

Purification and Characterization of Homoharringtonine from *Cephalotaxus koreana*

Byung-Sik Kim and Jin-Hyun Kim*

Department of Chemical Engineering, Kongju National University,

182 Shinkwan-Dong, Kongju 314-701, Chungnam, Korea

TEL: +82-41-850-8640, FAX: +82-41-858-2575

Abstract

A new isolation and purification method was developed aiming at increasing yield and purity for homoharringtonine. This method was a simple and efficient procedure, for the isolation and purification of homoharringtonine from *Cephalotaxus koreana*, consisting of solvent extraction, adsorbent treatment, low-pressure chromatography, and high performance liquid chromatography (HPLC). The crude homoharringtonine was efficiently pre-purified adequately to perform HPLC through a combination with adsorbent treatment and low-pressure chromatography. The homoharringtonine can be simply obtained with high purity and yield from crude homoharringtonine by HPLC. Purified homoharringtonine was characterized.

서론

Homoharringtonine(HHT)은 *Cephalotaxus korean*로부터 분리되는 식물유래 Alkaloid로써 항백혈 활성이 있고 효능 있는 골수억제제이다. 본 연구에서는 식물체인 biomass로부터의 유기용매 추출 공정을 최적화 하고, 전처리(pretreatment) 공정인 흡착제 처리 공정 및 정제 단계인 크로마토그래피(chromatography) 공정의 최적화를 통하여 효율적인 homoharringtonine의 분리 및 정제 공정을 개발하여 homoharringtonine의 동정을 실시하였다.

재료 및 방법

1. 유기용매 추출(solvent extraction) 및 액/액 추출(liquid/liquid extraction) 공정

본 연구에 사용한 한국산 개비자 나무(*Cephalotaxus koreana*)는 수고 1.3 m에서 잎과 줄기를 포함한 잔가지를 채취하였다. 식물체 시료는 60°C에서 48시간 동안 건조시킨 후 분쇄하고 0.25 mm sieve에 통과시켜 분말로 만들어 사용하였다. Solvent 추출: biomass:메탄올

(1:8,v/v)의 비율로 30분간 교반 후 여과를 거쳐 액만을 회수하는 과정을 4회 반복하였다.

Liquid/Liquid 추출: Solvent 추출물을 농축하고 여러 종류의 solvent를 사용하여 추출물 : 증류수 : solvent(1/1/2,v/v/v)의 비율로 30분 교반 후 분액깔때기에 정치하여 상 분리하고 하층액은 회수하고 상층액은 위 과정을 3회 반복하여 추출하였다.

2. Homoharringtonine의 분석

HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 분석은 C18 column (Shiseido, 4.6 ×250 mm, 5 μm)을 사용하여 수행하였다. 이동상으로는 methanol과 0.1 M ammonium formate 용액을 사용하였다. 용매의 gradient 조건은 1.0 ml/min 유속으로 methanol : 0.1 M ammonium formate가 25 : 75 에서 시작하여 30분 후 45 : 55 이 되도록 하였다. 각 화합물은 290 nm에서 UV에 의해 검출되었으며 주입량은 20 μl이다. homoharringtonine의 정량은 표준시료 (Sigma 제품, 순도 : 98.6 %)의 피크 면적으로 표준 정량선을 작성한 후 계산하였다.

3. 흡착제 처리 공정

액/액 추출 공정의 샘플을 이용하여 흡착제 처리 공정을 수행하였다. 흡착제 처리는 주로 식물유래 타르 또는 왁스성분(tar or waxy compound)을 제거하는데 그 목적이 있다. 이때 흡착제로 백토(active clay)와 활성탄(activated carbon)을 사용하였다.

