KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL.
Vol. 32, No. 5, pp. 985~990(2000)

ζ-Carotene의 산화개열산물

김 선 재
목포대학교 식품산업기술연구센터

Oxidative Cleavage Products of ζ-Carotene

Seon-Jae Kim
Food Industrial Technology Research Center, Mokpo National University

Abstract

ζ-Carotene was subjected to ozonolysis in ice-cold dichloromethane. The ozonolysis products were fractionated with a silica column and the carbonyl fraction was analyzed by ODS-HPLC with a photodiode array detector. ζ-Carotene was solubilized in toluene, and then oxidized by incubating at 37°C, 72 hr under atmospheric oxygen. Carbonyl compound and acidic compound were produced. In comparison with autoxidation and ozonolysis, each compound showed the same retention time and UV-vis spectra were identical to the reference cleavage products prepared by ozonolysis of ζ-carotene. Absoption spectrum of acidic compound was similar to that of standard 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid which is known to possess biological activity. Thus, eccentric cleavage of ζ-carotene was confirmed to occur *in vitro* under oxidation condition.

Key words : ζ-carotene, ozonolysis, autoxidation, oxidative cleavage products

서 론

Carotenoids는 장쇄의 공액이중결합을 특징으로 하는 일군의 색소의 총칭이다. 자연계에는 약 600종류의 carotenoids가 존재하지만 대부분은 탄소수 40개의 isoprene골격으로 구성되어 있는 화합물이다. 인간이 식물에서 섭취하는 carotenoids는 40종이 넘는 정도이지만 인간 혈장중에는 그 가운데 13종류의 carotenoids 및 그 대사산물이 존재하는 것으로 알려져 있다[1,2]. Carotenoids를 구조형태로 분류하면, 산소분자를 함유하지 않은 탄화수소 carotenoids(carotene류 및 lycopene류 등)와 산소를 함유하는 carotenoids(xanthophyll류)로 분류된다[2]. 또한 ionone환의 유무에 의해 환상 carotenoids(carotene류 및 xanthophyll류) 와 비환식 carotenoids(lycopene 및 phytoene류)로 분류할 수 있다[3].

Carotenoids의 생리활성으로서 유력한 것은 provitamin A 활성이 있지만 non-provitamin A인 zeaxanthin 및 lutein이 노인성 망막 황반 변성증(age-related macular degeneration : AMD)의 발증에 유의적인 억제효과가 있는 것으로 보고되고 있다[3,4]. 천연에 존재하는 carotenoids중에 vitamin A 전구체가 되는 것, 즉 산화효소(dioxygenase)에 의해 vitamin A로 대사변환되는 구조를 가지고 있는 것은 30종류 정도 밖에 없다. 한편, 인간의 혈장에는 provitamin A carotenoids 이외에 lutein 및 lycopene 등의 non-provitamin A carotenoids가 존재한다. 인간은 식물유래의 carotenoids를 그 형태로 흡수하여, 체액 및 조직에 축적하기 쉬운 동물이다[5]. 따라서 carotenoids 중에는 provitamin A 활성 이외의 생리기능이 존재하는 것은 당연하며 그 하나의 예로서 항산화활성이 유력시된다[6]. 그러나 현재 그의 기능성이 충분히 해명되어 있지는 않다.

한편 최근의 연구동향은 천연색소 및 그 대사산물, 비타민류, 미네랄, polyphenol, ion화합물, terpenoid, alkaloid 등 비영양소에 속한 식품성분들이 가지고 있는 생리기능, 특히 암 및 노화를 일으키는 질병의 예방이라고 하는 관점의 중요성이 인식되고 있으며[7], 식품성분 전체를 가지고 식품인자(food factor)라는 개념을 도입하여 산화스트레스가 다종다양한 질병의 발증

Corresponding author : Seon-Jae Kim, Food Industrial Technology Research Center, Mokpo National University, 61 Dorim-ri, Chonggye-myon, Muan-gun, Chonnam, 534-729, Korea
Tel : 82-61-450-6453
Fax : 82-61-454-1521
E-mail : foodkim@apollo.mokpo.ac.kr

에 큰 관계가 있다는 것에 주목하여 연구가 진행되고 있다[8].

