J. Korean Agric. Chem. Soc.
한국농화학회지 31(1), 106—113 (1988)

잠두(*Vicia faba* L)가 생산하는 Brassinosteroid 활성물질

朴 根 亨

전남대학교 농과대학 식품공학과

Occurrence of Castasterone, Brassinolide and Methyl 4-Chloroindole-3-acetate in Immature *Vicia faba* Seeds

Keun-Hyung Park

Department of Food Science and Technology, Chonnam National University, Kwang-ju, Korea

Abstract

The rice lamina inclination test indicated the presence of brassinosteroid-like active substances in immature *Vicia faba* seeds. Two of these were identified as castasterone and brassinolide by GC/MS and GC/SIM, respectively. Another active principle was identified as methyl 4-chloroindole-3-acetate by GC/MS and HPLC.

서 론

유채화분에 brassin이라고 명칭된 새로운 식물생장조절물질의 존재가 1970년 Mitchell등에 의해서 보고[1]된 이래, 1979년 Grove등[2]은 활성본체를 단리 하는데 성공하고, X-ray구조 해석에 의해 구조결정을 하고 이 물질을 brassinolide라고 명명하였다. brassinolide는 steroid 구조물질로는 식물체에서 발견된 최초의 생장조절물질이며, 이 구조의 특징으로는 A ring의 2,3 그리고 side chain의 22, 23 위치에 vicinal hydroxy를 갖고 있으며, B ring에 lactone 구조를 갖고 있는점을 들 수 있다.

그후 brassinosteroid(이하 BR)로 총칭 되는 brassinolide 및 동족체가 타 식물에서도 발견 되어짐과 동시에, BR에 의해서 발현되는 주요 생리현상, 즉 식물체에 대해 상당한 증수효과[3,4]와 식물체가 환경으로부터 받는 environmental stress의 해소에 이 물질이 커다란 역할[5,6]을 하고 있는 것 등이 알려졌다.

이와같이 BR의 특이한 구조와 특이하고도 다양한 생리활성으로 인하여 이들 물질에 관한 관심이 집중되어 BR의 발견이 gibberellin 발견 이후 가장 중요한 발견[7]으로 생각되어 지고 있으며, BR은 식물 hormone으로 알려진 auxin, gibberellin, cytokinin, abscisic acid, ethylene에 이어 제 6 의 식물 hormone으로 등장하려 하고 있다.

지금까지 BR의 존재가 알려진 식물은 쌍자엽식물 11종[2,8,~17], 단자엽식물 3종[18,19], 나자식물 2종[20,21] 그리고 조류 1종[32]에 이르고 있으나, BR가 식물계에서 보편적으로 존재하는 식물 생장조절물질 이며 또 어떠한 BR를 생산하고 있는가 하는 점은 고등식물의 생리제어 기구의 해석은 물론 추후 BR에 관한 연구의 기초가 되리라 생각된다.

여기에 본 연구는 아직 내생의 BR에 대해 보고된 바 없는 잠두(*Vicia faba* L)를 대상으로 잠두가 생산하는 BR 활성물질을 검색 하였다.

재료 및 방법

실험재료

전남 진도군 진도읍 근교에서 재배된 잠두(*Vicia faba* L)를 사용하였다. 이 잠두는 전년도 10월 20일에 파종하여 개화 후 약 40일 경과된 것으로, 완숙 15~20일 전의 미숙 잠두종자를 5월 24일에 콩깍지와 함께 채취하여 추출 직전에 깍지를 제거하였다.

본 논문은 1987년 2월 5일 건국대학교에서 개최된 1987년도 임시총회 및 제52차 학술발표회에서 발표된 특강 내용임.

추출 및 용매분획

미숙 잠두종자 29.5kg을 MeOH을 사용하여 마쇄 추출하고, 여과지(Toyo No. 2)와 G_3 glass filter를 사용하여 추출여액을 얻었다. 여액은 40°C에서 감압농축하여 얻어진 MeOH이 제거된 수용액을 박등[22]의 방법으로 용매 분획하였다.

Silica gel 흡착 chromatography

시료의 약 10배량에 상당하는 silica gel(100~200mesh, column chromatography용, Merck사)을 $CHCH_3$로 slurry를 만들어 column을 만들고 시료를 소량의 $CHCl_3$로 녹여 흡착시킨후, $CHCl_3$-MeOH, $CHCl_3$-acetone 용매계로 MeOH과 acetone의 농도를 0%에서 20%까지 각각 단계적으로 증가시키면서 용출 분획하였다.

Sephadex LH-20 column chromatography

Sephadex LH-20(25~100μ, pharmacia사)을 70% EtOH로 하루밤 팽윤시킨 후 column에 충진하고 동용매계로 용출 분획하였다.

