

博士論文

SEC/MALLS 分析によるセルロース試料の  
分子量分布測定と構造解析に関する研究

小野祐子

# SEC/MALLS 分析によるセルロース試料の分子量分布測定と 構造解析に関する研究

## 目次

### 第1章 緒言

1-1 植物の構成成分.....	1
1-2 木材の構造と化学成分.....	1
1-2-1 多糖・リグニン複合構造	
1-2-2 セルロース、ヘミセルロース、リグニン	
1-3 セルロースの単離・精製.....	5
1-4 セルロースの分子量測.....	6
1-4-1 高分子の分子量測定	
1-4-2 SEC/MALLS の測定原理	
1-4-3 セルロースの SEC/MALLS 測定	
1-4-4 セルロースの溶解	
1-4-5 粘度法によるセルロース分子量測定	
1-5 本研究の目的.....	10
1-6 参考文献.....	11

### 第2章 セルロースの $dn/dc$

2-1 背景.....	15
2-2 実験.....	15
2-2-1 試料と試薬	
2-2-2 8.0% w/w LiCl/DMAc 溶液および 8.0% w/w LiCl/DMI 溶液の調製	
2-2-3 $dn/dc$ 測定用溶液の調製	
2-2-4 分子量測定用溶液の調製	
2-2-5 F-MFC の 1.0% w/v LiCl/DMI 溶液の調製	
2-2-6 オフライン示差屈折率測定器 (Off-Line RI) による $dn/dc$ 測定	
2-2-7 SEC/MALLS 測定による分子量測定および $dn/dc$ 測定	
2-3 結果と考察.....	20
2-3-1 試料の溶解性	
2-3-2 $dn/dc$ 値	
2-3-3 $dn/dc$ 値と溶液の安定性への LiCl の影響	
2-3-4 MCC と低分子量セルロースの分子量	

2-3-5	水酸基と LiCl の相互作用	
2-3-6	溶媒の違いによる分子量測定結果への影響	
2-4	まとめ	36
2-5	参考文献	37

### 第 3 章 セルロースのモデルとしてのプルランの LiCl/DMAc 中での溶解機構

3-1	背景	38
3-2	実験	40
3-2-1	試料と試薬	
3-2-2	NMR 測定用溶液の調製	
3-2-3	NMR 測定	
3-3	結果と考察	40
3-3-1	NMR 測定によるプルランの構造解析	
3-3-2	セルロースの溶解機構	
3-4	まとめ	49
3-5	参考文献	50

### 第 4 章 難溶解セルロース試料の SEC/MALLS 測定

4-1	背景	52
4-2	実験	52
4-2-1	試料と薬品	
4-2-2	セルロース試料の溶解と SEC/MALLS 測定	
4-2-3	中性糖分析	
4-2-4	固体 NMR 測定 (CP/MAS 法)	
4-2-5	還元粘度測定	
4-3	結果と考察	55
4-3-1	EDA 浸漬法の分子量分析と中性糖分析への影響	
4-3-2	難溶解性セルロース試料の溶解	
4-3-3	溶液中でのセルロース分子間のネットワーク構造	
4-3-4	SEC/MALLS 測定結果	
4-4	まとめ	64
4-5	参考文献	65

## 第5章 ホロセルロースの SEC/MALLS 測定

5-1 背景.....	67
5-2 実験.....	67
5-2-1 試料と薬品	
5-2-2 ホロセルロース、 $\alpha$ -セルロースの調製	
5-2-3 試料の溶解、SEC/MALLS/UV 測定、中性糖分析	
5-3 結果と考察.....	69
5-3-1 ホロセルロースの溶解と SEC/MALLS 分析	
5-3-2 高分子領域ピークの構成糖	
5-3-3 高分子領域の分岐度	
5-3-4 様々な樹種、植物種中のセルロースの分子構造	
5-4 まとめ.....	79
5-5 参考文献.....	80

## 第6章 針葉樹試料のコンフォメーション

6-1 背景.....	83
6-2 実験.....	83
6-2-1 試料と試薬	
6-2-2 脱リグニン (Wise 法)、希酸加水分解、脱ヘミセルロース	
6-2-3 試料の溶解、SEC/MALLS 測定およびオンライン粘度測定、中性糖分析	
6-3 結果と考察.....	85
6-3-1 製紙用パルプと溶解パルプの SEC/MALLS 測定	
6-3-2 希酸加水分解、脱リグニン、脱ヘミセルロース処理によるホロセルロースの構造変化	
6-3-3 様々な因子の slope 値への影響	
6-3-4 希酸加水分解およびアルカリ抽出による $\alpha$ -エーテル型リグニン/多糖結合への影響	
6-4 まとめ.....	96
6-5 参考文献.....	97

第7章 オンライン粘度測定によるセルロース試料の構造解析と粘度法によるセルロース分子 量測定方法の検証	
7-1 背景.....	99
7-2 実験.....	99
7-2-1 試料と試薬	
7-2-2 セルロース試料の溶解およびオンライン粘度測定	
7-2-3 粘度法による分子量測定	
7-3 結果と考察.....	102
7-3-1 SEC/MALLS/ViscoStar 測定によるセルロース試料の構造解析	
7-3-2 セルロース溶液の Mark-Houwink-Sakurada 式	
7-3-3 分子構造と $M_v$ と $M_w$	
7-4 まとめ.....	107
7-5 参考文献.....	108
第8章 総括.....	110
投稿論文・研究発表.....	113
謝辞.....	115

# 第1章 緒言

## 1-1 植物の構成成分

植物由来のセルロースは、ヘミセルロースやリグニンとともに細胞壁の主な構成要素であり、植物構成成分に占めるセルロースの割合は乾燥重量に対して 40～70%である。またセルロースは地上に存在する有機化合物の中で最も多く存在し、光合成により年間 1000 億トン以上が生産される生物資源である<sup>1</sup>。

セルロースは繊維状で結晶構造を有しており、ヘミセルロースやリグニンとの分子間レベルでの複合化により細胞壁の高い物理強度に寄与し、延いては植物体を支える役割を担っている。素材として化学処理や生物処理に比較的安定であり、条件によっては生分解性であり、親水性かつ水に不溶、食品添加物等として生体安全性が認められているなどの特徴から汎用性も高い。近年、化石資源の枯渇問題や地球温暖化の観点からそれらに変わるリサイクル可能でカーボンニュートラルな資源として注目され、素材やエネルギー利用の観点からもさらなる研究開発が期待されており、世界中で盛んに行われている。

セルロースは生物が作り出す天然高分子であるため、多様性があり、起源、個体差、精製方法等の様々な条件により純度、分子量、分子量分布、繊維形状等を合成高分子のように制御することは困難である。植物由来の木材、非木材植物（ワラ、ケナフ、麻、綿など）セルロースと非植物由来のバクテリアセルロース及び動物性セルロース（ホヤの外套膜など）がある。木材由来のセルロースは資源量が多く、単離・精製方法が確立しており、安価であるため、製紙用パルプ、繊維、化学原料として広く利用されているものの、木材中でのセルロースとリグニンやヘミセルロースの化学的・物理的相互作用は、木材のパルプ化および漂白工程での機械的処理、化学的処理、熱エネルギーを要する一因になっており、環境負荷の少ない単離・精製方法のさらなる研究開発は重要である。一方、綿、バクテリアセルロース、ホヤなどからは比較的容易にほぼ純粋なセルロースを単離・精製することができ、結晶化度が木材セルロースよりも高いなどの特徴もあるが、資源量はそれほど多くはない。

## 1-2 木材の構造と化学成分

### 1-2-1 多糖・リグニン複合構造

木材の主要化学組成はセルロース、ヘミセルロース、リグニンであり、針葉樹ではおよそセルロースが 50%、ヘミセルロースが 20%、リグニンが 30%であり、広葉樹ではセルロースが 50%、ヘミセルロースが 25%、リグニンが 25%である<sup>2</sup>。Figure 1-1 に示すように、セルロースとヘミセルロースとをリグニンが接着している構造となっており<sup>3,4</sup>、リグニンとセルロ

ースマイクロフィブリル表面のセルロース分子は、グアイアシルグリセロール- $\beta$ -グアイアシルエーテル由来のキノンメチド構造を経て、グルコース残基の C6 位で  $\alpha$ -エーテル型リグニン／多糖結合し得ると考えられており<sup>5</sup> (Figure 1-2)、木材からセルロースを単離・精製するためには脱リグニン処理を行う必要がある。脱リグニンとはリグニンの構造を分解除去し、セルロースが主成分であるパルプ繊維に精製することである。

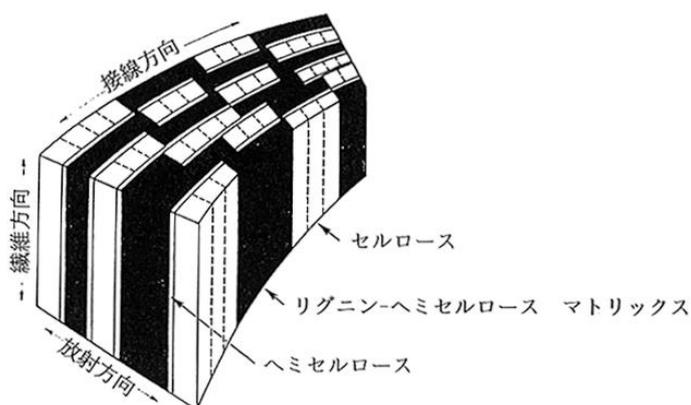


Figure 1-1 細胞壁中のリグニンと多糖類の微細配列モデル<sup>5</sup>

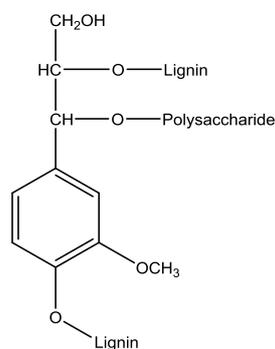


Figure 1-2  $\alpha$ -エーテル型リグニン／多糖結合

### 1-2-2 セルロース、ヘミセルロース、リグニン

セルロースは、D-グルコピラノースが  $\beta$ -1,4 グリコシド結合した直鎖状のホモ多糖であり (Figure 1-3)、直鎖・平面上のコンフォメーションを取りやすく、植物壁中では数十本が集合して結晶化し、セルロースマイクロフィブリルを形成、さらにそれらが寄り集まり高次元構造を形成し、植物体を支えている (Figure 1-4)。

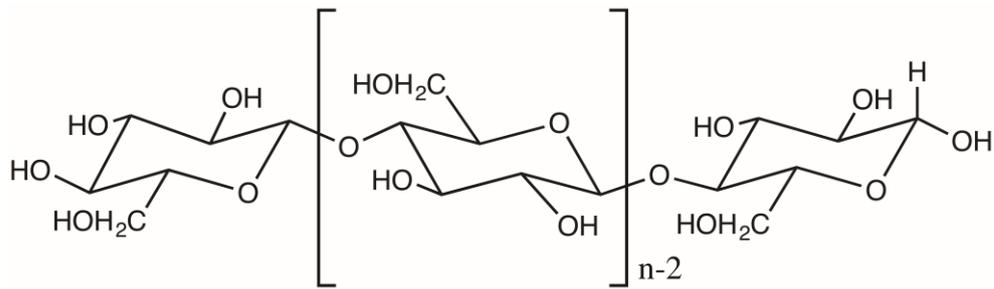


Figure 1-3 セルロースの分子構造

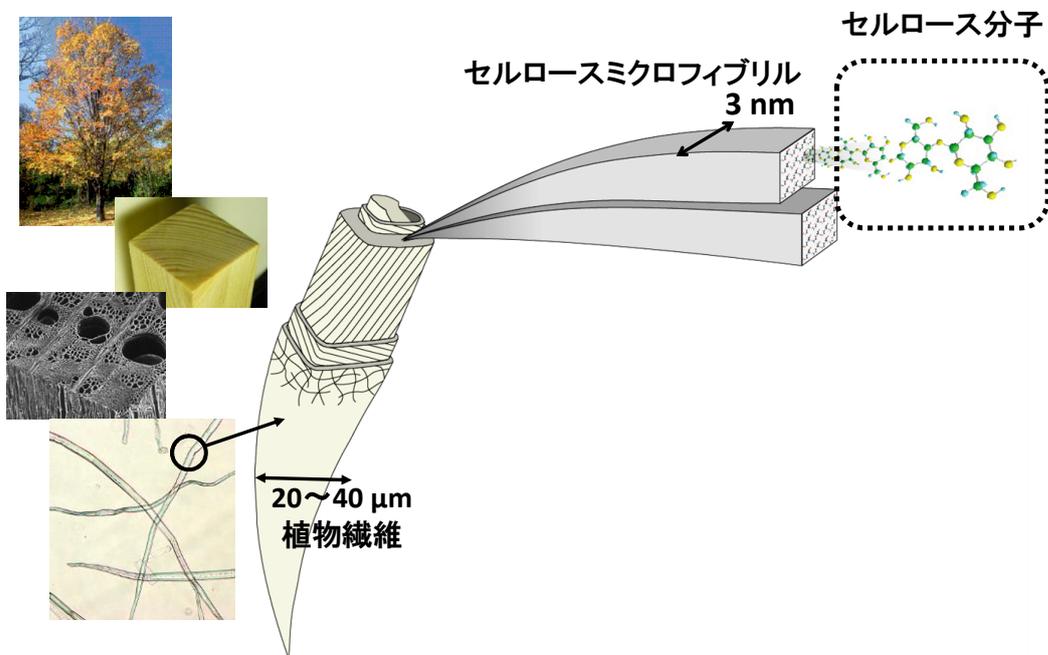


Figure 1-4 樹木におけるセルロースの階層構造

セルロースはグルコピラノース単位あたり 3 水酸基を有し、化学構造的には水溶性であっても良いが、実際は水及び一般的な溶剤には溶解しない。一方、 $\alpha$ -1,4 グリコシド結合が主な結合であるデンプン（アミロース、アミロペクチン）、プルランや  $\beta$ -1,3 グリコシド結合が主な結合であるカードランは容易に水に溶解あるいは膨潤してゲル化する。セルロースの水不溶性は分子内・分子間水素結合および疎水性相互作用に起因していると考えられている。 $\beta$ -1,4 グリコシド結合の C3 位の水酸基と 6 員環中の酸素原子は分子内水素結合を形成しやすく、

これにより隣接するグルコース残基の間にはグリコシド結合と C3-OH...O5 の水素結合の 2 つの結合が形成され剛直で帯状のセルロース鎖となる。その結果、分子鎖には水酸基が露出した親水面と C-H 基と O5 の疎水面が形成される (Figure 1-5)。セルロースのマイクロフィブリルの形成には分子間水素結合と同時に疎水面間でのファンデルワース力による疎水性相互作用も寄与していると考えられている。このような分子内・分子間水素結合と分子間疎水性相互作用により、セルロースの溶解は容易ではないとされている<sup>2</sup>。

セルロースは多様な結晶形をとり、セルロース I、III<sub>I</sub>とIV<sub>I</sub>のセルロース I 型と II、III<sub>II</sub>とIV<sub>II</sub>のセルロース II 型があり、天然セルロースはセルロース I である。セルロースマイクロフィブリルはセルロース I の還元末端と非還元末端が揃った平行鎖構造である。セルロース I を液体アンモニアやアミン系溶液で処理し、その後メタノールなどで洗浄してアンモニアやアミン系溶液を除去するとセルロース III<sub>I</sub>が得られる。たとえば、エチレンジアミンにセルロースを浸漬するとセルロース I-アミン複合体が形成され、さらにメタノール洗浄によりアミンは取り除かれセルロース III<sub>I</sub>へと変態する。この複合体は水で洗浄するとセルロース III<sub>I</sub>ではなくセルロース I へ戻ることが知られている<sup>1</sup>。

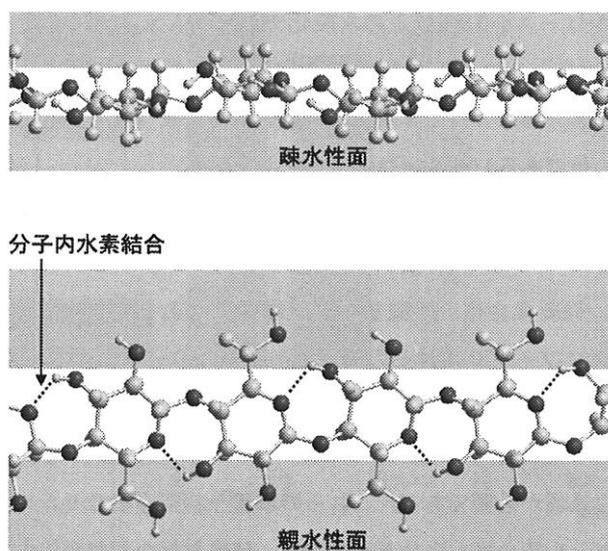


Figure 1-5 セルロース分子の親水面と疎水面<sup>1</sup>

ヘミセルロースは、セルロースマイクロフィブリル間に存在するセルロース以外の水に不溶性の多糖類の総称であり、脱リグニン後の細胞壁からアルカリ処理で抽出され、植物種間や細胞壁の壁層間でもその組成は異なっている。木材では、広葉樹と針葉樹で化学組成や含有量は大きく異なり、針葉樹 2 次壁の主要成分はグルコース残基とマンノース残基がおよそ 3 : 1 の比率でβ-1,4 グリコシド結合したガラクトグルコマンナンと 4-O-メチルグルクロノアラビノキシランであり、広葉樹では 4-O-メチルグルクロノキシランである。

リグニンはフェニルプロパン単位を基本骨格としており、細胞壁中での分布は植物種や細胞によって異なっている。針葉樹ではほとんどがグアイアシルリグニンであり、広葉樹ではグアイアシルリグニンとシリングルリグニンである。



Figure 1-6 グアイアシルリグニンとシリングルリグニンの構造単位

### 1-3 セルロースの単離・精製

木材からセルロースを取り出すには、細胞壁層のリグニンを化学的に分解除去する化学パルプ化法と、リグニンを除去せず熱軟化させてずりせん断力により繊維にする機械化パルプ化法があり、どちらも白色度を向上するためには漂白処理を行う必要がある。日本での製紙用パルプの主な化学パルプ化法は水酸化ナトリウムと水硫化ナトリウム (NaSH) 水溶液と木材チップをアルカリ条件下で 150~170°C、1.5 時間程度処理するクラフト蒸解 (KP) である。この時、セルロースやヘミセルロースの一部も蒸解工程で分解除去される。セルロースやヘミセルロースのグリコシド結合はアルカリ性下では比較的安定な一種のアセタール結合であるが、ピーリング反応による収率低下が生じ、さらに高温高圧のアルカリ性下ではアルカリ加水分解反応により低分子化される。ピーリング反応はセルロースやヘミセルロースのアルデヒド基である還元末端のからひとつずつグルコースが外れる反応ではあるが、セルロースの分子量が十分大きいいためパルプとしての分子量低下にはそれほど影響はしない。アルカリ加水分解反応は高温のアルカリ条件下でごくわずかに起こるグリコシド結合の開裂反応であり、セルロースやヘミセルロース鎖に対しランダムにおこり、分子量は顕著に低下する。

白色度の高いパルプを得るためには、クラフト蒸解後のパルプ (未晒パルプ) を漂白する必要がある。漂白工程では酸素、塩素、二酸化塩素、過酸化水素等を用いた酸化反応により着色成分である残存リグニンを分解し、さらに希アルカリ抽出で除去することにより高白色度でセルロース含有量が 80% 以上のパルプとなる。

溶解パルプはセルロース純度の高い木材パルプであり、化成品やレーヨン繊維用のセルロース原料として用いられ、薬品で処理して使用される。溶解パルプには、酸性サルファイト

パルプと前加水分解クラフトパルプがある。酸性サルファイトパルプは亜硫酸と重亜硫酸マグネシウムを用いた弱酸性下で脱リグニンし、この時同時にセルロースやヘミセルロースの加水分解による分子量低下も起こる。前加水分解クラフトパルプはクラフト蒸解前に水熱処理を行い、木材成分中から生じる酢酸等による酸処理過程でリグニンやセルロースと結合したヘミセルロースを加水分解で低分子化し、その後のクラフト蒸解でリグニンと一緒にヘミセルロースも取り除かれる。どちらの工程でも蒸解処理だけではリグニンは十分に除去できないので漂白工程が必要となる。酸性サルファイトパルプは蒸解工程後の漂白工程の際のアルカリ精製によりヘミセルロース除去も行う。溶解パルプは製紙用クラフトパルプより重合度は低く、リグニンとヘミセルロース量は少なく、 $\alpha$ -セルロース含有量は高い。

## 1-4 セルロースの分子量測定

### 1-4-1 高分子の分子量測定

分子量、分子量分布、分子構造は高分子材料の重要な基本特性であり、天然高分子材料として紙やナノ材料の原料としてセルロースを主成分とするパルプを用いるにあたり、材料として分子量関連パラメーターを制御するためには必要な情報である。

最も一般的な高分子の分子量および分子量分布測定方法はサイズ排除クロマトグラフィー (SEC) である。SEC は分子サイズの差により分離を行う高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の一種であり、高分子の分子量分布、平均分子量を測定することができる。従来は分子量既知の単分散プルランやポリスチレンを標準品に用い、それとの相対分子量値として測定する方法が一般的であった。しかし、現在は後述する多角度静的光散乱検出器 (MALLS) を検出器として用いることで絶対分子量の測定が可能な技術が確立されている。

### 1-4-2 SEC/MALLS の測定原理

多角度光散乱検出器 (MALLS) は、静的光散乱法により高分子の絶対分子量や分子サイズが測定できる検出器である。SEC/MALLS 測定では、MALLS を SEC の検出器として用いることで、連続的に分子量等の測定が可能となる。MALLS は高分子溶液に一定の波長のレーザー光を照射し、レイリー散乱した同じ波長の散乱強度を計測する。散乱角 ( $\theta$ ) における散乱強度 ( $R_\theta$ ) は下記の式で表せる<sup>7</sup>。

$$\frac{Kc}{R_\theta} = \frac{1}{M_w P(\theta)} + 2A_2c \quad (1-1)$$

$M_w$  は重量平均分子量、 $c$  は試料濃度、 $A_2$  は第 2 ビリアル係数。光学定数  $K$  と散乱角度に依存する関数  $P(\theta)$  は以下の式で表せる。

$$K = \frac{2\pi^2 n^2}{M\lambda_0^4 N_A} \left(\frac{dn}{dc}\right)^2 \quad (1-2)$$

$$\frac{1}{P(\theta)} = 1 + \frac{16}{3\lambda_0^2} \pi^2 R_g^2 \sin^2 \frac{\theta}{2} \quad (1-3)$$

$n$  は溶媒の屈折率、 $N_A$  はアボガドロ数、 $\lambda_0$  は入射光の波長、 $R_g$  は溶液中での高分子の回転半径。

測定に用いる非常に希薄な濃度では、Debye Plot (Figure 1-7) の切片から重量平均分子量 ( $M_w$ )、低角度での傾きから平均二乗回転半径 ( $R_g^2$ ) が求まる。

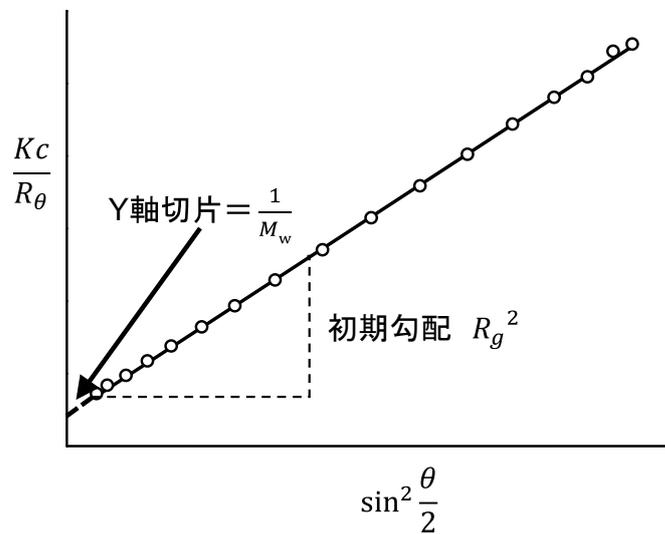


Figure 1-7 Debye Plot

さらに、Figure 1-7 に示した根平均二乗回転半径 ( $\sqrt{R_g^2}$ ) と分子量 ( $M_w$ ) の両対数のプロットの傾き (slope 値  $\alpha$ ) は、溶液中の高分子のコンフォメーションに関する値を示し、式 (1-4) の関係で表わせる。slope 値 0.33 は球状、0.50 は  $\theta$  溶媒中の直鎖ランダムコイル状、1.00 は棒状となる。実際の測定では、良溶媒中で直鎖ランダムコイル分子は 0.55~0.60 の値をとる (Figure 1-8)。直鎖ランダムコイルよりも高密度な分岐構造では、slope 値は直鎖ランダムコイル状よりも小さい値となる。

$$R_g^2 \propto M_w^\alpha \quad (1-4)$$

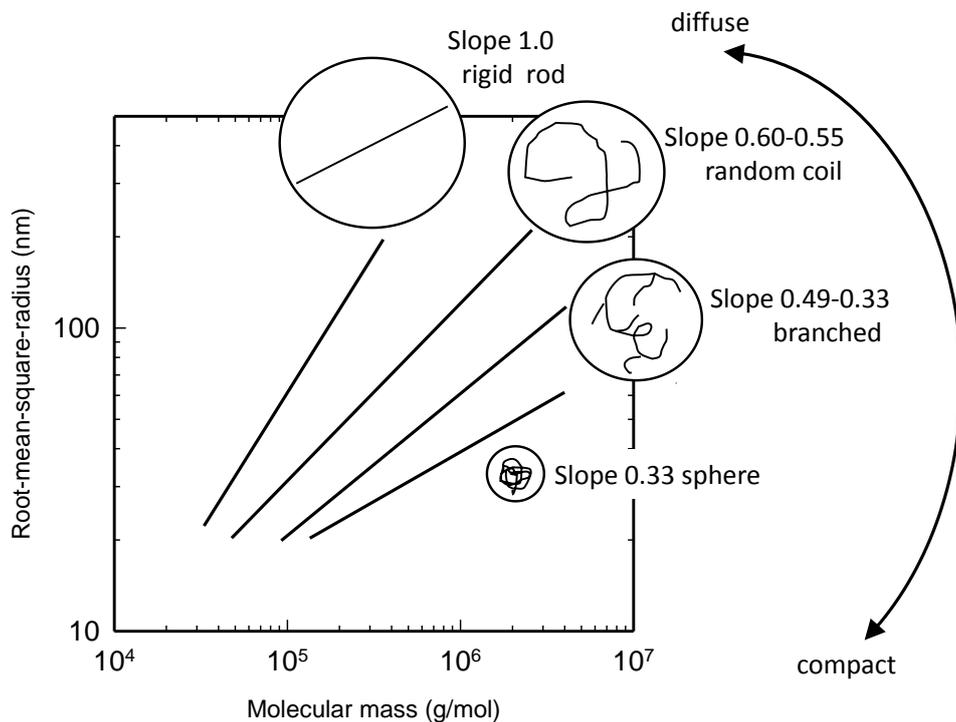


Figure 1-8 Conformation plots

### 1-4-3 セルロースの SEC/MALLS 測定

SEC/MALLS 測定によるセルロースの分子量測定について、既に多くの報告があり、様々な問題点も提起されている<sup>8-19</sup>。

McCormick らは、十分に希薄なセルロースの LiCl/DMAc 溶液中では、 $A_2$  の値を 0 としても  $M_w$  値には誤差程度の影響しかないと報告している<sup>20</sup>。 $A_2=0$  とすると、溶液固有の未知の値は  $dn/dc$  (屈折率増分) 値のみとなるが、セルロースの LiCl/DMAc 溶液中での  $dn/dc$  値は、様々な値が報告されているのが現状である<sup>12,13,15,19-23</sup>。通常  $dn/dc$  値の測定方法は溶質の濃度を変えた試料を示差屈折率検出器で測定し求めるが、セルロースではこの方法で求めた  $dn/dc$  値を用いて SEC/MALLS 測定を行うと、得られた結果は予想されるセルロースの分子量や試料濃度と大きく異なる結果となり、他の合成高分子では通常みられない現象が起こる。その原因として LiCl の溶媒和の影響が考えられるが、未だはっきりと解明されていない<sup>16,24,25</sup>。実際の分子量測定には、便宜的に SEC/MALLS 測定 100% 回収率法から算出した  $dn/dc$  値を用いている報告もあるが、その値の真偽の言及はない<sup>11,16,18,19,26,27</sup>。また、セルロースの難溶解性により溶媒置換前処理等が必要なため、正確なセルロース濃度の溶液調製が難しいことも  $dn/dc$  値を決定できない一因となっている。

#### 1-4-4 セルロースの溶解

1-2-2 で述べたように、セルロースは限られた溶剤にしか溶解せず、溶液の調製は容易ではない<sup>9,23,28-31</sup>。SEC/MALLS 測定には凝集のない完全溶解且つ分子分散した希薄なセルロース溶液が必須である。セルロース試料の SEC/MALLS 測定に用いられている溶剤は、塩化リチウム/*N,N*-ジメチルアセトアミド (LiCl/DMAc) と塩化リチウム/1,3-ジメチル-2-イミダゾリジノン (LiCl/DMI) 等の非水系非プロトン性セルロース溶剤 LiCl/アミドである。これらの溶剤は化学的に安定かつ無色透明で SEC/MALLS 測定が可能だが、高粘度、高吸湿性、LiCl の金属腐食性等により、SEC 用の溶離液としての扱いづらい面もある。また、セルロース試料の調製においては、セルロース試料を LiCl/アミド溶剤中で 80°C 以上に加熱し溶解するとセルロース試料の分子量低下が起こることが報告されており<sup>32,33</sup>、分子量低下させないようにセルロース試料を溶解するためにはセルロース試料を溶媒置換等で前処理する必要がある。セルロースをセルローストリカルバニレート (CTC) に誘導体化し、SEC/MALLS 測定を行う方法も行われている。しかし、CTC は汎用のテトラヒドロフランに可溶であるため測定は容易だが、誘導体化が不十分、反応中の高分子領域の分子量低下、低分子量領域の回収ロス等の問題点があり、試料の分子量分布を測定するには適していない。

現在、一般的に SEC/MALLS 測定に用いられているセルロースの LiCl/DMAc 溶液の調製方法は、セルロース試料を水で膨潤させた後、アセトンやエタノールなどにより溶媒置換し脱水し、さらに DMAc で溶媒置換後、8% LiCl/DMAc 中に分散し、攪拌して溶解する。この溶媒置換による溶解方法にも問題点は 2 つある。1 つ目は溶解できる試料が低分子量セルロース、溶解パルプ、広葉樹パルプに限定され、測定セルロース試料に汎用性がないことである。2 つ目は正確な濃度の溶液調製が難しいため、 $dn/dc$  値を測定することができないことである。これは、溶媒置換操作中での試料重量ロスや、溶媒置換後の試料を十分減圧乾燥しても DMAc が残存してしまい<sup>34</sup>、セルロースを正確に量り取れないためである。また、セルロースには分子量既知の標準品が無いこともセルロース/LiCl/DMAc の  $dn/dc$  値を決定することを困難にしている。柳澤らがセルロース溶剤として用いた LiCl/DMI は、針葉樹パルプ、未漂白パルプ、ホヤセルロースなども溶解することができ、セルロース試料の分子量測定の汎用性は広がったが、正確な濃度のセルロース溶液の調製ができないという問題点は依然残っている<sup>31</sup>。

#### 1-4-5 粘度法によるセルロースの分子量測定

セルロースの分子量測定法として粘度法は最も一般的に用いられ、TAPPI 法<sup>35</sup>などの標準法があり、報告されているセルロースの分子量も粘度法によるものが多い。測定方法はセルロースを 0.5M 銅エチレンジアミン水溶液に溶解し、Canon-Fenske 型粘度計や Ubbelohde 型粘度計を用い溶液の粘度測定を行い、極限粘度 ( $[\eta]$ ) を求め、Mark-Houwink-Sakurada 式 ( $[\eta] = KM_v^a$ ) を用い分子量 ( $M_v$ ) を決定する (詳細は第 7 章)。セルロースの銅エチレンジアミ

ン水溶液の定数  $K$  と  $\alpha$  の値として様々な値が提唱されている<sup>26,35-41</sup>。 $M_v$  は分子鎖が長い高分子量の分子の影響が大きいため、 $M_w$  に近い値となる。粘度法がセルロースの分子量評価に一般的に用いられているのは、装置が安価、実験が簡便、再現性が高いためである。問題点としては、銅エチレンジアミンは強塩基であるため、漂白工程での酸化処理条件によりアルデヒド基やケトン基等の官能基が多いセルロース試料の場合、 $\beta$ -アルコキシ脱離によって著しい分子量低下が起こること、一部のセルロース試料（バクテリアセルロース等）は完全に溶解しないこと、得られる値は粘度平均分子量値（ $M_v$ ）のみであり、分子量分布に関する情報は得られないこと等が挙げられる。しかし、既知試料の相对比较や品質管理等に用いるには十分な測定方法である。

## 1-5 本研究の目的

高分子材料の分子量分布は単分散ではなく、多分散で分布に幅があるのが一般的であり、分子量分布はその素材の力学的特性、溶解特性など様々な性質に影響する基本的な因子である。高分子の分子量測定法としては、SEC/MALLS 測定法が一般的であり、この方法は、絶対分子量や分子量分布だけでなく、溶液中での分子サイズを測定することで、溶液中での分子構造を解析することもできる。当研究室ではこれまで SEC/MALLS 測定に用いるセルロース溶剤として針葉樹パルプの溶解が可能な LiCl/DMAc を主に用いてきた。しかし、DMAc はセルロース溶液の HPLC 分析に一般的に用いられる DMAc よりもかなり粘度が高い。そのため、HPLC のポンプ圧等の安定性に影響し、測定日毎に Alignment 等の校正を行う必要があり、試料流出時間も若干変動するため、扱いが難しい溶離液である。また、ホヤやクラドフォラなどの高結晶化度、高分子量セルロース溶液の調製では、溶液粘度が高すぎるためマグネチックスタラーでの攪拌が困難なことも測定可能な試料の範囲を狭める原因となっていた。

本研究では、HPLC の溶離液として一般的な DMAc を溶剤としたセルロース試料の汎用性の高い SEC/MALLS 測定方法を確立し、これまで測定が出来なかった様々な由来のセルロース試料の分子量分布や分子構造を解析することで、樹木特有の構造についての知見を得ることを目的とした。

また、これまでセルロースの LiCl/DMAc 溶液の溶解機構について多くの報告があるものの、未だはっきりと解明されていない。そこで、溶液中でのセルロースと他の高分子の分子構造から溶解機構に関する知見を得ることも目的とした。

## 1-6 参考文献

- (2) 磯貝 明 (2008). “セルロース利用技術の最先端” シーエムシー出版 p.3, 32, 45
- (3) 中野 準三 (1990). “リグニンの化学 -基礎と応用-” ユニ出版 p.66
- (4) 磯貝 明, 手塚 育志 (2000). “セルロースの事典” セルロース学会編, 朝倉書店 p.108
- (5) Tanaka, K., Nakatubo, F., & Higuchi, T. (1979). Reactions of guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether with several sugars. II. Reaction of quinonemethide with pyranohexoses. *Mokuzai Gakkaishi* 25, 653–659
- (6) Kerr, A. J., & Goring, D. A. I. (1975). The role of hemicellulose in the delignification of wood. *Canadian Journal of Chemistry*, 53(6), 952-959.
- (7) Wyatt, P. J. (1993). Light scattering and the absolute characterization of macromolecules. *Analytica chimica acta*, 272(1), 1-40.
- (8) Kennedy, J. F., Rivera, Z. S., White, C. A., Lloyd, L. L., & Warner, F. P. *Cell Chem Technol* 1990, 24, 319. CAS| Web of Science® Times Cited, 31.
- (9) Westermark, U., & Gustafsson, K. (1994). Molecular size distribution of wood polymers in birch kraft pulps. *Holzforchung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 48(s1), 146-150.
- (10) Striegel, A. M., & Timpa, J. D. (1996). Size Exclusion Chromatography of Polysaccharides in Dimethylacetamide—Lithium Chloride. 20, 336-378.
- (11) Schult, T., Hjerde, T., Optun, O. I., Kleppe, P. J., & Moe, S. (2002). Characterization of cellulose by SEC-MALLS. *Cellulose*, 9(2), 149-158.
- (12) Röhrling, J., Potthast, A., Rosenau, T., Lange, T., Ebner, G., Sixta, H., & Kosma, P. (2002). A novel method for the determination of carbonyl groups in celluloses by fluorescence labeling. 1. Method development. *Biomacromolecules*, 3(5), 959-968.

- (13) Röhring, J., Potthast, A., Rosenau, T., Lange, T., Borgards, A., Sixta, H., & Kosma, P. (2002). A novel method for the determination of carbonyl groups in celluloses by fluorescence labeling. 2. Validation and applications. *Biomacromolecules*, 3(5), 969-975.
- (14) Dupont, A. L. (2003). Cellulose in lithium chloride/N, N-dimethylacetamide, optimisation of a dissolution method using paper substrates and stability of the solutions. *Polymer*, 44(15), 4117-4126.
- (15) Dupont, A. L., & Harrison, G. (2004). Conformation and dn/dc determination of cellulose in N, N-dimethylacetamide containing lithium chloride. *Carbohydrate polymers*, 58(3), 233-243.
- (16) Berggren, R., Berthold, F., Sjöholm, E., & Lindström, M. (2003). Improved methods for evaluating the molar mass distributions of cellulose in kraft pulp. *Journal of applied polymer science*, 88(5), 1170-1179.
- (17) Strlič, M., & Kolar, J. (2003). Size exclusion chromatography of cellulose in LiCl/N, N-dimethylacetamide. *Journal of biochemical and biophysical methods*, 56(1), 265-279.
- (18) Kes, M., & Christensen, B. E. (2013). Degradation of cellulosic insulation in power transformers: a SEC-MALLS study of artificially aged transformer papers. *Cellulose*, 20(4), 2003-2011.
- (19) Kes, M., & Christensen, B. E. (2013). A re-investigation of the Mark-Houwink-Sakurada parameters for cellulose in Cuen: a study based on size-exclusion chromatography combined with multi-angle light scattering and viscometry. *Journal of Chromatography A*, 1281, 32-37.
- (20) McCormick, C. L., Callais, P. A., & Hutchinson Jr, B. H. (1985). Solution studies of cellulose in lithium chloride and N, N-dimethylacetamide. *Macromolecules*, 18(12), 2394-2401.
- (21) Siller, M., Ahn, K., Pircher, N., Rosenau, T., & Potthast, A. (2014). Dissolution of rayon fibers for size exclusion chromatography: a challenge. *Cellulose*, 21(5), 3291-3301.
- (22) Schelosky, N., Röder, T., & Baldinger, T. (1999). Molecular mass distribution of cellulosic products by size exclusion chromatography in DMAc/LiCl. *Das Papier* (Germany).
- (23) Terbojevich, M., Cosani, A., Conio, G., Ciferri, A., & Bianchi, E. (1985). Mesophase formation and chain rigidity in cellulose and derivatives. 3. Aggregation of cellulose in N, N-dimethylacetamide-lithium chloride. *Macromolecules*, 18(4), 640-646.

- (24) Potthast, A., Radosta, S., Saake, B., Lebioda, S., Heinze, T., Henniges, U., Isogai, A., Koschella, A., Kosma, P., Rosenau, T., Schiehser, S., Sixta, H., Strlič, M., Strobin, G., Vorwerk, W., & Wetzel, H. (2015). Comparison testing of methods for gel permeation chromatography of cellulose: coming closer to a standard protocol. *Cellulose*, 22(3), 1591-1613.
- (25) Yanagisawa, M., & Isogai, A. (2005). SEC–MALS–QELS Study on the Molecular Conformation of Cellulose in LiCl/Amide Solutions. *Biomacromolecules*, 6(3), 1258-1265.
- (26) Hiraoki, R., Ono, Y., Saito, T., & Isogai, A. (2015). Molecular mass and molecular-mass distribution of TEMPO-oxidized celluloses and TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils. *Biomacromolecules*, 16(2), 675-681
- (27) Hiraoki, R., Fukuzumi, H., Ono, Y., Saito, T., & Isogai, A. (2014). SEC-MALLS analysis of TEMPO-oxidized celluloses using methylation of carboxyl groups. *Cellulose*, 21(1), 167-176.
- (28) Sjöholm, E., Gustafsson, K., Pettersson, B., & Colmsjö, A. (1997). Characterization of the cellulosic residues from lithium chloride/N, N-dimethylacetamide dissolution of softwood kraft pulp. *Carbohydrate polymers*, 32(1), 57-63.
- (29) Sjöholm, E., Gustafsson, K., Eriksson, B., Brown, W., & Colmsjö, A. (2000). Aggregation of cellulose in lithium chloride/N, N-dimethylacetamide. *Carbohydrate Polymers*, 41(2), 153-161.
- (30) Matsumoto, T., Tatsumi, D., Tamai, N., & Takaki, T. (2001). Solution properties of celluloses from different biological origins in LiCl·DMAc. *Cellulose*, 8(4), 275-282.
- (31) Yanagisawa, M., Shibata, I., & Isogai, A. (2004). SEC–MALLS analysis of cellulose using LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone as an eluent. *Cellulose*, 11(2), 169-176.
- (32) Potthast, A., Rosenau, T., Sixta, H., & Kosma, P. (2002). Degradation of cellulosic materials by heating in DMAc/LiCl. *Tetrahedron Letters*, 43(43), 7757-7759.
- (33) Potthast, A., Rosenau, T., Sartori, J., Sixta, H., & Kosma, P. (2003). Hydrolytic processes and condensation reactions in the cellulose solvent system N, N-dimethylacetamide/lithium chloride. Part 2: degradation of cellulose. *Polymer*, 44(1), 7-17.

(34) Ishii, D., & Isogai, A. (2008). The residual amide content of cellulose sequentially solvent-exchanged and then vacuum-dried. *Cellulose*, 15(4), 547-553.

(35) TAPPI Standard Method T230 om-82 (1982)

(36) Isogai, A., Mutoh, N., Onabe, F., & Usuda, M. (1989). Viscosity measurements of cellulose/SO<sub>2</sub>-amine-dimethylsulfoxide solution. *Sen'i Gakkaishi*, 45(7), 299-306.

(37) Evans, S.R., & Wallis, A.F.A. (1987). Proceedings of the 4th international symposium on Wood and pulping chemistry, Paris, April 27-30, vol.1, p.201.

(38) Schulz, G. V., & Blaschke, F. (1941). Molecular-weight determinations on macromolecular materials. IX. An equation for the calculation of the viscosity number at very small concentrations. *prakt. Chem*, 158, 130-135.

(39) Marx, M. (1955), *Makromol. Chem.*, 16, 157

(40) Smith, D. K., Bampton, R. F., & Alexander, W. J. (1963). Use of new solvents for evaluating chemical cellulose for the viscose process. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 2(1), 57-62.

(41) Sihtola, H. (1963). Comparison and conversion of viscosity and DP values determined by different methods. *Paperi ja puu*, 45, 225-323.

