

식물세포 *Taxus chinensis* 배양으로부터 신물질 13-Deacetyl-taxchinin I 의 분리 및 동정

*김진현·기은숙·¹유시용·최형균·홍승서·이현수
(주)삼양제넥스 생명공학연구소, ¹한국화학연구소
(접수 : 2000. 8. 2., 게재승인 : 2000. 9. 28.)

Isolation and Identification of 13-Deacetyl-taxchinin I, a New Taxoid from Plant Cell Cultures of *Taxus chinensis*

Jin-Hyun Kim*, Un-Sook Gi, Shi-Yong Ryu¹, Hyung-Kyoon Choi, Seung-Suh Hong, and Hyun-Soo Lee
Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea
¹Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejeon 305-600, Korea
(Received : 2000. 8. 2., Accepted : 2000. 9. 28.)

13-Deacetyl-taxchinin I, a taxoid having a rearranged 11(15→1)-abeo-taxane skeleton, has been isolated and identified from plant cell cultures of *Taxus chinensis*. The compound has not previously been encountered in nature. Its structure was elucidated by 1- and 2D NMR techniques including H-H COSY, HMQC, and HMBC experiments. This taxoid also provides information for better understanding of structure-activity relationships and biosynthesis, as well as improving the quality control of paclitaxel production.

Key Words : plant cell culture, *Taxus chinensis*, 13-deacetyl-taxchinin I, isolation, identification

서론

Paclitaxel(Taxol)은 1992년 난소암에 대해 FDA허가를 취득하였으며 1994년 유방암에 대해 FDA 허가를 취득하여 현재 가장 중요한 항암제로 사용되고 있다. Paclitaxel은 복잡하고 독특한 구조를 갖고 있을 뿐 아니라 매우 새로운 방식의 항암기작 때문에 많은 사람들의 관심을 받아 왔다(1). Paclitaxel 공급 방법은 다양하지만 주목으로부터 직접 추출하지 않고 대량으로 공급할 수 있는 대체 방안으로 크게 유기합성과 식물세포 배양에 의한 paclitaxel 생산으로 나눌 수 있다(2). Paclitaxel 구조가 복잡하고 분자량 (MW=853)이 크기 때문에 전합성(total synthesis)은 가능하지만 많은 반응과정을 거쳐야 하는 등 어려움이 따르고 있으며 현재 실용화되고 있는 합성 방법에는 주목 외에 존재하는 paclitaxel 전구체인 10-deacetylbaocatin III에 paclitaxel side chain을 화학 결합시켜 paclitaxel을 반합성(semisynthesis)하는 공정이 있다. 식물세포 배양에 의한 생산방법은 다른 방법에 비해 많은 장점을 가지고 있다. 장소와 시간에 제한되지 않고 일정한 결과량을 대량으로 생산 가능하며 특히 환경의 영향을 받지 않고 원

료의 공급과 수확시기 등의 제한 없이 지속적인 생산이 가능하므로 공급부족이나 생태계 파괴와 같은 문제가 없다. 또한 식물세포배양에 의한 paclitaxel 대량생산을 통하여 활성 또는 구조면에서 새로운 유용성분의 제공 뿐만 아니라 paclitaxel 반합성에 필요한 전구체나 유도체 제공도 가능하다.

본 연구에서는 식물세포인 *Taxus chinensis* 대량 배양액으로부터 신물질인 13-deacetyl-taxchinin I의 분리 및 동정에 그 목적이 있으며 이러한 연구는 결국 paclitaxel 이외의 새로운 유용성분, 유도체 또는 전구체의 개발에 유용하게 사용되어 진다.

재료 및 방법

Taxus 식물세포 배양

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주를 이용하여 3000 L 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다(3). 배양액으로부터 식물세포 회수를 위하여 테칸터(Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)를 이용하였으며, 식물세포 조각 회수를 위하여 고속 원심분리기(α -Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)를 사용하였다.

