

## 발효보중익기탕들의 생물전환성분 분석

김동선 · 노주환 · 조장원\* · 마진열#

한국한의약연구원 신한방제제연구센터, \*한국식품연구원

(Received September 1 2011; Revised September 26, 2011; Accepted September 30, 2011)

### Analysis of Bioconversion Compositions from Fermented Bojungikki-tangs

Dong-Seon Kim, Joo-Hwan Roh, Chang-Won Cho\* and Jin Yeul Ma#

Herbal Medicine Improvement Research Center, Korea Institute of Oriental Medicine, Daejeon 305-811, Korea

\*Regional Food Industry Research Group, Korea Food Research Institute, Sungnam 463-746, Korea

**Abstract** — Traditional herbal medicinal preparation Bojungikki-tang (BJT) is well-known herbal medicine used as tonic. We fermented Bojungikki-tang using nine lactic acid bacteria strains and discovered two remarkably increased compositions from the fermented BJTs using HPLC/DAD analysis. HPLC/DAD-guided fractionation of the increased compositions followed by structure identification using NMR and MS identified liquiritigenin and isoliquiritigenin. These bioconversion compositions were quantitatively analyzed using HPLC-DAD. Liquiritigenin contents were highest in BJTs fermented with *L. amylophilus* (1.91 mg/g) and *L. fermentum* (1.89 mg/g), which were increased by 20-fold compared to BJT (0.09 mg/g). Isoliquiritigenin contents were highest in BJTs in fermented with *L. plantarum* (0.19 mg/g) and *L. fermentum* (0.19 mg/g), which were increased by 19-fold compared to BJT (0.01 mg/g).

**Keywords** □ Bojungikki-tang, fermentation, herbal medicine, bioconversion, liquiritigenin, isoliquiritigenin

보중익기탕(補中益氣湯)은 동의보감(東醫寶鑑)<sup>1)</sup>에 노역(奴役)이 태심(太甚)하거나 음식을 조절하지 못해 몸이 번열(煩熱)하고 자한(自汗)하며 권태(倦怠)한 증(證)을 다스린다고 되어 있으며, 허약체질, 피로권태, 병후의 쇠약, 식은땀, 식욕부진의 개선을 위한 처방으로 사용되고 있다.<sup>2)</sup> 보중익기탕은 황기, 인삼, 백출, 감초, 당귀, 진피, 승마 및 시호로 구성되며,<sup>2)</sup> 효능연구로는 면역증진, 항염, 항산화, 항알러지, 항당뇨 효과 등이 보고되어 있다.<sup>3)</sup>

최근 한의학계에서는 장내 미생물을 이용한 발효한약에 대한 관심이 증가하고 있다.<sup>4,7)</sup> 발효과정을 거친 한약재는 유효성분이 저분자화 및 소수성화 되면서 체내 흡수를 증대시킬 수 있고, 특정 장내세균을 보유하지 않은 개인의 경우에도 정상적으로 동일한 효능을 기대할 수 있다.

본 연구에서는 유산균을 사용하여 발효보중익기탕들을 제조하고, 제조된 발효보중익기탕들로부터 주요 생물전환성분을 분리

하여, 그 구조를 확인하고, 균주변화에 따른 이들 성분들의 함량을 비교 하여, 우수한 균주를 선별하고자 하였다.

### 재료 및 실험방법

#### 실험재료 및 기기

보중익기탕의 제조에 사용한 황기, 백출, 당귀, 진피, 승마, 시호는 영천현대약업사, 인삼은 농협중앙회, 감초는 허브팜으로부터 구매하였다. HPLC 분석을 위한 acetonitrile과 water는 HPLC용 특급용매로, trifluoroacetic acid(TFA)는 분석용 등급의 용매로 각각 J.T. Baker(USA)와 대정화금에서 구입하였다. 생물전환성분의 최종확인 및 정량분석에 사용된 표준품 liquiritigenin 및 isoliquiritigenin은 시그마 알드리지社 제품을 사용하였다.

