

## 표면적이 증가된 분별침전에서 친수성 고분자물질을 이용한 paclitaxel의 입자 크기 감소

임용규, 김진현\*  
공주대학교 화학공학부

Received: October 12, 2015 / Revised: October 30, 2015 / Accepted: November 6, 2015

### Decrease in the Particle Size of Paclitaxel by Increased Surface Area Fractional Precipitation Process Using Hydrophilic Polymer

Yong Kyu Lim and Jin-Hyun Kim\*

Department of Chemical Engineering, Kongju National University, Cheonan 331-717, Republic of Korea

In this study, we applied an increased surface area fractional precipitation with hydrophilic polymer for decreasing the particle size of the anticancer agent paclitaxel from plant cell cultures. The addition of polymer resulted in a considerable decrease in the size of the paclitaxel precipitate. Among the polymers (HPMC 2910, PVP-K90, PVA) used, PVP-K90 was the most effective for the inhibition of precipitate growth. When PVP-K90 (0.2%, w/v) was used, the paclitaxel particles were four to five times smaller, having less than a 20  $\mu\text{m}$  radius, than those obtained in the absence of the polymer. In addition, the precipitate size was inversely correlated with the absolute value of zeta potential.

**Keywords:** Paclitaxel, increased surface area fractional precipitation, polymer, particle size, decrease

## 서 론

Paclitaxel은 현재 난소암, 유방암, 카포시 종양(Kaposi's sarcoma) 및 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer) 치료에 가장 효과 있는 항암물질이며 적응증(류마티스성 관절염 및 알츠하이머 치료)과 처방 방식의 확대로 향후 그 수요는 계속 늘어날 전망이다[16, 19]. Paclitaxel의 주요 생산 방법에는 주목나무(yew tree)에서 직접 추출하는 방법, 주목 나무에서 전구체(baccatin III, 10-deacetylpaclitaxel 등)를 얻어 반합성하는 방법, 주목나무에서 유도된 식물세포를 배양하는 방법이 있다[1, 3, 14]. 식물세포배양법은 기후, 환경 등에 의한 영향을 받지 않고 생물반응기 내에서 안정적으로 생산이 가능하기 때문에 일정한 품질의 paclitaxel을 대량 생산할 수 있다는 장점이 있다.

일반적으로 물에 잘 녹지 않는 원료의약품(active pharmaceutical ingredient, API)의 경우 입자 크기를 작게 하여

그 활용도를 높이고자 한다. 입자 크기가 작아질수록 제형 시 용해 속도, 약물 분산의 균일성, 경구 생체 이용률 등을 향상시킬 수 있다[2, 7]. 또한 정제 후 건조 단계에서 잔류수분 및 잔류용매 제거에도 상당히 도움이 된다[12]. Paclitaxel은 Biopharmaceutics classification system(BCS) class IV의약품으로 분류되어 물에 대한 용해도가 매우 낮아 그 활용도에 많은 제한이 있다[7, 8]. 입자 크기를 줄이기 위하여, “top-down(breaking-down)”과 “bottom-up(building-up)” 기술이 이용되고 있다[2]. 이미 제조된 큰 입자의 의약품을 다양한 방식의 milling이나 고압호모제나이저에 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 적용된 침전 기법에 의해 작은 입자의 의약품을 제조하는 bottom-up 기술은 낮은 수율과 높은 장비 비용이 발생할 수 있다. 본 연구에서 시도되는 분별침전은 bottom-up 기술에 포함된다.

기존 문헌에 의하면 분별침전 시 다양한 종류의 이온교환수지를 사용하여 반응액 부피당 표면적을 증가시킴으로써 paclitaxel의 입자 크기를 감소시킬 뿐만 아니라 침전 효율

### \*Corresponding author

Tel: +82-41-521-9361, Fax: +82-41-554-2640

E-mail: jinhyun@kongju.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

(침전시간 단축)을 향상시킬 수 있었다[11]. 또한 침전 공정에 고분자물질을 첨가해 줌으로써 megestrol acetate의 입자 크기를 감소시킬 수 있는 연구결과가 보고되었다[2]. 이러한 연구결과로부터 이온교환수지와 고분자물질을 접목하여 분별침전을 수행할 경우 시너지 효과에 의해 좀 더 효과적으로 작은 입자의 paclitaxel을 제조할 수 있을 것으로 예상된다. 즉, 이온교환수지를 이용한 표면적이 증가된 분별침전 공정에 고분자물질을 첨가함으로써 paclitaxel의 입자 크기를 효율적으로 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다. 따라서 본 연구에서는 이온교환수지(Amberlite IRA 400 OH)을 이용한 표면적이 증가된 분별침전 공정에 세 종류의 고분자물질[PVA(polyvinyl alcohol, MW 31,000-50,000), HPMC 2910(hydroxypropyl methylcellulose 2910), PVP-K 90(polyvinylpyrrolidone-K 90)]를 각각 첨가하여 분별침전 시간에 따른 paclitaxel 입자 성장 양상을 조사하고 궁극적으로 입자 크기를 효과적으로 감소시킬 수 있는지를 평가하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 실험에 사용된 식물세포배양액은 *Taxus chinensis*의 잎으로부터 얻은 세포주(cell line)를 이용하였으며, 수정된 Gamborg's B5 배지[5]에서 24°C, 암 조건으로 교반(150 rpm)하여 배양하였다. 식물세포배양 후 배양액으로부터 decanter (Westfalia, CA150 Clarifying Decanter)와 고속원심분리기( $\alpha$ -Laval, BTPX205GD-35CDEEP)를 이용하여 식물세포와 세포조각(cell debris)을 회수하였다. 회수한 식물 세포와 세포조각을 합하여 바이오매스라 하였다. 본 연구에 사용된 바이오매스는 (주)삼양제넥스로부터 제공받았다.

