

한국 제천 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisher)의 추출 조건별 추출물의 항산화 및 항균 활성 평가

하지훈·정윤주·성준섭·김경미·김아영·부민민·서지영·이난희·박진오*·박수남[†]

서울과학기술대학교 정밀화학과, 화장품종합기술연구소

*대봉엘에스(주)

(2015년 12월 1일 접수, 2012월 12월 8일 수정, 2015년 12월 16일 채택)

Antioxidant and Antibacterial Activities of *Glycyrrhiza uralensis* Fisher (Jecheon, Korea) Extracts Obtained by various Extract Conditions

Ji Hoon Ha, Yoon Ju Jeong, Joon Seob Seong, Kyoung Mi Kim, A Young Kim,
Min Min Fu, Ji Young Suh, Nan Hee Lee, Jino Park*, and Soo Nam Park[†]

Department of Fine Chemistry, Cosmetic R&D Center, Seoul National University of Science and
Technology, 232, Gongneung-ro, Nowon-gu, Seoul 01811, Korea

*Daebong LS, Ltd, Incheon 21697, Korea

(Received December 1, 2015; Revised December 8, 2015; Accepted December 16, 2015)

요약: 본 연구는 한국 제천에서 재배된 감초(*Glycyrrhiza uralensis* Fisher, *G. uralensis*)를 대상으로 추출 조건(85% 에탄올, 추출 온도 및 시간) 별로 추출한 추출물에 대하여 항산화 활성 및 항균 활성을 측정하고 이로부터 최적의 추출 조건을 선정하여 감초 추출물을 화장품 원료로 개발하기 위한 제조 공정에 활용하고자 하였다. 실험에 사용한 시료는, 각 추출 조건에서 얻어진 추출물을 농축하여 분말로 한 시료(시료-1)와 추출물을 농축하지 않고 추출물 원액을 그대로 사용한 시료(시료-2)이다. 항산화 활성은 라디칼 소거활성, 총항산화능, 활성 산소로 유도된 세포손상에서 세포보호효과를 측정하였다. 항균 활성은 피부 상재균에 대한 최소저해농도를 측정하였다. 1,1,-Diphenyl-2-picrylhydrazyl를 이용한 라디칼 소거활성에서, 시료-1은 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 추출시간이 6 h일 때가 12 h일 때보다 약 10% 정도 더 큰 라디칼 소거활성을 나타냈다. 반면에 시료-2의 라디칼 소거활성은 추출 시간에 따른 유의적 차이를 나타내지 않았다. 한편 동일 온도에서 12 h 추출한 추출물의 수율은 6 h 추출한 경우의 수율보다 2.6배 더 컸다. 하지만 총 플라보노이드 함량은 1.1배 정도 더 크게 나타났다. 따라서 추출 시간이 길어도 총플라보노이드 함량은 거의 증가하지 않았음을 보여준다. 추출 조건별 감초 추출물의 라디칼 소거활성, 총항산화능 및 세포보호효과가 추출물의 수율을 반영한 것이 아니라 추출물 중에 함유된 총플라보노이드 함량에 의존함을 나타내고 있다. 피부 상재균에 대한 항균 활성은 추출 조건별 동일 농도(시료-1)에서 측정했을 때, 세 균주(*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acnes*)에 대해 25 및 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 추출된 감초추출물(156 $\mu\text{g}/\text{mL}$)은 methyl paraben (2,500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)보다 약 16배 정도로 매우 큰 항균 활성을 나타냈다. 결론적으로 항산화 활성 및 항균 활성이 큰 감초 추출물의 최적 추출 조건은 85% 에탄올로 40 $^{\circ}\text{C}$ 에서 6 h 추출한 추출물이 최적임을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과, 화장품에 항산화 활성 및 항균 활성이 큰 감초 추출물을 원료화하기 위해서는 추출 조건별 추출물의 수율, 활성 성분의 수율, 추출물의 농도별 활성 평가와 추출 수율이 반영된 추출물 원액 자체의 활성을 종합 평가해서 추출 조건을 선정해서 원료의 제조 공정에 반영하는 것이 중요함을 시사한다.

[†] 주 저자(e-mail: snpark@seoultech.ac.kr)
call: 02)970-6451

Abstract: This study was carried out to evaluate the antioxidant and antibacterial activities of *Glycyrrhiza uralensis* Fisher (Jecheon, Korea) extracts obtained by various extraction conditions (85% ethanol, heating temperatures and times), and to establish the optimal extraction condition of *G. uralensis* for the application as cosmetic ingredients. The extracts obtained under different conditions were concentrated and made in the powdered (sample-1) and were the crude extract solutions without concentration (sample-2). The antioxidant effects were determined by free radical scavenging activity (FSC₅₀), ROS scavenging activity (OSC₅₀), and cellular protective effects. Antibacterial activity was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) on human skin flora. DPPH free radical scavenging activity of sample-1 (100 µg/mL) was 10% higher in group extracted for 6 h than 12 h, but sample-2 didn't show any significant differences. The extraction yield extracted with same temperature for 12 h was 2.6 times higher than 6 h, but total flavonoid content was 1.1 times higher. These results indicated that total flavonoid content hardly increased with increasing extraction time. Free radical scavenging activity, ROS scavenging activity and cellular protective effects were not dependent on the yield of extraction, but total flavonoid content of extraction. Antibacterial activity on three skin flora (*S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acnes*) of sample-1 in different extraction conditions were evaluated on same concentration, and the group extracted at 25 and 40 °C showed 16 times higher than methyl paraben (2,500 µg/mL). In conclusion, 85% ethanol extracts of *G. uralensis* extracted at 40 °C for 6 h showed the highest antioxidant and antibacterial activity. These results indicate that the extraction condition is important to be optimized by comprehensive evaluation of extraction yield with various conditions, yield of active component, and activity test with concentrations, and activity of 100% extract, for manufacturing process of products.

Keywords: *Glycyrrhiza uralensis*, antioxidative effect, antibacterial activity, various extraction conditions, cellular protective effect

1. 서 론

활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 노화, 특히 피부 노화의 원인 물질로 작용하고 있다. 활성산소종은 정상적인 대사과정에서도 생성되며, 질병상태나 스트레스를 받을 때 과잉으로 생성된다. 특히 피부는 자외선에 노출되어 있어 ROS를 만드는 광화학적 반응들이 피부에서 계속 일어난다. 뿐만 아니라 공해, 흡연 및 세균에 의해서도 활성산소종이 생성되는 것으로 알려져 있다[1-3].

활성산소들 중 반응성이 가장 큰 1O_2 와 $\cdot OH$ 등은 피부 세포 및 조직 손상을 야기하는데 주도적인 역할을 한다. 이들은 항산화효소와 비효소적 항산화제로 이루어진 피부 항산화 방어망을 파괴함으로써 피부를 산화적 상태로 변화시킨다. 이와 같이 활성산소로 유도된 산화적 스트레스는 지질 및 단백질 산화, 탄력 섬유인 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합, 히알루론산 사슬의 절단, 멜라닌 생성반응 촉진, DNA 산화 등 피부 구성 성분들의 손상을 야기한다. 결과적으로 피부의 탄력 감소, 주름 및 색소침착 등 피부노화가 가속화된다. 따라서 피부노화를 억제하기 위해서는 피부에서 생성되는 과잉의 활성산소 생성 억제 및 생성된 활성산소의 효율적인 제거를 위한 적절한 항산화제의 개발과 보충이 이루어져야 한다[4-7].

