

화학적, 대사적 산화반응 중 생성되는 S-oxide를 이용한  
O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1) 의  
독성 기작에 관한 연구

허장현\* · T. R. Fukuto\*\* , 한대성\*\*\*

Study of the possible mode of action of  
O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate via the formation  
of S-oxide in : chemical and metabolic oxidation systems

J. H. Hur\*, T. R. Fukuto\*\* and D. S. Han\*\*\*

Abstract

O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate [ $LD_{50}$  (rat, oral) 4.6mg/kg ;  $K_i$ (bovine erythrocyte acetylcholinesterase)  $303 M^{-1} min^{-1}$ ] was selected as a model compound to study the mode of action of O, S-dialkyl alkylphosphonothioates which have been hypothesized to be toxic via a bioactivation process. Two chemical oxidants, meta-chloroperoxybenzoic acid and monoperoxyphthalic acid, and rat liver microsomal oxidases were used to mimic the action of mixed function oxidases on the model compound. The formation of S-oxide, a very unstable active intermediate, was proposed based on the identification of metabolic products. Furthermore, a trapping experiment with ethanol showed that the unstable intermediate S-oxide had the ability to phosphorylate acetylcholinesterase which is an important enzyme in nerve systems. The S-oxide intermediates are presumed to be responsible for the toxicity of O,S-dialkyl alkylphosphonothioates.

---

\*Pesticide Chemistry and Toxicology Laboratory, Department of Entomological Sciences  
University of California, Berkeley, CA 94720, U. S. A.

\*\* Department of Entomology, University of California, Riverside, CA 92521, U. S. A.

\*\*\* 강원대학교 농과대학 농화학과 (Department of Agricultural Chemistry, Kangweon National University, Chuncheon, 200-701)

## 緒 言

유기인계 화합물은 현재 국내에서 사용되고 있는 농약 중 가장 많은 종류와 양이 사용되고 있는데 살충제를 비롯하여, 살균제, 살선충제, 제초제 등의 형태로 사용되고 있으며,<sup>(1)</sup> 기타 의학분야에서도 일부 이용되고 있다.<sup>(2)</sup> 일반적으로 유기인계 농약은 약제 그 자체가 독성을 지니고 있기 보다는 체내에서의 활성화 작용을 통하여 이들의 독성을 발현하는 것으로 알려져 있는데, 그중 phosphorothionate 계열에 속하는 parathion, sumithion, malathion 등의 약제들은 체내에서 mixed function oxidases에 의한 desulfuration 과정을 겪으면서 paraoxon, sumioxon 그리고 malaoxon 등의 독성이 강한 분자형태로 변환되면서 효과적인 살충 효과를 보이게 된다.<sup>(2)</sup> 반면 methamidophos, profenophos 등의 S-alkyl moiety를 함유하는 phosphorothiolates 계열의 약제들은 아직 정확한 독성기작이 정립되어 있지 않다. 다만 Eto 등이 제안한 가설에 근거한 여러가지 간접적인 실험적 증거를 통하여 sulfoxidation의 과정을 거치면서 생성될 수 있는 methamidophos S-oxide<sup>(3)</sup> 또는 profenophos S-oxide<sup>(4)</sup> 등의 산화 중간 생성물들이 이 계열 약제들의 독성기작을 설명하는 주요 물질들일 것이라고 추측이 되고 있다. Segall 등(1982)<sup>(5)</sup>은 화학적 산화제인 meta-chloroperbenzoic acid(MCPBA)를 사용하여 phosphorothiolate esters의 산화 생성물들중 주 생성물로 sulfonic-phosphoric acid anhydride를 찾아냈는데, 그들은 이 anhydride의 생성이 산화반응 중 1차적으로 생성될 것으로 추정되었던 S-oxide 형태의 중간물질을 경유할 것이라는 가정 아래 S-oxide의 존재를 간접적으로 입증하였다. Thompson 등(1984)<sup>(6)</sup>은 산화반응물에 대한 <sup>13</sup>C-NMR spectrum을 해석하면서 S-oxide가 가질 수 있는 diastereoisomeric 구조적 특성을 이용하여 methamidophos S-oxide의 존재를 설명하였다.

한편 1984년 Armstrong 등<sup>(7)</sup>은 포유동물에 대해 강력한 독성을 지니고 있는 O-alkyl S-alkyl alkylphosphonothioate 계열의 화합물들에 대한 체계적인 *in vitro*와 *in vivo* 실험에 대한 결과를 보고했다. *In vitro* 실험에서는 여러가지 sources로 부터 얻어진 acetylcholinesterases에 대한 이러한 약제들의 bimolecular inhibition rate constant( $k_i$ )를 측정해 했는데,

전반적으로 극히 낮은 저해율( $K_i=10^8 M^{-1}min^{-1}$ )을 보이고 있었다. 그러나 *in vivo* 실험에서는 전형적인 cholinergic 증상과 함께 강한 독성을 나타냈을 뿐 아니라, 약제 투여 후 분석된 혈액 중 acetylcholinesterase의 활성이 심하게 저해되는 것이 관찰되어졌다. 이렇게 *in vitro*와 *in vivo*에서의 acetylcholinesterases 저해에 대한 결과가 큰 차이를 보이고 있는 것으로 미루어 보아, 이러한 약제들이 독성을 나타내기 위하여 체내에서 mixed function oxidases에 의한 활성화 과정, 즉 sulfoxidation 과정을 거치는 것으로 유추되어졌다.<sup>(7,8)</sup>

본 실험에서는 독성이 매우 강한 유기인계 화합물로 알려진 O-alkyl S-alkyl alkylphosphonothioates의 체내에서의 가능한 작용기작(the mode of action)과 대사 중 생성될 수 있는 독성이 강한 active metabolites, 특히 S-oxide의 존재를 구명하기 위해 수행되었다. 한편 본 실험을 위한 model 화합물로 O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate(1)을 선정하였으며, MCPBA와 monoperoxyphthalic acid(MMPP) 등의 화학산화제와 쥐의 간에서 추출된 microsomal 산화 system, 그리고 nucleophile을 이용한 trapping method 등의 실험이 수행되었다. 반응생성물들의 분석을 위하여 <sup>13</sup>C과 <sup>31</sup>P-NMR 그리고 GC-MS가 이용되었다.

