

중금속 이온 존재하에서의 아스코르빈산 자동산화 과정에서의 $O_2^{\cdot -}$ 생성김 미 옥
경북대학교 식품공학과

Formation of Superoxide Anion in the Autoxidation of L-Ascorbic Acid in the Presence of Heavy Metal Ions

Mi-Ok Kim

Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University

Formation of superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) in the autoxidation of L-ascorbic acid (AsA) in the presence of heavy metal ions were determined. The generation of $O_2^{\cdot -}$ was studied by using superoxide dismutase (SOD) in aqueous and buffer solution, and using nitro blue tetrazolium (NBT) in methanol solution. The remaining amount of AsA was significantly higher in the presence of SOD than in its absence. It suggested that SOD stabilizes AsA in aqueous and buffer solution because of scavenging $O_2^{\cdot -}$ formed during the autoxidation reaction of AsA in the presence of heavy metal ions. NBT has an absorption maximum at about 560 nm in methanol solution. The absorbance at 560 nm increased during the oxidation of AsA, suggested the formation of $O_2^{\cdot -}$ in methanol solution. Thus, the formation of $O_2^{\cdot -}$ was confirmed during the autoxidation of AsA not only in aqueous solution but also in methanol solution in the presence heavy metal ions.

Key words : L-ascorbic acid, autoxidation, superoxide anion, heavy metal ions

서 론

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 의미하는데⁽¹⁾, 보통, 철(Fe)이나 동(Cu)등의 금속이온이 존재하지 않는 경우에는 비교적 반응하기 어렵지만, 존재하는 경우에는 그들의 촉매반응에 의해 쉽게 반응한다⁽¹⁻⁴⁾. 그러나, 이 AsA의 자동산화반응에 있어서는 유리중금속이온의 산화촉진효과를 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⁽⁵⁾, 아직 밝혀지지 않은 점이 많다. 최근에 중금속 이온 비존재 하에서의 AsA 자동산화반응경로로 지금까지 잘 알려진 반응경로 이외에 AsA의 산소 부가

물을 경유해서 C(2)-C(3)개열반응생성물이 생성되는 반응경로가 존재하는 것이 보고되어 있다(Fig. 1)^(6,7). 또한, Fig. 1에서 알 수 있듯이 중금속 이온 비존재 하에서의 AsA 자동산화반응 과정에서의 $O_2^{\cdot -}$ 생성에 대해서 수용성계에서는 superoxide dismutase(SOD)를 이용하여, 메탄올 용액 중에서는 nitro blue tetrazolium(NBT)를 이용하여 $O_2^{\cdot -}$ 생성을 실험적으로 확인하여 그 일부를 이미 보고한 바 있다⁽⁸⁾. 또한, Scarpa⁽⁹⁾ 등은 완충용액 중에서의 AsA 자동산화 과정에 있어서 중금속 이온의 존재 유무에 상관없이 $O_2^{\cdot -}$ 가 생성되는 것을 SOD를 이용하여 보고한 바 있으나, 그 상세한 것에 대해서도 밝혀지지 않은 점이 많다.

한편, 중금속 이온 존재 하에서의 AsA 자동산화반응의 경우, AsA과 금속이온 그리고 산소분자가 반응중간체를 만들어 각각 환원제, 촉매제, 그리고 산화제로 작용하여 반응이 진행한다고 보고되어 있지만^(3,10) 불분명한 점이 많다. 그러므로, 본 연구에 있어서는 수용액, 완충용액, 그리고 메탄올 용액 중, 중금속 이온 존재 하에 있어서 AsA의 자동산화반응을 유도하고 $O_2^{\cdot -}$ 생성에 대해 조사하였다. 수용액 및 완충용액 중에서는 SOD^(11,12)를 사용하여, catalase(CAT)⁽¹²⁾를 포함하는 반응액에서의 SOD 첨가유무에 따른 AsA의 잔존율을 비교하고, $O_2^{\cdot -}$ 의 생성을 확인하였다. 더욱이, 완충용액 중에서는 2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide(XTT)⁽¹³⁾를 사용하여 중금속이온 존재 하에서의 AsA의 자동산화반응에 의한 $O_2^{\cdot -}$ 의 생성을 조사하였다. 한

Corresponding author : Mi-Ok Kim, Department of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
Tel: 82-53-950-5775
Fax: 82-53-950-6772
E-mail: gipuge@hanmail.net

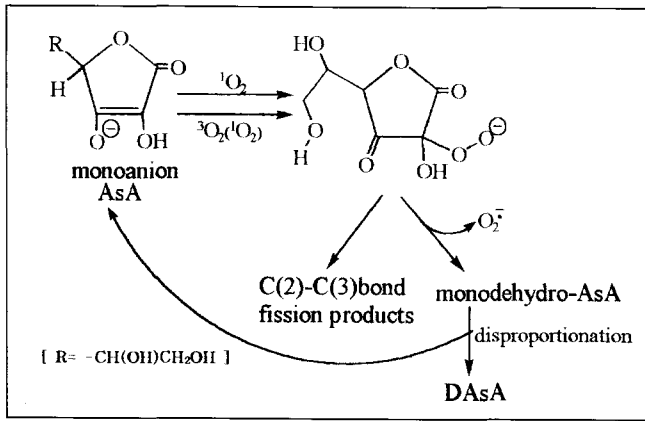


Fig. 1. Possible reaction mechanism of AsA autoxidation⁽⁵⁾

편, 메탄올 용액 중에서는 NBT환원법⁽¹⁴⁾을 이용하여 NBT의 O₂⁻에 의한 환원에서 생기는 blue formazan을 측정하여 O₂⁻의 생성을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

