

초임계 이산화탄소를 이용한 Paclitaxel의 잔류용매 제거

†김진현·¹박흥복·¹기은숙·¹강인선·¹최형균·¹홍승서
공주대학교 화학공학과, ¹(주)삼양제넥스 생명공학연구소
(접수 : 2000. 12. 4., 게재승인 : 2001. 6. 7.)

Removal of Residual Solvents in Paclitaxel by Supercritical Carbon Dioxide

Jin-Hyun Kim†, Heung-Bok Park¹, Un-Sook Gi¹, In-Seon Kang¹, Hyung-Kyoon Choi¹, and Seung-Suh Hong¹
Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea
¹Samyang Genex Biotech Research Institute, Taejeon 305-348, Korea
(Received : 2000. 12. 4., Accepted : 2001. 6. 7.)

Because of casehardening effect of amorphous paclitaxel, residual solvents, methylene chloride and methanol could not be reduced to the maximum value allowed, 600 ppm and 3,000 ppm, in accord with the guidelines issued by the International Conference on Harmonization (ICH, 1997), using rotary evaporation and successive drying in a vacuum oven. However, methylene chloride and methanol were reduced to 486 ppm and 403 ppm, respectively using supercritical CO₂ on purified paclitaxel. The optimum pressure and operating time were 80 bar and 30 min at fixed operating temperature (40°C). This approach serves as a novel application of supercritical fluid extraction to remove residual solvents from active pharmaceutical ingredients.

Key Words : supercritical CO₂, paclitaxel, removal of residual solvents, methylene chloride, methanol

서 론

Paclitaxel은 taxane 계열의 천연 diterpenoid로서 강력한 항암 효과를 가지고 있으며 현재 가장 각광을 받고 있는 항암제 이다(1-3). 이러한 paclitaxel의 공급 방법은 다양하지만 주목으로부터 직접 추출하지 않고 paclitaxel을 대량으로 공급할 수 있는 대체방안으로 크게 유기합성과 식물세포 배양에 의한 paclitaxel의 생산으로 나눌 수 있다(4-7). 유기합성의 경우 paclitaxel의 구조가 복잡하고 분자량(Mw=853)이 크기 때문에 현재 실용화되고 있는 합성방법에는 주목 잎에 존재하는 paclitaxel의 전구체적인 10-deacetyl baccatin III에 paclitaxel의 side chain을 화학결합시켜 paclitaxel을 반합성하는 방법이 있다. 식물세포 배양에 의한 생산방법은 장소와 시간에 제한되지 않고 일정한 질과 양을 대량으로 생산 가능하며 특히 환경의 영향을 받지 않고 원료의 공급과 수확시기 등의 제한 없이 지속적인 생산이 가능하므로 공급부족이나 생태계 파괴와 같은 문제가 없어 식물세포 배양에 의한 생산방법에 대한 관심이 매우 높다.

한편, paclitaxel이 의약품의 원료로 사용되기 위해서는 최

종 제품 내 잔류 용매가 규정치 이하로 존재하여야 하는데, 1997년 ICH(International Conference on Harmonization) guide에 의하면, 최종 원료 의약품인 paclitaxel 내의 잔류 용매 규정치는 methylene chloride 600 ppm과 methanol 3,000 ppm 이하이다(8). 일반적으로 사용되는 건조 방법인 진공건조법에 의해 paclitaxel을 제조하는 경우, 특히 무정형(amorphous) paclitaxel에는 정제에 사용된 용매들이 잔류하는 잔류용매, 예를 들어 methylene chloride의 경우 5,000 ppm 이상으로 존재하며, 장시간 건조하여도 잔류 용매량을 규정치 이하로 제조하기가 상당히 어렵다.

본 연구에서는 일반적으로 유용물질을 추출할 목적으로 많이 사용되는 초임계 유체를 원료 의약품 내에 잔존하는 유기 용매를 효과적으로 제거하는데 사용하여 새로운 응용 분야를 개발하였으며, 이러한 연구 결과는 많은 원료 의약품 생산에서의 잔류용매 제거에 이용될 수 있다.

재료 및 방법

Taxus 식물세포 배양

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 cell line을 이용하여 3000 L 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다(7). 배양액으로부터 식물세포 회수를 위하여 Decanter (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter, Germany)를 이용하였으며, 식물세포조각의 회수를 위하여 고속 원심분리

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Kongju National University, Kongju 314-701, Korea
Tel : +82-41-850-8642, Fax : +82-41-858-2575
E-mail : jinhyun@knu.kongju.ac.kr

기 (α -Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)를 사용하였다(9). 회수한 식물세포와 세포조각 (debris)을 합하여 biomass라 하였다.

