

博士論文

ビフェニル型構造の定量的分析による  
リグニンの分岐構造に関する研究

平山晴加

## 目次

1章 序論.....	1
1.1 リグニンの化学構造.....	2
1.2 リグニンの高分子構造に対するビフェニル型構造の影響.....	4
1.3 リグニンの高分子構造に関する既往の知見.....	6
1.4 ビフェニル型構造量に関する既往の知見.....	9
1.5 芳香核構造の構成比とビフェニル型構造量の関係に関する既往の知見.....	12
1.6 ビフェニル型構造の定量的解析手法.....	16
1.6.1 ニトロベンゼン酸化法の反応条件および改良型実験スキーム.....	16
1.6.2 リグニンモデル化合物のニトロベンゼン酸化.....	16
1.7 本研究の目的.....	18
1.8 本章の引用文献.....	20
2章 樹種間における GG 型ビフェニル型構造量の多様性.....	25
2.1 本章の背景および目的.....	26
2.2 実験.....	27
2.2.1 試料.....	27
2.2.2 ニトロベンゼン酸化法の分析手順.....	28
2.2.3 検量線の作成.....	29
2.3 結果と考察.....	36
2.3.1 ニトロベンゼン酸化生成物の GC 分析条件.....	36
2.3.2 樹種間におけるビフェニル型構造量の多様性.....	39
2.3.3 S/G 比と GG 型ビフェニル型構造量の関係.....	42
2.3.4 S/G 比とビフェニル型構造の形成頻度との関係.....	44
2.3.5 H/G 比と GG 型ビフェニル型構造量の関係.....	46
2.4 本章の結論.....	48
2.5 本章の引用文献.....	49
3章 縮合型 H 核のニトロベンゼン酸化による分析法の確立.....	51
3.1 本章の背景および目的.....	52
3.2 実験.....	53
3.2.1 HG 型および HH 型ビフェニル型モデル化合物のニトロベンゼン酸化.....	53

3.2.1.1	ビフェニル型モデル化合物の合成と予想されるニトロベンゼン酸化生成物の検討.....	53
3.2.1.2	ビフェニル型モデル化合物のニトロベンゼン酸化.....	57
3.2.1.3	ビフェニル型モデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の検討.....	58
3.2.2	H核型フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化.....	59
3.2.2.1	フェニルクマラン型モデル化合物の合成.....	59
3.2.2.2	フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化.....	61
3.2.2.3	フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の同定.....	62
3.2.2.4	検量線の作成.....	63
3.2.3	スギあて材のニトロベンゼン酸化.....	65
3.2.3.1	スギあて材のニトロベンゼン酸化.....	65
3.2.3.2	スギあて材のニトロベンゼン酸化生成物の同定.....	65
3.2.3.3	検量線の作成.....	67
3.3	結果と考察.....	70
3.3.1	HG型およびHH型ビフェニル型モデル化合物のニトロベンゼン酸化.....	70
3.3.1.1	ビフェニル型モデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の検討.....	70
3.3.1.2	HG型ビフェニル型モデル化合物を用いたニトロベンゼン酸化法の反応条件の検討.....	71
3.3.2	H核型フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化.....	72
3.3.2.1	フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の同定.....	72
3.3.2.2	フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の収率に対する反応時間の影響.....	76
3.3.3	スギあて材のニトロベンゼン酸化.....	78
3.3.3.1	スギあて材のニトロベンゼン酸化生成物の同定.....	78
3.3.3.2	スギあて材のニトロベンゼン酸化生成物のGC分析条件.....	84
3.3.3.3	スギあて材のニトロベンゼン酸化生成物の収率に対する反応温度の影響.....	86
3.4	本章の結論.....	89
3.5	本章の引用文献.....	90
4章	圧縮あて材におけるGG型およびHG型ビフェニル型構造量の分布.....	91
4.1	本章の背景および目的.....	92
4.2	実験.....	93
4.2.1	試料の調製.....	93

4.2.2	光学顕微鏡による組織観察.....	94
4.2.3	Klason 法.....	94
4.2.3.1	分析に供する木粉重量の検討.....	94
4.2.3.2	Klason 法の分析手順.....	95
4.2.4	メトキシ基の定量.....	96
4.2.5	圧縮あて材のニトロベンゼン酸化.....	96
4.3	結果と考察.....	97
4.3.1	光学顕微鏡による組織観察.....	97
4.3.2	Klason 法.....	99
4.3.2.1	分析に供する木粉重量の検討.....	99
4.3.2.2	あて樹幹内におけるリグニン含量の分布.....	100
4.3.3	あて樹幹内におけるメトキシ基含量の分布.....	102
4.3.4	ニトロベンゼン酸化法.....	103
4.3.4.1	あて樹幹内におけるニトロベンゼン酸化生成物の収率の分布.....	103
4.3.4.2	H/G 比と GG 型ビフェニル型構造量の関係.....	108
4.3.4.3	H/G 比と HG 型ビフェニル型構造量の関係.....	111
4.3.4.4	樹種間における H/G 比と GG 型および HG 型ビフェニル型構造量の関係.....	114
4.3.4.5	H/G 比とビフェニル形成頻度の関係.....	117
4.3.4.6	H/G 比とリグニンの枝分かれ頻度との関係.....	121
4.4	本章の結論.....	125
4.5	本章の引用文献.....	126
5 章	総括.....	131
	謝辞.....	135



# 第 1 章

## 序論

## 1.1 リグニンの化学構造

植物細胞壁の主要成分であるリグニンは、基本単位であるフェニルプロパン( $C_6-C_3$ )単位が、エーテル結合や炭素-炭素結合して形成する高分子である。基本単位は、芳香核構造の違いにより、*p*-ヒドロキシフェニル核(H 核)、グアイアシル核(G 核)、およびシリングル核(S 核)の3種類に分けられる(図 1-1)。これは、リグニン前駆体に *p*-クマリルアルコール、コニフェリルアルコールおよびシナピルアルコールの3種類があることに起因する(図 1-2)。針葉樹リグニンは G 核と少量の H 核で構成されるのに対し、広葉樹リグニンにはこれらに加えて S 核が樹種などの違いにより様々な含量で含まれる。また、草本や針葉樹あて材には H 核が比較的多く含まれる。

リグニンの基本単位は、最も主要な  $\beta$ -O-4 結合の他に  $\beta$ -5、 $\beta$ - $\beta$ 、5-5、4-O-5、 $\beta$ -1 など様々な結合様式により結合する(図 1-3)。これは、酵素などによる一電子酸化で生じたフェノキシラジカルは、混成共鳴体となるためである(図 1-4)。リグニンは、二つの混成共鳴体がラジカルカップリングすることで生長する。この時、メトキシ基で置換された芳香核部位でもラジカルカップリングする可能性はあるものの、同部位での結合はこれまで報告されていない[Dimmel 2010]。したがって、芳香核構造の構成比は、結合様式の割合に影響を与える要因の一つと想定される。

