

## GC-MS에 의한 옥수수 미숙종자의 Brassinosteroid 동정

박근형<sup>1\*</sup> · 김선재<sup>1</sup> · T. Yokota<sup>2</sup>

<sup>1</sup>전남대학교 농과대학 식품공학과, <sup>2</sup>Department of Bioscience, Teikyo University, Japan

**초록** : 옥수수미숙종자에 함유된 brassinosteroid활성물질을 탐색하고자 MeOH추출물에서 얻어진 brassinosteroid활성물질을 정제, 분획하여 GC-MS로 분석한 결과, castasterone, teasterone, 28-norcastasterone, 6-deoxocastasterone 등의 4종의 brassinosteroid가 옥수수종자로부터 최초로 동정되었다(1994년 1월 23일 접수, 1995년 2월 20일 수리).

### 서 론

식량과 유용자원을 공급하고 있는 식물의 생산력의 제고와 식물자원의 적극적인 이용을 위해서는 식물 및 식물자원에 존재하는 생물활성물질에 관한 연구가 대단히 중요하다. 생물활성물질 가운데 brassinosteroid는 이 물질이 갖고 있는 특이한 생물활성<sup>1-5)</sup>과 steroid의 구조<sup>6)</sup>를 갖고 있기에 이 물질에 관한 관심이 크다.

여기에 본 연구는 쌀, 밀 다음으로 중요한 세계적인 작물인 옥수수종자에 함유된 brassinosteroid활성물질의 탐색연구를 수행하여 전보에<sup>7)</sup> HPLC에 의해 2종의 brassinosteroid활성물질과 함께 미지의 brassinosteroid활성물질의 존재를 잠정적으로 보고한 바 있다. 본 연구에서는 옥수수미숙종자에 함유되어있는 brassinosteroid의 보다 신뢰성있는 동정과 미지 활성분체를 구명하고자 GC-MS 분석을 시도하여 4종의 brassinosteroid의 동정에 성공하였기에 보고한다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

전남대학교 봉황농장에서 재배된 옥수수(*Zea mays*, flint corn type)의 미숙종자 20 kg을 호숙기(암이삭길이 17~18 cm)인 8월 하순에 채취하여 공시하였다.

#### Brassinosteroid활성물질의 추출 및 정제

Brassinosteroid활성물질의 추출과 용매분획 그리고 silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, charcoal adsorption chromatography, Bondesil chromatography, preparative-TLC, HPLC 등의 chromatography에 의한 정제와 Rice Inclination Test의 생물검정법은 전보<sup>7)</sup>와 동일하게 수행하였다.

#### GC-MS에 의한 brassinosteroid 동정

GC-MS 분석은 Park 등의 방법<sup>8)</sup>으로 정제한 시료를

methaneboronic acid로 70°C에서 30분 처리하여 bismethaneboronation (BMB) 유도체로 하거나 BMB유도체를 다시 실온에서 N,O-Bis-trimethylsilyl-acetamide 처리하여 bismethaneboronation-trimethylsilylation(BMB-TMS)의 유도체화한 후 JEOL JMS-AX 505 기기를 사용하여 GC-MS 분석 [EI (70 eV); source temperature 250°C; column, fused silica capillary, DB-1(0.25 mm×15 m, 0.25 µm film thickness); injection temp. 240°C, column temp. 170°C, sampling time 1.5 min, 280°C까지 37°C/min 속도로 상승, 280°C에서 300°C까지는 1.5°C/min속도로 상승; carrier gas He, 1 ml/min; splitless injection]하였다.

### 결과 및 고찰

옥수수의 미숙종자 20 kg을 MeOH로 추출하여 얻어진 추출물을 Rice Inclination Test 생물검정법을 지표로 용매분획, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 column chromatography, charcoal adsorption chromatography, Bondesil chromatography, preparative-TLC, HPLC 등으로 brassinosteroid활성물질을 정제, 분획한 과정을 Fig. 1에 나타냈다. Brassinosteroid활성물질은 활성 I과 II로 분리되었으며 정제된 활성 I과 II는 HPLC에 의해 활성 I은 retention time( $t_R$ ) 14~16분,  $t_R$  19~21분,  $t_R$  24~26분,  $t_R$  27~30분의 분획에 그리고 활성 II는  $t_R$  45~47분의 분획에 활성을 나타냈다.

