

## 일일초 잎과 모상근으로부터 추출한 Vindoline과 Catharanthine의 화학결합에 의한 Vinblastine 생산

곽 상 수 · 정 경 희 · 유 장 렬 · 박 상 우\* · 이 혼\*  
한국과학기술연구원 유전공학연구소 식물세포생물학연구실  
\*한국과학기술원 화학공학과

### Production of Vinblastine by Chemical Coupling of Vindoline Extracted from Cultivated Plants and Catharanthine from Hairy Root Cultures in *Vinca*(*Catharanthus roseus*)

Sang Soo Kwak, Kyung Hee Jung, Jang Ryol Liu, Sang Woo Park\* and Huen Lee\*

Plant Cell Biology Lab., Genetic Engineering Research Institute, KIST,  
P. O. Box 17, Taedok Science Town, Taejon, 305-606 Korea

\*Department of Chemical Engineering, KIST, 373-1, Kusung-dong,  
Yusung-gu, Taejon, 305-701 Korea

#### ABSTRACT

Vinblastine, an anticancer agent was produced by chemical coupling of two different monomeric indole alkaloids, vindoline and catharanthine in the presence of ferric ion. Vindoline was efficiently extracted from the leaves of *vinca*(*Catharanthus roseus*) by using supercritical carbon dioxide, whereas catharanthine was chemically extracted from the *in vitro* cultured hairy roots. The extracted crude monomeric precursors were purified by a two-step preparative TLC. The coupling reaction was carried out in the 0.1M glycine buffer (pH 2.0, 5ml) containing 40mM FeCl<sub>3</sub> with purified vindoline(0.3mg) and catharanthine(0.3mg) at 4°C. The production yields(weight %) of vinblastine and 3', 4'- anhydrovinblastine in the products were 23.2 and 26.0, respectively. The produced vinblastine was confirmed by FAB-MS.

#### 서 론

일일초(*Catharanthus roseus*)에 함유되어 있는 많은 indole alkaloid 중, 특히 상업적으로 중요한 것은 급성백혈병과 악성임파종양 등의 치료에 사용되는 vinblastine과 vincristine이다(1). 이들은 현재 식물체에서 대량추출하여 공급되어지고 있으나 식물체내의 농도가 건물중의 0.0003%로 매우 낮고 추출

물중의 구성이 매우 다양하여 이들을 식물체로부터 직접 추출하는 공정은 간단하지 않을 뿐 아니라 비용도 많이 든다. 또한 이들은 복잡한 화학구조를 가지고 있어 화학합성도 용이하지 않다. 식물조직배양에 의한 생산방법도 많이 연구되고 있으나 아직 경제적으로 대량생산하는 단계에는 이르지 못하고 있다.

이렇게 vinblastine과 vincristine의 합리적인 생산 방법으로는 이들의 전구물질인 vindoline과 cath-

aranthine를 각각 대량생산한 후, 이들을 효소학적 또는 화학적방법으로 결합하여 생산하는 방법이 제시되고 있다(Fig. 1)(2, 3, 4). 이량체 indole alkaloid의 수율과 결합반응의 난이도를 고려할 때 화학적 결합이 효소학적 결합보다 유리하다. 두 전구물질 중 vindoline은 식물체내의 함량이 건물중의 0.12%로 비교적 높으며 초임계 이산화탄소에 대해 높은 선택성을 나타내므로 식물체 잎으로부터 효율적인 추출이 가능하다(5, 6, 7). 한편 catharanthine은 식물체내 함량이 0.003%로 낮아 세포배양에 의한 생산연구가 많이 시도되어 모상근(hairy root) 및 현탁배양세포로부터 선발한 catharanthine 고생산 세포주를 이용하여 생산이 가능하다(8, 9).

따라서 본 연구에서는 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 vindoline과 모상근 배양으로부터 생산된 catharanthine을 사용하여 3가 철이온을 촉매로 한 화학결합반응으로 vinblastine 생산에 관한 기초실험을 수행하였다.

재료 및 방법

TLC에 의한 전구물질의 정제

화학결합에 사용한 전구물질 vindoline과 catharanthine은 저자들에 의해 확립된 생산법으로 생산하여 사용하였다(7, 9). 일일초잎으로부터 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 vindoline 분획과 일일초 모상근으로부터 유기용매로 추출한 catharanthine 분획을 각각 TLC(Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 0.2×200×200mm, Merck)를 사용하여 2단계로 정제하였다. 1단계 정제로 추출액을 TLC plate에 충전 후 100% methanol로 indole alkaloid를 전개하여 전구물

질을 함유한 분획을 분취하였다. 1차 정제물질을 새로운 TLC plate에 충전한 후 전개액으로 BAW(n-butanol : acetic acid : water, 4 : 1 : 1)혼합액을 사용하여 정제하였다. 각 단계에서 전개가 끝난 후 CAS (ceric ammonium sulfate)시약으로 발색시켜 전구물질의 전개 여부 및 TLC plate상의 전개위치(R<sub>f</sub>) 등을 확인하였다(10). 각 정제단계 전후에 정제효율 및 수율을 계산하기 위하여 각 시료 중 일부를 취해 HPLC로 정량분석하였다. HPLC분석은 Jung 등(8)의 방법에 따라 ODS 컬럼( $\mu$ -Bondapack C<sub>18</sub> column, 30×0.39 cm)을 사용한 역상 크로마토그래피로 하였다.

