

Optimal Ethanol Extraction Conditions of Domestic Propolis and Its Chemical Composition

Sung Doo Kang, Kyu Ho Bang and Sang Won Lee*

Department of Pharmaceutical Engineering, Gyeongsang National University, Jinju 52725, Korea

Received July 13, 2023 /Revised October 13, 2023 /Accepted October 16, 2023

To determine the characteristics of propolis fermented with microorganisms, the optimal conditions for propolis extraction with ethanol were first reviewed, and the physicochemical properties of the extracted propolis were then investigated. The shaking and stationary extraction methods were tested. The flavonoid content was 6.40 mg/g when the stationary extraction method was used and 6.95 mg/g when the shaking extraction method was used. The ethanol concentration was then varied, and the use of 50, 60, 70, and 80% ethanol resulted in the total flavonoid content in the propolis samples reaching 6.75, 8.45, 7.45, and 7.75 mg/g, respectively. This indicated that a 60% (v/v) concentration was optimal. As the extraction time was increased from 1 to 3 hr, the flavonoid content slightly increased; however, extending the extraction step to more than 3 hr did not significantly affect the flavonoid content. In terms of the extraction temperature, the highest concentration of flavonoids (8.63 mg/g) was detected at 50°C. In the propolis samples, 5.80, 2.61, and 1.32 mg/g of fructose, sucrose, and rhamnose were detected, respectively. As for the amino acid content, 17 amino acids, including glutamic acid, were detected, and the total amino acid content was 2.49 mg/g.

Key words : Ethanol extraction, extraction conditions, flavonoids, free sugars, propolis

서 론

프로폴리스의 어원은 그리스어의 pro (before)와 도시를 의미하는 polis (city)의 합성어로 꿀벌들이 성벽을 쌓는다는 의미에서 유래되었다[2]. 이와 같은 propolis는 꽃, 잎, 수목 성장점 및 상처부위 등에 미생물의 침입을 막기 위해 식물들이 분비하는 보호물질을 꿀벌들이 채취하여 자신의 침샘 분비물과 혼합시켜 만든 수지성, 점착성 및 고무상의 천연혼합물로서 벌집에 세균이나 바이러스 등의 침입을 막기 위한 용도로 만들어진 물질이다[4, 7, 27]. 이러한 propolis는 봉교로부터 에탄올, 에테르 및 글리콜 등의 용매를 사용하여 효과적으로 추출하여 사용하고 있으며, 대부분의 항박테리아 성분은 주로 물과 알코올에 잘 추출되는 것으로 보고되고 있다[11]. 특히 에탄올 추출법은 다른 추출법에 비하여 flavonoids가 가장 효과적으로 추출되어 많은 연구자들이 널리 사용하고 있는 방법 중의 하나이다[21].

Propolis의 구성성분은 150~180여 개의 휘발성물질과 페놀계 화합물로서 주로 flavones, flavanones 및 flavonols 등과 같은 화합물이다[8, 25].

Propolis는 예로부터 민간 약품이나 상처 및 염증 치료제 등으로 사용되어 왔으나 최근에는 그 효능에 관한 연구 및 개발 등이 활발히 이루어짐에 따라 항산화, 항염증, 항바이러스 및 항암 등[3, 5, 17]이 있는 것으로 밝혀져 의약품뿐만 아니라 피부 치료제 및 화장품의 개발에 응용한 예도 많이 보고되고 있다[15, 22]. 특히 propolis는 독성이 없는 천연 항균성물질로 밝혀지고 안전성이 매우 높은 천연보존료 및 살균제로 개발 가능한 것으로 여겨져[9, 13] 식품분야에서는 식품의 보존성 증진을 위한 식품 포장재료, 건강보조제 및 첨가제 등 다양한 목적으로 사용되고 있다[18, 19].

프로폴리스의 활성도는 산지와 그 지역의 수중에 따라서 플라보노이드 성분구성과 함유량이 다르기 때문에 프로폴리스의 특성에도 많은 차이를 나타내며[11, 24, 26], 또한 적용분야가 다른 경우 추출조건 및 추출방법에 따라서 크게 다른 특성을 나타내고 있다. 쿠바산 프로폴리스의 항균활성에 대한 연구에서 용매에 대한 침지시간, 온도, 농도, 교반형태 등에 따라 다른 보고[21]를 하고 있으며, Debuyser [6]는 70% 알코올을 사용한 추출물이 대체 약의 일환으로 병원균 치료에 가장 좋은 활성을 나타내는 것으로 보고하였다. 특히 Kim [11] 등은 추출농도와 사용

