

## 에탄올을 조용매로 사용한 분별 결정화에 의한 Cyclodextrin의 분리정제

박성식 · 구윤모<sup>†</sup>

인하대학교 공과대학 생물공학과  
(1998년 5월 4일 접수, 1998년 9월 4일 채택)

### Fractional Crystallization of Cyclodextrin Mixtures using Ethanol as a Cosolvent

Sung-Sik Park and Yoon-Mo Koo<sup>†</sup>

Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
(Received 4 May 1998; accepted 4 September 1998)

#### 요 약

다성분계로부터 목적하는 물질을 고순도의 결정형태로 회수할 수 있는 분별결정화를 이용하여  $\alpha$ -,  $\beta$ -cyclodextrin 혼합물을 분리하는 공정을 개발하였다. 이를 위하여  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin, 용매로 이루어진 삼성분계에서의 평형농도를 측정하였다.  $\beta$ -Cyclodextrin은  $\alpha$ -cyclodextrin에 비해 상대적으로 낮은 수용액상의 용해도로 인하여 쉽게 결정화되어 분리가 가능하나  $\alpha$ -cyclodextrin의 회수가 어려우므로 조용매를 사용하여  $\alpha$ -cyclodextrin의 회수율을 높이고자 하였다. 사용된 조용매 중 에탄올이  $\alpha$ -cyclodextrin의 분별결정에 적합한 조용매로 선정되었으며 첨가량은 결정화 시간과 수율을 고려하여 용매 중의 50%로 하였다. 첨가된 에탄올은 분별증류를 거쳐 제거하여 다시  $\beta$ -cyclodextrin의 분리가 가능하도록 하였다. 이 공정에서 한 싸이클에서의 수율은  $\alpha$ -cyclodextrin은 55.2%,  $\beta$ -cyclodextrin은 63.6%였고 순도는 96% 이상이었다.

**Abstract**—Fractional crystallization of two homologues of cyclodextrin,  $\alpha$ -cyclodextrin and  $\beta$ -cyclodextrin, was tried to isolate one from the other in the mixture. A phase diagram of  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin and solvent was constructed to obtain the necessary conditions of fractional isolation of cyclodextrin mixture.  $\beta$ -Cyclodextrin was easily isolated from the mixture because of low solubility in water. Addition of cosolvent was tried for the isolation of  $\alpha$ -cyclodextrin, which has relatively lower solubility in water. Among the tested cosolvents, ethanol gave the highest yield. Yields of  $\alpha$ -cyclodextrin and  $\beta$ -cyclodextrin in the fractional crystallization were 55.2% and 63.6%, respectively, with the purities above 96%.

Key words: Fractional Crystallization, Cyclodextrin, Cosolvent, Solubility

#### 1. 서 론

결정화법을 이용한 분리는 적은 에너지를 사용하여 고순도의 제품을 생산할 수 있는 장점이 있어 오래전부터 널리 이용되어 왔으나 다성분계로부터의 분리는 비교적 최근에 연구가 이루어져 왔다. 분별 결정화는 다성분계 용액으로부터 용액의 가열/냉각과 용매의 첨가/제거 등의 조작을 이용하여 순수한 용질을 분리하는 공정이며, 다성분계에서 원하는 물질을 순도가 높고 보관이 편리한 결정형태로 회수할 수 있기 때문에 응용범위가 더욱 확대되고 있다[1, 2].

1970년에 Fitch는 처음으로 분별결정화에 대하여 가장 해석적으로 접근하여 가열이나 냉각과 같은 분리에 영향을 미치는 기본 공정과 수화물이나 화합물을 형성함으로써 다양한 상행동을 보이는 계들에 관하여 각각의 경우에 어떻게 분별결정화가 적용되는가를 보이고 이론적으로 설명하였다[3]. 그 후 Cisternas와 Rudd는 Fitch가 논의한

분리방법들에 대해 물질 수지식을 도입하였고[4] Dye는 이상과 삼상혼합물에서의 분별결정화에 관하여 보다 실제적인 공정 측면을 고려함과 동시에 분리에 소요되는 비용을 산출하였다[5].

