

최 종
연구보고서

심혈관 기능 개선에 효과적인 양파 품종의 선별
및 유효성분 탐색

Identification of onion components having
beneficial effects on cardiovascular
diseases

연구기관
아주대학교 산학협력단

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “심혈관 기능 개선에 효과적인 양파 품종의 선발 및 유효성분 탐색에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 아주대학교 산학협력단

총괄연구책임자 : 정 이 숙

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 정 효 지

위탁연구기관명 : 건국대학교

위탁연구책임자 : 박 세 원

요 약 문

I. 제 목

심혈관 기능 개선에 효과적인 양파 품종의 선발 및 유효성분 탐색

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근에 식생활이 현대화되면서 동맥경화증이나 고혈압 등의 심혈관에 관계되는 성인병 질환을 겪는 사람이 급격히 증가하고 있다. 이와 같이 삶의 질을 저하시키고 심지어 사망에 까지 이르게 하는 심혈관 질환을 경감시키고 사전에 예방하기 위한 방법으로서 혈관 기능의 향상 및 혈류의 유지가 매우 중요한 것으로 인식되고 있다.

최근 보고된 *Allium*속 식물에 함유된 물질들의 생리적 유용성에 대한 연구결과에 따르면 마늘 및 양파를 중심으로 항균작용, 항산화 활성, 혈당치 감소 작용, 항혈전 활성, 암세포 치사활성, 항돌연변이 작용, 혈중 콜레스테롤 경감작용, 식욕증진 및 단백질 소화작용 등에 효능이 있는 것으로 보고되고 있다. 뿐만 아니라 최근 마늘의 성분을 대상으로 연구하여 혈전 억제 및 동맥경화 방지를 통한 혈류개선효과, 심장기능 보호효과 등과 같은 긍정적인 효과를 나타낸다는 보고가 많이 나오고 있다. 그러나 같은 *Allium*속이면서 성분이 마늘과 비슷한 것으로 알려져 있는 양파의 효능에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 실정이다. 이를 위해 본 연구팀은 양파 ACSOs 성분의 정량 분석 조건을 확립함으로써 생리활성 가능물질의 분획 분석 및 품종별, 섭취 양태별 성분 분석을 비교하고, 동물실험을 통하여 양파 품종별, 구성 성분별, 섭취양태별 심혈관 기능 개선효과를 조사하며, 인체실험을 통해 양파의 수용성 추출물, 알코올 추출물, 섭취양태별 생리활성효과를 비교·분석하여 양파의 부가가치를 높이고 소비를 촉진하고자 하는 것이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 양파의 성분 분석조건 확립 및 분획 분리

- o 양파의 품질 특성이 확연히 구분되는 품종 및 계통을 국내 연구기관(양파시험장·목포시험장·고령지시험장)으로부터 수집 및 시료 조제

- 기능성 관련 물질인 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(ACSO)과 항산화제에 대한 성분 분석 조건 구명
- 심혈관 개선에 효과가 있는 성분의 분획 분리
- 2. 양파의 생리활성 가능 물질의 분획 분석 및 품종별 성분 비교
 - 양파 분획별 성분 분석 및 심혈관 개선에 효과가 있는 성분의 규명
 - 품종 및 계통간 심혈관 개선에 효과가 있는 성분 조성의 비교
- 3. 선발된 양파 품종의 섭취 양태별 성분 분석 및 기능성 비교
 - 생식양파, 즈양파, 끓인 양파의 성분 비교 분석
 - 섭취 양태별 성분 변화 규명후 최적 섭취 양태 제시
- 4. 동물 실험에서 양파 품종별 심혈관 기능 개선효과 비교
- 5. 동물 실험에서 양파 성분별 심혈관 기능 개선효과 비교
- 6. 동물 실험에서 양파 섭취 양태별 심혈관 기능 개선효과 비교
- 7. 인체 실험에서 양파의 수용성 추출물에 의한 심혈관 기능 개선효과 분석
- 8. 인체 실험에서 양파의 알코올 추출물에 대한 심혈관 기능 개선효과 분석
- 9. 인체 실험에서 양파의 섭취 양태별 심혈관 기능 개선효과 비교

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

<연구개발 결과>

- ▶ *Allium*종인 양파에서 주요 생리활성물질로 알려진 황 화합물과 quercetin을 HPLC분석을 통해 확인하고 분리·동정하고자 하였으며, 황 화합물은 HPLC 분석전 유도체 시약을 사용함으로써 각 성분의 분획분리가 가능하였으며 분석결과 MCSO, PrenCSO, PCSO 순서로 검출되었다.
- ▶ 총 ACSOs 성분 중 PrenCSO(1-propenyl-cysteine sulfoxid)의 함량이 70%이상으로 다른성분(MCSO, PCSO)에 비하여 높게 나타났다.
- ▶ 부위에 따른 ACSOs 성분은 전체적으로 과피에서의 함량이 과육에 비하여 높게 나타났으며, 성숙한 품종일수록 과피의 ACSOs 성분 함량이 크게 증가하였다.
- ▶ 양파의 quercetin함량은 전체적으로 5.0~6.5mg/g(d.w.) 수준이었으며 품종간의 차이만 있을 뿐 파종시기와 성숙도에 따른 유의차는 없었다.
- ▶ 실험동물 모델을 통해 quercetin의 심혈관 개선 효과를 관찰한 결과, quercetin은 허혈/재관류에 의한 심근경색모델에서 유의적인 보호효과를 나타냈다.

- ▶ 저산소로 유도된 심근세포 괴사 증가와 활성산소 증가를 감소시켰다.
- ▶ 본 실험에서 사용된 15품종 중 울프의 quercetin 성분 함량이 4.77mg으로 가장 낮았으며 히구마 품종의 함량이 6.57mg으로 가장 높게 나타났다.
- ▶ 터보 양파의 섭취 양태별(생양파, 볶은 양파, 끓인 양파, 즙양파)에 따른 총 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides)성분의 함량을 비교한 결과 볶은 양파, 생양파, 즙양파, 끓인 양파 순으로 높게 나타났다.
- ▶ 실험동물 모델에서 양파의 섭취 양태별에 따른 심혈관 기능 개선 효과를 혈소판 응집 억제 관찰과 심근세포 사멸 억제 관찰을 통해 확인하였다.
- ▶ 혈소판 응집 억제효과와 저산소로 유도된 심근세포 사멸 억제효과는 볶은양파>즙양파>생양파>끓인 양파 순으로 나타났다.
- ▶ 고 콜레스테롤 혈증을 가진 환자를 대상으로 양파처리군과 대조군으로 할당 한 후 양파의 수용성 추출물, 알콜성 추출물, 생양파 및 조리 양파를 4주간 섭취한 후 혈액지질 성상의 변화를 평가하여 심혈관 기능개선효과를 분석한 결과, 양파의 수용성 추출물은 위액군과 비교하였을 때 별다른 차이가 없었으며, 양파의 알코올 추출물은 섭취 전과 비교하였을 때 섭취 후 중성지방의 유의한 감소가 있었으나 대조군과의 차이는 없었다.
- ▶ 기름을 이용한 조리양파 섭취군에서 양파의 섭취 전 후를 비교하였을 때 총 콜레스테롤(p<0.001), LDL-콜레스테롤(p<0.01)에서 유의한 감소가 있었으나 대조군과의 차이는 없었다. 혈당은 대조군과 비교하였을 때 생양파 섭취군과 조리양파 섭취군에서 모두 유의한 감소가 있었다(p<0.01).

<활용에 대한 건의>

- ▶ 본 연구를 통해 양파 내에서의 주요 풍미 선구물질은 PrenCSO임을 알 수 있었고, 생리활성물질(ACSOs, quercetin)의 함량이 높게 나타난 춘파 중만생이 기능성식품 원료로의 활용에 효과적인 재배작형이라 판단되며, 특히 사뽀로기가 가장 우수하였다. 한편 현재 대부분 폐기되고 있는 양파의 과피에서 생리활성물질이 과육에 비해 높게 나타나 기능성 물질이 강화된 양파 가공품 등의 원료로의 활용 가능성이 매우 높다고 사료된다.
- ▶ 식생활에서 양파를 조리하여 섭취할 경우 섭취량이 많지 않음에도 불구하고 지질 성상이나 혈당에 긍정적인 효과가 있는 것으로 나타나 식생활에서 양파의 소비를 촉진하는 것이 심혈관 질환 예방 및 관리에 필요하다고 사료된다.
- ▶ 본 연구를 통해 얻어진 결과를 바탕으로 양파의 심혈관 질환 개선 효능을 홍보하기 위한 자료로서 적극적으로 활용할 수 있다고 판단된다.

SUMMARY

I. The Goal and Rationale of Research

Members of *Allium* family, especially garlic and onion, have been used as a traditional medicine to treat a variety of diseases. *Allium* such as garlic have been studied extensively for their health benefits. Several *Allium* foods have been shown to reduce risks and modulate metabolism to favor the prevention of cardiovascular diseases. Recent studies have validated many of the medicinal properties attributed to onion and its potential to lower the risk of cardiovascular disease. Consumption of garlic and related *Allium* is associated with antioxidant, antithrombotic, antihyperlipidemic, antihypertensive, and antiplatelet aggregation, contributing to decreased risk of cardiovascular disease. However, onion-induced positive effect on cardiovascular disease little has been done.

The purpose of this study were to investigate whether onion extract protect on cardiovascular disease and if so, which onion components is involved in this effect.

II. Research Contents and Scope1.

1. Studies of onion components analytic conditions, fractionation and extraction
2. Analysis of onion bioactive fractions and components of different cultivars
3. Analysis and functional analysis of selected onion cultivar components from different cooking methods
4. Effect of onion extracts on cardiovascular disease in animal model
5. Effect of onion compouents on cardiovascular disease in animal model
6. Effect of onion components from different cooking methods on cardiovascular disease in animal model
7. Effect of water-using onion extracts on hypercholesterolemia
8. Effect of alchol-using onion extracts on hypercholesterolemia

III. Research Results

- ▶ Extracts of Turbo onion are rich in two chemical groups, flavonoids and alk(en)yl cystein sulphoxides (ACSO).
- ▶ The flavour precursors of extracts of Turbo onion are MCSO, PrenCSO, PCSO.
- ▶ Collagen-induced platelet aggregation was inhibited by onion extract.
- ▶ Hypoxia-induced cell death and ROS generation was inhibited by treatment with onion extract.
- ▶ Chronic oral intake of onion extract significantly reduced myocardial infarct size.
- ▶ Hypoxia-induced cell death and ROS generation was inhibited by treatment with quercetin.
- ▶ Onion showed a significant positive effect on hypoxia-induced cell death and collagen-induced platelet aggregation with greater potency in fried onion than fresh onion.
- ▶ Water extract consumed group showed no effects on the lipid profiles, but alcohol extract group showed a significant decrease in total cholesterol and LDL-cholesterol concentration after consumption compared to before consumption($p < 0.001$).
- ▶ Raw and cooked onion group had a significant decrease in blood glucose, total cholesterol and LDL-cholesterol ($p < 0.05$). However the positive effects of onion on the lipid profile were disappeared when compared with controls.

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요 -----	15
제 1 절 연구 목적 -----	15
1. 최종목표 -----	15
2. 연차별 연구개발 목표와 내용 -----	16
제 2 절 연구의 필요성 및 범위 -----	17
제 2 장 국내외 기술개발 현황 -----	21
제 1 절 국내외 연구동향 -----	21
1. 혈류장애와 심혈관조직의 병변 -----	21
2. 양파의 약리작용 -----	21
3. 양파의 품종별 생리활성 성분의 분석 -----	22
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 -----	24
제 1 절 연구 방법 및 내용 -----	24
1. 양파의 성분 분석조건 확립 및 분획 분리 -----	24
가. 공시재료 -----	24
나. HPLC 분석조건 확립 -----	24
1) S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(ACSOs) standard chemical 합성 -----	24
가) PrenCSO(1-S-Propenyl-L-cysteine sulfoxide) -----	24
나) PCSO(S-propyl-L-cysteine sulfoxide) -----	27
다) MCSO(S-methyl-L-cysteine sulfoxide) -----	30
2) 유도체화 -----	31
3) HPLC 분석을 위한 양파의 ACSOs 성분 추출 -----	32
다. 양파 내의 ACSOs 성분 추출 및 시료 제공 -----	33
1) 동물실험을 위한 양파 내 ACSOs 분획 추출 -----	33
2) 인체실험을 위한 성분 추출 -----	33
2. 양파의 생리활성 가능 물질의 분획 분석 및 품종별 성분 비교 -----	33
가. 공시재료 -----	33
나. 양파 내 ACSOs 성분 함량 -----	34
1) ACSOs 성분 추출물 조제 -----	34
다. 양파 내 Quercetin 성분 함량 -----	34
1) Quercetin성분 추출물 조제 -----	34
2) HPLC 분석 -----	35

3. 선발된 양과 품종의 섭취 양태별 성분 분석 및 기능성 비교 --	36
가. 공시재료 -----	36
4. 동물실험에 의한 심혈관 기능 개선효과 검색 -----	36
가. 혈소판 응집 억제 활성 검색 -----	36
나. 심근경색 동물모델 -----	36
다. 심근세포 배양 및 저산소성 손상 유도 -----	37
라. 심근세포 사멸 측정 (세포 괴사) -----	37
마. 심근세포 사멸 측정 (세포 고사) -----	37
바. 활성산소 측정 -----	37
5. 인체실험에 의한 심혈관 기능 개선효과 검색 -----	38
가. 양과 수용성 추출물에 의한 심혈관 기능 개선 효과 및 작용 기전 연구 -----	38
1) 양과 추출물의 준비 -----	38
2) 조사 대상자의 선정 -----	38
3) 임상 시험연구의 진행 -----	38
4) 효과평가 -----	38
나. 양과 알코올 추출물에 의한 심혈관 기능 개선 효과 및 작용 기전 연구 -----	39
1) 양과 추출물의 준비 -----	39
2) 조사 대상자의 선정 -----	39
3) 임상 시험연구의 진행 -----	39
4) 평가조사 -----	40
다. 양과 섭취 양태별 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구	40
1) 양과의 준비 -----	40
2) 조사 대상자의 선정 -----	40
3) 임상 시험연구의 진행 -----	40
4) 효과평가 -----	41
라. 혈청 생화학적 검사 -----	41
마. 통계 분석 -----	41
제 2 절 연구개발 결과 -----	42
1. HPLC 분석 조건 확립 -----	42
가. 유도체화 유·무에 따른 분석 -----	42
나. ACSOs성분 peak의 분리 -----	45
2. 양과 내 ACSOs 성분 추출 및 시료 제공 -----	47
3. 양과의 품종별 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides)성분 함량 비교 -----	47
4. 양과의 부위별 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides)성분	

합량 비교 -----	52
5. 양과의 품종별 Quercetin 성분 합량 비교 -----	52
가. Quercetin 성분 peak의 확인 -----	53
나. 품종별 분석 -----	55
6. 양과의 섭취 양태별 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides)성 분 합량 비교 -----	57
7. 동물실험에서 양과 품종별 추출물에 의한 심혈관 기능 개선효 과 비교 검색 -----	58
가. 혈소판 응집반응에 대한 양과 품종별 억제효과 -----	58
나. 혈소판 응집반응에 대한 터보 품종의 억제효과 -----	58
다. 저산소로 유도된 활성산소 증가에 대한 터보 품종의 억제효 과 -----	59
라. 저산소로 유도된 심근세포 괴사(necrosis)에 대한 터보 품종 의 보호효과 -----	60
마. 저산소로 유도된 심근세포 고사(apoptosis)에 대한 터보 품 종의 보호효과 -----	60
바. 허혈/재관류에 의한 심근경색모델에서 터보 품종의 보호효과	61
8. 동물실험에서 선별된 양과성분 추출물에 의한 심혈관기능 개선효 과 비교검색 -----	61
가. 혈소판 응집반응에 대한 양과 구성 성분별 억제효과 -----	61
나. 저산소로 유도된 심근세포 괴사(necrosis)에 대한 양과 구성 성분 별 보호 효과 -----	62
다. 저산소로 유도된 활성산소 증가에 대한 Quercetin의 억제효과	63
라. 허혈/재관류에 의한 심근경색모델에서 Quercetin의 보호효과 -	63
9. 동물에서 양과 섭취 양태에 따른 심혈관 기능 개선효과 비교 ---	64
가. 양과 섭취양태에 따른 혈소판 응집반응 억제 효과 -----	64
나. 저산소로 유도된 심근세포 괴사(necrosis)에 대한 양과 섭취 양태에 따른 보호효과 -----	65
10. 인체실험에서 양과 수용성 추출물에 의한 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구 -----	66
11. 인체실험에서 양과 알코올 추출물에 의한 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구 -----	67
12. 인체실험에서 양과 섭취 양태별 심혈관 기능 개선 효과 및 작용 기전 연구 -----	69

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	71
--------------------------------	----

제 1 절 목표달성도 -----	71
제 2 절 관련분야 기여도 -----	72
제 5 장 연구개발결과의 활용계획 -----	73
제 1 절 추가연구의 필요성 -----	73
제 2 절 활용계획 -----	73
제 3 절 본 연구구제를 통해 얻어진 연구실적 -----	74
1. 학술지 투고 -----	74
2. 학술대회 발표 -----	74
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 -----	75
제 7 장 참고문헌 -----	76

CONTENTS

Chapter 1. Introduction -----	15
Clause 1. Objectives -----	15
1. Final objectives -----	15
2. Objectives and contents by year -----	16
Clause 2. Need and scope for research -----	17
 Chapter 2. Research trends -----	 21
Clause 1. Foreign and domestic R&D status -----	21
1. Blood flow disturbance and symptoms of cardiovascular tissue --	21
2. Medical action of onion -----	21
3. Bioactivity analysis of onion cultivars -----	22
 Chapter 3. Research methodology and results -----	 24
Clause 1. Research methods and details -----	24
1. Studies of onion components analytic conditions, fractionation and extraction -----	 24
1) Public materials -----	24
2) Studies of optimal HPLC conditions -----	24
(1) S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(ACSOs) standard chemical synthesis -----	 24
① PrenCSO(1-S-Propenyl-L-cysteine sulfoxide) -----	24
② PCSO(S-propyl-L-cysteine sulfoxide) -----	27
③ MCSO(S-methyl-L-cysteine sulfoxide) -----	30
(2) Derivatization -----	31
(3) Extraction of ACSOs -----	32
3) Extraction of ACSOs and sample offer -----	33
(1) Extraction and fractionation of ACSOs for in vivo -----	33
(2) Extraction and fractionation of ACSOs for clinical trial ----	33
2. Analysis of onion bioactive fractions and components of different cultivars -----	 33
1) Public materials -----	33

2) Contents of ACSOs components -----	34
(1) Extraction of ACSOs components -----	34
3) Contents of Quercetin of onion extracts -----	34
(1) Extraction of Quercetin -----	34
(2) HPLC analysis -----	35
3. Analysis and functional analysis of selected onion cultivar components from different cooking methods -----	36
1) Public materials -----	36
4. Analysis of cardiovascular function in vivo -----	36
1) Inhibition of platelet aggregation -----	36
2) Myocardial infarction model -----	36
3) Culture of myocardial cell and induction of hypoxia -----	37
4) Measurement of necrosis -----	37
5) Measurement of apoptosis -----	37
6) Measurement of ROS generation -----	37
5. Analysis of cardiovascular function in clinical trial -----	38
1) Effect of water-using onion extracts on cardiovascular function protection -----	38
(1) Extraction of onion -----	38
(2) Selection of subjects -----	38
(3) Clinical trial -----	38
(4) Effect evaluation -----	38
2) Effect of alcohol-using onion extracts on cardiovascular function protection -----	39
(1) Extraction of onion -----	39
(2) Selection of subjects -----	39
(3) Clinical trial -----	39
(4) Effect evaluation -----	40
3) Effect of different cooking methods on cardiovascular function protection -----	40
(1) Extraction of onion -----	40
(2) Selection of subjects -----	40

(3) Clinical trial -----	40
(4) Effect evaluation -----	41
4) Biochemical analysis -----	41
5) Statistical analysis -----	41
Clause 2. Results -----	42
1. Studies of optimal HPLC analytic condition -----	42
1) Analysis of derivatization -----	42
2) Confirmation of Quercetin peak -----	45
2. Extraction of ACSOs and sample offer -----	47
3. Comparison of contents of ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides) from onion cultivars -----	47
4. Comparison of contents of ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides) from onion regions -----	52
5. Comparison of contents of Quercetin from onion cultivars -----	52
1) Confirmation of Quercetin peak -----	53
2) Analysis from cultivars -----	55
6. Comparison of contents of ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides) from different cooking methods -----	57
7. Effect of onion cultivars on cardiovascular function protection in vivo -----	58
1) Effect of onion cultivars on inhibition of platelet aggregation --	58
2) Effect of Turbo cultivar on inhibition of platelet aggregation --	58
3) Effect of Turbo cultivar on hypoxia-induced ROS generation --	59
4) Effect of Turbo cultivar on hypoxia-induced necrosis -----	60
5) Effect of Turbo cultivar on hypoxia-induced apoptosis -----	60
6) Effect of Turbo cultivar on myocardial infarction model -----	61
8. Effect of onion components on cardiovascular function protection in vivo -----	61
1) Effect of onion components on inhibition of platelet aggregation	61
2) Effect of onion components on hypoxia-induced necrosis -----	62
3) Effect of Quercetin on hypoxia-induced ROS generation -----	63

4) Effect of Quercetin on myocardial infarction model -----	63
9. Effect of different cooking methods on cardiovascular function protection in vivo -----	64
1) Effect of different cooking methods on inhibition of platelet aggregation -----	64
2) Effect of different cooking methods on hypoxia-induced ROS generation -----	65
10. Effect of water-using onion extracts on cardiovascular function protection in clinical trial -----	66
11. Effect of alcohol-using onion extracts on cardiovascular function protection in clinical trial -----	67
12. Effect of different cooking methods on cardiovascular function protection in clinical trial -----	69
Chapter 4. Achievements and contribution -----	71
Clause 1. Achievements -----	71
Clause 2. Contribution -----	72
Chapter 5. Application plan of research results -----	73
Clause 1. Need of additional research -----	73
Clause 2. Application plan -----	73
Clause 3. Key achievements -----	74
1) Papers reported at published -----	74
2) Papers reported at conference -----	74
Chapter 6. Foreign information obtained during R&D process -----	75
Chapter 7. References -----	76

제 1 장 연구개발 과제의 개요

제 1 절 연구 목적

1. 최종목표

본 연구의 최종목표는 국산 양파의 심혈관 기능에 대한 개선효과를 조사하고, 양파의 품종별, 성분별, 생리활성효과를 비교·분석하며, 선발된 양파 품종의 섭취양태별 생리활성 비교 및 평가하여 양파의 부가가치를 높이고 소비를 촉진하고자 하는 것이다.

- 동물실험을 통하여 심혈관 기능 개선에 효과적인 양파의 품종 선발
- 동물실험을 통하여 심혈관 기능 개선에 효과적인 양파의 성분 탐색
- 심혈관 기능 장애 환자를 대상으로 개선효과를 나타내는 양파의 성분 탐색
- 심혈관 기능 장애 환자를 대상으로 개선효과를 나타내는 양파의 작용기전 연구
- 양파의 품종별 유효성분의 정량적 비교 분석
- 양파의 심혈관 기능 개선 유효성분 분리 및 분석

2. 연차별 연구개발 목표와 내용

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2003. 7. ~ 2004. 7.)	양과 품종별 추출물에 대한 성분분석 및 기능성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양과의 품질 특성이 확연히 구분되는 품종 및 계통을 국내 연구기관(양과시험장·목포시험장·고령지시험장)으로부터 수집 및 시료 조제 ○ 기능성 관련 물질인 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (ACSO)과 항산화제에 대한 성분 분석 조건 구명 ○ 심혈관 개선에 효과가 있는 성분의 분획 분리 ○ 양과 품종별 혈소판 응집 억제효과 관찰 ○ 양과 품종별 항산화 활성 관찰 ○ 양과 품종별 배양 심근세포사멸 억제효과 관찰 ○ 양과의 수용성 추출물에서의 심혈관 기능개선 효과
2차년도 (2004. 7. ~ 2005. 7.)	선발된 양과 품종의 분획 추출물에 대한 성분분석 및 기능성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양과 분획별 성분 분석 및 심혈관 개선에 효과가 있는 성분의 규명 ○ 품종 및 계통간 심혈관 개선에 효과가 있는 성분 조성의 비교 ○ 양과 성분별 혈소판 응집억제 효과 비교, 검색 ○ 양과 성분별 배양 심근 또는 혈관계 세포 사멸 억제 효과 비교, 검색 ○ 양과 성분별 항산화 활성 비교, 검색 ○ 양과의 알코올 추출물에서의 심혈관 개선 효과
3차년도 (2005. 7. ~ 2006. 7.)	선별된 양과 품종의 섭취 양태별 생리 활성 비교 및 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생식양과, 증양과, 끓인 양과의 성분 비교 분석 ○ 섭취 양태별 성분 변화 규명후 최적 섭취 양태 제시 ○ 동물에서 양과 섭취 양태에 따른 혈소판 응집 억제능 비교 ○ 동물에서 양과 섭취 양태에 따른 심혈관 기능 개선 효과 비교 ○ 심혈관 기능 이상자를 대상으로, 심혈관 질환 환자를 대상으로 양과 섭취 양태별 심혈관 기능 개선 효과 비교 ○ 양과 섭취양태별 지질과산화도 평가

제 2 절 연구의 필요성 및 범위

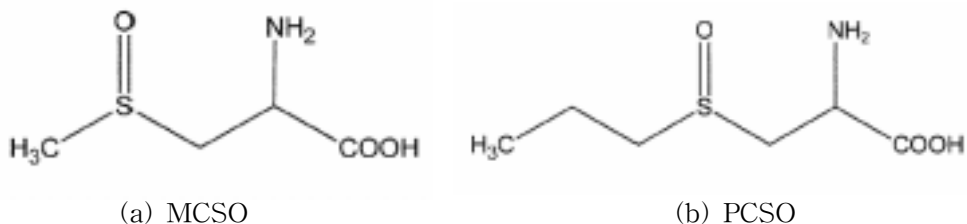
최근에 식생활이 현대화되면서 동맥경화증이나 고혈압 등의 심혈관에 관계되는 성인병 질환을 겪는 사람이 급격히 증가하고 있다. 이러한 병적인 상태나 여러 가지 위험 인자들 등의 존재하에서는 혈관 내피 기능의 이상이 초래되는데 혈관 내피 기능 이상은 혈관 수축반응이나 혈소판과 단핵구의 부착과 혈관 평활근 세포의 증식과 이주를 증가시켜 동맥경화증을 심화시킨다. 결국 혈관이 막히거나 파열되어 혈류가 급속히 감소하게 되고, 혈류가 감소된 부위의 조직 세포들은 산소 및 영양 공급을 받지 못하므로 죽게 되므로, 이러한 현상이 심장 또는 뇌 부위에서 나타나는 경우에는 결국 심근 경색 또는 뇌졸중과 같은 심각한 질병이 초래되며 사망에까지 이르게 된다. 이와 같이 삶의 질을 저하시키고 심지어 사망에 까지 이르게 하는 심혈관 질환을 경감시키고 사전에 예방하기 위한 방법으로서는 혈관 기능의 향상 및 혈류의 유지가 매우 중요한 것으로 인식되고 있다.

최근 보고된 *Allium*속 식물에 함유된 물질들의 생리적 유용성에 대한 연구결과에 따르면 마늘 및 양파를 중심으로 항균작용(Uchida 등, 1976, Kim 등, 1996, Yamata 등, 1977), 혈당치 감소 작용(Jain R. C 등, 1975), 항혈전 활성(Kim 등, 1998), 암세포 치사활성(Lim과 Kim, 1997, Dipaolo 등, 1960, Weisberger 등, 1958), 항돌연변이 작용(Kim 등, 1994), 혈중 콜레스테롤 경감작용, 식욕증진 및 단백질 소화작용(Moon 등, 1991), 성장작용, 결핵예방 및 치료작용, 혈압조절작용, 항산화 작용(Chun 등, 1986)등에 효능이 있는 것으로 보고되고 있다. 이 중 황 화합물은 원료 식물에 독특한 향미를 부여할 뿐만 아니라 다양한 생리적 기능을 발휘하는 주된 물질로서 기능성 식품소재로서의 활용가치가 높다. 양파는 *Allium*속 식물로 약 500여종으로 이루어져 있으며 향신료 및 약리작용으로 말미암아 수세기동안 경험적으로 이용되어 왔으나 효능에 대한 과학적인 연구는 1970년대 후반부터 산발적으로 이루어져 왔으며, 또한 전통적으로 마늘 및 양파를 비롯한 *Allium*속 식물의 생리적 기능에 관한 연구는 추출물에 대한 단편적인 효능 검색에 국한되어 있으며 활성성분의 분리, 동정 및 작용기작 등에 관한 연구는 극히 제한적이다. 최근 마늘의 성분을 대상으로 연구하여 혈전 억제 및 동맥경화 방지를 통한 혈류개선효과, 심장기능 보호효과 등과 같은 긍정적인 효과를 나타낸다는 보고가 많이 나오고 있다. 뿐만 아니라 여러 채소류 중에서 마늘은 가장 강한 항산화력을 가지고 있다는 보고가 있으며, 마늘 특유의 유효화합물은 활성산소 제거활성이 강하고, 항산화효소의 글루타치온 퍼옥시다제의 활성에 필요한 셀렌을 많이 함유하는 등, 마늘에는 항산화력을 높이는 성분이 풍부하게

들어있다고 알려져 있다. 그리고 수용성 항산화성분은 체내에서 비타민 C처럼 체액의 활성산소를 제거하고, 지용성성분은 비타민 E와 같이 세포막과 지질의 산화를 방지하는 것으로 알려져 있으며, 마늘은 수용성과 지용성의 항산화물질을 높은 활성으로 섭취할 수 있다는 보고가 있다. 그러나 같은 *Allium*속이면서 성분이 마늘과 비슷한 것으로 알려져 있는 양파의 효능에 대해서는 잘 알려져 있지 않은 실정이다.

