

Riboflavin 과 Barbiturate 와의 分子間 相互作用

俞炳高 · 李相得 · 李尙鍾 · 鄭賢鎬

서울대학교 藥學大學

(Received November 9, 1981)

Byung Sul Yu, Sang Deuk Lee, Sang Jong Lee and Hyun Ho Chung

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Molecular Interaction of Riboflavin and Barbiturates

Abstract—Spectroscopic investigation has been carried out to know the binding mechanism of riboflavin with barbiturates, such as phenobarbital and amobarbital in chloroform solution by using infrared and nuclear magnetic resonance spectra. Phenobarbital and isoalloxazine form a 1 : 1 cyclic hydrogen bonded dimer through the 3-N imino and the 2-C carbonyl groups of the isoalloxazine ring of the latter, and the 1-N₃(or 3-N) imino and the 2-C carbonyl groups of the pyrimidine ring of the former. Amobarbital and riboflavin form a 1 : 1 cyclic hydrogen bonded dimer by the same mode of phenobarbital.

鎮靜睡眠劑로 사용되는 barbiturate의 作用機轉에 對한 研究^{1~14}) 및 構造의 要因과 生理的 活性의 聯關性에 對한 研究^{15~24}) 進行되어 왔으나 barbiturate의 生體內 作用機轉에 對한 分子水準에서의 研究는 아직 되어 있지 않다.

그러나 barbiturate가 核酸鹽基中 여러 adenine 誘導體와 강한 水素結合을 形成하는 選擇성을 갖고 있음이 報告^{25~30})됨으로써 中樞神經系에 鎮靜效果를 나타내는 barbiturate의 作用樣式에 關한 하나의 根據가 되었으며 이로부터 呼吸連鎖系를 阻害하는 機轉이 adenine과의 選擇的 水素結合에 依한 것일 수 있다는 假說이 提示되었다³¹). 즉 barbiturate가 FAD나 NAD의 adenine 部位에 結合함으로써 NAD의 adenine 部位와 FAD의 flavine 部位와의 結合을 阻害하거나 NAD 및 FAD의 構造的 變化를 일으켜, NAD와 flavin 含有酸素의 活性을 阻害할 수 있다고 推定하고 있다.

이에 著者等은 barbiturate와 flavin의 結合 可能性을 考慮하여 呼吸連鎖系에 關與하는 FAD FMN 中の flavin 과 barbiturate의 結合樣式을 糾明해 보고자 核磁氣共鳴 spectrum 및 赤外吸收 spectrum 과 같은 分光學的 手段에 依하여 그 結合을 測定하고 結合比率 및 可能的 結合樣式을 調査하였으며 二次的으로는 이들 生體內 分子와 藥物分子의 作用機轉을 밝히는 데 基礎的 情報을 提供코자 하였다.

實驗 方法

實驗 物質—本實驗에 使用한 物質은 FAD 및 FMN의 model 化合物로서 chloroform 과 같

은 有機溶媒에 可溶性인 riboflavin 誘導體, 즉 riboflavin-2', 3', 4', 5'-tetraacetate (RFTA) 및 riboflavin-2', 3', 4', 5'-tetrabutyrate (RFTB)를 試料로 使用하였다. RFTA는 이미 알려진 方法³²⁾에 依하여 合成하였으며, RFTB(대웅제약에서 提供)는 再結晶³³⁾하여 使用하였다.

Barbiturate는 有機溶媒에 可溶性인 phenobarbital과 amobarbital(중근당에서 提供)을 chloroform으로 再結晶하여 使用하였다.

赤外吸收 spectrum과 核磁機共鳴 spectrum測定用 溶媒는 chloroform 및 重 chloroform($CDCl_3$)을 使用하였다. chloroform(市販 一級試藥)은 精製하여 使用하였다. 重 chloroform은 獨逸 E. Merck Co. 製品을, 其他 試藥은 市販 特級試藥을 精製없이 使用하였다.

實驗 方法—赤外吸收 spectrum은 Beckman IR 20A型的 赤外分光光度計를 使用하여 測定하였으며 3μ 領域에서는 1.0mm KBr cell을, 6μ 領域에서는 0.2mm KBr cell을 各各 使用하였다. 本論文에 나타난 赤外吸收 spectrum 圖는 溶媒의 吸收曲線을 基準線으로 하여 透過率을 吸光度로 換算하여 表示하였다.

