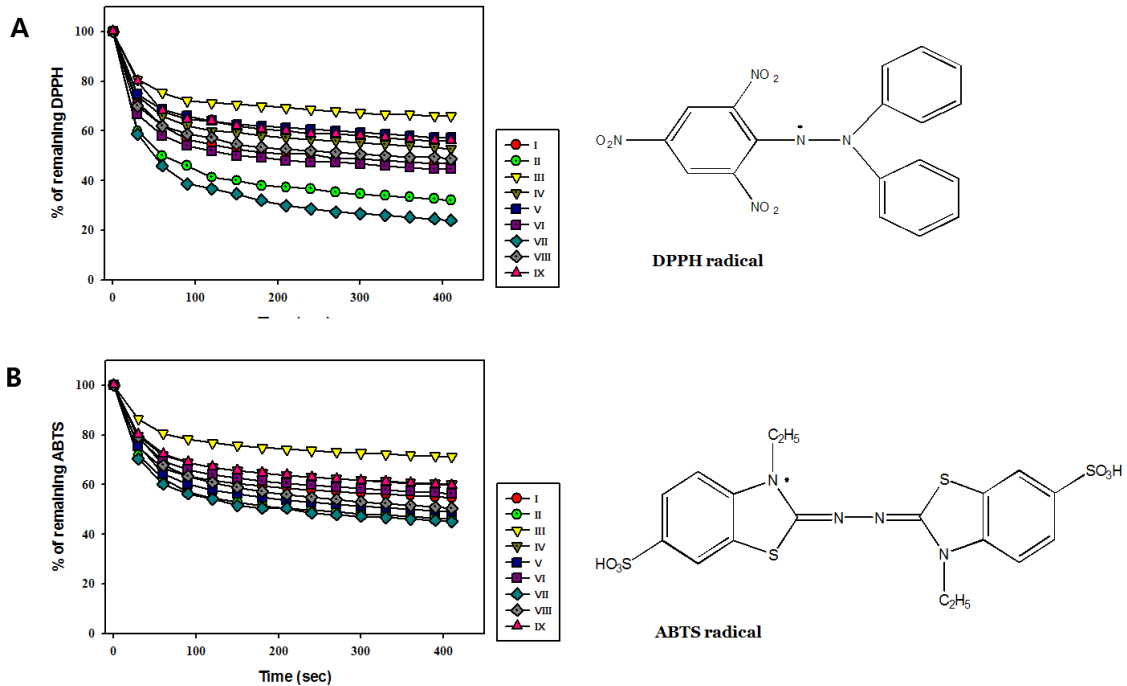


Fig. 3. Kinetics of licorice extracts containing 0.32 mM DPPH (A) and 2 mM ABTS (B) ( I : Monggo shingang, II : Monggo cultivate, III: Kyrgyzstan, IV: Monggo wild, V : Yoryungseong·Gilymseong, VI: Shingang, VII: Youngju, VIII: Uzbekistan, IX: Jagamcho).

이 가능하다는 것을 알 수 있었다(Fig. 3).

**DPPH 및 ABTS를 이용한 실시간 활성측정**

아홉 종류의 산지가 다른 감초 추출물의 성분 패턴과 이에 따른 항산화 효능을 비교하기 위해 실시간 활성 분석 시스템을 적용하였다. DPPH를 이용한 실시간 활성법은 모든 감초 추출물의 머무름 시간 retention time (Rt) 19 min에서 공통적으로 항

산화 활성 peak (1)이 관찰되었다. 특히, 영주산 감초에서 peak 1의 negative 면적 값이  $7.85 \times 10^5$ 으로 가장 크게 나타났으며 우즈베키스탄산( $5.77 \times 10^5$ ), 내몽고산 재배( $4.57 \times 10^5$ ), 내몽고산 신강( $3.57 \times 10^5$ ), 요령성·길림성산( $3.30 \times 10^5$ ), 내몽고산 야생( $1.64 \times 10^5$ ), 신강산 자감초( $1.08 \times 10^5$ ), 신강산( $7.75 \times 10^4$ ), 키르키즈스탄산 감초( $3.03 \times 10^4$ ) 순의 경향을 보였다(Fig. 4).

