

# Phthalimido methyl-*O,O*-dimethyl phosphorodithioate (Imidan)과 그의 代謝物質이 水稻 生育에 미치는 影響에 關한 研究

李成煥 · 李東碩\* · 李載球

서울대학교 農科大學

(1966年 4. 11 受理)

Studies on the effect of phthalimido methyl-*O,O*-dimethyl-phosphorodithioate (Imidan) and its possible metabolites on the growth of rice plant.

by

Sung Hwan Lee, Dong Suk Lee, Jae Koo Lee

Seoul National University

College of Agriculture

## Summary

This experiment was conducted to investigate the effect of phthalimido-methyl-*O,O*-dimethyl-phosphorodithioate (Imidan) known as an acaricide and its possible metabolic products on the growth of plant, when sprayed on the leaves of rice plant. The results are summarized as follows.

1) Possible metabolic products of Imidan, the following compounds were synthesized or recrystallized for the present experiment.

- a) *N*-Hydroxymethyl phthalimide
- b) Phthalimide
- c) Phthalamidic acid
- d) Phthalic acid
- e) Anthranilic acid
- f) *p*-Amino benzoic acid
- g) *p*-Hydroxy benzoic acid
- h) Benzoic acid

2) Among the above materials, a), c), d), e), and Imidan were dissolved in a buffer solution respectively to be 10 and 20 p.p.m. and tested with the wheat coleoptile straight growth method.

According to the results, Imidan inhibited the growth of coleoptile in both 10 and 20 p.p.m., whereas the others showed much better growth than the control, especially phthalamidic acid in 10 p.p.m.

It appears that Imidan itself inhibits the coleoptile growth, whereas the metabolites derived from Imidan through various metabolisms, including hydrolysis in plant tissues show growth-regulating activity. (refer: Table 1, Fig. 1)

3) 20, 100 and 200 p.p.m. solutions of Imidan emulsion in xylene were prepared. The lengths of shoot and root of rice seeds germinated on the respective media were measured after 12 days. The data showed that root was much more elongated in Imidan 20 p.p.m., whereas shoot in Imidan 100 p.p.m., respectively, than in the xylene control.

An interesting finding was that xylene used as solvent had a tendency to inhibit seriously the root growth of rice seed. (refer: Table 2, 5).

4) The emulsions of concentrations in 10, 25, 50 and 100 p.p.m.'s of control, Imidan, *N*-hydroxy methyl phthalimide, anthranilic acid, and phthalamide,

\* 農村振興廳 植物環境研究所

respectively, were sprayed twice on the rice plant on pot. After a certain period of time lengths of rice culms were measured, showing that plots treated with Imidan and *N*-hydroxy methyl phthalimide exhibited much more growth than those of control and the others.

5) Leaves and stems of rice plant were sampled and extracted with dried acetone at the intervals of 3-, 5-, 7-, and 14 days after treated with Imidan 250 p.p.m. emulsion. This sample extracted with acetone was purified by means of prechromatographic purification method with acetonitrile and paperchromatographed to detect the following metabolic products.

Imidan (Rf: 0.97-0.98), *N*-hydroxy-methyl phthalimide (Rf: 0.87) phthalimide (Rf: 0.86-0.87), phthalamidic acid (Rf: 0.13-0.14), phthalic acid (Rf: 0.02-0.03), benzoic acid (Rf: 0.42-0.43), *p*-amino benzoic acid or *p*-hydroxy benzoic acid (Rf: 0.08-0.09), and unidentified compounds (Rf: 0.73, 0.59, 0.33, 0.23, 0.07).

In addition, in the early stages, such as 3- and 5 days nonhydrolyzed Imidan and its first hydrolytic product, *N*-hydroxymethyl phthalimide were detected in relatively large amounts, whereas in the last stages of 7- and 14 days due to further decomposition, the afore-mentioned two materials were reduced in the amount and *p*-thalic, phthalamidic, benzoic, and *p*-Hydroxy benzoic, or *p*-Amino benzoic acids were detected in a considerably large amount. It is, therefore, believed that most of Imidan applied to the leaves of rice plant may be decomposed within almost 14 days. In the light of above observations it is considered that Imidan itself is not involved in plant growth regulating activity, whereas various phthaloyl derivatives produced in the course of metabolism (namely, enzymic action) in plant tissues may have such effect.

## 1, 緒 論

有機磷劑의 昆蟲, 植物 및 高等動物의 生體內에서의 代謝作用과 殘効性에 關한 研究는 많이 報告되어 있으며 일찌기 1953年 R.D.<sup>(1)</sup> O'Brien 氏는 最初의 有機磷劑의 하나인 Schradan 이 昆蟲體內的 enzyme system 에 依하여 그 組織中에서 毒性物質

로 轉換됨을 밝혔고 역시 Kilby (1953) 氏도 植物體와 哺乳動物의 生體內에서 Schradan 이 酸化의 過程에 依하여 毒性을 나타내는 amine oxide 와 methylol 誘導體로 轉換됨을 말한바 있다. 그 外에도 放射性 同位元素를 使用하여 昆蟲 植物 및 高等動物의 生體內에서의 代謝過程에 關한 研究<sup>(2,3,4,5,6)</sup>는 無數히 많으나 이들은 주로 毒性物質의 浸透, 移行 및 殘効性에 關한 것만 取扱하고 있으며 加水分解 產物인 非毒性 部分의 代謝過程과 代謝物質에 關하여는 別로 報告되어 있지 않은것 같다. 最近 殺蟊劑로 登場한 有機磷劑인 phthalimido methyl-O, O-dimethyl phosphoro dithioate (Imidan)의 代謝過程에 關하여 J.J.<sup>(7)</sup> Menn(1964) 氏 등은 木花의 葉面에 C-<sup>14</sup> labeled Imidan 을 處理하고 이의 植物體內에서의 代謝中 非磷酸 部分인 phthalimide moiety 의 代謝物質의 運命을 radiochromatography 와 Autoradiography 를 가지고 밝힌바 있다. 即 Menn 氏 등에 依하면 生體內에서 phthalimide moiety 는 容易하게 decarboxylation 이 일어나서 C<sup>14</sup>O<sub>2</sub>가 發生되고 同時에 여러가지 代謝過程을 거치는 동안 *N*-hydroxy methyl phthalimide, phthalamidic acid, phthalic acid 및 Imidan 의 酸化相似體(phthalimido methyl-O, O-dimethyl phosphorothioate) 등이 生成됨을 發表하였다. 特히 興味있는 事實은 1963—64 年度 農村振興廳의 各 藥劑에 對한 水稻害蟲 防除<sup>(8)</sup>試驗 結果에 依하면 二化螟蟲의 防除效果는 勿論 收量調查에서도 一, 二化期를 通하여 Imidan 處理區는 다른 比較된 藥劑處理區 보다 增收의 效果를 보였고 또한 日本 京都 農事試驗場의 T. Sawada 및 K.Suzuki (1964) 氏 등의 試驗結果에 依하면 二化螟蟲의 二化期의 Imidan 處理區에서 얻은 收量調查 結果는 玄米重이 無處理區는 勿論 다른 藥劑의 處理區보다 훨씬 많았다고 하였고 台灣의 Chia Yi 農業試驗場의 試驗結果(1962)를 보면 *Schoenobius incertulas*, *chilo suppressalis*, *Sesamia inferens* 에 對한 藥効比較 試驗 結果에서 0.05% Imidan 撤布區의 收量은 無處理區의 3350—3650 kg/ha 에 對하여 4050—4450 kg/ha 로서 最高의 收量을 보이고 있다. 또한 필립핀의 The international rice research institute 의 報告(1963)에 依하면 二化螟蟲 防除에 對한 藥効比較 試驗 成績에 있어서도 다른 藥劑處理區에 比해 收量에 있어 Imidan 0.05%가 若干 良好한 結果를 보이고 있다. 한편 Imidan 의 化學構造式에서 보는바와 같은 phthalimide 基나 또는 이에 類似한 基를 構造式 中에 가지고 있는 Captan (*N*-Trichloro-methyl thio-

