

## 결명자의 brassinosteroid 활성물질

박근형 · 김선재 · 현규환\*

전남대학교 농과대학 식품공학과, \*순천대학교 농과대학 자원식물학과

**초록 :** 결명자에 존재하는 brassinosteroid 활성물질을 탐색하기 위하여 미숙종자를 MeOH로 추출하고, 이 추출물을 rice inclination test를 지표로, 용매분획, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, charcoal adsorption chromatography, Bondesil chromatography 등의 수법으로 brassinosteroid 활성물질을 정제한 다음, silica gel 흡착 chromatography로 활성성분을 분리하고, 각 활성획분에 대해 TLC 및 C<sub>18</sub> column과 ODS column을 사용한 HPLC에 의해 활성본체를 구명한 결과, 결명자의 brassinosteroid 활성물질로 최초로 teasterone, castasterone, brassinolide가 동정되었다. 결명자에 함유된 brassinosteroid의 함량은 brassinolide로 환산하여 생체중량 g당 3.5~5.5 ng 정도였으며, 동정된 3종의 brassinosteroid는 teasterone, castasterone, brassinolide순으로 존재하였다(1993년 2월 27일 접수, 1993년 3월 24일 수리).

식량과 유용자원을 공급하고 있는 식물의 생산력을 제고하기 위해서는 식물 자신이 생산하여 자신의 생리현상을 제어하고 있는 생물활성물질에 관한 연구가 대단히 중요하다. 생물활성물질 가운데 brassinosteroid는 1979년 최초로 발견된 steroid성 생장조절물질<sup>1)</sup>로 이 물질에 의해 발현되는 생장촉진,<sup>2)</sup> 수확의 증대,<sup>3,4)</sup> 식물의 environmental stress의 해소효과<sup>5,6)</sup> 등의 특이한 생리작용 때문에 이 물질에 관심이 집중되고 있다.

Brassinosteroid에 관한 연구는 식물이 생산하는 brassinosteroid의 탐색, brassinosteroid의 합성, 미생물이나 배양세포를 이용한 brassinosteroid의 생산성 검토 그리고 brassinosteroid의 생리작용과 응용연구 등을 생각할 수 있으나, 가장 핵심적이고 시급한 것은 식물이 생산하는 brassinosteroid의 탐색일 것이다.

한편, 식품에 대한 최근의 연구경향은 지금까지 중요시되어 왔던 식품의 영양과 기호성외에 소위 제3차 기능이라고 불리는 식품에 존재하는 활성물질에 의한 생체조절기능의 가능성에 대해 관심이 고조되고 있는데, 식품의 제3차 기능을 구명하기 위해서는 식품중에 존재하는 활성물질의 검색이 우선적으로 요구되어진다.

여기에 본 연구는 건위, 강장약으로 사용하며, 눈을 밝게하는 효과가 있으며, 음료로서 차 대용으로 사용<sup>7)</sup>하는 숙곡류인 결명자(決明子)의 brassinosteroid에 관한 연구가 수행된 바 없어 결명자에 포함되어 있는 brassi-

nosteroid 활성물질을 탐색하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험재료

전남 화순군 화순읍에서 재배된 콩과식물인 결명자(*Cassia tora*)를 완숙 한달전인 9월 하순에 종자 외피를 포함한 미숙종자 20 kg을 채취하여 공시하였다.

#### 추출 및 용매분획

종자와외피를 포함한 미숙종자 20 kg을 과량의 MeOH 존재하에 blender로 마쇄하면서 추출한 다음, 여과지(Toyo No. 2)와 G<sub>3</sub> glass filter를 사용하여 여과하였다. 이 추출조작을 3회 반복하여 얻은 추출여액을 Rotary vacuum evaporator로 40°C에서 감압농축하여 MeOH이 제거된 수용액을 Park 등의 방법<sup>8,12)</sup>으로 용매분획하였다. 즉, MeOH이 제거된 수용액을 CHCl<sub>3</sub>으로 추출하여 수용액 획분과 CHCl<sub>3</sub> 획분을 얻었다. CHCl<sub>3</sub> 획분은 *n*-Hexane과 80% MeOH로 partition하여 *n*-Hexane 획분과 80% MeOH 획분을 얻었으며, *n*-Hexane 획분은 한번 더 80% MeOH로 세척하여 수용액 획분, *n*-Hexane 획분, 80% MeOH 획분을 얻었다.

