

## Cyclodextrin의 Inclusion Complex 형성능과 Fatty Acid와의 Complex 형성조건과 특성

†이 용 현 · 정 승 환 · 박 동 찬  
경북대학교 자연과학대학 유전공학과

## Comparison of Inclusion Complex Formation Capacity of Cyclodextrins with Various Molecules and Characterization of Cyclodextrin-fatty Acid Complex

Yong-Hyun Lee<sup>†</sup>, Seung-Hwan Jeong and Dong-Chan Park

Department of Genetic Engineering, College of Natural Sciences  
Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

### ABSTRACT

The capacity of inclusion complex formation between  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - cyclodextrins(CDs) and various compounds, such as pH indicators, biostains, glycoside, amino acid, and fatty acids, was compared. Fatty acid was identified as the most suitable ligand for fractionation of CDs in terms of capacity and selectivity. The effects of complex formation conditions, such as, mixing ratio of CD and fatty acid, pH, ionic strength, and temperature, on the capacity of fatty acid-CD complex was also investigated. The carbon number of fatty acids was identified as the most significant factor determining the capacity and selectivity of inclusion complex formation of CDs. Capric acid( $C_{10}$ ) and palmitic acid( $C_{16}$ ) showed high specificity for  $\alpha$ - and  $\beta$ -CDs, respectively. Under the optimal conditions, the molar ratio of complex formed was found to be 1.0:2.6 for  $\alpha$ -CD/capric acid and 1.0:1.9 for  $\beta$ -CD/palmitic acid. X-ray diffraction and infrared spectrum of the formed inclusion complex were analyzed. The changes of enthalpy( $\Delta H$ ) of the inclusion complex formation reaction was evaluated by differential scanning calorimetry, showed that the reaction was endothermic.

### 서 론

Cyclodextrin(CD)은 glucopyranose 분자가  $\alpha$ (1-4) 결합에 의하여 환상으로 연결된 비환원성 oligosaccharide로서, glucopyranose의 분자 6개가 연결된  $\alpha$ , 7개인  $\beta$ , 그리고 8개인  $\gamma$ -CD 세종류가

있다(1). 공동구조를 이루고 있는 CD는 각 glucopyranose의 외부로 노출되어 있는  $C_6$  위치의 hydroxyl group이 친수성을 나타내는 반면 내부는 수소결합과 ether결합으로 인하여 소수성을 나타내게 된다. 따라서 내부의 공동 구조에 많은 유기 또는 무기화합물들을 끌어들이어 inclusion complex를 형성할 수 있다(2-5).

이와 같은 CD의 inclusion complex 형성능은 식

† Corresponding Author

품, 의약품, 화장품 및 농약 등 많은 분야에서 안정성 개선, 반응성 변화, 물성개량 등을 목적으로 이용되고 있으며, 순수화합물 분리를 위하여 크로마토그래피의 이동상 또는 고정상으로도 이용되고 있다(6-10).

CD가 inclusion complex를 형성하는데 영향을 미치는 가장 큰 요인은 guest 분자의 입체구조적 특성으로, CD의 공동 크기에 적합한 분자구조의 화합물이 특이적으로 포접되게 된다. 또한 guest 분자의 극성, 전하, 온도, 그리고 이온강도와 같은 외부환경 조건도 중요한 요인으로 작용하고 있다. Inclusion complex형성의 결합력은 현재까지 잘 규명되어 있지 않지만 소수성 효과, van der Waals 결합, 수소 결합, CD 공동 내의 고에너지 분자의 방출에 의한 에너지 감소, 그리고 ligand의 결합에 의한 CD의 환상구조에 존재하는 strain energy의 방출 등으로 유추되고 있다(11).

최근 CD를 affinity chromatography를 이용하여 분리하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있는데, 이는 matrix에 한 종류의 CD만을 특이하게 포접하는 ligand분자를 결합시킨 specific adsorbent를 이용하여 CD 혼합물에서  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -CD를 고순도로 분리하는 것이다(12-16).

그러나 개발되어 사용되고 있는 방법은 대부분 독성이 있는 ligand 분자를 사용하고 있고 또한 adsorbent를 제조하는 과정도 복잡하다. 따라서 보다 효율적인 affinity chromatography 분리제법을 개발하기 위해서는 ligand로 적합한 특성을 갖는 새로운 구조의 화합물을 탐색할 필요가 있으며 또한 CD와 각종 화합물간의 포접 특성을 규명할 필요가 있다.

본 연구에서는 CD와 각종 화합물간의 inclusion complex 형성능을 비교 검토하여 각종 CD의 분리에 적합한 ligand를 선별하였다. 그리고 CD와 선별된 ligand간의 포접화합물 형성의 stoichiometry를 검토함으로써 inclusion complex 형성에 적합한 CD와 fatty acid 농도비를 검색하였고, 또한 온도, pH, ion strength 등 외부환경의 영향을 검토하였다. CD/fatty acid의 구조적 특성을 X-ray diffraction과 IR spectrum을 이용하여 규명하였다. 또한 inclusion complex가 형성에 관련되는 열역학적 특성을 differential scanning calorimetry를 이용하여 규명하였다. 이 연구는 CD의 inclusion complex 형성에 관한 이론 정립과 각종 CD의 고순도 분리제법 개발을 위한 기초자료로 활용될 것이다.

## 재료 및 방법

### Cyclodextrin

분리정제된 고순도의  $\alpha$ -,  $\beta$ -, 그리고  $\gamma$ -Cyclodextrin(Cyclolab)을 host molecule로 사용하였다.

