

명세서

발명의 명칭: 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정의 제조 방법

기술분야

- [1] 본 발명은 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정의 제조방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 농축 결정화로 유기 용매를 사용하지 않고 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 수득하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 5'-구아닐산이나트륨 결정은 일반적으로 무정형, 판상형의 4수화물, 주상형의 7수화물 형태가 알려져 있다. 무정형의 경우 고액분리, 운반, 보관이 곤란하여, 산업적으로 사용되는 형태는 주로 7수화물이다.

[3]

- [4] 상기 결정을 산업적으로 수득하는 방법은 알코올계 반응매인 메탄올, 에탄올 등의 친수성 유기 용매를 사용한다.

[5]

- [6] 이와 같이 유기 용매를 사용하는 정석법은 사용한 친수성 유기 용매가 결정 내부에 포함되어 제품 건조 이후에도 잔류하게 되어 사용자의 불안감을 야기하게 된다. 또한, 공정에 사용된 친수성 유기 용매를 회수하는 과정에서 고순도의 유기 용매를 얻어야 하기 때문에 증류탑 투자비 및 이와 관련한 유틸리티 비용, 작업자의 안전을 위한 방폭 비용 등이 발생한다.

[7]

- [8] 따라서, 본 발명자들은 상기와 같은 단점을 해소하고자 개선 실험을 거듭한 결과, 유기 용매를 사용하지 않고서도 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 수득할 수 있다는 것을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 일 양상은 염 수용액 및 5'-구아닐산 수용액을 혼합하여 혼합용액 내 비결정성 고체를 형성하는 단계; 및 상기 혼합용액에 결정 씨앗을 첨가하여 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 형성하는 단계를 포함하고, 상기 결정 씨앗을 첨가하는 단계는 온도를 25 내지 45°C로 유지하며 수행되는 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정의 제조 방법을 제공한다.

과제 해결 수단

- [10] 일 양상은 염 수용액 및 5'-구아닐산 수용액을 혼합하여 혼합용액 내 비결정성 고체를 형성하는 단계; 및 상기 혼합용액에 결정 씨앗을 첨가하여 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 형성하는 단계를 포함하고, 상기 결정 씨앗을 첨가하는 단계는 온도를 25 내지 45°C로 유지하며 수행되는 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정의 제조 방법을 제공한다.

- [11]
- [12] 상기 방법에 있어서, 상기 염 수용액은 pH가 7 내지 10인 것일 수 있다. 상기 첨가는 상기 혼합용액의 온도를 25 내지 45°C로 유지하면서 수행하는 것일 수 있다.
- [13] 상기 염 수용액 중 염의 농도는 5'-구아닐산 수용액과 혼합되어 160 내지 360 g/L의 염 농도를 갖는 혼합용액을 형성하는 것이라면 어느 것도 포함될 수 있다. 예를 들어, 상기 염 수용액은 200 내지 400 g/L 염 수용액일 수 있다.
- [14]
- [15] 상기 5'-구아닐산 수용액은 물에 5'-구아닐산을 첨가하여 제조된 것일 수 있다. 상기 5'-구아닐산 수용액은 50 내지 400g/L 5'-구아닐산 수용액인 것일 수 있다. 상기 5'-구아닐산 수용액은 염이 포함된 것일 수 있고, 예를 들어, 5'-구아닐산이나트륨 수용액일 수 있다. 상기 5'-구아닐산 수용액은 미생물 배양에 의하여 수득된 것을 포함할 수 있다. 상기 미생물 배양에 의하여 수득된 것은 5'-구아닐산 함유 배양물로부터 세포를 제거하여 얻어진 상등액일 수 있다. 상기 미생물 배양에 의하여 수득된 것은 상기 상등액으로부터 이온교환크로마토그래피 또는 활성탄을 사용하여 정제하여 얻어진 것일 수 있다. 활성탄을 사용한 정제는 활성탄과 배양액을 혼합하여 불순물을 활성탄에 결합시키고 그 불순물이 결합된 활성탄을 반응물로부터 제거하는 것일 수 있다.
- [16]
- [17] 상기 방법에 있어서, 5'-구아닐산 수용액을 혼합하는 것은 상기 혼합용액 중 염의 농도가 160 내지 360 g/L가 될 때까지 수행하는 것일 수 있다. 5'-구아닐산 수용액을 혼합하는 것은 상기 혼합용액 중 NaCl의 농도가 160 내지 360 g/L가 될 때까지 수행하는 것일 수 있다.
- [18] 상기 방법에 있어서, 상기 비결정성 고체를 형성하는 단계는 상기 혼합용액을 건조시켜 상기 염의 농도가 농도 160 내지 360 g/L가 되게 하는 단계를 포함하는 것일 수 있다. 5'-구아닐산 수용액을 혼합하는 것은 상기 수용액을 나누어 부분적으로 첨가하는 것일 수 있다. 상기 첨가는 점적하는 것일 수 있다. 상기 첨가는 1 내지 1000 분 동안 수행되는 것일 수 있다. 5'-구아닐산 수용액을 혼합하는 것은 교반하면서 수행하는 것일 수 있다.
- [19]
- [20] 본 명세서에서 용어 "비결정성 고체"는 결정과 같이 정형되어 있지 않고 무질서하게 석출된 하얀 고체로 용액 내에 부유하며, 현미경으로 봤을 때 무정형이기 때문에 투명하지 않고 불규칙적이며 불투명한 형상을 갖는다. 이 비결정성 고체를 건조하여 수화물 분석 시 무수화물임을 확인할 수 있다.
- [21]
- [22] 상기 방법에 있어서, 결정 씨앗을 첨가하는 것은 상기 혼합용액의 온도를 25 내지 45°C로 유지하면서 수행하는 것일 수 있다. 상기 결정 씨앗은 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 포함할 수 있다. 결정 씨앗을 첨가하는

