

Harmaline 과 N-Methylmaleimide 의 광화학반응 생성물이 효모 및 광합성 세균의 성장에 미치는 영향

함희석·강대길·최원기
전남대학교 자연과학대학 화학과

Effect on Growth of Yeasts and Photosynthetic Bacteria by Photochemical Product of Harmaline with N-Methylmaleimide

Heui-Suk Ham, Dae-Gil Kang and Won-Ki Choi

Department of Chemistry, College of Natural Science, Chonnam National University,
Kwang-Ju 500-757, Korea

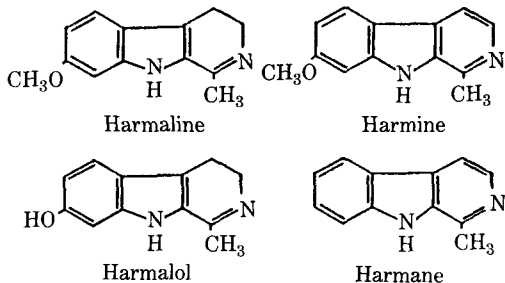
ABSTRACT: The photochemical reaction of harmaline and N-methylmaleimide has been investigated by spectroscopic methods. A photoproduct was isolated from the irradiation mixture of harmaline and N-methylmaleimide. Spectroscopic results suggested that the amine group of harmaline was added photochemically to the double C=C bond of N-methylmaleimide. This synthesized harmaline derivative has a biological toxicity, because it inhibits the growth of some yeasts and photosynthetic bacteria.

KEYWORDS: Harmaline, N-methylmaleimide

β -carboline 유도체들은 많은 종류의 식물에 분포되어 있는 일종의 alkaloid 로써 여러 가지 생물학적 효과를 가지고 있다는 사실이 알려져 있다 (Kobayaschi 등, 1984). 그 예로서 harmaline 은 monoamine oxidase 의 가역적 저해제로써 구충제, 항바이러스 또는 증추홍분제와 같은 생물학적 기능을 가지고 있다 (Antun 등, 1969). 이 화

합물은 광독성을 나타내고 있는 psoralene 과 acridine 화합물처럼 tricyclic system 구조로 되어 있으며 강한 형광을 나타낸다.

Meckenna 등(1981)은 bacteria 와 효모에 의한 bioassay 에서 몇 가지의 β -carboline 유도체들이 광독성을 나타내고 있음을 보고하였다. 이 광독성 메카니즘이 DNA 사이에 끼어든 β -carboline 과의 화학작용에 의한 것으로 예측하고 있으나 지금까지 그들의 광독성에 관한 메카니즘이 확실히 밝혀지지 않고 있다. 그럼에도 최근에 이 β -carboline 의 광독성에 관한 연구가 꾸준히 진행되고 있다 (Chae 등, 1986). 가장 잘 알려진 광독성 화합물인 8-methoxypsoralen 의 광독성 반응 메카니즘에 관한 보고에서는 (Hudson 등, 1986; Kanne 등, 1982) DNA 의 염기와 광고리화 반응이 일어남이 알려졌다고, coumarin 유도체인 5,7-dimethoxycoumarin 도 피리미딘 염기



Scheme 1. Structure of β -carboline alkaloids

와 광고리화 반응이 일어난다는 사실이 알려져 있다(Kanne 등, 1982). 특히 β -carboline 유도체들은 천연의 DNA와는 쉽게 배위하지만 변성된 DNA와는 배위가 되지 않고 RNA와는 천연 DNA의 40% 정도가 배위된다는 사실에 의하면(Shim 등, 1980 및 1983) β -carboline 유도체들의 광독성이 DNA 염기와의 광화학반응에 의한 결과로 생각되지만 그 반응메카니즘이 정확히 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 β -carboline 유도체들의 광독성 메카니즘을 알아보기 위하여 DNA의 가장 단순한 모델인 fumalonitrile과 harmaline의 광화학반응을 참고로(Shim 등, 1982)하며 역시 DNA의 간단한 모델인 N-methylmaleimide와 harmaline과의 광화학반응과 여기에서 합성되어진 harmaline의 N-methylmaleimide 유도체의 존재하에서 효모와 광합성 세균을 배양하여 이들의 성장에 미치는 harmaline 유도체의 영향을 관찰하였다.

