

망간산화물에 의한 1-Naphthol의 산화-결합 반응에 따른 반응산물 연구

임동민 · 이두희* · 강기훈** · 신현상†

서울산업대학교 환경공학과 · *서울산업대학교 환경공학과 친환경소재제품인력양성센터 · **(주)대림산업 기술연구소

(2007년 7월 30일 접수, 2007년 8월 16일 채택)

Investigation on Reaction Products From Oxidative Coupling Reactions of 1-Naphthol By Manganese Oxide

Dong-Min Lim · Doo-Hee Lee* · Ki-Hoon Kang** · Hyun-Snag Shin†

Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Technology

*Eco-Material Education Center, Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Technology

**Technology Research Institute, Daelim Industrial Co., Ltd.

ABSTRACT : In this study, abiotic transformation of 1-naphthol(1-NP) via oxidative-coupling reaction and its reaction products were investigated in the presence of Mn oxides. The reaction products were characterized for their relative polarity using solvent extraction experiment and reverse-phase HPLC, and for structure using GC/MS and LC/MS, and for absorption characteristics using UV-Vis spectrometry. The reaction products present in aqueous phase were more polar than parent naphthol and comprised of 1,4-naphthoquinon(1,4-NPQ) and oligomers such as dimers and trimers. Hydrophilic component present in water phase after solvent(CH_2Cl_2) extractions was identified as naphthol polymerized products having molecular weight(m/z) ranging from 400 to 2,000, and showed similar UV-Vis. absorption characteristics to that of soil fulvic acid. Transformation of 1,4-NPQ, which is non-reactive to Mn oxide, to the polymerized products via cross-coupling reaction in the presence of 1-NP was also verified. In this experimental conditions(20.5 mg/L, 1-NP, 2.5 g/L MnO_2 , pH 5), the transformation of 1-NP into the oligomers and polymerized products were about 83% of initial 1-NP concentrations, and more than 30% of the reaction products was estimated to be water insoluble fractions, not extracted by H_2O and methanol. Results from this study suggest that Mn oxide-mediated treatment of naphthol contaminated soils can achieve risk reduction through the formation of oligomers and polymer precipitation.

Key Words : 1-Naphthol, Mn Oxide, Reaction Products, Oligomers, Oxidative-coupling Reaction

요약 : 본 연구에서는 망간산화물 존재 하에서의 1-naphthol(1-NP)의 산화-결합반응을 통한 변환반응과 반응산물을 조사하였다. 변환 반응에 의해 생성된 반응산물을 대상으로 한 용매 추출과 HPLC, GC/MS, LC/MS 및 UV-Vis. 흡광특성 분석 등을 통해 반응산물의 분자 구조특성을 규명하였다. 반응 상등액에서 검출된 반응산물은 모두 1-NP에 비하여 높은 극성을 보였다. 주요 반응산물로는 1,4-naphthoquinon(1,4-NPQ)와 dimer, trimer 등의 소 중합체(oligomers)를 포함하며 특히, 용매추출(CH_2Cl_2) 후 수용액에 잔류하는 친수성 형태의 반응산물은 다양한 분자량의(m/z = 400~2000) 중합체로서 토양 휴믹물질(풀빅산)과 유사한 형태의 UV-Vis 흡광특성을 보였다. 또한, 비 반응성 생성물인 1,4-NPQ는 1-NP 존재 하에서 망간산화물에 의한 교차-결합(cross-coupling)을 통해 중합체로 변환될 수 있음을 확인하였다. 본 실험조건(20.5 mg/L, 1-NP, 2.5 g/L MnO_2 , pH 5)에서 산화-결합 반응에 의한 중합체 형성으로 제거되는 1-NP의 양(mg/L)은 초기농도 대비 약 83%에 해당하며, 이들 중 약 30% 정도는 침전층에서 증류수와 메탄올(CH_3OH)에 의해 추출되지 않는 안정화된 형태의 불용성 중합체 생성물로 존재하였다. 이상의 결과는 망간산화물에 의한 산화-결합반응이 naphthol 오염토양의 처리에 있어서 소 중합체와 중합체 침전물로의 변환을 통한 오염 저감 및 제거 효과를 나타냄을 제시한다.

주제어 : 1-Naphthol, 망간산화물, 반응산물, 중합체, 산화-결합 반응

1. 서론

산화-결합 반응(oxidative-coupling reactions)은 토양 및 지하수에 오염된 외래화학물질(xenobiotics)의 고분자화 반응과 토양 유기물에의 결합을 통한 제거 및 자연산 고분자 유기물질인 휴믹물질(humic substances)의 생성 등에 관여한다.^{1,2)} Bollag³⁾는 동식물의 분해 산물로서 토양에 흔히 존재하는 다

양한 폐놀 화합물의 산화-결합 반응은 휴믹물질의 생성에 중요한 반응임을 제시하였으며, 이러한 자연적 휴믹화(humification) 과정은 폐놀류로 오염된 토양의 현장처리에 효과적인 방법임을 제시한 바 있다. 토양 휴믹화에 의한 오염물질의 제거는 효소나 금속산화물을 이용한 산화-결합 반응을 통해 오염물질 자체를 독성이 감소되는 고분자 물질로 변환(transformation)하거나, 토양입자에의 비가역적 흡착을 유발하여 bound residue 형태로 고정화하는 방법이다.^{4,5)}

이러한 산화-결합 반응은 흔히 laccase, peroxidase 등의 생물학적 산화-환원 효소(biotic enzyme) 또는 Al, Si, Fe, Mn 등

† Corresponding author
E-mail: hyuns@snut.ac.kr
Tel: 02-974-7475

Fax: 02-971-5776

의 금속산화물에 의한 비생물학적 반응을 통해 이루어진다.⁴⁾ Fig. 1은 페놀의 전형적인 산화-결합 반응 기작을 도시한 것이다. 주요 반응기작으로서 페놀은 금속산화물 또는 페놀산화 효소와의 반응을 통해 전자 하나와 수소원자를 잃고 페녹시 래디칼(phenoxo radical)을 생성하며, 생성된 래디칼은 이들 촉매 혹은 용존산소에 의해 추가적인 산화가 일어나 퀴논(quinone) 화합물을 생성하게 된다.^{7,8)} 퀴논 화합물은 중간 단계(intermedia)의 반응산물로 판단할 수 있으며, 촉매들의 높은 반응성과 자발적인 공유결합에 의한 중합반응(polymerization)을 통해 중합체를 형성하게 된다.⁹⁾ 또한, 이 과정에서 토양입자에 존재하는 자연유기물질이나 미네랄 표면과 공유결합을 형성을 통해 고정화(immobilization) 된다.¹⁰⁾ Minard 등¹¹⁾은 2,4-dichlorophenol(2,4-DCP)과 페놀 산화효소를 이용한 산화-결합 반응 실험과 질량분석 및 ¹H-NMR 분석에 의한 반응산물 분석을 통해 DCP 단량체(monomer)들 사이에 C-C 및 C-O 결합에 의한 이량체(dimer) 및 올리고머(oligomer)등의 다양한 반응 산물이 형성됨을 확인한 바 있으며, Seling 등¹²⁾ 및 Parikh 등¹³⁾은 토양 유기물 존재 하에서의 망간산화물에 의한 페놀 화합물의 교차-변환 반응 연구를 통해 페놀 화합물이 토양 유기물과의 교차-결합(cross coupling) 반응을 통한 비가역적 흡착을 통해 고정화 제거됨을 보고한 바 있다.

