

米糠油中の Sterol組成

鄭 泰 明 · 梁 敏 錫* · 河 鳳 錫**

慶尙大學校 自然科學大學 化學科

*慶尙大學校 農科大學 農化學科

**慶尙大學校 自然科學大學 食品營養學科

(1984년 1월 10일 수리)

Sterol Composition of Rice Bran Oil

Tae-Myoung Jeong, Min-Suk Yang* and Bong-Suk Hah**

Department of Chemistry, Gyeongsang National University, Jinju, Korea

*Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University

**Department of Food and Nutrition, Gyeongsang National University

Abstract

The unsaponifiable from rice bran oil was fractionated into 4-desmethyl-7 α -monomethyl- and 4,4-dimethylsterol (triterpene alcohol) fraction by thin layer chromatography (TLC), and sterol composition of the each fraction was analyzed by gas liquid chromatography (GLC). The sterol peaks not well separated by GLC were further fractionated by AgNO₃-TLC, then analyzed using GLC. Each components in the three sterol fractions were identified by GLC and gas chromatography-mass spectrometry.

As the results, ten sterols were confirmed as 4-desmethylsterol, nine as 4-monomethylsterol and four as 4,4-dimethylsterol.

Such uncommon phytosterols in higher plants as fucosterol, 24-ethylphenol, 4 α -methylstigmasta-7,25-dienol and 28-isocitrostadienol were detected in rice bran oil and the biosynthetic pathways of the phytosterols were deduced with all the identified sterols.

緒 論

米糠은 쌀을 主食으로 하는 Asia 여러나라에서 豊富하게 얻을 수 있는 油資源의 하나이다. 米糠에서 얻는 米糠油의 生産은 日本이 壓到的으로 많고 이어서 India, Burma, Tailand, 韓國등이며 食用 또는 工業용으로 쓰이고 있다.¹⁾ 米糠의 含油量은 15~21%이며 기름中的 主要脂肪酸은 oleic,

linoleic, palmitic acid인 것으로 알려져 있다. 米糠油中的 sterol 成分에 관해서는 Eisner²⁾, Jacin³⁾ 및 Itoh^{4,5)}등에 의한 報告가 있으나 여기서는 모두 많은 植物油와 함께 米糠油를 包含시키고 있으며 또 Eisner는 4-desmethylsterol成分만을 Jacini는 4-desmethyl와 4,4-dimethylsterol 成分만을 밝히고 있다. 그 뒤에 Itoh는 여기에 4-monomethylsterol을 包含시켜 3群의 sterol 成分을 모두 分析했으나 다시 새로운 成分의 補充이 要望되고 있다.

最近의 器機分析을 包含하는 一連의 分析法의 發達은 sterol分野에 있어서도 놀랄만한 成果를 거두고 있어 從來에 檢出이나 構造同定이 어려웠던 새로운 sterol들이 속속 밝혀지고 있는 實情이다.

本實驗은 米糠油中の sterol의 成分 또는 組成을 더욱 詳細하게 또 體系의으로 밝히고 나아가서 米糠油中の sterol 生合成過程을 살펴볼 目的으로 이루어졌다. 기름에서 不檢化合物을 取하고 이것을 thin layer chromatography(TLC)에 의해서 4-desmethyl-, 4-monomethyl-, 4, 4-dimethylsterol (triterpene alcohol)의 各 fraction으로 나누고 必要에 따라서는 이들 fraction을 acetyl化 시켜 얻은 acetate를 AgNO₃를 침윤시킨 TLC(AgNO₃-TLC)로서 다시 몇개의 區分으로 나누어서 分析하였다. 個個의 sterol은 주로 gas liquid chromatography(GLC) 및 GLC에 連結된 mass spectrometry에 의해서 同定하였다.

이 報文에 쓰이고 있는 sterol의 慣用名은 다음과 같다.

4-desmethylsterols

- cholesterol=cholest-5-en-3β-ol
- campesterol=24R-methylcholest-5-en-3β-ol
- 24-methylenecholesterol=24-methylenecholest-5-en-3β-ol
- stigmasterol=24S-ethylcholesta-5, E22-dien-3β-ol
- 24-methylcholesta-5, 24-dienol=24-methylcholesta-5, 24-dien-3β-ol
- sitosterol=24R-ethylcholest-5-en-3β-ol
- fucosterol=stigmasta-5, E24(28)-dien-3β-ol
- Δ⁶-avenasterol=28-isofucosterol=stigmasta-5, Z24(28)-dien-3β-ol
- Δ⁷-stigmastenol=24R-ethyl-5α-cholest-7-en-3β-ol
- Δ⁷-avenasterol=5α-stigma-7, Z24(28)-dien-3β-ol

4-monomethylsterols

- lophenol=4α-methyl-5α-cholest-7-en-3β-ol
- obtusifoliol=4α-, 14α-dimethyl-24-methylene-5α-cholest-8-en-3β-ol
- 31-norcycloartenol=4α-, 14α-dimethyl-9, 19-cyclo-5α-cholest-24-en-3β-ol
- cycloauralenol=4α, 14α-dimethyl-9, 19-cyclo-24-methylene-5α-cholest-3β-ol
- gramisterol=4α-methyl-24-methylene-5α-cho-

lest-7-en-3β-ol

- 24-ethyllophenol=4α-methyl-24ξ-ethyl-5α-cholest-7-en-3β-ol
- 4α-methylstigmasta-7, 25-dienol=4α-methyl-5α-cholesta-7, 25-dien-3β-ol
- 28-isocitrostadienol=4α-methyl-5α-stigmasta-7, E-24(28)-dien-3β-ol
- citrostadienol=4α-methyl-5α-stigmasta-, 7, Z-24(28)-dien-3β-ol
- 4, 4-dimethylsterols
- cycloartanol=9, 19-cyclo-5α-lanostan-3β-ol
- cycloartenol=9, 19-cyclo-5α-lanost-24-en-3β-ol
- 24-methylcycloartanol=24ξ-methyl-9, 19-cyclo-5α-lanostan-3β-ol
- 24-methylenecycloartanol=24-methylene-9, 19-cyclo-5α-lanostan-3ξ-ol
- cyclobranol=24-methyl-9, 19-cyclo-5α-lanost-24-3β-ol

材料 및 方法

1. 試料油

우리나라 南部地方에서 集荷한 米糠에서 n-hexane을 써서 工業的으로 抽出한 기름을 精製하여 試料油로 使用하였다. 기름의 檢化價 189, 沃素價 102, 酸價 0.8이었다.

