

국산 프로폴리스 내 Chrysin과 Pinocembrin의 정량분석

김세건 · 홍인표 · 우순옥 · 장혜리 · 한상미*

농촌진흥청 국립농업과학원 농업생물부

Quantitative Analysis of Chrysin and Pinocembrin in Korean Propolis

Se Gun Kim, In Pyo Hong, Soon Ok Woo, Hye Ri Jang and Sang Mi Han*

Department of Agricultural Biology, National Institute of Agricultural Science,
Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

Abstract – In the present study, we carried out quantitative analysis of chrysin and pinocembrin in Korean propolis by ultra performance liquid chromatography (UPLC) equipped with diode array detector. The separation was done using BEH C18 (2.1×50 mm, 1.7 μm) column with a mobile phase consisting of MeCN and 0.1% H₃PO₄ at 280 nm. The chromatographic method was validated for specificity, limit of detection, limit of quantification, linearity, precision, and accuracy. A quantitative analysis exhibited that the contents of the two compounds in Korean propolis collected from 8 inland areas except Jeju-do ranged from 3.1-46.0 mg/g. These results will be valuable as basic data for standardization of Korean propolis.

Keywords – Korean propolis, UPLC, Chrysin, Pinocembrin

프로폴리스, 벌꿀, 화분, 로열젤리 등 양봉산물은 예로부터 민간에서 식·의약 소재로 활용되어 현재까지 이를 이용한 화장품, 의약품, 건강기능식품 등이 개발되고 있으며, 천연소재로 각광 받는 동시에 무한한 시장 잠재력을 가지고 있다.¹⁾ 특히 봉교라고 불리는 프로폴리스는 꿀벌들이 벌집을 보호하기 위하여 소나무, 포플러, 참나무 등의 수목에서 꽃봉오리나 나무의 갈라진 틈새에서 분비되는 물질을 수집하여 자신의 타액을 섞어 만든 천연항생물질로, 생리활성에 대한 많은 연구가 진행되어 항진균 효과, 항암 효과, 항균 효과, 항산화 효과, 항염 효과 등이 보고되었다.²⁻⁵⁾ 프로폴리스의 구성성분으로는 phenolics가 주를 이루고 이외에도 terpenes, steroids 등 180종 이상의 화합물이 존재하며 꿀벌의 타액에 포함되어 있는 β-glucosidase 등의 효소로 인하여 배당체(glycoside) 형태의 화합물보다는 비 배당체(aglycone) 형태의 화합물이 다량으로 존재한다.⁶⁾ 프로폴리스는 브라질, 중국, 동유럽 등지에서 주로 생산되는데 프로폴리스의 유용성이 입증되면서 화학적 구성성분에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Kumazawa 등⁷⁾의 연구에 의하면 브라질 프로폴리스는 prenylated cinnamic acid 유도체인

artepillin C가 주성분이자 특이성분으로 분석되었고, 중국 프로폴리스에는 flavone인 chrysin이 다량으로 함유되어 있으며, 동유럽의 불가리아 및 헝가리에서 생산된 프로폴리스에는 chrysin과 flavanone인 pinocembrin이 HPLC-DAD를 이용하여 주요성분을 나타내었다. 하지만 우리나라에서 생산되는 프로폴리스의 성분연구는 Ahn 등⁸⁾이 2004년도에 경상북도 칠곡군을 포함한 6개 지역에서 프로폴리스를 수집하여 15종의 화합물을 분석하였으나, 그 이후로는 국산 프로폴리스에 대한 주요성분 분석연구는 거의 없는 실정이다. 현재 기능성 원료로 사용하는 프로폴리스의 품질규격은 항산화효과의 활성물질인 flavonoids의 총 함량 10 mg/g 이상 등으로 규정하고 있다. 본 연구에서는 2015년도에 우리나라 각지에서 수집한 프로폴리스를 사용하여 주요 flavonoids를 탐색하고 정량분석을 실시하여 국산 프로폴리스의 표준화를 위한 기초자료로 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

공시시료 – 국산 프로폴리스는 2015년도 11월에 강원도, 경기도, 충청남도, 충청북도, 경상북도, 경상남도, 전라북도, 광주광역시, 제주시에에서 수집한 것을 사용하였다. 프로폴리스의 동정은 국립농업과학원 잠사양봉소재과 한상미 박사

*교신저자(E-mail): sangmih@korea.kr
(Tel): +82-63-238-2896

에 의해 꿀벌로부터 유래된 프로폴리스로 동정되었고, 프로폴리스 표본(GGP-15-1101, GWP-15-1102, CBP-15-1103, CNP-15-1104, JBP-15-1105, GJP-15-1106, GBP-15-1107, GNP-15-1108, JJP-15-1109)은 국립농업과학원 농업생물부 잠사양봉소재과 양봉산물실험실에 보관 중이다.