### Guest Molecules

Guest molecule(ligand)로는 pH indicator, biostain, 아미노산류, 천연배당체류, 그리고 지방산류를 사용하였다. pH indicator로는 crystal violet (Junsei Chemical Co.), fuchsin basic(Samchun Pure Chemical.), neutral red(Janssen Chimica.), 그리고 orange IV(Sigma Co.)를 사용하였다. Biostain류로는 coomasie brilliant blue R250, crocetin, 그리고 resazurin(Sigma Co.)를, 아미노산류로는 histidine, methionine, phenylalanine, tryptophan, tyrosine(Sigma Co.)를, 그리고 천연배당체류로는 glycyrrhizin acid와 stevioside,(Sigma Co.)를 사용하였다. 사용된 지방산류는 caproic acid, caprylic acid, lauric acid, myristic acid, palmitic acid(Junsei Chemical Co.), capric acid, stearic acid(Yakuri Pure Chemical Co.), oleic acid (Shinyo Pure Chemical Co.), 그리고 linoleic acid (Sigma Co.)였다.

### Inclusion Complex 형성조건과 Complex의 분리

Cyclodextrin inclusion complex는 50mM CD와 50mM의 각종 화합물 용액을 혼합하여 상온에서 10분간 교반하여 형성시켰다. 경우에 따라 CD와 화합물의 농도를 변화시켰으며, 또한 온도를 4~60°C로 변화시켜 60분까지 반응시켰다. 형성된 inclusion complex는 형성 반응후 4°C에서 6시간 방치한 후 10,000rpm에서 20분간 원심분리하고 얻어진 침전물을 50% ethanol로 처리하여 비포접 잔존물을 제거하고 진공 건조시켜 분석용 시료로 사용하였다.

### Cyclodextrin의 분석

Cyclodextrin은 HPLC(Model-305, Gilson Co.)와 spectrophotometric법을 이용하여 분석하였다. HPLC 분석조건은 Cosmosil 5NH<sub>2</sub> column(Nacalai Co.), acetonitrile/water(65:35), 1ml/min, 그리고 RI detector로 분석하였으며,  $\alpha$ -CD는 methyl orange법(17),  $\beta$ -CD는 phenolphthalein 정색법(18)

을, 그리고  $\gamma$ -CD는 bromocresol green 비색법 (17)을 이용하였다.

pH Indicators, Biostains, 아미노산, 천연배당체, 그리고 Fatty Acid의 분석

pH indicator 및 biostain류는 UV/Vis spectrophotometer(Beckman DU 60, Beckman)를 이용하여 200nm에서 700nm까지 scanning한 후 최대 흡광도의 변화를 측정하여 정량하였다. 아미노산류는 200nm에서 300nm의 흡광도 변화, 정색반응법(19), 그리고 적정법(19)으로 정량하였다. 천연배당체는 HPLC를 이용하여 분석하였다. Fatty acid는 alcoholic alkali법(20, 21)으로 정량하였다. 즉 각종 fatty acid 용액 1ml에 50% ethanol 9ml를 첨가하고 phenolphthalein 용액 0.4ml를 가하여 상온에서 수분간 반응시킨 후 10mM의 NaOH로 적정하여 표준 곡선과 비교하여 농도를 결정하였다.

X-ray Diffraction을 이용한 Inclusion Complex 결정구조 분석

X-ray diffraction(XRD)은 X-ray diffractometer(Philips X'Pert, Philips)를 사용하여 측정하였으며, 분석조건은 target; Cu $\alpha$ , scanning speed; 0.01°/min, filter; Cu/Ni, voltage; 30Kv, current; 20mA, 그리고 time constant; 1sec, 2 $\theta$ ; 4~34°였다.

Infrared Spectrum을 이용한 Inclusion Complex의 원자단 분석

Infrared(IR) spectrum은 KBr pellet을 만들고 IR spectrophotometer(Mattson Galaxy Series FTIR 7000, Galaxy)를 이용하여 4,000~400cm<sup>-1</sup>에서 분석하였다.

Differential Scanning Calorimeter를 이용한 열역학적 상수 평가

시료 5~10mg을 hermetic aluminum pan에 밀폐시키고 differential scanning calorimeter(DSC)(Seiko 220C, Seiko)의 상승온도를 10°C/min속도로 상온에서부터 230°C까지 scanning하여 얻어진 DSC curve의 endothermic peak의 면적으로부터 enthalpy를 계산하였다.

## 결과 및 고찰

Cyclodextrin의 각종 지시약류 및 Biostain, 아미노산, 그리고 천연배당체와의 Inclusion Complex 형성능 비교

$\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD의 inclusion complex 형성능을 비교하기 위해 각종 지시약류 및 biostain류, 치환기 중 alkyl기 및 phenyl기를 갖는 아미노산, 그리고 각종 천연배당체와 혼합하여 포접되지 않은 미반응 화합물의 농도를 측정하여 각종 CD에 대한 포접능을 비교한 결과는 Table 1과 같다.

### 지시약류 및 Biostains

지시약류와 biostains의 경우  $\alpha$ -CD에 대해서는 orange IV가,  $\beta$ -CD에는 coomassie brilliant blue R250와 neutral red가, 그리고  $\gamma$ -CD에는 crystal violet, fuchsin basic, 그리고 resazurin이 높은 inclusion complex 형성능을 보였다.

일반적으로  $\alpha$ -CD는 alkyl기,  $\beta$ -CD는 phenyl기, 그리고  $\gamma$ -CD는 naphthyl기 및 anthracene기와 용이하게 inclusion complex를 형성한다고 알려져 있다(2, 10). Table 1의 결과로 보아  $\alpha$ -CD는 or-

Table 1. Comparison of inclusion complex formation of cyclodextrins with pH indicators, biostains, amino acids, and glycosides.

