

# 반응표면분석법을 이용한 야관문(*Lespedeza cuneata*) 기능성분의 에탄올 추출조건 최적화

김대익<sup>1</sup> · 홍주현<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>(재)대구테크노파크 바이오헬스융합센터, <sup>2</sup>대구가톨릭대학교 식품가공학전공

## Optimization of Ethanol Extraction Conditions for Functional Components from *Lespedeza cuneata* Using Response Surface Methodology

Dae-Ik Kim<sup>1</sup> and Joo-Heon Hong<sup>2†</sup>

<sup>1</sup>Biohealth convergence Center, Daegu Technopark, Daegu, 704-801, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan  
712-702, Korea

### Abstract

This study was conducted to monitor the quality characteristics of *Lespedeza cuneata* ethanolic extracts, by a response surface methodology. The independent variables were the extraction temperature (35~95°C), extraction time (2~10 hr), and ethanol concentration (10~90%). The coefficients of the determinations (R<sup>2</sup>) were 0.8562 (p<0.1), 0.9787 (p<0.01), and 0.8344 (p<0.1) in total polyphenol, total flavonoid, and electron donating ability, respectively. The electron donating ability and nitrite scavenging effect were improved with an increase of ethanol concentration, rather than the extraction temperature. ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) with extraction conditions was 1,636.47~2,696.99 µmoles TE/g, and was increased with the increase of extraction temperature and 40~60% of ethanol concentration. Estimated conditions for the maximized extraction including the yield, total polyphenol, electron donating ability, nitrite scavenging effect, and ORAC, were 60~68°C in extraction temperature, 6~7 hr in extraction time, and 38~60% in ethanol concentration.

Key words : *Lespedeza cuneata*, ethanol extract, antioxidant, optimization, RSM

## 1. 서론

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(Koh YJ 등 2008, Halliwell B와 Aruoma OJ 1991). 이러한 산화적 스트레스의 직접적인 원인이 되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)은 불안정하고 반응성이 높아 여러 생체 물질과 쉽게 반응하고, 체내 고분자들을 공격하여 세포와 조직에 비가역적인 손상을 일으키거나 돌연변이, 세포독성 및 발암 등을 초래하게 된다. 따라서 활성산소를 소거하기 위한 항산화성 물질을 식품이나 천연물에서 찾고자 하는 노력이 많이 시도되고 있다(Fridovich I 1989).

야관문(*Lespedeza cuneata*)은 콩과의 여러 해살이 식물로 비수리, 삼엽초 등의 여러 가지 이름으로 불리며, 우리나라와 일본, 중국, 대만 등지에 분포하고 있다. 황폐지의 지피물 조성과 지력증진 식물로 널리 이용되는 혼한 식물이지만 예로

†Corresponding author : Joo-Heon Hong, Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Geumnakro 5, Gyeongsansi, Gyeongbuk, 712-702, Korea  
Tel: +82-53-850-3218  
Fax: +82-53-850-3217  
E-mail: jhhong@cu.ac.kr

부터 민간에서는 음위증이나 유정, 기침, 천식 등의 치료에 효능이 있는 약제로 쓰여 왔으며, 야관문의 생리활성 물질로는 pinitol, flavonoid, phenol성분, tannin 및  $\beta$ -sitosterol을 함유하며, flavonoid 중에서도 quercetin, kaempferol, vitexin, orientin 등이 분리되어 있음이 보고되었다(Atsushi N와 Kazuko H 1980). 야관문의 생리활성에 대한 연구로는 동물실험을 통한 혈당 강하 효과와 포도당 독성에 대한 세포보호 효과가 보고되었고(Choi JS 등 2010) 야관문 메탄을 추출물이 RIN-m5F세포에서  $H_2O_2$ 를 이용한 산화 스트레스에 대하여 세포보호 효과가 높은 것으로 보고되었다(Lee DS 등 2008). Kim SJ와 Kim DW 등(2007)은 야관문 종자의 열수 및 에탄올 추출조건에 따른 항산화 활성의 변화를 비교 평가한 연구에서 열수추출조건에 비해 에탄올 추출조건에서 항산화 성분이 잘 이행되었으며 항산화 활성도 높다고 보고하였다. 식물에서 기능성 물질을 추출하는 방법으로 주로 열수 추출법이 사용되고 있으나, 추출시간을 단축시키고 추출효율을 증가시키기 위해 유기용매를 이용한 용매추출이 많이 활용되고 있다. 용매추출은 용매가 삼투압이나 모세관 현상 등에 의해 식물체에 흡수될 때 용매 농도에 의해 식물체 조직이 손상되어 유용물질이 침출되고 녹지 않던 물질까지 가용성화 시킨 후, 세포 내부에서 바깥으로 확산되는 현상을 이용하므로 열수추출보다 높은 추출 효율을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그러나 야관문에 포함된 기능성 성분의 추출을 최적화하는 방법과 조건에 대한 연구는 미비한 실정이다.

