

고분자물질을 이용한 분별침전 공정에서 파클리탁셀의 입자크기 감소

김민재 · 김진현[†]

공주대학교 화학공학부
31080 충남 천안시 서북구 천안대로 1223-24
(2015년 10월 2일 접수, 2015년 11월 9일 수정본 접수, 2015년 11월 10일 채택)

Decreasing Particle Size of Paclitaxel Using Polymer in Fractional Precipitation Process

Min Jae Kim and Jin-Hyun Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Kongju National University, 1223-24, Cheonan-daero, Seobuk-gu, Cheonan, 31080, Korea
(Received 2 October 2015; Received in revised form 9 November 2015; accepted 10 November 2015)

요 약

원료의약품의 활용도를 향상시키기 위하여 입자 크기의 감소는 매우 중요하다. 본 연구에서는 식물세포 유래 항암 물질 파클리탁셀의 입자크기 감소를 위하여 친수성 고분자물질을 첨가하여 분별침전을 수행하였다. 고분자물질이 첨가된 분별침전을 통해 입자크기를 감소시킬 수 있었다. 특히 고분자물질 HPMC 2910을 이용한 분별침전의 경우 침전물 성장을 가장 효과적으로 저해함을 알 수 있었다. 고분자물질 HPMC 2910농도 0.2%에서 가장 작은 입자크기의 침전물을 얻을 수 있었는데, 대조군 대비 ~35% 정도로 입자크기를 감소시킬 수 있었다. 또한 파클리탁셀 침전물의 입자크기는 친수성 고분자물질 첨가에 따른 침전용액의 제타전위 절대값에 반비례함을 알 수 있었다.

Abstract – In this study, we have for the first time applied fractional precipitation with hydrophilic polymer in order to decrease the particle size of the anticancer agent paclitaxel from plant cell cultures. When compared with the case where no hydrophilic polymer was employed, the addition of hydrophilic polymer in fractional precipitation resulted in a decrease in the size of the paclitaxel precipitate. Among the polymers used, HPMC 2910 was the most effective for inhibition of precipitate growth. A polymer concentration of 0.2% (w/v) obtained the smallest particle size. The particle size was reduced by ~35% compared to control. In addition, the precipitate size was inversely correlated with the absolute value of the zeta potential.

Key words: Paclitaxel, Fractional precipitation, Polymer, Particle size, Zeta potential

1. 서 론

파클리탁셀(paclitaxel)은 기존의 항암제와는 다른 방식인 유사분열기의 암세포 분열을 억제함으로써 비교적 낮은 독성과 강력한 항암활성으로 알려진 가장 효과적인 항암제이다[1,2]. 주목나무(yew tree)의 표피에서 추출한 항암물질로 난소암, 유방암, 카포시 종양, 비소세포성(non-small cell) 폐암 치료용으로 미국 식품의약국으로부터 허가를 받아 현재 가장 중요한 항암제로 사용되고 있다[3,4]. 또한 여러 다른 치료 방법들과의 복합 처방에 관한 임상시험이 진행 중에 있고, 적응증(류마티스성 관절염 및 알츠하이머 치료 등)이 확대되고 있어 향후 파클리탁셀 수요는 계속해서 늘어날 전망이다[5]. 파클리탁셀 주요 생산방법으로는 크게 주목나무에 직접 추출하는

방법, 주목나무 잎으로부터 전구체를 얻어 화학적으로 결합하는 반합성 방법, 주목나무에서 캘러스(callus)를 유도하고 식물세포를 배양하여 얻는 방법이 있다[6-8]. 직접 추출과 반합성 방법은 지속적인 원료의 공급과 추출/정제에 어려움이 있으며 환경보호수인 주목나무 보호에도 적합하지 않다. 그러나 식물세포배양 방법은 외부 인자(기후, 환경 등)에 의한 영향을 받지 않고 생물반응기 내에서 안정적으로 생산이 가능하기 때문에 일정한 품질의 파클리탁셀을 대량 생산할 수 있는 장점이 있다[9].

일반적으로 원료의약품(active pharmaceutical ingredient, API)의 경우 입자크기를 작게 할수록 그 활용도가 높아지게 된다. 입자크기가 작아질수록 제형 시 용해속도(dissolution rate), 약물 분산의 균일성(uniformity of drug dispersion rate), 경구 생체 이용률(oral bioavailability) 등을 향상시킬 수 있는 장점이 있고 또한 결정 입자의 크기가 작을수록 정제 후 건조 단계에서 잔류수분 및 잔류용매 제거에도 상당히 도움이 된다[10-12]. 이러한 측면에서 항암물질 파클리탁셀의 입자크기 감소는 그 활용 면에서 매우 중요하다. 특히 파클리탁셀은 Biopharmaceutics Classification System (BCS)에 의하면, BCS class

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jinhyun@kongju.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

IV 의약품으로 분류되어 물에 대한 용해도가 매우 낮아 그 활용도에 많은 제한이 따르고 있다[13]. 따라서 파클리탁셀의 입자크기 감소에 대한 연구는 매우 필요하다.

입자크기를 줄이기 위하여, “top-down (breaking-down)”과 “bottom-up (building-up)” 기술이 이용되고 있다[10]. 이미 제조된 큰 입자의 의약품을 다양한 방식의 milling이나 고압호모게나이저에 의해 작은 입자로 분쇄하는 top-down 기술은 조업 과정에서 많은 에너지가 요구되고 의약품의 오염이나 분해가 발생할 수 있다. 반면 분자 수준의 의약품을 분무건조, 증발, 초임계안티솔벤트 등이 접목된 침전 기법에 의해 작은 입자의 의약품을 제조하는 bottom-up 기술은 낮은 수율과 높은 장비 비용이 발생할 수 있다[14-18].

