

セルロースナノファイバーの構成糖分析

周 毅婷、森田 あずさ

ユーザーベネフィット

- ◆ セルロースナノファイバー(CNF)の主要な構成糖を一斉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（以下CNF）は、バイオマスを効率よく有効活用し、持続循環型社会システム構築に向けた一種のアプローチとなる技術です。

植物細胞壁は、セルロース分子鎖が規則的に結合したセルロースマイクロフィブリルと呼ばれる繊維で構成されており、セルロースマイクロフィブリルを物理的もしくは化学的に解きほぐしたものをCNFと呼んでいます。また、近年では、バイオマス由来のグルコースを細菌により、セルロースに合成させて生成するCNFもあります。

CNFの材料となるバイオマスの種類により、完成したCNFを構成する糖が異なるため、製品化を進めていくのに際し、糖の種類やその比率を把握することが必要になります。ここでは、各種CNFを加水分解し、CNFを構成する糖の種類と比率をNexera™還元糖分析システムで測定しました。

■ Nexera還元糖分析システム

図1にNexera還元糖分析システムの流路図を示します。このシステムでは糖をカラムで分離後、アルギニンに反応試薬としてポストカラム誘導体化し、蛍光検出するシステムです。この検出法は、糖がほう酸存在下でアルギニンと加熱反応させると強い発蛍光性誘導体を生成する性質を利用しています。誘導体化された糖類は蛍光検出器RF-20Axsにより、高感度に検出されます。示差屈折率検出器では難しかった低濃度の糖類の分析が、還元糖分析システムでは可能になります。

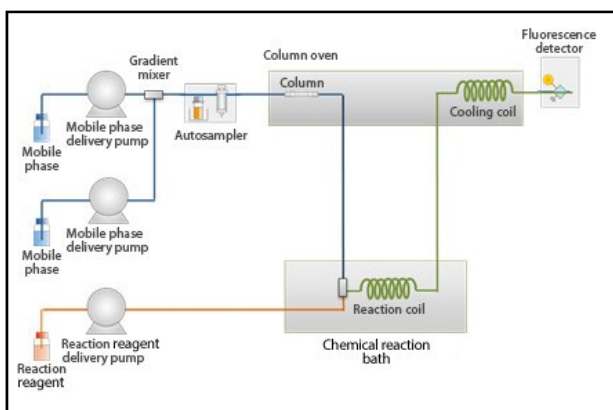


図1 Nexera還元糖システムの流路図

■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2に示します。

表1 測定試料の一覧

No.	Sample
1	CNF derived from broadleaf tree pulp-1
2	CNF derived from broadleaf tree pulp-2
3	CNF derived from broadleaf tree pulp-3
4	Carboxymethyl cellulose
5	CNF derived from coniferous tree pulp
6	Fermented nanocellulose (Hydrophilic type)
7	Fermented nanocellulose (Amphipathic type)
8	Commercially available cotton

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 μ L of 72 % sulfuric acid is added to the test tube. Immerse the test tube in a 30 $^{\circ}$ C 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 $^{\circ}$ C.

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 μ m. Dilute with ultrapure water^{*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.

試料により中和条件や糖の濃度が異なるため、試料により水酸化バリウムと試料の比率や水の希釈倍率を変更しました。表2に各試料の条件を示します。

表2 前処理における中和条件と希釈倍率

Sample.	Sample: saturated aqueous barium hydroxide solution (v/v)	pH	Dilution ratio
1	150:450	4	8
2	600:300	3	8
3	600:300	7	8
4	600:300	3	4
5	500:250	4	8
6	600:300	4	4
7	600:300	3	4
8	600:400	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。糖類はほう酸と陰イオン性錯体を形成する性質があることから、移動相としてほう酸緩衝液を用い、陰イオン交換カラムShim-pack™ ISA-09によって糖類を分離しました。標準溶液のクロマトグラムを図3に示します。

