

# 산성 수용액 조건에서 포도당과 자일로스의 반응 산물의 $^1\text{H-NMR}$ 분광분석을 이용한 정량 분석\*<sup>1</sup>

신수정\*<sup>2</sup>

## Quantitative Analysis of Reaction Products from Glucose and Xylose in Acidic Aqueous Medium by $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopic Method\*<sup>1</sup>

Soo-Jeong Shin\*<sup>2</sup>

### 요 약

진한 산 가수분해 반응 중 2차 가수분해 조건에서 포도당과 자일로스의 반응을 수소 핵자기 공명 분광분석을 통하여 정량적으로 분석하였다. 정량분석은 아노머성 수소, 퓨란과 개미산의 특징적인 피크를 이용하여 실시하였다. 진한 산 가수분해의 2차 가수분해 조건에서 포도당의 일부가 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) 중간 구조를 거쳐 levulinic acid와 개미산으로 분해되었음을 확인하였다. 자일로스는 furfural 중간 구조를 거쳐 개미산으로 분해가 되었으며, 포도당은 자일로스보다 2차 가수분해 조건에서 산에 의한 퓨란계 화합물의 전이가 느리게 전환되어 단당의 안정성이 높았다. 퓨란계 화합물로 전환된 이후, 산에 민감한 5-HMF는 쉽게 formic acid와 levulinic acid로 전환되었지만, furfural은 formic acid로의 분해 반응이 더디게 진행되어 furfural의 농도가 5-HMF보다 상대적으로 높게 나타났다.

### ABSTRACT

Reaction of glucose and xylose to secondary hydrolysis of concentrated acid hydrolysis was quantitatively analyzed by  $^1\text{H-NMR}$  spectroscopic method. Anomeric hydrogen, furan and formic acid peaks were selected for quantitative analysis. The glucose was converted to the formic acid and the levulinic acid via the 5-hydroxymethylfurfural (HMF) but the xylose was converted to the

\*<sup>1</sup> 접수 2012년 12월 15일, 채택 2013년 7월 29일

\*<sup>2</sup> 충북대학교 목재·종이과학과, Department of Wood and Paper Science, Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

† 교신저자(corresponding author) : 신수정(e-mail: soojshin@cbnu.ac.kr)

fufural, which further degraded to the formic acid. The conversion to furans was slower for the glucose than the xylose. But the 5-HMF formed from the glucose was unstable in acidic aqueous medium, resulted in fast conversion to the levulinic acid and the formic acid. The furfural was relatively stable than 5-HMF at acidic aqueous medium.

**Keywords:** glucose, 5-hydroxymethylfurfural, NMR, formic acid, levulinic acid, xylose, furfural

## 1. 서 론

셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 리그닌으로 구성된 목질계 바이오매스는 지구상에서 에너지를 축적하는 중요한 당당의 공급원이다. 광합성에 의하여 만들어진 포도당은 탈수 축합되어 셀룰로오스를 만들거나, 이성질화 효소에 의하여 mannose나 galactose로 전환 축합되어 galactoglucomannan이라는 헤미셀룰로오스를 생성한다. 또 포도당은 산화 반응과 탈탄산 반응을 거쳐 5탄당으로 전환되어 자이란을 생성하기도 한다. 이런 다당류로 구성된 목질계 바이오매스의 화학적 조성이나 알칼리 펄핑 특성을 예측하기 위해서는 당당 조성의 간편한 정량적인 방법이 필요하다.

