

Riboflavin과 藥品 分子와의 會合

俞 炳 高

서울대학교 藥學大學

(Received February 27, 1984)

Byung Sul Yu

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

Association of Riboflavin and Drug Molecules

Abstract—The study of interaction between riboflavin derivatives and biologically active substances was reviewed. With combination of spectroscopic methods such as NMR, UV, Fluorescence and IR, informations about interaction mechanism including hydrogen bond formation, conformation of association complex, and association constant were obtained. 1. Riboflavin associated with adenine but not with other bases found in the nucleic acids. -CONHCO- group was included in the formation of hydrogen bond with adenine. 2. Riboflavin interacted with alcohol to make a 1 : 1 association complex through the 3N-imino and 2C-carbonyl group of the isoalloxazine ring and the hydroxyl group of the alcohols. 3. Riboflavin associated with salicylates to produce the cyclic hydrogen-bonded dimer. The strongest complex was formed with salicylic acid, a weaker one with aspirin, and an even weaker one with salicylamide. 4. Other bio-active substances, crotonic acid and inhibitors such as phenol, trichloroacetic acid and indol also formed hydrogen bond with riboflavin. 5. Reduced riboflavin showed strong self-association to produce the cyclic hydrogen-bonded complex and it associated with adenine and with cytosine to form 1 : 3 complex.

生命體는 대단히 복잡한 構造로 이루어져 있으나 그 構成單位는 無生物이나 다름없이 分子로 구성되어 있음은 잘 알려져 있는 사실이다. 단지 그 차이점은 구성하고 있는 單位의 종류가 극히 다양하고 개개의 분자가 독자적 성질을 나타낼 뿐 아니라 分子間的 巧妙한 關連에 의하여 反應하여 集合體를 形成 또는 制御하여 生命體를 維持하고 있다는 것이다.

일찍이 DNA의 구조모형을 발표한 Watson은 그의 著書 「遺傳子의 分子生物學」에서 “Cells obey the laws of chemistry.”라고 한 바 최근에 이르러 이런 사실이 명백해지고 제인식됨에 따라 生命現象을 分子레벨에서의 반응으로 이해함은 生命科學분야에서 중요하게 되었다. 따라서 이러한 生命體의 구성단위의 形態, 構造, 物性, 反應 또는 相互作用의 機轉을 알아보는 것은 生命現象을 이해하는데 불가피한 것이라 할 수 있게 되었다.

生物은 無生物系에서는 볼 수 없는 각종의 特異的 反應을 많이 보여준다. 생물에서의 이러한 特異性은 Na, K, Mg, Cl, PO₄ 등의 無機이온 存在下 水溶液中에서 分子間에 작용하는 중요한 상호작용으로 水素結合, van der Waals力, 靜電氣力등의 二次的 結合力에 의한다고 이해되고 있다. 이와 같이 弱한 二次結合力에 의한 분자간 결합에는 相補的인 分子表面이 필요한데, 예컨대 蛋白質, 核酸 등의 鎖狀 高分子의 立體的 구조도 주로, 分子內에 작용하는 二次結合에 의하여 決定된다는 점에서 생체분자의 특징적 구조의 특이성이 이해될 수 있다.

이러한 견지에서 어떤 生理活性을 가진 物質, 특히 藥物 등의 作用機能을 밝히는 데에도 物理

化學的 基礎를 應用한 분자의 conformation, 이들 구조에 미치는 活性物質의 관계등에 관한 연구가 성행되고 있는 터이다.

생리적으로 활성인 분자의 입체적 구조를 究明함에는 固體狀態에서는 X線回折解析이 보다 有力한 방법임은 周知의 사실이지만 경우에 따라서는 分子量이 아주 큰 분자이거나 또는 結晶化가 어려운 분자에서처럼 해결하지 못할 수도 있다. 또한 작용기전을 연구함에는 相對의 생리활성물질(약품분자등)과 핵산이나 膜과 같은 구성성분과 결합한 結合體를 결정화 함이 요구되나 이 또한 용이한 일은 아닌 것이다.

그러나 X선해석 이외의 수단으로 核磁氣共鳴, 赤外線吸收, Raman散亂, 또는 圓偏光二色性 등의 기타 分光學的 方法으로는 溶液狀態에서의 입체적 구조나 溶質-溶液間의 상호작용 등에 관한 知見을 비교적 쉽게 알아낼 수가 있다. 다만 이런 경우는 X-線 해석과 같은 정밀한 구조를 직접 구할 수 없는 것이 단점이지만 數種 方法에 의하여 얻어진 정보를 綜合하여 이 조건에 만족하는 分子模型을 組立하여 봄으로써 입체구조를 추구하고 또한 보다 큰 장점으로는 생체내의 분자상태를 재현한다는 의미에서 용액중에서의 분자의 입체적 거동을 알아보는 것으로서, 作用對象分子와의 상호작용기전 또는 결합의 양상을 조사하는 데에는 중요한 의의를 가진다.

이와 같은 관점에서 생리활성분자(특히 약물등)의 작용기능을 이해함에는 化學構造 知識만이 아니라 분자의 實際 結合樣式의 구체적 추구에 관점을 맞출 수 있으며 이는 생명현상의 動的 舉動을 이해함에 중요한 수단임은 새삼스러운 것은 아닐 것이다.

생체내의 특이적 반응의 예로서는 抗原抗體反應, 蛋白合成系의 素材種 사이의 반응을 들 수 있다. 이와 같은 반응도 결국은 특정한 분자와 분자間, 또는 原子團間의 物理的 상호작용에 귀속하게 된다. 분자간에 작용하는 중요 物理化學的 作用은 수소결합 등의 二次的 結合力과 같은 것이나 결합의 대상에 대하여 보다 선택적인 성질을 가지고 있는 것은 수소결합이다.

생체내에서의 수소결합형성의 선택성은 생체조직 특히 핵산중에서는 중요한 의미를 가지고 있음이 알려져 있다.¹⁾ 예를 들면 유전자의 複製機構라든가 유전자를 함유한 情報에 따라 아미노산을 배열하는 단백질합성의 기구에는 핵산의 염기와 염기사이의 특이적 수소결합형성이 본질적 역할을 하고 있다는 증거가 밝혀져 있다.²⁻⁵⁾ 핵산이외에도 약물의 작용, 酵素反應에 있어서의 阻害劑의 작용기전에도 分子레벨에서의 상호작용이 중요한 의미가 있는 것으로 생각된다. 예컨대 살리실산의 殺菌力이 phenol性 OH基와 細菌의 활성물질간의 수소결합에 의한단가, 解熱劑 antipyrne의 작용기전이 發熱因子와의 특이적 수소결합에 基因한다⁶⁾는 사실등을 들 수 있다. 中樞神經系의 약물인 barbital系 약물의 작용기전도 효소반응의 레벨에서 설명하려는 경향이 많아지고 있다⁷⁻¹⁰⁾. 뿐만 아니라, 최근에 이르러 peptide性 抗生物質의 抗菌 또는 抗癌작용기전도 DNA의 핵산염기간의 특이적 수소결합에 의한 細胞制御작용임을 추기한 보고¹¹⁾도 있다.

이와 같은 배경에서 本稿에서는 생체내에서의 酸化還元에 중요한 역할을 하며 특히 cytochrome 呼吸酵素系에 있어 水素傳達體의 補酵素로 작용하는 FAD의 活性分子인 riboflavin과의 분자간 會合에 참여하는 각종 약물의 결합양식을 非水溶液 또는 水溶液中에서 分子內 또는 分子間의 상호작용을 分光學的 方法 또는 구조화학적 方法으로 조사한 바 그간의 연구결과¹²⁻²²⁾를 중심으로 각종 생리활성약물과 flavin 화합물의 생체내에서 상호작용기전, 특히 수소결합의 양상을 赤外, 核磁氣共鳴, 可視紫外 또는 螢光 등의 分光學的 方法으로 조사하여 生化學的 견지에서 綜合的으로 論하였다.

實 驗 方 法

1-1. 核磁氣共鳴에 의한 相互作用의 檢出

핵자기공명(Nuclear Magnetic Resonance)의 대상이 되는 것은 磁氣모멘트를 가지는 原子核이다. 生體系를 대상으로 하는 경우에는 ^1H , ^{13}C , ^{31}P (모두 核spin이 1/2)가 널리 사용된다. 이들 核種과 더불어 ^{15}N 核이 있으나 이는 ^{13}C 에 비하여 相對感度, 天然同位體比 등이 낮아 檢出이 어렵기 때문에 충분히 이용하기에는 아직 미흡한 점이 있다.

NMR이 다른 분광학적 수단에 비하여 보다 유효한 점은 生體系分子 중에서 개개의 原子核種의 信號를 개별적으로 관측할 수 있는 점에서 보다 구체적인 구조에 관한 정보를 제공할 수 있는데 있다. 따라서 개개의 信號를 귀속(assignment)시킬 수만 있다면 物質分子의 입체적 구조에 관한 原子레벨에서의 상세한 정보가 얻어질 것이 기대된다. NMR의 共鳴周波數는 核周圍의 電子의 存在 등에 기인하는 소위 化學性的 차이에 따른 化學移動(shift)이 일어나고 역으로 이런 화학 shift 값으로부터 注目하는 핵주위의 구조에 관하여 여러가지 정보를 밝혀낼 수 있는 것이다.

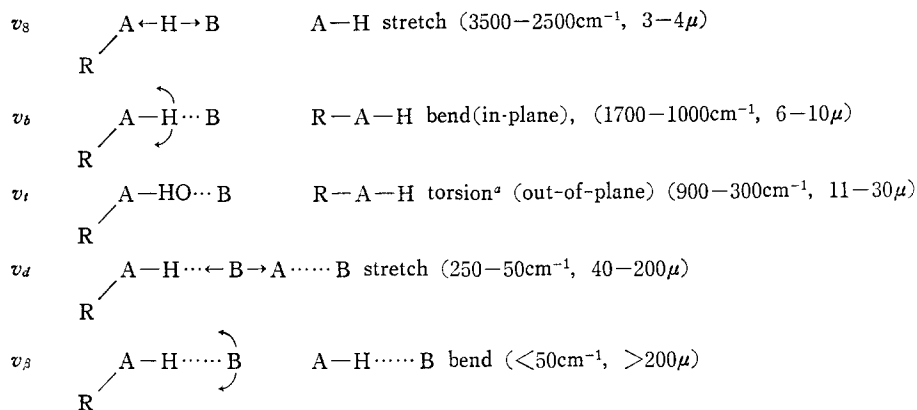
이와는 대조적으로 NMR의 최대단점은 感度が 낮은 점으로 보통 ^1H NMR에서 쉽게 信號가 관측가능한 농도는 약 20mg/0.4ml(5%)이며 ^{13}C NMR의 경우는 훨씬 고농도의 試料가 요구된다. 따라서 試料의 溶解度가 작은 경우 또는 微量일 경우는 측정이 어려울 것이 예상된다.

최근의 pulse-FT(pulse Fourier Transform)法の의 발달로서 이러한 문제는 어느 정도 극복하여지고 있는데 이는 이제까지의 CW(Continuons Wave)法の의 경우 1回の 測定에 10~20分 정도의 시간이 요하는데 비하여 FT法에서는 數秒에 측정이 가능하여 數萬回를 積算할 수 있어 희박한 용액에서도 S/N(Signal Noise)比가 양호한 스펙트럼을 얻을 수 있다. 또한 천연존재비가 1% 밖에 안되는 ^{13}C 등, ^1H 이외의 핵자기공명의 측정에서는 FT法에 의해 측정이 가능하게 되었다. NMR의 原理 및 FT NMR에 관하여는 成書²³⁻²⁶⁾에 미루기로 하거나 本稿에서는 실제로 생리활성물질간의 상호작용의 스펙트럼을 어떻게 해석하는가를 구체적 실험예를 들어 조사하였다.

NMR에 의한 분자의 상호작용을 비롯한 거동을 檢索함에는 각종 수단 중 化學 shift의 해석이 가장 유용하게 이용된다. 수소결합의 경우 ^1H NMR에 의하여 극히 강한 化學 shift의 변화를 일으킨다. 注目하는 proton이 電子를 빼앗기면 전자에 의한 遮蔽效果가 低下함으로써 低磁場으로 shift가 일어난다. 예컨대 純液體의 ethanol에서는 수소결합에 의하여 OH基의 信號가 methyl, methylene基보다도 低磁場으로 shift하고 반대로 非極性 溶媒인 사염화탄소 중에서는 高磁場으로 shift하는 것을 알 수 있다. 生化學 분야에서는 이제까지 tRNA의 鹽基와 酵素의 活性 中心에 있는 histidin 殘基의 NH proton등이 ^1H NMR에 사용되고 있으며 本稿에서는 非極性 溶媒 中에서 溶質-溶質間의 수소결합을 ^1H NMR을 통하여 檢討하였다. 대부분의 실험은 CW法에 의하였으며 基準物質은 TMS를 사용하고 농도범위는 基準物質의 용해도가 허용하는 한 標準허용 농도내에서 측정된 값이다.

1-2. 赤外吸收스펙트럼에 의한 水素結合 解析

赤外吸收스펙트럼은 分子의 原子間의 振動 energy를 나타내는 것으로 두 原子의 質量과 原子間의 結合의 強度(結合定數)가 振動數와 상관성을 가지고 있어 分子間의 수소결합을 형성한다면 필연적으로 두 原子間의 결합정수에 영향을 줄 것이므로 본래의 吸收스펙트럼의 변형을 가져올 것이 기대된다. 또한 수소결합이 가능한 基는 한정되어 있어 스펙트럼의 취급부위는 그림 1에서 보는 바와 같이 3μ 또는 6μ 領域의 A-H 伸縮振動과 變角振動的 變化度を 측정하여 쉽게 수소결



The symbol \odot indicates a vibrational movement of the hydrogen atom perpendicular to the RAB plane.