#### Silica gel adsorption chromatography

Key words : *Cassia tora*, endogeneous brassinosteroid, rice inclination test, HPLC  
Corresponding author : K. H. Park

Silica gel(200g과 10g, 70~230 mesh, column chromatography용, Merck사)을  $\text{CHCl}_3$ 으로 slurry를 만들어 column에 충전(3.2×60 cm와 1.5×18.5 cm)시킨 후,  $\text{CHCl}_3$ -MeOH 용매계로 MeOH 농도를 0, 5, 10, 15, 20% (gel 200g, 농도별로 1,700 ml/씩; gel 10g, 농도별로 80 ml/씩)까지 단계적으로 증가시킨 step-wise 용출방법을 사용하여 용출분획하였다.

**Sephadex LH-20 column chromatography**

Sephadex LH-20(25~100  $\mu$ , Pharmacia사)을 MeOH- $\text{CHCl}_3$ (4 : 1, v/v) 용매계<sup>9)</sup>와 70% EtOH 용매계<sup>9,10)</sup>로 하룻밤 팽윤시킨 후, column에 충전(MeOH- $\text{CHCl}_3$ , bed volume 1,000 ml와 bed volume 200 ml; 70% EtOH, bed volume 300 ml)하고 동 용매계로 용출분획하였다.

**Charcoal adsorption chromatography**

Charcoal(60~150 mesh, column chromatography용, Nakarai사)을  $\text{H}_2\text{O}$ , MeOH,  $\text{CHCl}_3$ 으로 각각 3회씩 세척하여 건조시킨 다음 activated charcoal 30g을 Park 등<sup>8)</sup>의 방법에 따라 40% MeOH로 slurry를 만들어 column에 충전(2.4×42 cm)하고, 동 용매계로 시료를 녹여 흡착시킨 후, 40(90 ml), 80(45 ml), 100% MeOH(45 ml)로 순차 용출분획한 다음, 또 다시 MeOH- $\text{CHCl}_3$  용매계로 MeOH 농도를 90%(45 ml)에서 70(45 ml), 50(45 ml), 30(45 ml), 10(45 ml), 0%(1,500 ml)까지 단계적으로 감소시키면서 순차 용출분획하였다.

**Bondesil chromatography**

Gel 4g(HPLC preparative grade, 40  $\mu$ m, Analytichem International사)을 MeOH로 slurry를 만들어 문 등의 방법<sup>13)</sup>으로 column에 충전(1.0×16.5 cm)하고 시료를 MeOH에 녹여 흡착시킨 후, 각 획분을 1 ml/씩으로하여 총 105 ml의 MeOH로 용출분획하였다.

**TLC**

시료를  $\text{CHCl}_3$ -MeOH(1 : 1, v/v) 용매계로 녹여 plate (Kieselgel 60 F<sub>254</sub>, 5×20 cm, 0.25 mm, Merck사)에 spotting 한 후, EtOAc-EtOH-Acetone(22 : 3 : 3, v/v) 용매계로 15 cm 전개시킨 후, R<sub>f</sub>별로 10등분하여 절취하고, MeOH- $\text{CHCl}_3$ (1 : 1, v/v) 용매계로 용출하였다.

**HPLC**

시료를 Sep-Park(silica type과 C<sub>18</sub> type)으로 전처리하고, filter(GELMAN Acrodisc LC 13 PVDF, 0.2  $\mu$ m, Waters사)로 여과한 후, C<sub>18</sub> column(1.9×30 cm, Wa-

ters사)과 ODS column(0.8×25 cm, ODS-3215-D, Senshu사)를 사용하여 80% MeOH 용매계를 이용하여 분당 각각 9 ml와 2 ml로 용출분획하였다.

**Brassinosteroid의 활성검정 및 생물검정에 의한 함량측정**

상풍벼의 조직을 이용한 Park 등<sup>11)</sup>의 생물검정법(rice inclination test)에 의하여 brassinosteroid 활성을 검정하였다. Brassinosteroid 활성물질의 함량은 brassinolide 표준용액을 생물검정하여 작성된 검량선에 의하여 산출하였다.