활성 I의  $t_R$  19~21분의 활성분획은 BMB 유도체화하여 GC-MS에 의해 brassinosteroid-BMB 유도체의 특징적인 fragment ion인 m/z 540, 528, 526, 524, 512, 510, 498, 169, 167, 155, 153, 141을 선택하여 mass chromatography를 시도한 결과, 10분 56초에 28-norcastasterone (brassinone)의 특징적인 fragment ion<sup>9)</sup>인 m/z 498( $M^+$ )와 m/z 141의 peak가 관찰되어 mass spectrum을 측정하자 full mass spectrum (Fig. 2) 또한 authentic 28-norcastasterone-BMB의 mass spectrum과 일치할 뿐만 아니라 GC의  $t_R$ (10분 56초) 또한 일치하여 활성 I의 ODS-HPLC

찾는말 : brassinosteroids, *Zea mays*, immature seeds, GC-MS

\*연락처

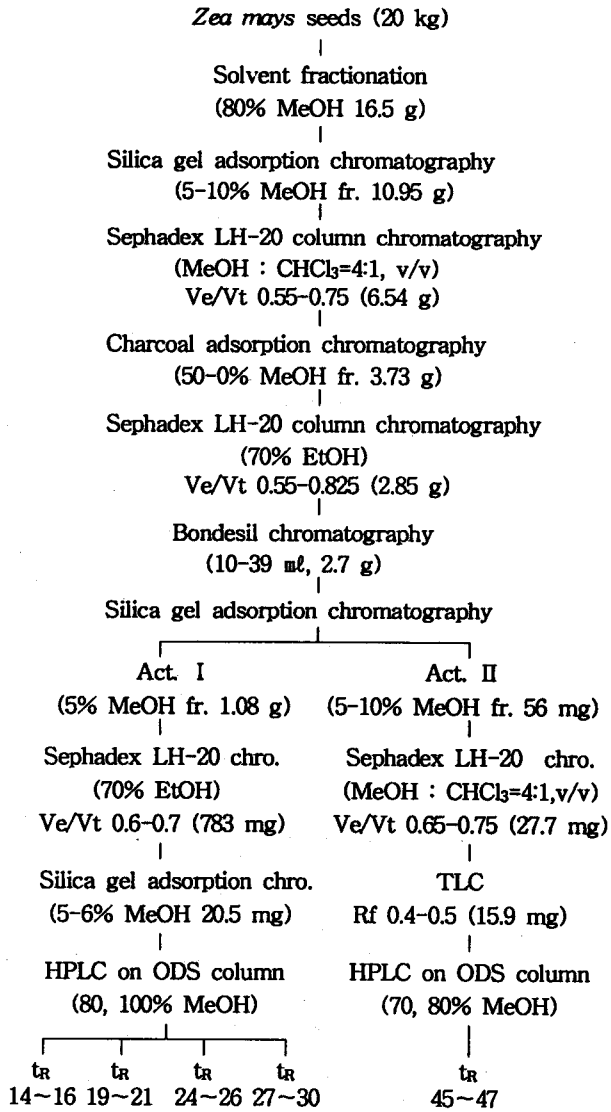


Fig. 1. Purification and fractionation process of brassinosteroids from immature seeds of *Zea mays*.

t<sub>R</sub> 19~21분의 활성분체로 28-norcastasterone이 동정되었다.

활성 I의 t<sub>R</sub> 24~26분의 활성분획을 BMB 유도체화하여 mass chromatography를 시도하였으나 brassinosteroid-like peak가 관찰되지 않아 BMB-TMS 유도체화하여 brassinosteroid-BMB-TMS 유도체의 특징적인 fragment ion인 m/z 558, 556, 544, 542, 530, 528, 516, 514를 선택하여 분석한 결과, t<sub>R</sub> 12분 30초에 teasterone-BMB-TMS의 fragment ion (m/z 544, 530, 516)<sup>10)</sup>이 관찰되어 mass spectrum을 측정하자 full spectrum (Fig. 3)은 authentic teasterone-BMB-TMS의 spectrum과 일치할 뿐만 아니라 GC의 t<sub>R</sub>(12분 30초)이 완전 일치하여 활성 I의 ODS-HPLC t<sub>R</sub> 24~26분의 활성분체로 teasterone이 동정되었다.

