

Atonic 원제의 부성분 구조 확인

경기성 · 정창국¹ · 이재구^{2*}

농업과학기술원 농산물안전성부 유해물질과, ¹한국삼공(주) 농업연구소, ²충북대학교 농과대학 농화학과

요약 : 생장조절제 Atonic 원제 중 부성분의 함량과 화학구조를 구명하기 위하여 diethyl ether와 dichloromethane 분배액을 각각 GC-FID와 GC-MSD로 분석하여 5종 부성분의 화학구조를 구명하였다. 주성분인 Atonic의 함량은 약 84%이었으며, 부성분의 함량은 0.24~10.74%이었다. 확인된 부성분은 2-methoxyphenol (guaiacol, m/z 124), 2-chloro-6-methoxyphenol 또는 4-chloro-6-methoxyphenol (m/z 158), 1,2-dimethoxy-4-nitrobenzene (m/z 183), 그리고 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (m/z 220)이었으며, 국내에서 규제중인 6종의 유해성분은 포함되지 않은 것으로 판단되었다.(2004년 6월 5일 접수, 2004년 6월 25일 수리)

Key words : Atonic, impurity, identification, technical product, GC-MSD.

서론

현대 농업에서 제한된 장소에서 보다 안전하고 품질이 우수한 농산물을 보다 빠르게 생산하여 경제성을 확보하려는 노력이 시도되고 있는데 식물생장조절제가 이러한 요구를 가능하게 하는 데 기여하고 있다. 생육을 촉진하는 식물생장조절제는 무기물의 흡수와 동화산물의 식물체내 이동을 향상시키고 효소와 스트레스 방어물질 및 다른 유익물질의 합성을 촉진하여 개화, 수정, 착과, 과실 생육을 촉진하고 스트레스에 대한 저항성을 증진 시키며, 해충, 냉해, 가뭄, 염해, 열악한 환경조건으로부터 생기는 식물체 손상을 빨리 회복시키는 것으로 알려졌다(Guo와 Oosterhuis, 1999).

Atonic은 이앙 및 개화기에 살포하여 생산량을 증가시키고 품질을 개선하며, 양분흡수와 질산염의 환원 및 광합성을 촉진하여 식물체내에 동화산물을 축적함으로써 식물생장을 촉진하는 작용기작을 갖는 천연 식물생장조절제이다 (Guo와 Oosterhuis, 1999; Vavrina, 1998). 또한 이 약제는 식물체내에 침투하여 식물세포의 활력을 높여주고, 화분관의 생장을 촉진시켜 수정력을 높이며, 식물의 생장에너지 감소 및 영양실조 등을 조절하여 비료성분의 흡수력을 증진시

키는 역할을 하는 것으로 알려졌다(농약공업협회, 2003).

Atonic의 토끼에 대한 급성경구독성(LD₅₀)은 5,000 mg/kg 이상이고 급성흡입독성(LD₅₀)은 5.8 mg/L 이상으로 독성등급 IV, 경피독성(LD₅₀)은 2,000 mg/kg 이상으로 독성등급 III로 분류되었으며, 무영향농도(NOEL)는 1,600 mg/kg/일로 보고되었다 (US EPA, 1998; US EPA, 2000). 생식독성은 최고시험농도인 600 mg/kg/일까지 나타나지 않았고 돌연변이 시험에서도 영향은 나타나지 않았으며, 내분비계에도 영향이 없는 것으로 보고되었다 (US EPA, 1998; US EPA, 2000). 또한 이 약제는 식물체내에 빠르게 흡수되어 대사되기 때문에 일반적으로 농약등록시 작물잔류성에 관한 시험성적의 제출이 면제된다(US EPA, 1998; US EPA, 2000). Atonic은 담배의 생육촉진용으로 아토닉 액제 (주성분 함량 0.3%)가 1967년 국내에 등록되어 사용되고 있으며(농약공업협회, 2003), 2002년도에 156 M/T이 출하되었고 사용량이 매년 증가하는 추세이다(농약공업협회, 2003). 또한 이 약제는 미국에 식물생육촉진제로서 목화, 벼, 콩에 Atonik으로 등록되었으며, 반드시 비이온성 계면활성제를 첨가하여 사용하도록 하고 있다(US EPA, 1998).

농약의 원제 등록시 조성비가 0.1% 이상인 부성분은 모두 분석하여야 하며, 주성분과 부성분의 종류별 함유량을 합하여 100% 규명되어야 하고 미확인 물질

*연락처자

을 2%까지 허용하되(농촌진흥청, 2004a) 국내에서 규제중인 hydrazine 등 6종의 유해성분은 검출한계까지 표기하도록 규정되어 있다(농촌진흥청, 2004b).

