

감초 중 리퀴리티게닌 분석법 개발 및 함량분석

이종화 · 제금련 · 김도훈 · 박주영 · 심영훈 · 김종환 · 임 숙 · 신진선 · 김인선
김지연 · 성상현¹ · 장승엽² · 김동섭 · 성락선*

식품의약품안전평가원 의료제품연구부 생약연구과, ¹서울대학교 약학대학,
²식품의약품안전청 바이오생약심사부

Analysis of Liquiritigenin, an Aglycone of Liquiritin in Licorice by High Performance Liquid Chromatography

Jong Hwa Lee, Keum Ryon Ze, Do Hoon Kim, Ju Young Park, Young Hoon Shim, Jong Hwan Kim,
Sook Lim, Jin Seon Shin, In Seon Kim, Ji Yeon Kim, Sang Hyun Seong¹, Seung Yeup Jang²,
Dong Seup Kim and Rack Seon Seong*

Herbal Medicine Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-704, Korea,

¹College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea,

²Biopharmaceuticals and Herbal Medicine Evaluation Department, Korea Food & Drug Administration, Seoul 122-704, Korea,

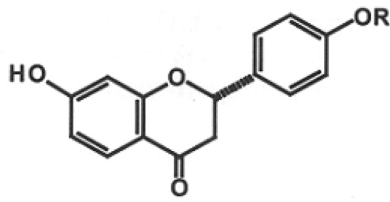
Abstract – Licorice(*Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*) is recorded as the root of *Glycyrrhiza uralensis* Fischer or *Glycyrrhiza glabra* Linné or *Glycyrrhiza inflata* Bat.(*Leguminosae*) in Korean Pharmacopoeia 9th edition (KP9) and Chinese Pharmacopoeia 2005(CP2005), *Glycyrrhiza uralensis* Fischer or *Glycyrrhiza glabra* Linné in Japanese Pharmacopoeia 2005(JP2005). It is established the content standard of Glycyrrhizin 2.5 % and liquiritin 1% in KP9 and CP2005. But, according to the reports, all Licorice species were not sufficient for content standard of liquiritin 1.0% for licorice in KP9 and CP2005. It shows different content of liquiritin among *G. uralensis*, *G. glabra* and *G. inflata*. Also, it was reported liquiritin, liquiritin apioside are transformed into liquiritigenin by human internal flora. Therefore, we have studied for the pre-treatment condition and analytical method of liquiritigenin; It was good efficient in 2M HCl reflux(1 hr) for hydrolysis and in methylene chloride for solvent fractionation. And 1% acetic acid in DW(A) and acetonitrile(B) with gradient condition as a mobile phase was most effective in HPLC analytical condition. According to these experimental methods, we have analyzed content of liquiritigenin about 77 Licorice sample. In this research, it was also examined the content of liquiritin and liquiritigenin for *Glycyrrhizae Radix* related growing area. According to the results, we suggested the content standard of glycyrrhizin more than 2.5%, liquiritigenin more than 0.7%(after hydrolysis) of licorice.

Key words – Licorice, Liquiritigenin, Analysis, HPLC

감초(Licorice, *Glycyrrhizae Radix et Rhizoma*)는 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fischer), 광과감초(*Glycyrrhiza glabra* Linne), 창과감초(*Glycyrrhiza inflata* Batal.)의 뿌리 및 뿌리 줄기로서 그대로 또는 주피를 제거한 것이다.¹⁾ 감초는 콩과(Leguminosae)에 속하며, 한의학적으로 청열해독(淸熱解毒), 윤폐지해(潤肺止咳), 보비익기(補裨益氣), 조화제약(調和諸藥)의 효능이 있다.²⁾ 또한, 항염증 작용, 항암작용, 해독작용, 항산화작용, 순환계 작용, 항미생물 작용 등이 보고되었다.³⁻⁷⁾