시약 및 기기 - 프로폴리스 구성성분 분리를 위한 유기용매는 SK chemicals(Seongnam, Korea)사의 제품을, silica gel(40-63 μm , Art. No. 9385), TLC plate(layer thickness 0.25 mm, 20×20 cm, Art. No. 5715)는 Merck(Kenilworth, NJ, USA)사의 제품을, MCI gel은 Mitsubishi chemical (Tokyo, Japan)사의 제품을 사용하였으며, 구조분석을 위한 NMR spectrometer는 Jeol JNM-ECA600(Tokyo, Japan)를 이용하였다. 분석 용매는 Fisher scientific(Hampton, NH, USA)사의 제품을 사용하였다.

추출 및 분리 - Kim 등⁹⁾의 방법에 따라 국산 프로폴리스 70 g을 methanol로 초음파 추출한 후, 추출액을 수욕상에서 감압농축하여 methanol 엑스를 얻었다. 이 methanol 엑스에 증류수를 넣고 현탁시킨 후, *n*-hexane, ethyl acetate, *n*-butanol의 순으로 용매 분획하였으며, TLC로 구성성분의 양상을 확인한 후 주요성분이 함유되어 있는 ethyl acetate 가용분획을 MCI gel 컬럼 크로마토그래피(MeOH:H₂O=20:80 →100:0)를 실시하여 9개의 소분획(GPEF1-9)으로 나누었다. GPEF5 분획에 대하여 SiO₂(CH₂Cl₂:MeOH=99:1→50:50) 컬럼 크로마토그래피를 실시하였으며, 소분획 GPEF 55로부터 화합물 1(340 mg)을 얻었다.

Chrysin - ¹H-NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 8.06 (2H, dd, *J*=9.8, 1.5 Hz, H-2',6'), 7.61(1H, m, H-4'), 7.58 (2H, m, H-3',5'), 6.96 (1H, s, H-3), 6.51 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.21 (1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6); ¹³C-NMR (150 MHz, DMSO-*d*₆) δ : 182.0 (C-4), 164.7 (C-7), 163.3 (C-2), 161.6 (C-5), 157.6 (C-9), 132.1 (C-4'), 130.8 (C-1'), 129.2 (C-3',5'), 126.5 (C-2',6'), 105.2 (C-3), 104.0 (C-10), 99.1 (C-6), 94.2 (C-8); LC ESI IT-TOF MS: *m/z* 254 [M+H]⁺

분석시료 전처리 및 UPLC 분석조건 - 9종의 프로폴리스 원피에 80% ethanol을 넣고 5 mg/mL로 만든 다음 수욕상에서 45분간 초음파 추출하여 여과한 후, diode array detector, binary pump, autosampler가 장착된 Waters (Minneapolis, MN, USA) ACQUITY UPLC I-Class에 BEH C18(Waters, 1.7 μm , 2.1×50 mm) 컬럼을 사용하여 분석하였고, UPLC 분석조건은 Table I과 같다.

분석법 검증 - 프로폴리스 분석에 사용한 UPLC 분석조건에 대하여 식품의약품안전처의 “생약(한약)제제의 성분 프로파일 가이드라인”과 “의약품 등 분석법의 밸리데이션에 대한 가이드라인”에 따라 분석법을 검증하였다. 특이성 (specificity)은 표준품과 시료 내 동일한 retention time을 가지는 피크의 UV spectrum을 비교하여 나타내었고, 직선성

Table I. UPLC conditions of propolis

| Item | Conditions |
|--------------------|---|
| Column | BEH C18(2.1×50 mm, 1.7 μm) |
| Flow rate | 0.5 mL/min |
| Column temperature | 40°C |
| Injection volume | 1 μl |
| Wavelength | 280 nm |
| Mobile phase | Time(min) MeCN(%) 0.1% H ₃ PO ₄ (%) |
| | 0 24 76 |
| | 5 25 75 |
| | 15 36 64 |

(linearity)은 표준품의 5개 구간(5-200 $\mu\text{g/mL}$)을 설정하여 상관계수($R^2 > 0.9$)로 평가하였다. 검출한계(limit of detection, LOD)와 정량한계(limit of quantification, LOQ)는 $\text{LOD} = 3.3 \times \sigma/S$, $\text{LOQ} = 10 \times \sigma/S$ (σ : y 절편의 표준편차, S : 검량선의 기울기)식에 대입하여 산출하였다. 정밀성(precision)은 일내 (intra-day), 일간(inter-day) 정밀도를 평가하여 상대표준편차 (RSD)로 나타내었고, 정확성(accuracy)은 회수율(recovery)을 측정하여 평가하였다.