반응표면분석은 복수의 독립변수들이 복합적인 작용을 하여 한 개 또는 여러 개의 종속변수들에 영향을 줄때 그 작용의 관계를 통계적으로 분석하는 방법으로 최근에는 제품개발, 공정개발, 품질관리 등의 분야에서 널리 활용되고 있다. Kim HK 등(2005)은 반응표면분석을 이용하여 용매비, 에탄올농도, 추출온도에 따른 홍월적 양배추의 추출조건을 최적화 하였고, Kim JO 등(2008)은 시료에 대한 용매비, 추출온도와 추출시간에 따른 무화과의 추출조건 최적화를 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 다양한 생리활성을 가지고 있는 야관문을 기능성 소재로 활용하기 위한 기초자료로서 에탄올을 이용한 기능성분들의 고효율 추출을 위해 최적 추출조건을 반응표면 분석법을 이용하여 설정하고자 하였으며 이를 위하여 추출온도, 추출시간 및 에탄올 농도에 따른 유용성분의 추출 및 기능적 특성을 분석하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

야관문은 대구약령시에서 구입하여 본 실험에 사용하였으며, 시료는 분쇄기(J-NCM, Jisico, Korea)로 분쇄한 후 표준체 No. 60(250  $\mu$ m 이하)를 통과한 것을  $-20^\circ\text{C}$  이하의 암소에 보관하면서 추출용 시료로 사용하였다. 추출조건은 시료 20 g에 대한 용매비를 20 mL/g로 하여 아래의 추출조건으로 실험을 수행하였다.

### 2. 추출조건 최적화를 위한 실험계획

본 실험에서는 추출물의 기능적 특성을 최대화 하는 최적 추출조건을 설정하기 위해 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 사용하였다(Gontard N 등 1992). 추출조건에 대한 실험계획은 중심합성계획(central composite design)을 사용하였으며, 반응표면분석을 위해 SAS(statistical analysis system)를 사용하였다. 실험계획은 Table 1과 같이 추출공정에서 중요한 변수로 고려되는 인자 즉, 시료에 대한 추출온도( $45\sim 85^\circ\text{C}$ ,  $X_1$ ), 추출시간( $2\sim 10$  hr,  $X_2$ ), 에탄올 농도( $10\sim 90\%$ ,  $X_3$ )를  $-2$ ,  $-1$ ,  $0$ ,  $1$ ,  $2$ 의 5단계로 부호화하여 중심합성계획에 따라 Table 2와 같이 16구간으로 설정하여 추출실험을 실시하였다. 또한 이들 요인변수에 의해 영향을 받는 종속변수( $Y_n$ ) 즉, 수율( $Y_1$ ), 총 폴리페놀함량( $Y_2$ ), 총 플라보노이드함량( $Y_3$ ), 전자공여능( $Y_4$ ), 아질산염소거능( $Y_5$ ), ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity) ( $Y_6$ )으로 하였으며, 이들은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다.

Table 1 Level in extraction conditions for *Lespedeza cuneata* based on central composite design

Extraction conditions	Level				
	-2	-1	0	1	2
Extraction temperature ( $^\circ\text{C}$ )	45	55	65	75	85
Extraction time (hr)	2	4	6	8	10
Ethanol concentration (%)	10	30	50	70	90

Table 2 Central composite design for optimization of extraction condition for *Lespedeza cuneata*

Experimental number <sup>1)</sup>	Extraction temperature ( $^\circ\text{C}$ )	Extraction time (hr)	Ethanol concentration (%)
1	55(-1)	4(-1)	30(-1)
2	75(1)	4(-1)	30(-1)
3	55(-1)	4(-1)	70(1)
4	75(1)	4(-1)	70(1)
5	55(-1)	8(1)	30(-1)
6	75(1)	8(1)	30(-1)
7	55(-1)	8(1)	70(1)
8	75(1)	8(1)	70(1)
9	45(-2)	6(0)	50(0)
10	85(+2)	6(0)	50(0)
11	65(0)	6(0)	10(-2)
12	65(0)	6(0)	90(2)
13	65(0)	2(-2)	50(0)
14	65(0)	10(2)	50(0)
15	65(0)	6(0)	50(0)
16	65(0)	6(0)	50(0)

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

### 3. 수율 측정

수율은 추출액을 회전 감압 증발기(Rotavapor R-123, Buchi,

Switzerland)로 감압 농축한 후 건조오븐(Forced convection oven, Jeico Tech, Korea)을 이용하여 105°C 상압가열건조법(AOAC 1990)으로 향량이 될 때까지 건조한 후 추출액 조제에 사용한 원료 건물량에 대한 고형분 수율(% db)로 나타내었다.

#### 4. 총 폴리페놀함량 및 총 플라보노이드 함량 측정

총 폴리페놀함량은 Folin-Denis법(Singleton VL과 Rossi JA 1965)에 따라 추출조건에 따른 추출액 0.5 mL에 2 N Folin-Ciocalteu reagent(Sigma Co., St. Louis, MO, USA) 0.1 mL를 첨가하고 충분히 혼합한 다음 8.4 mL의 멸균 증류수를 가하여 실온에서 3분간 반응시킨 후 20% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 첨가하고 실온에서 1시간 반응시킨 후 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co., Sweden)를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 폴리페놀 함량은 tannic acid(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

총 플라보노이드함량 측정은 Davis법(Davis WB 1947)에 따라 추출액 100 µL에 1 mL diethyl glycol(Duksan Co., Korea)을 혼합하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 1N NaOH 100 µL와 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 420 nm에서 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co., Sweden)로 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은 quercetin(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 정량하여 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

