

Original

セルロースの分解試料における単糖類の迅速HPLC分析

平山修治・山口迪子・泉 可也

Rapid HPLC Analysis of Monosaccharides in the Cellulose Decomposition Samples

Shuji Hirayama, Michiko Yamaguchi, Yoshiya Izumi

Biomaterial in Tokyo Co., Ltd.

5-4-19-103, Kashiwanoha, Kashiwa-shi, Chiba, 272-0882 Japan

Abstract

During producing the sulfite pulp, six kinds monosaccharides (arabinose, rhamnos, galactose, glucose, xylose and mannose) in sulfite waste liquor was presented. Conventional HPLC method to analyze these six monosaccharides were time consuming. Especially, it has been difficult to separate arabinose, rhamnose and galactose.

This manuscript was described the rapid determination of six monosaccharides. The linearity of the calibration curves of this method were yielded the coefficients ($r=0.996-0.999$). Recoveries were in the range of 89-98%.

Keywords: Analysis, monosaccharides, soft cellulose, hard cellulose

1. はじめに

近年、亜硫酸パルプ廃液に含まれる単糖類をエタノールに変換する技術や、農産物（コーン、さとうきび等）をエタノール化するのではなく、廃棄される稲わらや麦わらのソフトセルロース等を化学的に処理し、さらに酵素や細菌を利用してエタノールを製造する技術の確立が望まれている。その過程で単糖類の含有量を迅速に測定する方法が不可欠である。

パルプ製造法における構成糖の測定法としては、パルプを加水分解して得られた単糖類をトリメチルケイ素誘導体[1]としてGC分析する方法が用いられているが、キャピラリーGCでも複数の誘導体（異性体）混合物を完全に分離できない。そのため、糖の異性体を生じないようアルデヒド基をNaBH₄により還元して水酸基とし、糖アルコールを無水酢酸-ピリジンでアセチル化[2]して揮発性誘導体を生成させ、その誘導体をGC分析する木材パルプの炭水化物であるアラビノース、ガラクトース、グルコース、キシロースおよびマンノースの5成分の詳細な方法についてTappi法[3]として記載している。

前川等[4]はそのTappi法[3]を用いて木材のラムノースを含

む6成分の構成糖成分を定量し、その方法が紙パルプの構成糖組成分析法として広く用いられている。このGC法は還元とアセチル化の煩雑な操作を必要とし、化学的な処理や酵素反応および微生物による糖化の経時変化の監視法として用いることは困難である。

一方、HPLCによる糖分析法には誘導体化せず検出する方法としてRI (Refractive Index) 法とPAD (Pulsed Amperometric Detector) 法[5, 6]がある。RI法は検出感度が低く、グラジエント分析ができないため今日ではほとんど利用されていない。PAD法は糖濃度が300 ng/mlから150 µg/mlの範囲で測定でき、グラジエント分析ができる。その他に、HPLC法には蛍光検出器[7]を用いた高感度法があるがプレカラム誘導体化やカラム溶出後に蛍光物質を生成するポストカラム法の複雑な方法となっている。

鈴木等[8]は陰イオン交換カラムとPAD検出器を用いて1サイクル20分の糖分析法を発表しているが、製紙工場での利用例は少なく、Tappi法[3]のGC法が頻繁に用いられている。我々はGC法で分析可能であるが鈴木等[8]の方法では分析できなかった木材等のハードセルロースにわずかに検出される

ラムノースを含む6成分の糖を対象とした1サイクル15分の迅速な糖分析法を開発した。

2. 実験

2.1. 装置

HPLCのポンプはダイオネクス製モデルGP-40グラジェントポンプ(デガッサー付)に20 μ lサンプルループを装着したAS-50オートサンプラーを用いた。PAD検出器としてダイオネクス製ED-40を使用し、GP-40ポンプを用いポストカラム法[8]で0.15 M水酸化ナトリウムを送液した。また、データ処理にはダイオネクス製PeakNetクロマトグラフィソフトウェアを用いた。

分析カラムとして陰イオン交換カラムのダイオネクス製CarboPac PA 1 4 \times 250 mmおよびガードカラムとしてPA 1 Guard 4 \times 50 mmを使用した。