2. 불검화물

기름의 檢화는 常法에 따랐다. 즉 一定量의 試料油에 1N alcohol性 KOH를 加하여 N₂ gas를 불어 넣으면서 물증탕에서 1時間 還流시킨 다음 冷水를 加해서 反應物을 溶解, 冷却시킨 後 ethyl ether로서 3回씩 抽出했다. 抽出液을 合하여 alkali가 없어질때까지 증류수로서 세척한 다음 無水 Na₂SO₄로서 水分을 乾燥시키고 ether를 溜去하여 불검화물을 얻었다.

3. TLC

20×20cm의 유리판에 Wako gel B-10을 0.5mm 두께로 塗布하고 風乾後 105°C에서 活性化시켰다 여기에 10%液이 되도록 調製한 불검화물의 chloroform 溶液을 plate當 0.3ml씩 線狀으로 spotting 하고 hexane-ether(7:3)을 溶媒로 써서 60分間展開하였다. 0.01%의 rhodamine ethanol 溶液으로

發色시켜 赤外線(3600Å)下에서 관찰하였던바 5개의 band로 分離되었다. 즉 이들은 溶媒前端에서 各各 低極性化合物(fraction 1), 4, 4-dimethylsterol (fr. 2), 4-monomethylsterol (fr. 3), 4-desmethylsterol (fr. 4), 極性化合物(fr. 5)이다.⁹⁾ 이들 중 Fr. 2, 3, 4는 GLC로서 ΔR_{sc} 值⁷⁾(free sterol에 대한 acetate의 GLC RRT)를 測定하여 各各 該當 fraction임을 確認하였다.

4. AgNO₃침윤 TLC(AgNO₃-TLC)

위의 3개 fraction을 다시 더 分劃할 必要가 있을 때는 AgNO₃-TLC를 實施했다. 10% AgNO₃를 含浸시킨 Wakogel B-10으로 前項의 一般 TLC와 같은 方法으로 plate를 만들고 여기에 各 sterol fraction을 無水酢酸-pyridine(1:1)을 써서 常法에 따라 acetyl化시켜 얻은 acetate를 역시 line spotting하여 benzene-hexane (1:1) 展開液으로 60分間 展開하고 發色觀察도 前項과 같은 方法으로 하였다.

5. GLC: FID가 붙어있는 Shimadzu GC-4BM gas chromatograph (Kyoto, Japan)를 썼으며 測定條件은 다음과 같다. Column: OV-17(1.5%)를 充填한 glass column(2m×3mm I.D), column 溫度: 265°C, 檢出器溫度: 280°C, carrier gas (N₂) 流速: 60ml/min. 이 條件에서 sitosterol은 30min에서 流出되며, relative retention time (RRT)는 sitosterol에 대한 相對值로서, 그리고 各 sterol의 含量比는 半值幅法에 의해서 GLC peak 總面積의 100分率로서 나타내었다.

6. Mass spectrometry

Shimadzu LKB-7000型 gas chromatograph-mass spectrometer (Kyoto, Japan)로서 測定하였으며 1.5% OV-17 column을 써서 column溫度: 270°C, carrier gas(He): 30ml/min, ion source: 280°C, molecular separator溫度: 275°C, ion化 電壓: 70 eV, trap current: 60μA, 加速電壓 3500V로였다.

本 實驗에서 sterol 成分의 同定을 위해 쓰인 標

Table 1. Relative Retention Times of the Authentic Specimens of Sterol on OV-17 Column

Compounds	Position of double bonds	Other structural characteristics	RRT ^a
4-Desmethylsterols			
cholesterol	5	—	0.62
Campesterol	5	24R-CH ₃	0.81
stigmasterol	5, 22	24S-C ₂ H ₅	0.88
sitosterol	5	24R-C ₂ H ₅	1.00
Δ^5 -avenasterol	5, 24(28)	24Z-C ₂ H ₄	1.11
Δ^7 -stigmastenol	7	24R-C ₂ H ₅	1.17
Δ^7 -avenasterol	7, 24(28)	24Z-C ₂ H ₄	1.31
4-Monomethylsterols			
lophenol	7	—	0.82
obtusifoliol	8, 24(28)	14 α -CH ₃ , 24-CH ₂	0.95
31-norcycloartenol	24	14 α -CH ₃ , 9, 19-cyclo ^b	0.99
cycloeucalenol	24(28)	14 α -CH ₃ , 24-CH ₂ , 9, 19-cyclo	1.11
gramisterol	7, 24(28)	24-CH ₂	1.12
4, 4-Dimethylsterols			
cycloartanol	—	9, 19-cyclo	1.02
cycloartenol	24	9, 19-cyclo	1.24
24-methylenecycloartanol	24(28)	9, 19-cyclo, 24-CH ₂	1.37
24-methylcycloartanol	—	9, 19-cyclo, 24-CH ₃	1.34

a: RRT=Relative retention time for sitosterol(30 min.) is taken as 1.00.

b: 9, 19-cyclo=9 β , 19-cyclopropane ring.

準物質을 Table 1에 表示하였다.