한편, 산화-환원 효소의 활용은 오염물질과의 반응에 있어서 균일(homogeneous)반응계를 형성하므로 반응효율과 선택성은 좋으나 고비용에 따른 경제성 문제, 주변 환경에 따른 효소의 단백질 구조의 변경, 최적 활성 pH 조건의 제한점 등의 이유로 인하여 다양한 문제점을 수반하게 된다.¹⁰⁾ 반면, 금속산화물은 토양 입자 중에 널리 분포하여 활용이 용이할 뿐 만 아니라 취급과 사용조건의 제한점이 낮으므로 현장적용성이 높은 장점이 있다. 특히, 망간산화물(manganese oxide)은 토양 중에 널리 존재하는 금속산화물이며 높은 산화력으로 인해 페놀 화합물의 비생물학적 산화-결합 반응에 효과적인 것으로 알려진다.^{3,12)} Shindo와 Hung⁴⁾은 일반 토양 중에 존재하는 다양한 금속산화물을 이용한 실험으로부터 비생물학적인 휴믹물질의 생성에 있어서 망간산화물의 중요성을 강조한 바 있다.

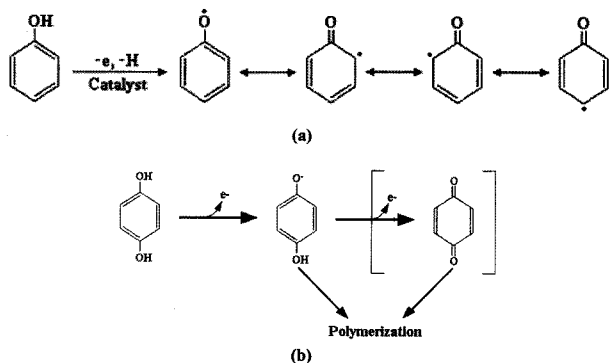


Fig. 1. Pathway of oxidative coupling reaction; (a) resonance-stabilized free radical generation by oxidation,⁷⁾ and (b) stepwise oxidation to form radical and quinone.⁸⁾

이러한 망간산화물에 의한 산화-결합 반응을 이용한 오염물질의 효율적인 고정화 제거기법을 개발함에 있어서 대상으로 오염물질의 제거 효율에 대한 정보뿐만 아니라 산화-결합 반응에 의해 생성되는 반응산물의 특성에 대한 이해는 중요한 의미를 지닌다. 산화-환원 효소 반응의 경우 반응산물에 대한 분석이 용이한 균일 반응계 특성으로 인해 반응생성물 분석에 대한 다양한 연구결과가 보고되고 있는 반면, 불균일 반응계인 망간산화물 반응의 경우 상대적으로 반응생성물 분석에 대한 연구결과가 미흡한 실정이다.

앞서 본 연구실에서는 1-naphthol(1-NP)을 대상으로 망간산화물을 이용한 산화-결합 반응에 대한 기초연구로써 제거효율 및 반응 동역학 인자를 도출하였고, 반응 시간에 따른 UV-Vis 분석 및 최종 반응용액에 대한 LC/MS 분석을 통해 망간산화물에 의한 1-NP의 제거가 중합체 생성에 기인한 것임을 입증한 바 있다.¹⁴⁾ 1-NP은 염료, 고무, 합성섬유 제조 및 살충제(carbaryl, napropamide) 등의 주요 성분으로 알려져지며, 대표적인 소수성 다환방향족탄화수소(PAHs) 화합물인 naphthalene의 주요 일차 분해산물로서 naphthalene에 상당하는 독성을 지니며, 치환된 -OH기에 의해서 용해도(Sw: 666 mg/L at 20°C)가 naphthalene에 비해 매우 높아 오염에 의한 영향이 큰 특성으로 관심을 대상이 되는 물질이다.¹⁵⁾

본 연구에서는 망간산화물에 의한 1-NP의 산화-결합 반응으로 생성되는 반응산물에 대한 보다 상세한 정보를 얻기 위해 용매추출을 통한 반응산물의 분리·분석 및 LC/MS, GC/MS 분석을 통한 분자 구조를 조사하였고, 토양 휴믹물질과의 비교 분석을 통해 반응생성물의 휴믹화 특성을 제시하였다. 또한, 반응 중간체의 변환과정에 대한 이해를 높이기 위해 반응 중간생성물인 퀴논 화합물의 망간산화물에 대한 반응성 및 1-NP 존재 하에서의 교차-결합(cross-coupling)을 통한 중합체로의 변환과정 등을 조사하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1. 실험 재료

실험에 사용한 1-NP과 1,4-naphthoquinone(1,4-NPQ)은 Sigma-Aldrich사로부터 구입한 고순도(99% 이상) 표준물질을 사용하였다. 1-NP와 1,4-NPQ 모용액은 일정량의 표준물질을 증류수에 넣고 N₂ 분위기하에서 24시간 동안 교반하며 용해시킨 후 PTFE(0.45 μm, PALL. Co. Ltd) 재질의 멤브레인 필터로 여과하고 HPLC로 농도를 결정하여 사용하였다. 망간산화물은 McKenzie¹⁶⁾에 의해 제시된 방법에 준하여 합성하여 사용하였다. XRD 분석결과 합성 망간산화물 주요 결정상은 버네사이트(birnessite, δ-MnO₂)이었으며, BET 방법으로 측정된 표면적은 44.37 m²/g이었다.¹⁴⁾ 1-NP의 산화-결합에 의한 중합체 생성물과의 비교를 위한 토양 풀빅산(fulvic acid)은 국제휴믹학회(International Humic Substances Society, IHSS) 표준절차에 따른 산-염기 침전법을 이용하여 토양에서 직접 추출하였으며, 한외여과(ultrafiltration) 장치를 이용한 분자량 분리를 통해 1000 dalton 이하의 소부분(subfraction)을 사용하였다.

