

양파껍질에서 분리된 용매 추출물의 항산화효과

나경수 · 서형주* · 정수현 · 손종연**

대구공업전문대학 식품영양과, *고려대학교병설 보건전문대학 식품영양과,

**안성산업대 식품공학과,

Antioxidant Activity of Solvent Extract from Onion Skin

Kyung Soo Ra, Hyung Joo Suh*, Soo Hyun Chung, Jong Youn Son**

Department of Food and Nutrition, Taegu Technical Junior College

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

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

Abstract

The antioxidant activity of the solvent fractions extracted from onion skin was examined. The antioxidant activity of methanol extract at the concentration of 0.02% and 0.03% was stronger than that of mixed tocopherol. The antioxidant activity of the fractions of methanol extract increased in the order of butanol>ethyl acetate> ethyl ether> water fraction. The antioxidant activity of each fractions was strongly related with total phenol content and HDA. Further separation of butanol fraction by TLC yielded 6 fluorescent bands with Rf values of 0.20, 0.33, 0.49, 0.60 and 0.94. The total phenol content and HDA of fluorescent band, Rf 0.96, were remarkable higher than those of the other band and exhibited a strong UV absorption at 255 nm and 317 nm, which would be specifically produced by flavonol. Spectral analyses indicated that the major antioxidant component was quercetin aglycone (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone).

Key words: antioxidant activity, onion skin, solvent extracts

서 론

최근 합성항산화제의 안정성문제로 그 사용규제가 엄격되면서 생리작용이 명확한 천연 항산화제의 개발에 관심이 고조되고 있다⁽¹⁾.

플라보노이드류는 항염, 항궤양, 항동맥경화, 항미생물, 항돌연변이, 항암, 및 항종양효과 등의 생리활성 외에도 상당한 항산화효과를 발휘하는 것으로 알려져 있다^(2,3). Metha와 Sessaedi 등⁽⁴⁾은 돈지에 대해 25종의 flavonoid류의 항산화효과를 조사한 결과, 3,7,8-trihydroxyflavone, fisetin, quercetin, dihydroquercetin, robinetin, myricetin, 3',4',5'- hexahydroxyflavane 등이 큰 항산화효과를 보였다고 하였다. Pratt 등⁽⁵⁾은 여러 야채의 열수 추출물들의 항산화작용을 조사한 결과, 강한 항산화작용을 나타낸 열수 추출물들 중에 고농도의 quercetin이 함유되어 있음을 밝히고 있다.

그러나 이들 성분의 이화학적 성질 및 항산화효과를 비롯한 여러 생리적 작용은 aglycone 또는 당과 결합된 배당체 형태 등 구조적 특성에 따라 각각 다른 것으로 알려져 있다. Yamaguchi 등⁽⁶⁾은 12종의 flavonoid류의 항산화효과를 조사한 결과, flavonol의 8위 치에 OH를 갖는 gossypetin과 herbacetin은 강한 항산화효과를 보였으나 gossypetin의 8위치에서의 OH 제거에 의해 유래된 quercetin의 항산화력은 약 1/3정도로 감소하였다고 보고 하였다. 또한 quercetin의 3위치의 OH를 제거함으로써 유래되는 kaempferol은 거의 항산화력을 보이지 않았다고 보고하였다. 양파 (*Allium cepa L.*)중에는 quercetin 4'-glucoside, quercetin 4',7-diglycoside, quercetin 3,7-diglycoside, quercetin 3,4'-diglycoside, quercetin aglycone, isorhamnetin monoglycoside, kaempferol monoglycoside 등의 flavonoid류가 함유되어 있으며, 이중 80%가 quercetin diglycoside, monoglycoside, quercetin aglycone으로 구성되어 있다⁽¹⁰⁾. Bilyk 등⁽¹¹⁾은 양파종류에 따라 flavonol의 농도변화가 커서 노란양파와 붉은 양파의 경

Corresponding author: Kyung Soo Ra, Department of Food and Nutrition, Taegu Technical Junior College, 831 Bondong, Dalseo-gu, Daegu 704-305, Korea