tetra hydrophthalimide)이나 Phaltan(*N*-Trichloromethyl thiophthalimide)와 같은 殺菌劑로 果樹에 撒布했을 때 樹勢를 良好케 하고 果實의 着色을 鮮明하게 한다는 報告가 있다.

上記와 같은 여러 試驗結果를 살펴 볼 때 이들 化合物 構造式中的 phthalimide 基가 生體內에서 代謝를 이루는 동안 生長을 調整하는 特質로 變化하는 것이 아닌가 推測된다. 그리하여 著者들은 Imidan을 二化螟虫 防除用으로 水稻에 撒布했을 때 이것이 水稻生育에 미치는 影響을 究明하고자 本實驗을 着手하였다. 即 Imidan 乳劑를 水稻葉에 全面撒布하고 一定期間 經過後에 抽出해서 얻은 試料中에서 이의 代謝物質로서 *N*-hydroxy methyl phthalimide (또는 phthalimide), phthalamidic acid (또는 phthalic acid) 및 *p*-amino benzoic acid (또는 *p*-hydroxy benzoic acid)와 benzoic acid 등을 비롯하여 여러개의 未知物質을 同時에 檢出하였고 아울러 代謝物質로 豫想되는 化合物이 植物의 生長에 미치는 效果에 對한 實驗成績을 얻었기에 이에 報告하고자 한다.

## 2. 實驗材料 및 方法

### (1) 小麥의 Coleoptile straight growth test

#### I] 供試藥劑

a) phthalimido methyl-*O*,*O*-dimethyl phosphorothioate (Imidan). 99.9% (美 Stauffer Chem. Co. 提供) 白色結晶. m.p. 72.0—72.7°C.

b) *N*-Hydroxy methyl phthalimide: Saul R. Bue<sup>(6)</sup>의 合成法에 따라 phthalimide와 formalin을 가지고 合成하였음. (m.p. 139—140°C) 白色 針狀結晶.

c) Phthalamidic acid: (日本 東京 化成製) m.p. 148—149°C

d) Anthranilic acid: EtOH로 再結晶한 mp. 146—147°C의 針狀結晶.

e) Phthalic acid: EtOH로 再結晶. mp. 193—194°C.

#### II] 小麥의 品種: 永光

III] Buffer 溶液: Potassium phosphate, dibasic ( $K_2HPO_4$ ) 2.6910 gr 과 citric acid monohydrate 1.5285 gr 을 2% Sucrose 1,500 ml 에 녹여서 만들 (pH=4.6)

이 Buffer 溶液으로 上記 Imidan, *N*-hydroxy methyl phthalimide, phthalamidic acid, Anthranilic acid 및 phthalic acid 의 10 ppm, 20 ppm. 溶液을 調製함.

IV] 方法: Auxin 에 對한 Bioassay 方法中에는 여러가지가 있으나 其中 Coleoptile<sup>(10)</sup> straight growth test 를 擇하였다. 即 胚를 精選하여 2時間 동안 25°C 程度의 溫水에 浸漬한後 30×40 cm 의 平皿에 濾紙 2枚를 깔고 증류수로 充分히 적신 다음 種子를 옮겨 23—25°C 의 incubator 內에서 發芽시켜 coleoptile 의 長이가 25—30 mm 程度 되었을 때 比較的 長이가 비슷한 것을 골라 暗所에서 cutter 로 尖端部位 3 mm 를 除去하고 5 mm 를 取하여 10個씩 미리 準備된 assay bottle 에 옮긴다. assay bottle 은 잘 水洗된 秤量瓶으로 하였으며 위에서 調製한 各 藥劑의 10 ppm, 20 ppm, Buffer 溶液을 2 ml 씩을 넣었다. Coleoptile section 은 23—25°C 의 incubator 에서 몇시간 마다 흔들어서 各部分의 伸長을 均一하게 하였으며 20時間 靜置後 coleoptile 의 伸長度를 microcaliper 로 測定하고 그 結果를 Histogram 으로 表示하였다.

### (2) Imidan 이 水稻種子의 生育에 미치는 影響에 關한 實驗

#### I] 供試藥劑: Imidan 乳劑原液

Imidan 0.5 gr 을 xylene 9.6 ml 에 溶解하고 乳劑化劑로 Antarox Cu—630, 0.4 ml 를 使用하여 5% 乳劑를 만들었다. 이 原液을 各各 250 배, 500 배 및 2,500 배의 濃도로 稀釋하여 200 ppm, 100 ppm 및 20 ppm 乳劑를 調製하였다. Xylene 乳劑: Control 로서 물과 比較하기 爲하여 調製하였으며 물로 250 배로 稀釋하였다.

#### II] 水稻品種: 農林六號

III] 方法: 水稻種子를 精選하여 PMA 1.5% 水和劑의 1,000 배 溶液에 6時間 浸漬後 다시 2日間 물에 浸漬하고 꺼내서 定性用 濾紙 2枚를 깔은 petri dish 에 옮겨 發芽시켰다. petri dish 에는 위에서 調製한 20 ppm, 100 ppm 및 200 ppm 의 Imidan 溶液과 Control 로서 증류수와 Xylene 乳劑 5 ml 씩을 注加하고 種子 30粒씩을 넣고 4反覆으로 하여 比較的 어두운 곳에서 發芽시키고 12日後에 shoot 와 root 의 伸長度를 測定하고 亂塊法에 依하여 統計 處理하고 Duncan 의 새로운 多重檢定法에 依하여 各 濃度間의 有意性을 檢定하였다.

