

## 정상 액체 크로마토그래피를 이용한 taxane으로부터 taxol의 분리

장 경 곤 · 노 경 호 · 정 성 택

인하대학교 화학공학과

(1996년 12월 9일 접수, 1997년 2월 25일 채택)

### Separation of Taxol from Taxanes by NP-HPLC

Kyung Kon Chang, Kyung Ho Row, and Sung Taik Chung

Dept. of Chem. Eng., Inha University, Incheon 402-751, Korea

(Received December 9, 1996, Accepted February 25, 1997)

**요 약 :** 항암제로 탁월한 효능이 있는 taxol을 정상 액체 크로마토그래피를 이용하여 주목나무의 추출물에서 분리하였다. Taxol을 분리하기 위해 시료 주입량은  $5\mu\text{l}$ 에서  $100\mu\text{l}$ 로 변화시키고, 이동상 유속은  $1\text{ml}/\text{min}$ 로 고정하여 일정 용매법으로 실험을 하였다. 실험에 사용된 이동상은 헥산, 에탄올, 메탄올, 1-프로판올, 이소프로판올이었다. Taxol과 유사한 성질을 갖는 표준시료 cephalomannine, taxol, 10-deacetyltaxol의 혼합물에서 taxol을 분리하였다. Cephalomannine, taxol, 10-deacetyltaxol 혼합물의 분리 실험 결과로 taxol의 분리 최적 조건은 2성분계에서 헥산/에탄올의 부피 조성비가 96/4이며, 3성분계에서는 헥산/1-프로판올/메탄올의 부피 조성비가 96/2/2이었다. 분리시간은 2성분계에서 80분인데 비해 3성분계에서는 50분으로 적은 용매를 사용하여 분리할 수 있었다. 위에서 얻는 실험조건으로 실제 주목나무의 추출물  $1\mu\text{g}$ 에서 taxol을 분리할 수 있었다.

**Abstract :** Taxol which is recognized as a powerful anticancer reagent was extracted from yew extract and separated by NP-HPLC (Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography). The experiments were performed in the isocratic mode with  $5\mu\text{l}$  to  $100\mu\text{l}$  injection volume and  $1\text{ml}/\text{min}$  mobile phase flow rate. The major mobile phase was hexane and small amounts of ethanol, methanol, 1-propanol and isopropanol were added to change the retention behavior. Prior to a real sample, the artificial mixture of taxol, cephalomannine and 10-deacetyltaxol was tested. They are hard to be separated because of similar chemical structures. The experimental results showed that the proper composition of mobile phase for separating the three components was found 96% hexane and 4% ethanol (vol.%) or 96% hexane, 2% 1-propanol and 2% methanol (vol.%). Compared to the run time of 80 minutes for the binary system, the mixture was separated within 50 minutes with the less amount of mobile phase for the ternary system. Finally,  $1\mu\text{g}$  of taxol was separated from yew tree extracts under the optimum operating conditions.

### 1. 서 론

Taxol(Paclitaxel)은 주목나무에서 추출되는 taxane diterpene amide ( $5\beta,20$ -epoxy- $1,2\alpha,4,7\beta,10\beta,13\alpha$ -hexahydroxy-4,10-diacetate-2-benzoate-13- $\alpha$ -phenyl hippurate, tax-11-en-9-one)로 taxane ring의 구조를 갖는 taxane 화합물을 말한다[1, 2]. 이 천연물질은 자궁암, 유방암, 후두암 등의 치료제로 탁월한 성능을 가지

고 있으며, 임상학적 실험으로 증명되었다[3]. 이런 taxol의 효능은 microtubule formation을 촉진하고 post-mitotic spindle 분해를 지연시키는 독특한 성질 때문인 것으로 알려졌다[4]. Taxol은 제한된 천연물질로부터 분리·추출되고 있는데, 주요 공급원은 주목나무로부터 추출한 추출물을 제조용 크로마토그래피를 이용하여 분리하는 것이다. 주목나무 한 그루에 taxol의 함유량이 0.01% 이하이고 이것은 taxol 1그램을 얻기 위해서 주목나

무 세 그루가 필요하다는 것이다. 현재 미국에서 한 해에 필요한 taxol의 양은 500Kg 이상이고 이것은 주목나무 150만 그루에 해당한다[5]. 앞으로의 taxol 분리연구는 주목나무의 각 기관(껍질, 잎, 씨앗 등)이 함유하고 있는 taxol의 양을 정량하고 최대수율을 얻는 공정을 찾는 것이다.