결과 및 고찰

화합물의 구조 - 화합물 1은 ESI/MS 분석에서 *m/z* 254.0579 [M+H]⁺로 확인하였으며, 분자식은 C₁₅H₁₀O₄이었다. ¹H-NMR spectrum에서 5개의 일치된 benzene ring proton signal이 δ 8.06(2H, dd, *J*=9.8, 1.5 Hz, H-2', 6'), 7.61(1H, m H-4'), 7.58(2H, m, H-3', 5') 영역에서 관찰되었고, δ 6.51(1H, d, *J*=2.0Hz, H-8)과 6.21(1H, d, *J*=2.0 Hz, H-6)영역으로부터 1,2,3,5-사치환 benzene의 *meta* coupling 하는 2개의 proton signal이 확인되었다. 또한 δ 6.96(1H, s, H-3)에서 olefinic proton signal이 관찰되어 flavonoid 계열의 물질로 추정하였다. ¹³C-NMR spectrum에서는 15개의 signal이 관찰되었고, olefin 영역에서 14개 그리고 carbonyl carbon signal 182.0(C-4) 1개를 확인하였다. 이를 기준문헌¹⁰⁾과 비교하여 화합물 1은 flavone인 chrysin으로 구조를 동정하였다.

지표성분 설정 및 분석조건 최적화 - 국산 프로폴리스의 주요 성분을 탐색하고자 프로폴리스 주성분 함유 ethyl acetate 분획으로부터 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 chrysin을 분리하였고(Fig. 1A), 이전의 연구⁹⁾에서 국산 프로폴리스 추출물로부터 pinocembrin을 분리하여 동정하였다(Fig. 1B). Chrysin은 항염 효과, 항돌연변이 효과, 항산화 효과가 보고되어 있으며,¹¹⁾ pinocembrin은 항염효능을 비롯하여 신경보호작용, 항산화효과 등의 생리활성을 가지는 것

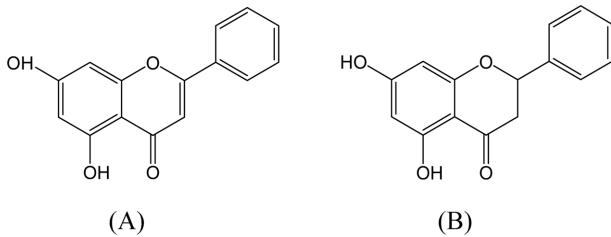


Fig. 1. Chemical structures of (A) chrysin and (B) pinocembrin.

으로 보고되어 있다.¹²⁾ 이 화합물들은 검출과장 280 nm로 설정한 UPLC-DAD 분석에서 강한 흡수를 보이는 피크로 주성분임을 알 수 있었으며(Fig. 2B), 지표성분으로 설정하여 분석법을 최적화 하였다. Chrysin 및 pinocembrin에 인

접한 불순물과의 분리도를 향상시키기 위하여 BEH C18 컬럼과, Advanced materials technology(Wilmington, DE, USA)사의 pentafluorophenyl propyl silane(PFP), C16 amide(RP-amide)가 충전된 컬럼을 사용하여 분석을 진행한 결과(data 미제시), BEH C18 컬럼, MeCN과 0.1% H_3PO_4 의 이동상 조건에서 지표성분과 시료 내 동일한 retention time에 검출되는 피크의 UV spectrum은 동일한 패턴을 나타내었으며, 지표성분의 양호한 분리능이 확인되어 분석조건은 특이성(specificity)을 나타내었다. 또한 15분 내에 신속하게 동시 분석이 가능하였다(Fig. 2).