AsA은 和光純藥(株)製の 특급시약을 재결정한 것을 사용하였고, Fe(III)이온은 FeCl₃·6H₂O, Cu(II)이온은 CuSO₄·5H₂O를 和光純藥(株)製の 특급시약을 사용하였다. SOD 및 CAT는 각각 和光純藥(株)製の 시약의 소적혈구유래 Cu, Zn-SOD(생화학용), 소간장유래 CAT(생화학용)를 사용하였다. XTT는 Sigma사 제품을 사용하고, xanthine[xanthine(2,6-dioxopurine)], ethylenediaminetetraacetic acid, disodium salt, 그리고 xanthine oxidase[buttermilk 유래, 동결건조품(Oriental 효모)]는 각각 和光純藥(株)製の 특급시약을 사용하였다. NBT는 和光純藥(株)製の 특급 시약을 사용하였다. 또한, 미량 중금속류를 완전히 제거하기 위해서 물은 1차 정제수를 탁상형 超純水 장치 Pulic-Z(Oregano(株))에서 2차 정제한 超純水(저항율: 18MΩ·cm)를 사용하고, 완충용액은 0.07 M 인산완충용액(KH₂PO₄-K₂HPO₄, pH 7.4)을 Chelex-100(Bio-Rad)의 column(column size: 0.9×18 cm)을 통해 중금속류를 제거한 것을 사용하였다. 그리고, 메탄올은 和光純藥(株)製の 특급을 재증류한 것을 실험에 사용하였다.

SOD를 이용한 O₂⁻ 생성 확인

AsA용액의 농도는 50 μM, SOD의 농도는 2×10⁻⁶ M, CAT의 농도는 2×10⁻⁷ M로 하고, 주로 사용된 Fe(III)이온의 농도는 5 μM, Cu(II)이온의 농도는 0.1 μM로 하였다. 수용액 중에서의 AsA자동산화반응은 50 μM 농도의 AsA수용액에 Fe(III)이온 혹은 Cu(II)이온을 첨가하여 용해시킨 후, 25°C에서 산소가스를 200 mL/min의 유속으로 일정시간 통기하여 산화반응을 일으켰다. 이때 미량 불순물이 반응에 관여하지 않도록 하기 위해 반응액에 超純水を 통과시켜 산소가스를 통기하였다(Fig. 2). 그리고, 완충용액 중에서는 35°C에서 수용액 중에서의 반응과 마찬가지로 일정시간 산화반응을 유도한 후, 반응액을 2배로 희석해서 double beam 분광광도계

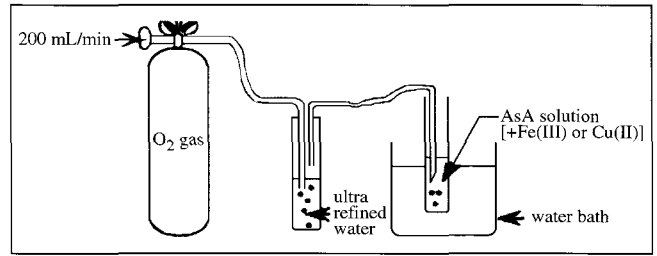


Fig. 2. Apparatus for the oxidation reaction of AsA
Recrystallized AsA was dissolved in aqueous or methanol solution at a concentration of 50 μM and Fe(III) or Cu(II) was added. The reaction was done by bubbling oxygen gas through the solution at a flow rate of 200 mL/min.

UV-180(Shimazu)을 이용하여 265 nm에서의 흡광도를 측정해서 AsA잔존량을 구하였다. 이처럼, SOD를 이용한 AsA의 산화반응에 관여하는 O₂⁻의 발생 유무에 관한 실험은 Scarpa⁽⁹⁾ 등, Miyake⁽⁸⁾ 등의 방법을 토대로 하여 본 실험에서는 완충용액 뿐만 아니라 수용액 중에서, Fe(III)이온 및 Cu(II)이온 존재 하에서, CAT를 함유하는 AsA 수용성용액에 SOD를 공존시킨 경우와 그렇지 않은 경우에 대해서 각각 비교, 검토하였다.

XTT에 의한 O₂⁻ 생성 확인

Ukeda 등의 방법⁽¹³⁾에 따라서 우선, xanthine-xanthine oxidase(XO)계에서의 O₂⁻ 생성을 확인하기 위해서 0.07 M 인산완충용액(pH 7.0)에 0.15 mM xanthine, 0.15 mM EDTA, 5.5 × 10⁻⁵ mM xanthine oxidase(XOD), 그리고 0.15 mM 농도의 XTT를 넣어서 35°C에서 일정시간 200 mL/min의 유속으로 산소가스를 통기하면서 산화반응을 유도하였다. 또한, 50 μM 농도의 AsA을 완충용액에 용해한 후, 50 μM XTT를 첨가하여 위와 같이 산화반응을 유도하였다. 산화반응 후, O₂⁻ 생성을 측정하기 위해, double beam 분광광도계 UV-180(Shimazu)을 이용하여 XTT의 환원생성물인 formazan(λ_{max} = 470 nm)의 생성량을 흡광도 측정치에 따라 구하고, O₂⁻ 생성의 유무를 조사하였다.