2.2. 試薬

糖の標準試薬としてデオキシグルコース (2-deoxy-D-glucose)、アラビノース (D-arabinose)、ラムノース (L-rhamnose)、ガラクトース (D-galactose)、グルコース (D-glucose)、キシロース (D-xylose)、マンノース (D-mannose) およびフルクトース (D-fructose) は関東化学製の特級試薬を用いた。溶離液試薬として水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、炭酸ナトリウムは関東化学製特級試薬を使用した。また、純水にはミリポア製ミリQ水を用いた。

2.3. クロマトグラフィの条件

溶離液1として純水、溶離液2として0.3 M水酸化ナトリウム溶液、溶離液3として0.1 M水酸化カリウム溶液、溶離

液4として0.125 M炭酸ナトリウムを使用した。また、糖のPAD検出を使用する際、pHの変化により感度の変動を避けるとともに、ベースラインを安定化するため、内径0.25 mm長さ5 mのテフロンチューブを使用して0.15 M水酸化ナトリウムを0.5 ml/minの流量で送液するポストカラム法を用いた。

溶離液条件をTable 1に示した。なお、本分析を行う前に内部標準物質および各標準物質1 μ g/mlのチェックスタンダードを含んだ溶液のダミー分析を2回行いかラムの平衡化を図った。

2.4. 検量線

デオキシグルコース(内部標準)、アラビノース、ラムノース、ガラクトース、グルコース、キシロース、マンノースの各1%溶液を作成してその1 mlをPCRチューブに小分けして-20 $^{\circ}$ Cで冷凍保存し、用時解凍し検量線を作成する溶液を調整した。

検量線はデオキシグルコースを10 μ g/ml添加し、それ以外の各糖を0.3 μ g、0.5 μ g、1 μ g、5 μ g、10 μ gおよび30 μ gを含んだ各1 mlの標準試料を用いて作成した。ただし、各5 μ gの標準糖を含む検量線溶液にラムノースを2 μ g添加し、10 μ gと30 μ gの検量線溶液にはラムノースを添加しなかった。

なお、ハードセルローズに含まれるラムノースは0.2%以下なのでアラビノース、ラムノース、ガラクトースの分離を損なわない0.3 μ g、0.5 μ g、1 μ g、および2 μ gの範囲でラムノースの検量線を作成した。

2.5. 分析試料

ハードセルローズの加水分解試料としてのサルファイトパルプ廃液(pH 3.0)は日本製紙ケミカル株式会社の江津事業所より入手し1000倍希釈して分析した。ソフトセルローズの試料として、農林水産省バイオエタノール製造実証試験における「ソフトセルローズ利活用技術活用事業」において柏の葉バイオエタノール生産実証有限責任事業組合が生産した稲わらをアルカリ蒸解処理したものを0.1 M塩酸でpH 4.0に調整後、1000倍希釈した溶液を分析した。

3. 結果と考察

3.1. クロマト条件の最適化

Figure 1にハードセルローズおよびソフトセルローズに含まれるアラビノース、ラムノース、ガラクトース、グルコース、キシロース、マンノースの6種の単糖と内部標準であるデオキシグルコースのクロマトグラムを示した。Table 2に6種の単糖の相対保持値とその相対標準偏差を示した。なお、内部標準物質を用いない場合(n=15)の保持値のRSDはアラビノースで5.9%、ラムノースで6.9%、ガラクトースで6.7%、グルコースで7.4%、キシロースで7.7%、マンノースでは8.1%であった。

Table 1. Time program of eluent (flow rate:1 ml/min)

| time (min) | eluent 1 | eluent 2 | eluent 3 | eluent 4 |
|------------|----------|----------|----------|----------|
| 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 0.1 | 97.0 | 3.0 | 0.0 | 0.0 |
| 1.6 | 97.0 | 3.0 | 0.0 | 0.0 |
| 2.0 | 95.0 | 5.0 | 0.0 | 0.0 |
| 2.1 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 9.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 9.1 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| 10.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 |
| 10.1 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 |
| 10.6 | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 |
| 10.7 | 30.0 | 0.0 | 0.0 | 70.0 |
| 10.8 | 30.0 | 0.0 | 0.0 | 70.0 |
| 10.9 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 15.0 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |

| | |
|-----------|---|
| eluent 1: | deionized water |
| eluent 2: | 0.3 M NaOH |
| eluent 3: | 0.1 M KOH |
| eluent 4: | 0.125 M Na ₂ CO ₃ |