**결과 및 고찰**

**Brassinosteroid 활성물질의 확인 및 정제**

종자의피를 포함한 결명자의 미숙종자 20 kg을 MeOH로 추출하고 용매분획하여 얻어진 수용액 획분, n-Hexane 획분, 80% MeOH 획분을 대상으로 생물검정법으로 활성을 검정한 결과, 80% MeOH 획분(32.2g)에서 활성이 인정되었다. 80% MeOH 획분중  $\text{CHCl}_3$ 에 난용성 성분을 제외한 활성획분(20.2g)을 200g의 gel을 사용한 silica gel adsorption chromatography를 행하여 용출분획한 후, 각 획분에 대하여 생체중량 20g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과,  $\text{CHCl}_3$  내의 MeOH 농도 5~10% 용출획분(2,210~4,760 ml, 13.3g)에서 활성이 집중되었다. 이 결과는 동 용매계에 의한 silica gel 흡착 chromatography에 있어서 전형적인 천연의 brassinosteroid의 거동<sup>10)</sup>과 비슷하여, 활성본체의 성질이 기지의 brassinosteroid의 성질과 유사한 물질임을 시사해줌과 동시에 활성물질의 존재를 확인할 수 있었다.

이어서 silica gel 흡착 chromatography의 활성획분(13.3g)을 MeOH- $\text{CHCl}_3$  용매계를 사용하여 Sephadex LH-20의 gel filtration(bed volume, 1,000 ml)에 의하여 용출분획하고 생체중량 50g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과, elution volume에 대한 bed volume의 비( $V_e/V_t$ ) 0.65~0.75의 용출범위(650~750 ml, 2.13g)에서 뚜렷한 활성이 인정되었다. Park 등<sup>8)</sup>은 동일 조건의 gel filtration에서 전형적인 brassinosteroid의 용출범위가  $V_e/V_t$  0.625~0.750이라고 보고한 바 있는데, 이것은 본 실험의 결과와 일치하여 결명자의 활성본체가 이미 알려진 brassinosteroid와 유사한 분자량을 갖는 물질에 의해 활성이 발현되고 있음이 시사되었다.

이를 더욱 더 정제하기 위하여 charcoal 흡착 chromatography를 행하였다. 활성획분(2.13g)을 전처리한 acti-

vated charcoal이 충전된 column에 흡착시키고 MeOH-H<sub>2</sub>O 용매계와 CHCl<sub>3</sub>-MeOH 용매계로 순차 용출분획하여 얻어진 획분에 대해 생체중량 100g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과, CHCl<sub>3</sub> 내의 MeOH 농도 30~0% 용출영역(360~1605 ml, 1.12g)에서 활성물질의 존재가 인정되어 활성물질의 활성을 재확인할 수 있었으며 상당한 정제효과도 얻을 수 있었다.

Charcoal 흡착 chromatography의 활성획분을 더욱 정제하고 활성분체에 대한 정보를 얻기 위하여, 70% EtOH 용매계로 Sephadex LH-20의 gel filtration(bed volume 300 ml)에 의하여 용출분획하고, 생체중량 150 g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과, Ve/Vt 0.575~0.800의 용출범위(165~240 ml, 0.84g)에서 활성을 나타내었다. 이 결과는 동일조건에 의한 gel filtration에서 전형적인 brassinosteroid가 Ve/Vt 0.65~0.80의 용출범위에서 용출된다고 한 Yokota,<sup>10)</sup> Park 등<sup>12)</sup>의 보고와 일치하여 이 활성물질의 활성분체가 기지의 brassinosteroid와 유사한 분자량을 갖는 물질일 가능성을 더욱 높여주었다.

이 활성획분을 MeOH에 의한 Bondesil chromatography를 행하면서 용출분획하고, 얻어진 획분에 대해 생체중량 120g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과, 5~13 ml의 용출영역(0.6g)에서 활성물질의 존재가 인정되었다. 이상의 과정을 Fig. 1에 나타내었다.