*Corresponding author

Tel : +82-55-772-3394, Fax : +82-55-772-3399

E-mail : dumul@gnu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

이전의 특성을 구명하는 것은 중요한 사항 중의 하나이며, 현재까지 프로폴리스의 추출을 위한 규격화된 기준이나 표준화된 추출방법에 대한 연구가 거의 없는 실정인 것으로 보고하였다. 본 연구에서는 propolis의 우수성을 더욱더 확립하기 위하여 추출한 propolis를 유용미생물로 발효시킨 발효 propolis를 제조한 다음 그 특성을 규명할 목적으로 먼저 채취한 봉교로부터 에탄올로 propolis를 추출하기 위한 최적 추출조건을 검토하고 추출한 propolis의 기초적인 이화학적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용한 봉교는 경북 영주지역의 영풍양봉에서 구입하여 이물질을 제거하고 냉암소(-20°C)에 보관해 두면서 propolis 추출을 위한 시료로 사용하였다. 봉교로부터 propolis의 추출방법으로는 초음파추출, 물추출 및 초임계추출 방법 등이 보고되어 있으나 flavonoids가 가장 효과적으로 추출되는 것으로 보고되어 있는 에탄올 추출 방법을 사용하였다[10, 21]. 에탄올을 용매로 propolis를 추출한 후 진공농축기로 농축하여 왁스 성분을 제거한 후 5°C에 냉장 보관하여 두면서 본 실험에 사용하였다.

Propolis 추출조건

봉교로부터 프로폴리스를 추출할 때 최적 추출조건은 flavonoids 함량을 측정하여 비교하였다[11]. 먼저 진탕 추출법과 정치 추출법을 서로 비교하였다. 즉 봉교 5 g에 10배(w/v) 부피의 70%(v/v) 에탄올 첨가하고 60°C에서 3시간 동안 120 rpm으로 진탕시키면서 추출한 시험구와 정치시켜 추출한 시험구 중의 flavonoids 함량을 측정하여 비교하였다. Propolis 추출시간은 추출하는 시간을 1~5 hr 범위로 변화시키면서 검토하였고, 추출온도의 검토는 propolis를 추출하는 온도를 30~80°C 범위에서 10°C 간격으로 변화시키면서 검토하였다. 그리고 에탄올의 최적농도 검토는 용매로 첨가하는 에탄올의 농도를 50~80%(v/v)범위로 변화시키면서 검토하였으며, 에탄올 최적 첨가량의 검토는 봉교에 첨가하는 에탄올의 부피를 5~30배 범위로 첨가하여 propolis를 추출한 다음 동일한 방법으로 검토하였다.

일반 성분 분석

봉교 중의 수분은 105°C 상압가열건조법, 조단백질은 micro-kjeldahl법, 주지방은 soxhlet 추출법으로 측정하였고 조섬유는 Association of official analytical chemists (A.O.A.C법), 조회분은 550°C 직접회화법으로 측정하였으며 그 외 나머지 성분들은 가용성 무질소물로 나타냈다[1].

유리당 측정

유리당은 전처리한 시료를 0.2 µm membrane filter로 여과한 후 HPLC (Agilent 1100 Series, U.S.A)로 분석하였으며[9, 12], 분석을 위한 column은 carbohydrate, 주입량은 20 µl, 유속은 0.6 ml/min, 0.1% H₃PO₄ 용액으로 용출하여 검출은 RI검출기, 표준물질은 glucose, fructose, maltose, sucrose, rhamnose 및 xylose를 사용하였다.

구성아미노산 측정

구성아미노산은 전처리한 시료용액을 0.2 µm membrane filter로 여과한 후 아미노산분석기(Hitachi Amino Acid Analyzer, Japan)로 분석하였다[9, 38]. Column은 Bio 20 peek lithium (200×4.6 mm+Resin pot), 유속은 buffer 20 ml/hr, ninhydrin 20 ml/hr로 하였다. 표준물질은 Sigma사의 특급품을 사용하였다.