분별결정화는 분별증류와 같이 상도에 의해 계의 상태와 평형, 공정의 수행 그리고 물질 수지를 나타낸다. 또한 한 성분만이 과포화상태를 형성하는 영역에 조성이 위치하도록 공정을 변화시키고 순도와 수율이 최대로 유지되는 조건을 구하는 것도 작성된 상도로부터 구해진다. 상도는 고액 평형농도 즉 용질의 용해도를 구함으로써 작성되며 분별결정화 공정을 적용하는 계는 고액 간의 평형이 이루어지는 양상에 따라 크게 3가지로 나누어진다.

- Type I : Anhydrous and hydrated single salts
- Type II : Anhydrous and hydrated multiple salts
- Type III : Solid solutions

Type I은 어떠한 온도범위내에서 용질이 결정화될 때 용매와 결합하여 수화물을 형성하거나, 수화물을 형성하지 않지만 용질끼리는

<sup>†</sup>E-mail : ymkoo@inha.ac.kr

화합물을 형성하지 않는 경우로 하나의 다포화점을 갖는다. Type II는 용질끼리 화합물을 형성하며 생성되는 화합물의 수에 따라 두 개 이상의 다포화점을 갖는 계이다. Type III는 solid solution을 형성하며 추출결정화(extractive crystallization)를 이용하여 분리를 수행한다[6].

삼상분계의 분별결정화에서는 일반적으로 수율을 고려하여 서로 다른 두 조건의 다포화점(multiple saturation point)을 오가면서 분리가 수행된다. 이때 서로 다른 두 지점에서의 용질의 질량비(A/B ratio)가 같으면 분별결정화에 의한 분리가 불가능하므로 일반적으로 두 값의 차이가 큰 조건에서 분별결정화가 수행된다[7].

본 논문에서는 기능성 올리고당인  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin 그리고 용매로 이루어진 계에서 고액평형농도를 구하고 조용매의 첨가와 첨가 비율에 따른 용해도의 변화를 조사하였다. 조용매를 첨가함으로써  $\alpha$ -cyclodextrin의 분리 효율을 높이하고자 하였으며 이를 위해 적절한 조용매를 선정하고, 최적의 조용매의 첨가 비율을 결정하고, 이렇게 선택된 조용매를 사용하여 공정을 설계하고 분별결정화 조건을 확립하고자 하였다.

## 2. 실험

### 2-1. 용해도 측정

실험에 사용된 용해도 측정장치는 Fig. 1에 나타내었다. 이 장치는 빠른 고액 상평형 용해도측정법(Rapid liquid-solid phase solubility measurement method)로 상도에서의 straight-line mixture rule에 의한 용해도측정법이다[8]. 용해도측정을 위한 컬럼은 10 ml 피펫을 적당한 크기로 자르고 내부의 아래쪽 끝 부분을 결정이 새어나가는 것을 막기 위해 솜으로 밀봉하였다. 그리고 미리 준비된  $\alpha$ -cyclodextrin과  $\beta$ -cyclodextrin 결정혼합액을 5 ml 부피로 컬럼에 채웠으며 액상과 고상을 분리할 목적으로 컬럼의 아래쪽 출구부분에 0.2  $\mu$ m syringe filter를 부착하였다. 관들을 연결한 뒤 온도 조절이 가능한 항온조에 넣어 평형농도에 도달하도록 하였다. 평형에 도달하였는지 확인하기 위해서 두 개의 컬럼을 설치하여 한 쪽 컬럼에는 주어진 온도에서 보다 과포화상태의 cyclodextrin용액을 채우고 다른 쪽 컬럼에는 물을 채워서 일정시간을 정제시킨 후 양쪽의 컬럼에서 시료를 얻어 농도를 측정하였을 때 양쪽 컬럼의 농도가 95%이상 접근하면 그 점을 용해도로 간주하였다(Fig. 2).

