

ブナ磨砕リグニンのエポキシ樹脂包埋及び

薄切による紫外線顕微分光

藤 井 智 之⁽¹⁾

FUJII, Tomoyuki: Ultraviolet Microphotometrical Analysis of
Beech Milled-Wood-Lignin by Epoxy-Embedding and
Thin-Sectioning Methods

要 旨: エポキシ樹脂の硬化剤の調合比を 0.125% に減じて、これに粉体のブナ磨砕リグニン (MWL) を昇温しながら攪拌することによって溶解した。MWL 濃度の異なる試料を調製し、硬化後、切り出した薄切片を濃度の順に積層し、さらに、この積層方向に対して直角方向に薄切片を 0.5~6.0 μm の異なる厚さで作製した。これによって一定の厚さの切片内に濃度の異なる部分がストリップ状に並んだ試料を調製した。これらの試料の紫外線吸収スペクトルを紫外線顕微分光装置で測定した。

それらの紫外線吸収スペクトルはジオキサン溶液中で測定した MWL のそれとほぼ同じであったが、吸収極大はやや長波長側に移行した。紫外線吸収は、MWL 濃度及び切片の厚さが大となるにつれて直線的に増大した。しかし、吸光度が高くなる条件では直線からはずれ、吸光度は低くなる傾向を示した。

1. 緒 言

細胞壁中に存在するリグニンの分布濃度やその性質は構成要素間や細胞壁層間で異なる。このことは木材のパルプ化を始め蒸煮・爆砕や有機溶媒等でリグニンを分離するうえで、リグニンの挙動や溶出速度に大きな影響を及ぼす。このリグニンの分布における不均一性を明らかにするために、Goring のグループは紫外線顕微分光法と薄切片法とを組み合わせることによって、木材の細胞壁中のリグニン濃度の面分布や、細胞壁中の各壁層の紫外線スペクトラムを得て、木材細胞壁中のリグニンの分布様式や各部位におけるリグニンの特性を詳細に検討してきた (SCOTT et al., 1969; FERGUS et al., 1969)。この方法を応用した研究が数多く発表されてきているが、リグニン濃度の定量性に問題が残されている (例えば STEPHEN, 1982)。HARDELL (1980), BOUTELJE ら (1982), そして Whiting ら (1982) は二次壁と複合細胞間層のそれぞれに含まれるリグニンの濃度の定量及び化学的特性の解明のために、物理的及び化学的またはそれらを組み合わせた手法を用いて木材を構成要素ごとや壁層ごとに分別し、それぞれの分画中のリグニンの特性を分析している。

一般的に知られているリグニンの紫外線吸収の性質は、化学的に単離されたリグニンの溶液状態でのものであり、固体状態で木材細胞壁中存在するリグニンのそれとは異なっているはずである。そこで、

紫外線顕微分光法で、細胞壁中に固体状態で存在するリグニンの濃度や性質を正確に測定することが可能か否かを検討することを目的として、通常の紫外線顕微分光法のための試料の作製時に包埋剤として用いられるエポキシ樹脂にブナの磨砕リグニン（以下 MWL と略す）を溶解し、エポキシ樹脂を硬化して、固体状態にしたリグニンの紫外線光学的性質を調べた。その結果として、木材細胞壁中におけるリグニンの濃度分布及び組成の紫外線顕微分光法による測定可能範囲及びその限界が明らかになると考えた。

試料の提供及び実験の遂行上多大のご援助及びご助言をいただいた須藤賢一博士に心から感謝の意を表する。

2. 試料及び実験方法

2.1 材 料

ブナの本粉から通常の方法 (Björkman, 1956) に従って抽出した MWL を用いた (Sudo et al., 1985)。この MWL のクラースンリグニン含有率は 83.8% である。

使用したエポキシ樹脂は日新 EM 社製のもので、Table 1 に示したように調合して用いた。

2.2 試 料 調 製

実験室内で秤量したプラスチック容器に所定量の MWL をとり、そこにエポキシ樹脂を加えた。試料調製の概略を模式図に示す (Fig. 1)。Table 2 に各試料の MWL 及びクラースンリグニンの濃度を示す。

