

과당에서 전환된 5-HMF(5-hydroxymethylfurfural)의 정량적 분석

심재훈 · 신수정[†]

접수일(2013년 1월 23일), 수정일(2013년 2월 5일), 채택일(2013년 2월 7일)

Quantitative analysis of 5-HMF produced from fructose

Jaehoon Sim and Jeong Shin[†]

Received January 23, 2013; Received in revised form February 5, 2013; Accepted February 7, 2013

ABSTRACT

Quantitative analysis of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) conversion from fructose by dehydration and rearrangement was investigated by ¹H-NMR spectroscopic method. Fructose was converted to 5-HMF in dimethylsulfoxide (DMSO)-d⁶ or acidic deuterium hydroxide at controlled reaction temperature and time. With addition of internal standards (biphenyl for DMSO-d⁶ solvent, and 2,5-dihydroxybenzoic acid for deuterium oxide solvent), conversion from fructose to 5-HMF was analyzed by ¹H-NMR spectroscopy. Quantitative analysis was run by comparison with peak area integration between of 5-HMF and internal standard. In DMSO solvent, 5-HMF was stable end product but part of 5-HMF was converted to formic and levulinic acid at acidic aqueous medium.

Keywords: fructose, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), ¹H-NMR

1. 서론

바이오매스 기반 석유 화학 대체에 대한 연구들이 몇 가지 방향으로 진행되어 오고 있다. 가장 전통적인 연구 방법은 2차 대전 이전에 공업화가 시도되었던 산 가수분해 공정을 통하여 목질계 바이오매스 자원의 당화 및 당화 산물의 이용 공정이다.¹⁾ 진한 산이나 묽은 산을

촉매로 산 가수분해 공정에 의하여 목질 바이오매스를 구성하고 있는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스계의 다당을 단당으로 전환시킬 수 있다. 산을 촉매로 사용하기 때문에 효소를 사용하는 경우 보다 반응의 특이성이 떨어지고 사용한 산의 처리 문제가 발생한다.

목재를 효과적으로 분해시킬 수 있는 흰개미는 셀룰로오스를 분해시킬 수 있는 효소 시스템을 지니고 있다.

• 충북대학교 농업생명과학대학 목재종이과학과 (Department of Wood and Paper Science, College of Agriculture and Life Science, Chungbuk Natl. Univ., Chungbuk 361-763, Republic of KOREA)

† Corresponding author: sojshin@cbnu.ac.kr

일반적으로 목질계 바이오매스 자원은 물리적 화학적인 구조가 복잡하여 대부분의 셀룰로오스나 헤미셀룰로오스 분해효소에 대한 저항성이 크다. 이런 문제를 해결하기 위하여 물리적 화학적 장애 요인을 제거하는 전처리 공정이 필요하다. 효과적인 전처리 공정으로 처리된 목질계 바이오매스는 셀룰라아제와 헤미셀룰라아제 복합 효소에 의하여 단당으로 전환 시킬 수 있다.²⁾ 이렇게 전환된 단당은 혐기성 발효 공정을 거쳐 에탄올, 부탄올, 젖산 또는 succinic acid와 같은 중요한 공업적인 원료나 에너지 자원으로 활용할 수 있다.³⁾

화학적 생물학적 단당 전환에 의한 목질계 바이오매스의 이용 공정 이외에 최근에는 열화학적 분해에 의하여 저분자량의 액체나 기체로 전환 시킨 후 이용하는 공정에 대한 관심이 커져 가고 있다. 목질계 바이오매스는 열분해에 의하여 가연성 기체로 분해된다. 적절하게 열분해 조건을 조절하면 액상의 바이오 오일을 생산할 수 있다.^{4,5)}

그리고 당화 공정에 의하여 생산된 단당을 촉매를 사용하여 적절하게 탈수 재배열 시킬 수 있고, 이 때 만들어진 산물은 석유 화학 중간물질을 대체 할 수 있는 유용한 화학 중간물질이다. 목질계 단당은 산 촉매에 의하여 furan계 화합물로 전환되고 이중 일부는 levulinic acid와 개미산으로 전환된다.⁶⁾