총 flavonoid 및 flavonoid 조성

봉교로부터 추출한 propolis 중의 총 플라보노이드 함량은 시료 1 ml에 90% diethylene glycol 10 ml, 1N NaOH 1 ml를 넣고 37°C에서 1 hr 동안 진탕하여 420 nm 흡광도에서 측정하는 다음, quercetin dihydrate로 검량선을 작성하여 함량을 환산하였다[20, 26]. Propolis에 함유된 각종 flavonoids의 조성분석은 500 ml 분액깔때기에 추출한 propolis 100 ml를 넣고 CHCl₃, ethyl acetate (EtOAc) 및 *n*-butyl alcohol (*n*-BuOH)를 순차적으로 각각 200 ml씩 첨가하고 강하게 혼합하여 propolis 중의 flavonoids를 용출한 다음 회전진공 농축기로 각 용매를 휘발시킨 후 에탄올에 용해시킨 시료를 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC (Agilent 1100 Series, U.S.A)로 분석하였다. Column은 C-18, 주입량은 20 µl로 하고, 용출액(30% acetonitrile in 0.025M KH₂PO₄)으로 용출하여 검출은 UV 420 nm에서 검출하였다. 표준물질로는 apigenine, kaempferol, quercetin, myricetin, chrysin 및 luteolin을 사용하였다.

통계처리

실험결과는 통계 SAS package (Statistical Analysis System, Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 사용하여 각 시료의 평균과 표준편차를 계산하였고 Duncan's multiple range test를 실시하여 $p < 0.05$ 에서 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

진탕과 정치 추출의 영향

천연 상태의 봉교는 밀랍과 수지가 50% 이상 함유하고 끈적끈적한 왁스 성분으로 구성되어 있는 물질이다. 이러한 봉교로부터 이물질 등의 불필요한 성분 등을 제거하고

균질화하여 저장해 두면서 이하의 프로폴리스 추출을 위한 시료로 사용하였다[22]. 봉교로부터 프로폴리스를 추출할 때 추출조건 및 추출방법에 따라서 크게 다른 특성을 나타낸다는 보고[21]가 있어 먼저 진탕 추출법과 정치추출법 중에서 어느 방법이 효과적인지를 검토하였다. 추출조건은 봉교 질량의 10배(w/v) 부피에 해당하는 70%(v/v) 에탄올을 첨가하고 60°C에서 6시간 동안 추출하여 flavonoids 함량을 측정하여 Fig. 1에 나타냈다. 그 결과 정치추출법에서는 6.40 mg/g의 flavonoids가 검출되었으나 진탕 추출은 6.95 mg/g의 flavonoids가 검출되어 진탕 추출법이 정치추출법 보다 약간 효과적인 것으로 나타났다. 본 연구의 진탕 추출로 얻은 결과는 Jeong [9]등이 50%의 에탄올 농도로 얻은 6.60 mg/g의 flavonoids값 보다 약간 높게 나타났다.

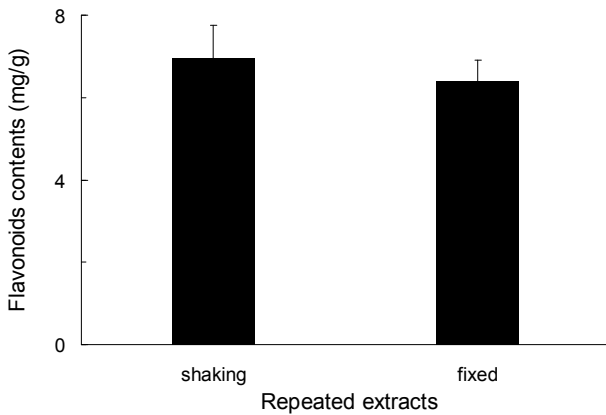


Fig. 1. Contents of flavonoids in propolis on during shaking and fixed extraction. The data are shown as mean ± SD obtained from three independent experiments ($p < 0.05$).

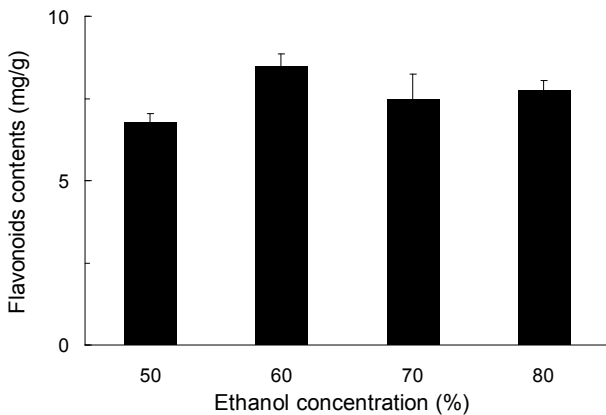


Fig. 2. Contents of flavonoids in propolis according to ethanol concentration. The data are shown as mean ± SD obtained from three independent experiments ($p < 0.05$).