HPLC 분석은 Waters 2695 및 996 photodiode array detector에 의하여 수행되었다. NMR spectrum은 Varian사의 INOVA 400NB spectrometer(<sup>1</sup>H 및 <sup>13</sup>C, 각각 400 MHz 및 100 MHz)에서 CD<sub>3</sub>OD를 용매로 사용하여 측정하였다. ESI-MS data는 Shimadzu사의 ESI-IT-TOFMS에 의하여 얻어졌다.

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 042-868-9466 (팩스) 042-868-9573  
(E-mail) jyma@kiom.re.kr

### 보충익기탕의 조제

보충익기탕은 동의보감(東醫寶鑑)을 기본으로 하여 황기 300 g, 인삼, 백출 및 감초 각 200 g, 당귀와 진피 각 100 g, 승마와 시호 각 60 g으로 구성된 약재 1,220 g에 생수(무학, 산청) 12.20 liter를 넣어 1시간 침적한 다음 180분간 열탕 추출한 후 test sieve(106  $\mu$ m, Retsch, Germany)로 여과하였다. 제조된 탕액 10 liter는 발효보충익기탕들의 제조에 사용하였고, 나머지는 동결건조하여 발효보충익기탕의 생물전환성분 확인을 위한 대조군으로 사용하였다.

### 발효보충익기탕의 조제

보충익기탕 발효에 사용된 9종의 유산균(*Lactobacillus casei* KFRI 129, *L. plantarum* KFRI 144, *L. fermentum* KFRI 145, *L. amylophilus* KFRI 161, *L. curvatus* KFRI 166, *L. hilgardii* KFRI 229, *L. amylophilus* KFRI 238, *L. gasseri* KFRI 658, *Bifidobacterium thermophilum* KFRI 748)은 한국식품연구원 (Korea Food Research Institute: KFRI, Seongnam, Korea) 식품미생물 유전자은행에서 분양 받았다. *Lactobacillus* spp.는 MRS broth(Difco, Detroit, MI, USA)에서, *B. thermophilum*은 Reinforced Clostridial Medium(Difco)에서 계대 배양한 뒤 초기 균수를  $1 \times 10^6$  CFU/ml로 조절하여 inoculum으로 사용하였다. 발효는 1 M NaOH로 보충익기탕의 pH를 7.0으로 조정 한 후, 121°C, 1.5 기압에서 15분간 가압멸균하고, 상온까지 냉각시킨 후, 유산균을 1%(v/v)로 접종하고 37°C의 항온배양기에서 48시간 동안 통기 배양하여 보충익기탕을 발효하였다. 제조된 발효 보충익기탕들은 동결건조하여 분석에 사용하였다.

### 생물전환성분의 탐색

보충익기탕과 발효보충익기탕들을 각각 50 mg/ml로 메탄올에 용해하고, PVDF syringe filter를 사용하여 여과한 후 HPLC로 분석하여 발효 후 증가 또는 새롭게 나타난 피크들을 탐색하였다. HPLC분석은 Optima pak C18 column(5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  250 mm)을 사용하여 수행되었으며, 칼럼의 온도는 35°C로 유지하였고, 검출은 PDA detector(DAD)를 사용하였다. 이동상은 발효 후 새로운 피크가 발견되는 다양한 이동상 조건을 탐색하여,

Table I – Eluent condition for HPLC analysis

Time (min)	Solvent A	Solvent B
0	10	90
10	30	70
45	50	50
55	70	30
65	75	25
75	10	90
85	10	90

Solvent A: acetonitrile; Solvent B: water including 0.1% TFA.

acetonitrile(A) 및 0.1% TFA 함유 water(B)를 이용한 gradient system으로 Table I과 같이 최적화 하였고, 유속은 1.0 ml/min, 주입량은 20  $\mu$ l로 하였다.