結果 및 考察

1. 불검화물

米糠油 50g에서 불검화물 2.4g(4.8%)을 얻었다. 이것은 Itoh⁴⁾등의 경우와도 비슷하며 一般의 으로 다른 植物油에 比해서 높은 收得率을 나타내고 있다. 불검화물을 TLC로서 分離한 5개의 fraction의 收得量은 fraction 1(低極性物質) : 0.43g (18%), fr. 2(4,4-dimethylsterol) : 0.65g(27%), fr. 3(4-monomethylsterol) : 0.19g(8%), fr. 4(4-desmethylsterol) 1.06g(44%)였으며 spot line 근처에는 fr. 5(極性物質) : 0.07g(3%)가 남아 있었다. 3개의 sterol fraction (fr. 2~4)의 收得率은 불검화물에 대해서 79%(1.90g)였다. 本實驗에서는 이들중 fr. 2, 3, 4의 3개의 fraction만을 取扱한다.

2. 4-Desmethylsterol 組成

4-Desmethylsterol fraction의 GLC에 의한 分析結果를 Table 2에 表示한다.

Table 2. Approximate Composition(%) of the 4-Desmethylsterol Fraction of Rice Bran Oil by GLC

RRT ^a		%	Sterols
Free	Acetate		
0.62	0.82	tr	cholesterol
0.81	1.07	19	campesterol
0.82	1.09	9	24-methylenecholesterol
0.88	1.16	15	stigmasterol
0.99	1.31	5	24-methylcholesta-5, 24-dienol
1.00	1.33	41	sitosterol
1.05	1.39	to	fucosterol
1.11	1.47	6	Δ^5 -avenasterol
1.17	1.57	3	Δ^7 -stigmastenol
1.31	1.76	1	Δ^7 -avenasterol

a: RRT for sitosterol(30 min.) is taken as 1.00.

各 GLC peak의 同定은 다음과 같이 이루어졌다. 즉 cholesterol은 RRT로서 stigmasterol, Δ^5 -avenasterol, Δ^7 -stigmastenol, Δ^7 -avenasterol은 RRT

및 mass spectrum을 標準物質의 그것과 各各 比較해서 確認하였다. RRT 0.81의 peak는 mass spectrum에 의하면 分子 ion(M⁺)이 m/e400및 398에 나타나 있으며 이들에 이어서 M-CH₃, M-H₂O, M-CH₃-H₂O에 해당하는 開裂 peak를 各各 同伴하고 있었다. 따라서 이 peak는 두 sterol의 混合物로 보아지며 이러한 現象은 前報⁶⁾의 예덕나무(Akamegashiwa) 및 고추(Capsicum) 種子油에서도 볼 수 있었으며 그때와 같이 이 混合物은 campesterol (RRT 0.81, C₂₈H₄₈O, MW 400)와 24-methylenecholesterol(RRT 0.82, C₂₈H₄₆O, MW 398)인 것으로 보아진다. RRT 1.00인 peak는 當然히 sitosterol이라고 보았으나 mass spectrum에서 意外로 M⁺이 m/e 414와 398에서 나타나 2개의 sterol混合物인 것을 알았다. M⁺을 m/e 414에 갖는 것은 sitosterol이라고 認定되었지만 M⁺이 m/e 398에 나타난 sterol은 다음과 같은 實驗結果에서 24-methylcholesta-5, 24-dienol인 것으로 確認했다. 즉 4-desmethylsterol fraction을 acetyl化하고 AgNO₃-TLC에 의해서 Fig. 1과 같이 4개의 band로 分離되었으며 start line쪽의 A-band는 GLC에 의하면 24-methylencholesterol과 Δ^7 -avenasterol

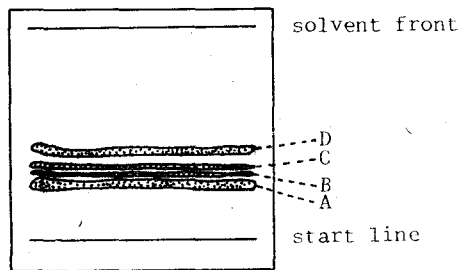


Fig. 1. Separation of 4-desmethylsterol acetate fraction by AgNO₃-TLC

의 acetate peak와 함께 RRT 1.31인 未知 peak가 보였다. 이것의 mass spectrum을 Fig. 2에 提示한다. 分子 ion(M⁺)은 보이지 않고 m/e 380(M-AcOH, 比强度 100%), 365(M-AcOH-CH₃, 30%), 296[M-AcOH-C₆H₁₂(side chain의 部分開裂) 86%], 281(M-AcOH-C₆H₁₂-CH₃, 32%), 228[M-C₁₁H₂₀(D-ring의 a 開裂)-AcOH, 38%], 213[M-C₁₂H₂₃(D-ring의 b 開裂)-AcOH, 70%]등의 開裂 ion이 관찰되었다. 이 開裂 pattern은 Itoh⁸⁾등에 의한 24-methylcholesta-5, 24-dienyl acetate의 그것과 잘 一致하고 있었다. 한편 이 acetate를 加水

