

감초 추출물 함유 키토산 나노캡슐의 특성 및 항산화 활성

김민정¹ · 이지수¹ · 이현규^{1,*}

¹한양대학교 식품영양학과

Characteristics of *Glycyrrhiza uralensis* extract-loaded chitosan nanocapsules and their antioxidant activity

Min Jung Kim¹, Ji-Soo Lee¹, and Hyeon Gyu Lee^{1,*}

¹Department of Food and Nutrition, Hanyang University

Abstract To improve the oxidative stability of *Glycyrrhiza uralensis* extract (GU), GU extraction conditions were optimized for maximal antioxidant activity, and GU-loaded nanocapsules were prepared by chitosan ionic gelation. The optimized ethanol concentration and extraction time were 83.0% and 32.6 min, respectively, using response surface methodology. The particle size of the GU-loaded nanocapsules ranged from 280 to 370 nm. A GU extract of 0.8 mg/mL and chitosan concentration of 2.0 mg/mL were selected as the optimal conditions for entrapment and loading efficiency. Both free GU and GU-loaded chitosan nanocapsules exhibited concentration-dependent antioxidant activity. However, the antioxidant protection factor of GU was effectively maintained when it was entrapped within the chitosan nanocapsules. In conclusion, chitosan nanoencapsulation is a potentially valuable technique for improving the oxidative stability of GU.

Keywords: *Glycyrrhiza uralensis*, extraction, nanocapsule, antioxidant activity, oxidative stability

서 론

감초(*Glycyrrhiza uralensis*)는 쌍떡잎식물 장미목 콩과에 속하는 다년생 초본식물로, 한국을 비롯하여 중국과 일본 등지에서 한약 재료로 널리 이용되고 있는 약용식물이다(Fukai 등, 2003). 감초는 대략 6,000년 전부터 약용식물로 널리 사용되어 왔으나(Mitscher 등, 1986), 체계적 연구를 통하여 감초에 대한 효능 및 효과가 인지됨에 따라 기능성 한방식품이나 한방화장품에 대한 재료로 사용되어 최근 그 수요가 매년 증가되고 있다. 감초의 생리활성 성분으로는 glycyrrhizin과 liquiritigenin, liquiritin, glabrone, glabrene 등의 다양한 플라보노이드와(Hanato 등, 2000), 이소플라보노이드 계열인 licoricidin, glabra 등이 있으며(Gafner 등, 2011), 그 외에도 coumarin derivatives인 herniarin, umbelliferone (Asl과 Hosseinzadeh, 2008), amino acid 계열인 alanine, asparagine, glycine 등이 보고되어 있다(Lee 등, 2007).

감초의 주요 생리활성 성분인 플라보노이드는 특히 항산화 활성을 비롯하여 항염, 항알레르기, 항바이러스, 면역증가 작용 등과 같은 다양한 활성을 나타낸다고 알려져 있다(Karahan 등, 2016; Kaur 등, 2013; Pastorino 등, 2018). 생체 내에서는 산화 스트레스에 의해서 활성 산소가 과잉으로 생성되어 세포막 인지질 내의 불포화지방산과 혈액 중의 지질성분이 산화되고, 핵산과 단백질도 손상을 일으키기 때문에 암을 비롯한 당뇨병, 뇌 질환, 동

맥경화 및 허혈성 심장질환 등 각종 질병이 유발되는 것으로 보고됨에 따라, 플라보노이드와 같은 항산화 물질에 대한 관심이 증가하고 있다. 플라보노이드는 분자 구조 중 B-ring에의 ortho-hydroxylation과 C-ring에의 C2-C3 이중결합을 가짐으로써 hydroxyl radical을 비롯한 각종 자유 라디칼에 대한 소거능을 나타내고 지질과산화 억제능을 나타낸다고 알려져 있다(Burda와 Oleszek, 2001; Cha와 Cho, 2001). 그러나 이러한 구조적 특성은 외부 환경에 취약한 이유가 되기도 한다.

감초에 대한 연구는 주로 생리활성 및 수율 증대를 위한 추출에 집중되어 왔다. Jeon 등(2008)과 Woo 등(2006)은 감초의 추출 수율 및 폴리페놀 함량, 항산화 활성 향상을 위해 열추출 조건을 최적화하였다. Park 등(2008)은 폴리페놀의 추출 수율 측면에서는 물 추출이, 생리활성의 측면에서는 에탄올 추출이 효과적이어서 수율과 생리활성의 경향이 서로 일치하지 않는 결과를 보고한 바 있다. 즉, 감초 에탄올 추출물의 항산화능 및 항암활성은 감초 물 추출물보다 유의적으로 높았으며, 산수유와 황기 에탄올 추출물보다도 더 높다고 하였다(Park 등, 2008). 그러나, 감초의 주요 활성성분인 glycyrrhizin 등의 플라보노이드는 일반적인 항산화 성분들과 마찬가지로 산화적 환경에 취약함(Haenen 등, 2006)에도 불구하고 이들 성분의 안정성을 증진시키고자 하는 연구는 매우 제한적이다. 이러한 문제는 내부 성분의 안정성을 증진시킴으로써 활성 발현을 향상시킬 수 있는 캡슐화(encapsulation) 기술을 적용함으로써 극복할 수 있다고 판단된다.

식품산업분야에서 캡슐화 기술은 향기성분이나 비타민, 필수지방산, 미생물, 효소 등을 외부환경인 빛, 산소, 수분, 온도 등으로부터 보호하여 손실과 산화를 방지하고, 취급을 간편하게 하여 불필요한 냄새나 맛을 차단하기 위해 주로 이용되어 왔다(Dziedzic, 1988). 최근에는 나노 기술이 발전함에 따라 다양한 천연 생리활성 성분의 전달시스템으로서 나노캡슐(nanocapsule)을 활용하는

*Corresponding author: Hyeon Gyu Lee, Department of Food and Nutrition, Hanyang University, Seoul 04763, Korea
Tel: +82-2-2220-1202
Fax: +82-2-2281-8285
E-mail: hyeonlee@hanyang.ac.kr
Received December 30, 2020; revised February 17, 2021;
accepted February 22, 2021

연구가 본격적으로 진행되고 있다(Opanasopit 등, 2008; Sanguansri와 Augustin, 2006). 식품분야에서의 나노캡슐의 장점은 일반적인 미세캡슐과 마찬가지로 불안정한 활성성분을 외부 환경인 빛, 산소, 수분, 온도 등으로부터 보호할 수 있을 뿐만 아니라 나노단위의 입자크기로 인해서 유효성분의 세포 내 유입을 증가시킬 수 있는 장점을 지니고 있어 세포 외부에서 유효성분을 방출시키는 기존의 캡슐보다 활성 유지 및 향상 효과가 우수하다고 알려져 있다(Dubal 등, 2006). 더욱이, 캡슐 내부에 포집된 유효성분의 체내 체류시간을 연장시킬 수 있기 때문에 생체 효율 또한 증가시킬 수 있다고 보고되었다.