### 생물전환성분의 분리

*L. plantarum*으로 발효하여 얻어진 발효보충익기탕을 감압건조하여 얻어진 건조분말 40 g을 D101 resin 800 g으로 크로마토그래피를 실시하였다. 이때 이동상 용매는 water : EtOH=9 : 1로부터 100% EtOH 까지 함량을 증가시키면서 유출하여 9개의 분획물(Fr. 1~Fr. 9)을 얻었다. 각 분획물을 PVDF syringe filter를 사용하여 여과한 후 HPLC로 위에 기술된 조건으로 생물전환성분들의 피크들이 함유된 분획물들을 확인하였다.

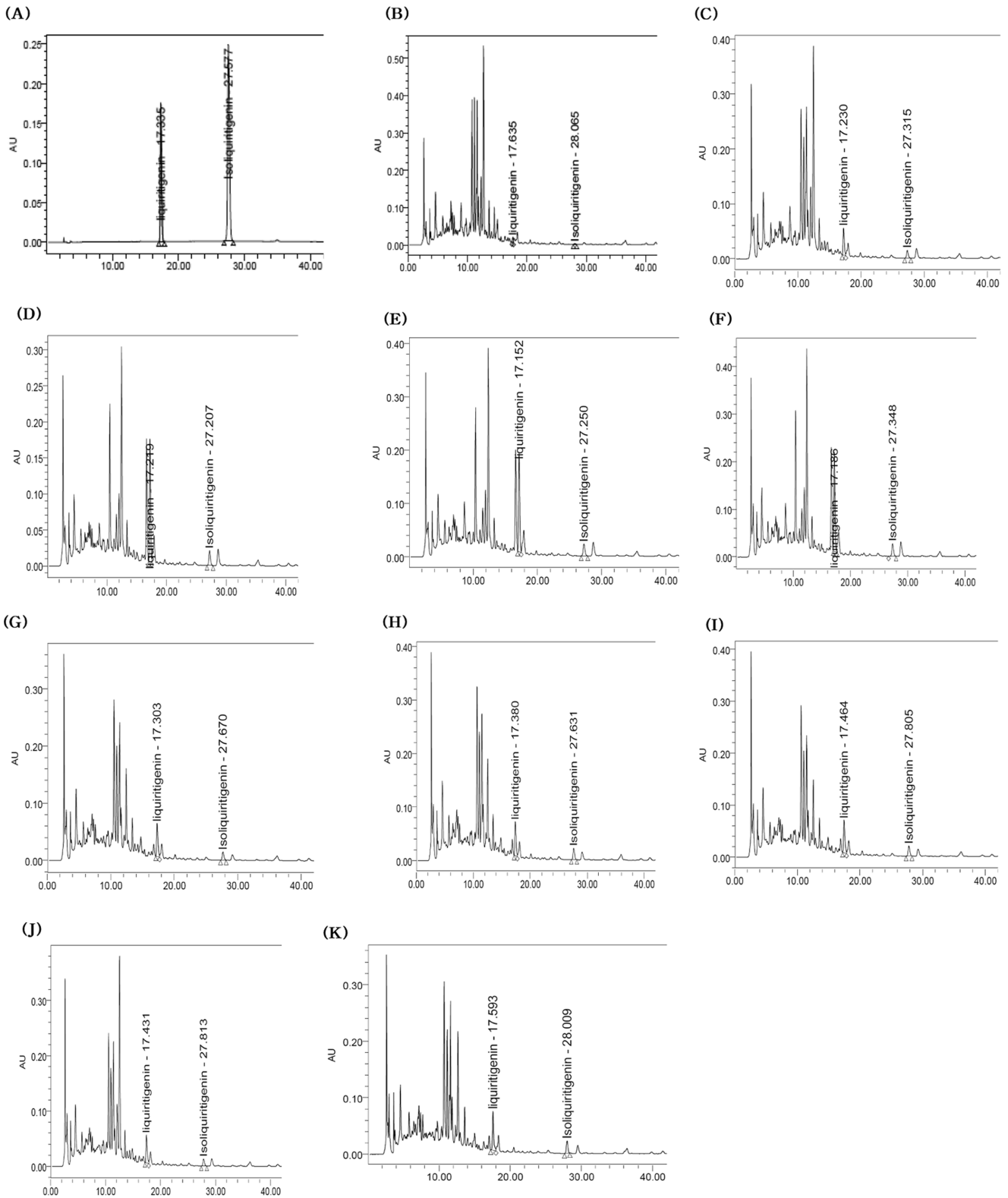
두 개의 생물전환성분을 함유하는 분획물 Fr. 7을 건조하여 얻어진 3.2 g을 메탄올에 용해하여 silica gel 15 g에 흡착하여 건조한 후, silica gel 150 g으로 칼럼 크로마토그래피를 실시하였다. 이때 이동상 용매는 CHCl<sub>3</sub> : MeOH=50 : 1로부터 40 : 1, 30 : 1, 20 : 1, 10 : 1, 5 : 1로 MeOH 함량을 증가시켜, 8개의 분획물들(Fr. 7-1~Fr. 7-8)을 얻었다. HPLC분석에 의하여 2개의 생물전환성분이 주요성분으로 확인된 Fr. 7-5 150 mg을 silica gel 10 g에 hexane : EtOAc=1 : 1을 전개용매로 하여 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 화합물 1(14.5 mg)과 화합물 2(3.8 mg)를 얻었다.

