

감초 추출물로부터 항균성 물질의 분리 및 동정

이진만¹ · 이윤원² · 허상선[†]

¹호서대학교 식품생물공학과, ²중부대학교 관광경영학과, [†]중부대학교 식품생명과학과
(2016년 5월 12일 접수; 2016년 6월 2일 수정; 2016년 6월 4일 채택)

Isolation and Identification of Antimicrobial Compounds from Licorice Extracts

¹Jin-Man Lee · ²Yoon-Won Lee · Sang-Sun Hur[†]

¹Department of Food Science and Technology and Basic Science Institute, Hoseo University,
Asan, Chungnam 336-795, Korea

²Department of Tourism Management, Joongbu University, Geumsan, Chungnam 312-702, Korea

[†]Department of Food Science and Biotechnology, Joongbu University,
Geumsan, Chungnam 312-702, Korea

(Received May 12, 2016; Revised June 2, 2016; Accepted June 4, 2016)

요약 : 식품부패미생물에 대한 감초추출물의 항균력을 확인하고 유효성분을 분리한 후 그 구조를 확인 하였다. 감초추출물은 대표적인 항균제인 메타중이황산칼륨과 myconazole과 비슷한 항균 활성을 나타내었다. 용매분획을 실시한 결과 chloroform fraction이 가장 항균활성이 높은 것으로 나타났다. 이에 chloroform분획을 silica gel column chromatography를 통해 분리하여 항균활성이 가장 큰 분획물인 KC를 분리하였다. 이 화합물은 ESI-MS 와 ¹H-NMR, ¹³C-NMR 결과로부터 활성물질의 구조를 동정하였으며 그 결과 KC는 (R)-glabridin인 것으로 확인하였다.

주제어 : 감초추출물, 항균 활성, ESI-MS, ¹³C-NMR, (R)-glabridin

Abstract : Antimicrobial properties of Licorice(*Glycyrrhizae radix L.*) against food spoilage microorganism, *Bacillus subtilis* KCTC 1021 was investigated. Antibacterial activity of the essential oil was as equivalent as Potassium metabisulfite and myconazole. The licorice extracts was fractionated to hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol and water fraction. Chloroform fraction showed the highest inhibitory effect on the *Bacillus subtilis* KCTC 1021. Chloroform fraction was further fractionated by silica gel column chromatography and thin layer chromatography(TLC). The antibacterial compound was isolated from their fractions and its chemical structures was identified as (R)-glabridin by ESI-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR.

Keywords : Licorice extracts, antimicrobial activity, ESI-MS, ¹³C-NMR, (R)-glabridin

[†]Corresponding author (E-mail: sshur@joongbu.ac.kr)

1. 서론

천연물에 존재한 항균성 물질에 대한 연구는 동서양을 막론하고 오래 전부터 시도되고 있다. 특히 천연 보존료 개발의 일환으로 약용식물, 식용식물의 항균성에 관한 연구가 많이 이루어지고 있으며 이러한 연구의 대부분은 자연계에 대략 8,000여종이 존재하는 2차 대사산물인 페놀 화합물에 대한 관심에 집중되고 있다[1]. 이들 폴리페놀 화합물은 천연 항산화 활성을 나타낼 뿐만 아니라 식물에 있어서 색깔, 쓴맛, 향, 수렴성 등 관능적 성질에도 중요한 역할을 한다[2]. 따라서 식물로부터 천연 기능성 소재를 갖는 새로운 물질을 탐색하는 연구가 활발히 이루어지고 있는데, 이는 약용식물이 소비자들에게 거부감이 없이 천연물로 인식될 수 있고 식물 중에 함유되어 있는 페놀 화합물이 항염, 항종양, 동맥경화 방지, 항암, 항균활성 등과 같이 생리활성 효과가 우수하고 건강에 유익한 여러 가지 작용을 하고 있는 것으로 알려져 있기 때문이다[3-6]. 일반적으로 식물체로부터 얻어진 천연물질은 인간이 장기간 식용으로 사용했던 천연물을 그대로 이용하거나 추출하여 보존제로 사용하는 경우 미국에서는 이를 generally recognized as safe (GRAS) list로 분류하여 관리하고 있어 천연물질의 개발과 이용은 인공합성 보존제의 사용으로 인한 부정적인 측면을 해소하고 소비자 기피현상을 유발하지 않으면서도 저장성 향상과 안전성을 확보할 수 있는 좋은 방안이다[7]. 하지만 이들 천연 식품 보존제는 물에 대한 용해도가 0.1% 이하로 난용성으로, 높은 휘발성 및 빛, 수분, 열 등에 노출되었을 때 급격히 분해되는 단점을 가지고 있고, 특유의 자극적인 냄새와 강한 부식성으로 사용에 많은 제약을 가지고 있어 난용성을 극복하고 항균력을 유지 및 강화시킬 수 있는 방법이 우선적으로 선행되어야 한다.

