

한국산 개비자나무로부터 Homoharringtonine 정제를 위한 전처리 공정 개발

김병식, 성주리, 김진현*
공주대학교 화학공학부
(jinhyun@kongju.ac.kr*)

A pretreatment process development for homoharringtonine purification from *Cephalotaxus koreana*.

Byung-Sik Kim, Ju-Ri Sung, Jin-Hyun Kim*
Department of Chemical Engineering, Kongju National University
(jinhyun@kongju.ac.kr*)

서론

Homoharringtonine 는 항백혈의 활성을 갖고 있고 효능 있는 골수 억제제이다. Homoharringtonin 의 구조는 알킬기가 치환된 cephaloaxine 의 succinic acid ester 이며 한국산 개비자 나무로부터 유용 생리활성물질인 homoharringtonine 의 분리 및 정제 공정 개발에 대한 연구는 향후 항암제로 가능성이 높은 Homoharringtonin 의 산업적인 생산에 이용할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 기존에 연구가 이루어지지 않은 유용성분인 homoharringtonine 을 분리 및 정제 하는 것에 중점을 두고, 식물체인 biomass 로부터의 유기용매 추출 공정을 최적화하고, 전처리(pretreatment) 공정인 흡착제 처리 및 크로마토그래피(open column chromatography) 공정의 최적화를 통하여 효율적인 Homoharringtonine 의 분리 및 정제 공정을 개발하고자 한다.

재료 및 방법

1. 추출을 위한 식물 재료

본 연구에 사용한 한국산 개비자 나무(*Cephalotaxus koreana*)는 수고 1.3 m 높이에서 잎과 줄기를 포함한 잔가지를 채취하였다. 식물체 시료는 60°C에서 48 시간 동안 건조시킨 후 분쇄하고 0.25 mm sieve 에 통과시켜 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

2. Homoharringtonine 의 분석

HPLC 분석 방법에 의하여 Homoharringtonine 함량을 분석하였다. C18 column (Shiseido, 4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$)을 사용하였으며 이동상으로는 methanol 과 0.1 M ammonium formate 용액을 사용하였다. 용매의 gradient 조건은 1.0 ml/min 유속으로 methanol : 0.1 M ammonium formate 가 20 : 80 에서 시작하여 30 분 후 40 : 60 이 되도록 하였다. 각 화합물은 290 nm 에서 UV 에 의해 검출되었으며 주입량은 $20 \mu\text{l}$ 이다. Homoharringtonine 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

3. 실험 방법

1) 유기용매 추출(solvent extraction) 공정

Biomass 에 유기용매를 가하여 상온에서 20 분 동안 교반하여 추출 후 감압 여과하여 여과액(여액)을 회수하고 filtercake 을 같은 조건으로 재 추출하는 방법으로 총 3 회 반복 추출을 수행하였다.

2) 액/액 추출(liquid/liquid extraction) 공정

유기용매 추출에서 회수한 여액을 rotary evaporator ($25-27$ 'Hg, 40°C)를 이용하여 농축하고 이 농축액과 동량의 chloroform 을 가하여 상온에서 30 분 동안 교반시킨 후 상 분리를 하였다. 상층과 하층으로 상 분리가 되면 하등액인 chloroform 층만을 회수하고, 상등액에 새로운 chloroform 을 가하여 4 회 반복 수행하였다.

3) 흡착제 처리(adsorbent treatment) 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 있으며 흡착제로 백토(active clay)와 활성탄(activated carbon)을 사용하였다.

4) 크로마토그래피(chromatography) 공정

Silica (Merck, $40-63 \mu\text{m}$)를 column(Pyrex, 25×140 mm, 40 ml)에 충전하고 elution 용액(methylene chloride/methanol = 80/20)을 사용하여 column 을 안정화 시켰다. 샘플은 흡착제 처리를 한 샘플을 사용하여 크로마토그래피 공정을 수행하였다.

결과 및 고찰

1. Biomass 특성 파악

한국산 개비자나무를 부위별로 추출하여 Homoharringtonine 의 함량을 분석한 결과, 잎에서 가장 높았으며, 잎은 매년 재생이 가능한 renewable sources 이므로 다른 조직에 비해 안정된 공급원으로 사용될 수 있다. 따라서 Homoharringtonine 의 생산을 위한 원료로 잎을 사용하는 것이 가장 바람직함을 알 수 있었다. Biomass 의 건조 조건은 60°C 에서 48 시간 동안 건조하는 것이 가장 효과적 이었다.

2. Biomass 추출 공정 최적화

유기용매의 종류에 따른 Homoharringtonine 의 추출 효율을 Homoharringtonine 의 수율과 극성 및 비극성 불순물의 포함 정도로 분석한 결과 100% ethanol 을 사용하였을 때 최적의 추출 효율을 얻을 수 있었다. Ethanol 투입량은 biomass: ethanol=1:8 로 하였을 때 Homoharringtonine 의 수율이 가장 높았다. Biomass 의 추출 횟수에 따른 실험에서 3 회 추출이면 대부분의 homoharringtonine 을 회수(>99%)할 수 있었다(Fig. 1). 추출 시간에 따른 영향은 20 분이면 평형에 도달하여 1 회 추출시간으로 20 분이 적당하였다.