HMF를 생산하기 위하여 원료 물질, 가수분해 방법, 전환 방법과 반응성, 반응용매와 산물의 안정성에 대한 다양한 연구결과를 자세하게 보고하였다.⁷⁾ 이렇게 만들어진 HMF를 원료로 휘발유와 유사한 물성을 갖는 dimethylfuran (DMF) 뿐만 아니라 levulinic acid, 2,5-furandicarboxylic acid (FDCA), 2,5-diformylfuran (DFF) 등 중요한 석유 화학 중간물질을 만들 수 있다.⁸⁾ 또한 HMF나 furfural를 원료 물질로 디젤이나 제트 연료로 대체가 가능한 선형 탄화수소를 만들 수 있다.⁹⁾

단당에서 HMF의 전환 과정을 공정화 하기 위해서는 이 반응을 정량적으로 분석할 수 있는 방법이 필요하다. ¹³C-NMR은 여러 가지 간섭에 의하여 피크의 면적이 정량적으로 비례하지 않지만 ¹H-NMR의 피크 면적은 특정 수소의 개수에 정량적으로 비례한다. 이런 성질을 이용하여 ¹H-NMR을 정량적 분석에 사용할 수 있다. ¹H-NMR 분석법을 사용하여 중수 용매 조건에서 D-fructose의 tautomer의 분포를 계산하였고, 가장 흔하게 존재 하는 형태는 β -pyranose 형태이지만 온도가

상승함에 따라 β -pyranose형은 감소하고 β -furanose형이 증가하는 것을 보여주었다.¹⁰⁾

반응산물을 HPLC 분석법으로 정량적으로 분석할 수 있지만, 정량분석을 위하여 다양한 농도의 표준물질로 보정할 필요가 있고, 시료의 분석 시간이 길다는 단점이 있다. 하지만 ¹H-NMR 분광분석법은 농도 보정 과정이 필요 없을 뿐만 아니라 분석 시간이 짧고 산성 조건의 반응 후에도 증화 과정을 필요로 하지 않기 때문에 신속한 정량분석 방법으로 적합하다.¹¹⁾ 따라서 본 연구에서는 액체 크로마토그래피의 단점을 개선하고 보다 간편한 분석 방법을 적용하고자 NMR 분광 분석을 통한 정량적인 분석 방법의 개발을 시도하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험 재료

과당 (fructose)은 Sigma-Aldrich 사의 시약등급을 구입하여 표준 단당으로 사용하였다. 반응에 필요한 용매는 dimethylsulfoxide (DMSO)-d⁶와 중수 (D₂O, deuterium oxide)는 Cambridge Isotope Laboratories, Inc사의 순도 99.9%를 사용하였다. 내부 표준물질로 사용한 biphenyl 과 2,5-dihydroxybenzoic acid는 Sigma-Aldrich사의 시약등급을 구입하여 사용하였다.

2.2 실험 방법

2.2.1 단당에서 5-HMF로 전환 반응

DMSO-d⁶ 용매 3.0ml에 과당 1.00g 첨가한 후 140℃에서 60분간 반응 시킨 후 냉각 한 다음 표준물질인 biphenyl 0.314 g 첨가 하여 NMR 분석용 시료를 제조하였다.

중수는 황산을 사용하여 pH를 1.8로 조절한 것을 5.0 ml에 과당 1.00 g을 첨가한 후 150℃에서 150 분간 반응 시킨 후 냉각하였다. 냉각한 다음 표준물질 2,5-dihydroxybenzoic acid를 0.028 g 첨가 하여 용해시킨 후 NMR 분석용 시료를 제조하였다.

표준물질의 NMR 피크 확인은 biphenyl을 DMSO-d⁶에 용해시킨 것과 2,5-dihydroxybenzoic acid를 중수 (D₂O)에 용해시킨 것을 각각 NMR 분석에 사용하여 표준물질의 화학 이동 값(chemical shift)을 측정 하였다.

2.2.2 기기분석

$^1\text{H-NMR}$ 분광분석은 Bruker사의 500MHz NMR 기기를 충북대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 분석을 실시하였다. Bruker사의 Topspin 프로그램을 사용하여 내부 표준물질과 분석 대상 물질의 정량 분석용 피크를 결정하고 각 피크 면적을 적분하여 정량적인 분석을 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 $^1\text{H-NMR}$ 분광 분석을 통한 5-HMF의 정량적 분석 기법 개발

