

산·학·연 논문

중금속 이온 존재 하에서의 아스코르빈산 자동산화반응에 관한 연구

Autoxidation Reaction Mechanism of L-Ascorbic Acid in the Presence of Heavy Metal Ions

김미옥 (Mi-Ok Kim)

울산대학교 식품영양학과

서론

L-아스코르빈산(L-ascorbic acid, AsA)은 식품 및 생체계에 존재하는 주요한 수용성 항산화물질로, 특히 인간에게 있어서는 필수 불가결한 수용성비타민으로써 중요한 역할이 알려져 있다. AsA의 자동산화는 AsA과 산소분자와의 반응을 의미한다(1). 이 양쪽은 보통, 철(Fe)이나 동(Cu) 등의 전이중금속이온이 존재하지 않는 경우에는 비교적 반응하기 어렵지만, 존재하는 경우에는 그들의 촉매반응에 의해 쉽게 반응한다(2). 그러나, 이 AsA의 자동산화반응에 있어서는 유리중금속이온의 산화 촉진효과를 포함해 상세한 것에 대해서는 밝혀지지 않은 점이 많다.

예전부터 AsA의 산화적분해경로는 MDAsA(monodehydro-L-ascorbic acid)를 경유해서 disproportionation반응에 의해 DAsA(dehydro-L-ascorbic acid)의 생성을 거쳐 분해해 가는 경로가 잘 알려져 있지만, 아직 밝혀지지 않은 점이 많다. 최근에 중금속 이온 비존재 하에서의 AsA 자동산화반응경로로 지금까지 잘 알려진 반응경로 이외에 AsA의 산소 부가물을 경유해서 C(2)-C(3)개열반응생성물이 생성되는 반응경로가 존재하는 것이 보고되어 있다(Fig. 1)(3,4). 한편, 중금속 이온 존재 하에서의 AsA 자동산화반응의 경우, AsA과 금속이온 그리고 산소분자가 반

응중간체를 만들어 각각 환원제, 촉매제, 그리고 산화제로 작용하여 반응이 진행된다고 보고되어 있지만(5,6) 불분명한 점이 많다.

본 연구에서는 식품 및 생체 계에서 AsA의 항산화작용의 기초가 되는 자동산화반응의 기작을 규명하기 위한 제 1 단계로써, 중금속이온 존재 하에서의 AsA의 자동산화반응기작에 대해 검토하였다. 또, 생체 내에서 AsA의 대사와 철의 대사는 상호간 대단히 밀접하게 연결되어 있다고 생각되지만, 그 상세한 것에 대해서도 충분하게 해명되어 있지 않은 점에 주목해, 생체 내에 있어서 AsA과 철의 기본적인 상호관련의 일부를 밝혀주기 위해, ferritin으로부터 철의 유리(遊離)에 따른 AsA의 관여에 대해서도 검토하였다.

아스코르빈산의 자동산화반응 해석

중금속 이온 존재 하에서의 AsA 자동산화반응에 있어서 우선, Fe(III)이온 및 Cu(II)이온의 영향, 그리고 단백질의 공존효과 등에 대해서 검토하였다. AsA수용액(50μM) 및 메탄올용액 중에 Fe(III)이온(5μM) 및 Cu(II)(0.1μM)이온을 용해하고, 실온(25°C)에서 일정시간 산소를 통기(通氣)(200ml/min)해서 자동산화반응을 촉진하였다. 그 결과, 비해리형 AsA의 경우(Fig. 2), 수용액 중에서는 Fe(III)이온보다 Cu(II)이온 쪽이 AsA잔존율이 낮은 반면, 메탄올용액 중에서는 수용액 중에서는와 달리, Cu(II)이온보다 Fe(III)이온 쪽의 AsA잔존율이 낮은 것을 알 수 있었다. 즉, 비해리형 AsA의 경우는 용매 및 금속의 종류에 따라 AsA의 산화 프로세스가 크게 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 또, AsA monoanion으로서 AsA-Na(sodium-L-ascorbate)를 갖고 AsA의 산화반응을 일으킨 경우(Fig. 3), 수용액 및 메탄올용액 중에서, Fe(III)이온보다 Cu(II)이온 쪽의 AsA잔존율이 낮고, 비해리형 AsA의 경우와는 다른 것이 밝혀졌다. 또, AsA비해리형 및 해리형과 함께 Fe(III)이온 및 Cu(II)이온 존재에 의해, 수용액

