

## 반응표면분석법에 의한 어성초와 삼백초 혼합물의 추출조건 최적화

신해현, 강민정<sup>1</sup>, 조형용<sup>1,\*</sup>, 김병철<sup>1</sup>, 조은경<sup>1</sup>  
백석문화대학 외식산업학부, <sup>1</sup>(주)다손

### Optimization of Extraction Conditions for *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Baill Mixture by Response Surface Methodology

Hae-Hun Shin, Min-Jeong Kang<sup>1</sup>, Hyung-Young Cho<sup>1,\*</sup>, Byung-Cheol Kim<sup>1</sup>, Eun-Kyung Cho<sup>1</sup>

Department of Food service industry, BaekSeok College of Cultural Studies, Cheonan 330-705, Korea

<sup>1</sup>Dason Co., Bucheon 303-303, Kyungi-do, Korea

#### Abstract

This study was conducted in order to establish the optimum conditions in obtaining *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Baill mixture extracts. The extraction conditions were based on the central composite experimental design with independent variables(extraction time, ethanol concentration, and *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Baill mixing ratio) and dependent variable (yield, electron donating ability, total polyphenol, total flavonoid, histamine secretion by using human mast cell and *in vitro* tyrosinase inhibition). Response surface methodology(RSM) was applied for the independent variables. The effect of primary variables on electron donating ability(anti-oxidant effect) was significant. The optimum conditions estimated by RSM for extraction of the effective components were 6-12 hr of extraction time, 20-60 % ethanol concentration and 1:1 - 4:1 mixing ratio.

**Key words** : extraction, *Houttuynia cordata* Thunb, *Saururus chinensis* Baill, response surface methodology, optimization

최근에 세계 각국이 천연물 연구에 관심을 가지고 이 분야 연구가 강화되고 있다. 국내에서도 천연물로부터 의약품 개발은 물론, 특수 기능성 식품재료, 향료, 염료, 화장품의 개발 등은 큰 부가가치를 가질 수 있으며, 이를 이용한 다양한 가공품 생산으로 국산 한약재 신규 수요를 창출하는데 다양한 노력을 기울이고 있다. 이에 따라 산·학·연 공동 연구가 의약품, 건강기능식품, 화장품 등의 용도개발, 유망 식물자원 탐색, 생물활성 검정체계 확립, 약용식물 추출물 은행 구축, 활성물질의 독성평가로 기능성 물질 확인, 동정 및 정제기술의 개발, 기능성 정유의 물질의 대량 분리 정제 기술 및 산업화 연구에 집중되고 있다(Kim, 2003).

따라서 지역의 특산물을 이용한 제품 개발 및 상용화를 통한 지역경제 활성화를 위해서는 먼저 피부개선에 효과가 있는 지역 특산물(생약초)을 선정하여 성분과 효능 및 효과에 대해 알아보고, 추출 조건의 최적화와 소재화를 연구·개발, 이를 이용한 상품개발 및 상용화모델 개발이 시급한

실정이다(Kim, 1997).

어성초(魚腥草, *Houttuynia cordata* Thunb)는 삼백초과에 속하는 다년생 초본의 야생약초로서 중국, 일본 및 한국이 원산지이다. 잎과 줄기에서 생선 비린내가 나서 어성초라고 불리게 되었다. 한방에서 어성초는 이뇨작용, 진통작용, 지혈작용 등의 다양한 약리작용이 있는 것으로 알려져 오래전부터 생약제로 이용되어 왔으며(Moon, 1994), 최근에는 항균제로서의 역할과 항암제로서의 효용이 관심의 대상이 되어 여러 가지 형태로 제품화되어 건강보조식품으로 이용하고 있는 실정이다. 어성초의 성분들 중 quercitrin은 강력한 이뇨효과와 혈청 콜레스테롤을 저하시키는 효과 및 항산화 활성이 있는 것으로 알려져 있고(Ha, 2003), 항종양(Kim et al., 2001), 항백혈병 및 고지혈 억제효과(Chung et al., 1999), 카드뮴에 대한 독성억제 효과(Lee et al., 2001a), 휘발성 향기성분 추출물의 항균효과(Shin et al., 2006), 뿌리에서 추출한 순차 분획물의 항균활성(Song et al., 2003)에 대한 것 등이 보고되었다.

삼백초(三白草, *Saururus chinensis* Baill)는 삼백초과의 다년생 초본으로서 꽃이 피는 7-8월에 3-4개의 잎이 백색이기 때문에 삼백초라고 부른다. 삼백초의 주성분은 quercetin, quercitrin, isogueritrin, rutin 및 수용성 tannin

Corresponding author: Hyung-Young Cho, Dason Co., Bucheon 303-303, Kyungi-do, Republic of Korea  
Tel: +82-32-329-4040; Fax: +82-32-321-9025  
E-mail: hycho@hanmail.net

등으로 알려져 있으며, 이 중 삼백초의 주성분인 quercetin, quercetrin은 flavonoid의 일종으로 항균 및 항산화 효과를 나타내는 것으로 보고되며, 항암성 및 모세혈관 강화작용 등의 효과들이 알려져 있다(Lee et al, 2001c; Kim & Song 2000; Kim et al., 2005). 식물체에 존재하는 flavonoid는 항돌연변이 및 항암성을 갖는 것으로 나타났으며, 그 중 quercetin은 동맥경화를 유발할 수 있는 인자인 LDL(low density lipoprotein)의 산화와 cytotoxicity 억제효과도 보고되고 있다(Lee et al., 2001b).

최근의 연구결과에서 산소가 스트레스나 대기오염, 식품첨가물, 음주, 흡연 등 체내외의 각종 물리·화학적 요인에 의하여 반응성이 높은 활성산소(active oxygen, free radical)로 전환되면 정상적인 체세포의 구성성분들을 변성시키거나 파괴하여 각종 질병 및 노화를 촉진하는 원인이 되는 것으로 보고(Lee et al, 2001c; Kim & Song 2000; Kim et al., 2005)되고 있다. 이러한 생체 내 산화로 인해 야기되는 여러 질병의 발생이나 노화방지를 위해 각종 천연물로부터 안전하고 강력한 항산화력을 지닌 물질을 찾기 위해 많은 노력이 이루어져 왔다. 이에 따라 추출물의 항산화 활성을 알아보기 위해 전자공여능, 총폴리페놀 함량 및 총플라보노이드 함량 등을 측정하고 있다

현대인들이 쉽고 간편하게 섭취할 수 있는 기능성 식품 또는 건강보조식품은 유효성분을 추출한 액상형태로 많이 제조되고 있다. 추출조건에 대한 연구는 백작약(Jeong 2003), 백문동(Chung et al., 2004), 패모, 어성초 등(Lee et al., 1993)과 삼백초(Lee et al., 2005)와 같이 다양한 천연물에 연구되고 있다. 식물에 함유된 항산화성 유효성분의 추출은 methanol, hexane, 물 등 여러 가지 용매를 이용하고 있으며 주로 극성이 다른 용매를 이용하여 유효물질을 분리하는 방법이 널리 이용되고 있다(Lee et al., 1993). 그러나 어성초, 삼백초의 추출 조건의 최적화에 대한 연구는 부족한 편이다.