다당류에서 전환된 당은 환원당 정량법에 의하여 분석되어 왔지만(Smith and Montgomery, 1956), 단당류뿐만 아니라 환원성 말단기를 갖는 모든 당이 정량되는 단점을 갖고 있다. 이후에는 크로마토그래피 방법이 발달함에 따라 당 분석에도 응용되었다. 이 방법은 단당류를 휘발성이 높은 유도체로 만드는 것으로, 기체 크로마토그래피에 의한 단당 조성 분석법과 액체 크로마토그래피에 의한 단당 분석 방법이 있다. 하지만 크로마토그래피법은 기체의 경우 휘발성 유도체로 전환시키는 단계가 필수적이며(Crowell and Burnett, 1967; Bochart and Piper, 1970), 액체의 경우 단당류 분석에 필요한 시간이 긴 단점을 가지고 있다(Davis, 1998). 최근 중수를 용매로 사용하고, 수소 핵자기 공명법에 의하여 단당류의 조성을 분석할 수 있는 방법이 개발되었고, 현재 널리 사용되고 있다(Kiemle *et al.*, 2004; Shin and Cho, 2008).

NMR 분광분석에 의한 당 조성 분석은 고가의 장

비를 필요로 하지만, 가스크로마토그래피가 갖는 유도화 단계가 필요하지 않고, 액체크로마토그래피가 갖는 긴 분석 시간과 분석 중간 컬럼에 흡착되어 있는 오염 물질을 제거하는 공정이 필요하지 않다. 또 기체나 액체 크로마토그래피를 이용하기 위해서는 산 당화액을 중화시키는 공정이 필수적인데, NMR 분광분석법은 산성 상태에서 분석하기 때문에 이 단계를 생략하여 실험 시간을 단축할 수 있다.

단당이 산성 조건에서 반응하여 만들어진 퓨란계 화합물은 산성 조건에서 불안정하여 물과 산에 의하여 절단 반응이 일어나거나 다른 알코올 구조와 축합하여 다른 화합물로 전환된다(McKibbins *et al.*, 1962). 지금까지 퓨란계 화합물과 개미산은 바이오매스 기반 알코올 생산 공정에서 발효 저해 물질로 작용하기 때문에 당화액 내 이런 성분들을 액체크로마토그래피를 사용하여 정량적으로 분석하여 왔다(Cho *et al.*, 2011).

본 연구에서는 단당 조성 분석에서 알려진 바와 같은 액체 크로마토그래피의 단점을 개선하고, 보다 간편한 분석 방법을 적용하고자, NMR 분광 분석을 이용한 정량적 분석 방법의 개발을 시도하였다. 또한 산성 반응 매질에서 2차 반응에 의하여 생성되는 퓨란계 화합물과 개미산의 정량적 분석도 동시에 진행할 수 있는 정량적 방법의 개발을 시도하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

포도당과 자일로스를 공시재료 단당으로 사용하였고, 단당의 산성 조건 반응 후, 정량적인 분석을 위한 내부 표준 물질로 L-rhamnose를 사용하였다.

Table 1. Analytical conditions for NMR spectroscopy

$^1\text{H-NMR}$	
Model	Brucker, AVACE NMR spectrometer (500 MHz)
Solvent	$\text{D}_2\text{O}$
Pulse	11 $\mu\text{sec}$
Delay between pulse	10 s
Acquisition time	273 s
Sweep width	10 ppm
Center of spectrum	45 ppm
Temperature	295.6 K

3종의 단당은 Sigma-Aldrich사의 시약등급을 구입하여 사용하였다. 황산도 시약등급을 사용하였고, 이차 증류수를 사용하여 72% (24.0 N) 황산을 제조하였다. 2차 가수분해의 회석을 위하여, 사용한 중수( $\text{D}_2\text{O}$ , deuterium oxide)는 Cambridge Isotope Laboratories, Inc사의 순도 99.9%를 사용하였다.

## 2.2. 실험 방법

### 2.2.1. 산 가수분해

72% 황산(24.0 N) 0.4 ml과 단당(포도당 또는 자일로스, 건조 중량 70.0 mg)을 섞은 후, 2차 가수분해 조건으로 맞추기 위하여, 중수 3.2 ml를 첨가한다. 진한 산 가수분해의 2차 가수분해에 해당하는 반응을 실시하였다. 반응 온도를 달리하여 100°C와 120°C에서 120분간 반응을 실시하였다. 반응 후 급냉시켜 반응을 정지시키고, 내부 표준물질을 첨가하여 완전하게 용해시킨 후, 여과하여 여과액을 NMR 분석에 사용하였다.

