

## 제주도 주목(*Taxus cuspidata* S. et Z.)의 Taxol 및 Cephalomannine의 함량분석

곽상수 · 최명석\* · 박용구\* · 고경수\* · 유장렬  
KIST 생명공학연구소 생물자원연구그룹 · \*경북대학교 임학과  
\*\*(주)한국신약 개발연구실

### Analysis of Taxol and Cephalomannine in Cheju Island Yew (*Taxus cuspidata* S. et Z.)

Sang-Soo Kwak, Myung-Suk Choi\*, Kyung-Soo Ko\*\*, Young-Goo Park\*,  
and Jang Ryol Liu

Bioresources Research Group, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST,  
Yusong P.O.Box 115, Taejeon, 305-600, Korea

\*Department of Forestry, Kyungpook National University, Taegu, 702-701 Korea

\*\*Development & Research Team, Hankook Shin Yak Pharm. Co., LTD.

Kwan Jeo-dong, Seo-Ku, Taejeon, 302-243 Korea

**Abstract**—To seek for a stable supply source of taxol as an anticancer agent urgently needed for the treatment of ovarian cancer, the concentrations of taxol and cephalomannine in bark and needles of 37 yew (*Taxus cuspidata* S. et Z.) trees grown in 6 locations of Cheju Island were analyzed by using HPLC. A considerable variation in the content was observed in plant part and the location. The average taxol content in the needles ( $220.3 \pm 56 \mu\text{g}$  per g dry wt) was ca. 4 times higher than that in the bark, whereas the content of cephalomannine in the needles ( $353 \pm 141 \mu\text{g}$ ) was ca. 5 times higher than that in the bark. Particularly, even within Cheju Island, needles from trees grown near the coast including Sogwipo area contained much higher taxol contents than needles from trees grown at mountain locations, indicating that taxane level is affected by environmental effects. Taxol in the needles was confirmed by electrospray mass spectrometry. These results suggest that the needles of yew trees growing in Cheju Island may provide a renewable source for taxol.

**Keywords**—*Taxus cuspidata* · yew · Taxaceae · taxane · taxol · cephalomannine · anticancer agent

Taxol은 1971년 태평양주목(*T. brevifolia*)의 수피로부터 분리된 diterpene amide계 화합물로 난소암 등에 탁월한 치료효과가 있는 항암물질이다.<sup>1)</sup> 이 화합물은 tubuline polymerization을 안정 또는 촉진시키지만, 반대로 depolymerization을 억제하는 것으로 지금까지의 보고된 세포분열

억제제인 vinblastine, colchicine 등과는 다른 특이한 작용기작을 가지고 있다.<sup>2)</sup> 그러나 taxol의 공급부족으로 난소암치료 뿐 아니라 유방암 등 다양한 임상시험에 많은 어려움이 있는 실정이다.<sup>3)</sup>

현재 taxol의 공급은 지구상에 자생하는 주목

의 수피에 의존하고 있으나 제한된 자원과 생태계 보존 측면에서 이 방법에 의한 지속적인 공급에는 한계가 있다. 또한 taxol은 구조가 복잡하여 경제적인 화학합성이 매우 어렵다. 따라서 주목의 대량식재를 통하여 나무에 피해를 거의 주지 않고 지속적인 채취가 가능한 조직으로부터 taxol을 직접 추출하거나 전구물질을 확보하여 이로부터 반합성하는 방법, 조직배양 및 미생물 배양에 의한 대체생산 방법이 활발히 연구되고 있다.<sup>3,4)</sup> 프랑스연구진은 유럽주목(*T. baccata*) 잎에 건조중량당 약 0.1% 함유되어 있는 taxol의 전구물질 10-deacetyl baccatin III를 추출하여 몇 단계의 반합성으로 효율적으로 taxol과 새로운 활성물질 Taxotere를 생산하는 연구를 보고하였다.<sup>5)</sup> 그러나 반합성보다 taxol 생산단가를 낮출 수 있는 합리적인 taxol 생산방법은 taxol을 많이 함유하고 있으면서 지속적으로 채취가 가능한 조직을 가진 식물체를 확보하여 이로부터 직접 taxol을 생산하는 것이라 하겠다.