Vindoline과 catharanthine의 화학결합

Vindoline과 catharanthine의 화학반응은 Vukovic등(11)의 방법에 준하여 수행하였다. 표준반응은 4℃에서 충분히 냉각한 0.1M glycine 완충액(pH 2.0) 5ml에 정제한 vindoline과 catharanthine을 각각 0.3mg씩 넣고 염화제 2철(FeCl<sub>3</sub>)의 농도가 40mM이 되도록 1.2M FeCl<sub>3</sub>용액을 첨가한 후, 4℃에서 2시간동안 행하였다. 반응 후, 반응액에 sodium borohydride(NaBH<sub>4</sub>)를 mol 과량 첨가하고 pH가 약 10이 되도록 14M 암모니아수 0.1ml를 넣어 반응을 정지시켰다. 또한 초임계 이산화탄소에 의해 추출된 crude vindoline 추출액(순도 50%)과 모상근으로부터 추출, 정제한 catharanthine을 사용한 실험에서도 같은 방법으로 반응시켰다.

생성물의 분석

화학결합반응에 의해 생성된 이량체 indole alkaloid를 ethyl acetate 5ml로 3회 추출한 후, 유

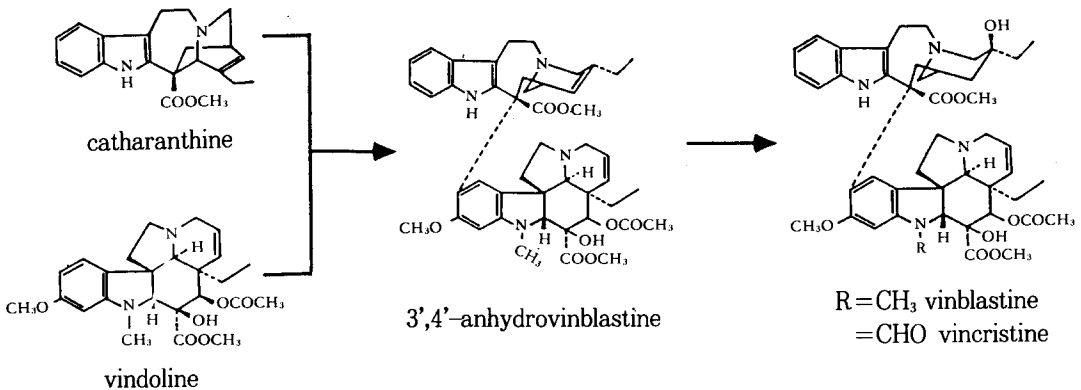


Fig. 1. The biosynthesis of dimeric indole alkaloids from catharanthine and vindoline in vinca(*Catharanthus roseus*).

기용매를 감압하에서 증발시키고 소량의 methanol로 시료를 녹여 생성물을 HPLC로 분석하였다. 추출 및 분석에는 HPLC 등급 시약을 사용하였다. HPLC 분석은 Jung 등(8)의 방법에 따라 ODS 컬럼을 사용한 역상크로마토그래피로 하였다. 반응물 중의 이량체 indole alkaloid의 생성율은 전체반응물에 대한 무게비율로 표시하였다. Vinblastine의 최종 정성분석은 FAB-MS(JEOL JMS-DX 303 Mass spectrometer)로 하였다. FAB-MS 분석은 한국화학연구소 분석실에 의뢰하였으며, 측정조건은 glycerol과 argon을 각각 matrix와 gas로 사용하고 gun voltage는 2kV였고, emission current는 10mA였다.

## 결과 및 고찰

### TLC에 의한 전구물질의 정제

정제하기 전 일일초 앞에서 추출한 vindoline 추출액에 포함된 vindoline의 함량은 50%이었으나 1단계와 2단계 TLC 정제 후에는 각각 60%와 97%로 거의 순수하게 정제되었으며, 정제수율은 94%로 높았다. 일일초 모상근으로부터 유기용매 추출에 의한 crude indole alkaloid 추출물질에 포함된 catharanthine 함량은 7~8%로 낮았으나 1, 2단계 TLC정제 후에는 각각 37%와 85%까지 되었으며 수율은 55%였다. 정제된 vindoline과 catharanthine은 MS로 구조가 확인되었다(5, 9). Vindoline에 비해 catharanthine의 정제도 및 정제수율이 낮은 것은 일일초 모상근으로부터 유기용매추출에 의한 crude indole alkaloid 추출물질 중의 catharanthine 함량이 낮기 때문이라 여겨진다.

