

# 생리적조건에서 L-Ascorbic acid의 분해물질

申 東 範\*

## The Degradation Products of L-ascorbic Acid in the Physiological Condition

Dong-Bum Shin\*

### Summary

The degradation products of L-ascorbic acid was examined by incubating it alone and in the presence of  $\alpha$ -N-formyl-L-Lysine (NFL) at pH 7.4 (0.2M phosphate buffer) in the presence of oxygen, metal ion chelator, and in both the presence and absence of sodium cyanoborohydride. Among the large number of degradation products produced, threonic, oxalic, glyceric and glyoxylic acids, as well as threose were all identified by GLC-MS. Decarboxylation is also a feature of the degradation, with approximately 30% of the ascorbic acid undergoing degradation via this pathway. In the presence of NFL and cyanoborohydride  $\epsilon$ -N-carboxymethyl-L-lysine (CML) was detected as a reaction product as well. Using GLC-MS as the detection method and ascorbic acid-1- $^{13}$ C as the reactant, only glyoxylic acid and CML were found to contain a  $^{13}$ C label, indicating that, of the compounds identified above, only these latter two contain C-1 of ascorbic acid.

### 서 론

Ascorbic acid (AsA)는 용액중에서 대단히 불안정하다고 알려져 있으며, 여러 반응조건에서 분해산물에 대한 많은 연구가 보고되어져 있다 (Finholt *et al.* 1963; Kurata and Sakurai, 1967a; Niemela, 1987). 산소 존재하에서 AsA는 자유 라디칼 매개 산화반응에 의해 dehydro-L-ascorbic acid (DHA)로

되며 (Bielski *et al.* 1971), 이것은 다시 가수분해 반응에 의하여 2,3-diketo-L-gulonate (DKG)로 된다 (Hvoslef, 1970). 이들 두물질은 용액중에서 불안정하여 복잡한 분해반응에 의해 저분자량 물질로 되거나, 또는 탈수반응에 의해 반응활성이 큰 중간물질을 형성한다 (Kurata and Sakurai, 1967a, 1967b).

Bensch등 (1985)이 ascorbic acid가 노인성 백내장 형성에 관여한다고 보고한 이래, 많은 연구가 안구 단백질인 lens crystallin과 ascorbic acid와의 반응

\* 自然科學大學 食品營養學科 (Dept. of Food Science and Nutrition, Cheju Univ., Cheju-do, 690-756, Korea)

에 대해 보고되고 있다(Slight *et. al.*, 1992; Ortwerth *et. al.*, 1992; Prabhakaram and Ortwerth, 1992). Ascorbic acid는 정상인의 안구중에 glucose보다 고 농도로 존재하고 있으며(Kern and Zolot, 1987), 당뇨병의 진행과 함께 lens crystallin의 중합을 일으키며, 노인성 백내장에서 볼 수 있는 단백질의 형광성을 나타낸다고 하였다.

한편, AsA의 산화물질인 DHA는 단백질의 lysine 잔기와 부가물을 형성하며, 이것은 다시 환원되어  $\epsilon$ -N-(carboxymethyl) lysine(CML)이 된다. 이 lysine 유도체는 사람의 lens crystallin(Dunn *et. al.*, 1989), collagen(Dunn *et. al.*, 1991), 소변(Knecht *et. al.*, 1975) 등에서 검출이 되었고, 이 CML의 수준은 안구의 노화와 함께 증가된다(Ahmed *et. al.*, 1986).

최근, 단백질의 Maillard반응(또는 Glycation)에 의해 일어나는 단백질의 중합 구조물인 pentosidine이 동정되었다(Sell and Monnier, 1989). 이 물질은 단백질의 lysine잔기의  $\epsilon$ -아미노기와 arginine의 guanidyl기가 ribose에 의해 가교를 이룬 형태로서, ribose가 중합의 가교물질로 밝혀졌으나, 그후 glucose와 fructose 뿐만 아니라 ascorbic acid도 이 중합물에 관여하고 있음이 알려졌다(Grandhee and Monnier, 1991; Dyer *et. al.*, 1991). 이 중합구조물의 형성기구는 정확하게 밝혀지지 않았으나, AsA는 DHA를 거쳐 DKG로 되고 이 DKG가 decarboxylation이 되면서 분해되는 물질이 이 반응에 참여할 것이라 예상되고 있다.

