

마이크로웨이브 에너지를 이용한 레몬그라스로부터 플라보노이드 성분의 추출: CCD-RSM을 이용한 최적화

유봉호* · 장현식 · 이승범†

단국대학교 화학공학과, *단국대학교 공과대학
(2021년 1월 14일 접수, 2021년 2월 10일 수정, 2021년 3월 8일 채택)

Extraction of Total Flavonoids from Lemongrass Using Microwave Energy: Optimization Using CCD-RSM

Bong-Ho Yoo*, Hyun Sick Jang, and Seung Bum Lee†

Department of Chemical Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea

*College of Engineering, Dankook University, Gyeonggi 16890, Korea

(Received January 14, 2021; Revised February 10, 2021; Accepted March 8, 2021)

초 록

본 연구에서는 마이크로웨이브 에너지를 이용하여 항산화성분을 다량 함유하고 있는 레몬그라스로부터 플라보노이드 성분을 추출하였다. 또한 반응표면분석법 중 중심합성계획모형을 이용하여 추출공정을 최적화하였다. 추출공정의 독립변수로는 주정/초순수의 부피비, 마이크로웨이브 조사시간, 마이크로웨이브 조사세기를 설정하였고, 반응치는 추출수율과 플라보노이드 함량을 확인하였다. CCD-RSM 분석 결과 최적조건인 주정/초순수 부피비(56.3 vol.%), 마이크로웨이브 조사시간(6.1 min), 마이크로웨이브 조사세기(574.6 W)에서 추출수율(17.2%)와 플라보노이드 함량(44.7 µg QE/mL dw)의 결과를 얻는 것으로 나타났다. 이때 종합만족도는 $D = 0.8562$ 이고, P-value는 추출수율(0.037)과 플라보노이드 함량(0.002)으로 나타났다. 이 조건에서의 실제실험 결과 오차율은 5.0% 이하로 나타나 높은 유의수준의 결과를 얻을 수 있었다.

Abstract

In this study, we measured total flavonoids after extracting the total flavonoids from lemongrass which is known to have a high content of antioxidant ingredients when using microwave energy. Also, optimal extraction conditions of active ingredients using central composite design-response surface methodology (CCD-RSM) were presented. Both ultrapure water and alcohol were used as extraction solvents and the volume ratio of ethanol/ultrapure water, microwave irradiation time, and microwave irradiation power were set as independence variables. And the extraction yield and total flavonoids were measured. The optimal extraction conditions using CCD-RSM were the volume ratio of ethanol/ultrapure water = 56.3 vol.%, the microwave irradiation time = 6.1 min, and the microwave irradiation power = 574.6 W. We could also obtain expected results of yield = 17.2 wt.% and total flavonoids = 44.7 µg QE/mL dw under the optimum conditions. The comprehensive satisfaction degree of this formula was 0.8562. The P-value was calculated for the yield of 0.037 and the total flavonoids content of 0.002. The average error from actual experiments established for the verification of conclusions was lower than 2.5%. Therefore, a high favorable level could be obtained when the CCD-RSM was applied to the optimization of extraction process.

Keywords: Optimization, CCD-RSM, Total flavonoids, Lemongrass, Microwave energy

1. 서 론

최근 들어 건강에 대한 관심이 급증함에 따라 노화방지에 대한 연

구도 활발히 진행되고 있다. 산화와 항산화의 적당한 균형은 생체 건강에 굉장히 큰 영향을 끼치는데, 현재 알려진 노화의 가장 주요한 원인으로서는 생체 내에서 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 축적이다[1,2]. 인체가 호흡할 때 유입되는 산소는 체내에서 일부가 ROS로 전환되고 체내에 적정량이 있을 경우엔 이로운 역할을 한다. 하지만 과도한 ROS의 축적은 단백질 변성, 지질 과산화 등을 유도하는 산화 스트레스를 유발하며 이는 결론적으로 세포 손상과 세포사를 유발하여 노화를 촉진한다[3,4]. 이러한 현상을 방지하기 위해선

† Corresponding Author: Dankook University,
Department of Chemical Engineering, Gyeonggi 16890, Korea
Tel: +82-31-8005-3559 e-mail: leesb@dankook.ac.kr