NBT에 의한 O₂⁻ 생성 확인

AsA의 농도는 50 μM로 하고, Fe(III)이온이나 Cu(II)이온의 농도는 각각 0.001 μM, 0.01 μM, 0.1 μM, 0.2 μM을 사용하고, NBT의 농도는 61 μM로 하였다. AsA 산화 반응계에서 O₂⁻ 발생의 유무를 조사하기 위하여 AsA 메탄올 용액에 Fe(III)이온이나 Cu(II)이온을 각각의 농도가 되도록 용해한 후, NBT를 첨가하여 25°C에서 산소가스를 200 mL/min의 유속으로 일정시간 통기하여 산화반응을 유도하였다. NBT의 환원생성물인 blue formazan(λ_{max} = 560 nm)을 double beam 분광광도계 UV-180(Shimazu)을 이용하여 측정하고, 흡광도 측정치에 따라 구해, O₂⁻ 생성의 유무를 조사하였다⁽¹⁴⁾.

AsA 잔존율의 산출방법 및 검출법

AsA 산화반응시간 0분의 AsA 농도를 100%로 하고, 각 반응시간에서의 AsA 농도를 %로 나타낸 것을 AsA 잔존율로 하였다. 각치의 유의차 검증은 Student의 t 검증에 의해 구하

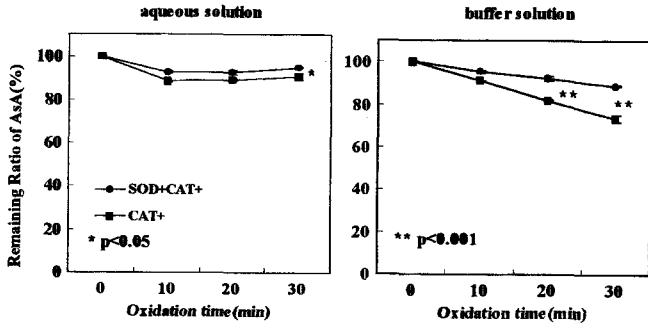


Fig. 3. Effect of SOD on the autoxidation rate of AsA in the presence of Fe(III)

Data represent Mean±SD(n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts AsA regarded as 100%. Concentrations; AsA: 50 μM, Fe(III): 5 μM, SOD: 1×10⁻⁶ M, CAT: 2×10⁻⁷ M, Reaction solution: H₂O(resistivity = 18 MΩ·cm), 0.07 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), Reaction temperature: 35°C, *p<0.05, **p<0.001 significantly different from control.

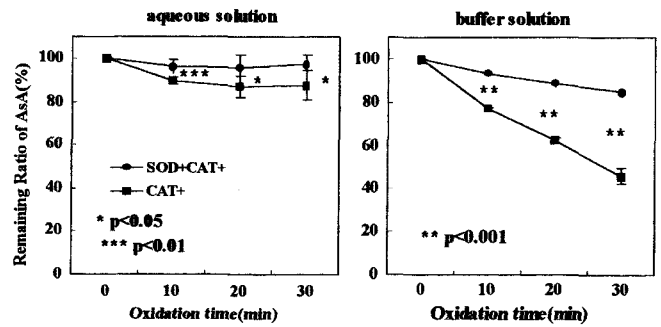


Fig. 4. Effect of SOD on the autoxidation rate of AsA in the presence of Cu(II)

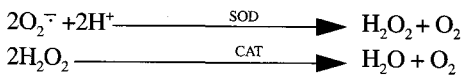
Data represent Mean±SD(n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts AsA regarded as 100%. Concentrations; AsA: 50 μM, Cu(II): 0.1 μM, SOD: 1×10⁻⁶ M, CAT: 2×10⁻⁷ M, Reaction solution: H₂O(resistivity = 18 MΩ·cm), 0.07 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), Reaction temperature: 35°C, *p<0.05, **p<0.001 significantly different from control.

고, 위험을 5% 이하를 유의하다고 판정하였다.

결과 및 고찰

수용액 및 완충용액 중에서의 O₂⁻ 생성 확인

중금속 이온 비존재 하에서의 AsA 자동산화반응 과정에서 수용성계에서의 AsA산화반응에 대한 SOD의 효과에 대해 이미 보고한 바 있는데⁽⁶⁾, SOD가 존재하는 경우가 존재하지 않는 경우에 비해 유의하게 AsA의 잔존율이 높아 SOD가 AsA산화반응에서 생성된 O₂⁻를 제거하여 AsA 산화를 억제하는 것으로 확인되었다. 이때, AsA반응액에 미리 CAT를 첨가해 두고, O₂⁻의 불균화반응을 촉매하는 SOD의 첨가 유무에 따른 반응을 알아보았다.