본 실험에서는 이러한 중합반응이 일어나는 조건(pH 7.4, 37°C)에서 AsA가 분해되었을 때 생성되는 반응물질들의 동정에 그 목적을 두고 있다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

Thin layer chromatography(TLC)용 silica gel plate는 Merck사, acetonitrile, acetone, acetic acid는 Aldrich사 제품을 사용하였으며, ascorbic acid와 lysine은 Sigma사 제품을, gas-liquid chromatography(GLC)용 유도체화 물질인 N-(tert-butyl)dimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide(MTBSTFA)와 tert-butyl)dimethylsilylchloride

(tBDMS)는 Adrich사 제품을, N,O-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide(BSTFA)와 trimethylchlorosilane(TMS)는 Pierce사 제품을 사용하였다.

### 2. 실험방법

**반응물질의 조제 :** DHA는 Ohmori등(1983)의 방법에 의해 charcoal 존재하에서 산소로 산화시켜서 조제하였고, TLC로 단일 spot임을 확인하여 -10°C에 수개월 보관에도 순도의 변화가 없었다. Na-DKG는 Otsuka등(1976)의 방법으로 DHA를 가수분해하여 얻었으며, 역시 TLC상 단일 spot임을 확인한후 질소하에서 -10°C에 사용전까지 보관하였다. TLC의 전개용매는 acetonitrile : water : acetone : acetic acid (80 : 15 : 5 : 1, v/v; 전개용매 A)와 butanol : acetic acid : water (4 : 1 : 1, v/v; 전개용매 B)를 사용하였다. CML은 Ahmed등(1986)의 방법으로 iodoacetic acid와 NFL로 조제하여 GLC로 단일 peak임을 확인하고 mass spectrum(MS)으로 동일 물질임을 확인하였다.

**반응조건 :** AsA, DHA 또는 DKG 각각 0.1M을 0.2M phosphate buffer (pH 7.4)에 녹여 만든 후 0.2 $\mu$ m Acrodisc filter(Gelman Science)로 Ultrafiltration을 한후 screw cap이 달린 vial에 넣고 37°C에서 반응을 시키면서 24hr 간격으로 0.2ml를 분취하여 TLC 및 GLC 또는 GLC-MS용 유도체로 변환시켰다.

**반응물질들의 검출 :** carbonyl화합물을 함유한 물질은 chromatogram상에 2N HCl에 녹인 0.5% dinitrophenylhydrazine용액을, amino화합물은 0.5% ninhydrin ethanol용액을 각각 spray하여 검출하였다. GLC-MS는 DS-55 data system을 장착한 double focussing Kratos MS-25 장치에 SE-30 capillary column을 연결한 Hewlett-Packard GLC를 연결한 기계를 이용하였다. 평상시 사용한 GLC장치는 0.25 $\mu$ m두께의 30m길이의 SPB-1 capillary column(Supelco)을 이용, carrier gas로 helium과 FID 검출기를 이용한 Shimadzu model number GC-9A 장치를 이용하였다.

**AsA의 Decarboxylation의 측정 :** AsA-1-<sup>13</sup>C (20mM, 1.0 $\mu$ Ci) 및 각 반응물질을 0.2M phosphate buffer (pH 7.0)에 녹인 용액을 1 $\times$ 12cm의 시험관에

넣고, CO<sub>2</sub>를 포집하기 위하여 5M ethanolamine으로 포화시킨 2.5cm의 Whatman 1mm filter paper를 시험관 중앙에 걸어둔다. 각 반응액을 조제한 후 37C incubator에 넣었다. 시간대 별로 시료 tube에 0.5ml의 4M HCl을 반응액에 넣은후 30분 후에 filter paper를 꺼내서 scintillation counting을 행하였다.

**분해산물의 분석:** 반응액의 일정량을 분취한 후 염을 제거하기 위하여 Dowex 50 (hydrogen form) 과 Dowex 1 (acetate form) 이온교환수지를 통과시키고 물로 씻은 후 30C에서 감압건조 시킨후 GLC 분석을 위하여 유도체화를 시켰다(중성 성분). 산성 성분은 2배 용량의 2N trifluoroacetic acid로 용출 시킨 후 감압건조하여 유도체화를 시켰다. CML 분석을 위하여는 Ahmed 등(1986)의 방법으로 acetylated methyl ester화 시킨후 GLC 분석을 하였다.

### 결과 및 고찰

L-Ascorbic acid의 용액중의 안정성을 측정하기 위하여 265nm에서의 흡광도의 소실을 측정하였다. 300hr에 걸쳐 측정된 결과 흡광도가 서서히 감소하면서 약 80%의 감소를 나타내었고, 반응액은 갈색으로 변하였다. NFL(동 농도), 단백질(lens protein과 lysozyme)의 공존은 흡광도의 감소에 거의 영향을 나타내지 아니하였다. 이 사실은 용액중에서 Ascorbic acid는 공존물질에 관계없이 자체적으로 분해되면서 최종적으로는 갈색물질을 형성하고 있음을 나타내고 있다. 반응의 초기단계인 처음 48hr 동안 AsA의 직접적인 산화물질인 DHA 및 DHA의 가수분해물질인 DKG를 TLC(진개용매 A)로 확인하여 Rf 값이 각각 0.45, 0.70, 0.15를 나타내었다. DHA와 DKG는 어느것도 265nm에서 흡광도를 나타내지 않았다. 반응의 후기단계에서는 여러종류의 카르보닐 화합물들이 나타났으며, 그중 하나인 L-threose도 검출되었다.