항산화 성분이 많은 플라보노이드를 충분히 섭취하는 것은 도움이 된다. 대표적인 항산화 물질인 플라보노이드(flavonoids)는 phenylalanine 으로부터 합성되는 식물색소이며, 채소나 과일에서 흔히 보이는 벤조 Y 피론 구조를 특징으로 하는 폴리페놀 화합물의 큰 무리를 구성한다 [5,6]. 플라보노이드는 flavonols, flavan-3-ols, anthocyanins, flavanones, flavones, isoflavones and proanthocyanidins 등의 하위 물질들을 포함한다[7]. 게다가 플라보노이드는 radical scavengers로써의 높은 약리 활성 때문에 인체의 건강에도 매우 중요하다[8,9]. 천연물 중에서 레몬그라스는 플라보노이드 함량이 높다고 알려진 물질들 중 하나이다. Lemongrass는 잎과 줄기에서 레몬향이 나며, 주로 citral로 구성되어 있으며 이밖에 α -pinene, camphene, myrcene, limonene 등의 성분들이 함유되어 있다. 또한 레몬그라스는 해열작용, 진통작용에 탁월하며 최근 항산화 작용에 특히 두각을 나타내는 것으로 보고되었다[10,11]. 따라서 본 연구에서는 lemongrass를 원료로 microwave assisted solvent extraction (MASE) 실험을 진행하여 최적 추출조건을 알아보고자 하였다. 마이크로웨이브 에너지를 이용하여 플라보노이드를 추출하기 위한 기초실험을 진행한 후 중심합성계획모형-반응표면분석법 (central composite design-response surface methodology, CCD-RSM)을 적용하여 최적추출조건을 결정하였다[12]. 추출에 사용된 추출용매로는 초순수와 95%-주정이고, 주정/초순수 부피비, 마이크로웨이브 조사시간, 마이크로웨이브 조사세기 등을 변수로 설정하였다.

2. 실험방법

2.1. 마이크로웨이브 에너지를 이용한 플라보노이드 성분의 추출

실험에 사용된 레몬그라스는 푸드믹서로 분쇄하여 건조한 후 추출용매 250 mL를 기준으로 준비된 12.5 g의 시료를 이용하여 추출공정을 수행하였다. 추출용매로는 초순수(ultrapure water)와 95%-주정(대한주정라이프, 95%)을 이용하였으며, 추출공정의 최적화 과정에서 반응표면분석법의 독립변수로는 주정/초순수 부피비, 마이크로웨이브 조사시간, 마이크로웨이브 조사세기 등을 설정하였다. 기초실험으로부터 각 독립변수의 최적 추출 범위를 결정한 후 CCD-RSM을 이용하여 최적화 과정을 수행하였다. 이때 반응치(response)로는 추출된 플라보노이드 성분의 추출수율과 플라보노이드 함량(total flavonoids)을 선정하였다. 추출된 플라보노이드 성분의 수율은 냉동건조법(freeze drying method)을 이용하여 측정하였다. 레몬그라스로부터 추출된 플라보노이드 성분은 여과과정 거친 후 진공증류를 통해 농축하여 -10 °C로 6 h 동안 1차 동결한다. 동결된 시료는 냉동건조장치(LP3, Jouan)에서 0.1 mbar, -40 °C의 조건으로 24 h 건조한 후 추출수율을 측정하였다.

2.2. 플라보노이드 함량 분석

레몬그라스로부터 추출된 플라보노이드 성분의 함량 분석은 자외선 분광광도계를 이용하여 측정하였다. 플라보노이드의 검정곡선을 작성하기 위해 표준물질로 quercetin (Sigma-Aldrich, Q4951)을 이용하였으며, 자외선 파장은 415 nm에서 측정하였다[9]. 냉동 건조한 시료 1 mg/mL에 10% aluminum nitrate 0.1 mL와 1 M potassium acetate 0.1 mL를 혼합한 후 메탄올을 이용하여 총부피를 5 mL로 제조하였다. 제조된 시료는 암실에서 40 min간 방치한 후 자외선 분광광도계를 이용하여 정량하였다. 측정된 흡광도는 검정곡선을 이용하여 quercetin equivalents ($\mu\text{g QE/mL dw}$)로 환산하였다[13,14].