본 실험에 있어서도 위 식에서 보듯이 O₂⁻의 불균화반응에 의해 H₂O₂와 O₂가 생성되고, 생성된 H₂O₂에 의해 반응성이 높은 ·OH 생성 등 다른 반응을 유발할 가능성을 배제하기 위해, AsA수용액 및 완충용액 중에 CAT를 미리 첨가해 두고, SOD의 첨가 및 무첨가의 경우와 각각 비교하여 AsA 자동산화반응에서의 O₂⁻ 생성에 미치는 SOD의 효과를 알아보았다. 이처럼 AsA 자동산화반응에서 O₂⁻ 생성을 살펴보면 SOD를 사용한 이유로서는 AsA이 O₂⁻를 환원해서 radical을 소거하는 반응속도가 5~27×10⁴ M⁻¹sec⁻¹인데 비해⁽¹⁵⁾, SOD 존재하에서 O₂⁻의 불균화 반응속도는 1.8~3.5×10⁹ M⁻¹sec⁻¹(pH 4.8~9.5)⁽¹⁶⁾로 상당히 큰 것에서 SOD에 의한 O₂⁻의 검출이 가능한 것을 알 수 있다.

본 연구에 있어서는 Fe(III)이온 및 Cu(II)이온 존재 하에서의 AsA 자동산화반응에 있어서 O₂⁻ 생성을 수용액 및 완충용액에서 각각 살펴보았다. 먼저 5 μM Fe(III)이온 존재 하에서의 결과를 보면(Fig. 3) 수용액 중에서는 SOD가 존재하는 쪽이 존재하지 않는 경우와 비교해서 반응시간 30분에서의 AsA잔존율이 5%의 유의차로 큰 것을 알 수 있다. 또한, 식

품 및 생체계에 보다 가까운 조건 하에서의 AsA 산화반응 과정 중에서의 O₂⁻ 생성을 살펴보기 위해 pH 7.4 인산완충용액을 사용하여 수용액 중에서의 경우와 동일한 실험을 한 결과, 반응시간 30분에서 SOD가 존재하는 경우와 존재하지 않는 경우의 AsA 잔존율이 각각 88.7%, 73.6%로 나타났다. 이것은 SOD가 존재하는 경우가 존재하지 않는 경우에 비해 0.1%의 유의차로 AsA 잔존율이 높게 나타나 완충용액 중에서의 AsA 산화반응과정에서 생성되는 O₂⁻가 SOD에 의해 억제되는 것으로 여겨진다. 또한, 수용액 및 완충용액 중에서 SOD가 존재하지 않는 경우의 AsA 잔존율을 비교해 보면 수용액(90.6%)중에서 보다 완충용액(73.6%)중에서 AsA 산화가 더욱 촉진되는 것을 알 수 있는데, 이것은 AsA 산화속도가 pH에 의해 크게 영향을 받는다는 것을 재확인할 수 있었다. 또한, 이들은 모두 SOD의 공존에 의해 산화가 억제되는 것을 알 수 있었다.

그리고, Cu(III)이온 존재 하에서의 수용액 중에서의 반응과 완충용액 중에서의 반응 결과를 각각 Fig. 4에 나타내었다. Cu(II)이온 존재 하에서도 Fe(III)이온 존재 하에서와 마찬가지로 반응시간 30분에 있어서 SOD공존에 의해 수용액 중에서는 5%, 완충용액 중에서는 0.1%의 유의차로 각각 AsA 잔존량이 높은 것이 밝혀졌다. 이것은 AsA 산화반응 과정에서 생기는 O₂⁻가 SOD에 의해 소거되어 AsA 잔존율을 높인 것으로 사료된다. 또한 SOD가 존재하지 않는 Fe(III)이온의 경우와 비교해 보면, Cu(II)이온 존재 하에서 AsA의 산화반응이 더욱 촉진되는 것을 알 수 있다. 이것은 수용액 및 완충용액 중에서의 AsA 산화반응에 있어서 Fe(III)이온보다 Cu(II)이온 쪽이 AsA 산화촉진능력이 더욱 큰 것을 의미한다. 그 뿐만 아니라, Fe(III)이온 및 Cu(II)이온이 존재하는 어느 경우에서도 SOD의 존재에 따른 AsA 산화반응이 억제되는 것으로 나타났다. 이들 결과로 보아, 중금속 이온 존재 하에서 수용액 및 완충용액 중에서의 AsA 자동산화반응에 있어서도 비존재하에서의 경우와 마찬가지로 SOD가 O₂⁻를 소거함으로써 AsA 산화반응이 억제되고, 이러한 결과로 보아 AsA 산화반응 과정에서 O₂⁻가 생성되는 것이 실험적으로 확인되었다.

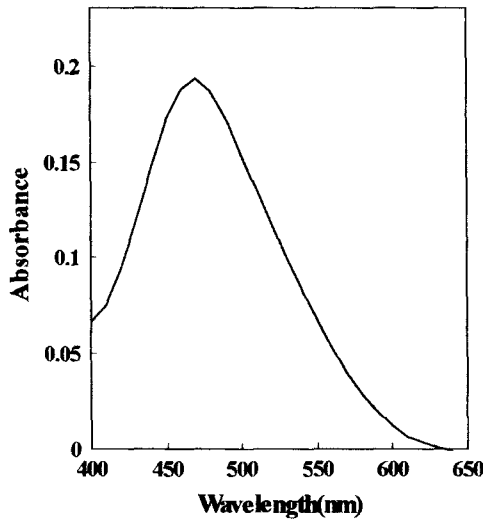


Fig. 5. Spectrum of the reduction of XTT by xanthine-xanthine oxidase

Concentrations; 0.05 mM xanthine, 0.05 mM EDTA, 1.8×10⁻⁵ mM XOD, 0.05 mM XTT, Reaction solution: potassium phosphate buffer(pH 7.4), Reaction temperature: 35°C, Reaction time: 30 min.