2.3 薄 切 及 び 積 層

5.1% から 58.8% の MWL を含むエポキシ樹脂の試料ブロックからガラスナイフを装着した回転式マイクロトームを用いて、約 5 mm 四方の切片を 10 μm の厚さで切り出した。MWL 濃度の異なる切片を順次エポキシ樹脂ブロックに載せ、瞬間接着剤（シアノアクリレート樹脂）を滴下し、圧縮・硬化させた。この積層試料から超マイクロトーム (LKB IV型 2128) にガラスナイフを装着して、各積層切片に垂直な面の切片を、0.5, 1.0, 2.0, 4.0 及び 6.0 μm の各厚さで切り出した。これらの切片は MWL 濃度の異なる部分が幅 10 μm のストリップ状に並んだものとなる。このようにして調製した切片を石

英スライドガラスに載せ、無蛍光グリセリンで封入して、石英カバーガラスを載せた後、紫外線顕微分光装置で測定した。

2.4 顕 微 分 光 法

紫外線吸収スペクトルは、デスクトップ・コンピュータ (HP-9824 A) を装備した紫外線顕微分光装置 (Carl Zeiss MPM-03) で測定した。波長走査プログラム “Lambda-scan” を用いて、測定径 0.5 μm 、測定波長幅 5 nm、測定波長範囲 250~290 nm で、1 nm ごとに

Table 1. エポキシ樹脂の調合比
Recipe of epoxy resin mixture.

試薬 Chemicals	分量 Measure
Quetol 812	100 ml
DDSA	25 ml
NMA	75 ml
DMP-30	0.25 ml

* 日新 EM 社製エポキシ樹脂セット Quetol 812 セットを使用

Quetol 812 set (Nisshin EM Co., Ltd) was used.

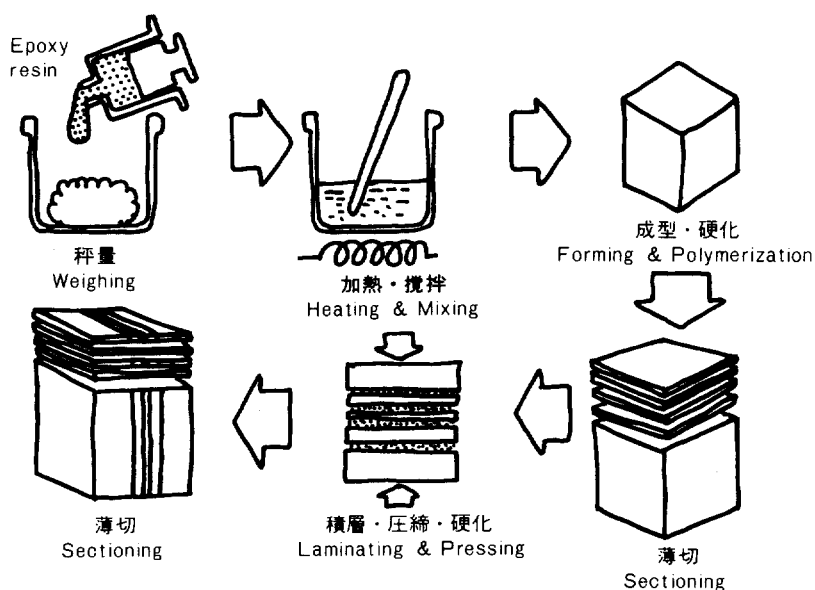


Fig. 1. 試料調製法
Sample preparation method.

Table 2. エポキシ樹脂と MWL の混合比率
Mixing ratio of epoxy resin and MWL by weight.

MWL (Wmwl)	樹脂 Resin (We)	総重量 Total weight (Wt)	MWL 濃度 MWL content (Wmwl/Wt)	リグニン 濃度 Lignin content
(g)	(g)	(g)	(%)	(%)
0.1315	2.4347	2.5662	5.1	4.3
0.1305	1.2232	1.3537	9.6	8.1
0.3038	1.2122	1.5160	20.0	16.8
0.5189	1.2057	1.7246	30.1	25.2
0.7830	1.2143	1.9973	39.2	32.9
0.6038	0.6071	1.2331*	49.0	41.0
0.9022	0.6078	1.5348*	58.8	49.3

* MWL 濃度 49.0% と 58.8% の試料については、MWL をジオキサンに溶解した後にエポキシ樹脂に混合したので、硬化終了後に総重量を測定した。

* Total weight of the samples was measured after polymerization, because MWL was dissolved in 90% aq. dioxane before mixing with epoxy resin.

