

산국으로부터 항암활성 성분의 분리

남상해* · 양민석

경상대학교 농화학과, 식물분자생물학연구소

초록 : 60종의 생약의 methanol 추출물을 L1210세포에 대하여 1차스크리닝실험을 수행하여 항암활성물질을 검색하고, 그 중에서 비교적 세포독성이 강하게 나타나는 산국(*Chrysanthemum boreale* M.)에서 항암활성물질을 분리정제하였다. 산국의 용매분획물의 L1210, K562, A549세포에 대한 세포독성실험에서는 chloroform 분획에서 ED₅₀값이 각각 3.98, 4.28, 3.84 (µg/ml)로 나타났다. 이 chloroform 분획에서 유효세포독성물질을 정제하여 Compound I과 Compound II를 각각 얻었으며, 이 중에서 Compound I은 L1210, K562, A549세포에 대하여 각각 ED₅₀값이 0.55, 0.0003, 0.001 (µg/ml)로 강한 세포독성을 나타내었으나, Compound II는 K562에 대해서만 ED₅₀값이 4.79 (µg/ml)의 세포독성을 나타내었다(1995년 3월 16일 접수, 1995년 4월 20일 수리).

서 론

과학기술의 발달이나 물질의 풍요와 함께 의료수준도 급격히 향상되었으나, 자연환경의 오염, stress의 증가, 방부제를 비롯한 기타 식품첨가물이 함유된 인스턴트 식품의 과다활용등으로 인한 발암성물질 및 자극에 쉽게 접근하게 되어 세계적으로 암으로 인한 사망율이 날로 증가하고 있는 실정이다. 20세기에 들어 암이라는 질병이 인간에게 부각되어 암의 치료에 많은 신경을 쓰기 시작하였으나 현재 사용되고 있는 암치료제의 대부분이 합성화학약품이나 방사선을 이용한 것으로서, 이들은 대개가 강한 독성을 보이고 있으며, 특히 면역 및 조혈기능에 심각한 장애를 나타낸다.^{1,2)}고 알려져 있어 효과적인 치료에 많은 문제점들이 나타나고 있는 실정이다. 뿐만 아니라, 이들 항암제에 대한 암세포의 내성이 쉽게 발현되기도 하여 재발의 경우가 빈번하여 부작용이 적은 천연 항암제를 개발하는 것이 절실히 요구되고 있다.

본 연구에 사용한 산국은 국화과에 속하는 야생국화로서 한방에서 주로 두통, 제풍열, 청혈해독등에 주로 사용되고 있는데 우리나라에서 민간요법에 이용되는 것은 종기의 통증을 멎게 하는데 있을 잔 즙이 효과가 있다고 하며, 현대 의학적 연구로도 산국꽃의 추출물에는 중추신경의 진정작용이나, 혈압강하작용, 결핵균 및 각종 바이러스에 대한 억제효과가 있다는 것이 증명되었고,^{3,4)} 폐암과 간암에도 효과가 있는 것으로 알려져 있으나,⁵⁾ 그 성분에 대한 명확한 연구가 이루어지지 않고 있다.

재료 및 방법

실험재료

생약재료

찾는말 : *Chrysanthemum boreale* M., antitumor, cytotoxicity, leukemia, human lung carcinoma

*연락처자

주목(*Taxus cuspidata*) 잎 외 37종은 진주 및 진양지역의 한약방에서 구입하였으며, 제비꽃(*Viola mandshurica*)의 21종은 서부경남 일대의 야산에서 채취하여 대한식물도감⁶⁾과 원색한국약용식물도감⁷⁾ 등을 참고로 동정하였으며, 음지에서 건조하여 실험재료로 사용하였으며, 이 중에서 일부는 -70°C의 밀폐된 용기에 보관중이다.

암세포주

본 실험에 사용한 암세포주는 L1210 (mouse leukemia cell), K562 (human chronic myelogenous leukemia cell), A549 (human lung carcinoma cell)로서 충남대학교 약학대학에서 분양 받아 사용하였다.

L1210 세포의 배양

배양액은 Fisher's medium 1pk (10.5 g), NaHCO₃ (1.125 g), penicillin G (100,000 units) 그리고 streptomycin (100 mg)을 섞어 용해시키고, 전체의 량이 900ml 일때 pH를 7.2가 되도록 조절하였으며, 사용시에는 적정량을 분취한 후, 최종농도가 10%가 되도록 horse serum을 첨가하고 membrane filter (0.2 µm)로서 세균을 여과하여 사용하였다.

