



감초 육성품종 뿌리 추출물의 *In vitro* 활성 평가

이승은[†] · 이정훈 · 박춘근 · 김형돈 · 이윤지 · 서경혜 · 정현수 · 장재기 · 김동희

농촌진흥청 국립원예특작과학원 인삼특작부

Evaluation of the *In vitro* Activity of *Glycyrrhiza* Cultivar Roots

Seung Eun Lee[†], Jeong Hoon Lee, Chun Geon Park, Hyung Don Kim, Yun Ji Lee, Kyung Hae Seo, Hyeon Soo Jeong, Jae Ki Chang and Dong Hwi Kim

Department of Herbal Crop Research, NIHHS, Eumseong 27709, Korea.

ABSTRACT

Background: *Glycyrrhiza radix* (licorice root) have been used as an oriental medicine material for long time, and its protective effects on oxidative stress, inflammation and cognition deficit have been recently reported. However, the cultivation of *Glycyrrhiza* species as medicinal crops is associated with some problems such as low productivity and early leaf fall, etc. To resolve this problems, *Glycyrrhiza* cultivars have been developed by direct hybridization of each *Glycyrrhiza* species by Korean researchers. The present study was conducted to compare the *Glycyrrhiza* cultivar radix (Dagam, Sinwongam and Wongam) for their anti-oxidation, anti-inflammation, and cognition improvement effects and levels of liquiritin, isoliquiritigenin and licochalcone in order to select an excellent cultivar as a material resource.

Methods and Results: For evaluating the inhibitory efficacies of the *Glycyrrhiza* cultivar extracts on oxidative stress and inflammation in BV2 cells, we measured their reactive oxygen species (ROS) production and nitric oxide (NO) release after treating them with lipopolysaccharide. The scavenging activities on 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and peroxynitrite (NOO⁻) radicals were evaluated. Cell proliferation and N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) inhibition were analyzed. The total phenol, liquiritin, isoliquiritigenin and licochalcone A content in the extracts of the three cultivars were quantified. Furthermore, the correlation coefficient between the activities and contents of total phenol, liquiritin, isoliquiritigenin and licochalcone A were also calculated. The results indicated that Sinwongam exhibited potent anti-oxidant, anti-inflammatory and NMDAR inhibitory activities. Sinwongam also showed higher total phenol and licochalcone A contents than the other cultivars. Among the three cultivars, Dagam exhibited a positive effects on NO release inhibition, cell proliferation and contents of liquiritin and isoliquiritigenin.

Conclusions: Sinwongam is expected to be the most useful resource as a functional material for anti-oxidation/anti-inflammation and cognition improvement among the three studied licorice cultivars.

Key Words: *Glycyrrhiza uralensis* Fischer, Anti-oxidation, Anti-inflammation, N-methyl-D-aspartate Receptor, Total Phenol

서 언

감초 (감초, Chinese Licorice)는 콩과에 속하는 여러해살이풀로 중국, 시베리아, 몽골 등지에 분포하며, 뿌리 및 뿌리 줄기를 건조시켜 한약재로 사용한다. 감초 기원식물의 학명은 *Glycyrrhiza uralensis* Fischer (감초), *Glycyrrhiza glabra* L.

(광과감초), *Glycyrrhiza inflata* Bata. (창과감초)으로 정리되는데, 뿌리 및 뿌리줄기는 식용이 가능하여 위 건강에 도움을 주는 건강기능식품으로도 활용되고 있다 (Yoon, 2009).

오랜 기간 한약재로 사용되어온 감초는 flavonoids 또는 triterpene saponin이 주요 성분으로 검출 또는 분리되는 데 (Montoro *et al.*, 2011), glycycomarin 등의 prenylflavonoids

[†]Corresponding author: (Phone) +82-43-871-5782 (E-mail) herbin3@korea.kr

Received 2018 November 7 / 1st Revised 2018 November 22 / 2nd Revised 2019 January 23 / 3rd Revised 2019 April 9 / 4rd Revised 2019 April 19 / Accepted 2019 April 19

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성분은 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)- γ ligand 결합에 대한 활성을 가지며, isoliquiritigenin는 vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 발현 억제를 통해 혈관 내피의 염증 완화 효능을, nuclear factor-kappaB (NF- κ B) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2) 발현 억제를 통해 항염증 효과를, licochalcone A는 조골세포분화에 효과를 가진다고 보고되고 있다 (Mae *et al.*, 2003; Kwon *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2009; Soe *et al.*, 2013). 그리고 감초 추출물은 천식에 대해 항알레르기 작용 (Kwak and Park, 2004), 아밀로이드 베타 단백질로 인지 손상을 유발한 생쥐에서 인지 손상에 대한 보호, nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf2)-antioxidant response element (ARE)-산화스트레스 신호전달체계의 강한 활성화 및 NF- κ B 매개 염증에 대해 강한 저해효과, 급성 간 손상 모델에서 Nrf2 경로의 활성화를 통한 산화스트레스 보호 작용 (Ahn *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2010; Cao *et al.*, 2017)이 보고되어 있다.

이처럼 감초는 많은 약효 성분의 작용에 의해 다양한 효능을 나타내는 주요 약용작물이지만 감초 필요량은 대부분 수입에 의존하여 왔기에 그 수급을 위한 대책이 필요하였다. 이러한 필요에 따라 근래에 이르러 국내에서도 감초 재배에 성공하여 재배면적이 확대되고 있는 한편 감초 국내 재배 시 문제되는 도복성과, 조기 낙엽성, 수량 등을 극복하기 위해 국내 연구기관에서 육성품종이 개발되었다 (Fig. 1). 감초 단일 종에 대해서는 앞서 언급한 바와 같이 성분 및 효능에 관한 많은 연구가 이루어져 있지만, 그 육성품종에 대해서는 연구가 미흡한 실정이다.

따라서, 본 연구에서는 국내에서 개발된 감초 신품종 3 가지 (다감, 신원감, 원감)를 재료로 하여 liquiritin, isoliquiritigenin 및 licochalcone A 등 주요 약리성분의 정량 분석 및 이들 성분이 나타낼 수 있는 효능인 항산화, 항염 및 인지 관련 수용체 제어능을 분석, 비교함으로써 산화화 소재로 활용할 수 있는 기초자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

연구에 이용된 재료는 농촌진흥청에서 개발된 감초 (감초, Chinese Liquorice) 3 품종의 뿌리를 이용하였으며, 2016년 11월 21일 충북 음성군 국립원예특작과학원 인삼특작부 약용작물시험포장에서 증식된 것으로서 1년근 주근을 채취하여 세척한 후 55°C 조건의 건조기에서 3 일간 건조하였다 (Fig. 1). 건조된 감초 육성품종을 각각 분쇄한 후 에탄올을 이용하여 50°C 조건의 가속용매추출장치에서 추출 및 여과한 후 감압농축기 (N-1200NB, Eyela, Kesenuma, Japan)를 이용하여 50°C에서 에탄올을 증발시켜 농축하였다. 그리고 농축물 중에 남아 있는 미량의 수분은 동결건조기를 이용해 30°C의 선반에서 4 일간 건조하여 제거하고 실험에 사용하였다.

2. 시약

본 연구를 위해 사용된 시약으로 Dulbecco's minimum essential media (DMEM), fetal bovine serum (FBS), Folin-Ciocalteu reagent와 NaCO₃는 Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA), lipopolysaccharide (LPS), dimethyl sulfoxide (DMSO), penicillin & streptomycin (PEST), diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), tannic acid, L-ascorbic acid, 3-morpholinopyridone (SIN-1), dihydrorhodamine 123 (DHR123), sulfanilamide, N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), liquiritin, isoliquiritigenin, licochalcone A, L-glutamate, trizma base 및 ethylene-diamine-tetraacetic acid (EDTA)는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, phosphate buffered saline (PBS)는 WelGene (Gyeongsan, Korea), [³H]CGP39653 및 scintillation cocktail (Perkin Elmer, Boston, MA, USA), HCl은 VWR international (Radnor, PA, USA)에서 구입하였다.

