SHIMADZU
Excellence in Science

Application News

高速液体クロマトグラフ　Nexera 還元糖分析システム

TEMPO酸化セルロースナノファイバーの構成糖とグルクロン酸の同時分析

周 毅婷 、森田 あずさ

ユーザーベネフィット

- ◆ TEMPO酸化セルロースナノファイバーの主要な構成糖とグルクロン酸を同時分析することができます。
- ◆ ポストカラム蛍光誘導体化法の検出により、糖類を選択的に感度よく定量することができます。

■はじめに

セルロースナノファイバー（CNF）は、木質パルプ（繊維径20–30 µm、繊維長0.5–3 mm）を機械処理することにより得られます。しかし、木質パルプ中のCNFは、CNF間に強固な水素結合を形成しているため、機械処理のみでは、結晶の最小サイズ（繊維径3–4 nm）までのナノ化が不充分であったり、CNFへのダメージが大きくなったり、ナノ化に大量のエネルギーが必要になることが課題でした。

東京大学の磯貝明特任教授らのグループにより、セルロースをTEMPO（2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical）によってナノファイバー化できることが報告され、量産化が進んでいます。アプリケーションニュース01-00023-JPではNexera™還元糖分析システムによる様々なCNFの構成糖分析例をご紹介しましたが、ここではTEMPO酸化CNFの構成糖と、TEMPO触媒によって生成されるグルクロン酸の同時分析例を紹介します。

■TEMPO酸化セルロースナノファイバー

CNFの量産化を見据えて、ナノ化に要するエネルギーを低減する手法の一つが、機械処理の前に木材パルプ中のセルロース結晶表面にイオン性官能基を導入する方法です。イオン性官能基を導入することで、CNF 間に水の浸透圧効果と静電的反発効果が得られ、水中での簡単な機械処理によりナノ化が可能となります。

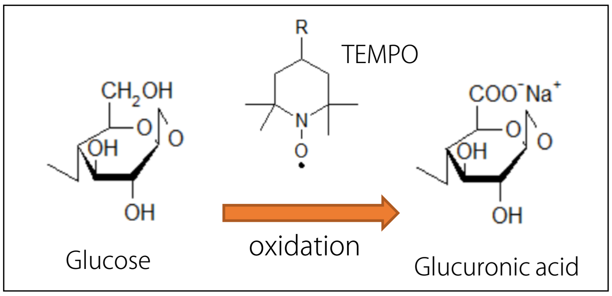

図 1 TEMPO酸化CNF

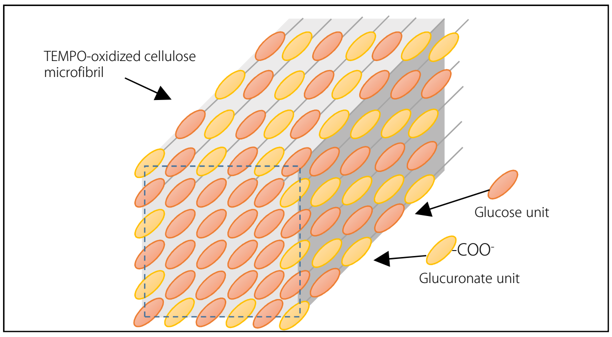

図 2 TEMPO酸化CNFの構造モデル

TEMPO酸化CNFでは、TEMPO触媒で水酸基の一部をカルボキシル化します（図1）[1]。

セルロースミクロフィブリル表面に露出している部分のみ、グルコースのC6 位の水酸基がTEMPO 触媒酸化でカルボキシル基のナトリウム塩に変換されます。その結果、均一にCNFを得ることができます(図２)[2]。

導入されるカルボキシル基の量は均質なCNFを得る上で重要と考えられます。カルボキシル基量の測定は、電気伝導度滴定やNMR測定などがあげられます[3)4)]が、本稿では構成糖と同時にグルクロン酸を分析することを検討しました。

■前処理方法

測定に用いた試料の一覧を表1に、試料を加水分解処理する手順を図3に示します。

表 1　測定試料の一覧

No.	Sample
1	Tempo oxidized CNF-1
2	Tempo oxidized CNF-2
3	Tempo oxidized cellulose

1. Freeze drying

All samples are lyophilized.

2. Primary hydrolysis

Transfer about 0.03 g of the sample to 25 mL of the test tube. 300 µL of 72 % sulfuric acid is added to the test tube. Immerse the test tube in a 30 ℃ water bath for about 1 hour. Mix with a vortex mixer or glass rod every 15 minutes to completely dissolve the sample.

3. Secondary hydrolysis

Add 8.4 mL of ultrapure water to the test tube, and mix well. The test tube is heated in an autoclave for 60 minutes at 120 ℃.