이와 같은 배경을 토대로 한 연구 중에서 최근 Araki 등[9]과 Shidoji 등[10]이 비환식 retinoid의 발암억제 작용에 대해 보고한 바에 의하면 비환식화합물이 retinoid receptor의 ligand로 작용하는 것으로 밝혀 냈으며 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid, geranyl geranyl acid가 all-*trans* retinoic acid와 동일한 생리활성을 나타내었으며 특히 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid는 간암 유래의 세포주에 대하여 현저한 생물작용을 나타냈다고 한다.

ζ-Carotene(7,8,7',8'-tetrahydro-ψ,ψ-carotene)은 비환식 carotenoid이며 토마토 쥬스내에는 약 0.5% 정도 존재하는 미량 색소물질로서 lycopene 생합성의 중간대사산물로 lycopene의 구조에 비해 이중결합이 2개 부족한 구조로 되어 있다[5]. 토마토 쥬스를 사람이 섭취할 때 토마토 쥬스내에 존재하는 토마토 carotenoids (lycopene, neurosporene, ζ-carotene, β-carotene, lutein, phytofluene 그리고 phytoene)는 대부분 인체에 흡수된다. 이들 carotenoids중에 ζ-carotene은 혈장에 존재하는 비율이 lycopene 함량과 거의 같은 수준으로 존재되어 있음이 확인되어[11] 생체내에서 어떤 생물활성을 나타낼 가능성이 시사되고 있지만, 아직 그와 관련된 연구는 미미한 실정이다.

본 연구에서는 생물활성을 나타낸다고 보고되고 있는 비환식 retinoid인 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid가 ζ-carotene으로부터 생성 가능성에 대해 탐색하였다. ζ-Carotene에 대하여 ozonolysis을 통하여 산화개열산물의 표준품을 얻고 ζ-carotene의 자동산화를 통해서 생성된 산화개열산물과의 비교 및 특성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

토마토 carotene인 ζ-carotene과 분해산물인 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid는 일본식품총합연구소 지질연구실에서 분리 정제된 것으로 순도 99.5~99.7%의 표준품을 사용하였다.

ζ-Carotene 산화개열산물 표준품의 조제

ζ-Carotene의 산화개열산물의 표준품을 얻기 위하여 Kim 등[12]의 방법으로 ζ-carotene을 dry ice 상에서 오존반응시켰다. 오존은 8W UV lamp가 장착된 오존발생기(Matsui MO-5A, Matsui Co. Tokyo, Japan)를 이용하여 260 mL/min의 속도로 발생시켰다. ζ-Carotene (2.0 mM)을 dichloromethane에 용해시킨 후 오존과 반응을 시키고 ζ-carotene농도가 초기에 비해 10%정도 감소되는 시점에서 오존반응을 중지하였다. 반응용액은 회전감압농축기로 농축하고 질소로 완전히 용매를 휘발시킨 후 silica gel column(Kieselgel, 30-70 mesh, bed volumn 80 mL, Merck, Darmstadt, Germany) chromatography를 행하였다. Silica gel column chromatography는 시료를 *n*-hexane : ethylacetate(99 : 1, v/v)로 용해한 후 column에 주입하고 500 mL를 용출하였다. 이어 *n*-hexane : ethylacetate(95 : 5, v/v) 800 mL로 용출하여 이 획분을 오존에 의한 산화개열산물 획분으로 하였다. 얻어진 각각의 산화개열산물은 ODS-HPLC를 통하여 각각의 peak를 분취한 후 용출용매를 완전히 휘발시키고 ampule에 분말상으로 -80°C에서 보관하고 ζ-carotene 산화개열산물의 표준품으로 하였다.

ζ-Carotene의 자동산화

ζ-Carotene의 자동산화는 test tube에 ζ-carotene(50 μM)을 toluene 1 mL로 용해하고 37°C, 72시간 황색등하에서 정치하여 상압하에서 공기의 접촉을 통해 자동산화시켰다. 반응이 완료된 산화생성물은 추출 및 분석할 때까지 -80°C에서 보관하였다[12].