각 활성 피크들 간의 활성 정도를 비교하기 위해 대표적인 항

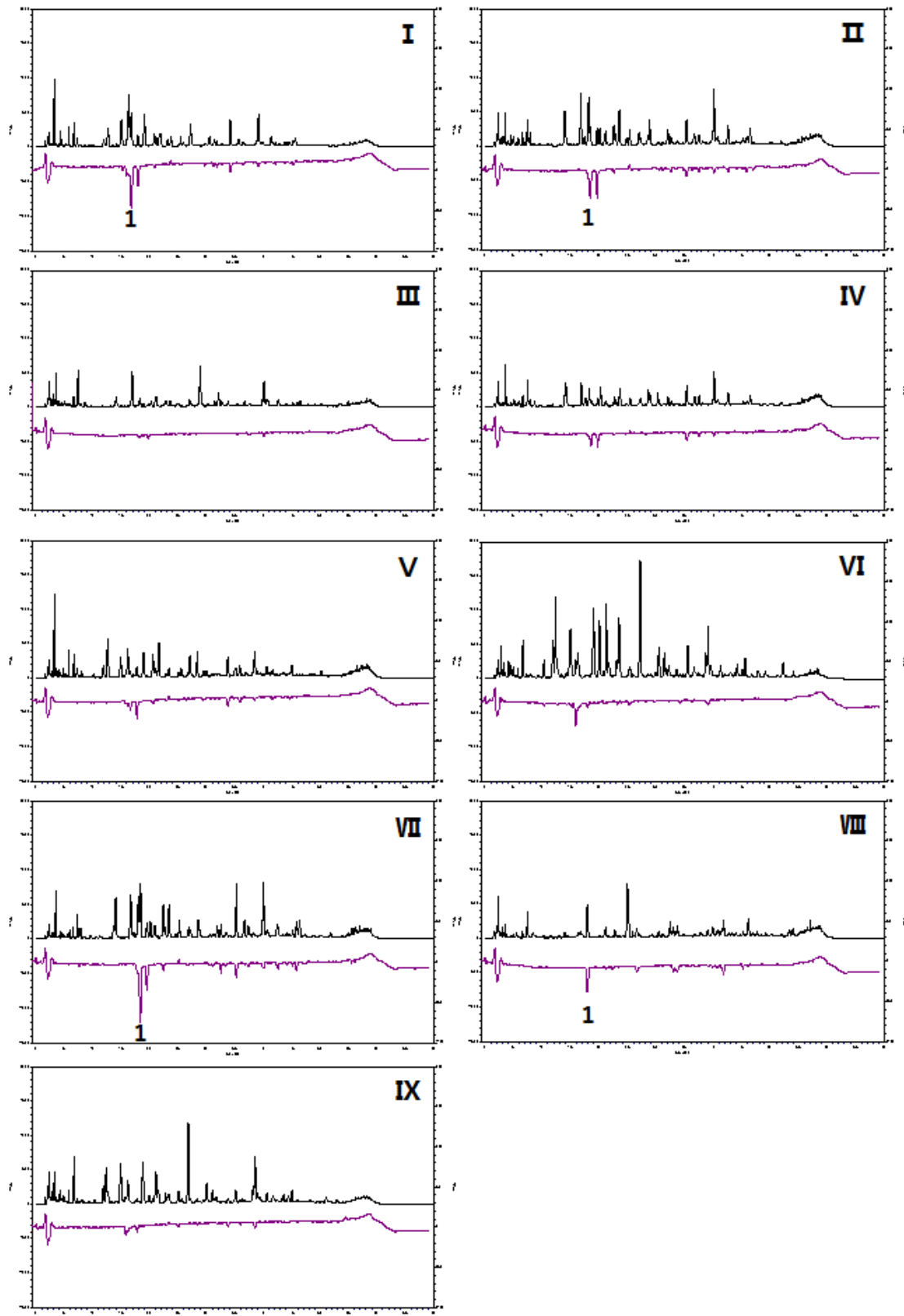


Fig. 4. UV and DPPH radical quenching chromatogram of licorice extracts ( I : Monggo shingang, II : Monggo cultivate, III : Kyrgyzstan, IV : Monggo wild, V : Yoryungseong-Gilymseong, VI : Shingang, VII : Youngju, VIII : Uzbekistan, IX : Jagamcho).

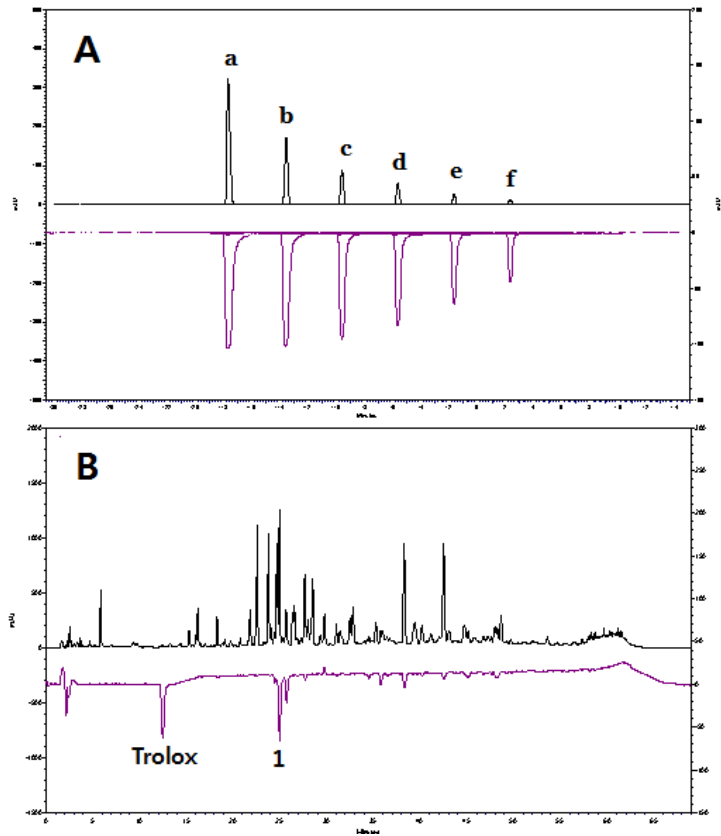


Fig. 5. Combined plot of the UV and DPPH quenching profiles of different concentrations of Trolox (A); (a)4, (b)2, (c)1, (d)0.5, (e)0.25, (f)0.13 mM and *G. uralensis* extract containing trolox of 0.13 mM (B).

산화제인 trolox를 내부 물질 및 대조 물질로써 사용하였다. 첨가할 trolox의 농도를 결정하기 위해 농도별(4-0.13 mM)로 측정 한 결과 trolox 농도와 negative peak 면적 값이 농도의존적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 하지만, 2 mM 이상의 농도에서는 항산화 차이가 나타나지 않았으며 이 시스템을 통한 trolox의 최대 분석 활성 농도는 2 mM로서 감초 내 첨가 농도는 감초 내 활성 피크 수준을 감안하여 0.13 mM로 결정하였다. 감초 추출물의 활성 peak 1과 trolox의 활성 정도를 negative peak의 면적 값으로 비교한 결과 peak 1에서 1.4배 높게 나타났다(Fig. 5).

