

항산화 활성 증진을 위한 민들레 잎의 열수추출 조건의 최적화

고윤정 · 차동수¹ · 최희돈* · 박용곤 · 최인욱

한국식품연구원, ¹(주)바이오코트

Hot Water Extraction Optimization of Dandelion Leaves to Increase Antioxidant Activity

Yoon-Jeoung Koh, Dong-Su Cha¹, Hee-Don Choi*, Yong-Kon Park, and In-Wook Choi

Korea Food Research Institute, ¹BioCoats

Abstract This study used response surface methodology (RSM) in an effort to optimize the hot water extraction conditions of dandelion leaves in order to increase antioxidant activity in the extract. A central composite design was applied to investigate the effects of independent variables, which included the ratio of solvent to sample (X_1), extraction temperature (X_2), and extraction time (X_3), on dependent variables of the extracts, including soluble solid (Y_1), total polyphenols (Y_2), total flavonoid (Y_3), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging ability (Y_4), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) radical scavenging ability (Y_5), and superoxide radical scavenging ability (Y_6). The estimated optimal conditions were as follows: $83.77 \pm 1.07^\circ\text{C}$ of the extraction temperature, 20.85 ± 0.24 mL/g of solvent per sample, and 1.59 ± 0.12 hr of extraction time. At the optimal conditions, the predicted characteristic values were: a yield of 38.98%, a total polyphenol level of $74.28 \mu\text{g}/\text{mg}$, a total flavonoid level of $74.00 \mu\text{g}/\text{mg}$, a DPPH radical scavenging ability (IC_{50}) of 0.14 mg/mL, a ABTS radical scavenging ability (IC_{50}) of 3.24 mg/mL, and a superoxide radical scavenging ability (IC_{50}) of 2.49 mg/mL.

Keywords: dandelion leaves, RSM, antioxidant activity, DPPH, ABTS, superoxide

서 론

인체는 산화촉진물질(prooxidant)과 산화억제물질(antioxidant)이 균형을 이루고 있으나 여러 가지 요인들에 의하여 이런 균형상태가 불균형을 이루게 되고 산화촉진 쪽으로 기울게 되면, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 잠재적인 세포손상 및 병리적 질환을 일으키게 된다(1,2). 이러한 산화적 스트레스의 직접적 원인이 되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 불안정하고 반응성이 높아 여러 생체물질과 쉽게 반응하고, 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하게 된다(3,4). 활성산소를 소거하기 위한 항산화성 물질을 안전성 문제 때문에 식품이나 천연물에서 찾고자 하는 노력이 많이 시도되고 있다(5,6).

민들레(*Taraxacum officinale*)는 국화과(Compositae)에 속하는 다년산 초본으로 이른봄부터 늦가을에 이르기까지 우리나라 전역에 걸쳐 널리 분포하고 있으며, 뿌리, 잎, 꽃 등 식물체 모두를 식용할 수 있는 식물이다(7). 예로부터 민들레의 어린 순과 뿌리는 나물이나 국 그리고 구황식물 등으로 식용되었고, 서양에서는 잎은 샐러드용, 뿌리는 커피대용, 꽃은 와인재료로 이용되어 왔

으며(8), 또한 비타민과 무기질이 풍부하고 지방함량과 칼로리가 낮아 영양학적으로 현대인의 식품으로 적합한 것으로 알려져 있다(9). 또한 천연물의 개발과 허브산업의 활성화에 힘입어 민들레의 여러 가지 생리활성과 약리성이 밝혀지면서 민들레의 유용성을 기능성 식품이나 의약품 소재로 개발하려는 시도가 진행되고 있으며 특히 항산화 활성에 대한 연구 결과가 많이 보고되고 있다. Choi 등(10)은 팜유와 돈지에 대한 민들레의 항산화력을 측정하고 에탄올 추출물과 물 추출물의 항산화력을 인정하였고, Kang(11)은 linoleic acid를 이용하여 민들레의 항산화력을 측정하고 물추출물의 항산화력이 BHA보다 유의적으로 높은 값을 나타내었으며, 또한 EPR를 이용하여 민들레 잎의 superoxide 라디칼에 대한 소거활성을 분석한 결과 물 추출물이 가장 높은 활성을 나타낸다고 하였다. 이상의 연구결과에서 보는 바와 같이 민들레는 에탄올 등의 유기용매 추출물보다는 물 추출물이 더 높은 항산화 활성을 나타내기 때문에 민들레의 항산화 활성을 이용한 기능성 소재를 개발하고자 할 때 물 추출물을 이용하는 것이 적합함을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서는 우수한 항산화 활성을 갖는 것으로 보고된 민들레 잎 물추출물의 항산화 활성을 증진시키기 위한 최적 추출조건을 설정하고자 하였으며, 이를 위해서 시료에 대한 용매비, 추출온도, 추출시간에 따른 유용성분과 항산화 효과 등의 추출특성을 반응표면분석하였다.

