

O-Ethyl S-methyl ethylphosphonothioate의 代謝 主生成物인 O-ethyl ethylphosphonic acid의 ³¹P-NMR chemical shift에 대한 pH 및 용매 효과

許長鉉 · 韓大成

³¹P-NMR chemical shift variation of O-ethyl ethylphosphonic acid
with change of pH's and solvents in metabolic and chemical oxidation of
O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate

Jang-Hyun Hur and Dae-Sung Han

Abstract

O-Ethyl S-methyl ethylphosphonothioate was studied for chemical and metabolic oxidation using ³¹P-NMR analyses. The chemical shifts of O-ethyl ethylphosphonic acid (**2**) which is one of major metabolites were changed with the variation of oxidation systems. ³¹P-NMR chemical shifts of **2** were observed at 40.15 ppm from oxidation by MCPBA, 30.98 ppm by MMPP, 29.31 ppm from *in vitro* rat liver microsomal oxidation, and 29.10 ppm from *in vivo* metabolism in houseflies. ³¹P-NMR chemical shift of **2** in two different solvents such as deuterio-chloroform and deuterium oxide were observed at 30.70 ppm and 40.15 ppm, respectively. And those of the metabolites were also observed at around 30 ppm under the conditions of pH 3, 5.6 and 14 and 47.91 ppm under pH 1 which is a strong acidic condition. It could be explained that the ionized form of **2** should have greater shielding effect on phosphorus atom and hence shows upfield chemical shift in polar solvents and alkaline conditions. On the other hand, a protonated form under organic solvents and the strong acidic condition should have less shielding effect than its ionized form, shifting the peak downfield.

강원대학교 농과대학 농화학과

Department of Agricultural Chemistry, Kangweon National University, Chuncheon, 200-701.

서 론

유기인계 화합물 중 O,S-dialkyl alkylphosphonothioate 계열의 화합물들은 포유동물에 구강투여를 하거나 곤충에 topical 처리를 하였을 때, 체내 신경 전달물질인 acetylcholine을 분해하는 효소, 즉 acetylcholinesterase를 저해하는 독성물질로 알려져 있다¹⁾. 그러나 bovine erythrocyte, 쥐 적혈구 그리고 집파리에서 각각 추출된 cholinesterase를 이용한 *in vitro* 저해 실험에서는 bimolecular inhibition rate constant(k_i)가 $10^2 \text{ M}^{-1}\text{min}^{-1}$ 정도의 비교적 낮은 저해율을 보이고있어, 이 계열의 화합물들은 아마도 체내에서 mixed function oxidase 등에 의해 acetylcholinesterase에 대해 강력한 저해력이 있는 중간물질로 활성화되어 그들의 독성을 발현하는 것으로 추정될 수 있었다.

이러한 계열의 화합물 중 독성이 매우 강한 O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate(**1**, LD₅₀, rat, oral, 4.6 mg/kg; housefly, topical, 14 µg/g)를 선정하여, 화학적 산화제인 m-chloroperoxybenzoic acid (MCPBA)^{2,3)}, monoperoxyphthalic acid (MMPP) 그리고 쥐의 간에서 추출한 쥐 microsomal system과 집파리 생체를 직접 사용하여 얻어진 산화 생성물들을 ³¹P-NMR을 이용하여 이들의 대사구성물들을 구명하고자 하였다⁴⁾. 그 중 주 산화 생성물의 하나로 확인된 O-ethyl ethylphosphonic acid (**2**)의 chemical shift가 ³¹P-NMR spectrum에서 산화 system에 따라 큰 변화가 있음이 확인 되어 이에 대한 연구가 수행되었다.

재료 및 방법

1. 합성 표준물질

1) O-Ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (**1**) 및 본 실험에서 관찰된 산화 생성물의 합성방법은 본 실험과 병행하여 수행된 Hur 등의 보고⁵⁾에 요약되어 있다.