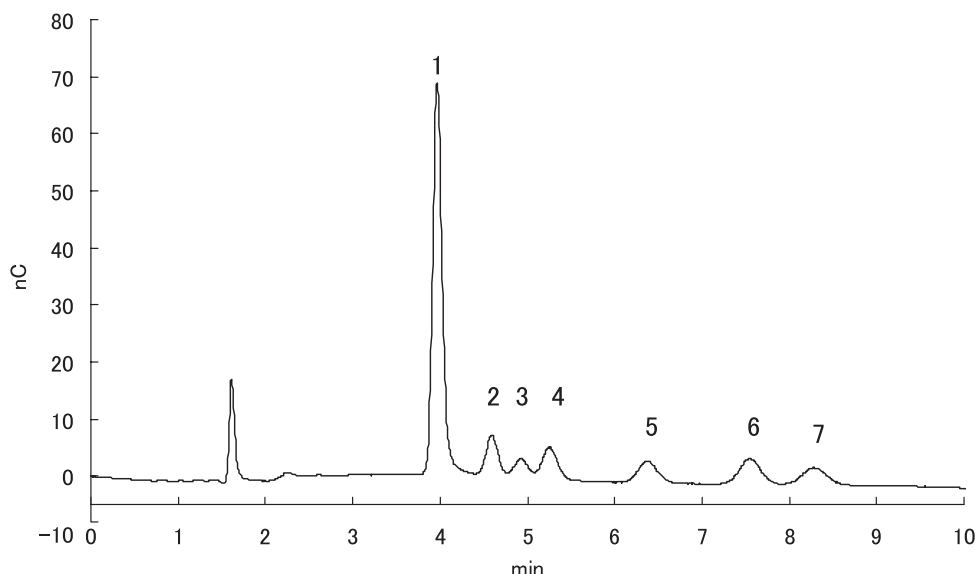


Figure 1. Chromatogram of standards.

Peak identification: 1,2-deoxy-D-glucose (internal standard, 10 µg/ml); 2,arabinose; 3,rhamnose; 4,gallactose; 5,glucose; 6,xylose; 7,mannose.
Each standard is contained 1 µg/ml.

Table 2. Repeatability (n=15) of retention time obtained for standard monosaccharide solution containing 1 µ/ml each monosaccharide and 10 µ/ml of internal standard

| | Relative retention time | RSD (%) |
|----------------------|-------------------------|---------|
| Deoxy-glucose (ISTD) | 1.00 | |
| Arabinose | 1.18 | 0.8 |
| Rhamnose | 1.25 | 1.6 |
| Galactose | 1.35 | 1.5 |
| Glucose | 1.62 | 1.9 |
| Xylose | 1.92 | 2.1 |
| Mannose | 2.09 | 1.9 |

なお、アラビノース、ラムノース、ガラクトース各 1 µg/ml のRsはアラビノースとラムノースで1.07、ラムノースとガラクトースでは1.01であった。

3.2. 検量線の直線性と相関性および検出下限

アラビビノース、ガラクトース、グルコース、キシロースおよびマンノースの検量線は0.3 µg/mlから30 µg/mlまで直線でその相関係数は0.999であり、ラムノースの0.3 µg/mlから2 µg/mlの検量線の相関係数は0.996であった。なお、アラビノース、ラムノース、ガラクトース、グルコースの検出下限値は0.1 µg/mlであり、キシロースおよびマンノースの検出下限値は0.2 µg/mlであった。

3.3. サルファイトパルプ廃液の定量結果

Table 3 に 3 種のサルファイトパルプ廃液について 5 回の

Table 3. Analytical data of neutral sugar composition determined in the waste liquor of sulfite pulp by liquid chromatography (n=5)

| | | Mean (%) | RSD (%) |
|----------------|-----------|----------|---------|
| Waste liquor A | Arabinose | 0.07 | 7.4 |
| | Rhamnose | 0.18 | 10 |
| | Galactose | 0.23 | 2.3 |
| | Glucose | 0.41 | 1.3 |
| | Xylose | 2.68 | 1.7 |
| | Mannose | 0.14 | 5.0 |
| Waste liquor B | Arabinose | 0.05 | 0 |
| | Rhamnose | 0.01 | 7.1 |
| | Galactose | 0.16 | 3.5 |
| | Glucose | 0.25 | 1.8 |
| | Xylose | 1.87 | 0.3 |
| Waste liquor C | Mannose | 0.09 | 6.4 |
| | Arabinose | 0.04 | 0 |
| | Rhamnose | 0.07 | 10 |
| | Galactose | 0.11 | 4.8 |
| | Glucose | 0.18 | 2.5 |
| | Xylose | 1.43 | 0.8 |
| | Mannose | 0.07 | 6.6 |