대부분의 천연항균물질은 전통적으로 사용해온 소금, 식초 등 일반 식품소재 외에 동, 식물 내에 한 성분으로 함유된 경우가 많으며 단백질, 특정 효소, 유기산, 식물정유, 식물의 특정 성분 등이 항균효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[8]. 특히 식물에 존재하는 항균물질은 대부분이 alkaloid, flavonoid, terpenoid, phenolic compound, quinone, volatile oil 등의 이차대사 산물이거나 또는 그 유도체들로 알려져 있다[9]. 따라서 인간이 오랫동안 안전하게 섭취하여 왔던 천연물로부터

터 인체에 안전하고 항균활성이 높은 물질을 분리 이용하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

천연항균물질에 관한 연구로는 정유, 향신료, 한약재 등과 alkaloid, flavonoid, phytoalexin, 항균 펩타이드 등이 보고되어 있다[10, 11]. 이외에도 국내에서 향신료로 많이 사용되는 생강, 마늘 등의 성분에 의한 항균성에 대한 연구가 이루어졌다[12-14].

감초(Licorice, *Glycyrrhizae radix*)는 콩과에 속하는 다년생 초본 식물로 맛이 달고 독이 없으면서 따뜻한 기운을 가지고 있어 약제 외에도 식품산업에 광범위하게 이용되어 왔다. 이 식물의 유효성분으로는 triterpenoid류의 glycyrrhizin, glycyrrhetic acid, uralsaponin, licorice saponines, glycyrrhetic acid methyl ester와 flavonoid류의 liquiritin, liquiritigenin, isoliquiritin, isoliquiritigenin, neoliquiritin, isolico flavonol 등이 분리 보고되고 있다[15]. 그 중 사포닌 계통의 감미성분인 glycyrrhizin은 1 분자의 glycyrrhetic acid와 2 분자의 glucuronic acid로 이루어져 있으며 설탕의 약 200~300배의 단맛을 내어 천연감미료[16]로 이용되고 있으며, 항염증[17], 항바이러스[18]등에 효과가 있는 것으로 알려지고 있다. 또한 감초의 liquiritigenin 성분은 천연 보존제로 사용되며 특히, 냉장식품에서 발육 가능한 저온성균인 *listeria monocytogenes*에 대하여 살균 효과를 가지는 것으로 보고되었다[19].

본 연구에서는 감초 추출물로부터 항균성 실험을 통하여 자연계에 널리 분포되어 식품을 변질시키는 유포자 세균인 *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대해 가장 높은 항균 효과를 보인 분획으로부터 항균물질을 분리, 정제하여 ESI-MS, $^1\text{H-NMR}$ and $^{13}\text{C-NMR}$ 등을 이용하여 항균 효과를 나타내는 물질을 분리, 동정하여, 향후 천연식품보존제로서의 활용가능성에 대한 기초 자료로 제시하고자 한다.

2. 실험

2.1 공시 재료

본 실험에 사용한 감초는 (*Glycyrrhizae radix*, L)은 2014년 10월에 금산시장의 한약 재료상에서 구입한 후 믹서(FM-680W, HANIL Co., Wom Joo, Korea)로 분쇄 한 후, 40 mesh 체에 내려 폴리에틸렌 백에 넣어 -40°C deep freezer

에 보관하면서 사용하였다. 감초 추출물의 제조는 감초 중량의 10배의 증류수와 99% 에탄올을 가하여 환류냉각기가 장착된 추출기로 비등점에서 4시간 동안 추출하여 Whatman No 2여과지로 여과한 후 이를 다시 50°C에서 6시간 동안 증발하여 동결 건조하여 -4°C 냉동고에 보관하면서 사용하였다.