Decarboxylation은 강산성용액에서 L-ascorbic acid가 나타내는 특징적인 분해 반응이다(Kurata and Sakurai, 1967a, 1967b). 이 반응은 이 반응조건에서 carbon dioxide와 2-furaldehyde(주된 decarboxylation 생성물)가 거의 정량적으로 생성되는 주된 반응 경로임을 나타내고 있다. 본 실험에서

는 생리적 조건(pH 7.4, 37C)에서 decarboxylation의 정도를 검토하기 위하여, L-ascorbic acid-1-<sup>14</sup>C을 반응시켜 생성되는 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>를 측정하였다(Fig. 1).

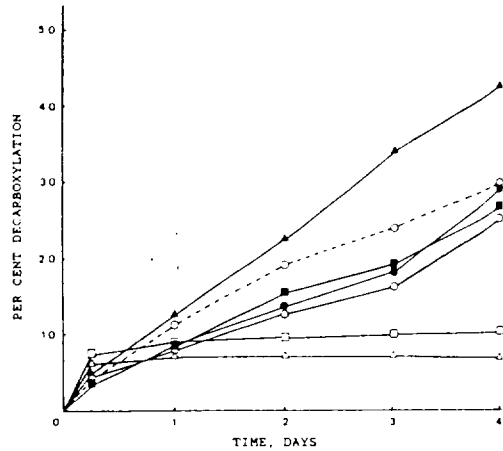


Fig. 1. Rates of decarboxylation of L-ascorbic acid in the presence of possible reactants. Measurement involved the collection of <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> from L-ascorbic acid-1-<sup>14</sup>C. Each data point used a solution that was 20mM in L-ascorbic acid (1.0 Ci) in 1.0ml of phosphate buffer (pH 7.4). (▲-▲), +  $\alpha$ -N-acetyl lysine (20mM); (○-○), control (no reactants added); (●-●), + lens protein (25mg); (■-■), + lens protein (50mg); (○-○), + cyanoborohydride (40mM); (□-□), + glutathione (40mM); (△-△), + dithiothreitol (40mM).

실험결과, 반응의 초기 48hr 동안 전체 carboxyl carbon의 약 20%가 CO<sub>2</sub>로서 검출이 되었으며, 반응의 진행에 따라 NFL이나 단백질은 전체반응에 큰 영향을 미치지 않는 것이었다. Abt 등(1963)은 사람을 포함하여 동물에게 L-ascorbate-1-<sup>14</sup>C를 부여한 결과 약 25%의 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>가 호흡으로 검출되었다고 보고하고 있다. 환원제인 glutathione과 dithiothreitol은 반응에 약간의 저해효과를 나타내었다. 이러한 사실들은 AsA의 C-1이 decarboxylation에 관여하고 있음을 시사하고 있다.

이 반응에서 L-threose를 포함한 여러 분해산물이 GLC chromatogram상에 나타나고 있는데, 이것

은 AsA의 chain fragmentation을 일으키고 있음을 보여주고 있다. 이러한 fragmentation 반응물을 검출하기 위하여 반응액의 일정량을 취하여 이온교환수지로 중성물질과 산성물질을 분획 시킨후, 유도체

화를 시켜 GLS-MS를 행하였다. 생성물 모두가 동정되지는 않았지만, GLC상의 주된 peak를 GLC-MS로 동정하였다(Table 1). 최초 반응물질로서, AsA 뿐만 아니라 DHA 및 DKG를 사용한 실험의 결

Table 1. GLC and MS parameters of some fragmentation products produced by the degradation of L-ascorbic acid at pH 7.4 and 37c after 48 hours of incubation

Compound	Derivative	GLC retention time (min.)	Major mas spectral peaks
L-ascorbate	tBDMS	39.8	575 (M-57)
Oxalate	tBDMS	9.6	261 (M-57)
Glyoxylate	TMS	6.1	218 (M-15), 233 (M)
Glycerate	tBDMS	17.4	391 (M-57)
Threonate	tBDMS	29.8	535 (M-57)
Threose	TMS	11.5	408 (M-15), 423 (M)
CML	Acetylated-Methyl ester	15.5	257 (M-59) 273 (M-43), 316 (M)

과도 같은 양상을 나타내었다.