2.2. 회분식 실험 및 반응산물의 분리

회분식 실험을 위한 반응용기는 20 mL 용량의 serum bottle 을 사용하였다. 반응용액은 serum bottle에 1-NP 표준용액 (40 mg/L) 20 mL을 채운 후, 일정 양의 망간산화물(12.5, 25, 50 mg)를 첨가하여 조제하였다. 반응 용기는 테프론 재질의 격막 및 알루미늄 캡으로 완전히 밀봉한 후, 알루미늄박을 사용하여 빛의 유입을 차단한 뒤 회전식 교반기(FINEPCR®, AG)에서 30 rpm으로 40분 동안 회전 교반시켰다. 반응 후 각 serum bottle로부터 500 μ L의 분석시료를 채취하고, 0.45 μ m syringe filter(PTFE, PALL. Co. Ltd)를 이용하여 여과한 후 여액은 곧바로 HPLC를 사용하여 분석하였다.

반응산물 분석은 반응이 종료된 반응용액을 원심분리(8,000 rpm, 15 min)하여 반응 상등액과 반응 잔류물(침전물)로 구분하여 실시하였다. 반응 상등액에 존재하는 반응산물은 CH_2Cl_2 를 이용한 용매추출을 통하여 친수성(hydrophilic)과 소수성(hydrophobic) 성분으로 구분하였다. 소수성 성분 시료는 감압식 회전증발기(vacuum rotary evaporator)를 사용하여 증발 농축 후 분석 사용하였으며, 친수성 성분 시료는 별도의 전처리 없이 사용하였다. 망간산화물을 포함한 침전물은 원심분리를 통해 수층과 충분히 분리한 후 탈착 실험에 사용하였다.

2.3. 분석 방법

반응물과 생성물의 농도는 영린기기(model M930)의 HPLC 및 Waters사(Supelcosil LC-18DB)의 C18 46 \times 150 mm(5- μ m particle size) 역상컬럼을 사용하여 분석하였다. 이동상(50% acetonitrile)의 유량은 1.0 mL/min으로 하였으며, 20 μ L의 시료를 주입하여 254 nm의 UV 검출기를 이용하여 분석하였다. 반응산물의 구조적 특성 분석은 UV-Vis 분광분석 및 GC/MS, LC/MS 분석을 통하여 실시하였다. UV/Vis 분석은

Simadzu 사의 UV-1601을 사용하였으며, 중합반응 생성물과의 비교를 위한 국내 토양 FA 시료용액(20 mg/L, pH = 5)을 대상으로 200~800 nm 파장 범위에서의 흡광도 변화를 조사하였다. GC/MS와 LC/MS 분석은 각각 용매추출을 통해 분리한 소수성 반응산물과 친수성 반응산물을 대상으로 실시하였으며, 자세한 분석방법과 측정조건은 Table 1과 같다. 수층과 침전층 중의 존재하는 1-NP 변환 반응산물의 농도 분포는 반응 전과 후의 상등액을 대상으로 한 TOC (Simadzu, TOC-5000A) 분석을 통하여 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 망간산화물에 의한 1-NP의 산화-결합 반응산물의 분리 · 분석

Fig. 2(a)는 망간산화물 첨가 전과 첨가 후(40분 경과)의 반응용액(상등액)에 대하여 얻은 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 망간산화물과의 반응 후 머무름 시간(RT) 4.6분에서의 1-NP 피크가 사라지고 RT 1.1분, 2.6분, 3.9분 등에서 반응산물 피크가 생성됨을 확인할 수 있다. 본 실험에서와 같은 역상 컬럼 방식의 HPLC 분석에서는 극성물질일수록 머무름 시간이 짧게 나타난다.¹⁷⁾ 따라서 Fig. 2(a)에서 확인된 반응산물은 모두 1-NP 보다 극성이 높은 물질이며, 이들 물질의 물과 유기용매에 대한 물질의 분배 값을 표현하는 물-옥탄올 분배계수(log K_{ow}) 값은 1-NP(2.85) 보다 낮을 것으로 예상된다.^{18,19)} 본 실험의 상등액에서는 RT 4.6분 이상에서의 피크가 관찰되지 않았다. 이로부터 망간산화물과의 반응 후 수용액에 존재하는 반응산물은 1-NP보다 높은 극성의 물질들임을 알 수 있다.

망간산화물에 의한 1-NP의 산화-결합 반응산물을 극성도에 따라 세분화하여 조사하기 위하여 용매추출(CH_2Cl_2)을 통해 소수성과 친수성으로 분리하였다. Fig. 2(b)는 CH_2Cl_2 에 추출된 반응 산물(소수성 성분)의 크로마토그램을 나타낸 것이다. 소수성 반응산물 성분은 RT 2.60, 3.90분에서 나타났으며, 용매추출 후 수층에 잔류하는 반응산물(친수성 성분)은 RT 1.02분에서 나타났다. 이는 망간산화물에 의한 1-NP의 산화-결합반응에 의해 생성되는 반응산물이 서로 다른 용해도와 극성을 띠고 있음을 나타내며, 페놀계 화합물의 산화-결합반응을 다룬 문헌에서의 결과와도 일치한다.²⁰⁾ Majcher 등²⁰⁾은 망간산화물을 이용한 ^{14}C -labeled catechol의 산화-결합 반응 실험에서 반응 시간 및 추출 용매가 지니는 다양한 조건(pH, polarity)의 따라 생성되는 반응 산물을 추출함으로써 각기 다른 용해도와 극성을 지닌 중합체들이 검출되는 것을 확인한 바 있다.

생성된 반응산물에 대한 추가 반응성을 조사하기 위해 반응이 종료된 40분 반응시료를 대상으로 망간산화물을 추가로 투입하여 반응시켰다. 그 결과 소수성 반응산물의 피크(RT 2.6, 3.9분)가 제거되면서 친수성 반응산물의 피크(RT 1.1분)가 다소 증가함을 확인하였다. 이는 1-NP의 소수성의 반응산물들은 산화-변환 과정에서 생성되는 중간단계의 반응생성물로서 망간산화물의 반응성을 유지시키는 한 추가적인 산화-

Table 1. Analytical parameters for LC/MS and GC/MS

Parameters	GC/MS(HP 6890, USA)
Column	Capillary(J & W 122-5532)
Injector(Split mode)	270
Injection volume(μ L)	1
GC carrier gas	He
Aux($^{\circ}\text{C}$)	280
Ionization source	EI method
Ion source($^{\circ}\text{C}$)	230
Quadruple($^{\circ}\text{C}$)	150
Parameters	LC/MS (LCQ DECA XP)
Column(Shiseido, Japan)	1 \times 250 mm C18, 5 μ m
Mobile phase	A: 5% ACN, B: 95% ACN
Gradient	A : B = 100 : 0(5') - 0 : 100(40')
Flow rate(μ L/min)	50
Ionization source	ESI mode(negative ion mode)
Capillary voltage(V)	- 48
Mass scan range(Da)	0 - 1000
Source temperature($^{\circ}\text{C}$)	27.5