### 화합물 1

Colorless crystal powder, ESI-MS(*m/z*); 279[M+Na]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz),  $\delta$ ; 2.69(1H, dd, *J*=17.0, 3.0 Hz, H-3a), 3.05(1H, dd, *J*=17.0, 13.0 Hz, H-3b), 5.38(1H, dd, *J*=13.0, 3.0 Hz, H-2), 6.35(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.50(1H, dd, *J*=8.5, 2.0 Hz, H-6), 6.82(2H, d, *J*=8.5 Hz, H-3', 5'), 7.32(2H, d, *J*=8.5 Hz, H-2',6'), 7.73(1H, d, *J*=8.5 Hz, H-5); <sup>13</sup>C-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz),  $\delta$ ; 45.1(C-3), 81.2(C-2), 104.0(C-8), 111.9(C-6), 115.1(C-10), 116.4(C-3', 5'), 129.2(C-2', 6'), 130.0(C-5), 131.5(C-1'), 159.1(C-4), 165.7(C-9), 167.0(C-7), 193.7(C=O).

### 화합물 2

Yellow crystal powder, ESI-MS(*m/z*); 257[M+H]<sup>+</sup>, <sup>1</sup>H-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz),  $\delta$ ; 6.29(1H, d, *J*=2.4 Hz, H-3'), 6.42(1H, dd, *J*=8.8, 2.4 Hz, H-5'), 6.85(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-3, 5), 7.61(1H, d, *J*=15 Hz, H-a), 7.62(2H, d, *J*=8.8 Hz, H-2, 6), 7.79(1H, d, *J*=15.2 Hz, H- $\beta$ ), 7.97(1H, d, *J*=9.2 Hz, H-6'); <sup>13</sup>C-NMR(CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz),  $\delta$ ; 102.7(C-3'), 108.1(C-5'), 113.5(C-1'), 115.0(C-3, 5), 116.4(C-a), 126.6(C-1), 131.1(C-6'), 132.0(C-2, 6), 144.2(C- $\beta$ ), 160.7(C-4), 165.2(C-2'), 166.3(C-4'), 192.3(C=O).



**Fig. 1** – Analytical HPLC chromatograms of Bojungikki-tang (BJT) before and after fermentation with lactic acid bacteria strains. (A) liquiritigenin and isoliquiritigenin; (B) BJT; (C) BJT fermented with *L. casei*; (D) BJT fermented with *L. plantarum*; (E) BJT fermented with *L. fermentum* BJT; (F) BJT fermented with *L. amylophilus*; (G) BJT fermented with *L. curvatus*; (H) BJT fermented with *L. hilgardii*; (I) BJT fermented with *L. amylophilus*; (J) BJT fermented with *L. gasseri*; (K) BJT fermented with *B. thermophilum*; UV detection at 310 nm.

