

Lycopene의 자동산화에 의한 Acycloretinoic acid의 생성

김 선 재

목포대학교 식품산업기술연구센터

Formation of Acycloretinoic Acid by Autoxidation of Lycopene

Seon-Jae Kim

Food Industrial Technology Research Center, Mokpo National University

Abstract

Acycloretinoic acid was prepared from acycloretinal by oxidation with Tollens reagent. Acycloretinoic acid was separated with Silica-HPLC and analyzed by ODS-HPLC with a photodiode array detector and by GC-MS. Lycopene was solubilized in toluene and aqueous Tween 40, and then oxidized by incubating at 37°C under atmospheric oxygen. Acidic compound was produced by autoxidation of lycopene. Retention time, UV-Vis spectra and mass spectra of the acidic compound were identical to the standard acycloretinoic acid. Thus, acycloretinoic acid was confirmed to occur *in vitro* under oxidation condition of lycopene.

Key words : lycopene, autoxidation, acycloretinoic acid

서 론

최근의 연구에서 천연색소 뿐만아니라 그 대사산물이 산화 스트레스에 의한 다종다양한 질병의 억제에 큰 관계가 있다는 관점에서 다양한 연구들이 진행되고 있다^(1,2). Carotenoids 색소 중에서 canthaxanthine의 대사산물이 생물활성을 나타낸다는 보고⁽³⁾와 함께 세포배양용 배지에서 canthaxanthine이 산화되어 4-oxo-retinoic acid가 생성되며 이것이 F9 embryonal carcinoma의 분화를 유도하는 활성⁽⁴⁾을 나타냈다고 한다. 그리고 비환식 retinoid가 발암억제 작용을 한다는 보고^(5,6)에서는 비환식 retinoid가 retinoid receptor의 ligand로 작용한다고 한다. 특히 4,5-didehydrogeranyl geranyl acid, geranyl geranyl acid가 all-trans retinoic acid와 동일한 생물활성을 나타냈으며 상대적인 활성은 약하였지만 acycloretinoic acid도 생물활성을 나타낼 가능성을 제시하였다. 이들의 보고를 토대로 carotenoids로부터 retinoid의 생성과 함께 그들의 생물

활성의 발현 가능성이, 즉 산화스트레스를 받은 조직에 있어서 carotenoids가 비효소적인 산화반응에 의해 대사 분해되어 retinoid와 유사한 물질로 변환되며, 그 산화분해물들이 생물활성을 발현할 가능성이 있다는 것을 시사하고 있다.

본 연구에서는 토마토와 관련제품의 섭취에 따른 토마토 carotenoids와 그 대사산물의 생체내 동태 및 생물활성 탐색의 기초연구로서 비환식 caroteneoid인 lycopene으로부터 생성이 가능한 acycloretinoic acid의 특성을 lycopene의 자동산화를 통하여 조사하였다.

재료 및 방법

재료

Lycopene은 tomato oleoresin(Lyc-O-mato™ 6%, Ajinomoto Takara Co., Japan)에 대하여 methanol과 dichloromethane을 용매로 결정화 수법으로 얻었고 Tween 40과 α -tocophenol은 Wako사(Tokyo, Japan)의 것을 구입하여 사용하였다. Acycloretinal은 lycopene의 ozonolysis로부터 생성된 중앙개열산물을 정제하여^(7,8) 사용하였다.

Acycloretinoic acid 표준품의 조제 및 정제

Lycopene의 중앙개열산물인 acycloretinal에 대하여

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

Nagao 등⁽⁸⁾에 의한 방법으로 행하였으며 Tollens 시약⁽⁹⁾을 처리하여 acycloretinoic acid의 표준품을 얻었다. 즉 Tollens 시약(10 mg AgNO₃/100 µL H₂O에 10% NaOH 100 µL 및 10% ammonium 용액 100 µL를 혼합한 용액)에 acycloretinal 200 nmol을 ethanol 150 µL로 용해한 액을 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합용액을 30°C에서 30분간 암조건 하에서 반응시켰다. 반응이 종료된 약 400 µL의 용액에 대하여 ethanol : water(1 : 2, v/v) 용액 1.5 mL를 첨가한 후 6 N HCl 300 µL로 산성화시킨 후 ice상에서 냉각하였다. 이 용액에 대하여 ethyl ether 2 mL로 2회 추출하고 물로 2회 세척하였다. 이어 Na₂SO₄로 탈수처리하고 얻어진 ethyl ether 용액을 질소 gas로 완전히 휘발시키고 얻어진 건조물에 대하여 ethanol 1 mL를 가하여 용해한 후 이를 acycloretinoic acid 획분으로 하였다.