TLC

preparative-TLC: silica gel(10~40μ, H type, Sigma사)로 박층(20×20cm, 1mm두께)을 만들고, 110°C에서 1시간 건조시켜 활성화시킨 다음, 시료를 band상으로 흡착시키고, EtOAc-EtOH(22 : 3, V/V) 용매계로 15cm 전개시킨 다음, R_f치에 의해 10등분하여 용출하였다.

HPTLC : HPTLC(Merck사)를 사용하여 $CHCl_3$-EtOH(5 : 1, V/V) 용매계로 전개시킨후 70% H_2SO_4를 분무하여 가열시킨다음, UV로 검출하였다.

HPLC

시료를 여과(Millipore FH, 0.5μm, Water사)시킨다음, Porasil(Water사) Column에 의한 HPLC는 $CHCl_3$-isoPrOH(95 : 5, V/V)로 C_{18}(Water사) column에 의한 HPLC는 CH_3CN-H_2O(45 : 55, V/V), Aquasil(Senshu Pak) column에 의한 HPLC는 $CHCl_3$-H_2O(100 : 0.1, V/V) 혹은 $CHCl_3$-MeOH-H_2O(95 : 5 : 0.1, V/V) 용매계로 각각 용출 분획하였다.

GC/MS 및 GC/SIM

JEOL DX-303 기기를 사용하여, 이온화 EI(70 eV), 이온화실 온도 180°C, column은fused silica capillary(DB-1, 0.25mm×15m, 0.25μm film), column 온도는 150°C에서 2분간 유지한 뒤 32°C/min으로 290°C까지 승온, carrier gas(He, 1.1kg/cm^2, splitless mode)의 조건에서 분석하였다.

*bismethane boronate*의 유도체화는 *methane boronic acid* 2mg을 pyridine 1ml에 녹인 시약을 70°C에서 30분 처리[23]하여 행하였다.

4-Cl-IAA-Me의 분석은, Shimadzu QP1000 기기를 사용하여, 이온화 EI(70eV), 이온화실온도 250°C, *column*은 *silicone* OV-1 capillary(FS-WCOT, 0.3μm×25m), column 온도는 140°C에서 1분간 유지한뒤 4°C/min으로 260°C까지 승온, carrier gas(He, 1ml/min)의 조건에서 분석하였다 heptafluorobutyric 유도체화는 hepafafluorobutyric anhydride 100μl를 CH_3CN 1ml에 녹인 시약을 실온에서 30분 처리[24]하여 행하였다.

NMR

400MHz ^{1}H-NMR 기기를 사용하여, 내부표준물질로 TMS를 가하여 $CDCl_3$ 용매로 측정하였다.

생물검정법

선발된 벼의 lamina joint 조직을 이용하여 박등[25]의 방법으로 생물검정 하였다.

결과 및 고찰

용매분획

잠두 꼬투리 82.3kg에서 미숙 잠두종자 29.5kg을 수확할 수 있었으며, 이들을 MeOH로 추출하고, 용매분획하여 중성구(neutral benzene soluble fraction 37.86g, neutral chloroform soluble fraction 0.53g)로 38.39g과 산성구(acidic EtOAc soluble fraction)로 15.91g을 얻었다. 이들 분획을 생물검정한 결과, 중성분획에 BR의 활성이 인정되었다. 이것은천연의 BR가 중성분획에 존재한다는 일련의 보고[10,11,12,15,18,26]와 잘 일치하고 있다. 이 중성구에는 잠두종자의 지질성분과 색소성분이 다량 함유하고 있어 *n*-hexane과 80% MeOH로 분배하여 hexane구(16.69g)와 80% MeOH구(19.45g)를 얻었는데, 대부분의 활성은 80% MeOH구에 존재하였다.

