

구기자 추출물의 최적 항산화 추출조건 모니터링

김학윤¹ · 이기동^{2†}

¹계명대학교 환경학부, ²중부대학교 바이오융합학부
(2017년 7월 16일 접수: 2017년 8월 20일 수정: 2017년 8월 29일 채택)

Monitoring for optimum antioxidant extraction condition of *Gugija (Lycium chinensis Mill)* extract

Hak-Yoon Kim¹ · Gee-Dong Lee^{2*}

¹Faculty of Environmental Science, Keimyung University, Daegu 42601, Korea
²Division of Integrated Biotechnology, Joongbu University, Geumsan 32713, Korea
(Received July 16, 2017; Revised August 20, 2017; Accepted August 29, 2017)

요약 : 본 연구는 구기자 항산화 성분의 최적 추출과 항산화 활성의 변화를 모니터링 하였다. 건조 구기자의 추출 조건은 에탄올 농도(X_1 , 0~80%) 및 추출 시간(X_2 , 1~5 hr)이며, 종속변수로는 수율, 안토시아닌, 플라보노이드 및 DPPH 라디칼 소거능으로 반응표면분석을 실시하였다. 가용성 고형분 수율, 안토시아닌, 플라보노이드 및 DPPH 라디칼 소거능에 대한 회귀식의 R^2 은 각각 0.9066, 0.9859, 0.8645, 0.9464로 1~10%의 유의수준에서 유의성이 인정되었다. 건조 구기자 가용성 고형분 수율이 가장 높은 추출 조건은 에탄올 농도 8.25%에서 4.22 hr 추출한 것(23.12%)으로 나타났다. 안토시아닌이 가장 높은 추출 조건은 에탄올 농도 79.98%에서 3.06 hr 추출한 것(흡광도 1.43)으로 나타났다. 플라보노이드의 가장 높은 추출 조건은 에탄올 농도 67.02%에서 3.37 h 추출한 것(3,100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$)으로 나타났다. 그리고 DPPH 라디칼 소거능이 가장 높은 추출 조건은 에탄올 농도 69.81%에서 1.67 h 추출한 것(96.93%)으로 나타났다. 안토시아닌, 플라보노이드 및 DPPH 라디칼 소거능에 대한 등고선도를 겹쳐 그려 얻은 최적 조건(에탄올 농도 70% 및 추출 시간 2.5 hr)으로 추출된 추출물의 안토시아닌은 1,0080(흡광도) 이었으며, 플라보노이드 함량은 3,145 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 그리고 DPPH 라디칼 소거능은 97%로써 증류수로 1시간 추출한 대조구(안토시아닌 0.4652(흡광도), 플라보노이드 1,633 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 및 DPPH 라디칼 소거능 87%)에 비해 높은 항산화 성분 추출 및 항산화 효과를 나타내었다.

주제어 : 구기자, 항산화물질, 추출, 최적화, 모니터링

Abstract : This study optimized the extraction of antioxidants from *Gugija (Lycium chinensis Mill)*. To determine operational parameters, including ethanol concentration (X_1 , 0~80%) and extraction time (X_2 , 1~5 hr), response surface methodology was applied to monitor yield, anthocyanins, flavonoids and DPPH radical scavenging activity. Coefficients of determinations (R^2) of the models were range of 0.8645~

[†]Corresponding author
(E-mail: geedlee@jbm.ac.kr)

0.9859 ($p < 0.01 \sim 0.1$) in dependant parameters. Yield of *Gugija* extracts was maximized 23.12% in extraction conditions of 4.22 h at 8.25% ethanol. Anthocyanins was maximized 1.43 (OD in 530 nm) in extraction conditions of 3.06 h at 79.98% ethanol. Flavonoids was maximized 3,100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ in extraction conditions of 3.37 h at 67.02% ethanol. DPPH radical scavenging activity was maximized 96.93% in extraction conditions of 1.67 h at 69.81% ethanol. Optimum extraction conditions (2.5 h extraction at 70% ethanol) were obtained by superimposing the contour maps with regard to anthocyanins, flavonoids and DPPH radical scavenging activity of *Gugija*. Maximum values of anthocyanins, flavonoids and DPPH radical scavenging activity in optimum extraction condition were 1.0080 (OD in 530 nm), 3,145 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 96.96%, respectively. But values of anthocyanins, flavonoids and DPPH radical scavenging activity in water extraction condition (1 h at water) were 0.4652 (OD in 530 nm), 1,633 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 86.98%, respectively.

Keywords : *Gugija* (*Lycium chinensis* Mill), extraction, antioxidants, optimization, monitoring

1. 서론

구기자(*Lycii fructus*)는 가지과에 속하며 한쪽이 뾰족한 방추상으로써 길이 2~3cm, 지름 5~10mm이다. 과피는 적색 또는 어두운 적색이고 바깥 면은 주꿀주꿀하며 속에는 황색을 띤 백색의 씨가 들어 있다[1]. 구기자열매는 8월부터 11월까지 장시간 수확하므로 많은 양을 수확할 수 있고 손으로 직접 하나하나 수확함으로써 시골과 인근 도시의 유희 노동력을 활용할 수 있는 노동 집약적 고소득 작목이다.

