

최 증
연구보고서

개비자나무로부터 신규 항암·항균소재의 발굴 및 이를 이용한 고부가가치 임업산물의 개발

고기능성 개비자나무 우수개체신발 및 증식기승 개발에 관한 연구
개비자나무를 이용한 신기능성 물질 생산기술 개발에 관한 연구
개비자나무 유래 생물소재의 *in vitro* 생리활성 및 독성분석에 관한 연구
개비자나무 유래 생물소재의 *in vivo* 생리활성 및 독성분석에 관한 연구

연구기관

서울대학교
공주대학교
호서대학교
한국농업전문학교

농림자료실



0012280

농 립 부

요 약 문

I. 제 목

개비자나무로부터 신규 항암·항균소재의 발굴 및 이를 이용한 고부가가치 임업산물의 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

국내에는 1100여종의 유용 자생식물자원이 있는 것으로 알려져 있고 그 중 약 70%는 초본식물이고, 나머지 30% 정도가 목본식물이다. 이들 자생식물은 식용, 약용, 가축사료용, 산업용, 관상용, 목재용 등에 이용되고 있다. 주목나무의 표피에서 추출한 항암제 Taxol은 이미 상업화되어 시판되고 있다. 느릅나무는 건위 및 진해 작용이 있으며, 두릅나무는 당뇨병 치료에 사용된다. 두충나무는 혈액순환 촉진과 신장 기능 강화에 효능이 있으며 마가목은 강정작용을 가지고 있다. 오갈피나무는 빈뇨 치료제로 널리 사용되며, 오미자나무는 순환기 계통에 효능이 있으며, 구기자나무는 해열 및 강장작용을 가지고 있다. 이와 같이 많은 종류의 식물유래 유용성분들이 함유되어 있음을 알 수 있으며, 이에 대한 관심이 증가하고 있다. 따라서 이들 식물과 식물유래 유용물질들에 대한 체계적이고 종합적인 연구 및 개발에 대한 노력이 절실하다.

이 외에도 민간요법에서는 골담초 뿌리를 술에 담가 신경통 치료약으로 이용한다. 비파는 토리텔페노이드와 탄닌 등의 성분을 함유하며 한방과 민간에서는 비파 잎을 건위, 이뇨, 진해 등에 약으로 사용한다. 산사자(아가위)는 비타민C, 칼슘, 구연산 등의 성분이 함유되어 있으며 과실은 생식하거나 요통치료 약재로 사용된다. 산사자 열매를 이용한 음료로는 차와 술이 있다. 인동(금은화)은 디텔펜 성분을 함유하며 한방과 민간에서는 이뇨, 해독, 지혈작용 및 종기, 부종, 감기치료에 효능이 있어 약재로 많이 사용된다. 개다래나무는 류머티즘, 관절염, 중풍, 신경통 등에 사용되며, 물푸레나무는 명이나 부기, 신장병 치료에 사용된다. 엄나무는 신경통이나 관절염에 효능이 있으며 치자나무는 이뇨, 소염, 지혈 등에 효능이 있다. 이와 같이 현재까지 식물에서 여러 종류의 유용한 물질들이 보고되고 있다. 따라서 여러 식물을 이용하여 이들 유용물질들의 기능에 대해 보다 더 심도 있는 연구를 하고 이를 기반으로 한 새로운 생물제제의 개발이 필요하다.

식물유래 유용물질이 상업화된 대표적인 것은 천연항암제 Taxol이다. Taxol은 학명이 paclitaxel로 taxane 계열의 천연 diterpenoid로서 강력한 항암효과를 가지고 있으며 1990년대 가장 널리 사용되고 있는 항암제이다. 1958년 미국 암 연구소(National Cancer Institute, NCI)와 미국 농림청(USDA)이 35,000종의 식물을 대상으로 실시한 항암 생리활성물질 탐색을 위한 대규모 스크리닝 프로그램으로부터 Taxol에 대한 연구는 시작되었다. 1963년 주목나무의 표피로부터 Taxol을 발견하였고, 1979년 항암기작이 밝혀졌다. 1983년부터 1990년까지 임상시험을 거쳐 현재 난소암(1992년), 유방암(1994년), 카포시(Kaposi)종양(1997년)에 대하여 미국 FDA 허가를 득하여 미국의 제약회사 BMS(Bristol-Myers Squibb)사에 의해 시판되고 있다. 세계시장이 1조7천억('99년 기준) 정도이며 향후 폐암, 후두암, 식도암, 방광암, 알츠하이머, 관절염 치료 등으로 적응증 개발과 여러 다른 약물들과의 복합처방에 대한 임상시험이 진행되고 있으므로 시장규모는 계속 확대될 것으로 예상된다. 기존의 항암제인 colchicine, podophyllotoxin, vincristine, vinblastine, spongistatin 등은 유사분열시 tubulin의 assembly를 억제하여 암세포 성장을 방해하는 기작을 가지고 있는 반면 Taxol은 암세포의 유사분열시 microtubule의 depolymerization을 억제함으로써 암세포의 분열을 방해하는 기작을 가져 그 기작(mechanism)면에서 차이를 보인다. 이러한 차

이 때문에 항암제 Taxol은 그 부작용이 기존의 화학합성 항암제에 비해 적은 천연항암제로 1990년대 가장 각광 받고 있는 암치료제이다. 그러나 주목의 껍질에는 0.01%밖에 들어있지 않아 환자 한 사람에게 필요한 양인 2g을 얻기 위해서는 30 그루의 주목이 필요한데 반해 개비자나무는 개비자나무의 잎 1kg 당 HHT 함량 1.8g을 얻을 수 있고 환자 한 사람에게 필요한 양은 2.8 그루로 주목에 비해 항암 성분이 상당히 높다. 그 경제적 가치를 추정해본 결과, 한국에 있는 개비자나무 집단을 대략 100개 집단으로 가정하면 5조 1112억원으로 국내 총생산액(521조 9,592억원)의 0.98%에 상당한 가치이다. 개비자나무 잎이 매년 재생 가능한 자원임을 고려했을 때 그 가치가 더 커짐을 예상할 수 있다. 또한 주목(朱木)에서 추출한 물질로 만들어지는 Taxol은 제약사상 최대의 매상을 올린 항암제이기는 하지만 두가지 결점이 있다. 그 하나는 사용할수록 효력이 떨어진다는 것이고 또 하나는 물에 대한 용해도(최대 7ppm 정도)가 낮아 부작용이 있을 수 있는 다른 화학물질(주로 유기용매와 계면활성제 사용)을 섞어 환자에게 투여해야 한다는 것이다. 이러한 이유 때문에 Taxol을 대신할 차세대 신규항암제 개발에 대한 연구가 지속적으로 필요하며 특히 물에 대한 용해도가 높은 항암제 개발이 절실히 요구된다.

본 연구의 목적은 1) 고기능성 개비자 나무의 우수 집단 선발 및 대량 재배법을 개발하고, 2) 개비자 나무 유래의 기능성 물질을 분석하며, 3) 기능성 물질의 분리정제 공정을 개발하여 약용작물의 생약성분에 포함된 항암, 항균물질의 기본모델을 수립하는데 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

첫째, 고기능성 개비자나무의 우수 집단 선발 및 증식기술 개발에 관한 연구는 1) 천연집단 조사 및 자원파악, 2) 부위별, 개체별, 집단별 함량변이의 정량적인 통계분석 3) 우수집단 선발 및 대량증식기술을 개발하였고,

둘째, 개비자나무를 이용한 신기능성 물질 생산기술 개발에 관한 연구는 1) 기능성 물질의 분석 및 추출, 2) 생리활성물질 분리 및 정제 공정 개발, 3) 공정 가능성 확인 및 제품화 연구를 하였다.

셋째, 개비자나무 유래 생물소재의 *in vitro* 생리활성 및 독성 분석에 관한 연구는 1) 목본식물 추출물의 항암, *in vitro* 활성분석, 2) 분리정제된 물질의 *in vitro* 항암활성 및 독성분석, 3) 항균 활성분석, 4) 특성 분석을 하였으며

넷째, 개비자나무 유래 생물소재의 *in vivo* 생리활성 및 독성 분석에 관한 연구는 1) *in vivo* 생리활성 분석 2) *in vivo* 급성 및 만성 독성 및 조직 검사를 하였다.

IV 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

가. 연구결과 및 활용내용

1). 학술 논문 발표

일시(년.월)	발표논문제목	발표 학술단체	학술지 권.호.페이지
2004. 4	한국산 개비자나무로부터 Homoharringtonine 정제를 위한 전처리 공정 개발	한국생물공학회	춘계 학술대회 발표
2004. 4	A pretreatment process development for homoharringtonine purification from <i>Cephalotaxus koreana</i> .	Theories and Applications of Chem. Eng.	Theories and Applications of Chem. Eng. 2004(10)1
2004. 6	개비자나무의 천연집단 조사 및 자원과약과 개체 내 부위별 기능성 물질(homoharringtonine)의 함량분석	한국임학회	추계 학술연구 발표
2004. 12	Purification and Characterization of Homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	The 17th Symposium on Chemical Engineering	
2005. 2	개비자나무(<i>Cephalotaxus koreana</i> Nakai)의 homoharringtonine 함량에 영향을 미치는 무생물적 환경인자	한국임학회	춘계 학술연구 발표
2005. 2	개비자나무(<i>Cephalotaxus korean nakai</i>)의 homoharringtonine 함량에 영향을 미치는 생물 및 무생물적 환경인자	서울대 석사학위 논문	
2005. 4	Purification and Characterization of Homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	한국생물공학회	춘계 학술연구 발표
2005. 6	Analyses of homoharringtonine contents in plummyew tree (<i>Cephalotaxus koreana</i>) distributed in natural forests in Korea and its variation among parts, ages and sites	IUFRO Symposium	
2005. 10	Identification and Characterization of Homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	한국생물공학회	추계 학술연구 발표
2005. 10	Purification and identification of homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	한국화학공학회	추계 학술연구 발표
2005. 10	한국산 개비자나무(<i>Cephalotaxus koreana</i>) 8개 천연집단의 Homoharringtonine 함량변이	한국임학회	한국임학회지 94(6)397
2005. 12	Efficient purification and characterization of homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	The 18th Symposium on Chemical Engineering	
2006. 2	한국산 개비자나무로부터 Homogarringtonine의 정제 및 특성	공주대 석사학위 논문	

2) 연구개발 결과

고기능성 개비자나무의 우수 집단 선발 및 증식기술 개발에 관한 연구에서는 8개 천연집단 조사 및 자원과약을 하였고, 개비자나무의 부위별 함량에서는 잎에서 HHT(Homoharringtonine) 함량이 가장 높았으며, 집단별로는 거창의 남덕유산이 가장 높았다. HHT 함량에 미치는 환경인자를 조사해본 결과 토양습도가 상대적으로 높게 영향을 미치는 것으로 나타났다. 대량증식기술 개발에 관한 연구는 삽목이 조직배양에 비해 단시일 내에 대량증식이 가능하고 발근이 양호한 것으로 나타나서, 시간적, 경제적, 기술적인 면에서 실용적이고 적합한 것으로 나타났다.

개비자나무를 이용한 신기능성 물질 생산기술 개발에 관한 연구결과 Biomass 0.25 mm을 60℃에서 48시간동안 biomass : ethanol(100%) = 1 : 8 에서 추출하였고, 액/액 추출에서는 pH 5.0의 농축액에 chloroform을 가하여 4회 추출하였다. 흡착제는 chloroform : ethanol = 1 : 2의 세척용매에 백토(active clay)인 P-1으로 건조물의 무게와 동량으로 하였다. Low-Pressure Chromatography 공정에서는 methylene chloride : methanol = 80 : 20 의 혼합액을 사용하고 column (50×400mm) 내 Silica gel (MERCK, 40~60 μ m)을 조건으로 운전한 후 middle-pressure chromatography column(10×900mm×2)에 silica gel을 충전하여 elution 용액을 methylene chloride : methanol = 93 : 7 로 하여 isocratic 조건 하였을 때 최적의 공정이었다. 공정 가능성 확인 및 제품화 연구결과 HHT의 morphology를 용매 처리(solvent treatment)에 의하여 조절할 수 있는 방법(solvent-induced method)을 개발하였고, 분무건조 방법과 무정형 HHT가 물에 대한 용해도가 더 높아서 원료의약품으로 가장 적합한 것으로 나타났다.

개비자나무의 주정 추출물과 개비자나무의 유효성분으로 알려진 HHT의 생리활성 분석결과 유방암 세포주를 이용한 항암활성분석 실험에서는 SK-BR-3세포주가 SCC-1395세포주보다 민감성이 높은 것으로 나타났으며, 혈액암 세포주를 이용한 항암활성분석 실험에서는 K562세포주가 HL-60세포주보다 농도에 의존적이며, 민감한 것으로 나타났다. 총 약물처리 시간에 따른 최적 투여조건 결정 실험 결과 HHT를 9일, 6일, 3일 동안 매일 처리 할 경우 각각 0.27, 0.37, 1.10 mM의 농도에서 K562세포의 성장을 50% 감소시킴을 확인하였다. 기존 백혈병 치료제로 사용되고 있는 Adriamycin과의 비교실험 결과 HHT는 Adriamycin보다는 K562 세포주에 대하여 저해율이 낮았지만 비교적 근사한 값을 가졌다. 또한, 개비자 추출물은 hemolysis를 크게 유발하는 물질이 없고, 돌연변이원성을 갖지 않았다. pH 안정성 실험에서는 개비자나무 추출물에 존재하는 HHT가 알칼리 조건(pH 11)을 제외하고는 산성과 중성 영역에서 안정한 것으로 나타났다. 개비자나무 추출물을 건강기능 식품 소재로 활용하기 위한 기본 성분분석 결과는 탄수화물 1.05%, 지방 0.13%, 단백질 0.02%, 조섬유 0.06%, 회분 0.2%, 수분 98.54%, HHT 5.46%이었다. HHT를 의약품 용도로 활용하기 위해 특성을 조사한 결과 건조감량 0.77%, 강열잔분 3.72%, HHT 98%의 성분분석결과를 얻었다.

개비자나무에서 추출한 HHT의 마우스를 이용한 급성독성실험 결과, HHT 처리군의 적혈구수(RBC)는 대조군보다 높고 크기가 작았으나, 만성독성실험에서는 차이가 없었다. 급성독성실험에서는 간기능 관련효소가 상승하여 간 손상이 심하였으나, 만성독성실험에서는 모두 정상이었다. 손상된 간을 조직학적으로 관찰한 결과, 급성독성실험에서는 간세포증대 및 지방변성 소견이 관찰되었고 만성독성실험에서는 마우스의 간표면에 이상을 발견하였다. HHT는 면역학적 기능에 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다.

SUMMARY

(영문요약문)

Plumyew (*Cephalotaxus*), known for its anti-cancer agents, consists of eight or nine evergreen shrub or tall tree species that are distributed in China and Eastern Asia. Of them Korean native plumyew (*Cephalotaxus koreana* Nakai) is the only species growing in South Korea. The Korean native plumyew was studied in eight sites for habitat characteristics and plant samples were analyzed using HPLC (High Performance Liquid Chromatography). The analyses of plant parts showed that the HHT (homoharringtonine) contents were highest in plant needles. HHT contents among and within populations were significantly different with Mt. South Dukyu(1048 μ g/g) having the highest and followed by Mt. Naejang(958.7 μ g/g) and Mt. Obong(411 μ g/g). The relationship between the environmental factors and the HHT contents was investigated that soil moisture appeared to be the most affecting factor to the content of HHT. The study of mass propagation technique of Korean native plumyew was carried out by means of two experiments : cutting and tissue culture. It was showed that the cutting was feasible to proliferate in short term and also had good effects on root growth. Therefore, cutting propagation was more suitable and practical than tissue culture in terms of time, economics and technique.

A novel purification method was developed to guarantee high purity and yield for producing HHT from Korean native plumyew, The simple and efficient procedure for isolating and purifying HHT from Korean native plumyew biomass consisted of solvent extraction, synthetic adsorbent treatment, low-pressure and middle-pressure chromatography, followed by high-pressure chromatography. A purified HHT (purity: 98%) was identified by LC/MS and NMR. The NMR spectrum of HHT was identical to that of HHT reported in the literature. The morphologies of HHT were conveniently controlled by solvent treatment and the morphologies of HHT were characterized by SEM. The residual methanol and methylene chloride were easily removed (to less than concentration limit in ICH(International Conference on Harmonisation) guidance) by spray drying. Amorphous HHT was markedly more soluble in water than crystalline HHT. and the water content of amorphous HHT was less changeable than crystalline HHT during storage. Hence, we found that this procedure is fully possible to make products as medical treatments.

In vitro cytotoxicity assay of the ethanol extract of Korean native plumyew and its active compound, HHT, was carried out using breast and blood cancer cell lines. A breast cancer cell line, SK-BR-3 was more sensitive than SCC-1395. From the cancer cell screening experiment using various blood cancer cell line, K562 cell line was selected because it had the highest concentration-inhibition dependency and sensitivity among the tested cell lines. Using the cell line, the optimal treatment conditions were experimentally obtained. When K562 was treated everyday for 9, 6, 3 days, IC₅₀ values of HHT were determined as 0.27, 0.37, and 1.10 mM, respectively. The efficacy of HHT was compared with that of a known anticancer drug compound for blood cancer treatment, adriamycin: the anticancer activity of HHT was comparable to adriamycin. Additionally, the ethanol extract showed no significant adverse effect in hemolysis, and no mutagenicity. The pH stability of HHT in the ethanol extract was examined: HHT was stable in wide range of neutral

and acidic pH, but it was unstable in alkaline pH (pH 11). The chemical composition of the ethanol extract was analysed as 1.05% carbohydrate, 0.13% crude lipid, 0.02% crude protein, 0.06% crude fiber, 0.2% crude ash, 98.54% moisture and 5.46% HHT, and the properties of HHT for a medical use, was also determined.

In vivo physiological activity and toxicity test of the ethanol extract from Korean native plumyew was performed. From the acute toxicity test, the number of red blood cell (RBC) in the group treated with HHT was higher than the control group, but there was no significant difference in chronic toxicity test. The degree of damage on liver was serious in acute toxicity test because of the increased hepatic enzymes in chronic toxicity test. In histological analysis of damaged liver, the expansion of hepatocyte and lipid denaturation was observed in acute toxicity test, and abnormal feature of mouse liver surface was also observed in chronic toxicity test. HHT did not have effects on the immunological function.

Contents
(영문목차)

Chapter 1. Project summary	1
Chapter 2. Present condition of domestic and foreign country	8
Chapter 3. Contents and results of the project study	11
Section 1. A study on the predominant population selection and mass propagation technique of high-function Korean native plummyew	11
Section 2. A study on development of a novel substance and production method by Korean native plummyew	44
Section 3. A study on the <i>in vitro</i> physiological activity and toxicity test of functional bio-substance derived from Korean native plummyew	89
Section 4. A study on the <i>in vivo</i> physiological activity and toxicity test of functional bio-substance derived from Korean native plummyew	118
Chapter 4. Accomplishment and contribution to research area	130
Chapter 5. Plan to application of study results	131
Chapter 6. References	132

제 1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구 개발의 필요성

1. 연구개발의 필요성

가. 기술적 측면

1) 임업자원 개발의 필요성

21세기 인간계놈프로젝트에 많은 진전을 보이며 생명공학의 시대가 급진적으로 가속화되고 있다. 이에 따라 생명공학은 인간 생활 여러 분야에서 중요한 역할을 담당하고 있으며 그 중 임업 분야도 생명공학 기술을 기반으로 한 연구개발의 비중이 증가하였다.

특히 식물자원은 오랜 전부터 인류뿐만 아니라 다른 모든 생물들에게는 없어서는 안 될 가장 중요한 에너지원으로 사용되었으며 의약품, 식품첨가물, 향료, 색소, 효소, 특수화학제품 등의 원료로 이용되어 왔다. 또한 근래 배양, 분석, 추출, 검증기술 등의 발달에 의한 인공재배법이 개발되어 약리, 생리활성, 식품 및 식품가공 등을 위한 식물의 성분들이 속속히 밝혀짐에 따라 식물의 이용과 개발이 급속하게 이루어지고 있다. 그러나 우리나라에서 자생하고 있는 1100 여종의 유용 자생식물 중 유용성분을 분리 및 동정으로 상업화한 사례는 몇 종에 지나지 않는다. 반면, 중국이나 일본 등은 식물의 약제화, 식용화를 위한 연구와 기술 개발이 대규모로 급속히 이루어지고 있어 우리 나라에서도 신기능성 소재화할수 있는 새로운 식물의 발굴과 이를 이용할 수 있는 체계적인 기술개발이 절실하다.

국내에는 1100여종의 유용 자생식물자원이 있는 것으로 알려져 있고 그 중 약 70%는 초본식물이고, 나머지 30% 정도가 목본식물이다. 이들 자생식물은 식용, 약용, 가축사료용, 산업용, 관상용, 목재용 등에 이용되고 있다. 주목나무의 표피에서 추출한 항암제 Taxol은 이미 상업화되어 시판되고 있다. 느릅나무는 건위 및 진해 작용이 있으며, 두릅나무는 당뇨병 치료에 사용된다. 두충나무는 혈액순환 촉진과 신장기능 강화에 효능이 있으며 마가목은 강정작용을 가지고 있다. 오갈피나무는 빈뇨 치료제로 널리 사용되며, 오미자나무는 순환기 계통에 효능이 있으며, 구기자나무는 해열 및 강장작용을 가지고 있다. 이와 같이 많은 종류의 식물유래 유용성분들이 함유되어 있음을 알 수 있으며, 이에 대한 관심이 증가하고 있다. 따라서 이들 식물과 식물유래 유용물질들에 대한 체계적이고 종합적인 연구 및 개발에 대한 노력이 절실하다.

이 외에도 민간요법에서는 골담초 뿌리를 술에 담가 신경통 치료약으로 이용한다. 비파는 토리텔페노이드와 탄닌 등의 성분을 함유하며 한방과 민간에서는 비파 잎을 건위, 이뇨, 진해 등에 약으로 사용한다. 산사자(아가위)는 비타민C, 칼슘, 구연산 등의 성분이 함유되어 있으며 과실은 생식하거나 요통치료 약재로 사용된다. 산사자 열매를 이용한 음료로는 차와 술이 있다. 인동(금은화)은 디텔펜 성분을 함유하며 한방과 민간에서는 이뇨, 해독, 지혈작용 및 종기, 부종, 감기치료에 효능이 있어 약재로 많이 사용된다. 개다래나무는 류머티즘, 관절염, 중풍, 신경통 등에 사용되며, 물푸레나무는 명이나 부기, 신장병 치료에 사용된다. 엄나무는 신경통이나 관절염에 효능이 있으며 치자나무는 이뇨, 소염, 지혈 등에 효능이 있다. 이와 같이 현재까지 식물에서 여러 종류의 유용한 물질들이 보고되고 있다. 따라서 여러 식물을 이용하여 이들 유용물질들의 기능에 대해 보다 더 심도 있는 연구를 하고 이를 기반으로 한 새로운 생물체계의 개발이 필요하다.

2) 신규 항암제 개발의 필요성

식물유래 유용물질이 상업화된 대표적인 것은 천연항암제 Taxol이다. Taxol은 학명이 paclitaxel로 taxane 계열의 천연 diterpenoid로서 강력한 항암효과를 가지고 있으며 1990년대 가장 널리 사용되고 있는 항암제이다. 1958년 미국 암 연구소(National Cancer Institute, NCI)와 미국 농림청(USDA)이 35,000종의 식물을 대상으로 실시한 항암 생리활성물질 탐색을 위한 대규모 스크리닝 프로그램으로부터 Taxol에 대한 연구는 시작되었다. 1963년 주목나무의 표피로부터 Taxol을 발견하였고, 1979년 항암기작이 밝혀졌다. 1983년부터 1990년까지 임상시험을 거쳐 현재 난소암(1992년), 유방암(1994년), 카포시(Kaposi)종양(1997년)에 대하여 미국 FDA 허가를 득하여 미국의 제약회사 BMS(Bristol-Myers Squibb)사에 의해 시판되고 있다. 세계시장이 1조7천억('99년 기준) 정도이며 향후 폐암, 후두암, 식도암, 방광암, 알츠하이머, 관절염 치료 등으로 적응증 개발과 여러 다른 약물들과의 복합처방에 대한 임상시험이 진행되고 있으므로 시장규모는 계속 확대될 것으로 예상된다. 기존의 항암제인 colchicine, podophyllotoxin, vincristine, vinblastine, spongistatin 등은 유사분열시 tubulin의 assembly를 억제하여 암세포 성장을 방해하는 기작을 가지고 있는 반면 Taxol은 암세포의 유사분열시 microtubule의 depolymerization을 억제함으로써 암세포의 분열을 방해하는 기작을 가져 그 기작(mechanism)면에서 차이를 보인다. 이러한 차이 때문에 항암제 Taxol은 그 부작용이 기존의 화학합성 항암제에 비해 적은 천연항암제로 1990년대 가장 각광 받고 있는 암치료제이다. 그러나 주목(朱木)에서 추출한 물질로 만들어지는 Taxol은 제약사상 최대의 매상을 올린 항암제이기도 하지만 두가지 결점이 있다. 그 하나는 사용할수록 효력이 떨어진다는 것이고 또 하나는 물에 대한 용해도(최대 7ppm 정도)가 낮아 부작용이 있을 수 있는 다른 화학물질(주로 유기용매와 계면활성제 사용)을 섞어 환자에게 투여해야 한다는 것이다. 이러한 이유 때문에 Taxol을 대신할 차세대 신규항암제 개발에 대한 연구가 지속적으로 필요하며 특히 물에 대한 용해도가 높은 항암제 개발이 절실히 요구된다.

나. 경제·산업적 측면

WTO 출범, UR협상 체결 등 급속히 변해 가는 국제농업 환경변화에 따라 우리나라의 농산물 분야도 생존을 위한 경쟁력 제고가 절실했다. 이러한 차원에서 최근 생물공학 기술을 이용하여 생물자원으로부터 유용물질 생산에 많은 관심을 보이고 있다.

기능성 식물을 이용한 신 기능성 생물제제의 개발을 통한 생물산업은 농촌경제의 활성화 뿐 만 아니라 국가경제발전에도 지대한 공헌을 할 수 있는 중요한 산업으로서 그 부가가치는 무한하다. 식물의 약리 효과를 체계적으로 연구하게 될 경우 식물유래 유용성분으로 건강을 지킬 수 있다는 믿음을 일반인들에게 보다 확고히 줄 수 있게 되어 국민건강 증진은 물론 유용 식물재배를 통한 소득증대를 촉진시킬 수 있어 궁극적으로는 임업경제발전과 국가경제 발전에 큰 도움을 주게 될 것이다.

또한 식물유래 의약품 생산에 대한 기술적 인프라를 구축하여 다른 생물의약품(미생물, 동물 유래) 생산에 이용 가능하게 되어 부수적인 기대효과도 상당히 클 것으로 판단된다. 현재 식물의 유전자원확보, 기능성의 연구, 재배법 등에 관한 연구는 분야에 따라서는 국내에서도 심도 있는 연구가 이루어지고 있으나 중국에서는 이미 국책사업으로 상당히 연구가 진전되어 있고, 대부분의 기능성 물질에 대한 연구는 일본과 미국에서 이루어지고 있는 실정이다. 기능성 식물의 연구는 여러 나라에서 큰 관심을 나타내고 있는 시점에서 우리나라에서도 보다 체계적이고 응용에 기반이 되는 연구를 통하여 새로운 산업발전을 위한 기초를 구축하여야 할 것이다.

식물은 우리에게 식량, 주택재료 등을 제공해 왔을 뿐만 아니라 천연산물로서 의약품, 식품첨가물(flavours, aromas, colourants), 농약, 향료, 색소, 효소, 특수화학제품(specialty chemicals) 등의 공급처가 되었으며 현재 미국에서는 100억 달러 이상의 식물체에서 추출된 의약품이 통용되고 있을 정도임. 식물 의약품으로는 주목나무, 회수나무, 두릅나무, 느릅나무, 오미자나무, 구기자나무 등으로부터 경구용, 주사용 약품이 개발되어 이용되고 있으며, 약용식물을 이용한 건강음료는 100가지 이상의 제품이 개발되어 시판되고 있다.

항암제 paclitaxel은 주목나무의 표피에서 추출한 천연항암물질로 1992년 미국의 제약회사 BMS에서 처음으로 상업화하였다. 세계시장이 1조7천억('99년 기준) 정도이며 향후 폐암, 후두암, 식도암, 방광암, 알츠하이머(치매), 관절염 치료 등으로 적응증 개발과 여러 다른 약물들과의 복합처방에 대한 임상시험이 진행되고 있으므로 시장규모는 계속 확대될 것으로 예상된다. 기존의 항암제인 colchicine, podophyllotoxin, vincristine, vinblastine, spongistatin 등은 유사분열시 tubulin의 assembly를 억제하여 암세포 성장을 방해하는 기작을 가지고 있는 반면 paclitaxel은 암세포의 유사분열시 microtubule의 depolymerization을 억제함으로써 암세포의 분열을 방해하는 기작을 가져 그 기작(mechanism)면에서 차이를 보인다. 이러한 차이 때문에 항암제 paclitaxel은 그 부작용이 적은 천연항암제로 1990년대 가장 각광 받고 있는 암치료제이다. 또한 주목나무로부터 항암제 paclitaxel 이외에도 여러 가지 유용 생리활성물질과 그 유도체(cephalomannine, 10-deacetylcephalomannine-7-xyloside, taxol-7-xyloside, 10-deacetyltaxol-7-xyloside, 10-deacetyl- baccatin III, 10-deacetyltaxol 등)가 함유되어 있어 이들에 대한 상품화 가능성도 매우 높다.

국내에서도 paclitaxel의 상업화에서 보는 바와 같이 좀더 체계적이고 심도 있는 지속적인 연구개발 노력이 절실히 요구된다. 먼저 식물을 대상으로 한 R&D mind 고취, 생산 공정의 정립, Scale-up, 시제품생산, 효능 Test(동물실험), 임상시험, 제품개발(적응증 개발), 제품규정 확인(순도, 불순물함량, 잔류용매, 잔류수분, 제품형태 등), Marketing & Business 등 종합적이고 체계적인 연구개발을 통한 식물자원의 고부가가치화가 필요하다. 이러한 연구개발에 대한 infra가 구축되면 다른 자원(미생물, 동물자원)으로부터의 유용 생리활성물질 screening으로부터 상업화까지 그 응용 범위는 매우 클 것으로 판단된다.

일본의 경우 70년대 초부터 화학방부제를 사용한 식품에 대한 소비자 기피 심리가 확산에 따라 후생성에서 발효 알콜을 이용한 천연항균제를 75년경 식품첨가물 및 공중위생 품목으로 지정, 보급을 장려해 오고 있음. 그 후 1996년 0-157군에 의한 식중독사건이 사회 문제화 되면서 알콜소독 제품이 급성장, 1997년 말 기준 61억엔의 시장규모를 형성하였다.

모든 가공식품에는 보존제가 사용되고 있으며 특히 우리가 일상생활에서 많이 섭취하는 청량 음료수를 비롯한 모든 음료수, 빵, 과자, 버터, 마가린, 소세지, 치즈뿐만 아니라 양조 간장에도 사용하므로 그 사용 범위와 양은 매우 크다.

천연 식품 보존제가 개발되면 화학 보존제에서 천연 보존제로의 전환이 가능하고 이것은 화학비료에서 유기농으로 재배하는 식품을 만드는 것과 같아서 고부가가치의 가공식품을 개발하는 것도 가능하게 함으로 천연 식품 보존제의 시장은 매우 크다.

다. 사회·문화적 측면

경제발전과 함께 식생활의 개선으로 영양상태는 매우 향상되어 있으나 각종 성인병이 날로 증가하고 있는데 심지어는 당뇨병에 걸린 어린이가 증가하는 추세이다. 이러한 질병을 치료하기 위한 치료법과 약재가 연구 개발되고 있는데 특히, 신 기능성 생물재료를 이용한 치료제의 개발은 부작용이 적어서 더욱 선호되고 있다. 최근에는 식물에 유용한 물질들이 다량 포함되어 있다는 것이 알려져 그 관심도가 높아지고 있다. 이러한 물질들의 장점은 인체에는 무해하며 부작용이 없고 치료효과가 높은 데 있다.

제 2절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구개발 목표

가. 개비자 나무 유래의 기능성 물질 분석

나. 고기능성 개비자 나무의 우수 집단 선발 및 대량 재배법 개발

다. 기능성 물질의 분리정제 공정 개발

약용작물의 생약성분에 포함된 항암, 항균물질로부터 신규 천연 식품보존제 개발을 위한 model 물질을 창출하고 의약품, 식품으로 용도 개발한다.

2. 연구내용

가. 기능성 개비자 나무 우수 집단 선발 및 효능분석

기능성 개비자나무의 천연집단으로부터 시료를 개체별로 수집·분리하고 기능성물질의 함량변이를 조사한다. 수종별로 기본적인 생리적특성을 조사하고, 대량증식 및 재배법을 개발하고 신 기능성 물질(항암성 물질, 항균물질 등)을 개발한다.

나. 기능성 물질의 분리정제 및 공정 개발

기능성 물질의 동정, 분석법과 분리 및 정제공정을 개발한다. 생산된 시제품을 이용하여 효능 및 독성 test와 동정을 통한 용도를 개발한다.

다. 고기능성 물질의 생산

우수제품의 품종 등록 및 이 제품의 생산기술을 개발하고 고기능성 물질을 함유한 우량주의 생산시스템 형성으로 산업화의 기반을 확보한다.

3. 연차별 연구개발 목표와 내용

구분	연구개발 목표
1차년도 (2003-2004)	고기능성 목본식물류의 자원파악 및 수집
	기능성 물질의 분석 및 추출
	목본식물로부터 기능성 물질 탐색
2차년도 (2004-2005)	우수개체 및 집단선발을 위한 함량분석
	생리활성 물질의 분리 및 정제 공정개발
	고기능성 목본식물류의 효용성, 안정성 검정 (in vitro 분석)
	고기능성 목본식물류의 효용성, 안정성 검정 (in vivo 분석)
3차년도 (2005-2006)	고기능성 목본식물의 대량 증식기술 개발
	공정가능성 확인 및 제품화 연구
	기능성물질의 효용성 검정 및 용도 개발
	실험동물에서 기능성물질의 만성 독성 및 항암 실험

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도 (2003-2004)	·천연집단 조사 및 자원파악	1. 천연집단의 위치, 분포 및 크기 파악
	·기능성 물질의 분석 및 추출	1. 열수 추출 및 분석 - 증류수 이용한 가열추출 - 유기용매 이용한 비극성불순물 제거 - HPLC 수행 2. Methanol 추출 및 분석 - 유기용매 추출 - 액/액추출에 의한 극성불순물 제거 - HPLC 수행
	·목본식물로부터 기능성 물질의 탐색	1. 기능성 물질의 추출(crude extract) 2. Crude extract의 항암활성 분석

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
2 차 년 도 (2004- 2005)	·우수개체 및 집단선발을 위한 함량 분석	1. 세부적인 개체부위별 HHT 함량변이 분석 2. 7개 집단별 HHT 함량변이 통계분석 - 우수 개체 및 집단을 선정하여 서식특성을 비교 분석
	· 생리활성 물질의 분리 및 정제 공정개발 - 항암물질 HHT 분리(전처리) 조건 선정 - 정제방법 정립 - 물질 동정	1. 개비자나무로부터 항암물질 HHT의 효율적 전처리 방법 정립 - 흡착제 처리 - open column 2. 크로마토그래피 방법에 의한 고순도 HHT 정제 방법 정립 3. 순수 분리 및 물질 동정 - 크로마토그래피에 의한 순수 분리 - 화학구조 분석 및 분자량 확인
	· 고기능성 목본식물류의 효용성, 안정성 검정 (in vitro 분석) - crude extract 및 분리물질의 in vitro 항균 활성분석 - 급성독성검사	1. 고기능성 목본식물류의 항균분석 - Radical diffusion assay와 Microbroth diluti on assay - 대상균: <i>E. coli</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter aerogenes</i> , <i>Vibrio para haemolyticus</i> , <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Streptococcus mutans</i> 2. in vitro 독성 분석 - Hemolysis 분석: 적혈구용혈검사 - 미생물 이용한 변이원성 시험 (<i>Salmonella typhimurium</i>)
	· 고기능성 목본식물류의 효용성, 안정성 검정 (in vivo 분석) - 실험동물을 이용한 생리조절효과 검토 - 실험동물에서의 만성독성 검사	1. 분리된 기능성물질의 활성 분석 - 항암활성 - 항균활성: 식중독유발균, 충치균, 등 2. 고기능성 목본식물류의 급성독성검사 - 간, 신장, 폐 및 비장 조직학적 검사 - 간기능, 신장기능 및 혈액학적 검사 등

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
3 차 년 도 (2005- 2006)	·대량 증식기술 개발	1. 효과적인 대량 증식기술 개발 -삼목묘 증식기술 개발 연구 -조직배양 증식기술 개발 연구 -효과적인 증식기술을 선정하여 심층연구
	·공정 가능성 확인 및 제품화 연구	1. 공정 가능성 확인 2. 제품화 연구 -제품형태 연구(결정형, 무정형) -잔류수분 -잔류용매
	·기능성물질의 효용성 검증 및 용도 개발 - 식품보존제 또는 의약품으로서의 효과 검증	1. 기존 물질과 비교실험(생리활성) 2. 물리화학적 특성조사 -pH안정성 측정 -전하적 성질 -용해도 측정 -수분 흡수력 등
	·실험동물(생쥐)에서 HHT의 만성 독성 및 항암 실험	1. HHT의 만성독성 실험 -간기능 관련 효소분석 -간의 조직학적 검사 2. HHT의 항암 실험 -조직병리 및 면역조직화학(Histopathological evaluation of carcinogenicity) -HHT의 항암효과 검증

제 2장 국내·외 관련기술의 현황

제 1절 목본식물(개비자나무)과 관련된 연구현황

개비자나무의 경우 국내 개발은 아직 미흡한 상태이며, 본 연구진에 의해 국내 개비자나무에서 항암 활성물질인 homoharringtonine을 검색하였다. 또한 한국산 개비자나무의 지역 및 계절에 따른 생리활성 물질(알칼로이드)의 변화를 확인하였다. 특히 homoharringtonine는 P388 leukemia, L1210 leukemia, B16 melanoma 세포에 대한 항암활성을 확인하여 암 치료와 만성 백혈병 치료에 효과가 높은 것으로 알려져 있다. 본 연구진에 의해 한국산 개비자나무로부터 항암 활성물질인 homoharringtonine, isoharringtonine, deoxyharringtonine, harringtonine 등의 대량생산에 관한 기초적인 연구가 수행되고 있다. 이들 물질은 여러 가지 암치료, 만성 백혈병 치료 및 치매(Alzheimer's disease) 치료에 효과가 높을 것으로 사료된다. 또한 개비자나무에서 추출되는 항암물질은 기존의 항암제에 비하여 물에 대한 용해도가 높으며 그 효능 또한 높아 상품화 가능성 매우 높은 차세대 항암제로 주목받고 있다. 본 연구진에 의하여 확인된 개비자나무에서 추출한 항암물질의 구조식은 다음과 같다.

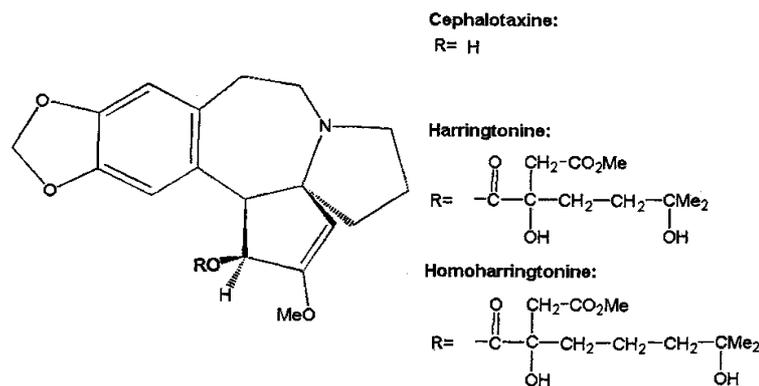


그림1. 개비자나무에서 추출된 항암성분의 화학구조(본연구진)

제 2절 국내외 목본 식물 자원화 현황

현재 목본식물류로부터 항암제로 사용되고 있는 것들은 1958년 미국에서 연구개발된 주목나무에서 얻은 항암제 원료 Paclitaxel 및 회수나무에서 얻은 항암제 원료물질인 캄토테신(Camptothecin, CPT) 등이 있으며 현재 항종양효과(폐암, 식도암, 후두암, 방광암, 뇌암), 임상효과, 항세균, 항바이러스, 류마티스성 관절염, 알츠하이머 등의 치료 등으로 적응증 개발에 대해 많은 연구가 계속되고 있다.

1995년 이후 국내의 의약자원개발 추세는 일차적으로 AIDS 치료제, 항암제, 당뇨병, 간경화, steroid의 대치품, 성인병예방 및 치료제, impotence 치료제를 위해 인삼, 가시오갈피나무, 오갈피나무류, 파극, 지황 등이 이용되었으며, 발모제, Alzheimer 형 치매 치료제를 위해서는 지황, 하수오, 당약류, 죽절인삼, 부자류 등이 이용되었다.

제 3절 앞으로의 전망

1. 기술적 측면

가. 본 연구팀들이 대상으로 하고 있는 목본 식물들에서 뿐 만 아니라 앞으로 다른 식물들에서도 신규 항암물질 및 항균물질을 찾아내려는 많은 시도가 있게 될 것이다.

나. 식물류는 식용, 약용, 건강음료, 기호식품, 화장품, 기타산업용으로 이용되고 있다.

특히 현대 의학에 있어서 화학적 암치료제는 암세포의 억제내성과 체내흡수와 배원위치설의 문제 그리고 2차적 부작용으로 인하여 새로운 치료제, 특히 천연 항암·항균원위치제의 개발을 요청 받고 있다.

다. 가공식품이 건강에 유해하다고 하는 이유 중에 하나가 화학 첨가물을 사용하는 것이고 그 중에서도 화학 보존제가 암을 발생시킬 가능성이 있다는 것이 시사되어 가공식품의 섭취에 문제를 제기하고 있으므로 천연 보존제의 개발은 많은 가공식품에 고부가가치적 측면을 제공할 수 있다.

2. 경제적 측면

가. 임업을 새로운 부가가치 산업으로 전환

우리 임업은 개방화 이후에 소득증대를 위한 작목이 갈수록 줄어들고 있는 형편임. 주목나무로부터 항암제 paclitaxel의 성공사례로 들 수 있는 바, 앞으로는 목재용 식물과 더불어 기능성식물로 국내는 물론 세계적으로 판매할 수 있는 제품의 개발이 필요하며 향후 기업의 기술개발도 이러한 방향으로 전개 될 것으로 전망된다.

나. 임업의 영역 확대

농산물의 가공으로 식품 및 벤처 임업의 육성산업이 활성화되어가고 있음. 더 나아가서 건강식품과 의약품의 개발 등으로 제약 산업 및 가공 산업으로 임업의 영역을 확대해야 되며, 특히 임업을 보건 환경 영역으로 확대될 것으로 전망된다.

본 연구의 결과 재배분야와 육종에 의한 새로운 계통의 식물의 육성으로 산업화가 가능하며 신물질에 의한 신기능성식품과 드링크제 및 의약품생산 벤처임업의 육성으로 전개될 것으로 기대됨. 건강음료의 연간 매출액은 모두 알 수 없으나 일약약품 영비천의 경우 1996년 매출액이 385억원인 점을 감안해 볼 때 어마어마한 시장임에 틀림없다.

3. 사회적 측면

가. 신기능성 식품과 의약품에 의한 국민보건에 기여

식물을 이용한 기능성 식품 및 의약품 산업은 국민 보건상 중요할 뿐만 아니라 부가가치를 가지는 자원 절약형, 기술 집약적 산업이며 다른 정밀화학 산업에 대한 파급효과도 대단히 크다고 사료된다.

나. 환자를 비롯한 소비자의 보호

주목나무 등 항암효과가 보고 되면서 고가에 거래되고 있는바, 가짜가 대단히 많이 유통되고 있으며 저질의 수입품마저 횡행하고 있는 형편임. 본 연구에서 식물의 각 계통을 수집하여 철저한 검증을 통하여 표준화와 평가기준을 마련할 예정이어서 소비자와 환자의 피해를 제거하게 될 것이다.

기능식물의 대량생산으로 저렴한 가격에 소비자들에게 공급할 수 있다

다. 자연환경의 보전

자연의 보호는 아무리 강조하여도 지나치지 않는데 토종식물이 고가로 거래되기 때문에 무차별 남획이 되고 있으며 기주나무를 마구 베어내고 있기 때문에 본 연구에서 효과적으로 재배 육성할 수 있는 방법을 개발하여 기능성을 가진 진품을 합리적인 가격에 공급함으로써 자연환경을 보전하는 첩경이 될 것이다.

라. 기술도입의 타당성

기술 도입 시 로열티가 연구개발비의 수십 배에 달할 정도로 비싸고 천연보존제와 관련된 기술은 도입할 만한 단계에 이른 대상이 현재까지 알려져 있지 못하므로 타당하지 않다고 판단된다.

제 3장 연구개발 내용 및 결과

제 1절 고기능성 개비자나무 우수 집단선발 및 증식기술 개발에 관한 연구

1. 서 언

개비자나무속(*Cephalotaxus*)은 중국과 동북아시아에 서식하는 상록 관목 또는 교목으로 8~9개의 종을 포함한다(van Gelderen, 1986). 한국에는 오직 *Cephalotaxus koreana* 종만이 자생하는데 북위 38도 이남에 널리 분포하는 상록 관목이다. 꽃은 자웅이주로 4월에 피고 육질종의로 둘러싸인 열매는 다음해의 8~9월에 익는다. 개비자나무의 잎은 3.5~4cm 길이의 선형이고, 주맥이 뚜렷하며, 끝이 뾰족하여 비자나무와 차이를 보인다(이창복, 1980).

중국 한방에서 종양치료제로 사용되어온 개비자나무의 추출액은 새로운 항암성분을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다(Ohnama 와 Holland, 1985). Powell 등(1972)은 개비자나무(*Cephalotaxus harringtonia*)의 추출액으로부터 homoharringtonine (HHT) 을 분리하고, p388 Leukemia, L1210 Leukemia, B16 melanoma 세포에 대한 항암 활성을 확인하였다. Huang(1976)은 HHT와 개비자나무로부터 추출된 알칼로이드를 특정 진핵세포에서 단백질 생합성의 억제제로 보고하였고, 최근에는 Visani(1997)가 HHT가 세포사멸을 유도함으로써 종양 성장을 저해한다고 제시하였다. 그 후 현재까지 약 40종 이상의 알칼로이드가 개비자나무 여러 종에서 분리되었고(Miah, 1998), 항암 활성을 갖는 개비자나무 알칼로이드는 모두 cephalotaxine 유도체로 harringtonine, homoharringtonine, isoharringtonine과 deoxyharringtonine 등이 있다(Zhou 등, 1995).

개비자나무에서 추출되는 항암물질은 기존의 항암제에 비하여 물에 대한 용해도가 높으며, 그 효능 또한 높아 상품화 가능성이 매우 높은 차세대 항암제로 주목받고 있다(Jingyi, 2000). Cephalotaxine과 그것의 esters 화학적 합성방법이 보고(Wang, 1992) 되고는 있으나 수율이 낮아 여전히 개비자나무는 HHT의 중요한 자원이다(Jingyi, 2000). 국내에서는 박호일 등(1994)이 국내의 개비자나무에서도 항암 활성을 가지는 homoharringtonine과 harringtonine이 존재한다는 보고가 있었고, 최근에는 김상익 등(2000)이 소수의 표본을 이용하여 개비자나무의 지역별, 계절별 함량의 변화에 대해 보고하였다. 그러나 개비자나무 우수 집단선발 및 증식기술 개발과 개비자나무의 HHT에 관련한 화학적 연구는 초기단계이며 아직까지 많은 연구가 진행되지 않고 있다. 이 결과들은 향후 개비자나무의 HHT 연구에 기초자료가 될 뿐 아니라, 대량생산 방법을 확립하면 항암제로 가능성 있는 HHT의 학문적으로나 산업적인 면에서 중요한 가치가 있다고 생각된다. 그러므로 본 연구에서는 고기능성 개비자나무 우수 집단선발 및 증식기술 개발에 관한 기초조사를 수행하였기에 보고하고자 한다.

세부과제 1-1. 개비자나무의 천연집단 조사 및 자원파악

2. 재료 및 방법

가. 개비자나무 분포지 특성 및 크기 조사

1) 함량분석을 위한 Sampling

국내 자생하고 있는 개비자 나무의 전국 7개 천연집단에 대하여 서식지 특성, 지형특성, 개체군 구조, 주변 출현층을 조사하였고, 개체내 함량변이를 분석하기 위해 각 집단별 7개체씩 잎, 줄기, 뿌리 부위를 채취하였다. 개비자 나무는 관목으로 50 Cm를 기준으로 줄기 부위를 채취하였고, 뿌리 부위는 주근과 잔뿌리를 분리하였으며 잎은 20개체씩 채집하였다. 문헌조사와 함께 생장이 우수한 3지역의 백운산, 내장산, 지리산 집단을 택하여 개체내 분석의 시료로 사용하였다(Figure 1).



내장산 지역



백운산 지역



지리산 지역

Figure 1. *Cephalotaxus koreana* Sampling site

나. 개체내 부위별 기능성 물질의 함량분석

1) 유기 용매 추출 및 액/액 추출

식물체 시료를 분말로 만들기 위해 60℃에서 16시간 동안 건조시킨 후 분쇄기로 분쇄하였고 0.25 mm sieve에 통과시켜서 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 분석은 Wickremesinhe 방법을 변형시켜 HPLC 분석용 Sample 1g을 methanol (50ml)에 녹인 후 10 분간 sonication 하여 추출하였다. 추출액은 감압 상태 하에서 funnel을 이용하여 여과하여 여과액(여액)을 회수하고 rotary evaporator (25-27''Hg, 40℃)로 완전 농축시켰다. 건고물을 0.5% ammonium hydroxide에 녹이고(20 ml/g), 이 농축액과 동량의 chloroform을 가하여 분액갈때기를 이용하여 상 분리를 하였다. 상층과 하층으로 상 분리가 되면 하등액인 chloroform층만을 회수하였고, 상등액에 새로운 chloroform을 가하여 3회 반복 수행하여 추출액을 취하였다.

2)HPLC분석Sample및HPLC분석

추출액을 다시 rotary evaporator (25-27''Hg, 40℃)로 감압농축 시킨 후 건고물을 methanol 3ml/g에 녹인 후 Syringe filtration(Whatman, 25 mm, 0.45 μ m, 50 units)하였다. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 분석은 Lichrospher 60 RP-select B(4 × 250 mm, 5 μ m)을 사용하여 수행하였다. 이동상으로는 methanol과 0.1 M ammonium formate 용액을 사용하였다. 용매의 gradient 조건은 0.8 ml/min 유속으로 methanol : 0.1 M ammonium formate가 20 : 80 에서 시작하여 40분 후 40 : 60 이 되도록 하였다. 각 화합물은 290 nm 파장에서 UV에 의한 흡광도를 측정하였고 주입량은 15 μ l이다. Homoharringtonine의 정량은 Sigma사에서 구입한 표준 물질의 피크 면적으로 표준 정량선을 작성한 후 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 개비자나무의 분포지 조사

국내 개비자나무과 식물의 분포현황을 파악하기 위해 먼저 주요 대학 표본관 및 박물관 소장 식물표본목록을 정리하였다.

표본 기록에 따른 국내 개비자나무과 식물의 현황을 살펴보면 모두 1속 1종으로 확인되었다. 우선 현재 보고 된 기 문헌을 토대로 작성한 국내 자생 개비자나무의 분포지역을 정리한 결과는 다음과 같다.(Table 1, Figure 2).과 같다.

Table 1 . Distribution sites of Cephalotaxaceae in Korea (Published literature and specimens)

Scientific Name	Korean Name	Distribution sites
<i>Cephalotaxus koreana</i>	개비자나무	서울 남산, 관악산, 충북 월악산, 속리산, 괴산 충남 계룡산, 전북 모악산, 장안산, 덕유산, 전남 백양산, 내장산, 제암산, 불갑산, 난봉산, 백운산, 봉화산, 월출산, 오봉산, 두륜산, 천관산 경남 덕유산, 망운산, 금산, 가야산, 지리산, 경북 운문산, 황학산, 주흘산
<i>Cephalotaxus koreana</i> var. <i>nana</i> Nak.	눈개비자나무	충남 계룡산, 속리산 전남 백양산, 월출산, 오봉산

우리나라에서 개비자 나무속의 분포 지역을 살펴 보면 전국적으로 분포 하면서 특히 중부 이남지역과 도서지역 일대에 많이 분포하고 있다. 한편, 개비자 나무는 남부지역의 습한 계곡부에서 그 집단을 많이 발견할 수 있었다. 눈 개비자 나무 또한 개비자 나무 와 비슷한 서식지역을 형성하고 있으며 특히 전라남도 지역에 많이 분포하는 것으로 나타나 있다. 개체군 특성을 비롯한 정밀 조사는 계룡산, 남덕유산, 백운산, 오봉산, 두륜산, 지리산, 내장산등 7개 지역을 중심으로 이루어졌다. 7개 지역을 제외한 다른 지역은 분산 분포되어 있어 집단별 군락을 찾기 힘들었다.