*Corresponding author: Hee-Don Choi, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi-do 463-746, Korea

Tel: 82-31-780-9068

Fax: 82-31-709-9876

E-mail: chdon@kfri.re.kr

Received January 7, 2008; revised March 10, 2008;

accepted March 17, 2008

재료 및 방법

재료

본 연구에 사용한 민들레는 경남 의령군의 (주)민들레식품에서 재배한 길이 20 cm 내외의 잎을 채취하여 실험에 사용하였다. 시료는 이물을 제거하고 깨끗이 세척한 후 열풍 건조하여 분쇄한 후 사용하였고, 열수 추출물은 Whatman No. 1으로 여과한 다음 동결 건조하여 분석용 시료로 사용하였다.

추출조건 설정을 위한 실험계획

본 실험에서는 추출조건에 따른 추출특성의 모니터링과 추출조건의 최적화를 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)(12)을 사용하였다. 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획(central composite design)(13)을 사용하였으며, 반응표면분석을 위해 MINITAB statistical software(version 13, Minitab Inc., State college, PA, USA)를 사용하였다. 이 때 추출조건은 시료에 대한 추출온도(X_1) 50-90°C와 추출용매비(X_2) 10-30 mL/g와 추출시간(X_3) 1-3시간이었으며, 이들 독립변수들은 5단계(-2, -1, 0, 1, 2)로 부호화(Table 1)하여 중심합성계획에 따라 16구간으로 설정하였다(Table 2). 또한 이들 요인변수에 의해 영향을 받는 종속변수(Y_p)는 수율(Y_1), 총 폴리페놀(Y_2), 총 플라보노이드(Y_3), DPPH 라디칼 소거활성(IC_{50}) (Y_4), ABTS 라디칼 소거활성(IC_{50}) (Y_5), superoxide 라디칼 소거활성(IC_{50}) (Y_6)으로 하였다. 이 때 민들레 잎을 추출조건에 따라 3회 반복 추출하여 구한 값을 반응표면분석에 사용하였다.

수율

수율은 추출액을 동결건조한 후 추출액 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 고형분 양(% , d.b.)으로 나타내었다.

총 폴리페놀 함량

민들레 잎 열수추출물의 총 폴리페놀 함량은 Folin-Ciocalteu 방법(14)을 변형하여 측정하였다. 농도별 시액 0.125 mL를 증류수 0.5 mL에 녹이고 Folin 시약을 0.125 mL 첨가하고 잘 혼합한 후 1.25 mL의 7% sodium carbonate 용액을 서서히 가하였다. 이 혼합액을 90분간 방치한 후 분광광도계를 사용하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. Chlorogenic acid를 사용하여 구한 검량선으로부터 시료 중의 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량

민들레 잎 열수추출물의 총 플라보노이드 함량은 Jia 등의 방법(15)을 변형하여 측정하였다. 농도별 시액 0.25 mL를 증류수 1.25 mL에 녹이고 5% sodium nitrite 용액 0.075 mL를 첨가하고 잘 혼합한 후 5분간 반응시켰다. 다시 10% aluminium chloride 용액 0.15 mL를 첨가하여 6분간 반응시킨 후, 1 N NaOH 0.5 mL와

증류수 0.275 mL를 첨가하였다. 잘 혼합시킨 후, 분광광도계를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Catechin을 사용하여 구한 검량선으로부터 시료 중의 플라보노이드 함량을 구하였다.

DPPH 라디칼 소거활성

추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 DPPH 자유 라디칼에 대한 환원력을 측정하였다. EtOH에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 1 mL, EtOH 1 mL와 각 농도별로 희석한 시료 0.5 mL를 혼합하여 15분경과 후에 520 nm에서 흡광도를 측정하였다(16). 각 추출물의 라디칼 소거활성은 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 추출물의 농도인 IC_{50} 값으로 나타내었다.

ABTS 라디칼 소거활성

ABTS 라디칼을 이용한 항산화력 측정은 $ABTS^+ \cdot cation$ decolorization assay 방법(17)에 의하여 시행하였다. 7 mM 2,2-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)와 2.45 mM potassium persulfate를 최종 농도로 혼합하여 실온인 암소에서 1시간 동안 방치하여 $ABTS^+ \cdot$ 을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도 값이 0.70 ± 0.02 가 되게 5 mM phosphate buffer saline(PBS)로 희석하였다. 희석된 용액 0.99 mL에 시료 0.01 mL를 가하여 6분 동안 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 추출물의 라디칼 소거활성은 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 추출물의 농도인 IC_{50} 값으로 나타내었다.

Superoxide 라디칼 소거활성

Superoxide 라디칼 소거활성은 nitro blue tetrazolium(NBT) 환원법(18)에 의해 측정하였다. Xanthine(0.4 mM)이 함유된 0.1 M phosphate buffer(pH 7.5)에 xanthine oxidase(0.05 units/mL)를 반응시켜 superoxide anion radical을 생성시킨 후 NBT(0.24 mM/L)와 추출물을 첨가하여 반응시키고 560 nm에서 흡광도를 측정하여 소거 효과를 측정하였다. 각 추출물의 superoxide 라디칼 소거활성은 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 추출물의 농도인 IC_{50} 값으로 나타내었다.

통계 분석

민들레 잎의 열수 추출조건에 따른 추출물의 특성은 MINITAB statistical software program을 사용하여 반응표면회귀분석으로 통계처리하였다.

