

양파 껍질에서 분리한 Xanthine Oxidase 저해물질

나경수 · 정수현* · 서형주* · 손종연** · 이효구***

대구공업대학 식품영양과, *고려대학교병설보건대학 식품영양과

안성산업대학교 식품공학과, *공주대학교 식품공학과

Inhibitor of Xanthine Oxidase from Onion Skin

Kyung Soo Ra, Soo Hyun Chung*, Hyung Joo Suh*, Jong Youn Son** and Hyo Ku Lee***

Department of Food and Nutrition, Taegu Technical College

*Department of Food and Nutrition, College of Allied Health Sciences, Korea University

**Department of Food Science and Technology, Anseng National University

***Department of Food Science and Technology, Kongju University

Abstract

Two major flavonoid compounds having inhibition activity of xanthine oxidase from onion skin were separated, isolated and identified by ODS chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, UV/visible absorption spectroscopy and FAB Mass. Spectral analyses indicated that F_1 was a flavonol having 3,5,7,3'-OH and 4'-glucoside (quercetin 4'-glucoside), and F_2 was a flavonol having 3(5),7,3',4'-OH (quercetin). FAB-Mass of fraction F_1 and F_2 in positive-ion-mode produced a spectra containing main ions at m/z 465, corresponding to the $(M+H)^+$ ion of quercetin 4'-glucoside, and m/z 303, corresponding to the $(M+H)^+$ ion of quercetin. The inhibition mechanisms of F_1 and F_2 were a mixture of the uncompetative and non-competative modes, with respect to xanthine as a substrate.

Key words: xanthine oxidase inhibitor, onion skin, quercetin, quercetin 4'-glucoside

서 론

양파(*Allium cepa* L.)는 백합과에 속하는 다년생 식물로 향신료로 활용되고 있으며, 많은 양의 플라보노이드류를 함유하고 있다. 이러한 플라보노이드류는 항염, 항게양, 항동맥경화, 항균, 항돌연변이, 항암, 항종양 및 항산화효과를 발휘하는 것으로 알려져 있으며⁽¹⁻⁶⁾, xanthine oxidase에 대한 저해효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. Xanthine oxidase는 생체내 퓨린대사에 관여하는 효소로 xanthine 혹은 hypoxanthine으로부터 요산을 생성하여 혈장내 요산이 증가되면 낮은 용해성으로 인하여 골절에 축적되어 심한 통증을 유발하는 통풍을 일으킨다⁽⁷⁾. 따라서 단백질의 과잉섭취는 다량의 요산 생성을 증대시키므로 통풍환자에게는 식생활에서 가급적 단백질의 양을 제한하는 것이 바람직하다. 이와같이 통풍을 예방하려면 식이요법과 약물요

법이 병행되어야 한다. 통풍의 치료에 사용되는 약물로는 hypoxanthine의 유사체인 allopurinol과 alloxanthine이 있는데 allopurinol은 xanthine oxidase에 의하여 alloxanthine으로 산화된 다음, 이것이 xanthine oxidase에 강하게 결합하여 요산 생성의 최종단계에 관여하는 xanthine oxidase의 효소활성을 저해함으로써 요산의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다⁽⁸⁾. 통풍의 원인이 되고 있는 xanthine oxidase의 활성을 저해할 목적으로 천연물을 대상으로 많은 연구가 진행되어 왔다. 특히 식물계에 널리 존재하는 플라보노이드류 성분중 분자내 hydroxy기의 위치에 따라 그 저해효과가 다르며⁽⁹⁾, gallate기를 함유한 플라보노이드는 경쟁적으로 저해한다고 보고되고 있다⁽¹⁰⁾. 또 녹황색 채소류의 잎에 존재하는 folate⁽¹¹⁾와 팔꽃나무의 꽃과 눈으로 부터 분리된 genkwanin, luteolin-7-methyl ether 및 luteolin⁽¹²⁾ 및 녹차의 폴리페놀화합물에 의한 xanthine oxidase에 대한 저해효과 등도 보고되어 있다⁽¹³⁾.

