

LC TALK

Vol. 116
July 2021



- Talk 「誰もやっていないこと、
世界で一番になるすごい研究をしよう」…… P. 2
- TEC Method Scouting Solutionによるメソッド開発の効率化
～実験計画法による頑健性評価をサポート～ …… P. 4
- Products ナノ材料分級計測システム
遠心フィールドフローフラクショネーション …… P. 7
- Applications セルロースナノファイバーの構成糖分析 …… P. 10

Talk

「誰もやっていないこと、世界で一番になるすごい研究をしよう」

味の素株式会社
宮野 博

四日市にある東海事業所で食品や医薬品、医薬中間体の品質保証と品質管理の業務（GMP、HACCP、ISO、バリデーション…）に従事して、1999年7月、6年ぶりに研究所に戻って上司から言われた言葉である。無理難題!と思ったが、上司の命令は絶対である。悩みに悩んだ末、2つのテーマを立ち上げた。その1つがメタボローム解析である。メタボローム、当時この造語は既にあったが、認知度はほぼ0%で、私も知らなかった。そのテーマ名は「内在性代謝物の網羅的解析」であった。2000年前後はヒトゲノムの全配列解析が終盤をむかえ、またLC/MSの進歩と相まってプロテオーム解析の全盛期であった。「遺伝子とタンパク質だけで十分、代謝物を網羅的に調べても新しいことは何も得られない。どうしてそんな無駄なことするのか!」と身内からもバッシングを受けた。社内外でメタボローム解析の意義を説明するのが、私の仕事の1つになっていたが、部下の頑張りのおかげで、131種類の代謝物を一度に測定できるようになった。

しかし、同じ前処理と方法で多種多様な代謝物を測定して問題ないのかという疑問と限界を感じていた。そこで、代謝物の構造に着目して、アミノ酸、クエン酸回路内代謝物、ケト酸、ジペプチド等それぞれに適切な前処理と分析、具体的にはプレカラム誘導体化LC/MS/MSによる定量法の開発を目指すことにした。が、LC/MS/MSは高選択性で高感度な測定法として、2000年代前半はまさに飛ぶ鳥を落とす勢いで、「なぜ面倒なプレカラム誘導体化をするのか意味が分からない」と、このアイデアも随分と非難された。

アミノ酸分析に絞って話を進める。アミノ酸は、タンパク質の構成成分であり、遊離アミノ酸としても重要な機能を有している。また、膨大な代謝物の中で、アミノ酸は「ハブ」として代謝状態の全体を俯瞰できる指標でもある。

イオン化効率を高め、試薬とアミノ酸との結合部位が衝突誘起解離で特異的に開裂するようなLC/MS/MS用アミノ基プレカラム誘導体化試薬を設計し、selected reaction

monitoringでアトモルレベルのアミノ酸を検出でき、precursor ion scanでMSクロマトグラム上にアミノ酸のみが抽出できるようになった。この方法は夾雑物の多い試料中の微量アミノ酸分析、例えばFlux解析研究等に応用された。

ある日、私が退社しようとしていると、担当者が「20種類のアミノ酸を2.8分で分析できた」と報告してきた。そのような研究は命じていないのに…。このクロマトグラムは特許にもあるが、ロイシンとイソロイシンは分離していないし、ピーク形状が悪く、長年分析を生業としてきた私には到底受け入れられない代物であった。

しかし、この分析研究屋には思いもつかぬ方向に話が進み始めた。

「この分析があれば、ビジネスになる!」

丁度その頃、疾病や健康状態によって体内の遊離アミノ酸のバランスが変化するという知見が社内でも得られていた。現在のインフォマティックスの先駆けの研究である。しかし、アミノ酸分析に一検体2時間以上を要していたので、データ収集に膨大な時間がかかり、仮にアミノ酸バランスが健康をチェックする指標になることが証明されても、この測定法での実用化は難しいと考えられていた。因みに、同じ建物の1階でアミノ酸インフォマティックス研究が、3階で私たちの研究がそれぞれ行われていたのだが、当事者はお互い関連のない研究と考えていた。が、幸いこの2つの研究が結び付いた。

詳細は省略するが、私たちのアミノ酸分析研究は、「高感度化で得られた発見・知見を研究開発に活かすこと」に、「データ収集の短時間化とインフォマティックス事業の鍵技術」という視点が加わった。そのため、感度より分離能を高める試薬を開発し、定量性を高めるために分析時間を2.8分より少し長くした。また、簡単に測定できるように、試薬をセットするだけでアミノ酸測定ができるLC-MS専用装置（LC-MS/MSではない）を開発した。これが9分間で38成分

以上のアミノ酸・アミノ酸関連物質の一斉分析できるUF-Amino Station (島津製作所、図1)であり、APDSタグ (富士フイルム和光純薬) である。この技術により、アミノ酸インフォマティクス研究は開発、事業化への階段を駆け上がり「アミノインデックス」として2011年に上市した。現在、「複数のがんについて、現在がんである可能性」を一度に評価するAICS (AminoIndex Cancer Screening) と「10年以内に脳卒中・心筋梗塞を発症するリスク」、「4年以内に糖尿病を発症するリスク」、「現在認知機能が低下している可能性」、「血液中の必須・準必須アミノ酸の低さ (栄養状態の評価)」を評価するAILS (AminoIndex LifeStyle diseases) がある¹⁾。アミノインデックス誕生経緯については、オープンイノベーションの事例として紹介されている²⁾。

ところで、アミノ酸は臨床化学的に重要な指標として、これまで多くの報告があった。しかし、それぞれの研究者独自の分析方法で、試料の種類 (血液か血清か血漿か)、採血時間、試料の取扱い (血漿分離、保管や前処理など)、定量用の標準物質などが統一されていなかった。つまり、論文間のデータ比較は難しかった。アミノインデックス研究では、疾病を有する多くの方々の血液だけでなく、それを1桁以上上回る数の健康な方々の血液も同条件で分析しなければならなかった。そこで、科学的な検証された血漿アミノ酸分析