분별침전(fractional precipitation) 공정은 항암물질 파클리탁셀을 효율적으로 분리/정제 할 수 있는 매우 간편하고 편리한 방법으로 용해도 차이를 이용하여 높은 순도의 파클리탁셀을 고수율로 얻을 수 있는 대표적인 분리/정제 공정이다[19-23]. 최근에는 분별침전 기법을 파클리탁셀의 입자크기 감소에도 응용하고 있다[24]. 즉, 분별침전 시 다양한 종류의 이온교환수지를 첨가해 줌으로써 침전시간에 따른 원료의약품(파클리탁셀) 입자의 성장을 저해시켜 입자크기를 감소시킬 수 있다. 하지만 분별침전에 사용되는 이온교환수지의 비용 문제뿐만 아니라 분별침전 후 이온교환수의 제거 문제와 같은 단점이 있다. 기존 문헌에 의하면, 침전(precipitation) 과정에서 고분자 물질(polymer) 첨가에 의해 다양한 원료의약품(megestrol acetate, spironolactone, atorvastatin calcium)의 입자크기를 감소시킨다는 연구결과가 보고되었다[10,25,26]. 이러한 연구결과들로부터 이온교환수지 대신 고분자물질을 이용하여 분별침전을 수행할 경우, 이온교환수지 첨가에 따른 비용과 제거 문제를 동시에 해결함으로써 보다 효율적으로 작은 입자의 파클리탁셀을 제조할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서 본 연구에서는 최초로 분별침전 기법에 고분자물질 [HPMC 2910 (hydroxypropyl methylcellulose 2910), PVP-K 90 (polyvinylpyrrolidone-K 90), PVA (polyvinyl alcohol, Mw 31,000-50,000)]을 도입하여 항암물질 파클리탁셀의 입자크기를 줄일 수 있는지를 조사하였다. 즉, 분별침전 시 고분자물질의 종류와 농도를 달리하여 첨가하고 분별침전 시간에 따른 파클리탁셀 입자 성장 양상을 조사함으로써 입자크기 감소 가능성을 평가하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 식물재료

본 실험에 사용된 식물세포배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주(cell line)를 이용하여 배양하였다. *Taxus chinensis*로부터 기원된 현탁액 세포는 24 °C 암조건에서 150 rpm으로 교반하여 배양하였다. 현탁(suspension) 세포는 수정된 Gamborg's B5 배지[27], 30 g/l sucrose, 10 μM naphthalene acetic acid, 0.2 μM 6-benzylamino purine, 1 g/l casein hydrolysate, 1 g/l 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid에서 배양하였다. 세포 배양은 2주마다 새로운 배지로 갈아 주었으며 생산과 배양을 연장시키기 위해 7일과 21일째 되는 날에 1~2% (w/v)의 maltose를 첨가해 주고 elicitor로서 배양 초기에 4 μM의 AgNO₃를 첨가해 주었다. 식물세포배양 후 배양액으로부터 decanter (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)와 고속원심분리기(α-Laval, BTPX205GD-35CDEEP)를 이용하여 식물세포와 세포조각(cell debris)을 회수하였다. 회수한 식물세포와 세포조각을 합하여 바이오

매스라 하였다. 본 연구에 사용된 바이오매스는 (주)삼양제넥스로부터 제공 받았다.

2-2. 파클리탁셀 분석

파클리탁셀 함량 분석을 위해 HPLC 시스템(Waters, USA)과 Capell Pak C₁₈ (250 × 4.6 mm, Shiseido, Japan) 컬럼을 사용하였다. 이동상은 증류수와 아세트니트릴 혼합용액(65/35~35/65, v/v, 구배용매조성법)을 유속 1.0 ml/min으로 흘려주었다. 시료 주입량은 20 μl이며 227 nm에서 UV에 의해 검출하였다. HPLC 분석은 표준정량곡선을 이용하였으며 표준시료는 Sigma-Aldrich 제품(순도: >97%)을 사용하였다[28].