$^1\text{H-NMR}$ 분석에서 분석대상 물질 내에 존재하는 수소 주위의 전자 환경에 따라 화학 이동 값이 다르다. 피크의 면적은 수소 원자의 밀도에 비례한다. 이런 성질을 이용하여 화합물의 정성적, 정량적 분석이 가능하다. 수용액내 aldose형 당당의 수산기는 인접해 있는 물 분자와 수화(hydration)되어 있다. 이러한 이유로 수산기의 수소와 물 분자의 수소가 빠르게 치환하기 때문에 NMR 화학 이동 값(chemical shift)이 이동한다.¹²⁾ 당의 농도에 따라 다르지만 수용액속에서 1번 탄소에 붙어 있는 수산기의 수소 화학 이동 값은 3.33-3.44 ppm 범위이고 2번, 3번, 4번의 수산기 수소는 2.38-2.57 ppm이며 6번 탄소의 수산기의 수소는 2.04-2.07 ppm의 값을 갖는다.¹²⁾ DMSO 용매는 자유롭게 치환할 수 있는 수소가 없기

때문에 당당의 수산기의 수소가 고정되어 있고 화학 이동 값이 4.2-5.6 ppm 범위를 갖는다.¹⁰⁾ Keto형 당당은 아노머성 위치에 수소가 존재하지 않는다. 따라서 ketose에 존재하는 수소는 화학 이동 값이 유사하여 정량적으로 분석하기 어렵다. 과당의 DMSO 용매 조건에서 화학 이동 값은 수소의 위치와 tautomer의 구조에 따라 다른 값을 갖기 때문에 Fig. 1에서와 같이 스펙트럼이 매우 복잡하다. 그러나 물에서는 당당내 수산기의 수소와 용매와의 치환 반응이 빠르게 진행되기 때문에 Fig. 2에서와 같이 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼이 DMSO용매보다 간단하다.

DMSO용매에서는 용매가 산으로 작용하여 탈수 재배열 반응이 일어나고 과당이 5-HMF로 전환된다.¹³⁾ 만들어진 5-HMF는 당당과 다른 화학 이동 값(6.4-9.6 ppm)의 방향족 수소와 4.7 ppm에서의 수산기와 인접한 수소를 갖는다. 투입한 과당의 양을 알고 있기 때문에 전환 반응 후 내부 표준물질을 첨가하여 생성된 HMF의 양을 정량적으로 분석할 수 있다. biphenyl화합물은 DMSO에 대한 용해도가 높고 5-HMF의 분석하고자 하는 영역과 Fig. 3에서와 같이 화학 이동 값이 유사하여 피크중의 일부가 겹치지만 겹치지 않는 피크를 기준으로 정량 분석에 사용할 수 있기 때문에 내부 표준물질로 사용할 수 있다.

수용액에서는 과당의 산 촉매 탈수 반응이 일어나지 않기 때문에 산을 첨가하였다. 산성 중수 용매에서는 biphenyl 화합물이 녹지 않기 때문에 2,5-dihydroxybenzoic acid를 내부 표준물질로 사용하였다. 이 표준물질은

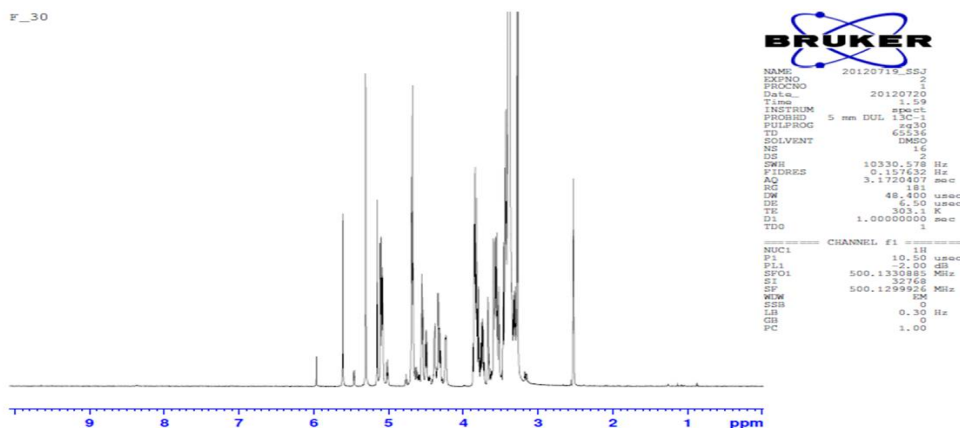


Fig. 1. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of fructose at dimethylsulfoxide-d6.

