

국산 프로폴리스의 플라보노이드 조성에 관한 연구

이수원 · 김희재* · 양희진 · 황보 식

성균관대학교 생명공학부, *한국식품연구소

Studies on the Flavonoid Compositions of Korean Propolis

S. W. Lee, H. J. Kim*, H. J. Yang, and S. Hwangbo

Faculty of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University

*Korea Advanced Food Research Institute

Abstract

This study was conducted to investigate the flavonoid contents of Korean propolis. The total flavonoids content measured by spectrophotometer of Yecheon, Youngwol, Brazilian, Chinese, Australian propolis were 6.33, 6.43, 2.44, 6.52 and 8.11mg/g. The p-coumaric acid content of Yecheon and Youngwol propolis were 5.58 and 6.84mg/100g, respectively. Luteolin, however, was not detected both in Yecheon and Youngwol, respectively. The quercetin content of Yecheon and Youngwol propolis revealed between 0.41 to 0.53%, however, overseas propolis was not detected. The t-cinnamic acid of Brazilian propolis was 7.92% and Chinese propolis was 8.74%. And than, the t-cinnamic acid of Chinese propolis was not detected.

Key words : propolis, flavonoids, coumaric acid.

서 론

프로폴리스는 꿀벌이 식물의 수피, 꽃봉오리 등의 수지물질을 채집하여 자신의 타액과 혼합하여 조합한 식물 기원의 물질이다. 따라서 벌의 종류, 채집시기, 지역 등에 따라서 함유되어 있는 화학성분에는 차이가 있으나^(1,2), 일반적으로 프로폴리스 원피의 주성분은 점성류의 수지 50~55%, 왁스류 30%, 정유 8~10%, 화분 5%, 유기산 및 미네랄 물질이 약 5%로 이루어져 있으며, 원피의 알코올 가용성 분획의 성분을 분리하여 확인된 화합물이 50여종 이상이 된다^(1,3,4). 최근 기기분석의 진보와 함께 Popravko⁽¹⁾가 flavones 4종, flavonones 6종, flavanils 3종과 isovanillin 등을 순수분리, 동정함으로써 flavonoid가 프로폴리스의 주요 화학성분으로 주목받게 되었다. 그 후, Janes 등⁽⁵⁾

은 프로폴리스를 수증기 증류하여 benzoic acid, benzyl alcohol, sorbic acid, vanillin을 동정하였으며, 또한 phenyl vinyl ether, anicyl vinyl ether, cyclohexyl benzoic acid의 존재를 확인하였다. 또한 Cizmarik 등⁽⁶⁾은 galangine, chrysin, tectochrysin, isalpinin 등의 flavonoid류와, flavanone류인 pinocembrin을 분리하였으며 ferrulic acid로 알려진 4-oxy-3-methoxy cinnamic acid의 구조식을 밝히기도 하였다.

플라보노이드는 식물계에 폭넓게 분포되어 있으며 그 대부분은 배당체로서 존재하고 있다. 그러나 프로폴리스에서 발견되는 플라보노이드의 특징은 대부분 가수분해되어 aglycon의 형태로 존재하며 또한 알칼로이드의 존재도 확인되지 않는다는 점이 특징이다. 프로폴리스 중의 플라보노이드류의 성분은 식물에서 유래한 식품의 지리적, 식물학적 연구에 사용되고 있다. 주로 와인^(7,8), 주우스^(9,10)와 bee pollen⁽¹¹⁾ 등의 분석에 관한 연구가 보고되고 있다. 꿀에 존재하는 향균물질의 하나인 flavanone류인 pinocembrin이 검출되었고^(12,13), flavone류인 kaempferol, quercetin과 flavanone류인 narin

Corresponding author : S. W. Lee, Faculty of Life Science and Technology, Sungkyunkwan University, 300, Chunchun-dong, Jangan-gu, Suwon, Kyunggi-do, Korea. E-mail : leesw@skku.ac.kr

genin, pinocembrin은 해바라기 꿀에서 검출되었고⁽¹⁴⁾, 스위스산 몇몇 꿀에서 galangin과 chrysin이 존재한다는 보고가 있다⁽¹⁵⁾.