반응표면 분석에서 독립변수(X_1, X_2, X_3)에 대한 2차 회귀모형은 다음과 같다.

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 + A_{33}X_3^2 + A_{12}X_1X_2 + A_{13}X_1X_3 + A_{23}X_2X_3$$

여기서 Y는 반응변수, X_1, X_2, X_3 는 독립변수, A_0 는 절편, A_n 은 회귀계수이다.

반응표면분석에 의한 민들레 잎의 열수추출 조건의 최적화는 MINITAB program을 이용하여 각각의 반응변수의 특성값에 대한 목표값을 설정하여 목표값을 만족시키는 인자의 최적 조합을 결정하였다.

결과 및 고찰

수율에 대한 추출조건의 영향

중심합성계획에 의한 16 구간의 추출조건에 따라 추출한 추출

Table 1. Experimental range and values of the independent variables in the central composite design for hot water extraction conditions of dandelion leaves

Independent variables	Symbol	Levels				
		-2	-1	0	1	2
Extraction temperature (°C)	X_1	50	60	70	80	90
Ratio of solvent to sample (mL/g)	X_2	10	15	20	25	30
Extraction time (hr)	X_3	1	1.5	2	2.5	3

Table 2. Central composite design and responses of dependent variables for hot water extraction conditions to independent variables

Exp. No.	Coded levels of variable			Responses					
	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6
1	-1	-1	-1	36.71	41.21	32.53	0.78	6.15	8.86
2	1	-1	-1	37.19	65.94	68.14	0.17	3.63	3.06
3	-1	1	-1	37.16	45.35	36.51	1.04	6.51	8.54
4	1	1	-1	38.43	67.12	71.23	0.17	3.47	3.04
5	-1	-1	1	37.46	40.49	32.53	0.73	6.42	9.04
6	1	-1	1	38.28	72.93	65.37	0.18	3.66	3.04
7	-1	1	1	36.87	48.24	43.78	0.59	5.39	5.15
8	1	1	1	38.82	65.81	66.76	0.17	3.78	2.66
9	-2	0	0	34.89	32.32	19.99	1.39	7.17	11.62
10	2	0	0	38.03	79.78	74.53	0.16	3.38	1.94
11	0	-2	0	35.82	47.14	45.43	0.29	4.78	2.95
12	0	2	0	39.42	52.08	46.68	0.32	4.44	3.10
13	0	0	-2	37.89	52.81	49.24	0.35	4.27	3.25
14	0	0	2	38.01	59.38	58.68	0.16	4.22	2.65
15	0	0	0	37.98	57.28	52.10	0.24	4.22	3.35
16	0	0	0	37.86	57.34	55.62	0.22	4.10	3.37

X_1 (extraction temperature, °C), X_2 (ratio of solvent, mL/g), X_3 (extraction time, hr), Y_1 (yield, %), Y_2 (total polyphenol, µg/mg), Y_3 (total flavonoid, µg/mg), Y_4 (DPPH radical scavenging ability, IC₅₀ (mg/mL)), Y_5 (ABTS radical scavenging ability, IC₅₀ (mg/mL)), Y_6 (superoxide radical scavenging ability, IC₅₀ (mg/mL))

물의 수율의 결과를 Table 2에 나타내었으며, 이에 대한 반응표면 회귀식은 R²이 0.819로 나타났다. Table 3는 t-statistic에 근거한 종속변수 Y_1 의 상수, 일차항(X_1, X_2, X_3), 이차항(X_1^2, X_2^2, X_3^2), 상호항(X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3)의 계수와 유의성을 나타낸 것으로 상수($p < 0.01$)와 X_1, X_2 ($p < 0.05$)항이 유의성이 있는 것으로 나타났다. 분산분석의 결과(Table 4), 이차항과 상호항은 통계적으로 유의성이 인정되지 않았고($p > 0.1$), 일차항만이 유의성($p = 0.023$)이 있는 것으로 나타났다($p < 0.05$).

각 추출조건에 따른 수율 변화의 반응표면 분석 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 추출시간이 증가함에 따라 수율이 약간 증가하기는 하지만 온도나 용매비율에 비해서는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고, 시료의 용매비가 감소할수록 수율이 증가하는 경향을 나타내었으며 추출온도는 70°C 이후부터 수율이 감소하는 경향을 나타내었다. Kim 등(19)은 천마유효성분의 추출 시 시료에 대한 용매비가 감소할수록 가용성 고형분 함량이 증가하는 것으로 보고하여 본 실험의 결과와 비슷한 경향을 나타내었다.