산화개열산물의 추출

ζ-Carotene의 자동산화에 의해 생성된 carbonyl 화합물의 추출을 위해 반응액에 대하여 질소 gas로 완전히 휘발시킨 후 *n*-hexane : ethylacetate(99 : 1, v/v) 300 μL로 용해하고 Bond Elut solid phase cartridge(SI 100 mg, Varian, Harbor, USA)에 주입하였다. 시료가 주입된 cartridge에 *n*-hexane : ethylacetate(99 : 1, v/v) 1 mL로 용출한 후 이어 *n*-hexane : ethylacetate(95 : 5, v/v) 3 mL로 용출한 후 이 획분을 산화생성물 획분으로 하고 용출액을 농축하고 acetonitrile 200 μL로 용해하여 그 중 100 μL를 HPLC 분석을 위해 사용하였다.

ζ-Carotene의 자동산화에 의해 생성된 acidic 화합물의 추출을 위해 ζ-carotene의 자동산화 반응액에 대해 회전감압농축기를 이용하여 농축하고 질소로 완전히 휘발시킨 후 ethanol 1 mL로 용해하고 이어 0.1 N NaOH 1 mL를 첨가하였다. 이 혼합물에 대해 hexane 2 mL로 3번 세척하고 얻어진 수용액층에 대해 6 N HCl 30 μL로 산성화시키고 hexane 2 mL로 3번 추출하여 acidic 화합물 획분으로 하여 농축하였다. 이어 혼합물의 용매를 질소로 완전히 휘발시키고 200 μL의 0.1% acetic acid 함유 acetonitrile : methanol : water(70 : 20 :

10, v/v/v)로 용해한 후 이 중 100 μL를 HPLC분석에 사용하였다.

HPLC 분석

ζ-Carotene 및 그 산화개열산물의 HPLC의 분석 column은 precolumn인 Pelliguard LC-18(2×20 mm, Tosoh Co., Tokyo, Japan)이 장착된 TSK-GEL ODS 80Ts(4.6×250 mm, Tosoh Co.)를, 검출기는 MCPD-3600 photodiode array detector(Otsuka Electronics Co. Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 400 nm에서 분석하였고, 유속은 1.0 mL/min의 조건으로 하였다.

Carbonyl 화합물의 분석을 위한 용출용매는 0.1% ammonium acetate 함유 acetonitrile : methanol : water (75 : 15 : 10, v/v/v)와 0.1% ammonium acetate 함유 methanol : ethylacetate(70 : 30, v/v)의 두 용매를 10분간 linear gradient 방법으로 분석하였다. 그리고 acidic 화합물의 분석을 위한 용출용매는 0.1% acetic acid 함유 acetonitrile : methanol : water(70 : 20 : 10, v/v/v)로 하였다[13].

결과 및 고찰

Ozonolysis에 의한 ζ-carotene의 산화개열산물 생성

ζ-Carotene을 dichloromethane에 용해시키고 ozonolysis

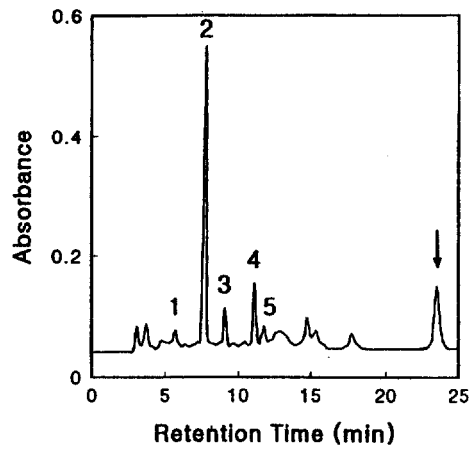

Fig. 1. The formation of cleavage products by ozonolysis of ζ-carotene in dichloromethane.

를 행한 후 얻어진 산화개열산물에 대하여 HPLC를 행한 결과는 Fig. 1에 나타낸 것 처럼 산화개열산물이 다량 생성되었으며 그 중 5개의 peak를 ζ-carotene의 산화개열산물로 추정하였다. 본 실험조건에서의 용출시간은 peak 1은 6.68분, peak 2는 8.13분, peak 3은 9.16분, peak 4는 11.08분 그리고 peak 5는 11.53분으로 나타났다. 또한 각각의 peak에 대하여 photodiode array detector를 이용하여 분광학적 특성을 조사한 결

