

초임계 유체 크로마토그래피(SFC) 방법에 의한 Paclitaxel 및 그 유도체의 분리 정제

조 병 관 · † 변 상 요

아주대학교 공과대학 화학·생물공학부
(접수 : 1998. 8. 3., 게재승인 : 1998. 11. 11.)

Purification of Paclitaxel and Its Derivatives by Supercritical Fluid Chromatography(SFC)

Byung-Kwan Cho and Sang Yo Byun†

School of Chemical Engineering and Biotechnology, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea
(Received : 1998. 8. 3., Accepted : 1998. 11. 11.)

Studies were carried out to elucidate the effects of pressure, temperature and mobile phase composition on supercritical CO₂ chromatographic separations of paclitaxel, baccatin III, 10-deacetyl baccatin III, 7-epi-10-deacetylaxol, cephalomannine, and 10-deacetylaxol. High resolutions of paclitaxel, 10-deacetyl baccatin III, 10-deacetylaxol were observed with optimized pressure, temperature, and mobile phase composition. The highest resolution between paclitaxel and 10-deacetyl baccatin III was observed at 275 kg/cm², 40°C with the mobile phase composition of gradient mixture of 3.9-3.6 mL/min CO₂, 0.1-0.4 mL/min methanol for 20 min. Resolutions of baccatin III, cephalomannine, and 7-epi-10-deacetylaxol were found to be low in this study. On-line coupled SFE/SFC process was applied to isolate paclitaxel from yew tree powder. As a consequence, paclitaxel with a purity of 95% was obtained with a recovery yield of 38%.

Key Words : paclitaxel, supercritical fluid chromatography, purification

서 론

크로마토그래피에서 초임계 유체가 처음 이용된 것은 1962년 Klesper 등이 고압 GC에 초임계 유체를 이동상으로 적용한 경우를 할 수 있으며 그 후 여러 연구 그룹에서 초임계유체 크로마토그래피(SFC)에 대한 연구가 진행되어 왔다. 초임계 유체를 크로마토그래피에 적용하여 얻을 수 있는 가장 큰 장점은 초임계 유체의 물성, 즉 낮은 점도와 높은 확산 계수로 표시되는 transport 불성과 우수한 용해력을 들 수 있다. 더불어 용해력(solubility)과 선택성(selectivity)을 압력과 보조용매의 조절로 변화시킬 수 있는 장점을 가지고 있다(1). 물론 이동상으로 이산화탄소가 주로 사용되는 것이 환경 문제 및 경제성에 관련된 장점이 될 수도 있지만 한편으로는 이동상의 다양성이 떨어지는 단점으로도 작용하고 있다.

SFC의 특성을 살피는 데는 대부분 HPLC와 비교하면서 시작되고 실제로 SFC의 발전 역사도 HPLC와 밀접한 관계가 있다.

1960년대에 SFC가 처음 소개되고 개발이 시작되었지만 HPLC의 우수한 성능 때문에 상대적으로 주목받지 못하였다. 그 후 1980년대에 들어와서 분리 속도와 resolution이 월등한 capillary칼럼이 많은 사람들의 관심을 끌면서 SFC의 장점이 부각되기 시작하였다. Open tubular capillary칼럼이나 packed capillary칼럼을 HPLC에 적용하는 경우 좋지 않은 mass transport 특성 때문에 분리 속도 및 resolution이 나쁠 수밖에 없었다. 반면에 SFC의 경우 1981년 이후, Lee 그룹(2,3)에서 capillary칼럼을 이용한 우수한 결과가 발표되고, 1984년 Hirata 등(4)과 Takeuchi 등(5)이 HPLC용 충전물을 packing한 0.3 mm packed capillary칼럼을 이용한 SFC결과도 발표되는 등 개발이 계속되었다. 이러한 capillary칼럼을 이용한 SFC는 초임계 유체 특유의 낮은 점도 및 높은 확산계수에 의한 우수한 mass transport 특성으로 가능하였으며 이동상의 사용량이 크지 않다는 점도 SFC에 대한 관심을 높이는 한 요인이 되었다. HPLC에 비하여 위와 같은 장점이 있는 SFC는 다양한 검출기와 조합을 이루며 분석 용도가 발전하게 되었다. SFC-UV뿐만 아니라, 1982년에 Smith 등(7)에 의하여 SFC-MS(mass spectrometry)가 소개된 이래, SFC-FID가 1984년 Norris 등(6)에 의하여, 1986년에 SFC-DR-FTIR(diffuse reflectance)이 Shafer 등(9)에 의하여 소개되었다. 이들 외에도 다양한 기능의 검출기들이 SFC와 조합되어 연구 개발되고 있다.

† Corresponding Author ; School of Chemical Engineering and Biotechnology, Ajou University, Suwon, Kyunggi 442-749, Korea

Tel : 0331-219-2451, Fax : 0331-214-8918

e-mail : sybyun@madang.ajou.ac.kr

일반 HPLC용 칼럼 (내경 2~6 mm)을 이용하는 SFC에 관한 연구가 1982년에 Gere 등(10)에 의하여 진행되었다. 여전히 분리 속도는 HPLC보다 월등히 우수하였다. 일반 HPLC용 칼럼을 이용한 경우, 초임계 유체의 용매 특성상 HPLC용매를 사용할 때보다 resolution은 떨어질 수 있지만 이는 초임계 유체에 보조용매를 적절히 첨가하고 또한 ion pairing agent의 적절한 사용으로 최근에는 아주 우수한 결과를 얻고 있다. HPLC에 비하여 SFC의 또 하나의 장점은 크로마토그래피 분리 후 용매와 용질이 자동적으로 분리되므로써 HPLC와 같이 크로마토그래피 후 용매와 용질의 분리 공정이 불필요해지는 것이다. 이러한 SFC의 다양한 장점은 최근 산업용 HPLC를 대신하는 산업용 SFC (PSFC, preparative SFC)에 그대로 응용되고 있다. 산업용 HPLC의 낮은 분리 속도, 과도한 용매 사용 등의 대표적인 문제점을 해소할 뿐 아니라, 초임계 유체의 기본 특성인 저온 추출경제, 환경을 오염시키지 않는 무공해 공정이 가능한 점 등의 장점이 부각되면서 식품, 의약품 등의 생물산업 진 분야에 그 활용성이 증대되고 있다.