法による健康人の血漿アミノ酸濃度データベースを整備するため、採血からの検体の管理の取扱手順を検証し、UF-Amino Stationによるアミノ酸濃度測定をバリデートした。また、富士フイルム和光純薬から認証標準物質 (Certified Reference Material: CRM) のアミノ酸混合標準液が安定供給されるようになった。この条件で測定された日本人の健康人の血漿遊離アミノ酸濃度の基準範囲は現在公開されており^{3), 4)}、生体内アミノ酸研究が加速・発展しやすい環境を整えることができた。

この一連の研究は、社内は言うに及ばず、また先に挙げた企業だけでなく、大学、病院、アミノ酸学会、臨床化学会、エスアールエルなど、多くの方々のご指導、ご支援に基づくものである。上司の一言から始まった苦難 (?) の研究ではあるが、アミノ酸分析を通じて人々の健康に資することが少しはできたように思う。関係者に感謝!

参考文献

- 1) <https://www.ajinomoto.co.jp/products/aminoindex/>
- 2) 清水洋, 一橋ビジネスレビュー, 62, 144-158 (2014)
- 3) 中山聡, 宮野博, ぶんせき, 2019(2), 58-66 (2019)
- 4) H. Miyano, A. Nakayama, *Chromatography*, 42, 17-27 (2021)



図1 UF-Amino Stationと38成分アミノ酸の分析例

執筆者紹介

東京大学大学院薬学系研究科修了、味の素株式会社入社、同社理事、イノベーション研究所基盤技術研究所長を経て現在同社アドバイザー。日本分析化学会理事、クロマトグラフィー学会理事、日本アミノ酸学会評議員、新アミノ酸分析研究会アドバイザー、薬学振興会評議員。

専門分野 分析化学

将来の夢 クロマトグラフィーを使わないアミノ酸分析

趣味 (今年は) ジャイアンツのイースタンリーグ観戦

TEC

Method Scouting Solution による メソッド開発の効率化

～実験計画法による頑健性評価をサポート～

LCビジネスユニット

藤崎 真一

メソッド開発のための分析条件の検討には多くの時間を要しますが、この作業を誰でも「簡単に、ミスなく、素早く」実施できるようにすれば、作業のスピードアップが可能になります。本稿では、メソッド開発を効率化するためのソフトウェアであるMethod Scouting Solution（以下：MSS）を用いて、開発における各フェーズの作業効率を高める方法について解説します。なお、MSSはメソッド開発のバリデーションフェーズにおける実験計画法に基づく頑健性評価の実施も支援しています。また、分離改善検討といった用途で、カラム1本のケースや、既設システムへの適用も可能です。

1. メソッド開発のフェーズ

新規化合物に対するメソッド開発においては、その検討開始から完成に至るまでに多くの工程を経ますが、開発の工程を4つのStageに分けると図1のようになります。

《Stage1》保持挙動予測 (prediction)

分析を行う前に、分析種の構造式などの物性情報を元に、溶出順序や保持の強さ等を予想します。

《Stage2》探索 (scouting)

網羅的にカラムや移動相を組み合わせて検討する工程です。メソッド開発の初期段階では、保持の強さや分離に与える影響の大きいカラム及び移動相とを種々組み合わせた分析を試行して、最適な組み合わせを探索します。

《Stage3》最適化 (optimization)

Stage2で選択したカラムと移動相を固定した上で、流量、カラム温度、ポンプのグラジエントプログラム等の各種パラメータの最適化を実施します。

《Stage4》頑健性評価 (validation)

分析メソッドにバリデーションを実施する工程であり、メソッドの頑健性についても確認します。

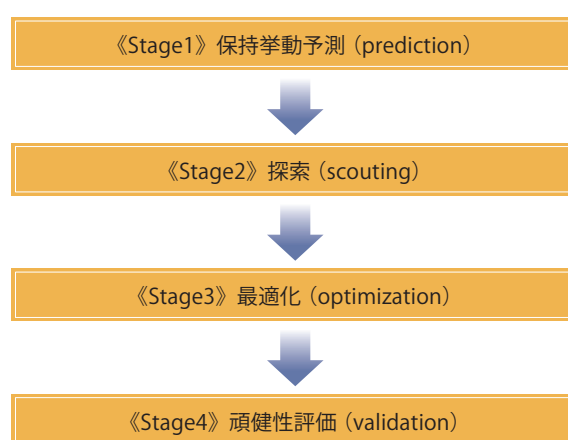


図1 メソッド開発のフェーズ

2. メソッド開発におけるボトルネック

Stage2、Stage3、Stage4においては、網羅的な分析を実施するため、分析メソッドやスケジュールの作成に多くの時間を要します。探索及び最適化では、豊富な経験や専門知識を必要とするため、担当者のスキルにも左右されますが、しばしばトライ＆エラーが繰り返されています。さらに、Stage2では、種々の移動相の調製や移動相及び複数カラムの装置へのセッティングに関して手間がかかり、取り付けミスも起こり得ます。そのため、移動相の自動調製やカラムの自動切換え、さらには網羅的な条件検討のための多数の分析スケジュール作成の効率化が、メソッド開発に要する時間を短縮するためには重要です。また、さらに効率化を促すためには、実験計画法を用いた検討項目や分析回数の最適化も有効です。

