

콩과 벼懸濁培養 중 PCP 水溶性代謝物の 同定 3. PCP glucose conjugates의 同定

金弼濟* · 朴昌奎*

Identification of Water Soluble Metabolites of Pentachlorophenol(PCP) in the Suspension Cultures of Soybean and Rice Cells

3. Identification of PCP Glucose conjugates

Pil-Je Kim* and Chang-Kyu Park*

Abstract

In order to identify PCP glucose conjugates transformed from PCP in soybean and rice cell suspension cultures, the purified metabolites were acetylated, purified twice by HPLC using a normal and a reversed phase column, and then subjected to fast atom bombardment(FAB) mass spectrometric analysis.

As were the conjugates, their acetylated derivatives of the glucose conjugates formed at the early stage(48 hr) of metabolism were separated by HPLC into three fractions. FAB-MS analysis of each fraction revealed that, at least in two fractions, the locations of the spectral peaks were practically coincident with those deducible from the structures of pentachlorophenyl and tetrachlorophenyl β -D-glucopyranosides.

Based on information obtained from mass spectral and chromatographic analysis of not only the water-soluble metabolites but also aglycones and glycone, it is concluded that PCP is primarily metabolized to glucose conjugates, which account for more than 50%

* 서울대학교 농업생명과학대 농화학과

Department of Agricultural Chemistry, College of Agricultural & Life Sciences, Seoul National University, Suwon, Korea.

recovery of the PCP-conveyed radioactivity from the water soluble metabolites: The conjugates are mainly made up of pentachlorophenyl β -D-glucopyranoside, tetrachlorophenyl β -D-glucopyranosides(probably 2 or more isomers), and 2-hydroxy-3,4,5,6-tetrachlorophenyl β -D-glucopyranoside.

Key words : Pentachlorophenyl β -D-glucopyranoside, Tetrachlorophenyl β -D-glucopyranoside
2-Hydroxy-3, 4, 5, 6-tetrachlorophenyl β -D-glucopyranoside.

서 론

식물이나 곤충체로 직접 유입되거나 다른 약제의 분해로 생성된 phenols는 uridine diphosphate glucose(UDP)등 glucose供與體와 glucosyl transferase에 의해 glucose와 conjugation반응을 하여 O-glucoside로 轉換된다^{1,2)}. 이러한 glucose conjugation반응은 生理活性이 높은 phenol대사물의 cell내 농도를 調節하는 機構로 Kuhr는 carbamate계 약제의 곤충에 대한 독성은 phenols 대사물이 glucoside로의 轉換속도에 따라 부분적인 차이가 있다고 하였으며, Bull과 Whitten은 chlorpropham의 대사물인 2-hydroxychlorpropham의 O-glucoside 형성이 약제의 약해와 직접적인 관련이 있다고 제안하였다²⁾. 이와 같이 conjugation반응은 약제의 生理적 활성을 저하시키는 無毒化反應이라는 해석이 주류를 이루고 있음에도 불구하고 IAA의 아미노산 conjugation반응은 IAA의 수준을 cell의 필요에 따라 조절하는 수단으로 밝혀졌고, 또한 cell내 conjugates를 분해시키는 효소도 동시에 존재하기 때문에 환경여하에 따라서는 conjugates로 부터 독성성분이 遊離될 수 있다고 하는 의견이 제기되고 있다^{1,2)}. 따라서 농약의 대사를 연구함에 있어 conjugates를 정상적으로 파악하는 접근방식으로는 농약의 종합적인 안전성 평가를 기대하기 어렵다는 보고도 있다.

최근에는 conjugates를 연구함에 있어 여러 기술적인 문제가 해결되어 이들 구조를 파악할 수 있게 되

었다. 즉, 소량의 conjugates밖에 확보할 수 없었던 문제가 組織培養을 이용하여 多量の conjugates를 얻을 수 있게 되고^{3,4-6)}, 이를 preparative HPLC 등 chromatography로 효율적인 정제가 가능해졌고^{1,9-11)}, 또한 FAB(fast atom bombardment) 및 CI(chemical ionization)방법으로 農藥의 glucose conjugates와 같은 비휘발성이거나 분자량이 큰 대사물에 대해서도 구조가 확인되고 있다.

Frerar 등은¹²⁾ 가수분해 산물의 조사와 conjugates 자체 및 유도체에 대해 FAB와 CI/MS를 이용하여 metribuzin의 N-glucoside의 구조를 확인하였으며, 이밖에도 phenmedipham¹³⁾, chloresulfuron^{14, 15)} picloram¹⁶⁾ 등의 glucose conjugates가 同定되었다.

염화페닐류중 환경위해성이 가장 큰 것으로 알려진 PCP를 이용하여 현탁배양에서의 PCP glucose conjugates의 形成, 特性 및 주요 aglycone을 조사한 결과 PCP glucose conjugates는 PCP의 주요 수용성 대사물이며, 대사 초기에 이미 여러 종류의 aglycone이 glucose와 conjugates를 이루고 있음을 보고한 바 있다^{17, 18)}. 그러나, 이러한 접근만으로는 생체 내에서 여러 종류의 conjugates가 동시에 생길 수 있고 이들의 특성도 차이가 있기 때문에 농약의 안전성 평가에 제한적일 수밖에 없다. 즉 conjugate의 구조 등 수용성 대사물을 확인하는 것이 식물체와 환경에서 약제의 fate를 구명하는데 필요하다고 판단하여 본 연구에서는 이제까지의 연구 결과를 바탕으로 glucose conjugate의 구조확인을 시도하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 기기

Glucose conjugates는 前報에서 aglycone과 glycone 분석에 사용되고, β -anomer임이 입증된 glucose conjugates를 사용하였다. High resolution mass spectrometer는 fast atom bombardment(FAB)이 부착된 VG Analytical 70-VSEG으로 이를 同定用 MS로 사용했으며, 기타 TLC plate, HPLC, GC/MS 및 동위원소 측정용 시약, 기기는 전보와 같다^{17, 18)}.