## 材料 및 方法

### 1. 합성 표준 물질

1) O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1), <sup>13</sup>C-enriched O-ethyl S-[<sup>13</sup>C]-methyl ethylphosphonothioate (<sup>13</sup>C-1), O-ethyl ethylphosphonic acid(2), O-ethyl ethylphosphinyloxymethylsulfonate (3), 그리고 O-ethyl ethylphosphonic acid anhydride(4)의 합성 방법은 본 실험과 병행하여 수행된 Hur 등의 보고<sup>(11)</sup>에 요약되어 있다.

2) O,O,O-Trimethyl phosphate의 합성을 위하여 7.67g의 phosphorus oxychloride(0.05 mole)를 -5°C~0°C를 유지하고 있는 200ml 3구 반응 flask내 methanolic sodium methoxide(9.18 g, 0.17 mole in 25 ml methanol, Aldrich Chemical Co.) 용액에 서서히 첨가하였다. 반응 혼합물을 상온으로 도달하게 한 후 30분 동안 reflux를 시켰다.

생성된 염(NaCl)을 제거하기 위하여 여과(Whatman No. 2)를 행한 후, rotary evaporator를 이용하여 용매를 제거하였다. 일반 증류방법을 이용하여 5.9g의 O,O,O-trimethyl phosphphate(85% 수율)를 얻었다. Bp 193~196°C(lit. bp 197°C);  $n_D^{25}$  1.3962(lit.  $n_D^{25}$  1.3958)<sup>(12)</sup>; NMR,  $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>: 3.8 (OCH<sub>3</sub>, doublet, 9H). O, O, S-Trimethyl phosphrothioate는 Toia 등<sup>(13)</sup>이 합성한 것을 일부 분량 받아 사용하였다.

3) O,O-Diethyl ethylphosphonate의 합성을 위하여 107g의 triethyl phosphite(0.65 mole, Aldrich Chemical Co.), 3.2g의 ethyl iodide(0.02 mole, Aldrich Chemical Co.) 그리고 200ml의 무수 ethyl alcohol(Quantum Chemical Co.)을 500ml round bottom flask에 첨가하여 24시간 동안 reflux시켰다. Rotary evaporator를 사용하여 용매인 ethyl alcohol을 제거한 후, 감압 증류를 행하여 100.5g의 O,O-diethyl ethylphosphonate(85% 수율)를 얻었다. Bp 60~64°C/1.7mm Hg; NMR,  $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>: 4.2 (OCH<sub>2</sub>, multiplet, 4H), 2.0(PCH<sub>2</sub>, doublet of quartets, 2H), 1.3(OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, multiplet, 6H), 1.2(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>, double triplet, 3H).

## 2. 사용기기

Proton nuclear magnetic resonance(<sup>1</sup>H-NMR) spectra를 얻기 위하여 Varian EM-390 spectrometer(Varian)와 QE-300 spectrometer(General Electric)가 사용되었으며, internal standard로 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였다. <sup>13</sup>C과 <sup>31</sup>P-NMR spectra를 얻기 위하여 Fourier Transform 기능이 부착된 QE-300 spectrometer(General Electric)와 NT-300 spectrometer(Nicolet)를 사용하였으며, <sup>31</sup>P-NMR spectra의 external standard로 phosphoric acid가 사용되었다.

본 실험을 위해 합성된 화합물과 대사 생성물들의 분자구조를 확인하기 위하여 Gas Chromatograph(Hewlett-Packard 5790 A series)가 부착된 Finnegan 3500 mass spectrometer를 사용하였으며, sample은 1  $\mu$ l를 주입하였다.

Refractive indices는 refractive index apparatus(Carl Zeiss Option)를 사용하여 상온(23°C)에서 측정하였다.

## 3. 화학적 산화반응

1) MCPBA 산화반응<sup>(3,9,10)</sup>: 본 실험을 위하여 사용된 MCPBA(85% Aldrich Chemical Co., # C6, 270-0)의 정제는 Fieser 등(1967)이 보고한 방법<sup>(14)</sup>에 의해 행해졌다. O-ethyl S-methyl ethylphosphorothioate (1) 또는 <sup>13</sup>C-enriched O-ethyl S-[<sup>13</sup>C]-methyl ethylphosphorothioate(<sup>13</sup>C-1) (73 mg, 0.43 mmole)를 5ml의 CDCl<sub>3</sub> 용매가 들어 있는 10ml 시험관에 넣고 잘 섞은 후, ice bath를 이용하여 저온을 유지하면서 MCPBA(148mg, 0.86 mmole)를 서서히 첨가하였다. 시험관 내의 발열반응이 끝난 후, 시험관을 밀봉하여 상온에서 4시간 동안 교반하였다. 반응물을 12 mm NMR tube에 옮겨 <sup>31</sup>P-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR 분석을 행하였다.

위의 산화반응 생성물에 탈산화제인 trimethyl phosphite(213 mg, 1.72 mmole)를 첨가하고, N<sub>2</sub> 가스로 시험관 내의 여분의 산소를 제거한 후 다시 밀봉하여 72시간을 반응시켰다.<sup>(6, 15)</sup> 반응물을 <sup>31</sup>P-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR을 이용하여 분석하였다.

2) NMPP 산화반응: O-ethyl S-methyl ethylphosphorothioate (1) 또는 <sup>13</sup>C-enriched O-ethyl S-[<sup>13</sup>C]-methyl ethylphosphorothioate (<sup>13</sup>C-1) (73 mg, 0.43 mmole)를 0.5ml의 acetone과 3 ml의 deuterium oxide가 들어있는 10 ml 시험관에 넣고 잘 섞은 후, ice bath를 이용하여 저온을 유지하면서 1.5 ml의 deuterium oxide에 용해되어 있는 MMPP(123.7 mg, 0.2 mmole, Aldrich Chemical Co., # 28,320)를 서서히 첨가하였다. 시험관을 잘 밀봉하여 상온에서 4시간 동안 반응 시킨 후, 반응물을 <sup>31</sup>P-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR을 이용하여 분석하였다.

## 4. 대사적 산화반응

쥐의 간 microsome을 준비하기 위하여 5마리의 female Sprague-Dawley albino rats(140~160g)가 사용되었다. 사용된 쥐들로부터 간을 얻기전에 사흘동안 sodium phenobarbital(100mg/kg, ip, daily)을 주사하여 microsomal oxidases의 활성을 유도하였다. 준비된 간은 0.9% NaCl 용액으로 잘 세척하였고, 잘게 자른 후 1.15% KCl 용액과 함께 motor-driven Potter-Elvehjem glass homo-

genizer를 사용하여 충분히 마쇄하였다. 이 마쇄물들을 Sorvall RC-2 냉동 원심분리기를 이용하여 10,000g에서 30분 동안 원심분리한 후, 상층액을 다시 Beckman L2-50 Ultracentrifuge를 이용하여 100,000g에서 1시간 동안 원심분리하여 침강된 microsome pellets를 대사적 산화반응에 이용하였다.