총 폴리페놀 함량에 대한 추출 조건의 영향

추출조건에 따른 민들레 잎의 열수추출물의 총 폴리페놀 함량을 Table 2에 나타내었으며, 이에 대한 반응표면 회귀식에 관한 계수는 Table 3에 나타내었다. 총 폴리페놀 함량에 대한 회귀식의 결정계수 R²는 0.979로 반응모형이 적합하였으며, 통계적으로도 유의성이 1% 이내에서 인정되었다. 종속변수 Y_2 의 상수, 일차항(X_1, X_2, X_3), 이차항(X_1^2, X_2^2, X_3^2), 상호항(X_1X_2, X_1X_3, X_2X_3) 중에서 상수($p < 0.01$)와 X_1, X_2, X_3 ($p < 0.1$)항이 유의성이 있는 것으로 나타났다(Table 3). 분산분석의 결과(Table 4), 이차항과 상호항은 유의성이 인정되지 않았고($p > 0.1$), 일차항만이 유의성이 인정되었다($p < 0.01$). 추출물의 총 폴리페놀 함량에 대한 반응표면

Table 3. Regression coefficients of the fitted quadratic polynomial equation for different response based on t-statistic

	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_5	Y_6
Intercept						
A ₀	37.89**	57.10**	53.54**	0.23**	4.15**	3.25**
Linear						
A ₁	0.72*	12.91**	15.95**	-0.33**	-1.19**	-2.64**
A ₂	0.57*	1.04	1.60	0.01	-0.10	-0.32
A ₃	0.16	1.38	1.17	-0.06*	-0.04	-0.34
Quadratic						
A ₁₁	-0.44	0.06	-1.56	0.20**	0.42**	1.47**
A ₂₂	-0.03	-2.22*	-1.99	0.03	0.19*	0.14
A ₃₃	0.08	0.08	0.80	0.01	0.06	0.12
Cross product						
A ₁₂	0.24	-2.23*	-1.35	-0.02	0.08	0.48
A ₁₃	0.13	0.44	-1.81	0.06**	0.15	0.35
A ₂₃	-0.22	-0.59	0.70	-0.05*	-0.14	-0.49

*Significant at 5% level

**Significant at 1% level

Model on which X_1 =extraction temperature (°C), X_2 =solvent ratio (mL/g), X_3 = extraction time (hr) is

$$Y = A_0 + A_1X_1 + A_2X_2 + A_3X_3 + A_{11}X_1^2 + A_{22}X_2^2 + A_{33}X_3^2 + A_{12}X_1X_2 + A_{13}X_1X_3 + A_{23}X_2X_3$$

X_1 (extraction temperature, °C), X_2 (ratio of solvent, mL/g), X_3 (extraction time, hr), Y_1 (yield, %), Y_2 (total polyphenol, µg/mg), Y_3 (total flavonoid, µg/mg), Y_4 (DPPH radical scavenging ability, IC₅₀ (mg/mL)), Y_5 (ABTS radical scavenging ability, IC₅₀ (mg/mL)), Y_6 (superoxide radical scavenging ability, IC₅₀ (mg/mL))

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) for response of dependent variables ($Y_1, Y_2, Y_3, Y_4, Y_5,$ and Y_6)

Responses	Sources	DF	SS	MS	F-value	p-value
Y_1	Model	9	15.41	1.71	3.01	0.096
	Linear	3	11.73	3.91	6.88	0.023
	Quadratic	3	2.71	0.90	1.59	0.288
	Cross-product	3	0.97	0.32	0.57	0.655
	Residual	6	3.41	0.57	-	-
	Lack of fit	5	3.40	0.68	84.41	0.082
	Pure error	1	0.01	0.01	-	-
	Total	15	18.82	-	-	-
Y_2	Model	9	2424.59	269.40	31.36	0.001
	Linear	3	2317.59	772.53	89.94	0.001
	Quadratic	3	62.96	20.98	2.44	0.162
	Cross-product	3	44.05	14.68	1.71	0.264
	Residual	6	51.54	8.59	-	-
	Lack of fit	5	51.54	10.31	5032.68	0.011
	Pure error	1	0.00	0.00	0.00	-
	Total	15	2476.13	-	-	-
Y_3	Model	9	3659.04	406.56	26.49	0.001
	Linear	3	3529.31	1176.44	76.64	0.001
	Quadratic	3	85.11	28.38	1.85	0.239
	Cross-product	3	44.63	14.88	0.97	0.466
	Residual	6	92.09	15.35	-	-
	Lack of fit	5	85.91	17.19	2.78	0.425
	Pure error	1	6.19	6.18	-	-
	Total	15	3751.15	-	-	-
Y_4	Model	9	2.03	0.23	44.90	0.001
	Linear	3	1.55	0.52	102.50	0.001
	Quadratic	3	0.43	0.14	28.60	0.001
	Cross-product	3	0.05	0.02	3.61	0.085
	Residual	6	0.03	0.01	-	-
	Lack of fit	5	0.03	0.01	20.74	0.165
	Pure error	1	0.00	0.00	-	-
	Total	15	2.06	-	-	-
Y_5	Model	9	21.85	2.43	31.55	0.001
	Linear	3	19.63	6.54	84.99	0.001
	Quadratic	3	1.85	0.62	8.01	0.016
	Cross-product	3	0.38	0.13	1.64	0.278
	Residual	6	0.46	0.08	-	-
	Lack of fit	5	0.45	0.09	12.21	0.214
	Pure error	1	0.01	0.01	-	-
	Total	15	22.32	-	-	-
Y_6	Model	9	127.13	14.13	11.53	0.004
	Linear	3	98.18	32.73	26.71	0.001
	Quadratic	3	24.21	8.07	6.59	0.025
	Cross-product	3	4.74	1.58	1.29	0.361
	Residual	6	7.35	1.23	-	-
	Lack of fit	5	7.35	1.47	11487.02	0.007
Pure error	1	0.00	0.00	-	-	
Total	15	134.48	-	-	-	