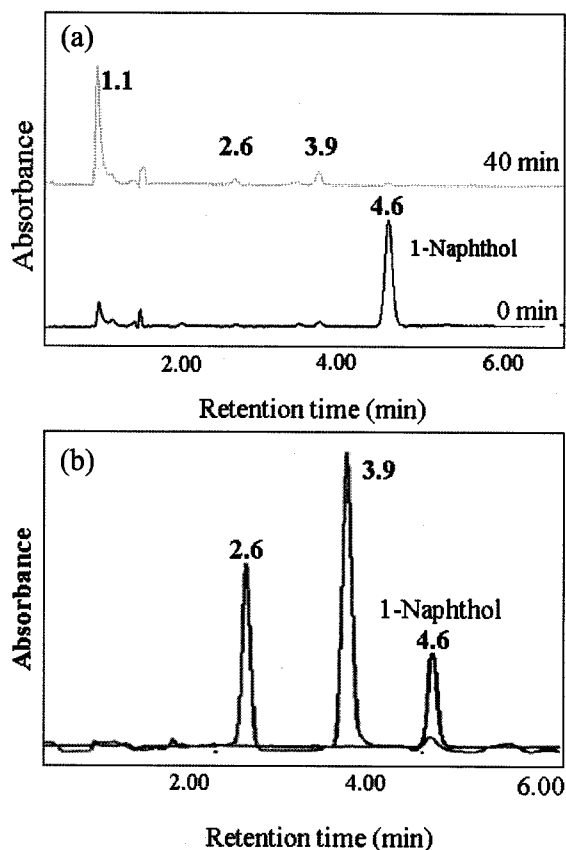


Fig. 2. HPLC chromatogram of (a) 1-NP and its reaction products by Mn oxides (b) CH_2Cl_2 extracted reaction products. Experimental conditions: 40 mg/L 1-NP, 1.25 g/L Mn oxides, pH 5.0 ± 0.1 , and 20°C in the dark.

결합반응을 통해 보다 안정화 된 형태인 친수성 물질로 전환될 수 있음을 의미한다.^{21,22)}

3.2. 반응산물의 분자구조 특성

용매추출법을 통해 반응용액에서 분리하고 ACN(acetonitrile)으로 농축한 소수성 반응산물은 분자구조 규명을 위하여 GC/MS 분석을 실시하였으며, 그 결과는 Fig. 3에 제시하였다. GC 크로마토그램 분석 결과 추출 용매에 남아 있던 1-NP($m/z = 114$)의 피크가 RT 11.39분에서 검출되었으며(Fig. 3(b)), 1-NP 이외에 두 개의 반응산물 피크가 각각 RT 9.96 분과 RT 11.27분에서 검출되었다. 질량스펙트럼 분석결과, RT 9.96분에서 검출된 물질은 1,4-NPQ에 해당하였다(Fig. 3(c)). 1-NP와 1-NPQ 표준물질의 질량스펙트럼과 조각이온(fragment ion)에 대한 m/z 비가 동일하게 나타났으며(일치도 95% 이상), 1-NP 및 1,4-NPQ의 표준물질의 HPLC 크로마토그램 분석을 통해 확인한 머무름 시간(4.6분, 3.9분)과도 일치하였다. 이러한 결과는 1,4-NPQ의 $\log K_{ow}$ 값이 1.71¹⁷⁾로서 앞서 HPLC 크로마토그램 상의 피크위치로부터 예측했던 극성도 비교 결과와도 일치한다. 한편, RT 11.27분에서의 물질은 질량스펙트럼의 분자이온 피크($m/z = 281$) 및 조각이온 피크 특성으로부터 판단할 때 1-NP의 산화-결합반응으로 생성된 이량체(dimer)로 판단된다(Fig. 3(d)). 이상의 GC/MS 분석 결과 및 표준물질의 HPLC 분석 결과는 Table 2에 요약하여 나타내었다. Xu 등²³⁾은 산화-환원 효소인 peroxidase를 이용한 1-NP의 산화-결합 반응실험과 LC/MS와 MS/MS 분석을 통하여 용존성의 주요 반응산물로서 세 개의 1-NP가 중합된 trimer($m/z = 427$)가 생성됨을 보고한 바 있다.

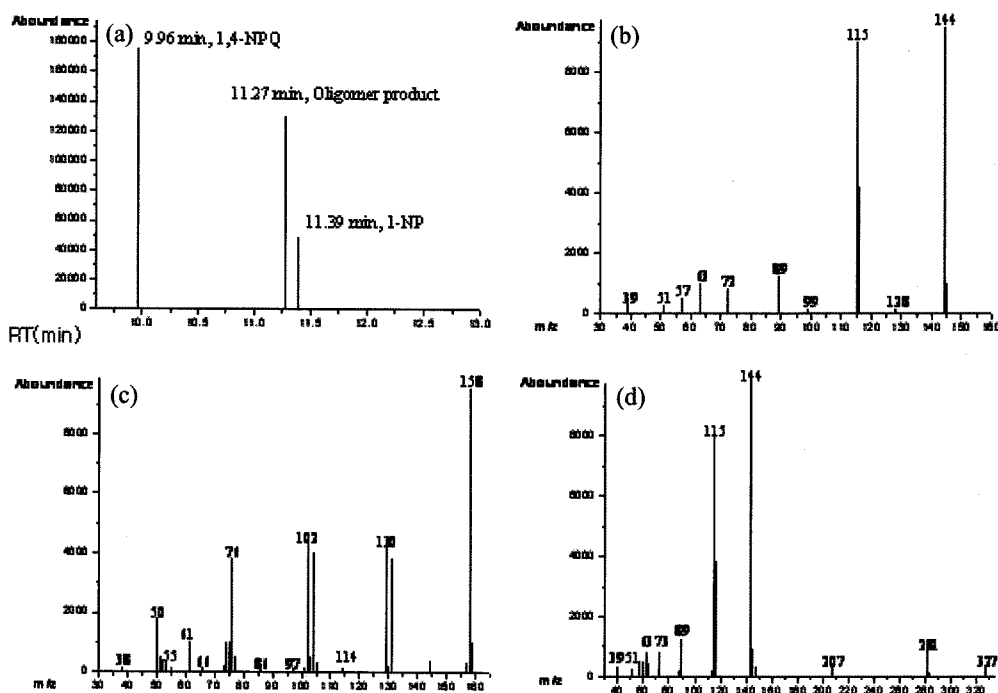


Fig. 3. (a) GC/MS chromatogram for CH_2Cl_2 -extracted reactions products produced at pH 5 with 40 mg/L 1-NP, 1.25 g/L Mn oxides and (b-d) Mass spectra of 1-NP and its reaction products.