키토산(chitosan)은 식품분야에서 나노캡슐의 피복물질로 사용되고 있는 대표적인 천연 다당류로, 감각류의 주요 구성 성분인 키틴(chitin)을 탈아세틸화(deacetylation)함으로써 제조된다. 키토산 구조 내의 아미노 그룹은 산성조건에서 양전하를 나타내기 때문에 키토산은 음이온물질과의 정전기적 상호작용을 통해서 유독한 유기용매나 고온, 고압 등의 처리없이 비교적 완만한 조건에서도 균일한 입자특성의 나노캡슐의 제조가 가능하며, 무독성 및 생분해성, 생체적합성 등 식품분야에서 나노캡슐의 피복물질로서의 장점을 가지고 있다(Ali와 Ahmed, 2018). 따라서 키토산 나노캡슐은 카테킨, 커큐민, 안토시아닌 등과 같이 외부환경에 민감한 천연 생리활성성분의 안정성을 증진시키기 위하여 연구되어 왔다(Ali와 Ahmed, 2018; Hu 등, 2017).

본 연구의 목적은 감초 추출물의 항산화 안정성을 증진시키기 위하여 천연 다당류를 이용한 감초 추출물 함유 나노캡슐을 개발하는 것이다. 이를 위하여 반응표면분석을 이용하여 감초 추출물의 항산화활성을 향상시킬 수 있도록 추출조건(에탄올 농도 및 추출시간)을 최적화한 후, 최적 감초 추출물 내의 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성을 분석하였다. 또한 감초 추출물을 함유한 나노캡슐을 제조하여 포집효율과 함유효율을 비롯하여 캡슐 크기와 polydispersity index (PDI)의 물리적 특성을 측정하였다. 최종적으로 나노캡슐화에 따른 감초 추출물의 항산화 안정성이 증진됨을 확인하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

감초는 충북약초영농조합에서 분말형태로 2019년도에 구입하였으며 밀봉하여 냉장보관하였다. DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), rutin, 키토산(chitosan, low molecular weight, 75-85% deacetylated)과 sodium triphosphate (pentabasic practical grade, 90-95%, TPP)은 Sigma Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

감초 추출물 제조

감초 분말(1 g)을 20-100% 에탄올 100 mL에 분산시킨 뒤, 상온(25±1°C)에서 400 rpm으로 교반하면서 30-270분간 추출하였다. 추출이 완료되면 여과(Whatman No. 2, Whatman Inc., Clifton, NJ, USA)한 후, 감압 건조하여 이후 실험에 사용하였다.

감초 추출조건 최적화

반응표면분석법(response surface methodology)을 이용하여 감초의 최적 추출 조건을 확립하였다(Statistical Analysis System program, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). 예비실험을 통해 에탄올 농도와 추출시간이 감초 추출에 영향을 미치는 주요 인자임을 확인하여 이들을 독립변수로 선택하였다. 이들 독립변수들을 Table 1과 같이 다섯 단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화하여 실험값을 나타내었고 각각의 독립변수에 대한 실험구간 또한 예비실험을 통해 결정하였다. 실험모델은 중심합성계획의 2차 모형으로 작성되어 총 10개의 실험구를 수행하였다. 독립변수와 종속변수와의 관계를 이차다항회귀식으로 구하였고 1차 선형효과 및 2차 곡선효과, 인자간 교호작용을 검토하였다. 독립변수에 대한 종속변수의 반응표면상태를 3차원 그래프를 통해 관측하였으며 각 종속변수(Y)에 대한 모델식은 다음과 같다.

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^3 b_i X_i + \sum_{i=1}^3 b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 b_{ij} X_i X_j$$

Table 1. Experimental values of total flavonoid content and DPPH radical-scavenging activity determined from ten experimental runs generated by the central composite design

Run Number	Independent variables ¹⁾ (X _n)				Response variables (Y _n)	
	Coded variables		Process variables		Total flavonoid content (µg RE/mg)	DPPH radical scavenging activity (%/mg)
	X ₁	X ₂	X ₁	X ₂	Y ₁	Y ₂
1	1	1	70	210	21.06±1.15	22.20±1.53
2	1	-1	70	90	20.32±0.53	21.51±1.77
3	-1	1	30	210	17.85±0.68	14.03±0.98
4	-1	-1	30	90	16.84±0.16	13.27±1.19
5	0	0	50	150	20.54±0.56	19.79±1.06
6	0	0	50	150	20.64±0.68	20.62±1.10
7	2	0	90	150	18.67±1.16	21.95±1.35
8	-2	0	10	150	14.65±0.43	9.52±1.09
9	0	2	50	270	20.90±0.57	19.69±2.14
10	0	-2	50	30	19.71±0.40	18.91±0.64

¹⁾X₁=ethanol (%), X₂=extraction time (min)

이때 b_0 는 절편을 나타내며, b_1 는 1차 선형, b_2 는 2차 곡선, b_j 는 인자교호작용을 나타내는 회귀계수이다.

총 플라보노이드 함량 측정

감초 추출물에서의 총 플라보노이드 함량은 Abeysinghe 등의 방법(2007)을 일부 변형하여 분석하였다. 즉, 감초 추출물 0.14 mL과 diethylene glycol 0.7 mL, 1 N NaOH 0.07 mL을 혼합한 다음, 항온수조(37±1°C)에서 1시간 동안 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도(DU 650, Beckman Couiter Inc., Fullerton, CA, USA)를 측정하였다. 표준물질로는 rutin을 이용하였으며 시료의 총 플라보노이드 함량은 건조 중량(mg)에 대한 rutin의 µg으로 나타내었다(µg RE/mg).

DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 Brand-Williams 등(1995)의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. DPPH 10 mg을 에탄올 50 mL과 증류수 50 mL에 용해시켜서 DPPH 용액을 제조하였다. 추출물과 DPPH 용액을 1:9 (v:v)의 비율로 혼합한 후, 상온에서 30분 동안 암실에서 반응한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래 식에 따라 산출하였다.

$$\text{DPPH radical-scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Absorbance of sample}}{\text{Absorbance of control}}\right) \times 100$$

Antioxidant protection factor (APF) 측정

β-Carotene을 이용한 linoleic acid의 과산화 억제능을 평가함으로써 APF를 측정하였다(Andarwulan과 Shetty, 1999). 이를 위해 먼저 β-carotene 20 mg을 chloroform 40 mL에 용해시킨 후 β-carotene 용액 3 mL을 등근 수기에 넣는다. 수기에 tween-20 (600 mg)과 linoleic acid (0.075 mL), chloroform (7 mL)을 넣고 감압농축(Evaporator, Labtech, Kyonggido, Korea) 시킨 후, 150 mL의 과산화수소를 넣고 격렬하게 교반하였다(1,000 rpm, 10 min). 삼각 플라스크에 나노캡슐화되지 않은 유리 감초 추출물 또는 감초 추출물 함유 나노캡슐을 넣고 수기에 만든 과산화수소수 용액을 10 mL 넣었다. 삼각플라스크를 항온수조(50±1°C)에서 교반(100 rpm)하면서 1시간 간격으로 470 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군의

흡광도가 0.2 이하로 떨어질 때까지 420분간 측정을 계속하여 아래의 식에 의해 APF를 산출하였다(Andarwulan과 Shetty, 1999; Akhmadjon 등, 2020; Chun 등, 2005).

$$\text{Antioxidant protection factor} = A_i/A_0$$

A_i 와 A_0 는 각각 시료와 대조군의 t시간 후의 흡광도이다.

나노캡슐 제조

감초 추출액 함유 나노캡슐은 키토산과 TPP를 이용한 ionic gelation 방법에 의하여 제조하였다(Calvo 등, 1997). 즉, 키토산을 1% acetic acid에 용해시킨 키토산 용액 2 mL과 감초 추출물 3 mL을 먼저 혼합하고 10분간 1,000 rpm으로 교반하면서, 1.6 mg/mL 농도의 TPP 용액 3 mL을 연동펌프(Peristaltic pump, Master flex 77200-60, Cole Parmer Inc., Vernon Hills, IL, USA)를 이용하여 분당 1.0 mL의 속도로 균일하게 주입하여 나노캡슐을 제조하였다. 나노캡슐 제조 시에 감초 추출물과 키토산의 최종 농도는 각각 0.2-1.0과 1.0-2.5 mg/mL이 되도록 하였다.

나노캡슐의 물리화학적 특성

나노캡슐의 크기와 분산도(PDI)를 측정하기 위하여, Zetasizer (Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK)를 이용하였다. 측정을 위하여 DTS 1060C clear disposable zeta cell (Malvern Instruments Ltd.)을 사용하였으며, 측정 조건은 여러 peak를 동시에 나타낼 수 있는 다중분석으로 수행하였고, 각각 나노캡슐의 크기는 25±1°C에서 intensity distribution을 비교 분석하였다(Jang과 Lee, 2008).

나노캡슐의 포집효율 및 함유효율 측정

나노캡슐 제조 후 4°C, 38,000×g 조건에서 30분 동안 초고속 원심분리(Optima TL Ultracentrifuge, Beckman, Fullerton, CA, USA) 한 후 나노캡슐 분산액으로부터 나노캡슐을 분리시켰다. 감초 추출물 내에 함유된 플라보노이드를 지표성분으로 이용하였으며 초고속원심분리 후 상등액 내에 함유된 플라보노이드를 정량분석함으로써 나노캡슐에 포집되지 않고 유리된 플라보노이드 함량을 산출하였다. 포집(entrapment efficiency, EE) (Jang과 Lee, 2008) 및 함유효율(loading efficiency, LE) (Kuo, 2005)은 다음의 식을 이용하여 산출하였다.

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{Actual amount of } G \text{ uralensis extract entrapped in nanocapsules}}{\text{The theoretical amount of } G \text{ uralensis extract entrapped in nanocapsules}} \times 100$$

$$\text{LE (\%)} = \frac{\text{Amount of } G \text{ uralensis extract in nanocapsules}}{\text{Total amount of nanocapsules}} \times 100$$

통계 처리

모든 실험은 3회 이상 반복 수행하였으며, 실험결과는 SPSS 12.0.1 (Statistical Package for the Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 사용하여 일원배치분산분석(one-way ANOVA)과 독립표본 T 검정을 이용하였으며 모든 결과는 평균 ±표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

감초 추출조건 최적화

항산화 활성이 높은 감초 추출물을 제조하기 위한 추출 조건

을 최적화 하기 위하여 반응표면분석을 이용하였다. 여러 연구를 통해서 에탄올 추출이 항산화활성이 우수한 감초 추출물의 제조에 적합(Kim 등, 2006b)하다고 보고되었기 때문에 본 연구에서는 추출용매로 에탄올을 선정하였다. 다양한 추출 온도에서 제조된 감초 추출물의 연구에서 Woo 등(2006, 2007)은 110-130°C의 고온으로 열처리를 해줌으로써 수율 및 항산화 활성이 증가되었다고 보고한 반면, Kim 등(2006b)은 20°C에서 50°C로 추출온도가 높아짐에 따라 항산화 활성이 오히려 감소한다고 하였다. 따라서 추출온도에 따른 추출물의 생리활성의 경향은 아직까지 논란의 여지가 있으며 추출공정의 경제성 또한 중요한 인자로 판단되어 본 연구에서는 별도로 가온하지 않고 상온에서 감초 추

출을 실시하였다.