주목은 교목성의 상록침엽수로 한국에 자생하는 주목속(*Taxus*)에는 2종(*T. cuspidata* Sieb. et Zucc, *T. caespitosa* Nakai), 1변종(*T. cuspidata* var. *latifolia*)의 3종이 있다. 한국의 자생 주목에 대한 taxol 및 관련화합물의 함량분석에 대한 연구로는 변 등<sup>6)</sup>, 최 등<sup>7)</sup>, Choi et al.<sup>8)</sup>의 보고가 있다. 특히 저자들에 의해 분석된 울릉도주목(*T. cuspidata* var. *latifolia*, 일명 회솔나무)의 잎에는 보고된 태평양 주목 수피의 taxol 함량에 필적하는 양이 함유되어 있음이 밝혀졌다<sup>7)</sup>. 본 연구에서는 울릉도와 유사한 환경을 가진 제주도 지역에 자생 또는 식재되어 있는 주목(*T. cuspidata*, 일명 노가리나무)의 taxol 및 관련물질 cephalomannine의 함량을 6개 지역으로 나누어 자세히 조사하였다.

### 실험방법

식물재료 - 제주도에 자생 또는 식재되어 있는 주목(*Taxus cuspidata*)의 각 지역간 taxol 및 cephalomannine 함량변이를 조사하기 위해 Fig. 1에 나타난 6개지역 37개체(성판악, 서귀포 지역은 6개체, 기타 지역은 각 8개체)로부터 가

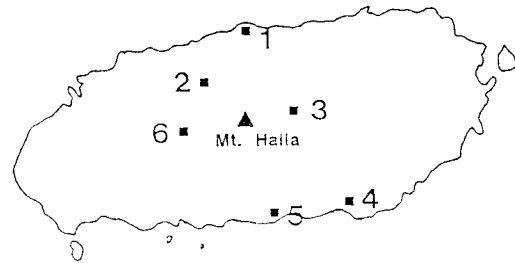


Fig. 1. Sampling sites of yew (*T. cuspidata*) trees grown in 6 locations of Cheju Island (1: Cheju, 2: Orrimok, 3: Songpanak, 4: Namwon, 5: Sogwipo, 6: 1100 kogi, above sea level). All samples were collected in January 1994.

습높이의 겉가지를 1994년 1월에 채취하여 잎과 수피를 분리하였다. 분리한 각 부위를 50°C에서 24시간 건조시킨 후, 0.1 mm 메쉬를 통과하도록 유발에서 분말을 만들어 -70°C에서 보관하여 분석에 사용하였다.

Taxane류의 추출 - Taxol 및 cephalomannine의 추출은 Vidensek 등<sup>9)</sup>의 방법을 변형하여 실시하였다. 건조분말 1.5 g을 100 ml 삼각플라스크에 넣고 n-hexane 20 ml로 12시간 추출하여 n-hexane 가용부분을 여과하여 제거하였다. 여기에 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH(1:1) 혼합액 20 ml을 넣고 12시간 추출하여(이 과정을 2회 반복) 얻어진 추출액을 40°C에서 감압여과하였다. 농축액을 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O의 혼합용액(각 20 ml)으로 분배한(이 과정을 2회 반복) 후, 원심분리하여 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>가용부분을 감압 농축하였다. 농축액을 1 ml의 MeOH에 녹인 후, 분취용 TLC plate (silica gel 60 F<sub>254</sub>, 0.2 x 200 x 200 mm, Merck)에 충전하여 전개용액으로 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH(98:2)을 사용하여 화합물을 분리하였다. 이 조건에서 taxol과 cephalomannine의 Rf 값은 각각 0.37과 0.34였다. Rf 값 0.30-0.42를 taxane분획으로 하였다. Taxane 분획을 TLC plate로부터 분리하고 MeOH로 taxane류를 추출한 후 농축하였다. 농축액을 0.5 ml의 MeOH에 녹여 0.45 m FH-type Millipore filter로 여과한 후 HPLC로 정량분석하였다.