### 균주들에 따른 발효보중익기탕들의 생물전환성분들의 함량분석

발효 보중익기탕의 정량분석은 HPLC를 사용하여 생물전환성분 탐색을 위하여 최적화된 조건과 동일한 조건으로 분석하였다. Liquiritigenin 274 nm에서, isoliquiritigenin 370 nm에서 검출된 UV-Vis. 흡광도를 정량분석을 위하여 사용하였다. 표준품은 0.781, 3.125, 12.5, 50.0, 100 µg/ml의 농도로 제조하고, 각 균주별 보중익기탕 시료의 농도는 50 mg/ml로 하여 HPLC 분석을 시행한 후 표준품의 양과 peak area 사이의 상관관계를 도출하여 검량선을 작성하여 계산하였다.

## 결과 및 고찰

### HPLC-DAD 분석을 통한 생물전환성분들의 탐색 및 분리

보중익기탕으로부터 유산균들을 이용하여 9종의 발효보중익기탕들이 제조되었고, 이들의 성분변화를 HPLC-DAD로 분석하여 발효 후 증가 또는 새롭게 나타난 피크들을 탐색한 결과, 17.3분과 27.6분의 retention time에서 발효 후 획기적으로 증가된 2종의 성분들을 확인 하였다(Fig. 1). 이들 성분을 HPLC-DAD-guided fractionation에 따라 성분을 추적하면서, D101 resin과 silica gel 칼럼 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 분리한 결과 17.3 min의 retention time에서 화합물 1과 27.6 min에서의 화합물 2를 분리하였다.

### 분리된 생물전환성분들의 구조결정

분리된 화합물 1은 무색분말로 ESI-MS 스펙트럼에서  $m/z$  279  $[M+Na]^+$ 를 관찰하여 분자량이 256임을 알 수 있었다.  $^1H$ -NMR 스펙트럼에서는 aromatic 영역에서는  $\delta$ 6.82(d,  $J=8.5$  Hz) 및 7.32(d,  $J=8.5$  Hz)에서 각각 2개의 수소에 해당하는 A2B2 형태의 1,4-2치환 benzene ring의 proton signal들을 관찰하였고, 서로  $m$ -coupling 하고 있는  $\delta$ 6.35(1H, d,  $J=2.0$  Hz)과 6.50(1H, dd,  $J=8.5, 2.0$  Hz)에서의 proton들, 그리고  $\delta$ 6.50의 proton과  $o$ -coupling 하고 있는 7.73(1H, d,  $J=8.5$  Hz, H-5)에서의 signal이 관찰되었다.  $\delta$ 2.69, 3.05에서 aliphatic proton에서 기인한 double doublet signal들이 나타났고, 이들이 17.0 Hz의 서로 동일한 coupling constant를 갖으며, 또한 이들 둘 다 5.38 ppm에서의

double doublet의 methine signal과 각각 3.0, 13.0 Hz 각각 커플링하고 있음이 확인되어, 이는 flavanone C환에서 유래한 것으로 추정하였다. 이들  $^1H$  및  $^{13}C$ -NMR 스펙트럼 자료를 참고 문헌<sup>8)</sup>과 비교하여 liquiritigenin(Fig. 2)으로 동정하였다.