우 육질의 flavonol농도는 60 mg/kg에서 1,000 mg/kg의 범위를 나타낸다고 하였고, 색을 가진 마른 껍질에 특히 flavonol함량이 높아 2.5~6.5%로 많은 양이 함유되어 있으며 이들의 함량은 산지, 품종에 따라 상당한 차이가 있다고 보고하였다. 또한 양파에 대한 항산화효과는 대부분 양파 육질이나 양파즙^(12,13)에 대한 것으로 상당히 많은 양의 flavonoid를 함유하고 있는 국내산 양파껍질에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 많은 양의 flavonoid를 함유하고 있는 양파껍질의 메탄올 추출물을 유기용매로 분획하여 그 항산화효과를 천연항산화제인 mixed tocopherol과 비교, 조사하고, TLC와 spectral analysis로 유효성분을 분리, 동정하고자 하였다.

재료 및 방법

재료

무안에서 재배된 양파(*Allium cepa L.*)를 구입(농협, 서울)하여 분리한 양파껍질은 수세, 정선 및 탈수과정을 거쳐 -60°C에서 동결한 후 동결건조기에서 건조하였다. 건조한 양파껍질을 분쇄한 분말을 시료로 사용하였다.

추출 및 용매 분획

양파껍질분말에 10배의 methanol을 가하고 환류 냉각하에서 3회 추출한 후 여과 농축하여 methanol 추출물을 얻었다. 이 methanol추출물을 적당량의 물에 분산시킨 후 ethyl ether, ethyl acetate, butanol 및 water fraction의 순으로 순차용매분획하였다. 용매 분획물은 rotary evaporator로 농축하여 중량법으로 추출율을 측정하였으며, 추출율은 추출전 양파분말의 무게에 대한 추출물의 무게 백분율로 계산하였다.

항산화효과측정

Methanol 추출물을 소량의 methanol에 녹인 후 linoleic acid (Sigma Co. Ltd., U.S.A.)에 0.01%, 0.02% 및 0.03% 농도로 첨가하였다. Methanol 추출물이 농도별로 첨가된 기질은 각각 50 mL의 beaker에 20 g씩 분취하여 40°C를 유지하는 항온기에 저장하면서 일정한 간격으로 과산화물가(AOCS official Method cd 8-58)를 측정하였다⁽¹⁴⁾. 또한 methanol 추출물로 부터 얻어진 ethyl ether, ethyl acetate, butanol 및 water fraction은 위와 동일한 방법을 사용하여 각각 0.02%의 농도로 기질에 첨가하여 행하였다. 한편 유도기간은 각 기

질의 저장중의 과산화물가가 40 meq/kg oil에 도달할 때 까지의 시간으로 임의적으로 정하였다.

수소공여능(hydrogen donating ability, HDA)의 측정⁽¹⁵⁾

수소공여능은 DPPH(1,1-diphenyl-picrylhydrazyl)의 환원성을 이용하여 516 nm에서 UV/Vis spectrophotometer (Beckman DU-65, U.S.A.)로 측정하였다. 즉, 적당히 희석한 분획물 1 mL와 DPPH용액(6.25×10^5 M) 3 mL을 시험관에서 5초동안 vortex mixer로 혼합한 후 30분후의 대조구에 대한 흡광도의 감소비율로서 수소공여능을 나타내었다.

총페놀 함량분석

총페놀 함량은 Folin-Denis법에 의해 행하였다⁽¹⁶⁾. 즉, 100 mL 메스플라스크에 75 mL의 증류수와 분획물 1 mL을 넣고 잘 혼합한 후, Folin-Denis 시약 5 mL와 탄산나트륨 포화용액 10 mL을 넣은 후 증류수로 100 mL 용량으로 채웠다. 이것을 잘 혼합하여 실온에서 30분간 방치시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 % tannic acid 당량으로 환산하였다.

TLC에 의한 butanol fraction의 재분획

항산화효과가 가장 우수한 butanol fraction의 TLC에 의한 재분획은 ethyl acetate : formic acid : water (10 : 2 : 3의 상층, v/v)의 전개용매를 이용하여 UV lamp (365 nm)로 검출하였다. 즉, butanol fraction 50 mg을 Silica gel TLC plate (Merck, Germany 0.2 mm)에 가로로 길게 spot한 후 분리된 5개의 band를 scrapping하였다. Scrapping한 분획물은 다시 50 mL methanol에 용해시켜 여과후 45°C에서 rotary evaporator로 완전 농축후 다시 5 mL의 methanol에 녹여 이들의 총페놀함량, 수소공여능 및 shift reagent에 의한 spectral spectrum분석에 사용하였다.