### 2-2. 분별결정화

시료는 순도 98%인  $\alpha$ -cyclodextrin과  $\beta$ -cyclodextrin(Cyclolab Co.)을 각각 18.3  $\Omega$  탈이온수에 녹여서 재결정화시켜 준비하였다.  $\alpha$ -Cy-

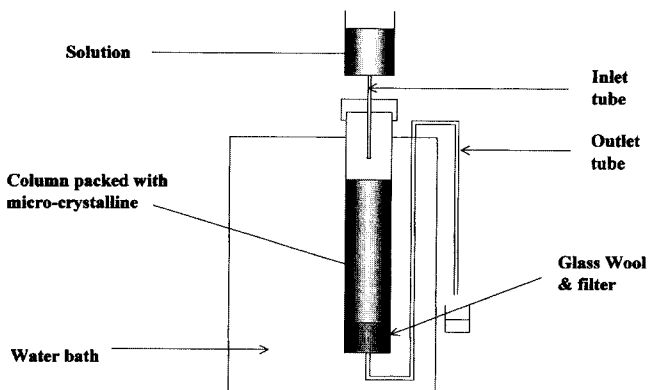


Fig. 1. Schematic of the rapid liquid-solid phase solubility determination system.

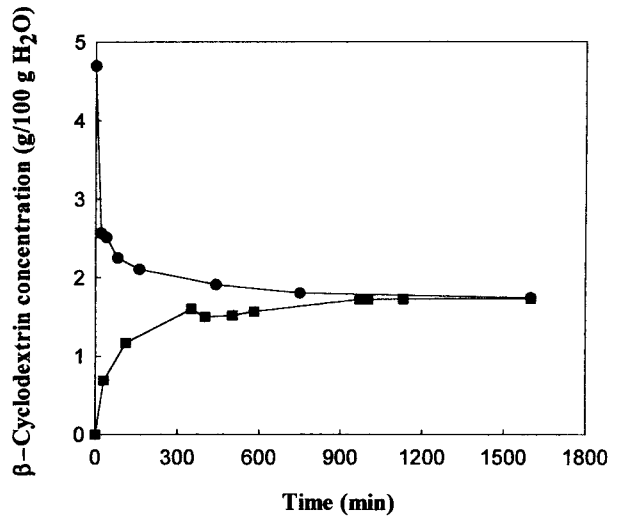
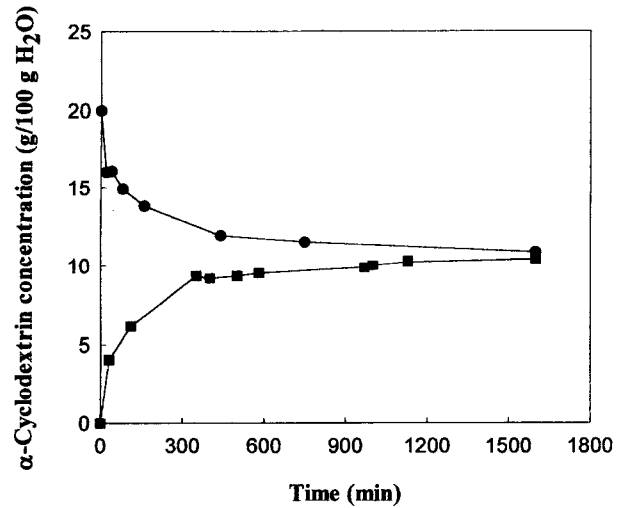


Fig. 2. Isothermal equilibration for the oversaturated(●) and undersaturated(■)  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin solutions in the solubility columns at 20  $^{\circ}$ C.

clodextrin과  $\beta$ -cyclodextrin의 혼합용액에서의  $\alpha$ -cyclodextrin과  $\beta$ -cyclodextrin의 분리에 사용된 결정화기의 부피는 30 ml이고 magnetic impeller를 사용하여 120 RPM으로 교반하였다. 온도의 변화와 유지를 위해서 오차  $\pm 0.25$   $^{\circ}$ C인 항온조(Polyscience Co., model 9110)를 사용하였다.

Ethanol을 용액으로부터 제거하기 위해서 감압(190 mm Hg)상태에서 온도를 50  $^{\circ}$ C에서 서서히 증가시켜 분별증류를 수행하였다. 분별증류를 위해 감압증류기(Eyela Co.)와 온도의 조절이 가능한 항온조를 사용하였다.

