

Identification 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 novel purification method was developed for producing homoharringtonine from *Cephalotaxus koreana*, to guarantee high purity and yield. Our simple, efficient procedure for isolating and purifying homoharringtonine from *C. koreanabiomass* consisted of solvent extraction, synthetic adsorbent treatment, low-pressure chromatography, followed by high performance liquid chromatography (HPLC). The use of active clay treatment and silica gel low-pressure chromatography in the pre-purification process allowed for the rapid, efficient separation of homoharringtonine from interfering compounds and dramatically increased the yield and purity of crude homoharringtonine for high-performance liquid chromatography (HPLC) purification steps compared with alternative processes. Homoharringtonine could be obtained simply with high yield and purity from biomass using this purification method, while minimizing solvent use and the scale and complexity of HPLC operations for homoharringtonine purification. Purified homoharringtonine was identified and characterized.

Keywords: Homharringtonine, *Cephalotaxus koreana*, Purification, Characterization, Identification

서론

본 연구에서는 *Cephalotaxus koreana*로부터 homoharringtonine을 분리 및 정제할 수 있는 새로운 개념의 공정을 개발하였으며 또한 정제된 homoharringtonine을 동정하고 산업화를 위한 특성을 파악하였다.

재료 및 방법

1. 식물 재료 및 분리/정제 공정

본 연구에 사용한 biomass는 한국산 개비자 나무(*Cephalotaxus koreana*)의 잎과 줄기를 채취하여 60°C에서 48시간 동안 건조시킨 후 분쇄하고 0.25mm sieve에 통과시켜 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

Biomass 추출 및 액/액 추출: Biomass와 메탄올을 1:8(v/v) 비율로 혼합하고 30분간 교반 후 여과를 거쳐 액만을 회수하는 과정을 4회 반복하였다. Biomass 추출물을 농축하고 여러 종류의 유기용매를 사용하여 Biomass추출물/증류수/ 유기용매(1/1/2,v/v/v)의 비율로 혼합하여 30분 교반 후 분액깔때기에 정치하여 상 분리하고 하층액은 회수하고 상층액은 위 과정을 3회 반복하여 액/액 추출하였다.

흡착제 처리 공정: 액/액 추출물에 포함되어 있는 식물유래 타르 또는 왁스성분(tar or waxy compound)을 제거하기 위하여 여러 종류(active clay, activated carbon)의 흡착제 처리를 수행하였다.

Silica gel low-pressure chromatography: Silica 흡착제(Merck, 40-63 μ m)를 methanol에 용해시킨 후 column(Pyrex, 25 \times 140mm, 40ml)에 충전하였다. 충전된 silica column에 elution 용액은 methylene chloride/methanol = 80/20(v/v)의 혼합 용액을 사용하였다. 시료는 흡착제 처리를 한 후의 것을 사용하여 크로마토그래피 공정을 수행하였다.

2. Homoharringtonine의 분석

HPLC(High Performance Liquid Chromatography) 분석은 C18 column (Shiseido, 4.6 \times 250 mm, 5 μ m)을 사용하여 수행하였다. 이동상으로는 methanol과 0.1 M ammonium formate 용액을 사용하였다. 용매의 gradient 조건은 1.0ml/min 유속으로 methanol/0.1M ammonium formate가 25/75 (v/v)에서 시작하여 30분 후 45/55(v/v)이 되도록 하였다. 각 화합물은 290nm에서 UV에 의해 검출되었으며 주입량은 20 μ l이다.

Homoharringtonine의 정량은 표준시료(Sigma 제품, 순도 : 98.6%)를 이용한 표준 정량 선으로부터 계산하였다.

3. 분자량 및 구조 분석

Chromatography 공정을 통해서 얻어진 homoharringtonine를 Liquid con chromatograph-Mass Specific Detector를 통해 분자량을 확인하였다. 또한 Proton NMR을 이용하여 정제된 homoharringtonine의 구조를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 분리 및 정제 공정

Biomass와 methanol를 1:8(v/v)의 비율로 혼합하여 20분간 교반하여 3회 반복 추출하면 biomass 내의 homoharringtonine을 거의 대부분 회수(>99%)할 수 있었다. 액/액 추출을 위한 유기용매로 chloroform을 사용하여 PH 5.0에서 가장 높은 수율(~90%)과 순도(~10%)의 homoharringtonine를 얻을 수 있었다. 흡착제 처리를 통하여 식물유래 타르 성분과 왁스 성분들을 효과적으로 제거할 수 있었다. 흡착제 종류에 따른 영향은 활성백토(active clay)가 homoharringtonine 수율 측면에서 가장 효과적임을 알 수 있었다. 흡착제(active clay) 양은 건조물 대비 50 wt%로 하여 흡착처리 하였을 때 homoharringtonine의 수율이 가장 높았다. 흡착제 처리 후 얻어진 crude homoharringtonine는 silica gel low-pressure chromatography 공정을 통하여 정제하였으며 이동상은 methylene chloride/methanol = 80/20(v/v)(isocratic 조건)을 사용하였다. 최종 정제로 HPLC 공정을 통해 고순도 (>98%)의 homoharringtonine을 얻을 수 있었다.