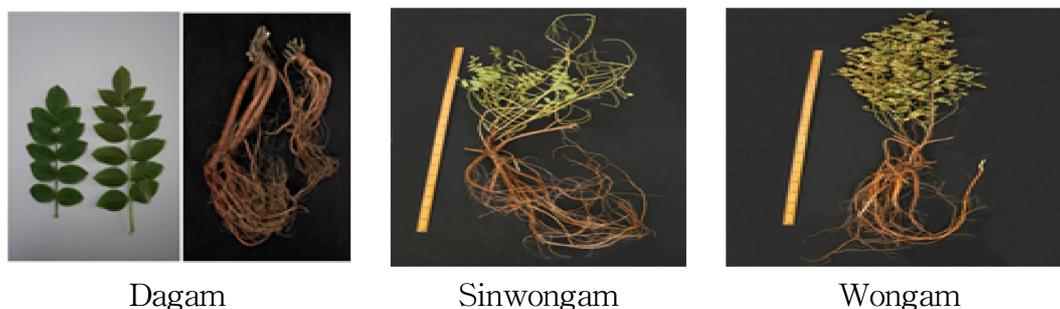


Fig 1. Specimens of Glycyrrhiza cultivars.

3. 세포주 및 배양방법

세포에서의 감초 육성품종의 항염 활성, 세포증식을 및 활성산소 저해능 비교를 위해 사용된 BV-2 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA)에서 분양받은 것으로 37°C의 온도, 5%의 이산화탄소 농도 조건인 배양기에서 5% FBS, 1% PEST를 포함하는 DMEM 배지를 사용하여 배양되었다.

4. 세포에서의 항산화 활성 분석

감초 육성품종별 추출물의 활성산소 저해능을 분석하기 위해서는 BV-2 세포를 96 well plate에 5×10^4 cells/well 만큼 분주하고 16 시간 동안 배양한 후 감초 육성품종별 추출물을 24 시간동안 처리하였다. 그 후 0.5 $\mu\text{g/ml}$ LPS를 12 시간 처리하고, 순차적으로 10 μM 의 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA)가 포함된 배지를 30 분간 처리한 후 PBS를 이용해 세척하였다. 반응이 끝난 96 well plate를 microplate reader (Bio-Tek Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 excitation 485 nm 및 emission 530 nm 조건에서 형광 정도를 측정하였다 (Lau *et al.*, 2007). 이러한 실험으로부터 감초 육성품종별 추출물의 형광도를 시료를 처리하지 않은 대조실험의 형광 정도에 대한 백분율 (%)로서 나타내었다.

한편, 감초 육성품종추출물의 항산화 효과를 기존 항산화제와 비교하기 위해 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 감초 육성품종 추출물 및 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 L-ascorbic acid에 대해 lipopolysaccharide (LPS)가 처리된 BV-2 세포에서의 형광생성 정도를 분석함으로써 활성산소 저해효과를 비교하고자 하였다.

5. 세포에서의 항염 활성 및 세포증식에 대한 영향 분석

감초 육성품종 추출물의 항염 활성을 평가하기 위해 Lau 등 (2007)의 방법을 변형하여 NO (nitrite) 생성에 대한 저해 정도를 분석하였다. BV-2 세포를 2×10^5 cells/ml 비율로 48 well plate에 분주한 다음 24 시간 배양한 후 감초 육성품종별 추출물을 2 시간동안 처리하였으며, 배지를 제거한 후 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 LPS를 처리하여 배양하였다. 24 시간 후 각 well의 상등액인 배지 50 μl 를 96 well plate에 옮겨 담고, 1% sulfanilamide 50 μl 와 0.1% N-1-naphthyl-ethylenediamine dihydrochloride (NED) 50 μl 를 각각 가하여 혼합한 후 microplate reader (Bio-Tek Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 520 nm 조건에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 측정된 NO 표준물질 (nitrite)의 흡광도로부터 작성된 검량선식을 적용하여 감초 육성품종 추출물 처리군의 흡광도에 대한 NO량을 계산하였다.

또한, 감초 육성품종별 추출물의 세포증식을 분석을 위해서는 Jung 등 (2009)의 방법에 따라 BV-2 세포주에 대해 NO 생성 저해능 분석 실험과 동일한 조건 및 실험과정으로 처리

된 상등액을 제거하고 0.6 mg/ml 농도의 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)를 포함하는 배지를 처리하였다. 1 시간 후 MTT 함유 배지를 제거하고 DMSO를 가해 formazan을 용해한 후 microplate reader (Bio-Tek Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 540 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포증식은 측정된 감초 육성품종 시료의 흡광도를 대조실험의 흡광도에 대한 백분율 (%)로 나타내었다.

6. DPPH 유리기 및 Peroxynitrite (NOO⁻) 소거능 분석

감초 육성품종별 추출물의 자유라디칼에 대한 소거능을 확인하기 위해 Lee 등 (2010)의 방법에 따라 에탄올에 1.5×10^{-4} M의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)를 녹인 후 감초 추출물을 최종농도 5, 10, 20, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 혼합하였다. 3 분이 경과한 후 반응액은 분광광도계 (Cary-300, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 농도별 흡광도 값을 대조물질의 흡광도에 대해 저해율 (%)을 구한 후 시료별 농도와 저해율 간의 방정식을 산출하여 50% 저해농도인 IC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)값을 계산하였다.

또한, 감초 육성품종별 추출물의 peroxynitrite (NOO⁻)에 대한 소거능 분석을 위해서는 rhodamine buffer와 diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), dihydrorhodamine 123 (DHR123), 3-morpholinopyridone (SIN-1)을 이용하여 reaction buffer를 제조하고, 감초 추출물과 혼합하여 96 well black plate에 분주하고 5 분간 반응시켰다. 반응 후 microplate reader (Bio-Tek Synergy HT, BioTek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 형광조건 (excitation 485 nm/emission 530 nm)에서 반응액의 형광 정도를 측정하였으며 IC₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) 값으로 NOO⁻ 소거활성을 산출하였다.

7. N-Methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체 제어능 분석

감초 육성품종별 추출물의 NMDA 수용체에 대한 제어능을 확인하기 위해 Sills 등 (1991)의 방법에 따라 실험하였다. 먼저, 4°C에서 1 mg의 protein에 해당하는 뇌피질막 균질액을 5 nM [³H] CGP39653와 함께 5 mM Tris-HCl (pH 7.7), 10 mM EDTA-Tris와 함께 최종농도 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 감초 추출물 포함 또는 포함하지 않는 조건에서 60 분간 배양하면서 비특이적 결합을 100 μM L-glutamate 존재 하에 결정하였다. 배양 후, 시료를 진공 하에 glass fiber filters (GF/B, Brandel Inc., Gaithersburg, MD, USA)로 신속히 여과하고, 48 sample cell harvester를 사용하여 ice-cold incubation buffer로 여러 차례 세척하였으며, 여과액은 건조시킨 후 scintillation cocktail을 사용하여 scintillation counter (LS series, Beckman Instruments,