Paclitaxel 함량 분석

HPLC(Waters) 분석 방법에 의하여 paclitaxel과 taxane derivative 함량을 분석하였으며(4) 모든 sample은 3개씩 취하여 분석 후

†Corresponding Author : Samyang Genex Biotech Research Institute, 63-2 Hwaam-Dong, Yusung-Gu, Taejeon 305-348, Korea
Tel : +82-42-865-8392, Fax : +82-42-865-8399
E-mail : jhkim@genex.co.kr

평균값을 취하였다. 채취한 발효배양액 2 mL에 internal standard 용액 100 μ L (6.25 mg N-propyl paraben/5 mL methanol), CPC 용액 200 μ L (10 g cetyl pyridinium chloride/100 mL distilled water), methyl t-butyl ether 2.5 mL를 첨가하고 24시간 교반하였다. 교반 후 상등액을 취하여 amino propyl SPE cartridges (Alltech, Cat. #211025)를 통과시킨 후 methyl t-butyl ether/methanol (85/15, v/v) 용액 3 mL로 세척하고 여액을 건조한 후에 0.5 mL methanol에 녹여 분석하였다. 또한 분리/정제 과정에서 건조물은 0.5 mL methanol에 직접 녹여 분석하였다. 분석에 사용한 column은 Capcell Pak C₁₈ UG 120 (250 mm X 4.6 mm), column 온도는 40°C, 이동상은 CH₃CN/Water (20-100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, sample 주입량은 10 μ L 이며, 측정은 227nm에서 detector를 사용하였다. Paclitaxel 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

단성분의 분리 및 정제

세포배양액으로부터 회수한 식물세포를 methanol(MeOH)추출하여 얻은 건조물 7 g을 취하여 methylene chloride(CH₂Cl₂) 70 mL에 녹인 후 silica gel column에 loading하고 CH₂Cl₂ 300 mL (fraction 1)와 CH₂Cl₂ : MeOH 99:1(v/v) 혼합용액 300 mL (fraction 2)로 elution하였다. 다음으로 CH₂Cl₂:MeOH 98:2(v/v) 혼합용액 500 mL로 용출하여 fraction 3으로 명명하고 재차 CH₂Cl₂:MeOH 90:10(v/v) 500 mL로 washing한 분획을 fraction 4로 하였다.

화학구조 분석 및 동정

분리/정제된 taxane derivative는 NMR, MS 등을 사용하여 화학구조를 분석하였다. NMR 실험을 위해서는 Bruker, AM-300, AMX-500 (Germany)를 사용하였으며, 시료 수 mg을 CDCl₃용매에 녹여 ¹H, ¹³C NMR 실험 및 DEPT, COSY, HETCOR 등의 실험을 통하여 각 성분의 분자구조를 분석하였다. 분자구조가 추정된 화합물의 대해서는 FAB mass spectrometry로 분자량을 확인하였는데 AMD Intecra (Harpstedt, Germany)를 사용하였다. Source temperature, 69°C; accelerating voltage, 6kV; scan range, m/z 100-1000; scan rate, 35 s/cycle; resolution, 1000의 조건 하에서 Cs⁺ 이온을 분자 이온 source로 사용하였다.

결과 및 고찰

13-Deacetyl-taxchinin I의 분리

Fraction 1-4를 각각 TLC로 확인하여 본 결과 13-deacetyl-taxchinin I은 모두 fraction 3으로 이행되어 있음을 알 수 있었다. 13-Deacetyl-taxchinin I의 silica gel plate (silica gel 60 F₂₅₄ Cat. No. 10575, Merck) 상에서의 R_f치는 약 0.18 (전개용매: CH₂Cl₂/MeOH 95/5, v/v)인데 반하여 paclitaxel의 R_f치는 약 0.20로서 1차 전개만으로는 이들 두 물질을 서로 분리하기 어려웠으나 2-3번 TLC를 반복 전개하면 이들 두 물질을 확연하게 서로 분리할 수 있었다. 또 전개가 완료된 TLC plate를 10% H₂SO₄ spray 후 hot plate 상에서 가열하면 13-deacetyl-taxchinin I의 spot는 짙은 청자색을 나타내는 반면 paclitaxel의 spot는 옅은 밤색을 나타내어 쉽게 구별 가능하였다. 한편 13-deacetyl-taxchinin I 및 paclitaxel의 octadecylsila (ODS) silica gel plate (RP-18

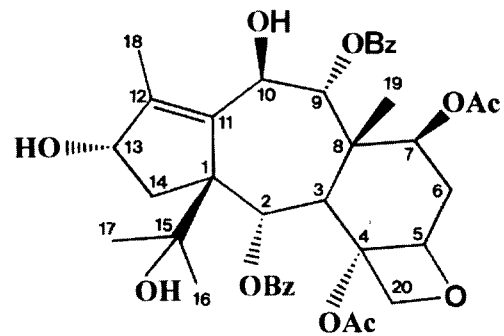


Figure 1. Chemical structure of 13-deacetyl-taxchinin I.