### 화학결합 및 생성물의 분석

정제된 전구물질 vindoline과 catharanthine을 40mM 3가 철이온 농도에서 2시간 반응시킨 결과 효과적으로 이량체 indole alkaloid가 생성되었다. 반응 생성물을 HPLC로 분석한 결과, 확인된 주요 생성물은 vinblastine(retention time, 18.2 min)과 3', 4'-anhydrovinblastine(21.3min)이었다. 반응액 중에는 이량체로 여겨지는 미확인 반응물(19.7 min)과 사용한 기질 vindoline(8.5 min)과 catharanthine(13.8min)도 일부 남아 있었다(Fig. 2). 전체 생성물 중 vinblastine과 3', 4'-anhydrovinblastine의 비율(무게 %)은 23.2와 26.0였다. 화학결합으로 생성된 vinblastine을 분취한 후 FAB-

MS로 분석한 결과, vinblastine의 강한 분자량 이온(M+1, 812)피크를 나타내어 생성물이 vinblastine임이 확인되었다.

초임계 이산화탄소에 의해 추출된 crude vindoline 추출액(순도 50%)을 정제하지 않고 정제된 catharanthine과 같은 방법으로 화학반응을 시켰을 때 생성물의 조성이 약간 복잡하였으나 이량체의 수율은 정제된 vindoline을 사용하였을 경우와 거의 같았다. 그러나 두 전구물질을 정제하지 않고 화합반응에 사용하였을 때는 생성물을 확인할 수 없을 정도로 HPLC chromatogram이 복잡하였으므로(결과는 제시되지 않았음) 모상근에서 생성된 catharanthine은 미리 정제하여 사용할 필요가 있다. 이상의 결과는 전구물질을 완전히 정제하지 않고 TLC로 부분정제한 것을 화학결합에 이용한 후

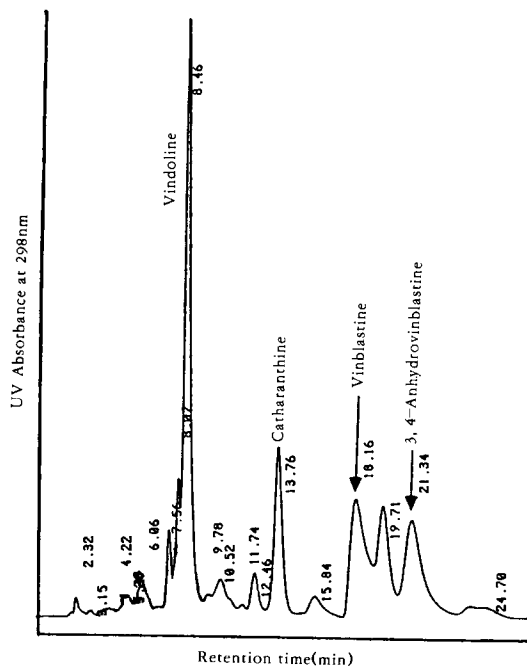


Fig. 2. HPLC chromatogram of products formed from chemical coupling reaction of catharanthine and vindoline. Products were injected onto a reversed phase column,  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(3.9×30cm). The solvent mixture of methanol, acetonitrile, and 5mM diammonium hydrogen phosphate(pH 7.3, 3/4/3 by vol) was eluted at a flow rate of 1ml/min.