4. Neutralization

Filter through glass fiber filter paper, and dilute with 10 mL of pure water. While checking the pH with a pH test paper, a saturated aqueous solution of barium hydroxide[*1] is added, neutralized[*2], and sulfuric acid is salted out.

5. Filtration and dilution

Filter through a membrane filter with a pore size of 0.2 µm. Dilute with acetonitrile[*3].

*1：Dissolve 8 g of barium hydroxide octahydrate in 100 mL of ultrapure water.
*2,*3： The ratio and magnification vary depending on the sample. See Table 2.

図 3　前処理方法

試料により中和条件や糖の濃度が異なるため、表２に各試料の条件を示します。また、試料溶媒がピーク形状に与える影響を考慮し、希釈溶媒にアセトニトリルを用いました。

表2　前処理における中和条件

Sample.	Sample: saturated aqueous barium hydroxide solution (v/v)	pH	Dilution ratio
1	600:300	3	4
2	600:300	5	4
3	500:500	3	8

■分析条件

加水分解処理した試料を測定した分析条件を表3に示します。分離カラムには、アミノ基を修飾したポリマー系カラムであるAsahipak NH2P-50を用いました。アミノ基修飾カラムは、シッフ塩基の形成による副次的な相互作用により、アラビノースやマンノースの吸着が生じ、ピーク強度が得られないという問題があります。そこでシッフ塩基の吸着抑制のために、りん酸を添加した移動相を用いました。この条件を用い、糖類標準溶液を測定したクロマトグラムを図4に示します。

表３　分析条件

System	: Nexera Reducing Sugar Analysis System
<Separation>	
Column	: Asahipak NH2P-50 4E（250 mm × 4.6 mmI.D., 5 µm）
Guard column	: Asahipak NH2P-50G 4A（10 mm × 4.6 mmI.D., 5 µm）
Mobile phase A	: Water / 85 % Phosphoric acid = 1000 : 3 (v:v)
Mobile phase B	: Acetonitrile / 85 % Phosphoric acid = 1000 : 3(v:v)
Flow rate	: 0.8 mL/min
Time program	: B Conc. 90 %(0 min)-87 %(30 min)- 80 %(40 min)- 75 %(55.01-65 min)- 90 %(65.01-100 min)
Gradient mixer capacity	: 1.7 mL
Column temp.	: 35 ℃
Injection vol.	: 10 µL
Vial	: Shimadzu Vials, LC, 1.5 mL Clear Glass *4
<Post-column reaction>	
First reaction	
Reagent	: Mixed aqueous solution of 5 g/L arginine, 0.4 mol/L borate and 0.2 mol/L potassium hydroxide
Flow rate	: 0.5 mL/min
Reaction temp.	: 150 ℃
Detection	: Spectrofluorometric detector RF-20Axs (Standard Cell) Ex 320 nm Em 430 nm
Cell temp.	: 25 ℃
Reaction coil	: SUS tubing, 8 m×0.5 mm i.d.

*4 P/N：227-34001-01

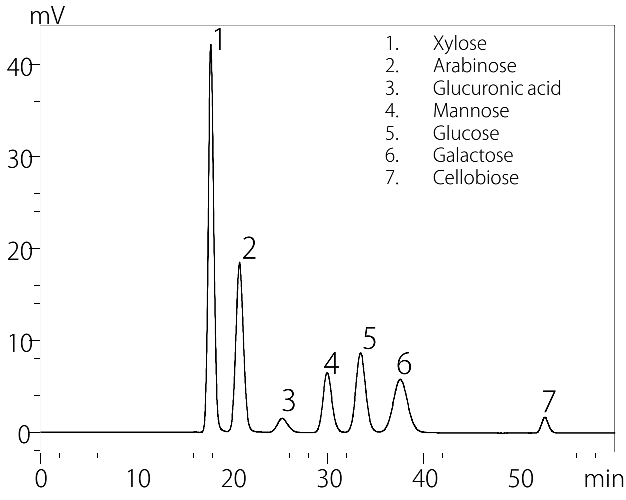

図４　標準溶液のクロマトグラム(各500 µmol/L)

■検量線の直線性

標準溶液の分析結果から作成した検量線を図5に示します。検量線の範囲は10-1000 µmol/Lとしました。いずれの糖も、寄与率 r^2=0.9999 以上の良好な直線性が確認されました。