AsA의 분해반응과 관련하여 oxalate는 AsA의 C-1과 C-2로 부터 생성된다는 것이 일반적으로 알려진 사실이다. 본 실험에서는 oxalate외에 2-carbon 산들 뿐만이 아니라 다른 물질들도 검출되므로, 이 물질들의 출처를 밝혀보고자 하였다. 반응물질로서는 L-ascorbic acid-1-<sup>13</sup>C를 사용하여 반복실험을 행하였다. 이 AsA-1-<sup>13</sup>C는 <sup>13</sup>C NMR로 178 PPM에 enriched carbon의 signal을 확인하였다. 두가지의 반응액을 만들었는데, NFL과 cyanobohydride를 첨가한 것과 cynoborohydride를 첨가하지 않은 것을 같은 실험조건에서 반응을 시킨 후 GLC-MS를 행하였다(Fig. 2, 3, 4, 5, 6). 모든 acidic compound들은 carboxylic acid들의 특징적인 M-57 (tertiary butyl group을 뺀 이온)에 해당되는 강한 mass spectrum을 나타내었다. CML과 glyoxylic acid를 제외하고 모든 생성물들은 <sup>13</sup>C을 표식시키지 않은 AsA로 부터 생성된 물질과 spectrum이 중첩됨을 보여주었다. CML의 경우 표식시키지 않은 AsA의 peak들 보다 1 mass가 높은 M/Z=258, 274, 317을 나타내어 AsA의 C-1이 유래됨을 나타내었으며, glyoxylic acid의 경우도 219, 234 peak들 역시 AsA의 C-1에서 유래되고 있음을 나타내고 있다. CML은 human lens protein의 가수분해물로서 검출이 되며, NFL과 D-

glucose와의 model system에서도 검출이 된다 (Ahmed *et. al.* 1986). CML은 비갈색화 Glycation의 최종산물이며, 인간의 여러조직에서 노화와 함께 그 함량이 증가한다고 하였다. CML은 ascorbate와 단백질간의 model system에서도 검출이 되지만 그 함량이 대단히 적었다. 본 실험에서는 비교적 많은 양의 CML이 생성되었는데, cyanobohydride의 존재 하에서 AsA로 부터 glyoxylate가 생성이 되어, 이것이 NFL과의 반응에 의해서 CML이 생성되며, AsA와 NFL사이에서 직접적인 반응에 의해 생성되지는 않은듯 하였다.

여기에서 흥미로운 것은 glyoxylate는 AsA의 표식된 C-1을 함유하고 있으나, oxalate는 함유하지 않았다는 사실이다. 많은 수의 생성물들이 생성되는 것을 보았을 때 분해반응은 여러 다른 분해경로에 의해 수행되고 있음을 알 수 있었다. Scheme은 생성된 분해산물들의 생성경로를 나타내었다. AsA, DHA 및 DKG의 분해양상이 똑 같다는 사실로써 최종산화 물질인 DKG가 분해반응의 출발물질로 여겨지고 있다. CO<sub>2</sub>와 oxalate 및 glycerate는 C-1과 C-2사이 및 C-3와 C-4사이에서 절편이 일어나고 있으며, 표식된 glyoxylate와 표식이 안된 threonate는 C-2와 C-3사이에서 절편이 일어나고 있음을 나타내고 있다. 실제 반응은 이보다도 더욱 복잡한 경로로 일어

