

## 工業リグニンスルホン酸解析のための有望なツールとしての AF4-MALS

Irina Sulaeva, Ute Henniges, Thomas Rosenau, Antje Potthast  
University of Natural Resources and Life Science, Vienna, Austria

### 概要

リグニンは有望な商業的可能性のある再生可能な物質です。リグニンは一般的な化学パルプ生産過程の副産物として容易に入手可能な安価な出発物質で、種々の物質の生産において化石由来の天然物質に代わり得ます。リグニンを付加価値の高い産物に変換することは巨大な経済効果を約束するものです。

現在、多くの研究所が工業会社と共同でリグニンの応用過程の評価を行っています。新しい生産戦略と共に、適正な分析過程の必要性が急速に上昇しています。

標準的なリグニンの解析は種々の低分子不純物が混入しているために困難となります。そのため、リグニンの解析のための汎用性のある簡易な方法の探索に興味が集まっています。本研究では、AF4-MALSを用いた工業リグニンスルホン酸の分子量測定の新規の方法を提示します。この方法では、試料の人手やコストのかかる精製ステップは不要で、工場現場に即座に容易に簡単に導入することができます。AF4-MALSは短時間で信頼性のあるデータを提供するので、経済的な観点からも大変魅力的です。

### 序論

パルプ及び製紙工業ではリグニンからセルロースを分離するために種々の化学的方法を用います。その結果、異なる性質を持った大量の副産物が生成します。分離精製の過程には使用した工業液からリグニンを取り除く過程が含まれます。リグニンを化学変化によって他の生成物に変換することは、特に通常の燃料に変換することに比べて大きな経済的見通

しがあります。全生成物の価値は 0.18 US \$/kg から 1.08 US \$/kg に増加すると期待されます[1]。

亜硫酸パルプ化の際に生じるリグニンスルホン酸 (LS) は、全リグニン生産量の 10 %に過ぎませんが、付加価値のある産物としては最も広く利用されているものです[2]。商業的な応用の広いスペクトルは構造的特徴に由来します。特に、硫酸基が存在するために水溶性であることが保証されることで、これは特異なコロイドの性質にも関わっています[3]。



写真: [https://en.wikipedia.org/wiki/Black\\_liquor](https://en.wikipedia.org/wiki/Black_liquor)

LS の機能的特性は分子量と密接に関わっているので、迅速かつ正確に分子量解析を行うことが非常に重要になります。ゲルろ過クロマトグラフィー (GPC) は高分子の分子量測定のための伝統的な方法です。しかし、亜硫酸パルプ廃液 (SSL) 中の無機塩や糖単量体や糖オリゴマーおよびフェノール抽出物などの低分子量有機不純物は GPC カラムを劣化させる大きなリスクを負っています。

これらの化合物の全体に対する割合は場合によりますが、通常全 SSL 重量当たり 50 %程度です[4, 5]。

したがって、GPC による解析には、解析に先立って大量で高コストの LS 精製が必要となります。これらの不純物の限外ろ過や吸着法による除去によって GPC による試料の解析は可能ですが、これらのプロセスは機器、エネルギー、時間の観点から高価なものとなります。

非対称フロー・フィールドフローフラクショネーション (AF4) に多角度光散乱 (MALS) を連結した系は、精製と分析的分離を組み合わせたもので、従来の LS 解析に替わる方法を提供します。本研究では LS の分子量解析のための新たなアプローチとして AF4-MALS を検討しました。チャンネル中の分離は、問題となるカラムの固定相との相互作用の危険性を最小化し、その結果、大変簡便化された試料調製過程を可能にし、工業における研究室への直接導入を容易にしました。

## 材料と方法

リグニンスルホン酸試料は、市販のパルプ調製過程の未精製液体の形で提携の会社から受領しました。AF4 は、脱気装置、送液ポンプ、オートサンプラーを付属した [Wyatt Technology Eclipse® AF4 分離システム](#) を、検出器には UV 検出器 (280 nm)、偶数番号の全ての検出器に干渉フィルターを装着した [Wyatt Technology DAWN HELEOS 多角度光散乱検出器](#) ( $\lambda = 658$  nm レーザー)、および [Wyatt Optilab T-rEX RI 示差屈折率検出器](#) を、分離には AF4 ロングチャンネル (275 mm) に 350  $\mu\text{m}$  のスペーサーと 5 kDa の再生セルロース膜を取り付けて行いました。移動相には 0.1 M  $\text{NaNO}_3$  (+250 ppm  $\text{NaN}_3$ ) を用いました。

十分な分離を保証するために、クロスフローを 20 分かけて 4 mL/min から 0.1 mL/min に減少させ、続いて 0.1 mL/min で 10 分のチャンネル洗浄のクロスフローを行いました。クロスフローなしで 5 分間洗浄を行い、チャンネルから試料を完全に溶出させました。他のシステムパラメーターは以下の通りです：1 mL/min のディテクターフロー、0.2 mL/min のインジェクションフロー、5 分間のフォーカシング (2 分間のインジェクションを含む)、測定時間の総計は 55 分です。データの評価は ASTRA®ソフトウェア (Wyatt Technology) によって行いました。