**Table 1.** The content of taxol and cephalomannine in the needle and bark of native yew (*T. cuspidata*) grown in 6 locations of Cheju Island (numbers represent means  $\pm$  standard deviations).  
( $\mu\text{g/g}$  dry wt)

Location	taxol		cephalomannine	
	needle	bark	needle	bark
Cheju (n=6)	258.5 $\pm$ 66.5	ND <sup>a</sup>	399.0 $\pm$ 185.0	ND
Orrimok (n=6)	139.4 $\pm$ 53.4	19.3 $\pm$ 5.1	264.9 $\pm$ 150.0	60.5 $\pm$ 40.0
Songpanak (n=6)	219.9 $\pm$ 60.4	71.3 $\pm$ 24.4	396.6 $\pm$ 238.0	102.5 $\pm$ 97.0
Namwon (n=7)	229.9 $\pm$ 130.2	ND	118.2 $\pm$ 53.6	ND
Sogwipo (n=6)	296.8 $\pm$ 159.2	ND	518.0 $\pm$ 278.0	ND
1100 koji (n=6)	177.3 $\pm$ 80.1	62.7 $\pm$ 4.2	418.7 $\pm$ 275.0	39.6 $\pm$ 34.0
Mean (n=37)	220.3 $\pm$ 56.1	56.1 $\pm$ 28.2	353.0 $\pm$ 141.0	67.6 $\pm$ 32.0

<sup>a</sup>Not determined.

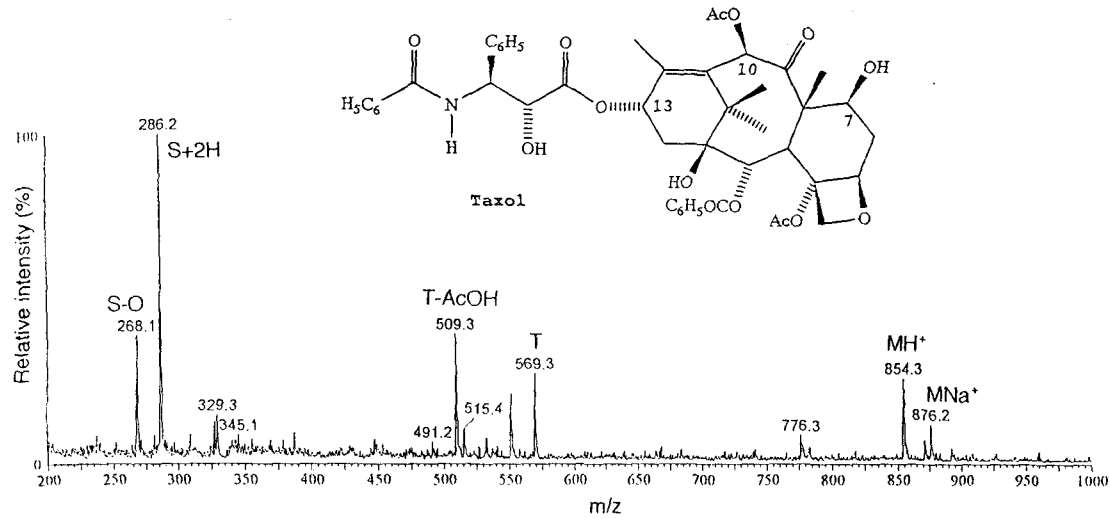
Taxane류의 정량 및 정성분석 - HPLC 분석은 Curosil-G column (250 x 4.6 mm, 6  $\mu\text{m}$ , Phenomenex)을 이용하여 표준 taxane화합물과 비교하여 정량분석하였다. 용출액(10 mM ammonium acetate, pH 4.0: acetonitrile, 55:45)의 유속은 1.5 ml/min로 하였으며, UV 228 nm에서 각 화합물을 검출하였다. 이조건에서 taxol과 cephalomannine의 retention time(분)은 각각 10.4와 8.9였다. 제주도 주목잎에서 분리한 taxane은 electrospray mass spectrometry (VG Quattro Triple Quadrupole 4 Mass Spectrometer, Fisons Instruments, UK)을 사용하여 정성분석하였다. 상기 HPLC에서 분취한 taxol과 cephalomannine 분획 10  $\mu\text{l}$  (각 0.5  $\mu\text{g}$  상당 함유)를 loop injection한 후, 용출액(MeOH-H<sub>2</sub>O, 68:32)을 유속 10  $\mu\text{l}/\text{min}$ 으로 하여 capillary voltage 3.0 KV, source temperature 70° 조건에서 측정하였다.