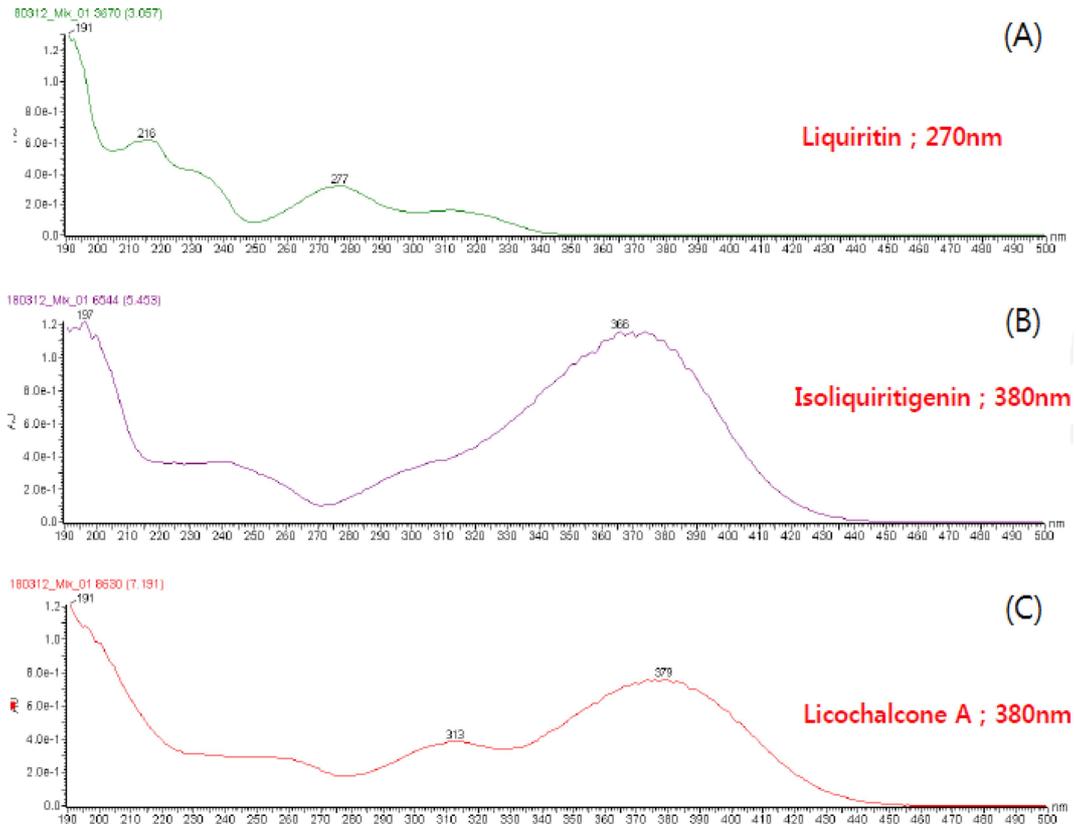


Fig. 2. UV spectrum of the standard compounds (A; liquiritin, B; isoliquiritigenin, C; licochalcone A).

Fullerton, CA, USA)를 이용하여 radioactivity를 계산하였다. NMDA 수용체에 대한 저해능은 control radioligand specific binding에 대한 저해율 (%)로서 나타내었다.

8. 총페놀 함량 및 약효성분 분석

감초 육성품종별 추출물의 총페놀 함량 분석을 위해 감초 추출물 일정량과 2% Na₂CO₃ 용액을 혼합한 후 1 N Folin-Ciocalteu 용액을 가하여 30 분간 반응시켰다. 반응물은 분광광도계 (Cary-300, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 750 nm 파장에서 흡광도를 측정하였고 측정된 감초 추출물의 흡광도를 페놀성 화합물의 하나인 gallic acid를 표준물질로 사용하여 농도별 흡광도로부터 도출된 검량선식 ($y = 0.022x - 0.0121$, $R^2 = 0.9976$)을 이용하여 총페놀 함량을 계산하였다 (Lee *et al.*, 2008).

감초 주요 약효성분인 liquiritin, isoliquiritigenin 및 licochalcone A의 육성품종별 함량을 확인하기 위해서는 아래와 같이 정량분석을 실시하였다. 먼저, liquiritin, isoliquiritigenin 및 licochalcone A는 구조적으로 벤젠 링과 이중결합 등의 chromophore가 있어 UV 흡광이 좋고, 일반적으로 사용되는 HPLC 용매인 물 및 유기용매에 잘 용해되며, 각각의 추출물

시료를 또한 해당 용매에 잘 용해되는 특성이 있으므로 190 - 400 nm에서 full scan하여 최대 UV 흡광을 측정하여 해당 파장을 선택하여 분석 조건을 설정하였다 (Fig. 2). 이러한 방법에 따라 분석에 사용된 검출기의 파장은 liquiritin은 270 nm로, isoliquiritigenin 및 licochalcone A는 모두 380 nm로 선택하여 진행하였다.

분석시간 단축 및 분리 효율을 위하여 UV detector와 Acquity UPLC BET C8 (1.7 μ m, 2.1 \times 100 μ M) 컬럼이 장착된 UPLC (Waters Acquity, Milford, MA, USA)를 사용하였다. 이동상으로 water (A)와 acetonitrile (B)를 사용하여 분석초기에는 A : B의 비율을 80 : 20으로 시작하여 3 분까지, 그리고 계속하여 10 분까지 60 : 40으로 변경하였으며, 추가적으로 15 분까지 50 : 50으로 변경한 후 20 분까지 20 : 80으로 진행시키는 gradient system을 적용하여 분석하였다. 유속은 0.4 ml/min, injection volume은 1 μ l, column/sample temp은 25 $^{\circ}$ C의 조건으로 하였다.

본 연구에서 사용된 분석방법은 isoliquiritigenin 및 licochalcone A이 LC-UV 시스템을 이용하여 분석용매와 컬럼을 선택한 후 지표성분과 추출시료의 분석조건 설정을 할 수 있는 구조를 감안하여 190 - 500 nm의 전파장 스캔을 통하여

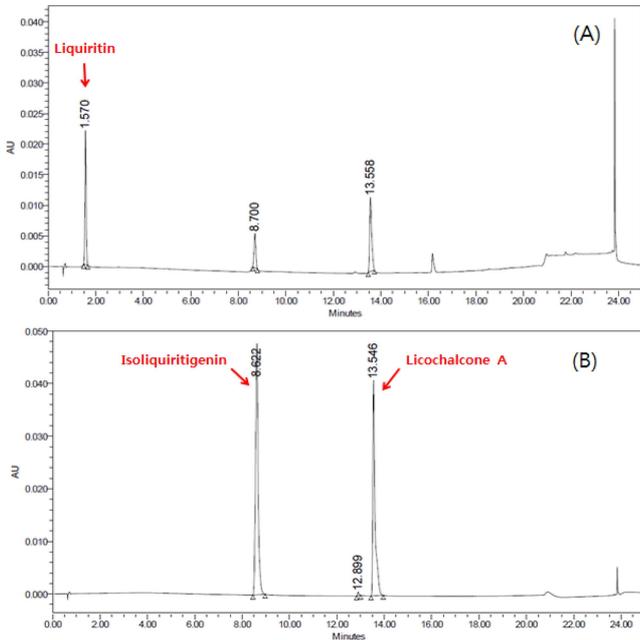


Fig. 3. HPLC chromatograms of the standard compounds dissolved in 3 mg/ml of 50% ethanol (A); liquiritin, (B); isoliquiritigenin and licochalcone A.

각각의 물질이 최대 흡수하는 파장을 선택하여 설정하였다. Isoliquiritigenin 및 licochalcone A의 구조적 특성 상 UV를 흡수할 수 있는 chromophore가 있어 UV 흡광이 유리하다는 점에서 UV 검출기를 사용하였다. 또한, 추출물 시료의 크로마토그램에서 지표성분인 isoliquiritigenin (8.6 분), licochalcone A (13.5 분)의 주변으로 많은 추출 성분들이 검출되었으며 이 성분들을 분석하기 위하여 일반적인 HPLC 시스템을 사용할 경우, 분석 소요 시간이 늘어날 뿐 아니라 지표성분 주변의 성분들은 분리되지 않으므로 본 실험에서는 UPLC 시스템을 이용하여 분석하였다. 또한, 1.7 μm의 입자를 가진 컬럼을 사용함으로써 HPLC의 5 μm 입자 컬럼을 사용했을 때 보다 분리능이 높아지고 지표성분 주변의 성분들의 분리도 가능하므로 분석 소요시간이 단축되고 분리능이 높은 UPLC 시스템을 사용하여 분석하였다.

이 조건에서 표준물질 liquiritin, isoliquiritigenin 및 licochalcone A의 검량선식은 각각 $3858.616x + 4501.121$, $17808.099x + 1247.297$ 및 $11895.576x + 561.242$ 이었으며, R²는 모두 1.000이었다. 또한, 분석용액에서의 각 표준물질 및 감초 육성품종별 크로마토그램은 Fig. 3, 4, 5에 나타내었다.