2) O-Ethyl ethylphosphonic acid (**2**)의 합성은

Hoffman 등⁶⁾과 Worms 및 Schmidt-Dunker 등⁷⁾의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. KOH (19.3 g, 0.3 mole)가 녹아 있는 ethanol 용액에 O,O-diethyl ethylphosphonate (54.6 g, 0.3 mole)을 다시 소량의 ethanol에 녹여 첨가한 후, 8시간 동안 환류시켰다. 반응물을 1M HCl로 산성화시키고, 생성물을 CHCl₃로 추출하였다. Rotary evaporator 로 용매를 제거한 후, vacuum distillation을 행하여 28.9 g의 O-ethyl ethylphosphonic acid를 얻었다. 수율 69%; bp 138-140°C/0.2 mm Hg. NMR, δ, CDCl₃: 4.15 (OCH₂, multiplet, 2H), 1.8 (PCH₂, doublet of quartets, 2H), 1.3 (CH₂CH₃, OCH₂CH₃, multiplet, 6H).

2. 사용 기기

Proton nuclear magnetic (¹H-NMR) spectra를 얻기 위하여 varian EM-390 spectrometer (Varian) 와 QE-300 spectrometer (General Electric)가 사용되었으며, internal standard 로 tetramethylsilane (TMS) 을 사용하였다. ¹H decoupled ³¹P-NMR spectra를 얻기 위하여 Fourier Transform 기능이 부착된 NT-300 spectrometer (Nicolet)를 사용하였으며, external standard 로 phosphoric acid가 사용되었다. 산화반응물들의 구조확인 은 본 실험을 위해 합성된 여러가지 표준물질들을 산화반응물에 spike 한후 이들의 chemical shift를 비교분석하여 결정하였다. 필요할 경우에는 ¹H coupled ³¹P-NMR spectra를 얻어 구조결정에 참고를 하였다.

본 실험을 위해 합성된 화합물들의 분자구조를 확인하기 위하여 Gas Chromatograph (Hewlett-Packard 5790 A series)가 부착된 Finnegan 3500 mass spectrometer를 사용하였으며, sample은 1 µl을 주입하였다.

3. 화학적 산화반응

1) MCPBA 산화반응: 본 실험을 위하여 사용된 MCPBA (85%, Aldrich Chemical Co.)의 정제는 Fieser 등 (1967) 이 보고한 방법⁸⁾에 의해 행해 졌다. O-Ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (**1**, 73 mg,

0.43 mmole)을 5 ml의 CDCl₃ 용매가 들어 있는 10 ml 시험관에 넣고 잘 섞은 후, ice bath를 이용하여 저온을 유지하면서 MCPBA (148 mg, 0.86 mmole)를 서서히 첨가하였다. 시험관 내의 발열반응이 끝난 후, 시험관을 밀봉하여 상온에서 4 시간 동안을 교반하였다. 반응물을 12 mm NMR tube에 옮겨 ³¹P-NMR 분석을 행하였다.

2) MMPP 산화반응: O-Ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1, 73 mg, 0.43 mmole)를 0.5 ml의 acetone과 3 ml의 D₂O (deuterium oxide)가 들어 있는 10 ml 시험관에 넣고 잘 섞은 후, ice bath를 이용하여 저온을 유지하면서 1.5 ml의 D₂O에 용해되어 있는 MMPP (123.7 mg, 0.2 mmole, Aldrich Chemical Co.)를 서서히 첨가하였다. 시험관을 잘 밀봉하여 상온에서 4 시간 동안을 반응 시킨 후, 반응물을 ³¹P-NMR을 이용하여 분석하였다.

4. 대사적 산화반응

1) 쥐 간을 이용한 *in vitro* microsomal system
 쥐의 간 microsome을 준비하기 위한 방법은 허 등의 보고⁴⁾에 따랐다.

반응 구성물질들은 0.1 M tris-HCl buffer (pH 7.8, 5 ml), glucose-6-phosphate (G-6-P, 10 mM, Sigma Chemical Co.), reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH, 5 mM, Sigma Chemical Co.), G-6-P dehydrogenase (10 EU, Sigma Chemical Co.), 쥐 간 microsome pellet (175 mg/wet weight), 그리고 O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1, 1.69 mg, 2 mM)를 25 ml Erlenmeyer flask에 넣어 37.5°C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 1 ml의 acetone을 넣어 반응을 중지시킨 후, 반응물을 12 mm NMR tube에 옮겨 ³¹P-NMR 로 분석을 행하였다.

2) 집파리 생체를 이용한 *in vivo* 산화 system

집파리 (*Musca domestica*, S_{NAIDM})에서의 대사물질을 관찰하기 위하여 약 5,000 마리의 집파리 (羽化 후 3-5 일)에 O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1)를 LD₅₀량(14 µg/g) 만큼씩 처리하였다.

