

## Propolis로부터 Quercetin 분리 기술에 관한 연구

김유석, 김선일\*  
 조선대학교 화학공학과  
 (sibkim@mail.chosun.ac.kr\*)

## The Study on Separating Techniques of Quercetin Substances in Raw Propolis

You-Suk Kim, Sun-Il Kim\*  
 Department of Chemical Engineering, Chosun University  
 (sibkim@mail.chosun.ac.kr\*)

## 서론

Propolis의 성분은 주로 polyphenol류이며 flavonoid, phenolic acid, ester, phenolic aldehydes, ketone, wax와 각종비타민 및 미네랄이 함유되어있으며[1], 여러 가지의 특성을 보이고 있다[2].

Quercetin은 Flavonoid속에 들어있는 여러 물질(morin, gossypetin, chrysin, rutin, catechin etc) 중 하나이다. Flavonoid는 대개의 polyphenolic substance의 그룹형태로 양파[3], 어성초[4], 두충나무, 참당귀, berry 등의 식물체에 존재하나, 그 양은 매우 미비하다. 자연에서 생산되는 천연항생제라고 불리는 propolis에도 flavonoid가 존재하고 그 양은 식물체의 것보다는 몇 배에서 몇 십 배 존재하고 그 종류도 150여종에 이르고 [1-2] 그 효능도 다양하다[5].

Free radicals(the superoxide radical, hydroxyl radical, hydrogen peroxide etc.)는 산화에 의해 암, 천식, 심장병, 당뇨병 등의 질병을 유발시키고 노화를 발생시킨다, 이러한 이유로 이들이 산화되는 것을 억제하는 항산화 물질의 개발, 특히 자연으로부터의 개발연구가 활발히 진행되고 있다. 또한 quercetin은 항암[6], 항돌연변이 활성[7], 항바이러스 작용[8], 지질산화반응 억제[9] 등에도 효과가 있음이 알려져 있다. 현재 propolis로부터 quercetin 추출 방법으로는 유기용매, 특히 에탄올로 추출하는 것(EEP)이 일반적인 방법이나, 이는 propolis속에 있는 wax, 수지 등이 flavonoid와 동시에 다량 추출됨으로 복용이 힘들고, 특히 물에 잘 섞이지 않는 단점으로 실용화에 한계가 있으며, 최근에는 일부 알레르기 등의 부작용이 보고되고 있어, 이에 propolis의 추출에 유기용매가 아닌 순수한 물로 추출하는 방법(WEP)이 요구되고 있다.

## 실 험

Propolis는 천연에서 채취한 상태(브라질산)를 구입하여, 냉장고에 1일 이상 보관하면서 사용 시 분쇄하여 사용하였다. 분쇄한 Propolis는 증류수와 1:10의 비율(w/v)로 용해하여 300 ml를 만들어 500 ml 용량 플라스크에 담아 추출하였다. 추출은 다음과 같은 5가지 방법으로 실시하였다. 1) shaking water bath(TS-100, Advatec, Japan)에서 실온 상태로 24 ~ 240 시간 동안 진탕을 하고 80 rpm으로 교반 추출, 2) 동일한 shaking water bath에서 온도를 70±2°C의 온도로 24 ~ 240 시간 진탕을 하고 속도는 80 rpm으로 교반 추출, 3) stirrer/hot plate를 사용하여 70±2°C에서 80 rpm으로 24 ~ 240 시간 동안 추출, 4) ultrasonic stirrer(USS-1, NISSEI, Japan)를 사용하여 40 kHz의 주파수로 고정하여 별도의 항온장치를 만들어 70±2°C에서 800 rpm으로 24 ~ 240 시간 동안 추출, 5) 70±2°C의 shaking water bath에서 진탕속도를 80 rpm으로 36 시간 동안 교반, 추출 후 역시 70±2°C의 온도로 stirrer/hot plate로 800 rpm의 회전수로 144 시간 교반 추출한 것을 ultrasonic stirrer를 사용하여 70±2°C, 800 rpm에서 60 시간

추출하였다.

모든 실험에서 시료분석은 추출상황에 따라 12 ~ 48 시간마다 하였다. 이러한 과정을 거쳐 생산된 수용성 Propolis는 식품 공정에 의한 방법에 의해 확인시험을 실시한 후 flavonoid의 함량이 확인된 시료는 원심분리기로 30 분간 원심분리 후 상등액을 membrane filter(millipore 0.45 $\mu$ m)로 여과한 후 박 등[10]의 방법을 기초로 HPLC(분석 조건 : octadecylsilane (ODS) column 125 × 5 mm, mobile phase solvent A = methanol /H<sub>2</sub>O/acetic acid=5 : 93 : 2 v/v/v, B = methanol, Flow rate 1.0 mL/min, UV dectctor 370nm, injection volume 10mL)로 분석하여 Quercetin의 함량을 정량하였다. 모든 실험값은 3회 반복하여 정량한 값을 평균하였다.

