

크로마토그래피를 이용한 Paclitaxel 정제에서 비중 조절에 의한 Eluent 재사용

김진현

공주대학교 화학공학부

(접수 : 2007. 9. 13., 게재승인 : 2007. 10. 16.)

Reuse of Eluent by Controlling its Specific Gravity during the Chromatographic Purification of Paclitaxel

Jin-Hyun Kim

Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Kongju 314-701, Korea

(Received : 2007. 9. 13., Accepted : 2007. 10. 16.)

In this study, the feasibility of reusing the eluent was confirmed by monitoring its specific gravity during the chromatographic purification of paclitaxel from plant cell cultures. The specific gravity of the eluent (methanol/water = 70/30, v/v) was measured prior to its elution through the hydrophobic resin column. The measurement showed a specific gravity of 0.853. The discharged eluent from the column outlet was first evaporated under vacuum pressure. The evaporated eluent was collected and condensed into a liquid eluent again, followed by the HPLC analysis in order to check the presence of any trace of impurity. Even if the specific gravity of the liquid eluent is varied from 0.853 as a result of the evaporation and condensation, the eluent can still be reused after its specific gravity is adjusted by the addition of methanol or water. The reuse of the eluent resulted in the paclitaxel yield of 86% with a purity of 95% which were closely similar to those of before the eluent reuse. These results indicate that the strategy of reusing the eluent on the basis of the specific gravity analysis was successfully implemented in this study.

Key Words : Paclitaxel, chromatographic purification, eluent reuse, specific gravity

서론

항암제 paclitaxel (화학식: $C_{47}H_{51}NO_{14}$, 분자량: 853.9, CAS number: 33069-62-4)은 주목 (yew tree)의 표피에서 발견된 diterpenoid 계열의 항암물질로 1992년 난소암, 1994년 유방암, 1997년 카포시 종양 (kaposi's sarcoma), 1999년 비소세포성 폐암 (non-small cell lung cancer) 치료에 대해 미국 FDA (Food and Drug Administration) 허가를 취득하여, 현재 가장 많이 사용되고 있는 항암제 중의 하나이다. 세계 시장규모는 3조원 (2003년 기준), 국내 시장규모는 553억원 (2003년 기준) 정도이며 현재 항암제 중 시장규모 1위, 주요 항암화학치료제 시장의 22% 정도를 점유하고 있다. 또한 류마티스성 관절염, 알츠하이머 치료 등에 적용증이 계속 확대되

고 있으며, 여러 다른 약물들과의 복합처방에 관한 임상시험이 현재 180여건 진행 중에 있어 수요는 계속 늘어날 전망이다(1). Paclitaxel의 주요 생산 방법에는 주목나무에서 직접 추출 (extraction)하는 방법(2), 주목나무의 잎에서 전구체 (예, baccatin III, 10-deacetylbaaccatin III, 10-deacetylpaclitaxel)를 얻어 side chain을 화학적으로 결합하는 반합성 (semi-synthesis) 방법(3), 주목나무에서 callus를 유도하고 종균배양 (seed culture)을 거쳐 주배양기 (main bioreactor)에서 식물세포를 배양하여 얻는 방법(4, 5)이 있다. 이들 중 식물세포배양에 의한 생산 방법은 원료의 안정적 공급 뿐만 아니라, 기후, 환경 등 외부인자에 의한 영향을 받지 않고 생물반응기 내에서 안정적으로 생산이 가능하기 때문에 일정한 품질의 paclitaxel을 대량 생산할 수 있다는 장점이 있다.

식물세포배양으로부터 항암제 paclitaxel의 분리 및 정제는 여러 단계의 추출 및 정제 공정으로 이루어져 있는데, 특히 고순도 (>95%)의 제품을 생산하기 위해서는 HPLC (high performance liquid chromatography) 정제 과정이 필수적이다(6-8). HPLC 정제 과정에서는 대량의 유기용매가 사

† 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@kongju.ac.kr

용되므로, 이를 회수하여 공정에 재사용하는 것은 경제적 측면뿐만 아니라 환경적인 측면에서 매우 중요하다. 문헌 보고에 의하면 HPLC 정제에 사용되는 유기용매와 흡착제 비용이 전체 정제 비용에서 매우 높은 비중을 차지한다(9-11). 그러므로 eluent로 사용되는 유기용매를 간단하고 안전하게 재사용할 수 있다면 크로마토그래피 공정의 경제적 효율성을 향상시키는데 많이 기여할 것으로 판단된다. 따라서 본 연구는 식물세포로부터 항암제 paclitaxel 정제를 위한 크로마토그래피 공정에 사용되는 eluent를 비중 조절 방법에 의해 간편하게 재사용할 수 있는 방법을 개발하고 이를 생산 공정에 적용해 보는데 그 목적이 있다.