감초의 성분은 글리시리진, 리퀴리틴, 이소리퀴리틴, 리퀴리티게닌, 이소리퀴리티게닌, 글리시롤 등 14종의 화합물이 분리·보고되었다.^{8,9)} 이러한 물질 중 감초의 주성분은 글리시리진, 리퀴리틴, 리퀴리틴 아피오사이드, 이소리퀴리틴, 이소리퀴리틴 아피오사이드, 리퀴리티게닌 6개라고 보고되었다.¹⁰⁾ 식품의약품안전청에서는 감초의 품질관리를 위해 유효성분인 글리시리진 2.5% 이상 및 리퀴리틴 1.0% 이상으로 기준을 설정하였다.¹⁾ 그러나, 리퀴리틴의 경우 체내에 흡수되면 비당체 형태인 리퀴리티게닌으로 전환되고,¹¹⁾ 리퀴리티게닌의 다양한 활성(간보호 활성,¹²⁾ tyrosinase 활성 역

*교신저자(E-mail): seongrs@kfda.go.kr
(Tel): +82-2-380-1391~2



Liquiritigenin (LG): R-H

Liquiritin (LQ): R-β-D-Glu

Liquiritin apioside (LA): R-β-D-Glu^(2→1)-β-D-Api

Fig. 1. Structures of Liquiritigenin, Liquiritin, Liquiritin apioside

제를 통한 멜라민 생성 억제,¹³⁾ 진해효과,¹⁴⁾ 신경보호활성¹⁵⁾, 항염증 활성,¹⁶⁾ estrogenic 활성,¹⁷⁾ 등이 보고되어 있다. 또한, 산재성 칸디다증 억제활성 및 카드뮴 유래 세포 사멸억제의 경우 리퀴리틴은 활성이 없지만, 리퀴리티게닌은 활성이 있음이 보고되어 있다.^{18,19)} 따라서, 감초의 품질관리를 위하여 감초 중 함량이 높으며, 활성이 있는 성분으로 리퀴리티게닌을 선정하였다. 그러나, 리퀴리틴 아피오사이드, 리퀴리티게닌은 감초 중 함량이 낮아 품질관리를 위한 정량에 어려움이 있다.

이에 본 연구에서는 감초에 함유된 리퀴리틴류(리퀴리틴, 리퀴리티게닌, 리퀴리틴 아피오사이드)(Fig. 1)를 가수분해하여 리퀴리티게닌의 함량 분석을 실시하였다. 또한, 리퀴리티게닌의 분석을 위한 가수분해 조건, 분석법 밸리데이션 등을 수행하였으며, 개발한 분석법으로 감초 검체 77개에 대해 리퀴리티게닌 함량을 분석하여 함량기준(안)을 도출하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 감초의 국내 유통품은 서울·경기, 경상도, 전라도, 충청도 및 강원도 각 지역별로 분산하여 한약재도매업소에서 규격품을 구입하였고, 일부는 중국에서 감초를 직접 수입하는 업체를 통해 구입하거나, 채취한 것을 구매 실험하였다.(중국산 41건, 내몽고·아제르바이잔·우즈베키스탄 등 중앙아시아산 10건, 국산 2건, 수입품 2건, 기타 총 77건)

기기 및 시약 - 고성능 액체크로마토그래피(HPLC)는 Agilent 1100 Series System을 사용하였으며, Autosampler, 컬럼 오븐 및 Photodiode Array Detector(PDA)를 사용하였다. 소프트웨어는 Chemstation을 사용하였다. 시료 추출에 사용된 환류추출기는 다솔과학 DS-27S4D 추출향온수조, 감압농축기는 EYELA JP/CVE-2000를 사용하였다. 분석에 사용된 컬럼은 Supelco C18(5 μm, 4.6 × 250 mm), Xterra C18(5 μm, 4.6 × 250 mm), Shimadzu C18(5 μm, 4.6 × 250 mm),

ACE C18(5 μm, 4.6 × 250 mm) 컬럼을 사용하였다.