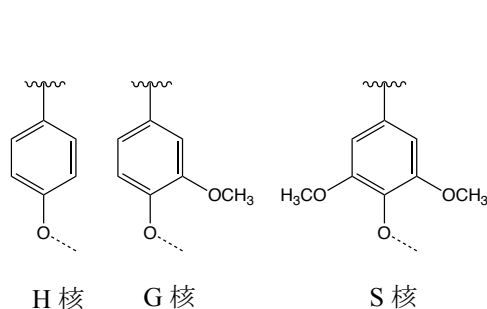


図 1-1 リグニンの芳香核構造。

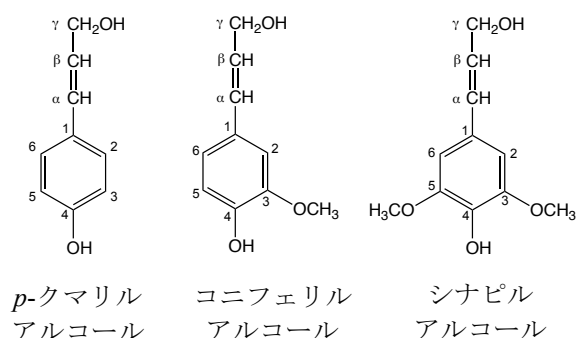


図 1-2 3 種類のモノリグノール。

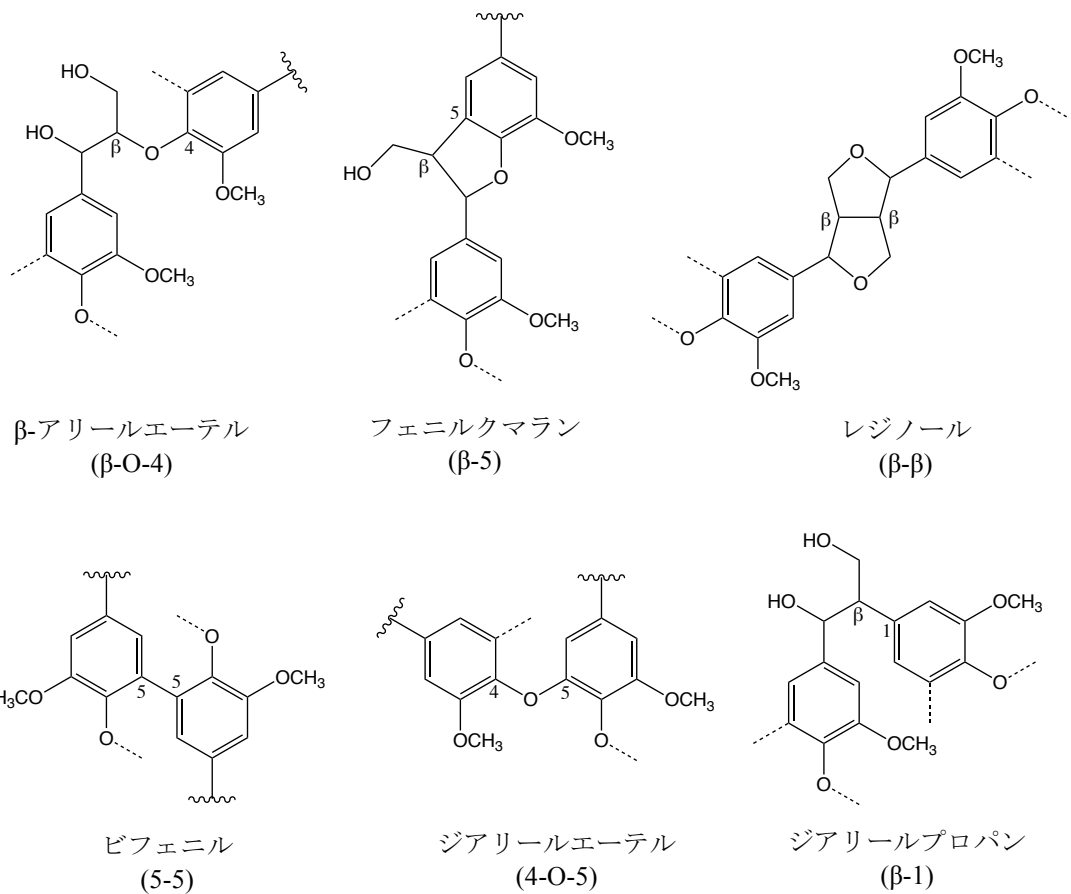


図 1-3 ラジカルカップリングにより形成したリグニンの様々な結合様式。

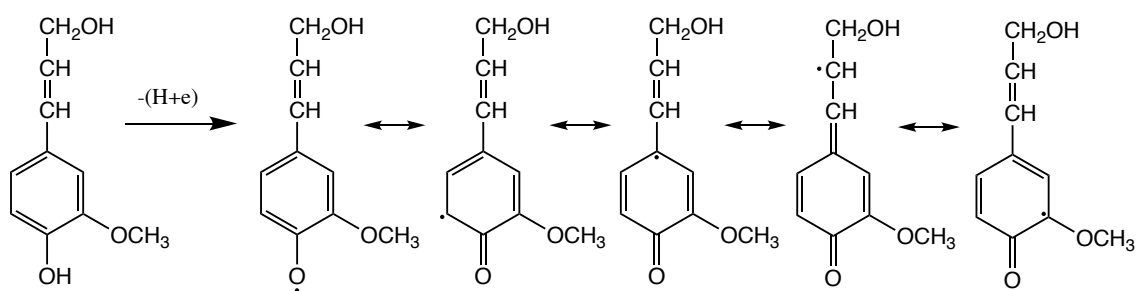


図 1-4 モノリグノールからラジカル混成共鳴体の生成。

## 1.2 リグニン的高分子構造に対するビフェニル型構造の影響

リグニン形成時、 $\beta$ -O-4 型構造やフェニルクマラン型( $\beta$ -5 型)構造が、高分子鎖の伸長を担い直鎖構造を形成するのに対して、ビフェニル型(5-5 型)構造やジアリールエーテル型(4-O-5 型)構造は、生長過程にある二つのリグニンの結合を可能にする結合様式として重要な構造である。このため、これら二つの結合様式は、リグニンの枝分かれの候補構造として認識されてきた。1.4 項で後述するように、ビフェニル型構造は、特に針葉樹リグニンにおいて主要な構造の一つと考えられる。ジアリールエーテル型構造も分岐候補として重要な構造であるが、その含有量はビフェニル型構造ほど高くはないと思われる[Li 2016, Yue 2016]。

ビフェニル型構造の生成機構、および想定される伸長機構を図 1-5 に示す。前述したように、リグニンのフェノール性水酸基が一電子酸化されると、ラジカル混成共鳴体が生成する。混成共鳴体が、5 位同士でカップリング重合すると、5-5 結合が形成される。最後に、5 位の水素が脱離することで芳香核が再生しビフェニル型構造(図 1-5-A)となる。ビフェニル型構造の一方のフェノール性水酸基が、伸長の起点として脱水素重合を繰り返すと Y 字型の分岐点になると考えられる(図 1-5-B)。ビフェニル型構造の二つのフェノール性水酸基が、それぞれ伸長の起点となり、モノリグノールと更なる脱水素重合を繰り返すと X 字型の分岐点になると考えられる(図 1-5-C)。また、ビフェニル型構造の一方のフェノール性水酸基が、モノリグノールと  $\beta$ -O-4 結合し、生成したキノンメチドの  $\alpha$  位にもう一方のフェノール性水酸基が付加すると、芳香核が再生しジベンゾジオキソシン構造が形成される(図 1-5-D)[Karhunen 1995]。ジベンゾジオキソシン構造は、Y 字型の分岐点になると考えられる。

ビフェニル型構造は、それを構成する芳香核構造の組み合わせにより、GG 型、HG 型および HH 型の 3 種類が報告されている(図 1-6)[Yamasaki 1971, Yamasaki 1972, Erickson 1973b, Saito 2005, Ralph 2006, Akiyama 2009]。

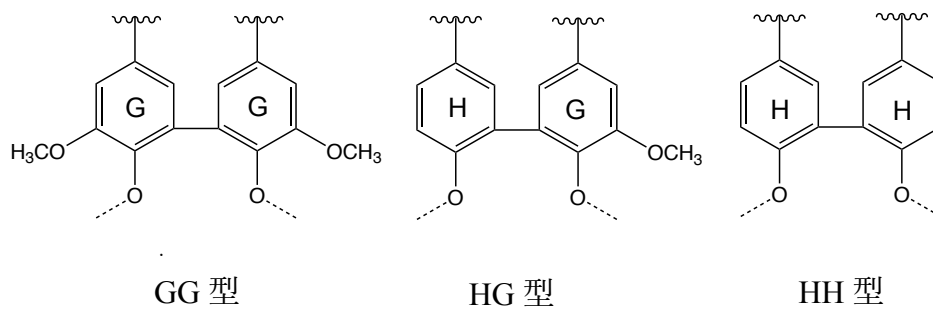
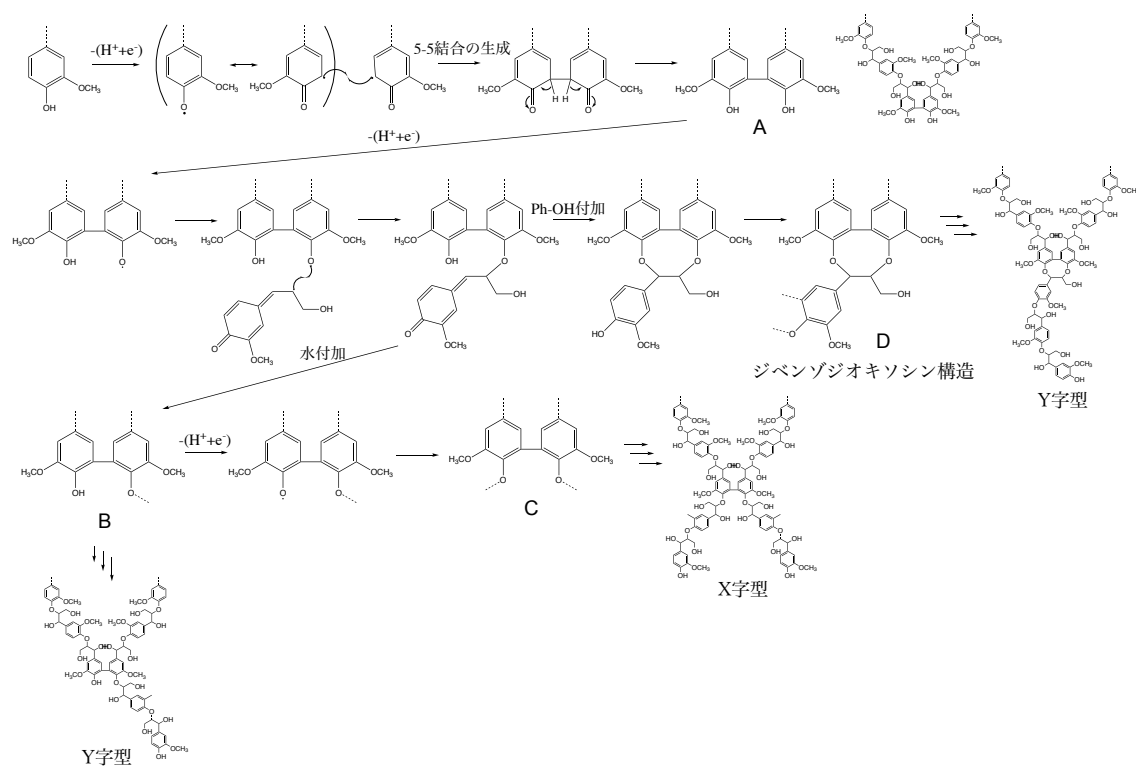


図 1-6 3 種類のビフェニル型構造。

### 1.3 リグニンの高分子構造に関する既往の知見

リグニンは、枝分かれの候補構造であるビフェニル型(5-5 型)構造やジアリールエーテル型(4-O-5 型)構造を含むことから、直鎖型ではなく非直鎖型の高分子を含むと推測される。ビフェニル型構造やジアリールエーテル型構造が分岐点となるには、これらのフェノール性水酸基は伸長の起点としてモノリグノールとさらに脱水素重合する必要がある(図 1-5)。両構造が分岐点として存在するか否かについて検討を行った過去の研究例を、リグニンの構造解析にしばしば用いられてきた試料の説明とともに以下に記す。

- MWL(Milled Wood Lignin): 木粉を振動式ボールミルで微粉碎した後、有機溶媒で抽出することにより得られるリグニン試料。単離過程における化学構造の変化が少なく、リグニン化学構造の解析には最良の試料と考えられている[黒田 2010]。しかし、磨砕の進行に従って、フェノール性水酸基量や  $\alpha$ -カルボニル基量が増加することが報告されている[Chang 1975]。また、MWL の収率は、Klason リグニン量の約 25%程度であり[Lundquist 1992]、MWL が全リグニンの平均的な構造を代表するものであるか否かについては未解決の状態にある[越島 1990]。例えば、シリングル/グアイアシル核比(S/G 比)の指標である S/V 比は、MWL で木粉よりもかなり低いことが報告されている[Lee 1981]。
- CEL(Cellulolytic Enzyme Lignin): ボールミルで微粉碎した木粉から、多糖類を酵素により分解して得られるリグニンに富んだ残渣。MWL と同様にもとのリグニン構造からの変化が少ないことに加え、MWL よりも収率が高いという利点がある。しかし、CEL も MWL と同様に磨砕処理を要することから、この過程でリグニンの化学構造は変化する可能性がある。
- 木粉: リグニン全体の化学構造を分析することができる。ただし、木粉試料を NMR 法で分析する際には、単離リグニンの分析時よりも感度が下がること、また木粉試料を完全に溶解するには磨砕処理が必要であり、この過程で化学構造が変化する可能性に注意を要する[Lu 2003]。

