J. Plant Biol. 37(4) : 441~444 (1994)

강낭콩 미숙종자내 신규 Saringosteryl Glucoside의 동정

金 成 淇
中央大學校 理科大學 生物學科

강낭콩(*Phaseolus vulgaris* L.) 미숙종자로부터 신규 phytosteryl glucoside를 순수분리하였다. 이 화합물은 positive FAB-MS에서 m/z 613에 $[M+Na]^+$를, 696에 $[M+Matrix]^+$의 강한 ion peak를 나타내었고, negative FAB-MS에서 m/z 589에 $[M-1]^-$의 강한 ion peak를 나타내어 그 분자량은 590으로 확인되었다. 400 MHz ^{1}H-NMR 분석 결과 이 화합물은 24-hydroxy-24-vinyl-cholesterol(saringosterol)과 β-D-glucopyranose가 연결되어 있는 saringosteryl glucoside임을 알 수 있었고, 이 화합물의 acetyl화 화합물의 400 MHz ^{1}H-NMR의 분석을 통하여 이 화합물은 saringosterol의 C-3 수산기와 β-D-glucopyranose의 C-1′의 수산기가 탈수축합되어 있는 3-O-β-D-glucopyranosyl-24-hydroxy-24-vinyl-cholesterol(saringosteryl glucoside)로 구조결정되었다. 이 saringosteryl glucoside는 천연으로부터 처음 동정된 신규 화합물이며, 이 화합물의 aglycone인 saringosterol도 고등 식물에서는 처음으로 발견된 것이다.

주요어 : 강낭콩, 미숙종자, 신규 phytosteryl glucoside, saringosteryl glucoside, 구조결정

지난 수년간 우리는 강낭콩 미숙종자내의 steroid성 화합물의 연구를 계속하여 왔다. 그 결과 강낭콩 미숙종자에는 steroid성 식물호르몬으로서 약 60여종의 brassinosteroid가 존재함을 확인하여 그중 19개의 화합물의 구조결정을 할 수 있었다(Kim *et al.*, 1983, 1987; Yokota *et al.*, 1987; Kim, 1991). 또한 그 구조적 유사성으로 미루어 볼 때 brassinosteroid의 생합성 과정의 전구물질로 사료되는 4-demethyl sterol들을 주로 하는 내생 phytosterol을 조사한 결과, 미숙종자는 cholesterol, campesterol, stigmasterol, sitosterol 그리고 isofucosterol 등의 일반적인 phytosterol 이 외에도 clerosterol, 24-ethyldesmosterol, 24-methylene-25-methylcholesterol(Kim *et al.*, 1988) 그리고 25-methylgramisterol(Akihisa *et al.*, 1989) 등의 특이한 phytosterol들을 포함하고 있음을 알 수 있었음과 동시에, 동정된 내생 brassinosteroid와 phytosterol간에는 곁사슬 부분에 구조적 유사성이 높음을 알 수 있었다. 이러한 brassinosteroid와 phytosterol의 곁사슬 구조의 유사성을 연구하는 과정에서 그 존재가 황색 해조류인 *Sargassum ringgoldianum*에서 유일하게 보고되어 있고 곁사슬에 24-hydroxy-24-vinyl기를 갖고 있는 특이한 phytosterol인 saringosterol(Ikekawa *et al.*, 1966)의 배당체(Fig. 1)가 자연계에서는 처음으로 강낭콩 미숙종자로부터 순수분리되었기에 본 논문에 그 구조결정 과정을 보고하고자 한다.

교신저자 : Fax (02) 820-5206
© 한국식물학회 [서울] 1994

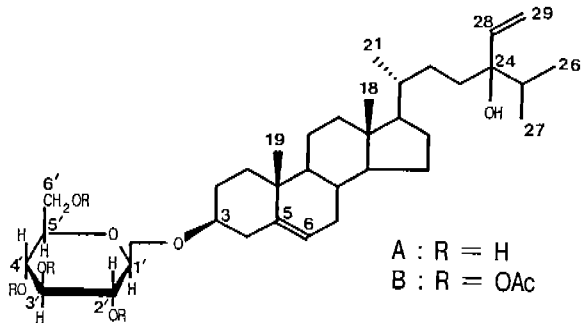

Fig. 1. Structure of saringosteryl glucoside (A) and its acetate (B).