본 연구에서는 어성초, 삼백초의 혼합 추출을 통해 유효성분의 상승(synergy) 효과를 기대하고, 이로 인한 전남 장흥의 지역 특산물인 어성초와 삼백초의 소비량 증진을 통해 지역경제 활성화를 도모 하고자 하였다. 추출 방법으로 식품공전상 이용이 가능하고 산지가공에 가장 적합한 물과 에탄올을 이용한 용매추출방법을 선택하였고, 추출 효율의 최적화를 이루기 위하여 중심합성계획법(central composite experiment design)에 의한 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 실시하여 최적 추출조건을 구하고자 하였다. 추출에 미치는 인자인 독립변수는 추출시간, 에탄올 함량 및 삼백초와 어성초의 혼합비율로 설정하였고 종속변수는 수율, 유효성분 함량(quercetin 류), 항산화 효과(DPPH, 총폴리페놀 함량 및 총플라보노이드 함량), 그리고 항염 및 미백효과로 하였다. 추출조건을 최적화하기 위하여 독립변수에 대한 반응표면분석을 이용한 등고선과 3차

원 분석을 수행하여 그 유의성을 조사함으로써 추출조건의 타당성을 검토하여 최적화된 추출조건을 구하고자 하였다(Chung et al., 2004; Sung 2004; Kim & Lee 2008b; Kim et al., 2008a)

## 재료 및 방법

### 실험 재료

삼백초와 어성초는 줄기의 높이가 각각 50~100 cm, 20~50 cm이며 잎은 어긋나고 달걀 모양의 타원형이며 길이가 각각 5~15 cm, 3~8 cm이고 끝이 뾰족하며 밑 부분이 심장 모양이다. 본 실험에 사용한 삼백초와 어성초는 줄기와 잎이 온전한 전초를 전남 장흥군의 장흥농산에서 2007년 8월 채취한 생초와 2006년 7~8월에 채취되어 음건한 것을 냉장 보관하면서 추출 재료로 사용하였다.

### 추출물 제조

생약제의 추출효율 및 효능에 영향을 주는 요소는 추출시간, 추출용매, 추출온도, 추출압력, 용매 가수량 및 혼합생약초의 비율 등으로 나타난다. 이와 같은 여러 가지 변수 중에 예비 실험과 장비의 운전조건을 검토하여 추출온도와 압력은 100°C, 1.2 kg/cm<sup>2</sup>으로 탕재원의 추출기의 고정 조건에 따라 조정하였다. 용매의 가수량은 실험재료인 삼백초 어성초가 충분히 잠길 정도의 양으로 1:20의 비율로 일정하게 조정하였다. 변수는 추출시간, 에탄올 농도 및 삼백초와 어성초의 혼합비율로 결정하였다. 추출기로는 탕재원에서 일반적으로 사용하는 장비(44L, Goryo ENG Co., Korea)를 활용하였다. 실험계획법에 의거 추출조건에 따라 추출한 후, 부직포(ADNANTEC® T-260)로 거르고 회전감압(Rotary Vacuum Evaporator, N-1000 series, EYELA, Japan) 농축하여 얻은 추출물을 동결건조기(PUTFD 20R, Ilshin lab Co. Ltd, Korea)로 건조하여, -20°C 냉동고에 보관하면서 실험재료로 사용하였다.

### 추출조건의 최적화를 위한 실험설계

추출조건의 최적화를 위한 실험계획은 중심합성계획법(Sung 2004)에 의하여 설계하였고, 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 활용하기 위하여 statistical analysis system(SAS) program(SAS 1990)을 사용하였다. 중심합성계획에서 독립변수( $X_n$ )는 추출시간(3-15 hr,  $X_1$ ), 알코올 농도(0-80%,  $X_2$ ) 및 삼백초·어성초의 혼합비율(1:4 - 4:1,  $X_3$ )이며, 실험계획은 Table 1과 같이 -2, -1, 0, 1, 2의 5수준으로 부호화하여 16가지의 추출실험을 하였다. 생약제 추출물의 품질특성에 관련된 종속변수( $Y_n$ )로는 추출수율( $Y_1$ ), 항산화효과로서 DPPH 전자공여능( $Y_2$ ), 총폴리페놀 함량( $Y_3$ ) 및 총플라보노이드 함량( $Y_4$ )과 항염효과로서 histamine 분비 억제 효과( $Y_5$ ), 미백효과로서

Table 1. Independent variables and their coded and actual values used for analysis

Symbol	Independent variable	Unit	Coded level				
			-2	-1	0	1	2
X <sub>1</sub>	Extraction time	hr	3	6	9	12	15
X <sub>2</sub>	ethanol concentration	%	0	20	40	60	80
X <sub>3</sub>	<i>Houttuynia cordata</i> : <i>Saururus chinensis</i> mixing ratio	-	1:4	1:2	1:1	2:1	4:1

tyrosinase 저해 효과(Y<sub>0</sub>) 및 유효성분 함량(quercetin류, Y<sub>1</sub>)로 나타내었다. 이들은 3회 반복 측정하여 그 평균값을 회귀분석에 사용하였다. 이때 세 개의 독립변수와 종속변수에 대한 2차 회귀모형식은 아래와 같다.

$$Y_n = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

여기서 Y는 종속변수, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, X<sub>3</sub>는 독립변수, β<sub>n</sub>는 회귀계수이다.

또한 회귀분석 결과 임계점이 안장점인 경우에는 능선분석을 하여 최적점을 구하였으며, SAS program을 이용하여 3차원반응표면으로 표시하였다(Sung 2004).