양파의 독특한 향과 풍미는 비단백질 황 아미노산 전구체인 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides (ACSOs) 로부터 나온다 (Lancaster & Boland 1990). 그림 1에서 보는 바와 같이 methyl- (MCSO), 1-propenyl (1-PECSO), 2-propenyl (allyl, 2-PECSO) 4가지 형태의 cysteine sulfoxide가 양파나 마늘을 자르거나 분쇄하였을 때 나타나는 전형적인 ACSOs이다 (Saghir 등 1964, Freeman & Whenham 1976, Kim & Chun 1999). 양파조직에 있는 아리인 (alliin) isomer (1-PECSO)와 아리신 isomer를 포함한 그의 분해 산물은 혈전 용해, 항당뇨, 항암효과가 있는 것으로 알려지고 있다 (Kim & Chun 1999, S대 등 1996, Kang & Kang 1997). 따라서 이 같은 화합물들의 정량 분석 결과는 양파의 품질을 개선할 수 있는 좋은 척도가 될 수 있을 것이며, 또한 양파에서 특정 화합물을 약용 목적으로 생산하기 위한 좋은 조건의 육종과 저장방법을 개발하는데 이용할 수 있을 것이다.

이상과 같이 양파의 주요 기능성 성분중 하나인 ACSOs 성분은 중요한 물질이라고 알려져 있지만 식물체에서 어느 정도로 존재하고 있는지에 대해서는 많은 논란이 있어 왔던 것이 사실이다. 예를 들어 PCSO가 주요 성분이라고 주장하는 반면 혹자는 미량만 존재한다고 주장하고 있다. 또한 *Allium*속 식물체 각각이 다른 flavour 특성을 지니고 함량 또한 다르다고 보고하고 있다. 즉 마늘에서는 2-PrenCSO가 높게 나타난 반면에 양파의 경우 1-PrenCSO가 주요 성분이라고 보고하고 있다.



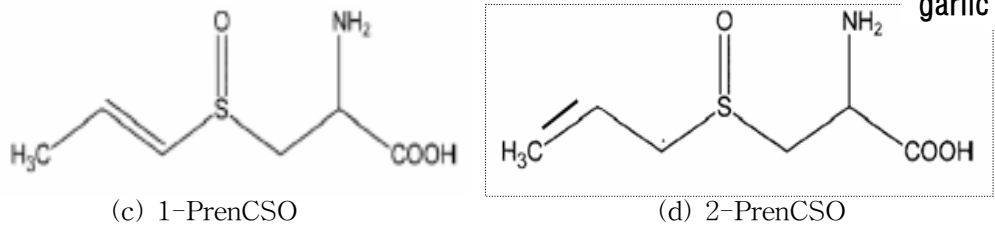


그림 1. 양파에서 존재하는 S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(ACSOs)의 구조식

국가 농업과학기술 중장기 연구개발 계획의 장기목표(2006~2010)에 양파의 고기능다용도 품종 육성이 포함되어 있다(표 1). 따라서 양파산업의 경쟁력 강화를 위한 장기목표에 부응하기 위한 유전자 분석 및 형질전환과 같은 첨단 기초연구가 수행되어야 한다.

표 1. 국가 농업과학기술 중장기 개발 계획중 양파의 연구추진 계획

연구과제	중기(2001~2005)	장기(2006~2010)
품종육성	<ul style="list-style-type: none"> ○ 응성불임 유지계통 개발 ○ 고정종 육종 체계확립 ○ 채종효율 증진기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 극조숙, 고저장성 품종육성 ○ 고기능 다용도 품종 육성 ○ 안전 채종 재배 종합관리
재배기술	<ul style="list-style-type: none"> ○ 육묘 및 기계정식 기술 개발 ○ 펠렛종자 실용화 연구 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 일관기계작업 체계 확립 ○ 직파재배기술 확립
병해충 방제	<ul style="list-style-type: none"> ○ 연작지 병해충 방제 기술 개발 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 병해충 종합관리 기술개발
수확후 관리	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수확후 건조 저장기술 개발 ○ 저장성 약화 원인 구명 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수확후 관리체계 확립 ○ 기능성 양파 가공제품 개발

<농촌진흥청, 2001>

양파는 고추, 마늘, 파, 생강 등 5대 조미채소 중에서 재배 면적 측면에서는 4 번째인 7%에 불과하나, 생산량에 있어서는 36%로 1위를 점하고 있어 타작물에 비하여 단위면적당 수확량이 높은 고소득 작물이다. 그러나 타 작물에 비하여 소

득이 높은 관계로 최근에 양파의 생산 면적이 급격히 증가함에 따라 1999년의 경우 연간 소비량이 70만 톤인데 비하여 95만톤이 생산되었다. 이러한 양파 생산량의 급격한 증가는 국내 소비 시장에서 가격의 폭락을 가져와 농민에게 막대한 경제적 손실을 입게 하였다. 특히 양파는 국내 소비 용도가 가정용으로 편중되어 있고, 2005년도 기준으로 양파 가공 생산량은 총 양파 생산량의 1.5%에 불과하였다(그림 2). 또한 양파는 저장성이 낮아 부패에 의한 폐기율이 30%이상이 되고 있어 이에 대한 대책이 필요한 실정이다.

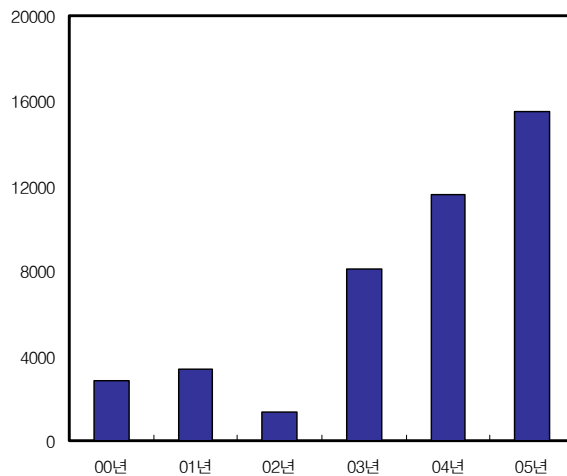


그림 2. 국내 양파의 가공 생산량 현황

양파농가의 소득을 안정화하기 위해서는 생산기술의 개발과 함께 양파의 유통 및 소비시장의 안정적 확보가 매우 중요하다. 양파의 부가가치를 높이고 소비시장을 안정화하는 현실적인 방법은 첫째, 가공용 소비를 확대하는 방법과, 둘째, 기능성이 우수한 품종을 선발하거나 육성하는 방법이다. 두 가지를 동시에 만족하기 위해서는 소비자들이 필요로 하는 양파관련 제품을 생산하는 것이다. 따라서 본 연구를 통하여 우리나라에서 생산되는 양파의 생리활성 기능이 확인되고 이러한 성분을 이용하여 기능성 양파 제품이 생산되면, 이들 양념채소류의 소비가 확대될 수 있으므로 농가의 소득을 안정화 할 수 있을 뿐만 아니라 양파를 이용한 식품산업이 활성화 될 수 있을 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국내외 연구동향

1. 혈류장애와 심혈관조직의 병변

혈소판은 정상적으로 상호간에 혹은 혈관벽과 하등의 마찰 없이 8-10일간 혈액 순환과 더불어 순화하고 있다. 그러나 각종 스트레스 인자에 의하여 혈관이 손상되거나 혹은 병적 상태에서는 혈소판의 기능이 비정상적으로 활성화되어 혈소판 응집괴(혈전)가 형성되고 혈류가 감소되며 결국 혈관주변 조직이 괴사됨에 따라 각종 병적 증상을 야기하게 된다. 현대 사회에서 급격히 발병이 증가하고 있는 고혈압, 동맥경화 그리고 심근경색, 뇌졸중 등의 성인병에서 빈번히 나타나고 있는 혈류 장애 역시 그 주된 요인이 혈소판 응집능의 비정상적 향진에 의한 것으로 보고 되고 있어, 혈소판 기능을 정상화시킴으로써 이러한 관련 질환을 치료 또는 예방할 수 있을 것으로 예상되고 있다.

2. 양파의 약리작용

양파는 독특한 향기성분과 함께 약리작용이 있다는 것이 밝혀지면서 기능성 식품이나 의약품 소재로서의 활용가능성이 높은 식품소재이다. 민간요법에 의하면 양파는 습진, 발열, 감기, 만성기관지염, 복통 등에 이용되었으며, 소화기에 대한 강한 항균작용이 있다고 전해지고 있다. 근래에는 양파가 발암억제작용을 가지며, 고혈압, 고지혈증, 동맥경화, 심근경색 등 현대인에게 심각한 성인병에도 뛰어난 효과를 나타낸다고 보고되어 질병에 대한 예방 및 치료제로서의 이용가치가 높은 것으로 인식되고 있다 (Sharma 등 1977, Fenwick & Hanley 1985, Ali & Mohammad 1985, Bordia 1996). 최근 연구에 따르면 양파는 혈압을 낮추고, 혈소판 응집을 억제하고 섬유소 분해활성을 증가시켜 혈액성상 및 혈류를 개선함으로써 동맥경화증을 저해하는 효과가 있으며, 심근경색, 협심증, 그리고 당뇨병의 혈관합병증등의 심혈관계 질환의 발생을 예방할 수 있다고 보고되었다. 이러한 양파의 효과는 thromboxane의 생성을 감소시켜 혈소판 응집을 억제하기 때문인 것으로 밝혀졌으며, 혈장의 유동성이 낮아진 대상자의 경우 더욱 효과적

인 것으로 확인되었다(Srivastava 1986). 또한 생양파의 수용성 추출물이 조리한 양파보다 강력한 항혈소판 작용을 하는 것이 보고되었다 (Bordia 1996). 이와 같은 양파의 효과는 품종에 따라 차이가 있으며, 섭취하는 종속에 따라서도 차이가 있을 수 있으므로 외국의 결과를 그대로 활용할 수 없는 실정이다.

3. 양파의 품종별 생리활성 성분의 분석

전세계적으로 양파에 있어서 S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(ACSOs) 성분이 중요하다는 것은 알고 있지만 식물체에서 어느 정도로 존재하고 있는지에 대해서는 많은 논란이 되고 있는 실정이다. ACSOs 물질을 측정하기 위해 여러 가지 직접 혹은 간접 방법을 시도하고 있으나 아직 분석방법을 표준화하지 못하고 있다(Thomas & Parkin 1994, Tokimoto & Kobayashi 1992). 그 이유는 이상의 생리활성물질의 경우 조건에 따라 다양한 형태가 존재하며 구조적으로 매우 불안정하여 쉽게 다른 물질로 전환되기 때문이다. 예를 들어 S-propyl-L-cysteine sulfoxide (PCSO)가 주요 황 화합물이라고 Matikkala와 Virtanen(1898-1900), Lancaster와 Boland(1990)등은 주장한 반면, 혹자는 미량으로만 존재한다고 주장하기도 하였다 (Ziegler & Sticher 1989, Yamagi 등 1980). 비록 간접적이기는 하지만 여러 가지 다양한 방법이 S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(ACSOs)를 측정하기 위해서 시도되었다. S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(ACSOs)가 alliinase와 반응하였을 때 나오는 pyruvate를 측정하는 방법이 가장 대표적이나 (Schwimmer & Guadagni 1962), 이 방법은 ACSOs들의 상대적인 양이나 profile을 알 수는 없다. Nakata 등(1970)은 alliinase의 반응 산물인 thiosulfinates을 측정하는 방법을 제안하였으나 이 역시 원래의 상대적인 ACSOs양을 측정하지는 못하였고, 분쇄된 상태의 양파나 마늘이 가지고 있는 상대적인 thiosulfinates와 S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(ACSOs)의 양도 다르게 나타났다 (Thomas 등 1992). 그 후, 이들 thiosulfinates분석을 정확히 할 수 있는 새로운 액체 크로마토그래피 (GC)나 가스-액체 크로마토그래피 (GLC)를 이용한 방법이 개발되었다 (Block 등 1992). GLC를 이용하여 원래의 ACSOs양을 측정하려는 시도가 많이 이루어졌고, 그중 Tokitomo와 Kobayashi (Tokimoto & Kobayashi 1992)는 GLC를 이용하여 양파를 분석한 결과, *n*-propyl 형태가 주종을 이루고 있다고 보고한 바 있으나, 이 형태가 원래의 PCSO로부터 나온 것인지 시료 전처리나 분석중에 1- 혹은 2-propenyl 형태의 반응산물로 *n*-propyl 형태가 나온 것인지는 확실치 않다. 이에 반해 Freeman과 Whenham (Freeman

& Whenham 1975)은 위의 결과는 GLC 분석중 높은 온도나 내재되어 있던 환원력 때문에 나온 변형일 것이며, PCSO : 1-PECSO : MCSO = 2 : 80 : 18의 비율로 존재한다고 주장하였고, Block등 (Block 등 1992, Block 등 1992)도 같은 정도로 존재한다고 보고하였다. 이러한 혼란을 줄이기 위해서 분쇄되지 않은 양파 등에서 ACSOs양을 직접적으로 측정하려는 시도 역시 많이 이루어졌다. Silica gel을 사용한 박층 전기영동과 크로마토그래피를 이용한 이차원적 분리를 통해서 Granroth (1968)는 양파 구근에는 MCSO와 1-PECSO만 존재한다고 발표한 바 있으나, 유사한 실험방법으로 Lancaster와 Kelly (Lancaster & Kelly)는 pyruvate 방법으로 측정한 것보다 4배 이상의 ACSOs양이 검출되었고 PCSO : 1-PECSO : MCSO = 66 : 14 : 20의 비율로 존재한다고 보고하였다. 위 결과는 서로 맞지 않을뿐더러, Matikkala와 Virtanen (Matikkala & Vertanen 1967)이 측정한 결과 (미량 : 92 : 8)와도 다르다. 위의 예들은 특정 식물에서의 상대적인 ACSOs양을 분석한 결과에 많은 혼란이 있었다는 것을 보여주는 것이다.

GC나 GLC에서 측정한 결과가 일치되지 않은 결과가 나타나자 최근 HPLC를, 양파를 비롯한 *Allium*속에 존재하는 ACSO 분석에 이용하려는 시도가 이루어졌다. Gustine (1985)은 *o*-phthaldahyde (OPA)와 2-mercaptoethanol로 ACSOs를 유도체화하여 MCSO를 *Brassica*에서 검출하였으며, Ziegler와 Sticher (1989) 역시 OPA와 2-methyl-2-propanethiol로 유도체화하여 마늘에서 MCSO와 2-PECSO를 분석한 바 있다. 이후에도 계속된 분석으로 마늘에서는 2-PECSO가 가장 많이 존재한다는 것을 알게 되었으며 PCSO나 1-PECSO는 존재하지 않거나 극미량으로만 있다는 사실도 밝혀졌다 (Block 등 1992, Block 등 1992). 또한 불안정한 OPA와 다른 유도체화 방법으로 9-fluorenylmethyl chloroformate (FMOC)를 이용하는 방법도 개발되고 있다 (Cunico 등 1986, Thomas & Parkin 1994).

국내에서도 양파에 대한 연구논문은 비교적 많이 발표되었으나 (Kang & Kang 1997, Kim & Chun 1999, Seo 등 1996), 생리활성성분 분석에 관한 연구는 많지 않고(Ha 등 1996), 더구나 생리활성 물질의 양에 대하여 정량 분석한 자료는 미진한 실정이다.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 연구 방법 및 내용

1. 양파의 성분 분석조건 확립 및 분획 분리

가. 공시재료

본 실험에 사용된 공시재료는 고령지농업연구소에서 재배한 울프, 창녕양파시험장에서 재배한 터보 품종을 수집하여 사용하였다. 수집된 양파시료는 상부와 하부의 뿌리부분을 제거하고 껍질을 벗겨 과육과 과피로 구분하여 -70℃의 deep-freezer에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

나. HPLC 분석조건 확립

1) S-Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(ACSOs) standard chemical 합성

양파의 품미특성을 나타내는 thiosulfinates의 진구물질인 S-alk(en)yl-L-cystein sulfoxides(ACSOs)의 정량분석을 위하여 본 실험에서 실시한 HPLC분석법은 standard 표준물질을 필요로 하지만, thiosulfinates 화합물은 매우 민감하고 불안정하여 상업적으로 존재하지 않기 때문에 인공합성을 통한 표준물질을 만들어 사용하였으며 NMR(핵자기공명)과 HPLC(고속액체크로마토그래피)을 통하여 성분을 확인하였다. 실험에서 사용한 standard 표준물질의 합성방법은 다음과 같다.

가) PrenCSO(1-S-Propenyl-L-cysteine sulfoxide)

환류 냉각기가 연결된 500 ml의 삼구 플라스크에 L-cysteine 24.23 g과 ethanol 250 ml를 넣고 50℃에서 30분간 환류하였다. 10 M의 NaOH 수용액 20 ml를 서서히 첨가하고 30분간 반응 시킨 후 ethanol 35 ml에 allyl bromide 17.28 ml를 녹여 서서히 첨가한 후 3시간동안 반응시켰다. 30℃로 식혀 acetic acid를 pH 5.0~5.5가 될 때까지 첨가하여 산성화하였고, acetic acid를 첨가하면 결정이 생긴다. 이를 냉동고에서 2시간 보관하고 여과하여 50℃에서 건조하였다. Ethanol로 재결정하여 18%의 흰색 고체인 S-allyl-L-cysteine을 획득하였다(그림 3). 500 ml의 삼구 플라스크에 위에서 합성한 S-allyl-L-cysteine 5.60 g과 건조

된 DMSO 200 ml를 넣고 아르곤 하에 상온에서 30분간 교반하였다. 건조된 DMSO 40 ml에 potassium *tert*-butoxide 5.60 g을 녹여 6~10℃에서 서서히 첨가하였으며 완전히 첨가되고 나면 상온에서 18시간 동안 반응시켰다. Acetic acid를 pH 5.0~5.5가 될 때까지 첨가하여 산성화하고, 냉동고에서 2시간 보관 후 여과하여 건조하였다. Ethanol로 재결정하여 20%의 흰색 고체인 1-*S*-propenyl-L-cysteine를 획득하였다(그림 3). 250 ml의 삼구 플라스크에 위에서 합성한 1-*S*-propenyl-L-cysteine 1.1g과 distilled water(Dw) 50 ml를 넣고 30분간 교반하였다. H₂O₂ 1 ml를 Dw 20 ml에 녹여 서서히 첨가한 후 상온에서 24시간 반응 시키고 감압하여 Dw를 제거하였다. 노란색의 액체에 methanol을 넣고 흔들어주면 흰색의 고체가 생기며, 여과한 후 Dw 0.2 ml와 methanol 5 ml로 재결정하여 12%의 흰색 고체인 1-*S*-propenyl-L-cysteine sulfoxide를 획득하였다(그림 4).

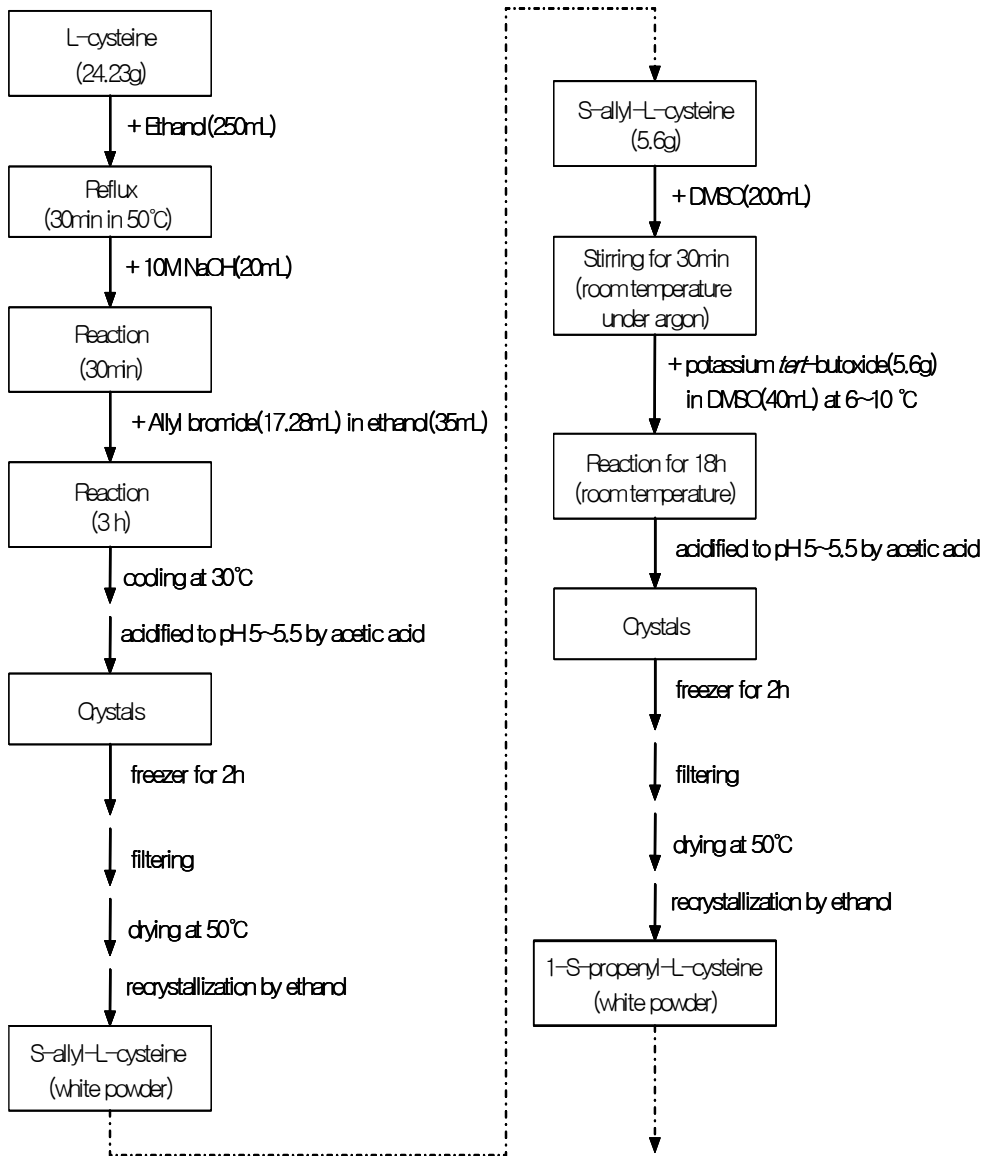


그림 3. The diagram S-allyl-L-cysteine, 1-S-propenyl-L-cysteine synthesis.

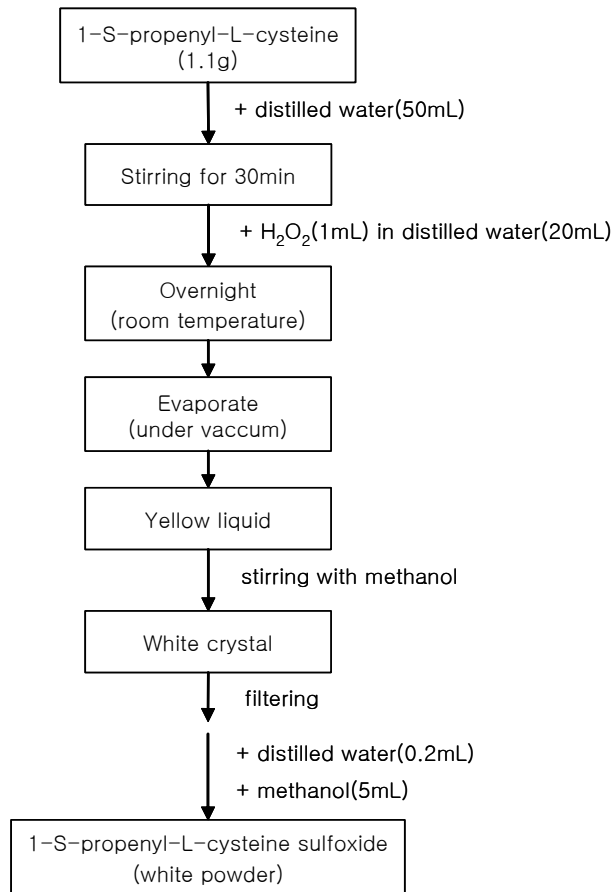


그림 4. The diagram 1-S-propenyl-L-cysteine sulfoxide synthesis.

나) PCSO(S-propyl-L-cysteine sulfoxide)

환류 냉각기가 연결된 500 ml의 삼구 플라스크에 L-cysteine 19.46 g과 ethanol 200 ml를 넣고 50℃에서 30분간 환류하였다. 10 M의 NaOH 수용액 10 ml를 서서히 첨가하여 30분간 반응 시켰으며, propyl bromide 14.56 ml를 ethanol 35 ml에 녹여 서서히 첨가 하고 3시간 동안 반응 시켰다. 30℃로 식히고 acetic acid를 pH 5.5가 될 때까지 첨가하여 산성화하였다. Acetic acid을 첨가하면 결정이 생기며, 이를 냉동고에서 2시간 보관 후 여과하여 50℃에서 건조하였다. Ethanol로 재결정하여 23%의 흰색 고체인 S-propyl-L-cysteine을 획득하였다(그림 5).

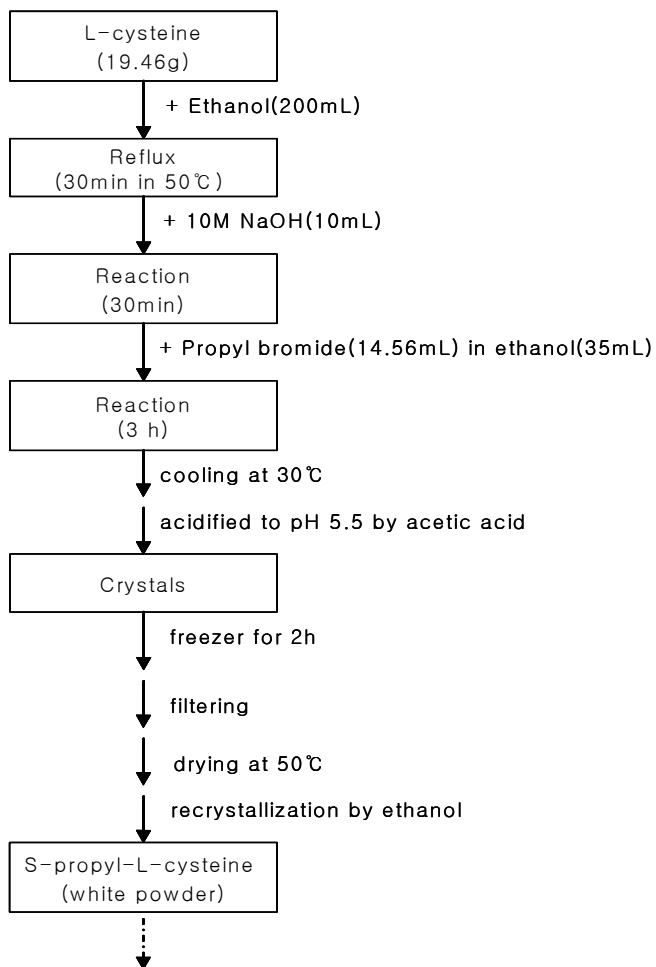


그림 5. The diagram of S-propyl-L-cysteine synthesis.

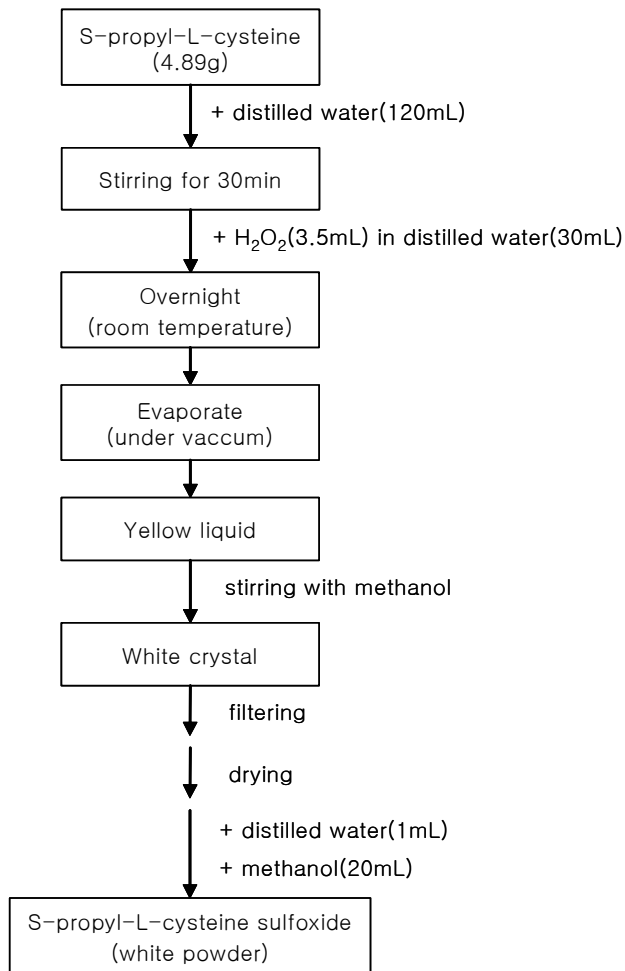


그림 6. The diagram of S-propyll-L-cysteine sulfoxide synthesis.

250 ml의 삼구 플라스크에 위에서 합성한 S-propyl-L-cysteine 4.89 g과 Dw 120 ml를 넣고 30분간 교반하였다. H₂O₂ 3.5 ml를 Dw 30 ml에 녹여 서서히 첨가하고 상온에서 24시간 반응 시킨 후 감압하여 Dw를 제거하면 노란색의 액체가 생긴다. 여기에 methanol을 넣고 흔들면 흰색 결정이 생기며 여과, 건조 한 뒤 Dw 1 ml와 methanol 20 ml로 재결정하여 20%의 흰색 고체인 S-Propyl-L-cysteine sulfoxide을 획득하였다(그림 6).

다) MCSO(S-methyl-L-cysteine sulfoxide)

250 ml의 삼구 플라스크에 S-methyl-L-cysteine 4.05 g과 Dw 50 ml를 넣고 30분동안 교반하였다. H₂O₂ 3.5 ml를 Dw 30 ml에 녹여 서서히 첨가한 후 상온에서 24시간 반응 시켜 Dw를 감압 하에서 제거하였다. 노란색의 액체에 methanol을 넣어 흔들면 흰색 결정이 생기며 여과, 건조 후 Dw 1ml와 methanol 20 ml로 재결정하여 23%의 흰색 고체인 S-methyl-L-cysteine sulfoxide를 획득하였다(그림 7).