분획물의 자외선 및 가시광선의 흡수 패턴

분획물을 methanol에 용해한 후 shift reagent (NaOH, AlCl₃, AlCl₃/HCl, NaOAc 및 NaOAc/H₃BO₃)를 첨가하여 반응전후의 자외선 및 가시광선의 흡수 패턴의 변화를 조사하였으며 이때 UV/Vis spectrophotometer (Beckman DU-65, U.S.A.)를 사용하여 200~500 nm의 범위에서 측정하였다.

결과 및 고찰

용매별 추출물의 추출율

Methanol 추출물에 ethyl ether, ethyl acetate, butanol 및 water를 가하여 얻어진 fraction의 추출수율은 Table 1과 같았다.

동결건조한 양파껍질에서 추출한 methanol 추출물의 양은 7.3%이었으며 methanol 추출물에 대한 ethyl ether, ethyl acetate, butanol 및 water fraction의 추출수율은 각각 61.1%, 16.2%, 10.0% 및 9.7%로서 ethyl ether fraction에서 용출되는 성분이 가장 많았으며 water fraction의 경우 가장 낮은 것으로 나타났다. 이 결과로 부터 분획용매의 극성이 증가됨에 따라 추출수율은 낮아지는 것을 알 수 있었다.

Methanol 추출물의 항산화효과

분획전 양파껍질의 methanol추출물을 0.01, 0.02, 0.03%의 농도 및 0.02% mixed tocopherol를 각각 첨가된 linoleic acid의 과산화물가의 변화를 측정한 결과 (Fig. 1), 모든 첨가농도에서 항산화효과를 보였으며, 첨가농도가 증가됨에 따라 증가되는 경향을 보였다.

Table 1. Extraction yield of onion skin by various solvents

Fraction	Yield(%) ¹⁾
Ethyl ether	61.1%
ethyl acetate	16.2%
Butanol	10.0%
water	9.7%

¹⁾Mean value of duplicate.

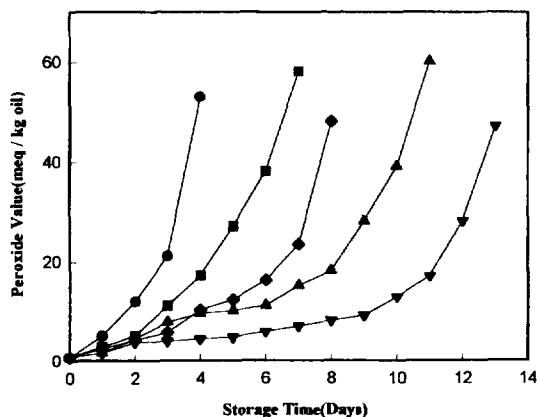


Fig. 1. Peroxide value of linoleic acid substrate containing methanol extracts of onion skin ●—●: Control, ■—■: Methanol, ◆—◆: Methanol extract 0.02%, ▼—▼: Methanol extract 0.03, ▲—▲: Mixed tocopherol.

0.02 및 0.03%의 methanol 추출물이 첨가된 기질은 0.02% mixed tocopherol 첨가구보다 항산화효과가 우수하였다. 대조구, 0.01, 0.02, 0.03% methanol 추출물 및 0.02% tocopherol첨가구의 유도기간은 각각 3.59, 6.10, 10.04, 12.62 및 7.67일로서 0.03% methanol 추출물은 대조구에 비해 3.51배의 유도기간 연장효과를 보였다.

한편 대조구, methanol 추출물의 ethyl ether, ethyl acetate, butanol 및 water fraction이 각각 첨가된 linoleic acid의 과산화물가의 변화를 측정한 결과(Fig. 2), ethyl acetate, butanol fraction의 항산화효과는 분획전 methanol 추출물보다 항산화효과가 증가됨을 나타냈다. 이들의 유도기간은 3.59, 8.33, 11.60, 13.17 및 7.41로서 butanol fraction은 대조구에 비해 유도기간을 3.67배 연장하는 가장 강한 항산화효과를 보였다.