지금까지 taxol을 얻는 방법은 세 가지가 알려져 있다. 첫째는 주목나무 추출물에서 분리하는 방법으로 현재 가장 많이 사용되고 있다. 이 방법의 단점은 주목나무를 재배하는 데 시간적 제약과 지형적인 제약이 있다는 것이며, 또한 cephalomannine과 10-deacetyltaxol이 taxol과 분리하기가 매우 어렵다는 것이다. 이것을 분리하고자 하는 연구가 octadecyl-, cyanopropyl-, phenyl-bonded silica 등을 충전물로 하여 일정 용매법, 기울기 용매법으로 연구되고 있다[6]. 둘째는 합성하는 방법인데 taxol의 복잡한 화학적 구조 때문에 큰 성과를 거두지 못하고 있으며, 현재는 주목나무 씨앗 추출물 중 합성의 전구체로써 역할을 하는 10-deacetyl baccatin III, baccatin III, 10-deacetyltaxol을 이용한 합성(semi-synthesis)이 연구되고 있다[7]. 셋째는 주목나무 배양액으로부터의 분리인데 아직까지 경쟁력을 확보하지 못하고 있으며, 첫째 방법과 마찬가지로 cephalomannine과 taxol의 분리가 매우 어렵다[8].

크로마토그래피를 이용하여 taxol을 얻는 연구는 Zorbax SW Taxane column(60Å, 10µm silica particles, bonded with a proprietary phase)을 사용하여, 역상 크로마토그래피에서 메탄올/물(65/35)로, 정상 크로마토그래피에서 헵탄/이소프로판올(60/40)의 이동상 조성으로 taxol과 cephalomannine을 분리하였고[9], phenyl column (150×4.6mm)을 사용하여 역상 크로마토그래피에서 아세트로니트릴/메탄올/물을 이동상으로 하여 taxol을 분리하였다[10]. 또한 정상에서 헥산/이소프로판올을 이동상으로 하여 cyanopropyl column(250×2.1mm I.D.)으로 taxol을 분리하는 실험 등이 진행되었다[11]. 역상 크로마토그래피가 정상 크로마토그래피보다 taxol을 분리가 용이하다고 보고되고 있지만, 역상 크로마토그래피의 경우 충전물이 고가이기 때문에 정상 크로마토그래피에서 taxol을 분리하고자 하는 연구가 진행 중이다.

본 연구의 목적은 정상 액체 크로마토그래피를 이용하여 주목나무의 추출물에서 taxol을 분리하기 위한 실험조건을 결정하는 것이다. 이동상으로 헥산, 1-프로판올, 이소프로판올, 메탄올, 에탄올 등을 사용하여 용매의 종류와 조성의 변화에 따른 가장 좋은 taxol에 대한 분리도를 얻기 위하여 실험적으로 최적조건을 구하는 것이다.

## 2. 실험

### 2.1. 시약

본 실험에 사용된 표준시약(cephalomannine, taxol, 10-deacetyltaxol)은 NCI(the National Cancer Institute, Bethesda, MP, USA)에서 제공하였다. 이동상으로는 J. T. Baker사의 HPLC용 헥산, 1-프로판올, 이소프로판올, 메탄올, 에탄올을 감압 펌프(Division of Millipore, Waters)와 필터(FH-0.5µm)를 이용하여 감압 여과를 한 후에 사용하였다.

### 2.2. 기기 및 장치

HPLC는 Waters사의 600E 펌프(multisolvent delivery system), 486 검지기(UV-visible tunable wavelength absorbance), U6K 주입기(2ml sample loop)를 사용하였고, 데이터 저장 시스템(data acquisition system)은 CHROMATE(v.3.0, Interface Eng.)를 PC에 설치하여 얻었다. 본 실험에서 사용한 column은 Waters사의 Nova-Pak Silica 60Å 4µm (3.9×150mm) HPLC column이다. 추출 후 시료를 농축하기 위해 회전식 증발기(LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co.)를 사용하였다.

