

ガスクロマトグラフィーによる木材多糖成分の 分析と定量 (その1)

前 川 英 一・越 島 哲 夫

Analysis and Determination of Wood Polysaccharide Components by Gas-Liquid Chromatography [I]

Eiichi MAEKAWA and Tetsuo KOSHJIMA

(昭和62年8月3日受理)

1. 緒 言

木材を構成する種々の成分の中で、セルロース、ヘミセルロースを主体とする多糖成分は、材の70~75%を占める。これらの多糖成分を構成する単糖類は、中性糖としては D-グルコース (D-Glc), D-キシロース (D-Xyl), D-ガラクトース (D-Gal), L-アラビノース (L-Ara), D-マンノース (D-Man), L-ラムノース (L-Rha) であり、酸性糖としては 4-O-メチル D-グルクロン酸 (4-O-Me-D-Glc UA), D-グルクロン酸 (D-Glc UA), D-ガラクトン酸 (D-Gal UA) である。そして L-アラビノースと L-ラムノースが L-系列のアルドースであるのに対して、他の糖はいずれも D-系列のものである。また単糖類の環構造は、L-アラビノースのみフラノース型とピラノース型の存在が知られている以外、すべて構造的に安定なピラノース型である。植物ガム質や海藻の細胞壁成分として知られる L-フコースを材成分の構成単糖に挙げることもあるが、存在量の上から極めて稀で、構成単糖としてここでは含めない。

これらの構成単糖残基の分析・定量は、従来はペーパークロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーによって行われてきた。これまで1960年代前半の文献に記載されている木材多糖の組成分析値は、ペーパークロマトグラフィーによって分析・定量されたものである。

1954年に SAEMAN ら¹⁾によって材の多糖成分の加水分解法及びペーパークロマトグラフィーによる構成糖の分析・定量法の一定基準が確立されると、ペーパークロマトグラフィーによる方法が構成糖組成の分析・定量に専ら用いられてきた。MEIER²⁾はこの手法を用いて木材細胞壁における多糖成分の分布状態を初めて明らかにした。ペーパークロマトグラフィーによる分析・定量は、加水分解した単糖をろ紙上にスポットし、展開して分離後、抽出して比色定量するのであるが、操作が煩雑で、細かい技術を必要とし、大変な時間と労力を要する方法であった。近年になって機器分析技術の進展により、微量で、正確にしかも簡単な操作で分析・定量出来るガスクロマトグラフィー (GLC 法) 及び高速液体クロマトグラフィー (HPLC 法) が普及し、糖質の分析・定量への適用も検討されているようになった。とくに1960年代になって、単糖のみならずオリゴ糖、グリコンドのような糖質をトリメチルシリル化 (TMS 化) 誘導体に調製することによって、ガスクロマトグラフィーによる糖質の分析が可能であることが SWEELEY ら³⁾によって初めて示された。それ以来、糖質のガスクロマトグラフィーによる分析のみならず定量を目的として、一つの単糖

が相当する一つのピークを与えるアルジトールアセテート法の適用が検討された。1960年代後半になって CROWELL⁴⁾ ら及び BROCHARDT ら⁵⁾によってガスクロマトグラフィーによる木材多糖成分のアルジトールアセテート法による分析・定量法が発表されると、従来のペーパークロマトグラフィーによって行われていた構成糖組成の分析・定量に代ってガスクロマトグラフィーによる方法が適用されるようになった。その結果、今日ではガスクロマトグラフィーによる中性単糖の分析・定量は、ほぼ確立されたといつてよい。紙パルプ試験法にもアルジトールアセテートとするガスクロマトグラフィーによる木材パルプ及びパルプ材の炭水化物の組成分析法が詳細に記載されている⁶⁾。