우리나라 구기자의 재배면적은 2001년 261 ha에서 2009년 144 ha 까지 약 45%나 감소하였다. 이러한 지속적인 재배면적 감소는 2010년 259 ha로 반등되어, 전년도 대비 79% 재배면적의 증가가 나타났다. 이와 같이 구기자 재배면적의 큰 반등으로 구기자 생산량 및 가격의 불안정이 심화되므로, 구기자 농가의 소득을 높이기 위해서는, 구기자 산업을 1차 산업 농업 위주에서 탈피하여 다양한 2차 산업 가공식품 생산으로 전환할 필요가 있다[2].

구기자는 수확시기에 따라 성분이 다른 것으로 알려져 있다. 구기자의 당은 8월에 수확한 것보다 11월에 수확한 것이 더 높으며, Betaine 또한 수확시기가 늦을수록 더 많은 것으로 알려져 있다. 총 페놀성 화합물은 구기자 품종에 따라 다르나 8월과 9월에 수확한 것이 더 많고 전자공여능 등 항산화성은 11월에 늦게 수확한 구기자가 높은 것으로 알려져 있다[3].

구기자 주요 성분으로는 betaine, zeaxanthin,

carotene, thiamine, nicotinic acid, ascorbic acid 등이 있고, 잎에는 rutin, daucosterin, betaine 등이 들어 있으며, 근피에는 betaine, linoleic acid 등이 포함되어 있다[1]. 구기자 열매의 phytochemicals은 rutin, kukoamine, ρ -coumaric acid, cerebroside, carotenoid, β -sitosterol, zeaxanthin, physalien, cholin, stigmasterol, campesterol, cholesterol, cycloeucaleanol, obtusifoliol, gramisterol, citrostadienol, cycloartanol, taurine, γ -aminobutric acid 등[4] 아주 다양한 성분이 발견되고 있다.

구기자는 오래전부터 장수식품으로 알려져 많은 사람들이 차로 즐겨먹어 왔다. 이러한 구기자 항산화성에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔으며, 구기자 에탄올 및 물 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 물 추출물이 에탄올 추출물보다 높게 나타났다으며, 페놀성 화합물인 chlorogenic acid 함량이 물 추출물이 에탄올 추출물보다 더 많은 것으로 보고되었으나[5], 구기자를 저농도의 에탄올로 추출한 추출물이 물로 추출한 물 추출물보다 페놀성 화합물이 많이 추출되었고 ABTS 라디칼 소거능 및 Fe^{2+} 킬레이트 활성 또한 증가되었다[6]. 플라보노이드는 대표적인 식물성 항산화 성분으로 알려져 왔으며, 와송의 플라보노이드는 물 추출보다 70% 에탄올 추출에서 더 많이 추출되었고 DPPH 라디칼 소거능 또한 물 추출물보다 70% 에탄올 추출물에서 높게 나타난다고 보고하였다[7].

따라서 본 연구에서는 청양군에서 고소득 작목

으로 재배되어 많이 판매되고 있는 구기자의 항산화 성분인 안토시아닌, 플라보노이드 등을 효율적으로 추출함으로써 항산화 효과를 모니터링하고 그 추출조건을 최적화 하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험재료 및 시약

본 실험에 사용된 구기자(*Lycium chinensis* Mill)는 충남 청양군 청양구기자농협에서 건조 구기자를 구입하여 시료로 사용하였다. 구기자의 전처리하는 건조구기자를 분쇄기(Samsung Pharmaceutical Machine, Seoul, Korea)로 마쇄하여 20~40 메쉬 분말을 추출시료로 사용하였다. 그 외 시약은 HCl(GSLAB TECH, Daejeon, Korea), aluminum chloride(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), naringin(Sigma Aldrich Co.), DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl, Sigma Aldrich Co.) 및 absolute ethanol(Samchun Chemical, Seoul, Korea)을 사용하였다.

2.2. 실험계획 및 반응표면분석

구기자의 추출조건에 따른 항산화 성분 및 항산화 효과의 변화를 최적화하고자 실험계획은 중심합성계획법[8]에 의하여 설계하였고, 반응표면회귀분석을 위해서는 SAS program(Statistical Analysis System, ver. 8.01, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 사용하였다.

중심합성실험계획에 따라 추출용매로써 에탄올의 농도(0, 20, 40, 60, 80%) 및 추출 시간(1, 2, 3, 4, 5 h)은 -2, -1, 0, 1, 2 다섯 단계로 부호화 하였으며, 실험계획은 Table 1에 나타내었다. 종속변수로는 수율, 안토시아닌, 플라보노이드 함량 및 DPPH 라디칼 소거능으로 하였다.

2.3. 수율 및 안토시아닌 측정

수율은 건조구기자 추출용액 10 mL를 항량을 구한 수기에 취하여 105°C에서 증발 건조시킨 후 그 무게를 측정하였으며, 추출액 조제에 사용된 건물 시료량에 대한 백분율로써 고형분 함량을 나타내었다.