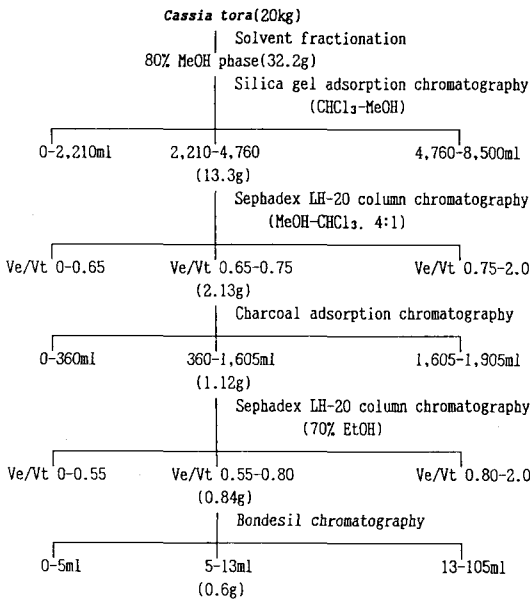


Fig. 1. Purification process of brassinosteroids from *Cassia tora* extracts.

정제 중간단계에서의 brassinosteroid 함량측정

이상의 정제과정에서 정제된 결명자의 brassinosteroid 활성획분에 포함된 brassinosteroid 함량을 검량선(Fig. 2)을 이용하여 측정하였다. 결명자의 생체중량 1, 5, 10, 50g에 상당하는 추출물에 의하여 각각 104.4°, 121.9°, 124.4°, 124.5° 활성을 나타내 brassinolide로 환산하여 전 brassinosteroid의 함량은 생체중량 g당 3.5~5.5 ng 정도를 나타냈다. 이러한 수준은 기 보고<sup>14,15)</sup>된 다른 식물에 존재하는 brassinosteroid 함량과 비슷하면, 영양생장조직의 함량보다는 훨씬 많고, 화분보다는 낮으나 타 종자와는 비슷한 수준이었다.

Brassinosteroid 활성물질의 분리

이상의 정제과정에서는 전환성획분을 모아서 활성획분을 분리하지 않고 정제하였으나, 정제가 어느 정도

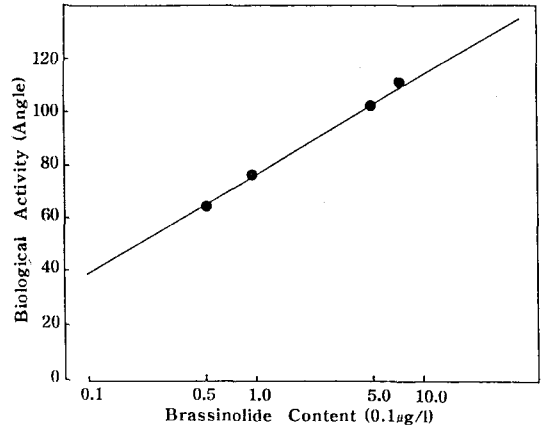


Fig. 2. Calibration curve of brassinolide by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo.

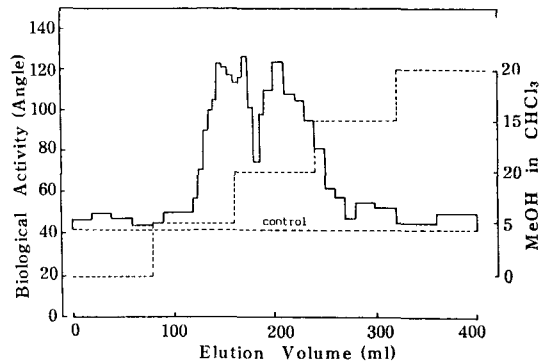


Fig. 3. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpungbyeo after silica gel adsorption chromatography of the extract from *Cassia tora*.

이루어졌기에 활성성분의 분리를 시도하였다. Bondesil chromatography에서 얻어진 활성획분(0.6g)을 10g의 gel을 사용한 silica gel 흡착 chromatography에 의해 용출분획하고, 얻어진 획분에 대해 생체중량 120g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과(Fig. 3), CHCl<sub>3</sub> 내의 MeOH 농도 5~10% 용출획분(135~185 ml, 196 mg, 활성 I로 명명) 그리고 MeOH 농도 10~15% 용출획분(185~250 ml, 31 mg, 활성 II로 명명)에서 높은 활성을 보였으며, 활성물질의 분리가 이루어졌다. 활성 I은 더욱 정제의 필요성이 있어 MeOH-CHCl<sub>3</sub> 용매계의 Sephadex LH-20의 gel filtration (bed volume, 200 ml)에 의하여 용출분획하고, 생체중량 100g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과(Fig. 4), Ve/Vt 0.625~0.750(125~150 ml, 161 mg)의 용출범위에 활성을 보여 기보고된 brassinosteroid의 용출범위와 일치<sup>8,12)</sup>하여 알

려진 brassinosteroid와 유사한 분자크기를 갖는 물질에 의해 활성이 발현되고 있음이 거듭 시사되었다.

