

한국산 개비자(*Cephalotaxus koreana*)에서의 Harringtonine과 Homoharringtonine의 확인 및 함량 분석

박 호 일 · 이 연 · 이 현 채 · 윤 차 원 · 이 계 숙 · *권 기 락 ·
**이 인 · 신 동 수 · †주 우 홍

창원대학교 생물학과, *화학과, **인제대학교 기초과학연구소

Identification of Harringtonine and Homoharringtonine and Their Contents in Korean Native Plumyew(*Cephalotaxus koreana*)

Ho Il Park, Yŏn Lee, Hyun Chae Lee, Cha-Won Yun, Gye-Suk Lee, Gi-Rak Kwon*, Yeehn Yeeh**, Dong-Soo Shin*, and Woo Hong Joo†

Dept. of Biology, *Dept. of Chemistry, Changwon Nat'l. Univ., Changwon, Kyungnam 641-773, Korea

**Institute of Basic Sciences, Inje Univ., Kimhae, Kyungnam 621-749, Korea

ABSTRACT

Harringtonine and homoharringtonine known as anti-cancer agents were isolated from Korean native plumyew(*Cephalotaxus koreana*) using column chromatography(CHCl₃:MeOH=19:1, R_f=0.28). The structure of the mixture of two compounds was characterized by ¹H-NMR. Comparison of our spectra of harringtonine and homoharringtonine with previously reported ones indicated that the two are identical. The contents of harringtonine and homoharringtonine in the needles, stems, and roots of Korean native plumyew were determined by high performance liquid chromatography(HPLC). The contents of both compounds varied with the site of location and the part of plant. The content of harringtonine was higher in needles and roots than in stems, whereas the content of homoharringtonine was lower than harringtonine. Homoharringtonine contents in needles at Mt. Palgong, Mt. Dukyu, Mt. Baekyang, Mt. Jiri, and Namhae were higher than in stems and roots. But homoharringtonine contents in needles at Mt. Jokye and Jindo were lower than in stems and roots.

서 론

의학과 화학요법이 급진적으로 발달하여 왔음에도 불구하고 전이성이 높은 암은 인류의 주요 사망요인이 되고 있으므로 암을 극복하고자 하는 인류에게는 항암제의 개발이 주요 관심사이다. 식물, 동물, 미생

물은 항암제의 주요 탐색 및 공급원으로 인류의 생존을 위한 연구대상으로 계속적으로 주목을 받고 있다. 식물의 2차 대사물질은 일찍이 생약으로 이용되어 왔고, 이러한 경험과 실증적인 결과로부터 신약들이 개발되어 왔다.

최근 태평양 주목(*Taxus brevifolia*)에서 항암활성이 우수한 taxol이 개발되어 임상 실험에서도 효과가 있는 것이 검증되었다(1-2). Taxol은 미국

† Corresponding Author

FDA에서 판매 허가를 받아 Bristol Myer Squibb에 의하여 시판되고 있다. Taxol 이외에도 암 화학요법제로서 궁극적으로 개발될 수 있기에 계속적으로 연구가 진행되고 있는 식물기원화합물은 homoharringtonine, camptothecin 등이 있다(3). 그 외에도 다양한 화합물 즉 baccharin, bruceantine, ellipticine, holacanthone, indicine N-oxide, mytansine 등이 임상실험 중이거나 개발여부가 검토되고 있다(4). 국내산 주목(*Taxus cuspidata*)에서 taxol 생산을 위한 기초적인 추출법과 분석방법이 확립되었으며 세포배양을 통한 최적 생산조건에 관한 연구가 몇 그룹의 연구자들에 의하여 진행되고 있다(5-9).