그러므로 주성분 함량이 6%인 Atonic 원제중 부성분의 함량과 그 화학 구조를 밝히고 국내외에서 규제하는 유해성분의 함유여부를 확인하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

시험약제

한국삼공(주)로부터 분양받은 Atonic 원제(유효성분 함량 6%)를 부성분 분석용 시험약제로 사용하였다.

분석기기의 선정

Atonic 원제중 주성분은 극성이 높고 물에 대한 용해도가 크기 때문에 일반적으로 고성능액체크로마토그래프(high performance liquid chromatograph, HPLC)로 분석하는 것이 편리하나 주성분인 atonic과 각 부성분들의 최대흡광파장(λ_{max})이 서로 다를 수 있으므로 HPLC 검출기의 특정 파장에서 분석하여 얻은 chromatogram을 기준으로 각 부성분의 함량을 결정하는 것은 비합리적일 수 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위하여 불꽃이온화검출기(flame ionization detector, FID)와 질량선택검출기(mass-selective detector, MSD)가 장착된 기체크로마토그래프(gas chromatograph, GLC, Hewlett Packard, USA)를 이용하여 주성분 및 부성분을 각각 분석하였다.

Atonic 원제중 부성분의 검출 및 함량 분석

Atonic 원제를 증류수로 10배 희석한 후 그 중 2 mL를 500 mL 분액여두에 넣고 50 mL의 증류수와 5 mL의 2.5 N HCl을 가한 후 50 mL의 ethyl ether로 3회 분배·추출하였다. 모두 합한 ethyl ether 추출액을 농축하여 10 mL의 acetone에 용해한 후 GC-FID로 분석하여 Atonic 원제에 함유된 부성분의 갯수와 함량(%)을 구하였다. 각 부성분의 함량은 GC 분석으로 얻은 chromatogram의 integration data중 각 성분들의 peak 높이 값을 총 peak 높이 값으로부터 용매의 peak 높이 값을 감한 값으로 나누어 %로 표시하였다. 분석에 사용한 기기는 FID가 장착된 Hewlett Packard 5890 Series II gas chromatograph(미국)이었으며, 분리관

(column)은 HP-1(glass capillary column, cross-linked methyl silicone gum, 길이 25 m × 내경 0.2 mm × 필름두께 0.33 μ m, 미국)를 사용하였다. 분리관의 온도는 100°C에서 1분간 유지하고 분당 5°C씩 200°C까지 승온한 후 5분간 유지하였으며, 주입구(injector)와 검출기의 온도는 각각 200과 250°C이었다. 가스의 유속은 담체가스(N₂) 1 mL/분, 수소 30 mL/분, 공기 400 mL/분, 보조가스(make-up gas, N₂) 29 mL/분, septum purge(N₂) 2 mL/분, split vent는 4 mL/분이었으며, 시료주입량은 1 μ L이었다.

Atonic 원제중 부성분의 구조 구명

Atonic 원제에 함유된 부성분의 구조를 구명하기 위하여 앞서의 시료를 GC-MSD로 분석한 결과 Na-염 형태로 제품 중에 함유된 Atonic으로부터 Na가 이탈된 형태의 Atonic만이 검출되고 미량으로 존재하는 부성분들은 검출되지 않았다(chromatogram 미제시). 따라서 미량으로 존재하는 부성분들을 분석하기 위하여 Atonic 원제 1 mL를 500 mL 분액여두에 넣고 20 mL의 증류수를 가한 후 pH를 산성으로 조절하지 않은 조건에서 100 mL의 diethyl ether와 dichloromethane으로 각각 3회 분배·추출하였다. 각 분배액을 합하여 농축하고 GC-FID로 분석하여 Atonic 원제중 부성분의 함량을 구한 후 GC-MSD로 분석하여 각 부성분의 구조를 구명하였다. 각 부성분의 구조를 구명하기 위하여 사용한 분석기기는 MSD (Hewlett Packard 5972 Series, 미국)가 장착된 Hewlett Packard 5890 Series II gas chromatograph (미국)이었으며, 분리관(column)은 HP-1(glass capillary column, cross-linked methyl silicone gum, 길이 25 m×내경 0.2 mm×필름두께 0.33 μ m, 미국)를 사용하였다. 분리관의 온도는 100°C에서 1분간 유지하고 분당 5°C씩 200°C까지 승온한 후 10분간 유지하였으며, 주입구(injector)와 검출기의 온도는 각각 200과 280°C이었다. 가스의 유속은 담체가스(He) 15 psi, septum purge (He) 1.5 mL/분, split vent는 7 mL/분이었으며, 시료주입량은 1 μ L이었다.