주목 수피나 배양된 주목 세포에 주로 존재하는 paclitaxel은 현재 약 19단계에 이르는 유기 용매를 이용하는 추출 정제 과정을 통하여 공급되고 있다. 이러한 추출 정제 과정은 여러 단계의 복잡한 과정을 거치기 때문에 추출 경제 효율이 높지 못한 문제점을 가지고 있다. 또한 많은 종류의 독성 유기 용매가 사용되기 때문에 유기 용매 잔류에 의한 안전성 문제도 포함하고 있는 실정이다 따라서 유기 용매의 사용을 최소로 하며 환경적인 측면에서도 안전하고 전체적인 추출 정제 효율을 높일 수 있는 방법에 관한 연구를 필요로 하고 있었다 그 중 초임계 유체를 이용한 추출방법(SFE)은 독성 유기 용매를 사용하지 않는 장점과 추출 효율 증가 및 공정 단순화의 경제적인 이점이 있기 때문에 많은 관심의 대상이 될 수 있었다 그러나 SFE방법에 의한 paclitaxel추출에는 한가지 문제점이 있는데 그것은 추출 용매로 이용되는 초임계 이산화탄소 유체와 paclitaxel간의 선택성이 좋지 않은 것이다 즉 초임계 이산화탄소 유체를 이용하여 추출을 하면 paclitaxel외에 taxane 및 다양한 유기 화합물이 동시에 추출되어 paclitaxel의 추출 효율은 높지만 선택성이 낮아 추출물내 paclitaxel의 조성비는 1% 에도 미치지 못한다. 이러한 현상은 다양한 종류의 보조용매를 사용하였을 때에도 마찬가지이다 이렇게 1차 추출시 추출물내의 paclitaxel의 함량이 낮으면 이어지는 정제 공정이 매우 복잡해지고, 이 복잡한 공정에는 독성 유기 용매 사용을 피할 수 없기 때문에 전반적으로 볼 때 SFE방법의 장점이 희석될 수도 있다 따라서 paclitaxel 처럼 초임계 이산화탄소 유체에 선택성이 떨어지는 물질들의 추출정제에는 SFE와 SFC방법을 동시에 적용하는 것이 바람직하다 SFE에 의하여 고효율로 추출은 되었지만 추출물 내에 낮은 함량으로 존재할 때 이 추출물을 직접 SFC칼럼에 loading 하고 분획하여 효율적인 정제를 할 수 있다 SFE/SFC 방법을 적용하면 일반적인 초임계 유체 추출 정제 방법이 갖는 장점 외에도 on-line 연속 공정이 가능하기 때문에 효율 향상을 기대할 수 있다.

Diterpenoid alkaloid인 paclitaxel은 1971년도에 태평양 주목 (*Taxus brevifolia*)의 수피와 줄기 껍질에서 최초로 분리되어 알려졌다(11). 1983년에 임상연구가 시작되었고 이후 많은 임상 연구 결과 여러 종류의 암, 특히 말기의 유방암과 난소암에 대

하여 우수한 항암 효과를 보이는 것으로 판명되었으며 1992년에 미국 FDA의 승인을 받아 난소암 치료제로 시판되어 각광을 받고 있다(12,13,14). 또한 그 유도체들에 대한 연구가 많이 진행되고 있는데, baccatin III나 10-deacetylbaaccatin III는 paclitaxel반합성의 전구체로서 활용되고 있으며 taxine계 alkaloid화합물에 대한 항암 효과도 많이 연구되고 있다(15). 본 연구에서는 이러한 paclitaxel 및 그 유도체들을 초임계 유체 크로마토그래피 방법으로 분리하기 위하여 분리 성능에 영향을 미치는 여러 인자들에 대한 연구를 통하여 최적 정제 조건을 찾아 보았다 또한 초임계 유체 추출(SFE)과 초임계 유체 크로마토그래피(SFC)를 동시에 적용하는 on-line coupled SFE/SFC 공정 개발을 통하여 기초 원료 물질로부터 고순도 정제물질을 얻는 방법에 대한 연구도 수행하였다.

재료 및 방법

시료 및 시약

본 연구에 사용된 paclitaxel 및 유도체들의 표준물질은 미국 NCI의 Ken Snader 박사로부터 공급받아 사용하였다. 추출에 이용된 주목시료는 한국산 주목의 껍질 부분으로서 음지에서 자연 건조 시킨 후 미세분말로 입자화 시킨 후에 사용하였다. 초임계 추출 용매로는 99.9%의 순도를 갖는 이산화탄소를 사용하였으며 분석용매, 보조용매, 추출물의 포집을 위한 용매 등은 99.8% 이상의 순도를 갖는 HPLC용 용매(Fisher, U.S.A)를 사용하였다.