Fig. 1- Vibrational absorption bands to be used for assignment of the hydrogen bonds.

합의 정보를 얻을 수 있다.²⁷⁾

생물체내 수소결합 등의 적외흡수는 최근 20여년의 발전으로 생체내의 特異的 會合의 檢出에 많이 이용되어 왔다.^{2,3,28,29)} 일반적으로 생명현상에 관여하는 물질의 대다수는 많은 官能基를 가진 복잡한 分子構造를 가지므로 어느 부위가 특이적 상호작용을 하는 것인가 하는 것을 직접 실험적으로 확인하기는 어려운 일이다. 그러나 이들을 단순화하였을 경우 적외흡수스펙트럼의 측정은 이와 같은 목적을 위하여는 유효한 수단이라 생각된다. 생체내의 물질은 水溶液 狀態로 존재하므로 분자간의 작용을 水溶液 中에서 조사함이 이상적이라 할 수 있다. 그러나 이와 같은 수용액 중에서의 수소결합을 적외흡수 스펙트럼으로 측정함에는 溶質-溶媒, 溶媒-溶媒간의 수소결합의 奇與를 고려하지 않으면 안되며, 水分子 自體가 赤外領域에서 강한 吸收를 나타내므로 적외스펙트럼 측정용의 용매로서는 不適當하다. 용질-용질간의 수소결합만 두드러지게 하려면 가능한 용질-용매간의 상호작용이 작은 용매일수록 적당하며 사염화탄소가 이상적이지만 물질의 溶解度를 고려할 때 클로로포름을 사용함이 추천된다.

용질간의 수소결합이 일어나면 적외흡수스펙트럼에는 몇가지 변화가 일어난다. 일반적으로 수소결합이 관여하고 있는 基(NH, OH 또는 C=O)의 伸縮振動은 低波數로 이동하고 吸收帶는 폭이 넓고 강하게 나타난다. 반대로 變角振動은 高波數로 이동하고 吸收帶의 강도에는 그리 현저한 변화가 일어나지 않는다.

本稿에서 취급하는 riboflavin분자의 isoalloxazine環에는 3位에 NH基가 존재하며 2位와 4位에 C=O基가 있어 3μ 영역 또는 6μ 영역에 각각의 흡수대가 나타나 수소결합에 의한 변화가 기대된다. 따라서 riboflavin과 각종 약물의 수소결합을 적외스펙트럼으로 檢索할 수 있으며 化學量論的 測定도 가능하다. 실제로 사용한 용매는 重水素化클로로포름(CDCl_3)로서 3μ 영역에서 石英 cell, 6μ 영역에서 KBr cell을 사용하여 赤外吸收度를 측정하였으며 결과로 透過率을 吸收度로 고쳐 換算하였다.

1-3. 기타 分光學的 方法에 의한 水素結合檢出

1-3-1. 紫外吸收스펙트럼

생체분자의 可視紫外吸收스펙트럼의 측정은 生物物理化學 실험 연구의 중요한 실험 수단이다.

그 이유로서는 중요 생체분자의 대부분은 어떤 형태이건 發色團을 갖는다는 점에 유래한다. 생체물질분자 중의 C=N, C=O, C=C 등 不飽和結合 특히 共役二重結合의 π 電子가 만드는 전자에너지 準位간의 천이에 의한 흡수스펙트럼의 변화가 중요한 原理이다. 특히 分子吸光係數가 10,000 정도의 發色團을 가지는 분자의 경우 10^{-5} mol/l의 농도로 측정이 가능하다는 점에, 소량의 試料로 측정이 된다는 편리한 점이 있다. 특히 flavin은 可視部에서 紫外部에 이르기까지 현저한 스펙트럼^{30,31)}이 있으며 이러한 스펙트럼은 flavin의 산화환원에 따른 변화³¹⁾, 基質과의 상호작용^{32,33)}, 또는 阻害劑, 變質劑와의 결합³⁴⁾ 등에 의하여 변화를 일으키므로 flavin 酵素관계연구에 많이 이용되어 왔다.

Riboflavin과 對象化合物이 결합한 분자화합물을 형성할 경우 본래의 flavin의 흡수스펙트럼의 변화는 수소결합의 경우 red shift가 일어날 것이 기대되며 그 강도에서는 淺色效果도 기대된다. 아울러 二量體의 흡수스펙트럼을 해석함으로써 riboflavin과의 상호작용이 檢索되며 농도변화실험에 따른 흡수강도차로 化學量論的 定量도 가능한 것이다.

1-3-2. 螢光光度計에 의한 방법

분자가 빛을 흡수하면 基底一重項狀態의 安定한 核의 平衡位置에서 勵起一重項狀態로의 電子遷移가 일어난다. 이 과정은 10^{15} sec 정도의 빠른 시간내에 일어난다. 勵起一重項狀態의 수명이 10^{-9} - 10^{-8} sec 정도인 π 전자계에서는 이 수명 시간안에서는 여기평형상태에 도달할 수 있다. 勵起平衡狀態에서 Flank-Condon狀態^{35,36)}의 發光遷移가 일어난다면 이 때 螢光이 發光한다. 이와 같은 형광천이과정은 분자구조에 따라 다르다. 螢光分子가 生體高分子中에 있다면 그 환경정보를 얻을 수 있어 內部構造의 연구에 이용된다.

Riboflavin 物質은 isoalloxazine環에 基因하는 綠色의 형광을 發함은 잘 알려져 있는 사실이다³⁷⁻³⁹⁾. 그 화합물이 共存物質에 의하여 형광의 抑制작용이 나타난다⁴⁰⁻⁴²⁾. 형광억제물질의 作用機構는 단순하지 않지만 다른 분자에 의한 이온충돌이거나 또는 수소결합 등에 의한 會合에 의하여 일어난다고 설명할 수 있다. 두 原因은 온도변화에 의하여 쉽게 구별할 수 있다. 충돌에 의한 경우에는 온도의 증가에 의해 消光의 強度가 증대한다. 이와 같이 riboflavin의 형광의 消光現象을 보아 다른 화합물간의 분자간 會合體 形成을 추정할 수 있다.

1-4. 會合定數 測定法

會合은 보통 분자간에 二次的 結合力에 의하여 二量體 등이 생겨 한 개의 분자처럼 행동함을 의미하며 그 결합의 강도는 2 Kcal/mol 이하라고 알려지고 있다. 이와 같은 회합현상은 최근 생명과학연구의 중요한 요인으로 나타나고 있다. Riboflavin 유도체의 상호작용을 하는 각종 물질분자간의 定量的 強度를 표시하는 것은 위와 같은 이유에서 중요한 의미를 가진다. Riboflavin과 결합하는 경우 二量體가 보통이나 對象物質에 따라 三量體形成을 할 수도 있다. 이의 會合定數를 算出하는 방법에는 여러 가지가 있지만 分光學的인 방법에 의하여 흡수정도의 변화도 또는 온도변화, 농도변화에 따른 강도변화로부터 비교적 정확한 회합정수를 정할 수 있다. 그 대표적 數種方法을 例示하고자 한다.

1-4-1. 赤外吸收 스펙트럼에 의한 會合定數²⁾

Riboflavin과 각종 약품분자의 수소결합체가 化學量論的으로 定量的이라면 각 會合體의 強度는 會合定數 K 로 표시할 수 있다. 회합정수 K 는 單量體의 흡수대의 강도 변화에서 산출할 수 있다.⁵⁾

즉 단일화합물 X 의 용액중에서 非會合單量體와 會合二量體의 회합정수는

$$K_{XX} = C_d / C_m^2 \dots\dots\dots (1)$$

로서 정의된다. 여기에서 C_m 은 非會合單量體의 농도이고 C_d 는 會合二量體의 농도이다. 비회합흡수대의 흡광도 A_{Xm} 과 C_m 과의 사이에는 Lambert-Beer의 법칙에 따라

$$A_{Xm} = A_m C_m l \dots\dots\dots (2)$$

라는 관계식이 성립된다. 여기에서 A_m 은 吸收係數, l 은 光路長이다. 용액의 농도가 아주 희박하다면 三量體이상의 회합체의 존재는 무시되므로 용해된 화합물의 농도를 C_o 라 하면

$$C_o = C_m + 2C_d \dots\dots\dots (3)$$

라고 쓸 수가 있다. (1)(2)(3)의 식으로부터

$$A_{Xm} = \left(\frac{1}{2K_{XX}} \right) A_m^2 l^2 \left(\frac{C_o}{A_{Xm}} \right) - \left(\frac{1}{2K_{XX}} \right) A_m l \dots\dots\dots (4)$$

이 導出되며 C_o/A_{Xm} 에 대해 A_{Xm} 을 도시하면 直線이 얻어진다. 그 기울기 S 와 절편 i 로부터

$$A_m = -S/i l \dots\dots\dots (5)$$

$$K_{XX} = S/2i^2 \dots\dots\dots (6)$$

이 되며 이에 따라 A_m 과 K_{XX} 를 구할 수 있다. 이와 같은 방법은 A_{Xm} 을 무한히 희석하여 外伸法으로 A_m 을 구하고 이 값을 사용하여 K_{XX} 를 구하는 방법이다. 2종의 화합물 X 와 Y 의 사이에 會合定數 K_{XY} 는 같은 방법에 의하여 다음 관계식으로 유도된다.

$$A_{Xm} = \frac{1}{K_{XY} + 2K_{XX}} \left[\frac{A_m^2 l^2}{2} \left(\frac{C_o}{A_{Xm}} \right) - A_m l \right] \dots\dots\dots (7)$$

앞의 관계식과 마찬가지로 기울기 S 와 절편 i 로부터 A_m 과 K_{XY} 는

$$A_m = -2S/i l \dots\dots\dots (8)$$

$$K_{XY} = 2(S/i^2 - K_{XX}) \dots\dots\dots (9)$$

X , Y 화합물의 회합정수가 구해진다. 여기서 K_{XX} 는 단일한 용액으로서 처음부터 구할 수 있으므로 K_{XY} 를 산출할 수 있다. 이와 같은 식은 수소 결합二量體가 1:1의 環狀體를 이루는 riboflavin의 會合體의 定數를 구하는데 이용될 수 있다. 실제로 riboflavin의 적외흡수곡선에서 3485cm^{-1} , 3330cm^{-1} 의 單量體의 흡수강도를 농도변화시켜 얻은 값으로부터 구하여진다.

1-4-2. 核磁氣共鳴에 의한 會合定數⁴³⁾

Hanna⁴³⁾ 등에 의한 방법으로 이를 요약하면 다음과 같다.

혼합된 회합체의 proton shift값과 회합정수간에는 다음 식이 성립된다.

$$\frac{1}{\Delta\delta_{obs}} = \frac{1}{K_c(\delta_c - \delta_a)} \cdot \frac{1}{C_b} \cdot \frac{1}{\delta_c - \delta_a}$$

여기에서 $\Delta\delta_{obs} = \delta_{obs} - \delta_c \cdot \delta_a$ 라 쓸 수 있으며 이는 혼합하기 전의 riboflavin의 NH proton의 shift값이고 δ_{obs} 는 혼합액의 riboflavin proton의 관측값, δ_c 는 회합체중의 riboflavin NH proton의 shift값, C_b 는 회합체를 형성하는 화합물의 농도이며 K_c 는 회합정수이다. 위의 식으로부터 $1/\Delta\delta_{obs}$ 에 대하여 $1/C_b$ 을 도시하면 riboflavin과 회합체를 형성할 경우 직선이 얻어지며 이로부터

K 값을 쉽게 구할 수 있다.

1-4-3. 可視紫外스펙트럼에 의한 會合定數

UV에 의한 회합정수 측정법에서는 우선 회합체스펙트럼의 변화를 구한다. 이를 식으로 표현하면 다음과 같다.

$$\begin{aligned}\Delta A &= (\epsilon_{RL_n} - n\epsilon_L - \epsilon_R)(RL_n)/l \\ &= \Delta\epsilon_{RL_n}(RL_n)l \dots\dots\dots(1)\end{aligned}$$

여기서 l 은 사용한 cell의 光路長, ϵ 는 吸收強度이고 n 은 회합체의 化學量論比이다. 이로써 물질 R (riboflavin)과 L (對象物質)의 회합체의 회합정수가 구하여진다.

$$K_{RL_n} = (RL_n)/(L)^n(R) \dots\dots\dots(2)$$

식 (1)을 (2)에 대입하여 정리하면

$$(R_o)/\Delta A = 1/\Delta\epsilon_{RL_n} \cdot l + 1/\Delta\epsilon_{RL_n} \cdot l \cdot K_{RL_n} \cdot (L)^n \dots\dots\dots(3)$$

여기서 (R_o) 은 riboflavin의 총농도이다. 여기에서 $(R_o)/\Delta A$ 를 $1/(L)^n$ 에 대하여 도시하면 회합체형성의 경우 직선이 얻어지며 이 직선의 기울기는 화학양론적 계수 n 에 좌우되며, 이에 의해 $\Delta\epsilon_{RL_n}$ 및 K_{RL_n} 이 산출된다. 이런 수치는 $(L_o) \gg n(R_o)$ 의 조건하에서의 총물질농도 (L_o) 안에서 (L) 을 취함으로써 구할 수 있다. 직선의 기울기로부터 n 값이 산출되면 K_{RL_n} 값이 산출되며 따라서 식(3)을 이용하여 $\Delta\epsilon_{RL_n}$ 및 K_{RL_n} 의 값이 결정되어 회합정수를 구할 수 있다.