한편 homoharringtonine도 현재 미국 FDA의 판매허가에 대한 심의가 진행되고 있으므로 장래 허가가 예상되고 있다. Harringtonine과 homoharringtonine은 cephalotaxine ester 유도체로서 일본산 개비자(*Cephalotaxus harringtonia*)에서 분리 보고되어 P388 leukemia, L1210 leukemia, B16 melanoma 세포에 대하여 항암활성이 있음이 확인되었으며, 특히 vincristine에 내성인 P388세포에 대하여서도 효과가 있음이 보고되고 있다(10). 개비자(*Cephalotaxus*)에는 9개 종이 알려져 있는데 이들중 7종이 중국에 자생하고 있고, *Cephalotaxus harringtonia*는 일본에서 자라고 있으며 *C. koreana*는 우리나라에서 자생하고 있다. 한국 개비자(*C. koreana*) 외에 개비자 8종에 대한 cephalotaxine ester 등은 연구되어 있으나 한국 개비자에서는 연구되지 않고 있다. 장래 homoharringtonine이 시판되기 전에 한국 개비자에서 homoharringtonine에 대한 기초적인 연구를 선도적으로 하고 연구와 세포배양을 통한 대량생산 방법을 확립하면 수입 대체 효과와 국내 기술 축적 등 학문적으로나 실용적인 의미에서 중요한 가치가 있다고 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 1차적으로 한국 개비자에서 harringtonine과 homoharringtonine의 유무를 확인하여 그 화학구조를 동정하고자 하였으며 지역별, 부위별 함량에 대한 기초조사를 수행하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재료

우리나라에서 자생하고 있는 한국 개비자에서 harringtonine과 homoharringtonine의 생산여부와 화학 구조 확인 및 함량변이를 조사하기 위하여

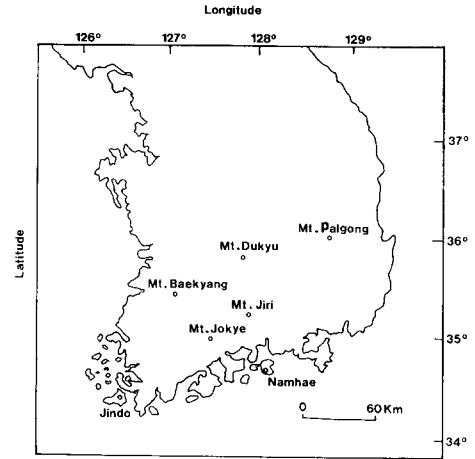


Fig. 1. Sample sites of Korean native plumyew (*Cephalotaxus koreana*). 1: Mt. Palgong, 2: Mt. Dukyu, 3: Mt. Baekyang, 4: Mt. Jiri, 5: Mt. Jokye, 6: Namhae, 7: Jindo. All samples were collected in May, 1995.

Fig. 1에 나타난 7개 지역으로부터 1995년 5월에 개비자를 채집하여 잎과 줄기, 뿌리를 각각 분리하였다. 채취된 각 시료를 잘게 잘라 50°C에서 24시간 건조시킨후 분쇄기를 이용하여 표준망체(200~250 mesh)를 통과할 수 있도록 분말로 만들어 -20°C에 냉동 보관하여 분석에 사용하였다.

Harringtonine 및 Homoharringtonine의 추출

건조분말을 ethanol로 24시간 추출하여 얻어진 추출액을 40°C에서 감압여과하였다. 농축액을 증류수에 녹여 pH 3-4로 조정후 4°C에서 하루동안 방치하였다. 방치한 시료를 원심분리하여 상등액을 분리하였으며 침전물은 6% tartaric acid에 녹여 다시 원심 후 상등액을 합하여 pH 7.5로 조정하였다. Chloroform으로 2번 추출후 chloroform 가용부분을 감압농축하였으며 농축액은 methanol에 녹여 보관하였다. 보관 추출액의 일정량은 0.45µm filter로 여과하여 고속 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography: HPLC)로 정량분석하였다.