감초는 콩과 식물로 아시아에서 각종 한약재 및 식품 분야에서 널리 이용되고 있다[8,9]. 현재 우리나라에서 이용되는 감초는 크게 두 종류(*G. uralensis* 및 *G. glabra*)가 있다. *G. uralensis*는 아시아계 감초로 특히 약용이나 식품에서 이용되며 대부분 중국에서 수입한 감초로 알려져 있다. 유럽계 감초인 *G. glabra*는 glabridin 성분이 주요 성분으로 함유되어 있고 현재 기능성 미백 소재인 유용성 감초 추출물로 고시되어 있다[10]. 감초의 주성분으로는 glycyrrhizin과 플라보노이드인 liquiritin, liquiritigenin 및 isoliquiritigenin 등과 아이소플라보노이드인 licoricidin 등이 보고되고 있고[11], 감초 추출물은 항산화 활성, 면역 증강 및 항균 활성 등이 있는 것으로 보고되고 있다[12-14].

본 연구에 앞서 저자들은 국내산 농산물의 수입대체 목적으로 국가별(한국, 중국 및 우즈베키스탄) 감초의 항산화 활성을 비교 분석하여 보고한 바 있다. 한국 감초 추출물의 분획별 항산화 활성을 측정된 결과 수입된 중국 및 우즈베키스탄 감초보다 라디칼 소거활성과 활성산소에 대한 세포보호효과가 매우 탁월함을 확인하였다[15]. 또한 원산지별 감초 추출물에 대하여 피부 상재균(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Propionibacterium acnes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* 및 *Pityrosporum ovale*)에 대한 항균 활성을 측정 비교하였다. 감초 추출물의 여드름균(*P. acnes*)에

대한 최소저해농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 측정한 결과 한국 감초 에틸아세테이트 분획은 MIC가 156 $\mu\text{g/mL}$ 로 중국 및 우즈베키스탄 감초보다 각각 4배 및 16배 더 큰 항균효과를 보였고, 이는 화장품의 방부제로 알려진 methyl paraben (2,500 $\mu\text{g/mL}$)보다도 항균 활성이 훨씬 큼을 알았다[16]. 피부 상재균(*B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli*, *P. aeruginosa*)에 대한 항균 활성에서 가장 우수한 효과를 보인 성분은 isoliquiritigenin이었고, 특히 수입산 감초에 비해 우리나라 감초가 우수한 항균 활성을 나타낸 것은 한국 감초에 비교적 많이 함유된 isoliquiritigenin과 liquiritigenin에 때문인 것으로 파악되었다[17].

한국산 감초 추출물을 화장품에 응용하기 위해 감초 추출물 함유 크림을 제조하여 저장조건별(4 °C, 25 °C, 37 °C 및 45 °C) 및 태양광(3 ~ 5월) 하에서 제품 안정성(pH, 점도, 흡광도 및 색상 변화)을 평가한 결과, 한국 감초 추출물은 제품의 안정성에도 기여함을 확인하였다[18]. 또한 감초의 유효 성분들의 안정화 및 피부 흡수 증진과 효능 증대를 위한 다양한 피부 활성소재 전달체 연구도 수행하였다. Isoliquiritigenin을 담지한 하이드로겔의 제조 및 그들의 물리화학적 특성과 피부 흡수능 평가 및 항균 활성을 평가 보고한 바 있다[19, 20].

감초 추출물의 항산화 및 항균 활성이 큰 최적의 추출 조건을 확립을 위해 원산지별(한국, 중국 및 우즈베키스탄), 추출 용매별, 추출 온도별, 추출 시간별 조건에 따른 감초 추출물을 제조하여 평가하여, 한국 감초 추출물의 최적 추출 조건(85% 에탄올, 60 °C, 6 h)을 확립하였고[21], 가장 큰 항균 활성은 85% 에탄올, 40 °C 및 12 h 추출조건에서 나타났다고 보고했다[22]. 그러나 상기의 추출 조건은 추출물의 추출 수율 등이 고려하지 않고 추출물을 건조 분말로 하여 동일 농도에서 평가한 결과를 최적 추출조건으로 선정된 결과였다. 일반적으로 천연물을 화장품 원료로 이용할 때는 건조된 추출물을 일정 농도로 희석하여 사용하든가 추출물 원액을 농축하지 않고 그대로 사용하는 경우로 나눌 수 있다.

본 연구에서는 추출 조건별로 추출된 감초 추출물을 건조시킨 파우더를 동일 농도에서 활성을 측정한 것과 건조시키지 않은 추출물 자체 원액(추출 수율이 반영된 것)을 대상으로 항산화 및 항균 활성을 평가하여 그

결과를 바탕으로 화장품 원료화하기 위한 최적의 추출 조건을 확립하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 기기 및 시약

UV-Vis spectrophotometer는 Cary 50 (Varian, Australia), high-performance liquid chromatography (HPLC)는 SPD-M20A (Shimadzu, Japan)을 사용하였고, pH meter는 SevencompactTMS220 (Mettler Toledo, Switzerland)을 사용하였다. Luminol, heparin, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), rose bengal, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)는 Sigma Chemical Co. (USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 는 Junsei Chemical Co. (Japan)을 사용하였으며, 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, H_2SO_4 그리고 에탄올 (EtOH), 화장품 방부제인 methyl paraben (MP) 및 propyl paraben (PP)와 비교물질로 사용한 (+)- α -tocopherol (1,000 IU vitamin E/g)은 Sigma (USA)에서 구매하였다.

2.2. 감초 추출물 및 시료 제조

2.2.1. 국내산 감초 추출물 제조 및 추출물 중 총플라보노이드 함량 측정

건조시킨 국내산 제천 감초 50 g을 교반 및 환류 장치가 있는 추출기에 넣은 후 85% 에탄올 1,000 mL를 가한 다음, Table 1의 추출 조건(온도별; 25, 40, 60 °C 및 추출 시간별; 6 h, 12 h)별로 추출하여 추출물을 제조하였다. 85% 에탄올 추출 용매 조건은 선행 연구에서 항산화 및 항균 효과가 있는 추출물을 얻는데 가장 적합한 용매 조건으로 선정된 바 있다. 감초 추출물 중 총플라보노이드 함량 측정에는 표준 물질로 감초의 주 성분인 liquiritin을 사용하여 검량선을 작성하고 이 검량선을 이용하여 추출물 중의 총플라보노이드 함량을 측정하였다.

상기의 6가지 추출 조건으로 추출된 추출물을 2.2.2.항에 있는 2가지 방법으로 실험 시료를 제조하여 항산화 활성 및 피부 상재균에 대한 항균 활성을 측정하는데 사용하였다.

Table 1. Extraction Conditions of *G. uralensis* Cultivated in Korea

Extraction conditions	Sample-1	Sample-2
85% EtOH, 25 °C, 6 h	A1	A2
85% EtOH, 25 °C, 12 h	B1	B2
85% EtOH, 40 °C, 6 h	C1	C2
85% EtOH, 40 °C, 12 h	D1	D2
85% EtOH, 60 °C, 6 h	E1	E2
85% EtOH, 60 °C, 12 h	F1	F2

2.2.2. 항산화 활성 및 항균 활성 측정을 위한 시료 제조
일반적으로 천연물을 화장품 원료로 이용 시, 건조된 추출물을 일정 농도로 희석하여 사용하거나 추출물 원액을 농축하지 않고 그대로 사용하는 경우로 나눌 수 있다. 본 연구에서는 2가지 시료 제조 방법에 따른 항산화 및 항균 활성을 확인하여 최적 추출 조건을 선정하고자하였다. 시료-1은 Table 1의 추출 조건으로 추출한 것을 농축하여 건조 추출물 파우더를 얻고 이를 동일 농도로 제조하였으며, 각 실험에서 사용한 농도는 Table 2에 나타내었다.