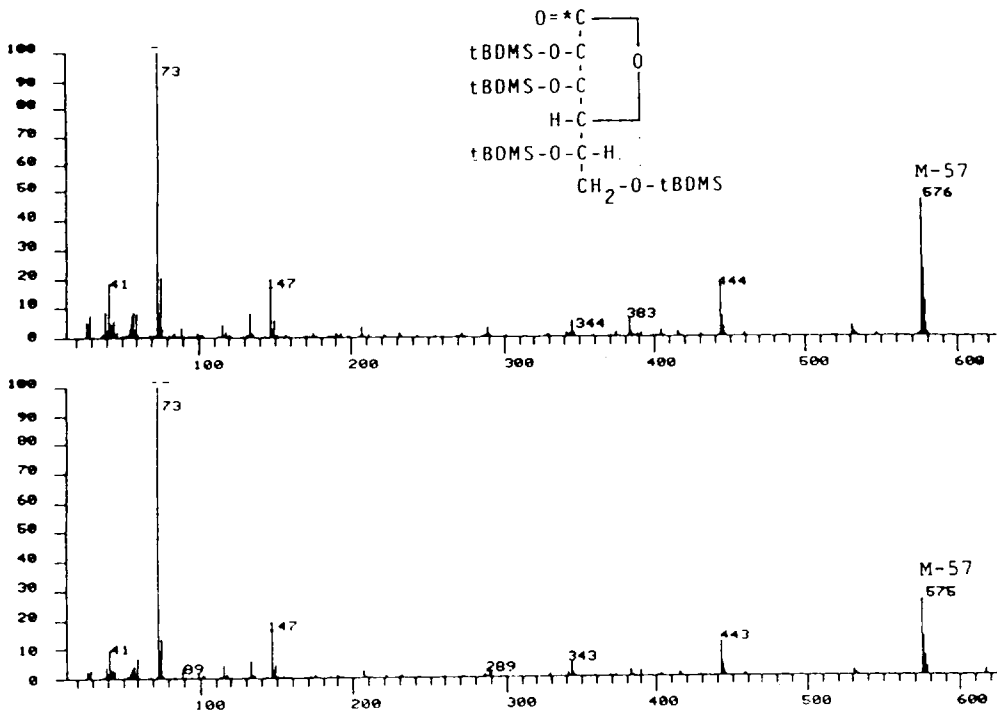


Fig. 2. Mass Spectra of t-Butyl-Dimethylsilyl (tBDMS) Ether Derivatives of L-Ascorbic Acid-1-<sup>13</sup>C (Top) and Ordinary L-Ascorbic Acid (Bottom)

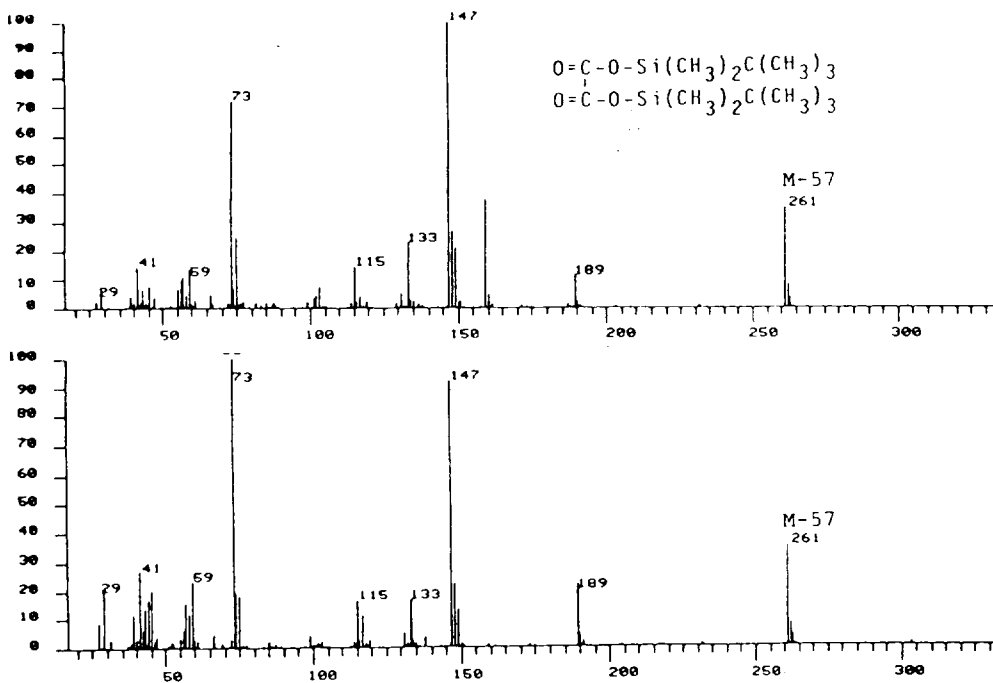


Fig. 3. Mass Spectra of t-Butyl-Dimethylsilyl Ether (tBDMS) Derivatives of Authentic Oxalic Acid (Top) and Oxalic Acid Isolated From the Incubation of L-Ascorbic Acid-1-<sup>13</sup>C.