반응 구성물질들은 0.1M tris-HCl buffer(pH 7.8, 5ml), glucose-6-phosphate(G-6-P, 10 mM, Sigma Chemical Co., # G 7375), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH, 5 mM, Sigma Chemical Co., # N 1630), G-6-P dehydrogenase(10 EU, Sigma Chemical Co., # G 7750), 쥐 간 microsome pellet(175 mg/wet weight) 그리고 model 화합물 1 또는 <sup>13</sup>C-1(1.69 mg, 2mM)로서 25ml Erlenmeyer flask을 이용하여 37.5°C에서 2시간 동안 반응을 시켰다. 1 ml의 acetone을 넣어 반응을 중지시킨 후, 반응물을 12 mm NMR tube에 옮겨 <sup>31</sup>P-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR분석을 행하였다.

5. Ethanol을 이용한 trapping 방법(3,9,10)

MCPBA 산화 반응 중 생성되는 것으로 추측되는 S-oxide의 존재를 확인하기 위하여, model 화합물 1 또는 <sup>13</sup>C-1(73.0 mg, 0.43 mmole)을 MCPBA(148 mg, 0.86 mmole)와 함께 2.5ml CDCl<sub>3</sub>와 2.5ml ethanol이 존재하는 시험관에서 4시간 동안 상온에서 반응을 시켰다. 반응물은 <sup>31</sup>P-NMR과 <sup>13</sup>C-NMR을 사용하여 분석하였다.

結果 및 考察

1. MCPBA를 이용한 화학적 산화

Thiono 또는 thio phosphorus esters 등의 유기인계 화합물에 대한 mixed function oxidases의 역할을 *in vitro*에서 화학적으로 재현하기 위하여 여러가지 종류의 산화제들이 사용되어 왔는데, 그중 MCPBA가 가장 잘 알려져있다.<sup>(2)</sup> Model 화합물인 1의 화학적 산화반응물들을 관찰하기 위해, 화학 산화제인 MCPBA를 1과 함께 CDCl<sub>3</sub> 용매 하에서 4시간, 상온에서 반응한 뒤 얻어진 <sup>1</sup>H decoupled <sup>31</sup>P-NMR spectrum은 Figure 1와

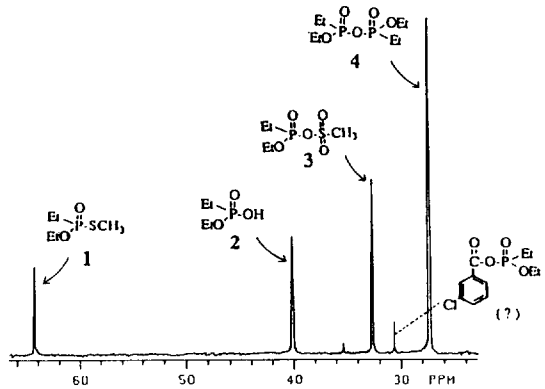


Fig. 1. <sup>31</sup>P-NMR spectrum of the chemical oxidation mixture(1+MCPBA, 1 : 2 : CDCl<sub>3</sub> ; 4 hrs. at room temperature).

같다. <sup>31</sup>P-NMR spectrum에서 네개의 주된 peaks가 관찰되었는데, 이들은 본 실험을 위해 합성된 표준물질들의 chemical shifts와 비교하거나 또는 표준물질들을 산화반응물에 첨가하는 spiking test에 의하여, 각각 7%의 미반응 전구물질 1(64.28 ppm), 17%의 O-ethyl ethylphosphonic acid(2, 40.15 ppm), 15%의 O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate(3, 32.65 ppm), 66%의 O-ethyl ethylphosphonic acid anhydride (4, 27.33과 27.41 ppm)로 확인되었다.<sup>(11)</sup> 그외 30.68 ppm에서 관찰된 작은 peak는 chemical shift를 고려한 결과 O-ethyl ethylphosphonic-m-chlorobenzoic acid anhydride로 추정되었다.<sup>(6)</sup> O-ethyl ethylphosphonic acid anhydride (4)의 인원자에서 두개의 chemical shifts가 관찰된 것은, anhydride 구조의 이 산화생성물 (4)가 두개의 diastereoisomeric form으로서 존재할 수가 있기 때문인 것으로 설명이 되어진다.<sup>(6)</sup> 이상의 산화반응물에 3가의 유기인계 탈산소제(oxygen scavenger)인 trimethyl phosphite(4당량)을 첨가한 후 상온에서 72시간을 다시 반응시킨 결과, 많은 반응생성물들이 관찰되었다. [Figure 2(A)]. 산화반응물에서 확인되었던 미반응 전구물질인 1을 비롯하여, 2, 3, 4등이 각각 61.55 ppm, 37.97 ppm, 32.05 ppm 그리고 26.59와 26.73 ppm에서 관찰되었으며, 그외 O,O,S-trimethyl phosphorothioate와 O,O,

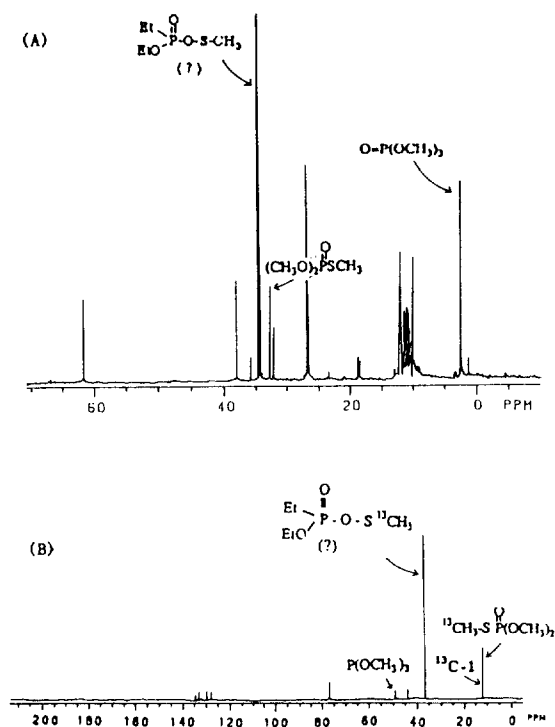


Fig. 2. <sup>31</sup>P-NMR(A) and <sup>13</sup>C-NMR(B) spectra of the reaction mixture(the oxidation mixture of 1 or <sup>13</sup>C-1 with MCPBA+trimethyl phosphite, 1 : 4 ; CDCl<sub>3</sub> ; 72 hrs, at room temperature).

