

발암물질인 아플라톡신 G₁의 탈독소화 반응에 관한 연구

The Study on the Detoxification of Aflatoxin G₁ in Cancer Compound

장 향 동* · 김 래 현* · 이 수 경**

Hyang-Dong Jang · Lae-Hyun Kim · Su-Kyung Lee

(1996년 7월 4일 접수, 1996년 12월 14일 채택)

ABSTRACT

The Oxidation of aflatoxin G₁(AFG₁) with ozone in chloroform solvent gave the stable ozonide into ozonization of the double bond in the terminal furan ring, and this reaction have been carried out for 3hr at -78.5°C. The chloroform solvent was removed in a stream of nitrogen and the residue was separated by elution chromatography(EC). The structure of this compound have been identified by using MS, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and I. R spectroscopy, respectively. This compound was formed the normal stable AFG₁-ozonide into spontaneous rearrangement after unstable ozonide according to sigmatropic rearrangement dependent upon cyclo addition by ozone.

1. 서 론

1960년초에 *Aspergillus flavus* 균주에 의하여 생성된 아플라톡신 화합물들은 발암성이 대단히 강력한 독소 화합물로 알려졌다며, 최초로 분리하여 발견한 것은 얇은막 크로마토그래피를 실시한 결과 R₁값의 순서에 따라서 푸른색을 나타낸 것이 AFB₁과 AFB₂이었으며, 그 다음으로 녹색색을 나타낸 것이 AFG₁과 AFG₂이었다. 그리고, 찌소에 분비되어 나온 우유 속에 내포된 것이 AFM₁과

AFM₂이었다. 이후에 AFB_{2a} 및 AFG_{2a}등도 있음이 보고되었다. 이들 발암성 화합물 중에서 최초로 AFB₁의 화학적 구조가 Asao와 그 공동 연구자에 의하여 1965년 JACS에 발표되었다¹⁾. 그후 이와 같은 종류의 아플라톡신 화합물들은 모두가 7, 8-dihydrofuro-[2, 3-b]-furan(DHFF) 또는 2, 3, 7, 8-tetrahydrofuro-[2, 3-b]-furan(THFF)의 골격을 갖는 것으로서 AFB₁과 AFG₁의 유도체가 AFB₂와 AFG₂이고, AFM₁은 AFB₁의 히드록시 유도체이며, AFM₂는 AFM₁의 유도체이다. 그리

*서울산업대학교 화학공학과

**서울산업대학교 안전공학과

고 AFB_{2a}와 AFG_{2a}는 각각 AFB₂와 AFG₂의 유도체이다.

현재까지 알려져 있는 이 화합물 계열의 발암물질 중에서 가장 독소력이 강한 AFB₁과 AFG₁은 간암 및 담관 이상증식등을 일으키는 주된 원인의 물질임이 보고된 이후로 여러 분야에서 이들을 제거, 변환 또는 파괴시키려는 많은 실험 결과가 보고된 바가 있다²⁻³².

최근에 Guengerich와 그 공동 연구자³³는 AFB₁을 Cytochrom P450 Enzyme을 이용하여 탈독소화시키기 위한 산화반응이 현재 주목을 끌고 있다. 그러나 AFG₁을 탈독소화시키기 위한 산화반응은 아직까지 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 그동안 계속적인 실험을 수행하여 왔던 결과들을 근간으로 하여, 발암물질인 아플라톡신 G₁을 탈독소화 방법으로 효소가 아닌 오존을 이용하여 저온(-78.5°C)에서 산화반응 시켰을 때, 결과물인 최종 생성물의 구조를 규명하고, 그 메커니즘을 추정하고자 한다. 이러한 결과는 앞으로 발암물질에 대한 산업 위생의 예방 대책으로 안전을 도모하는데 일조가 되리라고 본다.

2. 실험

2.1 시 약

AFG₁의 원시료는 Aldrich Chemical Co.,에서 구입한 것으로 완전하게 밀봉된 10mg단위의 앰플로서 냉장고에 0°C에서 보관하여 놓은 것을 사용하였으며, 클로로포름, 아세톤, 이소프로필 알코올, 메탄올 및 μ -porasil Si-gel(10 μ m)은 Merck Co.,에서 G.R을 구입하여 사용하였다. 그리고, 산소 및 질소 가스는 순도가 99.9%인 것을 구입하여 사용하였으며, 본 산화반응에 사용한 반응기를 -78.5°C로 유지하기 위한 dry ice는 시판된 것을 사용하였다.