실험에 사용된 시약은 염산(Wako 083-03435), 디클로로메탄(Wako 135-02446), 황산(Wako 195-04706), 초산(Wako 014-00266), 인산(Wako 167-02166), 아세트니트릴(HPLC용, Merck 1.00030.4000), 물(3차 증류수,)을 사용하였다. 실험에 사용된 표준품은 리퀴리티게닌(한약재과학화연구 결과물질)을 사용하였다.

실험방법 - 감초 검체를 가수분해 처리 후 HPLC-UV를 이용하여 리퀴리티게닌을 분석하고 정량하였다.(가수분해 및 HPLC 분석법은 밸리데이션 후 적용하였다.)

분석전처리 및 분석법 밸리데이션 - 가수분해 영향을 미치는 용매, 산 농도, 추출시간 등을 검토하였으며, 분석시 직선성, 범위, 검출한계, 정량한계, 특이성, 재현성, 완전성(컬럼, 유기첨가제)에 따른 밸리데이션을 수행하였다.

결과 및 고찰

가수분해 - 리퀴리틴류(리퀴리틴, 리퀴리틴 아피오사이드, 리퀴리티게닌)의 가수분해시 리퀴리티게닌으로 변환됨을 HPLC-UV 및 LC/MS/MS를 통하여 확인하였으며 (Fig. 2), 가수분해시 2M 염산을 가하여 1시간 동안 환류추출하는 조건이 리퀴리틴, 리퀴리틴 아피오사이드가 리퀴리티게닌으로 전환되는데 가장 효율적이었다. (Table 1)

분석법 밸리데이션

직선성, 범위, 검출한계 및 정량한계(Linearity, Range, LOD and LOQ) - 검량선은 리퀴리티게닌 (0.05-1 mg/mL)의 피크면적을 이용하였으며, 상관관계수 $r^2 \geq 0.998$ 로 양호한 직선성을 나타내었다. (Fig. 3)

특이성 및 선택성 (Specificity and Selectivity) - 분리도 > 1.3 으로 시료 중의 다른 내인성 성분 및 외인성성분으로부터 잘 분리되어 분석되었다. (Fig. 4)

재현성 (Repeatability) - 리퀴리티게닌 표준품(0.5 mg/mL)을 3번 연속 분석하였을 때, 피크 면적의 측정 재현성은 상대표준편차(RSD) 0.45% 로 우수하였으며, 머무름시간의 재현성도 상대표준편차(RSD) 1.78%로 우수하였다.

완전성 (Robustness) - 컬럼 및 유기첨가제의 변화 등의 변화에 따른 분석결과, 4가지 컬럼 종류를 사용하였을 때, 머무름시간은 조금씩 차이가 있었지만, 리퀴리티게닌은 완전히 분리 분석됨을 알 수 있었다. 또한, 3가지 산(인산, 초산, 개미산) 및 각 산의 농도 변화에 따른 분석결과 모두 리퀴리티게닌이 완전히 분리분석되었으며, 이중 0.5% 초산의 경우 가장 양호한 분석결과를 보였다. (Fig. 5)

분석전처리 및 표준액 제조 - 감초 검체를 갈아 50호체를 통과시킨 가루 약 0.5 g을 정밀하게 달아 2M 염산 100 mL을 가하고 90°C에서 한 시간동안 환류추출 하였다.