3. MSSによるメソッド開発の効率化

MSSは、網羅的な条件検討のための多数の分析スケジュール（個々の条件のメソッド含む）作成を「素早く」、「ミスなく」実行するためのソフトウェアです。最大耐圧130 MPaを有する超高速液体クロマトグラフNexeraシリーズ、最大耐圧70 MPaを有する一体型LCシステムi-Series、超臨界流体クロマトグラフNexera UCにて使用可能です。MSSを用いることで、膨大な分析回数のスケジュール作成を①～⑤の5つのステップだけで素早く完了できます（図2）。使用する移動相やカラムは1クリックで選択でき、カラム平衡化やブランク分析も反映した網羅的なスケジュールが自動で生成されるため、作業の効率化だけでなく、ミスの低減も可能です。

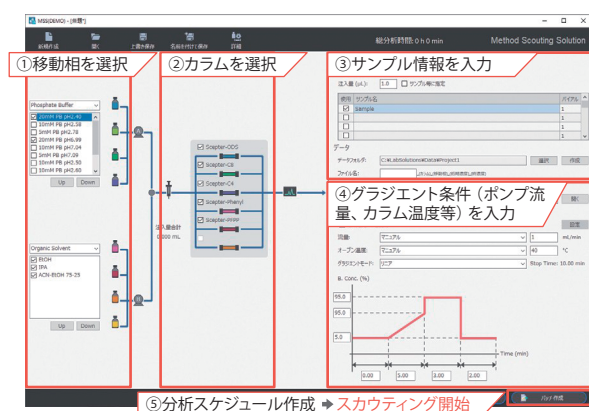


図2 分析スケジュールを「素早く」、「ミスなく」作成

Nexeraシリーズを用いたメソッドスカウティングシステムでは、Stage2の探索フェーズにおいて、8種類の移動相と12種類のカラムを用いた最大192（4×4×12）通りの組み合わせを実行できます。加えて、MSSが有する移動相ブレンディング機能（図3）は、あらかじめ用意した数種の移動相のみで、pH及び有機溶媒比率を任意に変更し自動調製し、これまで移動相の準備に要していた時間を大幅に短縮します。i-Seriesでは、低圧グラジエントを用いた水系、有機系それぞれ2種ずつの移動相ブレンディングが実行できます。

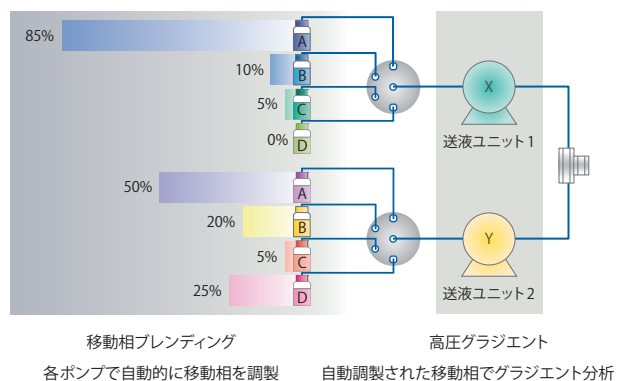


図3 移動相ブレンディング機能による移動相の自動調製

Stage3の最適化フェーズでは、Stage2で選択したカラム及び移動相を固定した上で、流量、カラム温度、ポンプのグラジエントプログラムの最適化を行います。MSSでは、これらのパラメーターを網羅的に振った分析スケジュール（図4）を、自動生成可能です。

さらに、MSSでは、Excel形式のファイルを外部からインポート（図5）し、分析スケジュールを自動生成することも可能です。例えば、専用ソフトウェア等で作成した任意の実験計画を取り込み、それに基づき分析回数を最適化し、さらなるメソッド開発の効率化を図ることも可能です。

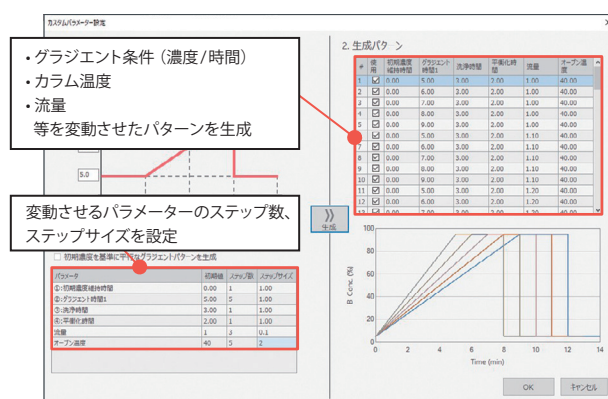


図4 流量、カラム温度、ポンプのグラジエントプログラムの設定画面

B.Conc	pH	Oven Temp.	Column	Flow Rate
39	2.5	40	Scepter-ODS	1
40	2.5	40	Scepter-ODS	1
41	2.5	40	Scepter-ODS	1
40	2.4	40	Scepter-ODS	1

専用ソフトウェア等で作成した実験計画を
カラム種類やカラム温度等各项目ごとにインポート

図5 実験計画のMSSへのインポート

4. MSSによるメソッド開発の効率化事例

図6に、セフェム系抗生物質に対してMSSによるメソッド開発を適用した事例を示します。探索フェーズでは、水系移動相を4種類と有機溶媒系移動相を3種類、そしてカラムを6種類用意して、移動相とカラムの最適な組み合わせを探索しました。また、最適化フェーズでは、9パターンのグラジエント条件を検討しました。それにより得られた膨大な量の分析結果から最適な分析条件を選定することは、容易なことではありません。

LabSolutions DB/CSのオプションソフトウェアであるマルチデータレポートを使用すれば、最適な分析条件を迅速に見つけることができます(図7)。

島津が考案した分離度とピーク検出数による評価法を用いることにより、定量的にクロマトグラムを解析し、順位付けします。その結果、最適な分析条件とそのクロマトグラムが得られました(図6《最適化した分析条件とクロマトグラム》)。

