KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 26, No. 5, pp. 622~626(1994)

Propolis 추출물의 유지 산화 억제 효과 비교

임대관 · 최 웅 · 신동화 · 정용섭
전북대학교 식품공학과

Antioxidative Effect of Propolis Extract on Palm Oil and Lard

Dae-Kwan Lim, Ung Choi, Dong-Hwa Shin and Yong-Seob Jeong
Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Chonju

Abstract

Propolis was extracted by several organic solvents ,and the antioxidative effect of the extracts on palm oil and lard was tested with the extract solely or combined with some synergists, using the Rancimat Method. The extraction yields of propolis by each solvent were 68.1% (75% ethanol), 75.5% (99% ethanol), 67.4% (methanol), 86.7% (chloroform), 72.6% (ethyl acetate) and 65.6% (butanol). AI (Antioxidative Index; induction p-eriod of oil containing antioxidant/induction period of natural oil) of the methanol extract was highest, and more effective on lard than palm oil. The ethyl acetate fraction of 75% ethanol extract showed higher antioxidative effect than 75% ethanol extract, and obtained the highest antioxidative effect on palm oil with ascorbic acid as synergist and lard with δ-tocopherol

Key words: antioxidant, propolis, palm oil, lard, synergist, Rancimat Method

서 론

유지는 가수분해, 산화, 중합 등에 의해서 저장중 변질이 일어나는데, 그 중에서도 산화에 의한 산패[1]는 유지 및 유지를 이용한 식품의 변질에 가장 중요한 요인이 되고 있으며 이를 억제하여 저장성을 향상시킬 수 있는 항산화제를 개발하기 위한 많은 연구[2-5]가 수행되었다. 현재 사용되고 있는 항산화제로는 인공 합성항산화제인 BHA, BHT, TBHQ 등과 함께 천연항산화제인 tocopherol이 있고 rosemary 추출물이[6] 일부 이용되고 있다. BHA, BHT는 값이 저렴하고 항산화력이 우수한 phenol성 물질이지만 열안정성이 떨어지고 발암의 위험성[7,8]으로 인하여 소비자들은 합성항산화제 보다는 천연항산화제를 보다 더 선호하고 있다. Tocopherol은 내열성이 강하나 고가이고 합성항산화제에 비하여 항산화력이 약하며 식물성 기름에서는 항산화효과가 낮은 등의 단점[6]이 있다.

Propolis는 꿀벌이 나무에서 수집한 단단한 수지를 함유한 물질인데 꿀벌이 원래의 propolis 구성성분을 변형하여 꿀을 보전하기 위하여 벌집의 틈새 등 방을 튼튼하게 하는 물질로 꿀의 방부에도 관여하는 것으로 알려져 있다[9]. Propolis의 주요 구성성분은 resin, balsam 그리고 phenol 화합물로 알려져 있으며 phenol fraction의 주된 구성성분은 flavonoids 임이 밝혀지고 있다[10]. 이들 propolis는 벌들에 의해서 채집되기 때문에 채취 장소에 따라서 구성성분의 차이가 있으며 함유된 성분의 항균 및 항산화[10] 특성이 보고 되고 있다. Propolis에서 flavonoid를 분리하여 그 성분이 5,7-dihydroxyflavone임[11]을 밝혀낸 바 있으며 1991년 중반까지 137종의 flavonoid[12]가 보고된 바 있다. 최근에 발표되어 항산화성이 인정된 식물 추출물중에 그 원인 물질이 flavonoid에 의한 것이라고 보고된 것들로는 칠레의 토착식물[13], 왕겨[14,15], 오레가노[16] 등이 있다.

본 실험에서는 propolis를 여러가지 용매로 추출하고 그 추출물을 palm oil과 lard에 일정량씩 첨가하여 항산화 효과를 실험하였으며 synergist 첨가에 의한 항산화 효과 상승도 비교하여 결과를 얻었기로 이에 보고한다.

재료 및 방법

재료

Propolis는 93년 10월경 전북대학교 축산학과에서 양봉한 벌통에서 채집한 것을 분양받아 75% ethanol로 용해시키고 이 액을 시료로 사용하였다.