Ligands	Conc. of ligand(mM)	Capacity*(%)		
		$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Coomassie brilliant blue R250	0.05	6.26	11.16	0.44
Crocein	0.10	2.38	2.46	2.46
Crystal violet	0.10	14.72	14.68	70.46
Fuchsin basic	0.10	4.24	3.28	12.34
Neutral red	0.10	4.12	34.80	27.72
Orange IV	0.10	15.00	2.72	4.10
Resazurin	0.20	2.50	25.08	34.90
Histidine	10.00	0.00	0.00	0.00
Methionine	10.00	0.00	0.00	0.00
Phenylalanine	10.00	12.12	9.09	9.09
Tryptophan	10.00	0.00	0.00	0.00
Tyrosine	2.50	4.90	4.90	4.90
Stevioside	10.00	45.40	44.90	49.20
Glycyrrhizic acid	2.50	21.60	21.60	14.40

\* Capacity: Mole percent of ligands that form inclusion complex equal mole concentration of ligand and CDs, at 25°C and 10min.

ange IV의 끝부분의 NaO<sub>2</sub>S기와 결합되며,  $\beta$ -CD의 경우는 coomassie brilliant blue R250과 neutral red의 phenyl기와 결합된다. 그리고  $\gamma$ -CD는 구조적 특성으로 보아 anthracene기와 유사한 구조인 resazurin 그리고 naphthyl기와 유사한 구조를 포함한 crystal violet, fuchsin basic과 쉽게 결합될 수 있을 것으로 유추된다.

#### 아미노산

대부분의 아미노산은 cyclodextrin과 inclusion complex를 형성하지 않았다. 이는 아미노산 중의 alkyl기와 phenyl기는 CD와 포접할 수 있는 구조를 갖고 있으나 아미노산의 다른 기에 의하여 공간적으로 저해를 받아 inclusion complex를 형성할 수 없는 것으로 생각된다. 단지 phenyl 그룹만을 가지고 있는 phenylalanine과 tyrosine만이 inclusion complex를 형성하였으며, 형성능은 pH indicator 및 biostain류 보다 다소 낮았다.

#### 천연배당체

배당체로서 steviol 구조를 갖고 있는 stevioside와 steroid ring과 유사한 구조를 갖는 glycyrrhizic acid 사용하였다. 전반적으로 천연배당체는 다른 화합물보다 높은 형성능을 보였다. 그중 stevioside는 높은 형성능을 보였으며 CD에 대한 선택성이 없는 반면, glycyrrhizic acid는 형성능은 낮았으나  $\alpha$ -,  $\beta$ -CD에 대해 선택성을 보였는데, 이는 glycyrrhizic acid의 말단부분인 steroid ring구조가  $\alpha$ -CD,  $\beta$ -CD와 결합되기 때문으로 판단된다.

위의 결과를 종합하여 볼 때 inclusion complex 형성능 및 선택성은 각 CD의 공동크기뿐만 아니라 포접되는 화합물의 각종 작용기 및 작용기가 존재하는 공간적 구조와 밀접한 관계가 있음을 알 수 있었다.

#### 각종 지방산을 Guest Molecule로 한 Inclusion Complex 형성능

$\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CD를 각종 포화, 불포화 지방산을 guest molecule로 사용하여 inclusion complex의 형성능을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

형성능은 포화 지방산의 탄소쇄의 길이와 밀접한 상관관계가 있었으며, 탄소의 수가 10개까지는  $\alpha$ -CD와, 10~18개까지는  $\beta$ -CD와 높은 형성능을 보여 탄소수의 증대에 따라  $\beta$ -CD와의 선택성이 증가하였다. 포화 지방산 중 capric acid는  $\alpha$ -CD와 palmitic acid는  $\beta$ -CD에 대하여 높은 포접능과 선택성

을 보였다. 또한 탄소쇄에 이중결합이 있는 불포화 지방산인 oleic acid와 linoleic acid는 높은 형성능을 보였으나 각 CD에 대한 선택성은 없었다. 지방산은 일반적으로  $\gamma$ -CD와 형성능은 높았으나 선택성은 없었다.

위에서와 같이 지방산류는 다른 화합물에 비교하여 inclusion complex 형성능이 우수하였고, 특히 탄소쇄의 수를 달리함으로써 높은  $\alpha$ -와  $\beta$ -CD를 선택적으로 분리할 수 있어 CD분획용 adsorbent 제조를 위한 ligand로서 fatty acid가 유용하게 활용될 수 있음을 예시하고 있다. 따라서 CD와 지방산류의 inclusion complex 형성에 미치는 반응조건의 영향을 검토할 필요가 있으며, 지방산류 중  $\alpha$ -CD와 포접능 및 선택성이 높은 capric acid와  $\beta$ -CD의 경우는 palmitic acid를 ligand로 사용하여 형성조건을 검토하였다.

#### $\alpha$ -CD와 Capric Acid간의 Inclusion Complex 형성조건 검토

$\alpha$ -CD와 capric acid의 적정 혼합농도: 적정 혼합농도를 결정하기 위하여  $\alpha$ -CD의 농도를 10, 20, 50, 그리고 100mM로 각각 고정하고 capric acid를 10mM에서 200mM까지 변화시키면서 inclusion complex를 형성하는  $\alpha$ -CD의 비율 즉 형성률을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

$\alpha$ -CD의 농도와 지방산의 농도가 증가할수록 형성률이 증가하였으나  $\alpha$ -CD의 농도가 50mM 그리고 capric acid의 농도가 50mM 이상일 때에는 더 이상 증가하지 않고 유사한 수준을 유지하였다. 이는

Table 2. Comparison of inclusion complex formation of cyclodextrins with fatty acids.