두 번째로 ABTS 라디칼의 경우 감초 추출물간 분리 양상은 기원별로 다소 차이를 보였으나 머무름 시간 26, 19, 40, 13, 44.49에서 공통적인 세 개의 활성 peak가 관찰되었다. 아홉 개의 감초 추출물에 0.31 mM trolox를 공통적으로 첨가하여 total negative peak 면적 값 및 활성 peak 1-3에 대한 negative peak 면적 합계 값을 비교하였다(Fig. 6). 각각의 peak는 영주산 감초에서  $2.12 \times 10^7$ 과  $1.08 \times 10^7$ 로 가장 높게 나타났으며, trolox의 면적 값을 각각의 활성 peak의 면적 값으로 나눈 값을 TEAC

(Trolox equivalent activity capacity)로 정의하여 첨가한 trolox 농도 수준에서 활성 peak들 간의 항산화도를 비교한 결과 영주 감초의 활성 peak 1-3에 대한 TEAC 값이 각각 1.09, 0.85, 0.44로 나타나 다른 감초 추출물에 비해 가장 높게 나타났다(Table 3).

분석 과정에서 negative peak의 면적 값이 동일한 시료에 대해 다소 차이가 나타남을 확인할 수 있었으며 이는 앞서 언급한 ABTS<sup>+</sup>의 시간 경과에 따른 감도 변화에 의한 변화로 판단되어 활성이 가장 높은 영주산 감초를 이용하여 시간대별로 측정된 TEAC 값으로 비교하였다. 영주 감초의 세 가지 활성 peak에 대한 TEAC 값은 18시간 경과시 1.27, 1.10, 0.57으로, 24시간 경과시 1.29, 1.03, 0.51로 각각 나타났으며 Trolox의 면적 값과 TEAC 값이 거의 유사한 것으로 확인되어 실시간 활성 측정법에 의한 분석 법에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다(Fig. 7). 또한, 감초의 세 가지 표준화 물질에 대해 상기 아홉 종류의 시료를 TEAC 값을 기준으로 영주산, 내몽고산 신강, 내몽고산 재배 감초를 상품, 요령성·길림성산, 내몽고산 야생, 신강산 자감초를 증품, 신강산, 우즈베키스탄산, 키르키즈스탄산 감초를