### Paclitaxel 분석

Paclitaxel 함량 분석을 위해 HPLC system(Waters, USA)과 Capell Pak C<sub>18</sub>(250×4.6 mm, Shiseido, Japan) 컬럼을 사용하였다. 이동상은 아세트니트릴과 증류수 혼합용액(35/65-65/35, v/v, gradient mode)을 유속 1.0 ml/min으로 흘려주었다. 시료 주입량은 20 ml이며 227 nm에서 UV에 의해 검출하였다. HPLC 분석은 표준정량곡선을 이용하였으며 표준시료는 Sigma-Aldrich 제품(순도: 95%)을 사용하였다[15].

### 분별침전(fractional precipitation)을 위한 시료준비

식물세포배양액으로부터 회수한 바이오매스와 메탄올의 비율을 1/1(w/v)로 하여 실온에서 4회 반복 추출한 후 농축(원액의 30%)하였다. 액-액 추출을 위해 농축된 메탄올 용액

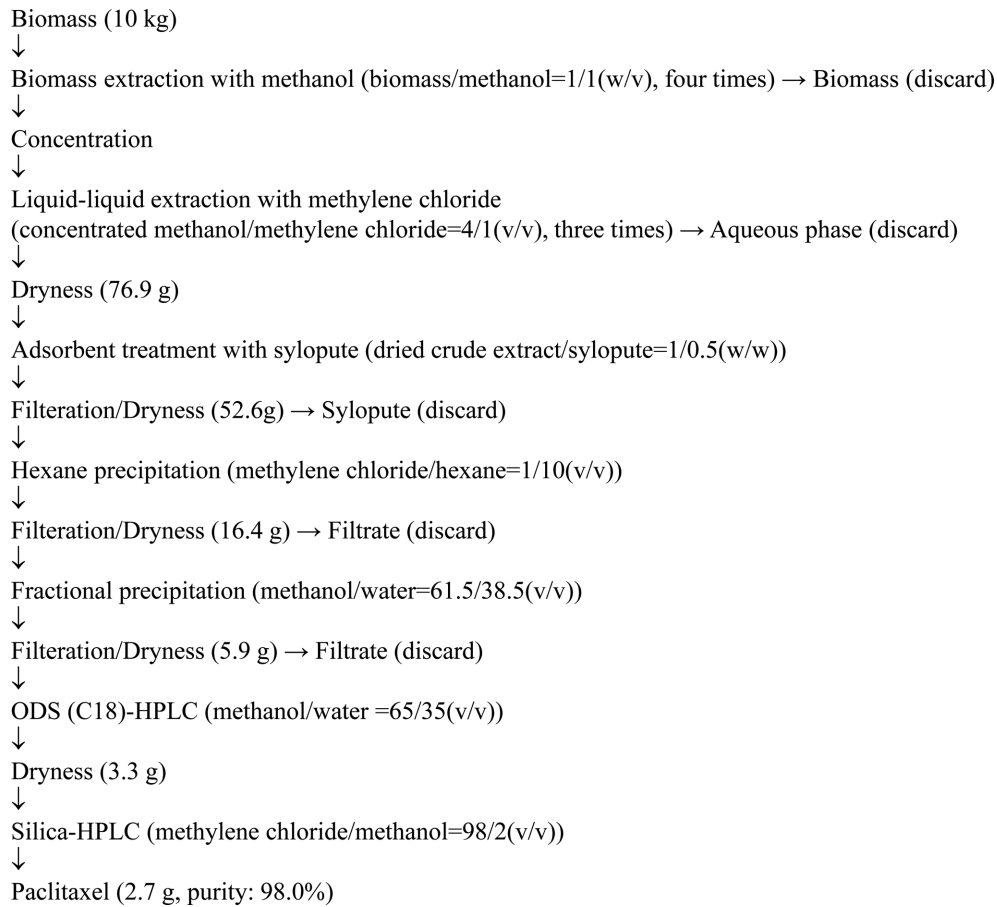
에 메틸렌 클로라이드를 첨가(메탄올 농축액의 25%)하고, 30 min 동안 교반 후 정제 시켜 상 분리를 유도하였다. 액-액 추출을 수행하여 paclitaxel이 포함된 하층인 메틸렌 클로라이드 층으로 paclitaxel을 회수하여 농축/건조하였다. 건조된 추출물(crude extract)을 메틸렌 클로라이드에 20% (v/w) 비율로 녹이고 흡착제 sylopute(Fuji Silysia Chemical Ltd., Japan)를 건조된 추출물 대비 50% (w/w) 비율로 첨가하여 40°C 항온조에서 30 min 동안 교반 시킨 후 여과하였다. 여과액은 30°C, 감압상태에서 건조하고, 건조된 시료를 메틸렌 클로라이드에 녹인 후 핵산에 떨어뜨려 핵산 침전을 수행하였다(메틸렌 클로라이드/핵산 = 1/10, v/v). 핵산 침전 후 여과를 통하여 paclitaxel 침전물을 얻고 35°C에서 24시간 동안 진공 건조하고, 건조된 시료를 메탄올에 용해하고 (순수한 paclitaxel의 함량: 0.5%, w/v) 메탄올이 61.5%가 될 때까지 한 방울씩 천천히 증류수를 떨어뜨린 후 4°C에서 보관하여 paclitaxel 침전물을 얻었다. 침전 후 침전물을 여과하고 35°C에서 24시간 동안 진공 건조하여 ODS C<sub>18</sub> 컬럼(50 mm×500 mm, Shiseido, Japan)과 Silica 컬럼(50 mm×500 mm, Shiseido, Japan)이 장착된 HPLC 공정으로 추가 정제하였다[13]. 최종 정제된 paclitaxel 순도는 98.0%이었으며 시료 준비 과정을 Fig. 1에 나타내었다.