Ligands	Capacity*(%)		
	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\gamma$ -CD
Caproic acid	50.00	48.34	46.66
Caprylic acid	53.34	50.84	50.00
Capric acid	86.66	67.50	66.66
Lauric acid	59.16	56.66	53.34
Myristic acid	66.50	70.00	67.50
Palmitic acid	67.50	85.84	69.16
Stearic acid	72.50	81.66	75.84
Oleic acid	75.84	80.00	74.16
Linoleic acid	75.00	78.34	71.66

\* Capacity: Mole percent of ligands that form inclusion complex 50mM fatty acid, 50mM  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -CDs, at pH 6.0, 25°C and 10min.

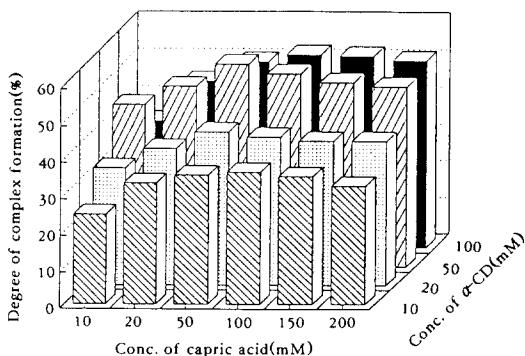


Fig. 1. Effect of molar mixing ratio of  $\alpha$ -CD and capric acid on the capacity of the inclusion complex formation. Mixed  $\alpha$ -CD and capric acid was incubated at 25°C and pH 6.0.

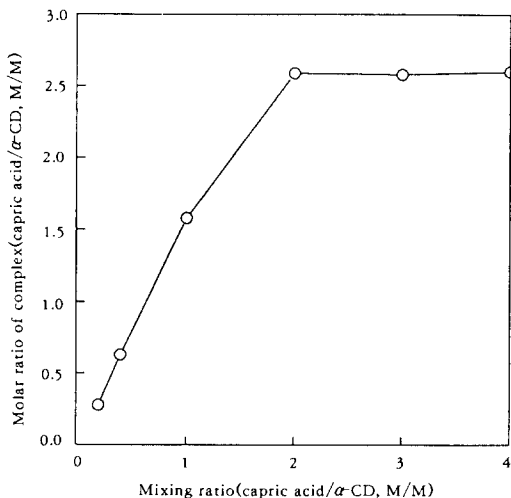


Fig. 2. Correlationship between the molar ratios of  $\alpha$ -CD and capric acid before complex formation and those of  $\alpha$ -CD and capric acid complex formed.

capric acid를 고농도로 첨가하여도 한 분자의  $\alpha$ -CD가 포접할 수 있는 capric acid의 양이 한정되기 때문이다.  $\alpha$ -CD와 capric acid간의 inclusion complex 형성에 적합한 혼합농도는  $\alpha$ -CD 50mM 그리고 capric acid 50mM로 판단되었다.

또한 형성된 inclusion complex의 몰 조성비를 규명하고자  $\alpha$ -CD를 50mM로 고정하고 capric acid

의 농도를 10~200mM로 변화시키면서 complex 형성에 소요된  $\alpha$ -CD 및 capric acid 농도를 측정하여 몰 조성비로 환산한 결과는 Fig. 2와 같다.  $\alpha$ -CD 와

capric acid간의 몰 조성비( $\alpha$ -CD : capric acid, M/M)는 1.00:0.28에서 1.00:2.60까지 변화되었다.  $\alpha$ -CD의 농도가 낮고 capric acid의 농도가 높을 때에는 한 분자의  $\alpha$ -CD에 최대 2.60 분자의 capric acid가 결합됨을 알 수 있었다. 이는 한 분자의  $\alpha$ -CD에 여러 분자의 capric acid가 결합 가능성이 있음을 제시한 Schlenk(3) 등의 결과와 유사한 것이다. 반면  $\alpha$ -CD의 농도가 높고 capric acid의 농도가 낮을 경우에는 complex의 molar ratio가 0.28였으며, 여러 분자의  $\alpha$ -CD가 한분자의 capric acid 탄소쇄에 결합된 것으로 생각된다.

반응조건의 영향

반응 조건이 CD와 fatty acid간의 inclusion complex의 형성에 미치는 영향은 많이 연구되지 않았다. 여기서는  $\alpha$ -CD를 50mM 그리고 capric acid를 50mM로 고정하고 반응조건들, pH, 온도, 그리고 ionic strength가 inclusion complex 형성물에 미치는 영향을 검토하여 그 결과를 Fig. 3에 나타냈다.

pH는 전반적으로 큰 영향을 미치지 않았으나 증가할수록 약간 증가하는 경향을 보였다. 이는 pH가 높아짐에 따라 capric acid의 ionic charge 변화 때문으로 추측된다.  $\alpha$ -CD와 p-(3-methylsalicylazo) benzenesulfonate간의 complex 형성반응에 미치는 pH의 영향을 검토한 Sasaki 등(22)도 유사한 관찰을 한 바 있다.