실험 유지 및 시약

어떤 항산화제도 첨가되지 않은 palm oil(농심에서 분양받음)과 lard(롯데 삼강 제품)를 냉장보관하며 사용

Corresponding author: Dong-Hwa Shin Department of Food Science & Technology, Chonbuk National University, Dukjin-Dong, Chonju, Chonbuk 560-756, Korea

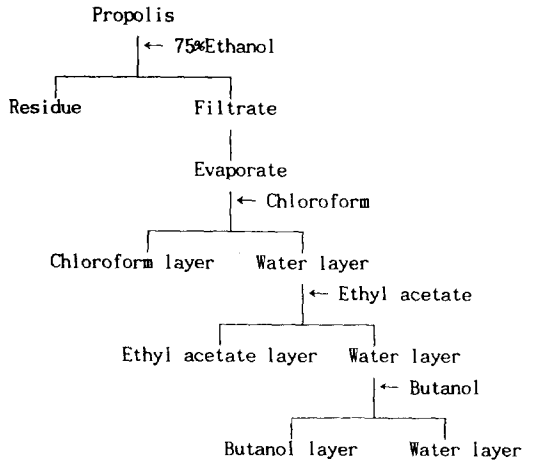

Fig. 1. Fractionation flow chart of propolis

하였다. Ascorbic acid, d-δ-tocopherol(Sigma사 제품), citric acid(동양화학 제품)는 특급을 사용하였고 0.1g씩을 각각 95% EtOH 10 ml에 녹여 사용하였다. 추출용 용매는 1급을 사용하였다.

추출방법 및 가용성 고형분 함량 측정

감압 농축기로 ethanol을 제거하고 둥근바닥 플라스크에 추출용매(시료중량의 5배)를 넣고 환류냉각관을 부착하여 수욕상에서(75℃, 3 hr) 추출, 여과, 농축(rotary vacuum evaporator, 45℃)하였다. 가용성 고형분 함량은 추출물(1 ml)을 105℃에서 건조 후, 증발 잔사의 양으로 하였다.

추출 수율 측정

추출용 시료 건물량에 대한 추출물의 총 가용성 고형분 함량의 백분율로 계산하였다.

75% ethanol 추출물의 분획

분액깔대기를 이용, Fig. 1과 같이 chloroform($CHCl_3$), ethyl acetate(EtOAc), butanol(BuOH), water 순으로 분획 후 45℃ 수욕상에서 rotary vacuum evapo-rator로 완전히 농축하여 분획물을 얻었다.

항산화력 비교

Rancimat 679(METROHM AG, CH-9100 Herisau, Swiss)를 이용하여 측정하였으며, conductivity가 급격하게 증가되는 시점까지를 유도기간으로 계산하여 항산화 정도를 측정하였다. 또 antioxidant index(AI)는 각 항산화제를 첨가한 실험구의 유도기간을 무첨가구의 유도기간으로 나눈 값으로 구하였다. Rancimat의 측정조건은 시료유지 2.5g을 reaction vessel에 취하고, 증류수 70 ml을 measuring vessel에 넣은 후, air flow rate 20 l/hr, 반응온도 120℃로 하여 산화 안정성을 비교하였다.

Table 1. Extraction yield of propolis by various solvents

Solvent	Extraction yield (%, w/w)
75% Ethanol	68.1[1)]
99% Ethanol	75.5
Methanol	67.4
Chloroform	86.7
Ethyl acetate	72.6
Butanol	65.6

[1)]Mean value of duplicate

결과 및 고찰

추출 용매별 수율

Propolis를 각종 용매로 추출하여 얻은, 용매별 추출수율을 Table 1에 나타내었다. Table 1을 보면 추출수율은 chloroform이 86.7%로 가장높고 methanol 67.4%, butanol 65.5% 순이었다. 이 결과는 methanol을 용매로 하여 rosemary[17], 칡뿌리[18], 붉나무[19]의 추출수율을 실험한 결과 각각 26.0, 17.6, 14.53%이었던 것과 비교할 때 상당히 높은 추출 수율이었다. 따라서 propolis 구성성분의 대부분이 유기용매에 잘 용해된다는 것을 알 수 있었다.