시료-2는 Table 1의 추출 조건으로 얻은 추출물을 농축하지 않고 추출물 원액 자체를 동일한 희석 배수로 각각의 추출조건별 감초 추출물 희석하여 제조하였으며, 각 실험에 사용한 희석 배수는 Table 2에 나타내었다. 항균 활성 평가에서는 시료-1 및 시료-2의 제조방법으로 만들어진 시료들을 희석하여 실험에 이용하였다.

2.3. 항산화 활성 측정

2.3.1 DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

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 µg/mL 농도의 추출 조건별 감초 추출물 1 mL 첨가하여 섞은 후 실온에서 10 min 동안 반응시킨 다음 UV spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군(control)은 감초 추

Table 2. Concentration of Sample-1 and Dilution factor of Sample-2 on the Experiments Respectively

Experiments	Sample-1 (µg/mL)	Sample-2 (Dilution rate)
Free radical scavenging activity assay	100	40
Oxygen radical scavenging activity assay	10	1600
Cellular protective effect assay	25	1600

출물을 첨가하지 않았고, 공시험(blank)은 DPPH를 첨가하지 않고 측정하여 시료의 영향을 보정하였다. 라디칼 소거 활성은 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 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거 활성(총항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂ 계는 각종 ROS (O₂^{·-}, ·OH 그리고 H₂O₂)를 생성시키며 철과 같은 전이금속은 특히 반응성이 큰 ·OH를 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 µg/mL 농도의 추출 조건별 감초 추출물을 50 µL 첨가한 후, 2.5 mM EDTA 40 µL, 5 mM FeCl₃ · 6H₂O 10 µL, 35 mM 루미놀 80 µL를 넣고 섞은 후 5 min 동안 항온시켰다. 그 후 Fenton 반응을 일으키기 위해 150 mM H₂O₂ 40 µL를 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.

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{(\text{Control의 cpm} - \text{Sample의 cpm})}{(\text{Control의 cpm} - \text{Blank의 cpm})} \times 100$$

2.4. 광용혈법을 이용한 세포보호효과 측정

2.4.1. 적혈구 현탁액 제조

실험에 사용된 토끼 적혈구는 삼육축산농원(경기도 화성군)에서 구입한 생후 6개월 된 건강한 토끼로부터 얻어 채혈 후 heparin이 첨가된 시험관에 넣어 4 °C의 냉장고에 보관하고 12 h 이내에 실험에 이용하였다. 이를 3,000 rpm으로 5 min 동안 원심분리하여 혈구와 혈장을 분리하였고, 분리한 혈구는 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4, Na₂HPO₄ · 12H₂O 9.6 mM, NaH₂PO₄ · 2H₂O 1.6 mM)로 3회 반복해서 세척하여 원심분리하고 흰색의 백혈구 층은 제거하였다. 실험에 사용된 적혈구 현탁액은 700 nm에서 O. D. 값이 0.6이었으며 이때 적혈구 수는 1.5 × 10⁷ cells/mL이었다.

2.4.2. 감초 추출물의 광용혈 억제 효과

적혈구 현탁액 3.5 mL를 파이렉스 시험관(No. 9820)에 넣은 후 추출 조건별 감초 추출물을 10 µg/mL를 50 µL씩 첨가한 후 암소에서 30 min 동안 pre-incubation 시켰다. 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 τ₅₀으로 나타내었다. 대조군(control)은 τ₅₀이 28.5 min으로 오차 범위 ± 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.

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

2.5. 항균 활성 측정

2.5.1. 사용균주, 배지 및 배양 조건

항균 효과 평가에 사용된 균주로는 *B. subtilis* (ATCC6633), *E. coli* (ATCC8739), *P. acnes* (ATCC6919), *P. aeruginosa* (ATCC9027) 및 *S. aureus* (ATCC6538)로 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul, Korea)에서 분양받았다. *P. acnes*의 배지는 reinforced clostridial medium 및 reinforced clostridial agar (Becton, Dickinson and company, USA)에서 CO₂ 존재하에 37 °C에서 48 ~ 72 h 배양하였다. *E. coli*와 *P. aeruginosa*는 mueller hinton broth 및 mueller hinton agar (Becton, Dickinson and company, USA)를 이용하여 37 °C 배양기에서 배양했으며, *B. subtilis* 및 *S. aureus*는 tryptic soy broth (Becton, Dickinson and company, USA)와 tryptic soy agar (Sigma-Aldrich Co., USA)에 각각 37 및 30 °C 배양기에서 24 h 배양하였다.

2.4.2. 최소저해농도(MIC) 측정

추출 조건별 감초 추출물에 대한 최소저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC) 측정은 48 well plate에 1 × 10⁵ CFU/mL broth 균주 현탁액을 0.95 mL 넣고, 시료를 0.05 mL씩 첨가하였다. 시료는 2배 희석법을 이용하여 DMSO로 희석한 후에 사용하였다. 시료-1(동일 농도로 제조한 시료)는 DMSO에 녹여서 각 균주에 대하여 최종 농도가 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 312, 156, 78, 39 µg/mL가 되도록 처리하였다. 시료-2(동일한 희석 배수로 희석하여 제조한 시료)는 DMSO에 녹여 각 균주에 대하여 최종 희석 배수가 20배, 40배, 80배, 160배 및 320배가 되도록 처리하였다. 대조군으로는 화장품의 방부제로 사용되는 메틸 파라벤 및 1,2-hexanediol을 사용하였다. 24 h 배양 후(*P. acnes*의 경우, 48 ~ 72 h), 육안으로 관찰하였을 때, 각각의 균들이 증식되지 않는 최소 농도를 MIC로 결정하였다. 그리고 시료의 용매로 사용된 DMSO와 broth만을 처리한 공시료군(blank), 균액, DMSO 및 균액을 처리한 그룹을 growth control로 하여 실험을 하였다 [23].

Table 3. Extraction Yields of *G. uralensis* Extracts according to Extraction Conditions

Extraction conditions	Yield (%, w/w) ^a	Sample-1	Sample-2
		Total flavonoid content (%)	Total flavonoid content ($\mu\text{g/mL}$)
85% EtOH, 25 °C, 6 h	9.1	A1 (2.4)	A2 (119.0)
85% EtOH, 25 °C, 12 h	23.3	B1 (1.5)	B2 (132.0)
85% EtOH, 40 °C, 6 h	10.8	C1 (2.3)	C2 (130.1)
85% EtOH, 40 °C, 12 h	27.6	D1 (1.9)	D2 (173.5)
85% EtOH, 60 °C, 6 h	22.6	E1 (2.1)	E2 (156.3)
85% EtOH, 60 °C, 12 h	29.0	F1 (1.4)	F2 (157.4)

^a Yield (%) = Dried *G. uralensis* Extract (g) / Dried *G. uralensis* Root (g) × 100

3. 실험 결과

3.1. 국내산 감초 추출물의 추출 조건별 추출 수율 및 총플라보노이드 함량

추출 조건별 감초 추출물의 추출 수율은 9.1 ~ 29.0%의 범위를 나타냈다. 모든 감초 추출물은 추출시간이 6 h일 때의 평균 수율은 14.2%이고 12 h 추출 수율이 26.3%로 12 h 추출할 경우가 약 1.85배 더 큰 추출 수율을 나타냈다. 특히, 60 °C, 6 h에서 추출한 추출물의 수율은 25 및 40 °C에서의 추출 수율보다 약 2배 정도 높았다. 추출 시간이 12 h일 때는 온도별로 추출 수율이 큰 차이를 나타내지 않았다.