## 第2章 セルロースの $dn/dc$

### 2-1 背景

$dn/dc$  値（固有の屈折率増分）は溶質の濃度変化に対する溶液の屈折率の変化を表わし、光散乱測定により高分子材料の絶対分子量を求めるために必要な値である。一般的に  $dn/dc$  値は文献値または示差屈折率検出器で実測した値を用いる。しかし、セルロースの LiCl/DMAc 及び LiCl/DMI 溶液の  $dn/dc$  の実測値を用い SEC/MALLS 測定を行うと、調製試料濃度や予想される分子量とは大きく異なる結果となる。これは一般的な高分子材料溶液にはみられない現象である。また、 $dn/dc$  値の測定には正確な濃度の溶液が必要であるが、これまでのセルロース溶液の調製方法では、溶媒置換を経て溶解するため、正確な濃度のセルロース溶液の調製は難しいことや、分子量が既知のセルロース標準試料が無い場合、分子量値から  $dn/dc$  値を算出することができないことも、セルロースの  $dn/dc$  値の測定を困難にしている。

本章では、市販のナノフィブリル化セルロースをさらに高圧ホモジナイザー処理し、凍結乾燥試料を調製した。予備実験の結果、その試料が直接アミド系溶媒に溶解することを見出した。そこで、正確な濃度のセルロース溶液の調製方法を確立し、LiCl/アミド溶媒系での  $dn/dc$  値について検討を行った。

### 2-2 実験

#### 2-2-1 試料と試薬

セルロース試料として市販の針葉樹溶解パルプを原料としたナノフィブリル化セルロース（MFC, Celish KY100G Daicel FineChem, Ltd., Japan）をマイクロフィブリル化処理により調製した微小繊維状セルロース（F-MFC）を用いた。MFC の組成は中性糖分析の結果、グルカン 96.2%、マンナン 1.2%、キシラン 2.2%、アラビナン 0.3%であった（中性糖分析方法 4.2.3 参照）。MFC に蒸留水を加え攪拌し、0.5% w/v の 1 L の懸濁液を調製した。この懸濁液を高圧ホモジナイザー（Star Burst Mini, HJP-25001S, Sugino Machine, Ltd., Japan）で 10 回処理し（245 MPa, ノズル径 0.1 mm）、微繊維化したナノフィブリル化セルロース（F-MFC）分散液を調製した。この分散液（40 mL）を下記の遠心分離溶媒置換法で脱水して、凍結乾燥を行った。遠心分離溶媒置換法による脱水は、遠心分離機（12,000×g, 10 分間）を用いて水と分離し、同様に遠心分離機を用いてエタノール溶媒置換を 3 回（各 30 mL）、さらに *t*-ブチルアルコール溶媒置換を 3 回（各 30 mL）行い、完全に水を除去する。均一リン酸加水分解法で調製した低分子量セルロース（DP15、DP7）<sup>1</sup>も同様に、遠心分離溶媒置換法で脱水、凍結乾燥した。低分子量アミロース溶液（DMAc 可溶アミロース（DMAc-amylose）3 種類と 8% LiCl/DMAc 可溶アミロー

ス (LiCl-amylose) 3 種類) は磯部紀之博士 (JAMSTEC) からご提供していただいた。キチンは市販のカニ殻由来の  $\alpha$ -キチン粉末 (Chitin P, Dainichiseika Color & Chemicals Mfg. Co., Ltd., Japan) を希酸加水分解で低分子化し、遠心分離溶媒置換法で脱水、凍結乾燥し、低分子量キチン (A-Chitin) を調製した。希酸加水分解は、キチン (100 mg) を 1M HCl (100 mL) 溶液中で 85 °C、2 時間攪拌後、遠心分離機 (12,000  $\times$ g, 5 分間) を用いて上澄みを除去し、得られた固形物を 0.05M NaOH に浸漬後、遠心分離機を用い、中性になるまで水洗浄を行った。プルランスタンダード (P20  $M_w$  22,800, P200  $M_w$  212,000, Shoko Science Co., Ltd., Japan)、セルローストリアセテート (LT-35  $M_w$  138,000, Dainichiseika Color & Chemicals Mfg. Co., Ltd., Japan) とポリエチレンスタンダード (PS30k  $M_w$  30,000)、セロビオース (Wako Pure Chemicals, Japan)、微結晶セルロース (MCC, Cellulose powder C Advantec. Toyo, Co., Ltd, Japan) は、市販品を真空乾燥し用いた。塩化リチウム (LiCl)、ジメチルアセトアミド (DMAc) および他の試薬や溶媒は試薬特級または高速液体クロマトグラフ用 (Wako Pure Chemicals, Japan) を使用した。

### 2-2-2 8% w/w (8.2% w/v) LiCl/DMAc 溶液および 8% w/w (9.2% w/v) LiCl/DMI 溶液の調製

8% w/w LiCl/DMAc 溶液は、一晩 105 °C 真空乾燥した LiCl (16.4 g) と DMAc (200 mL) を冷蔵庫 (4 °C) で 1 時間冷却後、マグネチックスタラーで DMAc を攪拌しながら LiCl を加え、1 時間室温で攪拌後、30 °C で 1 晩攪拌、完全溶解して調製した。

同様の方法で、8% w/w LiCl/DMI は、LiCl (18.4 g) を DMI (200 mL) に加え調製した。

アミド系溶媒と LiCl をあらかじめ冷却しておくこと、混合した際の発熱反応による溶液の黄変を防ぐことができる。また、LiCl/アミド系溶媒は、LiCl とアミド系溶媒双方の含水率が低いほど LiCl が溶解しにくくなり、高濃度 LiCl 溶液の調製が困難になる。一方、セルロース溶剤としては、含水率が低いほどセルロースの溶解度は高くなることが報告されている<sup>2</sup>。

### 2-2-3 dn/dc 測定用溶液の調製

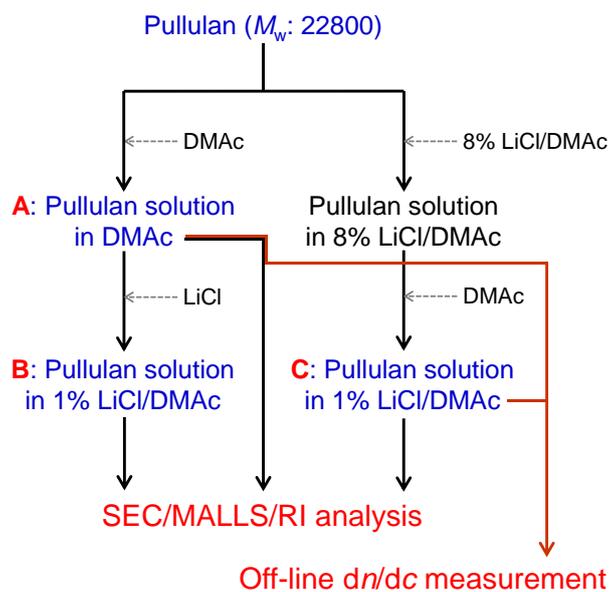
F-MFC (160 mg)、A-Chitin (170 mg) を 8% w/w LiCl/DMAc (5 mL) に加え、マグネチックスタラーで 1 週間攪拌して溶解した。セルローストリアセテート (400 mg)、ポリスチレン (200 mg)、セロビオース (400 mg) は 1 日攪拌して溶解した。プルラン (400 mg) は、8% w/w LiCl/DMAc (2.5 mL) に加え、60 °C で加温しながら 1 日攪拌して溶解した。これらの高分子とセロビオースが完全に溶解した 8% w/w LiCl/DMAc 溶液に DMAc を加え、1% w/v LiCl/DMAc 溶液に希釈した。さらに 1% w/v LiCl/DMAc で希釈して、適宜必要な試料濃度溶液を調製した (Table 2-2)。同様に乾燥したプルラン (400 mg)、LiCl (600 mg) とセルローストリアセテート (430 mg) を DMAc (20 mL) に加え、1 日室温で攪拌して溶解した。セロビオース (400 mg) は、蒸留水 (40 mL) に加え、1 日室温で攪拌して溶解した。これらも

各溶媒で希釈して適宜必要な試料濃度の溶液を調製した。全ての溶液は 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE ディスポーザルメンブランフィルター (Millex-LG, Merck Millipore Co., Germany) を通した際、抵抗が無ければ、完全溶解していると判断した。

#### 2-2-4 分子量測定用溶液の調製

SEC/MALLS 測定用のプルラン P20 溶液を 3 種類と P200 溶液 2 種類を以下の方法で調製した。プルラン DMAc 溶液は、P20 (8 mg) を DMAc (4 mL) に溶解した (A:P20-DMAc)。プルランの 1% LiCl/DMAc 溶液は、A:P20-DMAc (2 mL) に LiCl (20 mg) を添加して、1% w/v LiCl/DMAc 溶液としたものと (B:P20-DMAc $\rightarrow$ 1% LiCl/DMAc)、P20 (16 mg) を 8% w/v LiCl/DMAc 溶液 (1 mL) に溶解後、DMAc で希釈して、1% w/v LiCl/DMAc 溶液としたもの (C:P20-8% LiCl/DMAc $\rightarrow$ 1% LiCl/DMAc) を調製した。C はセルロースの SEC/MALLS 測定試料と同じ調製方法である (Figure 2-1)。プルラン P200 (16 mg) は DMAc (4 mL) に溶解した P200/DMAc と P200/DMAc (2 mL) に LiCl (20 mg) を加えた P200/1% w/v LiCl/DMAc を調製した。

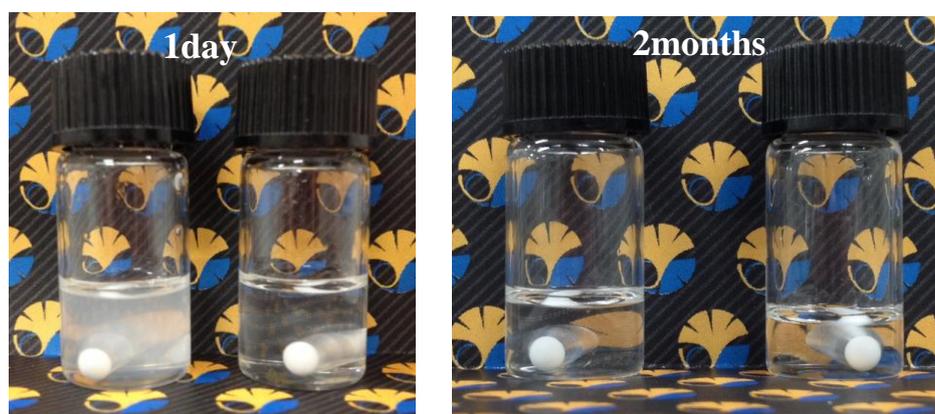
MCC (20 mg) は蒸留水、アセトン、DMAc の順に各溶媒中 (40 mL) で 1 日浸漬後、遠心分離機を用いて各溶媒で溶媒置換 3 回 (各 30 mL) 行い、最後に DMAc を除去して 8% w/w LiCl/DMAc を加え全量を 5 g とした。これらの約 0.4% w/w MCC/8% w/w LiCl/DMAc は完全に溶解するまで攪拌した。さらに、DMAc で希釈し、0.05% w/w MCC/1% w/v LiCl/DMAc を調製した<sup>3,4</sup>。同様に DMAc を DMI に変えて 0.05% w/w MCC/1% w/v LiCl/DMI を調製した。低分子量セルロース DP15 と DP7 (各 90 mg) は蒸留水、エタノール、DMAc の順に溶媒置換を行い、DMAc を除去後、8% w/w LiCl/DMAc (2 mL) を加え、1 ヶ月間攪拌した。これらを DMAc で希釈し、低分子量セルロースの 1% w/v LiCl/DMAc を調製した。全ての溶液は 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE ディスポーザルメンブランフィルターを通した時に会合体による抵抗が無ければ、完全溶解していると判断した。



**Figure 2-1** Procedures to prepare three pullulan solutions (A,B,C) for SEC/MALLS analysis and two pullulan solutions (A, B) for off-line  $dn/dc$  measurement. Reproduced of image with permission from Elsevier (©Elsevier 2017)

### 2-2-5 F-MFC の 1% w/v LiCl/DMI 溶液の調製

F-MFC の 8% w/w LiCl/DMAc 溶液と同様の方法で F-MFC の 8% w/w LiCl/DMI 溶液を調製した (2-2-3 参照)。DMI 溶液中では DMAc 溶液中よりも溶解にしにくく、完全溶解に 1 ヶ月半要した (Figure 2-2)。DMI を加え 1% w/v LiCl/DMI 溶液に希釈した。



**Figure 2-2** Celish solution in 1% w/v LiCl/DMI (left) and 1% w/v LiCl/DMAc (right).

### 2-2-6 オフライン示差屈折率測定器 (Off-Line RI) による $dn/dc$ 測定

一般的に溶液の  $dn/dc$  値は、濃度を変えた 4 種類以上の溶液を調製し、示差屈折率測定器 (Optilab,  $\lambda=658$  nm, Wyatt Technologies, USA) を用い測定する。 $dn/dc$  値は測定波長によっても変化するため、多角度光散乱検出器 (DAWN HELEOS-II,  $\lambda=658$  nm) と同じ波長で測定を行う必要がある。測定は  $0.45 \mu\text{m}$  の PTFE ディスポーザルメンブランフィルターを装着した測定試料の入ったシリンジを直接示差屈折率測定器に接続し、シリンジポンプ (Econoflo, Harvard Apparatus, Physio-Tech Co., Ltd., Tokyo, Japan) を用いて流速  $0.5 \text{ mL/min}$  で行った。各高分子の  $dn/dc$  値は測定結果から各濃度の信号強度 ( $\alpha V - \alpha V_{\text{baseline}}$ ) とその濃度から ASTRA ソフトウェアにより算出した。 $\alpha$  は RI 検出器装置定数、 $V$  は RI 検出器の信号強度、 $V_{\text{baseline}}$  は RI 検出器のベースライン信号強度。 $dn/dc$  値測定には、正確な濃度の溶液が必須であるため、溶液は完全溶解していなければならない。

### 2-2-7 SEC/MALLS 測定による分子量測定および $dn/dc$ 測定

各種高分子の  $dn/dc$  値および分子量分布は、示差屈折率検出器 (RI)、多角度光散乱検出器 (MALLS) を組み合わせたサイズ排除クロマトグラフィー (SEC/MALLS) を用いて測定した。SECの構成は、オンラインデガッサー (DGU-20A, Shimadzu, Japan)、高圧ポンプ (LC-10ADVP, Shimadzu, Japan)、オートインジェクター (SIL-20AC, Shimadzu, Japan)、カラムオープン (CTO-10ACVP, Shimadzu, Japan)、ガードカラム (KD-G, Shoko Science Co., Ltd., Japan)、サイズ排除カラム (KD-806M, Shoko Science Co., Ltd., Japan)、多角度光散乱検出器 (DAWN HELEOS-II,  $\lambda = 658$  nm, Wyatt Technologies, USA)、示差屈折率検出器 (RID-10A, Shimadzu, Japan) からなる。サイズ排除カラム KD-802 (Shoko Science Co., Ltd., Japan) を低分子量セルロースとアミロースを測定する際に追加した。データの取得および解析は ASTRA IV ソフトウェア (Wyatt Technologies, USA) を用いた。ポリエチレンスタンダード ( $M_w$  30,000) を測定前に標準試料として測定をおこなった。測定条件は、溶離液  $1\% \text{ w/v LiCl/DMAc}$ 、流速  $0.5 \text{ mL/min}$ 、カラムオープン  $40^\circ\text{C}$ 、注入量  $100 \mu\text{L}$ 、室温  $25^\circ\text{C}$  とした。測定溶液は  $0.45 \mu\text{m}$  ディスポーザルメンブランフィルター (Millex-LG, Merck Millipore Co., Germany) に通した後、測定した。各高分子の  $dn/dc$  値は SEC/MALLS 測定結果から 100% 回収率法 式 (2-1) を用い、ASTRA ソフトウェアで算出した。100% 回収率法による  $dn/dc$  値測定では、注入試料量が正確であることが必須であり、完全溶解した希薄な分子分散試料を用いなければならない。

$$\frac{dn}{dc} = \frac{\alpha}{W_{\text{injected}}} \sum_{\text{peak}} \Delta v_i (V_i - V_{\text{baseline}}) \quad (2-1)$$

$\alpha$  は RI 検出器装置定数、 $W_{\text{injected}}$  は注入量 (mL)、 $\sum \Delta v_i$  は各スライスの面積、 $V_i$  は RI 検出器の信号強度、 $V_{\text{baseline}}$  は 検出器のベースライン信号強度。

## 2-3 結果と考察

### 2-3-1 試料の溶解性

正確な濃度のセルロース試料溶液の調製が難しいことはセルロースの  $dn/dc$  値の測定を困難にしていた。比較的溶解が容易である MCC でも LiCl/DMAc 等の LiCl/アミン系溶媒に完全溶解するには、アセトン、エタノール、メタノールなどの溶媒で溶媒置換を行った後、最後に DMAc 溶媒置換を行わなければならない。しかし、DMAc などのアミン系溶媒を乾燥によって完全に除去する事は難しく<sup>5</sup>、正確な濃度のセルロース溶液を調製する事が出来なかった。しかし今回、市販の  $\alpha$ -セルロース含有率が高いナノフィブル化セルロース (MFC) を高圧ホモジナイザーでさらに微繊維化および低分子量化 (F-MFC) することにより、アミド系溶媒置換を行わずに、乾燥試料を直接 8% w/w LiCl/DMAc に溶解することができたことで、正確な濃度のセルロース溶液の調製が可能になった。これは、コットンリンターなどと比べ結晶化度が低い木材パルプを原料とした MFC に過度な物理的なナノフィブリル化処理を行うことにより、セルロースマイクロフィブリル内に 8% w/w LiCl/DMAc が浸透しやすくなり、さらに分子量が低下することにより低粘度のセルロース溶液を調製できたためだと考えられる。また、セルロースの溶解度には試料の水分が影響するため、F-MFC をエタノールと *t*-ブチルアルコールで溶媒置換後に凍結乾燥することにより、十分に脱水することも必要であった。また、キチンもエタノールと *t*-ブチルアルコール溶媒置換後に凍結乾燥して脱水することで、8% w/w LiCl/DMAc に溶解することができるが、セルロース溶液よりもかなり高粘度で扱いにくい。そこで、希酸加水分解処理をおこない、低分子量化 (A-Chitin) することで、低粘度キチン溶液を調製した。

Table 2-1 に各溶媒に対する各溶質の溶解性を示した。セロビオースでさえも LiCl がなければ、DMAc には溶解しないが、セルロースをアセチル化したセルローストリアセテートは LiCl の有無にかかわらず良溶解性であった。プルランは DMAc には室温で容易に溶解できるが、LiCl/DMAc 溶液に溶解するには加温する必要があった (2-2-3 参照)。

**Table 2-1** Solubility of various polymers and cellobiose in Water, DMAc and 8% LiCl/DMAc.  
 Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2015)

Solute	Solvent		
	water	DMAc	8% w/w LiCl/DMAc
F-MFC	insoluble	insoluble	<u>soluble</u>
A-chitin	insoluble	insoluble	<u>soluble</u>
DMAc-amylose	<u>soluble</u>	<u>soluble</u>	insoluble
LiCl-amylose	<u>soluble</u>	insoluble	<u>soluble</u>
pullulan	<u>soluble</u>	<u>soluble</u>	<u>soluble</u>
cellulose triacetate	insoluble	<u>soluble</u>	<u>soluble</u>
poly(styrene)	insoluble	<u>soluble</u>	<u>soluble</u>
cellobiose	<u>soluble</u>	insoluble	<u>soluble</u>

### 2-3-2 $dn/dc$ 値

SEC/MALLS 測定法では、濃度を変えた溶液を測定し、算出した  $dn/dc$  値の平均値を各溶液の  $dn/dc$  値とした。この  $dn/dc$  値を用い算出した分子量プロットと分子量分布を Figure 2-3、測定結果を Table 2-2 に示す。それぞれの試料の分子量プロットは全ての濃度で重なり、分子量分布の面積も濃度と一致したため、これらの  $dn/dc$  値は妥当であると考えられる。

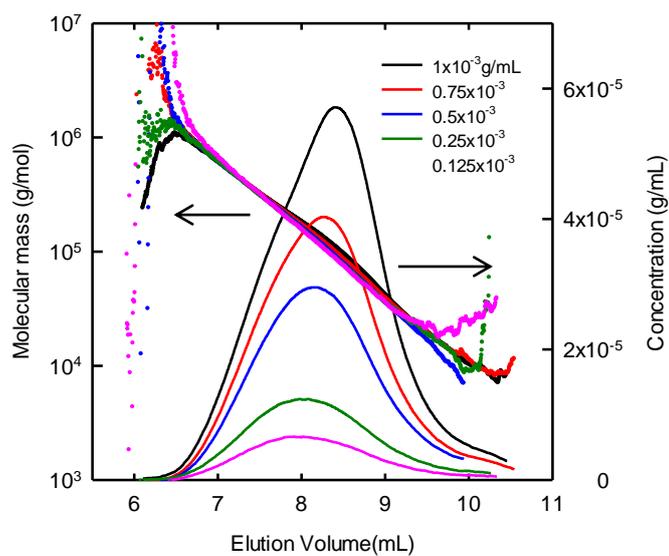
Off-Line RI 測定法の結果を Figure 2-4 と Table 2-2 に示す。全ての試料でほぼ  $R^2=0.999$  となり高い直線性を示した。

SEC/MALLS 測定法の A-Chitin の分子量分布は高濃度のピーク形状は歪んでいる (Figure 2-3 (d))。これは高濃度のキチン溶液は粘度が非常に高く、このことが分子分散性に影響を及ぼしたためである。Off-Line RI 測定法の測定限界濃度を Figure 2-5 に示す。SEC/MALLS 測定法では、Table 2-2 の濃度で調製した溶液を溶離液で約 30 倍に希釈しながら測定する。そのため、SEC/MALLS 測定の際の実測試料濃度は、Off-Line RI 測定法では測定限界以下の希薄溶液となる。また、LiCl/DMAc 溶液では、LiCl の  $dn/dc$  値が試料の  $dn/dc$  値の約 3 倍とかなり大きい値のため、LiCl 濃度の調製誤差の影響が大きくなり、Off-Line RI 測定法では低濃度試料の測定は DMAc 溶液よりもさらに困難となる。Table 2-2 に 2 つの測定方法による各溶媒に対する各溶質の  $dn/dc$  値の測定結果を示す。セルローストリアセテートとポリスチレンにおいては、2 つの測定方法から算出した  $dn/dc$  値は一致した。また、Off-Line RI 測定法による  $dn/dc$  値は LiCl の有無にかかわらず同じ値となり、これらの高分子溶液の屈折率には LiCl の影響は一定値としてベースラインに含まれ、高分子の  $dn/dc$  値には影響しないことがわかる。一方、1% w/v LiCl/DMAc 溶液中での F-MFC、A-Chitin の  $dn/dc$  値は 2 つの測定方法で既報の結果と同様一致しなかった<sup>6,7</sup>。

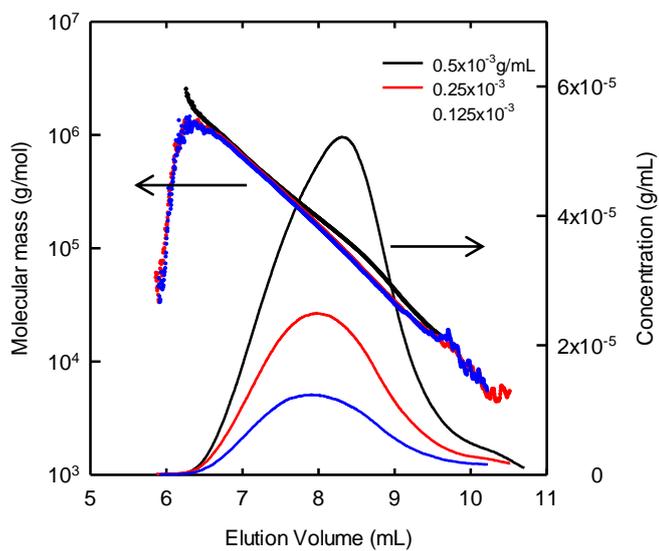
**Table 2-2** The  $dn/dc$  values of polymers, cellobiose, and LiCl in various solvents. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2015)

Solute	solvent	$dn/dc$ , mL/g (concentration range, g/mL)	
		SEC/MALLS/RI	off-line RI
F-MFC	1% LiCl/DMAc	$0.131 \pm 0.005$ ( $0.125 - 1 \times 10^{-3}$ )	$0.065$ ( $0.5 - 4 \times 10^{-3}$ )
F-MFC	0.5% LiCl/DMAc	$0.131$ ( $0.25 - 5 \times 10^{-4}$ )	$0.084$ ( $0.125 - 2 \times 10^{-3}$ )
F-MFC	1% LiCl/DMI	$0.104$ ( $0.125 - 1 \times 10^{-3}$ )	–
A-chitin	1% LiCl/DMAc	$0.138 \pm 0.004$ ( $0.13 - 1.1 \times 10^{-3}$ )	$0.091$ ( $0.13 - 4 \times 10^{-3}$ )
amylose	1% LiCl/DMAc	$0.130 \pm 0.003$	–
amylose	DMAc	$0.095 \pm 0.003$	–
pullulan	1% LiCl/DMAc	$0.125$ ( $5 \times 10^{-2}$ )	$0.069$ ( $0.13 - 4 \times 10^{-3}$ )
pullulan	DMAc	$0.091$ ( $5 \times 10^{-2}$ )	$0.091$ ( $0.02 - 2.5 \times 10^{-4}$ )
cellulose triacetate	1% LiCl/DMAc	$0.040 \pm 0.001$ ( $0.5 - 2 \times 10^{-3}$ )	$0.042$ ( $0.02 - 2.5 \times 10^{-4}$ )
cellulose triacetate	DMAc	–	$0.04$ ( $0.01 - 1.1 \times 10^{-2}$ )
poly(styrene)	1% LiCl/DMAc	$0.150$	$0.148$ ( $0.63 - 5 \times 10^{-3}$ )
cellobiose	1% LiCl/DMAc	–	$0.067$ ( $0.125 - 1 \times 10^{-2}$ )
cellobiose	water	–	$0.146$ ( $1.25 - 1 \times 10^{-2}$ )
LiCl	DMAc	–	$0.39$ ( $0.025 - 1.5 \times 10^{-2}$ )

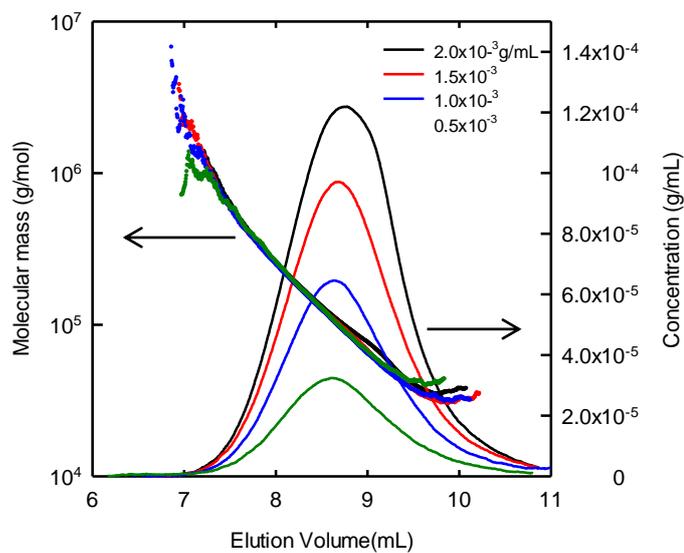
(a) F-MFC in 1% w/v LiCl/DMAc



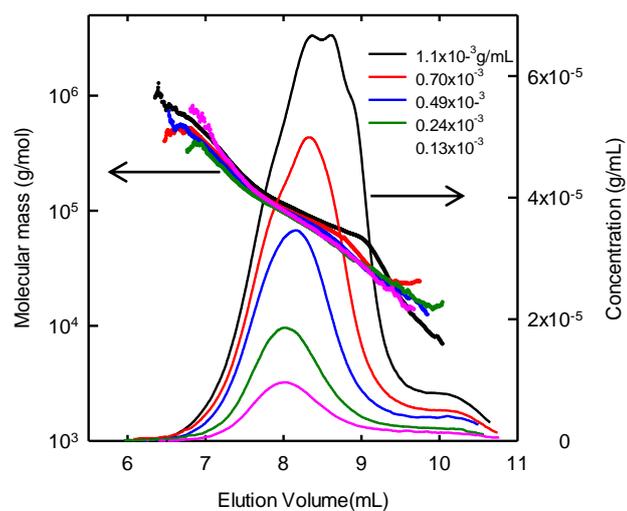
(b) F-MFC in 0.5% w/v LiCl/DMAc



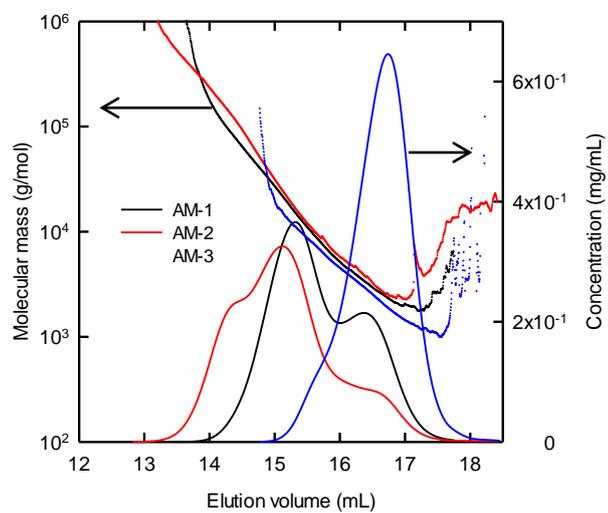
(c) Cellulose triacetate in 1% w/v LiCl/DMAc



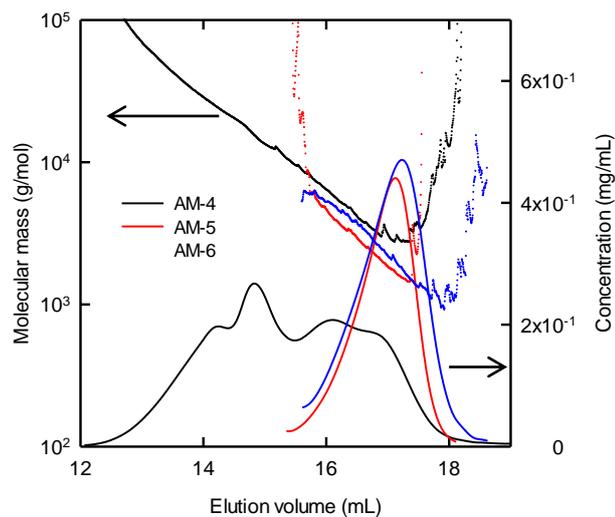
(d) Chitin in 1% w/v LiCl/DMAc



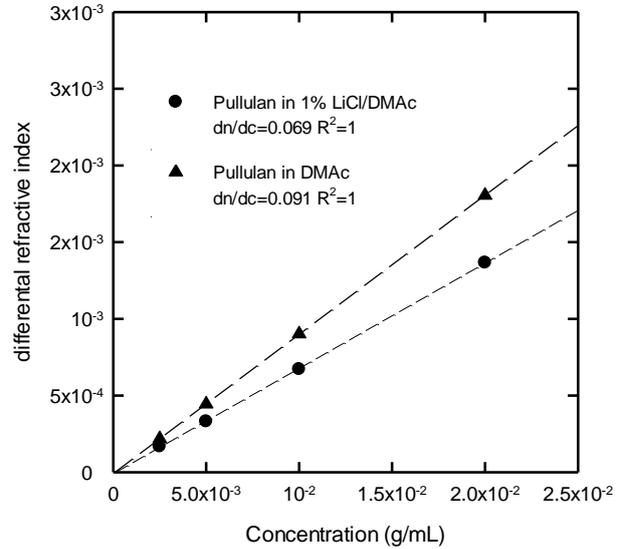
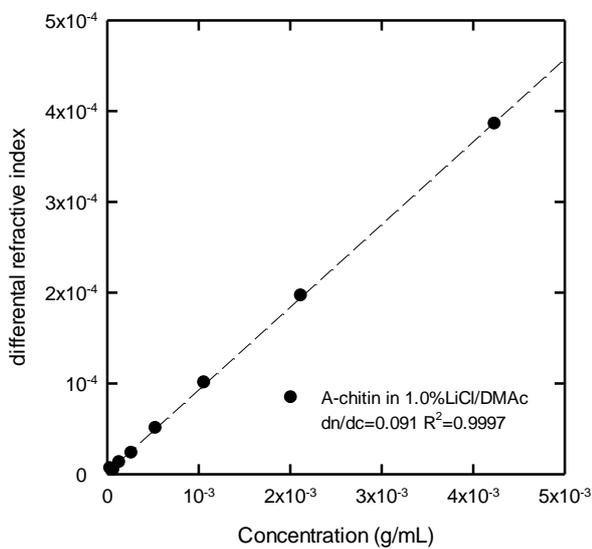
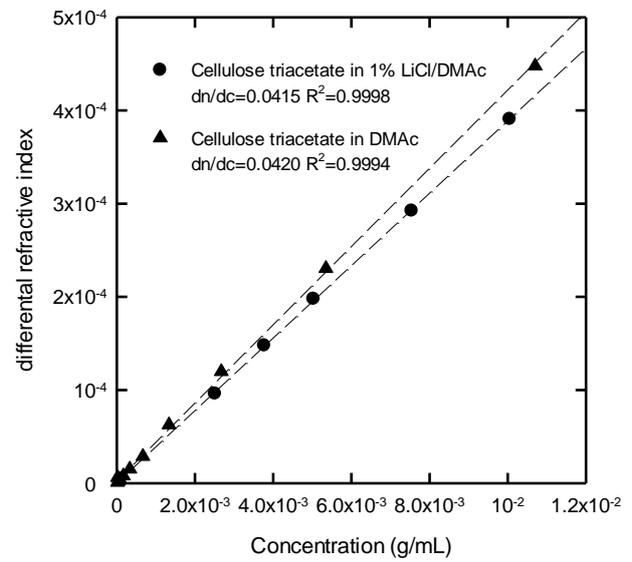
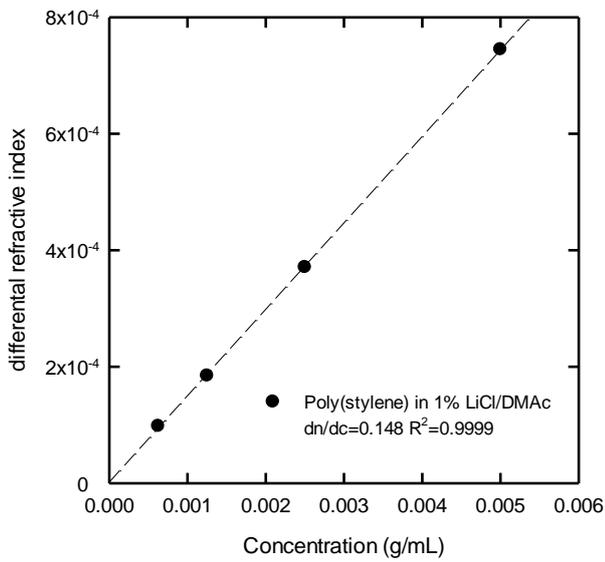
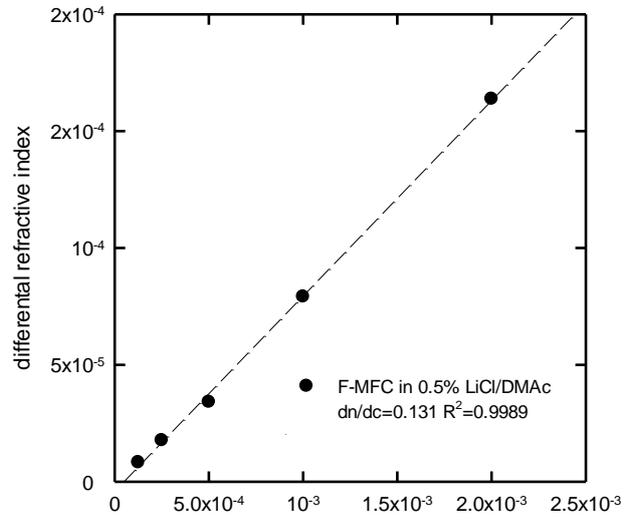
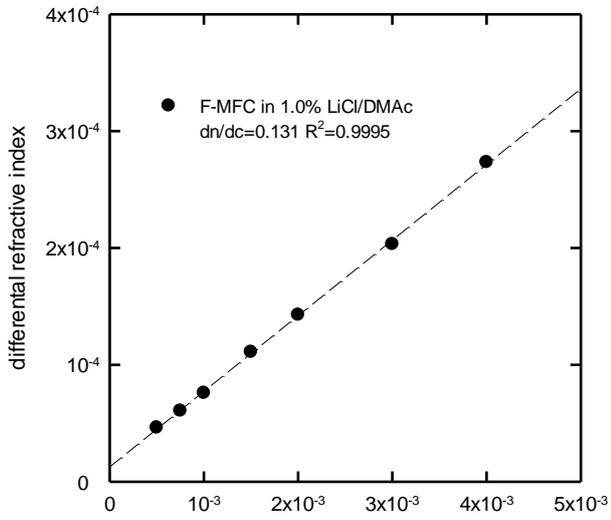
(e) Amylose in 1% w/v LiCl/DMAc

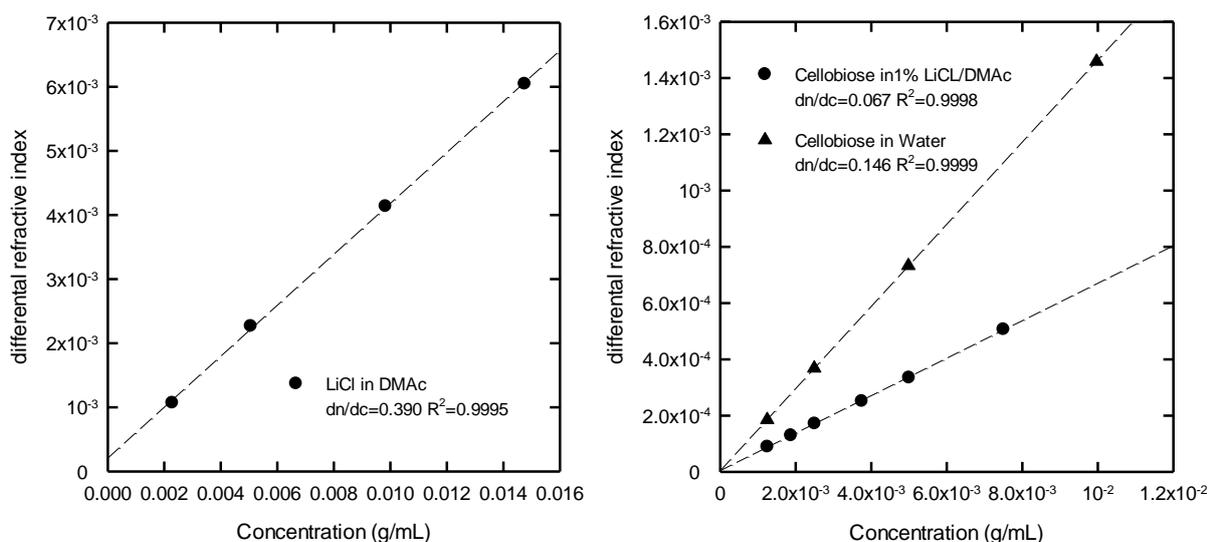


(f) Amylose in DMAc

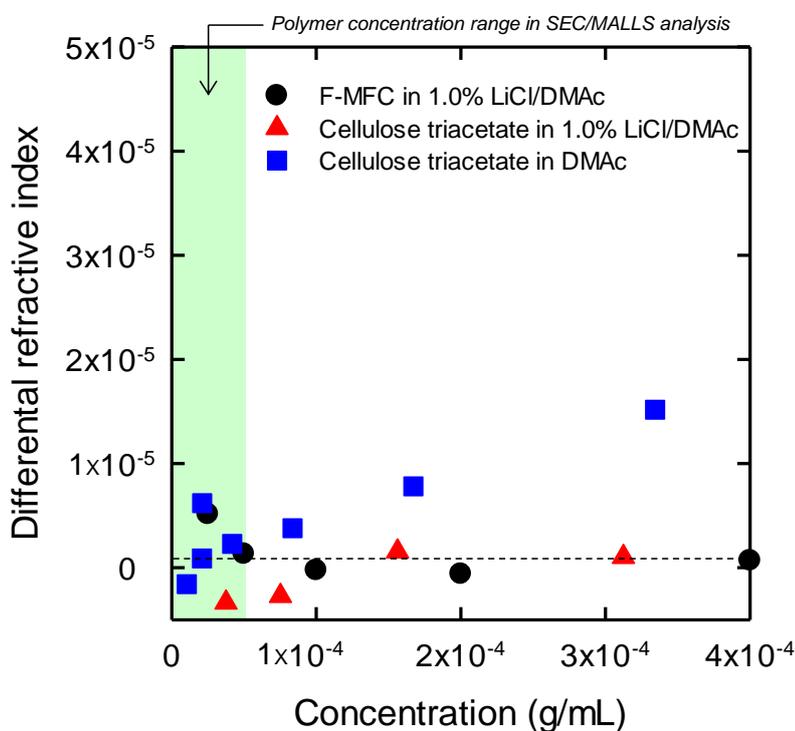


**Figure 2-3** SEC elution patterns and corresponding molecular mass. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2015)





**Figure 2-4** Relationships between concentration of polymers, cellobiose and LiCl, and differential refractive index determined by off-line RI method. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2015)



**Figure 2-5** Relationship between F-MFC or cellulose triacetate concentration and differential refractive index of selected solutions in 1% LiCl/DMAc or DMAc, measured using the off-line RI method. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2015)

### 2-3-3 $dn/dc$ 値と溶液の安定性への LiCl の影響

分子量既知の標準試料が市販されているプルランを DMAc と LiCl/DMAc に溶解し、SEC/MALLS 測定法と Off-Line RI 測定法による  $dn/dc$  値の比較をおこなった。

3 種類の P20 溶液 (2-2-4 参照) の  $dn/dc$  値と分子量を Table 2-3 に示す。P20 は  $M_w$  22800 の HPLC 用プルランスタンダード試料である。A P20-DMAc を Off-Line RI 法より算出した  $dn/dc$  値 0.091 を用い SEC/MALLS 測定を行うと、分子量 ( $M_w$ ) はラベル表示の値と一致し、実測濃度 (Calculated mass) も試料調製濃度 (Injected mass) と一致した。このことから、 $dn/dc$  値 0.091 は適正な値であることがわかる (Figure 2-6)。一方、C P20-8%LiCl/DMAc→1%LiCl/DMAc に Off-Line RI 法より算出した  $dn/dc$  値 0.065 を用いて SEC/MALLS 測定を行うと、分子量と濃度の結果は、予想とは大きく異なる値を示した。そこで、P20-DMAc の実測濃度に合わせた場合の  $dn/dc$  値 0.125 を用いて  $M_w$  を算出したところ、 $M_w$  は P20-DMAc の値と一致した。このことから、プルランの  $dn/dc$  値は、DMAc 溶液では 0.091、1% w/v LiCl/DMAc 溶液では 0.125 であることがわかる。次にプルランスタンダード P200 ( $M_w$  212000) の SEC/MALLS 測定結果 ( $dn/dc$  値 0.125) を Table 2-3 と Figure 2-7 に示す。P20 と同様、DMAc 中の方がカラム保持時間が短く、分子サイズが大きいことがわかる。また、DMAc 中では slope 値が大きい値となったことから、プルランは DMAc 中では LiCl/DMAc 中よりも慣性半径は大きく、分子は広がっていた。また、 $M_w$  も適正な測定結果が得られた。

プルランの  $dn/dc$  値は、DMAc 溶液ではセルローストリアセテートと同様に 2 つの測定方法で一致したが、1% w/v LiCl/DMAc 溶液では 2 つの測定方法の  $dn/dc$  値は一致せず、それぞれの値はセルロースの  $dn/dc$  値の近似値となった。このことから、プルランとセルロースは 1% w/v LiCl/DMAc 中で同じ溶解状態を形成しており、これらの 1% w/v LiCl/DMAc 溶液の  $dn/dc$  値が 2 つの測定方法で一致しない原因として、LiCl の存在の関与が推察できる。SEC/MALLS 測定法の結果、アミロース (DMAc-amylose、LiCl-amylose) の  $dn/dc$  値も DMAc と 1% w/v LiCl/DMAc で異なり、プルランの  $dn/dc$  値と近似値となった (Table 2-2)。このように、グルコース鎖を基本骨格とするポリマー (セルロース、アミロース、プルラン、キチン) は、LiCl/DMAc 中で同じ溶解状態だと推察できる。

A (P20-DMAc) に LiCl を加えた B (P20-DMAc→1% LiCl/DMAc) の  $dn/dc$  値は、プルランを 8% w/w LiCl/DMAc に溶解した後に DMAc を加えて調製した C (P20-8%LiCl/DMAc→1%LiCl/DMAc) の  $dn/dc$  値と一致した (Figure 2-1, Table 2-3)。このことは、LiCl の添加によりプルラン/DMAc 型はプルラン/LiCl/DMAc 型に変わり、プルラン/LiCl/DMAc 型の方がより安定であることを示す。

また、SEC/MALLS 測定法では、F-MFC の  $dn/dc$  値が 0.5% w/v LiCl/DMAc 中と 1% w/v LiCl/DMAc 中で一致するが、Off-Line RI 測定法では異なる値となった。このことは、Off-Line RI 測定法の  $dn/dc$  値には LiCl の濃度が影響していることを示している。

0.05% A-Chitin / 1% w/v LiCl/DMAc に DMAc を添加し調製した 0.025% A-Chitin / 0.5% w/v

LiCl/DMAc はキチンが析出した。このことから、溶解状態を保つためには、ある程度の LiCl 濃度が必要であることがわかる (Figure 2-8)。また、0.05% w/v F-MFC / 1% w/v LiCl/DMAc 溶液に DMAc を添加し、0.025% w/v F-MFC/0.25% w/v LiCl/DMAc を調製してもセルロースの析出はみられなかった。このことから、セルロース溶液はキチン溶液よりも低い LiCl 濃度でも安定して溶解状態を保っていると推察できる。

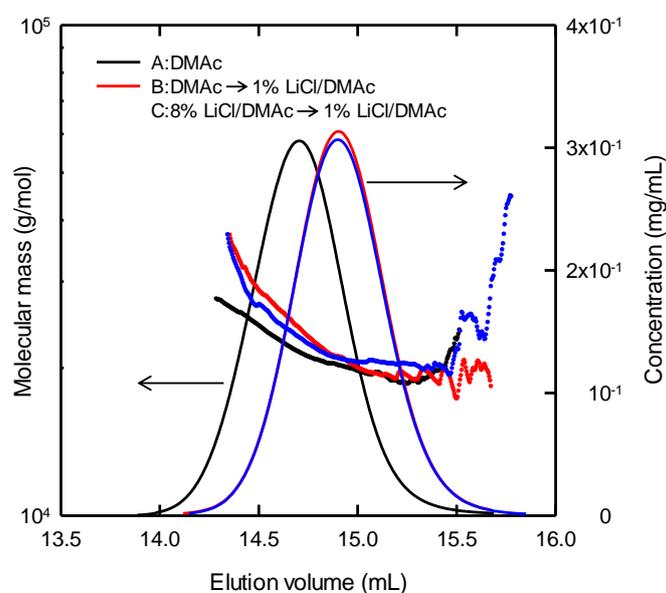
**Table 2-3** Molecular mass parameters of P20 and P200 in 1% w/v LiCl/DMAc and DMAc.