表3 分析条件

System	: Nexera Reducing Sugar Analysis System
<Separation>	
Column	: Shim-pack ISA-09 (250 mm × 4.0 mm I.D.) *4
Guard column	: Shim-pack ISA-09 (G) (50 mm × 4.0 mm I.D.) *5
Mobile phase A	: 0.1 mmol/L Potassium borate buffer solution (pH 8)
Mobile phase B	: 0.4 mmol/L Potassium borate buffer solution (pH 9)
Flow rate	: 0.6 mL/min
Time program	: B Conc. 0 % (0 min)-100 % (50 min)- 100 % (65 min)- 0 % (65.01-90 min)
Gradient mixer capacity	: 1.7 mL
Column temp.	: 65 °C
Injection vol.	: 10 µL
Vial	: Shimadzu Vials, LC, 1.5 mL Clear Glass *6
<Post-column reaction>	
First reaction	
Reagent	: 10 g/L Arginine and 30 g/L boric acid aqueous solution
Flow rate	: 0.5 mL/min
Reaction temp.	: 150 °C
Detection	: Spectrofluorometric detector RF-20Axs (Standard Cell) Ex 320 nm Em 430 nm
Cell temp.	: 25 °C
Reaction coil	: SUS tubing, 10 m × 0.8 mm i.d.

*4 P/N : 228-59512-41, *5 P/N : 5228-59512-42, *6 P/N : 227-34001-01

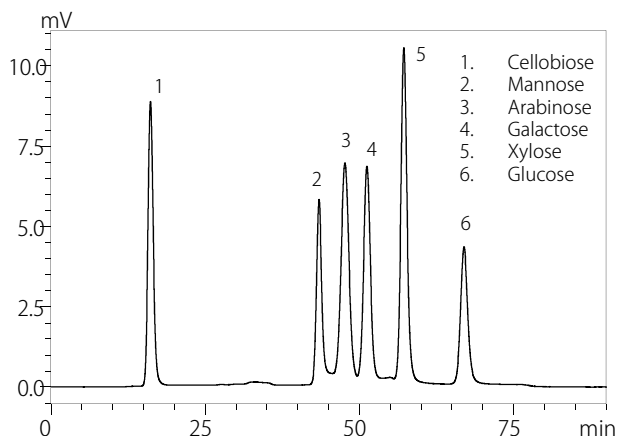


図3 標準溶液のクロマトグラム(各500 µmol/L)

■ 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4に示します。検量線の範囲を表4に示します。いずれの糖も、寄与率 $r^2=0.999$ 以上の良好な直線性が確認されました。

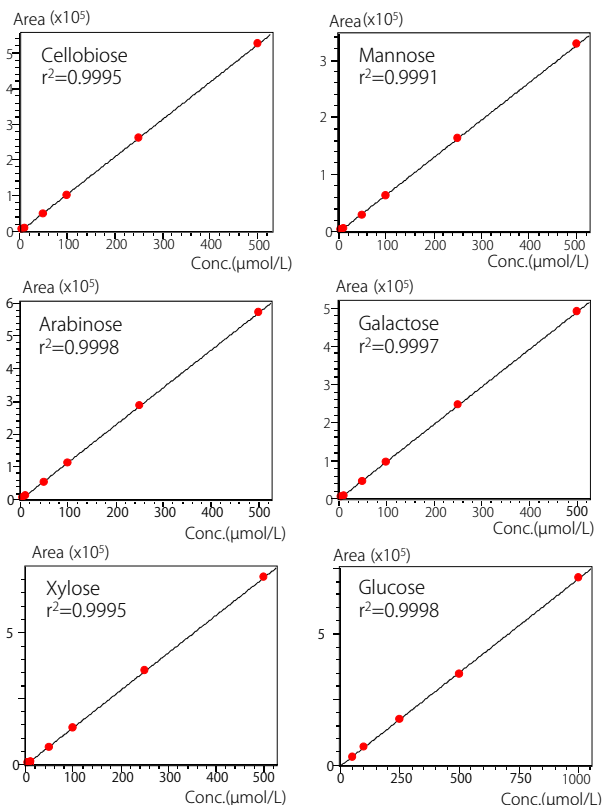


図4 各化合物の検量線

表4 各化合物の検量線範囲

Compound	Calibration curve range(µmol/L)
Cellobiose	5-500
Mannose	5-500
Arabinose	5-500
Galactose	5-500
Xylose	5-500
Glucose	50-1000

■ 標準溶液の再現性

標準溶液各500 µmol/Lを6回繰り返し測定した際の保持時間とピーク面積の相対標準偏差を表5に示します。いずれも良好な再現性が得られ、システムパフォーマンスが安定していることが分かりました。

表5 各化合物の保持時間とピーク面積の再現性 (n=6)

Compound	Retention time (%RSD)	Peak area (%RSD)
Cellobiose	0.04	0.10
Mannose	0.02	0.17
Arabinose	0.01	0.13
Galactose	0.01	0.17
Xylose	0.01	0.12
Glucose	0.01	0.13