1-4-4. 螢光光度計에 의한 會合定數⁴⁴⁾

수소결합에 의한 결합정수와 형광강도간의 관계는 다음 식으로 표시할 수 있다.

$$\frac{1 - (f_{obs}/f_a)}{(C_b)} = K \left(\frac{f_{obs}}{f_a} \right) - K \left(\frac{\epsilon_c}{\epsilon_a} \right) \alpha$$

여기에서 f_a 는 非會合體의 riboflavin의 螢光強度, f_{obs} 는 회합체의 riboflavin의 強度, ϵ_a 는 비회합체 riboflavin의 吸光係數, ϵ_c 는 회합체 riboflavin의 吸光係數, α 는 riboflavin의 結合, 非結合에 대한 分子量, C_b 는 對象物質의 농도이며 K 는 회합정수이다. 마찬가지로, $(1 - f_{obs}/f_a)$ 에 대하여 (f_{obs}/f_a) 를 도시하면 회합이 일어날 경우 직선이 얻어지며 이로부터 K 값이 산출된다.

1-5. 使用物質化合物

本稿에 사용한 flavin系의 主物質과 反應對象物質은 非極性溶媒에 可溶性인 것을 사용하였는데 이는 溶質-溶質간의 수소결합을 목적으로 하였기 때문이다. Riboflavin의 대표적 유도체인 riboflavin-2', 3', 4', 5'-tetracetate (RFTA)의 製法은 다음과 같다. Pyridine 용매중에 무수초산과 건조한 市販 riboflavin을 장시간 교반하면서 반응시켜 pyridine을 alcohol을 加하여 減壓증류하여 제거하고 alcohol 또는 chloroform으로 재결정하여 얻을 수 있다. 그 외의 riboflavin-2', 3', 4', 5'-tetrabutylate(RFTB)를 비롯한 結合對象物質인 核酸鹽基類, 變質劑, alcohol類, 解熱劑 등의 사용물질은 시판품을 정제 사용하였으며 종류는 Table I와 같다.

Riboflavin 및 關聯化合物

2-1. Riboflavin₀란^{45~48)}

생물학적으로 중요한 isoalloxazine 유도체는 7,8-dimethyl-N(10) 치환체로서 일반적으로 이를

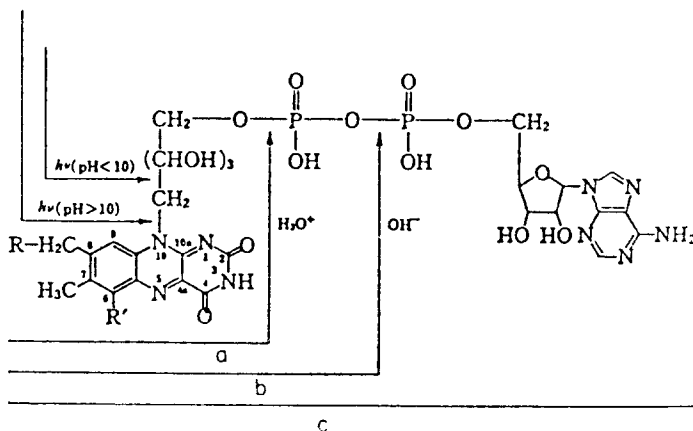
Table I- Materials used in the experiments.

Riboflavin derivatives
Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)
Flavin Mononucleotide (FMN)
Riboflavin-2', 3', 4', 5'-tetraacetate (RFTA)
Riboflavin-2', 3', 4', 5'-tetrabutylate (RFTB)
Substances forming hydrogen bond with riboflavin compounds
Nucleic acid bases
9-ethyladenine (A)
1-cyclohexyluracil (U)
2', 3'-benzylidene-5'-triphenylcytidine (C)
Alcohols
Ethylalcohol (EtOH)
Methylalcohol (MeOH)
Butylalcohol (BtOH)
Salicylates
Salicylic acid
Aspirin
Salicylamide
Others
trichloroacetic acid, phenol, indol
orotic acid derivatives

flavin이라 총칭하며 N(10) alkyl기가 ribitol인 경우 이를 riboflavin 또는 vitamin B₂라고 명명하고 있다. Vitamin B₂는 發育 vitamin으로서 생체내 부족시 發育不進을 초래한다. 이는 riboflavin이 生體酸化에 관계하는 酵素의 補酵素의 素材이기 때문이다. 따라서 이것이 부족되면 생체산화에 지장을 가져오기 때문에 에너지를 얻지 못하여 각종의 代謝障害를 일으킨다고 되어있다. Riboflavin系 연구는 1932年 독일의 Kuhn Wagner-Jauregg 및 György⁴⁹⁾ 등의 공동연구로부터 시작하여 1932年 Banga, Szent-György에 의한 FMN의 발견⁵⁰⁾, Kuhn, Karrer 등에 의한 ribityl基가 있는 isoalloxazine 화합물, 즉 riboflavin의 正體의 발견⁵¹⁻⁵³⁾ 등으로 이어졌다. 이러한 화학구조 決定의 연구결과 1937年 riboflavin이라는 명칭이 채용되어 IUPAC에서 정식으로 국제적 명칭화되었다. 1938년에는 FAD가 효소에서 분리되고⁵³⁻⁵⁵⁾ 이어 합성되었다.^{56,57)}

이와 같이 flavin 유도체 중에서 생체내 flavin의 대부분을 차지하는 FAD, FMN, riboflavin의 존재, 구조는 1930年代에 완성되었으며 이후 FAD 또는 FMN을 補酵素로 하는 酵素가 多數 발견되어 총칭 flavin酵素라고

하고 있다. 따라서 화학구조가 알려진 flavin유도체가 어떻게 효소와 작용하는가 하는 것이 최근의 연구대상이며 특히 分光學的 수단에 의한 flavin의 量子化學의 성격도 많이 알려지고 있다.

**Fig. 2-1a-** Structure of flavin compounds. a, riboflavin; b, FMN; c, FAD

그러나 체내에서의 吸收, 排泄, 생체내 代謝, 分解 등 未解決 문제가 많으며 또한 산화환원반응이 생체내에서 광범위하게 관여하므로 이에 관련된 분야의 연구가 성행되고 있다.

2-2. Riboflavin과 관련화합물

Flavin의 化學에 대하여도 이미 많은 綜說이 나와 있다. 本稿에서는 riboflavin, FMN, FAD의 몇 種 相關물질에 관한 性狀과 反應에 대하여서만 소개코자 한다.

2-2-1. Flavin의 種類

a) 酸化型 flavin

Riboflavin($C_{17}H_{20}N_4O_6$, 분자량 376.36)은 同質量의 몇 種의 結晶을 형성하여 mp. $280^{\circ}C \sim 290^{\circ}C$ 를 가지고 물에 대한 용해도는 약간 차이가 있으나 100ml중 5mg 정도이며 기타 용매에 대한 용해도는 낮다. FMN($C_{17}H_{21}N_4O_9P$, 분자량 456.4)은 mp. $195^{\circ}C$ 이며 물에는 아주 잘 녹는다. FAD($C_{27}H_{33}N_9O_{15}P_2$, 분자량 786.6)는 橙黃色 물질로 FMN과 마찬가지로 물에 可溶性이다. 이상의 3種 모두 中性領域에서는 안정하며 alkali性에서 불안정하여 분해하기 쉽고 FMN은 酸性에서 인산기의 加水分解가 일어나며 熱에는 비교적 안정하다.

Flavin類의 커다란 특징의 하나는 可視部의 특이적 스펙트럼이다. (Fig. 2-2a.) Riboflavin과 FMN은 거의 同一吸收帶이나 FAD는 약간 다른 흡수곡선을 가지고 있어 구조상 isoalloxazine環과 adenine간의 상호작용에 관한 차이점을 암시하여 준다. 이들의 흡수극대, 分子吸收係數 등의 성질은 flavin이 가지는 환경의 변화(예컨대 용매의 極性, 다른 물질과의 상호작용등)에 의하여 波長의 shift, 微細構造의 出現 등의 변화를 가져와 이를 이용하여 단백질 중의 補酵素 존재 등을 확인하는 수단이 되기도 한다.

또한 flavin類는 536nm에 極大를 가지는 黃綠色의 螢光을 發하는 것이 또 하나의 특징이다. FMN과 riboflavin의 경우와 달리 FAD는 FMN의 1/10 정도의 형광을 發하며 이는 역시 adenine과의 분자내 상호작용의 결과라고 해석된다. Flavin은 兩性物質로 酸化型에서 cation型, 中性, anion型의 三者가 酸解離 平衡狀態로 존재하여 可視部의 변화와 형광의 변화도⁵⁸⁾ 가져온다.

Flavin에 관한 旋光分散 및 圓二色性(CD) 등의 연구⁵⁹⁻⁶²⁾가 있는데 이들로 부터 단백질결합 또는 산화환원과정의 변화등에 관한 많은 知見을 얻을 수 있다.

FAD의 isoalloxazine環과 adenine 骨格의 상호작용에 관한 그 동안의 연구⁶³⁻⁶⁷⁾로 서로 0.3~0.4nm 떨어져 立體的 상호작용을 하고 있음이 명백히 밝혀져 있다.

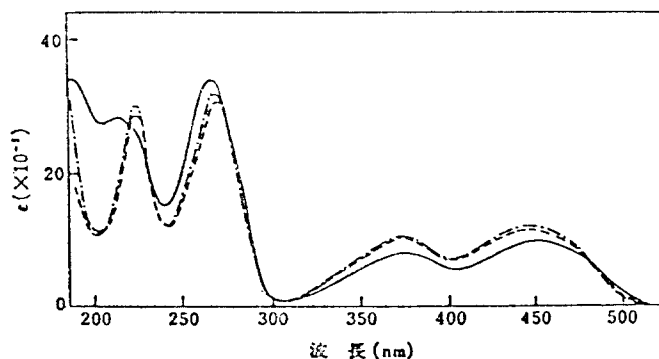


Fig. 2-2a- Absorption spectra of flavins in neutral solution. Broken line represents riboflavin, dotted line FMN, solid line FAD, respectively.

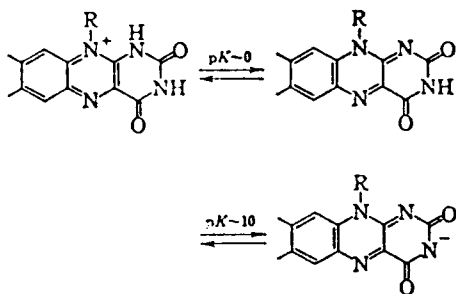


Fig. 2-2b- Acid base equilibrium among cationic, nonionic and anionic forms of oxidized riboflavin.

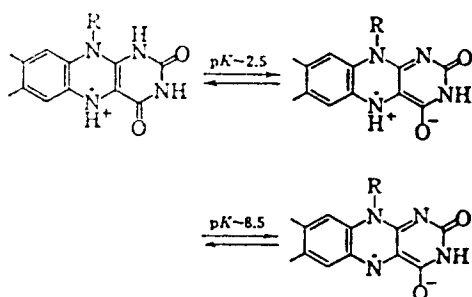


Fig. 2-2c- Acid base equilibrium among cationic, nonionic and anionic forms of semi-quinone riboflavin.

b) Semiquinone型 flavin

위에서 언급한 바 酸化型 flavin의 특징적인 흡수스펙트럼이나 형광스펙트럼은 공기중에서 안정하게 취급되어지나 생체내의 경우 flavin의 기능 특히 補酵素의 입장에서 보면 semiquinone 또는 完全還元型 flavin이 중요한 역할을 하는데 基質의 脫水素電子移動, 酵素의 活性化등에 기여한다.

Semiquinone型 즉 flavin radical의 존재는 flavin의 산화환원의 電位差滴定실험에서 알 수 있으며 산화형과 환원형의 중간체의 존재가 알려지고 이어서 ESR등의 실험으로 확인되었다.^{68,69} 이와 같은 遊離의 flavin semiquinone은 不均化反應을 일으키기 쉬우며 일반적으로는 산화형 환원형이 共存하는 二量體共存體가 존재함이 밝혀지고 있다.

c) 還元型 flavin

Flavin의 二電子 還元에 의하여 생성하는 dihydroflavin體는 完全還元型 또는 roico體라고 하며 酸化型 flavin이 가지는 특징적 黃色흡수대가 消失하는데, 생체내 산화환원반응에서 중요한 작용을 하지만 산소와 접하여 쉽게 산화형으로 되어 취급이 어려우므로 연구대상이 되지 못하였다.

차차 환원형 riboflavin의 低溫實驗 또는 단백질과의 결합을 형광으로 관측하게 되어 새로운 연구분야로 나타나고 있다.

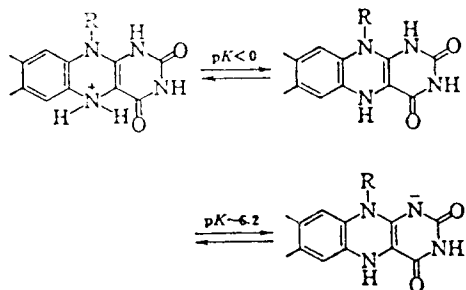


Fig. 2-2d- Acid base equilibrium among cationic, nonionic and anionic forms of reduced riboflavin.

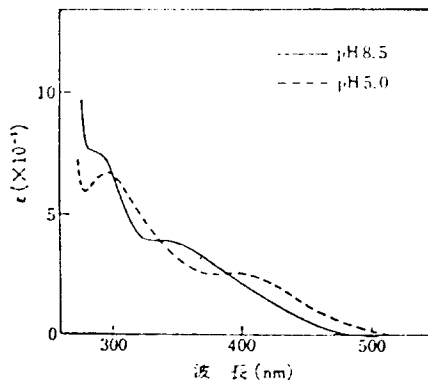


Fig. 2-2e- Absorption spectra of reduced FMN.

산화형, semiquinone형과 마찬가지로 환원형도 3개의 解離平衡狀態를 유지하며 dihydro體로서는 몇 種이 존재하나 생화학적으로는 1,5異性體가 의미를 가진다. 환원형은 可視部에서 Fig. 2-2e. 과 같이 342~395nm에서 吸收極大를 가지며 온도변화에 따라 산화형으로 되는 것이 확인되었다.⁷⁰⁾ 환원형의 경우 산화형과는 달리 5位와 10位의 질소원자를 잇는 선에서 “나비날개” 모양으로 되어져 있음이 X-線연구결과⁷¹⁾로 밝혀진 立體的구조의 특징이다.