Reproduced of image with permission from Elsevier (©Elsevier 2017)

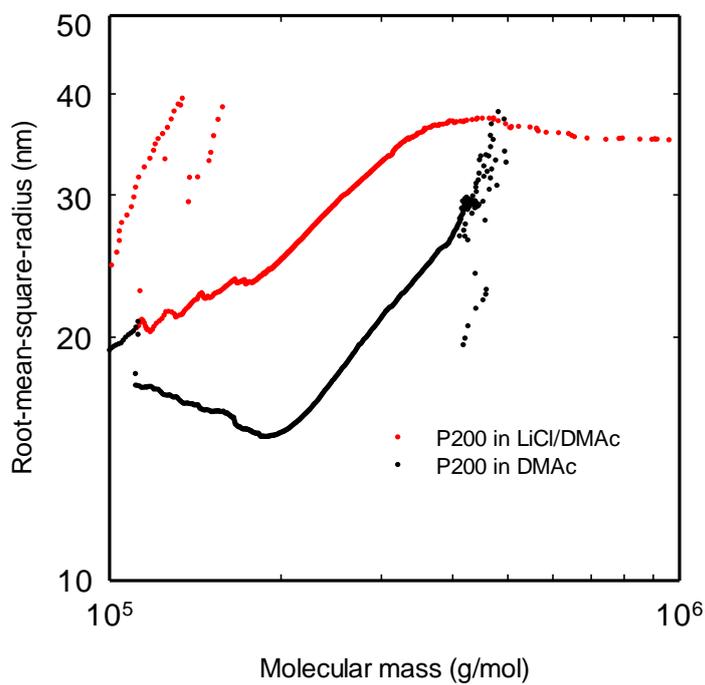
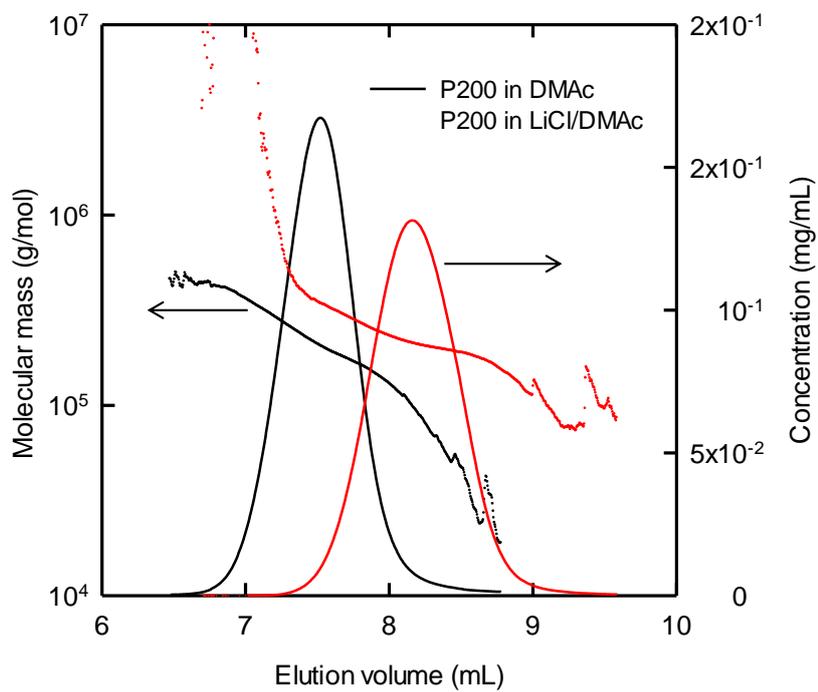
Sample	Eluent	$M_n$	$M_w$	$M_w/M_n^a$	Calc. mass <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Slope value <sup>c</sup>	$dn/dc$ (mL/g)
A P20-DMAc	DMAc	22900	23300	1.01	0.19	-	0.091
B P20-DMAc → 1% LiCl/DMAc	1% LiCl/DMAc	22600	23100	1.02	0.18	-	0.125
		41300	41900	1.02	0.34	-	0.069
C P20-8% LiCl → 1% LiCl/DMAc	1% LiCl/DMAc	22800	23100	1.02	0.18	-	0.125
		41000	41900	1.02	0.33	-	0.069
P200	1% LiCl/DMAc	210500	215400	1.02	0.97	0.65	0.125
	DMAc	200800	216900	1.08	0.10	0.84	0.125

<sup>a</sup> Polydispersity, <sup>b</sup> Calculated mass determined by SEC/MALLS analysis,

<sup>c</sup> Slope value of conformation plot



**Figure 2-6** SEC elution patterns and corresponding molecular mass plots of P20 in DMAc (A,  $dn/dc:0.091$ ) and 1% w/v LiCl/DMAc (B and C,  $dn/dc:0.125$ ). Reproduced of image with permission from Elsevier (©Elsevier 2017)



**Figure 2-7** SEC elution patterns and corresponding molecular mass plots of P200 (above). Double logarithmic plots of molecular mass versus r.m.s. radius for P200 (below).



**Figure 2-8** Gel-like precipitates were formed when the 1% w/v LiCl/DMAc A-chitin solution was diluted to 0.5% w/v LiCl/DMAc.

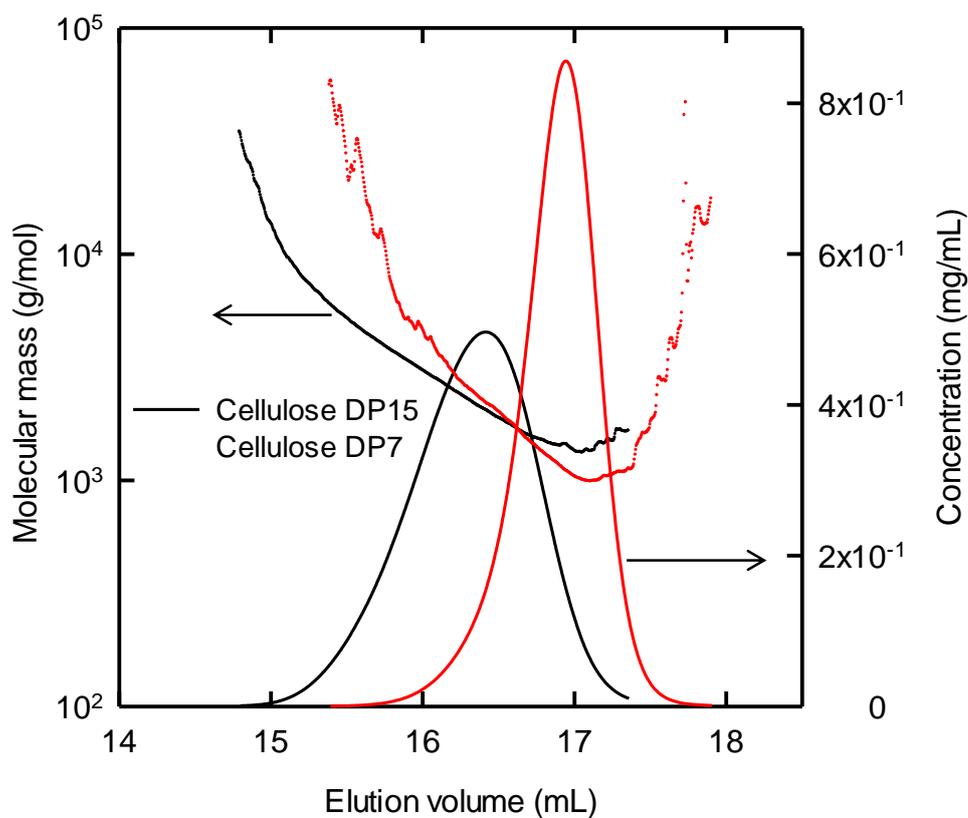
#### 2-3-4 MCC と低分子量セルロースの分子量

セルロースには分子量既知のスタンダード試料は無いが、コットンリンターを希酸加水分解した市販の MCC の分子量は、レベルオフ重合度 (LODP) DP200~300 と報告されている。磯貝らは DP7 と DP15 (プルランスタンダードを用いた HPLC 分子量測定法により測定) の 2 種類の単分子分散セルロースの調製方法を確立している<sup>1</sup>。これら試料の 1% w/v LiCl/DMAc 溶液を調製し、2つの方法により求めた  $dn/dc$  値 (Table 2-2) を用いて分子量を算出した結果を Table 2-4 に示す。 $dn/dc$  値 0.131 を用いて算出した  $DP_w$  は予想される値とほぼ一致し、試料調製濃度 (injected mass) と実測濃度 (calc. mass) もほぼ一致した。このことから、プルランと同様、セルロースの  $dn/dc$  値も SEC/MALLS 測定法により算出された値を用いるべきである。

**Table 2-4** Molecular mass parameters of MCC, cellulose DP7 and DP15 pullulan. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2015)

Sample	$dn/dc$ (mL/g)	$M_n$	$M_w$	$DP_w^a$	$M_w/M_n^b$	Injected mass <sup>c</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Calc. mass <sup>d</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Slope value <sup>e</sup>
MCC	0.131	19400	29800	184	1.5	0.50	0.46	0.6
	0.065	39000	60100	371	1.5	0.50	0.93	0.6
Cellulose DP7	0.131	1100	1300	8	1.1	0.51	0.52	-
	0.065	2300	2600	16	1.1	0.51	1.05	-
Cellulose DP15	0.131	2100	2500	15	1.2	0.51	0.51	-
	0.065	4200	5000	31	1.2	0.51	1.04	-

<sup>a</sup>  $DP_w = M_w/162$ , <sup>b</sup> Polydispersity, <sup>c</sup> Sample prepared concentration, <sup>d</sup> Calculated mass determined by SEC/MALLS analysis, <sup>e</sup> Slope value of conformation plot

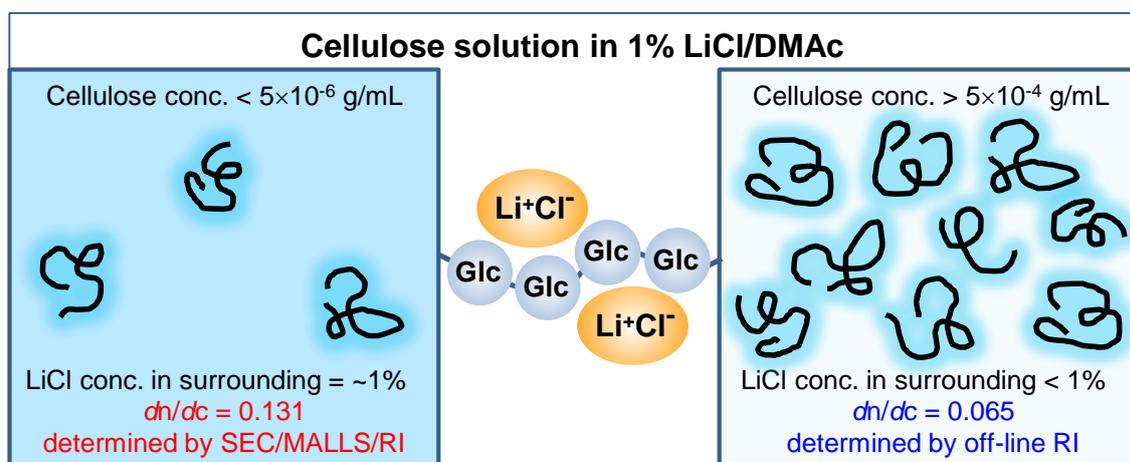


**Figure 2-9** SEC elution patterns and corresponding molecular mass plots of cellulose DP15 and DP7 using  $dn/dc$  0.131.

### 2-3-5 水酸基と LiCl の相互作用

LiCl/DMAc 中でのセルロースの溶解機構は未だ解明されていない。セルロース/LiCl/DMAc の  $^{13}\text{C}$  NMR の結果から、セルロース誘導体やセルロースの水酸基と LiCl または LiCl/DMAc 間の共有結合はないことが報告がされている<sup>4,8-10</sup>。また、LiCl/DMAc 中では、セルロース分子周辺で LiCl 濃度が高くなる濃度勾配があるとの仮説がある<sup>7</sup>。今回の Off-Line RI 測定法の結果は、高分子の高濃度溶液の濃度と屈折率との関係は高い直線性を示し、この濃度領域での屈折率が正しい値である事を示している。また  $dn/dc$  値に LiCl の影響が無いセルローストリアセテートとポリスチレンには水酸基がほとんど又は全く無いこと、LiCl と DMAc は水との親和性が非常に高いこと、LiCl/DMAc の含水率が低いほどセルロース溶解度は高くなることは、セルロースの水酸基と LiCl がセルロースの溶解性に関係していることを示唆している<sup>2</sup>。

これらのことから、以下のようなセルロースの溶解機構が考えられる。水と同様にセルロースの水酸基は DMAc 中でなんらかの LiCl-セルロース水酸基間の結合を形成し、それによりセルロースマイクロフィブリル間の水素結合及び疎水性相互作用は阻害される。徐々にセルロースマイクロフィブリル内に LiCl/DMAc が浸透することで、マイクロフィブリルがほぐれ、セルロース分子は LiCl/DMAc 中に分散する。セルロースが溶解している状態では、LiCl はセルロース水酸基周辺に集まっている (Figure 2-10)。このように考えると、高濃度セルロース溶液を用いて  $dn/dc$  値を測定する Off-Line RI 測定法では、溶液中のセルロースと離れた所の LiCl はより希薄になり、LiCl の濃度勾配が顕著になる。LiCl の  $dn/dc$  値はセルロースの 3 倍以上であり、セルロース濃度が高いと LiCl の濃度勾配は無視できないほど  $dn/dc$  値に大きく影響する。セルロース量の増加に比例して、溶液中でセルロースと離れた広領域での屈折率が低下するため、Off-Line RI 測定結果は高い直線性を示したと推察できる。



**Figure 2-10** Model of cellulose solution in 1%LiCl/DMAc. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2015)

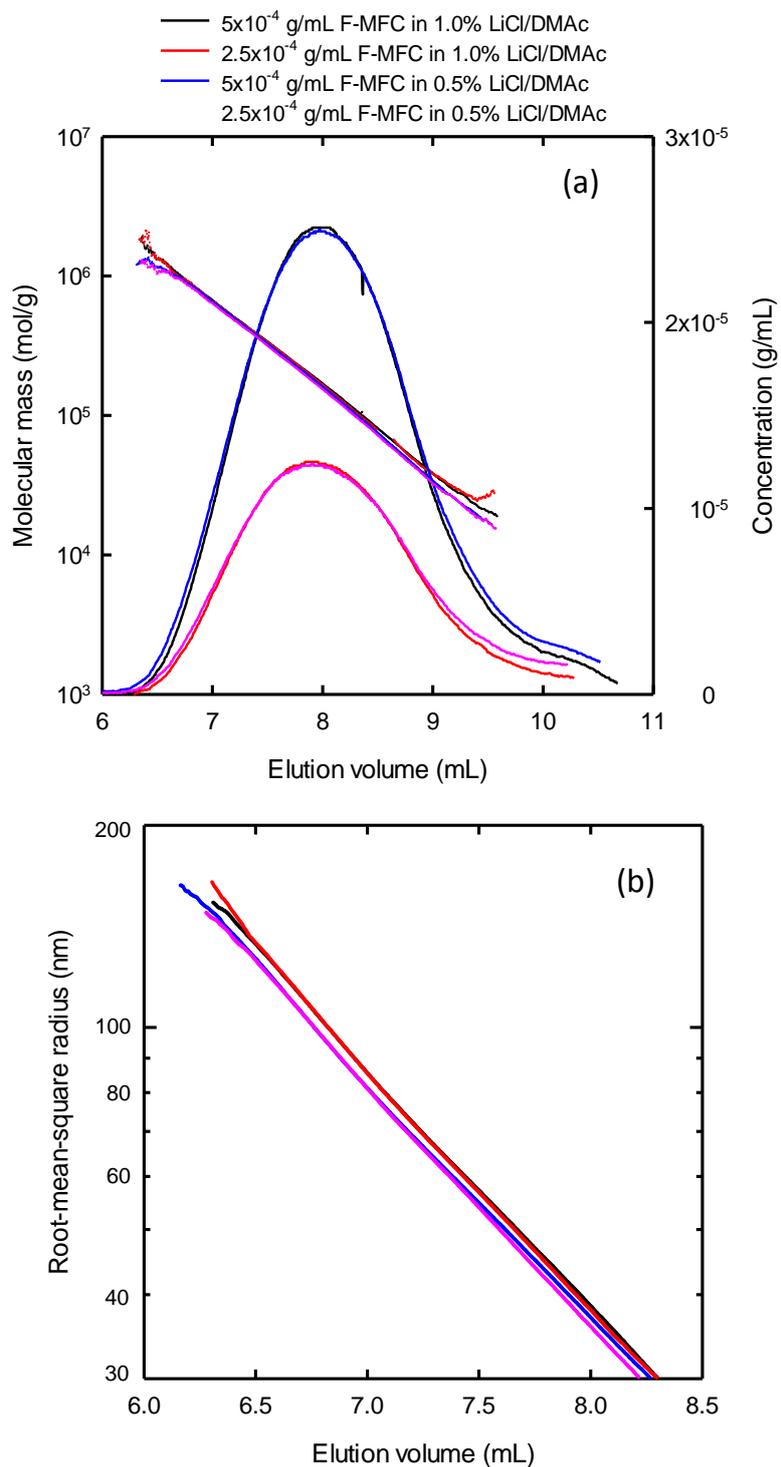
この濃度勾配をモデル的に LiCl 高濃度領域（セルロースなどの溶質周辺の狭い領域）と LiCl 希薄領域（セルロースと離れた広領域）と 2 つの領域とみなし、1% および 0.5% w/v LiCl/DMAc 中におけるセルロース周辺の高濃度領域の 1 グルコースユニットあたりの LiCl の mol 数を式 (2-2) と (2-3) より算出した。プルランとキチンについても同様に算出した (Table 2-5)。これらの式は、SEC/MALLS 測定法による低濃度高分子溶液の  $dn/dc$  値と Off-Line RI 測定法による高濃度高分子溶液の  $dn/dc$  値の差は、高濃度高分子溶液のセルロースと離れた広領域の LiCl 濃度の低下により生じていると仮定した。SEC/MALLS 測定法ではかなりの希薄高分子溶液となるため、高分子に吸着している LiCl 量  $\propto 0$  とみなした。

$$\frac{d_{\text{off-line RI}}}{1+a} + d_{\text{LiCl}} \times a = \frac{d_{\text{MALLS}}}{1+a} \quad (2-2)$$

$$m_{\text{LiCl}} = \frac{a}{42.4} \times 162 \text{ (for cellulose and pullulan)}; m_{\text{LiCl}} = \frac{a}{42.4} \times 203 \text{ (for chitin)} \quad (2-3)$$

$d_{\text{off-line}}$  は F-MFC、プルラン P20、A-chitin の 1% w/v および 0.5% w/v LiCl/DMAc 溶液中の Off-Line RI 測定法による  $dn/dc$  値、 $d_{\text{MALLS}}$  は SEC/MALLS 測定法による  $dn/dc$  値、 $d_{\text{LiCl}}$  は LiCl の DMAc 溶媒中での  $dn/dc$  値 (0.390 mL/g)、 $a$  は LiCl 高濃度領域で F-MFC、プルラン P20、A-chitin 1g あたりの LiCl 量 (g)、42.4 は LiCl の分子量、162 はセルロースとプルランの繰返しユニットの分子量、203 はキチンの繰返しユニットの分子量。

その結果、1% w/v LiCl/DMAc 中では 2 セルロースの繰返しユニットあたり LiCl 約 1 分子、0.5% w/v LiCl/DMAc に希釈すると、3 セルロースの繰返しユニットあたり LiCl 約 1 分子分となった (Table 2-5)。SEC/MALLS 測定結果から、0.5% w/v LiCl/DMAc 中では 1% w/v LiCl/DMAc 中よりも F-MFC の根平均二乗回転半径が若干小さくなった (Figure 2-11 (b))。これらのことから、溶液の LiCl 濃度が低下するとセルロース周辺の LiCl 量も減少し、貧溶媒傾向となると考えられる。しかし、分子量測定結果には LiCl 濃度の希釈による影響はなかった (Table 2-4)。キチンは DMAc を加え、0.5% w/v LiCl/DMAc に希釈すると、ゲル化のような析出現象がみられる (Figure 2-8)。キチンは繰返しユニットあたりの水酸基が 2 つであり、セルロースの 3 つよりも少ないため、LiCl 濃度低下により不安定になりやすいと考えられる。LiCl/DMAc 中で、これらの高分子溶液の安定性には水酸基の存在が重要であることを示している。



**Figure 2-11** Effect of LiCl or F-MFC concentration on SEC elution patterns and corresponding molecular mass plots of different solutions (a), and relationship between SEC elution volume and r.m.s. radius of cellulose molecules determined by SEC/MALLS analysis (b). Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2015)

**Table 2-5** Amount of LiCl apparently bound to one repeating unit (mol/mol) of F-MFC, A-Chitin, pullulan molecules. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (© American Chemical Society 2015)

polysaccharide	solvent	LiCl (mol) bound to one repeating unit
F-MFC	1% w/v LiCl/DMAc	0.55
F-MFC	0.5% w/v LiCl/DMAc	0.41
A-chitin	1% w/v LiCl/DMAc	0.51
pullulan	1% w/v LiCl/DMAc	0.48

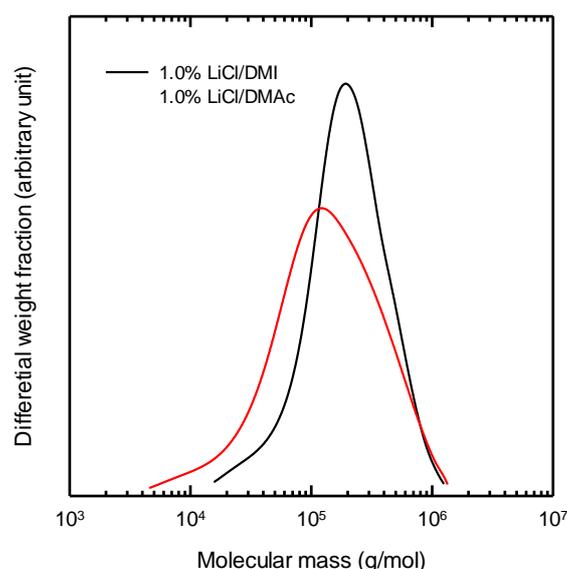
### 2-3-6 溶媒の違いによる分子量測定への影響

溶媒や溶離液が異なっても、同じ溶質であれば、分子量測定結果は同じとなるはずである。LiCl の濃度を変更した 0.5% w/v LiCl/DMAc と 1% w/v LiCl/DMAc 中で F-MFC の分子量測定結果は一致した (Table 2-6)。F-MFC/1% w/v LiCl/DMAc を調製し、SEC/MALLS 測定を行った結果、 $M_w$  は DMAc の結果とほぼ同じ値となった (Table 2-6)。しかし、DMI 溶媒の方が DMAc 溶媒より多分散度が低い結果となり、分子量分布は異なった (Figure 2-12)。

**Table 2-6** Molecular mass parameters of F-MFC in 1.0% w/v LiCl/DMAc, 0.5% w/v LiCl/DMAc, and 1.0% w/v LiCl/DMAc. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (© American Chemical Society 2015)

F-MFC conc. (µg/mL)	solvent	$M_n$	$M_w$	$DP_w^a$	$M_w/M_n^b$	Calc. mass <sup>c</sup> (µg/mL)	Slope value <sup>d</sup>
1.00	1% LiCl/DMAc	105000	227000	1400	2.2	0.92	0.60
0.50	1% LiCl/DMAc	68400	224000	1380	3.2	0.48	0.60
0.25	1% LiCl/DMAc	80100	231000	1420	2.9	0.24	0.60
0.50	0.5% LiCl/DMAc	63600	227000	1400	3.6	0.50	0.56
0.25	0.5% LiCl/DMAc	67700	226000	1390	3.3	0.25	0.57
average		77000	227000	1400	3.0	–	0.59
standard deviation		16800	2550	15	0.5	–	0.02
$1 \times 10^{-3}$	1% LiCl/DMAc	146700	246000	1520	1.7	0.99	0.61

<sup>a</sup>  $DP_w = M_w/162$ , <sup>b</sup> Polydispersity, <sup>c</sup> Calculated mass determined by SEC/MALLS analysis, <sup>d</sup> Slope value of conformation plot



**Figure 2-12** Differential molecular-mass distribution of F-MFC dissolved in 1.0% w/v LiCl/DMAc and 1.0% w/v LiCl/DMI, obtained by SEC/MALLS analysis. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2015)

## 2-4 まとめ

DMAc 溶媒置換していない乾燥 F-MFC を 8% w/w LiCl/DMAc に直接溶解することができた。その結果、正確な濃度のセルロース溶液を調製することができ、 $dn/dc$  値の測定が可能となった。セルロースの 1% w/v LiCl/DMAc の  $dn/dc$  値は SEC/MALLS 測定法から算出した値 0.131 と決定することにより、セルロースの絶対分子量の測定が可能となった。セルロースは様々な工業製品の原料として広く用いられており、正確な分子量や分布を把握することは、原料の性質管理に大変有用である。

Off-Line RI 測定法は、溶液の  $dn/dc$  値測定方法として一般的ではあるが、セルロースやキチンなどのように DMAc に溶解する際、LiCl が必要である高分子の  $dn/dc$  値の測定はできない。この原因として、これらの高分子の水酸基に LiCl が接近し、溶液中で LiCl の濃度勾配が生じることが考えられ、この水酸基と LiCl の相互作用が高分子の溶解機構に関与していると考えられる。また、セルロースと同じグルコース骨格であるアミロースやプルランは DMAc 溶液中と 1% w/v LiCl/DMAc 中の  $dn/dc$  値が異なり、これは LiCl の有無によってアミロースやプルランの溶解機構や溶液中での溶解状態は異なることを示す。また、これらの LiCl 溶液の Off-Line RI 測定法により得られた  $dn/dc$  値は SEC/MALLS による分子量測定には適さなかった。さらに、プルランやアミロースの 1% w/v LiCl/DMAc 中の  $dn/dc$  値は、セルロースやキチンの 1% w/v LiCl/DMAc 中の  $dn/dc$  値と近似値となった。これらのことから、LiCl の有無によるプルランの溶液中での溶解状態の違いを明らかにすることで、セルロースの溶解機構を解明する手がかりが得られると考えられる。

## 2-5 参考文献

- (1) Isogai, A., & Usuda, M. (1991). Preparation of low-molecular weight celluloses using phosphoric acid. *Journal of the Japan Wood Research Society (Japan)*.
- (2) Chrapava, S., Touraud, D., Rosenau, T., Potthast, A., & Kunz, W. (2003). The investigation of the influence of water and temperature on the LiCl/DMAc/cellulose system. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 5(9), 1842-1847.
- (3) Yanagisawa, M., Shibata, I., & Isogai, A. (2004). SEC-MALLS analysis of cellulose using LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone as an eluent. *Cellulose*, 11(2), 169-176.
- (4) Matsumoto, T., Tatsumi, D., Tamai, N., & Takaki, T. (2001). Solution properties of celluloses from different biological origins in LiCl-DMAc. *Cellulose*, 8(4), 275-282.
- (5) Ishii, D., & Isogai, A. (2008). The residual amide content of cellulose sequentially solvent-exchanged and then vacuum-dried. *Cellulose*, 15(4), 547-553.
- (6) Yanagisawa, M., & Isogai, A. (2005). SEC-MALS-QELS Study on the Molecular Conformation of Cellulose in LiCl/Amide Solutions. *Biomacromolecules*, 6(3), 1258-1265.
- (7) Potthast, A., Radosta, S., Saake, B., Lebioda, S., Heinze, T., Henniges, U., Isogai, A., Koschella, A., Kosma, P., Rosenau, T., Schiehser, S., Sixta, H., Strlič, M., Strobin, G., Vorwerg, W., & Wetzal, H. (2015). Comparison testing of methods for gel permeation chromatography of cellulose: coming closer to a standard protocol. *Cellulose*, 22(3), 1591-1613.
- (8) McCormick, C. L., Callais, P. A., & Hutchinson Jr, B. H. (1985). Solution studies of cellulose in lithium chloride and N, N-dimethylacetamide. *Macromolecules*, 18(12), 2394-2401.
- (9) Spange, S., Reuter, A., Vilsmeier, E., Heinze, T., Keutel, D., & Linert, W. (1998). Determination of empirical polarity parameters of the cellulose solvent N, N-dimethylacetamide/LiCl by means of the solvatochromic technique. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 36(11), 1945-1955.
- (10) Striegel, A. M. (2003). Advances in the understanding of the dissolution mechanism of cellulose in DMAc/LiCl. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 48(1), 73-77.

## 第3章 セルロースのモデルとしてのプルランの LiCl/DMAc 中での

### 溶解機構

#### 3-1 背景

セルロースは DMAc や DMI には溶解することはできないが、8% LiCl/DMAc または 8% LiCl/DMI には溶解することができる。この分子レベルでのセルロースの溶解に LiCl がどのように作用しているのか、セルロースは溶液中でどのような構造なのかについて、これまでも多くの先行研究や報告があり、様々な手がかりは提示されているものの未だ解明されていない<sup>1-10</sup>。

セルロースを溶解するという事は、固体内のセルロース分子間に形成されていた水素結合および疎水性相互作用を全て切断し、セルロース分子間の相互作用を除去することにより、セルロース分子 1 本 1 本を分子レベルで分散させ、その状態を維持することである。セルロース分子は分子内水素結合により直鎖状になり、直鎖状のセルロース分子鎖間の水素結合または疎水性相互作用により結晶性のマイクロフィブリルが形成される。これらの分子間や分子内結合がセルロースの不溶性の要因だと推察される。セルロース試料を EDA などのアミン系有機溶媒に浸漬すると、膨潤し、結晶化度 (C.I.) は低下するということが X 線回折により明らかになっている<sup>11-13</sup> (Figure 4-9)。これらの溶液中では、セルロース分子間と分子内水素結合の可逆性の切断は起こるが、全てが同時に切断されることがないため、セルロースは溶解に至らないのではないかと考えられる<sup>14</sup>。

LiCl/DMAc は、多角度静的光散乱検出器付きのサイズ排除クロマトグラフィー (SEC/MALLS) を用いた分子量分布測定に一般的に用いられているセルロース溶剤であり、セルロース試料を溶解するためには、ある程度の高濃度 LiCl 溶液が必要である<sup>15</sup>。SEC/MALLS 測定用のセルロース溶液は、セルロースを 8% LiCl/DMAc に溶解し、完全溶解後に DMAc を加え LiCl 濃度を 1% に希釈し調製する。このセルロース溶液は、1% LiCl に希釈しても析出やゲル化することなく安定溶解状態を維持している。これらのことから、LiCl が DMAc 溶媒中においてセルロース分子間、分子内水素結合が切断された瞬間、それらが再結合するのを阻害するためには高い LiCl 濃度が必要である一方、完全溶解したセルロース/LiCl/DMAc 溶液の LiCl 濃度を 1% に下げてもセルロースが析出しないことから、一度溶解するとセルロース溶液は安定である事がわかる。ホロセルロース、ホヤ、再生セルロースなどの難溶解セルロースは、EDA に浸漬して膨潤した後、DMI や DMAc 溶媒置換を経て、8% LiCl/DMI または 8% LiCl/DMAc 中で攪拌することにより溶解できる<sup>16-18</sup>。これは、EDA 浸漬によりセルロースマイクロフィブリル内の分子内および分子間水素結合が一部切断され、結晶構造内に 8% LiCl/DMI または 8% LiCl/DMAc が浸透しやすくなり、LiCl がセルロース分子

間及び分子内水素結合に作用できるためと推察される。セルロース/LiCl/DMAc の溶解機構について、これまで様々な分析やシミュレーションによる解析が行われてきた。しかし、LiCl や DMAc がどのようにセルロース溶解に寄与しているのか、LiCl/DMAc 中でのセルロース分子や DMAc 中での LiCl の状態など、未だ解明されていない。セルロースのモデル試料としてセロビオースやオリゴマーを用いて分析および考察も行われてきたが、セロビオースでさえも LiCl 無しでは DMAc に不溶であるため、溶媒中での LiCl 有無によるセルロース分子への影響を調べることは出来なかった<sup>27</sup>。

第2章では、ポリスチレンやセルローストリアセテート溶液の  $dn/dc$  値は LiCl の有無にかかわらず同じ値となり、2種類の測定方法から算出された値も一致していた。一方、DMAc 中でのプルランの  $dn/dc$  値も2種類の測定方法による結果は一致していたが、LiCl/DMAc 中での  $dn/dc$  値は2種類の測定方法で異なる値を示した。さらに、2つの測定法のプルランとセルロースの  $dn/dc$  値はそれぞれ近似値となった。このような2つの測定方法で得られた  $dn/dc$  値が一致しないという挙動は、一般的な合成高分子ではみられない。また、プルラン、アミロース、セルロース、キチンのようなグルコースを基本骨格とする高分子の2測定法により得られた  $dn/dc$  値はそれぞれ近似値を示すことから、これらのグルコースを基本骨格とする高分子の溶解機構や溶液中での分子構造は同じであると推察できる。

プルランはグルコース3分子が  $\alpha$ -1-4 結合したマルトトリオースが  $\alpha$ -1-6 結合で結合した構造を持つ多糖類であり、高速液体クロマトグラフィ (HPLC) を用いた分子量測定のみならず、分子量標準物質として分子量概知の高い精製度の試料が市販されている (Figure 3-1)。プルランはセルロースと異なり溶解性に優れ、水可溶性かつ DMAc にも容易に溶解する多糖類である。

また、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルでは、試料構造内に存在する水酸基 (R-OH) のプロトンはブロードなピークになることが多く、測定温度、解離度、構造変化などの影響で化学シフトやピーク形状も変化しやすい。この現象を活用して、化学構造の動的変化を追跡することができる。そこで本章では、モデル物質としてプルランの DMAc と LiCl/DMAc 溶液の NMR 測定を行い、溶液中で LiCl がプルランにどのように作用しているかを調べることで、セルロースを含めたグルコースを基本骨格とする高分子の溶解機構解明の手がかりとした。

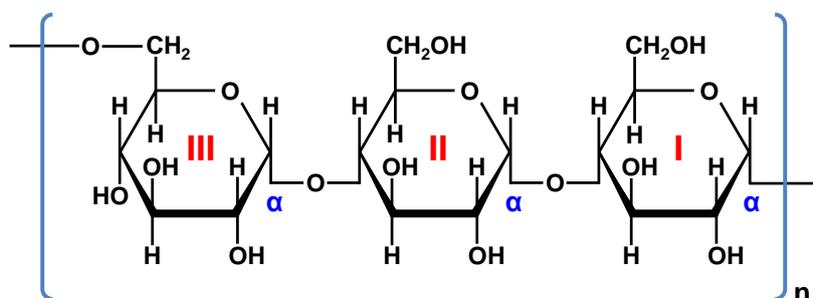


Figure 3-1 Chemical structure of Pullulan.

## 3-2 実験

### 3-2-1 試料と試薬

市販のプルランスタンダード (P5, Mw: 5900, Shoko Science Co., Ltd., Japan)、重水素化溶媒 DMAc- $d_9$  (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. USA) を NMR 測定試料および溶媒として用いた。他の試薬や溶媒は試薬特級(Wako Pure Chemicals, Japan) を使用した。

### 3-2-2 NMR 測定用溶液の調製

プルランスタンダード P5 (41.5 mg) を DMAc- $d_9$  (2 mL) に溶解し (P5-DMAc)、この溶液 (1 mL) に LiCl (10 mg) を加え溶解した (P5-LiCl/DMAc)。P5-DMAc と P5-LiCl/DMAc に内部標準物質テトラメチルシラン (TMS) を適量加え、NMR 測定用溶液とした。

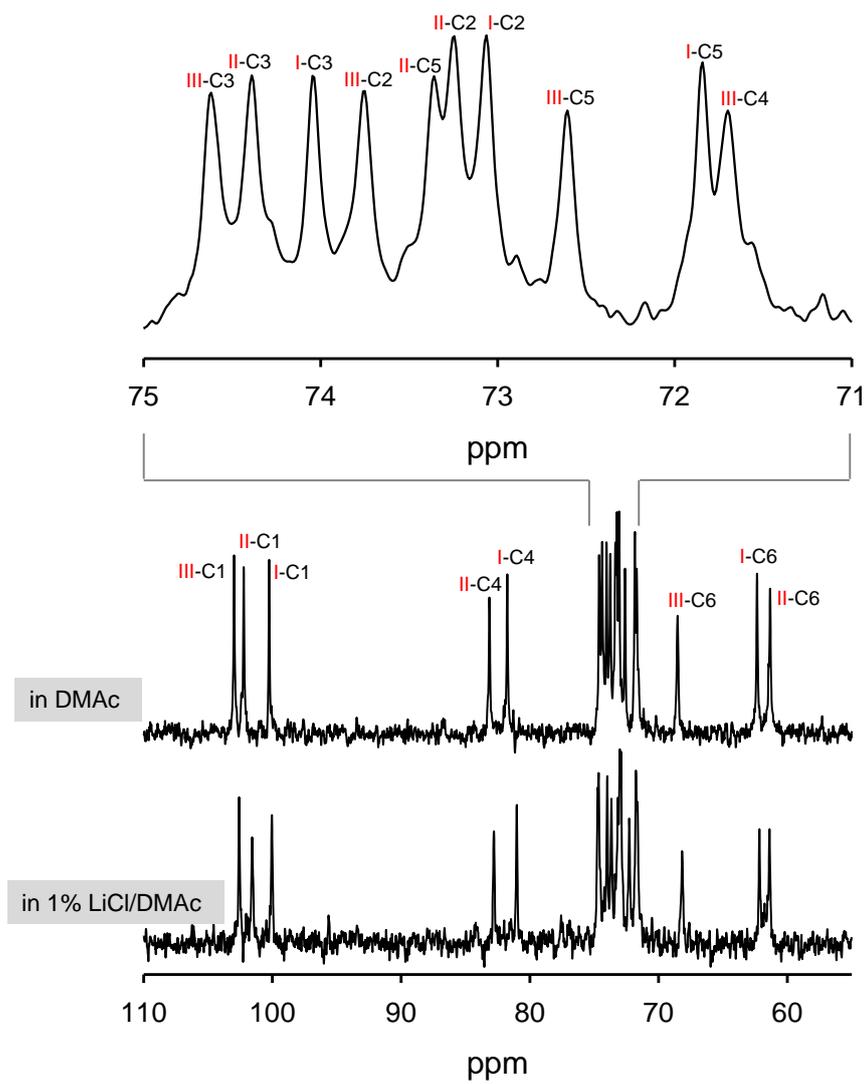
### 3-2-3 NMR 測定

測定装置は、JMN-ECA II 500 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) を使用した。測定方法は  $^1\text{H}$ -NMR、 $^{13}\text{C}$ -NMR、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC、試料液量は 0.6 mL、測定温度は 23°C (室温) または 35°C<sup>19</sup>。

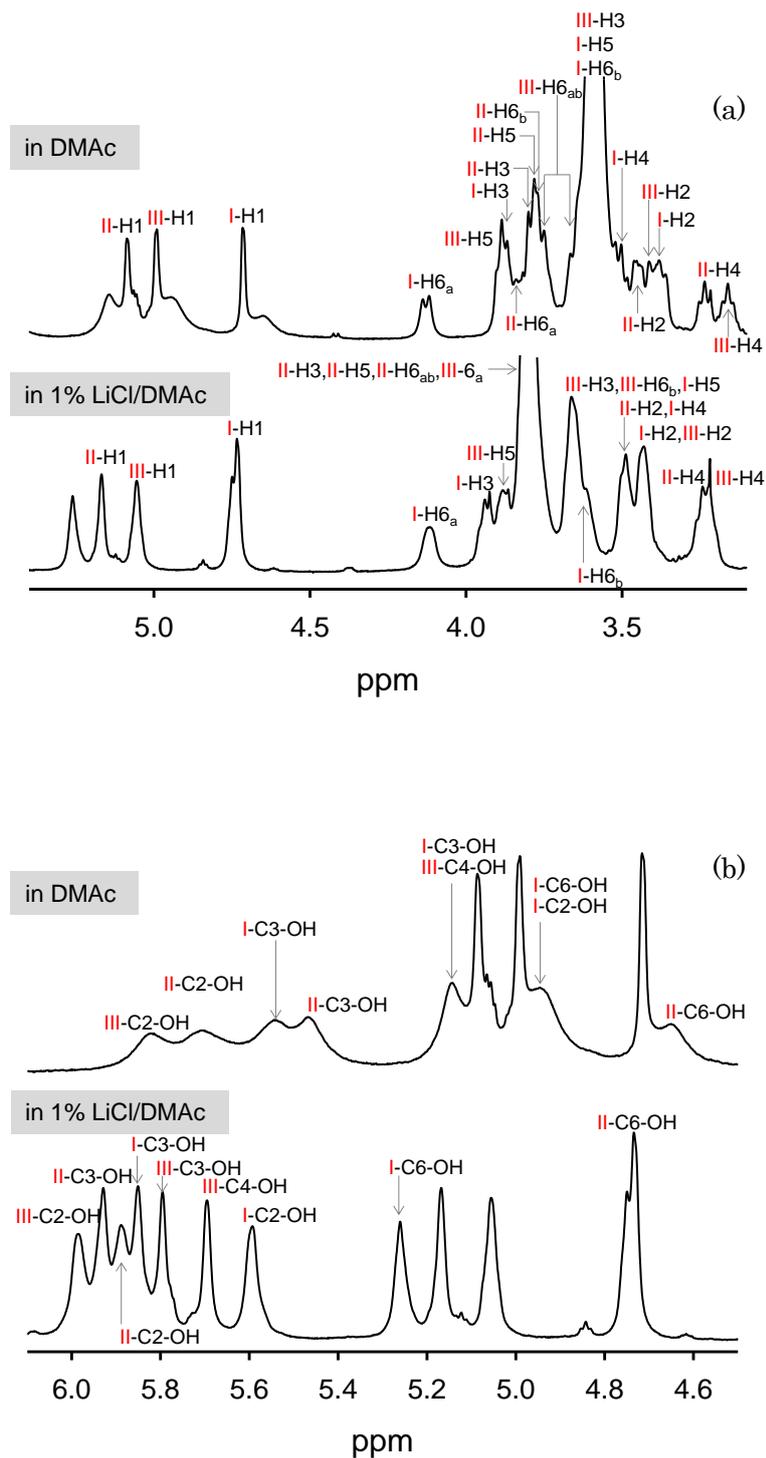
## 3-3 結果と考察

### 3-3-1 NMR 測定によるプルランの構造解析

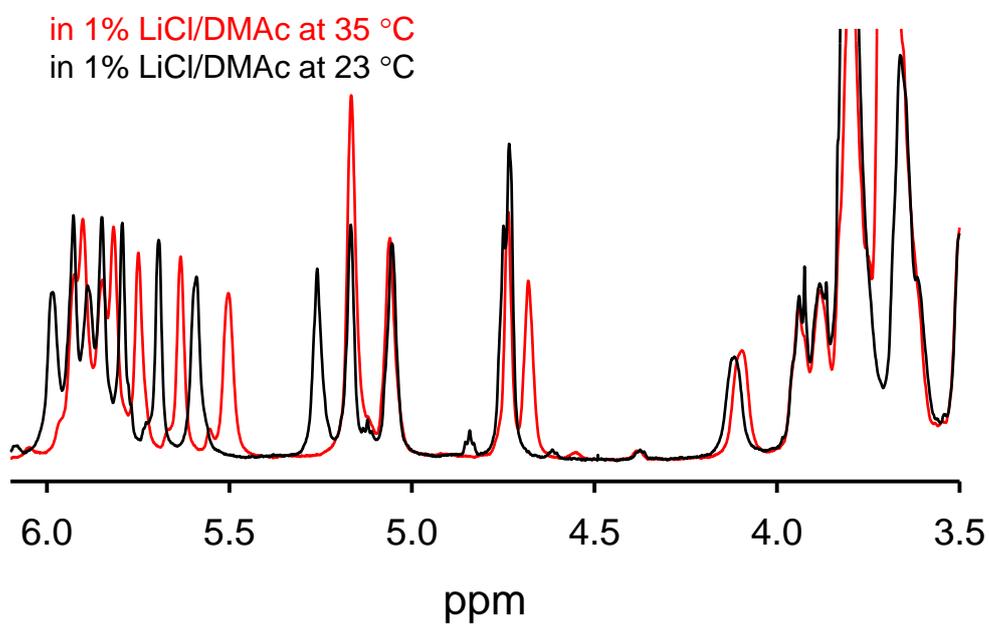
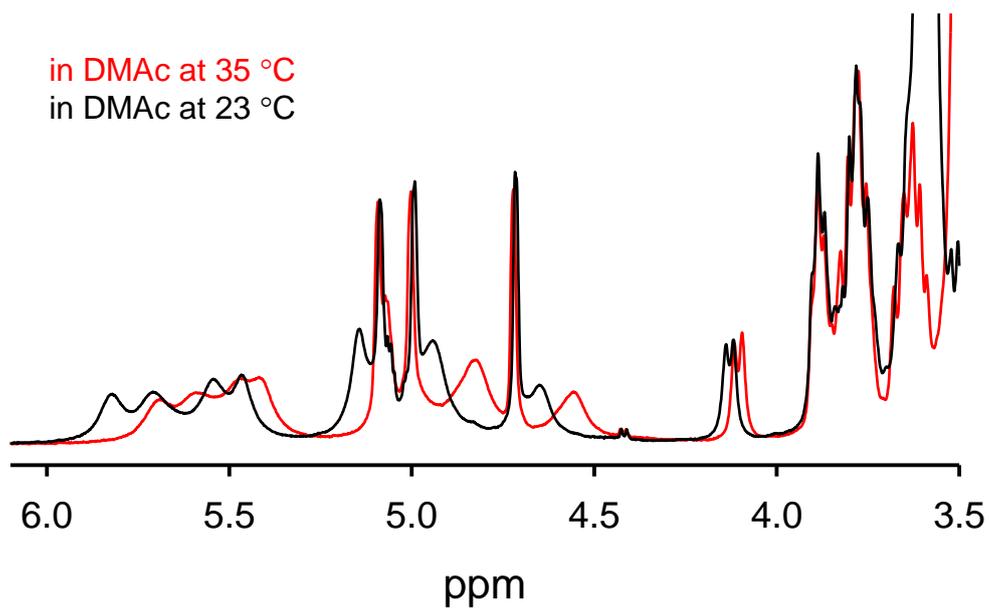
$^1\text{H}$ -NMR、 $^{13}\text{C}$ -NMR、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQCOSY、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC 測定により、P5-DMAc と P5-LiCl/DMAc のケミカルシフトを決定することができた (Figure 3-2, 3-3, Table 3-1, 3-2, 3-3)。水酸基 (-OH) のピークは、測定温度を変えて  $^1\text{H}$ -NMR 測定を行うと、低温になるにしたがい水素結合が強まり、動きが抑制されて低磁場側へシフトし (Figure 3-4)、 $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC 測定では、交差ピークが観測されない (Figure 3-5, 3-6)。これらのことから  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルの C-OH プロトンのピークと C-H プロトンのピークは容易に判別できる。また、 $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQCOSY の交差ピークを詳細に解析することでプロトンのケミカルシフトを決定し、更に  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC の交差ピークからカーボンのケミカルシフトも決定できた (Figure 3-5, 3-6, 3-7, 3-8)。



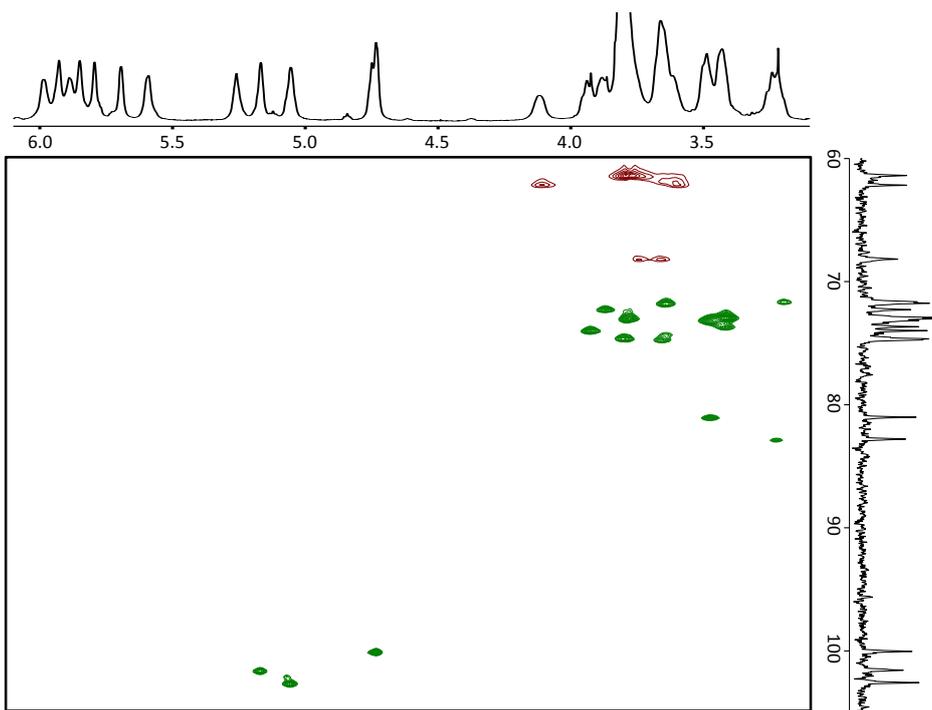
**Figure 3-2**  $^{13}\text{C}$ -NMR spectra and signal assignments of pullulan in DMAc and 1.0% LiCl/DMAc.