4. Silica gel low- pressure 크로마토그래피 공정

Silica 흡착제(Merck, 40-63 μm)를 methanol에 용해시킨 후 column(Pyrex, 25×140 mm, 40 ml)에 충전하고 고정 시키기 위해 methanol에 규조토를 넣어 교반 후 silica 흡착제가 충전된 column에 흘려주었다. 이렇게 하여 충전된 silica column을 원하고자 하는 높이로 만들고 elution 용액은 methylene chloride/methanol = 80/20의 혼합용액을 사용하여 column에 넣고 안정화 시켰다. 샘플은 전처리 공정인 흡착제 처리를 한 후의 것을 사용하여 크로마토그래피 공정을 수행하였다.

결과 및 고찰

1. solvent 추출 과 Liquid/Liquid 추출 공정

한국산 개비자나무로부터 1:8 (biomass:methanol)의 비율로 20분간 교반하여 3회 추출하면 biomass 내의 homoharringtonine 99%이상을 얻을 수 있었다. Liquid/Liquid 추출시 solvent로chloroform을 사용하여 PH5.0에서 가장 효율적이었으며 본 과정에서 90%의 수율과 10%의 순도인 homoharrngtonine을 얻을 수 있었다.

2. 흡착제 처리 공정

흡착제 처리를 통하여 식물유래 타르 성분과 왁스 성분들을 효과적으로 제거 할 수 있었다. 흡착제 양은 건고물/흡착제=1/1(50wt%)로 하여 흡착처리 하였을 때 homoharringtonine의 수율이 가장 높았다. 흡착제 종류에 따른 영향은 활성백토(active clay)가 homoharringtonine 수율 측면에서 가장 효과적임을 알 수 있었다.

3. 크로마토그래피 공정

흡착제 처리 후 얻어진 저순도(~0.46%)의 homoharringtonine은 크로마토그래피를 수행 하였는데 이동상은 methylene chloride: methanol=80/20(v/v)로 하여 진행되었고 이 과정을 통해 높은 순도(>52%)의 homoharringtonine을 높은 수율(>85%)로 얻을 수 있었다. 그리고 HPLC 공정을 통해 고순도 (>99%)의 homoharringtonine을 정제할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

한국산 개비자나무로부터 alkaloid계 항암 활성 물질인 Homoharringtonine의 분리 및 정제 공정을 개발하였다. 추출 용매로 메탄올을 사용하여 biomass와 methanol을 1:8의 비율로 분씩 3회 추출할 경우 개비자나무로부터 대부분(>99%)의 Homoharringtonine이 추출됨을 알 수 있었다. 흡착 공정에서는 활성 백토(active clay)를 사용하여 추출물에 포함되어 있는 식물유래 타르, 왁스 성분을 효과적으로 제거하였다. 크로마토그래피 공정을 통해서 52% 이상의 Homoharringtonine을 정제하였다.

감 사

본 연구는 농림부 농림기술개발 연구과제에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Wickremesinhe, E. R. M. and R. N. Arteca, "HPLC separation of cephalotaxine, harringtonine and homoharringtonine from callus and root culture of *Cephalotaxus harringtonia*" (1996), *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 19, 889-897.
2. Kim, S. I., Choi, H.K., Song, J.Y., Kim, J.H., Lee, H.S. and Hong, S.S., Analysis of Alkaloid Contents in Korean Plumyew [*Cephalotaxus koreana*]: Variation with Location and Season(2000), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, 434-437.
3. Kim, J. H. and Hong, S.S., Optimization of extraction process for mass production of paclitaxel from plant cell cultures(2000), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, 346-351.

4. Kim, J.H., Kang, I.S., Choi, H.K., Hong, S.S. and Lee, H.S., A novel prepurification for paclitaxel from plant cell cultures(2002), *Process Biochemistry*,37, 679-682.