### 2.3. 실험방법

#### 2.3.1. 추출 및 분배

추출은 임목육종연구소에서 제공한 주목나무 분말을 사용하였다. 완전히 건조한 분말 10g에 메탄올 1ℓ로 24시간 추출한 후, 추출액에 있는 왁스나 스테로이드 같은 불순물을 제거하기 위해 클로로포름으로 분배하였다. 추출액 125ml에 클로로포름 100ml와 물 100ml를 혼합하여 30분간 교반한 후 분별깔대기에서 10시간 이상 침강시킨다. 이 공정을 두 번 반복하여 분별깔대기의 하부층(100ml)을 분취하여 회전식 증발기(rotary evaporator)에서 syrup이 될 때까지 농축한다. 이 syrup을 다시 감압식 오븐에서 24시간 방치하여 용매를 완전히 증발시키고, 여기에 메탄올을 가하여 100ppm 시료를 만든다. 이런 일련의 추출공정을 통해 크로마토그래피 분리전에 상당량의 불순물을 제거할 수 있었다. 추출 공정은 Fig. 1에 표시하였다.

#### 2.3.2. 크로마토그래피 조건

시료는 주목나무 추출액과 NCI에서 제공한 3가지 성분의 혼합물을 사용하였다. 이 혼합물은 각기 100ppm의 cephalomannine, 10-deacetyltaxol, taxol으로 구성되어

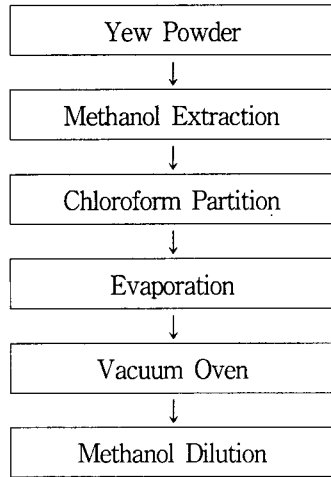


Fig. 1. Extraction procedure from yew tree.

있다. Cephalomannine, 10-deacetyltaxol은 taxol과 매우 유사한 화학구조를 갖기 때문에 분리하기 어렵다. 주목 나무 추출액으로부터 taxol을 분리하기 이전에 이 혼합물로서 크로마토그래피의 분리조건을 얻고자 하였다.

시료 주입량은 5 μl에서 100 μl이고, 유속은 1ml/min로 고정하여 일정 용매법으로 실험을 하였다. UV 검지는 228nm에서 고정하였다.

이동상 조성은 2성분계는 정상 액체 크로마토그래피이기 때문에 헥산을 기본으로 하여 헥산/에탄올, 헥산/메탄올, 헥산/1-프로판올과 헥산/이소프로판올을 선정하였다. 초기 조성은 헥산과 기타 용매를 50/50으로 실험하여 헥산의 양을 증가시키면서 극성을 조절하였다. 3성분계에서는 헥산을 기본으로 하여 헥산/메탄올/1-프로판올, 헥산/메탄올/이소프로판올, 헥산/메탄올/1-프로판올, 헥산/에탄올/이소프로판올에 대한 이동상의 조성을 변화시키면서 분리도를 확인하였다.

### 3. 결과 및 고찰

혼합물은 크로마토그래피 column 안에서 각 물질의 이동속도의 차이로 분리된다. 용매효율(solvent efficiency)은 두 성분에 대한 상대 체류(relative retention) α의 향으로 정의 할 수 있다.

$$\alpha = \frac{t_{R_i} - t_m}{t_{R_j} - t_m} = \frac{K_j}{K_i}$$

여기서 K는 분배계수(distribution coefficient)이며, 각 물질의 분배계수의 차이로 인해서 크로마토그래피에서 는 물질이 분리된다.