또, HPLC t<sub>R</sub> 24~26분의 활성분획은 GC의 t<sub>R</sub> 15분 35초에 m/z 558, 543, 529의 fragment ion이 mass chromatography에 인정되어, mass spectrum을 측정한 결과 (Fig. 4), authentic 28-methyl-teasterone-BMB-TMS의 mass spectrum (Fig. 5)과 거의 동일하나 GC의 t<sub>R</sub>이 28-methyl-teasterone의 경우 13분 30초이나 ODS-HPLC t<sub>R</sub> 24~26분의 활성분획에서 얻어진 이 물질은 15분 35초로 차이를 보이고 있다. 그러나, chromatography 상의 양상 및 mass spectra의 유사성 등을 고려할 때, 이 물질은 28-methyl-teasterone과 구조가 아주 유사한 새로운 brassinosteroid 존재 가능성이 시사되었다.

활성 I의 t<sub>R</sub> 27~30분의 활성분획을 BMB 유도체화하여 전술한 brassinosteroid-BMB 유도체의 특징적인 fragment ion을 선택하여 mass chromatography를 시도한 결과, t<sub>R</sub> 9분 43초에 6-deoxocastasterone-BMB의 특징적인 fragment ion인 m/z 498(M<sup>+</sup>) 155의 peak가 관찰되어 mass spectrum을 측정한 결과(Fig. 6), authentic 6-deoxocastasterone-BMB의 mass spectrum과 일치할 뿐만 아니라 GC의 t<sub>R</sub>(9분 43초)이 완전 일치하여 활성 I의

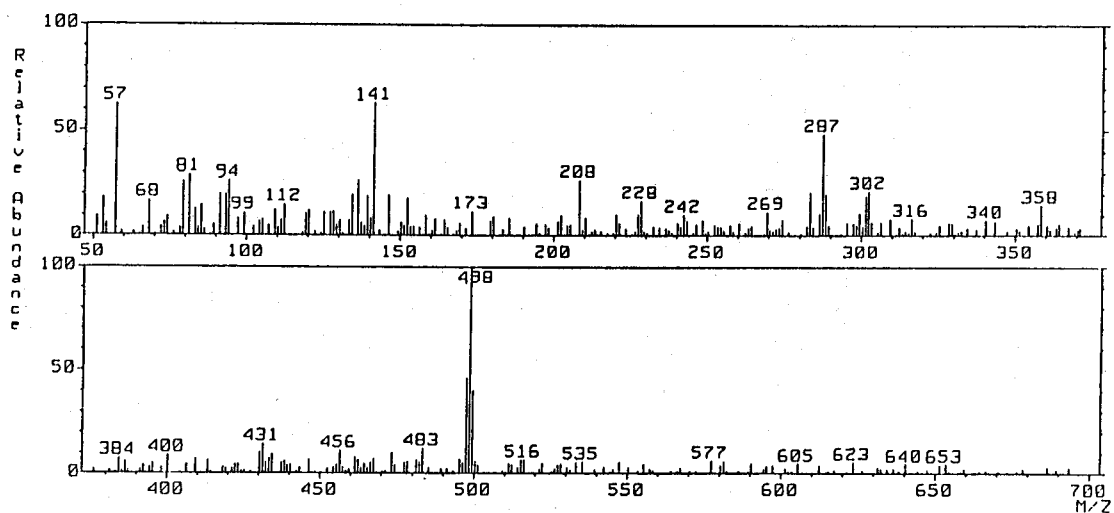


Fig. 2. Mass spectrum of bismethaneboronated HPLC active fr. (t<sub>R</sub> 19~21 min) obtained by GC-MS from immature seeds of *Zea mays*.