K562 세포의 배양

K562 세포는 일주일에 2번씩 계대배양하였으며, 배양액은 RPMI1640 1pk (10.4 g), NaHCO₃ (2 g), penicillin G (100,000 units) 그리고 streptomycin (100 mg)을 넣어 용해시키고, 전체의 량이 900 ml 일때 pH를 7.2가 되도록 조절하였으며, 사용시에는 적정량을 분취하여 최종농도가 10%가 되도록 fetal bovine serum (FBS)을 첨가한 후, membrane filter (0.2 µm)로서 세균을 여과하여 사용하였다.

A549 세포의 배양

배양액은 K562 세포와 마찬가지로 RPMI1640 배지를 사용하여 조제하였으며, FBS의 최종농도가 5%가 되도록 첨가하여 사용하였다.

방법

시료의 조제

각 생약 100 g을 methanol로서 24시간씩 2회 가열추출하여 여과하고 감압농축한 후, 추출물을 10 mg/ml의 농도가 되도록 DMSO (dimethylsulfoxide)에 녹여 시료 용액으로 하였다.

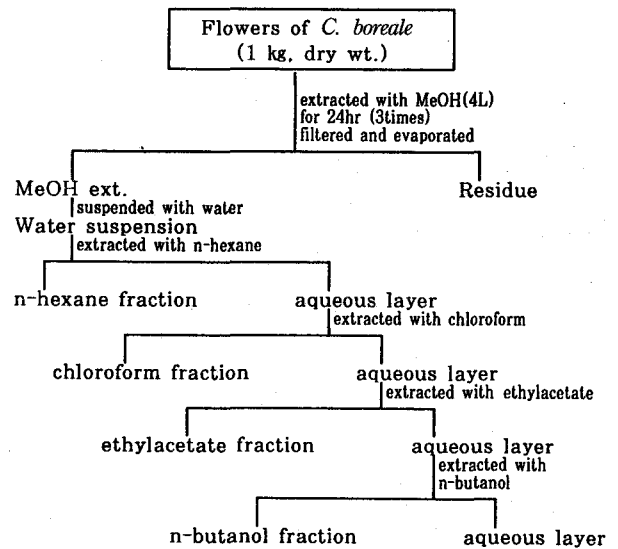
세포독성실험

L1210과 K562 세포에 대한 세포독성실험

세포를 $2\sim 3 \times 10^5$ cells/ml 농도가 되도록 조정 한 후 하룻밤 동안 배양하여 배양액중의 세포의 농도가 약 1×10^6 cells/ml이 되도록 하였다. 세포를 세포독성실험 직전에 37°C의 신선한 배지로 5×10^4 cells/ml의 농도로 희석하여 세포현탁액을 만들었다. 시료는 실험직전에 DMSO에 용해시켰으며, 이 시료용액 0.1 ml에 다시 신선한 배지 0.9 ml를 가해 10배 희석하였다. 이 시료희석액을 시험관에 각각 20, 10, 5 μ l를 가하고, 세포현탁액을 3 ml씩을 넣었다. 대조군의 시험관은 3 ml의 세포현탁액만을 넣었다. 이것을 37°C, CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 세포수를 계산하였다. 실험은 3회 이상 반복하여 각각을 평균하여 ED₅₀값을 계산하였으며, 5-fluorouracil (5-FU)과 세포독성을 비교하였다.

A549 세포에 대한 세포독성실험

A549세포는 세포독성실험 직전에 A549 세포에 37°C의 trypsin-EDTA용액을 약 10 ml 넣고, 37°C에서 1~2분간 방치하면 세포가 서로 떨어지기 시작하는데, 이때 상등액을 조심스럽게 버리고 RPMI1640 배지를 넣어 세포의 수가 8×10^4 cells/ml이 되도록 희석한다. 이 세포희석액을 1 ml씩을 24-well microplate에 넣고 37°C, CO₂ 배양기에서 24시간 배양한다. 시료희석액은 20, 10, 5 μ l씩을 취하여 각각 2개씩의 홈에 넣고, 그 위에 다시 순수한 배지 1 ml씩을 넣는다. 대조군은 1 ml의 배지만을 넣고, 37°C, CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후, SRB assay법⁸⁾으로 세포독성을 측정하였다. 즉, SRB assay의 실험방법은 24-well microplate의 배지를 조심스럽게 버리고, 0.9%-NaCl 1 ml로서 한번 닦은 후, 15% trichloroacetic acid (TCA, 4°C) 1 ml를 넣어 4°C에서 1시간 방치하여 세포를 microplate의 바닥에 완전히 부착시킨다. TCA를 버리고 상수로 5회 씻어내고 잘 말린 후, 1% acetic acid에 녹인 0.4% sulforhodamine B (SRB)를 200 μ l 취하여 각각의 홈에 넣고 1시간 방치한다. 그 뒤 1% 초산으로 여분의 SRB를 완전히 행구어 낸다. 물기를 제거하고 말린 후 10 mM tris (hydroxymethyl)-aminomethane 용액을 1 ml씩을 각 홈에 가한 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다.