Harringtonine과 Homoharringtonine의 분리 및 확인 추출 농축액을 column chromatography(silica

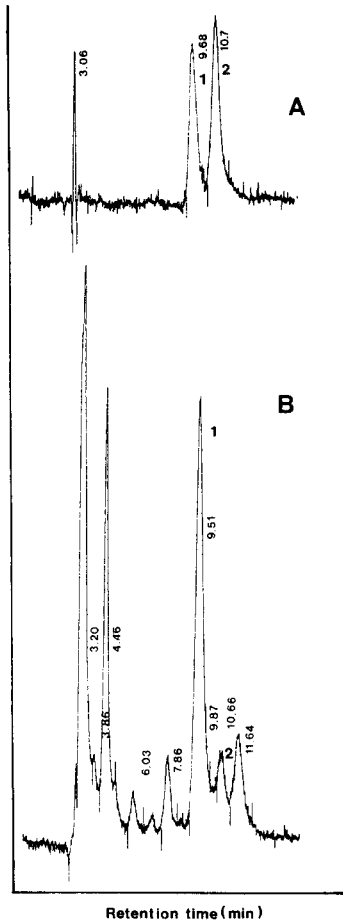


Fig. 2. HPLC chromatography of authentic harringtonine and homoharringtonine form (A) and extracts from korean native plummyew(*Cephalotaxus koreana*) A: Authentic compounds, B: Extracts, 1: Harringtonine, 2: Homoharringtonine.

gel)를 사용하여 $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}=19:1$ 의 용매조건 ($R_f=0.28$)으로 harringtonine과 homoharringtonine을 분리하였다. 분리한 harringtonine과 homoharringtonine의 구조를 $^1\text{H-NMR}$ spectrometer (Varian unit 300; 300MHz)를 사용하여 확인하였으며, 내부기준물질로 tetramethylsilane(TMS)을 사용하였으며, 화학적 이동(chemical shift, δ)은 ppm값으로 나타내었다.

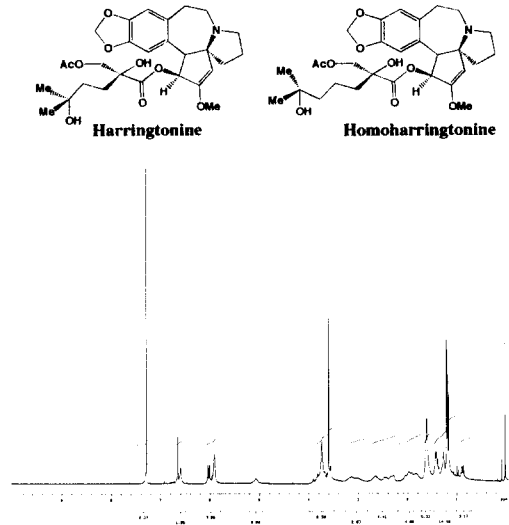


Fig. 3. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum for the mixture of harringtonine and homoharringtonine in CDCl_3 .

Harringtonine과 Homoharringtonine의 정량분석
Harringtonine과 homoharringtonine의 분석은 Chan 등(11)의 방법을 이용하였다. HPLC분석은 μ -bondapak CN steel column(3.9 300mm, Waters)을 이용하였고 표준 harringtonine과 homoharringtonine을 비교하여 정량분석하였으며, 기기는 Termo separation products R1500 HPLC system을 이용하였다. 용출액(15mM phosphate buffer pH 7.1 : acetonitrile, 80 : 20, v/v)의 유속은 1mL/min로 하였고 각 화합물의 검출은 amperometric detector(Dionex, PAD-2, U.S.A.)로 하였으며 glassy carbon전극은 Ag/AgCl 대조전극에 대해 +1.0v산화전위를 유지하였다. 이때 harringtonine 및 homoharringtonine의 retention time는 각각 9.68분, 10.73분이었다(Fig. 2).