초임계 유체 크로마토그래피

초임계 유체 크로마토그래피의 실험 장치는 Figure 1과 같다 액체상태의 이산화탄소를 cooling head가 부착된 HPLC펌프 (PU-980, JASCO Co., Japan)에 공급하여 주어진 압력으로 가압할수 있는데 이때 cooling head는 펌프에 공급되는 액체 이산화탄소가 펌프 head에서 공동화현상으로 인해 기화되는 것을 방지하기 위해서이다 또한 보조용매는 동일한 HPLC펌프 (PU-980, JASCO Co., Japan)를 이용하여 공급되며 이산화탄소와 보조용매는 밸브에 의해 공급이 조절된다. Air driven oven(CO-965 column oven, JASCO Co., Japan)내에 설치되어 있는 mixer내에서 공급된 이산화탄소와 보조용매가 완전히 혼합되며 pre-heating coil에서 보다 정확한 초임계 상태가 보장된다 이후 injector를 통과하고 6-way valve를 지나 크로마토그래피용 칼럼에 공급된다. 칼럼은 순상칼럼(Superpak SIL, JASCO Co., Japan)을 이용하여 온도와 압력 및 이동상의 조성을 변화하여 실험한다 칼럼에서 분리된 물질은 초임계유체의 함께 UV/VIS detector(UV-975, JASCO Co., Japan)에서 흡광도가 측정되어 크로마토그램으로 출력된다. Detector를 지난 초임계 유체와 분리된 물질들은 back pressure regulator(880-01, JASCO Co., Japan)에서 압력이 조절되어 포집기에 모이게 된다. 이때 back pressure regulator에는 막힘현상을 방지하기 위한 heater가 설치되어 있다

On-line coupled SFE/SFC

Figure 2와 같이 본 연구에 사용된 온라인 초임계추출/초임계 크로마토그래피시스템은 다양한 조절 밸브를 통하여 추출과 고순도 정제를 연속적으로 가능케 하는 장치이다. 장치는 fluid

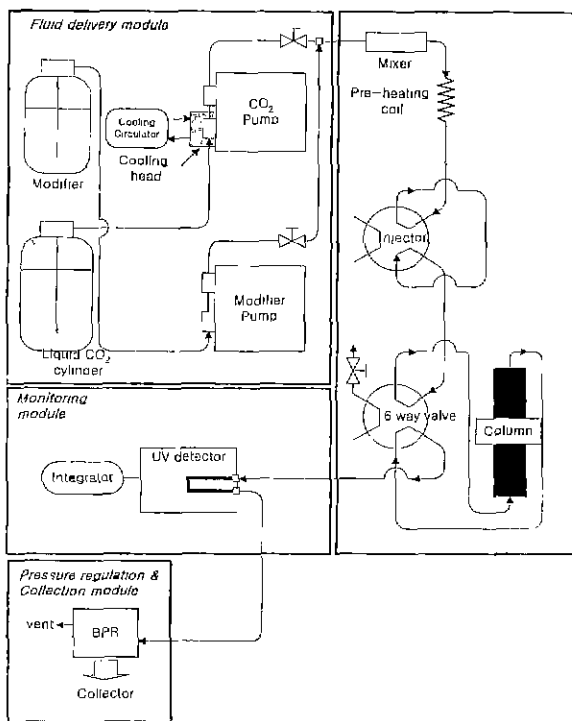


Figure 1 Schematic flow diagram of supercritical fluid chromatography.

regulation and collection module로 구성되어 있다. 즉, fluid delivery module에서는 이산화탄소를 가압하여 임계 압력 이상으로 만들어 주는 cooling head가 부착된 펌프와 보조용매를 공급하는 펌프로 구성되며 time programming을 통하여 초임계유체와 보조용매의 gradient조성 공급을 가능케 한다. Extraction module에서는 선택밸브를 통하여 추출기에 초임계 유체를 공급하거나 by-pass 시킬 수 있게 되어 있다. Partial purification module에서는 초임계 유체로 추출된 추출물을 부분 정제용 칼럼에 흡착시키고 elution시키는 기능을 수행한다. 이 module에서도 선택밸브를 통하여 이동상을 다음 module로 by-pass시킬 수 있다. Purification module은 고순도 정제를 위하여 partial purification module에서 분획된 추출물을 고순도 정제용 칼럼에 흡착시키고 elution시켜 고순도의 paclitaxel을 분리한다. Partial purification module 및 purification module의 크로마토그래피는 monitoring module에서 detection된다. Monitoring module은 300bar까지 운전이 가능한 detection cell과 integrator로 구성되며 정제과정을 monitoring한다. Pressure regulation module에서는 back pressure regulator를 이용하여 전 장치내의 압력과 유속을 동시에 조절한다. 구체적인 장치의 운전방법은 먼저 보조용매가 포함된 초임계 유체를 이용하여 추출을 한다. 본 연구에서는 미리 추출된 추출물을 이용하여 injector에서 injection하므로써 실험을 진행하였다. 부분 정제 칼럼이 연결되어 있는 상태에서 추출물은 injector를 거쳐 부분 정제 칼럼에 흡착되고 보조용매가 포함된 초임계 이산화탄소로 elution시킨다. 이때 monitoring module을 통해 paclitaxel이 주로 포함된 분획을 확인하고 그 분획만을 밸브조작에 의해 고순도 정제 칼럼에 유입시킨다. 또한 line switching valve를 이용하여 초임계 이산화탄소가 부분 정제 칼럼내로 흐르지 않게 하고 직접 고순도 정제 칼럼내로 흐르게 한다. 고순도 정제 칼럼 내에서 부분 정제된 추출물이 용리될 때 paclitaxel을 분획하면 고순도의 paclitaxel을 얻을 수 있다. 밸브조작을 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 밸브A가 열려져 있고 밸브B와 밸브C가 닫혀있는 상태에서는 추출물이 부분 정제 칼럼을 통과한 다음 바로 detector와 back pressure regulator를 거쳐 외부로 유출된다. Detector를 통하여 부분 정제 칼럼에서 paclitaxel함유 분획의 elution이 확인되면 밸브D와 밸브A를 닫고 밸브B와 밸브C를 열어, 부분 정제된 paclitaxel함유 분획을 고순도 정제 칼럼에 유입시킨다. 정해진 시간동안 고순도 정제 칼럼에 유입시키고 line switching valve를 이용하여 초임계 이산화탄소가 부분 정제 칼럼을 통하지 않고 직접 고순도 정제 칼럼을 통과케 한 다음 밸브B와 밸브C를 닫고 밸브A와 밸브D를 열면, 용리된 분획들은 검출기와 압력조절기를 통하여 외부로 유출된다.