2-3. 분별침전을 위한 시료준비

식물세포배양액으로부터 회수한 바이오매스와 메탄올의 비율을 1/1 (w/v)로 하여 실온에서 4회 반복 추출하고 추출액을 rotary evaporator (CCA-1100, EYELA, Japan)를 이용하여 농축(원액의 30%)하여 액-액 추출을 수행하였다. 농축된 메탄올 용액에 메틸렌 클로라이드를 첨가(메탄올 농축액의 25%)하고, 30 min 동안 교반 후 정제시켜 상 분리를 유도하였다. 액-액 추출을 수행하여 파클리탁셀이 포함된 하층인 메틸렌 클로라이드 층으로 파클리탁셀을 회수하여 농축하고 여과지(150 mm, Whatman)로 감압 여과 후 건조하였다. 식물세포 유래 타르/왁스 성분을 제거하기 위하여 건조된 추출물(crude extract)을 메틸렌 클로라이드에 20% (v/w) 비율로 녹이고 합성흡착제인 sylopute (Fuji Silysia Chemical Ltd., Japan)를 건조된 추출물 대비 50% (w/w) 비율로 첨가하여 40 °C 항온조(PS-1000, EYELA, Japan)에서 30 min 동안 교반하여 반응시킨 후 여과하였다. 여과액은 30 °C, 감압상태에서 건조하여 핵산 침전 공정에 이용하였다. 건조된 시료를 메틸렌 클로라이드에 녹여 핵산에 떨어뜨려 침전을 유도하여 비극성불순물(non-polar impurity)을 제거하였다(메틸렌 클로라이드/핵산=1/10, v/v). 핵산 침전 후 여과를 통하여 파클리탁셀 침전물을 얻고 35 °C에서 24시간 동안 진공오븐(UP-2000, EYELA, Japan)으로 건조하였다. 그리고 HPLC 정제 공정은 ODS C₁₈ 컬럼(50 mm × 500 mm, Shiseido, Japan)과 Silica 컬럼(50 mm × 500 mm, Shiseido, Japan)으로 구성되었다. 먼저 ODS 컬럼 HPLC에서 시료 주입량은 50~150 mg/ml, 유속은 3~5 cm/min, UV detector의 파장은 227 nm, 용리 조건은 메탄올/물(65/35, v/v)로 하였다. 그리고 미량의 불순물들을 추가적으로 제거하기 위한 Silica 컬럼 HPLC에서는 시료 주입량은 50~150 mg/l, 용리 조건은 메틸렌 클로라이드/메탄올(98/2, v/v)로 하였으며 UV detector의 파장은 227 nm에서 측정하였다[20]. 최종 정제된 파클리탁셀(순도: 98.7%)을 분별침전에 이용하였다.

2-4. 분별침전

파클리탁셀 입자크기 감소를 위한 분별침전 공정의 개략도를 Fig. 1에 나타내었다. 고분자물질인 HPMC 2910, PVP K90, PVA 31,000~50,000를 각각 증류수에 미리 충분히 녹인 뒤 사용하였다. 실험에 사용된 고분자물질의 농도는 0.1, 0.2, 0.3% (w/v)로 변화시켜 실험을 수행하였다. 파클리탁셀 시료를 메탄올에 녹이고(순수 파클리탁셀 함량: 0.4%, w/v) 메탄올이 61.5%가 될 때까지 고분자물질이 포함된 증류수를 교반(180 rpm)하여 10초에 한 방울씩 떨어트렸다. 그리고 4 °C 항온 흡습기(KCL-2000W, EYELA, Japan)에 보관하여 파

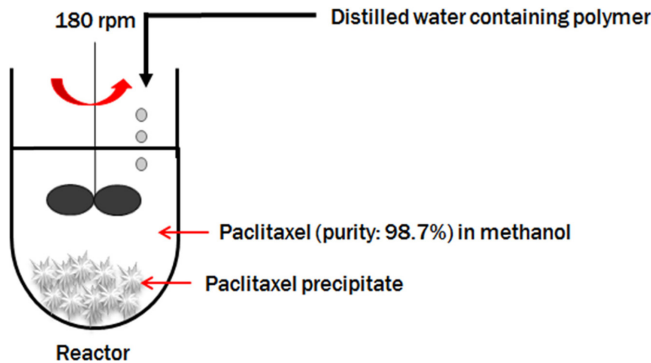


Fig. 1. Schematic diagram of fractional precipitation with a polymer for decreasing particle size of paclitaxel. The methanol composition in water, pure paclitaxel content, and temperature were 61.5% (v/v), 0.4% (w/v), and 4 °C, respectively.

클리탁셀 침전물을 얻었다. 항온 항습기에서 침전 시간에 따라 얻은 파클리탁셀 침전물을 전자현미경을 이용하여 측정하였다. 기존 문헌[24]에 의하면, 시료의 순도와 분별침전 시 메탄올 용액에 녹이는 순수한 파클리탁셀의 함량이 증가할수록 과포화도가 높아져 더 빠른 시간 내에 파클리탁셀 침전물을 얻을 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 시료의 순도 98.7%인 경우 순수한 파클리탁셀의 함량 0.5% (w/v) 이상에서는 침전물이 쉽게 뭉쳐 입자의 형태 조절에 어려움이 있어 순수한 파클리탁셀의 함량 0.4% (w/v)에서 침전물의 크기를 감소시키기 위한 분별침전을 수행하였다.

2-5. 침전물 크기 및 용액 제타전위 측정

분별침전 공정에서 파클리탁셀 침전물 형태 및 크기를 측정하기 위해 전자현미경, SV-35 Video Microscope 시스템(Some Tech., Korea)을 사용하였다. 분별침전 동안 파클리탁셀 침전물을 고배율($\times 100$)에서 관찰하였다[20]. 관찰된 파클리탁셀 침전물은 IT-Plus 시스템(Some Tech., Korea)에서 동화상으로 확인하였으며 이를 통해 파클리탁셀 침전물의 형태를 확인하고 크기를 측정하였다.