#### 수율계산

각 조건에서 얻어진 추출물의 수율은 조건별 동결건조 후 시료를 재빨리 수거하여 밀봉하여 공기중의 수분 흡수를 최소화한 후 무게(g)를 측정하여 추출에 사용된 원료량(건물량 200 g)에 대한 백분율로서 나타내었다.

#### 유효성분 분석

유효성분인 Isoquercitrin, Quercitrin, Quercetin 함량은 HPLC(Waters Associate, Liquid chromatograph 2690/5, USA)로 분석하였다. 이동상은 0.1% formic acid in water와 0.1% formic acid in methanol을 gradient mode (75~35 : 25~65%)로 35분간 흘려주었다. 유속은 1 mL/min, injection volume은 10 μL, 사용한 column은 Sunfire C<sub>18</sub> (5 μm, 4.6×150 mm)이며, 검출은 2996 PDA detector를 이용하여 254 nm에서 실시하였다.

시료의 전처리에는 3가지 방법으로 진행하였다. 방법 A는 시료를 증류수에 녹여 10 mg/mL로 만든 후 0.45 μm syringe filter로 여과한 샘플을 3 mg/mL로 조정하였다. 방법 B는 시료를 75% 에탄올에 녹여 3 mg/mL로 만든 후 1시간동안 sonication 한 후 0.45 μm syringe filter로 여과하였다. 방법 C는 시료 15 mg을 75% 에탄올 4.2 mL에 녹여 1시간 sonication 한 후 HCl 0.8 mL를 넣고 80°C에서 80분간 가수분해 시켜 0.45 syringe filter로 여과하였다. 표준 검량선은 Isoquercitrin, Quercitrin, Quercetin을 각각 10 ppm, 20 ppm, 30 ppm농도로 혼합하여 HPLC를 실시하

여 작성하였으며, 상관계수가 모두 0.99 이상이었다.

#### DPPH 전자공여능 측정

생약제 추출물의 DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼에 대한 소거활성은 증류수에 녹인 여러 농도의 시료 1 mL에 2×10<sup>-4</sup> M DPPH 용액 1 mL를 가하고 vortex로 균일하게 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 아래와 같이 계산하였다(Blois, 1958).

DPPH radical scavenging activity(%) =

$$\left(1 - \frac{A_{bs}}{A_{bc}}\right) \times 100(\%)$$

A<sub>bc</sub>: 시료 무첨가군의 흡광도, A<sub>bs</sub>: 시료 첨가군의 흡광도

#### 총폴리페놀 함량 측정

시료를 일정하게 희석한 검액 1 mL에 Folin-Ciocalteu 시약 1 mL를 가하여 혼합하고 3분 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 넣어 진탕하고 1시간 실온에서 방치하여 760 nm에서 흡광도를 측정하였다(Gufginger, 1981). 이때 표준물질로는 gallic acid를 0-50 μg/mL의 농도로 조제한 후 검량선을 작성하여 총 페놀함량을 계산하였다.

#### 총플라보노이드 함량 측정

시험용액 0.2 mL와 에탄올 0.6 mL, 10% 질산알루미늄용액 0.04 mL, 1 M 초산칼륨용액 0.04 mL, 물 1.12 mL를 가하여 충분히 교반을 한다. 실온에서 40분간 방치한 후 물을 대조액으로 하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다(Graham 1992). Blank는 질산알루미늄용액 대신 물 0.04 mL를 가한 것의 흡광도이며, 표준물질로는 quercetin을 0-50 μg/mL의 농도로 조제한 후 상기 조작에 준하여 검량선을 작성하여 총플라보노이드 함량을 계산하였다.

#### 항염효과 확인

항염효과는 HMC(human mast cell)을 이용한 histamine 분비 억제효과로 확인하였다. HMC에 각 시료를 투여한 후, compound 48/80을 처치하여 histamine 분비를 유도한 후 histamine 분비량을 측정하였다(Kim et al., 2006). 시료는 증류수에 녹여 실험을 수행하였다. 실험은 50, 100,

**Table 2. Analysis of variables for regression model of dependent variables(Y) in extraction conditions**

Source	Prov<F					
	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>	Y <sub>4</sub>	Y <sub>5</sub>	Y <sub>6</sub>
Model	0.2003	0.0045	0.1324	0.0135	0.5274	0.9627
R <sup>2</sup>	0.7530	0.9421	0.7935	0.9140	0.5959	0.2854
X <sub>1</sub>	0.1117	0.0177	0.9167	0.1985	0.6263	0.9968
X <sub>2</sub>	0.06	0.0034	0.0836	0.0044	0.3759	0.9584
X <sub>3</sub>	0.200	0.0083	0.0739	0.0993	0.4710	0.7496

Y<sub>1</sub>: Extraction yield(%) Y<sub>2</sub>: Electron donating ability(%) Y<sub>3</sub>: Total polyphenol(mg/g) Y<sub>4</sub>: Total flavonoid(mg/g) Y<sub>5</sub>: Histamine(μg/ml)  
 Y<sub>6</sub>: In vitro tyrosinase inhibition(%) X<sub>1</sub>: Extraction time(hr) X<sub>2</sub>: Ethanol concentration(%) X<sub>3</sub>: *Houttuynia cordata*: *Saururus chinensis* mixing ratio

150, 200 μg/mL 농도로 수행하여 샘플의 효과가 가장 적절하게 비교되는 농도를 정하였다. 최종 200 μg/mL 실험 농도에서 가장 효과분석이 용이한 것으로 판단하여 이를 최종 실험농도로 정하여 각 시료의 효과를 비교하였다.

**미백효과 검증**

Tyrosinase 는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로의 가장 중요한 초기속도 결정단계 효소로 시험관내에서 tyrosinase 의 활성을 저해하는 정도를 평가하여 미백기능의 유효성을 알아볼 수 있다(Lee et al., 2002). 추출한 시료를 여러 농도로 증류수에 녹인 것을 검액으로 한다. 0.1 M 인산이수소칼륨액을 pH 6.8이 되도록 2 M NaOH로 조정한 완충액 500 μL에 tyrosine 3 mg에 물을 넣어 녹여 10 mL로 한 기질액 500 μL, 증류수 450 μL 및 검액 50 μL를 혼합한 후 2 units/μL 농도의 효소액 50 μL를 첨가한다. 이를 혼합한 후 37°C에서 10분간 반응시키고 곧 얼음 중에 5분간 방치하여 냉각한 후 475 nm에서 흡광도 B를 측정하였다. 이때 공시험액은 검액 대신 증류수 50 μL를 가지고 측정한 흡광도 A를, 색보정액은 효소액 대신 증류수 50 μL를 넣어 측정한 흡광도 C로 하였다. Tyrosinase 억제율은 아래의 식에서 구하였다.

$$\text{Tyrosinase 억제율(\%)} = \frac{A - (B - C)}{A} \times 100$$

여기서 A는 control, B는 sample, C는 blank 흡광도이다.