繰り返し分析における定量結果を示す。ラムノースの相対標準偏差だけが10%以上であるが、糖組成分析としては満足できるものと考えられる。

サルファイトパルプ廃液に各糖濃度で 1 µg/1 ml の添加回収試験では、アラビノースで97%、ラムノースで90%、ガラ

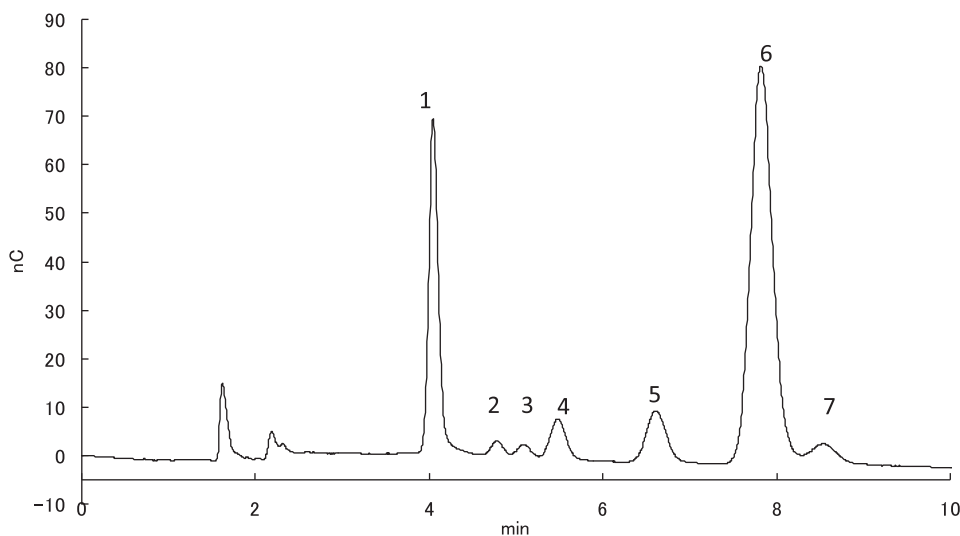


Figure 2. Chromatogram of the sulfite pulp waste liquor (waste liquor A).

Peak identification: 1,2-deox-D-glucose (internal standard); 2,arabinose; 3,rhamnose; 4,galactose; 5,glucose; 6,xylose; 7,mannose.

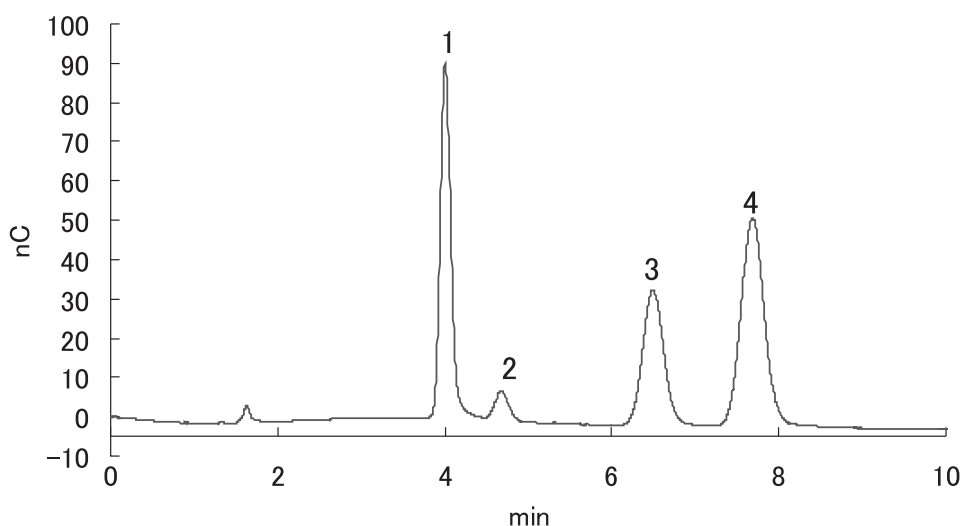


Figure 3. Chromatogram of alkaline cooked soft cellulose (rise straw).

