

## HPLC 형광분석법을 통한 벼에서 Brassinolide의 검정

심재한\* · 김인선 · 이강봉 · 서용택 · E.D. Morgan<sup>1</sup>

전남대학교 농화학과, <sup>1</sup>Keele University, Staffordshire, England

**초록 :** 벼의 생육 단계별 brassinolide의 검정을 위하여 HPLC 형광분석법을 개발하였다. 형광분석에 민감한 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid를 *o*-phthalaldehyde와 *m*-phenylboronic acid 및 KCN과 반응시켜 합성하여 brassinolide의 1, 2-diol과 유도체화 시켰다. Brassinolide 1 µg에 대한 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid의 brassinolide boronate의 형성정도는 20 µg에서 90% 이상의 유도체화를 보였고 형광검출법에 의한 brassinolide의 검출한계는 0.16 ng이었다. 벼의 생육단계별 brassinolide는 분얼기 및 신장기에서는 검출이 되지 않았으며 유수형성기에는 0.8 µg(생체 10 g)이 그리고 출수개화기에는 0.2 µg(생체 100 g)이 검출되었다(1995년 3월 28일 접수, 1996년 1월 3일 수리).

### 서 론

인류는 식량을 대부분 식물체에서 얻고 있다. 식물체는 또한 다른 동물의 필수적인 식량자원이 되기도 한다. 병해충 방제를 통해 식물체의 생산력을 증대시키려는 많은 노력들은 식물체가 식량자원으로서 매우 중요함을 시사하고 있다. 하지만 궁극적으로 생산력 증대를 목적으로 사용되는 각종 화학합성 물질들은 환경에 지속적으로 잔류되는 경우도 있어 환경오염 및 독성적 측면에서 많은 부수적인 문제점을 야기시킬 수 있다.

이러한 이유로 인해 저독성 및 천연물에서 유래된 약제의 개발을 위한 많은 노력들이 진행되고 있지만 많은 시간과 엄청난 비용이 수반되어 실질적인 면에서 확대되지 못하고 있는 실정이다. 그러므로 무엇보다도 식물의 생산력을 증대시키기 위해서는 식물체 자신이 만들어서 그의 생리적인 현상을 스스로 조절하는 식물 자체의 생리활성 물질에 대한 탐색 및 연구가 매우 중요하다고 할 수 있다. 식물의 생리활성 물질들은 식물의 개화, 결실, 발아, 성장 그리고 숙성 등의 여러면에서 생리적인 대사과정을 조절함으로써 식물의 생산력에 관여하고 있다.

Brassinolide는 일반적으로 세포분열이나 세포신장을 통해 식물의 성장을 촉진시키는 steroid성 호르몬으로서 유채의 화분에서 유래되었다.<sup>1)</sup> 또 brassinolide는 식물체에서 auxin 형태의 식물생장 촉진효과를 가지며 이는 벼의 lamina joint에 대한 생체분석을 통해 입증되어 왔다.<sup>2)</sup> Brassinolide는 특히 벼의 성장에 있어서 성장 촉진 호르몬으로서 매우 중요한 역할을 하므로 농업에 있어서 식량생산 증대를 위한 생리활성 물질의 탐색에 있어서 매우 다양한 연구가 필요하다고 할 수 있다.

Brassinolide를 탐색하기 위한 방법으로 생체분석이 많이 이용되어 왔으나 이 방법은 brassinolide의 호르몬

적 특성으로 인해 실험에 사용되는 생체량의 증가에 따라 lamina joint의 골곡현상이 역효과가 나타나거나 한계가 있어 brassinolide에 대한 정량적 분석이 어렵다. 한편으로 GLC(gas liquid chromatograph)나 GC/MC와 HPLC/UV<sup>3)</sup> 그리고 ELISA 및 RIA 등<sup>4)</sup>의 방법이 이용되고 있는데 GC분석법은 brassinolide의 수산화기를 methyl화 해야 하기 때문에 분석법 과정상 매우 복잡하고 시간이 많이 소요되어 간편하고 손쉬운 방법이 못된다. 또 HPLC/UV방법도 brassinolide에 대한 감도가 낮아 식물에서 매우 낮은 미량으로 존재할 수 있는 이 호르몬을 검출하는데 있어서 효과적인 방법이 되지 못하고 있다. 뿐만 아니라 RIA나 ELISA에 의한 방법도 감도 면에서는 뛰어나지만 시간과 비용이 많이 소요되고 고도의 숙련된 기술이 요구되어 분석법의 응용 및 확대 그리고 보급에 있어서 쉽게 접근 하기가 어렵다.