결과 및 고찰

부성분의 검출 및 함량 분석

GC-FID에 의한 Atonic 원제에 함유된 부성분의 분석결과는 그림 1에서 보는 바와 같이 용매 peak 이의

Table 1. Amounts of the active ingredient and the impurities in the technical product of Atonic

Peak	Retention time (min.)	Amount (%)	Remark
A	6.2	0.24	Impurity
B	10.7	83.48	Atonic
C	12.7	1.38	Impurity
D	13.7	3.08	"
E	15.4	10.74	"
F	16.0	0.39	"
G	16.5	0.69	"
Total		100	

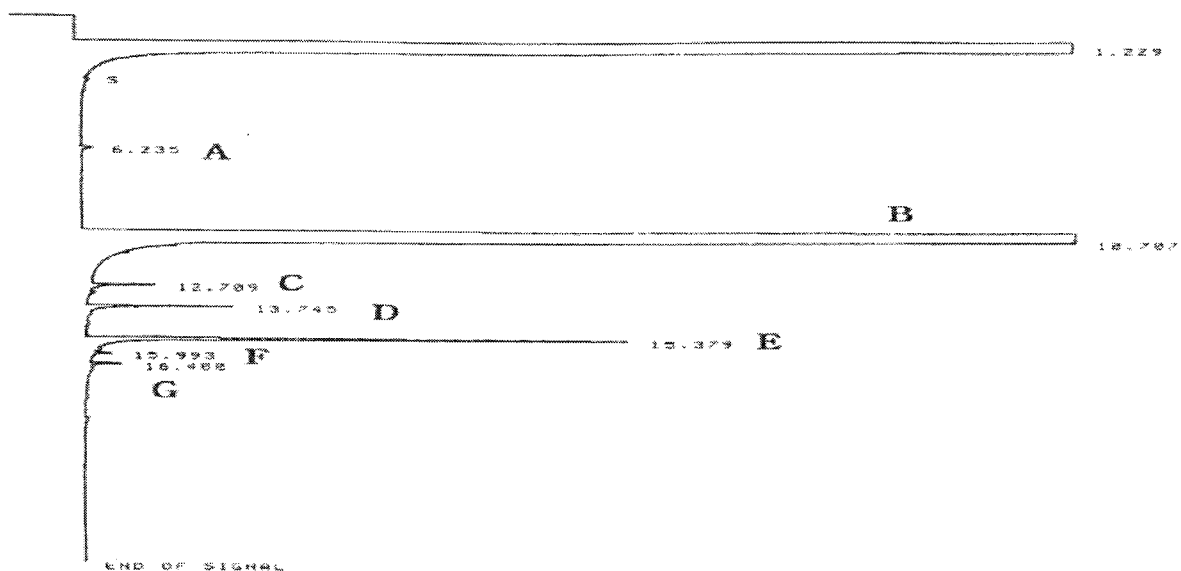


Fig. 1. GLC chromatogram of the diethyl ether extracts from the technical product of Atonic.

에 주성분인 Atonic과 6종의 부성분이 검출되었다. Chromatogram상의 peak 높이 값으로부터 구한 주성분과 부성분 각각의 함량은 표 1에서 보는 바와 같이 주성분인 Atonic의 함량은 83.5%이고 부성분들의 함량은 0.24~10.74%이었다.

부성분의 구조 구명

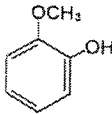
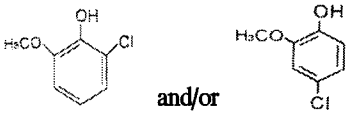
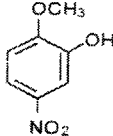
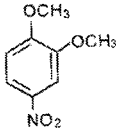
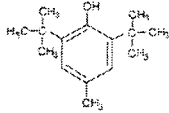
GC-FID를 이용한 Atonic 원제의 분석 chromatogram은 그림 1에서 보는 바와 같이 Atonic인 peak B는 GC-MSD로 분석할 때에는 Atonic 구조중의 -Na가 -H로 치환되어 즉-O-Na가 -OH로 변형된 형태로 나타나 그림 6의 peak #4와 같은 mass spectrum을 보였다. 또한 Atonic 원제에 함유된 부성분들의 보다 정확한 구조 구명을 위해서는 GC-MS의 분석결과와 NMR, IR

등의 분석결과를 토대로 종합적으로 해석하여야 하나 부성분의 농도가 낮고 각 부성분을 순수분리하기가 곤란하여 GC-MSD로 분석하였으며, GC-MSD 분석결과 total ion chromatogram (TIC)상의 retention time 15분 이후에 나오는 일부 peak는 분자량과 fragmentation pattern이 합성법으로부터 추정된 생성 가능한 모든 화합물을 고려할 때 너무 상이하여 구조 구명이 곤란하였다. TIC상의 각 peak별 mass spectrum을 해석하여 각 부성분의 구조를 동정한 결과는 다음과 같으며, 이를 표 2에 요약하였다.