양파에는 quercetin 4'-glucoside, quercetin 4',7-diglycoside, quercetin 3,7-diglycoside, quercetin 3,4'-diglycoside,

Corresponding author: Hyung Joo Suh, Department of Food and Nutrition, College of Allied Health Sciences, Korea University, 1 Jeongneung-dong, Sunghuk-gu, Seoul 136-703, Korea

quercetin aglycone, isorhamnetin monoglycoside, kaempferol monoglycoside 등의 플라보노이드류가 함유되어 있다. 이중 80%가 quercetin diglycoside, monoglycoside, quercetin aglycone으로 구성되어 있다⁽¹⁴⁾. 양파에 대한 여러 생리적 기능은 많이 보고되고 있으나 xanthine oxidase에 대한 저해효과는 보고되어 있지 않으며, 특히 양파가공시 부산물로 얻어지는 양파 껍질에 대한 생리적 기능에 대한 연구는 거의 전무한 편이다.

본 연구에서는 전보⁽⁶⁾에서 보고한 양파 껍질의 항산화 효과 외에 xanthine oxidase에 대한 저해효과를 보이는 플라보노이드류를 분리, 동정하였다.

재료 및 방법

재료

무안에서 재배된 양파를 구입하여 분리한 양파 껍질은 수세, 정선 및 탈수과정을 거쳐 동결건조하였다. 건조된 양파껍질을 분쇄하여 얻은 분말을 시료로 사용하였다. 플라보노이드 정제에 사용한 Sephadex LH-20은 Pharmacia Co., xanthine oxidase는 Sigma Co. 제품을 구입하여 사용하였다.

Xanthine oxidase 저해활성 측정

Xanthine oxidase의 저해활성 측정은 Strip와 Corte⁽¹⁵⁾의 방법에 준하여 실시하였다. 즉 시료 추출물 1 mL에 40 mU의 xanthine oxidase 0.1 mL 및 1/15 M phosphate buffer (pH 7.5) 2.9 mL를 가하여 25°C에서 15분간 preincubation시켰다. 여기에 기질로써 150 mM xanthine 2 mL를 가하고 30분간 반응시킨 후 1 N HCl를 가하여 반응을 정지시켜 290 nm에서 흡광도를 측정하여 xanthine oxidase의 활성을 나타내었다.

추출 및 분리

양파껍질 분말에 10배량의 메탄올을 가하고 환류냉각하에서 3회 추출한 후 여과 농축하여 메탄올 추출물을 얻었다. 메탄올 추출물은 Park과 Lee⁽¹⁶⁾의 방법에 따라 ODS column으로 처리하여 얻은 메탄올 분획을 Leighton 등⁽¹⁴⁾의 방법에 따라 Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 분리하였다.

분획물의 자외선 및 가시광선의 흡수 패턴

분획물을 메탄올에 용해한 후 Markham 방법⁽¹⁷⁾에 준하여 NaOH, AlCl₃/HCl, NaOAc 및 NaOAc/H₃BO₃를 첨가하여 반응 전후의 자외선 및 가시광선의 흡수패턴의 변화를 조사하였으며, 이때 UV/Vis spectropho-

meter (Beckman DU-65, U.S.A.)를 사용하여 200~500 nm의 범위에서 측정하였다.

FAB 질량분석

Positive ion FAB mass (VG70-VSEQ) system에 의해 정제시료의 분자량을 측정하였다. 이때 FAB source는 35 keV Cs⁺ ion beam을 matrix는 3-nitrobenzyl alcohol을 사용하였다.