또한, 완충용액 중에서의 AsA 산화반응에서, SOD를 이용한 O₂⁻ 생성 확인을 재검토하는 의미에서 XTT를 이용하여 실험하였다. XTT는 XO에 의해 생기는 O₂⁻에 의해, 약 470 nm에서 흡수극대를 가지는 수용액물질로 환원된다. XTT의 환원속도는 XO활성에 비례하고, SOD에 의해 그 환원은 억제된다고 알려져 있다. XTT는 XO와 직접적으로 상호작용하지 않고, XTT의 환원 물질은 수용성이기 때문에 수용성계에서 간단한 분광분석이 보다 쉽게 행할 수 있는 장점이 알려져 있다. 여기서 우선, XTT를 이용해서 XO계 실험을 같은 방법으로 행하고, O₂⁻ 생성을 확인한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5에서 알 수 있듯이 pH 7.4의 완충용액 중, XO계에 XTT를 첨가해서 35°C에서 30분간 방치하고 400 nm~650 nm간의 스펙트럼 변화를 측정된 결과로, XTT에 의해 470 nm에서 흡수극대를 가지는 환원물질의 특징적인 스펙트럼을 얻은 것이 확인되었다. 이 결과는 470 nm에서 흡수극대를 갖는 환원물질의 스펙트럼을 얻은 것으로 보아 O₂⁻가 생성된 것임이 Ukeda 등⁽¹³⁾의 실험결과와 일치하고 있다.

이처럼, XTT를 이용하여 XO계에서 O₂⁻ 생성을 확인한 후, XO계 대신에 AsA를 이용하여 O₂⁻ 생성을 조사한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 이 스펙트럼은 400 nm~600 nm사이의 파장에 있어서 반응시간 15분, 30분, 그리고 60분간의 스펙트럼 변화를 측정하고, 그 측정점을 연결한 결과로 중금속 이온 비존재하, Fe(III)이온 존재하, 그리고 Cu(II)이온 존재하에서의 결과를 각각 나타내고 있다.

우선, 중금속 이온 비존재하에서 AsA 산화반응을 일으킨 결과, 반응시간 15분, 30분, 60분에서의 470 nm에서의 흡광도가 각각 0.01, 0.02, 그리고 0.04를 나타내어, 시간의 경과와 함께 흡광도가 높아짐을 알 수 있고, 이것은 AsA 산화반응에서 생긴 O₂⁻에 의한 것으로 생각되어진다. 여기서 XTT가 AsA과의 반응에 의해 나타난 결과가 아닌지에 대한 의문점이 지적될 수 있는데, 이 점은 이미 Ukeda 등의 보고⁽¹³⁾

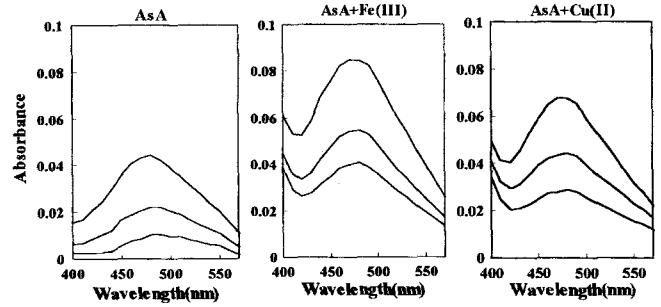


Fig. 6. Spectra of the reduction of XTT in the autoxidation of AsA

Concentrations; AsA: 50 μM, Fe(III): 5 μM, Cu(II): 0.1 μM, Reaction solution: potassium phosphate buffer(pH 7.4), Reaction temperature: 35°C, Reaction time: 15 min, 30 min, 60 min.

에 의해 O₂⁻에 의해 환원되는 XTT 환원물질이 470 nm에서 흡수극대를 갖고, 이 환원물질이 상당히 안정하며, 환원물질과 XO활성이 상관관계를 가진다고 보고하고 있다. 또한, XTT 농도의 상승과 함께 470 nm에서의 흡광도가 높아지는 것을 연구하여 XTT는 XO와 직접적인 상호관계가 일어나지 않는 것이 보고되어 있어, 본 실험에 나타난 결과는 AsA과 XTT와의 반응에 의해서가 아니라 AsA의 산화반응 과정에서 생기는 O₂⁻에 의한 결과임을 뒷받침한다고 할 수 있겠다. 또한, Fe(III)이온 존재 하에서는 반응시간 60분에 있어서 470 nm에서 흡광도 0.08을 나타내어 중금속 이온 비존재하에서의 경우보다 2배가량 높은 흡광도를 나타내는 것을 알 수 있다. 이것은 Fe(III)이온의 촉매작용에 의해 AsA 산화반응이 촉진되고, Fe(III)이온을 첨가한 경우, 중금속 이온 비존재하에서의 경우보다 약 2배 많은 O₂⁻가 생성될 가능성이 시사되었다. 더욱이, Cu(II)이온 존재 하에서는 5 μM의 Fe(III)이온 보다 약 50배 정도 낮은 농도인 0.1 μM Cu(II)이온을 사용한 경우, 반응시간 60분에 있어서 흡광도 약 0.07을 나타내어 Fe(III)이온 존재 하에서의 경우와 거의 유사한 경향을 나타내었다. 즉, 중금속이온 비존재하, Fe(III)이온 존재하, 그리고 Cu(II)이온 존재하의 어느 경우에 있어서도 O₂⁻에 의해 XTT가 470 nm에서 흡수극대를 갖는 환원물질의 스펙트럼을 가지며, 시간의 경과와 함께 O₂⁻ 생성이 상승되는 것이 밝혀졌다. 따라서, 완충용액 중에서의 AsA 산화반응과정에 있어서 Fe(III)이온 및 Cu(II)이 존재하는 어느 쪽의 반응계에 있어서도 SOD를 이용한 O₂⁻ 생성 확인 실험과 마찬가지로 XTT에 의한 O₂⁻ 생성이 밝혀졌다.