이에 본 실험에서는 brassinolide의 검색을 위해 형광성이 매우 뛰어난 화합물을 일반적인 시약들을 통해 합성하여 brassinolide의 diol부분과 반응시킴으로써 감도가 매우 뛰어나고 간편한 HPLC/형광 분석법을 개발하고자 한다. 또한 이 분석법을 실제로 우리나라에서 많이 재배되고 있는 벼에 응용하여 벼의 생육단계별로 brassinolide의 수준을 조사함으로써 식물생리활성 물질 탐색에 도움을 주고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 시약

Brassinolide 표준품은 Ikekawa<sup>5)</sup>로부터 제공받아 사용하였으며 *m*-aminophenylboronic acid 그리고 *o*-phthalaldehyde 및 KCN 등은 Sigma(St Louis, USA) 제품을 사용하였고 유기용매는 HPLC용(Fisher Sci. Co., USA)을 그리고 그 밖의 일반적인 시약은 Junsei(Japan)제품을 사용하였다.

찾는말 : Brassinolide, 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid HPLC/Fluorescence

\*연락처

## 기기

사용기기로는 IR(Nicolet FT-IR 520-P, USA), NMR(Bruker AM 200 MHz FT-NMR spectrometer, USA), GC/MS(Varian Saturn 3 GC/MS, USA) 및 HPLC(Waters 510, USA) 등이었다.

## 방법

### (1) 1-Cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid의 합성

1-Cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid의 합성은 *o*-phthalaldehyde(2 mmol, 268 mg)를 10 ml의 methanol에 잘 녹인 다음 5 ml의 증류수에 녹인 *m*-aminophenylboronic acid(2 mmol, 310 mg)와 KCN(2 mmol, 130 mg)을 가하여 40°C에서 2 시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 반응산물을 10 ml의 chloroform으로 3회 분배 추출한 다음 유기용매층은 무수황산나트륨 상에서 탈수시킨 후 완전히 감압농축 시켰다. 농축물은 5 ml의 1%(v/v) methanol/chloroform 용매로 재용해한 다음 silica gel column(2 mm i.d.×50 cm lengths)를 이용하여 1%(v/v) methanol/chloroform 70 ml를 흘려 보내 이를 제거하고 다시 120 ml의 동 용매를 흘려 보내 이를 100 ml용 농축 플라스크에 받아서 실시하였다. 정제된 용출물은 건조 후 각각 IR, GC/MS, NMR 및 CHN elemental corder로 분석하여 그 구조를 확인한 다음 실험에 사용하였다. GC/MS 분석시 분석용 column은 DB-5 capillary column(0.25 μm thickness, 0.253 mm i.d.×30 m lengths)였으며 이동상은 질소개스로 그의 유속은 3 ml/min이었다. 또한 분석 column의 온도는 150°C에서 250°C까지 분당 10°C씩 승온하였고 GC/MS의 이온화 방법은 EI(electron impact)였다.

### (2) Brassinolide boronate 유도체화

유도체화는 Fig. 1과 같이 일정량의 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid를 함유한 0.1%(v/v) pyridine/acetone

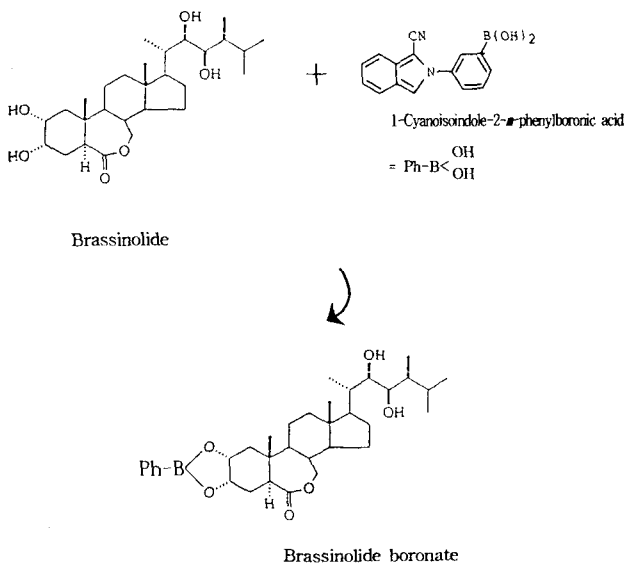


Fig. 1. The experimental scheme for derivatization of brassinolide boronate.