예비실험을 통해 감초 추출물에 영향을 미치는 주요 인자로 에탄올 농도(%)와 추출시간(min)을 독립변수로 선정하였다(Table 1). 또한 감초 추출물의 항산화활성과 추출물 내에 함유된 총 플라보노이드 함량과의 관련성을 파악하기 위하여 종속변수는 추출물 내에 함유된 총 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거능으로 선정하였다. 반응표면분석은 중심합성법에 의해 설계되어 총 10개의 실험조건에서 추출된 감초 추출물의 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성을 측정하여 나타내었다(Table 1). 다양한 조건에서 추출된 감초 추출물내의 총 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거능은 각각 14.65-21.06 µg RE/mg, 9.52-22.20%/mg 범위로 확인되었다. 총 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거능 각각의 최소값 및 최대값은 모두 실험구 No. 8과 1 조건에서 관측되어, 감초 추출물의 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성은 매우 유사한 경향을 가지는 것으로 확인되었다.

종속변수인 총 플라보노이드 함량(µg RE/mg)과 항산화 활성(%/mg)에 대한 독립변수들(X_1 =에탄올(%), X_2 =추출시간(min))의 영향을 다중 회귀분석을 수행한 결과 다음의 다항 회귀식과 통계 결과를 산출하였다.

$$\begin{aligned} \text{Total flavonoid content } (\mu\text{g RE/mg}) \\ = 20.30^{**} + 1.23X_1^{**} + 0.35X_2 - 0.07X_1X_2 - 0.95X_1^{2**} - 0.03X_2^2 \\ (R^2=0.9535, p<0.05) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{DPPH radical scavenging activity } (\%/mg) \\ = 19.57^{**} + 3.44X_1^{**} + 0.25X_2 - 0.02X_1X_2 - 1.04X_1^{2*} - 0.15X_2^2 \\ (R^2=0.9653, p<0.05) (*p<0.05, **p<0.01) \end{aligned}$$

총 플라보노이드 함량과 항산화 활성에 대한 결정계수(coefficient of determination, R^2)는 각각 0.9535과 0.9653으로, 0.05 이하의 유의수준에서 확인되었다. 따라서 본 연구에서 설계된 에탄올 농도와 추출시간의 두 가지 독립변수의 반응표면분석 모델에 의해 감초 추출물의 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성을 적절하게 설명하고 예측할 수 있음을 확인하였다. 또한 총 플라보노이드 함량 및 항산화 활성 모두 에탄올 농도에 의해서 유의적으로 영향을 받는 것으로 확인되었으나 추출시간에 의한 유의적인 영향은 관측되지 않았다($p<0.05$).

에탄올 농도(X_1)와 추출시간(X_2)이 총 플라보노이드 함량에 미치는 영향은 3차원 그래프를 통하여 도식화하였다(Fig. 1A). 총 플라보노이드 함량은 에탄올 농도가 20%에서 약 60%까지 높아짐에 따라 뚜렷하게 증가되는 경향을 나타내다가 60% 이상부터는 유지되거나 다소 감소되는 경향을 나타냈다. 또한 추출시간이 30분에서 270분으로 증가됨에 따라 에탄올 농도에 따라 차이는 있지만 전반적으로 총 플라보노이드 성분이 다소 증가되거나 유지되는 경향을 나타냈다. 반응표면분석에 의하면, 에탄올 농도와 추출시간이 각각 59.22%와 70.6분인 조건으로 추출되었을 때 총 플라보노이드 성분이 가장 높을 것으로 예측되었다(Table 2).

DPPH 라디칼 소거능에 대한 에탄올 농도(X_1)와 추출시간(X_2)의 영향은 3차원 그래프를 통하여 도식화하였다(Fig. 1B). 에탄올

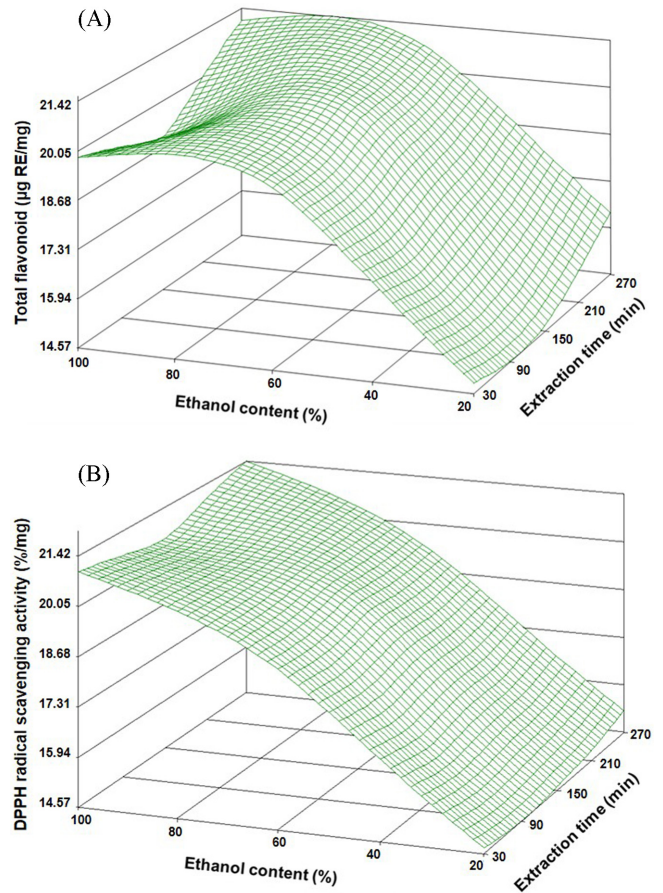


Fig. 1. Three-dimensional response surface plots for effects of ethanol concentration and extraction time on (A) total flavonoid content and (B) DPPH radical scavenging activity of *G. uralensis* extracts.

농도가 20%에서 약 80%까지 증가됨에 따라서 감초 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 급격히 증가되다가 80% 이상부터는 서서히 증가되거나 유지되는 경향이 관측되어, 총 플라보노이드 함량과 비슷한 경향임을 확인할 수 있었다. 또한 추출시간이 늘어남에 따라서 DPPH 라디칼 소거능은 서서히 증가한 후, 이후 다소 감소되거나 유지되는 경향을 나타냈다. 반응표면분석에 의하면, 83.01%의 에탄올 농도와 32.6분의 추출시간에서 DPPH 라디칼 소거능이 가장 높을 것으로 예측되었다(Table 2).