것은 반응기를 교반하면서 수행하는 것일 수 있다. 결정 씨앗을 첨가하는 것은 결정을 나누어 부분적으로 첨가하는 것일 수 있다. 상기 첨가는 점적하는 것일 수 있다. 상기 첨가는 1 내지 1000 분 동안 수행되는 것일 수 있다. 상기 첨가되는 결정 씨앗의 양은 5'-구아닐산 수용액과 염 수용액의 혼합용액 중 5'-구아닐산염의 중량을 구하여 이를 결정 씨앗 첨가 중량의 기준으로 할 수 있다. 상기 첨가되는 결정 씨앗의 양은 상기 5'-구아닐산염 100 중량부에 대하여 0.1 내지 5.5 중량부, 또는 0.1 내지 5.0 중량부인 것일 수 있다. 상기 5'-구아닐산염은 예를 들어, 5'-구아닐산이나트륨일 수 있다.

[23]

[24] 상기 방법은 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 형성하는 단계 후 형성된 결정을 함유하는 용액을 냉각하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 냉각은 25°C 이하, 예를 들면, 4 내지 25°C, 4 내지 20°C, 4 내지 15°C, 4 내지 10°C, 10 내지 25°C, 15 내지 25°C, 또는 10 내지 20°C로 수행하는 것일 수 있다.

[25]

[26] 상기 방법은 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 형성하는 단계 후 형성된 결정을 함유하는 용액으로부터 상기 결정을 분리하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 분리는 원심분리, 또는 여과인 것일 수 있다. 상기 원심분리는 100 내지 1000xg에서 수행하는 것일 수 있다. 상기 원심분리는 1 내지 30분 동안 수행하는 것일 수 있다. 상기 여과는 0.22 내지 200 μm 의 필터를 사용하는 것일 수 있다.

[27]

[28] 상기 방법에 있어서, 상기 염 수용액은 금속 염의 수용액일 수 있다. 즉, 상기 염 수용액의 염은 금속 염일 수 있다. 상기 금속 염은 알칼리 금속 염을 포함할 수 있다. 상기 알칼리 금속 염은 나트륨 함유 염일 수 있다. 상기 알칼리 금속 염은 NaCl, KCl, Na_2CO_3 , NaHCO_3 , 또는 Na_2CO_3 일 수 있다.