最近のガスクロマトグラフには大抵本体にデータ処理装置（島津製作所のガスクロマトグラフでは、クロマトパック C-R1B, C-R2A, C-R5A など）が付属している場合が多く、調製試料をガスクロマトグラフに注入すると自動的に分析結果の記録から定量計算まで行なうことが出来るので大変便利である。従って Crowell⁴⁾ や Slonecker ら⁶⁾によって示された構成糖組成の分析・定量のための複雑な計算を適用しなくても簡単な方法で構成糖組成を分析・定量することが出来るので紹介する。ここでは著者らがガスクロマトグラフィーによって材の構成糖組成を分析・定量している実例を記載する。

2. 実 験

2.1 供試木粉

供試木粉はブナ材、イタヤカエデ材、アカマツ材、モウソウチク材を用い、常法通りあらかじめアルコール・ベンゼン混液（1：2，v/v）で抽出処理後、60～80メッシュの大きさに揃える。調整木粉の水分含量を JIS-8002-1959 に準じて定量し、絶乾重量をもとめておく。

2.2 酸加水分解

脱脂処理済み木粉 0.25～0.3 g を秤量して、秤量瓶にとり、一定時間（4時間）105°C で乾燥する。72% (w/w) 硫酸 5 ml を加え、室温（25～30°C）にて1時間ときどきガラス棒でよく攪拌して突き砕き放置する。（1次加水分解）内容物は 300 ml 容三角フラスコに蒸留水 139 ml で定量的に移し入れ、硫酸濃度4%とする。アルミ箔で口をおおった容器ごと滅菌用オートクレーブ中に入れて、120°C にて1時間加水分解する。（2次加水分解）常圧で行なう場合、蒸留水で希釈後、100°C で6時間煮沸する。1次、2次の加水分解により木材中の多糖成分はほぼ定量的に単糖に加水分解される。Table 1 に示したようにキシロースが加水分解の際にいく分崩壊を受け易いが、他の糖は95%以上の残存量で回収される。

Table 1. Residual sugar contents on conditions of complete hydrolysis

	72% H ₂ SO ₄ 30°C, 1 hr ¹⁾ 4% H ₂ SO ₄ 15 psi, 1 hr	72% H ₂ SO ₄ 30°C, 1 hr ²⁾ 4% H ₂ SO ₄ boil, 6 hr	1N H ₂ SO ₄ 100°C, 8 hr in sealed tube ³⁾
Glucose	97.4(%)	100(%)	} 100(%)
Mannose	96.2	98.3	
Galactose	97.2	99.5	
Arabinose	95.3	98.6	96.0
Xylose	91.2	91.4	87.8
Rhamnose			93.3

1) J.F. SAEMAN, W.E. MOORE, R.L. MITCHELL, M.A. MILLETT: Tappi, 37, 336 (1954)

2) 戸田久昭, 浜田忠平: 紙パ技協誌, 12, 324 (1958)

3) 著者の分析データ

2.3 中 和

加水分解後、飽和水酸化バリウム溶液で pH 5.0～5.5 に中和し、生成した硫酸バリウムの沈殿物と不溶

性残渣は遠心分離またはセライト層を通して吸引ろ過して除去する。1晩放置後、ろ液の pH を再調整して、減圧下、40°C にて濃縮し 50 ml とする。不溶残渣はろ過または遠心分離して除去する。

2.4 中性糖成分と酸性糖成分の分離

濃縮液はアニオン型 Dowex 1×8 (アセテート型, 100~200 メッシュ) カラムに通して、蒸留水で中性糖成分を流出後、30% 酢酸で酸性糖成分を流出する。前者によって分離した区分は蒸留水で 100ml 定容とし、その 5 ml を分析に供試する。