### 2-3. 분석방법

분석시료는 0.2  $\mu$ m syringe filter로 여과한 뒤 HPLC(Orom Co.)를 이용하여 RI detector(Waters Co., Water 410)로 검출하였다. Carbohydrate column(Waters Co., 4.6 $\times$ 250 mm)을 사용하였고 컬럼 온도는 35  $^{\circ}$ C, detector 온도는 40  $^{\circ}$ C로 설정하였다. 이동상은 acetonitrile: water (70:30 v/v)을 혼합하여 헬륨으로 degassing한 뒤 유속 1.5 ml/min로 용리하였다.

Ethanol분석은 GC(Chrompack Co., Cp9001)를 사용하여 FID detector로 검출하였다. CP-WAX- 58-CB capillary column을 사용하였으

**Table 1. Solubilities of  $\alpha$ -cyclodextrin and  $\beta$ -cyclodextrin at multiple saturation points(g/100 g)**

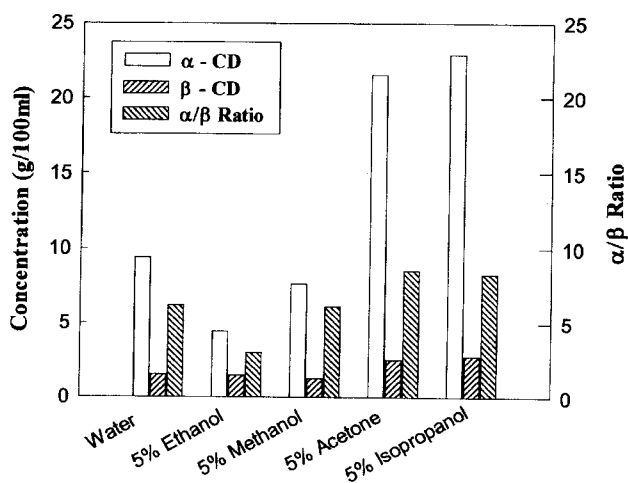
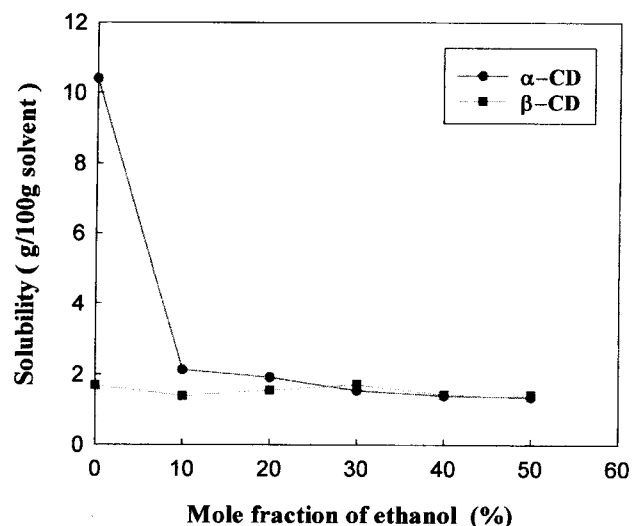
Temperature(°C)	$\alpha$ -Cyclodextrin	$\beta$ -Cyclodextrin	$\alpha/\beta$ Ratio
5	8.33	1.06	7.86
15	9.03	1.33	6.79
20	10.42	1.70	6.13
25	11.29	1.89	5.97
35	17.30	2.90	5.96
45	28.56	4.88	5.85

며, detector 온도 275 °C, injector 온도 250 °C, 오븐 초기 온도 60 °C, 오븐 최종 온도 100 °C, 오븐온도 상승 속도 10 °C/min으로 하였다. 기준물질로는 1-propanol을 사용하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3-1. Cyclodextrin의 용해도와 조용매의 영향