2.2 기구 및 장치

본 실험을 위해서 오존화 반응 실험 장치는 Fig. 1과 같이 구성하여 장치하였다. 여기서 산소 공급(99.9%)은 해당 유량계와 조절기(Okamoto회사)를 부착시키고, 일정한 속도로 오존 발생기(22,000V, arc 진공 장치)에 보내어 발생된 오존

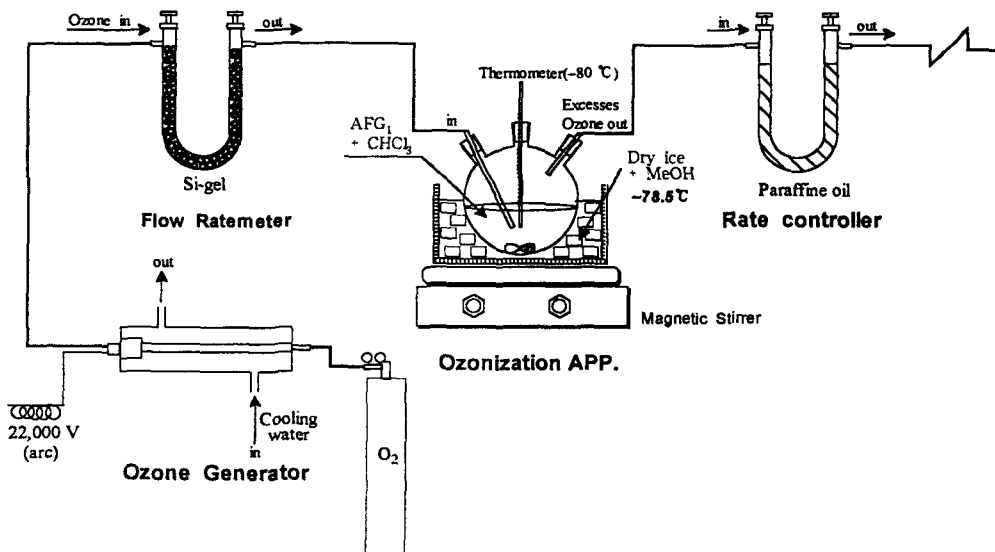


Fig. 1 Schematic Diagram of Ozonization Apparatus

가스를 U자관에 흡수용 실리카 겔을 충전시켜 놓은 곳에 통과시켜 습기를 제거한 다음에 본 반응기로 보내었으며, 본 반응기는 -78.5°C로 유지하기

위하여 MeOH에 dry ice를 포화시켜 놓은 곳에 안치시켜 놓고 U자관에서 유도된 관을 깊숙이 삽입시켜 장치하여 놓았다. EC에 사용한 컬럼은 내부

직경이 0.5cm이고, 길이가 150cm인 것으로 정지 코크는 나일론 6.6으로 만든 것이었다. 다음으로 질소봄베는 해당유량계와 조절기(Tanaka회사)를 부착하여 놓았으며, 증발건조기는 ELEYIA회사 제인 N-1N형을 사용하였다.

기기분석에 사용한 질량분석 측정기는 SHIMADZU회사 제인 GC/MS-QP 1100 EX를 사용하였으며, $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ 는 JEOL회사 제인 JNM-EX 90A인 90MHz를 사용하였다. 그리고 I.R은 Perkin-Elmer회사제인 1330-IR을 이용하였다.

2.3 실험방법

순수한 결정체인 원시료 AFG₁ 300mg(앰플 30개)을 클로로포름 300ml에 완전히 용해시킨 다음에 삼구플라스크에 안치시키고, 그 중앙 입구에는 -80°C 온도계를 설치하고, 왼쪽 입구에는 오존 가스 유입용 유도관을 설치하여 건조시킨 실리카 겔을 충전시켜 놓은 U자관에 연결시켜 놓고서 반대편에는 건조된 오존 가스가 반응기에 유입되도록 장치하였다. 한편 오른쪽입구에는 반응하고 난 여분의 오존가스를 배출시키기 위한 유도관을 설치하여 배출관 끝을 연결시켜 놓았다.