감초 추출물의 항산화 활성

감초 추출물이 최대 항산화 활성을 나타내는 최적 추출조건인 83.01% 에탄올에서 32.6분간 감초 추출물을 제조하여 총 플라보노이드 함량 및 DPPH 라디칼 소거능을 분석하여 반응표면분석에서의 예측값과 비교하였다(Table 2). 총 플라보노이드 함량과 DPPH 라디칼 소거능의 실측값은 각각 20.47 µg RE/mg와 22.32%/mg로 분석되었으며, 각 예측값은 실측값의 표준편차 범위 내로 확인되었다.

Table 2. Optimized values obtained by maximizing DPPH radical-scavenging activity

Response	Expected values	Observed values
Total flavonoid content (µg RE/mg)	19.9	20.47±0.57
DPPH radical scavenging activity (%/mg)	22.5	22.32±0.18

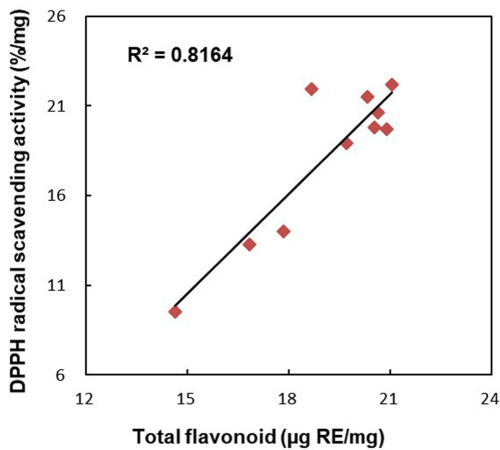


Fig. 2. Linear regression analyses between DPPH radical scavenging activity and total flavonoid content of *G. uralensis* extracts.

DPPH 라디칼 소거능과 총 플라보노이드 함량과의 상관관계를 분석한 결과(Fig. 2), DPPH 라디칼 소거능과 총 플라보노이드 함량은 유의적인 양의 상관관계($R^2=0.8164$)를 나타내어, 감초 추출물 내의 플라보노이드가 항산화 활성을 나타내는 주요 활성성분임을 확인하였다.

감초 추출물 나노캡슐의 물리적 특성

감초 추출물을 나노캡슐화 하기 위하여 양이온을 가진 키토산과 음이온을 가진 TPP와의 ionic gelation 특성을 이용하여 감초 추출물 함유 키토산 나노캡슐을 제조하였다. 감초 추출물과 키토산 농도에 따른 나노캡슐의 크기와 PDI에 미치는 영향을 알아보기 위하여 다양한 감초 추출물 농도(0.0-1.0 mg/mL)와 키토산 농도(1.5-2.5 mg/mL)에서 나노캡슐을 제조하였다(Fig. 3). 먼저 감초 추출물 농도 변화에 따른 나노캡슐의 물리적 특성을 측정된 결과, 감초 추출물의 농도가 높아짐에 따라 나노캡슐의 크기는 276에서 347 nm까지 유의적으로 증가되었고 0.4 mg/mL 농도 이상에서는 캡슐크기가 유지되는 경향을 나타냈다. PDI는 0.224-0.277 범위로 관측되었으며 추출물의 농도 증가에 따른 별다른 경향을 나타내지 않았다. 키토산 농도가 증가됨에 따라 나노캡슐의 크기는 295에서 364 nm까지 유의적으로 증가하였고, PDI는 0.223에서 0.260 범위로 측정되었으며 키토산 농도 증가에 따른 유의적 차이는 관측되지 않았다. 감초추출물과 키토산 농도 증가에 따른 나노캡슐 크기의 증가는 나노캡슐내에 포집되는 감초추출물과 키토산의 양이 증가됨에 따른 결과로 추정되며 키토산 나노캡슐의 물리적 특성을 연구한 여러 연구들에서 동일한 결과가 보고되었다(Han 등, 2015; Je 등, 2017; Kim 등, 2006a; Lee 등, 2010). 또한 일반적으로 PDI는 0.3이하일 때 균일한 크기의 캡슐이 형성되었다고 판단되므로(Du 등, 2005), 본 연구에서 제조된 나노캡슐은 감초 추출물과 키토산의 다양한 농도 조건에서 비교적 균일한 입자 분포를 보인다고 판단된다.

포집효율 및 함유효율 측정

감초 추출물과 키토산 농도에 따른 나노캡슐의 포집 및 함유효율을 측정하였다(Fig. 4). 감초 추출물 농도가 0.2에서 0.6 mg/mL로 증가됨에 따라 포집효율은 유의적으로 증가되다가 0.8에서 1.0 mg/mL로 감초 추출물의 농도가 높아짐에 따라서는 포집효율이 유의적으로 감소되는 경향을 나타냈다. 이러한 결과는 낮은

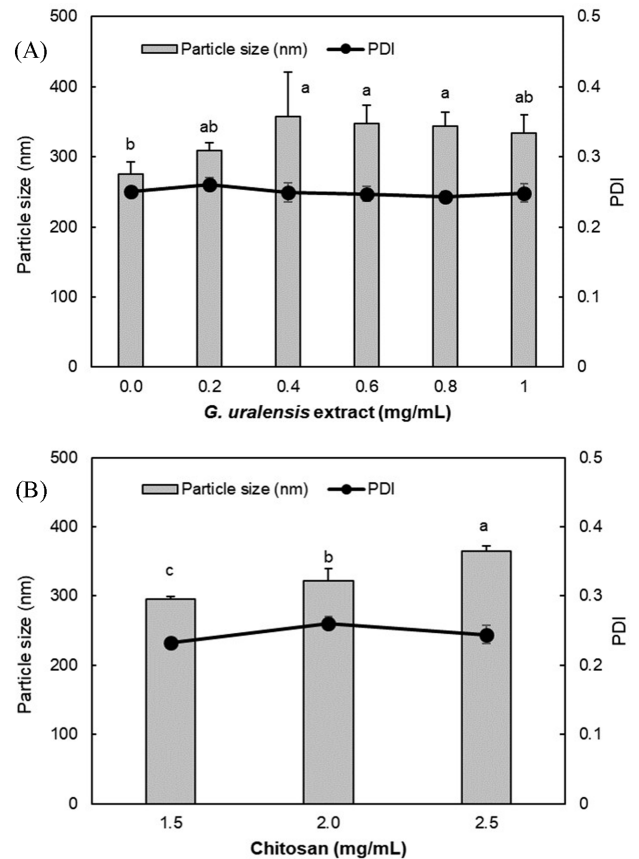


Fig. 3. Particle size and PDI of chitosan nanocapsules with different concentrations of *G. uralensis* extract (A) and chitosan (B). Different letters (a-b) indicate a significant difference in particle size (chitosan=2.0 mg/mL, TPP=1.6 mg/mL (A) and *G. uralensis* extract=1.0 mg/mL, TPP=1.6 mg/mL (B)).