2. 방법

1) [Phenyl-U-¹⁴C]pentachlorophenyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl- β -D-glucopyranoside(PAG)

標識 PAG는 α -acetobromoglucose(2,3,4,6-tetra-O-acetyl- α -D-glucopyranosylbromide, Aldrich)와 phenol 류를 base 조건에서 결합하는 König-Knorr 방법^{19, 20)}을 참고하여 [phenyl-U-¹⁴C]PCP를 phenol로 사용, 합성하였다. HPLC로 정제한 PAG의 比放射能은 353.35 KBq/mmole이었으며, 非標識 PCP를 이용하여 합성한 PAG의 구조를 NMR, MS 및 IR로 확인하였다.

합성한 PAG는 HPLC 상에서는 逆相(μ Bondapak/C₁₈) 및 順相(Richrosorb/Si)에서 단일 peak를, 그리고 DSC(Perkin Elmer DSC7)분석시에도 특이한 용점(MP 166°C)를 보여 일단 PAG를 anomeric mixture로 보기 어려웠다. 그리고 FT-NMR(¹H, 300 MHz, Bruker AM-300) 분석결과 H₁(5.56ppm)의 coupling constant(J)가 7.8Hz로 β -D-glucose tetraacetyl derivatives에서 anomeric proton을 assign할 때의 J=7.7-8.0 Hz과 α -configuration에서 관찰되는 J=3.7Hz^{10, 12, 21)}와 비교할 때 합성한 PAG는 β -configuration임을 알 수 있었다. 또한 H₂ (4.98ppm, J=9.6/9.4, dxd), H₃(5.40 ppm, J=9.6/9.6, dxd) 및 H₄(5.15ppm) 등을 assign할 수 있었으며, H₅ 및 H₆는 각각 4.00ppm과 4.12ppm을, acetyl group의 proton은 1.94-2.07ppm의 chemical shift를 각각 보였다. C-13 NMR(75.5MHz, Bruker

AM-300) 분석에서는 C₁(asymmetric carbon)을 보여주는 chemical shift(100.87ppm)를 확인할 수 있었으며 ⁴⁾ 기타 C₂(71.4ppm), C₃(77.0ppm), C₄(68.2ppm), C₅(72.3ppm) 및 C₆(61.5ppm) 등도 assign 하였다. 그리고 phenyl基의 Ca(148.0ppm), Cb 및 Cd(128.7ppm), Cc(132.0ppm)와 acetyl group의 methyl(20.0ppm)과 carbonyl(169.2-170.4ppm) 등의 carbon을 각각 확인할 수 있었다. 이상의 기기분석 결과로 합성한 PAG는 예상한 화학구조를 갖는 것으로 판단되었다(Fig. 3의 구조 참조).

2) Acetylation glucose conjugate(s)의 精製 및 FAB/MS 分析

충분히 정제한 glucose conjugate(s)에 acetic anhydride/pyridine(9 : 1) 용액 2ml를 가하고 40°C에서 4 시간 동안 반응시켰다¹²⁾. 반응 용매를 질소가스를 이용하여 제거하고 2회 연속 TLC(용매계 : n-hexane-diethyl ether-formic acid, 70/30/4 및 diethyl ether-n-hexane, 9/1)한 후, 방사능이 확인된 부위를 ethylacetate로 용출시켰다. 순상 column을 사용하고 용출속도는 1.0ml인 조건에서 acetylation glucose conjugate(s)를 HPLC로 분리하였다. RT가 16분~25분 사이인 3개의 분획을 모으고, 2회 더 같은 조건의 HPLC로 정제하였다. 마지막으로 각 분획을 역상column을 이용한 HPLC로 정제하여 FAB 분석용 시료로 하였다.

결과 및 고찰

1. Acetylation glucose conjugates 의 特性

농약의 대사과정에서 생성되는 conjugate는 순수분리가 어렵고, 불안정하여 직접적인 구조확인에 많은 어려움이 있다. 따라서 많은 경우 간접적인 방법으로 conjugate 구조를 예측하거나 확인하고 있다. 즉, 전보와 같이 conjugates를 가수분해하고 이때 생성된 exocone(glucose conjugate의 경우 aglycone)및 endocone(glycone)을 각각 분석하여 본래 conjugate 구조를 예측

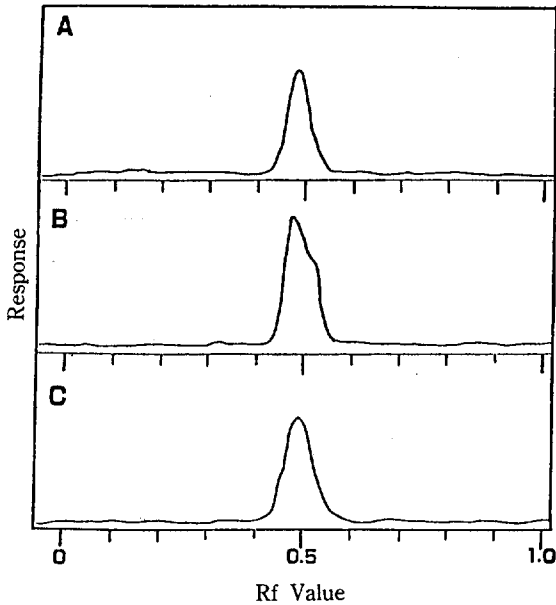


Fig. 1. Radiograms showing the same migration of authentic [¹⁴C]PAG(A) and acetylated glucose conjugates on a TLC plate. Glucose conjugates were isolated from soybean cells(B) and rice plants(C), and then acetylated.

하는 방법이 일반화되어 있기는 하지만 構造同定으로는 인정되고 있지는 않다. 그러나, conjugate를 가수분해하지 않고 誘導體(methyl-, acetyl- 및 TMS-)화 시킨 것을 분석하여 intact conjugate 구조를 확인하는 방법은 비록 유도체화 반응 중에 알려지지 않은 구조변형 가능성이 있기도 하지만 conjugate 동정기술로 제안되고 있다. Thomas 등은²²⁾ 2,4,5-T의 대사과정에서 생성된 glucose conjugates를 acetyl화하여 합성한 acetylglucoside와 비교하여 동정하였다. Frear 등도¹⁶⁾ picloram의 glucose 및 gentiobiose conjugates를 acetyl화한 다음 CI/MS로 각각의 conjugates를 동정하였으며, 이외에도, metribuzin(acetyl 및 methyl화)^{10, 12)}, triclopyr(methyl화)³⁾, chloramben(acetyl화)²¹⁾ 등의 conjugates도 유사한 방법으로 동정되었다.