### 결과 및 고찰

제주도의 6개지역에 자생 또는 식재되어 있는

주목(*T. cuspidata*)의 잎과 수피에 함유되어 있는 taxol 및 cephalomannine의 함량을 분석하였다. 제주도 주목 37개체 잎의 평균 taxol 함량은 g 건조중량당 220  $\pm$  56  $\mu\text{g}$ 으로 수피의 것보다 약 4배 높았으며, cephalomannine의 함량(353  $\pm$  141  $\mu\text{g}$ )도 잎에서의 함량이 수피의 것보다 약 5배 높았다(Table 1). Taxol의 전구물질에 해당하는 10-deacetylbaaccatin III의 잎(267  $\pm$  95  $\mu\text{g}$ )의 함량도 수피의 것보다 약 1.5배 높았다.<sup>10)</sup>

Taxol 함량은 지역과 부위에 따라 큰 차이를 보였는데, 잎에서의 함량은 조사지역중 서귀포지역의 것이 g 건조중량당 297  $\pm$  159  $\mu\text{g}$ 으로 가장 높았으며, 한라산의 어리목과 1100 m 고지지역의 잎에서는 각각 139  $\mu\text{g}$ 과 177  $\mu\text{g}$ 으로 다소 낮았으나, 그외 지역에서는 200  $\mu\text{g}$  이상으로 함량이 높았다. 이것은 보고된 태평양주목 수피의 taxol 함량(>200  $\mu\text{g}$ )에 필적하는 양이다. 잎의 cephalomannine 함량도 지역과 개체간에 큰 차이를 보였다. 가장 함량이 높았던 지역은 서귀포에서 g 건조중량당 521  $\pm$  298  $\mu\text{g}$ 이었고, 남원지역, 성판악지역의 것이 비교적 낮았다. 주목수피의 평균 taxol 함량은 g 건조중량당 56  $\pm$  28  $\mu\text{g}$



**Fig. 2.** Electrospray mass spectrum of endogenous taxol isolated from needles of *T. cuspidata* grown in Cheju Island. In spectrum, T and S represent taxane moiety and C-13 side chain ions, respectively.

으로 보고된 태평양주목의 것에 비해 매우 낮았다. 분석한 함량의 표준편차가 큰 것은 분석간의 실험오차에 의한 것이 아니고 같은 지역내의 주목에서 나타나는 개체의 다양성에 의한 것으로 사료된다.

Fig. 2는 주목잎으로부터 분리한 taxol의 electrospray mass spectrum을 나타낸 것이다. 앞에서 분리한 taxol은 분자이온 ( $[M+H]^+$ ; 854,  $[M+Na]^+$ ; 876)을 비롯하여 taxane골격 ( $m/z$ ; 569)과 C-13측쇄 ( $m/z$ ; 286)의 ion fragment가 표준품의 것과 보고된 분석결과<sup>11)</sup>와도 일치하여 제주도 주목잎에서 분리한 taxol을 정성적으로 확인할 수 있었다. 앞에서 분리한 taxol은 NMR 측정으로도 정성적으로 확인되었으며 cephalomannine ( $[M]^+$ ; 831)은 mass로 정성분석되었다 (결과 미제시).