온도는 형성물에 매우 중요한 인자로 작용하였으며, 4°C에서 44.80%, 25°C에서 55.00%로 온도가 증가함에 따라 증가하였다. 그러나 30°C 이상에서는 오히려 감소하여 53.34%, 40°C에서 40.54%였고, 그 이상 60°C까지는 큰 변화가 없었다. 25°C까지 형성물이 증가하는 것은 물분자의 활동도가 증가하기 때문이며, 30°C 이상에서 감소하는 것은 활동도가 높아짐으로써 complex 형성의 주요 결합 요인인 hydrophobic interaction이 저해받기 때문으로 유추된다.

또한 ionic strength( $\Gamma/2$ )를 0.0부터 5.0까지 변화시킨 결과 ionic strength는 형성물에 큰 영향을 미치지 않았으나 증가함에 따라 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 ionic strength를 제공하는 Na<sup>+</sup>

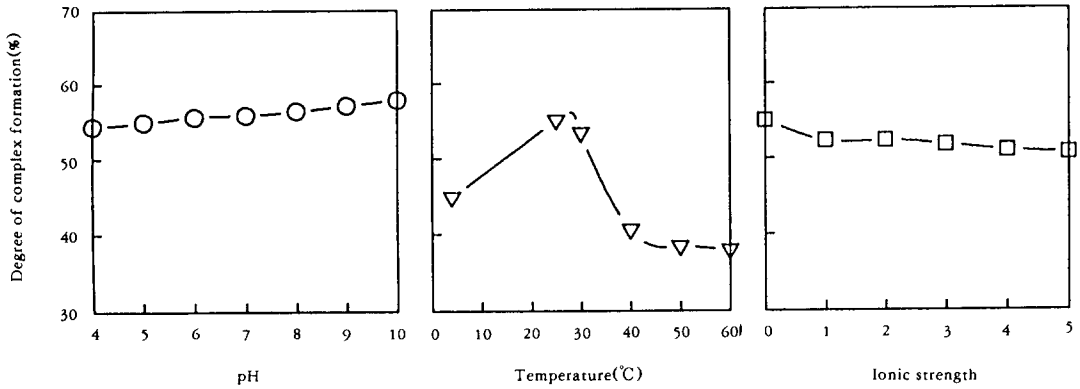


Fig. 3. Effect of pH, temperature, ionic strength on the capacity of  $\alpha$ -CD/capric acid complex formation. 50mM  $\alpha$ -CD, 50mM capric acid.

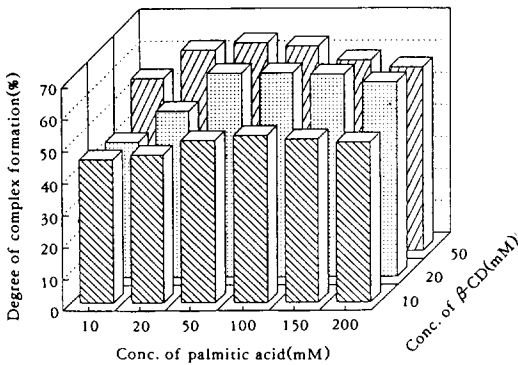


Fig. 4. Effect of molar mixing ratio of  $\beta$ -CD and palmitic acid on the capacity of inclusion complex formation. Mixed  $\beta$ -CD and palmitic acid was incubated at 25°C and pH 6.0.

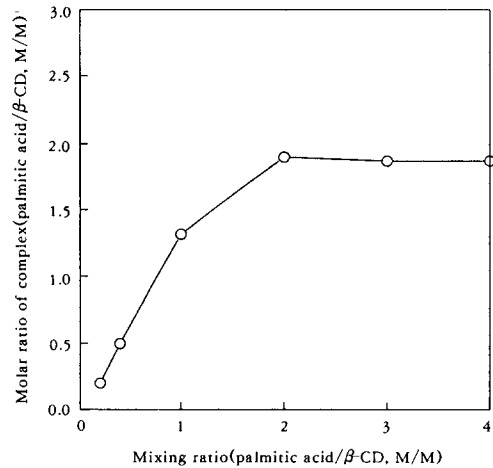


Fig. 5. Correlation between the molar ratios of  $\beta$ -CD and palmitic acid before complex formation and those of  $\beta$ -CD and palmitic acid complex formed.

가 지방산의 COO<sup>-</sup>에 영향을 미치어 complex 형성을 저해하거나 다량의 이온이 용매분자의 활성을 증가시켜 hydrophobic interaction을 저해하기 때문으로 생각된다.

$\beta$ -CD와 Palmitic Acid간의 Inclusion Complex 형성조건 검토

$\beta$ -CD와 palmitic acid의 적정 혼합농도

$\beta$ -CD의 농도를 10, 20 그리고 50mM로 고정하고 palmitic acid를 각각 10mM에서 200mM로 하여 형성율의 변화를 측정한 결과는 Fig. 4와 같다.

이 경우도 앞에서 관찰한 바와 유사하게  $\beta$ -CD와

지방산의 농도가 증가할수록 형성률이 증가하는 경향을 보였다. 그러나  $\beta$ -CD의 농도가 50mM 그리고 palmitic acid의 농도가 50mM 이상에서는 더 증가하지 않았으며, 적합한 혼합농도는  $\beta$ -CD 50mM과 palmitic acid 50mM일 때로 판단된다.