감초에 가장 많이 함유된 성분인 liquiritin을 표준 물질로 검량선을 작성하여 추출물 중의 총플라보노이드 함량을 측정하고 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 추출 조건별로 추출한 감초 추출물을 건조시켜서 얻은 감초 파우더를 일정 농도로 제조한 시료-1 (100 $\mu\text{g/mL}$) 군에서 추출 수율과 총플라보노이드 함량은 역비례 경향을 나타내었다. 즉, 25 °C에서 6 h 추출한 감초 추출물 중 플라보노이드 함량은 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 당 2.4 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 그러나 12 h 추출한 경우는 추출 수율은 6 h보다도 2.6배 더 크게 비하여 총플라보노이드 함량은 100 $\mu\text{g/mL}$ 당 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 로 6 h 추출의 경우보다도 총플라보노이드 함량이 37.5% 감소하였다. 이러한 경향은 40 °C와 60 °C 추출한 경우에서도 같은 경향을 나타내었다. 즉 추출 시간이 길수록 추출되는 추출물 중 총플라보노이드의 함량은 작았다. 추출 조건별로 추출한 감초 추출물을 건조시키지 않고 추출물 원액 자체 (시료-2)에 포함된 총플라보노이드 함량도 Table 3에

있다. 25 °C에서 6 h 추출한 감초 추출물 원액 중에 총플라보노이드 함량은 119.0 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났다. 하지만 동일 온도에서 12 h 추출한 경우는 총플라보노이드 함량이 132.0 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 동일 온도에서 6 h 추출했을 때보다도 12 h 추출했을 때의 추출 수율이 2.6배 많았는데 총플라보노이드 함량은 1.11배 증가에 그쳤다. 이러한 결과는 추출 시간이 길어도 추출물에 플라보노이드의 함량은 크게 증가하지 않음을 보여주고 있다.

3.2. 추출 조건별 감초 추출물의 항산화 활성

3.2.1. DPPH법을 이용한 Free Radical 소거 활성

자외선 등에 의해 생성된 활성산소종 중에서 $\cdot\text{OH}$ 및 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 과 같은 라디칼은 세포막 지질, 단백질 및 DNA 등의 산화시켜 피부 노화를 촉진한다. (+)- α -Tocopherol 및 flavonoid 등과 같은 항산화제는 활성산소로 인해 생성된 지질 라디칼 등에 수소 주개로 작용하여 연쇄 반응을 종결시킨다. 이 때문에 라디칼 소거는 세포 손상을 막아 피부 노화를 억제하는데 매우 중요한 요인이라 할 수 있다. 추출 조건이 다른 감초 추출물의 라디칼 소거 활성을 확인하기 위하여 안정한 DPPH 라디칼을 이용하여 실험하였으며, 비교 물질로는 잘 알려진 항산화제인 (+)- α -tocopherol을 사용하였다.

추출 조건별로 추출한 감초 추출물을 건조시켜서 얻은 감초 파우더를 일정 농도로 제조한 시료-1 (100 $\mu\text{g/mL}$)과 추출 조건별로 추출한 감초 추출물을 건조시키지 않고 추출물 자체 일정량을 동일한 배수로 희석하여 실험에 사용한 시료-2에 대하여 프리 라디칼 소거 활성을 측정하였다(Figure 1). 시료-2의 경우는 추출 수율이 반영된 시료이다. 시료-1 (100 $\mu\text{g/mL}$)은 온도

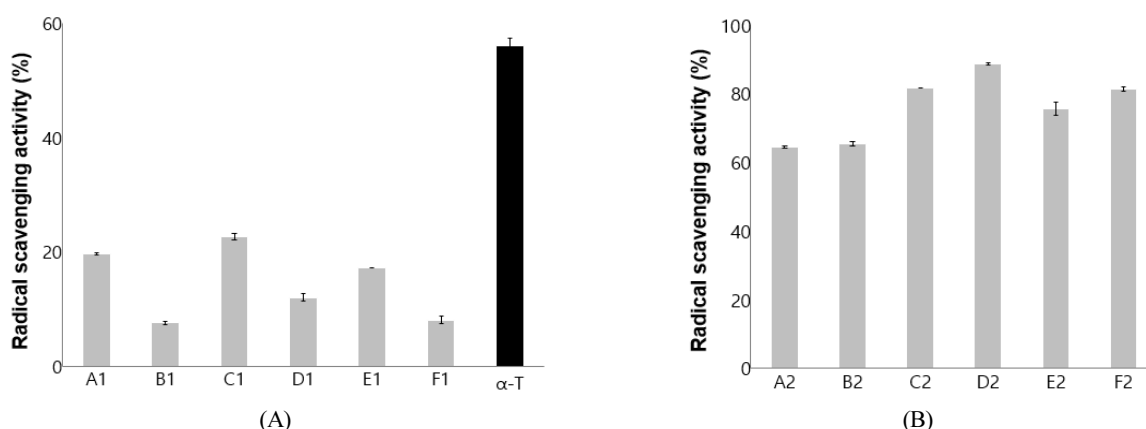


Figure 1. Free radical scavenging activities (%) of *G. uralensis* extracts according to extraction conditions. (A) extract powders (100 µg/mL) as sample-1, (B) extracts (40 times diluted) as sample-2, reference; (+)- α -tocopherol (α -T); 100 µg/mL (56.1 ± 1.2%).

조건(25, 40, 60 °C) 모두에서 추출시간이 6 h일 때가 12 h일 때보다 약 10% 정도 더 큰 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 특히, 25 °C에서 추출한 추출물의 라디칼 소거활성은 6 h 추출한 경우(A1)가 19.6%로 12 h 추출했을 때(B1, 7.6%)보다도 2.6배 더 큰 라디칼 소거활성을 나타냈다. 이 경우 각각의 추출 수율은 9.1%, 23.3%로 12 h 추출한 B1이 6 h 추출한 A1 보다 2.6배 높은 수율을 가졌다. 다른 온도(40, 60 °C)의 추출한 시료들(C1, D1과 E1, F1)도 A1, B1과 같은 라디칼 소거활성 경향을 나타냈다. 시료-1은 모두 같은 농도(100 µg/mL)의 (+)- α -tocopherol (56.1%)보다는 동일 농도에서 비교적 낮은 활성을 나타냈다.

추출 조건별로 추출한 감초 추출물을 건조시키지 않고 추출물 원액 자체를 동일 배수(4배)로 희석하여 실험에 사용한 시료-2의 라디칼 소거 활성은 3가지 추출 온도 조건에서 추출 시간(6 h 및 12 h)에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 25 °C 6 h 추출한 A2보다도 12 h 추출한 B2의 수율이 2.6배 더 크에도 불구하고 라디칼 소거활성은 A2가 64.5%이고 B2가 65.4%로 0.9% 밖에 차이가 나지 않았다. 다른 시료들(C2, D2, E2, F2)의 경우도 모두 추출 수율과 라디칼 소거활성을 비교할 때 라디칼 소거활성에 추출물의 수율이 거의 반영되지 않음을 알 수 있었다.