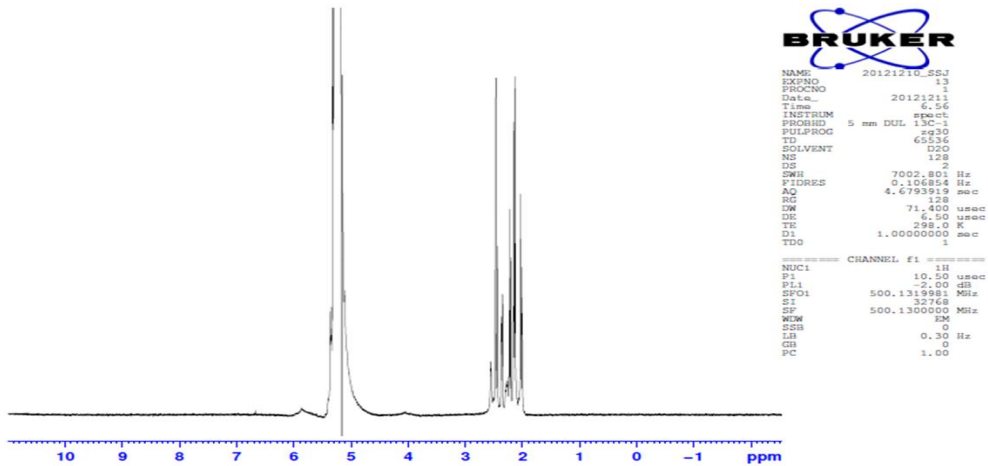


Fig. 2. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of fructose at deuterium oxide.

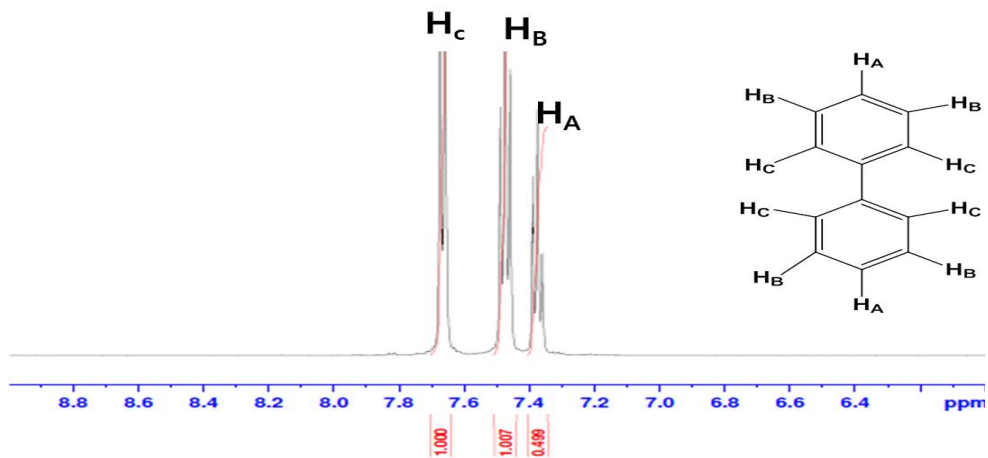


Fig. 3. Aromatic hydrogen peaks in $^1\text{H-NMR}$ spectrum of biphenyl at dimethylsulfoxide- d_6 .

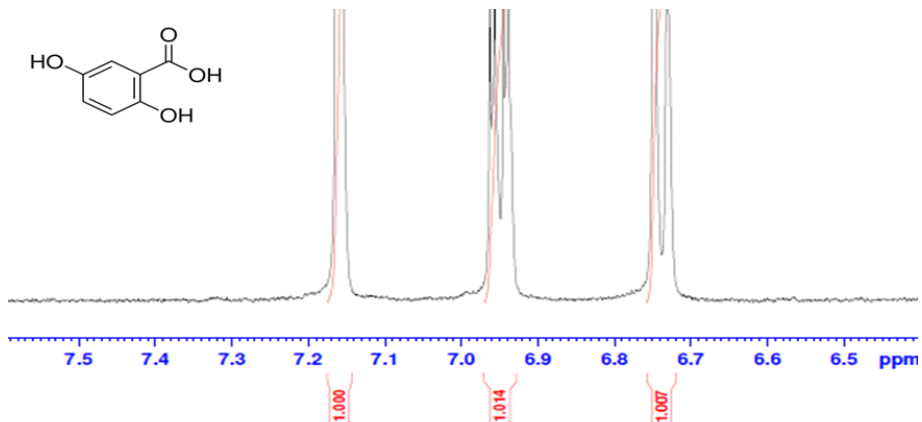


Fig. 4. Aromatic hydrogen peaks in $^1\text{H-NMR}$ spectrum of 2,5-dihydroxybenzoic acid dissolved at deuterium oxide.