HPLC에 의한 플라보노이드 정량

Ohara 등⁽¹⁸⁾의 방법에 따라 양파껍질에 함유된 플라보노이드의 함량을 정량하였다. 즉 Nova-Pak C₁₈ (Waters Co.) column, UV detector (350 nm)와 2.5% acetic acid/acetonitrile/methanol (70 : 20 : 10)의 mobile phase를 사용하여 0.5 mL/min의 유속으로 분석하였다.

결과 및 고찰

추출 및 분리

양파껍질로부터 플라보노이드류를 추출하고자 물, 50% 메탄올, 99% 메탄올을 사용하여 추출한 결과, 각각 7.7%, 8.8%와 12.8%의 추출율을 보였다(결과 미제시). 양파 껍질에 함유되어 있는 플라보노이드를 분리하고자 메탄올 추출물을 ODS column chromatography에 의해 전처리하여 당과 다른 불순물을 제거하여 얻은 메탄올 분획을 Sephadex LH-20 column chromatography를 한 결과(Fig. 1), 두 개의 분획(F₁, F₂)을 얻었다. Leighton 등⁽¹⁴⁾은 양파 과육으로부터 quercetin diglycosides, isorhamnetin glucoside, quercetin 4'-mono-

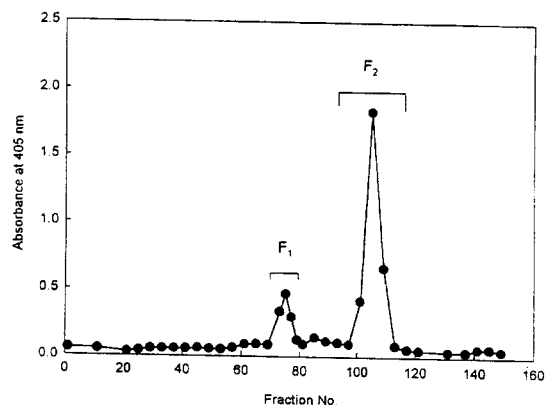


Fig. 1. Chromatogram of methanol fraction obtained from ODS column on Sephadex LH-20 column. Fractions were eluted with methanol that contained 7.5% acetic acid as a mobile phase at 0.8 ml/min.

glucoside와 quercetin 등 4개의 분획을 보고하였으며, Lee 등⁽⁶⁾은 양과 과육으로부터 quercetin diglycosides, rutin, isorhamnetin glucoside, quercetin 4'-monoglucoside와 quercetin 등 5개의 분획을 분리하고, 양과과육에서의 quercetin 4'-monoglucoside가 주성분임을 보고하였다. 그러나 본 실험에서 얻은 두 개의 분획은 이들의 보고^(14,16)와 chromatogram을 비교한 결과, quercetin 4'-monoglucoside (F₁)와 quercetin (F₂)로 추정된다.

분획물의 자외선 및 가시광선의 흡수 패턴

Sephadex LH-20 column chromatography에 의해 얻은 분획 F₁과 F₂의 물질 동정을 위해 자외선과 가시광선에서의 흡수패턴을 측정된 결과(Table 1), F₁ 분획은 253 nm와 364 nm에서 최대흡수피크를 나타내었다. 일반적으로 플라보놀의 흡수패턴은 3-OH가 치환된 경우 250~280 nm (band II)와 330~360 nm (band I)에서 최대 피크를, 3-OH가 치환되지 않은 경우 250~280 nm (band II)와 350~385 nm (band I)에서 최대 피크를 나타내므로⁽¹⁷⁾ 이 물질이 플라보놀임을 알 수 있었다. 또한 2 M NaOH를 첨가시 band I이 410 nm로 46 nm의 장파장 이동을 나타내었으며, 시간이 경과할수록 흡광도가 감소되는 경향을 보임에 따라 3-OH와 4' 위치에 -OH기 대신에 다른 치환체가 존재함을 확인할 수 있었다. 327 nm에서 새로운 피크가 확인됨에 따라 7-OH기를 가지는 플라보놀임을 확인하였다. Al³⁺ ion 첨가시 -OH기와 인접한 keton기 사이에, o-dihydroxyl groups간에 복합체가 형성되며, 이때 형성된 복합체는 HCl 첨가로 인해 hydroxy-keto 복합체만이 남게된다. AlCl₃ 첨가시와 AlCl₃/HCl 첨가시 band I이 변화가 없는 것은 hydroxy-keto 복합체의 형성만을 의미하므로 5-OH가 존재하는 것이며, B-ring에 o-dihydroxyl groups이 존재하지 않는 것을 의미한다. Sodium acetate는 플라보노이드의 가장 산성인 -OH기인 7-OH의 이온화에 관여하여 그 존재 확인에 이용되며 sodium acetate/boric acid는 o-OH기 사이에 가교하므로 그 확인에 사용된다. Table 1에서 보는 바와 같이 sodium acetate 첨가시 band II는 22 nm 심색이동(bathochromic shift)을