### (3) Imidan 및 이의 代謝物質이 水稻生育에 미치는 영향

I] 供試藥劑: (1) control (供試藥品의 乳劑와 同一한 濃度의 xylene 乳劑를 만들어 증류수로 희석함)

(2) Imidan (20, 50, 100, 200 ppm 의 유제)

(3) *N*-Hydroxy methyl phthalimide (10, 25, 50, 100 ppm 유제)

(4) Anthranilic acid (10, 25, 50, 100 ppm 유제)

(5) Phthalimide (10, 25, 50, 100 ppm 유제)

II) a) 水稻品種 : 八達

b) 播種日 : 65年 7月 22日

c) 移秧日 : 65年 7月 26日

d) Pot의 體積 :  $9l \left( \frac{1}{2萬} \right)$ 들이

e) 藥劑撒布 時期 : 一次撒布 : 65年 8月 8日  
二次撒布 : 65年 8月 18日

f) 生育調查 時期 : 一次調查 : 65年 8月 7日  
(살포직전)

二次調查 : 65年 8月 12日

三次調查 : 65年 8月 15日

四次調查 : 65年 8月 18日

五次調查 : 65年 8月 21日

六次調查 : 65年 8月 24日

七次調查 : 65年 8月 27日

八次調查 : 65年 9月 6日

III) 方法 : 上記 Pot 에 番土壤 9kg 씩을 넣고 基肥로 Urea, 염화카리 및 중과석을 各各 Pot 당 1.4 gr, 1.07 gr, 1.4 gr 씩을 施肥하였다. 여기에 水稻를 三本씩 심고 一定期間 生育시키고 上記와 같은 時日에 2次에 걸쳐 各濃度의 乳液을 살포하고 一定한 간격을 두고 生育相을 調査하였다. 生育도중 뜻하지 않은 장애로 말미암아 收穫을 보지 못하고 生育相만을 分割區配置法에 依하여 統計處理하고 LSD 檢定을 하였다. 그리고 各 時期別 Data는 一部만을 여기에 發表하기로 한다.

(4) Paperchromatography 에 依한 水稻體內에서의 Imidan 의 代謝物質 檢出에 關한 實驗

I) 供試藥劑

A) Imidan 乳劑 : 250 ppm 溶液

B) Acetonitrile: 80—82°C에서 再蒸溜된 것

C) Authentic compounds: Imidan, *N*-Hydroxy methyl phthalimide, phthalimide, phthalamidic acid, Anthranilic acid, phthalic acid, Benzoic acid 및 *p*-amino benzoic acid의 95% EtOH 飽和溶液.

II) 濾紙 : Whatman No 4 Paper

III) 發色劑 :

A) 3.0% W/V AgNO<sub>3</sub> 水溶液

B) Cyclohexane에 溶解시킨 2,6-Dibromo *N*-chloro-*p*-quinoneimine의 0.5% W/V 溶液 (D.C.Q)

IV) 展開溶媒 :

A) 1.5 *N*-NH<sub>4</sub>OH 溶液으로 飽和된 1-BuOH

B) Pyridine: amyl alcohol: H<sub>2</sub>O (7:7:6)(PAW)

C) EtOH: H<sub>2</sub>O:NH<sub>4</sub>OH (80:15:5)

D) Acetone에 溶解된 12% V/V glutaronitrile 溶液(holder)

Glutaronitrile로 飽和된 isopropyl ether (mover) } E/G system

V) 方法

A) 藥劑處理 : 上記 250 ppm 濃度의 Imidan 乳劑를 小型噴霧器를 使用하여 水稻葉에 30ml 를 撒布하고 이것이 全部 마른 後 다시 20ml 를 撒布한 후 polyethylene 으로 小型 Tunnel 을 만들어 비에 依해서 젖겨 나가는 것을 防止하고 日照를 많게 하였다. 藥劑撒布 後 3日, 5日, 7日 및 14日, 都合 4回에 걸쳐 水稻葉을 採取하고 다음 方法에 依하여 抽出하였다.

B) 抽出方法 :

每回마다 約 10gr 씩의 葉 포기를 取하여 dried acetone 으로 3回 씻어서 水稻葉 外部에 吸着되어 있는 Imidan 을 完全히 除去하고 다음에 水分이 없어도도록 充分히 乾燥시킨 후 waring blender 에서 acetone 約 80ml 로 3回에 걸쳐 充分히 抽出한 후 少量의 無水黃酸曹達(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)를 加하여 脫水시키고 2,000 r.p.m.으로 40分間 遠心分離시킨다. 上澄液을 따른 후 殘渣를 다시 3回에 걸쳐 acetone 으로 抽出하여 全抽出液을 습치고 이에 含有되어 있는 chlorophyll 을 비롯한 여러가지 不純物을 除去하기 위하여 Activated<sup>(11)</sup> carbon column 을 通過시킨 후 N<sub>2</sub> 氣流中에서 35°C 以下의 溫度로 濃縮시켰다. 이와 같이 하여 얻은 crude extract 中에는 特히 lipid 가 많이 溶入되어 있으므로 이것을 除去하기 위하여 Prechromatographic<sup>(12)</sup> Purification 을 行하였다. 即 filter paper 를 길이 2.5 inch, 넓이 1 inch 되게 자르고 한쪽끝은 뾰족하게 한 후 濾紙 中央部에 上記 crude extract 를 spotting 하고 乾燥시킨 후 密閉한 유리 그릇속에서 下降法에 依하여 acetonitrile 로 40分間 elute 시켰으며 이렇게 해서 얻은 抽出液을 모아서 濃縮시켜 Paperchromatography 用 sample 로 하였다.

C) Paperchromatography

길이 45 cm, 넓이 15 cm 의 Whatman No4 Paper 에 上記 authentic compounds 와 sample 을 spotting 하고 hair drier 로 乾燥시킨 후 上記 1.5 N-NH<sub>4</sub>OH 溶液으로 飽和시킨 1-BuOH<sup>(13)</sup> 을 展開溶媒로 하여 一次元 下降法으로 6.5 時間동안 展開시키고 發色劑로는 Mitchell<sup>(14)</sup> chromogenic agent 를 若干 變更하여 使用하였다. 即 paperchromatogram 을 3.0% W/V AgNO<sub>3</sub> 水溶液으로 spray 하고 2537 Å에서 가장 큰 emission energy 를 가진 紫外線을 照射하여 各 物質을 檢出하고 authentic compounds 의 Rf 値와 比較하였다. 그리고 다른 方法으로는 溶媒를 變更하여 上記 (D)의 E/G system 을 溶媒로 使用하여 展開시킨 후 D.C.Q 를 撒布하고 Menn<sup>(15)</sup> et al 의 方法으로 發色시켰다. 또한 PAW (上記 展開溶媒 B)와 EtOH: H<sub>2</sub>O: NH<sub>4</sub>OH system (展開溶媒 C)를 使用하여 上記 操作과 같이한 후 AgNO<sub>3</sub> 水溶液으로 發色, Rf 値를 檢討하였다.