구기자의 안토시아닌 측정[9]은 구기자 분말을 1% HCl-ethanol-물로 색소를 추출 및 여과하여 사용하였으며, 추출된 색소는 시료 대비 3배 희

석된 것을 530 nm에서 흡광도를 UV spectrophotometer(UV1601, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 측정하였다.

2.4. 플라보노이드 함량 측정

전체 플라보노이드 함량은 aluminium chloride 비색법[10]을 이용하여 정량하였다. 분석시료는 시험용액 0.5 mL, 95% ethanol 1.5 mL, 10% aluminum chloride 0.1 mL, 1 M NaOH 1 mL 및 deionized water(DIW) 2.8 mL를 혼합하여 상온에서 30분간 반응을 시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질의 제조는 naringin을 methanol에 용해하여 100 mg/100 mL로 만든 후 DIW로 희석하여 검량곡선을 작성 후 시료 100g 중 μg naringin으로 나타내었다.

2.5. DPPH 라디칼 소거능 측정

중심합성계획에 의한 구기자 추출물의 항산화성은 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)를 이용한 방법[11]으로 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능 측정을 위한 DPPH용액은 DPPH시약 16 mg을 100 mL absolute ethanol에 용해한 후 증류수 100 mL로 정용, 여과하여 DPPH용액으로 사용하였으며, DPPH용액 1.6 mL에 시료 대비 16배 희석된 시험용액 0.4 mL를 가하여 vortex mixer로 10초간 혼합하여 10분 간 방치(암실)한 후 528 nm에서 흡광도를 측정한다. DPPH 라디칼 소거능은 시료첨가구와 무첨가구(시료대신 증류수 0.4 mL)의 흡광도 차이를 배분율로 나타낸다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거능(\%)} = 1 - (A/B) \times 100$$

A : 시료 첨가구의 흡광도

B : 시료 무첨가구의 흡광도

3. 결과 및 고찰

3.1. 수율의 변화

건조 구기자의 추출 수율의 변화를 관찰해 본 결과, 에탄올 농도 및 추출 시간의 변화에 따른 가용성 고형분 수율의 변화는 20.85~23.45%의 차이를 나타내었다(Table 1). 이를 회귀분석한 결과 수율에 대한 모델식의 R^2 은 0.9066으로 5% 이내 유의수준에서 유의성이 인정되었다(Table 2).

Table 1. Experimental data on yield, anthocyanins, flavonoids, and DPPH radical scavenging activity of the dried *Gugija* (*Lycium chinensis* Mill) under different conditions based on central composite design for response surface analysis

| Exp. No. ¹⁾ | Extraction conditions | | Yield (%) | Anthocyanins (OD at 530 nm) ³⁾ | Flavonoids ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) | DPPH radical scavenging activity (%) ⁴⁾ |
|------------------------|---------------------------|---------------------|---------------------|---|---|--|
| | Ethanol concentration (%) | Extraction time (h) | | | | |
| 1 | 60 (1) | 4 (1) | 21.20 ²⁾ | 0.833 | 3,029 | 95.0 |
| 2 | 60 (1) | 2 (-1) | 21.90 | 0.756 | 2,808 | 95.4 |
| 3 | 20 (-1) | 4 (1) | 23.20 | 0.294 | 2,582 | 94.2 |
| 4 | 20 (-1) | 2 (-1) | 23.45 | 0.237 | 2,166 | 91.7 |
| 5 | 40 (0) | 3 (0) | 22.70 | 0.335 | 3,036 | 94.2 |
| 6 | 40 (0) | 3 (0) | 22.65 | 0.329 | 3,049 | 95.2 |
| 7 | 80 (2) | 3 (0) | 20.85 | 1.422 | 3,114 | 95.9 |
| 8 | 0 (-2) | 3 (0) | 22.70 | 0.243 | 2,218 | 90.5 |
| 9 | 40 (0) | 5 (2) | 22.50 | 0.319 | 2,932 | 95.0 |
| 10 | 40 (0) | 1 (-2) | 22.70 | 0.297 | 2,608 | 94.8 |

¹⁾The number of experimental conditions by central composite design.

²⁾Data were expressed as mean of triplicate determinations.

³⁾Anthocyanins is OD at 530 nm of 3 times dilution extracts

⁴⁾DPPH radical scavenging activity is electron donating ability of 16 times dilution extracts.

Table 2. Polynomial equations calculated by RSM program for the dried *Gugija*

| Responses | Polynomial equations ¹⁾ | R ² | Significance |
|----------------------------------|---|----------------|--------------|
| Yield | $Y_{\text{Yield}} = 22.474851 + 0.031756X_1 + 0.227679X_2 - 0.005625X_1X_2 - 0.000564X_1^2 - 0.019196X_2^2$ | 0.9066 | p < 0.05 |
| Anthocyanins | $Y_{\text{Anthocyanins}} = 0.166497 - 0.010415X_1 + 0.074637X_2 + 0.00025X_1X_2 + 0.000299X_1^2 - 0.011634X_2^2$ | 0.9859 | p < 0.001 |
| Flavonoids | $Y_{\text{Flavonoids}} = 1042.529762 + 34.79881X_1 + 513.047619X_2 - 2.4375X_1X_2 - 0.193527X_1^2 - 51.410714X_2^2$ | 0.8645 | p < 0.10 |
| DPPH radical scavenging activity | $Y_{\text{DPPH}} = 86.232143 + 0.243214X_1 + 1.229762X_2 - 0.03625X_1X_2 - 0.000884X_1^2 + 0.071429X_2^2$ | 0.9464 | p < 0.05 |

¹⁾X₁, Ethanol concentration (%); X₂, Extraction time (h).