[29]

[30] 일 구체예는 염 수용액에 5'-구아닐산 수용액을 혼합하여 혼합용액 중 염의 농도가 160 내지 360 g/L가 되도록 하여 혼합용액 중에 비결정성 고체를 형성하는 단계; 및 상기 혼합용액에 결정 씨앗을 첨가하여 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 형성하는 단계를 포함하는, 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정의 제조 방법으로서, 상기 혼합용액의 온도는 25 내지 45°C인 것인 방법일 수 있다. 상기 염 수용액은 200 내지 400 g/L 염 수용액일 수 있다. 상기 5'-구아닐산 수용액은 50 내지 400 g/L 5'-구아닐산 수용액일 수 있다. 상기 염 수용액은 pH가 7 내지 10일 수 있다. 상기 결정 씨앗은 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정일 수 있다. 상기 5'-구아닐산 수용액은 미생물 배양에 의하여 수득된 것을 포함한다. 상기 5'-구아닐산 수용액은 미생물 배양에 의하여 수득된 배양물 또는 그로부터 세포를 제거한 배양 상등액, 또는 그로부터 정제된 5'-구아닐산을 포함하는 것일 수 있다. 상기 미생물은 5'-구아닐산 생산능을 갖는 것일 수 있다. 상기 첨가되는 결정 씨앗의 양은 상기 혼합용액 중에 형성된 5'-구아닐산염 100 중량부에

대하여 0.1 내지 5.5 중량부일 수 있다. 상기 염은 NaCl일 수 있다. 상기 5'-구아닐산염은 예를 들어, 5'-구아닐산이나트륨일 수 있다.

[31]

[32] 일 구체예는 NaCl 수용액과 5'-구아닐산 수용액을 혼합하여 혼합용액 중 염의 농도가 160 내지 360 g/L가 되도록 하여 혼합용액 중에 비결정성 고체를 형성하는 단계; 및 상기 혼합용액에 상기 혼합용액 중에 형성된 5'-구아닐산염 100 중량부에 대하여 0.1 내지 5.5 중량부의 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 결정 씨앗으로 첨가하여 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 형성하는 단계를 포함하는, 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정의 제조 방법으로서, 상기 혼합용액의 온도는 25 내지 45°C인 것인 방법일 수 있다. 상기 염 수용액은 200 내지 400 g/L 염 수용액일 수 있다. 상기 5'-구아닐산 수용액은 50 내지 400 g/L 5'-구아닐산 수용액일 수 있다. 상기 염 수용액은 pH가 7 내지 10일 수 있다. 상기 5'-구아닐산 수용액은 미생물 배양에 의하여 수득된 것을 포함한다. 상기 5'-구아닐산 수용액은 미생물 배양에 의하여 수득된 배양물 또는 그로부터 세포를 제거한 배양 상등액, 또는 그로부터 정제된 5'-구아닐산을 포함하는 것일 수 있다. 상기 미생물은 5'-구아닐산 생산능을 갖는 것일 수 있다. 상기 첨가되는 결정 씨앗의 양은 상기 5'-구아닐산염 100 중량부에 대하여 0.1 내지 5.5 중량부일 수 있다.

발명의 효과

[33] 일 양상에 따른 5'-구아닐산 수용액으로부터 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정의 제조 방법에 의하면, 5'-구아닐산 수용액으로부터 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 효율적으로 제조할 수 있다.

[34] 구체적으로, 본 발명의 5'-구아닐산이나트륨 7수화물의 제조 방법에 의하면, 유기용매 첨가 없이 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 수득할 수 있다. 본 발명의 제조 방법에 의하면, 유기 용매로 인해 유발될 수 있는 안전성 측면에서 작업자에게 보다 유리하며, 최종 제품 내 유기 용매가 잔류하지 않아 최종 사용자의 유기 용매 유해성에 대한 불안감을 야기하지 않을 수 있다. 또한, 방폭 설비 투자 및 설비 유지 비용이 감소하거나 사용한 유기 용매를 고순도로 회수하는 증류탑 투자 및 설비 비용, 공정 가동에 활용되는 유틸리티 비용이 감소하여 경제적이다.

도면의 간단한 설명

[35] 도 1은 실시예 1에 따라 수득된 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 현미경으로 촬영한 사진이다.