Crestini ら[Crestini 2011]は、トウヒとブナから単離したリグニン試料(MWL)を NMR 法および DFRC(Derivatization Followed by Reductive Cleavage)法で解析した。なお、DFRC 分解生成物の無水酢酸によるアセチル化は行っていない。その結果、ビフェニル型構造は、MWL において X 字型ではなく Y 字型の分岐点として存在する可能性が以下の結果から示唆された。二つのフェノール性水酸基がともに  $\beta$ -O-4 結合したビフェニル型構造由来の分解生成物(図 1-7-A)のピークは、 $^{31}\text{P}$ -NMR 法でほとんど検出されなかった。一方で、ジベンゾジオキソシン構造(図 1-5-D)の含有量は、QQ-HSQC 測定で 0.033/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> と算出された。収率はリ

グニン単位あたりの結合数を表している。なお、フェノール性水酸基の片方が  $\beta$ -O-4 結合したビフェニル型構造(ジベンゾジオキソシン構造を含む)由来の生成物(図 1-7-B)のピークは、 $^{31}\text{P}$ -NMR のスペクトル上で他ピークと重なっており、収率は合計値(0.038/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)として示されている。また、両方のフェノール性水酸基が遊離したビフェニル型構造(図 1-5-A)の含有量は、 $^{31}\text{P}$ -NMR 法で 0.034/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> と試算され、ビフェニル型構造は MWL のフェノール性末端にも存在することが明らかとなった。

秋山ら[Akiyama 2008]は、ジベンゾジオキソシン(DBDOX)構造がリグニン高分子の内部に存在するかどうかを調べる目的で、フェノール性の末端型 DBDOX モデル化合物(図 1-8-a)と、末端型 DBDOX モデル化合物がさらにモノリグノールと  $\beta$ -O-4 結合した内部型 DBDOX モデル化合物(図 1-8-b)を合成し、これらとアカマツ MWL の 2D NMR(HMBC)データを比較した。その結果、アカマツ MWL において、末端型 DBDOX 構造のピークは検出されたが、内部型 DBDOX 構造のピークは検出されなかった。このことについて、秋山らは、HMBC 測定条件を最適化する、または MWL 残渣といった分子量のより大きいリグニン試料を解析することで、内部型 DBDOX 構造が検出される可能性に言及している。

Yue ら[Yue 2016]は、テーダマツとトウヒから単離したリグニン試料(CEL)を 2D NMR(HSQC)法で分析し、末端型および内部型ジアリールエーテルモデル化合物の NMR データと比較した。その結果、Yue らは、CEL においてジアリールエーテル型構造の大半はリグニン高分子の末端に存在すると報告した。

分岐の候補構造であるビフェニル型構造やジアリールエーテル型構造の含有量は、リグニン高分子の分岐の頻度に影響を与える重要な因子の一つと考えられる。両構造の含有量については、1.5 項で後述するように、これまで主に分光法もしくは化学分解法により様々な推定値が示されてきたが、真の含有量は現在のところ明らかにはなっていない[Larsson 1971, Erickson 1973a, Adler 1977, Lapierre 1991, Lange 1999, Parkas 2007, Cresitini 2011, Li 2016, Yue 2016, Yue 2017]。この原因の一つとして、リグニンのように多種多様な結合様式、官能基、立体構造で構成される分子の場合、分光法によるスペクトル上には、一般に多くのピークが混在し、分析対象の構造によっては目的ピークが他ピークと著しく重なることが挙げられる。ビフェニル型構造のピークは、 $^{13}\text{C}$ -NMR のスペクトル上で他ピークと重なることが示されている[Drumond 1989, Brunow 1995, Capanema 2004](1.4 項を参照)。また、分光法では、リグニン以外の成分に由来するピークの影響を出来るだけ排除する目的で、単離リグニンを試料として用いることがあるが、単離リグニンはリグニン全体の化学構造を反映していない可能性、および単離の過程で化学構造が変化する可能性があることを念頭に置く必要がある[Björkman 1957, Matsukura 1969, Obst 1988, Lundquist 1992, Fujimoto 2005]。化学分解法では、元の構造から何%の収率で分解生成物が得られるのか、その変換係数を明らかにす

することは難しく、分解生成物の収率から真の含有量を明らかにすることは困難と思われる。一方で、化学分解法を用いれば、対象とする化学構造を化学反応により単純な分解生成物に変換できることから、分析条件を検討することにより、目的ピークをクロマト上で十分に分離することは可能である。したがって、化学分解法により得られるビフェニル型およびジアリールエーテル型生成物の収率を試料間で比較すれば、両構造の含有量について、僅かな差異を検出し大小関係を明らかにすることは可能と思われる。さらに、上記生成物の収率とそれらに影響し得る因子との相関を調べれば、分岐候補であるビフェニル型およびジアリールエーテル型構造の含有量が、どのような因子と相関をもつのかについて情報を得ることはできるだろう。

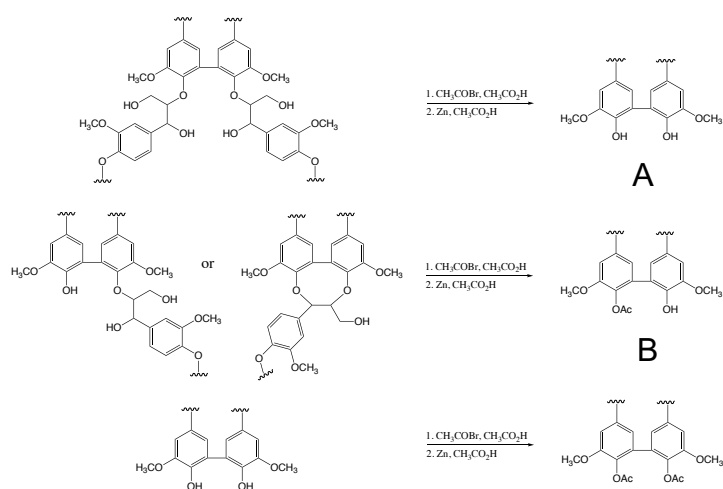


図 1-7 DFRC 法によるビフェニル型分解生成物。ただし、DFRC 分解生成物の無水酢酸によるアセチル化は行っていない。Crestini ら[Crestini 2011]の論文データを改編。

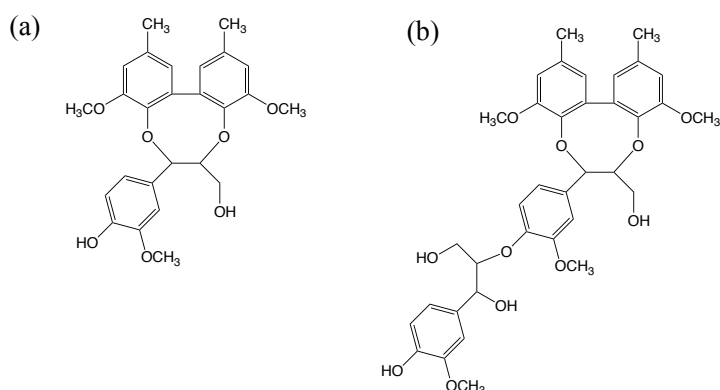


図 1-8 (a)末端型、および(b)内部型ジベンゾジオキソシンモデル化合物。Akiyama ら[Akiyama 2008]の論文データを改編。



#### 1.4 ビフェニル型構造量に関する既往の知見

ビフェニル型構造は芳香核構造の違いにより、GG 型、HG 型および HH 型の 3 種類が報告されている(図 1-6)。これらビフェニル型構造の含有量については、以下に示すように、これまで主に分光法もしくは化学分解法により様々な推定値が報告されてきた。

##### GG 型ビフェニル型構造

針葉樹リグニンにおける GG 型ビフェニル型構造の含有量を分光法で調べた研究例として、Pew[Pew 1963]は、トウヒから単離したリグニン試料(CEL)を UV 吸光度法で分析し、芳香核の 4 分の 1 以上がビフェニル型構造として存在すると報告した。Pew は、トウヒ CEL スペクトルの波長 250-260 nm と 300-400 nm 領域の強い吸収は、 $\alpha$ -カルボニル等の共役二重結合をもつ構造だけでは説明できないとし、ビフェニル型構造が波長 250 nm および 300 nm 付近の吸収を引き起こしていると考えた。 $\alpha$ -カルボニル基の影響を除く目的で還元処理したトウヒ CEL のスペクトルを、ビフェニル型モデル化合物を含むいくつかのモデル化合物のスペクトルと比較することでビフェニル含量を概算した。トウヒの単離リグニン(MWL)を  $^{13}\text{C}$ -NMR 法で分析した研究でも、芳香核の約 4 分の 1 がビフェニル型構造として存在すると試算されている[Drumond 1989, Capanema 2004]。しかし、後に Brunow ら[Brunow 1995]は、 $^{13}\text{C}$ -NMR 法で試算したビフェニル型構造の含有量は、スペクトル上のピークの重なりが著しいために、いくつかの仮定を踏まえて求めた概算値であると指摘している。

化学分解法による研究例として、Erickson ら[Erickson 1973a]は、トウヒの単離リグニン(Björkman リグニン)を、酸化第一銅とともにソーダ蒸解に供した後、メチル化過マンガン酸カリウム酸化法で分析した。その結果、GG 型ビフェニル型生成物が 0.06/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>の収率で得られた。収率は、同論文の分析データを用いて、リグニン単位あたりのモル収率として算出した(リグニン単位の分子量を 200 と概算した)。この時、ビフェニル型生成物は 1 分子に 2 つの芳香核を有することから、モル収率に 2 を乗じて芳香核の収率として表した。しかしながら、後に Bose ら[Bose 1998]は、非縮合型リグニンモデル化合物を前述の Erickson らと同様に酸化第二銅の存在下でソーダ蒸解に供したところ、無視できない量のビフェニル型生成物が二次的に生成したと報告している。Leopold[Leopold 1952]と Pew[Pew 1955]は、ともにトウヒをニトロベンゼン酸化法で分析し、GG 型ビフェニル型生成物を単離した。Leopold は木粉 150 g からダイバニリンとダイバニリン酸を各々 0.8%と 0.03%の収量で、Pew は木粉 10 g からダイバニリンを 2.2%の収量で単離した(重量収率かモル収率かは記載がないため不明)。玉井ら[Tamai 2015]が、スギをニトロベンゼン酸化法で分析したところ、リグニンの芳香核 100 個あたり少なくとも 7 個(0.07/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)はビフェニル型構造として存在することが明らかとなり、この下限値を基にしてもビフェニル型構造は針葉樹リグニンにおい