O-trimethyl phosphate가 각각 32.57 ppm과 2.37 ppm에서 합성된 표준물질을 이용한 spiking test와 GC-MS 분석에 의해 확인되었다. O,O,S-trimethyl phosphorothioate와 O,O,O-trimethyl phosphate의 생성 경로는 Eto 등 (1977)<sup>(3)</sup>의 가설을 기초하여 설명되어 질 수 있었다. 한편 Thompson 등 (1984)<sup>(6)</sup>과 Chukwdebe (1987)<sup>(15)</sup>가 관찰한 S-oxide의 탈산소화로 인한 반응전구물질의 증가는 본 실험에서는 관찰하지 못했는데, 다만 3의 현격한 감소와 함께 34.26 ppm에서 새로운 주 peak가 관찰되었다. 이는 3으로부터 trimethyl phosphite의 탈산소작용에 의해 생성된 O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate로 추정되었다.[Figure 2(A)]. 그러나 GC-MS 분석에서 이 탈산소 생성물의 존재를 확인할 수 없었는데,

이는 이 anhydride(O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate)의 GC-MS system 내에서의 불안정성에 기인하는 것으로 생각 되고 있다. 이러한 탈산소생성물이 3으로 부터 생성되는가를 확인하기 위하여 보충실험을 실시했는데, CDCl<sub>3</sub>의 용매 하에 3(108 mg, 0.5 mmole)과 trimethyl phosphite(248.0 mg, 2.0 mmole)를 상온에서 72 시간 반응을 시킨 후 이를 <sup>31</sup>P-NMR로 분석하였다. 해당 <sup>31</sup>P-NMR spectrum에서 미반응 물질 3이 33.26 ppm, O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate로 추정되는 탈산소 생성물이 33.95 ppm에서 각각 관찰되었고, O,O,O-trimethyl phosphate도 2.41 ppm에서 확인되었다.

CDCl<sub>3</sub> 용매 하에서 <sup>13</sup>C-enriched O-ethyl S-[<sup>13</sup>C]-methyl ethylphosphonothioate (<sup>13</sup>C-1)와 2 당량의 MCPBA를 4시간동안 상온에서 반응시킨 후 얻어진 <sup>1</sup>H decoupled <sup>13</sup>C-NMR spectrum의 결과로부터 11.99와 12.04 ppm에서 미반응 전구물질 (1), 39.26 ppm에서 O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate (3), 그외 40.81 ppm과 44.84 ppm 등에서 미확인 반응생성물들이 관찰되었다. 이 산화반응물에 4당량의 trimethyl phosphite를 첨가하여 상온에서 72시간을 다시 반응 시킨 후 얻은 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서 전구물질 (<sup>13</sup>C-1, 12.14와 12.20 ppm)과 O,O,S-trimethyl phosphorothioate (11.98과 12.02 ppm)가 확인되었고, 36.53 ppm에서 O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate로 유추되는 주 peak가 관찰되었다. [Figure 2(B)]. 산화반응물에서 주 산화생성물로 관찰되었던 3은 trimethyl phosphite를 첨가한 후 행해진 탈산소와 반응물에서는 전혀 그 존재를 확인할 수 없었는데(39.26 ppm), 이는 탈산소화제인 trimethyl phosphite의 작용으로 3이 O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate로 변환된 것으로 생각 되고 있다.

한편 Eto 등<sup>(3)</sup>에 의하여 phosphorothioate S-oxide가 phosphorothioates의 active intermediate로 제안된 이후, 이 S-oxide의 존재를 규명하기 위하여 여러가지 실험이 시도되어왔다<sup>(4,5,6,9,10,15)</sup>. Thompson 등(1984)<sup>(6)</sup>은 비대칭적 구조인 sulfide가 산화작용을 받은 후 tetrahedral sulfoxide로 변환하는 것을 이용하여 methamidophos

S-oxide의 존재를 설명하였다. 이들은 산화작용 후  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 관찰된 doublets(36.37과 47.11 ppm)를 한쌍의 diastereoisomeric S-oxide 구조에 기인한 것으로서 이해를 하였으며, 또한 두 chemical shifts 간의 커다란 coupling constant를 amino group과 sulfoxide group사이의 분자내 수소결합에 근거를 두어 설명을 시도하였다. 그 후 Chukwudebe (1987)<sup>(15)</sup>은  $^{13}\text{C}$ -enriched O-ethyl S-[ $^{13}\text{C}$ ]-methyl ethylphosphonothioate를 이용한 실험에서 MCPBA 과의 산화반응 후에  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 관찰된 두 chemical shifts (44.84와 48.88 ppm)를 근거로, Thompson 등과 같은 이론을 통해 S-oxide의 존재에 대한 설명을 시도하였다. 그리고 trimethyl phosphite의 탈산소 작용을 이용하여 S-oxide의 산소원자를 trimethyl phosphite로 이동시켜 phosphate로 변환시키면서, S-oxide가 최초의 전구물질로 다시 환원되는 것을 관찰하여 간접적으로 산화반응물 내에 S-oxide가 존재했음을 확인하였다.

본 실험에서도 MCPBA와 반응시킨 후 40.80 ppm과 44.84 ppm에서 각 미확인된 두 peaks가 관찰되었는데, 이들이 산화반응물 내의 diastereoisomeric S-oxide의 존재에 기인된 것으로 이해될 수 있었으나,  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum에서 S-oxide에 해당하는 어떠한 흡수 peaks도 확인되지 않아 S-oxide의 존재에 대한 결론을 내릴 수가 없었다. 더욱이 trimethyl phosphite를 이용한 탈산소화반응에서도 S-oxide가 최초의 전구물질인 1로 환원되는 것을 확인할 수 없었다. 다만  $^{13}\text{C}$ 과  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra에서 O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate로 추측되는 새로운 peak를 관찰할 수 있어서, 결국 trimethyl phosphite 첨가 후 S-oxide가 최초의 전구물질인 1 또는  $^{13}\text{C}$ -1로 환원되는 것이 아니라, O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate (3)가 탈산소화작용을 받아 3의 양은 현격히 줄어 들고 반면에 탈산소 생성물인 O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate의 생성을 초래하였다고 생각되어졌다. 다시 말해서 S-oxide의 존재를 증명하기 위해 Thompson 등 (1984)<sup>(6)</sup>과 Chukwudebe (1987)<sup>(15)</sup>에 의해 제시되었던 이론들을 본 실험에서 그대로 받아들이기에는 여러가지 무리가 있었으며, 결국

MCPBA 산화 반응물 내에는 S-oxide가 존재하지 않는다고 결론을 내렸다. 그러나 O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate 등의 생성 경로 등을 고려해 볼 때 이러한 S-oxide가 반응중에 생성되는 불안정한 중간물질로서 존재할 가능성에 대해서는 배제하지 않았다.