Y_1 (yield, %), Y_2 (total polyphenol, $\mu\text{g}/\text{mg}$), Y_3 (total flavonoid, $\mu\text{g}/\text{mg}$), Y_4 (DPPH radical scavenging ability, IC_{50} (mg/mL)), Y_5 (ABTS radical scavenging ability, IC_{50} (mg/mL)), Y_6 (superoxide radical scavenging ability, IC_{50} (mg/mL))

분석 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 추출시간이 증가함에 따라 총 폴리페놀 함량이 약간 증가하고 용매비가 증가함에 따라 약간 증가하다가 최적 용매비를 지나면서 폴리페놀 함량이 다시 감소하는 경향을 나타내었다. 한편 추출온도가 증가함에 따라 총 폴리페놀 함량이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

총 플라보노이드 함량에 대한 추출 조건의 영향

추출 조건에 따른 민들레 잎의 열수추출물의 총 플라보노이드 함량을 Table 2에 나타내었고 반응표면 회귀식의 계수는 Table 3에 나타내었다. 총 플라보노이드 함량에 대한 회귀식의 결정계수 R^2 는 0.975로 반응모형이 적합하였으며, 통계적으로도 1% 이내의 유의성이 인정되었다. 종속변수 Y_3 의 상수와 X_1 항만이 유의성($p<0.01$)이 있는 것으로 나타났으며(Table 3), 분산분석의 결과(Table 4), 이차항과 상호항은 유의성이 인정되지 않았고($p>0.1$), 일차항만이 유의성이 인정되었다($p<0.01$). 추출물의 총 플라보노이드 함량에 대한 반응표면 분석결과(Fig. 3), 폴리페놀 함량에 대한 분석결과와 마찬가지로 추출시간과 용매비가 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났고, 추출온도가 증가할수록 총 플라보노이드 함량이 크게 증가하는 경향을 나타내었다.

DPPH 라디칼 소거활성에 대한 추출 조건의 영향

추출조건에 따른 민들레 잎의 열수추출물의 DPPH 라디칼 소거활성에 대한 결과는 Table 2에 나타냈으며 반응표면 회귀식에 대한 계수는 Table 3에 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성(IC_{50})에 대한 회귀식의 결정계수 R^2 는 0.985로 반응모형이 적합하였으며, 통계적으로도 매우 유의성 있게 나타났($p<0.01$). 종속변수 Y_4 의 상수와 X_1 항, X_{11} 항이 1% 이내의 유의성이, X_3 항, X_{13} 항은 5% 이내의 유의성이 인정되었고, X_{23} 항은 약간의 유의성($p<0.1$)이 인정되었다(Table 3). 분산분석의 결과(Table 4), 일차항과 이차항이 고도의 유의성이 인정되었고($p<0.01$), 상호항은 $P=0.085$ 로 약간의 유의성이 인정되었다. 반응표면 분석결과(Fig. 4), 추출시간과 용매비는 DPPH 라디칼 소거활성에 크게 영향을 미치지 않고, 추출온도에 크게 영향을 받는 것으로 나타났다. 추출온도가 높아질수록 IC_{50} 값이 감소하여 소거활성이 증가하다가 최적온도

Table 5. Optimization parameters in the response optimizer

Response	Goal	Lower	Target	Upper	Weight	Importance
Y_1	Maximum	37.0	38.0	38.0	1	0.5
Y_3	Maximum	50.0	74.0	74.0	1	0.5
Y_4	Minimum	0.3	0.3	1	1	1
Y_5	Minimum	3.0	3.0	7	1	1

Y_1 (yield, %), Y_3 (total flavonoid, $\mu\text{g}/\text{mg}$), Y_4 (DPPH radical scavenging ability, IC_{50} (mg/mL)), Y_5 (ABTS radical scavenging ability, IC_{50} (mg/mL))

Table 6. Optimal conditions of hot water extraction of dandelion leaves for increasing antioxidant activity

Independent variables	Ratio of solvent to sample (mL/g)	Critical value	
		Coded	Uncoded
Extraction temperature ($^{\circ}\text{C}$)		1.38 \pm 0.11	83.77 \pm 1.07
Extraction time (hr)		-0.83 \pm 0.23	1.59 \pm 0.12

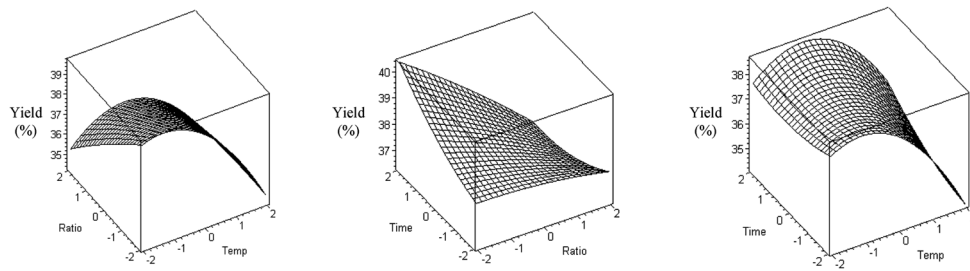


Fig. 1. Response surface for the effects of extraction temperature, solvent ratio, and extraction time on yield of extracts.

