

재배지역별 감초의 Glycyrrhizic Acid 함량 분석과 항당뇨 효능 평가

장다운 · 송 진 · 황인국 · 이상훈 · 최정숙 · 황경아

국립농업과학원 기능성식품과

Determination of Glycyrrhizic Acid Content and Anti-Diabetic Effect of *Glycyrrhiza uralensis* Depending on Cultivation Region

Da Eun Jang, Jin Song, In Guk Hwang, Sang Hoon Lee,
Jeong-Sook Choe, and Kyung-A Hwang

Functional Food & Nutrition Division, National Academy of Agricultural Science,
Rural Development Administration

ABSTRACT This study investigated the glycyrrhizic acid content and anti-diabetic activities of *Glycyrrhiza uralensis* (GU) depending on the cultivation region (*Jecheon, Youngju, Gokseong*, China, and Uzbekistan). Glycyrrhizic acid accuracy recovery and intra- and inter-day precisions (RSD%) of the method were calculated at 99.10~107.07% and 3.92 and 6.31% for GU samples, respectively, whereas the limits of detection and quantitation were 0.14 and 0.20 $\mu\text{g/mL}$. Anti-diabetic activity was measured by α -glucosidase and glucose uptake. GU (20 g) was extracted with 70% ethanol at 70°C for 6 h. The *Jecheon* and *Gokseong* GU showed good inhibitory activity compared to the control. The *Jecheon, Youngju*, and Uzbekistan GU ethanol extracts (100 $\mu\text{g/mL}$) showed glucose uptakes (in C₂C₁₂ myotube) of 124.19, 127.18, and 126.92%, respectively, compared to the positive control. In conclusion, these methods were validated for detection of glycyrrhizic acid in GU, and the results indicate that GU might have potential anti-diabetic activities.

Key words: *Glycyrrhiza uralensis*, glycyrrhizic acid, method validation, α -glucosidase, glucose uptake

서 론

생활환경 및 식생활의 변화로 현대인의 대사질환이 증가하고 있다. 특히 당뇨병은 매년 꾸준히 증가하고 있으며, 당뇨 합병증으로 인한 사망률 또한 크게 증가하고 있다(1,2). 최근 주목할 점은 당뇨병이 성인뿐만 아니라 청소년 및 아동 등에서의 발병도 증가 추세에 있으며, 유병 연령 또한 낮아지고 있어 그 심각성이 크게 대두하고 있다(3). 혈당의 증가는 활성산소의 발생과 관련이 있으며, 이는 세포와 조직에 손상을 가하여 지질 및 단백질 변화와 DNA 손상 등을 초래한다(4,5). 따라서 최근 천연물에 존재하는 여러 가지 유용 성분들의 항산화 활성을 통한 대사질환 조절에 효과적인 소재를 발굴하고자 천연물 생리활성 평가 및 기전에 관한 연구가 전 세계적으로 집중되고 있다. 이러한 연구는 과거의 화학적 합성품에 대한 생체 내 부작용 및 자극을 최소화하고 효능을 극대화하기 위한 일환으로 활발히 진행되고 있다(6). 천연물 가운데 특히 생약재로 사용되는 감초(*Glycyrrhiza*

uralensis)는 한방에서 해독제, 진해거담제로 쓰이며, 근육이나 조직의 급격한 긴장 때문에 생기는 통증을 풀어주는 작용, 체중의 증가, 백혈구의 증가, 이노작용, 항염 작용 등의 효능이 알려져 있다(7). 감초의 항산화 활성 연구로는 원산지별 감초 추출물의 항산화 활성 비교(8), 열처리한 국산 감초 추출물의 항산화 활성(9), 감초의 에탄올 추출물의 항산화 활성 및 안정성 조사(10), 원산지별 감초 추출물의 항산화 활성 증가를 위한 효율적인 추출조건 탐색(11), 감초와 향신료 물 추출물의 항균 및 항산화능(12), 실시간 활성 시스템을 접목한 감초의 유효성분에 대한 표준화 연구(13) 등이 있으며 이를 통해 감초의 항산화 활성이 우수함을 확인할 수 있다. 최근 항산화 작용과 당뇨병은 밀접한 연관이 있는 것으로 보고되고 있고, 이는 고혈당에 의해 산화적 스트레스가 증가하여 당뇨병 발병 시 세포 내 항산화 방어 시스템이 약화하기 때문으로 설명하고 있다(14,15). 따라서 본 연구에서는 항산화 활성이 우수한 것으로 알려진 감초의 혈당개선 효과를 검증하고자 하였다. 또한, 감초의 주요 기능성 성분은 단맛 성분이며 천연 감미료로 사용되고 있는 glycyrrhizin과 licopyranocoumarin, apioliquiritin, glabridin 등이 있으며, 이 중에서 glycyrrhizin은 β -D-glucuronidase에 의해 대사되는 생리활성 성분인 glycyrrhizic acid가 있다