Table 2. Results of HPLC and GC/MS analysis for the oxidation-coupling reaction products of 1-NP by Mn oxides

	HPLC			GC/MS		
	RT(min)	RT(min) ^a	compounds	RT(min)	compounds	m/z
1	4.89	4.88	1-NP	11.39	1-NP	144(100), 116(14), 115(63), 89(7)
2	3.99	3.90	1,4-NPQ	9.96	1,4-NPQ	158(100), 130(31), 104(53), 76(42), 50(21)
3	-	-	-	11.27	oligomer products	327(5), 281(11), 144(100), 115(82),

^aRetention time obtained from the measurement of standard sample solutions

Fig. 4는 용매추출과정에서 수층에 잔류하는 친수성 반응산물에 대한 LC/MS 분석 결과를 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 친수성 형태의 반응산물은 다양한 분자량을 지니는 중합체 물질($m/z = 400 \sim 2000$)을 포함하고 있음을 알 수 있다. 이는 망간산화물에 의한 1-NP 일차 산화반응에서 생성되는 퀴논화합물과 라디칼 공명구조를 통한 다양한 반응자리에서의 자체-결합(self-coupling) 및 이들을 포함한 소 중합체(oligomer) 화합물 간의 C-C, C-O 결합을 통한 교차-결합(cross-coupling) 등을 통하여 다양한 형태의 중합체들이 형성되었음을 제시한다.^{7,18)} 한편, 1-NP($m/z = 144$)보다 적은 분자량 피크는 기존 문헌에 보고된 바와 같이 산화-결합의 중합반응 이외에도 산화 반응으로 인한 방향족 고리분해와 작용기의 치환 등의 반응으로 생성되는 분해산물로 판단된다.^{24,25)}

흔히, 산화-결합 반응시료의 상등액에 존재하는 중합체들은 용해성이 높은 성분 또는 상대적으로 저분자성 물질로 알려져 있다. Xu 등²³⁾은 peroxidase에 의한 1-NP의 산화-결합 반응 실험에서 침전물에 포함된 비 용해성 반응산물의 분자량은 크기배제크로마토그래피(size exclusion chromatography)와 MS/MS 분석 결과 평균분자량이 853 Da으로 naphthol-hexamer에 해당하는 반면, 용액 중에 존재하는 용해성 반응산물은 분자량(m/z) 400~600 범위의 naphthol-trimer, -tetramer 등에 해당하는 중합체임을 밝힌 바 있다. 망간산화물을 이용한 본 연구에서의 용해성 반응산물(친수성)의 분자량 피크(m/z)은 400~2,000 범위로서 생물학적 산화-환원 효소(e.g., peroxidase)를 사용한 경우에 비하여 분자량이 큰 중합체물질이 생성되고 있음을 알 수 있다. 질량스펙트럼에 나타난 주요 분자량 피크(m/z)인 684.9, 757.8 등은 문헌을 토대로 판단할 때, 4~5 분자 이상의 1-NP가 중합되어 생성된 반응산물로 예측된다. 한편, 망간산화물에 의한 산화-결합 반응으로 생성된 이들 중합체들은 1-NP에 비하여 극성이 높아 지하수나 토양 내 빗물의 침투로 인한 오염물질의 확산을 가져올 수 있으므로 우려의 대상이 될 수 있다. 그러나 Xu 등²³⁾이 산화-환원 효소(peroxidase)를 이용한 1-NP의 산화-변환 반응 실험과 용해성 반응산물을 대상으로 수행한 독성실험결과에 따르면, 1-NP이 산화-결합에 따라 중합체로 변환되면서 반응용액의 독성이 크게 저감되고 있음을 확인한 바 있다. 결과적으로 망간산화물의 폐쇄계 화합물에 대한 산화-결합 반응 기작이(Fig. 1) 산화-환원 효소에서와 유사함을 고려할 때^{7,8)} 본 연구에서의 망간산화물에 의한 1-NP 산화-결합 반응 중합체 생성물 역시 1-NP에 비하여 독성이 낮은 물질일 것으로 예측된다.

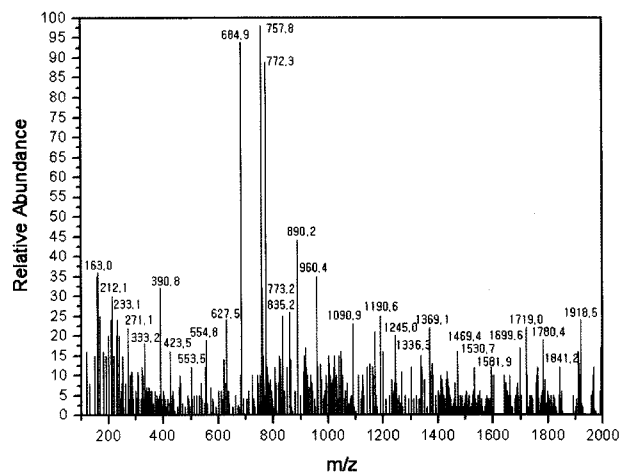


Fig. 4. LC/MS spectrum of the CH_2Cl_2 non-extractable reaction products(e.g., NPPs) produced at pH 5 with 40 mg/L 1-NP, 1.25 g/L Mn oxides.

앞서 언급한 바와 같이 산화-결합 반응이 휴믹물질의 형성에 있어서 가장 중요한 자연적인 과정임^{4,26,27)}을 고려할 때, 망간산화물에 의해 형성된 중합체는 휴믹물질과 유사한 특성을 가지게 됨을 예측할 수 있다. 이에 본 연구에서는 비교를 위하여 1-NP의 산화-결합에 따른 중합체 생성물(naphthol polymerized products: NPPs)과 토양에서 얻은 유사한 분자량($< 1,000$ Da)의 풀빅산에 대한 자외선-가시광선 흡광스펙트럼을 얻었고, 그 결과는 Fig. 5에 제시하였다. 반응 전 1-NP 표준용액에 대한 스펙트럼은 $\lambda_{\text{max}} \sim 295$ nm에서 1-NP 분자 내 주요 발색기인 벤젠 치환체의 1차 흡수대(E_2 -band)에 의한 특성 피크를 보여준다.^{28,29)} 반면, 중합체 생성물은 $\lambda_{\text{max}} \sim 295$ nm에서의 특성 흡수대가 사라지고, 200~700 nm 영역에서 파장이 증가하면서 흡광도가 서서히 감소하는 전형적인 휴믹물질(풀빅산)의 흡광도 스펙트럼 특징을 보였다.^{30,31)} 이러한 결과는 다양한 자연산 유기물의 불균질 혼합체로 구성된 휴믹물질과 같이 중합체 생성물(NPPs)이 여러 분자량을 지닌 산화-결합 반응 생성물이며, 휴믹물질과 유사한 흡광특성을 지니고 있음을 제시한다.