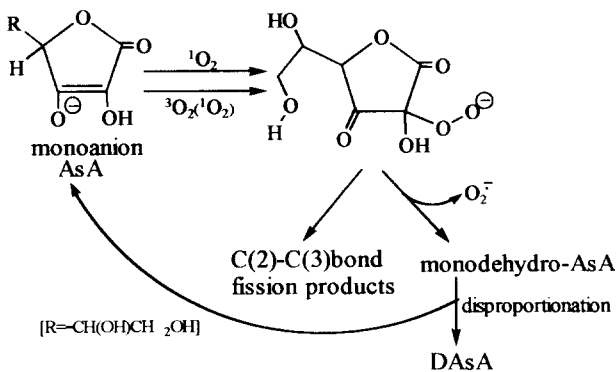


Fig. 1. Possible reaction mechanism of AsA autoxidation(4).

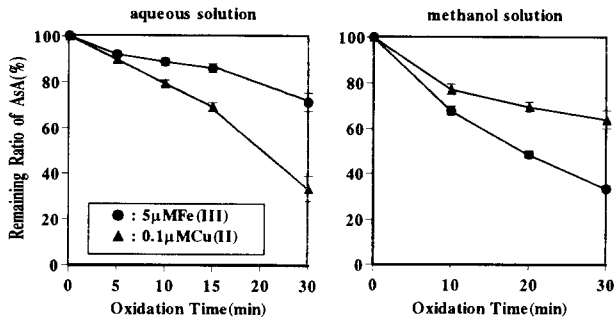


Fig. 2. Degradation of AsA in the presence of metal ions. cf. Data represent mean \pm SD (n=5) and are expressed as ratio, with the initial amounts of AsA regarded as 100%. AsA concentration : 50 μ M Reaction solution : H₂O, MeOH Reaction temperature : 25 $^{\circ}$ C

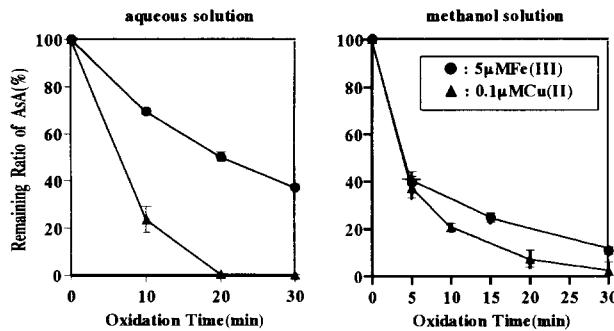


Fig. 3. Degradation of AsA-Na in the presence of metal ions. cf. Data represent mean \pm SD (n=5) and are expressed as ratio, with the initial amounts of AsA regarded as 100%. AsA-Na concentration : 50 μ M Reaction solution : H₂O, MeOH Reaction temperature : 25 $^{\circ}$ C

중에서 보다는 메탄올용액 중에서의 산화반응이 더욱 촉진되는 것이 밝혀지게 되었다. 이것은 수용액 중에서도 메탄올용액 중에서의 산소용해도가 약 10배 높은 것이 원인이라고 생각되어진다. 또, Fe(III)이온 및 Cu(II)이온 존재 하에서의 해리형 및 비해리형 AsA의 반응속도를 조사한 결과(Fig. 4), 비해리형 AsA보다도 해리형 AsA 쪽의 산화반응 속도가 더 빠른 것이 밝혀졌다. 그리고, AsA의 자동산화반응에 대해서, 효소단백질로써 SOD(superoxide dismutase) 및 catalase를 가지고 AsA의 자동산화반응을 행하고 각 효소의 공존효과를 조사한 결과(Fig. 5), 중금속이온 존재 하에 있어서도 비존재 하의 경우(7)와 마찬가지로 AsA의 산화반응이 억제되는 것이 확인되었다. 또, 비효소단백질로써 BSA(bovine serum albumin), ovalbumin, γ -globulin, 그리고 lysozyme을 가지고 AsA의 산화반응을 행한 경우에도 AsA에 대한 비특이적인 꽤 강한 안정화작용이 밝혀졌다.