(16). 이 중에서도 glabridin은 체내에서 인체에 해로운 LDL (low density lipoprotein)의 산화를 억제하는 효과도 있다고 알려져 있다(9). 이처럼 다양한 효능을 가진 감초의 생리 활성 물질에 대한 품질 평가는 국내외적으로 미비한 실정이며 한약재의 표준화가 시급한 실정이다(17). 따라서 본 연구에서는 재배지역별 감초의 물질 표준화를 위해 지표물질로서 glycyrrhizic acid를 선정하였고 정량 분석 및 분석법을 검증하였다. 또한, 현대인의 심각한 대사질환 중 하나인 당뇨병 예방 및 개선에 효과적인 생약식품 소재를 발굴하고 항당뇨 효과 검증을 위해 생산지역별 감초 에탄올 추출물의 α -glucosidase 저해 활성 및 glucose uptake 활성을 평가하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 감초는 한약 규격품으로 2015년 6월 한국생약협회를 통해서 국산 3종(제천, 영주, 곡성)과 수입산 2종(우즈베키스탄, 중국)의 건조품을 각 6 kg씩 구입하여 본 실험에 사용하였다. 시료의 균질성을 위하여 600 g씩 소포장 된 각 팩에서 100 g씩 각각 취하고 한곳에 모아 혼합한 후 분쇄기(DA338-G, Daesung Artron, Seoul, Korea)를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄한 각 시료는 100 g씩 소분 후 -20°C 냉동고에 보관하며 실험에 사용하였다.

Glycyrrhizic acid 표준용액의 조제

본 실험에서 사용된 표준품은 glycyrrhizic acid(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 검량선 작성을 위해 water(Fisher Scientific Korea Ltd., Seoul, Korea)에 녹여 1 mg/mL가 되도록 고농도 표준용액을 제조한 후 단계적으로 희석하여 7개 농도(3.9, 7.8, 15.6, 31.3, 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$)로 조제하였다. Glycyrrhizic acid 함량을

구하기 위하여 표준용액의 크로마토그램에서 얻은 피크의 농도별 면적에 대하여 검량선을 작성하였다.

Glycyrrhizic acid 추출 및 HPLC 분석

지역별 감초의 glycyrrhizic acid 분석은 Hennell 등(18)과 Wang 등(19)의 방법을 참고하여 분석하였다. Glycyrrhizic acid 추출은 제천산 감초를 이용하여 조건별로 3 반복 이상 최적 추출조건 시험을 하였다. 최적 추출조건은 glycyrrhizic acid 추출의 영향 요인이라고 보는 메탄올 농도(0~100%), 추출 용매량(25~200 mL) 및 추출시간(15~120 분)을 달리하여 추출한 후 glycyrrhizic acid 함량을 분석하여 결정하였다. 즉 감초 건조 분말 0.5 g을 정확히 칭량한 후 정해진 조건에 의해 초음파 추출기(WUC-A22H, Daihan Scientific, Wonju, Korea)로 추출한 후 여과 및 정용하여 분석시험액으로 사용하였다. 최종적으로 확인된 40% 메탄올, 추출용매량 150 mL, 초음파 추출 90 min의 추출조건으로 3회 반복 실험하여 분석시험액을 만들고 0.45 μm 필터로 vial에 여과 후 high-performance liquid chromatography(HPLC)/diode-array detector(DAD)로 분석하였다. 함량은 표준용액 크로마토그램의 피크 면적을 통하여 작성된 검량선에 의해 감초 중 glycyrrhizic acid 농도를 산출하였다. 감초의 glycyrrhizic acid 분석을 위한 HPLC 분석조건은 Table 1에 요약하였다.

Glycyrrhizic acid 정량방법의 검증(method validation)

감초의 glycyrrhizic acid 함량 분석법 검증은 대한민국 약전 제11개정(20)과 AOAC 가이드라인(21)에 기초하여 수행되었다.

특이성(specificity)의 확인은 glycyrrhizic acid 표준용액과 제천산 감초 추출시험액을 HPLC로 분석하여 크로마토그램상의 머무름 시간(retention time)과 UV spectrum을 비교하여 확인하였다.