Paclitaxel 함량 분석

HPLC 분석 방법에 의하여 paclitaxel 함량을 분석하였으며 (10) 모든 샘플은 3개씩 취하여 분석 후 평균값을 취하였다. 채취한 샘플 2 mL에 내부 표준(internal standard)용액 10 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 밤새 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. 분석에 사용한 컬럼은 Capcell Pak C₁₈ UG 120 (250 mm X 4.6 mm, Shiseido, Japan), 컬럼 온도는 40°C, 이동상은 acetonitrile/water (20-100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, 샘플 주입량은 10 μ L이며, UV (227 nm) detector를 사용하였다. Paclitaxel 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

잔류용매 분석

Paclitaxel 내 잔류용매인 methanol과 methylene chloride는 gas chromatography (GC, HP 5890 with auto sampler & ChemStation, USA)를 이용하여 분석하였다. 분석 조건은 DB-5 column(30 m, 0.25 μ m film, 0.32 mm ID, J&J, Folsom, CA) 및 FID(flame ionization detector)를 통해 분석하였으며, column 내에서의 분리온도는 40°C에서 100°C까지 10°C/min의 속도로 programming하여 사용하였다. 사용 가스는 helium이며 3 mL/min 유속으로 분석하였다.

Paclitaxel 정제

Methanol을 이용하여 biomass 내 paclitaxel을 4회 회분식으로 추출하였다. Methanol과 biomass 혼합비는 1:1(1 kg biomass/1 L methanol)로 하였으며 반응시간은 1회 10분으로 하였다. 4회 methanol 추출 후 추출액의 농축은 rotary evaporator에서 수행하였으며 농축조건은 635 mmHg, 40°C에서 이루어졌다. Methanol 추출액을 농축하고(1/5-1/8) 농축액에 methylene chloride를 첨가하여(methanol: methylene chloride = 5:1) 액/액 추출을 실시하였으며 methanol 농축액에 존재하는 극성불순물(polar impurity)을 먼저 제거하였다. 액/액 추출은 회분식으로 3회에 걸쳐 실시하였으며 액/액 추출을 통하여 극성불순물이 제거된 methylene chloride 용액을 rotary evaporator (450 mmHg, 30°C)에서 농축하고 건조하여 사용하였다. 건조물에 포함되어 있는 타르성분은 흡착제(active clay, Mizukalife Chemical Co., Japan)를 이용하여 제거하였고, hexane 침전과 분별침전 공정으로 각각 비극성불순물과 극성불순물을 제거하여 순도 70% crude paclitaxel을 얻었으며 HPLC 공정에 의하여 고순도(>98%) paclitaxel을 정제하여 잔류용매 제거 실험에 이용하였다(10).

실험장치 및 실험방법

실험장치는 Figure 1(A)에서 보는 바와 같이 이산화탄소

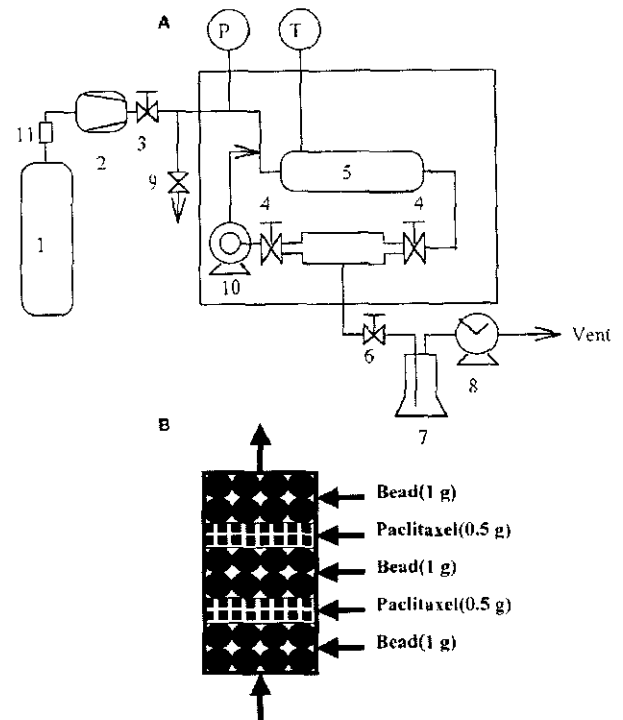


Figure 1. Schematic diagram of apparatus(A) and inside of cell(B).

1, Carbon dioxide bomb; 2, Compressor; 3, Valve; 4, Sample trap three way valves; 5, Equilibrium cell; 6, Metering valve; 7, Collector; 8, Wet test meter; 9, Backpressure regulator; 10, High pressure pump; 11, Line filter.