[36] 도 2는 비교예 2에 따라 수득된 판상형의 5'-구아닐산이나트륨 4수화물 결정을 현미경으로 촬영한 사진이다.

[37] 도 3은 비교예 3에 따라 친수성 유기 용매인 메탄올을 사용하여 얻어진 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 현미경으로 촬영한 사진이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [38] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이 실시예들은 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이 실시예들에 한정되는 것은 아니다.
- [39]
- [40] **실시예 1**
- [41] 본 실시예에서는 5'-구아닐산이나트륨 수용액으로부터 유기 용매를 사용하지 않고, 5'-구아닐산이나트륨 7 수화물 결정을 형성시키고, 이를 분리하였다.
- [42]
- [43] 3L 플라스크에서 pH 9 및 온도 40°C인 염화나트륨 300g/L 수용액 1L에 5'-구아닐산이나트륨 380g/L 수용액 0.875L를 30 분에 걸쳐서 서서히 첨가하였다. 그 결과, 혼합용액 중에 비결정성 고체가 형성되었다. 또한, 상기 5'-구아닐산이나트륨은 자체적으로 미생물 발효를 통하여 5'-구아닐산 함유 발효 산물을 얻고 정제하여 얻은 것이다. 상기 염화나트륨 300g/L 수용액의 pH는 농도 50 (w/w)% NaOH 2mL를 사용하여 조정된 것이다. 상기 비결정성 고체는 상기 혼합용액 중 염화나트륨 농도 160g/L에서 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정으로 전이되었다.
- [44]
- [45] 염화나트륨 수용액과 5'-구아닐산이나트륨 수용액의 혼합용액의 온도를 42°C로 유지하면서 용액에 결정화 씨앗으로서 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 상기 혼합용액 중에 형성된 5'-구아닐산이나트륨의 중량 대비 1 중량%가 되게 첨가하고, 동일한 조건에서 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 1시간 이내에 비결정성 고체가 주상형 5'-구아닐산이나트륨 7수화물로 전이되었다. 그 결과, 상기 혼합용액은 결정을 포함한 슬러리 형태를 하고 있었다. 용어 "슬러리"는 고체상의 결정과 액체가 혼합된 점성의 현탁액을 나타낸다. 이 하 결정을 포함하는 상기 혼합용액을 결정 슬러리라고도 한다.
- [46]
- [47] 이는 염화나트륨 수용액과 5'-구아닐산 수용액의 혼합용액을 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정 씨앗의 존재 하에서 인큐베이션함으로써, 주상형 5'-구아닐산이나트륨 7수화물을 형성할 수 있다는 것을 나타낸다. 이는 유기 용매를 사용하지 않고서도 혼합용액의 인큐베이션에 의하여 주상형 5'-구아닐산이나트륨 7수화물을 형성할 수 있다는 것을 나타낸다. 이는 통상의 기술자에게 예기치 않은 현저한 효과이다.
- [48] 다음으로, 인큐베이션 1시간 후부터 결정 슬러리의 온도를 25°C 이하로 두 시간에 걸쳐 서서히 자연 냉각하였다.
- [49] 이 결정 슬러리를 바스켓 분리기 H-110F(KOKUSAN Co. Ltd., 일본)에 넣고 보울(bowl) G-힘(G-force) 340 x g에서 20분 동안 원심분리하였다. 원심분리 결과,

상등액은 제거하고 결정 슬러리를 취하였다. 얻어진 결정 슬러리로부터 285g의 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 얻었다.

[50]

[51] 상기 H-110F 원심분리기는 그 내부에 구멍이 난 바스켓(perforated basket)이 설치되어 있고 이 바스켓은 외부 회전 구동기(external rotation supply)에 연결되어 있다. 구멍이 난 바스켓은 폴리아미드 멀티필라멘트 섬유 필터 섬유재(polyamide multifilament fiber filter fabric)로 되어 있으며, 필터의 공기 투과도는 2 mbar에서 250 L/m²/s이다. 여과된 결정은 상온에서 24 시간 건조하였다.