본 연구에서는 glucose conjugates를 acetyl화 한 다음

conjugate의 구조 확인을 시도하였다. 대두 및 벼에서 분리한 glucose conjugates는 acetyl화 시켰을 경우 chloroform/water 분배에서 모두 유기용매로 추출되었으며, 또한 용매 分配前 전체 acetyl화 산물의 TLC 조사(Fig. 1)에서도 acetyl화되지 않은 glucose conjugates(Fig. 1에서 origin)가 없는 것으로 보아 모두 acetyl화되는 것으로 판단되었다. Acetyl화된 glucose conjugates는 aglycone 확인과정에서 예측된 몇 개의 peak는 TLC 상으로 확인할 수 없었다. 합성한 PAG와 acetyl화된 glucose conjugates는 TLC에서 Rf값이 일치하는 사실로 보아 β-glucosidase에 의한 glucose conjugates 확인 방법이 무리가 없음을 알 수 있었다. 그리고 glucoside를 acetyl화 시킬 때의 anomeric conversion 여부는 α- 및 β-form의 p-nitrophenylglucopyranoside 각각을 acetyl화하고, HPLC 및 NMR로 확인한 결과 anomeric conversion 없이 反應이 進行됨을 알 수 있었다. 즉, glucose conjugates 경우에도 acetyl화 反應 중 構造의 變形은 없는 것으로 추정할 때 합성한 PAG와 acetyl화된 glucose conjugates가 TLC에서 Rf 값이 일치하는 것으로 보아 acetyl화된 glucose conjugates 중에 PAG와 동일한 화합물이 포함되어 있을 뿐만 아니라 다른 conjugates 들도 β-form의 glucoside일 가능성이 높고 전보의 aglycone과 glycone 동정 결과에 대한 재 확인 등 glucose conjugates 구조에 관한 많은 정보를 포함하고 있다고 생각되었다.

전보와 상기의 결과 즉, 현탁배양에서 분리한 glucose conjugates가 1) β-glucosidase에 의해 선택적으로 가수분해되고¹⁷⁾ 2) aglycones는 PCP를 포함하여 구조가 유사한 몇 개의 PCPs이고 3) carbohydrate moiety는 glucose(β-추정)이며¹⁸⁾ 4) acetyl화 반응물 모두가 합성한 PAG와 TLC 상에서 Rf가 일치한다는 사실은 glucose conjugates에 관한 최소한의 정보만 추가로 확보해도 PCP뿐만 아니라 PCP와 구조가 유사한 aglycone을 갖는 glucose conjugates의 구조를 확인할 수 있다고 판단되었다.

2. Acetyl화 glucose conjugates의 HPLC

구조가 확인된 PAG의 RT가 16.5분인 HPLC조건에서

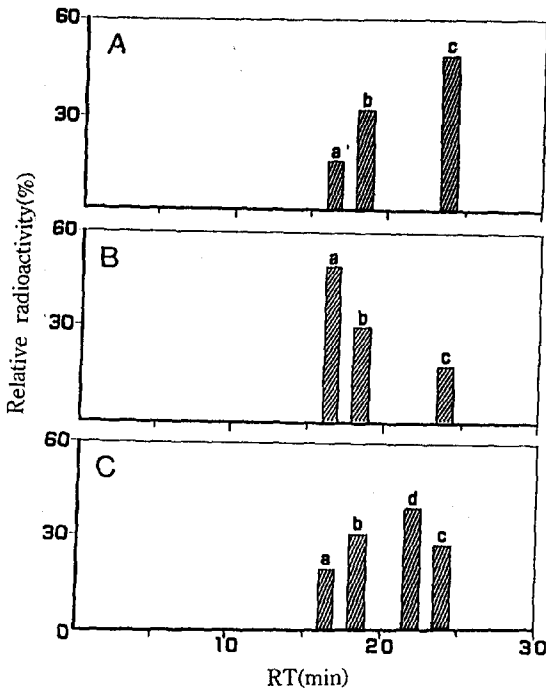


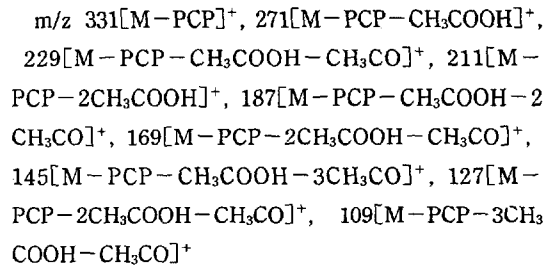
Fig. 2. HPLC profiles of acetylated glucose conjugates from soybean(A), rice(B) cells and rice plants(C). Each fraction(a, b, and c in A and B) was collected and further purified for the measurement of FAB-MS spectra. Chromatographic conditions : column, Richrosorb/Si₆₀, 10 μm (25cm×4.6mm id) ; solvent system, isooctane-isopropanol(98.5/1.5) ; flow rate, 1.0ml/min. Radioactivity of eluate was assayed at every 0.5min with LSC.

acetylated glucose conjugates를 分離하였다(Fig. 2). 현탁배양에서 얻은 대두 및 벼의 각 acetylated conjugates는 RT가 동일한 3개의 peaks를 확인할 수 있어 존재 형태는 같은 것으로 판단되었으나 방사능의 개별적인 분포는 큰 차이가 있었다. 그리고 HPLC분석에서 16분에서 25분 사이에 conjugates는 대부분 용출되나, 지금까지의 결과에서 예측한 PCPs glucose conjugates 중 염소의 수가 같은 isomer는 분리되지 않는 것으로 판단되었다. 그리고 수도체에서 분리한

glucose conjugates 중 현탁배양과 정성적으로 차이가 있는 분획(peak d)은 aglycone 분석으로 미루어 보아 PCP의 glucose conjugates로 추정되었다. 현탁배양에서 얻은 acetylated glucose conjugates는 순상과 역상 column를 사용하여 천연에 존재하는 glycoside의 제거에 주안점을 두어 HPLC로 정제하였으며 이 과정에서 대두와 벼의 개별 분획(Fig. 2에서 A와 B의 a, b 및 c)은 순상이나 역상 column에서 항상 RT가 같았다. 따라서 conjugate 구조에 관한 확실한 정보를 위해서는 많은 시료가 필요할 것으로 판단하여 대두와 벼에서 얻은 acetylated glucose conjugates를 혼합하고 RT 별 분리도 병행하였다.