#### 5. 전자공여능 측정

항산화능을 측정하기 위한 전자공여능은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)(Sigma, St. Louis, MO, USA)의 환원력을 이용하여 측정하였다(Lee EJ 등 2008). 추출물 1 mL에 4×10<sup>-4</sup> M DPPH용액(99.9% ethyl alcohol에 용해) 1 mL를 가하여 총액의 부피가 2 mL가 되도록 하였다. 이 반응액을 약 10초간 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 후 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co., Sweden)를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 전자공여효과는 추출물의 첨가 전과 후의 차이를 백분율로 나타내었다.

$$EDA(\%) = \left(1 - \frac{A}{B}\right) \times 100$$

- A : 추출물 첨가구의 흡광도  
B : 추출물 무첨가구의 흡광도

#### 6. 아질산염 소거능 측정

아질산염 소거효과(nitrite-scavenging effect)는 Gray JI와 Dugan LR (1975)의 방법으로 측정하였다. 1 mM 아질산나트륨 용액 1 mL에 각각의 추출물을 2 mL 가하고 여기에 0.1 N 염산(pH 1.2) 및 0.2 N 구연산 완충용액(pH 3.0, 4.2)을 7

mL 가하여 반응용액의 pH를 각각 1.2, 3.0 및 4.2로 달리하여 반응용액의 부피를 10 mL로 하였다. 이를 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음 반응액을 1 mL씩 취하고 여기에 2% 초산 5 mL, Griess 시약(acetic acid에 1% sulfanylic acid와 1% naphthylamine을 1:1 비율로 혼합 것으로 사용 직전에 제조)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 0.4 mL를 가하여 잘 혼합시켜 15분간 실온에서 방치시킨 후 분광광도계(Ultraspec 2100pro, Amersham Co., Sweden)를 사용하여 520 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 그리고 대조구는 Griess 시약 대신 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 동일하게 행하였다. 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 추출액 첨가전후의 아질산염 백분율(%)로 표기하였다.

$$N(\%) = \left(1 - \frac{A - C}{B}\right) \times 100$$

- N : 아질산염 소거율  
A : 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 시료를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도  
B : 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액에 시료대신 증류수를 첨가하여 1시간 반응시킨 후의 흡광도  
C : 시료 추출물 자체의 흡광도

#### 7. ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity) 측정

추출조건별 야관문 추출물의 항산화 활성은 Talcott ST와 Lee JH(2002)가 항산화 활성 측정에 사용한 ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity) 분석법을 이용하였다. 본 실험에서 검액 및 표준액의 농도별 희석과 실험용 시료의 제조에는 중성 phosphate buffer(61.6:38.9 v/v, 0.75 M K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 0.75 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)를 사용하였다. 검량 곡선을 작성하기 위하여 항산화 활성 비교 표준액으로 Trolox(Aldrich Chem, Inc., USA)를 인산완충액을 가해 각각 0.0, 1.65, 3.125, 6.25, 12.5, 25.0, 50.0 µM 농도로 희석하고 fluorescent stock(Sigma, St. Louis, MO, USA) 10 µL를 phosphate buffer 50 mL에 용해하여 제조하였고 측정기기는 fluorescent microplate reader(Infinite M200 PRO, Tecan Co., Austria)를 사용하여 485 nm에서 전자가 여기 되고 538 nm에서 방출되게 조절하여 본 실험에 적용되었다.

#### 8. 최적 추출조건 예측

조건별 추출물의 최적 추출조건 예측은 품질특성에 대한 contour map superimposing 하였을 때 중복되는 부분의 범위에서 최적 추출조건 범위를 설정하였다. 또한 예측된 범위에서 임의의 중심점을 최적조건으로 예측하고, 각 회귀식에 대입하여 예측 값을 설정하였다.

Table 3 Experimental data on yield, total polyphenol, total flavonoid, electron donating ability, nitrite-scavenging ability and ORAC of *Lespedeza cuneata* by central composite design for response surface analysis

Exp. number <sup>1)</sup>	Yield (%)	Total Polyphenol (mg/mL)	Total flavonoid (mg/mL)	Electron donating ability (%)	Nitrite-scavenging ability (%)			ORAC ( $\mu$ moles TE/g)
					pH 1,2	pH 3,0	pH 4,2	
1	15.0	234.77	129.20	90.85	83.03	39.30	22.03	1,636.47
2	15.6	246.96	125.79	92.71	86.28	44.05	23.60	1,925.70
3	11.2	173.04	152.46	79.05	75.31	30.75	24.47	2,366.94
4	14.3	209.14	144.39	92.62	88.78	38.15	25.82	2,421.06
5	16.2	223.18	129.26	89.93	87.54	37.09	24.35	2,383.24
6	16.7	274.30	121.87	94.18	97.31	49.78	26.28	2,547.30
7	12.4	175.94	150.12	80.01	76.88	29.43	22.81	2,329.58
8	16.0	218.17	147.97	91.32	82.37	41.23	23.71	2,620.19
9	12.6	223.90	139.85	92.20	84	36.39	27.33	2,696.99
10	17.6	279.57	134.42	95.60	89.11	50.31	29.98	2,633.30
11	14.0	169.22	112.83	71.20	88.06	31.10	14.17	2,247.32
12	8.3	165.47	168.40	78.45	74.86	27.84	16.43	2,059.47
13	13.0	222.06	139.02	91.98	82.23	37.89	17.30	1,674.15
14	15.0	251.83	134.63	94.53	93.71	42.47	23.70	2,182.60
15	14.3	228.92	132.78	94.63	90.26	42.64	24.18	2,474.43
16	14.5	229.69	131.11	94.59	90.93	41.94	24.11	2,478.78

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 수율의 변화

중심합성계획에 따라 요인변수에 의해 영향을 받는 종속변수들에 대한 회귀식과 반응표면분석에서 요인변수들 중 영향이 가장 적은 것으로 나타난 추출시간을 6.5시간으로 고정하여 반응표면을 나타내었다.