2.2 시험균주 및 항균 검색

본 실험에 사용한 균주는 자연계에 널리 분포하여 식품을 변질시키는 유포자 세균인 *Bacillus subtilis* KCTC 1021 균주로 potato dextrose agar(PDA)에 접종하여 72hr 배양한 후 실험에 사용하였다. 항 세균활성 측정은 배지에 72~84hr 배양한 균주를 2% 취하여 중층용 배지(agar 1.5%)에 분주하여 항 세균 활성검색 배지를 조제한 후 평판배지에 올려 밀착 시킨 filter paper disc(Ø 8mm, Advantec, Toyo Roshi Co)에 감초 추출물을 DMSO로 희석하여 농도별로 제조하고 20, 30, 40, 50 µl씩 접종하여 30°C incubator에 72~84hr 배양한 후 Paper disc agar diffusion법 [20]에 준하여 disc 주위에 생성되는 clear zone 직경(mm)을 측정하였다. 이때 대조군로서는 항균제인 메타중아황산칼륨과 myconazole을 사용하였다.

2.3 Chloroform 분획으로부터 항균성 물질의 분리

항균 활성이 가장 우수한 chloroform 분획물을 감압 농축한 후 Flash silica gel column chromatography를 이용하여 CHCl₃:MeOH 혼합용매를 100:1에서 2:1의 비율로 제조하여 순차적으로 농도를 조절하면서 Column chromatography를 실시하였고 각 분획물에 대하여 항균활성 평가 및 TLC(용매, chloroform : methanol = 2:1, v/v)로 monitoring 하였다. 한편, 활성능이 가장 우수한 활성분획을 농축한 후 methanol을 용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행하였고 이를 TLC로 분석하여 감초 추출물로부터 분리한 항세균 화합물을 얻었다(Fig. 1). Column chromatography용 silica gel은 Kieselgel 60(70~230 mesh, Merck, Germany)을 사용하였고, Sephadex LH-20(GE Healthcare, Sweden)

을 사용하였다. Thin Layer chromatography (TLC)는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck, German)를 사용하였고, 실험에 사용한 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

2.4 항균성 물질의 동정

항균성이 높게 나타난 최종 정제된 감초 추출물의 항균 성분은 EI-MS와 ¹H(400 MHz), ¹³C(100 MHz) NMR을 통하여 얻은 화학구조상의 수소 및 탄소골격에 대한 정보를 얻어 활성물질의 구조를 동정하였다. ESI-MS는 Hewlett-Packard 6890 GC를 사용하였고, Column은 HP5-MS (30m×250 µm×0.25 µm), column 온도는 100°C에서 2분간 유지시킨 후 10°C/min으로 승온하여 280°C, 10 min 조건으로 분석하였다. Injector 온도는 280°C, detector 온도는 280°C, carrier gas는 He(1.0mL/min)을 사용하였다. NMR 분석조건은 Varian model UI 500 spectrometer(Varian Inc., Melbourne, America)를 이용하여 400 MHz에서 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 감초 추출물의 항균성

감초를 건조시켜 분쇄한 후 50% ethanol로 추출한 것을 10%의 농도로 희석하여 20~50 µl까지 10 µl 간격으로 첨가하여 부패 미생물의 농도별 생육저해 효과를 paper disc agar diffusion법에 따라 생육 저해완의 유무를 관찰하였다(Table 1). 감초 추출물의 경우 40 µl/mL의 농도에서 메타중아황산칼륨은 30 µl/mL 이상에서 15mm 이상의 clear zone이 형성되었으나 myconazole은 상대적으로 50 µl/mL 농도에서도 15mm 이상 크기의 clear zone을 형성되는 것으로 관찰되었다. 특히, 대조군으로 사용된 메타중아황산칼륨의 경우 20 µl/mL 농도에서도 12~15mm의 생육저해완이 형성되는 것을 알 수 있었다. 전반적으로 감초 추출물의 경우 대조군인 메타중아황산칼륨과 비슷한 항균활성을 나타내었고 myconazole에 비해서는 상대적으로 항균활성이 우수한 것으로 나타났다.