### 2.2.2. 기기분석

$^1\text{H-NMR}$  분광분석은 Brucker사의 500 MHz NMR 기기를 충북대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 분석을 실시하였다. Brucker사의 Toppin 프로그램을 사용하여 각 피크 면적을 적분하여 정량 분석을 실시하였다. 기기 분석 조건은 Table 1과 같다. 피크

면적은 베이스라인을 기준으로 하여 베이스 라인보다 높은 부분의 양 끝단을 기준으로 적분하여 농도 계산에 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 단당 및 분해 산물의 정량 분석 기술 개발

기존의 NMR에 의한 당 분석에서는 아노머성 수소의 다른 화학 이동 값을 기초로 단당의 조성 분석을 실시하였다. 그러나 아노머 수소뿐만 아니라 방향성 수소도 정량 분석에서 유용하게 사용할 수 있다(Shin and Cho 2008). 단당의 산성 조건 반응 물질인 푸란계 화합물이나 개미산은 방향족 수소의 화학 이동 값에서 특징적인 피크를 나타내므로, 이를 기반으로 정량 분석이 가능하다. 중수가 화합물의 수소와 치환되어 만들어진 HDO (중수의 중수소 중 하나가 수소로 치환된 용매)가 강한 수소 피크를 만들기 때문에, 분석하고자 하는 아노머성 수소 피크 영역이나 방향족 수소 범위를 벗어난 위치에 나타나도록 산의 농도를 조절해야 한다.

Fig. 1은 포도당의 2차 가수분해 조건에서 반응 후, 반응 산물을  $^1\text{H-NMR}$ 을 통하여 분석한 스펙트럼이다. 포도당이 분해되지 않고 남아 있는 단당은 4.5~5.3 ppm의 화학 이동 값에 나타나며, 분해 산

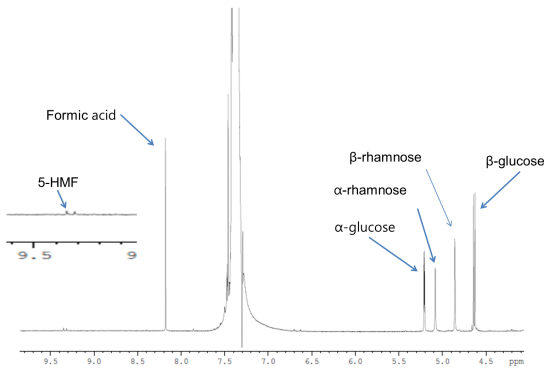


Fig. 1. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of reaction products from second hydrolysis of glucose at concentrated acid.

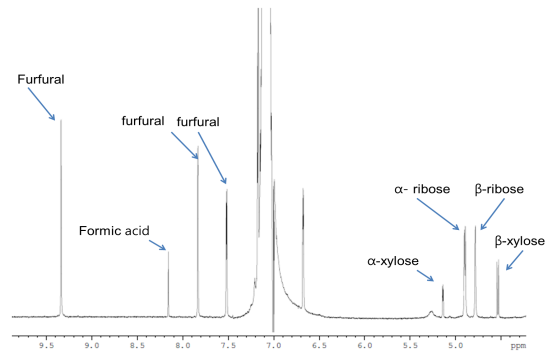


Fig. 2. <sup>1</sup>H-NMR spectrum of reaction products from second hydrolysis of xylose at concentrated acid.