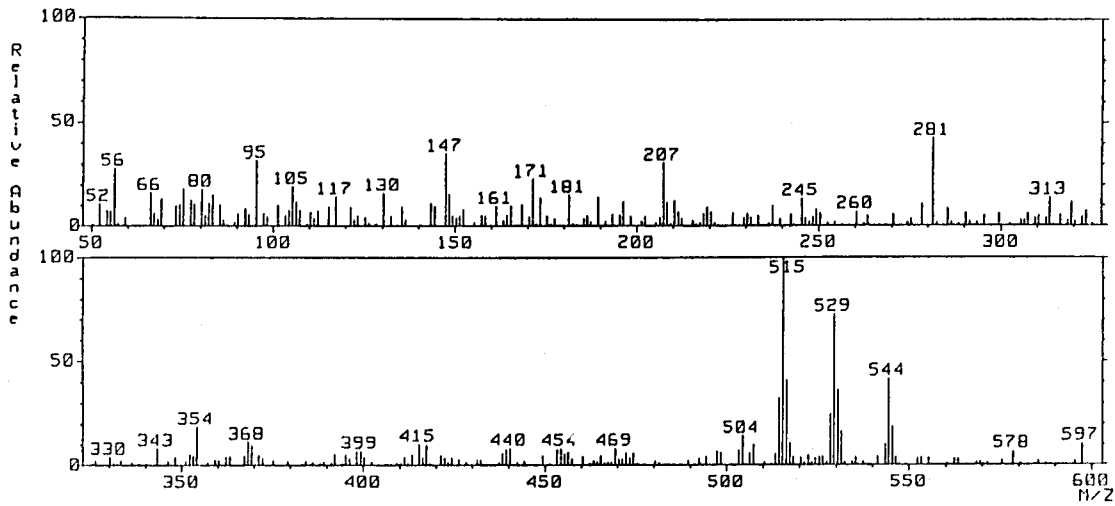


Fig. 3. Mass spectrum of bismethaneboronation-trimethylsilylated HPLC active fr. ( $t_R$  24~26 min, GC  $t_R$  12.5 min) obtained by GC-MS from immature seeds of *Zea mays*.

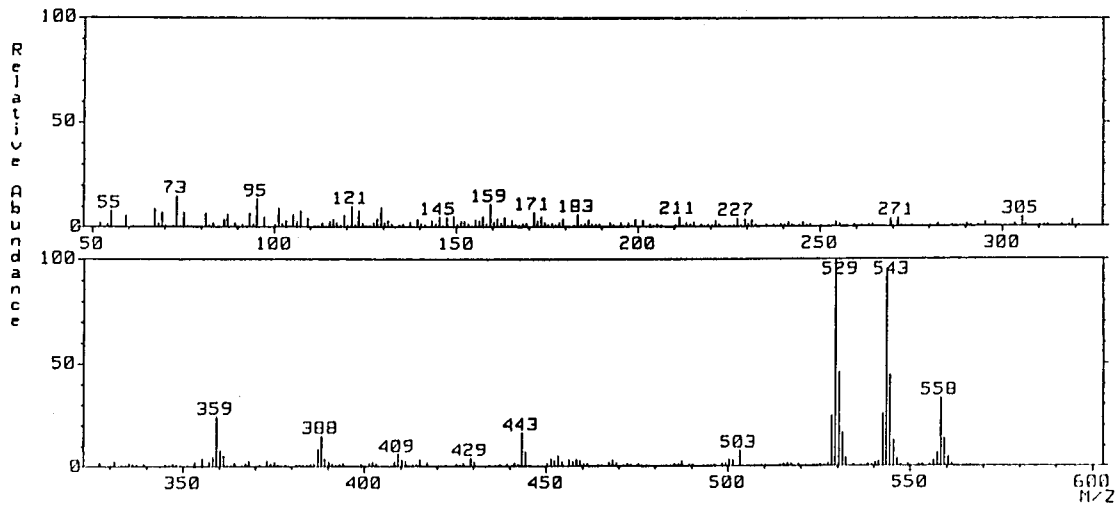


Fig. 4. Mass spectrum of bismethaneboronation-trimethylsilylated HPLC active fr. ( $t_R$  24~26 min, GC  $t_R$  15.58 min) obtained by GC-MS from immature seeds of *Zea mays*.

