

*Taxus chinensis*로부터 파클리탁셀 정제를 위한 개선된 아세톤-물 분별침전 공정 개발 및 그 동역학 및 열역학적 해석

강희종 · 김진현[†]

공주대학교 화학공학부

31080 충남 천안시 서북구 천안대로 1223-24

(2021년 4월 9일 접수, 2021년 4월 30일 수정본 접수, 2021년 5월 5일 채택)

Development of An Improved Acetone-Water Fractional Precipitation Process for Purification of Paclitaxel from *Taxus chinensis* and Its Kinetic and Thermodynamic Analysis

Hoe-Jong Kang and Jin-Hyun Kim[†]

Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Cheonan, 31080, Korea

(Received 9 April 2021; Received in revised 30 April 2021; Accepted 5 May 2021)

요 약

본 연구에서는 초음파 캐비테이션 버블과 가스 버블을 이용한 파클리탁셀의 개선된 아세톤-물 분별침전 공정을 개발하였다. 전통적 방법에 비해 침전에 소요되는 시간이 20~25배 단축되었다. 또한 파클리탁셀의 침전물 크기는 3.5~5.5배 감소하였으며 파클리탁셀의 확산 계수는 3.5~6.7배 증가하였다. 초음파 캐비테이션 버블을 이용한 침전의 경우 초음파 파워는 증가할수록, 침전 온도는 감소할수록 침전 속도 상수는 증가하였다. 가스 버블을 이용한 침전의 경우 가스 유량은 증가할수록, 침전 온도는 감소할수록 침전 속도 상수는 증가하였다. 열역학적 해석을 통해 개선된 분별침전은 비자발적 발열 공정이었다.

Abstract – In this study, an improved acetone-water fractional precipitation process for paclitaxel using ultrasonic cavitation bubbles and gas bubbles was developed. Compared to the conventional method, the time required for precipitation has been reduced by 20~25 times. In addition, the particle size of paclitaxel decreased by 3.5~5.5 times and the diffusion coefficient of paclitaxel increased by 3.5~6.7 times. In the case of precipitation using ultrasonic cavitation bubbles, as the ultrasonic power increased and the temperature decreased, the precipitation rate constant increased. In the case of precipitation using gas bubbles, as the gas flow rate increased and the temperature decreased, the precipitation rate constant increased. Thermodynamic parameters revealed the exothermic, irreversible, and nonspontaneous nature of the improved fractional precipitation.

Key words: Paclitaxel, Fractional precipitation, Ultrasound, Cavitation bubbles, Gas bubbles

1. 서 론

파클리탁셀(paclitaxel)은 주목(yew tree)의 표피에서 발견된 항암 활성을 가진 디테르페노이드(diterpenoid) 화합물이다[1,2]. 파클리탁셀은 전이성 난소암, 유방암, 폐암, 두경부암, 방광암 치료에 널리 사용되고 있다[3-5]. 파클리탁셀은 주로 주목으로부터 직접 추출하는 방법[6], 전구체(baccatin III, 10-deacetyl baccatin III, 13-dehydroxybaccatin III, 10-deacetyl paclitaxel 등)를 이용한 반합성 방법[7], 캘러스

(callus)를 이용한 식물세포배양 방법으로 생산된다[8]. 최근에는 외부 인자(기후, 환경)의 영향이 적고 생물반응기에서 안정적으로 균일한 제품 생산이 가능한 식물세포배양이 각광을 받고 있다[9-11]. 식물세포배양에 의해 생산되는 이차대사산물인 파클리탁셀은 세포 내 제품(intracellular product)으로 대부분 식물세포(바이오매스)에 축적되어 있다. 바이오매스로부터 높은 순도의 파클리탁셀을 얻기 위하여 여러 추출 및 정제 단계를 거치게 된다. 일반적으로 유기 용매를 이용하여 바이오매스로부터 파클리탁셀을 추출하고, 전 처리(pre-purification) 및 최종 정제(purification)를 거쳐 제품을 생산한다. 특히 전 처리 공정은 최종 정제 비용에 많은 영향을 미친다[12,13]. 따라서 전처리 공정 개발은 매우 중요하며, 전 처리를 통해 가급적 시료의 순도를 높여 주어야 최종 정제, 특히 HPLC를 이용한 정제에서의 비용을 줄일 수 있다[14].

[†]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.

2000년 최초로 보고된 분별침전(fractional precipitation)은 파클리탁셀의 용해도 차이를 이용한 간단하고 효율적인 전 처리 방법이다[15]. 이후 분별침전 조건(용매, 온도, 시료 특성) 최적화에 대한 연구로 높은 순도(>50%)의 파클리탁셀을 얻을 수 있었다[16,17]. 하지만 파클리탁셀의 용해도 한계로 분별침전에 많은 시간(~3 일)이 소요되어 대량생산 공정에 적용하는데 어려움이 있다[12,13,18]. 이러한 문제점을 개선하기 위하여 글라스 비즈(glass beads) 또는 이온교환수지를 이용하여 침전기 내부 표면적(surface area per working volume)을 증가시켜 침전 효율을 향상시키려는 연구가 시도되었다[19,20]. 이러한 연구들을 통해 긴 침전 시간은 어느 정도 단축되었지만 파클리탁셀의 대량 생산 공정에 적용하기에는 여전히 미흡한 실정이다. 2014년에는 분별침전 용매(메탄올-증류수 혼합물)의 극성 조절에 의해 침전 시간을 단축시켰지만 과도한 증류수 첨가로 파클리탁셀 순도가 오히려 감소하였다[21]. 최근에는 초음파를 이용한 분별침전으로 기존의 긴 침전 시간을 획기적으로 개선하였다[22]. 즉, 분별침전 과정에 초음파를 도입함으로써 핵 생성 속도를 증가시켜 분별침전 시간을 단축할 수 있었다. 이러한 결과는 초음파 캐비테이션(ultrasonic cavitation)에 기인하는 것으로 캐비테이션 버블(cavitation bubble)이 수축과 팽창 과정에서 붕괴(collapse)되어 침전 용액의 마이크로젯(microjets), 강열한 국소 가열, 고압 충격파(shock waves)가 생성되기 때문으로 설명되고 있다[23]. 하지만 아세톤-물 분별침전에서 초음파 캐비테이션 버블 및 가스 버블의 영향에 대한 연구는 전무한 실정이다. 초음파 캐비테이션 버블은 생성, 성장, 붕괴를 통해 고온/고압이 발생하는 반면 가스 버블은 이들의 라이프타임 동안 단지 팽창만 하게 되어 고온/고압이 발생하지 않는다. 따라서 본 연구에서는 이러한 특성을 이용하여 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 이용한 아세톤-물 분별침전으로 파클리탁셀의 침전 양상을 조사하였다. 또한 초음파 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 이용한 새로운 침전 방식을 개발하여 침전 효율(특히 침전시간 단축)을 극대화하고자 하였다. 더 나아가 초음파 캐비테이션 버블과 가스 버블을 이용한 분별침전 공정에 대한 동역학 및 열역학적 해석을 수행하여 침전 특성을 정량적으로 파악하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 식물 재료

본 실험에서는 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주(cell line)를 이용하여 24 °C 암조건에서 150 rpm으로 교반하여 현탁 배양하였다. 현탁세포는 수정된 Gamborg's B5 배지[24]에서 배양하였으며 세포 배양은 2주마다 새로운 배지로 갈아주었으며 생산과 배양을 연장시키기 위해 7일과 21일째 되는 날에 1~2%의 maltose를 첨가해 주고 엘리시터(elicitor)로서 배양 초기에 4 μM의 AgNO₃를 첨가하였다. 식물 세포 배양 후 데칸터(Westfalia, CA150Claritying Decanter)와 고속원심분리기(α-Laval, BTPX 205GD35CDEFP)를 이용하여 식물세포(바이오매스)를 회수하였다[25,26]. 회수한 식물 세포와 세포조각을 합하여 바이오매스라 하며, 본 연구에 사용된 바이오매스는 ㈜삼양바이오팜으로부터 제공받았다.

2-2. 분별침전을 위한 시료 준비

바이오매스/메탄올 비를 1/1 (w/v)로 혼합하여 추출한 후 메틸렌

클로라이드(methylene chloride)를 첨가(추출액의 25%)하여 액-액 추출을 수행하였다. 상 분리를 통해 하층인 메틸렌 클로라이드 층으로 파클리탁셀을 회수하여 농축/건조하였다. 액-액 추출을 통해 얻은 건조된 조추출물(crude extract)을 메틸렌 클로라이드에 20% (v/w) 비율로 녹이고 상용흡착제 실로푸트(Sylopute, Fuji Silysia Chemical Ltd., Japan)를 건조된 조추출물 대비 100% (w/w) 비율로 첨가하여 40 °C 항온조(PS-1000, EYELA, Japan)에서 30 분 동안 교반하며 흡착시킨 후 여과하였다. 여과액을 30 °C, 감압 하에서 건조하고, silica-gel 60N (Timely, Japan) 컬럼(elution: 1.5% (v/v) methanol in dichloromethane)을 통해 정제하였다(시료 순도: 20.4%). 또한 정제된 시료를 메틸렌 클로라이드에 녹인 후 용액을 헥산에 떨어뜨려(methylene chloride/hexane=1/10, v/v) 침전을 수행하였다. 헥산 침전 후 여과를 통하여 얻어진 침전물을 35 °C에서 24 시간 진공 건조하였다(시료 순도: 63.6%) [22,27]. 파클리탁셀의 분리 및 정제 과정에서 얻어지는 다양한 시료에 대한 분별침전 효과를 확인하기 위하여, 상기 방법으로 얻은 두 종류의 시료(파클리탁셀 순도: 20.4, 63.6%)를 본 연구에 사용하였다.

2-3. 아세톤-물 분별침전

아세톤-물을 이용한 전통적 분별 침전, 초음파 캐비테이션 버블-침전, 가스 버블-침전의 개략도를 Fig. 1에 나타내었다. 먼저 초음

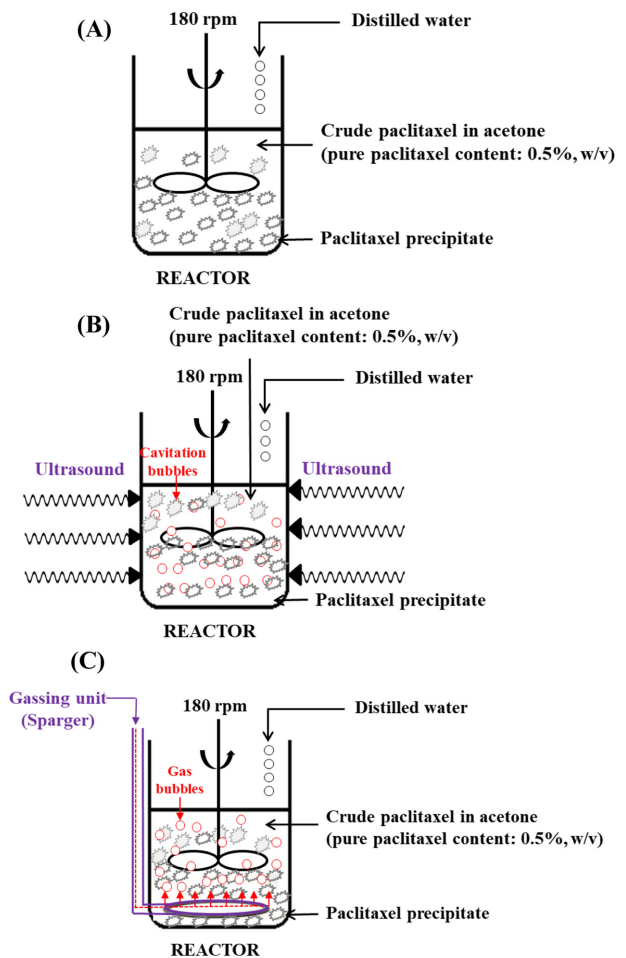


Fig. 1. Schematic diagram of conventional fractional precipitation (A), fractional precipitation with ultrasonic cavitation bubble (B), and fractional precipitation with gas bubble (C) for pre-purification of paclitaxel.

파 캐비테이션 버블-분별 침전을 위한 두 종류의 시료(순도: 20.4, 63.6%)를 아세톤에 용해시키고(순수 파클리탁셀 함량: 0.5%, w/v), 상온에서 아세톤/물 비가 20:80 (v/v)이 될 때까지 증류수를 교반 (~180 rpm) 하에 한 방울씩 떨어뜨렸다. 그 이후 40 kHz ultrasonic bath (UC-10, Jeiotech, Korea)에 넣고 초음파 파워(80, 180, 250 W)와 침전 온도(5, 15, 25 °C)를 달리하여 분별침전을 수행하였다. 그리고 침전시간에 따른 파클리탁셀의 수율 및 순도를 조사하였다. 침전 온도와 초음파 파워는 파클리탁셀의 침전 효율과 분해 가능성을 고려하여 선정하였다[15,17,22]. 초음파 용기 내 온도는 circulator 온도 조절 장치(CTP-1000, EYELA, Japan)를 이용하여 일정하게 유지하였다. 또한 가스 버블-분별 침전은 오리피스(지름: 0.5 mm)가 장착된 기포발생기(SH-A2, Amazonpet, Korea)를 이용하여 침전 용액 내로 가스 버블(공기 버블)을 주입하였다. 기포발생기의 가스 유량(1.15, 4.52, 9.41 L/min)이 분별 침전 효율(침전 시간, 수율 및 순도)에 미치는 영향을 조사하였다. 침전 후 여과하여 침전물을 얻고 40 °C에서 24 시간 동안 진공 오븐(UP-2000, EYELA, Japan)에서 건조하였다. 건조된 침전물의 순도와 수율은 HPLC로 분석하였다. 또한 파클리탁셀 수율은 다음 식 (1)과 같이 계산하였다.

$$\text{Yield} = \frac{\text{Quantity of paclitaxel in precipitate}}{\text{Quantity of paclitaxel in sample}} \quad (1)$$

2-4. 파클리탁셀 함량 분석

파클리탁셀 함량 분석을 위해 HPLC 시스템(SCL-10AVP, Shimadzu, Japan)과 Capcell Pak C18 컬럼(250×4.6 mm, Shiseido, Japan)을 사용하였다. 이동상은 아세토나이트릴/물(acetonitrile/water, 35/65~65/35, v/v, gradient mode) 용액을 유속 1.0 mL/min으로 40분 동안 흘려주었다. 시료 주입량은 20 µL이며 227 nm에서 UV로 검출하였다[26,28]. HPLC 분석은 표준정량곡선을 이용하였으며 표준 시료는 Sigma-Aldrich 제품(순도: 95%)을 이용하였다.

2-5. 분별침전물의 크기 측정

분별침전에서 수득한 침전물의 형태와 크기를 조사하기 위하여, 전자현미경(SV-35 Video Microscope System, Some Tech, Korea)을 사용하였다[29]. 침전물을 고배율(x200)에서 관찰하였으며, 침전물의 크기는 IT-Plus System (Some Tech, Korea)을 사용하여 비디오 이미지에서 측정하였다.

2-6. 확산계수 측정

분별침전 용매(A)에 확산되는 파클리탁셀 분자(B)의 확산 계수는 Stokes-Einstein 식으로부터 계산하였으며, 식 (2)과 같이 나타낼 수 있다[30].

$$D_{AB} = \frac{kT}{6\pi r_0 \eta} \quad (2)$$

여기서 k 는 Boltzmann constant (1.38×10^{-23} J/K), r_0 는 파클리탁셀 분자 반경, η 는 용액의 점도(viscosity), T 는 용액의 절대 온도를 나타낸다. 용액의 점도는 점도계(Viscolite 700, Hydromotion, UK)를 이용하여 측정하였다.

2-7. 동역학적 해석

주로 결정화 또는 침전 과정에 사용되는 Johnson-Mehl-Avrami-

Kolmogorov (JMAK) 식은 핵 생성 및 입자 성장 동안 등온 상변환의 속도론을 다룬다[31]. JMAK 식은 식 (3)과 식 (4)에 나타내었다.

$$X = 1 - e^{-kt^n} \quad (3)$$

$$\log\left(\left(\ln \frac{1}{1-X}\right)\right) = n \log t + \log k \quad (4)$$

$\log\left(\left(\ln \frac{1}{1-X}\right)\right)$ 와 $\log t$ 를 plot하여 기울기와 절편으로부터 n 과 k 값을 계산하였다. 여기서 X 는 침전 수율, t 는 침전 시간, k 는 속도 상수(min^{-1}), n 은 결정의 구조 및 결정 핵 생성의 특성을 묘사하는 Avrami 지수이다. 결정계수(coefficient of determination, r^2)로 모델의 적합성을 판단하였다.

2-8. 열역학적 해석

활성화에너지(E_a)는 Arrhenius 식을 이용하여 계산할 수 있다[32]. Arrhenius 식을 식 (5)와 식 (6)에 나타내었다.

$$k = A e^{-\frac{E_a}{RT}} \quad (5)$$

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (6)$$

여기서 k , A , E_a , R 및 T 는 각각 속도 상수(min^{-1}), Arrhenius 상수(min^{-1}), 활성화에너지(kJ/mol), 기체 상수($8.314 \text{ J/mol} \cdot \text{K}$), 절대 온도(K)를 나타낸다.

분별침전의 반응열, 자발성, 가역성 및 타당성을 평가하기 위하여 열역학적 파라미터를 계산하였다. 침전 과정에서의 자유에너지는 식 (7)과 같이 van't Hoff 식에 의해 평형 상수와 연관이 있다[33,34].

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_e \quad (7)$$

여기서 ΔG° 는 표준 Gibbs 자유 에너지 변화(kJ/mol), K_e 는 평형 상수이다. 평형 상수와 표준 Gibbs 자유 에너지 변화(kJ/mol)를 식 (8)과 식(9)에 정의하였다.

$$K_e = \frac{C_p}{C_s} \quad (8)$$

$$\Delta G^\circ = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \quad (9)$$

여기서 C_p 는 파클리탁셀의 침전 평형 농도(mg/mL), C_s 는 용액 내의 파클리탁셀의 평형 농도(mg/mL)를 나타낸다. ΔH° 는 표준 엔탈피 변화(kJ/mol), ΔS° 는 표준 엔트로피 변화(kJ/mol K)를 나타낸다. 식 (7)과 식 (9)를 정리하여 식 (10)에 나타내었다[35,36].

$$\ln K_e = -\frac{\Delta G^\circ}{RT} = -\frac{\Delta H^\circ}{RT} = \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad (10)$$

$\ln K_e$ 와 $1/T$ 를 plot하여 기울기와 절편으로부터 ΔH° 와 ΔS° 값을 계산하였다.

또한 전이상태(transition state)에서의 활성화 파라미터(activation parameters)인 활성화 엔탈피 변화(ΔH^*), 활성화 엔트로피 변화(ΔS^*), 활성화 Gibbs 자유에너지 변화(ΔG^*)를 Eyring 식을 이용하여 구할 수 있으며 식 (11)과 식 (12)에 나타내었고, 활성화 Gibbs 자유

에너지 변화(kJ/mol) 관계식을 식 (13)에 나타내었다.

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\frac{\Delta G^*}{RT}} \quad (11)$$

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} - \frac{\Delta G^*}{RT} \quad (12)$$

$$\Delta G^* = \Delta H^* - T\Delta S^* \quad (13)$$

식 (12)과 식 (13)를 정리하여 식 (14)에 나타내었다.

$$\ln \frac{k}{T} = \ln \frac{k_B}{h} - \frac{\Delta H^*}{RT} + \frac{\Delta S^*}{RT} \quad (14)$$

여기서 k 는 속도 상수(min^{-1}), k_B 는 Boltzmann 상수(1.38×10^{-23} J/K), h 는 Planck 상수(6.63×10^{-34} J·s), ΔH^* 는 활성화 엔탈피 변화(kJ/mol), ΔS^* 는 활성화 엔트로피 변화(kJ/mol K)를 나타낸다[37,38]. $\ln(k/T)$ 와 $1/T$ 를 plot하여 기울기와 절편으로부터 ΔH^* 과 ΔS^* 값을 계산하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 개선된 분별침전 공정 개발

3-1-1. 초음파 캐비테이션 버블을 이용한 분별침전

분별침전 용매로 아세톤-물을 도입하여 초음파 캐비테이션 버블의

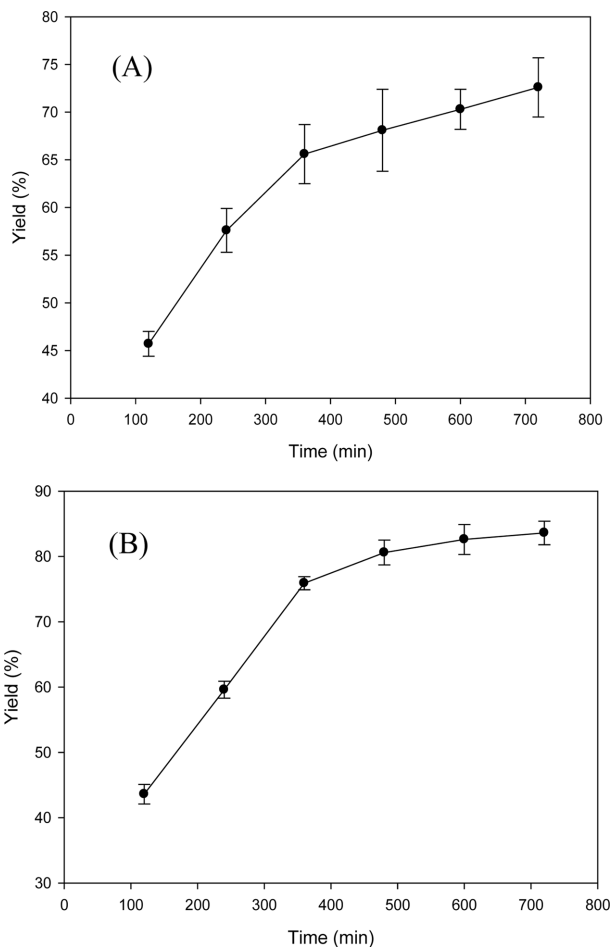


Fig. 2. Effect of precipitation time on the yield of paclitaxel obtained by conventional acetone-water fractional precipitation at 5 °C. (A) Sample purity 20.4%; (B) Sample purity 63.6%.

적용 가능성을 확인하였다. 전통적 분별침전(대조군)에서 침전 시간에 따른 파클리탁셀의 수율을 Fig. 2에 나타내었다. 시료 순도가 20.4, 63.6%일 때 침전 수율이 거의 평형에 도달하는데 소요되는 시간은 각각 500, 400분이었으며 파클리탁셀 수율은 각각 72.6, 83.6%이었다. 또한 침전물의 순도는 각각 30.3, 85.6% 였다(data not shown). 반면 초음파 캐비테이션 버블을 도입한 경우(Fig. 3), 모든 침전 온도(5-25 °C)에서 시료 순도 20.4%일 때 초음파 파워 80, 180, 250 W에서 침전 시간은 12-20 분, 파클리탁셀 수율은 각각 82.0-85.5% (5 °C), 76.6-82.6% (15 °C), 69.1-78.6% (25 °C)이었다. 또한 시료 순도 63.6%일 때 침전 시간은 5-20분, 파클리탁셀 수율은 각각 92.6-95.8% (5 °C), 83.6-94.5% (15 °C), 79.3-89.1% (25 °C)이었다. 침전물의 순도는 시료 순도 20.4%일 때, 34.7~35.0% (5 °C), 33.7~34.2% (15 °C), 30.2~33.8% (25 °C)이었다. 또한 시료 순도 63.6%일 때, 82.8~83.5% (5 °C), 82.8~83.1% (15 °C), 80.5~82.3% (25 °C)이었다(data not shown). 결과적으로 침전 온도가 낮을수록 초음파 파워가 증가할수록 파클리탁셀 수율은 증가하였으며 순도는 온도 및 초음파 파워에 관계없이 거의 일정 하였다. 유사한 파클리탁셀 수율과 순도를 얻기 위해 전통적 분별침전에서는 저온 (0~5 °C) 조업으로 8 시간 이상의 침전 시간이 소요되었다[39]. 하지만 초음파 캐비테이션 버블을 이용한 분별침전으로 전통적 방법에 비해 분별침전에 소요되는 시간을 획기적으로 단축(20-25배)할 수 있었다.

3-1-2. 가스 버블을 이용한 분별침전

초음파-분별침전의 효율 향상은 캐비테이션 버블의 붕괴에 의한 고압 충격파, 높은 속도의 마이크로젯, 강열한 국소 가열의 영향 (micromixing/mass transfer, supersaturation)으로 핵 생성이 촉진되기 때문으로 설명된다[30]. 초음파 캐비테이션 버블을 이용한 분별 침전 메커니즘을 조사하기 위하여, 분별침전 시 캐비테이션 버블 대신 가스 버블을 도입하였다. 가스 버블은 캐비테이션 버블과 달리 이들의 라이프타임 동안 단지 팽창만 하게 되어 고온/고압이 발생하지 않는다[40]. 두 종류의 시료(순도: 20.4, 63.6%)를 아세톤에 녹이고 증류수를 첨가(acetone/distilled water ratio=20:80, v/v)한 후 기포 발생기(gassing unit)를 통해 가스 유량을 1.15, 4.52, 9.41 L/min으로 변화시켜 다양한 침전 온도(5, 15, 25 °C)에서 실험을 수행하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 시료 순도가 20.4%일 때 가스 유량이 1.15, 4.52, 9.41 L/min일 때 침전 시간은 12~20 분, 파클리탁셀 수율은 각각 80.4~84.4% (5 °C), 75.3~82.0% (15 °C), 68.1~75.9% (25 °C)이었다. 또한 시료 순도 63.6%일 때 침전 시간은 5~20 분, 파클리탁셀 수율은 각각 90.7~95.0% (5 °C), 82.6~93.1% (15 °C), 78.8~85.3% (25 °C)이었다. 침전물의 순도는 시료 순도 20.4%일 때, 34.1~34.9% (5 °C), 33.2~34.0% (15 °C), 30.0~32.9% (25 °C), 시료 순도 63.6% 일 때, 82.6~83.0% (5 °C), 82.2~82.9% (15 °C), 80.1~81.9% (25 °C)이었다(data not shown). 결과적으로 침전 온도가 낮을수록 가스 유량이 증가할수록 파클리탁셀의 수율은 증가하였으며 순도는 온도 및 가스 유량에 관계없이 거의 일정 하였다. 전통적 침전(대조군)과 비교하여 시료 순도가 20.4, 63.6%일 때 각각 각각 500 분에서 ~20 분, 400 분에서 ~20 분으로 단축되었다. 이러한 결과는 초음파-분별침전의 결과와 매우 유사하며, 이로부터 분별 침전 시 초음파 캐비테이션 버블과 가스 버블의 역할이 매우 유사함을 확인할 수 있었다. 결국, 초음파 캐비테이션 버블 또는 가스 버블을 도입한 분별침전

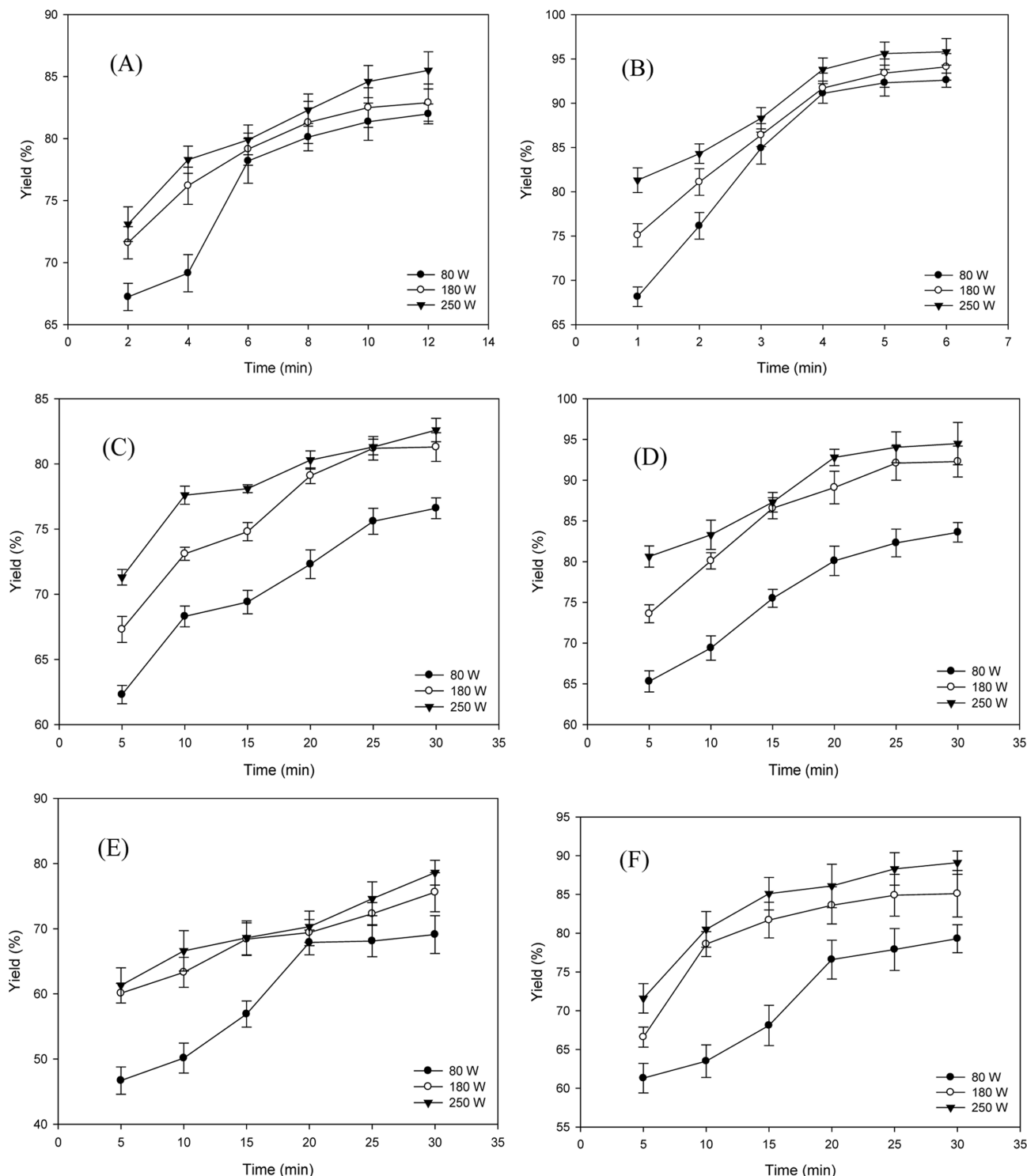


Fig. 3. Effect of ultrasonic power on the yield of paclitaxel obtained by ultrasound-assisted acetone-water fractional precipitation at different sample purities and temperatures. (A) Sample purity 20.4% and 5 °C; (B) Sample purity 63.6% and 5 °C; (C) Sample purity 20.4% and 15 °C; (D) Sample purity 63.6% and 15 °C; (E) Sample purity 20.4% and 25 °C; (F) Sample purity 63.6% and 25 °C.

에서 생성되는 버블 자체가 핵 생성(heterogeneous nucleation)의 위치(sites)로 작용하여 핵 생성을 위한 자유 에너지 장벽을 낮추어 침전이 빨라지는 것으로 판단된다[40]. 더 나아가 초음파 캐비테이션 버블의 경우, 버블 파괴에 의해 발생하는 높은 온도와 압력보다는 버블 자체가 분별 침전에 더 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다[28].

3-2. 확산계수 계산

분별침전 특성을 좀 더 정량적으로 조사하기 위하여, 전자현미경을 이용하여 전통적 침전, 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 이용한 침전에서 침전물의 입자 크기를 측정하여 Table 1에 정리하였다. 전통적 분별침전에서 침전 시간 400 분 동안 평균 입자 크기는 시료 순도 20.4, 63.6%에서 각각 175, 132 μm 로 측정되었다. 반면 초음

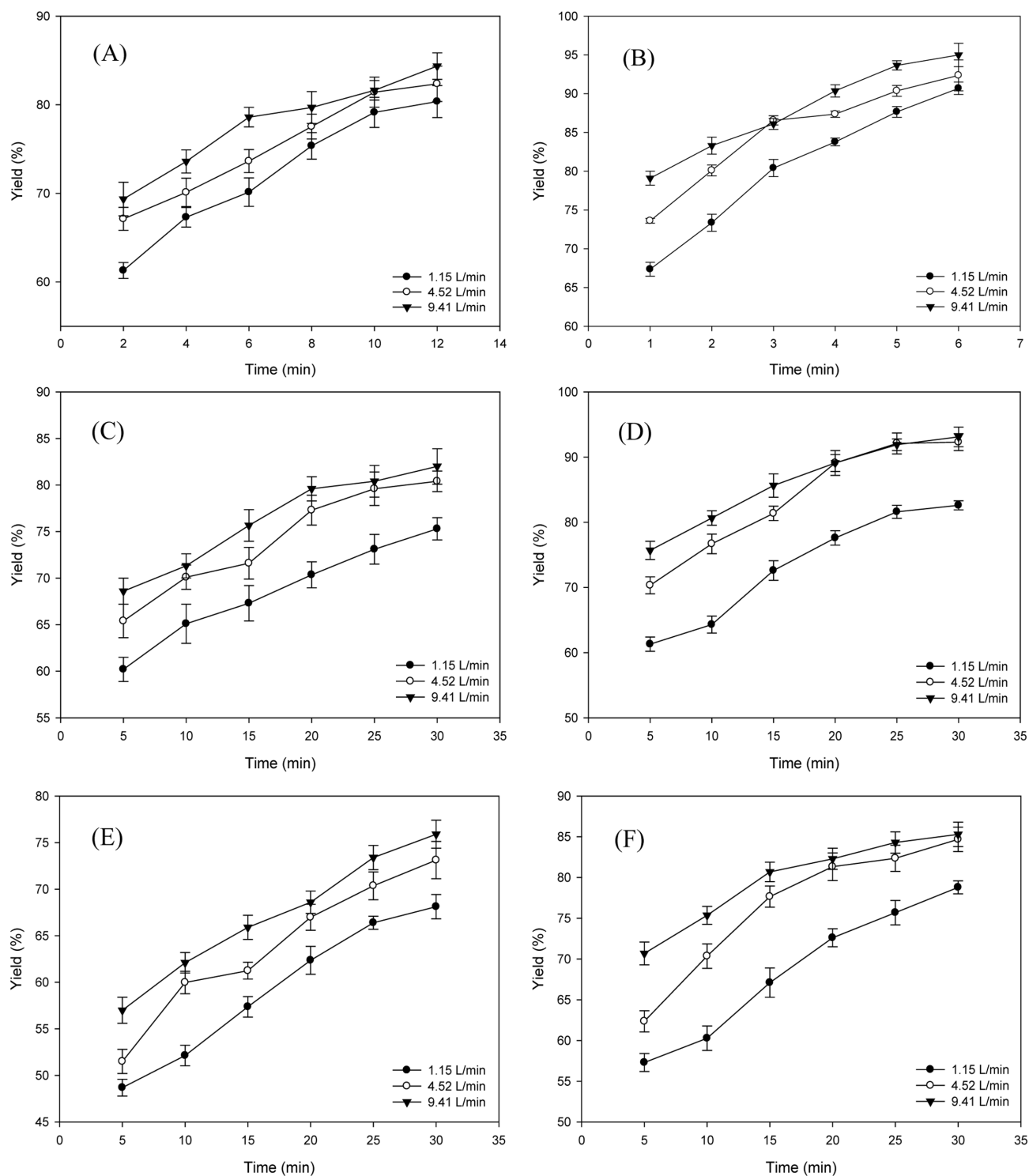


Fig. 4. Effect of gas flow rate on the yield of paclitaxel obtained by acetone-water fractional precipitation with gassing unit at different sample purities and temperatures. (A) Sample purity 20.4% and 5 °C; (B) Sample purity 63.6% and 5 °C; (C) Sample purity 20.4% and 15 °C; (D) Sample purity 63.6% and 15 °C; (E) Sample purity 20.4% and 25 °C; (F) Sample purity 63.6% and 25 °C.

과 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 이용한 침전의 경우 침전 시간 30 분 동안 평균 입자 크기는 시료 순도 20.4, 63.6%에서 각각 32.1, 25.2 μm 와 48.0, 37.5 μm 이었다. 전통적 방법에 비해 평균 입자 크기는 시료 순도 20.4, 63.6%에서 각각 초음파 캐비테이션 버블을 이용한 침전의 경우 5.2, 5.4배, 가스 버블을 이용한 침전의 경우 3.5, 3.6배 정도 감소하였다.

Stokes-Einstein 식을 이용하여 확산계수 D_{AB} 을 계산하였다 (Table 1). 아세톤-물 시스템에서 전통적 분별침전, 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 이용한 분별침전에서 용액 점도는 각각 1.1, 0.9, 1.1 g/cm^3 로 측정되었다. 시료 순도 20.4, 63.6%에서 전통적 방법의 경우 D_{AB} 값은 각각 2.27×10^{-15} , $3.00 \times 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$ 이었다. 반면 초음파 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 이용한 침전의 경우, 시료 순도

Table 1. Effect of ultrasonic cavitation bubbles and gas bubbles on mean particle size and diffusivity in acetone-water fractional precipitation

Fractional precipitation type	Sample purity (%)	Mean particle size (μm)	Viscosity ($\text{g}/\text{cm}\cdot\text{s}$)	Diffusion coefficient, $D_{AB} \times 10^{15} (\text{m}^2/\text{s})$
Control*	20.4	175.0 \pm 21.6	1.1	2.27
With cavitation bubbles		32.1 \pm 9.7	0.9	15.1
With gas bubbles		48.0 \pm 10.7	1.1	8.26
Control*	63.6	132.0 \pm 17.9	1.1	3.00
With cavitation bubbles		25.2 \pm 6.8	0.9	19.2
With gas bubbles		37.5 \pm 10.3	1.1	10.6

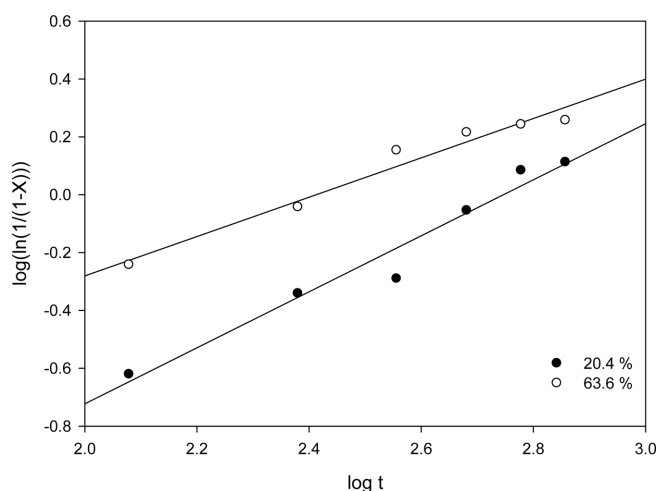
*Conventional fractional precipitation

20.4%에서 D_{AB} 값은 각각 1.51×10^{-14} , $8.26 \times 10^{-15} \text{ m}^2/\text{s}$, 시료 순도 63.6%에서 1.92×10^{-14} , $1.06 \times 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$ 이었다. 파클리탁셀의 확산 계수는 전통적 침전에 비해 초음파 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 이용한 침전의 경우 시료 순도 20.4%에서 6.7, 3.6배, 시료 순도 63.6%에서 6.4, 3.5배 각각 증가하였다. 이러한 결과는 초음파-침전 (75 W, 20 kHz)에 의한 다른 원료의약품(poorly water-soluble drugs)에서의 연구결과(itraconazole 1.4배, ibuprofen 1.82배, sulfamethoxazole 7.9배, griseofulvin 33.6배)와 비교될 수 있다[41]. 분별침전에서 확산 계수의 증가는 균질 핵 생성(homogeneous nucleation)에 중요하게 영향을 미친다[28]. 침전 시 초음파 캐비테이션 버블과 가스 버블 모두 확산에 영향을 미쳤으며, 특히 초음파 캐비테이션 버블이 가스 버블보다 좀 더 많은 영향을 미침을 알 수 있었다. 이러한 차이는 캐비테이션 버블의 붕괴에 의한 캐비테이션 현상(shock waves and microjets) 때문으로 판단된다[30,41].

3-3. 동역학적 해석

3-3-1. 초음파 캐비테이션 버블을 이용한 분별침전

아세톤-물 분별침전에서 대조군과 초음파-분별침전에 대해 Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK) 모델을 이용하여 $\log\left(\ln\frac{1}{1-X}\right)$ 와 $\log t$ 를 plotting하여 Fig. 5, 6에 나타내었다. 또한

**Fig. 5. Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK) plots at different sample purities for conventional acetone-water fractional precipitation at 5 °C.**

기울기와 절편을 통해 Avrami 지수(n)와 속도상수(k)를 구하여 Table 2에 정리하였다. Avrami 상수 n은 모든 침전 온도(5~25 °C)에서 시료 순도 20.4%일 때 1.197 (control), 초음파 파워 80, 180, 250

Table 2. Kinetic parameters for the acetone-water fractional precipitation with ultrasonic cavitation bubble at different ultrasound powers

Temperature (°C)	Sample purity (%)	Ultrasound power (W)	n	k	r ²	
5	20.4	Control*	1.197	0.0004	0.963	
		80	0.271	0.897	0.897	
		180	0.197	1.094	0.988	
		250	0.214	1.125	0.986	
	63.6	Control*	0.328	0.157	0.965	
		80	0.507	1.102	0.966	
		180	0.426	1.324	0.969	
		250	0.396	1.544	0.913	
	15	20.4	80	0.219	0.682	0.971
			180	0.237	0.757	0.975
250			0.177	0.955	0.968	
63.6		80	0.320	0.606	0.967	
		180	0.390	0.692	0.983	
		250	0.353	0.866	0.916	
25	20.4	80	0.397	0.310	0.909	
		180	0.232	0.613	0.951	
		250	0.246	0.621	0.915	
	63.6	80	0.314	0.534	0.896	
		180	0.306	0.712	0.938	
		250	0.315	0.777	0.984	

*Conventional fractional precipitation

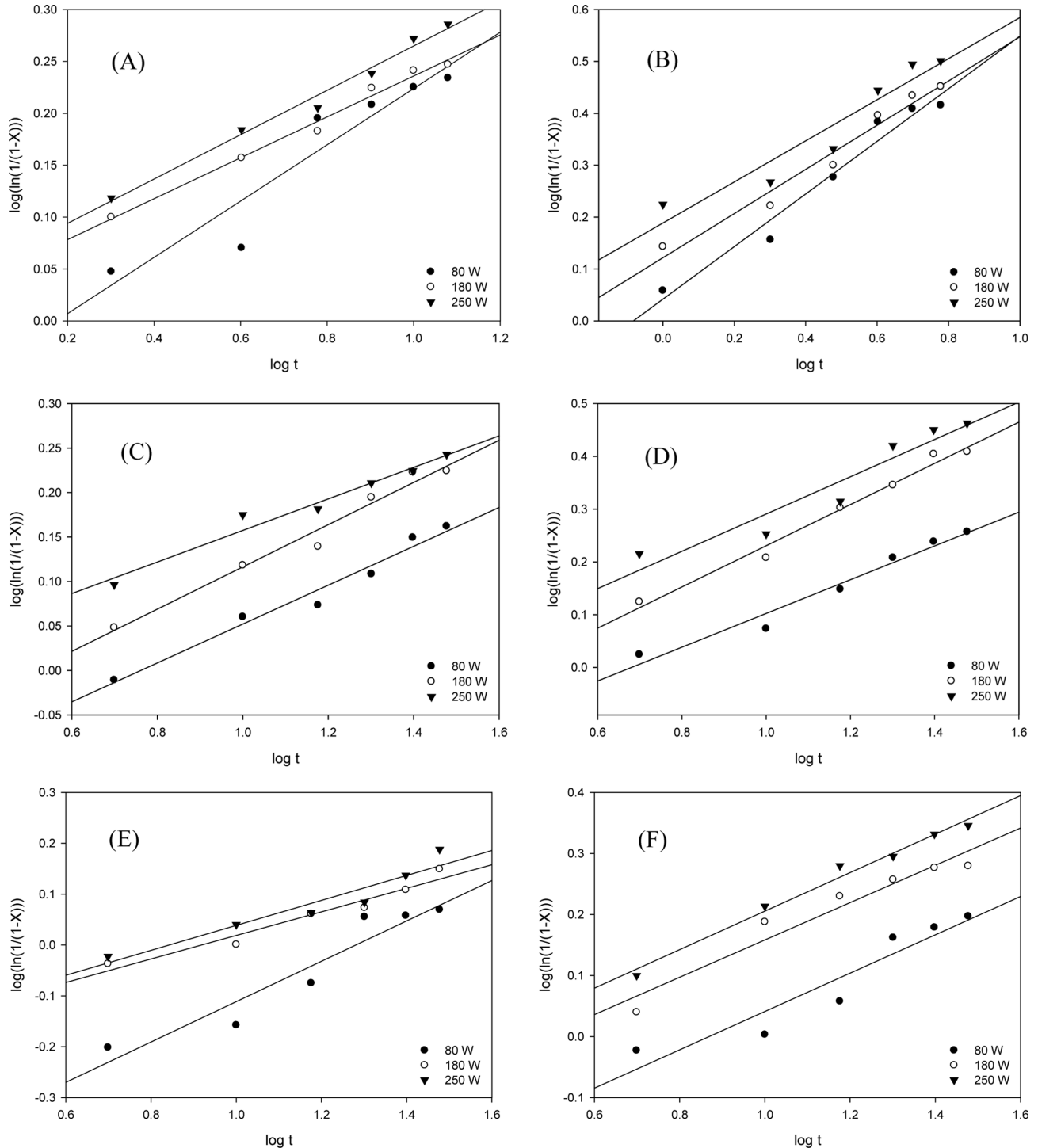


Fig. 6. Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK) plots for acetone-water fractional precipitation with ultrasonic cavitation bubble at different sample purities and temperatures. (A) Sample purity 20.4% and 5 °C; (B) Sample purity 63.6% and 5 °C; (C) Sample purity 20.4% and 15 °C; (D) Sample purity 63.6% and 15 °C; (E) Sample purity 20.4% and 25 °C; (F) Sample purity 63.6% and 25 °C.

W에서 각각 0.197~0.271 (5 °C), 0.177~0.237 (15 °C), 0.232~0.397 (25 °C)이었다. 또한 시료 순도 63.6%일 때 0.328 (control), 초음파 파워 80, 180, 250 W에서 각각 0.396~0.507 (5 °C), 0.320~0.390 (15 °C), 0.306~0.315 (25 °C)이었다. Fig. 6에서 보는 바와 같이 초음파-분별침전의 모든 조건에서 하나의 직선이 형성되어 모든 온도에서 핵 생성 및 성장(nucleation and growth)이 동시에 이루어짐을

확인하였다[42]. 속도 상수 k 는 모든 온도(5~25 °C)에서 시료 순도 20.4%일 때 0.0004 min^{-1} (control), 초음파 파워 80, 180, 250 W에서 각각 $0.897\sim 1.125 \text{ min}^{-1}$ (5 °C), $0.682\sim 0.955 \text{ min}^{-1}$ (15 °C), $0.310\sim 0.621 \text{ min}^{-1}$ (25 °C)이었다. 또한 시료 순도 63.6%일 때 0.157 min^{-1} (control), 초음파 파워 80, 180, 250 W에서 각각 $1.102\sim 1.544 \text{ min}^{-1}$ (5 °C), $0.606\sim 0.866 \text{ min}^{-1}$ (15 °C), $0.534\sim 0.777 \text{ min}^{-1}$ (25 °C)이었

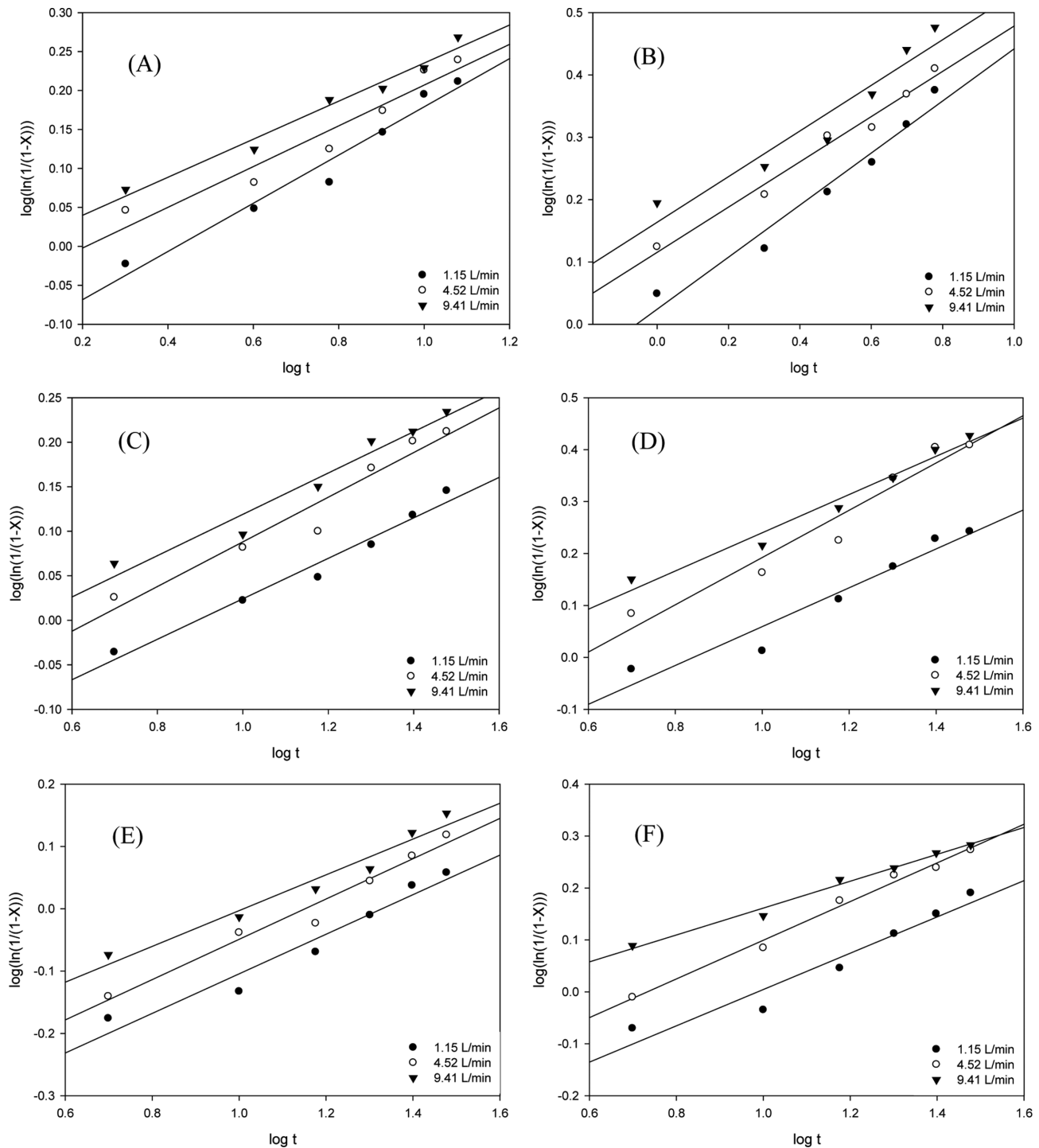


Fig. 7. Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK) plots for acetone-water fractional precipitation with gas bubble at different sample purities and temperatures. (A) Sample purity 20.4% and 5 °C; (B) Sample purity 63.6% and 5 °C; (C) Sample purity 20.4% and 15 °C; (D) Sample purity 63.6% and 15 °C; (E) Sample purity 20.4% and 25 °C; (F) Sample purity 63.6% and 25 °C.

다. 속도 상수는 대조군 대비 초음파-분별침전(80~250 W)의 경우 시료 순도가 20.4, 63.6%일 때 각각 0.0004 min^{-1} (control)에서 $0.310\text{--}1.125 \text{ min}^{-1}$, 0.157 min^{-1} (control)에서 $0.534\text{--}1.544 \text{ min}^{-1}$ 로 증가하였다. 시료 순도가 낮을수록 속도 상수가 더 큰 폭으로 증가하였다. 이전 전통적 분별침전의 연구 결과($1.810 \times 10^{-5} \text{ min}^{-1}$ at 4 °C)와 비교했을 때 초음파 캐비테이션 버블을 이용한 분별침전에서 속도 상수가 더 큼을 확인하였다[43].

3-3-2. 가스 버블을 이용한 분별침전

가스 버블을 이용한 분별침전의 경우 Johnson-Mehl-Avrami-Kolmogorov (JMAK) 모델을 이용하여 $\log\left(\ln\left(\frac{1}{1-X}\right)\right)$ 와 $\log t$ 를 plotting하여 Fig. 7에 나타내었다. 또한 기울기와 절편을 통해 구한 파라미터를 Table 3에 정리하였다. Avrami 상수 n 은 모든 온도 (5~25 °C)에서 시료 순도 20.4%일 때 가스 유량을 1.15, 4.52, 9.41 L/min에서 각각 0.244~0.309 (5 °C), 0.227~0.251 (15 °C), 0.287~0.323

Table 3. Kinetic parameters for the acetone-water fractional precipitation with gas bubble at different gas flow rates

Temperature (°C)	Sample purity (%)	Gas flow rate (L/min)	n	k (min ⁻¹)	r ²
5	20.4	1.15	0.309	0.741	0.966
		4.52	0.262	0.882	0.932
		9.41	0.244	0.980	0.976
	63.6	1.15	0.418	1.057	0.966
		4.52	0.363	1.304	0.981
		9.41	0.366	1.458	0.922
15	20.4	1.15	0.227	0.627	0.974
		4.52	0.251	0.688	0.945
		9.41	0.232	0.771	0.958
	63.6	1.15	0.374	0.485	0.940
		4.52	0.455	0.546	0.943
		9.41	0.368	0.802	0.971
25	20.4	1.15	0.318	0.379	0.950
		4.52	0.323	0.424	0.970
		9.41	0.287	0.513	0.959
	63.6	1.15	0.350	0.452	0.939
		4.52	0.372	0.534	0.990
		9.41	0.259	0.799	0.987

(25 °C), 시료 순도 63.6%일 때 가스 유량을 1.15, 4.52, 9.41 L/min에서 각각 0.363~0.418 (5 °C), 0.368~0.455 (15 °C), 0.259~0.372 (25 °C)이었다. Fig. 7에서 보는 바와 같이 가스 버블-분별침전 역시 모든 조건에서 하나의 직선을 형성함으로 핵 생성 및 성장 (nucleation and growth)이 동시에 이루어짐을 확인하였다[42]. 속도 상수 k는 모든 온도(5~25 °C)에서 시료 순도 20.4%일 때 가스 유량을 1.15, 4.52, 9.41 L/min에서 각각 0.741~0.980 min⁻¹ (5 °C), 0.627~0.771 min⁻¹ (15 °C), 0.379~0.513 min⁻¹ (25 °C), 시료 순도 63.6%일 때 가스 유량을 1.15, 4.52, 9.41 L/min에서 각각 1.057~1.458 min⁻¹ (5 °C), 0.485~0.802 min⁻¹ (15 °C), 0.452~0.799 min⁻¹ (25 °C)이었다. 속도 상수는 대조군과 비교할 때 가스 버블을 이용한 분별침전(1.15~9.41 L/min)의 경우 시료 순도가 20.4, 63.6%일 때 각각 0.0004 min⁻¹ (control)에서 0.379~0.980 min⁻¹, 0.157 min⁻¹

(control)에서 0.452~1.458 min⁻¹로 증가하였으며, 시료 순도가 낮을수록 속도 상수가 더 큰 폭으로 증가하였다. 이상의 결과를 바탕으로 초음파 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 도입한 분별 침전의 경우 속도 상수 k는 모두 유사한 값을 보였다.

3-4. 열역학적 해석

3-4-1. 열역학적 파라미터 계산

초음파 캐비테이션 버블을 이용한 분별침전에서 활성화에너지 E_a를 계산하기 위하여 Arrhenius 식을 이용하여 lnk 대 1/T를 도식화하였다. 기울기와 절편을 통해 구한 파라미터를 Table 4에 나타내었다. 시료 순도 20.4%일 때 초음파 파워 80, 180, 250 W에서 각각 -36.3 -20.0, -20.3 kJ/mol, 시료 순도 63.6%일 때 초음파 파워 80, 180, 250 W에서 각각 -25.1, -21.6, -23.9 kJ/mol이었다. 또한

Table 4. Thermodynamic parameters for the acetone-water fractional precipitation with ultrasonic cavitation bubble at different ultrasound powers

Ultrasound power (W)	Sample purity (%)	Temperature (°C)	E _a (kJ/mol)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/mol K)	ΔG° (kJ/mol)
80	20.4	5				16.4
		15	-36.3	-5.87	-0.08	17.2
		25				18.0
	63.6	5				10.8
		15	-25.1	-5.36	-0.06	11.4
		25				12.0
180	20.4	5				16.4
		15	-20.0	-3.15	-0.07	17.1
		25				17.8
	63.6	5				10.8
		15	-21.6	-3.44	-0.05	11.3
		25				11.8
250	20.4	5				16.3
		15	-20.3	-2.89	-0.07	17.0
		25				17.7
	63.6	5				10.7
		15	-23.9	-2.48	-0.05	11.2
		25				11.7

Table 5. Thermodynamic parameters for the acetone-water fractional precipitation with gas bubble at different gas flow rates

Gas flow rate (L/min)	Sample purity (%)	Temperature (°C)	E_a (kJ/mol)	ΔH° (kJ/mol)	ΔS° (kJ/mol K)	ΔG° (kJ/mol)
1.15	20.4	5				16.5
		15	-23.0	-5.67	-0.08	17.2
		25				18.0
	63.6	5				10.9
		15	-29.5	-4.86	-0.06	11.5
		25				12.0
4.52	20.4	5				16.4
		15	-25.1	-4.07	-0.07	17.1
		25				17.9
	63.6	5				10.8
		15	-31.1	-2.95	-0.05	11.3
		25				11.8
9.41	20.4	5				16.3
		15	-22.2	-3.62	-0.07	17.1
		25				17.8
	63.6	5				10.9
		15	-20.9	-3.51	-0.05	11.4
		25				11.9

가스 버블을 이용한 분별침전에서 활성화에너지 E_a 를 계산하기 위하여 Arrhenius 식을 이용하여 $\ln k$ 대 $1/T$ 를 도식화하였다. 기울기와 절편을 통해 구한 파라미터를 Table 5에 정리하였다. 시료 순도 20.4%일 때 가스 유량 1.15, 4.52, 9.41 L/min에서 각각 -23.0, -25.1, -22.2 kJ/mol, 시료 순도 63.6%일 때 가스 유량을 1.15, 4.52, 9.41 L/min에서 각각 -29.5, -31.1, -20.9 kJ/mol이었다. 모든 E_a 값이 음수를 나타내므로 낮은 온도에서 반응이 더 빠르게 진행되는 발열반응임을 확인할 수 있다[44,45].

초음파 캐비테이션 버블을 이용한 분별침전에 대한 열역학적 파라미터(표준 엔탈피 변화 ΔH° , 표준 엔트로피 변화 ΔS° , 표준 Gibbs 자유 에너지 변화 ΔG°)를 계산하기 위하여 van't Hoff 식을 이용하여 $\ln K_e$ 대 $1/T$ 를 도식화 하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 초음파 캐비테이션 버블-분별침전에서 시료 순도 20.4%일 때 초음파 파워 80, 180, 250 W에서 ΔH° 는 각각 -5.87, -3.15, -2.89 kJ/mol, ΔS° 는 각각 -0.08, -0.07, -0.07 kJ/mol·K, ΔG° 는 각각 16.4~18.0, 16.4~17.8, 16.3~17.7 kJ/mol이었다. 시료 순도 63.6%일 때 초음파 파워 80, 180, 250 W에서 ΔH° 는 각각 -5.38, -3.44, -2.48 kJ/mol, ΔS° 는 각각 -0.06, -0.05, -0.05 kJ/mol·K, ΔG° 는 각각 10.8~12.0, 10.8~11.8, 10.7~11.7 kJ/mol이었다.

가스 버블을 이용한 분별침전에 대한 열역학적 파라미터(표준 엔탈피 변화 ΔH° , 표준 엔트로피 변화 ΔS° , 표준 Gibbs 자유 에너지 변화 ΔG°)를 계산하기 위하여 van't Hoff 식을 이용하여 $\ln K_e$ 대 $1/T$ 를 도식화하였다. Table 5에서 보는 바와 같이 가스 버블-침전에서 시료 순도 20.4%일 때 가스 유량을 1.15, 4.52, 9.41 L/min에서 ΔH° 는 각각 -5.67, -4.07, -3.62 kJ/mol, ΔS° 는 각각 -0.08, -0.07, -0.07 kJ/mol·K, ΔG° 는 각각 16.4~18.0, 16.4~17.9, 16.3~17.8 kJ/mol이었다. 시료 순도 63.6%일 때 가스 유량을 1.15, 4.52, 9.41 L/min에서 ΔH° 는 각각 -4.86, -2.95, -3.51 kJ/mol, ΔS° 는 각각 -0.06, -0.05, -0.05 kJ/mol·K, ΔG° 는 각각 10.9~12.0, 10.8~11.8, 10.9~11.9 kJ/mol이었다. ΔH° 는 모두 음수 값을 나타내므로 모든 침전 공정이 발열임을 확인하였다. ΔS° 는 음수 값을 나타내므로 침전이 진행됨에 따라 무질서도(randomness)가 감소함을 알 수 있었다. ΔG° 는 모두

양수를 나타내므로 비자발적(nonspontaneous) 반응이며 침전 온도가 증가할수록 더 비자발적임을 알 수 있었다[46,47]. 전통적 분별침전의 경우에는 ΔH° 는 -32.8 kJ/mol로 발열, ΔS° 는 -0.12 J/mol·K로 비가역적, ΔG° 는 4, 7, 8 °C에서 각각 -0.01, 0.35, 0.46 kJ/mol로 온도가 증가할수록 더 비자발적이었다[38]. 이상의 결과로부터 초음파 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 도입한 아세톤-물 분별침전의 경우 열역학적 파라미터 값이 매우 유사함을 확인할 수 있었다.

3-4-2. 활성화 파라미터 계산

초음파 캐비테이션 버블을 이용한 분별침전 공정의 전이상태(transition state)에서 활성화물(activated complex)의 활성화 엔탈피 변화(ΔH^*), 활성화 엔트로피 변화(ΔS^*), 활성화 Gibbs 자유에너지 변화(ΔG^*)를 계산하기 위하여 Eyring 식인 식 (12)을 이용하여 $\ln \frac{k}{T}$ 와 $1/T$ 를 도식화 하였다. 기울기와 절편으로부터 구한 파라미터를 Table 6에 나타내었다. 시료 순도 20.4%일 때 초음파 파워 80, 180, 250 W에서 ΔH^* 는 각각 -38.7, -22.4, -22.7 kJ/mol, ΔS^* 는 각각 -0.38, -0.32, -0.32 kJ/mol·K, ΔG^* 는 각각 68.0~75.7, 67.8~74.3, 67.5~74.0 kJ/mol이었다. 시료 순도 63.6%일 때 초음파 파워 80, 180, 250 W에서 ΔH^* 는 각각 -27.5, -24.0, -26.2 kJ/mol, ΔS^* 는 각각 -0.34, -0.33, -0.34 kJ/mol·K, ΔG^* 는 각각 67.9~74.7, 67.5~74.1, 67.1~73.8 kJ/mol이었다. 가스 버블을 이용한 분별침전의 경우 $\ln \frac{k}{T}$ 와 $1/T$ 를 도식화하여 기울기와 절편으로부터 구한 파라미터를 Table 7에 정리하였다. 시료 순도 20.4%일 때 가스 유량을 1.15, 4.52, 9.41 L/min에서 ΔH^* 는 각각 -25.4, -27.5, -24.6 kJ/mol, ΔS^* 는 각각 -0.34, -0.34, -0.33 kJ/mol·K, ΔG^* 는 각각 68.5~75.2, 68.1~75.0, 67.9~74.6 kJ/mol이었다. 시료 순도 63.6%일 때 가스 유량 1.15, 4.52, 9.41 L/min에서 ΔH^* 는 각각 -31.9, -33.5, -23.3 kJ/mol, ΔS^* 는 각각 -0.36, -0.36, -0.33 kJ/mol·K, ΔG^* 는 각각 68.1~75.2, 67.6~74.9, 67.3~73.8 kJ/mol이었다. ΔH^* 는 모두 음수 값을 나타내므로 활성화된 침전물의 생성 과정이 발열(exothermic)임을 확인하였다. ΔS^* 는 음수 값을 나타내므로 결합 메커니즘(associative mechanism)을 포함하고, ΔG^* 는 양수 값을 나타내므로 비자발적

Table 6. Activation parameters for the acetone-water fractional precipitation with ultrasonic cavitation bubble at different ultrasound powers

Ultrasound power (W)	Sample purity (%)	Temperature (°C)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (kJ/mol K)	ΔG^* (kJ/mol)
80	20.4	5	-38.7	-0.38	68.0
		15			71.8
		25			75.7
	63.6	5	-27.5	-0.34	67.9
		15			71.3
		25			74.7
180	20.4	5	-22.4	-0.32	67.8
		15			71.0
		25			74.3
	63.6	5	-24.0	-0.33	67.5
		15			70.8
		25			74.1
250	20.4	5	-22.7	-0.32	67.5
		15			70.8
		25			74.0
	63.6	5	-26.2	-0.34	67.1
		15			70.4
		25			73.8

Table 7. Activation parameters for the acetone-water fractional precipitation with gas bubble at different gas flow rates

Gas flow rate (L/min)	Sample purity (%)	Temperature (°C)	ΔH^* (kJ/mol)	ΔS^* (kJ/mol K)	ΔG^* (kJ/mol)
1.15	20.4	5	-25.4	-0.34	68.5
		15			71.9
		25			75.2
	63.6	5	-31.9	-0.36	68.1
		15			71.6
		25			75.2
4.52	20.4	5	-27.5	-0.34	68.1
		15			71.6
		25			75.0
	63.6	5	-33.5	-0.36	67.6
		15			71.3
		25			74.9
9.41	20.4	5	-24.6	-0.33	67.9
		15			71.2
		25			74.6
	63.6	5	-23.3	-0.33	67.3
		15			70.5
		25			73.8

(nonspontaneous)이었다. 침전 온도가 증가할수록 더 비자발적이며 추가적인 에너지를 필요로 함을 알 수 있었다[48,49]. 전통적 분별 침전의 경우 ΔH^* 는 -926.24 kJ/mol로 발열반응, ΔS^* 는 -3.67J/mol·K로 비가역적 결합 메커니즘을 포함하고 ΔG^* 는 4, 7, 8 °C에서 각각 91.7, 102, 106 kJ/mol로 침전 온도가 증가할수록 더 비자발적이었다[30]. 이상의 결과로부터 초음파 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 도입한 아세톤-물 분별침전의 경우 활성화 파라미터 값 역시 매우 유사함을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 기존 아세톤-물 분별침전의 긴 침전 시간을 획기적으로 개선할 수 있는 초음파 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 이

용한 분별침전 방식을 개발하였다. 또한 동역학 및 열역학적 해석을 수행하여 침전 특성을 정량적으로 조사하였다. 아세톤-물 분별침전에 초음파 캐비테이션 버블 및 가스 버블을 도입함으로써 전통적 방식에 비해 분별침전 시간을 20~25배 단축할 수 있었다. 또한 침전 온도(5~25 °C)는 낮을수록, 초음파 파워(80~250 W)와 가스 유량(1.15~9.41 L/min)은 증가할수록 파클리탁셀의 수율이 증가하였다. 침전물의 평균 입자 크기는 5.2~5.4배(초음파 캐비테이션 버블), 3.5~3.6배(가스 버블) 감소하였으며, 확산계수는 6.4~6.7배(초음파 캐비테이션 버블), 3.5~3.6배(가스 버블) 증가하였다. 동역학적 해석에서 속도 상수는 전통적 방식(대조군)과 비교할 때 초음파 캐비테이션 버블-분별침전(80~250 W)의 경우 시료 순도가 20.4, 63.6%일 때 각각 0.0004 min^{-1} (대조군)에서 $0.310\sim 1.125 \text{ min}^{-1}$, 0.157 min^{-1} (대조군)에서 $0.534\sim 1.544 \text{ min}^{-1}$ 로 증가하였으며, 시료

순도가 낮을수록 속도 상수가 더 큰 폭으로 증가하였다. 가스 버블-분별침전(1.15~9.41 L/min)의 경우 시료 순도가 20.4, 63.6%일 때 각각 0.0004 min^{-1} (대조군)에서 $0.379\sim0.980 \text{ min}^{-1}$, 0.157 min^{-1} (대조군)에서 $0.452\sim1.458 \text{ min}^{-1}$ 로 증가하였으며, 시료 순도가 낮을수록 속도 상수가 더 큰 폭으로 증가하였다. E_a 값이 모두 음수를 나타내므로 낮은 온도에서 반응이 더 빠르게 진행되는 발열반응임을 확인할 수 있다. ΔH° 는 음수 값을 나타내므로 침전 공정이 발열임을 확인하였다. ΔS° 는 음수 값을 나타내므로 침전이 진행됨에 따라 무질서도가 감소하였고, ΔG° 은 양의 값을 나타내므로 비자발적으로 침전이 수행되고 침전 온도가 증가할수록 더 비자발적임을 알 수 있었다.

감 사

이 성과는 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구임(NRF-2021R1A2C1003186).