Table 1. HPLC/DAD operating condition for glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis*

Parameter	Condition		
Instrument	Waters 2489 Separation Module (Waters Co., Milford, MA, USA)		
Detector	Waters 2489 Photodiode Array Detector		
Wavelength	251 nm		
Column	X-Bridge C18 (4.6 \times 250 mm, 3.5 μm , Waters Co.)		
Column temperature	30 $^{\circ}\text{C}$		
Sample temperature	15 $^{\circ}\text{C}$		
Flow rate	0.6 mL/min		
Run time	40 min		
Injection volume	10 μL		
	Time	A: 0.5% phosphoric acid in water (v/v)	B: 0.5% phosphoric acid in acetonitrile (v/v)
Mobile phase	Initial	60	40
	15	60	40
	16	40	60
	28	0	100
	32	60	40
	40	60	40

직선성(linearity)은 glycyrrhizic acid 표준용액을 1 mg/mL 농도로 제조하고, water로 7.8~500 µg/mL 농도(7개 농도)로 6회 이상 반복 단계 희석 및 분석 후 농도에 대한 면적에 대하여 검량선을 작성한 후 평균값을 이용하여 검량선을 작성하여 직선성을 확인하였다.

검출한계(LOD, limit of detection)와 정량한계(LOQ, limit of quantitation)는 분석물질인 glycyrrhizic acid의 검출 및 정량이 가능한 최저 농도를 확인하기 위한 검출한계와 정량한계를 HPLC/DAD로 분석하여 얻은 바탕시험용액 크로마토그램의 신호잡음비(signal-to-noise) 값, 평균값 및 표준편차를 구하고, 표준편차에 각각 3과 10을 곱한 값을 평균값에 더하여 검출한계와 정량한계를 구하였다.

감초 glycyrrhizic acid 성분분석의 정확성을 위하여 표준품을 3가지 농도(125, 250, 500 µg/mL)로 제조하고, 시료 추출 시 3회 spiking 하여 분석 후 시료에 대한 표준품의 농도별 회수율(%)을 구하여 정확성을 시험하였다.

정밀성(precision) 검증은 재천산 감초를 quality control 시료로 이용하여 하루에 독립적으로 5회 반복 실험하는 일내분석을 수행하여 반복성을 계산하였고, 5일 동안 하루에 1회씩 3 반복 이상 실험하여 이들 간 결과의 일치성을 계산하여 재현성을 시험하였다.

추출물의 제조

감초 추출물의 제조방법은 식품의약품안전처(22)의 한약재 생리활성 성분 분리 및 효능 유전자 확인 연구-감초, 지실 연구결과보고서를 바탕으로 실험하였다. 지역별 감초 분말 20 g에 70% 에탄올을 10배수씩 첨가하여 70°C 진탕 항온수조(WSB-30, Daihan)에서 6시간씩 2회 반복(총 12시간) 추출하였다. 추출이 종료된 추출물은 여과지(No. 42, Whatman International Ltd., Maidstone, UK)에 감압 여과 후 회전진공농축기(EYELA CCA-110, Tokyo Rikakikai Co., Tokyo, Japan)로 40°C에서 농축한 다음 이를 3차 증류수로 재용해 하였다. 최종 감초 추출물의 재용해액은 동결 후 동결건조기(Ilshine Lab, Suwon, Korea)를 사용하여 건조 후 -70°C 냉동고에 보관하여 실험에 사용하였다. 동결 건조한 감초 70% 에탄올 추출물은 dimethyl sulfoxide (DMSO)로 희석하여 100 µg/mL 농도로 사용하였다.

α -Glucosidase 저해활성

감초 에탄올 추출물에 대한 α -glucosidase 저해 활성은 Lee 등(23)의 방법을 변형하여 실시하였다. Rat 기원의 α -glucosidase(Sigma-Aldrich Co.)를 100 mM sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 용해해 0.5 unit/mL 농도로 만든 효소용액 50 µL에 시료 10 µL를 첨가한 후, microplate reader(SpectraMax M5, Molecular Devices, LLC., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이어서 37°C에서 5분간 반응시키고 5 mM 4-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside(pNPG, Sigma-Aldrich

Co.) 50 µL를 가하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 최종 반응 후 405 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 변화로부터 효소 저해 활성을 계산하였다.

세포 배양과 myotube 분화

마우스 근육세포(C2C12 myoblast)는 American Type Culture Collection(ATCC; Manassas, VA, USA)으로부터 분양받아 실험에 사용하였다. C2C12 myoblast 세포는 10% fetal bovin serum(FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)과 penicillin streptomycin(100 U/mL; Invitrogen)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM) 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다. Myoblast 상태의 C2C12 세포를 배양하여 confluent 상태가 되면, DMEM 배지에 2% horse serum(Invitrogen)과 penicillin streptomycin(100 U/mL)을 첨가한 분화배지로 교체하여 myotube로 분화시켰다. 분화 시작 후 배지는 2일마다 교체해 주었으며, 4~5일간 분화한 후 실험에 사용하였다.