Silica gel 흡착 chromatography

80% MeOH구를 $CHCl_3$-MeOH 용매계의 silica gel 흡착 chromatography에 의해 분획하고 각 분-

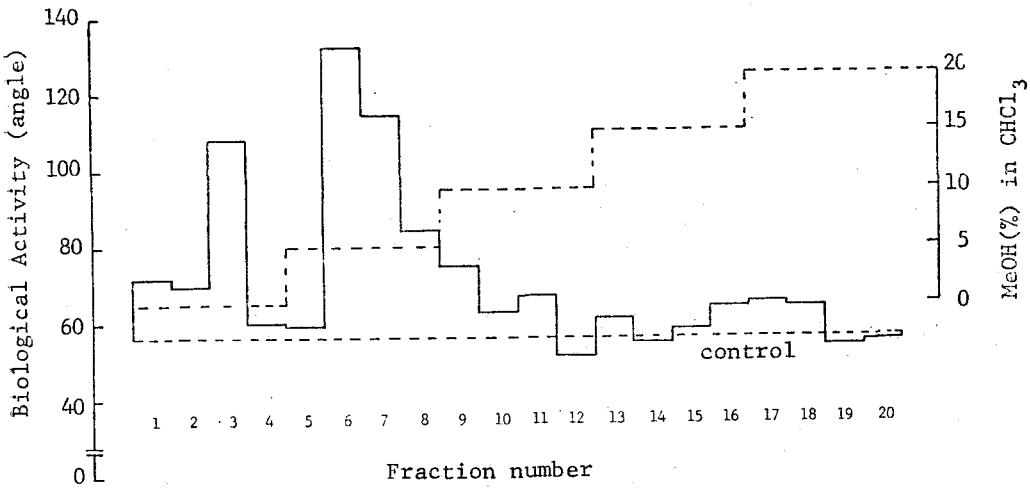

Fig. 1. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Tongjin-byeo after silica gel adsorption chromatography of the extract from *V. faba*

획의 활성을 생물검정법으로 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

생체중량 5g에 상당하는 추출물에 의해 100% $CHCl_3$ 용출구는 194%, 그리고 5~10% MeOH 용출구에 240%에 이르는 활성을 나타내, 극성이 낮은 것을 활성 I (0.49g), 높은것을 활성 II (6.07g)로 명명하였다.

이어서 비교적 다량인 활성 II를 $CHCl_3$-acetone 용매계로 용출분획하여 5~20% acetone 용출구(3.84g)을 얻었다. 이 과정에서 잠두가 생산하는 BR 활성을 재확인할 수 있었으며, 활성본체로 극성이 다른 적어도 2종의 BR 존재가 시사되었다.

Sephadex LH-20 Chromatography

앞 과정에서 부분정제된 활성구를 70% EtOH의 LH-20 chromatography로 용출 분획하고 활성을 측정한 결과중, 활성 II는 Fig. 2에 나타냈다.

활성 II는 Ve/Vt 0.675~0.80의 용출위치에 75g에 상당하는 추출물에 의해 435%에 이르는 활성을 나타냈다. 한편 Yokota등[15]은 dolicholide, dolichosterone, homodolichosterone, brassinolide, castasterone, 6-deoxydolichosterone 등의 BR는 동용매에 의한 LH-20 chromatography에서 Ve/Vt 0.65~0.80의 용출범위에서 용출됨을 보고하고 있는데, 이것은 본 실험의 결과와 잘 일치하고 있어 활성 II의 본체는 기지의 BR과 거의 같은 분자량을 갖는 활성물질임이 거듭 시사되고 있다. 또 활성구로 0.92g을 얻을 수 있어 LH-20 chromatography는 BR에 관한 정보뿐만 아니라 정제효과도 뛰어남을 알 수 있었다.

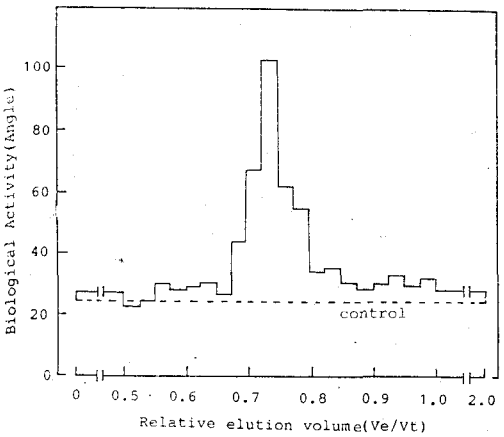

Fig. 2. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Kiho-byeo after Sephadex LH-20 column chromatography of the Fr. II.

한편 활성 I의 TLC활성구(316mg)를 동용매계의 LH-20 chronmatography로 분획하고 생물검정한 결과는 Fig. 3과 같다.

생체중량 200g에 상당하는 추출물에 의해 300%에 이르는 활성이 Ve/Vt 1.0~0.5의 용출위치에 나타나, 앞 과정의 활성을 재확인 할 수 있었으며 활성구로 18.4mg을 얻어 큰 정제효과를 얻었다. 그러나 활성 I의 용출위치는 활성 II의 용출위치와 달리 저분자영역에서 활성을 나타내, 활성 I의 본

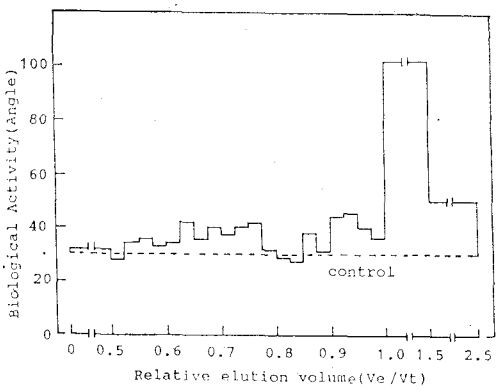

Fig. 3. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Sangpung-byeo after Sephadex LH-20 column chromatography of Fr. I.