제주도주목(*T. cuspidata*)의 taxol 함량은 내륙 산간지역인 지리산과 소백산의 자생주목(*T. cuspidata*)의 것과는 매우 다른 경향을 나타내었으나, 울릉도주목(*T. cuspidata* var. *latifolia*)의 것과는 매우 유사하였다. 지리산과 소백산 주목수피의 taxol 함량은 각각  $232 \pm 120 \mu\text{g}$ 과  $190 \pm 101 \mu\text{g}$ 으로 태평양주목의 것과 비슷한 함량을 나타내었으나 주목잎의 함량은 각각  $85 \pm 35 \mu\text{g}$

과  $58 \pm 36 \mu\text{g}$ 으로 낮았다.<sup>8)</sup> 그리고 저자들이 울릉도 5개지역에 자라는 주목의 taxol의 함량변이를 조사한 결과 잎에서의 평균 taxol 함량(g 건조중량당  $173 \pm 55 \mu\text{g}$ )은 수피의 것( $33 \pm 12 \mu\text{g}$ )보다 월등히 높게 나타나 제주도주목의 결과와 매우 유사하였다.<sup>7)</sup>

본 연구에서 제주도주목의 taxol 함량은 수피보다 잎에서 그 함량이 약 4배 높았으며 특히 해안인접 지역인 제주, 서귀포, 남원지역의 주목잎에서의 평균 taxol함량  $262 \mu\text{g}$ 은 섬 중앙에 위치한 한라산 1100 m 고지, 어리목, 성판악지역의 평균함량  $179 \mu\text{g}$ 보다 약 1.5배 높았다. 울릉도주목의 경우도 섬해안인접지역 주목잎의 함량이 섬 중앙의 것에 비해 높았다.

지역간 taxol 및 관련화합물의 함량 차이는 유전적인 요인과 환경적인 요인에 의해 영향을 받을 것으로 추측된다. 환경적인 요인 측면에서 제주도와 울릉도는 내륙지방에 비해 연평균 기온이 높고, 강수량이 많아 습도가 높으며, 해풍으로 인한 대기와 토양중의 염분농도가 높은 점 등의 환경적인 요인이 taxane 생합성에 abiotic stress로 작용한 것으로 사료되나 추후 이에 대한 자세한 연구가 요구된다. Wheeler 등<sup>12)</sup>은 미국 북서부지역에 자생하는 태평양주목(*T. brevifolia*)에서

도 taxane의 함량변이는 지역간, 개체간에서도 일어나며, 북서부의 태평양 인접지역의 주목이 내륙지역의 것보다 taxol 함량이 높았다고 한 것은 본 연구의 결과와 일치한다. 그리고 내륙산간 지역 주목은 계곡능선부에 서식하고 있어 다소 음수수종의 특징을 띄는 것에 비해 해안지역의 대부분의 주목은 대체로 주위식생에 노출 되어 있다. 따라서 해안지역의 주목은 산간지역의 것에 비해 일사량이 많은 점도 taxol생산에 환경적인 영향으로 작용할 것으로 여겨진다.<sup>13)</sup>

한편, 기내배양에서 특히 염분이 elicitor로 작용하여 이차대사산물의 생산성을 증가시킨 예는 *Catharanthus roseus*<sup>14)</sup>, *Coffea arabica*<sup>15)</sup>, *Datura innoxia*<sup>16)</sup>의 현탁배양세포에서 보고되어 있다. 따라서 저자들은 본 연구에서 taxane 생합성에 abiotic stress로 작용한 것으로 간주되는 요인들을 주목 배양세포에 적용하여 taxol의 생산성을 향상시키고자 하는 연구를 모색중에 있다. 그리고 지역간, 개체간 taxol함량 변이가 환경적인 요인 때문인지, 유전적인 요인에 의해 유발되는 것인지에 대해서는 RAPD를 이용한 분자수준에서 검토중에 있다.

본 연구에서 확인된 제주도주목 잎의 taxol 함량은 보고된 태평양 주목수피의 함량에 필적하고 있어 제주도는 taxol의 경제적인 생산을 위한 좋은 환경적인 여건을 가진 지역으로 간주된다. 즉 자생 또는 재식되어 있는 주목잎에 taxol을 고함유하고 있는 식물체를 선발하여 번식한 후 재배 주목잎으로부터 taxol과 전구물질을 추출할 수 있을 것으로 기대된다.