이들 유도기간, 총페놀함량 및 수소공여능과의 관계를 조사한 결과(Table 2), ethyl ether, ethyl acetate, butanol 및 water fraction의 총페놀함량은 482.4, 635.8, 661.3 및 319.5 mg%이었으며 수소공여능은 0.46, 0.58,

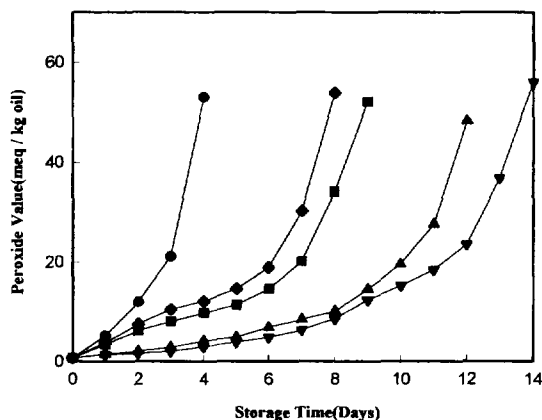


Fig. 2. Peroxide value of linoleic acid substrate containing various solvent fractions of methanol extracts ●—●: Control, ■—■: Ethyl ether fraction, ▲—▲: Ethyl acetate fraction, ▼—▼: Butanol fraction, ◆—◆: Water fraction.

Table 2. The total phenol content, hydrogen donating ability (HDA) and Induction period (IP) of fractions of onion skin methanol extracts

Fraction	Total phenol content (mg%)	HDA	Induction period (days)
Ethyl ether	482.4	0.46	8.33
Ethyl acetate	635.8	0.58	11.60
Butanol	661.3	0.69	13.17
Water	319.5	0.39	7.41

0.69 및 0.39이었다. 이들 결과에서 총페놀함량과 수소공여능이 큰 butanol fraction이 가장 강한 항산화효과를 나타내는 점으로 보아 항산화효과는 총페놀함량 및 수소공여능과 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

항산화제의 일반적인 항산화작용은 수소공여능으로만 설명할 수 없으나 양과점질중에 함유되어 있는 항산화물질들은 유지의 자동산화과정중 생성되는 ROO·, R·, RO· 등의 라디칼에 수소(또는 전자)를 주는 능력이 수소공여능(또는 전자공여능)이 중요한 작용을 하는 것으로 보인다. 즉 양과점질중에 함유되어 있는 항산화물질의 주요작용은 free radical acceptor나 chain breaker와 같은 1차 항산화작용임을 나타내고 있다.

TLC에 의한 methanol추출물의 분획

가장 강한 항산화효과를 나타낸 butanol fraction을 ethyl acetate : formic acid : water (10 : 2 : 3의 상층, v/v) 전개용매를 이용하여 재분획한 결과, 5개의 형광 band가 확인되었다. 이들의 Rf치는 각각 0.20, 0.33, 0.49, 0.60 및 0.94이었다.

이들의 총페놀함량과 수소공여능을 조사한 결과 (Table 3), Rf치 0.94의 총페놀함량은 569.3 mg으로 butanol fraction에 함유되어 있는 페놀화합물중 87%가 이 부분에 함유되어 있음을 알 수 있었다. 또한 수소공여능도 0.91로서 다른 band에 비해 현저히 높은 것으로 나타난 점으로 보아 대부분의 항산화성 물질이 이 부분에 존재하는 것을 알 수 있었다.

자외선 및 가시광선의 흡수 패턴의 변화

NaOH 첨가 spectrum의 변화: TLC로 분획한 Rf치 0.94 fraction을 메탄올에 용해하여 자외선 및 가시광선의 흡수패턴을 조사한 결과(Fig. 3), 371 nm와 255 nm에서 최대흡수 peak를 나타내었다. 일반적으로 flavonoid의 spectrum은 3-OH가 치환된 경우 250~280 nm (band II)와 330~360 nm (band I)에서 최대흡수 peak를, 3-OH가 치환되지 않은 경우 250~280 nm (band II)와 350~385 nm (band I)에서 최대 peak를 나