### 표면적이 증가된 분별침전(increased surface area fractional precipitation)

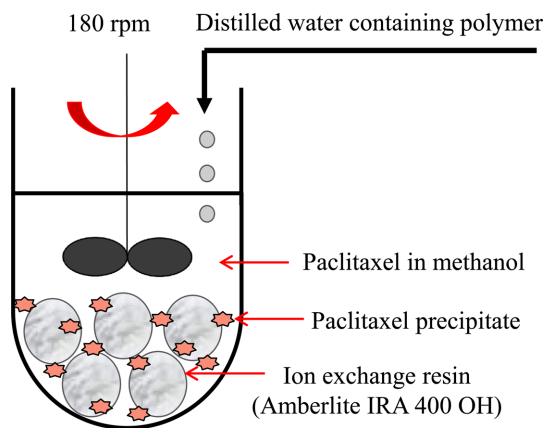
표면적이 증가된 분별침전 공정의 개략도를 Fig. 2에 나타내었다. 기존 문헌[2, 4]에서 원료의약품의 입자크기 감소에 효과적인 세 종류의 고분자물질(HPMC 2910, PVP-K 90, PVA 31,000-50,000)를 각각 농도(0.1, 0.2, 0.3%, w/v)를 달리하여 증류수에 녹인 후 첨가하여 분별침전을 수행하였다. 시료를 메탄올에 녹이고(순수한 paclitaxel 함량 기준: 0.3%, w/v), 메탄올이 61.5%가 될 때까지 고분자물질이 포함된 증류수를 교반(~180 rpm)하에 한 방울씩 떨어뜨렸다. 분별침전공정의 반응액 부피당 표면적(S/V) 증가를 위해 이온교환수지(Amberlite IRA 400 OH)를 첨가(S/V = 0.428 mm<sup>-1</sup>)한 후 4°C로 항온항습기(KCL-2000W, EYELA, Japan)에 보관하여 paclitaxel 침전물을 얻었다[11]. 이온교환수지는 35°C에서 하루 동안 건조한 후 실험에 사용하였다. 분별침전 시간 변화에 따른 paclitaxel 침전 양상을 전자현미경을 이용하여 관찰하였다.

### 침전물 형태 및 크기 확인

분별침전 동안 paclitaxel 침전물 형태 확인 및 크기 측정을 위하여 전자현미경(SV-35 Video Microscope System, Some Tech., Korea)을 사용하였다[6]. 분별침전을 통해 얻은 paclitaxel 침전물을 고배율(×100)에서 관찰 하였다. 관찰된



**Fig. 1. Preparation of sample for increased surface area fractional precipitation with hydrophilic polymer.** The process consists of biomass extraction, liquid-liquid extraction, adsorbent treatment, hexane precipitation, fractional precipitation, ODS-HPLC, and silica-HPLC.