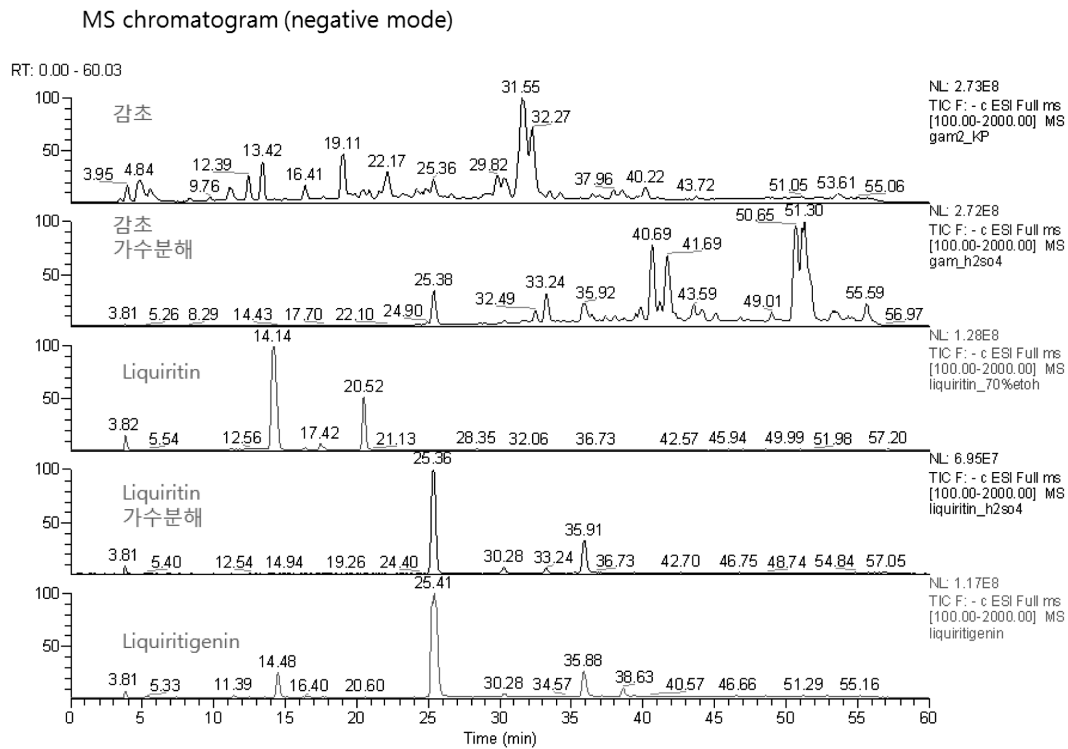


Fig. 2. LC-MS Chromatograms of Extract of Glycyrrhiza Radix, Extract of Glycyrrhiza Radix Hydrolysed, Liquiritin, Liquiritin Hydrolysed, Liquiritigenin

Table I. Condition of Hydrolysis(each acid, concentration of acid and extraction time)

산 종류	추출시간	산 농도 (mol/L)	RT	Liquiritigenin Peak Area	Liquiritigenin 농도(mg/ml)	Liquiritigenin 함량(%)
염산 가수분해	1 hr	1M	12.965	7799.10742	0.354324499	0.885811248
		2M	12.934	9779.67383	0.444304437	1.110761093
		3M	12.949	8790.58203	0.399368596	0.998421489
	2 hr	1M	12.719	9517.81055	0.432407617	1.081019044
		2M	12.933	9434.10547	0.428604777	1.071511943
		3M	12.878	7432.12158	0.337651813	0.844129532
	3 hr	1M	12.796	9468.70117	0.430176509	1.075441272
		2M	12.934	8157.81396	0.370621046	0.926552614
		3M	12.73	7496.8501	0.340592521	0.851481303
황산 가수분해	1 hr	1M	12.747	7053.3584	0.320444065	0.801110162
		2M	12.918	8495.08496	0.385943745	0.964859363
		3M	12.648	8737.49023	0.39695656	0.9923914
	2 hr	1M	12.9	9541.8547	0.433499977	1.083749943
		2M	12.893	9641.58691	0.438030953	1.095077382
		3M	12.903	8023.35742	0.364512495	0.911281236
	3 hr	1M	12.888	9583.03418	0.435370819	1.088427049
		2M	12.707	9144.73828	0.415458416	1.038646039
		3M	12.877	7478.5957	0.339763198	0.849407995

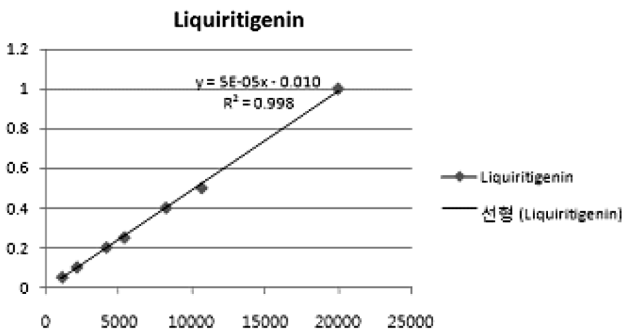


Fig. 3. Calibration Curve of Liquiritigenin Standard.