재료 및 방법

Saringosteryl glucoside의 정제

Saringosteryl glucoside의 정제는 136 kg 강낭콩 미숙종자의 ethyl acetate soluble fraction(64.3 g)에 대하여 silica gel(500 g) column chromatography로 methanol-chloroform을 용출용매로서 이용하여 행하였다. Silica gel chromatography 후 얻어진 활성 fraction(4-7% methanol in chloroform)을 농축한 후 Sephadex LH-20로 정제를 진행하였는데 이때 사용한 용출용매는 methanol : chloroform = 4 : 1이었으며 매분 0.5 mL의 유속으로 행하였다. 다음으로 활성 fraction(3.56 g)을 activated

charcoal 40 g을 충전제로 이용하고 methanol과 methanol-chloroform을 용출 용매로 사용한 column chromatography로 정제하여 약 500 mg의 활성 fraction(100% methanol fraction, methanol : chloroform=2 : 1 fraction)을 얻었다. 그 다음으로 Senshu Pak LRP-1 column(20×300 mm)을 이용한 reversed phase HPLC로 정제하였는데 이때 사용한 용매는 처음 40분간은 45% acetonitrile, 그 다음는 80% acetonitrile이었으며, 매분 10 mL의 유속으로 행하였다. 그후 reversed phase HPLC의 fraction 58에 대하여 최종적으로 normal phase HPLC로 정제하였는데, 시료는 10% methanol에 녹여 주입하였고, 용출에 사용한 용매는 3%의 methanol을 포함하는 chloroform 혼합용매로서 0.1%의 H_2O를 첨가한 것으로, 매분 3 mL의 유속으로 행하였다. 매분 분취한 결과 saringosteryl glucoside는 fraction 30-32에서 용출되어 나왔다. 마지막으로 얻어진 활성 fraction을 농축 후 methanol내에서 재결정하여 순도 100%의 saringosteryl glucoside(5 mg)를 얻었다.

Saringosteryl glucoside의 가수분해

소량(2 mg)의 saringosteryl glucoside를 2% pectolyase를 포함하는 1 mL acetate buffer(pH 5, 10% methanol 함유)에 가하고 한 방울의 toluene를 첨가한 후 37℃에서 20시간 반응시켰다. 반응 후 ethyl acetate(5 mL)로 추출하여 가수분해 산물인 aglycone(saringosterol)을 얻었다. 얻어진 aglycone은 benzene-hexane으로 결정화하여 녹는점 측정 등에 사용하였다.

Saringosteryl glucoside의 분자량 측정

Saringosteryl glucose의 분자량 측정은 JEOL DX-303 mass spectrometry를 이용하여 FAB-MS로 행하였는데, 보다 정확성을 위하여 positive mode와 negative mode의 두 방법으로 측정하였다. 이때 사용한 가스는 Xe이였고, matrix로는 diethanoamine[$(OHCH_2CH_2)_2NH_2$]를 이용하여 emissiom 20 mA, shut gun voltage 3 kV에서 post-acceleration 방법으로 측정하였다.

^{1}H-NMR 측정

Saringosteryl glucoside와 그 acetyl화 화합물의 ^{1}H-NMR 측정은 JEOL 400 MHz FX-400 기종으로 행하였으며, 이때 내부 표준 시약으로 tetramethylsilane(TMS)를 이용하였다. Saringosteryl glucoside는 5%의 CD_3OD를 포함하는 $CDCl_3$ 용액에 녹여 측정하였고, saringosteryl glucoside acetate는