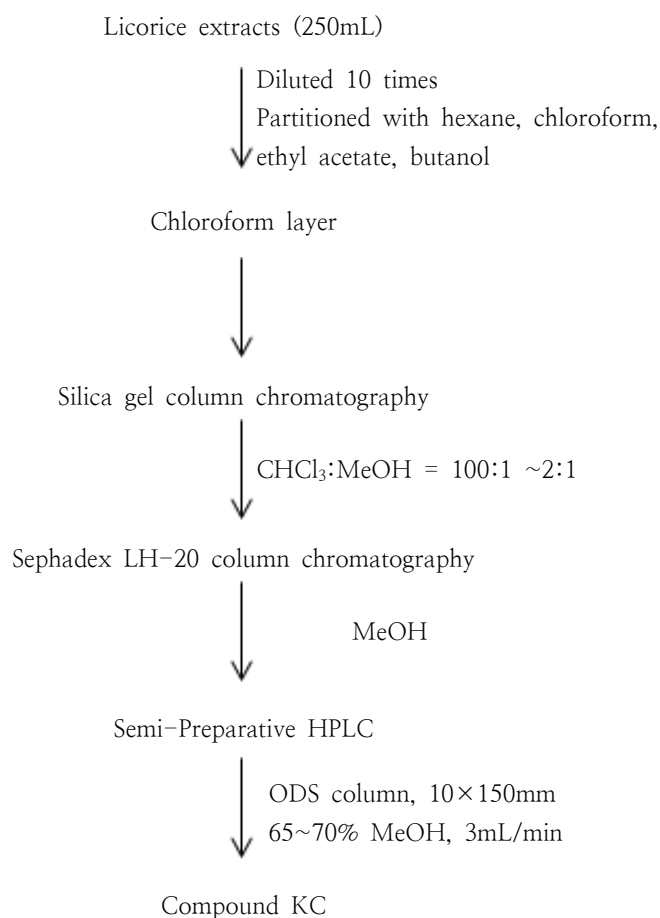


Fig. 1. Fractionation and isolation procedures of antimicrobial substance from *Glycyrrhizae radix* L.

Table 1. Antimicrobial properties of *Glycyrrhizae radix* extract, potassium metabisulfite and myconazole against microorganism using the paper disc diffusion method

Extract	Concentration ($\mu\text{l}/\text{mL}$)			
	20	30	40	50
<i>Glycyrrhizae radix</i> extract	+	++	+++	+++
Potassium metabisulfite	++	+++	+++	+++
Myconazole	+	++	++	+++

Diameter of clear zone

(+; under 12mm, ++; 12~15mm, +++; over 15mm)

The diameter of the zone of inhibition includes the paper disc(8mm)

3.2. 감초 추출물의 분획별 항균성

항균성을 나타낸 감초 추출물의 항균성 물질을 분리할 목적으로 먼저 감초 추출물(55. Brix) 250mL을 10배 희석하여 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 등의 유기용매를 이용하여 순차적으로 분배 추출하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 항균성 활성은 chloroform과 ethyl acetate 분획 층에서 나타났으며, chloroform 층의 활성이 더 강한 것으로 분석되었다. 따라서 감초의 항균 효과를 추출 용매별로 살펴보면 chloroform 층이 가장 우수한 것으로 나타났고 나머지 용매에서는 항균 활성이 전혀 없거나 약한 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 각 용매 분획 시 용매에 따른 항진균성 물질이 용해되어 나타나는 것으로 사료되며 특히, 감초의 항균 물질은 chloroform 분획에서 부패 미생물에 대한 광범위한 clear zone을 형성하는 것으로 보아 항균 물질은 chloroform에 잘 용해되는 물질이고 극성에 가까운 것으로 생각된다.

지금까지 보고된 감초의 항세균성 시험은 물 추출물의 경우 *E. coli*, *S. aureus*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa*에 대해서 항균효과를 나타내었으며, methanol 추출물의 경우 모든 균에서 항균성을 나타내었다고 보고 하였다[21, 22]. 하지만 기존의 이러한 실험 결과와 다르게 본 실험을 통하여 chloroform 분획물이 항균활성을 나타내는 것을 확인함으로써 감초의 새로운 용도 개발이라는 측면에서 기대를 할 수 있을 것으로 사료된다.