■ CNF構成糖の測定

各試料を図2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5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。

1. Cellobiose
2. Mannose
3. Arabinose
4. Galactose
5. Xylose
6. Glucose

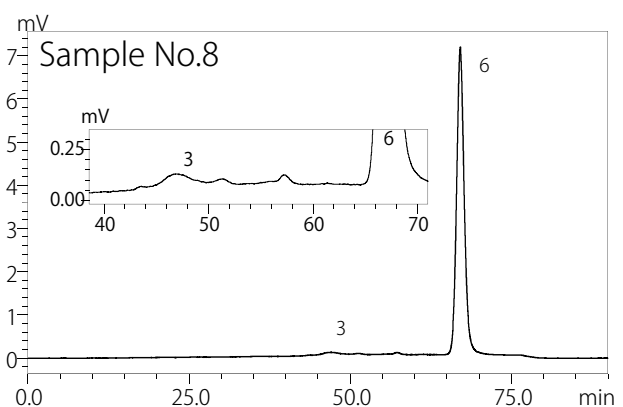
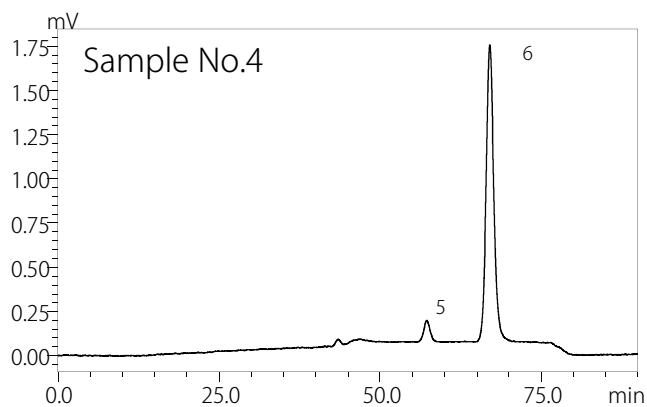
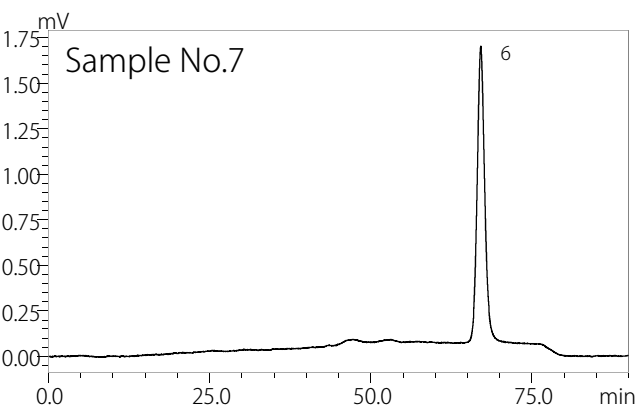
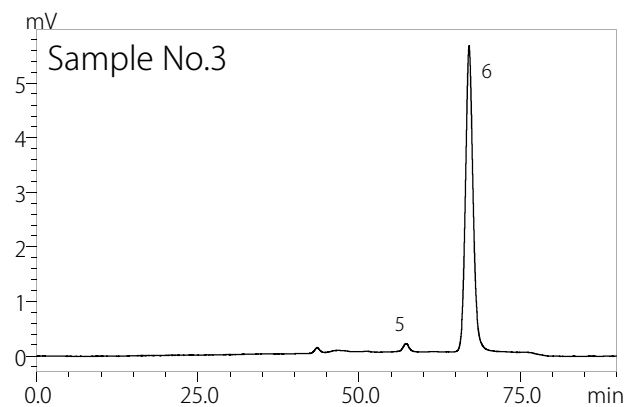
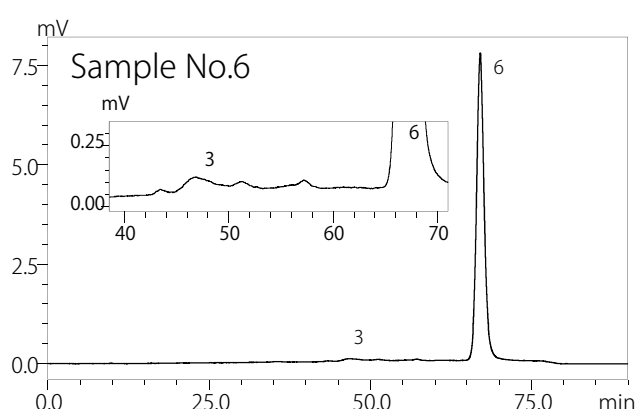
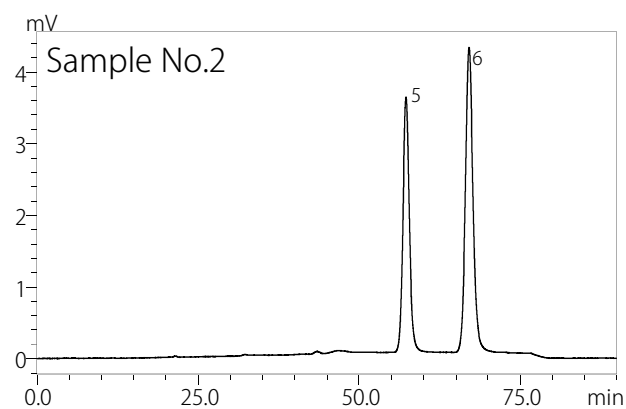
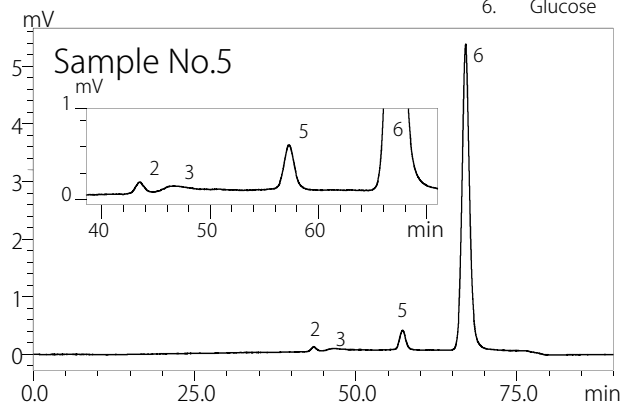
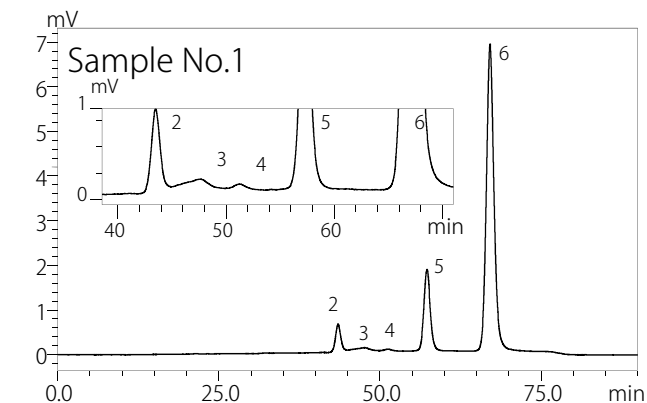


