

GC-MS를 이용한 植物激素 分析

趙 匡 衍*

Analysis of Plant Hormones using GC-MS

Kwang Yun Cho*

ABSTRACT

The analytic principles of GC and MS were explained in relation to plant hormone analyses and the characteristics of two instruments were compared. The selection of column, condition of measurement and the method of ionization to get a good spectrum were also briefly described. Finally, the pre-treatment of sample by solvent extraction method to remove the unnecessary part of sample and the synthetic method, especially reagents and reaction condition, for the preparation of ether or ester derivative which can be easily vaporized in GC were explained.

Key words : plant hormone, GC, MS, GC-MS.

1. 緒 論

GC-MS를 이용한 식물호르몬의 분석을 제대로 소화하자면 GC(gas chromatography)와 MS(mass spectrometry) 각각에 대한, 또 이 두 기종을 연결해 사용할 때의 분석원리, 기계적인 고찰, 조작방법, 분해능을 높이기 위한 각종 이론, data 해석방법 등에 필요한 이론을 설명하고, 식물호르몬의 종류, 각 호르몬의 구조, 물리화학적 성질, 시료의 조제방법 등에 관한 광범위한 분야를 망라하지 않으면 안된다. 이러한 분야에 대해서는 이미 나와 있는 여러 저서를 참고하기 바라며 말미에 참고서적을 열거하는 것으로 그치고 본고에서는 꼭 필요한 사항과 주의사항 등에 한해서 언급하기로 한다.

우선 GC의 특성을 살펴보면 분석시간이 짧으면서도 resolution이 좋고 감도가 높으며, 분석오차가 작고 조작이 용이하며 혼합물에 대해서도 분석이 가능하여 특히 정량분석에 있어서는 절대적인 위력

을 발휘하지만 화합물의 확인은 retention time에만 의존하며, 상압에서 휘발하는 화합물이어야 하는 약점이 있다.

MS는 분자식을 구할 수 있고 fragment pattern을 이용해서 화합물의 구조를 확인할 수 있으며, GC보다도 더 고감도이기 때문에 물질의 확인에는 절대적인 위력을 발휘하지만, 이것은 순수한 화합물에만 적용되며 또한 광학이성체 등은 구별할 수 없는 단점이 있다.

GC-MS는 GC와 MS를 연결해서 사용하는 장치로써 각각의 단점을 보완하고 장점을 확대시킨 중요한 분석기술로써 화합물의 확인이나 미지화합물의 구조해석에 아주 유용한 수단이다.

GC-MS를 성공적으로 운영하기 위해서는 첫째 GC를 이용해서 각 성분들이 선명하게 분리되어야 하고 둘째 분리된 각 성분들에 대해 안정한 이온을 생성시키는 방법이 강구되어야 한다.

최근의 기술발전은 눈부신 바가 있어 SIM이라는 방법을 이용하면 선명하게 분리되지 않은 혼합물에

* 한국화학연구소 농약활성연구실 Pesticide Screening Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon 301-343, Korea.

대해서도 어떤 화합물이 어느 정도 들어 있는가를 알아내는 방법도 확립되어 있다.

식물호르몬은 옥신, 지베렐린, 시토키닌, 아브시스산, 에틸렌의 다섯 그룹이 호르몬으로 인정받고 있으며, 최근에 발견된 브라시노라이드류가 여섯번째의 호르몬군으로될 가능성이 매우 높다.

이들 화합물은 보편적인 식물체의 특정부위에서 생산되어 식물체내의 각 기관에 이동해서 미량으로 식물의 생리현상을 제어하고 있다. 따라서 이들의 생체내의 양은 아주 미량이고 추출과정에서 여러가지 다른 화합물과 혼합물의 형태로 추출되어지기 때문에 분석에 임하기 전에 적당한 방법으로 前處理를 하지 않으면 안된다.

또한 이들 호르몬은 극성이 큰 -OH, -COOH 등의 관능기를 가지고 있어서 일반적으로 비점이 높고 휘발성이 낮으며 강한 흡착력을 가지고 있기 때문에 GC로 명확하게 분리하기가 어렵다. 따라서 이들 그룹은 적당한 방법으로 에테르나 에스테스를 만들어 분석하게 된다.