6.7, 6.9, 7.2 ppm의 화학 이동 값에서 각각의 피크를 갖기 때문에 HMF와 같은 방향족 수소의 화학 이동 값을 갖지만 피크의 분리가 확실하기 때문에 정량적인 분석에 사용할 수 있다(Fig. 4). 용매의 pH에 따라 HDO의 피크가 이동하는데 증수에 과당을 녹인 중성 조건에서는 HDO 피크가 6.8 ppm영역이었지만 pH 1.8의 산성 조건에서는 5.1 ppm으로 이동함을 알 수 있다.

3.2 DMSO 용매 조건에서 과당에서 5-HMF로의 전환 분석

DMSO 용매는 일반적으로 극성 비양성자성 용매(polar aprotic solvent)로 용매의 수소와 수산기의 수소

사이의 치환이 극성 양성자성 용매(polar protic solvent)에 비하여 매우 느리게 일어난다. 용매가 산으로 작용하여 산의 첨가 없이 과당의 탈수 재배열 반응에 의하여 5-HMF로의 전환이 일어난다. Fig. 5에서 140°C, 60분 반응 후 과당에서 HMF로의 전이과정을 ¹H-NMR 스펙트럼을 통하여 보여주고 있다. 반응이 일어나기 전에 과당의 피크가 뚜렷하게 보이고 HMF의 피크는 보이지 않지만 140°C에서 60분간 반응이 진행된 후 과당의 피크는 대부분 사라지고 HMF 피크가 강하게 나타남을 알 수 있다.

표준물질의 몰수를 기준으로 과당의 첨가 몰수와 5-HMF 생성 몰수를 비교하여 전환율을 계산할 수 있

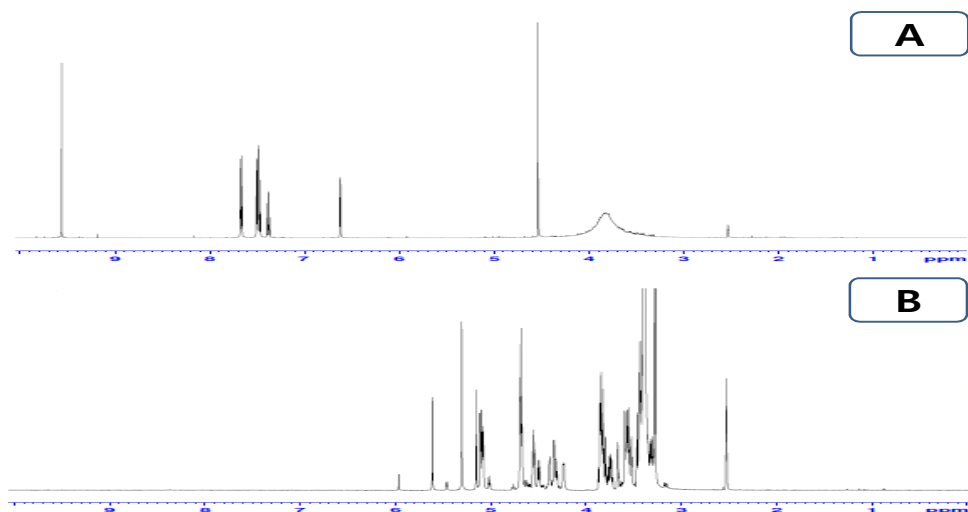


Fig. 5. Fructose (B) to 5-HMF (A) conversion at dimethylsulfoxide-d6.

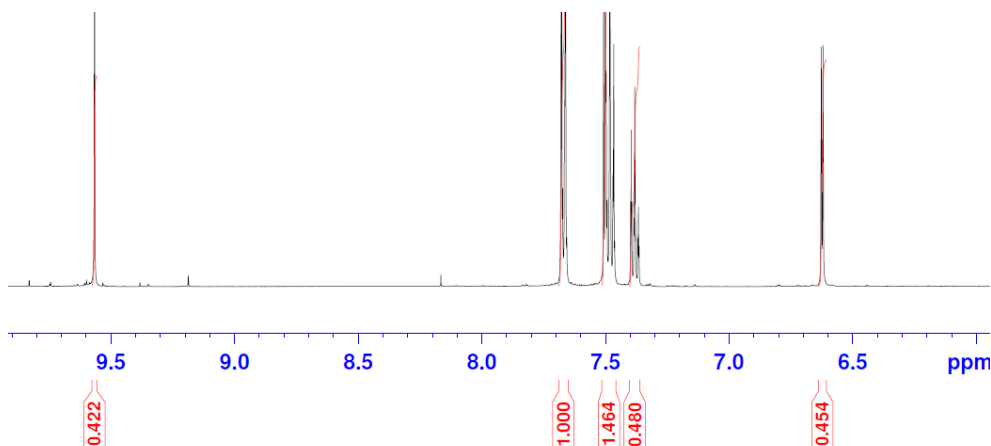


Fig. 6. Comparison of ¹H-NMR spectra from 5-HMF and biphenyl.