## 2. MMPP를 이용한 화학적 산화

Mixed function oxidases의 작용을 화학적으로 재현하기 위하여 일반적으로 많이 사용되고 있는 MCPBA가 수용액에서의 용해도가 극히 낮은 이유 때문에, 실제 물이 주 구성분으로 되어있는 생체 내에서의 산화작용을 *in vitro*에서 재현하는데 한계가 있음이 제기될 수 있었다. 결국 수용성 산화제인 monoperoxyphthalic acid(MMPP)가 본 실험을 위하여 새로운 model 화학산화제로 선택되었으며, 반응 용매로는 deuterium oxide( $\text{D}_2\text{O}$ )가 사용되었다. 본 실험의 model 화합물인 1을 MMPP와 deuterium oxide 용매 하에서 반응시킨 후의  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum은 Figure 3(A)와 같았다. 수용액 조건하에서 얻어진 산화반응 생성물은 69.05 ppm에서 관찰된 미반응 전구물질(1)과 30.98 ppm에서 확인된 O-ethyl ethylphosphonic acid (2)였다.<sup>(11)</sup> 그리고  $^{13}\text{C}$ -1을 MMPP와 산화반응 시킨 후에 얻은  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 미반응 전구물질  $^{13}\text{C}$ -1이 10.99와 11.03 ppm, methylsulfonic acid가 38.52 ppm에서 각각 관찰되었다. [Figure 3 (B)]<sup>(11)</sup> 결국  $^{13}\text{C}$ 과  $^{31}\text{P}$ -NMR spectra로부터 확인된 산화생성물들은 2와 methylsulfonic acid뿐이었다. 이러한 결과는 MCPBA를  $\text{CDCl}_3$  용매 하에서 산화반응하였을 때 비교적 다양한 종류의 산화생성물을 얻었던것과는 다른 양상을 보이는 것이었다.

수용성 산화제인 MMPP를 사용한 1의 산화 생성물들, 즉 2와 methylsulfonic acid가 어떠한 경로를 통하여 생성되었는가에 대해 두가지 가설이 제기될 수 있었다. 첫번째는 MCPBA 산화 경로에서 제안된 것을 근거<sup>(5,11)</sup>로 설명을 시도한 것인데, S-oxide와 phosphoxathiirane 등의 중간물질을 거치면서 O-ethyl ethylphosphinyl oxymethylsulfonate (3)가 형성이 되고, 다시 물 분자에 의해 가수분해를 받아 2와 methylsulfonic acid가 생성되었다는 것이다. 그러나 이러한 가설이 성

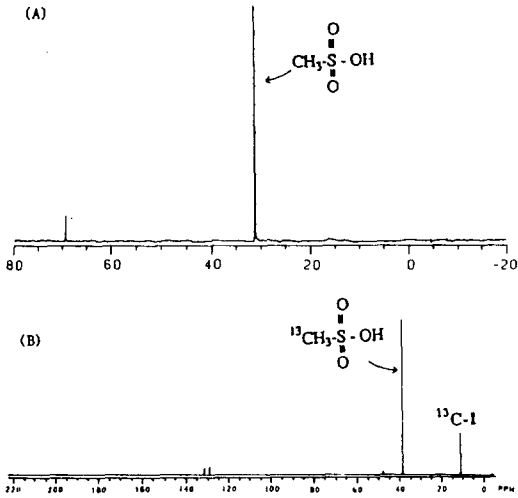


Fig .3. <sup>31</sup>P-NMR(A) and <sup>13</sup>C-NMR(B) spectra of the chemical oxidation mixture(1 or <sup>13</sup>C-1 + MMPP, 1 : 1 ; D<sub>2</sub>O ; 4 hrs. at room temperature).

립될 수 있는 조건은 CDCl<sub>3</sub>, acetone 또는 benzene 등의 유기용매를 사용하였을 때 가능한 것이지<sup>(5, 9)</sup>, 물 분자와 같은 nucleophile 들이 공존하는 조건에서는 1차적으로 생성된 S-oxide가 재배열 과정을 거쳐 가기 이전에 이미 가수분해를 경험하게 될 것이기 때문에 가능하지 않을 것이라는 사실이다. 결국 두 번째의 가설이 제시되었는데, 이는 1차 산화 생성물인 S-oxide가 즉시 물 분자에 의해 가수분해를 겪으면서 2와 methylsulfinic acid로 변환되고, 이 중 後者는 여분의 MMPP에 의한 부차적인 산화과정을 통해 methylsulfinic acid를 거쳐 methylsulfonic acid로 변환되었다는 것이다.(Figure 4). 이러한 가설을 규명하기 위해 <sup>13</sup>C-1(33.6 mg, 0.2 mmole)과 0.5 당량의 MMPP (61.9 mg, 0.1mmole)를 deuterium oxide 용매 하에서 4시간 반응을 시킨 후 <sup>31</sup>P와 <sup>13</sup>C-NMR spectra를 얻었는데 <sup>31</sup>P-NMR spectrum에서는 전구 물질 <sup>13</sup>C-1과 가수분해물인 2만을 관찰할 수 있었다. 그러나 <sup>13</sup>C-NMR spectrum에서는 전구물질