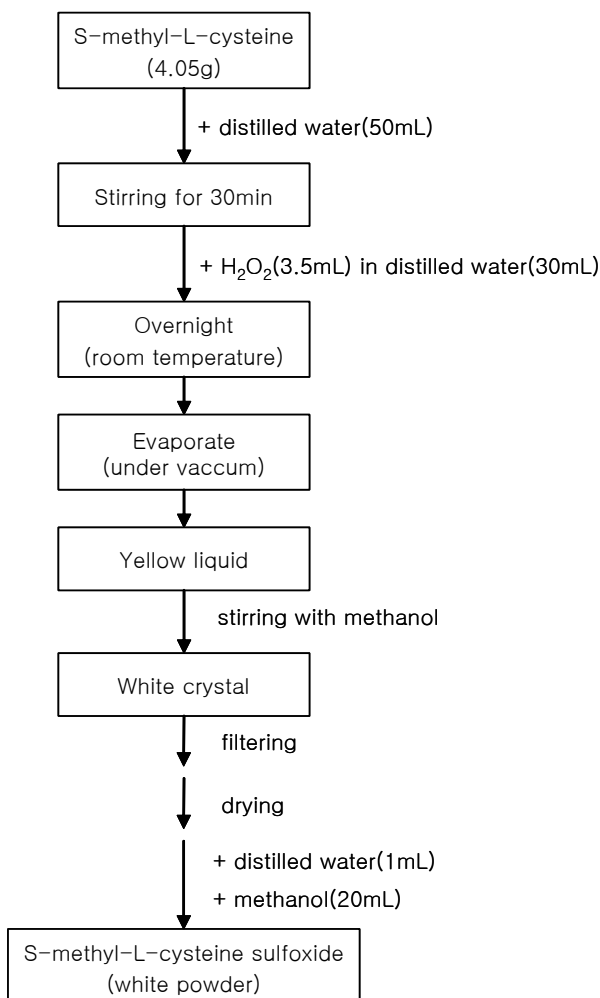


그림 7. The diagram of S-methyl-L-cysteine sulfoxide synthesis.

2) 유도체화

추출샘플의 유도체화를 위한 유도체액의 조제는 Ziegler와 Sticher(1989)의 방법에 따라 다음과 같은 순서로 조제하였다(그림 8). OPA(*o*-phthaldialdehyde) 140 mg을 5 ml의 methanol에 용해시킨 후 0.2 ml의 2-methylpropanethiol을 첨가하여 voltex mixer (KMC-1300V, Vision scientific, Korea)로 잘 혼합하였다. 이 혼합액에 0.05 M sodium tetraborate buffer(pH 9.5) 50 ml을 첨가함으로써 희석하였으며, 이 유도체 용액은 조제된 12시간 이후부터 사용하였다.

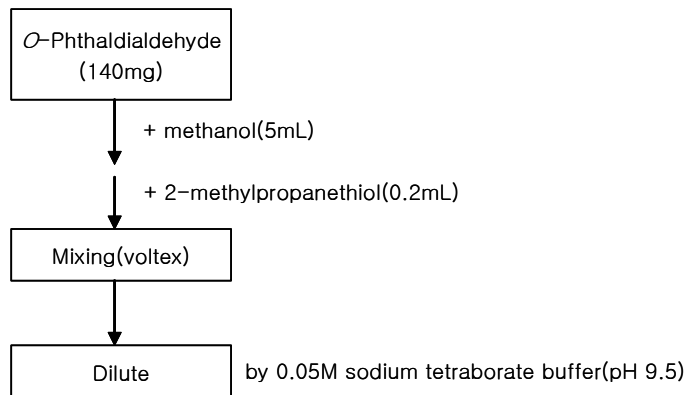


그림 8. The diagram of derivatization reagent be prepare.

3) HPLC 분석을 위한 양파의 ACSOs 성분 추출

ACSOs 성분 추출방법은 David와 Kirk(1994)의 방법을 응용하여 실시하였다. freezing한 양파구근 50 g을 최대 속도로 homogenize하여 MCW(methanol:chloroform:water = 12:5:3v/v/v) 용액 100 ml에 침지시켜 -20℃의 냉동고에서 24 h동안 overnight하였다. 24 h후 냉동고의 양파추출물을 꺼내어 감압여과하여 고형물과 추출액을 분리한 후 추출액에 chloroform과 water(chloroform:water = 2:3v/v) 100 ml을 첨가하여 층을 분리하였다. 두 개의 분획중 하층의 chloroform 층은 버리고 상층의 methanol/water층만을 취하여 vacuum evaporator(N-2N, Eyela, Tokyo, Japan)로 60℃에서 추출액이 50 ml이 될 때까지 감압농축 하였다. 농축된 용액 중 1 ml만을 따로 취하여 speed vacuum을 이용해 완전 건조시켰으며 -20℃의 냉동고에 보관해 두었다가 HPLC 분석실험에 사용하였다(그림 9).

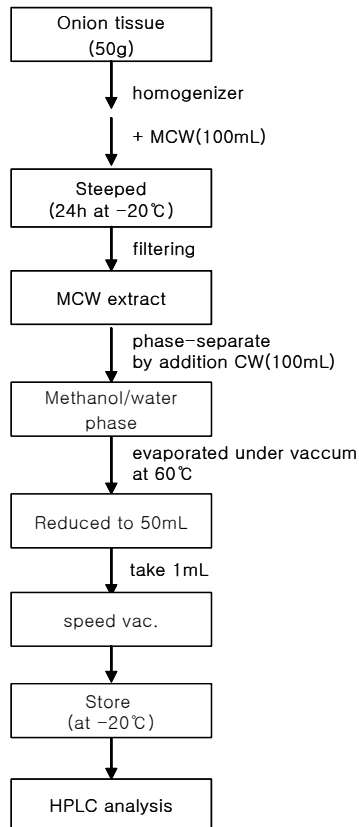


그림 9. The diagram of ACSOs extraction.

다. 양파 내의 ACSOs 성분 추출 및 시료 제공

1) 동물실험을 위한 양파 내 ACSOs 분획 추출

동물실험을 위한 양파 내 ACSOs 성분 추출은 HPLC 분석용 샘플과 동일한 방법으로 추출하였으며 추출방법은 다음과 같다. 수확한 양파는 -70°C 에서 freezing한 후 꺼내어 구근 50 g을 최대 속도로 homogenizer한 후 100ml의 MCW(methanol:chloroform:water = 12:5:3v/v/v)용액에 침지시켜 -20°C 의 냉동고에 24 h동안 overnight시킨다. 그 후 추출된 용액은 필터링 플라스크에 호스를 연결하여 압력을 이용하여 여과시킨 후 추출된 MCW 용액은 같은 volume의 chloroform과 water(chloroform:water = 2:3v/v)을 첨가하여 층을 분리시킨다. 분리된 층의 chloroform층은 버리고 상층액 methanol/water층만을 취하여 60°C 에서 감압농축기를 이용하여 최종 용액이 50 ml가 될 때까지 농축시킨다. 이렇게 농축된 용액 중 1 ml만을 따로 취하여 vacuum centrifuge를 이용하여 완전 건조시켜 제공하였다.

2) 인체실험을 위한 성분 추출

인체실험을 위한 ACSOs 성분 추출을 위해 수용성(물) 추출물과 알콜 추출물 두 가지 형태로 준비하여 시료를 제공하였다. 공시재료는 수용성 추출물은 고령지농업시험장에서 재배한 울프 양파 600 kg을 homogenizer하여 95°C 에서 6시간 shaking 한 다음 원심 분리하여 농축하여 최종 농축액이 240 kg이 되도록 추출하였다. 추출된 농축액은 탕제원에서 100 ml씩 날개 포장하여 2,400회 섭취분을 인체실험에 제공하였다. 알콜 추출물은 경북 문경에서 재배한 터보 양파를 곱집질을 제거하고 속껍질은 그대로 둔 채 세척하였다. 양파를 절단하고 주정(60%)을 동량 첨가한 후, 일정한 압력 ($1\sim 2\text{ Kg/cm}^2$)과 온도($85\sim 95^{\circ}\text{C}$)에서 12시간동안 추출하여 주정을 휘발 한 후 양파 250 g에 해당하는 양을 1팩에 포장하여 제공하였다.

2. 양파의 생리활성 가능 물질의 분획 분석 및 품종별 성분 비교

가. 공시재료

본 실험에 사용된 공시재료는 고령지농업연구소에서 재배한 춘파 중만생종(사뽀로기, 울프, 장알황, 천심, 히구마)과 창녕양파시험장에서 재배한 추파 조생종

(귀금, 선케이, 양춘황, 제비황, 조생드래곤) · 중만생종(슈퍼볼황, 천주대고, 터보, 파워볼, OP황)을 각각 5품종씩 수집하여 사용하였다(표 2). 수집된 양파시료는 상부와 하부의 뿌리부분을 제거하고 껍질을 벗겨 과육과 과피로 구분하여 -70℃의 deep- freezer에 보관하였다가 실험에 사용하였다.

표 2. Cultivars according to three different cultivation of onion.

Division	Sowing in spring	Sowing in autumn	
	Mid and late ripening	Precocious ripening	Mid and late ripening
Cultivar	Sapporogi	Guigum	Superbolhwang
	Wolf	Sunkei	Chunjudaego
	Jangalhwang	Yangchunhwang	Turbo
	Chunsim	Jeabihwang	Powerball
	Higuma	Chosaengdragon	OP-hwang

나. 양파 내 ACSOs 성분 함량

1) ACSOs 성분 추출물 조제

ACSOs 성분 추출방법은 HPLC 분석조건 확립에 사용된 추출방법 및 조건과 동일하다.

다. 양파 내 Quercetin 성분 함량

1) Quercetin성분 추출물 조제

Quercetin성분의 추출방법은 Nogate 등(1994)의 방법을 응용하여 실시하였다. 먼저 -70℃의 냉동고에서 freezing한 양파구근을 꺼내 동결건조 한 후, 건조된 양파를 분쇄하여 얻은 분말을 시료로 사용하였다. 양파분말 0.5 g을 10mL의 1M HCl-50%methanol에 침지시켜 상온에서 24 h동안 overnight하였다. 24 h후 양파 추출물의 가수분해를 위하여 vacuum evaporator(N-2N, Eyela, Tokyo, Japan)로 90℃에서 2 h동안 refluxing하였으며 filter paper(Whatman No. 41)로 여과함으로써 양파내의 quercetin 추출물을 획득하였다(그림 10).

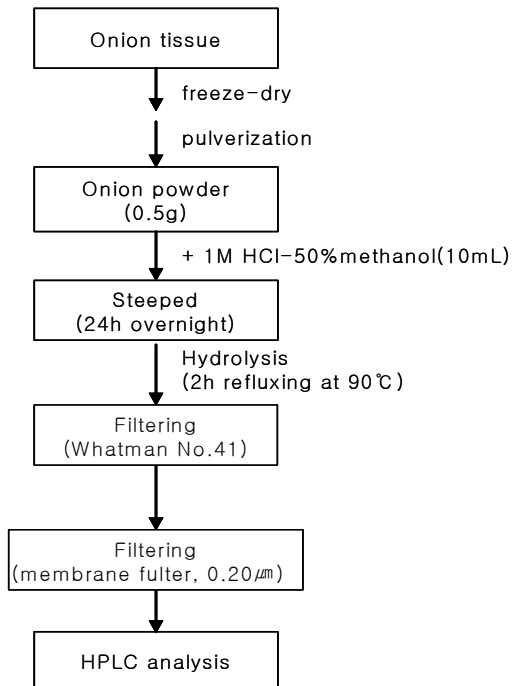


그림 10. The diagram of quercetin extraction.

2) HPLC 분석

상기의 과정을 통하여 획득한 양과 추출물을 membrane filter(millipore 0.20 μ m)로 여과한 후 바로 HPLC 분석하였으며 분석조건은 표 3와 같다(Krest 등, 2000).

표 3. Instrument and operating conditions for HPLC analysis of quercetin.

Conditions	
Instrument	Shimadzu LC-10Avp system
Column	Symmetry R C ₁₈ (5 μ m particle size; 4.6~250mm)
Detector	UV-Vis detector
Wave length	370nm
Eluant #1	Methanol
Eluant #2	10mM phosphoric acid
Gradient	45% to 55% eluant #1 in eluant #2 for 45min
Flow rate	0.6ml/min
Injection volumn	20 μ l

3. 선발된 양파 품종의 섭취 양태별 성분 분석 및 기능성 비교

가. 공시재료

본 실험에 사용된 공시재료는 2006년 6월에 수확한 터보 품종을 목포시험장에서 수집하여 사용하였다. 수집된 양파시료는 비가식 부위를 제거하고 일반적으로 섭취하는 조리방법에 준하여 표 4와 같은 조건으로 생(Fresh), 끓이기(boiling), 볶기(Frying), 증(Steaming)으로 처리하였으며 조리시간은 예비실험을 통해 섭취하기 적절한 상태로 되었을 때로 정하였다.

표 4. Cooking conditions of onion in this study

Cooking methods	Cooking time	weight(g)	Heat mediator	Cooking sample form
Fresh	-	200g	-	1.5cm segment
Boiling	7min	200g	water 1L	1.5cm segment
Frying	5min	200g	oil 10ml	1.5cm segment
Steaming	7hrs	5kg	-	Whole

4. 동물실험에 의한 심혈관 기능 개선효과 검색

가. 혈소판 응집 억제 활성 검색

흰쥐의 복대동맥으로부터 채혈하여 얻은 혈소판 다량 함유혈장 (PRP)을 이용하여 콜라젠 및 ADP, U46619를 가함으로써 혈소판 응집반응을 유도하는 과정에서 양파 추출물을 전 처리한 경우와 대조군을 비교 관찰하였다. 혈소판 응집능 측정기 (Chronolog, Harvertown, PE, USA)를 이용하였다.

나. 심근경색 동물모델

갈비뼈 3-4번 사이를 제거한 후 left anterior coronary artery(LAD)를 봉합사

(4.0)로 뜬 후 infarct size 측정을 위해서 45분동안 결찰시킨 후 90분 동안 재관류시키며, immunohistochemistry 염색을 위해서 45분동안 결찰시킨 후 24시간동안 재관류한다.

다. 심근세포 배양 및 저산소성 손상 유도

ATCC에서 분양받은 심근세포주 H9c2를 hypoxic chamber(5% CO₂, 95% N₂, 37℃)에 넣은 후 N₂로 30분간 미리 saturate된 DMEM·Base(serum-free, glucose-free)로 배지를 갈아줌으로써 저산소 상태에 노출시킨다.

라. 심근세포 사멸 측정 (세포 괴사)

심근세포사멸(세포 괴사)을 양적으로 측정하기 위해 LDH의 활성을 측정하였다. 저산소에 의한 세포사멸 진행 동안 적정 시간별로 상층액을 취하고, 최종 상층액은 0.1% Triton X-100으로 처리하여 LDH의 최대값을 정하였다.

마. 심근세포 사멸 측정 (세포 고사)

*in situ*로 labeling된 DNA 조각(DNA fragments)을 TUNEL방법을 이용하여 분석하였다. 심근세포를 1% paraformaldehyde을 이용하여 고정하였다. 이 방법은 ApopTag Plus kit(Oncor, Gaithersburg, MD)를 구입하여 안내서에 따랐다. 간단히 설명하면, 뉴클레오좀 크기의 DNA 조각을 digoxigenin nucleotide로 작용기 끝에 붙이고(tailing), 다시 floresein-conjugated antidigoxigenin antibodies를 이용하여 반응시켰다. 핵은 4', 6-diamidino-2- phenylindole로 counterstaining시켰다.

바. 활성산소 측정

세포내 ROS 측정은 ROS 중 대표격인 O₂^{·-}와 H₂O₂ 각각에 특이적으로 반응하는 fluorescence dye인 dihydroethidium 과 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCF-DA)를 사용하여 나타나는 형광강도를 측정하였다.

5. 인체실험에 의한 심혈관 기능 개선효과 검색

가. 양과 수용성 추출물에 의한 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구

1) 양과 추출물의 준비

국내에서 소비가 많은 양과(울프)를 수용성 성분을 추출하여 양과 250 g 에 해당하는 양을 1팩에 포장하였고, 양과 껍질을 제거한 후 동량의 수분과 함께 95°C 에서 3시간 추출하였다. 양과의 수용성 추출물에 대한 섭취순응도를 조사하기 위하여 약 20명에게 예비조사를 실시한 결과 약 90%의 대상자가 섭취에 문제가 없다고 응답하여 본 조사에 사용하기로 하였다.

2) 조사 대상자의 선정

춘천 및 서울에 거주하는 대상자 중에서 공복 혈장의 콜레스테롤 수준이 200-300 mg/dL이면서 치료를 받지 않고 있는 대상자들에게 본 연구의 목적을 설명한 후 참여를 희망하는 대상자를 공개모집하였으며, 대상자에게 본 연구에 대한 설명을 한 후 참여 동의서를 작성하도록 하였고, 참여를 희망하는 50명의 대상자 중에서 양과 추출물 복용군과 대조군에 각각 25명씩 무작위 할당하였다.

3) 임상 시험연구의 진행

대상자 중 대조군 25명과 양과군 25명 중에서 1개월간 시험연구를 완료한 대상자는 양과군 23 명, 대조군 25명으로 양과 추출물 혹은 위약 투여가 70%이하인 사람을 제외하고 분석에 사용한 대상자는 양과군 12명과 대조군 18명이었다. 모든 대상자는 기초조사와 평가조사를 받았으며, 기초조사는 임상시험연구를 시작하기 전에 실시하였고, 평가조사는 양과 군과 대조군 모두 양과 혹은 위약을 4주간 섭취한 후에 실시하였다. 양과 250g 에 해당하는 양과 추출물과 위약은 1일 2회 아침과 저녁에 복용하도록 하였다.

4) 효과평가

모든 조사는 면접설문조사, 신체계측, 혈액검사로 구성하였다. 면접설문조사는 연구대상자의 일반적 특성(성, 연령, 직업, 나이, 진단병명, 진단일자, 합병증여부, 동반질환)과 생활습관(음주, 흡연, 운동정도, 영양제 및 건강식품섭취 유무)을 조사하였고, 식사조사는 24시간 회상법을 이용하여 2일간 식사내용을 조사하였으며, 8시간 공복 상태에서 혈액 15ml을 채취하였고, 혈액은 채취

후 2시간 이내에 혈청을 분리하여, 측정시까지 -70도 냉동 보관하였다. 신체검사로써 신장, 체중, 체 성분, 혈압, 혈당을 측정하였다.

나. 양파 알코올 추출물에 의한 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구

1) 양파 추출물의 준비

국내에서 소비가 많은 양파(터보)를 겉 껍질을 제거하고 속껍질은 그대로 둔 채 세척 후 양파를 절단하고 주정(60%)을 동량 첨가한 후, 일정한 압력 (1-2 Kg/cm²)과 온도(85-95°C)에서 12시간 동안 추출하였다. 주정을 휘발 한 후 물을 혼합하여 액상으로 만든 후 양파 250g 에 해당하는 양을 1팩(50ml)에 포장하였으며, 이 과정에서 양파 추출물의 섭취순응도 평가를 위한 예비 조사를 실시하였다. 알콜성 양파 추출물의 경우 양파 향이 강하여 섭취에 어려움을 호소하는 대상자가 50%가 넘어서 초기 추출물 보다 2배 더 희석하여 1팩 당 100ml로 제품을 완성하였다. 뿐만 아니라 텍스트린, 계피 등을 이용하여 양파 추출물과 색, 탁도, 농도, 분량 등이 유사한 위액 제품(100ml)을 제조하였다.

2) 조사 대상자의 선정

분당에 소재하는 1개 종합병원에서 건강검진을 받은 대상자중에서 공복 혈장의 콜레스테롤 수준이 200-300 mg/dL이면서 치료를 받지 않고 있는 대상자들에게 본 연구의 목적을 설명한 후 참여를 희망하는 대상자를 공개모집하였다. 대상자에게 본 연구에 대한 설명을 한 후 참여 동의서를 작성하도록 하였으며, 참여를 희망하는 50명의 대상자중에서 양파 추출물 복용군과 위액복용군(Placebo)에 각각 25명씩 무작위 할당하였다.

3) 임상 시험연구의 진행

대상자중 위액군 25명과 양파군 25명 중에서 2개월간 시험연구를 완료한 대상자는 양파군 23 명, 위액군 20명으로, 양파 추출물 혹은 위액 투여가 70%이하인 사람을 제외하고 분석에 사용한 대상자는 양파군 15명과 위액군 14명이었다. 모든 대상자는 임상시험연구를 시작하기 전에 기초조사를 실시하였고, 1차 평가조사는 양파 군과 대조군 모두 양파 혹은 위액을 4주간 섭취한 후에 실시하였으며, 2차 평가조사는 양파 혹은 위액을 8주간 섭취한 후에 실시하였다. 양파 250g 에 해당하는 양파 추출물과 위액은 1일 2회 아침과 저녁에 복용하도록 하였다.

4) 평가조사

양과 수용성 추출물에 의한 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구와 동일한 방법으로 평가하였다.

다. 양과 섭취 양태별 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구

1) 양과의 준비

시중에서 판매하는 양과를 이용하여 생양과 및 기름을 이용한 볶음 양과를 조리하여 섭취하게 하였다. 대상자들을 10명 모집하여 생양과와 기름에 볶은 양과에 대한 섭취 순응도를 2일 간 조사한 결과 생양과의 경우 1/2개 또는 1/4개를 선호하는 비율이 높았으나 1/4개는 1,2차 실험(500g/d)과 비교하였을 때 섭취분량이 너무 작다고 판단하여 1/2개/일 로 결정하였으며, 기름에 볶은 양과의 경우 1개, 1/2개에 대한 선호도가 높았으나 1개/일을 섭취하는 것으로 결정하였다.

2) 조사 대상자의 선정

서울시내에 소재하는 1개 종합병원의 순환기내과에서 검진을 받은 대상자중에서 공복 혈장의 콜레스테롤 수준이 200-300 mg/dL이면서 치료를 받지 않고 있는 대상자들에게 본 연구의 목적을 설명한 후 참여를 희망하는 대상자를 공개모집하였다. 대상자에게 본 연구에 대한 설명을 한 후 참여 동의서를 작성하도록 하였으며, 참여를 희망하는 30명의 대상자중에서 생양과 섭취군과 볶음양과 섭취군에 각각 15명씩 성별, 연령별 무작위 할당하였다. 대조군은 지역사회에 광고를 실시하여 공복 혈장의 콜레스테롤 수준이 200-300 mg/dL이면서 치료를 받지 않고 있는 대상자들을 모집한 후 아무런 처리를 하지 않은 채 기초조사와 평가조사만 실시하였으며, 20명의 대상자가 참여하였고 기초조사 및 평가조사를 완료한 대상자는 16명이었다.

3) 임상 시험연구의 진행

대상자 중 생양과 섭취군 20명과 볶음양과 섭취군 20명 중에서 1개월간 시험 연구를 완료한 대상자는 생양과 섭취군 12 명, 볶음양과 섭취군 18명이었으며, 양과 섭취가 70%이하인 사람을 제외하고 분석에 사용한 대상자는 생양과 섭취군 12명과 볶음양과 섭취군 18명이었다. 모든 대상자는 기초조사, 1차 평가조사를 받았으며, 기초조사는 임상시험연구를 시작하기 전에 실시하였고, 1차 평가조사는 생양과 섭취군과 볶음양과 섭취군 모두 양과를 1개월간 섭취한 후에 실시하

였다. 생양파 섭취군은 하루 양파 1/2개 분량을, 볶음양파 섭취군은 하루 양파1개 분량을 섭취하도록 하였다.

4) 효과평가

양파 수용성 추출물에 의한 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구와 동일한 방법으로 평가하였다.

라. 혈청 생화학적 검사

혈장 중의 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지방등의 혈청지질 분석은 자동분석기(Hitachi 7600, Hitachi)를 이용하였다. LDL-콜레스테롤은 Friedwald 식 (=총콜레스테롤-(고밀도지단백+중성지방/5))으로 계산하였다.

마. 통계 분석

SAS 프로그램을 사용하여 양파군과 대조군간의 각종 검사 치의 투여 전·후 비교는 paired t-test, GLM을 이용하였고, 각 군 내에서의 기간에 따른 평균의 차이는 ANOCOVA를 이용하였다.

제 2 절 연구개발 결과

1. HPLC 분석 조건 확립

양과 내의 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides 성분분석을 위해서 최우선으로 실시한 standard 합성에서 백색 침상의 결정모양의 인공합성물질을 얻을 수 있었으며, 정량에 필요한 외부표준물질로서 표준곡선을 작성하였고 이때의 상관 결정계수는 MCSO(S-methyl-L-cysteine sulfoxide), PrenCSO(1-S-Propenyl-L-cysteine sulfoxide), PCSO(S-Propyl-L-cysteine sulfoxide) 각각 0.9991, 0.9883, 1 이었다. 양과 추출액에서의 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides 성분 분리를 위해 유도체화 하였으며 마지막으로 계통 및 품종별 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides 성분을 HPLC로 분리·정량하였다.

가. 유도체화 유·무에 따른 분석

각각의 standard MCSO(S-methyl-L-cysteine sulfoxide)와 PrenCSO(1-S-propenyl-L-cysteine sulfoxide), PCSO(S-prpyl-L-cysteine sulfoxide)의 혼합액을 HPLC 분석한 결과 그림 11과 같이 3분 전후로 신속히 standard peak가 모두 검출되었지만 각 standard간의 tR(retention time, min)이 유사하여 성분사이의 분획 분리가 불가능하였다. 하지만 Krest 등(2000)의 방법을 응용하여 유도체화 과정을 거친 후 HPLC 분석을 실시한 결과 그림 12에서와 같이 성분간의 분획 분리가 가능하였다. 또한 양과조직 내의 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides) 성분 추출물을 유도체화 과정을 거치지 않고 바로 HPLC 분석을 실시하였을 경우 그림 13과 같이 10분 내에 peak가 검출되었으며, 유도체화 시키기 전의 standard chromatogram 결과와 마찬가지로 각 성분간의 분획분리가 불가능하였다. 따라서 위의 방법과 동일하게 유도체화하였으며, 그 결과 그림 14와 같은 chromatogram을 얻음으로써 분획을 분리할 수 있었다.

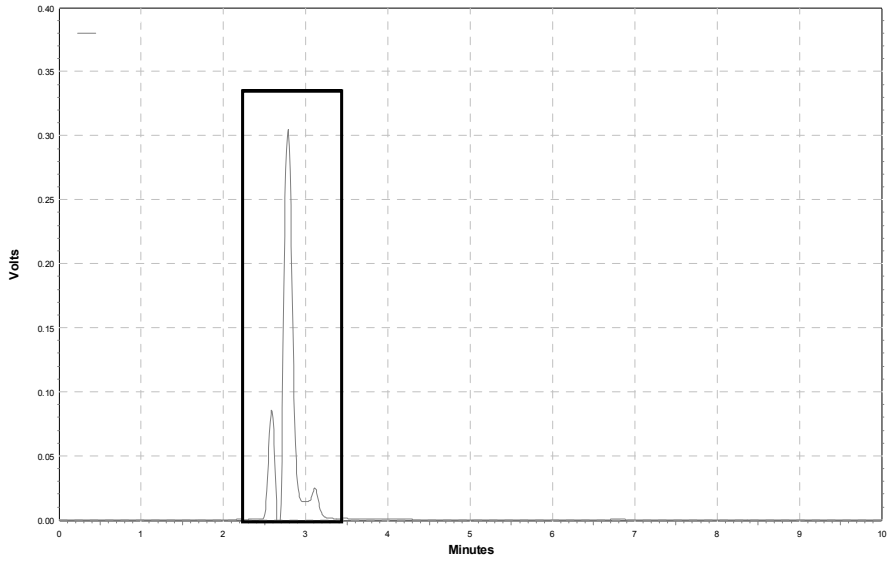


그림 11. HPLC chromatogram of standards.

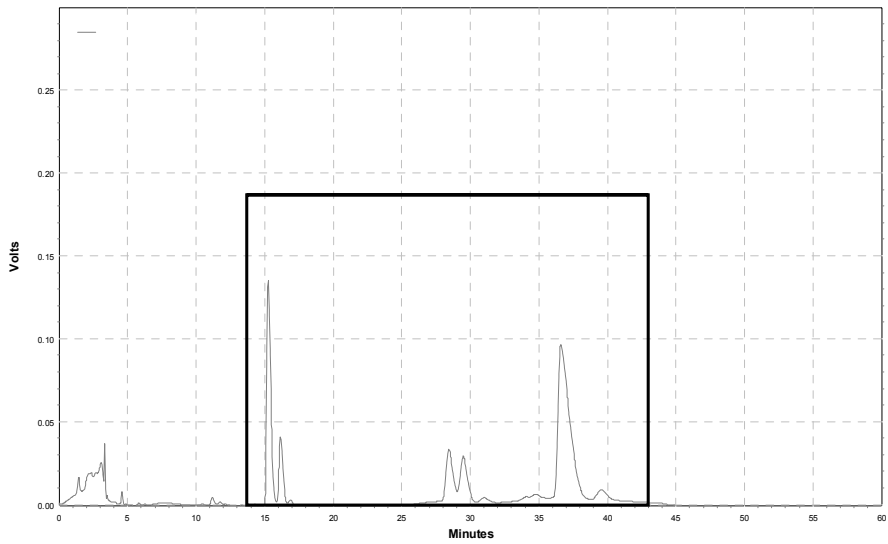


그림 12. HPLC chromatogram of derivative standards.

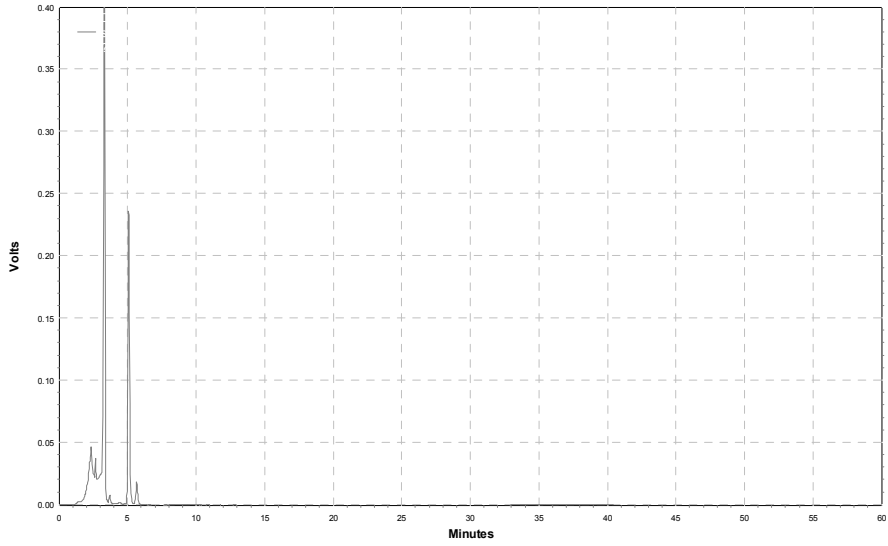


그림 13. HPLC chromatogram in extracts of onion tissue.