Peak identification: 1,2-deoxy-D-glucose (internal standard); 2,arabinose; 3,glucose; 4,xylose.

クトースで94%、グルコースで96%、キシロースで98%、マンノースでは87%であった。

なお、Figure 2 にサルファイトパルプ廃液 (waste liquor A) のクロマトグラムを、Figure 3 にソフトセルロースである稲わらをアルカリ蒸解処理した試料のクロマトグラムを示す。

3.4. まとめ

本分析法は特に、時々刻々変化する糖組成のモニタリングに対応するため、カラムの平衡化時間を最小化しているので、保持時間の変動は避けられないが内部標準物質を使用することにより定性および定量分析を確実にできると考えられ

る。

木材化学の研究者は、HPLCではラムノースを分離できないことから現在でもGCを多用しているものと思われる。実際に、我々の分析経験ではソフトセルロースにはラムノースがほとんど含まれておらず、ハードセルロース分析でも、アラビノース、ラムノースおよびガラクトースは微量成分である。従って、種々のセルロースから生じる糖の定量法として本方法は十分適用でき、GC分析に代わる迅速分析法となるものと考えられる。

鈴木等[8]は内部標準物質にリボースを用いているが、Sullivan等[6]が使用しているデオキシグルコースは分析目的の

糖より早く溶出するため、内部標準物質に用いると、近年バイオエタノールの原料として注目されるようになったサッカロースを主成分とするソルガム（イネ科作物）等を化学処理や酵素処理で生じるフラクトース（相対保持時間=2.28）の分析にも応用できるという優位性がある。

Sullivan等[6]は2価の炭酸イオンが陰イオン交換樹脂に比較的強く結合し交換容量を低下させるため、窒素ガスで溶離液中の炭酸イオンを除去して5種類の糖を50分で分析している。

ところが、鈴木等[8]はSullivan等[6]の分析において妨害となる2価の炭酸イオンでカラムを汚染する物質を除去しつつ、その炭酸イオンの減少による逆グラジエントによりアラビノース、ガラクトース、グルコース、キシロースおよびマンノースを20分で分析している。

しかし、炭酸イオンのグラジエントだけではラムノースの分離は難しい。

Sullivan等[6]、鈴木等[8]および我々が使用したCarboPac PA 1カラムはマイクロビーズで表面を修飾したペリキュラー型の陰イオン交換樹脂を充填しており、このマイクロビーズ樹脂は溶質を短時間で拡散させることができる。我々は鈴木等[8]が使用した炭酸イオンによるカラムのクリーンアップと溶質を短時間に拡散できるという利点を応用し、水酸化ナ

トリウムの急速なグラジエント法を用いたアラビノース、ラムノース、ガラクトース、グルコース、キシロースおよびマンノースの6種の糖を15分で分離できる分析法を開発した。

文献

- [1] Sweeley, C. C.; Bentley, R.; M, Makita and Wells, W. W. *J. Am. Chem. Soc.* **1963**, *85*, 2497–2507.
- [2] Crowell, E. P and Burnett, B. B. *Anal. Chem.* **1967**, *39*, 121–124.
- [3] TAPPI Test Method T 249 cm-85, “Carbohydrate composition of extractive-free wood and pulp by gas-liquid chromatography.”; In Tappi Test Methods. Atlanta, GA; Technical Association of the Pulp and Paper Industry.
- [4] 前田英一；越島哲夫. 木材研究・資料 **1987**, *23*, 219–224.
- [5] Lee, Y. C. *Anal. Biochem.* **1990**, *189*, 151–162.
- [6] Sullivan, J and Douek, M. *J. Chromatogr. A.* **1994**, *617*, 339–350.
- [7] Mikami, H.; Ishida, Y. *Bunseki Kagaku* **1983**, *32*, E 207–E 210.
- [8] Suzuki, M; Sakamoto, R and Aoyagi, T. *Tappi Journal* **1995**, *78*, 174–177.