Flavin 酵素系에서 환원형과 산소와의 반응은 “효소활성”이라는 점에서 반응이 용이한 것으로 알려지고 있다.

2-3. Flavin과 分子間複合體의 生成

Flavin은 分子間複合體를 쉽게 만드는 물질로서 산화형, semiquinone, 환원형 어느 것이나 種別의 복합체를 生成함이 보고되고 있다.

산화형에서는 phenol類⁷²⁻⁷⁵⁾, indol類^{73,76-78)}, purine類^{77,79-81)} 등과의 복합체형성 例가 보고되고 있으나 이들의 대부분은 電荷移動錯體의 형성에 의한 것이라고 생각되고 있으며 可視吸收스펙트럼에서 長波長側에 폭이 넓은 흡수가 나타나는 것 등으로 확인하고 있다. semiquinone 상태에서는 NADH나 phenol과의 복합체^{82,83)}, 환원형에서는 NAD⁺나 산화형 flavin, caffein 등의 복합체⁸⁴⁻⁸⁷⁾가 관찰된 바 있다. Flavin은 補酵素이므로 물론 단백질과 복합체를 형성, 基質과 상호작용할 것임에 틀림없으나 이는 생화학적 반응으로 本稿에서는 피하기로 한다.

Flavin類의 基底狀態의 전자밀도를 고찰한 결과^{88,89)}, 5位의 N이 가장 낮으며 따라서 求核試藥과의 반응이 쉬울 것으로 생각되나 실제로 flavin類와의 반응付加體를 형성한 例는 적어 이 반응은 불분명한 것으로 남아있다.

Riboflavin과 作用하는 藥物

3-1. Riboflavin과 核酸鹽基

이미 序文에서도 언급한 바 생체내에서의 수소결합은 중요한 의미를 가지고 있으며 특히 DNA의 二重나선구조도 adenine과 thymine 또는 guanine과 cytosine의 수소결합에 의해 유지되며 t-RNA에 의한 단백질합성을 함에 m-RNA가 codon을 읽어 RNA의 鹽基로 바꾸어 감에도 수소결합은 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이와 같은 핵산염기간의 수소결합을 分光學的으로 조사 연구하여 Watson-Crick型의 결합양식을 밝힌 보고는 많다.⁹⁰⁻⁹⁷⁾ 또한 赤外吸收스펙트럼에 의한 purine-pyrimidine간의 특이적 會合을 형성함을 밝힌 바 있다.¹⁷⁾

FAD는 Fig. 2-1a. 과 같이 isoalloxazine環과 adenine環과 糖-磷酸 ester를 구성하고 있다. FAD를 분해한 FMN과 AMP의 두 물질의 可視스펙트럼의 흡이 FAD의 흡수스펙트럼과 일치하지 않는다는 것과 FAD의 螢光是 FMN에 비하여 현저하게 약화되어 있음을 볼 때 FAD分子內에는 分子內 相互作用이 있는 것으로 알려지고 있다.⁹⁸⁻¹⁰⁰⁾

이상과 같은 배경으로 本章에서는 FAD內에 존재하는 riboflavin과 adenine과의 會合性を 檢出함을 목적으로 하였으며 이어 기타 核酸鹽基와의 회합성을 조사하였다. FAD는 생체내에서 水溶液狀態로서 존재하므로 이상의 두 화합물의 상호작용도 수용액중에서 조사함이 이상적이지만 수용액중에서의 수소결합을 赤外線스펙트럼으로 측정함에는 溶質-溶媒, 溶媒-溶媒간의 수소결합의 寄與도 고려하지 않으면 안되며 또한 水分子의 강한 흡수대가 있으므로 부적당하여 클로로포름(CH₂Cl₂吸收가 방해되므로 실제로는 CDCl₃)을 사용하였다. 용질간에 수소결합이 일어나면 적외선흡수스펙트럼에 몇가지 변화가 일어난다. Riboflavin 유도체의 isoalloxazine環에는 3位의 NH基가

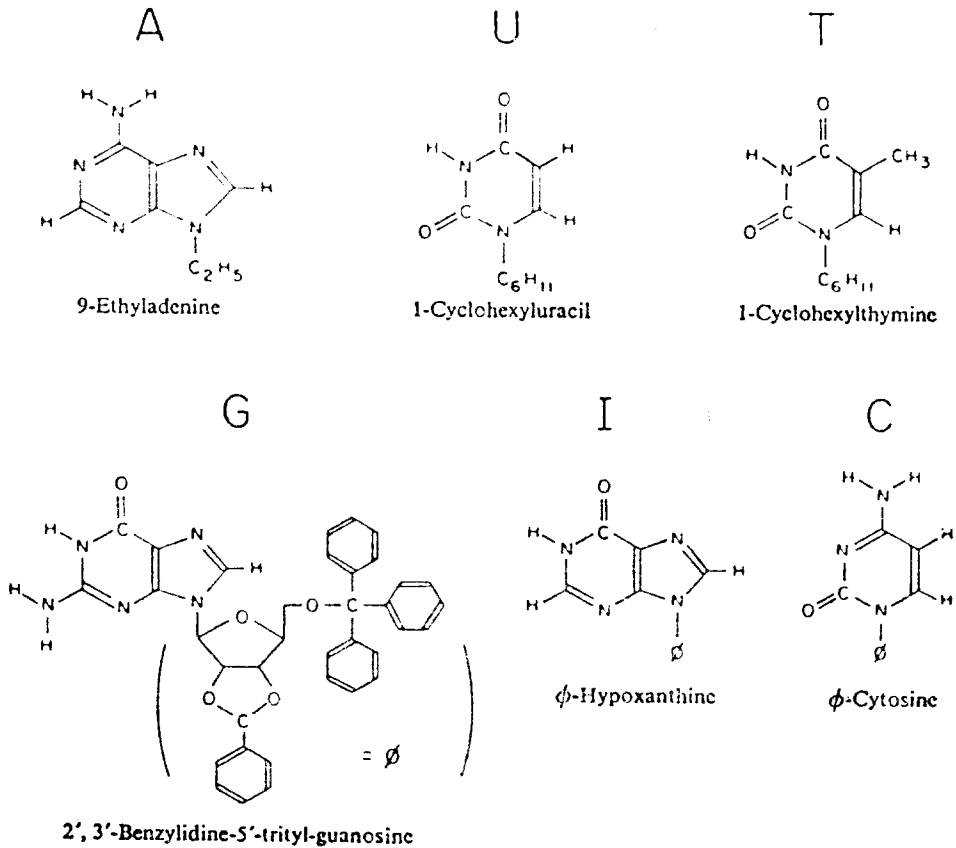


Fig. 3-1a- Nucleic acid purine and pyrimidine derivatives used in the infrared studies.

존재하며 2位와 4位에 C=O基가 있어 3μ 領域 또는 6μ 領域에 각각의 흡수대가 나타나 수소결합에 의한 변화를 기대할 수 있다. 본실험에 사용한 각종 핵산염기類의 구조는 Fig. 3-1a와 같으며 이는 클로로포름에 可溶性인 유도체이다.

3-1-1. Riboflavin과 Adenine의 赤外吸收스펙트럼

0.02M 농도의 riboflavin 용액의 적외흡수스펙트럼은 3380cm^{-1} 에 예민하고 강한 흡수대와 3200cm^{-1} 에 폭넓은 흡수대를 나타낸다(Fig. 3-1b.). 이들의 흡수대는 重水素化 또는 methyl化하여 H가 消去되는 실험에 의해 isoalloxazine의 3位의 N-H 伸縮振動임이 확인된다. 핵산염기 adenine의 경우 3525cm^{-1} 와 3414cm^{-1} 의 amino基와 imino基의 逆對稱 및 對稱伸縮振動임을 확인할 수 있다. 두 용액을 혼합하였을 때 흡수스펙트럼의 변화는 그림에서 보는 바와 같다. 同mol농도의 單一용액의 스펙트럼과 비교하여 보면 非會合의 adenine의 3527cm^{-1} 와 3416cm^{-1} 또는 非會合의 riboflavin의 3380cm^{-1} 의 吸收帶의 강도가 감소하고 두 化合物의 會合에 의해 생성된다고 생각되는 $3485, 3330, 3260$ 또는 3200cm^{-1} 이하의 흡수대의 강도가 두드러지게 강화되는 것을 볼 수 있다. 이들 흡수대의 위치는 adenine 또는 riboflavin의 自己會合에 의한 흡수대의 위치와 달라 새로운 riboflavin-adenine의 회합에 의한 것으로 관측된다. Riboflavin의 3位의 NH를 methyl化한

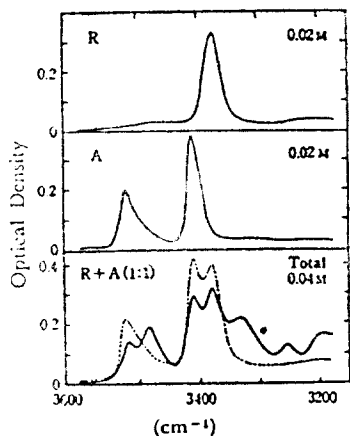


Fig. 3-1b- Infrared spectra of the deuteriochloroform solutions in a 1mm quartz cell. Solid line: observed spectra. Dotted line: calculated sum of the upper two spectra.

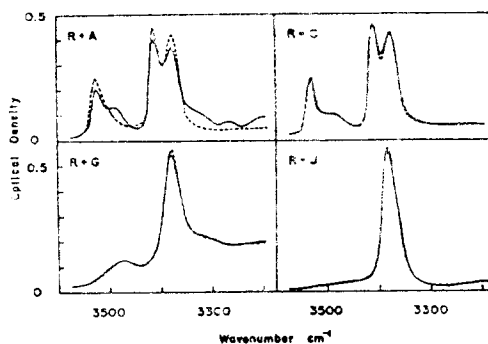


Fig. 3-1c- Infrared spectra of the equimolar mixture solutions of riboflavin tetracetate and one of the A, U, G and C compounds in chloroform. The total concentration is 0.08 M and the path length is 5mm.

methyriboflavin의 경우는 adenine과 전혀 반응하지 않았으며, 連續變化法에 의한 化學量論比를 측정하여 riboflavin-adenine(R-A)의 會合은 riboflavin의 3位の NH가 關係한 riboflavin : adenine = 1 : 1의 수소결합을 형성함을 알 수 있다. R-A의 구조는 後篇에서 論하기로 한다. 흡수강도의 농도변화에 따른 실험치로부터 定量的 結合定數 K_{A-R} 은 25°C에서 $130M^{-1}$ 임이 측정된다.

3-1-2. Riboflavin과 다른 核酸鹽基와의 會合性

Riboflavin은 핵산염기 adenine과 클로로포름용액 중에서 상당히 강한 회합체를 형성하고 있음을 알았다. 핵산염기중 adenine 이외의 염기유도체와 riboflavin과의 회합성을 검토하여 보았다.

Fig. 3-1c에는 각종 핵산염기유도체와 riboflavin과의 혼합용액의 적외흡수스펙트럼을 나타내었다. 즉 0.08M의 R-A, R-U, R-C 또는 R-G의 3μ 領域스펙트럼으로서 이들 핵산의 purine, pyrimidine 염기가 riboflavin과 회합된다면 adenine의 경우와 마찬가지로 수소결합에 의한 흡수대가 기대된다. 그러나 R-A의 경우와는 달리 각각의 혼합용액의 흡수대는 두 개의 각각의 스펙트럼의 강도의 합과 거의 일치하고 있다. 따라서 riboflavin과의 사이에 상호작용이 거의 없거나 있다고 하더라도 riboflavin자신 또는 핵산염기의 自己會合보다 약한 것으로 해석된다. 같은 현상으로 핵산염기유도체간에서는 A와 U만이 會合하는 사실¹⁷⁾이 알려지고 있어 U와 유사한 基를 가지는 riboflavin은 A와만 선택적인 수소결합을 형성하는 것을 알 수 있다.

Adenine은 핵산염기 이외에 數種의 barbital 유도체와 회합하는 사실이 이미 알려져 있다.¹⁰⁾ Adenine이 구조적으로 uracil과 유사한 화합물과 회합한다는 사실로 보아 riboflavin은 핵산염기중 adenine 과만 상호작용이 있음을 이해할 수 있다. 즉 adenine과의 상호작용에 필요한 구조는 비교적 확실하여 環狀의 -CONHCO-基가 요구되며 riboflavin은 isoalloxazine 環內에 -CONHCO-를 가지고 있어 핵산염기 adenine과 선택적 수소결합이 이루어짐을 이해할 수 있다.

3-1-3. Riboflavin環과 Adenine環의 結合部位

R-A의 結合부위를 명백히 할 목적으로 6μ 領域의 C=O伸縮振動의 거동을 조사하였다. 이 領域

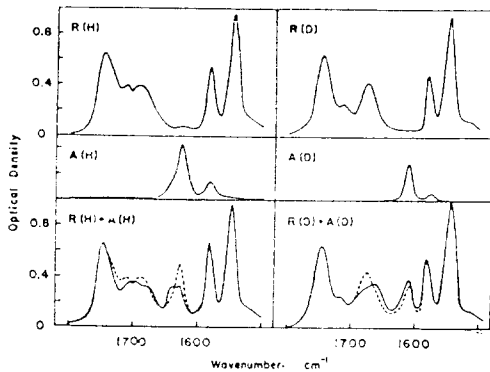


Fig. 3-1d- Infrared spectra of the carbonyl stretching region of riboflavin tetraacetate (R) and ethyladenine(A). The concentration of each solute is 0.05M and the path length is 0.1mm. H, nondeuterated compounds; D, N-deuterated compound. Solid line, observed spectra; dotted line, calculated sum of the upper two spectra.