이렇게 얻어진 acycloretinoic acid를 정제하기 위해 HPLC를 행하면서 용출되는 acycloretinoic acid를 분취하였다. HPLC분석 column은 precolumn인 Pelliguard LC-SI(2×20 mm, Tosoh, Co., Tokyo, Japan)이 장착된 TSK-GEL Silica-60 (4.6×250 mm, Tosoh, Co.)를 사용하였으며 검출기는 MCPD-3600 photodiode array detector(Otsuka Electronics Co. Ltd., Osaka, Japan), 유속은 1.0 mL/min의 조건으로 하였다. 용출용매는 0.1% acetic acid 함유 n-hexane : ethylacetate(92 : 8, v/v)로 하였다.

Lycopene의 자동산화에 의한 acycloretinoic acid의 생성

Lycopene의 자동산화⁽¹⁰⁾는 toluene 및 5% Tween 40 중에서 행하였다. 유기용매 중의 자동산화는 lycopene(50 µM)을 toluene 1 mL로 용해하고 시험관 내에서 37°C, 24시간 동안 황색등하에서 정치하여 자동산화시켰다. 수용액 중의 자동산화는 5% Tween 40의 acetone 용액 1 mL와 dichloromethane에 용해된 lycopene(50 µM)을 시험관에 넣어 혼합하고 질소 gas로 휘발시켰다. 용매가 완전히 제거된 고형물에 대해 초순수 1 mL로 용해하였다. Lycopene이 함유된 Tween 40 수용액은 황색등 하에서 37°C, 24시간 진탕시키면서 자동산화시켰다. 각각의 자동산화 반응액에 0.02% α-tocopherol 1 mL를 첨가하여 반응을 정지시키고 추출 및 분석할 때까지 -80°C에서 보관하였다.

자동산화 반응액에서 acycloretinoic acid의 추출

Lycopene의 자동산화에 의해 생성된 acycloretinoic acid의 추출을 위해 Kim 등⁽⁷⁾의 방법으로 먼저

lycopene의 자동산화 반응액 1 mL에 ethanol 1 mL와 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 acycloretinoic acid 획분으로 하여 농축하였다. 이어 혼합물의 용매를 질소 gas로 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. Acycloretinoic acid의 HPLC 분석 column은 precolumn인 Pelliguard LC-18(2×20 mm, Tosoh, Co.)이 장착된 TSK-GEL ODS 80Ts(4.6×250 mm)를 사용하였으며, 유속은 1.0 mL/min, 용출용매는 0.1% acetic acid 함유 acetonitrile : methanol : water(70 : 20 : 10, v/v/v)로 하였다.

GC-MS 분석

Acycloretinoic acid의 동정을 위해 GC-MS 분석을 행하였다. Acycloretinoic acid는 diazomethane을 이용하여 methyl ester화⁽¹¹⁾시켜 GC-MS 분석용 시료로 하였다. GC-MS(QP-5000MS system, Shimadzu Co., Japan)의 column은 methyl 65% phenyl silicone(10 m×0.25 mm, 0.5 µm, Quadrex Co. Woodbridge, CT)를 사용하였고 oven 온도는 60°C에서 10분간 유지하다가 40°C/min의 속도로 250°C까지 상승시켰다. 이 때 electron impact는 70 eV였다.

Acycloretinoic acid의 정량

Acycloretinoic acid의 생성량 및 순도는 ODS-HPLC의 peak area로 결정하였다. 그리고 Acycloretinoic acid의 extinction coefficient값⁽⁸⁾(ε = 15570)을 이용하여 acycloretinoic acid의 농도를 결정하였으며, 농도와 peak area의 상관관계로 검량선을 작성하였다.