이에 따라 1차년도 개비자 나무의 조사를 위해 집중조사가 이루어진 지역과 기타조사지역에서 확인 조사된 자생 개비자 나무의 분포장소를 지역별로 표시한 지도는 다음과 같다.(Figure 1) 즉 개비자 나무의 경우 모두 13개 지역에서 조사가 이루어 졌으며 그 중 7개 지역의 집단 별 분포지역을 대상으로 본 종에 대한 집중 조사가 있었다.

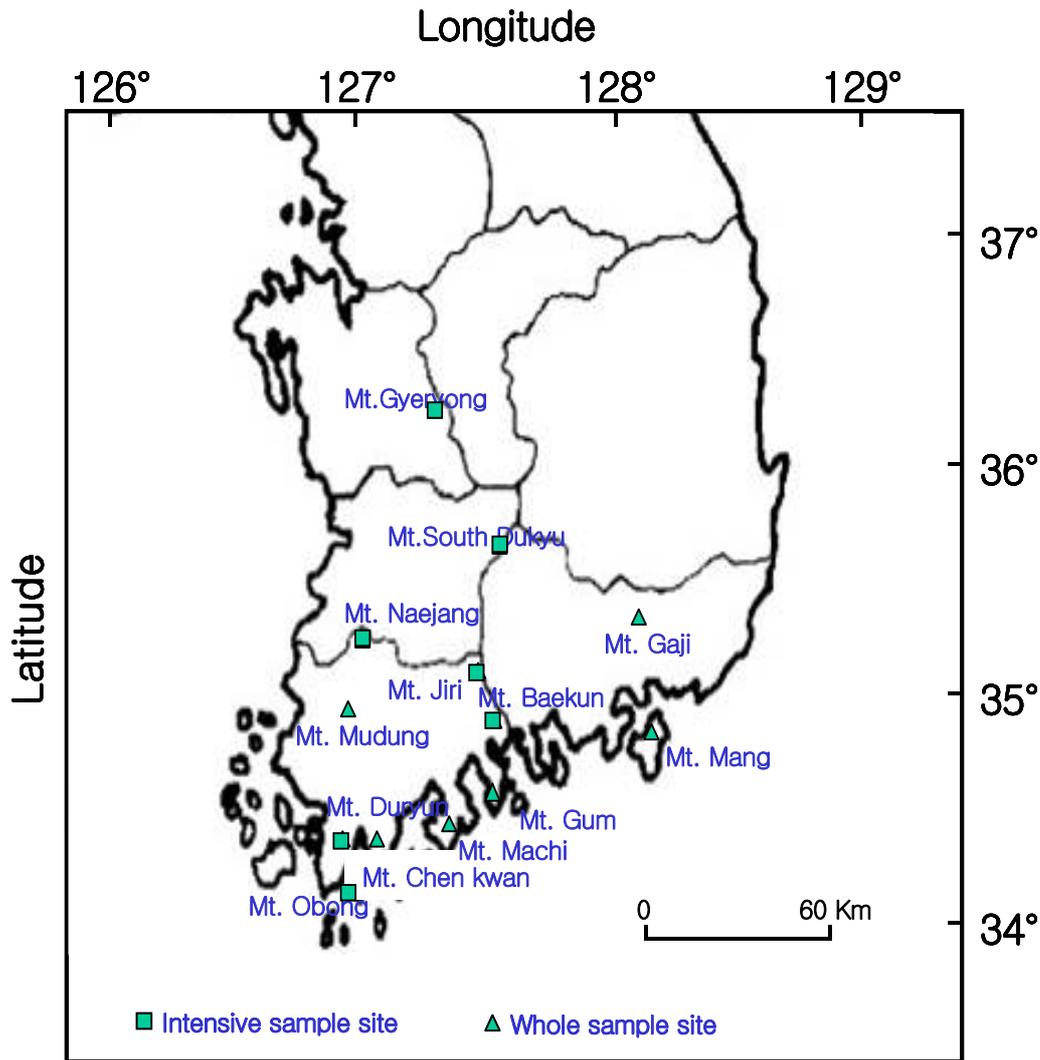


Figure 2. A map showing distribution sites *Cephalotaxus koreana* species in Korea.

나. 천연집단의 개체군 특성조사

개체군 특성은 주요 개비자 나무의 분포지 중에서도 집단적으로 분포하는 지역을 중심으로 이루어졌으며 그 결과를 간략히 요약하면 다음과 같다.(Table 2)

자생 개비자 나무의 종별 개체군 특성 조사결과를 보면, 개비자 나무의 개체군은 수분조건이 높은 지역으로 서어나무류, 참나무류, 등 잘 발달된 천연활엽수림과 비자나무류 와 조릿대가 많은 계곡부에서 주로 군락을 이루고 있었으며, 대부분이 밀집형 분포를 이루고 있다. 또한 남부지역으로 갈수록 수고, 흉고직경, 수령이 오래되어 생장상태가 우수한 것으로 나타났다. 기온이 높은 남부지역이 개체군을 잘 유지하였고, 습도가 높은 계곡부에서 개체군이 나타나는 것으로 보아 기온이 높을수록 습도가 높을수록 개체군 유지에 영향을 미치는 것으로 짐작되었다. 또한 상층수관울폐로 광선경쟁에서 도태되어 점차 개체군의 규모가 작아지는 경향이 관찰되었고, 비옥한 토양에서 생장의 우수함을 보이는 것을 미루어 보아 이 요인들도 개체군의 서식조건에 작용하는 것으로 짐작되었다.

Table 2. Ecological characters of each species in investigated region

		개비자 나무(<i>Cephalotaxus koreana</i>)			
조사지		거창 남덕유산	공주 계룡산	정읍 내장산	구례 지리산
서식지특성	해발고도	741m	474m	248m	341m
	좌표	N 35° 45.048' E 127° 40.722'	N 36° 21.237' E 127° 13.185'	N 35° 29.086' E 126° 53.765'	N 35° 15.575' E 126° 31.922'
	경사	23 ~ 27 %	6 ~ 10 %	41 ~ 60 %	6 ~ 10 %
	부엽층	3.3 mm	4.9 mm	6.8 mm	3.9 mm
	토양수분	10 %	35 %	40 %	25 %
	토양유기물	11 ~ 25 %	25 ~ 45 %	30~50 %	25~40 %
	토성	loam+ clay	loam	loam	loam
지형특성		계곡부 주변부	계곡부 주변부	계곡부 주변부	계곡부 주변부
개체군구조특성	크기	70~80	65~75	500~600	90 ~ 100
	면적	20m×50m	20m×35m	30m×100m	20m×50m
	분포	밀집형	밀집형	밀집형	밀집형
	수고 (Cm)	100~192	40~112	62.2~110	71~132
	DBH (Cm)	1~1.5	0.6~1.1	0.6~1	0.6~1.3
수량	3~5	2~5	2~5	3~5	
개체군 demography	성숙목	50%	20%	30%	70%
	유령목	50%	80%	70%	30%
주변출현종	교목층	소나무(육송) 개서어나무 산딸나무	굴참나무 매죽나무 잣나무 생강나무	굴거리 나무 군락 신갈나무, 소나무(육송)	졸참나무 굴참나무 사스래나무 개서어나무
	관목층	털꿩나무 다릅나무 사위질빵	난티나무 퀴똥나무 벚나무	느티나무 단풍나무 동백나무 매자나무 사철나무	퀴똥나무 고로쇠 철쭉 병꽃나무 말오줌 나무
	초본층	조릿대 고사리, 참나물 관중	조릿대 포아풀 오리방풀 쇠뜨기	조릿대 개산초 털 노박덩쿨 쇠고비	조릿대 아욱제비꽃 고란초

개비자 나무(<i>Cephalotaxus koreana</i>)				
조사지		광양 백운산	해남 두륜산	완도 오봉산
서식지 특성	해발고도	633m	82m	485m
	좌표	N 35° 06.067' E 126° 38.632'	N 34° 29.429' E 126° 37.115'	N 34° 19.585' E 126° 42.150'
	경사	11~40%	6~10%	41~60%
	부엽층	4.7 Cm	6.3 Cm	4.7 Cm
	토양수분	27 %	59.5 %	32.5 %
	토양유기물	30 ~ 50 %	20 ~ 40 %	15~25 %
	토성	loam	loam	loam
지형 특성		계곡부 주변부	계곡부 주변부	계곡부 주변부
개체군 구조 특성	크기	600~700	70~80	110~120
	면적	30m×100m	20m×50m	20m×100m
	분포	밀집형	밀집형	밀집형
	수고 (Cm)	63~97	60~520	90~525
	DBH (Cm)	0.5~1	0.5~9	0.5~4.3
	수령	3~5	3~7	3~11
개체군 demography	성숙목	60%	90%	80%
	유목	40%	10%	20%
주변 출현종	교목층	신갈나무 개서어나무 소나무(육송) 잣나무	졸참나무 소사나무 서어나무 소나무(육송)	잣나무 후박나무 개서어나무 산딸나무
	관목층	자귀나무 국수나무 산수국	산수국 동백나무	때죽나무 사위질빵 동백나무
	초본층	바위말발도리 조릿대 개망초	다람쥐꼬리 조릿대 곰취 짚신나물	조릿대 고사리 박쥐나물

다. 개체내 부위별 HHT(Homoharringtonine) 물질의 함량분석

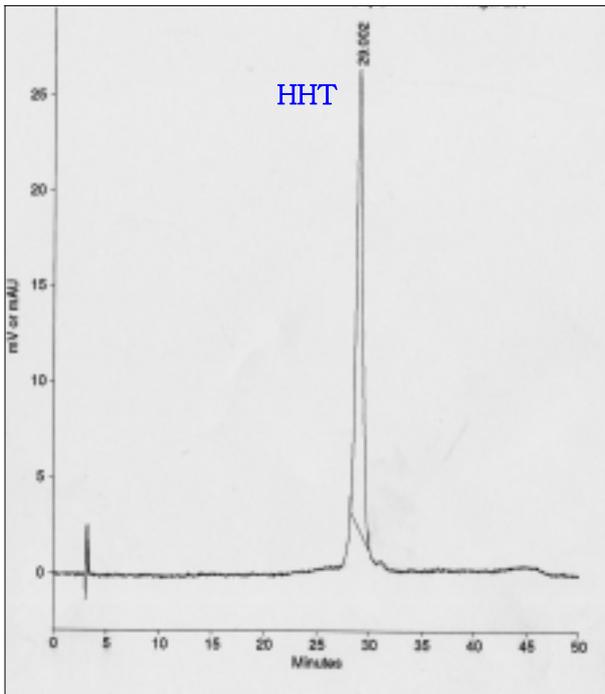
3개 집단에서 7개체의 부위별 함량은 homoharringtonine의 표준시로 피크와 비교하여 면적 표준화법 (area normalization)으로 결정하였으며 그 분석 결과와 분석결과에 따른 graph 그리고 성분이 검출되는 retention time을 각각 Table 3, Figure3 , Figure4 과 같다.

7개체를 성장상태가 우수한 백양산, 내장산, 지리산 등 3곳에서 잎, 뿌리, 줄기 3 부분으로 나눠 분석을 하였으며 각 개체와 부위마다 성분함량의 차이가 나타났다. 잎, 뿌리, 줄기 순으로 성분이 높게 나타났다. 가장 많은 함량을 가지고 있는 잎은 성분추출의 좋은 재료로 쓰일 수 있을 것으로 기대되며, 함량 극대 조건을 잡기 위해서 지역별, 서식지 영향인자들을 좀더 고찰해 볼 필요가 있는 것 같다.

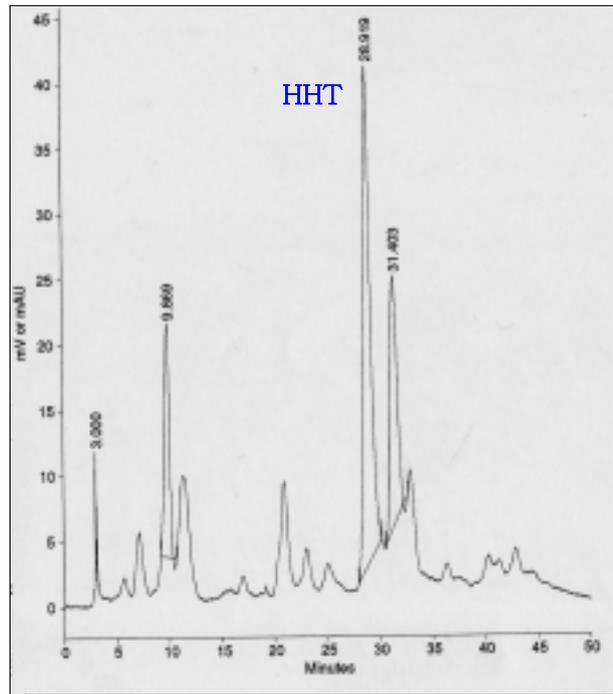
Table 3. The Contents of Homoharringtonine in the Needles, Stems and Roots of *Cephalotaxus koreana*

Sample Number	HHT contents of each parts ($\mu\text{g/g}$)				HHT contents of each parts (%)		
	Needle	Stem	Root	Total	Needle	Stem	Root
A1	357.2	120.7	278.3	756.2	47.2	16.0	36.8
A2	480.4	178.6	273.5	932.5	51.5	19.2	29.3
A3	859.8	232.5	178.1	1,270.4	67.7	18.3	14.0
A4	690.3	185.7	366.1	1,242.1	55.6	15.0	29.5
A5	458.8	113.6	365.5	937.9	48.9	12.1	39.0
A6	1188.9	151.8	746.4	2,087.1	57.0	7.3	35.8
A7	645.3	352.2	286.4	1,283.9	50.3	27.4	22.3
Average	668.7	190.7	356.3	1,215.73	54.0	16.5	29.5

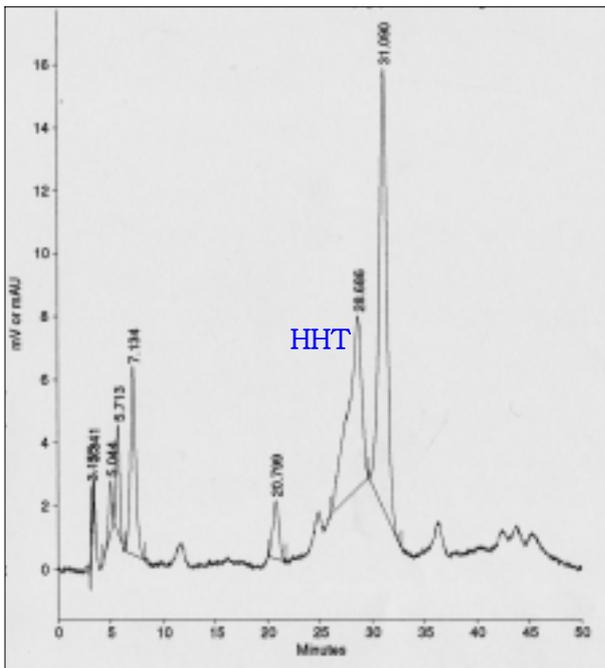
* The contents (μg) of homoharringtonine was showed on the g dry weight in the needle, stem, and root (data represent means \pm standard deviation)



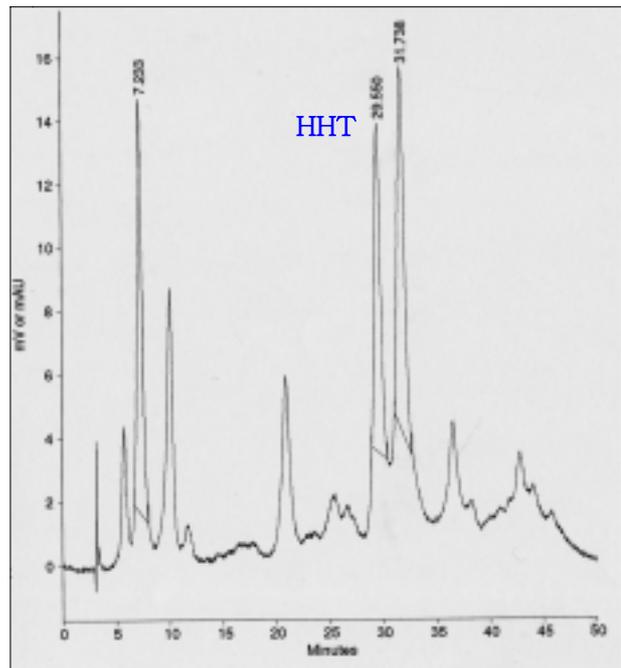
Standard



Leaf



Root



Stem

Figure3. HPLC chromatography of authentic HHT(Homoharringtonine) and extracts from Leaves, Roots, Stems of *Cephalotaxus koreana*

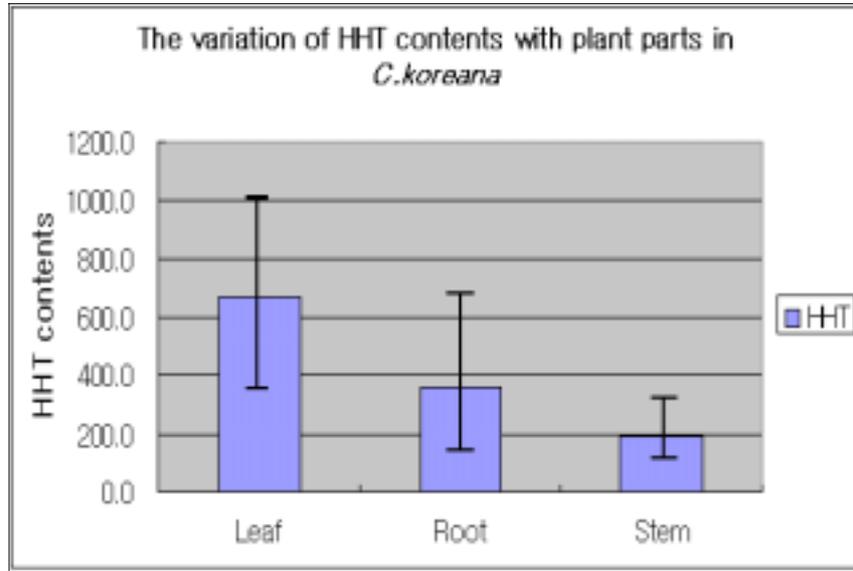


Figure 4. The variation of homoharringtonine(HHT) contents with plant parts in *Cephalotaxus. koreana*.

4. 적 요

- 가. 우리나라에서 개비자 나무속의 분포 지역을 살펴 보면 전국적으로 분포 하면서 특히 중부 이남지역과 도서지역 일대에 많이 분포하였다.
- 나. 개비자나무의 천연집단의 개체군 특성조사에서는 수분조건이 높은 지역에서 주로 군락을 이루고 있었으며 남부지역으로 갈수록 수고, 흉고직경, 수령이 오래되어 성장상태가 우수한 것으로 나타났다.
- 다. 개체내 부위별 HHT(Homoharringtonine) 물질의 함량분석에서는 개비자나무의 잎에서 함량이 가장 높았다.

세부과제 1-2. 개비자나무의 우수집단 선발 및 부위별, 개체별, 집단별 함량변이

가. 우수집단 선발을 위한 함량분석

1) 집단의 서식환경 조사

가) 토양 산도 및 습도 조사

8개 집단의 환경인자와 homoharringtonine 함량과의 관계를 분석하기 위하여 개비자나무의 집단에서 집단 당 10곳의 토양을 Soil pH & Moisture Tester (DM-15)를 이용하여 측정하였다.

고도에 따른 homoharringtonine 함량과 환경인자와의 관계를 분석하기 위하여 광양의 백운산 집단에서 각 개체가 서식하고 있는 고도별로 5곳의 토양 산도 및 습도를 측정하였다.

Damage index에 따른 homoharringtonine 함량과 토양 산도 및 습도와의 관계를 분석하기 위하여 광양의 백운산 집단에서 50×50m 조사구를 설치하고, 그 조사구를 다시 상, 중, 하 세부분으로 나눠 각 부분 별로 6곳의 토양 산도 및 습도를 측정하였다.

나) 서식밀도와 기온 조사

8개 집단에 대해서 서식밀도의 조사는 단위 면적당 개체수(N/m^2)로 나타내는 절대밀도의 방형구법을 사용하였다. 기온은 각 지역별 가장 가까운 기상관측소의 기상관측자료(기상청, 10. 2003~9. 2004)를 가지고 기온을 조사하였다. 위도가 가장 높은 관악산은 개비자나무 개체목들이 집단으로 발견되지는 않았지만 각 집단의 서식지 간 기온의 변이폭을 크게 하기 위하여 집단으로 포함시켰다.

2) Homoharringtonine 물질의 함량분석

가) 함량분석을 위한 시료 채취

이 연구는 2004년 9월부터 2005년 2월 까지 겨울에 연구를 수행 하였는데, 이는 김 등(2000)에 의해 보고 된 계절에 따른 homoharringtonine의 함량이 겨울철에 가장 높게 나타났다는 보고와 겨울에는 식물의 성장이 멈추어 있고, 함량의 변이가 작은 점을 고려한 것이다.

채집한 표본은 homoharringtonine의 함량을 분석할 때 까지 냉동보관 하였으며, 유기용매 추출 및 액/액 추출(Liquid/liquid extraction)을 하였다. 이런 결과로 얻어진 HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 분석용 표본을 이용하여 HPLC 분석을 수행하였다.

8개 집단의 함량변이 분석을 위하여 공주의 계룡산, 거창의 남덕유산, 광양의 백운산, 완도의 오봉산, 해남의 두륜산, 구례의 지리산, 정읍의 내장산, 서울의 관악산에서 시료를 채취하였고, 각 집단 당 20개체를 임의로 선택하여 개체 당 7개의 아무런 피해를 입지 않은 깨끗한 잎을 선택하였으며, 시료는 1년생 가지를 선택해서 잎을 채집하여 함량변이를 최소화 하였다. 7개의 잎 중 무작위로 1개를 선택하여 총 160점을 분석하였다.

개체 내 부위별 함량변이 분석을 위하여 정읍의 내장산 집단, 광양의 백운산 집단, 거창의 남덕유산 집단의 3개 집단에서 7개체씩 택하여 잎, 줄기, 뿌리, 종자 부위를 채취하였는데, 줄기는 지상에서 50cm 부위를 채취하여 다시 형성층을 포함한 수피와 목부로 나눴다. 그리고 종자는 종피를 제거하고 분석에 사용하였다. 잎을 제외한 수피, 목부, 뿌리, 종자에 대해 총 84점을 분석에 이용하였다.

고도에 따른 homoharringtonine 함량을 분석하기 위하여 백운산 집단의 해발 505m부터 580m, 633m, 702m, 760m, 820m까지 6개 지점에서 지점 당 5개체씩 택해서 잎을 채취하여 25점을 분석하였다. 해발 580m 지점의 5개체는 집단별 함량변이에서 이미 분석된 백운산 집단으로 그 5점에 대한 분석 자료를

그대로 사용하였다. 2년생에서부터 5년생에 이르는 수목의 1년생 가지를 대상으로 잎을 채집하였다.

나) 유기용매 추출 및 액/액 추출(Liquid/liquid extraction)

알칼로이드 분석은 Wickremesinhe(1996) 방법을 변형시켜 사용하였다. 식물체 시료를 분말로 만들기 위해 60℃에서 16시간 동안 건조시킨 후 분쇄기로 분쇄하고 0.25mm sieve에 통과시켜서 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 분석은 HPLC 분석용 sample 1g을 methanol 50ml에 녹인 후 10 분간 sonication 하여 추출하였다. 추출액은 감압상태 하에서 funnel을 이용하여 여과하여 여과액을 회수하고 rotary evaporator (25-27''Hg, 40℃)로 완전 농축시켰다. 건고물을 0.5% ammonium hydroxide 20ml/g에 녹이고, 이 농축액과 동량의 chloroform을 가하여 분액깔때기를 이용하여 상 분리를 했다. 상층과 하층으로 상 분리가 되면 하층액인 chloroform층만을 버리고, 상층액에 새로운 chloroform을 가하여 3회 반복 수행하여 추출액을 취했다.

다) HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 분석 sample 및 HPLC 분석

추출액을 다시 rotary evaporator (25-27''Hg, 40℃)로 감압농축 시킨 후 건고물을 methanol 3ml/g에 녹인 후 Syringe filtration (Whatman, 25mm, 0.45um, 50units)을 했다. HPLC (High Performance Liquid Chromatography) 분석은 Lichrospher 60 RP-select B (4 × 250mm, 5μm)을 사용하여 수행했다. 이동상으로는 methanol과 0.1M ammonium formate 용액을 사용했다. 용매의 gradient 조건은 0.8ml/min 유속으로 methanol : 0.1M ammonium formate의 비율이 20 : 80 에서 시작하여 40분 후 40 : 60 이 되도록 했다. 추출한 각 화합물의 15μl를 HPLC 분석기에 주입하였고, 290nm 파장에서 UV에 의한 흡광도를 측정하였다. Homoharringtonine의 정량은 Sigma사에서 구입한 표준물질의 피크 면적으로 표준 정량선을 작성한 후 계산했다. Figure 3에 homoharringtonine의 정제 과정을 나타냈다.

3) 우수 집단 선발

차년도 우수집단 선발을 이용한 대량증식 기술을 개발하기 위하여 당해연도 우수집단과 우수개체를 선발하였다. 선발된 우수집단 내 우수개체에 labelling을 하여 표시를 하였고, 충실한 종자를 선정하여 조직배양과 삽목등과 같은 대량 증식기술을 위한 시료를 마련하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 개비자나무의 개체 내 부위별 homoharringtonine 함량 변이

개비자나무 개체 내 부위별 homoharringtonine의 함량분석 결과 (Table 4, Figure 5) homoharringtonine 함량이 부위별(P<.001)로 상당히 유의한 변이가 있는 것으로 나타났다. 개비자나무 잎에서 homoharringtonine의 함량은 1011μg/g, 뿌리에서 325μg/g, 줄기에서 311.2μg/g(수피 247.3μg/g, 목질부 82.2μg/g), 그리고 종자에서 180μg/g으로 나타났다. 잎에서 homoharringtonine의 함량이 가장 높았으며, 다음으로 뿌리, 줄기, 종자 순으로 함량을 나타냈다. 이러한 변이를 보다 세부적으로 알아보기 위해 Duncan 검정을 실시하였으며, 그 결과 뿌리, 줄기, 종자 간에는 함량의 차이가 없는 것으로 나타났고, 잎은 뿌리, 줄기, 종자보다 높은 것으로 나타났다. 이 결과는 박 등(1996)이 종자를 제외한 잎, 줄기, 뿌리에 대해 부위별 함량을 비교 분석한 결과와 유사하게 나타났다. 김 등(2000)의 보고에 의하면 개비자나무의 잎이 줄기에 비해 약 2배 정도 높은 homoharringtonine 함량을 보인다고 하였으나 본 연구

결과 약 3배 정도 높은 것으로 나타났다.

Taxol 공급을 위해 상당량의 주목나무를 훼손하는 것에 대해 세계적으로 환경단체들이 문제를 제기하고 있다(Chase, 1991). 수피로부터 taxol의 추출공정이 발전 되어온 주목나무(*Taxus brevifolia*) 경우에는 최근 안정된 공급원으로 많이 사용되고 있다(Rao, 1995). 잎은 매년 재생이 가능하므로 개비자나무 또한 다른 조직에 비해 안정된 공급원으로 사용될 수 있을 것으로 판단된다(김 등, 2000).

Table 4. The variation of homoharringtonine contents in the different parts of *Cephalotaxus koreana* trees of 3 different populations.

Location	Homoharringtonine contents				
	Leaf	Stem		Root	Seed
		Bark	Xylem		
SD	1047.7	294	89.5	224.7	172.2
NJ	958.7	303.5	55.8	393.9	221.6
BU	617.4	144.5	46.2	356.3	146.2
Mean	1010.9±257.2	247.3±63.9	63.9±19.5	325±178.1	180±50.4

* The contents(μg) of homoharringtonine in the leaf, stem, root, and seed were shown as the gram dry weight (data represent means \pm standard deviation)

* SD, Mt. South Dukyu; NJ, Mt. Naejang; BU, Mt. Baekun.

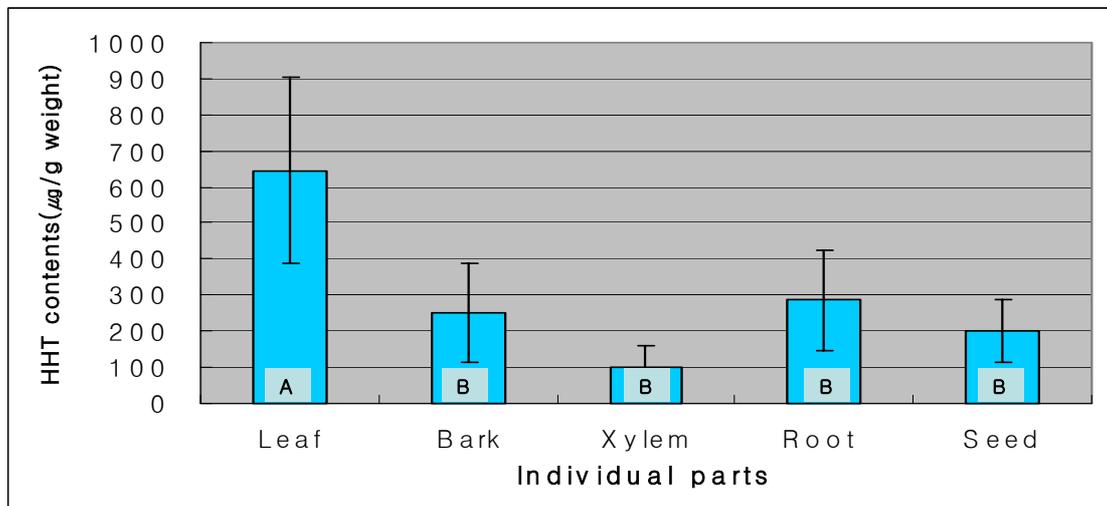


Figure 5. The variation of homoharringtonine contents in the different parts of *C. koreana* trees of the 3 different populations. Same letters are not significantly different ($P < 0.001$) according to Duncan's Multiple Range Test.

나. 개체의 수령, 수고 및 직경과 homoharringtonine 함량과의 관계

개비자나무의 지역별 개체특성은 완도의 오봉산이나 해남의 두륜산 등 남부지역으로 내려갈수록 수령이 오래되었고, 중부지역으로 올라갈수록 수령이 5년 이하였다. Fu 등(1999)에 의하면 개비자나무는 광량이 적고, 따뜻한 지역에서 생육이 왕성하다고 보고한 바 있다. 이러한 원인은 기온이 따뜻한 남부지

역으로 내려갈수록 상층부에 활엽수림이 많이 분포함에 따라 빛의 노출에 약한 개비자나무에게 유리한 생육지를 만듦으로써 성장을 발달 시키는 것으로 추정된다. 따라서 개비자나무는 상층수관에 의하여 햇빛이 많이 차단되고, 기온이 따뜻하며, 습도가 높은 곳에서 생장이 좋은 것으로 판단된다.

개비자나무는 다양한 antitumor alkaloid를 제공하는데 그 함량은 다양한 환경의 지배를 받는다. Norman 등(1980)의 연구결과에 의하면 free alkaloids (homoerythrina alkaloids, cephalotaxine)의 농도가 수령에 따라 증가하지 않는 반면, cephalotaxine ester (harringtonine, deoxyharringtonine, isoharringtonine and homoharringtonine)의 농도는 수령에 따라 약 5배나 증가한다고 보고 하였다. 그리고 전체 알칼로이드 농도는 잎의 연령에 따라 증가 하였으나, 줄기는 상반된 결과를 나타낸다고 도출하였다. 그러나 이 연구는 Norman 등(1980)의 실험과는 달리 자생지에서 장기간 동안 자란 정읍의 내장산 집단, 광양의 백운산 집단, 해남의 두륜산 집단의 3개 집단에 대해서 각 개체별로 수고, 직경, 수령을 조사한 자료를 이용하여 homoharringtonine과의 관계를 분석하였다(Table 5, Figure 6).

개비자나무의 수령, 수고 및 직경과 homoharringtonine 함량과의 관계를 분석한 결과 2년생은 함량이 944.1 μ g/g로 가장 높았고, 3년생에서 4년생까지 점차 함량이 감소하다가 5년생이 되면서 함량이 566.1 μ g/g로 급격히 감소하는 것으로 나타났다. 또한 직경은 6.9mm에서 11.7mm, 수고는 72cm에서 123.2cm까지는 함량이 점차 감소하다가 직경은 11.7mm, 수고는 123.2cm보다 커지면서 급격히 감소하였다(Table 5). 식물의 성장과 2차대사산물은 많은 식물 세포에서 부(-)의 관계가 있는 것으로 알려졌다(Phillips, 1977). 이 연구에서도 개비자나무의 수령, 수고 및 직경과 homoharringtonine의 함량은 부(-)의 관계가 있는 것으로 나타났다.

Table 5. Relationship between the features of individual trees and homoharringtonine contents

Tree age(year)	Diameter(mm)	Height(cm)	HHT contents(μ g/g)
2	6.9	72.0	944.1 \pm 425.9
3	10.5	85.6	832.7 \pm 371.2
4	10.8	92.0	790.5 \pm 594.4
5	11.7	123.2	566.1 \pm 356.4
6	16.4	188.2	114.6 \pm 72.8
7	16.6	196.5	230.3 \pm 215.4

* This data was based on the features of 60 individuals and homoharringtonine contents (represent means \pm standard deviation)

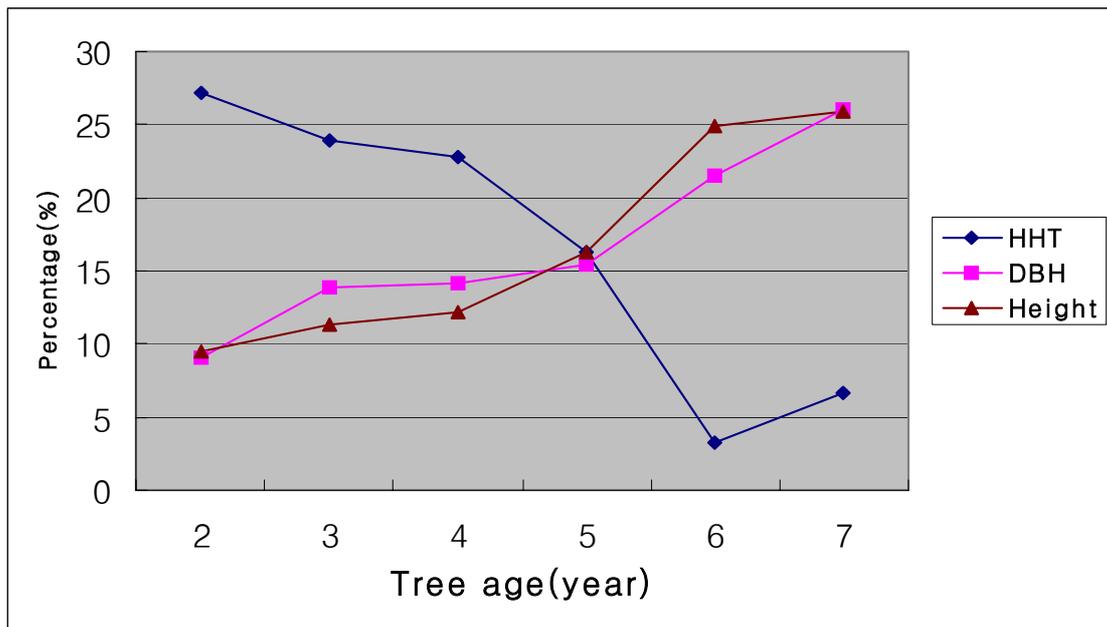


Figure 6. Relationship between the features of individual trees and homoharringtonine contents. Each of the data figures was transformed into percentage.

다. 개비자나무의 집단 간 homoharringtonine 함량의 변이

Figure 3은 집단 간 homoharringtonine 함량의 변이를 나타낸 것으로 거창의 남덕유산 집단이 1048 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높았고, 다음으로 정읍의 내장산 집단이 958.7 $\mu\text{g/g}$ 이며 완도의 오봉산 집단이 411 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 낮았다. 박 등(1996)이 연구한 결과에 의하면 위도상으로 남쪽보다는 북쪽으로 올라 갈수록 homoharringtonine 함량이 증가한다고 보고 하였다. 그러나 이 연구 결과 북쪽으로 올라 갈수록 homoharringtonine 함량이 증가한다는 일관된 경향을 확인할 수 없었다(Figure 7).

개비자나무의 homoharringtonine 함량에 대해서 집단 간 및 집단 내 변이에 대한 분산분석을 한 결과(Table 6, Table 7) 집단 간 변이값이 652509.6으로 집단 간($P < .01$)에 상당히 유의한 차이가 있는 것으로 조사 되었으며, 집단 내 변이값은 44180188.4으로 집단 내에서도 차이가 있는 것으로 나타났다. 이러한 차이를 보다 세부적으로 살펴보기 위하여 Duncan 검정(Duncan's Multiple Range Test)을 실시하였으며, 다중비교 결과는 A그룹 남덕유산, 내장산, 백운산과 B그룹 내장산, 백운산, 지리산, 계룡산, 그리고 C그룹 백운산, 지리산, 계룡산, 관악산, 두륜산, 오봉산 집단으로 그룹이 만들어 졌으며, 각 그룹 내에서는 homoharringtonine 함량의 유의 차가 없는 것으로 나타났다. 남덕유산은 지리산, 계룡산, 관악산, 두륜산, 오봉산과 유의적인 차이를 나타냈고, 내장산은 남덕유산, 관악산, 두륜산, 오봉산과 유의적인 차이를 나타냈으며, 백운산은 남덕유산, 내장산에서 유의적인 차이를 나타냈다. 따라서 기온에 따른 homoharringtonine의 함량 변이 보다는 또 다른 서식지 환경인자가 homoharringtonine의 함량에 영향을 미칠 것으로 보인다.

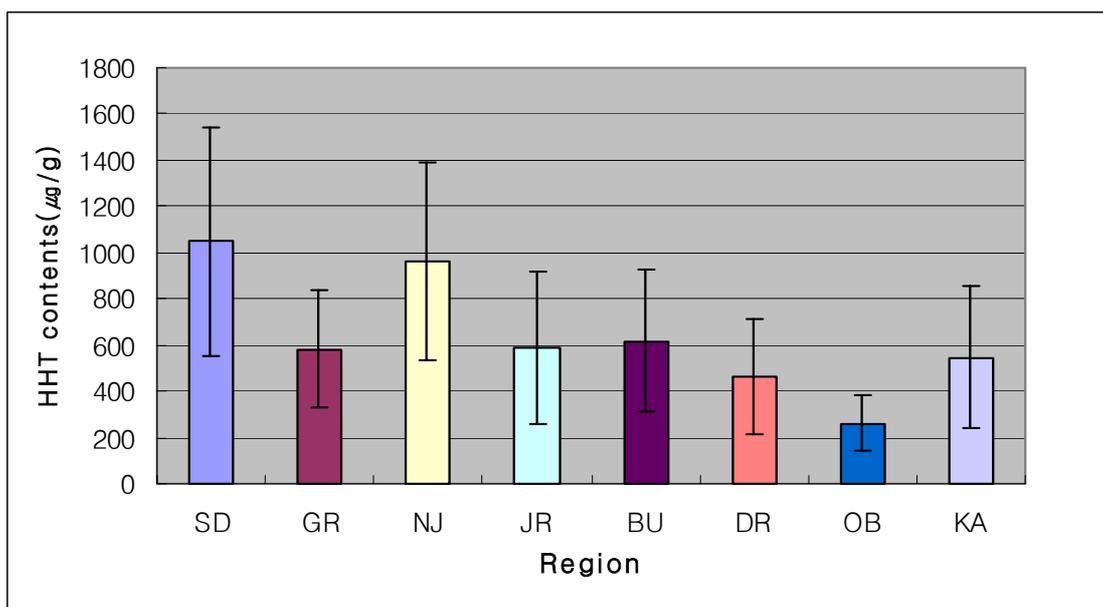


Figure 7. The contents of homoharringtonine in the *Cephalotaxus koreana* trees of 8 different populations

SD, Mt. South Dukyu; GR, Mt. Gyeryong; NJ, Mt. Naejang; JR, Mt. Jiri; BU, Mt. Baekun; DR, Mt. Duryun; OB, Mt. Obong; KA, Mt. Kwanak.

Table 6. ANOVA of homoharringtonine contents in the *Cephalotaxus koreana* trees of 8 different populations

	DF	MS	P
Among populations	7	932272.8	F=3.21 ** (.003)
Within populations	152	290659.1	

* ** P<.01.

Table 7. Mean of the homoharringtonine contents in the *Cephalotaxus koreana* trees of 8 different populations

Region	N. of Sample	Mean	S.D.	Duncan grouping
SD	20	1047.7	490.8	A
NJ	20	958.7	428.3	B A
BU	20	617.4	309.2	B A C
JR	20	586.6	331.2	B C
GR	20	583.1	257.9	B C
KA	20	546.4	308.5	C
DR	20	467.3	250.2	C
OB	20	411.0	121.3	C

* SD, Mt. South Dukyu; GR, Mt. Gyeryong; NJ, Mt. Naejang; JR, Mt. Jiri; BU, Mt. Baekun; DR, Mt. Duryun; OB, Mt. Obong; KA, Mt. Kwanak.

* Multiple comparison by Duncan's Multiple Range Test.

라. 8개 집단의 무생물적 환경인자와 homoharringtonine 함량과의 관계

8개 집단의 무생물적 환경인자와 homoharringtonine 함량과의 관계를 분석하기 위하여 개비자나무의 집단에서 토양 pH, 토양 습도(%), 서식밀도(N/m^2), 기온($^{\circ}C$)을 이용하여 환경인자의 자료로 사용하였다(Table 8, Figure 8). 토양의 pH는 내장산 집단이 7로 가장 높았으며, 지리산 집단과 계룡산 집단이 6.4로 가장 낮은 pH를 나타냈다. 토양 습도는 내장산 집단 40%로 가장 높았고, 오봉산 집단이 26.5%로 가장 낮았다. 서식밀도는 내장산 집단이 $4N/m^2$ 로 가장 높았으며, 오봉산 집단이 $0.3N/m^2$ 로 가장 낮았다. 기온은 오봉산 집단이 $14.7^{\circ}C$ 로 가장 높았고, 남덕유산 집단이 $12.6^{\circ}C$ 로 가장 낮은 수치를 나타냈다. Homoharringtonine 함량이 $1048\mu g/g$ 으로 가장 높은 남덕유산 집단은 토양 습도가 높았고, 토양 pH는 낮았으며, 서식밀도는 중(中) 정도의 수치를 나타냈고, 기온은 가장 낮았다. 한편 내장산 집단은 전체적으로 homoharringtonine 함량과 토양 pH, 토양 습도, 서식밀도, 기온에서 높은 수치를 나타냈다(Figure 4).

무생물적 환경인자와 homoharringtonine 함량의 관계를 살펴 본 결과(Table 9) 유의수준 5%수준에서 토양 습도의 회귀계수만 유의하고, 토양 pH, 서식밀도, 기온의 회귀계수들은 유의하지 않은 것으로 나타났다. 따라서 토양습도만 homoharringtonine 함량에 높은 영향을 미치는 것으로 보이고, 토양 pH, 서식밀도, 기온은 함량에 영향을 미치는 정도가 낮은 것으로 보인다. 또한 본 연구에서는 homoharringtonine 함량이 우수개체 내 유전적인 요인보다는 환경인자에 의한 영향이 더 큰 것으로 판단되어 우수개체 선발 보다는 우수집단 선발을 하였다.

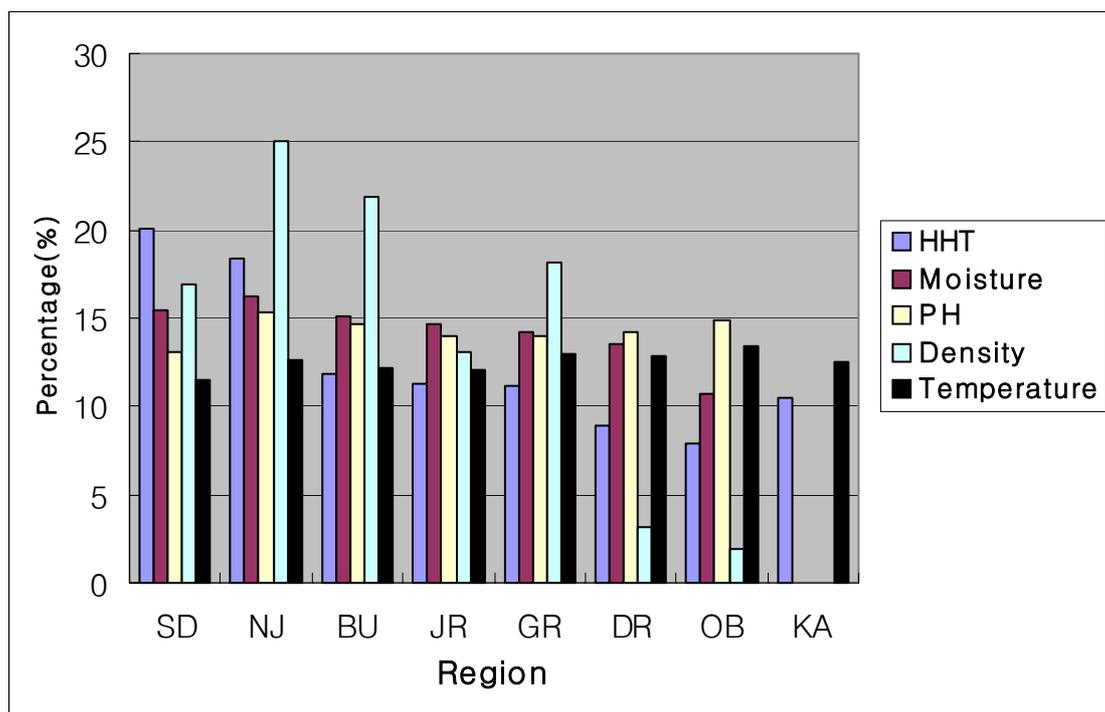


Figure 8. Relationship between homoharringtonine contents and abiotic factors in the 8 different populations. Each of the data figures was transformed into percentage.

Table 8. Relationship between homoharringtonine contents and abiotic factors in the 8 different populations.

	HHT($\mu\text{g/g}$)	Moisture(%)	PH	Density(%)	Temperature($^{\circ}\text{C}$)
SD	1047.7	38.1	6	2.7	12.6
NJ	958.7	40	7	4	13.8
BU	617.4	37.4	6.7	3.5	13.3
JR	586.6	36.2	6.4	2.1	13.2
GR	583.1	35	6.4	2.9	14.2
DR	467.3	33.4	6.5	0.5	14.1
OB	411	26.5	6.8	0.3	14.7
KA	546.4	-	-	-	13.7
Mean	652.3	35.2	6.5	2.3	13.7

Table 9. Regression of homoharringtonine contents with abiotic factors in the 8 different populations.

	Coefficient	t-value	R ²
Soil pH	-180.35	-0.56	0.05
Soil moisture	42.30 *	2.69	0.59
Density	117.56	2.14	0.48
Temperature	-236.21	-2.25	0.46

* Simple regression was conducted. Significance of differences from the abiotic factors: * P<0.05

마. 고도에 따른 무생물적 환경인자와 homoharringtonine의 함량 변이

Homoharringtonine은 고도가 높아질수록 함량이 낮아졌다. 광양의 백운산 집단에서 고도가 낮은 580m에서 622.9 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 높게 나타났고, 고도가 820m에서 225.4 $\mu\text{g/g}$ 으로 가장 낮게 나타났다. Darrow 등(1997)은 창질경이(*Plantago lanceolata*)에 대해서 monoterpeneoid 화합물인 catalpol의 고도에 따른 함량변이를 연구했다. Catalpol은 고도가 낮은 지점에서 함량이 높았고, 고도가 높은 지점에서 함량이 낮아 본 실험과 유사한 결과를 나타냈다. 이러한 원인은 빛이 제한인자라고 가정 했을때, 질소에 대한 탄소의 비율이 이차대사산물의 합성에 영향을 준다는 탄소/양분균형 가설에 의해 설명될 수 있다고 보고 하였다(Bryant 등, 1987, Herms 등, 1992). 본 연구는 고도의 범위가 좁아서 Darrow(1997)의 연구와 원인이 일치한다고 보기는 어려우나, 질소에 대한 탄소의 비율이 homoharringtonine 함량에 어느 정도 영향을 미치는 것으로 추정된다.

토양 pH는 633m에서 가장 높게 나타났으나 고도에 따른 pH의 일관된 변이는 보이지 않았다. 토양 습도는 고도가 높아질수록 낮아졌다, 505m에서 42.9%로 가장 높게 나타났고, 820m에서 31.4%로 가장 낮았다(Figure 9).

고도에 따른 무생물적 환경인자와 homoharringtonine의 함량 관계에 대해서 homoharringtonine 함량에 상대적으로 높은 영향인자를 찾기 위하여 다중회귀 분석을 실시한 결과 유의수준 5% 수준에서 토양 습도의 회귀계수만 유의하였다. 따라서 지역 간 비교와 마찬가지로 토양 pH 보다는 토양 습도가 상대적으로 homoharringtonine 함량에 높은 영향을 미치는 것으로 보인다(Table 10, Table 11).

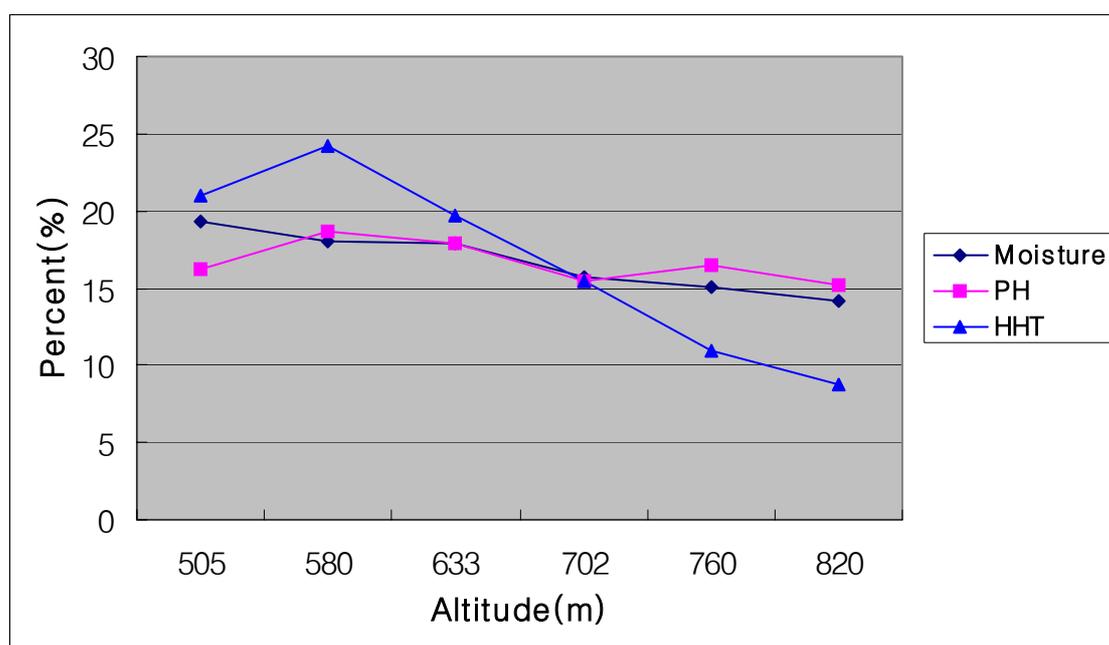


Figure 9. Relationship between homoharringtonine contents and abiotic factors with altitude at Mt. Baekun.

Table 10. Relationship between homoharringtonine contents and abiotic factors with altitude at Mt. Baekun.

Altitude	moisture	PH	HHT
505	42.9	6.1	538.5
580	40	7	622.9
633	39.8	6.7	506.0
702	34.9	5.8	398.2
760	33.5	6.2	281.8
820	31.4	5.7	225.4
Mean	37.1	6.3	428.8

Table 11. Regression of homoharringtonine contents with abiotic factors in different altitude at Mt. Baekun.

	Coefficient	t-value	R ²
Soil pH	25.12*	3.26	0.90
Soil moisture	96.8	1.43	

* Multiple regression was conducted. Significance of differences from the abiotic factors: * P<0.05

4. 적 요

1. 개비자나무의 개체 내 부위별 homoharringtonine 함량변이를 세부적으로 살펴본 결과 앞에서 homoharringtonine의 함량이 가장 높았다.
2. 개비자나무의 집단 간 homoharringtonine 함량변이 연구 결과 거창의 남덕유산 집단이 가장 높게 나타났다.
3. 8개 집단의 무생물적 환경인자와 homoharringtonine 함량과의 관계에서는 토양 습도가 상대적으로 homoharringtonine 함량에 높은 영향을 미치는 것으로 나타났다.