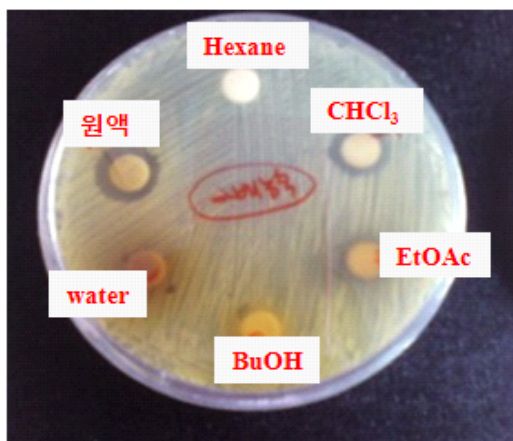


Fig. 2. Antimicrobial activity of various organic solvents extract of *Glycyrrhizae radix* against microorganism.

3.3. Silica gel column chromatography와 TLC에 의한 항균 물질의 분리

감초 chloroform층 분획물을 silica gel column chromatography한 후 TLC 전개한 결과 fraction 45~50 사이에서 항균활성이 가장 강하게 나타났으며, 이를 농축하여 계속적인 정제를 수행하였고 각 분획물에 대한 silica gel TLC를 이용하여 monitoring을 하였다. 아울러 활성분획 fraction 45~50은 농축한 후 methanol을 용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography를 수행한 결과 fraction 33~40 사이에서 강한 활성을 나타내었다(Fig. 3). 이에 활성분획인 fraction 33~40의 분획물에 대하여 analytical HPLC로 분석한 후 농축된 fraction 34, 35는 65~70% 메탄올을 용출 용매로 preparative HPLC (ODS column, 10 i.d. x 150mm, 3mL/min)를 수행하여 각 피크를 분취하여 각 피크의 항균활성을 측정하였으며 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 2번 피크에서만 강한 활성을 나타냈으며(1번은 2번 피크 앞의 모든 피크를 분취하여 농축한 것이며, 3번은 2번 피크 뒤의 모든 피크를 분취하여 농축한 것임), 2번 피크의 활성성분을 KC라 임의로 명명하였다.

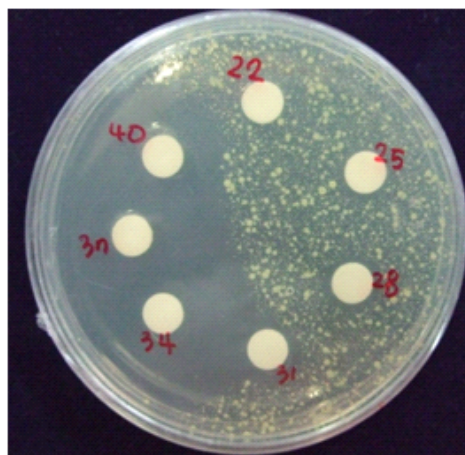


Fig. 3. Antimicrobial activity of each fractions derived from Sephadex LH-20 column chromatography.

3.4 감초 추출물의 항균성 성분 화학구조 동정

감초로부터 분리한 항세균 활성성분 KC의 화학구조를 규명하기 위하여 CDCl_3 에 녹여 ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY 등의 1차원 및