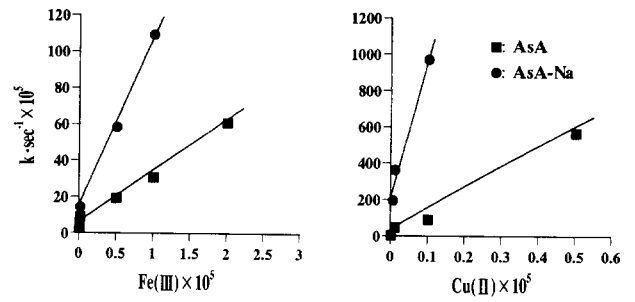


Fig. 4. Rate constants for the metal-ions-catalyzed autoxidation of AsA. cf. First-order rate constants were obtained from plots of log [a/(a-x)] vs. time and multiplying the slopes by 2.303, where is the initial concentration of AsA and x is the concentration of the product at time t.

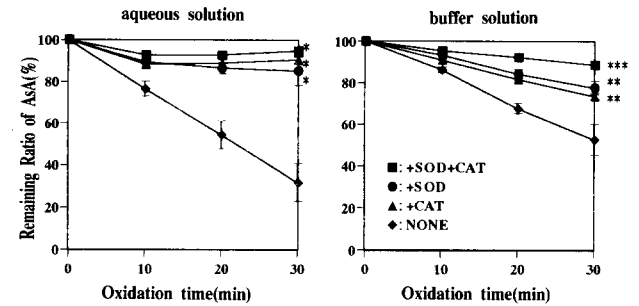


Fig. 5. Effect of SOD or CAT on the autoxidation rate of AsA in the Presence of Fe(III). cf. Data represent mean \pm SD (n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts of AsA regarded as 100%. *p<0.001, **p<0.01, ***p<0.05 significantly different from control. Concentration; AsA: 50 μ M, Fe(III): 5 μ M, SOD: 1 \times 10⁻⁶M, CAT: 2 \times 10⁻⁷M, Reaction solution; pure water (resistivity=18M Ω ·cm), 0.07M potassium phosphate buffer, pH 7.4 (treated Chelex100), Reaction temperature; 35 $^{\circ}$ C

아스코르빈산의 자동산화반응생성물에 대한 분리 및 정량

다음은, 예전부터 알려져 있던 중금속이온 존재 하에서의 AsA의 산화적 반응경로 이외에 AsA의 C(2)산소부가물을 경유하여, C(2)-C(3)개열생성물인 THL(L-theonolactone) 및 THA(threonic acid)를 생성할 가능성에 대해 조사했다. 먼저, 비해리형 AsA의 경우, 수용액 중에서 약 84%정도, 메탄올 용액 중에서 약 51%의 AsA잔존율이 같은 반응시점에서 DAsA, DKG(2,3-diketo-L-ascorbic acid), THL 그리고 THA의 생성수율을 Table 1과 Table 2에 나타내고 있다. Table 1과 Table 2에서 알 수 있듯이 분해한 AsA을 100%로 생각했을 때, AsA 산화생성물이 어느 정도 설명 가능한가를 살펴보면, 중금속이온 비존재 하에 있어서 수용액 중과 메탄올용액 중의 양쪽에서 분해한 AsA

Table 1. Remaining ratio of AsA and yield of DAsA, DKG, THL and THA in the autoxidation of AsA in aqueous solution (%)

	AsA 60 min	AsA + Fe(III) 15 min	AsA + Cu(II) 5 min
Remaining ratio of AsA	82.5 ± 5.8	85.9 ± 1.8	83.6 ± 1.3
Yield of DAsA	2.9 ± 3.0	0.2 ± 0.2	0.6 ± 1.1
Yield of DKG	15.9 ± 2.2	13.2 ± 6.3	15.4 ± 1.5
Yield of THL	1.5 ± 1.0	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.2
Yield of THA	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.3	0.8 ± 0.1

cf. Values represent mean ± SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of AsA regarded as 100%. Concentration of AsA: 50µM, Fe(III): 5µM, Cu(II): 0.1µM, Reaction solution: H₂O

Table 2. Remaining ratio of AsA and yield of DAsA, THL and THA in the autoxidation of AsA in methanol solution (%)