다. 5.5 mmol의 과당을 반응에 사용하였고 내부 표준물질을 2.0 mmol 첨가한 후 반응 후의 5-HMF 수율을 계산하기 위하여 반응 산물의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 방향족 수소 화학 이동 값 영역을 피크별로 적분하였다. 6.6, 7.5, 9.6 ppm 영역에서 5-HMF 방향족 수소 피크가 나타났으며 내부 표준물질의 피크는 7.3-7.7 ppm 영역에서 3개의 피크로 나타났다. 7.5 ppm 영역에서는 5-HMF와 내부 표준물질의 피크가 겹쳐서 나타나 정량 분석에서 이 부분의 피크는 사용하지 않는 것이 바람직하다. 내부 표준물질 biphenyl은 10개의 방향족 수소를 갖고 있으며 4개가 *ortho*-, 4개가 *meta*- 그리고 2개가 *para*- 위치에 존재한다. 따라서 5-HMF와 biphenyl이 같은 농도로 존재할 경우 5-HMF는 각 수소가 방향족 수소 위치에서 다른 화학 이동 값을 갖기 때문에 하나의 수소에 대한 적분이 가능하여 9.6 ppm이나 6.6 ppm 피크의 면적을 적분한 값보다 7.65 ppm (*ortho* 위치 수소) 피크를 적분한 값은 4배, 7.38 ppm (*para* 위치 수소)를 적분한 값은 2배에 해당되는 값을 갖는다.

Fig. 6에서 표준물질 biphenyl의 *ortho* 위치 수소를 기준으로 피크면적의 적분 값이 1.000이고 *para* 위치 수소는 절반인 0.480를 보인다. HMF의 방향족 피크의 적분 값은 0.422와 0.454 값을 갖는다. 표준물질의 6개의 수소가 1.48의 적분 값을 갖고 HMF는 2개의 수소가 0.876의 값을 갖기 때문에 HMF의 농도가 biphenyl 보다 1.78배 높다. 이것으로부터 생성된 HMF의 몰 농도

가 3.56 mmol에 해당하고 반응에 사용한 과당의 몰 농도가 5.5 mmol이기 때문에 몰 농도를 기준으로 64.7%의 과당이 HMF로 전환된 것이다.

3.3 산성 수용액 조건에서 과당에서 5-HMF로의 전환 분석

수용액에서 과당에서 HMF로 전이가 되기 위해서는 산성 조건이 필요하다. 반응 전에는 과당의 피크가 3.7-4.3 ppm 영역에서 나타나지만 (용매 피크 제외) pH 1.8, 150°C에서 150분 반응 시킨 후 과당에서 HMF로의 전이를 보여주고 있다 (Fig 7). 산성 수용액 조건에서 HMF는 levulinic acid와 개미산으로 분해된다. HMF의 일부가 분해된 개미산은 화학 이동 값 8.3 ppm에서 나타나고 있다.

5.70 mmol의 과당을 반응에 사용하였고 내부 표준물질을 0.05 mmol 첨가한 후 반응 후 5-HMF 수율을 계산하기 위하여 반응 산물의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 방향족 수소 화학 이동 값 영역을 피크별로 적분하였다 (Fig 8). 6.8, 7.7, 9.6 ppm 영역에서 5-HMF 방향족 수소 피크 영역에서 1.079, 1.072, 1.000의 적분 값을 갖고 내부 표준물질 2,5-dihydroxybenzoic acid는 피크는 7.0-7.4 ppm 영역에서 3개의 피크(0.015, 0.014, 0.017의 피크 면적 적분 값)으로 나타났다. 내부 표준물질 2,5-dihydroxybenzoic acid는 3개의 방향족 수소가 잘 분리되어 나타난다. 내부 표준물질의 농도가 반응물의