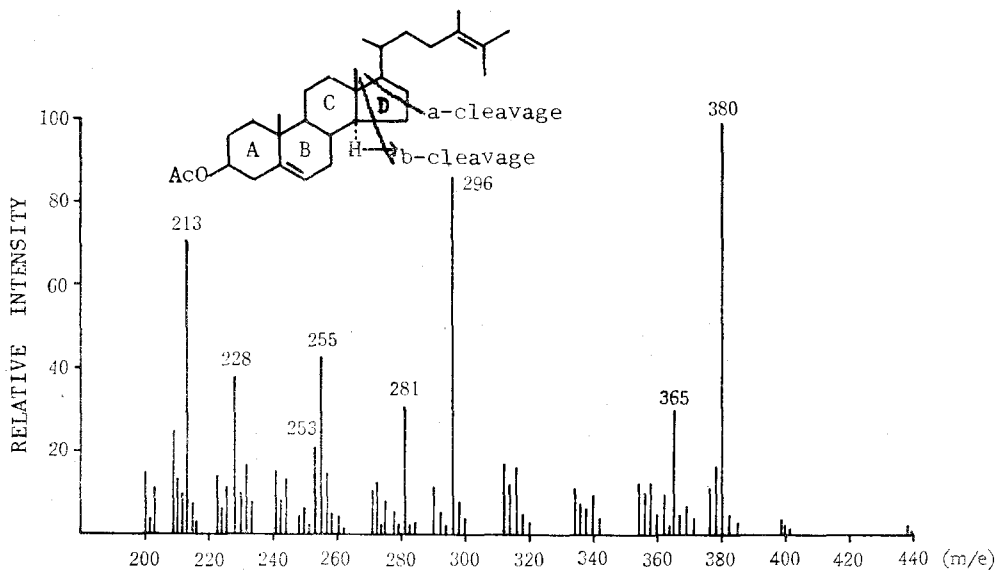


Fig. 2. Mass spectrum of 24-methylcholesta-5, 24-dienyl acetate

分解해서 얻은 free sterol은 RRT가 0.99였다. 따라서 이 sterol은 24-methylcholesta-5, 24-dienol ($C_{28}H_{46}O$, MW 398)인 것으로 同定한다. 다음에 start line쪽에서 두번째에 희미하게 보이는 B-band의 GLC에서는 Δ^5 -avenasterol acetate의 peak (RRT 1.47)와 함께 RRT 1.39에 적은 peak가 나타나 있었다. 過量注入하여 얻은 이 peak의 mass spectrum에 따르면 m/e 394(比強度 86%), 379(10%), 296(100%), 281(20%), 273(4%), 255(5%), 253(6%), 229(4%), 228(7%), 227(5%), 213(10%)등의 開裂 ion이 나타나 있으며 이 pattern은 위의 Δ^5 -avenasterol acetate의 mass spectrum 開裂 pattern과 거의 一致하고 있었다. 이 band의 acetate 混合物를 加水分解해서 얻은 free sterol의 GLC에서 Δ^5 -avenasterol은 RRT 1.11에 그리고 後者の 작은 peak의 RRT는 1.05였다. Itoh등⁹⁾에 의하면 Δ^5 -avenasterol (isofucosterol, Z-24(28)-ethylidene, Ib)가 存在하는 植物油 不飽和物에는 Δ^5 -avenasterol의 幾何異性體인 fucosterol (E-24(28)-ethylidene, Ia) (scheme 參照)를 微量으로 同伴하는 예를 報告하고 있으며 米糠油에서도 fucosterol을 檢出한 바 있다. 따라서 RRT 1.05 sterol은 그 mass spectrum과 RRT로 보아 fucosterol($C_{29}H_{48}O$, MW : 412)인 것으로 推定한다.

4-desmethylsterol混合物의 GLC에서 分離되지 않았던 2쌍의 peak 즉 RRT 0.81, 0.82 및 0.99,

1.00의 各 sterol 含量比는 $AgNO_3$ -TLC로 分離된 acetate의 GLC peak로부터 Table 2에서 보는 바와 같이 計算되었다.

以上과 같이 米糠油의 4-desmethylsterol fraction에서는 10種의 sterol이 確認되었으나 이들중 少量成分인 Δ^7 -stigmastenol(3%)과 Δ^7 -avenasterol(1%)를 除外하면 모두가 Δ^5 -sterol인 것으로 보아서 米糠油의 4-desmethylsterol은 소위 Δ^5 -sterol型이라고 할 수 있다. 24-methylenecholesterol은 Idler 등¹⁰⁾에 의해서 海産貝類인 굴(oysters), 대합조개(clams)에서 最初로 單離되었으나 前報⁹⁾에서와 같이 예덕나무(akamegashiwa), 겨자(mustard), 고추(capsium)種子油에서도 檢出되고 있으며 그 외의 植物에서도 널리 分布하고 있는 것으로 안다. 24-methylcholesta-5, 24-dienol은 Itoh등⁹⁾에 의하면 몇種의 가지科(*Solanaceae*) 植物種子油에 微量成分으로 存在하고 있으나 特히 구기자(*Lycium chinese* Mill)에는 4-desmethylsterol fraction의 27%를 占하고 있는 것으로 報告되고 있다.

3. 4-Monomethylsterol組成

4-Monomethylsterol fraction의 GLC에 의한 分析結果를 Table 3에 表示한다.

lophenol, obtusifoliol, 31-norcycloartenol은 RRT와 mass spectrum을 標準物質의 그것과 比較해서 同定하였다. 이 fraction의 主成分을 이루고

Table 3. Approximate Composition(%) of the 4-Monomethylsterol Fraction of Rice Bran Oil by GLC

RRT ^a		%	Sterols
Free	Acetate		
0.74	0.96	12	—
0.82	1.07	3	lophenol
0.95	1.23	4	obtusifoliol
0.99	1.29	7	31-norcycloartenol
1.11	1.44	22	cycloeucaenol
1.12	1.46	17	gramisterol
1.26	1.63	6	—
1.32	1.70	7	24-ethyllophenol
1.36	1.76	1	4-methylstigmasta-7,25-dienol
1.42	1.83	tr	28-isocitrostadienol
1.50	1.94	21	citrostadienol

a: RRT for sitosterol(30 min.) is taken as 1.00.

있는 RRT 1.11 peak는 mass spectrum에 의하면 2개의 sterol混合物인 것으로 보였다. 이混合物 peak를分離시키고 나면, 성분들의 確認을 보다 쉽게 하기 위하여 이 fraction 170mg을 acetyl化시켜 AgNO₃-TLC를 實施하였다. 그 결과 Fig. 3과 같이 3개의 band(A: 31mg, B: 50mg, C: 59mg)로 나누어졌으며 各 band의 GLC chromatogram을 Fig. 4(a,b,c)에 表示한다.