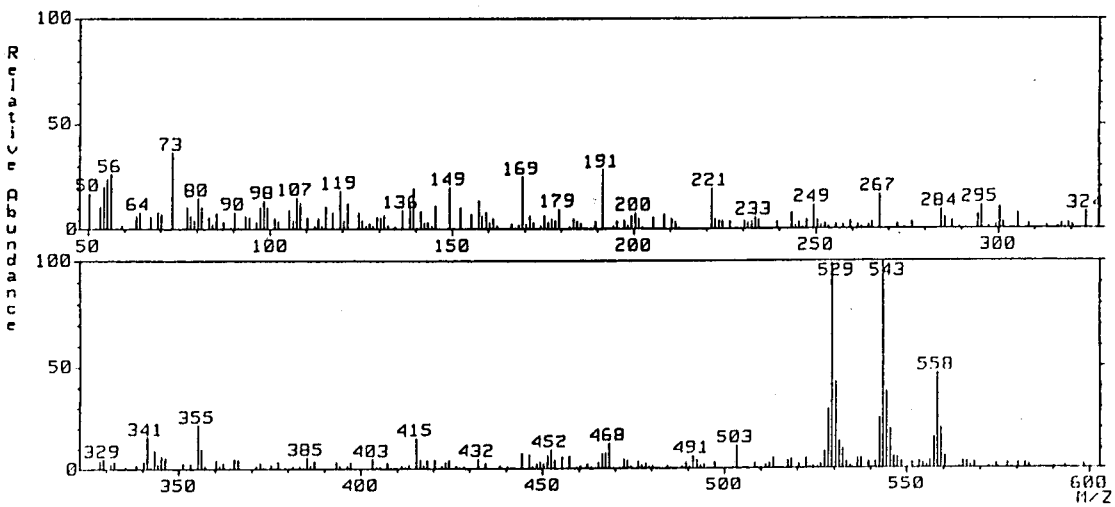


Fig. 5. Mass spectrum of bismethaneboronation-trimethylsilylated 28-methyl-teasterone.

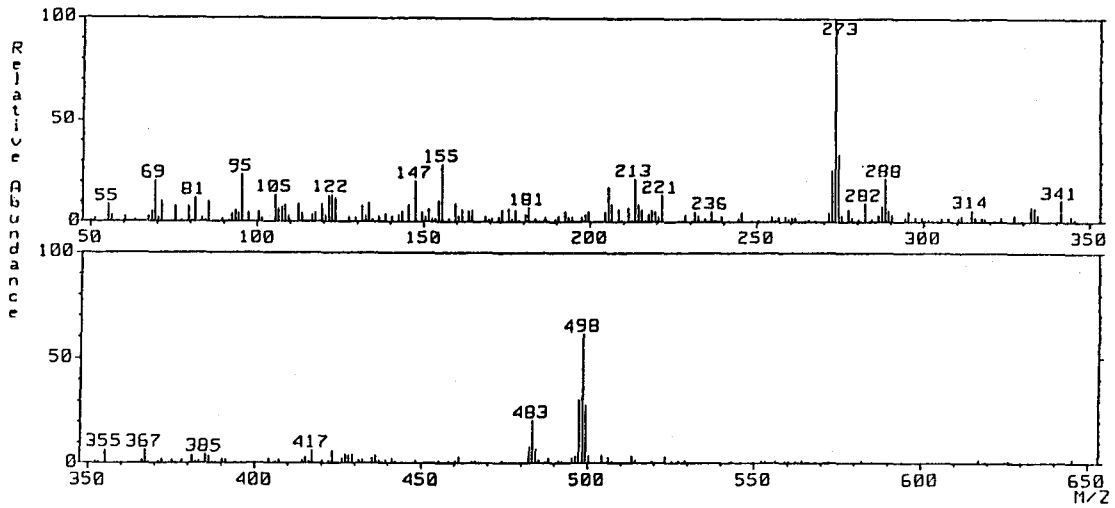


Fig. 6. Mass spectrum of bismethaneboronated HPLC active fr. ( $t_R$  27~30 min) obtained by GC-MS from immature seeds of *Zea mays*.