용액 100 μl를 1 ml용 cap tube에 넣고 acetonitrile에 녹인 brassinolide를 최종농도가 1 μg이 되게 가한 다음 parafilm으로 밀봉한 후 70°C에서 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 50°C에서 pyridine만 남을 때까지 질소로 농축시킨 다음 50 μl의 acetonitrile로 재 용해하여 이 용액 10 μl를 HPLC에 주입하여 분석을 행하였다. 분석기기는 HPLC(high performance liquid chromatograph, Waters 510, USA)로서 분석 column은 RP μ-Bondapak C-18 stainless column(3.9 mm i.d.×30 mm lengths), 검출기는 형광 검출기(Waters 420, emission filter 400 nm, excitation filter 330 nm, USA)이었으며 이동상은 64% CH<sub>3</sub>CN이 함유된 1% acetic acid 수용액이었다.

### (3) 벼의 생육단계별 brassinolide의 검정

벼의 생육단계별 brassinolide의 검정 및 분석은 우리나라에서 주로 재배되고 있는 동진벼를 재배하여 분얼기, 신장기, 유수형성기 및 출수개화기에 벼의 줄기부분만을 각각 10 kg씩 채취한 후 1~2 cm 길이의 크기로 절단한 다음 생체 1 kg씩을 2 l의 85% methanol 수용액에 24시간 침지시켜 다음과 같이 추출하였다. 추출물을 Büchner 깔때기 상에서 감압 여과한 후 여과된 찌꺼기는 다시 동 용액을 가해 색깔이 더 이상 추출되지 않을 때까지 반복 침지시켜 여과한 다음 앞서의 여액과 합하여 45°C에서 수용성 잔류물이 남을 때까지 감압 농축시켰다. 농축 후 수용성 잔류물에 증류수를 가해 최종 부피를 1 l로 맞춘 다음 3 l용 분액여두에 옮겨 1 l의 chloroform으로 색소가 더 이상 추출되지 않을 때까지 분배 추출하였다. 분배된 chloroform층은 무수황산나트륨으로 탈수시킨 후 10 ml까지 감압 농축시켰다. 농축물은 다시 실온에서 질소개스로 건조시켜 80% methanol 수용액으로 재 용해한 다음 생체중량 100~200 g이 되게 3 l용 분액여두에 취해 1 l의 80% methanol 수용액을 가하고 hexane 500 ml로 2회 분배추출하였다. 분배액중 hexane 층은 제거하고 80% methanol 수용액 층에 1 l의 5% NaHCO<sub>3</sub> 수용액을 가해 다시 ethyl acetate 500 ml로 2회 분배 추출하였다. 분배된 ethyl acetate층은 1 l의 0.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 수용액을 가한 후 methylene chloride 200 ml로 2회 분배 추출한 다음 무수황산나트륨으로 탈수하여 500 ml용 농축플라스크에 받아 35°C에서 완전히 감압 농축시켰다. 농축액은 10 ml의 methanol로 재 용해하여 생체중량 10~20 g이 되게 1 l용 분액여두에 취한 다음 100 ml의 methanol과 0.2 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 수용액을 가해 ethyl acetate 50 ml로 2회 분배추출하였다. 분배된 ethyl acetate 층은 상기 과정처럼 탈수시킨 후 250 ml용 농축플라스크에 받아 50°C에서 완전히 감압 농축시켰다. 농축액은 acetonitrile로 재 용해하여 벼 엽신골곡시험을 통해 brassinolide의 존재를 확인한 다음 HPLC분석을 행하였다.

## 결과 및 고찰

### 1-Cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid 합성

합성 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid 구조는

IR, NMR 및 GC/MS 그리고 CHN elemental corder 등의 분석을 통해 확인하였다. 합성 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid는 IR 분석의 결과(Fig. 2) 파수 2193 cm<sup>-1</sup>에서 이 화합물의 CN이 확인되었고 1454 cm<sup>-1</sup>에서 방향족 벤젠고리의 C=C 결합이, 1350 cm<sup>-1</sup>에서 B-O와 C-N의 결합이, 3390 cm<sup>-1</sup>에서 O-H의 결합이 그리고 3600 cm<sup>-1</sup> 부위에서 유리 OH의 존재가 각각 확인 되었다. 특히 형광에 민감한 CN은 원래 2250 cm<sup>-1</sup>에서 강한 흡수대를 형성하나 더욱 낮은 파수인 2150 cm<sup>-1</sup>에서 나타나 방향족 화합물에 결합되어 있음을 시사하였다. 파수 2359 cm<sup>-1</sup>의 spectrum은 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid의 CN과 B-OH가 상호작용하여 생긴 -C≡N<sup>+</sup>-O<sup>-</sup>의 입체적 구조에서 비롯된 결과로 생각되었다. 또 합성 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid의 GC/MS 분석 결과 (Fig. 3) m/z값이 218로서 구조중 boronate인 -B(OH)<sub>2</sub>가 떨어져 나간 형태로 나타났다.