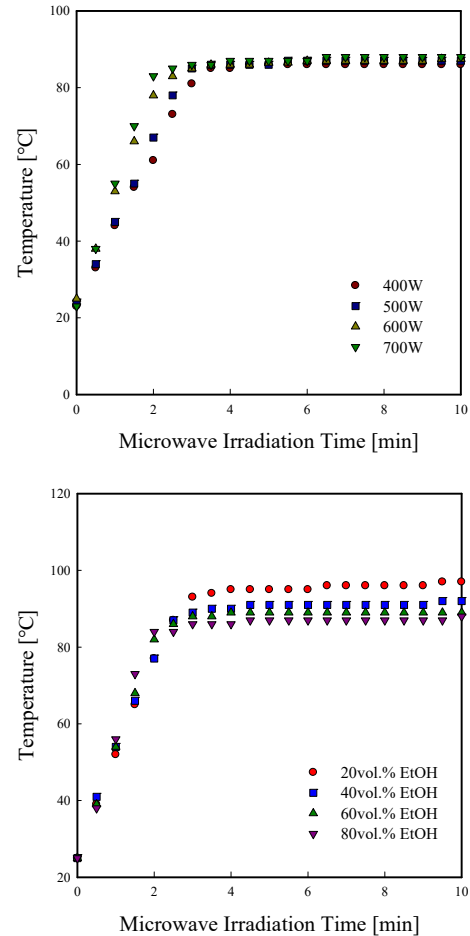


Figure 1. Variation of temperature with microwave irradiation time and ethanol/water volume ratio.

3. 결과 및 고찰

3.1. 레몬그라스로부터 플라보노이드 성분의 추출

마이크로웨이브 에너지를 이용하여 레몬그라스로부터 플라보노이드 성분을 추출하기 위한 독립변수를 결정하기 위해 기초실험을 진행하였다. 본 연구에서는 추출용매의 극성을 조절하기 위해 주정/초순수 부피비, 그리고 추출에너지를 공급하기 위해 마이크로웨이브 조사시간과 조사세기 등을 독립변수로 설정하였다. 마이크로웨이브 조사시간 변수범위를 결정하기 위해 마이크로웨이브 조사세기와 주정/초순수 부피비에 추출용매의 온도변화를 Figure 1에 나타내었다. 주정/초순수의 부피비 80 vol.%의 조건에서 마이크로웨이브 조사세기가 증가함에 따라 추출용매의 온도는 증가하였으며, 마이크로웨이브 조사세기에 관계없이 2.0-4.0 min에서 추출용매의 끓는점인 87 °C에 도달하는 것을 알 수 있었다. 또한 마이크로웨이브 조사세기를 700.0 W로 일정하게 조사시키면서 주정/초순수의 부피비에 따른 추출용매의 온도변화를 실험한 결과 주정이 비율이 감소할수록 혼합용매의 끓는점인 87-97 °C까지 상승하는 것을 알 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 마이크로웨이브 조사시간 범위를 4.0-10.0 min으로 설정한 후 실험을 진행하였다.

Table 1. Experimental Data on Yield and Total Flavonoids of Lemongrass based on Central Composite Design by Response Surface Method in MASE

| | Experimental factors levels | | | Response values | |
|----|-----------------------------|--------------|-----------|-----------------|---|
| | Time [min] | EtOH [vol.%] | Power [W] | Yield [%] | Total flavonoids [$\mu\text{g QE/mL dw}$] |
| 1 | 6.0 | 50.0 | 500.0 | 16.1 | 28.9 |
| 2 | 8.0 | 50.0 | 500.0 | 17.1 | 32.6 |
| 3 | 6.0 | 60.0 | 500.0 | 12.8 | 37.5 |
| 4 | 8.0 | 60.0 | 500.0 | 17.8 | 44.3 |
| 5 | 6.0 | 50.0 | 600.0 | 9.6 | 39.8 |
| 6 | 8.0 | 50.0 | 600.0 | 8.2 | 31.8 |
| 7 | 6.0 | 60.0 | 600.0 | 14.6 | 40.7 |
| 8 | 8.0 | 60.0 | 600.0 | 17.9 | 33.4 |
| 9 | 5.3 | 55.0 | 550.0 | 19.5 | 44.9 |
| 10 | 8.7 | 55.0 | 550.0 | 14.0 | 40.5 |
| 11 | 7.0 | 46.6 | 550.0 | 14.9 | 27.0 |
| 12 | 7.0 | 63.4 | 550.0 | 16.2 | 31.6 |
| 13 | 7.0 | 55.0 | 465.9 | 15.8 | 29.7 |
| 14 | 7.0 | 55.0 | 634.1 | 15.3 | 43.1 |
| 15 | 7.0 | 55.0 | 550.0 | 20.3 | 43.2 |
| 16 | 7.0 | 55.0 | 550.0 | 14.6 | 43.1 |
| 17 | 7.0 | 55.0 | 550.0 | 17.8 | 40.0 |
| 18 | 7.0 | 55.0 | 550.0 | 15.7 | 38.1 |
| 19 | 7.0 | 55.0 | 550.0 | 19.8 | 43.8 |
| 20 | 7.0 | 55.0 | 550.0 | 19.2 | 44.1 |