그러면 이제부터 분석원리를 간단하게 고찰하고 식물호르몬 분석에 필요한 전처리, 유도체의 제조방법, 각각의 호르몬에 대한 분석조건 등에 대해 살펴보기로 한다.

2. GC분석에 영향을 주는 요소

GC라고 한마디로 이야기 하지만 그 내용은 실로 다양하며 우리가 보통 사용하는 GC는 gas-liquid chromatography이다. 이것은 氣化한 검체와 고정상의 liquid간의 분배계수의 차이가 가장 큰 분리요건이 되며 이 때 담체의 성질이나 온도조건, carrier gas의 流速 등이 복합적으로 작용하여 분리능을 향상시키게 된다. 따라서 liquid phase의 선택, 좀더 일반적으로 말하면 column의 선택이 가장 중요한 요건이 된다.

Liquid phase를 선정하는 요령은 분석하고자하는 화합물의 성질과 비슷한 성질을 가지는 것을 선택하는 것이 원칙인데, 분리하려는 화합물의 구조에 따라 분리능이 좋은 liquid phase들이 경험적으로 알려져 있다.

Table 1에는 화합물들을 極性的의 순으로 정리하여 다섯개 그룹으로 분류하였다. 第 I 群은 水素 결합을 할 수 있는 화합물들로써 극성이 가장 크며 第 II 群은 active hydrogen atom이나 O, N, F와 같이 electron doner atom을 가지는 것들이고 第 III 群은 doner atom은 있으나 active hydrogen이 없

Table 1. Solute classification

<u>CLASS I (Most Polar)</u>	<u>CLASS II (Polar)</u>
Water	Alcohols
Glycol, glycerol, etc	Fatty acids
Amino alcohols	Primary and secondary amines
Hydroxy acids	Oximes
Polyphenols	Nitro compounds with α -H atoms
Dibasic acids	Nitriles with α -H atoms
	NH ₃ , HF, N ₂ H ₄ , HCN
<u>CLASS III (Intermediate)</u>	<u>CLASS IV (Low polarity)</u>
Ethers	CHCl ₂
Ketones	CH ₂ Cl ₂
Aldehydes	CH ₃ CHCl ₂
Esters	CH ₃ ClCH ₂ Cl
Tertiary amines	CH ₂ ClCHCl ₂ etc.
Nitro compounds with no α -H atoms	Aromatic hydrocarbons
Nitriles with no α -H atoms	
<u>CLASS V (Non-Polar)</u>	
Saturated hydrocarbons	
CS ₂	
Mercaptans	
Sulfides	
Hylocarbons not in Class IV such as CCl ₄	

는 것들, 第IV群은 active hydrogen은 있으나 doner atom이 없으며 第V群은 수소결합능력이 없는 가장 극성이 낮은 화합물들이 포함되어 있다.

이러한 화합물의 각 그룹에 대해 통상 사용되는 liquid phase를 분류한 것이 表 2이다. 즉 第I群의 화합물 분리에는 A群의 liquid phase가 적당함을 뜻하는데 paraffin과 같은 비극성 hydrocarbon을 분리하는 데는 극성이 낮은 Squalane과 같은 liquid phase가 좋고 alcohol과 같은 polar compound는 Hallcomid와 같은 liquid phase가 좋다.

그러나 이것은 어디까지나 원칙적인 이야기이고 실제의 경우에는 결국 시행착오적인 방법으로 선택하게 마련인데 시행착오를 줄이는 방법은 화합물의 유래를 고려하여 문헌조사를 철저히하는 수 밖에 없다. 또한 기기제작회사가 발행하는 안내책자나 팜프렛도 대단히 중요한 정보들을 제공하게 된다.

실제 식물호르몬 분석에서 많이 사용되는 liquid phase는 OV-1, OV-17, SE-30 등인데 그 이유는 호르몬 그 자체로 분석하지 않고 에테르나 에스테르를 만들어서 극성을 낮게하기 때문이다.