[52]

[53] 상기 분리된 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정의 순도 및 농도를 HPLC를 사용하여 분석하였다. 구체적으로, 건조된 상기 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정 및 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 표준 결정 (Sigma, ≥ 99.0 (w/w)%(HPLC)) 1.0g을 3차 증류수 1L에 녹여 각각 1.0g/L의 실시예 및 표준품 용액을 제조하였다. 표준품 용액 중 5'-구아닐산이나트륨 7수화물은 표준 시약 제조사의 증명서를 통해 표준 제품의 순도를 확인하였다. 그 후에, 표준품 내의 5'-구아닐산이나트륨의 농도를 1.0000g/L x [표준 제품의 순도]로 산출하였다.

[54]

[55] 실시예 및 표준품 용액 5 μ L를 Agilent 1260 Infinity Quaternary LC (Agilent Technology Inc.) 시스템 중의 칼럼에 로딩하였다. 상기 칼럼은 Shiseido CAPCELL PAK C18 ACR (150mm x 4.6mm, 3 μ m)이다. 다음으로, 상기 칼럼에 아세트니트릴 2 %(v/v)/포스페이트 버퍼(pH 2.4) 98 %(v/v)를 1 ml/min의 유속으로 흘려주면서 흘러나오는 용출액에 대하여 254nm에서의 흡광도를 측정하였다. 상기 포스페이트 버퍼는 암모늄 포스페이트 2g/L, 테트라부틸 암모늄 포스페이트 0.2g/L, 및 인산 0.82g/L를 포함한다. 이 때 온도는 35°C이었다. 이 HPLC 조건은 여과액 중의 5'-GMP 농도를 측정할 때도 사용하였다. 그 결과, 순도는 하기 식에 따라 계산하였다.

[56]

[57] $\text{순도} = 5'\text{-GMP 함량} / \text{전체 고형분의 무게} \times 100$

[58]

[59] 또한, 상기 실시예 및 표준품 용액 5 μ L를 CARY 100 UV-VIS (Agilent Technology Inc.) 기기의 사각형 셀에 넣고 420nm에서 투과도를 측정하였다.

[60]

[61] 그 결과, 얻어진 결정 슬러리를 25°C에서 12시간 자연 건조하여 건조된 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 얻었다. 상기 건조된 결정은 잔류 수분 함량이 23.6 (w/v)%이었다. 상기 얻어진 건조된 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정은 중량 261g이었으며, 수율이 78.0% 및 순도가 95.0%이었다. 상기 결정 5 (w/v)% 수용액에 대하여 특정한 경우, 투과도(T)%는 95.0%이고 pH는 7.0 내지 8.5이었다.

[62]

[63] 도 1은 실시예 1에 따라 수득된 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 현미경으로 촬영한 사진이다. 도 1에서, 5'-구아닐산이나트륨의 결정은 주상형이었는데, 실시예 1에 따라 수득된 결정은 5'-구아닐산이나트륨 7수화물임을 확인하였다.

[64]

[65] **비교예 1**

[66] 5'-구아닐산이나트륨 380g/L 수용액 0.875L 대신 1.3L를 첨가하여, 상기 혼합용액 중 염화나트륨 농도가 130.4g/L인 것을 제외하고 상기 실시예와 동일한 과정에 따라 실험을 수행하였다. 그 결과, 상기 결정 씨앗을 첨가하고 6시간 관찰하였지만 상기 비결정성 고체의 5'-구아닐산이나트륨 7수화물로의 전이는 관찰되지 않았다. 혼합 용액의 온도를 25°C 이하로 두 시간에 걸쳐 서서히 냉각한 이후에 상기 비결정성 고체가 그대로 존재하고 있어서 바스켓 분리기를 사용한 원심분리에서 분리할 수 없었다.

[67]

[68] **비교예 2**

[69] 5%의 NaOH 0.3g을 이용하여 pH 9로 조절된 온도 40°C의 염화나트륨 300g/L 1L 수용액에 5'-구아닐산이나트륨 380g/L 수용액 0.875L를 서서히 첨가하였더니 염화나트륨 농도 160g/L에서 비결정질 즉 무정형 결정이 판상형의 4수 결정으로 전이되었다. 염 수용액과 5'-구아닐산이나트륨 수용액의 혼합용액 내부 온도를 약 52°C로 유지하면서 혼합용액에 결정 씨앗을 5'-구아닐산이나트륨 중량 대비 1 중량% 첨가하였으며, 1시간 이내에 결정 전이가 완료되었으나, 전이된 결정은 주상형의 7수 결정이 아닌 판상형의 4수 결정이었다.