이때의 배출 유도관 중간에 파라핀 오일을 1/2 정도 넣은 U자관을 장치하여 일정한 속도로 방울방울 배출되도록 산소봄베에 부착된 유량계와 조절기를 이용하여 조정되도록 하였다. 다음으로 본 반응 플라스크를 투명한 경질 욕조에 안치시킨 후, 이 욕조에 MeOH를 넣고, 여기에 dry ice를 조금씩 넣어 주면서 서서히 계속적으로 저어 가면 거의 겔 상태로 되면서 -78.5°C를 유지하게 된다.

위와 같이 된 것을 자석것게 판 위에 안치시키고, 계속적으로 자석것게로 저어 가면서 오존가스 발생장치로부터 오존을 미량씩 방울방울로 통과시키면서 정확히 3hr동안 산화반응을 시켰다. 이때 생성된 산화반응물에 질소가스를 일정한 속도로 흘려보내어 용매를 제거시키고, 다시 재정제하여 증발 건조시켰다. 이때 최종 생성물을 EC를 실시하기 위하여 클로로포름-아세톤/이소프로필알코올(80+15+5, v/v%)로 만든 용액을 μ -porasil Si-gel(10 μm)로 충전시켜 놓은 컬럼(0.5 \times 150cm)에 주입시켜 미량씩 통과시켜 주면 약 30분 후에 용리현상이 나타나기 시작한다. 여기서 분리

시킨 녹황색의 띠 즉 반점고리를 다시 재정제하여 증발 건조시킨 결과 수율은 56.7%이었다.

3. 결과 및 고찰

본 실험에서 생성된 최종 산화물의 질량을 확인하기 위하여 먼저 MS를 70eV에서 EI방법으로 측정된 결과에 의하면 원시료(AFG₁)와 오존화시킨 생성물(AFG₁-ozonide)의 m/e측정값은 다음과 같았다.

AFG₁; m/e=51, 63, 89, 115, 185, 227, 255, 328, 329

AFG₁-ozonide; m/e=70, 113, 149, 167, 279, 303, 328, 344, 360, 376

이와 같은 결과가 나타난 원인을 고찰하여 보면 표준시료 AFG₁의 분자량은 328이므로, M⁺는 328이 당연하고, (M+1)피크가 나타난 것으로 보아서 동위원소 1개 내포되어 있음을 지적하여 주고 있다. 다음에 오존으로 산화시킨 AFG₁-ozonide의 m/e값이 344, 360 그리고 376에서 각각 나타난 것은 질량이 16씩 증가하였음을 의미한 것으로서 산소가 3개 결합되어 있다는 사실이 증명되었다. 따라서, 결과론 적으로 AFG₁을 오존으로 산화시킨 최종 생성물은 마지막 푸란고리 2, 3-위치의 이중결합에 전형적인 시클로 부가반응을 하여 AFG₁-ozonide가 생성되었음을 입증한 것이다.

다음으로 최종 산화물인 AFG₁-ozonide의 구조를 확인하기 위하여 $^1\text{H-NMR}$ (90MHz)로 측정된 화학적 이동값(δ)은 다음과 같았다.

AFG₁; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃),

δ =3.45(t, 2H), 3.93(s, 3H), 4.42(t, 2H),
4.73(d, 1H), 5.47(t, 1H), 6.46(t, 2H),
6.77(d, 1H), 7.26(s, 1D)

AFG₁-ozonide; $^1\text{H-NMR}$ (CDCl₃),

δ =1.31(t, 2H), 1.56(t, 2H), 3.45(s, 3H),
3.95(d, 1H), 4.18(d, 1H), 6.33(s, 1H),
7.01(s, 1D), 7.27~8.24(m, 2H)

이와 같이 나타난 측정 결과들을 고찰하여 보면 표준시료 AFG₁의 대다수 피크는 (n+1)규칙에 의하여 시그날이 나타났으나, 본 실험에서 오존으로 산화시킨 AFG₁-ozonide는 거의 다르게 시그날이 나타났음을 볼 수가 있다. 즉 이들 시그날 가운