세부과제 1-3. 개비자나무의 대량 증식기술 개발

2. 재료 및 방법

가. 캘러스 배양을 통한 개비자나무의 대량증식

1) 조사지역

2005년 11월부터 2006년 2월 까지 전국 7개 지역을 조사한 결과 성장상태가 가장 우수하고 homoharringtonine 함량이 가장 높은 경상남도 거창의 남덕유산 군락을 선정하여 1-2년생의 유령목들을 굴취하여 시료로 사용하였다(Figure 10).

Figure 10. 남덕유산 개비자 나무 군락지 조사 및 굴취



2) 세포주 유도

가) 잎의 전처리

Callus 유도에 이용한 1-2년생의 성장상태가 좋은 잎을 이용하였다. 잎이 달려 있는 줄기를 약 10cm 길이로 자른 다음 세척한 후 70% 에탄올에 1-2분 동안 넣고 교반하여 표면 살균하였다. 2% Sodium hypochlorite(NaClO)로 10-15분간 표면 살균한 후 멸균수로 5회(5m, 5m, 20m, 5m, 5m) 간격으로 총 30-40분 동안 세척하였다.

나) 종자의 전처리

과산화수소(1%)에 종자의 종피를 제거하고 1일 동안 표면살균 하였다. 알콜 70%으로 30-60초 동안 Shaking 한 후 Sodium Hypochlorite 2%을 Flask에 30분 동안 재표면 살균 하였고 멸균수를 잎 전처리 와 같이 총 5회 30분 동안 세척하였다.

3) 배지 제조 및 세포배양

가) 잎의 절편체 세포배양

잎을 0.3-1cm 정도로 자른 뒤 SH배지에 한천을 혼합한 고체 배양용 배지위에 옮겨 배양을 시작하고, 개비자 현탁배양에 이용할 성장배지는 Schenk와 Hilderbrandt(SH) 기본배지에 탄소원으로 자당을 20g/L 첨가하며, 2 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L Kinetin, vitamin 농축용액을 보충하였다(Figure 11). 이러한 모든 조작은 무균 조작대에서 무균적으로 실시하고, 25℃ 암조건에서 배양 시작한 후 Callus가 유도되면 이중 생장이 우수한 것을 골라 계대배양을 실시하였다. pH는 가압증기멸균 전에 1N NaOH로 5.8이 되도록 하였다. 계대배양은 2주 간격으로 수행하고 250ml Erlenmeyer flask에 100ml의 배지에 접종한 후 암소의 회전식 진탕배양기에서 120rpm, 25℃를 유지하였다. 생산배지는 Bringi 등이 개발한 생산배지를 기본재로 하여 2 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L Kinetin vitamin 농축용액, amino acid 혼합용액을 첨가하였다. 탄소원으로는 자당 60g/L를 첨가한 생산배지(PMB6S)와 과당 60 g/L를 첨가한 생산배지(PMB6F)를 이용한 후 pH는 가압증기멸균 전에 5.8이 되도록 하였다.

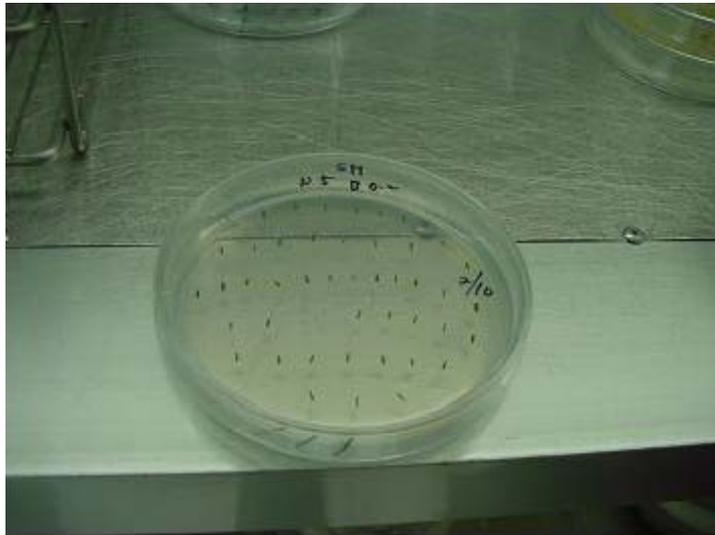


Figure 11. 잎을 성장배지에 치정

나) 종자의 체세포 배양

무균상태에서 종자의 embryo를 분리해낸 다음 SH배지에 한천을 혼합한 고체 배양용 배지위에 옮겨 배양을 시작하였다(Figure 12). 현탁배양에 이용할 성장배지는 Schenk와 Hilderbrandt(SH) 기본배지에 탄소원으로 자당을 20g/L 첨가하고, 2 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L Kinetin, vitamin 농축용액을 보충하였다. 이러한 모든 조작은 무균 조작대에서 무균적으로 실시하고, 25℃ 암조건에서 배양 시작한 후 Callus가 유도되면 이중 생장이 우수한 것을 골라 계대배양을 실시하여 세포주를 확립하였다. pH는 가압증기멸균 전에 1N NaOH로 5.8이 되도록 하였다. 계대배양은 2주 간격으로 수행하고, 250ml Erlenmeyer flask에 100ml의 배지에 접종하고 암소의 회전식 진탕배양기에서 120rpm, 25℃를 유지하였다. 생산배지는 Bringi 등이 개발한 생산배지를 기본재로 하여 2 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L Kinetin, vitamin 농축용액, amino acid 혼합용액을 첨가하였다. 탄소원으로는 자당 60g/L를 첨가한 생산배지(PMB6S)와 과당 60 g/L를 첨가한 생산배지(PMB6F)를 이용한 후 pH는 가압증기멸균 전에 5.8이 되도록 하였다.



Figure 12. 종자의 embryo를 성장배지에 치정

나. 삼목을 통한 개비자나무의 대량증식

개비자나무는 경상남도 거창에 있는 남덕유산에서 성장이 잘된 나무를 선정하여 삼수로 채취하였고, 삼수(14개체씩)는 9-10cm가 되도록 자른 후 서울대학교 관악 수목원내 온실에서 삼목 하였다. 삼목용토는 peatmoss : vermiculite = 1 : 1, peatmoss : vermiculite : perlite = 1 : 1 : 1, peatmoss : perlite = 1 : 1 비율로 나눈 혼합용토로 하였고, 발근촉진제는 저농도의 IBA와 Rootone(주성분 NAA)을 각각 75, 100, 200 ppm에 24시간을 침지하였다. 삼목상은 전열 삼목상으로 22, 24, 26℃로 온도를 다르게 하였고, 대조구는 무처리로 두고, 완전임의배치 3반복으로 실험을 실시하였다. 삼목 시기는 2006년 3월 1일 삼목하여 삼목 3개월 후에 발근율, 발근수 등 발근상황을 조사하였다(Figure 13).

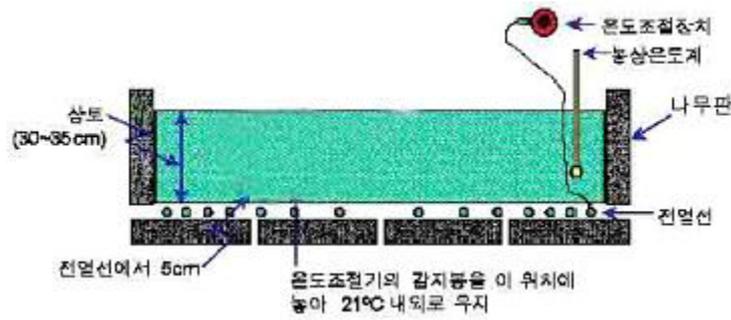


Figure 13. 개비자나무의 대량증식을 위한 전열 삼목상

3. 결과 및 고찰

가. 캘러스 배양을 통한 개비자나무의 대량증식

개비자나무의 캘러스에 효과적인 식물생장조절물질의 종류와 농도를 파악하고자 잎의 줄기 절편체를 2,4-D와 Kinetin이 첨가된 MS배지에 치상하여 캘러스 유도율을 조사하였다(Table 12). 배양 4주 후부터 잎절편체의 절단면에서 캘러스가 형성되기 시작하여 표면 전체로 확산하는 것을 관찰할 수 있었으며, 잎 절편체의 모든 조합에서는 캘러스가 유도되었으나 캘러스 유도율이 상당히 낮았고, 줄기절편체와 종자에서는 대부분 유도되지 않고 갈변화 또는 고사현상이 두드러지게 나타났다. 개비자나무의 잎 절편체를 2 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L Kinetin의 조합배지에 치상하였을 때 캘러스가 가장 효과적으로 유도되었고, 또한 암조건이 광조건보다 캘러스 유도에 유리하게 작용하는 것을 알 수 있었다. 개비자나무의 기본생장배지를 만들기 위하여 4가지 배지(0.5 MS, MS, B5, SH)를 실험한 결과 SH배지에서 34%로 캘러스 형성이 가장 효과적으로 유도되었다(Table 13). SH배지에 2 mg/L 2,4-D와 0.5 mg/L Kinetin의 조합으로 유도된 잎절편체 유래 캘러스를 암조건에서 계대배양하였을 때 초기 형태를 계속 유지하는 큰 덩어리로 성장하였다. 이들 캘러스의 윗부분은 노쇠하여 분열력이 약해 캘러스로부터 shoot 원기를 발달시킬 수 있는 부위의 캘러스의 선별은 중요하다. 개비자나무의 잎절편체 유래 캘러스는 부위별 형태적 특징에 의해 shoot-forming(SF) 캘러스와 non-shoot-forming(NSF) 캘러스로 구분할 수 있었다. SF캘러스는 표면에 광택이 있고, 조직이 치밀하게 배열되었으며 전체적으로 구형의 돌기구조로 인한 녹색을 띠었

다. 반면에 NSF 캘러스는 전반적으로 함수량이 많거나 구성세포 간에 부착력이 적어 쉽게 부서지거나 함수량이 적어 더 이상 성장하지 않았다.

Table 12) 개비자나무의 잎, 줄기, 종자로부터 캘러스 유도에 관한 식물생장조절물질의 효과

식물생장조절물질(mg/L)		Callus 유도(%)*		
2,4-D	Kinetin	잎	줄기	종자
0.5	0.2	11	0	0
1	0.2	15	0	0
2	0.2	22	2	0
5	0.2	17	0	0
0.5	0.5	13	0	0
1	0.5	24	0	2
2	0.5	36	11	5
5	0.5	24	2	0

* 25개 치상한 절편체 당 캘러스 형성체 백분율(%)

Table 13) 개비자나무의 잎, 줄기로부터 다른 성장배지의 효과

성장배지	Callus 유도(%)*	
	잎	줄기
0.5 MS	15	0
MS	21	0
B5	11	0
SH	34	5

* 25개 치상한 절편체 당 캘러스 형성체 백분율(%)

대량증식을 위해서는 현탁배양을 통해 다량의 균일한 세포괴를 얻고 이들을 재분화가 가능한 캘러스로 유도하는 것은 안정된 식물체 재분화 조건을 확립하고 매우 중요하다. 현탁배양을 위해 육안으로 선별한 배양초기의 SF캘러스들은 단세포로 분리되지 않고 대부분 여러개의 세포가 군집으로 뭉쳐있기 때문에 이들을 처음 1개월간은 일주일 간격으로 2회이상 계대배양을 통해 선별된 캘러스를 5 mg/L 2,4-D 와 0.5 mg/L Kinetin와 1mg/L CH(Casein Hydrolysate)가 첨가된 액체배지에서 다량으로 현탁배양을 하였으나 곰팡이균의 오염과 기술적인 문제로 인해 식물체 재분화과정은 관찰할 수 없었다(Figure 14, Figure 15).

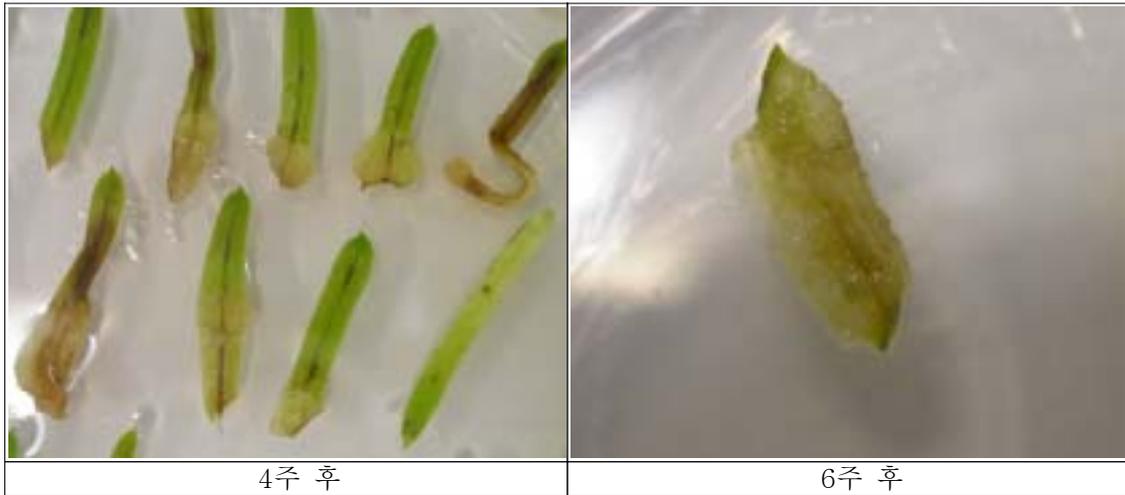


Figure 14. 개비자나무 잎 절편체의 캘러스 형성



Figure 15. Shoot-Forming(SF) 캘러스의 형태적 특징

가. 삽목을 통한 개비자나무의 대량증식

1) 개비자나무의 삽목용토별 발근효과

개비자나무는 늦가을부터 이른 봄까지 발근호르몬이 제일 많이 축적된 시기로서 3월 1일에 peat moss : vermiculite = 1 : 1 의 비율로 삽목한 결과 24℃의 삽목온도는 22℃의 삽목온도보다 매트형성 정도를 제외한 발근정도, 발근 최대장, 발근 생체중의 발근묘소질에서 근소한 차이로 높았으나 26℃ 삽목온도에서는 발근묘소질면에서 전체적으로 상당히 낮았다. 발근율은 삽목온도에 따라서 다르게 나타났는데, 24℃의 삽목온도 IBA 200 ppm이 56.6%, 26℃ 삽목온도 Rootone 200 ppm이 15.4%로 가장 높았고, 22℃ 온도에서는 IBA 75 ppm이 57.9%로 가장 높았으며, 매트형성정도 2.6, 발근정도 2.5, 발근최대장 1.9cm, 발근생체중 48.6mg으로 가장 높았다(Table 14, Figure 16).

Table 14. 개비자나무 삽목용토(peat moss : vermiculite = 1 : 1)에 따른 삽목온도 및 발근촉진제 처리가 발근에 미치는 영향

온도(℃)	발근촉진제 농도 및 침지시간(24시간)	매트형성 정도*	발근정도**	발근최대장 (cm)	발근 생체중 (mg/개)
22	무처리	1.3	1.4	1.3	11.6
	IBA 75	2.6	2.5	1.9	48.6
	IBA 100	2.4	2.3	1.4	45.3
	IBA 200	2.2	2.1	1.2	40.3
	Rootone 75	1.9	1.2	1.1	28.7
	Rootone 100	2	1.5	1.2	32.9
	Rootone 200	2.2	1.9	1.4	34.3
평균		2.09	1.84	1.36	34.53
24	무처리	1.9	1.7	1.4	28.4
	IBA 75	2.5	2.2	1.7	43.2
	IBA 100	2.4	2.3	1.6	40.8
	IBA 200	2.6	2.4	1.9	46.1
	Rootone 75	2	2.2	1.5	45.3
	Rootone 100	1.5	1.8	1.3	28.6
	Rootone 200	1	1.1	0.8	11.4
평균		1.99	1.96	1.46	34.83
26	무처리	1.5	1.2	1.4	22.7
	IBA 75	1.1	1.1	0.8	19.1
	IBA 100	1.4	1.4	1.4	24.6
	IBA 200	1.5	1.4	1.3	22.8
	Rootone 75	1.5	1.3	0.9	19.4
	Rootone 100	1.6	1.3	1.2	22.9
	Rootone 200	1.8	1.5	1.5	25.4
평균		1.49	1.31	1.21	22.41

* 1: 매우불량, 2: 불량, 3: 보통, 4: 양호, 5: 매우양호

** 1: 1~5, 2: 6~10, 3: 11~15, 4: 16~20, 5: 20개 이상

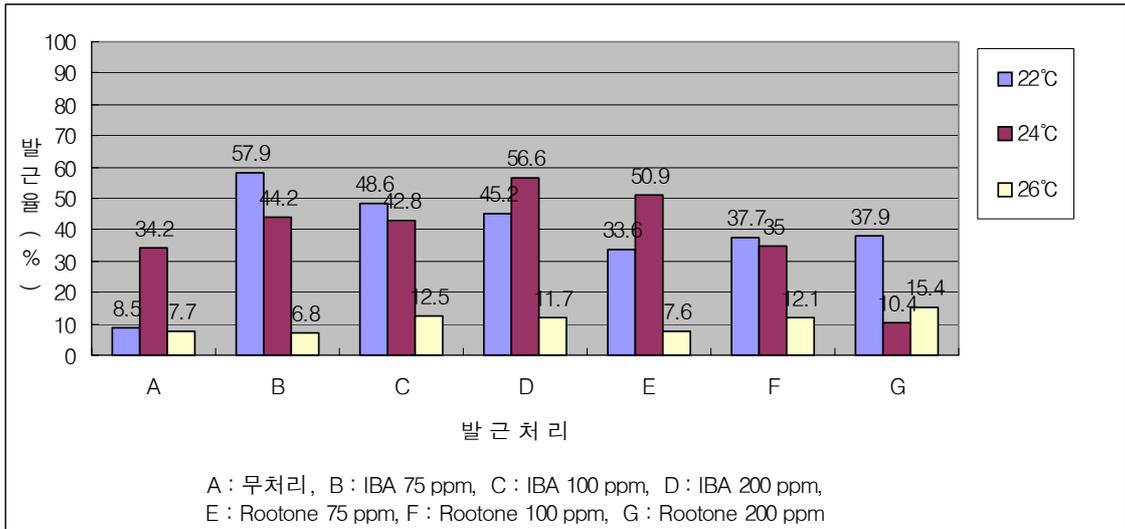


Figure 16. 개비자나무 혼합용토(peat moss : vermiculite = 1 : 1) 삼목의 삼목온도 및 발근촉진제별 발근율

개비자나무를 peat moss : vermiculite : perlite = 1 : 1 : 1 의 비율로 삼목한 결과 다른 삼목용토에 비해 발근율 및 발근묘소질면에서 가장 높은 결과를 보였으며(Figure 17), 24°C 의 삼목온도가 22°C, 26°C 삼목온도보다 발근율 및 발근묘소질에서 높았다(Figure 18). 발근촉진제처리에 있어서는 IBA가 Rootone보다 발근 촉진이 잘 되는 것으로 나타났으며(Figure 19), Rootone 200 ppm이 발근율 및 묘소질면에서 가장 낮았다. 그러나 24°C의 삼목온도에서 IBA 100 ppm은 74.4%로 가장 높은 발근율을 보였고, 발근묘소질면에서도 매트형성 4.1, 발근정도 3.3, 발근최대장 2.3cm, 발근생체중 57.2mg으로 가장 높았다(Table 15, Figure 20).



Figure 17. 개비자나무의 삼목용토에 따른 발근율(삼목온도 24°C, IBA 100ppm)



Figure 18. 개비자나무의 삼목온도에 따른 발근율
(IBA 100ppm, peat moss 1 : vermiculite 1 : perlite 1)



Figure 19. 개비자나무의 삼목발근촉진제에 따른 발근율
(IBA 100ppm, peat moss 1 : vermiculite 1 : perlite 1, 24°C)

Table 15. 개비자나무 삽목용토(peat moss : vermiculite : perlite = 1 : 1 : 1)에 따른 삽목온도 및 발근촉진제처리가 발근에 미치는 영향

온도(°C)	발근촉진제 농도 및 침지시간(24시간)	매트형성 정도*	발근정도**	발근최대장 (cm)	발근 생체중 (mg/개)
22	무처리	1.2	1.3	1.3	11.6
	IBA 75	2.8	2.9	1.5	48.6
	IBA 100	3.2	3.1	1.9	51.1
	IBA 200	3	2.9	1.9	52.1
	Rootone 75	2.2	1.9	1.1	28.7
	Rootone 100	2.6	2.1	1.4	35.9
	Rootone 200	2.4	1.9	1.2	31.3
	평균		2.49	2.30	1.47
24	무처리	2	1.5	1.4	28.4
	IBA 75	3.5	3.2	1.9	51.1
	IBA 100	4.1	3.3	2.3	57.2
	IBA 200	3.5	2.9	2	53.1
	Rootone 75	2.5	2.2	1.8	42.1
	Rootone 100	3.1	2.9	2	49.7
	Rootone 200	2.1	2.3	1.8	40.5
	평균		2.97	2.61	1.89
26	무처리	1.3	1.2	1.5	23.7
	IBA 75	2.1	1.8	1.3	40.1
	IBA 100	2.2	1.8	1.2	38.6
	IBA 200	2.5	1.9	1.4	40.3
	Rootone 75	1.5	1.3	1.2	33.4
	Rootone 100	1.2	2.1	1.5	21.9
	Rootone 200	1.8	1.5	1.4	22.4
	평균		1.80	1.66	1.36

* 1: 매우불량, 2: 불량, 3: 보통, 4: 양호, 5: 매우양호

** 1: 1~5, 2: 6~10, 3: 11~15, 4: 16~20, 5: 20개 이상

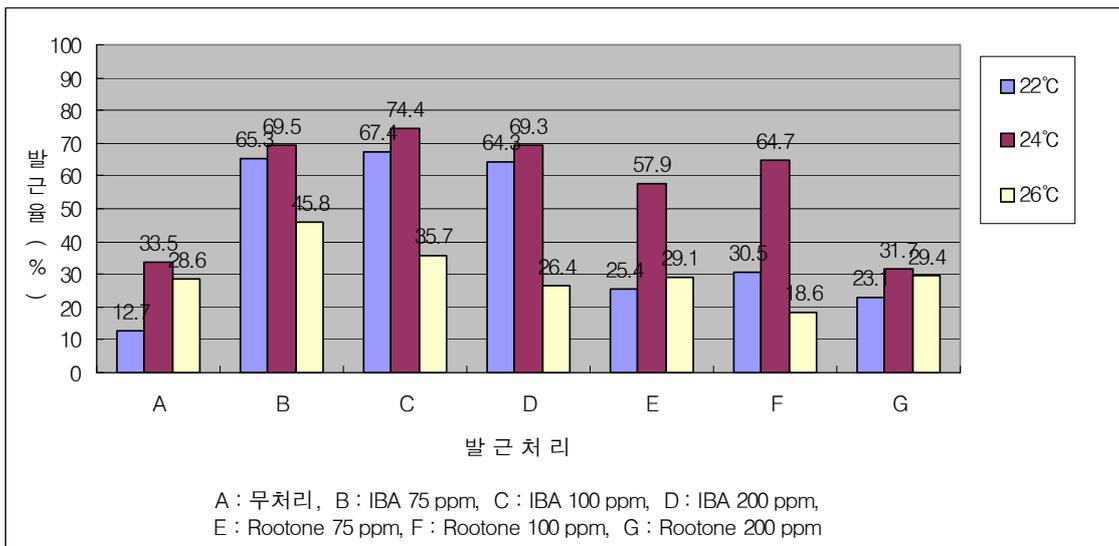


Figure 20. 개비자나무 혼합용토(peat moss : vermiculite : perlite = 1 : 1 : 1) 삽목의 삽목온도 및 발근촉진제별 발근율

개비자나무를 peat moss : perlite = 1 : 1 의 비율로 삼목한 결과 발근율 및 발근묘소질에서 가장 낮은 결과를 나타냈으며, 22℃의 삼목온도가 24, 26℃ 삼목온도보다 발근정도를 제외한 매트형성정도, 발근최대장, 발근생체중의 발근묘소질에서 높게 나타났다. 또한 발근율은 22℃의 삼목온도에서도 24, 26℃ 삼목온도보다 전체적으로 높게 나타났으며, IBA 200 ppm이 38.2%로 가장 높았다. 발근묘소질면에서는 22℃의 삼목온도 IBA 200 ppm이 매트형성정도 2.4, 발근정도 2.1, 발근최대장 1.5cm, 발근생체중 35.1mg으로 가장 높았다(Table 16, Figure 21).

Table 16. 개비자나무 혼합용토(peat moss : perlite = 1 : 1)에 따른 삼목온도 및 발근촉진제처리가 발근에 미치는 영향

온도(℃)	발근촉진제 농도 및 침지시간(24시간)	매트형성 정도*	발근정도**	발근최대장 (cm)	발근 생체중 (mg/개)
22	무처리	1.8	1.6	1.4	27.9
	IBA 75	1.5	1.5	1.2	22.7
	IBA 100	2.3	1.7	1.4	31.6
	IBA 200	2.4	2.1	1.5	35.1
	Rootone 75	2.2	1.7	1.4	32.7
	Rootone 100	2	1.6	1.5	28.9
	Rootone 200	1.8	1.5	1.3	25.4
평균		2.00	1.67	1.39	29.19
24	무처리	1.7	1.3	1.1	24.8
	IBA 75	1.6	1.3	0.9	21.1
	IBA 100	1.8	1.5	1.2	26.8
	IBA 200	1.6	1.2	0.8	18.6
	Rootone 75	1.7	1.4	1.1	21.7
	Rootone 100	1.5	1.3	0.8	19.8
	Rootone 200	1.4	1.1	0.9	15.9
평균		1.61	1.30	0.97	21.24
26	무처리	1.6	1.6	1.3	23.9
	IBA 75	1.5	1.8	1.1	22.3
	IBA 100	1.5	1.7	1.3	22.7
	IBA 200	1.8	1.9	1.4	25.8
	Rootone 75	1.1	1.3	0.7	13.4
	Rootone 100	1.9	2.1	1.4	28.9
	Rootone 200	1.6	1.8	1.2	23.6
평균		1.57	1.74	1.20	22.94

* 1: 매우불량, 2: 불량, 3: 보통, 4: 양호, 5: 매우양호

** 1: 1~5, 2: 6~10, 3: 11~15, 4: 16~20, 5: 20개 이상

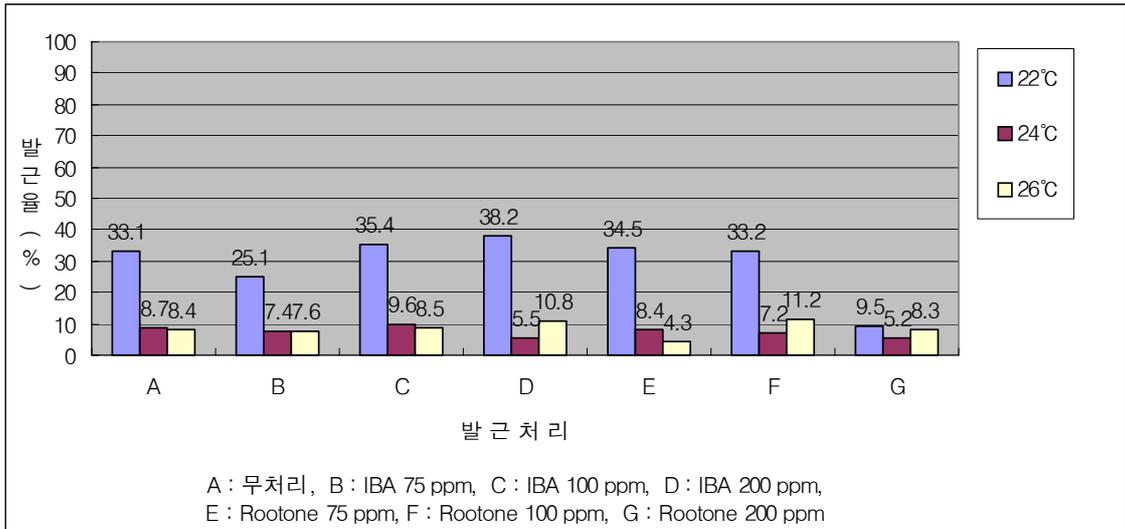


Figure 21. 개비자나무 혼합용토(peat moss : perlite = 1 : 1) 삼목의 삼목온도 및 발근촉진제별 발근율

4. 적 요

- 가. 삼목은 시간적, 경제적, 기술적인 면에서 조직배양보다는 더 효과적이고 실용적인 것으로 나타났다.
- 나. 개비자나무의 삼목용토는 peat moss : vermiculite : perlite = 1 : 1 : 1 비율의 삼목용토가 peatmoss : vermiculite = 1 : 1, peatmoss : perlite = 1 : 1 비율의 삼목용토보다 발근율 및 발근묘 소질 면에서 가장 높은 결과를 보였다.
- 다. 개비자나무의 발근촉진제는 24°C의 삼목온도에서 IBA 100 ppm이 74.4%로 가장 높은 발근율을 보였다.

제 2절 개비자나무를 이용한 신기능성 물질 생산기술 개발에 관한 연구

1. 서 언

개비자나무에서 추출되는 항암물질인 homoharringtonine는 항백혈의 활성을 갖고 있고 효능 있는 골수 억제제로 아포토시스(apoptosis)를 줄임으로써 종양 성장을 저해하는 물질이다. Homoharringtonine은 독성이 별로 없고 기존의 항암제에 비하여 물에 대한 용해도가 높으며 그 효능 또한 높아 상품화 가능성이 매우 높은 차세대 항암제로 주목받고 있다. *Cephalotaxus* 알칼로이드에 대한 연구는 주로 중국과 일본을 중심으로 여러 연구가 이루어졌는데 *Cephalotaxus*의 각 종에 대한 새로운 알칼로이드를 분리, 동정(identification)하고 이들의 항암 활성(activity)을 조사하였다. 또한 cephalotaxine과 그것의 esters의 화학적 합성 방법이 보고 되고 있으나 수율이 낮아 식물체로부터의 직접 추출은 homoharringtonine 생산을 위해 여전히 중요한 방법이다. 유용 생리활성물질인 homoharringtonine의 산업화를 위해서는 대량 생산 방법 개발 및 특성 연구는 필수적이지만 이에 대한 연구는 아직 상당히 미흡한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 향후 항암제로 가능성이 높은 homoharringtonine의 산업적인 생산을 위한 한국산 개비자나무로부터 homoharringtonine의 분리 및 정제 공정을 개발하고 정제된 homoharringtonine의 동정과 homoharringtonine의 특성 연구를 수행하였다. 이러한 연구 결과는 산업화

단계에서의 의약품 생산 및 품질관리에 필수적이며 향후 산업화 단계에서 상당히 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

세부과제 2-1. 기능성 물질의 분석 및 추출

2. 재료 및 방법

가. 추출을 위한 식물 재료

본 연구에 사용한 한국산 개비자 나무(*Cephalotaxus koreana*)는 2002년 국내의 여러 산에서 채집하였다. 수고 1.3 m 높이에서 잎과 줄기를 포함한 잔가지를 채취하였다. 식물체 시료는 60°C에서 48시간 동안 건조시킨 후 분쇄하고 0.25 mm sieve에 통과시켜 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

나. Homoharringtonine (HHT)의 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 20 : 80 에서 시작하여 30분 후 40 : 60 이 되도록 하였다. 각 화합물은 290 nm에서 UV에 의해 검출되었으며 주입량은 20 μl이다. Homoharringtonine의 정량은 표준시료(Sigma 제품, 순도 : 98.6 %)의 피크 면적으로 표준정량선을 작성한 후 계산하였다.

다. HPLC 분석 샘플

HPLC 분석을 위한 샘플은 추출액을 감압 여과하고 여액 1 ml 채취하여 evaporator로 완전 농축시킨 후 진공 건조기에서 12시간 동안 건조하였다. 건조물을 1 ml의 methanol에 용해시킨 후 syringe filtration(Whatman, 25 mm, 0.45 μm, 50 units)하여

HPLC로 분석하였다.

라. 유기 용매 추출(solvent extraction) 공정

유기용매를 이용하여 biomass로부터 항백혈의 활성을 갖는 유용성분인 homoharringtonine을 추출 하였다. 여기서 biomass라 함은 앞에서 언급한 식물 재료인 한국산 개비자 나무를 분말 상태로 만든 것을 의미한다. Biomass에 유기용매를 가하여 1,500 rpm/min으로 하여 최대 3,000 rpm/min인 교반기로 상온에서 20분 동안 추출하였다. 추출 후 aspirator로 감압상태 하에서 funnel을 이용하여 여과하여 여과액(여액)을 회수하고 filter cake을 처음 추출 조건과 같은 조건으로 재 추출하는 방법으로 총 3회 반복 추출을 수행하였다. 첫 공정인 유기용매 추출에서는 최적의 추출 효율을 얻을 수 있는 유기용매 선정, 추출 횟수에 따른 효과, 교반 시간에 따른 추출 효과, 용매의 투입량에 따른 효과 등을 확인하기 위한 실험을 수행하여 최적의 조건을 선정하였다.

마. 액/액 추출(liquid/liquid extraction) 공정

유기용매 추출에서 회수한 여액을 rotary evaporator (25-27''Hg, 40°C)를 이용하여 농축하고 이 농축액과 동량의 chloroform을 가하여 혼합액을 교반 속도 1,500 rpm/min으로 하여 상온에서 30분 동안 교반시킨 후 분액깔때기를 이용하여 상 분리를 하였다. 이를 액/액 추출이라 하며, 상층과 하층으로 상 분리가 되면 하등액인 chloroform층만을 회수하고, 상등액에 새로운 chloroform을 가하여 4회 반복 수행하였다. 이렇게 얻어진 액/액 추출액을 다음 공정에 사용하였다. 액/액 추출 공정을 통하여 극성 불순물을 주로 제거할 수 있으며 이 공정에서는 액/액 추출에 있어서 추출 횟수의 영향과 homoharringtonine의 수율에 있어서의 pH의 영향을 관찰하였다. pH를 2.5, 5.01, 9.5로 변화시켜 실험을 수행하였다. pH 조절은 2% HCl과 0.5% NaOH를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Biomass의 크기에 따른 추출 효율

채집한 한국산 개비자 나무(*Cephalotaxus koreana*)를 크기별로 각각 1.4 mm, 1 mm, 0.5 mm, 0.25 mm, 0.1 mm로 분쇄하여 추출 실험을 수행하였다. 이때 biomass는 60°C에서 16시간동안 건조한 것으로 각각의 크기는 sieve를 사용하여 정하였다. Biomass 0.5 g에 ethanol 4 ml를 혼합하여 30분 동안 상온에서 교반 시켜 추출 하였다. 크기별 추출효율은 Figure 2에서 보는 바와 같이 biomass의 크기별로 추출된 homoharringtonine의 함량이 1.4 mm일 때 1.408 mg/g, 1.0 mm일 때 1.696 mg/g, 0.5 mm일 때 1.952 mg/g, 0.25 mm일 때 2.608 mg/g으로 각각 나타났다. 동일한 추출조건 하에서 biomass의 크기가 0.25 mm일 때의 homoharringtonine의 함량은 1.4 mm 크기에 비해 약 2배정도 높게 나타났다. 이는 주어진 추출시간(30분) 동안 biomass의 크기가 작을수록 biomass로부터 homoharringtonine이 빨리 추출되는 것으로 판단된다. (Figure 1)

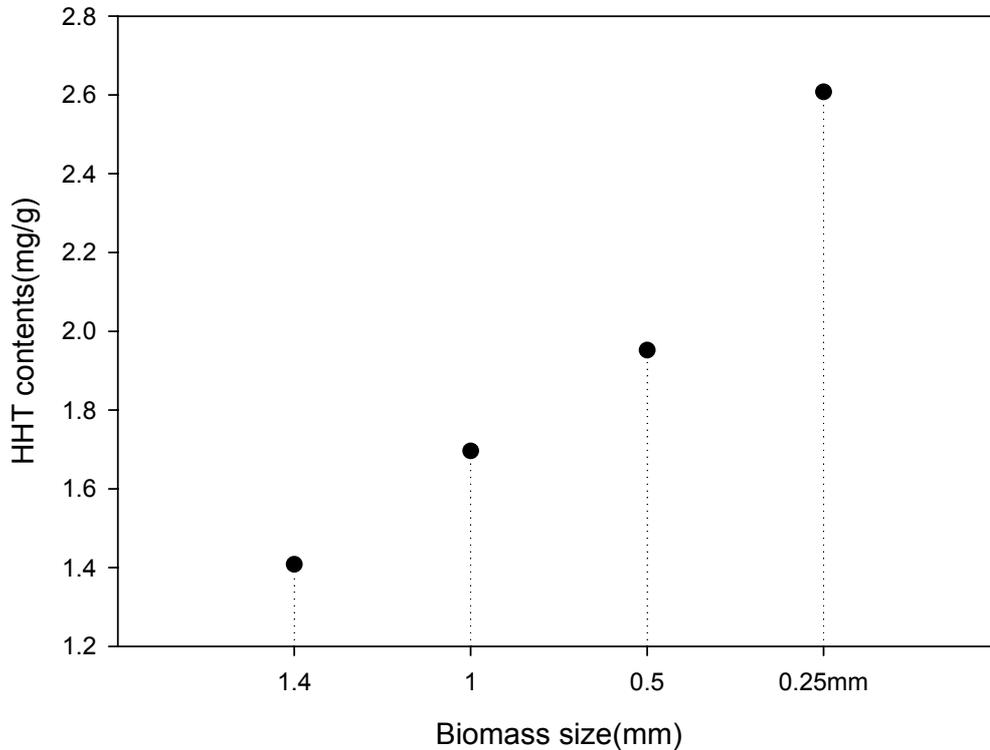


Figure 1. Effect of biomass size on extraction efficiency.

나. Biomass의 건조 조건에 따른 homoharringtonine 함량 변화

채집한 한국산 개비자 나무(biomass)를 50℃, 60℃, 70℃에서 각각 12시간, 24시간, 48시간, 72시간 동안 건조시킨 후 0.25 mm 이하의 크기로 분쇄한 후 분말로 만들었다. Figure 2에서 보는 바와 같이 homoharringtonine의 함량이 50℃와 60℃에서는 건조 시간이 길어짐에 따라 homoharringtonine의 함량이 증가하다 48시간 이후부터는 점차 감소하는 것으로 나타났다. 70℃에서는 건조시간이 길어질수록 homoharringtonine의 함량이 점점 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 대부분의 식물유래 생리활성물질이 온도에 많은 영향을 받는 것과 관계가 있으며, 고온에서 식물유래 생리활성물질의 성분이 분해 되는 경향이 있기 때문으로 판단된다. 개비자 나무의 건조 온도와 건조 시간은 Figure 2에서 보는 바와 같이 60℃에서 48시간 동안 건조 시키는 것이 가장 적합함을 알 수 있었다.

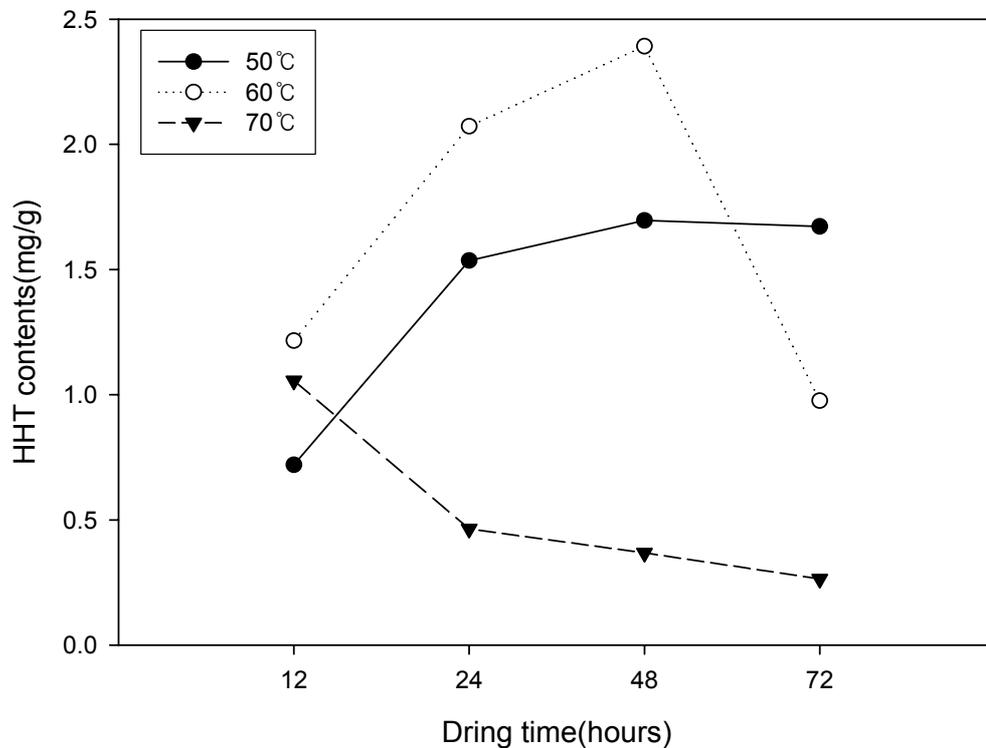


Figure 2. Effect of biomass drying condition (time and temp.) on extraction efficiency.

다. Biomass 추출공정 최적화

1) Biomass 추출 시 최적의 유기용매 선정

여러 가지 유기 용매(ethanol, methanol, diethylether, propyl alcohol, acetone, chloroform, chloroform/ethanol(9/1), chloroform/ethanol(8/2), methylene chloride, methylene chloride/ethanol(9/1), methylene chloride/ethanol(9/2) 등)를 이용하여 biomass로부터 homoharringtonine의 추출 경향을 조사하였다. 유기용매의 선정 시 homoharringtonine의 추출 수율과 불순물(극성 및 비극성) 포함 정도를 확인하였다. 이때의 실험 조건은 각각 40 ml의 유기용매에 5 g biomass를 실온에서 30분간 상온에서 교반시켜 추출효율을 조사하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 ethanol의 경우 극성 불순물이 상대적으로 좀 많이 추출되기는 하지만 가장 적은 양으로 가장 높은 homoharringtonine 회수율(>95%)을 얻어 분리공정의 초기 단계임을 고려해 볼 때 biomass로부터 homoharringtonine의 추출에 가장 적합함을 알 수 있었다. 그러므로 추후 모든 homoharringtonine 추출 공정 개발을 위해 ethanol을 선택 하였다.

Table 1. Effect of solvent on biomass extraction efficiency(5 g biomass/40 ml solvent, room temperature, 30 minutes reaction)

Solvent	Polar impurity*	Homoharringtonine	Nonpolar impurity	Yield
Ethanol	+++	++++	-	++++
Methanol	++++	++	-	++
Diethylether	-	-	-	-
Propyl alcohol	++	++	-	++
Acetone	+	+	-	+
Chloroform	-	-	-	-
Chloroform/Ethanol(9/1)	+	+	-	+
Chloroform/Ethanol(8/2)	++	++	-	++
Methylene chloride	-	-	-	-
Methylene chloride/ Ethanol(9/1)	+	+	-	+
Methylene chloride/ Ethanol(8/2)	++	++	-	++

*+: High extraction efficiency, -:low extraction efficiency

2) Ethanol 농도별 biomass의 추출 효과

Ethanol 농도(30%, 60%, 90%, 100%)별로 하여 biomass 추출을 수행하였으며 biomass 10 g을 농도별로 각각의 ethanol의 양을 80 ml로 하여 30분 동안 교반하면서 추출하였다. Table 2와 Figure 3에서 보는 바와 같이 ethanol 농도에 따른 biomass의 추출 효율은 100% ethanol에서 가장 높은 추출 효율을 보였다. 또한 30% ethanol과 60% ethanol로 추출 하였을 경우 90% ethanol과 100% ethanol로 추출하였을 때 보다 약 2배 이상의 극성 불순물이 함께 추출됨을 알 수 있었다. 따라서 homoharringtonine 수율과 불순물 함량을 비교해 볼 때 100% ethanol로 추출하는 것이 가장 효과적이었다.

Table 2. Effect of ethanol concentration on HHT yield(10 g biomass/80 ml ethanol, room temperature, 30 minutes reaction)

Ethanol concentration	Polar impurity*	Homoharringtonine	Nonpolar impurity	Yield
30% ethanol	++++	+	-	+
60% ethanol	++++	++	-	+++
90% ethanol	++	++	-	+++
100% ethanol	++	+++	-	++++

*+: High extraction efficiency, -:low extraction efficiency

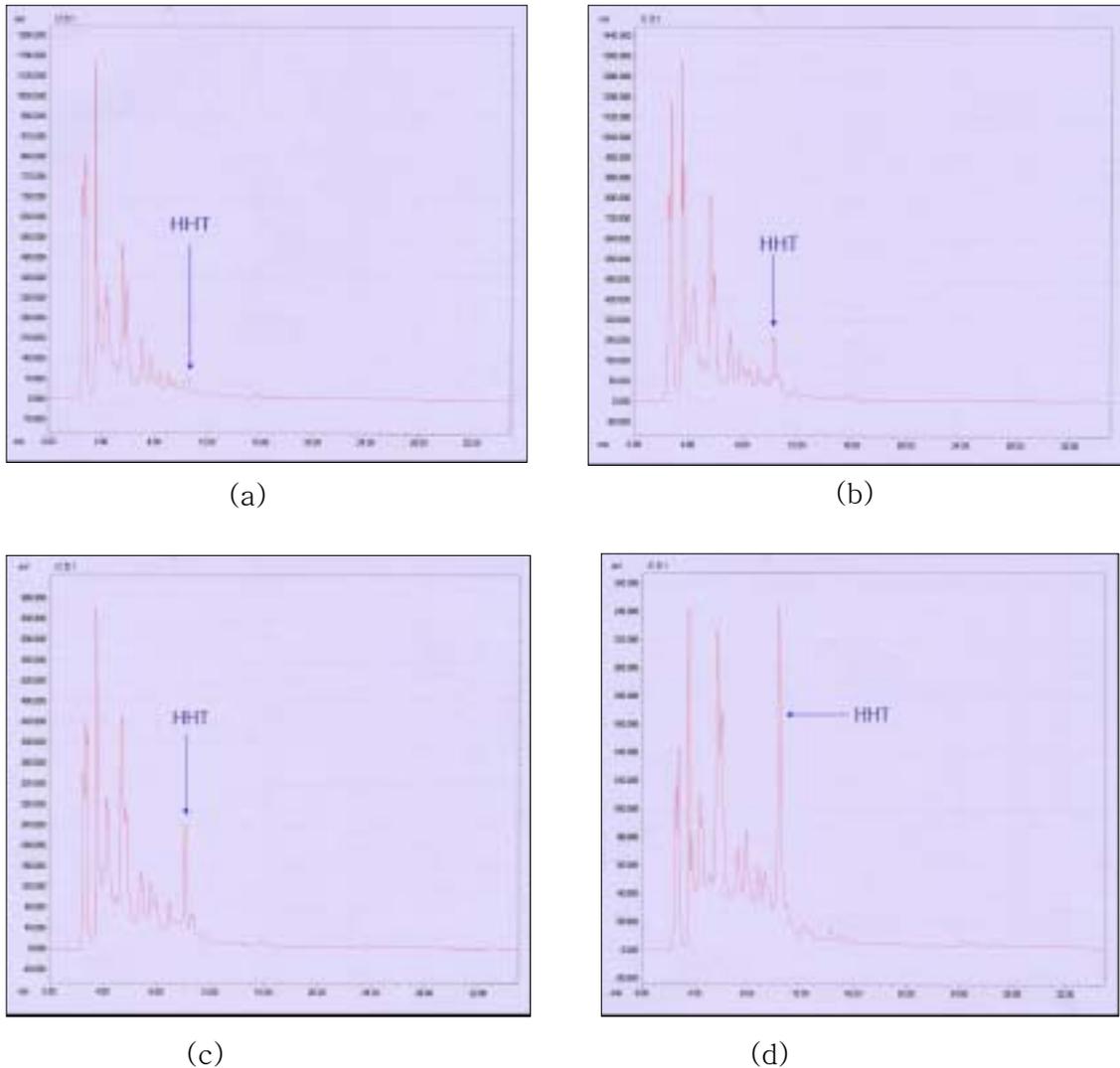


Figure 3. The HPLC chromatogram of ethanol extraction.

(a) 30% ethanol, (b) 60% ethanol, (c) 90% ethanol, (d) 100% ethanol

라. Ethanol 투입량에 따른 효과

Biomass와 ethanol의 비율에 따른 추출 효율을 파악하기 위하여 ethanol의 투입량을 biomass의 6배, 8배, 10배로 하여 추출 실험을 수행하였다. 각각에 대하여 biomass 5g에 ethanol을 6배, 8배, 10배로 가하여 상온에서 30분 동안 교반 후 4회 추출 하였다. Figure 4에서 보는 바와 같이 biomass : ethanol = 1 : 8 로 하였을 때 추출 효율이 가장 높게 나타났다. 반면 ethanol 투입량을 biomass의 10배로 하였을 때 수율이 현저히 떨어지는 것을 볼 수 있는데 이러한 원인은 용매의 양이 너무 많아 biomass와의 접촉이 작아져 추출 효율이 떨어지는 것으로 판단된다. 이러한 경우에는 추출기 내부에 방해판(baffle)을 설치하여 액체와 고체의 접촉을 증가시켜 주는 것이 추출에 도움이 될 것으로 사료된다. 따라서 biomass 추출에 필요한 ethanol의 양은 biomass의 8배가 적합하며 biomass : ethanol = 1 : 8의 비율로 추출을 하는 것이 가장 효과적으로 homoharringtonine을 얻을 수 있었다.

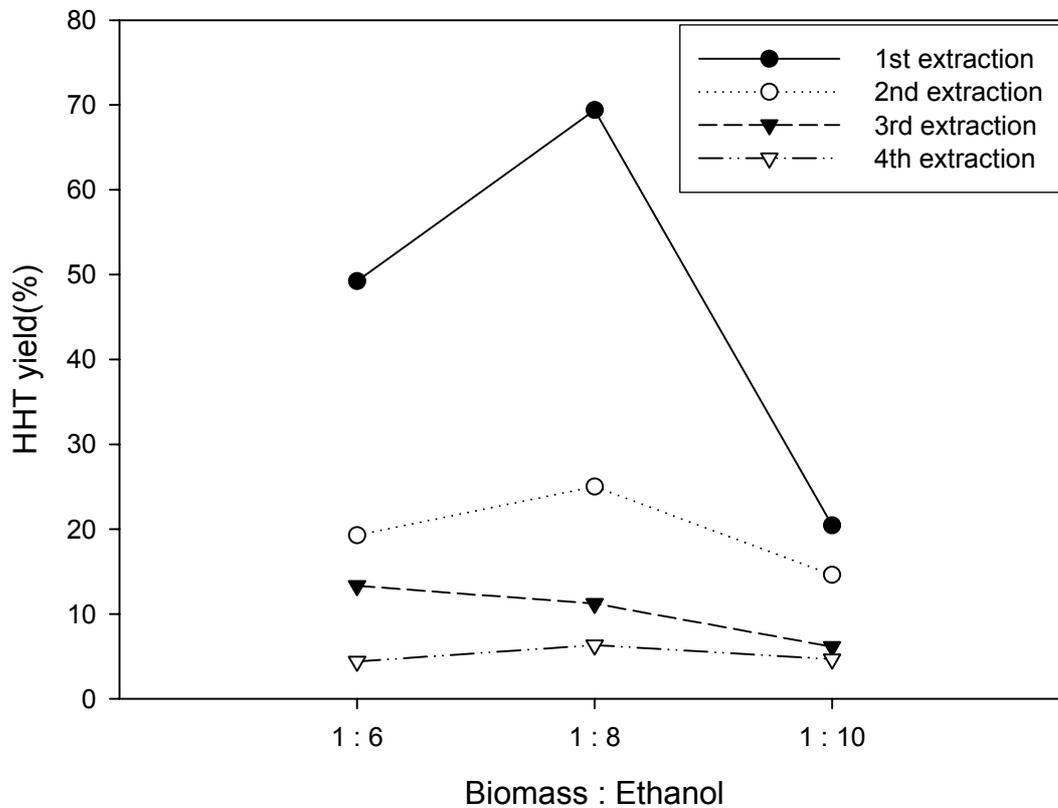


Figure 4. Effect of ethanol amount on homoharringtonine (HHT) yield.

마. Biomass의 추출 횟수에 따른 효과

Biomass 70 g과 ethanol 560 ml을 혼합하여 상온에서 30분 동안 교반 시킨 후 감압 여과 하여 여액을 회수하고 건고물 즉, 한번 추출했던 biomass를 재 추출하는 방법으로 4회 반복 추출을 하여 추출횟수에 따른 효과를 검토하였다. 이때 교반기는 최대 속도가 3,000 rpm/min인 교반기를 사용하였으며 이 실험에서의 교반 속도는 1,500 rpm/min으로 매회 교반시켜 추출하였다. 이 실험에 쓰인 biomass는 60℃에서 48시간 건조시킨 후 250 μ m이하의 크기로 분쇄한 것을 사용하였다. 추출 횟수에 따른 추출 효율 (homoharringtonine의 수율)을 Figure 5에 나타내었다. 1회 추출에서 homoharringtonine의 수율이 79.4%로 대부분의 homoharringtonine이 회수되었으며, 2회 추출에서 11.2%, 3회 추출에서 9.4%로 각각 나타났다. 따라서 3회의 추출로 99% 이상의 homoharringtonine이 회수됨을 알 수 있었다.