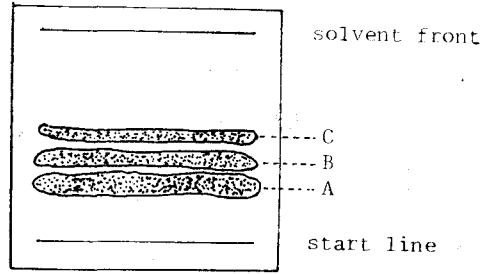
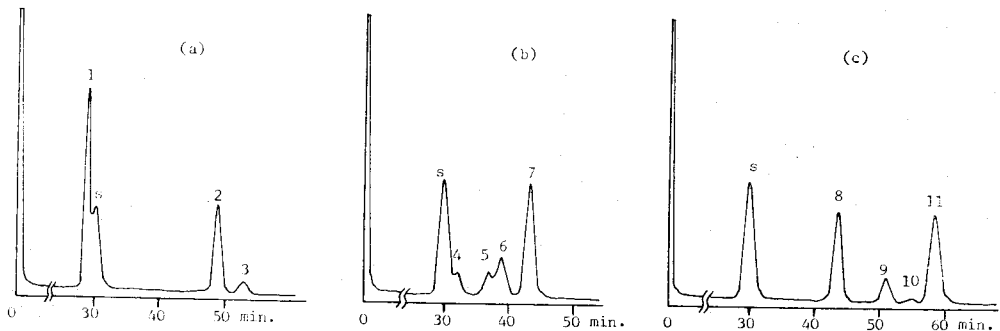


Fig. 3. Separation of 4-monomethylsteryl acetate fraction by AgNO₃-TLC.

Band A의 GLC는 Fig. 4-a에서 보는 바와 같이 peak-1(RRT 0.96, free 0.74)과 peak-2(RRT 1.63, free 1.26)이 主成分을 이루고 있었다. 이들의 mass spectrum에 따르면 前者는 그 분자 ion에서 MW가 452(free sterol 410)로 計算되었으면 그 뒤로 이어지는 開裂 peak로서 24-methylene基와 環系에 2개의 二重結合이 있다는 것은 알았으나 同定은 못했다. 後者は 분자 ion도 確認하기 어려웠으며 역시 未同定으로 남기게 되었다. 이 band의 작은 peak인 peak-3(RRT 1.76, free 1.36)는 mass spectrum에 의하면 分子 ion(M⁺)이 m/e 468(C₃₂H₅₂O₂, 比強度 7%)에 있고 그 外의 主要 ion으로서 m/e 453 (M-CH₃, 18%), 408 (M-AcOH, 62%), 393(M-CH₃-AcOH, 21%), 355 [M-C₇H₁₄(side chain部分開裂)-CH₃, 11%], 327 [M-C₁₀H₁₉(side chain)-2H, 100%], 302[M-C₁₂H₂₂



- | | | |
|--|----------------------------------|----------------------------------|
| s: Internal standard(sitosterol) | s: Internal standard(sitosterol) | s: Internal standard(sitosterol) |
| 1: } Unidentified | 4: Lophenol acetate | 8: Gramisterol acetate |
| 2: } | 5: Obtusifoliol acetate | 9: 24-Ethyllophenol acetate |
| 3: 4-Methylstigmasta-7,25-dienol acetate | 6: 31-Norcycloartenol acetate | 10: 28-Isocitrostadienol acetate |
| | 7: Cycloeucaenol acetate | 11: Citrostadienol acetate |

Fig. 4. GLC chromatogram of A-(a), B-(b) and C-band(c) separated from the 4-monomethylsteryl acetate fraction by AgNO₃-TLC.

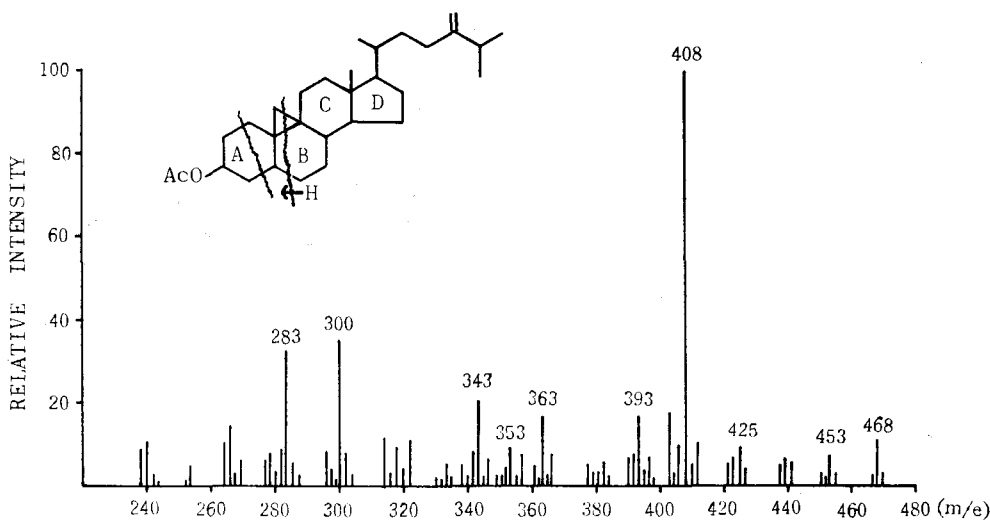


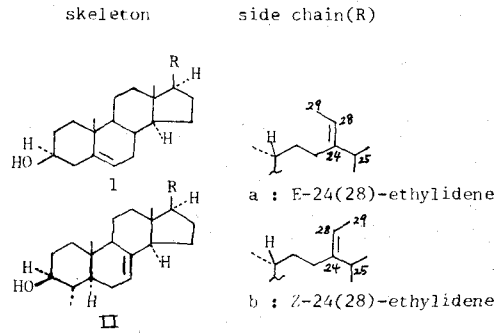
Fig. 5. Mass spectrum of cycloeucaenyl acetate.