보임으로 7-OH의 존재를 의미하였으며, sodium acetate/boric acid 첨가시 band I이 MeOH와 같은 경향을 보임에 따라 3'과 4'중 한 개가 -OH가 없는 것으로 확인되었다. 이상의 결과에 의하면 F₁ 분획은 3,5,7,3'-OH를 가지는 플라보놀로 확인이 되었다. F₁ 분획의 경우 산 가수분해 후 TLC에 의해 구성당을 확인한 결과(결과 미제시), glucose로 확인됨에 따라 4' 위치에 glucose가 결합된 형태임을 확인하였다.

F₂ 분획은 2 M NaOH를 첨가시 band I이 51 nm의 장파장 이동을 나타내었으며, 시간이 경과하여도 흡광도의 감소가 미약하므로 4'-OH의 결합되어 있음을 확인할 수 있었다. 327 nm에서 새로운 피크가 확인됨에 따라 7-OH기를 가지는 플라보놀임을 확인하였다. AlCl₃/HCl 첨가시 band I의 59 nm 심색이동은 3-OH 단독 또는 5-OH가 함께 존재함을 의미하며, AlCl₃와 AlCl₃/HCl 첨가시 band I의 피크의 변화는 B ring에 o-hydroxyl기의 존재를 의미하므로 3', 4'-OH기가 존재함을 알 수 있었다. Sodium acetate 첨가시 band II는 15 nm 심색이동을 보임으로 7-OH의 존재를 의미하며, sodium acetate/boric acid 첨가시 band I이 15 nm 심색이동은 B ring에 o-diOH를 의미한다. 따라서 F₂ 분획은 3(5),7,3',4'-OH를 가지는 플라보놀로 확인되었다.

FAB 질량분석

양과 껍질로부터 분리한 분획 F₁과 F₂의 분자량을 측정하고자 FAB mass를 이용하였다. Fig. 2의 결과에서 알 수 있듯이 F₁ 분획의 경우 m/z 465 (M+H)⁺로 quercetin monoglucoside에 해당되는 분자량을 보였으며, m/z 176과 329는 matrix에 해당되는 3-nitobenzyl alcohol에 의해 생성된 것이다. F₂ 분획은 m/z 303 (M+H)⁺로 quercetin에 해당되는 분자량을 보였으며, m/z 176과 329는 matrix에 해당되는 3-nitobenzyl alcohol에 의해 생성된 것이다. 이상의 결과에 의하면 F₁ 분획은 quercetin 4'-glucoside이고 F₂ 분획은 quercetin임을 알 수 있다. 이는 Leighton 등⁽¹⁴⁾의 보고와 일치하였으며, 양과 과육과는 달리 quercetin 4'-glucoside와 quercetin이 양과 껍질의 주요 플라보노이드임을 확인할 수 있었다.