약제는 acetone에 녹였으며, 집파리 당 1 ul 씩 topical 처리되었다. 처리된 집파리들은 15분간 항온 항습실 (25°C, 70% 상대습도)에서 보관된 후, -20°C로 유지되는 냉동고로 옮겨졌다. 냉동된 집파리를 ice bath를 이용하여 차갑게 유지하면서 Potter-Elvehjem homogenizer을 사용하여 마쇄하였다. 마쇄물은 300 ml hexane-acetone (1:1)으로 대사물질을 추출하였고, rotary evaporator을 이용하여 5 ml 까지 농축되었다. 농축물은 12 mm NMR tube에 옮겨진 후, ³¹P-NMR 로 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 화학적 산화반응

O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1)를 CDCl₃ 조건하에서 MCPBA 와 반응하여 얻어진 산화생성물을 ¹H decoupled ³¹P-NMR을 통해 분석한 결과 네가지의 주 생성물이 존재함을 관찰할수 있었다. 이들은 허 등의 보고⁴⁾에서 미반응 전구물질인 O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1, 64.28 ppm), O-ethyl ethylphosphonic acid (2, 40.15 ppm), O-ethyl ethylphosphinyloxymethylsulfonate (3, 32.65 ppm), O-ethyl ethylphosphonic acid anhydride (4, 27.33과 27.41 ppm) 로 확인되었다 (Figure 1).

O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1)를 deuterium oxide (D₂O) 조건하에서 반응 시킨 결과

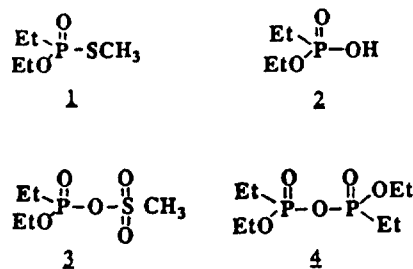


Figure 1. The chemical structures of O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1) and its metabolites.

^1H decoupled ^{31}P -NMR spectrum 상에서 관찰된 반응 생성물들은 미반응 전구물질 (**1**, 69.05 ppm)과 **2** (30.98 ppm)이었다. MMPP 산화반응물에서의 반응전구물질, 즉 **1**의 chemical shift는 MCPBA 산화반응물에서의 chemical shift에 비해 4.78 ppm 만큼 downfield 쪽으로 이동되는 현상을 볼수있었다. 이것은 사용 용매의 종류에 따라 관찰되어질수있는 일반적인 현상으로서 MCPBA 산화 실험에서 얻어진 산화 생성물 **3**, **4**의 경우에도 MMPP 산화 조건에 spike 했을 경우 downfield 쪽으로 chemical shift가 각각 2.98, 2.55 ppm 이동되는 경향을 나타내었다. 그러나 MMPP 산화 실험에서 관찰된 **2**의 경우에는 chemical shift가 30.98 ppm으로서 MCPBA 산화반응 조건에서 얻어진 **2**의 chemical shift 40.15 ppm과는 큰 차이를 보였으며, 더욱이 다른 산화대사물 (**1**, **3**, **4**) 들이 보여준 경향과는 반대방향으로, 즉 upfield 쪽으로 이동됨을 확인할 수 있었다.

2. 대사적 산화반응

O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (**1**)을 쥐의 간으로부터 추출한 microsome 과 반응한 후 얻은 대사생성물들을 ^{31}P -NMR 로 분석한 결과 미반응 전구물질 (**1**, 66.81 ppm)과 **2** (29.31 ppm)가 확인되었다. 본 실험에서 얻어진 대사생성물 **2**의 chemical shift는 CDCl_3 를 이용한 MCPBA 산화반응에서 얻어진 40.15 ppm과는 상당한 차이를 보였으며, D_2O 를 용매로 사용한 MMPP 산화반응에서 관측된 30.98 ppm과는 근사한 chemical shift를 보였다.

화합물 **1**을 집파리에 topical 처리한 후 추출한 대사생성물은 ^{31}P -NMR 로 분석한 결과, 대사생성물 **2** (29.10 ppm)가 확인되었다. 이 실험에서도 역시 대사생성물 **2**의 chemical shift가 CDCl_3 를 이용한 산화반응에서 얻어진 생성물 **2**에 대한 chemical shift, 40.15 ppm 보다도 11.05 ppm 만큼이나 upfield 쪽으로 이동되어 전술한 MMPP 산화반응과 microsomal 산화반응과 더불어 **2**의 확인에 어려움을 겪었다. 본 실험을 위해 합성된 표준물질 (**2**)를 이용한 spiking test를 통해 대사생성물 **2**의 존재를 확인하

였다.