메탄올 용액 중에서의 O₂⁻ 생성 확인

메탄올 용액 중에서의 O₂⁻ 생성을 조사하기 위해 O₂⁻ 검출법의 하나인 NBT환원법⁽¹⁴⁾을 이용하여 실험하였다. 우선, AsA의 산화반응 과정에서 생성된 O₂⁻가 노란색의 NBT를 환원시켜 blue formazan으로 바뀌어 가는 것을 450 nm~800 nm 사이의 스펙트럼 변화로 측정된 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 메탄올 용액에 NBT만을 첨가한 경우에는 blue formazan의 흡수극대(560 nm)를 갖지 않지만, AsA를 함께 첨가한 경우에는 NBT에 의해 노란색이었던 반응액이 반응개시로부터 약 15~20분 후에는 분홍 보라색으로 착색되기 시

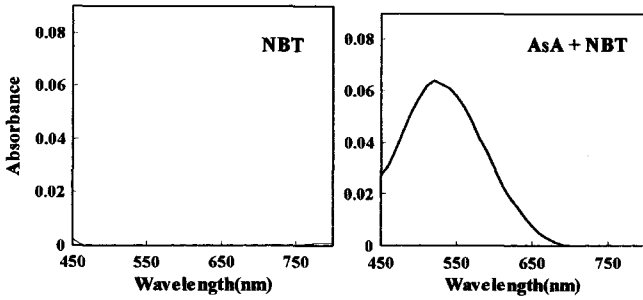


Fig. 7. Spectra of reduction of NBT in the autoxidation of AsA in the absence of heavy metal ions
 Concentrations; AsA: 50 μM , NBT: 61 μM , Reaction solution: methanol, Reaction temperature: 25°C, Reaction time: 30 min.

작해서 반응시간 30분에는 560 nm에서 흡수극대를 갖는 것을 확인할 수 있었다. NBT 환원반응에 대해서는 Bielski 등⁽¹⁴⁾에 의해 조사되어져, NBT는 전자 한 개가 환원되어 monoformazan(MF⁺), monoformazan radical(MF[·])을 경유해서 diformazan(DF)이 생성된다. MF⁺은 pH 5.7~11.0의 넓은 범위에서 530 nm의 흡수극대를 가지며, DF와 마찬가지로 물에 녹기 어렵다는 것이 밝혀져 있다. 본 실험은 메탄올용액 중에서 행했기 때문에 본 실험 결과에서 보여진 560 nm에 대한 흡수극대가 정말로 formazan의 생성에 의한 것인지 확인하기 위해 NBT와 DF의 표준품을 메탄올 용액에 용해시킨 후 흡수 스펙트럼을 측정하였다. 그 결과, 메탄올 용액에서의 표준품 NBT는 260 nm에서 흡수극대를 갖는 것이 확인되었고, DF는 540 nm~560 nm에 넓게 흡수대를 갖는 것이 밝혀졌다. 그리고, DF에 NBT를 첨가한 반응액의 산화반응 후, 적외·가시 흡수 스펙트럼을 측정한 결과, 잔존하는 NBT에 해당하는 흡수대, 및 DF에 해당하는 폭 넓은 흡수대 이외에 다른 흡수대는 전혀 나타나지 않았다. 이처럼, 메탄올 용액에서의 AsA 산화반응에 있어서 formazan의 생성이 확인된 것으로 보아, 이 반응계에 있어서 O₂⁻ 생성은 분명한 것으로 여겨진다. 또한, NBT 반응이 전자의 주고받음에 의해 일어나는 것이기 때문에 본 실험에서 생성된 formazan이 정말로 O₂⁻와의 반응에 기인한 것인지, 즉 NBT가 AsA으로부터 직접 전자를 받을 가능성은 없는지에 대해서 재검토하기 위해 三宅⁽¹⁷⁾의 연구 결과를 토대로 재확인하였다. 먼저, AsA 산화반응계에 산소농도를 10 mL/min에서 200 mL/min까지 크게하여 560 nm에서 흡광도를 측정한 결과, 산소농도의 증가와 함께 formazan 생성량이 증가하는 것과 AsA 농도를 변화시켜 AsA 농도가 높은 쪽이 낮은 쪽보다 formazan의 생성량이 낮은 경향을 나타내는 것, 그리고 AsA 농도에 따른 분해율을 조사한 결과, 본 실험에 사용된 50 μM 의 AsA 농도에서는 분해된 양이 거의 변화가 없는 것 등이 재확인되어, 메탄올 용액에서의 AsA 산화반응에 있어서 formazan의 생성은 AsA과 NBT와의 반응에 의해서가 아닌 AsA의 자동산화과정에서 생긴 O₂⁻에 의한 것임이 三宅⁽¹⁷⁾의 연구결과와 일치하였다. 이상의 결과에 의해 본 실험에서 밝혀진 formazan의 생성은 AsA에 의해 직접 환원된 것이 아니라 AsA의 자동산화반응 과정에서 생성된 O₂⁻에 의한 것으로 밝혀졌다.