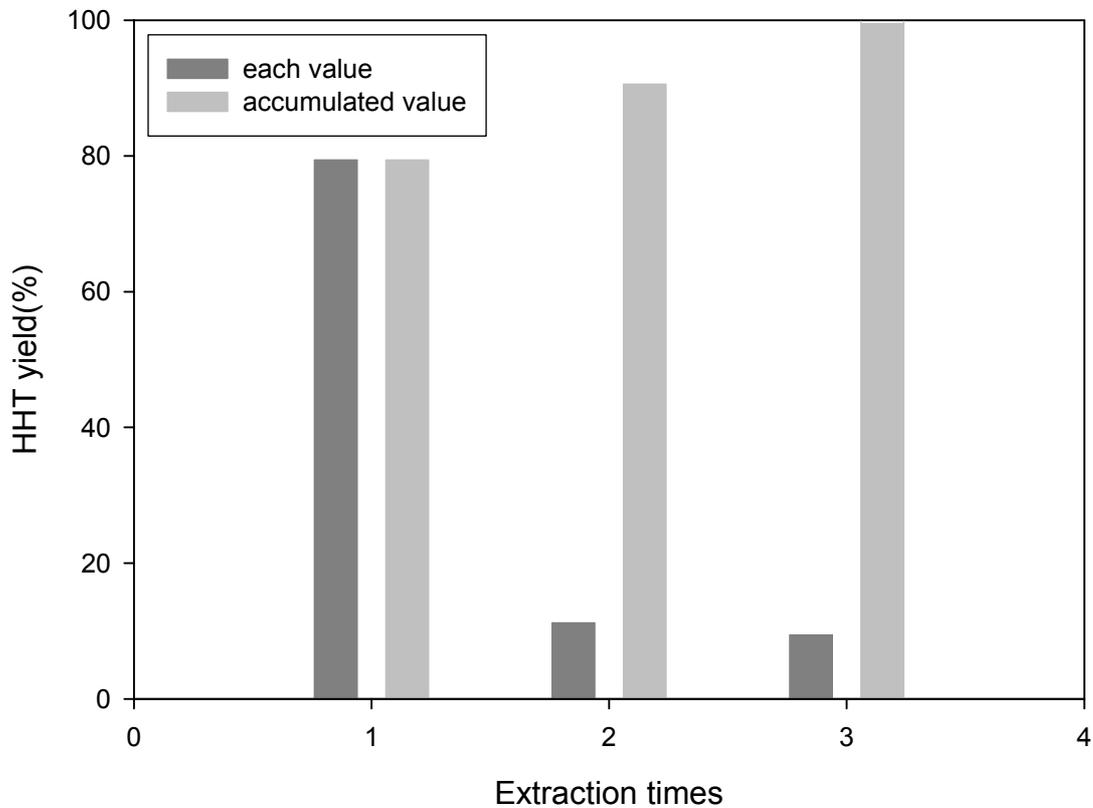


Figure 5. Effect of extraction times on homoharringtonine(HHT) yield.

사. Biomass로부터 ethanol 추출 시 교반시간에 따른 효과

교반시간에 따른 biomass의 추출 효율을 알아보기 위하여 biomass 8 g과 ethanol 64 ml를 혼합하여 각각 10분, 20분, 30분, 40분 동안 교반하여 추출하였다. 이 실험에 사용된 biomass는 60℃에서 48시간 건조시킨 후 250 μm 이하의 크기로 분쇄한 것을 사용하였다. 각각의 샘플은 추출액을 감압 여과하여 여액을 1 ml 채취하여 evaporator(25-27" Hg, 40℃)로 완전 농축 후 건조시키고, 1 ml의 methanol에 용해시킨 후 syringe filtration하여 HPLC로 분석하였다. Figure 7에서 보는 바와 같이 10분 동안 교반시켰을 때 homoharringtonine의 수율을 41.4%, 20분 동안 교반 시 99.7%, 30분 동안 교반 시 96%, 40분 동안 교반 시 96.3%로 나타났다. 따라서 biomass의 추출 시 교반 시간이 20분이면 99% 이상의 homoharringtonine의 수율을 얻을 수 있었다. 이러한 결과는 평형(biomass내 homoharringtonine 농도와 추출 용매 내 homoharringtonine 농도가 같을 때를 말함)이 20분 내에 도달함을 의미한다(Figure 6).

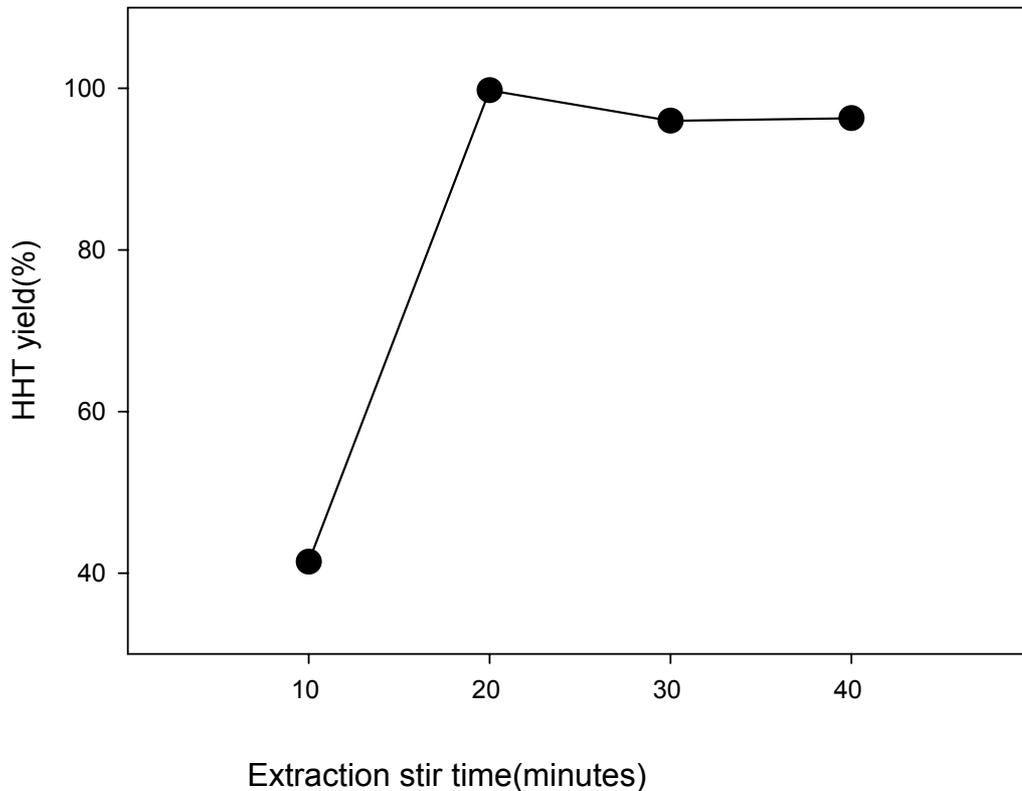


Figure 6. Effect of extraction time on homoharringtonine(HHT) yield.

1. 액/액 추출(liquid/liquid extraction) 공정의 최적화

가. Ethanol 추출 방법에 따른 액/액 추출 효율 비교

Ethanol을 이용하여 biomass로부터 homoharringtonine를 추출한 후 추출액을 분석하면 극성 성분순물들이 상당히 과량 함께 추출됨을 알 수 있었다. 이러한 극성 불순물을 효과적으로 제거하기 위해 액/액 추출공정을 도입하였다. Ethanol로 biomass를 추출한 다음 추출액을 농축하여 농축액을 얻고, 농축액에 일정량의 chloroform를 첨가하여 액/액 추출을 수행하였다. Ethanol 농도별 biomass 추출 효율에서는 100% ethanol을 사용할 경우 homoharringtonine 수율과 불순물 함량 등을 고려해 볼 때 추출 효율이 가장 높았다. 그러나 90% ethanol과 100% ethanol 두 가지 농도의 조건에서 biomass를 추출한 다음 액/액 추출 실험을 한 결과, Figure 7과 같이 90% ethanol로 추출 하였을 때 보다 100% ethanol로 추출 하였을 때의 homoharringtonine의 수율이 약 2배 정도 낮게 나타났다. 90% ethanol과 100% ethanol의 추출액을 농축한 후 농축액의 pH를 측정한 결과 각각 pH 5.0와 pH 4.1로 나타났다. 따라서 동일조건 하에서 90% ethanol로 추출할 경우 액/액 추출에서 homoharringtonine의 수율이 더 높게 나타난 이유는 액/액 추출 전 ethanol 농축액의 pH의 영향으로 판단된다. 즉, 액/액 추출 시 농축액의 pH에 따라 homoharringtonine에 대한 분배계수(partition coefficient)의 차이에 기인하는 것으로 사료된다. 농축액의

pH가 5.0 경우 pH가 4.1일 경우에 비해 상 분리(Figure 8)시 하등액인 chloroform 층으로 homoharringtonine이 더 많이 분배되어 회수율이 증가하는 것으로 판단된다. 액/액 추출에서 pH의 변화에 따른 homoharringtonine의 수율이 큰 차이를 보이므로 pH에 따른 액/액 추출 실험을 보충하였다.

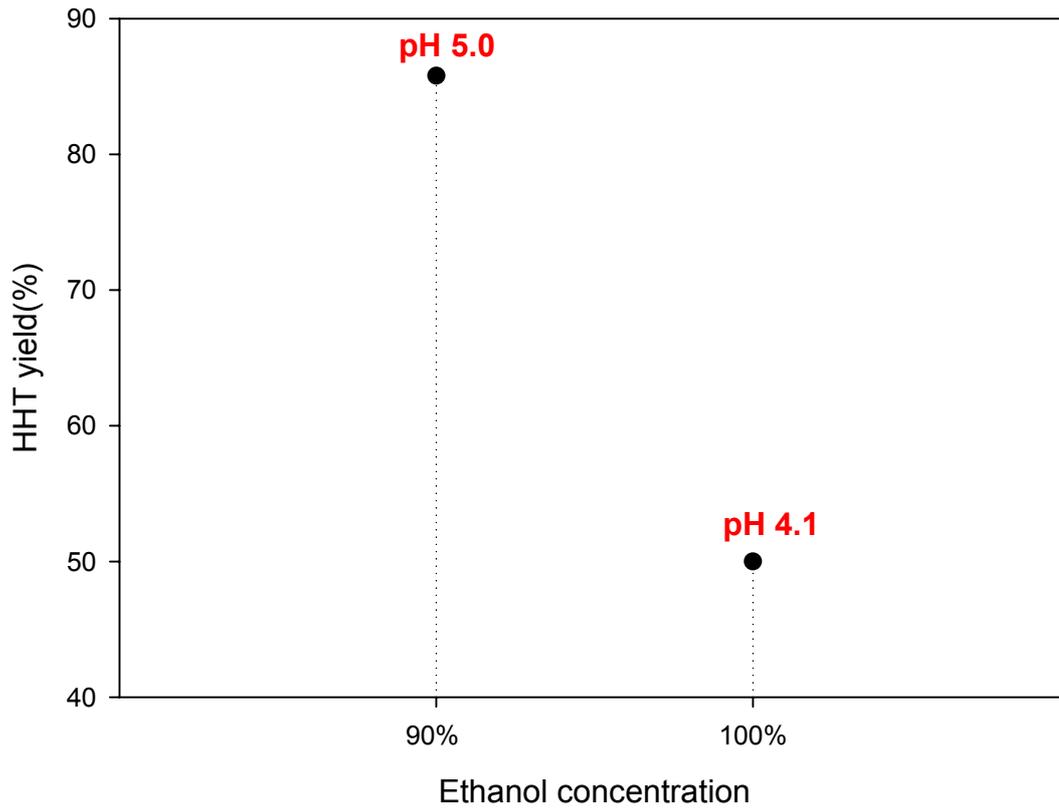


Figure 7. Effect of ethanol concentration in biomass extraction on liquid/liquid extraction efficiency.

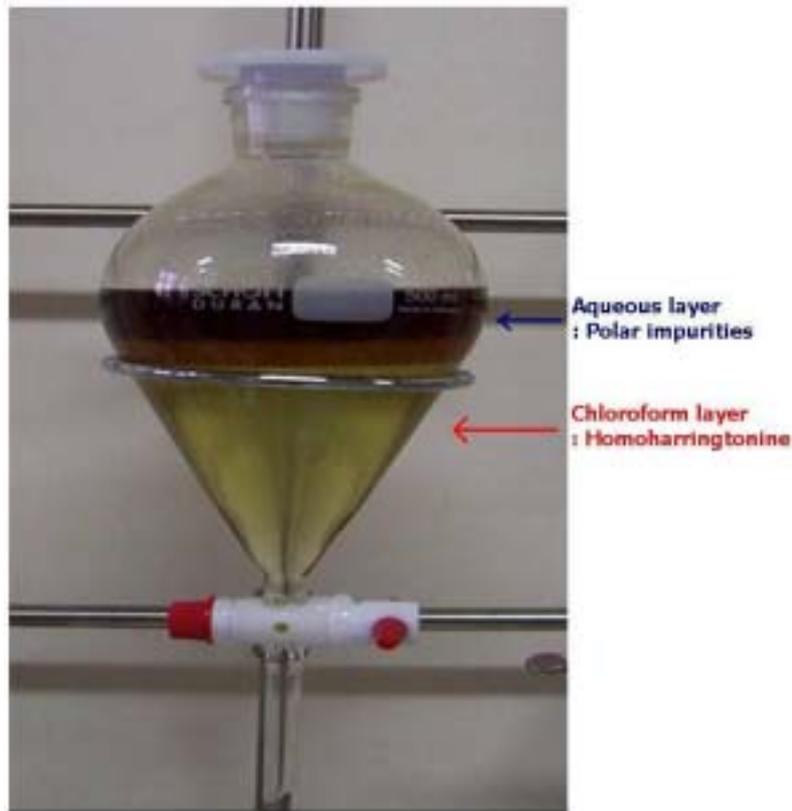


Figure 8. Phase separation by separatory funnel in liquid/liquid extraction step.

나. 액/액 추출에서의 pH 영향

Biomass의 추출 공정에서 얻어진 추출액을 농축한 후 농축액의 pH를 변화시켜 액/액 추출을 수행하였다. 먼저 농축액의 pH를 2% HCl과 5% NaOH를 이용하여 pH를 변화시켜 농축액을 만들고 동량의 chloroform을 가하여(농축액/chloroform=1/1, v/v) 30분 동안 상온에서 교반시킨 후 분별깔때기(separatory funnel)에 교반 용액을 넣고 30분간 방치 시켜 상 분리를 시켰다. 상등액은 물 층(aqueous layer)으로 극성 불순물이 용해되어 있고, 하등액은 chloroform 층(chloroform layer)으로 homoharringtonine이 용해되어 있다. 하등액인 chloroform 층만 회수하고 새로운 chloroform을 가하여 4회 반복 추출하였다. Figure 9에서 보는 바와 같이 pH가 5.0일 때의 homoharringtonine의 수율은 pH 2.5일 때 보다 약 20배, pH가 6.1일 때 보다 약 2배, pH가 7.6일 때 보다 약 5배, pH 9.5일 때에 비하여 약 6배 높게 나타났다. 이러한 결과로 볼 때, 액/액 추출공정에서 homoharringtonine의 수율은 pH에 크게 영향을 받는 것을 알 수 있었다. 또한, Figure 10에서 보는 바와 같이 액/액 추출을 4회 수행함으로써 대부분의 homoharringtonine이 회수되었다. 따라서 액/액 추출 공정은 pH 5.0의 농축액에 chloroform을 가하여 4회 추출함으로써 대부분의 homoharringtonine을 회수 할 수 있었다. 이러한 현상은 상등액인 물층의 pH가 homoharringtonine의 용해도 차이, 즉 분배계수에 상당한 영향을 미치는 것으로 사료된다.

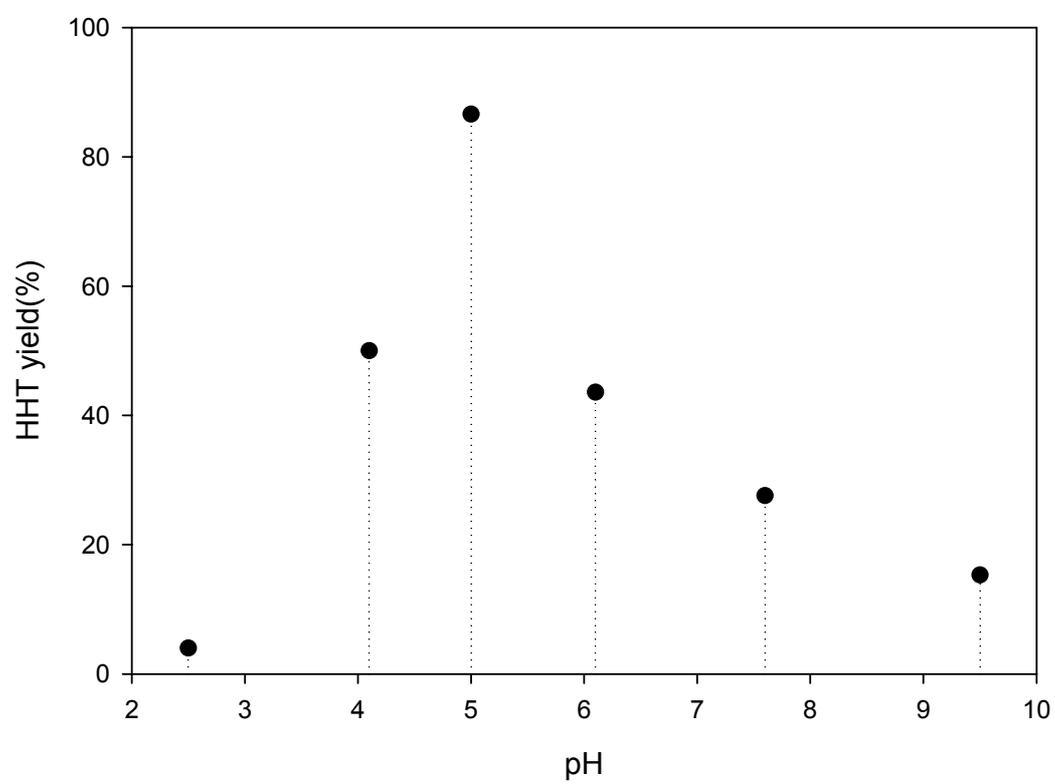


Figure 9. Effect of pH on homoharringtonine(HHT) yield in liquid/liquid extraction.

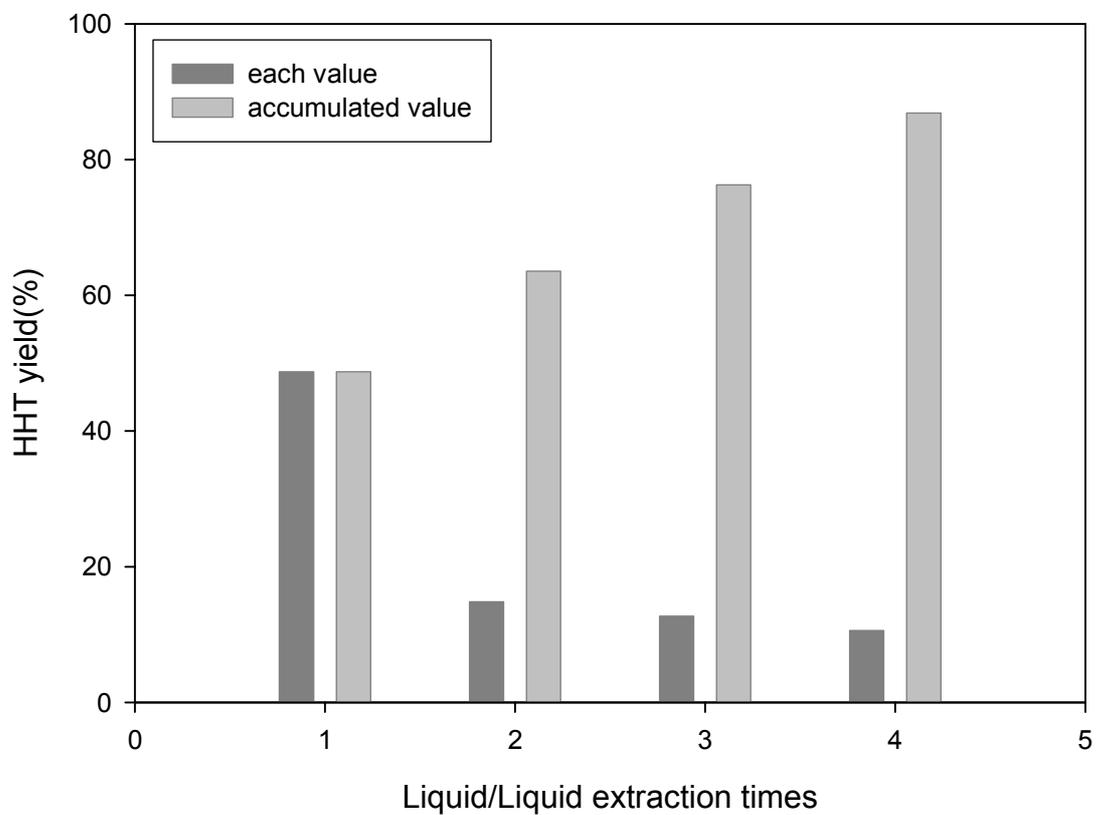


Figure 10. Effect of liquid/liquid extraction times on homoharringtonine(HHT) yield.

세부과제 2-2. 신기능성물질 분리 및 정제 공정 개발

2. 재료 및 방법

가. Biomass 및 분석방법

1) 추출을 위한 식물 재료(Biomass)

본 연구에 사용한 한국산 개비자 나무(*Cephalotaxus koreana*)는 2002년 국내의 여러 산에서 채집하였다. 수고 1.3 m 높이에서 잎과 줄기를 포함한 잔가지를 채취하였다. 식물체 시료는 60°C에서 48시간 동안 건조시킨 후 분쇄하고 0.25 mm sieve에 통과시켜 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

2) Homoharringtonine (HHT)의 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 : 75에서 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 정량 선을 작성한 후 계산하였다.

3) HPLC 분석 샘플

HPLC 분석을 위한 샘플은 추출액을 감압 여과하고 여액 1 ml 채취하여 evaporator로 완전 농축시킨 후 진공 건조기에서 12시간 동안 건조하였다. 건조물을 1 ml의 methanol에 용해시킨 후 syringe filtration(Whatman, 25 mm, 0.45 μm, 50 units)하여 HPLC로 분석하였다.

나. 전처리 및 정제 방법

1) 흡착제 처리(adsorbent treatment) 공정

유기용매를 이용한 biomass 추출과 액/액 추출 후 건조물을 이용하여 흡착제 처리를 수행하였다. 흡착제 처리는 주로 식물유래 타르 또는 왁스 성분(tar or waxy compound)을 제거하는데 그 목적이 있다. 흡착제 처리 공정에 사용된 흡착제는 백토(P-1, P-1G), 활성탄(CA-1, SX-PLUS), 그리고 charcoal를 사용하여 흡착 처리 효과를 조사하였다. 각각의 흡착제의 제조회사는 백토(P-1, P-1G)의 경우 Mizukalife Chemical Co. 제품(Japan), 활성탄 (CA-1)의 경우 NORIT 제품(Netherlands)을 사용하였으며, P-1을 미립화(granule)한 것이 P-1G이다. P-1은 정전기적인 성질이 있고, P-1G는 입자 형태가 둥글다. 특히, 백토의 주성분은 SiO₂(60.63%)와 MgO(27.22%)이며 surface area 675 m²/g, porosity 0.89 cc/g, size 5.6 μm, average pore diameter 45Å 등의 특성을 가지며 가격은 \$10 /kg 정도로 매우 저렴하다.

2) 크로마토그래피(chromatography) 공정

Silica 흡착제(Merck, 40-63 μm)를 methanol에 용해시킨 후 column(Pyrex, 25×140 mm, 40 ml)에 충전시켰다. Column의 충진을 고정시키기 위해 methanol에 규조토를 넣고 교반 후 silica 흡착제가 충전된 column에 흘려주었다. 이렇게 하여 충전된 silica column을 원하고자 하는 높이로 만들고 elution 용

액은 methylene chloride/methanol = 80/20의 혼합용액을 사용하여 column에 넣고 안정화 시켰다. 샘플은 추출공정을 거쳐 전처리 공정인 흡착제 처리를 한 후의 것을 사용하여 크로마토그래피 공정을 수행하였다. 이때 사용되어진 pump는 EYELA RP-1000 정량 pump를 사용하였으며 0.07 rpm/min의 속도로 하였다.

다. Homoharringtonine의 특성 파악

1) Homoharringtonine의 분자량 확인

LC/MSD(HEWLETT PACKARD) 분석은 C18 column (4.6 × 150 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 : 55이 되도록 하였다. 각 화합물은 290 nm에서 UV에 의해 검출되었으며 주입량은 10 μl이다. Low-pressure chromatography 공정을 통해 정제된 HHT(>50%)를 분자량 확인에 이용하였다.

2) NMR을 통한 homoharringtonine의 구조 확인

NMR(Varian Mercury 400 MHz Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)에 의한 HHT의 분석은 proton NMR 분석방법으로 수행하였다. NMR 분석에 사용된 용매는 TMS(tetramethyl silane)을 사용하였다. 구조 분석은 middle-pressure chromatography에서 정제된 순도 80%, 3mg의 HHT를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 흡착제 처리 공정의 최적화

1) 흡착제 종류에 따른 영향

액/액 추출 및 농축에서 얻은 건고물에는 식물유래 타르 및 왁스 성분의 불순물이 다량 포함되어 있고 이들 불순물은 다음 단계의 여러 공정에 많은 악영향을 미쳐 HHT 정제에 많은 어려움이 따른다. 다양한 흡착제를 사용하여 이러한 타르 성분, 왁스 성분 및 진한 crude extract의 색을 제거하기 위해 흡착제 처리 공정을 도입하였다. 이러한 흡착제를 통해 흡착 처리를 하여 HHT의 수율, 순도 및 불순물의 감소를 비교하여 결과를 Table 3에 나타내었다. 백토(active clay)인 P-1으로 흡착 처리 하였을 때 HHT의 수율이나 순도가 가장 높게 나타났다. 하지만 crude extract의 색을 제거하는 부분에서는 활성탄(activated carbon)과 charcoal이 백토보다 좋은 효과를 보였다. 따라서 흡착 처리 시 흡착제로서 백토 특히 P-1을 사용하는 것이 가장 효과적이었다. 일반적으로 활성탄은 crude extract에서의 색과 불순물을 제거하는 공정에 주로 이용되는 흡착제이다. 천연물 유래 항암제 paclitaxel의 흡착 처리 시 활성탄에 비해 백토를 사용하였을 때의 paclitaxel의 수율이 월등히 높은 것으로 보고 된 바 있다. 백토는 가격 측면에서도 매우 저렴(\$10/kg)하여 식물유래 타르 또는 왁스 성분을 대량 처리 및 제거하는 공정에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 판단된다.

Table 3. Comparison of active clays and charcoals in the adsorbent treatment step

	Color ^a	Purity (%)	Yield (%)
Starting	10	8.0	-
P-1	4	10.0	90
P-1G	4	9.5	75
CA-1	2	8.9	20
SX-PLUS	2	8.5	30
Charcoal	2	8.4	45

^aColor ; deep(10) ~ light(1)

2) 흡착제량에 따른 흡착처리 효과

백토 P-1의 양은 건고물과 흡착제의 양을 50%(w/w)로 실내 온도에서 30분간 교반 시 가장 좋은 효과를 보였다. 흡착제량에 따른 흡착처리 효과를 파악하기 위하여 액/액 추출 공정에서 얻어진 액/액 건고물 1 g을 methanol(20 ml)에 녹이고 백토를 첨가하여 상온에서 30분 동안 교반 시킨 후 감압 여과 하며 chloroform/ethanol = 1/2인 혼합용액 200 ml로 세척 하였다. 이때 백토의 양을 건고물의 0.5배(25%), 1배(50%), 1.5배(75%), 2배(100%)로 하여 흡착제 처리를 하였다. Figure 11 에서 보는 바와 같이 백토의 양이 50%(wt%) 일 때 HHT의 수율이 가장 높았으며, 백토의 양이 증가할수록 HHT의 수율은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 백토의 양이 액/액 추출 건고물의 2배(100%)가 되었을 때 HHT이 거의 회수되지 않았다. 이는 백토의 양이 50%(wt%) 이상에서는 흡착율이 높으나 탈착율이 오히려 떨어져 최종 수율은 결국 낮아지는 것으로 판단된다. 천연물 유래 항암제 paclitaxel의 흡착 처리 결과에서는 백토의 양이 40-50%(wt%)에서 paclitaxel의 수율이 가장 높게 나타났다. 따라서 흡착 처리 시 흡착제의 양, 즉 백토의 양은 액/액 추출 건고물의 무게와 동량으로 하여야 최대의 흡착 처리 효과를 얻을 수 있었다. 흡착 처리 공정을 통하여 식물 유래의 타르 성분과 왁스 성분들을 제거 하는 효과를 얻을 수 있었다. 또한 흡착처리 전 단계와 비교하였을 때 점성이 낮아진 것을 확인하였다.

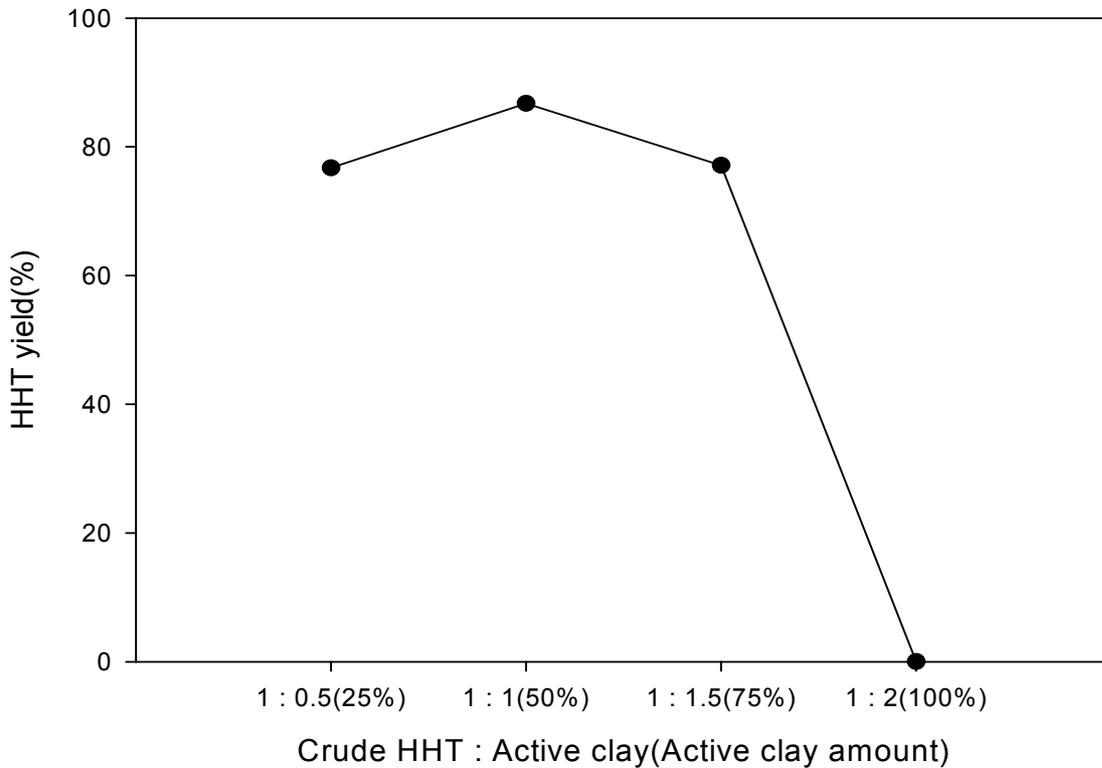


Figure 11. Effect of active clay amount on homoharringtonine(HHT) yield.

3) 흡착제 처리 시 세척 용매 선정

액/액 추출 공정에서 얻은 액/액 건고물 1 g을 methanol 20 ml에 녹이고 백토 1 g을 첨가하여 30 분 동안 상온에서 교반 시킨 후 감압 여과 하며 200 ml의 용매로 세척을 하였다. 세척 시 백토가 갈라지기 시작 할 때 200 ml의 세척 용매를 약 50 ml씩 소량으로 여러 번 나누어 세척 하였다. 이렇게 함으로써 백토에 타르 성분은 흡착되고 HHT는 백토에 흡착되지 않고 서서히 모두 빠져 나오도록 할 수 있었다. 감압 여과 한 여액(세척액)을 20 ml로 농축하고 농축액의 1 ml를 채취하여 evaporator로 완전 농축 후 건조시키고, 1 ml의 methanol에 용해시킨 후 syringe filtration하여 HPLC로 분석하였다. 최적의 세척 용매를 선정하기 위하여 Table 4에 나타낸 용매들을 실험에 사용하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 ethanol만을 사용하여 세척하였을 경우와 chloroform과 ethanol을 1 : 2의 비율로 하여 세척하였을 경우 최적의 HHT의 수율을 얻을 수 있었다. 그러나 ethanol만을 사용하였을 경우 chloroform과 ethanol의 1 : 2의 혼합용액으로 세척하였을 때 보다 극성 불순물이 많이 용해되어져 나왔다. 따라서 흡착 처리 시 세척 용매는 chloroform과 ethanol의 1 : 2의 혼합용액으로 세척하는 것이 HHT의 수율과 불순물 함량 측면에서 가장 효과적임을 알 수 있었다. 흡착제 처리 공정 단계에서 순도가 조금 증가한 것 같지만, 흡착제 처리 공정은 왁스 성분의 제거에 있어서 좋은 효과를 보이며, 간단하고 가능성이 있어 전처리 단계에서 수행되어야 함을 알 수 있었다. 흡착제 처리 후 HHT의 순도와 수율은 각각 10%, 90%가 됨을 확인 할 수 있었다(Figure 12).

Table 4. Effect of washing solvent on active clay treatment(1 g liquid/liquid solid, 1 g active clay/20 ml methanol, room temperature, 30 minutes reaction)

Solvent	Polar impurity*	Homoharringtonine	Nonpolar impurity	Yield
Ethanol	++++	++++	-	++++
Methylene chloride	-	-	-	-
Chloroform	-	-	-	-
Methylene chloride/Ethanol(2/1)	++	++	-	++
Chloroform/Ethanol(1/2)	+++	++++	-	++++
Chloroform/Ethanol(1/1)	++	+++	-	+++

*+: High extraction efficiency, -:low extraction efficiency

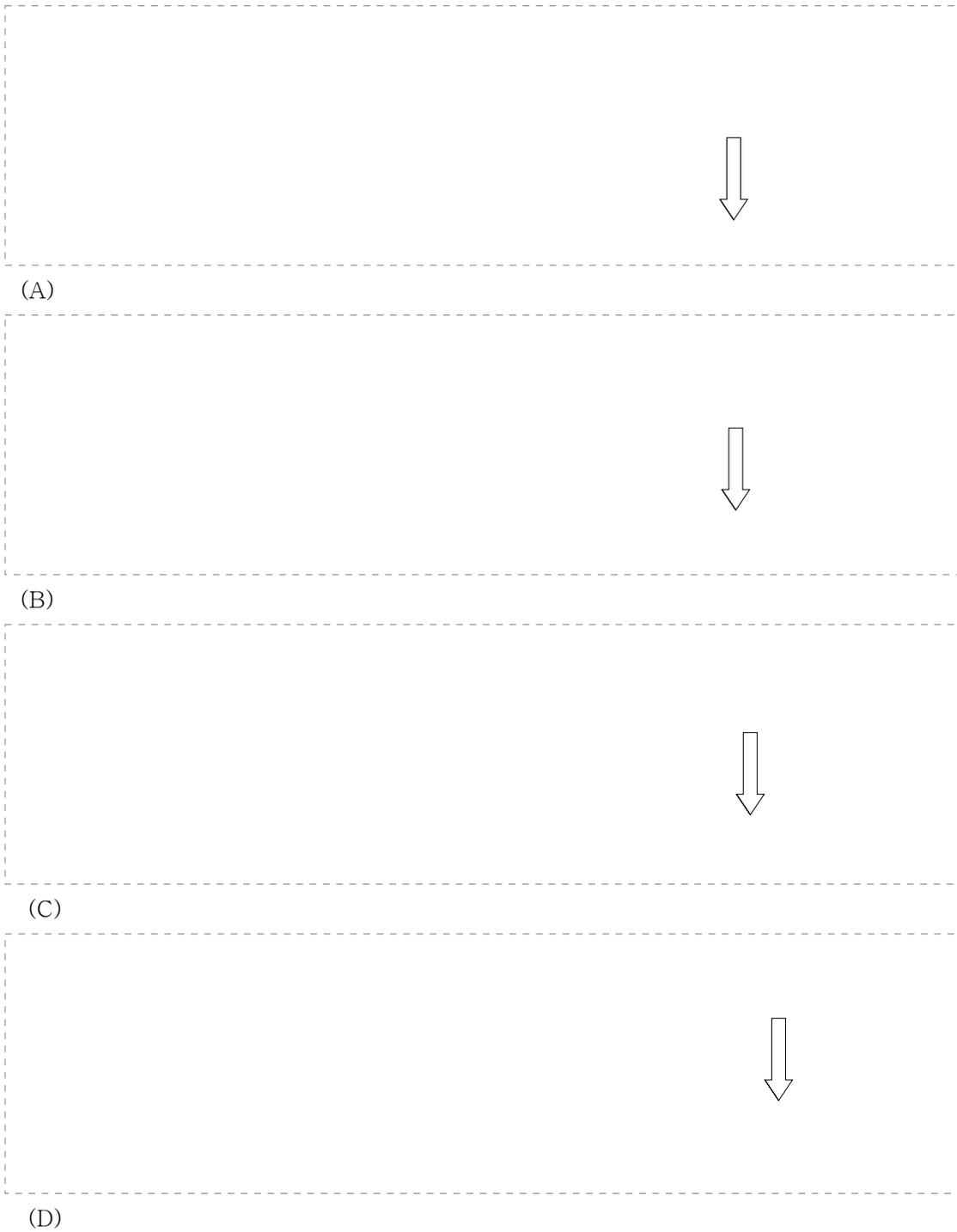


Figure 12. Chromatogram of the purification steps analyzed using RP-HPLC: biomass extraction with methanol (A), liquid-liquid extraction with chloroform (B), adsorbent treatment with active clay (P-1) (C), and low-pressure chromatography with silica gel (D). The arrow indicates the position of HHT.

나. 크로마토그래피 공정을 통한 Homoharringtonine 정제

1) Low-Pressure chromatography 공정

HHT의 정제에 있어서 전 단계 공정들만으로 고순도의 HHT를 얻을 수 없다. 그렇기 때문에 정제 공정에서 chromatography 공정이 도입되었다. 고순도의 HHT를 얻기 위한 HPLC 공정 전 단계로 low-Pressure chromatography가 수행되었다. 이 공정은 간단한 장비와 조작으로 운전할 수 있다는 장점이 있고 좋은 resolution을 보인다는 점에서 효과적인 공정이다. Elution 용액은 methylene chloride : methanol = 80 : 20 의 혼합액을 사용하고 column (50×400mm) 내 Silica gel (MERCK, 40~60 μ m)을 충전하여 elution 용액을 isocratic 조건으로 운전하였다. 이 공정을 통해 순도 10%를 52% 이상으로 증가시켰고 수율은 85%를 보였다(Figure 13).

2) Middle-pressure chromatography 공정

Low-pressure chromatography 공정에서 얻어진 순도 52%의 HHT는 고순도로 정제하기 위해서 middle-pressure chromatography 공정이 도입되어야 한다. 이 공정에서 column(10×900mm×2)에 silica gel을 충전하여 elution 용액을 methylene chloride: methanol = 93: 7 로 하여 isocratic 조건으로 운전하였다. 이 공정에서 80% 순도와 65% 수율의 HHT를 얻을 수 있었다. 이상의 정제공정을 정리하여 Table5, Figure 13에 나타내었다.

Table 5. Summary of the pre-purification of homoharringtonine from biomass (16 g)

	HHT (g)	Purity (%)	Step yield (%)	Yield (%)
Biomass	0.055	-	100.0	100.0
Biomass extraction	0.055	0.5	99.0	99.0
Liquid-liquid extraction	0.049	8.0	90.0	89.1
Adsorbent treatment	0.044	10.0	90.0	80.2
Low-pressure chromatography	0.038	52.0	85.0	68.2
Middle-pressure chromatography	0.025	80.0	80.0	65.0

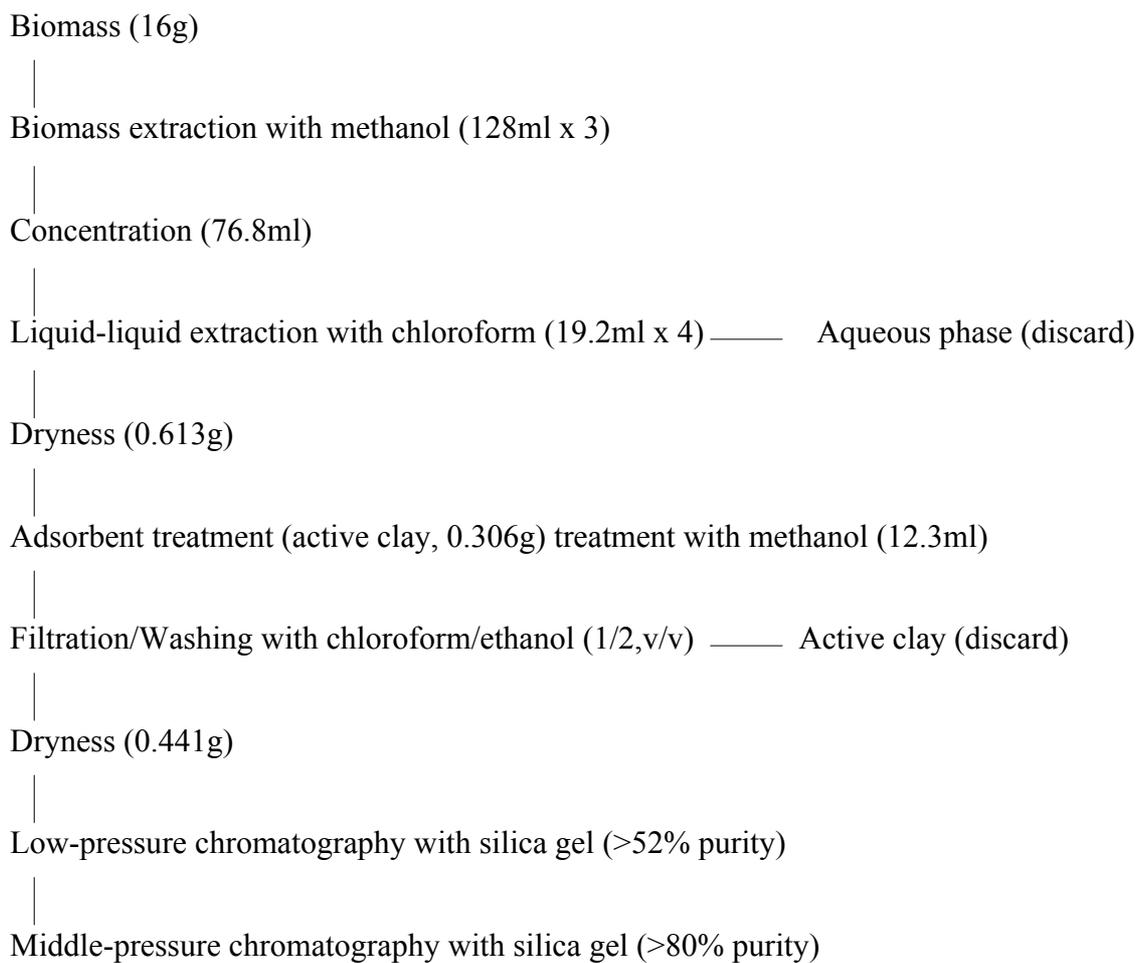


Figure 13. Schematic of recovery/pre-purification process.

다. Homoharringtonine의 독성 파악

1) 분자량 확인

Low-pressure chromatography 공정을 통해서 얻어진 HHT(>50%)를 Liquid con chromatograph -Mass Specific Detector를 통해 분자량을 확인하였다. 분석 결과 HHT의 분자량은 545.6g/mol이었으며(Figure 14), 이는 표준물질의 분자량과 일치함을 알 수 있었다.

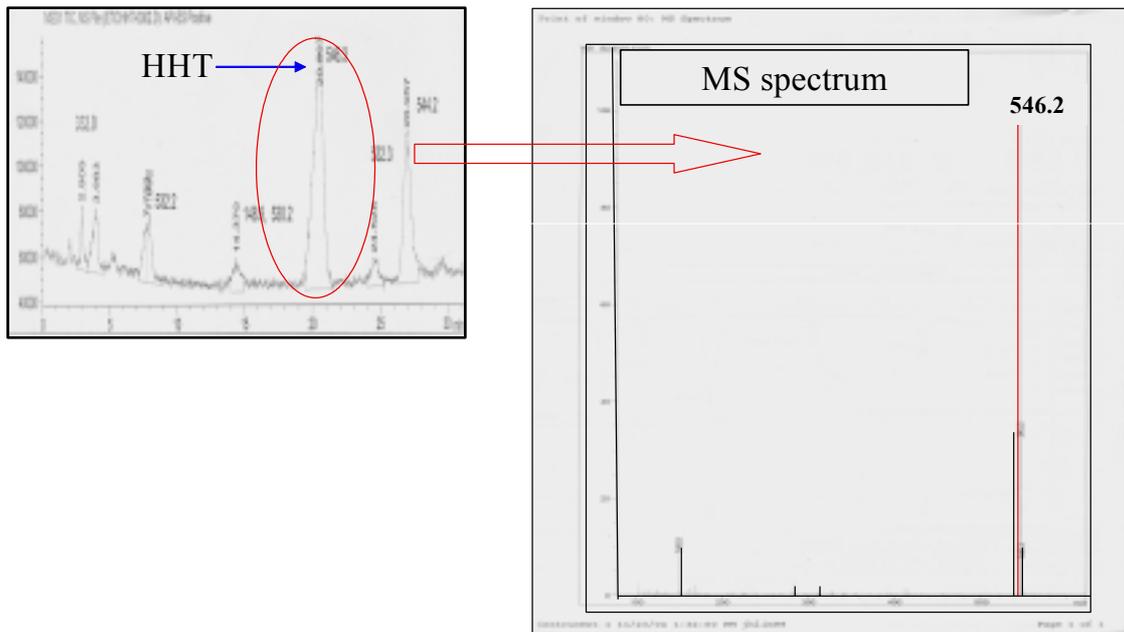


Figure 14. The molecular weight spectra of homoharringtonine.

2) NMR을 통한 HHT의 구조 확인

Proton NMR을 이용하여 표준시료와 정제시료에 대하여 구조 분석을 한 결과를 Figure 15 와 Figure 16에 나타내었다. 정제시료(Figure 16)에 불순물 peak가 보이기는 하나 표준시료(Figure 15)와 정제시료의 주요 peak의 pattern이 일치함을 확인 할 수 있었다.

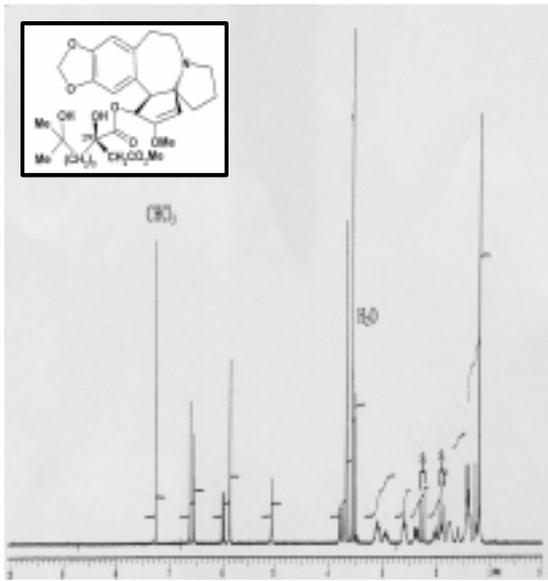


Figure 15 Proton NMR spectra of HHT (Standard)

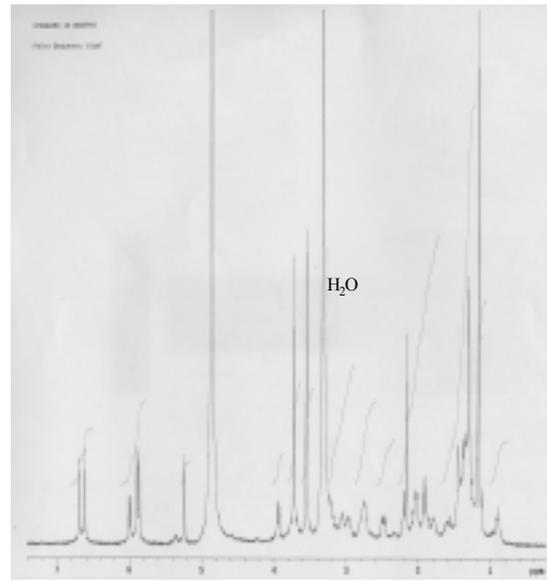


Figure 16 Proton NMR spectra of purified HHT

세부과제 2-3. 공정 가능성 확인 및 제품화 연구

2. 재료 및 방법

가. Biomass 및 분석방법

1) 추출을 위한 식물 재료(Biomass)

본 연구에 사용한 한국산 개비자 나무(*Cephalotaxus koreana*)는 2002년 국내의 여러 산에서 채집하였다. 수고 1.3 m 높이에서 잎과 줄기를 포함한 잔가지를 채취하였다. 식물체 시료는 60°C에서 48시간 동안 건조시킨 후 분쇄하고 0.25 mm sieve에 통과시켜 분말로 만들어 실험에 사용하였다.

2) Homoharringtonine (HHT)의 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 : 75에서 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 정량 선을 작성한 후 계산하였다.

3) HPLC 분석 샘플

HPLC 분석을 위한 샘플은 추출액을 감압 여과하고 여액 1 ml 채취하여 evaporator로 완전 농축시킨 후 진공 건조기에서 12시간 동안 건조하였다. 건조물을 1 ml의 methanol에 용해시킨 후 syringe

filtration(Whatman, 25 mm, 0.45 μm , 50 units)하여 HPLC로 분석하였다.

나. 전처리 및 정제 방법

1) 흡착제 처리(adsorbent treatment) 공정

유기용매를 이용한 biomass 추출과 액/액 추출 후 건고물을 이용하여 흡착제 처리를 수행하였다. 흡착제 처리는 주로 식물유래 타르 또는 왁스 성분(tar or waxy compound)을 제거하는데 그 목적이 있다. 흡착제 처리 공정에 사용된 흡착제는 백토(P-1, P-1G), 활성탄(CA-1, SX-PLUS), 그리고 charcoal를 사용하여 흡착 처리 효과를 조사하였다. 각각의 흡착제의 제조회사는 백토(P-1, P-1G)의 경우 Mizukalife Chemical Co. 제품(Japan), 활성탄 (CA-1)의 경우 NORIT 제품(Netherlands)을 사용하였으며, P-1을 미립화(granule)한 것이 P-1G이다. P-1은 정전기적인 성질이 있고, P-1G는 입자 형태가 둥글다. 특히, 백토의 주성분은 SiO_2 (60.63%)와 MgO (27.22%)이며 surface area $675 \text{ m}^2/\text{g}$, porosity 0.89 cc/g , size $5.6 \mu\text{m}$, average pore diameter 45 \AA 등의 특성을 가지며 가격은 $\$10 /\text{kg}$ 정도로 매우 저렴하다.

2) 크로마토그래피(chromatography) 공정

Low-pressure chromatography: Silica 흡착제 ($40\text{--}63 \mu\text{m}$, Merck, Germany)를 methanol에 용해시킨 후 column ($50 \times 400 \text{ mm}$, 40 ml , Pyrex)에 충전시켰다. Column의 충진을 고정시키기 위해 methanol에 규조토를 넣고 교반 후 silica 흡착제가 충전된 column에 흘려주었다. 이렇게 하여 충전된 silica column을 원하고자 하는 높이로 만들고 elution 용액으로 methylene chloride/methanol = $70/30(\text{v/v})$ 의 혼합 용액을 사용하여 column에 넣고 안정화 시켰다. 유속은 3.5 ml/min 이었고, 시료주입량을 50 mg 으로 isocratic 조건으로 운전하였다. Low-pressure chromatography 공정에 사용된 시료는 액/액 추출 공정을 거쳐 전 처리 공정인 흡착제 처리를 한 후의 것을 사용하여 크로마토그래피 공정을 수행하였다.

Middle-pressure chromatography: Low-pressure chromatography 공정으로부터 얻은 순도 52%의 homoharringtonine을 좀더 높은 순도로 정제하여 최종 정제 공정에 사용하기 위하여 middle-pressure chromatography 공정을 도입하였다. 이 공정에서 column ($10 \text{ mm} \times 900 \text{ mm} \times 2$, SUS)에 silica gel을 충전하여 elution 용액으로 methylene chloride : methanol = $93:7(\text{v/v})$ 로 하여 isocratic 조건으로 운전하였다. 유속은 3 ml/min 로 하고 파장은 290 nm 로 검출하였다. 시료 주입량은 2 g 을 10 ml 에 용해시켜 column에 주입하였다. 검출기를 통과 해 나오는 시료를 10분 간격으로 채취하였다.