核磁機共鳴 spectrum은 perkin-Elmmer R32型的 核磁機共鳴 吸收裝置를 使用하여 測定하였으며 基準物質로는 tetramethylsilan (TMS)를 internal로 使用하였다.

實驗 結果 및 考察

3μ 領域의 赤外吸收 Spectra—0.01M RFTA 溶液의 赤外吸收 spectrum은 $3380cm^{-1}$ 에서 銳敏하고 강한 吸收帶를 나타낸다(Fig. 1). 이 吸收帶는 riboflavin의 非會合 imino 基에 起因하는 NH 伸縮振動의 吸收帶로 알려져 있다²⁷⁾.

0.01M amobarbital 溶液의 赤外吸收 spectrum 역시 같은 位置인 $3380cm^{-1}$ 에서 RFTA 溶液보다 더 銳敏하고 강한 吸收帶를 나타낸다(Fig. 1) 이 吸收帶는 濃度를 稀釋함에 따라 그 겉보기 吸光係數가 增加하고 濃度를 높여줌에 따라 겉보기 吸光係數가 減少한다. 따라서 이 吸收帶 역시 amobarbital의 1, 3 位置의 2 個의 非會合 imino 基에 起因하는 NH 伸縮振動의 吸收帶로 推定할 수 있다.

同 mole 濃度의 RFTA와 amobarbital 混合液에서는 두 物質의 非會合性 imino 基에 起因하는 $3380cm^{-1}$ 의 吸收帶가 크게 減少하고 會合에 따른 吸收帶가 $3200cm^{-1}$ 에서 觀測된다. 이로써 두 物質의 分子內에 存在하는 imino 基가 會合에 關與되었음을 推定할 수 있다.

6μ 領域의 赤外吸收 spectra—有機溶媒中

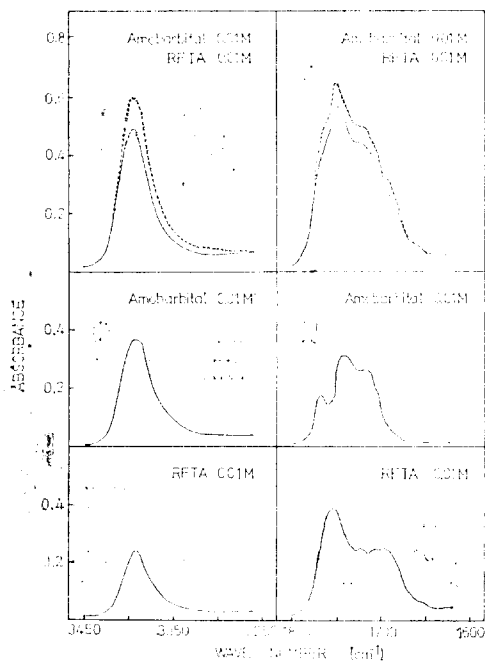


Fig. 1—Infrared spectra of RFTA, amobarbital and equimolar mixture solution of each compound in chloroform.

Solid line: observed spectra

Dotted line: calculated sum of the lower two spectra. The path length is 1mm for the 3μ region and 0.2mm for the 6μ region.

에서의 RFTA-amobarbital 會合體의, imino 基와의 結合部位를 明白히 할 目的으로 6μ 領域에서의 $c=O$ 伸縮振動의 變化를 알아보았다.

0.01M RFTA 溶液의 赤外吸收 spectrum 은 1745cm^{-1} 附近의 強한 吸收帶와 1715cm^{-1} , 1695cm^{-1} 에서의 2 個의 弱한 吸收帶를 나타낸다. 1745cm^{-1} 에 強하게 나타나는 吸收帶는 acetyl 基의 $c=O$ 伸縮振動에 依한 것으로 알려져 있으며³²⁾, 1715 , 1695cm^{-1} 에 나타난 2 個의 吸收帶는 4 位 및 2 位の $c=O$ 伸縮振動에 依한 것으로 알려져 있다²⁷⁾.

0.01M amobarbital 溶液의 赤外吸收 spectrum 은 1755 , 1735 , 1710cm^{-1} 에서 3 個의 吸收帶를 나타내며, 이 吸收帶는 amobarbital 의 3 個의 carbonyl 基에 起因하는 $c=O$ 伸縮振動의 吸收帶로 歸結된다.