재료 및 방법

식물세포 배양

본 연구에서는 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주 (cell line)를 이용한 세포배양액을 이용하였다(4). 식물세포배양으로부터 식물세포를 회수하기 위하여 데칸터 원심분리기 (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)를 사용하였으며, 세포조각 (cell debris)은 고속 원심분리기 (α -Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)를 사용하여 회수하였다. 회수한 식물세포와 세포조각을 합하여 biomass라 하였다. 본 연구에 사용된 biomass는 (주)삼양제넥스로부터 제공받았다.

Paclitaxel 분석

HPLC (Waters)를 사용하여 paclitaxel의 함량을 분석하였으며 모든 분석 시료는 3개씩 취하여 분석 후 평균값으로 함량을 결정하였다. 분석에 사용한 column은 Capcell Pak C₁₈ UG 120 (250 mm × 4.6 mm, Shiseido, Japan), column 온도는 40°C, 이동상은 acetonitrile/water (20~100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, 시료 주입량은 10 μ L이며, UV (227 nm) detector를 사용하였다(12). Paclitaxel 표준물질은 Sigma-Aldrich 제품 (순도: 95%)을 사용하였다.

HPLC 정제용 시료 제조

식물세포배양액으로부터 회수한 biomass를 메탄올을 이용하여 회분식으로 4회 추출하였다(12). 메탄올과 biomass 혼합비는 1/1 (g biomass/mL methanol)로 하였으며 추출시간은 1회 10분으로 하였다. 액-액 추출은 농축된 메탄올 용액에 methylene chloride를 첨가하고 (concentrated methanol : methylene chloride = 5 : 1, v/v), 혼합하여 정제시켜 상분리를 유도하였다. 상분리로부터 paclitaxel이 포함되어 있는 하층 (methylene chloride 용액층)을 회수하고 rotary evaporator (760 mmHg, 30°C)에서 농축/건조하였다(11). 건조된 crude extract를 methylene chloride에 녹이고 흡착제 (active clay) 처리와 두 번의 침전 공정을 거쳐 61.2% 순도의 paclitaxel을 얻어 HPLC 정제 공정에 이용하였다(11).

HPLC 정제

침전 공정을 통하여 얻은 61.2% 순도의 paclitaxel을 이용하여 HPLC 정제를 수행하였으며 이 과정에서 사용된

eluent를 이용하여 비중 조절에 의한 eluent 재사용 방법을 개발하였다. Hydrophobic resin인 ODS (octadecylsilylated, C₁₈, Shiseido, Japan)가 고정상으로 충전된 컬럼 (50 mm × 500 mm)이 장착된 HPLC를 이용하였다(11). 침전공정에서 얻은 시료를 메탄올에 녹이고 컬럼에 loading 하였으며 메탄올과 물 혼합용액 (methanol/water = 70/30, v/v)으로 용리하였다. 용리되는 용액은 UV detector를 이용하여 흡광도 227 nm 파장에서 분석하며 분취하였다. 용리 유속은 3~5 cm/min으로 하였으며 loading되는 시료 농도는 50~150 mg/mL (methanol)이었다. 분취 후 증발 건조하여 정제된 paclitaxel을 얻고 증발 건조된 eluent는 재사용 방법 실험에 사용하였다.

Eluent 재사용 방법 실험

HPLC 분취 후 증발 건조하여 제품을 얻고 나머지 모든 증발된 용액을 회수하여 eluent 재사용 실험을 수행하였다. 증발된 eluent 재사용을 위하여 먼저 HPLC 분석을 통하여 불순물의 포함 여부를 확인하였다. 또한 증발 과정에서 회수된 eluent의 비중을 측정하고 비중이 0.853에서 벗어났을 경우에는 메탄올 또는 물을 첨가하여 eluent의 비중을 0.853으로 조정하여 eluent로 재사용 하였다.