**Fig. 2. Schematic diagram of increased surface area fractional precipitation with hydrophilic polymer for decreasing the particle size of paclitaxel precipitate.** The surface area per working volume ( $S/V: 0.428 \text{ mm}^{-1}$ ) of the reactor was increased by addition of ion an exchange resin (Amberlite IRA 400 OH). The methanol composition in water, pure paclitaxel content, and temperature were 61.5% (v/v), 0.3% (w/v), and 4°C, respectively.

paclitaxel 침전물은 IT-Plus software(Some Tech., Korea)에서 동화상으로 확인하였으며 이를 통해 paclitaxel 침전물의 형태와 크기를 확인하였다.

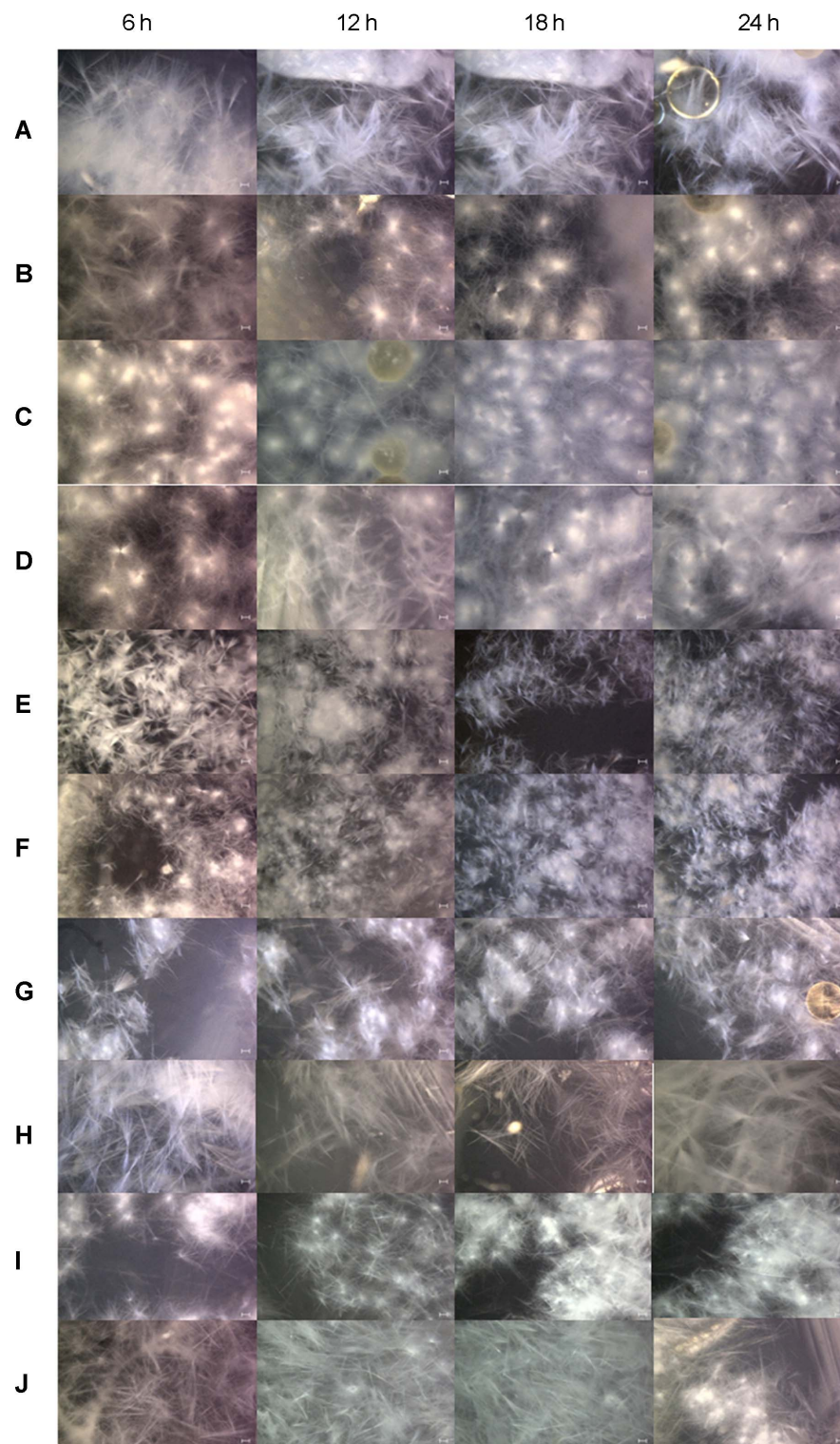
**제타전위(zeta potential) 측정**

표면적이 증가된 분별침전공정에서 고분자물질을 첨가하지 않은 경우와 동일 농도(0.2% w/v)로 세 종류의 고분자물질(PVA, HPMC 2910, PVP-K90)을 각각 첨가한 경우 분별침전(24시간) 용액에서의 제타전위를 측정하였다. ELS-Z (Photal, Japan)를 이용하여 제타전위를 측정하였으며 측정된 제타전위는 ELS-Z software를 사용해 확인하였다.