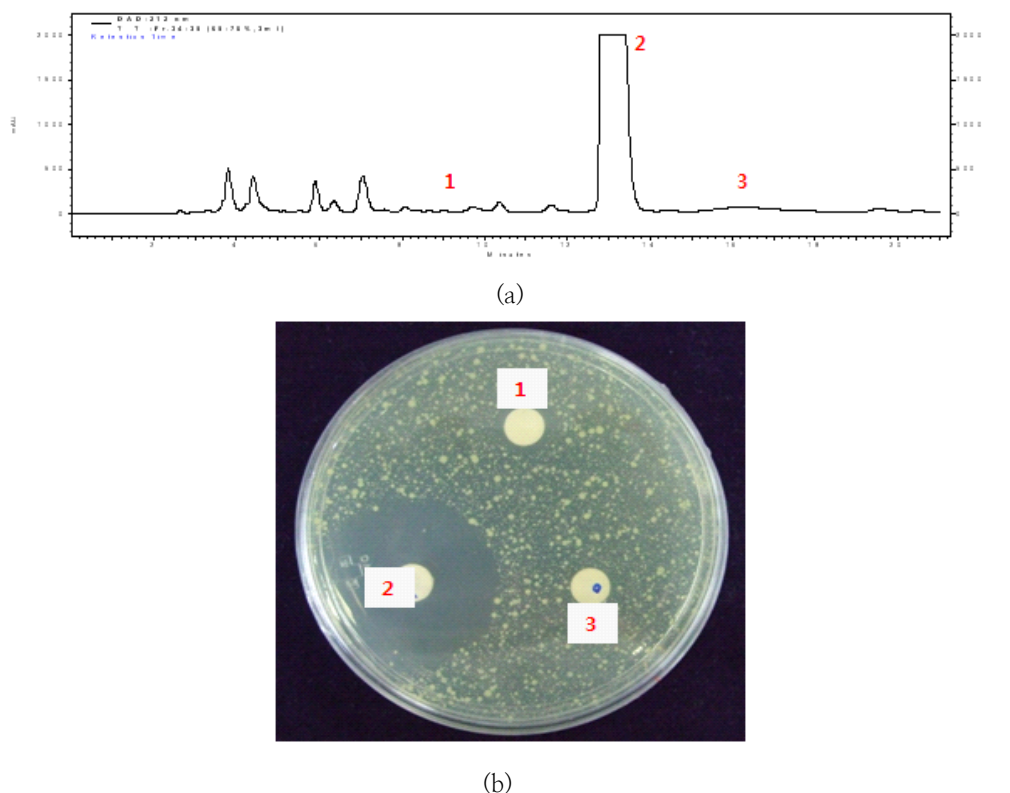


Fig. 4. Preparative HPLC profile of fraction 34, 35(a) and antimicrobial activity of the second peak(b).

2차원 NMR spectrum을 측정하여 해석하였다. KC 화합물을 ^1H NMR spectrum을 측정한 결과, 6.8~5.5ppm 사이에 7개의 aromatic methine proton이 관찰되었으며, 4.29와 3.95ppm에서 한 개의 oxygenated asymmetric methylene, 3.40 ppm에서 한 개의 methine, 2.93, 2.75ppm에서 한 개의 asymmetric methylene 및 1.36ppm에서 두 개의 methyl proton이 관찰되었다.

한편 ^{13}C NMR spectrum을 측정한 결과, 20개의 탄소가 관찰되었다. 즉 156.7, 155.9, 151.7, 149.7 ppm에서 네 개의 sp^2 oxygenated quaternary carbon, 129.0, 128.4, 127.4, 116.8, 108.1, 106.3, 102.2 ppm에서 7개의 sp^2 methine carbon, 118.6, 114.8, 109.6 ppm에서 세 개의 sp^2 quaternary carbon, 75.2ppm에서 sp^3 oxygenated quaternary carbon, 70.1ppm에서 oxygenated methylene carbon, 31.7 ppm에서 sp^3 methine carbon, 30.3ppm에서 sp^3 methylene carbon,

26.6, 26.5ppm에서 두 개의 methyl carbon이 관찰되었다. 따라서 이의 확인을 위하여 mass 분석을 수행 하였으며 ESI-mass spectrum을 positive mode에서 측정한 결과, $[\text{M}+\text{H}]^+$ 가 m/z 325에서 관찰되어 분자량이 324임을 알 수 있었다(Fig. 5). 따라서 NMR 분광분석 및 mass 분석에 의하여 감초 추출물에서 분리한 항세균 활성성분의 화학구조를 규명할 수 있었다. 화합물 KC는 한 개의 chiral center를 지니고 있고 천연에서 분리되는 glabridin은 (+)-glabridin 즉 (*R*)-glabridin으로 알려져 있다[23] 본 실험에서는 이를 규명하지 않았으나 감초 추출물에서 분리한 천연 glabridin인 점과 천연에서는 (*S*)-glabridin이 보고되지 않은 점 등으로부터 본 화합물을 (*R*)-glabridin으로 동정하였다.