세 종류의 고분자물질(HPMC 2910, PVP K90, PVA)를 이용한 분별침전 공정에서 제타전위(zeta potential) 값 변화를 측정하였다. ELS-Z (Photal, Japan)를 이용하여 제타전위를 측정하였으며 측정된 제타전위는 ELS-Z software를 사용해 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 고분자물질 첨가에 따른 영향

기존 문헌[10,25,26]에서 원료의약품의 입자크기 감소에 효과적인 세 종류의 고분자물질(HPMC 2910, PVP K90, PVA)을 이용하여 분별침전을 수행하였다. 파클리탁셀 분별침전 공정에서 분별침전이 완료되는데 걸리는 시간에 많은 차이가 있을 뿐만 아니라 분별침전에 많은 시간(>24시간)이 소요되어 파클리탁셀의 대량 분리 및 정제에 많은 한계가 있었다[19-22]. 본 연구에서 분별침전을 위해 파클리탁셀을 메탄올에 녹인 후 증류수만을 이용하여 분별침전을 수행하였을 경우(고분자물질을 첨가하지 않은 경우), Fig. 2에서 보는 바와 같이 분별침전 15시간 이상부터는 입자 크기에 큰 차이가 없었다. 또한 분별침전 15시간 이내에 대부분의 파클리탁셀을 회수 가능하였다[10]. 따라서 본 연구를 위한 모든 분별침전은 최대 15시간까지만 수

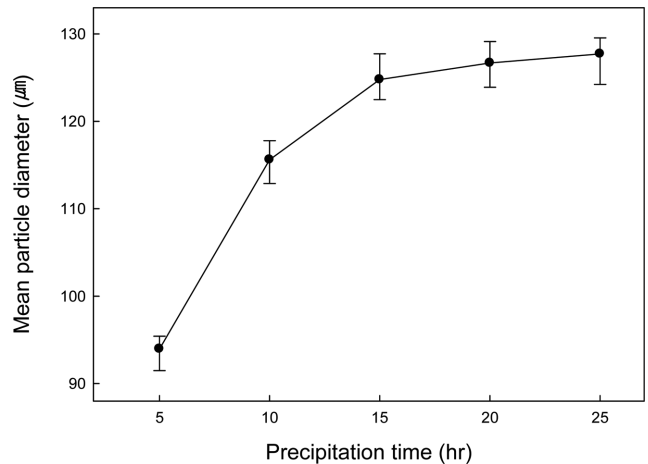


Fig. 2. Change of the size of paclitaxel precipitate through precipitation time in fractional precipitation. The methanol composition in water, pure paclitaxel content, crude extract purity, and precipitation temperature were 61.5% (v/v), 0.4% (w/v), 98.7%, and 4 °C, respectively.

행하였다.

먼저 고분자물질 PVP K90을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우에 대해 분별침전 과정에서 파클리탁셀 침전물의 입자크기 변화를 Fig. 3(a)에 나타내었다. 대조군(control)의 경우에는 분별침전 5, 10, 15 시간 일 때 입자크기가 각각 93.97, 115.61, 124.78 μm이었다. 침전물 입자는 원형에 가까운 둥근 형태로 침전시간이 경과함에 따라 입자가 점차 퍼지는 양상을 보이며 입자크기가 증가하였다. 고분자물질을 첨가하지 않은 기존의 분별침전 결과에서 침전시간이 경과할수록 파클리탁셀 침전물의 입자크기가 커지는 경향과 일치함을 알 수 있었다[24]. PVP K90 0.1% (w/v)를 첨가한 경우에는 분별침전 5, 10, 15 시간에서 입자크기는 83.52, 87.39, 103.86 μm, PVP K90 0.2% (w/v)를 첨가한 경우에는 85.23, 100.11, 111.25 μm, PVP K90 0.3% (w/v)를 첨가한 경우에는 89.51, 103.90, 116.15 μm이었다. 침전물 모양은 대조군과 유사하나 PVP K90이 첨가된 경우 좀 더 작은 알갱이 형태의 침전물들이 서로 엉겨서 뭉치는 경향이 있었고 침전시간이 길어질수록, 고분자물질의 농도가 커질수록 입자크기가 증가하였다. PVP K90을 첨가한 경우 농도에 관계없이 대조군에 비해 파클리탁셀 침전물의 입자크기가 감소함을 알 수 있었다. 또한 분별침전 5 시간에서 PVP K90농도에 따른 입자크기 차이는 비교적 작았지만 분별침전 10~15 시간에서 PVP K90 농도 0.1% (w/v)일 때 대조군 대비 20~30 μm 정도 감소하였으며 0.2, 0.3% (w/v)일 때는 대조군 대비 10~15 μm 정도 감소하였다. PVP K90 농도 0.1% (w/v)에서 입자크기가 가장 많이 감소하였으며 농도(0.2, 0.3%, w/v)가 증가할수록 입자크기가 오히려 증가하는 경향을 보였다.

고분자물질 PVA를 농도별(0.1, 0.2, 0.3%, w/v)로 첨가한 경우 분별침전 과정에서 파클리탁셀 침전물의 입자크기 변화를 Fig. 3(b)에 나타내었다. PVA 0.1% (w/v)를 첨가한 경우에는 분별침전 5, 10, 15 시간에서 입자크기는 86.67, 98.37, 115.27 μm, PVA 0.2% (w/v)를 첨가한 경우에는 88.57, 102.28, 115.88 μm, PVA 0.3% (w/v)를 첨가한 경우에는 83.15, 100.23, 118.60 μm이었다. 넓은 원형으로 입자들이 조밀하게 침전되었고 PVP K90과 다르게 PVA 농도와는 무관하게 침전시간이 길어질수록 입자크기가 증가하였다. 각 분별침전 시간에서 PVA를 첨가한 경우 대조군에 비해 파클리탁셀 침전물의