건조 구기자의 추출에 따른 수율은 에탄올 농도가 증가할수록 비례적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 추출시간의 변화에 따른 수율의 변화는 거의 없었으나 에탄올이 20% 이하의 낮은 농도에서는 추출시간이 증가할수록 다소 증가하고, 50% 이상의 높은 에탄올 농도에서는 추출시간이 경과할수록 감소하는 경향이였다(Fig. 1). 조건변수들이 수율에 미치는 영향을 알아보기 위해 회귀분석을 통해 F값을 구해 본 결과(Table 3), 에탄올 농도의 영향이 가장 높게 나타나 F값이 12.19로 5%의 유의수준에서 유의성이 인정되었으나, 추출 시간의 영향은 낮게 나타나 F값이 0.49로 유의성이 인정되지 않았다.

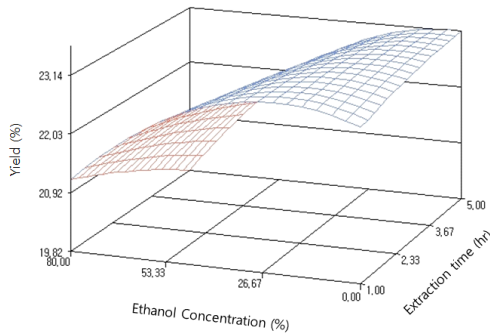


Fig. 1. Response surface for yield of the dried *Gugija* as a function of extraction ethanol concentration and time.

건조 구기자의 수율에 대한 반응표면 형태는 최대점을 나타내었으며, 최소의 수율은 에탄올 농도 79.00%, 추출 시간 3.44 hr에서 20.49%를 나타내었다.

그러나 최대의 수율은 에탄올 농도 8.25%, 추출 시간 4.22 hr에서 23.12%를 나타내었다(Table 4). 구기자의 추출은 대부분 물로 추출하여 차로 마시거나 그 추출물을 이용하여 다양한 음료제품을 만들고 있으며[12], 이는 물로 추출할 경우 추출 수율이 높아 유용성분을 많이 회수할 수 있어 즐겨 사용하였던 것으로 여겨진다.

3.2. 안토시아닌의 변화

건조 구기자의 추출에 따른 안토시아닌의 변화를 관찰해 본 결과, 시료 대비 3배로 희석한 안토시아닌의 흡광도가 0.243~1.422로 에탄올 농도에 따라 큰 차이를 나타내었다(Table 1). 이를 회귀분석한 결과 안토시아닌의 R²은 각각 0.9859로 1% 이내 유의수준에서 유의성이 인정되었다(Table 2).

건조 구기자의 안토시아닌 변화는 수율과는 정반대의 반응표면 형태를 나타내어 에탄올 농도 20% 이상에서 에탄올 농도가 증가할수록 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 추출시간의 변화에 따른 안토시아닌의 변화가 거의 없어 1시간의 추출로 안토시아닌의 추출이 충분히 이루어졌음을 알 수 있었다(Fig. 2). Kim[13]이 안토시아닌이 풍부한 홍жат, 맨드라미 및 비트의 20% 에탄올 추출에서 맨드라미의 안토시아닌이 가장 잘 추출되어 안토시아닌의 종류에 따라 추출특성이 다를 것으로 여겨진다. 에탄올 농도와 추출 시간이 안토시아닌의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위해 회귀분석을 통해 F값을 구해 본 결과(Table 3), 에탄올 농도의 영향이 가장 높게 나타나 F값이 85.92로 1%의 유의수준에서 유의성이 인정

Table 3. Regression analysis for regression model of yield, anthocyanins, flavonoids, and DPPH radical scavenging activity of the dried *Gugija*

| Regression model | F-value | |
|---------------------------|---------------------------|---------------------|
| | Ethanol concentration (%) | Extraction time (h) |
| Y _{Yield} | 12.19 ^{**1)} | 0.48 |
| Y _{Anthocyanins} | 85.92 ^{***} | 0.35 |
| Y _{Flavonoids} | 7.22 ^{**} | 1.72 |
| Y _{DPPH} | 21.89 ^{***} | 2.50 |

¹⁾**Significant at 5% level : ***Significant at 1% level.