### 3. 結果 및 考察

#### I) Coleoptile straight growth test

小麥의 coleoptile 伸長度를 測定하여 control 을 100 으로 하였을 때의 比較値는 다음 表 1 과 같다.

Table I

compounds	concentration in p.p.m.	
	10	20
I) Imidan	95.2	98.8
II) N-Hydroxy methyl phthalimide	101.4	102.4
III) Anthranilic acid	103.4	100.2
IV) Phthalamidic acid	106.8	103.9
V) Phthalic acid	101.7	103.5
VI) Control	100	100

上記 Data 를 histogram 으로 表示하면 (Fig. 1) 과 같다. 먼저 引用된 몇가지 報告에 依해 밝힌 바와 같이 稻體에 處理된 Imidan 劑가 벼의 收量에 미치는 影響의 有無를 알아보기 위해 우선 實驗 1 에서 Imidan 의 代謝生成物로 豫想되는 N-Hydroxy methyl phthalimide, Anthranilic acid, phthalamidic acid, phthalic acid 및 Imidan 을 供試藥品으로 해서 稈의 coleoptile straight growth test 를 하였다. 이의

實驗結果는 Fig. 1 에서 보는 바와 같으며 Imidan 區를 除外하고 다른 供試藥劑區는 各 藥劑間에 伸長度에 있어 若干의 差異는 있으나 一般적으로 對照區보다 良好한 結果를 보이고 있다.

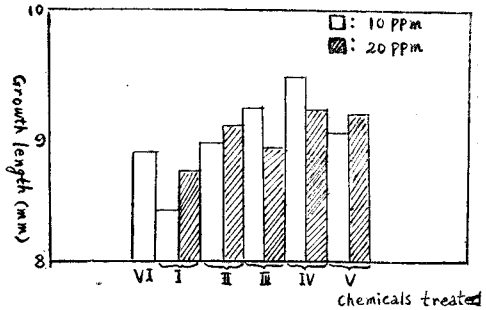


Fig. 1. Comparisons of wheat coleoptile growth lengths when treated with concentrations in 10 and 20 ppm of sample chemicals.

即 試驗期間中の 稈 coleoptile 의 伸長度를 보면 對照區 8.87 mm 에 對해 phthalamidic acid 區는 10 ppm 과 20 ppm 에서 各各 9.47 과 9.22 mm 를 보여 가장 큰 伸長度를 보였으며 [다음으로 anthranilic acid, phthalic acid, N-hydroxy methyl phthalimide 의 順序로 伸長이 促進됨을 볼 수 있다. 그리고 가장 낮은 伸長度를 보이는 것은 Imidan 區이며 對照區보다 오히려 抑制當한 結果를 보이고 있는데 이것은 Imidan 自體는 coleoptile 伸長에 對해 一種의 抑制作用을 끼치고 이의 代謝物質中の 어느것이 促進作用을 끼치지 않는가 生覺된다. 即 Menn 氏 等의 試驗結果에 依하면 20 ppm 의 Imidan 이 이의 50%가 加水分解를 받는데 所要되는 時間을 보면 pH 4.5 에서는 13 일, pH 7.0 에서는 12 時間 pH 8.3 에서는 4 時間이 所要된다고 하며 이것으로 미루어 보아 pH 4.6 의 Buffer solution 中에서 20 時間 處理하게 된 本 coleoptile straight growth test 에서는 Imidan 의 大部分이 加水分解를 받지 못하여 Imidan 自體에 依해 一種의 抑制作用을 받게 된 것이고 나머지 代謝物質로 豫想되는 供試藥劑에서는 一種의 促進作用을 받아서 coleoptile 伸長에 關與하지 않았나 믿어진다.

#### 2. Imidan 의 벼 種子 發芽에 미치는 影響

各 濃度의 Imidan 乳化液의 培地에서 發芽시킨 後 12 日에 shoot 와 root 의 長이를 測定한 結果는 다음 Table 2 와 같다.

다음에 shoot 의 伸長度 測定結果를 보면 Table 5 와 같다.

**Table 2** Effect of Imidan emulsion on rice seed germination at each level. (root length)

Treatment \ block	1	2	3	4	mean	significance
Xylene Emulsion	0.91	0.74	0.87	0.87	0.85	
Imidan 200 ppm	0.93	1.13	0.53	0.95	0.89	
// 100 ppm	1.32	1.34	1.25	1.56	1.37	
Control (H <sub>2</sub> O)	3.04	2.41	3.03	3.21	2.92	
Imidan 20 ppm	4.16	4.40	4.19	4.29	4.26	
Total	10.36	10.02	9.87	10.88	10.29	

**Table 3** Analysis of variance

SV	df	SS	MS	F
Total	19	36.33	1.91	
Treatment	4	35.66	8.92	178.40** > 5.41 = F(0.01)
Block	3	0.12	0.04	0.8 <sup>NS</sup>
Error	12	0.55	0.05	

**Table 4** Test of significance in root length of rice seed ( $S_x=0.1118$ )

P Value	2	3	4	5	
SSR	0.05 3.08	0.01 4.32	3.23 4.55	3.33 4.68	3.36 4.76
LSR	0.05 0.344	0.01 0.483	0.361 0.509	0.372 0.523	0.376 0.532

**Table 5** Effect of Imidan emulsion on shoot growth length in germination of rice seed.

Treatment \ block	1	2	3	4	Mean	significance
Imidan 100 ppm	2.33	2.13	2.25	2.22	2.23	
Imidan 20 ppm	2.29	2.02	2.27	2.04	2.16	
Control (H <sub>2</sub> O)	2.24	2.22	1.93	2.20	2.15	
Imidan 200 ppm	2.01	2.12	2.19	2.22	2.14	
Xylene Emulsion	1.97	1.85	2.06	2.04	1.98	
Total	10.84	10.34	10.70	10.72	10.66	

**Table 6** Analysis of variance

SV	df	SS	MS	F
Total	19	0.33	0.02	
Treatment	4	0.14	0.04	4* > 3.26 = F0.05
Block	3	0.03	0.01	1 <sup>NS</sup>
Error	12	0.16	0.01	

**Table 7** Test of significance in shoot growth length of rice seed  $S_x=0.0025$

P value		2	3	4	5
SSR	0.05	3.08	3.23	3.33	3.36
	0.01	4.32	4.55	4.68	4.76
LSR	0.05	0.0077	0.0080	0.0083	0.0084
	0.01	0.0108	0.0113	0.0117	0.0119