## 結果と考察

LS (リグニンスルホン酸) のインライン精製には図 1 に示すように、AF4 分離チャンネルを用いました。まず、溶媒をチャンネルの両端から送液し、フォーカシング作業を行いました。試料のフォーカシング作業と同時に、塩や糖のような低分子量不純物は 5 kDa カットオフのメンブレンを通して除去しました。次に検出器方向に送液を行うことで試料を溶出しました。その際、試料はクロスフローおよび放物線状のチャンネルフローの流れを利用し、自らの拡散性の違いにより、出口に向かって流れる間に大きさによって分離されます。

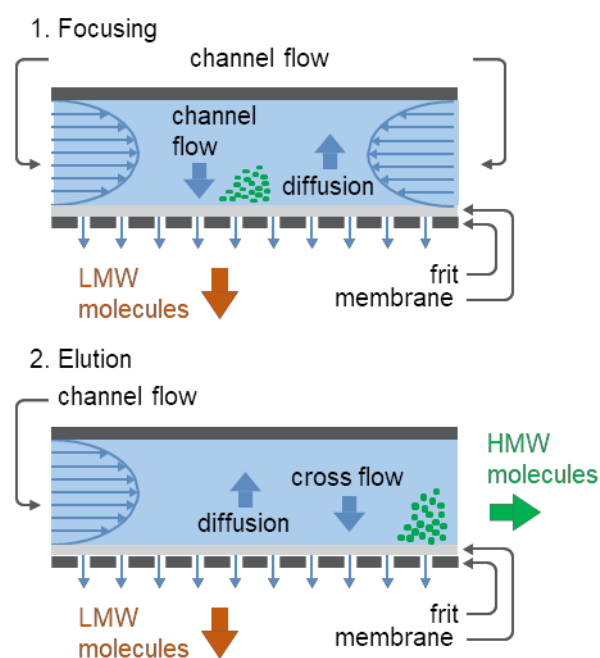


図 1. 粗製リグニンスルホン酸の AF4 による分離においては、塩や糖のような低分子量分子は膜を通してフォーカシングステップ (上図) で除去され、高分子量分子 (リグニンスルホン酸) は大きさによって分離されて、UV、MALS、RI に向かって溶出されます (下図)。

未精製の工業 LS のピーク分離例を図 2 に示します。主成分のリグニンスルホン酸を無機分子及び低分子夾雑物から分離することに成功しています。低分子夾雑物は膜を通過し、AF4 チャンネルを通過することによって溶液から取り除かれています。

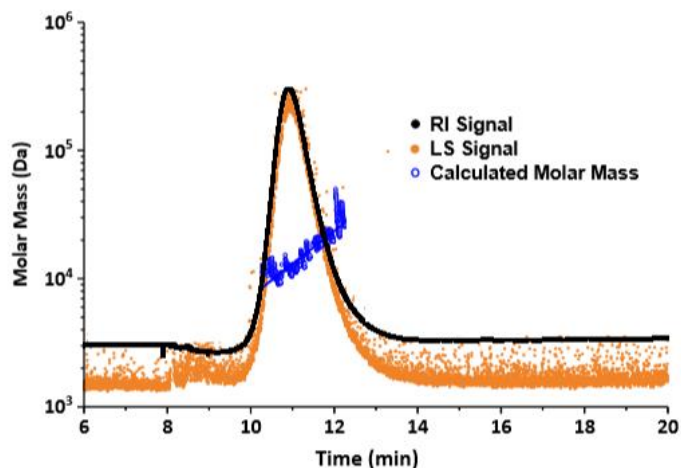


図 2. AF4-MALS によって得られた工業リグニンスルホン酸 (LS) の溶出分画。分子量の値 (青) は各溶出容積につき MALS-RI 解析によって計算されたもの。

### 蛍光の取り扱い

リグニンは蛍光を持つことが知られており、それによって光散乱の測定が影響を受けて、分子量の値が過大評価される可能性があります[6]。しかし、MALS 検出器に装着された干渉フィルターは蛍光を十分に除去し、散乱光の光子はリグニンスルホン酸の信頼できる分子量値を与えます[7, 8]。測定される散乱光中の蛍光光子を除去するために、偶数番の検出器には干渉フィルターが装着されています。

奇数番の検出器 (フィルターなし) は蛍光フィルターを持つフォトダイオードの値と比較するために用いました。Zimm プロットによるデータの比較から明らかな違いが見られません (図 3)。予想通り、フィルターを用いない場合、フィルターを装着した