**Brassinosteroid 활성분체의 구명**

활성 I과 II의 일부(1/80, 생체중량 240g상당)를 각각 취하여 활성분체에 대한 정보를 얻고자 TLC를 실시하였다. 분취하고 용출된 획분에 대해 생체중량 40, 200g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과(Fig. 5), 활성 I은 R<sub>f</sub> 0.4~0.5를 중심으로 R<sub>f</sub> 0.3~0.6에서 활성이 인정되었으며, 활성 II는 R<sub>f</sub> 0.5~0.6을 중심으로 R<sub>f</sub> 0.3~0.6의 위치에서 활성이 인정되었다. 이 결과를 동일조건의 TLC에 의한 authentic brassinosteroid의 위치(brassinolide, R<sub>f</sub> 0.3~0.4 ; castasterone, R<sub>f</sub> 0.4~0.5)와 비교하여 보면, 활성 I, II 모두 brassinolide와 castasterone의 존재 가능성과 또한 brassinolide나 castasterone보다 극성이

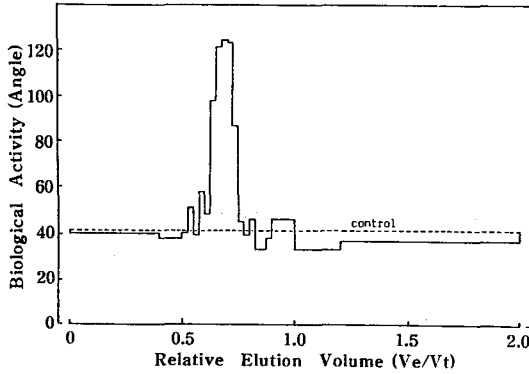


Fig. 4. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpu-nybyeo after Sephadex LH-20 column chromatography of *Cassia tora* active fr. I.

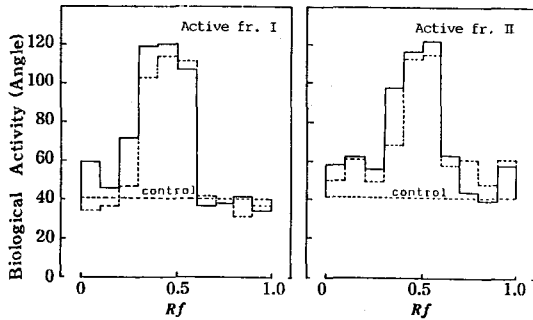


Fig. 5. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpu-nybyeo after TLC of *Cassia tora* active fractions. ---, 40g fr. wt. eq.; —, 200g fr. wt. eq.

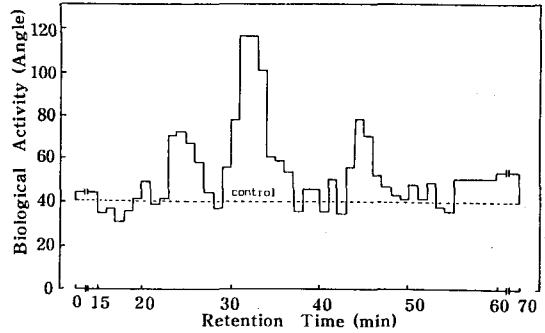


Fig. 6. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpu-nybyeo after HPLC on C<sub>18</sub> column of *Cassia tora* active fr. I.