에탄올 농도의 영향

봉교로부터 프로폴리스를 추출할 때 에탄올 농도가 추출에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 2에 나타냈다. 첨가하는 에탄올 농도를 50~80%(v/v) 범위로 변화시키면서 60°C에서 6시간 동안 진탕 추출한 결과, 봉교에 첨가하는 에탄올 농도가 50%, 60%, 70% 및 80%일 때 propolis 중의 총 flavonoids 함량은 각각 6.75, 8.45, 7.45 및 7.75 mg으로 나타나 60%(v/v) 농도에서 가장 높게 나타났다. Kim [11] 등은 propolis 추출물 중의 총 플라보노이드 함량은 알코올 농도가 20~50%까지 높아짐에 따라 그 함량도 증가하였으나 60%와 70%의 농도에서는 약간 감소한 것으로 보고하였다. 그러나 *E. coli* 등의 세균에 대한 항균활성은 70%(v/v)에서 높게 나타나 70%의 에탄올 농도가 최적인 것으로 보고하였다. 본 연구의 결과는 propolis를 추출할 때 Jeong [9]등과 Lee [12]는 50%, Debuyser [6]은 70%의 에탄올 농도가 최적 농도인 것으로 보고한 내용과는 약간 상의하였다.

추출 시간의 영향

봉교로부터 프로폴리스를 추출할 때 최적 추출시간을 검토하기 위하여 60% 에탄올 농도를 봉교 질량의 10배(w/v) 부피로 첨가하고 60°C에서 추출 시간을 1~5시간 범위로 변화시키면서 진탕 추출한 다음 총 flavonoids 함량을 측정하여 Fig. 3에 나타냈다. 그 결과 추출 시간을 1 hr, 2 hr, 3 hr까지 증가시킴에 따라 flavonoids 함량은 각각 6.5, 6.9 및 8.6 mg으로 약간씩 증가하였다. 그러나 3 hr 이상의 추출은 flavonoids 함량변화에 크게 영향을 미치지 못하여 추출 4 hr와 5 hr째에 각각 8.5 mg과 8.4 mg이 검출되어 최적 추출 시간은 3 hr이 적당한 것으로 생각되었다. 이상의 결과는 Lim [16] 등이 최적 추출시간을 3 hr으로 보고한 결과와는 일치하지만, Lee [14] 등은 6 hr 그리고

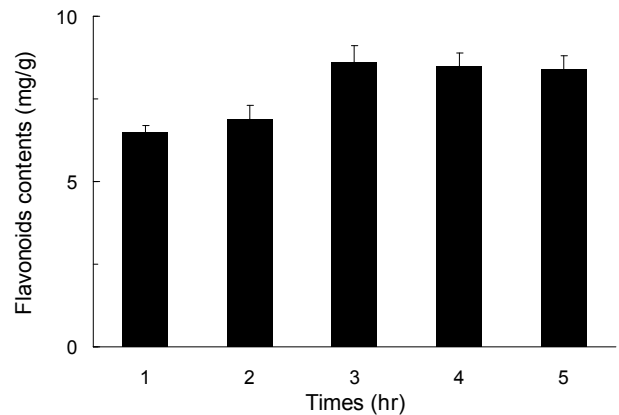


Fig. 3. Contents of flavonoids in propolis according to extraction times. The data are shown as mean ± SD obtained from three independent experiments ($p < 0.05$).

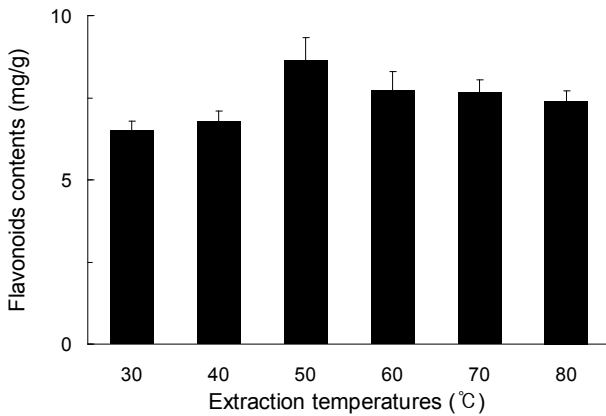


Fig. 4. Contents of flavonoids in propolis according to extraction temperatures. The data are shown as mean ± SD obtained from three independent experiments ($p < 0.05$).

Kim [9]은 12 hr으로 보고한 결과와는 약간 상이하였다.