Scheme 1. Solvent fractionation of methanol extracts from *C. boreale* for cytotoxicity against L1210, K562 and A549 cells.

ED₅₀값의 결정

대조군의 50% 수준으로 암세포의 성장을 억제하는 시료의 농도(μ g/ml)로서 ED₅₀값을 결정하게 되며 Thayer 등⁹⁾의 방법에 의해 결정하였다.

세포독성물질의 분리

스크리닝실험 결과, 세포독성이 강하게 나타나는 생약에 대하여 세포독성물질을 분리하기로 하여 이 생약의 methanol 추출물을 Scheme 1과 같이 처리하였다.

Column chromatography

세포독성을 나타낸 용매분획을 silica gel (Merck, 70~230 mesh) 500 g을 충전시킨 column (ϕ 7.8 cm)에서 chloroform/acetone (100/1→10/1→1/1)을 용매로 1차 column chromatography를 실시하여 7개의 분획(Fr.1~Fr.7)으로 분리하였으며, silica gel (Merck, 230~400 mesh) 300 g을 충전시킨 column (ϕ 5 cm)에서 chloroform/acetone (5/1)을 용매로 하여 2차 column chromatography를 실시하여 32개의 소분획(fr.4-1~fr.4-32)으로 분리하였다.

Thin layer chromatography (TLC)

TLC용 plate는 precoated TLC plate (Merck, silica gel 60GF₂₅₄, 0.2 mm, Art.5554)를 사용하였으며, TLC후 발색은 10%-H₂SO₄를 도포한 후, 110°C로 가열하여 확인하였다.

TLC 및 HPLC에 의한 순도검정

정제된 유효세포독성물질을 TLC와 HPLC로서 순도검정을 하였다. TLC는 전항과 동일한 방법으로 하였으며, HPLC의 기종은 LKB LCC2252, column은 Shimpak CLC ODS (M ϕ 4.6×250 mm), 이동상의 용매는 methanol/water (65/35), 유속은 1 ml/min로 하였다. 또한 검

출기는 UV detector를 이용하여 210 nm에서 측정하였다.

결과 및 고찰

스크리닝실험

생약 60종의 methanol 추출물들의 시험관내 cytotoxicity를 스크리닝 한 결과는 Table 1과 같다.

Table 1에서 보는 바와 같이 백두구를 비롯한 16종의 생약에서 L1210세포에 대한 세포독성을 나타내었는데, 이 중 전호, 반하, 의이인, 백두공, 인경쑥, 주목잎, 울금 등 7종의 생약에서는 비교적 낮은 독성을 나타내었고, 백두구, 초과, 석산, 주목줄기, 눈주목잎, 물봉선, 택사등 7종의 생약에서는 중정도, 산국, 눈주목줄기 등 2종의 생약에서는 비교적 강한 세포독성을 나타내었다.

세포독성이 강한 2종의 생약중 주목에 대해서는 비교적 많은 연구가 이루어져, 이미 taxol이라는 물질이 분리되어 항암효과가 있다고 알려져 있다.¹⁰⁻¹⁴⁾

용매분획의 세포독성

Methanol 추출물을 n-hexane, chloroform, ethylacetate 와 n-butanol로서 차례로 용매분획한 후 L1210, K562, A549 세포에 대해 세포독성실험을 한 결과는 Table 2와 같다. Chloroform 분획에서 ED₅₀값이 L1210, K562과 A549에 대하여 각각 3.98, 4.28, 3.84 µg/ml로서 매우 강한 세포독성을 나타내었다. 뿐만 아니라, n-hexane 분획에서도 K562세포에 대하여 ED₅₀값이 8.36 µg/ml로서 상당히 높았으며, A549세포에 대하여는 19.25 µg/ml로서 세포독성이 낮았다. 그러나 ethylacetate와 n-butanol, water 분획에서는 본 실험에서 사용한 모든 세포에 대하여 세포독성이 없는 것으로 나타났다.