High-pressure chromatography: Middle-pressure chromatography 공정을 통해서 얻어진 시료(순도: 80%)를 high-pressure chromatography 공정을 이용하여 최종 정제(순도 $>98\%$) 하였다. C18 column ($4.6 \times 250 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$, Shiseido, Japan)을 사용하였으며 elution 조건으로 methanol/ $0.1 \text{ mol ammonium formate}$ 를 $25/75(\text{v/v})$ 에서 $75/25(\text{v/v})$ 로 진행되도록 gradient를 주어 수행하였다. 이 과정에서의 유속은 1.0 ml/min 으로 하고 파장 290 nm 에서 검출하였으며, 시료 주입량은 10 mg 으로 하여 수행하였다.

다. Homoharringtonine의 특성 파악

1) Homoharringtonine의 분자량 확인

LC/MSD(HEWLETT PACKARD) 분석은 C18 column ($4.6 \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$)을 사용하여 수행하였다. 이동상으로는 methanol과 $0.1 \text{ M ammonium formate}$ 용액을 사용하였다. 용매의 gradient 조건은 1.0 ml/min 유속으로 methanol : $0.1 \text{ M ammonium formate}$ 가 $25 : 75$ 에서 시작하여 30분 후 $45 : 55$ 이 되

도록 하였다. 각 화합물은 290 nm에서 UV에 의해 검출되었으며 주입량은 10 μ l이다. Low-pressure chromatography 공정을 통해 정제된 HHT(>50%)를 분자량 확인에 이용하였다.

2) NMR을 통한 homoharringtonine의 구조 확인

NMR(Varian Mercury 400 MHz Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy)에 의한 HHT의 분석은 proton NMR 분석방법으로 수행하였다. NMR 분석에 사용된 용매는 TMS(tetramethyl silane)을 사용하였다. 구조 분석은 middle-pressure chromatography에서 정제된 순도 80%, 3mg의 HHT를 이용하였다.

라. Homoharringtonine의 특성 연구

1) 시료 준비

Homoharringtonine의 특성 연구를 위해 용매 조건과 건조 조건을 달리하여 3가지 종류의 시료를 준비 하였다(A, B, and C). 각각의 시료는 A(methanol/H₂O=98/2, v/v), B(methylene chloride/methanol=98/2, v/v), C(methylene chloride/methanol=98/2, v/v)이며 시료 A, B는 각각의 용매 조건으로 하여 일반 진공건조기(evaporation)로 건조시켰다, 시료 C는 B와 같은 용매 조건으로 하여 spray drier를 통해 건조시켰다. 시료 A, B, C를 이용하여 homoharringtonine의 morphology, 물에 대한 용해도, 잔류 수분 및 용매, 보관기간에 따른 수분변화를 각각 확인하였다. Homoharringtonine의 특성 연구에 사용된 시료는 Taihua Natural Plant Pharmaceutical Co.(Guilin, China)로부터 구입한 순도 99%의 제품을 사용하였다. Spray drier(SD-1000, EYELA, Japan)를 이용한 시료 C의 건조는 methylene chloride/methanol(98/2, v/v) 50 ml에 homoharringtonine를 약 3 g 용해시켜, 70°C에서 blower를 0.3 m³/min으로 유지하여 펌프를 통해 3 ml/min의 속도로 spray drier 내로 주입하였다. spray drier의 입구와 출구의 온도를 각각 70°C, 55°C로 유지하였다.

2) SEM(Scanning electron microscopy) 및 XRD(X-ray powder diffraction) 분석

시료 A, B, C 결정의 입자표면을 Field emission scanning electron microscopy (JSM-6335F, Jeol, Japan)을 사용하여 확인하였다. Accelerating voltages를 5 kV로 유지하고 각 시료의 배율을 달리하여 입자표면을 관찰하였다. 각 시료의 양은 약 5mg이 되도록 분석하였다. 또한 Xray powder diffraction (DMAX2000, Rigaku, Japan)을 이용하여 시료 A, B, C의 morphology를 확인하였으며 운전 조건은 2° 2 θ /min인 CuK α 를 사용하여 회절각을 2 θ 로 5°에서 40°가 되도록 수행하였다. 각 시료의 양은 약 50 mg이 되도록 하여 분석하였다.

3) 잔류 수분 측정

Karl fischer moisture titrator (MKC-510N, Japan)를 이용하여 시료 내의 수분 함량을 측정하였다. 수분함량 분석을 위해 사용되는 용매 내의 잔존수분을 제거하기 위하여 KF-reagent와 end point를 설정하여 수행하였다. 잔류 수분 측정을 위해 증류수를 20 μ l를 주입하여 표준화시켰다. 측정에 사용된 시료의 양은 약 20 mg이었다.

4) 잔류 용매 측정

Gas chromatography system (GC2014ATFSP, Shimadzu, Japan)과 column (0.32mm ID x 30m, 0.25 μ m film thickness, Hewlett-Packard, USA)를 이용하여 시료 내의 잔류 용매의 함량을 분석하였

다. 분석조건은 온도 프로그래밍이 2 min 동안 40°C에서 100°C(10/min)로 유지하고, 15 min 동안 300°C가 되도록 하였으며 잔류용매는 FID Detector를 이용하여 검출하였다. 측정에 사용된 용매로 Dimethyl Sulfoxide를 사용하였고, 잔류용매의 정량은 methanol과 methylene chloride의 피크 면적으로 표준 정량선을 작성한 후 계산하였다. Oven의 온도를 270°C로 유지하고 유속은 3 ml/min (helium)으로 하였다.

5) 용해도 측정

준비된 시료의 물에 대한 용해도 측정은 C18 column을 이용하여 HPLC(Waters)를 통해 수행하였다. 이동상으로 methanol 과 0.1 mol ammonium formate를 사용했으며, 30 min 동안 25/75(v/v)에서 45/55(v/v)로 진행되도록 gradient를 주어 분석하였다. 용해도 측정 실험에 이용된 시료는 약 1 mg이며 농도를 1 mg/ml(1,000 ppm)로 하여 0.5 hr, 2hr, 8hr, 24hr 의 시간과 5°C, 25°C, 45°C 의 온도 조건을 달리하여 측정하였다. 용해도 값은 homoharringtonie의 표준 정량선을 통해 확인하여 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 분리 및 정제 공정 개발

1) Biomass 추출 및 액/액 추출

여러 가지 유기용매(methanol, ethanol, diethylether, propyl alcohol, acetone, chloroform, chloroform/ethanol, methylene chloride, methylene chloride/ethanol)를 이용하여 biomass로부터 homoharringtonine의 추출 경향을 조사한 결과 methanol의 경우 가장 적은 양으로 가장 높은 homoharringtonine 회수율을 얻어 biomass로부터 homoharringtonine의 추출에 가장 효과적임을 알 수 있었다. Biomass 추출에서는 여러 가지 조업방법이 가능하나 크게 batch와 counter-current 형태로 나누어 작업이 가능하다. 이들 방법에 따른 회수율은 거의 차이가 없음을 알 수 있으며, 다만 counter-current 형태를 사용할 경우 유기용매 사용량을 줄일 수 있다. 그러나 counter-current 형태의 경우 작업의 복잡성 때문에 대부분 batch 형태의 조업을 택하고 있다. Batch 형태 조업으로 methanol을 이용한 biomass 추출에서 biomass와 유기용매 내 homoharringtonine 농도 사이의 평형은 추출시간 20 min 정도이면 도달하며 평형과 추출시간에 미치는 온도의 영향은 5°C~50°C에서는 거의 없었다. Batch 형태 조업에서 추출횟수와 biomass로부터 homoharringtonine 추출 정도는 Figure17에서 보는 바와 같이 총 3회의 추출로 biomass 내 homoharringtonine은 대부분 회수(99%) 가능하였으며 순도는 0.5% 정도 되었다. Methanol 추출 후 추출액의 농축은 rotary evaporator에서 수행하였으며 농축조건은 635 mmHg, 40°C에서 수행하였다.

Methanol을 이용한 biomass 추출 후 추출액에 존재하는 다량의 극성불순물은 액/액 추출(liquid-liquid extraction)에 의해 제거하였다. 여러 가지 유기용매 (methylene chloride, chloroform, diethylether, hexane/methylene chloride)를 이용하여 액/액 추출 경향을 조사한 결과 chloroform의 경우

가장 높은 homoharringtonine 순도 및 회수율을 얻어 액/액 추출에 가장 효과적임을 알 수 있었다. 즉, methanol 추출액을 원액의 20% 정도로 농축하고 농축액에 chloroform를 첨가하여(methanol 추출액/chloroform=5/1, v/v) 액/액 추출을 실시하면 methanol 농축액에 존재하는 다량의 극성불순물 (polar impurity)을 효율적으로 제거할 수 있었다. 액/액 추출은 batch 형태 조업으로 4회에 걸쳐 실시하여 대부분의 homoharringtonine 회수(~99%)가 가능하였으며 (Figure. 18) 액/액 추출 후 순도는 8% 정도 되었다. 액/액 추출을 통하여 극성불순물이 제거된 chloroform 용액을 rotary evaporator (450 mmHg, 30℃)에서 농축하고 건조하여 전 처리 공정에 이용한다.

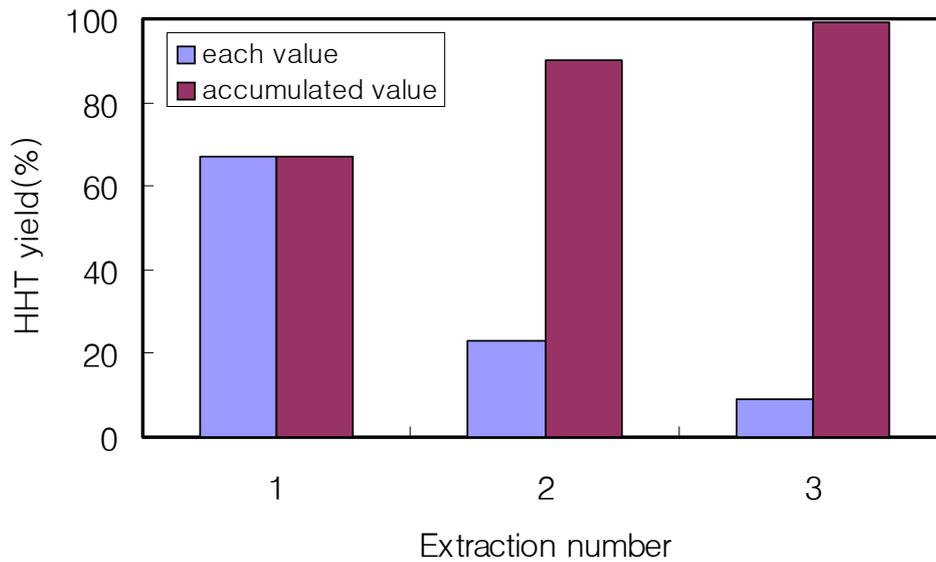


Figure 17. Effect of extraction number on homoharringtonine recovery from biomass.

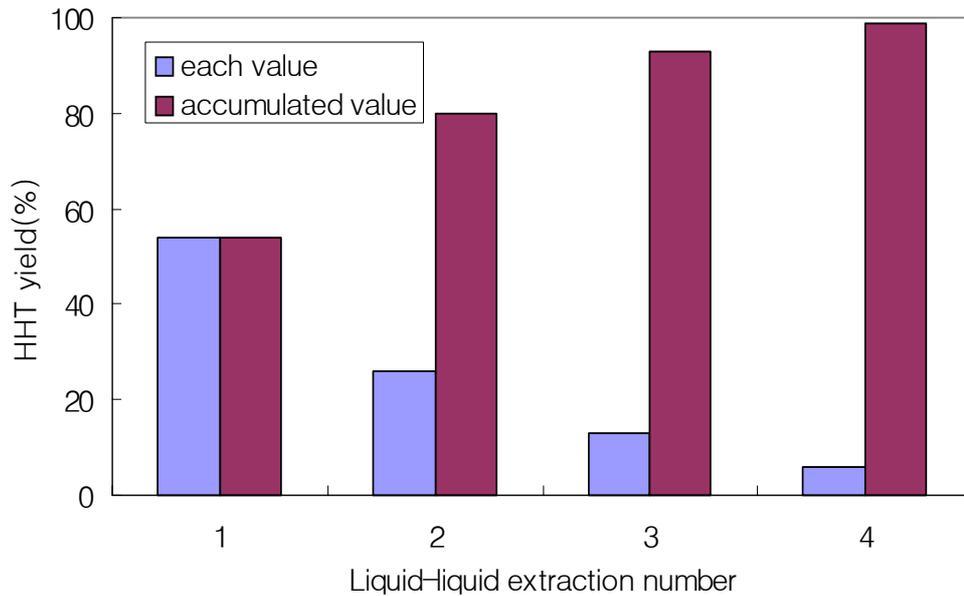


Figure 18. Effect of liquid-liquid extraction number on homoharringtonine recovery from the methanol extract.

2) 흡착제 처리

액/액 추출 및 농축에서 얻은 건고물에는 식물유래 타르 및 왁스 성분의 불순물이 다량 포함되어 있고 이들 불순물은 다음 단계의 여러 공정에 많은 악영향을 미쳐 homoharringtonine 정제에 많은 어려움이 따른다. 여러 종류의 흡착제를 사용하여 이러한 타르 성분, 왁스 성분 및 진한 crude extract의 색을 제거하기 위해 흡착제 처리 공정을 도입하였다. 흡착제 처리를 통한 homoharringtonine의 수율, 순도 및 색깔 제거 효과를 조사하여 Table 6에 나타내었다. 백토(active clay)인 P-1로 흡착 처리 하였을 때 homoharringtonine의 수율이나 순도가 가장 높게 나타났다. 하지만 crude extract의 색깔 제거 면에서는 활성탄(activated carbon)과 charcoal이 백토보다 오히려 좋은 효과를 보였다. 백토 P-1의 처리량은 건고물과 흡착제의 양을 1:1(w/w) 비로 혼합하여 처리할 경우 homoharringtonine의 수율이 가장 높았으며, 백토의 양이 증가할수록 homoharringtonine의 수율은 오히려 감소하는 경향을 보였다 (Figure 19). 백토의 양이 50 wt%(흡착제:건고물=1:1, w/w) 이상에서는 흡착율은 높으나 탈착율이 오히려 떨어져 최종 수율은 결국 낮아지는 것으로 판단된다. Pyo 등의 paclitaxel의 흡착 처리 결과에서 백토의 양이 40-50 wt%에서 paclitaxel의 수율이 가장 높게 나타났다. 따라서 흡착 처리 시 흡착제의 양, 즉 백토의 양은 액/액 추출 건고물의 무게와 동량으로 하여야 최대의 흡착 처리 효과를 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 흡착처리 공정을 통하여 식물 유래의 타르 성분과 왁스 성분들을 제거 하는 효과를 얻을 수 있었다. 또한 흡착처리 전 단계와 비교하였을 때 점성이 낮아진 것을 확인하였다. 일반적으로 활성탄은 crude extract에서의 색과 불순물을 제거하는 공정에 주로 이용되는 흡착제이나 천연물 유래 항암제의 흡착 처리 시 활성탄에 비해 백토를 사용하였을 때의 수율이 월등히 높은 것으로 보고 된 바

있다. 백토는 가격 측면에서도 매우 저렴(\$10/kg)하여 식물 유래 타르 또는 왁스 성분을 대량 처리 및 제거하는 공정에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 판단된다. 흡착 처리 공정을 통해서 액/액 추출 공정을 통해 얻어진 시료의 순도는 8%에서 10%로 많은 증가를 보이진 않았지만, 식물유래 타르나 왁스 성분을 효과적으로 제거하고 시료의 점성을 낮추어 chromatography 공정의 효율성에 상당히 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

Table 6. Comparison of active clay, activated carbon, and charcoal in the adsorbent treatment step

	Color ^a	Purity (%)	Yield (%)
Starting	10	8.0	-
P-1	4	10.0	90
P-1G	4	9.5	75
CA-1	2	8.9	20
SX-PLUS	2	8.5	30
Charcoal	2	8.4	45

^aColor ; deep(10) ~ light(1)

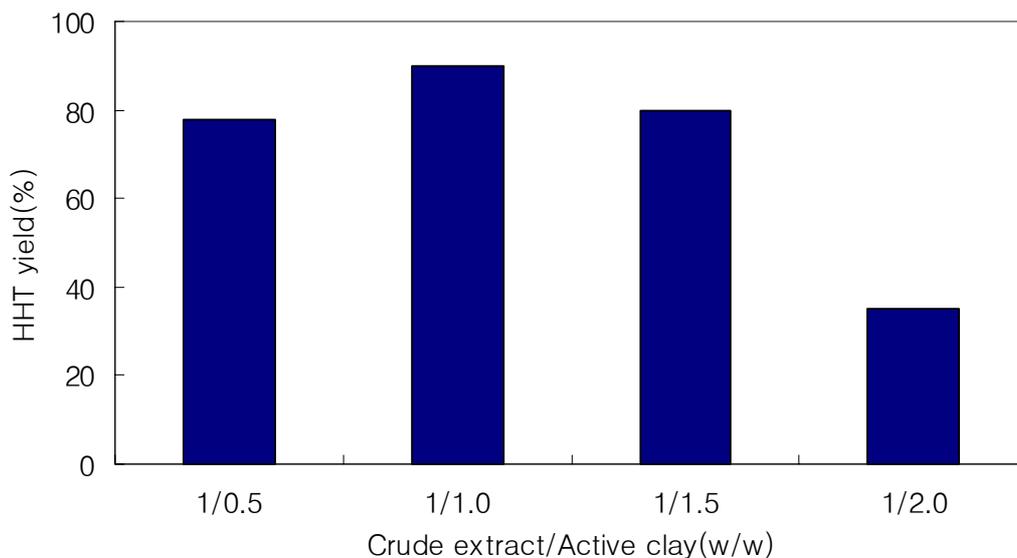


Figure 19. Effect of active clay amount on homoharringtonine(HHT) yield.

3) Chromatography 공정

Homoharringtonine의 정제에 있어서 전 단계 공정들만으로 높은 순도의 homoharringtonine을 얻을 수 없어 chromatography 공정을 도입하였다. 고순도의 homoharringtonine를 얻기 위한 HPLC 공정 전 단계로 silica gel low-pressure chromatography가 수행되었다. 이 공정은 간단한 장비와 조작으로 운전할 수 있다는 장점이 있고 좋은 resolution을 보인다는 점에서 효과적인 공정이다. Elution 용액은 methylene chloride : methanol = 80 : 20 (v/v)의 혼합액을 사용하였을 경우 homoharringtonine의 순도와 수율 측면에서 가장 좋았다. 또한 elution 용액을 isocratic 조건으로 운전하였다. 이 공정을 통해 homoharringtonine 순도 10%를 52% 이상으로 증가시켰으며 수율은 86.4%를 보였다.

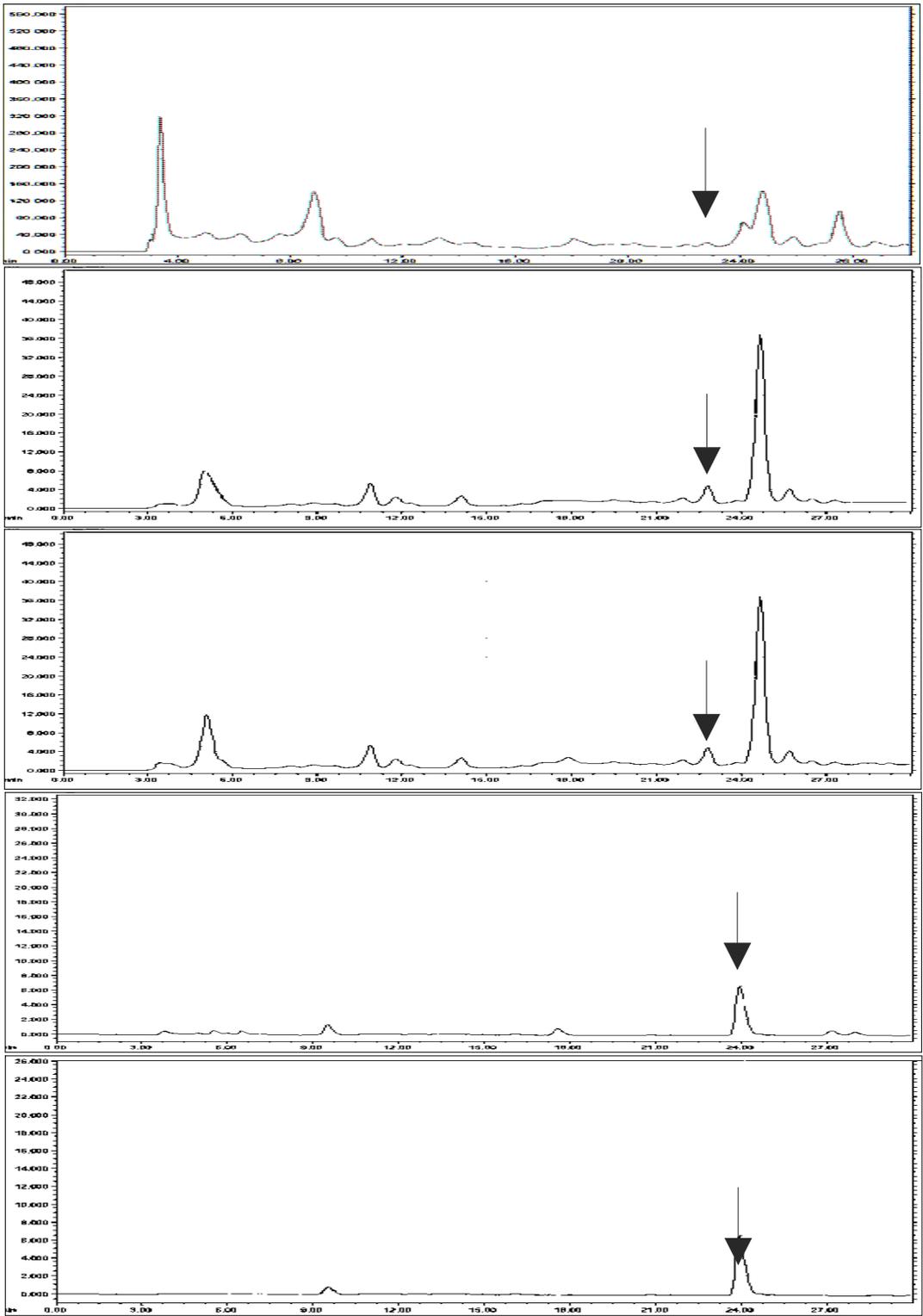
Low-pressure chromatography 공정에서 얻어진 순도 52%의 homoharringtonine는 높은 순도로 정제하기 위해서 silica gel middle-pressure chromatography 공정을 도입하였다. Elution 용액을 methylene chloride: methanol = 93:7(v/v) 로 하여 isocratic 조건으로 운전하였다. 검출기를 통과 해 나오는 시료를 10 min 간격으로 채취하였으며 homoharringtonine는 125 min 전후로 하여 검출되었다. 이 공정에서 80% 순도와 79% 수율의 homoharringtonine를 얻을 수 있었다. 특히 low-, middle-pressure chromatography 공정에서 elution 조건으로 gradient 조건에 비하여 긴 운전 시간과 많은 용매 사용에도 불구하고 장치 및 운전의 단순함, 용매회수의 간편성 등을 고려하여 isocratic 조건을 채택하였다.

Middle-pressure chromatography 공정을 통해서 얻어진 시료(80%)를 high-pressure chromatography 공정에 사용하였다. HPLC 공정은 98% 이상의 homoharringtonine을 얻고자 하는 목적으로 제품의 최종 정제 단계에 사용하였다. Methanol/0.1mol ammonium formate = 25/75(v/v)에서 75/25(v/v)로 진행되도록 gradient를 주어 수행하였다. 공정에서 얻어진 시료 중의 염(salt)을 제거하기 위해 methylene chloride에 용해시켜 염을 제거하였다. 공정을 통해 얻어진 시료는 HPLC 공정을 거쳐 98%의 homoharringtonine을 얻을 수 있었다. Homoharringtonine 분리 및 정제 결과, 분리 및 정제 단계별 크로마토그램 및 공정 단계를 정리하여 Table 7, Figure 20, Figure 21에 각각 나타내었다.

Table 7. Summary of the separation/purification of homoharringtonine from biomass(16 g)

	HHT (g)	Purity (%)	Step yield (%)	Overall yield (%)
Biomass	0.055	-	100.0	100.0

Biomass extraction	0.055	0.5	99.0	99.0
Liquid-liquid extraction	0.055	8.0	99.0	98.0
Adsorbent treatment	0.049	10.0	90.0	88.2
Low-pressure chromatography	0.042	52.0	86.4	76.2
Middle-pressure chromatography	0.033	80.0	79.0	60.2
High-pressure chromatography	0.029	98.0	86.7	52.2



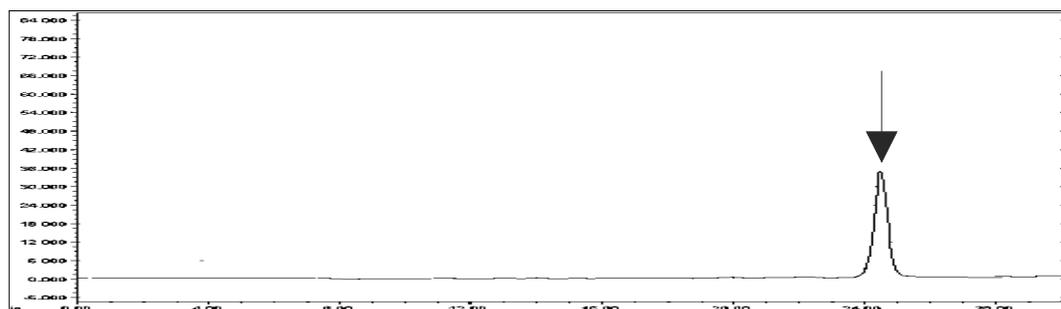


Figure 20. Chromatogram of the separation/purification steps analyzed using RP-HPLC: biomass extraction with methanol (A), liquid-liquid extraction with chloroform (B), adsorbent treatment with active clay (P-1) (C), low-pressure chromatography with silica gel (D), middle-pressure chromatography with silica gel (E), and high-pressure chromatography with ODS (F). The arrow indicates the position of homoharringtonine.

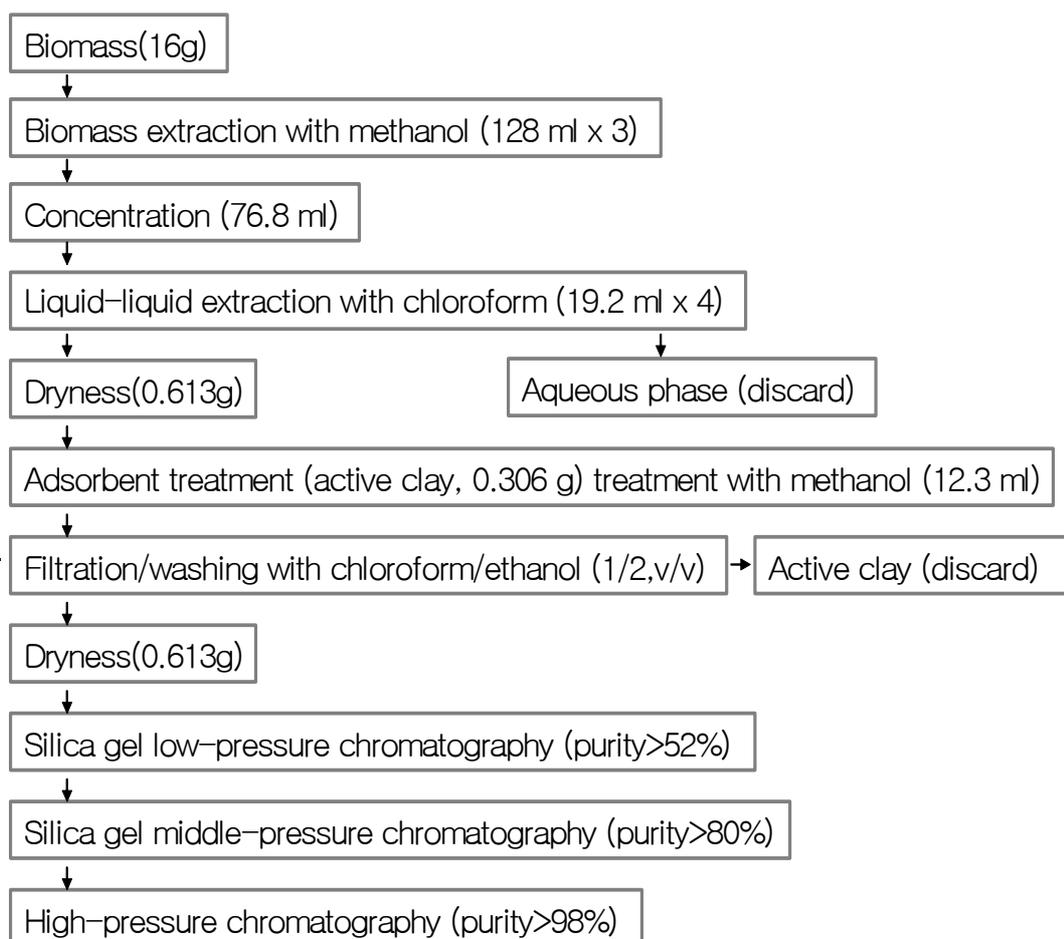


Figure 21. Schematic Flow Diagram of separation/purification process.

나. Homoharringtonine의 동정-분자량 및 구조 확인

Low-pressure chromatography 공정을 통해서 얻어진 homoharringtonine (>50%)의 분자량을 확인하였다. 물질의 고유한 성질인 분자량을 확인함으로써 분리 및 정제 과정에서 homoharringtonine로 예측되는 물질이 실제 homoharringtonine과 동일 물질인가에 대하여 확인을 위해 수행하였다. 분자량 분석은 Liquid chromatograph-Mass Spectrometer를 통해 이루어 졌다. 분석에 사용된 시료량은 5 mg 이었고 시료를 methanol에 용해시키고 homoharringtonine 분석 조건으로 하여 column (4.6 x 150 mm, Shiseido)에 주입하여 분자량을 확인하였다. Homoharringtonine의 분자량은 545.6 g/g-mol이고 분석을 통해 얻어진 결과를 Figure 22에 나타내었다. 정제된 시료의 분자량은 546.2 g/g-mol으로 homoharringtonine의 분자량과 동일함을 확인할 수 있었다. 분자량의 미세한 차이는 시료를 분석하는 과정의 negative 혹은 positive 방법에 따라 영향을 받는데, 분석에 이용된 negative 방법은 proton의 탈 부착 여부에 따라 분자량의 차이가 나는 것으로 확인되었다.

^1H -NMR을 이용하여 정제된 homoharringtonine의 구조를 확인을 하였다. NMR 분석 결과와 문헌에 보고[14]된 결과와 비교하여 동일 물질 여부를 확인하였다. 분석에 이용된 시료는 high-pressure chromatography 공정에서 정제된 시료(98%)를 이용하였으며, 문헌에 보고된 NMR 분석 결과와 정제 시료의 NMR 분석 결과를 Figure 23에 나타내었다. 분석 결과 두 데이터는 동일 peak들을 가지고 있음이 확인되었고 이를 통해 정제된 homoharringtonine는 문헌에 보고된 homoharringtonine와 동일한 물질임을 확인할 수 있었다.

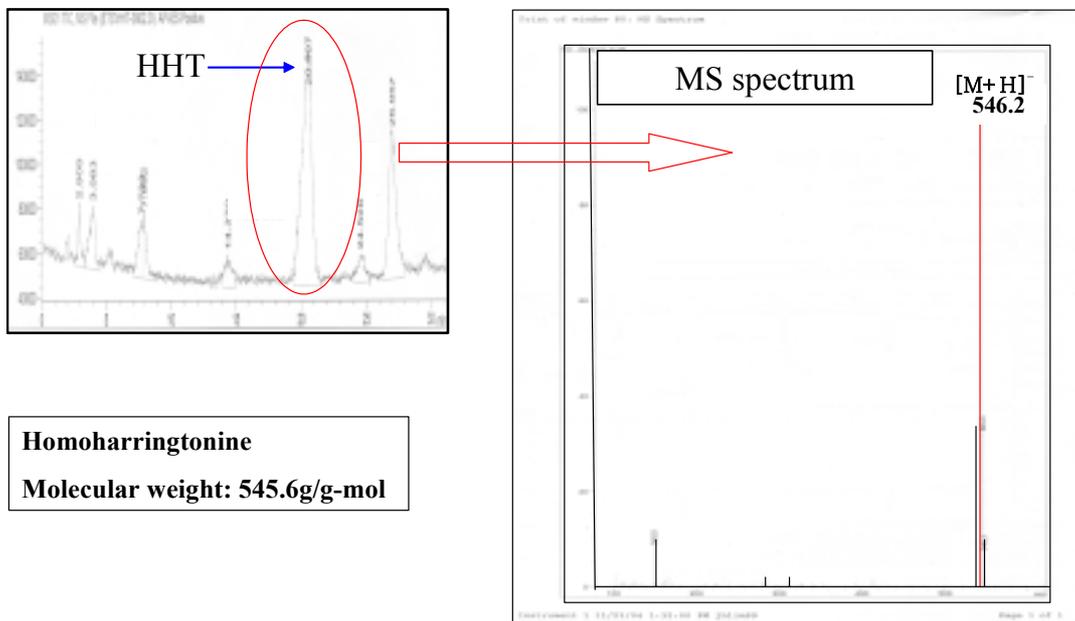


Figure 22. The molecular weight of homoharringtonine.

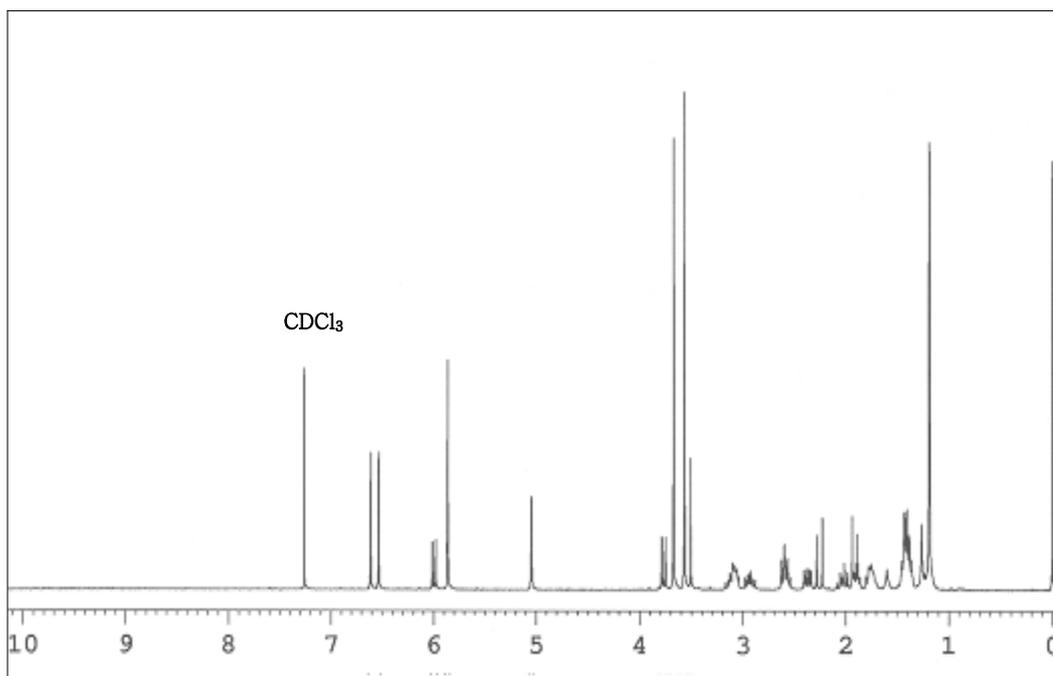


Figure 23. ^1H - NMR spectra of a purified homoharringtonine from *Cephalotaxus koreana*.

다. Homoharringtonine의 특성 파악

1). 용매처리에 의한 homoharringtonine의 morphology 조절

원료의약품(APIs; active pharmaceutical ingredients)의 경우 정제된 최종제품의 specification은 매우 중요하다. 최종 제품의 순도뿐만 아니라 최종제품의 morphology, 최종 제품에 포함되어 있는 잔류용매 및 수분, 불순물 함량, endotoxin 함량 등 여러 가지가 검토되어야 한다. 특히 최종 제품의 morphology는 의약품의 제형(formulation)에 매우 중요하게 영향을 미치는데, 일반적으로 원료의약품의 경우 solubility와 bioavailability 측면에서 crystalline 형태보다는 amorphous 형태의 제품이 보다 유용하다. 따라서 최종 solid-state homoharringtonine의 morphology를 쉽게 조절 할 수 있는 방법은 의약품 생산 공정에 매우 유용하게 활용될 수 있다. 항암제 paclitaxel의 경우 Liggins 등에 의하여 solid-state paclitaxel의 morphology를 조절할 수 있는 방법이 개발되기는 하였으나 제조 조건이 매우 고온에서 이루어지므로 실용적이지 못한 단점이 있다. 예를 들면, amorphous paclitaxel 제조를 위하여 221°C의 고온에서 quench cooling하여야 하기 때문에 제조 환경이 매우 열악하다. 본 연구에서는 homoharringtonine의 morphology를 용매 처리(solvent treatment)에 의하여 간단하고 편리하게 조절할 수 있는 방법(solvent-induced method)을 개발하였다. 즉, 물이 소량 포함되어 있는 극성 용매(methanol/H₂O=98/2, v/v)에 homoharringtonine을 녹여 건조할 경우 결정형(crystalline) homoharringtonine을 제조할 수 있었으며, 상대적으로 비극성 용매(methylene chloride/methanol=98/2, v/v)에 녹여 건조할 경우 무정형(amorphous) homoharringtonine을 제조할 수 있었다. 용매 처리에 의한 homoharringtonine의 morphology 변화를 확인하기 위해 SEM과 XRD 분석을 수행하였으며 분석 결과를 Figure 24과 Figure 25에 각각 나타내었다.

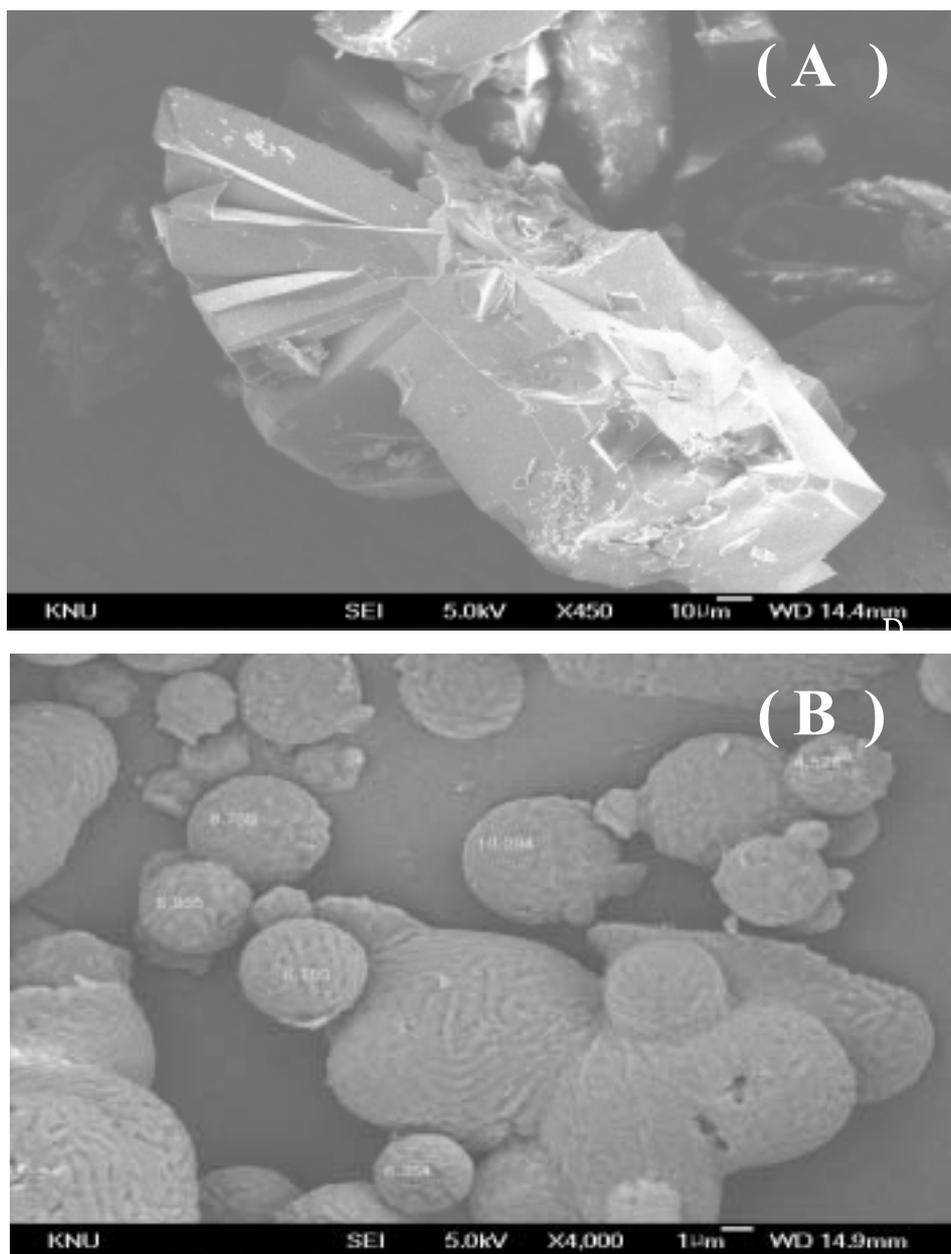


Figure 24. Pictures for morphology of homoharringtonine analysed by SEM: crystalline homoharringtonine from methanol/H₂O(98/2, v/v) (A); amorphous homoharringtonine from methylene chloride/methanol(98/2, v/v) (B), respectively.

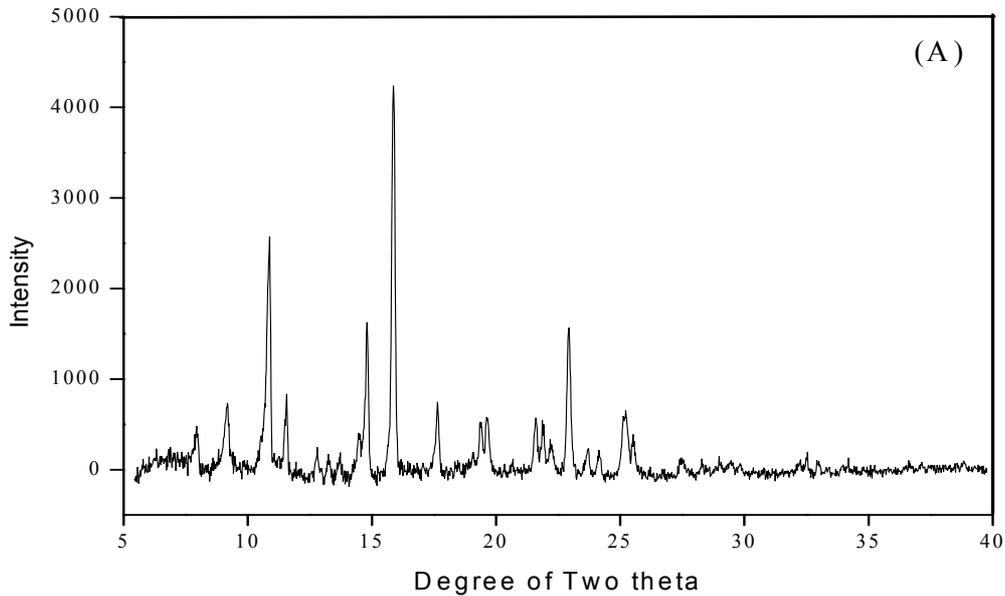


Figure 25. XRD patterns of (A) crystalline homoharringtonine from methanol/H₂O(98/2, v/v), (B) amorphous homoharringtonine from methylene chloride/methanol(98/2, v/v), respectively.

2) 건조방법에 따른 영향

용매처리 후 건조방법에 따라 homoharringtonine의 모양과 크기에 차이를 보였으며 잔류용매 농도에도 차이를 보였다. Figure 26에서 보는 바와 같이 동일한 용매 조건으로 처리한 후 건조 방법을 다르게 할 경우 즉, 일반 진공건조(evaporation)에 비하여 분무건조(spray drying)를 사용할 경우 훨씬 작은 크기의 homoharringtonine 제조가 가능하였다. 또한 Figure 27에서 보는 바와 같이 일반 진공건조의 경우와 분무건조의 경우 잔류 methanol 농도는 각각 1180, 1160 ppm이었으며 잔류 methylene chloride 농도는 각각 1040, 250 ppm으로 나타나 분무건조의 경우 잔류용매를 더 낮은 농도로 줄일 수 있었다. 원료의약품의 경우 잔류용매의 농도가 철저히 관리되어야 하며 이에 관련하여 ICH(International Conference on Harmonisation) guidance에 원료의약품에 포함되는 여러 가지 용매의 잔류 최대 농도를 엄격하게 규제하고 있다. ICH guidance에 의하면 methanol과 methylene chloride는 모두 Class 2에 해당되는 용매로 잔존 최대 농도가 각각 3,000, 600 ppm으로 규정하고 있다. 본 연구에서는 분무건조 방법으로 methanol과 methylene chloride의 잔류용매 농도를 모두 ICH 규정 농도 이하로 건조 가능하였다. 항암제 paclitaxel의 경우에도 유사한 결과를 보고한 바 있는데, 분무건조에 의하여 진공건조(evaporation)에 비해 상대적으로 작은 크기의 paclitaxel을 얻어 제품 내의 잔류용매를 효과적으로 제거할 수 있었다. 따라서 최종 정제 제품 내 잔류용매의 규정을 충족시켜주기 위해서는 건조 방법이 매우 중요하였다. 일반 진공건조기(rotary evaporator)에서 장시간 건조하여도 건조 중 잔류용매가 충분히 제거되기 전에 제품 표면이 딱딱하게 굳어버리는 표면경화(casehardening) 현상 때문에 잔류용매의 농도를 규정치 이하로 제조하기가 상당히 어렵다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여 원료의약품의 경우 일반적으로 분무건조(spray drying) 방법으로 건조하여 최종 제품 내 잔류용매의 규정을 충족시킨다. 분무건조의 경우 제품을 다공성 형태로 건조할 뿐만 아니라 열에 민감한 제품 건조에도 적합하여 원료의약품 건조에 가장 적합한 건조 방법으로 판단된다.

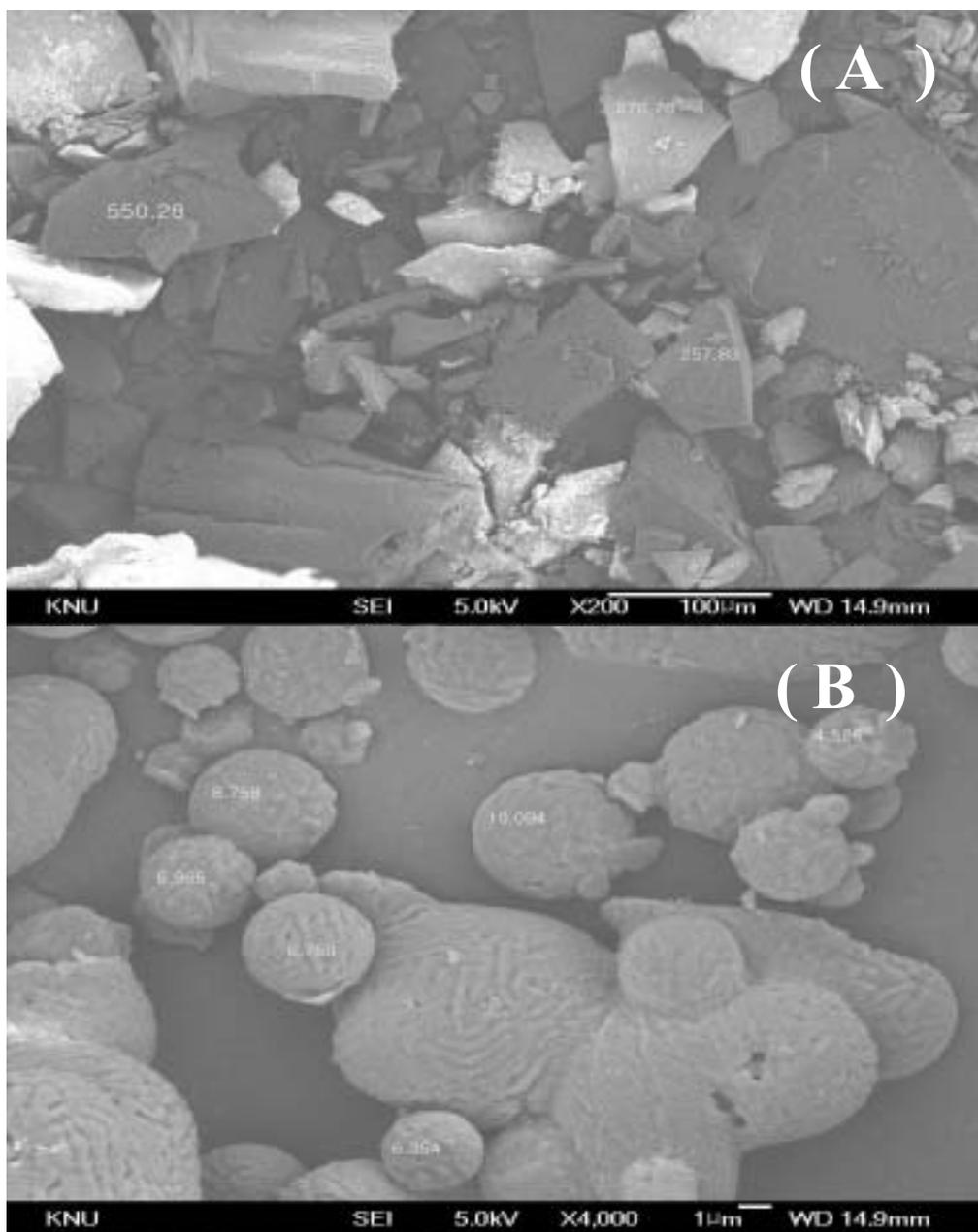


Figure 26. Pictures for morphology of homoharringtonine analysed by SEM : amorphous homoharringtonine obtained by evaporation (A); amorphous homoharringtonine obtained by spray drying (B), respectively.

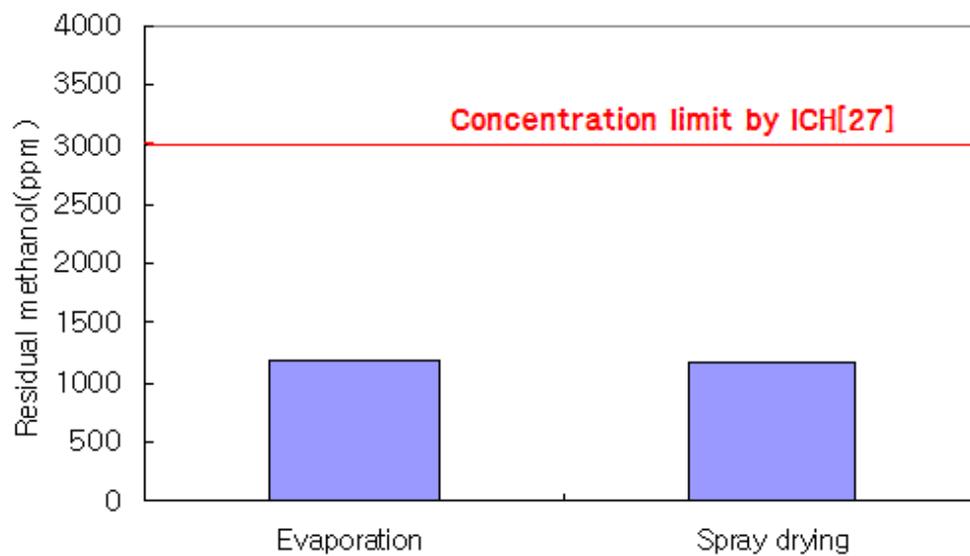
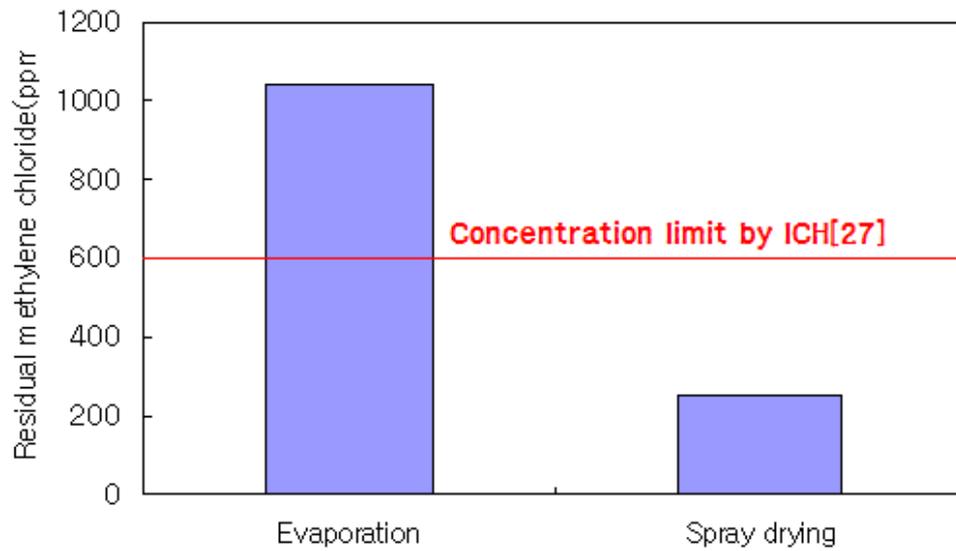


Figure 27. The effect of drying method on residual solvents. The methanol and methylene chloride belong to class 2 in ICH guidance, and they should be limited in pharmaceutical products.