Table 2. Liquid phase classification

CLASS A (I)	CLASS B (II)
FFAP	Tetracyanoethyl pentaerythritol
20N-TPA	Zonyl E-7
Carbowaxes (PEG)	β' , β -Oxydipropionitrile
Ucons	XE-60
Versamid 900	XF-1150
Hallcomid	Amine 220
Quadrol	Epon 1001
Theed	Cyanoethyl sucrose
Mannitol	
Castorwax	
CLASS C (III)	CLASS D (IV & V)
All polyesters	SE-30
Dibutyl tetrachlorophthalate	SF-96
	DC-200
	Dow 11
SAIB	Squalane
Tricresyl phosphate	Hexadecane
STAP	Apiezon
Benzyl cyanide	OV-1
Lexan	
Propylene carbonate	
QF-1	
Polyphenylether	
Dimethylsulfolane	
OV-17	

3. MS 분석의 원리

MS는 荷電된 입자, 즉 이온을 그 質量에 따라 분리해서 얻어지는 스펙트럼으로 이온을 만드는 방법이나 이온을 분리하는 방법의 차이에 따라 여러가지 장치가 고안되어져 있다.

기본원리는 시료를 이온화실에서 넣어서 이온화시키고 하전된 입자를 磁場이나 電場의 세기를 변화시켜 질량에 따라 분리시키고 그 양을 사진전판이나 레코더로 기록하는 것이다.

모든 mass spectrometer는 이온의 생성과 분리를 용이하게 하기 위해 고도의 眞空상태를 유지할 수 있도록 설계되어 있다. 때문에 진공계에 손상을 가져오는 일이 없도록 반드시 조작순서에 따라 장치를 운전해야하며, 고감도이기 때문에 내부가 오염되지 않도록 특별한 주의가 요하게 된다.

시료의 도입은 시료를 미리 氣化시켜 저장실에 넣었다가 이온화실에 도입하는 간접도입법과 시료를 직접 이온화실에 넣어서 가열기화시키며 동시에 이온화시키는 직접도입법이 있다.

증기압이 낮은 유기화합물은 직접도입법을 많이 쓰고 GC-MS는 간접도입방법에 속한다.

이온화방법은 electron impact ionization (EI), chemical ionization (CI), field ionization (FI) field desorption (FD), fast atom bombard (FAB) 등의 방법이 있는데 가장 보편적으로 쓰이는 것은 EI이며, EI로 parent ion이 발생하기 어려울 때, 또는 특수목적으로 CI, FI, FD, FAD 등이 쓰인다.

여기서는 EI의 원리에 대해서 간단하게 설명하기로 한다.

試料를 超眞空($10^{-6} \sim 10^{-7}$ torr) 하에서 가열 기화시킨 후 전기적으로 가열된 텅스텐 필라멘트에서 나오는 전자선으로 때리면 시료분자는 이온화된다.

이 때 전자선의 에너지가 分子의 이온화포텐셜과 같으면 분자중에 한 개의 전자가 떨어져 나가 분자와 같은 질량을 가진 분자이온이 생기며 전자선에 에너지가 이온화포텐셜보다 크면 분자이온내의 결합이 끊어지거나 전자의 재배열이 일어나서 여러가지 이온이 생기게 된다. 이것을 fragment pattern 이라고 하는데 화합물의 구조해석에 아주 유용한 정보가 된다. fragment pattern에 대해서는 지면관계상 설명할 수 없으나 이것은 전문서적을 통해서 철저히 공부해 두어야 未知의 화합물 분석에 응용할 수 있

게 된다.

Mass spectrum을 해석할 때는 스펙트럼이 제대로 된 것인가를 먼저 확인 해야 한다. 즉 mass marker를 이용하거나, GC-MS의 경우는 GC의 stationary phase의 특정 m/e가 제위치에 있는가를 확인할 수도 있고, m/e 28을 확인하여 N₂나 CO, C₂H₄ 등의 피크를 확인하는 것도 한 방법이다. 다음에는 각 피크들을 검토하고 스펙트럼해석에 들어가게 된다.

Molecular ion으로부터 분자식을 결정하게 되는 데 이 때 유용하게 사용되는 것이 질소법칙과 불포화도 계산법이다.

다음은 각 피크의 유래를 고찰하게 되는데 fragmentation이나 rearrangement pattern에 관해서는 별도의 저서를 참고하기 바란다. 이것을 설명하기에는 너무 양이 많고 또한 너무도 예외가 많아서 결국은 스펙트럼을 많이 보고 문헌을 많이 읽어서 눈에 익히는 걸 밖에 없으며 심한 경우에는 사용한 기종에 따라서도 전혀 다른 모양의 스펙트럼이 얻어지기도 하기 때문이다.