[實驗 2]는 Imidan 이 벼 種子 發芽에 미치는 影響을 알아 보기 위해 Imidan 乳劑(溶媒: Xylene, 乳劑: Antarox Cu-630)를 20, 100 및 200 ppm의 濃度로 稀釋한 乳化液을 培地로 하여서 12日間 培地上에서 일어나는 種子의 發芽相을 觀察하고 12日間에 生長된 shoot와 root의 길이를 測定하여 벼 種子 發芽에 미치는 影響을 實驗하였다. 우선 Imidan의 벼 뿌리 生長에 미치는 結果를 보면 Table 2와 같으며 이 結果의 分散分析表와 有意性 檢定 結果는 Table 3, 4와 같다. 以上の 實驗結果를 가지고 考察해 보면 root에서는 處理(濃度)間에서 高度의 有意性을 나타내었고 Duncan의 새로운 多重檢定法에 依하면 xylene과 Imidan 200 ppm間에서는 有意性이 없으나 Imidan 20 ppm, Imidan 100 ppm 및 蒸溜水區(Control)間에는 亦是 高度의 有意性을 볼 수 있다. 그리고 그 順序는 Imidan 20 ppm > 蒸溜水區 > Imidan 100 ppm으로서 低濃度인 Imidan 20 ppm區는 蒸溜水區보다 뿌리의 發育이 좋은 것을 알 수 있다. 그리고 xylene區가 가장 낮은 成績을 보이고 있는데 xylene은 벼 種子 發育過程에 있어서 初期의 뿌리 發育을 顯著히 抑制시키는 것으로 볼 수 있다. 그리고 集區間에는 有意性이 없음을 알 수 있다. 또한 乳化劑로 Antarox Cu-630을 使用하였는데 xylene과 Antarox Cu-630間의 뿌리 發育 抑制作用을 考察하기 위하여 한쪽은 蒸溜水만으로 또 한쪽은 蒸溜水에 上記 Antarox Cu-630을 添加하여 위의 方法과 같이 發芽實驗을 한 結果 Antarox Cu-630區는 역시 發根이 抑制되고 Coleo-

ptile이 먼저 發芽함을 觀察할 수 있었다. 그리고 shoot에 미치는 生長 實驗 結果와 이의 統計 處理 結果는 Table 5, 6, 7과 같으며 處理(濃度)間에서는 0.05% 水準의 有意性을 認定할 수 있으나 集區間에는 有意性이 없다. Duncan의 새로운 多重檢定 結果는 各 處理區는 xylene emulsion에 비하여 0.05% 수준에서 有意性이 있으며 그 順序는 Imidan 100 ppm > Imidan 20 ppm > 蒸溜水(control) > Imidan 200 ppm > xylene으로서 Imidan 100 ppm에서 shoot의 生長이 第一 좋았다. 이것으로 보아 Imidan 20 ppm과 100 ppm의 中間 程度의 濃度에서는 shoot와 root의 生育이 가장 좋은 結果를 보이리라고 推測할 수 있다. 以上の 두가지 實驗 結果를 綜合하여 볼 때 Imidan은 種子發芽에 있어서 shoot의 發育보다도 뿌리의 發育에 큰 刺戟的 影響을 주는 것 같으며 200 ppm의 高濃度보다는 20~100 ppm의 低濃度에서 一定期間 有効한 것 같다.

이러한 濃度에서 植物生育에 미치는 影響을 實用 濃度인 100 ppm과 比較해 볼 때 20-100 ppm의 濃度는 植物生育에 미치는 刺戟的인 效果만 아니라 水稻害蟲의 防除 效果를 거두는 데도 必要한 濃度가 된다.

**3. Imidan 및 이의 代謝物質이 水稻生育에 미치는 影響**

生育調查를 時期別로 하였으나 最終調查日인 9월 6日의 Data만을 表示하면 Table 8과 같으며 分散 分析 結果는 Table 9에서 보는 바와 같다.

**Table 8** Growth data of rice plant on pot on 46 th day, Sept. 6, 1965, since seeding date (length of culms)

Chemicals A	Block	Treatment B (Concentration)				Total	Mean
		10 ppm	25 ppm	50 ppm	100 ppm		
V <sub>1</sub> . Control	1	76.3	79.7	81.1	80.5	317.6	79.9
	2	77.0	82.0	79.4	79.8	318.2	
	3	78.2	82.9	80.4	82.4	323.9	
	Total	231.5	244.6	240.9	242.7	959.7	

V <sub>2</sub> . Imidan	1	81.0	81.5	78.5	82.4	323.4	82.4
	2	81.7	81.1	82.6	82.3	327.7	
	3	82.8	84.4	82.3	87.6	337.1	
	Total	245.5	247.0	243.4	252.3	988.2	
V <sub>3</sub> . N-hydroxy Methyl phthalimide	1	82.2	82.3	82.3	85.4	332.2	82.9
	2	81.9	81.4	84.4	85.6	333.3	
	3	85.5	82.0	79.4	82.6	329.5	
	Total	249.6	245.7	246.1	253.6	995.0	
V <sub>4</sub> . Anthranilic acid	1	80.8	85.9	77.1	81.7	325.5	79.9
	2	82.7	78.8	78.2	78.3	318.0	
	3	81.8	75.9	80.8	77.7	316.2	
	Total	245.3	240.6	236.1	237.7	959.7	
V <sub>5</sub> . Phthalimide	1	77.7	78.6	78.0	78.4	312.7	78.7
	2	77.3	78.9	79.4	79.6	315.2	
	3	80.3	79.1	80.5	76.6	316.5	
	Total	235.3	236.6	237.9	234.6	944.4	
Treatment totals		1207.2	1214.5	1204.4	1220.9	4847.0	

Block	Totals
1	1611.4
2	1612.4
3	1623.2

Table 9 Analysis of Variance for Table 8

Source of Variation	df	SS	MS	F
Blocks	2	4.28	2.14	
Factor A	4	151.83	37.95	7.18 > 3.87
Error (a)	8	42.25	5.28	7.01
Factor B	3	11.07	3.69	0.97 < 2.92
Interaction AB	12	69.15	5.76	4.51
Error (b)	30	113.84	3.79	1.51 < 2.09
Total	59			2.84

위의 Data를 考察해 보면 藥劑(Factor A)間에 高度의 有意性이 있음으로 L.S.D. 檢定을 한 結果는 다음과 같다.