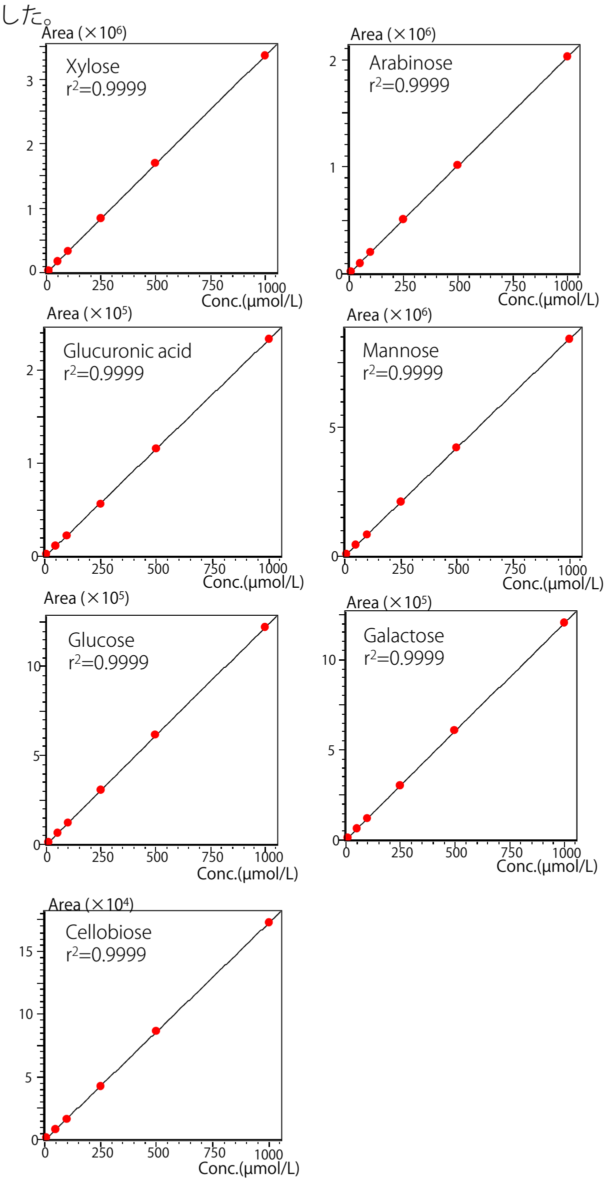

図５　各化合物の検量線

■TEMPO酸化CNFの測定

各試料を図3に従って前処理し、Nexera還元糖分析システムで分析した際のクロマトグラムを図6~8に示します。ポストカラム誘導体化反応により、糖類を選択的に感度よく検出することができました。