이와 같이 프로폴리스의 항산화 및 항균작용을 나타내는 주성분은 플라보노이드이지만 국내산 프로폴리스 중의 플라보노이드류의 조성에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구에서는 영월과 예천에서 생산된 국내산 프로폴리스의 플라보노이드 조성을 분석하여, 프로폴리스가 갖고 있는 항균활성을 검증하기 위한 기초자료를 얻기 위하여 실시하였다.

재료 및 방법

재 료

본 실험에 사용된 프로폴리스는 강원도 영월, 경북 예천 지방에서 원피 상태로 채취된 것과 브라질, 중국, 호주에서 수입된 에탄올 추출물을 사용하였다.

에탄올 추출물 조제

냉동된 원피를 상온에서 방치하여 하룻밤 동안 방치한 다음 원피 중량대비 10배의 에탄올을 첨가하여 약 70°C에서 6시간 가열 추출한 후, 여과지(Whatman No. 41)로 여과한 것의 여액을 진공농축기(Eyela, Japan)로 용매를 증발시켜 에탄올 농축 추출물로 하였다⁽²⁾.

플라보노이드 분석

1) UV spectrophotometer를 이용한 플라보노이드 분석

분쇄한 프로폴리스 시료 0.1~0.5g을 칭량하고, 80% 에탄올 20ml를 가해서 10분간 진탕 용해한 다음 원심분리(3,000rpm, 10min)하였다. 상등액을 취하고 잔류물은 80% 에탄올 8ml를 가하여 동일한 방법으로 3회 반복 추출하였다. 얻어진 전 추출액을 합한 후, 80% 에탄올을 이용해서 총 양을 50ml로 해서 시험용액으로 하

였다. 이와 같이 얻어진 프로폴리스 시험용액 0.5ml를 시험관에 분취하고, ethyl alcohol 1.5 ml, 10% aluminium nitrate 용액 0.1ml, 1M potassium acetate 용액 0.1ml와 증류수 2.8ml를 가해서 충분히 교반한다. 실온에서 40분간 방치한 후 10mm 셀을 이용해서 410nm에서 시료의 흡광도를 측정했다. 이때 blank로는 증류수를 사용하였다.

2) HPLC를 이용한 플라보노이드 분석

표준물질인 quercetin, t-cinnamic acid, narigenin, p-coumaric acid, luteolin, quercitrin, chrysin은 Sigma사(U.S.A.)에서 구입하여 사용하였다. 각각의 프로폴리스 시료 중에 함유되어 있는 플라보노이드 함량은 은 등⁽¹⁶⁾의 방법을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

총플라보노이드 함량

현재 플라보노이드는 그 다양성으로 인하여 자연계 내에 존재하는 물질의 특성이나 기능에 대하여 완전하게 밝혀지지 못하고 있다. 그러나 대체적으로 항산화 작용과 항균 작용 등 방어적 기능에 좋은 효과를 나타낸다고 알려져 있다^(17~19). 따라서 프로폴리스 중의 플라보노이드 함량을 측정하는 것은 이러한 프로폴리스의 기능을 구명하는데 매우 중요한 의미를 갖는다고 할 수 있다. 각 지역별 프로폴리스 중에 포함되어 있는 총플라보노이드 함량을 측정할 결과, 예천과 영월산 프로폴리스에서 각각 6.33 및 6.42mg/g함유되어 있는 것으로 나타나 (Table 1), 국내산 프로폴리스 중의 총플라보노이드 함량은 거의 같았다. 또한 호주산과 중국산 프로폴리스에서 각각 8.11과 6.52mg/g 함유되어 있었으며, 브라질산 프로폴리스의 총플라보노이드 함량이 가장 낮은 것으로 나타났다. 호주산의 경우, 총플라보노이드 함량이 가장 높았으며, 국내산과는 큰 차이가 없었으나,

Table 1. Relative amounts of total flavonoid in propolis (mg/g)

Region	Yecheon	Youngwol	Brazil	China	Australia
Total flavonoid	6.33±1.05	6.42±0.81	2.44±0.92	6.52±1.33	8.11±1.58

Results are expressed as mean values of triplicate.