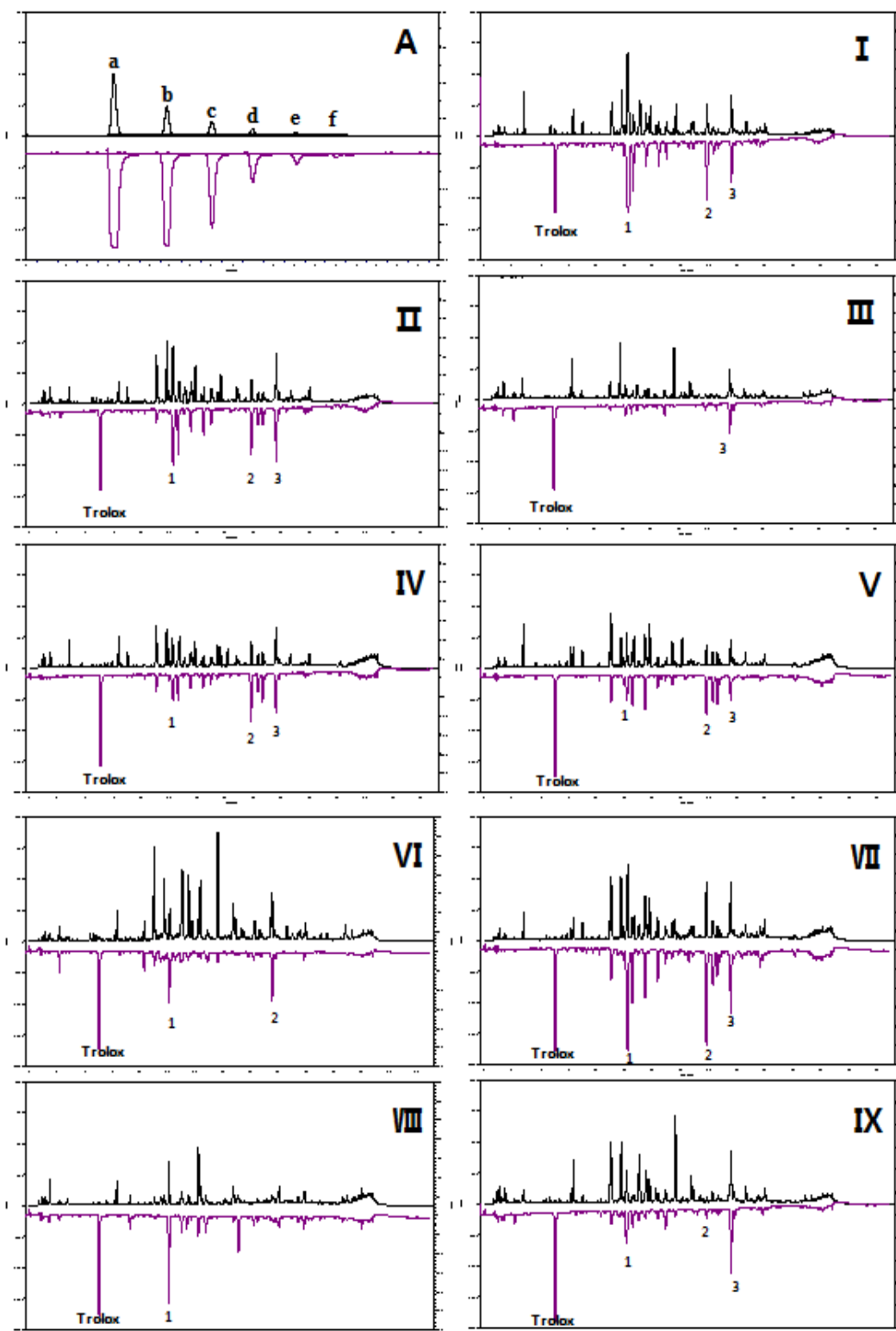


Fig. 6. Combined plot of the UV and ABTS quenching profiles of different concentrations of Trolox (A); (a)1.25, (b)0.63, (c)0.31, (d)0.16, (e)0.08, (f)0.04 mM and nine extracts of different origin containing trolox of 0.31 mM ( I -IX) ( I : Monggo shingang, II : Monggo cultivate, III: Kyrgyzstan, IV: Monggo wild, V : Yoryungseong-Gilymseong, VI: Shingang, VII: Youngju, VIII: Uzbekistan, IX: Jagamcho).

Table 3. Total antioxidant peak area and TEAC value from 9 extracts by the on-line HPLC-ABTS method<sup>z</sup>

Samples	Sum of negative peak		Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) <sup>y</sup>		
	(734 nm, mAU)		1 <sup>x</sup>	2 <sup>x</sup>	3 <sup>x</sup>
Monggo Shingang	(1.34 ± 0.25)×10 <sup>6</sup>	(8.59 ± 0.23)×10 <sup>5</sup>	1.08 ± 0.08	0.58 ± 0.07	0.38 ± 0.07
Monggo Cultivated	(1.15 ± 0.14)×10 <sup>6</sup>	(6.61 ± 0.17)×10 <sup>5</sup>	0.81 ± 0.10	0.41 ± 0.08	0.47 ± 0.08
Kyrgyzstan	(3.67 ± 0.21)×10 <sup>5</sup>	(1.74 ± 0.23)×10 <sup>5</sup>	0.10 ± 0.06	0.06 ± 0.06	0.27 ± 0.07
Monggo Wild	(8.11 ± 0.17)×10 <sup>5</sup>	(3.93 ± 0.20)×10 <sup>5</sup>	0.18 ± 0.07	0.42 ± 0.06	0.34 ± 0.08
Yoryungseong-gilymseong	(9.71 ± 0.18)×10 <sup>5</sup>	(3.22 ± 0.22)×10 <sup>5</sup>	0.22 ± 0.07	0.34 ± 0.08	0.19 ± 0.06
Shingang	(6.16 ± 0.32)×10 <sup>5</sup>	(2.46 ± 0.28)×10 <sup>5</sup>	0.20 ± 0.10	-	0.39 ± 0.07
Youngju	(2.12 ± 0.12)×10 <sup>6</sup>	(1.08 ± 0.18)×10 <sup>6</sup>	1.09 ± 0.05	0.85 ± 0.06	0.44 ± 0.04
Uzbekistan	(8.20 ± 0.22)×10 <sup>5</sup>	(2.84 ± 0.23)×10 <sup>5</sup>	0.65 ± 0.06	-	-
Jagamcho	(6.24 ± 0.26)×10 <sup>5</sup>	(3.18 ± 0.21)×10 <sup>5</sup>	0.25 ± 0.04	0.07 ± 0.05	0.44 ± 0.05

<sup>z</sup>All values are mean ± SD of triplicate determination.

<sup>y</sup>TEAC values, standardized values of antioxidant capacity, are determined by comparing the peak area from the samples to that of trolox.

<sup>x</sup>Compound 1; Dehydroglyasperin C, compound 2; Dehydroglyasperin D, compound 3; Isoangustone A.

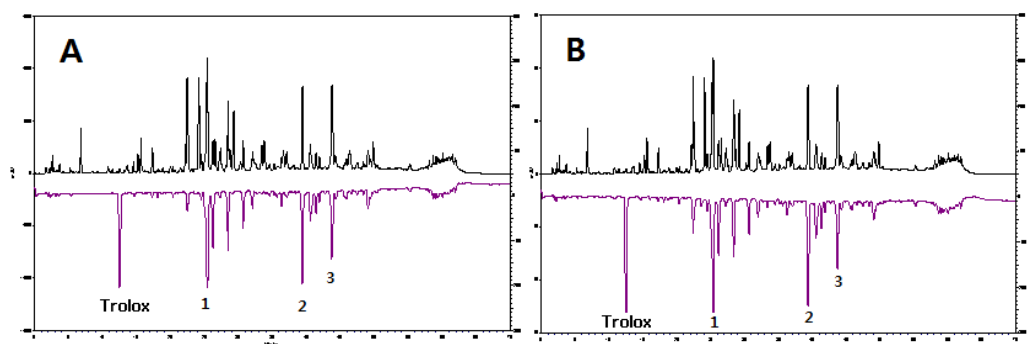


Fig. 7. The change effect of the absorbance of ABTS in *G. uralensis* extract on time; (A) 18 h, (B) 24 h.