이러한 결과들을 통해 6 h 추출한 시료들보다 12 h 동안 추출하여 얻은 시료들은 오랜 시간 추출하였음에도 불구하고 라디칼 소거활성을 갖는 항산화 활성을

나타내는 플라보노이드 등의 성분들 대신 항산화 활성이 없는 다른 성분들이 많이 추출된 것으로 보인다. Table 3에서 보여준 바와 같이 시료-1에서는 6 h 추출했을 때보다도 12 h 추출했을 때 추출물 건조 중량당 총플라보노이드 함량이 낮았다. 이러한 경향은 다른 온도에서 추출했을 때도 동일한 경향을 나타냈다. 즉 총플라보노이드의 함량이 프리 라디칼 소거 활성에 영향을 미치는 것임을 확인시켜주는 결과를 나타냈다.

3.2.2. 루미놀 발광법을 이용한 Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에 있어서 활성산소 소거활성(총항산화능)

Fe³⁺-EDTA/H₂O₂계에서 생성된 \cdot OH, O₂⁻, H₂O₂ 등의 다양한 종류의 활성산소가 루미놀과 반응하면 들뜬 상태의 루미놀이 되고 이어서 루미놀이 바닥 상태로 떨어지면서 빛을 낸다. 이것을 화학발광이라 한다. 이때 활성산소를 소거할 수 있는 페놀성 화합물과 같은 항산화제가 있으면 활성산소를 제거하거나 또는 활성산소의 생성을 억제함으로써 화학발광의 세기를 감소시킬 수 있다. 화학발광의 세기를 감소시키는 능력이 바로 활성산소 소거활성(총항산화능)이다. 추출 조건별 감초 추출물 파우더를 일정한 동일 농도(10 µg/mL)로 제조한 시료-1 (A1 ~ F1)과 추출물 원액을 일정한 비율로 희석(160배 희석)만 하여 제조한 시료-2 (A1 ~ F1) 총 12종의 시료에 대하여 총항산화능을 평가하였다(Figure 2).

일정한 농도로 제조한 시료-1 (10 µg/mL)은 3가지 추출 온도별(25, 40 및 60 °C) 모두에서 추출시간이 6

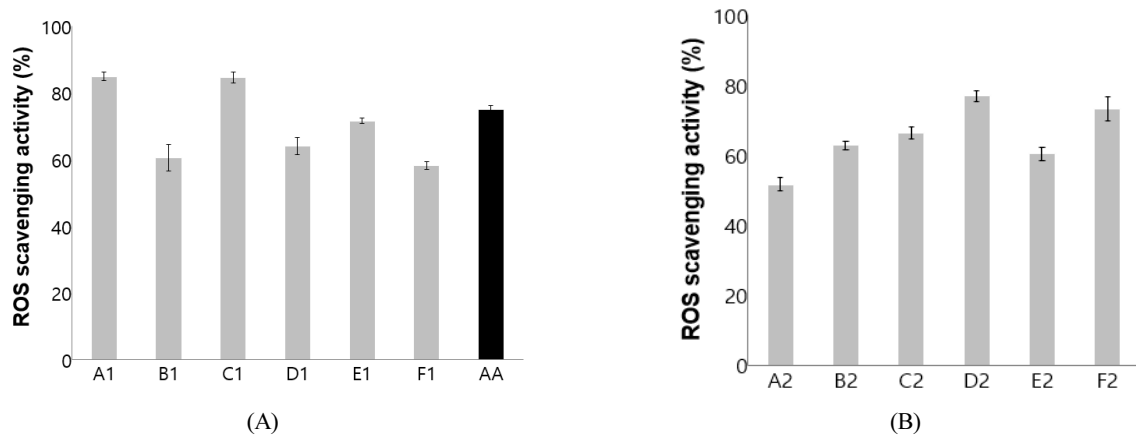


Figure 2. Oxygen radical scavenging activities (total antioxidant capacity) of *G. wralensis* extracts according to extraction conditions by luminol assay. (A) extract powders (10 µg/mL) as sample-1, (B) extracts (1600 times diluted) as sample-2 reference, L-ascorbic acid (AA); 10 µg/mL (74.8 ± 1.4%).

h일 때가 12 h일 때보다도 더 큰 활성산소 소거활성을 나타냈다. 특히, A1 (25 °C, 6 h)과 C1 (40 °C, 6 h)의 경우는 비교군인 L-ascorbic acid (74.8%) 보다 각각 9.8%, 9.5% 더 큰 활성산소 소거활성을 나타냈다. 특히, 추출 시간에서 큰 활성 차이를 보인 25 °C 추출물의 활성산소 소거활성은 6 h 추출한 A1 추출물(84.9%) 이 12 h 추출한 B1 (60.6%)보다 1.4배 더 큰 총항산화능을 나타냈다. 이와는 대조적으로 추출 수율은 Table 3에서와 같이 12 h 추출한 시료 B1이 6 h 추출한 A1에 비해 추출 수율이 약 2.6배 더 높았다. 이는 12 h 추출할 때 추출된 물질의 양은 많으나 활성산소를 소거할 수 있는 항산화제들은 6 h 추출로 충분히 추출되었고 이어서 12 h 추출 동안은 항산화 활성을 나타내지 않는 다른 성분들이 추출된 것으로 판단된다. 따라서 총항산화능이 낮게 나타난 것으로 판단된다. 이와 같은 경향은 추출 온도 25, 40 및 60 °C 모두에서 나타났다.

추출 조건별로 추출한 감초 추출물을 건조시키지 않고 추출물 원액 자체를 동일 배수(160배 희석)로 희석하여 실험에 사용한 시료-2의 활성산소 소거 활성은 25, 40 및 60 °C 모두에서 추출시간이 12 h일 때가 6 h일 때보다 약 10% 정도 더 큰 총항산화능을 나타냈다. 25 °C에서 12 h 추출한 B2의 총항산화능은 62.9%로 6 h 추출한 A2 (51.7%)보다 1.2배 더 큰 활성산소 소거활성을 나타냈다. 이는 추출 수율이 12 h 추출한 B2가 6 h 추출한 A2보다 2.6배 높은 것에 비해서는 미미한 활성 차이로 보인다. 40과 60 °C 추출 시료(C2,

D2, E2, F2)에서도 25 °C 추출 시료(A2, B2)의 경우와 같이 비슷한 경향을 나타내었다. 시료-2에서 화학발광법에 의한 활성산소 소거활성은 추출 온도가 25 °C보다는 40, 60 °C일 때, 총항산화능이 좀 더 크게 나타났다. 이러한 결과를 통해 12 h 추출된 시료들은 6 h 추출된 시료들보다 수율은 높지만 총항산화능에 기여할 성분들은 많지 않음을 나타낸다. 이러한 실험 결과는 DPPH법에서 보인 각 시료의 플라보노이드 함량과 라디칼 소거활성, 루미놀 발광법에서 보인 활성산소 소거활성과 플라보노이드의 함량 측면에서 같은 경향성을 나타냈다.