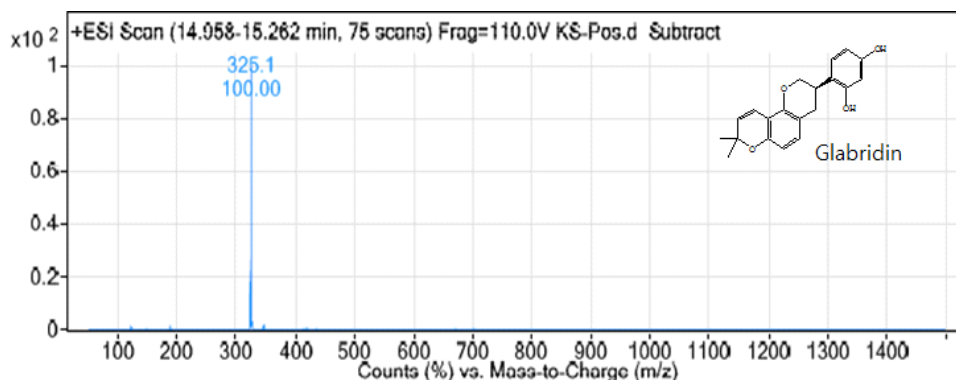


Fig. 5. ESI - mass spectrum of KC compound.

4. 결 론

본 연구에서는 감초 추출물로부터 항균물질을 분리, 정제하여 ESI-MS, ^1H -NMR과 ^{13}C -NMR 등을 이용하여 항균 효과를 나타내는 물질을 분리, 동정하여 하였다.

1. 유포자 세균인 *Bacillus subtilis* KCTC 1021에 대한 감초추출물의 항균성은 대조군으로 사용된 메타중아황산칼륨과 비슷한 항균활성을 나타내었고 myconazole에 비해서는 상대적으로 항균활성이 우수한 것으로 나타났다.
2. 감초 추출물의 분획별 항균성을 분석하기 위해 감초 추출물을 hexane, chloroform, ethyl acetate, butanol 등의 유기용매를 이용하여 순차적으로 분배 추출한 결과 항균성 활성은 chloroform과 ethyl acetate 분획층에서 나타났으며, chloroform층의 활성이 더 강한 것으로 분석되었다. 이에 감초 chloroform층 분획물로부터 항균활성이 가장 우수한 fraction 45~50을 취한 후 이를 농축 하고 methanol을 용매로 하여 Sephadex LH-20 column chromatography의 수행을 통해 fraction 33~40 사이에서 강한 활성을 띠는 분획물을 분리하였고 analytical HPLC로 분석을 통해 활성성분이 가장 강한 분획물을 KC라 임의로 명명하였다.

3. 감초로부터 분리한 항세균 활성성분 KC의 화학구조를 규명하고자 CDCl_3 에 녹여 ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^1H - ^1H COSY 등의 1차원 및 2차원 NMR spectrum을 측정하여 해석한 결과 화합물 KC는 한 개의 chiral center를 지니고 있는 (*R*)-glabridin으로 동정되었다.

References

1. N. T. Huang, C. T. Ho, and C. Y. Lee, Phenolic compounds in food and their effects on health(II): Antioxidants and cancer prevention, ACS Symp Series 507. American Chemical Society, Washington DC, 54-71 (1992).
2. R. M. Alonso-Salces, E. Korta, A. Barranco, L. A. Burrueta, B. Gallo, and F. Vicente, Pressurized liquid extraction for the determination of polyphenols in apple, *J. Chromatogr A*, **933**(9), 37-43 (2001).
3. N. C. Cook, and S. Samman, Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, **7**(2), 66-76 (1996).
4. C. Rice-Evans, N. Miller, and G. Paganga, Antioxidant properties of phenolic compounds, *Trend Plant Sci. Technol.*, **2**(4), 152-159 (1997).