Table 4. Estimated levels of optimum extraction conditions for the dried *Gugija*

| Responses | Extraction conditions | | | | Estimated responses | | Morphology |
|---|---------------------------|-------|---------------------|------|---------------------|----------|--------------|
| | Ethanol concentration (%) | | Extraction time (h) | | Max. | Min. | |
| | Max. | Min. | Max. | Min. | | | |
| Yield (%) | 8.25 | 79.00 | 4.22 | 3.44 | 23.12 | 20.49 | Maximum |
| Anthocyanins (OD) | 79.98 | 19.39 | 3.06 | 1.29 | 1.43 | 0.16 | Saddle point |
| Flavonoids ($\mu\text{g}/100\text{ g}$) | 67.02 | 4.42 | 3.37 | 2.09 | 3,100.05 | 2,016.63 | Maximum |
| DPPH radical scavenging activity (%) | 69.81 | 3.49 | 1.67 | 2.18 | 96.93 | 89.82 | Saddle point |

되었으나, 추출 시간의 영향은 낮게 나타나 F값이 0.35로 유의성이 인정되지 않았다.

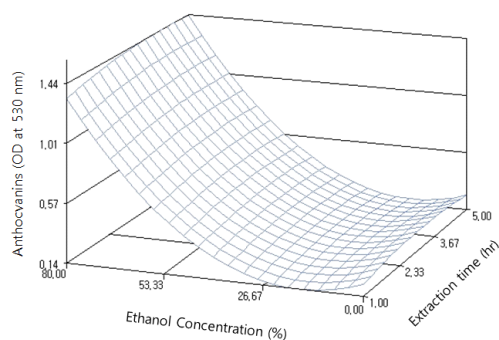


Fig. 2. Response surface for anthocyanins of the dried *Gugija* as a function of extraction ethanol concentration and time.

건조 구기자의 안토시아닌에 대한 반응표면 형태는 안장점(saddle point)을 나타내었으며, 최소의 수율은 에탄올 농도 19.39%, 추출 시간 1.29 hr에서 1.16(흡광도)을 나타내었다. 그러나 최대의 수율은 에탄올 농도 79.98%, 추출 시간 3.06 hr에서 1.43(흡광도)을 나타내었다(Table 4). 건조 구기자의 안토시아닌의 추출을 위해서는 30% 이상의 에탄올로 추출하는 것이 더 많은 안토시아닌을 얻을 수 있는 것으로 나타났으며, 에탄올 농도를 80%까지 높일수록 급격히 증가하는 것을 확인 할 수 있었다. 그러나 구기자 추출물의 수

율은 그와 반대로 30% 이하의 에탄올 추출이나 물 추출에서 더 많은 수율을 얻을 수 있어서 안토시아닌을 목적으로 할 것인지 아니면 전체적인 수율을 목적으로 할 것인지에 따라 추출 조건을 달리해야 할 것으로 모니터링 되었다.

3.3. 플라보노이드의 변화

건조 구기자의 추출에 따른 플라보노이드 변화를 관찰해 본 결과, 건조 구기자 100 g당 플라보노이드 함량이 2,160~3,049 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 에탄올 농도에 따라 다소 차이를 나타내었다(Table 1). 이를 회귀분석한 결과, 플라보노이드 함량의 R^2 은 각각 0.8645로 10% 이내 유의수준에서 유의성이 인정되었다(Table 2).

건조 구기자의 플라보노이드 함량 변화는 안토시아닌과 다소 유사한 반응표면을 나타내었다. 에탄올 농도가 증가할수록 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 추출시간 또한 증가할수록 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 3). 에탄올 농도와 추출시간이 증가할수록 증가하나 60% 이상의 높은 에탄올 농도에서는 시간이 3시간 이상 경과함에 따라 다소 감소하는 경향을 나타내었고(Fig. 3) 높은 에탄올 농도와 추출 온도에서 장시간 추출은 플라보노이드의 변화를 가져와 다소 감소하는 것으로 여겨진다. 하지만, 30% 이하의 낮은 농도의 에탄올 추출물에서는 추출시간이 증가할수록 플라보노이드의 함량이 증가되는 것으로 관찰되었다. Jin 등[7]은 와송추출물의 플라보노이드 함량이 물 추출물에 비해 70% 에탄올 추출물에서 더 높게 추출된다고 보고하였으며, 70% 에

탄올과 70% 메탄올과의 비교에서는 에탄올 추출물 보다 극성이 더 낮은 메탄올 추출물이 더 낮다고 보고하여 본 연구결과와 유사한 것으로 여겨진다. 에탄올 농도와 추출 시간이 플라보노이드 함량 변화에 미치는 영향을 알아보려고 회귀분석을 통해 F값을 구해 본 결과(Table 3), 에탄올 농도의 영향이 상대적으로 높게 나타나 F값이 7.22으로 5%의 유의수준에서 유의성이 인정되었으나, 추출 시간의 영향은 낮게 나타나 F값이 1.72로 유의성이 인정되지 않았다.

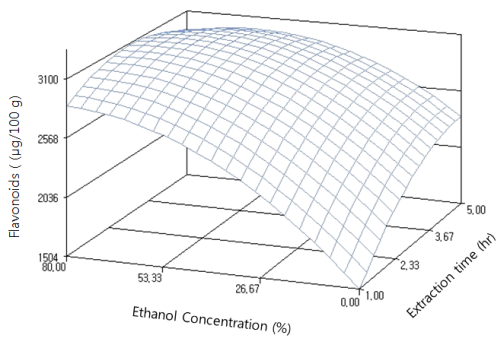


Fig. 3. Response surface for flavonoids of the dried *Gugija* as a function of extraction ethanol concentration and time.