	AsA 60 min	AsA + Fe(III) 15 min	AsA + Cu(II) 5 min
Remaining ratio of AsA	50.2 ± 5.5	53.0 ± 4.6	50.9 ± 7.5
Yield of DAsA	28.2 ± 3.3	23.0 ± 3.6	23.1 ± 1.7
Yield of THL	4.7 ± 1.7	9.1 ± 3.5	1.6 ± 0.4
Yield of THA	1.6 ± 0.9	2.1 ± 1.8	0.9 ± 0.5

cf. Values represent mean ± SD (n=4) and are expressed as a ratio, with the initial amounts of AsA regarded as 100%. Concentration of AsA: 50µM, Fe(III): 5µM, Cu(II): 0.1µM, Reaction solution: MeOH

의 약 12%가 AsA의 C(2)산소부가물을 거쳐, THL 및 THA를 생성하는 것을 알 수 있었다. 한편, Fe(III)이온 및 Cu(II)이온이 존재하는 경우, 수용액 중에서 비존재하에서의 경우와 거의 같고, 메탄올용액 중에서는 Fe(III)이온 존재 하에서 약 24%, Cu(II)이온 존재 하에서 약 5%가 AsA의 C(2)산소부가물을 경유하고, THL 및 THA를 생성하는 것이 확인되었다. 또한, 비존재 하에서의 경우와 비교해서 Fe(III)이온 존재 하에서는 약 2배 많고, Cu(II)이온 존재 하에서의 경우와 비교해서 약 1/2이하인 것이 밝혀졌다. 또, 수용액 중에서는 약 90%이상, 메탄올용액 중에서는 약 50%이상, O₂와 MDAsA를 생성하는 반응경로를 경유하는 것이 실험적으로 확인되었다. 더욱이, 이 생성물이 AsA로부터 생성한 것을 증명하기 위해서 DAsA과 DKG으로부터 산화반응을 행하고, 그들의 산화생성물을 조사한 결과, 우선, 수용액 중에 중금속이온 비존재하 및 Cu(II)이온 존재 하에서의 DAsA로부터의 산화반응에 의한 THL 및 THA의 생성수율은 AsA의 경우보다 약 1/2이하인 점에서 생각하여 DAsA로부터의 C(2)-C(3)개열생성물은 생성하기 어려운 것이라고 생각했다. 한편, Fe(III)

이온 존재 하에서는 50µM DAsA에서의 산화반응에 의한 C(2)-C(3)개열생성물의 생성의 가능성이 인정되었지만, 2µM의 저농도인 DAsA에서는 THL 및 THA의 생성은 인정되지 않았다. 또, 중금속이온 존재 및 비존재 하에서의 DKG에서의 산화에 의한 C(2)-C(3)개열생성물은 전혀 얻어지지 않았다. 메탄올 용액 중에서는 중금속 이온 존재 및 비존재 하, DAsA 및 DKG 양쪽으로부터의 C(2)-C(3)개열생성물은 AsA의 경우보다 유의하게 적은 것에서 AsA에서의 C(2)-C(3)개열생성물인 것이 재확인 되었다.

또, 해리형 AsA을 가지고 AsA의 산화반응을 행한 결과, 수용액 중, 중금속이온 비존재 하에서는 약 5%, Fe(III) 및 Cu(II)이온 존재 하에서는 각각 약 6%가 AsA의 C(2)산소부가물을 경유하고, THL 및 THA를 생성하는 것이 확인되었다. 한편, 메탄올용액 중에서는 중금속이온 비존재 하에서 약 23%, Fe(III)이온 존재 하에서 약 47%, Cu(II)이온 존재 하에서 약 20%가 AsA의 C(2)산소부가물을 거쳐, THL 및 THA를 생성하는 것이 확인되고, 메탄올용액 중 Fe(III)이온 존재 하에서는 비존재 하의 경우보다 약 2배 많은 AsA의 C(2)산소부가물을 경유할 가능성이 인정되었다. 이처럼, 해리형 AsA에 대해서도 비해리형AsA의 경우와 같이 THL 및 THA의 생성이 확인되었다. 또, 해리형AsA의 경우는 비해리형AsA의 경우보다 THA의 생성이 현저하게 많이 생성되는 것이 확인되었다. 또한, 약알칼리성(pH 8.5) 및 강알칼리성(pH 10.5)의 수용액을 사용한 경우, 약알칼리성 하에서는 THL 및 THA이 생성되고, 약 6%가 AsA의 C(2)산소부가물을 경유하는 반응경로가 존재할 가능성이 실험적으로 확인되었다. 또, 강알칼리성 하에서는 THL은 생성되지 않고, THA만 약 2%가 AsA의 C(2)산소부가물을 경유해서 생성하는 것이 확인되었다. 더욱이, 중금속이온 존재 및 비존재 하에서 AsA의 수용액을 산소가스를 통기시키지 않고 공기 중, 또는 실온 하에서 방치한 경우에도 THL 및 THA의 생성수율은 꽤 낮지만, 무시할 수 없을 정도로 생성되는 것이 밝혀졌다.