Glucose uptake 활성 평가

Glucose uptake 활성 측정은 glucose에 민감한 probe인 2-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4yl) amino]-2-deoxy(2-NBDG; Sigma-Aldrich Co.)를 이용하여 측정하였다(24). 분화가 완료된 C2C12 myotube를 PBS로 세척한 후 serum-free DMEM으로 2시간 배양한 다음 감초 에탄올 추출물 100 µg/mL를 3시간 동안 처리하였다. 이후 1 µM 인슐린을 10분 동안 처리한 후 50 µM 2-NBDG를 첨가하여 15분 동안 uptake를 유도하였다. 마지막으로 차가운 PBS로 3회 세척한 후 microplate reader를 사용하여 형광광도 excitation 485 nm, emission 535 nm에서 glucose uptake 활성을 측정하였다.

통계분석

통계분석은 SPSS 통계프로그램(Statistical Package for the Social Science, Ver.12, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 각 3회 이상 반복 실험하여 평균과 표준편차를 산출하고 glycyrrhizic acid 함량 분석 결과는 Duncan's multiple range test를 구한 후 $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다. α -Glucosidase 저해 활성 및 glucose uptake 활성은 3회 이상 실시하여 얻은 결과들을 mean \pm standard error of mean으로 정리한 후 그래프로 나타내었다. Student's t-test를 구한 후 $P < 0.05$ 인 경우 유의성이 있는 것으로 판단하였다(SPSS 12.0, IBM Co., Armonk, NY, USA).

결과 및 고찰

감초의 glycyrrhizic acid 분석법 검증

특이성은 공존이 예측되는 불순물, 간섭물질, 다른 구성

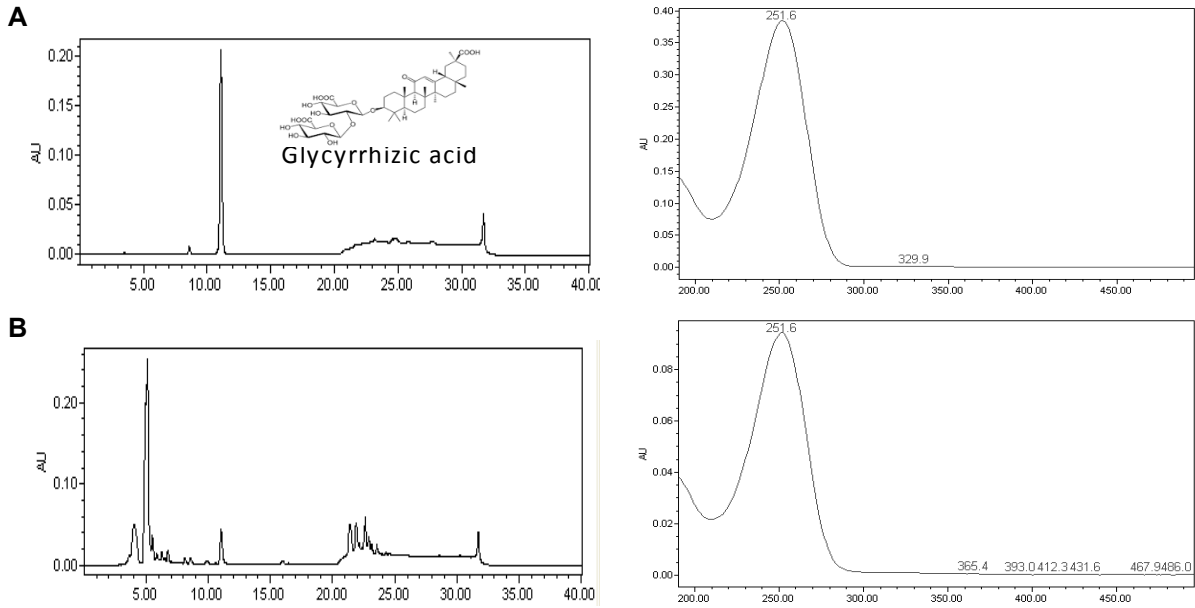


Fig. 1. HPLC chromatogram and UV spectrum of glycyrrhizic acid standard solution (500 µg/mL) (A), *Glycyrrhiza uralensis* (Jecheon) extract (B).

Table 2. Regression equation, limits of detection (LOD), and limits of quantitation (LOQ) of glycyrrhizic acid ($n=6$)

Regression equation	Correlation coefficient (R^2)	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
$y=10.615x - 20.464$	1	0.14	0.20

성분들의 존재 시 분석하고자 하는 목적성분을 정확하고 특이적으로 측정 가능한 것인지 아닌지를 판단하기 위한 검증 지표이다. Glycyrrhizic acid 표준용액과 제천산 감초 추출액의 HPLC 크로마토그램을 비교하여 glycyrrhizic acid peak가 분리되는지를 확인하였다. 그 결과는 Fig. 1과 같이 다른 물질에 간섭 없이 성분이 분리되었으며 표준용액과 감초 추출액의 peak 유지시간이 11.1분으로 일치하였으며, UV spectrum도 흡광파장 251 nm에서 정확히 일치함을 확인하였다(Fig. 1).