3) 용해도 확인

Homoharringtonine의 morphology 차이는 물에 대한 용해도(solubility)에 많은 영향을 미치게 되는데, 제품의 종류에 따라 차이는 있지만 실험 결과에 의하면 무정형(amorphous) 형태가 결정형(crystalline) 형태에 비하여 1.1~24.0배 정도 용해도가 높은 것으로 알려져 있으며 이러한 특성은 의약품의 제형(formulation)에 매우 유용하게 이용된다. Homoharringtonine의 경우 무정형과 결정형에 따른 물에 대한 용해도를 여러 온도(5°C, 25°C, 45°C)에서 측정하여 Figure 28에 나타내었다. 주어진 온도(5°C, 25°C, 45°C)에서 결정형 homoharringtonine에 비해 무정형 homoharringtonine이 물에 대한 용해도가 더 높음을 알 수 있었다. 무정형의 경우 결정형에 비해 대략 120 ppm 정도 높게 나타나 1.2 배 정도 높음을 알 수 있었다. 이러한 homoharringtonine의 용해도(500~750 ppm)는 이미 상업화 되어 판매되고 있는 항암제 paclitaxel의 물에 대한 용해도(~6 ppm) 보다 훨씬 높았으며 이는 기존의 항암제가 가지고 있는 낮은 물에 대한 용해도의 단점을 극복할 수 있는 좋은 항암제로서의 특징이라 할 수 있다. 또한 Figure 29에서 보는 바와 같이 결정형에 비해 무정형의 경우 온도증가에 따른 용해도 증가 폭은 더 큼을 알 수 있었으며 증가폭은 낮은 온도 범위(5°C~25°C)에서 보다 높은 온도 범위(25°C~45°C)에서 더 큰 폭으로 증가 하였다.

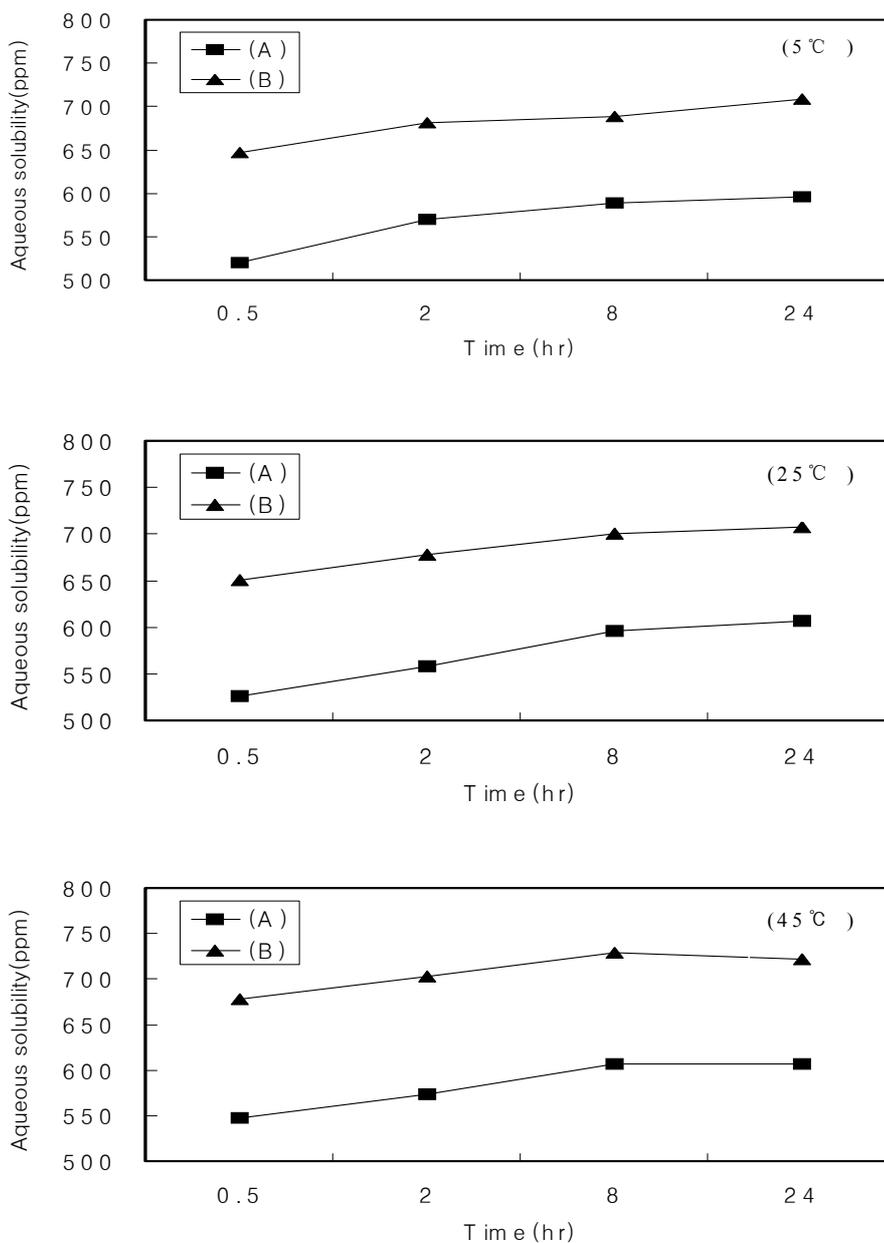


Figure 28. Experimental aqueous solubility profiles for amorphous and crystalline homoharringtonine at various temperatures : crystalline homoharringtonine from methanol/H₂O(98/2, v/v) (A); amorphous homoharringtonine from methylene chloride/methanol(98/2, v/v) (B), respectively.

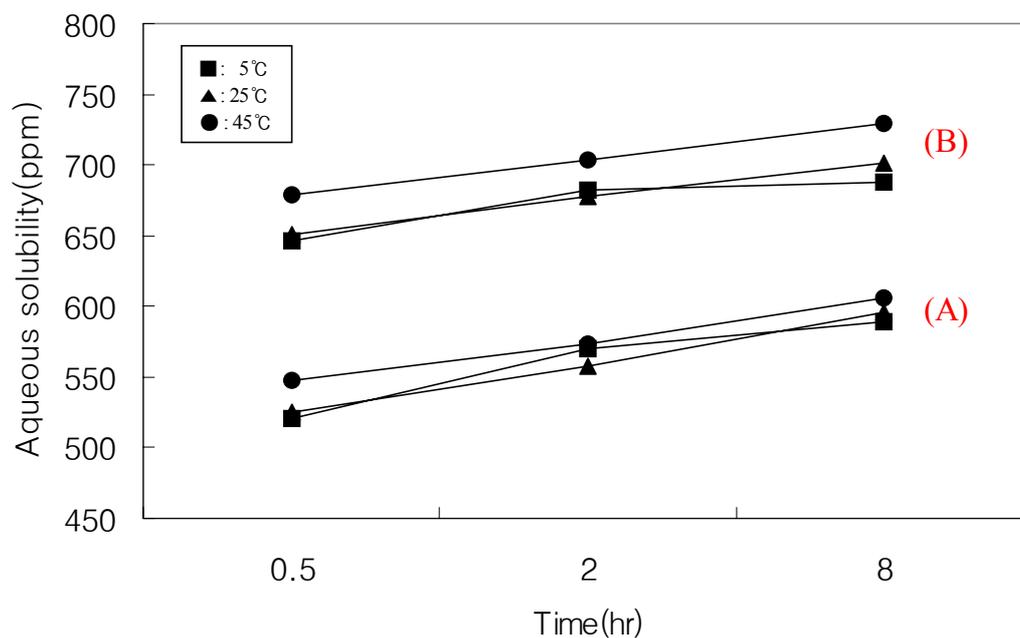
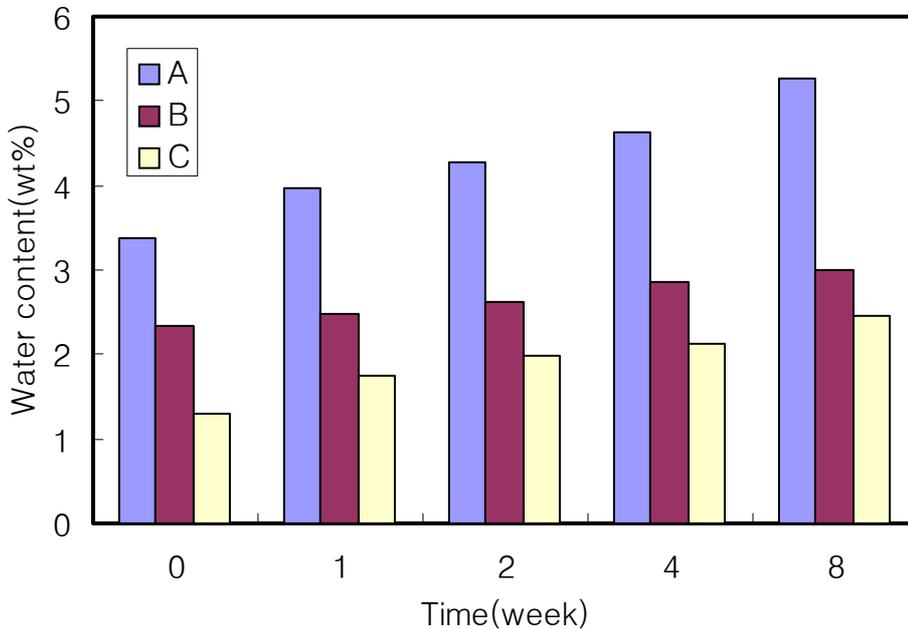


Figure 29. Effect of temperature on the increase of aqueous solubility : crystalline homoharringtonine from methanol/H₂O(98/2, v/v) (A); amorphous homoharringtonine from methylene chloride/methanol(98/2, v/v) (B), respectively.

4) 수분함량 확인

건조 후 수분함량은 결정형의 경우 3.373 wt%(시료 A)로 무정형의 경우 2.334 wt%(시료 B), 1.310 wt%(시료 C)에 비해 더 높게 나타났으며, 주어진 수분(RH95%) 조건 하에서 보관 기간에 증가에 따른 수분 함량은 무정형, 결정형 모두 증가하는 경향을 보였다(Figure 30). 또한 Figure 31에서 보는 바와 같이 보관 기간 증가에 따른 수분함량의 증가는 무정형이 결정형에 비하여 훨씬 적게 변하는 것을 알 수 있었다. 즉, 보관 기간 증가에 따라 결정형이 더 많은 수분을 흡수하여 보관 기간에 따른 수분 변화는 결정형에 비해 무정형이 더 안정함을 알 수 있었다. 일반적으로 의약품의 제형이나 보관 측면에서 수분함량의 안정성이 매우 중요하며, 이러한 측면에서 homoharringtonine의 제형에서 결정형 보다는 무정형이 더 바람직함을 알 수 있었다. 용매 처리에 의한 homoharringtonine의 morphology 조절과 잔류용매 제거 방법에 대한 개념을 정리하여 Figure 32에 나타내었다.



	Initial (wt%)	1 week	2 week	4 week	8 week
A	3.373	3.961	4.283	4.622	5.256
B	2.334	2.486	2.62	2.859	3.009
C	1.310	1.742	1.985	2.127	2.459

Figure 30. The change of water contents during storage at given humidity (RH95%) : crystalline homoharringtonine from methanol/H₂O(98/2, v/v) and evaporation (A); amorphous homoharringtonine methylene chloride/methanol(98/2, v/v) and evaporation(B); amorphous homoharringtonine methylene chloride/methanol(98/2, v/v) and spray drying (C), respectively.

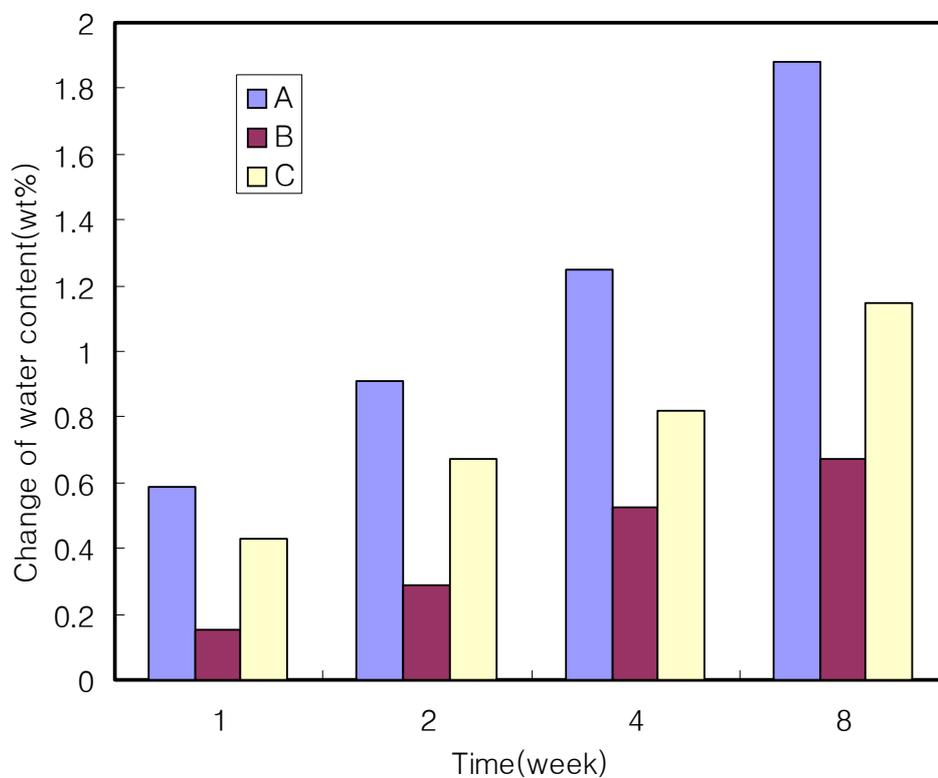


Figure 31. Effect of storage time on the change of water content at given humidity (95 RH%): crystalline homoharringtonine from methanol/H₂O(98/2, v/v) and evaporation (A); amorphous homoharringtonine methylene chloride/methanol(98/2, v/v) and evaporation(B); amorphous homoharringtonine methylene chloride/methanol(98/2, v/v) and spray drying (C), respectively.

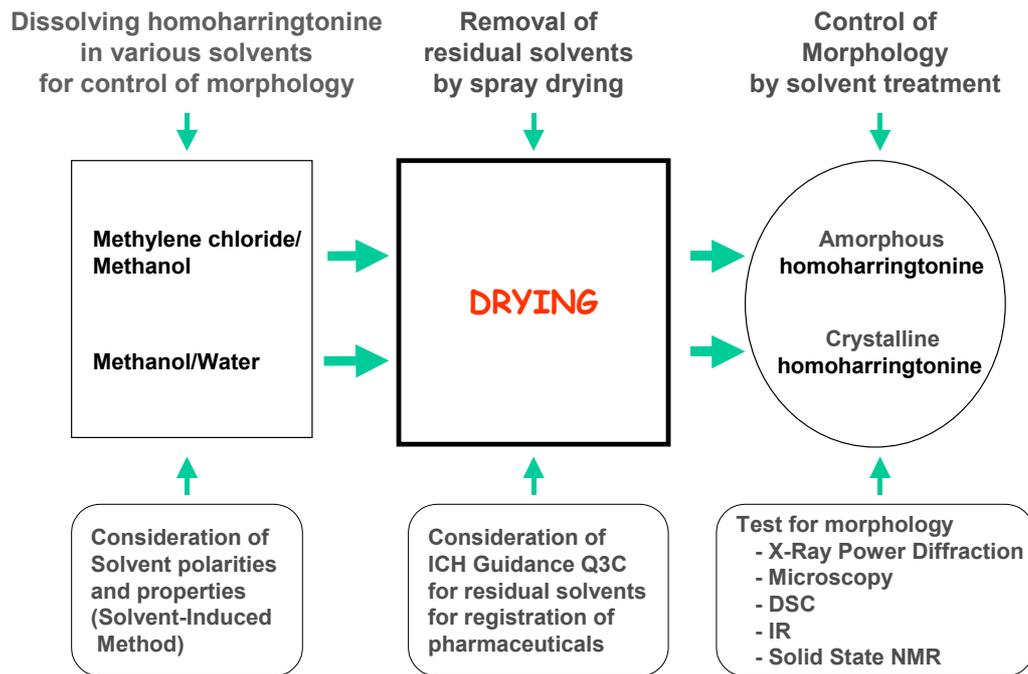


Figure 32. Proposed schematic diagram of the removal of residual solvents and control of homoharringtonine morphologies.

제 3절 개비자나무 유래 기능성 생물소재의 *In vitro* 생리활성 및 독성 분석에 관한 연구

1. 서 언

현대의학이 고도로 발달한 서구사회를 중심으로 동양의학에서 주로 이용되던 약용식물로부터 신약을 개발하려는 연구가 이루어지고 있으며, 이에 대한 관심이 집중되고 있다. 우리나라에서도 오래전부터 사용되어 온 약용식물을 관련 질환의 총체적 치료 또는 예방용으로 처방, 이용되었으나, 효능의 과학적 근거를 명확히 제시하지 못하여 상대적으로 그 활용도가 낮았는데, 약용식물의 2차 대사산물들이 생체에 대한 생리활성을 나타내면서 많은 천연자원에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 즉, 물질의 보고라고 할 수 있는 식물자원에서 향암, 항비만, 항산화, 항균 등의 기능성 물질 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있는 가운데 이들 유용성분을 식품이나 의약품에 이용하려는 시도 또한 활발하게 진행되고 있다.

최근 생명산업시장의 규모는 생리활성, 건강 및 장수와 관련된 well-being 제품 수요와 함께 확대되고 있는 실정인데 2003년도 특허청 통계자료는 국내 천연물 신약의 특허출원에서 사용된 원료의 70%가 식물에서 유래되어 있음을 제시하고 있어 식물자원이 잠재적인 기능성 식품이나 의약품 소재임을 시사하고 있다.

본 연구에서는 개비자 나무를 항암제 및 기능성 생물소재로 개발하기 위하여 개비자 나무의 항균, 항암활성 및 독성을 확인하였고, 식품 및 의약품으로 활용하기위해 개비자나무 추출물과 개비자나무의 유

효성분으로 알려진 homoharringtonine의 물리화학적 특성을 조사하였다.

세부과제 3-1. 고기능성 목본식물 추출물의 항균 활성분석에 관한 연구(*in vitro* 분석)

2. 재료 및 방법

가. 개비자 나무 추출물의 항균 활성 실험

1) 시험균주

효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 사상균(*Aspergillus oryzae*), 그램음성균 5종(*Salmonella typhimurim*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*), 그램양성균 3종(*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Streptococcus mutans*)을 ATCC, KCCM, KCTC 등의 균주기탁기관으로부터 입수하여 시험균주로 사용하였다(Table 1).

Table 1. 시험균주의 분류 및 최적온도

분류	그람	배양	균주명	Strain No.
Bacteria	G(-)	37	<i>Salmonella typhimurim</i>	ATCC 12023
		37	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 9027
		30	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ATCC 17802
		37	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 9633
		30	<i>Enterobacter aerogenes</i>	KCCM 12177
	G(+)	37	<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 65389
		30	<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 51189
Yeast	-	30	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KCTC 7243
		30	<i>Aspergillus oryzae</i>	KCCM 11530

2) 시험물질의 조제 및 농도

공주대학교(협동연구기관)로부터 제공받아 고형분함량이 0.01 g/ml인 메탄올 추출물을 50 ml 튜브에 25 ml씩 넣고 speed vacuum evaporator(Ecospin 3180C, Hanil Co. Ltd, Korea)을 이용하여 동결건조하였다. 건조된 추출물을 dimethyl sulfoxide(DMSO, 99.5%, Sigma, USA) 2.5 ml로 용해하여 추출물의 최종 고형분 기준 농도를 0.1 g/ml로 조제하였다. 용해된 추출물을 0.22 µm membrane filter로 이물질과 균을 제거하고 0.00625, 0.025, 0.05, 0.1 g/ml의 농도로 희석하였다.

양성대조균으로 homoharringtonine(HHT, Sigma, USA, 1 mg/ml)와 대표적인 천연항균제로 알려진 자몽추출액(DF-100, 1%)을 이용하여 비교 실험을 하였다.

3) 시험방법

TSB(triptic soy broth)배지(10 ml)를 담은 시험관에 동결보관된 시험균주의 seed(0.5 ml)를 접종하여 Table 1에 표시된 최적온도에서 18 시간 진탕배양하였다(120 rpm). 전배양한 배양액을 흡광도 (OD₆₆₀)값이 0.5가 되도록 멸균증류수로 희석한 후, microdilution assay를 이용하여 분석하였다. 96-well plate에 180 µl의 TSB, 개비자 추출물(10 µl), 균 희석액(10 µl)의 순으로 첨가한 뒤 최적온도에서 12 시간 배양한 후에 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분석시 DMSO의 최종농도는 5%가 되도록 시료를 희석하여 준비하였다.

4) 결과판정

12 시간 배양한 후의 OD₆₆₀과 배양액의 첨가 초기 OD₆₆₀의 차이(OD_{12hr}-OD_{0hr})를 균의 증식 정도로 간주하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 개비자 나무 추출물의 항균 활성 실험

개비자나무 추출물의 농도에 따른 항균활성은 Figure 1에서 보는 바와 같이 시험한 모든 균에 대하여 시험한 농도범위(0.00625, 0.025, 0.05, 0.1 g/ml)에서 성장 저해현상을 나타내었고, 개비자나무 추출물의 농도에 의존적임을 확인하였다.

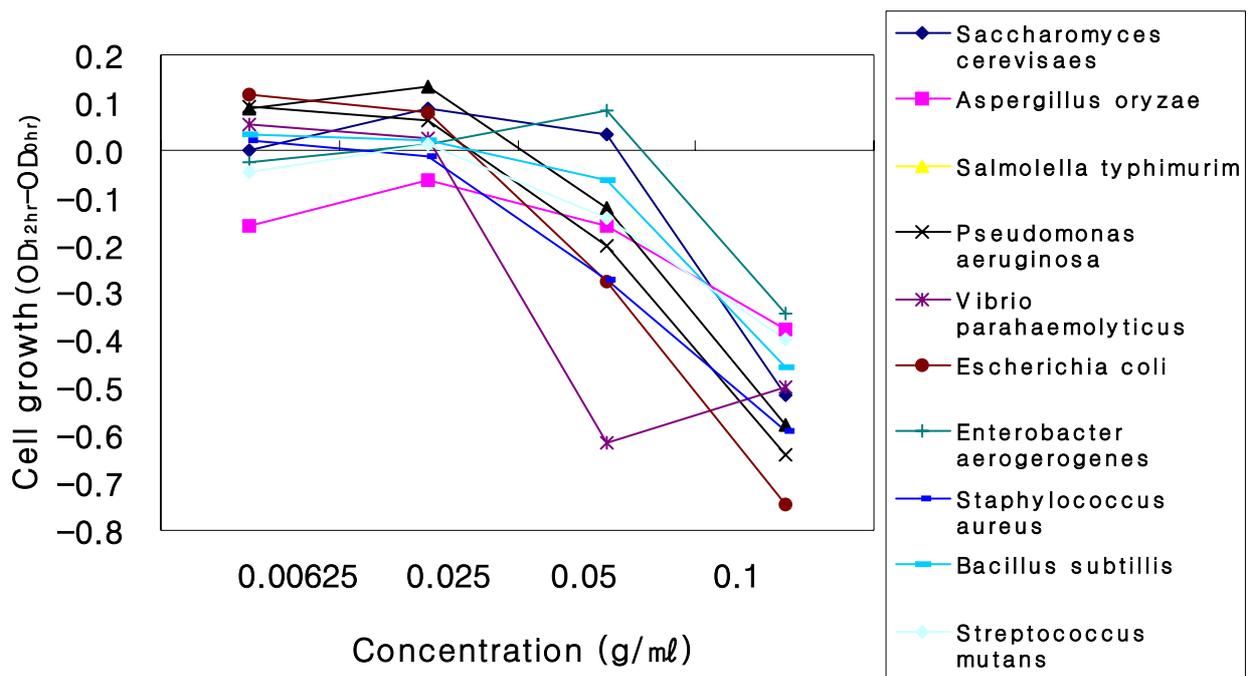


Figure 1. Antimicrobial activity of *Cephalotaxus koreana* extract

Figure 2는 Figure 1의 실험결과를 미생물의 종류 및 개비자나무 추출물의 처리 농도별로 도시한 그

림이다. Figure 2에서 보는 바와 같이 양성대조군인 DF-100은 모든 균에 대하여 항균능력을 나타내었고 10종의 시험균주 중 *Pseudomonas aeruginosa*가 개비자 추출물의 의해 가장 민감하게 생육 저해현상을 보였고, *Salmonella typhimurim*, *Escherichia coli*순이었으나 양성대조군에 비하여 낮은 항균활성을 보였다. 또한 그람 음성균이 양성균보다 다소 민감한 것으로 나타내었다. 사상균인 *Aspergillus oryzae*와 그람 음성균의 일종인 *Enterobacter aerogenes*에 대하여도 낮은 항균활성을 나타내었지만 개비자나무 추출물의 유효성분으로 알려진 HHT는 항균활성이 없는 것으로 나타났다(Figure 2).

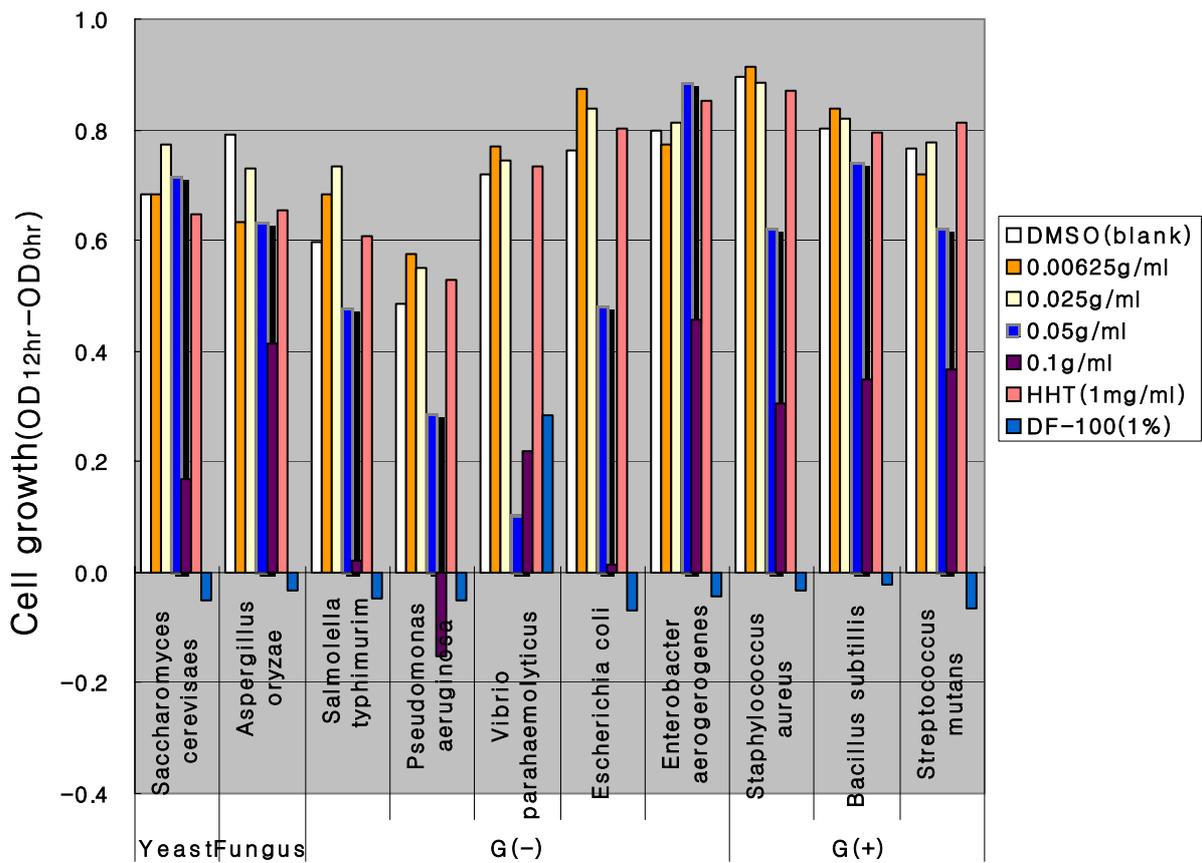


Figure 2. Antimicrobial activity of *Cephalotaxus koreana* extract against different microorganism

세부과제 3-2. 개비자나무 추출물과 HHT의 항암 활성분석에 관한 연구(in vitro 분석)

2. 재료 및 방법

가. 유방암 세포주를 이용한 개비자 나무 추출물의 항암 활성 분석

1) 시험세포주

한국 세포주 은행에서 유방암 세포주인 SCC-1395(breast, mammary gland)와 SK-BR-3(breast, mammary gland)를 분양받아 사용하였다(Table 2).

Table 2. Used cell line for anti-breast cancer activity

Cell line	Tissue
SCC-1395	breast, mammary gland
SK-BR-3	breast, mammary gland

2) 배지

RPMI-1640 배지(Hyclone, USA)에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin)을 혼합하여 사용하였다.

3) 시험물질 조제 및 농도

공주대학교(협동연구기관)로부터 개비자나무 추출물 Extract I 과 Extract 2를 제공받았으며 이중 Extract I 은 건조 후 에탄올에 1 : 8로 추출하였고, Extract II는 건조 후 응집제를 사용한 뒤 에탄올에 1 : 8로 추출하였다. 에탄올 추출물을 진공농축하여 에탄올을 제거하고 물을 넣어 2 시간동안 deep freezer에서 냉동한 후, 15시간동안 동결건조 하였다. 동결건조 후 개비자나무 추출물을 각각 증류수 (DW)와 DMSO(dimethyl sulfoxide, 99.5%, Sigma, USA)에 20000 ppm의 농도가 되도록 조제하였으며, HHT는 100 ppm이 되도록 조제하였다.

4) 시험방법

전 배양된 SCC-1395(breast, mammary gland, 5×10^5 cell/ml)와 SK-BR-3(breast, mammary gland, 5×10^5 cell/ml) 세포를 180 μ l의 배지에 부유시켜 96 well plate에 분주한 후(사방 각 column은 배지 200 μ l씩) 시료를 20 μ l씩 각 well에 첨가하고, 암세포와 시험물질이 접종된 plate를 37°C, 5% CO₂에서 44 시간 배양시켰다. 50 μ l의 MTT 용액을 모든 well에 가하였다. 37°C에서 4 시간 더 배양하고 1,500 rpm에서 5 분간 원심분리를 하여 상등액을 제거하였다. 각 well에 DMSO 200 μ l을 가한 후 formazan blue 결정이 녹을 때까지 10 분간 가볍게 진탕하였다. Microplate reader(VERSA max, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan blue으로 분해된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 살아 있는 cell수와 비례하였다).

5) 결과판정

각 well 컬럼의 평균 OD₅₇₀값을 구하여 대조군의 평균 OD₅₇₀값에 대한 백분율 값을 산출하였다. 이 백분율은 대조군(blank)과 비교한 시험군의 상대저해율(%)에 해당하는 값이다.

나. 혈액암 세포주를 이용한 개비자 나무 추출물의 항암 활성 분석

1) 시험세포주

한국 세포주 은행에서 K562(blood leukemia, chronic myelogenous), KG-1(bone marrow, leukemia, acute myelogenous), HL-60(blood leukemia, acute promyelocyte) 등의 혈액암 세포주 3 종을 분양받았다(Table 3).

Table 3. Used cell lines for anti-blood leukemia activity

cell line	Tissue
K562	blood leukemia, chronic myelogenous
KG-1	bone marrow, leukemia, acute myelogenous
HL-60	blood leukemia, acute promyelocyte

2) 배지

RPMI-1640 배지(Hyclone, USA)에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin (10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin)을 혼합하여 사용하였다.

3) 시험물질 조제 및 농도

공주대학교(협동연구기관)로부터 제공받아 고형분함량이 0.01 g/ml인 메탄올 추출물을 50 ml 튜브에 25 ml씩 넣고 speed vacuum evaporator(Ecospin 3180C, Biotron, Korea)을 이용하여 진공건조하였다. 추출물은 PBS(phosphate buffered saline, GIBCO) 2.5 ml로 용해하여 0.22 μm membrane filter로 이물질과 균을 제거하고 고형분 함량을 측정하여 80 mg/ml임을 확인하였다. 시험 시료로는 10, 20, 40, 80 mg/ml의 농도가 되도록 PBS로 희석하여 사용하였다. 양성 대조군으로는 HHT 3 mg/ml의 농도로 PBS에 용해하여 비교 실험을 하였다.

4) 시험방법

전 배양된 K562(blood leukemia, chronic myelogenous, 6.8×10^6 cell/ml), KG-1(bone marrow, leukemia, acute myelogenous, 6.6×10^6 cell/ml), HL-60(blood leukemia, acute promyelocyte, 7.2×10^6 cell/ml)로 세포를 180 μl 의 배지에 부유시켜 96 well plate에 분주한 후(사방 각 column은 배지 200 μl 씩) 시료를 20 μl 씩 각 well에 첨가하고, 암세포와 시험물질이 접종된 plate를 37°C, 5% CO₂에서 44 시간 배양시켰다. 50 μl 의 MTT 용액을 모든 well에 가하였다. 37°C에서 4 시간 더 배양하고 1,500 rpm에서 5 분간 원심분리를 하여 상등액을 제거하였다. 각 well에 DMSO 200 μl 을 가한 후 formazan blue결정이 녹을 때까지 10 분간 가볍게 진탕하였다. Microplate reader (VERSA max, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다(이 흡광도는 MTT가 세포에 의해 formazan blue으로 분해된 양을 나타내며 각 well에 존재하는 살아 있는 cell수와 비례하였다).

5) 결과판정

각 well 컬럼의 평균 OD₅₇₀값을 구하여 대조군의 평균 OD₅₇₀값에 대한 백분율 값을 산출하였다. 이 백분율은 대조군(Blank)과 비교한 시험군의 상대저해율(%)에 해당하는 값이다.

다. Homoharringtonine의 처리 시간에 따른 최적 투여조건 결정

1) 시험세포주

여러 혈액암 세포주를 이용한 항암 활성분석 실험에서 개비자나무 추출물과 HHT에 대하여 가장 민감한 활성을 보인 K562(blood leukemia, chronic myelogenous) 세포주를 한국세포주은행에서 분양받

아 사용하였다.

2) 배지

RPMI-1640 배지(Hyclone, USA)에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin)을 혼합하여 사용하였다.

3) 시험물질의 조제 및 농도

공주대학교(협동연구기관)로부터 제공받은 순도 99%의 HHT를 91.6, 183.3, 366.6, 733.1, 1466.2, 1832.8 mM의 농도가 되도록 PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4, GIBCO, USA)로 희석하여 사용하였다.

4) 시험방법

세포 활성은 sulforhodamine B(SRB)법으로 분석하였다. sulforhodamine B는 세포 단백질의 염기성 아미노산에 결합하는 염료로서 용해되었을 때 주어진 시료 안에 존재하는 세포의 수를 추정하게 한다. 전 배양된 K562(blood leukemia, chronic myelogenous)세포주를 6-well plate에 5×10^6 cells/well 농도로 부유시키고 37°C, 5% CO₂가스 존재 하에 24 시간 예비배양 하였다. 예비배양 후 HHT를 농도별로 (91.6, 183.3, 366.6, 733.1, 1466.2, 1832.8 mM) 1 ml씩 각 well에 처리하고 3, 6, 9 일 경과할 때까지 매일 정해진 동일 농도로 처리하면서 성장을 관찰하였다. 모든 실험구는 동일한 조건에서 동시에 3회씩 반복하여 실험하였다.

5) 결과판정

각 well plate의 평균 OD₅₂₀값을 구하여 대조군의 평균 OD₅₂₀값에 대한 백분율 값을 산출하였다. 이 백분율은 공시험군(blank)과 비교한 시험군의 상대저해율(%)에 해당하는 값이다.

라. 기존 항암제와 homoharringtonine의 비교실험

1) 시험세포주

여러 혈액암 세포주를 이용한 항암 활성분석 실험에서 개비자나무 추출물과 HHT에 대하여 가장 민감한 활성을 보인 K562(blood leukemia, chronic myelogenous) 세포주를 한국 세포주 은행에서 분양받아 사용하였다.

2) 배지

RPMI-1640 배지(Hyclone, USA)에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin)을 혼합하여 사용하였다.

3) 시험물질의 조제 및 농도

공주대학교(협동연구기관)로부터 제공받은 순도 99%의 HHT를 50, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도가 되도록 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4, GIBCO, USA)로 희석하여 사용하였다. 대조군으로는 기존에 백혈병 치료제로 판매되고 있는 항암제 Adriamycin(IL-Dong, Korea)과 비교 실험을 하였다.

4) 시험방법

세포 활성은 sulforhodamine B(SRB)법으로 분석하였다. sulforhodamine B는 세포 단백질의 염기성 아미노산에 결합하는 염료로서 용해되었을 때 주어진 시료 안에 존재하는 세포의 수를 추정하게 한다. 전 배양된 K562 세포주를 6-well plate에 5×10^6 cells/well 수준으로 부유시키고 37°C, 5% CO₂가스 존재 하에 24 시간 preincubation하였다. preincubation 후 HHT를 농도별로(50, 100, 200, 400, 800, 1000 $\mu\text{g/ml}$) 20 μl 씩 각 well에 처리하고 48 시간 더 배양하였다. 배양이 종료된 후 96-well plate로 옮겨 cold 50% TCA를 각 well에 50 μl 씩 가하고 4°C에서 1 시간동안 고정시켜 주었다. 고정이 끝나고 PBS로 5 회 세척하여 공기중에서 완전히 건조하고 0.4% SRB 용액 100 μl 를 가하여 상온에서 30분간 염색하였다. 염색이 끝난 후 1% acetic acid로 5 회 세척하여 잘 건조시키고 150 μl 의 10 mM unbuffered Tris 용액으로 SRB dye를 잘 녹여내어 96 well plate용 microplate reader로 520 nm의 범위에서 흡광도를 측정하였다.

5) 결과판정

각 well 컬럼의 평균 OD₅₂₀값을 구하여 대조군의 평균 OD₅₂₀값에 대한 백분율 값을 산출하였다. 이 백분율은 공시험군(blank)과 비교한 시험군의 상대저해율(%)에 해당하는 값이다.

$$\text{Survival rate (\%)} = \frac{\text{시료처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

가. 유방암 세포주를 이용한 개비자나무 추출물의 항암 활성 분석

개비자나무 추출물(Extract I, Extract II)과 HHT에 따른 유방암 세포주(SCC-1395, SK-BR-3)의 상대증식률(relative proliferation, %)의 결과(Figure 3와 Figure 4)를 보면 SK-BR-3세포주는 개비자나무 추출물 Extract II가 Extract I에 비하여 높은 활성을 보였고 개비자나무의 유효성분으로 알려진 HHT에서도 높은 항암 활성이 나타났(Figure 4). SCC-1395를 이용한 항암 활성 분석에서도 개비자나무 추출물 Extract II가 Extract I에 비하여 높은 항암 활성을 보였으나 HHT에서는 항암 활성이 나타나지 않았다(Figure 3). 즉 유방암 세포주를 이용한 개비자나무 추출물과 HHT의 항암 활성분석에서는 SK-BR-3 세포주가 적정 세포주로 확인되었다.

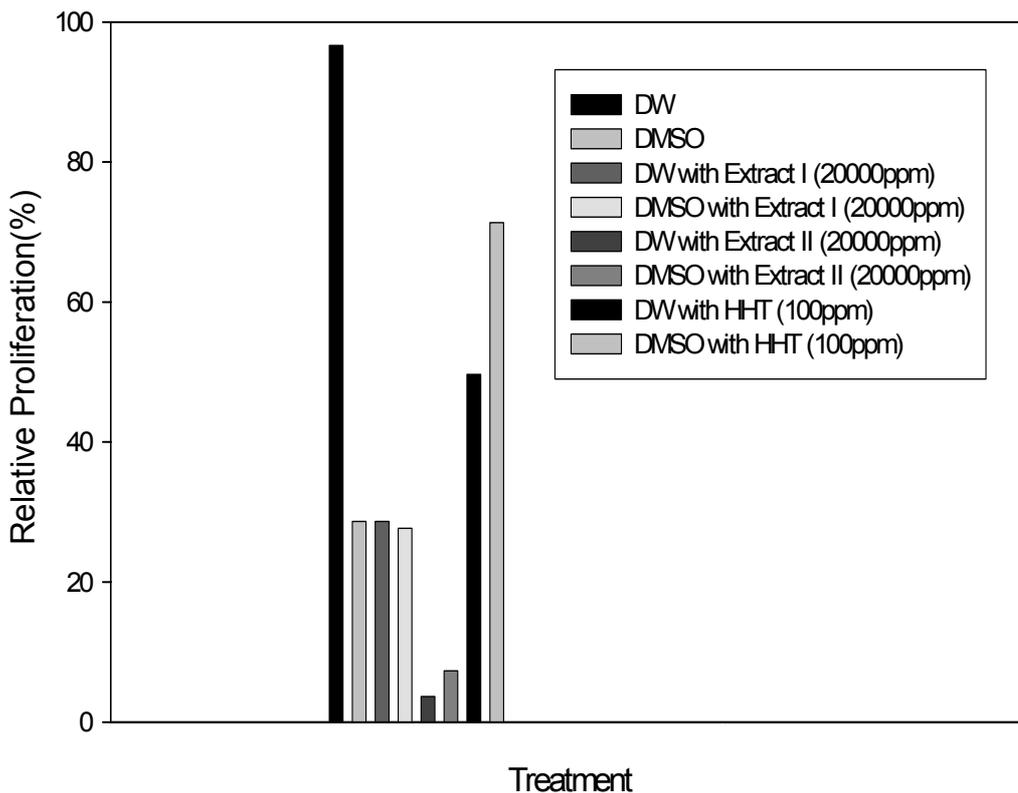


Figure 3. Relative proliferation rate by various treatments using SCC-1395

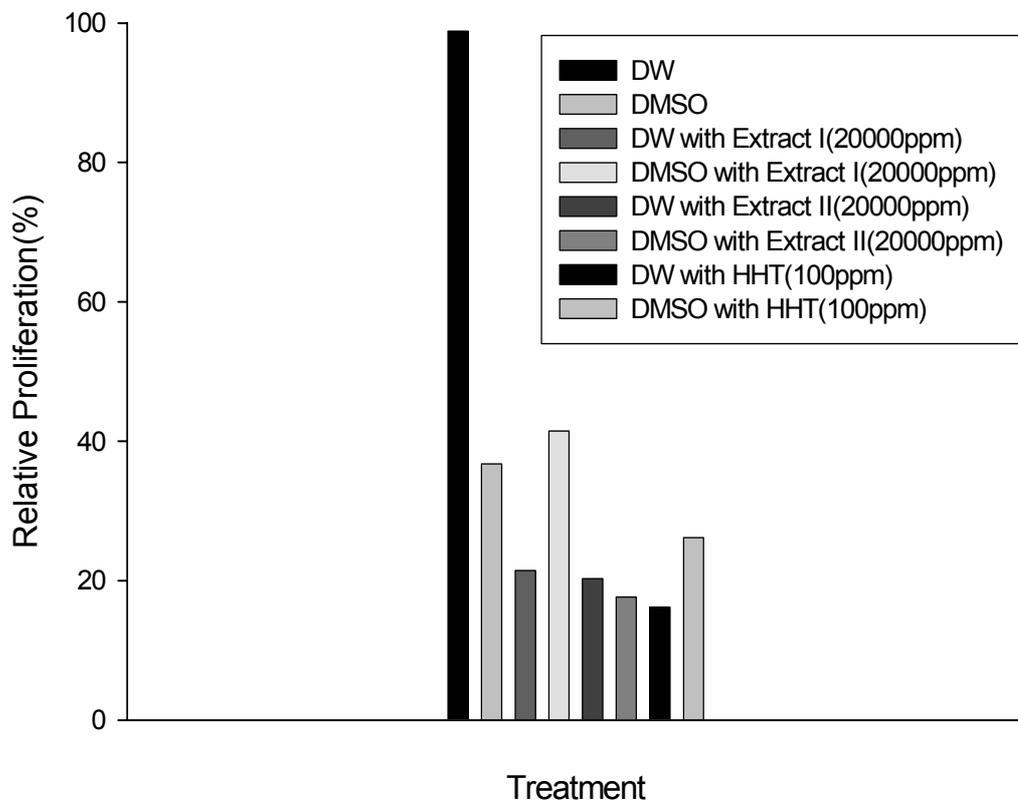


Figure 4. Relative proliferation rate by various treatments using SK-BR-3

나. 혈액암 세포주를 이용한 개비자 나무 추출물의 항암 활성 분석

PBS첨가구(blank)를 기준으로 하여 환산한 상대저해율 결과는 Figure 5와 같다. 3 종의 세포주 중 K562 세포주가 개비자나무 추출물과 HHT에 대하여 가장 민감하게 반응하였다. 따라서 향후 HHT를 이용한 항암활성 분석 실험에서 사용할 세포주로 K562를 선정하였다.

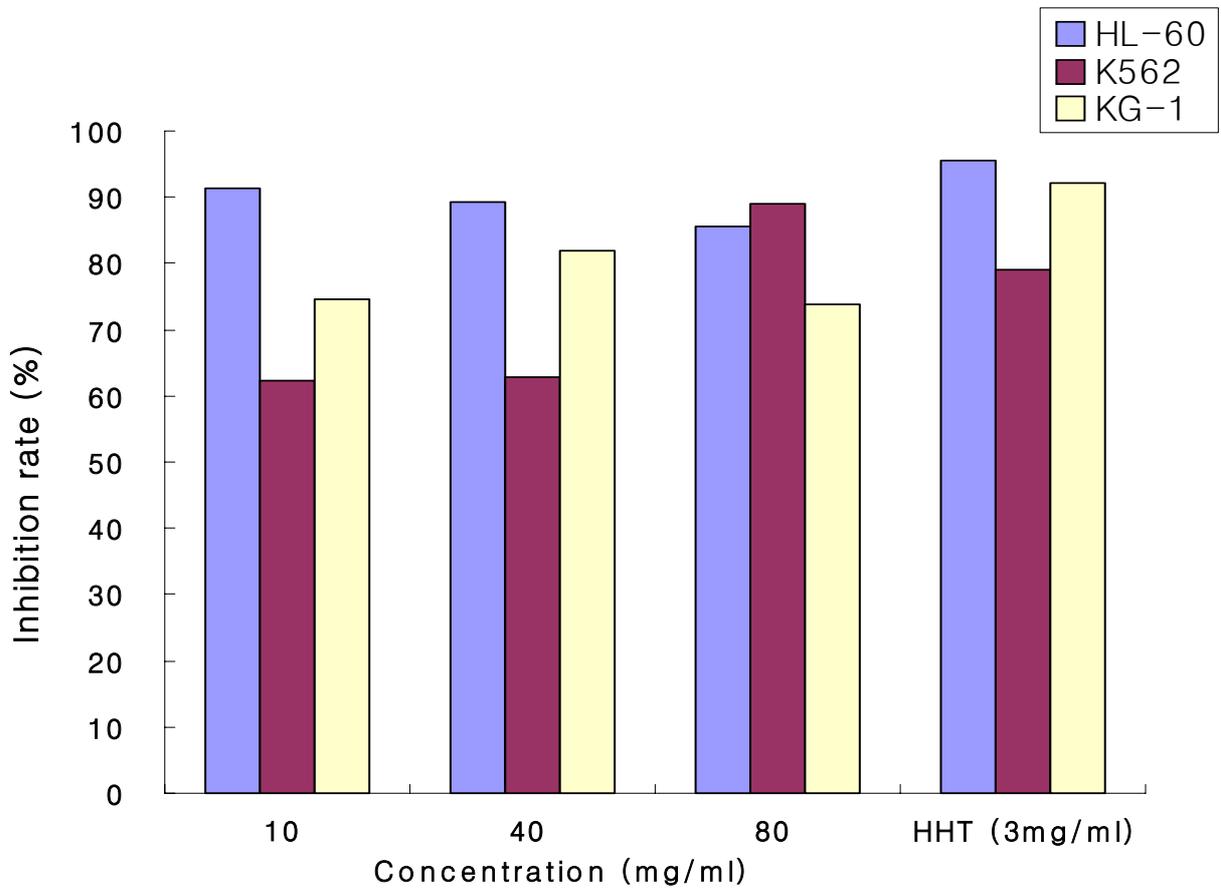


Figure 5. Inhibition rate of various blood leukemia cell lines by the treatment of *Cephalotaxus koreana* extract

다. Homoharringtonine의 처리 시간에 따른 최적 투여조건 결정

앞서의 개비자나무 추출물을 이용한 항암 활성분석 실험에서 선정된 K562세포주에 HHT를 농도별로 (91.6, 183.3, 366.6, 733.1, 1466.2, 1832.8 mM) 1 ml씩 각 well에 처리하고 3, 6, 9 일 경과할 때까지 매일 정해진 동일 농도로 처리하면서 성장을 관찰하였다. HHT의 농도별 총 처리시간에 따른 K562 세포주의 저해효과는 모든 농도범위(50, 100, 200, 400, 800, 1000 µg/ml)에서 성장 저해현상을 나타내었다(Figure 6, Figure 7).

Figure 6에서 보는 바와 같이 장기간 투여실험(9 day treatment)에서는 낮은농도(183.3~366.6 mM)에서도 50%의 세포성장저해를 보였다. 즉 3 일동안 매일 처리한 후 50%의 성장저해를 보인 농도는 600 µg/ml 이었으며, 6 일동안 매일 처리한 후 와 9 일동안 매일 처리한 후의 50%의 성장저해를 보여주는 HHT 농도는 감소하여 각각 366.6 mM, 274.9 mM 수준이었다. 이것으로부터 K562 세포주에 HHT을 장기간에 걸쳐 처리(9 day treatment)할 경우 비교적 낮은 처리농도(183.3~366.6 mM)에서도 K562세포주의 성장을 현저히 감소시킬 수 있다는 것을 알 수 있었다.