3.2.3. 1O_2 로 유도된 적혈구 파괴에 대한 추출 조건별 감초 추출물의 세포보호효과

활성산소(1O_2)로 유도된 산화적 스트레스로 인한 세포 손상 평가는 적혈구 세포 모델을 이용하여 확인하였다. 적혈구 세포는 지질이중층으로 이루어져 피부의 세포막과 유사한 구조를 가지고 있어서 세포 수준의 광노화 모델로서 항산화 연구에 유용하고 적합한 점이 많다. 싱글렛옥시젠(1O_2)은 반응성이 매우 큰 활성산소 중의 하나로 자외선에 노출된 피부에서 주로 생성된다. 이러한 1O_2 은 비효소적 항산화제를 파괴할 뿐만 아니라 피부에 존재하는 항산화 방어체계를 붕괴시켜서 세포막 구성 성분들인 인지질 및 단백질을 산화 손상시키면서 세포막 내에서 지질 라디칼 자동산화반응을 개시시킨다. 이러한 지질 라디칼 자동산화반응은 세포

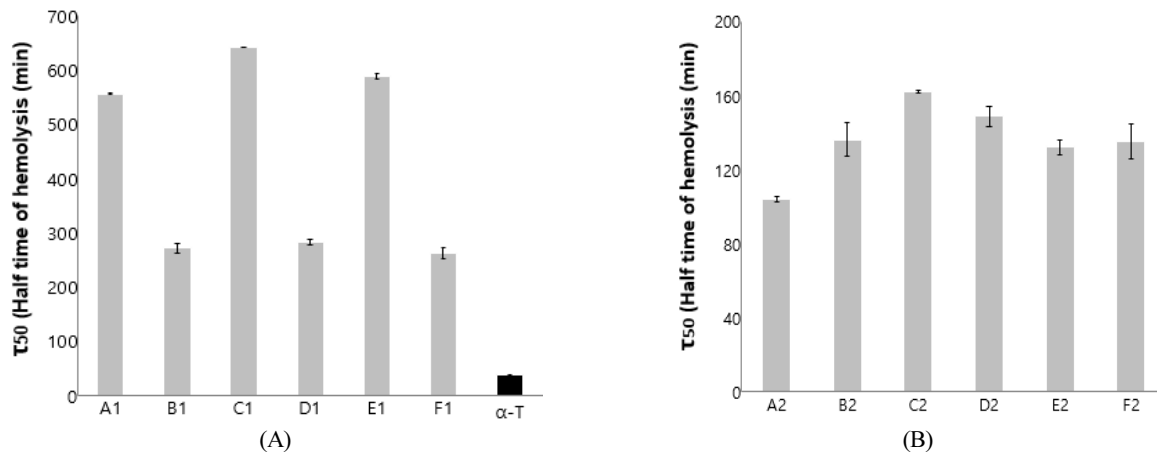


Figure 3. Cellular protective effects of *G. uralensis* extracts according to extraction conditions by photohemolysis of rabbit erythrocytes in 0.9% saline phosphate buffer (pH 7.4). (A) extract powders (25 µg/mL) as sample-1, (B) extracts (1600 times diluted) as sample-2.

- Reference, (+)- α -tocopherol (α -T); 25 µg/mL (τ_{50} , 37.2 ± 1.1 min)
- Control treated only rose-bengal not irradiated; τ_{50} (31.5 ± 0.1 min)

구성 성분들을 손상 파괴시키고 피부노화를 가속화시킨다. 따라서 본 실험에서는 광증감제인 rose-bengal를 이용하여 1O_2 을 발생시키고, 이때 생성된 1O_2 은 세포 손상 파괴시킨다. 이러한 광산화적 스트레스하에서 추출 조건별 감초 추출물의 세포보호효과를 평가하고자 하였다. 추출 조건별 감초 추출물의 비교 물질로는 지용성 항산화제인 (+)- α -tocopherol을 사용하였다.

실험에 사용한 시료-1의 농도는 25 µg/mL, 시료-2는 160배 희석하여 실험에 이용하였으며, 적혈구 세포가 50% 파괴되는데 걸리는 시간(τ_{50})으로 나타내어 시료간 세포보호효과를 비교하였다(Figure 3). 추출 조건별로 추출한 감초 추출물을 건조시켜서 얻은 후 감초 파우더를 일정 농도로 제조한 시료-1 (25 µg/mL)은 모든 추출 온도에서 추출시간이 6 h일 때(A1, C1, E1)가 12 h일 때(B1, D1, F1)보다 약 2배 더 큰 세포보호효과를 나타냈다. 같은 농도에서 6 h 추출 시료의 세포보호효과는 비교군인 강력한 지용성 항산화제인 α -tocopherol (τ_{50} , 37.2 min) 보다도 약 20배 정도로 매우 큰 세포보호활성을 나타내었다. 특히, 40 °C에서 6 h 추출한 C1의 세포보호효과는 τ_{50} 이 641.2 min으로 12 h 추출한 D1보다 2.3배나 더 큰 세포보호효과를 나타냈다. C1 및 D1의 경우는 추출 수율이 각각 10.8%, 27.6%로 12 h 추출한 D1이 추출 수율은 C1에 비해 2.6 배 높지만, 세포보호효과에 기여하는 성분의 양은 상

대적으로 적을 것으로 예상된다.

시료-2 (추출물 원액 160배 희석)들 중 추출 시간에 따라 가장 세포보호효과의 차이가 큰 25 °C도 6 h 추출한 A2이 103 ± 1.4분 B2가 136.2 ± 8.9로 1.3배 더 큰 세포보호효과를 나타냈다. 이는 라디칼 소거활성 및 활성산소 소거활성 평가에서와 마찬가지로 추출 수율이 약 2.6배 큰 B2가 추출 수율이 작은 A2와 비교할 때 세포보호효과가 비례해서 크지 않음을 알 수 있다. 이러한 현상은 40와 60 °C의 경우에서도 추출 수율이 반영된 세포보호효과가 전혀 나타나지 않았음을 그림이 보여주고 있다.

결과적으로 추출 수율이 반영된 시료-2에서 추출 시간이 12 h일 때 수율이 매우 큼에도 불구하고 광용혈 세포보호효과에 있어서는 추출 수율이 전혀 반영되지 않았음을 알 수 있었다. 또한 앞에서 언급한 라디칼 소거활성과 활성산소 소거활성이 추출물 중의 총플라보노이드 함량에 기인된 것처럼 적혈구 광용혈 실험에서 세포보호활성이 바로 liquiritin과 같은 플라보노이드 함량에 의존함을 강력히 시사하는 결과를 나타내었다. 세포 수준의 항산화 활성과 라디칼 소거활성 및 활성산소 소거활성(총항산화능)은 모두 추출물 중의 플라보노이드 함량에 기인된 것으로 결론지을 수 있다. 따라서 지금까지의 항산화 활성 평가 결과를 볼 때 항산화활성을 갖는 원료 개발은 감초 추출

Table 4. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of *G. uralensis* Extracts according to Extraction Conditions

Strains	MIC														
	Control	Positive control ($\mu\text{g/mL}$)		Sample-1 ($\mu\text{g/mL}$)						Sample-2 (Dilution times)					
		DMSO	Methyl paraben	1,2-Hexanediol	A1	B1	C1	D1	E1	F1	A2	B2	C2	D2	E2
<i>S. aureus</i>	-	2,500	> 10,000	156	156	156	312	625	312	80	80	160	160	80	80
<i>B. subtilis</i>	-	2,500	> 10,000	156	156	156	156	625	625	80	80	80	80	80	80
<i>P. acnes</i>	-	2,500	> 5,000	78	78	78	78	156	156	160	160	160	160	80	80
<i>E. coli</i>	-	1,250	10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	1,250	10,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

“ - ” Shows No Effects

물의 경우 25 °C에서 추출 시간 6 h이면 충분한 것으로 판단된다.

3.3. 추출 조건별 감초 추출물의 항균 활성

피부 상재균은 대표적으로 *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. acnes*, *E. coli* 및 *P. aeruginosa*가 있다. *S. aureus*는 화농성 감염을 유발하며 아토피 피부염의 요인으로 아토피 환자 중 90%에서 발견되고 있다. *P. acnes*는 여드름의 주 원인균으로 혐기성 세균이며 피부 안쪽 또는 피지선에 주로 존재한다. 여드름균은 proinflammatory cytokine 생성을 경유하여 염증을 유발하며 개방성 면포와 구진, 농포, 결절 및 낭종 등을 형성시킨다. *B. subtilis*는 결막염의 원인균이고, *P. aeruginosa*는 수막염과 패혈증 등을 유발한다.