3. PAG의 MS spectra

농약의 conjugate 구조 확인은 분자량이나 화학적 안정성에 따라 차이는 있지만 유도체화된 conjugate를 EI 나 CI/MS 분석을 통해 일부 얻어 왔다. 본 연구에서도 시료에 앞서 합성한 PAG를 EI/MS로 분석하여 M⁺ 등 conjugate의 구조확인에 필수적인 정보를 얻을 수 있는지를 조사하였다(Fig. 3의 A). 그러나 PCP moiety로 추정되는 fragment(m/z 264) 및 전형적인 tetra-O-acetyl glucose derivatives의 MS fragment는 확인할 수 있었으나, M⁺는 확인할 수 없었다. 즉 EI/MS분석에서는 시료의 양이 충분했음에도 합성한 PAG 분자구조를 최종 확인할 만한 정보를 얻을 수 없었다. Spectrum에서 알 수 있듯이 PAG는 이온화의 어려움은 없으나 이 과정에서 glucosyl moiety(m/z 331)가 쉽게 떨어져 M⁺가 mass spectrum에 나타나지 않는 것으로 판단된다. 각 fragment를 다음과 같이 assign 하였다.



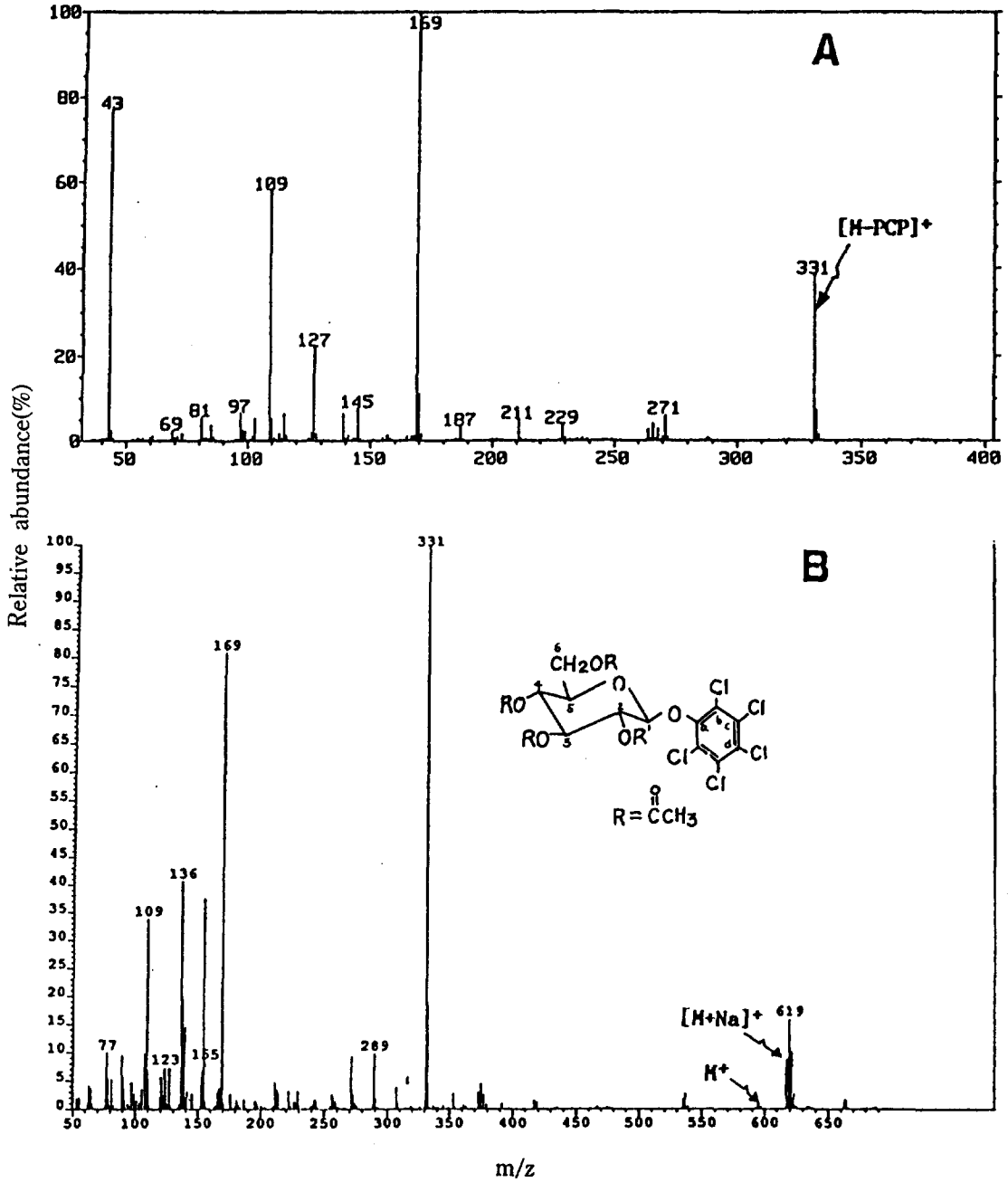


Fig. 3. EI(A) and FAB(B)/MS spectra of synthetic PAG. Spectrometric conditions : (A) ionization energy, 70eV (B) ionization energy, 35 KeV(Cs⁺ ion beam) ; matrix, p-nitrobenzyl alcohol.