**결과 및 고찰**

삼백초, 어성초 혼합물을 중심합성계획법에 의해 수행된 각 조건에서 얻어진 결과의 분산분석을 Table 2에 나타내었다.

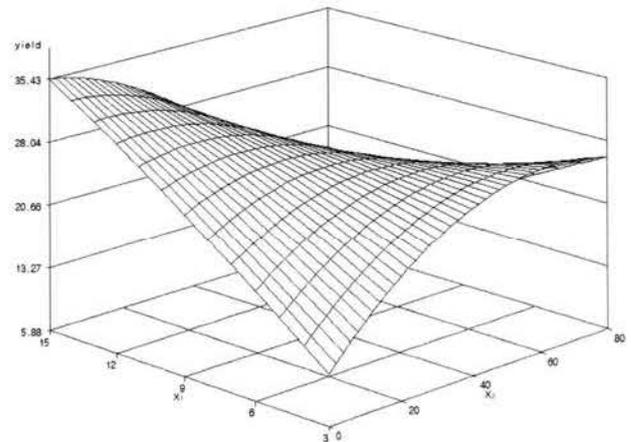
**수율**

삼백초, 어성초 혼합물을 중심합성계획법에 의해 수행된 각 조건에서 얻어진 추출물의 수율을 측정한 결과는 Table 3과 같이 17.0 ~ 30.2%의 범위로 측정되었으며, 결과에 대한 반응표면 회귀식의 R<sup>2</sup>은 0.7530의 값으로 상대적으로

높은 적합도를 보였다. 변수 중에서는 X<sub>2</sub>가 10% 유의수준에서 유의성이 있는 것으로 나온 반면에 X<sub>1</sub>, X<sub>3</sub>의 경우에는 유의성이 없는 것으로 나타났다(Table 2). 즉, 수율의 경우에는 에탄올 함량에 의해 영향을 받는 것으로 판단되었다. 수율에 대한 반응표면 회귀식은 다음과 같다.

$$Y = 7.556822 + 1.893185 \cdot X_1 + 0.575634 \cdot X_2 - 1.07573 \cdot X_3 + 0.00359 \cdot X_1 X_1 - 0.04583 \cdot X_2 X_1 - 0.003200 \cdot X_2 X_2 + 0.02631 \cdot X_3 X_1 - 0.001316 \cdot X_3 X_2 + 0.421234 \cdot X_3 X_3$$

수율에 대한 변수 중에서는 X<sub>1</sub> 즉 추출시간이 다른 변수들에 비해 상대적으로 영향이 크게 나타났다. 반응표면 그림에서 얻어진 정상점이 안장점이어서 능선분석을 한 결과 그 최대값은 X<sub>1</sub> = 13.56, X<sub>2</sub> = 16.29, X<sub>3</sub> = 2.63에서 33.25%로 예측되었다. 삼백초와 어성초의 혼합비율을 2:1로 고정한 상태에서 추출시간과 에탄올함량에 따른 수율의 변화는 Fig. 1과 같다. 즉, 추출시간과 에탄올 함량이 증가할수록 높아지는 것으로 나타났다. 이는 생약제가 추출용



**Fig. 1. Response surface for yield in *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Baill extract at constant mixing ratio(2:1) as a function of extraction time(X<sub>1</sub>) and ethanol concentration(X<sub>2</sub>).**

**Table 3. Effects of extraction time, ethanol concentration and mixing ratio on extraction yield**

No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	yield(%)
1	6(-1)	20(-1)	1:2(-1)	22.6
2	6(-1)	20(-1)	2:1(1)	25.0
3	6(-1)	60(1)	1:2(-1)	28.2
4	6(-1)	60(1)	2:1(1)	24.1
5	12(1)	20(-1)	1:2(-1)	28.4
6	12(1)	20(-1)	2:1(1)	26.8
7	12(1)	60(1)	1:2(-1)	17.0
8	12(1)	60(1)	2:1(1)	20.9
9	9(0)	40(0)	1:1(0)	26.9
10	9(0)	40(0)	1:1(0)	27.6
11	3(-2)	40(0)	1:1(0)	23.1
12	15(2)	40(0)	1:1(0)	30.2
13	9(0)	0(-2)	1:1(0)	25.8
14	9(0)	80(2)	1:1(0)	17.0
15	9(0)	40(0)	1:4(-2)	25.6
16	9(0)	40(0)	4:1(2)	29.9

X<sub>1</sub> : Extraction time(hr)

X<sub>2</sub> : Ethanol concentration(%)

X<sub>3</sub> : *Houttuynia cordata* : *Saururus chinensis* mixing ratio

매와 접촉하는 시간이 증가하고 용매비율이 높아지면 고형분의 용해속도 및 용해력이 증가하는 것으로 판단된다 (Kim et al., 2008a).

**유효성분 분석**

3가지 전처리 방법에 따른 유효성분의 함량을 측정하여 Table 4에 나타내었다. 전처리 방법에 따라서는 75% 에탄올로 재추출 후 산가수분해한 방법 C가 유효성분의 함량이 가장 높았고, 그 다음으로 78% 에탄올로 재추출한 방법 B였으며, 증류수에 녹인 방법 A가 가장 낮게 나왔다. 전처리 방법 C에서 다른 전처리 방법에 비해서 quercitrin, isoquercitrin 함량이 줄어들고 quercetin 함량이 월등히 높게 나온 것으로 보아 산가수분해 과정을 통해 배당체 등의 결합자가 잘려 quercetin으로 되거나 시료에서 훨씬 더 추출되어 나온 것으로 보인다.