추출 용매별 항산화 효과

추출용매를 달리하여 얻은 propolis 추출물을 농도별로 palm oil과 lard에 첨가하여 조사한 항산화 효과는 Table 2와 같다. Propolis의 용매별 추출물을 palm oil과 lard에 첨가할 때 첨가물의 양이 증가함에 따라서 항산화 효과도 증가하고 있음을 알 수 있었으며, palm oil 보다는 lard에 첨가하였을 때 항산화 효과가 더 높게 나타났다. Table 1에서 보면 MeOH(methanol)에 의한 추출 수율은 다른 용매 추출물에 비하여 비교적 낮게 나타났지만, 이 추출물 600 ppm을 palm oil과 lard에 첨가했을 때 AI가 각각 1.78, 5.54로 다른 유기용매 추출물의 AI보다 높게 나타나는 것으로 보아서 methanol에 propolis의 항산화 물질이 가장 잘 용출됨을 알 수 있었다. 또 propolis의 추출용매별 AI는 chloroform을 제외하고는 큰 차이가 없는 것으로 보아 항산화 효과가 있는 물질이 여러가지 용매에 잘 녹음을 알 수 있었다. Lard에 propolis의 MeOH 추출물 600 ppm 첨가시의 AI가 5.54인 것은 붉나무 MeOH 추출물[19]의 AI가 4.4이었던 것과 비교해 볼 때 항산화 효과가 매우 높음을 알 수 있다.

순차 용매 분획별 항산화 효과

추출수율이 비교적 높고 추출용매로서 안전성이 확보된 75% ethanol을 용매로하여 얻어진 추출물을 다시 순차 용매 분획하여 얻은 분획물을 palm oil과 lard에 농도별로 첨가하여 항산화 효과를 비교한 결과는 Table 3과 같다. Table 3에서 보면 crude extract를 600 ppm

Table 2. Antioxidative effect of propolis extract by various solvents on palm oil and lard

Solvent	Palm oil			Lard		
	200 ppm	400 ppm	600 ppm	200 ppm	400 ppm	600 ppm
99% Ethanol	1.26[1),2)]	1.43	1.64	2.49	3.71	5.09
75% Ethanol	1.26	1.43	1.63	2.60	3.88	4.51
Methanol	1.34	1.59	1.78	2.84	4.10	5.54
Chloroform	1.16	1.37	1.55	2.04	3.03	3.44
Ethyl acetate	1.28	1.48	1.61	2.34	3.40	5.06
Butanol	1.24	1.42	1.64	2.35	3.53	4.96

[1)]Antioxidative index (AI: Induction time of oil containing of each extract/Induction time of test oil)
[2)]Mean value of duplicate

Table 3. Antioxidative effect of each fraction of propolis ethanol extract on palm oil and lard

Fraction	Palm oil			Lard		
	200 ppm	400 ppm	600 ppm	200 ppm	400 ppm	600 ppm
Crude extract	1.26[1),2)]	1.43	1.63	2.60	3.88	4.51
Chloroform	1.22	1.44	1.64	2.89	3.68	4.20
EtOAc	1.30	1.64	1.81	2.72	4.49	5.97
Butanol	1.03	1.18	1.38	1.32	1.53	1.83
Water	–	1.10	1.12	–	–	1.10

[1),2)]Refer the foot note of Table 2

Table 4. Synergistic effect of 75% ethanol extract of propolis on palm oil and lard

Synergist	Palm oil			Lard		
	200 ppm	400 ppm	600 ppm	200 ppm	400 ppm	600 ppm
EE[1)]	1.26[2),3)]	1.43	1.63	2.60	3.88	4.51
EE+AA 200 ppm	1.58	1.79	1.98	2.77	4.14	4.63
EE+CA 200 ppm	1.51	1.64	1.92	2.47	3.85	5.09
EE+TO 200 ppm	1.45	1.56	1.90	4.40	5.51	6.43

[1)]EE(Ethanol extract), AA(Ascorbic acid), CA(Citric acid), TO(δ-Tocopherol)
[2),3)]Refer the foot note of Table 2

Table 5. Synergistic effect of EtOAc fraction of propolis EtOH extract on palm oil and lard

Synergist	Palm oil			Lard		
	200 ppm	400 ppm	600 ppm	200 ppm	400 ppm	600 ppm
EE[1)]	1.30[2),3)]	1.64	1.81	2.72	4.49	5.97
EE+AA 200 ppm	1.67	2.09	2.39	2.70	4.55	6.58
EE+CA 200 ppm	1.55	1.82	2.21	2.89	4.19	6.20
EE+TO 200 ppm	1.43	1.85	2.23	4.49	5.70	7.45