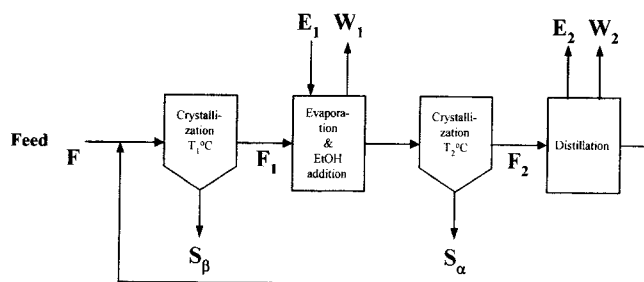
Table 1에 5-45 °C 범위에서 측정된 용해도를 나타내었다. 이 온도 범위내에서  $\alpha$ -cyclodextrin이  $\beta$ -cyclodextrin에 비해 다량 용해되었으나 두 용질의 질량비( $\alpha/\beta$  ratio)는 거의 일정하였다. 이 결과로부터 용해도가 상대적으로 낮은  $\beta$ -cyclodextrin은 수용액에서의 분리가 가능하나, 다시  $\alpha$ -cyclodextrin을 결정화시키는 것은 불가능한 것으로 사료된다. 그 이유는 두 용질의 질량비가 같은 두 용해도점에서는 다른 온도를 왕복하는 방법(temperature swing method)을 적용하여 두 용질을 각각으로 분리할 수 없으며 그 차이가 적을 경우에는 수율이 떨어지기 때문이다.  $\alpha$ -Cyclodextrin을 분리하기 위하여 용해도의 특성을 변화시킬 적절한 조용매의 첨가를 고려하였다. 조용매로 물과 잘 혼합되고 제거가 쉽도록 물보다 비점이 낮으며 cyclodextrin과 반응성이 없는 용매를 첨가하여  $\alpha$ -cyclodextrin과  $\beta$ -cyclodextrin의 다포화점에 미치는 영향을 보았다(Fig. 3). Ethanol, methanol, acetone, isopropyl-alcohol을 물에 5%(v/v) 첨가하고 용해도를 관찰하였다. Ethanol과 methanol의 경우 수용액에서보다  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin의 용해도와 질량비가 감소하였으며, acetone과 isopropyl-alcohol은 용해도와 질량비를 모두 증가시키는 효과를 나타냈다. Ethanol은 수용액에서와 비교할 때 가장 큰 질량비 차이를 나타내었고 인체에도 해가 없으므로 가장 적합한 조용매로 결정되었다. 25 °C에서 ethanol의 비율을 10, 20, 30, 40, 50%(w/w)로 증가시켜 다포화

**Fig. 3. Effect of cosolvents on the  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin solubilities at multiple saturation points at 15 °C.****Fig. 4. Solubility behavior of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin in aqueous solutions of ethanol at multiple saturation points at 25 °C.**

점에서의 용해도 변화를 관찰하였다(Fig. 4). Ethanol 양의 증가에 따라  $\alpha$ -cyclodextrin의 용액상 농도는 감소하였으며,  $\beta$ -cyclodextrin은 용해도에 큰 변화는 없지만 10-30%까지는 조금 증가하다 다시 감소하는 모습을 보였다. Ethanol 30% 첨가시의 질량비가 순수한 물이 용매인 경우에서와 가장 큰 차이를 나타내었으나 결정화 진행시간이 느리므로 ethanol 50%를 첨가량으로 결정하였다.

#### 3-2. 조용매를 이용한 cyclodextrin의 분별결정화

$\beta$ -Cyclodextrin은 물에서 쉽게 결정화되며  $\alpha$ -cyclodextrin은 ethanol 50% 용액에서 상대적으로 낮은 용해도를 나타낸다. 그러므로 이 두 가지 조건을 만족하는 조용매의 첨가와 제거 과정을 포함하는 분별 결정화 공정을 설계하고 공정에서의 물질수지식을 나타내었다(Fig. 5). Fig. 6은 분별결정화 실험의 결과를 Suhr projection으로 나타내어 물질수지와 공정의 변화를 표현한 것이다. Y축의 오른쪽은 물에서의  $\alpha$ -cyclodextrin,  $\beta$ -cyclodextrin의 질량분율을 나타내며 왼쪽은 ethanol의 변화를 표시한다. 먼저  $\beta$ -cyclodextrin이 45 °C에서 15 °C로 냉각되어 24시간 동안 91%까지 결정화되었고 0.2  $\mu$ m 여과지로 걸러서 분리하였다(1  $\rightarrow$  2). 모액은 물을 증류시켜 일정량을 제거하고 95% ethanol을 첨가하여 50% ethanol 용액으로 만들었다(2  $\rightarrow$  3). 이때 ethanol의 첨가로 인하여 국부적으로 ethanol농도가 높아져 자발적 핵형성이 발생하는 것을 방지하기 위해서 55 °C로 온도를 올린 후 첨가하였다.  $\alpha$ -Cyclodextrin은 25 °C에서 용해도의 65%까지 결정화를 진행시켰다(3  $\rightarrow$  4). Ethanol 용매(50%)에서 수거된  $\alpha$ -cyclodextrin 결정은 물에서와 결정의 구조가 달라졌음을 관찰하였다(Fig. 7). 수용액에서 결정화된  $\alpha$ -cyclodextrin은 바늘모양이었으나 50% ethanol