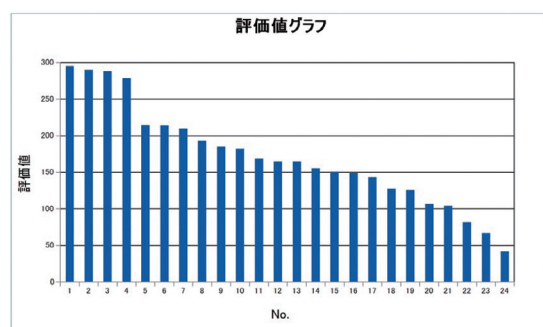


図7 マルチデータレポートを用いた各分析条件の評価値グラフ

以上のように、MSSによる分析スケジュールの自動生成、移動相の自動調製、移動相及びカラムの自動切換えによる効率化により、従来であれば1週間以上かかった作業をわずか1日余りに短縮することができました。

《セフェム系抗生物質 13成分の一斉分析に対するメソッド開発》

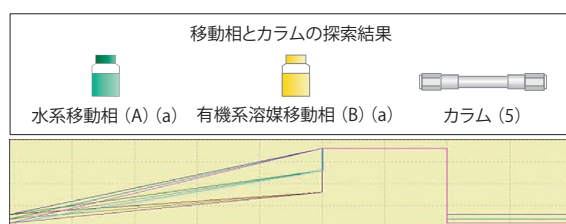
《探索フェーズ：移動相とカラムの最適条件探索》

移動相：(A) (水系)	(a) リン酸 (ナトリウム) 緩衝液 (pH 2.6) (b) ぐえん酸 (ナトリウム) 緩衝液 (pH 3.1) (c) 酢酸 (アンモニウム) 緩衝液 (pH 4.7) (d) 酢酸 (アンモニウム) 水溶液 (pH 6.7)	カラム： (1) Shim-pack XR-ODS (50 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm) (2) Shim-pack XR-C8 (50 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm) (3) Shim-pack XR-Phenyl (50 mm × 3.0 mm I.D., 2.2 μm) (4) Kinetex C18 (50 mm × 3.0 mm I.D., 2.6 μm) (5) Kinetex XB-C18 (50 mm × 3.0 mm I.D., 2.6 μm) (6) Kinetex PFP (50 mm × 3.0 mm I.D., 2.6 μm)
移動相：(B) (有機溶媒系)	(a) アセトニトリル (b) メタノール (c) アセトニトリル/メタノール=50/50 (v/v)	

計72通り (4×3×6) の組合せを実行

水系移動相 (A) (a) と有機溶媒系移動相 (B) (a) とカラム (5) との組合せが最適な結果を示した。

《最適化フェーズ：グラジエント条件の最適化》



計9パターンのグラジエントを実行

(2) が最適な結果を示した。

タイムプログラム：

- (1) B Conc. 5% (0 min) → 40% (5.01-7 min) → 5% (7.01-9 min)
- (2) B Conc. 5% (0 min) → 65% (5.01-7 min) → 5% (7.01-9 min)
- (3) B Conc. 5% (0 min) → 90% (5.01-7 min) → 5% (7.01-9 min)
- (4) B Conc. 10% (0 min) → 40% (5.01-7 min) → 10% (7.01-9 min)
- (5) B Conc. 10% (0 min) → 65% (5.01-7 min) → 10% (7.01-9 min)
- (6) B Conc. 10% (0 min) → 90% (5.01-7 min) → 10% (7.01-9 min)
- (7) B Conc. 15% (0 min) → 40% (5.01-7 min) → 15% (7.01-9 min)
- (8) B Conc. 15% (0 min) → 65% (5.01-7 min) → 15% (7.01-9 min)
- (9) B Conc. 15% (0 min) → 90% (5.01-7 min) → 15% (7.01-9 min)

《最適化した分析条件とクロマトグラム》

カラム : Kinetex XB-C18 (50 mm × 3.0 mm I.D., 2.6 μm)
 移動相 : (A) リン酸 (ナトリウム) 緩衝液 (pH 2.6)
 (B) アセトニトリル
 タイムプログラム : B Conc. 5% (0 min) → 65% (5.01-7 min) → 5% (7.01-9 min)
 流量 : 1.0 mL/min
 注入量 : 5 μL
 カラム温度 : 40℃
 検出波長 : 260 nm

1. Cefsulodin	2. Cefadroxil	3. Cephapirin	4. Cefaclor	5. Cephalixin
6. Cephadrine	7. Cefotaxime	8. Cefazolin	9. Cefuroxime	10. Cefmetazole
11. Cefoxitin	12. Cefoperazone	13. Cephalothin		

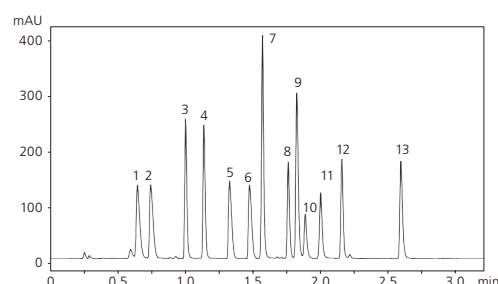


図6 セフェム系抗生物質 13成分のメソッドスカウティング事例

Products

ナノ材料分級計測システム 遠心フィールドフローフラクショネーション

LCビジネスユニット
青木 健吾

ナノ材料の分級計測法である遠心フィールドフローフラクショネーション（遠心FFF）は、液体クロマトグラフィーとは異なり分離担体（固定相）を使用せず、遠心力を利用して粒子を分級する手法です。遠心FFFはサイズ排除クロマトグラフィー（SEC）やハイドロダイナミッククロマトグラフィー（HDC）よりも大きなサイズの粒子を分級できるため、従来困難であった粒子径が大きく異なる粒子が混在する試料に対しても一斉測定が可能です。島津遠心FFFユニット FFF-C8030は、高い遠心力によって既存装置の課題であった分級下限を下げると同時に、高い分離性能を実現しました。FFF-C8030は、島津HPLC用の各種検出器と組み合わせて使用することももちろん、分画採取した試料を電子顕微鏡観察するなど、既存の測定技術との多彩な組み合わせが可能です。