추출온도의 영향

봉교로부터 프로폴리스를 추출할 때 최적 추출온도를 검토하여 Fig. 4에 나타냈다. 60% 에탄올을 봉교 질량의 10배(w/v) 부피로 첨가하고 120 rpm으로 진탕하면서 30~80°C 온도 범위에서 추출한 다음 총 flavonoids 함량을 측정하였다. 추출온도 30°C와 40°C에서는 flavonoids 함량이 6.5 mg/g과 6.8 mg/g을 나타내어 거의 변화가 없었지만 50°C에서는 8.63 mg/g으로 급격하게 높아지는 것으로 나타났다. 그러나 60°C, 70°C 및 80°C에서는 각각 7.70 mg/g, 7.65 mg/g 및 7.40 mg/g이 검출되어 추출 온도는 50°C가 적당한 것으로 판단되었다. 이와 같은 결과는 propolis의 최적 추출온도를 Kim 등[9]은 60°C로, Lee [12]는 70°C, Lim [16]은 75°C로 발표한 결과보다는 낮은 온도였다. 그리

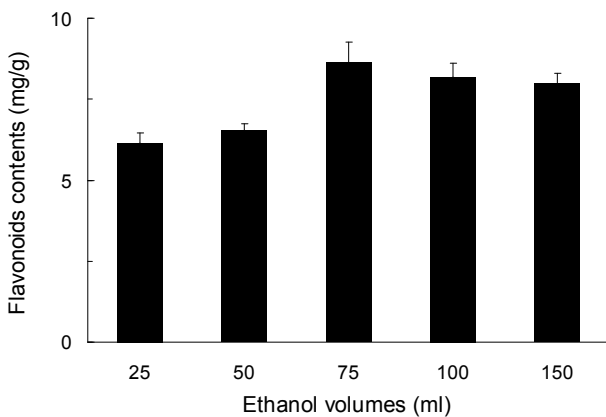


Fig. 5. Contents of flavonoids in propolis on changes of volumes 60% Ethanol extraction solution. The data are shown as mean ± SD obtained from three independent experiments ($p < 0.05$).

고 Kim [9] 등은 추출온도가 높아질수록 밀랍의 추출량이 증가하여 propolis의 수율이 떨어지는 것으로 보고하였다.

추출 용매 부피의 영향

봉교로부터 프로폴리스를 추출할 때 용매의 최적 부피를 결정하기 위하여 봉교 5 g에 60% 에탄올을 25 ml, 50 ml, 75 ml, 100 ml 및 150 ml씩 각각 첨가하고 50°C에서 3시간 동안 진탕 추출한 다음 총 flavonoids 함량을 측정하여 Fig. 5에 나타냈다. 60% 에탄올 농도의 부피를 5배에서 15배까지 증가시키에 따라 flavonoids의 함량은 급격하게 증가하였지만, 그 이상의 첨가는 효과가 거의 없는 것으로 나타났다. 봉교 질량의 15배(w/v)에 해당하는 75 ml를 첨가하였을 때는 8.65 mg의 높은 flavonoids 함량이 검출되었으나 그 이상의 부피인 100 ml 및 150 ml를 첨가하였을 때는 각각 8.20과 8.00 mg/g으로 flavonoids 함량이 낮아지는 경향을 나타냈다. 이상의 결과로 최적 추출 용매 부피는 봉교 질량의 15배(w/v)가 적당한 것으로 판단된다. Propolis를 추출할 때 최적 용매 부피를 Lee [14] 등은 10배(w/v), Kim [10]은 20배(w/v)가 적당한 것으로 보고한 내용과는 약간 상이하였다.

추출회수의 영향

봉교로부터 프로폴리스를 추출할 때 반복 추출회수가 추출되는 flavonoid 함량에 미치는 영향을 검토하여 Fig. 6에 나타냈다. 봉교 5 g에 60% 에탄올 75 ml를 첨가하고 50°C에서 3시간씩 3회에 걸쳐 반복 추출한 다음 각 추출 횟수에 따른 총 flavonoids 함량을 측정하였다. 1회째 추출에서는 8.65 mg/g의 flavonoids가 추출되었고, 2회째에는 7.05 mg/g의 flavonoids가 추출되어 1회째 수율의 약 82%를 얻을 수 있어 추출회수가 flavonoids의 함량에는 거의 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 그러나 3회째 추출