図5 各CNFのクロマトグラム

■ 回収率試験、過分解補正、多糖換算

試料中の糖は、加水分解時に過分解により一部消滅するため単糖の回収率試験によりこれを補正する必要があります。単糖標準混合液（各糖：500 μmol/L）8.4 mLを25 mL容の試験管に取り、300 μLの72%硫酸をピペットで加えました。この溶液は2つ用意し、1つを加水分解と同時に120°Cで、1時間オートクレーブで加熱分解し、放冷後10 mLに定容しました(a液)。もう1つは水で10 mLに定容しました(b液)。さらに、それぞれ4倍に希釈して、a液およびb液を定量し、単糖ごとに加水分解前後の回収率を求めました。回収率の逆数を試料の補正前単糖濃度に乘じることで過分解補正を行いました。各糖の回収率と過分解補正係数を表6に示します。補正後単糖濃度に6炭糖は0.9を、5炭糖には0.88を乗じ、多糖換算^{*7}を行いました。

表6 単糖の回収率と過分解補正係数

Compound	Recovery rate (%)	Correction factor for the excessive decomposition
Xylose	87	1.15
Arabinose	92	1.08
Mannose	94	1.07
Glucose	95	1.06
Galactose	92	1.08

*7: 本分析は、前処理にて加水分解し単糖として定量を行っています。多糖として換算するために、脱水縮合分を考慮した係数です。

■ 構成糖の比率

検出された糖類の定量値から、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としたときの各糖の構成比を図6に示します。

異なる材料のCNFでは、構成される糖の種類と量に違いが見られました。図7に示すようにセルロースは、グルコースがグリコシド結合により重合した多糖類ですが、ヘミセルロースの主成分はキシロースなどの糖類が重合したキシランやグルコースとマンノースが重合したマンナンといった不溶性食物繊維です。広葉樹にはヘミセルロースが多く分布していることが知られています。