て主要な構造の一つと考えられる。なお、玉井らはニトロベンゼン酸化反応中に、 $\beta$ -O-4 型構造からビフェニル型構造は2次的に生成しないことをモデル実験により確認している(1.6項を参照)。Yue ら[Yue 2017]は、テーダマツとトウヒをチオアシドリシス法で分析し、ビフェニル型生成物の芳香核の収率は両樹種ともに 0.02/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> だったと報告した。チオアシドリシス法の収率が、過マンガン酸カリウム酸化法やニトロベンゼン酸化法の収率よりも低かったのは、チオアシドリシス法では  $\beta$ -O-4 結合が選択的に開裂されるためと思われる。

針葉樹と比べると報告例は少ないが、広葉樹からもビフェニル型構造が検出されている。Ämmälähti ら[Ämmälähti 1998]が、<sup>13</sup>C 標識したポプラの MWL を 2D-NMR(HMQC)測定に供したところ、ビフェニル型構造がジベンゾジオキソシン構造として僅かに検出された。同構造は、針葉樹リグニンでは <sup>13</sup>C 標識をしていなくても容易に検出されることから、その含有量はポプラ MWL で非常に少なかったと考えられる。化学分解法による研究例として、田中ら[Tanaka 1958]は、660 g のブナ木粉をニトロベンゼン酸化法に供し、30 mg のダイバニリンを単離した。上記ブナ木粉のリグニン含量を 20%と仮定し試算したダイバニリンの芳香核の収率は 0.0003/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> と、玉井らが報告したスギのビフェニル型芳香核の収率 (0.07/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)よりも低かった。Larsson ら[Larsson 1971]が、カバの Björkman リグニンをサルファイト蒸解後メチル化過マンガン酸カリウム酸化法に供して得たビフェニル型生成物の芳香核の収率は 0.01/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> だった。

#### HG 型および HH 型ビフェニル型構造

HG および HH 型ビフェニル型構造については、これまで圧縮あて材や草本、遺伝子組換え体といった H 核含量の比較的高い試料で検出されている。分光法による研究例として、Ralph ら[Ralph 2006]は、アルファルファを用いて 4-coumarate 3-hydroxylase(C3H)の抑制株を作製し、野生株と C3H 抑制株から単離した様々なリグニン試料を 2D-NMR(HSQC)で測定した。その結果、H 核の相対収率は、野生株の約 1%に対し C3H 抑制株で約 65%に達した。また、C3H 抑制株では、GG 型ジベンゾジオキソシン構造のシグナルの周辺に、野生株にはない 2 種類のシグナルが観測され、一つは HH 型ジベンゾジオキソシン構造に帰属された。もう一つのシグナルは、後に秋山ら[Akiyama 2009]により HG 型ジベンゾジオキソシン構造に帰属された。

化学分解法による過去の知見として、山崎ら[Yamasaki 1971]は、様々な植物試料(ジュズダマ、アカマツ、ブナ、けん化処理した竹)の MWL を、アルカリ加水分解後メチル化過マンガン酸カリウム酸化法で分析した。その結果、竹とジュズダマから得られた HG 型ビフェニル型生成物の芳香核の収率は、ともに 0.002/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> だった。アカマツとブナからは、HG 型ビフェニル型生成物は検出されなかった。また、カラマツあて材の水素化分解生成物から

も、HG 型ビフェニル型生成物の単離例が報告されている[Yasuda 1977]。Erickson ら[Erickson 1973b]は、モンタナマツあて材を、アルカリ加水分解後メチル化過マンガン酸カリウム酸化法で分析し、HG および HH 型ビフェニル型生成物をあて部と対向部から検出した。木粉 1 g あたりのビフェニル型生成物量は、あて部と対向部ともに GG 型>HG 型>HH 型の順であった(表 1-1)。クロマツあて材のチオアシドリシス分解生成物からも、HG および HH 型のビフェニル型生成物が検出された[Saito 2005]。また、定量分析のための標品がないため、その量の比較はできないものの、ビフェニル型生成物の GC ピーク面積は、GG 型>HG 型>HH 型の順であった(表 1-4)。

表 1-1 モンタナマツあて材のメチル化過マンガン酸カリウム酸化生成物の収率。非縮合型(H、G)およびビフェニル型(GG、HG、HH)生成物。Erickson ら[Erickson 1973b]の分析データを改編。

	メチル化物 (mmol/g-木粉)				
	H	G	GG	HG	HH
あて部	0.099	0.300	0.031	0.007	0.001
対向部	0.019	0.320	0.033	0.002	<0.0006

H: Anisic acid, G: Veratric acid, GG: 5,5'-Dehydrodiveratric acid,

HG: 2,3,2'-Trimethoxybiphenyl-5,5'-dicarboxylic acid, HH: 3,3'-Dehydrodianisic acid

### 1.5 芳香核構造の構成比とビフェニル型構造量の関係に関する既往の知見

1.4 項で前述したように、GG 型ビフェニル型構造の含有量については、これまで様々な推定値が報告されてきた。しかし、この違いがリグニンの多様性によるものなのか、分析手法の違いによるものかは不明である。これを明らかにするには、様々な試料のビフェニル含量を単一の手法で調べる必要があると思われるが、その研究例はあまり多くない。以下に、過去の分析例の詳細を示す。なお、収率は引用論文の分析データを用いて、リグニン単位あたりのモル収率として算出した(リグニン単位の分子量を 200 と仮定した)。ただし、ビフェニル型生成物は 1 分子に 2 つの芳香核を有するため、モル収率に 2 を乗じた芳香核の収率として表した。

山崎ら[Yamasaki 1971]は、ジュズダマ、アカマツ、ブナ、および *p*-クマール酸やフェルラ酸を除く目的でけん化処理した竹の MWL を、アルカリ加水分解後メチル化過マンガン酸カリウム酸化法で分析した結果、GG 型ビフェニル型生成物(GG)の収率はアカマツで最も高かったと報告した(表 1-2)。同じく G 核型の非縮合型生成物(G)の収率も、アカマツで最も高かった。GG 型ビフェニル型構造は G 核同士の結合により形成することを考えると、GG 収率が G 核含量の最も高いと思われるアカマツで高かったことは、合理的なことかもしれない。

次に、山崎ら[Yamasaki 1972]は 3 種類のリグニン前駆体(図 1-2)の混合比を変えて調製した様々な脱水素重合物(DHP、Dehydrogenation polymer)を、同様にアルカリ加水分解後メチル化過マンガン酸カリウム酸化法で分析した。DHP-p は、*p*-クマリルアルコール(p)をペルオキシダーゼと過酸化水素を用いたカップリング反応に供し調製した。DHP-c と DHP-s は、各々コニフェリルアルコール(c)もしくはシナピルアルコール(s)から調製した。DHP-pc、DHP-cs、DHP-pcs および DHP-ps は、各リグニン前駆体を p:c=1:1、c:s=1:1、p:c:s=1:1:1 および p:s=1:1 のモル比で混合し調製した。DHP の分子量を 200 と概算すると、GG 型ビフェニル型生成物(GG)の収率は、DHP-c の方が DHP-pc や DHP-pcs よりも高かった(表 1-3)。これは、単純に DHP-c の方が G 核の割合が高かったため、と推測される。一方で、興味深いことに、S 核を含む DHP-cs の GG 収率は、G 核のみから成る DHP-c のそれよりもやや高かった。HG 型ビフェニル型生成物(HG)は、DHP-pc と DHP-pcs から僅かに検出された。HH 型ビフェニル型生成物(HH)は、H 核を含む全ての DHP で検出されたが、その収率は H 核のみで構成される DHP-p で最も高かった。

Chen[Chen 1988]は、トウヒとカバを酸化第二銅の存在下でアルカリ加水分解した後、メチル化過マンガン酸カリウム酸化法で分析した結果、GG 型ビフェニル型生成物の芳香核の収率は、カバよりもトウヒの方が高かったと報告した(トウヒ: 0.07/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>、カバ: 0.02/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>)。ただし、この値に関しては注意が必要であり、酸化第二銅の前処理によって、ビフェ

ニル型構造が 2 次的に生成することがモデル実験で示されている[Bose 1998]。

斎藤ら[Saito 2005]は、クロマツあて部の形成層から成熟木部に向かって 6 つの区画から木切片試料を採取し、チオアシドリシス法で分析した。全生成物の GC ピーク面積に対するビフェニル型生成物のピーク面積の比を、GG、HG、HH 型の各々について調べた。その結果、GG 型ビフェニル型生成物の面積比は、最も形成層に近い区画を除いた 5 つの区画で、チオアシドリシス法による H/G 比が高くなるほど、低い値を示すことが示された(表 1-4)。また、HG および HH 型ビフェニル型生成物の面積比は、H/G 比が高くなるほど高い値を示すことが示された(表 1-4)。

岸本ら[Kishimoto 2010]は、木粉(モミ、モクレン、ブナ、カバ)、MWL(モミおよびブナ)、およびコニフェリルアルコールとシナピルアルコールの混合比を変えて調製した様々な DHP をチオアシドリシス法で分析した。その結果、全生成物の GC ピーク面積に対する GG 型ビフェニル型生成物のピーク面積の比は、チオアシドリシス法による S/G 比が高くなるほど低い値を示すことが、木粉、MWL および DHP で確かめられた(表 1-5-a、b)。

これまでの知見から、ビフェニル型構造量は試料により異なり、GG 型ビフェニル型構造量は S/G 比または H/G 比が高いリグニンほど低い値を、HG 型および HH 型ビフェニル型構造量は H/G 比が高いリグニンほど高い値を示すことが明らかになりつつある。ただし、分析法として用いられたメチル化過マンガン酸カリウム酸化法では、生成物の合計収率がリグニンの 1~2 割程度で決して高いとは言えず、リグニン構造の全体の性状を反映しているか議論の余地がある。生成物の同定と定量値については、標品との比較により行っているため、その信頼性は高いと考えられる。チオアシドリシス法による分解生成物の同定については、標品は用いず GC-MS のフラグメントパターンで生成物を推定し、GC-FID による全ての生成物のレスポンスファクターが同じと仮定して、GC ピーク面積の比較により量比を議論していることから、不確実な要素が多く残されている。ビフェニル型構造の含有量と芳香核構造の構成比との関係を明瞭にするためには、収率の高い化学分解法により、信頼性の高い同定・定量手段を用いて分析することが必要であり、その分析法の一つとしてニトロベンゼン酸化法が挙げられる。当研究室の玉井らは、ニトロベンゼン酸化法をビフェニル型構造の定量的解析手法として採用し、分析条件の再検討を行った(1.6 項を参照)。