두 物質의 混合液의 赤外吸收 spectrum 變化를 볼 때 RFTA 에 있어서는 isoalloxazine 環의 2 位 carbonyl 基에 依한 吸收帶가 減少하고 amobarbital 에 있어서는 全體적으로 減少하는 것을 알 수 있다. 이는 carbonyl 基가 結合에 關與하였음을 나타내는 것이며 riboflavin 에 있어서는 isoalloxazine 環의 2 位 carbonyl 基가 結合에 利用됨을 알 수 있다. 그러나 amobarbital 의 境遇에는 3 個의 carbonyl 基에 依한 $c=O$ 伸縮振動의 吸收帶가 重複되어 나타나므로 正確한 結合部位를 決定할 수 없다.

連續變化法을 利用한 結合比率의 決定——溶液中에 있는 두 物質間의 反應이 가성정일일 경우를 감안하여 吸光度를 測定함으로써 生成物의 結合比率를 決定하는 連續變化法^{34, 35)}에 依하여 RFTB 와 barbiturate 의 結合比를 決定하였다.

RFTB 와 amobarbital 各各의 濃도가 0.02M 인 溶液을 使用하여 두 溶液의 混合比를 變化시켜 가면서 非會合性 imino 基의 伸縮振動에 依한 3380cm^{-1} 에서의 吸收帶에 對하여 吸光強度減少度를 測定하였다. 이때 各 混合比率에서의 吸光強度減少度를 그림으로 表示하면 Fig. 2 와 같다. 變曲點은 RFTB 및 amobarbital 의 濃도가 各各 0.01M 일 때(즉 RFTB:amobarbital=50:50)이므로 結合比率는 1:1임을 推定할 수 있다.

RFTB 와 phenobarbital 의 境遇에도 같은 結果를 보였다.

核磁機共鳴 spectra—— CDCl_3 溶媒中에서 RFTB 와 amobarbital 및 phenobarbital 의 會合如何 및 結合部位를 究明하기 爲하여 ^1H -核磁機共鳴 spectrum 의 變化를 測定하였다.

RFTB 의 imino proton 은 分子內에서 가장 큰 unshielding proton 으로서 다른 proton 의 resonance 에 比하여 더 低磁場에서 나타나며 phenobarbital 및 amobarbital 의 imino proton 역시 分子內에서 가장 큰 unshielding proton 으로서 다른 resonance 에 比하여 低磁場에서 나타난다.

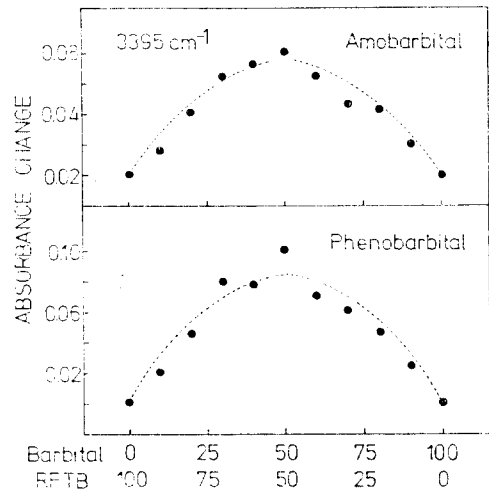


Fig. 2—Change in absorbance of the non-bonded bands at 3395cm^{-1} as a function of the molar ratio of (a) RFTB and amobarbital, and (b) RFTB and phenobarbital. Absorbance of the pure solution is adjusted to zero.

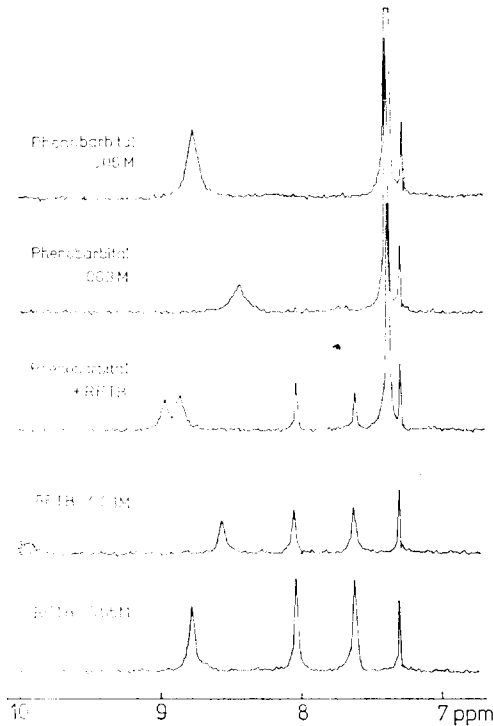


Fig. 3— ^1H -nmr spectra of RFTB, phenobarbital and their mixture in CDCl_3 .