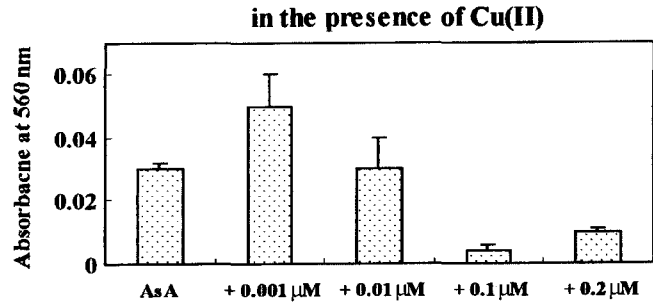
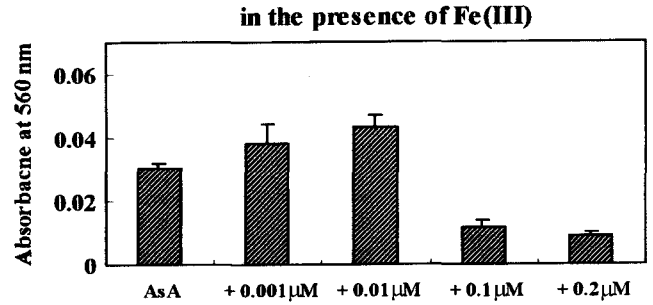


Fig. 8. Reduction of NBT in the autoxidation of AsA in the presence of heavy metal ions
 Data represent Mean \pm SD(n=4) and are expressed as ratio, with the initial amounts AsA regarded as 100%. Concentrations; AsA: 50 μM , NBT: 61 μM , Reaction solution: methanol, Reaction temperature: 25°C, Reaction time: 30 min.

또한, Fe(III)이온 및 Cu(II)이온 존재 하에서의 AsA 자동산화반응에서의 O₂⁻ 생성을 조사한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 중금속 이온 존재 하에서는 AsA 자동산화 반응에 있어서 O₂⁻ 생성을 조사하기 위해, Fe(III)이온 및 Cu(II)이온의 농도는 0.001 μM , 0.01 μM , 0.1 μM 그리고, 0.2 μM 을 사용하였다. Fig. 8에 나타냈듯이 0.001 μM 과 0.01 μM 의 농도를 이용한 경우는 중금속 이온 비존재 하에서의 AsA 자동산화반응에 있어서 O₂⁻ 생성보다 유의적으로 높은 것으로 밝혀졌지만, 0.1 μM 이상의 중금속 이온 농도의 존재 하에서는 중금속 이온 비존재 하에서의 경우보다 꽤 낮은 흡광도를 나타내었다. 또한, 데이터는 나타내지 않았지만, 2 μM 이상의 금속 이온 농도에서는 O₂⁻ 생성이 전혀 보이지 않았다. 이 현상을 흡수 스펙트럼에서 검토한 결과, 먼저 0.01 μM 농도의 Fe(III)이온을 넣어서 흡광도를 측정한 경우는 바로 O₂⁻가 생성되어 15~30분에서 흡수극대를 나타내며, 그 이후로는 시간이 경과해도 흡광도의 변화는 보이지 않았다. 또한, 0.01 μM 보다 20배 높은 농도인 0.2 μM Fe(III)이온을 사용한 경우는 0.01 μM Fe(III)이온을 사용한 경우보다 O₂⁻ 생성이 적은 것이 스펙트럼으로 확인되었다. 더욱이, 이 경우도 15~30분 이후부터는 시간이 경과해도 흡광도의 변화는 나타나지 않아 중금속 이온 존재 하에서의 AsA 자동산화 반응에 있어서 O₂⁻ 생성은 반응개시부터 약 15분 후에 560 nm에서 흡수극대를 가지고, 그 시점에서 이미 반응은 끝난 것으로 생각되어진다. 이 현상은 Cu(II)이온을 사용한 경우도 같은 경향을 나타내었다. 이처럼 중금속 이온 농도가 높을수록 formazan 생성이 보이지 않았던 것은 잔존하는 AsA 농도가 NBT 농도에 비해서 상당히 고농도이기 때문에 생성한 O₂⁻가 NBT에 의해 AsA과 반응해버리기 때문이라고 생각되

문 헌

어진다. 그러므로, Fe(III)이온 및 Cu(II)이온 존재 하에서의 AsA 자동산화반응에 있어서 O₂⁻ 생성은 비존재하에서의 경우와 마찬가지로 상당히 낮은 농도의 금속이온이면서도 O₂⁻ 생성하는 것이 밝혀졌다. 즉, 비수용성계에 있어서도 AsA 자동산화에 있어서 O₂⁻의 생성이 확인되었다. 한편, O₂⁻ 생성이 낮아져 버리는 0.01 μM이상의 금속이온 농도에 서의 현상에 대해서는 앞으로 검토할 필요가 있다고 여겨진다.