추출조건을 분석해 보면 용매비율이 80%인 14번 시료에서 가장 높은 유효성분 추출 효율을 얻을 수 있었고, 용매비율이 0%인 13번 시료의 유효성분 함량이 가장 낮은 것을 알 수 있었다. 대체적으로 용매비율이 높을수록 유효성분의 추출 효율이 높은 경향을 보였다. 그러나 삼백초만을 에탄올로 추출한 연구에서는 40% 에탄올 농도에서 quercitrin 및 quercetin 함량이 가장 높게 나타났다(Kim et al., 2005).

**DPPH 전자공여능 측정**

각각의 추출조건에 따른 추출물의 전자공여능을 측정한 결과(Table 5) 29.3 ~ 58.5%로 전반적으로 모든 시료의 자유 라디칼 소거율이 우수하였다. 이들 각 시료의 추출시간, 에탄올 함량, 삼백초와 어성초의 비율과 연관하여 분석하면 라디칼 소거율(항산화효능)은 추출시간은 12-15시간, 용매비율(%)은 60-80%, 삼백초와 어성초의 비율은 4:1 - 2:1로 삼백초를 다량 넣는 것이 가장 최적의 추출조건인 것으로 판단된다. 측정된 결과의 반응표면 회귀식의 R<sup>2</sup>은 0.9421로 1%의 수준에서 유의성이 인정되었다. 에탄올 함량(X<sub>2</sub>)과 삼백초와 어성초 혼합비율(X<sub>3</sub>)은 1% 수준에서 유의성이 인정되었으며, 추출시간은 5% 수준에서 유의성이 인정되었다(Table 2). 반응표면회귀식은 다음과 같다.

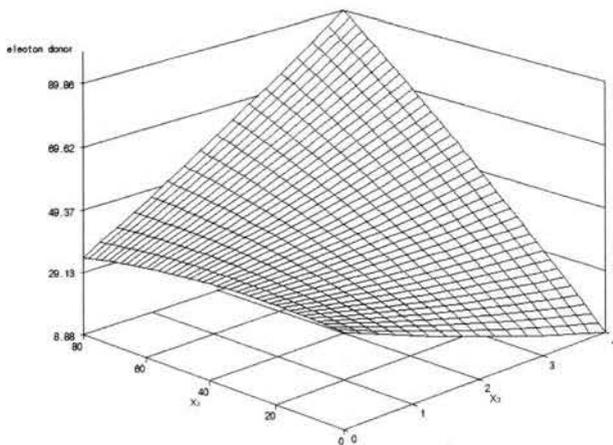
$$Y = 86.890212 - 8.158231 X_1 - 0.501996 X_2 - 20.55641 X_3 + 0.341369 X_1X_1 + 0.037708 X_2X_1 + 0.001337 X_2X_2 + 0.932456 X_3X_1 + 0.266974 X_3X_2 + 1.393718 X_3X_3$$

전자공여능에 미치는 변수들 중에서는 삼백초와 어성초 혼합비율이 가장 큰 영향이 미치고 있으며, 모델식에 의한 최대값은 X<sub>1</sub> = 12.35, X<sub>2</sub> = 65.57, X<sub>3</sub> = 3.12에서 81.49%의 값을 나타내었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 추출시간이 일정하면, 용매비율과 삼백초 어성초 혼합비율이 높아

**Table 4. Effect of pretreatment method on Isoquercitrin, Quercitrin, Quercetin concentration(mg/mL)**

No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	method A			method B			method C		
				a	b	c	a	b	c	a	b	c
1	6	20	1:2	9.3	5.9	0.6	20.0	15.5	6.1	3.8	-	230.3
2	6	20	2:1	11.4	7.1	0.8	15.8	11.5	5.9	5.3	-	329.0
3	6	60	1:2	15.6	11.6	0.7	19.8	18.0	3.3	4.2	-	335.2
4	6	60	2:1	14.1	10.4	0.8	17.6	15.4	4.3	-	-	379.4
5	12	20	1:2	6.5	5.6	1.0	8.1	7.8	5.0	7.9	-	181.9
6	12	20	2:1	8.4	5.6	1.0	9.9	8.8	6.7	8.4	5.2	258.1
7	12	60	1:2	17.4	15.8	0.6	20.8	24.4	3.2	5.1	-	421.7
8	12	60	2:1	20.2	17.3	1.0	19.6	20.5	4.3	3.4	-	370.5
9	9	40	1:1	9.8	7.7	0.7	13.6	14.6	4.7	4.4	-	286.5
10	9	40	1:1	13.0	9.1	0.9	15.3	13.8	6.3	-	-	296.9
11	3	40	1:1	10.3	9.5	0.6	16.4	16.8	3.7	-	-	286.1
12	15	40	1:1	15.5	13.3	0.7	46.5	41.6	4.2	-	-	320.0
13	9	0	1:1	2.2	1.3	1.0	2.8	2.5	2.7	4.0	-	62.7
14	9	80	1:1	45.1	34.9	1.7	37.3	31.6	4.7	7.4	-	521.3
15	9	40	1:4	17.0	13.9	0.7	21.3	20.8	4.2	7.6	-	292.5
16	9	40	4:1	10.7	8.6	0.7	11.3	13.9	4.0	4.9	4.6	300.2

X<sub>1</sub> : Extraction time(hr)  
 X<sub>2</sub> : Ethanol concentration(%)  
 X<sub>3</sub> : *Houttuynia cordata* : *Saururus chinensis* mixing ratio  
 a : Isoquercitrin, b : Quercitrin, c : Quercetin



**Fig. 2. Response surface for electron donating ability in *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Baill extract at constant extraction time(12 hr) as a function of ethanol concentration(X<sub>2</sub>) and mixing ratio(X<sub>3</sub>).**

질수록 증가하는 경향을 보이고 있다.