**결과 및 고찰**

**고분자물질이 입자 형태에 미치는 영향**

본 연구에서는 paclitaxel의 입자 크기를 획기적으로 감소시키기 위하여, 이온교환수지로 표면적이 증가된 분별침

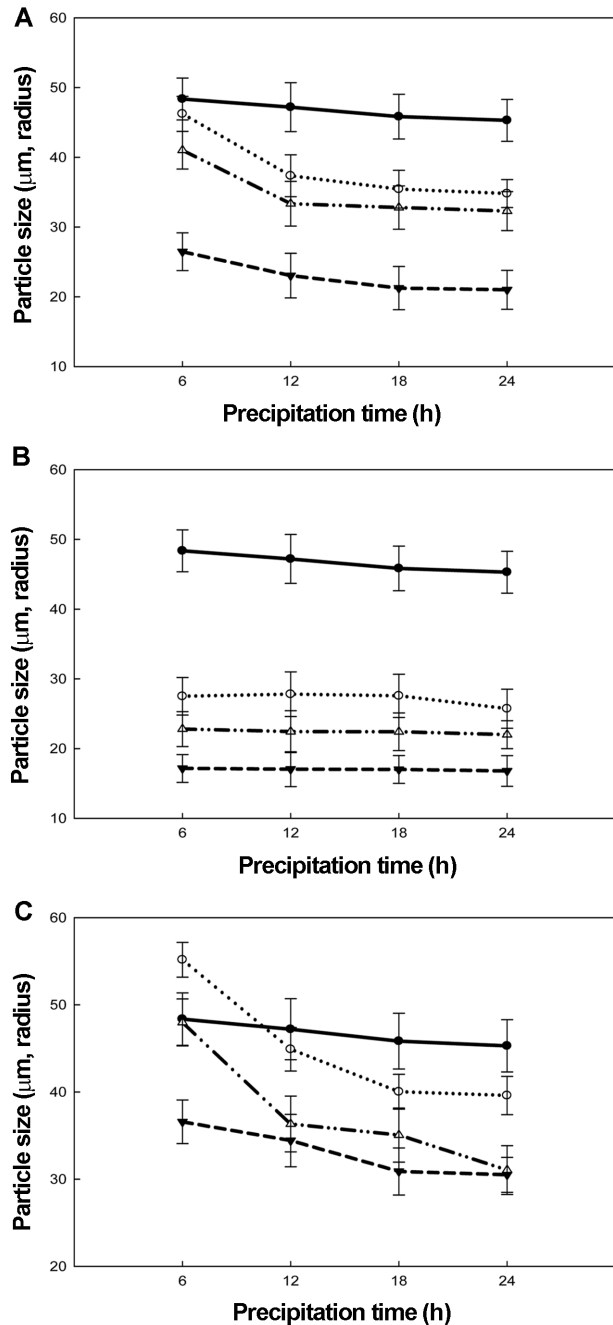


**Fig. 3. Electron micrograph of paclitaxel precipitates formed by increased surface area fractional precipitation at 6–24 h: (A) Control, (B) 0.1% (w/v) HPMC 2910, (C) 0.2% (w/v) HPMC 2910, (D) 0.3% (w/v) HPMC 2910, (E) 0.1% (w/v) PVP-K90, (F) 0.2% (w/v) PVP-K90, (G) 0.3% (w/v) PVP-K90, (H) 0.1% (w/v) PVA, (I) 0.2% (w/v) PVA, (J) 0.3% (w/v) PVA. The methanol composition in water, pure paclitaxel content, and temperature were 61.5% (v/v), 0.3% (w/v), and 4°C, respectively. Scale bar indicates 10  $\mu$ m.**

전 공정에 고분자물질을 첨가하여 분별침전을 수행하였다. 표면적이 증가된 분별침전 공정에서 고분자물질 첨가 유무에 따른 paclitaxel 침전 양상(입자 형태)을 조사하였다. 고분자물질 첨가 유무에 따른 입자 형태를 Fig. 3에 나타내었다. 고분자물질이 첨가되지 않은 경우(control, Fig. 3A), 입자 모양은 부채꼴 형태로 대칭을 이루며 길게 뻗어나가는 모양을 보였다. 고분자물질 HPMC 2910의 농도(0.1, 0.2, 0.3%, w/v)를 달리하여 첨가한 경우(Fig. 3B, C, D), 고분자물질이 첨가되지 않은 경우(Fig. 3A)보다 전반적으로 원형 형태(둥근 형태)의 입자 모양을 보였으며 입자 크기는 좀 더 작아지면서 가늘어짐을 알 수 있었다. 농도가 증가할수록 paclitaxel 침전물 입자간 좀 더 많이 뭉쳐있는 경향을 보였다. 고분자물질 PVP-K90의 농도(0.1, 0.2, 0.3%, w/v)를 달리하여 첨가한 경우(Fig. 3E, F, G), 입자 모양은 일정하고 균일한 크기의 부채꼴 형태를 나타내었으며 HPMC 2910의 경우보다 전반적으로 좀 더 뭉쳐 있으며 작은 크기를 보였다. 고분자물질 PVA의 농도(0.1, 0.2, 0.3%, w/v)를 달리하여 첨가한 경우(Fig. 3H, I, J), 입자 모양은 부채꼴 형태와 같이 가늘고 길게 형성되었으며 높은 농도(0.3%, w/v)에서는 부채꼴 형태라기 보다는 불규칙한 바늘 형태를 나타내었다.