데에서도 가장 명확하게 특이한 것은 1.31(t, 2H)와 1.56(t, 2H)의 시그널이 매우 특이하게 upfield에서 연속적으로 나타났으며, 그리고 7.27~8.24 δ 값 사이에 대단히 강력한 다중선이 폭넓게 나타난 점이다. 이 원인은 오존의 1, 3-dipolar addition에 의하여 마지막 푸란고리의 이중결합의 π결합이 끊어져서 일차적으로 불안정한 ozonide가 형성되며, 오존은 4π 전자들과 이중결합 2π 전자들에 의하여 (2+4)cyclo addition이 열역학적으로 허용되어 실험적으로 이들은 Stereospecific cis addition으로서 Pericyclic reaction이 제후된 특성 때문에 Sigmatropic rearrangement가 일어난 다음에 안정한 상태로 Spontaneous rearrangement가 일어나서 ozonide가 형성되므로 인하여 전기음성도가 강한 산소전자유에 Shielding되어 Magnetic non-equivalence가 되어 있기 때문인 것이다. 따라서 결과론적으로 표준시료 AFG₁의 ¹H-NMR과 AFG₁-ozonide의 ¹H-NMR의 δ 값은 명확하게 차이가 나타남을 관찰할 수가 있으므로 AFG₁-ozonide가 되어 있음을 입증하여 준 것이다.

한편 상호보완적으로 최종 생성물의 구조를 확인하기 위하여 ¹³C-NMR(22.5MHz)로 측정된 화학적 이동값(δ)은 다음과 같았다.

AFG₁; ¹³C-NMR(CDCl₃),
 δ = 28.8(CH₂), 47.8(OCH₃), 56.5(OCH₂),
 62.0(-C-), 77.0(CDCl₃), 92.2(C=C),
 102.5~113.5(COCO), 145.2(CO),
 160.3~165.0(⊙), 232.879(C=O),
 238.4(C=O)

AFG₁-ozonide; ¹³C-NMR(CDCl₃),
 δ = 10.9(CH₂), 14.0(OCH₂), 22.9(-C-),
 28.9(C=C), 38.7(OCH₃), 52.120(CO),
 64.49~70.1(COCO), 77.0(CDCl₃),
 128.7~132.4(⊙), 167.7(O-C-O),
 237.3~239.2(O-C-O)

이와 같은 결과를 고찰하여 보면 표준시료 AFG₁의 화학적 이동(δ)값과 본 실험에서 산화시킨 AFG₁-ozonide의 화학적 이동값(δ)은 약간의

큰 차이가 나타나며, 그들의 시그널 양상도 거의 다르다. 이 가운데 가장 특이한 시그널은 10.9 δ로부터 38.7 δ까지의 피이크가 upfield에 연속적으로 나타났으며, 그리고 237.3 δ로부터 239.2 δ까지의 피이크가 거의 다름을 관찰할 수가 있었다. 이와 같은 원인은 ¹H-NMR 특성에서 나타난 현상의 원인과 동일하다. 따라서 결론론 적으로 ¹³C-NMR의 측정에 의하여서도 명확하게 차이가 나타남을 관찰할 수가 있으므로 AFG₁-ozonide가 생성되었음을 입증하여 준 것이다.

끝으로 적외선 분광기를 이용하여 KBr정제법으로 측정된 결과는 다음과 같다.

AFG₁; I. R(KBr), cm⁻¹=3100(m), 2990(s), 2890(s), 1770(s), 1720(s), 1630(s), 1590(m), 1550(m), 1480(s), 1440(s), 1400(m), 1380(m), 1310(s), 1270(m), 1210(m), 1160(m), 1120(s), 1070(s), 1040(m), 980(s), 940(m), 830(m), 800(m), 780(m), 720(m)

AFG₁-ozonide; I. R(KBr), cm⁻¹=2980(s), 2880(s), 1770(s), 1730(s), 1630(s), 1600(s), 1550(s), 1490(m), 1470(m), 1440(m), 1380(s), 1290(s), 1280(s), 1270(s), 1260(s), 1220(m), 1170(s), 1130(s), 1070(s), 980(m), 950(m), 920(m), 810(m), 750(m), 710(m)