連続的に測光した。平均化することによって測定値のばらつきを小さくするために、各波長での測定を 50 回繰り返し、その平均値をとった。厚さ $2.0\mu\text{m}$ の切片で、MWL を含まないエポキシ樹脂のみの部分を 50 回繰り返し測定してその平均値をとると、波長 250 nm から 290 nm までの範囲で吸光度はほぼ 0 となった。

3. 結果と考察

3.1 エポキシ樹脂への重合加速剤の調合比

MWL をエポキシ樹脂に溶解させるためには 80°C 程度にまで加熱する必要があった。この温度では、重合加速剤 DMP-30 を樹脂全体に対して 1.5% 添加する通常の調合比を用いると、10 数分間の加熱で樹脂が硬化し始めたため、粉体の MWL とエポキシ樹脂の攪拌が十分にできなかった。そこで、攪拌時間を十分にとるために、重合加速剤の添加量を減らした調合比を検討した。

Quetol 812, DDSA, MNA を混合し、脱気した後、20 ml ずつ分け取り、それぞれに DMP-30 を 0.2 ml (1%), 0.1 ml (0.5%), 0.05 ml (0.25%), 0.025 ml (0.125%) 加えて、十分に混合してから脱気した。それぞれの混合樹脂から 1~2 ml を小容器に分け取り、80°C の恒温器内で樹脂の硬化の進行状況を観察した。どの条件の樹脂も、初期においては温度の上昇とともに低粘度化したが、DMP-30 の添加量が多いほど重合・硬化が速く進行した。DMP-30 を 0.125% と 0.25% 加えた樹脂では、80°C で 30 分間の加熱後も粘度は低く硬化は非常に遅かった。十分な硬化には 60°C で 3 日間の加熱が必要であった。

3.2 MWL とエポキシ樹脂の混合

Table 3 に示す四つの方法で MWL とエポキシ樹脂を混合した。すなわち、MWL を有機溶媒中に溶解させた状態または粉体の状態で、調合直後のエポキシ樹脂と加熱下で混合し、真空ポンプで減圧脱気後、加熱硬化させた。方法 1 と方法 4 の場合、混合樹脂を加熱重合させる途中で脱気したところ、著しく気泡が発生したが、DMP-30 の添加量が 0.125% の樹脂では硬化が進行する以前に気泡が消えた。方法 2 と方法 3 では気泡の発生量は少なかった。MWL 含有率 40% 以下の試料調製は方法 3 で可能であり、有機溶媒を加える必要はなかった。エポキシ樹脂と MWL との混合時間を十分にとるために、

Table 3. MWL とエポキシ樹脂の混合方法
Methods tried for mixing MWL with epoxy resin

No.	混 合 方 法 Methods tried for mixing
1.	MWL を 1,2-ジクロロエタン：エタノール (2:1) に溶解し、エポキシ樹脂と混合 Solution of MWL in 1,2 di-chloroethan/ethanol (2:1) was mixed with epoxy resin
2.	MWL を 1,2-ジクロロエタン：エタノール (2:1) に溶解し、風乾した後、エポキシ樹脂と混合 Solution of MWL in 1,2 di-chloroethan/ethanol (2:1) was air-dried and then mixed with epoxy resin
3.	MWL を粉体の状態でエポキシ樹脂に混合 MWL powder was mixed with epoxy resin
4.	MWL を 90% ジオキサン-水に溶解し、エポキシ樹脂と混合 Solution of MWL in 90% dioxane aq. was mixed with epoxy resin

3.1 で述べたように、硬化条件を検討し、DMP-30 の添加比率を 0.125% とした。MWL 自体がラジカル反応を始める性質を持っているとされるので、DMP-30 を添加しない条件を検討することが必要であろう。MWL 含有率 50% と 60% の試料調製には、3 の方法ではエポキシ樹脂に対する粉体の MWL の量が多すぎて、エポキシ樹脂のゲル化までの間に十分な攪拌ができなかった。そこで、4 の方法によって MWL を 90% ジオキサン水溶液に高濃度に溶解した後、エポキシ樹脂に混合した。

MWL 高濃度の試料では、樹脂の硬化速度も速く、かつ硬化後の樹脂も脆くなる傾向がみられた。MWL を 90% ジオキサンに溶解してからエポキシ樹脂に混合した 4 の方法による試料では、樹脂の硬化後も若干の柔軟性が保持されており、薄切に適していた。

3.3 エポキシ樹脂包埋 MWL の UV スペクトル

ジオキサン溶液の MWL の UV スペクトルは 258 nm に吸収の極小があり、275 nm 近辺に弱い肩を持ち、278 nm に吸収の極大を示していた (Fig. 2)。これに対して、エポキシ樹脂包埋 MWL の UV スペクトルは 260 nm に吸収の極小、275 nm に弱い肩、そして 280 nm に吸収極大があり (Fig. 3)、ジオキサン溶液中の MWL のスペクトル (Fig. 2) に比べて吸収極大が長波長側に 2 nm 移動し、また、吸収極大の現れ方がやや不鮮明であった。