Table 1. Spectral characteristics of F₁ and F₂ fraction obtained from onion skin in six shift reagents

Fraction	MeOH (λ _{max} , nm)	NaOMe (λ _{max} , nm)	AlCl ₃ (λ _{max} , nm)	AlCl ₃ /HCl (λ _{max} , nm)	NaOAc (λ _{max} , nm)	NaOAc/H ₃ BO ₃ (λ _{max} , nm)
F ₁	253, 302sh ¹⁾ , 364	277, 327, 410(dec)	272, 300sh, 351sh, 420	266, 302sh, 351sh, 421	275, 334sh, 379	252, 268, 363
F ₂	255, 302sh, 369	244, 330, 420	271, 437	267, 428	270, 327sh, 388	223, 260, 384

¹⁾sh: shoulder, dec: decomposition of sample evidenced by decreasing band intensity with time.

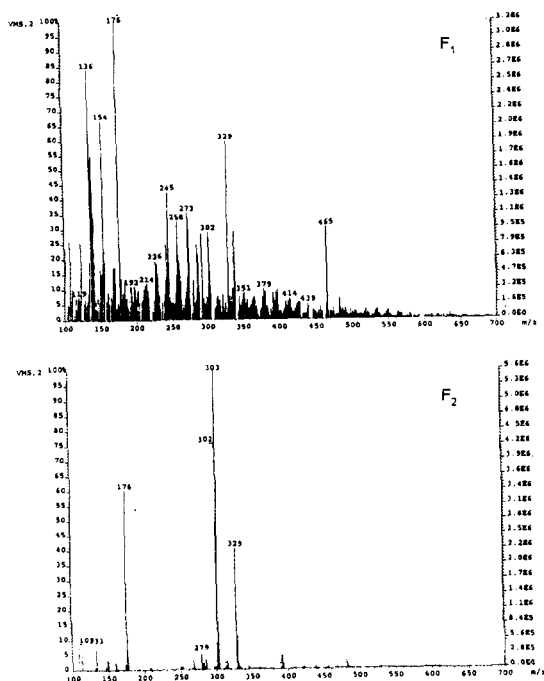


Fig. 2. FAB Mass spectrum of F₁ and F₂ fraction from onion skin.

HPLC에 의한 플라보노이드 정량

양파 껍질 추출물 100 mg을 메탄올 1 mL에 용해한 후 200배 희석하여 HPLC를 이용하여 분석한 결과 (Fig. 3), 두 개의 피크를 얻었으며, 6.7분대에 나타난 피크는 quercetin monoglucoside이며, 15.9분대에 나타난 피크는 quercetin으로 확인되었다. 양파 껍질에 함유된 quercetin monoglucoside와 quercetin의 양은 각각 양파껍질 1 kg에 1940 mg과 3150 mg 이었다. 이는 양파 껍질의 quercetin과 quercetin 4'-glucoside의 함량에 관한 Leighton 등⁽¹⁴⁾의 보고와 유사한 결과를 보였다. ODS와 Sephadex LH-20 chromatography에 의해 분리한 F₁ (quercetin 4'-glucoside)와 F₂ (quercetin)은 1106 mg/kg과 1953 mg/kg으로 각각 57%와 62%의 비교적 높은 플라보놀 회수율을 보였다.

Xanthine oxidase 저해활성

Quercetin 4'-glucoside와 quercetin으로 확인된 분획 F₁과 F₂에 의한 xanthine oxidase에 대한 저해기작을 측정하고자 기질인 xanthine의 농도를 각각 달리한 후 각 분획을 3 μM 첨가하여 xanthine oxidase에 대한 저해활성을 측정하여 Lineweaver-Burk plot를 작성하였