Peak #1

그림 3에 제시한 peak #1의 mass spectrum을 해석한 결과 library 탐색 결과와 정확히 일치하여 이 부성분

Table 2. Chemical properties of the active ingredient Atonic and the impurities in the technical product of Atonic

Peak number	Molecular weight	Chemical name	Chemical structure
1	124	2-Methoxyphenol (Guaiacol)	
2 and 3	158	2-Chloro-6-methoxyphenol and/or 4-chloro-6-methoxyphenol	
4	169	2-Methoxy-5-nitrophenol (5-Mononitroguaiacol)	
5	183	1,2-Dimethoxy-4-nitrobenzene	
6	220	2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methyl phenol	

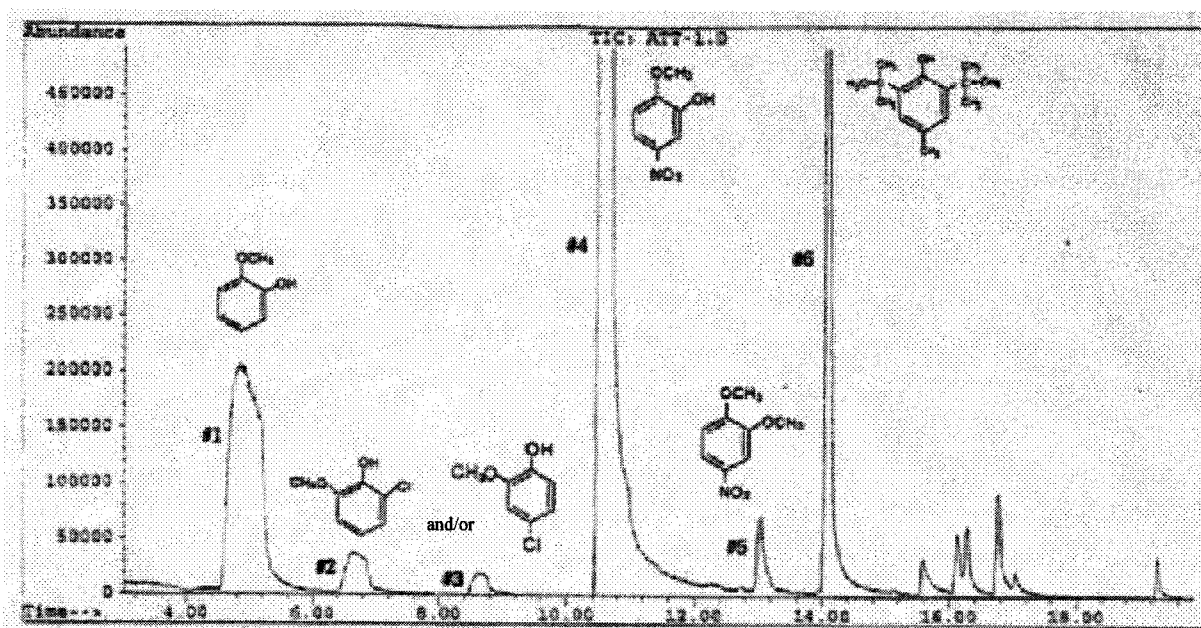


Fig. 2. Total ion chromatogram of the mixture of diethyl ether and dichloromethane extracts from the technical product of Atonic.

은 분자량이 m/z 124인 2-methoxyphenol (guaiacol)로 동정되었으며, Atonic 합성시 사용한 화합물인 guaiacol의 미 반응물로 판단되었다.

Peak #2와 #3

그림 4와 5에 제시한 peak #2와 #3의 mass spectrum에서 보는 바와 같이 염소 존재의 특징인 M+2 peak가 있고 M+2 peak의 동위원소 존재비로 판단할 때 염소원자의 존재는 확인되었으나 mass spectrum만으로는 염소원자의 정확한 결합 위치를 확인할 수 없으나

phenol의 hydroxyl 기는 ortho-para directing group이므로 벤젠환에 염소가 치환된 분자량이 m/z 158인 2-chloro-6-methoxyphenol 또는 4-chloro-6-methoxyphenol로 추정하였으며, 이 부성분들은 mass spectrum상의 base peak와 M⁺ peak의 분자량 및 fragmentation 형태가 일치하여 이성체로 판단되었다. 또한 이 화합물은 Atonic 합성원료인 guaiacol에 불순물로 함유된 것으로 추정되었다.