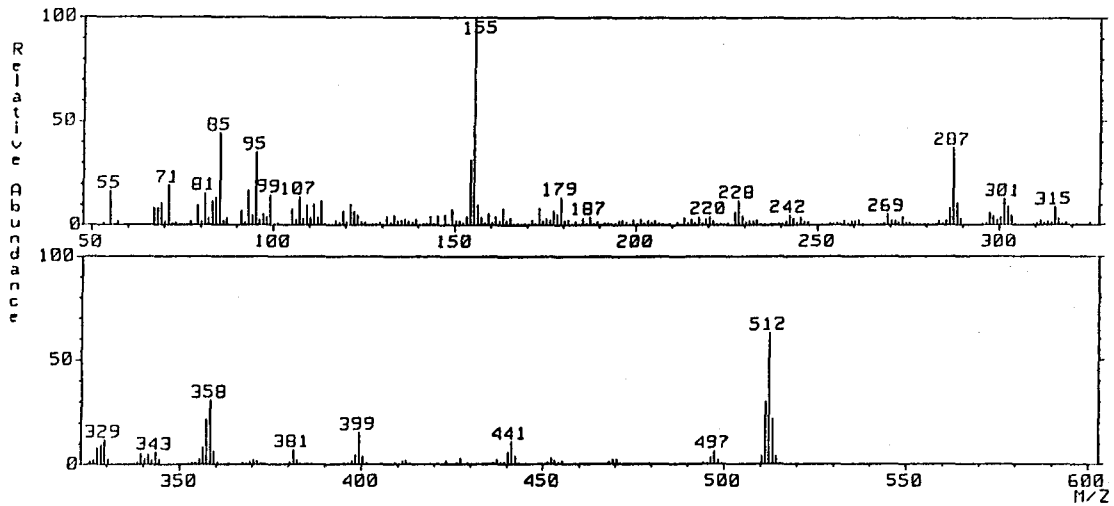


Fig. 7. Mass spectrum of bismethaneboronated HPLC active fr. ( $t_R$  45~47 min) obtained by GC-MS from immature seeds of *Zea mays*.

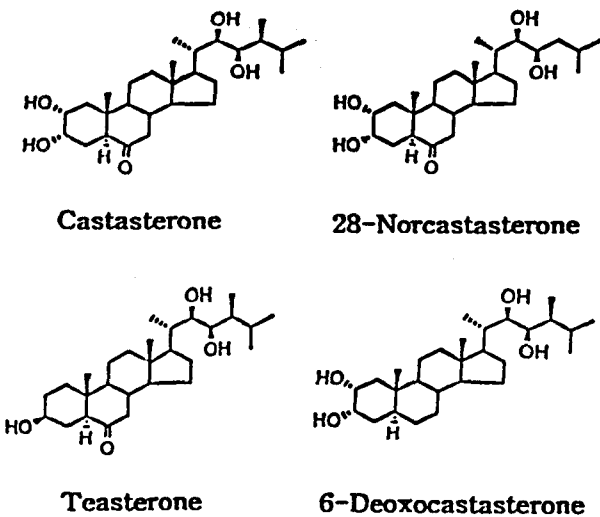


Fig. 8. Identified brassinosteroids from immature seeds of *Zea mays*.

ODS-HPLC  $t_R$  27~30분 활성분획의 활성분체로 6-deoxocastasterone이 동정되었다.

활성 I의  $t_R$  14~16분획의 활성은 HPLC의 용출위치로 보아 castasterone의 존재가 기대되었으나 GC-MS 분석으로는 brassinosteroid 관련 fragment ion이 인정되지 않았다.

활성 II의 활성분획인 HPLC분획( $t_R$  45~47분)의 일부를 BMB 유도체화하여 brassinosteroid-BMB 유도체의 특징적인 fragment ion인  $m/z$  540, 528, 526, 512, 510, 498, 169, 167, 155, 153, 141을 선택하여 mass chromatography를 시도한 결과, castasterone의 특징적인 fragment ion인  $m/z$  512( $M^+$ ), 155 ion이  $t_R$  11분 59초에 관찰되어 mass spectrum을 측정된 결과(Fig. 7), authentic castasterone-BMB의 spectrum과 일치할 뿐만 아니라 GC의  $t_R$ (11분 59초)이 완전 일치하여 활성 II의 ODS-HPLC  $t_R$  45~47 분획의 활성분체로 castasterone이 동정되었다.