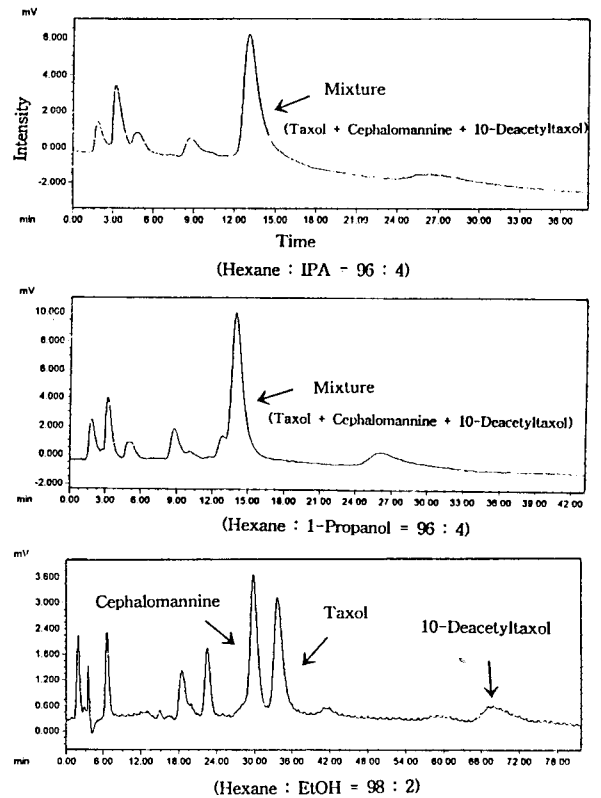


Fig. 2. Elution chromatogram with different compositions of mobile phases (inj. vol. : 5 μl, flow rate : 1ml/min, conc. : 100ppm).

분리도  $R_{ij}$ 는 두 가지 분석물질  $i, j$ 를 분리할 수 있는 column 능력의 정량적인 척도를 제공하여 주며, column의 분리도는 다음과 같이 정의한다.

$$R_{ij} = \frac{2(t_{R_i} - t_{R_j})}{(w_i + w_j)}$$

여기서  $t_{R_i}$ 와  $t_{R_j}$ 는 성분  $i, j$ 의 체류시간이고,  $w_i, w_j$ 는 기준선에서 성분  $i, j$ 의 peak의 폭을 나타냈다. 성분  $j$ 는 나중에 용출되는 성분이다[12]. 성분  $i, j$ 를 완전하게 분리하는 데 분리도가 1.5가 되어야 하며, 분리도가 0.75인 경우에는 분리가 되지 않는다. 1.0의 분리도의 경우 성분  $j$ 가 약 4%의  $i$ 를 포함하며 그 반대로 마찬가지이다. 1.5의 분리도의 경우 약 0.3% 정도 겹친다. 한 주어진 정지상이 가지는 분리도는 판의 길이를 늘이면, 즉 단의 수를 증가시키면 개선된다. 그러나 단이 증가하면 반대로 분리에 필요한 시간이 길어지게 된다.

본 연구에서는 taxane 성분 중 taxol 및 그와 가장 유사한 성질을 갖는 cephalomannine, 10-deacetyltaxol로 이루어진 가상적인 혼합물을 사용하여 이동상의 조성

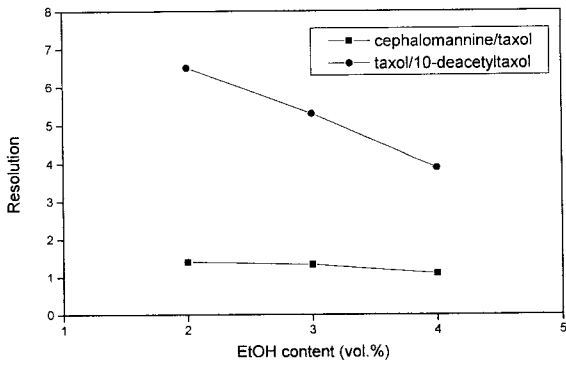


Fig. 3. Effect of EtOH content in mobile phase on resolution.

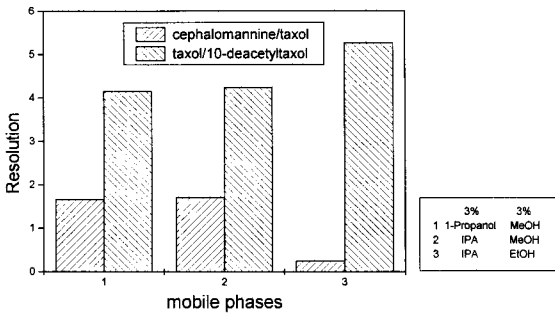


Fig. 4. Effect of type of mobile phases on resolution.