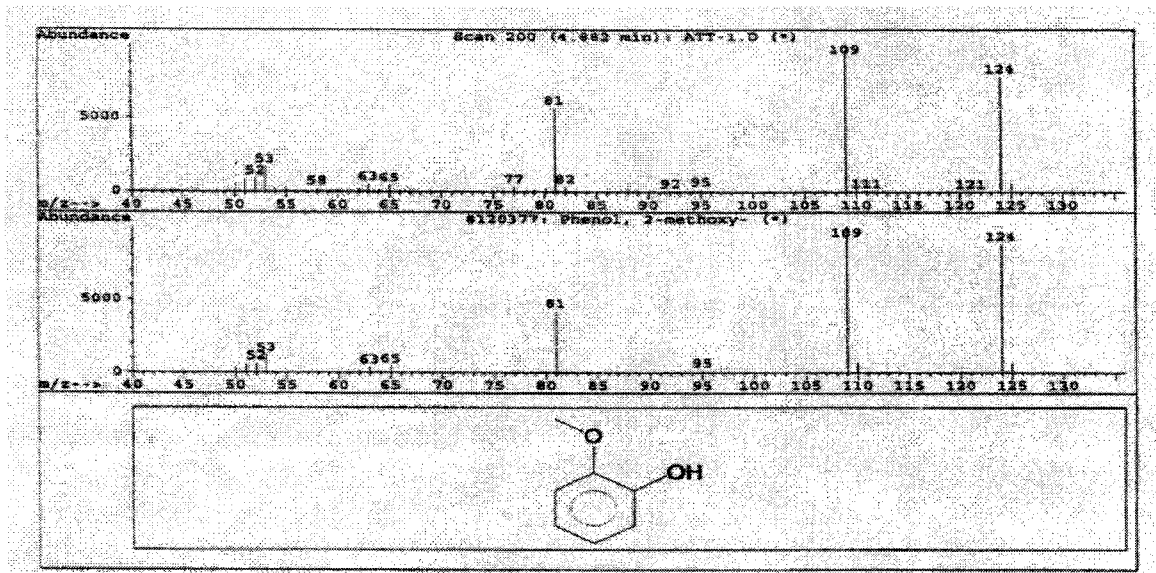


Fig. 3. Mass spectrum and library searching result of the peak #1 on the total ion chromatogram in Fig. 2.

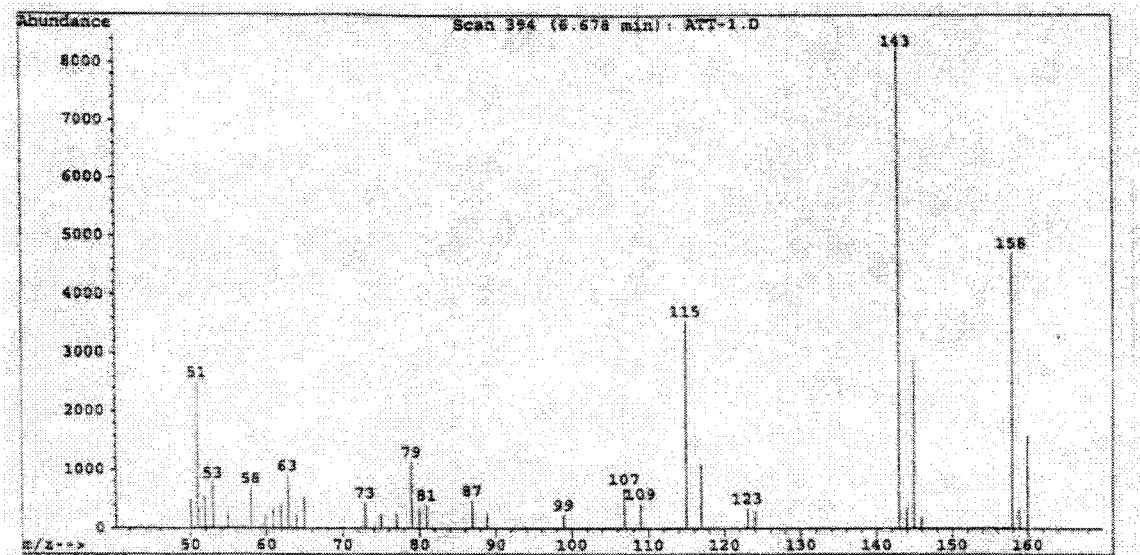


Fig. 4. Mass spectrum of the peak #2 on the total ion chromatogram in Fig. 2.