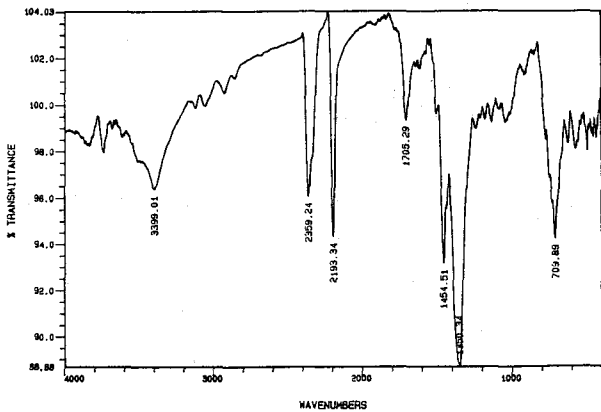


Fig. 2. The FR-IR spectrum of synthetic 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid.

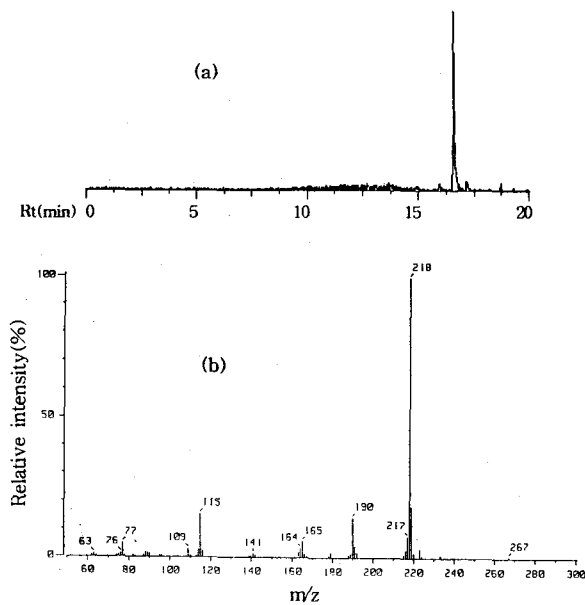


Fig. 3. The GLC chromatogram(a) and electron impact mass spectra(b) of synthetic 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid.

GC/MS 분석에서 m/z값 218에서 비롯된 m/z 190은 boronate가 제거된 상태에서 benzene 부위의 C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>가 제거된 분자이온 peak로, m/z 141은 benzene이 제거된 분자이온 peak로 그리고 m/z 115는 CN이 제거된 분자이온 peak로 나타났다.

<sup>1</sup>H-NMR의 분석을 통해서도 δ 7.0 ppm 이상에서 방향족 벤젠고리의 존재가 확인되었으며, δ2.8 ppm에서 OH의 존재가 확인되었다. 또한, CHN elemental corder의 분석을 통해서도 합성 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid는 탄소의 함량이 69.65%, 수소의 함량이 4.18%, 그리고 질소의 함량이 10.48%로 Gamoh<sup>®</sup> 등의 보고와 일치하였다.

이상의 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid는 3개월동안 안정하고 acetonitrile/pyridine용액에서 2주 동안 사용이 가능하였으며 합성수율은 78% 수준이었다.

**Brassinolide boronate 유도체화**

Brassinolide는 HPLC 분석상에서 검출정도가 매우 낮는데 이의 1,2-diol에 형광검출에 민감성이 뛰어난 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid로 유도체화 함으로서 매우 민감한 분석 감도에서 brassinolide의 형광분석이 가능 하였다(Fig. 4). 유도체화된 brassinolide boronate

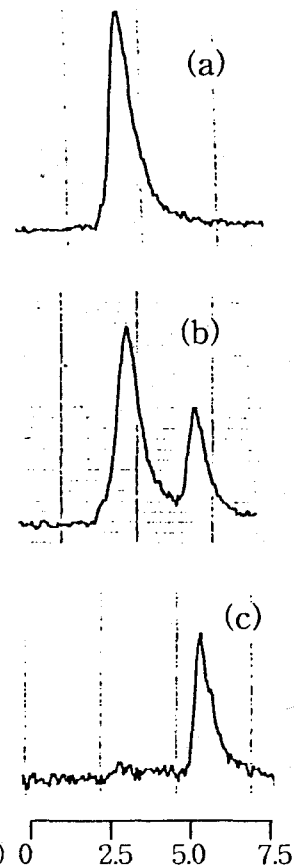


Fig. 4. HPLC chromatograms of (a) synthetic 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid and (b), (c) brassinolide boronate after reaction 1 µg of brassinolide with 10 µg and 20 µg of synthetic 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid respectively.