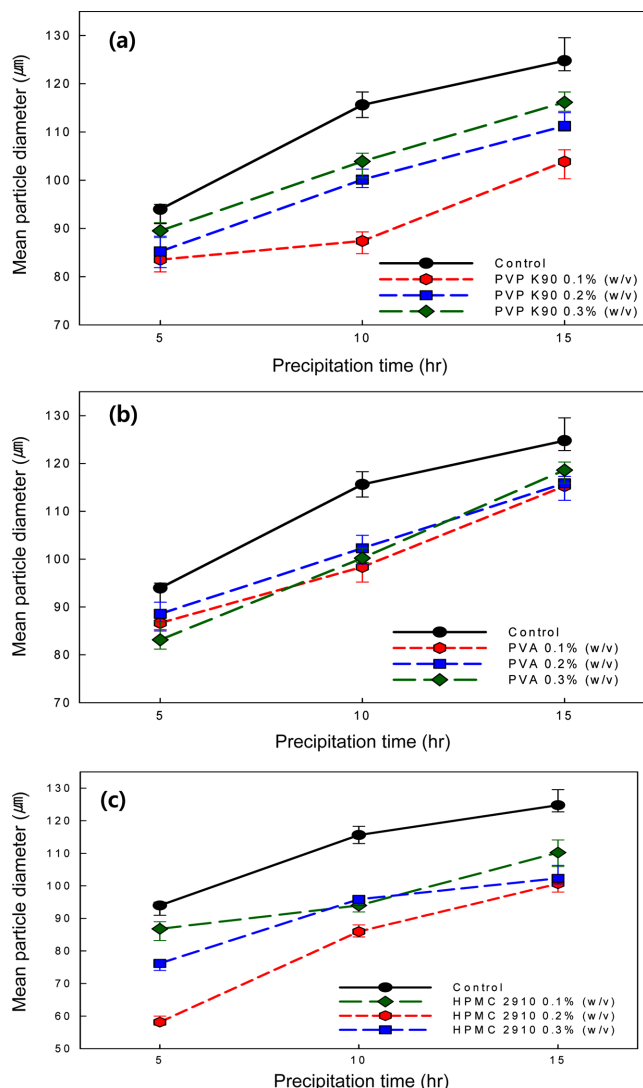


Fig. 3. Effect of polymer concentration on the particle size of paclitaxel during fractional precipitation: (a) PVP K90; (b) PVA; (c) HPMC 2910. The pure paclitaxel purity, methanol composition in water, pure paclitaxel content, and precipitation temperature were 98.7%, 61.5% (v/v), 0.4% (w/v), and 4 °C, respectively.

입자크기가 5~15 μm 정도 감소하였으나 PVP K90에 비해 입자크기 감소율은 작았다. 또한 입자크기에 미치는 PVA 농도별 차이는 미미하였다.

고분자물질 HPMC 2910을 농도별(0.1, 0.2, 0.3%, w/v)로 첨가한 경우 분별침전 과정에서 파클리탁셀 침전물의 입자크기 변화를 Fig. 3(c)에 나타내었다. HPMC 2910 0.1% (w/v)를 첨가한 경우에는 분별침전 5, 10, 15 시간에서 입자크기는 86.80, 93.95, 110.22 μm , HPMC 2910 0.2% (w/v)를 첨가한 경우에는 58.14, 85.94, 100.65 μm , HPMC 2910 0.3% (w/v)를 첨가한 경우에는 76.15, 95.85, 102.32 μm 이었다. 바늘모양의 단일가닥 형태로 응집이 되어 눈꽃모양을 이루는 것을 알 수 있었다. 침전시간이 경과할수록 입자크기가 증가하였다. PVP K90과 다르게 HPMC 2910 농도가 증가할수록 입자크기가 증가하는 것이 아니라 HPMC 2910 0.2% (w/v)에서 입자크기가 가장 작음을 관찰하였다. HPMC 2910농도에 관계없이 대조군에 비해 파클리탁셀 침전물의 입자크기가 감소함을 알 수 있었다. HPMC 2910

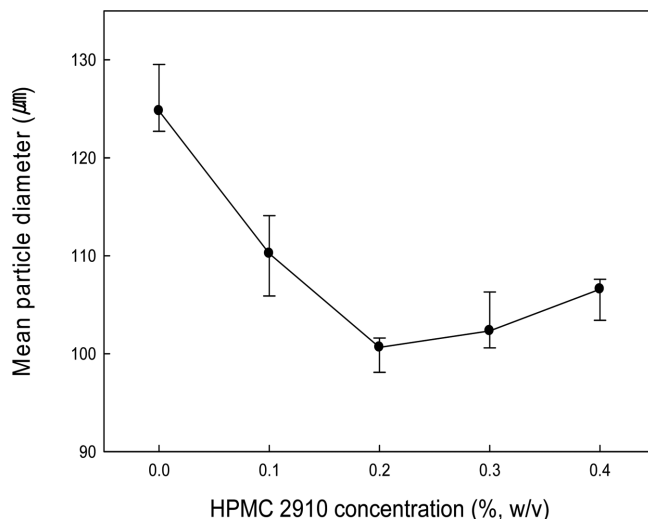


Fig. 4. Effect of HPMC 2910 concentration on the particle size of paclitaxel. The methanol composition in water, pure paclitaxel content, crude extract purity, and precipitation temperature were 61.5% (v/v), 0.4% (w/v), 98.7%, and 4 °C, respectively.

0.2% (w/v)일 때 분별침전 5~15 시간에서 대조군 대비 20~40 μm (30~35%) 정도 감소하였으며 0.1, 0.3% (w/v)일 때는 대조군 대비 10~25 μm 정도 감소하였다. HPMC 2910 농도와 파클리탁셀 침전물 입자크기와 상관 관계를 좀더 자세히 조사하여 Fig. 4에 나타내었다. HPMC 2910 농도 증가에 따라 입자크기가 감소하다 0.2% (w/v) 이상에서는 입자크기가 오히려 증가하는 경향을 보였다.