결과 및 고찰

한국 개비자에서 harringtonine과 homoharringtonine의 구조 확인 및 함량을 분석하였다. 한국 개비자에서 harringtonine과 homoharringtonine을 각각 정제하고자 하였으나 harringtonine과 homoharringtonine의 혼합물로 분리하였다. Harringtonine과 homoharringtonine을 각각 분리하기 어려

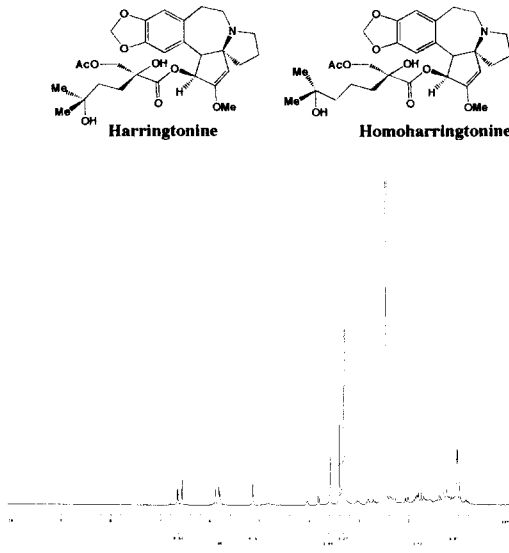


Fig. 4. The $^1\text{H-NMR}$ spectrum for the mixture of harringtonine and homoharringtonine in DMSO-d_6 .

은 이유는 harringtonine과 homoharringtonine는 거의 같은 화학구조를 가지고 있기 때문일 것이다. 이들은 cephalotaxine고리의 3번 탄소위치에 히드록시기의 H대신에 치환기가 치환되어 있는 에스테르 화합물 구조이다. Harringtonine은 에스테르기에 6개의 탄소가 연결되어 있고, 에스테르기의 2번 탄소위치에 히드록시기와 메틸아세틸기가 있으며, 5번 탄소위치에 히드록시기와 메틸기가 위치해 있다. 한편 homoharringtonine은 harringtonine보다는 에스테르기에 1개의 탄소가 더 많이 연결된 7개의 탄소가 연결되어 있으며, 2번 탄소위치에 히드록시기와 메틸아세틸기가 있으며, 6번 탄소에 히드록시기와 메틸기가 위치해 있다. 이와 같이 harringtonine과 homoharringtonine의 차이가 메틸렌기 하나 차이이기 때문에 column chromatography로 harringtonine과 homoharringtonine을 각각 분리하지 못하고 harringtonine과 homoharringtonine의 혼합물로 분리하였다. 분리한 harringtonine과 homoharringtonine의 혼합물을 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에 의해 화학구조를 확인하였다.

Fig. 3에는 CDCl_3 용매속에서 harringtonine과 homoharringtonine의 혼합물의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 나타내었다. Harringtonine과 homoharring-

tonine 혼합물의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼에서 보면 harringtonine구조의 1번 탄소에 위치해 있는 양성자가 단일선(singlet)으로 5.07 ppm에서, 3번 탄소에 위치해 있는 양성자가 4번 탄소와 커플링하여 이중선(doublet)으로 6.01 ppm에 나타나 있으며, 14번과 17번 탄소에 위치해 있는 방향족 수소가 6.65 ppm과 6.59 ppm에서 나타나 있으며, 4번 탄소에 위치해 있는 양성자는 3.80 ppm에서 이중선으로 나타나있는 것을 확인할 수 있었다. 한편 15번과 16번 탄소에 연결되어 있는 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 의 양성자가 5.90 ppm에서 단일선으로 나타나 있으며, 2번 탄소에 위치한 메톡시기가 3.68 ppm에서 단일선으로 나타나 있는 것을 확인할 수 있었다. 에스테르기의 2번 탄소에 위치한 아세틸기의 양성자가 3.58 ppm에서 나타나 있으며, 5번 탄소에 위치한 두개의 메틸기가 1.18 ppm에서 단일선으로 나타나 있으며, 3번과 4번 탄소에 위치한 메틸렌기가 2.0 ppm 부근에서 나타나 있는 것을 확인할 수가 있었다.

한편, Harringtonine과 homoharringtonine의 혼합물속에 존재하는 히드록시기를 확인하기 위해 의해 시료를 DMSO-d_6 용매속에서 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 얻었다(Fig. 4). 얻어진 스펙트럼에 의하면 4.82 ppm과 4.10 ppm에서 두개의 히드록시기를 넓은 단일선으로 확인할 수가 있었다. DMSO-d_6 용매를 사용하여 얻은 스펙트럼에 D_2O 를 첨가한 후에 얻은 NMR스펙트럼에서 두 개의 히드록시기에 의한 단일선이 없어졌다. 이상으로 본 실험에서 얻은 harringtonine과 homoharringtonine의 혼합물의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼 자료와 문헌에 알려진 화학적 이동 및 분열 형태(12)를 비교하여 harringtonine과 homoharringtonine의 구조를 확인할 수가 있었다.