시료 주입량의 변화에 따른 실험에서 최적의 taxol 분리 조건을 결정한 후 실제 주목나무 추출물을 분리하였다. 이동상의 조성의 변화에 따른 실험에서 2성분계는 hexan을 기본으로 hexan/에탄올, hexan/1-프로판올, hexan/이소프로판, hexan/메탄올을 사용하였다. hexan의 극성지수는 0.1, 메탄올의 극성지수는 5.1로 두 용매의 상이한 극성 때문에 2개의 상으로 분리가 되었다. Fig. 2는 hexan/1-프로판올, hexan/이소프로판올, hexan/에탄올의 조성으로 실험하여 가장 좋은 분리를 얻은 크로마토그램이다. hexan/1-프로판올, hexan/이소프로판올의 경우 cephalomannine, taxol, 10-deacetyltaxol이 같이 용출되고 있으나, hexan/에탄올의 부피 조성비가 98/2인 경우 cephalomannine, taxol, 10-deacetyltaxol이 분리되었다. hexan/에탄올의 조성에서 에탄올의 함량을 감소시킬 때 분리도에 대한 영향을 나타낸 것이 Fig. 3이다. 에탄올 함량의 감소에 따라 taxol/10-deacetyltaxol의 분리도는 선형적으로 증가하였고, cephalomannine/taxol의 분리도는 일정하였다. 에탄올의 함량을 2%이하로 할 경우의 분리시간이 길어져서 실험을 종결하였다.

3성분계는 hexan을 기본으로 메탄올, 에탄올을 고정하

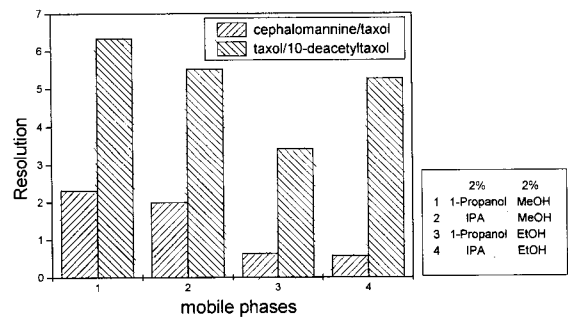


Fig. 5. Effect of type of mobile phases on resolution.

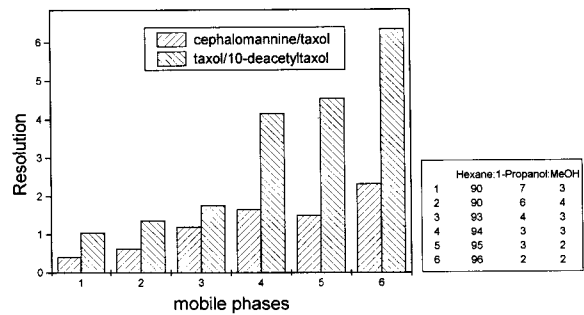


Fig. 6. Effect of type of mobile phases on resolution.

고 1-프로판올, 이소프로판올을 첨가하였을 때의 분리도에 미치는 영향을 관찰하였다. 3성분계에서 hexan/메탄올/1-프로판올의 조성이 가장 좋은 분리도를 나타내었다. 이것은 2성분계에서 hexan과 메탄올이 불용성인 것을 고려할 때 흥미로운 것이다. hexan/메탄올과 hexan/에탄올의 비를 94/3으로 고정하고, 1-프로판올과 이소프로판올의 첨가효과는 Fig. 6에서 나타내었다. hexan/메탄올에 1-프로판올과 이소프로판올을 첨가한 것이 좋은 분리도를 보였다. Fig. 6과 같은 실험방법으로 hexan/메탄올과 hexan/에탄올의 비를 96/2로 고정하고, 1-프로판올과 이소프로판올의 첨가에 따른 분리도를 비교한 것이 Fig. 5이다. hexan/메탄올을 고정하고 1-프로판올과 이소프로판올을 첨가한 것이 hexan/에탄올을 고정한 것보다 좋은 분리도를 보였다. Fig. 4는 hexan/1-프로판올/메탄올의 성분비에 따른 분리도를 비교한 것으로 hexan/1-프로판올/메탄올의 비가 96/2/2일 때 가장 좋은 분리도를 보였는데, 이것은 이동상에 hexan의 함량을 늘리면 cephalomannine, taxol, 10-deacetyltaxol은 고정상에 충분히 흡착하고, 비교적 높은 극성의 1-프로판올, 메탄올의 적은 양이 cephalomannine/taxol, taxol/10-deacetyltaxol에 대한 좋은 분리를 가능하게 하였다.