3.2. CCD-RSM을 이용한 추출조건 최적화

본 연구에서 사용된 최적화 도구인 CCD-RSM는 통계학적인 특성과 수학적 기술을 결합하여 여러 조건에 따른 최적화된 공정을 제시한다 [15]. 추출공정에 중요한 독립변수로 고려되는 인자에 대한 CCD-RSM 분석을 위한 독립변수 범위는 주정/초순수의 부피비(50.0~60.0 vol.%), 마이크로웨이브 조사시간(6.0~8.0 min), 마이크로웨이브 조사세기(500.0~600.0 W)이다. 독립변수에 영향을 받는 반응치(response)는 추출수율과 플라보노이드 함량을 측정하여 그 값을 회귀분석에 사용하였다. 마이크로웨이브 에너지를 이용한 추출공정에서 최적의 조건을 찾기 위해 CCD-RSM에 따라 설계된 20개의 조건에 대하여 각 실험을 진행하였다. 추출수율, 플라보노이드 함량에 대하여 측정하여 정리된 결과는 Table 1와 같다.

Table 1의 결과를 이용하여 최적화 과정을 진행하면 각 변수에 대한 회귀식을 얻을 수 있다. CCD-RSM에 따라 설계된 마이크로웨이브 에너지를 이용한 레몬그라스 추출수율에 대한 2차 회귀방정식은 다음과 같다.

$$Y = 5 + 4.1t - 0.98C + 0.094W - 0.74t^2 - 0.0466C^2 - 0.000471W^2 + 0.219tC \tag{1}$$

여기서, Y는 추출수율이고, C는 주정/초순수 부피비, t는 마이크로웨이브 조사시간, W는 마이크로웨이브 조사세기이다. 이러한 회귀방정식을 통해 변수의 주효과도, 교호효과도, 적합성 결여 등을 판단할 수 있다. 본 연구의 주효과도인 마이크로웨이브 조사시간, 주정/초순수의 부피비, 마이크로웨이브 조사세기가 반응치에 영향을 끼치는 정

도를 수치화하면 마이크로웨이브 조사시간 : 주정/초순수의 부피비 : 마이크로웨이브 조사세기 = 43.62 : -10.43 : 1.0의 비율로 나타난다. 이는 마이크로웨이브 조사시간이 0.2 min 증가할 때 추출수율은 0.82%가 증가하고, 주정/초순수 부피비가 1.0 vol.% 증가할 때 0.98% 감소하며 마이크로웨이브 조사시간이 10.0 W 증가할 때 추출수율이 0.94% 증가하는 것을 의미한다. 또한 교호효과도인 (마이크로웨이브 조사시간 × 주정/초순수 부피비) : (조사시간 × 마이크로웨이브 조사세기) : (주정/초순수 부피비 × 마이크로웨이브 조사세기)의 비율은 25.17 : -1.23 : 1.0로 나타났다. 추출수율에 영향을 끼치는 주효과도와 교호효과도를 같이 고려하였을 때, 마이크로웨이브 조사시간이 추출수율에 가장 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. CCD-RSM을 이용하여 얻은 회귀식을 이용하여 추출수율에 따른 인자에 대한 영향을 3차원 그래프와 등고선도를 통하여 Figure 2에 나타내었다. 시간을 일정한 값으로 고정한 경우, 일정한 마이크로웨이브 조사세기에 대해 주정/초순수의 부피가 증가할수록 추출수율은 감소하였다. 주정/에탄올의 부피비와 마이크로웨이브 조사세기 모두 범위내의 중간값을 가질 때 추출수율도 높은 것으로 나타났다. 주정/초순수의 부피비를 고정한 경우, 마이크로웨이브 조사시간에는 증가하였다가 감소하였으며 주정/초순수 부피비에는 마찬가지로 증가하였다가 감소하는 경향을 나타내었다. 마이크로웨이브 조사시간과 주정/초순수 부피비의 추출수율에 대한 영향 역시 두 인자 모두 중간 값을 가질 때 최대의 추출수율을 갖는 것으로 나타났다. 마이크로웨이브 조사세기를 고정한 경우, 마이크로웨이브 조사시간과 주정/초순수의 부피비가 증가할수록 추출수율도 증가하였다.