## 결 론

난소암치료 등에 필요한 diterpene amide계 항암제 taxol의 안정적인 공급을 위한 연구의 일환으로 저자들은 제주도 6개 지역에서 자라는 주목(*Taxus cuspidata* S. et Z.) 37개체의 잎과 수피에 함유되어 있는 taxol과 cephalomannine 함량을 HPLC로 정량분석하였다. Taxane 함량은 식물의 부위와 지역에 따라 큰 변이를 나타내었다. 주목잎의 평균 taxol 함량은 g 건조중량당  $220 \pm 56 \mu\text{g}$ 으로 수피의 것보다 약 4배 높았으

며, cephalomannine의 함량( $353 \pm 141 \mu\text{g}$ )은 수피의 것보다 약 5배 높았다. 특히 서귀포지역을 포함한 해안 인접지역에서 자라는 주목잎의 taxane 함량은 한라산 자생주목의 것보다 높아 taxane 생합성은 환경적인 요인에 의해 영향을 받고 있음이 시사된다. 주목잎으로부터 분리한 taxol은 electrospray mass spectrometry로 정성 분석되었다. 이상의 결과로 제주도의 해안인접에서 자라는 주목잎은 taxol 공급원으로 이용될 수 있을 것으로 보인다.

감사의 글 - 본 논문은 과학기술처 선도기술 개발 사업의 연구결과(N81160W)이다. 표준 화합물을 제공하여 준 미국 국립보건원 국립암연구소(NIH-NCI)와 Virginia Polytechnic Institute and State University의 D.G.I. Kingston교수에게 감사한다. 또한 MS측정에 도움을 준 한국표준연구원 기초과학지원센터 유종신박사와 논문의 세심한 논평과 수정을 가해준 이문순 박사에게도 감사한다.

(1995년 3월 7일 접수)

## 참고문헌

1. Wani, M.C., H.L. Taylor, M.E. Wall, P.C. Coggon and A.T. McPhail: *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 2325 (1971).
2. Schiff, P.B., J. Fant and S.B. Horwitz: *Nature* **277**, 665 (1979).
3. Cragg, G.M., S.A. Schepartz, M. Suffness and M.R. Grever: *J. Nat. Prod.* **56**, 1657 (1993).
4. Stierle, A., G. Strobel and D. Stierle: *Science* **260**, 214 (1993).
5. Denis, J.M., A.E. Greene, D. Guenard, D. Gueritte, F. Voegelien, L. Mangatal and P. Doiter: *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5917 (1988).
6. Byun, S.Y., I.S. Kang and K.H. Kim: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **8**, 122 (1993).
7. Choi, M.S., S.S. Kwak, Y.G. Park and J.R. Liu: *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **9**, 186 (1994).
8. Choi, M.S., S.S. Kwak, J.R. Liu, Y.G. Park, M.K. Lee and Y.H. An: *Planta Med.* (in press) (1995).
9. Vidensek, N., P. Lim, A. Campbell and C.

- Carlson: *J. Nat. Prod.* **53**, 1609 (1990).
10. Choi, M.S.: Ph.D. thesis. Kyungpook National Univ., p.169 (1994).
  11. McClure, T.M., K.H. Schram and M.L.J. Reimer: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **3**, 672 (1992).
  12. Wheeler, N.C., K. Jech, S. Masters, S.W. Brobst, A.B. Alvarado, A.J. Hoover and K.M. Snader: *J. Nat. Prod.* **55**, 432 (1992).
  13. Kelsey, R.G. and N.C. Vance: *J. Nat. Prod.* **55** 912 (1992).
  14. Smith, J.I., N.J. Smart, W.G.W. Kurz and M. Misawa: *J. Experi. Bot.* **38**, 1501 (1987).
  15. Frischknecht, P.M. and T.W. Baumann *Phytochemistry* **24**, 2255 (1985).
  16. Brachet, J. and L. Cosson: *J. Experi. Bot.* **37** 650 (1986).