세포독성물질의 분리 및 정제

용매분획과 세포독성실험 결과, chloroform 분획에 유효세포독성물질이 함유되어 있을 것으로 생각하고. 이를 분리정제하기 위하여 column chromatography를 실시하였다. 즉, 1차 column chromatography에서는 chloroform 분획을 7개의 분획(Fr.1~Fr.7)으로 분리하였으며, 이 분획들에 대한 세포독성실험을 실시한 결과는 Table 3 과 같다. 즉 Fr.4에서 L1210, K562, A549 세포에 대하여 각각 ED₅₀값이 1.18, 1.41, 2.24 µg/ml로서 다른 분획들에 비해 월등히 높은 세포독성을 나타내었고, Fr.3과 Fr.5에서도 다소 높은 세포독성을 나타내었다. 또한 이 분획들에 대한 TLC 에서도 Fr.4에서 2개의 붉은색 반점(Rf. 0.17, 0.38)이 뚜렷이 나타났으며, 다른 분획들에서는 나타나지 않았으므로, 세포독성실험과 연관지어보면 2개의 붉은색 반점을 형성하는 물질이 유효세포독성 물질일 것으로 생각된다.

1차 column chromatography분획들의 TLC 에서 확인 된 2개의 붉은색 반점을 분리정제하기 위하여, Fr.4에 대하여 2차 column chromatography를 행하여 32개의

Table 1. Cytotoxicity of methanol extracts against L1210 mouse leukemia cells

Medicinal plants	Parts ^{a)}	ED ₅₀ (µg/ml)	Remarks ^{b)}
<i>Paeonia lactiflora</i> (작약)	R	>20	-
<i>Polygonum multiflorum</i> (하수오)	W	>20	-
<i>Scutellaria baicalensis</i> (황금)	R	>20	-
<i>Amomum Kravanh</i> (백두구)	FR	12.57	++
<i>Amomum tsao-ko</i> (초과)	FR	11.26	++
<i>Torreya nucifera</i> (비자)	FR	>20	-
<i>Myristica fragrans</i> (육두구)	FR	>20	-
<i>Coix lachryma-jobi</i> (의이인)	FR	19.21	+
<i>Brassica campestris</i> (유채)	FL	>20	-
<i>Akebia quinata</i> (복통)	S	>20	-
<i>Orostachys japonicus</i> (와송)	W	>20	-
<i>Pinellia ternata</i> (반하)	R	16.29	+
<i>Lycoris radiata</i> (석산)	R	13.18	++
<i>Portulaca oleracea</i> (쇠비름)	W	>20	-
<i>Melandryum firmum</i> (장구채)	FR	>20	-
<i>Artemisia capillaris</i> (인경쑥)	H	17.16	+
<i>Ulmus davidiana</i> (느릅나무)	T	>20	-
<i>Chrysanthemum indicum</i> (감국)	FL	>20	-
<i>Chrysanthemum boreale</i> (산국)	W	6.40	+++
<i>Taraxacum platycarpum</i> (포공영)	W	>20	-
<i>Taxus cuspidata</i> (주목)	L	15.52	+
<i>Taxus cuspidata</i> (주목)	S	10.28	++
<i>Taxus caespitosa</i> (눈주목)	L	14.17	++
<i>Taxus caespitosa</i> (눈주목)	S	9.27	+++
<i>Phellodendron amurense</i> (황백)	B	>20	-
<i>Paeonia suffruticosa</i> (목단)	B	>20	-
<i>Morus alba</i> (상백)	B	>20	-
<i>Acanthopanax sessiliflorum</i> (오갈피)	RB	>20	-
<i>Magnolia officinalis</i> (후박)	B	>20	-
<i>Curcuma longa</i> (울금)	R	17.24	+
<i>Peucedanum decursivum</i> (전호)	R	17.65	+
<i>Lonicera japonica</i> (금은화)	FL	>20	-
<i>Selaginella tamariscina</i> (부처손)	W	>20	-
<i>Liguticum wallichii</i> (토친궁)	R	>20	-
<i>Osmunda japonica</i> (고비)	W	>20	-
<i>Pulsatilla koreana</i> (백두공)	R	18.27	+
<i>Populus maximowiczii</i> (황철)	L	>20	-
<i>Viola mandshurica</i> (제비꽃)	W	>20	-
<i>Patrinia scabiosaeifolia</i> (마타리)	W	>20	-
<i>Leonurus sibiricus</i> (익모초)	W	>20	-
<i>Juniperus chinensis</i> (향나무)	L	>20	-
<i>Albizia julibrissin</i> (자귀나무)	T,L	>20	-
<i>Hibiscus syriacus</i> (무궁화)	L	>20	-
<i>Trapa bispinose</i> (마름)	L,FR	>20	-
<i>Pittosporum tobira</i> (돈나무)	L,FR	>20	-
<i>Impatiens textori</i> (물봉선)	W	14.78	++
<i>Celtis sinensis</i> (팽나무)	T,L	>20	-
<i>Chrysanthemum zawadskii</i> (구절초)	W	>20	-
<i>Equisetum arvense</i> (쇠뜨기)	W	>20	-
<i>Agastache rugosa</i> (방아풀)	W	>20	-
<i>Clematis florida</i> (위령선)	R	>20	-
<i>Liriope platyphylla</i> (맥문동)	R	>20	-
<i>Sinomenium acutum</i> (방기)	R	>20	-
<i>Atractylodes japonica</i> (창출)	R	>20	-
<i>Curcuma zedoaria</i> (봉출)	R	>20	-
<i>Dioscorea japonica</i> (산약, 마)	R	>20	-
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> (지모)	R	>20	-
<i>Gastrodia elata</i> (천마)	R	>20	-
<i>Asparagus cochinchinensis</i> (천문동)	R	>20	-
<i>Alisma orientale</i> (택사)	R	14.54	++