또한 레몬그라스로부터 추출한 추출물의 플라보노이드 함량에 대

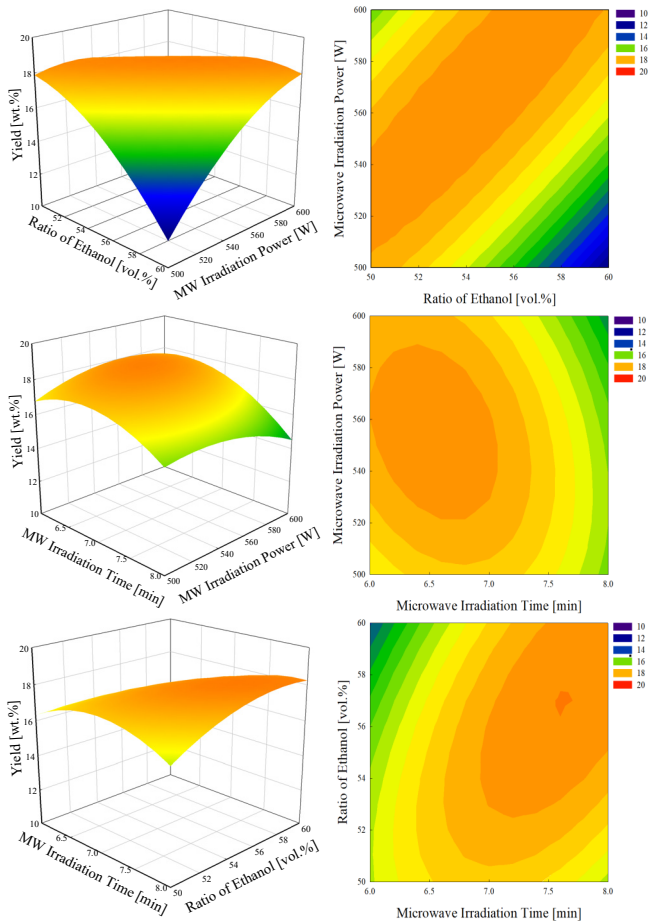


Figure 2. Response surface for yield of lemongrass extract at constant values as a function of time, ethanol concentration and power in MASE.

한 반응표면분석에 의한 회귀방정식은 다음과 같다.

$$F = -1230 + 25.4t + 24.13C + 1.819W + 0.296t^2 - 0.1770C^2 - 0.00076W^2 + 0.094tC \quad (2)$$

여기서, F 는 플라보노이드 함량을 의미하며 나머지 인자들은 위의 추출수율의 회귀식과 같은 의미를 갖는다. 플라보노이드 함량의 주요 과도인 마이크로웨이브 조사시간, 주정/초순수의 부피비, 마이크로웨이브 조사세기가 반응치에 영향을 끼치는 정도를 수치화 하면 마이크로웨이브 조사시간 : 주정/초순수의 부피비 : 마이크로웨이브 조사세기 = 13.96 : 13.27 : 1.0의 비율로 나타난다. 이는 마이크로웨이브 조사시간이 0.2 min 증가할 때 플라보노이드 함량이 5.08% 증가하며 주정/초순수 부피비가 1.0 vol.% 증가할 때 24.13% 증가하고, 마이크로웨이브 조사세기가 10.0 W 증가할 때 플라보노이드 함량이 18.19% 증가하는 것을 의미한다. 또한 교호효과도인 (마이크로웨이브 조사시간 × 주정/초순수 부피비) : (마이크로웨이브 조사시간 × 마이크로웨이브 조사세기) : (주정/초순수 부피비 × 마이크로웨이브 조사세기)의 비율은 -10.61 : 7.30 : 1.0으로 나타났다. 플라보노이드 함량의 경우 주요 과도와 교호효과도를 같이 고려하였을 경우, 추출수율과는 다르게 주정/초순수 부피비가 플라보노이드 함량에 가장 큰 영향을 끼치는 것을 알 수 있었다. 반응표면법을 이용하여 얻은 회귀식을 이용하여 플라보노이드 함량에 따른 인자에 대한 영향을 3차원 그래프와 등고선