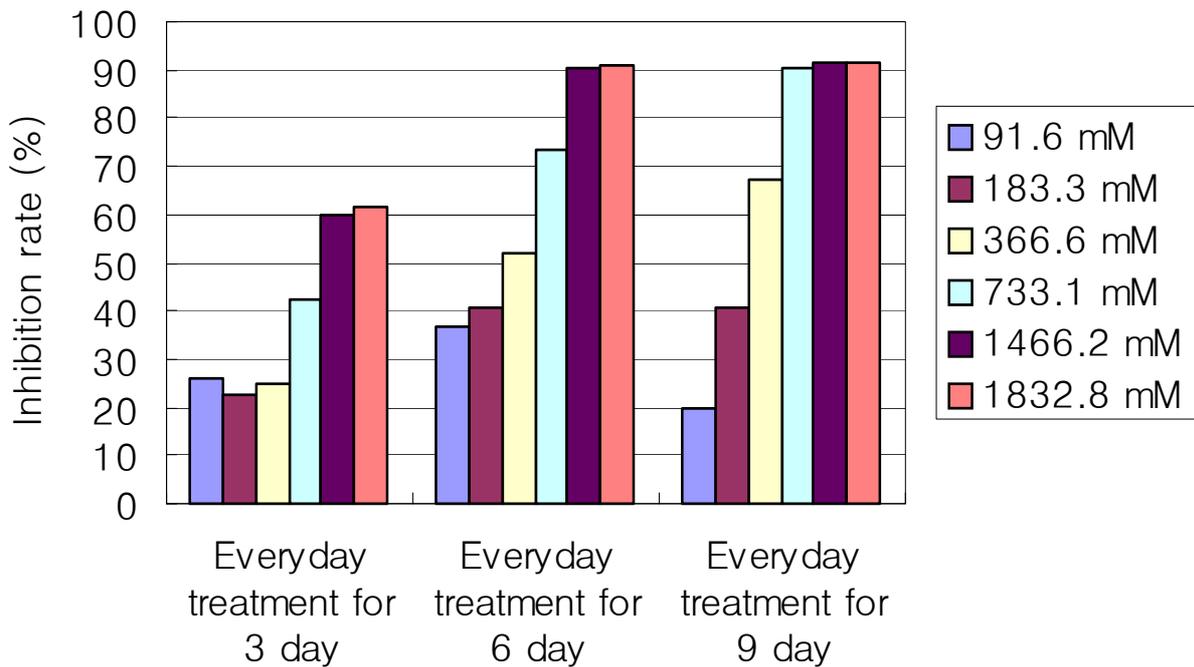


Figure 6. Inhibition rate of K562 cell line by HHT treatment

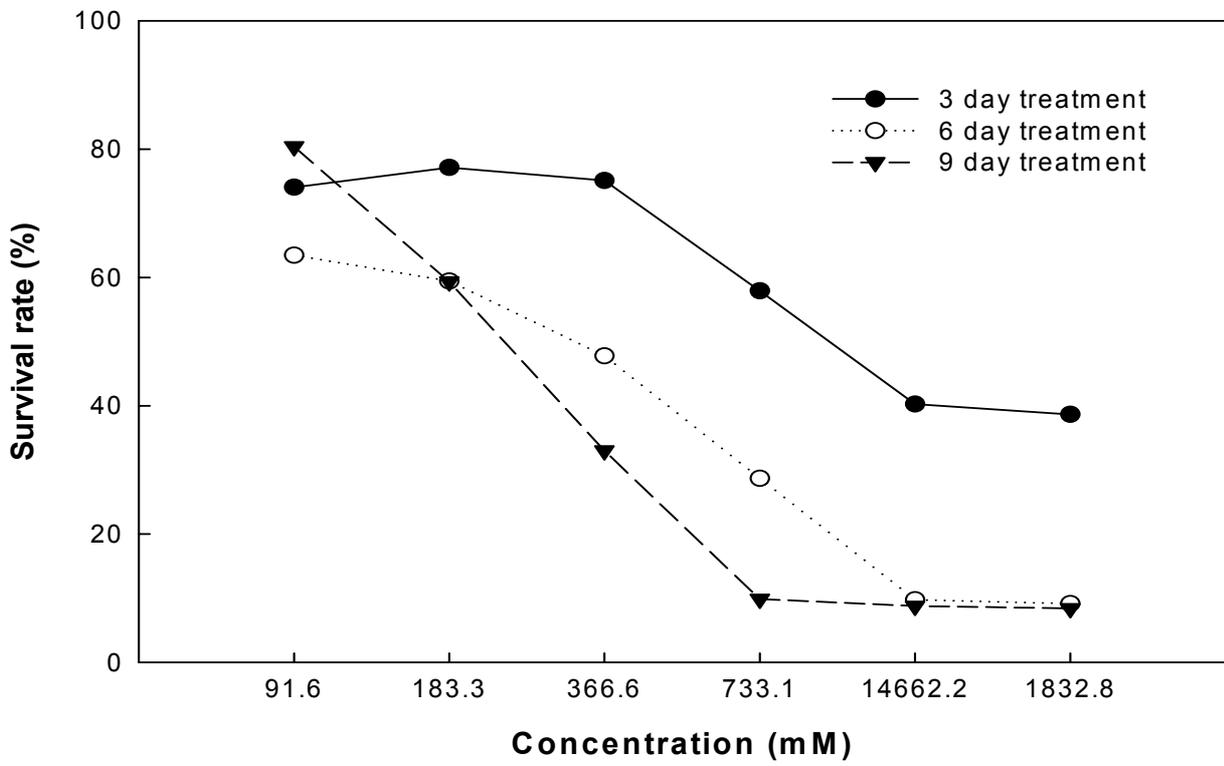


Figure 7. Survival rate of K562 cell line by HHT treatment according to treatment time and treatment concentration

라. 기존 항암제와 homoharringtonine의 비교실험

HHT을 항암제로 개발하기 위해 기존에 백혈병 치료제로 시판되고 있는 Adriamycin과 비교실험을 하였다. 실험 결과 혈액암 세포인 K562세포주의 저해율은 HHT의 농도 693 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 과 Adriamycin의 농도 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 근사값을 가졌다. 이는 HHT의 항암제로서 가능성을 보여주는 결과이다(Figure 8).

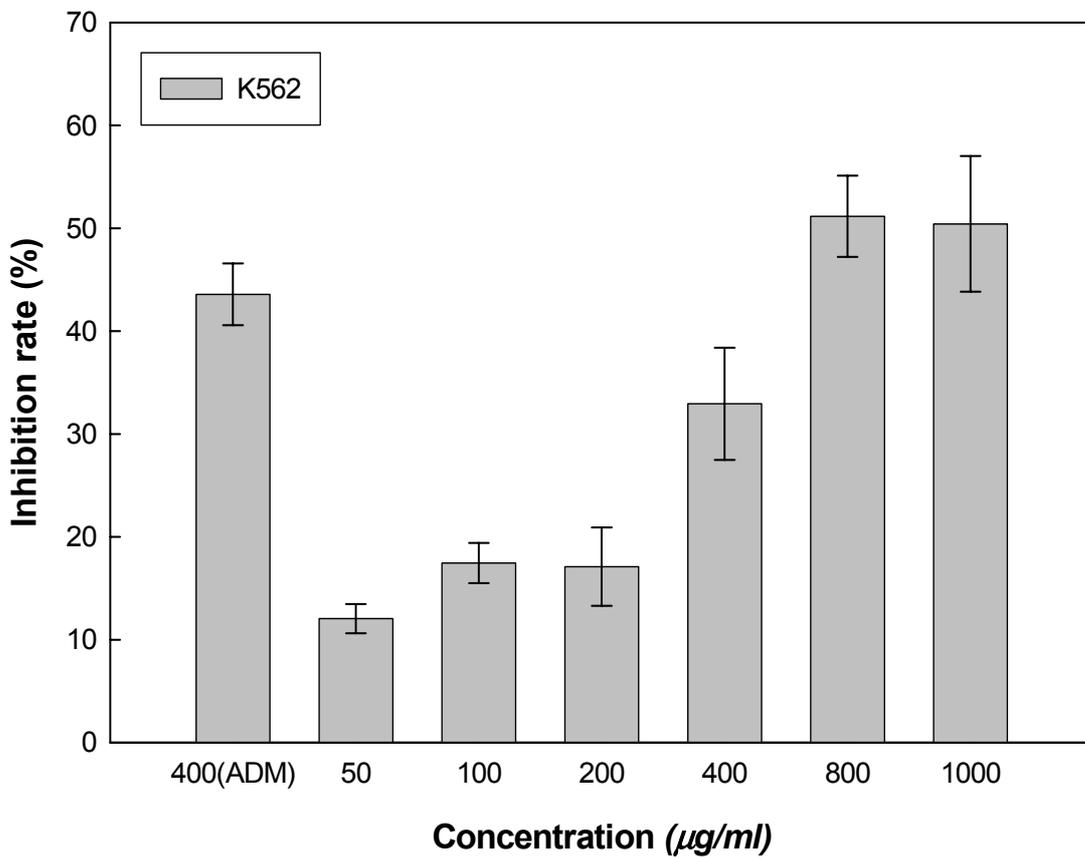


Figure 8. Comparison of inhibition rate by HHT and Adriamycin

세부과제 3-3. 개비자나무 추출물의 독성검사(*in vitro* 분석)

2. 재료 및 방법

가. 개비자나무 추출물의 hemolysis 분석

1) 연구배경

생체막의 불안정성은 주로 막지질 구성 불포화지방산의 반응성 산소종에 의한 지질 과산화가 가장 큰 원인으로 알려졌다. 생체막의 취약성을 연구함에 있어 적혈구는 쉽게 얻을 수 있고 어느 정도의 수명을 유지하며, 그 구조가 단순하기 때문에 생체막 실험모델로서 흔히 사용된다. 적혈구 막지질의 붕괴는 용혈을 수반하기 때문에 간편한 용혈율의 측정은 막지질 붕괴정도를 판단할 수 있는 수단으로서 흔히 이용된다.

적혈구 용혈의 원인으로서는 여러 가지가 있으나 정상적인 생체조건에서 유발되는 용혈은 세포내에서 대사과정 중에 생성되는 반응성 산소종(과산화수소, 수퍼옥사이드($O_2^{\cdot -}$), 히드록시라디칼 ($\cdot OH$) 등)에 의한 막지질 과산화와 이로 인한 막의 취약성 증가가 중요한 원인인 것으로 확인되었다. 그러나 반응성 산소종 외에도 많은 무기질과 시험물질들도 적혈구 용혈을 유발하는 것으로 밝혀졌다.

2) 시험물질의 조제 및 농도

공주대학교(협동연구기관)로부터 제공받아 고형분함량이 0.01 g/ml인 메탄올 추출물을 50 ml 튜브에 25 ml씩 넣고 speed vacuum evaporator(Ecospin 3180C, Bio tron, Korea)을 이용하여 진공건조하였다. 추출물은 PBS(phosphate buffered saline, GIBCO) 2.5 ml로 용해하여 0.22 μm membrane filter로 이물질과 균을 제거하고 고형분 함량을 측정하여 80 mg/ml임을 확인하였다. 시험 시료로는 5, 10, 20, 40, 80 mg/ml의 농도가 되도록 PBS로 희석하여 사용하였다. 양성 대조군으로는 HHT 3 mg/ml의 농도로 PBS에 용해하여 비교 실험을 하였다.

3) 시험방법

정상 성인의 혈액을 원심분리(3,000 rpm, 5 min)하여 혈청(상등액)을 제거하였고, 이로부터 얻은 적혈구를 차가운 PBS로 세 번 이상 세척하였다. 적혈구를 5% (v/v)의 농도가 되도록 PBS로 용해하였다. 다음과 같은 방법으로 하였다. 준비한 5% 적혈구 용액 100 μl 를 PBS 100 μl 와 혼합하였다 여기에 시험물질 20 μl 를 가해 주고 0% hemolysis control로서 PBS 20 μl 를 이용하였고, 100% lysis control로서 20 μl 의 1% Triton X-100을 이용하였다. 37°C에서 30분 동안 배양 후에 600 μl 의 PBS를 각 시험관에 넣고 3분간 원심분리(13,000 rpm)한 후 상등액의 흡광도를 540 nm에서 측정하여 다음 식으로

hemolysis를 계산했다.

$$\text{Hemolysis} = (A_{\text{sample}} - A_{0\% \text{ control}}) / (A_{100\% \text{ control}} - A_{0\% \text{ control}}) \times 100$$

나. 개비자 나무 추출물을 이용 변이원성 실험

1) 연구배경

일상생활에서 인간은 수많은 물리, 화학적 발암원에 노출되어 살아가고 있으며 역학적으로 관찰해보면 모든 암의 약 90%가 환경적 요인에 의하여 발생하였다. 천연물 중에도 여러 종류의 돌연변이원성 물질과 발암성 물질이 자연적으로 존재하고 있어 그 중 소량은 일상의 보통 식이를 통하여 섭취된다. 천연물에는 발암성 물질이나 돌연변이원성 물질과 함께 많은 종류의 돌연변이 억제성 물질이나 항암성 물질들도 존재하고 있다. 최근에는 사람에게 있어 환경에 의한 돌연변이원성 물질과 발암성 물질에 대한 억제에 대하여 관심이 집중되어 역학적 연구와 함께 다양한 연구가 이루어져 왔다.

본 실험에서 개비자 추출물을 기능성 물질로 활용하기 위해서는 돌연변이성의 유무가 발암성과 관련하여 매우 중요하다고 판단되었다. 그런 의미에서 본 연구에서는 Ame's 박사가 개발한 *Salmonella typhimurium* TA98 과 TA100을 이용하여 개비자 추출물의 농도에 따fms 돌연변이성이 있는가를 확인하기 위해 분석하였다.

2) 시험균주

시험에 사용한 *Salmonella typhimurium* LT2주 유래의 TA98, TA100 균주를 한국생명공학연구원에서 분양받아 계대 유지한 것을 사용하였다.

3) 시험물질의 조제 및 농도

공주대학교(협동연구기관)로부터 제공받은 고품분 기준으로 농도가 0.01 g/ml인 메탄올 추출물을 50 ml 튜브에 25 ml씩 넣고 speed vaccum evaporator(Ecospin 3180C, Korea)를 이용하여 진공건조하였다. 건조된 DMSO 2.5 ml로 용해하여 0.1 g/ml으로 농축하여 0.22 μm membrane filter로 이물질과 균을 제거하고 0.00625, 0.025, 0.05, 0.1 g/ml의 농도로 희석하여 사용하였다.

4) 시험방법

시험방법은 Ame's의 원법을 변형한 유전독성의 검색과 감도가 비교적 높은 preincubation법으로 수행하였다. 24 시간 배양된 균주 TA98(3.3×10^9 cell/ml), TA100(3.8×10^9 cell/ml)의 배양액을 각각 0.1 ml씩 취하였고 개비자 추출물 0.05 ml 과 인산완충액(phosphate buffer, pH 7.4) 0.5 ml를 멸균한 cap tube에 넣고 3 초간 vortex한 후 37°C에서 30 분간 preincubation하였다. 그 후 바로 45°C에서 용해한 histidine/biotine 이 첨가된 top agar(2 ml)를 혼합한 후 변이원성 검색용 배지(minimal glucose agar) 위에 증층하여 37°C에서 48 시간 배양한 후 복귀변이성 콜로니수를 계측하였다.

5) 결과판정

Ame's test는 가장 흔히 사용하는 단기간의 돌연변이성 시험이다. 정상적인 박테리아는 외인성 히스티딘을 필요로 하지 않는데 외인성 히스티딘(exogenous histidine)을 필요로 하는 *Salmonella typhimurium*의 돌연변이 종을 만들어 히스티딘이 없는 배지에 시험할 화학물질과 함께 배양하여 돌연변이종이 정상종으로 변화되는 능력을 검사하였다. 정상적으로 돌아가려는 능력이 클수록 그 화학물질은 유전물질을 변화시킬 가능성이 큰 것이므로 그만큼 발암성이 크다고 할 수 있다.

각 시험구 당 2 개의 plate를 이용하여, 콜로니 수의 평균치를 수집 하였다. 시험물질을 처리한 모든 군에 있어 복귀변이체수가 음성대조군의 2 배 이상이면 시험물질은 복귀변이 유발능 양성으로 판정하였다.

3. 결과 및 고찰

가. Hemolysis 분석

개비자나무 추출물의 hemolysis 분석 결과(Figure 9) 양성대조군인 HHT의 경우 1.32%의 낮은 hemolysis 현상을 보였으며, 개비자 추출물은 80 mg/ml의 농도에서 10.8%의 비교적 높은 hemolysis 현상을 보였다. 개비자 추출물은 5 mg/ml의 농도에서 HHT(3 mg/ml)보다 약한 수준의 hemolysis를 보이는 것으로 보아 개비자 추출물은 HHT 성분 이외에 hemolysis를 크게 유발하는 물질이 없는 것으로 판단된다.

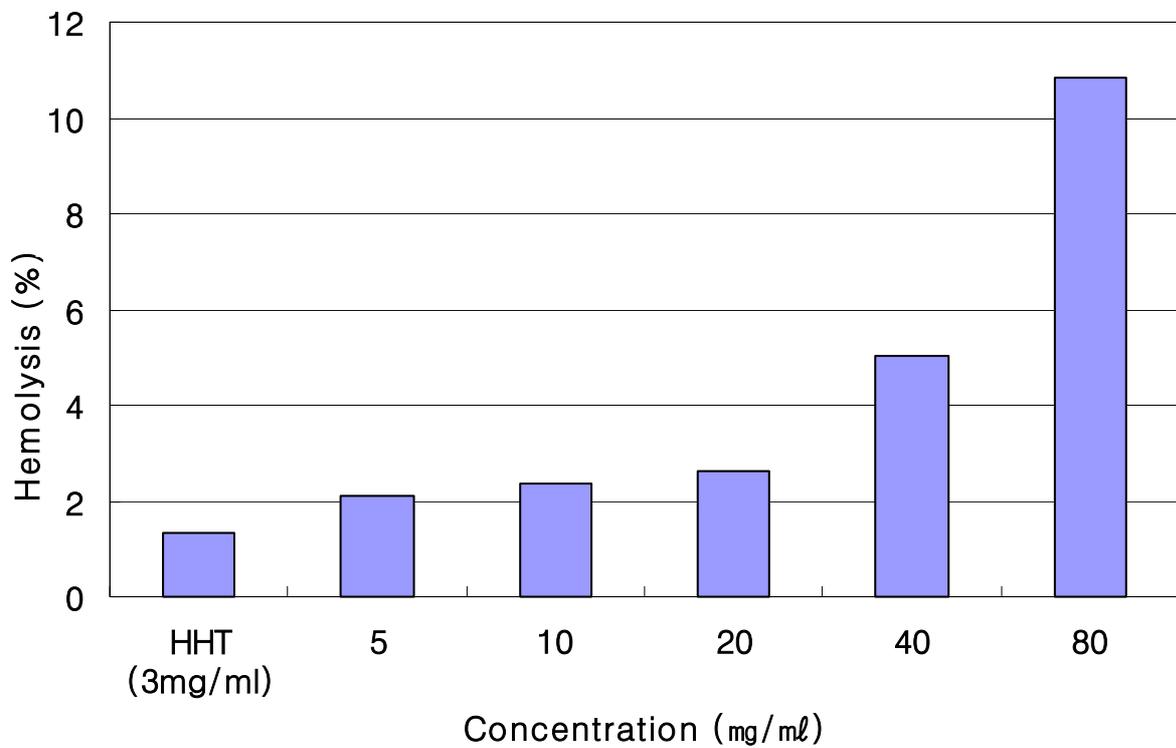


Figure 9. Hemolysis rate *Cephalotaxus koreana* extract

나. 개비자 나무 추출물을 이용 변이원성 실험

S. typhimurium TA98과 TA100을 이용한 Ame's test를 시행한 결과 base substitution형인 TA100의 콜로니수는 농도에 관계없이 음성대조군과 비교하여 증가되지 않아 음성으로 판정되었으며, frame shift형인 TA98에서도 콜로니수에 있어서 농도에 관계없이 음성대조군과 비교하여 상승되지 않아 음성으로 판정되었다. 따라서 개비자 추출물은 돌연변이원성을 갖지 않는 것으로 판정되었다(Table 4).

Table 4. Ame's test using *S. typhimurium* TA98 and TA100

TA98 (frame shift type)

	Number of revertants/plate
Dose of extract (g/ml)	extract
0.1	83
0.05	88
0.025	97
0.00625	74
Number of revertants / plate	
negative	HHT
66	73

TA100 (base replacement type)

	Number of revertants/plate
Dose of extract (g/ml)	extract
0.1	65
0.05	72
0.025	68
0.00625	74
Number of revertants / plate	
negative	HHT
62	69

세부과제 3-4. 식품 및 의약품 개발을 위한 물리화학적 특성조사

가. 식품소재 및 보존제로서의 활용검토

1) 일반성분 분석

일반성분시험법은 시료중에 일반적으로 함유되어 있는 성분에 관한 시험법으로서 개비자나무 추출물의 규격, 순도의 검사 및 영양가를 평가하기 위하여 시료의 수분, 회분, 탄수화물, 단백질, 지방, 섬유를 조사하였다.

(1) 시험물질의 조제 및 농도

광양 백운산에서 채집한 개비자 나무(잎, 줄기)를 분쇄기(HM-2500, Hi MIXER, Korea)로 분쇄하여 분말로 만들었다. 분말상태의 개비자나무 1 kg을 70% 주정 8 kg과 혼합하여 미리 예열된 80℃의 Water bath(JEIO TECH swb-10, Korea)에서 4.5 시간 동안 추출을 하였다. 추출액을 원심분리(400 xg)하여 상등액을 여과지(Whatman 0.45 μ m filter)를 이용하여 여과하였다. 최종 고형분 함량이 33.5 mg/ml임을 확인하였다.

(2) 시험 방법

(가) 수분함량

시료속의 수분함량을 구하기 위하여 상압가열건조법을 사용하였다. 실험에서 칭량병 항량을 미리 구하고 여기에 시료 5~10 g을 정확히 칭량한 후 105~110℃ dry oven에서 뚜껑을 열어 건조하였다. 건조 후 다시 desiccator속 에서 뚜껑을 닫고 실온이 될 때까지 방냉하여 칭량하였다. 위의 조작을 3 회 반복하여 항량을 구하고 건조 전후의 중량차로 수분량을 구하였다.

(나) 조회분 함량

조회분 함량을 구하기 위해서 직접회화법을 사용하였다. 도가니를 잘 씻어 건조하고 135℃의 dry oven에서 1 시간동안 가열건조한 후 꺼내어 desiccator에 넣고 10 분 동안 방냉하였다. 방냉 후 도가니를 칭량하는 방식으로 3 회 반복하여 도가니의 항량을 구하였다.

항량을 구한 도가니에 밀가루 1 g을 넣고 정확히 중량을 측정 한 후 회화로에 넣고 550℃에서 2 시간 가열하였다. 가열 후 흰색 또는 회백색의 재가 얻어지면 desiccator 내에서 실온(25℃)이 될 때까지 방냉 후 칭량하였다.

(다) 탄수화물 함량

탄수화물 정량에는 Bertrand법을 사용하였다. 개비자나무 시료 20 ml 에 CuSO_4 용액과 Rochelle염 용액을 각각 20 ml 씩 가하여 혼합하고 3 분동안 끓였다. 3 분후 흐르는 물에 플라스크를 담가 급냉 시킨 후 Witt여과장치에 부착된 유리여과기에 경사하여 서서히 흡인 여과하였다. 더운물 50 ml를 플라스크 내벽에 따라 붓고 플라스크를 흔들어 침전을 현탁시킨 후 방치하여 침전이 침강되면 상등액을 앞과 같이 유리여과기에 흡인여과 시켰다. 이와 같은 세척 조작을 수 회 반복한 후 황산 제 2철액 20 ml를 메스실린더로 3 회 나누어 유리여과기에 부어 침전을 녹이면서 흡인 여과하였다. 10 ml의 더운물로 여과기를 수 회 세척하고 세액을 전부 플라스크에 모아 플라스크를 여과장치에서 떼어내고 흔들어 침전을 완전히 녹여 즉시 KMnO_4 표준 용액으로 적정하였다. 용액의 색이 황록색으로부터 미적자색으로 되는 점을 종말점으로 하고 침전된 구리의 양을 측정하였다.

(라) 조지방 함량

개비자나무 시료의 조지방 함량을 알아보기 위해 mojonnier법을 사용하였다. 실험에 사용될 수기를 항량하여 무게를 측정고 시료 1 ml과 증류수 10 ml을 마조니아관에 넣고 45°C에서 진탕하였다. mojonnier관에 암모니아수 1.5 ml과 ethl alcohol 10 ml을 넣어 뚜껑을 닫고 혼합한 후 ether 25 ml 넣고 격렬히 진탕하였다. 마조니아관에 층분리가 되어 상등액이 투명해지면 수기에 상등액을 모아주었다. 마조니아관에 남은 시료액에 ether 15 ml과 석유 ethyl 15 ml을 격렬히 진탕하고 가스를 제거하여 층분리한 뒤 상등액을 수기에 모으는 방식으로 3 회 반복하였다. 상등액이 모아진 수기를 evaporator로 ether를 제거하고 105°C의 건조기에 완벽히 건조 후 방냉시켜 무게를 측정하였다.

(마) 조단백질 함량

개비자나무 시료의 조단백질의 함량을 알아보기 위해 Kjeldahl법을 사용하였다. Kjeldahl 플라스크에 시료 2 ml을 넣고 분해촉진제인 K_2SO_4 와 $\text{CaSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 를 9:1 비율로 섞어 3 ml과 진한 황산 20 ml을 플라스크에 넣어주었다. 동시에 다른 플라스크에 시료를 가하지 않고 진한 황산과 촉매만을 넣어 blank test를 병행하였다. 플라스크를 draft속의 분해대에 얹어 가열 분해하면 내용물이 흑갈색에서 다갈색, 녹갈색으로 변화하여 최후에 청색으로 되었다. 청색이 되고 나서 다시 1 시간동안 가열하여 완전히 분해시킨 다음 30 분간 방냉한 후 플라스크를 흔들면서 증류수 40 ml를 천천히 가하여 분해액을 희석하였다. 이것을 흐르는 물 속에서 냉각하여 100 ml들이 메스플라스크에 옮겨 넣은 후 분해플라스크를 소량의 증류수로 몇번 씻어 씻은액을 모두 메스 플라스크에 넣어 최후에 전량을 100 ml로 하여 혼합하였다. 희석한 시료 분해 용액 25 ml를 증류플라스크에 취하고 증류수 약 100 ml를 가하여 증류장치의 정위치에 고정하였다. 최후에 증류 플라스크 윗쪽의 깔대기를 통하여 포화 수산화나트륨 용액 20 ml를

가하고 분해플라스크 속의 용액을 강알칼리성으로 하였다. 수증기를 통하면 점차 플라스크 속은 비등상태가 되어 암모니아가 발생하고 수증기와 함께 냉각되어 0.1 N 황산용액중에 포집되면 20 분간 증류한 후 플라스크를 떼어내었다. 암모니아를 포집한 삼각 플라스크 중에 잔존하고 있는 0.1 N 황산용액을 수산화나트륨 용액으로 회색이 될 때까지 적정하였다.

(바) 조섬유

개비자나무 시료의 조섬유 함량을 알아보기 위해 AOAC법을 사용하였다. 개비자나무 시료 2 g을 정밀히 달아 에테르로 5 회 씻어 탈지하고 500 ml의 플라스크에 넣고 석면 0.5 g을 가하였다. 1.25% 황산 200 ml를 넣고 즉시 환류냉각기를 달아 30 분간 끓인후 플라스크에 여과관을 넣어 흡인여과 하였다. 열탕으로 세액이 산성을 나타내지 않을 때까지 플라스크와 잔류물을 5 회 씻은 후 1.25% 수산화나트륨 용액 200 ml를 사용하여 잔류물을 500 ml의 플라스크에 씻어 넣고 가열하였다. 30 분간 끓인 다음 유리 여과기를 사용하여 흡인여과 하였다. 세액이 알칼리성을 나타내지 아니할 때까지 5 회 열탕으로 씻은 다음 에탄올 15 ml로 씻고 110℃의 건조기에서 건조하여 에테르로 씻은 다음 항량이 될 때까지 다시 건조하여 데시게이터에서 식히고 칭량하였다. 다음 450 ~ 500℃의 전기로 중에서 항량이 될 때까지 가열하고 식힌 후 칭량하였다.

(3) 결과판정

(가) 수분함량

$$\text{수분 함량(\%)} = \frac{\text{건조 전 시료의 무게(g)} - \text{건조 후 시료의 무게(g)}}{\text{건조 전 시료의 무게(g)}} \times 100$$

(나) 조회분 함량

$$\text{조회분 함량(\%)} = \frac{\text{건조 후 시료의 무게(g)}}{\text{건조 전 시료의 무게(g)}} \times 100$$

(다) 탄수화물

$$\text{탄수화물 함량(\%)} = \frac{\text{Bertrand 당류정량표로부터 구한 당의 양(g)} * \text{회색배수}}{\text{시료 채취량(g)}} \times 100$$

(라) 조지방 함량

$$\text{조지방 함량(\%)} = \frac{\text{조지방 추출후 조지방(g)} + \text{수기의 함량(g)} - \text{수기의 함량(g)}}{\text{시료의 채취량(g)}} \times 100$$

(마) 조단백질 함량

$$\text{조단백질 함량(\%)} = \frac{(\text{공시험의 적정치} - \text{본 시험의 적정치}) \times 0.0014 \times \text{회석배수} \times 6.25}{\text{시료의 채취량(g)}} \times 100$$

(바) 조섬유

$$\text{조섬유 함량(\%)} = \frac{110^\circ\text{C에서의 함량 무게(g)} - \text{전기료에서의 함량 무게(g)}}{\text{시료의 채취량(g)}} \times 100$$

2) pH 안정성 검사

(1) 시험물질의 조제 및 농도

광양 백운산에서 채집한 개비자 나무(잎, 줄기)를 믹서기(Hi MIXER HM-2500, Korea)로 분쇄하여 분말로 만들었다. 분말상태의 개비자나무 1 kg대 70% 주정 8 kg의 비율로 혼합하여 미리 예열된 80 °C의 Water bath (JEIO TECH swb-10, Korea)에서 4.5시간 동안 추출을 하였다. 추출 후 추출액을 원심분리(400 xg)하여 상등액을 와트만 필터(whatman 0.45 μm filter)를 이용하여 여과하고 pH가 5.6인 추출액에 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 이용하여 3, 5, 7 및 11로 조절하여 사용하였다.

(2) 시험 방법

개비자나무 추출액의 pH에 따른 HHT의 함량 변화와 그 안정성을 측정하기 위해 pH가 5.6인 추출액에 0.1 N HCl과 0.1 N NaOH를 이용하여 3, 5, 7 및 11로 조절하고 0, 120, 240, 480 분 동안의 방치시간 후에 일정량의 시료를 취하여 HPLC (High performance liquid chromatography, Waters)로 HHT의 함량변화를 측정하였다. HPLC에 사용하는 column은 capcellpac C18 column (UG120, 4.6 × 250 mm, 5 μm, Shiseido)이며. 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 (v/v)에서 시작

하여 30 분 후 45 : 55 (v/v) 이 되도록 하고 시료 주입량은 20 μl 이며 290 nm에서 UV에 의해 검출하였다. HHT의 정량은 농도에 따른 표준시료(순도 : 98.6%, Sigma-Aldrich, USA)의 피크 면적으로 표준정량선을 작성한 후 계산하였다.

나. 의약품으로의 활용검토

가) 건조감량

건조감량은 의약품을 건조하였을 때 소실되는 검체중의 수분, 결정수의 전부 또는 일부 및 휘발성 물질 등의 양을 측정하기 위하여 사용된다.

(1) 시험물질의 조제 및 농도

공주대학교(협동연구기관)로부터 제공받은 순도 99%의 HHT를 사용하였다.

(2) 시험 방법

도가니 항량을 미리 구하여 여기에 시료 1 g을 정확히 칭량하고 105°C dry oven에서 뚜껑을 열어 4시간 동안 건조하였다. 건조 후 desiccator에서 뚜껑을 닫아 실온이 될 때까지 방냉한 후 칭량하였다. 위의 조작을 반복해서 항량을 구하고 건조 전후의 중량차로 수분량과 휘발성물질의 양을 구하였다.

(3) 결과판정

$$\text{건조감량(\%)} = \frac{\text{건조 전 시료의 무게(g)} - \text{건조 후 시료의 무게(g)}}{\text{건조 전 시료의 무게(g)}} \times 100$$

나) 강열잔분

강열잔분은 의약품을 강열하였을 때 휘발하지 않고 남는 물질의 양을 측정하는 방법으로 보통 유기물중에 불순물로 들어 있는 무기물의 함량을 알기 위하여 쓴다.

(1) 시험물질의 조제 및 농도

공주대학교(협동연구기관)로부터 제공받은 순도 99%의 HHT를 사용하였다.

(2) 시험 방법

도가니를 잘 씻어 건조한 것을 135℃의 dry oven에서 30 분간 가열건조한 후 desiccator에 넣고 10 분 동안 방냉하여 도가니 무게를 칭량하였다. 무게를 단 도가니에 개비자나무 시료 1 g을 넣고 정확한 중량을 측정하였다. 시료를 넣은 도가니의 뚜껑을 덮은 후 회화로에 넣고 550℃에서 2 시간 가열하여 회백색의 재가 얻어지면 desiccator 내에서 방냉한 후 칭량하였다.

(3) 결과판정

$$\text{강열잔분 함량(\%)} = \frac{\text{건조 후 시료의 무게(g)}}{\text{건조 전 시료의 무게(g)}} \times 100$$

3. 결과 및 고찰

가-1. 일반성분 분석

개비자나무 추출물을 식품으로 개발하기 위해 식품공전의 시험방법을 도입하여 개비자나무 추출액의 일반성분을 조사하였다. 일반성분시험법은 시료중에 일반적으로 함유되어 있는 성분에 관한 시험법으로서 시료의 규격, 순도의 검사 및 영양가를 평가하기 위한 방법이다. 실험결과는 Table 5와 같다.

Table 5. Chemical composition of *Cephalotaxus koreana* extract (HHT : 5.46)

Analysis item	Result (%)
Carbohydrate	1.05
Crude lipid	0.13
Crude protein	0.02
Crude fiber	0.06
Crude ash	0.20
Moisture	98.54
Total	100

가-2. pH 안정성 검사

개비자나무 추출물을 식품으로 활용하기 위해 개비자나무의 유효성분으로 밝혀진 HHT의 pH 안정성을 검토하였다. pH를 각각 3, 5, 7, 11로 변화시킨 후 시간에 따른 HHT의 함량 변화를 측정하여 안정성(stability)으로 나타낸 결과는 Figure 10과 같다. 결과에서 보면 pH 3, 5, 7 범위에서는 HHT이 비교적 안정함을 보였다. 특히 pH 7조건에서 감소의 폭이 가장 적어 안정하게 유지되었으나 pH 11에서는 HHT 분해가 진행되어 9 시간 경과시 초기 HHT의 62%만 남았다. 결론적으로 개비자나무 추출물에 존재하는 HHT은 알칼리 조건(pH 11)을 제외하고는 산성과 중성 범위에서 안정한 것으로 나타났다.

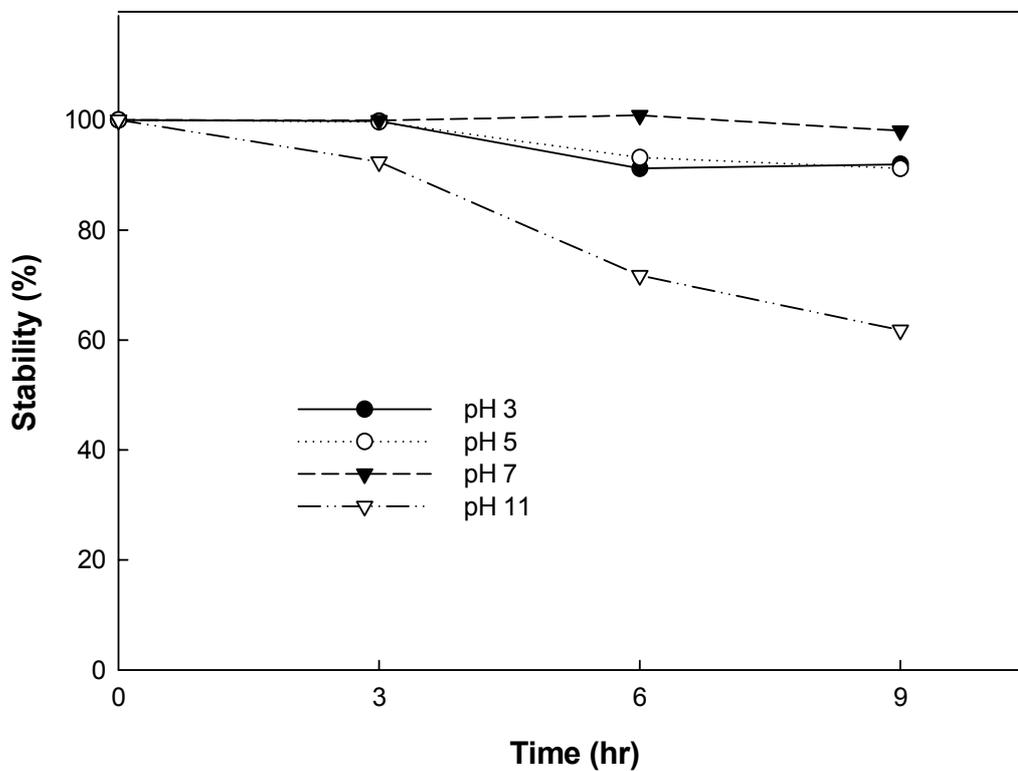
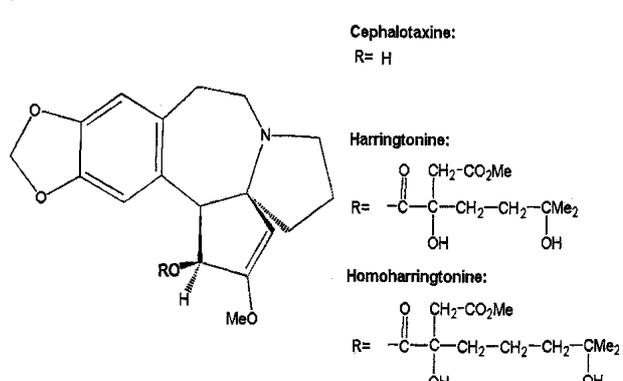


Figure 10. pH stability of HHT in *Cephalotaxus koreana* extract

나. 의약품으로의 활용검토

HHT을 의약품으로 개발하기 위해 대한약전의 시험방법을 도입하여 HHT의 정상, 건조감량, 강열잔분 등을 조사하였다(Table 6).

Table 6. Physicochemical properties of homoharringtonin

Analysis item	Result (%)
Name	Homoharringtonine
Structural formula	 <p>Cephalotaxine: R= H</p> <p>Harringtonine: R= $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CMe}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$</p> <p>Homoharringtonine: R= $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - \text{C} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{CMe}_2 \\ \qquad \qquad \\ \text{OH} \qquad \qquad \text{OH} \end{array}$</p>
Molecular Formula	C ₂₉ H ₃₉ NO ₉
Molecular Weight	545.62
Origin	<i>Cephalotaxus koreana</i>
Description	White powder, acerbity
Identification	Chromatographic method
Assay	HPLC
Loss on drying (%)	0.77
Ash content (%)	3.72
Standard substance	98.6% (Sigma-Aldrich, USA)

제 4절 개비자나무 유래 생물소재의 *in vivo* 생리활성 및 독성분석에 관한 연구

1. 서 언

천연물로부터 생리활성물질을 찾는 연구는 오래전부터 많은 연구자들에 의해 이루어지고 있으며 특히 질병에 대한 치료제 및 예방책으로 식물자원이 널리 이용되고 있는 실정이며, 최근 국민생활 수준의 향상으로 건강에 대한 관심이 높아지면서 천연물에 대한 중요성이 높이 평가되고 있다. 특히 약용 식물에 대한 여러 가지 항암 및 생리활성 기능이 밝혀짐에 따라 이들을 추출·정제하여 기능성 식품 및 의약품으로 개발함으로써 많은 관심을 가져오고 있다. 그러나 현대의학의 발달에도 불구하고 암은 여전히 치료하기 어려운 병의 하나로 여겨지고 있으며, 암 발생의 80~90%는 환경적 요인에 기인하며, 환경적 요인의 30~60%가 식이 및 영양과 관련이 있고, 그 외 다른 요인으로는 흡연, 방사선 조사(UV, X-ray 등), 직업적 요인, 음주 및 내인성 호르몬 등을 들 수 있다. 본 연구에서는 *in vivo*에서 nude mouse를 이용한 세포 독성작용, 간 기능 관련 효소분석, 간의 조직학적 검사, 세포면역학적 영향 및 발암성 비교평가 등을 검토하여 개비자나무의 전반적인 항암효과에 대한 연구를 행하였다.

세부과제 4-1. 급성독성 실험에 의한 개비자나무 유래 생물소재의 *in vivo* 생리활성 및 독성분석에 관한 연구

2. 재료 및 방법

가. 실험동물

8주령의 수컷 SPF ICR 마우스를 The Jackson Lab.으로부터 구입하여 사용하였다.

나. 급성독성 실험

1) 실험군 및 투여

SPF ICR 생쥐 20 마리를 5 일간에 걸쳐 매일 LD₅₀량 homoharringtonine(HHT, 1.34 mg/ml)을 미정맥에 투여하고, 동수의 대조군에는 동량의 식염수를 투여하였다.

2) 간기능 관련 효소분석

간기능 관련효소의 혈액분석을 위하여 HHT 투여하고 5 일 경과후 heparine이 처리된 capillary tube를 이용하여 각 실험군 마우스의 후안와정맥총(retro-orbital sinus)으로부터 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액을 즉시 5000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상층부의 혈장을 분리하여 혈액화학분석기(CIBA Corning 550 Express, USA)를 이용하여 간기능과 관련된 효소인 glutamate-oxalate-transferase(GOT), glutamate-pyruvate-transferase(GPT), bilirubine 및 alkaline phosphatase를 혈액자동분석기(Hithachi)를 이용하여 실험군간의 차이를 분석하였다.

3) 간의 조직학적 검사

HHT 투여하고 5 일 경과후 마우스를 희생시켜 곧바로 복강을 절개하여 육안적으로 간표면의 특이소견 유무를 확인한 다음, 10% 중성 포르말린에 넣어 24 시간 이상 고정하였다. 고정시킨 후 각 조직들을 흐르는 물로 충분히 수세하고 70, 80, 90 및 100% 알콜로 단계적으로 탈수시킨 다음 paraffin 투과과정을 거쳐 포매장치(SHANDON, Histocentre 2, USA)를 이용하여 포매하고 박절편기 (LEICA, RM2045, Germany)로 약 4 μ m의 두께로 조직절편을 제작하여 H & E(Hematoxylin & Eosin) 염색을 하고 xylene으로 투명화 과정을 거친 다음 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 혈액 중 혈액학적 지표

HHT 투여 후 10 마리 사망하였으며, 살아 남은 군으로 혈액학적, 조직학적 관찰을 실시 하였다. HHT 투여하고 5 일 경과 후 혈액 중 혈액학적 지표에 미치는 영향을 조사하기 위하여 마지막 HHT 투여 24 시간 후에 후안와정맥총(retro-orbital sinus)으로부터 혈액을 채취, 혈액학적 지표인 백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 적혈구 평균용적(MCV), 평균 헤모글로빈양(MCH), 및 평균 헤모글로빈 농도(MCHC) 등을 측정하였다.

HHT은 평균 헤모글로빈 농도(MCHC)는 대조군에서 약간 높았으나 유의적으로 차가 없었으며, 백혈구수(WBC), 적혈구 평균용적(MCV), 평균 헤모글로빈양(MCH)등 다른 혈액학적 지표에는 별다른 영향을 미치지 않았다. 그러나 HHT 처리군의 적혈구수(RBC)는 대조군 보다 유의적으로 높았다(Table 1).

Table 1. HHT 투여하고 5 일 경과 후 혈액 중 혈액학적 지표

	Control	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	AVERAGE	STDEV	단위
WBC	9.04±3.14	8	8.2	8.1	8.6	8.2	8	7.6	7.85	8.1	8	8.065	0.2582527	k/ul
RBC	3.64±1.48	9.09	10.37	11.11	8.9	9.9	10.2	10.8	11	8.9	8.8	9.907	0.9225936	M/ul
HB	14.2±1.96	13.7	13.5	13.7	13.6	16.5	13.7	13.4	13.8	13.7	13.8	13.94	0.9082339	g/dl
HT	37.4±4.9	44	47.1	50.8	42.9	49.5	43.1	46.3	43.8	42.4	48.6	45.85	3.0358049	%
MCV	43.8±4.84	45	45	46	45	46	45	45	46	45	44	45.2	0.6324555	fL
MCH	16.56±1.42	15	13.2	12.3	15.7	13.4	13.1	13.7	13.1	12.6	13.1	13.52	1.051771	pg
MCHC	37.93±0.96	33.4	29	27.1	30.5	28.9	29.7	31.2	29.7	29.4	32	30.09	1.7741665	g/dl
PLT	173.85±111.66	123	182	165	149	163	171	167	155	167	179	162.1	16.894772	k/ul
MPV	7.89±1.3	9.4	7.9	8.2	8.4	7.7	9.1	8.7	9.2	8.1	8.3	8.5	0.5773503	fL
PCT	0.13±0.08	0.082	0.131	0.12	0.115	0.094	0.099	0.121	0.119	0.104	0.127	0.1112	0.0157748	%
PDW	29.48±3.42	27.8	31.9	30.7	30.7	28	29.5	28.7	30.2	29.1	30.5	29.71	1.3177843	
Chol	129.05±7.15	148.7	151	149	150.47	149.31	148.9	149.7	150.37	149.92	150	149.737	0.7556167	mg/dl
TG	115.56±20.89	455	-	148	-	-	-	-	-	-	-	301.5	217.08178	mg/dl
GPT	45±4.36	162	147	152	149	155	151	160	157	155	152	154	4.7375568	U/L
GOT	100.28±37.98	218	239.7	259.8	236.4	211	238.4	256.3	253	250	254.1	241.67	16.459583	U/L
ALP	223.37±86.19	442	438	469	389	430	405	428	457	422	474	435.4	26.825361	U/L
BIL	0.25±0.16	1.82	0.966	1.09	1.423	0.827	1.189	1.644	1.467	1.77	1.62	1.3816	0.3464381	mg/dl
Glu	126.36±9.99	40.8	50.9	46.7	42.1	47.8	41.9	48.8	48.7	47.1	44.5	45.93	3.4211921	mg/dl

나. Blood histological analysis

대조군(A)과 비교했을 때 HHT투여군(B,C)의 경우 적혈구의 수가 증가하였고, 크기가 작아진 것을 볼 수 있다. 적혈구의 크기가 작은 경우, hemoglobin의 합성이 비정상적으로 일어날 가능성이 있다 (Figure 1).

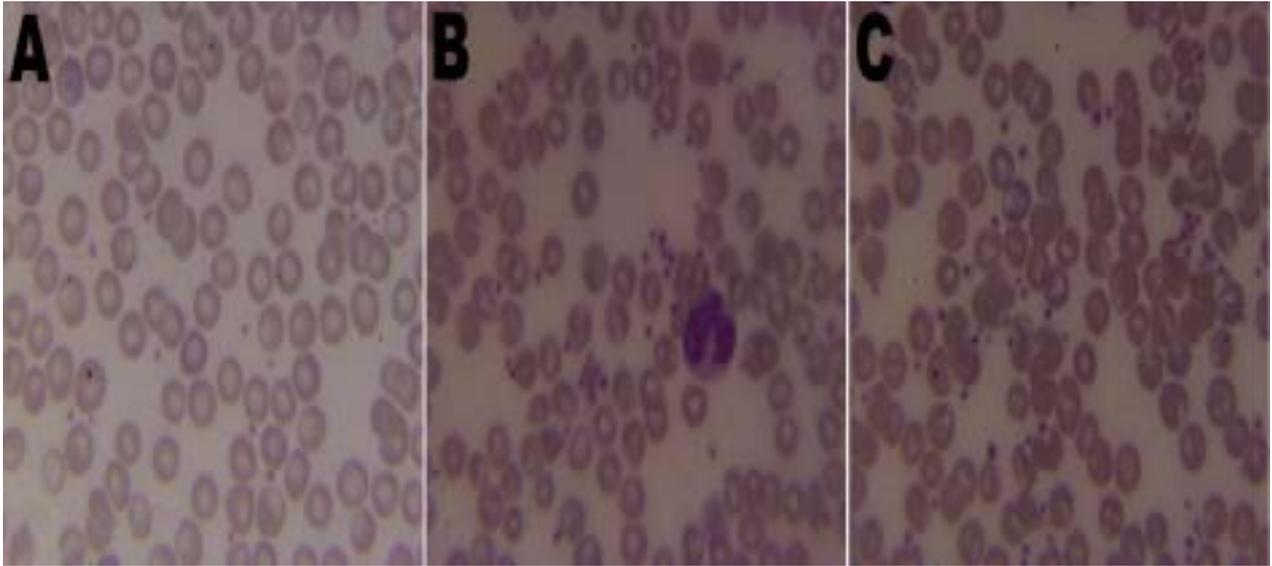


Figure 1. Blood histologic analysis(A: 대조군, B,C: HHT투여군).

다. 간기능 관련 효소분석

HHT 투여하고 5 일 경과 후, 간기능 관련효소의 혈액을 분석한 결과, HHT투여군이 동량의 식염수를 투여한 대조군에 비하여 간손상과 관련된 효소인 glutamate-oxalate-transferase(GOT), glutamate-pyruvate-transferase(GPT) cholesterol(Chol) 및 alkaline phosphatase(ALP) 모두 상승되어 있었으며, HHT투여군(GOT: 241.67 ± 16.45 U/L, GPT: 154 ± 4.74 U/L, Chol: 149.74 ± 0.76 mg/dl, ALP: 435.4 ± 26.82 U/L)가 대조군(GOT: 100.28 ± 37.98 U/L, GPT: 45 ± 4.36 U/L, Chol: 129.05 ± 7.15 mg/dl, ALP: 223.37 ± 86.19 U/L)에 비하여 유의적으로 높은 수치를 나타내어 간 손상이 심하였다 (Figure 2).

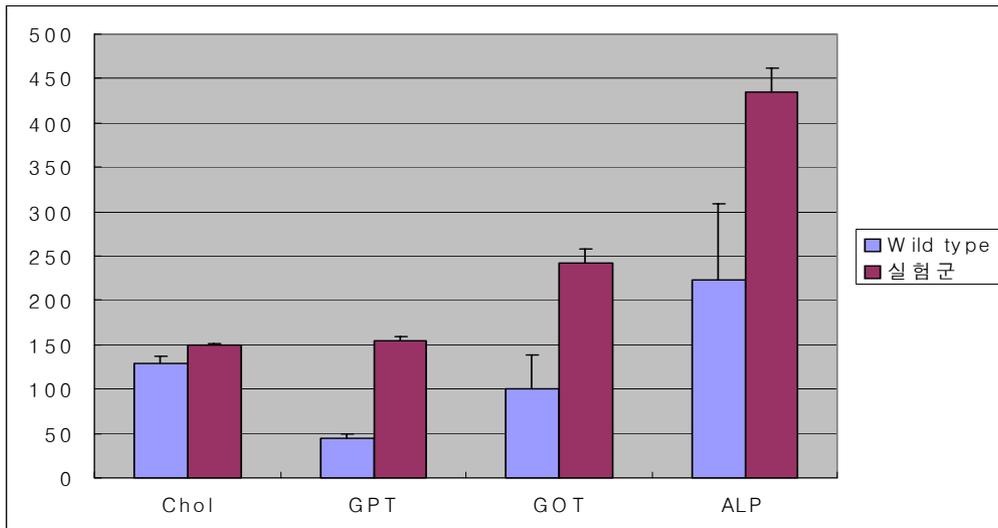


Figure 2. HHT투여군과 대조군의 간기능 관련 효소 분석

HHT 투여하고 5 일 경과 후, 간기능 관련효소의 혈액을 분석한 결과, HHT투여군이 동량의 식염수를 투여한 대조군에 비하여 간손상과 관련된 효소인 bilirubine 은 상승되어 있었으며 상대적으로 glucose는 감소되었다(Figure 3).

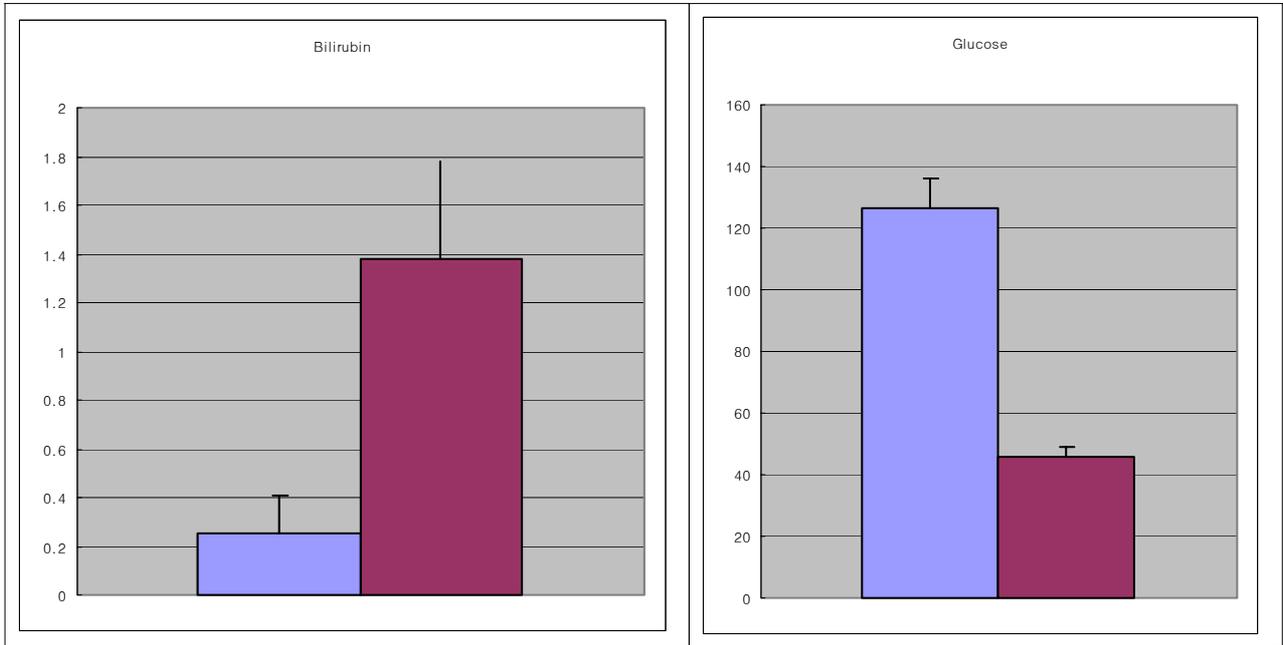


Figure 3. HHT투여군과 대조군의 간기능 관련 효소 분석

라. 간의 조직학적 관찰

간의 조직학적 관찰을 위하여 육안적으로 부검을 한 결과, 대조군 마우스의 경우에는 간표면에 이상을 발견할 수 없었으나, HHT투여군 마우스의 경우에는 간표면에 1 mm 내외의 hyperplastic nodules을 발견할 수 있었다. 또한 현미경으로 간에 대한 소견을 관찰한 결과, 대조군 마우스의 경우에는 별다른 이상을 발견할 수 없었으나, HHT투여군 마우스의 경우에는 높은 빈도의 간세포증대 및 지방변성 소견이 관찰되었다(Figure 4, Figure 5).