직선성은 glycyrrhizic acid 표준용액을 7.8~500 µg/mL의 7개 농도 수준으로 6회 이상 반복 단계 희석 후 HPLC로 분석하여 얻은 평균값으로 검량선을 작성하였다(Fig. 2).

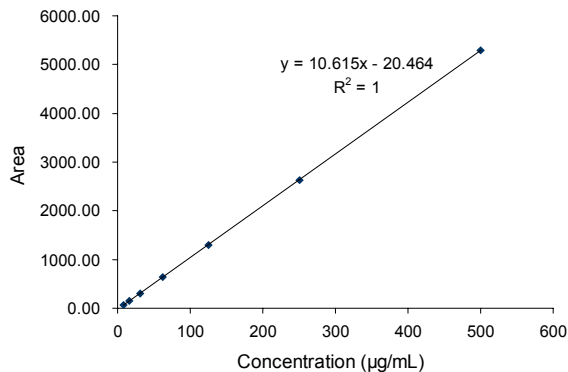


Fig. 2. Calibration curve of glycyrrhizic acid standard solution.

검량선의 상관계수(R^2)는 1로 신뢰도 높은 직선성을 나타내었고, 검출한계는 0.14 mg/mL, 정량한계는 0.20 mg/mL 수준으로 분석되었다(Table 2). 역상 고성능 액상 크로마토그래피(RP-HPLC)를 이용하여 감초 메탄올 추출물 중 liquiritin, glycyrrhizic acid와 glabridin을 분석한 Tian 등(25)의 연구에서 glycyrrhizic acid 표준품 검량선의 상관계수(R^2)는 0.9997이었으며, 검출한계는 464 ng/mL로 보고되었다. 감초 70% 메탄올 추출물을 이용하여 liquid chromatography/mass spectrometry(LC/MS)로 분석한 Liao 등(26)의 연구에서는 glycyrrhizic acid 표준품 검량선의 상관계수(R^2)가 0.9991, 검출한계는 0.031 µg/mL로 보고되어 있다. 이처럼 glycyrrhizic acid 검량선의 상관계수는 모두 1에 근사한 값이었고 검출한계는 본 연구의 값보다 낮은 경향을 보였는데, 이는 분석방법에서 검출기의 감도와 분석 조건에 따른 차이로 판단된다.

정확성 결과는 Table 3과 같이 glycyrrhizic acid의 농도

Table 3. Recovery of glycyrrhizic acid concentration

Glycyrrhizic acid concentration (µg/mL)	Recovery (%)		
	Mean	SD ¹⁾	RSD ²⁾
500	99.10	3.49	3.52
250	106.01	4.89	4.61
125	107.07	8.32	7.77

¹⁾SD: standard deviation.

²⁾RSD: relative standard deviation= $100 \times (SD/\text{mean})$.

Table 4. Precision of HPLC/DAD assay for glycyrrhizic acid analysis for *Glycyrrhiza uralensis*

<i>Glycyrrhiza uralensis</i> (Jecheon)	Glycyrrhizic acid (mg/g)	
	Intra-day ³⁾	Inter-day ⁴⁾
Mean±SD ¹⁾	16.08±0.63	17.67±1.12
RSD (%) ²⁾	3.92	6.31

¹⁾SD: standard deviation.

²⁾RSD (%): relative standard deviation=100×(SD/mean).

³⁾Repeatability refers to the results of 5 independent determinations carried out on a sample by analysing 5 replicates of the sample on the same day.

⁴⁾Reproducibility refers to the results of 5 independent determinations carried out on a sample by analyzing 5 replicates of the sample at different periods of time.

별 회수율을 확인하였다. RSD(relative standard derivation)는 8% 이내였으며, 농도별로 125 µg/mL에서는 107.07%, 250 µg/g에서는 106.01%, 500 µg/mL에서는 99.10%의 회수율을 보였다. AOAC 가이드라인(21)에 따르면 농도에 따른 회수율 범위가 설정되어 있으며, 0.1~1% 농도 범위의 회수율은 92~110%로 본 연구 결과 값을 수용하는 범위를 확인하여 정확성을 검증하였다. Tian 등(25)의 연구에서 0.5 mg/mL 농도의 glycyrrhizic acid 표준용액을 spiking 하여 88.7%로 낮은 회수율을 보였고, Liao 등(26)의 연구에서는 62.5~625 µg/mL 범위의 표준용액을 spiking 하여 회수율이 97.5%임을 보고하였다.

정밀성은 Table 4에서와 같이 intra- 및 inter-day 분석에서 일내와 일간의 RSD 값이 각각 3.92, 6.31%로 AOAC 가이드라인(21)에서 요구되는 5% 이내의 값을 보여 반복성과 재현성이 양호함을 확인하였다.