## 결 과

현재 propolis 추출은 Ethanol Extracted Propolis(EEP), Glycol Extracted Propolis (GEP), Water Extracted Propolis(WEP), 미셀화 추출법 등이 사용되고 있으나, 전세계적으로 대부분이 EEP를 이용하여 생산하고 있다. 위에서 살펴본 바와 같이 최근에는 여러가지 장점으로 WEP가 요구되고 있으나, 아직 효율적인 추출법이 없어 EEP 법으로 생산하여 여러 가지 방법으로 Ethanol을 제거한 후, 이를 동결건조하여 WEP로 대신하고 있다.

이러한 제품 역시 물에 녹여서 사용하지는 못하고, 정제 및 캡슐 등을 이용하여 실용화 되고 있는 실정이다. 이에 수용성의 효율이 좋은(EEP와 거의 비슷한)WEP의 개발은 중요하며 이에 대한 관심이 많아 세계적으로 활발한 연구가 진행되고 있다. Propolis는 단순히 열수추출만 하여도 propolis 속의 일부 수용성 flavonoid는 추출됨은 이미 알고 있으나, quercetin은 전혀 추출되지 않는다.

본 연구는 다양한 조건으로 flavonoid를 추출을 시도하여 raw propolis로부터 전혀 유기 용매를 사용하지 않고 물 만을 용매로 사용하여 유효 적절한 조건을 만들면 flavonoid를 추출하였고, flavonoid 확인 시험 후 함유물중에서 항산화 활성물질 및 항암 물질로 유용한 quercetin을 분리하여 정량하였다.

1) Shaking water bath에서 실온 상태로 24 ~ 240시간동안 진탕을 80 rpm으로 하여(진탕으로 인한 온도상승은 막기 위해 송풍을 실시함) 교반 추출한 경우, 교반을 시작하면서 물의 색이 변하면서 향도 진해 flavonoid가 추출되는 것으로 생각하였으나, flavonoid는 144 시간 경과 후 확인되었다. 초기의 색은 벌들이 propolis를 수집할 때 propolis에 혼합된 식물들의 물질이라 생각되며, quercetin은 240 시간이 지나도 전혀 검출되지 않았다. propolis는 가라앉은 상태로 초기의 상태를 거의 유지하였다.

2) Shaking water bath에서 온도를 70 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C의 온도로 24 ~ 240 시간 진탕 속도는 80 rpm으로 교반 추출 추출한 것도 flavonoid는 24 시간 경과 후 확인되었으며, 이 경우는 24 시간이 경과하면서 wax와 수지가 녹아서 플라스크의 윗 부분에 부착되었으나, 실험에 걸림돌이 안되므로 무시하였다. 시간이 경과하면서 raw propolis는 물에 녹아가면서 회전에 의해 공 모양을 형성하고 추출의 진행이 방해받아 수시로 냉동실에 넣어 냉각 후 분쇄하여 실험을 지속하였다. Quercetin은 144시간경과 후 미량 검출되었고, 240 시간이 경과 후 함량은 raw propolis 100 g에 약 0.3 mg 추출되었다.

3) Stirrer/hot plate를 사용하여 70 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C에서 800 rpm으로 24 ~ 240시간동안 추출한 경우, 24 시간이 경과하면서 wax와 수지가 녹아서 플라스크의 벽면 전체에 부착되어 이 경우는 수시로 떼어주었으며, 특히 교반자에 붙은 propolis의 제거를 계속 제거시켰다. 온도가 증가함에 따라 증발이 발생하여 수분이 증발되지 않도록 플라스크 상부를 냉하도록 유지하였다. 일부 증발되는 양은 무시하였다. 12 시간 경과 후 flavonoid가 확인되었으며, quercetin은 시간이 경과함에 따라 raw propolis 100 g에 약 0.2 mg(48시간), 약 0.5 mg(72시간), 약 1.0 mg(144시간), 약 3.0 mg(196시간), 약 5.2 mg(240시

간)이 추출되었다.

4) Ultrasonic stirrer를 사용하여 별도의 항온장치를 만들어  $70\pm 2^\circ\text{C}$ 에서 1,200rpm으로 24 ~ 240 시간 추출한 경우, 초음파에 의해 교반이 전체적으로 우수하게 되므로, 교반자에 부착되거나, 플라스크 벽면에 심하게 붙는 경우는 줄어들었으나, 플라스크 윗 부분에 일부 부착되는 현상은 있었다. 기계의 특성상 초음파는 1 회에 15 분 작동하고 15 분 멈추도록 하여 실험을 실시하였다. 이 방법은 초음파에 의한 온도 상승을 주의하여야 하므로 열전대를 이용한 디지털 온도계를 부착하여 조절하였다. 12시간 경과 후 flavonoid가 확인되었으며, quercetin은 시간이 경과함에 따라 raw propolis 100 g에 약 0.1 mg(48시간), 약 0.3 mg(72시간), 약 0.9 mg(144시간), 약 5.0 mg(196시간), 약 7.2 mg(240시간) 추출되었다.