このような UV スペクトルの変化は、MWL の質的变化による可能性もある。しかしそれ以上に、分光装置の測定条件の違い、つまり、顕微分光装置の光源強度の波長分布が測定波長域で著しく変化していること及び設定した測定波長幅が 5 nm と広くて吸収極大を不鮮明にしている可能性が大きい。

エポキシ樹脂に混合する MWL の濃度を高くしても UV スペクトルは変化しなかった。つまり、それぞれの厚さの切片内で、MWL 濃度の異なる切片の UV スペクトルを比較したとき、280 nm の吸収極大及び 275 nm の弱い肩の位置は移動していなかった (Fig. 3a-e)。従って、この濃度の範囲においては、MWL はエポキシ樹脂中の濃度が異なってもその紫外線吸収の性質は変わらないことが明らかである。

3.4 MWL の濃度と切片の厚さ

0.5 μm から 6.0 μm のそれぞれの厚さの切片内では、MWL 濃度と 280 nm での紫外線吸光度の関係はほぼ直線関係であった (Fig. 4)。ただし、MWL 濃度 60% の試料及び UV 吸光度

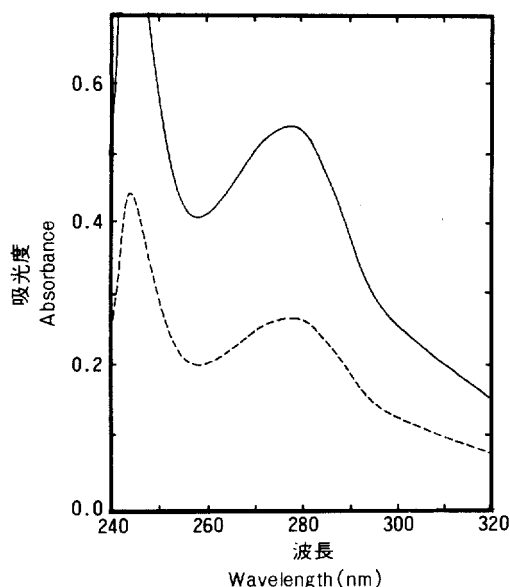


Fig. 2. MWL の UV スペクトル
UV-spectrum of MWL.

90% ジオキサン水溶液に MWL 濃度 4.6% で溶液を調製し、Shimazu UV-250 を用いて測定した。破線は縦軸 (吸光度) を 1/2 に縮めた場合のスペクトルを示す。

Ultraviolet spectrum of 4.6% MWL solution in 90% aq. dioxane measured with Shimazu UV-250. A broken line shows the spectrum on the reduced scale of one half in Y-axis (Absorbance).

