

## 프로폴리스추출물 제품의 플라보노이드 함량분석을 위한 비색법의 비교

김은정\* · 이화정 · 김혜정 · 남혜선 · 이미경 · 김혜영 · 이진하 · 강윤숙<sup>1</sup> · 이종옥<sup>2</sup> · 김희연

경인지방식품의약품안전청 시험분석팀, <sup>1</sup>식품의약품안전청 영양기능식품본부,

<sup>2</sup>식품의약품안전청 식품본부

## Comparison of Colorimetric Methods for the Determination of Flavonoid in Propolis Extract Products

Eun-Jeong Kim\*, Hwa-Jung Lee, Hye-Jeong Kim, Hye-Seon Nam, Mi-Keong Lee, Hae-Young Kim, Jin-Ha Lee, Yun-Sook Kang<sup>1</sup>, Jong-Ok Lee<sup>2</sup>, and Hee-Yun Kim

Testing and Analysis Team, Gyeongin Regional Food and Drug Administration

<sup>1</sup>Nutrition of Functional Food Headquarters, Korea Food and Drug Administration

<sup>2</sup>Food Headquarters, Korea Food and Drug Administration

Quantitative analysis of flavonoids in commercial propolis extract products were compared by three colorimetric methods; aluminum chloride method, dinitrophenylhydrazine method and aluminum nitrate method. Aluminum nitrate method in Korea Health Supplement Food Code was proved to be specific only for flavones and flavonols same as aluminum chloride method, while dinitrophenylhydrazine method was specific for flavanones and dihydroflavonols. Therefore, the sum of flavonoid contents determined by 2,4-Dinitrophenylhydrazine method and aluminum nitrate method may represent the real content of total flavonoids. As for the 25 commercial propolis extract products examined, the contents of flavonoid varied from 2.15% to 9.53% except for one product.

**Key words:** propolis, flavonoid, colorimetric method, aluminum nitrate, aluminum chloride, 2,4-dinitrophenylhydrazine

### 서 론

프로폴리스(propolis)는 벌이 나무, 꽃, 잎, 잎눈 등으로부터 수집하는 밀랍(beewax)과 수지(resin)물질을 타액과 혼합시켜 만든 물질로서 민간요법에서는 이미 기원전 300년부터 사용되어 왔으며 항균, 항바이러스, 항산화 같은 생리활성 효과를 보이는 것으로 알려져 있다(1,2). 그 구성 화합물은 아미노산, 플라보노이드, 페놀계 화합물 등 150여 가지 이상의 화합물로 구성되어 있으며(3), 이들 가운데 플라보노이드가 대표적인 기능물질로 확인되고 있다(4,5). 국내에서는 물과 주정을 이용한 프로폴리스추출물이 건강기능식품의 주원료로 사용되고 있으며 건강기능식품공전(6) 중 프로폴리스추출물 제품의 제조기준은 기능성분인 플라보노이드 함량으로 규정하고 있다. 플라보노이드 함량 분석법으로 비색법(7), 얇은막 크로마토그래피(thin layer chromatography)(8), 가스크로마토그래피(gas chromatography)(9),

가스크로마토그래피-질량 스펙트럼(gas chromatography-mass spectrometry)(10) 및 고성능 액체크로마토그래피(high performance liquid chromatography)(10) 등의 다양한 분석법이 보고되고 있다. Chromatograph 를 사용하여 분석한 연구(8-10)를 보면 프로폴리스 생산지역을 고려한 다양한 표준물질이 요구되며 그에 따른 장시간의 분석시간이 소요된다. 반면, 비색법의 경우 chromatograph를 이용한 분석법에 비해 번거로운 전처리 방법이 요구되지만 플라보노이드의 유사한 구조를 대상으로 한 분석방법으로 소요시간이 짧고 재현성이 우수하다. 현행 건강기능식품공전(6)에는 질산알루미늄을 이용한 비색법이 수재되어 있는데 Nagy(7) 및 Chang 등(11)의 보고에 따르면 비색법이 모든 종류의 플라보노이드를 정량할 수 있는 것이 아니다. 현행 질산알루미늄을 이용한 방법이 플라보노이드의 일부분만 정량이 가능하다면 프로폴리스 추출물제품에 표시된 플라보노이드의 함량이 실제 양이 아니다.

따라서 본 연구에서는 현행 건강기능식품공전에 수재된 질산알루미늄법 뿐만 아니라 염화알루미늄 및 2,4-디니트로페닐 하이드라진을 이용한 각각의 비색법 특성을 확인하고자 하였으며 25개의 프로폴리스추출물제품에 대하여 각 비색법에 따른 플라보노이드 함량을 비교·검토하여 효과적인 플라보노이드의 정량법을 확립하고자 하였다.