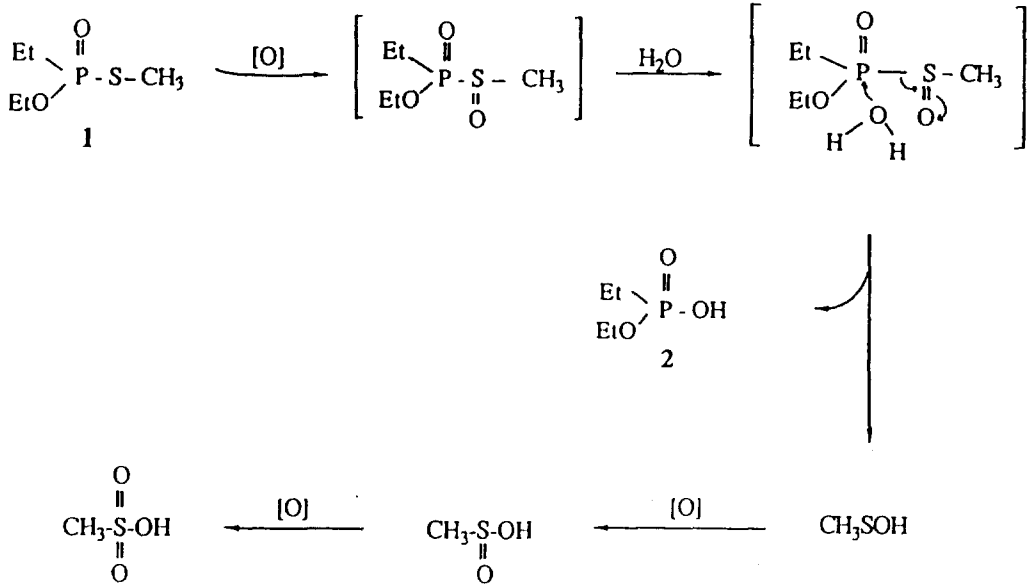


Fig. 4. postulated pathway of the oxidation of 1 to 2 and methylsulfonic acid via the formation of methylsulfinic and methylsulfinic acids.

(<sup>13</sup>C-1, 10.99와 11.03 ppm), methylsulfinic acid (38.27 ppm), 그외 미확인 peaks가 30.27 ppm, 214.

82 ppm 등에서 관찰되어 졌다. 이 산화반응물에 0.5 당량의 MMPP를 더 첨가한 후 다시 <sup>13</sup>C-NMR

spectrum을 얻었는데, methylsulfonic acid의 peak가 현저히 증가하고, 미확인 산화생성물이었던 30.27 ppm의 peak크기는 그만큼 감소했음을 확인할 수 있었다. 결국 이 미확인 산화생성물(30.27 ppm)은 부차적인 산화작용에 의해 methylsulfonic acid로 변환 될 수 있는 전구물질, 즉 methylsulfinic acid 또는 methylsulfenic acid일 것이라는 가능성을 갖게 해주었다. 한편 이러한 산화반응물에 대한 GC-MS 분석에서 <sup>13</sup>C-methylsulfinic acid(M<sup>+</sup> 65)의 존재를 확인할 수 있었는데, 이로써 미확인되었던 이 산화생성물(30.27 ppm)이 S-oxide로부터 가수분해된 methylsulfenic acid라는 결론을 얻을 수 있었다. 본 실험에서 MMPP를 사용한 수용액 내에서의 산화반응 중 S-oxide의 존재를 직접 확인할 수는 없었지만, Figure 6에 요약된 1의 산화과정을 고려해 볼 때 S-oxide가 불안정한 중간물질 형태로 산화반응의 초기에 존재했음을 확인할 수 있었다.

3. Microsomal mixed function oxidases를 이용한 대사적 산화

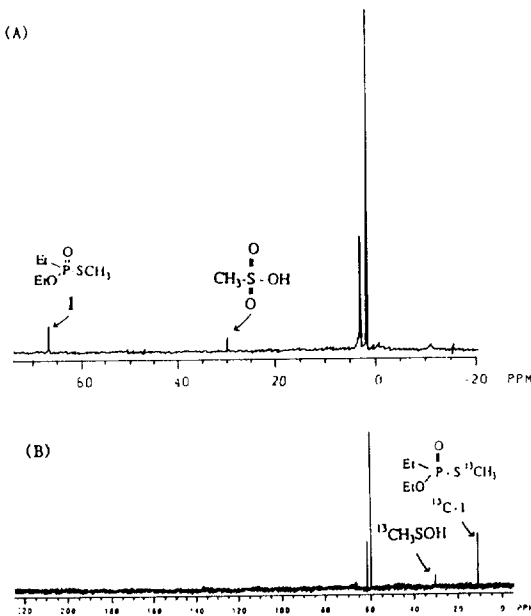


Fig 5. <sup>31</sup>P-NMR(A) and <sup>13</sup>P-NMR(B) spectra of the microsomal oxidation mixture(1 or <sup>13</sup>C-1+microsomal oxidase system ; 4 hrs. at 37.5°C).

Model 화합물인 1을 쥐의 간으로 부터 추출한 microsome과 반응한 후 얻은 <sup>31</sup>P-NMR spectrum은 Figure 5(A)와 같다. 0 ppm 주변에서 관찰된 크고 작은 peak들은 NADPH, ATP, G-6-P 또는 inorganic phosphates 등의 생물학적 반응물질로 부터 얻어진 것들이었고, 이러한 biological phosphate들을 제외하고 남은 두 peaks는 각각 미반응 전구물질 1(66.81 ppm)과 2(29.31 ppm)로 확인 되었다. <sup>13</sup>C-NMR을 이용한 <sup>13</sup>C-1의 microsomal 산화반응에서는, 미반응 전구물질(10.91과 10.94 ppm)과 methylsulfenic acid(30.87 ppm)가 관찰되었으며, 59.40 ppm과 61.27 ppm에서 관찰된 peak는 Control과의 비교를 통하여 용매인 tris-HCl buffer 또는 생물학적 반응물질로 부터 기인된 것으로 판명되었다.[Figure 5(B)]<sup>(11)</sup> 이러한 결과는 수용액 하에서의 MMPP 산화반응에서 얻은 산화생성물들과 거의 일치치를 하는데, microsomal 산화반응에서는 methylsulfonic acid의 존재를 관찰하지 못했다. 이는 microsomal 산화반응 조건이 MMPP를 이용한 화학적 산화반응 조건에 비해 model 화합물을 산화하여 methylsulfinic acid를 거쳐 methylsulfonic acid까지 생성하는데 필요한 산화력이 부족한데 기인하는 것으로 추정되고 있다. 결국 본 *in situ* microsomal 산화반응에서도 MMPP 산화반응에서 제안한 대사과정을 그대로 적용할 수 있었는데, 특히 methylsulfinic acid의 존재에 대한 관찰은 mixed function oxidases에 대한 sulfoxidation 과정을 통해 생성될 수 있는 S-oxide의 존재에 대한 가능성을 재차 확인해 주고 있다.