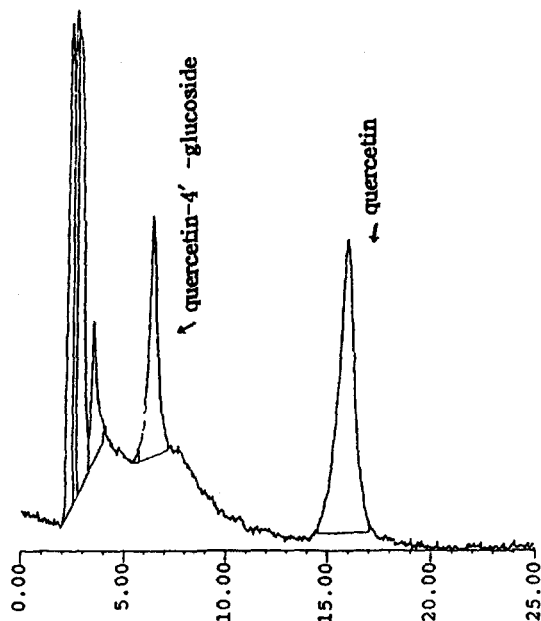


Fig. 3. Chromatogram of analytical HPLC of onion skin flavonoids.

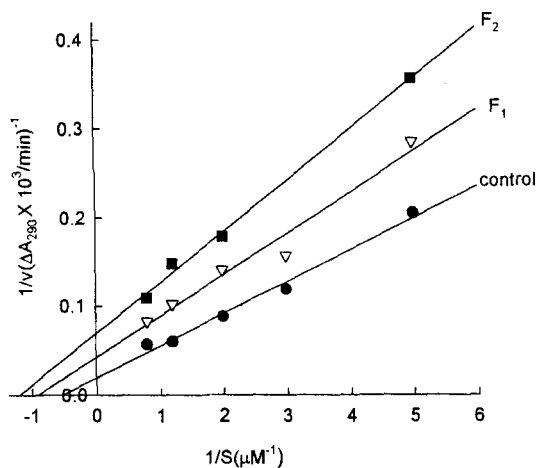


Fig. 4. Double-reciprocal plot of xanthine oxidase kinetics in the presence of F₁ and F₂ fraction.

다(Fig. 4). 그 결과 분획 F₁과 F₂의 Km' 값이 0.98 μM과 0.81 μM이며, 이때의 Vmax' 값은 21.74 μM와 14.28 μM로 Km과 Vmax값이 각각 다른 것으로 보아 이는 비경쟁적과 무경쟁적 저해 형태가 서로 혼합되어 있는 형태이다. 이러한 경향은 플라보노이드인 myricetin, keampferol과 quercetin이 xanthine oxidase에 대해 비경쟁적 저해와 무경쟁적저해의 혼합형임을

보고한 Fukumoto 등의 보고⁽¹⁹⁾와 일치하였다.

요 약

양파 껍질의 메탄올 추출물에 함유되어있는 플라보노이드류를 분리하고자 Sephadex LH-20 column chromatography를 한 결과, F₁, F₂ 두 개의 활성분획을 얻었다. F₁과 F₂ 분획의 자외선과 가시광선에서의 흡수패턴을 측정하였다. F₁과 F₂ 분획의 band I과 band II는 전형적인 프라보놀의 피크 파장을 보였으며, MeOH, NaOMe, AlCl₃, AlCl₃/HCl, NaOAc와 NaOAc/H₃BO₃의 shift reagent를 이용한 흡수패턴을 측정한 결과, F₁ 분획은 3,5,7,3'-OH를 가지며 4' 위치에 glucose를 가지는 플라보놀이 확인이 되었다. F₂ 분획은 3(5),7,3',4'-OH를 가지는 플라보놀이 확인이 되었다.

두 분획의 분자량을 측정하고자 FAB mass를 이용한 결과, F₁ 분획의 경우 m/z 465 (M+H)⁺로 quercetin monoglucoside에 해당되는 분자량을 보였으며, F₂ 분획은 m/z 303 (M+H)⁺로 quercetin에 해당되는 분자량을 보였다. Quercetin 4'-glucoside와 quercetin으로 확인된 분획 F₁과 F₂에 의한 xanthine oxidase에 대한 저해기작은 비경쟁적과 무경쟁적 저해 형태가 서로 혼합되어 있는 형태이었다.