브라질산 프로폴리스와의 차이는 5.67mg/g으로 약 4배 정도 많았다.

이와 같이 프로폴리스 중의 총플라보노이드의 함량은 지역이나 생육 환경에 따라 크게 영향을 받고 있다는 것을 의미한다고 할 수 있다. 또한 프로폴리스의 다양한 유용성은 프로폴리스 자체가 아주 많은 화학성분을 갖는 혼합물이기 때문이며, 또한 산지에 따라 그 환경 및 식물분포 차이로 인해 구성성분이 다를 수 있다는 보고^(2,20)와 매우 유사하다고 할 수 있다. 따라서 프로폴리스가 갖고 있는 항산화 또는 항염증 등의 생리활성은 대부분 플라보노이드류에 의해 진행되는 것으로, 이러한 생리적 기능도 지역에 따라 생산된 프로폴리스간에는 차이가 발생할 수도 있으리라 생각된다.

각종 프로폴리스의 플라보노이드 조성

HPLC를 이용하여 표준 플라보노이드류를 분석한 결과, flavanone류인 naringenin은 10.70분에 용출되었으며, flavanol류와 flavone류인 quercetin과 luteolin은 각각 12.66분과 14.29분에 용출되었다. 또한 p-coumaric acid, quercitrin, t-cinnamic acid는 각각 5.12분, 6.49분, 10.39분에 용출되었다(결과 생략). 이를 기준으로 각각의 프로폴리스를 HPLC로 분석한 결과, p-coumaric acid의 경우 국내산 프로폴리스가 수입산보다 상대적으로 그 함량이 많은 것으로 나타났다(Table 2). 즉, 예천산 프로폴리스의 경우 5.58mg/100g, 영월산 프로폴리스는 6.84mg/100g이었다. 그러나 국내산의 경우, 모두 luteolin은 존재하지 않는 것으로 나타났다. 브라질산 프로폴리스의 경우, 다른 프로폴

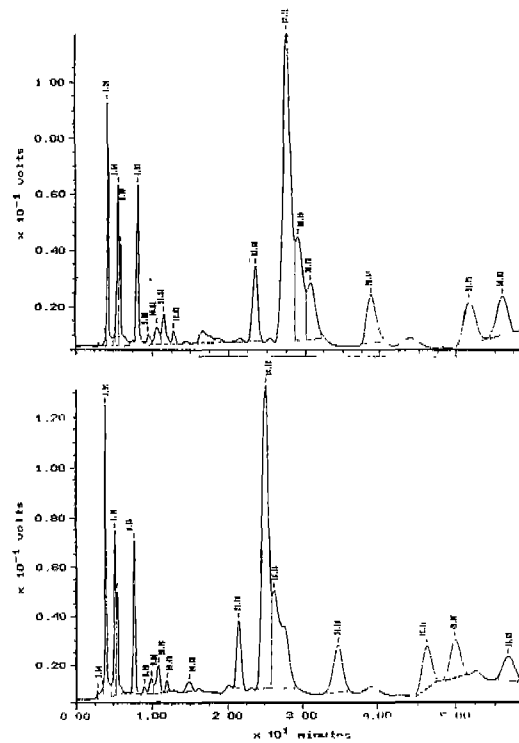


Fig. 1. HPLC patters of flavonoids from Yecheon (A) and Youngwol (B) propolis. The propolis was analyzed with HPLC system, and eluted peptides were calculated with peak area (Table 3). Elution times of standard propolis were shown at Table 3. Analysis conditions : reversed phase C-18 column, absorbance at 340 nm, detector sensitivity 0.1, flow rate 1ml/min.