에서 riboflavin의 스펙트럼은 1745cm^{-1} 에 강한 흡수대와 $1710, 1685\text{cm}^{-1}$ 에 약한 흡수대를 나타낸다(Fig. 3-1d). 1745cm^{-1} 의 강한 흡수대는 acetyl염기에 의한 것이고 1710cm^{-1} 의 흡수대는 isoalloxazine의 4位の $\text{C}=\text{O}$, 1685cm^{-1} 의 흡수대는 2位の $\text{C}=\text{O}$ 의伸縮振動에 의한 것으로 확인되어지므로 수소결합에 따른 변화가 기대된다. Adenine에서는 amino基의 N-H基의變角振動과 $\text{C}=\text{N}$ 基의伸縮振動이 겹쳐 1625cm^{-1} 에 흡수대가 나타나며 3μ 領域의 실험과 마찬가지로 두 용액을 혼합한 혼합체의 흡수스펙트럼에서도 수소결합에 따른 새로운 흡수대가 $1700, 1668$ 또는 1640cm^{-1} 部位에 나타나 본래의 $1710, 1685, 1625\text{cm}^{-1}$ 의 흡수대의 강도는 감소함이 관측되어 두 화합물의 흡음이 확증된다. 1745cm^{-1} 의 acetyl基의 변화는 없으며 R-A혼합액의 스펙트럼에서 1615cm^{-1} 의 흡수대만이 低波數로 移動하고 있어 isoalloxazine의 2位の $\text{C}=\text{O}$ 가 adenine염기와의 수소결합에 사용되었음이 추정된다. Riboflavin의 3位の NH基가 adenine의 amino基와의 수소결합에 관여함은 3μ 領域의 실험에서 확인되었으므로 결과적으로 adenine 유도체는 riboflavin유도체와 Fig. 3-1e과 같이 環狀水素結合體를 형성함이 추정된다.

핵산의 purine 또는 pyrimidine 염기간의 회합에서 보는 바와 같이 유기용매중에서의 희박용액 중에서는 環의 重複된 구조의 가능성도 있으나 A와 U의 회합체가 重複되어 있지 않다는 보고⁴⁾가 있음을 참고로 R-A의 경우도 1:1의 環狀結合體임을 확인할 수 있다.

3-1-4. 螢光스펙트럼結果

Riboflavin(RFTB) $2 \times 10^{-5}\text{M}$ 의 클로로포름용액의 형광스펙트럼을 Fig. 3-1f에 표시하였는데

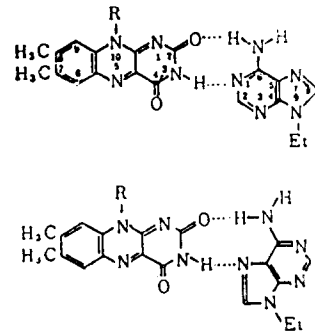


Fig. 3-1e- Cyclic hydrogen-bonded complex.

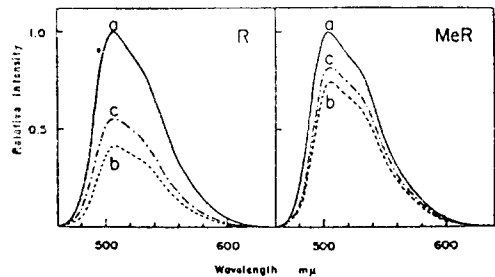


Fig. 3-1f- Fluorescence spectra of riboflavin tetraacetate (R) and N-methylriboflavin tetraacetate (MeR) in chloroform solution. a) $\text{R}(2 \times 10^{-5}\text{M})$; b) $\text{R}(2 \times 10^{-5}\text{M})$ and $\text{A}(2 \times 10^{-2}\text{M})$; c) $\text{R}(2 \times 10^{-5}\text{M})$, $\text{A}(2 \times 10^{-2}\text{M})$ and $\text{CB}(2 \times 10^{-2}\text{M})$.

ethyladenine $2 \times 10^{-2} M$ 을 加하였을 때의 消光現象을 관측한 결과 면적강도가 60% 감소하였다. 이는 MeR-A의 경우 消光現象이 없는 것과 비교고찰하면 riboflavin의 형광이 A에 의해 消光하는 것이라고 할 수 있다. 적외흡수스펙트럼의 경우 MeR-A는 전혀 수소결합을 형성하지 않는 것으로 해석되나 어느 정도 消光現象이 관측되어 이는 purine核과 isoalloxazine環과의 단순한 충돌에 의한 것이라 思料된다. 이런 사실을 확인하기 위하여 형광의 溫度變化에 따른 消光度變化를 알아본 결과 $50^{\circ}C$ 에서의 R-A 회합체 용액은 실온의 경우보다 消光度의 解消가 일어나 형광強度가 증가함을 볼 수 있고 MeR+A의 경우는 온도상승에 따라 消光度가 증가한다. 따라서 高溫에서의 分子충돌의 증가는 消光의 증가를 가져온다는 사실을 고려할 때 riboflavin과 adenin의 수소결합을 확인할 수 있다.

이상에서 非極性 溶媒中에서의 riboflavin과 核酸鹽基間的 結合에 대해 고찰하였다. 이러한 비극성 용매중에서의 결합은 생체내 반응과 무관하지 않다. 예를 들면 핵산분자 내부에서는 열기부분이 서로 모여 대응하고 있으므로 水溶媒와는 다른 조건이며, 약물과의 상호작용을 하는 부분도 lipid라는 점등을 고려할 때 이러한 고찰은 생화학적 機轉을 알아보는데 중요한 정보를 제공할 수 있다고 생각된다.

3-2. Riboflavin과 Alcohol類

Flavin을 함유한 α -amino 酸化酵素는 基質의 酸素傳達에 電子傳導體로서 중요한 역할을 한다.^{21,102)} 이와 같은 α -amino산 산화효소는 alcohol과 결합하여 기질과의 본래작용이 阻害된다는 연구보고가 많이 있다.¹⁰³⁻¹⁰⁶⁾ 즉, apo 효소가 alcohol과 반응하여 구조의 변화를 가져오므로써 효소의 친화성이 감소되어 그 촉매작용에 영향을 준다고 알려져 있다. 이에 α -amino 산 산화효소에 대한 alcohol의 영향을 밝히는 목적으로 alcohol과 riboflavin의 작용을 비극성용매중에서 조사하여 봄은 중요한 의미를 가진다. 本稿에서는 이러한 riboflavin과 數種 alcohol類의 결합을 해석하여 생체내 반응기전을 밝히는데 도움이 되고자 하였다.

3-2-1. 赤外스펙트럼結果

Fig. (3-2a)에서 보는 바와 같이 8mM의 riboflavin 유도체와 alcohol의 혼합용액은 예상할 수 있는 것과 같이 상호수소결합에 의하여 변화를 가져와 회합을 이루고 있음을 확인할 수 있다. 그 결합부위의 해석과 연속변화법에 따른 화학양론계산으로 riboflavin과 alcohol은 1:1의 比로 회합함이 추정되었다.

3-2-2. NMR스펙트럼結果

Riboflavin과 alcohol의 수소결합의 부위를

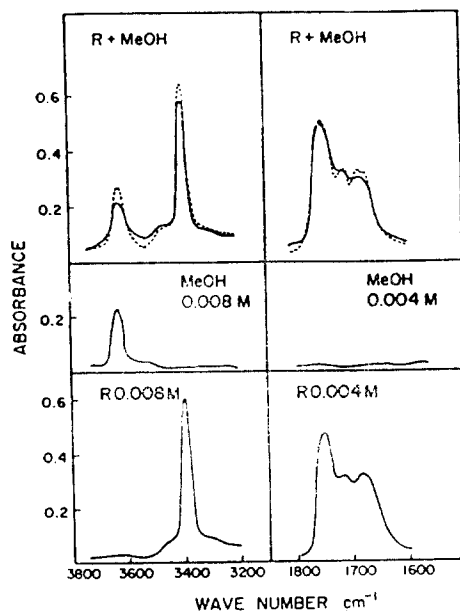


Fig. 3-2a- Infrared spectra of RFTA, methanol and 1:1 mixed solution. These spectra show the observed spectra (solid line) and the calculated sum of the lower two spectra (dashed line). The concentrations were 8mM in $CDCl_3$ for the measurements in $3\text{-}\mu m$ region (5mm quartz cell) and 4mM in $CDCl_3$ for the measurements in $6\text{-}\mu m$ region (1mm KBr cell).

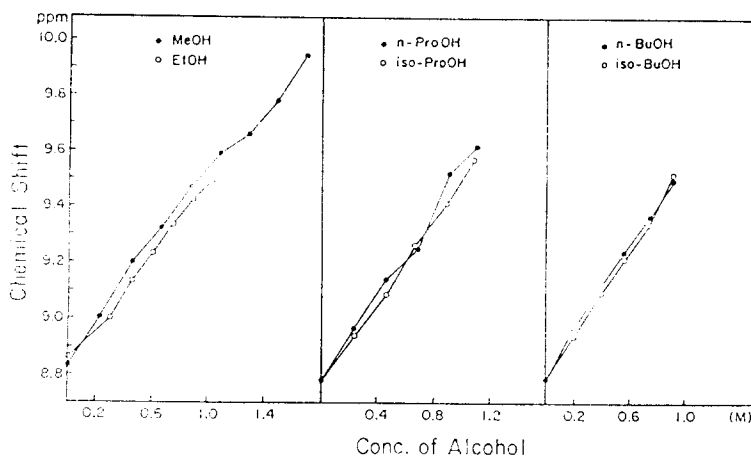


Fig. 3-2b- Effect of the concentration of alcohol on the chemical shift of the 3-N imino proton of RFTA in CDCl_3 , keeping the concentration of RFTA constant (0.05M).

결정합에는 NMR에 의한 riboflavin의 3位の NH proton의 移動을 관측하는 것이 이상적인 방법이다. Fig. 3-2b.에서 관측되는 바와 같이 riboflavin 유도체의 3位 NH proton은 8.76에 나타나며 이에 添加하는 alcohol量의 增加에 따라 점차적으로 低波數로 移動함을 볼 수 있다. 이와 같은 결과는 NH基가 alcohol과 결합체를 형성함에 수소결합이 관여하고 있음을 나타내며 이 결합의 강도는 $1/\Delta\delta_{obs}$ 對 $1/C_0$ 의 직선관계로부터 結合정수 K 를 구함으로써 알 수 있다. 다른 방법에 의해 구한 값과 비교하여 Table II에 표시하였다.

Table II- Measured properties of riboflavin and alcohols.

Alcohol	K_c (M^{-1})		
	UV method (in CCl_4) ^a	Fluorescence method (in CCl_4) ^a	NMR method (in CCl_3) ^b
Methanol	5.81	6.65	0.87 ± 0.02
Ethanol	2.99	4.07	0.35 ± 0.02
<i>n</i> -Propyl alcohol	2.01	3.14	0.21 ± 0.02
iso-Propyl alcohol	0.89	1.24	0.17 ± 0.02
<i>n</i> -Butyl alcohol	0.68	—c	0.22 ± 0.02
iso-Butyl alcohol	0.59	—c	0.16 ± 0.02

a: Measurements by UV and fluorescence were carried out by using RFTB.

b: RFTA was used in NMR method.

c: Could not be determined with accuracy.

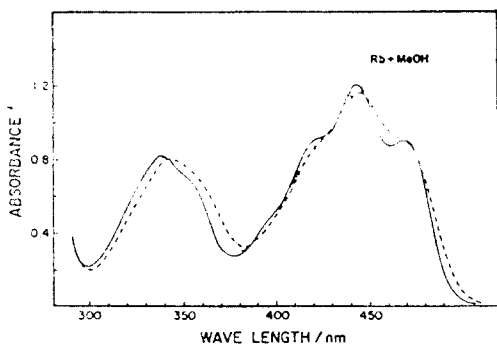


Fig. 3-2c- Effect of methanol on UV absorption spectrum of RFTB in CCl_4 . Solution of RFTB, $1 \times 10^{-4} \text{M}$ in CCl_4 -methanol solvent, 0-1% by volume methanol. Solid curve, free molecule; dotted curve, spectra in the presence of methanol in order of increasing concentration of methanol; broken curve, in the presence of 1 M methanol.

3-2-4. 螢光스펙트럼 結果

Riboflavin에 alcohol을 가하여 수소결합을 형성한다면 그 형광의 消光現象을 기대할 수 있다. 실험결과로 alcohol을 가함으로써 단독의 riboflavin의 형광이 단계적으로 감소하여짐을 관측할 수 있으며 이의 형광강도의 감소로부터 K 값을 구한 수치는 Table II에 표시하였다.

결합정수가 각각 방법에 따라 차이가 있음은 용매의 종류 또는 용질(riboflavin)의 종류 등에 기인하는 것으로 해석되며 단지 alcohol 종류에 있어서 alkyl基의 數가 증가함에 따라 安定度가 감소함은 alcohol의 極性的 변화 또는 電氣的 引力과 상관성을 고려할 때 충분히 이해된다.

이상의 각종 스펙트럼 결과를 검토하여 보면 우선 3μ 영역의 적외스펙트럼의 변화로서 riboflavin의 3位の NH와 alcohol의 OH가 수소결합에 관여하였음을 확인하였고 6μ 영역에서 쉽게 2位の C=O이 관여한 것을 알 수 있다. Isoalloxazine의 4位の C=O보다는 2位の C=O이 수소결합에 쉬운 조건임이 보고^{22,107-110}) 되어 있음을 고려하면 2位の C=O와 alcohol의 OH基가 수소결합을 하고 있음이 합리적이라 해석된다. 또한 UV스펙트럼의 결과가 이 사실을 뒷받침하여 주어 Fig. 3-2d. 과 같이 1:1의 결합체를 형성한다고 판정된다.