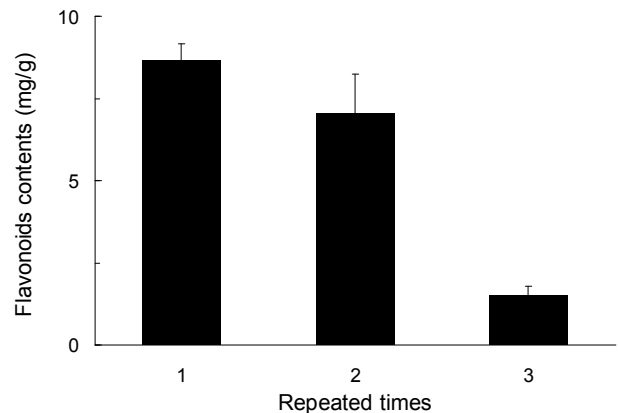


Fig. 6. Contents of flavonoids in propolis according to extraction times. The data are shown as mean ± SD obtained from three independent experiments ($p < 0.05$).

Table 1. Proximate compositions of crude propolis

(unit : %)

Moisture	Crude protein	Crude fat	Crude fiber	Ash	Nitrogen Free extract
6.32	1.74	79.48	0.40	0.96	11.1

The data are shown as mean ± SD obtained from three independent experiments ($p < 0.05$).

Table 2. Contents of free sugars in propolis

(mg/g)

Fructose	Sucrose	Rhamnose	Glucose	Maltose	Xylose
5.80	2.61	1.32	–	–	–

– ; Not detected. The data are shown as mean ± SD obtained from three independent experiments ($p < 0.05$).

에서는 flavonoids의 함량이 급격히 낮아져 1.50 mg/g의 flavonoids가 검출되어 1회째 수율의 약 17%를 나타내어 봉교로부터 propolis를 추출할 때는 2회까지의 반복추출이 효과적인 것으로 판단되었다.

일반성분

봉교의 일반성분을 분석한 결과를 Table 1 나타냈다. 조지방이 79.48%로 대부분을 차지하고 있었고 가용성 무질소물 11.1%, 수분 6.32%, 조단백은 1.74%, 회분 0.96% 및 조섬유 0.40% 순으로 나타났다. Jeong [9] 등과 Lee [12]는 조지방이 86.41%인 것으로 보고하였으며, Kim [11] 등은 경주 상주산 봉교를 구입하여 분석한 결과 수분, 조단백, 조지방 및 조회분의 함량이 각각 3.0%, 0.7%, 90.9% 및 0.2%인 것으로 보고하였다. 이상의 결과를 비교해 보면 조지방을 제외한 조단백질 및 조섬유 등의 함량은 비슷한 수준이나 조지방 성분에서 많은 차이를 나타내는 것은 지역의 환경적 요인 뿐만 아니라 추출하는 방법 및 조건에 따라서 propolis에 함유된 수지 및 밀납 성분의 차이가 나타나는 것으로 보고되어 있다[9, 11, 14].

유리당 함량

Propolis의 최적 추출조건에서 추출한 프로폴리스의 유리당 함량을 HPLC로 분석하여 Table 2에 나타냈다. 유리당 조성은 fructose, sucrose 및 rhamnose가 검출되었으며 그 함량은 각각 5.80, 2.61 및 1.32 mg/g로 나타났다. 그러나 glucose, maltose 및 xylose 등은 검출되지 않았다. Lee [12]는 경남지역에서 채취한 propolis의 유리당 함량을 측정된 결과 sucrose 152 mg%, glucose 114 mg% 및 fructose 6 mg%이 검출되어 maltose와 xylose가 검출되지 않은 것은 일치하였으나 유리당의 함량에서는 본 연구 결과와 약간 차이를 나타냈다. 이러한 결과는 환경적인 요인과 화분의 종류 및 채취시기에 따른 영향으로 여겨진다.

구성아미노산 함량

봉교 중의 구성아미노산 함량을 분석하여 Table 3에 나타냈다. 구성아미노산의 종류는 glutamic acid를 비롯하여

17종의 아미노산이 검출되었고 아미노산 총합량은 2.49 mg/g으로 나타났다. 그 중에서 glutamic acid, aspartic acid 및 leucine의 함량이 각각 0.30, 0.28 및 0.24 mg/g 순으로

Table 3. Structural amino acid contents in crude propolis

Components	Content(mg/g)
Glutamic acid	0.30
Aspartic acid	0.28
Leucine	0.24
Proline	0.22
Serine	0.20
Alanine	0.18
Valine	0.17
Glycine	0.16
Isoleucine	0.13
Threonine	0.13
Lysine	0.12
Phenylalanine	0.10
Arginine	0.10
Tyrosine	0.06
Histidine	0.06
Cystine	0.03
Methionine	0.01
Total	2.49

The data are shown as mean ± SD obtained from three independent experiments ($p < 0.05$).