Table 2. Chemical shift of anomeric hydrogen of the glucose and xylose, the formic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF)

Hydrogen source		Chemical shift (ppm)
Glucose	$\alpha$	5.21
	$\beta$	4.58
Xylose	$\alpha$	5.17
	$\beta$	4.51
Formic acid		8.20
Furfural		7.50, 7.85, 9.35
5-HMF		9.38

물로 존재하는 푸란계 화합물의 피크는 7.5~9.3 ppm의 화학 이동 값 영역에 나타났다. 내부 표준물질은 아노머성 수소의 화학 이동 값이 다른 단당과 겹치지 않는 L-rhamnose를 사용하였고, 2차 산 가수분해 반응이 끝난 후에 첨가하여, 잔류하는 포도당과 당 반응 물질인 5-HMF (hydroxymethylfurfural)와 개미산의 정량 분석이 가능하였다. 본 실험에서 정량 분석에 사용한 수소 화학 이동 값을 Table 2에 정리하였다.

Fig. 2는 자일로스의 2차 가수분해 조건에서 반응

후, 반응 산물을 분석한 스펙트럼이다. 분해되지 않고 잔류하는 자일로스 4.5~5.3 ppm의 화학 이동 값에 나타났고, 분해 산물인 furfural 피크는 방향족 수소의 화학 이동 값 영역에 뚜렷하게 나타났다. 자일로스의 2차 산 가수분해 후, 당의 탈수 재배열 산물인 furfural과 개미산의 정량 분석이 가능하였다.

### 3.2. 다른 반응 온도에서 단당 및 분해 산물의 정량 분석

Fig. 3은 포도당의 2차 가수분해 온도를 달리한 경우, 반응 산물들의 <sup>1</sup>H-NMR 스펙트럼이다. 포도당은 산 가수분해 조건에서 5-HMF로 전환되며, 5-HMF는 산과 물에 의하여 개미산과 levulinic acid로 전환된다.

피크 영역을 적분하여 내부 표준물질로 첨가한 L-rhamnose를 피크와 비교하여 정량 분석한 결과, 고온 반응에서 포도당의 잔류량이 상대적으로 낮았다. 100°C 반응 결과, 95.8%의 단당이 잔류하였지만, 120°C 반응 온도에서는 68.8%의 단당이 잔류하였다. 포도당의 탈수 재배열에 의한 산물인 5-HMF 농도는 100°C 반응에서 1.0%, 120°C 반응 조건에서 0.6%로 매우 낮게 나타났다. 하지만 5-HMF가 분해되어 생성되는 개미산은 100°C 반응에서 4.8%이지만 120°C 반응에서 21.6% 생성된 것으로 미루어

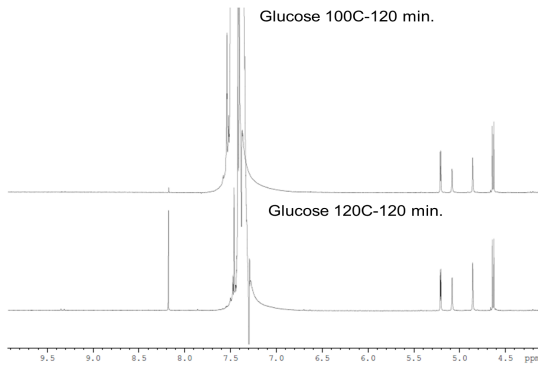


Fig. 3. Different  $^1\text{H-NMR}$  spectra between different reaction temperature from secondary hydrolysis of glucose at concentrated acid hydrolysis.

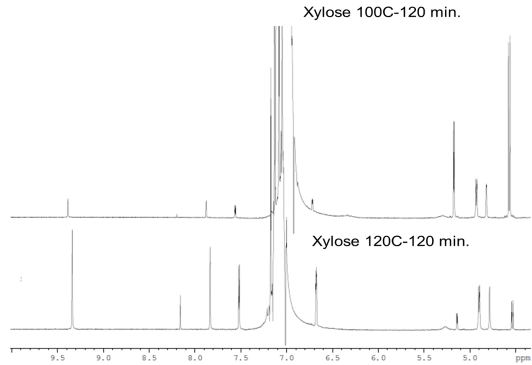


Fig. 4. Different  $^1\text{H-NMR}$  spectra between different reaction temperature from secondary hydrolysis of xylose at concentrated acid hydrolysis.