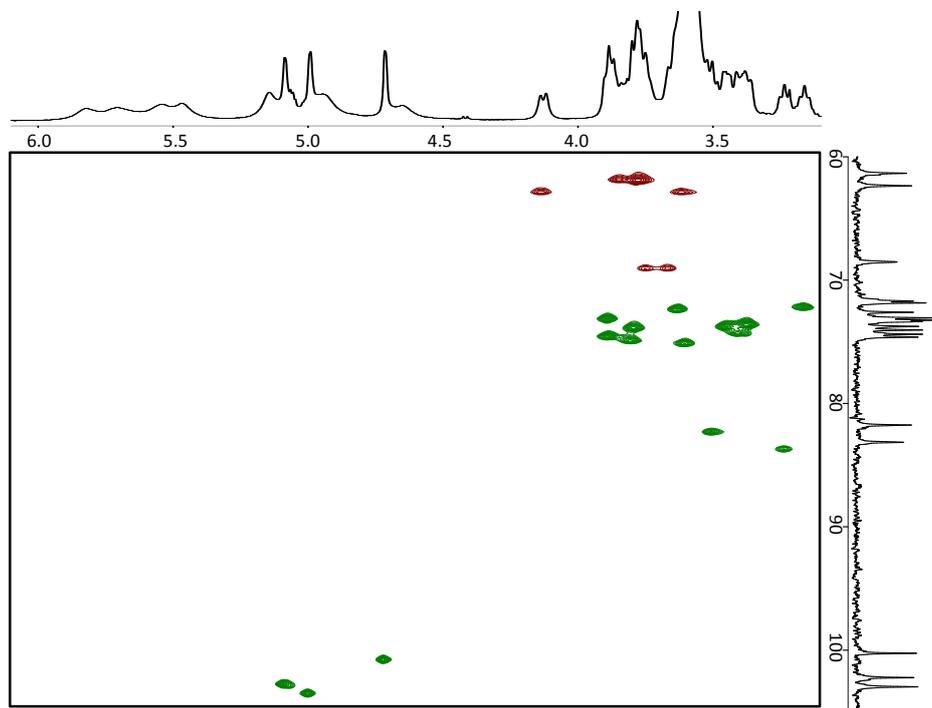
**Figure 3-3**  $^1\text{H}$ -NMR spectra and signal assignments of pullulan in DMAC and 1.0% LiCl/DMAC, showing (a) C–H and (b) O–H protons. Reproduced of image with permission from Elsevier (© Elsevier 2017)



**Figure 3-4** Changes in chemical shifts of  $^1\text{H}$ -NMR spectra of pullulan in DMAc and 1.0% w/v LiCl/DMAc at 23 and 35 °C.



**Figure 3-5**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC spectra of pullulan in 1.0% w/v LiCl/DMAc at 23°C.



**Figure 3-6**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC spectra of pullulan DMAc at 23°C.

z161111\_seishi\_ono\_LiCl\_DQCOSY  
Pulse Sequence: DQCOSY

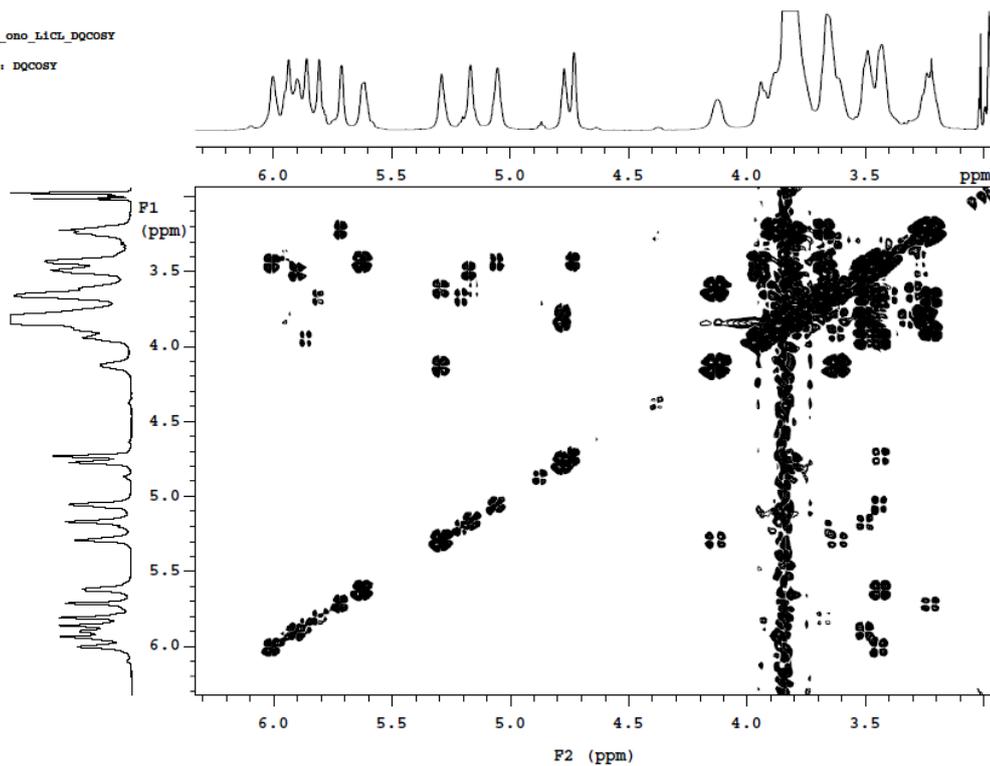


Figure 3-7  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQCOSY spectra of pullulan in 1.0% w/v LiCl/DMAc at 23°C.

z161114\_seishi\_ono\_DMAC\_DQCOSY  
Pulse Sequence: DQCOSY

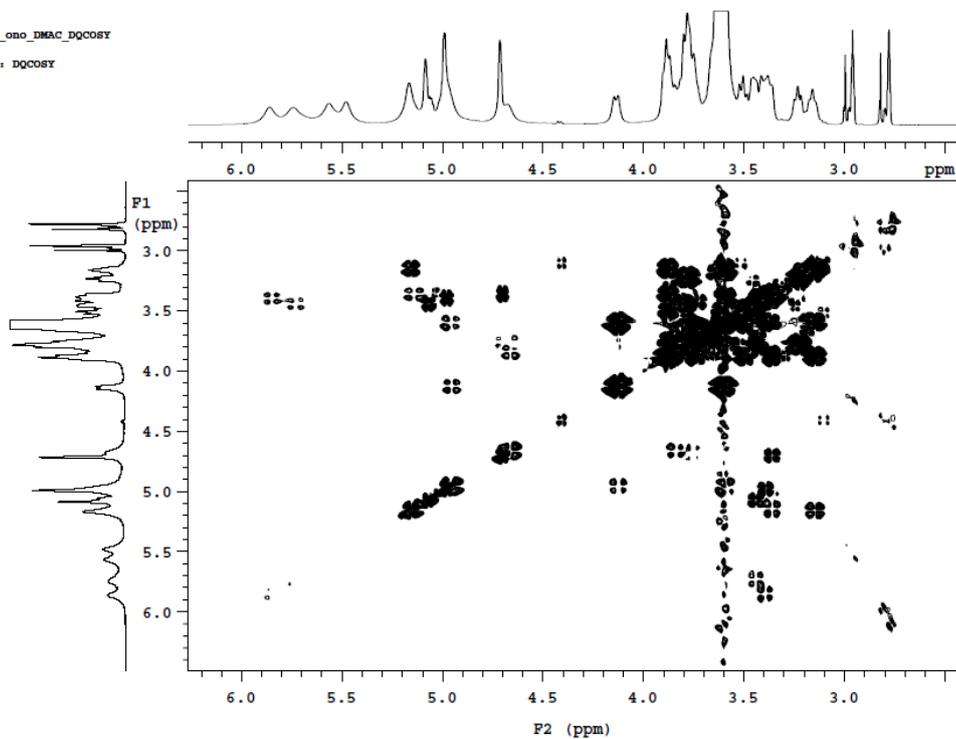


Figure 3-8  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  DQCOSY spectra of pullulan in DMAc at 23°C.

**Table 3-1**  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of pullulan in  $\text{DMAc-}d_9$  and 1% (w/v)  $\text{LiCl/DMAc-}d_9$ .

Solvent	Glucosyl unit	C1	C2	C3	C4	C5	C6
1% LiCl/DMAc	I	100.1	73.0	74.0	82.0	71.8	62.2
	II	101.6	73.2	74.7	82.8	72.0	61.4
	III	102.6	73.7	74.7	71.6	72.3	68.2
DMAc	I	100.3	73.1	74.0	81.8	71.8	62.4
	II	102.2	73.3	74.6	83.2	73.4	61.3
	III	103.0	73.7	74.4	71.7	72.6	68.5

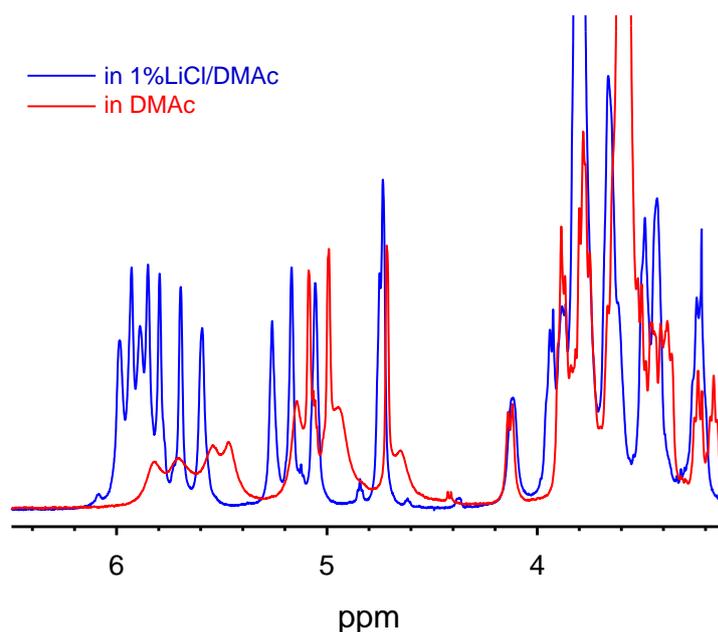
**Table 3-2**  $^1\text{H}$  chemical shifts of C–H protons of pullulan in  $\text{DMAc-}d_9$  and 1% (w/v)  $\text{LiCl/DMAc-}d_9$ .

Solvent	Glucosyl unit	H1	H2	H3	H4	H5	H6 <sub>a</sub>	H6 <sub>b</sub>
1% LiCl/DMAc	I	4.73	3.43	3.93	3.50	3.65	4.21	3.61
	II	5.17	3.49	3.8	3.24	3.8	3.80	3.76
	III	5.06	3.44	3.66	3.22	3.88	3.75	3.66
DMAc	I	4.72	3.38	3.87	3.50	3.64	4.12	3.60
	II	5.09	3.45	3.80	3.24	3.78	3.84	3.77
	III	5.00	3.41	3.59	3.16	3.89	3.75	3.66

**Table 3-3**  $^1\text{H}$  chemical shifts of C–OH protons of pullulan in  $\text{DMAc-}d_9$  and 1% (w/v)  $\text{LiCl/DMAc-}d_9$ .

Solvent	Glucosyl unit	C2–OH	C3–OH	C4–OH	C6–OH
1% LiCl/DMAc	I	5.59	5.85	–	5.26
	II	5.89	5.93	–	4.75
	III	5.99	5.80	5.70	–
DMAc	I	5.14	5.54	–	4.95
	II	5.71	5.47	–	4.65
	III	5.83	4.95	5.14	–

プルランの DMAc と LiCl/DMAc 中での  $^{13}\text{C}$ -NMR スペクトルと  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルの C-H プロトンのピークはほぼ一致し (Figure 3-2, Table3-4, Figure 3-3, Figure 3-9, Table3-5)、LiCl による影響はみられなかった。一方、LiCl/DMAc 中でプルランの 9 種類すべての C-OH プロトンのピークは大きく低磁場側にシフトし (+0.10~+0.56ppm)、シャープなピーク形状となった (Figure 3-3, Figure 3-9, Table3-6)。ピークが低磁場側にシフトするほど O と H の距離が離れている、つまり、C-OH 基の解離度は上がることを示している。また、ピーク形状がシャープなほど C-O-H の動きは抑制され安定しており、均一な構造となっていることを示している。これら結果から、LiCl/DMAc 中で、プルランの繰返し単位中の 9 種類の C-OH プロトンは個々に LiCl との相互作用があり、解離度は高いものの、動きは抑制され安定した均一構造をとっていることが推察できる。LiCl/DMAc 溶液の方が DMAc 溶液よりも安定なプルラン溶液であるということは、SEC/MALLS 測定の結果とも一致する (2-3-3 参照)。また、9 種類すべての C-OH プロトンのケミカルシフトを確定できたことから、C-OH プロトンの多くは誘導体化することなく、LiCl/DMAc と相互作用していることが示された。



**Figure 3-9** Difference in chemical shift of  $^1\text{H}$ -NMR spectra of pullulan in 1.0% LiCl/DMAc and DMAc.

**Table 3-4** Changes in  $^{13}\text{C}$  chemical shift (ppm) of pullulan carbons induced by changing the solution from DMAc to 1% (w/v) LiCl/DMAc. Reproduced of image with permission from Elsevier (© Elsevier 2017)

Glucosyl unit	C1	C2	C3	C4	C5	C6
I	-0.2	-0.2	0.0	0.0	-0.1	-0.2
II	-0.6	-0.1	0.1	-0.4	-0.3	0.0
III	-0.4	-0.1	0.3	-0.1	-0.3	-0.3

**Table 3-5** Changes in  $^1\text{H}$  chemical shift (ppm) of C–H protons of pullulan induced by changing the solution from DMAc to 1% (w/v) LiCl/DMAc. Reproduced of image with permission from Elsevier (©Elsevier 2017)

Glucosyl unit	H1	H2	H3	H4	H5	H6 <sub>a</sub>	H6 <sub>b</sub>
I	0.01	0.05	0.06	0.00	0.01	0.00	0.01
II	0.08	0.04	0.00	0.00	0.02	-0.04	-0.01
II	0.06	0.03	0.07	0.06	-0.01	0.00	0.00

**Table 3-6** Changes in  $^1\text{H}$  chemical shift (ppm) of C–OH protons of pullulan induced by changing the solution from DMAc to 1% (w/v) LiCl/DMAc. Reproduced of image with permission from Elsevier (©Elsevier 2017)

Glucosyl unit	C2–OH	C3–OH	C4–OH	C6–OH
I	0.45	0.31	–	0.31
II	0.18	0.46	–	0.10
II	0.16	0.85	0.56	–

### 3-3-2 セルロースの溶解機構

プルランの溶液中での分子構造の結果から、セルロースの溶解機構について以下のように推察できる。DMAc 中で C–OH プロトンの解離度を上げるためには、セルロースの 3 種類すべての OH 基と  $\text{Li}^+$  及び  $\text{Cl}^-$  イオン間の強い相互作用が必要である。更に、セルロースは DMAc には溶解しないことから、DMAc 分子はセルロースに直接作用はしていない。

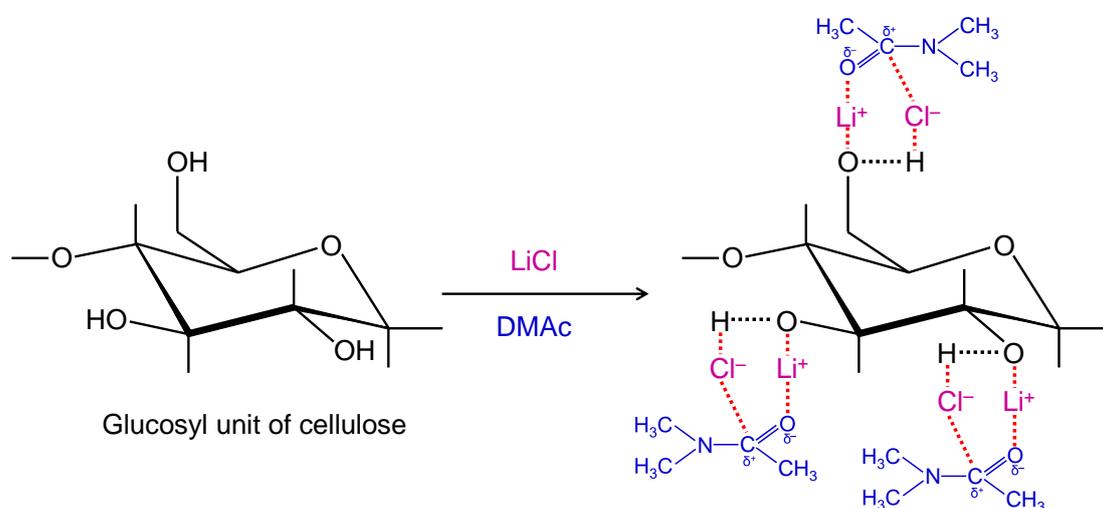
また、LiBr/DMAc も LiCl/DMAc と同様にセルロース溶剤であり、NaCl/DMAc にはセルロースは溶解しない事から、 $\text{Li}^+$  がセルロース溶解に必要であると考えられる。

Adam らはシミュレーションの結果から DMAc 中ではグルコース鎖や  $\text{Li}^+$  及び  $\text{Cl}^-$  イオンは比較的溶媒和が弱いため、それが  $\text{Li}^+$  及び  $\text{Cl}^-$  イオンとグルコース鎖間の相互作用に大きく影響しており、更にサイズの小さい  $\text{Li}^+$  イオンはセルロース分子鎖間に入り込み、グルコース鎖

と多様な結合をするため、Li<sup>+</sup>イオンがセルロース溶解機構の主要因であるとのべている<sup>20</sup>。

セルロース分子鎖間の水素結合または疎水結合を切断し、その状態を維持していることが、セルロースが溶解していることであり、Li<sup>+</sup>イオンがセルロース水酸基すべてに作用することで、セルロース分子鎖間の水素結合や疎水結合の再構築を妨げ、セルロースの分子分散状態の維持に寄与していると考えられる (Figure 3-10)。

また、セルロースは LiCl/DMAc と LiCl/DMI には溶解するが、類似した構造を有するジメチルホルムアミド (DMF) やジメチルスルホキシド (DMSO) の LiCl/DMF や LiCl/DMSO には溶解しない。DMI と DMAc には、Li<sup>+</sup>及び Cl<sup>-</sup>イオンと他の溶媒には無い何らかの相互作用があるのではないかと推察できるが、その要因については今後詳細な検討が必要である。



**Figure 3-10** Schematic model of solution-state structure of cellulose in LiCl/DMAc. Reproduced of image with permission from Elsevier (©Elsevier 2017)

### 3-4 まとめ

$dn/dc$  値と <sup>1</sup>H-NMR スペクトルの C-OH プロトンのケミカルシフトの違いから、プルランの DMAc 溶液中での構造は LiCl の有無により異なることが明らかになった。LiCl の存在によりプルランの全水酸基の解離度は上がり、均一な安定構造となっていた。1% w/v LiCl/DMAc 中での  $dn/dc$  値がプルランと同様の挙動を示すセルロースを含むグルコースを基本骨格とする多糖の水酸基と Li<sup>+</sup>と Cl<sup>-</sup>イオン間には相互作用があり、これによりセルロース等が DMAc 溶媒には不溶であるが、LiCl/DMAc 溶液中では溶解に至る一因ではないかと推察できる。

### 3-5 参考文献

- (1) Elkafrawy, A. (1982). Investigation of the cellulose/LiCl/dimethylacetamide and cellulose/LiCl/N-methyl-2-pyrrolidinone solutions by  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy. *Journal of Applied Polymer Science*, 27(7), 2435-2443.
- (2) Germain, J. S., & Vincendon, M. (1983).  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  and  $^7\text{Li}$  nuclear magnetic resonance study of the lithium chloride–N, N-dimethylacetamide system. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 21(6), 371-375.
- (3) McCormick, C. L., Callais, P. A., & Hutchinson Jr, B. H. (1985). Solution studies of cellulose in lithium chloride and N, N-dimethylacetamide. *Macromolecules*, 18(12), 2394-2401.
- (4) Morgenstern, B., Kammer, H. W., Berger, W., & Skrabal, P. (1992).  $^7\text{Li}$ -NMR study on cellulose/LiCl/N,N-dimethylacetamide solutions. *Acta polymerica*, 43(6), 356-357.
- (5) Gross, A. S., Bell, A. T., & Chu, J. W. (2013). Preferential interactions between lithium chloride and glucan chains in N, N-dimethylacetamide drive cellulose dissolution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(12), 3280-3286.
- (6) Medronho, B., & Lindman, B. (2014). Competing forces during cellulose dissolution: from solvents to mechanisms. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 19(1), 32-40.
- (7) Zhang, C., Liu, R., Xiang, J., Kang, H., Liu, Z., & Huang, Y. (2014). Dissolution mechanism of cellulose in N, N-dimethylacetamide/lithium chloride: revisiting through molecular interactions. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(31), 9507-9514.
- (8) Vincendon, M. (1985).  $^1\text{H}$  NMR study of the chitin dissolution mechanism. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 186(9), 1787-1795.
- (9) McIntyre, D. D., & Vogel, H. J. (1991). Nuclear magnetic resonance studies of homopolysaccharides related to starch. *Starch-Stärke*, 43(2), 69-76.
- (10) Isogai, A. (1997). NMR analysis of cellulose dissolved in aqueous NaOH solutions. *Cellulose*, 4(2), 99-107.
- (11) Wada, M., Heux, L., & Sugiyama, J. (2004). Polymorphism of cellulose I family: reinvestigation of cellulose IVI. *Biomacromolecules*, 5(4), 1385-1391.

- (12) Wada, M., Kwon, G. J., & Nishiyama, Y. (2008). Structure and thermal behavior of a cellulose I-ethylenediamine complex. *Biomacromolecules*, 9(10), 2898-2904.
- (13) Wada, M., Heux, L., Nishiyama, Y., & Langan, P. (2009). The structure of the complex of cellulose I with ethylenediamine by X-ray crystallography and cross-polarization/magic angle spinning  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance. *Cellulose*, 16(6), 943.
- (14) 磯貝 明 (2001). “セルロースの材料科学” 東京大学出版会 p.30-34
- (15) 石井 大輔, 磯貝 明, 第 58 回日本木材学会年次大会, つくば, 2008, 塩化リチウム・アミド系溶媒を用いたセルロースの溶解分別
- (16) Yamamoto, M., Kuramae, R., Yanagisawa, M., Ishii, D., & Isogai, A. (2011). Light-scattering analysis of native wood holocelluloses totally dissolved in LiCl-DMI solutions: high probability of branched structures in inherent cellulose. *Biomacromolecules*, 12(11), 3982-3988.
- (17) Tamai, N., Tatsumi, D., & Matsumoto, T. (2004). Rheological properties and molecular structure of tunicate cellulose in LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone. *Biomacromolecules*, 5(2), 422-432.
- (18) Siller, M., Ahn, K., Pircher, N., Rosenau, T., & Potthast, A. (2014). Dissolution of rayon fibers for size exclusion chromatography: a challenge. *Cellulose*, 21(5), 3291-3301
- (19) Hirota, M., Furihata, K., Saito, T., Kawada, T., & Isogai, A. (2010). Glucose/Glucuronic Acid Alternating Co-polysaccharides Prepared from TEMPO-Oxidized Native Celluloses by Surface Peeling. *Angewandte Chemie International Edition*, 49(42), 7670-7672.
- (20) Gross, A. S., Bell, A. T., & Chu, J. W. (2013). Preferential interactions between lithium chloride and glucan chains in N, N-dimethylacetamide drive cellulose dissolution. *The Journal of Physical Chemistry B*, 117(12), 3280-3286.

## 第4章 難溶解セルロース試料の SEC/MALLS 測定

### 4-1 背景

通常、SEC/MALLS 測定用のセルロース試料は LiCl/DMAc に溶解し、分子量測定を行う。セルロース試料は容易に溶解せず、水-アセトン-DMAc 溶媒置換法 (2-2-4 参照) を用いることで溶解できる。しかし、この溶媒置換法では LiCl/DMAc に溶解可能なセルロース試料は、広葉樹漂白クラフトパルプ (HBKP)、溶解パルプ、MCC、無灰パルプなどに限定されており、汎用性が無い。当研究室の先行研究では、溶媒を LiCl/DMI に変えることで、これまで完全溶解できなかった針葉樹漂白クラフトパルプ (SBKP) や未漂白クラフトパルプ (UKP)、ホヤセルロースなどの難溶解性セルロース試料を完全溶解し、SEC/MALLS による分子量分布測定可能な試料範囲を大きく広げた<sup>1</sup>。さらに、木粉から調製したホロセルロースもエチレンジアミン (EDA) に浸漬した後、DMI に溶媒置換することで LiCl/DMI に溶解でき、分子量分布測定も可能にした<sup>2</sup>。しかし、LiCl/DMI は LiCl/DMAc と比べかなり粘度が高いため、溶媒や溶離液としての扱いが難しく、セルロース試料を溶解する際の攪拌性、SEC/MALLS 測定結果の再現性に問題があった。

本章では、ホロセルロースの DMI 溶液の調製方法と同様に EDA に浸漬することで難溶解性セルロース試料を LiCl/DMAc に完全溶解する方法の検討を行った。それによる HPLC 溶離液として一般的な LiCl/DMAc を用いセルロース試料の汎用性が高い SEC/MALLS 測定方法の確立を目的とした。

### 4-2 実験

#### 4-2-1 試料と試薬

未乾燥広葉樹漂白クラフトパルプ (HBKP)、未乾燥針葉樹漂白クラフトパルプ (SBKP) は日本製紙株式会社製を用いた。酢酸菌 (*Acetobacter xylinum*: JCM10150) から調製したバクテリアセルロース (BC)、ホヤ (*Halocynthia roretzi*) の外套膜、クラドフォラ (*Cladophora* sp.) を亜塩素酸ナトリウム中で漂白しタンパク質除去した後、ホモジナイザーにより粉碎し、精製セルロースを調製した<sup>3</sup>。コットンリントはコットンボール (東京大学農場提供) を 90% アセトン溶液に 1 日浸漬脱脂後、Wise 法<sup>4</sup>を 1 回行い精製した。市販の無灰パルプ (AP) (Ashless pulp, Advantec Tokyo, Japan) は、良溶解性コットンリントとして用いた。他の試薬や溶媒は試薬特級 (Wako Pure Chemicals, Japan) を使用した。

#### 4-2-2 セルロース試料の溶解と SEC/MALLS 測定

セルロース試料溶液は、エチレンジアミン浸漬法と水-アセトン溶媒置換法により調製した。エチレンジアミン浸漬法は、凍結乾燥した試料 (0.04 g) をエチレンジアミン (EDA) (5 mL) に 4 日間浸漬後、遠心分離機により EDA を取り除いた。沈殿物をメタノール (40 mL) で 3 回溶媒置換し、さらにメタノール (40 mL) に 3 時間振とう浸漬した後、メタノールを遠心分離機によって除去し、DMAc (40 mL) で溶媒置換を 3 回行った。さらに DMAc (40 mL) に 1 晩振とう浸漬した後、遠心分離機によって DMAc を除去し、沈殿物に 8% w/w LiCl/DMAc を加え、全量を 10 g とした。得られた溶液は、室温で 2 週間攪拌し、溶解した。ホヤとクラドフォラは、さらに 2 週間静置し溶解した。

水-アセトン溶媒置換法は、セルロース試料 (0.04 g) を蒸留水、アセトン、DMAc の順に各溶媒 (40 mL) 中で 1 日浸漬後、遠心分離機により溶媒置換 3 回を行い、得られた沈殿物に 8% w/w LiCl/DMAc を加え、全量を 10 g とした。溶液は、室温で攪拌した。遠心分離機は 12,000 ×g、10 分間の条件で使用した。

得られたセルロース試料の 8% w/w LiCl/DMAc 溶液を DMAc で希釈し、約 0.05% 試料濃度の 1% w/v LiCl/DMAc 溶液を調製し、SEC/MALLS 測定用試料とした。測定試料は、0.45 μm PTFE ディスポーザルメンブランフィルターを通した際、抵抗が無ければ、完全溶解していると判断した。SEC/MALLS 測定方法は 2-2-7 に記載した方法に従い行った。dn/dc 値は 0.131 g/mL を用いた。

#### 4-2-3 中性糖分析

乾燥試料 (50 mg) は 72% 硫酸 (1 mL) に浸漬攪拌 (30 °C、2 時間) 後、水 (14 mL) を加え、オートクレーブで加熱 (120 °C、1 時間) した。得られた糖液に 20 mg/mL の myo-イノシトール水溶液 (0.5 mL) を加え、水酸化バリウム (1.7 g) と炭酸バリウムを添加し pH 5.5 ~ 6.5 に調製した。遠心分離機 (12,000 ×g、10 分間) により沈殿物を除去し、上澄みを凍結乾燥した。得られた乾燥固形物を HPLC 分析用蒸留水 (0.5 mL) に溶解し、遠心分離機によって残留硫酸バリウムを沈殿除去した。得られた糖液 (0.4 mL) にアセトニトリル (0.4 mL) を加え、超音波処理 (10 秒間) で均一溶液とし、0.45 μm PTFE ディスポーザルメンブランフィルターを通した後、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定を行った。

HPLC の構成は、オンラインデガッサー (DGU-20A, Shimadzu, Japan)、高圧ポンプ (LC-10ADVP, Shimadzu, Japan)、オートインジェクター (SIL-20AC, Shimadzu, Japan)、カラムオーブン (CTO-10ACVP, Shimadzu, Japan)、ガードカラム (NH2PG-50G 4A, Shoko Science Co., Ltd., Japan)、アミノカラム (NH2P-50 4E, Shoko Science Co., Ltd., Japan)、示差屈折率測定器 (Optilab, λ=658 nm, Wyatt Technologies, USA) からなる。データの取得および解析は ASTRA IV ソフトウェア (Wyatt Technologies, USA) を用いた。測定条件は、流速 1.0 mL/min、カラムオ

ーブンおよび示差屈折率測定器の温度は 50 °C、注入量 20 μL とした。溶離液 250 mM リン酸 75% (v/v) アセトニトリルは、超音波処理することで均一溶液化してから用いた。定量する糖 (グルコース (Glc)、マンノース (Man)、キシロース (Xyl)、アラビノース (Ara)、ガラクトース (Gal)、ラムノース (Rha)、myo-イノシトール (Ino)) の検量線はあらかじめ作製しておいた<sup>5</sup>。

#### 4-2-4 固体 NMR 測定 (CP/MAS 法)

測定試料 (約 60 mg) は乾燥して用いた。固体 <sup>13</sup>C NMR スペクトルは交差分極およびマジック角回転 (CP/MAS) を用いて測定した。JMN-ECA II 500 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) を使用し、プローブは 3.2 mm HXMAS プローブ、試料管は 3.2 mm 径のジルコニウムローターを用い、測定温度 23 °C で測定した。試料の回転周波数は 6 kHz、1H 90° パルス幅は 2.5 μs、遅延時間 5 s、コンタクトタイム 2 ms、積算回数 1024 回、リファレンスはアダマンタンのメチレンカーボンピーク 29.5 ppm とした。結晶化度 (C.I.) は、Gaussian-Lourentzian 関数を用いピーク分離を行い、C4 ピークの全域 (80-91 ppm) に対する結晶領域 (86-91 ppm) の面積割合から算出した<sup>6</sup>。

#### 4-2-5 還元粘度測定

レオメータ (MCR 302, Anton Paar GmbH, Graz, Austria) を使用し、0.4% w/v セルロース試料濃度の 8% w/w LiCl/DMAc と 0.05% w/v セルロース試料濃度の 1% w/v LiCl/DMAc のずり粘度測定を行った。測定は、コーンプレート (50 mm 径、angle 2°) を使用、ずり速度 0.01-1000 s<sup>-1</sup>、室温 25 °C の条件で行った。ゼロせん断粘度は、8% w/w LiCl/DMAc は 6.26 mPa・s、1% w/v LiCl/DMAc は 0.966.26 mPa・s を用い、式 (3-1) (3-2) (3-3) より還元粘度を算出した<sup>7,8</sup>。

$$\frac{\eta_0}{\eta_s} = \eta_{rel} \quad (3-1)$$

$$\eta_{rel} - 1 = \eta_{sp} \quad (3-2)$$

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (3-3)$$

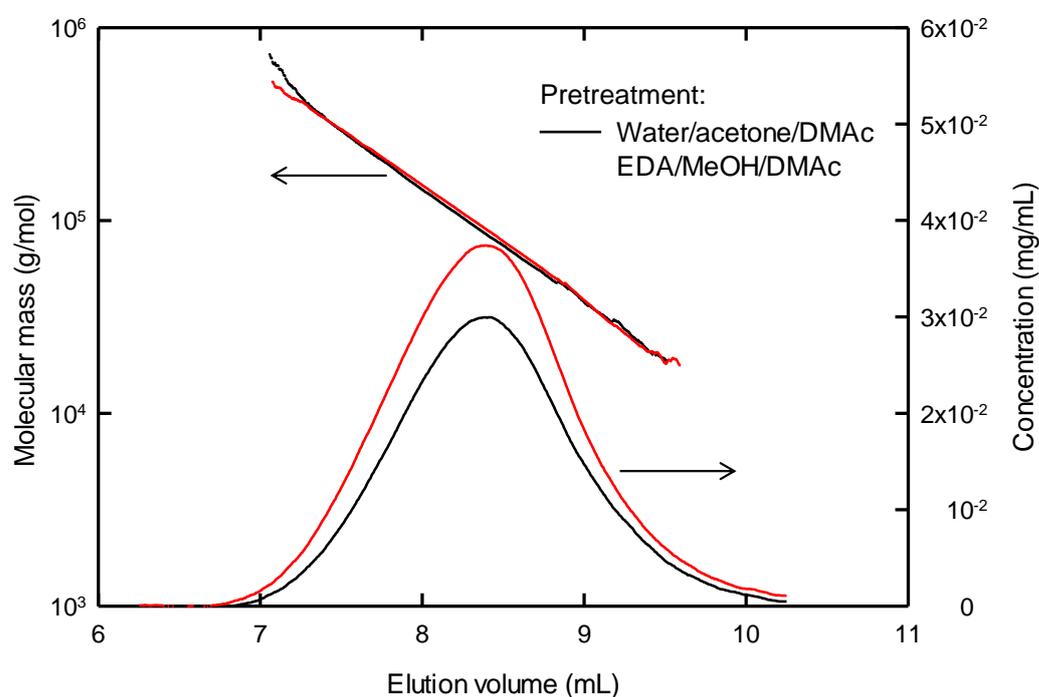
$\eta_s$  は溶液粘度、 $\eta_0$  はゼロ粘度、 $\eta_{rel}$  は相対粘度、 $\eta_{sp}$  は比粘度、 $\eta_{red}$  は還元粘度、 $c$  は濃度 (w/v)。

## 4-3 結果と考察

### 4-3-1 EDA 浸漬法の分子量分析と中性糖分析への影響

AP は良溶解性セルロース試料であり、水-アセトン溶媒置換法で容易に溶解する。そこで、EDA 浸漬法と水-アセトン溶媒置換法を用いて AP を溶解し、SEC/MALLS 測定を行った。その結果、分子量プロットは重なり、SEC 流出パターンはほぼ一致した (Figure 4-1)。実測濃度 (calculated mass) や分子量は EDA 浸漬法の値が若干大きくなった (Table 4-1)。これは、EDA 浸漬法で高分子量域の溶解性が上がったためだと考えられ、EDA 浸漬による低分子量化はみられず、溶解性の向上も確認できた。

EDA にホロセルロースを浸漬すると、ヘミセルロース成分の一部が EDA に溶出するとの報告がある<sup>2</sup>。そこで、SBKP と HBKP の EDA-メタノール-DMAc 溶媒置換後とオリジナル試料の構成糖分析を行った。その結果、EDA 浸漬による影響はほとんどみられなかった (Table 4-2)。これはパルプ化工程で既にヘミセルロースやリグニンの大部分が取り除かれているためだと考えられる。



**Figure 4-1** SEC elution patterns and corresponding molecular mass plots of cotton linters cellulose (AP) pretreated with water/acetone/DMAc and EDA/MeOH/DMAc. Reproduced of image with permission from Springer Nature (©Springer 2016)

**Table 4-1** Molecular mass parameters of cotton linters cellulose (AP) with different pretreatments, obtained using SEC-MALLS analysis. Reproduced of image with permission from Springer Nature (©Springer 2016)

Pretreatment	$DP_w^a$	$M_w$	$M_n$	$M_w/M_n^b$	Calc. mass ( $\mu\text{g}$ ) <sup>c</sup>
Water/acetone/DMAc	671	108700	59700	1.82	40.9
EDA/MeOH/DMAc	743	120400	65300	1.84	53.3

<sup>a</sup>  $DP_w = M_w/162$ , <sup>b</sup> Polydispersity, <sup>c</sup> Determined by SEC/MALLS analysis

**Table 4-2** Neutral sugar compositions of original and EDA-treated SBKP and HBKP. Reproduced of image with permission from Springer Nature (©Springer 2016)

Pulp sample	Glc	Man	Xyl	Rha	Ara	Gal	Total (%)
Original SBKP	82.2	4.7	6.0	0.1	0.0	0.0	93.0
EDA-treated SBKP	85.1	4.1	5.6	0.2	0.0	0.0	95.0
Original HBKP	76.4	0.4	17.1	0.4	0.0	0.0	94.3
EDA-treated HBKP	77.1	0.3	14.9	0.4	0.0	0.0	92.7

Glc: glucose; Man: mannose; Xyl: xylose; Rha: rhamnose; Ara: arabinose; Gal: galactose

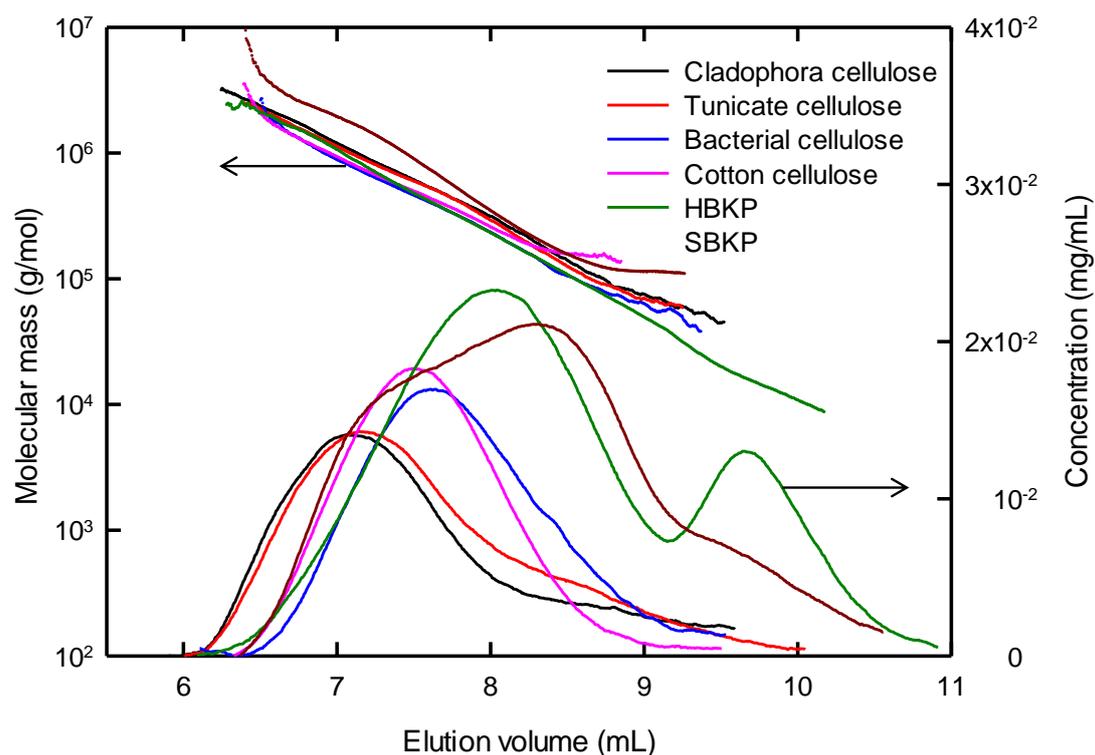
#### 4-3-2 難溶解セルロース試料の溶解

難溶解性セルロース試料である SBKP、ホヤセルロース、クラドフォラセルロースをエチレンジアミン浸漬法と水-アセトン溶媒置換法で溶解し、その溶解性を比較した。溶解性の判断は、①目視、②1% w/v LiCl/DMAc に希釈した液を 0.45  $\mu\text{m}$  PTFE ディスパーザルメンブレンフィルターに通した際の抵抗の有無、③SEC/MALLS 測定により MALLS 90° 光散乱検出器および示差屈折率検出器から得られたピーク形状から判断した。