[70]

[71] 도 2는 비교예 2에 따라 수득된 판상형의 5'-구아닐산이나트륨 4수화물 결정을 현미경으로 촬영한 사진이다.

[72]

[73] **비교예 3: 유기 용매를 사용한 결정**

[74] 200g/L의 5'-구아닐산이나트륨 용액 1.5L에 Na_2PO_4 4.4g을 넣어 완전 용해한 후 38°C의 온도에서 10 내지 20분 120 rpm으로 교반하였다. 여기에 메탄올 0.2L를 분당 3.4ml 첨가한 이후 결정 씨앗으로서 5'-구아닐산이나트륨 7수화물을 용액 내 5'-구아닐산이나트륨 중량 대비 1% 첨가하여 계가 완전히 평형이 된 이후 메탄올 1L를 반복 사용하여 분당 3.4ml씩 총 5시간 동안 동일한 속도로 정직한 후 탈수하여 295g의 주상형 결정을 수득하였다.

[75]

그 결과, 얻어진 결정을 25°C에서 12시간 자연 건조하여 건조된 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 얻었다. 상기 건조된 결정은 잔류 수분 함량이 23.6 (w/v)%이었다.

[76]

표 1은 실시예 1 및 비교예 3에 기재된 방법에 사용된 메탄올의 양 및 그에

의하여 생산된 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정의 순도 및 그에 잔류하는 메탄올 함량을 나타낸다. 표 1에서, 메탄올 사용량은 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 100g 수득을 기준으로 한다. 또한, 5'-구아닐산이나트륨 7수화물의 순도 (%)는 실시예 1에 기재된 방법에 따라 측정하였다. 잔류 메탄올 함량은 상기 결정 5 (w/v)% 수용액 중에 잔류하는 메탄올을 나타낸다.

[77] [표1]

	메탄올 사용량 (g)	5'-구아닐산이나트륨 7수화물 순도 (%)	잔류 메탄올 함량 (ppm)
비교예 3	270	95.06	850
실시예 1	0	95.00	미검출

[78] 표 1에 나타낸 바와 같이, 실시예 1의 결정은 순도를 95% 이상으로 유지할 수 있어 비교예 3과 유사하였다.

[79]

[80] 또한, 비교예 3은 100g의 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 수득하기 위하여 유기 용매인 메탄올을 270g 사용해야 하나, 실시예 1은 유기 용매를 사용하지 않았다.

[81] 도 3은 비교예 3에 따라 친수성 유기 용매인 메탄올을 사용하여 얻어진 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 현미경으로 촬영한 사진이다.

[82]

[83] **평가예 1. 혼합용액 중 염 농도가 결정 형성에 미치는 영향**

[84] 본 절에서는 염화나트륨 300g/L 수용액 대신 염화나트륨 400g/L 수용액을 사용하고, 5'-구아닐산이나트륨 수용액의 양을 달리하여 첨가하여 혼합용액 중 NaCl 농도가 120 내지 380g/L가 되게 한 것을 제외하고 상기 실시예 1과 동일한 과정에 따라 실험을 수행하였다.

[85] 그 결과, 상기 혼합용액 중에서 형성되는 비결정성 고체 또는 결정을 현미경을 통하여 관찰하였다. 그 결과를 표 2에 나타내었다.