4. 식물호르몬 분석의 前處理

정제된 상태의 식물호르몬을 분석하는 일은 실제의 경우 거의 없다.

통상 식물체를 추출하거나 또는 천연의 다른 생물체로부터 추출하는 것이 보통의 경우이다. 이러한 경

우에는 목적하는 식물호르몬 뿐만 아니라 그외에 여러가지 화합물이 한꺼번에 추출되어 분석을 방해하게 된다. 따라서 적당한 방법으로 전처리를 하여 가능한한 불순물을 제거하는 것이 분석을 바르게 할 수 있고 분석의 감도를 향상시킬 수 있게 된다. 전처리의 방법은 여러가지 방법이 있으나 그 중에서도 식물호르몬 분석에 자주 이용되는 것이 용매분획법이다. 그림 1에 그 개요를 표시하였다.

용매분획법은 液性を 변화시켜 가며 유기용매로 추출하므로써 산성물질, 염기성물질, 중성물질로 분획할 수 있으며 유기용매를 변화시킴으로써 용해도의 차이에 따른 분획이 가능하여 간단한 조작으로 화합물을 대별할 수 있어서 이 조작만으로도 대부분의 식물호르몬 분석에 필요한 순도를 얻을 수 있는데 더욱 순도가 필요한 경우에는 chroma chromatography나 TLC, paper chromatography 등을 병용 하면 된다.

이렇게 해서 얻어진 시료를 그대로 분석에 사용할 수도 있으나 GC-MS의 경우에는 화합물이 기화되어야 하므로 기화하기 쉽도록 적당한 형태의 유도체로 만들 필요가 있다.

식물호르몬분석에서 통상 이용되는 방법은 diazomethane을 사용하여 carboxylic acid基를 methylation하여 ester를 만드는 방법이다. 이 반응은 위에 상술하겠지만 常溫에서 시약을 넣어주고 가볍게 흔들어 주는 것으로 반응이 완결되기 때문에 대단히 간편하고 유용한 방법이다.

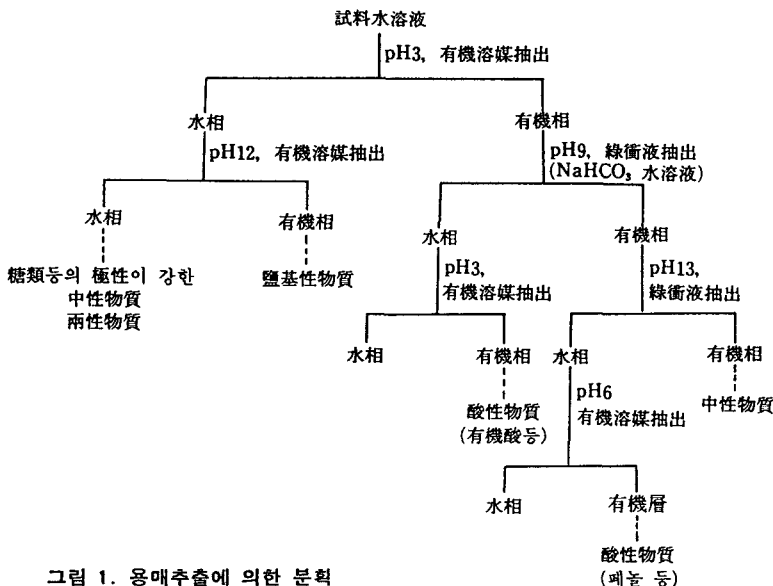


그림 1. 용매추출에 의한 분획

diazomethane 은 냄새가 없는 황색의 有毒 gas로서 무수에테르용액으로 보관하면서 사용하는데 반드시 배기가 잘되는 곳에서 실험을 해야 한다. 또한 심한 충격을 주거나, 날카로운 물질, 또는 불순물이 있으면 폭발하므로 취급에 주의를 요한다.

diazomethane 의 맹독성과 폭발성을 다시 한번 강조한다.

또한 hydroxy 基도 수소결합을 하기 때문에 통상 ether 유도체를 만들어 분석을 한다. 보통 silylating agent 를 사용하여 trimethylsilyl (TMS) ether로 만든다.

5. Diazomethane의 제법과 Silylating Reagents

Diazomethane 의 제법은 여러가지가 알려져 있으나 그 중에서 간편하게 만들 수 있는 방법은 p-tolylsulfonyl methyl nitrosamide 를 이용하는 방법이다.