各藥劑의 平均値의 差

$$L.S.D = t_{.05}(df=8) \sqrt{\frac{2 E_a}{qr}}$$

$$= 2.31 \times \sqrt{\frac{2 \times 5.28}{3 \times 4}} = 2.15$$

$$(V_2) - (V_1) = 82.4 - 79.9 = 2.5 > 2.15 = L.S.D$$

$$\therefore V_2 > V_1$$

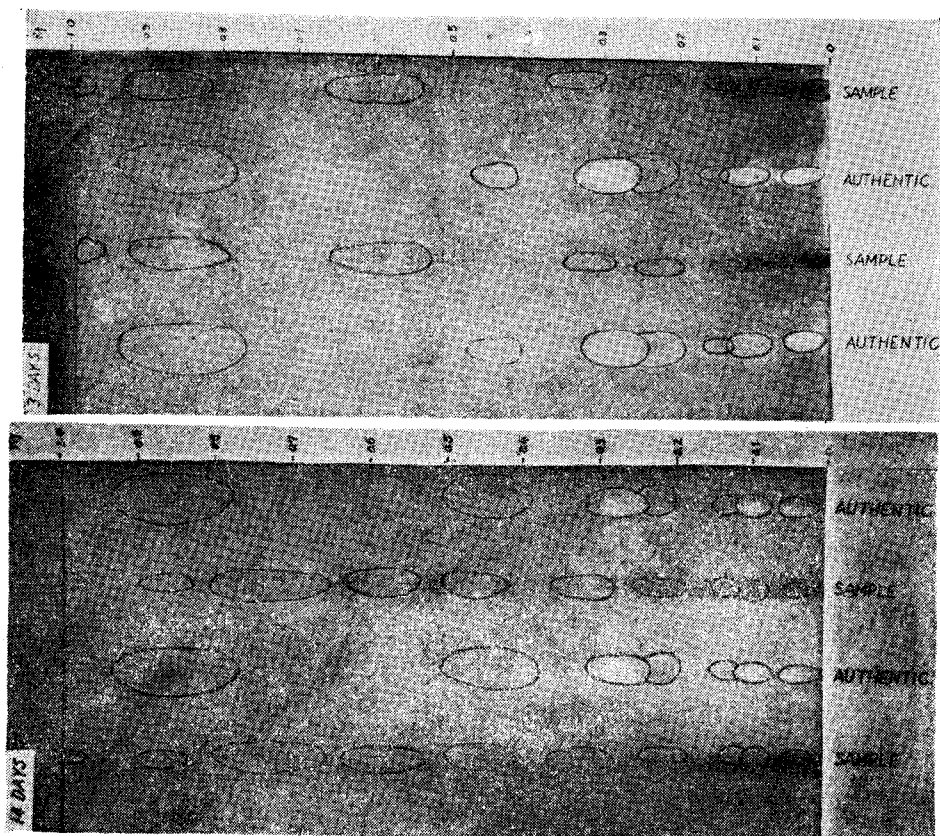
$$(V_3) - (V_1) = 82.9 - 79.9 = 3.0 > 2.15 = L.S.D$$

$$\therefore V_3 > V_1$$

以上과 같이 Imidan 處理區와 N-hydroxy methyl phthalimide 區는 control 보다 0.05% 水準에서 有意한 것 같다. 이것은 Imidan의 生體內代謝物質中 N-hydroxy methyl phthalimide가 이 경우에는 다른 物質보다 生長을 促進한 效果를 보이는 것으로 生覺된다.

4. Paper chromatography 에 依한 稻體內에서 의 Imidan 및 이의 代謝物質의 分離 및 同定 Whatman No. 4 filter paper 를 가지고 展開液(A)로 展開해서 얻은 代謝物質 및 authentic compound 의 Rf 値를 보면 다음 Fig. 2 및 Table 10 과 같으며





(Fig. 2)

Menn 氏에 依해서 報告된 E/G system 의 結果도 參考로 表示하였다. 그리고 溶媒 (B), (C), (D)에 依한 展開는 代謝物質을 確實히 檢出할 수 없었으므로 여기서는 除外되었다.

展開溶媒 : (A)

發色劑 : (A)

展開時間 : 6.5 時間

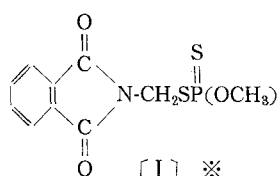
展開方法 : 一次元 下降法

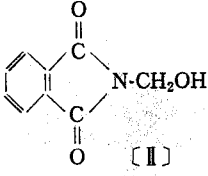
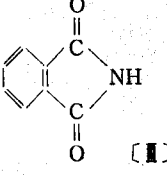
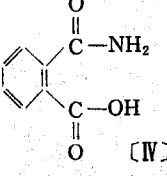
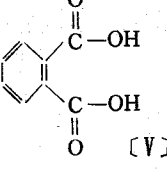
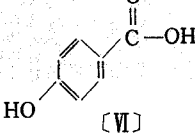
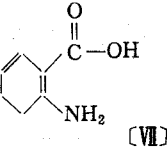
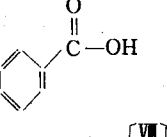
paper chromatography 에 依한 結果를 보면 撒布後 3 日에서는 代謝物로서 定量的으로는 確實치 않

으나 未分解의 Imidan 과 *N*-hydroxy methyl phthalimide 가 多量으로 檢出되고 phthalamidic acid 와 phthalic acid 가 少量 檢出되며 4 개의 未知化合物을 發見할 수 있다.

處理 5 日後의 結果는 處理 3 日과 大差가 없었다. 다음 處理 7 日에서는 亦是 未分解의 Imidan과 *N*-hydroxy methyl phthalimide 를 少量 檢出할 수 있으며 反面 phthalamidic acid, phthalic acid, *p*-hydroxy benzoic acid 및 benzoic acid 가 3 日보다 그 量이 增加함을 볼 수 있고 4 개의 未知化合物이 亦

(Table 10) Comparison of Rf values of metabolites detected with developing solvent A.

Compound	Solvent A		E/G system (Menn)	
	Authentic	Sample	Authentic	Sample
 (I) ※	0.97	0.97~0.98	0.46±0.05	0.46±0.05

 [ I ]	overlapped	0.87	0.87	0.25	0.25
 [ II ]		0.86	0.86~0.87	0.58	0.58
 [ IV ]	0.13	0.13~0.14	0~0.17	0~0.17	
 [ V ]	0.03	0.02~0.03	0~0.17	0~0.17	
 [ VI ]	0.08	0.08~0.09	0	None	
 [ VII ]	0.28	—	—	—	
 [ VIII ]	0.43	0.42~0.43	0	None	

Unknown compounds:

Rf=0.73 (detected in 7 days)

Rf=0.59, 0.33, 0.23, 0.07 (detected in 3 days)

\* [ I ] Imidan

[ II ] N-hydroxy methyl phthalimide

[ III ] Phthalimide

[ IV ] Phthalamidic acid

[ V ] Phthalic acid

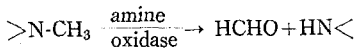
[ VI ] p-hydroxy benzoic acid

[ VII ] Anthranilic acid

[ VIII ] Benzoic acid

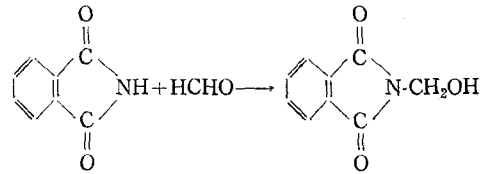
是 檢出된다. 處理 14 日에서도 大概 7 日과 大差없으나 未分解의 Imidan 과 *N*-hydroxy methyl phthalimide 의 量이 顯著히 減少하고 phthalic acid, phthalamidic acid 및 *p*-hydroxy benzoic acid 等의 量이 前보다 增加하였다.