아스코르빈산의 자동산화반응에서 O₂의 생성

한편, 중금속이온 존재 하에서의 AsA의 자동산화반응에 대한 O₂의 생성을 조사하기 위해 수용액, 완충용액, 그리고 메탄올용액 중에서의 반응을 행했다. 우선, 수용액 및 완충용액 중에 있어서 SOD(8)를 가지고 SOD 무침가의 경우와 비교하고, 또 O₂로부터 생성되는 H₂O₂를 소거하기 위해서 CAT를 첨가해 실험한 결과(Fig. 6), 수용액 중에서도 완충용액 중에서도 SOD가 O₂를 소거하고, SOD의 존재에 의해 AsA의 산화반응이 억제되는 것이 밝혀졌다. 또한, 완충용액 중에서는 XTT(2,3-bis[2-methoxy-

4-nitro-5-sulphophenyl-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) (9)의 환원생성물인 formazan의 생성물을 흡수극대 470nm에서 측정하고 O₂가 생성하는 것을 확인했다(Fig. 7). 한편, 메탄올용액 중에서는 NBT(nitro blue tetrazolium) (10)법을 이용해서 흡수극대 560nm에서 NBT의 환원생성물인 blue formazan을 측정한 결과, 0.01μM농도의 Fe(III) 및 Cu(II)이온 존재시, 반응시간 30분에서 흡광도 0.03~0.04를 나타내어, O₂의 생성을 확인했다. 이처럼, 수용성계 및 비수용성계 양쪽 모두다, 중금속 이온 존재 하에서의 AsA 자동산화반응에 대한 O₂의 생성이 강하게 시사되었다.

이상의 결과에 의해, 본 연구에서는 중금속이온 존재

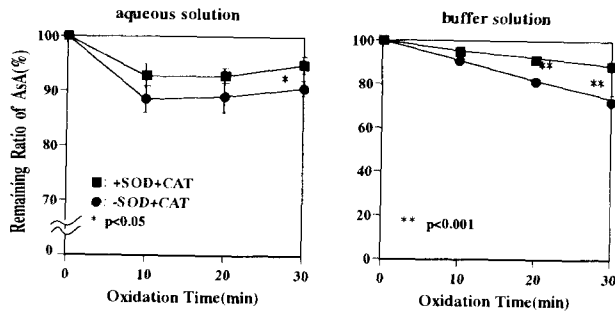


Fig. 6. Effect of SOD on the autoxidation rate of AsA in the presence of Fe(III).

cf. Data represent mean ± SD (n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts of AsA regarded as 100%. Concentration; AsA: 50μM, SOD: 1 × 10⁻⁶M, CAT: 2 × 10⁻⁷M, Reaction solution; H₂O(resistivity=18M.Ω·cm), 0.07M potassium phosphate buffer (pH 7.4)(treated Chelex100), Reaction temperature: 35°C, *p<0.05, **p<0.001 significantly different from control.

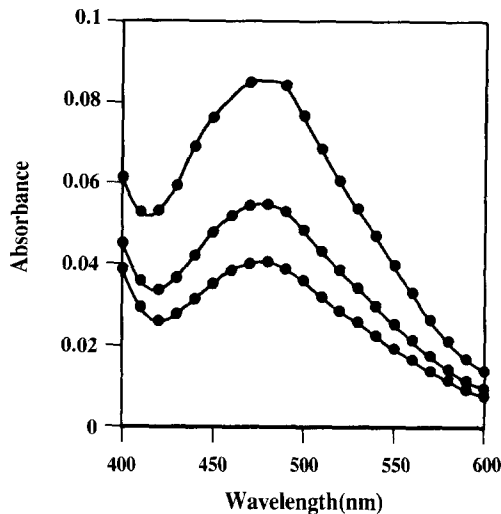


Fig. 7. Spectrum of the reduction of XTT by AsA in the presence of 5μM Fe(III).