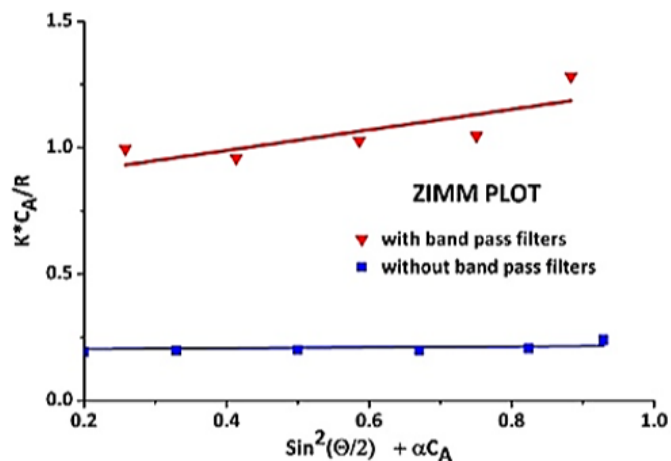


図 3. フィルターを用いた場合と用いない場合の Zimm プロットの比較。

場合よりも散乱光強度が大きくなり、従って分子量は常に大きな値を与えます。

### 分子量分布

図 4 に工業 LS の分子量分布の一例を示します。得られた平滑な分布には低分子の不純物は見当たらず、分離段階での試料の効率的な精製を示しています。

以前は、工業 LS の単離された画分につき、従来法及びユニバーサルキャリブレーション法[9]を用いた GPC、ならびに光散乱法[7]によって分子量分布を検討しました。これらの方法によって得られた分布の値は AF4 と光散乱によって得られた値とよく一致しています。

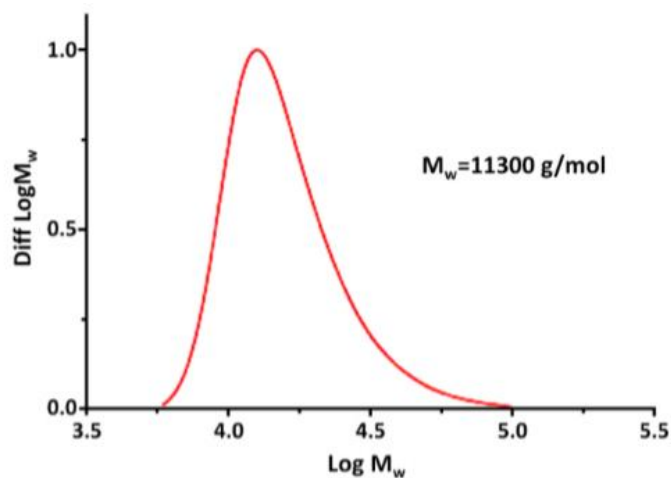


図 4. AF4-MALS によって得られたリグニンスルホン酸の分子量分布。低分子量の不純物は全く見られません。

### 結論

本アプリケーションノートでは、水溶性リグニンスルホン酸 (LS) の分子量を AF4-MALS によって解析する新しいアプローチについて紹介しました。この方法では、未精製の工業サンプルを直接注入することが可能で、LS の分子量についての正確で精密な分子量分布が決定できます。正確な光散乱測定を保證するために蛍光フィルターを用いました。

AF4-MALS は標準的な GPC 解析に替わる有望な代替法です。AF4-MALS は、リグニンスルホン酸の GPC による時間と手間のかかる試料調製を不要にする単純で迅速な方法です。この方法は容易に生産現場に導入できるもので、解析全体に要するコスト削減の大



きな可能性を秘めています。

## 文献

1. Vishtal, A. and A. Kraslawski, Challenges in industrial applications of technical lignins. *Bioresources*, 2011. 6(3): p. 3547-3568.
2. Lauten, R.A., B.O. Myrvold, and S.A. Gundersen, New Developments in the Commercial Utilization of Lignosulfonates, in *Surfactants from Renewable Resources* 2010, John Wiley & Sons, Ltd. p. 269-283.
3. Lora, J., Chapter 10 - Industrial Commercial Lignins: Sources, Properties and Applications, in *Monomers, Polymers and Composites from Renewable Resources*, M.N.B. Gandini, Editor 2008, Elsevier: Amsterdam. p. 225-241.
4. Marques, A.P., et al., Chemical Composition of Spent Liquors from Acidic Magnesium-Based Sulphite Pulping of Eucalyptus globulus. *J. Wood Chem. and Tech.*, 2009. 29(4): p. 322-336.
5. Mika, M. and N. Marianne, Utilization of Membrane

Processes in Treating Various Effluents Generated in Pulp and Paper Industry, in *Handbook of Membrane Separations* 2008, CRC Press. p. 981-1006.

6. Albinsson, B., et al., The origin of lignin fluorescence. *J. Mol. Struct.*, 1999. 508(1-3): p. 19- 27.
7. Fredheim, G.E., S.M. Braaten, and B.E. Christensen, Molecular weight determination of lignosulfonates by size-exclusion chromatography and multi-angle laser light scattering. *J. Chromatography. A*, 2002. 942(1-2): p. 191-199.
8. Sulaeva, I., et al., Molar Mass Characterization of Crude Lignosulfonates by Asymmetric Flow Field-Flow Fractionation. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, DOI: 10.1021/acssuschemeng.8b02856
9. Ringena, O., et al., Size-exclusion chromatography of technical lignins in dimethyl sulfoxide/water and dimethylacetamide. *J. Chromatography A*, 2006. 1102(1-2): p. 154-163.

