

## 同时分析 TEMPO 氧化纤维素纳米纤维的成分糖和葡萄糖醛酸

01-00022-CN

周 毅婷、森田 Azusa

### 对用户的好处

- ◆ 可同时分析 TEMPO 氧化纤维素纳米纤维的主要成分糖和葡萄糖醛酸。
- ◆ 利用柱后荧光衍生化法进行检测，可以高灵敏度选择性定量糖类。

### 简介

纤维素纳米纤维 (CNF) 通过机械处理木质纸浆 (纤维直径 20–30 μm、纤维长度 0.5–3 mm) 获得。但是，木质纸浆中的 CNF 与 CNF 之间形成氢键，因此，在结晶最小尺寸 (纤维直径 3–4 nm) 时，仅通过机械处理可能导致纳米化无法充分达到，或对 CNF 的损伤变大，需要更大能量进行纳米化，这些都是存在的问题。

据报告，东京大学矶贝明主任教授等组成的团队利用 TEMPO (2,2,6,6-四甲基哌啶-1-氧基) 实现了纤维素的纳米纤维化，正在进行量产。应用新闻 01-00023-JP 曾向您介绍了利用 Nexera™ 还原糖分析系统分析各种 CNF 成分糖的案例，本文将向您介绍同时分析 TEMPO 氧化 CNF 的成分糖和利用 TEMPO 催化生成的葡萄糖醛酸的案例。

### TEMPO 氧化纤维素纳米纤维

纵观 CNF 的量产化，降低纳米化所需能量的其中一个方法是在机械处理前将离子性官能团导入木材纸浆中的纳米纤维晶体表面。通过导入离子性官能团，在 CNF 之间获得水的渗透压效应和静电排斥效应，通过水中的简单机械处理可实现纳米化。

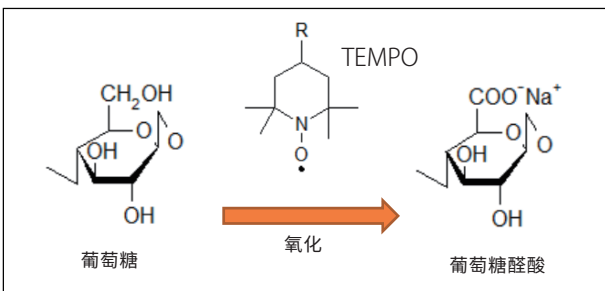


图 1 TEMPO 氧化 CNF

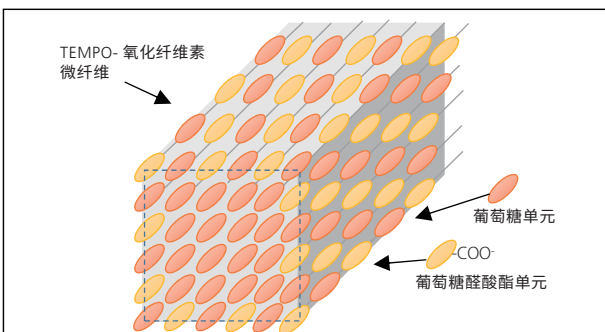


图 2 TEMPO 氧化 CNF 的结构模型

在 TEMPO 氧化 CNF 中，使用 TEMPO 催化剂将部分羟基进行羧基化 (图 1)<sup>1)</sup>。

仅纤维素微纤维表面露出的部分、葡萄糖的 C6 位羟基通过 TEMPO 催化氧化转化为羧基的钠盐。结果可均匀地获得 CNF (图 2)<sup>2)</sup>。

导入的羧基量对于获得均质 CNF 很重要。羧基量的测定包括电导滴定或 NMR 测定等<sup>3,4)</sup>，本文探讨了同时分析成分糖和葡萄糖醛酸。

### 前处理方法

测定所用样品如表 1 所示，加水分解处理样品的步骤如图 3 所示。

表 1 测定样品

序号	样品
1	Tempo 氧化 CNF-1
2	Tempo 氧化 CNF-2
3	Tempo 氧化纤维素

#### 1. 冻干

所有样品均已冻干。

#### 2. 一级水解

将约 0.03g 的样品转移到 25 mL 的试管中。将 300 μL 的 72% 硫酸加入试管中。将试管浸入 30°C 水浴中约 1 小时。每 15 分钟用涡旋混合器或玻璃棒混合，使样品完全溶解。