감초 중 glycyrrhizic acid 정량분석

본 연구의 glycyrrhizic acid 분석방법의 검증과정을 통하여 HPLC/DAD 분석법이 감초에 존재하는 중요한 약리적 성분의 표준화를 위한 정량분석법으로서 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성이 있음을 확인하였다. 또한, 검증된 분석방법으로 국내외 재배지역별 5종 감초의 glycyrrhizic acid 함량을 측정된 결과 12.53~54.22 mg/g 범위의 함량을 나타내었다. 특히 국내지역 제천시 감초는 16.98 mg/g, 국외지역은 우즈베키스탄산이 54.22 mg/g으로 높은 함량을 나타내었다(Table 5). 따라서 본 연구의

Table 5. Content of glycyrrhizic acid from *Glycyrrhiza uralensis* depends on cultivation regions

Cultivation regions	Glycyrrhizic acid content (mg/g) ¹⁾
Jecheon	16.98±0.35 ^c
Yeongju	12.53±0.11 ^c
Gokseong	13.83±0.36 ^d
China	37.82±0.20 ^b
Uzbekistan	54.22±0.92 ^a

¹⁾Values with different small letters within a column are significantly different ($P<0.05$) by Duncan's multiple range test.

glycyrrhizic acid 분석법 검증을 통해 생산지역별 감초의 물질 표준화 및 품질평가의 기초자료 제공 및 활용가치가 클 것으로 기대된다.

α-Glucosidase 저해 활성

α-Glucosidase는 소장에서 흡수되지 않은 다당류와 이당류를 단당류로 분해하여 소장에서의 탄수화물 흡수를 촉진하는 분해 효소이다. α-Glucosidase 억제제는 이 분해 효소의 활성을 억제하여 주로 소장의 상위 부분에서 흡수되던 단당류를 전체 소장에서 흡수되도록 함으로써 탄수화물의 흡수속도를 지연시키고 소장 전체에 포도당이 흡수되어 식후 혈당 상승을 완만하게 하는데, 이를 통해 혈액 내 포도당 수치를 조절할 수 있다(17). 따라서 본 연구에서는 생산지역별 70% 에탄올 감초 추출물의 α-glucosidase 활성을 측정하여 감초 추출물의 혈당개선 효과를 검토하였다. α-Glucosidase 활성이 감소할수록 혈당조절 능력이 우수한 것이며, 지역별 α-glucosidase 활성을 측정한 결과를 Fig. 3과 같이 나타냈다. 국내외 5종 감초 중 국내산 제천, 곡성지역의 감초에서 대조구(무 시료처리군)와 비교하였을 때 높은 저해 활성을 보이는 것으로 나타났으며, 중국산과 우즈베키스탄산은 대조구 대비 유의적인 차이를 보이지 않았다. Oh와 Kim(27)의 더덕과 일부 한약재 열수 추출물의 혼합 비율에 따른 생리활성 연구에서 감초 추출물의 α-glucosidase 저해능 측정 결과 61.3%의 높은 저해능을 확인하였다. 따라서 감초 에탄올 추출물에는 α-glucosidase 저해 활성을 나타내는 물질이 함유된 것으로 보인다. Weidner 등(28)에 의한 감초뿌리에서 아모르푸루틴류(amorfrutins)라는 항당뇨 효과가 있는 천연물질 동정 연구를 통해서 감초에는 항당뇨 효과가 있는 여러 활성물질이 존재함을 확인하였고, 이에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Glucose uptake 활성

인슐린 농도가 증가하면 간 및 근육세포에서 glucose

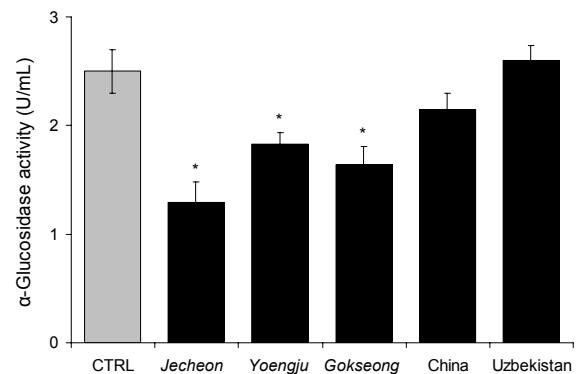


Fig. 3. α-Glucosidase activity of ethanol extract from *Glycyrrhiza uralensis* depending on cultivation regions. Vertical bars represents SEM (standard error of mean) of triplicates. Values with the asterisk (*) are significantly different from the control by Student's t-test ($P<0.05$).