이상의 EI/MS분석에서도 확인되었듯이 일상적인 MS방법으로는 시료의 양 문제를 떠나서도 conjugates와 같이 분자량이 비교적 큰 화합물은 M⁺ 등 구조에 관한 가장 기초적인 정보를 얻는 데 많은 어려움이 있다. 이러한 문제를 어느정도 해결한 MS기술이 FAB에 의한 이온화 방법으로 농약의 conjugates 구조 확인에 매우 유용하게 이용되고 있다.^{10, 13-15)}

FAB을 이용하여 농약의 conjugate를 확인할 때 [M+H]⁺, [M+Na]⁺ 및 [M+K]⁺ ion peak에서 M⁺에 관한 많은 정보를 얻고 있다. 이러한 ion peaks는 대부분 시료나 glycerol, thioglycerol, glycerol/oxalic acid, thioglycerol/ammonium acetate 등의 matrix로부터 생성되는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 fragments에서 분자구조에 관한 중요한 정보를 얻고 있다. Lamoureux 등은¹⁵⁾ fluorodifen의 malonyl cysteine conjugate를 FAB 분석했을 때 glycerol을 matrix로 할 경우 M⁺를 assign하지 못했으나 oxalic acid를 첨가하고 분석하여 [M+H], [M+Na]⁺, [M+NH]⁺을 얻었고 여기에서 분자구조를 추론하였다. 이외에도 [M+2Na-H]⁺와 [M+3Na-2H]⁺ 등이 FAB spectrum에서 검출됨을 보고하였다. 또 sodium carbonate나 sodium chloride 등을 시료에 첨가하여 위에 언급된 fragment로부터 여러 정보를 얻기도 하였으며, Frear 등은¹⁴⁾ chlorsulfuron의 O-glucoside conjugate의 FAB 분석시 matrix로 glycerol과 glycerol-d₃를 사용하여 각각에서 얻은 [Gly]⁺, [M+H]⁺ 및 [M+Na]⁺로부터 glucoside 구조에 관한 더 구체적인 정보를 얻을 수 있었다고 하였다.

EI/MS 분석에 사용한 것과 동일한 PAG를 FAB/MS로 mass fragment pattern을 조사하였다(Fig. 2의 B). 예상한 M⁺(594) 보다는 [M+Na]⁺(617)의 abundance가 높게 나타났다. 그러나, FAB 분석시 [M+Na]⁺가 흔히 나타나고^{10, 13, 14)} 또 염소화 화합물에서 나타나는 fragment들의 cluster와 이들의 abundance, 특히 [M+Na]⁺주위(M+Na, M+Na+2 및 M+Na+4)의 abundance(Fig. 3 참조)를 고려할 때 M⁺(594)를 PAG의 molecular ion으로 assign할 수 있었다. 각 fragment를 아래와 같이 assign 하였다.

m/z 617[M+Na]⁺, 594[M]⁺, 534[M-CH₃COOH]⁺, 373[M-3CH₃COOH-CH₃CO]⁺, 331[M-PCP]⁺, 289[M-PCP-CH₃HCO]⁺, 271[M-PCP-CH₃COOH]⁺

이와 같이 FAB/MS는 conjugates에 관한 aglycone 등 몇 가지 예비 지식만 있다면 그 구조를 확인하는데 매우 유용함을 알 수 있었다.

4. Acetyl化 glucose conjugates의 FAB 분석

대두와 벼의 acetyl化한 glucose conjugates를 glucose conjugates 분리과정에서 혼합하여 RT에 따라 분리한 a(RT; 16-17분), b(RT; 18-19분) 및 c(RT; 23.5-25분)분획(Fig. 2 참고)을 FAB으로 분석한 결과 a 및 b분획에서 MS spectra를 얻을 수 있었다. HPLC의 분획 a는 합성한 PAG와 RT가 동일하고 또한 glucose conjugates의 aglycone 분석결과와 함께 생각하여 PCP-glucose conjugate(MW; 596)로 추정된 대사물이다. 분획 a의 mass fragment pattern(Fig. 4)이 PAG와 정확하게 일치하지는 않지만 [M+Na]⁺(617) 등 多鹽素化 화합물에 특이한 fragment로부터 상기 Fig. 3에서와 같은 유추 방법으로 M⁺(594)를 확인하였다. 각 fragments는 다음과 같이 assign 하였다.

m/z 617[M+Na]⁺, 594[M]⁺, 533[M-CH₃COOH]⁺, 457[M-CH₃COOH-Cl-CH₃CO]⁺ 413[M-CH₃COOH-Cl-2CH₃CO]⁺, 399[M-2CH₃COOH-Cl-CH₃CO]⁺, 383[M-3CH₃COOH-Cl]⁺, 331[M-PCP]⁺

HPLC의 b분획, 즉 aglycones이 TeCP의 isomer로 추정된 conjugate의 acetyl化한 glucose conjugate(MW; 562)는 FAB 분석 결과 [M+Na]⁺(583)와 [M-TeCP]⁺(331)만 직접 assign할 수 있었다(Fig. 5). 그리고 Cs⁺를 ion source로 사용할 때 종종 나타나는 [M+Na+Cs]⁺ peak(693) 뿐만 아니라 [M+Na+Cs+NH₄]⁺ 및 [M+Na]⁺의 isotope abundance effect