^{a)}W, whole plant; T, twig; L, leaf; FR, fruit; FL, flower; S, stem; H, herb; R, root; B, bark; RB, root bark ^{b)}+++ , ED₅₀ ≤ 10; ++, 10 < ED₅₀ ≤ 15; +, 15 < ED₅₀ ≤ 20; -, ED₅₀ > 20.

Table 2. Cytotoxicity of the solvent fractions from *C. boreale* against L1210, K562 and A549 cells

Fractions	ED ₅₀ value (μg/ml) ^{a)}		
	L1210	K562	A549
n-Hexane	>20	8.36	19.25
Chloroform	3.98	4.28	3.84
Ethylacetate	>20	>20	>20
Buthanol	>20	>20	>20
Water	>20	>20	>20
5-fluorouracil ^{b)}	0.02	0.18	1.54

^{a)}Cytotoxicity of these fractions was evaluated by the procedure of Thayer *et al.* ^{b)}The value indicate for the range of ED₅₀ of each test.

Table 3. Cytotoxicity of the fractions of chloroform fraction from *C. boreale* against L1210, K562 and A549 cells

Fractions	ED ₅₀ value (μg/ml)		
	L1210	K562	A549
Chloroform fr.	4.21	4.76	3.17
Fr.1	>20	19.99	>20
Fr.2	>20	10.80	>20
Fr.3	7.34	6.14	9.20
Fr.4	1.18	1.41	2.24
Fr.5	9.16	6.63	>20
Fr.6	>20	8.49	>20
Fr.7	>20	15.66	>20
5-fluorouracil	0.015	0.24	1.80

소분획(fr.4-1~fr.4-32)으로 분리하였다. 이 소분획들의 TLC에서 fr.4-10~fr.4-16 (Rf. 0.60)와 fr.4-20~fr.4-21 (Rf 0.31)의 위치에 붉은색 반점들이 나타났다. 이 두 물질을 각각 diethylether/ethylacetate (1/1)와 methanol로서 재결정화하였으며 모두 백색 침상의 결정을 형성하였다. 이들을 편의상 Compound I (Rf 0.60)과 Compound II (Rf 0.31)라고 부르기로 하였다.

TLC에 의한 순도검정

정제한 Compound I과 II를 chloroform에 녹여 TLC 하여 순도를 검정하였다. 그 결과 Rf. 0.65와 0.32에서 붉은색의 단일 반점을 형성하여 이 물질들이 거의 정제되었음을 알 수 있었다.

HPLC에 의한 순도검정

Compound I과 II에 대한 순도검정을 위하여 HPLC를 실시한 결과, 보유시간 (RT)이 Compound I은 9.24 min에서, Compound II는 23.84 min에서 나타났으며, 각각의 순도는 98.7%, 97.6%임을 확인하였다.