농도 범위의 감초 추출물 농도에서는 감초 추출물 농도가 증가됨에 따라 포집효율 역시 함께 증가되다가 감초 추출물의 농도가 일정 농도 이상으로 증가됨에 따라서는 키토산 나노캡슐이 형성되는 동안에 분산액 중으로 빠져나가는 손실률이 증가되면서 포집효율의 감소를 나타낸 것으로 추정된다(Lu 등, 1999). 감초 추출물 농도가 높아짐에 따라 함유효율은 유의적으로 증가되는 경향을 나타냈으며 감초 추출물의 농도가 0.8 mg/mL일때 최대 농도 10.5%의 함유효율이 관측되었다. 이러한 결과는 나노캡슐 제조 시에 감초 추출물 농도가 증가됨에 따라 나노캡슐 내부에 포집된 감초 추출물 함량이 증가되어 함유효율 역시 증가 경향을 나타내다가 일정 농도 이상에서는 감초 추출물 농도의 증가에도 불구하고 포집효율이 오히려 감소되면서 함유효율이 유지되는 경향을 나타낸 것으로 판단된다(Lee 등, 2010).

키토산 농도가 증가됨에 따라서 포집효율과 함유효율은 모두 유의적으로 감소되는 경향을 나타냈다. 일반적으로는 키토산 농도가 증가함에 따라 포집효율이 증가되는 경향을 나타내지만(Je 등, 2017), Badawi 등(2008)의 indomethacin을 함유한 키토산 나노캡슐의 연구에서는 키토산 농도가 0.3에서 0.7 mg/mL까지 증가됨에 따라 포집효율이 감소되었는데, 이는 캡슐 제조 시에 피복물질의 점성이 과도하게 높으면 내부물질의 포집을 방해하기 때문이라고 추정된다(Xu와 Du, 2003; Wu 등, 2005). 포집효율의 감소에 따라서 함유효율 또한 감소되는 경향을 나타냈으며 키토

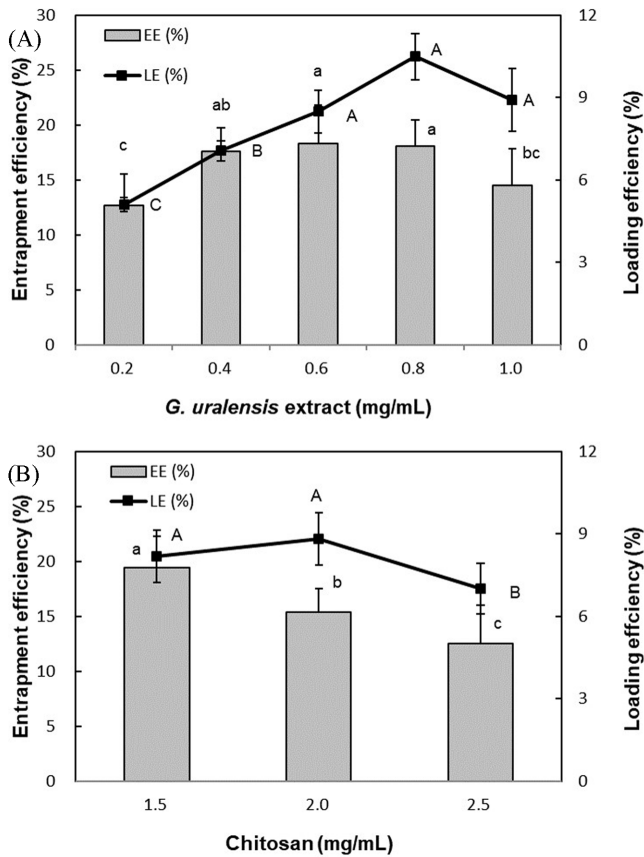


Fig. 4. Entrapment and loading efficiency of chitosan nanocapsules with different concentrations of *G. uralensis* extract (A) and chitosan (B). Different letters (A-C and a-c) indicate a significant different LE or EE, respectively (chitosan=2.0 mg/mL, TPP=1.6 mg/mL (A) and *G. uralensis* extract=1.0 mg/mL, TPP=1.6 mg/mL (B)).

산 농도 2.0 mg/mL에서 8.8%의 가장 높은 함유효율이 관측되었다. 따라서 본 연구에서는 포집효율 및 함유효율 모두를 고려하여 감초 추출물과 키토산 농도를 각각 0.8과 2.0 mg/mL로 결정하였으며, 이후 항산화 실험은 이 조건에서 감초 추출물 함유 나노캡슐을 제조하여 분석하였다.

나노캡슐의 항산화 활성

키토산 나노캡슐화가 감초 추출물의 항산화 활성에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 나노캡슐의 항산화 활성 측정에 적합한 β-carotene bleaching assay를 이용하여 나노캡슐화 되지 않은 유리 감초 추출물과 감초 추출물 함유 나노캡슐의 APF를 평가하였다(Fig. 5). 그 결과, 나노캡슐화 유무와 상관없이 모든 감초 추출물은 반응시간동안 농도의존적인 APF를 나타냈다. 그러나 반응 시작 1시간 후 APF는 유리 감초 추출물이 감초 추출물 나노캡슐보다 약 3배 정도 높은 것으로 확인되었다. 이는 나노캡슐화 되지 않은 유리 감초 추출물이 β-carotene/linoleic acid emulsion 내에서 즉각적으로 활성을 발현할 수 있는 것과는 달리 캡슐 내부에 포집되었던 감초 추출물은 서서히 방출되면서 활성이 발현될 수 있기 때문으로 추정된다. 한편, 유리 감초 추출물은 반응 4시간에 가장 높은 APF를 나타낸 후 급격히 감소되는 경향을 나타낸 반면, 감초 추출물 나노캡슐은 반응 시간 이후부터 꾸준히