3-3. Riboflavin과 살리실산誘導體²²⁾

살리실산鹽은 解熱鎮痛藥으로 그 작용기전은 살리실산염이 생체내에서 수소결합에 의하여 약 효를 나타낸다¹¹¹⁾고 알려져 있으며 또한 살리실산염이 呼吸作用에 영향을 미친다는 보고¹¹²⁻¹¹⁷⁾가 있으며 mitochondria 호흡계에서 살리실산유도체가 차단제로 작용함을 밝힌¹¹⁸⁾바 있다. 일반적으로 호흡차단제로서의 살리실산염의 작용은 phosphorylation 과정의 高에너지 중간체를 저해한다고 생각되어진다. 이와같은 저해작용은 아직 究明된 바가 없으며 작용기전으로서는 a) 살리실산이 FAD 또는 NAD의 adenine 부위에 결합하는 것 또는 b) FAD나 NAD의 flavine 잔기와 adenine 잔기의 결합을 살리실산이 저해하는 것 c) 살리실산이 flavine과 결합함으로써 전자배치를 변화시키는 것 d) 살리실산이 FAD나 FMN의 apo단백질과의 결합을 방해하는 것 등을 들고 있다.

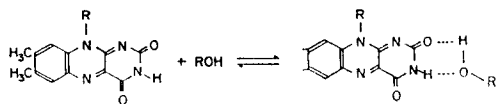


Fig. 3-2d- Association of riboflavin with alcohol.

3-2-3. UV스펙트럼 結果

Fig. 3-2c에서 보는 바와 같이 riboflavin에 alcohol을 가함으로써 생기는 UV스펙트럼의 변화를 관찰할 수 있는데 이 原因은 alcohol이 riboflavin과 수소결합을 형성하기 때문이라고 추정된다. 그림에서 보는 바 低波數의 흡수대는 red shift하였음을 보아 isoalloxazine의 C=O基와 3位の NH가 수소결합에 관여하였음을 확인할 수 있다. 이와 같은 스펙트럼변화에 따라 $(R_0)/\Delta A$ 對 $1/L$ 은 직선관계가 성립되고 이로부터 얻은 K 값은 Table II에 표시한 바와 같다.

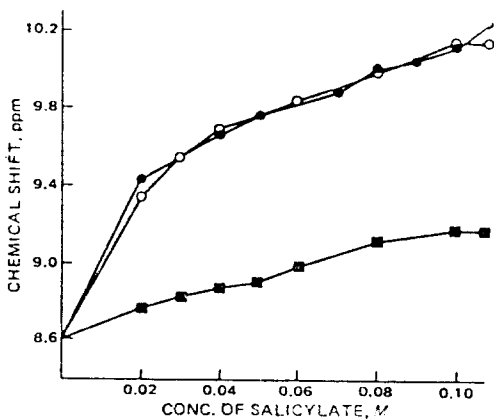


Fig. 3-3a- Stoichiometric pairing of riboflavin and salicylic acid: Dependence of the chemical shift of the riboflavin N-3 (○) and salicylic acid carbonyl (●) protons in a mixing experiment. Total concentration was constant at 0.08M.

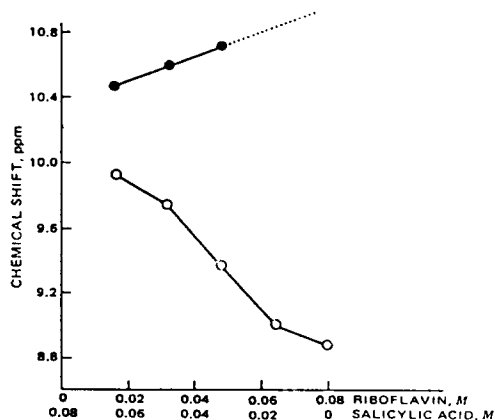


Fig. 3-3b- Effects of the concentrations of salicylates on the chemical shifts of the riboflavin N-3 proton in deuterochloroform, keeping the concentration of riboflavin at 0.04M. (●) salicylic acid; (○) aspirin; and (■) salicylamide.

이상의 어떤 이유이건 살리실산과 flavin의 분자간 결합은 중요한 의미가 있는 것으로 이들의 회합성을 조사하여 보는 것은 살리실산염의 약리작용기전을 알아보는 데 중요한 도움이 되리라고 생각된다.

3-3-1. NMR 스펙트럼

증글로로포름용액에서의 riboflavin과 살리실산염의 ^1H NMR 스펙트럼은 비교적 低波數領域에서 나타나며 살리실산의 COOH proton이 10 ppm 이하에서 관측되고 phenolic OH proton은 비교적 고농도에서 관측되어진다. 아스피린의 COOH proton의 경우는 불분명하며 살리실아마이드의 경우 6 ppm에서 aminoproton이 관측되며 OH proton이 12 ppm 근처에서 관측된다.

이들 살리실산염의 COOH, OH 또는 NH_2 의 proton은 riboflavin과의 수소결합에 관여한다면 화학적 이동이 생길 것이며 온도나 농도의 변화에 따라 화학적 이동값의 변화가 기대된다.

두 용질의 농도 변화에 따른 混合比에 따라 화학 shift가 Fig. 3-3a에서 보는 바와 같이 변화를 일으킨다. Riboflavin의 NH proton은 살리실산의 농도의 증가에 따라 低波數로 이동하고 살리실산의 COOH proton도 riboflavin의 농도증가와 더불어 低波數로 이동함을 볼 수 있어 이들 두 물질은 수소결합에 의한 결합체가 형성됨을 쉽게 알 수 있다. Riboflavin과 아스피린 또는 riboflavin과 살리실아마이드의 경우도 마찬가지로의 변화를 보였으며, 살리실아마이드의 경우 riboflavin의 NH proton의 이동 변화가 보다 약하게 나타남이 특징이나 이는 自己會合이 강한데 基因하는 것으로 생각된다.

또한 이상 3종류의 살리실산염류의 농도에 대한 riboflavin의 NH proton의 shift值를 비교하여 보아도 살리실아마이드가 앞의 두 물질보다 현저하게 구배가 약한 것으로 결합의 강도에 차이가 있음을 보여주고 있다(Fig. 3-3b). 결과적으로 살리실산염이 riboflavin과 결합할 때 그 결합의 강도는 살리실산, 아스피린, 살리실아마이드의 順이며 1:1의 수소결합체 형성을 추정할 수 있다. 살리실산 또는 살리실아마이드의 amino proton이 혼합용액 중에서 低波數로 이동함에 반하

Table III- Measured and calculated properties of riboflavin and salicylates on absorption spectra.

Salicylates	Range of salicylate concentration, M	Association	
		Solvent	constant (K), M ⁻¹
Salicylic acid	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-2}$	Benzene	450
Aspirin	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-2}$	Benzene	370
Salicylic acid	$1 \times 10^{-3} - 1 \times 10^{-2}$	CCl ₄	435
Aspirin	$1 \times 10^{-4} - 1 \times 10^{-3}$	CCl ₄	350

여 OH proton은 高波數으로 이동함을 보아 이 경우 phenol성 OH는 결합에 관여하지 않음이 확인되어 3종의 살리실산염과 riboflavin은 Fig. 3-3c와 같은 결합구조로 추정할 수 있다.

3-3-2. UV 스펙트럼

Riboflavin과 살리실산의 혼합액의 UV스펙트럼 실험결과는 앞章의 alcohol의 경우와 마찬가지로 red shift를 나타내어 쉽게 수소결합체 형성을 확인할 수 있다. 이는 NMR의 결과로 뒷받침할 수 있으며 두 종류의 실험치로부터 결합정수를 구한 값을 Table III에 표시하였다.

이상의 실험결과 riboflavin의 3位的 NH와 살리실산, 아스피린의 COOH 및 살리실아미드의 NH₂과 環狀水素結合體의 형성에 관여함을 알 수 있으며 이와 같은 비극성용매 중에서의 riboflavin과 살리실산의 결합은 생체내 효소중의 FAD 분자가 hydrophobic 상태에 있음을 고려할 때 살리실산의 작용기전을 고찰함에 충분한 생화학적 의미를 가진다고 평가된다.

3-4. Riboflavin과 기타生理活性物質

Flavin 효소의 阻害劑로서는 barbitol系 化合物을 비롯하여 수중화합물이 보고되어 있다. 119, 123) 阻害劑중에는 carbonyl酸鹽(R-COOH)이 효소중에서 기질과拮抗적으로 阻害하는 것으로 알려져 있다. 특히 phenyl carboxyl基를 가지는 benzene 유도체는 기질과拮抗作用이 강한 것으로 알려지고 있다.

다른 측면에서 생체내 각종 효소가 FAD 또는 FMN과 반응하여 산화환원반응에 관계하는 일은 많다. 例컨대, dihydroorotate dehydrogenase는 생체내의 중요효소로서 orotic acid의 산화환원반응에 작용하고 있으며 構成因子로서는 2 mole의 FAD, 2 mole의 FMN 및 4 gm atom의 금속철분을 함유하고 있음이 알려져 있다. 이들의 생체내에서의 작용기전 및 결합양식은 알려져 있지 않다. 이와 같이 flavin효소의 저

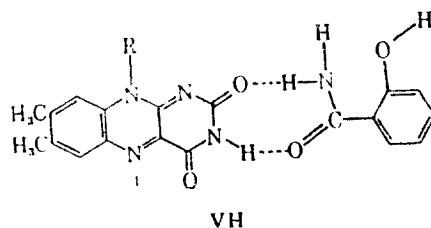
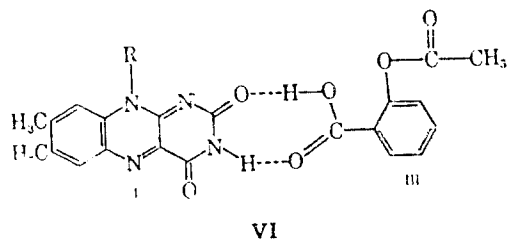
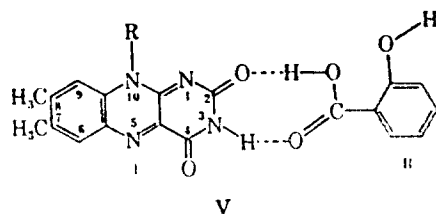


Fig. 3-3c- Association of riboflavin with salicylic acid(V), aspirin (W) and salicylamide (VII).

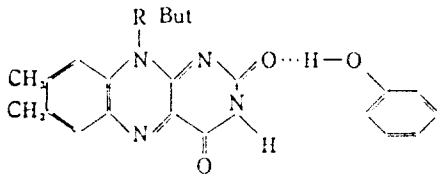


Fig. 3-4a- Association of riboflavin with phenol.

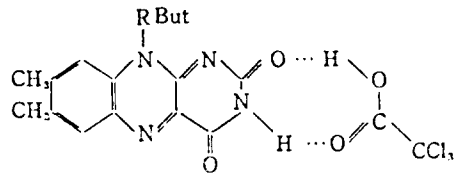


Fig. 3-4b- Association of riboflavin with trichloroacetic acid.

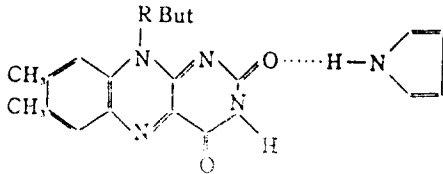


Fig. 3-4c- Association of riboflavin with indol.

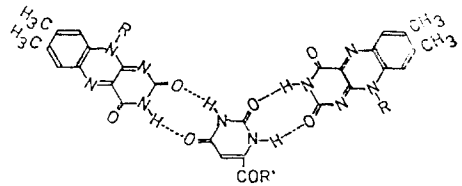


Fig. 3-4d- Association of riboflavin with orotic acid.

해 또는 생체내 반응을 究明함에는 그 구성성분 flavin과 작용대상물질간의 결합을 조사하여 봄이 중요한 수단으로 그간에 밝혀진 몇種 例를 들어 논술하고자 한다.

3-4-1. Riboflavin과 각종 阻害劑

Flavin 효소의 저해제로서 알려진 화합물중 phenol, 삼염화초산, indol 등을 대상으로 前章 등의 방법에 의하여 riboflavin과의 결합성을 조사하였다. 우선 적외흡수스펙트럼의 결과로 riboflavin의 3位的 NH 변화와 C=O基의 흡수대의 변화를 주로 보았다. 또한 저해제의 특이한 흡수대가 있는 경우는 이 흡수대의 변화를 관측할 수 있을 것이다.

Phenol의 경우 riboflavin을 가함으로써 phenol의 OH기의 伸縮振動吸收帶가 감소하였고 riboflavin C=O基의 강도도 감소하여 Fig. 3-4a과 같이 phenol의 OH基와 riboflavin의 C=O基가 관여하는 수소결합을 형성한다는 것이 확인되었다. ($K=100M^{-1}$)

삼염화초산의 경우 riboflavin의 혼합체 스펙트럼에서 riboflavin의 NH($3395cm^{-1}$), C=O($1665cm^{-1}$), 삼염화초산의 COOH의 OH基 흡수대의 강도는 감소되고 isoalloxazine 3位的 NH도 사용된 점을 볼 때 phenol과 달리 회합형식으로 環狀水素結合體라고 추정된다. 이때 회합정수 K 는 $500M^{-1}$ 정도이다.

Indol도 저해제로 사용되어 왔다. 적외스펙트럼에서 indol의 imino基伸縮振動흡수대는 $3490cm^{-1}$ 에 나타나서 riboflavin의 3NH와 구별하여 관측할 수 있다. 두 물질의 혼합액의 스펙트럼에서 riboflavin의 NH흡수대의 강도는 변화없고 6μ 영역의 C=O 흡수대의 변화와 indol의 imino基 변화를 확인하여 Fig. 3-4b과 같은 결합체를 추정할 수 있다. 그러나 동일 농도의 다른 화합물의 회합체 형성시의 흡수대의 강도변화와 비교하면 무척 약하여 그 수소결합이 약하다고 추정할 수 있다.