수율의 결과는 Table 3에 나타내었으며, 각각의 결과를 이용한 반응표면 회귀식은 Table 4에 나타내었다. 수율에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.9401이고 5%이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 16개 구간에서의 추출조건에 따른 수율의 최대값은 17.6%이었고, 각각의 추출조건에 따른 수율에 대한 반응표면 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 즉 추출온도 보다는 에탄올 농도에 많은 영향을 받는 것으로 나타났는데 Park NY 등(1998)은 산국 에탄올 추출물의 가용성 고형분 함량이 시료에 대한 용매비와 추출시간의 영향보다는 에탄올 농도에 의해 영향을 많이 받고 있다는 보고와 유사한 경향을 나타내었다.

#### 2. 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량의 변화

항산화작용을 가지는 폴리페놀류에는 caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, p-coumalic acid, syringic acid 및 vanilic acid 등이 있으며, phenolic hydroxyl 그룹 때문에 단백질 또는 효소단백질, 기타 거대분자들과 결합하는 성질이 있다(Kim

SM 등 2001). 중심합성계획에 의한 야관문 에탄올 추출조건별 총 폴리페놀함량은 Table 3에서와 같이 165.47~279.57 mg/mL의 범위였으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.8562로 10%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 4). 각각의 추출조건에 따른 총 폴리페놀함량에 대한 반응표면 결과는 Fig. 1에 나타내었다. 즉 추출온도보다는 에탄올 농도에 더 많은 영향을 받음을 알 수 있었다. Park KJ 등(2009)은 메밀 새싹 에탄올 추출조건 연구에서 총 폴리페놀함량은 추출온도에 비하여 에탄올 농도가 더 큰 영향을 준다는 보고하였고 Min DL 등(2010)은 대추잎의 폴리페놀 함량은 온도와 시간의 영향은 미미하였고 용매의 농도가 가장 결정적인 요인이었다는 연구결과와 유사한 경향을 나타내었다. 에탄올 추출조건별 총 플라보노이드 함량은 Table 3에서와 같이 112.83~168.40 mg/mL의 범위였으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R<sup>2</sup>는 0.9787로 1%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 4). 에탄올 농도가 증가할수록 추출온도가 높아질수록 함량이 증가됨을 확인하였다(Fig. 1). 야관문 에탄올 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 변화는 추출온도와 추출시간 보다는 에탄올 농도에 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 5).

#### 3. 전자공여능의 변화

전자공여능은 활성 라디칼에 전자를 공여하고 식품 중의 지방질 산화를 억제하는 목적으로 사용되며, 인체 내에서는 활성 라디칼에 의한 노화를 억제시키는 작용으로 이용되고

Table 4 Polynomial equations calculated by RSM program for extraction conditions of *Lespedeza cuneata*

Response	Second order Polynomials	R <sup>2</sup>	Significance
Yield	$Y_Y=23.559375-0.306250X_1+0.331250X_2-0.101250X_3$ $+0.001750X_1^2+0.002500X_1X_2-0.025000X_2^2$ $+0.003500X_1X_3+0.001875X_2X_3-0.002031X_3^2$	0.9401	0.0049
Total polyphenol	$Y_{TP}=436.165000-7.867750X_1-20.713125X_2+2.676375X_3$ $+0.056075X_1^2+0.281625X_1X_2+0.477500X_2^2$ $+0.009387X_1X_3-0.011937X_2X_3-0.038725X_3^2$	0.8562	0.0537
Total flavonoid	$Y_{TF}=206.325625-1.976875X_1-5.601250X_2-0.036187X_3$ $+0.012975X_1^2+0.012125X_1X_2+0.305000X_2^2$ $+0.000362X_1X_3+0.015938X_2X_3+0.005419X_3^2$	0.9787	0.0002
Electron donating ability	$Y_{EDA}=75.841250-0.124500X_1+1.268438X_2+0.458938X_3$ $-0.001775X_1^2+0.000812X_1X_2-0.084687X_2^2$ $+0.011731X_1X_3-0.002781X_2X_3-0.012366X_3^2$	0.8344	0.0770
pH 1.2	$Y_{pH1.2}=1.650313+1.445875X_1+6.798125X_2+0.532937X_3$ $-0.010100X_1^2-0.009125X_1X_2-0.164063X_2^2$ $+0.003713X_1X_3-0.063688X_2X_3-0.005709X_3^2$	0.8664	0.0444
Nitrite-scavenging ability	pH 3.0 $Y_{pH3.0}=37.568125-0.459250X_1-2.704375X_2+0.646563X_3$ $+0.002650X_1^2+0.077125X_1X_2-0.131875X_2^2$ $+0.001100X_1X_3-0.005500X_2X_3-0.008012X_3^2$	0.9339	0.0065
pH 4.2	$Y_{pH4.2}=31.860000-1.354250X_1+4.579063X_2+0.783875X_3$ $+0.011275X_1^2-0.000536X_1X_2-0.227813X_2^2$ $-0.000781X_1X_3-0.027406X_2X_3-0.005528X_3^2$	0.8986	0.0212
Oxygen radical absorbancy capacity	$Y_{ORAC}=749.778125-57.866000X_1+634.075000X_2+49.951375X_3$ $+0.471350X_1^2+0.695750X_1X_2-34.264375X_2^2$ $-0.067850X_1X_3-3.770625X_2X_3-0.202006X_3^2$	0.8383	0.0725