#### 3. 二级水解

将 8.4 mL 超纯水加入试管中，并混匀。将试管在 120°C 的高压灭菌器中加热 60 分钟。

#### 4. 中和

用玻璃纤维滤纸过滤，用 10mL 纯水稀释。用 pH 试纸检查 pH 值时，加入饱和的氢氧化钡水溶液<sup>\*1</sup>，中和<sup>\*2</sup>，并盐析出硫酸。

#### 5. 过滤和稀释

用孔径为 0.2 μm 的膜过滤器进行过滤。用乙腈<sup>\*3</sup>进行稀释。

\*1: 将 8 g 八水氢氧化钡溶解在 100 mL 的超纯水中。

\*2, \*3: 比率和放大倍数因样品而异。见表 2。

图 3 前处理方法

不同样品的中和条件和糖的浓度不同, 各样品的条件如表 2 所示。此外, 考虑到样品溶剂对于峰形的影响, 采用乙腈作为稀释溶剂。

表 2 预处理的中和条件

样品	样品: 饱和氢氧化钡水溶液 (v/v)	pH	稀释比
1	600:300	3	4
2	600:300	5	4
3	500:500	3	8

## 分析条件

测定水解处理后样品的分析条件如表 3 所示。分离色谱柱采用氨基修饰的聚合物类色谱柱 Asahipak NH2P-50。氨基修饰色谱柱因形成席夫碱类引起的二次相互作用, 发生阿拉伯糖和甘露糖的吸附, 存在无法获得峰强度的问题。因此, 为抑制席夫碱类的吸附, 采用了添加磷酸的流动相。使用该条件测定糖类标准溶液的色谱图如图 4 所示。

表 3 分析条件

系统	: Nexera 还原糖分析系统
< 分离 >	
色谱柱	: Asahipak NH2P-50 4E (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
保护柱	: Asahipak NH2P-50G 4A (10 mm × 4.6 mm I.D., 5 μm)
流动相 A	: 水 / 85% 磷酸 = 1000: 3 (v:v)
流动相 B	: 乙腈 / 85% 的磷酸 = 1000: 3 (v:v)
流速	: 0.8 mL/min
时间程序	: B 浓度 90% (0 min) - 87% (30 min) - 80% (40 min) - 75% (55.01-65 min) - 90% (65.01-100 min)
梯度混合	: 1.7 mL
器容量	
柱温	: 35 °C
进样量	: 10 μL
样品瓶	: 岛津样品瓶, LC, 1.5 mL 透明玻璃 *4
< 柱后反应 >	
第一反应	: 5 g/L 精氨酸、0.4 mol/L 硼酸盐和 0.2 mol/L 氢氧化钾的混合水溶液
流速	: 0.5 mL/min
反应温度	: 150 °C
检测	: 荧光检测器 RF-20Axs (标准池) Ex 320 nm Em 430 nm
池温度	: 25 °C
反应线圈	: SUS 管, 8 m × 0.5 mm i.d.

\*4 P/N: 227-34001-01

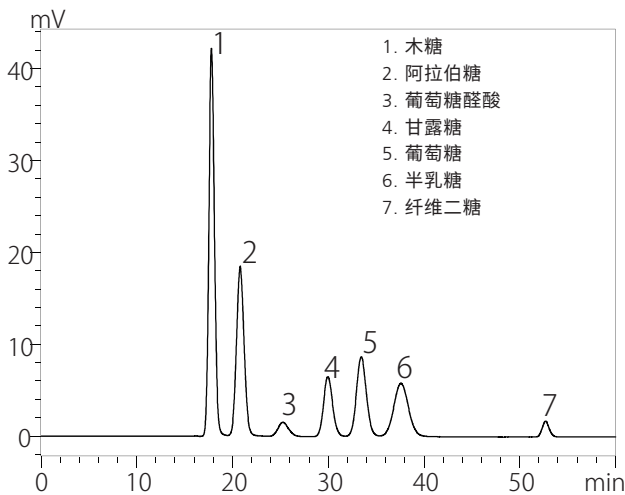


图 4 标准溶液的色谱图 (各 500 μmol/L)

## 标准曲线的线性

根据标准溶液的分析结果创建的标准曲线如图 5 所示。标准曲线的范围为 10-1000 μmol/L。所有糖均得到了判定系数  $r^2=0.9999$  以上的良好线性。