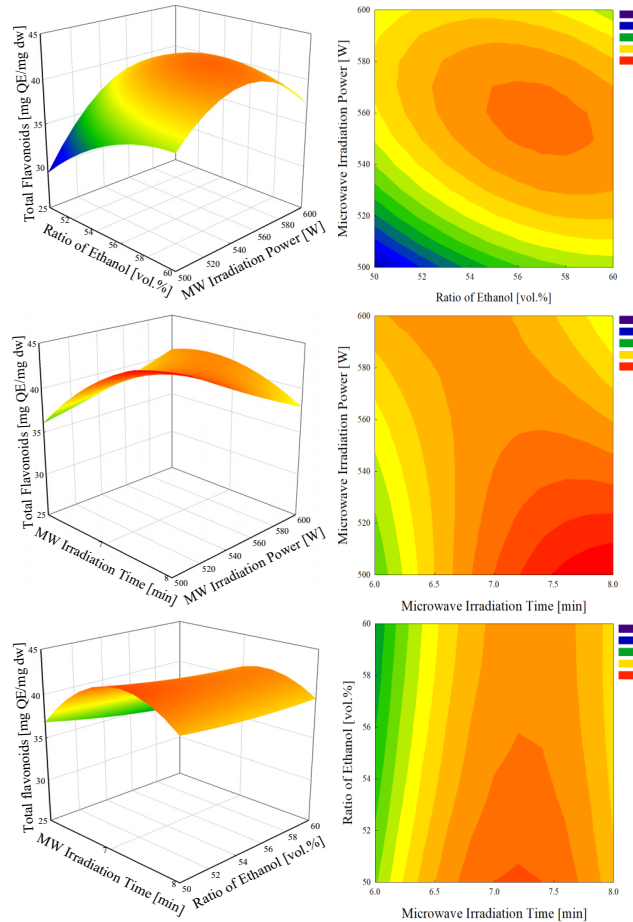


Figure 3. Response surface for total flavonoids of lemongrass extract at constant values as a function of time, ethanol concentration and power in MASE.

도를 통하여 Figure 3에 나타내었다. 마이크로웨이브 조사시간을 고정한 경우, 주정/초순수의 부피비에는 증가하였으며 마이크로웨이브 조사세기에는 증가하다가 소폭 감소하는 경향을 보였다. 주정/초순수 부피비를 고정한 경우에는 시간에 대해서는 계속해서 증가하였으며 반대로 마이크로웨이브 조사세기에는 반비례하는 경향을 보였다. 마이크로웨이브 조사세기를 고정한 경우, 마이크로웨이브 조사시간에 따라서 증가했다가 감소하는 경향을 보인 반면에 주정/초순수의 부피비에는 큰 변화를 보이지 않았다. 이는 마이크로웨이브 추출에서 마이크로웨이브 조사세기를 고정시킨 경우에 플라보노이드 함량은 추출 용매의 농도보다 마이크로웨이브 조사시간에 더 많은 영향을 받는 것으로 해석할 수 있다.

