

## Effect of temperature on fractional precipitation for paclitaxel purification

Soon-Yim Jeon and Jin-Hyun Kim\*

*Department of Chemical Engineering, Kongju National University,*

*182 Shinkwan-Dong, Kongju 314-701, Chungnam, Korea*

TEL: +82-41-850-8640, FAX: +82-41-858-2575

### Abstract

Fractional precipitation is a simple, efficient method for pre-purifying paclitaxel from plant cell cultures. The storage temperature of fractional precipitation was optimized in terms of the yield and purity of paclitaxel with a fixed methanol concentration in water (61.5%, v/v), paclitaxel content in the crude extract (0.5%, w/v), and storage time (3 days). The greatest yield (~84%) was obtained with storage at a constant temperature (0°C) for 3 days. Conversely, the highest purity (~79%) was obtained with stepwise reduction in temperature over 3 days. For a constant storage temperature, the maximum purity (~67%) was obtained at 0°C. There was little difference in the yield of paclitaxel between -20 and 12°C. This pre-purification process serves to minimize solvent usage, and the size and complexity of the high-performance liquid chromatography (HPLC) operation required for paclitaxel purification.

### 서론

식물세포배양액으로부터 항암제 paclitaxel 분리/정제는 여러 단계의 추출, 정제 공정을 거쳐 높은 순도(>98%)의 제품을 생산하게 된다. 일반적으로 정제 과정은 원료인 biomass(paclitaxel을 함유한 식물체 또는 식물세포)로부터 paclitaxel을 먼저 유기용매로 추출하고, 전처리 공정을 거쳐 최종 정제를 통하여 제품을 생산하는 공정으로 이루어져 있다. 이 과정에서 특히 전처리 공정은 최종 정제 비용에 많은 영향을 미친다. 기존의 연구들은 정제를 위한 전처리 공정으로 고가의 크로마토그래피를 이용하고 있거나 전처리 없이 추출을 거친 crude 제품을 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)에 의해서 바로 최종 정제하여 경제적 측면에서 많은 문제가 있으며 또한 scale-up에 많은 어려움이 따른다. 대체로 biomass로부터 유기용매를 이용하여 paclitaxel을 추출하면 순도는 0.5% 이하이며, 간단한 전처리 공정 후에도 1~4% 정

도의 순도로 매우 낮다. 이러한 샘플을 바로 HPLC에 의하여 최종 정제할 경우 많은 양의 유기용매 사용, column packing material(resin)의 수명 단축, 처리량 감소 등 상당히 비경제적이며 대량 생산을 위한 공정으로는 적합하지 않다. 전처리 공정을 통하여 샘플의 순도를 가능하면 높여(최소 50% 이상) 주어야 최종 정제, 특히 HPLC를 이용한 정제에서의 비용을 줄일 수 있다. 따라서 본 연구에서는 biomass로부터 paclitaxel을 저비용으로 대량 생산할 수 있는 효율적인 전처리 공정인 분별침전(fractional precipitation) 조건을 최적화하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. Taxus 식물세포 배양

본 연구에 사용된 배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주(cell line)를 이용하여 발효조에서 배양한 배양액을 이용하였다. 배양액으로부터 식물세포 회수를 위하여 Decanter (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter, Germany)를 이용하였으며, 식물세포조각의 회수를 위하여 고속 원심분리기 ( $\alpha$ -Laval, BTPX 205GD-35 CDEFP)를 사용하였다. 회수한 식물세포와 식물세포조각을 합하여 biomass라 하였다. Biomass는 (주) 삼양제넥스에서 제공 받았다.

### 2. 분석방법

Paclitaxel 함량 분석은 HPLC(high performance liquid chromatography)를 사용하며, 모든 샘플은 3개씩 분석하여 평균값을 취하였다. 사용 column은 Capcell Pak C<sub>18</sub> (250mm x 4.6mm, Shiseido, Japan)이며, column 온도는 40°C, 이동상은 acetonitrile/water(20~100% gradient), 유속은 1.0 mL/min, 샘플 주입량은 10  $\mu$ L, UV(227 nm) detector를 사용하였으며 paclitaxel 표준물질은 Sigma 제품을 사용하였다.