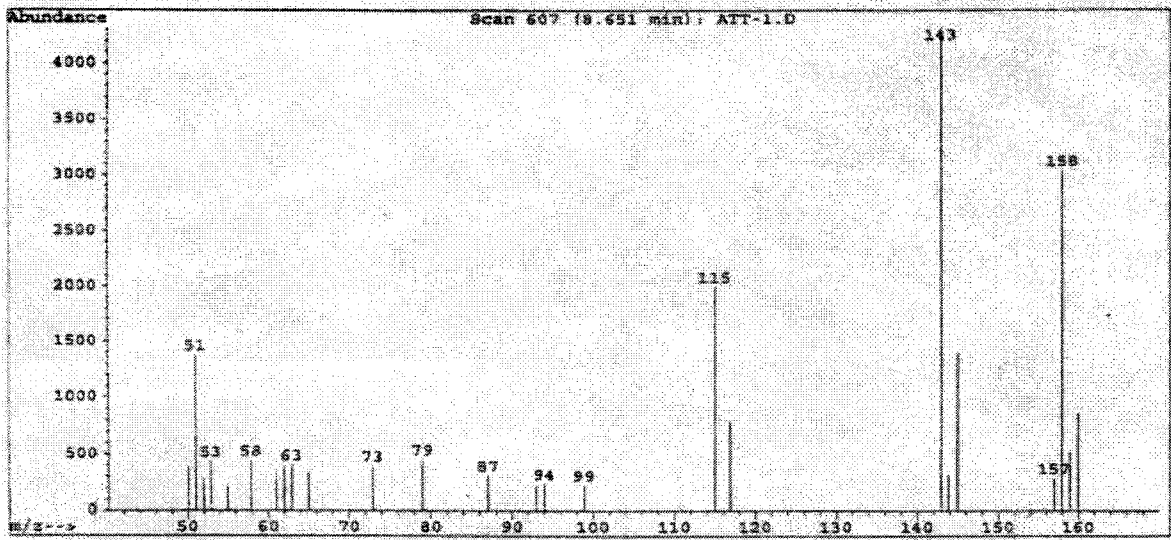


Fig. 5. Mass spectrum of the peak #3 on the total ion chromatogram in Fig. 2.

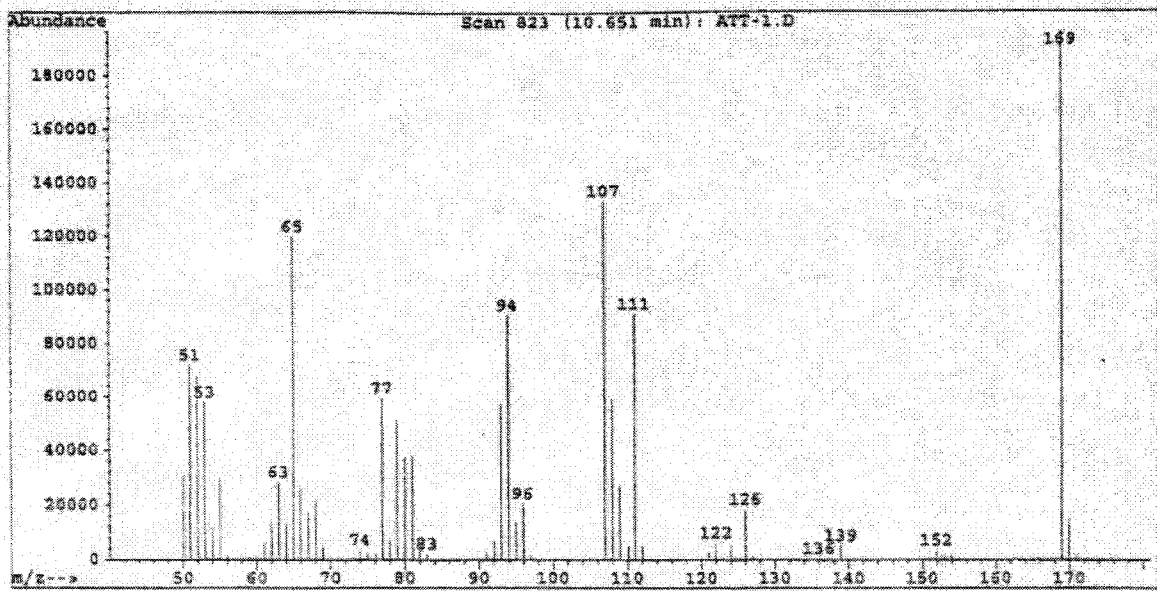


Fig. 6. Mass spectrum of the peak #4 on the total ion chromatogram in Fig. 2.