체는 기지의 BR보다 작은 분자량을 갖는 새로운 활성물질의 가능성이 시사되었다.

Preparative TLC

LH-20 chromatography에 의해 얻어진 활성Ⅱ를 preparative TLC를 하였다. 활성Ⅱ는 R_f 0.3~0.6 그리고 R_f 0.6~0.9의 범위에 활성을 나타내, 두 종이상의 BR의 존재가 시사 되었으며 활성분획 (R_f 0.3~0.9)으로 282mg을 얻을 수 있었다.

한편, 활성Ⅰ은 생체중량 100g에 상당하는 추출물에 의한 생물검정의 결과, R_f 0.6~0.9의 범위에서 250%에 이르는 활성을 보여 활성Ⅰ의 활성을 재확인할 수 있었다.

***Normal phase*의 HPLC**

활성Ⅱ의 정제 추출물을 Porasil Column의 HPLC로 분획하여 생물검정한 결과, t_R18~27분의 분획(34mg)에 활성을 나타냈다. 이와같이 넓은 범위에 활성을 보여 정성적인 효과는 없었으나 대부분의 impurity가 t_R2~15분에 존재하여 상당한 정제효과를 얻을 수 있었다.

한편, 활성Ⅰ을 동 용매($CHCl_3$-*iso*PrOH, 95 : 5, V/V)로 2ml/min의 유속으로 용출분획하여 생물검정한 결과, t_R2~4분에 집중적인 활성을 나타냈으나 impurity와 중복되기에, 용매계의 극성을 줄이고($CHCl_3$-*iso*PrOH, 99 : 1, V/V) 유속을 줄여 (1.5ml/min) 용출분획하여 생체중량 300g에 상당하는 추출물로 생물검정한 결과, t_R 4~10분(5mg)에 활성이 나타나고 대부분의 impurity는 t_R 2~4분에 나타나 정제효과를 얻을 수 있었다. 또 이 과정에서 활성Ⅰ의 본체는 활성Ⅱ보다 극성이 훨씬 작은 물질임이 거듭 시사되었다.

Reverse phase의 HPLC

Normal phase의 HPLC에 의해 정제된 활성Ⅱ를 reverse phase인 C_{18} *column*에 의해 분획하고 생체중량 300g에 상당하는 추출물로 생물검정한 결과 Fig. 4와 같이 t_R 6~11분(6.1mg)에 220%에 이르는 대부분의 활성이 존재하였다.

정제된 활성 Ⅰ을 같은 조건의 C_{18} column에 의해 분획하고 생체중량 300g에 상당하는 추출물로 생물검정한 결과, Fig. 5와 같이 t_R 6~12분(3.5 mg)에 290%에 이르는 대부분의 활성이 존재 하였다.

Aquasil column의 HPLC

C_{18} column에 의해 정제된 활성Ⅱ를 $CHCl_3$-

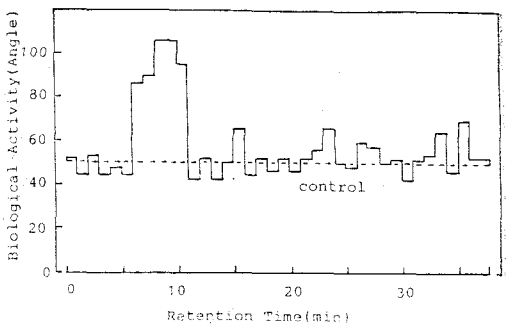

Fig. 4. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings of Sangpung-byeo after HPLC on an C_{18} column of Fr. II

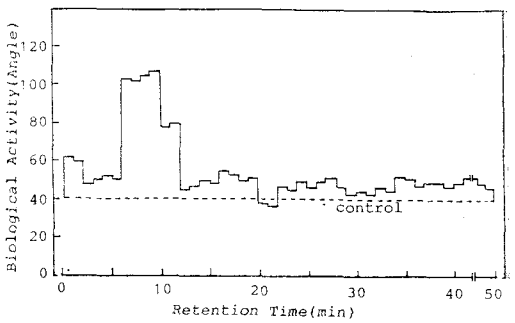

Fig. 5. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlins of Sangpung-byeo after HPLC on an C_{18} column of Fr. I

MeOH-H_2O의 용매계로 분획하여 생물검정한 결과, Fig. 6과 같이 t_R 17~18분과 t_R 25~26분의 분획에 또렷한 활성이 인정되었다. 그리고 이들 활성분획의 t_R으로 보아, main 활성의 본체는 castasterone, minor활성의 본체로 brassinolide의 가능성이 시사되었다.