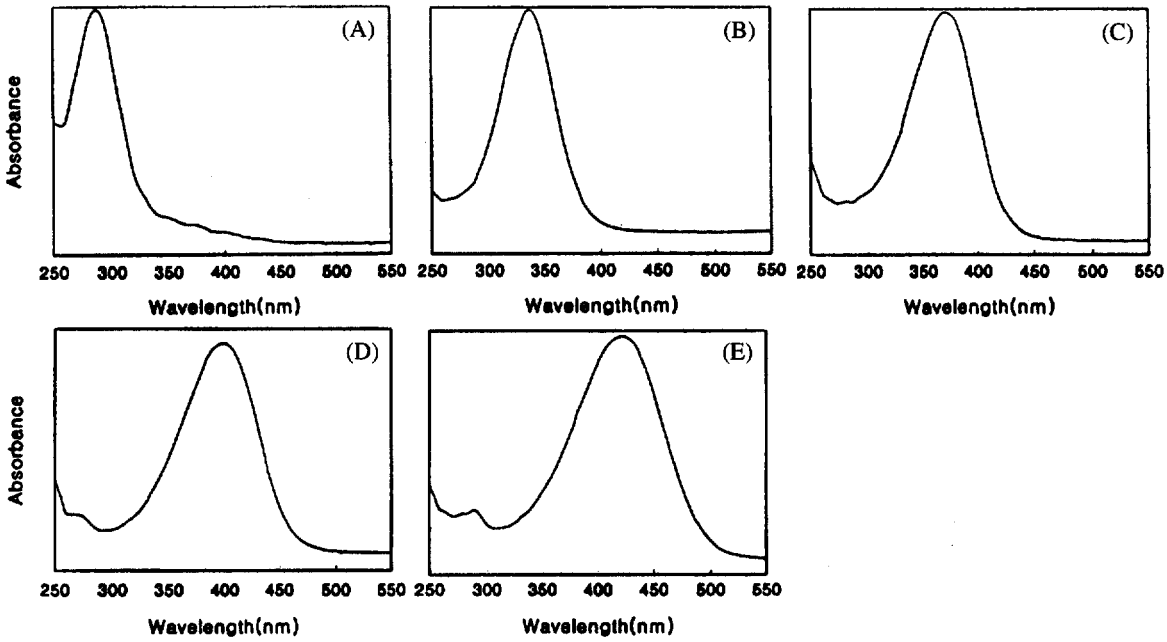

Fig. 2. The UV-vis spectra of cleavage products formed by ozonolysis of ζ-carotene. λ-max: peak 1, 290 nm(A); peak 2, 335 nm(B); peak 3, 365 nm(C); peak 4, 400 nm(D); peak 5, 420 nm(E).

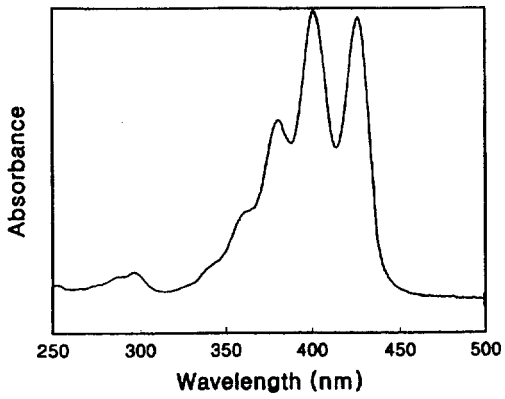

Fig. 3. The UV-vis spectrum of the ζ-carotene. The spectrum of peak corresponding to ζ-carotene were measured with photodiode array detector.

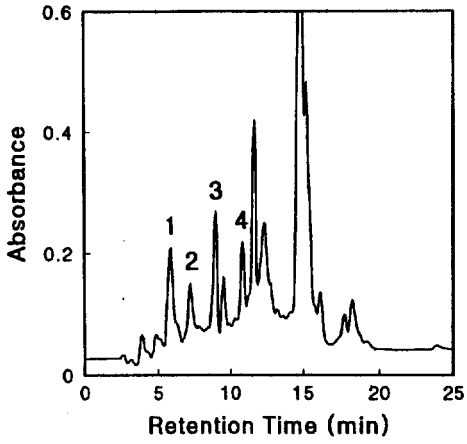

Fig. 4. The formation of cleavage products by autoxidation of ζ-carotene in toluene.