요 약

중금속 이온 존재 하에서 AsA 자동산화반응 과정에서의 O₂⁻ 생성을 조사하기 위해, 수용액, 완충용액, 그리고 메탄올 용액 중에서 산소가스를 통기하면서 AsA 산화반응을 유도하였다. 우선, 수용액 및 완충용액 중에 SOD를 이용하여, O₂⁻로부터 생성되는 H₂O₂를 소거하기 위해 CAT를 첨가해서, SOD 무첨가의 경우와 비교하여 실험하였다. 그 결과, 수용액 중에서도 완충용액 중에서도 SOD가 O₂⁻를 소거하고, SOD의 존재에 따라 AsA 산화 반응이 억제되는 것이 밝혀졌다. 또한, 완충용액 중에서는 XTT를 가지고 O₂⁻ 생성을 재확인하기 위해, O₂⁻에 의한 XTT의 환원생성물인 formazan의 생성량이 470 nm에서 흡수극대를 갖는 것을 확인한 후, AsA 산화반응 과정 중에 O₂⁻가 생성되는 것을 확인하였다. 이처럼, Fe(III)이온 및 Cu(II)이온이 존재하는 경우에도 비존재하의 경우와 마찬가지로 AsA 자동산화반응 과정 중 에서 O₂⁻가 생성되는 것이 확인되었다.

또한, 메탄올 용액 중에서 Fe(III)이온 및 Cu(II)이온 존재 하에서의 AsA 자동산화반응 과정에서의 O₂⁻ 생성을 조사하기 위해 NBT법을 이용하여 흡수극대 560 nm에서 NBT의 환원생성물인 blue formazan을 측정하고, O₂⁻ 생성을 확인하였다. 반응개시로부터 15분이 경과하면서 반응액의 색변화를 눈으로 관찰할 수 있었으며, 560 nm에서의 흡광도 측정치가 높아지는 경향을 나타내어 실험적으로 O₂⁻가 생성되는 것을 확인하였다. 또한, AsA 산화반응을 일으키는 과정에서 산소 농도의 증가에 따라 formazan 생성량이 증가한 사실과 AsA 농도의 증가에 따라 formazan 생성량이 낮아지는 경향을 보인 사실, 그리고, AsA 농도에 따른 분해율을 조사한 결과, 본 실험에 사용된 50 μM의 AsA 농도에서는 분해된 양이 거의 변화가 없는 것으로 보아 NBT가 아닌 AsA 자동산화반응 과정에서 생성된 O₂⁻에 의해 formazan이 생성된 것임이 확인되었다. 한편, Fe(III)이온 및 Cu(II)이온 존재 하에서 0.01 μM이하의 낮은 농도에서는 O₂⁻ 생성이 중금속 이온 비존재 하에서의 경우보다 유의적으로 높은 것으로 밝혀졌지만, 그 이상의 농도에서는 낮은 수치를 나타내었다.

이상의 결과로 보아 수용성계에서 뿐만 아니라, 비수용성계에서도 중금속 이온 존재 하에서의 AsA 자동산화반응에서의 O₂⁻ 생성이 시사되었다.

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., Thomas, C.E. Role of metals in oxygen radical reactions. *Free Radical Biol. Med.* 1: 3-25 (1985)
3. Martell, A.E. Chelates of Ascorbic acid: Formation and catalytic properties. In: *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses.* ACS Advances in Chemistry Series No. 200, eds. Seib, P.A. and Tolbert, B.M. American Chemical Society, Washington, D.C. pp.153-178 (1982)
4. Buettner, G.R. Ascorbate autoxidation in the presence of iron and copper chelates. *Free Rad. Res. Comms.* 1: 349-353 (1986)
5. Bielski, B.H. Chemistry of ascorbic acid radicals. In: *Ascorbic Acid: Chemistry, Metabolism, and Uses.* ACS Advances in Chemistry Series No. 200, eds. Seib, P.A. and Tolbert, B.M. American Chemical Society, Washington, D.C. pp.81-100 (1982)
6. Kurata, T., Miyake, N. and Otsuka, Y. Formation of L-threonolactone and oxalic acid in the autoxidation reaction of L-ascorbic acid. Possible involvement of singlet oxygen. *Biosci. Biotech. Biochem.* 60: 1212-1214 (1996)
7. 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)
8. 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)
9. 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)
10. 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)
11. McCord, J.M. and Fridovich, I. Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 244: 6049-6055 (1969)
12. Miyake, N., Kim, M. and Kurata, T. Stabilization of L-ascorbic acid by superoxide dismutase and catalase. *Biosci. Biotech. Biochem.* 63: 54-57 (1999)
13. 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)
14. Bielski, 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)
15. Cabelli, D.E. and Bielski, B.H.J. Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by HO₂/O₂⁻ radicals. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study. *J. Phys. Chem.* 87: 1809-1812 (1983)
16. Klug, D., Rabani, J., Fridovich, I. A direct demonstration of the catalytic of superoxide dismutase through the use of pulse radiolysis. *J. Biol. Chem.* 247: 4839-4842 (1972)
17. Miyake, N. Autoxidation mechanism of L-ascorbic acid. Doctoral dissertation, Ochanomizu Univ., Japan. p. 93-109 (1996)