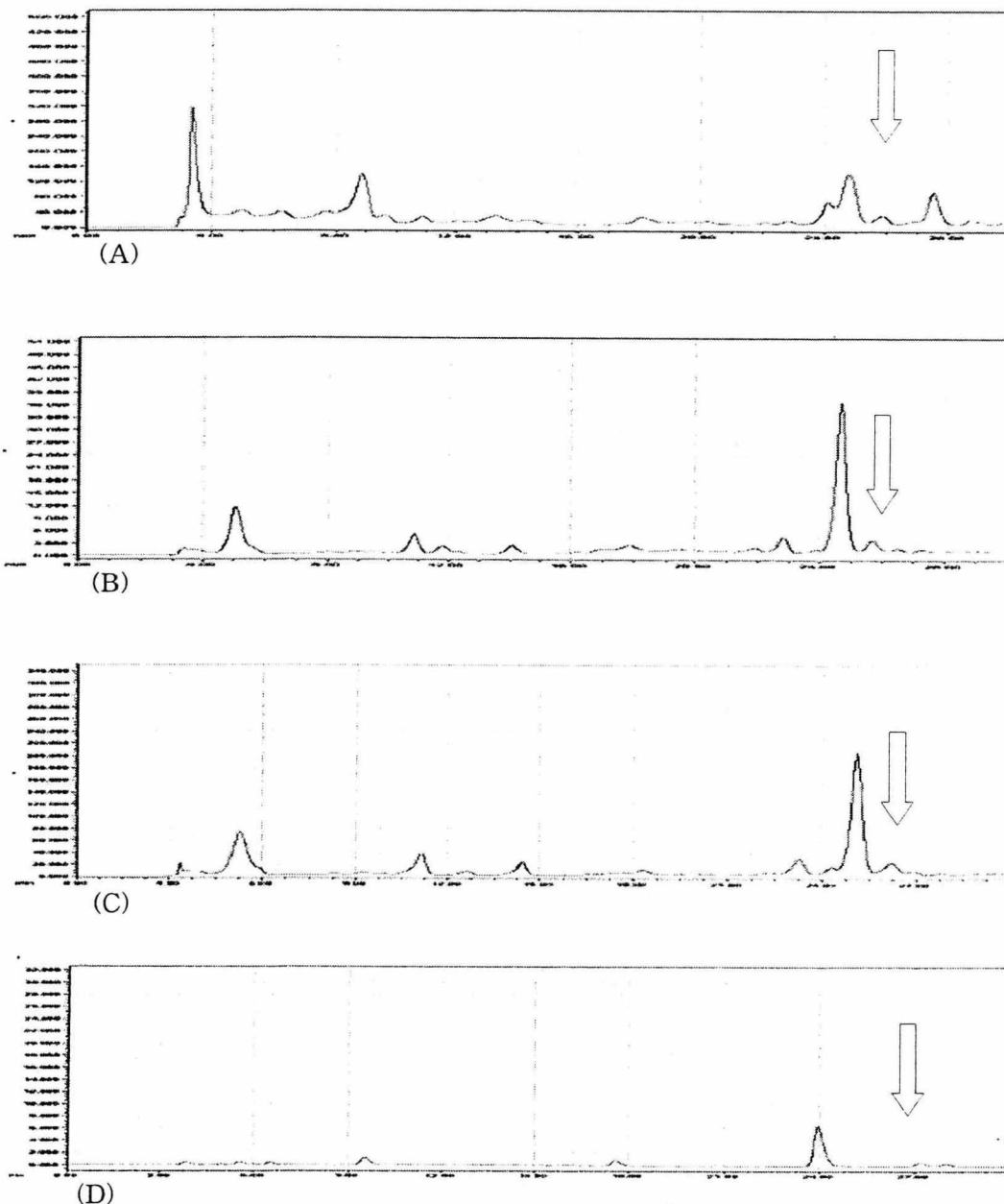


Fig.1~Fig. 4. Chromatogram of the purification steps analyzed using RP-HPLC: biomass extraction with methanol (A), liquid-liquid extraction with chloroform (B), adsorbent treatment with active clay (P-1) (C), and low-pressure chromatography with silica gel (D). The arrow indicates the position of HHT.