Direct probe방법에 의해 얻은 harringtonine과 homoharringtonine의 혼합물의 질량분석기 스펙트럼에서는 harringtonine의 M^+ 피크(m/e 531)와 homoharringtonine의 피크(m/e 545)를 확인할 수 없었지만 harringtonine의 특징적 피크인 m/e 298 (M^+-233)와 homoharringtonine의 특징적 피크인 m/e 298 (M^+-247)을 확인함으로써 한국 개비자에서 항암제로 알려진 harringtonine과 homoharringtonine의 화학구조를 확인할 수가 있었다(unpublished data). 그러므로 한국 개비자에서도 harringtonine과 homoharringtonine이 생산됨이 확인되었다.

다음으로 한국 개비자로부터의 harringtonine과 homoharringtonine의 함량을 조사하였다. 한국 개

Table 1. The Contents of Harringtonine and Homoharringtonine in the Needles, Stems, and Roots of *Cephalotaxus Koreana*.

Location	Harringtonine			Homoharringtonine		
	Needle	Stem	Root	Needle	Stem	Root
Mt. Palgong	34.8 ± 9.9	37.9 ± 12.6	ND	38.0 ± 11.9	16.2 ± 3.2	ND**
Mt. Dukyu	ND	ND	ND	22.2 ± 6.6	10.7 ± 2.9	11.1 ± 3.4
Mt. Baekyang	ND	ND	ND	25.0 ± 5.4	4.6 ± 1.3	14.6 ± 3.5
Mt. Jiri	40.9 ± 4.3	9.7 ± 0.7	14.7 ± 8.0	28.1 ± 6.7	14.7 ± 2.8	16.7 ± 1.8
Mt. Jokye	143.9 ± 58.0	111.5 ± 13.9	155.1 ± 21.9	9.9 ± 1.9	10.9 ± 0.6	19.0 ± 4.2
Namhae	77.0 ± 21.3	58.7 ± 5.1	65.1 ± 20.3	29.8 ± 1.3	13.5 ± 2.6	25.9 ± 5.1
Jindo	36.1 ± 8.9	61.7 ± 20.7	51.3 ± 13.0	4.4 ± 1.3	5.9 ± 2.0	20.3 ± 4.4

* The contents(μg) of harringtonine and homoharringtonine was showed on the g dry weight in the needle, stem, and root (data represent means \pm standard deviations).

** ND ; not detected

비자에 함유되어 있는 harringtonine과 homoharringtonine의 함량을 조사하기 위하여 Fig. 1에 표시된 7개 지역으로부터 자생하고 있는 한국 개비자를 채취하였으며 진도에서 자생하는 개비자는 흉고직경이 30cm, 남해에 자생하는 개비자는 흉고직경이 5cm로 수령이 상당히 오래되었으나 나머지 지역은 수령이 수년 이하였다.