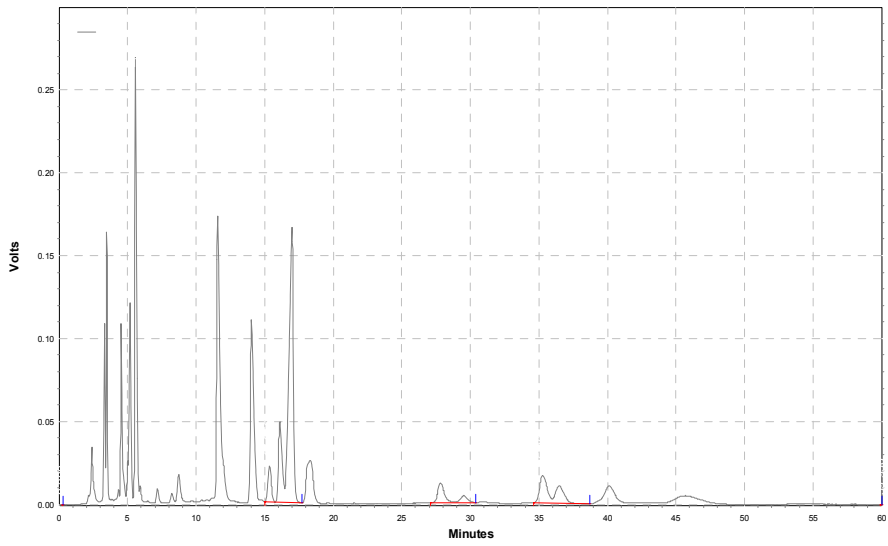


그림 14. HPLC chromatogram in derivative extracts of onion tissue.

나. ACSOs 성분 peak의 분리

양과 조직 내의 ACSOs 성분 분리를 위해 먼저 standard 혼합물의 HPLC 분석 결과를 개별 standard chromatogram과 비교함으로써 각 성분의 tR을 정하였다. 그 결과 MCSO(S-methyl-L-cysteine sulfoxide)가 15.2분으로 가장 먼저 검출되었고, PrenCSO(1-S-propenyl-L-cysteine sulfoxide)는 28.4분, PCSO(S-propyl-L-cysteine sulfoxide)는 36.6분 순으로 검출되었다(그림 15).

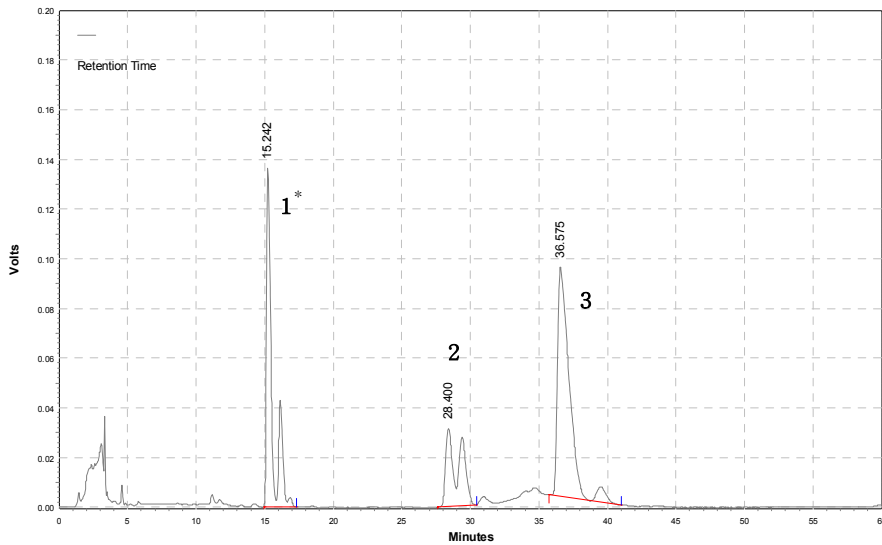


그림 15. HPLC chromatogram of standard(0.5mg/ml).

* 1: MCSO(methyl-cystein sulfoxide), 2: PrenCSO(1-propenyl-cysteine sulfoxide),
3: PCSO(propyl-cysteine sulfoxide).

본 실험의 터보와 울프 양과의 ACSOs 성분을 HPLC로 분석한 결과는 그림 16, 표 5와 같다. 그림 16에서 나온 결과에 비추어 볼 때 두 품종 모두에서 MCSO, PrenCSO와 PCSO 성분이 차례로 검출되었다. 우선 추파양과 터보의 ACSOs 성분을 조사한 결과 MCSO 함량은 0.158 mg, PrenCSO는 0.352 mg, PCSO는 0.033 mg으로 PrenCSO 성분이 MCSO와 PCSO 성분에 비해 높게 나타났다. 또한 춘파양과 울프에서도 MCSO는 0.135 mg, PrenCSO는 0.325 mg, PCSO는 0.035 mg으로 터보 양과에서 분리된 성분과 마찬가지로의 결과를 나타내

었다. 두 품종간의 ACSOs 성분 비교 차는 없는 것으로 나타났다.

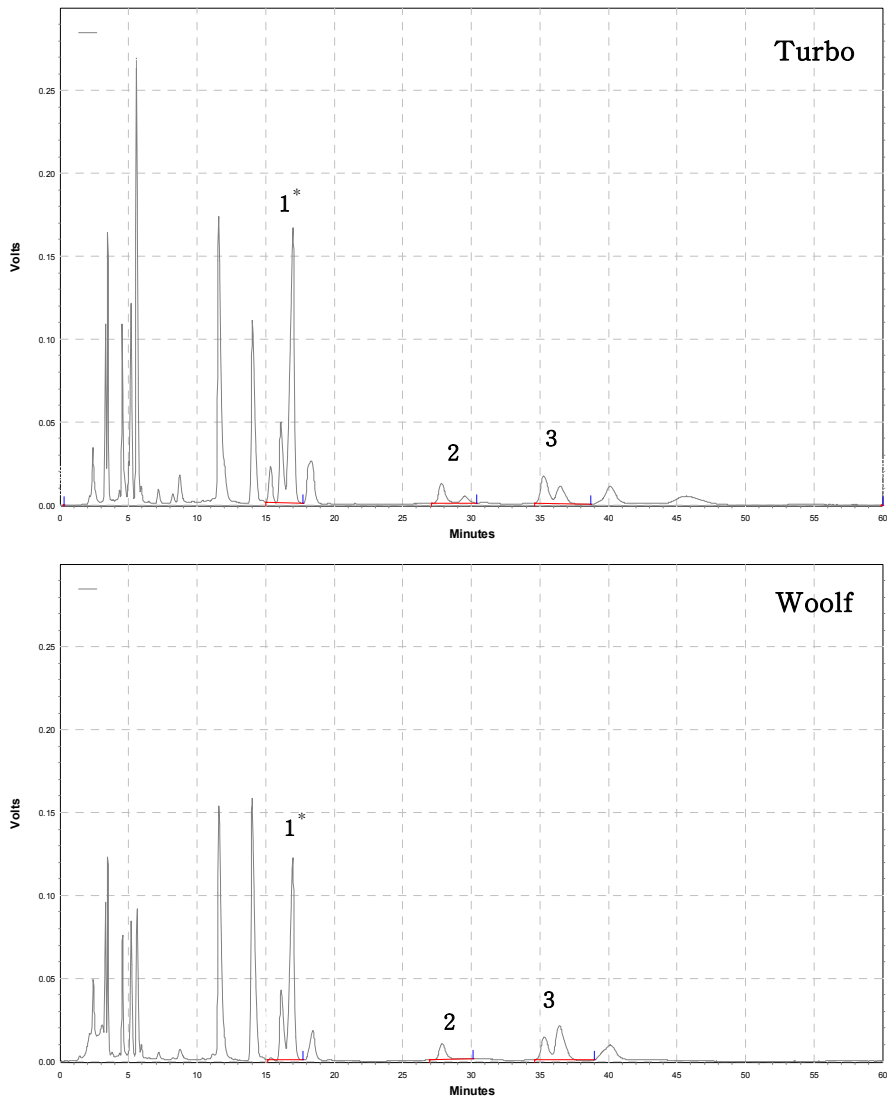


그림 16. HPLC chromatogram of Turbo(upper) and Woolf(bottom).

* 1: MCSO(methyl-cystein sulfoxide), 2: PrenCSO(1-propenyl-cysteine sulfoxide),
3: PCSO(propyl-cysteine sulfoxide).

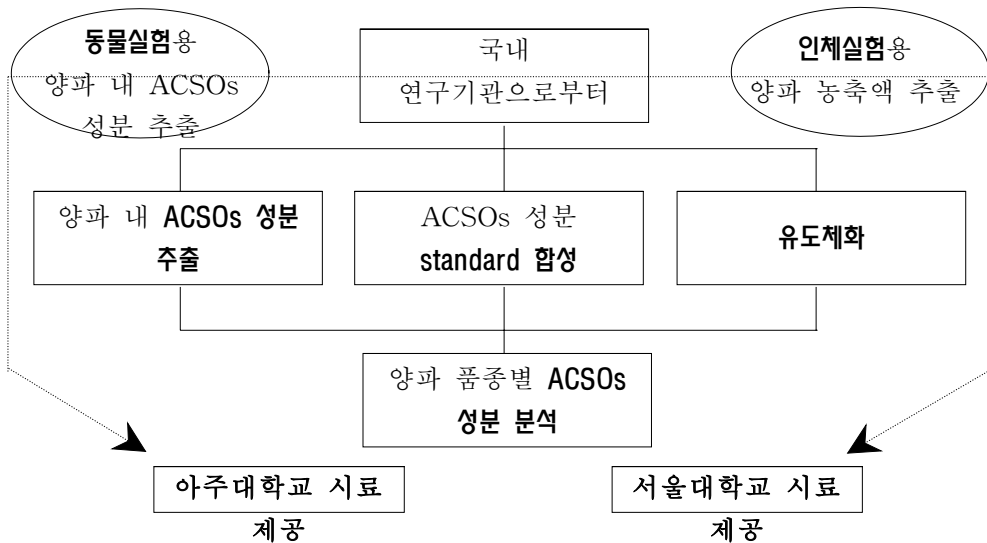
표 5. Levels of Alk(en)yl Cysteine Sulfoxide(mg) for two onion cultivars.

Cultivar	MCSO	PrenCSO	PCSO	Total ACSOs
turbo	0.158	0.352	0.033	0.543
Woolf	0.135	0.325	0.035	0.495

MCSO = *S*-methyl-L-cystein sulfoxide, PrenCSO = 1-*S*-Propenyl-L-cystein sulfoxide, PCSO = *S*-propyl-L-cysteinsulfoxide.

2. 양파 내 ACSOs 성분 추출 및 시료 제공

양파를 국내 연구기관(창녕양파시험장, 고령지농업연구소)으로부터 수집하여 동물실험(아주대)과 인체실험용(서울대) 시료를 조제하였다.



3. 양파의 품종별 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides)성분 함량 비교

양파의 파종시기와 성숙도에 따른 품종별 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides)성분의 함량을 알아보기 위하여 총 15품종을 선발하여 HPLC 분석하였으며, 그 결과는 다음과 같다(표 6). Total cysteine sulfoxides 함량에서 작형별 유의차가 높게 나타났으며 춘파 중만생 > 추파 중만생 > 추파 조생종 순이었

고 같은 작형내에서 품종간의 유의차는 없는 것으로 나타났다. 각 성분별로 유의 수준을 보면 MCSO(methyl-cysteine sulfoxide)는 작형간의 유의차가 <0.0001로 높게 나타났으며 품종간의 유의차는 없었고, PrenCSO(1-propenyl-cysteine sulfoxide)의 경우도 작형간의 유의차가 0.0041로 높은 편이었으나 품종간의 유의차는 없었다. 반면에 PCSO(propyl-cysteine sulfoxide)는 작형 및 품종 모두에서 <0.0001의 높은 유의차를 보였다. 양과내의 황 화합물에 대한 본 분석결과는 연구자에 따라 많은 편차를 가지고 있었는데, 이는 분석방법 및 품종간의 차이에 기인한 것으로 사료되며 본 실험결과 총 15품종 중 사뽀로기에서 ACSOs의 함량이 가장 높았다.

그림 17은 본 연구에서 실시한 양과의 세 가지 작형인 춘과 중만생(사뽀로기), 추과 조생(귀금), 추과 중만생(OP황)에서의 HPLC chromatogram으로 표 6에서 나타난 작형별 cysteine sulfoxides 성분구성의 비교를 보다 쉽게 하였다. 보는 바와 같이 물질 1(MCSO, methyl-cysteine sulfoxide)은 춘과중만생종에서의 함량이 가장 많았고 작형별로 그 차이가 컸으며 춘과 중만생 > 추과 중만생 > 추과 조생 순이었다. 물질 3(PCSO, propyl-cysteine sulfoxide)은 추과중만생종에서 가장 많은 함량을 나타내었으며 춘과 중만생에서 극소량이 발견되는 등 작형별로 상당한 차이를 보였다. 반면에 물질 2(PrenCSO, 1-propenyl-cysteine sulfoxide)는 춘과 중만생종에서의 함량이 가장 높았으며 작형간에 차이가 있었으나 물질 1, 3에 비하여 낮은 수준이었다.

표 6. Quantification of ACSOs in different cultivars grown under three different cultivation conditions.

Cultivation Group ^w	Cultivar	content of ACSOs in onion tissue(mg/100g fw)			
		MCSO ^x	PrenCSO	PCSO	Total
sowing in spring mid and late ripening (Group I)	SP ^y	29.52±12.88 ^Z	104.82±40.89	0.56± 0.80	135.40±36.29
	WF	22.73± 5.72	63.15±12.35	5.95± 1.59	91.83±17.17
	JA	21.99± 7.14	69.23±19.65	0.37± 0.56	91.59±22.99
	CS	25.21± 3.69	90.79±17.66	0.10± 0.06	116.09±19.65
	HG	24.13± 9.08	69.79±29.35	0.18± 0.27	94.10±35.81
sowing in autumn precocious ripening (Group II)	GG	20.63± 8.18	77.95±16.31	2.99± 0.58	101.57±22.51
	SK	14.35± 2.41	47.09±19.59	6.03± 0.96	67.46±19.64
	YC	18.52± 5.43	61.06±37.64	3.16± 0.92	82.74±40.07
	JB	13.76± 2.32	54.26±19.66	3.20± 0.83	71.11±22.42
	CD	11.84± 2.25	43.71±17.26	3.94± 1.60	59.48±18.18
sowing in autumn mid and late ripening (Group III)	SB	18.22± 4.68	65.91±14.32	6.10± 1.49	90.23±17.58
	CJ	16.84± 6.20	79.38±35.28	7.83± 1.16	104.04±38.47
	TB	22.75± 4.85	65.06±21.49	8.15± 2.21	95.99±25.66
	PW	20.99± 2.28	71.98± 9.42	6.64± 1.24	99.62± 9.73
	OP	26.02± 6.55	80.74±18.08	4.68± 2.61	111.44±19.97
Between groups		***	**	***	***
Between 5 cultivars in the same groups		NS	NS	***	NS
Between all 15 cultivars		NS	NS	***	NS

^w season for sowing and ripening

^x MCSO: methyl-cysteine sulfoxide, PrenCSO: 1-propenyl-cysteine sulfoxide, PCSO: propyl-cysteine sulfoxide.

^y The values are mean ± standard deviation(n=5).

^Z SP: Sapporogi, WF: Woolf, JA: Jangalhwang, CS: Chunsim, HG: Higuma, GG: Guigum, SK: Sunkei, YC: Yangchunhwang, JB: Jeabihwang, CD: Chosaengdragon, SB: Superbolhwang, CJ: Chunjudaego, TB: Turbo, PW: Powerball, OP:OP-hwang. NS,*,**,*** ; Non-significant or significant at P = <0.05, <0.01 or <0.001, respectively.

각 품종내에서 cysteine sulfoxide성분의 구성비를 비교해 본 결과 MCSO(methyl-cysteine sulfoxide)의 비율이 전체적으로 20~25% 사이의 유사한 수준이었으며, PrenCSO(1-propenyl-cysteine sulfoxide)의 비율이 전체적으로 70%이상을 차지함으로써 작형 및 품종에 상관없이 양파내의 주요 황 화합물이 PrenCSO임을 알 수 있었고, PCSO(propyl-cysteine sulfoxide)의 경우 춘파 품종에서 극히 낮은 함량을 나타내었다. Shin 등(1999)의 보고에 의하면 마늘에서의 주요 황 화합물은 allyl-cysteine sulfoxide(ACSO)라 하였으며, 총 향기성분에 대한 황 화합물의 함량비가 품종에 따라 70~80%를 차지한다고 하였는데 본 연구의 예비실험 결과 양파내에서는 ACSO성분이 극소량이거나 심지어 검출되지 않았기 때문에 양파에서 ACSO성분조사의 필요성이 없다고 판단되었다.

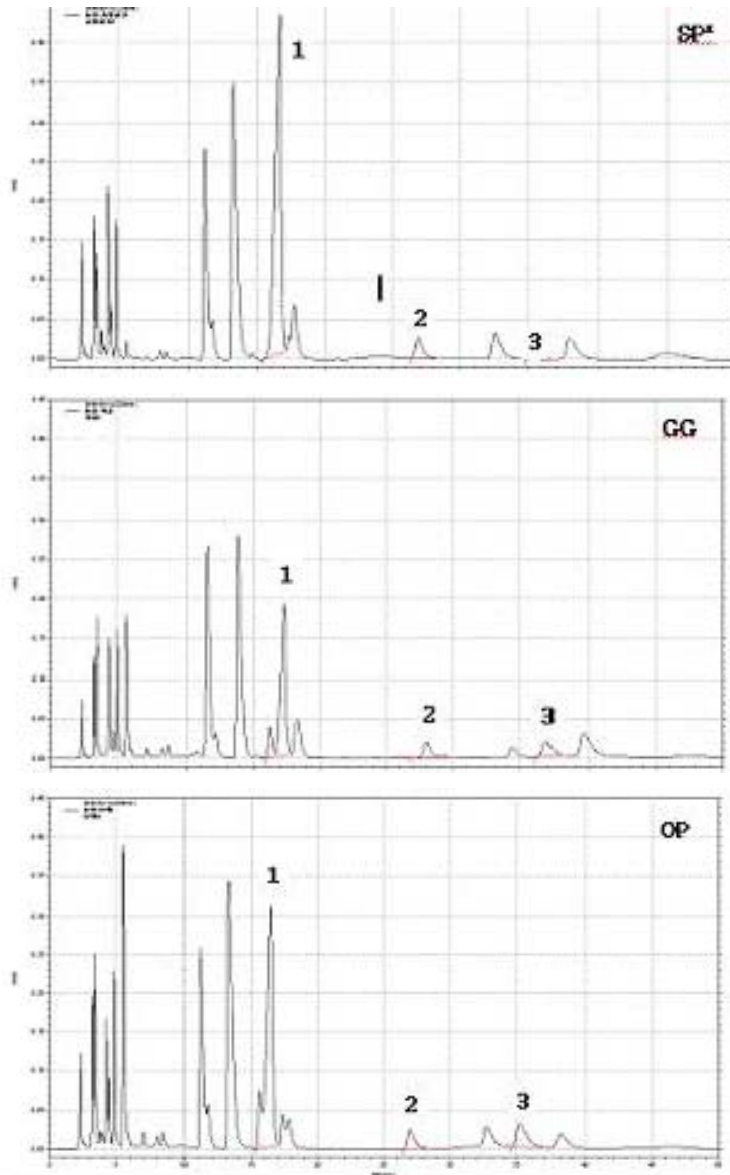


그림 17. HPLC chromatogram of onion extracts from three different cultivars. SP^x : Sapporogi(sowing in spring mid and late ripening), GG: Guigum(sowing in autumn precocious ripening), OP: OP-hwang(sowing in autumn mid and late ripening).

4. 양파의 부위별 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides)성분 함량 비교

부위별 cysteine sulfoxide의 함량을 비교한 결과 과육보다 과피에서의 함량이 크게 증가함을 나타내어 현재 대부분 폐기되고 있는 양파껍질의 재활용 측면에서 또 환경 친화적인 면에서 활용 가능성이 높을 것으로 기대된다(그림 18). 각 부위에서의 구성 물질을 비교해 보면 MCSO (methyl-cysteine sulfoxide), PrenCSO(1-propenyl-cysteine sulfoxide) 성분은 과피에서의 함량이 과육에 비해 월등히 높게 나타났으며 PCSO(propyl-cysteine sulfoxide) 성분은 동일한 함량을 나타내었다.

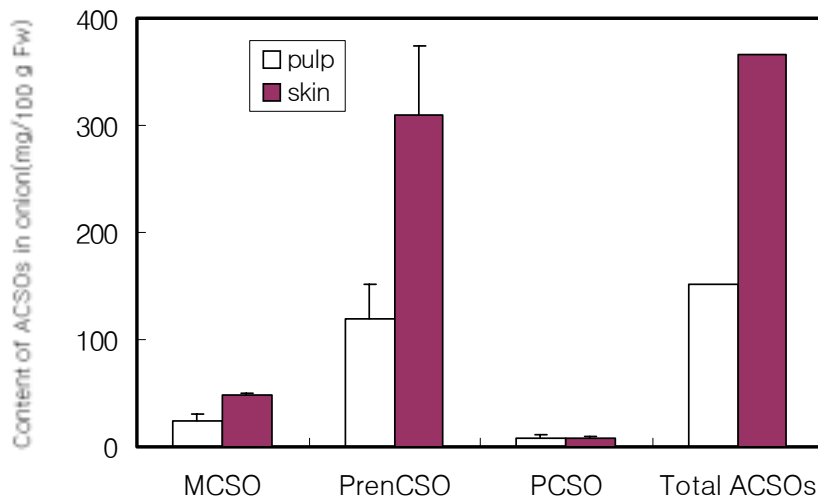


그림 18. Comparison of ACSOs according to different sections in 'Turbo' onion

5. 양파의 품종별 Quercetin 성분 함량 비교

양파의 품종별 비교를 위해 각 작형별로 5품종씩 선발하였으며 quercetin 성분 분석을 위해 동결건조 후 양파를 잘게 빻아 1M HCl- 50%methanol에서 추출하여 HPLC분석하였다. 정량에 필요한 외부표준물질로서 standard quercetin의 표준곡선을 작성하였고 이때의 상관결정계수는 0.9986이었다.

가. Quercetin 성분 peak의 확인

양파 내의 quercetin 성분분석을 위해 동결건조한 양파 powder 추출액을 HPLC 분석한 결과 standard에서의 peak와 일치하지 않았다. 이는 standard의 경우 정제된 순수한 물질인 반면, 양파 추출액은 quercetin 성분에 여러 잔기들이 달라붙어있기 때문이며, 이러한 glucose 잔기들을 제거하기 위해 90℃에서 2시간 동안 refluxing 함으로써 가수분해하였다. 그 결과 양파추출액의 chromatogram에서 standard peak와 일치하는 시점인 4.2분에 quercetin 성분이 발견되었다(그림 19). Leighton 등(1992)은 양파 과육으로부터 quercetin diglycosides, isorhamnetin glucoside, quercetin 4'-monoglucoside와 quercetin 등 4개의 분획을 보고하였고, Lee 등(1996)은 양파 과육으로부터 quercetin diglycosides, rutin, isorhamnetin glucoside, quercetin 4'-monoglucoside 와 quercetin 등 5개의 분획을 보고하였다 Ra등(1998)은 양파에서 quercetin 4'-monoglucoside와 quercetin 등 2개의 분획을 분리하고 양파내 flavonol의 53% 이상이 quercetin이라고 보고하며 quercetin이 주성분이라고 하였다. 본 실험에서 얻은 하나의 분획은 전처리에 의하여 당과 다른 불순물을 제거하여 얻은 순수한 quercetin 성분으로 Ra(1998)등의 결과와 일치한다.

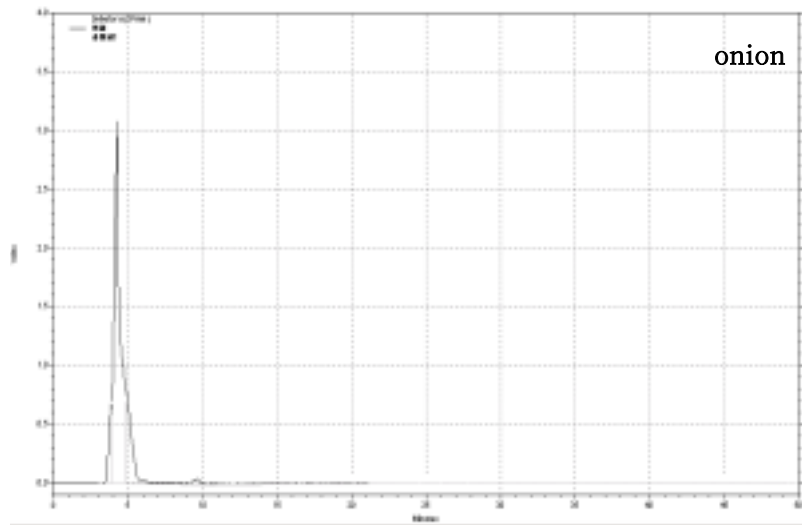
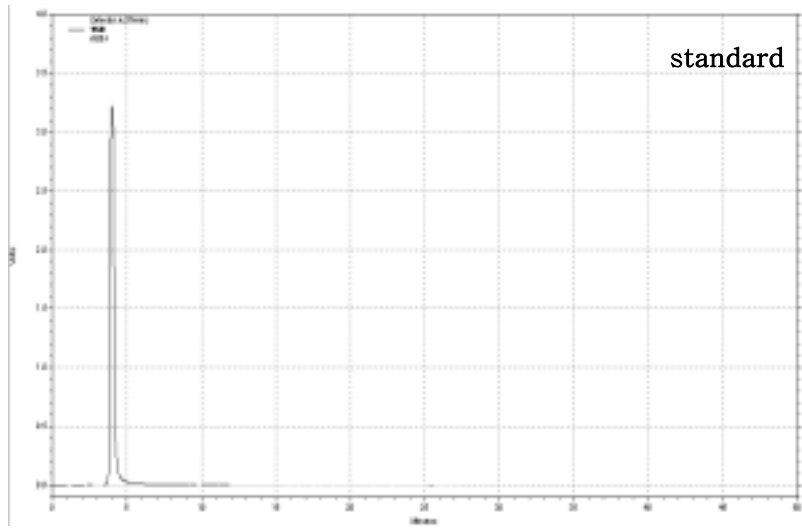


그림 19. HPLC chromatogram in standard(2.0mg/ml, upper) and extracts of onion powder(bottom)

나. 품종별 분석

양파의 파종시기와 성숙도에 따른 춘파 중만생, 추파 조생, 추파 중만생의 세 가지 작형에서 quercetin성분의 함량을 알아보기 위하여 작형별로 각기 다른 품종을 5종씩 선발하여 HPLC 분석하였으며, 그 결과는 다음과 같다(표 7).

실험결과 전체적으로 유사한 수준이었으며 춘파 중만생의 울프 품종에서 quercetin 성분이 4.77mg으로 가장 낮은 수치를 나타내었고, 춘파 중만생 히구마 품종에서의 함량이 6.57mg으로 가장 높았다. 이는 Lee 등(1996)의 결과와 비교하였을때 2배이상 많은 양으로 이는 HPLC 분석전 HCl처리에 의해 quercetin관련 배당체들이 quercetin으로 가수분해 되었기 때문으로 판단된다. 통계분석결과 양파내의 quercetin 성분은 품종간의 차이만 있을뿐 작형별 차이는 없는 것으로 나타났다. Kang 등(1998)의 보고에 의하면 양파의 quercetin 성분은 200℃(1시간)의 가열온도에서도 대략 100%를 유지함으로서 열에 대하여 안정하다고 하여, 양파의 가열조리와 양파주스 농축액 등의 제조 후에도 열에 의하여 파괴되지 않을 것으로 판단되어 기능성 제품 원료로의 가능성이 크다고 생각된다.

표 7. Quantification of flavonoid from different cultivars grown under three different cultivation.

cultivation Group ^x	cultivar	content of quercetin in onion powder(mg/g dw)
sowing in spring mid and late ripening (Group I)	Sapporog	6.19± 0.57 ^y
	Woolf	4.77± 0.39
	Jangalhwang	5.92± 0.48
	Chunsim	5.88± 0.12
sowing in autumn precocious ripening (Group II)	Higuma	6.57± 0.09
	Guigum	6.55± 0.51
	Sunke	5.69± 0.18
	Yangchunhwang	5.41± 0.20
sowing in autumn mid and late ripening (Group III)	Jeabihwang	6.31± 0.41
	Chosaengdragon	5.14± 0.37
	Superbolhwang	6.45± 0.32
	Chunjudaego	5.93± 0.29
	Turbo	5.92± 0.29
	Powerball	5.83± 0.35
	OP-hwang	5.68± 0.23
Between groups		NS
Between 5 cultivars in the same groups		***
Between all 15 cultivars		***

^x season for sowing and ripening

^y The values are mean ± standard deviation(n=5).

NS,*,**,*** ; Non-significant or significant at P = <0.05, <0.01 or <0.001, respectively.

6. 양파의 섭취 양태별 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides) 성분 함량 비교

터보 양파의 조리방법(생양파, 볶은 양파, 끓인 양파, 즈양파)에 따른 총 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides)성분의 함량을 비교한 결과 볶은 양파, 생양파, 즈양파, 끓인 양파 순으로 높게 나타났다(그림 20). 단 끓인 양파처리의 경우 양파 육질에서는 45.8mg/100g, 조리한 물의 경우 54.4mg/100으로 볶은 양파 처리구와 비슷한 수준의 ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides) 함량을 나타내었다.