材料 및 方法

시약 및 용매

Harmaline과 N-methylmaleimide는 Aldrich Co. 시약을 그대로 사용하였으며, TLC 및 Column chromatography용의 Silica Gel은 Merck제 Kiesel Gel 60 GF254와 Kiesel Gel 60을 각각 사용하였다. 그 외 일반 용매들은 Junsei Chemical Co. 일급시약을 더 이상 정제하지 않고 그대로 사용하였다.

광원 및 기기

350 nm 형광램프를 끼운 Raynot Photochemical Reactor(Model RPR-100)에 Merry-G-round 장치를 이용해서 시료를 Pyrex tube에 넣고 반응을 시켰으며, 분석기기로는 UV-vis Spectrophotometer(Hitachi model 557), IR-Spectrophotometer(Jasco model 302), HPLC(Waters model 244), GC/Mass(Ane-lva Te-600S)를 사용하였다.

N-methylmaleimide와 Harmaline의 광반응

Harmaline의 자외선의 최대 흡수파장은 375 nm 이고, N-methylmaleimide의 최대 흡수파장은 260 nm에서 나타나므로 375 nm에서의 흡광도

감소로서 광반응 진행여부를 확인하였고, HPLC에 의해 광반응 생성물을 확인하였다. Harmaline 50 mg(4×10^{-4} M)과 N-methylmaleimide 60 mg(1×10^{-3} M)을 메탄올 500 ml에 녹인 다음 15분 동안 질소를 통과시켜 산소를 제거하고, UV 조사시간에 따른 흡광도 변화를 매시간마다 측정하였다. 더 이상의 흡광도 변화가 없는 20시간을 반응시켜 그 생성물을 분리하였다.

Harmaline과 N-methylmaleimide의 광반응 생성물의 분리 및 확인

TLC에서 전개 용매로 cyclohexane : acetone : dimethylamine(50/45/5 v/v)을 사용하였고, HPLC에 의해서는 100% 메탄올을 용매로 사용해서 광반응 생성물을 확인하였으며, 주생성물은 길이 38 cm, 내경 4 cm인 column chromatography에 의해서 분리 정제하였다.

효모 및 광합성 세균의 배양

효모로는 *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619와 *Saccharomyces cerevisiae*를 YEPD 배지(1% Yeast extract, 2% Peptone, 2% Dextrose)에서 30°C를 유지시키고, 배양하여 성장곡선을 그렸다. 광합성 세균은 *Rhodospirillum rubrum* K-7을 변형된 Omerod 배지(Bae 등, 1983)에서 Ar 대기의 혐기성 조건에서 30°C, pH 6.8 약 12,000 Lux의 빛을 쬐어주면서 배양하여 성장곡선을 그렸다. Harmaline 유도체가 균의 성장에 미치는 영향을 관찰하기 위해 각각 100 μ M의 harmaline 유도체 존재하에서 같은 조건으로 균을 배양하였다.

結果 및 考察

N-methylmaleimide를 가하지 않았을 때(Fig. 1)와 가하였을 때(Fig. 2)의 350 nm 빛을 쬐었을 때의 시간에 따른 harmaline 흡수 스펙트럼의 변화를 보면 375 nm에서 흡광도가 점차 감소하였으며, 이것으로 광반응 진행의 척도로 하였다. Fig. 3은 harmaline의 최대 흡수파장인 375 nm에서 시간에 따른 흡광도 변화를 도시한 것으로 harmaline만의 것과 비교 표시하였다. N-methylmaleimide와 harmaline 사이의 광생성물 여부를 확인하기 위하여 빛을 쬐은 후의 반응

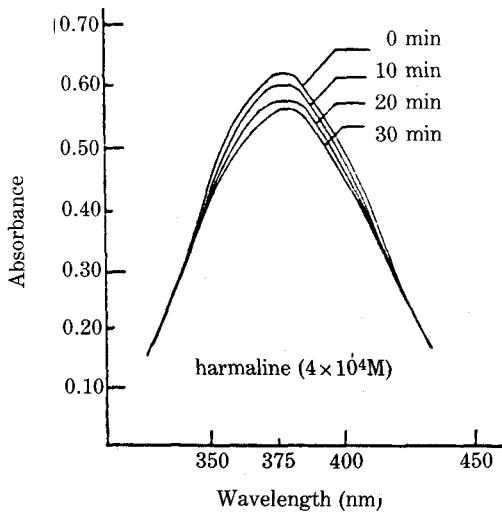


Fig. 1. UV spectrum change of harmaline with various irradiation time.