木質パルプを材料として製造されたBinfi-sを加水分解処理すると、グルコースの他にキシロースが多く検出される傾向が見られました。一方、発酵ナノセルロースのように、糖蜜や農作物中のグルコースを原料としてバクテリアが生成するCNFは9割以上がグルコースで構成されており、木質パルプ由来で確認されたキシロースは含まれていませんでした。

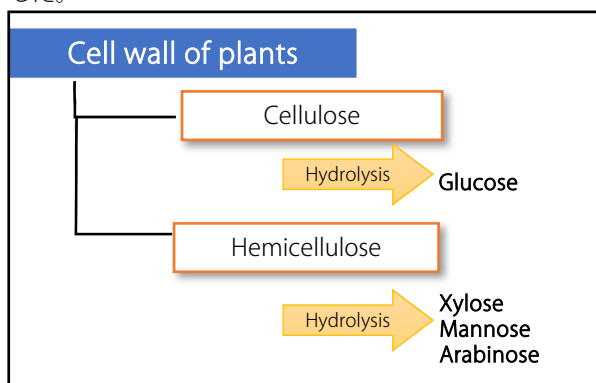


図7 セルロースとヘミセルロース

■ まとめ

Nexera還元糖分析システムで、加水分解処理したCNFの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。

<謝辞>

本分析方法の開発や試料提供に関しまして、以下の方々には有益なディスカッション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。

- ・ 東京大学 磯貝明特別教授・齋藤継之准教授・藤澤秀次助教
- ・ 北海道大学 田島健次准教授
- ・ 草野作工株式会社 ナノセルロース・農業事業担当部長 松島得雄様
- ・ 愛媛大学 内村浩美教授・藪谷智規教授・秀野晃大講師

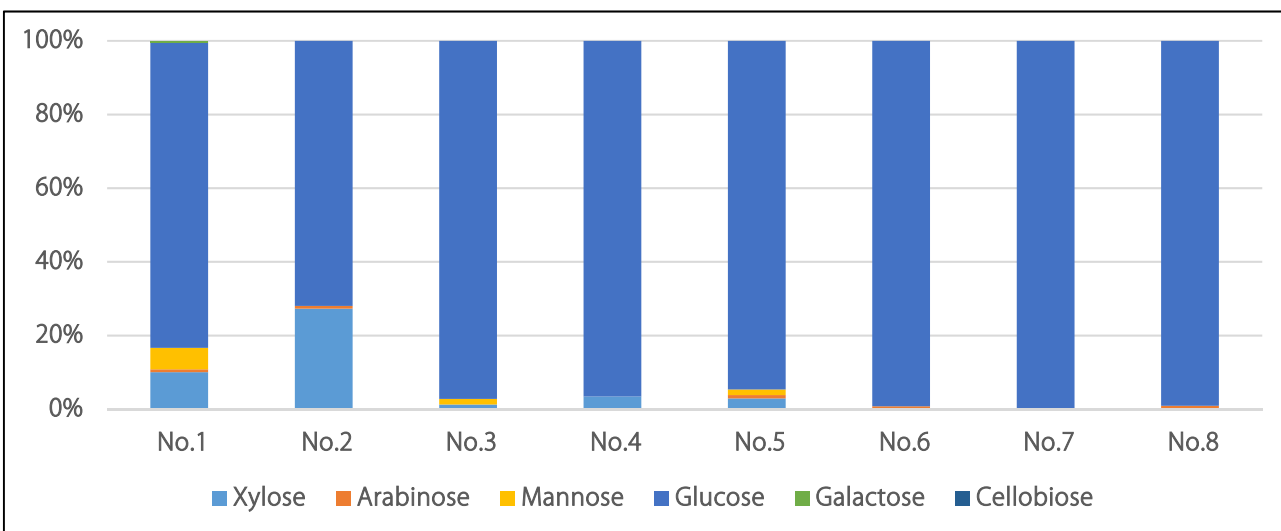


図6 各試料の構成糖比率

NexeraおよびShim-packは、株式会社島津製作所の日本およびその他の国における商標です。

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

01-00023-JP 初版発行：2021年3月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していません。

本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

改訂版は会員制サイト Solutions Navigator で閲覧できます。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>
閲覧には、会員制情報サービス Shim-Solutions Club にご登録ください。
<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

© Shimadzu Corporation, 2021