**총폴리페놀 함량 측정**

Table 5에서 나타난 총폴리페놀 함량을 반응표면분석을 실시한 결과 모델식의 R<sup>2</sup>은 0.7935로 10% 유의수준에서 유의성이 보이지 않았다. 변수 중에서는 에탄올 함량(X<sub>2</sub>)이 10% 수준에서 유의성이 인정되었다(Table 2). 반응표면 회

귀식은 다음과 같다.

$$Y = 22.306224 + 0.074744 X_1 - 0.259576 X_2 - 1.800384 X_3 - 0.015020 X_1X_1 + 0.000625 X_2X_1 + 0.001943 X_2X_2 + 0.053509 X_3X_1 + 0.096711 X_3X_2 - 0.632853 X_3X_3$$

총폴리페놀에 미치는 변수들 중에서는 에탄올함량의 X<sub>2</sub>의 영향이 가장 큰 것으로 나타나 다른 연구(Kim et al., 2005; Kim et al., 2008a)와 유사한 결과를 보이고 있으며, 모델식에서 X<sub>1</sub> = 9.01, X<sub>2</sub> = 77.31, X<sub>3</sub> = 2.80에서 26.03 mg/g의 최대값을 나타내었다. 삼백초 지상부만을 에탄올 추출한 연구(Kim et al., 2005)에서도 에탄올 함량에 큰 영향을 받으며, 에탄올 농도 40-60%에서 최대 추출을 나타내었다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 에탄올 함량이 낮을 때는 큰 차이를 보이지 않지만, 에탄올 함량이 높을 때는 삼백초와 어성초 비율이 증가함에 따라 총폴리페놀의 추출량이 크게 증가하는 경향을 보이고 있다. 즉 에탄올 함량에 따른 추출량의 변화가 큰 것으로 판단되었다.

**총플라보노이드 함량 측정**

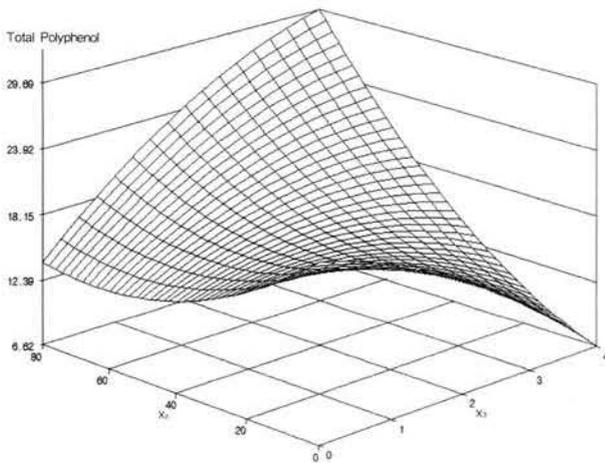
Table 5에서 추출시간, 용매비율, 삼백초:어성초 비율과 연관하여 플라보노이드 함량을 분석해 보면, 추출시간은 6-12시간, 용매비율(%)은 60-80%, 삼백초:어성초 비율은 1:2, 1:1, 2:1으로 하는 것이 적절한 추출조건으로 판단되었다.

총플라보노이드와 관련된 모델식의 R<sup>2</sup>은 0.9126으로 5%

**Table 5. Experimental data on Electron donating ability, total polyphenol, total flavonoid, histamine, and *in vitro* tyrosinase inhibition in *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Bail mixture extract under different conditions based on central composite design for response surface analysis**

No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Electron donating ability (%)	Total polyphenol (mg/g)	Total flavonoid(mg/g)	Histamine (µg/mL)	<i>in vitro</i> tyrosinase inhibition(%)
1	6(-1)	20(-1)	1:2(-1)	43.5	17.9	12.2	11.0	26.5
2	6(-1)	20(-1)	2:1(1)	30.7	16.8	16.8	10.1	19.4
3	6(-1)	60(1)	1:2(-1)	39.6	15.7	11.4	11.6	24.6
4	6(-1)	60(1)	2:1(1)	48.3	19.3	20.5	14.2	18.0
5	12(1)	20(-1)	1:2(-1)	36.6	19.4	9.5	15.1	20.0
6	12(1)	20(-1)	2:1(1)	37.5	16.4	14.0	11.4	16.2
7	12(1)	60(1)	1:2(-1)	47.4	15.8	21.2	17.4	19.8
8	12(1)	60(1)	2:1(1)	58.5	20.6	28.3	12.7	17.3
9	9(0)	40(0)	1:1(0)	32.9	15.8	14.0	9.5	27.9
10	9(0)	40(0)	1:1(0)	37.9	16.3	17.5	10.6	25.1
11	3(-2)	40(0)	1:1(0)	45.6	17.5	16.6	15.6	19.7
12	15(2)	40(0)	1:1(0)	49.7	13.6	13.1	13.1	26.6
13	9(0)	0(-2)	1:1(0)	29.3	18.6	7.8	19.8	23.3
14	9(0)	80(2)	1:1(0)	45.7	19.8	30.1	13.2	20.1
15	9(0)	40(0)	1:4(-2)	34.2	14.5	12.3	14.9	20.2
16	9(0)	40(0)	4:1(2)	52.7	14.6	14.6	17.5	19.8

X<sub>1</sub> : Extraction time(hr)  
 X<sub>2</sub> : Ethanol concentration(%)  
 X<sub>3</sub> : *Houttuynia cordata* : *Saururus chinensis* mixing ratio



**Fig. 3. Response surface for total polyphenol concentration in *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Bail extract at constant extraction time(12 hr) as a function of ethanol concentration(X<sub>2</sub>) and mixing ratio(X<sub>3</sub>).**

수준에서 유의성을 보이고 있다. 또한 에탄올 함량(X<sub>2</sub>)가 1% 수준에서 유의성이 인정된 결과를 보이고 있다(Table 2). 반응표면회귀식은 다음과 같다.

$$Y = 18.720118 - 1.235928 X_1 - 0.383560 X_2 + 6.601117 X_3 - 0.035943 X_1 X_1 + 0.048125 X_2 X_1 +$$

$$0.001754 X_2 X_2 + 0.057018 X_3 X_1 + 0.035395 X_3 X_2 - 1.803974 X_3 X_3$$

변수 중에서 전자공여능과 마찬가지로 삼백초와 어성초의 혼합비율(X<sub>3</sub>)의 영향이 상대적으로 크게 나타났다. 모델식에서 나타난 최대값은 36.24 mg/g으로 X<sub>1</sub> = 11.61, X<sub>2</sub> = 75.69, X<sub>3</sub> = 2.35에서 보이고 있다. 추출조건에 따른 총플라보노이드의 반응표면은 Fig. 4와 같이 에탄올함량이 높아질수록 증가하였으며, 삼백초와 어성초의 혼합비율은 중간정도에서 최대값을 보이고 있다.