ACSOs(S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides) 성분에서 각 성분별 처리간의 함량 차이를 살펴본 결과 우선 MCSO (methyl-cysteine sulfoxide)는 볶은 양파처리가 11.2mg/100g으로 다른 처리구에 비해 높은 함량을 나타내었으며 PrenCSO(1-propenyl-cysteine sulfoxide) 성분도 마찬가지로 볶은 양파 처리가 높았으며 생양파와 즈양파는 비슷한 함량을 나타내었다. PCSO(propyl-cysteine sulfoxide)의 경우 즈양파가 1.9mg/100g으로 다소 높은 함량을 나타내었다. 본 연구결과중 MCSO (methyl-cysteine sulfoxide)와 PCSO(propyl-cysteine sulfoxide) 성분이 기존 연구결과에 비해 낮은 함량을 나타냈는데 이는 재배지역, 재배환경의 차이가 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

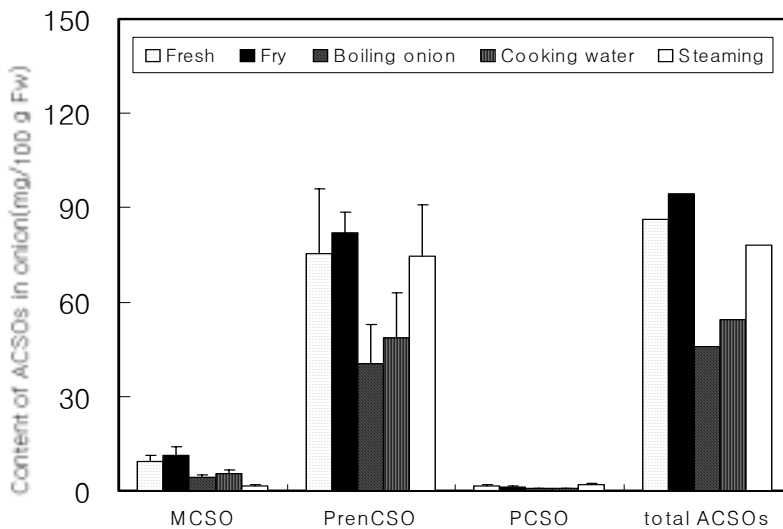


그림 20. Quantification of ACSOs from different cooking methods

7. 동물실험에서 양과 품종별 추출물에 의한 심혈관 기능 개선효과 비교 검색

가. 혈소판 응집반응에 대한 양과 품종별 억제효과

흰 쥐에서 혈소판을 분리하여 콜라젠 처리로 유도한 혈소판 응집반응에서 양과 품종별 영향을 관찰하였으며, 그 결과는 다음과 같다(그림 21). 실험결과 터보, 조생드래곤, 양춘황, 썬케이, 제비황, 귀금 등 모든 품종에서 혈소판 응집 억제효과를 나타내었다.

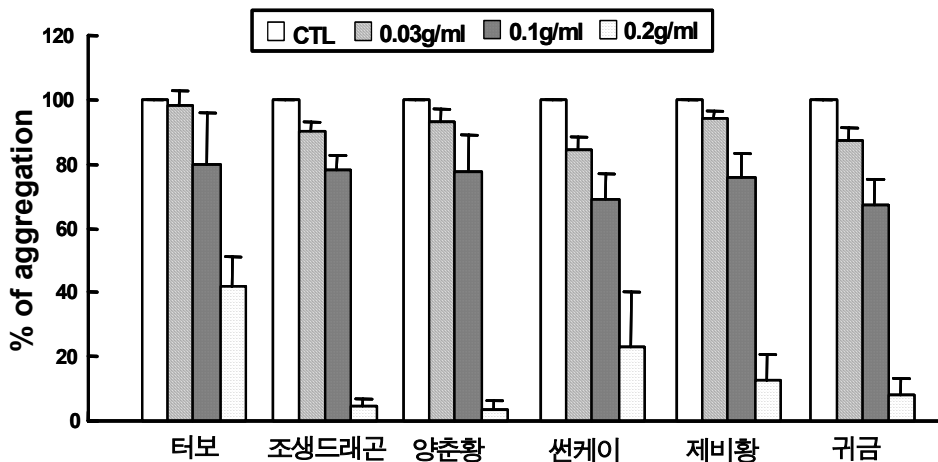


그림 21. 양과 품종별 혈소판 응집 억제 효과

나. 혈소판 응집반응에 대한 터보 품종의 억제효과

흰 쥐에서 혈소판을 분리하여 콜라젠, U46619 처리로 유도한 혈소판 응집반응에서 터보 품종의 영향을 관찰한 결과 터보 품종은 농도 의존적으로 혈소판 응집을 억제하였고, ADP에 의한 혈소판 응집반응에서도 효과적으로 혈소판 응집을 억제하였다(그림 22).

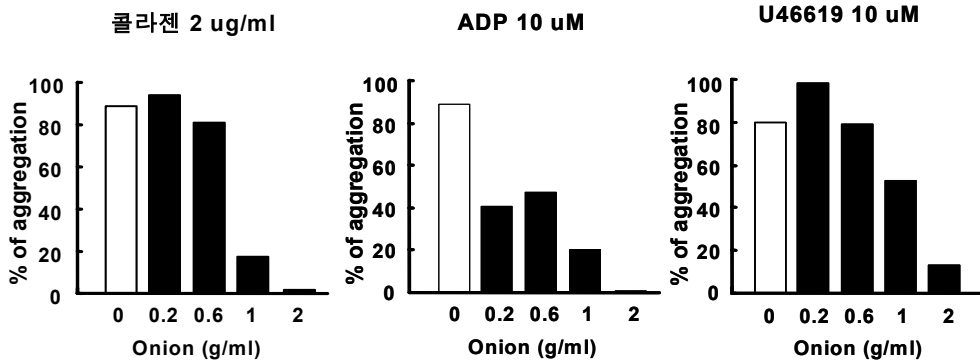


그림 22. 터보 품종이 혈소판 응집 억제에 미치는 영향

다. 저산소로 유도된 활성산소 증가에 대한 터보 품종의 억제효과

저산소로 유도된 활성산소의 증가를 DCF-DA dye를 통해 측정하였으며, 그 결과는 다음과 같다(그림 23). 저산소로 유도된 활성산소는 60분에서 대조군에 비해 600% 정도 증가하였으며, 이러한 활성산소의 증가는 터보 품종 처리에 의해 농도 의존적으로 감소되었다.

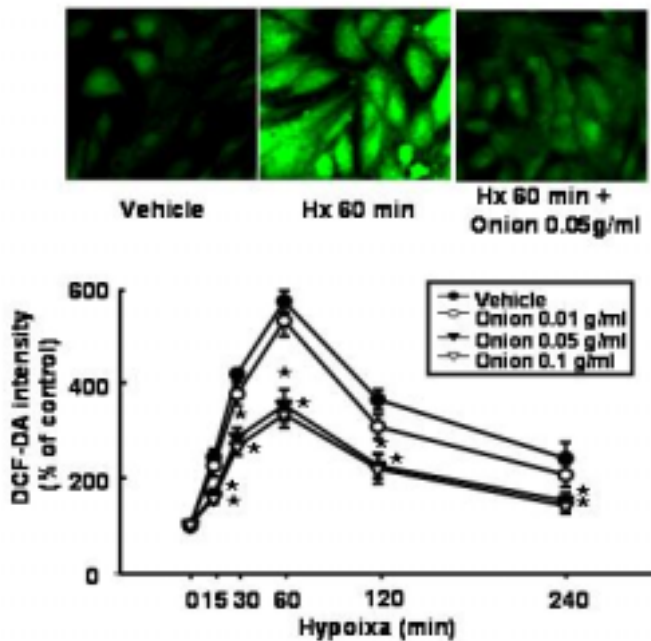


그림 23. 터보 품종이 활성산소에 미치는 영향

라. 저산소로 유도된 심근세포 괴사(necrosis)에 대한 터보 품종의 보호효과

저산소로 유도된 심근세포 괴사를 lactate dehydrogenase (LDH) 유리 정도 측정으로 관찰하였으며, 저산소로 인한 심근세포 괴사가 대조군에 비해 60% 정도 증가하였고, 터보 품종 처리에 의해 효과적으로 억제되었다(그림 24).

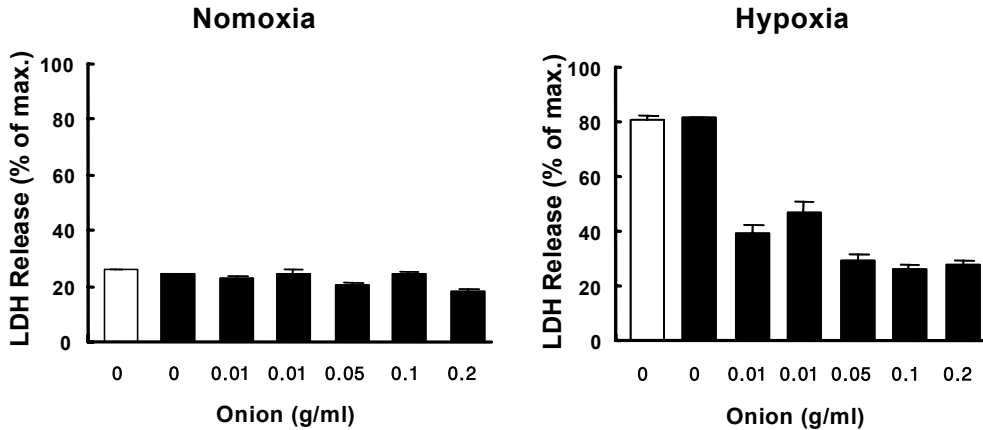


그림 24. 터보 품종의 저산소로 유도된 심근세포 괴사 억제 효과

마. 저산소로 유도된 심근세포 고사(apoptosis)에 대한 터보 품종의 보호효과

저산소 상태의 유지를 통한 심근세포 고사를 측정하였고, 저산소로 인한 심근세포 고사는 대조군에 비해 40% 이상 증가하였으며, 터보 품종 처리군은 대조군에 비해 저산소로 유도된 심근세포 고사가 유의성 있게 감소하였다(그림 25).

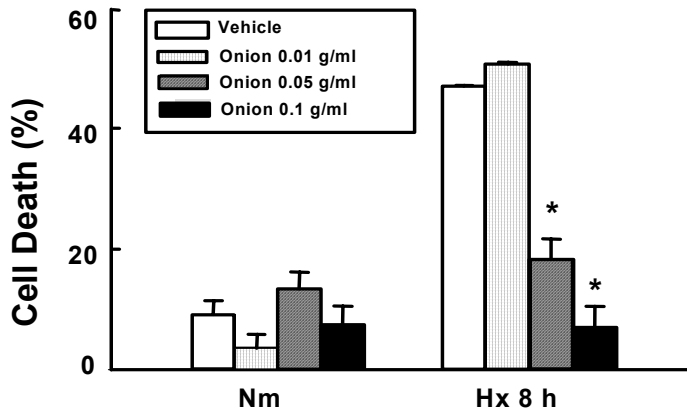


그림 25. 터보 품종이 저산소 상태의 심근세포 고사에 미치는 영향

바. 허혈/재관류에 의한 심근경색모델에서 터보 품종의 보호효과

허혈/재관류에 의한 심근경색모델에서 심근세포 손상 정도를 TTC를 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 다음과 같다(그림 26). 허혈/재관류에 의한 심근경색모델에서 터보 품종이 심근세포 손상을 농도 의존적으로 억제하였다.

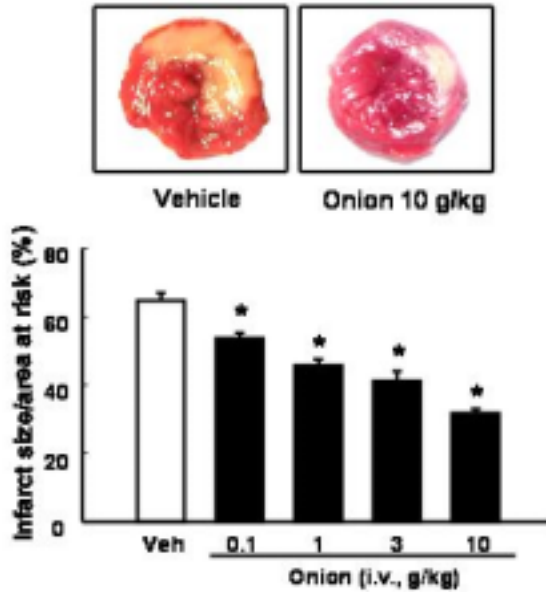


그림 26. 터보 품종에 의한 허혈/재관류 심근세포 손상 억제 효과

8. 동물실험에서 선별된 양파 성분별 추출물에 의한 심혈관 기능 개선효과 비교 검색

가. 혈소판 응집반응에 대한 양파 구성 성분별 억제 효과

동물실험에서 혈소판 응집 반응에 대한 양파의 구성 성분별 영향을 관찰하였고, 혈소판 응집 억제 효과는 양파 성분에 따라 뚜렷한 차이를 보였으며, 특히 PrenCSO와 Quercetin은 0.3 mg/ml과 1 mg/ml 농도에서 탁월한 혈소판 응집 억제 효과를 나타내었다(그림 27).

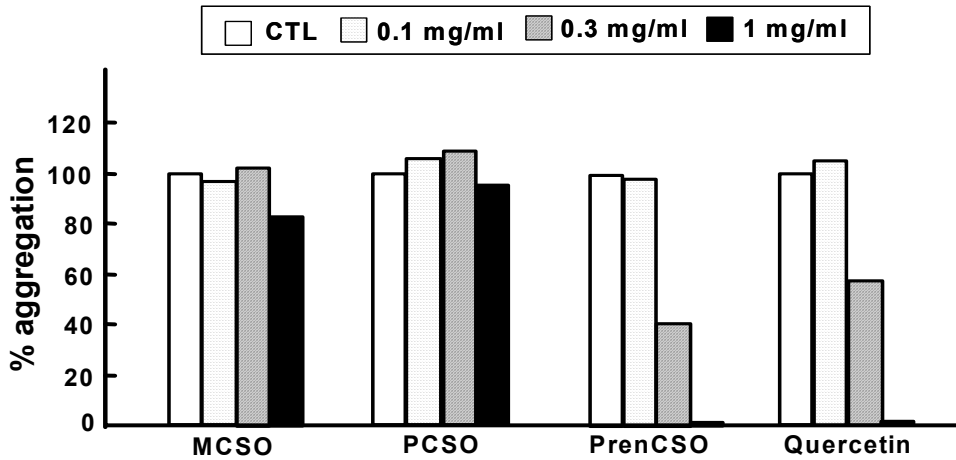


그림 27. 양과 구성 성분에 따른 혈소판 응집 억제 효과

나. 저산소로 유도된 심근세포 괴사(necrosis)에 대한 양과 구성 성분별 보호효과

저산소로 유도된 심근세포 괴사를 lactate dehydrogenase (LDH) 유리 정도 측정으로 관찰하였으며, 그 결과는 다음과 같다(그림 28). 저산소로 유도된 심근세포 괴사가 10 µg/ml 농도에서 양과 구성 성분에 관계없이 보호효과를 나타내었으며, 특히 Quercetin은 저산소로 유도된 심근세포 괴사를 농도 의존적으로 억제하였다.

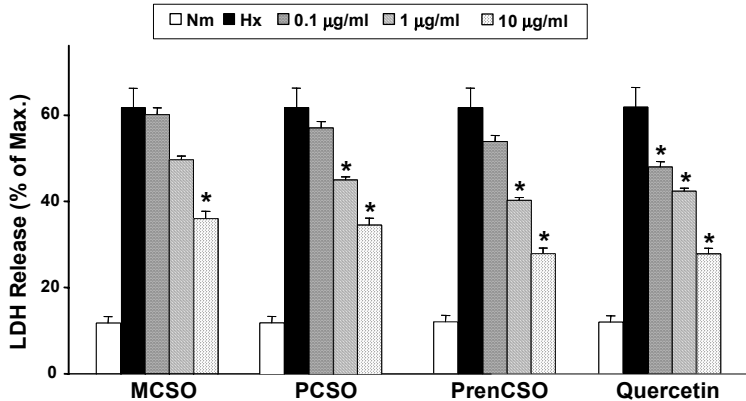


그림 28. 저산소로 유도된 심근세포 괴사에 양과 구성 성분별로 미치는 영향

다. 저산소로 유도된 활성산소 증가에 대한 Quercetin의 억제효과

저산소로 유도된 활성산소를 DCF-DA dye를 이용하여 측정하였으며, 저산소로 유도된 활성산소는 60분에서 400% 이상 증가하였으며, 이러한 활성산소의 증가는 Quercetin에 의해 농도 의존적으로 감소되었다(그림 29).

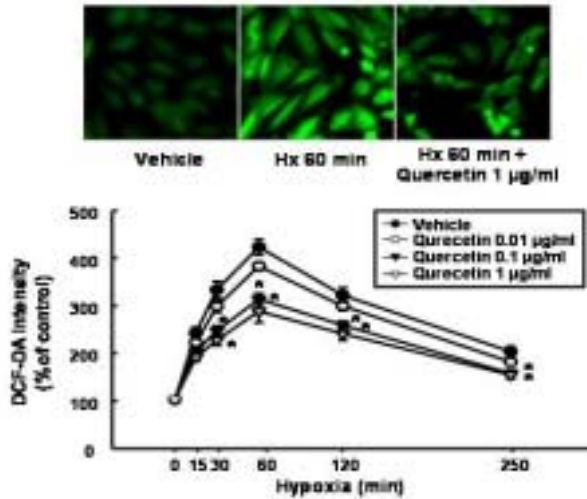


그림 29. Quercetin이 활성산소에 미치는 영향

라. 허혈/재관류에 의한 심근경색모델에서 quercetin의 보호효과

허혈/재관류에 의한 심근경색모델에서 심근세포 손상 정도를 TTC 염색를 이용하여 측정하였으며, 그 결과는 다음과 같다(그림 30). 허혈/재관류에 의한 심근경색모델에서 Quercetin 30 mg/kg, 100 mg/kg에서 심근세포 손상을 효과적으로 억제하였다.

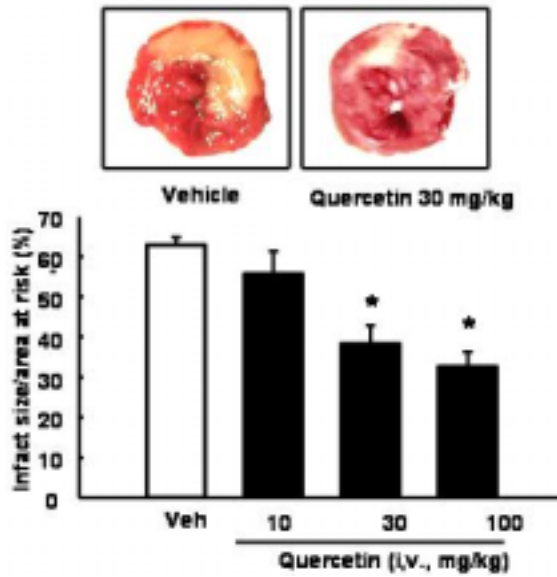


그림 30. Quercetin에 의한 허혈/재관류 심근세포 손상 억제효과

9. 동물에서 양파 섭취 양태에 따른 심혈관 기능 개선 효과 비교

가. 양파 섭취양태에 따른 혈소판 응집반응 억제 효과

동물실험에서 양파 섭취 양태에 따른 혈소판 응집 억제 효과를 관찰하였고, 혈소판 응집 억제 효과는 양파 섭취 양태에 따라 뚜렷한 차이를 보였다. 혈소판 응집 억제 효과는 fried>juice>fresh>boiling water>boiling pulp의 순서로 나타났으며, 특히 fried는 탁월한 혈소판 응집 억제효과를 나타내었다(그림 31).

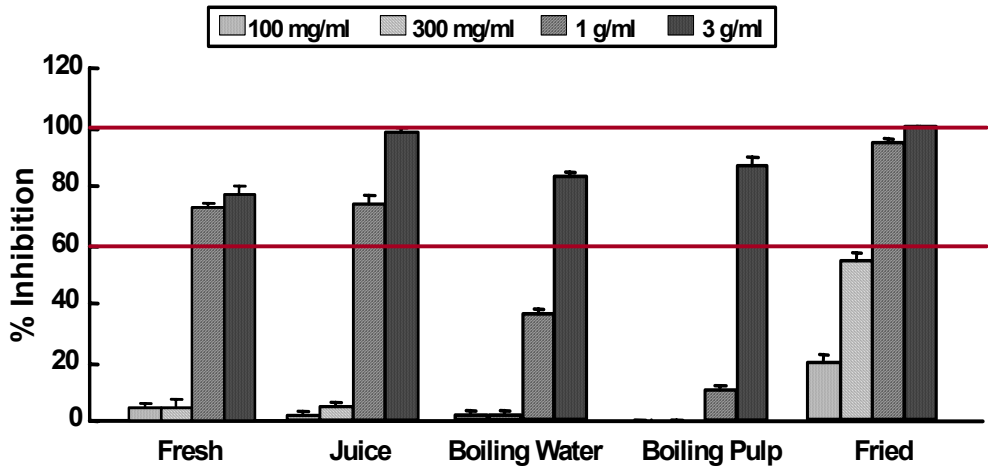


그림 31. 양파 섭취 양태에 따른 혈소판 응집 억제효과

나. 저산소로 유도된 심근세포 괴사(necrosis)에 대한 양파 섭취 양태에 따른 보호효과

저산소로 유도된 심근세포 괴사를 lactate dehydrogenase (LDH) 유리 정도 측정으로 관찰하였으며, 그 결과는 다음과 같다(그림 32). 저산소로 유도된 심근세포 괴사는 fried>juice>fresh>boiling water>boiling pulp의 순서로 억제되었으며, 특히 fried는 저산소로 유도된 심근세포 괴사를 농도 의존적으로 억제하였다.

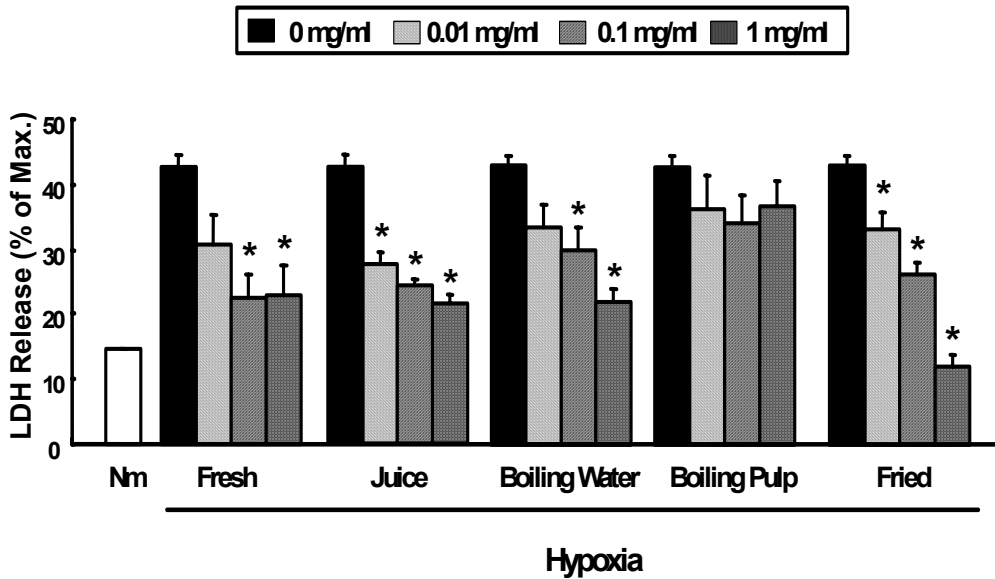


그림 32. 저산소로 유도된 심근세포 사멸에 대한 양파 섭취 양태에 따른 보호효과

10. 인체실험에서 양파 수용성 추출물에 의한 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구

가. 양파의 수용성 추출물을 섭취하기 전 기초 조사 자료의 분석 결과 양파섭취 군과 대조군 간에는 성, 연령, 신체계측치, 혈압 등에서 유의한 차이가 없었다(표 8).

나. 양파의 수용성 추출물 섭취 1개월 후 혈청 지질성상에는 대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었으며, 혈압의 경우 대조군의 이완기 혈압이 유의성 있게 감소하였다(표 9).

다. 따라서 매일 500g에 해당하는 양파의 수용성 추출물을 4주간 복용하였을 때 지질 성상에는 영향이 없음을 확인하였다.

표 8. General characteristics and body composition

	N=12	N=18	P
AGE (yrs)	56.17 ± 6.49	56.53 ± 5.40	0.5840
Height (cm)	157.02 ± 6.65	160.61 ± 7.51	0.9327
Weight (kg)	62.62 ± 6.32	65.73 ± 8.64	0.6337
BMI (kg/m ²)	25.39 ± 1.91	22.58 ± 8.52	0.5385
Glucose (mg/dl)	96.43 ± 13.20	96.28 ± 20.80	0.3960
S.B.P ¹⁾ (mmHg)	122.5 ± 11.38	128.94 ± 15.12	0.7850
D.B.P ²⁾ (mmHg)	76.67 ± 10.73	81.53 ± 9.58	0.7253
GENDER (%)			χ ²
MALE	33.33	66.67	0.073
Educational level (%)			
No school	8.3	0.0	
Elementary	41.7	15.4	
Middle school	16.7	23.1	0.1828
High school	8.3	46.2	
College	25.0	15.4	

Mean ± S.D, P-value of the t-test,

P value comes from the t-test for the difference between treated and control groups

1) S.B.P: Systolic Blood Pressure, 2) D.B.P: Diastolic Blood Pressure

표 9. Changes of serum lipid profiles after onion consumption

	Baseline	After 4 wk	Baseline	After 4wk	P
TC ¹⁾ (mg/dL)	133.75 ± 50.28	155.17 ± 50.55	137.94 ± 81.09	161.28 ± 83.10	0.9401
T-Chol ²⁾ (mg/dL)	244.50 ± 26.47	221.35 ± 26.21	235.28 ± 31.48	220.06 ± 30.21	0.3657
HDL-C ³⁾ (mg/dL)	58.17 ± 18.87	55.75 ± 16.53	56.33 ± 13.01	54.06 ± 11.11	0.9717
LDL-C ⁴⁾ (mg/dL)	159.58 ± 28.52	151.22 ± 24.66	157.22 ± 31.01	142.32 ± 32.96	0.4803
Glucose (mg/dl)	96.43 ± 13.20	93.86 ± 8.93	96.28 ± 20.80	97.72 ± 16.72	0.2993
Weight (kg)	62.62 ± 6.32	62.09 ± 6.16	65.73 ± 8.64	64.69 ± 9.10	0.3836
BMI ⁵⁾ (kg/m ²)	25.39 ± 1.91	25.18 ± 1.92	25.41 ± 2.39	25.01 ± 2.54	0.3749
S.B.P ⁶⁾ (mmHg)	122.50 ± 11.38	122.50 ± 12.88	128.94 ± 15.12	121.22 ± 12.36	0.2200
D.B.P ⁷⁾ (mmHg)	76.67 ± 10.73	78.33 ± 9.37	81.53 ± 9.58	75.78 ± 9.98	<0.0001

Mean ± S.D, P-value of the GLM

P value comes from the t-test for the difference between treated and control groups

1) TG: Triglyceride, 2) T-Chol: Total-Cholesterol, 3), HDL-C: HDL-Cholesterol, 4) LDL-C: LDL-Cholesterol,

5) BMI: Body Mass Index, 6) S.B.P: Systolic Blood Pressure, 7) D.B.P: Diastolic Blood Pressure

11. 인체실험에서 양파 알코올 추출물에 의한 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구

가. 양파의 알코올 추출물을 섭취하기 전 기초 조사 자료의 분석 결과 양파섭취 군과 대조군 간에는 성, 연령, 신체계측치, 혈압 등에서 유의한 차이가 없었다(표 10).

나. 양파 추출물 섭취군에서 양파 섭취전 중성지방의 농도가 179.5mg/dL에서 섭취 8주후에는135.0mg/dL로 유의하게 감소하였으나(p<0.05) 대조군에서도 163.7mg/dL에서 140.4mg/dL로 감소하여 그룹간에는 유의한 차이가 나타나지 않았다(표 11).

다. 매일 500g에 해당하는 양파의 알콜성 추출물을 8주간 섭취할 경우 중성지방의 감소가 있었으나 대조군에서 감소하여 통계적으로 유의한 차이는 없었다. 그 이유를 추정하면 인체대상 임상실험의 경우 실험에 참여한 것만으로도 긍정적인 효과를 가져오는 경우가 많이 있고, 본 대상자들의 경우 고지혈증 진단을 받은 환자들이기 때문에 연구진에서 생활양식의 변화를 하지 않을 것을 요청하였음에도 스스로 여러 각도에서 노력을 하였을 것이라 사료된다.

표 10. General characteristics and body composition

	N=15	N=14	P
AGE (yrs)	46.79 ± 4.90	47.11 ± 6.49	0.8842
Height (cm)	162.56 ± 7.37	166.32 ± 7.91	0.1959
Weight (kg)	67.62 ± 9.87	65.63 ± 11.43	0.2543
BMI (kg/m ²)	25.53 ± 2.82	26.05 ± 2.82	0.6294
Glucose (mg/dl)	86.80 ± 9.87	85.14 ± 9.55	0.6500
S.B.P ¹⁾ (mmHg)	124.87 ± 16.99	126.93 ± 12.59	0.7150
D.B.P ²⁾ (mmHg)	78.33 ± 12.14	80.36 ± 6.02	0.5719
GENDER (%)			χ^2
MALE	53.33	64.29	0.5496
Educational level (%)			
No school	0.0	0.0	
Elementary	0.0	0.0	
Middle school	13.3	0.0	0.3480
High school	20.0	28.6	
College	66.7	71.4	

Mean ± S.D, P-value of the t-test, P value comes from the t-test for the difference between treated and control groups

1) S.B.P: Systolic Blood Pressure, 2) D.B.P: Diastolic Blood Pressure

표 11. Changes of serum lipid profiles after onion consumption

	Alcohol Extract (N=15)			CONTROL (N=17)			P
	Baseline	After 4wk	After 8wk	Baseline	After 4wk	After 8wk	
TG ¹⁾ (mg/dl)	179.47 ± 57.33a	164.73 ± 55.51a	135.00 ± 47.68b	163.71 ± 64.99	150.21 ± 74.41	140.43 ± 51.27	0.1121
T-Chol ²⁾ (mg/dl)	263.53 ± 26.93	262.47 ± 23.84	248.40 ± 22.91	254.93 ± 25.39	259.57 ± 38.60	244.21 ± 23.78	0.7160
HDL-C ³⁾ (mg/dl)	55.67 ± 11.06	55.33 ± 10.90	56.20 ± 11.68	54.71 ± 14.15	50.43 ± 11.09	54.21 ± 11.52	0.8508
LDL-C ⁴⁾ (mg/dl)	171.97 ± 28.03	174.19 ± 26.33	165.20 ± 21.33	167.47 ± 25.32	179.10 ± 39.93	161.91 ± 24.18	0.9090
Glucose (mg/dl)	86.80 ± 9.87	94.67 ± 14.37	86.13 ± 14.31	85.14 ± 9.55	92.57 ± 15.16	91.36 ± 11.69	0.1497
Weight (kg)	67.62 ± 9.87	67.77 ± 9.88	67.41 ± 9.37	72.23 ± 11.43	72.56 ± 12.86	72.36 ± 12.75	0.9434
BMI ⁵⁾ (kg/m ²)	25.53 ± 2.82	25.59 ± 2.82	25.45 ± 2.73	26.05 ± 2.90	26.14 ± 3.29	26.07 ± 3.24	0.9314
S.B.P ⁶⁾ (mmHg)	124.87 ± 17.00	124.80 ± 16.15	121.67 ± 12.52	126.93 ± 12.59	127.86 ± 12.67	121.64 ± 14.39	0.7221
D.B.P ⁷⁾ (mmHg)	78.33 ± 12.14	79.53 ± 10.06	78.73 ± 10.15	80.36 ± 6.02	79.50 ± 7.89	80.89 ± 7.45	0.9022

Mean ± S.D, P-value of the GLMtest between group difference of baseline and 8weeks

a, b: means in a same row followed by the same letter are not significantly different from each other by duncan's multiple range test.