아울러 생체 내에서의 1에 대한 mixed function oxidases에 의한 산화반응을 재현하기 위한 화학적 model 산화 system으로는, CDCl<sub>3</sub> 하에서 MCPBA를 이용하는 보편화된 system보다는 수용성 화학산화제인 MMPP를 사용하는 것이 더욱 실제반응에 근접할 수 있음을 알 수 있었다.

4. 산화 중간생성물 S-oxide의 trapping 실험

산화반응 중 생성될 수 있는 중간물질로 추정되고 있는 S-oxide의 존재여부와 이러한 중간물질이 acetylcholinesterase 등의 target 효소들을 phosphorylation 할 수 있는지에 대한 가능성을 유추하기 위하여 nucleophile인 ethanol을 이용한



trapping 실험이 수행되었다. Model 화합물 1을 ethanol의 존재 하에서 MCPBA와 산화반응을 일으킨 후 얻은  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum은 Figure 8과 같다. 두개의 peaks가 관찰되었는데 각각 미반응 전구물질(68.42 ppm)과 ethanol에 의한 trapping 생성물인 O-O-diethyl ethylphosphonate (30.74 ppm)로 확인되었다.<sup>(11)</sup> 이러한 결과는 1이 산화제의 작용에 의한 sulfoxidation 과정을 거치면서 중간물질인 불안정한 S-oxide로 변환되고, 이 S-oxide 내의 친 전자 상태인 P 원자를 반응성이 좋은 nucleophile, 즉 ethanol이 공격하면서 O-O-diethyl ethylphosphonate를 생성하는데서 비롯된 것이다. 이러한 반응에 대한 이해를 통해 체내에서 일어날 수 있는 독성기작에 대한 가설적 설명을 구할 수 있는데, 즉 체내에서 생성된 S-oxide가 acetylcholinesterase의 esteratic site 내 친전자성의 serine hydroxy group의 공격을 받아 결국 acetylcholinesterase가 phosphorylation 되어 그 작용이 저해될 수 있음을 가정해 볼 수 있다는 것이다.

$^{13}\text{C}$ -1을 이용한 반응에서는 미반응 전구물질 (10.99와 11.03 ppm), methylsulfonic acid(38.27 ppm) 등이  $^{13}\text{C}$ -NMR spectrum에서 관찰되었으며, 17.43과 56.75 ppm에서 나타난 ethanol 흡수 peaks와 함께 36.73 ppm과 43.41 ppm에서 두개의 미확인 peaks가 목격되었다(Figure 6). 한편 이 반응생성물에 대한 GC-MS 분석에서  $^{13}\text{C}$ -methyl-

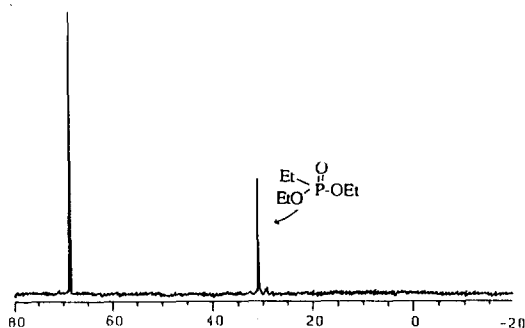


Fig 6.  $^{31}\text{P}$ -NMR spectrum of the reaction mixture of 1 or with MCPBA in the presence of ethanol(1 or  $^{13}\text{C}$ -1+MCPBA, 1 : 2 ;  $\text{CDCl}_3$ +ethanol, 1 : 1 ; 4 hrs. at room temperature).

sulfonic acid( $\text{M}^+ 81$ )의 존재가 확인되었는데, 이러한 결과를  $^{13}\text{C}$ -NMR분석에서 얻은 미확인 생성물들의 chemical shifts와 함께 고려한 결과, 36.73 ppm에서 관찰된 생성물인  $^{13}\text{C}$ -methylsulfonic acid인 것으로 추정되었다. 이러한 methylsulfonic acid의 존재 확인은 Figure 4에 요약된 반응 경로에서 볼 수 있듯이, 산화반응에 의해 1차적으로 생성된 S-oxide가 물분자 또는 다른 nucleophiles에 의해 친핵 공격을 받으면서 생성되어질 수 있기 때문에, 이를 통해 S-oxide의 존재에 대한 가능성을 간접적으로 다시 한 번 확인할 수 있었다.

### 5. 작용기작에 관한 가설 및 고찰

본 실험의 수행을 위해 사용된 model 화합물 1은 동물 실험에서 상당히 강한 급성독성( $\text{LD}_{50}$ , rat oral, 4.6 mg/kg)을 나타내었고, *in vitro* bimolecular inhibition rate constant( $k_i$ , Bovine acetylcholinesterase,  $303 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ ) 측정에서는 극히 낮은 저해작용을 보이고 있어, 이 약제가 체내에서 활성화 과정(bioactivation)을 거치면서 target 효소인 acetylcholinesterase에 대한 강한 저해작용을 한다고 가정되어질 수 있었다.<sup>(7, 11)</sup> 이러한 활성화 과정은 mixed function oxidases의 thiomethyl moiety에 대한 sulfoxidation으로 제안되어 왔었는데,<sup>(3)</sup> 이 과정을 통해 생성되는 불안정한 중간물질인 S-oxide는 강한 반응성과 함께 분자 내에 좋은 leaving group [ $\text{CH}_2\text{S}(\text{O})$ ]을 갖고 있어 독물학적으로 anti-acetylcholinesterase제로서의 훌륭한 구조적 조건을 소유하는 것으로 보고있다.<sup>(9)</sup> 이 S-oxide는 본 실험의 화학적, 대사적 산화 반응 그리고 trapping 실험에서 얻은 결과를 종합해 볼 때, 그 존재 가능성을 충분히 확인할 수 있었다.