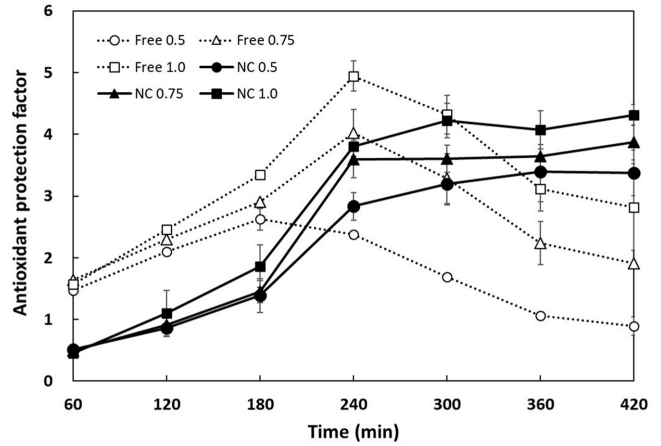


Fig. 5. Antioxidant protection factor of free *G. uralensis* extract and *G. uralensis* extract-loaded chitosan nanocapsules by β-carotene bleaching assay.

APF가 증가하여 반응 5시간 이후부터는 모든 농도에서 유리 감초 추출물의 APF보다 더 높아지는 경향을 나타냈으며, 그 이후 APF가 유지되어 반응 7시간 후에는 감초추출물의 농도에 따라 1.5배에서 최대 3.8배 높은 APF가 관측되었다. 이러한 효과는 나노캡슐화에 의한 것으로 추정되며(Chung 등, 2020; Pisoschi 등, 2018) 활성성분은 캡슐에 포집되었을 때 캡슐의 피복물질에 의해서 외부의 산화적 환경으로부터 보호되어 활성성분의 안정성이 증가됨으로써 소재 고유의 생리활성 또한 안정적으로 발현되고 활성의 유지기간이 증가되는 것으로 판단된다.

요 약

감초 추출물의 항산화 안정성을 증진시키기 위하여 키토산의 ionic gelation 특성을 이용한 감초 추출물을 함유한 키토산/TPP 나노캡슐을 제조하였다. 먼저 반응표면분석을 통해서 감초 추출물의 항산화활성을 최대로 할 수 있는 추출조건을 최적화하였다. 감초의 최적 추출조건은 83.01% 에탄올 농도에서 32.6분 동안 추출하는 것으로 결정되었으며, 최적 조건에서 제조된 감초 추출물의 총 플라보노이드 함량과 항산화 활성은 각각 20.47 μg RE/mg과 22.32%/mg로 관측되어 예측값과 모두 표준편차 범위 내에 있음을 확인하였다. 다양한 감초 추출물과 키토산 농도에서 나노캡슐을 제조한 결과, 약 280-370 nm 범위의 캡슐크기를 나타냈으며 0.3 이하의 PDI를 나타내어 전반적으로 균일한 나노캡슐이 형성되는 것으로 확인되었다. 포집효율 및 함유효율을 고려하여 감초 추출물과 키토산 농도를 각각 0.8과 2.0 mg/mL로 결정하였다. 지방산화 억제능을 통한 APF 측정 결과, 나노캡슐화되지 않은 감초추출물은 반응 후에 급격히 상승되어 반응 4시간에 가장 높은 APF를 나타낸 후 급격히 감소된 반면, 감초 추출물 나노캡슐은 초반에는 약한 APF를 나타내다가 꾸준히 증가한 후 유지되어 반응 6시간 이후에는 모든 농도에서 유리 감초 추출물보다 유의적으로 높은 항산화 활성을 나타냈다. 따라서 감초 추출물은 키토산 나노캡슐화에 의해서 산화 안정성이 향상됨으로써 항산화 활성의 유지기간이 증진됨을 확인하였다. 본 연구를 통해서 키토산 나노캡슐화는 감초추출물의 항산화 안정성 증대에 효과적으로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2021년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(2021R1A2C2013460).