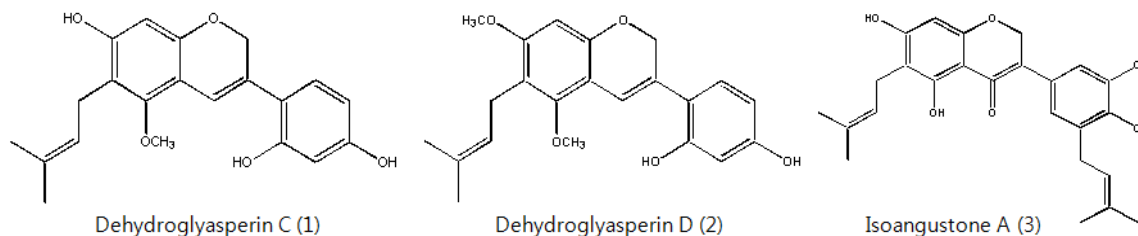


Fig. 8. Structure of Dehydroglyasperin C (1), Dehydroglyasperin D (2), Isoangustone A (3) from *G. uralensis*.

하품으로 분류하였다.

**지표성분의 분리 및 구조확인**

영주산 감초 추출물로부터 분리한 세 개의 화합물에 대해 EI-Mass, NMR 등을 측정하여 문헌치와 비교하여 dehydroglyasperin C (1), dehydroglyasperin D (2), isoangustone A (3)로 구조를

동정하였다(Fig. 8), (Mae *et al.*, 2003; Kiuchi *et al.*, 1990; Hatano, 2000). 영주산 감초 추출물에 활성물질 1-3의 함량은 각각 41.1, 29.13, 37.44 mg이며 영주산 감초 시료에 대한 1-3의 수율은 각각 0.14, 0.10, 0.13%로 확인되었다.

## Dehydrogyasperin C (1)

$C_{21}H_{22}O_5$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 1.62 (3 H, s, H-5"), 1.70 (3 H, s, H-4"), 3.14 (2 H, d,  $J=6.54$ , H-1"), 3.67 (3 H, s,  $OCH_3-5$ ), 4.83 (2 H, s,  $CH_2-2$ ), 5.13 (1 H, t-like, H-2"), 6.14 (1 H, s, H-8), 6.25 (1 H, dd,  $J=8.3, 2.4$ , H-5'), 6.32 (1 H, s,  $J=2.4$ , H-3'), 6.64 (1 H, s, H-4), 7.04 (1 H, d,  $J=8.3$ , H-6'), 9.39 (1 H, s, OH-4), 9.54 (1 H, s, OH-7), 9.60 (1 H, s, OH-2');  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 18.12 (C-4"), 22.61 (C-1"), 25.94 (C-5"), 62.10 (C-5,  $OCH_3$ ), 67.73 (C-2,  $CH_2$ ), 98.89 (C-8), 103.18 (C-3'), 107.30 (C-5'), 109.21 (C-4a), 114.36 (C-6), 115.06 (C-4), 117.02 (C-1'), 124.37 (C-2"), 127.97 (C-3), 129.12 (C-6'), 129.95 (C-3"), 152.74 (C-8a), 155.38 (C-5), 156.24 (C-7), 156.57 (C-2'), 158.46 (C-4').

## Dehydrogyasperin D (2)

$C_{22}H_{24}O_5$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 1.68 (3 H, s, H-5"), 1.76 (3 H, s, H-4"), 3.23 (2 H, d,  $J=6.85$ , H-1"), 3.73 (3 H, s,  $OCH_3-5$ ), 3.80 (3 H, s,  $OCH_3-7$ ), 4.95 (1 H, s,  $CH_2-2$ ), 5.14 (1 H, t-like, H-2"), 6.31 (1 H, dd,  $J=8.37, 2.4$ , H-5'), 6.38 (1 H, s, H-8), 6.40 (1 H, s,  $J=2.4$ , H-3'), 6.74 (1 H, s, H-4), 7.12 (1 H, d,  $J=8.37$ , H-6'), 9.47 (1 H, s,

OH-4'), 9.69 (1 H, s, OH-2');  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 18.08 (C-4"), 22.53 (C-1"), 25.94 (C-5"), 56.19 (C-7,  $OCH_3$ ), 62.22 (C-5,  $OCH_3$ ), 67.80 (C-2,  $CH_2$ ), 95.75 (C-8), 103.25 (C-3'), 107.36 (C-5'), 114.67 (C-4), 115.53 (C-6), 116.71 (C-1'), 124.00 (C-2"), 128.71 (C-3), 129.20 (C-6'), 130.40 (C-3"), 153.16 (C-8a), 154.88 (C-5), 156.53 (C-2'), 157.99 (C-7), 158.45 (C-4')

## Isoangustone A (3)

$C_{25}H_{26}O_6$ ;  $^1H$ -NMR (600 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 1.62 (3 H, s, H-5"), 1.69 (6 H, s, H-4", 5"), 1.72 (3 H, s, H-4"), 3.23 (4 H, s,  $CH_2, 1''$  and  $1'''$ ), 5.17 (1 H, t, H-2"), 5.28 (1 H, t, H-2'), 6.44 (1 H, s, H-8), 6.66 (1 H, d,  $J=1.2$ , H-6'), 6.88 (1 H, s,  $J=1.2$ , H-2'), 8.26 (1 H, s, H-2), 8.36, 9.36, 10.86 (each, 1 H, H, OH-3', 4', 7), 13.28 (OH-5);  $^{13}C$ -NMR (150 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$ : 18.16 (C-4", 4'''), 21.50 (C-1'''), 25.95 (C-5"), 26.01 (C-5'''), 28.75 (C-1"), 93.31 (C-8), 104.72 (C-4a), 111.42 (C-6), 114.46 (C-2'), 120.91 (C-6'), 122.55 (C-3), 122.63 (C-2"), 122.99 (C-1'), 123.50 (C-2'''), 128.41 (C-5'), 131.15 (C-3"), 131.37 (C-3'''), 143.58 (C-4'), 144.94 (C-3'), 154.11 (C-2), 155.75 (C-8a), 159.27 (C-5), 162.38 (C-7), 180.77 (C-4).