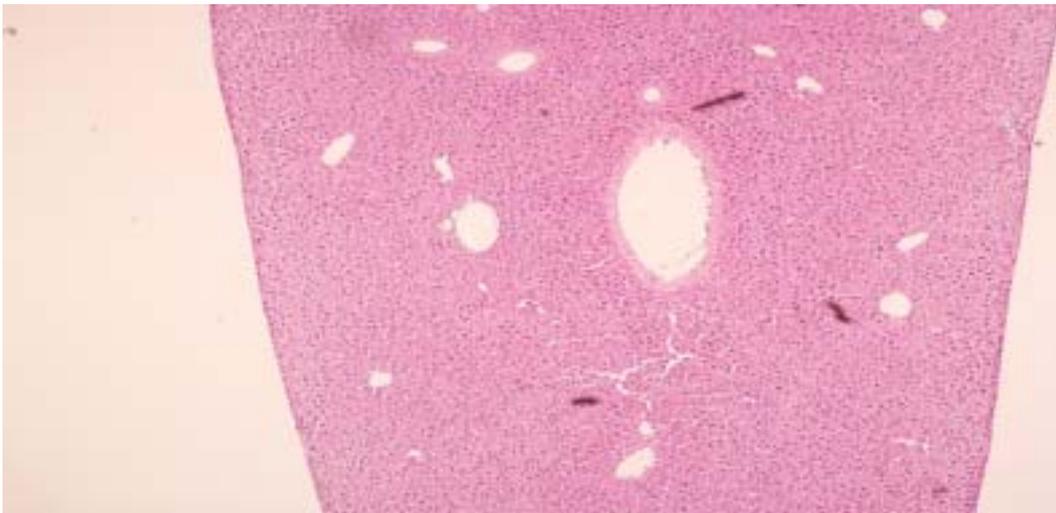


Figure 4. 대조군 마우스의 간조직. H&E, X100.

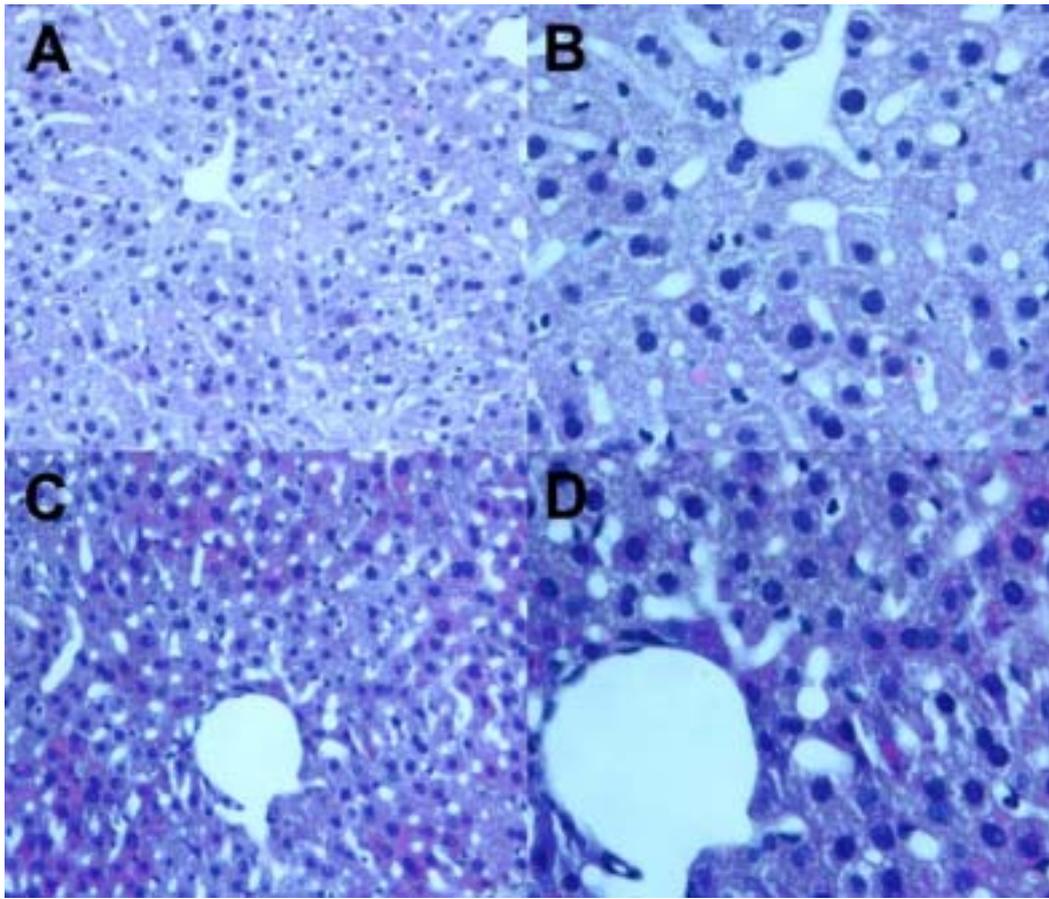


Figure 5. HHT투여군 마우스의 간조직. H&E, A,C, X100, B,DX200.

세부과제 4-2. 만성독성 실험에 의한 개비자나무 유래 생물소재의 *in vivo* 생리활성 및 독성분석에 관한 연구

2. 재료 및 방법

가. 실험동물

8주령의 수컷 SPF ICR 마우스와 6주령 수컷 nude mice를 The Jackson Lab.으로부터 구입하여 사용하였다.

나. 만성독성 실험 및 세포주를 이용한 발암성의 비교 평가

1) 실험군 및 투여

SPF ICR 생쥐 20 마리를 주 1 회 90 일간에 걸쳐 LD₅₀량 HHT(1.34 mg/ml)을 미 정맥에 투여 하고, 동수의 대조군에는 동량의 식염수를 투여하였다.

2) 간기능 관련 효소분석

간기능 관련효소의 혈액분석을 위하여 HHT 주 1 회 90 일간 투여하고 5 일 경과 후 heparine이 처리된 capillary tube를 이용하여 각 실험군 마우스의 후안와정맥총(retro-orbital sinus)으로부터 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액을 즉시 5000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상층부의 혈장을 분리하여 혈액 화학분석기(CIBA Corning 550 Express, USA)를 이용하여 간기능과 관련된 효소인 glutamate-oxalate-transferase(GOT), glutamate-pyruvate-transferase(GPT), bilirubine 및 alkaline phosphatase를 혈액자동분석기(Hithachi)를 이용하여 실험군간의 차이를 분석하였다.

3) 간의 조직학적 검사

HHT 주 1 회 90 일간 투여하고 5 일 경과 후 마우스를 희생시켜 곧바로 복강을 절개하여 육안적으로 간표면의 특이소견 유무를 확인한 다음, 10% 중성 포르말린에 넣어 24 시간 이상 고정하였다. 고정시킨 후 각 조직들을 흐르는 물로 충분히 수세하고 70, 80, 90 및 100% 알콜로 단계적으로 탈수시킨 다음 paraffin 투과과정을 거쳐 포매장치 (SHANDON, Histocentre 2, USA)를 이용하여 포매하고 박절편기 (LEICA, RM2045, Germany)로 약 4 um의 두께로 조직절편을 제작하여 H & E (Hematoxylin & Eosin) 염색을 하고 xylene으로 투명화 과정을 거친 다음 permount로 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 혈액중 혈액학적 지표

HHT을 주 1 회 90 일간 투여하고 5 일 경과 후 혈액 중 혈액학적 지표에 미치는 영향을 조사하였다. 각각의 생쥐를 마취한 다음 혈액을 3차에 걸쳐 채취하였다. 슬라이드에 스프레드한 다음 May-Gru'nwald-Giemsa 방법으로 염색을 한 다음 각각의 혈액 세포를 측정하였다. 혈액학적 지표 측정 결과 2 차년도에서 수행한 급성 독성실험(5 일간에 걸쳐 투여)에서는 HHT 처리군이 대조군 보다 적혈구수(RBC)가 유의적으로 높았으나 만성독성 실험의 적혈구수(RBC)는 대조군군과 homo-harringtonine 투여군 사이에 유의성이 없었다(Table 2).

Table 2. HHT 주 1 회 90 일간 투여하고 5 일 경과 후 혈액중 혈액학적 지표

	대조군	HHT투여군		
		1차	2차	3차
WBC, no. X10 ³ /uL	3.25±0.730	2.84±0.230	2.45±1.030	4.215±0.195
Differential count (%)				
Neutrophils	0.555±0.045	0.335±0.095	0.425±0.305	0.52±0.520
Lymphocytes	0.68±0.680	2.47±0.150	1.89±0.620	3.765±0.205
Eosinophils	0±0.000	0±0.000	0±0.000	0.005±0.005
Monocytes	0.005±0.005	0.015±0.015	0.13±0.100	0.01±0.001
RBC, no. X10 ⁶ /uL	7.87±1.050	8.96±0.520	9.8±1.100	9.235±0.195
Hematocrit(%)	42.45±3.650	49.8±1.000	51.45±4.350	50.55±1.350
Hb (g/dL)	13.1±1.700	14.3±0.500	15.25±1.250	14.7±0.500
Reticulocytes, % of Total RBC	2.62±0.550	3.6±3.600	3.08±0.800	2.475±0.355
Platelets, no. X10 ³ /uL	521±148	656.5±59.5	808±40	555.5±0.5

나. Blood histological analysis

대조군(A)과 비교했을 때 HHT투여군(B,C)의 경우 적혈구의 수가 증가하였고, 크기가 작아진 것을 볼 수 있다(Figure 6). 적혈구의 크기가 작은 경우, hemoglobin의 합성이 비정상적으로 일어날 가능성이 있다.

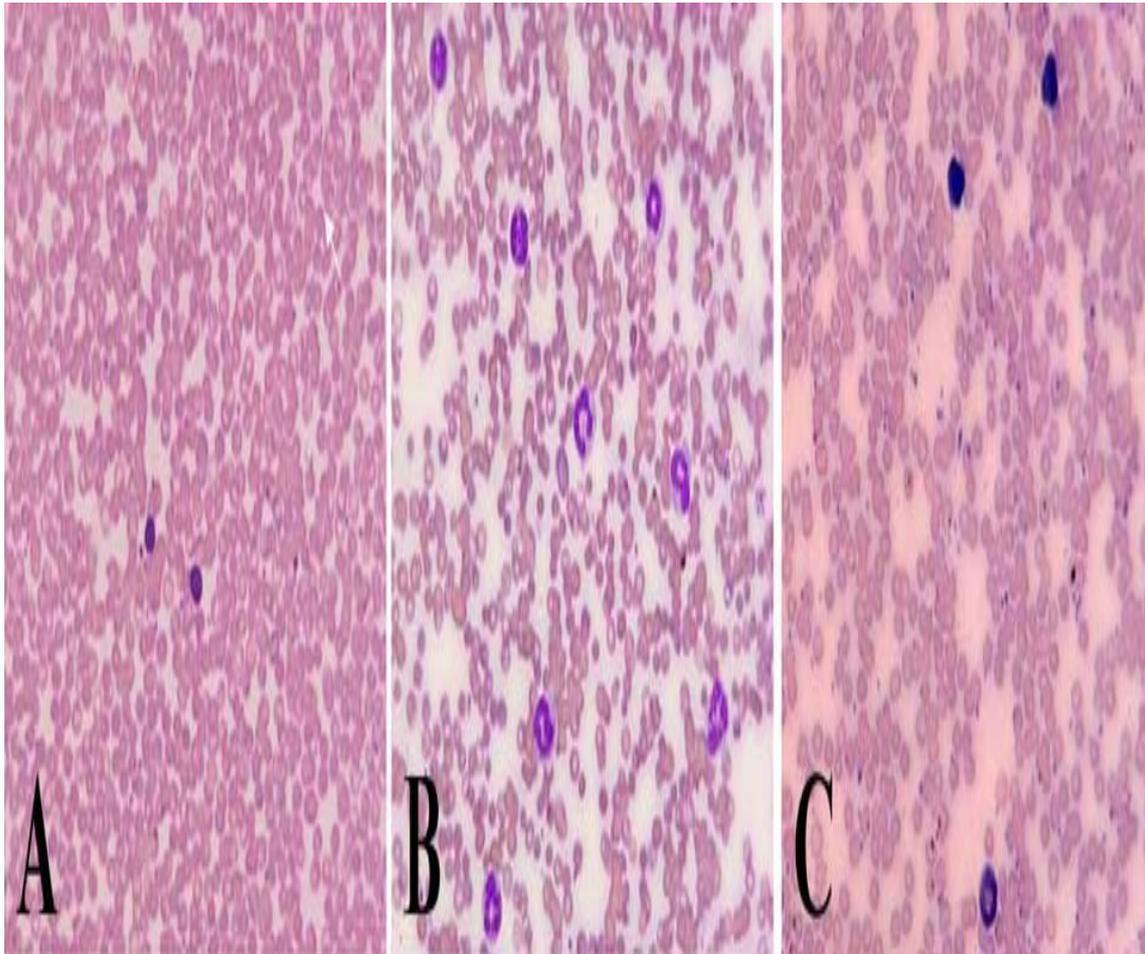


Figure 6. Blood histologic analysis(A: 대조군, B,C: HHT투여군).

다. 간 기능 관련 효소분석

HHT 주 1 회 90 일간 투여하고 5 일 경과후 경과 후, 간기능 관련 효소의 혈액을 분석한 결과, 2 차년도에 수행한 급성독성 실험에서는 HHT투여군이 동량의 식염수를 투여한 대조군에 비하여 간손상과 관련된 효소인 glutamate-oxalate-transferase (GOT), glutamate -pyruvate-transferase(GPT) cholesterol(Chol) 및 alkaline phosphatase(ALP) 모두 상승되어 간 손상이 심하였으나 만성독성 실험에서는 간 손상 관련 효소(GOT, GPT, Chol, ALP) 모두 정상이었다 (Figure 7).

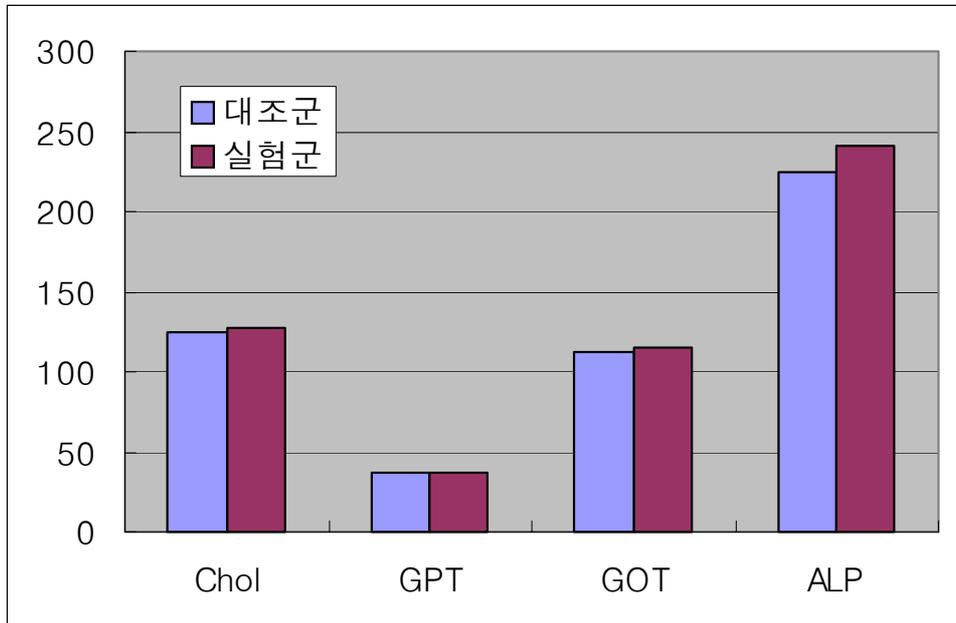


Figure 7. HHT투여군과 대조군의 간 기능 관련효소 분석

HHT 주 1 회 90 일간 투여하고 5 일 경과후 경과 후, 간기능 관련효소의 혈액을 분석한 결과, 2 차년도에 수행한 급성독성 실험에서는 HHT투여군이 동량의 식염수를 투여한 대 조군에 비하여 간손상 과 관련된 효소인 bilirubine 은 증가되어 있었으며 상대적으로 glucose 는 감소되 었나 만성독성 실험에 서는 bilirubine가 감소되고 glucose는 증가되었다. 대조군과 HHT투여군 사이에 유의성은 없었다 (Figure 8).

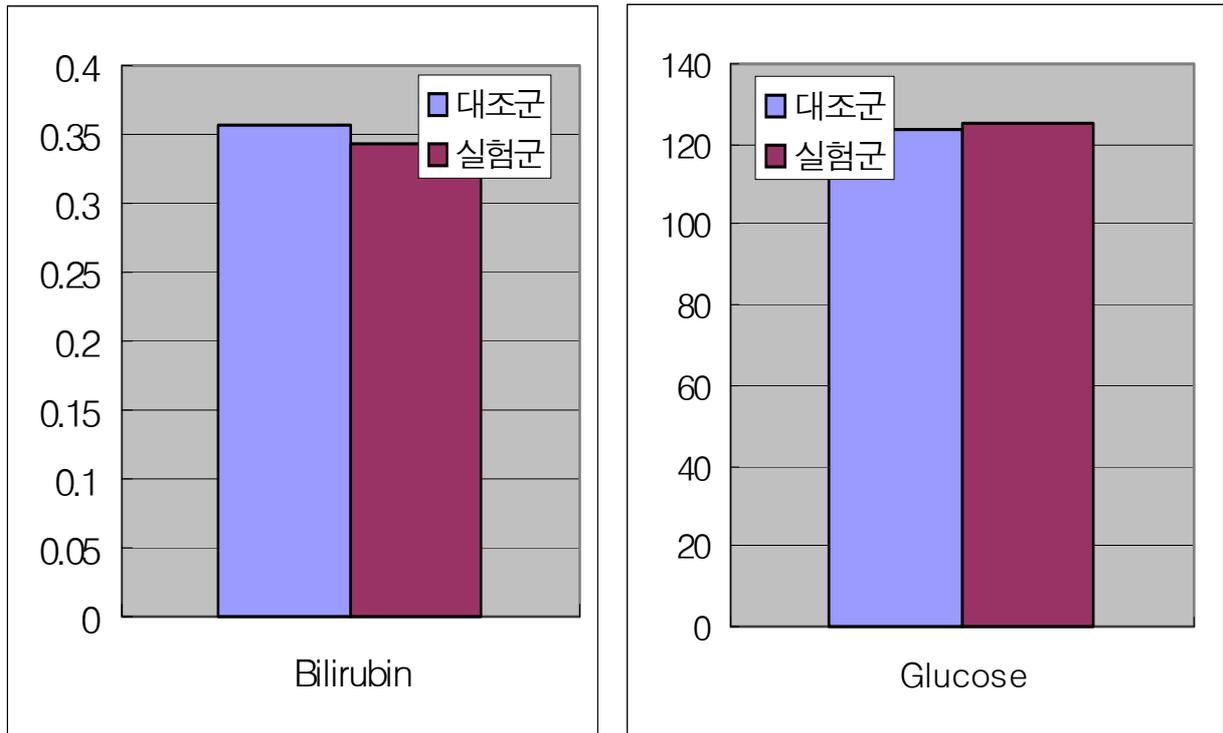
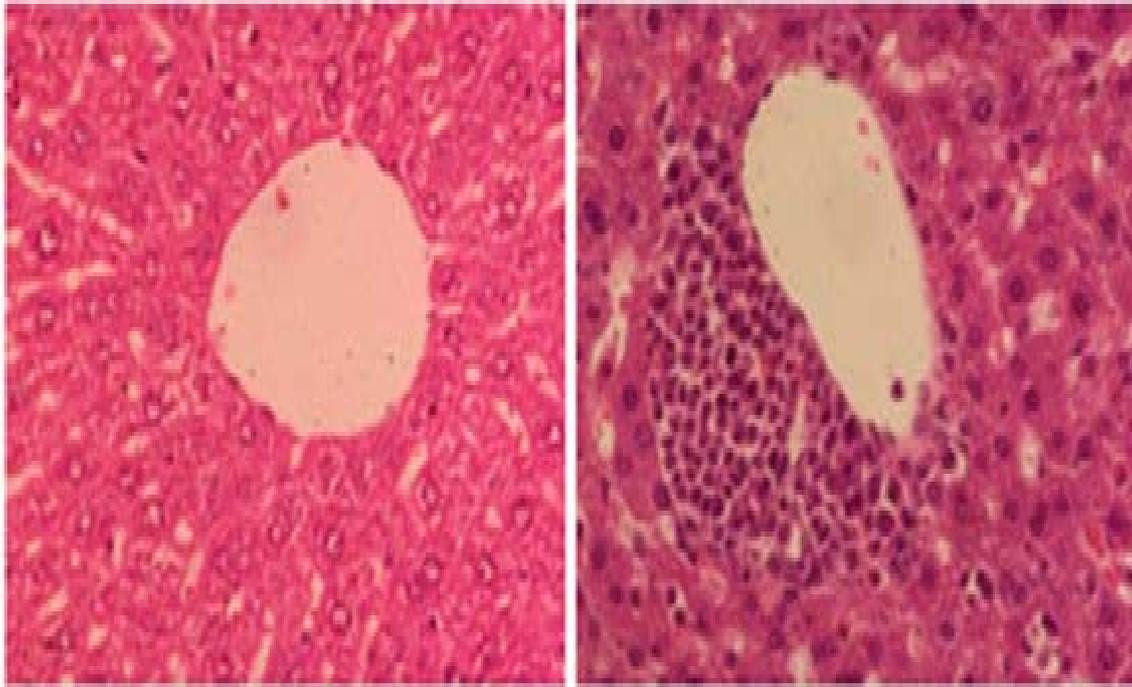


Figure 8. HHT투여군과 대조군의 간기능 관련 효소 분석

라. 간의 조직학적 관찰

간의 조직학적 관찰을 위하여 육안적으로 부검을 한 결과, 2 차년도에 실험한 급성독성 실험과 마찬가지로 대조군 마우스의 경우에는 간표면에 이상을 발견할 수 없었으나, HHT투여군 마우스의 경우에는 간표면에 1 mm 내외의 hyperplastic nodules을 발견할 수 있었다. 또한 현미경으로 간에 대한 소견을 관찰한 결과, 대조군 마우스의 경우에는 별다른 이상을 발견할 수 없었으나, HHT투여군 마우스의 경우에는 높은 밴드형의 호중구를 침착 시키는 것이 확인되었다(Figure 9).



(A)

(B)

Figure 9. 대조군 간조직(A) 및 HHT투여군 마우스의 간조직(B). H&E, X200.

마. 세포면역학적 영향

HHT 주 1 회 90 일간 투여하고 5 일 경과 후, 안전성을 확인하기 위해 lymph node에 있는 T-cell과 B-cell의 수를 비교함으로써 면역학적인 영향성을 확인하였다. 확인결과 면역학적 기능에 전혀 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다(Table 3).

Table 3. HHT 처리된 마우스의 B220-positive cell 과 CD11c-positive cell 의 양의 비교

	대조군	대조군	실험군	실험군
B220+ a 1st Exp	25.21	22.32	23.24	25.32
2nd Exp	23.93	21.23	24.19	23.18
CD11c+ b 1st Exp	1.19	2.38	1.93	2.34
2nd Exp	2.00	1.82	1.79	1.93

제 4장 목표달성도 및 관련분야에 의 기여도

전체적으로 목표 달성을 초과하였으며 각 분야별 기여도는 다음과 같다

제 1절 기술적 측면

가. 고기능성 개비자나무의 우수 집단 선발 및 증식기술 개발에 관한 연구에서 천연집단 조사 및 자원 파악, 2) 부위별, 개체별, 집단별 함량변이의 정량적인 통계분석 3) 우수집단 선발 및 대량증식기술을 개발하였다.

나. 개비자나무를 이용한 신기능성 물질 생산기술 개발에 관한 연구에서 1) 기능성 물질의 분석 및 추출, 2) 생리활성물질 분리 및 정제 공정 개발, 3) 공정 가능성 확인 및 제품화 가능성을 확인 하였다.

다. 개비자나무 유래 생물소재의 *in vitro* 생리활성 및 독성 분석에 관한 연구에서 1) 목본식물 추출물의 *in vitro* 항암, 항균 활성분석, 2) 분리정제된 물질의 *in vitro* 항암활성 및 독성분석, 3) 기존 항암제와의 비교분석, 4) 특성 분석을 하여 항암활성 및 항암제로서의 개발 가능성을 확인하였다.

라. 개비자나무 유래 생물소재의 *In vivo* 생리활성 및 독성 분석에 관한 연구에서 1) *in vivo* 생리활성 분석 2) *in vivo* 급성 및 만성 독성 및 조직 검사를 하여서 기초적인 연구토대를 마련하였다.

리. 본 연구팀들이 대상으로 하고 있는 목본 식물 개비자나무를 연구함에 따라 앞으로 다른 식물들에서도 신규 항암물질 및 항균물질을 찾아내려는 많은 시도가 있게 될 것이다.

나. 현대 의학에 있어서 화학적 암치료제는 암세포의 억제내성과 체내흡수와 배원위치설의 문제 그리고 2차적 부작용으로 인하여 새로운 치료제, 특히 천연 항암·항균원위치제의 개발을 요청 받고 있는 실정에 비추어 개비자나무의 homoharringtonine은 원료의약품 약품으로 이용 가능성을 제시하였다,

제 2절. 경제적 측면

가. 농산물의 가공으로 식품 및 벤처 임업의 육성산업이 활성화되어가고 있다. 더 나아가서 의약품 개발로 제약 산업 및 가공 산업으로 임업영역의 확대와 특히 임업 보건환경영역의 확대 가능성을 제시하였다.

나. 본 연구의 결과 재배분야와 육종에 의한 새로운 계통의 식물의 육성으로 산업화가 가능하며 신물질에 의한 의약품생산은 국민 보건상 중요할 뿐만 아니라 부가가치를 가지는 자원 절약형, 기술 집약적 산업이며 다른 정밀화학 산업과 벤처임업의 육성으로 가능성을 제시하였다.

다. 자연의 보호는 아무리 강조하여도 지나치지 않는데 토종식물이 고가로 거래되기 때문에 무차별 남획이 되고 있으며 기주나무를 마구 베어내고 있기 때문에 본 연구에서 효과적으로 재배 육성할 수 있는 방법을 개발하여 가능성을 가진 진품을 합리적인 가격에 공급함으로써 자연환경보전에 기여할 것으로 생각된다.

제 5장 연구개발결과의 활용

1). 학술 논문 발표

일시(년.월)	발표논문제목	발표 학술단체	학술지 권.호.페이지
2004. 4	한국산 개비자나무로부터 Homoharringtonine 정제를 위한 전처리 공정 개발	한국생물공학회	춘계 학술대회 발표
2004. 4	A pretreatment process development for homoharringtonine purification from <i>Cephalotaxus koreana</i> ,	Theories and Applications of Chem. Eng.	Theories and Applications of Chem. Eng. 2004(10)1
2004. 6	개비자나무의 천연집단 조사 및 자원파악과 개체 내 부위별 기능성 물질(homoharringtonine)의 함량분석	한국임학회	추계 학술연구 발표
2004. 12	Purification and Characterization of Homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	The 17th Symposium on Chemical Engineering	
2005. 2	개비자나무(<i>Cephalotaxus koreana</i> Nakai)의 homoharringtonine 함량에 영향을 미치는 무생물적 환경인자	한국임학회	춘계 학술연구 발표
2005. 2	개비자나무(<i>Cephalotaxus korean nakai</i>)의 homoharringtonine 함량에 영향을 미치는 생물 및 무생물적 환경인자	서울대 석사학위 논문	
2005. 4	Purification and Characterization of Homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	한국생물공학회	춘계 학술연구 발표
2005. 6	Analyses of homoharringtonine contents in plummyew tree (<i>Cephalotaxus koreana</i>) distributed in natural forests in Korea and its variation among parts, ages and sites	IUFRO Symposium	
2005. 10	Identification and Characterization of Homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	한국생물공학회	추계 학술연구 발표
2005. 10	Purification and identification of homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	한국화학공학회	추계 학술연구 발표
2005. 10	한국산 개비자나무(<i>Cephalotaxus koreana</i>) 8개 천연집단의 Homoharringtonine 함량변이	한국임학회	한국임학회지 94(6)397
2005. 12	Efficient purification and characterization of homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	The 18th Symposium on Chemical Engineering	
2006. 2	한국산 개비자나무로부터 Homogarringtonine의 정제 및 특성	공주대 석사학위 논문	

제 6장 참고 문헌

1. 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, *Med Pediatr Oncol*, 37, (2001), 103-107.
2. Bizzari et al. 1996. Chemical economics handbook
3. Chen, W. M., J. Y. Zhou, P. L. Zhang, and Q. C. Fang (1993), Taxayuntin A, B, C, and D : Four New Tetracyclic Taxanes from *Taxus yunnanensis*, *Chi. Chem. Lett.* 4, 695-698.
4. Choi, H.K., Yun, J.H., Kim, S.I., Song, J.Y., Kim, J.H., Choi, H.J. and Hong, S.S., Monitoring of FCW/DCW Ratio, Production of Protein and Peroxidase Activity During Suspension Culture of *Taxus chinensis*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(5), 525-528 (2002).
5. Choi, H.K., Yun, J.H., Kim, S.I., Son, J.S., Kim, H.R., Kim, J.H., Choi, H.J., and Hong, S.S., Enhanced Production of Paclitaxel by Semi-Continuous Batch Process (SCBP) in Suspension Culture of *Taxus chinensis*, *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 583-586 (2001).
6. Chu, A., M. Furlan, L. B. Davin, J. Zajicek, G. H. N. Towers, C. M. Soucy-Breau, S. J. Rettig, R. Croteau, and N. G. Lewis (1994), Phenylbutanoid and Taxane-Like Metabolites from Needles of *Taxus brevifolia*, *Phytochem.* 36, 975-985.
7. D. Z. Wang, G. E. Ma, R. S. Xu, Studies on the alkaloids of *cephalotaxus*. IX. semi-synthesis of cephalotaxine esters and their anti-leukemic activity, *Yaoxue Xuebao* 27, (1992), 178-184.
8. Gi,U.S.,Min,B.C., Hong,S.S., Lee,H.S. and Kim,J.H., Isolation and Identification of Nonpolar Taxane Derivatives from the Plant Cell Culture of *Taxus chinensis*, *J. Kor. Agricultural Chemistry & Biotechnology*, 43(3), 176-179 (2000).
9. Goodwin, T.W. and E. I. Mercer 1983. Introduction to plant biochemistry 2nd. pp528-566 Pwegamon Press. Oxford
10. Goodwin, T.W. and E. I. Mercer 1983. Introduction to plant biochemistry 2nd. pp528-566 Pwegamon Press. Oxford
11. Gunda I. Georg, Thomas T. Chen, Iwao Ojima, and Dolatrai M.Vyas, Taxane anticancer agents, ACS Symposium Series 583.
12. G. Visani, D. Russo, E. Ottaviani, P. Tosi, D. Damiani, A. Michelutti, S. Manfroi, M. Baccarani, S. Tura, Effects of homoharringtonine alone and in combination with alpha interferon and cytosine arabinoside on 'in vitro' growth and induction of apoptosis in chronic myeloid leukemia and normal hematopoietic progenitors, *Leukemia* 11, (1997), 624-628.
13. Hwang,S.W., Lee J.H., Park,H.B., Pyo,S.H., So,J.Y., Lee H.S., Hong,S.S. and Kim, J. H., A Simple Method for the Purification of an Antimicrobial Peptide in Recombinant *Escherichia coli*,

Molecular Biotechnology, 18(3), 193–198 (2001).

14. J. H. Kim and S. S. Hong, Optimization of extraction process for mass production of paclitaxel from plant cell cultures, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, (2000), 346–351.
15. J. H. Kim, I. S. Kang, H. K. Choi, S. S. Hong, H. S. Lee, A novel prepurification for paclitaxel from plant cell cultures, *J. Process Biochemistry*, 37, (2002), 679–682.
16. 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, *J. Pharm. & Biomed. Anal.*, 22, (2000), 541–554.
17. Kim, J.H. and Hong, S.S., Optimization of Extraction Process for Mass Production of Paclitaxel from Plant Cell Cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 346–351 (2000).
18. Kim, J.H. and Hong, S.S., Recovery of Paclitaxel from Suspension Culture Medium with Hydrophobic Resin, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 366–369 (2000).
19. Kim, J.H., Choi, H.K., Hong, S.S. and Lee, H.S., Development of High Performance Liquid Chromatography for Paclitaxel Purification from Plant Cell Cultures, *J. Microbiology & Biotechnology*, 11(2), 204–210 (2001).
20. Kim, J.H., Gi, U.S., Min, B.C, Hong, S.S. and Lee, H.S., Production and Purification of Taxane Derivative from the Plant Cell Cultures of *Taxus chinensis* in Large-Scale Process, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 398–402 (2000).
21. Kim, J.H., Kang, I.S. and Hong, S.S., Method of Using Hydrolysis to Increase Paclitaxel Yield from Plant Cell Culture, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 402–404 (2000).
22. Kim, J.H., Kang, I.S. and Hong, S.S., Recovery of Plant Cell and Its Debris by pH Control, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 405–407 (2000).
23. Kim, J.H., Kang, I.S., Choi, H.K., Hong, S.S. and Lee, H.S., A Novel Pre-purification for Paclitaxel from Plant Cell Cultures, *Process Biochemistry*, 37(7), 679–682 (2002).
24. Kim, J.H., Lim, C.B., Kang, I.S., Hong, S.S. and Lee, H.S., The Use of a Decanter for Harvesting Biomass from *Taxus* Cell Cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 337–341 (2000).
25. Kim, J.H., Park, H.B., Gi, U.S., Kang, I.S., Choi, H.K. and Hong, S.S., Removal of Residual Solvents in Paclitaxel by Supercritical Carbon Dioxide, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 16(3), 233–236 (2001).
26. 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, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(5), 434–437 (2000).
27. Kim, S.I., Choi, H.K., Son, J.S., Yun, J.H., Jang, M.S., Kim, H.R., Song, J.Y., Kim, J.H., Choi, H.J. and Hong, S.S., Cryopreservation of *Taxus chinensis* Suspension Cell Cultures, *CryoLetters*, 22, 43–50 (2001).

28. Lee, J.H., Gi, U.S., Kim, J.H., Kim, Y., Kim, S.H., Oh, H., and Min, B., Preparation and Characterization of Solvent Induced Dihydrated, Anhydrous, and Amorphous Paclitaxel (Taxol) , Bull. Korean Chem. Soc., 22(8), 925-928 (2001).
29. Miah, M. A., J. T. Hudlicky, J. W. Reed, *Cephalotaxus* alkaloids, In *Alkaloids*, G.A. Cordell, Ed., Academic Press, New York, 51, (1998), 199-265.
30. Nakai, T., Noturae ad Plantas Japoniae et Koreae XXXIX, *Bot. Mag. Tokyo*, 44, (1930), 507-537.
31. Ohnami, T., J. F. Holland, Homoharringtonine as a new antileukemic agent, *J. Clin. Oncol.*, 3, (1985), 604-606.
32. Park, H.B., Pyo, S.H., Hong, S.S., Kim, J.H., Optimization of the Hydroxylamine Cleavage of an Expressed Fusion Protein to Produce Recombinant Antimicrobial Peptide , *Biotechnology Letters*, 23(9), 637-641 (2001).
33. Powell, R. G., D. Weisleder, C. R. Smith, Antitumor alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*: structure and activity, *J. Pharm. Sci.*, 61, (1972), 1227-1230.
34. Pyo, S.H., Hong, S.S. and Kim, J.H., A New Large-Scale Pre-purification for Peroxidase from Plant Cell Cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 342-345 (2000).
35. Pyo, S.H., Lee, J.H., Park, H.B., Hong, S.S. and Kim, J.H., A Large-Scale Purification of Recombinant Histone H1.5 from *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, 23(1), 38-44 (2001).
36. Pyo, S.H., Park, H.B., Hong, S.S., Kim, J.H., Removal of Endotoxin in the Purification of Histone H1.5 from *Escherichia coli* , *Biotechnology Letters*, 23(9), 737-740 (2001).
37. R. M. Tuebaeva, D. M. Graifer, N. B. Matasova, O. S. Fedorova, V. B. Odintsov, N. A. Aitkhozhina, G. G. Karpova, Selective inhibition of the polypeptide chain elongation in eukaryotic cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1129, (1992), 177-182.
38. Rowinsky, E. K., L. A. Cazenave, and R. C. Donehower (1990), Review ; Taxol : A Novel Investigational Antimicrotubule Agent, *J. of the National Cancer Institute*. 82, 1247-1257.
39. S. H. Pyo, S. S. Hong, J. H. Kim, A new large-scale pre-purification for peroxidase from plant cell cultures, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, (2000), 342-345.
40. S. I. Kim, H. K. Choi, J. Y. Song, J. H. Kim, H. S. Lee, and S. S. Hong, Analysis of Alkaloid Contents in Korean Plumyew [*Cephalotaxus koreana*]: Variation with Location and Season, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, (2000), 434-437.
41. Stull, D. P., T. A. Scales, R. Daughenbaugh, N. A. Jans, and D. T. Bailey (1995), Taxol (Paclitaxel); Strategies to Increase the Supply of a New Anticancer Drug, *Appl. Biochem. Biotech.* 54, 133-140.
42. Van Gelderen D. M., *Conifers*, Helm, London, (1986).
43. Wiseman, Billy R., and James E. Carpenter. 1997. Dogwood, Hydrangea chemical foil key crop pests. *Agricultural Research*. July p.22.

44. Y. I. Park, 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*), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 11, (1996), 689-695.
45. Zhou, D. C., R. Zittoun, J. P. Marie, Homoharringtonine: an effective new natural product in cancer chemotherapy, *Bull. Cancer*, 82, (1995), 987-995.
46. 이창복 1993 신고 수목학 5th. pp195-205 향문사. 서울
47. 산림청 입업연구원 1992. 韓國樹木圖鑑 4th. pp165-174

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

전체적으로 목표 달성을 초과하였으며 각 분야별 기여도는 다음과 같다

제 1절 기술적 측면

가. 고기능성 개비자나무의 우수 집단 선발 및 증식기술 개발에 관한 연구에서 천연집단 조사 및 자원 파악, 2) 부위별, 개체별, 집단별 함량변이의 정량적인 통계분석 3) 우수집단 선발 및 대량증식기술을 개발하였다.

나. 개비자나무를 이용한 신기능성 물질 생산기술 개발에 관한 연구에서 1) 기능성 물질의 분석 및 추출, 2) 생리활성물질 분리 및 정제 공정 개발, 3) 공정 가능성 확인 및 제품화 가능성을 확인 하였다.

다. 개비자나무 유래 생물소재의 *in vitro* 생리활성 및 독성 분석에 관한 연구에서 1) 목본식물 추출물의 *in vitro* 항암, 항균 활성분석, 2) 분리정제된 물질의 *in vitro* 항암활성 및 독성분석, 3) 기존 항암제와의 비교분석, 4) 특성 분석을 하여 항암활성 및 항암제로서의 개발 가능성을 확인하였다.

라. 개비자나무 유래 생물소재의 *In vivo* 생리활성 및 독성 분석에 관한 연구에서 1) *in vivo* 생리활성 분석 2) *in vivo* 급성 및 만성 독성 및 조직 검사를 하여서 기초적인 연구토대를 마련하였다.

리. 본 연구팀들이 대상으로 하고 있는 목본 식물 개비자나무를 연구함에 따라 앞으로 다른 식물들에서도 신규 항암물질 및 항균물질을 찾아내려는 많은 시도가 있게 될 것이다.

나. 현대 의학에 있어서 화학적 암치료제는 암세포의 억제내성과 체내흡수와 배원위치설의 문제 그리고 2차적 부작용으로 인하여 새로운 치료제, 특히 천연 항암·항균원위치제의 개발을 요청 받고 있는 실정에 비추어 개비자나무의 homoharringtonine은 원료의약품 약품으로 이용 가능성을 제시하였다,

제 2절. 경제적 측면

가. 농산물의 가공으로 식품 및 벤처 임업의 육성산업이 활성화되어가고 있다. 더 나아가서 의약품 개발

로 제약 산업 및 가공 산업으로 임업영역의 확대와 특히 임업 보건환경영역의 확대 가능성을 제시하였다.

나. 본 연구의 결과 재배분야와 육종에 의한 새로운 계통의 식물의 육성으로 산업화가 가능하며 신물질에 의한 의약품생산은 국민 보건상 중요할 뿐만 아니라 부가가치를 가지는 자원 절약형, 기술 집약적 산업이며 다른 정밀화학 산업과 벤처임업의 육성으로 가능성을 제시하였다.

다. 자연의 보호는 아무리 강조하여도 지나치지 않는데 토종식물이 고가로 거래되기 때문에 무차별 남획이 되고 있으며 기주나무를 마구 베어내고 있기 때문에 본 연구에서 효과적으로 재배 육성할 수 있는 방법을 개발하여 기능성을 가진 진품을 합리적인 가격에 공급함으로써 자연환경보전에 기여할 것으로 생각된다.

제 5장 연구개발결과의 활용

1). 학술 논문 발표

일시(년.월)	발표논문제목	발표 학술단체	학술지 권.호.페이지
2004. 4	한국산 개비자나무로부터 Homoharringtonine 정제를 위한 전처리 공정 개발	한국생물공학회	춘계 학술대회 발표
2004. 4	A pretreatment process development for homoharringtonine purification from <i>Cephalotaxus koreana</i> ,	Theories and Applications of Chem. Eng.	Theories and Applications of Chem. Eng. 2004(10)1
2004. 6	개비자나무의 천연집단 조사 및 자원파악과 개체 내 부위별 기능성 물질(homoharringtonine)의 함량분석	한국임학회	추계 학술연구 발표
2004. 12	Purification and Characterization of Homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	The 17th Symposium on Chemical Engineering	
2005. 2	개비자나무(<i>Cephalotaxus koreana</i> Nakai)의 homoharringtonine 함량에 영향을 미치는 무생물적 환경인자	한국임학회	춘계 학술연구 발표
2005. 2	개비자나무(<i>Cephalotaxus korean nakai</i>)의 homoharringtonine 함량에 영향을 미치는 생물 및 무생물적 환경인자	서울대 석사학위 논문	
2005. 4	Purification and Characterization of Homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	한국생물공학회	춘계 학술연구 발표
2005. 6	Analyses of homoharringtonine contents in plumyew tree (<i>Cephalotaxus koreana</i>) distributed in natural forests in Korea and its variation among parts, ages and sites	IUFRO Symposium	
2005. 10	Identification and Characterization of Homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	한국생물공학회	추계 학술연구 발표
2005. 10	Purification and identification of homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	한국화학공학회	추계 학술연구 발표
2005. 10	한국산 개비자나무(<i>Cephalotaxus koreana</i>) 8개 천연집단의 Homoharringtonine 함량변이	한국임학회	한국임학회지 94(6)397
2005. 12	Efficient purification and characterization of homoharringtonine from <i>Cephalotaxus koreana</i>	The 18th Symposium on Chemical Engineering	
2006. 2	한국산 개비자나무로부터 Homogarringtonine의 정제 및 특성	공주대 석사학위 논문	

제 6장 참고 문헌

1. 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, *Med Pediatr Oncol*, 37, (2001),

103-107.

2. Bizzari et al. 1996. Chemical economics handbook
3. Chen, W. M., J. Y. Zhou, P. L. Zhang, and Q. C. Fang (1993), Taxayuntin A, B, C, and D : Four New Tetracyclic Taxanes from *Taxus yunnanensis*, *Chi. Chem. Lett.* 4, 695-698.
4. Choi, H.K., Yun, J.H., Kim, S.I., Song, J.Y., Kim, J.H., Choi, H.J. and Hong, S.S., Monitoring of FCW/DCW Ratio, Production of Protein and Peroxidase Activity During Suspension Culture of *Taxus chinensis*, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(5), 525-528 (2002).
5. Choi, H.K., Yun, J.H., Kim, S.I., Son, J.S., Kim, H.R., Kim, J.H., Choi, H.J., and Hong, S.S., Enhanced Production of Paclitaxel by Semi-Continuous Batch Process (SCBP) in Suspension Culture of *Taxus chinensis*, *Enzyme and Microbial Technology*, 29, 583-586 (2001).
6. Chu, A., M. Furlan, L. B. Davin, J. Zajicek, G. H. N. Towers, C. M. Soucy-Breau, S. J. Rettig, R. Croteau, and N. G. Lewis (1994), Phenylbutanoid and Taxane-Like Metabolites from Needles of *Taxus brevifolia*, *Phytochem.* 36, 975-985.
7. D. Z. Wang, G. E. Ma, R. S. Xu, Studies on the alkaloids of *cephalotaxus*. IX. semi-synthesis of cephalotaxine esters and their anti-leukemic activity, *Yaoxue Xuebao* 27, (1992), 178-184.
8. Gi,U.S.,Min,B.C., Hong,S.S., Lee,H.S. and Kim,J.H., Isolation and Identification of Nonpolar Taxane Derivatives from the Plant Cell Culture of *Taxus chinensis*, *J. Kor. Agricultural Chemistry & Biotechnology*, 43(3), 176-179 (2000).
9. Goodwin, T.W. and E. I. Mercer 1983. Introduction to plant biochemistry 2nd. pp528-566 Pwegamon Press. Oxford
10. Goodwin, T.W. and E. I. Mercer 1983. Introduction to plant biochemistry 2nd. pp528-566 Pwegamon Press. Oxford
11. Gunda I. Georg, Thomas T. Chen, Iwao Ojima, and Dolatrai M.Vyas, Taxane anticancer agents, ACS Symposium Series 583.
12. G. Visani, D. Russo, E. Ottaviani, P. Tosi, D. Damiani, A. Michelutti, S. Manfroi, M. Baccarani, S. Tura, Effects of homoharringtonine alone and in combination with alpha interferon and cytosine arabinoside on 'in vitro' growth and induction of apoptosis in chronic myeloid leukemia and normal hematopoietic progenitors, *Leukemia* 11, (1997), 624-628.
13. Hwang,S.W., Lee J.H., Park,H.B., Pyo,S.H., So,J.Y., Lee H.S., Hong,S.S. and Kim, J. H., A Simple Method for the Purification of an Antimicrobial Peptide in Recombinant *Escherichia coli*, *Molecular Biotechnology*, 18(3), 193-198 (2001).
14. J. H. Kim and S. S. Hong, Optimization of extraction process for mass production of paclitaxel from plant cell cultures, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, (2000), 346-351.
15. J. H. Kim, I. S. Kang, H. K. Choi, S. S. Hong, H. S. Lee, A novel prepurification for paclitaxel from plant cell cultures, *J. Process Biochemistry*, 37, (2002), 679-682.

16. 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, *J. Pharm. & Biomed. Anal.*, 22, (2000), 541-554.
17. Kim,J.H. and Hong,S.S., Optimization of Extraction Process for Mass Production of Paclitaxel from Plant Cell Cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 346-351 (2000).
18. Kim,J.H. and Hong,S.S., Recovery of Paclitaxel from Suspension Culture Medium with Hydrophobic Resin, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 366-369 (2000).
19. Kim, J.H., Choi, H.K., Hong, S.S. and Lee, H.S., Development of High Performance Liquid Chromatography for Paclitaxel Purification from Plant Cell Cultures , *J. Microbiology & Biotechnology*, 11(2), 204-210 (2001).
20. Kim,J.H., Gi, U.S., Min, B.C, Hong,S.S. and Lee,H.S., Production and Purification of Taxane Derivative from the Plant Cell Cultures of *Taxus chinensis* in Large-Scale Process, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 398-402 (2000).
21. Kim,J.H., Kang,I.S. and Hong,S.S., Method of Using Hydrolysis to Increase Paclitaxel Yield from Plant Cell Culture, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 402-404 (2000).
22. Kim,J.H., Kang,I.S. and Hong,S.S., Recovery of Plant Cell and Its Debris by pH Control , *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 405-407 (2000).
23. Kim,J.H., Kang,I.S., Choi,H.K., Hong,S.S. and Lee,H.S., A Novel Pre-purification for Paclitaxel from Plant Cell Cultures , *Process Biochemistry*, 37(7), 679-682 (2002).
24. Kim,J.H., Lim,C.B., Kang,I.S., Hong,S.S. and Lee,H.S., The Use of a Decanter for Harvesting Biomass from *Taxus* Cell Cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 337-341 (2000).
25. Kim, J.H., Park, H.B., Gi, U.S., Kang, I.S., Choi, H.K. and Hong, S.S., Removal of Residual Solvents in Paclitaxel by Supercritical Carbon Dioxide , *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 16(3), 233-236 (2001).
26. 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, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(5),434-437 (2000).
27. Kim, S.I., Choi, H.K., Son, J.S., Yun, J.H., Jang, M.S., Kim, H.R., Song, J.Y., Kim, J.H., Choi, H.J. and Hong, S.S., Cryopreservation of *Taxus chinensis* Suspension Cell Cultures , *CryoLetters*, 22, 43-50 (2001).
28. Lee, J.H., Gi, U.S., Kim,J.H., Kim, Y., Kim, S.H., Oh, H., and Min, B., Preparation and Characterization of Solvent Induced Dihydrated, Anhydrous, and Amorphous Paclitaxel (Taxol) , *Bull. Korean Chem. Soc.*, 22(8), 925-928 (2001).
29. Miah, M. A., J. T. Hudlicky, J. W. Reed, *Cephalotaxus* alkaloids, In *Alkaloids*, G.A. Cordell, Ed., Academic Press, New York, 51, (1998), 199-265.

30. Nakai, T., Noturae ad Plantas Japoniae et Koreae XXXIX, *Bot. Mag. Tokyo*, 44, (1930), 507-537.
31. Ohnama, T., J. F. Holland, Homoharringtonine as a new antileukemic agent, *J. Clin. Oncol.*, 3, (1985), 604-606.
32. Park, H.B., Pyo, S.H., Hong, S.S., Kim, J.H., Optimization of the Hydroxylamine Cleavage of an Expressed Fusion Protein to Produce Recombinant Antimicrobial Peptide, *Biotechnology Letters*, 23(9), 637-641 (2001).
33. Powell, R. G., D. Weisleder, C. R. Smith, Antitumor alkaloids from *Cephalotaxus harringtonia*: structure and activity, *J. Pharm. Sci.*, 61, (1972), 1227-1230.
34. Pyo, S.H., Hong, S.S. and Kim, J.H., A New Large-Scale Pre-purification for Peroxidase from Plant Cell Cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, 15(4), 342-345 (2000).
35. Pyo, S.H., Lee, J.H., Park, H.B., Hong, S.S. and Kim, J.H., A Large-Scale Purification of Recombinant Histone H1.5 from *Escherichia coli*, *Protein Expression and Purification*, 23(1), 38-44 (2001).
36. Pyo, S.H., Park, H.B., Hong, S.S., Kim, J.H., Removal of Endotoxin in the Purification of Histone H1.5 from *Escherichia coli*, *Biotechnology Letters*, 23(9), 737-740 (2001).
37. R. M. Tuebaeva, D. M. Graifer, N. B. Matasova, O. S. Fedorova, V. B. Odintsov, N. A. Aitkhozhina, G. G. Karpova, Selective inhibition of the polypeptide chain elongation in eukaryotic cells, *Biochim. Biophys. Acta* 1129, (1992), 177-182.
38. Rowinsky, E. K., L. A. Cazenave, and R. C. Donehower (1990), Review ; Taxol : A Novel Investigational Antimicrotubule Agent, *J. of the National Cancer Institute*. 82, 1247-1257.
39. S. H. Pyo, S. S. Hong, J. H. Kim, A new large-scale pre-purification for peroxiase from plant cell cultures, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, (2000), 342-345.
40. S. I. Kim, H. K. Choi, J. Y. Song, J. H. Kim, H. S. Lee, and S. S. Hong, Analysis of Alkaloid Contents in Korean Plumyew [*Cephalotaxus koreana*]: Variation with Location and Season, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 15, (2000), 434-437.
41. Stull, D. P., T. A. Scales, R. Daughenbaugh, N. A. Jans, and D. T. Bailey(1995), Taxol (Paclitaxel); Strategies to Increase the Supply of a New Anticancer Drug, *Appl. Biochem. Biotech.* 54, 133-140.
42. Van Gelderen D. M., Conifers, Helm, London, (1986).
43. Wiseman, Billy R., and James E. Carpenter. 1997. Dogwood, Hydrangea chemical foil key crop pests. *Agricultural Research*. July p.22.
44. Y. I. Park, 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 plumyew (*Cephalotaxus koreana*), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 11, (1996), 689-695.
45. Zhou, D. C., R. Zittoun, J. P. Marie, Homoharringtonine: an effective new natural product in cancer chemotherapy, *Bull. Cancer*, 82, (1995), 987-995.

46. 이창복 1993 신고 수목학 5th. pp195-205 향문사. 서울
47. 산림청 입업연구원 1992. 韓國樹木圖鑑 4th. pp165-174

주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.