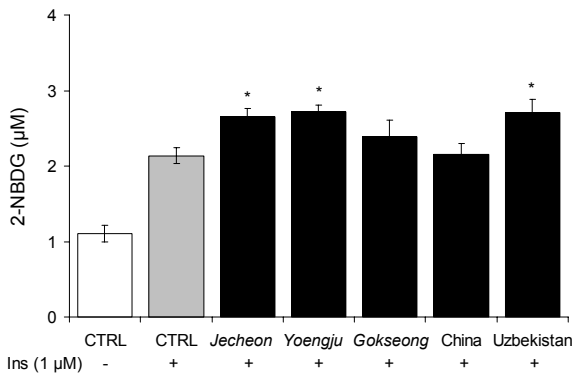


Fig. 4. Effect of *Glycyrrhiza uralensis* ethanol extracts (depending on cultivation regions) on glucose uptake in C2C12 myotube. Vertical bars represents SEM (standard error of mean) of triplicates. Values with the asterisk (*) are significantly different from the positive control by Student's t-test ($P < 0.05$).

transport의 활성이 증가하여 혈중 glucose를 세포 내로 유입하여 혈중 glucose 농도를 낮춘다(24). 이러한 원리로 감초 에탄올 추출물이 포도당 흡수 증가에 대한 기전을 조사하기 위하여 glucose uptake 활성을 측정된 결과 인슐린 처리를 한 대조군 대비 제천, 영주, 우즈베키스탄 지역의 감초에서 각각 24.19, 27.18, 26.92% 유의적으로 증가함을 확인하였다(Fig. 4).

요 약

본 연구에서는 생산지역별 감초의 물질 표준화를 위해 주요 지표성분 중 glycyrrhizic acid를 지표물질로 선정하고 정량 분석을 위해 분석법 검증은 수행하였다. 감초의 glycyrrhizic acid의 분석법 검증은 특이성, 직선성, 검출 및 정량 한계, 정확성, 정밀성을 구하여 확립하였다. 확립된 분석 방법으로 시험한 국내의 생산지역별 감초의 glycyrrhizic acid 정량 분석 결과 국내산 중에서는 제천산이, 수입산 중에서는 우즈베키스탄산이 각각 16.98, 54.22 mg/g으로 높은 함량을 나타내었다. 또한, 현대인의 심각한 대사질환 중 하나인 당뇨병 예방 및 개선에 효과적인 기능성 천연물 소재를 발굴하고 항당뇨 효과 검증을 위해 생산지역별 감초 에탄올 추출물의 α -glucosidase 저해 활성 및 glucose uptake 활성을 평가하였다. α -Glucosidase 저해 활성은 국내의 5종 중 제천, 곡성지역의 감초에서 무처리군 대비 높은 저해 활성을 보였고, 우즈베키스탄산은 유의적인 활성이 나타나지 않았다. Glucose uptake 활성의 경우 인슐린 처리를 한 대조군 대비 제천, 영주, 우즈베키스탄 지역의 감초에서 각각 24.19, 27.18, 26.92% 유의적으로 증가함을 확인하였다. 따라서 본 연구의 지표성분 분석, 분석법 검증 결과 및 생리활성 평가는 생산지역별 감초의 물질 표준화 및 품질 평가의 기초 자료를 제공하는 데 큰 의미가 있으며, 감초가 대사질환인 당뇨병 예방 및 개선에 효과적인 생약식품 소재로의 개발 가능성을 확보하였다. α -Glucosidase 저해 활성 및 glucose

uptake 활성 평가뿐만 아니라 감초에 함유된 많은 물질연구를 통해 알려지지 않은 활성에 관한 계속된 추후 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 소속 농식품자원부 국립농업과학원(과제번호: PJ011918)의 과제수행으로 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Brem H, Tomic-Canic M. 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest* 117: 1219-1222.
- Liu M, Wu K, Mao X, Wu Y, Ouyang J. 2010. Astragalus polysaccharide improves insulin sensitivity in KKAY mice: regulation of PKB/GLUT4 signaling in skeletal muscle. *J Ethnopharmacol* 127: 32-37.
- Pinhas-Hamiel O, Zeitler P. 2005. The global spread of type 2 diabetes mellitus in children and adolescents. *J Pediatr* 146: 693-700.
- Baynes JW, Thorpe SR. 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 48: 1-9.
- Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. 2004. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocr Rev* 25: 612-628.
- Ríos JL, Francini F, Schinella GR. 2015. Natural products for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Planta Med* 81: 975-994.
- Shibata S, Inoue H, Iwata S, Ma R, Yu L, Ueyama H, Takayasu J, Hasegawa T, Tokuda H, Nishino A, Nishino H, Iwashima A. 1991. Inhibitory effects of licochalcone A isolated from *Glycyrrhiza inflata* root on inflammatory ear edema and tumour promotion in mice. *Planta Med* 57: 221-224.
- Han SB, Gu HA, Kim SJ, Kim HJ, Kwon SS, Kim HS, Jeon SH, Hwang JP, Park SN. 2013. Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. *J Soc Cosmet Sci Korea* 39: 1-8.
- Woo KS, Hwang IG, Noh YH, Jeong HS. 2007. Antioxidant activity of heated licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) extracts in Korea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 689-695.
- Kim SJ, Kweon DH, Lee JH. 2006. Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). *Korean J Food Sci Technol* 38: 584-588.
- Ha JH, Lee HM, Kwon SS, Kim HS, Kim MJ, Jeon SH, Park J. 2013. Screening of effective extraction conditions for increasing antioxidant activities of licorice extracts from various countries of origin. *J Soc Cosmet Sci Korea* 39: 259-269.
- Park CJ, Park CS. 2007. The antibacterial and antioxidative activity of licorice and spice water extracts. *Korean J Food Cook Sci* 23: 793-799.
- Hong JS, Kang BG, Jang YS, Kim SH, Wang Z, Park YH, Park JH, Lim SS. 2014. Studies on standardization of licorice based on its active components with on-line HPLC bioassay system. *Korean J Plant Resour* 27: 401-414.