감사의 글

이 논문은 1996년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으므로 이에 감사를 드립니다.

문 헌

- Villar, A., Gasco, M.A. and Alcaraz, M.J.: Anti-inflammatory action and anti-ulcer properties of hypolaetin-8-glycosides, a novel plant flavonoid. *J. Pharmacol.*, **36**, 820-822 (1984)
- Frag, R.S., Daw, Z.Y. and Abo-Raya, S.H.: Influence of some essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic mechanism. *J. Food Sci.*, **54**, 74-76 (1989)
- Katiyar, S.K.: Protection against TPA-induced inflammation in SENCAR mouse ear skin by polyphenolic fraction of green tea. *Carcinogenesis*, **14**(3), 361-365 (1993)
- Michael, G.L.H., Edith, J.M.F., Peter, C.H.H.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease,

Lancet. **342**, 1007-1010 (1993)

- Hertogo, M.G.L., Hollamn, P.C. and Kromhout, D.: Determination of potentially anticarcinogenic flavonoids in food and preliminary results on daily intake in the Netherlands. *Nutr. Cancr.*, **20**, 21-25 (1993)
- Ra, K.Y., Suh, H.J., Chung, S.H. and Son, J.Y.: Antioxidant activity of solvent extract from onion skin (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **29**, 595-600 (1997)
- Storch, J. and Feber, E.: Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. *Anal. Biochem.*, **169**, 262-267 (1988)
- Lehninger, A.L.: Principles of Biochemistry. Worth Publishers INC., New York, p.634 (1988)
- Hayashi, T., Sawa, K., Kawasaki, M., Arisawa, M., Shimizu, M. and Morita, M.: Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids. *J. Natural Products*, **51**, 345-348 (1988)
- Hatano, T., Yashimura, T., Yoshihara, R., Ikegami, Y., Matsuda, M., Yazaki, K., Agata, I., Nishibe, S. and Noro, T.: Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase. *Plant Med.*, **57**, 83-84 (1991)
- Kohashi, M., Kenichi, A. and Tatsuo, W.: Non-thermal effect of ceramics radiation on folate structure and on xanthine oxidase inhibition by floate. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **39**, 425-429 (1993)
- Noro, T., Oda, Y., Miyase, T., Ueno, A. and Fukushima, S.: Inhibitors of xanthine from the flowers and buds of *daphne genkwa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3984-3989 (1983)
- Yeo, S.G., Park, Y.B., Kim, I.S., Kim, S.B. and Park, Y. H.: Inhibition of xanthine oxidase by tea extracts from green tea, oolong tea and black tea (in Korean). *J. Korean Sco. Food Nutr.*, **24**, 154-159 (1995)
- Leighton, T., Ginther, C., Fluss, L., Harter, W.K., Can-sado, J. and Nortario. V.: *Molecular Characterization of Quercetin and Quercetin Glycosides in Allium Vegetables, Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*. ACS, Washington, D.C., p.220 (1992)
- Strip, F. and Corte, E.D.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855-3858 (1969)
- Park, Y.K. and Lee, C.Y.: Identification of isorhamnetin 4'-glucoside in onions. *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 34-36 (1996)
- Markham, K.R.: Ultraviolet-visible absorption spectroscopy. *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London, p.36 (1982)
- Ohara, T., Ohimata, H., Muramatsu, N. and Matsuhashi, T.: Determination of rutin in buckwheat foods by high performance liquid chromatography (in Japanese). *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, **36**, 114-120 (1989)
- Iio, M., Moriyama, A., Matsumito, Y., Takaki, N. and Fukumoto, M.: Inhibition of xanthine oxidase by flavonoids. *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2173-2176 (1985)