cf. Concentration : AsA: 50μM, Fe(III): 5μM, Reaction temperature : 35°C, Reaction solution : potassium phosphate buffer(pH 7.4, treated Chelex100), Reaction time : 15min, 30min, 60min

하에서의 AsA의 자동산화반응경로에 대해서 지금까지 알려져 있었던 반응경로 이외에 새로운 경로가 존재할 가능성을 제시할 수 있었다(Fig. 8). 다시말해서, 중금속이온 존재 하에 있어서도 비존재 하에 대한 경우와 마찬가지로 수용액 및 메탄올용액 중에서의 AsA의 자동산화반응에 있어서, O₂⁻와 MDAsA를 생성하고, 또한, MDAsA의 disproportionation반응에 의해 DAsA과 AsA를 생성하는 반응경로<A>와 C(2)-C(3)간의 개열반응 생성물인 THL 및 THA를 생성하는 반응경로를 추정할 수 있었다.

AsA의 대사와 철의 대사간의 상호작용

또한, 생체 내에서 AsA의 대사와 철의 대사는 상호 밀접하게 연결되어 있다고 생각해, 본 연구에 있어서는 철 단백질의 하나인 ferritin을 가지고 AsA과의 상호작용의 유무를 조사했다. 가시부 영역의 흡수스펙트럼변화의 측정결과에 의해, 호기적 및 혐기적 조건하, 양쪽에서 ferritin으로 부터 철의 유리를 확인하고, 호기적 조건하에서 유리된 철의 50%이상이 AsA자신에 의해, 나머지는 AsA과 산소와의 반응에 의해 생기는 O₂에 의한 것으로 생각되어졌다(Table 3). 지금까지 ferritin에서의 철의 유리는 O₂에 의한 것이라고 하는 보고가 많았지만(11,12), 이 결과에 의해 ferritin으로 부터의 철의 유리에 O₂가 관여하지만, 그것과 같은 정도, 혹은 그 이상으로 AsA이 중요한 것으로 밝혀졌다.

또, 생체분자간 상호작용 해석장치인 BIACORE 2000 (13)를 사용한 경우에도 AsA과 ferritin이 결합해서 얻어질 가능성이 실험적으로 확인되었지만, apoferritin과의 상호작용은 나타나지 않았다(Fig. 9). 한편, DAsA 및 DKG를 사용한 경우에는 ferritin이나 apoferritin과의 상호작용이 나타나지 않았다. 또, AsA 이외에 erythorbic acid에 있어서도 ferritin 및 [apoferritin + Fe(III)]과의 상호작용이 확인되어, ferritin에서의 철의 유리에 대해서는 AsA과 같은 endiol기를 가진 erythorbic acid의 경우에도 거의 같은 기작에 의해 행해지고 있는 것으로 생각되어졌다. 이들의 결

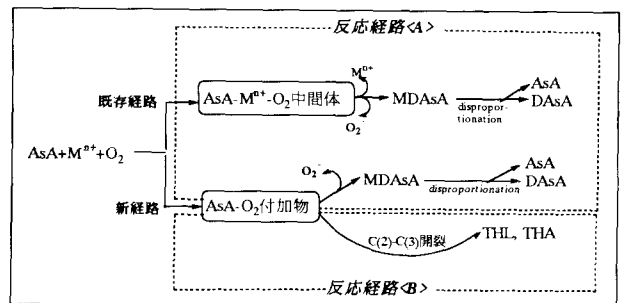


Fig. 8. Possible reaction mechanism of AsA autoxidation in the presence of heavy metal ions.