9. 통계분석

감초 육성품종별 추출물에 대해 반복실험으로 얻은 결과 (n = 3-4)는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 통계적 유의성은

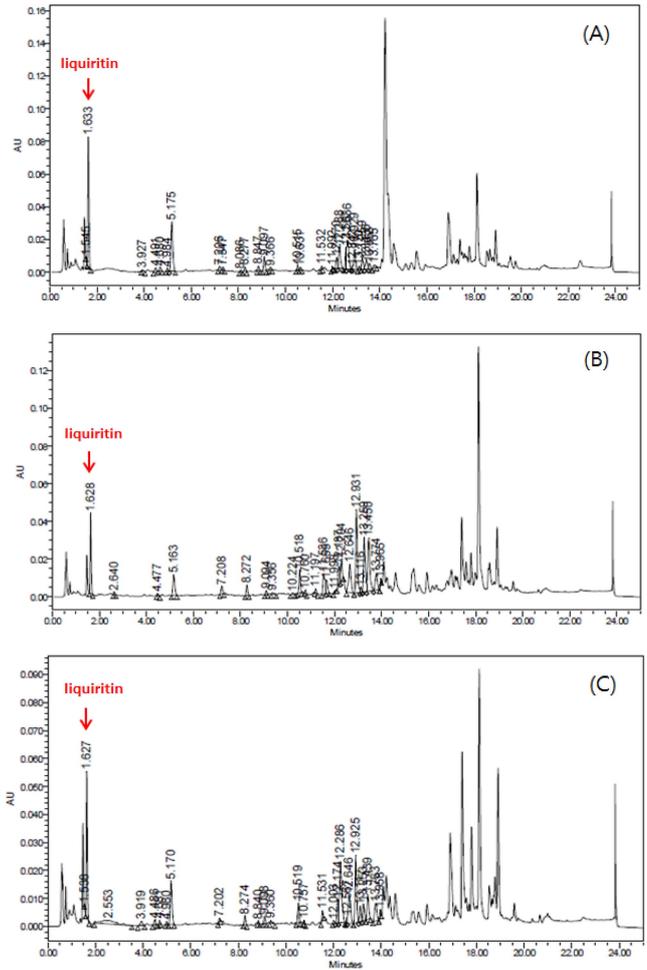


Fig. 4. HPLC chromatograms of liquiritin from Glycyrrhiza cultivar extracts. (A); Dagam, (B); Sinwongam, (C); Wongam.

Student's *t*-test로 확인하거나, SAS program (version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)에서 ANOVA 분석을 실시하여 유의성이 있을 경우 $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's Multiple Range Test (DMRT)를 실시하였으며, SPSS program (version 21, IBM Co., New York, NY, USA)을 이용하여 $p < 0.05$ 에서 상관계수를 산출하였다.

결과 및 고찰

1. 감초 육성품종 추출물의 항산화 활성에 미치는 영향

감초 (감초, Chinese Licorice)는 고지혈증인 흰쥐에서 항산화 상태를 개선시키며 급성 간손상 모델에서는 Nrf2 경로의 활성화를 통하여 산화스트레스에 대해 보호 작용을 하는 것으로 보고 (Visavadiya and Narasimhacharya, 2006; Cao *et al.*, 2017)되었으므로 세포수준에서 감초 육성품종별 에탄올 추

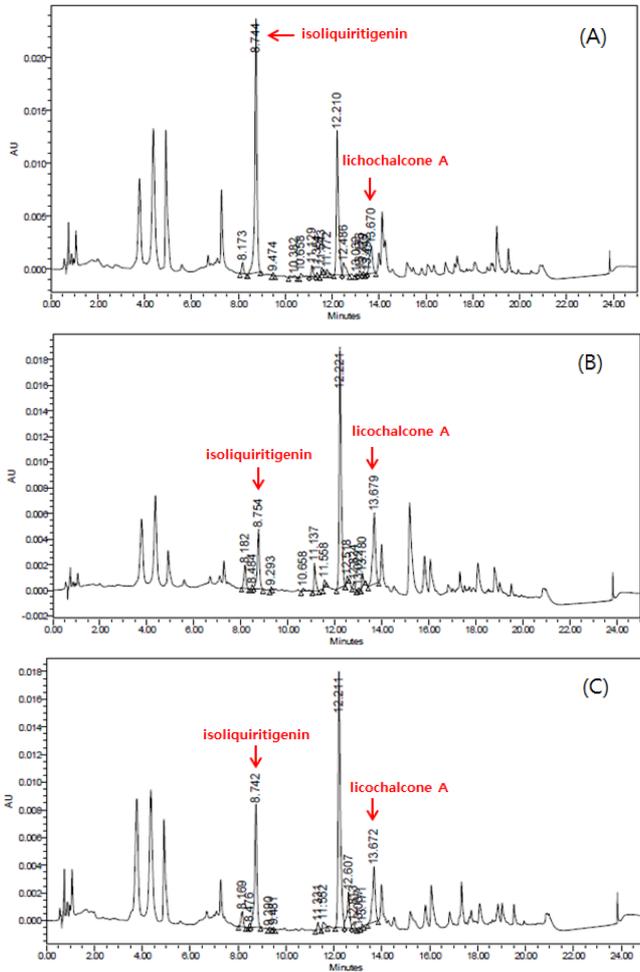


Fig. 5. HPLC chromatograms of isoliquiritigenin and licochalcone A from *Glycyrrhiza cultivar* extracts. (A); Dagam, (B); Sinwongam, (C); Wongam.

출물의 항산화 활성을 비교하였다.

그 결과, Fig. 6에 나타낸 바와 같이 LPS로 산화스트레스를 유발한 BV2 세포에서 감초 추출물의 활성산소 (reactive oxygen species, ROS) 저해효과를 분석하였을 때, LPS 단독 처리에 비해 감초의 육성품종별 추출물 처리에 의해 활성산소가 감소함을 확인할 수 있었다. 즉, LPS 무처리된 control의 fluorescence intensity를 100%로 하였을 때보다 LPS 단독 처리 시는 상대적 fluorescence intensity가 150.4%로 증가하였으나, 감초 육성품종 추출물을 (2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 처리하였을 때 다감 추출물은 각각 135.8%, 128.5%, 94.4%, 신원감 추출물은 131.7%, 122.4%, 76.1%, 원감 추출물은 123.2%, 116.0%, 81.4%의 값을 보여 LPS 단독처리보다 감소하였다. 이러한 결과를 IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)로 나타내었을 때, 신원감은 9.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로서 원감 (11.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 다감 (12.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에

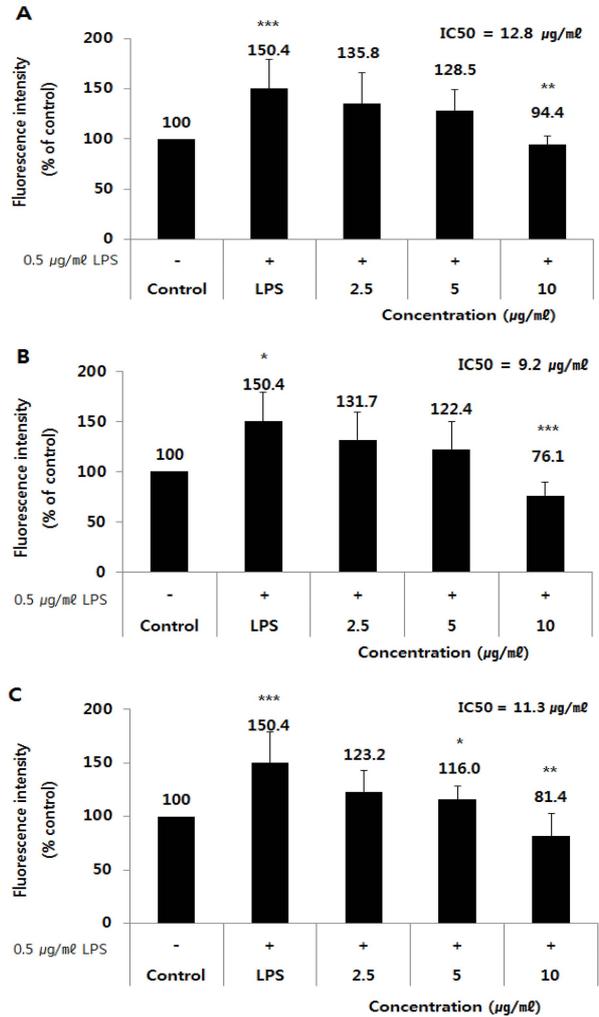


Fig. 6. Inhibition activity of *Glycyrrhiza cultivar* extracts on reactive oxygen species. BV-2 cells (5×10^4 cells/well) in 96-well plate were treated with the cultivar extract samples at 2.5, 5.0 and 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in serum free media and with serum free media for control experiment for 24 hours. The reaction wells were treated by LPS treatment (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 12 hours. After all of the treatments, the fluorescence of the plate was measured via DCFDA staining. (-); LPS-untreated experiment, (+); LPS-treated experiment. LPS means lipopolysaccharide. A; Dagam, B; Sinwongam, C; Wongam. Statistical analysis was performed using Student's t-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

비해 가장 낮은 수치를 보여 세포에서의 활성산소 저해능은 신원감이 가장 우수함을 알 수 있었다.