變化에 따라 proton signal의 移動度에 差異가 나타날 것이다.

RFTB의 濃度가 增加함에 따라 自體會合이 強하여지므로, 結合에 關與한 imino proton의 signal은 低磁場으로 移動하며 phenobarbital과 amobarbital의 imino proton 역시 같은 傾向을 나타내나 phenobarbital의 境遇에 더 顯著함이 觀測된다(Fig. 5, 6).

連續變化法에 依해 測定한 核磁機共鳴 spectrum의 變化는 赤外吸收 spectrum과는 달리 結合比에 該當하는 比率의 混合液에서 極大值(또는 極小值)를 나타내지는 않는다. RFTB의 imino proton signal은 RFTB의 濃度가 減少하고 phenobarbital의 濃度가 增加함에 따라 보다 低磁場으로 移動하며 phenobarbital의 imino proton signal 또한 phenobarbital의 濃度가 減少하고 RFTB의 濃度가 增加함에 따라 보다 低磁場으로 移動한다(Fig. 5). 그러므로 두 物質 모두 相互間 分子結合이 自體會合보다 強함을 알 수 있다. 또한 phenobarbital의 imino proton signal의 移動을 나타내는 기울기가 RFTB의 境遇에 比하여 反값에 지나지 않는 것은 phenobarbital의 2個의 imino proton中 1個만이 이들 두 物質의 分子間 水素結合에 關與하고 있음을 暗示해주는 것으로서 赤外吸收 spectrum에서 求한 1:1結合比를 잘 뒷받침해 준다. RFTB와 amobarbital의 境遇에도 같은 傾向을 나타낸다(Fig. 6).

Amobarbital과 phenobarbital의 RFTB에 對한 結合強度의 比較에서 amobarbital의 imino

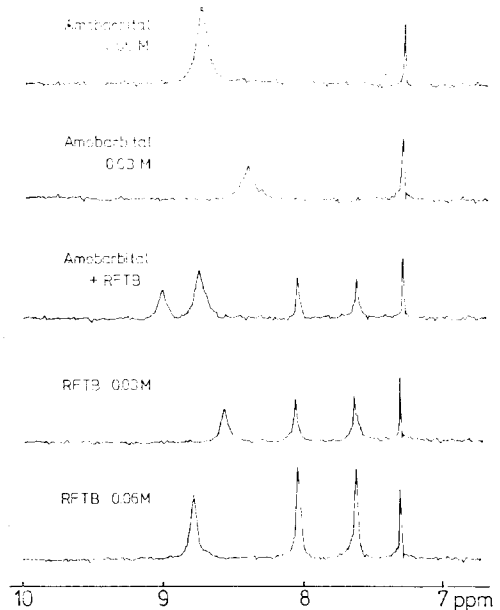


Fig. 4— ^1H -nmr spectra of RFTB, amobarbital and their mixture in CDCl_3 .

自體會合을 이루는 水素結合이나 RFTB-barbiturate會合을 이루는 水素結合에 imino proton들이 關與하였다면 그 signal들은 低磁場으로 移動할 것이며(Fig. 3, 4), 正確한 位置는 水素結合의 結合強度에 따를 것이므로 溫度 및 濃度の

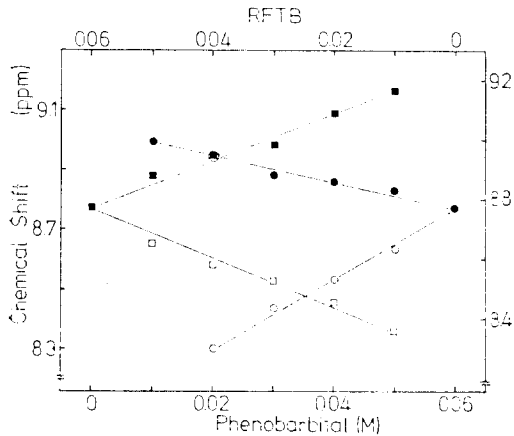


Fig. 5—Stoichiometric pairing of RFTB and phenobarbital. Dependence of the chemical shifts of the RFTB (■) and phenobarbital (●) imino protons in mixing experiments in CDCl_3 . Total concentration is constant at 0.09M.