5-HMF의 생성이 느린 것 보다는 생성된 5-HMF가 급격하게 개미산과 levulinic acid로 전환된 것으로 생각된다.

Fig. 4는 자일로의 2차 가수분해 온도를 달리한 경우, 반응 산물들의  $^1\text{H-NMR}$  스펙트럼이다. 자일로는 산 가수분해 조건에서 furfural로 전환된다 (Root *et al.*, 1959). 하지만 본 연구에서는 개미산이 자일로의 분해 산물에서 검출되어 furfural에서 개미산으로 분해된 것을 확인할 수 있었다. 100°C에서 2차 가수분해 반응을 시킨 경우, 120분 반응 후에도 상당량의 자일로스의 피크가 존재하고 있지만, 120°C에서 2차 가수분해를 시킨 경우, 대부분 자일로의 아노머성 수소 피크가 사라졌다(화학 이동 값 4.6 ppm과 5.1 ppm).

자일로스가 계속적으로 반응하여 만들어지는 산물인 furfural과 개미산의 피크는 120°C가 100°C보다 훨씬 뚜렷하게 나타났다. 피크 영역을 적분하여 내부 표준물질로 첨가한 L-rhamnose와 비교하여 정량 분석하면, 100°C에서 반응시킨 경우, 65.6% 자일로스가 단당 형태로 잔류하고, furfural로 8.9%가 전환되었으며, 0.5%의 개미산이 생성되었지만, 120°C 반응 온도에서는 단당 형태로 잔류하는 자일로스가 13.8%에 불과하였고, 23.5%의 furfural과 4.8%의 개미산이 생성되었다. 이것은 경쟁적인 다른 반응

경로에 의하여 수용액에 녹지 않는 humin계 화합물이 생성되기 때문에 전체적인 질량 수지에서 손실이 발생했기 때문이다(Rasrendra *et al.*, 2010).

### 3.3. 포도당과 자일로의 반응 산물 비교

일반적으로 산 조건에서 5탄당보다 6탄당이 안정된 구조이기 때문에, 산에 의한 탈수 재배열 반응이 느리게 진행된다고 알려져 왔다(Aguilar *et al.*, 2002). 2차 가수분해조건에 노출된 후, 단당의 잔류 정도는 2차 가수분해의 온도와 당의 종류에 의하여 좌우된다. 산성 수용액 조건에서 5-HMF는 가수분해에 의하여 levulinic acid와 개미산으로 분해된다 (Rasrendra *et al.* 2010).

자일로의 반응 산물인 furfural은 피크의 확인이 가능한만큼 뚜렷하게 나타났지만, 포도당의 반응 산물인 5-HMF의 피크는 상대적으로 작는데, 이것은 furfural과 5-HMF가 산성 반응 조건에서 안정성이 다르기 때문인 것으로 생각된다. 5-HMF에서 levulinic acid와 개미산으로의 분해 반응은 빠르게 진행되기 때문에 개미산의 농도가 높고 5-HMF 농도가 낮지만, furfural은 이런 조건에서 상대적으로 안정된 구조이기 때문에 개미산의 농도와 furfural의 농도가 유사하게 나타났다.

Levulinic acid는 물에 잘 용해되지 않기 때문에, 반응물을 여과하여 분석하는 과정에서 humin계 화합물과 같은 여과 잔사로, 본 분석에서는 NMR 스펙트럼에 나타나지 않았다. Levulinic acid를 정량 분석하기 위해서는 여과 잔사를 적당한 중수로 치환된 유기용매로 추출하여 분석해야 한다. 하지만 levulinic acid의 생성량과 개미산 생성량 사이에 일정한 관계가 성립하기 때문에, 생성된 개미산으로 levulinic acid의 농도를 추정할 수 있다(Asghari and Yoshida, 2007).