한편 Fig. 5는  $\beta$ -CD와 palmitic acid간의 몰 조성비( $\beta$ -CD : palmitic acid, M/M)를 나타낸 것으로 1.00:0.20에서 1.00:1.90까지 변화되었다. 한 분

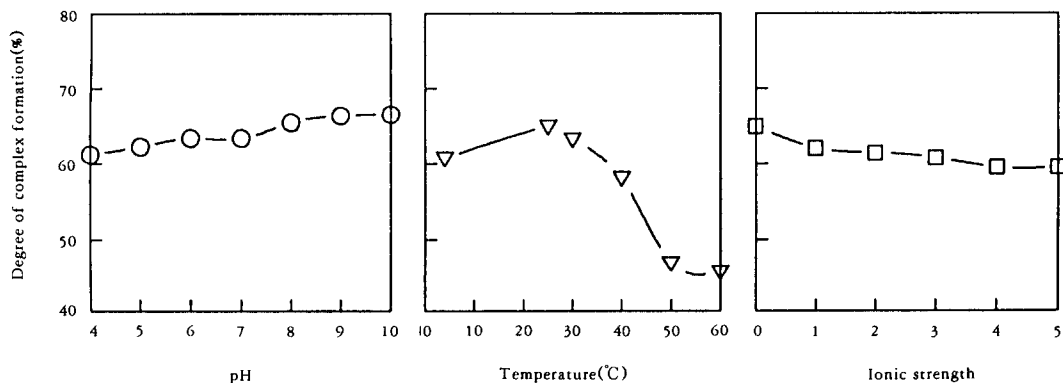


Fig. 6. Effect of pH, temperature, and ionic strength on the capacity of  $\beta$ -CD/ palmitic acid complex formation. 50mM  $\beta$ -CD, 50mM palmitic acid.

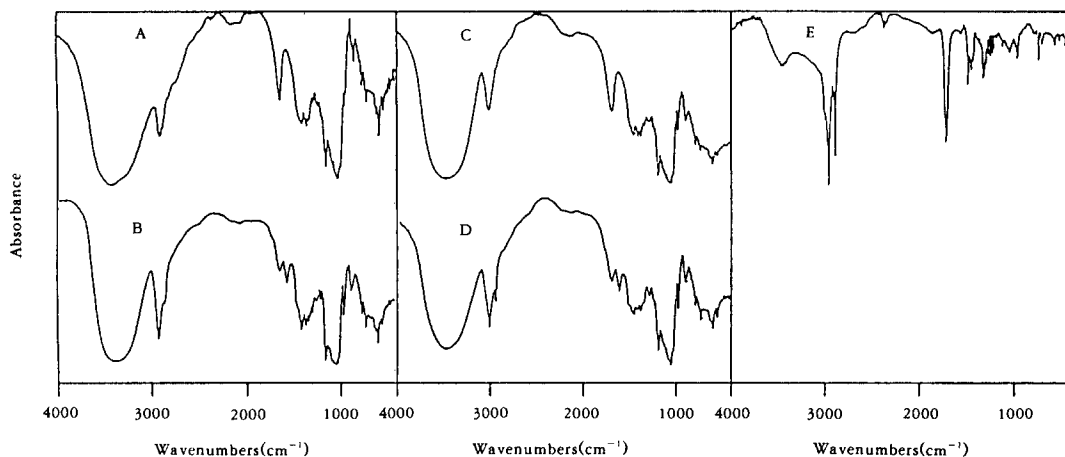


Fig. 7. Infrared spectrums of  $\alpha$ -CD,  $\alpha$ -CD/capric acid,  $\beta$ -CD,  $\beta$ -CD/palmitic acid complex, and mixture of  $\beta$ -CD and palmitic acid. A:  $\alpha$ -CD, B:  $\alpha$ -CD/capric acid complex, C:  $\beta$ -CD, D:  $\beta$ -CD/palmitic acid complex, E: mixture of  $\beta$ -CD and palmitic acid.

자의  $\beta$ -CD에 최대 1.90분자의 그리고 최저 0.20분자의 palmitic acid가 결합되었다.

반응조건의 영향

Fig. 6는 각종 반응조건이 inclusion complex 형성률에 미치는 영향을 검토한 결과이다. 위의 경우와 유사하게 pH는 큰 영향을 미치지 않는 반면 온도는 중요한 인자로 작용 하여 형성률은 4°C에서 60.80%, 25°C에서 64.96%로서 최대치를 보였고, 30°C에서는 62.34%, 40°C에서는 58.26%, 그리고

50°C 이상에서는 46.86%로 오히려 감소하였다. Ionic strength의 큰 영향을 미치지 않는 증가할수록 형성률이 감소하는 경향을 나타내었다.

Cyclodextrin Inclusion Complex의 IR Spectrum

CD의 IR spectrum과 capric acid와 palmitic acid를 포접한 CD complex의 IR spectrum을 파장 4,000~400cm<sup>-1</sup> 범위에서 측정 비교하여 Fig. 7에 나타내었다. 지방산이 포접된 CD complex의 IR pattern은 포접전의 CD와 전반적으로 유사한 양상

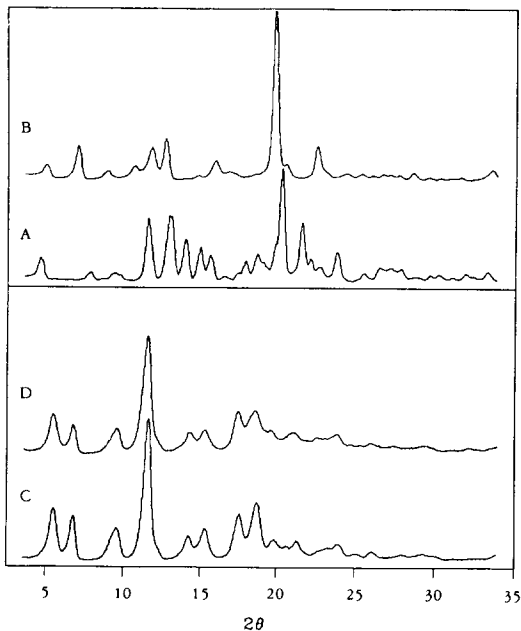


Fig. 8. X-ray diffraction patterns of  $\alpha$ -CD,  $\alpha$ -CD/capric acid,  $\beta$ -CD, and  $\beta$ -CD/palmitic acid complex. A:  $\alpha$ -CD, B:  $\alpha$ -CD/capric acid complex, C:  $\beta$ -CD, D:  $\beta$ -CD/palmitic acid complex.