- : Concentration dependence of the chemical shift of the 3-NH proton of RFTB in CDCl_3 .
- : Concentration dependence of the chemical shift of the 1,3-NH protons of phenobarbital in CDCl_3 .

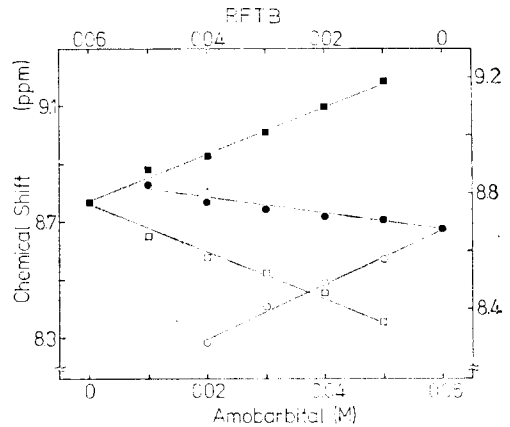


Fig. 6—Stoichiometric pairing of RFTB and amobarbital. Dependence of the chemical shifts of the RFTB (■) and amobarbital (●) imino protons in mixing experiments in CDCl_3 .

Total concentration is constant at 0.06M.

- : Concentration dependence of the chemical shift of the 3-NH proton of RFTB in CDCl_3 .
- : Concentration dependence of the chemical shift of the 1,3-NH protons of amobarbital in CDCl_3 .

proton signal의 移動을 나타내는 기울기는 phenobarbital의 境遇에 比하여 작게 觀測되므로 RFTB와 amobarbital의 結合力은 RFTB와 phenobarbital의 結合力보다 弱함을 알 수 있다.

結 論

以上の 實驗 結果로써 riboflavin 誘導體와 barbiturate는 各各의 自體會合에 比하여 더 強力한

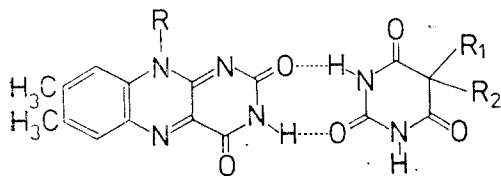


Fig. 7—Proposed interaction mechanism of riboflavin and barbiturate in chloroform.

1 : 1의 環狀水素結合體를 形成하며 riboflavin에서는 3位의 imino基와 2位의 carbonyl基가 barbiturate에서는 2位의 carbonyl基와 1位 또는 3位의 imino基가 結合에 關與함을 알 수 있다(Fig.7). Riboflavin에 水素結合이 形成되는 sequence에 있어서 isoalloxazine環의 2位의 carbonyl基가 4位의 carbonyl基보다 優勢한 事實³⁷⁾과 barbiturate의 4位 및 6位의 carbonyl

基가 5 位の 置換基들에 의하여 立體障得를 받을 것이라는 事實은 위에서 提示한 結合樣式을 잘 뒷받침해 주는 것이다.

生體內 酸化還元反應系에 關與하는 flavoprotein 의 活性部位인 FAD, FMN 과 NAD, 基質의 酵素反應段階가 isoalloxazine 環과 pyrimidine 環의 最大共域에 依한 電子傳達過程에 起因한다는 事實³⁸⁾과 isoalloxazine 環에 水素結合이 形成되면 環의 電子親和性이 增加하고 活性部位인 N-5 位置의 frontier electron density 가 增加된다는 事實^{39~45)}을 考處하면 barbiturate 가 呼吸連鎖系에 미치는 影響은 riboflavin 에의 選擇의 水素結合에 依한 flavin 含有酵素의 conformational change 나 isoalloxazine 環의 電子親和性의 增加에 起因한다고 推定할 수 있다. 그러므로 riboflavin 과 barbiturate 의 結合은 鎮靜睡眠作用을 갖는 構造類似體들의 構造의 要因과 生理的 活性的 聯關性 糾明에 意義가 있는 것으로 생각된다.