분리된 화합물 2는 황색분말로 ESI-MS 스펙트럼에서  $m/z$  257 $[M+H]^+$ 을 관찰하여 분자량이 256임을 알 수 있었다.  $^1H$ -NMR 스펙트럼에서는 aromatic 영역에서의 proton signal들만이 관찰되었으며,  $\delta$ 6.85(d,  $J=8.8$  Hz) 및 7.62(d,  $J=8.8$  Hz)에서 각각 2개의 수소에 해당하는 A2B2 형태의 1,4-2치환 benzene ring의 proton signal들을 관찰하였고, 서로  $m$ -coupling 하고 있는  $\delta$ 6.29(1H, d,  $J=2.4$  Hz)와 6.42(1H, dd,  $J=8.5, 2.0$  Hz)에서의 proton signal들, 그리고  $o$ -coupling 하고 있는  $\delta$ 6.42와 7.97에서의 proton signal들이 관찰 되었다. 그리고  $\delta$ 7.61(1H, d,  $J=15$  Hz), 7.79(1H, d,  $J=15$  Hz)에서 olefin의 trans coupling이 관찰되어 chalcone 골격으로 추정되었다. 이들  $^1H$  및  $^{13}C$ -NMR 스펙트럼 자료를 참고문헌<sup>8)</sup>과 비교하여 isoliquiritigenin(Fig. 2)으로 동정하였다.

### 발효보중익기탕들의 생물전환성분들의 함량분석

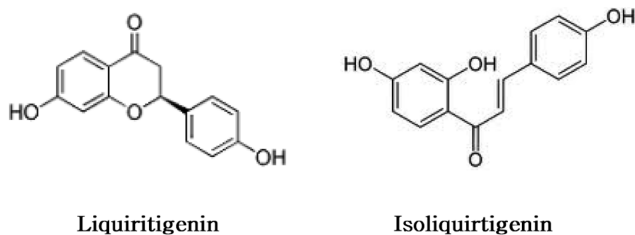
생물전환성분 Liquiritigenin 및 isoliquiritigenin의 HPLC 정량을 위한 검량선의 상관관계는 0.9999 이상으로 매우 적합하였다. liquiritigenin에 대한 검량선은  $Y=5060X+29500$ ,  $R^2=0.9999$ 이였으며, isoliquiritigenin의 검량선은  $Y=128000X+88800$ ,  $R^2=0.9999$  이었다( $Y$ =peak area,  $X$ =표준품의 함량( $\mu$ g/ml)).

분석결과 발효전 보중익기탕은 liquiritigenin과 isoliquiritigenin이 각각 0.09 mg/g과 0.01 mg/g으로 미량이 검출된 반면, 대부분의 발효보중익기탕들에서, 이들은 대부분 10배 이상 증가되었다(Table II).

Liquiritigenin 함량은 *L. amylophilus* 균주로 발효한 보중익기탕이 1.91 mg/g으로서 가장 높게 나타나 발효전 보중익기탕과 비교하여 20배 이상 증가하였으며, 다음으로 *L. fermentum* 1.89 mg/g, 그 다음으로 *L. plantarum* 1.61 mg/g 순으로 높게 나

**Table II** – The contents of bioconversion compositions in fermented Bojungikki-tangs (Mean  $\pm$  SD, n=3)

Fermented Bojungikki-tangs	Liquiritigenin (mg/g)	Isoliquiritigenin (mg/g)
Not fermented	0.09 $\pm$ 0.002	0.01 $\pm$ 0.001
<i>L. casei</i>	0.42 $\pm$ 0.005	0.16 $\pm$ 0.006
<i>L. plantarum</i>	1.61 $\pm$ 0.018	0.19 $\pm$ 0.008
<i>L. fermentum</i>	1.89 $\pm$ 0.023	0.19 $\pm$ 0.005
<i>L. amylophilus</i>	1.91 $\pm$ 0.018	0.18 $\pm$ 0.003
<i>L. curvatus</i>	0.62 $\pm$ 0.013	0.11 $\pm$ 0.002
<i>L. hilgardii</i>	0.57 $\pm$ 0.009	0.15 $\pm$ 0.003
<i>L. amylophilus</i>	0.70 $\pm$ 0.011	0.16 $\pm$ 0.001
<i>L. gasseri</i>	0.58 $\pm$ 0.007	0.11 $\pm$ 0.001
<i>B. thermophilum</i>	0.59 $\pm$ 0.011	0.14 $\pm$ 0.002



**Fig. 2** – Chemical structures of isolated bioconversion compounds.

타났다.