건조 구기자의 플라보노이드 함량에 대한 반응표면은 최대점의 형태를 나타내었으며, 최소의 수율은 에탄올 농도 4.42%, 추출 시간 2.09 hr에서 2,016 µg/100 g을 나타내었다. 그러나 최대의 수율은 에탄올 농도 67.02%, 추출 시간 3.37 hr

에서 3,100 µg/100 g을 나타내었다(Table 4). 건조 구기자의 안토시아닌은 높은 에탄올 농도에서 주로 추출되었지만, 플라보노이드는 에탄올 60% 이상에서 상대적으로 높게 추출되었으며, 에탄올 농도와 추출시간이 증가함에 따라 급격히 증가하여 안토시아닌과 다소 다른 반응표면 패턴을 나타내었다. 플라보노이드의 반응표면은 수율의 반응표면과는 정반대의 경향을 나타내었으며 (Fig. 3), 순수 물로 추출한 물 추출물의 플라보노이드 함량(1,633 µg/100 g)은 70% 에탄올로 추출한 추출물(3,145 µg/100 g)의 약 52% 밖에 추출되지 않음을 확인 할 수 있었다(Table 5). Cheigh 등[14] 및 Lee 등[15]은 에탄올과 물로 흑미강, 개뽕쑥 등을 추출할 경우 에탄올에서 추출한 추출물의 플라노이드 함량이 물에서 추출한 추출물의 플라보노이드 함량 보다 높다고 보고하였다.

따라서 구기자의 항산화 성분을 추출하기 위해서는 전통적인 방식의 물 추출로는 안토시아닌이 거의 추출되지 않고 플라보노이드 또한 충분히 추출할 수 없으므로 최적의 에탄올 농도에서 추출함으로써 항산화 성분이 충분히 추출될 수 있도록 최적 조건설정이 요구된다.

3.4. DPPH 라디칼 소거능의 변화

건조 구기자의 항산화성을 모니터링 하고자 에탄올 농도 및 추출 시간에 따른 DPPH 라디칼 소거능의 변화를 관찰한 결과, 시료 대비 16배로 희석한 구기자 추출물의 DPPH 라디칼 소거능(전자 공여능)은 90.5~95.9%로 에탄올 농도에 따라 다소 차이를 나타내었다(Table 1). 이를 회귀분석한 결과 DPPH 라디칼 소거능의 R²은 각각

Table 5. Experimental values of response variables at the given extraction conditions within the response surfaces

| Extraction conditions ¹⁾ | | Yield (%) | Anthocyanins (OD at 530 nm) | Flavonoids (µg/100 g) | DPPH radical scavenging activity (%) |
|-------------------------------------|---------------------|-----------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------------------|
| Ethanol concentration (%) | Extraction time (h) | | | | |
| 0 | 1 | 22.52 | 0.4652 | 1,633 | 86,98 |
| 70 | 2.5 | 21.39 | 1.0080 | 3,145 | 96,96 |

¹⁾Optimum extraction condition (2.5 h at 70% ethanol) by the response surface methodology and basic condition (1 h in water).

0.9464로 5% 이내 유의수준에서 유의성이 인정되었다(Table 2).

건조 구기자의 DPPH 라디칼 소거능은 플라보노이드 및 안토시아닌과 같이 에탄올 농도가 증가할수록 증가하는 반응표면 패턴을 나타내었다. 플라보노이드와 유사하게 에탄올 농도와 추출 시간이 증가할수록 비례적으로 증가하는 경향을 나타내었으나, 에탄올 농도 50% 이상에서는 추출 시간이 경과할수록 급격히 감소하는 경향을 나타내어 다소 차이를 보였다(Fig. 4). 짧은 추출기간 동안은 플라보노이드와 같이 에탄올 농도가 증가함에 따라 DPPH 라디칼 소거능이 증가하여 플라보노이드의 반응표면 패턴과 유사한 경향으로 나타내어 건조 구기자의 추출에 따른 DPPH 라디칼 소거능에는 플라보노이드가 크게 영향을 미치는 항산화 성분으로 여겨진다. 이러한 현상은 Jin 등[7]의 와송의 플라보노이드 함량과 항산화 활성의 비교 연구에서 플라보노이드가 물 추출물보다 70% 에탄올 추출에서 더 많이 추출되었는데, DPPH 라디칼 소거능 또한 물 추출물보다 70% 에탄올 추출물에서 더 높게 나타난다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 그러나 DPPH 라디칼 소거능의 반응표면이 플라보노이드나 안토시아닌과 유사하지만 일치하지 않는 것으로 보아 항산화 효과에 영향을 미치는 성분이 안토시아닌과 플라보노이드 이외에도 있을 수 있다고 판단된다. 이러한 현상은 Lee[6]가 구기자의 추출연구에서 총페놀성 화합물의 반응표면이 플라보노이드와 유사한 경향을 나타내고 있으나 낮은 에탄올 농도에서만 유사하고 높은 에탄올 농도에서는 급격히 감소하여 다소 다른 패턴을 보이고 있으며, 갈변물질의 반응표면과는 거의 유사한 경향을 나타내는 것으로 보고하여 갈변물질 또한 항산화 효과에 크게 관여할 것으로 보인다. 에탄올 농도와 추출 시간이 DPPH 라디칼 소거능의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 회귀분석을 통해 F값을 구해 본 결과(Table 3), 에탄올 농도의 영향이 상대적으로 높게 나타나 F값이 21.89으로 1%의 유의수준에서 유의성이 인정되었으나, 추출 시간의 영향은 낮게 나타나 F값이 2.50로 유의성이 인정되지 않았다.