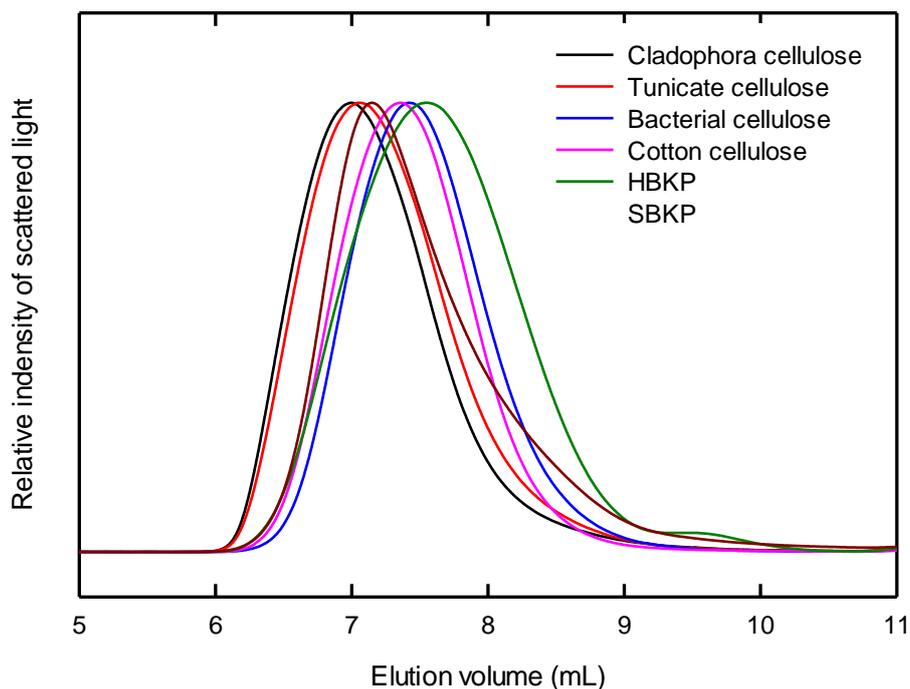
EDA 浸漬法で SBKP はボルテックスでの軽微な攪拌のみで、目視レベルで完全に溶解した。水-アセトン溶媒置換法では、1 ヶ月間のスタラー攪拌で、目視での不溶物は無くなったが、フィルターを通すと抵抗があり、溶解は不十分であった。EDA 浸漬法で調製した SBKP 溶液は 2 週間後にはフィルターを抵抗無く通過でき、SEC/MALLS 測定結果も良好であった (Figure 4-2, 4-3, 4-4)。ホヤセルロースとクラドフォラセルロースは、水-アセトン溶媒置換法では、1 ヶ月間攪拌しても溶解しなかった。一方、EDA 浸漬法では 1 日室温で攪拌すると目視レベルでは完全に溶解したが、更に 1 ヶ月間の攪拌後に SEC/MALLS 測定を行うと、異常溶出ピーク等がみられ、分子分散が不十分であった (Figure 4-5, 4-6, 4-7,4-8)。そこで、試

料濃度を半分に希釈し、1 晩攪拌後に SEC/MALLS 測定を行った。その結果、異常溶出ピークは無くなり、良好な結果が得られた (Figure 4-2, 4-3, 4-4)。

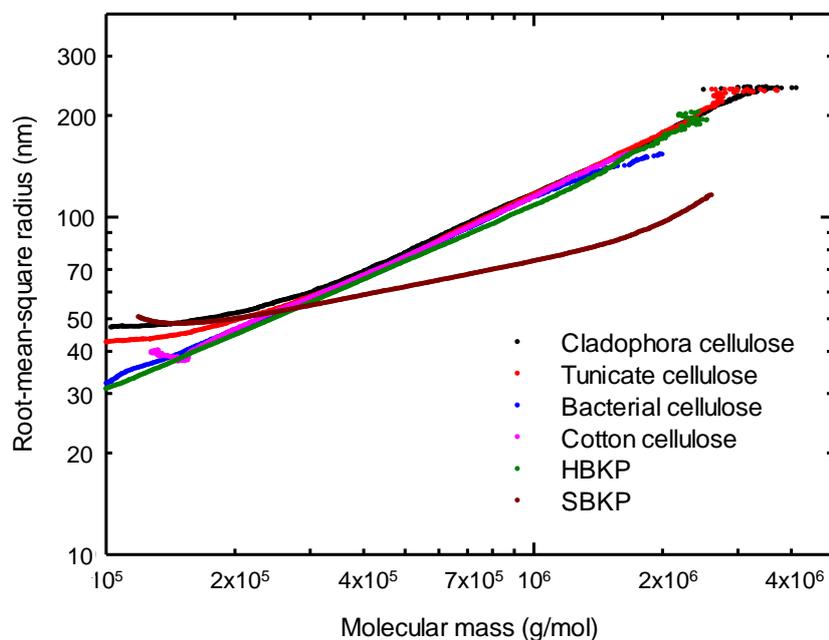
EDA 浸漬によるセルロース試料の溶解性が向上する機構は以下のように推察できる。セルロース分子は分子内の水素結合形成によって直鎖構造となっており、直鎖状のセルロース分子鎖どうしが複数の部位で分子間の水素結合で結合し、結晶性の束 (マイクロフィブリル) を形成している。EDA 浸漬処理によるセルロースマイクロフィブリルの膨潤は、セルロース分子内や分子間の水素結合や疎水性相互作用を一瞬切断するが、すぐに再結合し、結晶化度は下がるものの、結晶構造はセルロース I のままである。更にメタノール洗浄により EDA を除去すると、セルロース結晶構造はセルロース I からセルロース III へと変わる<sup>9-11</sup> (Figure 4-9)。このような結晶構造の変化により、マイクロフィブリル内に溶媒が浸透しやすくなり、セルロースの溶解を促進したと推察できる。



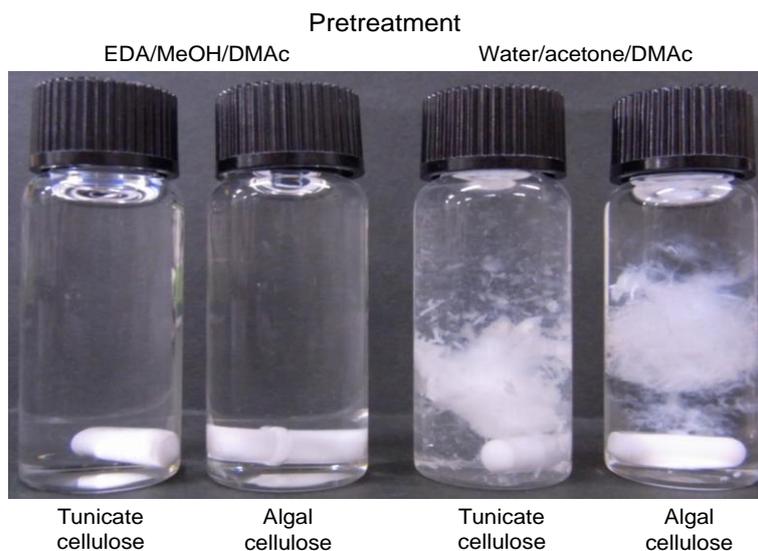
**Figure 4-2** SEC elution patterns and corresponding molecular mass plots of 0.025% (w/v) cellulose solutions and 0.05% (w/v) pulp solutions in 1% (w/v) LiCl/DMAc. Reproduced of image with permission from Springer Nature (©Springer 2016)



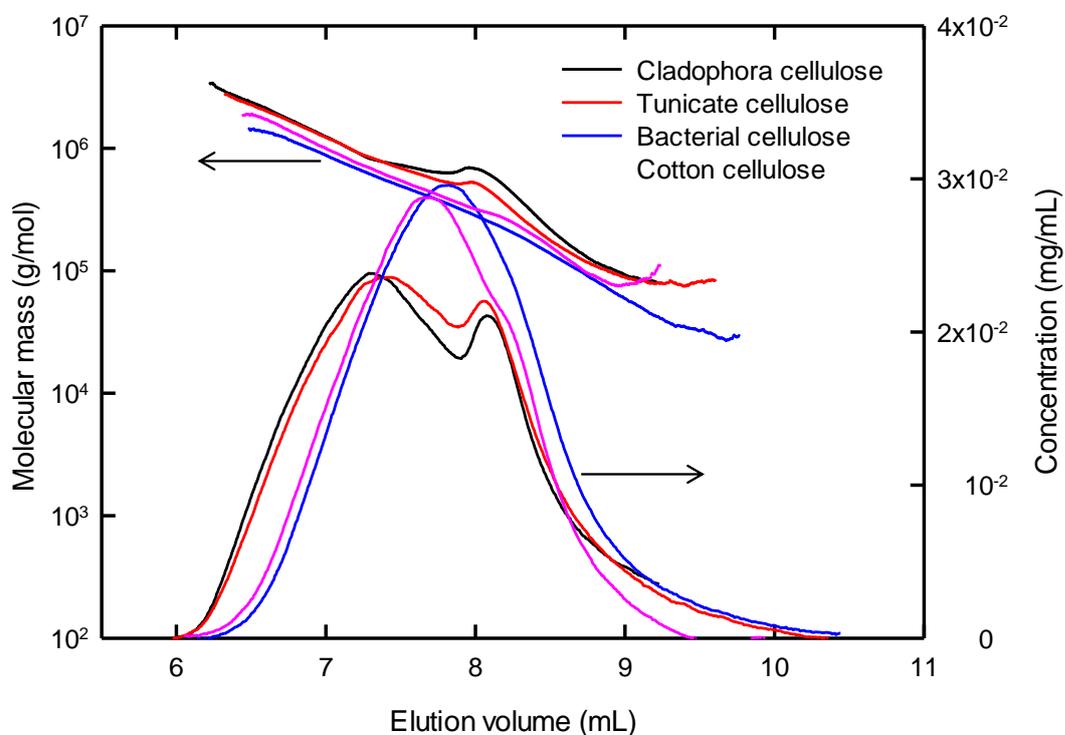
**Figure 4-3** SEC elution patterns of 0.025% (w/v) cellulose solutions and 0.05% (w/v) pulp solutions in 1% (w/v) LiCl/DMAc, detected by scattered laser light at  $90^\circ$  to incident light.



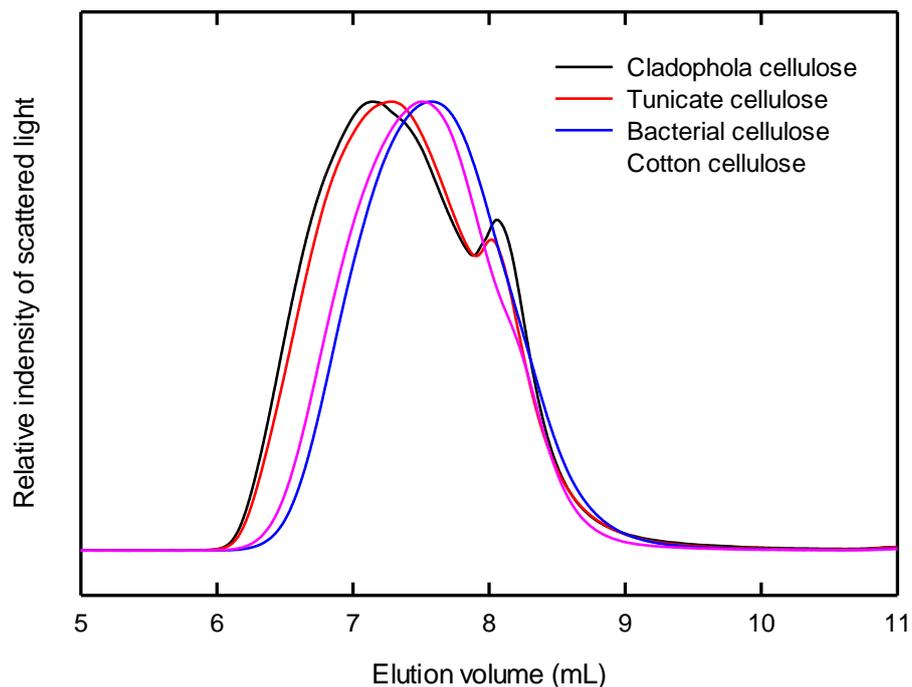
**Figure 4-4** Double logarithmic plots of molecular mass versus r.m.s. radius for 0.025% (w/v) cellulose solutions and 0.05% (w/v) pulp solutions in 1% (w/v) LiCl/DMAc. Reproduced of image with permission from Springer Nature (©Springer 2016)



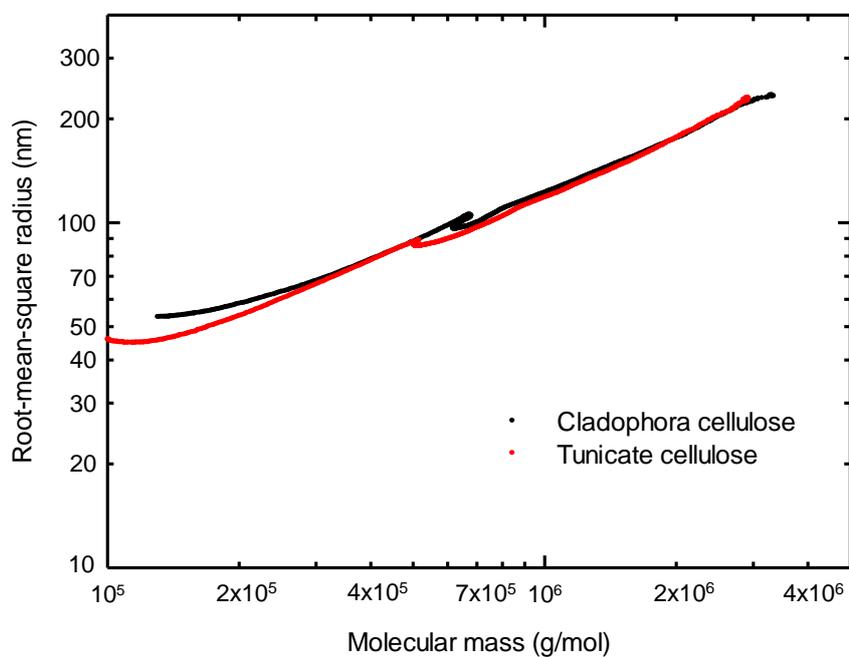
**Figure 4-5** Photographs of EDA/MeOH/DMAc-pretreated and water/acetone/DMAc-pretreated tunicate and algal celluloses in 8% (w/v) LiCl/DMAc, stirred at room temperature for 1 month. Reproduced of image with permission from Springer Nature (©Springer 2016)



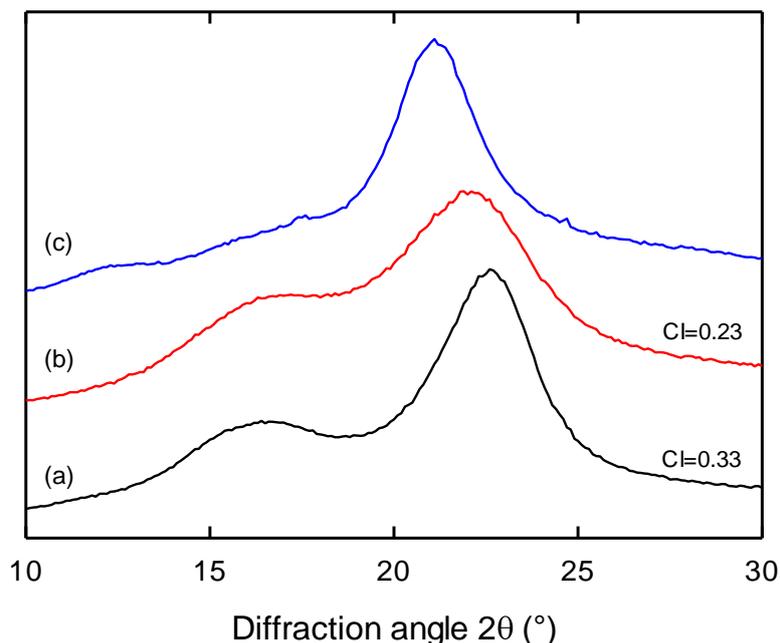
**Figure 4-6** SEC elution patterns and corresponding molecular mass plots of 0.05% (w/v) cellulose solutions in 1% (w/v) LiCl/DMAc.



**Figure 4-7** SEC elution patterns of 0.05% (w/v) cellulose solutions in 1% (w/v) LiCl/DMAc, detected by scattered laser light at 90° to incident light.



**Figure 4-8** Double-logarithmic plots of molecular mass versus r.m.s. radius for 0.05% (w/v) algal and tunicate cellulose solutions in 1% (w/v) LiCl/DMAc.



**Figure 4-9** X-ray diffraction patterns of the original eucalyptus holocellulose sample (a), EDA-treated eucalyptus holocellulose sample (b) and the EDA-MeOH-treated eucalyptus holocellulose sample (c). Reproduced of image with permission from Springer Nature (©Springer 2015)

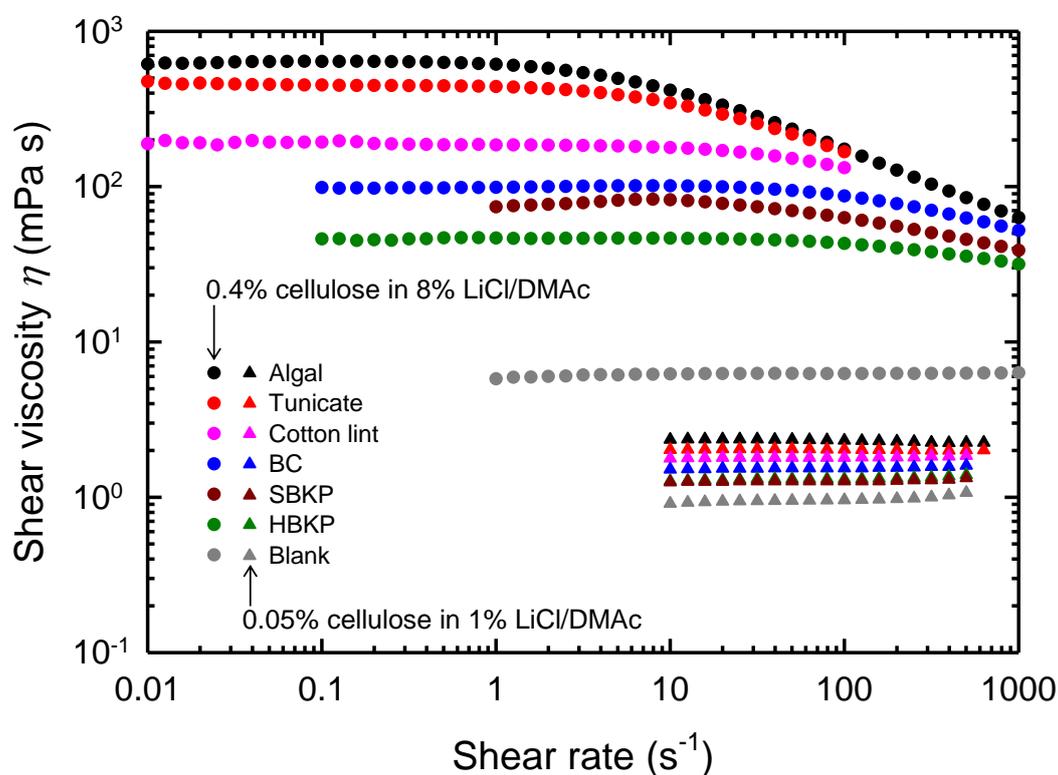
#### 4-3-3 溶液中でのセルロース分子間の相互作用

目視において、試料の由来の違いによるセルロース試料の 8% w/w LiCl/DMAc 溶液の粘度は大きく異なり、粘度が高いホヤセルロースやクラドフォラセルロースは分子分散性が悪いという傾向がみられた。セルロース溶液の粘度と分子分散性を調べるため、ずり粘度測定をおこなった結果を Figure 4-10 に示す。セルロース試料 0.4% w/v の 8% w/w LiCl/DMAc 溶液は、試料により異なるずり粘度を示した。また、シアニングも試料により異なるずり速度でみられ、セルロース分子鎖の相互作用や絡まりの頻度や度合いは試料により異なることが示唆された。これは、セルロース試料の由来により溶解性や分子分散性が異なることを示している。8% w/w LiCl/DMAc 中では、クラドフォラセルロースやホヤセルロースのずり粘度は高いため、これらの試料の SEC/MALLS 測定結果にみられた異常流出ピークの原因は、分子間相互作用の影響が 1% w/v LiCl/DMAc 溶液に希釈後も残ったためだと推察できる。

8% w/w LiCl/DMAc において、木材パルプ (HBKP、SBKP) より他のセルロース試料の結晶度が高くなった一因として、結晶化度 (C.I.) の影響が考えられる (Table 4-3)。セルロース試料の 8% w/w LiCl/DMAc 溶液では、試料が高結晶化度であるほど、溶媒がマイクロフィブリ

ル内に浸透しにくく、完全溶解に時間がかかり、分子間相互作用も残りやすいため高粘度となり、攪拌しにくくなる。このことが、分子分散性に影響し、溶解を困難にしたと考えられる。

セルロース試料0.05% w/vの1% w/v LiCl/DMAc溶液のずり粘度も試料によって異なる値を示した。シアニングはすべての試料でみられず、ニュートン流動を示し、高いずり速度でも良好分散性で、分子間相互作用はないことが確認でき、SEC/MALLS測定に適した溶液であることが確認された (Figure 4-10)。



**Figure 4-10** Shear viscosities of 0.4% (w/v) cellulose solutions in 8% (w/v) LiCl/DMAc and 0.05% (w/v) cellulose solutions in 1% (w/v) LiCl/DMAc, measured at 25 °C. Reproduced of image with permission from Springer Nature (©Springer 2016)

#### 4-3-4 SEC/MALLS 測定結果

分子分散しているセルロース溶液（木材パルプ 0.05% 濃度の 1% w/v LiCl/DMAc 溶液、その他のセルロース試料 0.025% w/v の 1% w/v LiCl/DMAc 溶液）の SEC/MALLS 測定結果を Table 4-3 と Figure 4-2 に示す。HBKP と SBKP の溶出パターンには 2 つのピークがあった。既報では、木材由来パルプの高分子領域のピークはセルロース、低分子領域のピークはヘミセルロースの溶出とみなしている<sup>1,12,13</sup>。BC、コットンリント、ホヤ、クラドフォラのピークは 1

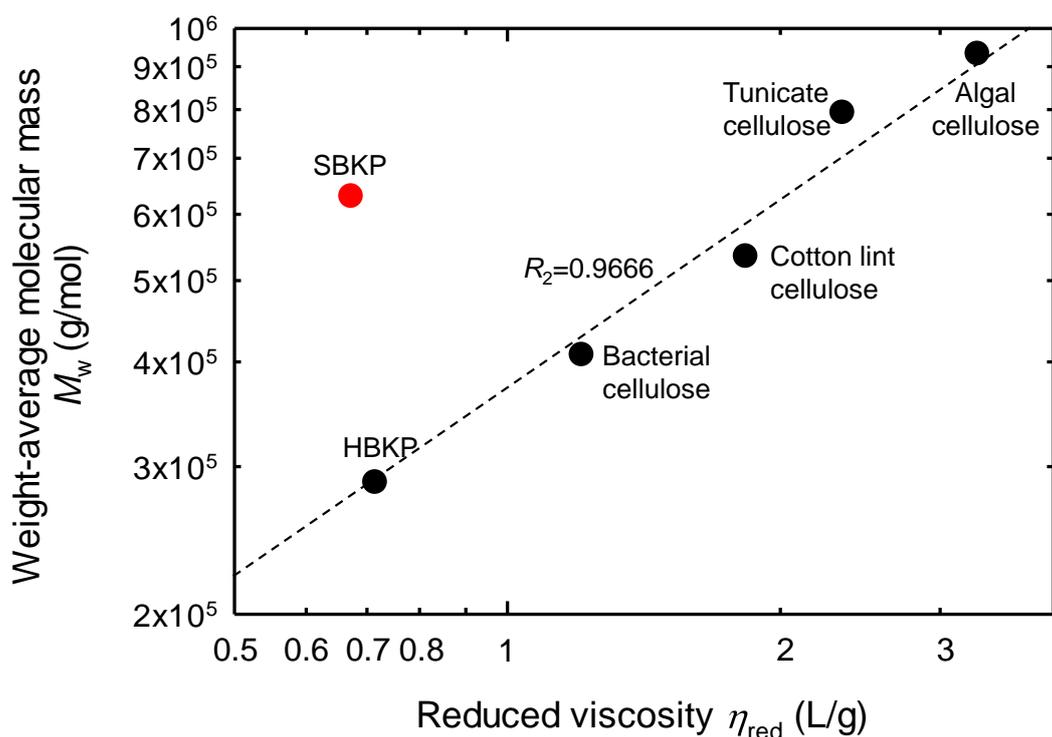
つであり、これはセルロース以外の構成成分はほとんど無いためである。分子量プロットは、SBKP 以外のすべての試料で重なり、良好な直線性を示した。SBKP は、溶出時間 6~8 mL で他の試料よりも高い分子量となり、明らかに他の試料とは異なる結果を示した。溶液中での高分子の構造を示すコンフォメーションプロットにおいても、SBKP 以外は良直線性でほぼ重なり、高分子量領域ピークから算出した slope 値は 0.56~0.57 となり、フレキシブルな直鎖ランダムコイル状を示した (Table 4-3, Figure 4-4)。この結果は、 $\beta$ -1,4 グリコシド結合の直鎖高分子であるセルロースの良溶媒中の構造として妥当である。しかし、SBKP の slope 値は 0.35 と低い値となり、高密度構造を示した (Table 4-3, Figure 4-4)。このような、SBKP 特有な SEC/MALLS 測定結果は、DMI 溶媒を用いた測定においても、同様の結果が報告されている<sup>1</sup>。SBKP は 1% w/v LiCl/DMAc 中で分子分散性も良好であり、凝集の可能性はない。そのため、分岐状などの高密度分子構造が反映された slope 値である。

セルロース試料の 1% w/v LiCl/DMAc 溶液の還元粘度 ( $\eta_{red}$ ) と分子量 ( $M_w$ ) の両対数グラフを Figure 4-11 示す。SBKP 以外は同一直線上に存在し、 $M_w$  と  $\eta_{red}$  に高い相関関係がみられたが、SBKP はこのラインから大きく外れていた。この結果からも、SBKP は他のセルロース試料と溶液中で異なる構造であること示唆している。

**Table 4-3** Molecular mass parameters of highly crystalline cellulose and pulp samples. Reproduced of image with permission from Springer Nature (©Springer 2016)

Sample	C.I. <sup>a</sup>	Reduced viscosity $\eta_{red}$		Calc. mass <sup>b</sup>	$DP_w^c$	$M_w$	$M_n$	$M_w/M_n^d$	Slope value <sup>e</sup>
		(L/g) in LiCl/DMAc							
		8% (w/v)	1% (w/v)	( $\mu\text{g/mL}$ )					
Algal cellulose	0.98	28.6	3.3	0.22 0.43	5750 5010	932000 811000	335000 401000	2.8 2.0	0.57 –
Tunicate cellulose	0.87	18.4	2.3	0.24 0.45	4900 4610	793000 747000	295000 346000	2.7 2.2	0.57 –
Bacterial cellulose	0.79	3.8	1.2	0.25 0.45	2520 2490	408000 404000	220000 232000	1.9 1.7	0.56 –
Cotton lint cellulose	0.66	7.5	1.8	0.24 0.42	3300 3210	534000 520000	343000 345000	1.6 1.5	0.57 –
SBKP	0.47	3.1	0.7	0.48	3890	630000	82000	7.7	0.35
HBKP	0.43	1.6	0.7	0.51	1770	287000	45000	6.4	0.57

<sup>a</sup> Crystallinity index measured from solid-state <sup>13</sup>C NMR spectra of cellulose and pulp samples (Larsson et al. 1999), <sup>b</sup> Calculated mass determined by SEC/MALLS analysis, <sup>c</sup>  $DP_w = M_w/162$ , <sup>d</sup> Polydispersity, <sup>e</sup> Slope value of conformation plot



**Figure 4-11** Double-logarithmic plots of reduced viscosity of cellulose and pulp solutions in 1% (w/v) LiCl/DMAc versus  $M_w$  of cellulose and pulp samples listed in Table 4-3. Reproduced of image with permission from Springer Nature (©Springer 2016)

#### 4-4 まとめ

これまで、SBKP や高結晶化度のホヤセルロースやクラドフォラセルロースは LiCl/DMAc に溶解することはできなかった。しかし、EDA 浸漬及びメタノール溶媒置換を経る事で、これらの試料の良溶解セルロース溶液の調製が可能になり、SEC/MALLS 測定が可能となった。それにより様々なセルロース試料の分子量や分子構造が明らかになった。ホヤやクラドフォラセルロースの分子量は大きく、SBKP 以外のセルロース試料はすべて直鎖高分子であり、溶液中でフレキシブルなランダムコイル状であった。しかし、SBKP のみは、分岐状高分子のような高密度構造を示した。この高密度構造の要因については、第 5 章以降で詳細な検証を行う。

#### 4-5 参考文献

- (1) Yanagisawa, M., & Isogai, A. (2007). Size exclusion chromatographic and UV-VIS absorption analyses of unbleached and bleached softwood kraft pulps using LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone as a solvent. *Holzforschung*, 61(3), 236-241.
- (2) Yamamoto, M., Kuramae, R., Yanagisawa, M., Ishii, D., & Isogai, A. (2011). Light-scattering analysis of native wood holocelluloses totally dissolved in LiCl–DMI solutions: high probability of branched structures in inherent cellulose. *Biomacromolecules*, 12(11), 3982-3988.
- (3) Okita, Y., Saito, T., & Isogai, A. (2010). Entire surface oxidation of various cellulose microfibrils by TEMPO-mediated oxidation. *Biomacromolecules*, 11(6), 1696-1700.
- (4) Wise, L. E., Murphy, M., & D'Addieco, A. A. (1946). A chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and studies on the hemicellulose. *Paper Trade J.*, 122, No. 2, 35. *Tech. Assoc. Papers*, 29, 210.
- (5) Kuramae, R., Saito, T., & Isogai, A. (2014). TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils prepared from various plant holocelluloses. *Reactive and Functional Polymers*, 85, 126-133.
- (6) Funahashi, R., Okita, Y., Hondo, H., Zhao, M., Saito, T., & Isogai, A. (2017). Different Conformations of Surface Cellulose Molecules in Native Cellulose Microfibrils Revealed by Layer-by-Layer Peeling. *Biomacromolecules*.
- (7) Tanaka, R., Saito, T., Ishii, D., & Isogai, A. (2014). Determination of nanocellulose fibril length by shear viscosity measurement. *Cellulose*, 21(3), 1581-1589.
- (8) Tanaka, R., Saito, T., Hondo, H., & Isogai, A. (2015). Influence of flexibility and dimensions of nanocelluloses on the flow properties of their aqueous dispersions. *Biomacromolecules*, 16(7), 2127-2131.
- (9) Wada, M., Kwon, G. J., & Nishiyama, Y. (2008). Structure and thermal behavior of a cellulose I–ethylenediamine complex. *Biomacromolecules*, 9(10), 2898-2904.
- (10) Wada, M., Heux, L., Nishiyama, Y., & Langan, P. (2009). The structure of the complex of cellulose I with ethylenediamine by X-ray crystallography and cross-polarization/magic angle

spinning  $^{13}\text{C}$  nuclear magnetic resonance. *Cellulose*, 16(6), 943.

(11) Ono, Y., Hiraoki, R., Fujisawa, S., Saito, T., & Isogai, A. (2015). SEC–MALLS analysis of wood holocelluloses dissolved in 8% LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone: challenges and suitable analytical conditions. *Cellulose*, 22(5), 3347-3357.

(12) Berggren, R., Berthold, F., Sjöholm, E., & Lindström, M. (2003). Improved methods for evaluating the molar mass distributions of cellulose in kraft pulp. *Journal of applied polymer science*, 88(5), 1170-1179.

(13) Yanagisawa, M., Shibata, I., & Isogai, A. (2005). SEC-MALLS analysis of softwood kraft pulp using LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone as an eluent. *Cellulose*, 12(2), 151.

## 第5章 木材由来ホロセルロースの SEC/MALLS 測定

### 5-1 背景

様々な樹種、植物種中のセルロースの分子構造を解析し、比較することは、樹木種特有の構造についての知見を得るために大変有用である。第4章では、SEC/MALLS 分析により SBKP のセルロース分子構造は他のセルロース試料と異なることが明らかになった。山本らは、Wise 法で脱リグニン処理した木材ホロセルロースも LiCl/DMI 溶液中で SBKP 同様に分岐状のような高密度構造を示すと報告している。また、木材由来のセルロース試料を LiCl/DMI に溶解するには、脱リグニンは必須であり、リグニンとセルロースマイクロフィブリルの相互作用は、木材の疎水性と強固な構造を保つためには必要不可欠であることもわかる<sup>1</sup>。このように木材中でセルロースはヘミセルロースやリグニンと分子レベルで複合化しているが、その構造については未だ明らかになっていない<sup>2-6</sup>。

本章では、木材ホロセルロースを LiCl/DMAc に溶解し、その SEC/MALLS 測定結果から溶液中の分子構造を解析し、試料の由来による違いを検証した。

### 5-2 実験

#### 5-2-1 試料と試薬

木材試料として、広葉樹のユーカリ (*Eucalyptus globulus*)、マカンバ (*Betula maximowicziana*)、針葉樹のスギ (*Cryptomeria japonica*)、裸子植物のイチョウ (*Ginkgo biloba*) の木片を用いた。木片を高速粉砕機 (HS-20, Senion Ind. Ltd., Tokyo, Japan) を用いて粉砕して、80 メッシュ以下に揃えた。HBKP と SBKP は日本製紙株式会社製、バクテリアセルロース (BC) は酢酸菌より調製した (4-2-1 参照)。参考試料として、ヒノキ (*Chamaecyparis obtuse*)、アカシア (*Acacia Mill*)、アカマツ (*Pinus densiflora*)、ヤナギ (*Salix L.*)、タケ (*Bambuseae*)、イナワラ (*Oryza sativa L*) の  $\alpha$ -セルロース (京都大学 矢野教授、伊達博士からご提供していただいた試料) を用いた。これらの  $\alpha$ -セルロース試料は、クラフト蒸解または 2% 水酸化ナトリウム抽出、Wise 法による脱リグニンを経て、17.5% 水酸化ナトリウム抽出を行い調製した。他の試薬や溶媒は試薬特級 (Wako Pure Chemicals, Japan) を使用した。

### 5-2-2 ホロセルロース、 $\alpha$ -セルロースの調製

木粉 (1 g) を 90% (v/v) アセトン (100 mL) に加え、マグネチックスターラーで 1 晩攪拌後、吸引濾過、風乾したものを脱脂試料とした。得られた脱脂試料は、Wise 法により脱リグニンを行った<sup>7</sup>。Wise 法は、脱脂試料 (2.5 g)、脱イオン水 (150 mL)、亜塩素酸ナトリウム (1.0 g)、氷酢酸 (0.2 mL) を加え、75°C のオイルバス中、マグネチックスターラーを用いて攪拌しながら、1 時間毎に亜塩素酸ナトリウム (1.0 g) と氷酢酸 (0.2 mL) を追加した。反応終了後、吸引濾過 (ガラスフィルター 1GP100) し、脱イオン水で中性になるまで洗浄後、凍結乾燥を行った<sup>8</sup>。亜塩素酸ナトリウムと氷酢酸の添加回数は、広葉樹は 4 回、スギとイチョウの回数はリグニンをできるだけ除去するため 6 回行った<sup>9</sup>。スギ  $\alpha$ -セルロースは、17.5% 水酸化ナトリウム溶液 (50 mL) にスギホロセルロース (2 g) と水素化ホウ酸ナトリウム ( $\text{NaBH}_4$ ) (0.02 g) を加え、窒素封入下で 1 時間浸漬後、吸引濾過し (ガラスフィルター 1GP100)、脱イオン水で洗浄して、更に少量の 5 M 酢酸中に分散した後、中性になるまで水洗浄したものを凍結乾燥して調製した。脱脂試料を基本重量とした回収率は、ユーカリホロセルロース 83%、マカンバホロセルロース 68%、スギホロセルロース 79%、イチョウホロセルロース 77%、スギ  $\alpha$ -セルロース 60% であった。

### 5-2-3 試料の溶解、SEC/MALLS/UV 測定、中性糖分析

溶解試料は、EDA 浸漬法 (4-2-2 参照) で調製し、完全溶解するまで室温で攪拌した。得られた 8% w/w LiCl/DMA 溶液を DMAc で希釈し、試料濃度約 0.05% または 0.025% w/v の 1% w/v LiCl/DMAc を調製し、SEC/MALLS 測定用試料とした。0.45  $\mu\text{m}$  PTFE ディスポーザルメンブランフィルターを通した時に抵抗が無ければ、完全溶解していると判断した。SEC/MALLS 測定は、2-2-7 に記載した方法に従って行った。一部の測定において、UV 検出器 (SPD-M20A; Shimadzu, Japan) を SEC/MALLS 測定ラインに追加し、波長 280 nm の吸収による残存リグニン分解物の検出も行った。SEC/MALLS 分析でのピーク面積算出には、Peak fit 4.12 (SeaSlove Software) を用いた。中性糖分析用試料は、SEC/MALLS 測定試料と同様の EDA 浸漬とメタノール溶媒置換処理を行った試料とその処理前の試料を 4-2-3 に記載した方法に従って行った。中性糖分析の回収率 (Total) は試料の酸加水分解後の不溶解物量等を示し、中性糖分析にかからないリグニン関連成分や酸性糖量と考えられる。

## 5-3 結果と考察

### 5-3-1 ホロセルロースの溶解と SEC/MALLS 分析

ほぼすべての試料は2週間~1ヶ月以内に完全溶解した。スギホロセルロースは約4ヶ月後に完全に溶解した。イチョウホロセルロースにおいては、4ヶ月後には目視では溶解していたが、0.45  $\mu\text{m}$  PTFE ディスポーザルメンブランフィルターを通した際に抵抗があり、完全には溶解していなかったため、フィルターを通過した溶液の測定を行った。中性糖分析の結果から、EDA 浸漬とメタノール溶媒置換前処理を行うと、ホロセルロース中のヘミセルロースとリグニンを含む酸加水分解後の不溶解物質の量が減少した (Table 5-1)。ヘミセルロースの EDA 溶媒への溶出については、山本らも報告しており<sup>1</sup>、このことから、EDA 浸漬とメタノール溶媒置換処理によるヘミセルロースやリグニン等の溶出は、ホロセルロースの溶解を促進する効果があると推察できる。また Siller らは、EDA 浸漬の影響でレーヨン分子量分布において低分子領域にのみ若干の減少がみられ、高分子領域には影響は無かったと報告している<sup>10</sup>。SEC/MALLS 測定結果において、ホロセルロースの実測濃度 (Calc. mass) が、試料調製濃度より低くなる一因は、溶解前処理中にヘミセルロースやリグニンの一部が EDA 中に溶出したためであると推察できる (Table 5-2)。イチョウホロセルロースの実測濃度が低くなった原因は、不溶部分がフィルターで濾されたためと考えられる。

フレキシブルな直鎖ランダムコイル状のセルロース分子の標準品として高純度セルロース試料 BC を用いた。SEC/MALLS の結果を Figure 5-1、Figure 5-2 に示す。測定に用いたセルロース試料溶液全てにおいて MALLS 90°検出器における異常ピークは見られず、凝集の無い良溶解溶液であった (Figure 5-1 (a), Figure 5-2 (a))。木材ホロセルロースの溶出パターンには木材パルプと同様に2つのピークがあり、高分子領域 (HMM) ピークはセルロース、低分子量領域 (LMM) ピークはヘミセルロースとリグニンの溶出とみなせる<sup>11-13</sup>。ホロセルロースは、クラフト漂白パルプよりも LMM ピーク面積が大きく、ヘミセルロースが多いことが示された (Figure 5-1 (b), Figure 5-2 (b))。また、針葉樹試料の  $M_w$  は広葉樹試料の  $M_w$  よりかなり大きい値となった (Table 5-2)。

全ての広葉樹試料の分子量プロットや HMM ピークのコンフォメーションプロットは BC とほぼ一致した (Figure 5-2)。そのコンフォメーションプロットの slope 値は約 0.6 であり、広葉樹試料と BC は良溶媒中でフレキシブルな直鎖ランダムコイル状であることを示した (Table 5-2)。

一方、針葉樹試料は広葉樹試料と異なる結果を示した。ヘミセルロース由来の LMM ピークは小さくなり、濃アルカリ抽出により脱ヘミセルロース処理したスギ  $\alpha$ -セルロースのヘミセルロース由来の LMM ピークは無かった。また、針葉樹の分子量プロットは BC とは一致せず、同じ分子サイズでも分子量が大きくなった (Figure 5-1 (b))。コンフォメーションプロットは BC と大きく異なり、凹み曲線となり、HMM ピークから算出した slope 値は約 0.4

となった (Figure 5-1 (c) , Table 5-2)。容易に溶解した SBKP やスギ  $\alpha$ -セルロースも同様の結果であることから、これらは、凝集等の溶解不良に起因しない針葉樹特有の構造である事を示している。Podzimec らは、SEC/MALLS 測定におけるコンフォメーションプロットの凹み曲線は、枝分かれ構造の高分子ポリマーの特徴であり、凹み曲線の直線部分から slope 値を算出する事が可能であると報告している<sup>14,15</sup>。すなわち、針葉樹試料の HMM ピークのコンフォメーションプロットの凹み曲線や低い slope 値は、針葉樹試料が溶媒中で分岐状であることを示している。しかし、生合成機構からセルロースが枝分かれ状になることは考えにくい。ため、針葉樹試料が分岐状を示す要因は、セルロースがヘミセルロースやリグニンと分子レベルで複合しているためではないかと推察される<sup>16,17</sup>。

**Table 5-1** HMM/LMM ratios obtained from SEC-elution patterns, and cellulose/others ratios calculated from neutral sugar compositions.

Sample	SEC/MALLS	Neutral sugar analysis (%) <sup>a</sup>								
	HMM/ LMM <sup>b</sup>	Cellulose/ Others <sup>c</sup>	Glc	Gal	Man	Ara	Xyl	Rha	Total	
Eucalyptus	wise	-	50.3/49.7 <sup>d</sup>	50.3	1.7	0.9	0.7	16.2	1.5	71.3
	wise→EDA-treat	63/37	66.9/33.1 <sup>d</sup>	66.9	1.5	1.5	0.5	14.5	1.0	85.9
Japanese cedar	wise	-	52.4/47.6 <sup>e</sup>	54.6	1.5	6.6	1.1	5.1	0.9	69.8
	wise→EDA-treat	83/17	69.6/30.4 <sup>e</sup>	71.5	1.6	5.7	0.9	4.6	0.7	84.9

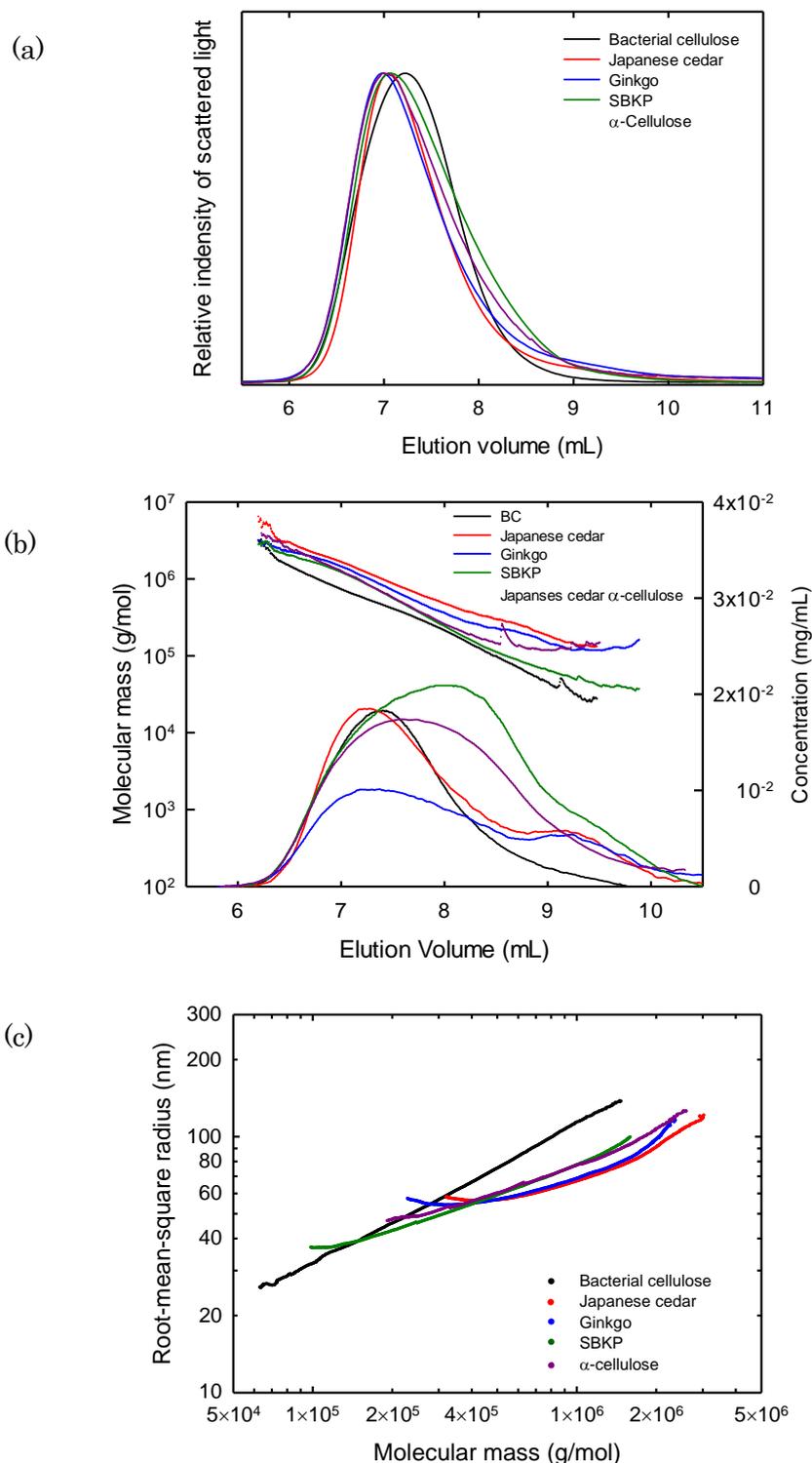
<sup>a</sup> Glc: glucose; Man: mannose; Xyl: xylose; Rha: rhamnose; Ara: arabinose; Gal: galactose.