결과 및 고찰

Lycopene을 dichloromethane에 용해하고 ozonolysis를 행하면 acycloretinal 뿐만 아니라 다양한 산화개열산물이 생성된다^(7,8). 이 중 acycloretinal에 대해서 ODS-HPLC로 정제하여 시료로 이용하였다. Acycloretinal을 Tollens 시약으로 처리하면 acycloretinoic acid가 생성되는데 본 연구에서는 200 nmol의 acycloretinal에 대하여 Tollens 시약을 처리하고 얻어진 획분에 대해 Silica-HPLC를 이용하여 정제하고 ODS-HPLC로 생성량 및 순도를 측정된 결과, 약 101 nmol의 acycloretinoic acid가 생성되어 수율은 약 50% 정도로 나타났다. 또한

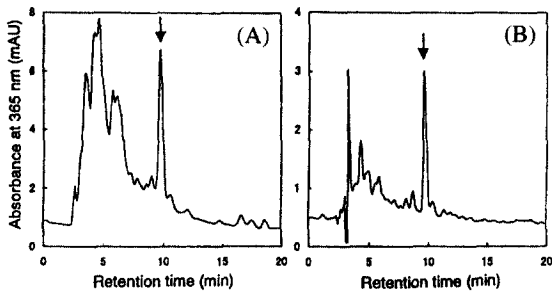


Fig. 1. HPLC chromatogram of acycloretinoic acid formed by autoxidation of lycopene in toluene(A) and Tween 40 solution(B).

ODS-HPLC를 이용하여 전체 peak area에 대한 생성된 acycloretinoic acid의 peak area로 결정한 acycloretinoic acid의 순도는 99.4%로 나타났다. 이와 같은 결과는 Barua 등⁽⁹⁾이 100 mg의 retinal을 Tollens 시약으로 처리하였더니 약 50 mg의 retinoic acid가 생성되어 약 50%의 수율을 나타내었다는 보고와 일치한다고 볼 수 있다.

Lycopene의 자동산화 과정에서 생성되는 acycloretinoic acid의 확인을 위하여 acidic 화합물의 추출법에 의해 얻어진 획득물에 대해 HPLC 분석을 한 결과, Fig. 1에 나타난 바와 같이 용출시간이 toluene 중에서는 9.23분에, 5% Tween 40 수용액 중에서는 9.25분에서 peak가 인정되었다. 이 peak들은 같은 HPLC조건에서 acycloretinoic acid 표준품의 용출시간(9.24분)과 거의 같은 시간대를 나타냈다. Toluene 및 Tween 40 수용액에서 lycopene의 자동산화로부터 생성된 peak들은 lycopene의 중양개열 acidic 화합물로 판단되어 이 화합물과 acycloretinoic acid 표준품의 spectra를 비교한 결과, Fig. 2에 나타난 것 처럼 acycloretinoic acid 표준품은 370 nm에서 최대흡수극대를 나타냈으며, toluene 중의 자동산화에 의해 생성되는 lycopene의 acidic 화합물도 동일한 spectra를 나타내었다.

Acycloretinoic acid 표준품과 toluene 중에서 lycopene의 자동산화에 의해 생성된 acidic 화합물에 대해 GC-MS를 이용하여 동정을 시도하였다. 즉, 각각의 화합물에 대해 diazomethane을 이용하여 methyl ester 화시키고 GC-mass chromatography를 행하였는데 Fig. 3에 나타난 것 처럼 다양한 fragment ion이 생성되었다. Figure 3(A)는 acycloretinoic acid 표준품의 mass spectrum을, Fig. 3(B)는 toluene중에서 lycopene의 자동산화에 의해 생성된 acycloretinoic acid의 mass spectrum을 나타냈다. 각각의 특징적인 fragment ion은 $[M^+, m/z 314]$ 와 $[M^+-69, m/z 245]$ 로서 lycopene의 자

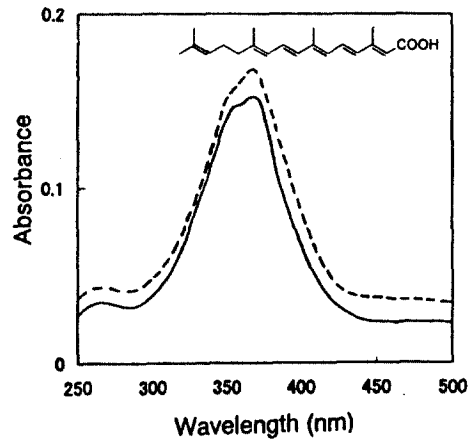


Fig. 2. UV-Vis spectra of standard acycloretinoic acid (----) and cleavage product formed by autoxidation of lycopene in toluene(—).