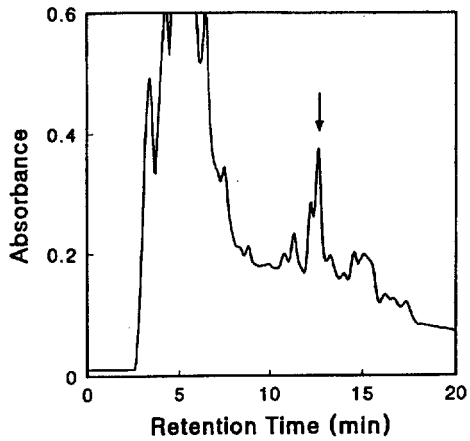

Fig. 5. The formation of acidic compound by autoxidation of ζ-carotene in toluene.

과 Fig. 2에 나타난 것과 같이 peak 1은 290 nm, peak 2는 335 nm, peak 3은 365 nm, peak 4는 400 nm 그리고 420 nm에서 최대흡수극대를 나타내어 다양한 흡수극대를 나타내고 있음을 알 수 있었다. 그리고 ζ-carotene의 용출시간(Fig. 1의 화살표)은 24.11분이었으며 분광학적 특징은 Fig. 3에 나타낸 것 처럼 380 nm, 400 nm 그리고 425 nm에서 최대흡수를 나타냄을 알 수 있었다.

Davis 등[14]의 보고에 의하면 ζ-carotene의 C-15와 C-15' 위치의 이중결합의 개열에 의해 생성된 화합물이 3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,10,14-pentaenal 이라고 하였고 최대흡수극대가 335 nm로 나타내었는데 ζ-carotene의 산화개열산물 중 peak 2는 335 nm에서 최대흡수극대를 나타내어 이것은 ζ-carotene의 중앙개열산물인 것으로 생각되었다. 또한 HPLC 상에서 peak 5 이후의 peak들은 다양한 흡수극대를 갖는 화합물이 존재함이 관찰되었으며 Kim 등[12,13]이 lycopene에 대하여 ozonolysis하고 얻어진 산화개열산물 중 HPLC chromatogram의 후미에 epoxide 화합물이 다수 존재함을 보고하였는데 본 결과에서의 peak 5 이후의 peak들은 ζ-carotene의 epoxide 화합물로 추정되었다.

ζ-Carotene의 자동산화물

Toluene 용액중에 ζ-carotene을 37°C, 72시간 동안 자동산화시키고 HPLC를 행한 결과, Fig. 4에 나타낸 것처럼 ζ-carotene의 자동산화물이 다량 생성되었다. 각각의 peak 중에 peak 1~4의 용출시간이 각각 6.65분, 8.12분, 9.17분 그리고 11.09분으로 나타나 ζ-carotene의 산화개열산물로서 ozonolysis에 의해 얻어진 산화개열산물의 HPLC 용출위치와 잘 일치하였다. 그러나 ζ-carotene의 ozonolysis에 의한 생성된 peak 5는 자동산화과정에서는 검출이 되지 않았으며 이 화합물은 자동산화과정 중 상대적으로 미량으로 생성되기 때문에 검출되지 않은 것으로 생각되었다. 그리고 ζ-carotene의 자동산화에 의한 산화개열산물의 분광학적 특성을 조사한 결과 peak 1~4까지의 spectra는 ζ-carotene의 ozonolysis에서 얻어진 산화개열산물의 spectra와 모두 일치하였다.

또한 ζ-carotene의 자동산화 과정에서 생성되는 acidic 화합물의 확인을 위하여 acidic 화합물 추출법에 의해 얻어진 화합물에 대해 HPLC 분석을 한 결과 Fig. 5에 나타낸 바와 같이 용출시간이 12.52분에 peak가 인정되었다. 이 peak는 ζ-carotene의 중앙개열 acidic 화합물로 판단되어 이 화합물과 4,5-didehydrogeranyl

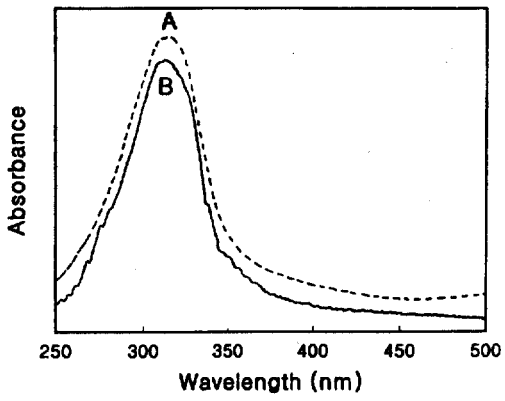

Fig. 6. The UV-vis spectra of standard 4,5-didehydrogeranl geranyl acid (A) and cleavage product(acidic compound) in autoxidation of ζ-carotene (B).

geranyl acid의 표준품의 spectra를 비교한 결과 Fig. 6에 나타낸 것처럼 표준품 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid는 315 nm에서 최대흡수극대를 나타냈으며 자동산화에 의해 생성되는 ζ-carotene의 중앙개열 acidic 화합물도 동일한 spectra를 나타내었다.