분석법 검증 - 지표성분 chrysin과 pinocembrin을 5, 10, 50, 100, 200 $\mu\text{g/mL}$ 로 만든 후 분석법을 적용하여 직선성을 평가하였다. 직선성은 표준용액의 검량선의 상관계수(R^2)로 나타내는데, 지표성분 모두 0.99 이상의 우수한 상관계수를

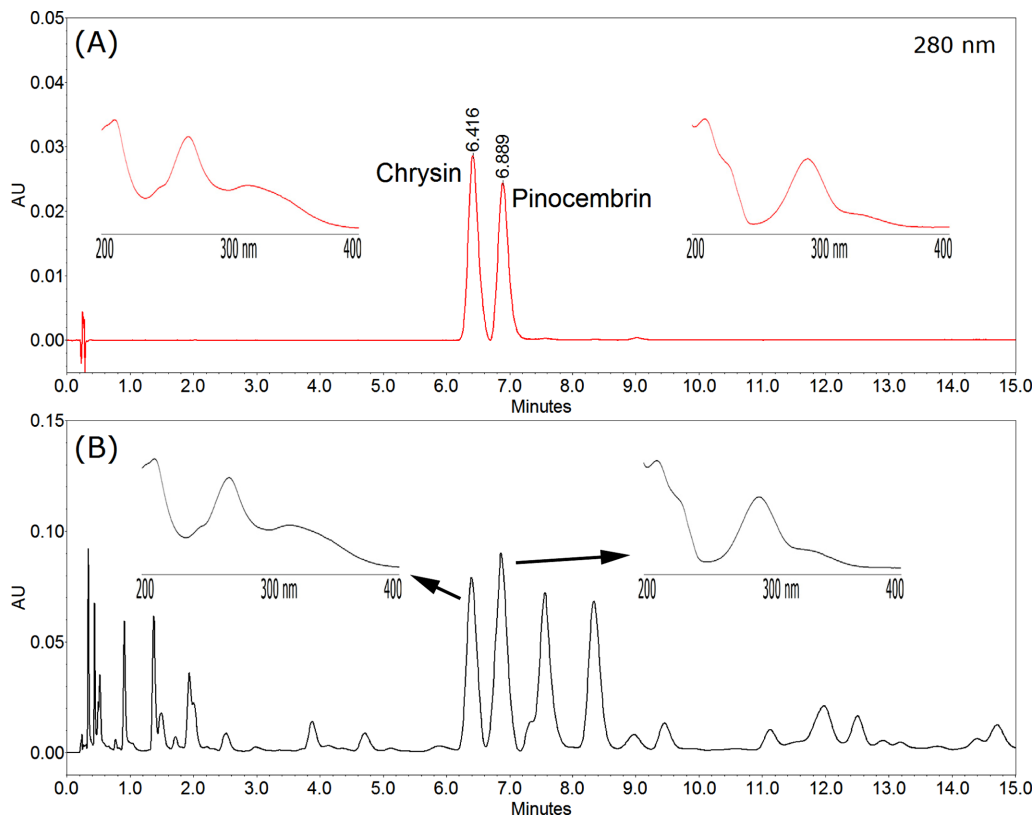


Fig. 2. UPLC chromatograms of (A) standard mixture and (B) 80% ethanol extract of propolis collected in Gyeonggi-do.

Table II. Regression equation, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of chrysin and pinocembrin

| Standard | Regression equation ^(a) | $R^{2(b)}$ | LOD ($\mu\text{g/mL}$) | LOQ ($\mu\text{g/mL}$) |
|-------------|------------------------------------|------------|--------------------------|--------------------------|
| Chrysin | $Y = 6245x + 8798$ | 0.9997 | 0.05 | 0.16 |
| Pinocembrin | $Y = 5433.6x + 9375.5$ | 0.9996 | 0.06 | 0.17 |

(a) Y: peak area, x: sample concentration ($\mu\text{g/mL}$)

(b) R^2 : correlation coefficient

Table III. Precision data of chrysin and pinocembrin

| Standard | Conc. ($\mu\text{g/mL}$) | Intra day | | Inter day | |
|-------------|-------------------------------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| | | Mean \pm SD | RSD(%) | Mean \pm SD | RSD(%) |
| Chrysin | 10 | 10.1 \pm 0.1 | 0.71 | 10.1 \pm 0.3 | 2.56 |
| | 50 | 49.9 \pm 0.1 | 0.27 | 50.3 \pm 0.6 | 1.10 |
| | 100 | 100.5 \pm 0.9 | 0.91 | 99.8 \pm 0.4 | 0.43 |
| Pinocembrin | 10 | 10.2 \pm 0.2 | 1.96 | 10.3 \pm 0.3 | 2.91 |
| | 50 | 49.8 \pm 0.1 | 0.20 | 50.1 \pm 0.2 | 0.40 |
| | 100 | 100.4 \pm 0.8 | 0.80 | 100.3 \pm 0.2 | 0.20 |