1. 粒子径測定の実状と課題

近年、電子部品、医薬、化学製品など多くの分野で製品の高性能、高機能化が進み、材料となる粒子の微細化や均一化が求められています。一方、「一辺が1～100 nmである物質」として定義される『ナノ材料』に対しては、安全性への懸念から欧州を中心として規制が始まっています。こうした状況から、微粒子の大きさをより正確に測定できる技術が求められています。

● 光散乱を利用した粒子径測定法の課題

一般に普及している粒子径測定法の中で、ナノ材料に対してよく使用される測定法が静的光散乱法（SLS）や動的光散乱法（DLS）です。しかし、これらの方法は大小異なる粒子が混在している試料においては、小さな粒子のシグナルが大きな粒子のシグナルに隠れてしまい、小さな粒子を正しく測定できなくなるケースがあることが知られています。図1は、ポリスチレンラテックス（PSL）標準粒子の粒子径81 nmと147 nm、及び両者の1：1混合試料をDLSで測定した結果です。混合試料は、混合前試料の中間の粒子径の単峰分布として測定されていることがわかります。

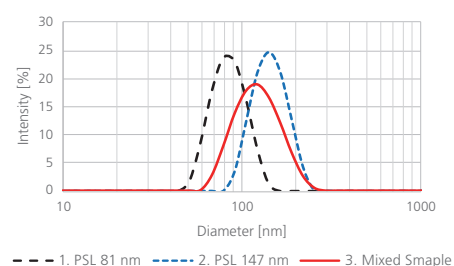


図1 DLSによるポリスチレンラテックス粒子の測定例

● 電子顕微鏡観察による粒子径測定の実状

個々の粒子を直接観察できる走査型／透過型電子顕微鏡（SEM/TEM）もよく使用される測定器です。電子顕微鏡ではサイズや形状など様々な情報を得ることができますが、粒子サイズごとに適切な観察倍率が異なることや小さな粒子が大きな粒子の陰に隠れてしまう課題があり、大きさの異なる粒子が混在している場合に観察が難しくなることがあります。例えば図2のように、大小の粒子が重なっている画像では、小さな粒子を数え落としてしまうため、正確な粒子径分布を求めることは困難です。また、視野の狭さのため、少数の画像からではサンプル全体の分布が分からず、正確な粒子径分布を測定するためには多数の画像解析が必要になります。

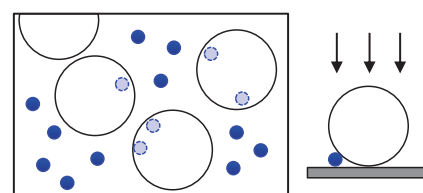


図2 電子顕微鏡観察の課題

● 分級の必要性

こうした課題の解決策として、図3のようにナノ材料を分級してから測定する分級計測に注目が集まっています。この概念は、2013～2018年度に行われた「ナノ材料の産業利用を支える計測ソリューション開発コンソーシアム」(COMS-NANO)の活動の中で提案され、その有用性が報告されています。



図3 分級計測の概念図

2. 遠心フィールドフローフラクショネーション

● 原理

遠心FFFは、液中に分散した微粒子を円環状のチャンネルを高速で回転させることで発生した遠心力を使ってサイズ分級します。遠心FFFシステムは、図4に示すように送液ポンプ、試料注入装置、遠心FFFユニット (FFF-C8030)、検出器で構成されます。図5に、遠心FFFによる分級の原理を説明します。まず、ポンプからキャリアを連続的に送液した状態で、遠心FFFユニットの分離チャンネルを一定の回転速度で回転させます。その後、試料注入装置から試料をキャリアに乗せて導入します。試料がチャンネル内に導入されたらチャンネルへの送液を一時停止し、チャンネル内で試料を沈降させます(図5上)。この工程をリラクゼーションと呼びます。一定時間経過後にチャンネルへの送液を再開し、続いて回転速度を徐々に低くします。するとチャンネル内の粒子は、拡散力が大きく、作用する遠心力が弱い小さな粒子から順にチャンネル中央側へ分布します(図5下)。チャンネル中央側はキャリアの流速が早いため、粒子がチャンネル内を進む速度が速くなります。その結果、小さな粒子から順番にサイズに応じた時間差がついて粒子を溶出させることができます。チャンネルから溶出した粒子は、遠心FFFユニットに接続した検出器で測定します。検出器には、試料に応じて吸光光度検出器、光散乱検出器、粒子径測定器などを使用します。さらに分取装置を使用して、分級した微粒子を取り出すこともできます。分画試料はキャリア液中に試料が分散した状態であるため、液体試料を扱える測定器で測定したり、キャリア液を乾燥させたのちに電子顕微鏡等で観察します。