表 1-2 竹、ジュズダマ、アカマツおよびブナ MWL のメチル化過マンガン酸カリウム酸化生成物の収率。非縮合型(H、G、S)、およびビフェニル型(GG、HG、HH)生成物。山崎ら[Yamasaki 1971]の分析データを改編。

	メチル化物( /C6-C3)					
	H	G	S	GG	HG	HH
けん化処理した竹	0.021	0.051	0.043	0.003	0.002	—
ジュズダマ	0.140	0.052	0.022	0.005	0.002	—
アカマツ	0.001	0.090	0.001	0.022	—	—
ブナ	0.003	0.037	0.054	0.001	—	—

—: 検出限界以下, H: Anisic acid, G: Veratric acid, S: Trimethylgallic acid

GG: 5,5'-Dehydrodiveratric acid, HG: 2,3,2'-Trimethoxybiphenyl-5,5'-dicarboxylic acid, HH: 3,3'-Dehydrodianisic acid

表 1-3 リグニン前駆体の混合比を変えて調製した様々な DHP のメチル化過マンガン酸カリウム酸化生成物の収率。非縮合型(H、G、S)、およびビフェニル型(GG、HG、HH)生成物。山崎ら[Yamasaki 1972]の分析データを改編。

	メチル化物( /C6-C3)					
	H	G	S	GG	HG	HH
DHP-p	0.036	—	—	—	—	0.029
DHP-c	—	0.018	—	0.015	—	—
DHP-pc	0.011	0.011	—	0.004	0.003	0.004
DHP-cs	—	0.070	0.092	0.018	—	—
DHP-pcs	0.018	0.019	0.017	0.005	0.004	0.004
DHP-ps	0.016	—	0.020	—	—	0.010

—: 検出限界以下, H: Anisic acid, G: Veratric acid, S: Trimethylgallic acid

GG: 5,5'-Dehydrodiveratric acid, HG: 2,3,2'-Trimethoxybiphenyl-5,5'-dicarboxylic acid, HH: 3,3'-Dehydrodianisic acid

表 1-4 クロマツのあて部をチオアシドリシス法に供して得た全生成物の GC ピーク面積に対するビフェニル型生成物のピーク面積の比。試料は、形成層から成熟木部にかけての連続切片。区画番号が小さいほど形成層に近く、H/G 比は低い。斎藤ら[Saito 2005]の分析データを改編。

	圧縮あて部					
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 10	No. 13
GG	26.3	33.8	32.2	32.8	27.2	30.1
HG	3.7	5.0	4.1	7.7	6.5	6.6
HH	tr	0.2	0.2	0.2	0.4	0.5

tr, trace

表 1-5 チオアシドリシス法による全生成物の GC ピーク面積に対する GG 型ビフェニル型生成物のピーク面積の比。(a)木粉と MWL、および (b)DHP。岸本ら[Kishimoto 2010]の分析データを改編。

(a)	試料	樹種	S/G比	GG
	木粉	モミ	0	28
		モクレン	1.37	13
		ブナ	2.48	8
		カバ	3.35	8
	MWL	モミ	0	28
		ブナ	1.76	11

(b)	試料	SA/(CA+SA)比	GG
	DHP	0	22
		0.25	20
		0.50	18
		0.75	3
		1.0	0

CA: コニフェリルアルコール, SA: シナピルアルコール

## 1.6 ビフェニル型構造の定量的解析手法

### 1.6.1 ニトロベンゼン酸化法の反応条件および改良型実験スキーム

玉井ら[Tamai 2015]は、GG 型ビフェニル型構造を有するニトロベンゼン酸化生成物の標品として、既知のダイバニリン(VV<sub>ald</sub>)、ダイバニリン酸(VV<sub>acid</sub>)に加え、新たにバニリンバニリン酸(VV<sub>ald-acid</sub>)を合成し、これらの化合物をリグニンのニトロベンゼン酸化生成物として同定した(図 1-9)。以下、VV<sub>ald</sub>、VV<sub>ald-acid</sub> および VV<sub>acid</sub> を総称して GG 型ビフェニル型生成物(VV)と呼ぶ。

リグニン中のビフェニル型構造の全てをビフェニル型生成物として定量することは困難であるが、ビフェニル型生成物の収率が最大となる反応条件および実験スキームを検討することにより、この収率をできるだけ真の含有量に近づけることは価値があるだろう。玉井ら[Tamai 2015]は、スギ木粉から得られる GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率について、ニトロベンゼン酸化法の反応条件および実験スキームの影響を調べた。その結果、VV の収率は 170°C、反応 2~4 時間の条件下で最も高い値を得た。また、実験スキームの検討として、濃縮乾固した反応生成物をフラスコからバイアル瓶に移す際に用いる溶媒の種類を検討した。その結果、従来から当研究室で用いられてきたジエチルエーテルよりも、ピリジンをを用いた方が VV 収率は高くなることが明らかとなった。

### 1.6.2 リグニンモデル化合物のニトロベンゼン酸化

リグニンのニトロベンゼン酸化が、一電子酸化と二電子酸化のどちらで進行するかについては、既往の研究で議論されてきた[Chang 1971, Schultz 1986, Schultz 1987, Dershem 1988]。もしニトロベンゼン酸化が一電子酸化で進行するならば、ニトロベンゼン酸化法による分析の過程でビフェニル型生成物が非縮合型構造から二次的に形成する可能性が考えられる。

そこで玉井ら[Tamai 2015]は、ビフェニル型および  $\beta$ -O-4 型リグニンモデル化合物(図 1-10-a、b)を同酸化法に供し、ビフェニル型生成物の起源構造を調べた。その結果、ビフェニル型モデル化合物からは、ビフェニル型生成物が 75mol%の高収率で得られた一方、 $\beta$ -O-4 型モデル化合物からは、ビフェニル型生成物は検出されなかった。このことから、ニトロベンゼン酸化反応中に、 $\beta$ -O-4 型構造からビフェニル型生成物が二次的に生成しないことが確認され、同酸化法によるビフェニル型生成物の収率は、実際の構造量に対し下限値となることが示された。



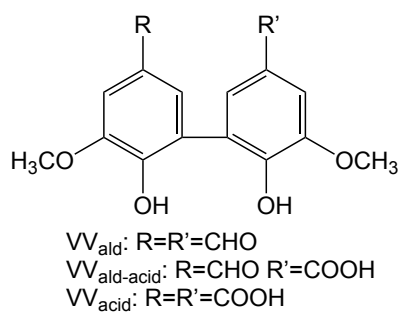


図 1-9 ニトロベンゼン酸化法による  
GG 型ビフェニル型生成物。

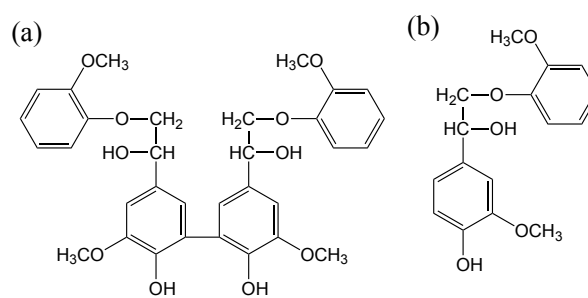


図 1-10 (a)ビフェニル型、および(b) $\beta$ -O-4 型リグニン  
モデル化合物。

## 1.7 本研究の目的

リグニン高分子は、どのような形状をしているのだろうか？それを示す直接的な証拠は未だ得られていないものの、おそらくリグニンは直鎖型ではなく非直鎖型の高分子と思われる。これは、分岐の候補構造として無視できない量のビフェニル型構造がリグニン中に存在していることに基づいている。

その含有量は、高分子の分岐の頻度に影響を与える重要な因子と考えられており、これまで分光法と化学分解法により様々な推定値が示されてきた。しかしながら、その定量値は不確かな要素を含んでおり、未だ推定の域を出ていない(1.4 項を参照)。この主な原因として、分光法ではビフェニル型構造由来のピークが他ピークと著しく重なること、化学分解法では元の構造から何%の収率で分解生成物が得られるのかを正確に把握することが難しいことが挙げられる。一方で、ビフェニル型生成物の収率を試料間で比較すれば、ビフェニル含有量の大小関係を明らかにすることは可能と思われる。リグニンを化学反応によって、ビフェニル型構造を保ったまま単純化された化合物へと切り出すためである。分析条件の検討次第では、ビフェニル型生成物のピークをクロマト上で完全に分離して定量することができる。さらに、もしビフェニル含有量が試料により異なるのであれば、その違いを生み出している要因は何か、ビフェニル型生成物の収率とそれに影響し得る因子との相関を調べれば、ビフェニル含有量がどのように規定されるのかを明らかにすることが可能となるだろう。

リグニンの生成機構を考慮すると、H 核と G 核はビフェニル型構造を形成し得るが、S 核からビフェニル型構造は生成しない。したがって、S 核の割合が高いリグニンほど、ビフェニル型構造の含有量は低くなると予想される。これまでに、ビフェニル型構造の中でも主要と考えられる GG 型(図 1-6)について、上記の予想を支持する実験結果が、チオアシドリシス法を用いた研究で報告されている[Kishimoto 2010](1.5 項を参照)。これは、S 核が増え G 核が減ったことで、G 核同士の結合で生成するビフェニル型構造が減ったためと思われる。一方で、G 核含量以外にもビフェニル型構造の形成頻度に影響し得る要因として、リグニン形成時、細胞壁に存在するモノリグノールの濃度や分布、酵素の種類、または共存する多糖などが考えられる。第 2 章では、GG 型ビフェニル型構造の含有量と S/G 比の関係について詳細に調べることを目的に、21 樹種(針葉樹 6 種、広葉樹 15 種)をニトロベンゼン酸化法で分析した。ニトロベンゼン酸化法は、分解生成物の収率が比較的高いことから、リグニン化学構造のより多くの部位について調べることができると思われる(2.3.2 項を参照)。