References

- Abesinghe DC, Li X, Sun C, Zhang W, Zhou C, Chen K. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of citrus fruit of four species. *Food Chem. Toxicol.* 104: 1338-1344 (2007)
- Akhmadjon S, Hong SH, Lee EH, Park HJ, Cho YJ. Biological activities of extracts from Tongue fern (*Pyrosia lingua*). *J. Appl. Biol. Chem.* 63: 181-188 (2020)
- Ali A, Ahmed S. A review on chitosan and its nanocomposites in drug delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* 109: 273-286 (2018)
- Andarwulan N, Shetty K. Phenolic content in differentiated tissue cultures of untransformed and Agrobacterium-transformed roots of anise (*Pimpinella anisum* L.). *J. Agr. Food Chem.* 47: 1776-1780 (1999)
- Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytother. Res.* 22: 709-724 (2008)
- Badawi AA, El-Laithy HM, El Qidra RK, El Mofty H, El Dally M. Chitosan based nanocarriers for indomethacin ocular delivery. *Arch. Pharm. Res.* 31: 1040-1049 (2008)
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Sci. Technol.* 28: 25-30 (1995)
- Burda S, Oleszek W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. *J. Agr. Food Chem.* 49: 2774-2779 (2001)
- Calvo P, Remunan-Lopez C, Vila-jato JL, Alonso MJ. Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 63: 125-132 (1997)
- Cha JY, Cho YS. Biofunctional activities of citrus flavonoids. *J. Korean Soc. Agr. Chem. Biotechnol.* 44: 122-128 (2001)
- Chun SS, Vattem DA, Lin YT, Shetty K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.* 40: 809-816 (2005)
- Chung JH, Lee JS, Lee HG. Resveratrol-loaded chitosan- γ -poly (glutamic acid) nanoparticles: Optimization, solubility, UV stability, and cellular antioxidant activity. *Colloid. Surface B* 186: 110702 (2020)
- Du J, Zhang S, Sun R, Zhang LF, Xiong CD, Peng YX. Novel polyelectrolyte carboxymethyl konjac glucomannan-chitosan nanoparticles for drug delivery. II. Release of albumin *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res. -A.* 72: 299-304 (2005)
- Dubal DB, Rau SW, Shughree PJ, Zhu H, Yu J, Cashion AB, Suzukr S, Gerhold LM, Bottner MB, Dubal SB, Merchenthaler I, Kindy MS, Wise PM. Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ER α in estradiol-mediated protection against delayed cell death. *Endocrinology* 147: 3076-3084 (2006)
- Dziedzic JD. Microencapsulation and encapsulated ingredients. *Food Technol.* 42: 136 (1988)
- Fukai T, Satoh K, Nomura T, Sakagami H. Preliminary evaluation of antinephritis and radical scavenging activities of glavridin from *Glycyrrhiza glabra*. *Fitoterapia* 74: 624-629 (2003)
- Gafner S, Bergeron C, Villinski JR, Godejohann M, Kessler P, Cardellina JH, Ferreira D, Feghali K, Grenier D. Isoflavonoids and coumarins from *Glycyrrhiza uralensis*: antibacterial activity against oral pathogens and conversion of isoflavans into isoflavan-quinones during purification. *J. Nat. Prod.* 74: 2514-2519 (2011)
- Haenen GRMM, Arts MJTJ, Bas, A, Coleman MD. Structure and activity in assessing antioxidant activity *in vitro* and *in vivo* A critical appraisal illustrated with the flavonoids. *Environ. Toxicol. Phar.* 21: 191-198 (2006)
- Han HJ, Lee JS, Park SA, Ahn JB, Lee HG. Extraction optimization and nanoencapsulation of jujube pulp and seed for enhancing antioxidant activity. *Colloid. Surface B* 130: 93-100 (2015)
- Hanato T, Aga Y, Shintani Y, Ito H, Okuda T, Yoshida T. Phenolic constituents of licorice part 9-Minor flavonoids from licorice. *Phytochemistry* 55: 959-963 (2000)
- Hu B, Liu X, Zhang C, Zeng X. Food macromolecule based nanodelivery systems for enhancing the bioavailability of polyphenols. *J. Food Drug Anal.* 25: 3-15 (2017)
- Jang KI, Lee HG. Stability of chitosan nanoparticles for L-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. *J. Agr. Food Chem.* 56: 1936-1941 (2008)
- Je HJ, Kim ES, Lee JS, Lee HG. Release properties and cellular uptake in Caco-2 cells of size-controlled chitosan nanoparticles. *J. Agr. Food Chem.* 65: 10899-10906 (2017)
- Jeon JY, Ha SY, Kim YJ, Lee JE, Choi YH. Optimization of the hot-water extraction process of functional components from *Glycyrrhiza uralensis* using a response surface methodology. *Food Eng. Progr.* 12: 289-296 (2008)
- Karahan F, Avsar C, Ozyigit II, Berber I. Antimicrobial and antioxidant activities of medicinal plant *Glycyrrhiza glabra* var. *glandulifera* from different habitats. *Biotechnol. Biotec. Eq.* 30: 797-804 (2016)
- Kaur R, Kaur H, Dhindsa AS. *Glycyrrhiza glabra*: a phytopharmacological review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 4: 2470 (2013)
- Kim DG, Jeong YI, Choi C, Roh SH, Kang SK, Jang MK, Nah JW. Retinol-encapsulated low molecular water-soluble chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 319: 130-138 (2006a)
- Kim SJ, Kweon DH, Lee JH. Investigation of antioxidative activity and stability of ethanol extracts of licorice root (*Glycyrrhiza glabra*). *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 584-588 (2006b)
- Kuo YC. Loading efficiency of stavudine on polybutyl cyanoacrylate and methylmethacrylate-sulfopropylmethacrylate copolymer nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 290: 161-172 (2005)
- Lee JS, Kim GH, Lee HG. Characteristics and antioxidant activity of *Elsholtzia splendens* extract-loaded nanoparticles. *J. Agr. Food Chem.* 58: 3316-3321 (2010)
- Lee SR, Yon JM, Kim MR, Baek IJ, Kim YB, Ahn B, Lee BJ, Nam S-Y, Yun YW. Effects of licorice (*Glycyrrhiza glabra*) on the gene expression of glutathione peroxidase in the female reproductive system of rats. *Lab. Anim. Res.* 23: 77-82 (2007)
- Lu Z, Bei J, Wang S. A method for the preparation of polymeric nanocapsules without stabilizer. *J. Control. Release* 61: 107-112 (1999)
- Mitscher LA, Drake S, Gollapudi SR, Harris JA, Shankel DM. Isolation and identification of higher plant agents active in antimutagenic assay systems: *Glycyrrhiza glabra*. *Basic Life Sci.* 39: 153-165 (1986)
- Opanasopit P, Apirakaramwong A, Ngawhirunpat T, Rojanarata T, Ruktanonchai U. Development and characterization of pectinate micro/nanoparticles for gene delivery. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 9: 67-74 (2008)
- Park CS, Kim DH, Kim ML. Biological activities of extracts from *Cormi fructus*, *Astragalus membranaceus* and *Glycyrrhiza uralensis*. *Korean J. Herbol.* 23: 93-101 (2008)
- Pastorino G, Cornara L, Soares S, Rodrigues F, Oliveira MBP. Licorice (*Glycyrrhiza glabra*): A phytochemical and pharmacological review. *Phytother. Res.* 32: 2323-2339 (2018)
- Pisoschi AM, Pop A, Cimpeanu C, Turcuş V, Predoi G, Iordache F. Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity-A critical view. *Eur. J. Med. Chem.* 157: 1326-1345 (2018)
- Sanguansri P, Augustin MA. Nanoscale materials development - a food industry perspective. *Trends Food Sci. Tech.* 17: 547-556 (2006)
- Woo KS, Hwang IG, Noh YH, Jeong HS. Antioxidant activity of heated licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) extracts in Korea. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 36: 689-695 (2007)
- Woo KS, Jang KI, Kim KY, Lee HB, Jeong HS. Antioxidative activity of heat treated licorice (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch) extracts. *Korean J. Food Sci. Technol.* 38: 355-360 (2006)
- Wu Y, Yang W, Wang C, Hu J, Fu S. Chitosan nanoparticles as a novel delivery system for ammonium glycyrrhizinate. *Int. J. Pharm.* 295: 235-245 (2005)
- Xu Y, Du Y. Effect of molecular structure of chitosan on protein delivery properties of chitosan nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 250: 215-226 (2003)