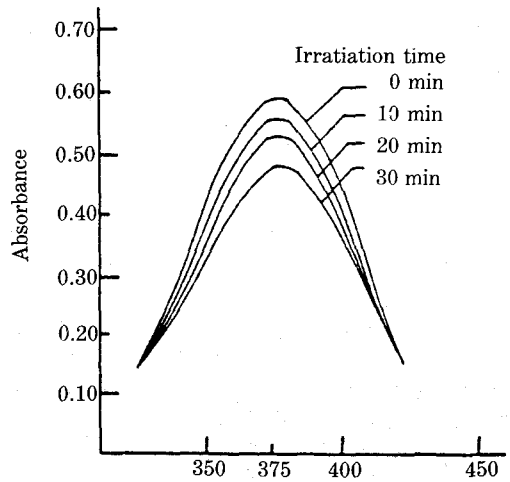


Fig. 2. UV spectrum change of harmaline and N-methylmaleimide mixture with various irradiation

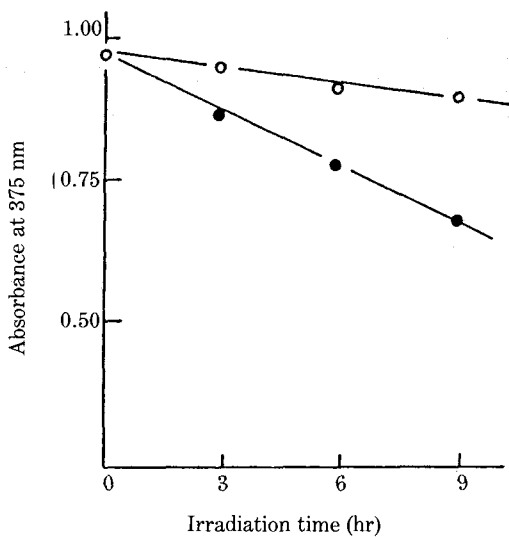


Fig. 3. Absorbance change of harmaline (-o-) and a harmaline-N-methylmaleimide (-●-) at 375 nm as a function of irradiation time.

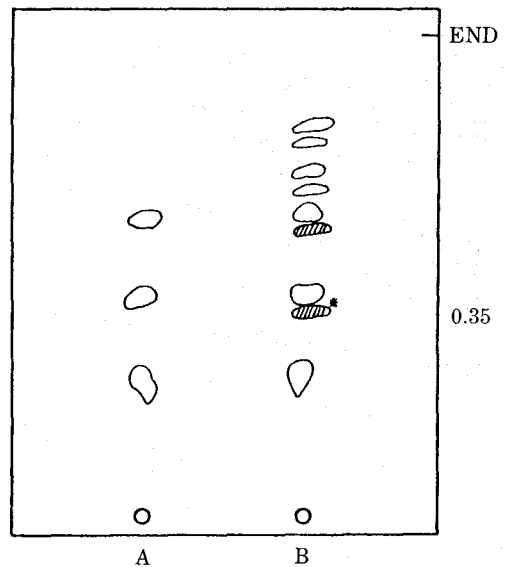


Fig. 4. TLC analysis of photolysis product A: harmaline + N-methylmaleimide before irradiation, B: harmaline + N-methylmaleimide after irradiation Eluent: cyclohexane/acetone/diethylamine (50/45/10, v/v).

물을 TLC로 분석하고 그 결과를 Fig. 4에 표시하였다. 또 Fig. 5에 HPLC로 확인한 결과를 나타내었다. 광생성물로 생각되는 물질 ($R_f=0.35$)을 Column chromatography로 분리해서 용매를 제거한 후 얻은 결정성생물의 녹는 점은 $215-217^{\circ}\text{C}$ 였다. Fig. 6은 광생성물의 자외선 스펙트럼으로

harmaline의 스펙트럼과 비슷하나 302 nm 에서 shoulder가 나타났고, 260 nm 의 흡수파장이 250 nm 흡수파장으로 이동됨을 보였으며, harmaline의 기본구조에 변화가 없었고 염기 영향도 받지 않