一方で、S 核を含まない針葉樹リグニンの場合、ビフェニル含量はどの程度変動し得るのだろうか？メトキシ基をもたない H 核は、芳香核の 3 位と 5 位の二つの炭素のどちらともカップリング反応してビフェニル型構造を形成し得るため、3 位がメトキシ基で置換さ

れた G 核よりもビフェニル型構造を形成しやすく、H 核の割合が高いリグニンほどビフェニル含有量は高くなるとも考えられる。第 3 章では、H 核が関与するビフェニル型構造(HH と HG 型)、および、ビフェニル型構造と並んで重要な縮合型構造であるフェニルクマラン型( $\beta$ -5 型)構造の分析法を確立するために、ニトロベンゼン酸化法の適用を検討した。ここで確立された手法を用いて、第 4 章では H 核含量の高いことで知られる針葉樹圧縮あて材を試料として、GG、HG、HH 型の全てのビフェニル型構造(図 1-6)について、H/G 比とビフェニル型生成物量との関係を調べた。HG 型ビフェニル型構造は、H 核と G 核の結合により生成することから、リグニン形成時における両者の共存についても情報を得ることができるだろう。また、 $\beta$ -5 型構造も分析することにより、H 核含量が縮合型構造全般の生成にどう影響するのかについても知見を得た。

以上、本研究では、リグニン形成時に芳香核型がビフェニル型構造の生成頻度にどう影響するかを明らかにすることを目的に、様々な試料をニトロベンゼン酸化法で分析し、ビフェニル型分解生成物の収率と芳香核構造の構成比との関係を調べた。

## 1.8 本章の引用文献

Adler E, Lignin chemistry-past, present and future, Wood Science and Technology, 11, 169 (1977)

Akiyama T and Ralph J, Characteristics in  $^1\text{H}$ - and  $^{13}\text{C}$ -NMR chemical shifts of non-phenolic dibenzodioxocin model compounds as branch-points in lignin, 第 52 回リグニン討論会要旨集, 東京, 84 (2008)

Akiyama T, Dixon RA, Kim H and Ralph J, Novel dibenzodioxocin structures involving *p*-hydroxyphenyl units on their biphenyl units, 第 53 回リグニン討論会要旨集, 静岡, 66 (2009)

Ämmälähti E, Brunow G, Bardet M, Robert D and Kilpeläinen I, Identification of side-chain structures in a poplar lignin using three-dimensional HMQC-HOHAHA NMR spectroscopy, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46, 5113 (1998)

Björkman A, Studies on finely divided wood. Part 5. The effect of milling, Svensk Papperstidn, 60, 329 (1957)

Bose SK, Wilson KL, Francis RC and Aoyama M, Lignin analysis by permanganate Oxidation. I. Native spruce lignin, Holzforschung, 52, 297 (1998)

Brunow G, Karhunen P, Lundquist K and Olson S, Investigation of lignin models of the biphenyl type by X-ray crystallography and NMR spectroscopy, Journal of Chemical Crystallography, 25, 1 (1995)

Capanema EA, Balakshin MY, Kadla JF, A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 1850 (2004)

Chang HM and Allan GG, Oxidation, In: Lignins-occurrence, formation, structure and reactions, Eds. Sarkanen KV and Ludwig GH, Wiley-Interscience, New York, 433-485 (1971)

Chang HM, Cowling EB, Brown W, Adler E and Miksche G, Comparative studies on cellulolytic enzyme lignin and milled wood lignin of sweetgum and spruce, Holzforschung, 29, 153 (1975)

Chen CL, Characterization of lignin by oxidative degradation: use of gas chromatography-mass

spectrometry technique, *Methods in Enzymology*, 161, 110 (1988)

Crestini C, Melone F, Sette M and Saladino R, Milled wood lignin: A linear oligomer, *Biomacromolecules*, 12, 3928 (2011)

Dershem SM, Fisher TH, Johnson S and Schultz TP, Substituent effects in nitrobenzene and copper (II) oxidations of some hydroxystilbene lignin model compounds, *Holzforschung*, 42, 163 (1988)

Dimmel D, Overview, In: *Lignin and lignans*, Eds. Heitner C, Dimmel DR and Schmidt JA, CRC Press (Taylor & Francis Group), Boca Raton, FL, 137-234 (2010)

Drumond M, Aoyama M, Chen CL and Robert D, Substituent effects on C-13 chemical shifts of aromatic carbons in biphenyl type lignin model compounds, *Journal of Organic Chemistry*, 9, 421 (1989)

Erickson M, Larsson S and Miksche GE, Gaschromatographische Analyse von ligninoxidationsprodukten. VIII. Zur des lignins der fichte, *Acta Chemica Scandinavica*, 27, 903 (1973a)

Erickson M, Larsson S and Miksche GE, Zur der lignins des druckholzes von *Pinus mugo*, *Acta Chemica Scandinavica*, 27, 1673 (1973b)

Fujimoto A, Matsumoto Y, Chang HM and Meshitsuka Gyosuke, Quantitative evaluation of milling effects on lignin structure during the isolation process of milled wood lignin, *Journal of Wood Science*, 51, 89 (2005)

Karhunen P, Rummakko P, Sililä J and Brunow G, Dibenzodioxocins; A novel type of linkage in softwood lignins, *Tetrahedron Letters*, 36, 169 (1995)

Kishimoto T, Chiba W, Saito K, Fukushima K, Uraki Y and Ubukata M, Influence of syringyl to guaiacyl ratio on the structure of natural and synthetic lignins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 895 (2010)

Lapierre C, Pollet B, Monties B and Roland C, Thioacidolysis of spruce lignin-GC-MS analysis of the

main dimers recovered after raney-nickel desulfuration, *Holzforschung*, 45, 61 (1991)

Larsson S and Miksche GE, Gaschromatographische analyse von ligninoxidationsprodukten. IV. Zur struktur des lignins der brike, *Acta Chemica Scandinavica*, 25, 647 (1971)

Lange W and Faix O, Lignin-polyphenol interaction in azobe (*Lophira alata*) heartwood. A study on milled wood lignin (MWL) and Klason residues, *Holzforschung*, 53, 519 (1999)

Lee ZZ, Meshitsuka G, Cho NS and Nakano J, Characterization of milled wood lignins isolated with different milling times, *Mokuzai Gakkaishi*, 27, 671 (1981)

Leopold B, Studies on lignin III. Oxidation of wood from *Picea abis*(L.) Karst.(Norway Spruce) with nitrobenzene and alkali, *Acta Chemica Scandinavica*, 6, 38 (1952)

Li Y, Akiyama T, Yokoyama T and Matsumoto Y, NMR assignment for diaryl ether structures (4-O-5 structures) in pine wood lignin, *Biomacromolecules*, 17, 1921 (2016)

Lu F and Ralph J, Non-degradative dissolution and acetylation of ball-milled plant cell walls: high-resolution solution-state NMR, *The Plant Journal*, 35, 535 (2003)

Lundquist K, Isolation and purification: wood. In: *Methods in lignin chemistry*. Eds. Lin SY, Dence CW, Springer-Verlag, Berlin, 65-70 (1992)

Matsukura M and Sakakibara A, On the heterogeneous distribution of chemical structure in lignin, *Mokuzai Gakkaishi*, 15, 35 (1969)

Obst JR and Kirk TK, Isolation of lignin, *Methods Enzymol*, 161(Biomass, Pt. B), 3-12 (1988)

Parkas J, Brunow G and Lundquist K, Quantitative lignin analysis based on permanganate oxidation, *Bioresources*, 2, 169 (2007)

Pew JC, Nitrobenzene oxidation of lignin model compounds, spruce wood and spruce “native lignin”, *Journal of the American Chemical Society*, 77, 2831 (1955)

- Pew JC, Evidence of a biphenyl group in lignin, *Journal of Organic Chemistry*, 28, 1048 (1963)
- Ralph J, Akiyama T, Kim H, Lu F, Schatz PF, Marita JM, Ralph SA, Reddy MSS, Chen F and Dixon RA, Effects of coumarate 3-hydroxylase down-regulation on lignin structure, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 8843 (2006)
- Saito K and Fukushima K, Distribution of lignin interunit bonds in the differentiating xylem of compression and normal woods of *Pinus thunbergii*, *Journal of Wood Science*, 51, 246 (2005)
- Schultz TP and Templeton MC, Proposed mechanism for the nitrobenzene oxidation of lignin, *Holzforschung*, 40, 93 (1986)
- Schultz TP, Fisher TH and Dershem SM, Role of the *p*-hydroxyl group in the nitrobenzene oxidation of *p*-hydroxybenzyl alcohols, *The Journal of Organic Chemistry*, 52, 279 (1987)
- Tamai A, Goto H, Akiyama T and Matsumoto Y, Revisiting alkaline nitrobenzene oxidation: Quantitative evaluation of biphenyl structures in cedar wood lignin (*cryptomeria japonica*) by a modified nitrobenzene oxidation method, *Holzforschung*, 69, 951 (2015)
- Tanaka J and Kondo T, Studies on degradation of lignin. II. Nitrobenzene oxidation products of hardwood lignin, *Mokuzai Gakkaishi*, 4, No.1, 34 (1958)
- Yamasaki T and Higuchi T, *p*-Hydroxyphenyl component of grass lignin, *Mokuzai Gakkaishi*, 17, 117 (1971)
- Yamasaki T and Higuchi T, Chemical properties of enzymic dehydrogenation polymer from *p*-coumaryl alcohol, *Mokuzai Gakkaishi*, 18, 361 (1972)
- Yasuda S and Sakakibara A, Hydrogenolysis of protolignin in compression wood. III. Isolation of four dimeric compounds with carbon to carbon linkage, *Mokuzai Gakkaishi*, 23, 114 (1977)
- Yue F, Lu F, Ralph S and Ralph J, Identification of 4-O-5-units in softwood lignins via definitive lignin

models and NMR, *Biomacromolecules*, 17, 1909 (2016)

Yue F, Lu F, Regner M, Sun R and Ralph J, Lignin-derived thioacidolysis dimers: Reevaluation, new products, authentication, and quantification, *ChemSusChem*, 10, 830 (2017)

黒田健一、リグニンの単離、日本木材学会編、木質の化学、文永堂出版株式会社、173-178 (2010)

越島哲夫、単離法、中野準三編、リグニンの化学—基礎と応用—（増強改訂版）、ユニ出版株式会社、37-49 (1990)