서식지별 부위별 함량은 harringtonine과 homoharringtonine의 표준시료 피크와 비교하여 면적 표준화법(area normalization)으로 결정하였으며 그 분석 결과는 Table 1에 나타내었다. Harringtonine과 homoharringtonine의 함량은 지역간 큰 변이를 보였다. Harringtonine은 대체로 잎과 뿌리에서 줄기보다 다소 함량이 높았으며, 조계산에서 자생하고 있는 개비자에 함량이 dry weight 기준으로 $136\mu\text{g}$ 이상으로 가장 높았으며, 잎, 줄기, 뿌리에서 전체적으로 다른 지역보다 많은 harringtonine을 함유함이 판명되었다. Homoharringtonine도 지역간에 다소 변이를 보였으나 잎에서의 함량이 dry weight 평균 $22\mu\text{g}$ 정도로 줄기, 뿌리에서 보다 다소 높았다. 조계산의 시료에서는 harringtonine의 함량이 homoharringtonine 보다 월등히 많았으나, 그 외의 지역에서는 harringtonine의 함량이 homoharringtonine 함량보다 다소 높았다. 조사지역중 잎의 homoharringtonine의 함량은 팔공산에서 dry weight $38\mu\text{g}$ 으로 가장 높았고, 다음은 남해($30\mu\text{g}$), 지리산($28\mu\text{g}$)에서 높았으나, 조계산과 진도의 시료에서는 $10\mu\text{g}$ 과 $4\mu\text{g}$ 로 타지역에 비해 상당히 낮은 수준이었다. 한편 Powell(12)에 의하면 일본 개비자(*C. harringtonia*)에서는 harringtonine과

homoharringtonine이 각각 dry weight당 $64\mu\text{g}$ 과 $61\mu\text{g}$ 이 함유되어 있었다고 보고되고 있다. 한국 개비자에는 harringtonine은 평균적으로 유사하게 함유되어 있으며, 조계산의 시료에서는 2-3배 정도 많이 함유되어 있었다.

그러나, homoharringtonine은 평균적으로 다소 작게 함유되어 있었다. 팔공산의 잎에서의 homoharringtonine의 함량이 $38\mu\text{g}$ 으로 함유량이 일본 개비자와 다소 비슷한 것으로 밝혀졌다.

그러므로 지속적으로 채취가 가능한 한국 개비자의 잎은 homoharringtonine 생산의 중요한 자원이 될 수 있을 것으로 기대된다. 개비자에서의 homoharringtonine 생산에 대한 환경적인 요인에 대하여는 조사가 되어 있지 않으나 위도상으로 남쪽보다는 북쪽으로 갈수록 harringtonine의 양이 감소하면서 homoharringtonine의 양이 증가하는 경향은 흥미있는 사실이다. 그러므로 우리나라에서 속리산까지 개비자가 서식하고 있으므로 좀더 서식지를 넓게 잡아 연구해 볼만한 가치가 있다고 생각된다. 한편 한국 개비자의 homoharringtonine 함량은 다소 적은 것으로 판명되었으나 삼목 등의 대량 재배방법의 확립과 세포배양을 통한 생산법의 확립을 통하여 이를 극복할 수 있을 것으로 기대되며 cephalotaxine의 함량이 dry weight $860\mu\text{g}$ 으로 전체 crude alkaloid의 54%을 차지하므로(13) 이를 기초로 한 새로운 반합성 방법의 연구로 연구용 및 임상용 물질을 공급할 수 있는 것으로 기대된다. 야외에 식재하여 재배했을 때 dry weight당 $0.18\mu\text{g}$ 까지 homoharringtonine이 감소한다는 보고(14)에서 여러 가지 재배조건을 탐구하여야 하며, 또한 callus유도 후

homoharringtonine의 생산량이 역시 0.015ug/g fresh wt.로 감소된다는 보고(15)에서도 여러 가지 측면에서의 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

한국산 개비자로부터 alkaloid계통의 성분인 harringtonine과 homoharringtonine의 혼합물을 column chromatography(CHCl₃:MeOH=19:1, R_f=0.28)로 분리, 정제하였다. 이 두 물질의 혼합물의 화학 구조는 ¹H-NMR에 의해 결정하였으며 이미 보고된 spectra와 이 두 물질의 혼합물의 spectra를 비교하여 harringtonine과 homoharringtonine임을 확인하였다. 한국산 개비자의 잎, 줄기, 뿌리에서의 harringtonine과 homoharringtonine의 함량은 고속액체 크로마토그래피에 의해 결정하였다. 두 물질의 함량은 서식지, 식물의 부위에 따라 상이하였다. Harringtonine의 함량은 줄기보다 잎과 뿌리에서 높았고, homoharringtonine의 함량은 harringtonine 함량보다 낮았다. 팔공산, 덕유산, 백양산, 지리산 및 남해에서의 잎의 homoharringtonine 함량은 줄기와 뿌리에서 높게 나왔으며, 조계산과 진도에서는 잎의 함량이 뿌리와 줄기에서 보다 낮았다.