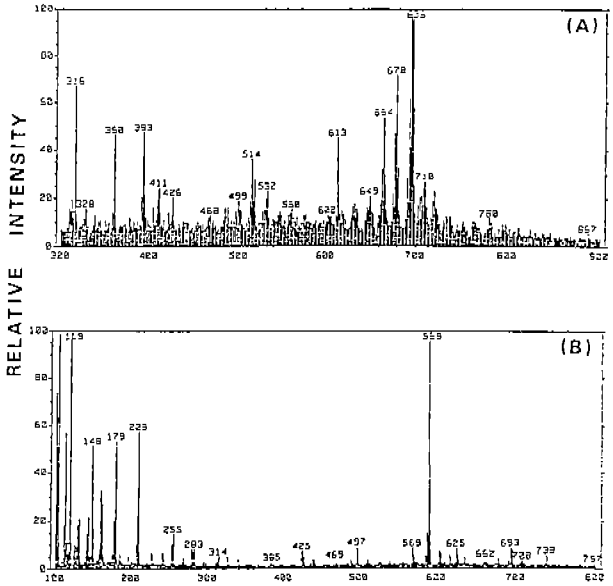

Fig. 2. Positive (A) and negative (B) FAB-MS spectra of saringosteryl glucoside.

$CDCl_3$에 녹여 측정하였다. Saringosteryl glucoside의 acetyl화 화합물의 합성 Saringosteryl glucoside에 무수초산과 pyridine의 2 : 1 혼합용액을 첨가하여 실온에서 24시간 방치 후, 합성된 saringosteryl glucoside acetate 화합물을 ethyl acetate로 추출하였다.

결과 및 고찰

강낭콩 미숙종자 136 kg의 methanol 추출액을 농축 후 solvent partitoning한 다음, 얻어진 중성 ethyl acetate 분획을 각종 open column chromatography와 reversed phase HPLC로 정제하였다. 그 다음 Aquasil column를 이용한 normal phase HPLC로 정제하여 최종적으로 약 5 mg의 하얀 가루를 얻었다. 우선 얻어진 화합물의 분자량을 FAB-MS를 통하여 측정하였는데, positive mode에서 이 화합물은 m/z 696(base peak), 678, 664, 613 등에 강한 ion peak가 나타났으며, negative mode에서는 m/z 589(base peak)에 강한 ion peak가 나타났다 (Fig. 2). 이들 ion peak들을 해석한 결과 positive mode에서의 m/z 613의 ion peak는 $[M+Na]^+$로, m/z 696의 ion peak는 $[M+Matrix]^+$로 해석 가능하였으며, negative mode에서의 m/z 589의 ion peak는 $[M-1]^-$에 기인함을 해석할 수 있어, 화합물의 분자량을 590으로 확정할 수 있었다. 또한 positive mode에서는 m/z 411에 특징적인 ion peak가 확인되어 이를 $[M-180+1]^+$로 해석할 때 이 화합물에는 분자량 180의 hexose가 한 분자 포함되어 있다고 사료되었다.

FAB-MS의 결과 이 화합물은 배당체일 가능성이 높다고

Table 1. ^{1}H-NMR at 400 MHz (δ value) of saringosteryl glucopyranoside in $CDCl_3$

Position of proton	δ value
Steroid nucleus	
H_3-18	0.67 s
H_3-19	1.01 s
H-3a	3.53 br
H-6	5.37 br
Side chain	
H_3-21	0.93 d (J=7 Hz)
H_3-26, 27	0.87 d (J=7.5 Hz)
	0.89 d (J=7.5 Hz)
H-28	5.79 dd (J=11, 16 Hz)
H_2-29	5.13 d (J=11 Hz)
	5.18 d (J=16 Hz)
Glucose moiety	
H-1′	3.35[a]
H-2′	3.56[a]
H-3′	3.56[a]
H-4′	3.33[a]
H-5′	3.79 dd (J=4, 10 Hz)
H_2-6′	3.87 dd (J=2.5, 10 Hz)

[a]Not resolved because of the overlapping absorptions.

사료되어, 이를 확인하기 위하여 당 가수분해효소인 pectolyase로 가수분해를 행하였다. 그 결과 이 화합물은 당 가수분해효소에 의하여 가수분해 되었음을 알 수 있었고, 얻어진 aglycone은 녹는점 162-164℃에 분자량 428의 화합물로서 TLC 분석시 sitosterol과 같은 R_f를 나타내어 4-demethyl sterol일 가능성이 크다고 사료되었다. 즉 이 화합물은 phytosteryl glucoside라고 생각되었다.