Isoliquiritigenin은 *L. plantarum*과 *L. fermentum*이 발효전 보중익기탕과 비교하여 둘다 동일하게 19배 증가하여 0.19 mg/g, 그 다음으로 *L. amylophilus* 0.18 mg/g으로 높게 나타났다.

## 결 론

발효보중익기탕으로부터 생물전환성분으로서 liquiritigenin과 isoliquiritigenin을 분리, 동정하였다. 9종의 유산균들로부터 제조된 발효보중익기탕들에 대하여 이들 함량을 분석한 결과, liquiritigenin 함량은 *L. amylophilus* 균주로 발효한 보중익기탕이 1.91 mg/g으로서 가장 높게 나타나 발효전 보중익기탕과 비교하여 20배 이상 증가하였으며, 다음으로 *L. fermentum* 1.89 mg/g, 그 다음으로 *L. plantarum* 1.61 mg/g 순으로 높게 나타났다. Isoliquiritigenin은 *L. plantarum*과 *L. fermentum*이 발효전 보중익기탕과 비교하여 둘다 동일하게 19배 증가하여 0.19 mg/g, 그 다음으로 *L. amylophilus* 0.18 mg/g으로 높게 나타났다. 따라서 이들 두 가지 성분 모두에 대한 관점에서 볼 때 우수한 균주는 *L. fermentum*과 *L. plantarum*으로 판단된다.

분리된 생물전환성분 중 liquiritigenin(Fig. 1)은 항염,<sup>9)</sup> 학습 및 기억력,<sup>10)</sup> 항우울증효능,<sup>11)</sup> 항알러지효능<sup>12)</sup> 등이 보고 되어 있다.

Isoliquiritigenin은 항산화 효과,<sup>13)</sup> 혈소판응집억제효과,<sup>14)</sup> 항우울증효과,<sup>15)</sup> 혈관이완효과,<sup>16)</sup> 에스트로젠 유사활성,<sup>17)</sup> 다양한 암 세포에 대한 억제활성<sup>18-20)</sup> 등이 보고 되어 있다. 또한 isoliquiritigenin과 이것의 배당체인 화합물인 liquiritin의 항염활성에 관한 논문이 보고 되었는데 isoliquiritigenin은 lipopolysaccharide (LPS)-유도 nitric oxide와 prostaglandin E2 생성을 더욱 강력하게 억제함을 보고 하였다.<sup>21)</sup> 따라서 본 연구를 통하여 선발된 유산균을 사용하고 발효공정을 최적화하여 효능을 증가 시키거나, 새로운 효능을 도출 할 수 있을 것으로 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원의 연구지원(K11050)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) 허준 : 동의보감, 남산당, 서울 p. 434 (1976).
- 2) 안창균 : 상용한방해설집, 기화제약주식회사, 진주 p. 317 (1999).
- 3) 서민준, 이규봉, 박진한, 홍승현 : 한국한의학연구원논문집 **16**, 83 (2010).