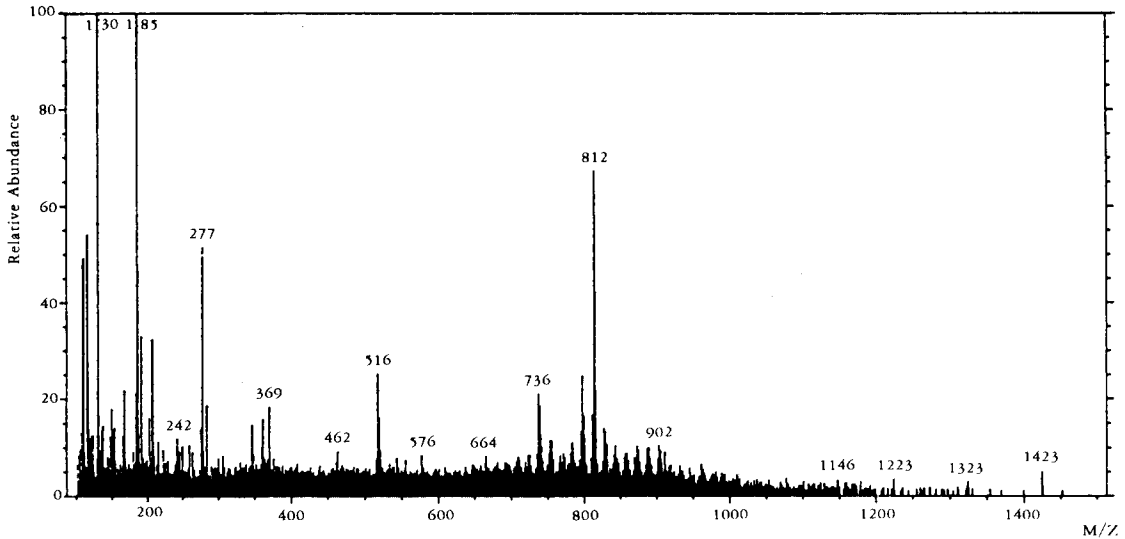


Fig. 3. FAB-MS spectrum of vinblastine formed from chemical coupling reaction of catharanthine and vindoline.

최종적으로 생성물질중의 vinblastine을 정제하는 것이 효율적임을 시사한다.

추후 화학결합으로 보다 높은 수율의 vinblastine 생산을 위해서 반응조건을 적정화하여야 할 것이다. 이량체 indole alkaloid 생산을 위한 전구물질 중 vindoline의 생산은 저자들이 확립한 초임계 이산화탄소를 사용한 유체추출법으로 가능하며, 이때 얻어지는 vindoline추출액은 화학반응에 직접 이용될 수 있다. 적정추출조건에서 추출액중의 최고 vindoline 함량은 58%였다(7). 현재 일일초 모상근 배양으로 catharanthine을 고생산하는 클론을 선발하여 배지 조성 등 배양조건의 적정화 연구가 수행되고 있다. 따라서 모상근의 대량배양과 추출공정의 확립으로 경제적인 catharanthine 공급이 이루어지면 화학결합을 통한 vinblastine의 효율적인 생산이 기대된다.

## 요 약

일일초 잎으로부터 초임계 이산화탄소로 추출된 vindoline과 모상근 배양에 의해 생성된 catharanthine을 3가철 이온을 촉매로하여 결합시킴으로써 이량체 항암물질인 vinblastine이 생산되었다. 전구물질 vindoline과 catharanthine은 조추출물로부터 2단계 TLC에 의해 효과적으로 정제할 수 있었다. 화학

결합반응은 0.1M glycine완충액(pH 2.0) 5ml에 전구물질 각 0.3mg과 염화제2철 40mM(최종농도)을 첨가하여 4°C에서 2시간동안 행하였다. 화학결합에 의한 생성물중 vinblastine 및 3', 4'-anhydrovinblastine의 생성비율(무게 %)은 각각 23.2와 26.0였다. 생성물중 vinblastine의 구조는 FAB-MS로 확인되었다.

## 감 사

본 논문은 과학기술처 첨단연구개발과제의 연구결과(BSG70320-427-4)이다.

## 참고문헌

1. M. Lounasmaa and J. Galambos(1989). *Forsch. Chem. Org. Naturst.*, **55**, 89.
2. Y. Fujita, Y. Hara, T. Morimoto and M. Misawa(1990), *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, Kluwer Academic Publishers Dordrecht, 783.
3. A. E. Goodbody, T. Endo, J. Vukovic, J. P. Kutney, Lewis S. L. Choi and M. Misawa (1987), *Planta. Medical.*, **196**, 136.
4. T. Endo, A. Goodbody, J. Vukovic and M. Misawa (1987). *Phytochemistry*, **27**, 3233.

5. H. Lee, W. H. Hong, J. H. Yoon, K. M. Song, S. S. Kwak and J. R. Liu (1992), *Biotech. Tech.* **6**(2), 127.
6. 송규민, 박상우, 이훈, 홍원희, 광상수, 유장열 (1991), *한국생물공학회지*, **6**(4), 407.
7. K. M. Song, S. W. Park, W. H. Hong, H. Lee, S. S. Kwak and J. R. Liu (1993), *Biotech Prog.*, (in press).
8. K. H. Jung, S. S. Kwak, S. W. Kim, C. Y. Choi, G. S. Heo and J. R. Liu (1992) *Biotechnol. Tech.* **6**(4), 305.
9. K. H. Jung, S. S. Kwak, S. W. Kim H. Lee, C. Y. Chio and J. R. Liu (1982), *Biotechnol. Letters*, **18**(8), 695.
10. N. R. Fransworth and I. M. Hilinski (1965), *J. Chromatog.*, **18**, 184.
11. John Vukouivc and A. E. Goodbody (1988), *United States Patent*, 4, 778, 885.