5. M. I. Yoshimoto, S. Okuno, M. Yamaguchi, and O. Yamakawa, Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweetpotato, *Biosci., Biotechnol. Biochem.*, **65(7)**, 1652-1655 (2001).
6. C. Proestosa, I. S. Bozarisb, G-J. E. Nychasb, and M. Komaitis, Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity, *Food Chem.*, **95(4)**, 664-671 (2006).
7. J. H. Jung, and S. H. Cho, Effect of steeping treatment in the natural antimicrobial agent solution on the quality control of processed tofu, *Korean J. Food Preserv.*, **10(1)**, 41-46 (2003).
8. L. R. Beuchat, and D. A. Dolden, Antimicrobials occurring naturally in foods, *Food Technol.*, **43(1)**, 134-142 (1989).
9. K. H. Lee, T. Ibuka, R. Y. Wu, and T. A. Geissman, Structure-antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds, *Phytochemistry*, **16(8)**, 1177-1181 (1997).
10. M. A. El-Shenawy, and E. H. Marth, Inhibition of inactivation of *Listeria monocytogenes* by sodium benzoate together with some organic acids, *J. Food. Protect.*, **52(11)**, 768-832 (1989).
11. J. N. Bizri, and I. A. Wahem, Citric acid and antimicrobials affect microbiological stability and quality of tomato juice, *J. Food. Sci.*, **59(1)**, 130-135 (1994).
12. E. J. Kim, and M. S. Anh, Antioxidative effect of ginger extracts. *Korean J. Soc Food Sci.*, **9(1)**, 37-42 (1993).
13. H. J. Kwak, Y. J. Kwon, P. H. Jeong, J. H. Kwon, and H. K. Kim, Physiological activity and antioxidative effect of methanol extract from onion (*Allium cepa* L.), *J. Korean Soc Food Nutr.*, **29(2)**, 349-355 (2000).
14. P. H. Byun, W. J. Kim, and S. K. Yoon, Effect of extraction conditions on the functional properties of garlic extracts, *Korean J. Food Sci Technol.*, **33(5)**, 507-513 (2001).
15. S. G. Kim, Comparison of major active compounds in some crude drugs distributed in domestic markets, MS Thesis, Daegu University, Gyeongsan, (2011).
16. E. J. Sohn, D. G. Kang, A. S. Lee, Y. M. Lee, M. H. Yin, K. B. Yeum, S. Y. Noh, and H. S. Lee, Antioxidant activities of Glycyrrhizin and its effect on renal expression of Na, K-ATPase in gentamicin-induced acute renal failure rats, *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, **17(2)**, 542-548 (2003).
17. S. Matsui, H. Matsumoto, Y. Sonoda, K. Ando, E. Aizu-Yokota, T. Satoh, and T. Kasahara, Glycyrrhizin and related compounds down-regulate production of inflammatory chemokines IL-8 and eotaxin 1 in a human lung fibroblast cell line, *Int. Immunopharmacology*, **4(13)**, 1633-1644 (2004).
18. A. Wolkerstorfer, H. Kurz, N. Bachhofner, and O. H. J. Szolar, Glycyrrhizin inhibits influenza A virus uptake into the cell, *Antiviral Res.*, **83(2)**, 171-178 (2009).
19. E. Y. Ahn, D. H. Shin, N. I. Baek, and J. A. Oh, Isolation and Identification of antimicrobial active substance from *glycyrrhiza uralensis* FISCH, *Korean J. Food Sci Technol.*, **30(3)**, 680-687 (1998).
20. M. S. Kim, D. C. Lee, J. E. Hong, K. S. Chang, H. Y. Cho, Y. K. Kwon, and H. Y. Kim, Antimicrobial effects of ethanol extracts from Korean and Indonesian plants Korean, *J. Food Sci Technol.*, **32(4)**, 949-958 (2000).
21. 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)**, 386-392 (2014).
22. J. Y. Bae, H. N. Jang, J. H. Ha, J. H. Park, and S. N. Park, Antimicrobial activities of licorice extracts from various

countries of origin according to extraction condition, *Korean J. Microbiol Biotechnol.*, **42(4)**, 361–366 (2014).

23. M. H. Kim, S. U. Kim, Y. U. Kim, and J. H. Han, Absolute configurations of (\pm)-glabridin enantiomers, *Bull. Korean Chem Soc.*, **30(2)**, 415–418 (2009).