Peak #4

그림 6의 mass spectrum에 제시한 바와 같이 peak #4의 부성분은 분자량이 m/z 169인 2-methoxy-5-nitrophenol (5-mononitroguaniacol)로 확인되었으며, 이 부성분은 Atonic 구조중 -ONa의 Na가 H로 치환된 형태로서 Atonic을 GC-MSD로 분석할 때에는 이 형태로 분석되었다.

Peak #5

그림 7의 mass spectrum에서 보는 바와 같이 이 부

성분은 분자량이 m/z 183인 1,2-dimethoxy-4-nitrobenzene으로 동정되었으며, Atonic의 합성과정중 methylation에 의하여 생성된 화합물로 추정되었다.

Peak #6

그림 8에 제시한 mass spectrum과 98%의 정확성이 인정된 library 검색결과를 근거로 판단할 때 분자량이 m/z 220인 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol로 확인되었으며, 이 부성분은 합성원료 중에 함유된 불순물로 추정되었다.

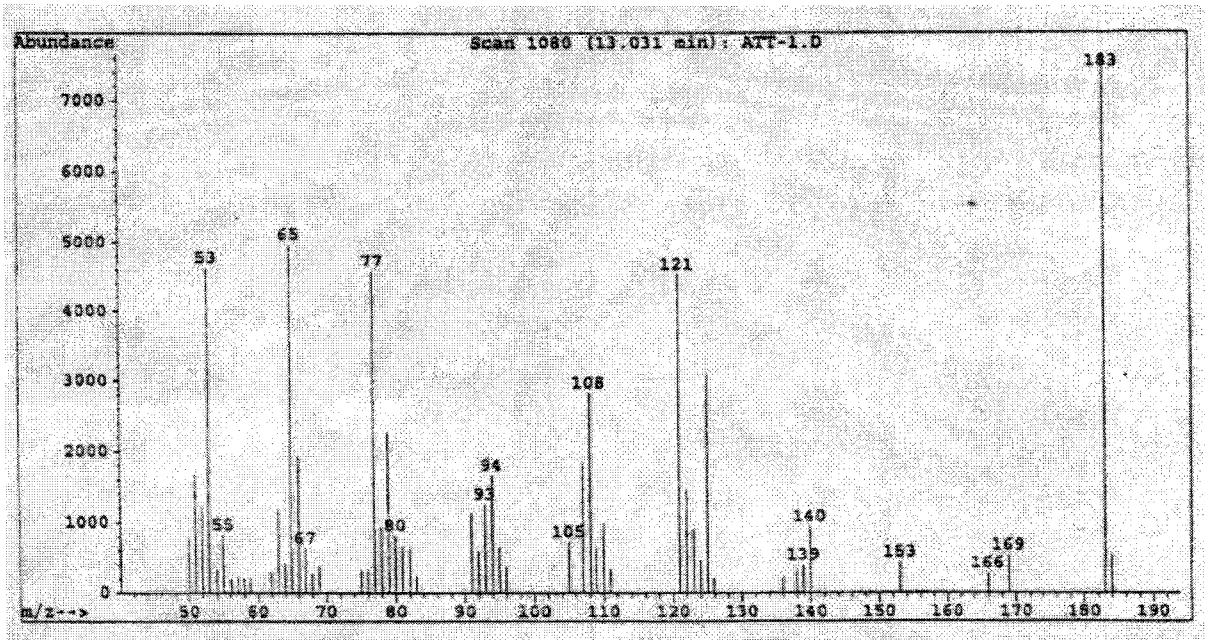


Fig. 7. Mass spectrum of the peak #5 on the total ion chromatogram in Fig. 2.