[86] [표2]

염화나트륨 농도(g/L)	고체 물질 형태	전이 시간(분)
120	비결정성 고체	-
140	비결정성 고체	-
160	주상형의 7수 결정	30
200	주상형의 7수 결정	25
300	주상형의 7수 결정	25
360	주상형의 7수 결정	25
380	주상형의 7수 결정이나 작고 염화나트륨과 혼합된 결정	25

[87] 표 2에 나타난 바와 같이, 혼합용액 중 염화나트륨의 농도가 160g/L 이상일 때 비결정성 고체 형태의 5'-구아닐산이나트륨은 7수화물로 전이되었다. 한편, 혼합용액 중 염화나트륨의 농도가 360 g/L를 초과하면 결정 크기가 작고 염화나트륨과 혼합된 결정이 수득되었으므로 결정 슬러리로부터 5'-구아닐산이나트륨을 분리하는 것이 어려웠다. 결정의 크기가 클수록 결정 슬러리로부터 5'-구아닐산이나트륨 결정의 분리가 용이하다. 그 결과, 하기 2절의 결과와 함께 고려하여, 혼합용액 중 염의 농도 160 내지 360 g/L에서 5'-구아닐산이나트륨은 7수화물이 형성됨을 확인하였다.

[88]

[89] **평가예 2. 혼합용액 내 5'-구아닐산의 용해도**

[90] 온도 40°C 및 25°C에서 염화나트륨 농도를 달리한 염화나트륨 수용액에 5'-구아닐산 수용액을 첨가하였을 때, 5'-구아닐산의 용해도를 확인하였다.

[91]

[92] 구체적으로, 각각 40°C 및 25°C에서 5'-구아닐산 수용액을 각 염화나트륨 수용액에 충분히 용해시켜 포화 용액을 제조하였다. 그 결과, 160 내지 360g/L의 농도로 염화나트륨을 포함하는 포화 용액을 제조하였다. 표 3 및 표 4에 나타난 바와 같이, 혼합용액 내 400g/L 이상의 염화나트륨을 포함하는 용액에서는 소금 결정이 석출되었다. 다음으로, 포화 용액을 원심분리하여 얻어진 상등액 즉, 혼합용액 중 5'-구아닐산의 농도(g/L)를 측정하였다.

[93]

[94] 표 3 및 표 4는 각각 40°C 및 25°C에서 5'-구아닐산이나트륨 7수화물의 염화나트륨 수용액에 대한 농도를 나타낸다.

[95] [표3]

염화나트륨농도 (g/L)	160	200	230	280	300	310	350	360	400	400 초과
혼합용액 내 5'-구아닐산 농도 (g/L)	86.5	62.7	57.1	50.1	49.9	49.5	48.9	49.8	49.6소 금 결정 석출	48.7 소금 결정 석출

[96] [표4]

염화나트륨농도 (g/L)	160	200	230	280	300	310	350	360	400	420
혼합용액 내 5'-구아닐산 농도 (g/L)	40.1	26.4	22.2	19.2	18.1	18.2	18.2	18.2	18.3소 금 결정 석출	18.2소 금 결정 석출

[97] 표 3 및 4에 나타낸 바와 같이, 5'-구아닐산이나트륨 7수화물은 160 g/L 내지 360 g/L, 예를 들면 160 g/L 내지 360 g/L의 각 염화나트륨 수용액에서 낮은 용해도를 갖는 것을 확인하였다. 한편, 5'-구아닐산이나트륨 7수화물은 160 g/L 미만의 각 염화나트륨 수용액에서는 주상형을 유지하지 못하고 용해되었다.

[98]

[99] **평가예 3. 혼합용액의 온도가 결정 형성에 미치는 영향**

[100] 5%의 NaOH 0.3g을 이용하여 pH 9로 조절된 농도 300g/L의 염화나트륨 수용액 1L에 농도 380 g/L 5'-구아닐산이나트륨 수용액 0.875L를 서서히 첨가하였다. 혼합 용액 중, 염화나트륨의 농도는 160g/L, 5'-구아닐산이나트륨의 농도는 200g/L이었으며, 혼합 용액 내부 온도를 하기 표 5와 같이 조절한 후, 결정 씨앗을 5'-구아닐산이나트륨 중량 대비 1 중량% 첨가하여, 5'-구아닐산나트륨의 비결정성 고체가 7수화물 결정으로 전이되는지를 현미경을 통해 관찰하였다. 표 5는 혼합용액의 온도에 따른 결정을 나타낸다.