시료-1의 피부 상재균에 대한 항균 활성을 측정된 결과, 여드름 균주(*P. acnes*)에 대한 항균 활성은 25 및 40 °C에서 추출된 감초 추출물이 가장 크게 나타났다 (MIC, 78 $\mu\text{g/mL}$). Methyl paraben (2500 $\mu\text{g/mL}$)보다 32배 더 큰 항균 활성을 나타냈다(Table 4). *S. aureus* 및 *B. subtilis*에 대해 25 및 40 °C에서 추출된 감초 추출물(156 $\mu\text{g/mL}$)은 60 °C에서 추출된 감초 추출물(156 $\mu\text{g/mL}$)에서 methyl paraben 보다 약 16배 정도 큰 항균 활성을 나타내었다. 이와 달리 60 °C에서 6 h 및 12 h 추출한 추출물은 methyl paraben 보다 약 4배 큰 항균 활성을 보였다. 그러나 그람 양성균인 3개의 균주에서는 항균 활성을 나타냈으나, 그람 음성균인 *E. coli* 및 *P. aeruginosa*에서는 항균 활성을 나타내지 않았다. 시료-1은 그람 양성균에 특징하게 작용하는 항균 활성

성분들이 많을 것으로 사료된다. 또한 추출 시간에 따른 유의적인 항균 활성 차이는 나타나지 않았으나, 비교적 고온인 60 °C에서 추출된 추출물은 항균 활성이 약간 감소하였다. 이는 온도에 의한 활성 성분들의 분해 등에 기인된 것일 수도 있다고 추측된다.

시료-2는 40 °C에서 추출된 감초 추출물들(C2, D2)은 160배 희석된 농도에서 *S. aureus*에 대한 항균 활성이 있었다. 이는 25 및 60 °C에서 추출된 감초 추출물(80배 희석) 보다 높은 항균 활성을 나타냈으며, 추출 시간에 의한 유의적 차이는 없었다. *P. acnes*의 MIC는 추출온도가 25 및 40 °C일 때, 160배 희석 농도였으며 60 °C에서는 80배 희석 농도였다. *B. subtilis*의 MIC는 시료-2 모두 80배 희석 농도였다. 그러나 시료-2는 그람 음성균인 *E. coli*과 *P. aeruginosa* 2종에 대해서는 항균 활성을 보이지 않았다. 시료-2도 시료-1과 같이 그람 양성균에 작용하는 항균 활성 성분들이 많이 함유된 것으로 사료되며, 추출 시간에 따라 추출 수율이 다름에도 불구하고 유의적인 항균 활성 차이가 나타나지 않았다. 60 °C에서 *S. aureus* 및 *P. acnes*의 항균 활성이 좋지 않은 이유는 온도가 높을수록 특정 균에 대한 항균 활성을 갖는 성분들이 비교적 높은 온도에 의해 활성 성분들의 분해 등으로 활성이 떨어졌을 것으로 사료된다.

4. 결 론

본 연구에서는 한국 감초 추출물을 화장품 소재로 응용함으로써 국내산 감초로 수입대체 효과를 달성하

고자 추출 조건별 감초 추출물의 항산화 활성을 평가하여 최적의 추출 조건을 확립하고자 하였다. 추출 조건은 추출 온도(40 및 60 °C) 및 추출 시간(6 및 12 h)을 토대로 추출물을 제조하였다. 최적의 추출 조건을 확립하기 위해서 실험에 이용한 시료의 제조는 두 가지 타입으로 제조하였다. 시료-1 (A1 ~ F1)은 추출 조건별로 추출한 감초 추출물을 건조시켜서 얻은 감초 파우더를 일정 농도로 제조하여 실험에 사용한 것이고, 시료-2 (A2 ~ F2)는 추출 조건별로 추출한 감초 추출물을 건조시키지 않고 추출물 원액 자체 동일 배수로만 희석하여 실험에 사용하였다. 다시 말하면 시료-2는 추출 수율이 반영된 시료이다. 두 가지 방법으로 제조된 시료들을 이용하여 항산화 및 항균 활성을 측정하여 항산화 및 항균 활성이 큰 최적의 추출 조건을 선정하고자 하였다.

1) 추출 조건별 감초 추출물의 추출 수율은 9.1 ~ 29.0%의 범위를 나타냈으며, 모든 감초 추출물은 추출 시간이 6 h일 때의 평균 수율은 14.2%이고, 12 h 추출시는 26.3%로 12 h 추출할 경우의 추출 수율이 약 2배 컸다. 특히, 60 °C에서 추출한 추출물은 다른 온도에서 추출한 것보다 높은 수율을 나타냈다. 추출 수율은 6 h일 때보다도 12 h에서 2배 정도 많았다. 감초 추출물 중 총플라보노이드 함량은 25 °C에서 6 h 추출한 추출물 100 µg/mL당 2.4 µg/mL으로, 12 h 추출한 경우의 추출 수율이 2.6배 더 큰 데 비하여 총플라보노이드 함량은 100 µg/mL당 1.5 µg/mL로 6 h 추출의 경우보다도 그 함량이 37.5% 감소하였다. 이러한 경향은 40 °C와 60 °C추출한 경우에서도 같은 경향을 나타냈다.

2) 감초 추출물 파우더의 농도를 일정하게 한 시료-1 (100 µg/mL)의 라디칼 소거활성은 온도 조건 모두에서 추출시간이 6 h일 때가 12 h일 때보다 약 10% 정도 더 큰 라디칼 소거 활성을 나타냈다. 특히, 25 °C에서 추출한 추출물의 라디칼 소거활성은 6 h 추출한 경우(A1)가 19.6%로 12 h 추출했을 때(B1, 7.6%)보다도 2.6배 더 큰 라디칼 소거활성을 나타냈다. 이 경우 이러한 라디칼 소거활성의 크기는 추출물의 수율과는 역비례 관계를 나타냈다. 이러한 경향은 다른 온도(40, 60 °C)의 추출한 시료들(C1, D1과 E1, F1)에서도 같은 경향을 나타냈다. 추출물 원액 자체를 동일 배수(4배)로 희석하여 실험에 사용한 시료-2에서의 라디칼 소거 활성은

추출 온도 조건 및 추출 시간에 따라 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 25 °C 6 h 추출한 A2보다도 12 h 추출한 B2의 수율이 2.6배 더 크에도 불구하고 라디칼 소거활성은 A2가 64.5%이고 B2가 65.4%로 0.9% 밖에 차이가 나지 않았다. 이러한 경향은 다른 시료들의 경우에서도 라디칼 소거활성에 추출물의 수율이 전혀 반영되지 않는 것으로 나타났다.