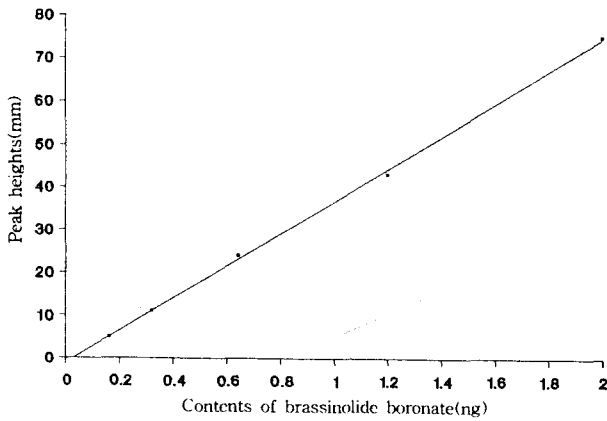


Fig. 5. The calibration curve of brassinolide boronate.

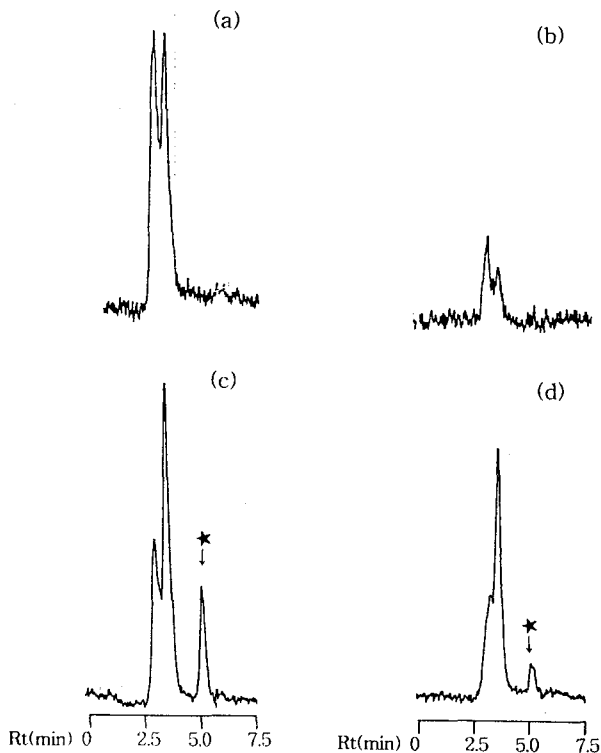


Fig. 6. HPLC chromatograms of brassinolide boronate from rice extracts at stage of (a) blooming, (b) elongation, (c) heading and (d) panicle formation. Each star mark represents brassinolide boronate of rice extracts.

nate의 확인은 일정한 농도의 brassinolide와 1-cyanoisoin-dole-2-*m*-phenylboronic acid의 농도별 반응을 통해 생-성된 brassinolide boronate의 HPLC 분석상에서 나타난 peak 높이의 증가를 통해 확인할 수 있었다. Brassinolide boronate의 유도체화율은 brassinolide 1 $\mu$ g에 대해 20  $\mu$ g의 1-cyanoisoin-dole-2-*m*-phenylboronic acid가 반응시 90% 이상이었다. 또 brassinolide boronate의 직선적 검-출범위는 0.16~2 ng이었으며(Fig. 5) 그의 최소 검출량은 0.16 ng으로 그 민감성이 매우 높았다.