[1),2),3)]Refer the foot note of Table 4

첨가시 palm oil과 lard에 대하여 AI가 각각 1.63, 4.51인데 비하여 EtOAc 분획물은 1.81, 5.97로 항산화 효과의 상승 현상을 보이고 있으며 추출물의 첨가양에 비례하여 항산화 효과가 상승함을 알 수 있었다. EtOAc fraction에서 항산화 효과가 높은 것은 붉나무[19], 쇠비름[20]에서와 같은 경향으로 보인다. 또 chloroform fraction에도 어느정도의 항산화 물질이 존재하고 있으며, water fraction에는 항산화 물질이 거의 잔존하지 않음을 알 수 있었다.

Synergist 첨가에 의한 상승효과

항산화제는 단독 이용시보다 synergist를 함께 사용하는 경우 항산화 효과가 월등히 상승하므로[21,22] propolis 추출물 및 분획물에 대해서도 몇 가지 synergist를 첨가하여 그 효과를 비교하였다.

EtOH 분획물에 synergist로 AA(ascorbic acid), CA(citric acid), 그리고 혼용효과를 보기 위하여 TO(δ-tocopherol) 200 ppm씩을 palm oil과 lard에 첨가하여 산화안정성을 비교한 결과는 Table 4와 같다. Table 4에서

보면 palm oil에 대한 항산화 효과는 75% EtOH 600 ppm과 AA 200 ppm을 첨가했을 때 1.98이었고 lard에 있어서는 75% EtOH 600 ppm과 TO 200 ppm을 첨가했을 때 6.43으로 가장 높게 나타났다. 이런 결과는 palm oil에 대해서는 AA의 상승 효과가 높고 lard에는 TO가 상승 효과가 높다는 결과[19]와 일치하고 있다.

한편 EtOH 추출물을 다시 분획하여 항산화 효과를 비교하여 본 결과 가장 산화 억제 효과가 높았던 EtOAc fraction에 대하여 synergist 효과를 측정한 결과는 Table 5와 같다. 즉 palm oil에 EtOAc 분획물 600 ppm과 AA 200 ppm을 첨가한 경우의 AI는 2.39, EtOAc 분획물 600 ppm과 CA 200 ppm을 첨가한 경우는 2.21 그리고 EtOAc 분획물 600 ppm과 TO 200 ppm을 첨가한 경우는 2.23으로 나타났으며 EtOAc 분획물 600 ppm과 AA 200 ppm을 첨가한 경우는 EtOAc 분획물 600 ppm만을 첨가한 처리구에 비하여 항산화 효과가 32.0% 상승하였다. 이것은 붉나무 EtOH 추출물 600 ppm의 항산화 효과가 AA 200 ppm에 의해서 20.3% 상승한 것[19]에 비하여 비교적 높은 synergism 효과를 나타내었다. 또, lard에 EtOAc 분획물 600 ppm과 AA 200 ppm을 첨가한 경우의 AI는 6.58, EtOAc 분획물 600 ppm과 CA 200 ppm을 첨가한 경우는 6.20 그리고 EtOAc 분획물 600 ppm과 TO 200 ppm을 첨가한 경우는 7.45이었으며 EtOAc 분획물 600 ppm과 TO 200 ppm을 첨가한 경우에는 EtOAc 분획물 600 ppm만을 첨가한 것에 비하여 24.8%가 상승하였다. 전체적으로 비교할 때 propolis의 추출물이나 이의 분획물은 palm oil보다는 lard에 항산화 효과가 높음을 알 수 있었다.

요 약

Propolis를 몇 가지 용매로 추출하여 분획물을 얻고 이를 palm oil과 lard에 단독으로 혹은 synergist와 함께 첨가하여 항산화 효과를 Rancimat을 이용하여 측정하였다. 용매별 추출 수율은 68.1%(75% ethanol), 75.5%(99% ethanol), 67.4%(methanol), 86.7%(chloroform), 72.6%(ethyl acetate), 65.6%(butanol)였다. Methanol 추출물이 항산화 효과가 가장 우수 하였고 palm oil 보다는 lard에서 더욱 효과적이었다. Ethanol(75%) 추출물을 chloroform, ethyl acetate, butanol 및 water 순으로 분획하였을 때 ethyl acetate 분획물은 조추출물보다 항산화 효과가 상승하였다. 또 ethyl acetate fraction 600 ppm에 synergist로 ascorbic acid(200 ppm)을 palm oil에 첨가했을 때와 δ-tocopherol(200 ppm)을 lard에 첨가했을 때 높은 항산화 상승 효과를 보였다.