5)  $70\pm 2^\circ\text{C}$ 의 shaking water bath에서 진탕 속도를 80 rpm으로 36 시간 동안 교반, 추출 후 냉장고에서 12 시간 보관 후 부유 물질을 제거하고, 공 모양으로 만들어진 raw propolis를 분쇄 후, 시료를  $70\pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도로 맞춘 후 stirrer/hot plate로 800 rpm의 회전수로 144 시간 교반 추출한 것을 ultrasonic stirrer를 사용하여  $70\pm 2^\circ\text{C}$ , 1,200 rpm에서 60 시간 추출하였다. 이 경우는 180, 240 시간 후에 시료를 각각 취하였다. Quercetin의 함량은 raw propolis 100 g에 약 7.1 mg(180시간), 약 12 mg(240시간)이 추출되었다.

## 결론

본 연구에서 여러 가지 추출법을 이용하여 raw propolis에 함유된 flavonoid를 추출하고, 특히 일부 활성산소에 의한 자유 라디칼 반응으로 야기되는 성인병, 발암, 노화 등을 예방하고 억제하는데 탁월한 효과가 있는 quercetin을 추출하여 HPLC 분석에 의하면 시간에 따라 raw propolis 100 g에 약 0 ~ 12 mg이었다. 이는 EEP 추출방법에 의한 함량 17 mg보다는 못하지만, 기존의 WEP방법에 의한 추출은 0 mg에 근접함으로써, 이에 비하면 매우 높은 결과라 할 수 있다.

향후 천연에서 얻어지는 propolis로부터 추출되는 flavonoid와 quercetin을 수용성으로 만듦으로 현재 탁월한 효과가 있으면서도 생체효소 활성을 억제하고 암을 유발시킬 수 있다는 안정성 때문에 사용이 꺼려지는 BHA와 BHT 등을 대체 할 수 있으리라 여겨지며, 특히 본 추출법에 의한 추출되는 수용성 propolis, flavonoid, quercetin은 현재 생산되는 대부분의 추출물이 지용성임으로 개발, 적용되지 못했던 많은 기능성 식품 및 약품에 사용이 가능하여 이용가치가 매우 높다고 판단된다.

## 참고 문헌

1. Walker, P. and Crane, F. "Constituents of Propolis." *Apidologie*. **18**, 327 (1987).
2. Miyataka, H., Nishiki, M., Matsumoto, H., Fujimoto, T., Matsuka, M. and Satoh, T. "Evaluation of Propolis. I. Evaluation of Brazilian and Chinese Propolis by Enzymatic and Physico-chemical Methods." *Biol. Pharm. Bull.* **20**(5), 496(1997).
3. Formica, J. V and Regelson, W. "Review of the Biology of Quercetin and Related Bioflavonoids." *Food Chem. Toxicol.* **33**, 1061(1980).
4. Lee, S. T., Lee, Y. H., Choi, Y. J., Shon, G. M., Lee, H. J. and Heo, H. S. "Com-parison of Quercetin and Soluble Tannin in *Houttuynia cordata* THUNB. according to Growth Stages and Plants parts." *Korean J. Med. Corp Sci.* **10**, 12(2002).
5. Dobrowolski, J. W., Vohora, S. B., Sharma, K., Shah, S. A., Naqvi, S. A. H and Dandiya, P. C. "Antibacterial, Antifungal, Antiamoebic, Antiinflammatory and Anti

- pyretic Studies on Propolis Bee Products." *J. Ethnopharmacol.* **35**(1), 77(1991).
6. Markaverich, B. M., Roberts, R. R., Alejandro, M.A., Johnan, G. A., Middledich, B.S. and Clark, J. M. " Bioflavonoid Interaction with Rat Utenne Type II Binding Sites and growth Inhibition." *J.Steroid Biochem.* **30**, 71(1998).
  7. Edenhader, R. and Tang, X. "Inhibition of the Mutagenicity of 2-Nitrofluorene, -Nitrofluorathene and 1-Nitropyrene by Flavonoids, Coumarines, Quinones and Other Phenolic Compound." *Food Chem. Toxicol.* **35**, 357(1996).
  8. Veckenstedt, A., Beladi, I. and Musci, I. " Effect of Treatment with Certain Flavonoids on Mengo Virus-induced Encephalitis in Mice." *Arch.Virol.* **57**, 255(1978).
  9. Younes, M. and Siegers, C. P."Inhibitory Action of Some Flavonoids on Enhanced Spontaneous Lipid Peroxidation Following Glutathione Depletion." *Planta Medica.*, **43**, 240(1981).
  10. 박양균, 이창용. "양파 가공 중 Quercetin 관련물질의 함량변화, 목포대학교 논문집, **15**, 629(1994).