3. O-Ethyl ethylphosphonic acid (**2**)의 확인

본 실험을 통해 얻어진 산화 또는 대사생성물 중, **1**로 부터 화학적, 대사적 산화경로를 통하여 **2**의 생성을 확인할 수 있었는데, 이는 ^{31}P -NMR spectrum 상의 chemical shift의 일치에서라기 보다는 단순한 spiking test를 통하여 **2**의 존재를 증명한 것이었다. 그러나 같은 화합물로 보기에는 너무 큰 chemical shift 차이 (약 10 ppm 정도)를 보였으며, 또한 전술한바와 같이 화합물 **1**, **3** 그리고 **4**의 경우와는 반대의 shift 경향을 보여 이의 확인을 위한 보조적인 실험이 수행되었다. 화학적 산화반응과 대사적 산화반응에서 얻어진 생성물 **2**에 대한 ^1H coupled ^{31}P -NMR 분석에서는 대략적인 구조만을 확인할수 있었는데, 이는 대사 산화반응의 생성물양이 너무 소량이어서 기대되었던 split-split coupling의 정확한 분리 spectrum을 얻을 수 없었기 때문이었다. GC-MS 분석에서는 각각의 반응물에 존재하는 대사 생성물 **2**의 존재를 확인 할 수 있었다.

그리고 MCPBA 산화반응, MMPP 산화반응, microsomal oxidation system, 집파리 생체 등을 통해 얻어진 대사 생성물들을 모두 같은 12 mm NMR tube에 넣어 ^{31}P -NMR 로 분석을 행하였다. 각각 40.15, 30.98, 29.31, 29.10 ppm에서 확인된 대사생성물 **2**의 chemical shifts가 본 혼합물의 분석에서는 30.02 ppm에서 하나의 peak 로 관찰되었다 (Figure 2).

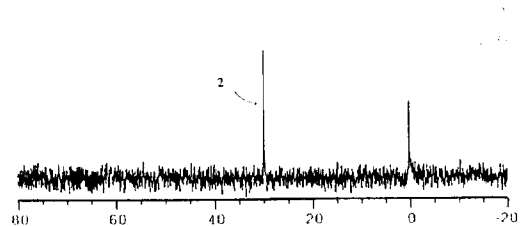


Figure 2. ^{31}P -NMR spectrum of O-ethyl ethylphosphonic acid (**2**) in the oxidation mixture pooled from the different oxidation systems.

이로서 서로 다른 systems 속에서 생성된 2가 ^{31}P -NMR spectra 상에서 다양한 chemical shift 들을 보였지만, 동일한 system에서는 한개의 peak를 나타내어 이들이 모두 동일한 화합물, 즉 2 임을 다시 확인할수 있었다.

4. 용매 및 pH 효과

본 실험을 통하여 확인된 주 반응 생성물인 O-ethyl ethylphosphonic acid (2)가 systems에 따라 ^{31}P -NMR spectra에서의 chemical shift가 크게 변화함에 따라 이를 설명하기 위하여 몇가지 부수적인 실험이 수행되었다.

먼저 화합물 2에 대한 용매 효과를 관찰하기 위하여 비극성 용매인 CDCl_3 와 극성용매인 D_2O 를 이용하여 ^{31}P -NMR 분석을 행하였다. Figure 3에 요약한바와 같이 화합물 1, 3, 4는 용매가 CDCl_3 에서 D_2O 로 바뀌면서 downfield 쪽으로 +8.7, +4.3, +3.7 ppm 씩 이동 되어진 반면, 2는 반대방향인 30.7 ppm에서 40.15 ppm으로, 즉 -9.5 ppm 만큼이나 upfield 쪽으로 이동되었다. 이러한 현상은 有機酸 형태인 화합물 2가 유기용매인 CDCl_3 조건하에서는 protonated form으로 존재하지만 극성의 수용액 (D_2O)조건에서는 ionized form으로 존재하면서 화합물 내의 燐 원자가 주변전자들에 의해 차폐되는효과

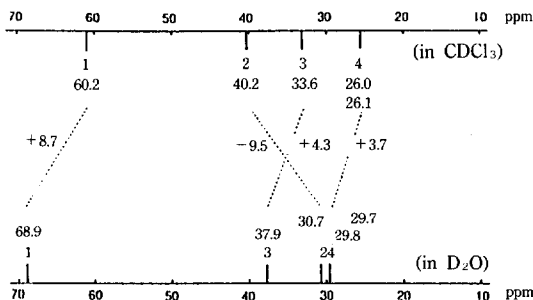


Figure 3. ^{31}P -NMR chemical shifts of O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1) and its metabolites in deuterio-chloroform and deuterium oxide.