이상의 결과로부터 고분자물질(PVP K90, PVA, HPMC 2910)을 첨가한 경우 대조군에 비해 더 작은 입자의 파클리탁셀을 얻을 수 있었다. 이러한 현상은 첨가된 고분자물질이 고체-액체 계면의 표면장력을 낮추고 파클리탁셀의 핵 생성 속도를 증가시켜(핵 성장 저해) 입자크기가 감소하는 것으로 판단된다[29]. 더 나아가 고체-액체 계면에 고분자물질의 흡착은 새로 생성되는 소수성 표면의 계면장력을 감소시키고 공간적(steric) 또는 정전기적(electrostatic) 안정화를 제공하여 핵 성장을 저해하게 된다. 파클리탁셀 순도(~98.7%) 및 수율(>85%)은 분별침전 동안 거의 변화가 없었으며 이러한 현상은 기존의 연구 결과와도 유사함을 알 수 있었다[24]. 특히 HPMC 2910이 분별침전 과정에서 파클리탁셀 침전물의 입자크기 감소효과가 가장 좋았는데, 이러한 결과는 HPMC 2910이 파클리탁셀 입자와의 높은 친화력(affinity)에 의해 입자의 성장 저해에 가장 효과적이기 때문으로 판단된다[10]. 고분자물질과 파클리탁셀 입자와의 친화력이 증가할수록 파클리탁셀 입자 성장을 저해 하는데 더 효과적인 공간적 저해 요소(steric barrier) 역할을 하기 때문에 침전물의 크기가 감소하게 된다[10,26]. HPMC 2910 (0.2%, w/v)과 PVP K90 (0.1%, w/v)의 경우 입자크기 감소를 위한 최적의 농도가 다르게 나타났는데, 이는 고분자물질과 파클리탁셀 사이의 친화력이 서로 다를 뿐 아니라 고분자물질의 농도가 일정량 이상이 되면 용액의 높은 점도로 인한 반용매(antisolvent)인 증류수를 향한 용매(메탄올)의 적절한 확산을 억제하기 때문으로 판단된다[10]. 높은 고분자물질 농도에 따른 입자크기 증가 현상은 기존 문헌[10,30-32]에도 보고되었다.

항암물질 megestrol acetate (MA)는 고분자물질 HPMC 2910 (0.2%, w/v)를 첨가할 경우 첨가하지 않은 경우에 비해 2~4배 정도

입자크기가 감소하였다[10]. 항생물질 azithromycin는 고분자물질 HPMC 2910 (0.35%, w/v)를 첨가할 경우 첨가하지 않은 경우에 비해 2배 정도 입자크기가 감소하였다[33]. 이처럼 동일한 고분자물질을 첨가하여도 첨가 농도와 대상 제품, 침전 시 사용되는 용매에 따라 고분자물질의 입자크기 감소 효과는 차이를 보였다. 또한 항암물질 파클리탁셀은 고분자물질 대신 이온교환수지를 첨가하여 분별침전을 수행할 경우 첨가하지 않은 경우에 비해 4~5배 정도 입자크기가 감소하였다[24]. 즉, 파클리탁셀 입자크기 감소 측면에서는 고분자물질보다 이온교환수지가 더 우수하였으나 별도의 추가 조업(분별침전 후 이온교환수 제거) 및 비용(이온교환수지 비용)이 발생하는 문제점이 있다.

3-2. 입자크기와 제타전위의 관계

고분자물질 첨가 유무와 고분자물질 종류에 따라 분별침전 15시간에서 분별침전 용액의 제타전위를 측정하여 Fig. 5에 나타내었다. 고분자물질을 첨가하지 않은 경우(대조군) 분별침전 용액의 제타전위 값(입자크기)은 0.08 mV (124.78 μ m)이었다. 동일한 농도(0.2%, w/v)로 고분자물질 PVA, PVP K90, HPMC 2910를 각각 첨가하였을 경우 분별침전 용액의 제타전위 값(입자크기)은 각각 4.58 mV (115.88 μ m), 15.95 mV (111.25 μ m), 22.73 mV (100.65 μ m)로 나타났다. 분별침전 시 파클리탁셀의 입자크기와 용액의 제타전위 값을 비교해 보면, 입자크기가 작아질수록 제타전위 값이 커짐을 알 수 있었다. 분별침전에서 파클리탁셀의 입자크기(100.65 μ m)가 가장 작게 나타난 HPMC 2910 0.2% (w/v)의 경우 가장 큰 제타전위 값(22.73 mV)을 나타내었다. 즉 파클리탁셀의 입자크기와 제타전위 값의 크기는 반비례 관계를 나타내어 분별침전 용액의 제타전위 절대값이 증가할수록 분별침전을 통하여 얻은 파클리탁셀 침전물의 입자크기가 감소하였다. 이러한 현상은 제타전위 절대값이 큰 고분자물질은 상호간의 반발력이 강하여 파클리탁셀 침전물의 입자 성장 과정에서 서로 뭉침 현상이 없이 안정되게 유지되어 더 효과적인 공간적 저해요소 역할을 하기 때문으로 판단된다[34]. 이러한 파클리탁셀의 입자크기 감소는 원료의약품의 건조뿐만 아니라 제형(formulation)을 개발하는 과정에서 매우 유용하게 활용될 수 있을

것으로 판단된다[10,26].