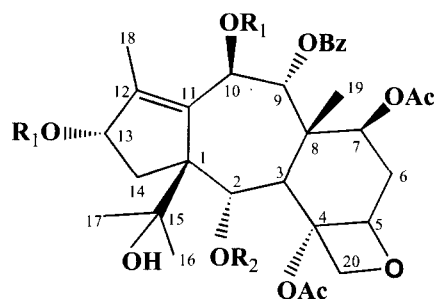
F₂₅₄ Cat. No. 115389, Merck) 상에서의 R_f치는 각각 0.22, 0.20 (전개용매: 70% MeOH)이고 TLC plate를 세 차례 반복 전개할 경우 이들 두 물질은 서로 구별되었다. Fraction 3을 50% MeOH에 녹여 ODS gel column에 loading하고 50% MeOH (fraction 31), 60% MeOH (fraction 32), 70% MeOH (fraction 33), 100% MeOH (fraction 34) 각 200 mL에 순차적으로 elution한 다음 이들 분획 (fraction 31-34)을 각각 HPLC로 분석하였다. HPLC 분석 결과 fraction 32 (320 mg) 및 fraction 33 (360 mg)이 각각 13-deacetyl-taxchinin I를 11% 및 41%씩 함유하고 있음을 알 수 있었다. Fraction 33을 Hexane/EtOAc 2/1 전개용매로 하여 두 차례 silica gel column chromatography를 반복하여 약 100 mg의 13-deacetyl-taxchinin I을 백상 침상결정 형태로 얻었다.

13-Deacetyl-taxchinin I의 화학구조 분석

13-Deacetyl-taxchinin I (Figure 1)은 용점 216°C의 colorless needle crystal로서 FAB mass spectrometry로 분자량을 확인한 결과, 분자량은 692 (C₃₈H₄₄O₁₂)로 확인할 수 있었으며, CDCl₃에 녹여 ¹H-NMR (Figure 2)과 ¹³C-NMR (Figure 3)을 측정한 결과 ¹H-NMR 상의 모든 proton signal들은 11(151)-abeo-taxane계 화합물들의 ¹H-NMR에서 관찰되는 전형적인 broadened splitting pattern을 보였다. 따라서 13-deacetyl-taxchinin I의 ¹H-NMR, ¹³C-NMR, DEPT, H-H COSY, HMQC, HMBC 등 각종 spectral data를 토대로 하여 관련 11(151)-abeo-taxane계 화합물들(Figure 4)의 spectral data를 비교 분석한 결과, 13-deacetyl-taxchinin I은 아직까지 보고된 바 없는 신물질로 판명되었다.

13-Deacetyl-taxchinin I acetate의 합성 및 화학구조분석

13-Deacetyl-taxchinin I의 화학구조해석을 검증 하고자 13-deacetyl-taxchinin I을 일부 취하여 acetylation을 시켜 13-deacetyl-taxchinin I acetate를 조제하였다. 즉 13-deacetyl-taxchinin I 25 mg을 pyridine에 녹이고 Ac₂O를 가하여 상온에서 12시간 방치한 후 반응액을 과잉의 물에 현탁시키고 EtOAc로 추출하였다. EtOAc 층을 농축하고 silica gel column chromatography (용매: Hexane/EtOAc 4/1)를 실시하고 정제하여 20 mg의 13-deacetyl-taxchinin I acetate를 얻었다. 13-Deacetyl-taxchinin I acetate을 CDCl₃에 녹여 ¹H-NMR (Figure 2) 및 ¹³C-NMR (Figure 3)을 측정하고 관련 11(151)-abeo-taxane계 화합물들 (Figure 4)의 spectral data를 비교 분석한 결과, taxchinin I의 acetate의 그것과 정확하게 일치함을 알 수 있었다.