\*Corresponding author: Eun-Jeong Kim, Testing and Analysis Team, Gyeongin Regional Food and Drug Administration, 120 Juan 1-dong, Nam ku, InCheon, 402-835, Korea  
Tel: 82-32-442-4620  
Fax: 82-32-442-4622  
E-mail: hisclif@kfda.go.kr

## 재료 및 방법

### 재료

본 연구에 사용한 프로폴리스추출물제품은 총 25개 제품으로 국내에서 유통되고 있는 프로폴리스추출물제품 20개 및 인터넷을 통해 유통·판매되는 제품 5개를 구입하여 사용하였다.

### 표준시약 및 시액제조

표준시약으로 quercetin(Q0125, Sigma, USA)과 pinocembrine(P5239, Sigma, USA)를 사용하였으며 quercetin 50 mg을 80%(v/v) 에탄올을 이용하여 100 mL로 용해한 후 10, 50, 100 µg/mL로 각각 희석하여 이를 표준액으로 사용하여 검량선을 작성하였다. 또한 pinocembrine 50 mg을 80%(v/v) 에탄올을 이용하여 100 mL로 정용한 후 100, 200, 500 µg/mL로 각각 희석하여 이를 표준액으로 검량선을 작성하였다. 10%(w/v) 질산알루미늄용액은 질산알루미늄[Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O, 98.0%, Aldrich Co.] 17.6 g을 정확히 달아 증류수로 용해하여 100 mL로 정용하여 사용하였고 10%(w/v) 염화알루미늄용액은 염화알루미늄(AlCl<sub>3</sub>, 95%, Kanto Co., Japan) 10 g을 증류수로 용해하여 100 mL로 하여 사용하였다.

1%(w/v) 2,4-디니트로페닐하이드라진(C<sub>6</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 97%, Aldrich, 이하 2,4-D)시액은 1g의 2,4-D를 2 mL 96% 황산으로 녹인 후 메탄올로 100 mL로 정용 하여 사용하였다. 1 M 초산칼륨액은 초산칼륨(CH<sub>3</sub>COOK, 99%, Sigma) 9.815 g을 취하여 증류수로 용해하여 100 mL로 정용하였다. 또한 10%(w/v) 수산화칼륨액은 수산화칼륨(KOH, 85%, Sigma) 10 g을 증류수 30 mL로 녹인 후 메탄올로 이용하여 100 mL로 정용하여 사용하였다.

### 시험용액의 조제

프로폴리스추출물제품 50-500 mg을 취하고 80%(v/v) 에탄올을 가하여 용해하고, 1,500×g에서 10분간 원심분리(Union 55R, Hanil, Korea) 하였다. 상등액을 분리보관하고 잔류물을 80% 에탄올로 3회 추출한 후 전 추출액을 합하여 전체 용량을 25 mL 또는 50 mL로 정용하여 시험용액으로 하였다.

### 질산알루미늄법

Quercetin 및 pinocembrine 표준액과 시험액 각각 0.5 mL를 시험관에 취하고 에탄올 1.5 mL, 10%(w/v) 질산알루미늄용액 0.1 mL, 1 M 초산칼륨용액 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 가하여 충분히 교반을 한 후 40분간 실온에서 정치를 시켰다. 정치시킨 상등액을 분광광도계(UV-uvikon, Bio-TEK Co., Switzerland) 10 mm 셀(cell)을 사용하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 증류수를 대조액으로 하였다. 별도로 10%(w/v) 질산알루미늄용액 대신 증류수 0.1 mL를 가한 것의 흡광도를 뺀 흡광도 차를 이용하여 작성한 검량선에 의하여 플라보노이드 함량을 산출하였다.

### 염화알루미늄법

Quercetin 및 pinocembrine 표준액과 시험액 각각 0.5 mL를 시험관에 취하고 95% 에탄올 1.5 mL, 10%(w/v) 염화알루미늄용액 0.1 mL, 1 M 초산칼륨용액 0.1 mL, 증류수 2.8 mL를 가하여 충분히 교반을 하고 실온에서 30분간 방치하였다. 그 후 여과액을 10 mm 셀(cell)을 사용하여 증류수를 대조액으로 하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 흡광도로부터 별도로 상기 조작 중 염화알루미늄용액 대신 증류수 0.1 mL를 가한 것

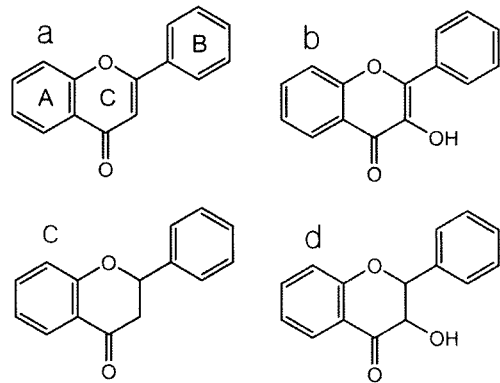


Fig. 1. Major groups of flavonoids.

a; flavone, b; flavonol, c; flavanone, d; dihydroflavonol.