4. 결 론

본 연구에서는 분별침전 공정에 친수성 고분자물질을 첨가하여 항암물질 파클리탁셀의 입자크기 감소 가능성을 평가하였다. 고분자물질의 종류(HPMC 2910, PVP K90, PVA)와 농도(0.1, 0.2, 0.3%, w/v)를 달리하여 분별침전을 수행한 결과, 고분자물질의 종류와 농도에 따라 침전물의 입자크기에 차이를 보였으며 모든 경우 대조군에 비해 입자크기가 감소하였다. 특히 분별침전 시 HPMC 2910 (0.2%, w/v)를 첨가할 경우, 대조군에 비하여 입자크기가 20~40 μ m (30~35%) 정도 감소하여 입자크기 감소에 가장 효과적이었다. 또한 분별침전 시 침전물 파클리탁셀의 입자크기와 침전용액의 제타전위 값은 반비례 관계를 나타내어 분별침전 용액의 제타전위 절대값이 증가할수록 분별침전을 통하여 얻은 파클리탁셀 침전물의 입자크기가 감소하였다. 제타전위 절대값이 큰 고분자물질은 상호간의 반발력이 강하여 파클리탁셀 침전물의 입자 성장 과정에서 서로 뭉침 현상이 없이 안정되게 유지되어 더 효과적인 공간적 저해요소 역할을 하기 때문으로 판단된다. 이러한 연구결과는 원료의약품인 파클리탁셀의 활용도 향상뿐만 아니라 효과적 건조에 매우 유용하게 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감 사

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업의 결과물입니다(과제번호 : 2015016271).

References

- Rowinsky, E. K., Cazenave, L. A. and Donehower, R. C., "Taxol : a Novel Investigational Antimicrotubule Agent," *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1247-1259(1990).
- Schiff, P. B., Fant, J. and Horwitz, S. B., "Promotion of Microtubule Assembly in vitro by Taxol," *Nature*, **277**, 655-667(1979).
- Kim, G. J. and Kim, J. H., "A Simultaneous Microwave-assisted Extraction and Adsorbent Treatment Process Under Acidic Conditions for Recovery and Separation of Paclitaxel from Plant Cell," *Korean J. Chem. Eng.*, **32**, 1023-1028(2015).
- Kim, J. H., "Paclitaxel: Recovery and Purification in Commercialization Step," *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1-10(2006).
- Hsiao, J. R., Leu, S. F. and Huang, B. M., "Apoptotic Mechanism of Paclitaxel-induced Cell Death in Human Head and Neck Tumor Cell Lines," *J. Oral Pathol. Med.*, **38**, 188-197(2009).
- Rao, K. V., Hanuman, J. B., Alvarez, C. and Stoy, M., "A New Large-scale Process for Taxol and Related Taxanes from *Taxus brevifolia*," *Pharm. Res.*, **12**, 1003-1010(1995).
- Baloglu, E. and Kingston, D. G., "A New Semisynthesis of Paclitaxel from Baccatin," *J. Nat. Prod.*, **62**, 1068-1071(1999).
- Choi, H. K., Son, S. J., Na, G. H., Hong, S. S., Park, Y. S. and Song, J. Y., "Mass Production of Paclitaxel by Plant Cell Culture," *Korean J. Plant Biotechnol.*, **29**, 59-62(2002).
- Georgiev, M. I., Weber, J. and Maciuk, A., "Bioprocessing of Plant Cell Cultures for Mass Production of Targeted Compounds," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **83**, 809-823(2009).

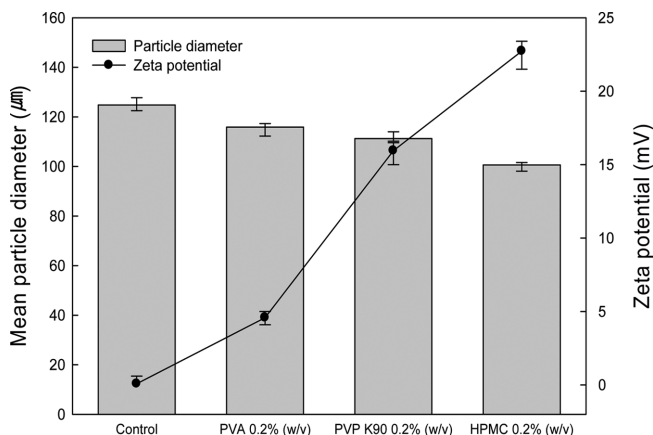


Fig. 5. The relationship between particle size of paclitaxel precipitate and zeta potential of reacting solution with polymer during fractional precipitation. The methanol composition in water, pure paclitaxel content, crude extract purity, precipitation temperature, and precipitation time were 61.5% (v/v), 0.4% (w/v), 98.7%, 4 $^{\circ}$ C, and 15 hr, respectively.