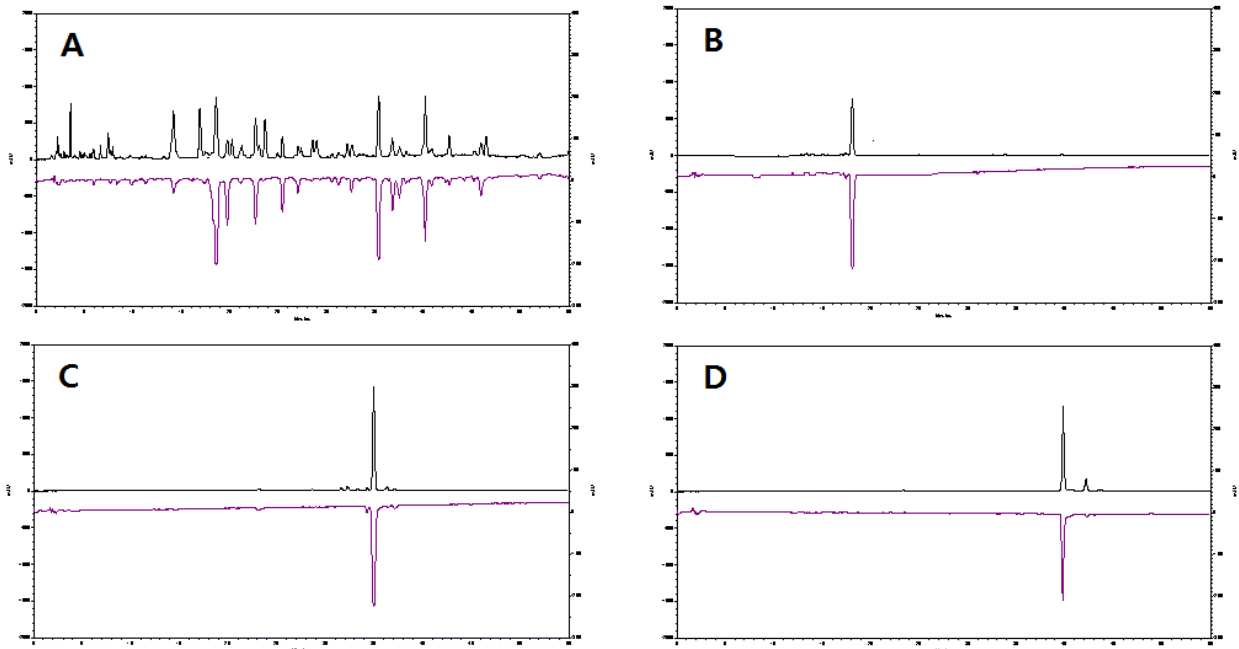


Fig. 9. HPLC chromatogram of *G. uralensis* extract (A), Dehydrogyasperin C (B), Dehydrogyasperin D (C), and Isoangustone A (D).

**분석 방법의 검증(Validation)**

**특이성(Specificity)**

확립된 실시간 활성 HPLC 조건으로 감초 추출물과 감초의 세 가지 항산화 지표성분을 분석하였다. 감초의 세 가지 지표성분의 Rt는 각각 18.09 (1), 34.98 (2), 39.83 (3) min으로서, 추출물 내 이들 물질의 Rt 18.12, 35.05, 39.91 min과 동일하였으며 또한 다른 성분들과 명확히 분리되었고 다른 물질과의 간섭이 없음을 확인하였다(Fig. 9).

**직선성(Linearity)**

감초의 세 가지 항산화 지표성분은 6.25, 12.5, 25, 50, 100 µg/ml 농도로 제조하고 확립된 HPLC 조건으로 분석을 실시하였다. X 축은(을) 농도, Y 축은(을) 피크 면적으로 하여 검량선을 작성한 결과 직선성(R<sup>2</sup>)이 0.99에서 1.00인 상관관계를 나타내어 직선성이 인정되었다. 또한, 항산화 지표성분들의 검출한계(LOD, limit of detection)와 정량한계(LOQ, limit of quantitation)를 측정된 결과 254 nm에서의 positive peak와 734 nm에서의 negative peak 값에서 각각 0.29~1.15 µg/ml과 0.18~0.82

Table 4. Calibration curve equations, LOD, and LOQ of 3 standards isolated from *Glycyrrhiza uralensis*

Compounds	Positive peak (254 nm)					Negative peak (734 nm)				
	Slope (a)	Intercept (b)	R <sup>2</sup>	LOD <sup>z</sup>	LOQ <sup>y</sup>	Slope (a)	Intercept (b)	R <sup>2</sup>	LOD <sup>z</sup>	LOQ <sup>y</sup>
Dehydroglyasperin C (1)	76993.87	-32828.40	1.00	0.29	0.89	28454.29	-51229.01	1.00	0.18	0.54
Dehydroglyasperin D (2)	99210.14	256282.74	1.00	0.38	1.15	30499.47	-61859.50	1.00	0.20	0.60
Isoangustone A (3)	69146.13	124517.84	1.00	0.31	0.93	13396.80	-92969.94	0.99	0.27	0.82

<sup>z</sup>Limit of detection (LOD) : 3.3×(Standard deviation of the response/Slope of calibration curve).

<sup>y</sup>Limit of quantitation (LOQ) : 10×(Standard deviation of the response/Slope of calibration curve).