결과 및 고찰

본 초임계 유체 크로마토그래피 시스템에서의 분리 대상 물질은 Baccatin III, 7-epi-10-deacetyltaxol, Cephalomannine, Paclitaxel, 10-Deacetylbaccatin III 및 10-Deacetyltaxol이며 변수로 주어진 크로마토그래피조건은 압력, 온도 및 이동상의 조성이다. 먼저 정해진 조건에서 각각의 표준시료를 분석한 다음 retention time이 서로 근접한 두 가지 시료를 혼합하여 분석한 뒤 retention time (t_R), unretained peak의 retention

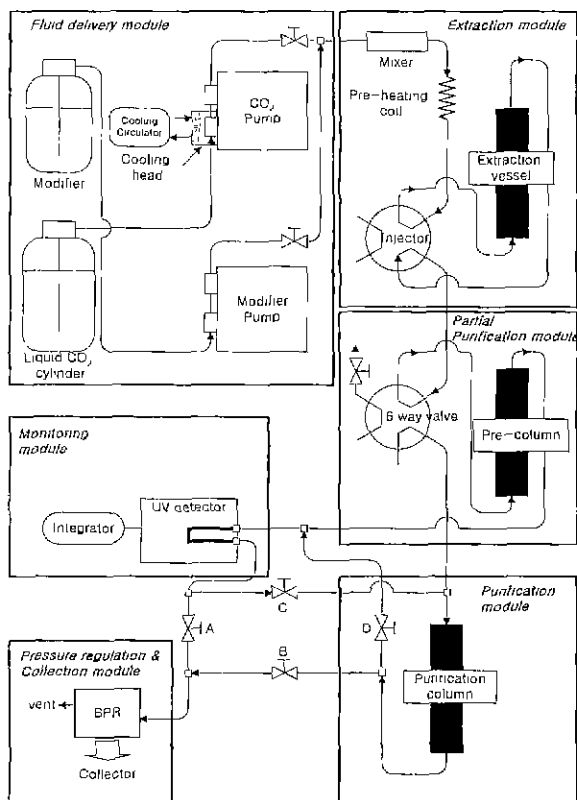


Figure 2. Schematic flow diagram of on-line SFE/SFC system.

delivery module, extraction module, partial purification module, purification module, monitoring module 및 pressure

time(t_R), peak width (W)를 측정한다. 측정된 세 가지 값으로부터 아래 식에 의해 capacity factor (k'), separation factor (α), resolution (R_S)을 계산하여 본 초임계 유체 크로마토그래피의 분리 성능을 알아보았다

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{k'_2}{k'_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (2)$$

$$R_S = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{0.5(W_1 + W_2)} \quad (3)$$

압력의 영향: 압력은 초임계 유체의 밀도에 가장 큰 영향을 미치는 인자로서 압력 변화에 의한 유체의 용해력 변화는 크로마토그래피의 분리 성능에 직접적인 영향을 미친다. 압력의 영향을 보기 위하여 초임계 유체의 압력을 각각 200, 225, 250, 275 kg/cm²로 변화시키미 대상 물질들의 분리 성능을 확인하였다. 위와 같은 압력 범위 선정 이유는 기초 실험 결과 200 kg/cm²이하에서는 초임계 CO₂의 taxane 용해력이 현저히 떨어지는 결과를 보였기 때문이며(16), 275 kg/cm²이상의 압력은 장치의 한계(특히 back pressure regulator) 때문에 제외되었다. 이때 온도는 40°C를 유지하였으며 초임계 이산화탄소 유체의 유속은 4 mL/min으로 일정하게 유지하고 보조용매인 메탄올을 20분 동안 0.1~0.4 mL/min의 gradient조건으로 흘려주었다. 20분 이후부터는 보조용매를 0.4 mL/min으로 일정하게 유지시켜 주었다. Table 1은 압력변화에 따른 대상물질들의 retention time을 나타낸다. 순상 칼럼을 이용하는 본 실험의 경우 대상 물질들의 elution순서는 baccatin III, 7-epi-10-deacetyltaxol, cephalomannine, paclitaxel, 10-deacetyl baccatin III, 10-deacetyltaxol 이었으며 이는 역상 칼럼을 이용하는 HPLC와는 다른 순서를 보인다. 특히 HPLC에서는 paclitaxel과 비로 뒤에 elution되는 cephalomannine의 분리가 가장 어려운 문제로 작용하지만 순상 칼럼을 이용하는 초임계 유체 크로마토그래피에서는 이 두 물질의 분리는 전혀 문제가 되지 않았다. Table 2는 압력 변화에 따른 capacity factor, separation factor 및 resolution을 나타낸다. 실험 결과 압력이 증가할수록 retention time은 감소하지만 유도체들간의 분리형태에는 큰 차이가 나지 않았다. Baccatin III, 7-epi-10-deacetyltaxol, cephalomannine의 경우 resolution이 1보다 작은 값을 나타내었지만 paclitaxel과 10-deacetyl baccatin III, paclitaxel 과 10-deacetyltaxol을 분리하는