Table 4. Contents of flavonoids in propolis of various solvents. (mg/g)

Propolis	Solvents		
	CHCl ₃	EtOAC	n-BuOH
Myricetin	0.14	2.71	0.94
Quercetin	0.67	10.91	– ¹⁾
Kaempferol	3.53	4.39	– ¹⁾
Apigenine	4.91	5.25	21.43
Chrysin	– ¹⁾	– ¹⁾	– ¹⁾
Luteolin	– ¹⁾	– ¹⁾	– ¹⁾
Total	9.25	23.26	22.37

¹⁾– : Not detected. The data are shown as mean ± SD obtained from three independent experiments ($p < 0.05$).

높게 검출되어 propolis의 주요 아미노산 성분으로 판단되었으며, cystine과 methionine 함량은 각각 0.03과 0.01 mg/g으로 낮게 나타났다. Jeong [9]등은 경남지역의 봉교를 수집하여 에탄올 농도에 따라 검출되는 아미노산의 종류 및 함량을 분석한 결과 50% 및 70%의 농도에서는 17종의 아미노산이 검출되었으며 lysine 및 glutamic acid의 함량이 높게 나타났고, 95% 에탄올 농도에서는 15종이 검출되었으며 lysine 및 proline의 함량이 높은 것으로 보고하였다. 또한 Song과 Gil [23]은 아카시아 나무와 밤나무 유래 propolis를 분석한 결과 aspartic acid, proline 및 glutamic acid가 주요 아미노산 성분으로 보고하여 본 연구의 결과와는 약간의 차이를 나타냈다.

총 Flavonoids 조성

프로폴리스에 함유된 플라보노이드 화합물의 조성을 확인하기 위하여 CHCl₃, ethyl acetate (EtOAc) 및 *n*-butyl alcohol (*n*-BuOH)로 분획하여 HPLC로 분석한 결과를 Table 4에 나타냈다. Table 4에서 보는 바와 같이 apigenine, kaempferol, quercetin 및 myricetin 등은 검출되었으나 chrysin 및 luteolin 등은 검출되지 않았다. CHCl₃ 분획에서 apigenine이 4.91 mg/g crude propolis로 가장 높았고, ethyl acetate (EtOAc) 분획에서는 quercetin이 10.91 mg/g crude propolis로 가장 높게 검출되었다. 그리고 *n*-butyl alcohol (*n*-BuOH) 분획에서는 apigenine이 21.43 mg/g crude propolis로 가장 높게 나타났다. Lee [14] 등은 지역별로 봉교에 함유되어 있는 플라보노이드 중 quercetin의 함량이 영월 예천산에서 0.41-0.53%, 중국산은 7.92%로 비교적 높게 함유된 것으로 발표하였다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. A.O.A.C. 1984. Official methods of analysis. 14th ed., Association of official analytical chemists. Washington D.C., U.S.A.
2. Bankova, V. S., De Castro, S. L. and Marucci, M. C. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* **31**, 3-15.
3. Borrelli, F., Maffia, P., Pinto, L., Ianaro, A., Russo, A., Capasso, F. and Ialenti, A. 2002. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia* **73**, S53-S63.
4. Chernyak, N. F. 1973. On synergistic effect of propolis and some antibacterial drugs. *Antibiotiki* **18**, 259-261.
5. Cizmarik, J. and Matel, I. 1978. Study of the chemical structure of propolis. Isolation and identification of 4-oxy-3-methoxycinnamic acid from propolis. *Apimondia Publishing House* **30**.
6. Debuyser, E. 1984. These pour diplome de docteur en pharmacie, pp. 34-41, In: La propolis, Fac, pharmacie, Nantes, France.
7. Grange, J. M. and Davey, R. 1973. Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. R. Soc. Med.* **83**, 259-261.
8. Greenway, W., May, J., Scaysbrook, T. and Whatley, F. R. 1990. Identification by gas chromatography-mass spectrometry of 150 compounds in propolis. *Zeitschrift für Naturforschung* **46**, 111-121.
9. Jeong, C. H., Bae, Y. I., Lee, H. J. and Shim, K. H. 2003. Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **32**, 501-505.
10. Kim, B. M. 2007. The effect of propolis concentration on the antibacterial activity. MS. thesis. Kangwon National University, Chuncheon, Korea.
11. Kim, C. T., Kim, C. J., Cho, Y. J., Choi, A. J. and Shin, W. S. 2002. Characteristics of propolis extracts from ethanolic extraction. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **34**, 941-946.
12. Lee, H. J. 2004. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis extracts and its development for functional foods. Ph.D. dissertation. Gyeongsang National University, Jinju, Korea.
13. Lee, J. H., Bae, Y. I., Jeong, C. H. and Shim, K. H. 2006. Biological activities of various solvent extracts from propolis. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **34**, 1-7.
14. Lee, S. W., Kim, H. J., Yang, H. J. and Hwangbo, S. 2001. Studies on the flavonoid compositions of Korean propolis. *Kor. J. Food Sci. Anal. Resour.* **21**, 389-394.
15. Lejeune, B., Pourrat, A. and Dehmouche, H. 1988. Propolis utilization en democosmetologie. *Parfums, Cosmetique, Aromes.* **82**, 73-77.
16. Lim, D. K., Choi, U., Shin, D. H. and Jeong, Y. S. 1994. Antioxidative effect of propolis extract on palm oil and lard. *Kor. J. Food Sci. Technol.* **26**, 622-626.
17. Marcucci M. C. 1995. Propolis chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* **26**, 83-99.
18. Mizuno, M. 1989. Food packaging materials containing as a preservative. *Japanese Patent*. JP 01 243 973.
19. Mizuno, M. 1989. Propolis or its extract-containing resin compositions. *Japanese Patent*. JP 01 245 058.
20. National Food Research Institute. 1990. Food ingredient measurement method for food quality evaluation (2). p.61.
21. Obregon, F. A. M. and Rojas, H. N. 1990. Antimicrobial action of alcoholic extracts of propolis. *Revista Cubana de Farmacia* **24**, 34-44.
22. Seol, J. W. 2010. Antimicrobial activity of propolis extracts and tea tree oil against pathogens relate to acne. Ph.D. dissertation. Kangwon National University, Chuncheon, Korea.
23. Song, H. N. and Gil, B. I. 2002. Analysis of nutritional composition and phenolic compound in propolis collected from false acacia and chestnut tree in Korea. *Kor. J. Food*