타내므로⁽¹⁷⁾ 이 물질이 3-OH가 유리상태로 존재하는 flavonoid임을 알 수 있었다. 또한 2M NaOH를 첨가시 Band I의 50 nm정도의 장파장이동을 나타내어 4' 위치에 OH기의 존재를 알 수 있으며, 330 nm에서 새로운 band가 관찰되는 점으로 보아 7-위치에 OH기가 존재함을 알 수 있었다. 2M NaOH 첨가 5분후 spectrum의 강도가 감소되는 점으로 보아 이는 알칼리에 민감한 o-diOH기가 결합되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 A- 또는 B-ring에 o-diOH기를 갖는 3, 4', 7-OH flavonoid임을 추정할 수 있었다.

AlCl₃ 첨가시 spectrum의 변화: AlCl₃첨가시(Fig. 4) band I이 76 nm 심색이동(bathochromic shift)을 나타내었다. flavonoid는 Al³⁺ ion첨가로 OH기와 인접한 ketone사이에서 복합체가 형성하여 장파장으로의 이동을 나타낸다. 이때 OH가 결합할 수 있는 부위는 3-OH 또는 5-OH이며 70 nm의 파장이동은 5-OH기의 존재를 의미한다⁽¹⁸⁾. AlCl₃/HCl 첨가시 band I의 경우 AlCl₃첨가시보다 천색이동(hypsochromic shift)을 보였으며 이는 B-ring에 결합되어 있는 Al³⁺ ion이 떨어져 면서 나타나는 spectrum의 결과로서 이물질은 B-ring의 o-diOH flavonoid, 즉 3',4'-OH기를 갖는 flavonoid임을 알 수 있었다.

따라서 NaOH첨가시의 spectrum결과와 종합해 보면 3,3',4',5,7-OH를 갖는 flavonoid임을 확인할 수 있었다.

Sodium acetate첨가시 spectrum의 변화: Sodium acetate는 flavonoid의 가장 산성인 hydroxy기인 7-OH의

Table 3. The total phenol content, hydrogen donating ability (HDA) of the spots of TLC from butanol fraction

Rf value	Total phenol content (mg%)	HDA
0.94	569.3	0.94
0.60	39.0	0.11
0.49	10.3	0.05
0.33	13.4	0.08
0.20	24.3	0.09

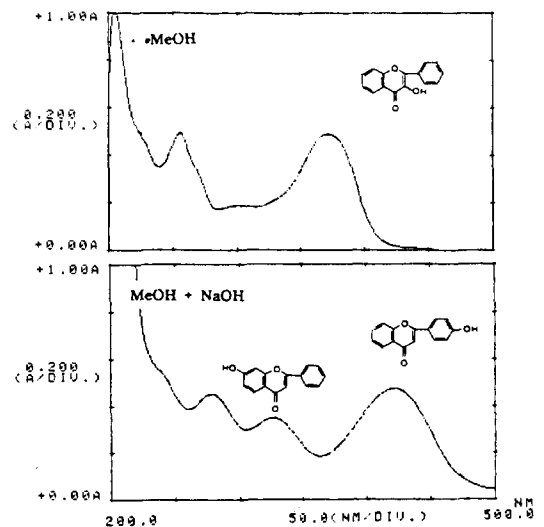


Fig. 3. Changes in UV-visible spectrum of Rf value of 0.94 refracted butanol fraction by addition of NaOH.