3.3. 불용성 반응산물의 분포 및 거동 특성

산화-결합에 의해 생성되는 중합체들은 분자량이 커지면서 침전되거나 토양 입자에 비가역적으로 흡착되어 결합잔류물(binding residues)로서 고정화 된다.^{12,13)} 따라서 망간산화물에 의한 1-NP의 산화-결합을 통해 생성되는 불용성 반응산물의 함량에 대한 규명은 반응산물의 거동을 이해하는데 중

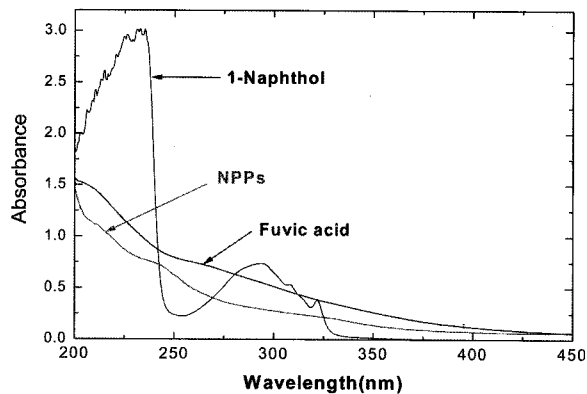


Fig. 5. UV-visible spectra of the NPPs and soil fulvic acid.

Table 3. Results of TOC analysis for supernatant after the reaction of 1-NP by Mn oxides

TOC in supernatants	(mg-OC/L) %	Initial Conc. of 1-NP	Mn oxides(g/L)		
			0.625	1.25	2.5
		20.5	13.2	12.0	10.6
		100	64.3	58.5	51.7

Experimental condition: reaction time for 24 hr, pH 5.0 ± 0.1 , and 20°C in the dark.

요한 의미를 가진다. 본 연구에서는 망간산화물 함량에 따른 수증 용해성과 불용성 반응산물 함량 분포 및 망간산화물 입자에 대한 탈착실험을 통한 거동 특성을 조사하였다.

Table 3은 일정 농도의 1-NP(20.5 mg/L)를 대상으로 망간산화물 첨가량에 따른 산화-결합 반응이 종료된 후 상등액에 존재하는 용해성 반응생성물의 TOC 함량(mg-OC/L) 분석결과를 나타낸 것이다. 여기서의 용해성 반응산물은 앞서 설명한 바와 같이 주로 1,4-NPQ와 친수성 중합반응 생성물에 해당한다. 망간산화물 첨가량 2.5, 1.25, 0.625 g/L에 따른 상등액의 TOC 농도는 각각 13.2, 12.0, 10.6 mg/L이었다. 초기 TOC 농도에 대한 차이로부터 계산하여 결정된 본 실험조건에서의 침전에 의해 제거되는 TOC 함량은 35.7~48.3% 범위임을 알 수 있다. 한편, 망간산화물 첨가량 2.5, 1.25, 0.625 g/L에서의 망간산화물 단위 무게 당 TOC 제거율(%-removal TOC/g-Mn oxides)은 각각 57.1, 33.2, 19.3로서 농도가 증가할수록 감소하였다. 이는 다량의 망간산화물 첨가 시 입자간 상호작용에 기인한 방해효과에 기인한 것으로 사료된다.

수층 및 침전층에 존재하는 반응산물의 함량 분포에 대한 보다 정량적인 결과를 도출하기 위하여 반응 상등액과 침전물 층에 존재하는 TOC 성분별 농도를 HPLC를 사용하여 분석하였다. 특히, 망간산화물을 포함한 슬러리 상태의 침전층에 존재하는 반응산물은 증류수와 메탄올(CH_3OH)을 이용하여 추출한 후, HPLC 분석을 통해 정량하였다. 실험 결과는 Table 4에 요약하여 제시하였다. 반응 후의 수층에 존재하는 1-NP 및 1,4-NPQ의 농도는 각각 1.23과 2.03 mg/L이었다. 침전물을 대상으로 한 증류수(H_2O) 추출물에는 미반응 1-NP 및 1,4-NPQ 만이 검출되었으며, 각각의 농도는

Table 4. Results of the extraction experiment for the precipitates produced from the 1-NP and Mn oxides reactions

Compounds	Concentrations (mg/L)			
	Before reaction	After reactions		
		Supernatants	H_2O extracts for sediments	MeOH extracts for sediments
1-NP	39.36	1.23	1.13	n.d.
1,4-NPQ	-	2.03	1.21	1.26

From the experimental conditions at pH 5 with 39.36 mg/L 1-NP, 2.5 g/L $\delta\text{-MnO}_2$ and 20°C in the dark. n.d.: not detectable.

각각 1.13, 1.21 mg/L이었다. 이어서 얻은 메탄올 추출물 중에는 1,4-NPQ 성분만이 존재하며, 농도는 1.26 mg/L이었다. 이상의 분석결과로부터, 본 실험조건에서는 전체 1-NP의 약 94%가 1,4-NPQ와 산화-결합 반응 생성물로 변환되었으며, 이 중 약 83%의 1-NP가 1,4-NPQ(11%)를 제외한 중합체 생성물로 변환되었음을 알 수 있다. 유사 실험조건(20.5 mg-OC/L, 2.5 mg/L MnO_2)에서의 초기농도 대비 TOC 제거율이 35.7%(cal. 9.9 mg-OC/L)임을 고려할 때, 이들 중합체 생성물 중 약 30% 정도($= 83 \times 35.7$)는 침전층에서 증류수와 메탄올에 추출되지 않는 안정화된 형태로 존재하는 불용성 중합체 생성물로 변환되었음을 알 수 있다. 이들 불용성 중합체 생성물에 대한 구조적 특성은 반응산물이 망간산화물 입자와 함께 혼합된 형태로 존재하므로 직접적인 분석이 용이하지 않으나, 앞서 설명한 바와 같은 상등액의 중합체 생성물에 비하여 분자량이 크고 용해성이 낮은 특성을 지닐 것으로 예측된다.^{10,11)}