X<sub>1</sub> : extraction temperature(°C), X<sub>2</sub> : extraction time(hr), X<sub>3</sub> : ethanol concentration(%)

Table 5 Regression analysis for regression model of physiochemical properties in extraction condition of *Lespedeza cuneata*

Extract condition	F-Ratio							ORAC
	Yield	Total polyphenol	Total flavonoid	Electron donating ability	Nitrite-scavenging ability			
					pH 1.2	pH 3.0	pH 4.2	
Extraction temperature	7.64**	2.70	2.37*	1.46*	2.42	9.55**	1.68	0.39
Extraction time	1.74	0.45	0.93	0.04	2.37	1.26	2.10	5.26*
Ethanol concentration	13.26***	3.75*	67.09***	4.84**	6.30**	8.56**	5.34**	1.98*

\*Significant at 10% level ; \*\*significant at 5% level ; \*\*\*significant at 1% level

있다(Koh YJ 등 2008). 라디칼 소거작용은 인체의 질병과 노화를 방지하는데 대단히 중요한 역할을 한다. 따라서 전자공여능 측정은 DPPH 라디칼 소거법으로 측정하며, DPPH법은 tocopherol, ascorbate, flavonoid 화합물, 방향족 아민류, Maillard형 갈변 생성물질, peptide 등의 항산화 활성을 나타내는 생리활성 물질에 의해 환원됨으로서 짙은 자색이 발생

되는 정도에 따라 항산화 효과를 수소공여능으로 측정하는 방법으로 알려져 있다(Blois MS 1958).

야관문 에탄올 추출조건에 따른 전자공여능은 Table 3에 나타내었으며, 전자공여능 변화에 대한 반응표면은 Fig. 1에 나타내었다. 추출조건에 있어 추출온도, 추출시간 및 에탄올 농도에 따른 전자공여능의 변화에 대한 반응표면 회귀식은