ζ-Carotene의 산화개열산물은 eccentric cleavage에 의해 여러종류의 단편을 갖는 화합물로 구성되어 있으며 이들의 화학구조를 HPLC상의 거동 및 분광학적 특성을 통해 정리하면 Fig. 7에 나타낸 것처럼 peak 1은 6,10,14-trimethylpentadeca-3,5,9,13-tetraen-2-one, peak 2는 3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,10,14-pentaenal, peak 3은 5,9,13,17-tetramethyloctadeca-2,4,6,8,12,16-hexaenal, peak 4는 2,7,11,15,19-pentamethylicosa-2,4,6,8,10,14,18-heptaenal 그리고 peak 5는 4,9,13,17,21-pentamethyldocosa-2,4,6,8,10,12,16,20-octaenal로 생각된다.

이러한 화합물의 생성을 추정할 수 있는 근거로서는 이미 보고[13]된 lycopene의 산화개열산물들의 거동 및 분광학적 특성으로 유추해 볼 수 있는데, 본 연구와 동일 한 조건 하에서 lycopene으로부터 생성되는 자동산화 산화생성물로 3,7,11-trimethyl-2,4,6,10-dodecatetraen-1-al, 6,10,14-trimethyl-3,5,7,9,13-pentadecapentaen-2-one, acycloretinal, apolycopenal 등이 있으며 중앙개열산물인 acycloretinoic acid가 자동산화에 의해 생성된다고 하여 ζ-carotene의 산화개열산물도 lycopene의 자동산화 개열산물의 용출경향과 잘 일치하고 있어 자동산화 과정에서 동일한 eccentric cleavage 경로로 산화개열산물이 생성되는 것으로 생각되었다. 또한 ζ-carotene의 중앙개열 acidic 화합물인 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid도 ζ-carotene의 자동산화과정에서

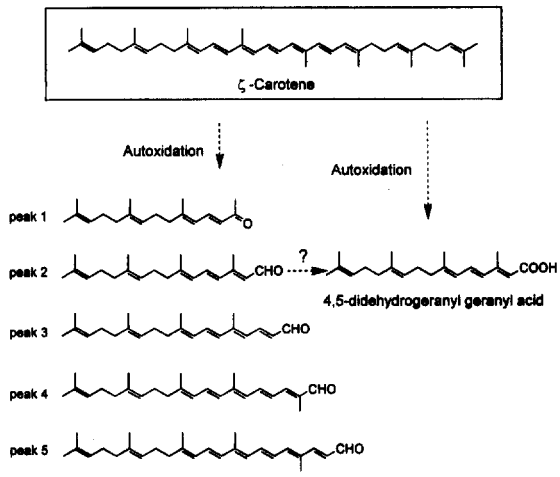

Fig. 7. Possible pathway of formation of 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid by autoxidation of ζ-carotene.
peak 1, 6,10,14-trimethylpentadeca-3,5,9,13-tetraen-2-one; peak 2, 3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,10,14-pentaenal; peak 3, 5,9,13,17-tetramethyloctadeca-2,4,6,8,12,16-hexaenal; peak 4, 2,7,11,15,19-pentamethylicosa-2,4,6,8,10,14,18-heptaenal; peak 5, 4,9,13,17,21-pentamethyldocosa-2,4,6,8,10,12,16,20-octaenal.