1) TG: Triglyceride, 2) T-Chol: Total-Cholesterol, 3) HDL-C: HDL-Cholesterol, 4) LDL-C: LDL-Cholesterol,

5) BMI: Body Mass Index, 6) S.B.P: Systolic Blood Pressure, 7) D.B.P: Diastolic Blood Pressure

12. 인체실험에서 양파 섭취 양태별 심혈관 기능 개선 효과 및 작용기전 연구

가. 양파를 섭취하기 전 기초조사의 분석 결과 양파섭취군과 대조군 간에 성, 연령, 신체체중치, 혈압 등에서 유의한 차이가 나타나지 않았다(표 12).

나. 기름을 이용한 조리양파 섭취군에서 양파의 섭취 전 후를 비교하였을 때 총 콜레스테롤이 섭취전 264.4mg/dL에서 226.3mg/dL로 유의하게 감소하였고 (p<0.001), LDL-콜레스테롤은 156.2mg/dL에서 139.2mg/dL으로 (p<0.01), 혈당은 97.1mg/dL에서 83.2mg/dL으로 (p<0.01)의 유의한 감소가 있었으며, 대조군에서도 감소경향은 있었으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다(표 13).

다. 양파 섭취군과 대조군의 변화를 비교하였을 때에는 지질의 경우 대조군에서도 감소하여 군간의 유의한 변화는 없었다. 혈당의 경우에는 대조군에서는 변화가 없었으나 섭취군에서 유의한 감소를 보여 생양파 섭취군과 조리양파 섭취군에서 대조군과 비교하여 모두 유의성 있는 감소를 나타내었다 (p=0.0097).

라. 이 결과를 토대로 하면 기름을 이용하여 볶음으로 양파를 조리한 경우 혈액 지질정상과 혈당에 긍정적인 효과가 있었고 생양파의 경우에도 혈당에 긍정적인 효과가 있는 것을 알 수 있었다. 조리양파의 경우 중간 크기 1개(약 250g)을 섭취하였고, 생양파의 경우 반개(약 125g) 섭취하여 양파 추출물(약

500g/d)보다 섭취량이 작음에도 불구하고 효과가 있는 것으로 나타나 식생활에서 양과소비를 촉진하는 것이 필요하다고 사료된다.

표 12. General characteristics and body composition

	N=12	N=18	N=16	P
AGE (yrs)	56.50 ± 8.21	55.61 ± 9.67	56.16 ± 5.48	0.5840
Height (cm)	162.08 ± 8.52	159.82 ± 9.05	160.65 ± 7.51	0.9327
Weight (kg)	63.93 ± 8.58	61.25 ± 12.74	65.17 ± 7.38	0.6337
BMI (kg/m ²)	24.26 ± 1.82	23.88 ± 3.89	22.06 ± 8.86	0.5385
Glucose (mg/dl)	100.75 ± 13.03	97.11 ± 20.19	96.31 ± 22.03	0.3960
S.B.P ¹⁾ (mmHg)	131.25 ± 13.57	128.78 ± 20.34	124.80 ± 10.26	0.7850
D.B.P ²⁾ (mmHg)	82.33 ± 11.20	83.39 ± 11.11	79.07 ± 7.05	0.7253
GENDER (%)				χ^2
MALE	50.00	33.33	68.75	0.1194
Educational level (%)				
No school	8.3	0.0	0.0	
Elementary	25.0	22.2	8.3	
Middle school	25.0	22.0	25.0	0.4601
High school	8.3	33.3	50.0	
College	33.3	22.2	16.7	

Mean ± S.D, P-value of the GLM, P value comes from the t-test for the difference between treated and control groups

1) S.B.P: Systolic Blood Pressure, 2) D.B.P: Diastolic Blood Pressure

표 13. Changes of serum lipid profiles after consumption

	Cooked and raw onion consumption						P
	Raw Onion (N=12)		Cooked Onion (N=18)		CONTROL (N=16)		
	Baseline	After 4wk	Baseline	After 4wk	Baseline	After 4wk	
TC ¹⁾ (mg/dl)	133.75 ± 62.29	122.75 ± 48.25	143.00 ± 64.66	140.17 ± 60.56	129.69 ± 70.29	142.81 ± 66.46	0.4840
T-Chol ²⁾ (mg/dl)	231.42 ± 15.63	218.42 ± 40.54	264.44 ± 23.93	226.67 ± 30.35 ^{***}	238.50 ± 31.84	225.69 ± 26.46	0.4963
HDL-C ³⁾ (mg/dl)	55.08 ± 11.96	55.50 ± 13.36	61.61 ± 16.71	59.44 ± 15.92	56.06 ± 12.61	54.56 ± 11.70	0.4444
LDL-C ⁴⁾ (mg/dl)	149.58 ± 22.77	138.37 ± 37.05	156.23 ± 24.20	139.19 ± 30.51 ^{**}	160.81 ± 30.93	149.05 ± 26.90	0.5943
Glucose (mg/dl)	100.75 ± 13.03	94.08 ± 20.60 ³⁾	97.11 ± 20.19	83.17 ± 14.82 ^{**}	96.31 ± 22.03	97.31 ± 17.69 ^{b)}	0.0097
Weight (kg)	63.93 ± 8.58	63.87 ± 8.83	61.25 ± 12.74	62.52 ± 12.84	65.17 ± 7.38	64.01 ± 7.75	0.5136
BM ⁵⁾ (kg/m ²)	24.26 ± 1.82	24.23 ± 1.84	23.88 ± 3.89	24.33 ± 3.71	22.06 ± 8.86	24.78 ± 2.31	0.2545
S.B.P ⁶⁾ (mmHg)	131.25 ± 13.57	120.50 ± 18.39 [*]	128.78 ± 20.34	123.44 ± 20.65	124.80 ± 10.26	122.00 ± 12.81	0.2354
D.B.P ⁷⁾ (mmHg)	82.33 ± 11.20	75.42 ± 12.51	83.39 ± 11.11	78.78 ± 14.05	79.07 ± 7.05	76.81 ± 10.09	0.6039

Mean ± S.D, *: Significant at p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 by paired t-test.

a, b: means in a same row followed by the same letter are not significantly different from each other by Duncan's multiple range test.

P-value of the GLMtest between group difference of baseline and 4 weeks

1) TC: Triglyceride, 2) T-Chol: Total-Cholesterol, 3) HDL-C: HDL-Cholesterol, 4) LDL-C: LDL-Cholesterol,

5) BM: Body Mass Index, 6) S.B.P: Systolic Blood Pressure, 7) D.B.P: Diastolic Blood Pressure

제 4 장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도

제 1 절 목표달성도

구 분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위	달성도 (%)
1차년도 (2003. 7. ~ 2004. 7.)	양과 품종별 추출물에 대한 성분분석 및 기능성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양과의 품질 특성이 확연히 구분되는 품종 및 계통을 국내 연구기관(양과시험장·목포시험장·고령지시험장)으로부터 수집 및 시료 조제 ○ 기능성 관련 물질인 S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides(ACSO)과 항산화제에 대한 성분 분석 조건 구명 ○ 심혈관 개선에 효과가 있는 성분의 분획 분리 ○ 양과 품종별 혈소판 응집 억제효과 관찰 ○ 양과 품종별 항산화 활성 관찰 ○ 양과 품종별 배양 심근세포사멸 억제효과 관찰 ○ 양과의 수용성 추출물에서의 심혈관 기능개선 효과 	100 100 100 100 100 100 100
2차년도 (2004. 7. ~ 2005. 7.)	선발된 양과 품종의 분획추출물 에 대한 성분분석 및 기능성 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양과 분획별 성분 분석 및 심혈관 개선에 효과가 있는 성분의 규명 ○ 품종 및 계통간 심혈관 개선에 효과가 있는 성분 조성의 비교 ○ 양과 성분별 혈소판 응집억제 효과 비교, 검색 ○ 양과 성분별 배양 심근 또는 혈관계 세포 사멸 억제 효과 비교, 검색 	100 100 100 100

		<ul style="list-style-type: none"> ○ 양파 성분별 항산화 활성 비교, 검색 ○ 양파의 알코올 추출물에서의 심혈관 개선 효과 	<p>100</p> <p>100</p>
3차년도 (2005. 7. ~ 2006. 7.)	선별된 양파품 종의 섭취 양태 별 생리활성 비 교 및 평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 생식양파, 즈양파, 끓인 양파의 성분 비교 분석 ○ 섭취 양태별 성분 변화 규명 후 최적 섭취 양태 제시 ○ 동물에서 양파 섭취 양태에 따른 혈소판 응집 억제능 비교 ○ 심혈관 기능 이상자를 대상으로, 심혈관 질환 환자를 대상으로 양파 섭취 양태별 심혈관 기능 개선 효과 비교 ○ 양파 섭취양태별 지질과산화도 평가 	<p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p> <p>100</p>

제 2 절 관련분야 기여도

본 연구를 통하여 양파의 기능성 물질 규명과 효능을 밝힘으로써 국민의 식생활 개선과 보건향상에 기여할 수 있으며 양파의 생리활성 기능이 확인되고 이러한 성분을 이용하여 기능성 양파 제품이 생산되면, 이들 양념채소류의 소비가 확대될 수 있으므로 농가의 소득을 안정화 할 수 있을 뿐만 아니라 양파를 이용한 식품산업이 활성화 될 수 있을 것이다. 또한 기존에 양파와 같은 원예작물이 건강에 유익하다는 속설을 과학적으로 입증함으로써 새로운 영역에 대한 학문발전에 기여하리라 예측된다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

제 1 절 추가연구의 필요성

본 연구에서는 심혈관 기능 개선에 효과적인 양파 품종과 유효성분을 확인하였다. 하지만 유효성분으로 확인된 황화합물을 순수분리동정하는 단계까지 진행하지 못한 관계로 앞으로 추가 연구를 통해 단일성분으로의 순수분리동정 및 대량추출공정을 통해 양파의 유용성분을 다양하게 이용할 수 있는 기반을 구축할 필요가 있다고 판단된다. 한편 본 과제의 심혈관기능에 대한 개선효과는 대부분 동물 모델을 이용하여 얻은 결과이다. 양파의 심혈관 기능 개선 효과를 실제 환자를 대상으로도 충분히 연구하려 하였으나 연구비와 연구기한의 제한으로 대상자의 수가 작고 양파 투여기간이 짧아 통계적으로 유의한 결과를 도출하지 못하였을 가능성이 있을 것으로 사료된다. 그러므로 양파의 효능을 과학적으로 입증하기 위하여 향후 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

제 2 절 활용계획

본 연구에서는 심혈관 기능 개선에 효과적인 양파 품종을 선발하였고, 탁월한 기능개선 효과를 나타내는 유효성분을 확인하였다. 따라서 상기(제 1절)에서 언급한 양파의 유효성분인 황화합물의 순수분리동정 및 대량 추출공정 기술이 확보된다면 본 연구과제 수행을 통하여 심혈관 기능 개선 효과가 검증된 양파의 성분을 기능성 식품소재로 이용할 수 있으며 양파를 건강식품으로서의 효능을 홍보하기 위한 자료로서 적극적으로 활용 가능할 것으로 보인다. 또한 기존 양파와 같은 원예작물이 건강에 유익하다는 속설을 과학적으로 입증함으로써 새로운 영역에 대한 학문발전의 기여가 기대되면, 국내에서 육성되는 양파 품종들 간의 ACSOs 성분 함량 비교와 동물실험의 심혈관 기능 개선 효과를 검증 후 국외 유명 SCI논문 게재할 예정이다.

제 3 절 본 연구과제를 통해 얻어진 연구실적

1. 학술지 투고

- ▶ 양파의 알코올 추출물이 고콜레스테롤혈증 환자의 지질 성상에 미치는 영향. 한국영양학회 (논문 투고 중) ◻첨부자료 (p82~p94) 참조
- ▶ Cardioprotective effect of onion (*Allium cepa*) through inhibition of oxidative stress and mitochondrial death pathway. *J. Nutr.* (논문 투고 중) ◻첨부자료 (p95~p117) 참조

2. 학술대회 발표

- ▶ Cardioprotective effect of onion extracts against ischemic injury. 제 12회 기초의학학술대회 (2004).
- ▶ Propylcystein sulfoxide(PCSO), a major sulfur compound of onion, screened by PPAR γ ligand-screening system and its functional study. 한국생화학분자생물학회 (2005).
- ▶ 양파의 알코올 추출물이 지질성상에 미치는 영향. 한국영양학회 (2005).
- ▶ Cardioprotective effect of onion extract against apoptotic death induced by ischemia in vitro and in vivo. 제 14회 기초의학 학술대회 (2006).

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재 *Allium*속 식물에 관한 연구는 상당히 진행되어있는 상태이다. 최근 보고된 *Allium*속 식물에 함유된 물질들의 생리적 유용성에 대한 연구결과에 따르면 마늘 및 양파를 중심으로 항균작용, 항산화 활성, 혈당치 감소 작용, 항혈전 활성, 암세포 치사활성, 혈압조절작용, 항산화 작용(Chun 등, 1986)등에 효능이 있는 것으로 보고되고 있다.

본 연구과제인 심혈관 질환과 관련된 연구로는 1993년 독일에서 발표된 연구결과로 마늘이 심혈관 질환 예방에 효과가 있다는 보고가 있다. 이 보고에서는 허혈/재관류 유도에 의해 기능이 약화된 흰쥐의 적출 심장은 마늘 처리에 의해 정상과 비슷한 수준의 기능이 나타났고, 이러한 보호효과에 항산화 작용이 관여하고 있음을 처음으로 제시하였다. 뿐만 아니라 여러 채소류 중에서 마늘은 가장 강한 항산화력을 가지고 있다는 연구결과가 발표되었으며, 마늘 특유의 유효화합물은 활성산소 제거활성이 강하고, 항산화효소의 글루타치온 퍼옥시다제의 활성화에 필요한 셀렌을 많이 함유하는 등, 마늘에는 항산화력을 높이는 성분이 풍부하게 들어있다고 알려졌으며, 마늘의 섭취는 수용성과 지용성의 항산화물질을 높은 활성으로 섭취할 수 있다고 보고되었다.

인도의 과학자들은 허혈/재관류에 의한 심근경색 동물 모델에서 경색 영역이 증가하는 것과 항산화효소가 감소한다는 것을 관찰하였다. 이러한 허혈/재관류 손상은 마늘 처리에 의해 억제되었으며, 항산화효소의 유의적인 증가를 통해 마늘에 의한 심근경색 억제 효과는 항산화작용이 크게 관여하고 있음이 시사되었다.

마늘과 비슷한 구조의 *Allium*속 식물인 양파에 의한 심혈관 질환 개선 작용기전으로 마늘과 마찬가지로 항산화 작용을 손꼽을 수 있다. 1999년 일본 과학자들은 동맥경화에 의한 산화적 스트레스가 양파에 의해 억제되었으며, 이 때 글루타치온의 양이 증가한다고 보고하였다.

이 밖에도 양파를 이용하여 심혈관 질환과 관련된 연구성과를 보이는 논문은 다수 있지만, 양파의 어떤 성분에 의한 것 인가는 아직 정확하게 밝혀져 있지 않은 실정이다. 그러므로 본 과제의 연구결과인 양파의 특정 성분이 심혈관 질환 개선에 탁월한 효과가 있다는 것으로써 양파의 성분을 기능성 식품소재로 이용할 수 있으며 국민의 식생활화 개선과 보건향상에 기여할 수 있을 것으로 기대한다.

제 7 장 참고문헌

- Block E. 1986. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic. *J. Am. Soc.* 108:1945.
- Block E. 1992. The organosulfur chemistry of the genus *allium*-Implications for the organic chemistry of sulfur. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 31:1135-1178.
- Block, E., S. Naganathan, D. Putnam and S-H Zhao. 1992. *Allium* chemistry: HPLC analysis of thiosulfinates from onion, garlic, wild garlic (ramsoms), leek, scallion, shallot, elephant (great headed) garlic, chive and Chinese chive. Uniquely high allyl to methyl ratios in some garlic samples. *J Agric Food Chem.*, **40**, 2418-2430.
- Block, E., D. Putnam and S-H Zhao. 1992. *Allium* chemistry: GC-MS analysis of thiosulfinates and related compounds from onion, leek, scallion, shallot, chive and Chinese chive. *J Agric Food Chem.*, **40**, 2431-2438.
- Cunico, R. A.G. Mayer, C.T. Wehr and T.L. Sheehan. 1986. High sensitivity amino acid analysis using a novel automated precolumn derivatization system. *BioChromatography*, **1**, 6-14.
- David J. T. and Kirk L. P. 1994. Quantification of Alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in *Alliums* by high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 42(8):1632-1638.
- Freeman, C.G. and R.J. Whenham. 1976. Thiopropanol S-oxide, alk(en)yl

thiosulfinates and thiosulfonates: simulation of flavour components of *Allium* species. *Phytochemistry*, **15**, 187-190.

Freeman, C.G. and R.J. Whenham. 1976. Synthetic alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides-allinase fission products: simulation of flavour components of *Allium* species. *Phytochemistry*, **15**, 521-523.

Freeman, C.G. and R.J. Whenham. 1975. A survey of volatile components of some *Allium* species in terms of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides present as flavour precursors. *J Sci Food Agric.*, **26**, 1869-1886.

Granroth, B. 1968. Separation of *Allium* sulfur amino acids and peptides by thin-layer electrophoresis and thin-layer chromatography. *Acta Chem Scand.*, **22**, 3333-3335.

Gustine, D.L. 1985. Determination of S-methyl cysteine sulfoxide in Brassica extracts by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, **319**, 450-453.

Kang, J.A. and J.S, Kang. 1997. Effect of garlic and onion on plasma and liver cholesterol and triacylglycerol and platelet aggregation in rats fed basal or cholesterol supplemented diets. *J Kor Nutr Soc.*, **30**, 132-138.

I. Krest, J. Glodek and M. Keusgen. 2000. Cysteine sulfoxides and alliinase activity of Some *Allium* species. *J. Agric. Food Chem.* 48(8):3753-3760.

Kim E. S., Chun H. J., Kim B. K. and Rhee K. C. 1997. Garlic and cancer prevention. *J. Food Sci. Nutr.* 2:180-190.

- Kim, H.J. and H.S. Chun. 1999. Biological functions of organosulfur compounds in *Allium* vegetables. *J Kor Soc Food Sci Nutr.*, **28**, 1412-1423.
- Kim O. M., Kim M. K., Lee S. O., Kee K. R. and Kim S. D. 1998. Antimicrobial effect of ethanol extracts from spices against *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* isolated from *kimchi*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 27:455-460.
- Kim Y. S., Park K. S., Kyung K. H., Shim S. T. and Kim H. K. 1996. Antibacterial activity of garlic extract against *Escherichia coli*. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 28:730-735.
- Lancaster, J.E. and M.J. Boland. 1990. Flavor Biochemistry. In *Onions and Allied Crops, vol. 3, Biochemistry, Food Science, and Minor Crops*; JL Brewster, HD Rabinowitch eds.; CRC Press: Boca Raton, FL, pp 33-72.
- Lancaster, J.E. and K.E. Kelly. 1983. Quantitative analysis of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides in onion (*Allium cepa* L.). *J Sci Food Agric.*, **34**, 1229-1235.
- Leighton T., Ginther C., Fluss L., Harter W. K., Candado J. and Nortario V. 1992. *Molecular characterization of Quercetin and Quercetin Glycosides in Allium Vegetables, Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health II*. ACS. Washington D. C. p220-221.
- Lim S. W. and Kim T. H. 1997. Physiological activity of alliin and ethanol extracts from Korean garlic(*Allium sativum* L.). *Kor. J. Food Sci. Technol.* 29:348-354.

Matikkala, E.J. and A.I. Vertanen. 1967. On the quantitative determination of the amino acids and γ -glutamylpeptides of onion. *Acta Chem Scand.*, **13**, 2891-2893.

Matikkala, E.J. and A.I. Vertanen. 1959. The isolation of S-methylcysteine-sulphoxide and S-n-propylcysteine sulphoxide from onion (*Allium cepa*) and the antibiotic activity of crushed onion. *Acta Chem Scand.*, **13**, 1898-1900.

Mun S. I., Ryu H. S., Lee H. J. and Choi J. S. 1994. Further screening for antioxidant activity of vegetable plants and its active principles from *Zanthoxylum schinifolium*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23:466-471.

Nakata, C., T. Nakata and A. Hishikawa. 1970. An improved colorimetric determination of thiosulfinate. *Anal Biochem.*, **37**, 92-97.

Ra K. S., Chung S. H., Suh H. J. Son J. Y. and Lee H. K. 1998. Inhibitor of Xanthine Oxidase from Onion Skin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30:697-701.

Saghir, A.R. L.K. Mann, R.A. Bernhard and J.V. Jacobson. 1964. Determination of aliphatic mono- and disulfides in *Allium* by gas chromatography and their distribution in common food species. *Proc Am Soc Hortic Sci.*, **84**, 386-398.

Schwimmer, S. and D.G. Guadagni. 1962. Relationship between olfactory threshold concentration and pyruvic acid content of onion juice. *J Food Sci.*, **27**, 94-97.

Seo, D.C. S.M. Chung and J.Y. Lee. 1996. Effect of oriental onion (*Allium*

fistulosum) on platelet aggregation. *J Food Hyg Safety*, **11**, 273-276.

Thomas, D.J., K.L. Parkin and P.W. Simon. 1992. Development of a simple pungency indicator test for onions. *J Sci Food Agric.*, **56**, 499-504.

Thomas, D.J. and K.L. Parkin. 1994. Quantification of S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxides and related amino acids in alliums by high-performance liquid chromatography. *J Agric Food Chem.*, **42**, 1632-1638.

Tokimoto, Y and A. Kobayashi. 1992. Isolation of the volatile components of fresh onion by thermal desorption cold trap capillary gas chromatography. *Biosci Biotechnol Biochem.*, **56**, 1865-1866.

Yagami M., Kawakishi S. and Namiki M. 1980. Identification of intermediates in the formation of onion flavour. *Agr. Biol. Chem.* 44:2533-2538.

Ziegler S. J. and Sticher O. 1989. HPLC of s-alk(en)yl-L-cystine derivatives in garlic including quantitative determination of (+)-s-allyl-L-cystine sulfoxide (alliin). *Plants Medica.* 55:372-378.

첨 부

본 연구과제를 통해 얻어진 연구실적
(학술지 투고)

1. 양파의 알코올 추출물이 고콜레스테롤혈증 환자의 지질 성상에 미치는 영향. 한국영양학회지 (논문 투고 중) ----- 82
2. Cardioprotective effect of onion (*Allium cepa*) through inhibition of oxidative stress and mitochondrial death pathway. *J. Nutr.* (논문 투고 중) ----- 95

1. 양파의 알코올 추출물이 고콜레스테롤혈증 환자의 지질 성상에 미치는 영향

남경희*, 정효지*[§], 백현욱**, 최태운***

서울대학교 보건대학원*, 분당제생병원**, 순천향대학병원***

Effects of ethanol extract of onion on the lipid profiles in patients with hypercholesterolemia

Nam, Kyung Hui* · Jung, Hyo Jee*[§] · Baik Hyun Wook** · Choi Tae Youn***

School of public health*, Seoul National University, Seoul 110-460, Korea

Department of Gastroenterology, Boondang Jaesaeng General Hospital, Seongnam 463-774, Korea**

Soonchunhyang University Hospital and Soonchunhyang University College of Medicine³, Seoul, Korea***

Abstract

It is known as that onion has positive biological functions such as increasing antioxidative and antibiotic capacity and decreasing blood pressure and serum cholesterol levels. This study was carried out to investigate that ethanol extracts of onion enhances blood lipid profiles in patients with hypercholesterolemia. Subjects were 43 adults with hypercholesterolemia and randomly divided into 2 groups (control group: 25, treated group: 18). Control group was offered to take placebo for 4 weeks, and treated group was offered to consume ethanol extracts of onion for 8 weeks. There were no differences in sex, age, body mass index(BMI) and educational levels between groups before treatment. After 8weeks of onion extract consumption, plasma triglycerides level was significantly decreased in treated group compared to control($p < 0.05$). Total cholesterol level was tended to decrease in treated group, but there was no significant difference between control and treated group. Plasma glucose, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol after onion extract consumption were not changed significantly after onion extract

consumption. In summary, alcohol extract of onion may have a positive effect on the lipid profiles of hypercholesterolemia patients through decreasing plasma triglyceride concentration.

Key words: onion, alcohol extract, hypercholesterolemia

서 론

우리나라는 1970년대 이후 지속적인 경제성장과 국민 소득의 증가로 인해 식물성 식품의 섭취량은 감소한 반면 동물성 식품의 섭취량은 크게 증가하였고¹⁾, 식생활이 점차 서구화 되어가면서 동맥경화증이나 고혈압 등의 심혈관 질환에 관계되는 성인병 질환의 발병률이 급격히 증가하고 있다. 한국인의 2004년 사인 중 심장순환기계 질환으로 인한 사망률이 십만 명당 120.4명으로 악성 신생물과 함께 사망 원인의 수위를 차지하고 있으며²⁾ 특히 허혈성심질환에 의한 사망률은 1995년 10만 명당 13.5명이었던 것이 2000년에는 21.5명, 2004년에는 26.3명으로, 최근 10년 사이에 2배정도의 증가를 보이고 있다^{1,3)}. 병적인 상태나 여러 가지 위험 인자들 등의 존재하에서는 혈관 내피 기능의 이상이 초래되는데 혈관 내피 기능 이상은 혈관 수축반응이나 혈소판과 단핵구의 부착과 혈관 평활근 세포의 증식과 이주를 증가시켜 동맥경화증을 심화시킨다. 결국 혈관이 막히거나 파열되어 혈류가 급속히 감소하게 되고, 혈류가 감소된 부위의 조직 세포들은 산소 및 영양 공급을 받지 못하므로 죽게 되므로, 이러한 현상이 심장 또는 뇌 부위에서 나타나는 경우에는 결국 심근 경색 또는 뇌졸중과 같은 심각한 질병이 초래되며 사망에까지 이르게 된다⁴⁾. 이와 같이 삶의 질을 저하시키고 심지어 사망에까지 이르게 하는 심혈관 질환을 경감시키고 사전에 예방하기 위한 방법으로서 혈관 기능의 향상 및 혈류의 유지가 매우 중요하다.

현재까지 우리나라의 식사패턴은 당질의 섭취량은 많고 지방의 섭취량은 적어 고지혈증 중에서도 고중성지방혈증이 많은 것으로 나타났으나^{5,6)} 최근에는 식생활의 서구화, 육류와 가공식품의 섭취증가로 고콜레스테롤혈증인 사람의 비율이 증가하는 추세라고 한다^{7,8)}. 따라서 고콜레스테롤혈증 등 각종 성인병에 예방 가능한 다양한 활성 물질을 함유하고 있는 식품에 대한 연구는 기능성 식품으로의 이용가능성 측면에서도 그 의미가 크다고 하겠다.

우리나라의 대표적인 향신료 중의 하나인 양파(*Allium cepa* L.)는 백합과에 속하는 다년초로서 동양에서는 해열, 구충, 해독, 장염 증풍 치료 등의 한약제로 널리 사용되어 왔으며⁹⁾, 양파를 장기간 섭취하게 되면 혈중 콜레스테롤과 지방함량을 저하시켜 동맥경화나 고혈압에 효과가 있는 것으로 알려져 있다^{10,11,12,13)}. 역학 조사에 의하면 양파와 마늘 같은 *Allium* 속 식품의 섭취는 심혈관계 질환 억제에 강력한 식이 인자로 논의되고 있다¹⁴⁾. 양파는 quercetin, isorhamnetin, kaempferol, rutin 과 같은 flavonoids가 풍부한 식품으로 알려져 있는데⁴⁾

flavonoids는 항산화 미량 영양소 중의 하나로 지질 및 저밀도 지단백의 산화억제 효과 뿐 아니라 항동맥경화, 항미생물, 항돌연변이, 항암 및 각종 항종양효과 등의 다양한 생리 활성을 갖고 있다¹⁵⁻¹⁷⁾. 이러한 양과의 효과는 thromboxane의 생성을 감소시켜 혈소판 응집을 억제하기 때문인 것으로 밝혀졌으며, 혈장의 유동성이 낮아진 대상자의 경우 더욱 효과적인 것으로 확인되었다²¹⁾.

국내에서도 양과에 대한 연구논문은 비교적 많이 발표되었으나 대부분 양과의 저장성, 양과 추출물에 대한 성분 분석연구 또는 동물 실험이 대부분이었으며^{18,19,20,22,23,25)}, 사람을 대상으로 한 양과의 추출 및 조리 형태에 따른 혈중 콜레스테롤과 지방함량의 감소효과에 대한 연구는 미진한 편이다²⁴⁾.

따라서

본 연구는 임상시험연구를 통하여 국산 양과의 알코올 추출물 섭취가 이상지혈증 환자들의 지질성상에 미치는 영향을 알아봄으로써 이상지혈증 환자를 위한 식생활 지침의 기초 자료를 마련하고자 실시되었다.