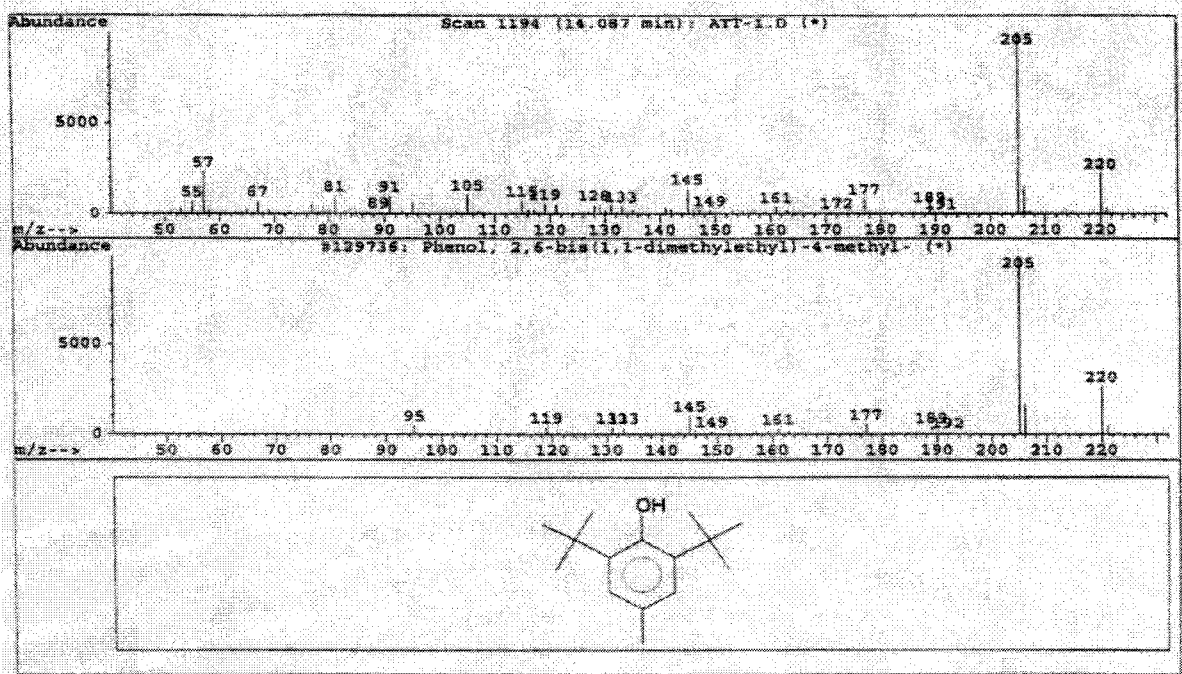


Fig. 8. Mass spectrum and library searching result of the peak #6 on the total ion chromatogram in Fig. 2.

Atonic 원제중 유해 부성분 함유 여부

Atonic 원제에 함유된 부성분을 분석하여 화학구조가 동정된 부성분중 현재 국내에서 규제중인 6종의 유해성분이 포함되었는지를 확인한 결과 유해성분은 함유되지 않았다.

인용문헌

Guo, C. and D. M. Oosterhuis (1999) Biomaterials for environment friendly crop production: A plant growth enhancer to increase yield in cotton, Abstract in Smart Farming 99, Available at <http://www.eng.upm>.

- edu.my/msae/biosystem.htm.
- US EPA (1998) Notice of Filing of a Pesticide Petition, Federal Register Environmental Documents, pp. 36901 ~ 36903.
- US EPA (2000) Sodium *o*-nitrophenolate, sodium *p*-nitrophenolate, and the end-use product Atonik exemption from the requirement of a tolerance and temporary exemption from the requirement of a tolerance, Federal Register Environmental Documents, pp.66178 ~ 66181.
- Vavrina, C. S. (1998) Atonik plant growth stimulator: Effect on cucumber under seepage irrigation in SW Florida, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Report No. VEG 97.5.
- 농약공업협회 (2003) 농약사용지침서, p.872.
- 농약공업협회 (2003) 농약연보, pp.198 ~ 199.
- 농촌진흥청 (2004a) 농약관리법령 고시 훈령집 (개정 증보판), p.153.
- 농촌진흥청 (2004b) 농약관리법령 고시 훈령집 (개정 증보판), p.472.

Identification of the impurities in the technical product of Atonic

Kee Sung Kyung, Chang Kook Chung¹ and Jae Koo Lee^{2*} (*Hazardous Substances Division, National Institute of Agricultural Science & Technology, Suwon 441-707, Korea, ¹Agricultural Research Center, Hankooksamgong Co., LTD, Osan 447-310, Korea, and ²Department of Agricultural Chemistry, College of Agriculture, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*)

Abstract : In order to determine the amounts of impurities and to identify the chemical structures of the impurities in the technical product of the plant growth regulator Atonic, the extracts of diethyl ether and dichloromethane were analyzed with GC-FID and GC-MSD. resulting in detection of five impurities and identification of their chemical structures. The amount of the active ingredient atonic in the technical product was about 84% and those of the impurities ranged from 0.24 to 10.74%. The identified impurities in this technical product are 2-methoxyphenol (guaiacol, m/z 124), 2-chloro-6-methoxyphenol and/or 4-chloro-6-methoxyphenol (m/z 158), 1,2-dimethoxy-4-nitrobenzene (m/z 183), and 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol (m/z 220), suggesting that they are not hazardous impurities.

*Corresponding author (Fax : +82-43-271-5921, E-mail : jklee@cbnu.ac.kr)