**항염효과**

HMC (human mast cell)에 각 시료를 투여한 후, compound 48/80을 처리하여 histamine 분비를 유도한 후 histamine 분비량의 억제효과를 확인하여 항염효과를 측정하였다. 실험은 모두 4개 농도로 수행하여 샘플의 효과가 가장 적절하게 비교되는 농도를 정하였다. 최종 200 µg/mL 농도에서 가장 효과분석이 용이한 것으로 판단하여 이 농도에서 각 시료의 효과를 비교한 결과를 Table 5에 나타내었다. Table 4에서와 같이 아무 것도 처리하지 않은 군의 경우는 4.0±0.2 µg/mL의 histamine 분비량을 나타내었고, compound 48/80만을 처리한 군의 경우는 16.2±1.6 µg/mL의 histamine 분비량을 나타내었다.

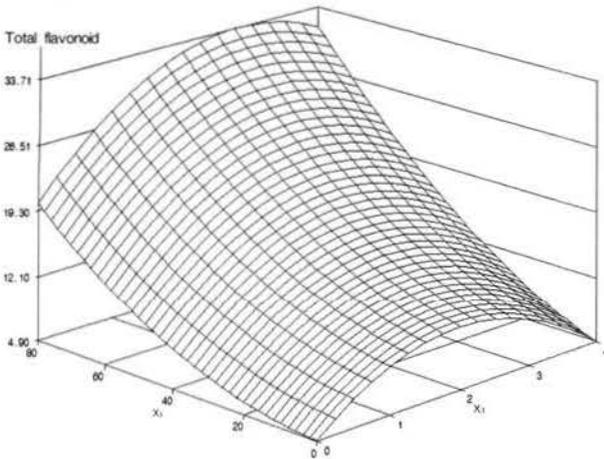


Fig. 4. Response surface for total flavonoid concentration in *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Baill extract at constant extraction time(12 hr) as a function of ethanol concentration( $X_2$ ) and mixing ratio( $X_3$ ).

항염 효과와 관련된 모델식의  $R^2$ 은 0.5959로 10% 수준에서도 유의성을 보이지 않고 있으며, 변수들 또한 유의성을 보이지 않았다. 예측한 반응표면모델식은 다음과 같다.

$$Y = 25.532954 - 1.204320 X_1 - 0.340904 X_2 - 3.874575 X_3 + 0.102604 X_1X_1 - 0.002292 X_2X_1 + 0.003652 X_2X_2 - 0.402632 X_3X_1 + 0.048026 X_3X_2 + 1.594569 X_3X_3$$

변수 중에서는 삼백초와 어성초의 혼합비율( $X_3$ )의 영향이 상대적으로 크게 나타났다. 모델식에  $X_1 = 10.06$ ,  $X_2 = 37.17$ ,  $X_3 = 1.93$ 에서  $9.41 \mu\text{g/mL}$ 의 최소값을 보이고 있다. 추출조건에 따른 histamine의 분비량은 3차원 반응표면으로 나타난 Fig. 5에서 보면 중간정도의 에탄올함량과 삼백초와 어성초 혼합비율에서 최소값을 보이고 있다.

미백효과

Tyrosinase 는 인체 내의 멜라닌 생합성 경로의 가장 중요한 초기속도 결정단계 효소로 시험관내에서 tyrosinase 의 활성을 저해하는 정도를 평가하여 미백기능의 유효성을 알아볼 수 있는 시험으로 tyrosinase 저해효과를 측정된 결과를 Table 5에 나타내었다. 추출시간과 에탄올 함량에 다른 tyrosinase 저해효과는 유의성이 없지만, 삼백초와 어성초 혼합비율이 1:1, 1:2 비율에서 비교적 높은 저해효과를 보였고, 2:1 비율에서 낮은 저해효과를 보였다. 즉 삼백초와 어성초의 혼합비율이 같거나 어성초의 비율이 높을 수록 높은 저해효과를 보임을 알 수 있었다.

Tyrosinase 저해 효과와 관련된 모델식의  $R^2$ 은 0.2854의

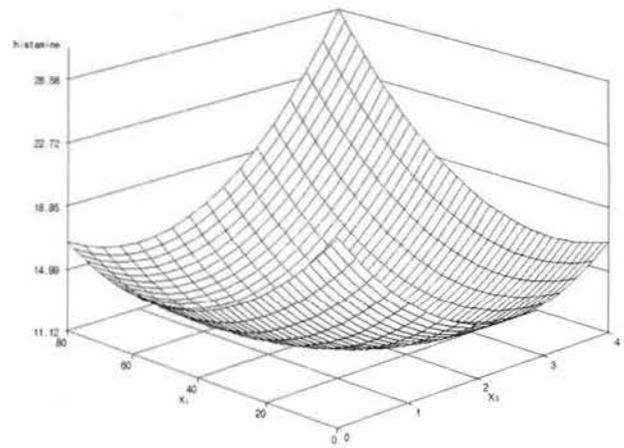


Fig. 5. Response surface for histamine secretion by using human mast cell in *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Baill extract at constant extraction time(12 hr) as a function of ethanol concentration( $X_2$ ) and mixing ratio( $X_3$ ).

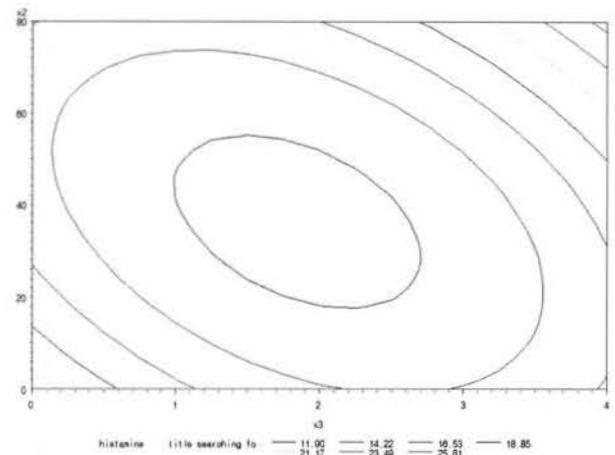


Fig. 6. Contour map for optimum histamine secretion inhibition conditions in *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Baill extract.

낮은 상관관계를 보이고 유의성도  $Pr > F$ 가 0.9627로 전혀 보이지 않고 있다.

최적추출조건

항염효과에서 최적값을 찾기 위해 등고선분석을 실시하고(Fig. 6), 위의 분석을 통해 항산화 효과(전자공여능)는 독립변수에 의한 영향이 크며, 통계적으로 유의성이 인정되었고, 항염 효과는 통계적 유의성은 부족하나 최적 조건을 구하는데 가장 적합한 경향을 보였다. 뿐만 아니라 경제적 효과를 고려하여 주정 농도를 60%이상을 사용하기 어렵다는 전제조건을 가한다면 Table 6과 같이 최적추출조건을 결정할 수 있었다.