(D-ring의 b開裂), 13%], 287[M-C₁₃H₂₅(D-ring의 6開裂), 21%] (Fig. 2 參照), 269(M-C₁₀H₁₉-AcOH, 26%), 267(M-C₁₀H₁₉-2H-AcOH, 29%), 242(M-C₁₂H₂₂-AcOH, 21%), 227(M-C₁₃H₂₅-AcOH, 31%)등을 觀察할 수 있었다. 이 開裂 pattern은 Bolger 등¹¹⁾이 누리장나무(*Clerodendrum campbellii*)에서 單離했고 또 著者 등¹²⁾이 박과(*Cucurbitaceae*)種子油에서 檢出한 바 있는 4 α -methyl-24 ξ -ethylcholesta-7, 25-dienol acetate의 그것과 基本的으로 類似하였으므로 이 sterol을 4 α -methylstigmasta-7, 25-dienol acetate (C₃₂H₅₂O₂, MW 468)라고 認定한다. 이 sterol은 植物體內에서 citrosta-dienol와 같이 결사슬 二重結合의還元과 脫 methyl를 거쳐 Δ^7 -stigmastanol에 이르는 生合成經路를 밟는 것으로 생각된다. 中央 band B를 切取, 抽出하여 그린 GLC chromatogram은 Fig. 4-b와 같다. Peak-4 (RRT 1.07, free 0.82)는 lophenol peak-5(RRT 1.23, free 0.95)는 obtusifoliol, peak-6(RRT 1.29, free 0.99)는 31-norcycloartenol acetate임을 標準sterol의 RRT 및 mass spectrum과 比較하여 確認하였다. Peak-7(RRT 1.44, free 1.11)의 mess spectrum을 Fig. 5에 실는다.

분자 ion (M⁺)이 m/e 468(比強度 11%)에 나타나 있으며 이어서 m/e 453 (M-CH₃, 8%), 425 (M-CH(CH₃)₂, 9%), 408(M-AcOH, 100%), 393 (M-AcOH-CH₃, 16%), 363(M-AcOH-43, 16%), 353[M-C₆H₁₁O₂(A-ring開裂), 35%] 및 283(M-C₉

H₁₇-AcOH, 32%)등의 開裂ion을 觀察할 수 있었다. 여기에서 특히 m/e 353 및 300은 Fig. 5에서 보는 바와 같이 Aplin 등¹³⁾이나 Audier 등¹⁴⁾에 의한 9 β -19-cyclopropane ring을 가지고 있는 4環性 sterol의 基本開裂인 것이다. 以上の spectrum pattern은 前報¹⁵⁾의 cycloeucaenol acetate의 그것과 基本的으로 一致하고 있으므로 이 sterol은 cycloeucaenolacetate (C₃₂H₅₂O₂, MW 468)라고 同定하였다. 上部 band c의 GLC chromatogram은 Fig. 4-c와 같다. 4개의 GLC peak中 peak-8(RRT 1.46, free 1.12)의 mass spectrum에서 m/e 454 (M⁺), 439(M-CH₃), 394(M-AcOH), 379(M-CH₃-AcOH), 370[M-C₆H₁₂(24-methylene基에 의한 Mc Lafferty轉移)]^{16,17)} 327[M-C₉H₁₇(side chain)-2H base peak], 269(M-AcOH-C₉H₁₇), 242[M-AcOH-C₁₁H₂₀(D-ring의 a開裂)] 및 227[M-AcOH-C₁₂H₂₃(D-ring의 b開裂)](Fig. 2 參照)등의 ion peak를 볼 수 있었으며 이 開裂 pattern은 Tamura 등¹⁸⁾에 의한 gramisterol (24-methylenelophenol) acetate의 그것과 基本的으로 잘 一致하고 있었다. 따라서 이 sterol은 gramisterol acetate(C₃₁H₅₀O₂, MW 454)라고 認定된다. Peak-9(RRT 1.70, free 1.32)는 mass spectrum에서 M⁺은 m/e 470(比強度 8%)에 있고, 이어서 m/e 455[M-C₁₀H₂₁(side chain)-2H, 100%], 302[M-C₁₂H₂₄(D-ring의 a-開裂 27%), 287[M-C₁₃H₂₇(D-ring의 b-開裂), 42%] (Fig. 2 參照), 269(M-C₁₀H₂₁-AcOH, 18%), 242

(M-AcOH-C₁₂H₂₃, 36%), 227(M-AcOH-C₁₃H₂₇, 48%) 등의 開裂 ion을 볼 수 있었다. m/e 327로서 Δ⁷-結合이, 그리고 m/e 327과 그 위의 開裂 ion에서 side chain에 24-ethyl基가 存在한다는 것을 推測할 수 있으므로 이 sterol은 24-ethylphenol acetate인 것으로 推定하였다. 이것은 Itoh 등¹⁹⁾에 의하면 가지科(*Solanaceae*)의 가지(*Shinkuro*, *Solanum melongena* L.)種子油中の 4-monomethylsterol fraction의 主成分(65%)을 이루고 있으며 그들에 의해서 單離同定된 바 있는데 그것의 mass spectrum pattern과도 잘 一致하고 있었다. 따라서 peak-9sterol은 24-ethylphenol acetate(C₃₂H₅₄O₂, MW 470)인 것으로 確認한다. Peak-11(RRT 1.94, free 1.50)의 mass spectrum에서는 m/e 468(M⁺, 5%), 453(M-CH₃, 5%), 408(M-AcOH, 7%), 393(M-CH₃-AcOH, 11%), 370[M-C₇H₁₄(24-ethylidene基에 의한 McLafferty轉移), 49%], 355(M-C₇H₁₄-CH₃, 5%), 327[M-C₁₀H₁₉(side chain)-2H, 100], 310(M-C₁₀H₁₉-CH₃, 22%), 295(M-C₇H₁₄-AcOH, 8%), 269(M-C₁₀H₁₉-AcOH, 20%), 267(M-C₁₀H₁₉-2H-AcOH, 37%), 242[M-C₁₂H₂₂(D-ring의 a-開裂)-AcOH, 10%], 227[M-C₁₃H₂₅(D-ring의 b-開裂)-AcOH, 25%] 등의 ion peak가 나타나 있었으며 이 開裂 pattern은 前報²⁰⁾의 citrostadienol(C₃₀H₅₀O, MW 426)의 acetate의 그것과 잘 一致하고 있었다. 매우 작은 peak-10(RRT 1.83)은 AgNO₃-TLC로서 分離하기 前의 4-monomethylsterol fraction에서는 나타나지 않았던 것이다. 過量注入으로서 測定한 mass spectrum에 의하면 m/e 468(M⁺, 4%), 453(5%), 408(9%), 393(8%), 370(52%), 366(7%), 327(100%), 310(18%), 295(11%), 269(26%), 267(33%), 242(8%), 227(28%) 등의 ion peak를 볼 수 있었으며 이것을 上記 citrostadienol acetate의 mass spectrum과 比較할때 각 ion peak의 比強度에 약간씩의 差가 있었으나 開裂 pattern은 잘 一致하고 있었다. 그리고 이 band C의 混合物을 加水分解해서 얻은 free sterol의 GLC에서 RRT 1.42로 측정되었다. mass spectrum pattern과 RRT에서 이 sterol은 4-desmethylsterol fraction에서 Δ⁵-avenasterol(28-iso-bucosterol)와 fucosterol의 關係와 꼭 같이 citrostadienol(II b, Z-24(28)-ethylidene)의 幾何異性體인 28-isocitrostadienol(II a, E-24(28)-ethylidene)인 것으로 推定해 보았다(scheme 參照).