을 보였으나 methyl기의 흡수파장인 1,450, 2,900  $\text{cm}^{-1}$ 와 carboxylic acid기 흡수파장인 1,700, 1,250  $\text{cm}^{-1}$  근처에서 새로운 흡수 band가 나타났다. 또한 CD와 지방산을 complex를 형성시키지 않고 혼합한 경우(Fig. 7(E))의 spectrum도 methyl기와 carboxylic acid기의 흡수 band의 변화가 관찰되었으며 강도가 증가하는 특징을 보였으며, 이와 같은 변화는 지방산이 포접된 CD complex의 경우 지방산의 탄소쇄의 일부가 CD 공동 내로 포접됨을 보여주고 있다.

#### Cyclodextrin의 Inclusion Complex 형성에 따른 X-ray 회절 양상의 변화

CD와 CD inclusion complex의 결정구조를 입사각을 4~34°로 scanning한 X선 회절도를 비교하여 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 8(A, B)에서와 같이  $\alpha$ -CD는 각각 11.82°, 13.17°, 13.38°, 20.43° 그리고 21.67°에서 강한 peak를 보였으며, capric acid가 포접된  $\alpha$ -CD는 같은 위치에서 peak가 관찰되었으나 높이가 낮아지는 경향을 보여 상대적으로 결정도

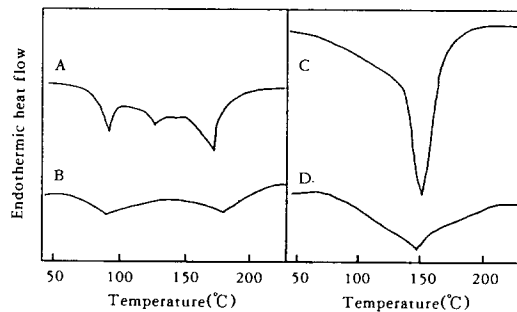


Fig. 9. DSC thermograms of  $\alpha$ -CD,  $\alpha$ -CD/capric acid,  $\beta$ -CD, and  $\beta$ -CD/palmitic acid complex. A:  $\alpha$ -CD, B:  $\alpha$ -CD/capric acid complex, C:  $\beta$ -CD, D:  $\beta$ -CD/palmitic acid complex

가 감소하였다. 반면 19.84°에서는 새로운 강한 peak가 형성되는 특징을 보였는데, 이는  $\alpha$ -CD의 결정구조가 capric acid를 공동 내에 포접할 경우 변화함을 알 수 있으며, 이와 같은 경향은 CD에 각종 ligand가 결합될 경우 X-ray 회절 양상이 변화된다는 Hidefumi 등(23)의 관찰과 일치한다.

Fig. 8(C, D)에서와 같이  $\beta$ -CD는 각각 5.99°, 7.30°, 12.02°, 15.55°, 그리고 18.79°에서 강한 peak를 보였으며, palmitic acid가 포접된  $\beta$ -CD의 peak 높이도 위에서와 같이 전체적으로 낮아졌고  $\alpha$ -CD에서 관찰된 19.84°의 강한 peak는 형성되지 않았다. 또한  $\alpha$ -CD와 비교할 때 전체적인 peak pattern이 다르며, complex를 형성한 후 pattern 변화 양상도 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다.

#### Differential Scanning Calorimeter를 이용한 Inclusion Complex 형성반응의 열역학적 특성 분석

CD와 지방산간의 inclusion complex 형성반응의 열역학적 특성을 규명하기 위해  $\alpha$ -CD와  $\alpha$ -CD-capric acid inclusion complex, 그리고  $\beta$ -CD와  $\beta$ -CD-palmitic acid complex를 상온에서부터 230°C까지 변화시키면서 얻은 DSC thermogram은 Fig. 9와 같으며, 이로부터 계산한 enthalpy의 변화값( $\Delta H$ )을 Table 3에 나타내었다.

$\alpha$ -CD의 DSC thermogram으로 보아 Peak I에서의 enthalpy 변화값( $\Delta H$ )은 5.33cal/g, Peak II에서 1.70cal/g, 그리고 Peak III에서는 11.07cal/g이다.  $\alpha$ -CD와 capric acid간의 complex의 Peak I에서의 enthalpy 변화값( $\Delta H$ )은 7.05cal/g, Peak



Table 3. Enthalpy changes of  $\alpha$ -,  $\beta$ -CD,  $\alpha$ -CD/  
capric acid, and  $\beta$ -CD/palmitic acid in-  
clusion complexes measured by DSC.

Cyclodextrin		$\alpha$ -CD/ capric acid inclusion complex		$\beta$ -CD/ palmitic acid inclusion complex	
		$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD	$\alpha$ -CD	$\beta$ -CD
Peak I	Temp(°C)	83.30	84.60	150.90	147.90
	$\Delta H$ (cal/g)	5.33	7.50	85.18	44.34
Peak II	Temp(°C)	124.00	—	—	—
	$\Delta H$ (cal/g)	—	—	—	—
Peak III	Temp(°C)	168.50	172.30	—	—
	$\Delta H$ (cal/g)	11.07	4.59	—	—

$\Delta H$  calculated by endothermic area of DSC curve.