Conc.: concentration, SD: standard deviation, RSD: relative standard deviation

Table IV. Accuracy data of chrysin and pinocembrin

| Standard | Spiked amount ($\mu\text{g/mL}$) | Measured amount ($\mu\text{g/mL}$) | RSD (%) | Recovery (%) |
|-------------|---------------------------------------|---|---------|--------------|
| Chrysin | 10 | 9.9 \pm 0.3 | 3.03 | 99.0 |
| | 50 | 49.1 \pm 0.3 | 0.61 | 98.2 |
| | 100 | 98.9 \pm 0.4 | 0.40 | 98.9 |
| Pinocembrin | 10 | 10.2 \pm 0.4 | 3.92 | 102.0 |
| | 50 | 49.8 \pm 0.6 | 1.20 | 99.6 |
| | 100 | 101.0 \pm 1.6 | 1.58 | 101.0 |

나타내어 양호한 직선성을 나타냈으며, 검출한계 및 정량한계는 0.05-0.17 $\mu\text{g/mL}$ 로 미량의 성분 분석이 가능함을 알 수 있었다(Table II). 일내 정밀성 및 일간 정밀성 평가에서는 검량선의 10, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 세 구간에 대하여 정밀도를 평가하였으며, 그 결과, 상대표준편차 5% 미만으로 확인되어 우수한 정밀도를 나타냈으며(Table III), 회수율은 정밀성평가에서 사용한 3가지 농도를 시료 내 첨가하여 분석법을 적용한 후 실시하였을 때, 지표성분 2종에서 분석오차 10%미만의 결과를 나타내었다(Table IV). 분석법 검증을 통하여 프로폴리스 UPLC 분석법은 우리나라에서 생산된 프로폴리스 내 chrysin과 pinocembrin의 정량분석에 사용할 수 있었다.

분석법 적용 및 함량평가 - 국산 프로폴리스 내 chrysin과 pinocembrin의 함량을 지역별로 알아보기 위하여 개발된 분석법을 적용한 정량분석 결과를 Table V에 나타내었다. Chrysin의 함량은 2.4-37.6 mg/g(원피), pinocembrin의 함량은 13.7-46.0 mg/g(원피)로, 경기도와 경상남도에서 수집한 프로폴리스에서 지표성분 2종 모두 30 mg/g로 높은 함량을 나타내었고, 제주도를 제외한 8개 내륙지방에서 모두 검출되었다. 프로폴리스는 식물의 분포, 기후 등에 따라 구성성분의 차이를 나타내는데, Kumazawa 등⁷⁾은 온대지방의 포플러 속(genus) 식물로부터 유래된 프로폴리스는 flavone 및 flavanone 계열 물질을 주성분으로 보고하였다. 본 연구

Table V. Contents of chrysin and pinocembrin in 9 different propolis

| Propolis | Content(mg/g) | |
|-------------------|-----------------|-----------------|
| | Chrysin | Pinocembrin |
| Gyeonggi-do | 37.6 \pm 0.02 | 38.7 \pm 0.06 |
| Gangwon-do | 15.9 \pm 0.08 | 35.9 \pm 0.12 |
| Chungcheongbuk-do | 19.1 \pm 0.08 | 25.7 \pm 0.10 |
| Chungcheongnam-do | 14.4 \pm 0.03 | 23.1 \pm 0.10 |
| Jeollabuk-do | 11.3 \pm 0.08 | 20.5 \pm 0.08 |
| Gwangju | 2.4 \pm 0.01 | 13.7 \pm 0.07 |
| Gyeongsangbuk-do | 3.1 \pm 0.01 | 14.4 \pm 0.07 |
| Gyeongsangnam-do | 30.9 \pm 0.09 | 46.0 \pm 0.06 |
| Jeju-do | ND | ND |

ND stands for "not detected"

를 통하여 우리나라 내륙지방의 프로폴리스에는 chrysin과 pinocembrin이 주요 flavonoids로 확인되었고, 버드나무, 미루나무 등 포플러 속 식물이 프로폴리스의 주요 밀원일 것이라 사료된다. 하지만, 제주도에서 생산된 프로폴리스는 내륙지방과 달리 아열대 기후를 형성하여 수종이 다르게 분포하는 특성 때문에 chrysin과 pinocembrin이 검출되지 않았으며, Shimomura 등¹³⁾은 chalcone 계 화합물이 제주 프로폴리스에 주로 존재한다고 보고하여 지역의 식생과 기후가 프로폴리스의 성분 차이에 크게 영향을 끼치는 것으로 확인되었다. 앞으로 국산 프로폴리스의 표준화 및 우수성을 입증하기 위하여 기능성 성분연구와 생리활성 검증이 필요할 것으로 사료되며, 특히 제주도 프로폴리스의 전수조사를 통하여 지표성분 설정 및 성분연구가 진행되어야 할 것이다.