건조 구기자의 DPPH 라디칼 소거능에 대한 반응표면은 안장점(saddle point)의 형태를 나타내었으며, 최소의 수율은 에탄올 농도 3.49%, 추출 시간 2.18 hr에서 89.82%를 나타내었다. 그러나 최대의 수율은 에탄올 농도 69.81%, 추출 시

간 1.67 hr에서 96.93%를 나타내었다(Table 4). DPPH 라디칼 소거능이 최대가 되는 에탄올 농도(69%)는 플라보노이드의 최대가 되는 에탄올 농도(67%)와 거의 일치하고 반응표면도 플라보노이드의 반응표면과 가장 유사하였으므로 건조 구기자의 항산화 효과에는 구기자의 플라보노이드 성분이 주로 관여하는 항산화 성분으로 여겨진다.

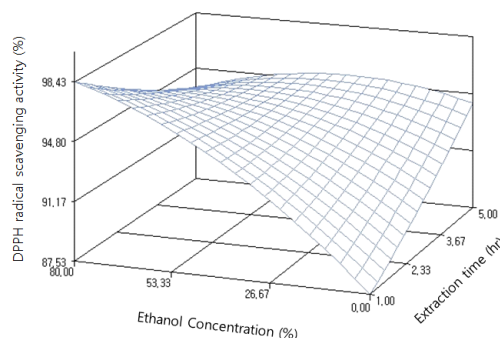


Fig. 4. Response surface for DPPH radical scavenging activity of the dried *Gugija* as a function of extraction ethanol concentration and time.

3.5. 최적 추출조건 설정

항산화 성분이 상대적으로 많아 항산화 효과가 우수한 최적 추출조건을 설정하고자 안토시아닌의 흡광도, 플라보노이드 함량 및 DPPH 라디칼 소거능에 대한 등고선도를 겹쳐 최적 조건을 설정하였다(Fig. 5).

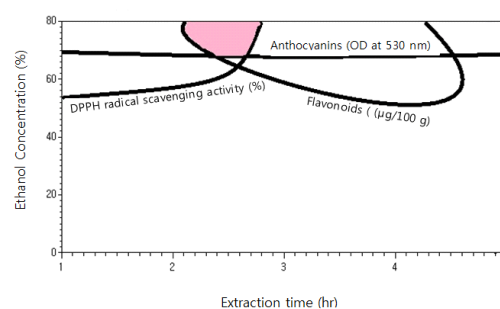


Fig. 5. Superimposed contour map of optimized condition for anthocyanins, flavonoids, and DPPH radical scavenging activity of the dried *Gugija* as a function of extraction ethanol concentration and time.

항산화 성분인 안토시아닌과 플라보노이드가 많이 추출되는 조건은 에탄올 농도가 상대적으로 높은 60% 이상의 에탄올 농도에서 설정되었으며, 에탄올 농도가 높지만 추출 시간이 짧은 조건에서 겹쳐지는 부분을 DPPH 라디칼 소거능이 높은 최적 추출조건으로 설정하여 임의의 최적 조건(에탄올 농도 70% 및 추출 시간 2.5 hr)으로 구기자 추출물을 얻었다.

임의의 최적 추출조건에서 추출된 추출물의 안토시아닌은 1.0080(흡광도)이었으며, 플라보노이드 함량은 3,145 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 그리고 DPPH 라디칼 소거능은 97%로써 물로 1시간 추출한 대조구(안토시아닌 0.4652(흡광도), 플라보노이드 1,633 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 및 DPPH 라디칼 소거능은 87%)에 비해 높은 항산화 성분 추출 및 항산화 효과를 나타내었다.