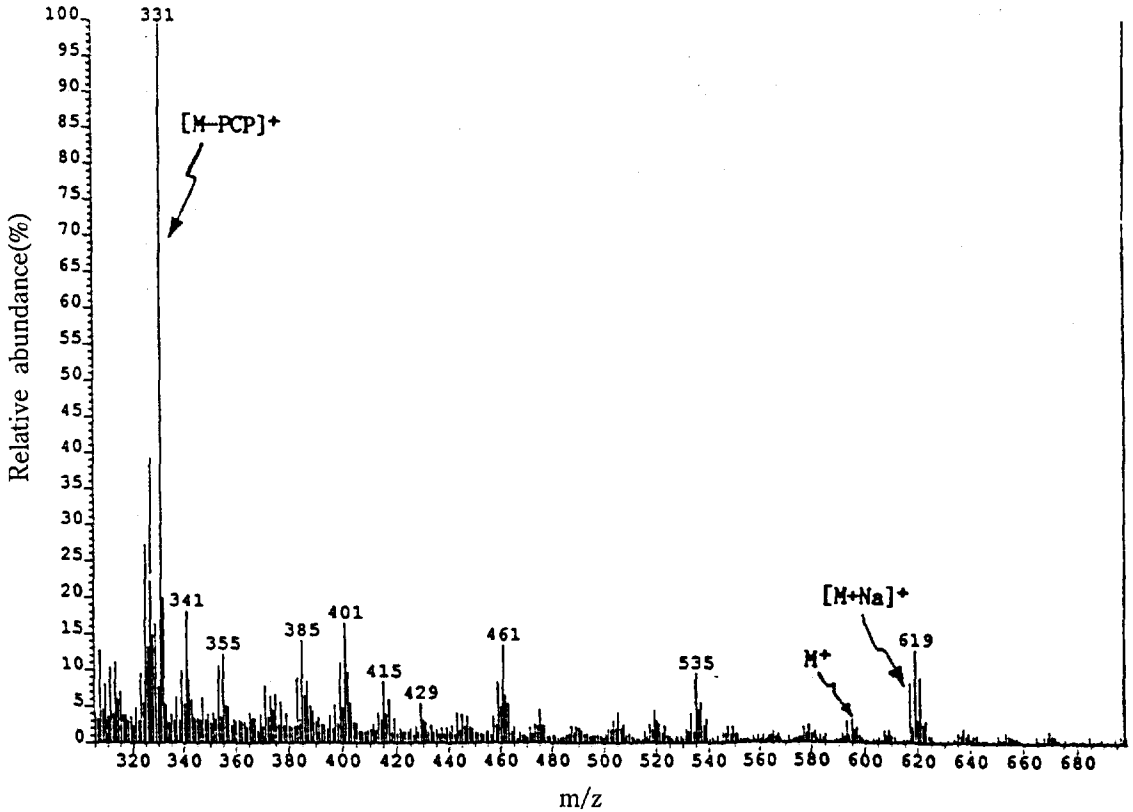


Fig. 4. FAB-MS spectrum of fraction a from soybean and rice cells. As for fraction a, sec Figure 2.

현상을 고려하여 상기 PAG와 같은 방법으로 추론할 때 $m/z=560$ 을 M^+ 로 판단할 수 있었다.

이상의 FAB/MS 분석에서 acetyl화된 분획 a와 b는 모두 hexose moiety(m/z 331, M-PCP혹은 M-TeCP)를 갖고 있었다. 그리고 intact glucose conjugates는 β -glucosidase에 의해 선택적으로 가수분해되는 glucose moiety를 갖고 있는 것으로 확인된 바 있다^{17,18)} 즉, FAB spectra에서 추론된 M^+ (594)을 PCP와 β -glucose의 conjugation 산물(acetyl화)의, M^+ (560)을 TeCP와 β -glucose의 conjugates(acetyl화)의 molecular ion peak로 각각 판단하였다.

5. PCP glucose conjugates의 구조

Aglycone, glycone 분석과 glucose conjugates의

acetyl화 前後의 HPLC 및 TLC에서 성질 그리고 FAB분석을 종합하여 볼 때 대두 및 벼에서 동정이 가능한 glucose conjugates는 pentachlorophenyl β -D-glucopyranoside(Fig. 6의 A)와 tetrachlorophenyl- β -D-glucopyranosides(Fig. 6의 B)로 판단되었다. 이와 같은 방법으로 Fig. 2의 c 분획(RT ; 23.5-25분)은 비록 MS정보는 얻지 못했지만 tetrachlorocatechol과¹⁸⁾ β -glucose의 conjugates 즉, 2-hydroxy-3,4,5,6-tetrachlorophenyl- β -D-glucopyranoside(Fig. 6에서 C)로 추정되었다.

Acetyl화 前까지의 분리과정이 복잡하고 conjugates가 불안정하여 다소 무리는 있지만 전체적인 대사과정을 다음과 같이 해석하였다. 대사과정이 매우 빨랐던 대두의 경우 PCP- β -D-glucopyranoside가 15~17%로