이제 paper chromatography 에 依하여 檢出된 代謝物質을 가지고 稻體內에서 일어나는 代謝過程을 推定해 보면 우선 Imidan 은 J.J. Menn 氏 등이 檢出한 바도 있지만 thio 體 磷劑가 生體內에서 一部 酸化를 받아  $\begin{matrix} S \\ || \\ -P- \\ || \\ O \end{matrix}$  가  $\begin{matrix} O \\ || \\ -P- \\ || \\ O \end{matrix}$  로 되고 이어서 phosphatase 에 依하여 加水分解를 받아 dimethyl thiophosphate 와 *N*-hydroxy methyl phthalimide 로 된다. 即 Imidan 을 비롯한 모든 有機磷劑는 一種의 磷酸 ester 로 되어 있기 때문에 alkali 溶液에서나 動植物의 生體內에서 加水分解를 容易하게 받아서 酸과 alcohol 로 되는 것이다. 다음 이 *N*-hydroxy methyl phthalimide 는 amine oxidase 의 作用에 依하여 HCHO 와 phthalimide 가 되는 것 같으며 이러한 事實은 J.J. Menn<sup>(16)</sup> 氏 等도 Imidan 의 生體內 代謝過程에서 HCHO 가 生成됨을 밝혔고 또한 H. Yamada<sup>(17,18)</sup> 와 K. Buffoni<sup>(19)</sup> et al 은 生體內에서 各級 amine 은 容易하게 amine oxidase 의 作用을 받으며 특히 三級 amine 은 다음과 같이 分解되어 HCHO 와 >NH (二級 amine)가 生成됨을 發表한바 있다.



또한 實驗室에서 *N*-hydroxy methyl phthalimide 를

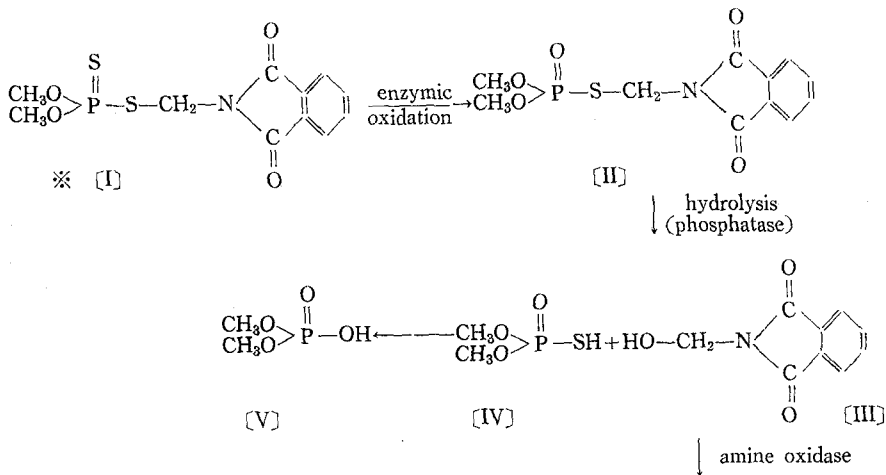
合成할 때에는 다음 式과 같이 phthalimide 에다 HCHO 를 作用시켜서 合成한다.

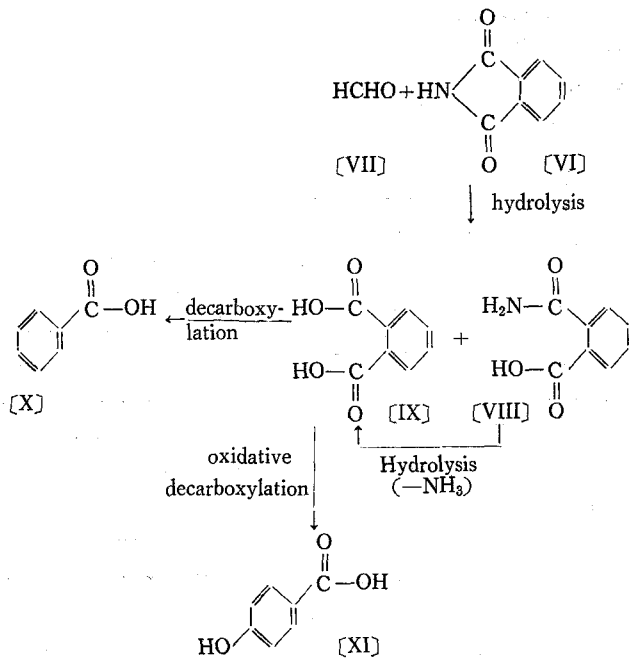


다음 이 phthalimide 는 다시 加水分解를 받아 phthalamidic acid 를 만들거나 또는 一部가 phthalic acid 로 되는 것이 아닌가 生覺되며 實驗室에서도 實際로 phthalimide 를 alkali 로 加水分解시킬때 0°C 以下の 低溫에서는 主로 phthalamidic acid 가 生成되나 0°C 以上에서는 主로 phthalic acid 가 生成되는 것이다. 다음 phthalamidic acid 는 다시 加水分解를 받아 phthalic acid 로 되는 것 같으며 本實驗에서도 phthalic acid 가 Imidan 撒布後 7 日이나 10 日以後에 顯著하게 檢出되는 것으로 미루어 立證할 수 있다. 이렇게 해서 生成된 phthalic acid 는 decarboxylation 을 일으켜 benzoic acid 를 만들거나 oxidative decarboxylation 이 되어 *p*-hydroxy benzoic acid 나 *o*-hydroxy benzoic acid 가 되는 것 같으며 이러한 事實은 Menn<sup>(7)</sup> 氏 등이 木花體內 代謝過程 研究에서도 指摘한 바와 같이 代謝過程중에 많은 C<sup>14</sup>O<sub>2</sub> 가 發生되고 *N*-hydroxy methyl phthalimide, phthalamidic acid, phthalic acid 및 *p*-hydroxy benzoic acid 等이 生成됨을 밝힌 바로도 알 수 있다.

以上 稻體內에서 일어나는 Imidan 의 代謝作用의 pathway 를 要約해서 diagram 으로 表示하면 다음 Fig. 3 과 같다.