결과 및 고찰

크로마토그래피를 이용한 정제 공정에서는 컬럼의 이동상으로 많은 양의 유기용매, 즉 eluent가 필요하며 이로 인해 많은 비용이 발생한다. 또한 환경적인 측면에서도 컬럼을 통하여 용리 (elution)되는 대량의 유기용매를 적절히 처리하여야 한다. 이러한 관점에서 eluent의 재사용은 경제적인 측면 뿐만 아니라 환경적인 측면에서 매우 중요한 의미를 갖는다. 문헌에 보고된 바에 의하면 크로마토그래피 공정에서 eluent로 사용되는 유기용매와 컬럼 흡착제 (resin)는 전체 정제 비용에서 많은 부분을 차지하고 있다(9-11). 그러므로 사용된 eluent를 간편하고 안전하게 재사용할 수 있다면 크로마토그래피 공정의 경제적 효율성을 향상시킬 수 있다. 본 연구에서는 식물세포배양으로부터 회수한 식물세포, 즉 biomass로부터 항암제 paclitaxel을 정제하기 위한 크로마토그래피 공정에서 컬럼을 통하여 용리되는 eluent의 비중 (specific gravity) 조절에 의한 재사용 방법을 개발하였다. 크로마토그래피 작업 전, ODS (C₁₈) 흡착제가 충전된 컬럼에서 용리에 사용되는 eluent (methanol/water = 70/30, v/v)의 비중을 측정한 결과 0.853을 얻었다. 컬럼에 시료를 loading하고 eluent로 용리하여 분취 (fraction)한 후에 분취 용액을 진공상태에서 증발 건조하여 건조된 제품과 증발된 용액인 eluent를 각각 회수하였다. 증발된 eluent는 재사용을 위하여 먼저 HPLC 분석을 통하여 불순물의 포함 여부를 확인한 결과 증발된 eluent 내에는 전혀 불순물이 검출되지 않음을 확인 할 수 있었다. 또한 증발 과정에서 회수된 eluent의 비중을 측정하여 비중이 0.853에서 벗어났을 경우에는 메탄올 또는 물을 첨가하여 eluent의 비중을 0.853으로 조정하여 eluent로 재사용 하였

다(Fig. 1). 비중이 조절된 eluent를 재사용하여 크로마토그래피 정제를 실시한 결과, Fig. 2에서 보는 바와 같이 고순도 (~95%), 고수율 (~86%)의 paclitaxel을 얻을 수 있었다. 이는 eluent를 재사용하지 않을 경우, 즉 재사용 전과 동일한 수준의 결과(11)로 비중 조절에 의한 eluent의 재사용이 성공적임을 알 수 있었다. 본 연구에서 처음 시도된 비중 조절에 의한 eluent의 재사용 개략도를 Fig. 1에 나타내었으며 이는 매우 간편하고 경제적인 방법으로 paclitaxel 정제 뿐만 아니라 다른 정제 공정에도 쉽게 적용가능할 것으로 판단된다. 특히 본 연구에서의 paclitaxel 정제 공정에서처럼 isocratic 조건에서 조업되는 크로마토그래피 공정에서는 보다 쉽게 적용할 수 있다.