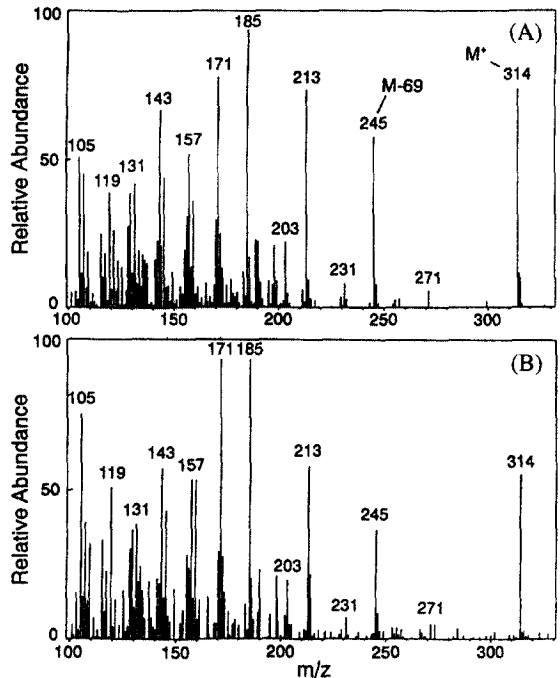


Fig. 3. Mass spectrum of methylated acycloretinoic acid(A) and cleavage product formed by autoxidation of lycopene in toluene(B).

동산화에 의해 생성된 acidic 화합물의 fragment ion의 생성경향은 acycloretinoic acid 표준품의 fragment ion 생성경향과 잘 일치하였다. Weigerath 등⁽³⁾이 laser desorption ionization mass spectrometry를 이용하여 acycloretinoic acid를 동정하였는데, 본 연구결과의 특징적인 fragment ion의 생성경향과 잘 일치하였다. 그

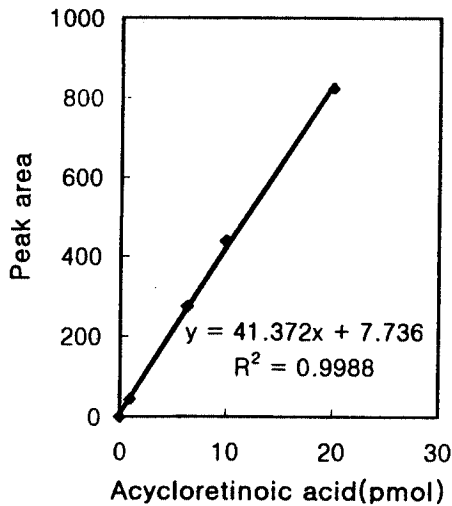


Fig. 4. Calibration curve of acycloretinoic acid

리고 Tween 40 수용액 중에서 생성된 산화 개열산물 (Fig. 1. B)도 acycloretinoic acid 표준품과 UV-Vis spectra가 일치하여 수용액계에서의 자동산화반응에서도 lycopene의 중앙개열산물인 acycloretinoic acid가 생성 가능함을 알 수 있었다.

한편 acycloretinoic acid의 정량을 시도하였는데 Fig. 4에 나타낸 것 처럼 acycloretinoic acid의 extinction coefficient값을 이용하여 농도를 결정하고 HPLC의 peak area와의 상관관계를 이용, 검량선을 작성하였다. 이렇게 작성된 검량선은 다양한 *in vitro* 또는 *in vivo* 실험에서 acycloretinoic acid의 정량에 이용될 수 있다고 생각한다.