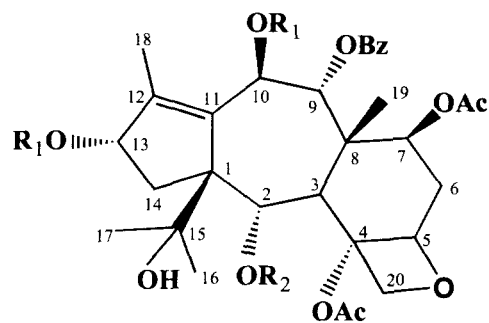


7 : R₁ = -H, R₂ = -Bz
13-deacetyl taxchinin I

7' : R₁ = -Ac, R₂ = -Bz
taxchinin I acetate

Position	7	7'	(taxchinin I acetate)
1			
2	6.27 (d, 7.5)	6.45 (d, 7.5)	6.45 (d, 8.1)
3	3.27 (d, 7.5)	3.10 (d, 7.5)	3.10 (d, 7.7)
4			
5	4.90 (d, 7.2)	4.94 (d, 7.2)	4.96 (d, 7.2)
6	2.60, 1.80 (each m, 15.4, 8.3 Hz)	2.69, 1.80 (each m, 15.4, 8.3 Hz)	2.69, 1.91 (each m, 15.4, 8.3 Hz)
7	5.48 (t, 6.5)	5.59 (t, 6.5)	5.60 (t, 7.9)
8			
9	6.06 (d, 10.2)	6.40 (d, 10.2)	6.42 (d, 11.0)
10	4.75 (d, 10.2)	6.50 (d, 10.2)	6.52 (d, 11.0)
11			
12			
13	4.53 (t, 7.5)	5.72 (t, 7.5)	5.72 (t, 7.4)
14	2.30, 1.75 (each m, 14, 7.5 Hz)	2.41, 1.93 (each m, 14, 7.5 Hz)	2.41, 2.00 (each m, 15, 7.5 Hz)
15			
16	0.97 (s)	1.16 (s)	1.16 (s)
17	1.17 (s)	1.16 (s)	1.16 (s)
18	1.89 (s)	1.94 (s)	1.91 (s)
19	1.80 (s)	1.83 (s)	1.85 (s)
20	4.50, 4.10 (each d, 7.5 Hz)	4.49, 4.16 (each d, 7.5 Hz)	4.50, 4.19 (each d, 7.7 Hz)
4-Ac (Me)	2.21 (s)	2.17 (s)	2.20 (s)
7-Ac (Me)	1.77 (s)	1.83 (s)	1.85 (s)
4-Ac (C=O)			
7-Ac (C=O)			
Bz (C=O)			
Bz (C=O)			
Ac (Me)		2.17 (s), 1.65(s)	2.20 (s), 1.67(s)
15-OH		2.52 (s)	2.59 (s)

Figure 2. ¹H-NMR results of 13-deacetyl-taxchinin I, 13-deacetyl-taxchinin I acetate and taxchinin I acetate.

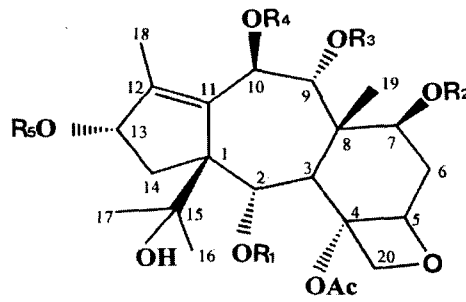


7 : R₁ = -H, R₂ = -Bz
13-deacetyl taxchinin I

7' : R₁ = -Ac, R₂ = -Bz
taxchinin I acetate

Position	7	7'
1	67.08	67.99
2	66.79	67.98
3	43.85	44.26
4	79.35	78.94
5	85.01	84.66
6	34.64	34.73
7	70.33	70.50
8	43.53	43.76
9	80.93	77.41
10	68.90	68.46
11	137.83	136.12
12	146.00	147.05
13	77.40	78.61
14	39.32	36.74
15	76.18	75.49
16	25.35	25.12
17	27.42	27.58
18	11.16	11.76
19	13.65	13.25
20	74.80	74.49
4-Ac (Me)	22.27	21.92
7-Ac (Me)	21.70	21.66
4-Ac (C=O)	171.13	170.61
7-Ac (C=O)	170.49	170.00
Bz (C=O)	167.77	166.29
Bz (C=O)	165.87	165.67
Ac (Me)		21.08,20.53
Ac (C=O)		168.92,168.01