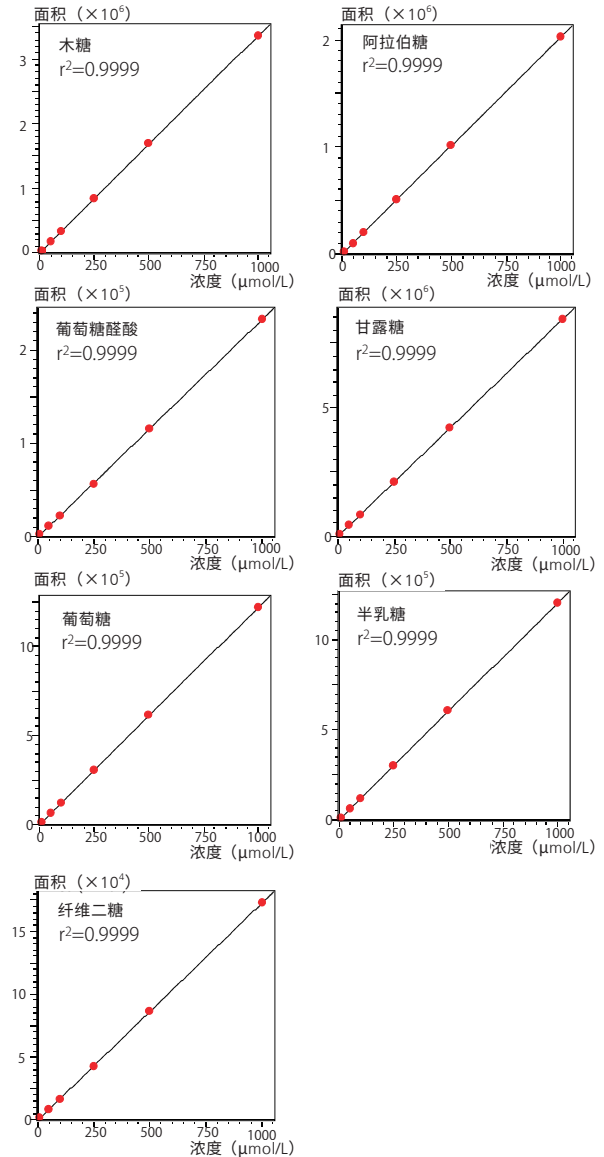


图 5 各化合物的标准曲线

## TEMPO 氧化 CNF 的测定

按照图 3 对各样品进行预处理, 利用 Nexera 还原糖分析系统分析时的色谱图如图 6~8 所示。利用柱后荧光衍生化反应, 可以高灵敏度选择性检测糖类。

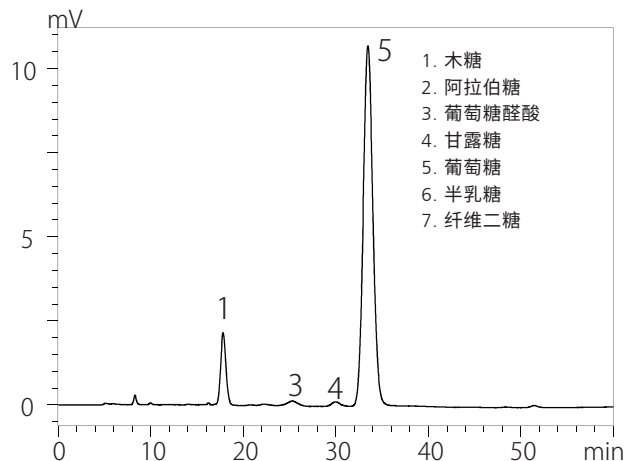


图 6 样品 1 的色谱图

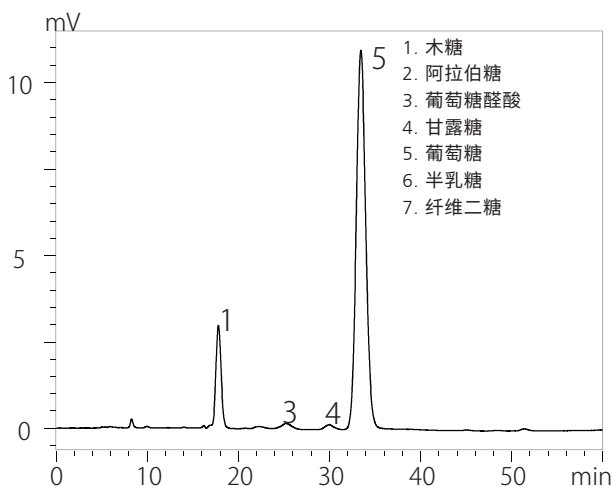


图 7 样品 2 的色谱图

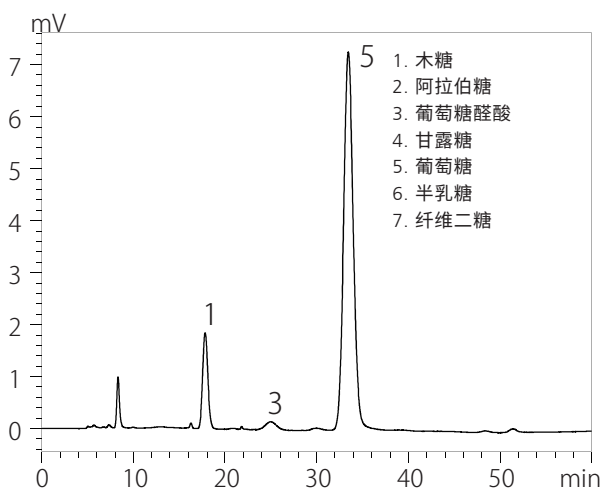
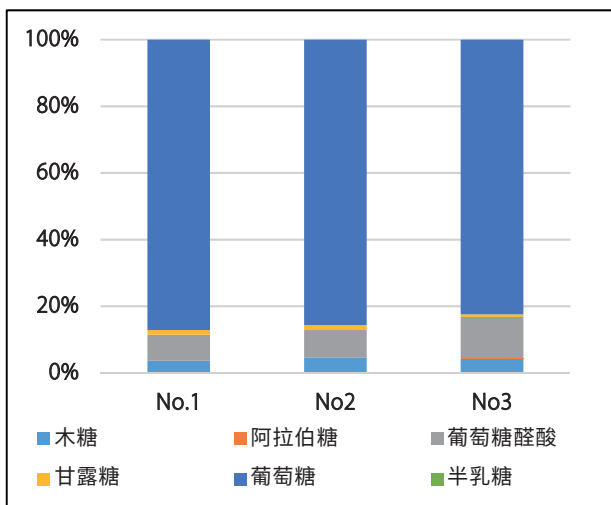


图 8 样品 3 的色谱图

## 成分糖的比率

根据已检测糖类的定量值，按照与应用新闻 01-00023-JP 相同的方法，进行回收率试验、过分解校正和多糖换算。累计值为 100 时的各糖及葡萄糖醛酸的构成比如图 9 所示。可以看出已检测出由 TEMPO 催化生成的葡萄糖醛酸。



## 分析结束时的注意事项

在本文的分析条件下，采用有机溶剂作为流动相，采用含高浓度盐的水溶液作为反应液。若在分析后立即停止供液，会导致因盐析出引起的管路堵塞等问题。本分析的结束步骤如下所示。

1. 分析结束后，关闭化学反应槽的加热器。保持分析时的流量，继续供应流动相和反应液，直至槽内温度降至 100°C 以下。