3.4. 반응매개체 존재 하에서의 1,4-NPQ의 교차-결합(cross-coupling) 반응

망간산화물에 의한 1-NP의 산화-변환 반응산물로 생성되는 퀴논화합물인 1,4-NPQ는 그 자체가 독성을 띠는 부산물이 될 수 있다. 그러나 대부분의 퀴논 화합물은 수산기를 포함하지 않아 그 자체로는 망간산화물에 대해 산화-변환 반응성을 가지지 않는다. 그러나 앞서 언급한 바와 같이 일차 반응이 완료되어 1,4-NPQ와 중합체만이 존재하는 반응용액에 추가로 망간산화물을 첨가한 경우, 1,4-NPQ와 소 중합체(oligomer) 피크가 감소하면서 친수성의 중합체 반응산물 피크가 증가함을 확인한 바 있다. 이는 망간산화물에 대해 반응성을 가지지 않는 비 반응성 유기물도 산화-결합 반응성을 가지는 반응물질(즉, 반응매개체)이 존재할 경우 교차-결합 반응을 통해 제거될 수 있음을 제시한다.^{21,23,32)} 본 연구에서는 이러한 반응 중간체의 교차-결합을 통한 중합체로의 변환과정을 확인하기 위하여 1,4-NPQ 표준용액을 사용하여 1-NP 존재 하에서의 변환과정을 조사하였다.

Fig. 6은 1-NP 존재 유·무에 따른 1,4-NPQ와 망간산화물과의 반응결과를 반응시간 경과에 따라 도시한 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 1-NP이 존재하지 않은 1,4-NPQ만의 대조군(control) 실험에서는 1,4-NPQ 농도의 변화가 없었다.

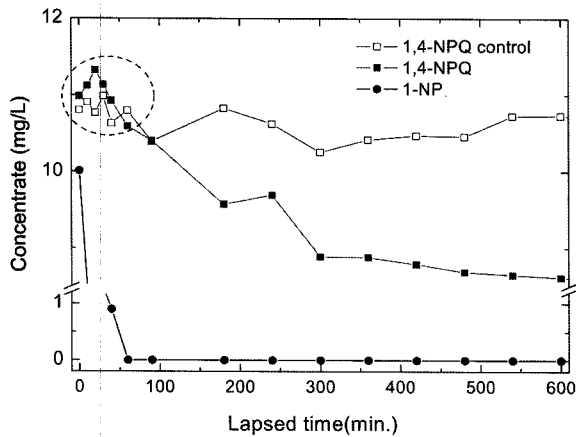


Fig. 6. Cross-coupling reactions of 1-NPQ by reaction mediator at pH 5.0 ± 0.1 , and 20°C in the dark. (□) 10.8 mg/L 1,4-NPQ + 25 mg Mn oxides. (■, ●) 10.8 mg/L 1,4-NPQ + 10.0 mg/L 1-NP + 25 mg Mn oxides.

그러나 1-NP이 존재하는 경우 1-NP은 반응 50분 경과시점에서 99% 이상이 제거 되었으며, 동시에 1,4-NPQ의 농도는 반응 30분까지 초기 농도(1,4-NPQ-10.8 mg/L) 이상으로 증가하였다가 이 후 서서히 감소하였다. 반응 초기의 1,4-NPQ 농도 증가는 망간산화물에 의한 1-NP의 초기 산화과정에서 생성되는 1,4-NPQ에 기인한 것으로 판단된다. 이 후 1,4-NPQ 농도의 점진적인 감소는 잔류 1-NP을 포함한 중합반응 생성물을 매개체로 한 교차-결합반응을 통하여 제거되었음을 나타낸다.^{21,22,32)} 이러한 교차-결합반응을 통한 1,4-NPQ의 제거는 1-NP에 비하여 상대적으로 느리게 진행됨을 알 수 있다. 이상의 결과를 통해 망간산화물에 대해 비 반응성 물질인 1,4-NPQ 역시 1-NP 및 중합반응 생성물과 같은 수산기를 매개로한 교차-결합 반응을 통해 고분자화 제거 될 수 있음을 확인할 수 있다. 또한, 망간산화물을 이용한 naphthol 오염토양의 처리에 있어서 충분한 반응성을 유지할 수 있는 망간산화물의 첨가량과 퀴논화합물의 교차-결합 반응에 요구되는 처리시간의 설정이 필요함을 알 수 있다.

4. 결론

페놀계 화합물의 금속산화물에 의한 비생물학적인 휴믹화(humification) 과정은 환경 중 휴믹물질 생성 경로 중 중요 반응기작으로 알려져 있으며, 자연적으로 발생한 페놀계 화합물뿐만 아니라 인위적으로 유입된 페놀계 화합물에 대해서도 동일한 선택적 반응성을 지닌다. 산화-결합 반응을 통한 소 중합체(oligomer) 또는 고분자 중합체의 형성은 이들 오염물질의 독성 저감 효과와 토양 구성 성분과의 교차-결합을 통한 고정화 반응을 수반하여 독성물질의 안정화를 유도할 수 있다. 망간산화물에 의한 비생물학적 산화-결합반응은 흔히 알려진 생물학적 효소에 의한 반응에서 보다 환경적 요인에 의한 방해 영향이 낮을 뿐만 아니라 토양에 광범위하게 존재하므로 가용성이 용이하다는 장점이 있어 상대적으로 높은 공학적 활용 가능성을 가진다. 이러한 산화-

결합 반응을 적용한 오염물질의 안정화 “제거”에 있어서 반응생성물에 대한 분석과 규명은 실제 활용에 앞서 검증되어야 할 중요한 부분이다. 그럼에도 생물학적 효소 반응과는 달리 망간산화물의 경우 반응생성물과의 분리·분석이 용이하지 않은 관계로 상대적으로 이들 반응산물의 종류와 특성에 대한 연구결과가 미흡한 실정이다.

본 연구에서는 페놀계 화합물로서 1-NP을 대상으로 망간산화물과의 반응용액에 대한 용매추출과 GC/MS, LC/MS 분석 등을 통해 산화-결합 반응산물의 분자구조에 대한 정보를 제공하였으며, HPLC와 TOC 분석을 통해 반응 상등액과 침전층에서의 이들 변환 반응산물의 존재형태별 함량 분포에 대한 정량적인 정보를 제공하였다. 또한, 반응산물로서 생성되는 비 반응성의 유해물질인 퀴논 화합물(1,4-NPQ)은 1-NP 및 중합반응 생성물을 매개체로 한 교차-결합 반응을 통해 중합체로의 변환을 통한 제거가 가능함을 확인하였다. 본 연구 자료는 망간산화물에 의한 산화-결합 반응과 휴믹화 과정을 통하여 페놀계 및 퀴논 화합물과 같은 난분해성의 방향족 유기물질로 오염된 토양의 복원기법을 개발하는데 유용한 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

사 사

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(과제번호 KRF-2004-D00379).