연구내용 및 방법

1. 연구대상자

본 연구는 경기도 소재 병원의 건강검진 대상자 중에서 고 콜레스테롤혈증(콜레스테롤 220mg/dl 이상)인 환자 66명을 대상으로 2005년 1월부터 2005년 4월까지 시행하였다. 연구 대상인 고 콜레스테롤혈증 환자는 연구 참여에 대한 사전 동의를 작성하였고, 성과 연령을 고려한 후 양과의 알코올 추출물 섭취군과 대조군으로 나누어 무작위 할당하였다.

2. 임상시험연구의 진행

본 연구에 사용한 양과 추출물은 국내에서 유통되는 양과(터보)를 겉껍질을 제거하고 속껍질은 그대로 둔 채 세척한 후 알코올(60%)을 동량 첨가하여 일정한 압력(1-2 kg/cm²)과 온도(85-95°C)에서 12시간 추출하여 제조하였다. 알코올을 휘발한 후 양과 1개(250g)에 해당하는 양을 파우치 1팩(100ml)에 포장하여 액상 제품을 만들었으며, 양과의 위액(placebo)은 텍스트린과 계피를 이용하여 양과 추출물과 색, 탁도, 농도, 분량 등이 유사한 제품을 제조하였다. 양과섭취군은 하루에 양과 2개(500g)에 해당하는 분량(2팩)을 8주간 복용하게 하였고, 대조군은 4주간 위액을 복용하게 하였으며, 1주일에 한 번씩 전화 상담을 통해 복용여부를 확인

하였다.

효과평가를 위하여 양과추출물과 위액을 복용하기 전과 4주, 8주 후에 면접 설문 조사, 신체계측, 혈액 검사를 실시하였다. 훈련된 조사자와 1:1 면담을 통해 대상자의 일반적 특성, 사회인구학적 특성(교육수준 및 직업), 생활 습관과 질병력(음주, 흡연, 운동 및 병력), 양과 섭취 선호도를 조사하였다. 신체계측조사는 아침 공복 시 얇은 옷을 착용한 상태로 Inbody 4.0(Biospace Co. Ltd, Seoul, Korea)을 이용하여 신장, 체중, 체지방을 측정하였고, 신장과 체중 값으로부터 BMI(Body Mass Index, kg/m²)를 산출하였으며, 편안한 상태에서 혈압을 측정하였다. 혈액의 지질 성상을 분석하기 위하여 15ml 의 12시간 공복 혈액을 채취한 후 혈장을 분리하여 분석시까지 -70°C에 보관하였다. 혈장 중의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지방은 자동분석기(Hitachi 7600, Hitachi)를 이용하였고, LDL-콜레스테롤은 Friedwald 식(=총콜레스테롤-(고밀도지단백+중성지방/5)으로 계산하였다.

3. 자료의 처리 및 분석

양과 추출물 혹은 위액 복용이 70%이하인 사람을 제외하고 양과섭취군 18명(52%)과 위액군 25명(76%)을 분석에 이용하였고, 모든 자료는 SAS program(version 8.2)을 이용하여 분석하였다. 일반사항 분석은 T-test와 Chi-square test를 실시하였으며, 양과섭취 전과 섭취 후의 변화는 대응표본 T 검정(Paired t-test)을 실시하여 유의성을 검정하였다. 각 군간의 변화량의 차이는 일반선형모형(GLM)을 사용하여 분석하였다.

연구결과 및 고찰

1. 일반 사항

조사 대상자의 일반사항은 <Table 1>에 제시하였다. 본 연구 대상자들의 평균 연령은 대조군 48.2±5.2세, 양파섭취군 45.4±5.9세였으며, 이들의 평균 신장은 각각 163.9±9.1 cm, 163.4±7.1 cm 이었다. 평균 체중은 대조군 69.8±10.4kg, 양파섭취군 68.1±9.6kg 으로 전국 평균 신장에 비해 체중이 더 높게 나타나²⁶⁾ 평균 BMI가 각각 25.8±2.4kg/m², 25.5±2.7kg/m²로 과체중 범위에 속하였다. 혈당은 평균 90.7±19.2mg/dl, 88.7±11.2mg/dl 이었으며, 수축기 혈압은 126.1±14.5 mmHg, 124.4±15.9mmHg, 확장기 혈압은 79.9±9.4mmHg, 78.5±11.5mmHg로 두 그룹 모두 정상 범위에 속하였다. 조사 대상자의 교육 수준은 대졸자의 비율이 가장 높았으며 두 그룹간의 차이는 없었다.

Table 1. General characteristics and body composition

	CONTROL N=25	TREATED ²⁾ N=18	P ³⁾
AGE (yrs)	48.22 ± 5.24 ¹⁾	45.43 ± 5.90	
Height (cm)	163.86 ± 9.09	163.38 ± 7.05	
Weight (kg)	69.84 ± 10.35	68.11 ± 9.58	
BMI ⁵⁾ (kg/m ²)	25.76 ± 2.38	25.47 ± 2.74	NS
Glucose (mg/dl)	90.68 ± 19.20	88.67 ± 11.18	
S.B.P ⁶⁾ (mmHg)	126.13 ± 14.46	124.44 ± 15.91	
D.B.P ⁷⁾ (mmHg)	79.87 ± 9.37	78.50 ± 11.51	
GENDER (%)			χ ² 4)
MALE	60.00	55.56	0.7707
Educational level (%)			
No school	0.0	0.0	
Elementary	4.0	0.0	
Middle school	12.0	11.1	0.7444
High school	24.0	16.7	
College	60.0	72.2	

1) Values are mean ± SD
2) Treated is onion offered group
3) P from t-test, NS: Not significant (p<0.05)
4) Chi-square test
5) BMI: Body Mass Index
6) S.B.P: Systolic Blood Pressure, 7) D.B.P: Diastolic Blood Pressure

2. 양파 추출물 섭취에 따른 대상자의 혈액성상의 변화

양파 추출물 섭취에 따른 혈액성상의 변화는 <Table 2>에 나타내었다. 혈장 중성지방은 양파 섭취군에서 섭취 전 176.3 ± 70.4 mg/dl 였으나 섭취 후 136.3 ± 51.3 mg/dl 으로 유의적인 감소를 보여주었으며($p < 0.05$), 대조군과 비교하였을 때도 유의적인 차이가 있었다($p < 0.05$). 이러한 결과는 황금희 등²⁴⁾의 연구에서도 양파 농축액 급여 1개월 후부터 혈장 중성 지방의 유의적 감소 효과를 보았던 보고와도 일치하는 결과이며, 쥐를 이용한 양파의 에탄올 추출물의 연구에서 혈장 중성지방이 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타낸 결과와도 일치한다²⁵⁾. 양파 추출물 섭취 후의 중성지방 농도 136.3 ± 51.3 g/dl은 고지혈증군에서의 전국 표준치²⁷⁾ 272.1 ± 20.4 g/dl 에 비교하였을 때 더 낮았다. 양파를 이용한 건분, 에탄올 추출물, 즙을 쥐에게 투여하였을 때 혈장의 총 지방농도 및 중성지방, 총 콜레스테롤에서 모든 실험군이 대조군보다 유의하게 감소하는 경향을 나타내었다³¹⁾. 특히 양파 에탄올 추출물군에서 중성지방과 총콜레스테롤을 가장 낮추는 것으로 보고되었다.

또한 총 콜레스테롤은 양파 섭취군에서 260.6 ± 61.6 mg/dl 이었다가 양파추출물 섭취 후 248.9 ± 25.2 로 유의적이지는 않지만 감소하는 경향을 보였다. 황금희 등²⁴⁾의 연구에서는 양파 농축액 섭취 후 8주까지는 유의성이 없이 농도만 낮아졌으나 12주에 유의적으로 낮아져 그 효과를 확인할 수 있었다는 보고가 있었으며, 동물 실험에서는 양파를 첨가한 고지방 섭취한 쥐의 혈청 콜레스테롤이 유의하게 감소하였다는 보고가 있었다²⁵⁾. Sheo와 Jung의 연구³²⁾에 따르면 식이의 10%에 해당하는 양파즙의 섭취가 지방섭취로 인한 혈중 중성지방과 콜레스테롤 농도의 증가를 효과적으로 낮춘다고 보고하였으며, Kang과 Kang의 연구¹⁸⁾에서도 양파 건분의 첨가식이 혈중 중성지방을 감소시키고 콜레스테롤 식이로 인한 혈중 콜레스테롤 농도의 증가를 억제한다고 밝히고 있어 본 연구와 일치된 결과를 보여준다. 또한 An과 Kim의 연구에서는 양파 에탄올 추출물군이 건분군보다 식이섬유질과 총 flavonoids의 함량이 낮음에도 불구하고 혈장과 간의 총지방, 중성지방, 총콜레스테롤의 농도저하에 있어서 그 효과가 가장 높게 나타나는 것은 식이섬유질 뿐 아니라 에탄올에 녹는 quercetin, kaempferol 등의 flavonoids에 의한 효과라고 보고하고 있다³¹⁾. Flavonoids는 그 화학구조에 따라 용해되는 용매와 정도가 달라지는데³⁴⁾, 양파 flavonoids의 80%이상을 차지한다고 알려져 있는 quercetin은 alcohol, glacial acetic acid에는 녹으나 물에는 거의 녹지 않으며, kaempferol은 물이나 뜨거운 alcohol, ether 또는 alkalies에 녹는다고 보고되어 있다^{33,35,36)}. 이로써 양파의 알코올 추출물군이 높은 체내 지방저하효과를 보인 것

이 설명될 수 있겠다.

HDL-콜레스테롤의 경우 양과 섭취군에서는 HDL-콜레스테롤이 변화가 없었으나 대조군에서는 섭취 전 55.1 ± 14.3 mg/dl, 섭취 후 52.0 ± 12.4 mg/dl 로 유의적인 감소가 있었으므로 ($p < 0.05$), 두 그룹간에 유의한 차이를 나타내었다 ($p < 0.05$). 본 연구의 양과 섭취군에서의 HDL-콜레스테롤 농도에 변화가 없었는데, 이는 고콜레스테롤 식이를 먹인 쥐에 있어 3% 양과 가루가 HDL-콜레스테롤 농도에 변화를 주지 못했다는 보고¹⁸⁾와 일치한다. 평균 LDL-콜레스테롤 농도는 대조군에서 167.7 ± 25.9 mg/dl, 167.1 ± 35.3 mg/dl로 별다른 차이가 없었으나 양과 섭취군에서는 170.4 ± 28.9 mg/dl, 166.2 ± 26.0 mg/dl 로 유의적이지는 않으나 감소하는 경향을 나타내었다. 황금희 등²⁴⁾의 연구에서는 LDL-콜레스테롤 농도가 양과 농축액을 12주간 섭취한 후 유의적으로 감소한 것으로 나타나 본 조사와 유사한 결과를 보고하였다

간기능을 측정하는 혈장 AST 농도는 대조군에서 26.8 ± 6.5 U/L에서 26.1 ± 10.0 U/L, 양과섭취군에서 27.6 ± 10.8 U/L, 26.7 ± 20.9 U/L로 양과 섭취에 의한 저하 효과가 없었고 정상 범위(40 U/L)에 있었으며, 혈장 ALT 농도도 두 군 모두 섭취 전과 후에 차이가 없었고 정상 범위(35 U/L)에 속하였다. 이는 양과 농축액을 섭취한 고지혈증 성인 남자의 연구²⁴⁾와도 일치하는 결과였다. 체중, BMI, 혈압, 혈당 등은 양과추출물의 섭취 전 후에 유의한 차이가 없었으며 이는 황금희 등²⁴⁾의 결과와도 일치하므로 양과의 섭취가 영향을 미치지 않는 것으로 볼 수 있다.

본 연구결과를 요약하면 양과의 알코올 추출물을 2개월간 섭취하였을 때 혈액 지질 성상 특히 중성지방 농도를 유의하게 감소시키는 효과가 있었고, 총 콜레스테롤도 감소시키는 경향이 있었으며, 혈당, 혈압, 비만도에는 영향이 없었다. 이는 우리나라의 이상지혈증 중 많은 비중을 차지하는 고중성지방혈증에 대한 개선 가능성을 제시하는 흥미로운 결과라고 할 수 있다. 특히 혈장 지질 성상의 변화가 본인의 식생활을 그대로 유지하면서 양과추출물을 추가로 섭취하여 낮아진 효과임을 감안할 때 의의가 크다 할 수 있겠다. 또한 혈장지질농도는 생활 습관의 변화나 체중 감소를 병행하면 지질 저하 정도가 더 효과적이라 보고^{28,29,30)}되고 있는 바, 본 연구의 이상지혈증 대상자의 상당수가 비만한 경향을 보이고 있는 점을 고려해 볼 때, 양과 추출물 섭취의 내용에 추가하여 체중 감량이 이루어지도록 식사요법 및 운동 요법을 시도해 본다면 더욱 큰 효과를 얻을 수 있을 것으로 예상된다.

그러나 본 연구는 실험군이 18명의 작은 규모로 수행되었고, 양과 추출물의 섭취기간이 8주밖에 되지 않기 때문에 알콜성 양과 추출물의 지질 개선효과를 충

분히 검토하지 못하였고, 양파의 섭취량에 따른 양-반응관계를 실험하지 못함으로 적절 한 섭취량이나 섭취기간을 제시하지 못하는 제한점이 있다.

Table 2. Changes of serum lipid profiles after onion consumption

	CONTROL (N=25)			TREATED (N=18)			p ³⁾
	Baseline	4 Weeks	diff-p ²⁾	Baseline	8 Weeks	diff-p	
AST ⁴⁾ (IU/L)	26.84 ± 6.50	26.12 ± 10.00	0.712	27.56 ± 10.82	26.67 ± 20.89	0.789	0.963
ALT ⁵⁾ (IU/L)	28.36 ± 14.01	32.24 ± 21.01	0.308	28.78 ± 15.55	25.94 ± 24.86	0.434	0.214
TC ⁶⁾ (mg/dL)	174.20 ± 118.98 ¹⁾	195.60 ± 136.58	0.352	176.33 ± 70.381	136.33 ± 51.284	0.002	0.004
T-Chol ⁷⁾ (mg/dL)	257.68 ± 26.19	258.20 ± 36.49	0.792	260.56 ± 61.577	248.94 ± 25.187	0.121	0.312
HDL-C ⁸⁾ (mg/dL)	55.12 ± 14.34	52.00 ± 12.17	0.045	54.889 ± 11.251	55.444 ± 11.205	0.604	0.048
LDL-C ⁹⁾ (mg/dL)	167.72 ± 25.92	167.08 ± 35.32	0.863	170.4 ± 28.92	166.23 ± 26.031	0.476	0.710
Glucose (mg/dL)	98.61 ± 19.20	92.16 ± 15.65	0.448	88.667 ± 11.178	87.222 ± 13.649	0.652	0.404
Weight (kg)	69.84 ± 10.35	68.98 ± 11.65	0.712	68.106 ± 9.5826	68.078 ± 9.4772	0.924	0.787
BMI ¹⁰⁾ (kg/m ²)	25.76 ± 2.38	25.61 ± 3.05	0.679	25.457 ± 2.7423	24.124 ± 2.6509	0.891	0.662
S.B.P ¹¹⁾ (mmHg)	126.13 ± 14.46	125.52 ± 11.24	0.513	124.44 ± 15.909	121.06 ± 12.637	0.220	0.214
D.B.P ¹²⁾ (mmHg)	79.87 ± 9.37	80.88 ± 8.36	0.503	78.5 ± 11.506	78.611 ± 10.511	0.959	0.171

1) Mean ± S.D

2) diff-P from Paired t-test

3) P from Gln test between baseline and after in control and treated

4) AST: Aspartic acid transaminase, 5) ALT: Alanine transaminase

6) TG: Triglyceride, 7) T-Chol: Total-Cholesterol, 8) HDL-C: HDL-Cholesterol, 9) LDL-C: LDL-Cholesterol,

10) BMI: Body Mass Index, 11) S.B.P: Systolic Blood Pressure, 12) D.B.P: Diastolic Blood Pressure

요약 및 결론

본 연구는 양파의 알코올 추출물이 우리나라 이상지혈증 환자의 혈중 지질 성상에 미치는 영향을 파악하기 위해 실행되었다.

1) 본 연구의 대상자는 경기도 소재 병원의 건강검진 대상자 중 이상지혈증(콜레스테롤 220mg/dl 이상)인 환자 66명으로 양파섭취군과 대조군으로 나누어 2005년 1월부터 2005년 4월까지 시행하였다.

2) 양파추출물은 알코올을 이용하여 양파 1개(250g)에 해당하는 양을 파우치 1팩(100g)에 포장하여 액상 제품을 만들었으며, 양파의 위액(placebo)은 텍스트린과 계피를 이용하여 양파 추출물과 색, 탁도, 농도, 분량 등이 유사한 제품을 제조하였다. 하루에 양파 2개(500g)에 해당하는 분량(2팩)을 4주-8주간 복용하게 하였으며, 1주마다 전화 상담을 통해 복용여부를 확인하였다.

3) 양파추출물을 복용하기 전과 4주, 8주 후에 면접 설문조사, 신체계측, 혈액검사를 실시하였으며, 혈액 검사는 혈장 중의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지방 등을 분석하였다.

4) 양파섭취군과 대조군간의 모든 일반적 특성과 신체계측치는 유의한 차이가 없었다.

5) 양파추출물 섭취 전과 후 양파섭취군과 대조군의 혈액 지질 성상을 비교한 결과 혈중 중성지방은 양파섭취군에서 섭취 후 유의적인 감소를 보여주었으며($p < 0.05$), 대조군과 비교하였을 때도 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$).

5)총 콜레스테롤은 양파섭취군에서 감소경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었으며, HDL-콜레스테롤의 경우 양파 섭취군의 변화가 없었으나 대조군에서 유의한 감소가 있어서서($p < 0.05$) 두 군간에 유의적인 차이를 나타내었다($p < 0.05$).

이상을 종합할 때 본 연구 결과 양파의 알코올 추출물 섭취는 고콜레스테롤혈증 환자의 혈액 지질 성상을 개선하는 효과가 있는 것이 확인되었고, 본 연구결과는 고콜레스테롤 혈증 환자의 예방 및 관리를 위한 식사지침방안 마련에 기초자료로 이용될 수 있을 것이며, 연구결과의 일반화를 위한 확대연구가 필요하다고 사료된다.

Literature cited

1. Ministry of Health and Welfare. 1998 Yearbook of Health and nutrition

Statistics, 2000

2. Statistic Office. 2004 yearbook of Death Cause Statistics, 2005
3. 김정순 : 한국 허혈성심질환의 사망률 및 유병률과 그 위험요인, 한국지질학회지, 7. 91-99, 1997
4. 유형준. 혈관 노화와 질환. 혈관 노화 및 관련 질환 연구위원회. 대한 노인병학회, 2002
5. Lim SH, Baik IK, Lee HS, Lee YJ, Chung NS, Jho SY, Kim SS. Effects of the life style in patients with coronary artery disease on the serum lipid concentrations and atherosclerotic coronary lesion. *Korean J Lipidology* 5(1):71-83, 1995
6. Lee YC, Synn HA, Lee KY, Park YH, Lee CS. A study on concentrations of serum lipids and food & daily habit of healthy Korean adults. *Korean J Lipidology* 2(1):41-51, 1992
7. Cho SH and Choi YS. Dietary therapy of hyperlipidemia. *Korean J Lipidology* 4(2):109-117, 1994
8. Lee JS, Lee MH, Kwon TB, Ju JS, A study on the concentration of serum lipid and its related factors of persons over 40years old in Whachon area, Kang-won Do. *Korean J nutr* 29(9):1035-1041, 1996
9. Block E. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic. *J Am Soc* 108: 1045-1050, 1986
10. Sharma KK, Gupta RK, Gupta S. and Samuel KC. Antihyperglycemic effect of onion: Effect on fasting blood sugar and induced hyperglycemia in man. *Ind J Med Res*, 65, 422-429, 1977
11. Fenwick CR and Hanley AB. The genus Allium. Part I. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr*, 22, 199-271, 1985
12. Bordia T, Mohammed N, Thomson M, Ali M. An evaluation of garlic and onion as antithrombotic agents. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 54(3): 183-186, 1996
13. Ali M and Mohammad SY. Selective suppression of platelet thromboxane formation with sparing of vascular prostacyclin synthesis by aqueous extract of garlic in rabbits. *Prostaglandins Leukot Med*, 25: 139-145, 1986
14. Ali M, Thomon M, Afzal M. Garlic and onions: their effect on eicosanoids

- metabolism and its clinical relevance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 52(2): 55-73, 2000
15. Son JY, Son HS, Cho WD. Antioxident effect of onion skin extract. *Korean J Soc Food Sci* 14(1): 16-20, 1998
 16. Ston WL, Stewart ME, Nicholas C and Pavuluri S. Effects of dietary selenium and vitamin E on plasma lipoprotein cholesterol levels in male rats. *Ann Nutr Metab*, 30, 94, 1986
 17. Westrope KL, Miller RA and Wilson RB. Vitamin E in a rabbit model of endogeneous hypercholesterolemia and atherosclerosis. *Nutr Rep Int*, 25: 83, 1982
 18. Kang JA and Kang JS. Effect of garlic and onion on plasma and liver cholesterol and triacylglycerol and platelet aggregation in rats fed basal or cholesterol supplemented diets. *J Kor Nutr Soc*, 30: 132-138, 1997
 19. Kim HJ and Chun HS. Biological functions of organosulfur compounds in allium vegetables. *J Kor Soc Food Sci Nutr*, 28:1412-1423, 1999
 20. Ra KS, Suh HJ, Chung SH, Son JY. Antioxident activity of solvent extract from onion skin. *Korean J Food Sci Technol* 26(3):595-600, 1997
 21. Srivastava KC. Onion exerts antiaggregatory effects by altering arachidonic acid metabolism in platelets. *Prostaglandins Leukot Med*, 24:43-50, 1986
 22. Park PS, Lee BR, Lee MY. Effects of onion juice on ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in rats. *J Korean Soc Food Nutr*, 23(5): 750-756, 1994
 23. An BJ and Lee JT. Screening of biological activity for phenolic fraction from onion. *Korean J. Postharvest Sci Technol*, 9(2):224-230, 2001
 24. Hwang KH, Jung LH, Cho NC, Yoo YK, Park PS, Noh YH, Seo HS, Noh IO. The effect of concentrated onion juice in a body composition, serum electrolytes and lipids levels on hyperlipidemia. *Korean J. Food & Nutr*, 16(1):36-45, 2003
 25. Woo HS, An BJ, Bae JH, Kum S, Choi HJ, Han HS, Choi C. Effect of biologically active fractions from onion on physiological activity and lipid metabolism. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, 32(1): 119-123, 2003
 26. 한국영양학회 : 한국인 영양권장량 제 7차 개정, 2000

27. 고지혈증 치료지침 제정위원회 : 고지혈증 치료지침, 1996
28. Hwang KH, Heo YR, Lim HS : The Effects of Lowering Dietary Fat and Cholesterol on Hypercholesterolemic Men. *Korean J Nutrition*, 32(5):552-560, 1999
29. Dengel JL, Katzell LI and Goldgerg AP. Effect of an American Heart Association diet, with or without weight loss, on lipid in obese middle-aged and older men. *Am J Clin Nutr*, 62:715-721, 1995
30. Kim SJ, Choue, RW, Yim JG, Kim YS. Effects of Apo E polymorphisms and dietary counseling on the levels of plasma lipids in hyperlipidemic patients. *Korean J Nutrition* 31(9):1411-1421, 1998
31. An SJ, Kim MK. Effect of dry powders, ethanol extracts and juices of radish and onion on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J nutrition* 34(5):513-524, 2001
32. Sheo HJ, Jung DL. The effects of onion juice on serum lipid levels in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 25(6):1164-1172, 1997
33. Leighton T, Ginther C, Fluss L, Harter WL, Cansado J and Nortario V. Molecular characterization of quercetin and quercetin glycosides in allium vegetables phenolic Compounds in Food and Their Effects on HealthII, ACS. Washington, D.C. pp.221-229, 1992
34. Bravo L. Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutr Reviews* 56(11): 317-333, 1998
35. Bravo L, Abio R, Eastwood MA, Saura-calixto F. Degradation of polyphenols(catechin and tannic acid) in the rat intestinal tract. Effect on colonic fermentation and fecal output. *Bris Nutr* 71:933-946, 1994
36. Park YG. Flavonoids of Fruits. *Bulletin of Food Technology* 8(2):76-91, 1995

2. Cardioprotective effect of onion (*Allium cepa*) through inhibition of oxidative stress and mitochondrial death pathway

Sok Park, Mi-Young Kim, Jae Kyung Sim, Soo Hwan Lee, Eun Joo Baik, Chang-Hyun Moon, Se Won Park¹ and Yi-Sook Jung*

Department of Physiology, School of Medicine, Ajou University, Suwon 442-749,

¹Department of Biotechnology and Environmental Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

* To whom correspondence should be addressed:

Yi-Sook Jung, Ph.D.

Department of Physiology

School of Medicine Ajou University

#5 Woncheon-dong, Suwon 442-749, South Korea

ABSTRACT

In the present study, we investigated whether onion extract have cardioprotective effect against ischemic injury in heart-derived H9c2 cell culture system and rat myocardial infarct model in vivo, and if so, whether the beneficial effect of onion is attributed to its antioxidant property. In H9c2 cells, onion extract markedly elicited cardioprotective effect against hypoxia-induced apoptotic death, demonstrated by its inhibitory effect on hypoxia-induced caspase-3 activation and increase in TUNEL-positive cells. Onion extract also inhibited elevation of reactive oxygen species (ROS) generation during hypoxia, and blocked hypoxia-induced decrease in mitochondrial membrane potential and cytochrome c release.

In conclusion, the results from this study suggest that onion extract has a significant cardioprotective effect contributed to antioxidant activity and the signaling cascade of its antiapoptotic effect involves inhibition of mitochondria death pathways.

INTRODUCTION

Ischemic heart disease, a worldwide health problem, results from severe impairments of the coronary blood supply usually produced by thrombosis or atherosclerotic plaques (1). One of the major causes of the ischemic heart disease is known to be oxidative stress, which is caused by an imbalance between oxidants and antioxidant defenses. During myocardial ischemic injury, activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD) and catalase have been reported to decrease, and the generation of reactive oxygen species (ROS) is increased at the site of damage (2,3). Potential antioxidant therapy should, therefore, include either exogenous supplementation of natural antioxidant or augmentation of endogenous antioxidants.

Onion, a vegetable member of the genus *Allium*, is known to have a potential to scavenge ROS (4) and increase activities of antioxidant enzymes, such as SOD and catalase (5), suggesting a beneficial role of onion in ischemic heart disease. Indeed, rates of atherosclerosis or thrombotic disease were decreased in populations with increased onion intake (6). Consistent with these reports, we previously have demonstrated that onion extracts elicit anti-thrombotic effect through inhibition of arachidonic acid release and thromboxane A₂ synthase activity (7).

Under these considerations, we hypothesized that onion may play a protective role during myocardial ischemic injury. This study, therefore, investigated the effect of onion extract on ischemic injury in heart-derived H9c2 cells and *in vivo* rat myocardial infarct model.

METHODS

Cell culture and hypoxia system

Heart derived H9c2 cells were purchased from American Type Culture Collection (Rockville, MD) and cultured before experimentation in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 5.5 Mm glucose supplementation with 10% fetal bovine serum. For hypoxic challenges, H9c2 cells were transferred into an anaerobic chamber (Forma Scientific, Marietta, OH, USA) maintained at 37C with a humidified atmosphere of 5% CO₂, 10% H₂, and 85% N₂. In the anaerobic chamber, the culture medium was replaced with serum-free, glucose-free DMEM that had been saturated with N₂ gas for 1 h. Normoxic incubation of the cells in the serum-free DMEM was conducted in a water-jacked incubator gassed with 95% air and 5% CO₂ at 37C.

Onion extract treatments

In vitro, onion extract was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO), the final concentration of DMSO was 0.1%, and this concentration of DMSO was found to have no effect on H9c2 cell viability. H9c2 cells were treated with inhibitors 30 min before and during hypoxia. In vivo, Chronic oral administration in rats were administered orally 1 ml vehicle (0.9% NaCl) or various doses (0.1, 1.0 or 10 g/kg) of onion extract , daily from the day of operation till 14 days after. In intravenous study, onion extract was dissolved in saline (Sigma, USA) and administered intravenously by a single bolus injection (0.1, 1.0 or 10 g/kg) 30 min before th e LAD occlusion. The concentrations and durations of onion extract-treatment were chosen on the basis of preliminary studies (data not shown)

Lactate dehydrogenase (LDH) assay

To measure overall cell injury, we assayed the activity of LDH released into the medium 10 h after hypoxia insult as described previously (8), i.e., by spectrophotometric analysis at 340 nm

In situ terminal deoxynucleotidyl transferase UTP nick end labeling (TUNEL)

To examine the extent of apoptotic cell death, we performed TUNEL-staining after 8 h of hypoxia with a commercially available ApopTag Plus kit (Oncor, Gaithersburg, MD, USA). As described previously (9).

Caspase -3 activity assay

The cells were lysed with lysis buffer (10 mM Tris/HCl, 0.32 M Sucrose, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100, 1 g/ml aprotinin, 10 g/ml leupeptin, 5 mM EDTA, and 10 mM DTT, pH 8.0) for 30 min and the lysates were centrifuged (10,000 g for 5 min at 4°C). Samples (200 g) of the extracted protein were incubated with the reaction buffer (100 mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% 3-[3-cholamidopropylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), pH 7.5, 10 mM DTT and 10 g/ml leupeptin) to 100 l volume containing 200 M Ac-DEVD-*p*-Na (Biomol, Plymouth meeting, PA, USA). Enzyme-catalyzed release of *p*-nitroanilide was measured at 405 nm using microplate reader (Molecular Devices, Palo Alto, CA, USA).

Separation of cytosolic and mitochondrial fractions

The cells for lysate preparation were washed twice with ice-cold PBS and collected by centrifugation at 1,000 g for 10 min at 4°C. The cell pellets were washed once with ice-cold PBS and resuspended in lysis buffer (20 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1.0 mM sodium EDTA, 1.0 mM sodium EGTA, 1.0 mM dithiothreitol, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 250 mM sucrose) supplemented with protease inhibitors (10 g/ml leupeptin, 10 g/ml aprotinin). The cells were then homogenized in a glass homogenizer, and the nuclei and cell debris were removed by centrifugation at 1,000 g for 15 min at 4°C. The supernatants were further centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C, and the resulting mitochondrial pellets were resuspended in lysis buffer. The supernatants created from the 10,000 g centrifugation were centrifuged once more at 100,000 g for 1 h at 4°C, and the supernatant was collected and designated the cytosolic fraction.