한편, BV2 세포를 이용하여 감초 육성품종 추출물의 항산화 활성을 기존의 항산화물질인 vitamin C (Vit. C)와 비교한 실험에서 대조실험의 형광 정도를 100%로 하였을 때의 각 시료의 상대적 fluorescence intensity (%)를 나타내었다. 그

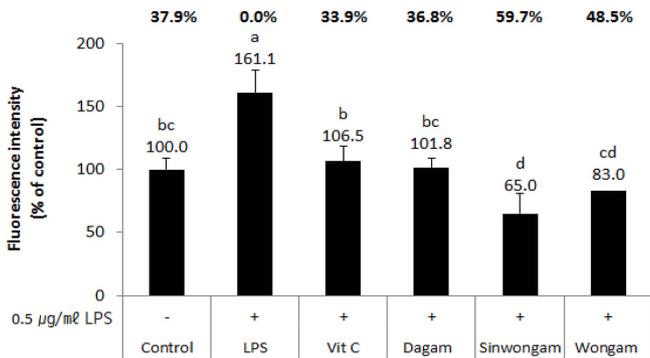


Fig. 7. Comparison of inhibition activity on reactive oxygen species between Glycyrrhiza cultivar extracts and vitamin C. BV-2 cells (5×10^4 cells/well) in 96-well plate were treated with the cultivar extracts at $5 \mu\text{g/ml}$, vitamin C (Vit. C) as positive control at $100 \mu\text{g/ml}$ and with serum free media for control experiment for 24 hours. The reaction wells were treated by LPS treatment ($0.5 \mu\text{g/ml}$) for 12 hours. After all of the treatments, the fluorescence of the plate was measured via DCFDA staining. (-); LPS-untreated experiment, (+); LPS-treated experiment. LPS means lipopolysaccharide. Statistical analysis was performed using SAS program. Values are means \pm standard deviation ($n = 4$) and those with different alphabet are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

결과 Fig. 7에 나타난 바와 같이 감초 육성품종 ($5 \mu\text{g/ml}$)의 상대적인 fluorescence intensity는 다감 101.8, 신원감 65.0, 원감 83.0의 상대 형광도를 나타내 Vit. C ($100 \mu\text{g/ml}$)의 106.5 보다 낮은 상대 형광도를 보였다. 이러한 결과는 Vit. C가 33.9%의 저해율을 보인 것인 반면 다감은 36.8%, 신원감 59.7%, 원감 48.5%의 저해율을 나타낸 것으로서 신원감이 가장 높은 항산화 효과를 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

라디칼에 대한 감초 육성품종 추출물의 소거효과를 확인하기 위해 DPPH 라디칼에 대한 실험을 수행한 결과에서는 대조실험의 흡광도를 100%로 하였을 때, $5 \mu\text{g/ml}$ - $100 \mu\text{g/ml}$ 로 처리된 감초 육성품종별 추출물의 상대 흡광도는 다감이 95.7 - 33.4의 값을, 신원감이 93.3 - 19.3의 값을, 그리고 원감이 95.8 - 40.8의 값을 나타내었다 (Fig. 8). 이러한 결과를 IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)로 환산한 결과, 다감 추출물이 $72.5 \mu\text{g/ml}$, 신원감 추출물이 $55.1 \mu\text{g/ml}$ 그리고 원감 추출물이 $82.1 \mu\text{g/ml}$ 의 수치를 보여 감초 육성품종별 추출물 중 신원감이 가장 우수한 유기 소거능을 나타냄을 알 수 있었다.

Peroxynitrite (NOO) 소거능 (IC_{50} , $\mu\text{g/ml}$) 비교 실험에서는 Table 1에 나타난 바와 같이 감초 육성품종 추출물들이 2.4 - $3.4 \mu\text{g/ml}$ 의 수치를 보였고 특히 신원감이 $2.4 \mu\text{g/ml}$ 로 가장 우수하였다.

이러한 결과는 감초의 추출물이 급성 간손상 모델에서 Nrf2 (nuclear erythroid 2-related factor2) 경로의 활성화를 통하여

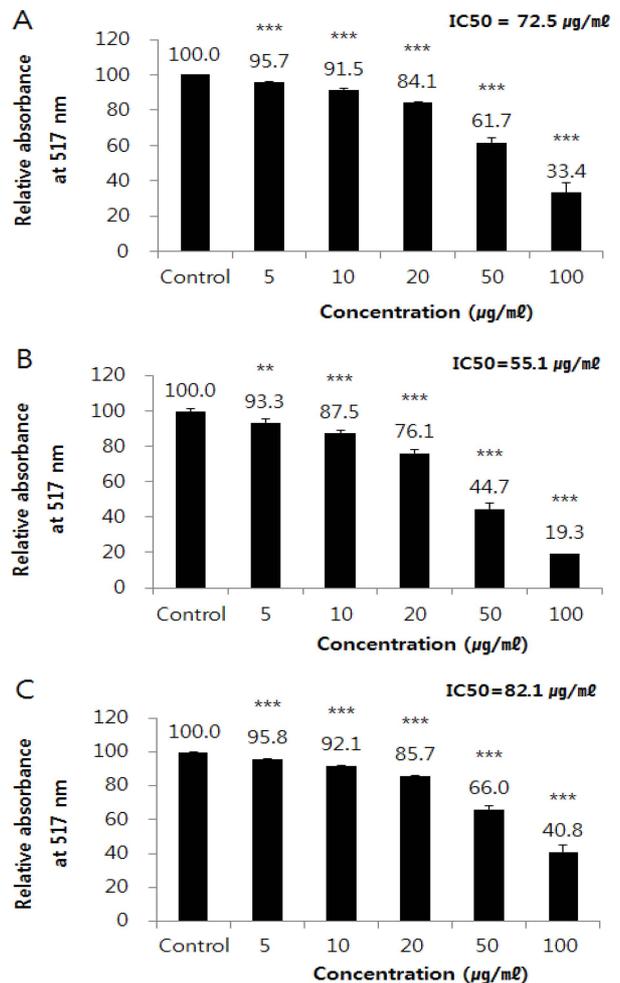


Fig. 8. DPPH radical scavenging activity of Glycyrrhiza cultivar extracts. Glycyrrhiza cultivar extracts at the final concentration of 5, 10, 20, 50 and $100 \mu\text{g/ml}$ were reacted with DPPH reagent for 3 minutes and DMSO for control experiment was used. Optical density of the reaction mixture was measured at 517 nm. A; Dagam, B; Sinwongam, C; Wongam. Statistical analysis was performed using Student's t -test ($*p < 0.05$; $**p < 0.01$; $***p < 0.001$).

산화스트레스에 대해 보호 작용을 하며 (Cao *et al.*, 2017), Nrf-antioxidant response element (ARE)-항산화 스트레스 신호경로의 강한 활성화에 대해 강한 저해효과를 나타내었다는 결과와 유사하였으며 (Wu *et al.*, 2010), 3 가지 감초 육성품종에 대한 세포 및 chemical level에서 항산화 활성을 종합적으로 비교한 결과, 신원감이 상대적으로 다른 품종에 비해 우수함을 확인할 수 있었다.