**Table 6. Predicted optimum range and optimum values for *Houttuynia cordata* Thunb and *Saururus chinensis* Baill mixture extraction by response surface methodology**

Conditions	Optimum range	Optimum value
Extraction time(hr)	6 ~ 12	9
Solvent ratio(%)	20 ~ 60	40
mixing ratio	1:1 ~ 4:1	2:1

## 요 약

항염 및 항산화 효능이 우수한 어성초와 삼백초의 추출 방법을 개발하기 위하여 열수추출과 주정을 이용한 용매추출방법을 사용하였다. 추출 효율의 최적화를 목적으로 중심합성계획법(central composite experiment design)에 의한 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 실시하여 최적 추출조건을 결정하였다. 항산화 효과(전자공여능)는 독립변수에 의한 영향이 크며, 통계적으로 유의성이 인정되었고, 항염 효과는 통계적 유의성은 부족하나 최적 조건을 구하는데 가장 적합한 경향을 보였다. 최적조건은 추출시간 6-12(9시간), 용매비율 20-60(40%), 혼합비율 1:1-4:1(2:1)로 예측되었다.

## 감사의 글

본 연구는 전남 장흥군에서 시행한 고부가가치 생약초제품 연구개발용역사업(신활력사업 장흥군 공고 제2006-386호)의 지원에 의해 수행되어진 것으로 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 26: 1199-1200.

Chung BW, Lee HC, Lee EM, Kwak IS, Kim HJ, Lee BS. 2004. Optimization of extraction conditions of *Liriope platyphylla* (Maekmoondong) by response surface methodology. *J. Eng. Res.* 35: 25-30.

Chung CK, Ham SS, Lee SY, Oh DH, Choi SY, Kang IJ, Nam SM. 1999. Effects of *Houttuynia cordata* ethanol extracts on serum lipids and antioxidant enzymes in rats fed high fat diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 28:205-211.

Graham, HD. 1992. Modified prussian blue assya for total phenolic compound. *J. Agri. Food Chem.* 40: 801-807.

Gutfinger T. 1981. Polyphenols in olive pols. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 58: 966-968.

Ha BJ. 2003. Effects *Houttuynia cordata* Thunb on antioxidative activity TCDD damage. *J. Environmental Sciences.* 16(6):599-603.

Jeong IY, Lee JS, Oh H, Jung UH, Park HR, Jo SK. 2003. Inhibitory effect of hot-water extract of *Paeonia japonica* on oxidative stress and identification of its active components. *J.*

*Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 32(5): 739-744.

Kim BH, Song WS. 2000. The dyeability and antimicrobial activity of *Saururus chinensis* (L). *J. Kor. Home Economics.* 38: 1-9.

Kim HJ. 1997. A study on the effect of the medicine plant (A cosmetic perspectives). a collection of learned papers. Suncheon Chongam College. 21(2):155-188.

Kim HT. 2003. A Literatual study on the ten herbs used for skin care. a collection of learned papers. College of oriental Medicine, Semyung University. pp. 5:29-48.

Kim JO, Kwon SY, Lee GD, Hong JH, Moon DH, Kim TW, Kim DI. 2008a. Optimization of extraction condition on Fig (*Ficus carica* L.) by response surface methodology. *Kor. J. Food Preserv.* 15(1): 66-73.

Kim SH, Jun CD, Suk KH, Choi BJ, Lim HJ, Park SJ, Lee SH, Shin HY, Kim DK, Shin TY. 2006. Gallic Acid Inhibits Histamine Release and Pro-inflammatory Cytokine Production in Mast Cells. *Toxicological Sciences.* 91(1):123-131

Kim SH, Lee JM. 2008b. Optimization of hot-water extraction conditions for preparation of polyphenol and gallic acid from acorn. *Kor. J. Food Preserv.* 15(1): 58-65.

Kim SJ, Bab SY, Kim JS, Chung SK. 2005. Change of antioxidant activity and antioxidant compins in *Saururus chinensis* by extraction conditions. *J. Kor. Soc. Appl. Biolo. Chem.* 48(1):89-92.

Kim SK, Ryu SY, Choi SU, Kim YS. 2001. Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Arch. Pharm. Res.*, 24:518-521.

Lee JH, Jeong SI, You IS, Kim SJ, Lee KN, Han DS, Baek SH. 2001a. The inhibitory effects of the methanol extract of *Houttuynia cordata* Thunb against cadmium induced cytotoxicity(V). *Kor. J. Pharm. acogn.* 31:228-234.

Lee JM, Son ES, Oh SS, Han DS. 2001b. Contents of total flavonoid and biological activities of edible plants. *Kor. J. Diet. Cul.* 16: 504-514.

Lee JP, Kim YO, Jang JY, Shon KH, Yang SJ, Lee KS, Baek OJ, Kim WH, Hong JT, Choi SS. 2002. Efficacy evaluation of the whitening cosmetics using in vitro tyrosinase inhibition assay. *The Annual Report of KFDA*, 6: 600.

Lee SJ, Lee YH, Choi YJ, Lee YH, Cho JS, Heo JS. 2001c. Yield and bioactive component on different compost amounts and cultural methods of *Saururus chinensis* Baill. *Kor. J. Med. Crop. Sci.* 9:220-224.

Lee YJ, Shin DH, Chang YS, Shin JI. 1993. Antioxidative effect of some edible plant solvent extracts with various synergists. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 25(6): 683-688.

Moon KS. 1994. Herbage component and utilization. *Ilwol seogak*, pp. 127-128.

SAS Institute, Inc. 1990. SAS user's guide. Statistical analysis systems institute, Cary, NC, USA.

Shin SE, Suh, DS, Jilu D, Cha WS. 2006. Chemical characterization and antibacterial effect of volatile flavor concentrate from *Houttuynia cordata* Thund. *J. Life Sci.* 16(2): 297-301.

Song JH, Kim MJ, Kwon HD, Park IH. 2003. Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. *J. Kor. Sci. Food Sci. Nutr.* 32(7): 1053-1058.

Sung RK. 2004. SAS/STAT regression analysis. Free Academy Press, Korea. pp. 233-288.

(접수 2008년 9월 10일, 수정 2008년 10월 27일, 채택 2008년 10월 30일)