참고 문헌

1. Wani, M. C., H. L. Taylor, H. E. Wall, P. C. Coggon, and A. T. McPhail(1971), Plant Antitumor Agents, VI. The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antineoplastic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325-2327.
2. Feldman, E., Z. Arlin, T. Ahmed, A. Mittelman, C. Puccio, H. Chun, P. Cook, and P. Baskind(1992), Homoharringtonine is Safe and Effective for Patients with Acute Myelogenous Leukemia, *Leukemia*, **6**(11), 1185-1188.
3. Kinghorn, A. D.(1993), The Discovery of Drugs from Higher Plants, The Discovery of Natural Products with Therapeutic Potential (V. P. Gullo, ed.), pp. 81-108, Butterworth-Heinemann, Boston.
4. Misawa, M. and T. M. Nakanishi(1988), Antitumor Compounds; Production by Plant Cell Culture, *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 4, Medicinal and Aromatic Plants, (Bajaj Y.P.S ed.), pp. 191-208, Springer-Verlag, Berlin.
5. Byun, S. Y., I. S. Kang, and K. H. Kim (1993), Taxol Content in Various Parts of Yew Trees in Korea, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 122-125.
6. Choi, M. -S., S.-S. Kwak, Y. -G. Park, and J. R. Liu(1994), Analysis of Taxol and Related Compounds in Ullung Island Yew (*Taxus cuspidata* var. *latifolia*), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 186-190.
7. Kwak, S. -S., M. -S. Choi, Y. -G. Park, J. -S. Yoo, and J. -R. Liu(1995), Taxol Content in The Seeds of *Taxus* spp., *Phytochemistry*, **40**, 29-32.
8. Choi, M.-S., S.-S. Kwak, J. R. Liu, Y.-G. Park, M.-K. Lee, and N.-H. An(1995), Taxol and Related Compounds in Korean Native Yews (*Taxus cuspidata*), *Planta Med.*, **61**, 264-266.
9. Kang, I. -S., J. -W. Jeon, S. -Y. Bahn, S. -B. Kim, S. -Y. Byun, D. -I. Kim, and H.-G. Chung(1994), Taxol Production in *Taxus* spp. Cell Cultures I. Studies on Taxol Content in Yew Trees and Cultured Plant Cells, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **9**, 299-305.
10. Takeda, S., N. Yajima, K. Kitazato, and N. Unemi(1982), Antitumor Activities of Harringtonine and Homoharringtonine, Cephalotaxus Alkaloids Which Are Active Principles from Plant by Intraperitoneal and oral administration, *J. Pharmacobiodyn.*, **5**, 841-847.
11. Chan, Y. -P., F. -W. Lee, and T. -S. S. Siu (1989), Quantitation of Homoharringtonine in Plasma by High-Performance Liquid Chromatography with Amperometric Detection, *J. Chromatography*, **496**, 155-166.
12. Powell, R. G.(1972), Structures of Homoharringtonine Alkaloids from *Cephalotaxus Harringtonia*, *Phytochemistry*, **11**, 1467-1472.
13. Powell, R. G., D. Weisleder, and C. R. Smith, Jr.(1972), Antitumor Alkaloids from Ceph-

- lotaxus harringtonia: Structure and Activity, *J. Pharmaceutical Science*, **61**, 1227-1230.
14. Misawa, M., M. Hayshi, and S. Takayama (1985), Acculation of Antineoplastic Agents by Plant Tissue Cultures. Primary and Secondary Metabolism of Plant Cell Cultures. (K. H. Neumann, W. Barz, and E. Reinhard eds.), pp. 235-246, Springer-Verlag, Berlin.
15. Delfel, N. E. and J. A. Rothfus(1977), Antitumor Alkaloids in Callus Cultures of *Cephalotaxus Harringtonia*, *Phytochemistry*, **16**, 1595-1598.