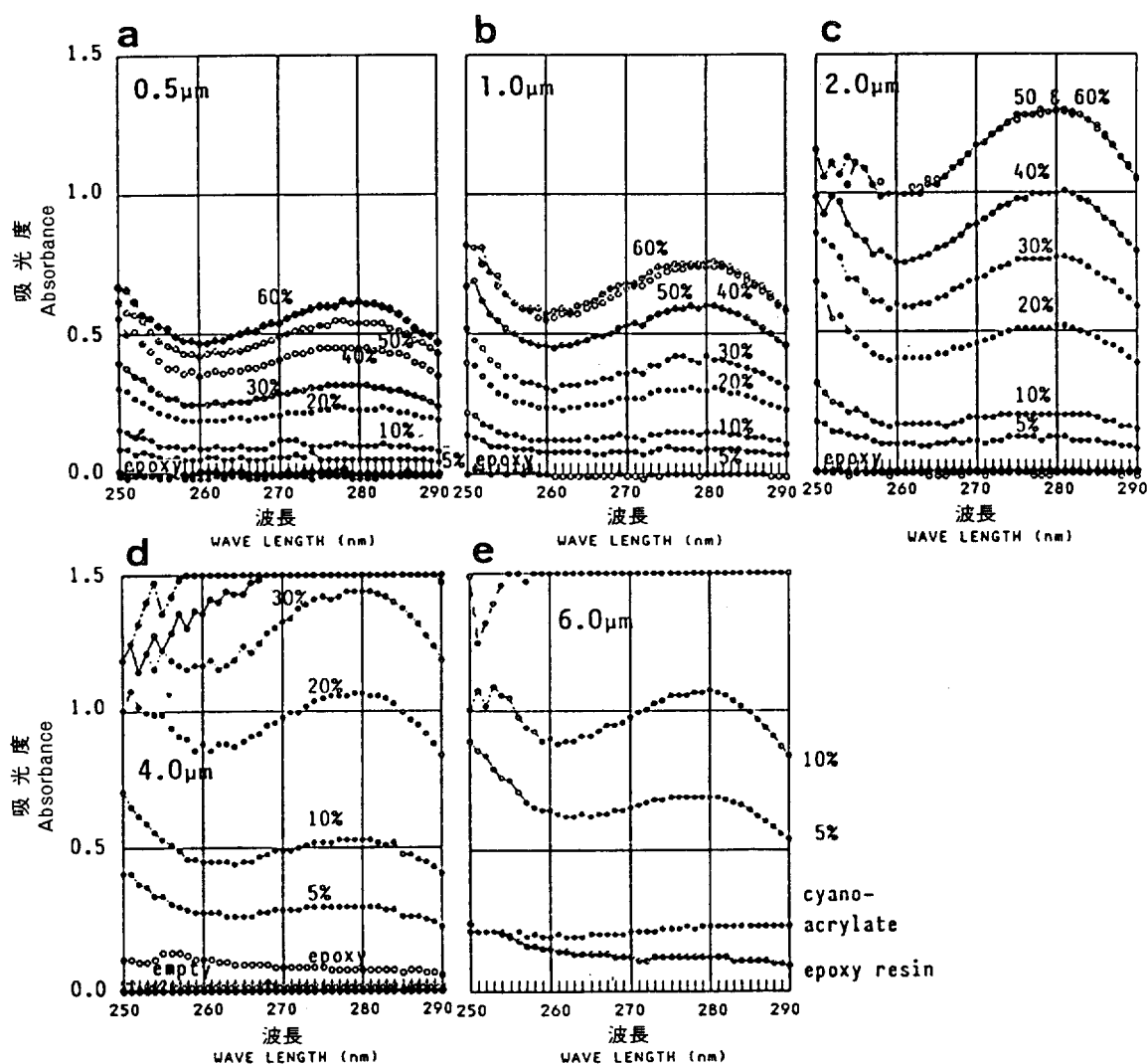


Fig. 3. エポキシ樹脂包埋 MWL の UV スペクトル

UV-spectrum of epoxy-embedded MWL.

0.5 μm (a) から 6.0 μm (e) までの各厚さの切片において, MWL 濃度の異なる試料 (5% から 60% まで), MWL を含まないエポキシ樹脂 (epoxy), 及び封入剤の無蛍光グリセリン (empty) の部分の UV スペクトルを測定した。

Ultraviolet spectra of MWL embedded in epoxy resin in each thickness (a-e) and each MWL-concentration (5%-60%), and also of pure epoxy resin and mounting medium.

切片の厚さは次のとおり :

Thickness of sections :

a : 0.5 μm , b : 1.0 μm , c : 2.0 μm , d : 4.0 μm , e : 6.0 μm .

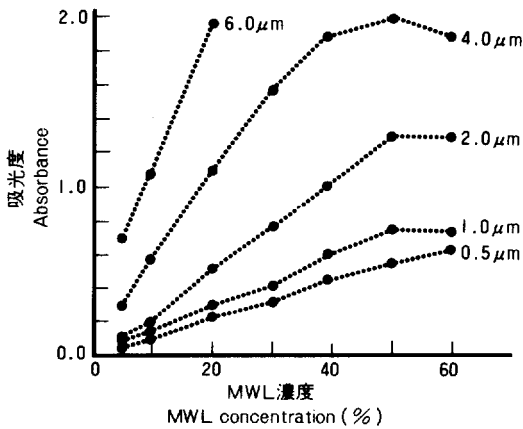


Fig. 4. MWL 濃度と 280 nm での UV 吸光度の関係

The relationship between MWL concentration and UV-absorbance at 280 nm.