리스보다 상대적으로 p-coumaric acid 함량

Table 2. Flavonoids concentration in the different propolis samples (mg/100g)

Trivial name	Systematic name	Yecheon	Youngwol	Brazil	Australia	China
p-Coumaric acid	4-hydroxy-cinnamic acid	5.58	6.84	1.47	2.72	4.35
Chrysin	5,7-dihydroxy-flavone	13.97	13.77	3.82	31.29	29.39
t-Cinnamic acid	3-phenylpro-penoic acid	5121.6	5104.7	7259.3	3296.7	N.D. ¹⁾
Naringenin	4,5,7-trihydro-xyflavone	5.69	3.86	N.D.	4.48	6.99
Quercetin	3,3',4',5',7-penta-hydroxyflavone	0.48	0.39	N.D.	0.29	0.39
Luteolin	3,4,5,7-tetrahydroxyflavone	N.D.	N.D.	0.73	t ²⁾	1.99
Quercitrin	quercetin-3-rhamnoside	t	N.D.	N.D.	t	t

Results are expressed as mean values of triplicate.

¹⁾N.D. unidentified peak; not detected; ²⁾t. compound present only trace.

이 낮았으며, 플라보노이드 함량도 역시 적게 함유되어 있었다. 특히 호주산 프로폴리스의 경우, 분석한 플라보노이드류를 모두 함유하는 것으로 나타났지만, 중국산 프로폴리스의 경우 *t*-cinnamic acid는 검출되지 않았다(Table 2).

각종 프로폴리스를 HPLC로 분석한 결과, 본 연구에서 사용한 표준 플라보노이드류와 다른 시간대에 용출되는 성분이 다량으로 함유되어 있었다(Fig. 1). 예천과 영월산의 프로폴리스의 경우, 용출 시간대가 다른 성분이 많았으며(Fig. 1, A and B), 특히 24분대에서 30분대에 용출되는 성분에서 큰 차이가 있었다(Fig. 1, Table 3). 또한 각각의 peak 면적을 기준으로 mol/%를 계산한 결과, 각각의 프로폴리스의 성분들은 매우 상이한 것으로 나타났다.(Table 3). 이러한 프로폴리스중에 함유되어 있는 플라보노이드류의 미확인 peak를 동정하기 위하여 현재 다른 표준품 등을 이용하여 분

석 중에 있다.

지금까지의 연구 결과, 총플라보노이드 함량은 호주산이 가장 많고, 한국과 중국산의 경우 유사하였으며, 브라질산이 가장 낮게 나타난 것은 생산 지역별에 따른 식물 분포 차이 때문인 것으로 생각된다⁽²⁰⁾. 특히 유럽, 북남미 및 서남아시아에서의 프로폴리스가 주로 포플라의 씨눈 추출물로 만들어진다는 König의 보고⁽²¹⁾와 비교할 때, 지역별 식물분포 차이에 절대적으로 의존하는 것으로 생각된다. 또한, quercetin의 경우 브라질, 호주, 중국의 프로폴리스에는 미량 함유되어 있거나 검출되지 않았지만, 국내산인 영월, 예천 지역의 프로폴리스에는 0.41~0.53% 함유되어 있었다(Table 3). 또한 브라질 프로폴리스의 경우, 용출시간이 4.25분인 미확인 물질과 *t*-cinnamic acid가 각각 15.87%, 7.92%로 타 지역의 프로폴리스보다 다량 함유되어 있었으며, 중국산 프로폴리스의

Table 3. Flavonoid analysis in the different propolis samples (mol/%)

Retention time (min)	Yecheon	Youngwol	Brazil	Australia	China
3.97	0.29	6.32	0.44	0.17	0.31
4.25	4.77	N.D. ¹⁾	15.87	1.79	4.35
5.54(<i>p</i> -coumaric acid)	4.07	4.79	3.65	2.06	3.39
5.89	2.89	2.78	2.74	6.85	6.62
6.91(quercitrin)	t ²⁾	N.D.	N.D.	0.20	8.74
8.17	5.29	4.88	6.22	9.20	5.40
9.56	0.47	0.28	N.D.	0.97	0.88
10.62(<i>t</i> -cinnamic acid)	1.19	0.77	7.92	1.10	1.56
11.58(naringenin)	1.64	1.57	N.D.	0.34	0.46
12.82(quercetin)	0.53	0.41	N.D.	N.D.	t
14.83(luteolin)	N.D.	0.73	t	-	1.79
16.06	N.D.	N.D.	2.08	N.D.	0.74
23.46	7.29	4.66	2.97	1.81	3.39
24.93	29.47	0.82	20.18	23.31	22.11
27.55	5.24	31.12	9.02	3.08	5.23
28.99	11.26	17.92	24.48	15.03	20.52
30.72	6.53	17.92	24.48	15.03	20.52
38.81	6.64	6.63	4.24	9.71	10.79
46.54	N.D.	N.D.	N.D.	1.80	1.50
51.75	6.39	5.97	-	22.30	1.91
56.03	5.97	5.61	-	22.30	-
56.65	-	4.22	-	22.30	-