Taxol과 6개의 taxane성분인 10-deacetylbaccatin, 7-epi-10-deacetylbaccatin III, baccatin III, cephalo-

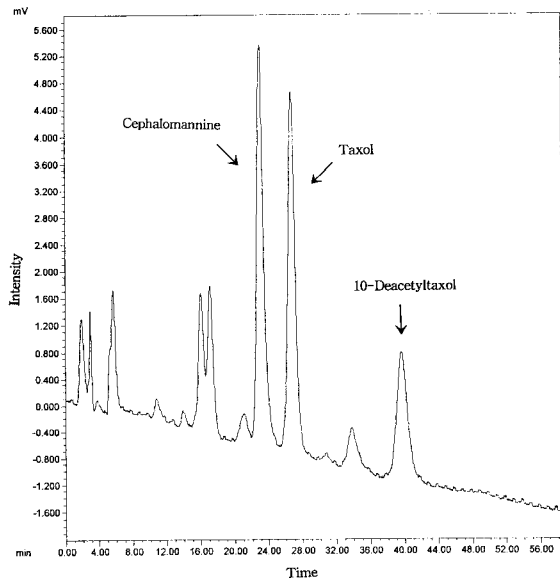


Fig. 7. Elution chromatogram of Cephalomannine, Taxol, 10-Deacetyltaxol (Hexane : I-Propanol : MeOH=96:2:2(vol %), inj. vol. : 5 $\mu$ l, flow rate : 1ml/min, conc. : 100ppm).

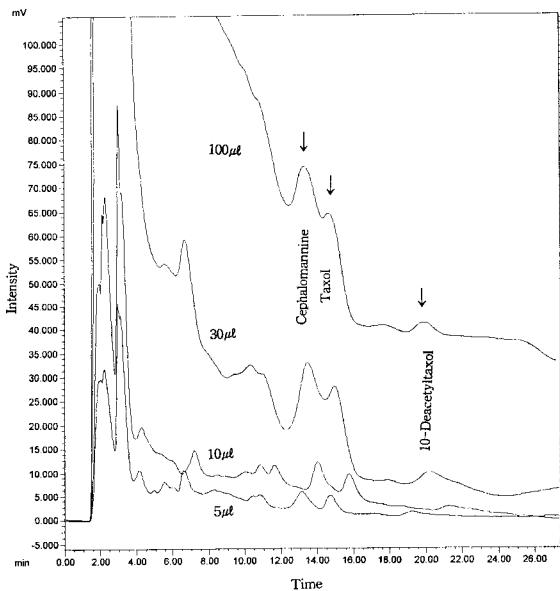


Fig. 8. Elution chromatogram of yew extract with different injection volumes (Hexane : EtOH= 96:4(vol %), flow rate : 1ml/min, conc. : 100ppm).

mannine, 7-epi-10-deacetyltaxol, 10-deacetyltaxol이 혼합되어 있는 주목나무 추출물에서 taxol만을 선택적으로 분리해내는데 있어서, taxane 성분들은 상대적으로 넓은 범위의 극성과 분자 크기를 갖기 때문에 단순한 분리

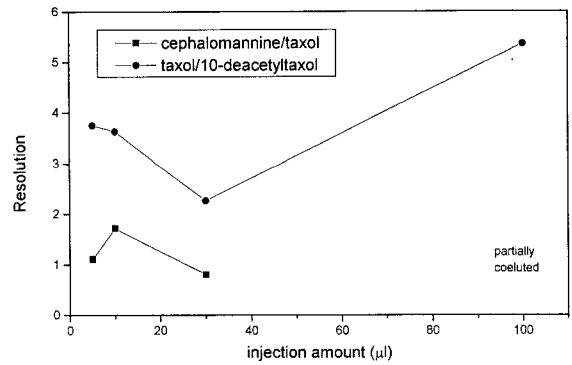


Fig. 9. Effect of injection amount on resolution.

방법으로 분리하기 매우 어렵다. 액체 크로마토그래피를 이용하여 taxol과 6개의 taxane을 주목나무 추출물에서 분리하는 공정은 개발되어 있으며, 크로마토그램 상에서 표준시료의 체류시간과 각 성분을 비교하여 확인하였다 [13].