<sup>b</sup> HMM/LMM ratio was calculated from SEC-elution patterns using peak deconvolution.

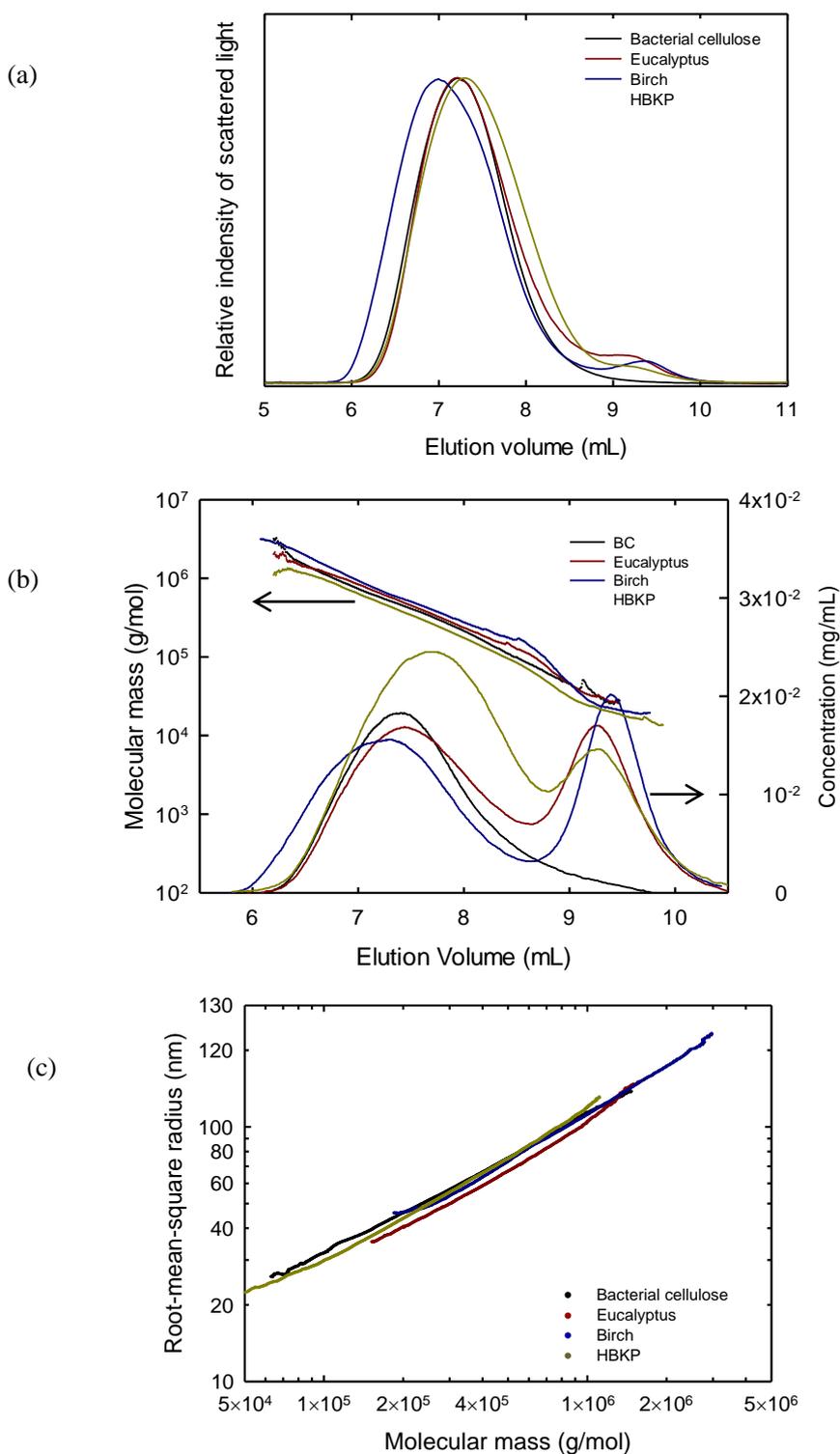
<sup>c</sup> Others: hemicelluloses, uronates, lignin fragments, etc.

<sup>d</sup> Cellulose/others ratios were calculated from neutral sugar compositions according to the following equation, (100-Glu).

<sup>e</sup> Cellulose/others ratios were calculated from neutral sugar compositions according to the following equation, (Glu-1/3Man)/(100-Glu+1/3Man).



**Figure 5-1** SEC elution patterns detected by scattered laser light at 90° to incident light (a), SEC elution patterns detected by RI and corresponding molecular mass plots (b), double logarithmic plots of molecular mass versus r.m.s. radius (c) of bacterial cellulose, Japanese cedar, ginkgo holocelluloses, Japanese cedar  $\alpha$ -cellulose, and SBKP. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2017)



**Figure 5-2** SEC elution patterns detected by scattered laser light at 90° to incident light (a) , SEC elution patterns detected by RI and corresponding molecular mass plots (b), double logarithmic plots of molecular mass versus r.m.s. radius (c) of bacterial cellulose, eucalyptus, birch holocelluloses and HBKP. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2017)

**Table 5-2** Molecular-mass parameters of bacterial cellulose, kraft pulps, and holocelluloses obtained by SEC-MALLS analysis. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2017)

Sample	$M_w$	$M_n$	$DP_w^a$	$M_w/M_n^b$	Slope value <sup>c</sup>	Calc. mass <sup>d</sup>	
Bacterial cellulose	79000	273000	2960	1.75	0.61	0.26	
Eucalyptus	347000	94700	2140	3.66	0.62	0.41	
Hardwood	Birch	542000	73300	3350	7.39	0.61	0.40
	HBKP	273000	78300	1690	3.49	0.63	0.53
Japanese cedar	890000	288000	5500	3.09	0.39	0.33	
Softwood	Japanese cedar $\alpha$ -cellulose	569000	116000	3510	2.32	0.38	0.40
	SBKP	495000	112000	3010	4.42	0.44	0.47
Gymnosperm	Ginkgo	703000	156000	4340	4.51	0.4	0.24

<sup>a</sup>  $DP_w = M_w/162$ , <sup>b</sup> Polydispersity, <sup>c</sup> Slope value of conformation plot, <sup>d</sup> Determined by SEC/MALLS analysis. ( $\mu\text{g/mL}$ )

### 5-3-2 高分子領域ピークの構成糖

広葉樹試料と針葉樹試料の分子構造が異なる要因を解明するため、中性糖分析と SEC/MALLS 分析結果からセルロースとヘミセルロースやリグニンなどの割合を算出し、比較を行った (Table 5-3)。SEC/MALLS 分析結果から、HMM ピークをセルロース、LMM ピークをヘミセルロース及びリグニン等とみなし、その面積比 HMM / LMM からセルロース / ヘミセルロース及びリグニン等を算出した。中性糖分析結果からは、広葉樹試料はグルカン量をセルロースとみなし、針葉樹試料ではマンナンは主にグルコマンナン由来であることを考慮し、セルロース量はマンナンの量で補正したグルカン量とし Cellulose/Others を算出した (Table 5-3 注釈 c, d)。その結果、広葉樹試料では中性糖分析と SEC/MALLS 分析結果から得られたセルロースとヘミセルロース及びリグニン等との割合はほぼ一致した。すなわち、広葉樹試料の SEC/MALLS 分析の 2 つのピークはそれぞれセルロースとヘミセルロース及びリグニン等であると判断できる。一方、針葉樹試料では SEC/MALLS 分析結果のセルロース割合が中性糖分析結果よりも明らかに大きくなった。このことは、針葉樹試料の HMM ピークにはヘミセルロースが含まれる可能性を示している。17.5% 水酸化ナトリウム抽出により脱ヘミセルロース処理を行ったスギ  $\alpha$ -セルロースの SEC/MALLS 分析結果では、ヘミセルロース由来の LMM ピークは無いが、中性糖分析結果には、マンナンが多く存在していた。このことから、針葉樹の HMM ピークには濃アルカリ抽出でも除去できないグルコマンナンが含まれていると推察できる。

**Table 5-3** HMM/LMM ratios obtained from SEC-elution patterns, and cellulose/others ratios calculated from neutral sugar compositions. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2017)

Sample	SEC-MALLS	Neutral sugar composition (%)							
	HMM/LMM <sup>a</sup>	Cellulose/ Others <sup>b</sup>	Glc	Gal	Man	Ara	Xyl	Rha	Total
Eucalyptus	63/37	67/33 <sup>c</sup>	67	1.5	1.5	0.5	15	1.0	86
HBKP	72/28	77/23 <sup>c</sup>	77	0.0	0.3	0.0	15	0.3	93
Japanese cedar	83/17	70/30 <sup>d</sup>	72	1.6	5.7	0.9	4.6	0.7	85
Japanese cedar $\alpha$ -cellulose	100/0	79/21 <sup>d</sup>	81	2.1	4.8	0.5	1.2	0.4	90
SBKP	85/15	80/20 <sup>d</sup>	82	.00	4.7	0.0	6.0	0.1	93

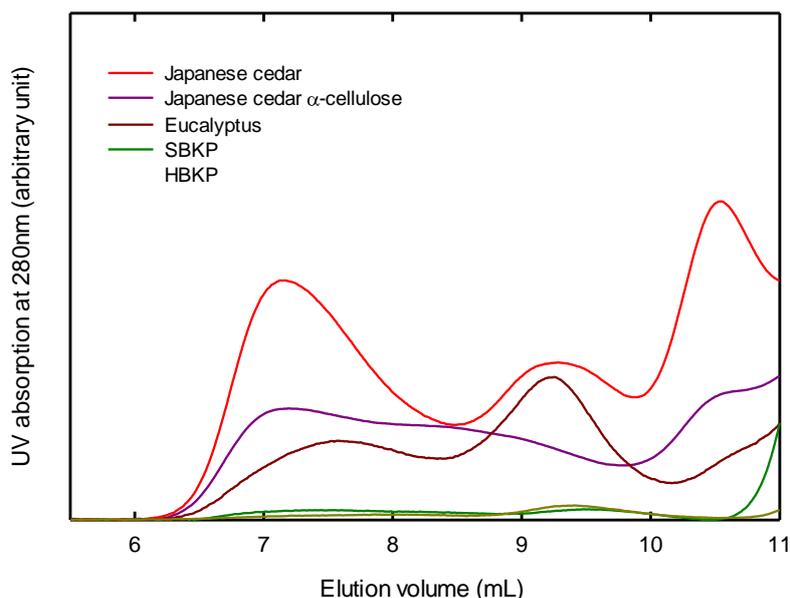
<sup>a</sup> HMM/LMM ratio was calculated from SEC-elution patterns using peak deconvolution.

<sup>b</sup> Others: hemicelluloses, lignin fragments, etc.

<sup>c</sup> Cellulose/others ratios of eucalyptus and HBKP were calculated from neutral sugar compositions according to the following equation,  $\text{Glu}/(100-\text{Glu})$ .

<sup>d</sup> Cellulose/others ratios of Japanese cedar and SBKP were calculated from neutral sugar compositions according to the following equation,  $(\text{Glu}-1/3\text{Man})/(100-\text{Glu}+1/3\text{Man})$ .

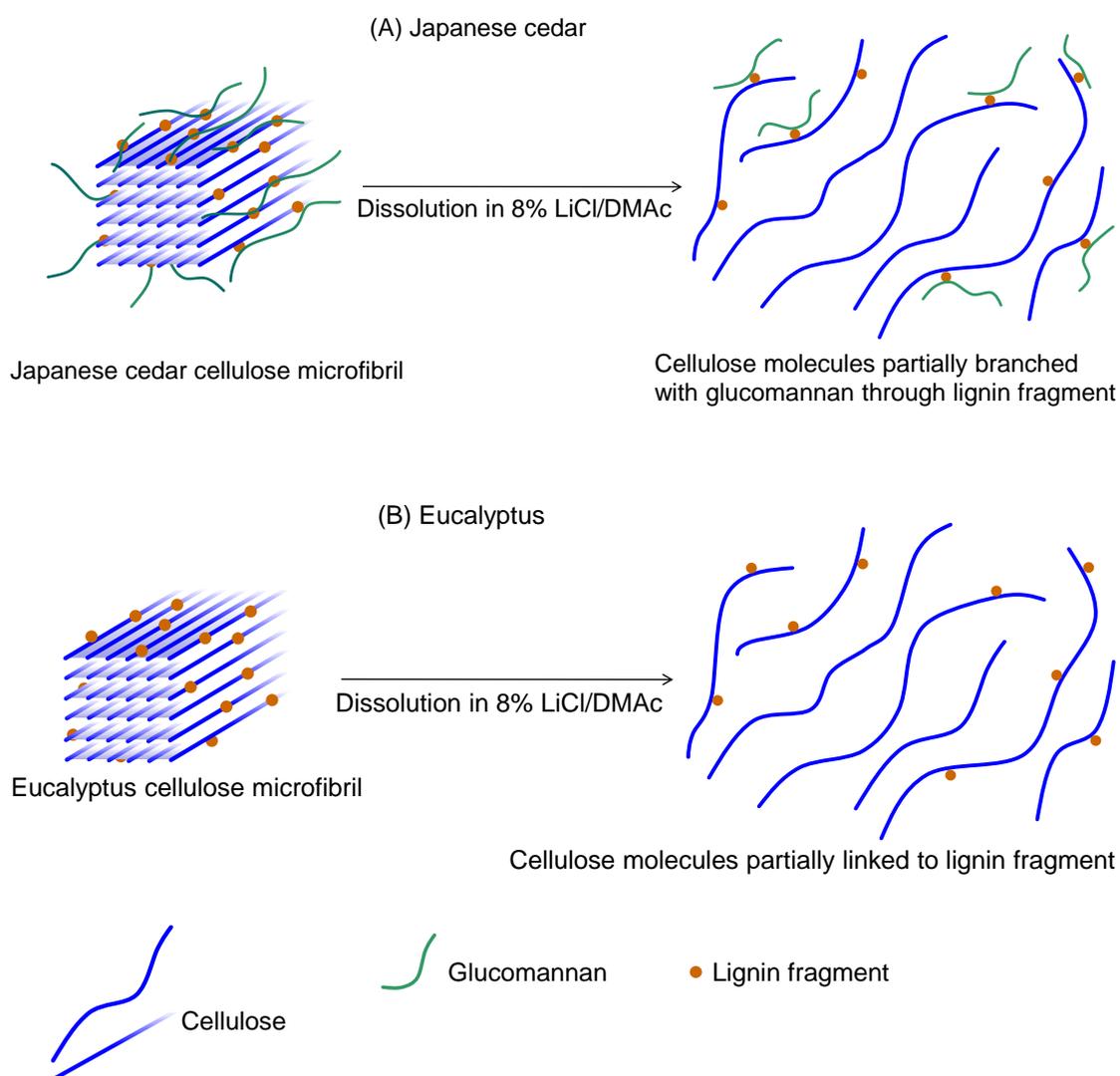
UV 検出器を SEC/MALLS 測定ラインに追加し、リグニン由来の 280 nm 吸収溶出パターンから残存リグニン分解物の分子量分布を調べた。その結果、SBKP や HBKP は 280 nm の吸収量は全領域で少なかった。これらは、漂白工程を経ているため、ベンゼン環が開裂し、280 nm の吸収はほとんど検出されなかったためだと考えられる。一方、ホロセルロースでは、HMM 領域にも大きな 280 nm の吸収があり、HMM 領域にも残存リグニン分解物が多く存在していることがわかる。今回調製したホロセルロースは、Wise 法によりリグニンは低分子化されているため、HMM 領域に溶出する高分子量のリグニンは残存していないと考えられる。そのため、HMM 領域の 280 nm の吸収はセルロース分子と相互作用をもつ残存リグニン分解物であると推察される。広葉樹（ユーカリホロセルロース）に比べ、針葉樹（スギホロセルロース、スギ  $\alpha$ -セルロース）は HMM 領域の UV 280 nm 吸収量が多く、残存リグニン分解物量が多いことが示された（Figure 5-3）。



**Figure 5-3** SEC-elution patterns of Japanese cedar holocellulose, its  $\alpha$ -cellulose, eucalyptus holocellulose, SBKP, and HBKP, detected by UV absorption at 280 nm. The relative intensities of UV absorption between samples correspond to SEC-elution patterns shown in Figures 5-1(b) and 5-2(b), detected by RI. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2017)

針葉樹のリグニンは主としてグアイアシルプロパン構造を有し、広葉樹はグアイアシルプロパン構造以外にもシリングルプロパン構造も有している。プロトリグニン中のシリングル単位は 280 nm の吸収量がグアイアシル単位の約 3 倍となることから<sup>18</sup>、HMM 領域において針葉樹は広葉樹よりもかなり多くの残存リグニン分解物の存在が示される。針葉樹は広葉樹よりもリグニン除去が困難なため、Wise 法の処理回数が多く必要であることは周知である。柳沢や山本らは、SBKP やホロセルロースが分岐構造を示す要因は、セルロースーリグニン-グルコマンナン結合であると考察しており<sup>1,13</sup>、今回のオンライン UV 溶出パターン測定結果は、針葉樹の HMM 領域ピークに残存リグニン分解物がセルロースに結合していることを示しており、この考察を裏付けすることができた (Figure 5-4)。また、セルロースは生合成される段階において、グルコマンナンやリグニンと結合する機会は無く、木化する際にセルロースマイクロフィブリル表面やグルコマンナン等多糖の C6 位の 1 級水酸基とリグニンの間に化学結合形成されることが報告されている<sup>4,3</sup>。針葉樹の高分子領域ピークの枝分かれ構造は、木化するときに形成されたセルロースーリグニン-グルコマンナン結合と推察でき、SBKP やスギ  $\alpha$ -セルロースでも分岐構造は維持されていることから、この化学結合はアルカリ処理やクラフトパルプ化-漂白工程では切断されない化学結合であることが推測された。細谷らは、非フェノールリグニンの  $\alpha$  位とセルロース及びヘミセルロースの C6 位とのエーテ

ル結合はアルカリ抽出やサルファイトパルプ化工程において安定であり、更にこの  $\alpha$  位のエーテル結合の安定性は、アルカリ条件下で隣接する  $\beta$  位のエーテル結合の開裂も阻害し、これがアルカリ抽出やクラフトパルプ化工程後もリグニンが残存する要因と推測している<sup>19</sup>。一方、広葉樹ヘミセルロースの主成分であるキシランやグルクノキシランには C6 位の 1 級水酸基を有しないため、このような結合はほとんど形成されない。そのため、LiCl/DMAc に溶解すると、セルロースとヘミセルロースはそれぞれ分子分散し、SEC/MALLS 分析で分離検出できると推察される (Figure 5-4)。



**Figure 5-4** Schematic model (upper) of cellulose microfibril containing glucomannan branches via lignin fragment in Japanese cedar holocellulose and the branched Japanese cedar cellulose dissolved in LiCl/DMAc, and that (lower) for eucalyptus holocellulose. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2017)

### 5-3-3 高分子領域の分岐度

SEC/MALLS 測定結果から高分子の分岐度解析を ASTRA VI ソフトウェアを用いた。直鎖と分岐試料の同一分子量における慣性半径 (R.M.S.) の値と (5-1) 式から分岐パラメータ  $g_M$  を算出し、(5-2) 式に示す 4 官能ランダム分岐理論式<sup>20,21</sup> から 1 分子あたりの分岐数  $\lambda M$  を求めた結果を Figure 5-5 に示す。直鎖セルロース分子標準試料として BC を用いた。

$$g_M = \frac{\langle r^2 \rangle_{br}}{\langle r^2 \rangle_{lin}} \quad (5-1)$$

$$g_M = [(1 + \lambda M/6)^{1/2} + 4/3\pi \lambda M]^{-1/2} \quad (5-2)$$

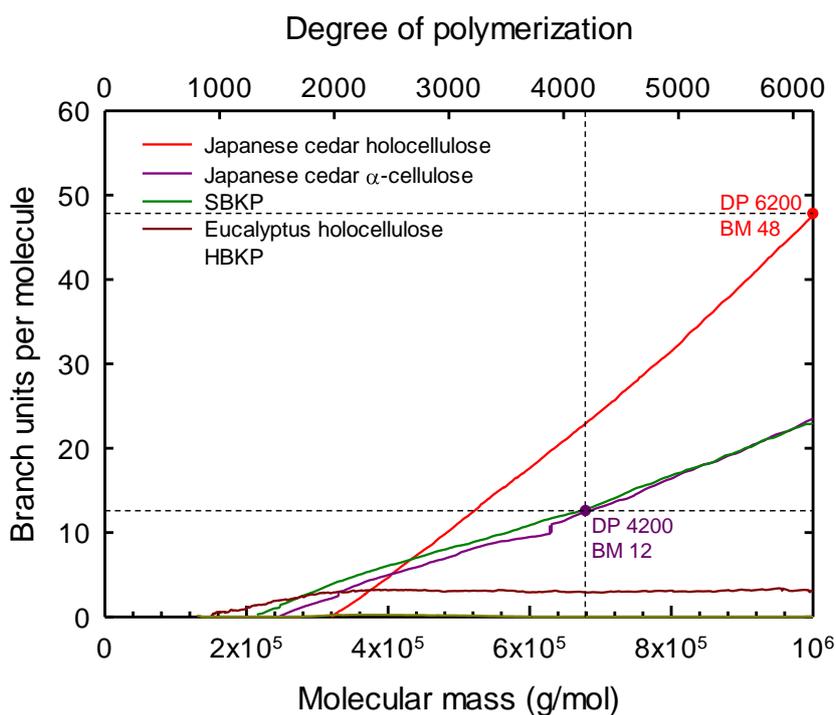
$g_M$  は分岐比、 $\langle r^2 \rangle_{br}$  は分岐試料の R.M.S.、 $\langle r^2 \rangle_{lin}$  は直鎖試料の R.M.S.、 $\lambda M$  は 1 分子あたりの分岐度。

広葉樹由来の試料の分岐数は分子量による変化はほとんどなかった。HBKP は分岐がほとんど無く、ユーカリは低い値ではあるが、各分子量で一定値の分岐数を示した。これは、Figure 5-3 の UV 吸収の結果からユーカリホロセルロースには残存リグニンの分解物がセルロースに結合しているためだと推察される。

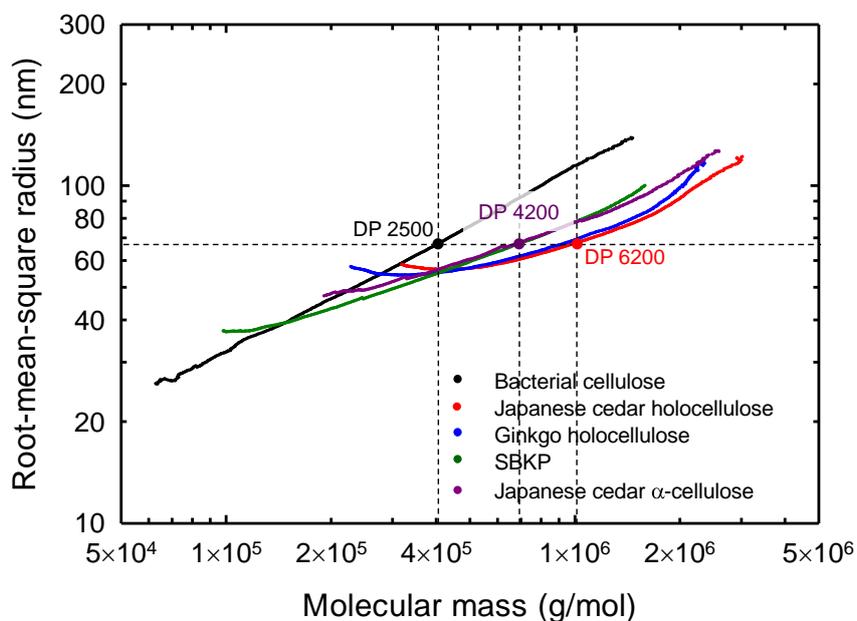
一方、針葉樹由来の試料は分子量が大きくなるのに対し分岐数が単調増加していた。同じ慣性半径約 68 nm の BC の重合度 (DP) は約 2500、スギホロセルロースは約 6500、スギ  $\alpha$ -セルロースと SBKP は約 4200 となり (Figure 5-6)、この時のスギホロセルロースの平均分岐数 48、SBKP やスギ  $\alpha$ -セルロースは平均分岐数 12 となった (Figure 5-5)。SBKP とスギ  $\alpha$ -セルロースの平均分岐数はほぼ一致し、中性糖分析でのマンナン量もほぼ同じであった (Figure 5-3)。このことは、SBKP の主な原料がスギであるためだと考えられ、アルカリ抽出や製紙用パルプ製造工程を経てもセルロース鎖から除去できないリグニンとグルコマンナンは一定量存在することを示している。

また、一本のセルロースマイクロフィブリルがセルロース分子 6×6 モデルと仮定すると、スギホロセルロース DP 6500 の側鎖へミセルロースの平均重合度は約 80 : (6500-2500) / 48 ≐ 83 となり、マイクロフィブリル表面のセルロースのグルコースユニット約 30 に 1 分岐 : 2500 / 48 / 36×20 ≐ 29 ある事になる。SBKP やスギ  $\alpha$ -セルロースの DP4200 の側鎖へミセルロースの平均重合度は約 140 : (4200-2500) / 12 ≐ 142 となり、マイクロフィブリル表面のセルロースのグルコースユニット約 120 に 1 分岐 : 2500 / 12 / 36×20 ≐ 116 ある事になる。

このように、SEC/MALLS 分析結果からセルロース試料の分子量分布だけでなく、分子構造に関する知見も得ることができる。



**Figure 5-5** Number of branch units per molecule plotted against molecular mass, calculated from SEC/MALLS data and corresponding numbers of branch units per molecule (BM). Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2017)



**Figure 5-6** DP of Japanese cedar holocellulose, its α-cellulose, ginkgo holocellulose, SBKP and bacterial cellulose with r.m.s radius of ~68 nm. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2017)

### 5-3-4 様々な樹種、植物種中のセルロースの分子構造

様々な由来の  $\alpha$ -セルロースを EDA 浸漬法により溶解し、SEC/MALLS 測定を行った結果を Figure 5-7 に示す。コンフォメーションプロットの結果から、広葉樹 (アカシア、ヤナギ)、タケ、イナワラはフレキシブルな直鎖ランダムコイル状を示した。一方、針葉樹 (ヒノキ、アカマツ) は分岐状を示した。この結果から、分岐構造は針葉樹とイチョウ特有の構造であることがわかる。

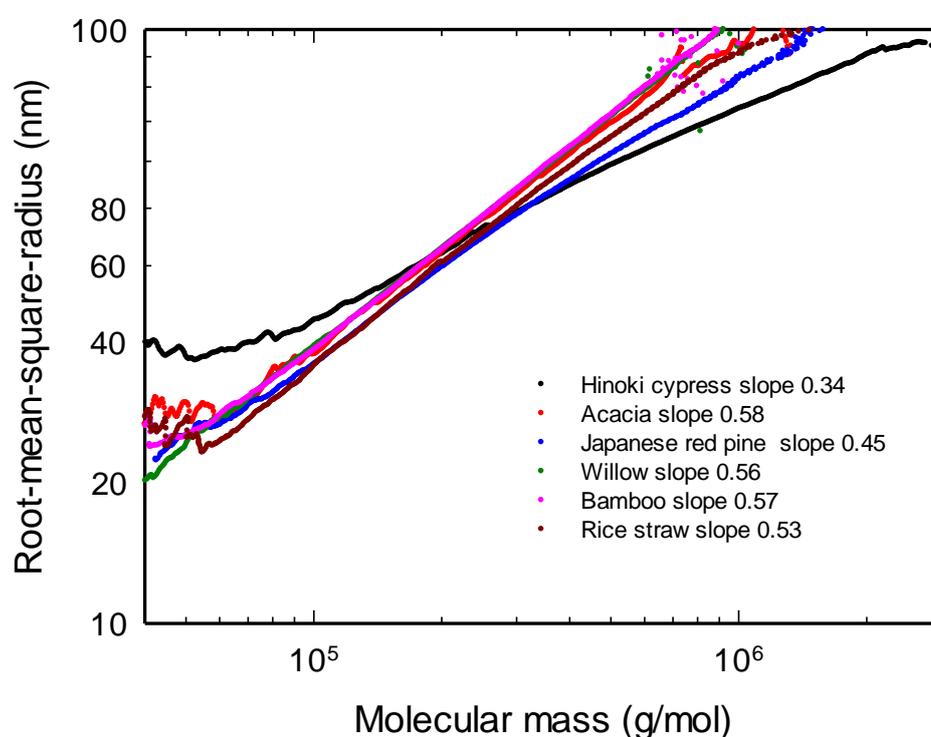


Figure 5-7 Conformation plots of  $\alpha$ -cellulose prepared from various kinds of wood species.

## 5-4 まとめ

EDA 浸漬法を用いホロセルロースや  $\alpha$ -セルロースを溶解し、SEC/MALLS 分析を行うことができた。広葉樹試料と針葉樹試料の SEC/MALLS 測定結果は明瞭にことなり、広葉樹の HMM 領域の分子構造は高純度セルロース試料と同じフレキシブルな直鎖ランダムコイル状であった。一方、針葉樹試料は広葉樹試料よりかなり分子量が大きく、HMM 領域の分子構造は分岐状を示した。この分岐構造は、セルロースーリグニンーグルコマンナン結合による

枝分かれ構造であると推察できる。また、針葉樹由来の  $\alpha$ -セルロースや製紙用漂白クラフトパルプでもこの分岐構造は維持されており、この分岐構造はアルカリ抽出やクラフトパルプ化漂白工程では切断できない強硬な化学結合であることが示された。この針葉樹特有の分岐構造は針葉樹の高い樹高や長寿命に寄与しているのではないかと考えられる。

## 5-5 参考文献

- (1) Yamamoto, M., Kuramae, R., Yanagisawa, M., Ishii, D., & Isogai, A. (2011). Light-scattering analysis of native wood holocelluloses totally dissolved in LiCl–DMI solutions: high probability of branched structures in inherent cellulose. *Biomacromolecules*, 12(11), 3982-3988.
- (2) Isogai, A., Ishizu, A., Nakano, J., Eda, S., & Katō, K. (1985). A new facile methylation method for cell-wall polysaccharides. *Carbohydrate research*, 138(1), 99-108.
- (3) Isogai, A., Ishizu, A., & Nakano, J. (1989). Residual lignin and hemicellulose in wood cellulose. Analysis using new permethylation method. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 43(5), 333-338.
- (4) Fry, S. C. (1986). Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual review of plant physiology*, 37(1), 165-186.
- (5) Karlsson, O., & Westermark, U. (1997). The significance of glucomannan for the condensation of cellulose and lignin under Kraft pulping conditions. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*, 12(2), 90.
- (6) Sjöholm, E., Gustafsson, K., Berthold, F., & Colmsjö, A. (2000). Influence of the carbohydrate composition on the molecular weight distribution of kraft pulps. *Carbohydrate polymers*, 41(1), 1-7.
- (7) Wise, L. E., Murphy, M., & D'Addieco, A. A. (1946). A chlorite holocellulose, its fractionation and bearing on summative wood analysis and studies on the hemicellulose. *Paper Trade J.*, 122, No. 2, 35. *Tech. Assoc. Papers*, 29, 210.
- (8) 日本木材科学会 編 “木質科学実験マニュアル” 文英堂出版 p.94
- (9) Kimura, M., Qi, Z. D., Fukuzumi, H., Kuga, S., & Isogai, A. (2014). Mesoporous structures in never-dried softwood cellulose fibers investigated by nitrogen adsorption. *Cellulose*, 21(5), 3193-3201.

- (10) Siller, M., Ahn, K., Pircher, N., Rosenau, T., & Potthast, A. (2014). Dissolution of rayon fibers for size exclusion chromatography: a challenge. *Cellulose*, 21(5), 3291-3301.
- (11) Berggren, R., Berthold, F., Sjöholm, E., & Lindström, M. (2003). Improved methods for evaluating the molar mass distributions of cellulose in kraft pulp. *Journal of applied polymer science*, 88(5), 1170-1179.
- (12) Yanagisawa, M., Shibata, I., & Isogai, A. (2005). SEC-MALLS analysis of softwood kraft pulp using LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone as an eluent. *Cellulose*, 12(2), 151.
- (13) Yanagisawa, M., & Isogai, A. (2007). Size exclusion chromatographic and UV-VIS absorption analyses of unbleached and bleached softwood kraft pulps using LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone as a solvent. *Holzforschung*, 61(3), 236-241.
- (14) Podzimek, S., Vlcek, T., & Johann, C. (2001). Characterization of branched polymers by size exclusion chromatography coupled with multiangle light scattering detector. I. Size exclusion chromatography elution behavior of branched polymers. *Journal of applied polymer science*, 81(7), 1588-1594.
- (15) Podzimek, S., & Vlcek, T. (2001). Characterization of branched polymers by SEC coupled with a multiangle light scattering detector. II. Data processing and interpretation. *Journal of applied polymer science*, 82(2), 454-460.
- (16) Kimura, S., Laosinchai, W., Itoh, T., Cui, X., Linder, C. R., & Brown, R. M. (1999). Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*. *The Plant Cell*, 11(11), 2075-2085.
- (17) Doblin, M. S., Kurek, I., Jacob-Wilk, D., & Delmer, D. P. (2002). Cellulose biosynthesis in plants: from genes to rosettes. *Plant and cell physiology*, 43(12), 1407-1420.
- (18) 原口 隆英, 諸星 紀幸 (1985) “木材の化学” 文英堂出版
- (19) Tanbda, H., Nakano, J., Hosoya, S., & Chang, H. M. (1987). Stability of  $\alpha$ -ether type model compounds during chemical pulping processes. *Journal of wood chemistry and technology*, 7(4), 485-497.

(20) Zimm, B. H., & Stockmayer, W. H. (1949). The dimensions of chain molecules containing branches and rings. *The Journal of Chemical Physics*, 17(12), 1301-1314.

(21) Zimm, B. H., & Kilb, R. W. (1959). Dynamics of branched polymer molecules in dilute solution. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 37(131), 19-42.

## 第6章 針葉樹試料のコンフォメーション

### 6-1 背景

第5章では、広葉樹試料と針葉樹試料の溶液中での分子構造は異なり、針葉樹特有の分岐構造の存在が明らかになった。この分岐構造は、製紙用クラフトパルプ化漂白工程後やホロセルロースの濃アルカリ抽出後（17.5% NaOH 抽出後）も維持されていた。一方、柳澤らは、溶解パルプである針葉樹由来の酸性サルファイトパルプは、水-アセトン溶媒置換法で 8% LiCl/DMAc に容易に溶解し、溶液中で直鎖ランダムコイル状であると報告している<sup>1</sup>。溶解パルプには、木材チップを酸性亜硫酸法で脱リグニンを行う酸性サルファイトパルプと木材チップを前加水分解した後にクラフト蒸解する前加水分解クラフトパルプがある。これらの溶解パルプ製造工程で共通し、且つ、製紙用パルプと異なる特徴は、脱リグニンと同時または前に希酸加水分解相当の処理を行うことである。そこで本章では、溶解パルプの製造工程をふまえ、木粉から調製方法が異なる試料を調製し、針葉樹の分岐構造を解明することを目的とした。

### 6-2 実験

#### 6-2-1 試料と試薬

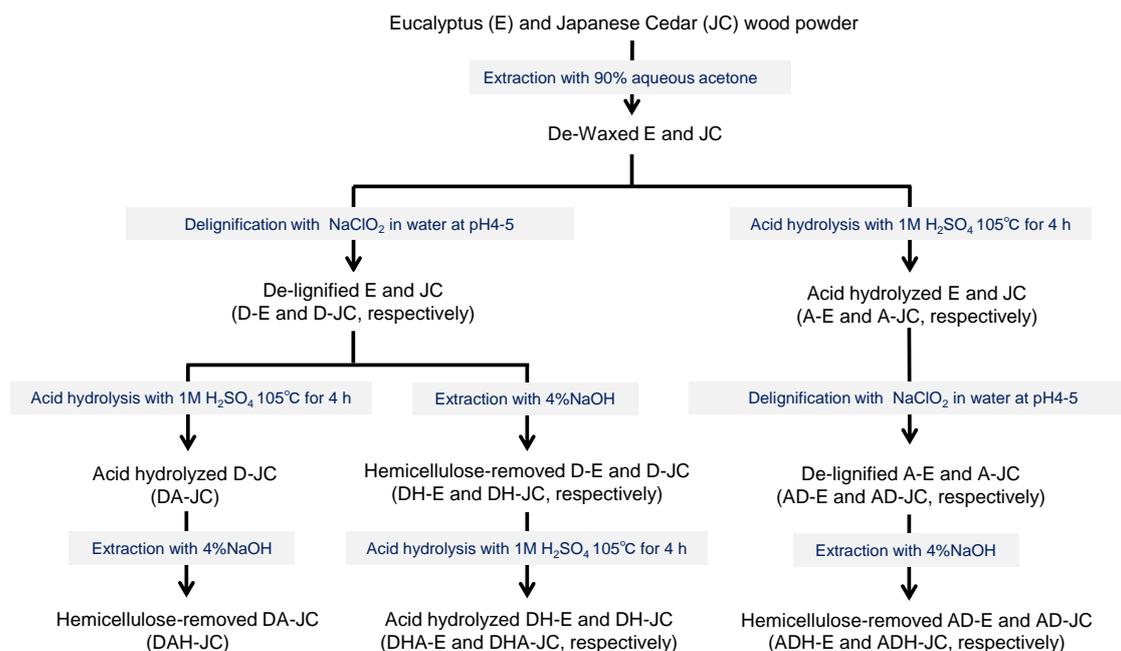
木材試料として、広葉樹はユーカリ (*Eucalyptus globulus*)、針葉樹はスギ (*Cryptomeria japonica*) の脱脂木粉 (5-2 参照) を用いた。製紙用パルプとして HBKP と SBKP、溶解サルファイトパルプとして、HBSP (広葉樹) と SBSP (針葉樹) を用いた (日本製紙株式会社製)。他の試薬や溶媒は試薬特級 (Wako Pure Chemicals, Japan) を使用した。

#### 6-2-2 脱リグニン (Wise 法)、希酸加水分解、脱ヘミセルロース

Wise 法は、5-5-2 に記載された方法に従って行った。酸加水分解は、試料 (約 1 g) を 1 M 硫酸 (150 mL) に加え、オートクレーブで 3 時間、105°C で処理後、吸引濾過 (ガラスフィルター 1GP100) で中性になるまで水洗浄を行った。脱ヘミセルロース処理は、4% 水酸化ナトリウム溶液 (100 mL) に、試料 (1 g) と NaBH<sub>4</sub> (1 g) を加え、室温で窒素封入下 1 時間攪拌反応後、吸引濾過 (ガラスフィルター 1GP 100) し、洗浄液が中性になるまで水洗浄を行った。

ユーカリ (E) とスギ (JC) の脱脂木粉を、脱リグニン (D)、希酸加水分解 (A)、脱ヘミセルロース (H) の順番を変えた試料の調製を行った。試料名の表記は、ユーカリ (E) を脱

リグニン (D)、希酸加水分解 (A)、脱ヘミセルロース (H) の順で調製した試料は DAH-E、スギ (JC) を希酸加水分解 (A)、脱リグニン (D)、脱ヘミセルロース (H) の順で調製した試料は ADH-JC と表記した。6 種類の試料調製方法は Figure 6-1、脱脂試料を基本重量とした各試料の回収率 (Yield) は、Table 6-2 に示した。



**Figure 6-1** Preparation scheme for variously treated eucalyptus (E) and Japanese cedar (JC) samples. The treatments are delignification (D), 4% NaOH extraction (H), dilute acid hydrolysis (A), and 17.5% NaOH extraction. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (© American Chemical Society 2018)

### 6-2-3 試料の溶解、SEC/MALLS 測定、中性糖分析

SEC/MALLS 測定試料は EDA 浸漬法を用いて調製した (4-2-2 参照)。SEC/MALLS 測定条件は、2-2-7 に記載した方法に従い行った。水酸基を有する多糖の  $dn/dc$  値は近似値であるため (Table 2-2)、ヘミセルロース量の多いホロセルロースにもセルロースの  $dn/dc$  値 0.131 を用い分子量を算出した。中性糖分析方法は 4-2-3 に記載した方法に従い行った。

## 6-3 結果と考察

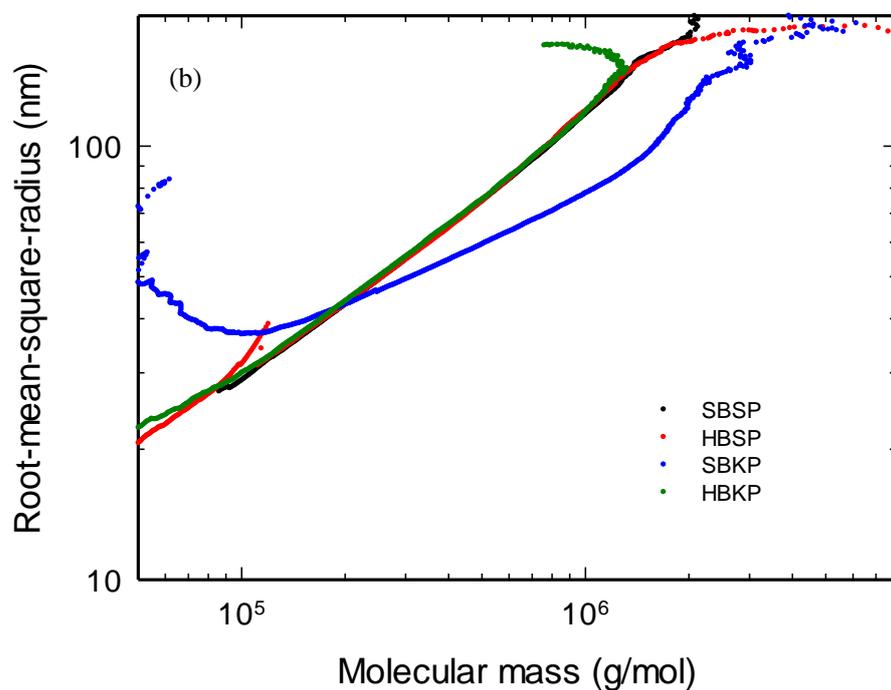
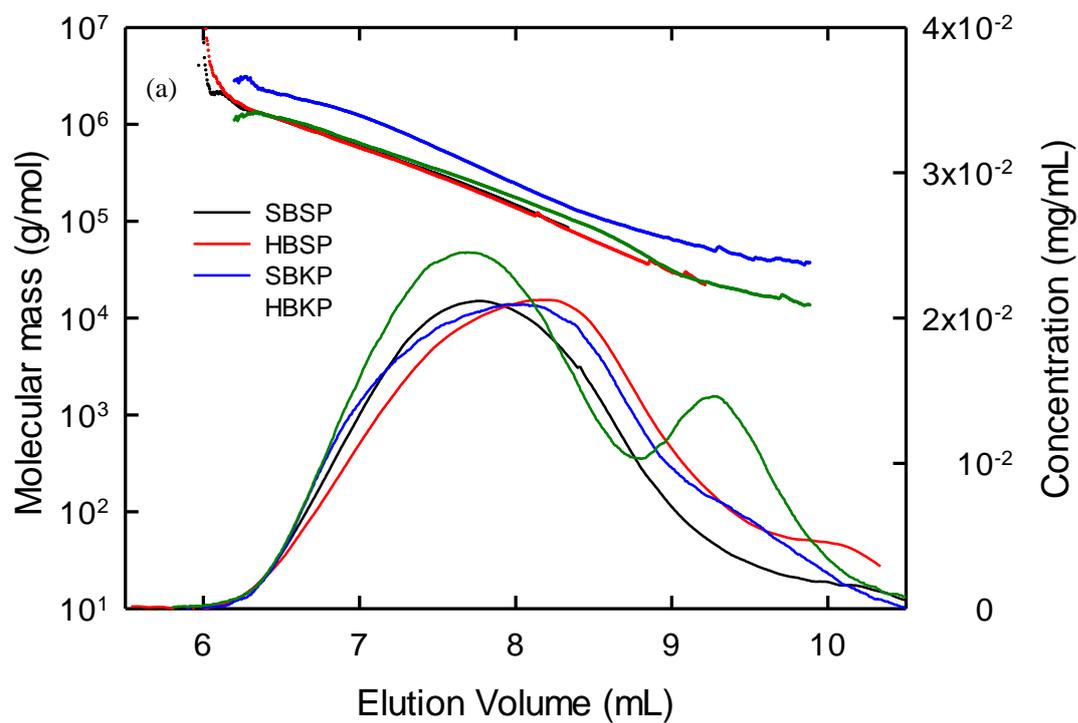
### 6-3-1 製紙用パルプと溶解パルプの SEC/MALLS 測定