**고분자물질이 입자 크기에 미치는 영향**

고분자물질 첨가 유무에 따른 입자 크기를 Fig. 4에 나타내었다. 고분자물질이 첨가되지 않은 경우(control), 분별침전 6, 12, 18, 24시간일 때 입자 크기는 각각 48.4, 47.2, 45.8, 45.3 μm로 침전시간이 경과함에 따라 입자 크기가 미미하게 감소하는 경향을 보였다. 선행연구에 의하면 표면적 증가물질(이온교환수지)이 첨가되지 않은 분별침전의 경우 침전시간이 경과함에 따라 paclitaxel 침전물의 입자 크기가 커지는 경향을 보였다[11]. 하지만 이온교환수지 첨가에 의해 표면적이 증가된 분별침전의 경우 침전시간이 경과함에 따라 입자 크기가 오히려 감소하였는데(Fig. 4, control), 이는 분별침전 과정에서 이온교환수지와 핵의 충돌 횟수가 증가되어 많은 핵이 생성됨에 따라 침전물 크기가 작아지는 것으로 판단된다[9]. HPMC 2910이 첨가된 경우(Fig. 4A), 분별침전 6, 12, 18, 24시간에서 입자 크기는 각각 농도 0.1% (w/v)일 때 46.3, 37.4, 35.4, 34.8 μm, 농도 0.2%(w/v)일 때 26.5, 23.0, 21.2, 21.0 μm, 농도 0.3%(w/v)일 때 41.0, 33.3, 32.8, 32.3 μm이었다. HPMC 2910 농도가 0.1%(w/v)에서 0.2%(w/v)로 증가할 경우에는 paclitaxel 입자 크기가 전반적으로 감소하였으나 0.2%(w/v)에서 0.3%(w/v)로 농도가 증가할 경우에는 paclitaxel 입자 크기가 오히려 다시 증가하였다. 즉, HPMC 2910의 경우 0.2%(w/v) 농도에서 가장 작은 paclitaxel 침전물을 얻을 수 있었다. PVP-K90이 첨가된 경우(Fig. 4B), 분별침전 6, 12, 18, 24시간에서 입자 크기는



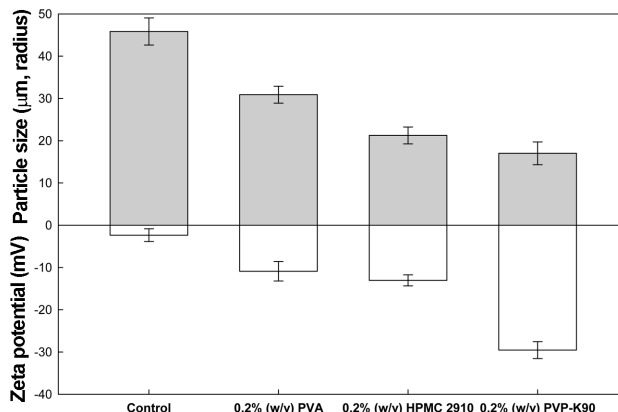
**Fig. 4. Effect of polymer concentration on the particle size of paclitaxel during increased surface area fractional precipitation: (A) HPMC 2910, (B) PVP-K90, (C) PVA.** The methanol composition in water, pure paclitaxel content, and precipitation temperature were 61.5% (v/v), 0.4% (w/v), and 4°C, respectively. ●: Control; ○: 0.1% (w/v) polymer; ▼: 0.2% (w/v) polymer; △: 0.3% (w/v) polymer.