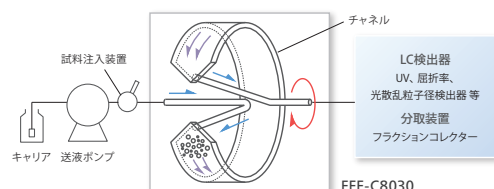


図4 遠心フィールドフローフラクショネーションシステム

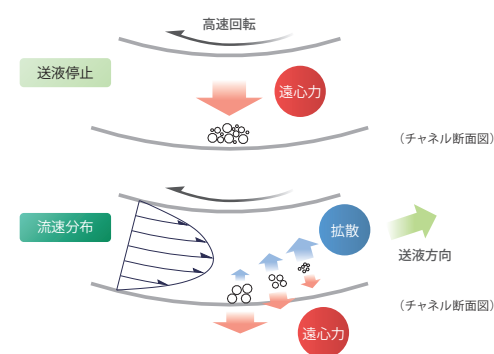


図5 遠心フィールドフローフラクショネーションの原理

● 分離例

図6に、FFF-C8030を用いて図1で測定したものと同一ポリスチレンラテックス粒子の混合試料(粒子径81 nmと粒子径147 nm)を分級分析した例を示します。吸光光度検出器(波長220 nm)でモニターした溶出曲線(図6上)では2つのピークが見られ、2種類の粒子が分離されていることが確認できます。粒子径を測定できる多角度光散乱検出器で測定した粒子半径からはそれぞれのピークが81 nmと147 nmの粒子に相当していることが確かめられました。この結果から粒子径分布を求めると図6下のようになり、図1に示したDLSの測定と比較して、混合試料の分布がより正確に測定できることが確認されました。このように遠心FFFを用いると、大きさの異なる粒子が混在した試料でも粒子径に応じて分離して測定することが可能となります。

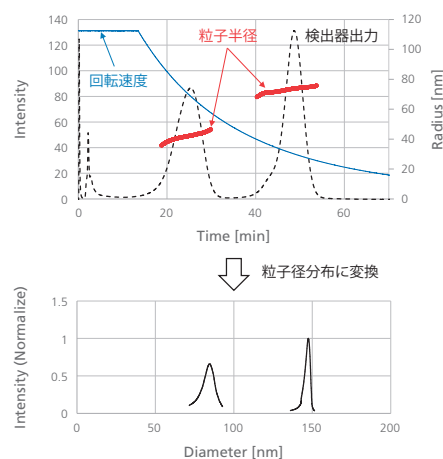


図6 遠心FFFによるポリスチレンラテックス粒子の測定例

● 幅広い分級範囲

遠心FFFはSECやHDCに比べ、広いサイズの粒子の分離が可能です。また、SECなどと異なり排除限界をもつ固定相を使わないため、より大きな粒子も分離でき、カラム目詰りも比較的起きにくくなります。遠心FFFは、粒子径が大きく異なる粒子が混在する試料の一斉測定に適しています(図7)。

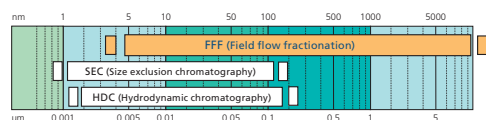


図7 FFF法の分級範囲

3. 最大15,900×gの遠心力による高分離性能

遠心FFFにおいて重要なパラメーターは試料注入やリラクゼーション時の遠心力、すなわち初期回転速度です。初期回転速度が分級性能に与える影響を、銀粒子およびシリカ粒子の分級例をもとに解説します。

● 分級下限粒子径の引き下げ

遠心FFFでは初期回転速度を高くすることで、より小さな粒子を分級できるようになります。実際の測定では、試料溶媒や遠心力のかからない不純物はリラクゼーション終了直後に溶出します。初期回転速度を高めると、そうした不純物と微小粒子を分離することができます。分離下限の粒子径は粒子密度によって変化しますが、FFF-C8030では銀粒子(密度10.5 g/cm³)で約10 nm、ポリスチレンラテックス粒子(密度1.05 g/cm³)で約60 nmが分級下限です。

FFF-C8030で銀標準粒子(10 nm、40 nm)の混合試料を分級した例を図8に示します。初期回転速度が低い場合(図8上)では、粒子以外の不純物と粒子径10 nmの銀粒子が分離できずに1つのピークとして観測されています。一方、初期回転速度が高い場合(図8下)では、不純物ピークと粒子径10 nmのピークが分離されました。

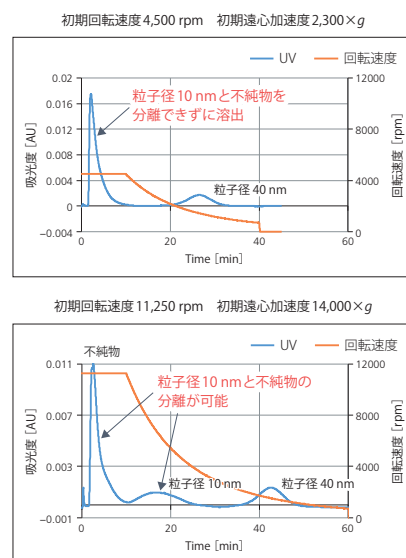


図8 銀粒子の分級下限

● 分級能の向上

初期回転速度は、分離能にも影響を与えます。図9に、4種類のシリカ標準粒子(40 nm、50 nm、60 nm、70 nm)を混合してFFF-C8030で分級した例を示します。回転速度が低い場合(4,000 rpm、図9左)はピークに大きな重なりが生じていますが、回転速度を高くすることで分離が向上されています(10,000 rpm、図9右)。このように、遠心FFFでは初期回転速度を高くするほど粒子の分離性能が良くなります。