정제된 물질의 세포독성

정제된 물질, 즉 Compound I과 II의 L1210, K562 및 A549 세포에 대한 세포독성실험결과에서 Compound I은

Table 4. Cytotoxicity of Compound I and II against L1210, K562 and A549 cells

Compounds	ED ₅₀ value (μg/ml)		
	L1210	K562	A549
Compound I	0.55	0.0003	0.001
Compound II	25.78	4.79	19.14
5-fluorouracil	0.03	0.19	1.47

L1210, K562, A549 세포에 대해 ED₅₀값이 0.55, 0.0003, 0.001 μg/ml로서 모두 매우 높은 세포독성을 나타내었으나, Compound II는 이 세포들에 대해서 25.78, 4.79, 19.14 μg/ml로서 K562에 대해서만 꽤 높은 세포독성을 나타내었으나, L1210과 A549에 대해서는 아주 낮거나 거의 세포독성이 나타나지 않았다. 따라서 지금까지 산국으로부터 유효세포독성물질을 추적해 본 결과, Compound II보다 Compound I이 본 논문에서 실험한 암세포에 대하여 아주 강력한 세포독성물질인 것으로 생각되었다.

감사의 글

이 논문은 경상대학교 식물분자생물 및 유전자조각 연구소(PMBBRC)의 연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과와 일부로서 깊은 감사를 드립니다.

참고 문헌

- Jang, I. M., J. H. Kim and D. S. Han (1982) Toxicological evaluation of medicinal plants used for herbal drugs (IV), Acute toxicity and antitumor activity. *Kor. J. Pharmacogn.* **13**, 62-69.
- Jang, I. M. and H. J. Chi. (1982) Toxicological evaluation of medicinal plants used for herbal drugs (III), Cytotoxicity and antitumor activities against Glioma (9 ASK). *Kor. J. Pharmacogn.* **13**, 55-61.
- 최영진 (1992) 한국민속식물. 아카데미서적
- DanBensky and G. Andrew (1986) in Chinese Herbal Medicine. *Eastland Press, Seattle.* p.59.
- 김수철 (1993) 東洋資源植物學會, 1993年度 天然抗癌資源의 開發에 關한 國際學術會議-백두산 항암식물 유전자원의 조사연구
- 이창복 (1989) 대한식물도감. 향문사 서울 p.648.
- 육창수 (1990) 원색한국약용식물도감. 아카데미서적 p 536-537.
- Schdiero, D. A., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff, and M. R. Boyd (1988) Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* **48**, 4827-4833.
- Thayer, P. S., P. Himmelfarb and G. L. Watts (1971) Cytotoxicity assay with L1210 cells *in vitro* Comperison with

- L1210 cells *in vitro* and KB cells *in vitro*. *Cancer Chemother. Rep. (Part 2)* **2**, 1.
10. Appendino, G., P. Gariboldi, A. Pisetta, E. Bombarelli and B. Gabetta (1992) Taxanes from *Taxus baccata*, *Phytochemistry* **31**, 4253-4257.
11. Appendino, G., P. Lusso, P. Gariboldi, E. Bombardelli and B. Gabetta, (1992) A 3,11-cyclotaxane from *Taxus baccata*. *Phytochemistry* **31**, 4259-4262.
12. Chu, A., J. Zajicek, L. B. Davin, N. G. Lewis and R. B. Croteau (1992) Mixed acetoxo benzoxy taxane ester from *Taxus brevifolia*. *Phytochemistry* **31**, 4249-4252.
13. Das, B., K. V. N. S. Srinivas and Yadav (1993) Phenolics from needles of himalayan *Taxus baccata*. *Phytochemistry* **33**, 1489-1491.
14. Kingston, D. G., G. Samaranyake and C. A. Ivey (1990) The chemistry of taxol, a clinical useful anticancer agent. *J. Nat. Prod.* **53**, 1-12.

Isolation of Cytotoxic Substances from *Chrysanthemum Boreale* M.

Sang-Hae Nam* and Min-Suk Yang (Department of Agricultural Chemistry, Plant Molecular Biology and Biotechnology Research Center, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea)

Abstract: Sixty kinds of medicinal plants were examined upon the cytotoxicity against L1210 mouse leukemia cells. Isolation and purification of effective antitumor substances from *Chrysanthemum boreale* had been performed which appeared strong cytotoxicity. In cytotoxicity test of the each solvent fractions, ED₅₀ values of chloroform fraction against L1210, K562 and A549 cells were shown as 3.98, 4.28, 3.84 (μg/ml), respectively. Compound I and II were purified from the chloroform fraction. Between the purified compounds, ED₅₀ values of Compound I against L1210, K562 and A549 cells were shown as 0.55, 0.0003, 0.001 (μg/ml), respectively. Whereas Compound II was shown as 4.79 against K562.

*Corresponding author