[101] [표5]

온도 (°C)	결정 형태	전이 시간 (분)
20	주상형의 7수 결정	180
25	주상형의 7수 결정	80
30	주상형의 7수 결정	60
35	주상형의 7수 결정	42
40	주상형의 7수 결정	30
45	주상형의 7수 결정	25
50	판상형의 4수 결정	30

[102] 표 5에 나타낸 바와 같이, 20°C에서도 주상형의 7수결정으로 전이됨은 확인하였으나 전이되는데 다소 시간이 소요되었으며, 25°C 이상의 온도로부터 비결정성 고체가 7수화물로 빠르게 전이됨을 확인하였다. 한편, 45°C 초과 온도에서는 비결정성 고체가 4수화물로 전이되었다.

[103]

[104] **평가예 4. 첨가되는 결정 씨앗의 양이 결정 형성에 미치는 영향**

[105] 5%의 NaOH 0.3g을 이용하여 pH 9로 조절된 300 g/L 농도의 염화나트륨 수용액 1L에, 농도 380 g/L의 5'-구아닐산 수용액 0.875L를 천천히 첨가하였다. 얻어진 혼합 용액 중 염화나트륨의 농도는 160g/L, 5'-구아닐산의 농도는 200g/L이었으며 혼합 용액의 온도는 40°C이었다.

[106]

[107] 비결정성 고체가 형성된 후, 결정 씨앗을 하기 표 6과 같이 첨가하여 결정 전이 속도를 현미경을 통해 관찰하였다. 표 6은 혼합용액에 첨가되는 결정 씨앗의 양에 따른 결정을 나타낸다.

[108] [표6]

결정 씨앗 중량(5'-구아닐산나트륨 100 중량부 기준)	결정 형태	전이 시간 (분)
0.05	주상형의 7수 결정	80
0.1	주상형의 7수 결정	60
0.5	주상형의 7수 결정	40
1.0	주상형의 7수 결정	30
2.5	주상형의 7수 결정	30
5.0	주상형의 7수 결정	25
5.5	주상형의 7수 결정	25

- [109] 표 6에 나타낸 바와 같이, 첨가되는 결정 씨앗의 중량이 증가할수록 5'-구아닐산이나트륨이 비결정성 고체에서 주상형의 7수화물로 전이되는 시간이 단축되는 경향을 보이다가 5.0 중량부를 초과하여 포함되는 경우 전이 시간이 더 이상 감소되지 않음을 확인하였다.

청구범위

- [청구항 1] 염 수용액 및 5'-구아닐산 수용액을 혼합하여 혼합용액 내 비결정성 고체를 형성하는 단계; 및
상기 혼합용액에 결정 씨앗을 첨가하여 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 형성하는 단계;를 포함하고,
상기 결정 씨앗을 첨가하는 단계는 온도를 25 내지 45°C로 유지하며 수행되는, 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정의 제조 방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서, 상기 혼합용액 중 상기 염 농도는 160 내지 360 g/L인 것인 방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서, 상기 염 수용액은 pH가 7 내지 10인 것인 방법.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서, 상기 염 수용액의 염 농도는 200 내지 400 g/L인 것인 방법.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서, 상기 5'-구아닐산 수용액의 5'-구아닐산 농도는 50 내지 400 g/L인 것인 방법.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서, 상기 5'-구아닐산 수용액은 미생물 배양에 의하여 수득된 것을 포함하는 것인 방법.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서, 상기 결정 씨앗은 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 포함하는 것인 방법.
- [청구항 8] 청구항 1에 있어서, 상기 첨가되는 결정 씨앗의 양은 상기 5'-구아닐산염 100 중량부에 대하여 0.1 내지 5.5 중량부인 것인 방법.
- [청구항 9] 청구항 1에 있어서, 상기 5'-구아닐산이나트륨 7수화물 결정을 형성하는 단계 후 형성된 결정을 함유하는 용액을 냉각하는 단계를 더 포함하는 것인 방법.
- [청구항 10] 청구항 9에 있어서, 상기 냉각은 25°C 이하로 수행하는 것인 방법.
- [청구항 11] 청구항 1에 있어서, 상기 염은 알칼리 금속 염을 포함하는 것인 방법.
- [청구항 12] 청구항 1에 있어서, 상기 염은 NaCl을 포함하는 것인 방법.