이것은 여러 회사에서 판매할 것으로 생각되나 일본의 東京化成에 주문하면 제법설명서와 함께 구입할 수 있다.

이것을 이용한 diazomethane 의 제법은 Organic Synthesis Collective Volume IV, 250(1963)에도 기재되어 있다.

기타의 방법은 OSCV II, 165 (1943), OSCV III, 119 (1955) OSCV III, 244 (1955), OSCV V, 351 (1961) JACS 70, 1974 (1948) Can, J. Research, 28B, 683(1950)을 참고하기 바란다.

Silylating reagents 역시 여러 종류가 東京化成 카타로그에 나와 있으므로 사용목적에 적합한 것을 고르면 된다.

Silylating reagent는 당, 알콜, 페놀, 스테롤, 아미노산 등의 난휘발성 극성화합물을 에테르나 에스테르화시켜 열에 안정한 휘발성 화합물을 만드는데 이용되며 산분해에 의해 본래의 화합물로 돌아가기 때문에 정제에도 이용할 수 있다.

6. 식물호르몬 분석의 실례

Gibberella fujikuroi 균이 생산하는 gibberellin 의 분석을 예로 들어 설명하기로 한다. *G. fujikuroi* 는 벼의 키다리병의 병원균으로써 이 菌의 대사산물 중에는 여러가지 gibberellin 이 들어 있다.

Gibberellin 이 처음 발견된 것은 벼의 키다리병을 연구하는 과정에서 *G. fujikuroi* 가 생산하는 식물독으로 발견되었으나 후에 gibberellin 이 광범위한 식물체내에 존재함이 알려지고 여러가지 식물의 생리현상을 조절하는 것이 밝혀짐으로써 식물호르몬으로 인정받게 된 것이다.

식물체내의 gibberellin 함량은 너무나 미량이고 생육단계에 따라 함량의 변화가 극심하기 때문에 gibberellin 의 생합성이나 대사연구 등에는 *G. fujikuroi* 균이 많이 사용되고 있으며 시판되는 gibberellin 들은 모두 발효에 의해 생산되고, 이것을 출발물질로해서 다른 유연체들을 합성하기도 한다.

G. fujikuroi 의 배양액에는 gibberellin 과 함께 배양액에 포함되어 있는 무기염들, 그리고 당과 같은 영양원들이 들어 있다.

배양액을 여과한 뒤 묽은염산으로 pH를 2로 조절하고 동량의 ethylacetate 로 2~3 회 추출한다. 유리형의 gibberellin 은 대부분 ethylacetate 층으로 옮겨온다. 이조작만으로도 GC 분석에 필요한 순도는 얻을 수 있으며 보다 순수하게 하려면 다음의 방법을 사용한다.

유기층을 포화중탄산나트륨용액으로 추출하고, 이 물층(aqueous phase)을 다시 묽은 염산으로 pH 2로 조정하고 ethylacetate 로 추출하면 gibberellin 은 ethylacetate 층으로 옮겨온다. ethylacetate 층을 소량의 물로 씻고 무수황산나트륨으로 건조한 뒤, 감압하에서 용매를 날려버리면 ethylacetate 가용산성 분획을 얻을 수 있다.

이 gibberellin 혼합물의 일부를 소량의 methanol 에 녹이고(실험 규모에 따라 달라지겠지만 배양액 20 ml의 경우 0.2ml의 methol) microsyringe 를 이용하여 20 μ l 를 취해 소형시험관에 담는다.

이 시험관에 diazomethane-ether 용액은 2~3 방울 떨어 뜨린다. diazomethane 의 양은 용액이 황색을 띠면 충분하다. 용매를 날려 버리면 gibberellin 의 에스테르가 얻어진다. 이것을 일정량의 용매에 녹이고 일정량을 취해서 GC로 분석한다.

hydroxy基가 많은 gibberellin 의 경우에는 설명한 바와 같이 ester를 만든 뒤, 이 에스테르를 적당한 silylating reagent 와 반응시켜 TMS 에테르를 만들어 GC로 분석한다.

Silylating reagent 의 양은 같은 mole 수이면 되지만 약간 과잉으로 넣어주는 것이 안전하다. 위에서 만들어진 ester를 예로 들면 10 μ l 의 피리딘에

속이고 BSA 10 μ l, TMCS 5 μ l 를 넣어 주면 충분하다.