2.5 加水分解単糖のアルジトールアセテートへの変換

加水分解液に内部標準糖として *meso*-イノシトール (1 mg/ml) 液を 1 ml 加えて、水素化ホウ素ナトリウム 15~20 mg 加えてよく混合し、室温に 2~3 時間放置する。過剰の水素化ホウ素ナトリウムは酢酸を滴々加えて分解し、(水素の発生が認められなくなるまで) 40°C にて減圧濃縮乾固する。内容物はメタノール 5 ml 加えて溶解し、再度減圧濃縮乾固する。この操作を反復処理後、五酸化リン上真空中で一晩乾燥する。乾燥した内容物に無水酢酸 5 ml 加え、120°C にて 2 時間加熱する。(アセチル化) 冷後、水 2 ml 加え混合し、試験管に移し入れ、ジクロルメタン (2 塩化メチレン) 3~4 ml でよく振とうしてアセチル化物を抽出する。ジクロルメタン層は蒸留水で洗浄し、40°C で減圧濃縮する。この際、メタノールを加えて濃縮を繰り返すと濃縮が促進される。濃縮物にジクロルメタン 0.2~0.5 ml を加えて溶解し、その 1~2 μ l をとってガスクロマトグラフィーによる分析に供試する。

2.6 標準糖溶液を用いるアルジトールアセテートへの変換

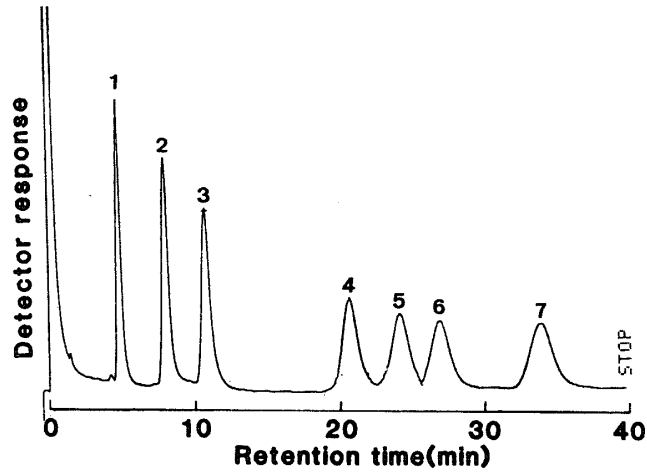
60°C にて 5 時間真空乾燥した L-Rha, L-Ara, D-Xyl, D-Man, D-Gal, D-Glc, *meso*-イノシトールのそれぞれ基準単糖試薬 (純度特級品) を 250 mg 正確に秤量し、蒸留水に溶かして 25 ml とする。この溶液 1 ml はそれぞれの基準糖を 10 mg 含む。この溶液 0.5 ml とって適当に蒸留水で希釈して、同様に水素化ホウ素ナトリウムで還元してアルジトールとし、同様にアセチル化してアセチル誘導体に変換後、ガスクロマトグラフィーによる分析に供試する。

分析装置：島津ガスクロマトグラフ GC-4CM, クロマトパック C-R1B データ処理装置付き

分析条件：カラム；3% ECNSS-M ガラスカラム (0.3 cm×200 cm), 担体；Gas Chrom Q 100~120 mesh, カラム温度；190°C, 注入口気化温度, 検出器温度；245°C, キャリヤーガス；N₂, 30 ml/min, 検出；水素炎イオン化検出器 (FID)

3. 結 果

基準糖についてガスクロマトグラフィーにより分析したクロマトグラムと分析データを Fig. 1 に示す。この結果、本分析条件のもとですべての単糖の分析は40分で終了する。分析データにはそれぞれの単糖のピークの保持時間と濃度、ピーク面積を計算して印字したデータが記録されて出てくる。これをもとに内部標準としての *meso*-イノシトールアセテートを 1.0000 としたときのガスクロマトグラム上に出現する相対面積比をもとめる。次に実際の木粉の多糖成分について分析した Fig. 2 のクロマトグラムと同様の分析データの結果がえられる。クロマトグラムに出現した相当する単糖の印字面積を先の相対面積比を用いて補正し、内部標準を基準として重量に換算する。表 1 に示された加水分解後の糖残存率 (%) グルコース97.4%, マンノース96.2%, ガラクトース97.2%, アラビノース95.3%, キシロース91.2%, を用いて重量を補正する。かくして各々の単糖の補正重量 (mg) の和をもって中性糖含量 (mg) とし、希釈倍率をかけて補正した値をもとの木粉の絶乾重量で割って百分率 (%) として材中の中性糖含量を表示する。また各々の単糖の組成百分率 (%) は中性糖含量に対する値として表示する。このようにしてもとめたブナ木粉, イタヤカエデ木粉, アカマツ木粉, モウソウチク粉の中性糖含量 (%) と構成糖残基 (%) の分析・定量結果を Table 2 に示した。より正確には酸性糖成分について分析・定量した結果を一部補正する必要はある。中