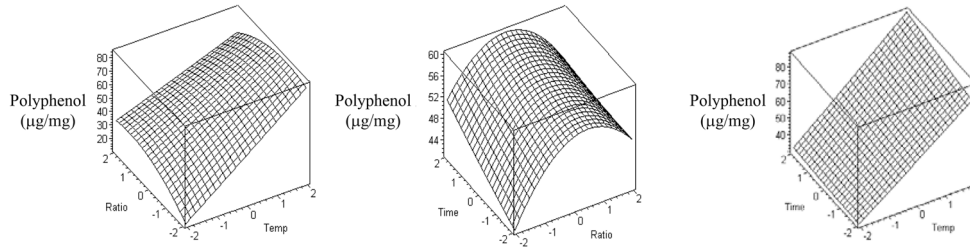


Fig. 2. Response surface for the effects of extraction temperature, solvent ratio, and extraction time on total polyphenol of extracts.

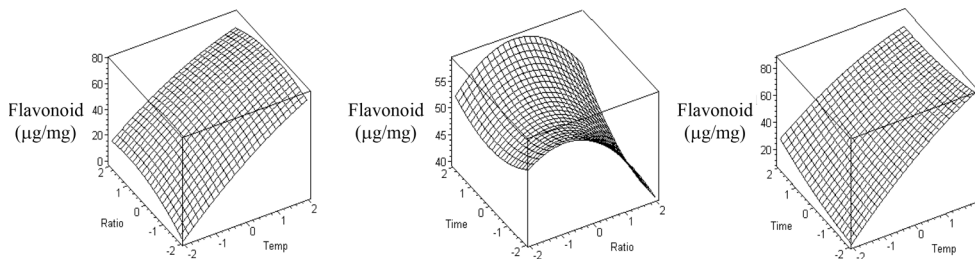


Fig. 3. Response surface for the effects of extraction temperature, solvent ratio, and extraction time on total flavonoid of extracts.

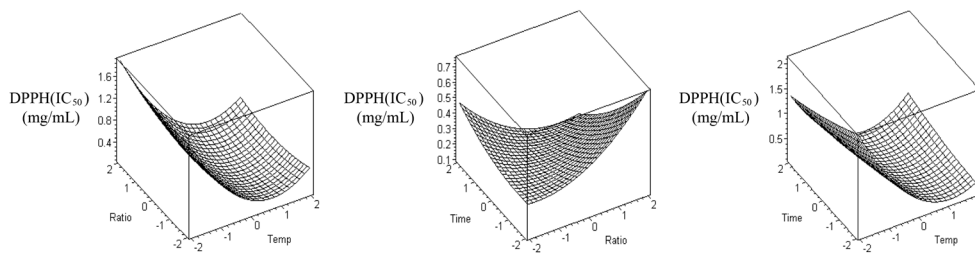


Fig. 4. Response surface for the effects of extraction temperature, solvent ratio, and extraction time on DPPH radical scavenging ability of extracts.

이후에 약간 감소하는 경향을 나타내었다. Kang 등(20)은 20 mL/g 용매비, 75-80°C에서 3시간 동안 3회 추출한 민들레 잎의 물 추출물이 첨가농도 0.1 mg/mL에서 50% 이상의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타내었다고 하여 본 실험의 결과와 유사한 결과를 보고한 바 있다. 또한 Choi 등(21)도 노루궁뎅이 버섯의 열수 추출 시험에서 추출온도가 증가할수록 전자공여작용이 증가하다가 최적 추출조건에서 최대점을 보인 후로 다시 감소하는 경향을 나타내었다고 보고하였다.

ABTS 라디칼 소거활성에 대한 추출 조건의 영향

추출조건에 따른 민들레 잎의 열수추출물의 ABTS 라디칼 소거활성에 대한 결과를 Table 2에 나타냈으며 반응표면 회귀식의

계수는 Table 3에 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성(IC₅₀)에 대한 회귀식의 결정계수 R²는 0.979로 반응모형이 적합하였으며, 통계적으로도 매우 유의성이 큰 것으로 나타났다(p<0.01). 종속변수 Y₅의 상수와 X₁항, X₁₁항이 고도의 유의성(p<0.01)이, X₂₂항은 약간의 유의성(p<0.1)이 인정되었고, 나머지 항은 유의성이 인정되지 않았다(Table 3). 분산분석 결과(Table 4), 일차항이 고도의 유의성이 인정되었고(p<0.01), 이차항은 p=0.016으로 5% 이내의 유의성이 인정되었으며 상호항은 유의성이 인정되지 않았다. 반응표면 분석결과(Fig. 5), 추출물의 ABTS 라디칼 소거활성이 추출 시간과 용매비에는 거의 영향을 받지 않고, 추출온도에 크게 영향을 받아 온도가 증가함에 따라 소거 활성이 증가하다가 고온에서 약간 감소하는 경향이 나타내어 DPPH 라디칼 소거활성 결