Fig. 3 Expected process of Imidan decomposition in rice plant tissues





- \* [I] Imidan (dithio)  
 [II] Imidan (monothio)  
 [III] N-hydroxy methyl phthalimide  
 [IV] O,O-dimethyl thio phosphate  
 [V] O,O-dimethyl phosphate  
 [VI] Phthalimide  
 [VII] Formaldehyde  
 [VIII] Phthalamidic acid  
 [IX] Phthalic acid  
 [X] Benzoic acid  
 [XI] p-hydroxy benzoic acid

#### IV. 要 約

acaricide 로 알려진 phthalimidomethyl O,O-dimethyl phosphorodithioate (Imidan)을 水稻에 撒布했을 때 Imidan 과 그 代謝物質이 植物의 生育에 미치는 影響을 研究하기 위하여 本 實驗을 하였으며 이의 結果를 要約해 보면 다음과 같다.

(1) Imidan 의 代謝物質로 豫想되는 다음의 8 가 지 化合物을 合成 또는 精製하여 供試藥劑로 使用 하였다.

- (a) N-Hydroxy methyl phthalimide
- (b) Phthalimide
- (c) Phthalamidic acid
- (d) Phthalic acid
- (e) Anthranilic acid
- (f) p-amino benzoic acid
- (g) p-hydroxy benzoic acid

(h) Benzoic acid

(2) 上記 物質中에서 (a), (c), (d), (e)와 Imidan 의 各 10 ppm 과 20 ppm 의 Buffer Solution 을 만들어 稗 種子를 가지고 coleoptile straight growth test 를 해 본 結果 Imidan 은 10 ppm 과 20 ppm 에서 모두 control 보다 抑制效果를 나타내고 있으나 其他 物質은 모두 control 보다 生長의 促進效果를 보였으며 其中 phthalamidic acid 10 ppm 이 가장 좋은 成績을 보였다. 이것으로 보아 Imidan 自體는 生長 抑制의 效果를 보이거나 이것이 一旦 生體內에서 加水分解를 비롯한 各種 代謝作用을 받으면 그 代謝 產物이 植物生長을 促進하는 效果를 보이는 것 같다. (Table 1, Fig. 1 參照)

(3) xylene 을 溶媒로 하여 Imidan 乳劑를 만들고 이것을 稀釋하여 20 ppm, 100 ppm 및 200 ppm 의 各 濃度 乳化液을 調製한 후 이것을 培地로 하여 水稻 種子를 發芽시킨 후 12 日에 shoot 와 root 의 길

이를 測定하였다. 이의 結果를 보면 root는 Imidan 20 ppm에서, shoot는 Imidan 100 ppm에서 모두 xylene 만의 乳劑區인 control 보다 좋은 效果를 보였으며 여기에서 興味있는 것은 溶媒로 使用된 xylene은 水稻種子 뿌리의 發育에 甚한 抑制效果를 보이는 것 같다. (Table 2, Table 5 參照)

(4) 벼를 pot에 심고 2회에 걸쳐 control, Imidan, *N*-hydroxy methyl phthalimide, anthranilic acid 및 phthalimide의 10, 25, 50, 100 ppm 濃度の 各 乳劑를 살포하고 一定期間後 生育相을 調査하였더니 Imidan 區와 *N*-hydroxy methyl phthalimide 區가 control 보다 좋은 成績을 보였다.

(5) Imidan 250 ppm 乳劑를 水稻葉面에 撒布하고 3日, 5日, 7日 및 14日 後에 一定量의 葉莖을 採取하여 acetone으로 抽出하고 acetonitrile을 가지고 prechromatographic purification을 거쳐 paper chromatography에 依하여 다음과 같은 代謝物質을 檢出하였다. Imidan (Rf: 0.97~0.98), *N*-hydroxy methyl phthalimide (Rf: 0.87), phthalimide (Rf: 0.86~0.87), phthalamidic acid (Rf: 0.13~0.14), phthalic acid (Rf: 0.02~0.03), benzoic acid (Rf: 0.42~0.43) 및 *p*-amino benzoic acid 또는 *p*-hydroxy benzoic acid (Rf: 0.08~0.09)와 Rf=0.73, 0.59, 0.33, 0.23, 0.07의 未知物質을 檢出하였다. 또한 3日, 5日 等 初期에서는 未分解의 Imidan과 最初의 加水分解 產物인 *N*-hydroxy methyl phthalimide 등이 比較的 多量으로 檢出되었으나 7日, 14日 等 後期에는 生體內에서 더 많은 分解를 받아 上記 二成分은 量이 減少되고 phthalic acid, phthalamidic acid benzoic acid 및 *p*-hydroxy benzoic acid 또는 *p*-amino benzoic acid 등의 量이 增加되는 것을 볼 수 있었으며 稻體上에 撒布된 Imidan은 體内に 吸收되어 14日이 經過되면 大部分이 分解를 받는 것으로 보여진다.

以上の 結果로 보아 Imidan은 自體로서는 植物生長 促進作用이 없으나 植物體內에서 여러가지 代謝作用(enzyme의 作用)을 받아서 各種 phthaloyl 系統의 化合物이 生成되며 이들이 植物生長促進에 影響을 주는 것으로 生覺된다.

## V. 參考文獻

- (1) R.D. O'Brien; J. Agr. & Food Chem. 1 (1953)
- (2) Ripper, W., Greenslade, R. Hartley, G. J. Ecvn. Entomol., 44, 448, (1951)
- (3) Wedding, R., J. Agr. Food and Chem. I. 832 (1953)
- (4) Metcalf, R.L., Agr. Chem. 9(3), 33, 128 (1954)
- (5) Heath, O., Congr. intern. phytopharm III Congr., Paris, (1954)
- (6) Gar, K., Kipiani, R., Proc. Intern. Conf.: Peaceful use of atomic Energy, United Nations, New York, 12, 185 (1955)
- (7) J.J. Menn & J.B. McBain: Agr. Food & Chem. 12, 162 (1964)
- (8) 委託 試驗 및 檢査報告 (農藥編 2 輯) 96—97 (1964)
- (9) Saul, R.Bue; J. Chem. Soc. 69—1, 380 (1947)
- (10) Forest Experiment Station, Research Report No 2, 29 (1962)
- (11) H.F. Mac Rae & W.P. McKinley; J. Agr. & Food Chem. 11, No 1~6, 174~178 (1963)
- (12) Menn, J.J. Eldefrawi, M.E., Gordon, H.T., J. Agr. Food & Chem. 8, 41 (1960)
- (13) Edgar Lederer & Michael Lederer; Chromatography: 123 (1955)
- (14) Mitchell, L.C.: J.Assoc. Offic. Agr. Chemists 41, 781 (1958)
- (15) Menn, J.J., Erwin, W.R., Gordon, H.T., Ibid., 5, 601 (1957)
- (16) J.J. Menn, Stauffer Chem. Co., unpublished data (1964)
- (17) H.Yamada, K.T. Yasunobu; J.Biol. Chem., 237, 1511 (1962).
- (18) H. Yamada, O.Adachi, K. Ogata: Agr. Biol. Chem., in Press.
- (19) F. Buffoni, H. Blaschko: Bio. Chem. J. 89, 111 (1963)