Riboflavin에 저해제를 혼합하였을 경우의 可視 螢光스펙트럼의 결과는 Table IV와 같다. Phenol과 riboflavin 혼합액의 可視 및 螢光스펙트럼은 $5 \times 10^{-2}M$ 농도에서 강한 변화가 있어 波數이동과 消光現象을 볼 수 있다. 삼염화초산의 경우 더욱 현저하여 可視 및 螢光스펙트럼의 변화를 가져왔다. 그 결합정수를 비교할 때 (Table IV) 적외 흡수스펙트럼에서 구한 경우보다 크게 나타

Table IV- Effects of several inhibitors on the spectra of riboflavin tetrabutylate (Solvent CCl_4)

method	IR $3\mu, 6\mu$) Cell: 3μ 10mm quartz, 6μ 1mm CaF_2 $R4 \times 10^{-3}\text{M} + \text{Inhibitor } 4 \times 10^{-3}\text{M}$ Self assoc. const. of R =745 1/mole.	UV(300—520 $m\mu$) $R5 \times 10^{-4}$ spectral change None (Shift or hypochromicity)		Fluor. (440—620 $m\mu$) E. wave 360 $m\mu$ $R5 \times 10^{-4}$ (Relative area intensity)
Ethyladenine	Intensity change	$R5 \times 10^{-4}$		$R5 \times 10^{-4}$ 100
	3μ R : NH \bigcirc , A : NH ₂ \bigcirc	5×10^{-4}		5×10^{-4} 98
	6μ C ₂ =O \bigcirc	5×10^{-4}	—	5×10^{-4} 59
	1 : 1 Cyclic association	5×10^{-3}	—	5×10^{-3} 29
	Self assoc. const. 200 Assoc. const. R-A 2000			
Phenol	Intensity change	$R5 \times 10^{-4}$		$R5 \times 10^{-4}$ 100
	3μ R : NH \times P : OH \bigcirc			
	6μ C ₂ =O \bigcirc	5×10^{-2}	+	5×10^{-2} 80
	1 : 1 Association	5×10^{-2}	++	5×10^{-2} 0
Self assoc. const. 34 Assoc. const. R-P 100				
Trichloroacetic acid	Intensity change	$R5 \times 10^{-4}$		$R5 \times 10^{-4}$ 100
	3μ R : NH \bigcirc , Cl : OH \bigcirc			
	6μ C ₂ =O \bigcirc	5×10^{-4}	++	5×10^{-4} 43
	Cyclic association (?)	5×10^{-3}	##	5×10^{-2} 30
Self assoc. const. 70 Assoc. const. R-Cl 500				
Indole	Intensity change	$R5 \times 10^{-4}$		$R5 \times 10^{-4}$ 100
	3μ R : NH \times I : NH \bigcirc			
	6μ C ₂ =O \bigcirc	5×10^{-4}		5×10^{-4} 78
	Weak association	5×10^{-2}	—	5×10^{-3}) 42
Self assoc. const. Assoc. const. R-I				
Cyclobarbital	Intensity change	$R5 \times 10^{-4}$		$R5 \times 10^{-4}$ 100
	3μ R : NH CB : NH			
	6μ	5×10^{-4}	—	5×10^{-4} 93
	Very weak association	5×10^{-3}	—	5×10^{-3} 91
	Self assoc. const. Assoc. const. R-CB	5×10^{-2}	—	5×10^{-2} 90

나며 이런 사실은 가시, 형광스펙트럼 측정에서 구한 數値는 다소 수소결합 이외의 작용효과가 가미된 것으로 고려된다. Indole의 경우 비교적 고농도($5 \times 10^{-3}M$) 용액에서만 波數변화 또 消光現象이 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 3種類의 分光學的 方法에 의한 각종 flavin저해제의 相互作用은 약간씩 차이가 있는 것으로 적외스펙트럼은 각종 基의 振動변화, 可視, 螢光의 경우 전자배치의 변화에 따르므로 단순한 可視 螢光스펙트럼만으로 저해작용을 확인함은 위험한 것이라 생각된다.

3-4-2. Riboflavin과 Orotin산誘導體²⁰⁾

생체내 반응기전을 유추하는 한 방법으로 고찰된 riboflavin과 orotin산유도체의 상호작용을 조사하여 본 결과, 적외스펙트럼의 경우 orotin산염의 NH의 伸縮振動흡수대가 riboflavin의 3位의 NH와 같은 위치($3380cm^{-1}$)에 강하게 나타나는데 혼합액의 경우 그 강도가 현저하게 감소하고 6μ 영역의 두 물질의 C=O基($1750cm^{-1}$, $1700cm^{-1}$)가 전체적으로 크게 감소하고 있음이 관측되어 이들이 결합에 관여함을 확인할 수 있다. NMR 스펙트럼에 의해서도 NH proton의 화학 shift를 확인할 수 있어 두 혼합체는 서로 상호작용이 있음을 알 수 있다. 또한 連續變化法에 따른 結合比를 산출할 때 orotin산유도체와 riboflavin은 1:2比임이 산출되어 Fig. 3-4d. 과 같은 결합체임이 확인되었다.

이상의 결과가 생체내의 효소반응과 일치하는지는 단정하기 어려우며 효소중에 존재하는 FAD 또는 FMN의 전자분포상태에 따라 차이가 있음을 고려할 때 본실험과 같은 산화형 riboflavin을 대상으로 하면 orotic acid와의 반응은 이상에서 제안한 결합양식이 가장 타당한 것임을 알 수 있다.

3-5. 還元型 Riboflavin과 作用하는 藥物¹⁴⁾

前章에서는 酸化型 riboflavin과 각종 약물간의 회합성을 검토하였다. 산화형 riboflavin의 회합은 FAD의 分子內 또는 分子間結合에 중요한 의미를 가짐을 알았으며 또한 FAD 構造上에서도 중요한 역할을 함이 밝혀져 있다. ^{13,18,41,65,98,99,121)}

Riboflavin의 isoalloxazine環이 산화 또는 환원함으로써 呼吸鎖의 전자전달작용을 하는 것을 고려하여 환원된 상태의 riboflavin과 각종 약물간의 작용을 조사하여 붉은 산화형 riboflavin의 연구와 더불어 중요한 가치가 있는 것으로 생각된다. 우선 핵산염기 purine 또는 pyrimidine유도체와의 상호작용, 생체내 산화환원에 직접 관여하는 것으로 생각되는 nicotine amide基와의 상호작용을 조사하였다. 이런 결과는 FMN-FMNH₂ 또는 NAD⁺-FMNH₂ 반응^{76,85,86,122,123)}을 이해하는데 충분한 도움을 줄 것이 기대된다. Riboflavin의 환원형 물질은 클로로포름중에서 환원제를 가하여 흔들어 만들고 水分을 제거한 후 밀폐한 상태에서 分光學的 측정을 행하였으며 자세한 방법은 생략한다.

3-5-1. 還元型 Riboflavin의 自體會合

환원형 riboflavin의 적외흡수스펙트럼은 3μ 영역에서 산화형과는 달리 대단히 넓고도 강한 흡수대를 나타낸다(Fig. 3-5a). 6μ 영역에서는 C=O의 伸縮振動이 低波數로 이동하여 나타난 것을 볼 수 있다. 이것은 isoalloxazine環의 공액이중결합이 환원되므로 N₁ 및 N₅에 NH基가 형성되어 RH의 自己會合이 이루어지는 것이라 해석된다. 즉 완전히 환원된 riboflavin의 경우 3개의 NH를 가지고 2개의 C=O基를 가지게 되므로 다른 RH와 環狀水素結合體를 형성하는데 4개의 部位를 가지게 된다. 결과적으로 RH는 자체회합이 강할 것이 예측되며 실제로 측정된 결합정수는 $600M^{-1}$ 로 산화형의 4배가 됨을 알 수 있다. N₁H와 N₅H의 수소결합은 N₃H의 경우보다 강하여 자

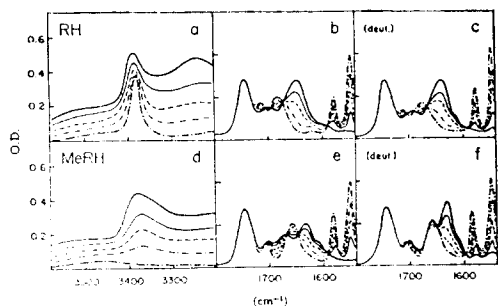


Fig. 3-5a- Infrared spectra of the chloroform solutions of RFTA (a,b,c) and MeR(d,e,f) in the reduced and oxidized forms. The concentration of the solution is $4 \times 10^{-3}M$, and the path length is 5mm for the $3500-3200cm^{-1}$ region and 0.5mm for the $1800-1500cm^{-1}$ region. Bold solid line, fully reduced state; bold broken line, fully oxidized state; other three fine lines, partially reduced and oxidized state.

체회합의 형성을 Fig. 3-5b와 같이 추정하였다. 중간산화형의 적외흡수스펙트럼은 완전산화형과 완전환원형의 사이에 나타나며 이는 semiquinone狀¹⁴⁾이라 알려져 있다.

3-5-2. 還元型 Riboflavin과 Purine, Pyrimidine 및 기타 化合物

산화형 riboflavin과 핵산염기간에는 adenine 만이 특이적 결합을 함을 前章에서 밝힌 바 있다. 환원형 riboflavin의 경우는 산화형과는 달리 cytosine과도 결합을 하며 그 결합비는 A, C 각각 riboflavin과 1 : 3의 비로 회합체를 형성함을 알았다. 즉 산화형에서의 선택성이 없어진다. 이와 같은 환원형의 결합양식을 검토하기 위하여 핵산염기 이외의 화합물과의 상호작용을 조사한 결과를 Table V에 표시하였다. Table V에서 보는 바와 같이 환원형 riboflavin은 각종 생리활성물질과 쉽게 결합을 하며 결합에 필요한 조건으로서는 대상물질의 구조중 heterocyclic環의 N原子와 amino group이 요구됨을 실험결과 알았다. 그러나 이 대상물질의 pK_a 값에 따라 주위환경의 전자배치가 달라지므로써 수소결합의 강도는 달라짐을 보아 각종 약물의 환원형 riboflavin과의 결합은 차이가 있음을 알 수 있으며 산화형의 riboflavin의 결합양식과 더불어 생체내의 작용기전을 추구함에 중요한 정보를 제공하여 주는 것으로 思料된다.

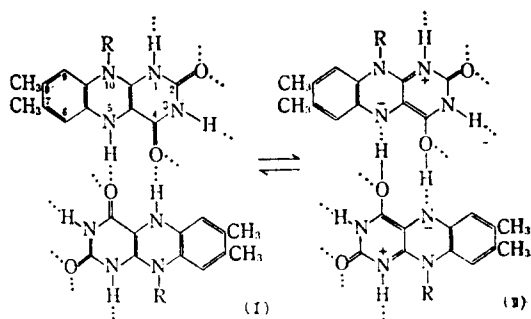


Fig. 3-5b- Self-association of reduced riboflavin.

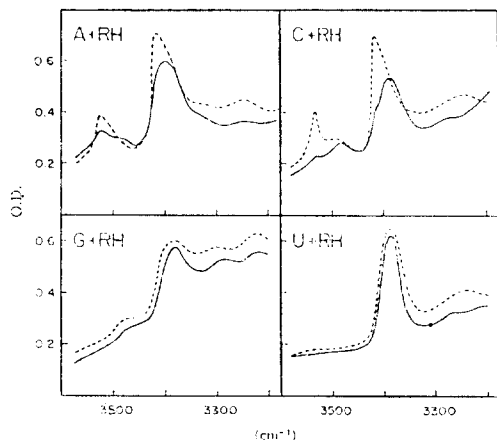


Fig. 3-5c- Infrared spectra of the equimolar mixture solution of reduced RFTA and one of the A, U, G and C compounds in chloroform. The total concentration is $8 \times 10^{-3}M$ and the path length is 5mm. Solid line, observed spectrum; dotted line, calculated sum of the individual spectrum of components.

Table V- Association of reduced RFTA with several compounds.

Compound		Compound	
A	‡	Aniline	—
G	—	Pyridine	—
G	‡	Nicotinamide	+
U	—	Isonicotinamide	+
2-Aminopyridine	‡	1-Methyl-4-hydrionicotinamide	+
3-Aminopyridine	+	Benzamide	—
4-Aminopyridine	‡	<i>o</i> -Hydroxybenzamide	—
2-Aminopyrimidine	—	1-Phenylurea	—
4-Aminopyrimidine	+	Urethane	—

The + signs denote the strength of interaction of RH with association constants bigger than 10^8 (l/mol)³ (‡), around 10^7 (‡) and smaller than 10^7 (+).

結 論

이상에서 생화학적으로 중요한 의미를 가지는 물질간의 상호작용의 연구수단으로서의 분광학적 방법에 대해 논하고 생체내 효소로서 작용하는 riboflavin 유도체와 핵산염기 및 여러 생리 활성물질들간의 상호작용을 검토하였다.

각 분광학적 수단을 이용하여 이들 상호작용에 있어서의 수소결합의 존재를 확인하고 결합양식을 추구함으로써 riboflavin의 생체내에서의 역할 및 생리활성물질들의 작용기전을 이해하는데 의미있는 정보를 제공한 것으로 생각된다.

向後 riboflavin과의 상호작용이 기대되는 다른 여러 약물들에 대한 연구에도 도움이 될 수 있을 것이며 이 계통의 研究를 계속 함에 참고가 되기를 바라 마지 않는 바이다.

본 원고를 작성함에 원고의 정서 및 data를 정리하는데 본인 연구실 金愛梨 碩士의 헌신적 노력에 힘입었으며 이에 감사한 말씀을 드리는 바이다.