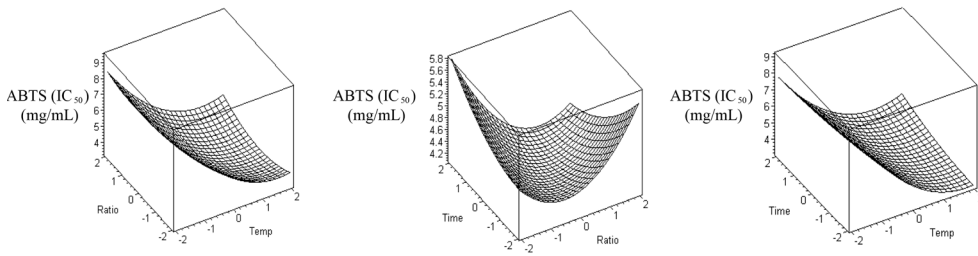


Fig. 5. Response surface for the effects of extraction temperature, solvent ratio, and extraction time on ABTS radical scavenging ability of extracts.

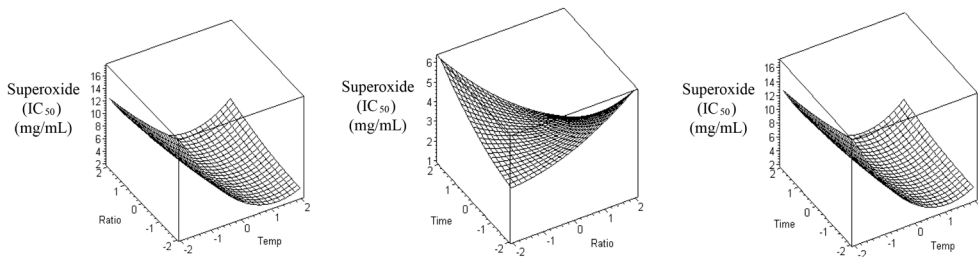


Fig. 6. Response surface for the effects of extraction temperature, solvent ratio, and extraction time on superoxide radical scavenging ability of extracts.

과와 유사한 경향을 나타내었다.

Superoxide 라디칼 소거활성에 대한 추출 조건의 영향

중심합성계획에 의한 16구간의 추출조건에 따라 얻어진 열수추출물의 superoxide 라디칼 소거활성의 결과를 Table 2에 나타내었으며, 반응표면 회귀식의 계수는 Table 3에 나타내었다. Superoxide 라디칼 소거활성에 대한 회귀식의 결정계수(R²)는 0.945로 반응모형이 적합하였으며, 반응표면모델식이 통계적으로 1% 이내에서 유의성이 큰 것으로 나타났다. 종속변수 Y₆의 상수와 X₁, X₁₁ 항이 고도의 유의성(p<0.01)이 인정된 반면 나머지 항은 유의성이 인정되지 않았다(Table 3). 분산분석의 결과(Table 4), 일차항은 1% 이내에서 고도의 유의성이 인정되었고, 이차항도 5% 이내에서 유의성이 인정되었지만 상호항은 유의성이 인정되지 않는 것으로 나타났다. 추출조건에 따른 반응표면 분석 결과(Fig. 6), DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼 소거활성 결과와 마찬가지로 추출시간과 용매비는 온도에 비해 크게 영향을 미치지 않았고, 온도가 증가함에 따라 superoxide 라디칼 소거활성이 크게 증가하는 것으로 나타났다.

최적 추출 조건

민들레 잎으로부터 항산화 활성 증진을 위한 최적추출조건을 구하기 위해 ANOVA 분석한 결과 Y₂와 Y₆는 Lack of fit의 값이 0.011과 0.007로 유의하게 낮아 반응표면분석 모델에 적용할 수 없어 최적화 과정에서 제외시켰다. 또한 나머지 종속변수 중 항산화능을 나타내는 Y₄와 Y₅은 Y₁와 Y₃보다 항산화 활성 증진을 위한 열수추출의 조건에서 중요한 요인이기 때문에 최적화 과정 시 중요도를 높게 설정하였고(Table 5), 모든 반응변수의 특성값을 고려하였을 때의 합성 만족도는 0.979이었다. 이러한 특성을 고려한 최적추출조건(Table 6)은 추출온도 83.77±1.07°C, 시료에 대한 용매비 20.85±0.24 mL/g, 추출시간 1.59±0.12 hr이었고 이 때 예측된 수율은 38.98%, 총 폴리페놀 함량은 74.28 µg/mg, 총 플라보노이드 함량은 74.00 µg/mg이고 DPPH 라디칼, ABTS 라디칼과 superoxide 라디칼의 소거활성(IC₅₀)의 예측 특성 값은 각각

Table 7. Predicted values of response variables in optimal conditions of hot water extraction of dandelion leaves for increasing antioxidant activity

Response variables	Predicted values
Yield (%)	38.98
Total polyphenol (µg/mg)	74.28
Total flavonoid (µg/mg)	74.00
DPPH radical scavenging ability (IC ₅₀ , mg/mL)	0.14
ABTS radical scavenging ability (IC ₅₀ , mg/mL)	3.24
Superoxide radical scavenging ability (IC ₅₀ , mg/mL)	2.49

0.14 mg/mL, 3.24 mg/mL, 2.49 mg/mL로 나타났다(Table 7).