14. Song Y, Wang J, Li Y, Du Y, Arteel GE, Saari JT, Kang YJ, Cai L. 2005. Cardiac metallothionein synthesis in streptozotocin-induced diabetic mice, and its protection against diabetes-induced cardiac injury. *Am J Pathol* 167: 17-26.
15. Cai L, Kang YJ. 2001. Oxidative stress and diabetic cardiomyopathy: a brief review. *Cardiovasc Toxicol* 1: 181-193.
16. Um Y, Shim K, Lee J, Park H, Ma J. 2009. Quantitative analysis of glycyrrhizic acid in fermented *Glycyrrhizae Radix* by HPLC. *Korean J Oriental Med* 15: 85-89.
17. Yu YB, Kim MJ, Huang DS, Ha HK, Ma JY, Shin HK. 2007. Quantitative analysis of liquiritin and glycyrrhizin in *Glycyrrhizae Radix* by HPLC-MS/MS. *Anal Sci Technol* 20: 331-338.
18. Hennell JR, Lee S, Khoo CS, Gray MJ, Bensoussan A. 2008. The determination of glycyrrhizic acid in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. ex DC. (*Zhi Gan Cao*) root and the dried aqueous extract by LC-DAD. *J Pharm Biomed Anal* 47: 494-500.
19. Wang P, Li SFY, Lee HK. 1998. Determination of glycyrrhizic acid and 18- β -glycyrrhetinic acid in biological fluids by micellar electrokinetic chromatography. *J Chromatogr A* 811: 219-224.
20. MFDS. 2014. *The Korean pharmacopoeia*. 11th ed. Ministry of Food and Drug Safety, Cheongju, Korea.
21. AOAC. 2002. *AOAC guidelines for single laboratory validation of chemical methods for dietary supplements and botanicals*. AOAC International, Gaithersburg, MD, USA.
22. MFDS. 2006. Study on the isolation of bioactive components and the identification of biomarker genes from oriental herbal medicines – project 1: *Glycyrrhiza uralensis* and *Ponciri trifoliata*). Report of Ministry of Food and Drug Safety, Seoul, Korea. p 13.
23. Lee BB, Park SR, Han CS, Han DY, Park EJ, Park HR, Lee SC. 2008. Antioxidant activity and inhibition activity against α -amylase and α -glucosidase of *Viola mandshurica* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 405-409.
24. Deng YT, Chang TW, Lee MS, Lin JK. 2012. Suppression of free fatty acid-induced insulin resistance by phytopolyphenols in C2C12 mouse skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem* 60: 1059-1066.
25. Tian M, Yan H, Row KH. 2008. Separation of liquiritin, glycyrrhizic acid and glabridin from licorice by RP-HPLC. *Anal Sci Technol* 21: 102-108.
26. Liao WC, Lin YH, Chang TM, Huang WY. 2012. Identification of two licorice species, *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra*, based on separation and identification of their bioactive components. *Food Chem* 132: 2188-2193.
27. Oh HS, Kim JH. 2007. Physiological functionalities of hot water extract of *Codonopsis lanceolata* and some medicinal materials, and their mixtures. *Korean J Community Living Sci* 18: 407-415.
28. Weidner C, de Groot JC, Prasad A, Freiwald A, Quedenau C, Kliem M, Witzke A, Kodelja V, Han CT, Giegold S, Baumann M, Klebl B, Siems K, Müller-Kuhrt L, Schürmann A, Schüler R, Pfeiffer AFH, Schroeder FC, Büssow K, Sauer S. 2012. Amorphutins are potent antidiabetic dietary natural products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 7257-7262.