경우 분리능(R_S)이 커서 쉽게 분리할 수 있음을 알 수 있었다. Paclitaxel과 10-deacetyl baccatin III는 Figure 3에서 보듯이 압력이 증가할수록 resolution이 증가하여 높은 압력에서 paclitaxel을 그 유도체들로부터 분리하는데 유리함을 알 수 있었다. 그러나 10-deacetyl baccatin III과 10-deacetyltaxol의 경우에는 압력이 증가할수록 resolution이 감소하는 경향을 보였다.

Table 2. Effect of pressure on capacity factor, separation factor, and resolution.

Pressure (kg/cm ²)	200	225	250	275
Capacity Factor, k'				
Baccatin III	11.76	12.60	8.09	6.55
7-epi-10-deacetyltaxol	12.20	12.85	8.15	6.63
Cephalomannine	12.71	14.07	8.50	6.83
Taxol	11.24	15.14	9.18	7.30
10-Deacetyl baccatin III	16.39	17.62	11.08	9.41
10-Deacetyltaxol	19.64	21.19	12.27	10.22
Separation Factor, α				
① - ②	1.04	1.02	1.01	1.01
② - ③	1.01	1.10	1.04	1.03
① - ③	1.08	1.12	1.05	1.04
④ - ⑤	1.15	1.16	1.21	1.29
⑤ - ⑥	1.20	1.20	1.11	1.09
Resolution, R_S				
① - ②	0.72	0.49	0.00	0.45
② - ③	0.89	0.85	0.70	0.56
① - ③	0.21	1.13	0.46	0.42
④ - ⑤	1.78	2.75	2.81	3.03
⑤ - ⑥	4.65	4.08	1.75	1.51

* ① Baccatin III, ② 7-epi-10-deacetyltaxol, ③ Cephalomannine, ④ Paclitaxel, ⑤ 10-Deacetyl baccatin III, ⑥ 10-Deacetyltaxol

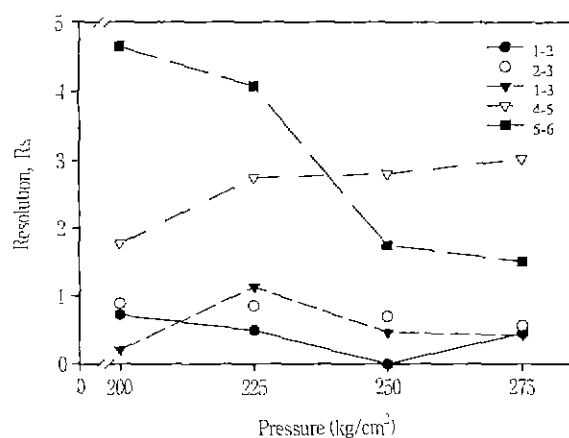


Figure 3. Effect of pressure on the resolution of paclitaxel and its derivatives.

1 Baccatin III, 2 7-epi-10-deacetyltaxol, 3 Cephalomannine, 4 Paclitaxel, 5 10-Deacetyl baccatin III, 6: 10-Deacetyltaxol, Temperature was maintained at 40°C and methanol was used as cosolvent. Methanol flow rate increased from 0.1 to 0.4 mL/min whereas CO₂ flow rate was kept constant at 4 mL/min. After 20 min, methanol flow rate was kept constant at 0.4 mL/min.

Table 1. Effect of pressure on retention time (min)

Pressure (kg/cm ²)	200	225	250	275
Baccatin III	18.75	18.22	16.46	15.40
7-epi-10-deacetyltaxol	19.40	18.56	16.57	15.57
Cephalomannine	20.15	20.19	17.20	15.98
Taxol	22.04	21.63	18.43	16.93
10-Deacetyl baccatin III	25.56	24.95	21.87	21.23
10-Deacetyltaxol	30.34	29.73	24.01	22.89
Unretained peak	1.17	1.31	1.81	2.04

온도의 영향 : 초임계 유체의 압력을 250 kg/cm²로 유지하면서 온도를 각각 40, 50℃로 변화시키며 대상 물질들의 분리 성능을 확인하였다. 초임계 유체를 이용하는 추출 실험 결과(16) 40℃ 이하 및 고온에서는 초임계 유체의 paclitaxel 용해력이 현저히 떨어지기 때문에 상기 두 온도 조건에서 크로마토그래피 분리 정도를 실험하였다. 이때 초임계 이산화탄소 유체의 유속은 4 mL/min으로 일정하게 유지하고 보조용매인 메탄올을 20분 동안 0.1~0.4 mL/min의 gradient조건으로 흘려주었다. 20분 이후에는 보조용매를 0.4 mL/min으로 일정하게 유지시켜 주었다. Table 3, Table 4는 압력 변화에 따른 retention time, capacity factor, separation factor 및 resolution의 변화를 나타낸다. 온도가 증가하면 retention time은 약간 증가하지만 압력이 미치는 영향만큼 크지는 않았다. Paclitaxel과 10-deacetyl baccatin III, paclitaxel 과 10-deacetylaxol 사이의 분리능(R_s)의 경우 40℃에서 약간 우수하였는데 이는 주로 peak width의 감소에 의한 것이다. 따라서 약간 우수한 분리능(R_s) 결과와 대상물질들의 열적 stability를 고려할 때 추후 실험은 40℃에서 수행하였다.