2. 감초 육성품종 추출물의 항염 활성 및 세포증식율에 대한 영향

감초 성분 중 총 플라보노이드는 흰쥐의 급성 염증모델에서

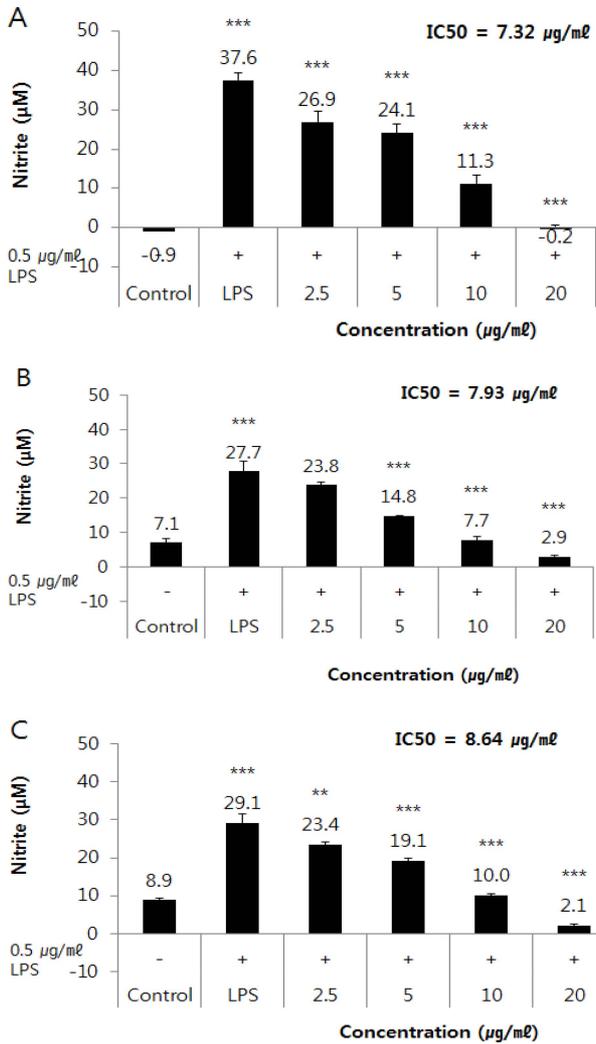


Fig. 9. Inhibition activity of Glycyrrhiza cultivar extracts on nitric oxide production. BV2 cells (2×10^5 cells/well) in 48-well plate were treated with sample extracts (at 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 2 hours and with serum free media as control. The wells were reacted with 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ LPS for 24 hours. Optical density of the reaction supernatant was measured at 520 nm. (-); LPS-untreated experiment, (+); LPS-treated experiment. LPS means lipopolysaccharide. A; Dagam, B; Sinwongam, C; Wongam. Statistical analysis was performed by using Student's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

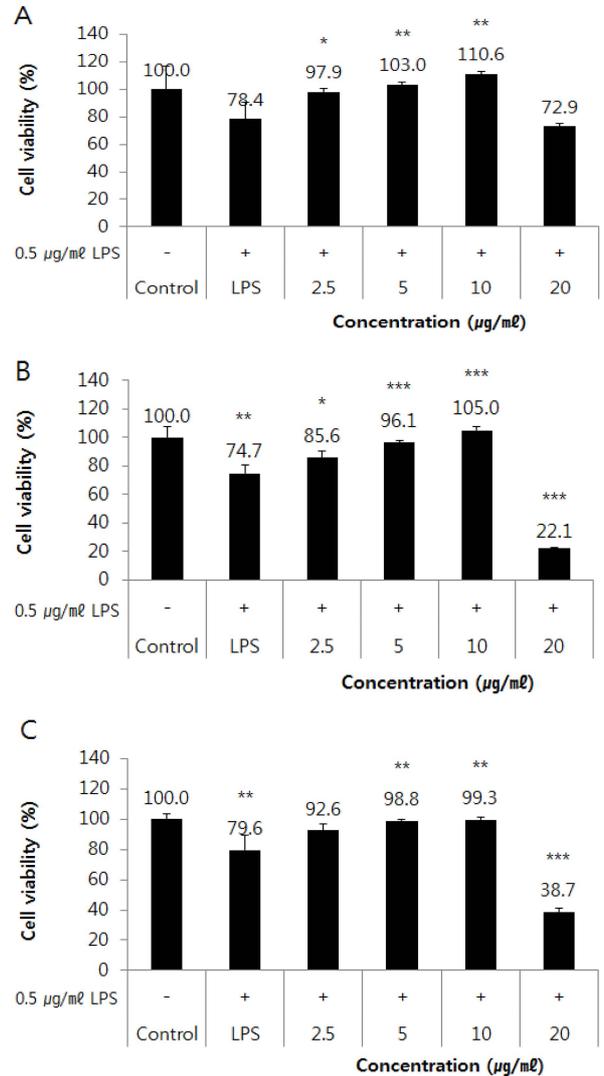


Fig. 10. Effect of Glycyrrhiza cultivar extracts on BV2 cell proliferation. BV2 cells (2×10^5 cells/well) in 48-well plate were treated with sample extracts (at 2.5, 5, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 2 hours and with serum free media as control. The wells were followed by LPS (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) treatment for 24 hours. After treatment with 0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ MTT, the optical density of formazan was measured at 540 nm. (-); LPS-untreated experiment, (+); LPS-treated experiment. LPS means lipopolysaccharide. A; Dagam, B; Sinwongam, C; Wongam. Statistical analysis was performed using Student's *t*-test (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

우수한 항염 활성을 나타내며, 감초 또는 붉은 감초로부터 제조된 추출물은 생쥐의 급성 및 만성 염증에 대한 보호작용을 나타내는 것으로 보고 (Kim *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2018) 되어 있어 다감 등 3 품종 추출물의 항염 활성을 비교하였다.

생쥐 소교세포인 BV2 세포에서 LPS 처리 시 발생하는 nitric oxide (NO) 생성에 대한 감초 추출물의 저해효과를 분석하고 NO 생성에 대한 저해효과를 IC₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$)로 나타내었

을 때 다감 추출물이 7.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 신원감 추출물이 7.93 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 원감 추출물이 8.64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 값을 보여 다감 추출물이 가장 우수한 NO 생성저해효과를 보였다 (Fig. 9). LPS가 처리된 BV2 세포의 증식률에 대해 미치는 감초 추출물의 영향을 살펴보았을 때, Fig. 10에 나타난 것처럼 감초 육성품종별

추출물들은 2.5 - 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 LPS 단독 처리 (74.7 - 79.6%)에 비해 다감이 97.9% - 110.6%, 신원감이 85.6 - 105.0%, 원감이 92.9% - 99.3%의 대체적으로 높은 세포증식효과를 나타냈지만 20 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 처리하였을 때는 다감 72.9%, 신원감 22.1%, 원감 38.7%의 값을 보여 감초 육성품종별 에탄올 추출물이 20 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 세포독성을 나타내는 것으로 확인되었다.

한편, 감초의 항염 효과에 대해서 보고한 자료 중에서 isoliquiritigenin 성분은 VCAM-1 발현 억제제를 통해 혈관내피의 염증 완화 (Kwon *et al.*, 2005) 및 NF- κ B와 COX-2 발현 억제 (Park *et al.*, 2009) 효과를 나타낸다는 보고가 있었는데, 본 연구결과에서도 3 가지 육성품종이 7.32 - 8.64 $\mu\text{g/ml}$ 의 우수한 항염 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. 다만, 이들 감초 육성품종 추출물이 20 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서는 세포독성을 나타낸 점을 감안하여 산업화 등에 적용 시에는 세밀한 검토가 필요하다고 사료된다.

3. 감초 육성품종 추출물의 NMDA 수용체 제어 효과

감초는 아밀로이드 베타 단백질로 인지 손상을 유발한 생쥐에서는 인지 손상을 막아주며 LPS로 유도한 신경염증의 완화로 인지개선 효과를 보이는 것으로 보고되었으므로 (Ahn *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2018) 인지능과 관련된 지표인 NMDAR 제어능을 분석하였다.

감초 육성품종 추출물을 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 단일에서 NMDAR 제어효과를 분석하였을 때 41.0 - 61.0%의 저해효과를 보였는데, 세 가지 감초 육성품종 추출물 중에서는 신원감이 61.0%로서 가장 우수한 활성을 나타내었다. 따라서, 신원감은 상대적으로 다른 두 가지 품종보다는 알츠하이머병과 관련된 시냅스 기능 장애와 연관되는 NMDAR의 활성화를 효과적으로 제어할 수 있는 NMDAR 길항제로의 활용성이 높다고 사료되었다 (Mota *et al.*, 2014). 또한, 감초 품종의 인지능관련 활성에 대해서는 베타 아밀로이드 등 인지손상과 관련된 다른 바이오마커에 대

한 추가적인 연구가 필요하다고 사료되었다.