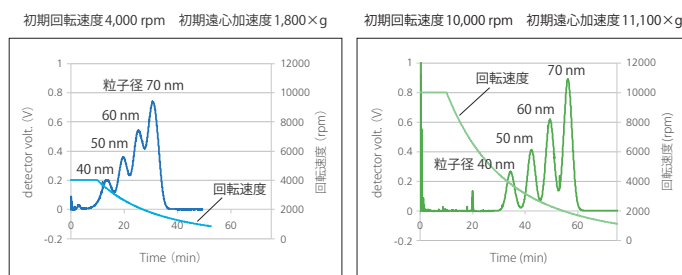


図9 シリカ標準粒子混合サンプルの分級例

出展：産業技術総合研究所物質計測標準研究部門 加藤晴久主任研究員ご提供

4. 多彩な測定技術との組み合わせ

FFF-C8030は、オンライン測定器、分画装置(フラクションコレクター)、オフライン測定器を使用することで様々な測定を行うことができます(図10)。FFF-C8030の下流にオンライン測定器を接続すると、分級状況のモニタリングや定性・定量分析、粒子径測定が可能になります。濃度の定量分析をする場合は、吸光光度検出器、蛍光検出器、屈折率検出器などから試料の特性に合わせて適切な検出器を選択します。粒子径分布を測定する場合は、多角度光散乱検出器(MALS)を使用します。MALSは、濃度検出器(吸光光度または屈折率検出器)と組み合わせることで分子量を求めることもできます。サイズ標準試料がある場合は、SECのようにサイズ検量線を作成するなどして保持時間から粒子径を算出し、粒子径分布を求めることもできます。フラクションコレクターで試料を分取すれば、様々なオフライン測定器を使用した多角的な測定ができます。例えば、誘導結合プラズマ質量分析装置(ICP-MS)では試料の組成や濃度の測定が可能です。また、電子顕微鏡(SEM/TEM)や走査型プローブ顕微鏡(SPM)を使えば形態・凝集観察が、電子線マイクロアナライザー(EPMA)では、形態観察と同時に組成解析もできます。遠心FFF(FFF-C8030)は多彩な測定器と組み合わせることで、ナノ材料の測定精度向上に貢献します。



図10 FFF-C8030で使用される測定器

謝辞

本稿のデータの一部は、国立研究開発法人産業技術総合研究所にて測定されたものです。特に、加藤晴久様、中村文子様には多大なご協力・ご助言をいただきました。ここに感謝の意を表します。

Applications

セルロースナノファイバーの構成糖分析

グローバルアプリケーション開発センター¹⁾、分析計測営業部²⁾周 毅婷¹⁾、内田 あずさ²⁾

セルロースナノファイバー (Cellulose Nanofiber、以下CNF) は、バイオマスを効率良く有効活用し、持続循環型社会システム構築に向けたアプローチの一種となる技術です。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バクテリアにより、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。

1. 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、アルギニン反応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。

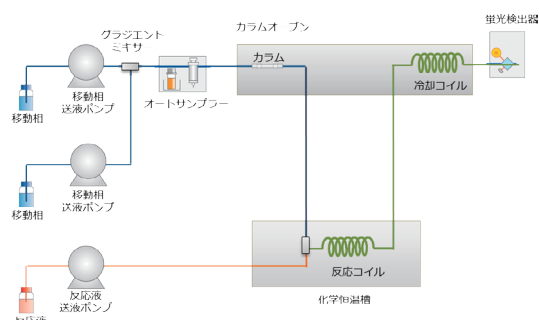


図1 Nexera還元糖分析システムの流路図

2. 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.	試料
1	広葉樹パルプ由来CNF-1
2	広葉樹パルプ由来CNF-2
3	広葉樹パルプ由来CNF-3
4	カルボキシメチルセルロース
5	針葉樹パルプ由来CNF
6	親水性発酵ナノセルロース
7	両親媒性発酵ナノセルロース
8	市販コットン（綿花由来）

1. 凍結乾燥

すべての試料を凍結乾燥する。

2. 一次加水分解

試料約 0.03 g を試験管 25 mL に入れる。300 μ L の 72 % 硫酸を加える。試験管を 30 $^{\circ}$ C のウォーターバスに約 1 時間浸す。15 分毎にボルテックスミキサーやガラス棒で攪拌し、試料を完全に溶解させる。

3. 二次加水分解

8.4 mL の超純水を加えて、よく混和する。オートクレープで 60 分間 120 $^{\circ}$ C で熱する。

4. 中和

ガラス繊維ろ紙でろ過し、純水 10 mL で定容する。pH 試験紙で pH を確認しながら、飽和状態の水酸化バリウム溶液^{*1}を添加し、中和させ^{*2}、硫酸を塩析させる。

5. ろ過・希釈

孔径 0.2 μ m のメンブランフィルターでろ過する。超純水で希釈^{*3}する。

^{*1}: 超純水 100 mL に水酸化バリウム八水和物を 8 g 溶解して調製しました。

^{*2}, ^{*3}: 試料により比率及び倍率が異なります。表2参照ください。

図2 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、各々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

試料	試料：飽和水酸化バリウムの比率 (v:v)	pH	希釈倍率
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

3. 分析条件

表3に、加水分解処理した試料の分析条件を示します。糖はほう酸と陰イオン性錯体を形成することから、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 によって糖を分離しました。図3に、糖標準液のクロマトグラムを示します。

表3 分析条件

システム	: Nexera還元糖分析システム
＜分離＞	
カラム	: Shim-pack ISA-09 (250 mm × 4.0 mmI.D.) *4
ガードカラム	: Shim-pack ISA-09 (G) (50 mm × 4.0 mmI.D.) *5
移動相A	: 0.1 mmol/L ほう酸 (カリウム) 緩衝液 (pH 8)
移動相B	: 0.4 mmol/L ほう酸 (カリウム) 緩衝液 (pH 9)
流量	: 0.6 mL/min
タイムプログラム	: B Conc. 0 % (0 min) -100 % (50 min) -100 % (65 min) -0 % (65.01-90 min)
ミキサー容量	: 1.7 mL
カラム温度	: 65 °C
注入量	: 10 µL
バイアル	: SHIMADZU LabTotal Vial for LC 1.5 mL, Glass*6
＜ポストカラム誘導体化反応＞	
反応液	: 10 g/L アルギニン、30 g/L ほう酸水溶液
反応液流量	: 0.5 mL/min
反応温度	: 150 °C
検出	: 蛍光 Ex. 320 nm、Em. 430 nm (RF-20Axs)
セル温度	: 25 °C
反応コイル	: SUS 製、10 m×0.8 mmI.D.