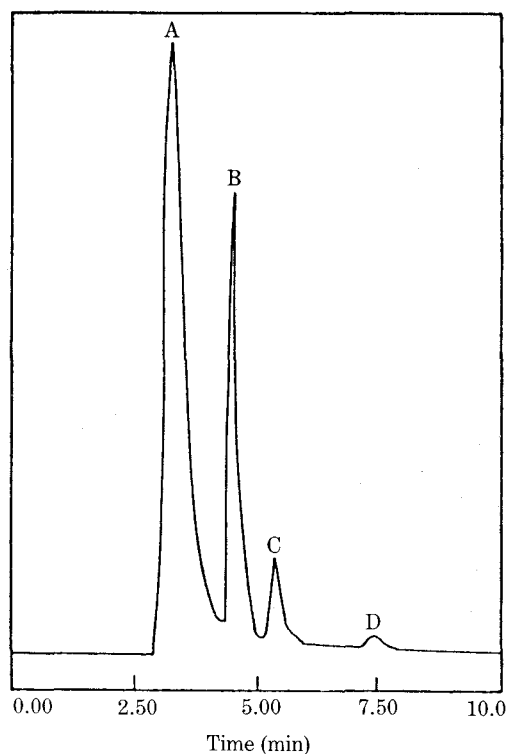


Fig. 5. HPLC analysis of photolysis product. A: N-methylmaleimide after irradiation, B: product, C: by-product, D: harmaline after irradiation.

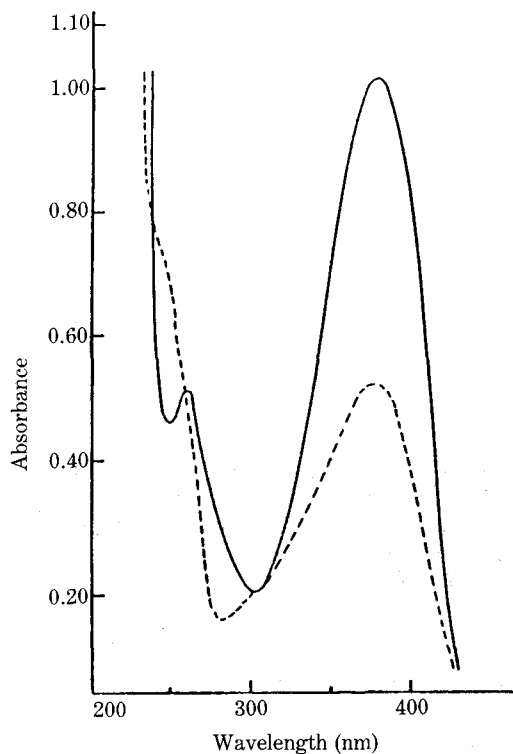


Fig. 6. UV absorption spectrum of harmaline-N-methylmaleimide photoproduct. — harmaline + N-methylmaleimide before irradiation, ----harmaline + N-methylmaleimide after irradiation

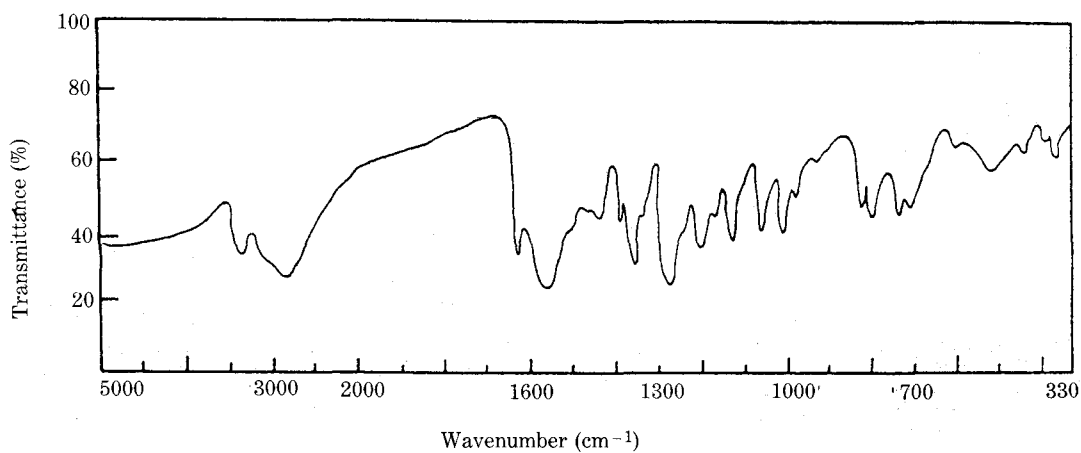


Fig. 7. IR spectrum of harmaline.