한편, C_{18} column에 의해 정제된 활성 I을 $CHCl_3$-H_2O의 용매계로 분획하고 활성을 조사해 보니 Fig. 7과 같이 t_R 9~10분의 분획에 활성이 집중되었으며, 또 이 분획에서 활성본체를 crystal로 isolation하는데 성공하였다. 이 시점에서는 활성 I이 극성이 낮고 분자량이 작은 사실에서 새로운 구조의 BR의 가능성이 기대되었다.

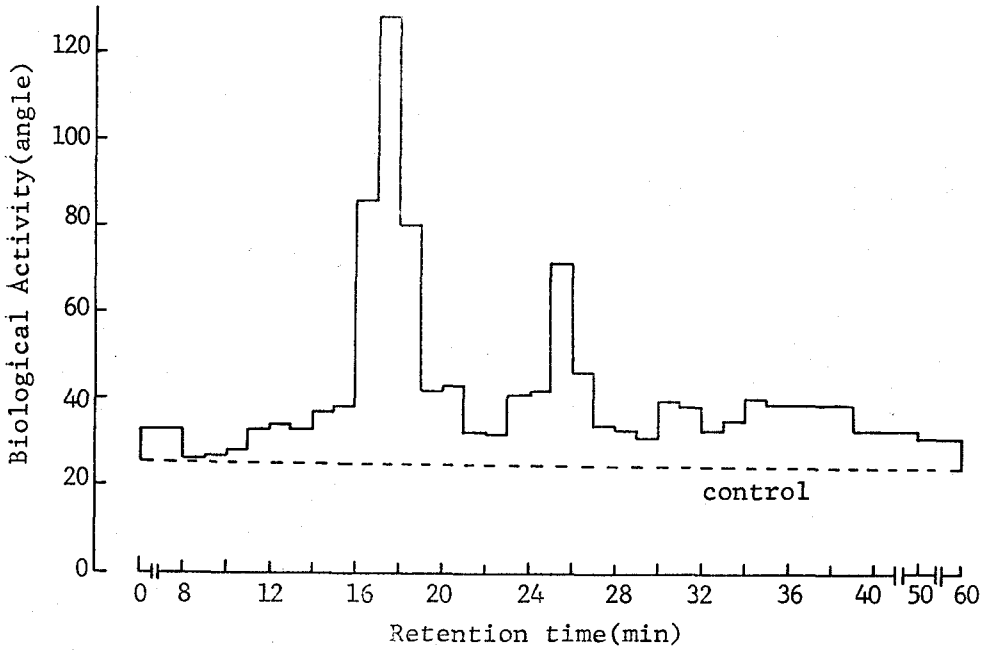

Fig. 6. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Koshihikari after HPLC on Aquasil column of the Fr. II

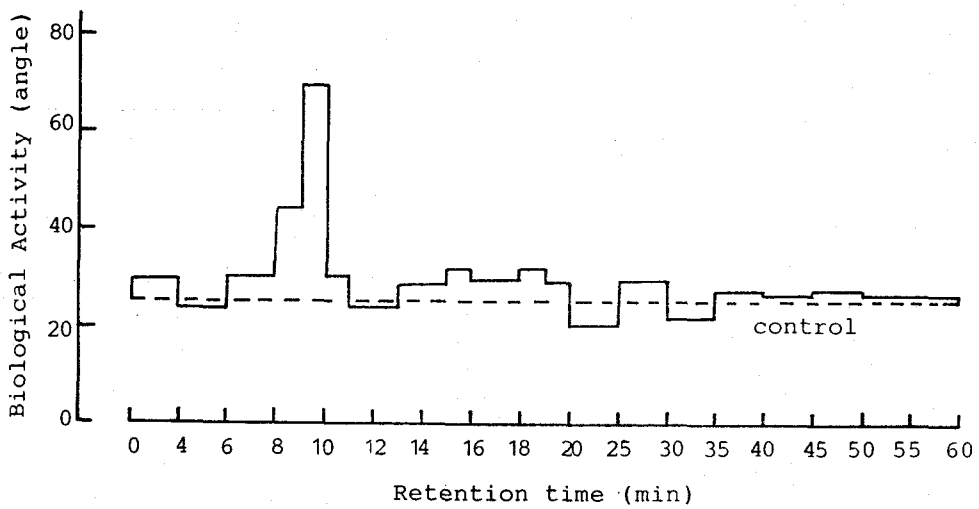

Fig. 7. Distribution of biological activity determined by the rice lamina inclination test with seedlings Koshihikari after HPLC on Aquasil column of Fr I