4. 감초 육성품종별 추출물의 총페놀 함량 분석 결과

Superoxide 음이온 라디칼 소거활성 등의 항산화활성은 총페놀 함량과의 상관계수가 높으므로 (Kim and Chung, 2002) 감초 육성품종 추출물의 총페놀 함량을 분석하여 항산화 활성에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

실험 결과, Table 1에 나타낸 바와 같이 감초 육성품종 추출물은 130.0 - 167.6 mg/g extract의 총페놀 함량을 나타내었으며 특히 신원감이 167.6 mg/g extract로 가장 높은 함량을 보였다. 이러한 결과는 세 가지 감초 육성품종 중에서는 신원감이 가장 효과적으로 항산화력을 발휘하는 데 기여함으로써 항산화활성이 우수한 것이 확인되었다 (Table 1, Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8).

5. 감초 육성품종별 추출물의 약효성분 정량 결과

감초에 함유된 liquiritin은 신경보호효과에 의해 알츠하이머 질환에 효과가 기대되며 감초와 isoliquiritigenin은 A β (25-35)-amyloid로 유도된 신경자멸사를 막아 알츠하이머와 같은 신경퇴화질환의 진행을 막을 것으로 보고되었고, licochalcone A는 항산화작용 및 암세포 증식 억제 효과가 알려져 있어 (Lee *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2017) 감초 육성품종 추출물에서 이들 약효성분의 분포를 확인하기 위해 liquiritin, isoliquiritigenin 및 licochalcone A에 대한 정량분석을 실시하였다.

그 결과, liquiritin의 경우 감초 육성품종별 추출물이 10.42 - 19.07 mg/g ext.의 수치를 보였고, isoliquiritigenin은 0.52 - 2.76 mg/g ext. 값을 보였으며, licochalcone A는 0.70 - 1.26 mg/g ext.의 값을 나타내었는데, liquiritin과 isoliquiritigenin 함량에서는 다감이 가장 높았으며, licochalcone A에서는 신원감이 가장 높은 수치를 보였다 (Table 2, Fig. 4, Fig. 5).

감초에서 분리된 isoliquiritigenin은 nuclear factor erythroid 2-related factor (Nrf2)를 통해 무독화 시스템을 자극함으로써 독성을 가진 외래물질에 대한 방어에서 중요한 역할을 한다

Table 1. Inhibitory activities on peroxynitrite, NMDA receptor and total phenol content of Glycyrrhiza cultivars extracts.

Cultivar	Peroxyntirite scavenging activity (IC ₅₀ , $\mu\text{g/ml}$)	Inhibition activity (%) on NMDAR at 50 $\mu\text{g/ml}$	Total phenol content (GAE·mg/g of extract) ¹⁾
Dagam	2.8±0.2 ^b	41.0±1.8 ^b	156.7±2.3 ^b
Sinwongam	2.4±0.2 ^c	61.0±1.8 ^a	179.2±6.1 ^a
Wongam	3.4±0.1 ^a	45.9±5.5 ^b	159.1±4.3 ^b

*Values are means ± standard deviation (n = 3) and those with different alphabet within the same marker are significantly different at p < 0.05 by Duncan's Multiple Range Test (DMRT). ¹⁾GAE; means gallic acid equivalent.

Table 2. Contents of liquiritin, isoliquiritigenin and licochalcone A in the Glycyrrhiza cultivar extracts.

Cultivar	Liquiritin (mg/g of extract)	Isoliquiritigenin (mg/g of extract)	Licochalcone A (mg/g of extract)
Dagam	19.07±0.31 ^a	2.76±0.08 ^a	0.70±0.07 ^c
Sinwongam	10.42±0.10 ^c	0.52±0.01 ^c	1.26±0.11 ^a
Wongam	12.40±0.30 ^b	1.03±0.01 ^b	0.95±0.07 ^b

*Values are means ± standard deviation (n = 4) and those with different alphabet within the same marker are significantly different at p < 0.05 by Duncan's Multiple Range Test (DMRT).

Table 3. Correlation coefficients between total phenol, liquiritin, isoliquiritigenin, licochalcone A and activities in the *Glycyrrhiza* cultivar extracts.

Biomarkers/ Components	Total phenol	Liquiritin	Isoliquiritigenin	Licochalcone A
ROS scavenge (IC ₅₀)	-0.946	0.921	0.921	-0.999*
DPPH scavenge (IC ₅₀)	-0.898	0.376	0.375	-0.682
Peroxynitrite scavenge (IC ₅₀)	-0.741	0.105	0.104	-0.453
NO inhibition (IC ₅₀)	0.054	-0.706	-0.707	0.406
Cell viability (%) ¹⁾	-0.812	0.994	0.994	-0.967
NMDAR inhibition (%) ²⁾	0.990	-0.831	-0.830	0.975

^{1,2)}Tested at 20 µg/ml and 50 µg/ml, respectively. *Significant at 5% level.

(Gong *et al.*, 2015). 따라서, 감초 3 품종 추출물 중에서 isoliquiritigenin의 함량이 가장 많은 다감 추출물이 항산화효과를 높게 나타낼 것으로 예상되었다. 하지만, 다감의 에탄올 추출물은 항염 활성에서는 가장 우수한 활성을 보인 반면 BV2를 이용한 세포실험 및 DPPH 소거능 실험 결과 등의 항산화활성에서는 신원감보다 다소 낮은 활성을 보였다. 반면에 총페놀 함량이 가장 높았던 신원감 추출물이 항산화활성에서 가장 우수한 결과를 보여 감초 육성품종에 함유된 페놀성 화합물 및 licochalcone A 등이 항산화 효과에 기여하였을 것으로 사료되었다.

또한, liquiritin은 만성 우울이 유도된 흰쥐에서 항산화작용을 통해 항우울 유사작용을 나타내는 것으로 보고되었으므로 (Zhao *et al.*, 2008) liquiritin의 함량이 높은 다감 추출물의 항우울 효과가 다른 감초 육성품종의 추출물보다 좋을 것으로 예상되며 이에 대한 추가 연구가 필요하다고 사료되었다. 이상의 실험결과에 대해 감초 품종들의 성분 및 생리활성 사이의 상관계수를 $p < 0.05$ 수준에서 산출하였으며 Table 3에 나타내었다.

감초 품종들의 활성산소 (ROS) 저해능 (IC₅₀), DPPH 소거능 (IC₅₀) 및 peroxynitrite 소거능 (IC₅₀)은 총페놀과 -0.946, -0.898, -0.741의 상관관계를, licochalcone A의 함량과는 -0.999, -0.682, -0.453의 상관관계를 나타내어 총페놀 및 licochalcone A의 함량이 높을수록 ROS, DPPH 및 Peroxynitrite 관련 IC₅₀ 값을 감소시켜 활성을 높였다.

NO 생성저해능 (IC₅₀)은 liquiritin과 -0.706, isoliquiritigenin과 -0.707의 상관관계를 보여 liquiritin과 isoliquiritigenin 함량이 높을수록 NO 생성저해 관련 IC₅₀ 값을 감소시키고 따라

서 NO 생성 저해효과를 상승시키는 경향을 확인하였다. 또한, 감초 품종들은 20 µg/ml 에서의 세포증식율 (%)에 있어서 liquiritin과 0.994의 상관관계를 보였고 isoliquiritigenin과도 0.994의 상관관계를 보여 이들 성분의 함량이 높을수록 세포증식율 증가를 일으키는 것을 알 수 있었다. 그리고 50 µg/ml 에서 감초 품종들의 NMDAR 제어능 (%)은 총페놀 함량과 0.990의 상관계수를, licochalcone A 함량과는 0.975의 상관계수를 보여 이들 성분의 함량이 높을수록 NMDAR 제어 효과가 증가된 것을 알 수 있었다.