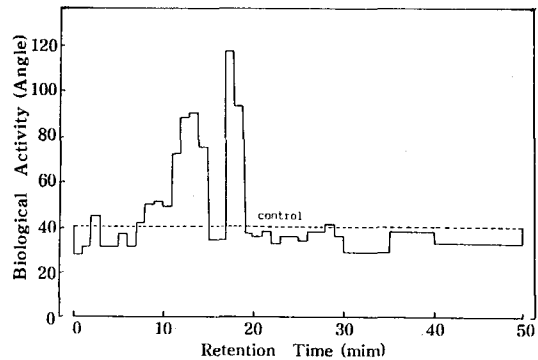


Fig. 7. Distribution of biological activity determined by the rice inclination test with seedlings of Sangpu-nybyeo after HPLC on ODS column of *Cassia tora* active fr. II.

낮은 brassinosteroid 존재 가능성이 시사되었다.

TLC에 의해 활성본체에 대한 정보가 얻어지자, HPLC의 용매계를 선택하여 HPLC 분석을 시도하였다. 활성 I(159.2 mg)은 대구경의 C<sub>18</sub> column을, 활성 II(30.6 mg)는 소구경의 ODS column을 사용한 reverse phase의 HPLC로 용출분획하고 얻어진 회분에 대해 활성 I은 생체중량 270g, 활성 II는 생체중량 236g에 상당하는 추출물에 의해 활성을 검정한 결과(활성 I은 Fig. 6, 활성 II는 Fig. 7), 활성 I은 Retention time(Rt) 31~33분에 main 활성이 그리고 Rt 23~25분과 Rt 44~46분에서 minor 활성을 나타냈다. 이 결과를 동일조건인 HPLC에 의해 조사한 authentic brassinosteroid의 용출위치(dolicholide, Rt 17~18분; brassinolide, Rt 23~24분; castasterone, Rt 32~33분; teasterone, Rt 44~45분)와 비교하여 보면, Rt 31~33분의 main 활성은 castasterone의 Rt과 완전히 일치하여 Rt 31~33분의 활성본체로 castasterone<sup>16)</sup>이 동정되었으며, Rt 23~25분의 minor 활성은 brassinolide의 Rt과 완전히 일치하여 Rt 23~25분의 활성본체로 brassinolide<sup>17)</sup>가 동정되었고, Rt 44~46분의 minor 활성은 teasterone의 Rt과 완전 일치하여 Rt 44~46분의 활성본체로 teasterone이 동정되었다. Teasterone<sup>17)</sup>은 2-deoxy-castasterone의 구조를 갖고 있어 castasterone보다 극성이 낮아 TLC의 R<sub>f</sub> 0.5~0.6의 활성은 teasterone에 의해 발현되고 있다고 설명되어진다.

한편, 활성 II는 Rt 17~19분에 main 활성이 그리고 Rt 11~15분에 minor 활성을 나타냈다. 이 결과는 동일조건인 HPLC에 의한 authentic brassinosteroid의 Rt (dolicholide, Rt 8~9분; brassinolide, Rt 11~12분; castasterone, Rt 14~15분; teasterone, Rt 18~19분)와 비교하면, Rt 17~19분의 main 활성은 teasterone의 Rt과 완전 일치하여 Rt 17~19분의 활성본체로 teasterone이 동정되었다. 한편 Rt 11~15분의 minor 활성은 castasterone의 Rt(13~14분)과 brassinolide의 Rt(11~12분)과 일치하고 있으며, 또 TLC의 결과와 종합하면 Rt 11~15분의 minor 활성의 활성본체는 Rt 13~14분의 castasterone과 Rt 11~12분의 brassinolide에 의해 활성이 발현되고 있음이 분명하다.

활성 I과 II에서 동정된 brassinosteroid 활성의 크기를 보면 활성 I은 castasterone, teasterone, brassinolide 순으로, 활성 II는 teasterone, castasterone, brassinolide 순으로 활성을 보이고 있다. Rice inclination test에 의해 조사된 brassinosteroid 구조와 활성과의 상관관계를 보면, lactone 구조(brassinolide)가 ketone 구조(castasterone)로 되면 활성이 50~20%로 떨어지며, 2위치의 수

산기가 결여(teasterone)되면 활성이 10~1%로 떨어짐이 보고<sup>15,17,18)</sup>되어 있으며, 본 실험에서도 확인한 바 있다. 이러한 경향을 고려할 때 결명자에서 동정된 3종의 brassinosteroid 함량은 teasterone, castasterone, brassinolide 순으로 존재함을 알 수 있었다.