β -Carotene의 경우, 효소적⁽¹²⁾ 또는 비효소적^(10,13)인 개열에 의하여 β -carotene으로부터 retinal 및 apocarotenal이 생성되며 retinoic acid로 변환된다고 한다. 그리고 생성된 retinoic acid는 retinoid receptor의 ligand로 작용하여 다양한 생물활성을 나타낸다고 한다. 이러한 보고들은 본 연구에서의 비효소계인 자동산화를 통하여 lycopene으로부터 acycloretinoic acid가 생성될 가능성을 강하게 시사하고 있다. 이와같이 생성된 lycopene의 대사산물이 생체내에서 어떻게 거동하는지 그리고 어떤 생물활성을 나타내는지에 대해서 심도있는 연구가 필요하리라 생각한다.

요 약

Acycloretinal을 Tollens 시약으로 처리하여 acycloretinoic acid를 얻었다. 생성된 표준품 acycloretinoic

acid는 Silica-HPLC 및 ODS-HPLC를 통하여 정제를 행하고 GC-MS에 의해 동정하였다. Lycopene을 toluene과 Tween 40 수용액에서 37°C 조건으로 자동산화시킨 결과, acidic 화합물이 생성되었다. Lycopene의 자동산화로부터 생성된 acidic 화합물은 그 HPLC상의 거동, 분광학적 특성 및 mass spectra의 특성이 acycloretinoic acid 표준품과 잘 일치하였다. 이러한 결과로 *in vitro* 상의 산화적 조건하에서 lycopene의 자동산화에 의해 acycloretinoic acid가 생성됨을 알 수 있었다.

감사의 글

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

문 헌

1. Esaki, H., Onozaki, H., Kawakishi, S. and Osawa, T. New antioxidant isolated from Tenpeh. *J. Agric. Food Chem.* 44: 696-700 (1996)
2. 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 lycopene supplements significantly increases plasma concentrations of lycopene and related tomato carotenoids in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* 68: 1187-1195 (1998)
3. Wingerath, T., Kirsch, D., Spengler, B. and Stahl, W. Analysis of cyclic and acyclic analogs of retinol, retinoic acid and retinal by laser desorption ionization-, matrix-spectrometry, and UV/Vis spectroscopy. *Anal. Biochem.* 272: 232-242 (1999)
4. Nikawa, T., Schulz, W.A., Brink, C.E., Hanusch, M., Saag, P., Stahl, W. and Sies, H. Efficacy of all-*trans*- β -carotene, canthaxanthine, and all-*trans*-, 9-*cis*- and 4-oxoretinoic acids in inducing differentiation of an F9 embryonal carcinoma RAR β -*lac*-Zrepoter cell line. *Arch. Biochem. Biophys.* 316: 665-672 (1995)
5. 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)
6. Shidoji, Y. and Muto, Y. Acyclic retinoids and their cancer preventive action. *Vitamin* 71: 221-234 (1999)
7. 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)
8. Nagao, A., Kim, S.J., Nara, E., Kobayashi, H. and Terao, J. Formation of oxidative cleavage from tomato carotene by autoxidation. Abstract No. 126 presented at 12th Ann. International Carotenoid Symposium.

- Cairns, Australia (1999)
9. Baura, R.K. and Barua, A.B. Vitamin A acid from retinene. *J. Biochem.* 92: 21-22(c) (1964)
 10. Handelman, G.J., van Kuijk, F.J.G.M., Chatterjee, A. and Krinsky, N.I. Characterization of products formed during the autoxidation of β -carotene. *Free Radical Biol. Med.* 10: 427-437 (1991)
 11. Richard, A.H., David, J.M., Jacqueline, A.D., Robert, B.S., Gregor, E., Ronald, M.E. and Christina T. 9-Cis retinoic acid is a high affinity ligand for the retinoid X receptor. *Cell* 68: 397-406 (1992)
 12. Wang, X-D., Tang, G-W., Fox, J.G., Krinsky, N.I. and Russell, R.M. Enzymatic conversion of β -carotene into β -apocarotenals and retinoids by human, monkey, ferret, and rat tissue. *Arch. Biochem. Biophys.* 285: 8-16 (1991)
 13. Mordi, R.C., Walton, J.C., Burton, G.W., Hughes, L., Ingold, K.U., Lindsay, D.A. and Moffatt, D.J. Oxidative degradation of β -carotene and β -apo-8'-carotenal. *Tetrahedron* 49: 911-928 (1993)
-

(2000년 6월 20일 접수)