- 4) 박정현, 김호준, 이명중 : 비만에서 장내 미생물 균총의 역할과 발효 한약의 활용. 한방비만학회지 **9**, 1 (2009).
- 5) Bae, E. A., Han, M. J., Kim, E. J. and Kim, D. H. : Transformation of ginseng saponins to ginsenoside Rh2 by acids and human intestinal bacteria and biological activities of their transformants. *Arch. Pharm. Res.* **27**, 61 (2004).
- 6) 함성호, 임병락, 유가화, 가선오, 박병현 : 발효에 의한 오가피의 항당뇨 활성 촉진. 동의생리병리학회지 **22**, 340 (2008).
- 7) 서성숙, 정승기 : 발효 금은화의 인플루엔자 바이러스 A형에 대한 저해효과. 대한한방내과학회지 **30**, 465 (2009).
- 8) Ma, C.-J., Li, G.-S., Zhang, D.-L., Liu, K. and Fan, X. : One step isolation and purification of liquiritigenin and isoliquiritigenin from *Glycyrrhiza uralensis* Risch. using high-speed counter-current chromatography. *J. of Chromatogr. A* **1078**, 188 (2005).
- 9) Kim, J. Y., Park, S. J., Yun K. Y., Cho, Y. W., Park, H. J. and Lee, K. T. : Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. of Pharmacol.* **584**, 175 (2008).
- 10) Liub, R. T., Zoub, L. B., Fub, J. Y. and Lua, Q. J. : Effects of liquiritigenin treatment on the learning and memory deficits induced by amyloid  $\beta$ -peptide (25-35) in rats. *Behav. Brain Res.* **210**, 24 (2010).
- 11) Wang, W., Hu, X., Zhao, Z., Liu, P., Hu, Y., Zhou, J., Zhou, D., Wang, Z., Guo, D. and Guo, H. : Antidepressant-like effects of liquiritin and isoliquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in the forced swimming test and tail suspension test in mice. *Prog. Neuro-Psychoph.* **32**, 1179 (2008).
- 12) Shin, Y. W., Bae, E. A., Lee, B., Lee, S. H., Kim, J. A., Kim, Y. S. and Kim, D. H. : *In vitro* and *in vivo* antiallergic effects of *Glycyrrhiza glabra* and its components. *Planta Med.* **73**, 257 (2007).
- 13) Haraguchi, H., Ishikawa, H., Mizutani, K., Tamura, Y. and Kinoshita, T. : Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. *Bioorg. Med. Chem.* **6**, 339 (1998).
- 14) Tawata, M., Aida, K., Noguchi, T., Ozaki, Y., Kume, S., Sasaki, H., Chin, M. and Onaya, T. : Anti-platelet action of isoliquiritigenin, an aldose reductase inhibitor in licorice. *Eur. J. Pharmacol.* **212**, 87 (1992).
- 15) Yu, S. M. and Kuo, S. C. : Vasorelaxant effect of isoliquiritigenin, a novel soluble guanylyl cyclase activator, in rat aorta. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 1587 (1995).
- 16) Tamir, S., Eizenberg, M., Somjen, D., Izrael, S. and Vaya, J. : Estrogen-like activity of glabrence and other constituents isolated from licorice root. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **78**, 291 (2001).
- 17) Ma, J., Fu, N. Y., Pang, D. B., Wu, W. Y. and Xu, A. L. : Apoptosis induced by isoliquiritigenin in human gastric cancer

- MGC-803 cells. *Planta Med.* **67**, 754 (2001).
- 18) Baba, M., Asano, R., Takigami, I., Takahashi, T., Ohmura, M. and Okada, Y. : Studies on cancer chemoprevention by traditional folk medicines XXV. Inhibitory effect of isoliquiritigenin on azoxymethane-induced murine colon aberrant crypt focus formation and carcinogenesis. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 247 (2002).
- 19) Rafi, M. M., Vastano, B. C., Zhu, N., Ho, C. T., Ghai, G. and Rosen, R. T. : Novel polyphenol molecule isolated from licorice root (*Glycyrrhiza glabra*) induces apoptosis, G2/M cell cycle arrest, and Bcl-2 phosphorylation in tumor cell lines. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 677 (2002).
- 20) Motohiro, K., Yoshiko, S., Yoichi, M., Osamu, U., Akihiro, K., Toshiyuki, S., Masaki, B., Toru, O., Hoyoku, N. and Tsuneharu, M. : Isoliquiritigenin inhibits the growth of prostate cancer. *European Urology* **43**, 580 (2003).
- 21) 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. : Anti-inflammatory effects of liquiritigenin as a consequence of the inhibition of NF-kappaB-dependent iNOS and proinflammatory cytokines production. *Br. J. Pharmacol.* **154**, 165 (2008).