Western blot analysis for cytochrome c release

To quantify cytochrome c release, Western blot analysis in the mitochondrial and the cytosolic fractions was performed. A quantity of 40 g protein of either the cytosolic fraction or the mitochondrial fraction was separated on 15% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) and transferred onto PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Millipore, Bedford, MD). The membrane was blocked with 5% nonfat dry milk for 90 min, and incubated overnight with a primary mouse anti-cytochrome c monoclonal antibody (BD Biosciences, Lexington, KY, USA). The membrane was then incubated with a secondary anti-IgG antibody conjugated with alkaline phosphatase for 4 h, and the cytochrome c band was visualized using the NBT/BCIP method (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

We verified the mitochondrial fraction with the mitochondrial marker cytochrome oxidase subunit IV (COX IV, Molecular Probes, Eugene, OR, USA), and cytosolic fractions with the cytosol marker actin (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Intracellular ROS measurement

5(6)-Chloroemthyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate-acetyl ester (CM-H2DCFDA; Molecular Probe) is an ROS-sensitive probe that can be used to detect oxidative activity in living cells. It passively diffuses into cells, where its acetate groups are cleaved by intracellular esterases, releasing the corresponding dichlorodihydrofluorescein derivative. Its thiol-reactive chloronethyl group reacts with intracellular GSH and other thiols. Subsequent oxidation yields a fluorescent adduct that is trapped inside the cell. CM-H2DCFDA is prepared in HCSS immediately before loading. H9c2 cells cultured on microwell glass-bottomed culture dishes were loaded with the dye (1g/ml) immediately after hypoxia. The cultures were then incubated in the dark at 37C for 30 min. After they were washed, the cells were allowed to recover at 37C for 20 min. The plates were examined immediately under a laser scanning confocal microscope (Olympus 5100, Japan).

Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) measurement

ΔFmm was assayed by measuring the accumulation of rhodamine 123 (Molecular probes, Eugene, OR, USA), a membrane-permeable cationic fluorescent dye (Emaus et al., 1986).

H9c2 cells were incubated with 1 M rhodamine 123 at 37° for 30 min. After incubation at 37°, cells were washed three times with DMSO and were observed at 530 nm under confocal microscope (Olympus 5100, Japan).

Rat myocardial infarct model

Rats were anesthetized with pentobarbital sodium (60 mg/kg i.p.). The trachea was intubated and the rats were mechanically ventilated with room air using a small rodent ventilator (Model 683, Harvard Apparatus) at a rate of 60 cycles per minute and a tidal volume of 1 ml/100g body weight. The left femoral artery was cannulated for measurement of mean arterial pressure and heart rate. The left femoral vein was catheterized for drug administration, and the electrocardiogram (ECG) was recorded with the standard Lead II limb leads. Body temperature was maintained at 37°C using a water circulating heating blanket. A left thoracotomy was performed and the heart was exposed. The heart was gently exteriorized by pressure on the chest, and a ligature (5.0 silk) was placed in position around the left anterior descending coronary artery: and the artery was either ligated or left untied. Myocardial ischemia was confirmed by the presence of ECG changes and by the visual assessment of regional cyanosis and dyskinesia of ischemic region of the left ventricle. After 45 min of occlusion, the coronary artery was reperfusion by removal of the polyethylene tube. After 90 min of reperfusion, the coronary artery was reoccluded and 2 ml of a 1% Evans blue was injected via femoral vein. The heart was removed, and the left ventricle was dissected free from other structures and sliced transversely into 2-mm thick sections. Each portion was weighed, then washed and incubated for 10 min, in a solution of triphenyl tetrazolium chloride (TTC) (Sigma). Salvaged myocardium within the area at risk stained brick red, whereas coloration of the infarct mass remained unaltered. Slices were then photographed (Gel doc 2000, BIORAD) and later analyzed via computerized planimetry (BAS 1500, Fuji film) to evaluate the composition of each heart with respect to normal, area at risk

and infarcted left ventricular zones, From these procedures a mathematical representation of total infarct and risk zone sizes were calculated in control and treated groups.

Statistical analysis

All data were expressed as meanS.D. The numerical data were compared by a Student's *t*-test for unpaired observations between the two groups. A *P*-value of <0.05 was considered significant.

RESULTS

Effect of onion extract against hypoxia-induced apoptosis

To investigate the effect of onion extract on hypoxia-induced apoptotic cell death, we performed TUNEL staining. The number of TUNEL-positive cells was 47.00.40% in vehicle-treated cells exposed to hypoxia for 8 h. When the cells were treated with 0.05 and 0.1 g/ml of onion extract, the number of TUNEL-positive cells after 8 h of hypoxia was significantly decreased (18.3%3.55% and 7.0%4.15%, respectively).

Effect of onion extract against hypoxia-induced ROS generation

To investigate the effect of onion extract on hypoxia-induced ROS generation, we assessed the changes of dichlorofluorescein (DCF-DA) fluorescence using confocal microscope. The ROS generation during hypoxia began to increase at 15 min after hypoxia and further increased to the maximum level (about 5.7 fold) at 60 min after hypoxia (Fig. 2B). The ROS generation during hypoxia 60 min was dose-dependently decreased by treatment with onion extract of 0.05 and 0.1 g/ml (about 3.5 fold and 3.3 fold, respectively).

Effect of onion extract on hypoxia-induced reduction in $\Delta\Psi_m$

To examine whether preservation of mitochondrial membrane potential is associated with cardioprotective effect of onion extract, we assessed the changes of rhodamine 123 fluorescence in the H9c2 cells exposed to hypoxia using confocal microscope. Fig. 3B and shows the time-dependent changes in rhodamine 123 fluorescence. The $\Delta\Psi_m$ was remarkably reduced by 51.4±1.45% as early as after 2 h of hypoxia and reached a maximum level (39.5±2.42%) after 4 h of hypoxia compared to normoxic control. The $\Delta\Psi_m$ reduction after 4 h of hypoxia (39.5±2.42%) was completely abolished by 0.05 and 0.1 g/ml onion extract (62.5±4.46% and 61.7±4.96%, respectively)

Effect of onion extract on cytosolic release of cytochrome c by hypoxia

To investigate the effect of onion extract on the release of cytochrome *c* from mitochondria to cytosol, the cytosolic release of cytochrome *c* was examined by western blotting in both cytosolic and mitochondrial fractions. The cytosolic release of cytochrome *c* was dramatically increased after 8 h of hypoxia. However, it was markedly inhibited by treatment with 0.05 g/ml onion extract (Fig. 5A).

Activation of caspase-3 during hypoxia

To investigate the effect of onion extract on hypoxia-induced cell death, we measured caspase-3 activity. As shown in Fig. 5B, hypoxia increased caspase-3 activity (213.82.85%) compared to the normoxic control (100%). The treatment of cells with 0.05 and 0.1 g/ml onion extract (142.54.13% and 116.23.77%, respectively) markedly decreased the caspase-3 activity nearly up to the level of normoxia vehicle.

Effect of onion extract on infarct size in rat myocardial infarction model

To investigate the effect of onion extract on ischemia/reperfusion induced infarct size, we performed TTC-staining. In the i.v. vehicle-treated group, ischemia (45 min) followed by reperfusion (90 min) resulted in an infarct size of 64.62.28% of the area at risk. Onion extract reduced the myocardial infarct size in a dose dependent manner (53.61.64%, 45.81.79% and 31.81.31% at 0.1, 1.0 and 10.0 g/kg, respectively).

In the p.o. vehicle-treated group, In the i.v. vehicle-treated group, ischemia (45 min) followed by reperfusion (90 min) resulted in an infarct size of 63.3 1.84% of the area at risk. Chronic oral intake of onion extract (1.0, 3.0 and 10.0 g/kg) significantly reduced (55.01.77%, 52.82.09% and 47.02.00, respectively) myocardial infarct size (Fig. 6B).

Effect of onion extract against ischemia-reperfusion induced apoptosis

To investigate the effect of onion extract on ischemia/reperfusion induced apoptotic cell death, we performed TUNEL-staining. Occlusion of the left main coronary artery for a period of 45 minutes followed by 12 h of reperfusion resulted in substantial injury to the myocardium. As shown in Fig. 15, the amounts of TUNEL-positive myocytes in onion extract-treated (1,0 and 10 g/kg) hearts were significantly less than that in control ischemia-reperfused hearts (8.290.73% and 4.610.57 vs. 14.341.93%).

DISCUSSION

In this study, we found that onion extracts elicit cardioprotective effects against hypoxia-induced apoptotic death and myocardial damage in heart-derived H9c2 cells and rat infarct model. From the results in H9c2 cell study, it is suggested that the mechanisms for their cardioprotective effects involve, at least in part, attenuation of oxidative stress and maintenance of mitochondrial integrity during hypoxia.

There are two basic patterns of cell death in myocardium: necrosis and apoptosis (10). Necrosis, a rapidly developed pathological process triggered by exogenous stimuli, is primarily manifested by cell swelling and breakdown of cell organelles with a consequent significant inflammatory response. On the other hand, apoptosis, a genetically controlled, progressively developed cell death under physiological or pathological conditions in response to endogenous or exogenous stimuli, is characterized by cell shrinkage, chromatin condensation and nucleosomal DNA fragmentation without accompanying inflammatory response (1). Although extensive investigations have pointed to cardiomyocyte ischemic injury evolving as the necrotic pattern of injury, more recently, apoptosis has been implicated in various forms of cardiac pathology, including myocardial ischemia (1).

A number of studies suggest that the apoptotic cell death can be triggered by oxidative stress, which is associated with an imbalance in cellular redox state, where ROS production overwhelms antioxidant capacity (11). In cardiomyocytes, ischemia/hypoxia causes oxidative stress, where decreased cytochrome oxidase activity could alter mitochondrial redox and increase oxidative stress (12), and the subsequent reperfusion results in a further increased oxidative stress (13). Recently, various studies including ours (14) have shown that ROS is overproduced in the pathological processes of ischemic injury with a resultant apoptotic cardiomyocytes death (15). The present study further showed consistent results demonstrating hypoxia-induced ROS elevation and apoptotic cell death in H9c2 cells (Fig. 1, Fig. 2). In these contexts, it has been suggested that the limitation of oxidative stress can prevent or ameliorates progression of ischemic heart

disease by favoring the balance towards lowering oxidative stress. Recently, there is growing awareness of the consumption of dietary antioxidants, fruits and vegetables, to reduce the detrimental effects of risk factors for ischemic heart disease and/or atherosclerosis (16). Garlic, one of the *Allium* species, and various forms of extracts prepared from it represent examples of such dietary antioxidants, having health benefits for the prevention of cardiovascular diseases, especially those associated with oxidative stress (2). In the present study, we focused on onion, another *Allium* species, which is known to possess antioxidant properties (17), to evaluate preventive potential of natural antioxidants against myocardial injury induced by oxidative stress. This study, for the first time, demonstrates that onion extract prevents cardiac cells and tissues from ischemic injury in *in vitro* hypoxia model and *in vivo* rat myocardial infarct model.

In addition, from the results that onion extract, not only suppressed the generation of ROS but also attenuated apoptotic cell death during hypoxia (Fig. 1 and Fig. 2), it is suggested that the preventive effect of onion against hypoxic injury may be attributed to its antioxidant property.

Mitochondria, the main organelles producing ROS, have been recognized as central regulators of life and death under various stresses in a variety of cells (18). Cardiac mitochondria are highly vulnerable to ischemic injury, resulting in the precipitation of mitochondria-dependent apoptotic death pathway in a number of pathologic conditions (19). Supporting this concept, we have previously demonstrated that oxidative stress during ischemia causes mitochondrial dysfunction, which involves mitochondrial permeability transition, disruption of mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and release of cytochrome c in heart-derived H9c2 cells (20). Cytochrome c released from mitochondria further induces the activation of downstream caspases, which in turn causes nuclear condensation, leading to ultimate apoptotic cell death (21). Thus, maintenance of the functional and structural integrity of mitochondria is considered as a prerequisite for successful cardioprotection. Consistently, our previous study reported that cardioprotective effects elicited by high glucose are associated with maintenance of mitochondrial integrity. In line with these studies, the results from the present study suggest that onion

elicits cardioprotective effect, at least in part, through attenuation of ROS generation and maintenance of mitochondrial integrity by inhibiting $\Delta\Psi_m$ reduction, cytochrome c release and caspase-3 activation during hypoxia (Fig. 1-4).

In view of the interrelationship between ROS and $\Delta\Psi_m$ reduction, there are controversial results one is that ROS causes $\Delta\Psi_m$ reduction, and the other is that $\Delta\Psi_m$ reduction causes ROS increase. The present study using H9c2 cells exposed to hypoxia supports the former theory by showing that $\Delta\Psi_m$ reduction by hypoxia was attenuated by not only onion but also a well-known antioxidant trolox (Fig. 2, 3).

Although this study did not include the investigation about which is the active component of onion, various studies have reported that two main components of onion, the flavonoids and the alk(en)yl cysteine sulphoxides (ACSOs) have health benefits including antioxidant activity (22). The phenolic hydroxyl groups in the structure of flavonoids have been recognized to function as electron or hydrogen donors, conferring free radical scavenging effect (3015??). Disulfides and thiol structures of ACSOs, are also reported to function as free radical scavengers by trapping electrons from other systems (23). To clarify which components of onion contribute to antioxidant effect resulting in cardioprotective effects shown in this study, further study remains to be elucidated.

Taken together, the results from this study suggest that onion extracts may be useful as a promising beneficial nutrient for the prevention of ischemic heart disease, possibly through its antioxidant property and mitochondria-maintaining potential. The present results further show that the in vitro hypoxia model and the in vivo ischemia/reperfusion model can be applied in the mechanistic studies on antiischemic nutrients in food and in research on the development and efficacy of food products.

Reference

1. Buja, L. M. (2005) Myocardial ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Path* 14: 170–175.
2. Banerjee, S. K., Dinda, A. K., Manchanda, S. C. & Maulik, S. K. (2002). Chronic garlic administration protects rat heart against oxidative stress induced by ischemic reperfusion injury. *BMC Pharmacol* 2: 16–25.
3. Ozdemir, R., Parlakpınar, H., Polat, A., Colak, C., Ermis, N. & Acet, A. (2006). Selective endothelin A (ETA) receptor antagonist (BQ-123) reduce both myocardial infarct size and oxidant injury. *Toxicology* 219: 142–149.
4. Shon, M. Y., Choi, S. D., Kahng, G. G., Nam, S. H. & Sung, N. J. (2004). Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food Chem Toxicol* 42: 659–666.
5. Helen, A., Krishnakumar, K., Vijayammal, P. L. & Augusti, K. T. (2000). Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa*. Linn) on the damages induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. *Toxicol Lett* 116: 61–68.
6. Kendler, B. S. (1987). Garlic (*Allium cepa*): a review of their relationship to cardiovascular disease. *Prev Med* 16: 670–685.
7. Moon, C. H., Jung, Y. S., Kim, M. H., Lee, S. H., Baik, E. J. & Park, S. W. (2000). Mechanism for antiplatelet effect of onion: AA release inhibition and TXA₂/PGH₂ receptor blockade. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 62: 277–283.
8. Moon, C. H., Jung, Y. S., Kim, M. H., Park, R. M., Lee, S. H. and Baik, E. J. (2000). Protein kinase C inhibitors attenuate protective effects of high glucose against hypoxic injury in H9c2 cardiac cells. *Jpn. J. Physiol* 50: 645–649.
9. Jung, Y. S., Kim, M. Y., Kim, M. H., Lee, S., Yi, K. Y., Yoo, S. E., Lee, S. H., Baik, E. J., Moon, C. H. and Cho, J. P. (2003). KR-31466, a benzopyranylidol analog, attenuates hypoxic injury through mitochondrial KATP channel and protein kinase C activation in heart-derived H9c2 cells. *J. Pharm Sci* 92: 13–18.
10. Zhao, Z. Q. & Vinten-Johansen, J. (2002). Myocardial apoptosis and

ischemic preconditioning. *Cardiovascu Rer* 55: 438-455.

11. Lam, L. H., Sakaguchi, K., Ukeda, H. & Sawamura, M. (2006). Flow Injection Determination of xanthine oxidase inhibitory activity and its application to food samples. *Anal Sci* 22: 105-109.

12. Prabu, S. K., Anandatheerthavarada, H. K., Raza, H., Srinivasan, S., Spear, J. F. & Avadhani, N. (2006). *G. J. Biol Chem* 281:2061-2067.

13. Sharikabad, M. N., Ostbay, KM., Lyberg, T. & Broros, O. (2001). Effect of extracellularMg⁺ on ROS and Ca²⁺ accumulation during reoxygenation of rat cardiomyocyte. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol* 280: 344-353.

14. Kim, M. H., Jung, Y. S., Moon, C. H., Lee, S. H., Baik, E. J. & Moon Ck. (2003). High-glucose induced protective effect against hypoxic injury is associated with maintenance of mitochondrial membrane potential. *Jpn. J. Physiol* 53: 451-459.

15. Durnateau, J., Chandel, N. S., Kulisz, A., Shao, Z. & Schumacker, P. T. (1998). Intracellular signaling by reactive oxygen species during hypoxia in cardiomyocytes. *J. Biol Chem* 273: 11619-11724.

16. Rissanen, T. H., Voutilainen, S. V., Virtanen, B. L., Vanharanta, M., Mura, J. and Salonen, J. T. (2003). Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: the kuopio ischemic heart disease risk factor (KIHD) study. *J Nut* 133: 199-204.

17. Choi, M. Y., Choi, S. D., Kahng, G. G., Nam, S. H. and Sung, N. J. (2004). Antimutagenic, antioxidant and free radical scavenging activity of ethyl acetate extracts from white, yellow and red onions. *Food Chem Toxicol* 42: 659-666.

18. O'Donovan, D. & Fernandes, C. J. (2000). Mitochondrial Glutathione and oxidative stress: implications for pulmonary oxygen toxicity in premature infants. *Mol Genet Metab* 71: 352-358.

19. Tantini, B., Fiumana, E., Cetrullo, S., Pignatti, C., Bonavita, F., Shantz, L. M., Giordano, E., Muscari, C., Flamigni, F. & Guarnieri et al. (2006) Involvement of polyamines in apoptosis of cardiac myoblasts in a model of simulated sicehmia. *J. Mol Cell Cardiol* 40: 775-782.

20. Kim, M. J., Moon, C. H., Kim, M. Y., Lee, S. K., Yi, K. Y., Yoo, S.

E., Lee, S. H., Baik, E. J. & Jung, Y. S. (2005). KR-32570, a novel Na⁺/H⁺ exchanger-1 inhibitor, attenuates hypoxia-induced cell death through inhibition of intracellular Ca⁺ overload and mitochondrial death pathway in H9c2 cells. *Eur J Pharmacol* 525: 1-7.

21. Borutaite, V & Brown, G. (2003). Mitochondria in apoptosis of ischemic heart. *FEBS Lett* 541: 1-5.

22. Griffiths, G., Trueman, L., Crowther, T., Thomas, B. & Smith, B. (2002). Onion—a global benefit to health. *Phytother Res* 16: 603-615.

23. Nishimura H, Higuchi O & Tateshita K. (2004). Antioxidative activity of sulfur-containing compounds in allium species for human LDL oxidation in vitro. *Biofactors* 21:277-80.

Acknowledgement

This Study was supported by Technology Development Program of the Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea.

This Study was carried out with the support of "Specific Joint Agricultural Research-promoting Projects", RDA, Republic of Korea.

FigureLegends

Fig 1. Effect of onion extract on apoptotic cell death during hypoxia in H9c2 cells. Effect of onion extract on TUNEL-positive cells increased by hypoxia (Hx). TUNEL-positive cells was evaluated as a percentage of total cell counts. H9c2 cells were treated with onion extract (0.01, 0.05 and 0.1 g/ml) and trolox (100 M) 30 min before and during hypoxia. All data represent mean ± SD (n = 4). * P<0.05 vs. Hx-Vehicle. Nm means normoxia.

Fig. 2. Effect of onion extract on hypoxia-induced reactive oxygen species (ROS) generation in H9c2 cells. (A) Representative images obtained by DCF-DA confocal laser microscopy. (B) Effect of onion extract on Hx-induced ROS generation determined by confocal images of

dichlorofluorescein (DCF-DA) staining. H9c2 cells were treated with onion extract (0.01, 0.05 and 0.1 g/ml) 30 min before and during hypoxia (Hx). All data represent mean \pm SD (n = 4). * P<0.05 vs. Hx-Vehicle.

Fig. 3. Effect of onion extract on hypoxia-induced mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) reduction in H9c2 cells. (A) Representative images of rhodamine 123 intensity obtained by confocal laser microscopy. (B) Effect of onion extract on Hx-induced $\Delta\Psi_m$ reduction. H9c2 cells were treated with onion extract (0.01, 0.05 and 0.1 g/ml) 30 min before and during hypoxia. All data represent mean \pm SD (n = 4). * P<0.05 vs. Hx-Vehicle.

Fig. 4. Effect of trolox on hypoxia-induced reactive oxygen species (ROS) generation and mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) reduction. (A) Effect of trolox on Hx-induced ROS generation determined by confocal images of dichlorofluorescein (DCF-DA) staining. H9c2 cells were treated with trolox (100 M) 30 min before and during hypoxia. (B) Effect of trolox on Hx-induced $\Delta\Psi_m$ reduction determined by confocal laser microscopy image of rhodamine 123 intensity. H9c2 cells were treated with trolox (100 M) 30 min before and during hypoxia. All values are mean \pm SD (n= 4). *P <0.05 vs. Hx-Vehicl.

Fig 5. Effect of onion extract on apoptotic cell death during hypoxia in H9c2 cells. (A) Western blots for cytochrome *c* were detected in the cytosolic (C) and mitochondrial (M) fractions 6 h after hypoxic insult. H9c2 cells were treated with onion extract (0.01 and 0.05 g/ml, respectively) 30 min before and during hypoxia. (B) Effect of onion extract on hypoxia-induced caspase-3 activation. H9c2 cells were treated with onion extract (0.01, 0.05 and 0.1 g/ml) 30 min before and during hypoxia. All data represent mean \pm SD (n = 4). * P<0.05 vs. Hx-Vehicle. Nm means normoxia.

Fig. 6. Effect of onion extract on infarct size in rat myocardial infarct model (A) Representative photomicrographs of left ventricular section. (B) Quantitative assessment of infarct size/AAR(area at risk). Myocardial infarct

was induced by 45 min ischemia/90 min reperfusion. Onion extracts (0.1, 1.0, 3.0 and 10 g/kg) were intravenously administered 20 min before occlusion. (C) Myocardial infarct was induced by 45 min ischemia/90 min reperfusion. Onion extracts (1.0, 3.0 and 10.0 g/kg) were administered orally once daily for 2 weeks. All values are mean \pm SEM (n= 8). *p<0.05 vs. Vehicle (Veh).

Fig. 7. Effect of onion extract (i.v) on apoptotic cell death in rat myocardial infarct model. (A) Representative photomicrographs of ventricular tissue stained by TUNEL method. (B) Quantitative analysis of TUNEL-positive cells. Percent TUNEL-positive cells were calculated by dividing the number of TUNEL-stained cells by total cell counts after 45 min ischemia/12 h reperfusion. All values are mean \pm SEM (n= 4). *P<0.05 vs. Vehicle (Veh).

Fig. 1

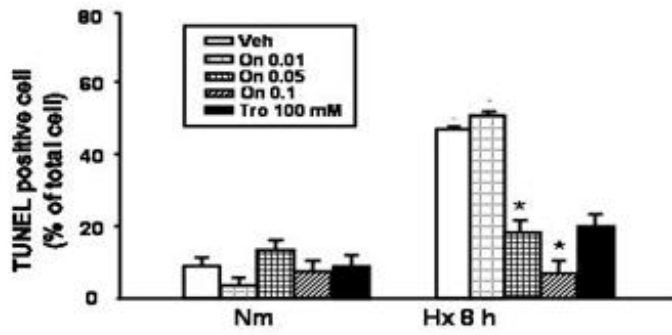


Fig. 2

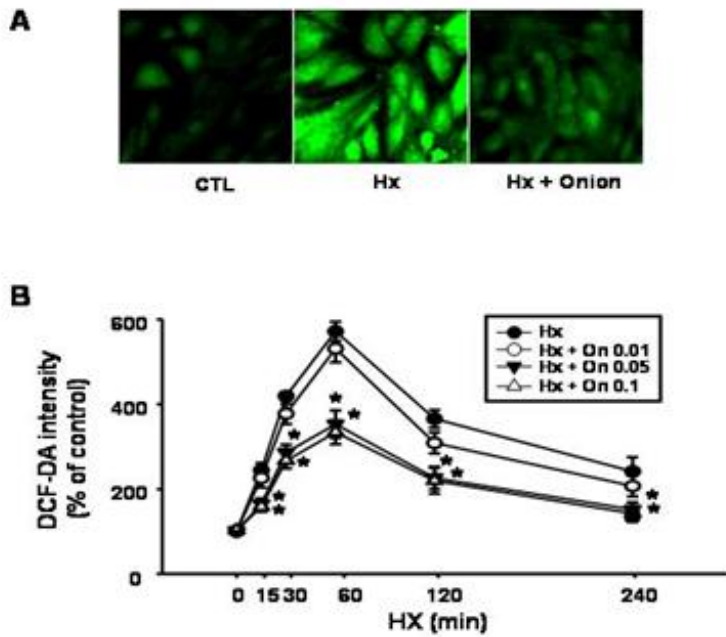


Fig.3

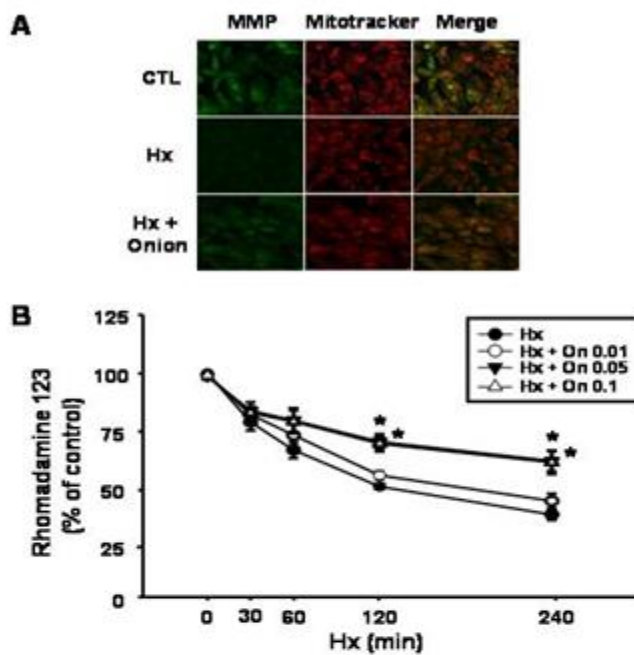


Fig.4

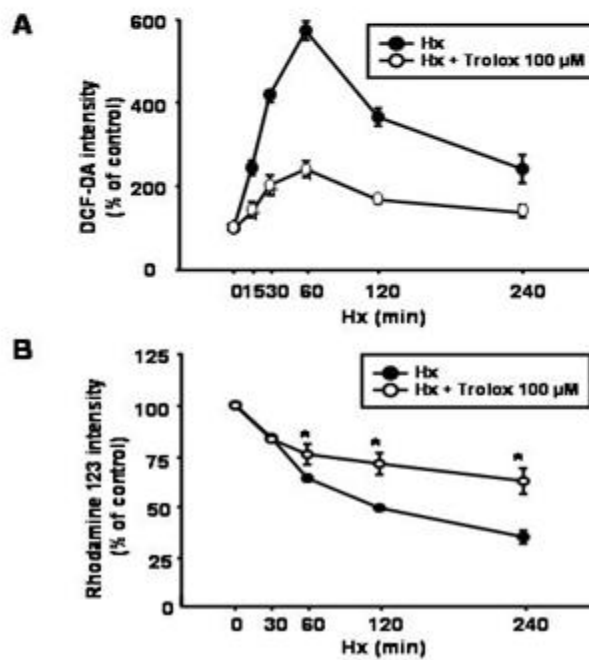


Fig.5

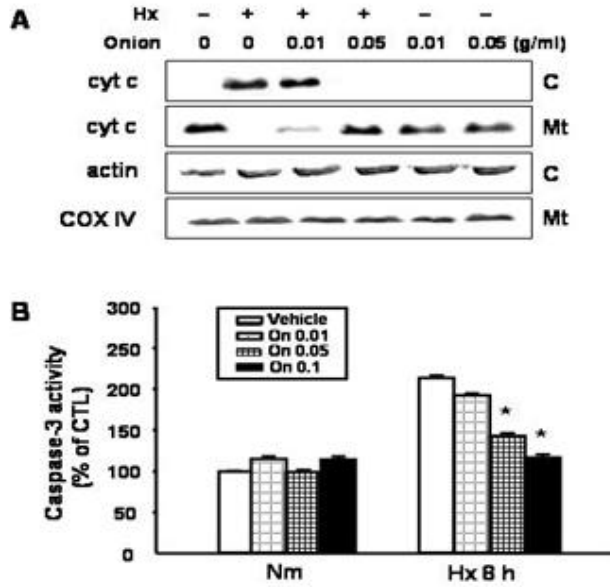


Fig.6

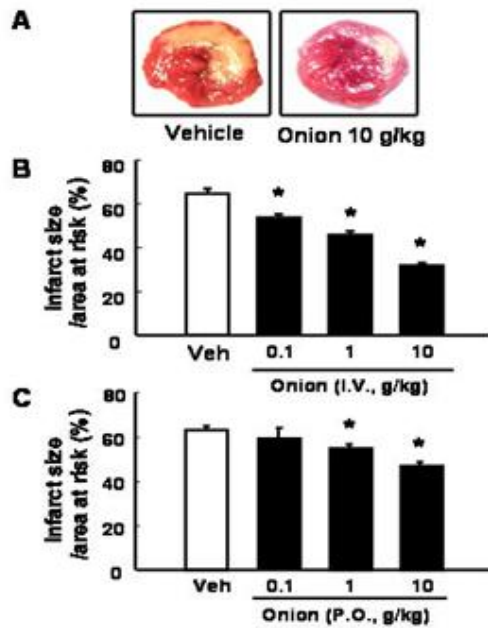


Fig.7