한편 phosphorothionate 계열의 화합물들도 체내에서 mixed function oxidases에 의한 활성화 과정을 밟게 되는데, 주로 desulfuration을 통해 생성된 oxon 화합물들이 일반적으로 acetylcholinesterase에 대한 강력한 저해제로 알려져 있다.<sup>(2)</sup> 이 oxon 화합물들은 GC, HPLC, GC-MS 또는 NMR 등의 일반적인 분석방법으로 그 존재가 용이하게 관찰될 뿐만 아니라 실제 합성도, 분

리도 가능할 만큼 안정된 독성물질이다. 그러나 본 실험에서 가설된 중간물질 S-oxide를 이용한 phosphorothioates의 독성기작에 대한 설명에서, 이 S-oxide가 극히 불안정 하기 때문에 주 활성화 장소로 알려진 간에서 생성을 하더라도 독성작용을 발휘하기 위해 target sites까지 이동을 하는 동안 가수분해 등의 과정을 통해 쉽게 무독화 될 수 있으리라는 것이 한가지 취약점으로 제기될 수 있었다. 그러나 최근에 쥐의 뇌 microsome에 cytochrome P<sub>450</sub> dependent monooxygenase의 활성이 존재한다고 보고 되었는데<sup>(16)</sup>, 비록 간 microsome에 비해 훨씬 낮은 활성을 보이기는 하지만 주 target site인 뇌에서 직접 활성화 작용을 한다는 것이 의미가 있었다. 결국 model 화합물 1이 뇌까지 이동을 한 후, 뇌에 존재하는 산화효소들의 작용에 의해 S-oxide 등의 불안정한 중간물질로 활성화되면서 뇌의 신경전달에 관여하는 주 효소로 알려진 acetylcholinesterase를 저해하는 것으로 가정을 하여 볼 수 있었다. 그러나 현 시점에서, 실제 생체 내에서 일어나고 있는 복잡한 독성기작을 충분히 그리고 정확히 이해하기 위하여는 보다 체계적이고 다양한 연구가 계속 진행되어야 한다고 사료 되었다.

### 要 約

O,S-dialkyl alkylphosphonothioates 계열 유기인계 농약의 체내 작용기작을 이해하기 위하여 model 화합물 (1), O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate [LD<sub>50</sub>(rat, oral) 4.6 mg/kg; k<sub>i</sub>(bovine erythrocyte acetylcholinesterase) 303 M<sup>-1</sup>min<sup>-1</sup>]이 선정되었다. 이 유기인계 화합물들은 체내에서 활성화 과정을 겪으면서 毒性을 발현하는 것으로 假說되어져 왔다. 생체 내 mixed function oxidases에 의한 산화 활성화 과정을 化學적으로 재현하기 위하여 두 종류의 유기산화제 즉, meta-chloroperoxybenzoic acid와 monoperoxyphthalic acid가 사용되었고, 代謝의 산화를 재현하기 위하여 쥐 肝에서 추출한 microsomal oxidation system을 이용한 *in vitro* 산화반응이 시도되었다. 산화반응 중간생성물인 S-oxide의 존재가 전구물질(1)의 가설적 산화 반응경로를 통해서 간접적으로나마 충분히 확인 되어질 수 있었다. 더욱이

ethanol을 이용한 trapping 실험에서 불안정한 산화 중간물질인 S-oxide가 강한 phosphorylating agent 라는 것이 확인되어, 전구물질 (1)로부터 산화반응을 거치면서 생성된 이 중간물질이 체내 신경전달에 중요한 역할을 하는 acetylcholinesterase를 phosphorylation하게 되고, 결국 이런 활성화 과정을 통하여 계열의 화합물들이 독성을 발휘하는 것으로 이해될 수 있었다.

### References

1. 農藥工業協會(1991) : 農藥年報
2. Eto, M.(1974) : Organophosphorus pesticides : organic and biological chemistry. C.R.C. Press, Cleveland, OH.
3. Eto, M., S. Okabe, Y. Ozoe and Maekawa K. (1977) : Oxidative activation of O,S-dimethyl phosphoramidothioate. Pestic. Biochem. Physiol, 7, 367.
4. Wing, K. D., A. H. Glickman and Casida, J. E. (1983) : Oxidative bioactivation of S-alkyl phosphorothiolate pesticides : stereospecificity of Profenofos insecticide activation, Science, 219, 63~65.
5. Segall, Y. and Casida, J. E.(1982) : Oxidative conversion of phosphorothiolates to phosphinyloxysulfonates probably via phosphorothiolate S-oxides, Tetrahedron Letters, 23, 139.
6. Thompson, C. M., S. Castellino and Fukuto, T. R.(1984) : A carbon-13 nuclear magnetic resonance study on an organophosphate-Formation and characterization of methamidophos(O,S-dimethyl phosphoramidothioate) S-oxide, J. Org. Chem., 49, 1696.
7. Armstrong, D. J. and Fukuto, T. R.(1984) : Synthesis and acute toxicity of simple O,S-dialkylphosphonothioate esters to the rat and housefly, J. Agric. Food Chem., 32, 774.
8. Casida, J. E.(1984) : "Oxidative bioactivation of acetylcholinesterase inhibitors with emphasis on S-alkyl phosphorothioate pesticides" *in* : Cholinesterase, Walter de Gruyter Co., Berlin-New

- York, 427.
9. Segall, Y.(1983) : Reaction of proposed phosphorothiolate S-oxide intermediates with alcohols, phosphorus and sulfur, 18, 209.
  10. Swinson, J.(1985) : Studies on the synthesis, oxidation, biological activities of some thiono phosphorus compounds, Ph.D. dissertation. Vanderbilt University, Nashville, Tennessee.
  11. Hur, J. H. and Fukuto, T. R.(1991) : The chemical and metabolic activation and the possible mode of action of O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate, Journal of Agricultural Food Chemistry,(in preparation)
  12. Pouchert, J. C. and Campbell, J. R.(1974) : The Aldrich library of NMR spectra, Vol. X, Aldrich Chemical Co., Inc., Milwaukee, Wisconsin.
  13. Toia, R. F., R. B. March, N. Umetsu, N. M. Mallapudi, R. Allahyari and Fukuto, T. R.(1980) : Identification and toxicological evaluation of impurities in technical malathion and fenthion, J. Agric. Food Chem., 28, 599.
  14. Fieser, M. and Fieser, L. F.(1967) : Reagents for organic synthesis, John Wiley and Sons, Inc., New York, 135.
  15. Chukwudebe, A. C.(1987) : Investigations into the chemistry, toxicology, mode of action and photochemical formation of some delayed toxic sulfur-containing organophosphorus triesters, Ph. D. dissertation University of California, Riverside.
  16. Forsyth, C. S. and Chambers, J. E.(1989) : Activation and degradation of the phosphorothionate insecticides parathion and EPN by rat brain, Biochem. Pharmacol. 38 (10), 1597.