**Fig. 5. Design for the separation of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin.**

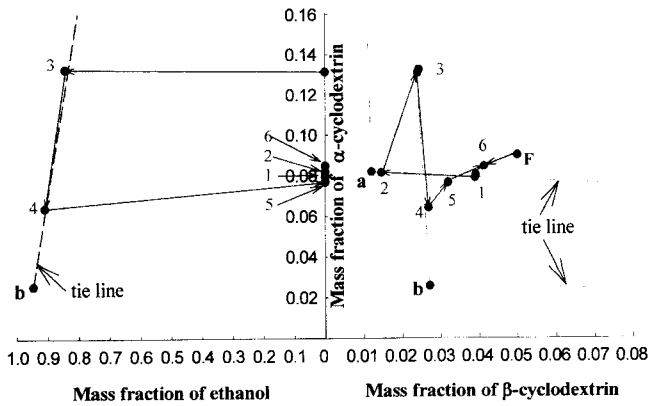
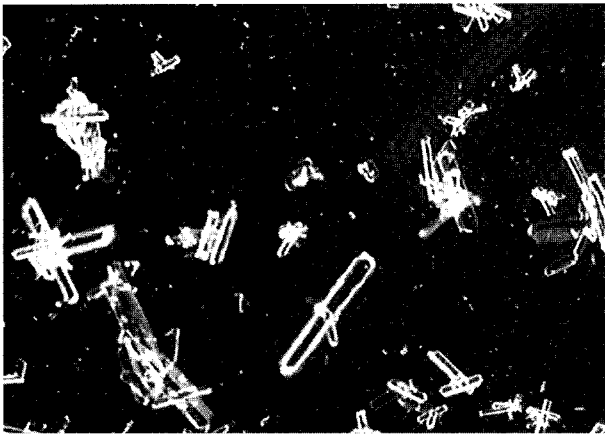
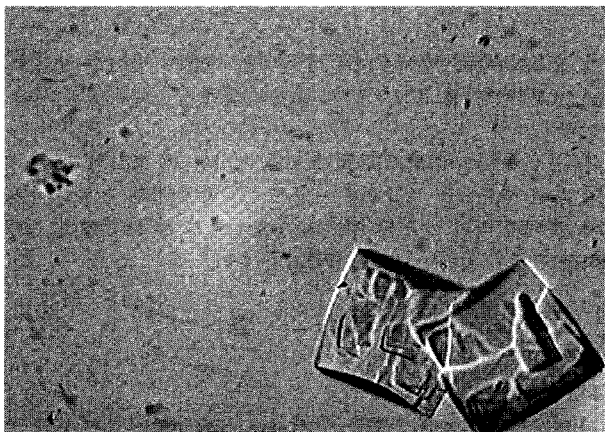


Fig. 6. Fractional crystallization of  $\alpha$ - and  $\beta$ -cyclodextrin with ethanol swings.

- 1→2: Cooling from 45 °C to 15 °C,  $\beta$ -cyclodextrin crystallization.
- 2→3: Increase of solvent content (Water removal at 45 °C in vacuum, ethanol addition).
- 3→4: Cooling from 45 °C to 25 °C,  $\alpha$ -cyclodextrin crystallization.
- 4→5: Ethanol removal by vacuum distillation at 50 °C.
- 5→6: Feed addition to mixture.
- 6→1: Dilution.
- a: Multiple saturation point (Water at 15 °C).
- b: Multiple saturation point (50 % ethanol at 25 °C).