3. 액/액 추출공정 최적화

Biomass 를 ethanol 로 추출한 후 농축액의 pH 에 따른 액/액 추출 효율은 농축액의 pH 가 5.0 에서 가장 높은 수율을 얻었다. 액/액 추출의 횟수는 4 회 수행하였을 때 대부분의 Homoharringtonine 을 회수 할 수 있었다.

4. 흡착제 처리 및 크로마토그래피 공정 최적화

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 Homoharringtonine 의 수율이 가장 높았다. 흡착제 종류에 따른 영향은 활성백토(active clay)가 Homoharringtonine 수율 측면에서 가장 효과적임을 알 수 있었다. 흡착제 처리 후 얻어진 저순도의 Homoharringtonine 은 크로마토그래피를 수행하여 고순도의 Homoharringtonine 을 고수율로 얻을 수 있었다.

감사

본 연구는 한국과학재단 지정 공주대학교 자원재활용신소재연구센터의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Wickremesinhe, E. R. M. and R. N. Artega, "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. Park, Y. I., Y. Lee, H. C. Lee, C. W. Yun, G. S. Lee, D. S. Shin, W. H. Joo, G. R. Kwon and Y. Yeeh, "Identification of harringtonine and homoharringtonine and their contents in Korean native plummyew (*cephalotaxus koreana*)" (1996), Korean J. Biotechnol. Bioeng., 11, 689-695
3. R. M. Tujebajeva, D. M. Graifer*, G. G. Karpova* and N. A. Ajtkhozina, "Alkaloid homoharringtonine inhibits polypeptide chain elongation on human ribosomes on the step of peptide bond formation"(1989), Federation of European Biochemical Societies, 257, 254-256

4. Jingyi He, Andrew P. Cheung, Euphemia Wang, Elaine Struble, Kexuan Fang, Namphuong Nguyen, Paul Liu, "Stability-indicating LC assay of and impurity identification in homoharringtonine samples" (2000), J. Pharm. & Biomed. Anal., 22, 541-554
5. Sang-Ic Kim, Hyung-Kyoon Choi, Jai-Young Song, Jin-Hyun Kim, Hyun-Soo Lee, and Seung-Suh Hong*, "Analysis of Alkaloid Contents in Korean Plumyew [*Cephaotaxus koreana*]: Variation with Location and Season"(2000), Korean J, Biotechnol. Bioeng., 15, 434-437
6. Beverly A. Bell, Myron N. Chang, and Howard J. Weinstein, "A phase II study of Homoharringtonine for the Treatment of Children With Refractory or Recurrent Acute Myelogenous Leukemia: A Pediatric Oncology Group Study" (2001), Med Pediatr Oncol, 37, 103-107

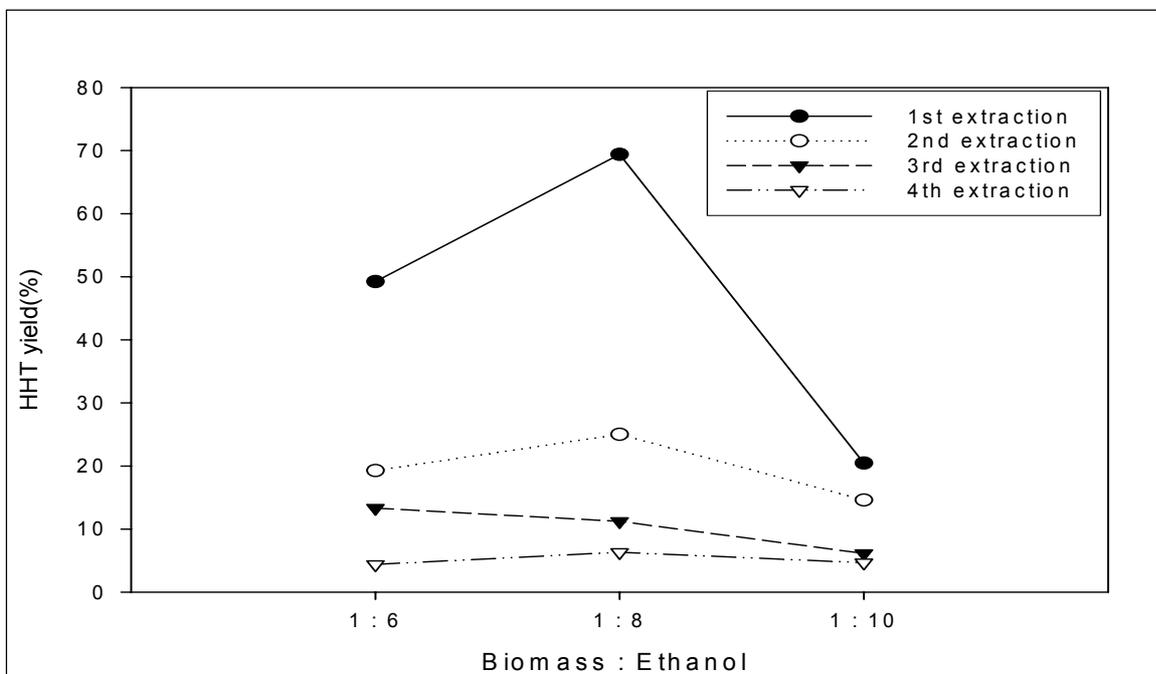


Figure1. Effect of ethanol amount on homoharringtonine(HHT) yield.