II는 관찰되지 않았고, Peak III는 4.59cal/g로, Peak I 값이 다소 증가되었는데 이는 없어진 Peak II 값에 기인하는 것으로 유추된다.  $\alpha$ -CD와  $\alpha$ -CD/capric acid complex간의  $\Delta H$ 의 값을 합산하여 비교한 결과  $\Delta H$ 값의 차이는 6.46cal/g으로 complex 형성반응은 발열반응임을 알 수 있었다.

$\beta$ -CD는 하나의 peak를 나타내었으며, enthalpy 변화 값은 85.18cal/g였고, palmitic acid와의 complex의 값은 44.34cal/g로서,  $\Delta H$ 값의 차이는 40.84 cal/g로서  $\alpha$ -CD와 같이 발열반응이었고 다소 높은 값을 보였다.

위에서와 같이 각종 포화 및 불포화 지방산류는 탄소쇄의 길이에 따라  $\alpha$ -,  $\beta$ -CD에 대한 형성능과 선택성에 차별성을 보였고, 가격이 저렴한 용이하게 얻을 수 있는 재료이며, 또한 독성이 없다는 장점이 있어 CD분획용 ligand로서 CD adsorbent 제조에 활용될 수 있는 특징을 갖고 있었다. 앞으로 fatty acid를 ligand로 한 CD adsorbent의 제조와 이를 이용한  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -cyclodextrin의 분획에 관한 연구가 요망된다.

## 요 약

각종 CD와 여러 종류의 화합물, pH indicator, biostain, 아미노산, 천연배당체, 그리고 fatty acid 간의 inclusion complex 형성능을 비교하였다. Fatty acid가 각종 CD에 대한 포접형성능과 선택성이 높아 CD 분리용 ligand로 적합함을 알았다. Fatty acid의 포접능과 선택성은 탄소쇄의 길이와 밀접한 상관관계를 나타내어 capric acid는  $\alpha$ -CD

와 palmitic acid는  $\beta$ -CD와 높은 선택성을 보였다. Complex형성에 미치는 반응조건인 혼합 농도비, pH, ionic strength, 그리고 온도의 영향을 검토하였다. 적정 혼합 농도비는 CD가 50mM 그리고 ligand인 fatty acid가 50mM일 때였으며, 온도가 중요한 형성조건으로 작용하였다. 포접되지 않은 CD와 fatty acid가 포접된 CD의 분자구조를 X-ray diffraction과 IR spectrum을 사용하여 비교 검토하였으며, DSC로 inclusion complex 형성반응의 enthalpy의 변화값( $\Delta H$ )을 측정하여 발열반응임을 확인하였다.

## 감 사

본 연구는 1994년도 학술진흥재단의 학술연구조성비 중 자유공모과제 연구비로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. 한국유전공학연구조합(1986), *Cyclodextrin*(유전공학 자료 60), pp. 3-40, 한국유전공학연구조합, 서울.
2. 이용현, 박동찬(1991), *산업미생물학회지*, **19**, 514.
3. J. Szejtli(1988), *Cyclodextrin Technology*, pp. 1-78, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
4. J. Szejtli(1993), *Cyclodextrins in Pharmacy*, pp. 1-18, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
5. J. S. Pagington(1987), *Chemistry in Britain*, May, 455.
- 6.鈴木正成, 佐藤厚子(1983), *澱粉科學*, **30**, 240.
7. 三崎勝(1984), *澱粉科學*, **31**, 98.
8. 原耕三, 橋本仁(1986), *澱粉科學*, **33**, 152.
9. 南手良裕, 勝田純郎 (1984), *澱粉科學*, **31**, 112.
10. S. H. Song, H. J. Lee, S. J. Chang and G. J. Woo(1993), *Foods and Biotechnology*, **2**, 132.
11. M. R. Eftink and J. C. Harrison(1981), *Bioorganic Chemistry*, **10**, 388.
12. M. J. Mäkelä, M. P. Mattsson and T. Korpela (1989), *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **11**, 193.
13. Y. Tsuchiyama, K. Yamamoto, T. Asou, M. Okabe, Y. Yagi and R. Okamoto(1991), *J.*

- Ferment. Bioeng.*, **71**, 407.
14. M. Yamamoto and K. Horikoshi(1981), *Starch*, **33**, 244.
  15. Y. Tsuchiyama, H. Nomura, M. Okabe and P. Okamoto(1991), *J. Ferment. Bioeng.*, **71**, 413.
  16. T. Korpela, S. Laakso and M. Mäkelä(1987), *European Patent Application*, EP-0,268,997 A1.
  17. M. J. Mäkelä, T. K. Korpela, J. Puisto and S. V. Laakso(1988), *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 83.
  18. T. Kaneko, T. Nakamura and K. Horikoshi (1987), *J. Jpn. Soc. Starch Sci.*, **34**, 45.
  19. 京都大學農學部(1970), 食品工學實驗書(上卷), pp. 378-387, 養賢堂, 東京.
  20. H. Kenneth(1990), *Official Methods of Analysis*, Vol. 2, p. 957. AOAC, Virginia.
  21. J. Szejtli and E. Bánky-Elöd(1975), *Die Stärke*. **27**, 368.
  22. M. Sasaki, S. Tanaka, N. Sugimoto and T. Sugano(1993), *Chem. Express*, **3**, 137.
  23. Y. Hidefumi, T. Furuta, M. Asada and H. Sugisawa(1992), *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **56**, 384.