Table 3 Effect of temperature on retention time (min)

Temperature (°C)	40	50
Baccatin III	16.46	16.85
7-epi-10-deacetylaxol	16.57	17.32
Cephalomannine	17.20	17.36
Taxol	18.43	18.90
10-Deacetyl baccatin III	21.87	21.25
10-Deacetylaxol	24.01	23.21
Unretained peak	1.81	2.18

Table 4 Effect of temperature on capacity factor, separation factor, and resolution

Temperature (°C)	40	50
Capacity factor, k'		
Baccatin III	8.09	6.73
7-epi-10-deacetylaxol	8.15	6.95
Cephalomannine	8.50	6.96
Taxol	9.18	7.67
10-Deacetyl baccatin III	11.08	8.75
10-Deacetylaxol	13.27	9.65
Separation factor, α		
① - ②	1.01	1.03
② - ③	1.04	1.00
① - ③	1.05	1.03
④ - ⑤	1.21	1.14
⑤ - ⑥	1.11	1.10
Resolution, R_s		
① - ②	0.00	0.39
② - ③	0.70	0.00
① - ③	0.46	0.52
④ - ⑤	2.81	2.48
⑤ - ⑥	1.75	1.47

*① Baccatin III, ② 7-epi-10-deacetylaxol, ③ Cephalomannine, ④ Paclitaxel, ⑤ 10-Deacetyl baccatin III, ⑥ 10-Deacetylaxol

이동상의 영향 : 압력은 250 kg/cm², 온도는 40℃를 유지하면서 초임계 유체 이동상의 유속 및 조성을 변화시키며 대상물질들의 분리 성능을 관찰하였다. 이동상의 조성은 Table 5처럼 6가지 형태로 변화시켰다. Table 5의 조성은 처음 20분간 gradient조건을 의미하며 20분 이후에는 gradient 마지막 조건으로 일정하게 유지하였다. Table 6, Table 7은 이동상의 조성 변화에 따른 retention time, capacity factor, separation factor 및 resolution의 변화를 나타낸다. 이동상중에서 보조용매인 메탄올의 조성이 증가할수록 전체적인 극성이 증가하여 retention time이 감소하고 이에 따라 peak의 겹침이 발생하여 resolution도 감소된다. 메탄올 농도의 증가가 완만한 I 조성과 IV조성의 경우에 보다 큰 resolution을 보이는 데 전체 유량을 4mL/min로 유지하는 I 조성이 가장 우수한 분리 성능을 보였다. Peak tailing도 발생하며 baccatin III, cephalomannine, 7-epi-10-deacetylaxol의 경우에는 전혀 분리가 일어나지 않는다. 6가지 조건에서는 I의 경우가 가장 좋은 resolution을 나타내었지만 전반적인 경향성을 고려하면 이산화탄소의 유속을 일정하게 하는 경우가 resolution이 고르게 우수한 것으로 나타났다.

본 실험에서 크로마토그래피 조건 변수로 주어진 압력, 온도 및 이동상의 조성 변화에 따라서 대상물질의 분리에 큰 차이가 있음을 알 수 있었다. Paclitaxel, 10-deacetyl baccatin III, 10-deacetylaxol은 압력, 온도, 이동상의 조성 변화에 의하여 우수한 분리 결과를 얻을 수 있었다. 특히 paclitaxel의 경우 본 실험 조건중 압력 275 kg/cm², 온도 40℃, 이동상 I 조성(Table 9)에서 가장 우수한 resolution을 보여 초임계 이산화탄소를 이용하는 크로마토그래피를 이용하는 정제 방법의 적용 가능성을 충분히 보여준다. 하지만 baccatin III, cephalomannine, 7-epi-10-deacetylaxol의 경우에는 매우 낮은 resolution을 보여 이들 물질을 정제하기 위한 보다 다른 크로마토그래피 조건에 대한 연구가 필요한 것으로 여겨진다. 역상 칼럼을 이용한 retention time변화를 유도하거나 ion pairing agent사용에 의한 방법들이 추후 연구 대상이 될 수 있으리라 여겨진다.

On-line coupled SFE/SFC : 실제 paclitaxel을 SFE방법 또는 보조용매를 이용하는 SFE방법에 의하여 추출하였을 때 추출물의 성분을 살펴보면 paclitaxel이 차지하는 비율이 높지 않음을 알 수 있었다. 진(17) 또는 진(18) 등에 의하여 조사된

Table 5. Mobile phase experimental conditions

Set	I	II	III	IV	V	VI
CO ₂	3.9-36	3.9-34	3.9-3.2	4.0	4.0	4.0
MeOH	0.1-0.4	0.1-0.6	0.1-0.8	0.1-0.4	0.1-0.6	0.1-0.8

Table 6. Effect of mobile phase composition on retention time (min)

Set	I	II	III	IV	V	VI
①	16.92	13.75	11.42	16.46	12.69	11.14
②	17.27	13.75	11.61	16.57	12.83	11.28
③	17.61	13.92	11.67	17.20	12.95	11.46
④	18.86	15.02	12.27	18.43	13.84	12.48
⑤	22.13	17.29	14.46	21.87	16.31	14.84
⑥	23.93	18.56	15.21	24.01	16.76	15.96
T_0	1.78	1.54	1.65	1.81	1.55	1.39