GC 조건은 1% OV-1(Shimalite, 80-100mesh) 을 충전한 유리칼럼(3mm \times 2m)을 사용하여 칼럼 온도 220 $^{\circ}$ C 정온, 시료주입구 230 $^{\circ}$ C, 검출기(FID) 온도 255 $^{\circ}$ C로 유지하면서 질소를 70ml/m 로 흘려주면 gibberellin의 methyl 에스테르 TMS 에테르는 A₁, A₃ 는 5~6 분 A₄ 와 A₇ 은 3~4 분에 나오게 된다.

실제의 분석조건은 예비실험을 통해서 확정해야 한다.

7. 結 論

서두에서 말했듯이 GC-MS를 이용한 식물호르몬 분석이라는 테마는 대단히 광범위하고 전문적인 지식을 요하는 내용이어서 필자의 부족함만 들어내어 미진한 마음을 금할 수 없다.

그러나 GC-MS의 분석효과를 명확히 하고, GC-MS를 효율적으로 이용하기 위하여 시료의 전처리나 유도제를 만드는 방법에 대해서 설명한 것은 대단히 유익했다고 생각한다.

GC나 MS 또는 GC-MS의 원리에 대해서는 많은 저서가 있기 때문에 이들을 참고하면 될 것이다. GC-MS를 효율적으로 사용하기 위해서는 fragmentation pattern 이나 rearrangement 에 대해 충

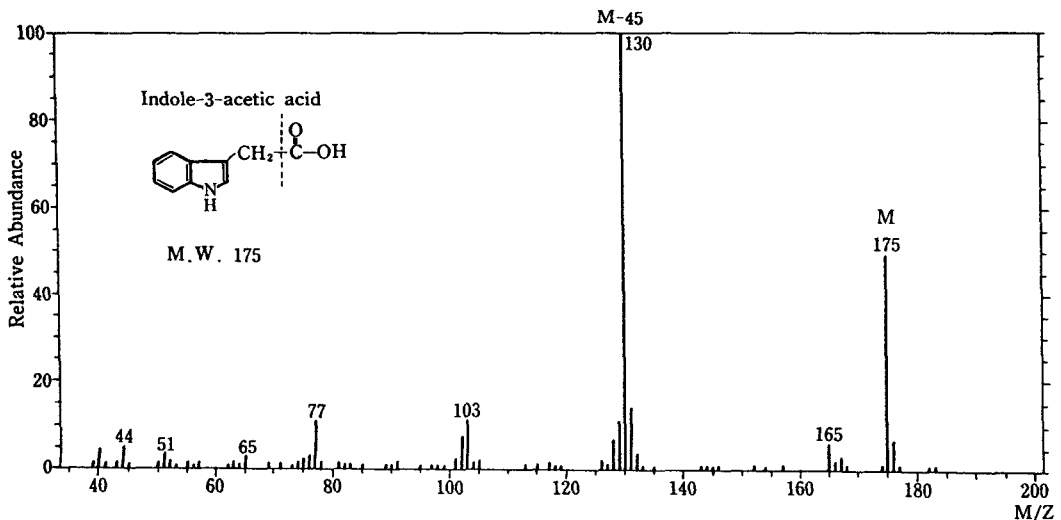
분한 지식을 가지고 있어야 미지의 화합물에 대해 구조를 확인할 수 있다. 이러한 목적으로는 참고문헌 1과 2를 후원한다.

식물호르몬에 관한 화학과 생물의 입문서로서는 참고문헌 3이 적당하며 식물호르몬에 관한 화학의 전문서로서는 참고문헌 4를 들 수 있다. 특히 참고문헌 4는 천연 및 합성의 식물호르몬에 대해 연구의 역사에서부터 추출, 정제, 구조확인, 합성, 생합성, 대사 등에 이르기까지 자세히 언급되어 있으며 수많은 참고문헌이 수록되어 있다.

끝으로 대표적인 식물호르몬의 MS 스펙트럼을 옮겨 실는다.