각각 농도 0.1%(w/v)일 때 27.5, 27.8, 27.6, 25.7 μm, 농도 0.2%(w/v)일 때 17.2, 17.1, 17.0, 16.8 μm, 농도 0.3%(w/v)

일 때 22.8, 22.4, 22.4, 22.0  $\mu\text{m}$ 이었다. HPMC 2910의 경우와 마찬가지로 PVP-K90 0.2%(w/v)에서 가장 작은 입자의 침전물을 얻었다. PVA이 첨가된 경우(Fig. 4C), 분별침전 6, 12, 18, 24시간에서 입자 크기는 각각 농도 0.1%(w/v)일 때 55.2, 44.9, 40.0, 39.6  $\mu\text{m}$ , 농도 0.2%(w/v)일 때 36.6, 34.4, 30.9, 30.5  $\mu\text{m}$ , 농도 0.3%(w/v)일 때 48.0, 36.3, 35.1, 31.0  $\mu\text{m}$ 이었다. HPMC 2910와 PVP-K90의 경우와 마찬가지로 PVA 0.2%(w/v)에서 가장 작은 입자의 침전물을 얻었다. 결과적으로 표면적이 증가된 분별침전 공정에 고분자물질 첨가는 paclitaxel 입자 크기 감소에 효과가 있었으며, 그 효과는 PVP-K90, HPMC 2910, PVA 순으로 나타났다. Paclitaxel 순도( $\sim 98.0\%$ ) 및 수율( $>85\%$ )은 분별침전 동안 거의 변화가 없었으며 이러한 현상은 기존의 연구결과와도 유사함을 알 수 있었다[11]. 이상의 결과로부터 paclitaxel의 입자 크기를 획기적으로 줄이기 위하여, 표면적이 증가된 분별침전 공정에 고분자물질(HPMC 2910, PVP-K90, PVA)을 첨가하는 방식이 매우 효과적임을 알 수 있었다. 첨가된 고분자물질이 고체-액체 계면의 표면장력을 낮추고 paclitaxel 핵 생성 속도를 증가시켜(핵 성장 저해) 입자 크기가 작아짐을 알 수 있었다[4]. 더 나아가 고체-액체 계에 고분자물질 흡착은 새로 생성되는 소수성 표면의 계면장력을 감소시키고 공간적(steric) 또는 정전기적(electrostatic) 안정화를 제공하여 핵 성장을 저해하게 된다[4]. 특히 PVP-K90의 경우 가장 작은 입자의 paclitaxel을 얻을 수 있어 침전과정에서 paclitaxel 입자 성장 저해에 가장 효과적임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 PVP-K90와 paclitaxel 입자와의 높은 친화력(affinity)에 기인하는 것으로 판단된다[2]. 즉, 고분자물질과 paclitaxel 입자 간의 친화력이 증가할수록 paclitaxel 입자 성장을 저해 하는데 더 효과적인 공간적 저해요소(steric barrier) 역할을 하기 때문이다. 또한 paclitaxel 입자 크기 감소를 위한 최적의 고분자물질 농도(0.2%, w/v)가 존재하였는데, 이는 첨가된 고분자물질의 농도가 일정량 이상이 되면 용액의 높은 점도로 인한 antisolvent(nonsolvent)인 증류수를 향한 용매(메탄올)의 적절한 확산을 억제하기 때문으로 판단된다[2]. 높은 고분자물질 농도에 따른 입자 크기 증가 현상은 다른 원료의약품의 경우에도 보고되었다[2, 10, 17, 18].

#### 입자크기와 제타전위의 관계

표면적이 증가된 분별침전 공정에서 고분자물질을 첨가하지 않은 경우와 동일 농도(0.2% w/v)로 세 종류의 고분자물질(PVA, HPMC 2910, PVP-K90)을 각각 첨가한 경우 분별침전 용액에서의 제타전위를 측정하여 제타전위와 입자크기와의 상관 관계를 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 고분자물질을 첨가하지 않은 경우(control) 분별침전 용액의 제타전위 값은 -2.35 mV(입자 반지름: 45.3  $\mu\text{m}$ )이었으며, 고



**Fig. 5. Particle size of paclitaxel precipitate and zeta potential of reacting solution using polymer during increased surface area fractional precipitation with an ion exchange resin (Amberlite IRA 400 OH).** The methanol composition in water, pure paclitaxel content, precipitation temperature, and precipitation time were 61.5% (v/v), 0.3% (w/v), and 4°C, 24 h, respectively.

분자물질 PVA, HPMC 2910, PVP-K90을 각각 첨가하였을 경우 분별침전 용액의 제타전위 값은 -10.90 mV(입자 반지름: 30.5  $\mu\text{m}$ ), -13.05 mV(입자 반지름: 21.0  $\mu\text{m}$ ), -29.54 mV(입자 반지름: 16.8  $\mu\text{m}$ )로 나타났다. 분별침전 시 paclitaxel 침전물의 입자 크기와 분별침전 용액의 제타전위 값을 비교해 보면, 제타전위 절대값이 증가할수록 입자크기가 감소하였다. 즉, 침전물의 입자 크기는 제타전위 절대값에 반비례함을 알 수 있었다. 표면적이 증가된 분별침전 공정에 고분자물질을 첨가할 경우 분별침전 용액의 제타전위를 증가시켜 침전물을 더욱 안정화시키고, 이로 인해 침전물들이 분별침전 용액 속에서 서로 뭉치지 않고 안정되게 유지되어 작은 입자의 침전물이 얻어지는 것으로 판단된다[2, 20]. 이러한 결과는 기존문헌에 보고된 paclitaxel 침전물의 입자 크기와 분별침전 용액의 제타전위와의 상관관계와도 일치함을 알 수 있었다[15].