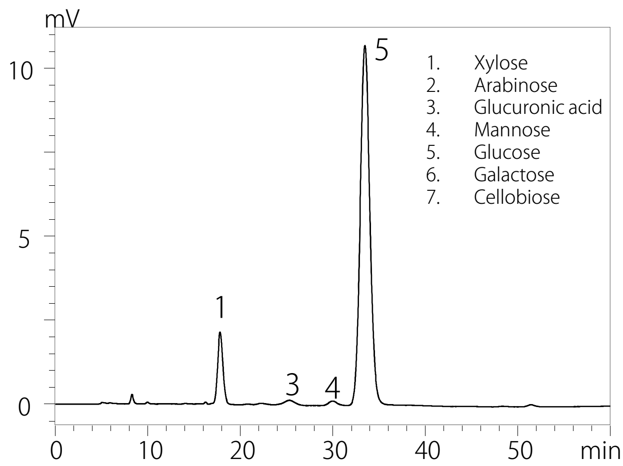

図６　Sample No.1のクロマトグラム

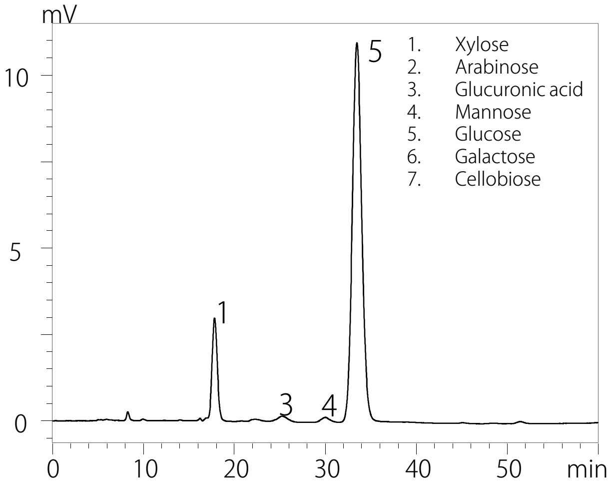

図7　Sample No.2のクロマトグラム

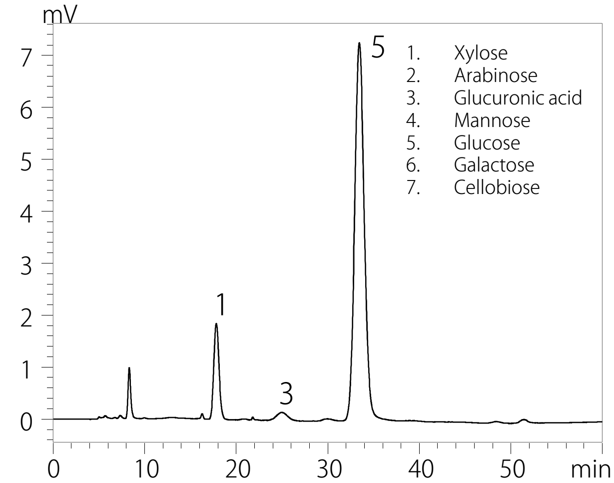

図8　Sample No.3のクロマトグラム

■構成糖の比率

検出された糖類の定量値から、アプリケーションニュース01-00023-JPと同様に回収率試験及び過分解補正と多糖換算を行いました。積算値を100としたときの各糖およびグルクロン酸の構成比を図9に示します。TEMPO触媒により生じたグルクロン酸が検出されていることが分かります。

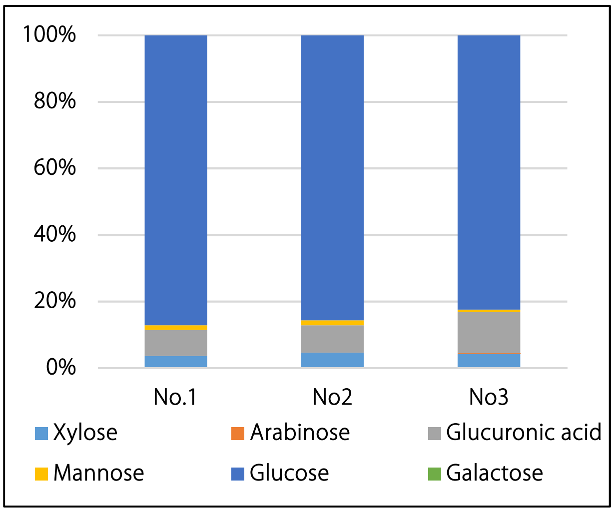

図9　各試料の糖およびグルクロン酸の構成比率

■分析終了時の注意点

本稿の分析条件では、移動相に有機溶媒を、反応液に高濃度の塩を含む水溶液を用いています。分析後すぐに送液を止めると、塩析出による配管の詰まりなどのトラブルの原因となります。本分析における終了手順を下記に記します。

1. 分析終了後、化学反応槽のヒーターを切ります。100 ℃以下に槽内温度が下がるまでは分析時の流量のまま移動相と反応液の送液を続けます。
2. 化学反応槽の温度が下がったら、移動相、反応液ともに流量を0.2 mL/minに変更し、室温まで冷やします。
3. カラム冷却後、速やかにカラムを取り外します。移動相と反応液を超純水に変更します。流量1 mL/minで15分程度送液し、流路全体を超純水で洗浄します。
4. 長期間（1か月以上）使用しない場合は、更にメタノールかエタノールでカラムを除く全流路を置換します。

■まとめ

Nexera還元糖分析システムで、TEMPO酸化CNFを加水分解処理した糖類を測定することにより、構成糖の比率を把握することができました。TEMPO触媒によって生成するグルクロン酸も同時に分析することができました。

＜謝辞＞
東京大学 磯貝明特別教授・齋藤継之准教授・藤澤秀次助教より、本分析方法の開発や試料提供や様々なアドバイスをいただきました。厚く御礼申し上げます。

参考文献
1) T. Saito, Y. Nishiyama, J.-L. Putaux, M. Vignonn, A. Isogai, Biomacromolecules, 2006, 7 (6), 1687-1691.
2) A. Isogai, The Society of Polymer Science, Japan, vol 58, Feb, 2009
3) Tamura N,. Wada, M., & Isogai, A.(2009). TEMPO-mediated oxidation of (1→3)- β -glucans. Carbohydrate Polymers, 77, 300-305
4) Saito, T., & Isogai, A.(2004). TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. The Effect of Oxidation Conditions on Chemical and Crystal Structures of the Water-Insoluble Fractions, Biomacromolecules, 5, 1983-1989

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
グローバルアプリケーション開発センター
01-00024-JP　初版発行：2021年 3月
島津コールセンター 0120-131691

> アンケート

関連製品

一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

> Nexera還元糖分析システム

関連分野

> 工業材料・マテリアル

> 価格お問い合わせ

> 製品お問い合わせ

> 技術お問い合わせ

> その他お問い合わせ