활성분획의 기기분석

활성 Ⅱ

Aquasil column에 의해 얻어진 활성분획과 BR의 authentic 시료를 함께 HPTLC를 사용하여 전개한 결과, main 활성(R_f 0.37)은 castasterone 그리고 minor 활성(R_f 0.29)은 brassinolide의 R_f값과 동일하여 aquasil column에 의한 HPLC의 결과와 일치하였다.

main 활성의 일부를 methaneboronate의 유도체를 만든다음 GC/MS분석을 하였더니 t_R 15.35분에 peak가 나타났으며, 얻어진 mass spectrum을 Fig. 8에 나타냈다.

castasterone의 methaneboronate의 molecular ion인 m/z 512 그리고 side chain 유래의 m/z 155가 base peak로 나타나 있으며, 기타 fragment ion 및 t_R은 castasterone의 그것들과 일치하여, main 활성의 본체를 castasterone으로 동정하였다.

한편, minor 활성의 일부도 methanboronate의 유도체로 만들고, brassinolide의 methaneboronate 유도체의 특징적인 fragment ion인 m/z 528(M^+), 374, 345, 177, 155을 선택하여 GC/SIM 분석을 하여 얻어진 chromatogram과 동일한 방법에 의해 얻어진 authentic brassinolide의 methaneboronate의 유도체의 chromatogram을 Fig. 9에 나타냈다. t_R 17.2분에 전 ion이 peak를 나타냈으며, 이들 ion의 강도비는 authentic brassinolide의 그것들과 일치하여 minor 활성의 본체를 brassinolide로 동정

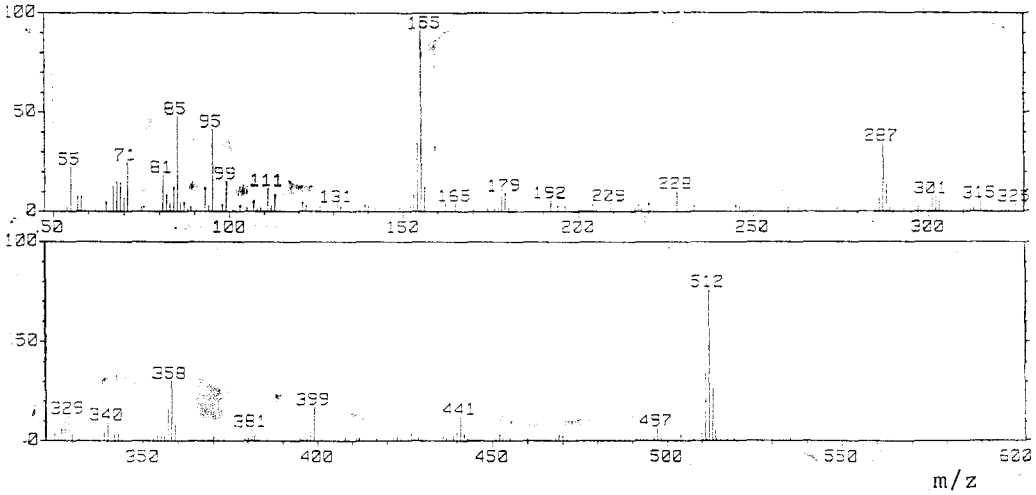

Fig. 8. Mass spectrum of bismethaneboroate of castasterone obtained from HPLC active fraction

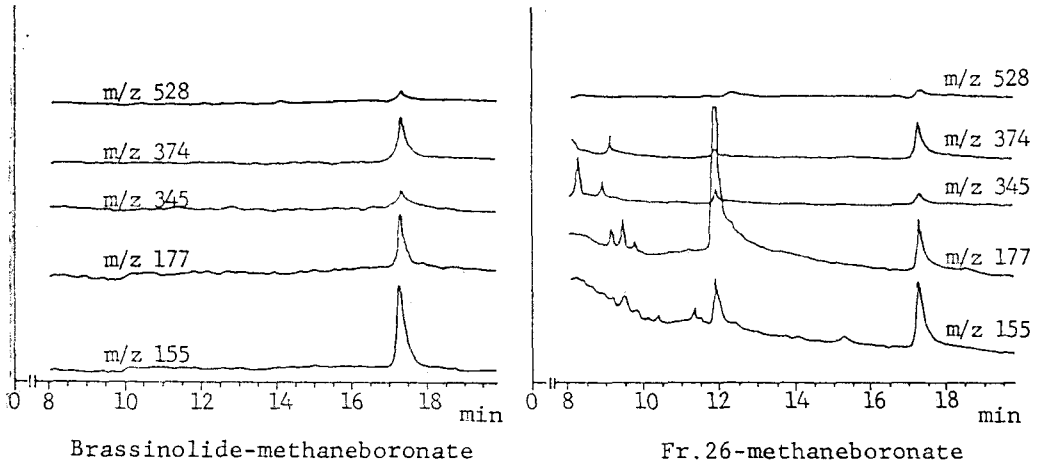

Fig. 9. GC/SIM profiles of methaneboronate derivatives of authentic brassinolide and HPLC active fractive fraction