(a)



(b)

Fig. 7.  $\alpha$ -Cyclodextrin crystal habit.

- (a) Acicular hexagonal form (from water), (b) Plate form (from 50 % ethanol).

용액에서는 판상형으로 변형되었다. 다시  $\beta$ -cyclodextrin를 분리하기 위한 용매 조성으로 바꾸기 위해 ethanol을 190 mm Hg, 50 °C에서 온도를 상승시키며 분별증류로 제거하였다(4→5). Ethanol은 85 % ethanol 용액으로 제거되었고 cyclodextrin-용액 중에 ethanol의 잔량은 1 % 미만이었다. 잔량의 ethanol은 다음  $\beta$ -cyclodextrin 결정화 수율에 영향을 미치지 않았다. 분별결정화공정에서  $\alpha$ -cyclodextrin과  $\beta$ -cyclodextrin의 수율은 각각 55.2 %와 63.6 %였고 분리된 cyclodextrin의 순도는 96-97 %였다. 상도 상의 용해도 곡선에 대한 운전최적화에 의하여 각 homologues의 회수율을 올릴 수 있을 것으로 보며, 이와 별도로 상기 분별결정화공정을 순환적으로 운전함으로써 전체적인 회수율이 증가될 것이다. 본 실험에서 대상물질로 사용한  $\alpha$ -,  $\beta$ -cyclodextrin 외에  $\gamma$ -cyclodextrin을 포함하는 혼합계에 대한 분별결정화 연구는 실제 효소(CGTase)반응에 의해 생성되는 혼합물의 분리, 회수의 측면에서 수행되어야 할 것이다.

#### 4. 결 론

기능성 올리고당인 cyclodextrin의  $\alpha$ -,  $\beta$ -homologues를 분별결정화 기술에 의해 분리하였고, 실험을 통해 다음과 같은 결론을 얻었다.

- (1) 결정화 수율을 증가시키기 위하여 조용매를 사용하였으며, 검토된 조용매 중 ethanol이 가장 적합하였으며, 최적 첨가량은 50 % 이었다.
- (2)  $\beta$ -Cyclodextrin은 15 °C에서 물로부터 결정화되어 분리되었고,  $\alpha$ -cyclodextrin은 50 % ethanol 용액으로부터 25 °C에서 결정화되었다.
- (3) Ethanol 50 %까지의 첨가는  $\alpha$ -cyclodextrin의 수용액상의 용해도를 감소시키나  $\beta$ -cyclodextrin의 용해도에는 큰 영향을 미치지 않았다. Ethanol은  $\alpha$ -cyclodextrin에 대한 선택적 침전제로 작용하였다.
- (4) 분별결정화 공정에서 한 사이클에서의  $\alpha$ -cyclodextrin과  $\beta$ -cyclodextrin의 수율은 각각 55.2 %와 63.6 %를 나타냈으며 순도는 96 % 이상을 나타내었다.

#### 감 사

본 연구는 생물공정연구센터 지원연구비와 인하대학교 교내 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Mullin, J. W.: "Crystallization", 3rd ed., Butterworth-Heinemann, New York(1993).
2. Ducruix, A. and Giege R.: "Crystallization of Nucleic Acids and Proteins", Oxford University Press, London(1992).
3. Fitch, B.: *Ind. Eng. Chem.*, **62**(12), 6(1970).
4. Cisternas, L. A. and Rudd, D. F.: *Ind. Eng. Chem. Res.*, **32**, 1993 (1993).
5. Dye, S. R. and Ng, K. M.: *AIChE Journal*, **41**(11), 2427(1995).
6. Weingaertner, D. A. and Lynn, S.: *Ind. Eng. Chem. Res.*, **30**, 490 (1991).
7. Wankat, P. C.: "Rate-Controlled Separations", Elsevier Applied Science, New York(1990).
8. Pusey, M. L. and Gernert, K.: *Journal of Crystal Growth*, **88**, 419 (1988).
9. Campbell, B. N. and Ali, M. M.: "Organic Chemistry Experiments", Brooks/Cole Publishing Company, New York(1994).