Scheme. Diagram of skeletons and side chains (R) of sterols.

이 推定을 確認하기 위해서 side chain에 있는 C-24와 28사이의 二重結合에 대한 Z-, E-異性體의 separation factor^{21, 22)}(RRT' 比)를 計算해 보았다. 즉 Δ⁵-avenasterol(Z-異性體, Ib)/fucosterol(E-, Ia)=1.11/1.05=1.057이고 citrostadienol(Z-, II b)/28-isocitrostadienol(E-, II a)=1.50/1.42=1.056으로서 두 比가 有效數字範圍內에서 잘 一致하고 있는 것을 볼 수 있다. 이 事實은 peak-10의 遊離 sterol(RRT 1.42)을 28-isocitrostadienol(C₃₀H₅₀O, MW 426)라고 確定하는데 有力한 根據가 된다. 이 sterol은 高等植物에서 檢出된 例가 稀貴했으나 最近 Itoh 등⁹⁾이 胡椒(capsicum), 흰 독말풀(*Datura stamonium*)種子油에서 微量成分으로서 檢出한 바 있다.

以上과 같은 結果에서 볼때 이 fraction에서는 cycloeucalenol, citrostadienol, gramisterol가 主成分을 이루고 있으며 余他는 10%이하의 少量成分이다. 한편 環系의 構造에서는 Δ⁷-, Δ⁸-, 9, 19-cyclopropane ring을 가지는 것등으로 多様な 反面 Δ⁵-sterol가 없다는 것은 4-desmethylsterol의 大部分이 Δ⁵-라는 것과는 對照의이다. 이것은 生體內의 sterol生合成經路가 4, 4-dimethyl-→4-monomethyl-→4-desmethylsterol의 順을 거쳐 끝내는 cholesterol(Δ⁵)에 도달한다는 事實에 비추어 볼때 經路의 中間段階인 이 fraction이 多様な 構造分布를 가지는 것은 理解할 수 있는 일이다. 한편 이 fraction에서 citrostadienol(II b)과 그것의 幾何異性體인 isocitrostadienol(II a)이 檢出됐다는 것과 4-desmethylsterol fraction에서 Δ⁵-avenasterol(Ib)과 fucosterol(Ia)의 檢出을 함께 比較할때 sterol 生全合成過程의 한 斷面을 보여주는 것 같아서 興味롭다. 즉 이들은 4-monomethyl-→4-

Table 4. Approximate Composition(%) of the 4, 4-Dimethylsterol Fraction of Rice Bran Oil by GLC

RRT ^a	%	Sterols
1.02	3	cycloartanol
1.24	42	cycloartenol
1.37	54	24-methylenecycloartanol
1.63	1	cyclobranol

a: RRT for sitosterol(30 min.) is taken as 1.00.

desmethylsterol段階에서 side chain의 變換에 앞서 環系の 4 α -methyl基의 離脫과 不飽和結合의 移動($\Delta^7 \rightarrow \Delta^5$)이 優先한다는 것을 보여주고 있다.

4. 4, 4-Dimethylsterol(triterpene alcohol)의 組成

4, 4-Dimethylsterol fraction의 GLC에 의한 概略的인 組成을 Table 4에 表示한다.

이 fraction에서 同定된 4개의 sterol중 cycloartanol, 24-methylenecycloartanol은 植物油에서 흔히 볼 수 있는 것이며 이들은 RRT와 mass spectrum을 標準物質의 그것과 比較해서 確認했다. RRT 1.63의 작은 peak는 mass spectrum에 의하면 M⁺이 m/e 440에서 보이고 이어서 425, 422, 407, 371, 353, 338, 313, 301, 285, 257 및 201 등의 主要 ion peak가 나타나 있었다. 이 開裂 pattern은 Endo 등²³⁾에 의한 cyclobranol의 그것과 잘 一致하였으므로 이 物質과 同一한 것으로 推定되었으나 다음과 같은 separation factor의 계산에 의해서 더욱 確實해졌다. 즉 Table 5에서 보는 바와 같이 side chain의 24位의 二重結合의 有無 및 24-methyl基의 有無에 따른 separation factor를 각각 計算하였다. 각 factor는 有效數字範圍 안에서 一定한 값을 나타냈으므로 RRT 1.63 sterol을 cyclobranol로서 證明할 수 있었다.