Figure 3. ¹³C-NMR results of 13-deacetyl-taxchinin I, 13-deacetyl-taxchinin I acetate and taxchinin I acetate.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	References
taxayuntin	-Ac	-Ac	-Ac	-Bz	-H	(5)
taxayuntin A	-Bz	-Bz	-H	-H	-H	(5)
taxayuntin B	-Ac	-Bz	-H	-H	-H	(5)
taxayuntin C	-Bz	-Ac	-Ac	-Bz	-Ac	(5-6)
taxayuntin D	-Bz	-Ac	-Bz	-Bz	-Ac	(5)
taxayuntin E	-Bz	-Ac	-Ac	-H	-H	(7)
taxayuntin F	-Ac	-Ac	-Bz	-H	-H	(7)
taxchinin B	-Ac	-Ac	-Ac	-Bz	-Cinn	(8)
taxchinin C	-Bz	-Ac	-Bz	-Bz	-Ac	(8)
taxchinin I	-Bz	-Ac	-Bz	-H	-Ac	(9)
taxchinin I Ac	-Bz	-Ac	-Bz	-Ac	-Ac	(9)
taxchinin J	-Ac	-Ac	-Bz	-H	-Cinn	(9)
taxchinin K	-Ac	-Ac	-Bz	-Bz	-Ac	(9)
taxchinin L	-Ac	-Ac	-Bz	-H	-H	(10)
taxchinin M	-Ac	-Ac	-Bz	-H	-Ac	(10)
deacetylabeobaccatin IV	-Ac	-Ac	-Ac	-H	-H	(11)
	-Bz	-H	-H	-H	-H	(12)
	-Ac	-Ac	-Ac	-Bz	-H	(13)
	-Ac	-Ac	-Ac	-Bz	-H	(14)
	-Ac	-Ac	-Ac	-Bz	-Ac	(14)
13-deacetyl-taxchinin I	-Bz	-Ac	-Bz	-H	-H	
13-deacetyl-taxchinin I acetate	-Bz	-Ac	-Bz	-Ac	-Ac	

Figure 4. Chemicals of 11(15→1)-abeo-taxane.

요 약

식물세포 *Taxus chinensis* 배양을 통하여 항암 활성 물질인 paclitaxel 외에 여러가지의 유도체가 생산된다. 이들 유도체 중에서 13-deacetyl-taxchinin I를 순수 분리하여 각종 spectral data를 근거로 하여 화학구조를 규명한 결과, 13-deacetyl-taxchinin I는 아직까지 보고된바 없는 신물질로 판명 되었다. 또한 이러한 연구 결과는 paclitaxel 이외의 새로운 유용성분, 유도체 또는 전구체의 개발 뿐만 아니라 품질관리에도 유용하게 사용되어 진다.

REFERENCES

1. 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.
2. 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.
3. Choi, H. K., T. L. Adams, R. W. Stahlhut, S. I. Kim, J. H. Yun, B. K. Song, J. H. Kim, S. S. Hong, and H. S. Lee (1999), Method for Mass Production of Taxol by Semi-Continuous Culture with *Taxus chinensis* Cell Culture, U.S. Patent, 5,871,979.
4. Hong, S. S., B. K. Song, J. H. Kim, C. B. Lim, H. S. Lee, K. W. Kim, I. S. Kang, and H. B. Park (1999), Method for Purifying Taxol from *Taxus* Biomass, U.S. Patent, 5,900,979.
5. 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.
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. Yue, Q., Q. C. Fang, X. T. Liang, and C. H. He (1995), Taxayuntin E and F : Two Taxanes from Leaves and Stems of *Taxus yunnanensis*, *Phytochem.* **39**, 871-873.
 8. Fuji, K., K. Tanaka, B. Li, T. Shingu, H. Sun, and T. Taga (1993), Novel Diterpenoids from *Taxus chinensis*, *J. Nat. Prod.* **56**, 1520-1531.
 9. Fuji, K., K. Tanaka, B. Li, T. Shingu, T. Yokoi, H. Sun, and T. Taga (1995), Structures of Nine New Diterpenoids from *Taxus chinensis*, *Tetrahedron*, **51**, 10175-10188.
 10. Tanaka, K., K. Fuji, T. Yokoi, T. Shingu, B. Li, and H. Sun (1996), Structures of Taxchinins L and M, Two New Diterpenoids from *Taxus chinensis* var. *Mairei*, *Ch.Ph.Bull.* **44**, 1770-1774.
 11. Chattopadhyay, S. K., R. P. Sharma, G. Appendino, and P. Gariboldi (1995), A Rearranged Taxane from the Himalayan Yew, *Phytochem.* **39**, 869-870.
 12. Chen, R. and D. G. I. Kingston (1994), Isolation and Structure Elucidation of New Taxoids from *Taxus brevifolia*, *J. Nat. Prod.* **57**, 1017-1021.
 13. Zhang, S., C. T. L. Lee, Y. Kashiwada, K. Chen, D. C. Zhang, and K. H. Lee (1994), Yunantaxusin A, a New 11(151)-Abeo-Taxane from *Taxus yunnanensis*, *J. Nat. Prod.* **57**, 1580-1583.
 14. Das, B., S. P. Rao, K. V. N. S. Srinivas, J. S. Yadav, and R. Das (1995), A Taxoid from Needles of Himalayan *Taxus Baccata*, *Phytochem.* **38**, 671-674.