## 第 2 章

### 樹種間における GG 型ビフェニル型構造量の多様性

## 2.1 本章の背景および目的

リグニン高分子の分岐点となり得る構造として、ビフェニル型構造(5-5 結合)とジアリールエーテル型構造(4-O-5 結合)の 2 種類の結合型が挙げられる。針葉樹では、リグニンの芳香核 100 コあたり少なくとも 7 コの芳香核がビフェニル型構造として存在することがニトロベンゼン酸化法で確かめられており、分光法ではさらに高い含有量が推定されている[Pew 1963, Drumond 1989, Capanema 2004, Tamai 2015]。一方、ジアリールエーテル型構造については、その存在は確かなものの、含有量はビフェニル型構造に比べかなり低いと認識されている[Li 2016]。このため、分岐の候補構造の含有量をリグニン試料間で比べるにあたり、研究対象をビフェニル型構造に絞った。また、ビフェニル型構造を構成可能な芳香核型は、*p*-ヒドロキシフェニル核(H 核)とグアイアシル核(G 核)の 2 種類であり、GG、HG および HH 型の 3 種類が報告されている(図 1-6)。リグニンに含まれる H 核は通常数%と僅かであるため、本章では最も主要と考えられる GG 型について調べ、HG および HH 型ビフェニル構造に関しては第 4 章で議論を行うこととした。本章の目的は、GG 型ビフェニル型構造の含有量を試料間で比較するとともに、芳香核構造の構成比との関係を明らかにすることである。21 樹種(針葉樹 6 種、広葉樹 15 種)をニトロベンゼン酸化法で分析し、GG 型ビフェニル型生成物の収率を比較した。さらに、同生成物量とシリングル/グアイアシル核比(S/G 比)の関係および *p*-ヒドロキシフェニル/グアイアシル核比(H/G 比)との関係を調べた。

## 2.2 実験

### 2.2.1 試料

試料は、秋山ら[Akiyama 2005]が調製した 21 樹種(針葉樹 6 種、広葉樹 15 種)の脱脂木粉を用いた(表 2-1)。ニトロベンゼン酸化法に供する際には、五酸化ニリン存在下、40°C で一晩、減圧乾燥した。リグニン含量は Klason 法で求め、Klason 残渣のメトキシ基含量を調べた[Akiyama 2005]。

表 2-1 ニトロベンゼン酸化法で分析した 21 樹種(針葉樹 6 種、広葉樹 15 種)[Akiyama 2005]。

試料番号 <sup>a</sup>	樹種	試料 部位	Klason リグ ニン量 <sup>b</sup> (wt%)	メトキシ基含量 <sup>c</sup> (mol/200 g-lignin)	採取国
針葉樹	学名	慣用名			
1	<i>Cedrus deodara</i>	Deodara Cedar (ヒマラヤスギ)	辺材	32.5	0.97 日本
2	<i>Ginkgo biloba</i> <sup>d</sup>	Maidenhair Tree (イチョウ)	辺材	31.6	0.99 日本
3	<i>Abies sachalinensis</i>	Sachalin Fir (トドマツ)	辺材	27.6	1.03 日本
4	<i>Agathis loranthifolia</i>	Agathis	幹	32.5	1.06 インドネシア
5	<i>Cryptomeria japonica</i>	Japanese Cedar (スギ)	辺材	33.8	1.07 日本
6	<i>Pinus densiflora</i>	Japanese Red Pine (アカマツ)	辺材	26.2	1.07 日本
広葉樹					
7	<i>Eusideroxylon zwageri</i>	Ulin	幹	38.8	1.06 インドネシア
8	<i>Plumeria alba</i>	White Frangipani	辺材	32.3	1.20 インドネシア
9	<i>Celtis sinensis</i>	Japanese Hackberry (エノキ)	辺材	27.7	1.25 日本
10	<i>Dalbergia latifolia</i>	Sonokeling	心材	30.5	1.15 インドネシア
11	<i>Acacia mangium</i>	Acacia mangium	辺材	31.2	1.18 インドネシア
12	<i>Melaleuca cajuputi</i>	Melaleuca	辺材	31.5	1.30 タイ
13	<i>Firmiana simplex</i>	Chinese Parasol Tree (アオギリ)	辺材	22.6	1.41 日本
14	<i>Mimusops elengi</i>	Tanjung	辺材	32.6	1.23 インドネシア
15	<i>Hevea brasiliensis</i>	Para Rubber Tree (ゴムノキ)	幹	24.4	1.37 タイ
16	<i>Rhizophora sp.</i>	Rhizophora	幹	25.6	1.42 インドネシア
17	<i>Fagus crenata</i>	Japanese Beech (ブナ)	辺材	24.9	1.49 日本
18	<i>Betula maximowicziana</i>	Monarch Birch (ウダイカンパ)	辺材	25.4	1.44 日本
19	<i>Eucalyptus florenxia</i>	Eucalyptus	辺材	30.4	1.26 インドネシア
20	<i>Liriodendron tulipifera</i>	Yellow Poplar	辺材	23.0	1.44 アメリカ
21	<i>Avicennia sp.</i>	Avicennia	幹	21.1	1.49 インドネシア

<sup>a</sup> 試料番号の大きい広葉樹ほど、ニトロベンゼン酸化法による  $S/(V+S+2VV)$  比は大きい、<sup>b</sup>Klason リグニンと酸可溶性リグニンの合計量、<sup>c</sup>Klason 残渣を用いて調べた、<sup>d</sup>便宜上、針葉樹として分類。

## 2.2.2 ニトロベンゼン酸化法の分析手順

玉井ら[Tamai 2015]の再検討した反応条件および実験スキームに従い(1.6 項を参照)、以下の手順で木粉試料のニトロベンゼン酸化を行った。

脱脂木粉(40 mg)、2 M 水酸化ナトリウム(7 ml)、およびニトロベンゼン(400  $\mu$ l)を 10 ml 容オートクレーブ(TVS-1-10、耐圧硝子工業)に加え、170°C に設定したオイルバス中で 2 時間の反応に供した。氷冷後、内部標準物質としてエチルバニリン(EV、5  $\mu$ mol)を 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液としてホールピペットでオートクレーブに加え(2.5 mM $\times$ 2 ml)、蓋をしてよく振盪した。オートクレーブの内容物を 50 ml 容ビーカーに移し、さらにオートクレーブ内を 0.1 M 水酸化ナトリウム(5 ml $\times$ 3)で洗浄し、その洗浄液を先の内容物と合わせた。100 ml 容分液漏斗を用いて、反応液をジクロロメタン(15 ml $\times$ 3)で洗浄した。水層を上記 50 ml 容ビーカーに取り出し、2 M 塩酸で pH=1 に調整した。水層を 100 ml 容分液漏斗に戻し、ジクロロメタン(20 ml $\times$ 2)、およびジエチルエーテル(20 ml $\times$ 1)で続けて抽出した。これらの有機層を合わせ、イオン交換水(20 ml $\times$ 1)で洗浄後、硫酸ナトリウムを加え静置した。桐山ロートで吸引ろ過し、硫酸ナトリウムをろ別した。ろ液は 100 ml 容ナシフラスコに回収し、溶媒を減圧留去した。濃縮乾固した反応生成物をピリジン 200  $\mu$ l に溶解し、4 ml 容ねじ蓋付きバイアル瓶に移した。このピリジン溶液に N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(BSA)200  $\mu$ l を加え、100°C で 10 分間処理しトリメチルシリル化(TMS 化)を行った。放冷後、2  $\mu$ l をガスクロマトグラフィー(GC-FID)で分析した。GC 分析は、2.2.3 項の測定条件およびカラム昇温条件を用いた。なお、収率はリグニン単位の分子量を 200 と概算し、Klason リグニン 200 g あたりのモル収率として算出した。ただし、ビフェニル型生成物は 1 分子に 2 つの芳香核を有するため、芳香核量を議論する際にはモル収率に 2 を乗じた数値を用いた。

### 2.2.3 検量線の作成

#### 広葉樹用の検量線

バニリン( $V_{ald}$ )、バニリン酸( $V_{acid}$ )、シリングアルデヒド( $S_{ald}$ )、シリング酸( $S_{acid}$ )、ダイバニリン( $VV_{ald}$ )、バニリンバニリン酸( $VV_{ald-acid}$ )、およびダイバニリン酸( $VV_{acid}$ )の7種類の標品(図 2-1)を用いて、検量線を内部標準法により作成した。内部標準物質はエチルバニリン(EV)を用いた。 $V_{ald}$ 、 $V_{acid}$ 、 $S_{ald}$ 、 $S_{acid}$ 、EV は市販品を標品として用いた。 $VV_{ald}$ 、 $VV_{ald-acid}$ 、 $VV_{acid}$  は玉井ら[Tamai 2015]が合成した標品を使用した。以下にその手順を示す。

五酸化ニリン存在下、40℃で一晩、減圧乾燥した標品を用いて、表 2-2 に示すように EV に対してモル比( /EV)の異なる混合溶液をピリジン溶液として調製した。その詳細な調製方法については後述する。 $VV_{ald}$  および  $VV_{ald-acid}$  はエタノール等の低沸点溶媒に難溶であるため、溶媒はピリジンを用いた[Tamai 2015]。 $V_{ald}$  および  $S_{ald}$  は 5 点検量線、 $V_{acid}$  および  $S_{acid}$  は 6 点検量線、 $VV_{ald}$  は 7 点検量線、 $VV_{ald-acid}$  および  $VV_{acid}$  は 8 点検量線として作成した。バイアル瓶に上記の混合溶液 200  $\mu$ l、および N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(BSA)200  $\mu$ l を加え、100 °C で 10 分間処理し、トリメチルシリル化(TMS 化)を行った。EV の GC 注入量が木粉試料の分析時と同等となるように、EV 濃度に応じて 2  $\mu$ l もしくは 3  $\mu$ l をガスクロマトグラフィー(GC-FID)で分析した。GC 分析条件の詳細を以下に示す[Tamai 2015]。

GC-FID 測定条件 : GC GC-2014(SHIMADZU) ; カラム Inert-Cap-1, 30 m×0.25 mm ; キャリアガス ヘリウム ; カラム流量 1.83 ml/分 ; インジェクション温度 280℃ ; デテクター温度 280℃ ; スプリット比 60

カラム昇温条件 A : 150℃ で 25 分保持→3 °C/分で 190℃ まで昇温、保持時間なし→10°C/分で 215℃ まで昇温、45 分保持→10°C/分で 230℃ まで昇温、20 分保持→10°C/分で 280℃ まで昇温、10 分保持(分析時間 122.3 分)