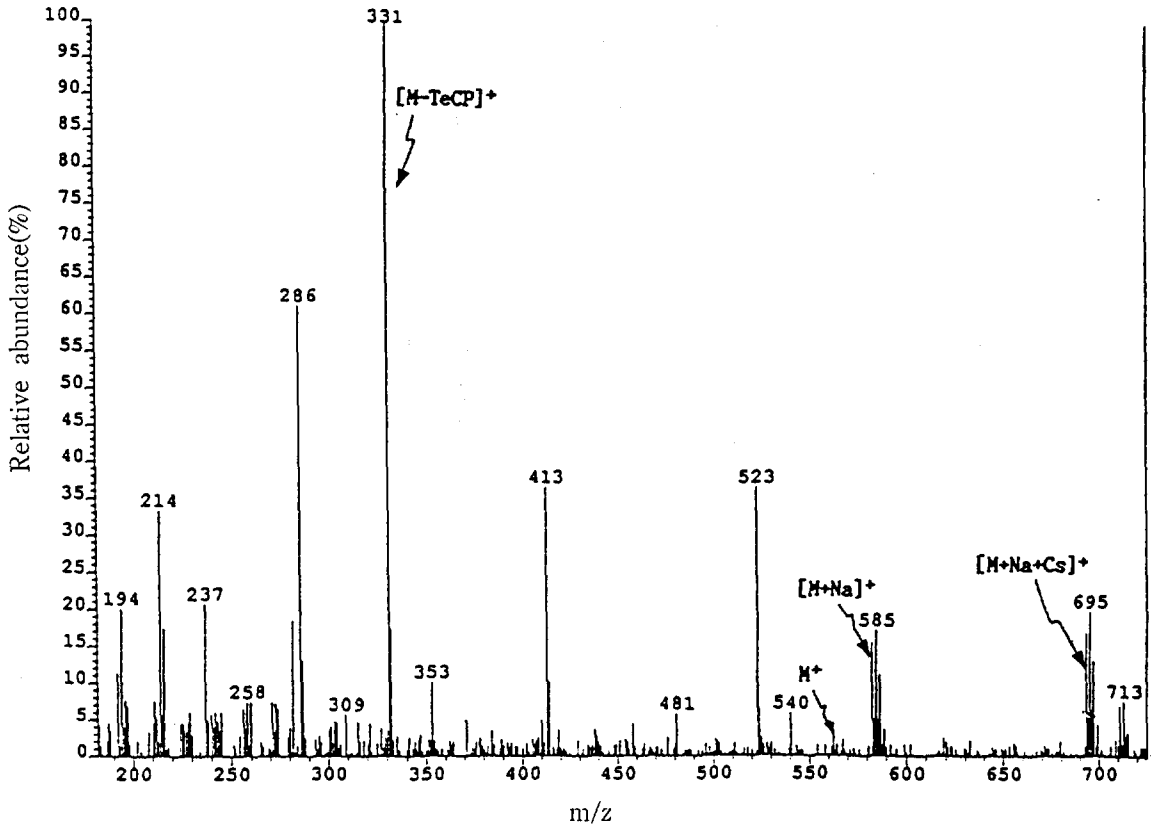


Fig. 5. FAB-MS spectrum of fraction c from soybean and rice cells. As for fraction c, see Figure 2.

적은 반면 좀 더 대사가 진행된 2-hydroxy-3,4,5,6-tetrachlorophenyl-β-D-glucopyranoside는 50% 이상 존재하였다. 벼는 대두와 반대로 PCP-β-D-glucopyranoside가 47%로 가장 많았다(Fig. 2 참조). 이러한 결과는, 특히 대두의 경우 glucose conjugates를 분리하는 조건에서 PCPs(유용성분획, 3.9%)가 매우 적었다는 사실과, 현탁배양에서 PCP 처리 초기에 수溶性 분획 대부분이 glucose conjugates라는 전보의 결과를 고려할 때 PCP-β-D-glucopyranoside보다 더 대사가 진행된 conjugates는 처리한 PCP가 conjugate로 전환되기 전에 TeCP나 TCC로 대사된 다음 생성되었다고 보기는 어려웠다. 즉 PCP-β-D-glucopyranoside가 cell

내에서 1차적으로 생성되고加水分解 酵素系(예, β-glucosidase)에 의해 PCP moiety가 유리된 다음 탈염 소화반응 등에 의해 PCPs로 전환되어 glucose와 conjugation 反應을 하는 것으로 판단된다. 그러나 conjugate가 가수분해되지 않고 PCP moiety만 TeCP나 TCC로 대사되는 것으로도 추정이 가능하다. 일반 식물에서 PCP 대사과정과 현탁배양에서 PCP 전환시험으로 보아 전자가 더 타당하다고 생각된다. 아울러 이러한 해석은 PCP 이외의 염화페놀류도 상당한 生理活性이 있음을 상기할 때 glucose conjugates등 수용성대사물이 독성 모화합물이나 독성대사물의 완전한 無毒化 反應產物이 아님을 시사한다.

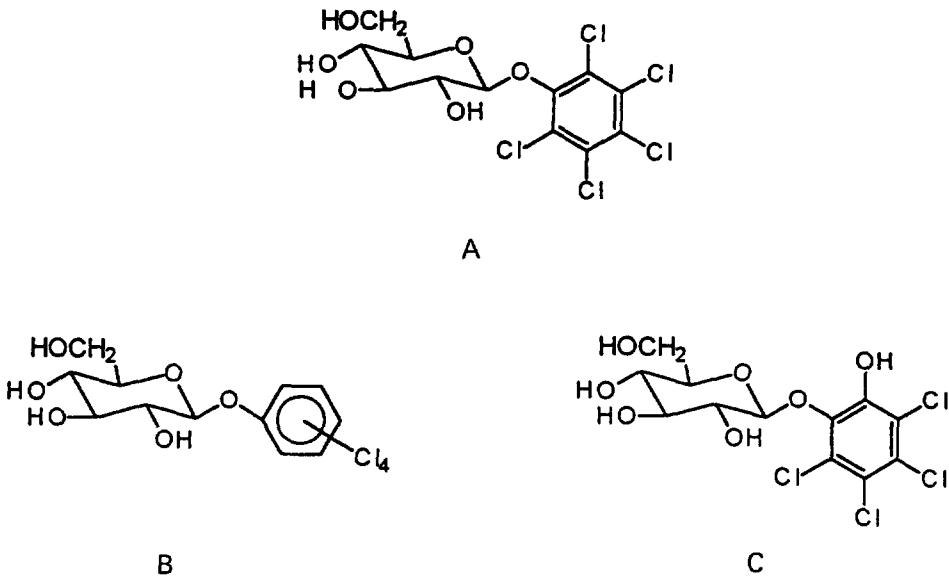


Fig. 6. The structures of major metabolites of PCP in plant cells, as suggested (A and B) and also deduced (C) from the present study. (A) pentachlorophenyl β -D-glucopyranoside, (B) tetrachlorophenyl(TeCPisomers) β -D-glucopyranoside, (C) 2-hydroxy-3,4,5,6-tetrachlorophenyl β -D-glucopyranoside.

요 약

전보에서 大豆와 벼의 懸濁培養細胞에서 생성된 PCP의 주요 수용성대사물은 PCP를 비롯한 여러 종류의 염화페놀과 glucose간 β -linkage로 연결된 β -glucoside 구조를 가질 것으로 추정된 바 있다. 본 연구에서는 conjugates를 가수분해시키지 않는 조건에서 기기적인 방법으로 그 구조를 확인하고자 하였다.