3) 루미놀 발광법을 이용한 실험에서 활성산소 소거 활성(총항산화능)은 일정한 농도로 제조한 시료-1 (10 µg/mL)은 세 가지 추출 온도별 모두에서 추출시간이 6 h일 때가 12 h일 때보다도 더 큰 활성산소 소거활성을 나타냈다. 특히, 25 °C, 6 h와 40 °C, 6 h의 경우는 비교군인 L-ascorbic acid (74.8%) 보다 각각 9.8%, 9.5% 더 큰 활성산소 소거활성을 나타냈다. 추출물 원액 자체를 동일 배수(160배 희석)로 희석하여 실험에 사용한 시료-2의 활성산소 소거 활성은 추출 온도 모두에서 추출시간이 12 h일 때가 6 h일 때보다 약 10% 정도 더 큰 총항산화능을 나타냈다. 25 °C에서 12 h 추출한 B2의 총항산화능은 62.9%로 6 h 추출한 A2 (51.7%)보다 1.2배 더 큰 활성산소 소거활성을 나타냈다. 이는 추출 수율이 12 h 추출한 B2가 6 h 추출한 A2보다 2.6배 높은 것에 비해서는 활성이 작게 나타났다.

4) 1O_2 로 유도된 적혈구 세포파괴에 대한 세포보호 효과에서 일정 농도로 제조한 시료-1 (25 µg/mL)은 모든 추출 온도에서 추출시간이 6 h일 때가 12 h 추출 경우보다 약 2배 더 큰 세포보호효과를 나타냈다. 동일 농도에서 6 h 동안 추출한 시료의 세포보호효과는 비교군인 강력한 지용성 항산화제인 α -tocopherol (τ_{50} , 37.2 min) 보다도 약 20배 정도로 매우 큰 세포보호활성을 나타내었다. 시료-2 (추출물 원액 160배 희석)들 중 추출 시간에 따라 가장 세포보호효과의 차이가 큰 25 °C도 6 h 추출한 추출물이 12 h 추출한 추출물보다 1.3배 더 큰 세포보호효과를 나타냈다. 이는 라디칼 소거활성 및 활성산소 소거활성 평가에서와 마찬가지로 추출 수율이 약 2.6배 큰 추출물이 추출 수율이 작은 추출물과 비교할 때 세포보호효과는 수율에 비례해서 크게 나타나지 않았다.

5) 피부상재균에 대한 항균 활성은 시료-1의 경우, 여드름 균주(*P. acnes*)에 대한 항균 활성은 25 및 40 °C에서 추출된 감초 추출물이 가장 크게 나타났다(MIC, 78 µg/mL). Methyl paraben (2500 µg/mL)보다 32배 더

큰 항균 활성을 나타냈다. *S. aureus* 및 *B. subtilis*에 대해 25 및 40 °C에서 추출된 감초 추출물(156 µg/mL)은 methyl paraben보다 약 16배 정도 매우 우수한 항균 활성을 나타내었다. 실험결과 그람 양성균인 3개의 균주에서는 항균 활성을 보였으나 그람 음성균인 *E. coli* 및 *P. aeruginosa*에서는 항균 활성이 나타나지 않았다. 시료-2는 그람 양성균 중 *S. aureus* 및 *P. acnes*에서는 40 °C에서 추출된 감초 추출물(160배 희석)이 항균 활성이 우수했다. 25 °C에서 추출한 감초 추출물에서도 여드름 균에 대한 활성이 크게 나타났다.

본 연구 결과, 추출 수율이 반영된 시료에서 추출 시간이 12 h일 때는 수율이 매우 큼에도 불구하고 활성 산소로 유도된 세포 손상에서 세포보호효과는 추출 수율이 거의 반영되지 않았다. 이는 세포보호 메커니즘에 기인하는 세포 수준의 항산화 활성 평가가 라디칼 소거활성 및 활성산소 소거활성(총항산화능) 평가에서도 같은 경향을 나타냈다. 항산화 활성 평가 결과 추출 시간이 6 h에서 12 h으로 증가시켜도 항산화활성에 영향을 미치는 항산화 성분들은 시간에 비례해서 추가로 추출되지 않았음을 보여주었다. 따라서 감초 추출물의 경우 항산화 활성을 갖는 기능성 소재로 개발하고자 할 때는 85% 에탄올 용액으로 추출 시간 6 h, 25 °C에서 추출하는 조건이 최적의 추출 조건이라고 판단되었다. 또한 본 연구 결과는 한국 감초를 화장품 소재로 응용하기 위한 최적 추출 조건 선정시 건조 추출물 파우더 및 건조시키지 않은 추출물 원액 자체의 활성 평가 비교 분석이 반드시 필요함을 시사한다.

Acknowledgement

이 연구는 2015년 서울과학기술대학교 교내연구비의 지원으로 수행되었습니다.

Reference

1. G. E. Rhie, M. H. Shin, J. Y. Seo, W. W. Choi, K. H. Cho, K. H. Kim, K. C. Park, H. C. Eun, and J. H. Chung, Aging- and photoaging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*, *J. Invest.*

- Dermatol.*, **117**(5), 1212 (2011).
2. S. N. Park, Skin aging and antioxidant, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **23**(3), 75 (1997).
3. L. C. Magdalena and Y. A. Tak, Reactive oxygen species, cellular redox system, and apoptosis, *Free Radic. Biol. Med.*, **48**(6), 749 (2010).
4. J. C. Tilak, K. K. Bloor, S. S. Ketaki, S. G. Saroj, and R. D. Lele, Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects, *J. Assoc. Physicians. India*, **52**, 796 (2004).
5. R. S. Sohal and W. C. Orrb, The redox stress hypothesis of aging, *Free Radic. Biol. Med.*, **52**(3), 539 (2012).
6. M. G. Kosmadaki and B. A. Gilchrest, The role of telomeres in skin aging/photoaging, *J. Micron.*, **35**(3), 155 (2004).
7. S. Pillai, C. Oresajo, and J. Hayward, Ultraviolet radiation and skin aging: roles of reactive oxygen species, inflammation and protease activation, and strategies for prevention of inflammation-induced matrix degradation-a review, *Int. J. Cosmet. Science*, **27**(1), 17 (2005).
8. J. L. McCullough and K. M. Kelly, Prevention and treatment of skin aging, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1067**, 323 (2006).
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, Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol ex-

- tracts 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, J. H. Ha, and S. N. Park, Antimicrobial activity, quantification and bactericidal activities of licorice active ingredients, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **42**(4), 386 (2014).
 18. 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).
 19. S. J. Kim, S. S. Kwon, E. R. Yu, and S. N. Park, Development of porous cellulose hydrogel for enhanced transdermal delivery of liquiritin and liquiritigenin as licorice flavonoids, *Polymer (Korea)*, **38**(5), 1 (2014).
 20. S. S. Kwon, B. J. Kong, and S. N. Park, Physicochemical properties of pH-sensitive hydrogels based on hydroxyethyl cellulose-hyaluronic acid and for applications as transdermal delivery systems for skin lesions, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **92**, 146 (2015).
 21. J. Y. Bae, H. N. Jang, J. H. Ha, J. Park, J. Park, and S. N. Park, Antimicrobial activities of licorice extracts from various countries of origin according to extraction conditions, *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **42**(4), 361 (2014).
 22. J. H. Ha, H. M. Lee, S. S. Kwon, H. S. Kim, M. J. Kim, S. H. Jeon, Y. M. Jeong, J. P. Hwang, J. Park, Y. Choi, J. Park, S. N. Park, and D. Park, Screening of effective extraction conditions for increasing antioxidant activities of licorice extracts from various countries of origin, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, **39**(4), 259 (2013).
 23. J. L. Rodriguez-Tudela, F. Barchiesi, J. Bille, E. Chryssanthou, M. Cuenca-Estrella, D. Denning, J. P. Donnelly, B. Dupont, W. Fegeler, C. Moore, M. Richardson, and P. E. Verweij, Method for the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) by broth dilution of fermentative yeasts, *Clin. Microbiol. Infect.*, **9**(8), 1 (2003).