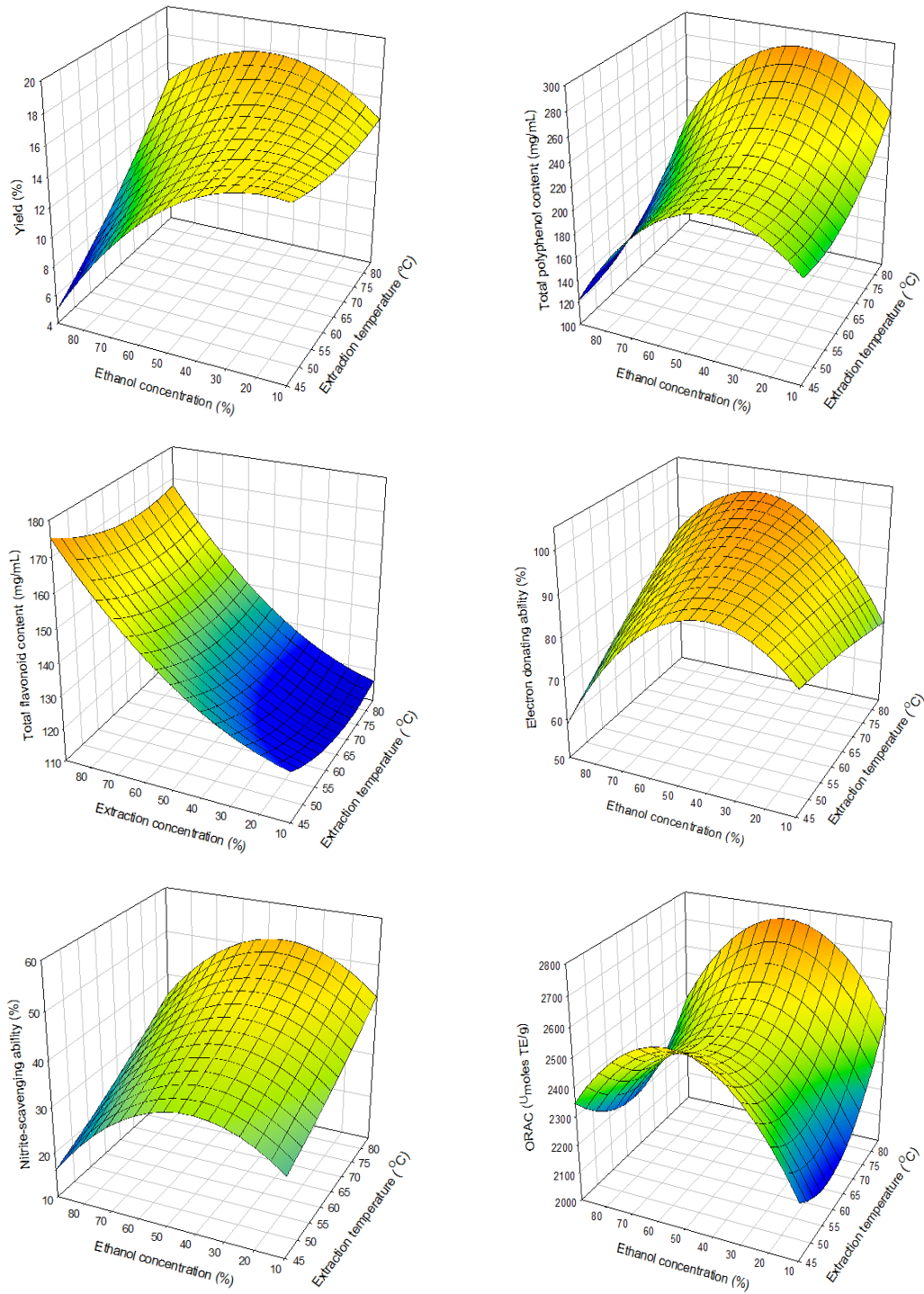


Fig. 1 Response surface for the effects of extraction conditions on yield, total polyphenol, total flavonoid, electron donating ability, nitrite scavenging activity, and ORAC of *Lespedeza cuneata* by ethanolic extraction.

Table 4와 같으며, 전자공여능에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8344로 10%이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 야관문 추출물의 전자공여능은 추출온도보다는 에탄올 농도에 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 5). 이러한 결과는 Yoon SR 등(2003)의 복분자 추출조건에서 전자공여능이 에탄올 농도에 의해 크게 영향을 받고 있다는 보고와 같은 경향을 나타내었으며, 최대값을 나타내는 에탄올 농도가 40~60%로 유사한 경향이였다.

#### 4. 아질산염 소거능의 변화

아질산염은 니트로사민의 전구체인 nitrous anhydride( $N_2O_3$ )와 같은 활성 니트로소화 물질을 생성하고, 이 nitrous anhydride가 2차 아민과 결합하여 발암물질인 N-nitrosamine을 생성하는 것으로 알려져 있다(Davies R 등 1980). Kang YH 등(1996)은 방향족 화합물인 polyphenol 화합물이 아질산염을 효과적으로 분해하여 발암성 nitrosamine의 생성을 억제한다고 보고하였다. 이들은 니트로사민 생성의 기질인 아민과 경쟁적으로 작용하며, 생성억제 정도는 상호간의 농도 및 pH에 의해 영향을 받는다. 최근에는 니트로사민 생성억제 인자의 함량이 높은 천연추출물에서 아질산염 소거능에 대한 연구가 이루어지고 있다.

추출조건에 따른 아질산염 소거능은 Table 3에 나타내었다. pH가 낮을수록 아질산염 소거능이 증가하였으며, 추출온도의 영향은 뚜렷하게 나타나지 않았으나 에탄올 농도에 영향을 받을 수 있었다. pH에 따른 아질산염 소거능에 대한 추출물의 회귀식을 Table 4에 나타내었다. 아질산염 소거능에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 pH 1.2, 3.0 및 4.2가 각각 0.8664, 0.9339 및 0.8986이었고, 5%이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. pH 조건에 따른 야관문의 아질산염 소거능에서 최대점을 보인 pH 3.0에서는 추출온도가 증가할수록 에탄올 농도 범위가 40~60% 범위에서 우수함을 확인하였다(Fig. 1). Table 5에서 보는 바와 같이 아질산염 소거능에 대한 pH별 추출조건의 영향은 추출온도 보다는 에탄올 농도가 영향이 큰 것으로 나타났다. Noh KS 등(2002)은 미나리과 산채 추출물의 아질산염 소거능이 pH가 낮을수록 높다고 보고하였고, Lee GD 등(2000)은 차류, 약용 식물류, 해조류, 채소류 및 과일류의 아질산염 분해작용이 pH 1.2에서 가장 크다고 보고한 바 있으며 그 외 많은 연구에서도 낮은 pH에서의 아질산염 소거능이 우수함을 알 수 있었다. 아질산염과 아민류가 반응하여 결합된 발암성 니트로사민은 강산성 조건 특히 인체나 동물 위내의 pH 조건에서 용이하게 생성되므로 야관문 에탄올 추출물이 강산성 조건하에서 아질산염 분해능이 크다는 사실은 위내에서 니트로사민의 생성억제에 기여하리라 생각된다.