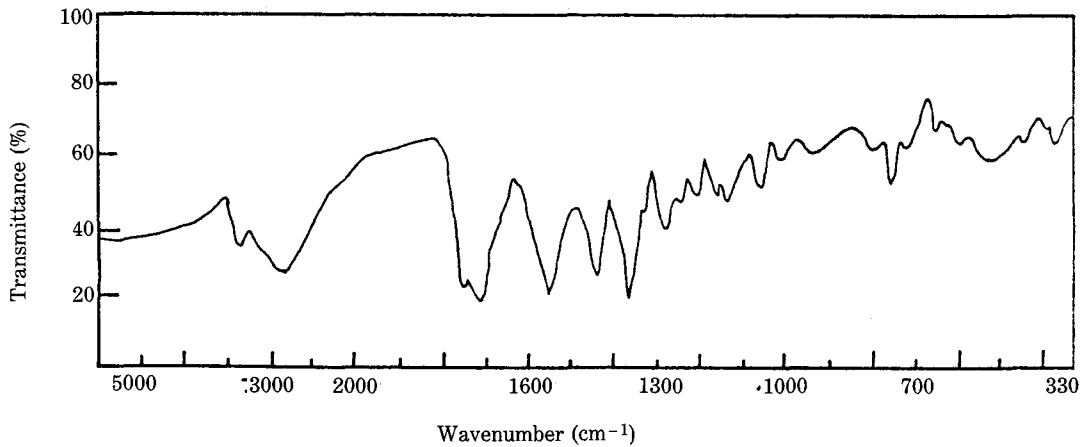


Fig. 8. IR spectrum of harmaline-N-methylmaleimide.

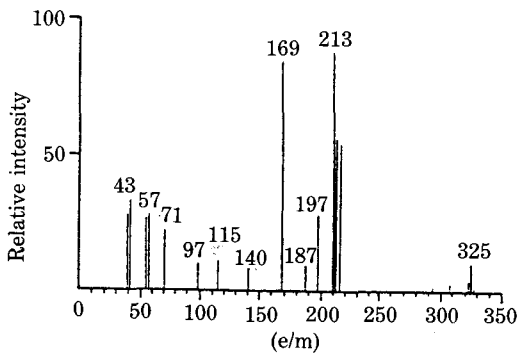


Fig. 9. Mass spectrum of harmaline-N-methylmaleimide photoproduct.

는 것으로 보아 이차아민의 수소가 다른 작용기로 치환되었음을 알 수 있었다. Harmaline의 IR 스펙트럼 (Fig. 7)과 광부가 생성물의 IR 스펙트럼 (Fig. 8)에서는 전체적으로 스펙트럼의 모양에 변화가 있었는데 특히 $1700\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ 에서 강한 C=O band가 나타났고, N-H 신축운동의 band가 없어졌다. Fig. 9의 광생성물의 질량분석 스펙트럼은 모이온이 325에 나타났는데 이것은 harmaline과 N-methylmaleimide의 분자량의 합과 같고, 213 peak는 harmaline 이온의 질량수와 일치하였다. 이와 같은 결과로 보아 Harmaline과 N-methylmaleimide 사이의 광반응은 n-methylmaleimide의 C=C 결합에 harmaline amine기의 질소가 부가된 생성물로서 harmaline과 fumaronitrile 사이의 반응 결과 (Ham 등,

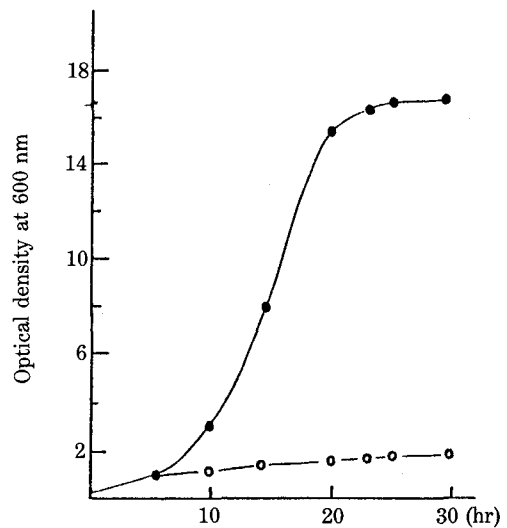


Fig. 10. Growth curve of *Candida pseudotropicalis* ATCC 8619. -●- growth in normal condition, -○- growth in $100\mu\text{M}$ harmaline derivative.