Values are peak area percentages of the total absorption of the HPLC chromatogram recorded at 340nm.

¹⁾N.D. unidentified peak; not detected; ²⁾t, compound present only trace.

경우 타 지역의 프로폴리스보다 quercitrin이 8.74%로 많이 함유되어 있었다. 이러한 결과로 추정해 볼 때, 프로폴리스의 중요한 물질은 플라보노이드이며, 프로폴리스 중의 플라보노이드가 각 산지별로 형태가 다른 이유는, 벌들이 프로폴리스 수집에 사용된 식물원 및 환경에 따라 플라보노이드 종류가 일부 바뀌게 됨을 알 수 있다⁽²⁰⁾.

Cizmarik 등⁽⁶⁾은 프로폴리스에서 4-oxy-3-methoxycinnamic acid (ferrulic acid)를 순수 분리하였으며, 이 물질이 가지는 항균작용(그람양성균과 그람음성균)으로 인해 프로폴리스가 정균 및 균사멸 효과를 가진다고 하였다. 화분에서는 이 물질이 발견되지 않으므로 벌이 여러 식물의 봉우리와 수피에서 수지성 배출물을 채집하여 프로폴리스를 만든다고 하였다. Pepeljnjak 등⁽²²⁾은 유고의 크로아티아 지역에서 수집된 38종의 프로폴리스에 대한 크로마토그래피 분석 결과, 13종(pinostrobin, 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-flavonone, izalpinin, tectochrisin, 5-hydroxy-7,4'-dimethoxyflavone, pinocembrine, p-coumaric acid benzyl ester, vanillin, galangin, chrysin, rhamnetin and campherol)이 공통적으로 함유되어 있었으며, 이 중에서 pinocembrine과 galangin의 농도가 *B. subtilis*에 대한 항균력과 상당한 상관관계를 보였다고 하였다. 이와 같이 프로폴리스의 플라보노이드류의 조성은 프로폴리스의 기능에 큰 영향을 미치며, 이러한 기능을 구명하기 위해서는 프로폴리스의 성분 분석은 매우 중요한 의미를 갖는다고 생각한다. 또한 지금까지 유럽, 남미, 중국, 캐나다 및 스페인 등 각 지역별에 따른 프로폴리스의 성분함량에 관한 연구는 오랫동안 이루어져 왔으나^(11,23), 국내의 경우 매우 뒤떨어져 있어, 국내산 프로폴리스의 이용가치를 극대화하기 위해서도 이러한 분석을 지속적으로 수행하여야 할 것으로 생각한다.

요 약

본 연구는 벌집에서 얻어지는 프로폴리스의 플라보노이드 함유량을 조사하였다. UV spectrophotometer를 이용한 총플라보노이드는 예천, 영월, 브라질, 호주, 중국이 각각 6.33, 6.42, 2.44, 8.11, 6.52mg/g이었다. HPLC를 이용한

플라보노이드 분석 결과, p-coumaric acid는 예천 5.58, 그리고 영월이 6.84mg/100g 이었다. 그러나 예천 및 영월의 프로폴리스에서는 luteolin이 검출되지 않았다. Quercetin은 영월, 예천에서 0.41~0.53%이었으며, t-cinnamic acid는 브라질이 7.92%, quercitrin은 중국이 8.74%로 가장 높았다. 또한 중국산 프로폴리스에서는 t-cinnamic acid가 검출되지 않았다.