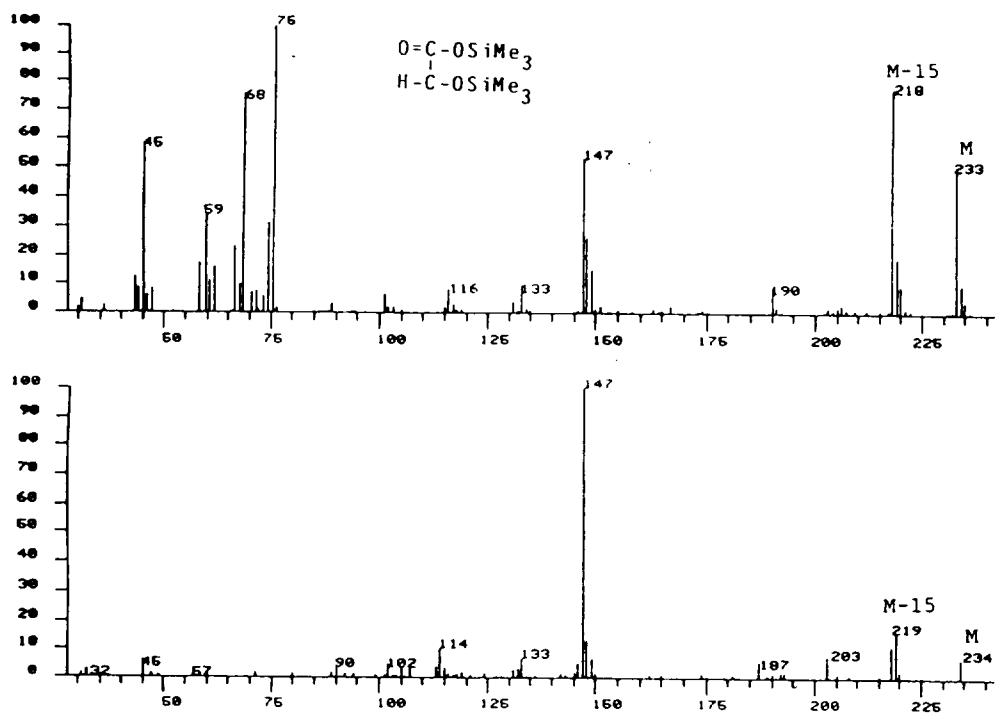


Fig. 4. Mass Spectra of TMS Derivatives of Authentic Glyoxylic Acid (Top) and Glyoxylic Acid Isolated from the Incubation of L-Ascorbic Acid-1-<sup>13</sup>C.

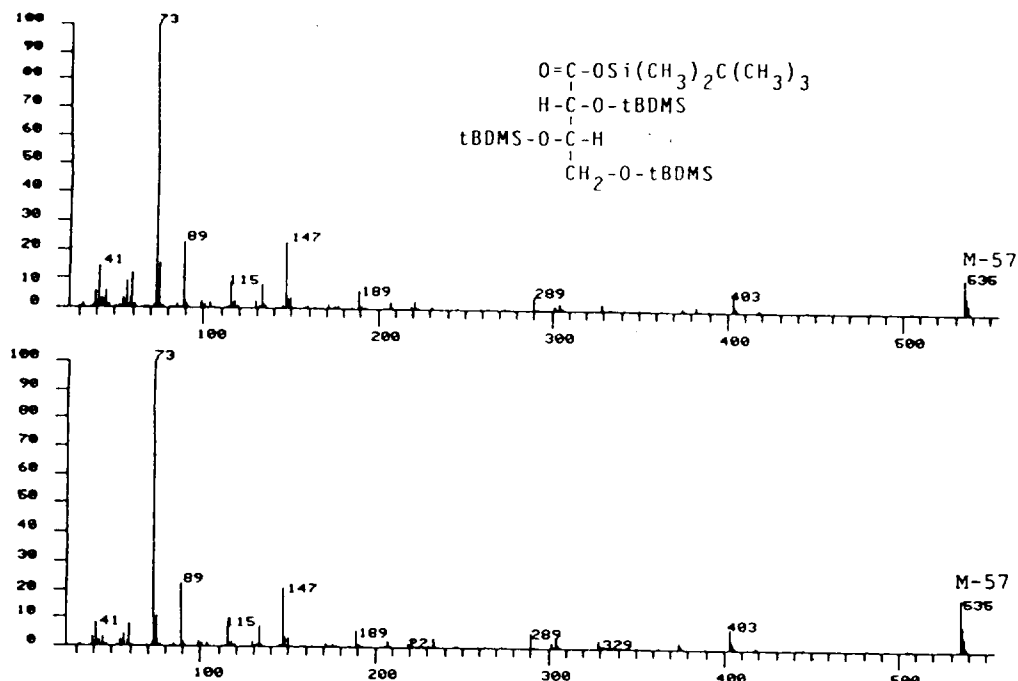


Fig. 5. Mass Spectra of Authentic threonic Acid (Top) as the tBDMS Derivative and Threonic Acid Isolated from the Incubation of L-Ascorbic Acid-1-<sup>13</sup>C.