이상의 결과, 결명자의 종실에 포함되어 있는 brassinosteroid 활성물질로 teasterone, castasterone, brassinolide가 동정되었는데 결명자의 brassinosteroid에 관한 연구로는 첫 보고로 생각된다. Brassinosteroid 활성물질의 함량은 brassinolide로 환산하여 생체중량 g당 3.5~5.5 ng 정도이었으며, 동정된 3종의 brassinosteroid는 teasterone, castasterone, brassinolide 순으로 존재하였다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 지원으로 수행되었기에 재단 당국에 감사드립니다. 아울러 농업생물신소재연구센터의 지원과 실험을 도와준 박종대 군과 이란숙 양에게 감사드립니다.

### 참 고 문 헌

- Grove, M. D., Spencer, G. F., Rohwedder, W. K., Mandava, N., Worley, J. F., Warthen, J. D., Jr., Stefens, G. L., Flippen Anderson, J. L. and Cook, J. C.: Nature, 23 : 216(1979)
- Worley, J. F. and Mitchell, J. W.: J. Am. Soc. Hort. Sci., 96 : 270(1971)
- Gregory, L. E.: Am. J. Bot., 68 : 586(1981)
- Maugh, T. H.: Science, 212 : 33(1981)
- Fujita, F.: Kagaku-to-seibutsu, 23 : 717(1985)
- Takematsu, T. and Takeuchi, Y.: Chem. Regul. Plants, 18 : 38(1983)
- 한국자원식물연구소: 한국식물대보감 p. 500, 제일출판사(1989)
- Park, K.-H., Saimoto, H., Nakagawa, S., Sakurai, A., Yokota, T., Takahashi, N. and Syono, K.: Agric. Biol. Chem., 53 : 805(1989)
- Ikedo, M., Takatsuto, S., Sassa, T., Ikekawa, H. and Nukiwa, M.: Agric. Biol. Chem., 47 : 655(1983)
- Yokota, T., Baba, J., Koba, S. and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 49 : 2529(1984)
- Park, K.-H., Hyun, K.-H. and Kim, D.-Y.: Korean J. Agric. Chem., 29 : 22(1986)
- Park, K.-H., Yokota, T., Sakurai, A. and Takahashi, N.: Agric. Biol. Chem., 51 : 3081(1987)
- Moon, J.-H., Hyun, K.-H. and Park, K.-H.: Korean J. Biotechnol. Bioeng., 7 : 21(1992)

14. Yokota, T. and Takahashi, N.: Chem. Regul. Plants, 19 : 102(1984)
15. Adam, G. and Marquardt, V.: Phytochemistry, 25 : 1787(1986)
16. Yokota, T., Arima, M. and Takahashi, N.: Tetrahedron Lett., 23 : 1275(1982)
17. Abe, H., Morishita, T., Uchiyama, M., Takatsuto, S. and Ikekawa, N: Agric. Biol. Chem., 48 : 2171 (1984)
18. Yokota, T.: Chem. Regul. Plants, 22 : 10(1987)

---

#### **Brassinosteroid substances in immature *Cassia tora* seeds**

Keun-Hyung Park, Seon-Jae Kim and Kyu-Hawn Hyun\* (Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chonnam National University, Kwang-ju, 500-757, \*Department of Resources Plant, College of Agriculture, Sunchon University, Suncheon, 540-742)

**Abstract :** In order to explore the brassinosteroid-active component in *Cassia tora*, methanol extract of immature seeds was purified by sequences of solvent fractionation, silica gel adsorption chromatography, Sephadex LH-20 chromatography, charcoal adsorption chromatography and Bondesil chromatography. The activity of brassinosteroid was monitored by the rice inclination test and its presence could be confirmed in each purification step. The purified active components were separated by silica gel adsorption chromatography. Brassinosteroid substances in separated active fractions were identified as teasterone, castasterone, brassinolide by TLC and HPLC. Our work is probably the first report of endogenous brassinosteroid in *Cassia tora*. The content of brassinosteroid in *Cassia tora* as converted into brassinolide was 3.5~5.5 ng/g fresh weight. The order of brassinosteroid contents was toward to be teasterone, castasterone, brassinolide.