압축, 재순환 추출기(평형 셀) 및 시료 채취부로 구성되어 있다(11). Compressor로 압축된 이산화탄소의 압력은 backpressure regulator로 $\pm 1\%$ 범위로 조절하였고 compressor에 공급되는 이산화탄소를 여과하기 위하여 이산화탄소 bomb와 compressor 사이에 line filter를 부착하였다. 평형 셀로는 내경이 1/2 in, 부피가 75 mL인 SUS 316 재질의 튜브형 추출기를 사용하였고 순환 가열기가 부착된 항온수조 내에서 $\pm 0.5^\circ\text{C}$ 범위로 온도를 조절하였다. 시료분말(paclitaxel)을 정량하여 Figure 1(B)에서 보는 바와 같이 양쪽 끝 부분을 유리섬유로 막은 평형 셀에 유리구슬(bead) 1 g과 시료 0.5 g을 번갈아 가며 충전하여 packed bed 형태로 만들었다. 항온수조의 온도를 설정된 온도로 올린 후 compressor를 가동하여 시스템내의 이산화탄소를 가압하였고, backpressure regulator를 이용하여 설정압력으로 정확히 맞추었다. 온도와 압력이 실험조건에 도달하면 펌프를 가동시켜 초임계 상을 재순환시켰다.

결과 및 고찰

원료 의약품의 경우 정제된 최종 제품의 specification은 매우 중요하다. 최종 순도 뿐만 아니라 불순물 profile, 불순물 함량, 불순물의 정체 확인, endotoxin, 잔류용매 등 여러가지가 검토되어야 한다(8,10). 잔류용매의 경우 1997년 ICH guide에 의하면 원료 의약품의 잔류용매 규정치는 methylene chloride 600 ppm과 methanol 3,000 ppm 이하이다(8). 식물세

Table I. Results of supercritical CO₂ extraction for removal of residual solvents in purified paclitaxel.

| Pressure (Bar) | Operating time (min) | Methylene chloride (ppm) | Methanol (ppm) | Purity (%) |
|----------------|----------------------|--------------------------|----------------|------------|
| 60 | 1 | 2894 | 1932 | 99.08 |
| | 20 | 1988 | 1548 | 99.08 |
| | 30 | 1042 | 1121 | 99.06 |
| 80 | 1 | 1652 | 1436 | 99.08 |
| | 20 | 1358 | 1125 | 99.05 |
| | 30 | 486 | 403 | 99.07 |
| 100 | 1 | 1232 | 1207 | 99.04 |
| | 20 | 832 | 765 | 98.70 |
| | 30 | 247 | 235 | 98.30 |
| Control | | 5869 | 2135 | 99.08 |

* Temperature of cell : 40°C

* Compressed CO₂ flow rate : 1 mL/min

포배양을 통하여 얻어진 biomass로부터 paclitaxel을 분리 정제하여 수득한 최종 제품을 methylene chloride/methanol (98/2, v/v)에 녹여 진공건조법에 의해 paclitaxel을 제조하는 경우, 특히 무정형(amorphous) paclitaxel에는 정제에 사용된 용매들이 잔류하는 잔류용매, 예를 들어 methanol과 methylene chloride이 각각 2,135 ppm, 5,869 ppm 이상으로 존재하며, 장시간 건조하여도 casehardening 현상 때문에 잔류 용매의 농도를 규정치 이하로 제조하기가 상당히 어렵다. 이러한 잔류용매를 초임계 CO₂를 이용하여 잔류용매 제거를 확인한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 상당히 효과적으로 제거할 수 있었다. 40°C에서 여러 압력과 조업시간 변화에 따른 영향은 이산화탄소의 임계압력 (73.8 bar) 이상인 80 bar에서 30분 이상이면 제품 내 잔류 용매의 농도가 상당히 낮아짐을 알 수 있었다. 압력이 높을 경우에는 잔류용매는 상당히 줄일 수 있는 반면 paclitaxel이 분해될 가능성이 있었다. Table 1에서 보는 바와 같이 이산화탄소의 임계압력 이하인 60 bar에서는 잔류용매 제거가 미흡하나 임계압력 이상인 80 bar부터는 상당히 효과적이었다. 또한 조업시간도 30분 정도면 적당하였다. 80 bar에서 30분 초임계 CO₂를 이용하여 추출하였을 경우 methylene chloride와 methanol의 각각 486 ppm과 403 ppm을 보여 규정치 이하로 효과적으로 제거할 수 있었다. 100 bar에서 30분 조업하였을 경우 잔류용매는 상당히 제거되나 paclitaxel이 미량 분해되어 순도 저하 현상을 보였다. 일반적으로 유용물질을 추출할 목적(12,13)과 효소 가수분해의 목적(14,15)으로 사용되는 초임계 유체를 이용하여 원료 의약품 내에 잔존하는 유기용매를 효과적으로 제거할 수 있는 새로운 용도를 개발하였으며 이러한 연구 결과는 여러 가지 원료 의약품으로부터 잔류용매 제거에 효과적으로 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