이 fraction의 sterol分布는 單純하여 確認된 4개가 모두였다. 이 중에서도 cycloartenol과 24-methylenecycloartanol이 合하여 96%를 占하고 있으며 또 確認된 4개의 sterol은 모두 cyclopropane ring을 가지고 있어 뚜렷한 特徵을 나타내고 있다. 이와 같은 事實을 squalene \rightarrow cycloartenol \rightarrow 24-methylenecycloartanol \rightarrow cycloeucaenol \rightarrow obtusifolliol \rightarrow gramisterol \rightarrow citrostadienol \rightarrow Δ^7 -avenasterol \rightarrow Δ^7 -stigmastenol \rightarrow sitosterol \rightarrow stigmasterol \rightarrow cholesterol와 같은 Goodwin 등²⁴⁻²⁶⁾이 提案한 高等植

Table 5. Separation Factors of 24-Double Bond vs. Saturated and 24-Methyl vs. Non-Methyl on OV-17 Column

Compounds compared	Separation factors
24-Double bond/Saturated	
cycloartenol(1.24)/cycloartanol(1.02)	1.216
cyclobranol(1.63)/24-methylcycloartanol(1.34)	1.216
24-Methyl/Non-methyl	
24-methylcycloartanol(1.34)/cycloartanol(1.02)	1.314
cyclobranol(1.63)/cycloartenol(1.24)	1.315

() : RRT, RRT for sitosterol(30 min.) is taken as 1.00.

物中の sterol生合成의 主要經路에 비추어 볼때 이 fraction은 그 初期段階를 밟고 있다는 것을 알 수 있다. 4-monomethylsterol 및 그 以後의 段階에 있어서도 若干의 支流가 있기는 하나 大體로 위와 같은 經路를 따르고 있는 것 같이 보인다.

抄 錄

米糠油의 不飽和物을 分析하여 sterol組成을 살펴본 結果는 다음과 같다.

4-Desmethylsterol로서는 10개가 同定되었으며 이 중 sitosterol이 主成分을 이루고 있었다. 2개의 少量成分인 Δ^7 -stigmastenol(3%)과 Δ^7 -avenasterol(1%)를 除外하면 모두가 Δ^5 -sterol였으며 所謂 Δ^5 型 sterol分布를 보이고 있었다.

4-monomethylsterol fraction에서는 9개가 確認되었으나 cycloeucaenol, citrostadienol, gramisterol,가 主成分이었다. 環系の 구조가 多樣하여 sterol의 生合成經路의 中間段階임을 보여주고 있다.

4, 4-Dimethylsterol(triterpene alcohol)로서는 4개가 同定되었으나 이들은 모두 9, 19-cyclopropane ring을 가지고 있다. 이 들中 sterol生合成의 初期段階의 物質인 cycloartenol과 24-methylenecycloartenol가 이 fraction의 96%를 占하고 있는 것으로 봐서 米糠의 4, 4-dimethylsterol는 짧은 經路를 거쳐 쉽게 4-monomethylsterol로 轉換되는 것 같다.

Side chain에서 E-, Z-關係인 異性體가 4-desmethylsterol로서는 fucosterol과 Δ^5 -avenasterol가

그리고 4-monomethylsterol로서는 28-isocitrostadienol와 citrostadienol로서 각각 1쌍식이 檢出된 것으로 미루어 볼때 sterol의 生合成過程에서 side chain에서 보다 環系에서 먼저 變換이 일어나는 것으로 보아진다.

參考文獻

1. Toyama, Y.: Yukagaku, 22 : 127(1973)
2. Eisner, J., and Firestone, D.: JAOAC, 46 : 542(1963)
3. Fedeil, E., Lanzani, A., Capeia, P., and Jacini, G.: *ibid.*, 43 : 254(1966)
4. Itoh, T., Tamura, T., and Matsumoto, T.: *ibid.*, 50 : 122(1973)
5. Itoh, T., Tamura, T., and Matsumoto, T.: *ibid.*, 50 : 300(1973)
6. Jeong, T.M., Itoh, T., Tamura, T., and Matsumoto, T.: *Lipids*, 9 : 921(1974)
7. Itoh, T., Tamura, T., Iida, T., and Matsumoto, T.: *Steroids*, 23 : 687(1974).
8. Itoh, T., Tamura, T., and Matsumoto, T.: *ibid.*, 30 : 425(1977)
9. Itoh, T., Sakurai, S., Tamura, T., and Matsumoto, T.: *Lipids*, 15 : 22(1980).
10. Idler, D.R., and Fagerlund, U.H.M.: *J. Amer. Chem. Soc.*, 77 : 4142(1955).
11. Bolger, L.M., Ress, H.H., Ghisablerti, E.L., Goad, L.J., and Goodwin, T.W.: *Tetrahedron Letters*, 1970 : 3043
12. Jeong, T.M., Yang, M.S., and Matsumoto, T.: *J. Korean Chem. Soc.*, 21 : 193(1977)
13. Aplin, R.T., and Hornby, G.M.: *J. Chem. Soc.*, (B) 1966 : 1078
14. Audier, H.E., Bengelmans, R., and Das, B. C.: *Tetrahedron Letters*, 1966 : 4341
15. Jeong, T.M., Itoh, T., and Matsumoto, T.: *Yukagaku*, 22 : 153(1973)
16. Goad, L.J., and Goodwin, T.W.: *European J. Biochem.* 1 : 357(1967)
17. Knights, A.: *J. Gas Chromatogr.*, 5 : 273 (1967)
18. Tamura, T., Itoh, T., and Matsumoto, T.: *Yukagaku*, 22 : 157(1973).
19. Itoh, T., Ishii, T., and Matsumoto, T.: *Phytochemistry*, 17 : 971(1978)
20. Jeong, T.M., Itoh, T., Tamura, T., and Matsumoto, T.: *Lipids*, 10 : 634(1975)
21. Ikekawa, N., and Watanuki, R.: *Anal. Chem.*, 40 : 1139(1968)
22. Patterson, G.W.: *ibid.*, 43 : 1165(1971)
23. Endo, T., Misu, O., and Inaba, Y.: *Yukagaku*, 18 : 255(1969)
24. Williams, B.L., Goad, L.J., and Goodwin, T.W.: *Phytochemistry*, 6 : 1136(1966)
25. Goodwin, T.W.: *Biochem. J.* 123 : 293(1971)
26. Tomita, Y., and Uomori, A.: *J. Chem. Soc., Part D*, 284(1971)