2. 化学反应槽的温度下降后，将流动相、反应液的流量同时变更为 0.2 mL/min，冷却至室温。
3. 色谱柱冷却后，立即拆下色谱柱。将流动相和反应液变更为超纯水。以 1 mL/min 的流量供应 15 分钟左右，使用超纯水清洗整体流路。
4. 长时间（1 个月以上）未使用时，使用甲醇或乙醇替换除色谱柱之外的整体流路。

## 结论

利用 Nexera 还原糖分析系统，通过测定经水解处理的 TEMPO 氧化 CNF 的糖类，掌握了成分糖的比率。同时分析了由 TEMPO 催化生成的葡萄糖醛酸。

### <致谢>

东京大学矶贝明教授、斋藤继之副教授、藤泽秀次助教为本分析方法的开发和样品提供等提供了很多建议。在此致以最诚挚的感谢。

### <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

岛津应用云



Nexera 是岛津制作所株式会社在日本及其他国家的商标。Asahipak 是昭和电工株式会社的注册商标。



岛津企业管理（中国）有限公司  
岛津（香港）有限公司

<http://www.shimadzu.com.cn>

用户服务热线电话：800-810-0439  
400-650-0439

免责声明：

\* 本资料未经许可不得擅自修改、转载、销售；  
\* 本资料中的所有信息仅供参考，不予任何保证。  
如有变动，恕不另行通知。

第一版发行日：2021 年 3 月