위의 실험결과를 토대로 주목나무 추출물을 시료로 하여 2성분계와 3성분계의 크로마토그램을 얻었다. 크로마토그래피 분리관의 오염 문제를 방지하기 위해 크로마토그래피 분리 전에 시료의 불순물을 제거하는 공정이 필수적이다. 시료의 불순물을 제거하는 공정은 클로로포름과 물의 분배를 통해서 이루어지며, 수용액층에서 불순물과 무기물이 제거되고, 클로로포름층에서 고순도의 taxane을 얻을 수 있으며, 이것은 메탄올 추출물보다 약 20% 정도 높은 순도를 가진다. 시료 주입은 multiple injection이 유리하고 정기적인 관 세척이 요구된다. 3성분계에서 좋은 분리도를 보인 헥산/1-프로판올/메탄올의 조성비인 96/2/2일 때의 크로마토그램이 Fig. 7이다. Fig. 8은 이동상 조성으로 헥산/에탄올의 조성비를 96/4로 고정하고 시료 주입량을 5 $\mu$ l, 10 $\mu$ l, 30 $\mu$ l, 100 $\mu$ l로 증가시킬 때의 크로마토그램을 overlap시킨 것이다. 시료 주입량이 5 $\mu$ l와 10 $\mu$ l일 때 cephalomannine, taxol, 10-deacetyltaxol이 분리되었으며, 30 $\mu$ l와 100 $\mu$ l인 경우는 cephalomannine과 taxol이 부분적으로 같이 용출되었다. Fig. 9는 Fig. 8의 시료 주입량을 증가시켰을 때의 분리효과를 보인 것이며, 100 $\mu$ l에서 taxol과 10-deacetyltaxol의 분리도가 증가한 것은 시료량이 증가할수록 크로마토그램 상의 10-deacetyltaxol의 peak의 폭이 감소하기 때문인 것으로 보인다.

#### 4. 결 론

본 연구를 통하여 주목나무 추출물에서 taxol 이외의

taxane 성분을 제거하는 용매 추출공정을 확립하였으며, 정상 액체 크로마토그래피를 이용하여 이동상 조성이 2성분계에서 헥산/에탄올의 부피 조성비를 96/4로 하였을 때와 3성분에서 헥산/1-프로판올/메탄올의 부피 조성비를 96/2/2로 하였을 때 taxol을 cephalomannine과 10-deacetyltaxol로부터 분리할 수 있었다. 2성분계에서의 분리시간이 80분이었으며, 3성분계에서는 50분으로 분리시간을 단축 시킬 수 있는 장점이 있었다. 위에서 얻은 실험조건으로부터 실제 주목나무 분말로부터 얻은 추출물의 시료를 최대 1  $\mu\text{g}$ 까지 완전히 분리하였다.

## 감 사

본 연구는 교육부 생물화학공학 분야 연구과제(제조용 액체 크로마토그래피를 이용한 Taxol 분리공정의 개발)로 수행 중인 project입니다. 연구가 원활하게 진행될 수 있게 표준시료를 제공해 주신 NCI와 주목나무 분말을 제공해 주신 임목육종연구소에 감사를 표합니다.

## 참 고 문 헌

1. M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggon, and A.T. McPhail, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 2325 (1971).
2. M. T. Huizing, H. Rosing, F. Koopman, A. C. F. Keung, and J. H. Beijen, *J. Chromatogr. B.*, **664**, 373-382(1995).
3. Manfred E. Wolff, "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery", 5th Ed., John Wiley & Sons, NY, U.S.A., 996(1995).
4. S. D. Harvey, J. A. Campbell, R. G. Kelsey, and N. C. Vance, *J. Chromatogr. B.*, **664**, 300-305 (1991).
5. Raymond E. B. Ketchum, and Donna M. Gibson, *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 2519-2530(1993).
6. K. M. Witherup, S. A. Look, H. W. Stasko, T. G. Mccloud and H. J. Muschik, *J. Liq. Chromatogr.*, **12**, 2117(1989).
7. Giovanni Appendino, Silvia Tagliapietta, Hasan C. Ozen, Pieluigi Gariboldi, Bruno Gabetta and Ezio Bombardelli, *J. Nat. Prod.*, **56**, 4, 514-520(1993).
8. Raymond E. B. Ketchum and Donna M. Gibson, *J. Liq. Chromatogr.*, **18**, 1093-1111(1995).
9. D. R. Wu, K. Lohse, and H.C. Greenblatt, *J. Chromatogr. A.*, **702**, 234(1995).
10. T. P. Castor and T. A. Tyler, *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 724(1993).
11. J. H. Cardellina II, *J. Liq. Chromatogr.*, **14**, 661(1991).
12. R. J. Hamilton and P. A. Sewell, "Introduction to high performance liquid chromatography", 2nd Ed., Chapman and Hall, NY, U.S.A., 29(1982).
13. W. J. Kopycki, H. N. Elsohly, and J. D. McChesney, *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 2569-2591 (1994).