#### 요 약

본 연구에서는 표면적이 증가된 분별침전 공정에 친수성 고분자물질을 첨가하여 식물세포 유래 항암물질 paclitaxel의 입자 크기를 감소시키고자 하였다. 표면적이 증가된 분별침전 공정에 고분자물질(PVA, HPMC 2910, PVP-K90)을 첨가할 경우 침전물의 입자 크기는 획기적으로 감소하였다. 첨가된 고분자물질 중 PVP-K90가 가장 효과적이었으며, PVP-K90 농도 0.2%(w/v)로 첨가한 경우 고분자물질을 첨가하지 않은 경우보다 4-5배 정도 가장 작은 입자 크기( $<20 \mu\text{m}$  radius)의 침전물을 얻었다. 또한 분별침전을 통해 얻은 침

전물의 입자 크기는 분별침전 용액의 제타전위 절대값에 반비례함을 알 수 있었다.

## Acknowledgments

This research was supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education, Science and Technology (Grant Number: 2015016271).

## References

- Baloglu E, Kingston DG. 1999. A new semisynthesis of paclitaxel from baccatin?. *J. Nat. Prod.* **62**: 1068–1071.
- Cho EB, Cho WK, Cha KH, Park JS. 2010. Enhanced dissolution of megestrol acetate microcrystals prepared by antisolvent precipitation process using hydrophilic additive. *Int. J. Pharm.* **396**: 91–98.
- Choi HK, Son SJ, Na GH, Hong SS, Park YS, Song JY. 2002. Mass production of paclitaxel by plant cell culture. *Korean J. Plant Biotechnol.* **29**: 59–62.
- Dalvi SV, Dave RN. 2009. Controlling particle size of a poorly water-soluble drug using ultrasound and stabilizers in antisolvent precipitation. *Ind. Eng. Chem. Res.* **48**: 7581–7593.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* **50**: 151–158.
- Jeon KY, Kim JH. 2009. Improvement of fractional precipitation process for pre-purification of paclitaxel. *Process Biochem.* **44**: 736–741.
- Kawabata Y, Wada K, Nakatani M, Yamada S, Onoue S. 2011. Formulation design for poorly water-soluble drugs based on biopharmaceutics classification system: Basic approaches and practical applications. *Int. J. Pharm.* **420**: 1–10.
- Khadka P, Ro J, Kim H, Kim I, Kim TJ, Kim H, Cho JM, Yun G, Lee J. 2014. Pharmaceutical particle technologies: An approach to improve drug solubility, dissolution and bioavailability. *Asian J. Pharm. Sci.* **9**: 304–316.
- Kim SY, Kim KJ, Ryu SK. 2002. *In situ* analysis of growth mechanism in batch crystallization of phosphoric acid. *Theories and Applications of Chem. Eng.* **8**: 3445–3448.
- Labouret AD, Thioune O, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. 1995. 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.
- Lee JY, Kim JH. 2012. Decrease in the particle size of paclitaxel by increased surface area fractional precipitation. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 169–174.
- Pyo SH, Kim MS, Cho JS, Song BK, Han BH, Choi HJ. 2005. Efficient purification and morphology characterization of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**: 1162–1168.
- Pyo SH, Park HB, Song BK, Han HB, Kim JH. 2004. A large-scale purification of paclitaxel from cell cultures of *Taxus chinensis*. *Process Biochem.* **39**: 1985–1991.
- Rao KV, Hanuman JB, Alvarez C, Stoy M, Juchum J, Davies RM, et al. 1995. A new large-scale process for taxol and related taxanes from *Taxus brevifolia*. *Pharm. Res.* **12**: 1003–1010.
- Ryu JK, Kim JH. 2012. 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.
- Schiff PB, Fant J, Horwitz SB. 1979. Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. *Nature* **277**: 655–667.
- Stainmesse S, Orecchioni AM, Nakache E, Puisieux F, Fessi H. 1995. Formation and stabilization of a biodegradable polymeric colloidal suspension of nanoparticles. *Colloid Polym. Sci.* **273**: 505–511.
- Thioune O, Fessi H, Devissaguet JP, Puisieux F. 1997. Preparation of pseudolatex by nanoprecipitation: influence of the solvent nature on intrinsic viscosity and interaction constant. *Int. J. Pharm.* **146**: 233–238.
- Wani MC, Talyor, HL, Wall, ME, Coggon P, McPhail AT. 1971. Plant antitumor agent. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. *J. Am. Chem. Soc.* **93**: 2325–2327.
- Zhang HX, Wang JX, Zhang ZB, Le Y, Shen ZG, Chen JF. 2009. Micronization of atorvastatin calcium by antisolvent precipitation process. *Int. J. Pharm.* **374**: 106–113.