요 약

민들레 잎의 열수 추출물의 항산화 활성 증진을 위한 추출조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법을 사용하였다. 중심합성계획에 따라 추출조건(추출온도, 용매비, 추출시간)과 이에 따라 영향을 받는 종속변수(수율, 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량, DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성, superoxide 라디칼 소거활성)를 설정하였다. 추출물의 수율은 추출시간에 의해 거의 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며 시료의 용매비가 증가할수록 감소하였고, 70°C 이상의 추출온도에서 감소하는 것으로 나타났다. 총 폴리페놀과 총 플라보노이드 함량은 추출온도가 증가함에 따라 크게 증가하였으며, DPPH 라디칼, ABTS 라디칼, superoxide 라디칼 소거활성도 추출온도에 가장 크게 영향을 받아 추출온도가 증가함에 따라 증가하다가 최적온도 이후에 약간 감소하는 것으로 나타났다. 이들 추출물의 특성을 모두 만족시키는 최적 추출조건은 추출 온도 83.77±1.07°C, 시료에 대한 용매비 20.85±0.24 mL/g, 추출시간 1.59±0.12 hr이었고 이 때 예측된 수율은 38.98%, 총 폴리페놀 함량은 74.28 µg/

mg, 총 플라보노이드 함량은 74.00 µg/mg이었으며, DPPH 라디칼, ABTS 라디칼, superoxide 라디칼의 소거활성(IC₅₀)의 예측 특성 값은 각각 0.14 mg/mL, 3.24 mg/mL, 2.49 mg/mL로 나타났다.

문 헌

- Videla LA, Fernandez V. Biochemical aspects of cellular oxidative stress. Arch. Biol. Med. Exp. 21: 85-92 (1988)
- Halliwell B, Aruoma OJ. DNA damage by oxygen-derived species. FEBS Lett. 281: 9-19 (1991)
- Jennings PE, Barnett AH. New approaches to the pathogenesis and treatment of diabetic microangiopathy. Diabetic Med. 5: 111-117 (1988)
- Fridovich I. Superoxide dismutase an adaption to paramagnetic gas. J. Biol. Chem. 264: 7761-7762 (1989)
- Branen AL. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. J. Am. Oil Chem. Soc. 52: 59-63 (1975)
- Jorge M, Ricardo DS, Jacques R, Vernonique C, Anni C, Michel M. Procyanidin dimers and trimers from grape seeds. Phytochemistry 30: 1259-1264 (1991)
- Kim TJ. Our Flower, 100 Species 9th ed. Hyunamsa, Seoul, Korea. pp. 2-5 (1994)
- Kang MJ, Kim KS. Current trends of research and biological activities of dandelion. Food Ind. Nutr. 6: 60-67 (2001)
- Williams CA, Goldstone F, Greenham J. Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. Phytochemistry 42: 121-127 (1996)
- Choi U, Shin DH, Chang YS, Shin JL. Screening of natural antioxidant from plant and their antioxidative effect. Korean J. Food Sci. Technol. 24: 142-148 (1992)
- Kang MJ. Antioxidant activity and free radical scavenging effect of dandelion extract. PhD thesis, Yeungnam University, Kyungsan, Korea (2001)
- Gontard N, Guilbert S, Cuq JL. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. J. Food Sci. 57: 190-196 (1992)
- Lee GD, Lee JE, Kwon JH. Application of response surface methodology in food industry. Food Ind. 33: 33-45 (2000)
- Singleton V, Rossi J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am. J. Enol. Viticult. 16: 144-158 (1965)
- Jia M, Tang M, Wu J. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. Food Chem. 64: 555-559 (1999)
- Hatano T, Kagawa H, Yasuhara T, Okuda T. Two new flavonoids and other constituents in licorice root: Their relative astringency and radical scavenging effects. Chem. Pharm. Bull. 36: 1090-1097 (1988)
- Miller N, Rice-Evans C. Factors influencing the antioxidant activity determined by the ABTS radical cation assay. Free Radical Res. 26: 195-199 (1997)
- Richmond R, Halliwell B, Chauhan J, Darbre A. Superoxide-dependent formation of hydroxyl radicals: Detection of hydroxyl radicals by the hydroxylation of aromatic compound. Anal. Biochem. 118: 328-330 (1981)
- Kim SH, Kim IH, Kang BH, Lee SH, Lee JM. Optimization of ethanol extraction conditions for effective components from *Gastrodia elata* Blume. Korean J. Food Preserv. 13: 506-512 (2006)
- Kang MJ, Shin SR, Kim KS. Antioxidative and free radical scavenging activity of water extract from Dandelion (*Taraxacum officinale*). Korean J. Food Preserv. 9: 253-259 (2002)
- Choi MA, Park NY, Jeong YJ. Optimization of hot water extraction conditions from *Hericium erinaceus*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33: 1068-1073 (2004)