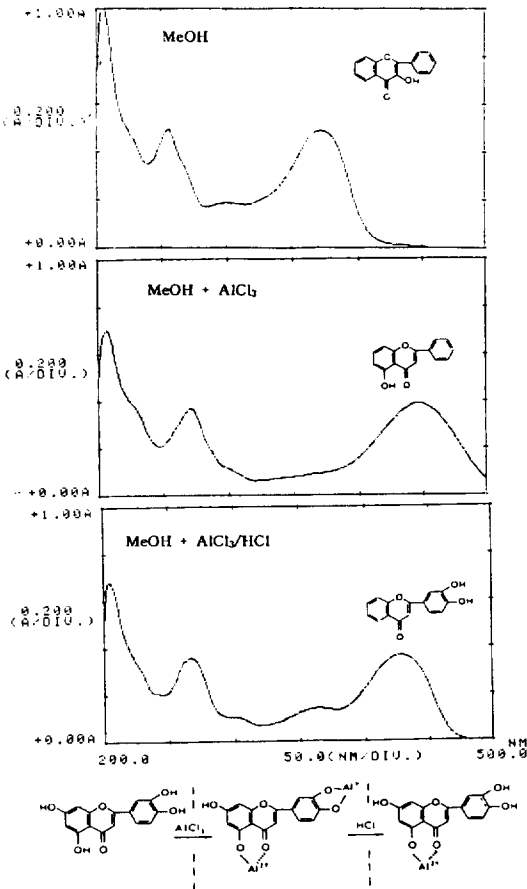


Fig. 4. Changes in UV-visible spectrum of Rf value of 0.94 refractated butanol fraction by addition of $AlCl_3$ and $AlCl_3/HCl$.

이온화에 관여하여 그 존재 확인에 이용되며 sodium acetate/boric acid는 o-OH기 사이에 가교하므로 그 확인에 사용된다.

Fig. 5에서 보는 바와 같이 sodium acetate첨가시 band II가 17 nm의 심색이동을 보이는데 이는 flavones, flavonol 또는 isoflavones 등의 7-OH의 존재를 의미하며 sodium acetate/boric acid첨가시 band I이 20 nm의 심색이동을 보였는데 이는 flavones, flavonols, aurones 또는 chalcone 등의 Bring의 o-diOH기에서 일어나는 현상으로 3',4'-diOH의 존재를 확인할 수 있었다.

일반적으로 식물체중에 존재하는 flavonoid류는 주로 배당체형태로 존재하며⁽¹⁹⁾, 당이 결합할 수 있는 위치는 3, 3', 4' 또는 7위치인 것으로 알려져 있으나⁽¹⁷⁾ 본 실험에서 3, 3', 4' 위치는 모두 free OH기의 존재가 확인되어 양과껍질중에 존재하는 flavonoid류는 aglycone의 형태로 존재함을 알 수 있었다. Bilyk 등⁽¹¹⁾

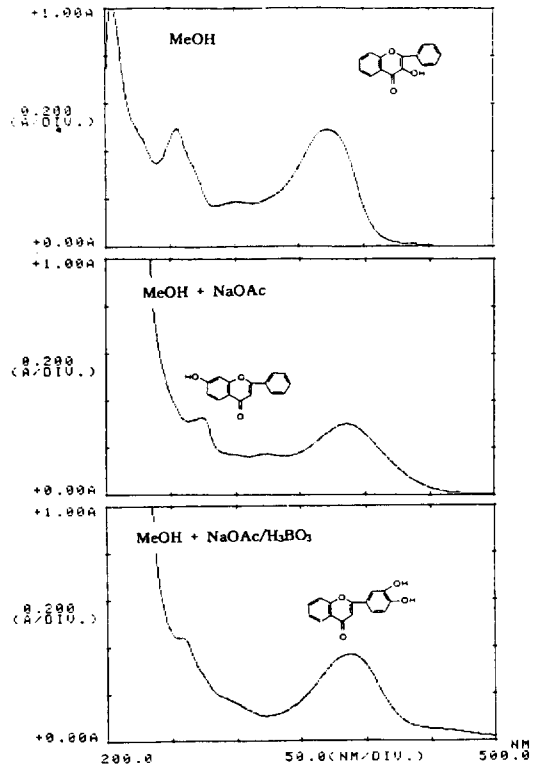


Fig. 5. Changes in UV-visible spectrum of Rf value of 0.94 refractated butanol fraction by addition of sodium acetate and sodium acetate/boric acid.

은 양과육질성분중 flavonol함량이 안쪽부분에서 바깥부분으로 갈수록 증가하며 양과 껍질부분의 flavonol의 53%이상이 aglycone형태인 quercetin이라고 보고하여 본 실험의 결과를 잘 뒷받침해 주고 있다.

이들 결과를 종합해 볼 때 양과껍질중에 존재하는 주요 항산화물질은 3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone, 즉 quercetin aglycone으로 확인되었으며, cellulose TLC plate에 n-butanol: glacial acetic acid: water (5:1:4의 상층, v/v)의 전개용매를 이용하여 표준품 quercetin과 비교한 결과, Rf value 0.65의 동일물질임을 재확인할 수 있었다.