Acetyl化 한 glucose conjugates는 aglycones 분석에서 예상한 대로 3종류 이상이 존재하는 것으로 확인할 수 있었으며, 충분히 정제한 각각의 acetyl化 대사물을 FAB-MS로 분석한 결과 분자량과 aglycones part와 관련된 특징적 spectral data 등 conjugates 구조 확인에 필수적인 정보를 얻을 수 있었다. 이러한 구조적 정보와 지금까지의 연구 결과, 즉 현탁배양초기에 생성된 PCP의 glucose conjugates는 β -glucosidase에 의해

특정적으로 가수분해되고, aglycones이 PCP 외에도 tetrachlorophenol 및 tetrachlorocatechol 등이라는 사실을 종합할 때 현탁배양에서 생성된 conjugates는 주로 pentachlorophenyl β -D-glucopyranoside, tetrachlorophenyl β -D-glucopyranoside 및 2-hydroxy-3,4,5,6-tetrachlorophenyl β -D-glucopyranoside인 것으로 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. Edwards V. T., A. L. McMinn and A. N. Wright. (1982). Sugar conjugates of pesticides and their metabolites in plants-Current status. *Progress in Pesticide Biochemistry*. 2 : 71-125.
2. Kaufman, D. D., Still, G. G, Paulson G. D.,

- and Bandal S. K.(1976). Bound and conjugated pesticide residues : Pesticide conjugates-glycosides, ACS Symp. Ser. 29, American Chemical Society, Washington.
3. Lewer P. and W. J. Owen.(1989). Amino acid conjugation of Triclopyr by soybean cell suspension cultures. Pestic. Biochem. Physiol. **33** : 249-256.
 4. Ozawa T. and Y. Takino.(1979). Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra of phenolic glycosides isolated from chestnut galls, Agric. Biol. Chem. **43** : 1173-1177.
 5. Sandermann H., D. Scheel, and Th. V. D. Trenck.(1984). Use of plant cell cultures to study the metabolism of environmental chemicals. Ecotoxicol. Environ. Safety. **8** : 167-182.
 6. Schafer W. and H. Sandermann.(1988). Metabolism of pentachlorophenol in cell suspension cultures of wheat(*Triticum aestivum* L.) : Tetrachlorocatechol as a primary metabolite. J. Agric. Food Chem. **36** : 370-377.
 7. Schmidt, R., J. Kaul, V. D. T. Trenck, E. Schaller, and H. Sandermann.(1984). β -D-glucosyl and O-malonyl- β -D-glucosyl conjugates of pentachlorophenol in soybean and wheat : Identification and enzymatic synthesis. Pestic. Biochem. Physiol. **24** : 77-85.
 8. Schuphan I., A. Haque and W. Ebing. Ecochemical assessment of environmental chemicals Part 1 : Standard screening procedure to evaluate chemicals in plant cell cultures. Chemosphere **13** : 301-313.
 9. Falb L. N . and A. E.Smith.(1987). Metribuzin metabolism in soybeans : Partial characterization of the polar metabolites. Pestic. Biochem. Physiol. **27** : 165-172.
 10. Frear D. S., H. R. Swanson, and E. R. Mansager. Alternate pathways of metribuzin metabolism in soybean : Formation of N-glucoside and homogluthathione conjugates. Pestic. Biochem. Physiol. **23** : 56-65.
 11. Humf H. U., Winterhalter, and P. Schreier.(1991). 3,4-dihydroxy-7,8-dihydro- β -ionone β -D-glucopyranoside : Natural precursor of 2,2,6,8-tetramethyl-7,11-dioxatricyclo(6.2.1.01,6) undec-4-ene (riesling acetal) and 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydro-naphthalene in red current(*Ribes rubrum* L.) leaves. J. Agric. Food Chem. **39** : 1833-1835.
 12. Frear D. S., E. R. Mansager, H. R. Swanson, and F. S. Tanaka.(1983). Metribuzin metabolism in tomato : Isolation and identification of N-glucoside conjugates. Pestic. Biochem. Physiol. **19** : 270-281.
 13. Celorio J. I., G. A. Hoyer, J. Iwan, and Kolsch L.(1986). Metabolism of phenmedipham in the sugar beet(*Beta vulgaris* L.) in "Pesticide Science and Biotechnology"(R. Greenhalgh and T. R. Roberts eds), Blackwell Scientific Publications, Oxford.
 14. Frear D. S., Swanson H. R., and E. R. Mansager.(1986). 1,8-naphthalic anhydride/auxin protection against chlorsulfuron inhibition of corn seedling growth in "Pesticide Science and Technology"(R. Greenhalgh and T. R. Roberts eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford.
 15. Lamoureux G. L. and D. S. Frear.(1986). Current problems, trends, and developments in pesticide metabolism in plants in "Pesticide Science and Technology"(R. Greenhalgh and T. R. Roberts eds.), Blackwell Scientific Publications, Oxford.
 16. Frear D. S. H. R. Robert, and E. R. Mansager. (1989). Picloram metabolism in leaf spurge : Isolation and identification of glucose and gentiobiose conjugates. J. Agric. Food Chem. **37** : 1408-1412.
 17. 김 필제, 박 창규.(1992). 大豆 및 벼懸濁培養 중

- Pentachlorophenol(PCP)의 水溶性代謝物 同定 :
I PCP glucose conjugates의 形成. 한국환경농학
회지. **11**(3) : 215-223.
18. 김 필제, 박 창규.(1996). 콩과 벼 懸濁培養 中 Pe-
ntachlorophenol(PCP) 水溶性代謝物의 同定 : II
PCP glucose conjugates의 分離 및 分析. 한국환
경농학회지. **15**(1) : 37-45.
19. Conchie J. and G. A. Levvy.(1963). Aryl glucopy-
ranosides by the König-Knorr method, in "Me-
thods in Carbohydrates Chemistry". **11** : 335.
20. Jermyn M. A.(1966). Fungal cellulases X IV. The
synthesis of pentafluorophenyl β -D-glucopyrano-
side and its interaction with β -glucosidase and
the β -glucosidase induction system in *Stachybot-*
rys atra. Aust. J. Biol. Sci. **19** : 715-717.
21. Frear D. S., H. R. Swanson, E. R. Mansager,
and R. G. Wien.(1978). Chloramben metabolism
in plants : Isolation and identification of glucose
ester. J. Agric. Food Chem. **26** : 1347-1351.
22. Thomas E. W. and B. C. Loughman.(1964). Me-
tabolic fate of some chlorinated phenoxyacetic
acids in the stem of tissue of *Avena sativa*. Na-
ture. **204** : 286.