*4 P/N : 228-59512-41、*5 P/N : S228-59512-42、*6 P/N : 227-34001-01

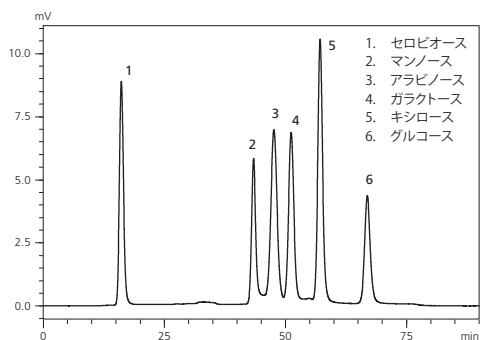


図3 糖標準液のクロマトグラム (各500 µmol/L)

4. 検量線の直線性

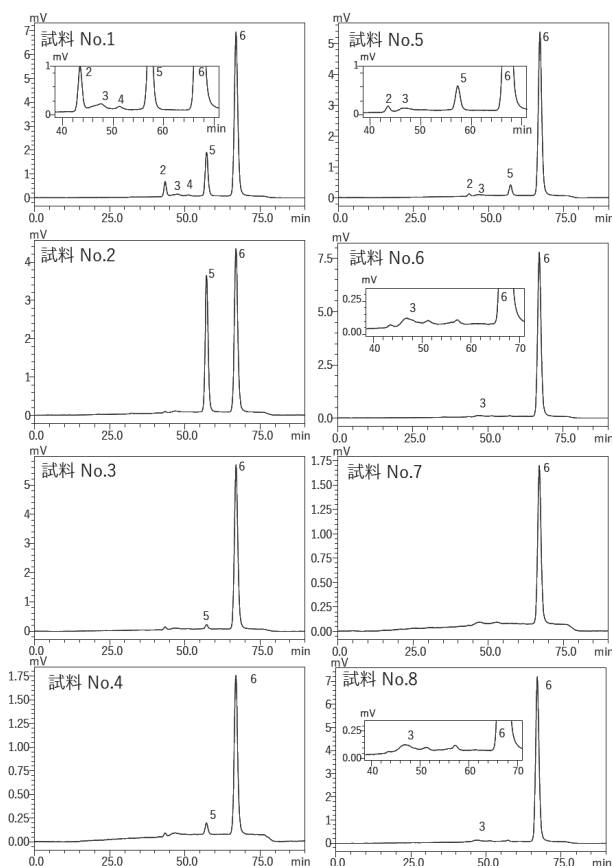
表4に、標準液の分析結果から作成した検量線の範囲と寄与率 (r^2) を示します。何れの糖においても、 r^2 は0.999 以上の良好な直線性が確認されました。

表4 各化合物の検量線範囲と寄与率 (r^2)

化合物	検量線範囲 (µmol/L)	寄与率 (r^2)
セロビオース	5-500	0.9995
マンノース	5-500	0.9991
アラビノース	5-500	0.9998
ガラクトース	5-500	0.9997
キシロース	5-500	0.9995
グルコース	50-1000	0.9998

5. CNF 構成糖の測定

図4に、CNF各試料を図2に従って前処理後、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示します。ポストカラム誘導体化反応により、糖を選択的に感度良く検出することができました。



1. セロビオース 2. マンノース 3. アラビノース
4. ガラクトース 5. キシロース 6. グルコース

図4 CNFを前処理した試料のクロマトグラム

6. 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って一部消滅するため、単糖の回収率試験を行い補正する必要があります。

単糖標準混合液（各糖：500 $\mu\text{mol/L}$ ）8.4 mLを25 mLの試験管に取り、300 μL の72 %硫酸をピペットで加えました。この溶液を2つ用意し、1つは加水分解と同時に120 $^{\circ}\text{C}$ 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液及び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乗じることで、過分解補正を行いました。表5に、各糖の回収率と過分解補正係数を示します。補正後単糖濃度に6炭糖には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5 単糖の回収率と過分解補正係数

化合物	回収率 (%)	過分解補正係数
キシロース	87	1.15
アラビノース	92	1.08
マンノース	94	1.07
グルコース	95	1.06
ガラクトース	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。

7. 構成糖の比率

検出された糖の定量値から、回収率試験及び過分解補正と多糖換算を行いました。図5に、積算値を100とした時の各糖の構成比を示します。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6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ですが、

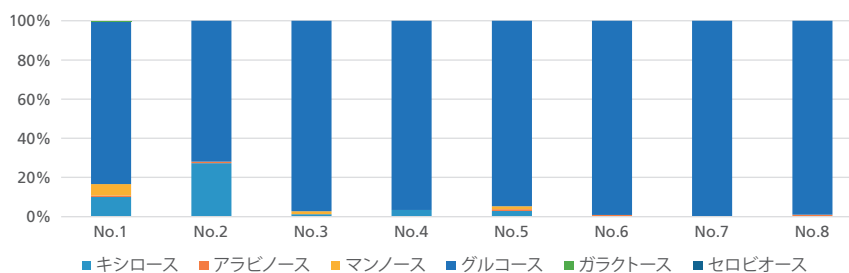


図5 各試料の構成糖比率

本文書に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。
なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

ヘミセルロースの主成分は、キシロースなどの糖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。

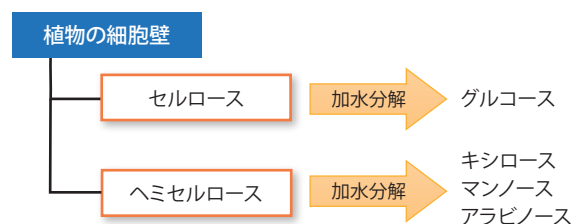


図6 セルロースとヘミセルロース

8. まとめ

Nexera還元糖分析システムを用いて加水分解処理したCNFの糖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