참고문헌

1. Popravko, S. A. : Chemical composition of propolis, its origin and standardization. Propolis. Apimondia Publishing House. p. 15 (1978).
2. 이수원, 김희재, 황보 식 : 국내산 프로폴리스의 화학적 특성에 관한 연구. 한국축산식품학회지, 21, 383 (2001).
3. Donadieu, Y. : Propolis in natural therapeutics. Honey Bee Sci., 8, 67 (1987).
4. 水野瑞夫, 飯沼宗和, 加藤久幸 : 프로폴리스의 생리활성. フレグランスジャーナル, 15, 20 (1987).
5. Janes, K. and Bumba, V. : Contributions to investigation of composition of propolis. Propolis. Apimondia Publishing House. p. 28 (1978).
6. Cizmarik, J. and Matel, I. : Study of the chemical structure of propolis. Isolation and identification of 4-oxy-3-methoxycinnamic acid from propolis. Propolis. Apimondia Publishing House. p.30 (1978).
7. Etievant, P., Schlich, P., Bertrand, A., Symonds, P. and Bouvier, J. C. : Varietal and geographic classification of French red wines in terms of pigments and flavonoid compounds. J. Sci. Food Agri., 4, 39 (1988).
8. Tomas-Lorente, F., Garcia-Viguera, C., Ferreres, F. and Tomas-Barberan, F. A. : Analisis por HPLC de polifenoles en algunos vinos tintos espanoles. Rev. Agroalim. Tecnol. Aliment, 29, 399 (1989).
9. Rouseff, R. L., Martin, S. F. and Youtsey, C. O. : Quantitative survey of narirutin,

- naringin, hesperidin and neohesperidin in Citrus. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 1027 (1987).
10. Rouseff, R. L. : Liquid chromatographic determination of naringin and neohesperidin as a detector of grapefruit juice in orange juice. *J. Assoc. Offic Anal. Chem.*, 71, 798 (1988).
 11. Tomas-Barberan F. A., Tomas-Lorente F., Ferreres, F. and Garcia-Viguera, C. : Flavonoids as biochemical markers of the plant origin of bee-pollen. *J. Sci. Food Agric.*, 47, 337 (1989).
 12. Villanueva, V. R., Barbier, M., Gonnet, M. and Lavie, P. : Les flavonoides de la propolis. Isolement d'une nouvelle substance bacteriostatique: la pinocembrine (dihydroxy-5,7-flavanone). *Ann. Inst. Pasteur.*, 118, 84 (1970).
 13. Bogdanov S. : Characterization of antibacterial substances in honey. *Lebens Wiss Technol.*, 17, 74 (1984).
 14. Sabatier, S., Amiot, M. J., Tacchini, M. and Aubert, S. : Identification of flavonoids in sunflower honey. *J. of Food Sci.*, 57, 773 (1992).
 15. Bogdanov, S. : Determination of pinocembrin in honey by using HPLC. *J. Apicultural Res.*, 28, 55 (1989).
 16. Markham, K. B. : HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry*, 42 (1996).
 17. Grange J. M. and Davey, R. W. : Antibacterial properties of propolis (bee glue). *J. R. Soc. Med.*, 83, 159 (1990).
 18. Krol, W., Szuba, Z., Scheller, S., Gabrys, J., Grabiec, S. and Shami, J. : Antioxidant property of ethanolic extract of propolis (EEP) as evaluated by inhibiting the chemiluminescence oxidation of luminol. *Biochemistry-International*, 21, 539 (1990).
 19. Yamauchi, R., Kato, K., Oida, S., Kaneda, J. and Ueno, Y. : Benzyl caffeate, an antioxidative compound isolated from propolis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 56, 1321 (1992).
 20. Wollenweber, E., Hausen, B. M. and Greenway, W. : Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam and balsam of Peru. *Bull. Groupe Polyphenols*, 15, 112 (1990).
 21. Konig, B. : *Bee World*, 66, 136 (1985).
 22. Pepeljnjak, S., Jalsenjak, I. and Maysinger, D. : Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of *Bacillus subtilis*. *Pharmazie*, 40, 122 (1985).
 23. Greenaway, W., Scaysbrook, T. and Whatley, F. R. : *Bee World*, 71, 107 (1990).

(2001년 9월 6일 접수)