(shielding effect)가 더 커지는데 기인되는 것으로 설명되어 질수 있었다. 분석하고자 하는 nucleus에 대한 차폐효과가 커지게 되면 NMR spectrum 상의 chemical shift가 upfield 쪽으로 이동된다는것은 잘 알려진 현상이다.^{8,9)}

화합물 2의 pH 효과를 알아보기 위하여 몇가지 다른 pH 조건을 만들어 ^{31}P -NMR 분석을 행하였다 (Figure 4). 화합물 2를 pH 5.6 인 D_2O 에 넣어 ^{31}P -NMR 로 분석한 결과, 2의 chemical shift가 30.71 ppm에서 관찰 되었다. 8% KOH 용액 (pH 14)에서 관측된 2의 chemical shift는 pH 5.6 인 D_2O 에서와 비슷한 30.65 ppm으로 나타났으며, pH 3의 산성 용액에서도 30.98 ppm으로서 유사하게 관찰되었다.

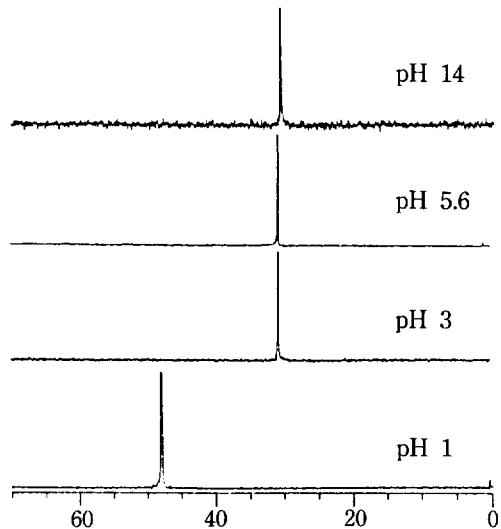


Figure 4. ^{31}P -NMR chemical shifts of O-ethyl ethylphosphonic acid (2) under the conditions of various pH's

그러나 pH 1의 강산성 조건인 황산 용액에서는 2의 chemical shift가 47.91 ppm으로 나타나 pH의 차이에 따라 상당한 정도의 chemical shift 변화가 확인 되었다. 이러한 결과는 화합물 2가 pH 1의 강산성 조건에서는 protonated form으로 존재하지만, 최소한 pH 3 이상의 조건에서는 수소원자를 잃어 버린 ioni-

zed form으로 존재하기 때문에 磷 원자에 대한 차폐효과가 극대화되어 전술된 바와 같이 ³¹P-NMR spectrum 상에서의 chemical shift가 downfield 쪽으로 이동 된다는 이론에 잘 부합되는 것이었다.

이상의 결과로서 화합물 2의 chemical shifts가 용매의 종류와 pH의 변화에 따라 달라질수 있음이 확인 되었는데, pH 3 이상의 수용액 하에서 ionized form으로 존재하는 2의 chemical shift는 약 30 ppm 부근에서, CDCl₃ 등의 비극성 유기용매에 녹아있는 2의 protonated form은 40.2 ppm에서, 그리고 pH 1의 강산 조건에서는 protonated form 보다도 downfield 쪽으로 더욱 이동된 47.91 ppm으로 나타났다. 이러한 경향은 아마도 화합물 2의 磷 원자에 이중 결합으로 연결되어 있는 산소 원자마저도 강산조건에서 protonation 되어 磷 원자에 대한 차폐효과가 더욱 줄어들은 결과 (deshielding effect)에 기인된 것으로 해석되었다 (Figure 5).