HBKP、SBKP、HBSP、SBSP の SEC/MALLS 測定の結果を Figure 6-2 と Table 6-1 に示す。SBKP 以外はすべての試料で分子量プロットとコンフォメーションプロットは一致し、slope 値は 0.63 となり、分子構造はフレキシブルな直鎖ランダムコイル状であった。SBKP のみ分岐状となり、針葉樹由来でも溶解パルプ (SBSP) は分岐状を示さなかった。この結果は柳澤らの報告と一致している<sup>1</sup>。溶解パルプと HBKP の  $M_w$  値はほぼ同じとなったが、分子量分布は全く異なっている。HBKP には 2 つのピークがあり、高分子領域はセルロース成分、低分子領域はヘミセルロース成分とみなせる。一方、溶解パルプはピークが 1 つであり、これはヘミセルロース成分が除去され、構成成分がほぼセルロースのみであるためである。また、溶解パルプのピークは HBKP よりも低分子量側にシフトしており、溶解パルプ中のセルロースの分子量は HBKP よりも低下していることを示している。このように、分子量分布は高分子試料の詳細な情報を得るには極めて重要な分析方法である。

**Table 6-1** Molecular mass parameters of variously treated wood samples determined by SEC/MALLS/RI. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (© American Chemical Society 2018)

Original sample	Sample name	$M_n$	$M_w$	$DP_w^a$	$M_w/M_n^b$	Calc. mass <sup>c</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )	Slope value <sup>d</sup>
Eucalyptus	D-E	94700	347000	2142	3.7	0.41	0.62
	DHA-E	24900	166000	1025	6.7	0.50	0.57
	ADH-E	22500	127700	788	5.7	0.55	0.57
Japanese cedar	D-JC	288000	890000	5494	3.1	0.33	0.38
	AD -JC	64900	327600	2022	5.1	0.37	0.46
	ADH-JC	23000	106400	657	4.6	0.52	0.61
	DHA-JC	30400	189800	1172	6.2	0.47	0.46
	DAH-JC	31000	158700	980	5.1	0.41	0.60
	$\alpha$ -cellulose	115900	568700	3510	2.3	0.45	0.38
	Pulp	HBKP	78300	273300	1687	3.6	0.54
SBKP		112000	494900	3055	5.3	0.47	0.44
HBSP		49100	218700	1350	4.5	0.48	0.63
SBSP		129700	289800	1789	2.2	0.40	0.63

<sup>a</sup>  $DP_w = M_w/162$ , <sup>b</sup> Polydispersity, <sup>c</sup> Determined by SEC/MALLS analysis, <sup>d</sup> Slope value of conformation plot



**Figure 6-2** SEC-elution patterns and corresponding molecular mass plots (a) and double logarithmic plots of molecular mass versus r.m.s. radius (or conformation plots) (b) for SBSP, HBSP, SBKP, and HBKP. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2018)

### 6-3-2 希酸加水分解、脱リグニン、脱ヘミセルロース処理によるホロセルロースの構造変化

ユーカリ (E) とスギ (JC) の脱脂木粉を 脱リグニン (D) → 脱ヘミセルロース (H) → 希酸加水分解 (A) の順で処理した試料 (DHA-E, DHA-JC) と 希酸加水分解 (A) → 脱リグニン (D) → 脱ヘミセルロース (H) の順で処理した試料 (ADH-E, ADH-JC) の SEC/MALLS 測定および構成糖分析を行った。構成糖分析の回収率 (Total) は試料の酸加水分解後の不溶解物量等を示し、中性糖分析にかからないリグニン関連成分や酸性糖量と考えられる。その結果、希酸加水分解を初めに行ったスギ試料 ADH-JC の分子量プロットとコンフォメーションプロットはユーカリ (DHA-E, ADH-E) と一致し、構造は直鎖ランダムコイル状となった。このことから、ADH-JC は SBSP の分子構造を再現していると考えられる。一方、DHA-JC は、slope 値が小さくなり、SBKP と同様の針葉樹由来の試料の特徴を維持していた (Table 6-1, Figure 6-3)。また、構成糖分析の結果から、DHA-JC には ADH-JC よりもマンノース量が多いことがわかった。このように、処理順序を変えることで分子構造や組成に顕著な違いがみられた (Table 6-1)。

DHA-JC のように脱リグニン後の残存リグニン量が少ない状態で希酸加水分解 (A) を行うと、セルロースと類似した構造のグルコマンナン分子がセルロースマイクロフィブリル表面に水素結合等で結合し、セルロースマイクロフィブリルと強固に結合することで希酸加水分解によるグルコマンナンの低分子量化を妨げており、ADH-JC のように最初に希酸加水分解 (A) を行うことにより、ヘミセルロースが低分子化し、分岐が除去されるのではないかと考えた。そこで、希酸加水分解 (A) 後に脱リグニン処理 (D) した AD-JC の分析を行った。その結果、AD-JC の slope 値は 0.46 となり、分岐構造は維持されており、マンノースなどのヘミセルロース成分も多く残っていた。つまり、リグニンが存在する状態での希酸加水分解が分岐構造除去の要因であるとは言えず、最後のアルカリ抽出による脱ヘミセルロース処理 (H) が分岐構造除去には必須であった。更に、AD-JC はリグニン由来の UV 280 nm の吸収ピークが大きく、中性糖の回収率 (Total) が低いことから、残存リグニン量が多く、脱リグニン処理後のアルカリ抽出は脱ヘミセルロースだけでなく、脱リグニンにも効果的であることがわかる (Figure 6-4, 6-5, Table 6-2)。

針葉樹特有の分岐構造は木化する際に形成されたセルロースーリグニンーグルコマンナン結合であり、この化学結合はアルカリ条件下で安定なエーテル結合であると推察されている<sup>2-5</sup>。他のヘミセルロースは脱リグニン処理後にアルカリ抽出で除去できるが、グルコマンナンは残存リグニン成分と化学結合しているため、アルカリ抽出での除去が困難だと推察される。

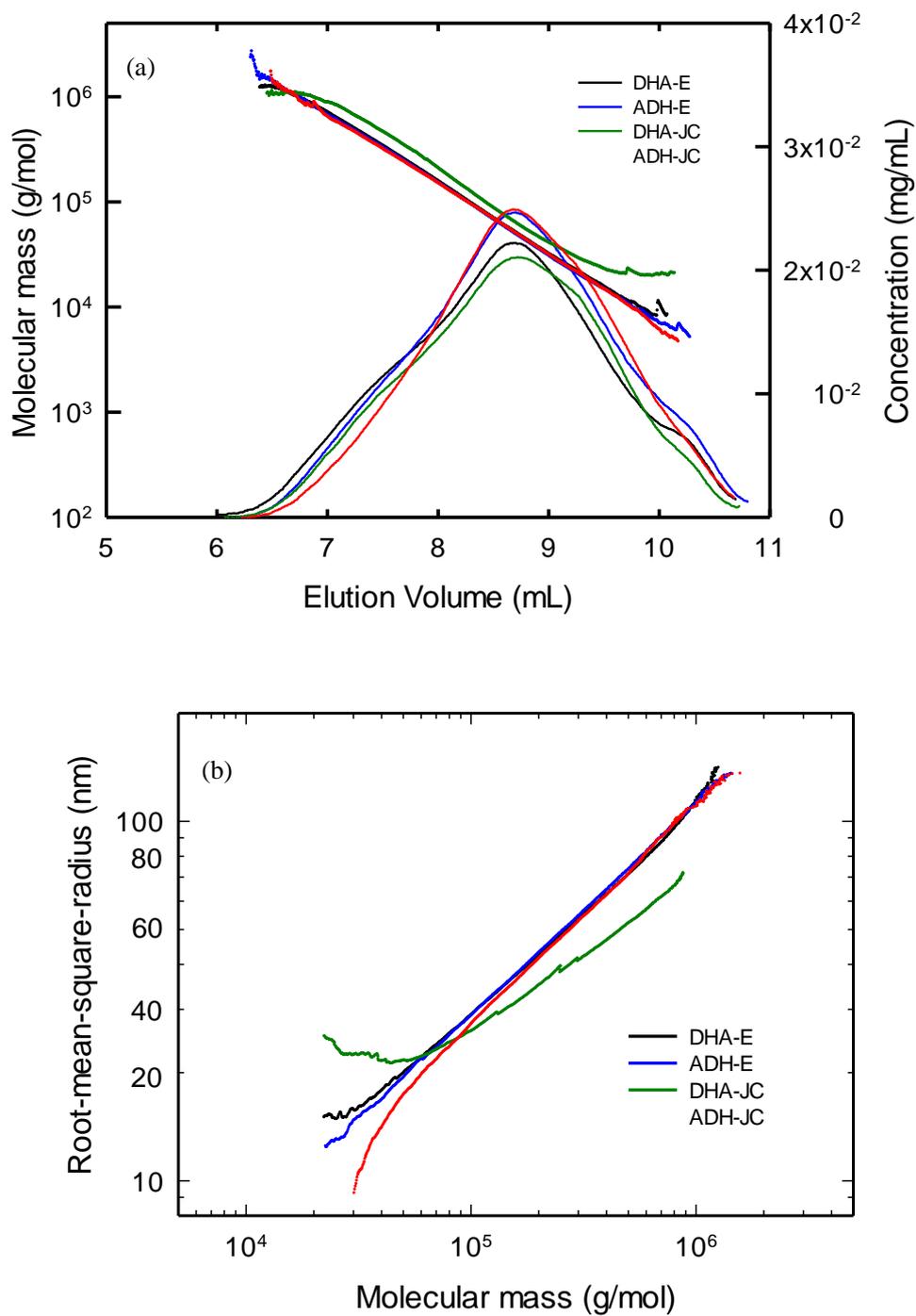
続いて、希酸加水分解をどの段階で行うのが分岐構造に影響するのかを検討するため、脱リグニン (D) 直後に希酸加水分解 (A) を行った DAH-JC を調製した。その結果、ADH-JC と DAH-JC の分子量プロットと slope 値は一致し、slope 値は約 0.6 となり直鎖ランダムコイル状を示した。しかし、DAH-JC のコンフォメーションプロットラインはユーカリ試料

(ADH-E、DHA-E) や ADH-JC よりも明らかに高分子量側にスライドし、同じ慣性半径でも分子量が大きくなった (Table 6-1, Figure 6-4)。DAH-JC は希酸加水分解、脱リグニン、アルカリ抽出のすべてを行った 3 種類の試料中では、最もリグニン由来の UV280 nm の吸収ピークが大きく、構成糖分析の回収率 (Total) も低いことから、残存リグニン量が多いことがわかる (Table 6-2, Figure 6-5)。脱リグニン処理後の低分子化してセルロースに結合している残存リグニン成分は分岐鎖構造を示す要因とはならないが、セルロース分子に多く結合していることで、同じ慣性半径でも高分子量側にシフトした、つまり分子量が明瞭に大きくなったと判断できる。

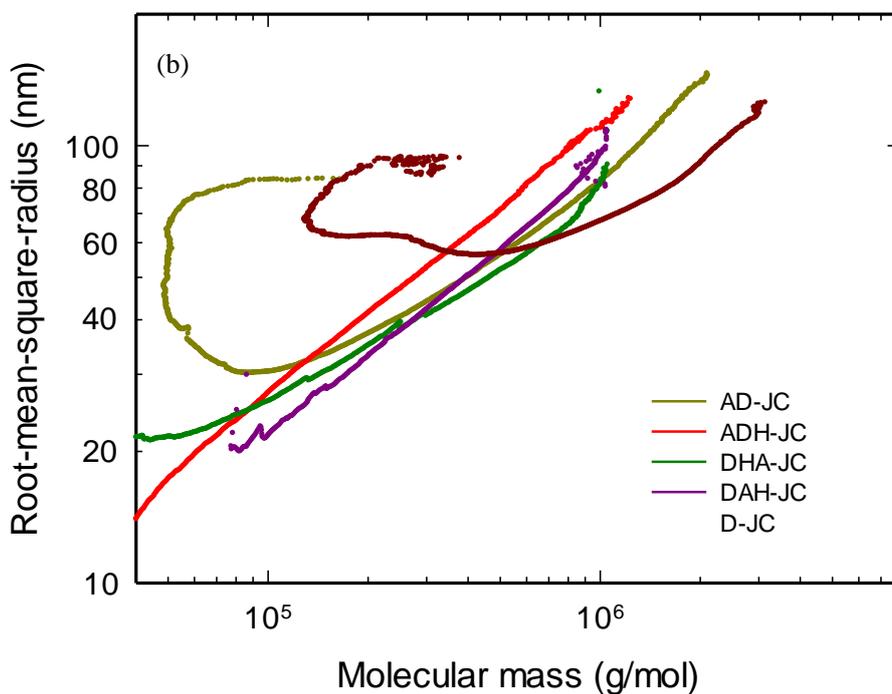
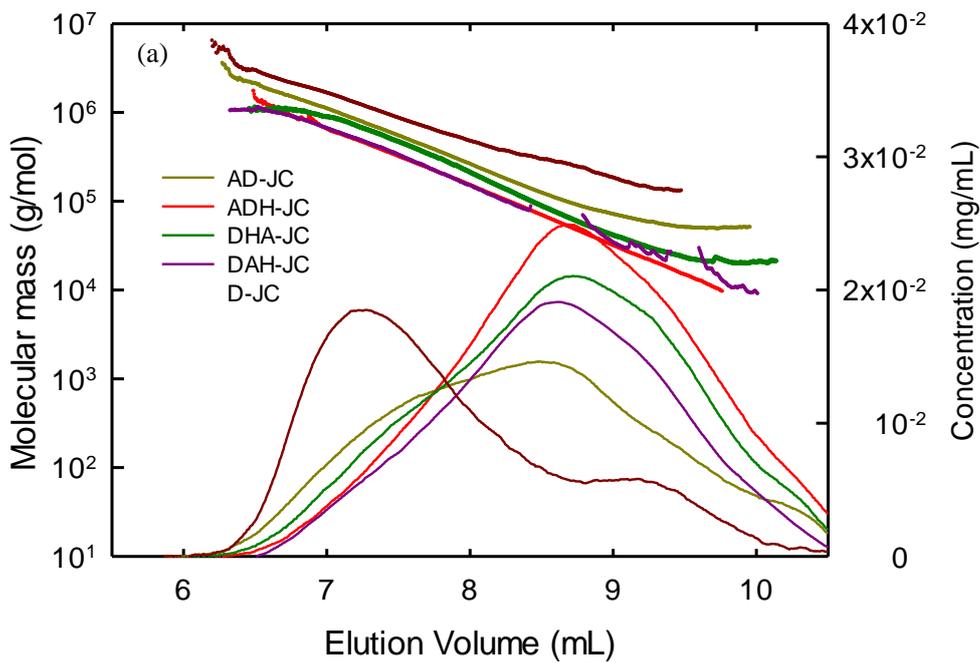
DAH-JC は ADH-JC より若干マンノース量も多いが、これは残存リグニン量が ADH-JC よりも多いためリグニンに結合したグルコマンナンも多いためである。

一方、DHA-JC はアルカリ抽出 (H) の際、リグニンとエーテル結合したグルコマンナンが長鎖高分子の状態で存在しており、エーテル結合はアルカリ条件下で安定であるため、アルカリ抽出 (H) ではグルコマンナンは除去できない。アルカリ抽出 (H) 後の希酸加水分解 (A) による脱ヘミセルロース効果は AD-JC の構成糖分析結果が示すように、アルカリ抽出 (H) ほどの脱ヘミセルロース効果はない。

DHA-JC は DAH-JC よりも残存リグニン量が少ないが分岐構造を示したことから、リグニンごと長鎖のグルコマンナンを取り除くことはセルロースの分岐構造除去には必要ではあるが、残存リグニン成分は分岐構造の主な要因ではなく、高分子領域のリグニン成分を介した長鎖グルコマンナンがセルロースに結合していることが分岐構造の直接的な要因だと考えられる。



**Figure 6-3** SEC elution patterns and corresponding molecular mass plots (a), and double logarithmic plots of molecular mass versus r.m.s. radius ( or conformation plots) (b) for eucalyptus and Japanese cedar after the DHA and ADH treatment. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2018)



**Figure 6-4** SEC elution patterns and corresponding molecular mass plots (a), and double logarithmic plots of molecular mass versus r.m.s. radius ( or conformation plots) (b) for Japanese cedar after the D, AD, DAH, DHA, and ADH treatments. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2018)

**Table 6-2** Yield and neutral sugar composition of variously treated wood samples, and their cellulose/others ratios obtained by SEC/MALLS and neutral sugar composition analyses. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2018)

Original sample	Sample name	SEC-MALLS	Neutral sugar analysis (%)								Yield <sup>e</sup>
		HMW / LMW <sup>a</sup>	Cellulose / Others <sup>b</sup>	Glc	Gal	Man	Ara	Xyl	Rha	Total	
Eucalyptus	D-E	63/37	67/33 <sup>d</sup>	66.9	1.5	1.5	0.5	14.5	1.0	85.9	83
	DHA-E	-	95/5 <sup>d</sup>	94.7	0.0	1.1	0.0	2.7	0.0	98.4	32
	ADH-E	-	97/3 <sup>d</sup>	96.9	0.0	0.5	0.0	1.2	0.0	98.7	30
Japanese cedar	D-JC	83/17	52/48 <sup>c</sup>	54.6	1.5	6.6	1.1	5.1	0.9	69.8	79
	DHA-JC	-	88/12 <sup>c</sup>	90.3	0.0	5.7	0.0	1.3	0.0	97.2	42
	AD-JC	-	66/54 <sup>c</sup>	69.6	0.0	4.5	0.7	2.1	0.9	77.9	45
	ADH-JC	-	95/5 <sup>c</sup>	95.9	0.0	2.1	0.0	1.0	0.0	99.0	38
	DAH-JC	-	94/6 <sup>c</sup>	90.3	0.0	3.6	0.0	1.1	0.0	95.0	35
	$\alpha$ -cellulose	-	79/21 <sup>c</sup>	81.0	2.1	4.8	0.5	1.2	0.4	90.0	47
HBKP	72/28	77/23 <sup>d</sup>	77.0	0.0	0.3	0.0	15.0	0.3	93.0	-	
SBKP	85/15	80/20 <sup>c</sup>	82.0	0.0	4.7	0.0	6.0	0.1	93.0	-	
HBSP	-	93/7 <sup>d</sup>	92.5	0.0	1.5	0.0	2.2	0.0	96.2	-	
SBSP	-	96/4 <sup>c</sup>	96.1	0.0	0.9	0.0	1.5	0.0	98.5	-	

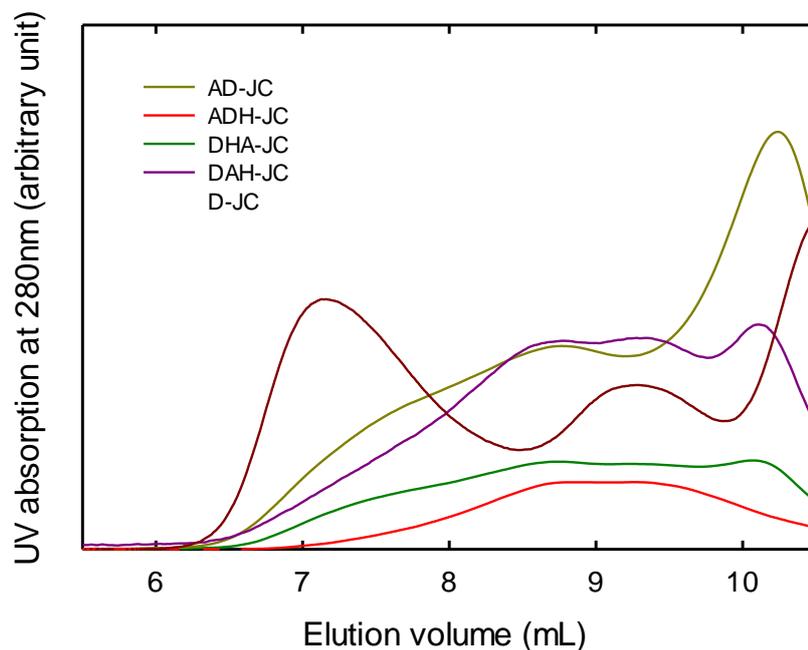
<sup>a</sup> HMM/LMM ratio was calculated from SEC-elution patterns using peak deconvolution.

<sup>b</sup> Others: hemicelluloses, lignin fragments, etc.

<sup>c</sup> Cellulose/others ratios of Japanese cedar and SBKP were calculated from neutral sugar compositions according to the following equation,  $(\text{Glu}-1/3\text{Man})/(100-\text{Glu}+1/3\text{Man})$ .

<sup>d</sup> Cellulose/others ratios of eucalyptus and HBKP were calculated from neutral sugar compositions according to the following equation,  $\text{Glu}/(100-\text{Glu})$ .

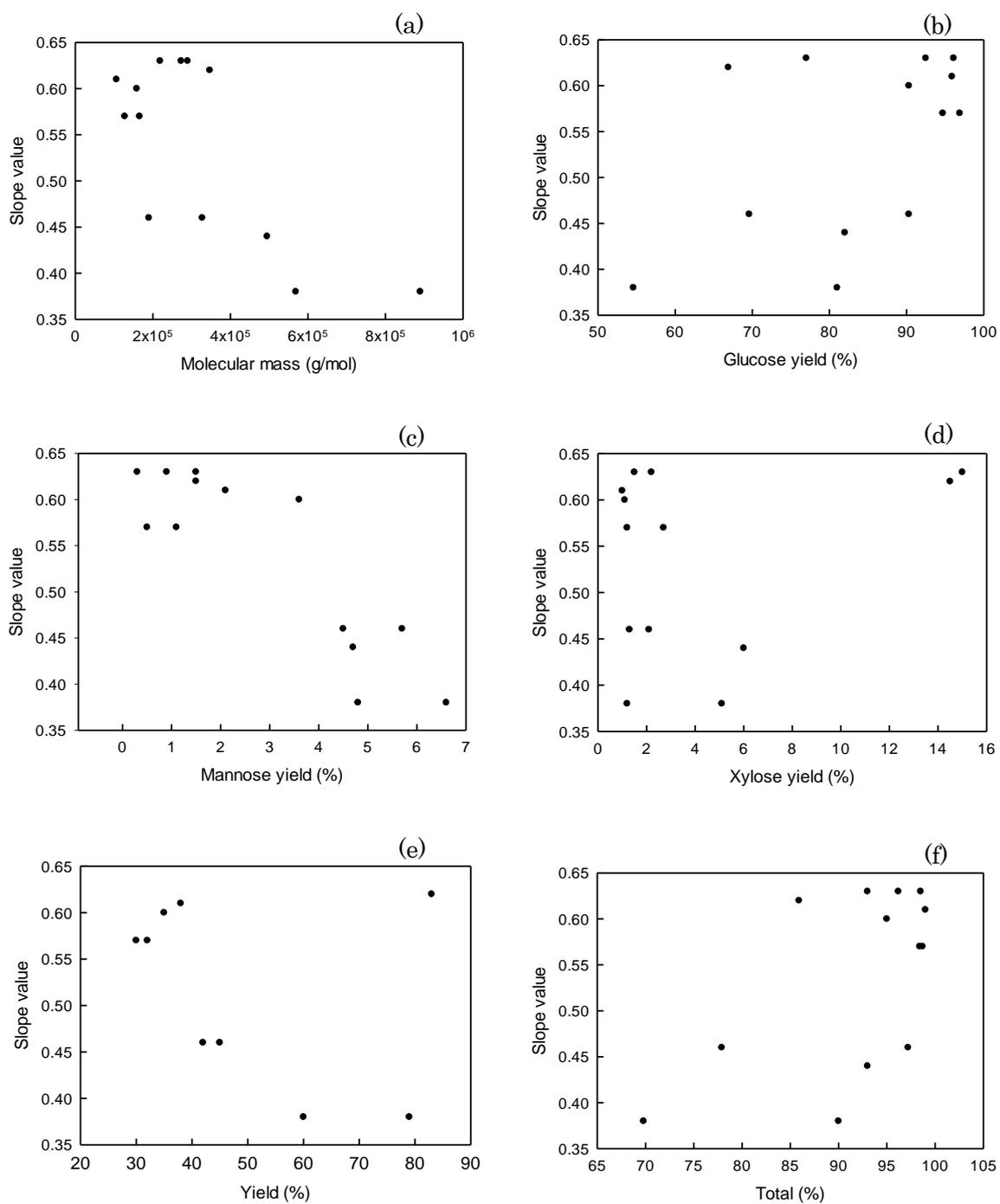
<sup>e</sup> Based on the dry weight of the dewaxed wood meals.



**Figure 6-5** SEC-elution patterns for Japanese cedar after various treatments, detected by UV absorption at 280nm. The relative intensities of UV absorption between samples correspond to SEC-elution patterns shown in Figures 6-4(a), detected by RI. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2018)

### 6-3-3 様々な因子の slope 値への影響

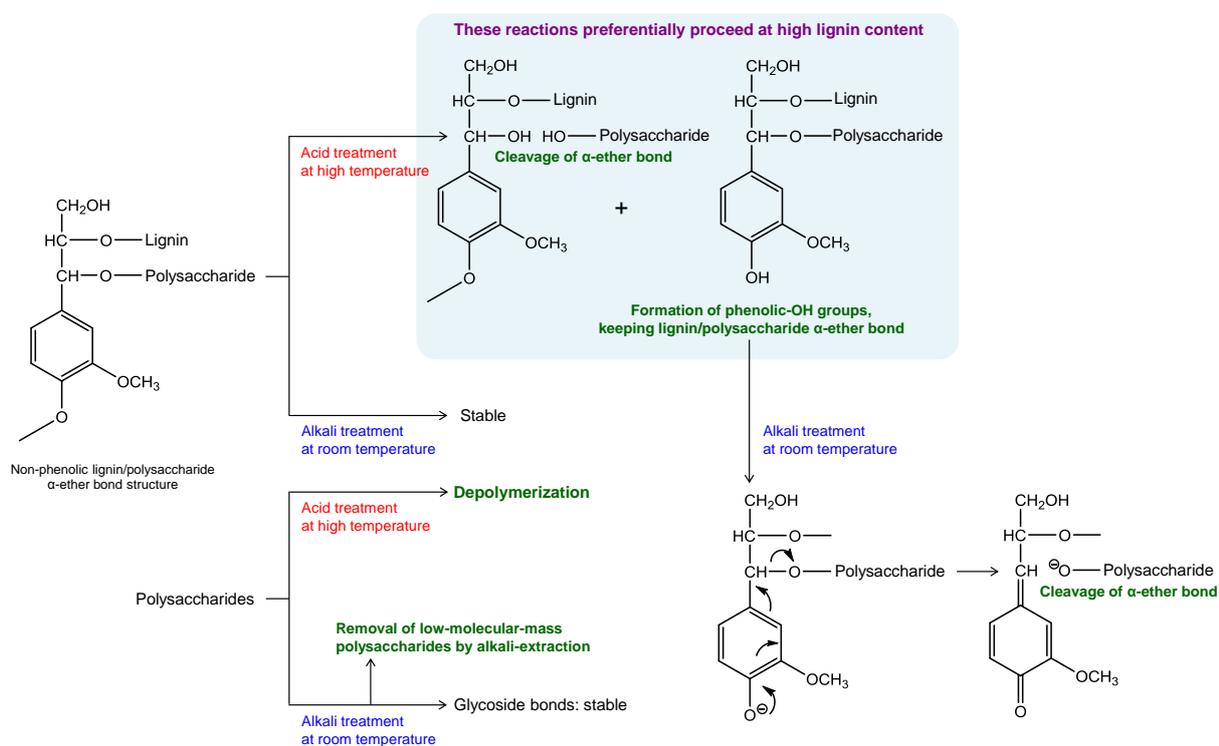
Figure 6-6 に slope 値と  $M_w$ 、グルコース量、マンノース量、キシロース量、試料調製時の重量回収率 (Yield)、中性糖の収率 (Total) の相関関係を示す。重量回収率は試料の精製度が高いほど値は小さくなり、中性糖の収率は残存リグニン量が多いほど値は小さくなる。その結果、マンノース量と slope 値には負の相関関係がみられ、マンノース量が多いほど slope 値は小さくなり、セルロース成分の分岐度が高いことがわかる。また、D-E を除いた重量回収率と slope 値にも相関関係がみられ、試料の精製度が低いほどセルロース成分の分岐度が高くなっている。キシロースが多い D-E の重量回収率は slope 値と相関が無い。これらの結果からも、残存マンノース量と試料精製度がセルロース成分の分岐構造に関係がある因子だと考えられる。



**Figure 6-6** Correlations of slope values versus molecular mass (a), glucose yield (b), mannose yield (c), xylose yield (d), yield (e), total (f).

### 6-3-4 希酸加水分解 およびアルカリ抽出による $\alpha$ -エーテル型リグニン/多糖結合への影響

アルカリ抽出では、非フェノール型リグニンの  $\alpha$ -エーテル型リグニン/多糖結合は安定であるが、フェノール型リグニンはキノンメチド構造を経て、 $\alpha$ -エーテル型リグニン/多糖結合は切断することができる<sup>6,7</sup> (Figure 6-7)。今回調製した AD-JC ではセルロース成分に分岐構造が存在し、その後アルカリ抽出した ADH-JC ではその分岐構造が除去されている。この結果を説明するためには、最後のアルカリ処理で多糖とリグニンのエーテル結合が切断される必要があり、そのためにはリグニンがフェノール型でなければならない。



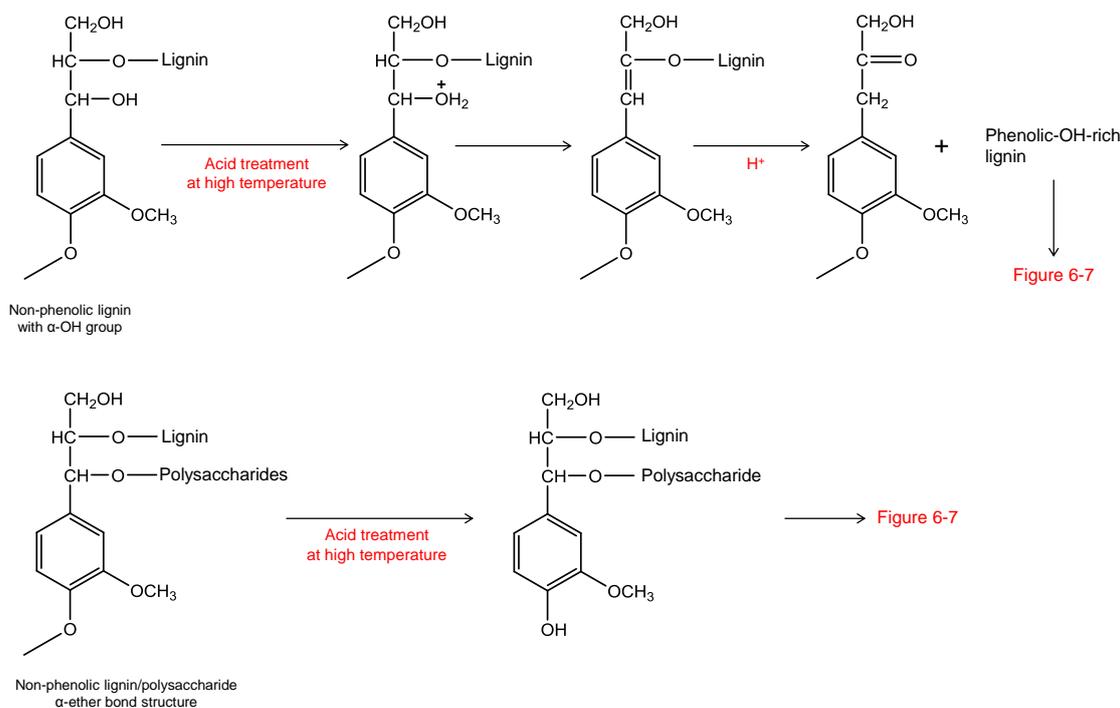
**Figure 6-7** Preferential reactions in terms of cleavage of lignin/polysaccharide bonds in wood samples, that can explain the results obtained in this study. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2018)

棚橋らは、木材は爆砕法により、フェノール性水酸基の多い反応性に富む低分子リグニンが多量に得られるとの報告している<sup>8</sup>。爆砕法では木材の高温、高圧下での蒸煮処理の間に木材成分中の酢酸エステルから酢酸が生成し、希酸性下でヘミセルロースやリグニンが加水分解され低分子化し、三主要成分が分離・抽出され易い状態になる。その後の水抽出やメタノール抽出によりリグニンやヘミセルロースの大部分は除去される。針葉樹は広葉樹と比較して、リグニンの除去割合が少ないが、酸を針葉樹チップに含浸させてから爆砕処理を行うと、

その後の酵素による糖化率が向上するとの報告もある<sup>8-10</sup>。

ADH-JC では木材を爆砕法や酸性サルファイト法のように酸-加熱下で処理することで、フェノール型リグニン分解物の増加が促進され、リグニン構造の  $\beta$ -エーテル型の結合が部分的に切断され、その後の脱リグニン処理 (D) により十分にリグニンが分解され、アルカリ抽出でフェノール型リグニンと多糖の結合は切断され、グルコマンナンとリグニン分解物はセルロースマイクロフィブリル表面から除去されると考えられる。一方、DHA-JC のように希酸加水分解 (A) せずに脱リグニン (D) を行うと、非フェノール型リグニンが多く、アルカリ処理を行っても多糖とリグニンのエーテル結合は安定している。

溶解パルプ製造工程では、アルカリ条件下でのクラフト蒸解や漂白工程前に希酸加水分解を行うことで、フェノール型リグニンが増加し、後のアルカリ条件下での処理によりセルロース成分の分岐構造の要因となるグルコマンナンとリグニンをセルロースから効果的に除去しているとすれば、本実験の DHA-JC の結果と一致する。



**Figure 6-8** The hypothesis to form phenolic hydroxy groups of lignin, keeping lignin/polysaccharide  $\alpha$ -ether linkages, during acid-hydrolysis of Japanese cedar.

しかし、希酸加水分解処理によるフェノール型リグニン量の増加機構については、モデル実験の結果、希酸加水分解を行うと、 $\alpha$  位の水酸基にプロトンが結合し、そこから段階を経て  $\beta$ -O-4 型結合が切断されるとの横山らの報告もある<sup>11, 12</sup>。このモデル実験の結果と、本実験の結果を完全に矛盾なく説明するのは困難である。そこで、希酸加水分解処理によるフェ

ノール型リグニン量の増加を以下のように仮定すると、本実験で得られた結果を説明することは可能だと考える。すなわち、モデル実験のようにリグニンの  $\alpha$  位が水酸基の場合には、希酸加水分解によって  $\alpha$  位の水酸基に  $H^+$  が結合し、結果的に  $\beta$ -O-4 型結合が優先的に切断され、フェノール性水酸基が生成・増加する (Figure 6-8)。しかし、リグニンの  $\alpha$  位が多糖水酸基とエーテル結合を形成している場合には、その立体障害によって  $\alpha$  位の多糖とのエーテル結合は希酸加水分解でも開裂せずに Figure 6-7 の上部右のフェノール性水酸基を有し、なおかつ  $\alpha$  位に多糖とのエーテル結合が存在し、 $\beta$  位にはリグニンと  $\beta$ -O-4 型結合を形成しているユニットが残存する (Figure 6-8)。この段階、すなわち、Figure 6-1 の AD-JC 試料中には Figure 6-7 に示すようにセルロース/リグニン/グルコマンナンの分岐が存在する。しかし、アルカリ処理することによりこの結合は切断され、分岐構造が消失し、Figure 6-1 の ADH-JC 中には分岐は存在しない。

DAH-JC 試料は、分岐構造はほとんどないが、同じ慣性半径でも純粋なセルロースよりも重量が大きく、マンノース量も少ない (Figure 6-4, Table 6-2)。このことは、セルロース/リグニン (分解物) の結合は相当量残存していても、リグニン/グルコマンナンの結合の残存量は少ないことを示唆している。したがって、セルロース/リグニンの結合も、リグニン/グルコマンナンの結合も  $\alpha$  位のエーテル結合だと考えられるので、希酸加水分解の立体障害による抵抗性が、結晶性セルロースマイクロフィブリル表面のセルロース/リグニンの結合リグニンの  $\alpha$  エーテル結合の方が、非晶性で低分子量のグルコマンニンとリグニンの  $\alpha$  エーテル結合よりも、同じ希酸加水分解処理でも抵抗性が高いことを示している。

しかし、これらの仮説を証明するためには今後の更なる検討が必要である。

## 6-4 まとめ

調製方法を変えたスギ木粉の SEC/MALLS 分析や構成糖分析の結果から、広葉樹やバクテリアセルロースなどのような高結晶化度セルロース試料と同様の直鎖状の試料を針葉樹から調製するには、アルカリ処理前に希酸加水分解-脱リグニン処理を行うことが必須であった。先に希酸加水分解-脱リグニン処理を行うことで、フェノール型リグニン構造が増加し、後のアルカリ条件下処理によりフェノール型リグニンと多糖とのエーテル結合が切断される。それにより、分岐構造の要因となるグルコマンニンとリグニンを同時に効果的にセルロースから除去できると推察される。また、セルロース分子と結合している低分子量の残存リグニン量が多い場合には、コンフォメーションプロットは純粋なセルロース同様、直鎖状を示すが、同じ慣性半径でも分子量は大きくなる。このように、木材由来のセルロース試料にはヘミセルロースやリグニンとセルロースが分子レベルで結合しており、アルカリ条件下での処理をどのタイミングで行うかは、脱ヘミセルロースと脱リグニン処理効果に大きく影響する。

## 6-5 参考文献

- (1) Yanagisawa, M., Shibata, I., & Isogai, A. (2005). SEC-MALLS analysis of softwood kraft pulp using LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone as an eluent. *Cellulose*, 12(2), 151.
- (2) Freudenberg, K., & Harkin, J. M. (1960). Models for the linkage of lignin to carbohydrates. *Chemische Berichte*, 93, 2814-2819.
- (3) Tanaka, K., Nakatsubo, F., & Higuchi, T. (1979). Reactions of guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether with several sugars. II. Reaction of quinonemethide with pyranohexoses. *Mokuzai Gakkaishi* 25, 653-659
- (4) Leary, G. J., Sawtell, D. A., & Wong, H. (1983). The formation of model lignin-carbohydrate compounds in aqueous solution. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 37(1), 11-16.
- (5) Jeffries, T. W. (1991). Biodegradation of lignin-carbohydrate complexes. In *Physiology of Biodegradative Microorganisms* (pp. 163-176). Springer Netherlands
- (6) Taneda, H., Nakano, J., Hosoya, S., & Chang, H. M. (1987). Stability of  $\alpha$ -ether type model compounds during chemical pulping processes. *Journal of wood chemistry and technology*, 7(4), 485-497.
- (7) Karlsson, O., Ikeda, T., Kishimoto, T., Magara, K., Matsumoto, Y., & Hosoya, S. (2004). Isolation of lignin-carbohydrate bonds in wood. Model experiments and preliminary application to pine wood. *Journal of Wood Science*, 50(2), 141-150.
- (8) 棚橋光彦. (1983). <総説> 爆砕法による森林バイオマスの変換と総合利用.
- (9) 志水一允. (1988). 木質系資源の蒸煮・爆砕処理, *紙パ技協誌*, 42(12), 1114-1130.
- (10) Sudo, K., Shimizu, K., Ishii, T., Fujii, T., & Nagasawa, S. (1986). Enzymatic Hydrolysis of Woods-Part IX. Catalyzed Steam Explosion of Softwood. *Holzforschung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 40(6), 339-345.
- (11) Yokoyama, T., & Matsumoto, Y. (2010). Revisiting the mechanism of  $\beta$ -O-4 bond cleavage

during acidolysis of lignin. Part 2: detailed reaction mechanism of a non-phenolic C6-C2 type model compound. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 30(3), 269-282.

(12) Ito, H., Imai, T., Lundquist, K., Yokoyama, T., & Matsumoto, Y. (2011). Revisiting the mechanism of  $\beta$ -O-4 bond cleavage during acidolysis of lignin. Part 3: Search for the rate-determining step of a non-phenolic C6-C3 type model compound. *Journal of wood chemistry and technology*, 31(2), 172-182.