이 화합물의 구조결정은 400 MHz ^{1}H-MNR로 행하였다. 그 결과는 Table 1에 정리한 것과 같다. 즉, 그 존재가 확인되었던 hexose로부터 유래하는 signal들이 δ 4.43(d, J=7.5 Hz, H-1′), 3.35(br, H-2′), 3.56(br, H-3′), 3.56(br, H-4′), 3.33(br, H-5′), 3.79 (dd, J=4, 10 Hz, H-6′) 그리고 3.87(dd, J=2.5, 10 Hz, H-6′)에 나타나, 이 화학적 이동과 결합상수들은 보고된 D-glucopyranose의 그것들과 거의 일치하는 것이었다(Suzuki *et al.*, 1993). 또한 anomeric proton인 H-1′의 결합상수가 $J_{1',2'}$=7.5 Hz로 이는 axial-axial coupling에 의한 것으로(Adolfo *et al.*, 1984), D-glucopyranose는 aglycone에 β-결합으로 연결되어 있다고 생각되었다.

한편 aglycone 유래의 signal들은 다음과 같이 해석되었다: δ 0.67(s, H-18), 1.01(s, H-19), 0.93(d, J=7Hz, H-21), 0.87(d, J=7.5 Hz, H-26 or H-27), 0.89(d, J=7.5 Hz, H-26 or H-27), 3.53(br, H-3a), 5.37(br, H-6), 5.13(d, J=11 Hz, H-29), 5.18(d, J=16 Hz, H-29)와 5.79(dd, J=11, 16, H-28). 이 ^{1}H-NMR

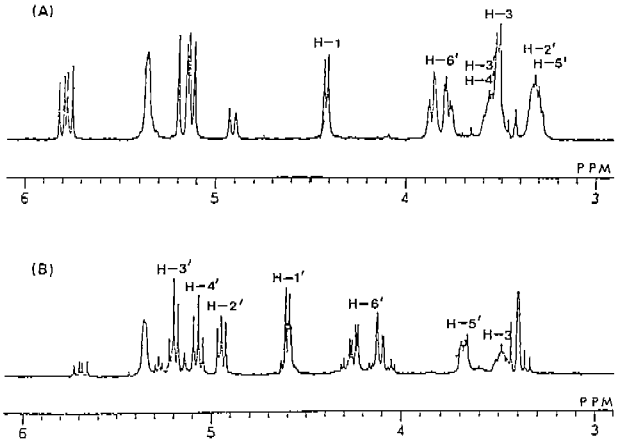

Fig. 3. ^{1}H-NMR spectral comparison of saringosteryl glucoside (A) and its tetra-acetate (B).

결과는 황색 해조류인 *Sargassum ringgoldianum*으로부터 동정된 saringosterol의 ^{1}H-NMR의 결과와 거의 일치하는 것으로, aglycone은 C-3β hydroxyl기, C-5와 C-6 사이에 이중결합, 그리고 C-24에 vinyl기와 hydroxyl기를 동시에 갖고 있는 4-methylsterol인 saringosterol로 구조 결정하였다.

Saringosterol과 β-D-glucopyranose의 연결을 알아보기 위하여 이 화합물을 acetyl화 하였다. 얻어진 acetyl화 화합물 (Fig. 1B)을 ^{1}H-NMR로 분석한 결과 이 화합물은 tetra-acetyl화 하였음을 알 수 있었고, acetyl화에 의하여 H-2′, H-3′, H-4′ 그리고 H-6′의 signal들은 낮은 장쪽으로 상당히 이동하였으나, H-1′과 H-3의 signal은 거의 변화가 없어(Fig. 3), 본 화합물은 saringosterol의 C-3β hyroxyl기와 β-D-glucopyranose의 C-1′의 hydroxyl기가 탈수축합으로 연결되어 있음을 확인할 수 있었다. 최종적으로 본 화합물은 3-O-β-D-glucopyranosyl-saringosterol (Fig. 1A)로 구조결정하였다.