의 흡광도를 뺀 흡광도 차를 이용하여 작성한 검량선에 의하여 플라보노이드 함량을 산출하였다.

### 디니트로페닐하이드라진법

Quercetin 및 pinocembrine 표준액과 시험용액 1 mL를 각각 10 mL 정량용 플라스크에 취하고 2 mL 1% 2,4-D 시액을 가한 후 50°C에서 50분간 방치하였다. 상온에서 식힌 후 10%(w/v) 수산화칼륨용액으로 10 mL로 정용하였다. 이 혼합액 1 mL를 50 mL 정량용 플라스크에 취한 후 메탄올을 가하여 50 mL로 정용한 후 486 nm에서 흡광도를 측정하였다. Pinocembrine대신 메탄올 1 mL를 이용한 상기조작을 대조액으로 하였다.

## 결과 및 고찰

현재 플라보이드는 그 종류의 다양성, 물질의 특성 및 기능에 대하여 완전하게 밝혀지지 못하고 있다. 그러나 대표적으로 Fig. 1에 나타낸 것과 같이 A, B, C환을 가진 것을 기본구조로 C환의 구조차이에 의하여 대표적으로 flavone, flavonol, flavanone 및 dihydroflavonol등으로 분류된다.

본 실험에서는 flavonol류인 quercetin과 flavanone류인 pinocembrine을 표준물질로 사용하였다. 이 두 표준물질에 대하여 질산알루미늄법, 염화알루미늄법 및 디니트로페닐하이드라진법을 적용시켜 본 결과 Table 1에 나타낸 바와 같다. 질산알루미늄법과 염화알루미늄법은 quercetin의 농도가 증가할수록 흡광치의 증가를 보였고 pinocembrine에 대해서는 반응을 보이지 않았다. 또한 질산알루미늄법을 quercetin 0.1 ppm에 대한 흡광치가 1.113 ± 0.004로 나타났는데 이는 염화알루미늄법에 의한 흡광치 0.451 ± 0.011보다 2배가량 높게 나타났다. 반대로 디니트로페닐하이드라진법은 pinocembrine에 대해서만 흡광치를 나타내었다. 이는 Chang 등(11)의 연구보고와 같은 유사한 경향을 보였다. 즉, 염화알루미늄법은 flavone류와 flavonol류의 C환의 C-4 ketone group과 C-3 hydroxyl group과 안정한 결합으로 흡광을 나타냄으로서 flavonoid의 정량에 사용되어왔고 디니트로페닐하이드라진법(7,11)은 황산에 소량 녹인 2,4-dinitrophenylhydrazine이 C환의 ketone 및 aldehydes와 결합하여 2,4-dinitrophenylhydrazone을 형성하여 486-495 nm에서 최대흡광을 나타냄으로써 정량하는데 이용되어 왔는데 flavanone류 및 dihydroflavonol류와 hydrazone을 형성하는 반면 C2-C3 double bond를 가진 flavone류, flavonol류는 2,4-D와는 결합을 하지 않는다. 현행 건강기능식품공전에 수제된 질산알루미늄법은 염화알루미늄법과 같이

**Table 1. The optical density of standards determined by aluminum nitrate, aluminum chloride and 2,4-dinitrophenylhydrazine colorimetric methods**

Flavonoids (systematic name)	Concentration (ppm)	Methods		
		Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> O.D. at 415 nm	AlCl <sub>3</sub> O.D. at 415 nm	2,4-D O.D. at 486 m
Quercetin (3,3',4',5,7-Penta hydroxyflavone)	0.01	0.092 ± 0.003 <sup>1)</sup>	0.037 ± 0.001	0.000 ± 0.000
	0.05	0.537 ± 0.012	0.221 ± 0.002	0.000 ± 0.000
	0.1	1.113 ± 0.004	0.451 ± 0.011	0.000 ± 0.000
Pinocembrine (5,7-dyhydroxy flavanone)	0.1	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.022 ± 0.002
	0.2	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.037 ± 0.007
	0.5	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.110 ± 0.004

<sup>1)</sup>All results were presented as mean ± SD (n = 3).