Table 7. Effect of mobile phase composition on capacity factor, separation factor, and resolution

Set	I	II	III	IV	V	VI
Capacity factor, k'						
①	8.51	7.93	5.92	8.09	7.19	7.01
②	8.70	7.93	6.04	8.16	7.28	7.12
③	8.91	8.04	6.07	8.50	7.35	7.24
④	9.60	8.75	6.44	9.18	7.93	7.98
⑤	11.43	10.23	7.76	11.08	9.52	9.68
⑥	12.44	11.05	8.22	12.27	9.81	10.48
Separation factor, α						
①-②	1.02	1.00	1.02	1.01	1.01	1.02
②-③	1.02	1.01	1.00	1.04	1.01	1.02
①-③	1.05	1.01	1.03	1.05	1.02	1.03
④-⑤	1.19	1.17	1.21	1.21	1.20	1.21
⑤-⑥	1.09	1.08	1.06	1.11	1.03	1.08
Resolution, R_s						
①-②	0.00	-	-	0.00	0.00	0.12
②-③	0.73	0.00	0.00	0.70	0.00	0.50
①-③	0.82	0.39	0.00	0.46	0.25	0.00
④-⑤	3.26	2.39	1.76	2.81	2.50	2.43
⑤-⑥	2.18	1.09	0.74	1.75	1.18	1.42

① Baccatin III, ② 7-epi-10-deacetylaxol, ③ Cephalomannine, ④ Paclitaxel, ⑤ 10-Deacetyl baccatin III, ⑥ 10-Deacetylaxol

결과 전체 추출물 내에서 paclitaxel이 차지하는 비율은 1%에도 미치지 못하고 있다 이는 초임계 유체가 paclitaxel에 대하여 선택성이 높지 않다는 것을 보여주는 결과로 SFE방법에 의한 paclitaxel추출정제 방법에 대한 부정적인 판단을 할 수 있는 근거가 된다. 즉 이렇게 저농도의 paclitaxel추출물은 정제단계인 크로마토그래피 단계에 직접 적용하는 것은 무리이고 또 다른 1차정제 과정이 필요하게되어 SFE방법의 우수성을 주장할 수 없다 하지만 SFE에 SFC를 coupling 시키면 상황은 달라진다 즉, SFE에 의하여 추출된 저농도 paclitaxel은 preliminary SFC에서 농도를 수십% 까지 올리고 이를 다시 고순도 정제용 SFC에 적용시켜 원하는 순도의 paclitaxel을 분리하면 기존의 추출정제 방법 보다 많은 장점을 가질 수 있다. Figure 2는 on-line coupled SFE/SFC 장치로서 모든 공정이 연속적으로 진행되는 특징을 가지고 있다. Partial purification module의 칼럼은 주로 단순한 기능을 가지는 흡착제로 충전되어 SFE에 의한 저농도 paclitaxel추출물을 흡착시키고 elution시킨다. Elution과정에서 paclitaxel함유 fraction을 purification module의 정제용 칼럼에 loading 시키고 적절한 초임계 유체 압력, 온도, 이동상 조성 조건으로 elution시켜 고순도의 paclitaxel을 얻는다.

On-line coupled SFE/SFC장치를 이용하여 한국산 주목의 껍질 부분을 음지에서 자연건조시킨 미세분말 시료로부터 paclitaxel을 고순도 정제 하였다 SFE에 관련된 추출 조건은 서(16) 등이 연구한 조건을 적용하였다. 또한 SFC에 관련된 크로마토그래피 정제 조건들은 앞에서 최적화한 조건들을 적용하였다. Figure 2의 extraction module에서는 시료 10g을 이용하여 250 kg/cm², 40°C에서 초임계 이산화탄소와 13% 메탄올을 보조용매로 사용하여 추출하였다(16). SFE추출물은 partial purification

module의 흡착용 실리카 칼럼(10×120 mm, 10-40 μ m, 60Å)에 흡착시키고 압력은 250 kg/cm², 온도는 40°C조건에서 보조용매로 10% 에탄올을 포함하는 초임계 이산화탄소 4 mL/min로 elution시켰다. 이중 retention time 10분부터 약 1분간에 해당하는 분획을 purification module로 보내서 고순도 정제용 칼럼(4.6×250 mm, C18 90Å, Vydac, U.S.A)에 loading 시켰다. Loading 시간(1분)은 전체적인 수율과 크로마토그래피의 분산을 고려하여 최적화시킨 결과이다 고순도 정제용 칼럼에서 압력은 250 kg/cm², 온도는 40°C조건에서 10% 에탄올을 포함하는 초임계 이산화탄소 4 mL/min로 elution시키고 paclitaxel분획을 수거하였다. 수거한 최종 정제물을 HPLC 분석(16)한 결과 99.5% 표준 시료와 비교하여 95% paclitaxel을 얻을 수 있었으며 전체 수율은 38%이었다. 앞에서 연구한 초임계 유체 크로마토그래피 최적 조건을 적용하지 않았고, 또한 paclitaxel 분획 최적화가 이루어지지 않은 조건에서 얻은 결과임을 감안할 때 상기 결과는 on-line coupled SFE/SFC 방법에 의한 paclitaxel 고순도 정제의 가능성을 보여준다 이러한 SFE/SFC에 의한 paclitaxel 정제는 그 순도 및 효율면에서 거의 HPLC와 유사한 결과까지 얻을 수 있어 SFC 본래의 장점인 분리속도, 공정정순화 등의 경제성 측면에서 볼 때 우수한 방법이라 할 수 있다. 또한 청정공학적 측면에서의 부가적 가치는 SFE/SFC 방법의 활용을 제속하는 또 하나의 요인이 될 수 있다