원료 의약품의 경우 정제된 최종제품 내의 잔류용매 제거는 매우 중요하다. 일반적인 진공건조 방법에 의한 제품생산시 casehardening 효과 때문에 잔류용매의 제거가 상당히 어렵다. 본 연구에서는 초임계 이산화탄소를 이용하여 정제된 paclitaxel 내의 methylene chloride와 methanol의 잔류용매를

효과적으로 제거하였다. 초임계 이산화탄소를 이용하여 40°C, 80 bar에서 30분간 조업하였을 경우 최초 최종제품 내 잔류용매인 methylene chloride와 methanol이 각각 5,869 ppm과 2,135 ppm에서 486 ppm과 403 ppm으로 줄어 ICH 규정치를 충분히 만족시킬 수 있다. 이러한 연구 결과는 초임계 유체의 새로운 응용 분야를 개척하고 많은 원료 의약품의 잔류용매 제거에 효과적으로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

감 사

초임계 추출 실험에 많은 도움을 주신 아주대학교 화학생물공학부 변상요 교수님과 연구실 여러분께 감사드립니다.

REFERENCES

- Fett-Neto, A. G., W. T. Zhang, and F. DiCosmo (1994), Kinetics of Taxol Production, Growth and Nutrient Uptake in Cell Suspensions of *Taxus cuspidata*, *Biotechnol. Bioeng.* **44**, 205-210.
- Strobel, G. A., A. Stierle, and F. J. G. M. Van Kuijk (1992), Factors Influencing the in vitro Production of Radiolabelled Taxol by Pacific Yew, *Taxus brevifolia*, *Plant Sci.* **84**, 65-69.
- Kingston, D. G. I., G. Samaranyake, and C. A. Ivey (1991), The Chemistry of Taxol, A Clinically Useful Anticancer Agent, *J. Nat. Prod.* **53**, 1-12.
- Nicolaou, K. C., Z. Yang, J. J. Llu, Ueno, G. Nantermet, R. K. Guy, C. F. Clalborne J. Renaud, E. A. Couladoruos, K. Paulvannan, and E. J. Sorensen (1994), Total Synthesis of Taxol, *Nature*, **369**, 630-633.
- Holton, R. A., C. Somoza, H. B. Kim, F. Liang, F. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang P. Zhang, K. K. Murthi, L. N. Gemto;e. amd J. H. Liu (1994), First Total Synthesis of Taxol. 1. Functionalization of the B Ring, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1597-1598
- Holton, R. A., H. B. Kim, C. Somoza, F. Liang, R. J. Biediger, R. J. Biediger, P. D. Boatman, M. Shindo, C. C. Smith, S. Kim, H. Nadizadeh, Y. Suzuki, C. Tao, P. Vu, S. Tang, P. Zhang, K. K. Murthi,

- L. N. Gentile, and J. H. Liu (1994), First Total Synthesis of Taxol. 2. Completion of the C and D Ring, *J. Am. Chem. Soc.* **116**, 1599-1600.
7. 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.
 8. ICH Guidance Q3C Impurities: Residual Solvents (1997), *Federal Register* Vol. 62, No.247, 67378-67388.
 9. Kim, J. H., C. B. Lim, I. S. Kang, S. S. Hong, and H. S. Lee (2000), The Use of a Decanter for Harvesting Biomass from Plant Cell Cultures, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 337-341.
 10. Kim, J. H., S. Gi, B. Min, H. K. Choi, S. S. Hong, and H. S. Lee (2000), Purification and Characterization of Paclitaxel from Plant Cell Cultures of *Taxus chinensis* in Large-Scale process, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **15**, 537-540.
 11. Hyun, B. H., S. Y. Byun, and C. Kim (1997), Extraction of Taxol by Supercritical Carbon Dioxide-An Equilibrium Solubility Study, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 197-202.
 12. McHuge, M. A. And V. J. Kurkonis (1986), *Supercritical Fluid Extraction; Principles and Practice*, Butterworth, Stoneham, MA.
 13. Huang, F. H., M. H. Li, L. L. Lee, K. E. Starling, and F. T. H. Chung (1985), An Accurate Equation of State for Carbon Dioxide, *J. Chem. Eng. Japan* **18**, 490-495.
 14. Park, C. Y., H. S. Lee, C. Kim, and Y. W. Ryu (1997), Effect of Explosion Pretreatment by Supercritical Carbon Dioxide in the Acid Hydrolysis of Hemicellulose, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **12**, 371-376.
 15. Park, C. Y., C. Kim, and Y. W. Ryu (1998), The Enzymatic Hydrolysis of Cellulose in Supercritical Carbon Dioxide Fluid, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **13**, 687-692.