4. 결론

청양군에서 고소득 작목으로 재배되고 있는 구기자의 항산화 성분인 안토시아닌, 플라보노이드 등을 효율적으로 추출함으로써 항산화 효과를 모니터링하고 그 추출조건을 최적화 하였다. 건조 구기자의 추출 수율은 에탄올 농도 및 추출 시간의 변화에 따른 가용성 고형분 수율의 변화는 21.85~23.20%의 차이를 나타내었다. 건조 구기자의 추출에 따른 안토시아닌은 흡광도가 0.237~1.422로 에탄올 농도에 따라 큰 차이를 나타내었으며, 최대의 흡광도는 에탄올 농도 79.98%, 추출 시간 3.06 hr에서 1.43을 나타내었다. 건조 구기자의 추출에 따른 플라보노이드 함량은 2,160~3,040 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 으로 에탄올 농도에 따라 다소 차이를 나타내었으며, 최대의 수율은 에탄올 농도 67.02%, 추출 시간 3.37 hr에서 3,100 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ 을 나타내었다. 건조 구기자의 DPPH 라디칼 소거능은 90.5~95.9%로 에탄올 농도에 따라 다소 차이를 나타내었으며, 최대의 수율은 에탄올 농도 69.81%, 추출 시간 1.67 hr에서 96.93%를 나타내었다. 항산화 효과가 우수한 최적 추출조건에서 얻은 구기자 추출물의 안토시아닌이 1.0080(흡광도), 플라보노이드 함량이 3,145 $\mu\text{g}/100\text{ g}$, 그리고 DPPH 라디칼 소거능이 96.96%로써 높은 항산화성을 얻을 수 있었다. 이상의 연구 결과를 종합해 볼 때 항산화 효과가

우수한 안토시아닌 및 플라보노이드 등 항산화 성분을 충분하게 추출하기 위해서는 에탄올 60~80%에서 2~3시간 추출하는 것이 적당한 것으로 여겨진다. 그러나 식품산업에 적용하기 위해서는 가용성 고형분의 추출 수율 또한 중요하므로 가용성 고형분이 많이 추출되면서 항산화 성분이 높게 추출되는 추출조건에 대한 연구가 더 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

감사의 글

이 논문은 2016년 (재)청양군부자농촌지원센터 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사를 드립니다.

References

1. Herbal Botany Study, New Herbal Botany. p. 358-359, Suhaksa, (1998).
2. D. S. Yim, "Analysis of production and trade of *Lycium chinense* Mill. in Korea and China", *Korean J Intl Agri*, Vol.24, No.4 pp. 425-428, (2012).
3. S. J. Park, W. J. Park, B. C. Lee, S. D. Kim, M. H. Kang, "Antioxidative activity of different species *Lycium chinense* Miller extracts by harvest time", *J Korean Soc Food Sci Nutr*, Vol.35, No.9, pp. 1146-1150, (2006).
4. H. Amagase, N. R. Farmsworth, "A review of botanical characteristics, phytochemistry clinical relevance in efficacy and safety of *Lycium barbarum* fruit(Goji)", *Food Res Intl*, Vol.44, pp. 1702-1717, (2011).
5. Y. J. Cho, S. S. Chun, W. S. Cha, J. H. Park, K. H. Lee, J. H. Kim, H. J. Kwon, S. J. Yoon, "Antioxidative and antihypertensive effects of *Lycii fructus* extracts", *J Korean Soc Sci Nutr*, Vol.34, No.9, pp. 1308-1313, (2005).
6. G. D. Lee, "Monitoring of antioxidant activities with dried *Gugija(Lycium chinensis* Mill) extraction", *Korean J Food Preserv*, Vol.23, No.6, pp. 859-865,

- (2016).
7. D. H. Jin, H. S. Kim, J. H. Seong, H. S. Chung, "Comparison of total phenol, flavonoid contents, and antioxidant activities of *Orostachys japonicus* A. Berger extracts", *J Envir Sci Intl*, Vol.25, No.5, pp. 695-703, (2016).
 8. R. H. Myers. Response Surface Methodology. p. 132-133, Allyn and Bacon Inc., (1971).
 9. H. G. Choi, H. B. Lee, "Variations of anthocyanin content by relative optical density analysis of colored rice collected from domestic and exotic", *Korea J Breed Sci*, Vol.34, No.1, pp. 350-351, (2002).
 10. E. S. Saleh, A. Hameed, "Total phenolic contents and free radical scavenging activity of certain Egyptian Ficus species leaf samples", *Food Chem*, Vol.114, No.4, pp. 1271-1277, (2009).
 11. M. S. Blois, "Antioxidant determination by the use of a stable free radical", *Nature*, Vol.181, pp. 1199-1200, (1958).
 12. H. S. Ko. Manufacture of functional healthy beverage using *Lycium barbarum* extract and its antioxidant activity. Joongbu University, Master, (2011).
 13. M. H. Kim, "Optimal conditions for extraction of anthocyan from *Celosia cristata* L., *Brassica juncea czerniak et coss*, *Beta vulgaris* L. for manufacture of color *Dongchimi*", *Korea J Food Culture*, Vol.27, No.6, pp. 686-694, (2012).
 14. C. I. Cheigh, E. U. Chung, M. J. Ko, S. W. Cho, P. S. Chang, Y. S. Park, K. A. Lee, H. D. Paik, K. T. Kim, S. I. Hong, M. S. Chung, "Effect of subcritical water for the enhanced extraction efficiency of polyphenols and flavonoids from black rice bran", *Food Eng Prog*, Vol.14, No.4, pp. 335-341, (2010).
 15. S. J. Lee, J. R. Kang, J. G. Kim, S. K. Kang, N. J. Sung, "Establishment of optimum extraction condition for antioxidant activity of *Artemisia annua* L. by response surface methodology", *J Agri & life Sci*, Vol.47, No.2, pp. 103-113, (2013).