參 考 文 獻

1. H. Budzikiewicz, C. Djerassi and D. Williams, Mass Spectrometry of Organic Compounds, Holden-Day, (1967).
2. R. Silverstein, G. Bassler and T. Morrill, Spectrometric Identification of Organic Compounds, 3rd Ed, John Wiley & Sons Inc. (1974).
3. 趙匡衍·安龍濬·安鍾雄 共譯, 生理活性天然物化學, 대한교과서주식회사, 서울(1988).
4. N. Takahashi, Chemistry of Plant Hormones, CRC Press(1986).



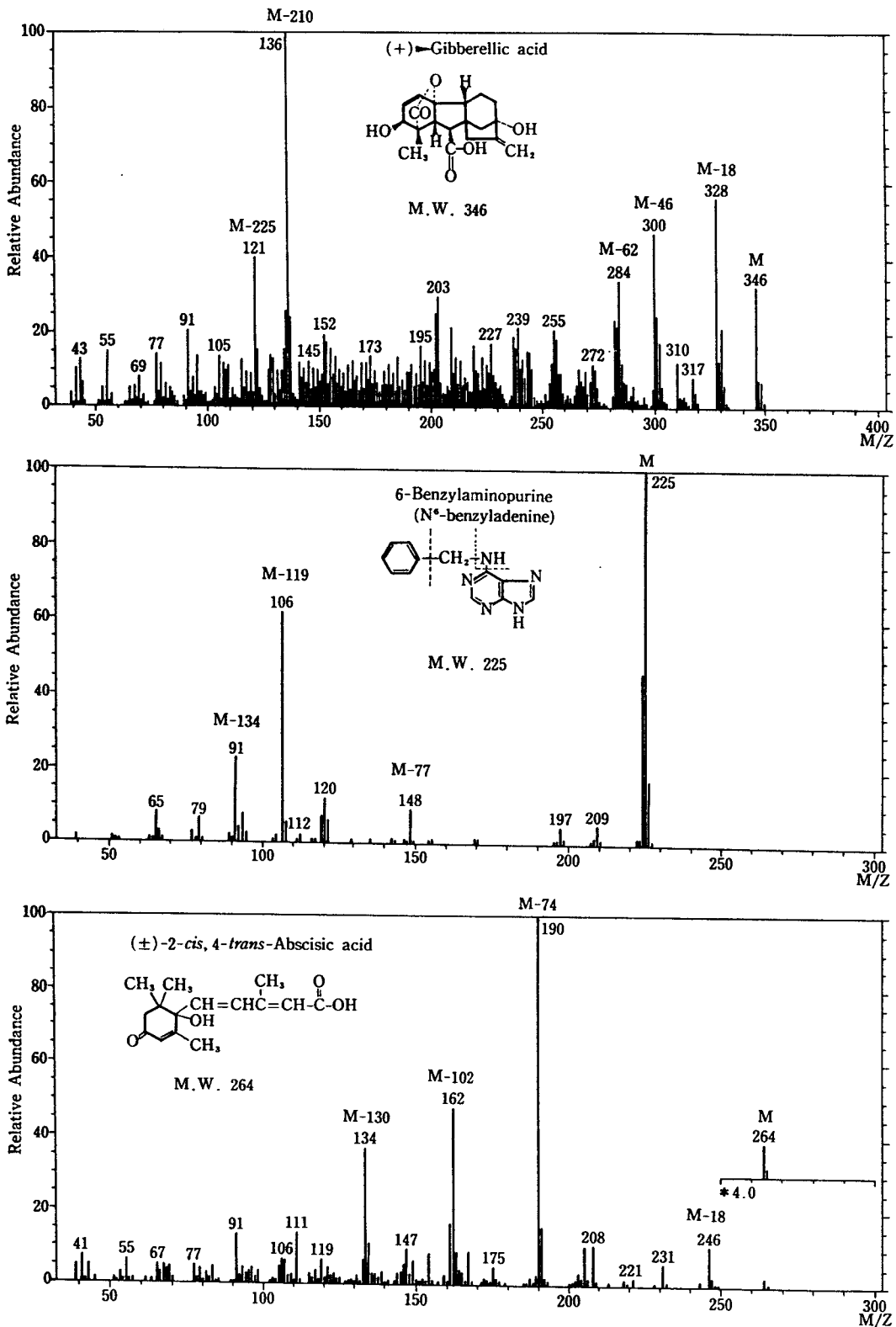


그림 2. Some MS Spectra Examples of Major Plant Hormones