이와 같은 적외선 흡수들이 나타난 결과를 고찰하여 보면 먼저 표준시료 AFG₁의 경우에 3100cm⁻¹에서 중간 흡수 피이크는 마지막 푸란 고리의 이중결합이 있음을 지적하여 준 것이다. 그러나 본 실험에서 산화반응을 시킨 AFG₁-ozonide의 흡수 피이크는 3100cm⁻¹에서 나타나지 않았음을 볼 수가 있었다. 따라서 이중결합이 깨어져서 전형적인 시클로 부가 반응을 하여 AFG₁-ozonide가 생성되었음을 입증하여 준 것이다. 그리고 1300cm⁻¹ 이후에서 부터 1100cm⁻¹ 이내까지 AFG₁의 C-O 신축진동은 4개의 흡수대가 나타났지만, AFG₁-ozonide의 C-O 신축진동은 7개의 흡수대가 나타났다. 이 가운데 특징적인 것은 1290cm⁻¹, 1280cm⁻¹, 1270cm⁻¹ 및 1260cm⁻¹는 중첩되어 폭이 넓게 나타났다는 사실이 중요한 의미로서 오존화가 되어있다는 사실을 증명하여 준 것이다. 이와같은 원인은 ozonide가 삼각형태의 산소 3개에 많은양의 적외선이 흡수되었다가 방출이 동시에 이루어지므로 인하여 나타난 현상으로서 산소의 전기음성도가 강하게 작용하였기 때문인 것이다.

4. 결 론

Aspergillus flavus 균주에 의하여 생성된 AFG₁은 발암성이 대단히 강력한 화합물로서 화학적으로 오존화 반응을 1시간 정도 시켰을 때 오존화 반응의 메카니즘은 전형적인 알켄화합물을 오존으로 산화시켰을 때와 유사한 형태의 반응 과정을 거치는 것으로 생각되나^{34,35}, 다음 Fig. 2와 같이 3단계의 메카니즘으로 진행되는 것으로 사료된다. 즉 첫째 단계는 시클로 부가 반응이 일어나고, 둘째 단계로 시그마트로픽 자리 옮김 반응이 일어나서 대단히 불안정한 Initial ozonide 즉, Molozonide가 생성된 후에, 세 번째 단계로 자발적 자리 옮김 반응이 일어나서 정상적으로 안정화된 AFG₁-ozonide가 생성된 것으로 판단된다.

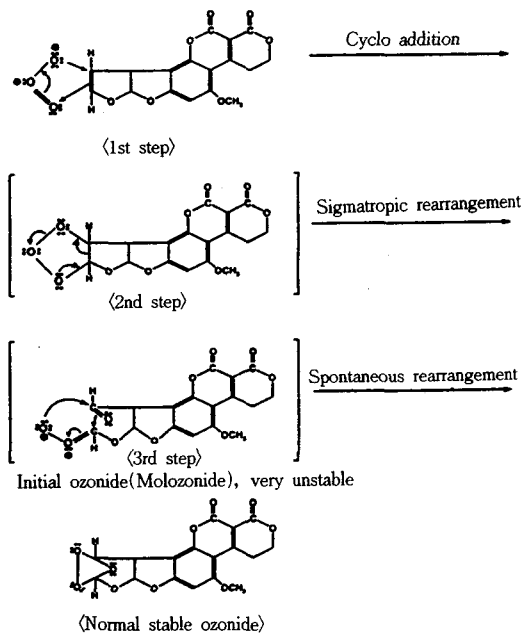


Fig. 2 The Mechanism of the Ozonization on the Aflatoxin G₁

본 논문은 1995학년도 서울산업대학교 공모 과제 학술 연구비에 의하여 연구되었습니다.

참 고 문 헌

1) T. Asao, G. Buchi, M. M. Abdel-Kodder,

S. B. Chang, E. L. Wick and G. N. Wogan, J. Am. Chem. Soc., Vol. 87, No. 4, p. 882, 1965.

2) W. A. Pons, A. F. Cucullu, A. O. Franz and L. A. Goldblatt., J. Assoc. Off. Anal. Chemist., Vol. 49, p. 554, 1966.

3) W. A. Pons, L. A. Goldblatt, J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 42, p. 471, 1966.

4) W. A. Pons, J. A. Robertson and L. A. Goldblatt, J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 42, pp. 565~669, 1966.

5) H. R. Burmeister and C. W. Hesseltnine, App. Microbial, Vol. 14, No. 3, p. 403, 1966.

6) H. R. Burmeister; Microbiological screening process for aflatoxins, U.S. Patent No. 3, pp. 360~441, 1967.

7) C. W. Hesseltnin, O. L. Shotwell, J. J. Ellis and Stubbfield, Bacterial Rev., Vol. 30, p. 7959, 1966.

8) F. G. Dollear and H. K. Gardner, Proc. 4th Nat. Peanut Res., Tifton, Georgia, Vol. 14, No. 5, pp. 72~81, 1966.