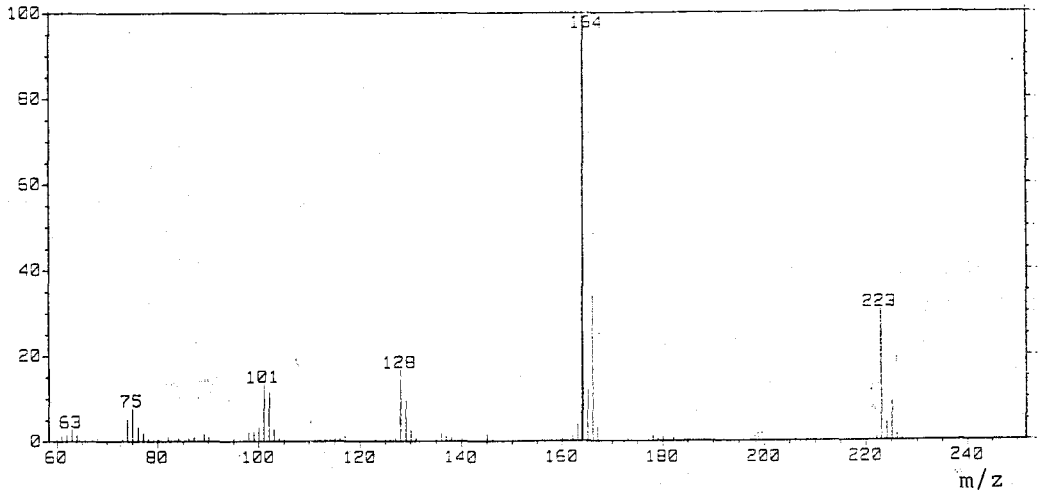

Fig. 10. Mass spectrum of methyl 4-chloroindole-3-acetate isolated from Fr. I

하였다. 따라서, 잠두의 미숙종자에서 활성 BR로 castasterone과 brassinolide가 동정되었다.

활성 I

crystal로 isolation된 활성 I을 EI mass 분석을 하여 얻어진 spectrum을 Fig. 10에 나타냈다.

molecula ion이 m/z 223에 그리고 m/z 164에 base peak가 나타나 있다. 또 이들 ion에는 m/z 223, 225, 그리고 m/z 164, 166과 같이 3 : 1의 강도를 나타내고 있어, chlorine atom의 특징적인 ^{35}Cl, ^{37}Cl의 3 : 1의 isotope ion의 존재비를 나타내, 이 분자에는 chlorine atom의 존재[27]를 나타내고 있으며, m/z 166, 164 ion은 chloro-indole moiety[28,29]의 존재를 나타내고 있어 이 물질은 indole acetic acid의 methyl ester에 chlorine atom이 포함된 것으로 생각되어 졌다. 그러나 indole ring의 어느 위치에 chlorine atom이 존재하는 가는 확인 할 수 없었다. 그래서 문헌상 유사한 mass spectra로 보고된[27,29] methyl 4-chloroindole-3-acetate(4-Cl-IAA-Me)와 활성 I을 capillary column을 장착한 GC/MS에 의해 비교분석을 시도한 결과, 두물질이 t_R(11.7분)과 mass spectra가 일치하였으며, 또 두 물질을 heptafluorobutyric 유도체로 만든 경우도 t_R(8.3분)과 mass spectra가 일치하였다.

400MHz의 ^{1}H-NMR에 의해 얻어진 활성 I의 spectra[δ3.73(3H, s, O-CH_3), 4.05(2H, s, allyl CH_2), 7.17(1H, d, J=2.5Hz, indole ring의 H-2), 7.07(2H, m), 7.26(1H, m)]와 4-Cl-IAA-Me의 spectra도 일치하였다.

따라서, 활성 I의 활성본체를 4-Cl-IAA-Me로 동정하였다.

한편, 4-Cl-IAA-Me은 *Pisum sativum*의 미숙종자에서 처음으로 발견[30,31] 된 바 있다.

그런데, 4-Cl-IAA-Me 이 벼의 limina joint 조직을 이용한 생물검정법에 의해 검출, 분리된 사실은 본 연구가 최초로 생각된다.

이상의 결과, 미숙잠두의 종자에서 벼의 limina inclination test의 양성물질로, castasterone과 brassinolide의 두 BR가 동정되었으며 그리고 4-Cl-IAA-Me가 분리되고 동정되었다.