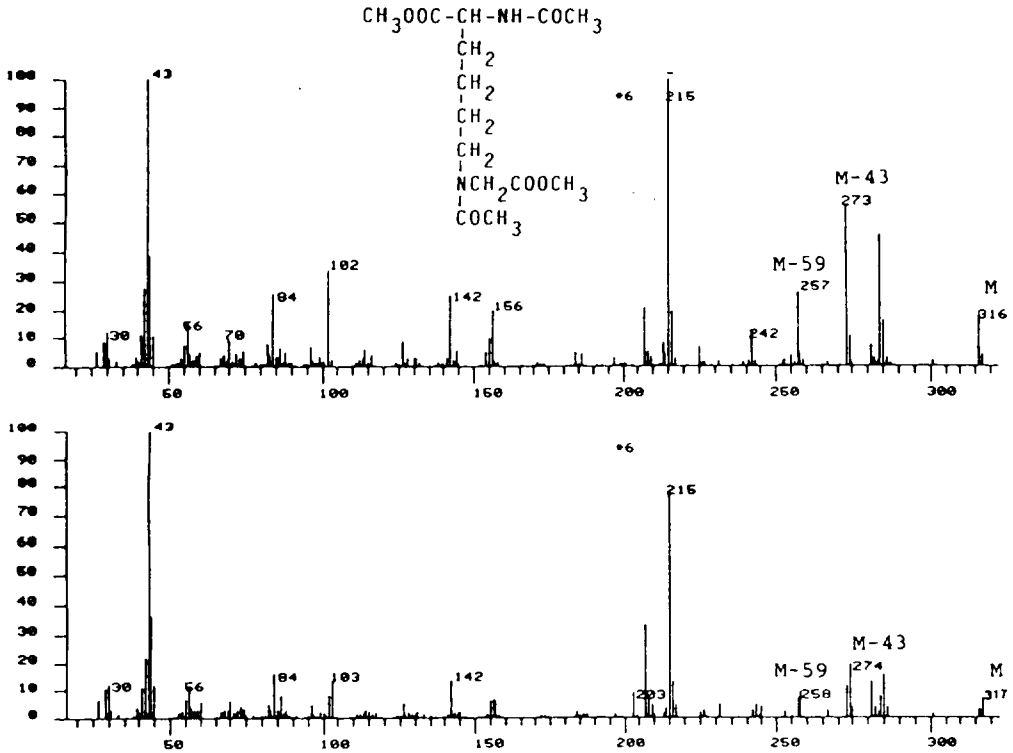
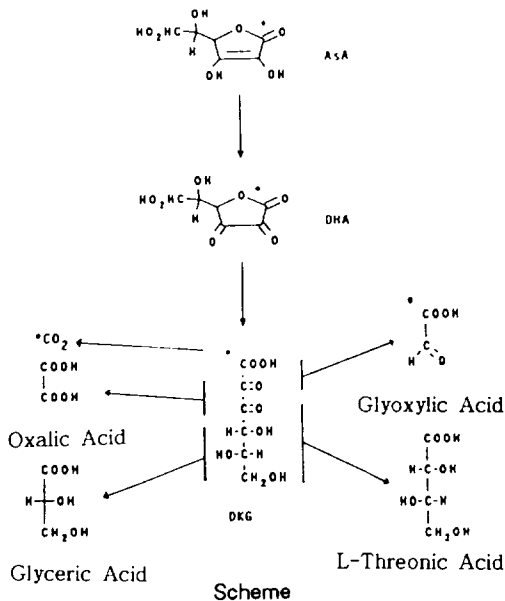


Fig. 6. Mass Spectra of Authentic CML(Top) as the Acetylated Methyl Ester Derivative and CML Isolated from the Incubation of L-Ascorbic Acid-1-<sup>13</sup>C.



나고 있음은 threose 뿐만 아니라 동정되지 못한 수많은 분해산물들(GLC chromatogram상에서)을 보아도 분명하다. 반응경로에서 30%이상의 decarboxylation을 보이는것은 가수분해 반응 또는 reverse aldol reaction으로 탄소사슬의 절편화가 일어나고 있음을 시사하고 있다.

### 적 요

생리적 조건 (pH 7.4, 37C)에서 ascorbic acid의 분해산물을 조사하였다. 많은 분해산물중에서 threonic, oxalic, glyceric, glyoxylic acid와 threose가 GLC-MS로 동정되었다. 탈탄산반응도 이 반응의 특징적인 것으로 이 반응을 통하여 약 30%의 ascorbic acid가 분해되었다. α-N-formyl-L-lysine과 cyanoborohydride의 존재하에서 ε-N-carboxymethyl-lysine (CML)이 분해산물로서 역시 검출이 되었다.

Ascorbic acid-1-<sup>13</sup>C을 이용하여 분해산물을 검색한 결과 glyoxylic acid와 CML만이 <sup>13</sup>C를 함유하고 있음이 나타났는데, 이것은 이 두물질만이 ascorbic acid의 C-1이 유래되고 있음을 나타내었다.