### 3. 분별침전을 위한 샘플제조

Biomass로부터 유기용매(메탄올)를 사용하여 paclitaxel를 4회 추출하였다. 추출액에 포함되어 있는 극성불순물을 제거하기 위해 액/액 추출을 수행하였다. 흡착제 처리를 통해 식물세포 유래 타르 및 왁스 성분을 제거하고 헥산을 이용하여 침전을 실시하였으며 이를 통하여 얻어진 crude paclitaxel을 분별침전 공정 최적화에 이용하였다.

### 4. 분별침전(2차침전)

분별침전은 Paclitaxel 순도를 67%까지 높이고 극성불순물을 제거 한다. 추출물을 메탄올에 용해하고 메탄올이 61.5%가 될 때까지 증류수를 떨어뜨리고 Paclitaxel 침전을 얻기 위해 0℃에서 3일간 유지한다. 침전후 침전물은 여과하고 40℃에서 3시간 동안 진공 하에서 건조하면 67%순도의 Paclitaxel 분말로 된다. 이것은 주목나무의 biomass에서 Paclitaxel의 정제공정의 간단하고 효과적인 절차이다. 특별히 그것은 원액 추출물에서 불순물을 제거하는데 매우 효과적이다. 이 공정은 방해 화합물들로부터 Paclitaxel의 빠른 분리에 이용되고 다른 공정들과 비교할 때 용매사용량을 극적으로 줄인다.

## 결과 및 고찰

온도는 분별침전 공정에서 중요한 공정 변수 중에 하나이다. 분별침전 공정에서 순도 및 수율에 미치는 온도의 영향을 확인하였다. Figure 1 (A)에서 보는 바와 같이 분별침전을 위해 일정 온도(0℃)에서 보관할 경우와 단계적으로 보관 온도를 하강하는 경우에 대한 분별침전 효율을 확인하였다. 일정온도(0℃)에서 보관할 경우 높은 수율(~84%)을 얻을 수 있는 반면 단계적으로 보관 온도를 하강할 경우 상대적으로 높은 순도(~79%)를 얻을 수 있었다. 또한 단계적으로, 큰 폭으로 보관 온도를 하강 시킬 경우 더 높은 순도를 얻을 수 있었다. 분별침전 후 일정 온도에서 보관할 경우 최적의 보관온도를 확인하게 위하여 저장온도를 -20℃, -10℃, -5℃, 0℃, 4℃, 8℃, 12℃로 3일간 실험을 수행하였다. Figure 2에서 보는 바와 같이 0℃에서 보관할 경우 순도(~64%)가 가장 높은 것을 확인 하였으며, 수율(~85%)은 4℃가 가장 높았다. 하지만 순도와 수율을 같이 볼 경우는 0℃가 가장 효율적인 것을 확인 하였다. 또한 낮은 온도(0℃전)에서 보관할 경우가 높은 온도(0℃ 후)에서 저장할 때보다 순도와 수율이 더 높았다.

## 요 약

분별침전 공정에서 순도 및 수율에 미치는 온도의 영향을 확인하였다. 분별침전을 위해 일정 온도에서 보관할 경우와 단계적으로 보관 온도를 하강하는 경우에 대한 분별침전 효율을 확인하였다. 일정온도(0℃)에서 보관할 경우 높은 수율(~84%)을 얻을 수 있는 반면 단계적으로 보관 온도를 하강할 경우 상대적으로 높은 순도(~79%)를 얻을 수 있었다. 또한 단계적으로, 큰 폭으로 보관 온도를 하강 시킬 경우 더 높은 순도를 얻을 수 있었다. 저장온도(-20℃~12℃)를 일정하게 유지할 경우 paclitaxel 순도 면에서

0°C가 가장 효과적이었으며 온도변화에 따른 수율은 거의 영향이 없었다. 따라서 최종 정제를 위한 전 처리 공정으로 분별침전 공정이 간단하고 매우 효과적임을 알 수 있었다.