**Table 2. The flavonoid contents of 25 commercial products determined by aluminum nitrate, aluminum chloride and 2,4-dinitrophenylhydrazine colorimetric methods**

Sample	Flavonoid contents (%) <sup>1)</sup>			
	Al(NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> <sup>2)</sup>	AlCl <sub>3</sub> <sup>2)</sup>	2,4-D <sup>3)</sup>	Total <sup>4)</sup>
1	1.14 ± 0.03	1.12 ± 0.05	1.11 ± 0.01	2.25 ± 0.08
2	2.08 ± 0.02	1.89 ± 0.04	3.44 ± 0.08	5.52 ± 0.10
3	2.38 ± 0.06	2.28 ± 0.09	3.29 ± 0.03	5.67 ± 0.09
4	1.19 ± 0.01	1.20 ± 0.19	1.15 ± 0.03	2.34 ± 0.04
5	0.12 ± 0.01	0.11 ± 0.17	<0	0.12 ± 0.01
6	2.27 ± 0.03	2.07 ± 0.03	3.88 ± 0.16	6.15 ± 0.19
7	1.29 ± 0.01	1.04 ± 0.04	0.72 ± 0.10	2.01 ± 0.11
8	3.20 ± 0.02	3.11 ± 0.10	3.75 ± 0.12	6.95 ± 0.14
9	1.97 ± 0.12	2.05 ± 0.07	2.23 ± 0.01	4.20 ± 0.13
10	1.17 ± 0.10	1.16 ± 0.04	1.00 ± 0.09	2.17 ± 0.19
11	1.76 ± 0.65	1.75 ± 0.09	1.34 ± 0.15	3.10 ± 0.80
12	3.06 ± 0.33	2.80 ± 0.12	4.26 ± 0.05	7.32 ± 0.21
13	1.36 ± 0.23	1.25 ± 0.03	2.16 ± 0.12	3.52 ± 0.35
14	2.05 ± 0.21	1.90 ± 0.04	1.94 ± 0.05	3.99 ± 0.26
15	1.80 ± 0.30	1.63 ± 0.04	1.68 ± 0.05	3.48 ± 0.35
16	2.84 ± 0.21	2.49 ± 0.18	3.07 ± 0.02	5.91 ± 0.23
17	1.47 ± 0.35	1.35 ± 0.03	1.14 ± 0.01	2.61 ± 0.36
18	1.35 ± 0.22	1.10 ± 0.05	1.11 ± 0.01	2.45 ± 0.23
19	5.21 ± 0.88	4.78 ± 0.18	4.32 ± 0.41	9.53 ± 1.29
20	0.72 ± 0.21	0.64 ± 0.06	3.31 ± 0.02	4.03 ± 0.23
21	1.17 ± 0.06	1.21 ± 0.06	0.99 ± 0.05	2.16 ± 0.11
22	1.10 ± 0.08	1.03 ± 0.06	3.01 ± 0.10	4.11 ± 0.18
23	1.20 ± 0.11	1.31 ± 0.07	1.11 ± 0.20	2.31 ± 0.31
24	1.32 ± 0.08	1.26 ± 0.05	1.23 ± 0.11	2.55 ± 0.19
25	1.31 ± 0.14	1.29 ± 0.06	0.84 ± 0.02	2.15 ± 0.16

<sup>1)</sup>All results were presented as mean ± SD (n=3).

<sup>2)</sup>Levels calculated as quercetin equivalents.

<sup>3)</sup>Levels calculated as pinocembrine equivalents.

<sup>4)</sup>Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> + 2,4-D.

flavone류 및 flavonol류만 측정이 가능한 것을 확인 할 수 있었다(Table 1). 또한 Chang 등(11) 의 보고에 따르면 프로폴리스 원료에 대한 플라보노이드 함량을 확인한 결과 디니트로페닐하이드라진을 이용하여 확인한 함량이 염화알루미늄을 이용하여 확인한 함량보다 3배 가량 높은 것으로 확인됨으로서 프로폴리스 원료에 다량의 flavanone류와 dihydroflavonol류도 존재하고 있는 것을 보여주었다.