앞서 세 가지 인자(마이크로웨이브 조사시간, 주정/초순수 부피비, 마이크로웨이브 조사세기)에 따른 두 가지 요인(추출수율, 플라보노이드 함량)에 대한 회귀식을 각각 얻었으며, 그에 따른 표면도를 3차원 그래프와 등고선도로 나타내었다. 최종적으로 인자에 따른 요인에 대한 최적화를 하고자 한다. 추출수율과 플라보노이드 함량 모두 최대값을 가질 수 있는 세 가지 인자에 대한 최적 조건 그래프를 Figure 4에 나타내었다. CCD-RSM을 이용한 최적화 결과 레몬그라스 마이크로웨이브-용매 추출의 최적조건은 마이크로웨이브 조사시간 6.1 min, 주정/초순수 부피비 56.3 vol.%, 마이크로웨이브 조사세기 574.6 W로 나타났다. 이 조건으로부터 예상되는 요인의 값은 추출수율 17.2%, 플라

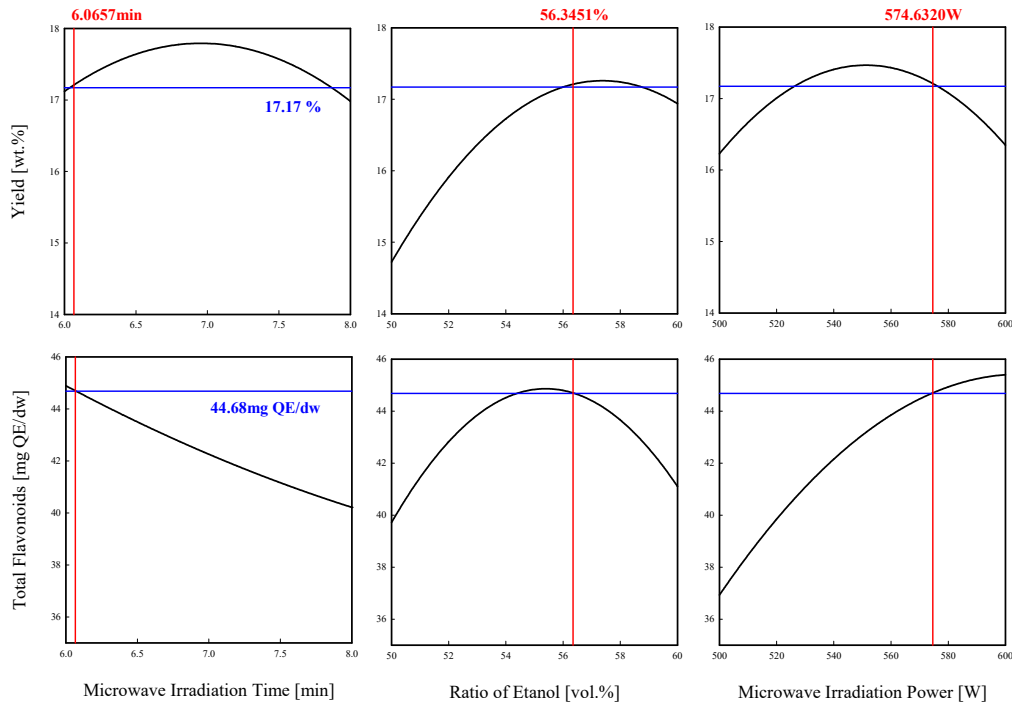


Figure 4. Optimization graph of response surface for yield and total flavonoids of lemongrass.

보노이드 함량 44.7 μg QE/mL dw으로 나타났다. CCD-RSM 분석 결과 본 연구에서의 종합만족도 $D = 0.8562$ 이고 그 유의성은 5% 이내에 수준에서 나타났다.

4. 결 론

본 연구에서는 마이크로웨이브 에너지를 이용하여 항산화능 및 플라보노이드 성분이 포함된 레몬그라스로부터 플라보노이드 성분을 추출하기 위한 최적추출조건을 CCD-RSM으로 산출한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 추출에 사용된 추출용매는 초순수와 95%-주정을 이용하여 최적 추출조건의 범위를 알아보고, 추출된 플라보노이드 성분의 추출수율을 측정하고, 플라보노이드 함량분석을 수행하였다. 추출수율에 영향을 끼치는 주효과도와 교호효과도를 같이 고려하였을 때, 추출수율의 경우 마이크로웨이브 조사시간이 플라보노이드 함량의 경우에는 주정/초순수 부피비가 가장 큰 영향을 미치는 것을 알 수 있었다.