추출액에 디클로로메탄 100 mL을 가하여 40°C 30분간 환류추출한 다음 추출액을 분액깔때기에 넣어 디클로로메탄층을 취한다. 이 과정을 2회 반복한다. 디클로로메탄층을 모아 감압농축한 뒤 메탄올 2 mL에 녹여 검액으로 하였다.

표준액은 리퀴리티게닌 표준품 약 10 mg에 70% 에탄올을 넣어 100 mL로 하여 표준액으로 하였다.

분석조건 - 이동상 아세토니트릴(A), 0.5 % 초산용액(B)를 기울기용리를 통해 분석하였다. 기울기용리는 다음과 같다; 0분 A : B = 75 : 25, 20분 A : B = 75 : 25, 30분 A : B = 65 : 35, 45분 A : B = 75 : 25, 유량은 1.0 mL/분으로 하였으며, 검출파장은 276 nm로 하여 분석하였다.

함량모니터링 - 개발된 분석법을 이용하여 감초 검체 77건에 대해 리퀴리틴, 리퀴리티게닌 함량 분석 및 가수분해 후 리퀴리티게닌 함량 모니터링을 실시하였다. 함량 모니터링 결과, 리퀴리틴 0~3.55%, 리퀴리티게닌 0~1.84%, 가수분해 후 리퀴리티게닌 0.58~1.73%의 함량을 보였다. 그러나, 현행 대한약전 9개정 감초의 기준은 리퀴리틴 1.0% 이상으로, 기준을 충족하지 못하는 검체가 36건이었다.(부적합률 47%) 따라서, 감초의 유효성분인 리퀴리티게닌을 감초 가수분해를 통해 정량하였으며, 모든 감초에서 리퀴리티

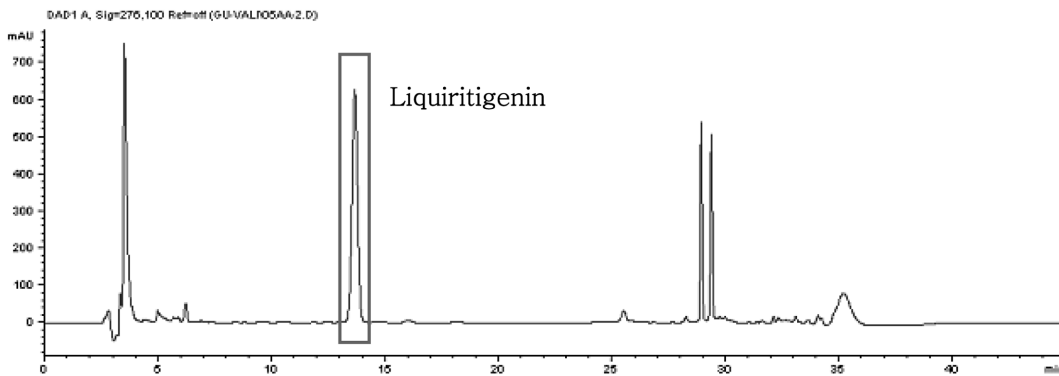


Fig. 4. HPLC Chromatogram for Extract of Glycyrrhiza Radix.