10. Cho, E. B., Cho, W. K., Cha, K. H. and Park, J. S., "Enhanced Dissolution of Megestrol Acetate Microcrystals Prepared by Antisolvent Precipitation Process Using Hydrophilic Additives," *Int. J. Pharm.*, **396**, 91-98(2010).
11. Yeo, S. D., Kim, M. S. and Lee, J., "Recrystallization of Sulfathiazole and Chlorpropamide Using the Supercritical Fluid Antisolvent Process," *J. Supercrit. Fluids*, **25**, 143-154(2003).
12. Pyo, S. H., Kim, M. S., Cho, J. S., Song, B. K., Han, B. H. and Choi, H. J., "Efficient Purification and Morphology Characterization of Paclitaxel From Cell Cultures of *Taxus chinensis*," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **79**, 1162-1168(2005).
13. Prakash, K., Jieun, R., Kim, H. M., Kim, I. S., Kim, J. T., Kim, H. I., Cho, J. M., Yun, G. A. and Lee, J. H., "Pharmaceutical Particle Technologies: An Approach to Improve Drug Solubility, Dissolution and Bioavailability," *Asian J. Pharm. Sci.*, **9**, 304-316(2014).
14. Ruala, J., Eerikaine, H. and Kauppinen, E. I., "Influence of the Solvent Composition on the Aerosol Synthesis of Pharmaceutical Polymer Nanoparticles," *Int. J. Pharm.*, **284**, 13-21(2004).
15. Chen, X., Young, T. J., Sarkari, M., Williams III, R. O. and Johnston, K. P., "Preparation of Cyclosporine A Nanoparticles by Evaporative Precipitation into Aqueous Solution," *Int. J. Pharm.*, **242**, 3-14(2002).
16. Vehring, R., "Pharmaceutical Particle Engineering Via Spray Drying," *Pharm. Res.*, **25**, 999-1022(2008).
17. Weers, J. G., Tarara, T. E. and Clark, A. R., "Design of Fine Particles for Pulmonary Drug Delivery," *Expert Opin. Drug Deliv.*, **4**, 297-313(2007).
18. Kawashima, Y. and York, P., "Drug Delivery Applications of Supercritical Fluid Technology," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **60**, 297-298(2008).
19. Han, M. G., Jeon, K. Y., Mun, S. and Kim, J. H., "Development of a Micelle-fractional Precipitation Hybrid Process for the Pre-purification of Paclitaxel from Plant Cell Cultures," *Process Biochem.*, **45**, 1368-1374(2010).
20. Jeon, K. Y. and Kim, J. H., "Improvement of Fractional Precipitation Process for Pre-purification of Paclitaxel," *Process Biochem.*, **44**, 736-741(2009).
21. Jeon, S. I., Mun, S. and Kim, J. H., "Optimal Temperature Control in Fractional Precipitation for Paclitaxel Pre-purification," *Process Biochem.*, **41**, 276-280(2006).
22. Kim, J. H., Kang, I. S., Choi, H. K., Hong, S. S. and Lee, H. S., "Fractional Precipitation for Paclitaxel Pre-purification From Plant Cell Cultures of *Taxus chinensis*," *Biotechnol. Lett.*, **22**, 1753-1756(2000).
23. Pyo, S. H., Park, H. B., Song, B. K., Han, B. H. and Kim, J. H., "A Large Scale Purification of Paclitaxel from Cell Cultures of *Taxus chinensis*," *Process Biochem.*, **39**, 1985-1991(2004).
24. Lee, J. Y. and Kim, J. H., "Decrease in the Particle Size of Paclitaxel by Increased Surface Area Fractional Precipitation," *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **40**, 169-174(2012).
25. Dong, Y., Ng, W. K., Shen, S., Kim, S. and Tan, R. B., "Preparation and Characterization of Spironolactone Nanoparticles by Antisolvent Precipitation," *Int. J. Pharm.*, **375**, 84-88(2009).
26. Zhang, H. X., Wang, J. X., Zhang, Z. B., Le, Y., Shen, Z. G. and Chen, J. F., "Micronization of Atorvastatin Calcium by Antisolvent Precipitation Process," *Int. J. Pharm.*, **374**, 106-113(2009).
27. Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K., "Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells," *Exp. Cell Res.*, **50**, 151-158(1968).
28. Lee, C. G. and Kim, J. H., "Optimization of Adsorbent Treatment Process for the Purification of Paclitaxel from Plant Cell Cultures of *Taxus chinensis*," *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**, 497-502(2014).
29. Dalvi, S. V. and Dave, R. N., "Controlling Particle Size of a Poorly Water-soluble Drug Using Ultrasound and Stabilizers in Antisolvent Precipitation," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **48**, 7581-7593(2009).
30. Labouret, A. D., Thioune, O., Fessi, H., Devissaguet, J. P. and Puisieux, F., "Application of An Original Process for Obtaining Colloidal Dispersions of Some Coating Polymers Preparation, Characterization, Industrial Scale-up," *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **21**, 229-241(1995).
31. Stainmesse, S., Orecchioni, A. M., Nakache, E., Puisieux, F. and Fessi, H., "Formation and Stabilization of a Biodegradable Polymeric Colloidal Suspension of Nanoparticles," *Colloid Polym. Sci.*, **273**, 505-511(1995).
32. Thioune, O., Fessi, H., Devissaguet, J. P. and Puisieux, F., "Preparation of Pseudolatex by Nanoprecipitation: Influence of the Solvent Nature on Intrinsic Viscosity and Interaction Constant," *Int. J. Pharm.*, **146**, 233-238(1997).
33. Pouretedal, H. R., "Preparation and Characterization of Azithromycin Nanodrug Using Solvent/antisolvent Method," *Int. Nano Lett.*, **4**, 103(2014).
34. Ryu, H. K. and Kim, J. H., "Effect of Zeta Potential on Fractional Precipitation for the Purification of Paclitaxel from Plant Cell Cultures of *Taxus chinensis*," *Korean J. Microbiol. Biotechnol.*, **42**, 114-120(2014).