9) W. C. Tragger and L. Stoloff; J. Agric. Food Chem., Vol. 15, No. 4, p. 679, 1967.

10) V. Sreenivasamurthy, H. A. Papia, S. Sri-kanta and A. Shanker, Murti, Vol. 50, p. 350, 1967.

11) W. A. Pons, A. F. Cucullu, A. O. Franz and L. A. Goldblatt; J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 45, p. 694, 1968.

12) F. G. Dollear, G. E. Mann, L. P. Codifer, J. H. K. Gardner, J. S. P. Koltun and H. L. E. Vix, J. Am. Oil Chem. Soc., Vol. 45, p. 862, 1968.

13) W. H. Butler, M. Greenblatt and W. Lijinsky, Cancer Res., Vol. 29, p. 2206, 1969.

14) M. Ullo-Sosa and H. W. Schroeder "Der Cereal Chem.", Vol. 46, p. 397, 1969.

15) L. S. Lee, A. F. Cucullu, A. O. Franz and W. A. Pons, Agric. Food Chem., Vol. 17, No. 3, p. 451, 1969.

- 16) M. Steyne, *J. Assoc. Anal. Chem.*, Vol. 53, No. 3, p. 619, 1970.
- 17) J. H. K. Gardner, J. S. P. Koltun, F. G. Dollear and E. T. Rayner, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Vol. 48, pp. 70~73, 1971.
- 18) W. A. Pons, A. F. Cucullu, L. S. Lee, H. J. Janssen and L. A. Goldblatt *J. Am. Oil Chem. Soc.*, Vol. 49, p. 124, 1972.
- 19) F. E. Escher, P. F. Koheler and J. C. Ayres, *J. Food Sci.*, Vol. 38, p. 889, 1973.
- 20) A. Prevot, *Prev. Fr. Corps Gras*, Vol. 21, p. 91, 1974.
- 21) F. Kiermier and L. Ruffer; *Z. Lebensm. Unters, Frosch*, Vol. 155, pp. 129~141, 1974.
- 22) K. R. Natarajan, K. G. Rhee, C. M. Carter and K. F. Martill, *J. Food Soc.*, Vol. 40, No. 6, p. 1193, 1975.
- 23) A. C. Beckwith, R. F. Vesonder and A. Ciegler, *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 23, pp. 582~587, 1975.
- 24) A. F. Cucullu, L. S. Lee, W. A. Pons and J. B. Stanley *J. Agric. Food Chem.*, No. 24, pp. 408~410, 1976.
- 25) H. H. Wassermann and J. L. Ives, *J. Org. Chem.*, Vol. 43, No. 16, p. 3238, 1978.
- 26) W. A. Pons and F. J. Anthonyo, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 61, No. 4, pp. 793~840, 1978.
- 27) O. L. Shotwell, E. E. Vandergraft and C. W. Hesseltine, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 61, No. 3, pp. 574~577, 1978.
- 28) L. P. Kirk, G. C. Mustakas and E. L. Griffin, *J. Am. Oil Chem. Sci.*, Vol. 55, pp. 550~555, 1978.
- 29) L. S. Lee, E. J. Conkerton, R. L. Ory and J. W. Bennett *J. Agric. Food Chem.*, Vol. 27, No. 3, p. 598, 1979.
- 30) J. K. Lin, K. A. Kennan, E. C. Miller and J. A. Miller, *Cancer Res.*, Vol. 38, p. 2424, 1978.
- 31) B. F. Coles and J. R. Lindsay Smith, *J. Chem. Soc., Perkin I*, pp. 2664~2671, 1979.
- 32) C. P. Gorst-Allmann, P. Steyne and P. L. Wessels, *J. Chem. Soc., Perkin I*, pp. 1360~1364, 1977.
- 33) Y. F. Ueng, T. Shimada, H. Yamazaki and F. P. Guengerich, *Chem. Res. Toxicol.*, Vol. 8, No. 2, pp. 218~225, 1995.
- 34) T. H. Lowry and K. S. Richardson, "Mechanism and Theory in Organic Chemistry (2nd ed.,)" Harper & Row Pub. Co., pp. 758~897, 1981.
- 35) T. W. Graham Solomons, "Fundamentals of Organic Chemistry (2nd ed.,)" John Wiley Pub. Co., pp. 209~286, 1980.