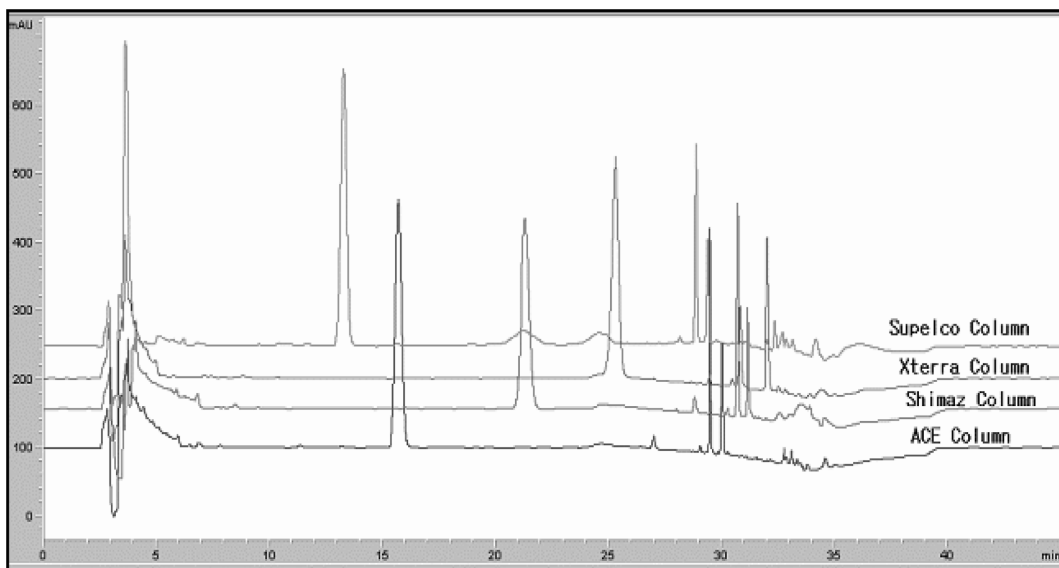


Fig. 5. HPLC Chromatogram of Each Column (Roubstness)

Table II. Content of Liquiritin, Liquiritigenin, Liquiritigenin Hydrolysed for Glycyrrhiza Radix

번호	원산지	LQ(%)	LT(%)	LQ-H(%)	번호	원산지	LT(%)	LQ(%)	LQ-H(%)
1	내몽고	0.04	1.33	0.91	40	내몽고	-	1.84	1.46
2	중국	0.03	1.46	1.17	41	내몽고	0.00	2.60	1.35
3	중국	0.02	2.03	1.12	42	중국	0.83	0.01	0.98
4	원남	0.13	3.55	1.73	43	신강	0.98	0.07	0.97
5	신강	0.16	2.59	1.50	44	내몽고	0.98	0.10	0.75
6	감숙	0.04	1.69	0.92	45	중국	0.09	-	0.86
7	중국	0.02	1.05	0.79	46	수입품	0.77	0.02	0.71
8	중국	0.01	2.61	1.44	47	우즈벡	0.15	-	0.79
9	내몽고	0.02	1.36	1.11	48	-	0.90	0.09	0.65
10	-	0.02	1.57	1.12	49	중국	0.15	0.01	0.76
11	중국	0.02	1.75	1.04	50	수입품	1.00	0.02	0.69
12	중국	0.02	1.71	0.99	51	중국(신강)	0.45	0.01	0.63
13	한국	0.06	1.09	0.53	52	중국	0.52	0.01	0.69
14	중국	0.02	1.82	0.96	53	중국	0.99	0.01	0.90
15	중국	0.03	2.27	1.01	54	중국	0.81	0.01	0.68
16	중국	0.02	2.07	1.12	55	중국	0.96	0.02	0.89
17	중국	0.03	3.18	1.39	56	중국	0.55	0.01	0.58
18	중국	0.01	1.15	0.98	57	중국	0.15	-	0.91
19	중국	0.02	1.29	0.95	58	중국	0.92	-	0.78
20	-	0.05	2.09	1.11	59	야생	0.70	0.02	0.81
21	중국	0.00	1.04	0.72	60	-	-	-	0.48
22	우즈벡	0.03	1.63	1.25	61	-	0.20	-	0.85
23	우즈벡	0.01	1.38	1.05	62	신강(북)	0.16	-	0.68
24	우즈벡	0.03	2.20	1.36	63	우즈벡	0.12	-	0.81
25	영주	0.00	1.21	0.71	64	우즈벡	0.06	-	0.65
26	내몽고	0.00	1.58	1.07	65	-	0.72	0.02	1.00
27	신강	0.01	1.08	0.71	66	-	0.59	0.02	0.67
28	신강(북)	0.10	1.09	0.72	67	중앙아시아	0.03	-	0.67
29	내몽고	0.02	2.71	1.30	68	-	0.09	-	1.05
30	내몽고	0.02	2.41	1.36	69	-	0.17	-	1.03
31	내몽고	0.02	1.55	0.88	70	-	0.10	-	0.90
32	-	0.02	3.02	1.33	71	-	0.11	-	1.25
33	-	0.03	2.28	1.21	72	-	0.13	-	0.78
34	신강	0.01	1.21	0.75	73	아제르바이잔	0.06	-	0.58
35	중앙아시아	-	-	0.67	74	우즈벡	0.15	-	1.01
36	-	0.00	1.70	0.97	75	아제르바이잔	0.04	-	0.85
37	-	0.00	1.60	0.91	76	중국 신강	0.72	-	1.11
38	-	0.00	2.26	0.80	77	중국	0.25	-	1.06
39	중국	0.00	1.47	0.91					