참고문헌

- Bollag, J. M., Myers, C., Pal, S., and Huang, P. M., “The role of abiotic and biotic catalysts in the transformation of phenol compounds,” In *Environmental Impact of Soil Components Interactions: Natural and Anthropogenic Organics* (P. M. Haug, J. Berthelin, J. M. Bollag, W. B. McGill, A. L. Pake eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 299~310(1995).
- Naidja, A., Huang, P. M., and Bollag, J.-M., “Comparison of reaction products from the transformation of catechol catalyzed by birnessite or Tyrosinase,” *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **62**, 188~195(1998).
- Bollag, J. M., “Decontaminating soil with enzymes: An in situ method using phenolic and anilinic compounds,” *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 1876~1881(1992).
- Shindo, H. and Huang, P. M., “Role of Mn(IV) oxide in abiotic formation of humic substances in the environment,” *Nature(London)*, **298**, 363~365(1982).
- Shindo, H. and Huang, P. M., “Significance of Mn(IV) oxide in abiotic formation of organic nitrogen complexes in natural Environment,” *Nature(London)*, **308**, 57~58(1984).

6. Karthikeyan, K. G., Chorover, J., Boritiatynski, J. M., Hatcher, P. G., "Interaction of 1-naphthol and its oxidation products with aluminum hydroxide," *Environ. Sci. Technol.*, **33**, 4009~4015(1999).
7. Thurston, C. F., "The Structure and Function of Fungal Laccases," *Microbiology*, **140**, 19~26(1994).
8. Reinhammer, B. and Malmstrom, B. G., "Blue" copper-containing oxidases," In Copper proteins (Metal ions in Biology, Vol. 3), *Spiro, T. G. Ed., John Wiley & Sons, New York*, pp. 109~149(1981).
9. Dec, J., Shuttleworth, K. L., and Bollag, J.-M., "Microbial release of 2,4-dichlorophenol bound to humic acid or incorporated during humification," *J. Environ. Qual.*, **19**(3), 546~551(1990).
10. Kang, K.-H., Shin, H. S., and Park, H., "Characterization of humic substances present in landfill leachates with different landfill ages and its implications," *Water Res.*, **36**(16), 4027~4036(2002a).
11. Minard, R.-D., Liu, S.-Y., Bollag, J. M., "Oligomers and quinones from 2,4-dichlorophenol," *J. Agric. Food Chem.*, **29**, 250~253(1981).
12. Seling, H., Michael Keinath, T., and Weber, W. J., "Sorption and manganese-induced oxidative coupling of hydroxylate aromatic compounds by natural geosorbents," *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 4122~4127(2003).
13. Parikh, S. J., chorover, J., and Burgos, W. D., "Interaction of phenanthrene and its primary metabolite(1-hydroxy-2-naphthoic acid) with estuarine sediments and humic fractions," *J. Contam. Hydrol.*, **72**, 1~22(2004).
14. 임동민, 강기훈, 신현상, "망간산화물을 이용한 1-Naphthol의 산화 제거 연구," *대한환경공학회지*, **28**(5), 535~542(2006).
15. Salloum, M. J., Dudas, M. J., McGill, W. B., "Variation of 1-naphthol sorption with organic matter fractionation: the role of physical conformation," *Orgnic Geochem.*, **32**, 709~719(2001).
16. McKenzie, R. M., "The synthesis of birnessite, cryptomelane, and some other oxides and hydroxides of manganese," *Miner. Mag.*, **38**, 493~502(1971).
17. Hansch, C., Leo, A., Hoekman, D., "Exploring QSAR-Hydrophobic, Electronic, and Steric Constants," American Chemical Society, Washington, DC(1995).
18. Burgos, W. D., Berry, D. F., Bhandari, A., and Novak, J. K., "Reversible sorption and irreversible binding of naphthalene and α -naphthol to soil: Elucidation of processes," *Environ. Sci. Technol.*, **30**(4), 1205~1211(1996).
19. Huang, Q. and Weber, W. J., "Peroxidase-catalyzed coupling of phenol in the presence of model inorganic and organic solid phases," *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 5238~5245(2004).
20. Majcher, E. H., Chorover, J., Bollag, J.-M., and Huang, P. M., "Evolution of CO₂ during birnessite-induced oxidation of ¹⁴C-labeled catechol," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **64**, 157~163(2000).
21. Kang, K.-H., Dec, J., Park, H., and Bollag, J.-M., "Transformation of the fungicide cyprodinil by a laccase of *Trametes villosa* in the presence of phenolic mediators and humic acid," *Water Res.*, **36**(19), 200~208(2002b).
22. Kang, K.-H., Dec, J., Park, H., and Bollag, J.-M., "Effect of phenolic mediators and humic acid on cyprodinil transformation in the presence of birnessite," *Water Res.*, **38**(11), 2737~2745(2004).
23. Xu, F., Koch, D. E., Kong, I. C., Hunter, R. P., and bhandari, A., "Peroxidase-mediated oxidative coupling of 1-naphthol: Characterization of polymerization products," *Water Res.*, **39**, 2358~2368(2005).
24. Wang, M. C. and Huang, P. M., "Significance of Mn(IV) oxide in the abiotic ring cleavage of pyrogallol in natural environments," *Sci. Total Environ.*, **113**, 147~157(1992a).
25. Ukrainczyk, L. and McBride, M. B., "Oxidation of phenol in acidic aqueous suspensions of manganese oxides," *Clays and Clay Minerals*, **40**, 157~166(1992).
26. Sparks D. L., *Environmental Soil Chemistry*, Academic Press Inc., California, USA, pp. 99~139(1995).
27. Shindo, H. and Huang, P. M., "Catalytic effect of manganese(IV), iron(III), Al, and Si oxides on the formation of phenolic polymers," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **48**, 927~934(1984).
28. Karthikeyan, K. G. and Chorover, J., "Effects of solution chemistry on the oxidative transformation of 1-naphthol and its complexation with humic acid," *Environ. Sci. Technol.*, **34**, 2939~2946(2000).
29. Silvertin, R. M. and Webster, F. X., *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 6th Ed., Jhon Wiley & Sons(1997).
30. Kang, K.-H., Lim, D.-M., and Shin, H.-S., "Removal of TNT reduction products via oxidative-coupling reaction using manganese oxide," *Water Res.*, **40**(5), 903~910(2006).
31. Stevenson, F. J., *Humus Chemistry*, John Wiley and Sons Inc., New York, pp. 303~324(1994).
32. Dec, J. and Bollag, J.-M., "Phenoloxidase-mediated interactions of phenols and anilines with humic materials," *J. Environ. Qual.*, **29**, 665~676(2000).