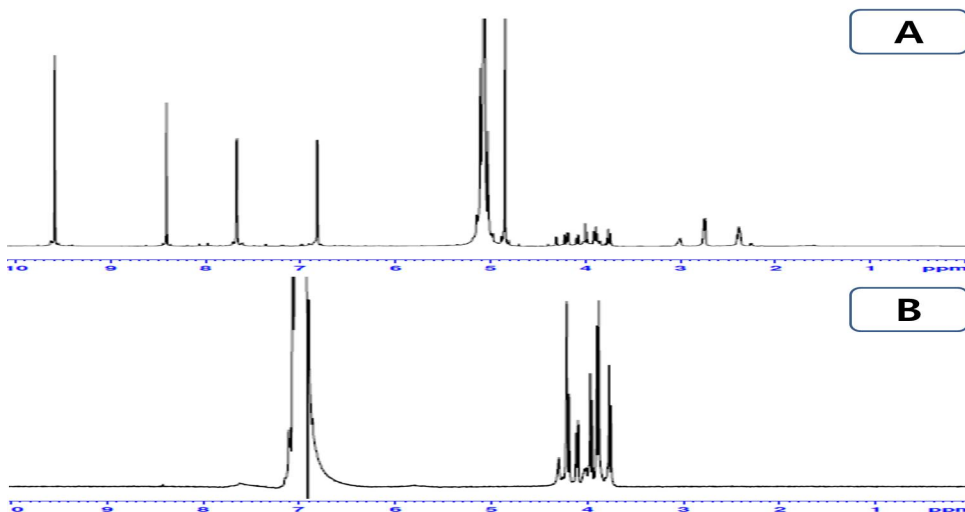


Fig. 7. Fructose (B) to 5-HMF (A) conversion at acidic deuterium oxide.

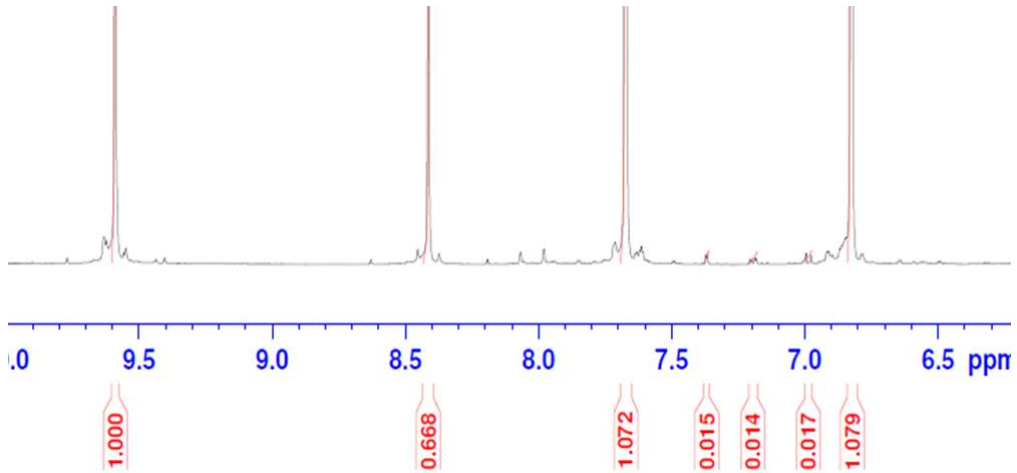


Fig. 8. Comparison of $^1\text{H-NMR}$ spectra from 5-HMF and 2,5-dihydroxybenzoic acid.

3.5%에 불과하기 때문에 피크 면적이 이에 비례하여 적게 나타났다. HMF와 2,5-dihydroxybenzoic acid의 피크 면적 비율이 3.151/0.046의 비율로 HMF가 내부 표준물질보다 68.5배 더 많이 들어있다. 따라서 생성된 HMF의 농도는 내부 표준 물질 2,5-dihydroxybenzoic acid 0.05 mmol의 68.5배에 해당하는 것이다. 생성된 HMF의 농도는 3.43 mmol에 해당되며 과당에서 HMF로의 전환율은 60.2%이다.

뿐만 아니라 HMF의 피크와 개미산의 피크를 비교하여 보면 HMF가 분해되어 생성된 개미산의 농도로 정량할 수 있다. 8.4ppm의 화학 이동 값은 개미산의 특징적인 값으로 HMF와 비교하여 개미산의 농도가 2.27 mmol임을 알 수 있다. 이것은 약 39.8%의 과당은 HMF를 거쳐 levulinic acid와 개미산으로 분해되었음을 알려주는 것이다.