2. CCD-RSM 분석 결과 최적조건인 주정/초순수 부피비(56.3 vol.%), 마이크로웨이브 조사시간(6.1 min), 마이크로웨이브 조사세기(574.6 W)에서 추출수율(17.2%)와 플라보노이드 함량(44.7 μg QE/mL dw)의 결과를 얻는 것으로 나타났다. 이때 종합만족도는 $D = 0.8562$ 이고, P-value는 추출수율(0.037)과 플라보노이드 함량(0.002)으로 나타났다. 이 조건에서의 실제실험 결과 오차율은 5.0% 이하로 나타나 높은 유의수준의 결과를 얻을 수 있었다

References

1. M. J. Akhtar, M. Ahamed, H. A. Alhadlaq, and A. Alshamsan, Mechanism of ROS scavenging and antioxidant signalling by redox metallic and fullerene nanomaterials: Potential implications in

ROS associated degenerative disorders, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1861**(4) 802-813 (2017).

2. M. Y. Lee, M. S. Yoo, Y. J. Whang, Y. J. Jin, M. H. Hong, and Y. H. Pyo, Vitamin C, total polyphenol, flavonoid contents and antioxidant capacity of several fruit peels, *Korean J. Food Sci. Technol.*, **44**(5), 540-544 (2012).

3. N. C. Cook and S. Samman, Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, **7**, 66-76 (1996).

4. Y. Christen, Oxidative stress and Alzheimer disease, *Am. J. Clin. Nutr.*, **71**, 621-629 (2000).

5. S. B. Lee, X. Wang, and I. K. Hong, Ultrasound-assisted extraction of total flavonoids from wheat sprout: Optimization using central composite design method, *Appl. Chem. Eng.*, **29**(6), 663-669 (2018).

6. I. K. Hong, B. R. Park, G. S. Jeon, and S. B. Lee, Extraction of flavonoid components from persimmon leaf, thistle and new green, *Appl. Chem. Eng.*, **27**(3), 276-279 (2016).

7. V. C. Georgea, G. Dellaireb, and V. Rupasinghe, Plant flavonoids in cancer chemoprevention: Role in genome stability, *Nutr. Biochem.*, **45**, 1-14 (2017).

8. A. H. Clifford and S. L. Cuppett, Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 1063-1072 (2000).

9. N. C. Cook and S. Samman, Flavonoids-chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources, *J. Nutr. Biochem.*, **7**, 66-76 (1996).

10. H. L. Jiang, J. L. Yang, and Y. P. Shi, Optimization of ultrasonic cell grinder extraction of anthocyanins from blueberry using response surface methodology, *Ultrason. Sonochem.*, **34**, 325-331 (2017).

11. F. Dranca and M. Oroian, Optimization of ultrasound-assisted extraction of total monomeric anthocyanin (TMA) and total phenolic content (TPC) from eggplant (*Solanum melongena* L.) peel, *Ultrason. Sonochem.*, **31**, 637-646 (2016).

12. K. Ameer, S. W. Bae, Y. Jo, H. G. Lee, A. Ameer, and J. H. Kwon, Optimization of microwave-assisted extraction of total extract, stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni) leaves, using response surface methodology (RSM) and artificial neural network (ANN) modelling, *Food Chem.*, **229**, 198-207 (2017).
13. S. Beck and J. Stengel, Mass spectrometric imaging of flavonoid glycosides and biflavonoids in *Ginkgo biloba* L., *Phytochem. Lett.*, **130**, 201-206 (2016).
14. R. F. Yanga, L. L. Genga, H. Q. Lub, and X. D. Fanc, Ultrasound-synergized electrostatic field extraction of total flavonoids from *Hemerocallis citrina* baroni, *Ultrason. Sonochem.*, **34**, 571-579 (2017).
15. A. Das, A. K. Golder, and C. Das, Enhanced extraction of reba-

udioside-A: Experimental, response surface optimization and prediction using artificial neural network, *Ind. Crops Prod.*, **65**, 415-421 (2015).

Authors

Bong Ho Yoo; Ph.D., Professor, College of Engineering, Dankook University, Yongin 16890, Korea; bongho@dankook.ac.kr

Hyun Sik Jang; M.Sc., Researcher, Department of Chemical Engineering, Dankook University, Yongin 16890, Korea; hyunsick5879@gmail.com

Seung Bum Lee; Ph.D., Professor, Department of Chemical Engineering, Dankook University, Yongin 16890, Korea; leesb@dankook.ac.kr