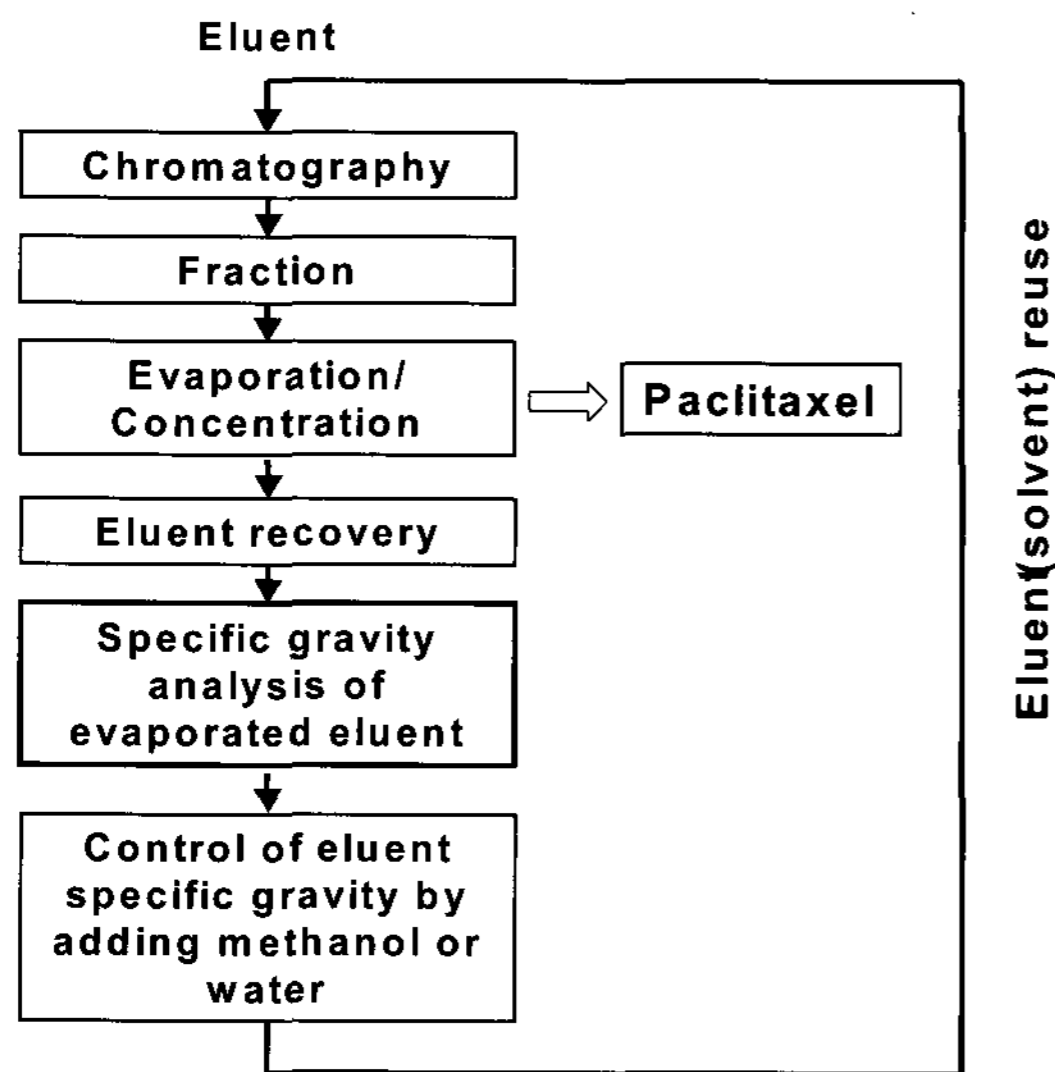


Figure 1. Proposed schematic diagram of the solvent recovery and reuse.

요 약

본 연구에서는 식물세포배양으로부터 회수한 식물세포, 즉 biomass로부터 항암제 paclitaxel를 정제하기 위한 크로마토그래피 공정에서 컬럼을 통하여 용리되는 eluent의 비중 (specific gravity) 조절에 의한 eluent 재사용 방법을 개발하였다. 크로마토그래피 조업 전에 eluent (methanol/water = 70/30, v/v)의 비중을 측정하여 0.853을 얻었다. 컬럼으로부터 분취한 용액을 증발 건조하여 건조된 제품과 증발된 용액인 eluent를 각각 회수하였다. HPLC 분석을 통하여 증발/회수된 eluent에 불순물이 포함되어 있지 않음을 확인하고, 회수된 eluent의 비중을 측정하여 비중이 0.853에서 벗어났을 경우에는 메탄올 또는 물을 첨가하여 eluent의 비중을 0.853으로 조정하여 eluent로 재사용하였다. 회수된 eluent를 재사용하여 크로마토그래피 정제를 실시한 결과, 고순도 (~95%), 고수율 (~86%)의 paclitaxel을 얻을 수 있었다. 이는 eluent를 재사용하지 않을 경우, 즉 재사용 전과 동일한 수준의 결과로 비중 조절에 의한 eluent의 재사용이 성공적임을 알 수 있었다.