따라서 GC-MS 분석에 의해 전보<sup>7)</sup>에서 잠정적으로

동정된 castasterone과 teasterone의 존재를 명확히 확인할 수 있었으며 이들 두종의 brassinosteroid 외에 28-norcastasterone과 6-deoxocastasterone을 추가 동정할 수 있었다. 한편, Suzuki 등<sup>11)</sup>은 옥수수의 화분에 castasterone, teasterone, typhasterol의 존재를 보고한 바 있었는데 본 연구의 결과로 옥수수종자에는 보다 다양한 brassinosteroid가 존재함을 알게 되었다.

이상의 결과, 옥수수미숙종자에 포함되어 있는 brassinosteroid활성물질(Fig. 8)로 castasterone, 28-norcastasterone, teasterone 그리고 6-deoxocastasterone이 동정되었으며, 28-methyl-teasterone과 유사한 새로운 brassinosteroid 존재 가능성이 시사되었다. 옥수수미숙종자의 brassinosteroid함량은 brassinolide로 환산하여 생체중량 g당 3~8 ng정도이었으며 대부분 castasterone 형태로 존재하였다.

### 감사의 글

이 연구는 과학재단과 농업생물신소재연구센터의 연구비 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부이며 이에 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- Gregory, L. E. (1981) Acceleration of plant growth through seed treatment with brassins. *Am. J. Bot.* **68**, 586-589.
- Maugh, T. H. (1981) New chemicals promise larger crops. *Science*. **212**, 33-34.
- Takematsu, T. and Y. Takeuchi (1983) Bioassay method and physiology of brassinolides. *Chem. Regul. Plants.* **18**, 38-54.
- Fujita, F. (1985) Brassinolide의 農業利用への期待, *Kagaku-to-seibutsu*, **23**, 717-725.
- Kakiuchi, T., Y. Kamuro, S. Takatsuto and K. Kobayashi (1988) A new brassinolide analog and its practical efficacy under field-cultivation conditions. *Agric. Biol. Chem.* **52**, 2381-2382.
- Grove, M. D., G. F. Spencer, W. K. Rohwedder, N. Mandava, J. F. Worley, J. D. Warthen, G. L. Steffens, J. L. Flippen Anderson and J. C. Cook (1979) Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature*. **23**, 216-217.
- Park, K. H., S. J. Kim and K. H. Hyun (1993) Brassinosteroid substances in immature *Zea mays* seeds. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **8**, 300-305.
- Park, K. H., T. Yokota, A. Sakurai and N. Takahashi (1987) Occurrence of castasterone, brassinolide and methyl 4-chloroindole-3-acetate in immature *Vicia faba* seeds. *Agric. Biol. Chem.* **51**, 3081-3086.
- Suzuki, Y., I. Yamaguchi and N. Takahashi (1985) Identification of castasterone and brassinone from immature seeds of *Pharbitis purpurea*, *Agric. Biol. Chem.* **49**, 49-54.
- Abe, H., T. Morishita, M. Uchiyama, S. Takatsuto and N. Ikekawa (1984) A new brassinolide-related steroid in the leaves of *Thea sinensis*, *Agric. Biol. Chem.* **48**, 2171-2172.
- Suzuki, Y., I. Yamaguchi, T. Yokota and N. Takahashi (1986) Identification of castasterone, typhasterol and teasterone from the pollen of *Zea mays*, *Agric. Biol. Chem.* **50**, 3133-3138.

#### Identification of Brassinosteroids in Immature seeds of *Zea mays* by GC-MS analysis

Keun-Hyung Park<sup>1\*</sup>, Seon-Jae Kim<sup>2</sup> and T. Yokota<sup>2</sup>(<sup>1</sup>Department of Food Science & Technology, College of Agriculture, Chonnam National University Kwang-ju 500-757, Korea, and <sup>2</sup>Department of Bioscience, Teikyo University, Utsunomiya 320, Japan.)

**Abstract**: The brassinosteroid-like active principles from immature seeds of *Zea mays* were purified and identified as castasterone, teasterone, 28-norcastasterone and 6-deoxocastasterone by GC-MS analysis. Our work is probably the first report that showed the presence of brassinosteroids in *Zea mays* seeds.

\*Corresponding author