Table 5. Intra-day precision for retention time (Rt) and peak area of three active components from *Glycyrrhiza uralensis*

Concentration (µg/ml)	Relative Standard Deviation (RSD)% for intra-day precision											
	Dehydroglyasperin C (1)				Dehydroglyasperin D (2)				Isoangustone A (3)			
	254 nm		734 nm		254 nm		734 nm		254 nm		734 nm	
	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area
6.25	0.47	1.52	1.00	1.20	0.14	1.63	0.22	1.07	0.15	1.31	0.20	1.79
12.5	0.32	0.57	0.32	1.29	0.13	1.33	0.17	1.41	0.16	1.06	0.19	1.47
25	0.55	0.89	0.46	1.83	0.19	0.94	0.20	1.35	0.19	1.88	0.21	1.32
50	0.50	0.81	0.40	1.46	0.19	0.82	0.20	1.83	0.19	1.62	0.19	1.16
100	1.21	0.74	1.14	1.63	0.44	0.55	0.46	1.26	0.43	0.98	0.47	1.35

Table 6. Inter-day precision for retention time (Rt) and peak area of three active components from *Glycyrrhiza uralensis*

Concentration (µg/ml)	Relative Standard Deviation (RSD) % intra-day precision											
	Dehydroglyasperin C (1)				Dehydroglyasperin D (2)				Isoangustone A (3)			
	254 nm		734 nm		254 nm		734 nm		254 nm		734 nm	
	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area	Rt	Area
6.25	0.52	1.37	0.50	1.3	0.18	1.50	0.10	1.03	0.18	1.33	0.08	1.77
12.5	0.68	0.83	0.83	0.73	0.29	1.13	0.3	0.99	0.28	1.10	0.32	0.99
25	0.44	0.69	0.31	0.94	0.18	0.84	0.15	0.75	0.16	1.19	0.15	0.99
50	0.41	0.90	0.31	1.37	0.13	0.98	0.14	1.16	0.14	1.21	0.14	1.30
100	1.20	0.93	1.31	1.58	0.57	0.77	0.61	1.29	0.55	1.02	0.64	1.31

Table 7. Recovery data of three standards from *Glycyrrhiza uralensis*

Compound	Recovery (%)				
	Original amount ( $\mu\text{g}$ )	Spiked amount ( $\mu\text{g}$ )	Determined amount ( $\mu\text{g}$ )	Positive peak (254 nm)	Negative peak (734 nm)
Dehydroglyasperin C	24.9	25.1	49.90 $\pm$ 0.26	98.83 $\pm$ 0.42	104.20 $\pm$ 0.18
	50.2	49.7	99.90 $\pm$ 0.40	102.31 $\pm$ 0.37	102.61 $\pm$ 0.53
Dehydroglyasperin D	25.3	25.0	50.07 $\pm$ 0.49	98.13 $\pm$ 0.15	108.69 $\pm$ 1.13
	49.9	49.7	99.73 $\pm$ 0.32	109.00 $\pm$ 0.17	104.61 $\pm$ 2.22
Isoangustone A	25.1	24.8	50.03 $\pm$ 0.42	105.25 $\pm$ 0.05	108.87 $\pm$ 0.71
	50.4	50.3	100.2 $\pm$ 0.50	108.34 $\pm$ 1.77	105.67 $\pm$ 0.69

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 나타났다(Table 4).

#### 정밀성(Precision)

일내 정밀도 측정에서 감초의 세가지 항산화 지표성분을 6.25, 12.5, 25, 50, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 표준액으로 5회 측정하였으며, Rt와 피크의 면적 값으로부터 일내 정밀도를 확인해 본 결과 상대표준편차(RSD) 값이 2% 이내로 나타나 정밀성이 인정되었다(Table 5). 또한, 일간 정밀도에 있어서도 일내 정밀도를 측정한 동일한 농도의 표준액으로 1일 1회 3일간 반복 측정하였다. 농도에 따른 피크의 면적을 확인한 결과 지표성분의 일간 정밀도도 2% 이내의 RSD 값을 나타내어 정밀성이 인정되었다(Table 6).

#### 정확성(Accuracy)

감초의 세 가지 항산화 지표성분을 50과 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 표준액으로 각각 3회 측정된 다음 검량선을 이용하여 이론 농도로 환산하였으며, 세 가지 지표성분으로부터 산출한 회수율(recovery, %)은 98~109%의 수치를 나타내었다(Table 7).

## 적 요

기존의 HPLC 분석법에 활성을 접목시킨 실시간 분석법을 활용한 새로운 표준화 방법을 시도하였다. 항산화, 항염증, 항암작용을 포함한 다양한 생리 활성을 가지고 있는 한약재인 감초를 대상으로 산지가 다른 아홉 종류의 감초 추출물을 시료로 하여 분석을 실시한 결과 영주산 감초에서 라디칼 소거능이 가장 우수하게 나타났으며 실시간 활성 측정법에 의해 세 개의 활성 peak가 확인되었다. 이를 대상으로 크로마토그래피를 실시하여 세 개의 활성 피크의 물질을 각각 dehydroglyasperin C,

dehydroglyasperin D, isoangustone A로 동정하였으며 감초의 항산화 지표 성분으로 설정하였다. 실시간 활성 분석법에 대한 validation을 수행한 결과 다른 물질과의 간섭이 없는 특이성, 상관계수 0.99~1.00의 직선성, 일내와 일간 정밀도의 RSD 값이 2% 이내의 정밀성 갖으며, 회수율 98~100%의 정확성을 보여 이 분석방법에 대한 신뢰도와 재현성이 검증되었다. 특히, 실시간 활성측정법은 활성 물질의 정성 및 정량분석을 동시에 측정할 수 있어 빠른 시간내 효과적으로 시료를 비교 분석할 수 있는 장점을 가지고 있다. 결과적으로 ABTS를 이용한 라디칼 소거능을 접목시킨 실시간 활성 분석법은 활성을 기반으로 한 천연물 소재의 표준화 연구 접근법 중의 하나로 유용하게 사용될 것으로 기대된다.