※ LQ=Liquiritigenin, LT=Liquiritin, LQ-H=Liquiritigenin after Glycyrrhiza Radix hydrolysed

게닌을 정량할 수 있었다.(Table II) 감초 가수분해 후 리퀴리티게닌 함량 평균(m)은 0.95%, 표준편차(s)는 0.26, 상대 표준편차는 27.12였다. 이러한 결과를 바탕으로, 가수분해 후 리퀴리티게닌의 함량을 0.7% 이상으로 제안할 경우, 감초 77개 검체 중 6개의 검체만 0.7% 이하로 나타났다.(부적합률 7.7%)

결 론

감초 중 리퀴리틴은 함량이 낮고, 체내에서 리퀴리티게닌으로 전환되므로, 가수분해를 통한 리퀴리티게닌으로의 전환 후 정량하는 연구를 수행하였다. 감초 중 리퀴리티게닌 정량을 위한 가수분해 조건 검토결과, 감초 검체를 2M 염산으로 1시간 환류추출하는 것이 가장 효율적이었다. 또한, 리퀴리티게닌의 HPLC 분석을 위한 이동상 조건으로 1% 아세트산(A)과 아세토니트릴(B) 용매를 기용기용리로 하였을 때 효과적이었다. 함량 모니터링 연구 결과를 통해 대한 약전 9개정에 수재된 감초의 함량기준을 글리시리진산 2.5% 이상, 리퀴리티게닌 0.7% 이상으로 수정·제안하였다.

사 사

본 연구는 식품의약품안전청 자체연구사업(08111생약안212)에서 수행되었습니다.