Table 3. Iron release from ferritin by various antioxidants under aerobic and anaerobic conditions

	(A)		(B)		(B)/(A)	
	aerobic condition		anaerobic condition		(%)	
	30min	60min	30min	60min	30min	60min
AsA	0.0676	0.1170	0.0466	0.0772	68.9%	66.0%
DAsA	-	0.0333	-	0.0359	-	100%
DKG	-	0.0438	-	0.0467	-	100%

cf. λ max=562nm

Concentration: 50 μ M(AsA, DAsA, DKG) 1mM ferrozine, 0.6 μ M ferritin, Reaction time: 1 hour, Reaction temperature: 27°C, Reaction solution: 0.1M MOPS buffer, pH 7.0(treated Chelex 100)

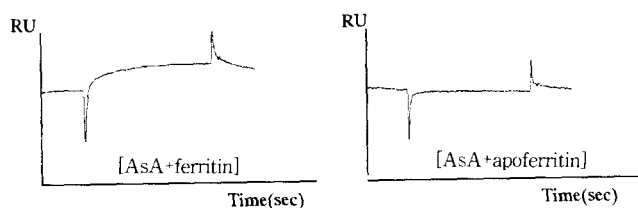


Fig. 9. Binding of AsA to immobilized ferritin and apoferritin.

과에 의해, ferritin에서의 철의 유리는 AsA이 ferritin의 core부분까지 들어가, Fe(III)를 Fe(II)로 환원해서, Fe(II)를 ferritin의 외부로 유리하는 가능성이 강하게 시사되었다.

위와 같이, 본 연구에 있어서는 식품 및 생체 계에서 AsA의 항산화기구, 특히 중금속 이온 존재 하에서 항산화 기구의 해명에 도움되는 중요한 기초자료를 얻는 것과 함께, 생리적으로 대단히 중요하게 여겨지는 AsA대사와 철 대사에 관한 기초적인 지식을 얻을 수가 있었다.

문 헌

1. Miller, D.M., Buettner, G.R. and Aust, S.D. : Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radical Biol. Med.*, **8**, 95-108(1990)
2. Aust, S.D., Morehouse, L.A. and Thomas, C.E. : Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical Biol. Med.*, **1**, 3-25(1985)
3. Miyake, N., Otsuka, Y. and Kurata, T. : Autoxidation reaction mechanism for L-ascorbic acid in methanol without metal ion catalysis. *Biosci. Biotech Biochem.*, **61**, 2069-2075(1997)
4. Miyake, N., Kim, M. and Kurata, T. : Formation mechanism of monodehydro-L-ascorbic acid and superoxide anion in the autoxidation of L-ascorbic acid. *Biosci. Biotech Biochem.*, **61**, 1693-1695(1997)
5. Martell, A.E. : *Ascorbic Acid : Chelates of Ascorbic Acid : Formation and Catalytic Properties*. Seib, P.A. and Tolbert, B.M. (eds.), American Chemical Society, Washington, p.153-178(1982)
6. Khan, M.M.T. and Martell, A.E. : Metal ion and metal chelate catalyzed oxidation of ascorbic acid by molecular oxygen. I. Cupric and ferric ion catalyzed oxidation. *J. Am. Chem. Soc.*, **89**, 4176-4185(1967)
7. Miyake, N., Kim, M. and Kurata, T. : Stabilization of L-ascorbic acid by superoxide dismutase and catalase. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **63**, 54-57(1999)
8. Scarpa, M., Stevanato, R., Viglino, P. and Rigo, A. : Superoxide ion as active intermediate in the autoxidation of ascorbate by molecular oxygen. *J. Biol. Chem.*, **258**, 6695-6697(1983)
9. Ukeda, H., Maeda, S., Ishii, T. and Sawamura, M. : Spectrophotometric assay for superoxide dismutase based on tetrazolium salt 3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis(4-methoxy-6-nitro) benzenesulfonic acid hydrate reduction by xanthine-xanthine oxidase. *Anal. Biochem.*, **251**, 206-209(1997)
10. Bieiski, B.H.J, Shiue, G.G. and Bajuk, S. : Reduction of nitro blue tetrazolium by CO₂⁻ and O₂⁻ radicals. *J. Phys. Chem.*, **84**, 830-833(1980)
11. Bolann, B.J. and Ulvik, R.J. : Release of iron from ferritin by xanthine oxidase. *Biochem. J.*, **243**, 55-59(1987)
12. Tufano, T.P., Pecoraro, V.L. and Raymond, K.N. : Kinetics of iron release from ferritin to catecholamides. *Biochimica et Biophysica Acta*, **668**, 420-428(1981)
13. Jönsson, U. and Malmqvist, M. : Real time biospecific interaction analysis. *Advances in Biosensors*, **2**, 291-336 (1992)