4. 결론

$^1\text{H-NMR}$ 분광 분석을 사용하여 과당에서 5-HMF로의 전환공정에서 일어나는 반응의 정량적인 해석이 가능하였다. 전환과정에서 반응을 하지하는 방향족 수소를 포함하는 표준물질을 첨가하여 반응물의 농도와 표준물질의 농도비를 계산하고 반응 후 반응산물과 표준물질의 농도 비율로 반응물에서 생성물로의 전환율을 계산할 수 있다. 방향족 수소 영역의 피크 확인 및 적분을 통하여 단당에서 5-HMF로의 전환에 대한 정량적으

로 확인 할 수 있다.

DMSO 용매조건에서는 HMF가 상대적으로 안정된 화합물이기 때문에 이차반응의 산물이 검출되지 않았지만 산성 수용액 조건에서는 HMF에서 levulinic acid와 개미산으로 분해가 진행된 것이 확인 되어 산성 수용액 조건에서 과당에서 5-HMF로 전환공정의 반응 조절이 더 까다로울 것으로 생각된다.

사 사

감사의 글 2012학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의해 연구되었음

인용문헌

1. Shin, S.-J., Park, J.-M., Cho, D.H., Kim, Y.H. and Cho, N.-S., Acid hydrolysis characteristics of yellow poplar for high concentration of monosaccharides production, Mokchae Konghak (Korean J. Wood Sci.) 37(6): 578-584 (2009).
2. Shin, S.-J., Yu, J.-H., Cho, N.-S., Cho, I.-G., Kim, M.-S. and Park, J.-M., Effects of aqueous ammonia soaking to chemical compositional changes and enzymatic saccharification of yellow poplar, J. Korea TAPPI 41(1):61-66 (2009).
3. Shin, S.-J., Park, J.-M., Cho, D.H., Kim, Y.H. and Cho, N.-S., Bio-ethanol production from alkali prehy-

- drolyzed yellow poplar(*Liriodendron tulipifera* L.) using enzymatic saccharification and fermentation, Jour. Korean For. Soc. 98(3): 305-310 (2009).
- Kim, T.-S., Kim, J.-Y., Oh, S., Hwang, H. and Choi, J. W., Investigation of physicochemical properties of bio-oils produced from pitch pine (*Pinus rigida*) at various temperatures, Mokchae Konghak (Korean J. Wood Sci.) 40(3): 204-211 (2012).
 - Choi, J.-W., Choi, D.-H. Cho, T.-S. and Meier, D.. Characterization of bio-oils produced by fluidized bed type pyrolysis of woody biomass, Mokchae Konghak (Korean J. Wood Sci.), 34(6): 36-43(2006).
 - Cho, D.H., Kim, Y.H., Park, J.-M., Sim, J., Kim, B.-R. and Shin, S.-J., Characteristics of xylose and glucuronic acid at concentrated sulfuric acid hydrolysis, J. Korea TAPPI 44, (3): 9-14 (2012).
 - Kuster, B.F.M., 5-Hydroxymethylfurfural(HMF). A review focussing on its manufacture, Starch 42:314-321 (1990).
 - Rosatella, A.A., Simeonov, S.P., Frade, R.F.M., and Afonso, C.A.M., 5-Hydroxymethylfurfural(HMF) as a building block platform: Biological properties, synthesis and synthetic applications, Green Chem., 13:754-793(2011).
 - Alonso, D.M., Bond, J.Q., and Dumesic, J.A., Catalytic conversion of biomass to biofuels, Green Chem., 12: 1493-1513 (2010).
 - Barclay, T., Ginic-Markovic, M., Johnson, M.R., Cooper P., and Petrovsky, N., Observation of the keto tautomer of D-fructose in D₂O using ¹H-NMR spectroscopy, Carbohydr. Res., 347:136-141 (2012).
 - Shin, S.-J., and Cho, N.-S., Conversion factors for carbohydrate analysis by hydrolysis and ¹H-NMR spectroscopy. Cellulose 15: 255-260 (2008).
 - Harvey, J.M., and Symons, M.C.R., The hydration of monosaccharides-an NMR study, J. Solution Chem., 7:571-586 (1978).
 - Amarasekara, A.S., Williams, L.D., and Ebede, C.C., Mechanism of the dehydration of D-fructose to 5-hydroxymethylfurfural in dimethylsulfoxide at 150°C: an NMR study, Carbohydr. Res. 343: 3021-3024 (2008).