## 第7章 オンライン粘度測定によるセルロース試料の構造解析及び粘度法によるセルロース分子量測定方法の検討

### 7-1 背景

第6章までは SEC/MALLS 測定による静的光散乱法を用いた慣性半径の結果からセルロース試料の構造解析を行ってきたが、粘度法による Mark-Houwink-Sakurada 式を用いた高分子の構造解析も一般的に用いられている。当研究室においてもセルロース試料の銅エチレンジアミン溶液の固有粘度から Mark-Houwink-Sakurada 式を用い、分子量 ( $M_v$ ) を算出している。

第4章のレオメーターを用いて測定したセルロース試料の 1% LiCl/DMAc 溶液の還元粘度と分子量 ( $M_w$ ) の両対数プロットの結果は、SBKP は他のセルロース試料と溶液中で異なる構造であること示していた。

本章では、HPLC オンライン粘度検出器を用い、セルロース試料の 1% LiCl/DMAc 溶液の粘度測定を行い、その結果から Mark-Houwink-Sakurada プロットを作成し、得られた Mark-Houwink-Sakurada 式からセルロースの分子構造解析を行った。

また、一般的なセルロースの分子量 ( $M_v$ ) 測定方法であるセルロースの銅エチレンジアミン溶液の粘度測定法で用いる Mark-Houwink-Sakurada 式を、今回実測により作成した 1% LiCl/DMAc セルロース溶液の Mark-Houwink-Sakurada プロットと比較することで、銅エチレンジアミン溶液の粘度法で得られるセルロース試料の分子量値の妥当性について検証した。

### 7-2 実験

#### 7-2-1 試料と試薬

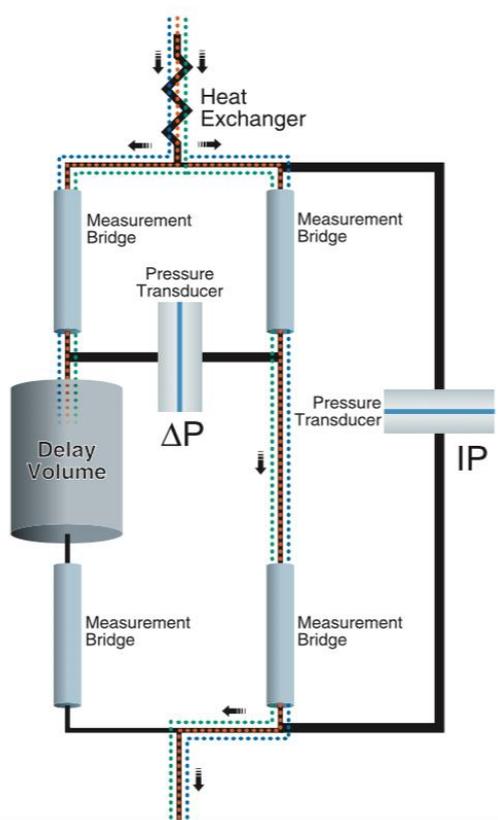
広葉樹漂白クラフトパルプ (HBKP)、針葉樹漂白クラフトパルプ (SBKP) は日本製紙株式会社製を用いた。スギ木粉から脱脂、脱リグニン、脱ヘミセルロース、希酸加水分解を行った試料 2 種類 (ADH-JC、DHA-JC) を調製した。これらの試料の詳細な調製方法は Figure 6-1 に示す。微結晶セルロースはコットンリンター由来の Cellulose powder (Cellulose powder C, Advantec. Toyo, Co., Ltd, Japan)、木材パルプ由来のフナセル (Funacel II, Funakoshi Co., Ltd. Japan) を用いた。他の試薬や溶媒は試薬特級 (Wako Pure Chemicals, Japan) を使用した。

## 7-2-2 セルロース試料の溶解およびオンライン粘度測定 (SEC/MALLS/ViscoStar 測定)

SEC/MALLS 測定に用いるパルプおよびホロセルロースの LiCl/DMAc 溶液は、EDA 浸漬前処理法、微結晶セルロースの LiCl/DMAc 溶液は、水-アセトン溶媒置換法を用いて調製した (4-2-2 参照)。SEC/MALLS 測定条件は、2-2-7 に記載した方法に従い、 $dn/dc$  値は 0.131 mL/g を用いた。オンライン差圧粘度検出器 (ViscoStar, Wyatt Technologies, USA) を SEC/MALLS 測定ラインに追加し、分子量測定と同時に粘度測定を行った。参考資料として ViscoStar の経路図を以下に示す。測定原理は、カラムから溶出した溶媒は検出器に入ると 2 経路に半量ずつ分離して流れ、このときの 2 経路の差圧  $\Delta P$  は釣り合い 0 を示す。サンプルを注入すると同様に半量ずつに分かれ、一方の経路の delay volume 部分に試料が入ると 2 経路の圧力が不均一となる。このときの差圧  $\Delta p$  と経路全体の内部圧力  $IP$  には、式 (7-1) の関係があり、還元粘度  $\eta_{sp}$  が求まる。

$$\eta_{sp} = \eta/\eta_0 - 1 = 4\Delta P/(IP - 2\Delta P) \quad (7-1)$$

$\eta$  は試料の粘度、 $\eta_0$  は溶媒の粘度、 $\Delta P$  は左右の流路の差圧、 $IP$  は内部全体の圧力。



参考資料： ViscoStar の経路図 (粘度検出器 ViscoStar カタログより)

得られた  $\eta_{sp}$  と RI 測定器により同時に計測された濃度  $c$  を用いて、式 (7-2) から固有粘度  $[\eta]$  が求まる。

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \eta_{sp}/c \quad (7-2)$$

固有粘度  $[\eta]$  と分子量  $M_w$  の関係は、Mark-Houwink-Sakurada 式 (7-3) で表すことができる。

$$[\eta] = KM_w^\alpha \quad (7-3)$$

$\alpha$  と  $K$  は高分子の種類、溶媒の種類及び温度によって定まる定数である。 $\alpha$  は分子形状を示す定数であり、棒状は  $\alpha$  が約 1.0、良溶媒中での直鎖ランダムコイル状は約 0.8、更に分岐の度合いに応じて  $\alpha$  は小さい値となる。

### 7-2-3 粘度法による分子量測定

凍結乾燥試料 (40 mg) に蒸留水 (10 mL) を加え攪拌し、試料分散後、1M 銅エチレンジアミン水溶液 (10 mL) を加えて常温で 30 分間攪拌し試料を溶解させた。この溶液 10 mL を Canon-Fenske 型粘度計 (S-2524, Shibata scientific technology LTD, Japan) に注入し、25 °C の恒温槽 (VB-3 Shibata scientific technology LTD, Japan) 中に 5 分間静置後、粘度測定を行い、3 回測定した平均値 ( $\eta$ ) を求めた。同様に溶媒の粘度測定を行い ( $\eta_0$ ) も求め、式 (7-4) と (7-5) を用いて還元粘度 ( $\eta_{sp}$ ) を算出した。

$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_0} = \frac{t}{t_0} \quad (7-4)$$

$$\eta_{sp} = \eta_r - 1 \quad (7-5)$$

$\eta_r$  は相対粘度、 $\eta_0$  は溶媒の粘度、 $\eta$  は溶液の粘度  $t_0$ : 溶媒の流下時間  $t$ : 溶液の流下時間。

セルロース試料の銅エチレンジアミン溶液の一点法による測定では、Shultz-Blaschke の式 (7-6) を用いて粘度の相対増加分から固有粘度 ( $[\eta]$ ) を求める。銅エチレンジアミン溶液のセルロース試料では  $k = 0.28$  を用いた。

$$[\eta] = \frac{\eta_{sp}}{c(1 + k\eta_{sp})} \quad (7-6)$$

Mark-Houwink-Sakurada 式 (7-7) を用い粘度平均分子量  $M_v$  を算出した。定数  $\alpha$  と  $K$  は、それぞれ  $\alpha = 1, K = 0.0057$  を用いた<sup>1</sup>。

$$[\eta] = KM_v^\alpha \quad (7-7)$$

## 7-3 結果と考察

### 7-3-1 SEC/MALLS/ViscoStar 測定によるセルロース試料の構造解析

セルロースの難溶解性は良く知られており、8% LiCl/DMAc に溶解する際、溶媒置換による前処理が必須である。また、純粋なセルロース分子は直鎖状であり、セルロース分子が分岐状であるとは考えられない。そこで、一般的にはセルロース試料のコンフォメーションプロットの slope 値が低い場合は、その原因として凝集等の分散不良の可能性が疑われる<sup>2</sup>。しかし、本実験で調製した測定試料は、良溶解性であり、SEC/MALLS 測定結果にも凝集による Figure 4-7 に示したような異常光散乱も検出されなかったにもかかわらず、針葉樹由来の試料の slope 値は低くなり、分岐状であることを示していた (Figure 5-1, 5-7)。この結果を再検証するため、直鎖ランダムコイル状試料として HBKP と ADH-JC、分岐状試料として SBKP と DHA-JC を用い (Figure 6-1, 6-2, 6-3)、これらの試料の SEC/MALLS/ViscoStar 測定を行い、その結果から Mark-Houwink-Sakurada plots を作成し、その近似直線の式から粘度法による分子構造解析を行った (Figure 7-2)。 $\alpha$  の算出は、溶出ピークのピークトップ付近の近似直線の値から求めた。その結果、HBKP と ADH-JC の  $\alpha$  は 0.75 となりフレキシブルな直鎖ランダムコイル状を示した。一方、SBKP の  $\alpha$  は 0.46、DHA-JC の  $\alpha$  は 0.55 となり HBKP や ADH-JC よりも明らかに小さな値となり、分岐状を示した。このように静的光散乱法と粘度法による異なる測定方法での分子構造解析結果が一致したことは、これらの方法による分子構造解析結果は妥当であることを示す。Figure 7-2 に示した直鎖状の HBKP と ADH-JC の Mark-Houwink-Sakurada plots ラインは曲線であり、高分子量側 (溶出ピークトップを含む) と低分子量側の傾き ( $\alpha$ ) は異なっている。このことは、セルロースの分子鎖の屈曲性はある程度の低分子量になると傾き ( $\alpha$ ) は大きくなり、棒状に近づくことを示している。柳澤らは、セルロースのクーン鎖長を理論曲線から算出し、その値は 18 nm (約 DP 36 に対応) としている。この値は溶媒 (LiCl/アミド溶液) の影響やセルロースの C3-OH と C5-O 間の分子内結合の影響は受けない値であるとも述べている<sup>3</sup>。セルロース分子鎖長がクーン鎖長付近では棒状であると推察され、そのため低分子量側の  $\alpha$  値は大きくなると考えられる。

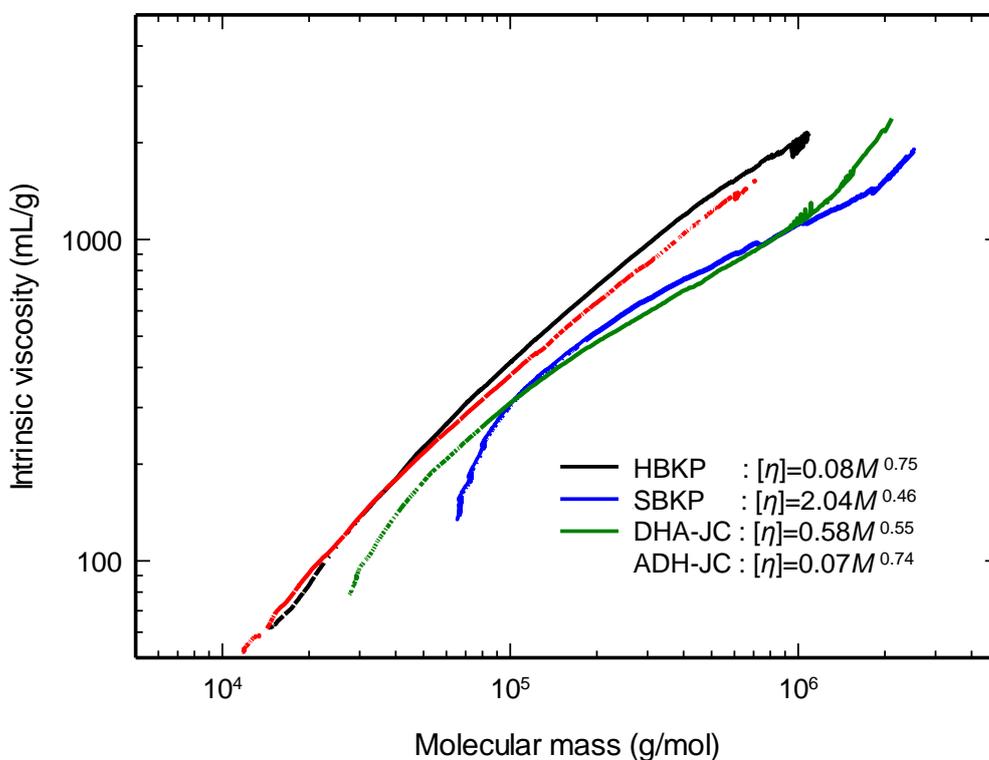


Figure 7-2 Mark-Houwink-Sakurada plots of cellulose samples using SEC/MALLS/Viscostar.

### 7-3-2 セルロース溶液の Mark-Houwink-Sakurada 式

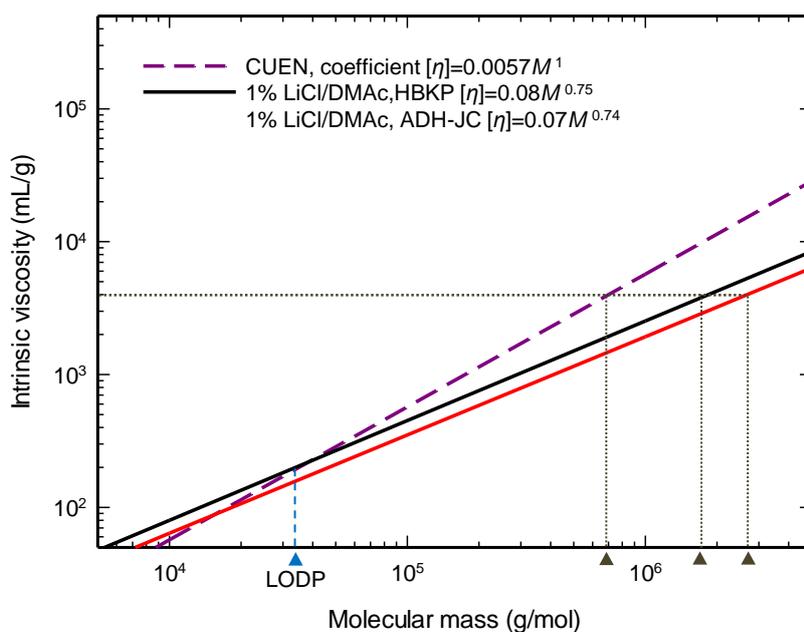
SEC/MALLS 分析は、絶対分子量、分子量分布、分子構造等の詳細な解析を行うことができる一方、セルロース試料の LiCl/DMAc 溶液調製に時間がかかり、装置が高価であるという欠点もある。そのため、セルロース試料の分子量測定法として銅エチレンジアミン溶液の粘度測定法が一般的に用いられている。分子量 ( $M_v$ ) 算出に用いる Mark-Houwink-Sakurada 式の係数 ( $\alpha, K$ ) においては様々な値が提唱されており<sup>4-13</sup>、木質科学実験マニュアルでは、算出が簡便な係数  $\alpha = 1$  と  $K = 0.0057$  を分子量算出に用いている<sup>1</sup>。

今回の実測結果で得られた直鎖ランダムコイル状試料 (HBKP, ADH-JC) の 1% LiCl/DMAc 中での Mark-Houwink-Sakurada 式の係数と一般的にセルロース試料の分子量測定に用いられている銅エチレンジアミン溶液中の係数の Mark-Houwink-Sakurada プロットを Figure 7-3 に示す。溶媒が異なるため直接比較は出来ないが、セルロースの LODP 値とされる DP 200 ( $M_w$  32400) 付近では、粘度法と今回の実測結果のラインはほぼ重なっているが、それより大きい一般的なパルプの分子量領域では分子量は大きく異なり、木質科学実験マニュアルの係数では今回の実測結果よりもかなり小さい分子量となる。この値の差は分子量が大きいほど顕著

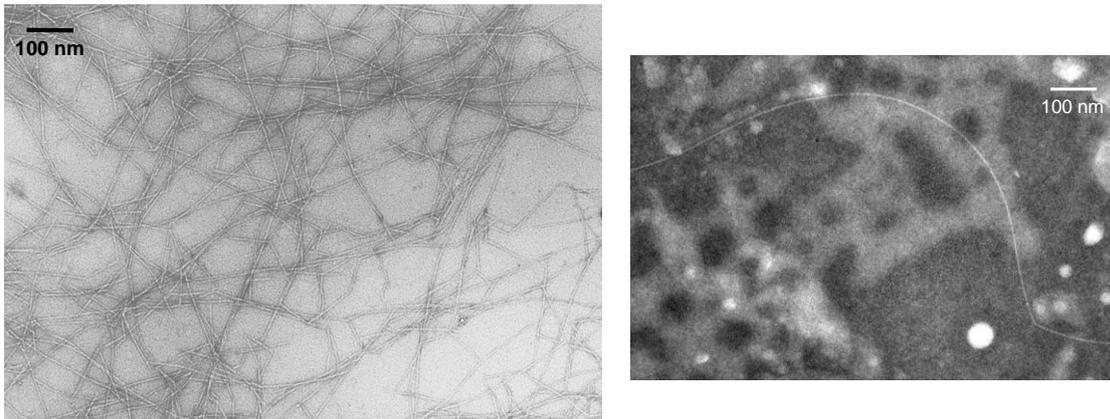
になる。これは粘度法ではセルロースを棒状高分子とみなし、 $\alpha = 1$  として分子量 ( $M_v$ ) を算出しているためである。7-3-1 で述べたように、セルロース分子鎖はクーン鎖長付近では棒状であるが、分子鎖が長くなると屈曲性を示すとされている。植物セルロースから得られる TEMPO 酸化セルロースナノファイブリラの TEM 画像から、セルロースマイクロファイブリル束は剛直な棒状であるが、セルロースマイクロファイブリルが単離分散された状態では剛直ではなく屈曲性を示すことが観察されている (Figure 7-4)。その構成高分子であるセルロースも多くの合成高分子と同様にランダムコイル状高分子であると推察され、従来の係数  $\alpha = 1$  は妥当ではない。植物セルロースマイクロファイブリルはセルロース分子の数本の束で構成されていると考えられており、そのサイズと本数については様々な報告があり確定されていない<sup>14-19</sup>。コットンや木材セルロースを希酸加水分解し調製した微結晶セルロースの分子量は約  $DP\ 200$  とされており、今回の実測結果では粘度法と SEC/MALLS 測定による分子量測定結果はどちらも約  $DP\ 200$  となり、Figure 7-3 と一致する (Table 7-1)。

**Table 7-1**  $M_v$  and  $M_w$  of microcrystalline celluloses obtained by SEC/MALLS and the viscosity method.

Sample	$M_v (DP_v)$	$M_w (DP_w)$
	Viscosity method	SEC/MALLS
Cellulose powder	29500 (182)	29800 (184)
Funacell	34500 (213)	36600 (223)



**Figure 7-3** Mark-Houwink-Sakurada plots using various coefficients for cellulose samples.



**Figure 7-4** TEM images of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils (TOCNs)<sup>20</sup>. Reproduced of image with permission from American Chemical Society (©American Chemical Society 2007)

### 7-3-3 分子構造と $M_v$ と $M_w$

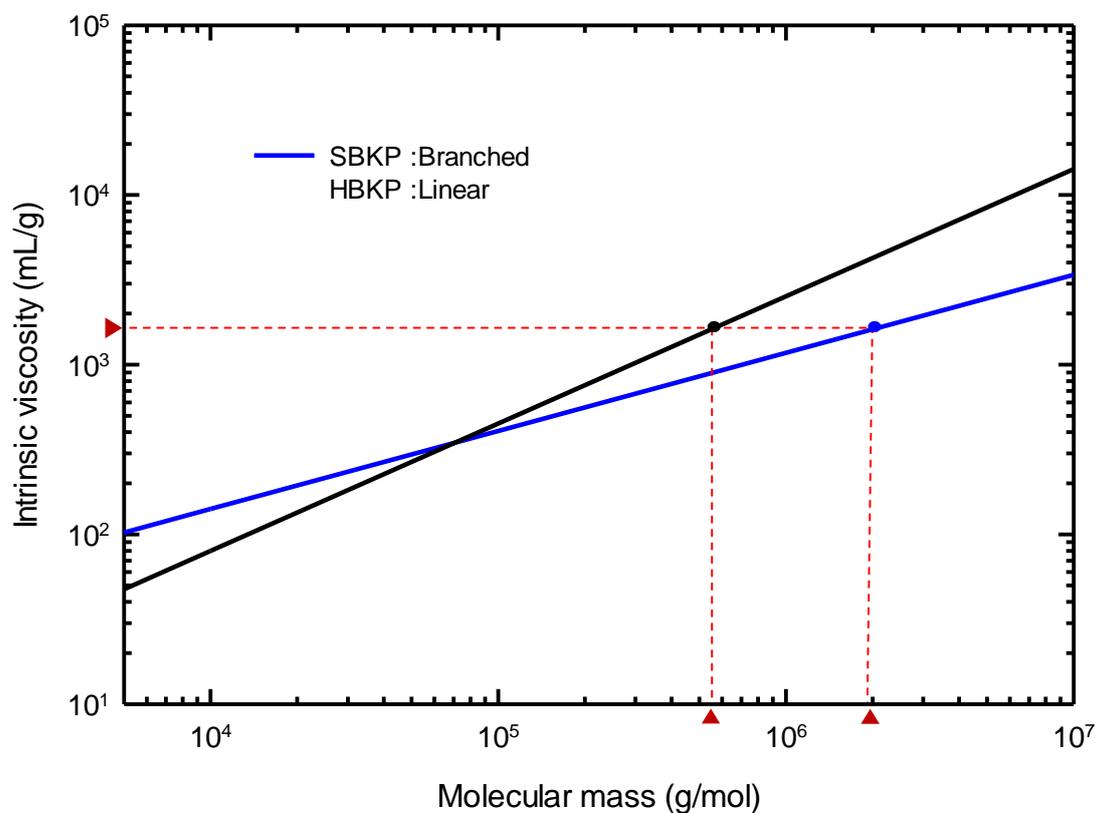
SBKP と HBKP の分子量を粘度法 ( $M_v$ ) と SEC/MALLS 測定法 ( $M_w$ ) 用いて求めた結果を Table 7-2 示す。SBKP と HBKP の分子量は  $M_v$  ではほぼ値が同じではあるが、HBKP の方が若干大きい。 $M_w$  では SBKP と HBKP の値は明瞭に異なり、SBKP の分子量の方が大きい値を示した。粘度法から求められる流体力学半径は拡散係数の等しい球の半径であり、静的光散乱法から求められる慣性半径は分子の重心からの距離を平均化した値である。このように異なる定義であるため、結果が必ずしも一致する必要は無いが、HBKP と SBKP の  $M_v$  と  $M_w$  のように結果が全く異なる傾向を示すとセルロースの分子量評価は困難になる。このような異なる結果の要因は、SEC/MALLS/ViscoStar を用い実測した HBKP と SBKP の Mark-Houwink-Sakurada プロットから説明することが出来る。

SEC/MALLS/ViscoStar 測定の結果、HBKP と SBKP の分子量領域では、同じ粘度で比較すると、直鎖ランダムコイル状の HBKP 係数のプロットよりも分岐状の SBKP 係数のプロットの方が明瞭に大きな分子量値を示す (Figure 7-5)。つまり、分岐状の SBKP を HBKP と同じ係数の Mark-Houwink-Sakurada 式を用いて  $M_v$  を算出したため、このような  $M_v$  と  $M_w$  が全く異なる傾向を示したと考えられる。

また、レオメーターを用いて測定した 1% LiCl/DMAc 溶液中の同じセルロース濃度の HBKP、コットン、バクテリアセルロース、ホヤセルロース、クラドフォラセルロースの還元粘度( $\eta_{red}$ ) と  $M_w$  の両対数プロットには高い相関関係がみられ、試料の由来に関わらずセルロースの分子量が大きいほど還元粘度が大きくなること示された (Figure 4-7)。このことは、これらのセルロース試料は同じ構造であり、同じ係数の Mark-Houwink-Sakurada 式を用いた  $M_v$  の比較は可能であることを示している。一方、SBKP は他のセルロース試料のプロットは他のセルロース試料のラインから大きく外れており、このことから SBKP の分子構造は異なり、Mark-Houwink-Sakurada 式の係数も異なることを示している。

**Table 7-2**  $M_v$  and  $M_w$  of pulps obtained by SEC-MALLS and the viscosity method.

Sample	$M_v (DP_v)$	$M_w (DP_w)$
	Viscosity method	SEC/MALLS
SBKP	156000	495000
HBKP	184000	273000



**Figure 7-5** Mark-Houwink-Sakurada plots of SBKP (branched structure) and HBKP (linear structure).

## 7-4 まとめ

高分子を溶解して SEC/MALLS 測定を行うと、絶対分子量や分子量分布だけでなく、コンフォメーションプロットから高分子の溶液中での溶解状態についての有用な情報を得ることができる。同様に、粘度測定からも Mark-Houwink-Sakurada 式を用い高分子の分子構造を解析することができる。しかし、このように溶液中での高分子の分子構造は静的光散乱や粘度測定による間接的な方法でしか解析することができない。そのため、凝集や濃度が高い等の影響により完全に分子分散していない試料を測定し、誤った解釈をしてしまう恐れもあるため、良溶解性溶液を測定に用いることは重要である。

今回、SEC/MALLS/ViscoStar を用いて粘度と分子量を同時に測定することにより、セルロース試料の 1% LiCl/DMAc 溶液の Mark-Houwink-Sakurada プロットを実測値から直接作成することが出来た。2 つの異なる原理の測定方法（静的光散乱と粘度測定）により得られたセルロース試料の溶液中での分子構造解析結果は一致したことから、これらの測定方法の結果は分子構造の違いを正しく検出しているとみなすことができる。1% LiCl/DMAc 中でフレキシブルな直鎖ランダムコイル状のセルロース試料の固有粘度は、 $[\eta] = 0.08 M_w^{0.75} \text{ (cm}^3/\text{g)}$  となり、この結果は、上出らが静的光散乱と粘度測定から求めたセルローストリアセテートの DMAc 溶液  $[\eta] = 0.0264 M_w^{0.75} \text{ (cm}^3/\text{g)}$  と近似であり、K 値が DMAc より高粘度である 1% LiCl/DMAc の方が大きいことも妥当な結果である。また、 $\alpha$  値 0.75 はセルロースとセルローストリアセテートは溶液中でフレキシブルな直鎖ランダム状であることを示している<sup>21</sup>。これらのことから鑑み、今回実測値から算出したセルロース試料の 1% LiCl/DMAc 溶液の Mark-Houwink-Sakurada 式は妥当である。

セルロース試料の銅エチレンジアミン溶液の一点法による粘度測定から得られた分子量値は、同じ原料から調製した試料などの分子量値を相対的に比較するには、十分用いることが出来る。また、HBKP やバクテリアセルロース等のように直鎖ランダムコイル状のセルロース試料であれば、同じ係数を用いて  $M_v$  を算出し比較しても良い。しかし、針葉樹試料のようにグルコマンナン分岐鎖がある構造では、直鎖ランダムコイル状と同じ係数を用いて分子量を算出し、分子量を比較することは妥当ではないと考えられ、分岐構造の可能性のある針葉樹由来の試料の分子量を粘度法で評価する場合は、分岐構造による影響を考慮する必要がある。

## 7-5 参考文献

- (1) 日本木材科学会 編 “木質科学実験マニュアル” 文英堂出版 p.101
- (2) Siller, M., Ahn, K., Pircher, N., Rosenau, T., & Potthast, A. (2014). Dissolution of rayon fibers for size exclusion chromatography: a challenge. *Cellulose*, 21(5), 3291-3301.
- (3) Yanagisawa, M., Shibata, I., & Isogai, A. (2005). SEC-MALLS analysis of softwood kraft pulp using LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone as an eluent. *Cellulose*, 12(2), 151.
- (4) TAPPI Standard Method T230 om-82 (1982)
- (5) Isogai, A., Mutoh, N., Onabe, F., & Usuda, M. (1989). Viscosity measurements of cellulose/SO<sub>2</sub>-amine-dimethylsulfoxide solution. *Sen'i Gakkaishi*, 45(7), 299-306.
- (6) Evans, S.R., & Wallis, A.F.A. (1987). Proceedings of the 4th international symposium on Wood and pulping chemistry, Paris, April 27-30, vol.1, p.201.
- (7) Schulz, G. V., & Blaschke, F. (1941). Molecular-weight determinations on macromolecular materials. IX. An equation for the calculation of the viscosity number at very small concentrations. *prakt. Chem*, 158, 130-135.
- (8) Marx, V. M. (1955). Viskosimetrische molekulargewichtsbestimmung von cellulose in kupfer-äthylendiamin. *Macromolecular Chemistry and Physics*, 16(1), 157-176.
- (9) Smith, D. K., Bampton, R. F., & Alexander, W. J. (1963). Use of new solvents for evaluating chemical cellulose for the viscose process. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 2(1), 57-62.
- (10) Sihtola, H., Kyrklund, B., Laamanen, L. & Palenius, I. (1963). Comparison and conversion of viscosity and DP-values determined by different methods. *Paperi ja puu*, 45, 225-232.
- (11) Hiraoki, R., Ono, Y., Saito, T., & Isogai, A. (2015). Molecular mass and molecular-mass distribution of TEMPO-oxidized celluloses and TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils. *Biomacromolecules*, 16(2), 675-681.

- (12) Kes, M., & Christensen, B. E. (2013). A re-investigation of the Mark–Houwink–Sakurada parameters for cellulose in Cuen: a study based on size-exclusion chromatography combined with multi-angle light scattering and viscometry. *Journal of Chromatography A*, 1281, 32-37.
- (13) Schult, T., Hjerde, T., Optun, O. I., Kleppe, P. J., & Moe, S. (2002). Characterization of cellulose by SEC-MALLS. *Cellulose*, 9(2), 149-158.
- (14) Paredez, A. R., Somerville, C. R., & Ehrhardt, D. W. (2006). Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science*, 312(5779), 1491-1495.
- (15) Ding, S. Y., & Himmel, M. E. (2006). The maize primary cell wall microfibril: a new model derived from direct visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(3), 597-606.
- (16) Nixon, B. T., Mansouri, K., Singh, A., Du, J., Davis, J. K., Lee, J. G., Slabaugh, E., Vandavasi, G.V., O'Neill, H., Roberts, E.M., Roberts, A. W., Yingling, Y. G. & Haigler, C. H. (2016). Comparative structural and computational analysis supports eighteen cellulose synthases in the plant cellulose synthesis complex. *Scientific reports*, 6, 28696.
- (17) Jarvis, M. C. (2013). Cellulose biosynthesis: counting the chains. *Plant physiology*, 163(4), 1485-1486.
- (18) Zhang, T., Zheng, Y., & Cosgrove, D. J. (2016). Spatial organization of cellulose microfibrils and matrix polysaccharides in primary plant cell walls as imaged by multichannel atomic force microscopy. *The Plant Journal*, 85(2), 179-192.
- (19) Silveira, R. L., Stoyanov, S. R., Kovalenko, A., & Skaf, M. S. (2016). Cellulose aggregation under hydrothermal pretreatment conditions. *Biomacromolecules*, 17(8), 2582-2590.
- (20) Saito, T., Kimura, S., Nishiyama, Y., & Isogai, A. (2007). Cellulose nanofibers prepared by TEMPO-mediated oxidation of native cellulose. *Biomacromolecules*, 8(8), 2485-2491.
- (21) Kamide, K., Miyazaki, Y., & Abe, T. (1979). Dilute solution properties and unperturbed chain dimension of cellulose triacetate. *Polymer Journal*, 11(7), 523-538.

## 第 8 章 総括

高分子を溶解して SEC/MALLS 分析を行うことで、高分子の絶対分子量や分子量分布だけでなく、コンフォメーションプロットから高分子の溶液中での分子構造や溶解状態に関する高分子材料の詳細な情報を得ることができる。本研究では第 2 章で示した通り、正確な濃度のセルロース溶液を調製することで SEC/MALLS 分析には必須であるセルロースの  $dn/dc$  値を 0.131 mL/g と決定することができた。

セルロースの  $dn/dc$  値を検証するにあたり、様々な高分子の  $dn/dc$  値を 2 つの測定方法から算出し比較することで、セルロースを含むグルコースを基本骨格とするキチン、アミロース、プルランの 1% LiCl/DMAc 溶液の  $dn/dc$  値には溶質濃度依存性があることがわかった。これは DMAc 中での LiCl と高分子の水酸基との相互作用の影響によるものであり、これがセルロースにおける Off-Line RI 測定の  $dn/dc$  値が希薄濃度で測定を行う SEC/MALLS 分析に適さない原因であることが判明した。さらに、このようなグルコースを基本骨格とする高分子の  $dn/dc$  値が同じ挙動及び近似値を示すことは、これらが 1% LiCl/DMAc 中で同じ溶解機構であることを示している。

第 3 章では、セルロースのモデル試料としてプルラン溶液の NMR 測定を行い、LiCl 有無による DMAc 中での化学シフト値を比較することで、セルロースの LiCl/DMAc 中での溶解機構の解明を検討した。その結果、すべてのグルコースユニットの水酸基と  $Li^+$  と  $Cl^-$  イオン間の相互作用が確認され、その相互作用が溶解状態を形成し、溶解後の安定した溶液状態を維持している要因であることが明らかになった。

第 4 章からは、EDA 浸漬法による前処理を行うことで、これまで 8% LiCl/DMAc に溶解できなかった針葉樹由来のパルプ、高結晶化度セルロース（ホヤセルロース、クラドフォラセルロース）、木粉から調製した少量のリグニンと多量のヘミセルロース成分を含有するホロセルロース等の試料の溶解が可能となり、様々な由来のセルロースおよびホロセルロース試料の SEC/MALLS 分析が可能となった。その結果、絶対分子量と分子量分布測定だけでなく、セルロース成分の溶液中での分子構造の特性を明らかにすることができた。ほぼ全てのセルロースの分子量プロットやコンフォメーションプロットは、由来に関わらず一致し、1% LiCl/DMAc 中でセルロースはフレキシブルな直鎖ランダムコイル状であることが明らかになった。しかし、針葉樹由来のセルロース試料のみは他の試料と分子量プロットも一致せず、コンフォメーションプロットも分岐構造を示した。この分岐構造は、製紙用クラフトパルプー漂白工程後、ホロセルロースの濃アルカリ抽出後、希酸加水分解後も維持されていたが、針葉樹由来でも溶解パルプのみは直鎖ランダムコイル状であった。

スギホロセルロースの分岐構造は希酸加水分解後に脱リグニン処理を行い、最後にアルカリ処理を行うことにより分岐構造は効果的に除去することができた。これは溶解パルプの製造工程とほぼ同様の処理順序であり、アルカリ処理前に希酸加水分解ー脱リグニン処理を行

う必要があった。この針葉樹特有の分岐構造は構成糖分析や SEC/MALLS/UV 検出器の測定結果からセルロースーリグニン-グルコマンナン間の化学結合による構造であると推察できる。グルコマンナンがヘミセルロース主成分であることは針葉樹の特徴であり、このような結合が針葉樹の力学的強度に寄与し、針葉樹の高い樹高や長寿命の一因となっているのではないかと考えられる。

セルロースーリグニン-グルコマンナン結合は、木化の際に形成されるリグニン-多糖間の  $\alpha$ -エーテル結合であると推察され、非フェノール型リグニンであればこの結合はアルカリ条件下で安定だが、第 6 章で述べたように、フェノール型リグニンにおいてはアルカリ条件下でキノンメチド構造を経て、 $\alpha$ -エーテル型リグニン/多糖結合は切断される。木材チップあるいは木粉を最初に加熱下で酸処理することによりフェノール型リグニンが増加し、続く希アルカリ抽出処理でリグニン/多糖の結合が切断され、セルロースの分岐構造が無くなるのではないかと推察することができるが、これについてさらなる検証が必要である。

広葉樹ヘミセルロースの主成分であるキシランには C6-OH が無いため、グルコマンナンのようなリグニンとの  $\alpha$ -エーテル結合の確率は低い。そのため広葉樹由来のセルロース試料にはセルロースーリグニン間の化学結合の存在を示す結果は得られているが、セルロースーリグニン-キシランのような分岐構造は無いと考えられる。

このような樹種の種類あるいはパルプ化-漂白工程順序の最適化は、ヘミセルロースやリグニンのパルプ化漂白工程における効率的な除去、あるいは残存による強度維持など、合成高分子材料とは異なる天然高分子材料特有の性能制御方法である。

第 7 章においては、SEC/MALLS に HPLC オンライン粘度検出器を組み込み、粘度と分子量を同時に測定し、セルロース/1% LiCl/DMAc 溶液の Mark-Houwink-Sakurada プロットを作成した。その結果、静的光散乱法による慣性半径から得られた結果と粘度法により得られたセルロース試料の分子構造結果は一致した。このように異なる測定方法でも同じ結果が得られたことは、両者の構造評価結果は正しいということを裏付けている。また、直鎖ランダム状と分岐状のセルロース試料では 1% LiCl/DMAc 中の Mark-Houwink-Sakurada プロットは当然ながら異なっていた。これは、セルロース試料の粘度法分子量測定に一般的に用いられている 0.5M 銅エチレンジアミン溶液についても同じであると考えられる。銅エチレンジアミン溶液中の針葉樹由来の試料は LiCl/DMAc 中と同様に分岐状である可能性があり、直鎖状の広葉樹パルプと分岐状の針葉樹パルプを同じ式を用い分子量を算出し、比較することは避けるべきである。

様々な由来のセルロース試料の分子量測定を行った今回の実験結果をまとめると、一見同じように見えるパルプ試料の SEC/MALLS 分析や構成糖分析を行うとその由来や処理履歴などをある程度推測することもできる (Figure 8-1)。

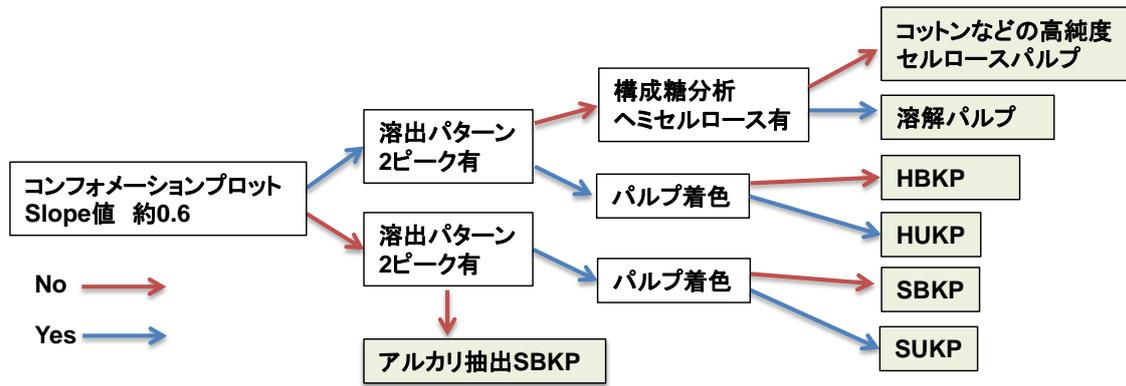


Figure 8-1 パルプ判別フローチャート

高分子の分子構造はレーザーやX線などによる間接的な方法でしか観測することができない。そのため、その解析においては慎重に行う必要がある。SEC/MALLS 分析による高分子の分子構造解析方法は確立されてはいるものの、溶質と溶媒固有の  $dn/dc$  値や第2ビリアル係数  $A_2$  などの定数は正確な値を用いなければ間違った結果を導きだしてしまう。同様に、測定試料においても慎重に調製しなければならない。目視レベルでは十分溶解していても、分子レベルで絡まっていると、SEC/MALLS 測定には不十分な分子分散状態であり、正確な測定結果は得られない。SEC/MALLS 測定を行うと、試料や定数の正誤に関わらず、なにがしかの値が算出されてしまうため、得られた値については慎重に評価しなければならない。

セルロースの  $dn/dc$  値を  $0.131\text{mL/g}$  と決定するにあたり、セルロース以外の高分子の  $dn/dc$  値の測定や測定方法の検証などの多くの裏付け実験を行った。この係数を用いて様々なセルロース試料の SEC/MALLS 分析を行うと分子量や試料濃度などの測定結果は驚くほど想定した値と一致した。プルランなどの他の高分子試料においても正しい  $dn/dc$  値を用いると同様に想定される結果が得られた。矛盾のない結果が得られることはその結果の真偽を因るにあたり重要である。一方、針葉樹由来のセルロース試料が分岐構造であるという結果は直鎖構造であるはずのセルロース分子において不可解な結果ではあった。しかし、SEC/MALLS と UV 検出器の組み合わせや構成糖分析の結果からセルロースーリグニンーグルコマンナン結合による分岐構造であることが示唆された。このように、一つの分析方法では解明できない結果も他の分析結果からその原因や理由を導きだすことができる。また、このような予想外の結果が得られた場合は、必ず原因（測定において何かが間違っている、想定外の事が検出されている）はあり、その原因を解明する事により真実に近づくことができる。植物由来のセルロースを主成分とする天然高分子材料の分子構造は未だ解明されていない点が多くあり、本研究が今後の構造解析に貢献することができれば幸いである。

## 投稿論文・学会発表

### 投稿論文

Ono, Y., Hiraoki, R., Fujisawa, S., Saito, T., & Isogai, A. (2015). SEC-MALLS analysis of wood holocelluloses dissolved in 8% LiCl/1, 3-dimethyl-2-imidazolidinone: challenges and suitable analytical conditions. *Cellulose*, 22(5), 3347-3357.

Ono, Y., Ishida, T., Soeta, H., Saito, T., & Isogai, A. (2015). Reliable dn/dc values of cellulose, chitin, and cellulose triacetate dissolved in LiCl/N, N-dimethylacetamide for molecular mass analysis. *Biomacromolecules*, 17(1), 192-199.

Ono, Y., Tanaka, R., Funahashi, R., Takeuchi, M., Saito, T., & Isogai, A. (2016). SEC-MALLS analysis of ethylenediamine-pretreated native celluloses in LiCl/N, N-dimethylacetamide: softwood kraft pulp and highly crystalline bacterial, tunicate, and algal celluloses. *Cellulose*, 23(3), 1639-1647.

Ono, Y., Saito, T., & Isogai, A. (2017). Branched Structures of Softwood Celluloses: Proof Based on Size-Exclusion Chromatography and Multi-Angle Laser-Light Scattering. In *Nanocelluloses: Their Preparation, Properties, and Applications* (pp. 151-169). American Chemical Society.

Ono, Y., Furihata, K., Isobe, N., Saito, T., & Isogai, A. (2017). Solution-state structures of the cellulose model pullulan in lithium chloride/N, N-dimethylacetamide. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Ono, Y., Funahashi, R., Saito, T., & Isogai, A. (2018). Investigation of stability of branched structures in softwood cellulose using SEC/MALLS/RI/UV and sugar composition analyses. *Cellulose*, 10.1007/s10570-018-1713-7

Shi, Z., Yang, Q., Ono, Y., Funahashi, R., Saito, T., & Isogai, A. (2015). Creation of a new material stream from Japanese cedar resources to cellulose nanofibrils. *Reactive and Functional Polymers*, 95, 19-24.

Hiraoki, R., Fukuzumi, H., Ono, Y., Saito, T., & Isogai, A. (2014). SEC-MALLS analysis of TEMPO-oxidized celluloses using methylation of carboxyl groups. *Cellulose*, 21(1), 167-176.

Hiraoki, R., Ono, Y., Saito, T., & Isogai, A. (2015). Molecular mass and molecular-mass distribution of TEMPO-oxidized celluloses and TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils, *Biomacromolecules*, 16(2), 675-681.

Tanaka, R., Saito, T., Hänninen, T., Ono, Y., Hakalahti, M., Tammelin, T., & Isogai, A. (2016). Viscoelastic properties of core-shell-structured, hemicellulose-rich nanofibrillated cellulose in dispersion and wet-film states. *Biomacromolecules*, 17(6), 2104-2111.

Funahashi, R., Ono, Y., Qi, Z. D., Saito, T., & Isogai, A. (2017). Molar Masses and Molar Mass Distributions of Chitin and Acid-Hydrolyzed Chitin. *Biomacromolecules*.

Funahashi, R., Ono, Y., Tanaka, R., Yokoi, M., Daido, K., Inamochi, T., ... & Isogai, A. (2017). Changes in the degree of polymerization of wood celluloses during dilute acid hydrolysis and TEMPO-mediated oxidation: Formation mechanism of disordered regions along each cellulose microfibril. *International Journal of Biological Macromolecules*.

Hiraoki, R., Tanaka, R., Ono, Y., Nakamura, M., Isogai, T., Saito, T., & Isogai, A. (2018). Determination of length distribution of TEMPO-oxidized cellulose nanofibrils by field-flow fractionation/multi-angle laser-light scattering analysis. *Cellulose*, 1-8.

Jiang, J., Ye, W., Yu, J., Fan, Y., Ono, Y., Saito, T., & Isogai, A. (2018). Chitin Nanocrystals Prepared by Oxidation of  $\alpha$ -Chitin using the O<sub>2</sub>/Laccase/TEMPO System. *Carbohydrate Polymers*.

## 学会発表

### 【ポスター発表】

小野 祐子, 福井 俊介, 舟橋 龍之介, 齋藤 継之, 磯貝 明 「SEC/MALLS/UV 測定による TEMPO 酸化セルロースの構造解析」セルロース学会第 23 回年次大会, つくば, 2016 年 7 月 14 ~15 日

【口頭発表】小野 祐子, 齋藤 継之, 磯貝 明 「セルロース系試料の SEC/MALLS 測定による構造解析」第 84 回紙パルプ研究発表会, 東京, 2017 年 6 月 21~22 日

【ポスター発表】 Y. Ono, K. Furihata, N. Isobe, T. Saito, A. Isogai, “Solution-state structures of pullulan and cellulose in LiCl/DMAc”, The 4th International Cellulose Conference, Fukuoka, JP, October 17-20, 2017

## 謝辞

本博士論文は東京大学大学院農学生命科学研究科 生物材料科学専攻 製紙科学研究室において、特任専門職員としての5年間の雇用期間の研究をまとめたものです。ここに研究を行う上でご指導ご協力を賜りました多くの方々に心より御礼申し上げます。

このような研究をさせていただく貴重な機会を与えて下さった製紙科学研究室 磯貝明教授に心から感謝申し上げます。

指導教官の磯貝先生からは、本研究の意義、方向性等をご教示いただきながら、それ以上に試行錯誤する中での困難な課題を解決する楽しさ、やりがい、勉強する意欲など大変多くの事を学び習得させていただきました。齋藤継之准教授からのご助言は、一度立ち止まり、振り返り、新たな視点から見直す有用な機会を与えてくださいました。木村実特任教授からは、試料調製方法などの基本的な事から始まり、研究への熱意など多くのご指導を賜りました。竹内美由紀特任助教は、実験手法の確立やデータ解析方法などのご指導だけではなく、実験結果についても多くのご助言をいただき、励ましてくださいました。藤枝志野氏は、私が製紙科学研究室で行っていた事務業務を引き継いでくださり、3年半の間、研究に専念することができました。製紙科学研究室の卒業生並びに在校生の皆様には、研究のみならず、言い尽くせないほどの様々な面でご協力していただきました。NMR 測定においては、先端機器分析室 降旗一夫博士、 $dn/dc$  値測定においては昭光サイエンス株式会社 中村雅英氏のご指導、ご協力をいただきました。皆様には、ここに心より謝意を表します。

本論文の副査をお引き受けいただいた松本雄二教授、横山朝哉准教授、齋藤継之准教授、東京農業大学 石井大輔准教授からは多くのご助言をいただき、深く感謝申し上げます。

大学受験と高校受験で頑張る姿から今回の博士号取得を目指す勇気を与えてくれた息子悠太、娘 菜々実、様々な面で理解を示してくれた夫 克正さんに感謝します。最後に、これまで大切に育て、見守り続けてくれた父、母に感謝いたします。

平成 30 年 3 月

小野 祐子