#### 5. ORAC(Oxygen Radical Absorbance Capacity) 변화

본 연구에서 사용한 ORAC 방법은 radical chain reaction의 가장 핵심적인 단계인 수소전자 전달과 연관하여

AAPH(2,2'-azobis-2-methyl-propanimidamide, dihydrochloride)에 의해 생성된 자유라디칼에 대한 항산화 물질의 소거 능력, 즉 radical chain breaking antioxidant capacity를 측정함으로써 식품내에 존재하는 hydrophobic 성분과 hydrophilic 성분 모두에 반응하기 때문에 응용범위가 넓은 장점을 가지고 있다(Prior RL 등 2003). 또한 항산화 대조 물질로 수용성 비타민 E의 일종인 Trolox를 대조 표준액으로 사용하였고, 과산화 라디칼의 생성을 위해 AAPH를 사용하였으며 검체 용액과 표준액에 fluorescent를 결합시켜 형광 검출기에 의해 시간 경과에 따른 peroxy radical의 생성과 소멸에 의한 fluorescent의 감소율을 측정하는 방법으로 측정 감도가 예민하여 정확도를 높일 수 있어 많건, 용되고 있다(Kim SH와 Kim YM 2007). 야관문 에탄올 추출조건별 ORAC은 Table 3에서와 같이 1,636.47~2,696.99  $\mu$ molal의 TE/g의 범위였으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의  $R^2$ 는 0.8383로 10%이내의 유의수준에서 인정되었다(Table 4). 추출온도가 증가할수록 ORAC값이 증가하였으며 에탄올 농도 40~60%에서 가장 우수하였다(Fig. 1). 야관문 에탄올 추출물의 추출조건에 대한 영향은 추출온도보다는 추출시간과 에탄올 농도에 영향을 많이 받을 수 있었다(Table 5). Shelly H 등(2010)은 항산화 효과가 우수한 Acai에 대한 연구에서 60% 메탄올을 사용하여 추출한 Acai 동결건조 분말에 대한 ORAC값은 2,589  $\mu$ moles TE/g을 보인다고 하였는데 야관문은 Acai와 비교시 유사한 항산화 활성을 보여주어 항산화 소재로 활용가능함을 확인하였다.

#### 6. 최적 추출조건의 예측

야관문의 추출조건을 최적화하기 위하여 추출물의 특성인 조건별 추출물의 수율, 총 폴리페놀함량, 전자공여능, 아질산염소거능 및 ORAC에 대해 contour map을 superimposing하여 최적 추출조건 범위를 예측하였다. Fig. 2에서와 같이 추출물의 품질특성(반응변수,  $Y_1$ - $Y_5$ )을 대상으로 하였을 경우 반응표면이 중복된 부분에 대한 최적추출조건의 범위는 추출온도 78~85 $^{\circ}$ C, 추출시간 6~7시간, 에탄올 농도 38~60%이었다.

Table 6 Optimization of ethanol extraction condition for response variables by superimposing contour maps

Extraction conditions	Optimum ranges
Extraction temperature ( $^{\circ}$ C)	78~85
Extraction time (hr)	6~7
Ethanol concentration (%)	38~60

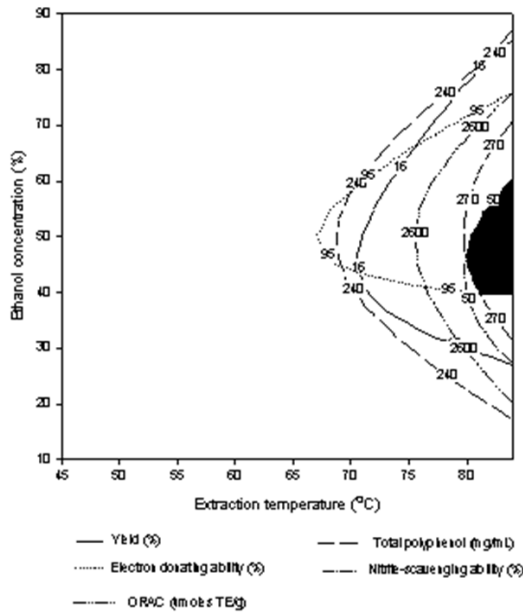


Fig. 2 Superimposing contour map of optimized conditions for the yield, total polyphenol, electron donating ability, nitrite scavenging activity, and ORAC of *Lespedeza cuneata* as functions of extraction temperature, extraction time (6.5 hr) and ethanol concentration by ethanolic extraction.

#### IV. 요약

본 실험은 반응표면분석법을 이용하여 야관문 에탄올 추출물의 기능성분에 대한 추출조건을 최적화하였다. 추출조건에 따른 수율의 최대값은 17.6%이었고, 중심합성계획에 의한 야관문의 추출조건별 총 폴리페놀 및 총플라보노이드 함량에 대한 반응표면 회귀식의  $R^2$ 는 각각 0.8562와 0.9787로 10% 및 1%이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 야관문 에탄올 추출물의 폴리페놀 및 플라보노이드 함량 변화는 추출온도와 추출시간보다는 에탄올 농도에 크게 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 전자공여능에 대한 회귀식의  $R^2$ 는 0.8344로 10% 이내의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. pH 조건에 따른 야관문의 아질산염 소거능에서 최대점을 보인 pH 3.0에서는 추출온도가 증가할수록 에탄올 농도 범위가 40~60% 범위에서 우수함을 확인하였다. ORAC은 1,636.47~2,696.99  $\mu$ moles TE/g의 범위였으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의  $R^2$ 는 0.8383로 10%이내의 유의수준에서 인정되었고 추출온도보다는 추출시간과 에탄올 농도에 영향을 받는 것으로 나타났다. 야관문의 추출조건을 최적화하기 위하여 추출물의 특성인 조건별 추출물의 수율, 총 폴리페놀함량, 전자공여능, 아질산염 소거능 및 ORAC에 대해 contour map을 superimposing하여

얻은 최적조건의 범위는 추출온도 78~85°C, 추출시간 6~7시간, 에탄올 농도 38~60%이었다.