상기 세 가지 방법을 사용하여 25개 프로폴리스추출물제품

의 플라보노이드 함량을 비교 검토해보았다(Table 2). 염화알루미늄법과 질산알루미늄법은 quercetin을 검량선 작성에 사용하였으며 결정상관계수(R<sup>2</sup>)는 0.999를 나타내었다. 질산알루미늄법과 염화알루미늄법은 Table 1에서 확인된 바와 같이 quercetin에 대한 흡광치 차이가 나타났으나 두 방법에 의한 제품의 플라보노이드 함량은 동일하게 확인되었으며 2개 제품을 제외한 23개 제품의 플라보노이드 함량은 모두 1-5%으로 다양하게 나타났다.

Flavanone류 및 dihydroflavonol류의 확인이 가능한 디니트로페닐하이드라진법은 검량선 작성에 nargenin을 사용한 예도 있으나 본 실험에서는 프로폴리스의 flavanone류 중 가장 풍부하다는 pinocembrine을 사용하여 검량곡선을 작성하여 결정상관계수( $R^2$ )는 0.999를 나타내었다. 이 방법에 의한 함량을 확인한 결과 4개 제품에서 1% 미만으로 확인되었고 7개 제품에서는 질산알루미늄법을 이용하여 확인된 함량에 비해 40% 정도 더 높은 함량을 보였다. 특히 20번 제품의 경우 질산알루미늄법으로 1% 미만의 함량을 보여준 반면 디니트로페닐하이드라진법으로 3.3%의 함량을 확인하였는데 이것은 프로폴리스 원료에 다량의 flavanone류와 dihydroflavonol류도 존재하고 있는 것을 보여 주었다.

이러한 결과로 볼 때 flavone류 및 flavonol류의 확인이 가능한 질산알루미늄법과 flavanone류 및 dihydroflavonol류의 확인이 가능한 디니트로페닐하이드라진법에 의한 함량의 합이 실제 플라보노이드 함량에 가까운 것이라 판단되어지며 두 값의 총합을 Table 2에 나타내었다. 그 결과 25제품 중 5번 제품을 제외한 24개 제품에서 플라보노이드 함량이 2% 이상으로 나타났고 그 중에서 7개 제품의 플라보노이드 함량은 5% 이상 높은 것으로 확인되었으며, 특히 19번 제품은 9.5%의 높은 함량을 보였다.

## 요 약

본 연구는 유통 중인 프로폴리스추출물제품의 플라보노이드 함량을 3가지 비색법을 이용하여 비교 검토해본 결과 현행 건강기능식품공전의 질산알루미늄법은 염화알루미늄법과 마찬가지로 flavone류와 flavonol류의 확인이 가능하며 디니트로페닐하이드라진법은 flavanone류와 dihydroflavonol류의 정량이 가능한 것을 확인하였다. 따라서 질산알루미늄법과 디니트로페닐하이드라진법에 의한 함량의 합이 실제 플라보노이드 함량에 가까운 것으로 확인하였다. 두 방법의 총합에 의한 프로폴리스

추출물 25개 제품의 플라보노이드 함량을 확인한 결과 24개 제품에서 2.15-9.53%로 다양하게 나타났다.

## 문 헌

- Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem. Toxicol.* 35: 347-363 (1998)
- Kujumgiev A, Svetkova IT, Yu Serkedjieva, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 64: 235-240 (1999).
- Greenway W, Scaysbrook T, Whatley FR. The composition and plant origins of propolis: a report of work at oxford. *Bee World* 71: 107-118 (1990)
- Vennat B, Arvouet-Grand A, Gross D, Pourrat A. Qualitative and quantitative analysis of flavonoids and identification of phenolic acids from a propolis extract. *J. Pharm. Belg.* 50: 438-444 (1995)
- Mirzoeva OK, Calder PC. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins, Leukotrienes Essent. Fatty acids.* 55: 441-449 (1996)
- Korea Food and Drug Administration. Health Supplement Food Code. KFDA, Seoul, Korea (2004)
- Nagy M, Grancai D. Colorimetric determination of flavanones in propolis. *Pharmazie* 51: 100-101 (1996)
- Didry N, Dubreuil L, Pinkas M. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J. Apicult. Res.* 37: 99-105 (1998)
- Christov R, Bankova V. Gas chromatographic analysis of underivatized phenolic constituents from propolis using an electron-capture detector. *J. Chromatogr.* 623: 182-185 (1992)
- Maklham KR, Mitchell KA, Wilkins AL, Daldy JA, Lu Y. HPLC and GC-MS identification of the major organic constituents in New Zealand propolis. *Phytochemistry* 42: 205-211 (1996)
- Chang CC, Yang MH, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J. Food Drug Anal.* 10: 178-182 (2002)

(2005년 8월 23일 접수; 2005년 11월 10일 채택)