요 약

양과껍질중에 존재하는 항산화물질을 여러 용매로 분획하여 그 항산화효과를 비교하고, butanol fraction의 TLC에 의한 재분획 및 총페놀함량, 수소공여능 및 UV spectral 분석을 행하였다. 메타놀추출물의 항산화효과는 첨가농도가 증가함에 따라 증가되었다. 메타

늘추출물의 용매 분획물의 항산화효과는 buthanol> ethyl acetate> ethyl ether>water fraction의 순으로 나타났다. 이들의 항산화효과는 총페놀함량 및 수소공여능과 밀접한 관계를 보였다.

TLC에 의한 butanol fraction의 재분획 결과 Rf치 0.20, 0.33, 0.49, 0.60 및 0.94을 나타내는 형광띠를 나타내었다. Rf치 0.94의 형광 band는 다른 형광 band에 비해 현저히 강한 것으로 보여 주었으며 flavonol의 존재를 나타내는 에서 나타나는 255 nm와 317 nm에서 강한 흡수가 보였다. Spectral analyses 결과 양과겹질 중에 함유되어 있는 주요 항산화성 물질은 quercetin aglycone (3,3',4',5,7-pentahydroxyflavone)인 것으로 확인되었다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단의 자유공모 과제 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사를 드립니다.

문 헌

1. 김동훈 : 식용유지의 산패, 고려대학교 출판부, p.336 (1994)
2. 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 (1984)
3. Frag, R.S., Daw, Z.Y. and Abo-Raya, S.H.: Influence of some essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of alatoxins in a synthetic mechanism, *J. Food Sci.*, **54**, 74 (1989)
4. Katiyar, S.K.: Protection against TPA-induced inflammation in SENCAR mouse ear skin by polyphenolic fraction of green tea, *Carcinogenesis*, **14**(3), 361 (1993)
5. Michael, G.L.H., Edith, J.M.F., Peter, C.H.H.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart

6. Hertog, M.G., Feskens, E.J., Hollman, D.C., Katan, M.B. and Kromhout, D.: Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease. *Lancet*, **342**, Oct. 23, 1007 (1993)
7. Meta, A.C. Seshadri, T.R.: Flavonoids as antioxidants, *J. Sci. Ind. Res.*, **18**(B), 24 (1954)
8. Pratt, D.E.: Role of flavones, and related compounds in retarding lipid oxidative flavor changes in foods. In *Phenolic, Sulfur and Nitrogen Compound in Food Flavors*, Charalambous, G. and Kats, I. (Ed.), American Chemical Society, Washington D. C. p.1 (1976).
9. 山口直彦 : 天然抗酸化物質について 研究第1報), *日本食品工業學會誌*, **22**, 270 (1975)
10. Leighton, T., Ginther, C., Fluss, L., Harter, W. K., Cansado, 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.221 (1992)
11. Bilyk, A., Cooper, P.L. and Sapers, G.M.: Varietal differences in distribution of quercetin and kaempferol in onion (*Allium cepa* L.) tissue, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 274 (1984)
12. Pratt, D.E. and Watts, B.M.: The antioxidant activity of vegetable extracts. I. Fanone aglycones, *J. Food Sci.*, **29**, 27 (1964)
13. Pratts, D.B.: Lipid antioxidants in plant tissue, *J. Food Sci.*, **30**, 737 (1965)
14. AOCS: Method Cd 1-25. In *AOCS Official and Tentative Methods*. 4th ed., American Oil Chemists' Society, Chicago (1990)
15. Blios, M.S.: Antioxidant determination by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**, 1199 (1958)
16. Swain, T, and Hillis, W.E., and Oritega, M.: Phenolic constituents of *Ptunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents, *J. Sci. Food Agric.*, **10**, 83 (1959)
17. Markham, K.R.: *Techniques of Flavonoid Identification*, Academic Press, London. p.36 (1982)
18. 우원석 : 천연물화학연구법, 민음사. p.99 (1984)
19. Herrmann, K.: Flavonols and flavanes in food plants: A review, *J. Food Technol.*, **11**, 433 (1976)

(1997년 2월 28일 접수)