생성 가능한 것으로 생각되었다. 그리고 lycopene의 경우, 중앙개열산물인 acycloretinal이 간조직내 산화효소의 작용에 의해 acycloretinoic acid로 변환된다고 보고[15]하였는데 ζ-carotene의 중앙개열산물인 3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,4,6,10,14-pentaenal도 조직내에서 효소의 작용에 의해 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid로 변환될 수 있는지에 대해서는 추후 검토가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

ζ-Carotene를 dichloromethane에 용해하고 dry ice 상에서 ozonolysis을 행하였다. Ozonolysis에 의해 생성된 화합물은 silica gel chromatography를 행하여 분획하고, photodiode array detector를 이용하여 ODS-HPLC로 분석하였다. Toluene에 ζ-carotene을 용해하고 37°C, 72시간 자동산화시킨 결과, 다수의 carbonyl 및 acidic 화합물이 생성되었다. ζ-Carotene의 자동산화로부터 생성된 carbonyl 화합물의 대부분은 ozonolysis에 의하여 얻어진 산화개열산물이 나타내는 HPLC상의 거동과 분광학적 특성이 서로 잘 일치하였다. 또한 ζ-carotene의 자동산화에 의해 생성된 중앙개열 acidic 화합물은 생물활성을 나타내는 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid 표준품과 동일한 분광학적 특성을 나타냈다. 이러한 결

과는 *in vitro*상의 산화적 조건하에서 ζ-carotene 자동산화에 의해 eccentric cleavage가 생성됨을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구의 수행에 협조하여 준 목포대학교 식품산업기술연구센터와 일본 식품총합연구소에 깊이 감사드립니다.

문 헌

1. Micheline, M.M. Recent progress in the medical application of carotenoids. Pure & Appl. Chem. 63: 147-156 (1991)
2. Peto, R., Doll, R., Buckley, J.D. and Sporn, M.B. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates ?. Nature 290: 201-208 (1981)
3. Lim, B.D., Nagao, A., Terao, J., Tanaka, K., Suzuki, T. and Takama, K. Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. Biochi. Biophys. Acta 1126: 178-184 (1992)
4. Scheidegger, R., Pande, A.K., Bounds, P.L. and Koppenol, W.H. The reaction of peroxynitrite with zeaxanthin. Nitric Oxide 2: 8-16 (1998)
5. Thompson, J.N. Official methods for measurement of vitamin A. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 69: 727-738 (1986)
6. Gross, J. Pigment in fruit. pp. 87-91, Academic Press, London (1987)
7. Esaki, H., Onozaki, H., Kawakishi, S. and Osawa, T. New antioxidant isolated from Tenpeh. J. Agric. Food Chem. 44: 696-700 (1996)
8. Ohigashi, H., Osawa, T., Terao, J. and Watanabe, T. and Yohsikawa, T. Food factors for cancer prevention. Springer-Verlag Tokyo, pp. 39-46 (1997)
9. Araki, H., Shidoji, Y., Yamada, Y., Moriwaki, H. and Muto, Y. Retinoid agonist activities of synthetic geranyl geranoic acid derivatives. Biochem. Biophys. Res. Commun. 209: 66-72 (1995)
10. Shidoji, Y. and Muto, Y. Acyclic retinoids and their cancer preventive action. Vitamin 71: 221-234 (1999)
11. Paetau, I., Khachik, F., Brown, E.D. Beecher, G.R., Kramer, T.R., Chittams, J. and Clevidence, B.A. Chronic ingestion of lycopene-rich tomato juice or lycopne supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. Am. J. Clin. Nutr. 68: 1187-1195 (1998)
12. Kim, S.J., Kobayashi, H. and Nagao, A. Formation of γ-retinal and apolycopenals from lycopene by oxidative cleavage. Abstract No. 1 presented at 9th Ann. Japanese Society for Retinoid Research, Tokyo (1998)
13. Kim, S.J., Kobayashi, H., Nagao, A. and Terao J. Oxidative cleavage products of lycopene. Abstract No. 131 presented 73th Ann. Japanese Society for Bioscience, Biotechnology and Agrochemistry. Hukuoka (1999)
14. Davis, J.B., Jackman, L.M., Siddons, P.T. and Weedon, C.L. Carotenoids and related compounds. Part XV. The structure and synthesis of phytoene, phytofluene, ζ-carotene and neurosporene. J. Chem. Soc. 2154-2165 (1966)
15. Nagao, A., Kim, S.J., Nara, E., Kobayashi, H. and Terao, J. Formation of oxidative cleavage from tomato carotene by autoxidation. Abstract No. 467 presented at 12th Ann. International Carotenoid Symposium, Cairns (1999)

(2000년 4월 24일 접수)