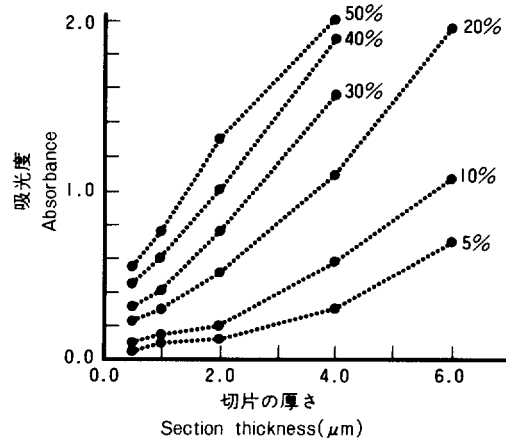


Fig. 5. 切片の厚さと 280 nm での UV 吸光度の関係

The relationship between section-thickness and UV-absorbance at 280 nm.

が 1.8 を超える測定領域では測定結果は関係直線よりも低かった。

一方, MWL 濃度 5~60% のエポキシ樹脂包埋試料のいずれについても紫外線吸光度は切片の厚さの増加とともに高くなった (Fig. 5)。しかし, その関係は直線関係ではなく, 二次曲線であり, Lambert-Beer の法則には従っていなかった。

従って, 厚さの異なる切片間の測定値を直接比較することは誤った結論を導き出すことになる。しかし, 切片の厚さを一定として, リグニン濃度と UV 吸光度の間に直線関係が成り立つ条件で測定すれば, 顕微分光法は細胞壁中のリグニン量を高精度で測定できる方法である。

4. 引用文献

- BJÖRKMAN, A.: Studies on finely devided wood. Part 1 Extraction of lignin with neutral solvents, *Svensk Papperstidning*, **59**, 477-486 (1956)
- BOUTELJE, J.B. *et al.*: An UV-microscopy study of lignin in middle lamella fragments from fibers of mechanical pulp of spruce, *Svensk Papperstidning*, **84**, R 39-42 (1982)
- FERGUS, B.J. *et al.*: The distribution of lignin in sprucewood as detected by ultraviolet microscopy, *Wood Sci. Technol.*, **3**, 117-138 (1969)
- HARDELL, H.-L. *et al.*: Variation in lignin structure in defined morphological parts of spruce, *Svensk Papperstidning*, **82**, 44-49 (1980)
- SCOTT, J.A.N. *et al.*: The application of ultraviolet microscopy to the distribution of lignin in wood—Description and validity of the technique, *Wood Sci. Technol.*, **3**, 73-92 (1969)

- STEPHEN, Y.L. : Derivative ultraviolet spectroscopy of lignin and lignin model compounds—a new analytical technique, *Svensk Papperstidning*, **84**, R 162-171 (1982)
- SUDO, K. *et al.* : Characterization of steamed wood lignin from beech wood, *Holz-forschung*, **39**, 281-288 (1985)
- WHITING, P. *et al.* : Chemical characterization of tissue fractions from the middle lamella and secondary wall of black spruce tracheids, *Wood Sci. Technol.*, **16**, 261-267 (1982)

Ultraviolet Microphotometrical Analysis of Beech Milled-Wood-Lignin by Epoxy-Embedding and Thin-Sectioning Methods

FUJII, Tomoyuki⁽¹⁾

Summary

A method for embedding and thin-sectioning beech wood MWL (milled wood lignin) in epoxy resin was investigated for the purpose of studying their UV spectrum in the same solid state as lignin in wood cell-walls.

MWL was easily mixed in the epoxy resin and dissolved in an oven at 80°C, when the amount of accelerator added to the mixture of epoxy resin was reduced to 0.125%. Sections 10 μm thick were cut from the epoxy-embedded blocks. Then they are laminated in the order of the concentration of MWL on a pure-epoxy-resin block and glued to form a sample block. From this block, sections 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 and 6.0 μm thick were cut. These sections consisted of narrow stripes of different MWL-concentration, which were uniform in thickness in each section.

The UV-spectrum of MWL embedded in epoxy resin resembled that of MWL solution in dioxane, but the absorption peak shifted slightly to a longer wavelength. The UV-absorbance increased with the concentration of MWL and also with the thickness of the sections. Within the range of MWL content by weight from 5 to 60% (4 to 49% of Klason lignin), the UV spectrum of MWL in epoxy resin is assumed to be unchanged by the concentration and by the section-thickness. The relationship of the MWL concentration to UV-absorbance was in a direct proportion with the exceptions of those in the measuring conditions higher than 1.8 in UV-absorbance and the sample of 60% MWL-content.

Received February 22, 1990

(1) Wood Technology Division

A part of this report was presented at 32th Lignin Symposium, October 1987 at Fukuoka. This work was aided by the Biomass Conversion Program of the Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries.