

초임계 유체를 이용한 주목 수피로부터 taxol의 추출에 관한 연구

서 정 혁 · 조 병 관 · † 변 상 요 · 김 공 환

아주대학교 공과대학 화학생물공학부

Studies on the supercritical fluid extraction of taxol from yew tree

Jung-Hyuck Suh, Byung-Kwan Cho, Sang-Yo Byun[†], and Kong-Hwan Kim

School of Chemical Engineering and Biotechnology, College of Engineering, Ajou University,
Suwon 442-749, Korea

ABSTRACT

Studies were carried out to examine some factors affecting the supercritical carbon dioxide extraction of taxol from the bark of *Taxus cuspidata* using a continuous packed bed extractor. The factors investigated in this study were pressure, temperature, volume of carbon dioxide, and co-solvent. It was found out that the amount of taxol extracted was not significantly affected by the operating pressure in the absence of a co-solvent although it increased by about 20% at 5500 psig. With 24ℓ of carbon dioxide the saturated amount of taxol was extracted at 318 K and 5500psig. Methanol was found to be the most effective co-solvent in terms of amount of taxol extracted among six different co-solvents used. When methanol was used as a co-solvent the effect of operating pressure became significant; approximately 50% increase in the amount of taxol extracted was observed at 3000 psig as compared to at 2500 or 3500psig. The optimum methanol concentration in supercritical fluid was 13%(w/w) at 308K, 3000psig.

서 론

식물에서 생산되는 유용물질들은 예부터 인류에게 소중한 자원이었는데 이들은 주로 물리 화학적인 방법을 사용하여 추출정제되어 주로 의약품으로 사용되고 있다. 여러식물중 주목에는 항암작용을 하는 taxol이라는 유용물질 외에도 alkaloid인 taxine, taxinine, taxane 및 flavonoid인 sciadoptysin 등 여러 성분들이 포함되어 있다고 알려져 있다. 항암제 taxol은 최근 FDA로부터 난소암 및 유방암치료제로 승인을 받아 사용되고 있는데 이들외에도 다양한 암에 대해 임상이 현재 진행중이다(1,2,3). 그

러나 주목은 성장속도가 매우 느리고 또한 주목수피에 주로 존재하는 taxol의 양도 매우 적어 항암제로서의 taxol의 공급은 한정되어 있고 이로 인하여 가격도 매우 비싼실정이다.

주목수피에 주로 있는 taxol은 다단계 유기용매를 이용하는 추출정제 과정을 거쳐 공급된다. 이러한 추출정제 과정은 복잡하고 효율이 높지 못한 문제점을 갖고 있다. 또한, 많은 수의 유기 용매들이 일반적인 액체 추출로 이용되고 있는데 이들은 유효 성분만이 추출된다고만은 할 수 없기 때문에 부수적인 정제 공정이 필요한 경우가 많고 또 유기 용매가 잔류하는 가능성도 문제가 된다. 따라서 전문가들은 식물체의 사용과 유기 용매들의 사용을 최소로 하면서 taxol을 얻을수 있는 방법과 환경적으로도 안전

† Corresponding Author

하고 보다 효율적인 방법들을 계속해서 연구하고 있다. 이러한 필요에 의하여 활발하게 연구되고 있는 초임계 유체를 이용한 추출 방법은 여러 가지 화합물을 포함한 혼합물로부터 taxol을 분리할 수 있는 효율적인 방법일 뿐 아니라 환경적으로도 안전한 방법이다. 특히 초임계 유체로 많이 이용되어지는 이산화탄소는 여러 가지 장점을 가지고 있다. 이산화탄소에 의한 초임계 유체 추출의 경우에는 유효 성분외의 성분이 함께 추출되더라도 몇 단계의 감압 분리에 의하여 다른 조성을 갖는 추출물의 선택 분리가 가능하다는 장점도 있다.

초임계 유체를 이용하는 taxol추출에 관한 보고들(3,4)이 있었지만 그 내용들이 모두 불완전하고 아직 효율도 높지 못하다. 따라서 본 연구에서는 초임계 유체를 이용하는 taxol추출의 장점을 이해하고 추출의 효율을 높일수 있는 다양한 영향인자를 조사하는데 연구목적이 있다.

실험재료 및 방법

시료 및 시약

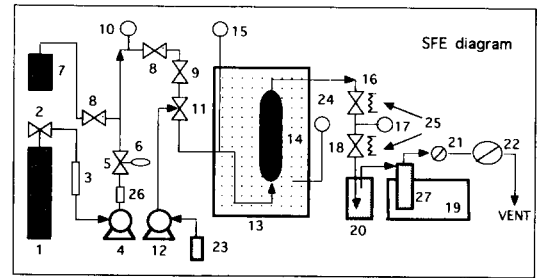
본 연구에서 쓰인 시료는 주목(*Taxus cuspidata*)의 껍질 부분으로서 음지에서 자연건조시킨 후 미세분말로 입자화 시킨 후에 각 실험당 10g씩 사용하였다. 추출용매로 99.9% 순도의 이산화탄소를 사용하였으며 분리기에서 추출물을 포집하기 위한 methanol을 비롯한 보조용매는 BDH사의 HPLC용 특급 시약을 사용하였다.

분석방법

추출된 taxol의 양은 HPLC방법으로 분석하였다(Pump-LC1110 GBC Co. Australia, UV Detector-Waters 484, millipore Co, U. S. A). 분석용 column은 Curosil B (Phenomenex Co. U. S. A. 3.2 × 250mm, 5)을 이용하였다. Curosil B column을 이용한 분석에서의 이동상은 water와 acetonitrile을 isocratic조건으로 53:47(v/v)로 30분간 일정한 비율로 유지하였고 유속은 0.8ml/min로 유지하였다. 또한 sample주입량은 20 μ l로 유지하였다. 그리고 정확한 taxol분석을 위하여 검색 파장은 228nm와 280nm를 이용하였다(5).

초임계 유체 추출장치

본실험에서 사용한 supercritical fluid extraction



- | | | |
|-----------------------------|---------------------|---------------------------|
| 1. CO ₂ cylinder | 10. Pressure gauge | 19. Low temp. circulator |
| 2. High pressure regulator | 11. 3way valve | 20. Collector |
| 3. Line filter | 12. Co-solvent pump | 21. Flow meter |
| 4. Compressor | 13. Oven | 22. Wet test meter |
| 5. 3way valve | 14. Extractor | 23. Co-solvent reservoir |
| 6. Rupture disk | 15. Pressure gauge | 24. Temperature gauge |
| 7. Reservoir | 16. 2way valve | 25. Heating belt & mantle |
| 8. 2way valve | 17. Pressure gauge | 26. Check valve |
| 9. Forward regulator | 18. Micro-valve | 27. 2nd collector |

Fig. 1. Schematic diagram of supercritical fluid extraction system.

system의 개략도는 Fig. 1과 같다. 추출 장치는 고압에서 견딜 수 있도록 20000psi용 연결장치를 사용하였고 연결관의 재질은 고압용 스테인레스 강을 사용하였다. 이산화탄소의 가압은 압축기(Nova Co. Swiss)를 사용하였고 공급 부분과 가압 부분 사이에는 line filter(HiP Co. U. S. A)를 설치하여 가압 부분으로 공급되는 이산화탄소내의 불순물을 여과하였다. 그리고 압축기 다음 부분에 안전 장치로 10000psi용 rupture disk(STD, Oseco Co. U. S. A.)를 설치하였다. 보조용매 공급을 위해 미니 펌프(Thermo separation products Co. U. S. A)를 사용하였다. 반응기(HiP Co. U. S. A.)는 내경 1/2 인치, 외경 1 인치, 길이 20 인치, 부피 64 cc로 최대 압력 15000psi인 제품을 사용하였고 추출 작업 동안 일정한 온도를 유지하기 위해 국내에서 제작한 오븐을 이용하였다. 일정한 추출 반응기내 압력을 유지하기 위해 예열부 앞쪽에 forward pressure regulator(Tescom Co. U. S. A)를 설치하였다. 배출되는 이산화탄소의 양은 wet test meter(Sinagawa Co. Japan)를 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

초임계 이산화탄소를 이용하여 주목 수피로부터 taxol을 추출할때 taxol의 추출에 영향을 미치는 여러가지 인자에 대하여 실험한 결과는 다음과 같다.

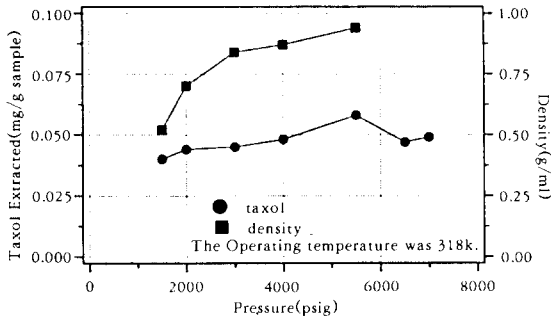


Fig. 2. Effect of pressure on taxol extraction. The operating temperature was 318K.

압력 및 용매유량에 의한 영향

압력에 의한 영향을 살펴보기 위하여 온도 318K에서 추출용매인 CO₂ 유량 24ℓ를 사용하며 압력을 변화시키고 실험을 하여 다음과 같은 결과를 얻었다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 taxol의 추출에 대한 압력의 영향은 크지 않은 것으로 나타났지만 5500psig에서 taxol의 추출량이 약간 많았음을 보여 준다. Taxol의 추출량 증가에는 압력보다는 다른 인자들이 미치는 영향이 클 것으로 여겨진다. 그러나 초임계 유체를 이용한 taxol의 추출은 추출량의 증가 측면 뿐만 아니라 선택성도 고려되어야 하기 때문에 이러한 압력의 영향도 항상 고려되어야 할 것이다.

추출용매 유량에 의한 영향은 온도 308K, 압력 5500 psig에서 유량을 변화시키며 실험하였다. 추출용매의 유량에 의한 영향은 사용된 용매의 유량이 많아질 수록 taxol의 추출량이 많아지는 것은 당연한 일이다. 그러나 taxol의 추출량이 많아진다고 유량만 계속 증가시킨다면 또 다른 문제를 발생시킨다. 즉, 비용과 시간 낭비의 문제가 발생할 것이다. 그러나 본 실험에 이용한 초임계 유체 추출 시스템에서는 용매유량이 24ℓ 이상에서는 추출량이 더 이상 증가하지 않는 결과를 얻었다. 그러므로 용매 유량을 24ℓ 이상으로 한다는 것은 비용의 측면에서 볼 때 바람직하지 못하다는 것을 알 수 있다. 물론 Egon (6)이 지적한 것 처럼 압력등 조건이 변하면 추출에 요구되어지는 초임계 유체의 양도 변하게 된다.

온도에 의한 영향

온도에 의한 영향을 살펴보기 위하여 5500psig에서 용매 유량 24ℓ를 사용하여 온도를 변화시켜 taxol의 추출효율 실험을 하였다. Fig. 3에서 보는

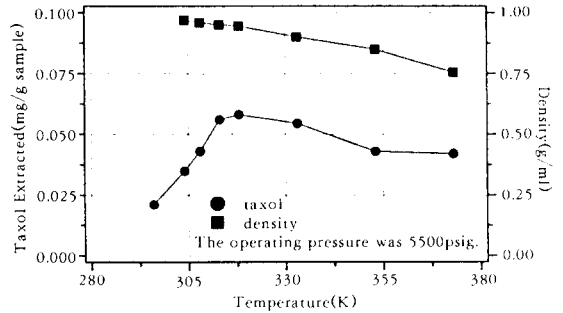


Fig. 3. Effect of temperature on taxol extraction. The operating pressure was 5500psig.

바와 같이 온도에 의한 taxol의 추출 영향은 온도가 증가함에 따라서 taxol의 추출량이 점점 증가하다가 온도 318K에서 최대의 추출 효율을 보이고 온도가 더 증가하면 taxol의 추출량이 감소함을 보인다. 전 (8)의 논문에 의하면 압력 200, 300bar에서 각각 308K와 323K의 온도 조건으로 실험한 결과 200bar에서는 323K에서 보다 308K에서 많은 추출량을 얻었고 300bar에서는 323K와 308K에서 별로 차이를 보이지 않는다고 보고되었고, Nair(5)의 논문에서도 330atm에서는 온도가 증가함에 따라 추출량이 증가하지만 430atm에서는 온도가 증가함에 따라 추출량이 감소하는 것으로 보고되고 있다. 이는 본 실험 결과와 약간 차이가 있으나 그 경향은 비슷한 것으로 나타나 있다. 위의 실험 결과가 본 실험과 약간 차이가 있는 것은 압력 조건의 차이에 의해 생긴 것으로 생각된다.

Gale(7)에 의하면 일반적으로 고압에서는 온도 증가에 따라 밀도의 변화가 별로 없는데 그림과 같은 결과를 나타낸 이유를 생각해 보면 두가지로 생각해 볼 수 있다. 첫째로는 문헌에 의하면 저압에서는 온도가 증가할 수록 밀도가 감소하여 용해도가 감소하고 고압에서는 온도가 증가해도 별로 밀도가 감소하지 않는다고 보고되어 있다. 그렇지만 Fig. 3에서 보듯이 온도가 333K 이후부터는 온도 증가에 따라 고압에서도 밀도가 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 그림에서 보듯이 353K 이후부터는 taxol의 추출량이 감소하는 것으로 볼 수 있다. 두번째로 taxol의 선택성면에서 생각할 수 있다. 일정 온도 (318K) 이상에서는 taxol의 용해도가 다른 물질보다 떨어진다면 정해진 포화 능력을 갖고 있는 양의 초임계 유체를 이용했을 때 다른 물질에 비해 상대적으로 추출되어지는 양이 줄어들 것으로 생각된다.

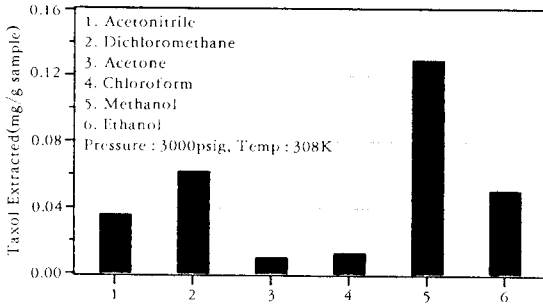


Fig. 4. Effects of various co-solvents on taxol extraction. The operating pressure and temperature were 3000psig and 308K respectively.

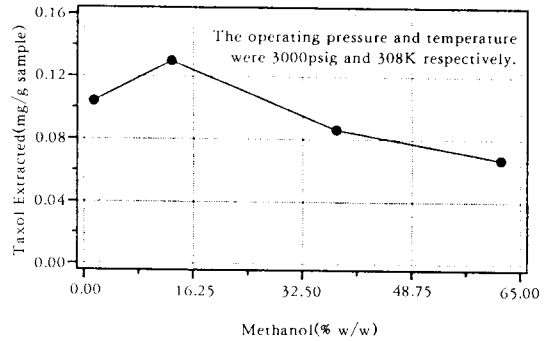


Fig. 5. Concentration effect of methanol as a co-solvent on taxol extraction. The operating pressure and temper.

보조 용매의 종류에 의한 영향

Fig. 4에서 보는바와 같이 보조 용매의 종류에 의한 taxol의 추출 영향을 살펴보면 methanol을 보조 용매로 이용하였을때 가장 좋은 효과(기존 유기 용매 추출의 약 81% 회수)를 나타내고 있음을 알 수 있고, dichloromethane과 ethanol도 methanol에는 미치지 못하지만 좋은 효과(각각 유기 용매 추출의 약 39%, 31% 회수)를 나타내고 있음을 알 수 있다. 그렇지만 위의 실험은 methanol의 최적 농도비로 알려진 13%(w/w), 압력 3000psig, 온도 308K에서 24ℓ의 이산화탄소를 사용하여 실험한 결과이므로 다른 보조 용매에 대해서는 다른 최적비가 존재할 수 있으리라 생각된다. 그 예로 신(9)은 methanol을 사용했을때 유기 용매로 추출한 양의 15%의 추출량을 얻었고 dichloromethane을 사용했을때 16%의 추출량을 얻었다. 따라서 이와같은 보조 용매 첨가에 의한 영향을 살펴 볼때 앞으로의 실험방향은 각각의 보조 용매에 대한 최적 조건에 대해서 고찰하고 한개 이상의 보조 용매를 사용하는 방법을 사용할 수 있다. 비록 본 실험에서는 taxol의 추출량이 methanol을 사용했을때 가장 좋았지만 taxol의 선택성은 dichloromethane이 훨씬 좋은 것으로 보고되고 있다(2). 따라서 methanol과 dichloromethane을 적당한 비율로 혼합하여 사용하면 선택성과 추출량을 높일 수 있으리라 기대된다.

보조용매농도의 영향

보조 용매의 농도에 의한 영향을 살펴보기 위하여 308K, 3000psig, 용매 유량 24ℓ를 사용하는 조건에서 보조용매 methanol의 농도를 변화시키며

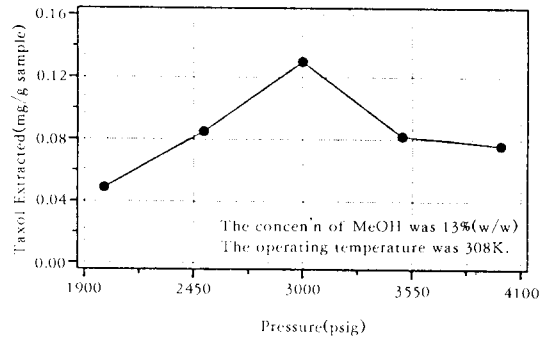


Fig. 6. Effect of pressure on taxol extraction in the methanol/SCF system. The concentration of methanol was 13%(w/w). The operating temperature was 308K respectively.

taxol의 추출에 미치는 영향을 살펴보았다. Fig. 5에서는 보조 용매로 methanol을 사용하였을때 보조 용매의 농도에 따른 taxol의 추출량을 보여준다. 이 그림도 온도 효과와 비슷하게 보조용매의 농도가 증가함에 따라 taxol의 추출량도 증가하다가 최고치-13%(w/w)-이상부터는 다시 감소한다. 이 값 보다 더 많은 보조 용매를 사용하면 역효과가 나타남을 알 수 있다. 그리고 보조용매 사용시 과도한 보조용매 사용은 비용 뿐만 아니라 기타 많은 문제를 발생시킬 수도 있음을 고려해야 한다.

보조용매 사용시 압력의 영향

보조용매 사용시 압력에 의한 영향을 살펴보기 위하여 308K에서 용매 유량 24ℓ, methanol농도 13

%(w/w)조건에서 압력을 변화시키며 taxol의 추출 효율을 비교하였다. 보조용매로 methanol을 사용하였을 때 압력에 따른 taxol의 추출량의 변화를 보면 Fig. 6에서 보는 바와 같이 압력이 증가함에 따라 추출되는 taxol의 양이 증가하다가 압력이 3000psig 이후 부터는 다시 감소했다. 즉, 온도 308K, methanol농도가 13%(w/w)이고 24ℓ의 이산화탄소를 사용했을 때 3000psig에서 가장 많은 추출량을 얻었다. Nair(3)도 보조 용매를 사용하여 압력 330atm, 430atm에서 일정 온도 318K에서 실험을 했는데, 그의 논문에 의하면 압력증가에 따라 추출량이 증가한다고 보고되었다. 하지만 비교 압력이 2개밖에 없어서 어떤 경향을 알아내기는 어렵다. 그리고 Nair(3)가 실험한 압력 조건은 본 실험의 압력 조건보다 고압이기 때문에 얻어진 결과가 상이할 수도 있으리라 생각된다.

초임계 추출 공정 개선 방안

본 실험을 수행함에 있어서 보조 용매를 사용하면 이산화탄소만 사용했을 때 보다 taxol의 추출량을 상당한 수준으로 증가시킬 수 있었고(순수한 이산화탄소만 사용시 유기 용매 추출의 약 36%를 얻었고 보조용매로 methanol을 사용하여 약 81%의 효율을 얻었다) 운전조건이 완화되어 작업이 편리하고 비용이 절약된다는 장점이 있다. 그러나 보조 용매사용시 포집 장치의 끝 부분이나 미세 조절 밸브 부분에서 자주 막히는 문제가 발생하고 있다. 이런 문제들은 주로 식물체에 있는 엽록체 성분들이나 왁스 성분들 때문인 것으로 알려져 있는데 이들의 제거를 위해서 n-hexane등으로 전처리하는 방법들이 있으나 이런 방법들은 또다른 유기용매 사용의 번거로움과 환경 문제를 안고 있어서 제약이 따른다. 따라서 그와같은 문제가 없는 방법은 순수하게 초임계 장치만으로 그런 문제를 해결할 수 밖에 없다. 그 방법으로 taxol이 가장 잘 추출되는 최적 압력, 온도 뿐만 아니라 가장 추출되지 않는 조건을 찾아 그 조건에서 몇분 혹은 몇시간 전처리 과정을 통해 시료내의 엽록체와 같은 taxol이외의 다른 성분들을 추출시킨 후에 실제의 추출 실험을 수행한다면 환경적으로도 안전하고 관들이 막히는 문제도 많이 줄일 수 있으리라 기대된다. 이를 위해서는 앞으로도 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

요 약

초임계 유체에 의한 taxol의 추출에서 온도 318K, 24ℓ의 이산화탄소만 사용했을 때 압력의 영향은 별로 없었으나 압력 5500psig에서 약간 증가하는 것으로 나타났다. 그리고 초임계 유체에 의한 taxol의 추출량의 변화를 살펴볼 때 온도 308K, 압력 5500psig에서 시료 10g당 사용된 이산화탄소의 양이 24ℓ 이상 사용한 이후 부터는 taxol의 추출량이 별로 증가하지 않았다. 온도에 의한 영향실험에서 가장 많은 taxol을 얻은 온도는 압력 조건 5500psig에서 24ℓ의 이산화탄소를 사용할 때 318K로 나타났다.

온도 308K, 압력 3000psig, 보조용매농도 13%(w/w), 24ℓ의 이산화탄소를 사용했을 때 다양한 보조용매(methanol, acetonitrile, chloroform, acetone, dichloromethane, ethanol)를 첨가했을 경우 methanol을 보조용매로 사용했을 때 가장 많은 추출량을 얻었다. 보조용매로 methanol을 사용할 때 methanol의 농도에 의한 영향은 압력 3000psig, 온도 308K에서 24ℓ의 이산화탄소를 이용했을 때 methanol의 농도가 13%(w/w)일 때 가장 많은 추출량을 얻었고 압력을 변화시키면서 온도 308K에서 24ℓ의 이산화탄소와 13%(w/w)의 methanol을 사용했을 때 가장 많은 추출량을 얻은 압력은 3000psig이다.

효율적 측면에서는 순수한 초임계 이산화탄소만으로 추출시 온도 318K, 압력 5500psig에서 24ℓ의 이산화탄소를 사용했을 때 효율은 유기용매 추출의 약 36%를 얻었고, methanol을 보조용매로 사용하여 온도 308K, 압력 3000psig에서 24ℓ를 사용했을 때 약 81%를 보였다.

감 사

본 연구는 통상자원부 에너지관리공단 부설 에너지자원기술개발지원센터 연구비로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. M. C. Wani, H. L. Taylor, M. E. Wall, P. Coggeon and A. T. Mcphail(1971), *J. Amer. Chem. Soc.*, **93**, 2325.

2. 변상요, 강인선, 김공환(1993), *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 122-125.
3. Nair, Jayaprakash B(1992), US Patent 726421.
4. Darren M. Heaton, Keith D. Bartle, Christopher M. Rayner, and Anthony A. Clifford (1993), *Journal of High Resolution chromatography*, **16**, 666-671.
5. S. A. Westwood 'Supercritical Fluid Extraction and its Use in Chromatographic Sample Preparation' Blackie Academic & Professional. 1993.
6. Egon Stahl, Erwin Schutz, and Helmut K. Mangold(1980), *J. Agric. Food Chem.* **28**, 1153-1157.
7. Gale G. Hoyer(1985), CHEMTECH, 440-448.
8. 전문균, '초임계 이산화탄소를 이용한 주목의 잎과 종자로부터 탁솔관련물질 추출에 관한 연구' 한국과학기술원 석사학위 논문, 1992.
9. 신혜원, '보조용매가 첨가된 초임계 이산화탄소를 이용한 탁솔과 바카틴 III의 추출에 관한 연구' 한국과학기술원 석사학위 논문, 1994.