초 록

벼의 lamina inclination test를 이용하여 미숙 잠두종자 추출물에 포함되어 있는 BR 활성물질을 검색하였다. silica gel chromatraphy에 의해 극성이 다른 두 활성구를 얻었다. 극성이 높은 활성구를 정제하여 GC/MS, GC/SIM 분석에 의해 활성본체를 castasterone과 brassinolide로 동정하였다. 또, 극성이 낮은 활성구에서 활성본체를 결정으로 분리하고 MS, NMR등의 분석에 의해 이 물질이 4-Cl-IAA-Me임을 밝혔다.

참 고 문 헌

1. Mitchell, J.W., Mandava, N., Worley, J.F., Plimmer, J.R. and Smith, M.V.: Nature, 225 : 1065(1970)
2. Grove, M.D., Spencer, G.F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J.F., Warthen, J.

D., Jr., Steffens, G.L., Flippen Anderson, J.L. and Cook, J.C., Jr.: Nature, 281 : 216 (1979)
3. Gregory, L.E.: Am. J. Bot., 68 : 586(1981)
4. Maugh, T.H.: Science, 212 : 33(1981)
5. Fujita, F.: Kagaku-to-seibutsu, 23 : 717(1985)
6. Takematsu, T. and Takeuchi, Y.: Chem. Regul Plants, 18 : 38(1983)
7. Thompson, M.J., Mandava, N.B., Meudt, W.J., Lusby, W.R. and Spaulding, D.W.: Steroids, 38 : 567(1981)
8. Abe, H., Morishita, T., Uchiyama, M., Kitsuwa, T., Takatsuto, S., Ikekawa, N., Ikeda, M., Sassa, T. and Marumo, S.: Experientia, 39 : 351(1983)
9. Ikekawa, N., Takatsuto, S., Kitsuwa, T., Saito, H., Morishita, T. and Abe, H.: J. Chromatogr, 290 : 289(1984)
10. Ikeda, M., Takatsuto, S., Sassa, T., Ikekawa, H. and Nukina,, M.: Agric. Biol. Chem., 47 : 655(1983)
11. Abe, H., Morishita, T., Uchiyama, M., Marumo, S., Munakawa, K., Takatsuto, S. and Ikekawa, N.: Agric. Biol. Chem., 46 : 2609 (1982)
12. Arima, M., Yokota, T. and Takahashi, N.: Phytochemistry, 23 : 1587(1984)
13. Katsumi, M.: Plant Cell Physiol., 26 : 615 (1985)
14. Morishita, T., Abe, H., Uchiyama, M., Marumo, S., Takatsuto, S. and Ikekawa, N.: Phytochemistry, 22 : 1051(1983)
15. Yokota, T., Baba, J., Koba, S. and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 48 : 2529(1984)
16. Yokota, T., Morita, M., and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 47 : 2149(1983)
17. Park, K.-H., Yokota, T., Sakurai, A. and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 51 : 3081 (1987)
18. Suzuki, Y., Yamaguchi, I. and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 49 : 49(1985)
19. Schneider, J.A., Yoshihara, K., Nakanishi, K. and Kato, N.: Tetrahedron Letters, 24 : 3589(1983)
20. Yokota, T., Arima' M., Takahashi, N., Takatsuto, S., Ikekawa, N. and Takematsu, T.: Agric. Biol. Chem., 47 : 2419(1983)
21. Yokota, T., Arima, M., Takahashi, N. and Crozier, A.: Phytochemistry, 24 : 1333(1985)
22. Park, K.-H. and Hyun, K.-H.: Korean J. Agric. Chem., 30 : 54(1987)
23. Takatsuto., S., Ying, B., Morisaki, M. and Ikekawa, N.: J. Chromatogr., 239 : 233(1982)
24. Pless, T., Böttger, M., Hedden, P. and Graebe, J.: Plant Physiol., 74 : 320(1984)
25. Park, K.-H., Hyun, K.-H. and Kim, D.-Y.: Korean J. Agric. Chem., 29 : 22(1986)
26. Yokota, T., Baba, J. and Takahashi, N.: Tetrahedron Letters, 23 : 4965(1982)
27. Engvild, K.C., Egsgarrd, H. and Larsen, E.: Physiol. Plant. 42 : 365(1978)
28. Jamieson, W.D. and Hutzinger, O.: Phytochemistry, 9 : 2029(1970)
29. Abe, H. and Marumo, S.: Agric. Biol. Chem., 38 : 1537(1974)
30. Gandar, J.-C. and Nitsch, C.: C.R. Acad. Sci. (Paris), Ser. D, 265 : 1795(1967)
31. Marumo, S., Abe, H., Hattori, H. and Munakata, K.: Agric. Biol. Chem., 32 : 117(1968)
32. Yokota, T., Kim, S.-K., Fukui, Y., Takahashi, N., Takeuchi, Y. and Takematsu, T.: Phyocthemistry, 26 : 503(1987)