O-Ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1)의 대사생성물 2를 ³¹P-NMR spectrum으로 분석한 후, 그 결과를 해석할때 야기되었던 어려움을 이상에서 논의되었던 용매 및 pH 효과를 이용하여 생성물의 chemical shift를 해석하게 되면 이론적으로 쉽게 접근할수 있음이 확인되었다. 앞으로도 대사생성물 2와 유사한 구조를 가진 화합물, 특히 유기인산 계열 화합물들을 ³¹P-NMR 분석방법을 이용하여 확인할 경우에 본고에서 고찰되었던 내용들을 근거로하여 chemical shift 들을 해석하게 되면 화합물의 확인에 도움이 될것으로 사료된다.

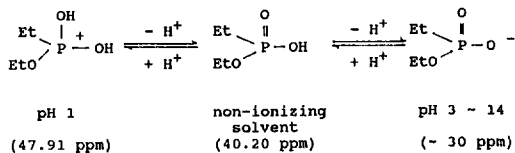


Figure 5. Effects of pH's and solvents for ³¹P-NMR chemical shifts of O-ethyl ethylphosphonic acid (2)

요 약

유기인계 화합물중 독성이 매우 강한 O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1)의 화학적, 대사적 산화생성물들에 대한 ³¹P-NMR 분석에서 주된 산화 생성물인 O-ethyl ethylphosphonic acid (2)의 chemical shift가 MCPBA 반응에서 40.15 ppm, MMPP 반응에서 30.98 ppm, microsomal oxidation system에서 29.31 ppm, 그리고 집파리 생체실험에서 29.10 ppm으로 반응조건에 따라 서로 상당히 상이하게 관찰되었다. 이 산화 생성물의 ³¹P-NMR spectrum 상에서의 chemical shift에 대한 용매효과는 deuterio-chloroform을 사용했을때 30.70 ppm, 극성 용매인 deuterium oxide를 사용했을때 40.15 ppm으로 관찰되었으며, pH에 대한 효과는 pH 3, 5.6, 14에서는 30 ppm을 전후하여, pH 1의 강산성 조건하에서는 47.91 ppm에서 나타났다. 이는 유기산 형태의 생성물 (2)가 ionized form이 형성될수있는 조건하에서는 산소원자의 비공유전자쌍들에 의하여 인원자가 차폐되어 chemical shift가 upfield쪽으로 이동 을하고, 반면 비극성과 강산성 조건하에서는 protonated form으로 존재하여 磷원자에 대한 차폐효과가 줄어들기 때문에 downfield쪽으로 이동하는 것으로 관찰되었다.

참고문헌

1. Armstrong, D. J. and Fukuto, T. R. (1984): Synthesis and acute toxicity of simple O,S-dialkyl alkylphosphonothioate esters to the rat and housefly, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 774.
2. Segall, Y. and Casida, J. E. (1982): Oxidative conversion of phosphorothiolates to phosphinoyloxysulfonates probably via phosphorothiolate S-oxides, *Tetrahedron Lett.*, **23**, 139.
3. Thompson, C. M. and Fukuto, T. R. (1982): Mechanism of cholinesterase inhibition by Methamidophos, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 282.

- 허장현, T. R. Fukuto, 한대성 (1991): 화학적, 대사적 산화반응 중 생성되는 S-oxide를 이용한 O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate (1)의 독성기작에 관한 연구, *한국환경농학회지*, **10**(2), 167.
- Jang Hyun Hur (1989): *Investigations into the chemistry, toxicology, metabolism and possible mode of action of O-ethyl S-methyl ethylphosphonothioate*. Ph.D. dissertation. University of California, Riverside.
- Hoffmann, F. W., Kagan, B. and Canfield, J. H. (1959): The preparation of O-alkyl alkylphosphonothioic acids in Organic phosphorus compounds, Vol. V., *J. Amer. Chem. Soc.*, **80**, 148.
- Worms, K. H. and Schmidt-Dunker (1976): Phosphonic acids and derivatives in *Organic phosphorus compound*, Vol. 7, eds: Kosolapoff, G. M. and Maier, L., John Wiley and Sons, New York, 1.
- Fieser, M and Fieser, L. F. (1967): *Reagents for organic synthesis*, John Wiley and Sons, New York, 135.
- Gadian, D. G. (1982): *Nuclear magnetic resonance and its application to living systems*, Clarendon Press, Oxford.
- Silverstein, R. M., Bussler, G. C. and Morrill, T. C. (1981): *Spectrometric identification of organic compounds*, 4th edition, John Wiley and Sons, New York.