文 獻

1. 高浪滿, 生物物理化學研究法(1) 朝倉書店(東京) p. 15 (1969).
2. Y. Kyogoku, R.C. Lord and A. Rich, *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 496 (1967).
3. Y. Kyogoku, R.C. Lord and A. Rich, *Science* **154**, 518 (1966).
4. L. Katz and S. Penman, *J. Mol. Biol.* **15**, 220 (1966).
5. Y. Kyogoku, R.C. Lord and A. Rich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **57**, 250 (1967).
6. C.O. Wilson, O. Gisvold and R.F. Doerge, *Text Book of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* Liprincott, Philadelphia Pa p. 47 (1977).
7. B. Chance and G. Hollunger, *J. Biol. Chem.* **278**, 418 (1963).
8. S. Minakami, F. Cremona, R.L. Ringler and T.R. Singer, *J. Biol. Chem.* **238**, 1929 (1963).
9. A. Giuditta and L. Casola, *Biochim. Biophys. Acta* **110**, 32 (1965).
10. A. Giuditta and H.J. Strecker, *Biochim. Biophys. Acta* **48**, 10 (1961).
11. Y. Kyogoku, B.S. Yu, H. Akutsu, M. Watannabe and K. Kawano, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **83**, 172 (1978).
12. Y. Kyogoku and B.S. Yu, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **41**, 1742 (1968).

13. Y. Kyogoku and B.S. Yu, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **42**, 1387 (1969).
14. B.S. Yu and Y. Kyogoku, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **43**, 239 (1969).
15. Y. Kyogoku and B.S. Yu, *Chem.-Biol. Interactions* **2**, 117 (1970).
16. B.S. Yu, *Korean Biochem. J.* **3**, 61 (1970).
17. Y. Kyogoku, B.S. Yu, R.C. Lord and A. Rich, *The Jerusalem Symposia on Quantum Chemistry and Biochemistry, IV*, The Israel Academy of Sciences and Humanities, Jerusalem p.223 (1972).
18. Y. Kyogoku, M. Nishikimi, B.S. Yu and K. Yagi, *Biochim. Biophys. Acta* **321**, 437 (1973).
19. J.W. Huh and B.S. Yu, *J. Pharm. Soc. Korea* **20**, 131 (1976).
20. B.S. Yu, S.J. Lee, S.Y. Jeong, Y.B. Kim and C.K. Kim, *J. Pharm. Soc. Korea* **23**, 63 (1979).
21. B.S. Yu, S.J. Lee and H.H. Chung, *Chem-Biol. Interactonsi* **41**, 61 (1982).
22. B.S. Yu, S.J. Lee, S.J. Lee and H.H. Chung, *J. Pharm. Soc.* **72**, 592 (1983).
23. J.A. Pople, W.G. Schneider and H.J. Bernstein, *High Resolution Nuclear Magnetic Resonance*, McGraw-Hill (1959).
24. F.A. Bovey, *Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, Academic Press (1969).
25. D. Shaw, *Fourier Transform NMR Spectroscopy*, Elsevier (1976).
26. 曾良達生, 京極好正, 生化學實驗講座 第2卷 核酸の化學 III, 高次構造研究法, 東京化學同人 (1977).
27. G.C. Pimental and A.L. McClellan, *The Hydrogen Bond* W.H. Freeman and Company p.68 (1960).
28. Y. Kyogoku, R.C. Lord and A. Rich, *Nature* **218**, 69 (1968).
29. 坪井正道 赤外線 Raman效果, 生物物理化學研究法, 朝倉書店(東京) p.133-153 (1969).
30. H.A. Harbury, K.F. Nanone, P.A. Loach and R.M. Amick, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **45**, 1708 (1959).
31. K. Yagi, T. Ozawa, M. Naoi and A. Kotaki, *Flavins and Flavoproteins*, Univ. of Tokyo Press p.237 (1968).
32. H. Kubo, H. Watari and T. Suiga, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **40**, 981 (1959).
33. K. Yagi, T. Ozawa, *Biochim. Biophys. Acta.* **81**, 29 (1964).
34. K. Yagi, T. Ozawa, M. Naoi, N. Sugiura and A. Kotaki, *Biochim. Biophys. Acta* **146**, 77 (1967).
35. Flank, *Trans. Faraday. Soc.* **21**, 536 (1925).
36. E.U. Condon and P.M. Morse, *Quantum Mechanics*, McGraw-Hill p.164 (1929).
37. R. Kuhn and G. Moruzzi, *Ber.* **67**, 888 (1934).
38. D. Karrer and H. Fritzsche, *Helv-Chem. Acta* **18**, 911 (1935).
39. 八木, 太幡, 小瀧, 荒川 *Vitamin* **8**, 61 (1955).
40. H. Weil-Marherbe, *Biochem. J.* **40**, 363 (1946).
41. G. Weber, *Biochem. J.* **47**, 114 (1950).
42. K. Burton, *Biochem. J.* **48**, 458 (1951).
43. M.W. Hanna and A.L. Ashbaugh, *J. Phys. Chem.* **68**, 811 (1964).
44. N. Mataga and S. Tsuno, *Bull. Chem. Soc. Jap.* **30**, 711 (1957).
45. K. Yagi, M. Ohishi, Riboflavin in *ビタミン學(上)* 日本ビタミン學會, 東京化學同人 (1980), pp.70-83 (1980).
46. 八木國夫, Riboflavin in *ビタン補酵素(上)* 日本生化學會, 東京化學同人會 (1975), p.120 (1975).
47. K. Yagi, *Flavins and Flavoprotenis*, Univ. of Tokyo Press (1972).
48. 八木國夫, *Flavinの生化學*, 共立出版株式會社 (1956).
49. R. Kuhn, P. György and T. Wagner-Jauregg, *Ber.* **66**, 317 (1933).
50. I. Banga, A. Szent-György, *Biochem. Z.* **246**, 203 (1932).
51. P. Karrer, H., Salomon, K. Schöpp and E. Schlittler, *Helv. Chim. Acta* **17**, 1165 (1934).
52. R. Kuhn, K. Reinemund, F. Weygand and R. Ströbele, *Ber.* **68**, 1765 (1935).
53. P. Karrer, K. Schöpp, F. Benz and K. Phaehler, *Helv. Chim. Acta* **18**, 69 (1935).
54. O. Warburg and W. Christin, *Biochem. Z.* **298**, 150 (1938).
55. O. Warburg and W. Christin *Biochem. Z.* **298**, 368 (1938).
56. S.M.H. Christie, G.W. Kenner and A.R. Todd, *Nature* **170**, 924 (1952).
57. S.M.H. Christie, G.W. Kenner and A.R. Todd, *J. Chem. Soc.* **46** (1954).
58. F. Kavanagh, R.H. Goodwin, *Arch. Biochim.* **20**, 315 (1949).

59. I.M. Gascoige, G.K. Radda, *Chem. Commun.* **21**, 533 (1965).
60. K. Aki, T. Takagi, T. Isemura and T. Yamano, *Biochim. Biophys. Acta* **122**, 193 (1966).
61. D.W. Miles, D.W. Urry, *Biochemistry* **7**, 279 (1968).
62. G. Tollin, *Biochemistry* **7**, 1720 (1968).
63. 齋炳尙, 東京大學博士學位論文 (1970).
64. F.J. Bullock, and O. Jardetzky, *J. Org. Chem.* **30**, 2056 (1965).
65. R.H. Sarma, P. Dannies and N.O. Kaplan, *Biochemistry*, **7**, 4359 (1968).
66. G. Kotowycz, N. Teng, M.P. Klein and M. Calvin, *J. Biol. Chem.* **244**, 5056 (1969).
67. M. Kainosho and Y. Kyogoku, *Biochemistry* **11**, 1741 (1972).
68. A. Ehnrenberg, *Acta. Chem. Scand.* **11**, 205 (1957).
69. B. Commoner, B. Lippincott, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **44**, 1110 (1958).
70. S. Ghisla, V. Massey, J.M. Zhoste and S.G. Mayhew, *Biochemistry* **13**, 589 (1974).
71. P. Kierkegaard, R. Norrestam, P.E. Werner, I. Csöregy, M. von Glehn, R. Karlsson, M. Leijonmarck, O. Rönquist, B. Stensland, O. Tillberg, L. Torbjörnsson, *Flavins and Flavoproteins* ed. by University Park Press, Baltimore (1971).
72. K. Yagi, Y. Matsuoka, *Biochim. Z.* **328**, 138 (1956).
73. H.A. Harbury, K.A. Foley, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **44**, 662 (1958).
74. K. Yagi, T. Ozawa, K. Okada, *Biochim. Biophys. Acta* **35**, 102 (1959).
75. D. Fleishmann, G. Tollin, *Biochim. Biophys. Acta* **94**, 248 (1965).
76. I. Isenberg, A. Szent-György, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **44**, 857 (1959).
77. J.E. Wilson, *Biochemistry* **5**, 1351 (1966).
78. J.F. Pereira, G. Tollin, *Biochim. Biophys. Acta* **143**, 79 (1967).
79. G. Weber, *Biochim. J.* **54**, 114 (1950).
80. L.D. Wright, D.B. McCormick, *Experientia* **26**, 501 (1964).
81. J.C.M. Tsibris, D.B. McCormick, L.D. Wright, *Biochemistry* **4**, 504 (1965).
82. H.R. Mahler, L. Brand *Free Radicals in Biological Systems* ed. by M.S. Blois *et. al.* Academic Press, New York p.163, (1961).
83. D.E. Fleischman, G. Tollin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **53**, 237 (1965).
84. H. Berinert, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 5323 (1956).
85. H.A. Harbury, K.F. Lanoue, P.A. Loach R.M. Amick, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* **45**, 1708 (1959).
86. Q.H. Gibson, V. Massey, N.M. Atherton, *Biochem. J.* **85**, 369 (1962).
87. T. Sakurai, H. Hosoya, *Biochim. Biophys. Acta* **112**, 459 (1966).
88. P.S. Song, *J. Phys. Chem.* **72**, 536 (1968).
89. P.S. Song, *Photochem. Photobiol.* **7**, 311 (1968).
90. R.M. Hamlin Jr. R.C. Lord and A. Rich, *Science* **148**, 1734 (1965).
91. E. Küchler and J. Derkosch, *Z. Nature* **213**, 209 (1966).
92. J. Pitha, R.N. Jones and P. Pithova, *Can. J. Chem.* **44**, 1045 (1966).
93. J.H. Miller and H.M. Sobell, *J. Mol. Biol.* **24**, 345 (1967).
94. Y. Kyogoku, R.C. Lord and A. Rich, *Biochim. Biophys. Acta* **179**, 10 (1969).
95. R.R. Shoup, H.T. Miles and E.D. Becker, *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **23**, 194 (1966).
96. K.H. Scheit, *Angew. Chem.* **79**, 190 (1967).
97. L. Katz, *J. Mol. Biol.* **44**, 279 (1969).
98. L.G. Whitby, *Biochem. J.* **54**, 437 (1953).
99. J.C.M. Tsibris, D.B. McCormick and L.D. Wright, *Biochemistry* **4**, 504 (1965).
100. G. Weber, *Flavins and Flavoproteins* ed. by E. Slater, Elsevier, Amsterdam, p.15 (1966).
101. L. Casola, A. Giuditta and E. Rocca, *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 57 (1964).
102. K. Yagi, *Frontiers in Physico-Chemical Biology*, Academic Press, Inc., New York p.299 (1978).
103. H. Ohama, N. Sugiura, F. Tanaka and K. Yagi, *Biochemistry* **16**, 126 (1977).
104. H. Ohama, N. Sugiura and K. Yagi, *J. Biochem. (Tokyo)* **73**, 1123 (1973).
105. T. Shiga and K. Yagi, *J. Biochem. (Tokyo)* **74**, 103 (1973).
106. K.H. Tan and R.L. Lovrien, *J. Biol. Chem.* **274**, 278 (1972).

107. K. Nishimoto, Y. Watanabe and K. Yagi, *Biochim. Biophys. Acta* **526**, 34 (1978).
108. K. Yagi, N. Ohishi, K. Nishimoto, J. Dehoi and P-S Song, *Biochemistry* **19**, 1553 (1980).
109. P-S. Song, J.D. Choi, R.D. Fugate and K. Yagi, *Flavines and Flavoproteins*, Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam p.381 (1976).
110. M. Honda, *J. Phys. Soc. Jpn.* **31**, 1196 (1971).
111. C.O. Wilson, O. Gisvold and R.E. Dorege *Text Book of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* Lippincott, Philadelphia Pa. p.47 (1977).
112. T.M. Brody, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **117**, 39 (1956).
113. D.H. Sproull, *Br. J. Pharmacol.* **9**, 262 (1954).
114. J.G. Spenny and M. Brown, *Gastroenterology* **73**, 995 (1977).
115. J.T. Fishgold, J. Field and V.E. Hall, *Am. J. Physiol.* **164**, 727 (1951).
116. J. Levy, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **28**, 338 (1946).
117. J.D.P. Graham and W.A. Parker, *Q.J. Med.* **17**, 153 (1948).
118. F.X. Galen, R. Truchot and R. Michel, *Biochem. Pharmacol.* **23**, 1379 (1974).
119. K. Yagi and T. Ozawa, *Nature* **192**, 70 (1961).
120. K. Yagi., *Flavoproteines* ed by E.C. Slater, Elsevier, Amsterdam p.210 (1966).
121. K. Uehara, T. Misoguchi, S. Hosimi, T. Fujiwara and K. Tomita, *J. Biochem.* **64**, 589 (1968).
122. V. Massey and G. Palmer, *J. Biol. Chem.* **237**, 2347 (1962).
123. E.M. Kosower, *Flavines and Flavoproteins* ed by M.K. Slater, Elsevier, Amsterdam p.1 (1964).