References

1. Park, J. M. and Kim, J. H., "Ultrasound-assisted Micellar Extraction for Paclitaxel Purification from *Taxus chinensis*," *Korean Chem. Eng. Res.*, **59**, 106-111(2021).
2. Jo, Y. J. and Kim, J. H., "Effective Diffusivity and Mass Transfer Coefficient During the Extraction of Paclitaxel from *Taxus chinensis* Using Methanol," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **24**, 818-823(2019).
3. Jang, Y. S. and Kim, J. H., "Characteristics and Mechanism of Microwave-assisted Drying of Amorphous Paclitaxel for Removal of Residual Solvent," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **24**, 529-535 (2019).
4. Ghorbani, M., Pourjafar, F., Saffari, M. and Asgari, Y., "Paclitaxel Resistance Resulted in a Stem-like State in Triple-negative Breast Cancer: A Systems Biology Approach," *Meta Gene*, **26**, 100800 (2020).
5. Sun, T., Liu, Y., Li, M., Yu, H. and Piao, H., "Administration with Hyperoside Sensitizes Breast Cancer Cells to Paclitaxel by Blocking the TLR4 Signaling," *Mol. Cell. Probes*, **53**, 101602 (2020).
6. Choi, H. K., Son, J. S., 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).
7. Pyo, S. H., Choi, H. J. and Han, B. H., "Large-scale Purification of 13-dehydroxybaccatin III and 10-deacetylpaclitaxel, Semi-synthetic Precursors of Paclitaxel, from Cell Cultures of *Taxus chinensis*," *J. Chromatogr. A*, **1123**, 15-21(2006).
8. Rao, K., Hanuman, J., Alvarez, C., Stoy, M., Juchum, J., Davies, R. and Baxley, R., "A New Large-scale Process for Taxol and Related Taxanes from *Taxus brevifolia*," *Pharm. Res.*, **12**, 1003-1010(1995).
9. Park, G. Y., Kim, G. J. and Kim, J. H., "Effect of Tar Compounds on the Purification Efficiency of Paclitaxel from *Taxus chinensis*," *J. Ind. Eng. Chem.*, **21**, 151-154(2015).
10. Kang, H. J. and Kim, J. H., "Removal of Residual Toluene and Methyl Tertiary Butyl Ether from Amorphous Paclitaxel by Simple Rotary Evaporation with Alcohol Pretreatment," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **25**, 86-93(2020).
11. Kang, H. J. and Kim, J. H., "Removal of Residual Chloroform from Amorphous Paclitaxel Pretreated by Alcohol," *Korean J. Chem. Eng.*, **36**, 1965-1970(2019).
12. 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).
13. Jeon, K. Y. and Kim, J. H., "Improvement of Fractional Precipitation Process for Pre-purification of Paclitaxel," *Process Biochem.*, **44**, 736-741(2009).
14. Kang, I. S. and Kim, J. H., "Effect of Reactor Type on the Purification Efficiency of Paclitaxel in the Increased Surface Area Fractional Precipitation Process," *Sep. Purif. Technol.*, **99**, 14-19 (2012).
15. 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).
16. Kim, J. H., Kang, I. S., Choi, H. K., Hong, S. S. and Lee, H. S., "A Novel Prepurification for Paclitaxel from Plant Cell Cultures," *Process Biochem.*, **37**, 679-682(2002).
17. Jeon, S. I., Mun, S. Y. and Kim, J. H., "Optimal Temperature Control in Fractional Precipitation for Paclitaxel Pre-purification," *Process Biochem.*, **41**, 276-280(2006).
18. Lee, J. Y. and Kim, J. H., "Influence of Crude Extract Purity and Pure Paclitaxel Content on Fractional Precipitation for Purification of Paclitaxel," *Sep. Purif. Technol.*, **103**, 8-14(2013).
19. Jeon, Y. L. and Kim, J. H., "Precipitation Characteristics of Paclitaxel in Solvent Systems with Different Ion Exchange Resins," *Korean J. Chem. Eng.*, **30**, 1954-1959(2013).
20. Lee, J. Y. and Kim, J. H., "Evaluation of the Effect of Crude Extract Purity and Pure Paclitaxel Content on the Increased Surface Area Fractional Precipitation Process for the Purification of Paclitaxel," *Process Biochem.*, **47**, 2388-2397(2012).
21. Lee, C. G. and Kim, J. H., "Improved Fractional Precipitation Method for Purification of Paclitaxel," *Process Biochem.*, **49**, 1370-1376(2014).
22. Seo, H. W. and Kim, J. H., "Ultrasound-assisted Fractional Precipitation of Paclitaxel from *Taxus chinensis* cell cultures," *Process Biochem.*, **87**, 238-243(2019).
23. Jordens, J., Coker, N. D., Gielen, B., Gerven, T. V. and Braeken, L., "Ultrasound Precipitation of Manganese Carbonate: The Effect of Power and Frequency on Particle Properties," *Ultrason. Sonochem.*, **26**, 64-72(2015).
24. 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).
25. Sim, H. A., Lee, J. Y. and Kim, J. H., "Evaluation of a High Surface Area Acetone/pentane Precipitation Process for the Purification of Paclitaxel from Plant Cell Cultures," *Sep. Purif. Technol.*, **89**, 112-116(2012).
26. Kim, J. H., "Comparison of Conventional Solvent Extraction, Microwave-assisted Extraction, and Ultrasound-assisted Extraction Methods for Paclitaxel Recovery from Biomass," *Korean Chem. Eng. Res.*, **58**, 273-279(2020).
27. Yoo, K. W. and Kim, J. H., "Kinetics and Mechanism of Ultrasound-assisted Extraction of Paclitaxel from *Taxus chinensis*,"

- Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **23**, 532-540(2018).
28. Kang, H. J. and Kim, J. H., "Cavitation Bubble- And Gas Bubble-induced Fractional Precipitation of Paclitaxel from *Taxus chinensis*," *Process Biochem.*, **99**, 316-323(2020).
 29. Park, J. N. and Kim, J. H., "Kinetic and Thermodynamic Characteristics of Fractional Precipitation of (+)-dihydromyricetin," *Process Biochem.*, **53**, 244-231(2017).
 30. Dalvi, S. V. and Dave, R. N., "Analysis of Nucleation Kinetics of Poorly Water-soluble Drugs in Presence of Ultrasound and Hydroxypropyl Methyl Cellulose During Antisolvent Precipitation," *Int. J. Pharm.*, **387**, 172-179(2010).
 31. Kalu, P. N. and Waryoba, D. R., "A JMAK-microhardness Model for Quantifying the Kinetics of Restoration Mechanisms in Inhomogeneous Microstructure," *Mater. Sci. Eng. A*, **464**, 68-75 (2007).
 32. Yang, J. W. and Kim, J. H., "Evaluation of Adsorption Characteristics of 2-picoline Onto Sylopute," *Korean Chem. Eng. Res.*, **57**, 210-218(2019).
 33. Cho, D. N. and Kim, J. H., "Isotherm, Kinetic and Thermodynamic Characteristics for Adsorption of Acenaphthene Onto Sylopute," *Korean Chem. Eng. Res.*, **58**, 127-134(2020).
 34. Park, S. H. and Kim, J. H., "Equilibrium, Isotherm, Kinetic and Thermodynamic Studies for Adsorption of 7-epi-10-deacetylpaclitaxel from *Taxus chinensis* on Sylopute," *Korean Chem. Eng. Res.*, **58**, 113-121(2020).
 35. Kang, S. S. and Kim, J. H., "Kinetics, Mechanism, and Thermodynamics Studies of Vacuum Drying of Biomass from *Taxus chinensis* Cell Cultures," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **25**, 336-343(2020).
 36. Kim, H. and Kim, J. H., "Adsorption of Cephalomannine Onto Sylopute: Isotherm, Kinetic and Thermodynamic Characteristics," *Korean Chem. Eng. Res.*, **57**, 219-224(2019).
 37. Nam, H. W. and Kim, J. H., "Characteristics of Microwave-assisted Drying of Plant Cells of *Taxus chinensis* for Moisture Removal," *Appl. Chem. Eng.*, **31**, 208-214(2020).
 38. Saha, P. and Chowdhury, S., "Insight Into Adsorption Thermodynamics," Prof. Mizutani Tadashi (Ed.) ISBN: 978-953-307-544-0, InTech, Available from: <http://www.intechopen.com/books/thermodynamics/insight-into-adsorption-thermodynamics> (2011).
 39. Kim, T. W. and Kim, J. H., "Development of An Acetone/water Fractional Precipitation Process for Purification of Paclitaxel From Plant Cell Cultures," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **21**, 751-757(2016).
 40. Wohlgemuth, K., Kordylla, A., Ruether, F. and Schembecker, G., "Experimental Study of the Effect of Bubbles on Nucleation During Batch Cooling Crystallization," *Chem. Eng. Sci.*, **64**, 4155-4163(2009).
 41. Schueller, B. S. and Yang, R. T., "Ultrasound Enhanced Adsorption and Desorption of Phenol on Activated Carbon and Polymeric Resin," *Ind. Eng. Chem. Res.*, **40**, 4912-4918(2001).
 42. Røyset, J. and Ryum, N., "Kinetics and Mechanisms of Precipitation in an Al-0.2 wt.% Sc Alloy," *Mater. Sci. Eng. A*, **396**, 409-422(2005).
 43. Lee, C. G. and Kim, J. H., "A Kinetic and Thermodynamic Study of Fractional Precipitation of Paclitaxel from *Taxus chinensis*," *Process Biochem.*, **59**, 216-222(2017).
 44. Kang, H. J. and Kim, J. H., "Adsorption Kinetics, Mechanism, Isotherm, and Thermodynamic Analysis of Paclitaxel from Extracts of *Taxus chinensis* Cell Cultures Onto Sylopute," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **24**, 513-521(2019).
 45. Lee, S. H. and Kim, J. H., "Kinetic and Thermodynamic Characteristics of Microwave-assisted Extraction for the Recovery of Paclitaxel from *Taxus chinensis*," *Process Biochem.*, **76**, 187-193 (2019).
 46. Bang, S. Y. and Kim, J. H., "Isotherm, Kinetics and Thermodynamic Studies on the Adsorption Behavior of 10-deacetylpaclitaxel on to Sylopute," *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **22**, 620-630 (2017).
 47. Shin, H. S. and Kim, J. H., "Isotherm, Kinetic and Thermodynamic Characteristics of Adsorption of Paclitaxel Onto Diaion HP-20," *Process Biochem.*, **51**, 917-924(2016).
 48. Doğan, M., Abak, H. and Alkan, M., "Adsorption of Methylene Blue Onto Hazelnut Shell: Kinetics, Mechanism and Activation Parameters," *J. Hazard. Mater.*, **164**, 172-181(2009).
 49. Çelekli, A., İlğün, G. and Bozkurt, H., "Sorption Equilibrium, Kinetic, Thermodynamic, and Desorption Studies of Reactive Red 120 on *Chara contraria*," *Chem. Eng. J.*, **191**, 228-235(2012).