### 벼 생육단계별 brassinolide의 검정

식물체에서 brassinolide의 검색을 위한 HPLC형광 분석법을 개발하여 우리 나라에서 많이 재배되고 있는 동진벼에 응용을 하고자 동진벼의 분얼기, 신장기 그리고 유수형성기 및 출수개화기의 생육단계별로 brassino-lide의 수준을 검정한 결과 분얼기 및 신장기에서 생체 200 g까지 검출되지 않았으며 반면에 유수형성기에서는 생체 10 g에 까지 0.8  $\mu$ g이 그리고 출수개화기에는 생체 100 g까지 약 0.2  $\mu$ g이 검출되었다(Fig. 6). 이러한 결과는 사용된 생체량을 비교할 때 벼 줄기의 성장율이 가장 높은 유수형성기에 brassinolide가 많이 존재함을 의미 하였다. 또 출수개화기에는 오히려 유수형성기에 비해 brassinolide의 검출이 낮게 나타나 벼의 성숙이 거의 완성된 생육단계에서는 brassinolide가 낮게 존재함을 의미하였으며 brassinolide가 벼의 성장촉진 호르몬으로 서의 역할을 하고 있음을 시사하였다.

한편, HPLC 형광 분석법을 통한 brassinolide의 검색 결과를 토대로 brassinolide가 집중적으로 존재할 수 있는 벼의 생육시기인 유수형성기의 생체량을 가지고 벼 엽신굴곡시험을 한 결과 생체 0.1 g에서 2.0 g까지 굴곡 시험의 유효성이 입증되었고 생체 5 g에서는 오히려 역효과가 나타나 높은 농도에서는 식물체의 생리활성에 상반되는 결과를 나타내는 brassinolide의 hormone성 특징을 보여 주었으며 생물학적 검정을 통해서도 유수형성기에 brassinolide가 많이 존재함을 알 수 있었다. 하지만 벼 엽신굴곡시험은 생체량의 증가에 따라 굴곡 현상의 역효과가 나타나 기기분석법에 비해 정확한 정량은 불가능함을 알 수 있었으며, 국내에 비교적 널리 보급되어 있는 HPLC 를 이용하여 brassinolide를 탐색 하는데 있어서 본 실험의 분석법이 매우 유효하리라 생각되었다.

### 감사의 글

본 연구는 93년도 학술진흥재단의 연구비 지원으로 수행된 결과로서 이에 감사드립니다.

### 참고 문헌

1. Mitchell, J. H., N. Mandava, J. F. Worley, J. R. Plimmer and M. V. Smith (1970) Brassin - a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* **225**, 1065-1071.
2. Park, K. H., K. H. Hyun and D. Y. Kim (1986) An assay method with lamina joints of korean rice. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **29**(1), 22-28.
3. Takatsuto, S., B. Ying, M. Morsaki and N. Ikekawa (1982) Microanalysis of brassinolides and its analogues by liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatography* **239**, 233-241.
4. Yokota, T., J. Baba and N. Takahashi (1982) A new steroidal

- lactone with plant growth-regulatory activity from *Dolichos lablab* seed. *Tetrahedron Letters* **23**(47), 4965-4966.
5. Ikekawa, N. and T. Sugum (1982) Synthesis of (22R, 23R)-28-homobrassinolide. *Chem. Pharm. Bull.* **30**(11), 4181-4185.
6. Gamoh, K. (1989) A boronic acid derivative as a highly sensitive fluorescence derivatization reagent for brassinosteroids in liquid chromatography. *Analytica. Chemica. Acta.* **222**, 201-204.

---

**Determination of Brassinolide by HPLC equipped with Fluorescence Detector in Rice(*Oriza sativa* L.)**

Jae-Han, Shim\*, In-Seon, Kim, Kang-Bong, Lee, Yong-Tack, Suh, and E.D. Morgan<sup>1</sup> (*Department of Agricultural Chemistry, Chonnam National University, Kwangju, South Korea, 500-757; <sup>1</sup>Department of Chemistry, Keele University, Staffordshire, England*)

**Abstract:** To determine brassinolide in rice(*Oriza sativa* L.) using HPLC equipped with fluorescence detector, a highly sensitive fluorescence reagent, 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid, was synthesized from the reaction of *o*-phthaldehyde, *m*-phenylboronic acid and KCN, then was reacted with brassinolide. The formation ratio of brassinolide boronate exhibited 90% up at the ratio of 20 : 1( $\mu\text{g}/\mu\text{g}$ ) of 1-cyanoisindole-2-*m*-phenylboronic acid and brassinolide respectively. The detection limit of brassinolide boronate with fluorescence detector was 0.16 ng. Brassinolide was detected in heading stage(biomass : 10 g) and panicle formation stage(biomass : 100 g) of the rice(*Oryza sativa* L.) with quantity of 0.8  $\mu\text{g}$  and 0.2  $\mu\text{g}$  respectively. However, brassinolide was not detected in blooming and elongation stage.

---

\*Corresponding author