1987)와 일치하고 있다. 이러한 부가반응으로 잘 알려진 예는 9-phenanthrenecarbonitrile과 diethylaminyl에 자외선을 쬐었을 때 amine에서 수소가 제거되고 -aminoradical이나 dialkylaminyl을 형성하여 비극성 용매에서 free radical 반응이 일어나 광부가 생성물이 얻어진다는 보고 (Lewis 등, 1981)가 있는데 본 실험결과도 harmaline과 fumaronitrile 사이의 반응결과와

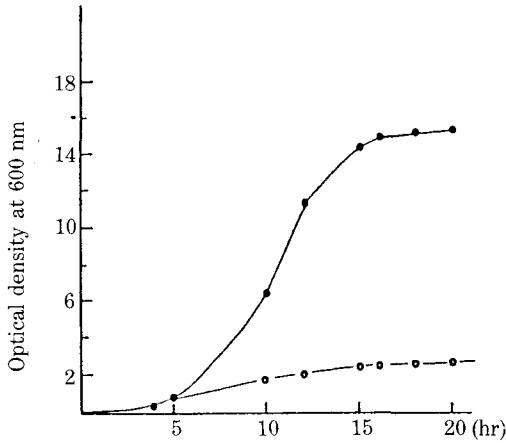


Fig. 11. Growth curve of *saccharomyces cerevisiae*. -●- growth in normal condition, -○- growth in 100 μM harmaline derivative.

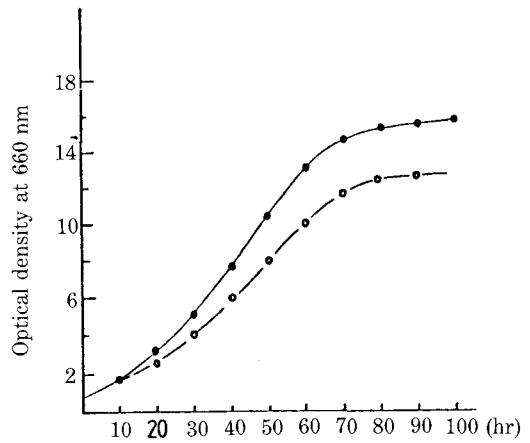
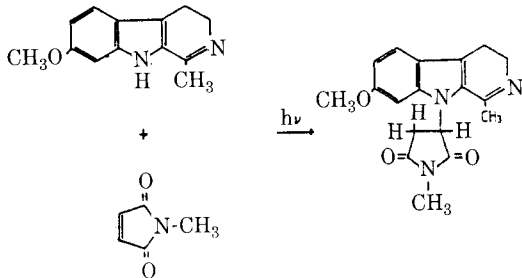


Fig. 12. Growth curve of *Rhodospseudomonas sphaeroides* K-7. -●- growth in normal condition, -○- growth in 100 μM harmaline derivative.

같이 다음과 같은 반응메카니즘에 의한 결과라고 생각한다.



이러한 광부가 반응에 의해 합성되어진 harmaline 유도체가 생체내에서 독성을 가지는지의 여부를 보기 위하여 합성된 harmaline 유도체 존재하에서 효모, *Candida pseudotropicalis* 와 *Saccharomyces cerevisiae* 및 광합성 세균 *Rhodospseudomonas sphaeroides* 를 배양한 결과 효모의 경우는 거의 성장을 하지 못하였고 (Fig. 10, 11) 통성 혐기성 자색 비유황 광합성 세균인 *Rhodospseudomonas sphaeroides* 의 경우는 성장은 하지만 다소 억제가 됨을 보였다 (Fig. 12). 이와 같이 harmaline 의 N-methylmaleimide 유도체가 효모와 광합성 세균의 성장을 억제시킴으로 보아 생물학적 활성을 가지고 있는 것으로 생각되어 진다.

結 論

Harmaline 과 N-methylmaleimide 에 자외선을 쬐여 TLC 와 Column chromatography 에 주생성물을 분리한 분석결과로 다음의 결과를 얻었다.