이러한 결과를 종합하면 항산화 활성 지표들에서의 활성 및 NMDAR 제어효과 그리고 licochalcone A 함량에서는 신원감 추출물이 다른 품종 추출물에 비해 월등히 우수한 결과를 보였고 기존의 항산화물질인 Vit. C보다 우수한 효과가 확인되었다. 한편, 다감 추출물은 항염 활성 및 세포증식율에서 가장 우수하였고 liquiritin과 isoliquiritigenin 함량에서 가장 높은 함량을 나타내었다. 그러므로 실험에 사용된 세 가지의 감초 육성 품종 중에서 항염 활성, 세포증식율, liquiritin과 isoliquiritigenin 함량에서는 다감보다 다소 낮거나 비슷한 효과를 발휘하였지만 항산화 효과, NMDAR 제어 활성, 총페놀 함량 및 licochalcone A 함량 등에서 매우 우수한 결과를 나타내었던 신원감이 다른 품종들에 비해 항산화 소재 등으로의 활용성이 높을 것으로 사료되었다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 시험연구사업(과제번호: PJ01193302)의 연구비 지원에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ahn J, Um M, Choi W, Kim S and Ha T. (2006). Protective effects of *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. on the cognitive deficits caused by *b*-amyloid peptide 25-35 in young mice. *Biogerontology*. 7:239-247.
- Cao LJ, Hou ZY, Zhang BK, Fang PF, Xiang DX, Li ZH, Gong H, Deng Y, Ma YX, Tang HB and Yan M. (2017). The ethanol extract of licorice(*Glycyrrhiza uralensis*) protects against triptolide-induced oxidative stress through activation of Nrf2. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2752389. <https://doi.org/10.1155/2017/2752389> (cited by 2019 Feb 5).
- Chen X, Liu Z, Meng R, Shi C and Guo N. (2017). Antioxidative and anticancer properties of licochalcone A from licorice. *Journal of Ethnopharmacology*. 198:331-337.
- Cho MJ, Kim JH, Park CH, Lee AY, Shin YS, Lee JH, Park CG and Cho EJ. (2018). Comparison of the effect of three licorice varieties on cognitive improvement via an amelioration of neuroinflammation in lipopolysaccharide-induced mice. *Nutrition Research and Practice*. 12:191-198.

- Gao J, Inagaki Y, Li X, Kokudo N and Tang W.** (2013). Research progress on natural products from traditional Chinese medicine in treatment of Alzheimer's disease. *Drug Discoveries and Therapeutics*. 7:46-57.
- Gong H, Zhang BK, Yan M, Fang PF, Li HD, Hu CP, Yang Y, Cao P, Jiang O and Fan XR.** (2015). A protective mechanism of licorice(*Glycyrrhiza uralensis*): Isoliquiritigenin stimulates detoxification system via Nrf2 activation. *Journal of Ethnopharmacology*. 162:134-139.
- Jung HW, Yoon CH, Park KM, Han HS and Park YK.** (2009). Hexane fraction of *Zingiberis* Rhizoma Crudus extract inhibits the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines in LPS-stimulated BV2 microglial cells via the NF-kappaB pathway. *Food and Chemical Toxicology*. 47:1190-1197.
- Kim KR, Jeong CK, Park KK, Choi JH, Park JHY, Lim SS and Chung WY.** (2010). Anti-inflammatory effects of licorice and roasted licorice extracts on TPA-induced acute inflammation and collagen-induced arthritis in mice. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 709378. <https://doi.org/10.1155/2010/709378> (cited by 2019 May 3).
- Kim YC and Chung SK.** (2002). Reactive oxygen radical species scavenging effects of Korean medicinal plant leaves. *Food Science and Biotechnology*. 11:407-411.
- Kwak JS, Jang KJ, Seong HG and Jeong YO.** (2009). Cultivation and use of medicinal crops. Purenhangbok Publisher. Seoul, Korea. p.103.
- Kwak SK and Park YC.** (2004). Effects of Gamcho on cytokine production in asthma model mouse. *Journal of Physiology and Pathology in Korean Medicine*. 18:463-467.
- Kwon HM, Lim SS, Choi YJ, Jeong YJ, Kang SW, Bae JY and Kang YH.** (2005). Inhibitory effects of licochalcone A and isoliquiritigenin on monocyte adhesion to TNF- α -activated endothelium. *Nutritional Science*. 8:153-158.
- Lau FC, Bielinski DF and Joseph JA.** (2007). Inhibitory effects of blueberry extract on the production of inflammatory mediators in lipopolysaccharide-activated BV2 microglia. *Journal of Neuroscience Research*. 85:1010-1017.
- Lee HK, Yang EJ, Kim JY, Song KS and Seong YH.** (2012). Inhibitory effects of *Glycyrrhizae* radix and its active component, isoliquiritigenin, on A β (25-35)-induced neurotoxicity in cultures rat cortical neurons. *Archives of Pharmacal Research*. 35:897-904.
- Lee SE, Kim GS, Han HS, Lee ES, Kim YO, Lee JH, Seong NS, Lee SW and Kim YC.** (2010). Biological activity of organic solvent fractions from *Lythrum salicaria* L.(root). *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:323-328.
- Lee SE, Sung JS, Jang IB, Kim GS, Ahn TJ, Han HS, Kim JE, Kim YO, Park CB, Cha SW, Ahn YS, Park HK, Bang JK and Seong NS.** (2008). Investigation on antioxidant activity in plant resources. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 16:356-370.
- Mae T, Kishida H, Nishiyama T, Tsukagawa M, Konishi E, Kuroda M, Mimaki Y, Sashisa Y, Takahashi K, Kawada T, Nakagawa K and Kitahara M.** (2003). A licorice ethanolic extract with peroxisome proliferator-activated receptor- γ ligand-binding activity affects diabetes in KK-A^y mice, abdominal obesity in diet-induced obese C57BL mice and hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutrition*. 133:3369-3377.
- Montoro P, Maldini M, Russo M, Postorino S, Piacente S and Pizza C.** (2011). Metabolic profiling of roots of liquorice (*Glycyrrhiza glabra*) from different geographical areas by ESI/MS/MS and determination of major metabolites by LC-ESI/MS and LC-ESI/MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 54:535-544.
- Mota SI, Ferreira IL and Rego AC.** (2014). Dysfunctional synapse in Alzheimer's disease -a focus on NMDR receptors. *Neuropharmacology*. 76:16-26.
- Park SJ, Yang SJ and Youn HS.** (2009). NF- κ B activation and cyclooxygenase-2 expression induced by toll-like receptor agonist can be suppressed by isoliquiritigenin. *Korean Journal of Food Science and Technology*. 41:220-224.
- Sills MA, Fagg G, Pozza M, Angst C, Brundish DE, Hurt SD, Wilusz EJ and Williams M.** (1991). [³H]CGP 39653: A new N-methyl-D-aspartate antagonist radioligand with low nanomolar affinity in rat brain. *European Journal of Pharmacology*. 192:19-24.
- Soe CR, Byun JS, An JJ, Lee JH, Hong JW, Jang SH and Park KW.** (2013). Effects of *Glycyrrhiza inflata* Batal extracts on adipocyte and osteoblast differentiation. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 42:1015-1021.
- Visavadiya NP and Narasimhacharya AVR.** (2006). Hypocholesterolaemic and antioxidant effects of *Glycyrrhiza glabra*(Linn) in rats. *Molecular Nutrition & Food Research*. 50:1080-1086.
- Wu TY, Khor TO, Saw CLL, Loh SC, Chen AI, Lim SS, Park JHT, Cai L and Kong ANT.** (2011). Anti-inflammatory/antioxidative stress activities and differential regulation of Nrf2-mediated genes by non-polar fractions of tea *Chrysanthemum zawadskii* and Licorice *Glycyrrhiza uralensis*. *American Association of Pharmaceutical Scientists*. 13:1-13.
- Yin L, Guan E, Zhangg Y, Shu Z, Wang B, Wu X, Chen J, Liu J, Fu X, Sun W and Liu M.** (2018). Chemical profile and anti-inflammatory activity of total flavonoid from *Glycyrrhiza uralensis* Fisch. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 17:726-734.
- Yoon YP.** (2009). Coloured Illustration for Discrimination of Herbal Medicine. Ministry of Food and Drug Safety. Homibooks. Daejeon, Korea. p.16.
- Zhao Z, Wang W, Guo H and Zhou H.** (2008). Antidepressant-like effect of liquiritin from *Glycyrrhiza uralensis* in chronic variable stress induced depression model rats. *Behavioral Brain Research*. 194:108-113.