## 참 고 문 헌

- Ahmed, M. U., S. R. Thrope and J. W. Baynes, 1986. Identification of N-carboxymethyllysine as a degradation product of fructosyllysine in glycated protein, *J. Biol. Chem.*, 261: 4889-4894.
- Abt, A. F., S. L. von Schuching and T. Anns, 1963. Vitamin C requirements of man reexamined. New values based on previously unrecognized exhalatory excretory pathway of ascorbic acid, *Am. J. Clin. Nutr.*, 12: 21-29.
- Bensch, K. G., J. E. Fleming and W. Lohmann, 1985. the role of ascorbic acid in senile cataract, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82: 7193-7196.
- Bielski, B. H. J., D. A. Comstock and R. A. Bowen, 1971. Ascorbic acid free radicals, *J. Am. Chem. Soc.*, 93: 5624-5629.
- Dunn, J. A., D. r. McCance, S. R. Thorpe, T. J. Lyons and J. W. Baynes, 1991. Agedependent accumulation of ε-N-(carboxymethyl) hydroxylysine in human skin collagen, *Biochemistry*, 30: 1205-1210.
- Dunn, J. A., J. S. Patrick, S. R. Thorpe and J. W. Baynes, 1989. Oxidative degradation of glycated proteins: Age-dependent accumulation of carboxymethyllysine in lens proteins, *Biochemistry*, 29: 10964-10970.
- Dyer, D. G., J. A. Blackledge, S. R. Thorpe and J. W. Baynes, 1991. Formation of pentosidine during nonenzymatic browning of proteins by glucose, *J. Biol. Chem.*, 266: 11654-11660.
- Finholt, P., R. B. Paulssen and T. Higuchi, 1963. Rate of anaerobic degradation of ascorbic acid in aqueous solution, *J. Pharm. Sci.*, 52: 948-954.
- Grandhee, S. K. and V. M. Monnier, 1991. Mechanism of formation of the Maillard protein cross-link pentosidine, *J. Biol. Chem.*, 266: 11649-11653.
- Hvoslef, J., 1970. The molecular and crystal structure of dehydroascorbic acid, *Acta Chem. Scand.*, 25: 2238-2239.
- Kern, H. L. and S. L. Zolot, 1987. Transport of vitamin C in the lens, *Curr. eye Res.*, 6: 885-896.
- Knecht, K. J., J. A. Dunn, K. F. McFarland, D. R. McCance, T. J. Lyons, S. R. Thorpe and J. W. Baynes, 1991. Effect of diabetes and aging on carboxymethyllysine levels in human urine, *Diabetes*, 40: 190-196.
- Kurata, T. and Y. Sakurai, 1967a. Degardation of L-Ascorbic acid and mechanism of nonenzymatic browning reaction, *Agric. Biol. Chem.*, 31: 177-184.
- Kurata, T. and Y. Sakurai, 1967b. Degardation of L-Ascorbic acid and mechanism of nonenzymatic browning reaction, *Agric. Biol. Chem.*, 31: 170-176.
- Mawhinney, T., R. S. R. Robinet, A. Atalay and M. A. Madson, 1986. Gas-liquid chromatography and mass spectral analysis of mono-, di- and tricarboxylate as their tert. - butyldimethylsilyl derivatives, *J. Chromatogr.*, 361, 117-130.
- Niemela, K., 1987. Oxidation and non-oxidative alkali-catalysed degradation of L-ascorbic acid, *J. Chromatogr.*, 399: 235-243.
- Ohmori, M., H., Higashioka and M. Takagi, 1983. Pure dehydro-L-ascorbic acid prepared by O<sub>2</sub>-oxidation of L-ascorbic acid with active charcoal as catalyst, *Agric. Biol. Chem.*, 47: 607-608.
- Ortwerth, b. J., S. H. Slight, M. Parabhakaram,



- Y. Sun and J.B. Smith, 1992. Site Specific glycation of lens crystallins by ascorbic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, 1117 : 207-215.
- Otsuka, M., T. Kurata and N. Arakawa, 1986. Isolation and characterization of a degradation product derived from 2,3-diketo-L-gulonic acid, "Amino-carbonyl Reaction in Food and Biological Systems" in *Dev. Food Sci.*, 13 : 77-84.
- Prabhakaram, M. and B.J. Ortwerth, 1992. The glycation and cross-linking of isolated lens crystallins by ascorbic acid, *Exp. Eye Res.*, 55 : 451-459.
- Sell, D.R. and V.M. Monnier, 1989. Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix, *J. Biol. Chem.*, 264 : 21597-21602.
- Slight, S.H., M. Prabhakaram, D.B. Shin, M. S. Feather and B.J. Ortwerth, 1992. the extent of  $\epsilon$ -N-(carboxymethyl) lysine formation in lense proteins and polylysine by the autoxidation products of ascorbic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, 1117 : 199-206.