#### 4. 결 론

<sup>1</sup>H-NMR 분광 분석을 사용하여 진한 산 가수분해 공정의 2차 가수분해 공정에서 일어나는 반응의 정량적인 해석이 가능하였다. 아노머성 수소 영역의 피크 확인 및 적분을 통하여, 단당류를 정량할 수 있었고, 방향족 수소영역의 피크 확인 및 적분을 통하여, 단당류에서 전환된 퓨란계 화합물과 유기산의 정량 분석이 가능하였다. 포도당이 자일로스로부터 2차 가수분해 조건에서 산에 의한 퓨란계 화합물의 전이가 느리게 전환되어 단당의 안정성이 높았고, 퓨란계 화합물로 전환된 이후에는 산에 민감한 5-HMF는 쉽게 개미산과 levulinic acid로 전환되었지만, furfural은 개미산으로의 분해 반응이 더디게 진행되어 furfural의 농도가 5-HMF보다 상대적으로 높게 나타났다.

#### 사 사

2011학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비(기성희비 연구비) 지원에 의해 연구되었음.

#### 참 고 문 헌

1. Aguilar, R., J. A. Ramirez, G. Garrote, and M. Vazquez, 2002. Kinetic study of the acid hydrolysis of sugar cane bagasse. *J. Food Eng.* 55: 309~318.
2. Asghari, F. S. and H. Yoshida, 2007. Kinetics of

the decomposition of fructose catalyzed by hydrochloric acid in subcritical water: formation of 5-hydroxymethylfurfural, levulinic and formic acids. *Ind. Eng. Chem. Res.* 46: 7703~7710.

3. Borchardt, L. G. and C. V. Piper, 1970. A gas chromatographic method for carbohydrate as alditol-acetates. *TAPPI J.* 53(2): 257~260.
4. Cho, D. H., S.-J. Shin, Y. Bae, C. Park, and Y. H. Kim, 2010. Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*. *Bioresour. Technol.* 101: 4947~4951.
5. Crowell, E. P. and B. B. Burnett, 1967. Determination of the carbohydrate composition of wood pulps by gas chromatography of alditol acetates. *Anal. Chem.* 39: 121~124.
6. Davis, M. W. 1988. A rapid modified method for compositional carbohydrate analysis of lignocellulosics by high pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection (HPAEC/PAD). *J. Wood Chem. Technol.* 18: 235~252.
7. Kiemle, D. J., A. J. Stipanovic, and A. J. Mayo in *Hemicelluloses : science and technology*, Gatenholm, P. and Tenkanen, M. Eds, pp. 122~139. American Chemical Society, Washington DC. (2004)
8. McKibbins, S. W., J. F. Harris, J. F. Saeman, and W. K. Neil, 1962. Kinetics of the acid-catalyzed conversion of glucose to 5-hydroxymethyl-2-furfuraldehyde and levulinic acid. *Forest Prod. J.* 12: 17~23.
9. Rasrendra, C. B., I. G. B. N. Makertihartha, S. Adisasmito, and H. J. Heeres, 2010. Green chemicals from d-glucose: systematic studies on catalytic effects of inorganic salts on the chemo-selectivity and yield in aqueous solutions. *Top. Catal.* 53: 1241~1247.
10. Root, D. F., J. F. Saeman, J. F. Harris, and W. K. Neil, 1959. Kinetics of the acid catalyzed conversion of xylose to furfural, *Forest Prod. J.* 9: 158~164.
11. Shin, S.-J. and N.-S. Cho, 2008. Conversion factors for carbohydrate analysis by hydrolysis and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy. *Cellulose* 15: 255~260.
12. Smith, F. and R. Montgomery, 1956. End group analysis of polysaccharides. *Method Biochem. Anal.* 3: 153~212.