C-R1B
 SMPL # 00
 FILE # 2
 REPT # 1648
 METHOD 41

#	NAME	TIME	CONC	MK	AREA	RELATIVE AREA
0	1	5.3	12.6474		10431	0.8476
0	2	8.46	14.5787		12024	0.9770
0	3	11.28	15.1505		12496	1.0154
0	4	21.12	14.9342		12317	1.0008
0	5	24.56	14.6987		12123	0.9850
0	6	27.36	13.0689		10779	0.8758
0	7	34.25	14.9214		12307	1.0000
TOTAL			99.9999		82479	

Fig. 1. Gas chromatogram on 3% ECNSS-M glass column (2 m × 0.3 cm) after conversion into alditol acetates of standard monosaccharides
 Column temp.: 190°C, Injection and detection temp.: 245°C
 Carrier gas: N₂, 30 ml/min
 1: Rhamnitol, 2: Arabinitol, 3: Xylitol, 4: Mannitol, 5: Galactitol, 6: Glucitol, 7: *meso*-Inositol (Internal standard)

Table 2. Analytical data of neutral sugar contents and sugar composition determined on various wood meals by gas-liquid chromatography

	Neutral sugar content (%)	Composition (%) of sugar residues					
		Rha	Ara	Xyl	Man	Gal	Glc
Buna	66.68	0.48	0.94	29.44	2.96	+	66.19
Itayakaede	58.44	+	1.07	29.05	3.30	+	66.58
Akamatsu	61.35	+	2.61	10.63	18.20	2.50	66.07
Mosochiku	65.85		1.93	36.15			61.91