문 헌

1. Gray, J.I.: Measurement of lipid oxidation. *JAOCS*, **55**, 539(1978)
2. Chipault, J.R., Mizuno, G.R., Hawkins, J.M. and Lundberg, W.O.: The antioxidant properties of natural spices. *Food Res.*, **17**, 46(1952)
3. 최 웅, 신동화, 장영상, 신재익 : 식물성 천연 항산화 물질의 검색과 그 항 산화력 비교. 한국식품과학회지, **24**, 142(1992)
4. 안찬영, 현규환, 박근형 : 검은깨의 항산화 활성물질. 한국식품과학회지, **24**, 31(1992)
5. Atsuko Kasuga, Yasuo Aoyagi and Tatsuyuki Sugatara: Antioxidant activities of edible plants. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **35**, 828(1988)
6. Haumann, B.F.: Antioxidants, Firms seeking products they can label as 'natural'. *INFORM.*, 1, 1002(1990)
7. Branen, A.L.: Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *JAOCS*, **52**, 59(1975)
8. Farag, R.S., Badei, A.Z.M.A. and Baroty, G.S.A.: Influence of thyme and clove essential oil in cotton seed oil oxidation. *JAOCS*, **66**, 800(1989)
9. Havsteen, B.: Flavonoids, A class of natural products of high pharmacological potency. *Biochemical Pharmacology*, **32**, 1141(1983)
10. Bonvehi, J.S., Coll, F.V. and Jorda, R.E.: The Composition, active components and bacteriostatic activity of propolis in dietetics. *JAOCS*, **71**, 529(1994)
11. Villanueva, V.R., Barbier, M., Gonnet, M. and Lavie, P.: Les flavonoides de la propolis. Isolement d,une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine (dihydroxy-5,7flavanone). *Annales de l'Istitut Pasteur* **118**, 84(1970)
12. Hye Sook Yun-Choi: Flavonoid components in plants of the Genus Scutellaria. 생약학회지, **23**, 201(1992)
13. Nieto, S., Garrido, A., Sanhueza, J., Loyola, L.A., Morales, G., Leighton, F. and Valenzuela, A.: Flavonoids as stabilizers of fish oil. An atternative to synthetic antioxidants. *JAOCS*, **70**, 773(1993)
14. Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M. and Kawakiski: Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 1. isolation, fractionation and partial characterization. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 732(1988)
15. Ramarathnam, N., Osawa, T., Namiki, M. and Kawakiski: Chemical studies on novel rice hull antioxidants. 2. Identification of isovitexin, A C-Glyco syl flavonoid. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 316(1988)
16. Vekiari, S.A., Oreopoulou, V., Tzia, C. and Thomopoulos, C.D.: Oregano flavonoids as lipid antioxidants. *JAOCS*, **70**, 483(1993)
17. Qinyun Chen, Huang Shi and Chi-Tang Ho.: Effects of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. *JAOCS*, **69**, 999(1992)
18. 오만진, 손화영, 강재철, 이가순 : 식용유지에 대한 취뿌리 추출물의 항산화 효과. 한국식량영양학회지, **19**, 448(1990)
19. 이연재, 신동화, 장영상, 강우석 : 붉나무 순차용매 추출물의 항산화 효과 비교. 한국식품과학회지, **25**, 667(1993)
20. 이연재, 신동화, 장영상, 신재익 : 패모, 어성초, 쇠비름 및 돌깨박 에탄올 추출물의 순차 용매 분획별 항산화

효과. 한국식품과학회지, **25**, 683(1993)
21. Banias, C., Oreopoulou, V. and Thomopoulos, C.D.: The effect of primary antioxidants and synergists on the activity of plant extracts in lard *JAOCS*, **69**, 520 (1992)
22. Ock-Sook Yi, Daeseok Han and Hyun-Kyung Shin: Synergistic antioxida tive effects of tocopherol and ascorbic acid in fish oil/lecithin/water system. *JAOCS*, **68**, 881(1991)

(1994년 8월 23일 접수)