## 사 사

이 논문은 2014년도 정부(교육부) 재원으로 한국연구재단의 중점연구소사업(NRF-2009-0094071)과 기초연구사업(NRF-2012R1A1A2008842)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

- Akao, T., M. Hattori, M. Kanaok, K. Yamamoto, T. Namba and K. Kobahashi. 1991. Hydrolysis of glycyrrhizin to 18 beta-glycyrrhetyl monoglucuronide by lysosomal beta-D-glucuronidase of animal livers. *Biochem. Pharmacol.* 41:1025-1029.
- Folin, O. and V. Ciocalteu. 1927. On tyrosine and tryptophane determination in proteins. *J. Biol. Chem.* 27:627-650.
- Francini-Pesenti, F., M. Puato, A. Piccoli and F. Brocadello. 2008. Liquorice-induced hypokalaemia and water retention

- in the absence of hypertention. *Phytother. Res.* 22:563-565.
- Fua, B., J. Liu, H. Li, L. Li, F.S.C. Lee and X. Wang. 2005. The application of macroporous resins in the separation of licorice flavonoids and glycyrrhizic acid. *J. Chromatogr. A.* 1089:18-24.
- Hatano, T., Y. Shintani, Y. Aga, S. Shiota, T. Tsuchiya and T. Yoshida. 2000. Phenolic constituents of licorice. VIII. Structures of glicophenone and glicoisoflavanone, and effects of licorice phenolics on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Chem. Pharm. Bull.* 48:1286-1292.
- Hayashi, H., H. Fukui and M. Tabata. 1993. Distribution pattern of saponins in different organs of *Glycyrrhiza glabra*. *Planta Med.* 59:351-353.
- Jeong, Y.J., Y.J. Yang and S.C. Kang. 2013. Constituent alteration of *pueraiae* radix and *lacquer* tree mixture extract and their anti-allergic effects. *J. Korean Plant Res.* 26(1): 103-110 (in Korean).
- Johannsen, F.R. 1990. Risk assessment of carcinogenic and noncarcinogenic chemicals. *Crit. Rev. Toxicol.* 20:341-367.
- Kim, D.O., K.W. Lee, H.J. Lee and C.Y. Lee. 2002. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. *J. Agric. Food Chem.* 50:3713-3717.
- Kiuchi, F., C. Xing and Y. Tsuda. 1990. Four new phenolic constituents from licorice (root of *Glycyrrhiza* sp.). *Heterocycles* 31:629-636.
- Lee, J.Y., J.H. Lee, J.H. Park, S.Y. Kim, J.Y. Choi, S.H. Lee, Y.S. Kim, S.S. Kang, E.C. Jang and Y. Han. 2009. Liquiritigenin, a licorice flavonoid, helps mice resist disseminated candidiasis due to *Candida albicans* by Th1 immune response, whereas liquiritin, its glycoside form, does not. *Int. Immunopharmacol.* 9:632-638.
- Mae, T., H. Kishida, T. Nishiyama, M. Tsukagawa, E. Konishi, M. Kuroda, Y. Mimaki, Y. Sashida, K. Takahashi, T. Kawada, K. Nakagawa and M. Kitahara. 2003. A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand-binding activity affects diabetes in KK-Ay mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* 133:3369-3377.
- Musilek, K., J. Jampilek, J. Dohnal, D. Jun, F. Gunn-Moore, M. Dolezal and K. Kuca. 2008. RP-HPLC determination of the lipophilicity of bispyridinium reactivators of acetylcholinesterase bearing a but-2-ene connecting linker. *Anal. Bioanal. Chem.* 391:367-372.
- Shibata, S. and T. Saito. 1968. The chemical studies on the oriental plant drugs. XIX. Some new constituents of licorice root. 1. The structure of licoricidin. *Chem. Pharm. Bull.* 16:1932-1936.
- Somjen, D., E. Knoll, J. Vaya, N. Stern and S. STamir. 2004. Estrogen-like activity of licorice root constituents: glabridin and glabrene, in vascular tissues *in vitro* and *in vivo*. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 91:147-155.
- Sung, K.C. 2006. A study on the pharmaceutical characteristics & analysis of glycyrrhizin extract. *J. Korean Oil Chemists. Soc.* 23:215-222 (in Korean).
- Tanaka, S., C. Uno, M. Akimoto, M. Tabata, C. Honda and W. Kamisako. 1991. Anti-allergic effect of bryonolic acid from *Luffa cylindrica* cell suspension cultures. *Planta Med.* 57: 527-530.
- van Platerink, C.J., H.G. Janssen, R. Horsten and J. Haverkamp. 2006. Quantification of ACE inhibiting peptides in human plasma using high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B: Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 830:151-157.
- Wu, J.H., C.Y. Huang, Y.T. Tung and S.T. Chang. 2008. Online RP-HPLC-DPPH screening method for detection of radical-scavenging phytochemicals from flowers of *Acacia confusa*. *J. Agric. Food Chem.* 56:328-332.
- Xu, B.J., S.H. Yuan and S.K.C. Chang. 2007. Comparative analyses of phenolic composition, antioxidant capacity, and color of cool season legumes and other selected food legumes. *J. Food Sci.* 72:167-177.
- Yang, Y.J., H.J. Kim, S.H. Kang and S.C. Kang. 2011. Screening of natural herb resources for anti-oxidative effects in Korea. *J. Korean Plant Res.* 24:1-9 (in Korean).

(Received 23 May 2014 ; Revised 22 July 2014 ; Accepted 25 July 2014)