본 연구에서 구조결정한 saringosteryl glucoside는 천연으로부터 처음 구조결정된 신규 화합물이다. 이 화합물의 aglycone은 C-24 위치에 vinyl기와 hydroxyl기를 동시에 갖고 있는 특이한 4-demethylsterol로서 고등식물에서는 발견된 적이 없으며, 황색 해조류인 *Sargassum ringgoldianum*에서만 동정된 적이 있다. 향후 본 연구에 의해서 구조결정된 saringosteryl glucoside와 그 aglycone인 saringosterol이 생체내에서 어떠한 생리적 역할을 하는가는 매우 흥미로운 연구과제라 하겠다.

인 용 문 헌

Adolfo, M.I. and P.B. Alicia. 1984. Sitosterol 3-O-β-D-xylopyranoside from *Bauhinia candicans*. *Phytochemistry* **23**: 2087-2088.

Akihisa, T., T. Yokota, N. Takahashi, T. Tamura and T. Matsumoto. 1989. 25-methylgramisterol and other 4α-methylsterols from *Phaseolus vulgaris* seeds. *Phytochemistry* **28**: 1219-1224.

Ikekawa, N., K. Tsuda and N. Morisaki. 1966. Saringosterol: a new sterol from brown algae. *Chemistry and Industry* **July 2**: 1979-1980.

Kim, S.K. 1991. Natural occurrences of brassinosteroids. *In* Brassinosteroids —Chemistry, Bioactivity, and Application. ACS Symposium Series 474. G.C. Cutler, T. Yokota and G. Adam (eds.). American Chemical Society, Washington, D.C. pp. 26-35.

Kim, S.K., T. Akihisa, T. Tamura, T. Matsumoto, T. Yokota and N. Takahashi. 1988. 24-Methylene-25-methyl-cholesterol in *Phaseolus vulgaris* seed: structural relation to brassinosteroids. *Phytochemistry* **27**: 629-636.

Kim, S.K., T. Yokota and N. Takahashi. 1987. 25-Methyldolichosterone, a new brassinosteroid with a tertiary butyl group from immature seed of *Phaseolus vulgaris*. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 2303-2305.

Suzuki, H., S.K. Kim, N. Takahashi and T. Yokota. 1993. Metabolism of castasterone and brassinolide in mung bean explant. *Phytochemistry* **33**: 1361-1367.

Yokota, T., S. Koba, S.K. Kim, S. Takatsuto, N. Ikekawa, M. Sakakibara, K. Okada, K. Mori and N. Takahashi. 1987. Diverse structural variation of the brassinosteroids in *Phaseolus vulgaris* seed. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1625-1631.

(1994. 8. 26 接受)

Identifiaction of Novel Saringosteryl Glucoside in *Phaseolus vulgaris* Seed

Kim, Seong-Ki

Department of Biology, Chung-Ang University, Seoul 156-756, Korea

ABSTRACT

From immature seed of *Phaseolus vulgaris* L., a novel phytosteryl glucoside was isolated. Strong ion peaks at m/z 613 $[M+Na]^+$, 696 $[M+Matrix]^+$ in positive FAB-MS and at m/z 589 $[M-1]^-$ in negative FAB-MS indicated the molecular weight of the compound is 590. Four hundred MHz ^{1}H-NMR analysis revealed that the compound carrys a 24-hydroxy-24-vinyl-cholesterol (saringosterol) as an aglycone and a β-D-glucopyranose. Four hundred MHz ^{1}H-NMR analysis of the acetate derivate of the compound revealed that hydroxyls at C-1′ in glucose moeity and at C-3 in aglycone have been condensed. Therefore, the phytosteryl glucoside was characterized to be 3-O-β-D-glucopyranosyl-24-hydroxy-24-vinyl-cholesterol (saringosteryl glucoside). This is the first demonstration for the presence of saringosterol in higher plants. Also this is the first identification of saringosteryl glucoside in natural materials.

Keywords: *Phaseolus vulgaris*, immature seed, novel phytosteryl glucoside, saringosteryl glucoside, strucure determination

Corresponding author: Fax +82-2-820-5206