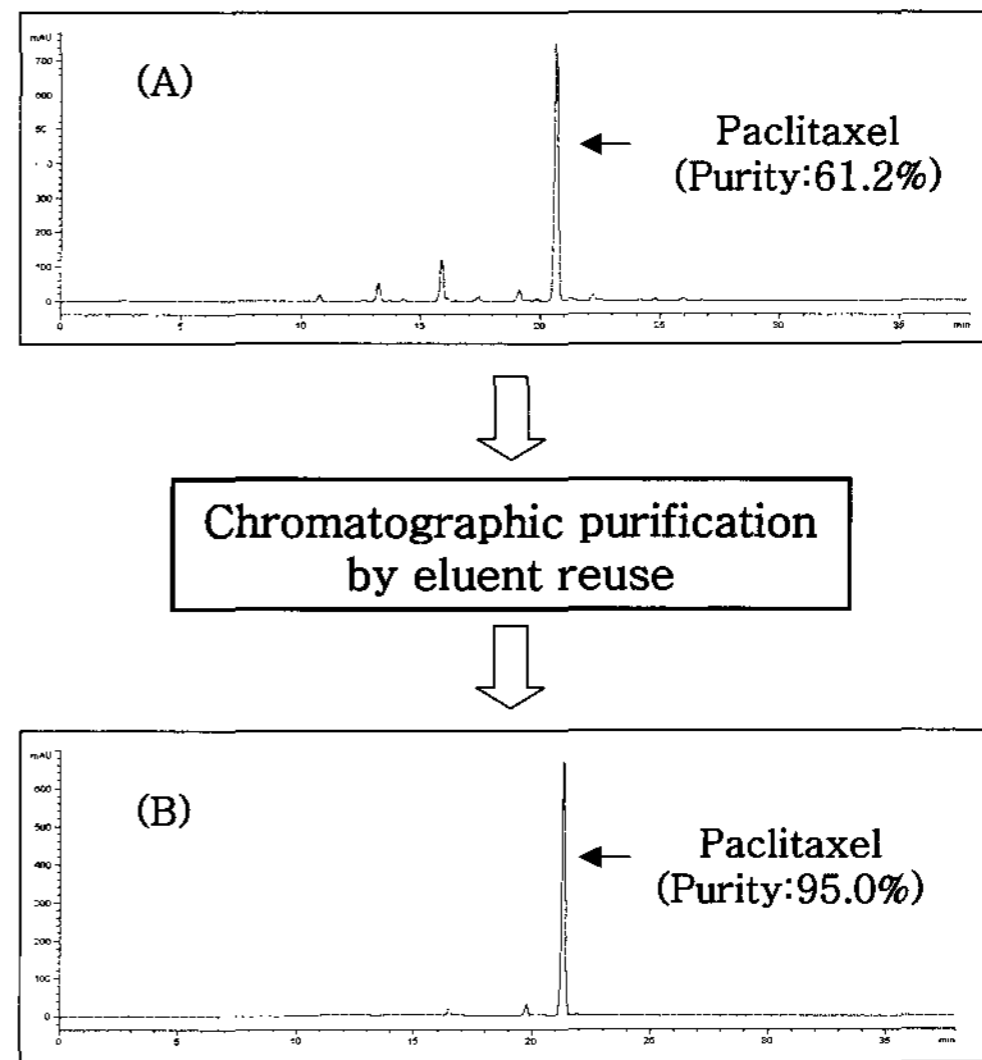


Figure 2. Chromatogram of the ODS-HPLC purification by reusing of eluent: before purification (A) and after purification (B), respectively.

감 사

본 연구는 산업자원부 지정 공주대학교 자원재활용 신소재 지역혁신센터의 지원에 의한 것입니다. 또한 본 연구에 사용된 biomass는 (주)삼양제넥스로부터 제공 받았으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Kim, J. H. (2006), Paclitaxel: recovery and purification in commercialization step, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **21**, 1-10.
- Rao, K. V., J. B. Hanuman, C. Alvarez, M. Stoy, J. Juchum, R. M. Davies, and R. Baxley (1995), A new large-scale process for taxol and related taxanes from *Taxus brevifolia*, *Pharm. Res.* **12**, 1003-1010.
- Baloglu, E. and D. G. Kingston (1999), A new semisynthesis of paclitaxel from baccatin III, *J. Nat. Prod.* **62**, 1068-1071.
- 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, US Patent, 5,871,979.
- Choi, H. K., S. J. Son, G. H. Na, S. S. Hong, Y. S. Park and J. Y. Song (2002), Mass production of paclitaxel by plant cell culture, *Kor. J. Plant Biotechnol.* **29**, 59-62.
- Kim, J. H., H. K. Choi, S. S. Hong, and H. S. Lee (2001), Development of high performance liquid chromatography for paclitaxel purification from plant cell cultures, *J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 204-210.
- Pyo, S. H., B. K. Song, C. H. Ju, B. H. Han, and H. J. Choi (2005), Effects of adsorbent treatment on the purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis* and yew tree, *Process Biochem.* **40**, 1113-1117.
- Kim, J. H., I. S. Kang, H. K. Choi, S. S. Hong, and H. S. Lee (2002), A novel pre-purification for paclitaxel from plant cell cultures, *Process Biochem.* **37**, 679-682.
- Mun, S., Y. Xie, J. H. Kim, and N. H. L. Wang (2003), Optimal design of a size-exclusion tandem simulated moving bed for insulin purification, *Ind. Eng. Chem. Res.* **42**, 1977-1933.

10. Kim, J. H. (2004), Prepurification of paclitaxel by micelle and precipitation, *Process Biochem.* **39**, 1567-1571.
11. Pyo, S. H., H. B. Park, B. K. Song, B. H. Han, and J. H. Kim (2004), A large-scale purification of paclitaxel from plant cell cultures of *Taxus chinensis*, *Process Biochem.* **39**, 1985-1991.