+ present

性糖含量は材中の大部分の糖質量を表わしており、また構成糖残基の結果から存在する構成糖組成の割合を知ることが出来る。

ガスクロマトグラフィーによる酸性糖成分の分析・定量については別の機会にゆずる。

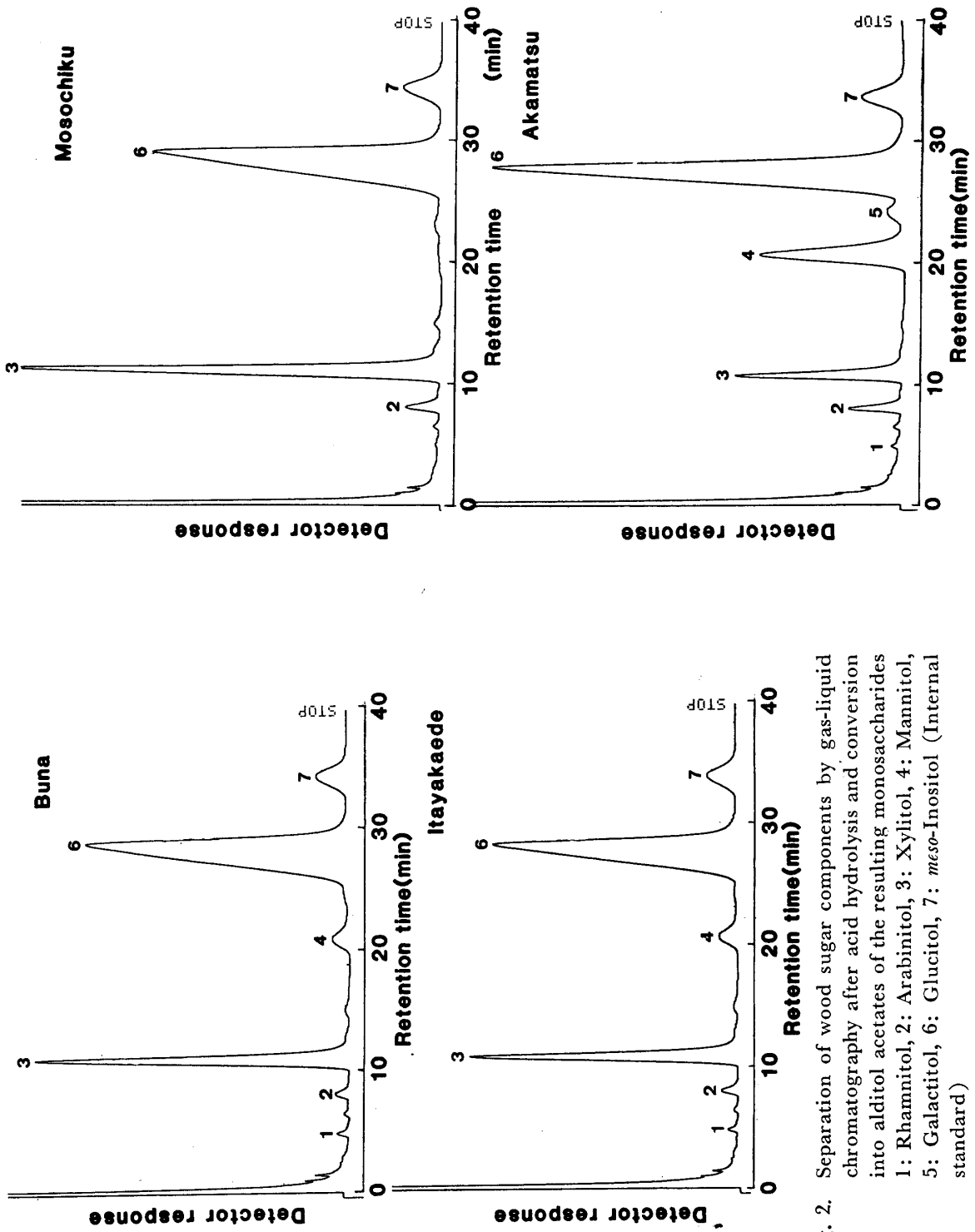


Fig. 2. Separation of wood sugar components by gas-liquid chromatography after acid hydrolysis and conversion into alditol acetates of the resulting monosaccharides
 1: Rhamnitol, 2: Arabinitol, 3: Xylitol, 4: Mannitol, 5: Galactitol, 6: Glucitol, 7: *meso*-Inositol (Internal standard)

文 献

- 1) J.F. SAEMAN, W.E. MOORE, R.L. MITCHELL and M.A. MILLETT, Tappi, **37**, 336 (1954)
- 2) H. MEIER, J. Polymer Sci., **51**, 11 (1961)
- 3) C.C. SWEELEY, R. BENTLEY, M. MAKITA and W.W. WELLS, J. Amer. Chem. Soc., **85**, 2497 (1963)
- 4) E.P. CROWELL and B.B. BURNETT, Anal. Chem., **39**, 121 (1967)
- 5) L.G. BORCHARDT and C.V. PIPER, Tappi, **53**, 257 (1970)
- 6) J. Tappi 紙パルプ試験法 No. 42⁸⁴, 紙パ技協誌, **38**, 361 (1984)
- 7) J.H. SLONEKER, "Methods in Carbohydrate Chem.", ed. R.L. WHISTLER and J.N. BEMILLER Vol. VI, Academic Press, New York and London, P. 20 (1972)