### References

1. Kim, J.H., Song,B.K., Lim,C.B., Kim,K.U., Kang,I.S., Hong,S.S. and Lee,H.S. , "Method for Purifying Taxol from *Taxus* Biomass"(1999), US Patent No. 5,900,367.
2. Kim, J.H., Kang, I.S., Choi, H.K., Hong, S.S., Lee, H.S., "A novel prepurification for paclitaxel from plant cell cultures"(2002), Process Biochemistry, 37, 679-682.
3. Pyo, S.H., Park, H.B., Song, B.K., Han, B.H., Kim, J.H, "A large-scale purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis*"(2004), Process Biochemistry, 39, 1985-1991.

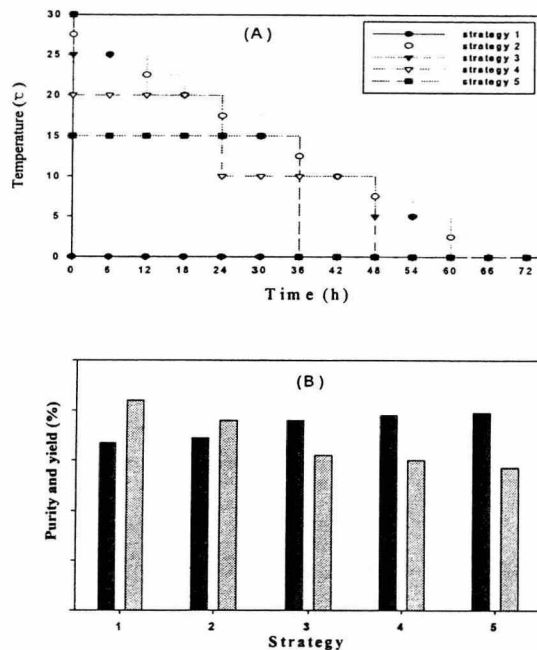


Figure 1. Effect of storage temperature on the yield and purity of paclitaxel in fractional precipitation. (A) Strategy for fractional precipitation at fixed methanol composition (61.5%, v/v) in water, paclitaxel content in crude extract (0.5%, w/v), and storage time (3 days). Strategy 1 : keep at 0°C for 3 days; Strategy 2 : stepwise drop of temperature (temperature interval : 2.5°C,

time interval : 6 h); Strategy 3: stepwise drop of temperature (temperature interval : 5.0°C, time interval : 12 h); Strategy 4 : stepwise drop of temperature (temperature interval : 10.0°C, time interval : 24 h); Strategy 5: stepwise drop of temperature (temperature interval : 15.0°C, time interval : 36 h) (B) Results of fractional precipitation at various strategies.

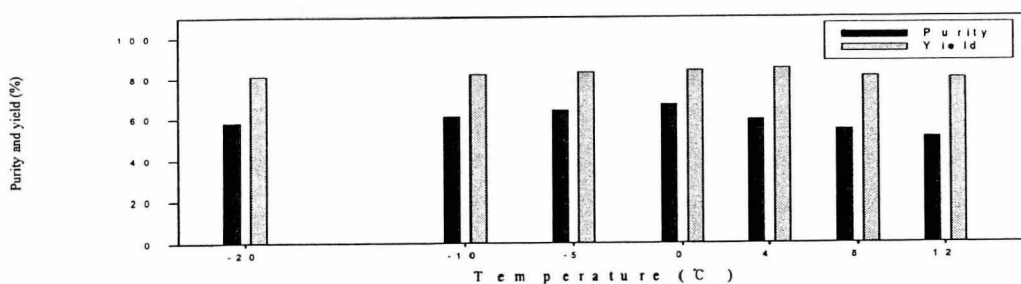


Figure 2. Effect of storage temperature on the purity and yield of paclitaxel in fractional precipitation. The methanol concentration in water, paclitaxel content in the crude extract, storage temperature, and storage time were 61.5% (v/v), 0.5% (w/v), 0°C, and 3 days, respectively.