#### V. 감사의 글

본 연구는 지식경제부의 지역산업기술개발사업(과제번호: A000200004)의 지원에 의한 연구결과 일부로 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

AOAC. 1990. Official methods of analysis 15th ed. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC, USA.

Atsushi N, Nazuko H. 1980. C-Glycosylflavones in *Lespedeza cuneata*. Chem Pharm Bull 28:964-965

Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature 26:1199-1204

Choi JS, Cho CS, Kim CJ. 2010. Cytoprotective effect of *Lespedeza cuneata* Extract on glucose toxicity. J Korean Oriental Med 31(4):79-100

Davies R, Massey RC, McWeeny DJ. 1980. The catalysis of the N-nitrosamine of secondary amines by nitrosophenols. J Food Chem 6:115-122

Davis WB. 1947. Determination of flavonones in citrus fruits. Anal Chem 19:476

Fridovich I. 1989. Superoxide dismutase an adaption to paramagnetic gas. J Biol Chem 264: 7761-7762

Gontard N, Guilbert S, Cuq JL. 1992. Edible wheat gluten films: Influence of the main process variables on film properties using response surface methodology. J Food Sci 57:190-196

Gray JI, Dugan LR. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food system. J Food Sci 40:981-984

Halliwell B, Aruoma OJ. 1991. DNA damage by oxygen-derived species. FEBS Lett 281:9-19

Kang YH, Park YK, Lee GD. 1996. The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. Korean J Food Sci Technol 28(2):232-239

Kim HK, Do JR, Hong JH, Lee GD. 2005. Optimization of extraction conditions for cabbage. J Korean Soc Food Sci Nutr 34(10):1625-1632

Kim JO, Kwon ST, Lee GD, Hong JH, Moon DH, Kim TW, Kim DI. 2008. Optimization of extraction condition on fig (*Ficus carica*



- L.) by response surface methodology. Korean J Food Preserv 15(1):66-73
- Kim SH, Kim YM. 2007. Determination of the antioxidant capacity of Korean ginseng using an ORAC assay. J East Asian Soc Dietary Life 17(3):393-401
- Kim SJ, Kim DW. 2007. Antioxidative activity of hot water and ethanol extracts of *Lespedeza cuneata* seeds. Korean J Food Preserv 14(3):332-335
- Kim SM, Cho YS, Sung SK. 2001. The antioxidant ability and nitrite scavenging ability of plant extracts. Korean J Food Sci Technol 33(6):626-632
- Koh YJ, Cha DS, Choi HD, Park YK, Choi IW. 2008. Hot water extraction optimization of Dandelion leaves to increase antioxidant activity. Korean J Food Sci Technol 40(3):283-289
- Lee DS, Jeong GS, An RB, Bin Li, Erisa B, Kim YC. 2008. Search for plant extracts with protective effects of pancreatic beta cell against oxidative stress. Kor J Pharmcogn 39(4):335-400
- Lee EJ, Kim JS, Kwon JH. 2008. Optimization of microwave-assisted extraction conditions for total catechin and electron donating ability of grape seed extracts. Korean J Food Preserv 15(6):840-846
- Lee GD, Lee JE, Kwon JH. 2000. Application of response surface methodology in food industry. Food Industry 33:33-45
- Min DL, Lim SK, Ahn JB, Choi YJ. 2010. Optimization of ethanol extraction conditions for antioxidants from *Zizyphus jujuba* Mill. leaves using response surface methodology. Korean J Food Sci Technol 42(6):733-738
- Noh KS, Yang MO, Cho EJ. 2002. Nitrite scavenging effect of *Umbelliferaeaceae*. Korean J Soc Food Cookery Sci 18(1):8-12
- Park KJ, Lim JH, Kim BK, Jeong JW, Kim JC, Lee MH, Cho YS, Jung HY. 2009. Optimization of extraction conditions to obtain functional components from buckwheat(*Fagopyrum esculentum* M.) sprouts, using response surface methodology. Korean J Food Preserv 16(5):734-741
- Park NY, Lee GD, Jeong YJ, Kwon JH. 1998. Optimization of extraction conditions for physicochemical properties of ethanol extracts from *Chrysanthemum boreale*. J Korean Soc Food Sci Nutr 27(4):585-590
- Prior RL, Hoang H, Gu L, Wu X, Bacchiocca M, Howard L, Hampsch-Woodill M, Huang D, Ou Jacob R. 2003. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity oxygen radical absorbance capacity (ORAC) caplasma and other biological and food samples. J Agri Food Chem 51:3273-3279
- Shelly H, Chung H, Lei Z, Jianrong L, Lee YW, Yumin D, Kequan Z. 2010. Antiproliferative and antioxidant properties of anthocyanin-rich extract from Acai. Food Chem 118:208-214
- Singleton VL, Rossi JA. 1965. Colorimetry of total phenolics with phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. Am J Enol Viticult 16:144-158
- Talcott ST, Lee JH. 2002. Ellagic acid and flavonoid antioxidant content of mascadine wine and juice. J Agri Food Chem 50:3186-3192
- Yoon SR, Jeong YJ, Lee GD, Kwon JH. 2003. Changes in phenolic compounds properties of *Rubi Fructus* extract depending on extraction conditions. J Korean Soc Food Sci Nutr 32(3):338-345