1. 자외선 흡수 스펙트럼으로부터는 harmaline 의 기본구조에 변함이 없었고 염기에 대해서도 스펙트럼의 변화가 없었다.
2. 적외선 흡수 스펙트럼으로부터는 C=O 흡수 peak 를 볼 수 있었고 이차 아민의 peak 는 없어졌다.
3. 질량분석 스펙트럼으로부터는 분자 이온 peak 가 325에서 관찰되었다.
4. 이상의 결과에 의해 harmaline 과 n-methylmaleimide 의 광반응은 harmaline 의 아민기가 N-methylmaleimide 의 C=C 결합에 부가되는 생성물이 일어났음을 알 수 있다.
5. 몇 가지 효모 및 광합성 세균의 성장에 harmaline 유도체가 저해제로 작용하는 것으로 보아 합성되어진 harmaline 의 N-methylmaleimide 유도체가 생물학적인 독성을 가짐을 나타내었다.

摘 要

N-methylmaleimide 와 Harmaline 의 혼합용액에서 자외선을 조사시켜 합성한 주생성물을 분광학적으로 분석하였다. 그 결과 harmaline 의 아민기와 N-methylmaleimide 의 탄소-탄소 이중결합 사이에 광부가 반응을 한 harmaline 의 N-methylmaleimide 유도체가 얻어졌으며 이 유도체는 몇 가지의 효모 및 광합성 세균의 성장을 억제하므로 생물학적 독성을 가지고 있는 것으로 보여진다.

參考文獻

- Antun, F. and Smythies, J.R. (1969): Binding of tryptamine and allied compounds to nucleic acids. *Nature* **223**: 1001-1073.
- Bae, M. and Lee, J.K. (1983): A study on physiological conditions for hydrogen evolution by rhodospseudomonas sphaeroides K-7. *Kor. J. Microbiol.* **21**(3): 109-114.
- Chae, K.H. and Ham, H.S. (1986): Production of singlet oxygen and superoxide anion radicals by β -carbolines. *Bull. Korean Chem. Soc.* **7**(6): 478-479.
- Chae, K.H. (1986): Evidence for photochemical radical formation by β -carbolines. *Bull. Korean Chem. Soc.* **7**(3): 253-254.
- Ham, H.S., Yoon, W.I. and Chae, K.H. (1987): Photochemical reaction of harmaline and fumaronitrile. *J. Research In. Catalysis (CNU)* **9**: 55-60.
- Hudson, J.B., Graham, E.A. and Towers, G.H.N. (1986): Antiviral effect of harmine, a photoactive β -carboline alkaloids. *Photochem. Photobiol.* **43**: 21-26.
- Kanne, D., Straub K., Rapoport H. and Hearst, J.E. (1982): Psoralen-Deoxyribonucleic acid photoreaction. *Biochemistry* **21**: 861-871.
- Kobayashi, J., Harbour, G.C., Gilmore, J. and Rinehart, K.L. (1984): Eudistomins A, G, H, I, J, M, N, O, P and Q, bromo-, hydroxy-, pyrrolyl-, and 1-pyrrolynyl- β -carboline from the antiviral caribbean tunicate eudistoma olivacetum. *J. Am. Chem. Soc.* **106**: 1526-1528.
- Lewis, F.D. and Corra, P.E. (1981): On the formation of aminyl vs. aminoalkyl radicals in the photooxidation of diethylamine. *J. Am. Chem. Soc.* **103**: 7347-7349.
- Mckenna, D.J. and Towers, G.H.N. (1981): Ultra-Violet mediated cytotoxic activity of β -carboline alkaloids. *J. Photochem.* **20**: 1001-1004.
- Shim, S.C. and Kim, Y.Z. (1983): The photocycloaddition reaction of 8-methoxypsoralen with olefins. *J. Photochem.* **23**: 83-92.
- Shim, S.C., Koh, H.Y. (1982): A study on phototoxic compounds. *Prog. in Chem. and Chem. Ind.* **22**: 136-155.
- Shim, S.C., Ra, C.S. and Chae, K.H. (1980): Photocycloaddition of 5,7-dimethoxycoumarin to 5-fluorouracil. *Bull. Korean Chem. Soc.* **1**(4): 121-123.

Accepted for Publication 15 November 1989