2 동정 실험

Chromatograph-Mass Specific Detector를 통한 분자량 확인 결과 분자량은 546g/g-mol로 확인되었고 표준물질과 비교하여 동일한 분자량임을 확인할 수 있었다. 또한 NMR분석을 통하여 표준물질인 homoharringtonine와 동일 구조임을 확인할 수 있었다.

요약

한국산 개비자나무로부터 새로운 개념의 homoharringtonine 분리 및 정제 공정을 개발하였다. 메탄올을 사용한 4회 반복 추출에 의해 biomass로부터 대부분(>99%)의 homoharringtonine을 회수할 수 있었다. 흡착 공정에서는 활성 백토(active clay)를 사용하여 추출물에 포함되어 있는 식물유래 타르, 왁스 성분을 효과적으로 제거하였다. Silica gel low-pressure chromatography 공정을 통해서 순도 52% 이상의 homoharringtonine을 얻었으며, HPLC 공정을 통해 고순도 및 고수율의 homoharringtonine을 정제할 수 있었다. 정제된 homoharringtonine의 분자량 및 구조분석을 수행한 결과 표준물질(Homoharringtonine)과 동일 물질임을 확인할 수 있었다.

감사

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. Sung, J.L., B.S. Kim. and J.H. Kim, "Development of a pre-purification process for homoharringtonine (2005), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80, 1148-1153.
3. Kim, J. H. and S.S. Hong, Optimization of extraction process for mass production of paclitaxel from plant cell cultures (2000), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, 346-351.

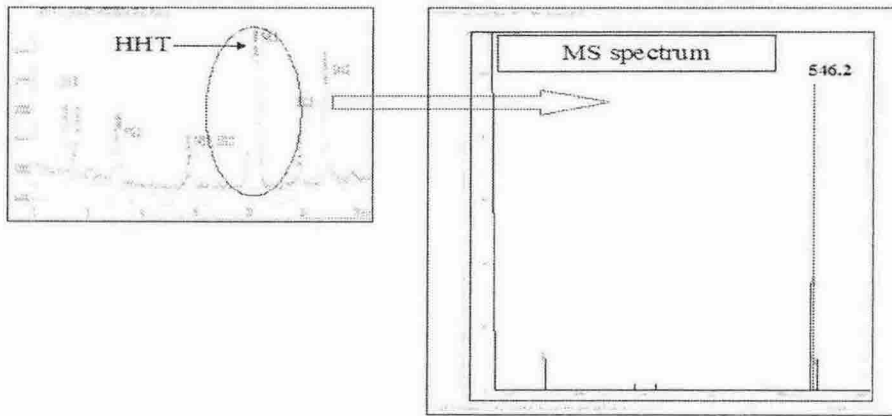


Figure 1. Analysis of homoharringtonine molecular weight.

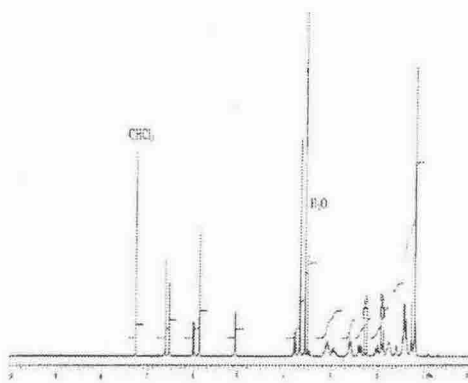


Figure 2. Proton NMR spectra of HHT.

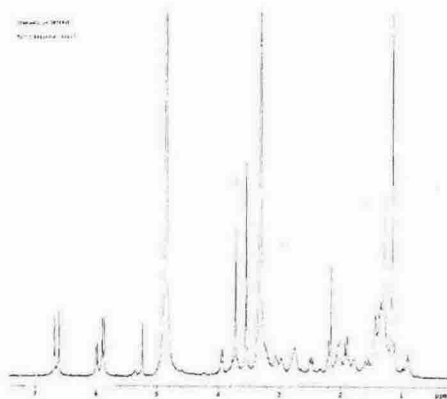


Figure 3. Proton NMR spectra of a purified HHT from *Cephalotaxus koreana*.