文 獻

1. H. Komai, D.R. Hunter, R.A. Haworth and H.A. Berkeff, *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 1455 (1980).
2. R.A. Nicoll, *Science*, **199**, 451(1978).
3. D. Pericic, J.R. Walters and T.N. Chase, *J. Neurochem.*, **29**, 839(1977).
4. J. Richter and M.B. Waller, *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 609(1977).
5. E.B. Geller, L. Durlifsky, C. Harakal, A. Cowan and M.W. Alder, *Pharmacologist*, **19**, 142(1977).
6. R.L. Ginsberg and M.B. Garnick, *Gastroenterology*, **72**, 1221(1977).
7. S. Tzing and I.K. Ho, *Biochem. Pharmacol.*, **26**, 699(1977).
8. E.R. Ransom and J.L. Barker, *Brain Res.*, **114**, 530(1976).
9. A. Stiehl, M. Thaler and W.H. Amirand, *Pediatrics*, **51**, 992(1973).
10. Sundwall, *Brain Res.*, **62**, 531(1973).
11. H.L. Sharp and B.L. Mirkin, *J. Pediatr.*, **81**, 116(1972).
12. L. Stern, N.N. Khanna, G. Levy and S.J. Yaffe, *Am. J. Dis. Child.*, **120**, 26(1970).
13. R.C.B. Aitken and A.T. Proudfoot, *Postgrad. Med. J.*, **45**, 612(1969).
14. B. Chance and G. Hallunger, *J. Biol. Chem.*, **278**, 418(1963).
15. M.K. Ticku and R.W. Olsen, *Life Sci.*, **22**, 1643(1978).
16. J. Caldwell and P.S. Sever, *Clin Pharmacol. Ther.*, **16**, 737(1974).
17. R.W. Cutler, D. Markowitz and D.S. Dudzinsky, *Brain Res.*, **81**, 189(1974).
18. R.I. Freudenthal and F.I. Carroll, *Drug Metab. Rev.*, **2**, 265(1973).
19. L. Casola, A. Giuditta and E. Rocca, *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**, 57(1964).
20. W.N. Aldridge and V.H. Parker, *Biochem. J.*, **76**, 47(1960).
21. N.S. Domek, C.F. Barlow and L.J. Roth, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **130**, 285(1960).
22. A. Goldstein and L. Aronow, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **128**, 1 (1960).
23. P.O. Kane and S.E. Smith, *Brit. J. Pharmacol.*, **14**, 261(1959).
24. L.C. Mark, J.J. Burns, L. Brand, C.I. Campomanes, N. Trousof, E.M. Papper and B.B. Brodie, *J. Pharmacol. exp. Ther.*, **123**, 70(1958).
25. N.-T. Yu and Y. Kyogoku, *Biochim. Biophys. Acta*, **331**, 21(1973).
26. B.S. Yu, *Korean Biochem. J.*, **6**, 1 (1973).
27. Y. Kyogoku and B.S. Yu, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **42**, 1387(1969).
28. Y. Kyogoku, R.C. Lord and A. Rich, *Nature*, **218**, 69(1968).
29. S.H. Kim and A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **60**, 492(1968).
30. L. Casolar, A. Giuditta and E. Rocca, *Arch. Biochem. Biophys.*, **107**, 57(1964).
31. Y. Kyogoku and B.S. Yu, *Chem. Biol. Interaction*, **2**, 117(1970).
32. K. Yagi, Y. Yamamoto and M. Kobayashi, *J. Vitaminol* **14**, 271(1968).
33. K. Yagi, H. Ohoma, Y. Takahashi and J. Okuda, *J. Vitaminol.*, **13**, 191(1967).
34. P. Job, *Ann. Chim.*, **9**, 113(1928).

35. W.C. Vosburgh and G.R. Cooper, *J. Am. Chem. Soc.*, **63**, 437(1941).
36. L. Katz, *J. Mol. Biol.*, **44**, 279(1969).
37. K. Yagi, N. Ohishi, K. Nishimoto, J.D. Choi and P-S. Song, *Biochemistry*, **19**, 1553(1980).
38. M. Honda, *J. Phys. Soc. Jpn.*, **31**, 1196(1971).
39. K. Nishimoto, Y. Watanabe and K. Yagi, *Biochim. Biophys. Acta*, **526**, 34(1978).
40. P-S. Song, J.D. Choi, R.D. Fugate and K. Yagi, *Flavins and Flavoproteins*, (T.P. Singer, Ed.), Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, p.381, **1976**.
41. M. Sun and P.-S. Song, *Biochemistry*, **12**, 4663(1973).
42. D.E. Edmonson, B. Barman and G. Tollin, *Biochemistry*, **11**, 1133(1972).
43. P-S. Song and M. Sun, *Chemical and Biochemical Reactivity*, (B. Pullman and E. Bergmann, Eds.), Israel Academy of Sciences, Jerusalem, p.407, **1974**.