결론

국산 프로폴리스의 표준화를 위한 기초연구로 주요 성분을 확인하기 위하여 프로폴리스 methanol 추출물로부터 컬럼 크로마토그래피를 실시하여 chrysin을 분리하였다. UPLC-

DAD를 이용하여 chrysin과 이전의 연구에서 분리된 pinocembrin은 주요 flavonoids로 확인되어 지표성분으로 설정하였으며, BEH C18 컬럼을 사용하여 동시분석법을 작성하였다. 또한 특이성, 직선성, 검출한계, 정량한계, 정밀성, 정확성 등의 파라미터를 측정하여 분석법을 검증하였다. 프로폴리스 분석법을 적용하여 우리나라 9개 지역에서 수집한 프로폴리스 내 지표성분 2종에 대하여 제주도를 제외한 8개 내륙지역의 프로폴리스 추출물에서 모두 검출되었으며, 경기도와 경상남도에서 수집한 프로폴리스에 chrysin과 pinocembrin의 함량이 30 mg/g(원괴) 이상 높게 나타났다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 공동연구 국책기술개발사업(과제번호: PJ1083701)의 지원에 의해 이루어진 것입니다.

인용문헌

1. Jeong, C. H., Bae, Y. I., Lee, H. J. and Shim, K. H. (2003) Chemical components of propolis and its ethanolic extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **32**: 501-505.
2. Park, S. I., Ohta, T., Kumazawa, S., Jun, M. and Ahn, M. R. (2014) Korean propolis suppresses angiogenesis through inhibition of tube formation and endothelial cell proliferation. *Nat. Prod. Commun.* **9**: 555-560.
3. Bonvehí, J. S. and Gutiérrez, A. L. (2012) The antimicrobial effects of propolis collected in different regions in the Basque Country (Northern Spain). *World J. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 1351-1358.
4. Wang, K., Zhang, J., Ping, S., Ma, Q., Chen, X., Xuan, H., Shi, J., Zhang, C. and Hu, F. (2014) Anti-inflammatory effects of ethanol extracts of Chinese propolis and buds from poplar (*Populus×canadensis*). *J. Ethnopharmacol.* **155**: 300-311.
5. Orsolić, N., Kosalec, I. and Basić, I. (2005) Synergistic anti-tumor effect of polyphenolic components of water soluble derivative of propolis against Ehrlich ascites tumour. *Biol. Pharm. Bull.* **28**: 694-700.
6. Castaldo, S. and Capasso, F. (2002) Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* **73**: S1-6.
7. Kumazawa, S., Hamasaka, T. and Nakayama, T. (2004) Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* **84**: 329-339.
8. Ahn, M. R., Kumazawa, S., Hamasaka, T., Bang, K. S. and Nakayama, T. (2004) Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. *J. Agric. Food Chem.* **52**: 7286-7292.
9. Kim, S. G., Hong, I. P., Woo, S. O., Jang, H. R. and Han, S. M. (2016) Quantitative analysis of pinocembrin isolated from Korean propolis. *Journal of Apiculture* **31**: 103-111.
10. Elisabetta, S., Stocchero, M., Morelato, E., Facchin, C. and Mammi, S. (2012) An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics* **8**: 679-690.
11. Kasala, E. R., Bodduluru, L. N., Madana, R. M., V. A. K., Gogoi, R. and Barua, C. C. (2015) Chemopreventive and therapeutic potential of chrysin in cancer: mechanistic perspectives. *Toxicol. Lett.* **233**: 214-225.
12. Lan, X., Wang, W., Li, Q. and Wang, J. (2016) The natural flavonoid pinocembrin: molecular targets and potential therapeutic applications. *Mol. Neurobiol.* **53**: 1794-1801.
13. Shimomura, K., Sugiyama, Y., Nakamura, J., Ahn, M. R. and Kumazawa, S. (2013) Component analysis of propolis collected on Jeju Island, Korea. *Phytochemistry* **93**: 222-229.

(2017. 1. 5 접수; 2017. 2. 23 심사; 2017. 3. 3 게재확정)