요 약

초임계 이산화탄소 크로마토그래피 방법에 의한 paclitaxel, baccatin III, 10-deacetyl baccatin III, 7-epi-10-deacetylaxol, cephalomannine, 10-deacetylaxol의 분리에서 초임계 유체의 압력, 온도 및 이동상의 조성이 미치는 영향을 연구하였다. Paclitaxel, 10-deacetyl baccatin III, 10-deacetylaxol은 압력, 온도, 이동상의 조성 변화에 의하여 우수한 분리 결과를 얻을 수 있었다. Paclitaxel의 경우 압력 275 kg/cm², 온도 40°C, 이동상 조성을 초기 20분간 초임계 이산화탄소와 보조용매인 메탄올을 각각 3.9~3.6 mL/min, 0.1~0.4 mL/min의 gradient조건으로 하였을 때 가장 우수한 분리능을 보였다. Baccatin III, cephalomannine, 7-epi-10-deacetylaxol의 경우에는 낮은 분리능을 보였다. 주목 분말 시료로부터 paclitaxel을 정제할 때 on-line coupled SFE/SFC 장치를 이용하여 추출 정제 공정을 단순화하였다 초임계 이산화탄소를 용매로하여 추출, 1차 정제 및 크로마토그래피 정제 단계를 연속적으로 거쳐 38% 수율로 95% paclitaxel을 얻을 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Saito, M., Y. Yamauchi and T. Okuyama (1994), Fractionation by packed-column SFC and SFE, VCH Publishers, Inc, New York.
2. Novotny, M., S.R. Springton, P.A. Peaden, J.C. Fjeldsted, and M.L. Lee (1981), Capillary Supercritical Fluid Chromatography, *Anal. Chem.*, **53**, 407A-414A.
3. Peaden, P.A. and M.L. Lee (1982), Supercritical Fluid Chromatography: methods and principles, *J. Liq. Chrom.*

- matogr.*, 5, 179-221.
4. Hirata, Y. and F. Nakata (1984), Supercritical Fluid Chromatography with Fused- Silica Packed Columns, *J. Chromatogr.*, 295, 315-322.
 5. Takeuchi, T., D. Ishii, M. Saito and K.Hibi (1984), Supercritical Fluid Chromatography with Micro Packed Columns and Carbon Dioxide as a Mobile Phase, *J Chromatogr.*, 295, 323-331.
 6. Noriss, T. A and M.G Rawdon (1984), Determination of Hydrocarbon Types in Petroleum Liquids by Supercritical Fluid Chromatography with Flame Ionization Detection. *Anal. Chem.*, 56, 1767-1769.
 7. Smith, R. D., W.D. Felix, J.C Fjeldsted, and M.L. Lee (1982), Capillary Column Supercritical Fluid Chromatography / Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 54, 1883-1885
 8. Crowther, J.B and J.D. Henion (1985), Supercritical Fluid Chromatography of Polar Drugs using Small-Particle Packed Columns with Mass Spectrometric Detection. *Anal. Chem.*, 57, 2711-2716.
 9. Shafer, K.H., S.L. Pentoney, Jr and P.R. Griffiths (1986), Supercritical Fluid Chromatography / Fourier Transform Infrared Spectrometry with an Automatic Diffuse Reflectance Interface, *Anal. Chem.*, 58, 58-64
 10. Gere, D.R., R. Board, and M.McManigill (1982), Supercritical Fluid Chromatography with Small Particle Diameter Packed Columns, *Anal. Chem.*, 54, 736-740
 11. Wani, M.C., H.L. Taylor, M.E. Wall, P. Coggon, and A. T. Mcphail (1971), Plant Antitumor Agent The Isolation and Structure of Taxol, a Novel Antileukemic and Antitumor Agent from *Taxus brevifolia*, *J. Am. Chem. Soc.*, 93, 2325-2327.
 12. Woo, D.D.L., S.Y.P Miao, J.C. Palayo, and A.S Woolf (1994), Taxol Inhibits Progression Congenital Polycystic Kidney Disease. *Nature*, 368, 750-753.
 13. Senilh, V., S. Blechert, M. Colin, D Guenard, F Picot, P. Potier, and P Varenna (1984), Mise en evidence de nouveaux analogues du taxol extraits de *Taxus baccata*, *J Nat. Prod*, 47, 131-137
 14. Wheeler, N.C and M.T. Hehnen (1993), Taxol. A Study in Technology Commercialization, *J. Forestry*, 91, 15-18
 15. Baxter, J.N., B. Lythogoe, B Scales, R.M. Scrowston, and S. Trippett (1962), Taxine. Part I. Isolation Studies and the Functional Groups of O-Cinnamoyltaxme- I, *J Chem Soc.*, 2964-2971
 16. 서정혁, 조병관, 변상요, 김공환 (1996), 초임계 유체를 이용한 주목 수피로부터 taxol의 추출에 관한 연구, *한국생물공학회지*, 11, 71-76.
 17. 전문균 (1992), 초임계 이산화탄소를 이용한 주목의 일과 종자로부터 탁솔관련 물질 추출에 관한 연구, 석사학위논문, 한국과학기술원, 대전.
 18. 신혜원 (1994), 보조 용매가 첨가된 초임계 이산화탄소를 이용한 탁솔과 마카틴 III의 추출에 관한 연구, 석사학위논문, 한국과학기술원, 대전