- Sci. Technol.* **34**, 546-561.
24. Volpi, N. and Bergonzini, G. 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **42**, 354-361.
25. Walker, P. and Crane, E. 1987. Constituents of propolis. *Apidologie* **18**, 327-334.
26. Woo, S. O., Hong, I. P. and Han, S. M. 2015. Comparison of total flavonoids and phenolic contents of propolis collected in Korea. *J. Apiculture* **30**, 293-298.
27. Yun, C. G., Cho, S. H., Kim, S. J., Lee, J. H., Jung, G. H., Kim, J. I., So, I. S., Park, Y. H. and Lim, J. H. 2021. Comparison of functional flavonoid components and contents from domestic propolis extracts. *J. Sci. Edu. Gifted.* **13**, 213-221.

초록 : 국내산 프로폴리스의 에탄올 최적추출조건 및 그 화학성분

강성두 · 방규호 · 이상원*

(경상국립대학교 자연과학대학 제약공학과)

Propolis를 미생물로 발효시킨 발효 propolis의 특성을 밝히기 위하여 먼저 에탄올로 propolis를 추출하기 위한 최적 추출조건을 검토하고 추출한 propolis의 이화학적 특성을 조사하였다. 진탕 추출법과 정치 추출법으로 추출한 propolis 중의 flavonoids의 함량을 측정한 결과 정치 추출법에서는 6.40 mg/g, 진탕 추출법에서는 6.95 mg/g이 검출되었다. 용매로 첨가하는 에탄올 농도가 50%, 60%, 70% 및 80%일 때 propolis 중의 총 flavonoids 함량은 각각 6.75, 8.45, 7.45 및 7.75 mg/g으로 나타나 60%(v/v) 농도가 최적인 것으로 나타났다. 추출 시간은 1~3시간까지 증가시킴에 따라 flavonoids 함량은 약간 증가하였으나 3시간 이상의 추출은 flavonoids 함량변화에 크게 영향을 미치지 못하였다. 추출온도는 50℃에서 가장 높은 8.63 mg/g의 flavonoids가 검출되었다. Propolis 중의 유리당은 fructose, sucrose 및 rhamnose가 각각 5.80, 2.61 및 1.32 mg/g으로 나타났고 amino acid는 glutamic acid를 비롯하여 17종의 아미노산이 검출되었다.