인용문헌

- 대한약전 제9개정 (2007), 903. 식품의약품안전청, 서울.
- 한방약리학 (2006), 115. 신일상사, 서울.
- 한약재 생리활성성분의 효능 확인 연구 결과보고서 (2006), 34-41. 식품의약품안전청, 서울
- Gujral, M. L., Sareen, K. N., Tangri, K. K., Roy, A. K., Gupta, G. P. and Amma, M. K. (1959) Antiarthritic activity of *Glycyrrhiza glabra* Linn.. *Indian J. Psychol.*, **3**: 39-47.
- Herold, A., Cremer, L., Calugaru, A., Tamas, V., Inonescu, F., Manea, S. and Szegli, G (2003) Hydroalcoholic plant extracts with anti-inflammatory activity. *Roum. Arch. Microbial. Immunol.* **62**: 117-129.
- Akamatsu, H., Komura, J., Asada, Y. and Niwa, Y. (1991) Mechanism of anti-inflammatory action of glycyrrhizin : Effects on Neutrophil functions including reactive oxygen species generation. *Planta Med.* **7**: 119-121.
- Rao, B. N. N., Anderson, M. B., Musser, J. H., Gilbert, J. H., Schaefer, M. E., Foxal, C. and Brandley, B. K. (1994) Sialyl Lewis X mimics derived from a pharmacophore search are selection inhibitors with anti-inflammatory activity. *J. Biol. Chem.* **269**: 19663-19666.
- 한약재 생리활성성분 분리 및 효능 유전자 확인 연구 (감초, 지실) 결과보고서 (2006), 90-94, 식품의약품안전청, 서울
- Wang, Y.-C. and Yang, Y.-S. (2007) Simultaneous quantification of flavonoids and triterpenoids in licorice using HPLC. *J. Chromatography B*, **850**: 392-399.
- Kenji, K., Mao, S., Rie, N., Takashi, M. and Yukihiko, S. (2007) Constituent Properties of Licorices Derived from *Glycyrrhiza uralensis*, *G. glabra*, or *G. inflata* Identified by Genetic Information. *Biol. Pharm. Bull.* **30**: 1271-1277.
- Takayuki, A., Kazuhisa I., Takashi, M., Shuichi, T. and Masaki, A. (2003) Permeability of the flavonoids liquiritigenin and its glycosides in licorice roots and davidigenin, a hydrogenated metabolite of liquiritigenin, using human intestinal cell line Caco-2. *J. Ethnopharmacol.* **89**: 285-289.
- Kim, Y. W., Ki, S. H., Lee, J. R., Lee, S. J. Kim, C. W. Kim, S. C. and Kim, S. G. (2006) Liquiritigenin, an aglycone of liquiritin in *Glycyrrhizae radix*, prevents acute liver injuries in rats induced by acetaminophen with or without buthionine sulfoximine. *Chem. Biol. Interact.* **161**: 125-138.
- 이주상, 김정아, 조세훈, 손에량, 장태수, 소명숙, 정시련, 이승호. 감초의 Tyrosinase 활성 억제 성분. *생약학회지* **34**: 33-39 (2003).
- Junzo, K., Rie, N., Hiroyuki, I. and Masayoshi, K. (2003) Antitussive principles of *Glycyrrhizae radix*, a main component of the Kampo preparations Bakumondo-to (Mai-mendong-tang). *Eur. J. Pharmacol.* **469**: 159-163.
- Rui-ting, L., Li-bo, Z. and Qiu-jun, L. (2009) Liquiritigenin inhibits A β_{25-35} -induced neurotoxicity and secretion of A β_{1-40} in rat hippocampal neurons. *Acta. Pharmacol. Sin.* **30**: 899-906
- Kim, Y. W., Zhao, R. J., Park, S. J., Lee, J. R., Cho, I. J., Yang, C. H., Kim, S. G. and Kim, S. C. (2008) Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF- κ B-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br. J. Pharmacol.* **154**: 165-173.
- Jennifer, E. M., Nitzan, L., Richard, E. S., Scott, B., Tetjana, Z., Sylvia, C., William, A. R., Mary, T., Issac, C., Leonard, F. B., Dale, C. L. (2008) Liquiritigenin is a plant-derived highly selective estrogen β , receptor agonist. *Mol. Cell. Endocrinol.* **283**: 49-57.
- Lee, J. Y., Lee, J. H., Park, J. H., Kim, S. Y., Choi, J. Y., Lee, S. H., Kim, Y. S., Kang, S. S., Jang E. C. and Han, Y. M. (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.
- Kim, S. C., Byun, S. H., Yang, C. H., Kim, C. Y., Kim, J. W. and Kim, S. G. (2004) Cytoprotective effects of *Glycyrrhizae radix* extract and its active component liquiritigenin against cadmium-induced toxicity (effects on bad translocation and cytochrome c-mediated PARP cleavage). *Toxicology.* **197**: 239-251.

(2009년 11월 3일 접수)