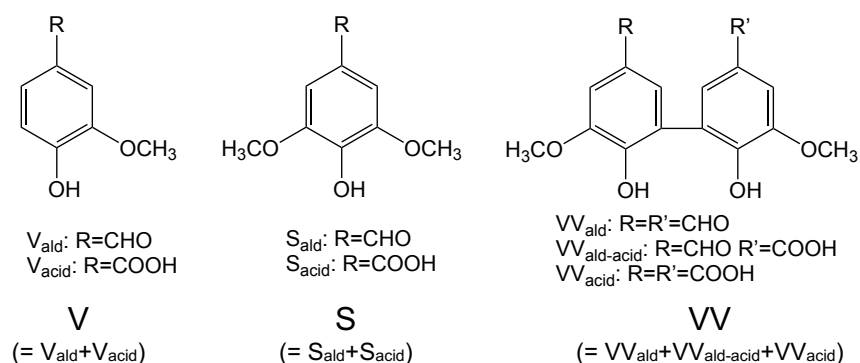


図2-1 広葉樹のニトロベンゼン酸化生成物として定量した7種類の化合物。

表 2-2 混合溶液中の内部標準物質(EV)に対する各標品のモル比(広葉樹検量線用)。  
( )は検出限界以下。

物質名	内部標準物質に対するモル比 ( /EV*)								
バニリン (V <sub>ald</sub> )	6.2	4.4	3.1	1.9	0.62				
バニリン酸 (V <sub>acid</sub> )	0.51	0.36	0.26	0.15	0.051	0.0051			
シリンガアルデヒド (S <sub>ald</sub> )	6.0	4.2	3.0	1.8	0.60				
シリンガ酸 (S <sub>acid</sub> )	0.56	0.39	0.28	0.17	0.056	0.0056			
ダイバニリン (VV <sub>ald</sub> )	0.30	0.15	0.089	0.074	0.044	0.037	0.0044		
バニリンバニリン酸 (VV <sub>ald-acid</sub> )	0.094	0.075	0.037	0.022	0.019	0.011	0.0094	0.0047	(0.0011)
ダイバニリン酸 (VV <sub>acid</sub> )	0.11	0.088	0.044	0.026	0.022	0.013	0.011	0.0055	(0.0013)

\*EV: エチルバニリン (50  $\mu$ mol = 50 mM  $\times$  1 ml)

混合溶液の詳細な調製方法を以下に示す。

乾燥した標品を用いて、表 2-2 に記した濃度の内部標準溶液、および溶液 A、B1、B2、C をピリジン溶液として調製した。

まず VV<sub>ald</sub> の検量線を作成するために、溶液 A をピリジンで所定の濃度(0.8～0.016 倍)に希釈した(表 2-3)。溶液 A(1 ml)にそれぞれ内部標準溶液(1 ml)を加え、7 種類の混合溶液を調製した。各混合溶液は前述の方法に従い TMS 化後、2  $\mu$ l を GC 分析した。

次に V<sub>ald</sub>、S<sub>ald</sub>、VV<sub>ald-acid</sub> および VV<sub>acid</sub> の検量線を作成するために、溶液 B1 および溶液 B2 を希釈した。溶液 B1 および溶液 B2 をそれぞれ所定の濃度(1.0～0.10 倍または 1.0～0.016 倍)に希釈した(表 2-3)。溶液 B1(1 ml)、溶液 B2(1 ml)、および内部標準溶液(1 ml)をそれぞれ混合し、9 種類の混合溶液(2 ml または 3 ml)を調製した。TMS 化後 2  $\mu$ l または 3  $\mu$ l を GC 分析した。

最後に V<sub>acid</sub> および S<sub>acid</sub> の検量線を作成するために、溶液 C を所定の濃度(1.0～0.010 倍)に希釈した(表 2-3)。溶液 C(1 ml)にそれぞれ内部標準溶液(1 ml)を加え、6 種類の混合溶液を調製した。TMS 化後 2  $\mu$ l を GC 分析した。

表 2-3 調製した溶液の濃度、およびその希釈率と混合量(表 2-2 の詳細)。

溶液名	調製濃度	検量線作成に用いた溶液の希釈率、およびEV溶液との混合量									
A	VVald: 18.5 mM	溶液名	0.80A	0.40A	0.32A	0.20A	0.16A	0.10A	0.016A		
		希釈率	×0.80	×0.40	×0.32	×0.20	×0.16	×0.10	×0.016		
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml		
内部標準	EV: 50.0 mM	希釈率	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0		
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml		
B1	Vald: 310.6 mM, Sald: 300.1 mM	溶液名	B1	0.70B1	0.50B1	0.30B1	0.10B1				
		希釈率	×1.0	×0.70	×0.50	×0.30	×0.10				
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml				
B2	VVald-acid: 4.7 mM, VVacid: 5.5 mM	溶液名	B2	0.80B2	0.40B2	0.32B2	0.20B2	0.16B2*	0.10B2*	0.05B2*	0.016B2*
		希釈率	×1.0	×0.80	×0.40	×0.32	×0.20	×0.16	×0.10	×0.05	×0.016
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
内部標準	EV: 50.0 mM	希釈率	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
C	Vacid: 25.6 mM, Sacid: 27.9 mM	溶液名	C	0.70C	0.50C	0.30C	0.10C	0.010C			
		希釈率	×1.0	×0.70	×0.50	×0.30	×0.10	×0.010			
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml			
内部標準	EV: 50.0 mM	希釈率	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0			
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml			

\*の溶液B2は、単独で内部標準溶液と混合した。

広葉樹から得られたニトロベンゼン酸化生成物(図 2-1)の保持時間、検量線、相関係数  $R^2$ 、および内部標準物質(EV)との有効モル比範囲を以下に示す。

保持時間:  $V_{ald} = 8.4$  min、 $EV = 10.6$  min、 $S_{ald} = 15.9$  min、 $V_{acid} = 23.2$  min、 $S_{acid} = 34.0$  min、 $VV_{ald} = 72.9$  min、 $VV_{ald-acid} = 88.9$  min、 $VV_{acid} = 100.8$  min

### 検量線

$V_{ald}$ :  $Y = 1.0957 X + 0.0298$ (相関係数  $R^2 = 1.000$ )

モル比範囲( $V_{ald}/EV$ ):  $0.62 \leq Y \leq 6.2$

$V_{acid}$ :  $Y = 0.8395 X + 0.0035$ (相関係数  $R^2 = 0.9999$ )

モル比範囲( $V_{acid}/EV$ ):  $0.0051 \leq Y \leq 0.51$

$S_{ald}$ :  $Y = 1.0877 X - 0.0295$ (相関係数  $R^2 = 0.9998$ )

モル比範囲( $S_{ald}/EV$ ):  $0.60 \leq Y \leq 6.0$

$S_{acid}$ :  $Y = 0.8243 X + 0.0032$ (相関係数  $R^2 = 0.9998$ )

モル比範囲( $S_{acid}/EV$ ):  $0.0056 \leq Y \leq 0.56$

$VV_{ald}$ :  $Y = 0.5368 X + 0.002$ (相関係数  $R^2 = 0.9997$ )

モル比範囲( $VV_{ald}/EV$ ):  $0.0044 \leq Y \leq 0.37$

$VV_{ald-acid}$ :  $Y = 0.4622 X + 0.0001$ (相関係数  $R^2 = 0.9982$ )

モル比範囲( $VV_{ald-acid}/EV$ ):  $0.0011 \leq Y \leq 0.094$

$VV_{acid}$ :  $Y = 0.3308 X + 0.0035$ (相関係数  $R^2 = 0.9993$ )

モル比範囲( $VV_{\text{acid}}/EV$ ):  $0.0013 \leq Y \leq 0.11$

Y はモル比( $/EV$ )、X は面積比( $/EV$ )である。

#### 針葉樹用の検量線

*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド( $H_{\text{ald}}$ )、 $V_{\text{ald}}$ 、 $V_{\text{acid}}$ 、 $VV_{\text{ald}}$ 、 $VV_{\text{ald-acid}}$ 、および  $VV_{\text{acid}}$  の 6 種類の検量線を内部標準法により作成した(図 2-2)。内部標準物質はエチルバニリン( $EV$ )を用いた。 $H_{\text{ald}}$ 、 $V_{\text{ald}}$ 、 $V_{\text{acid}}$ 、 $EV$  は市販品を標品として用いた。 $VV_{\text{ald}}$ 、 $VV_{\text{ald-acid}}$ 、 $VV_{\text{acid}}$  は玉井ら[Tamai 2015]が合成した標品を使用した。以下にその手順を示す。

五酸化二リン存在下、 $40^{\circ}\text{C}$  で一晩、減圧乾燥した標品を用いて、表 2-4 に示したように、 $EV$  に対してモル比( $/EV$ )の異なる混合溶液をピリジン溶液として調製した。その詳細な調製方法については後述する。 $VV_{\text{ald}}$  は 5 点検量線、 $V_{\text{acid}}$  は 6 点検量線、 $H_{\text{ald}}$ 、 $V_{\text{ald}}$ 、 $VV_{\text{ald-acid}}$  および  $VV_{\text{acid}}$  は 7 点検量線として作成した。バイアル瓶に上記の混合溶液( $200\ \mu\text{l}$ )および  $BSA(200\ \mu\text{l})$  を加え、 $100^{\circ}\text{C}$  で 10 分間処理し  $TMS$  化を行った。 $EV$  の  $GC$  注入量が木粉試料の分析時と同等となるように、 $EV$  濃度に応じて  $2\ \mu\text{l}$  もしくは  $3\ \mu\text{l}$  の  $TMS$  化物を  $GC-FID$  分析した。 $GC$  測定条件は広葉樹の条件に従った。カラム昇温条件は下記の条件を用いた。

カラム昇温条件 B :  $130^{\circ}\text{C}$  で 10 分保持  $\rightarrow 5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で  $150^{\circ}\text{C}$  まで昇温、13 分保持  $\rightarrow 3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で  $190^{\circ}\text{C}$  まで昇温、保持時間なし  $\rightarrow 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で  $215^{\circ}\text{C}$  まで昇温、45 分保持  $\rightarrow 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で  $230^{\circ}\text{C}$  まで昇温、20 分保持  $\rightarrow 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  で  $280^{\circ}\text{C}$  まで昇温、10 分保持(分析時間 124.3 min)

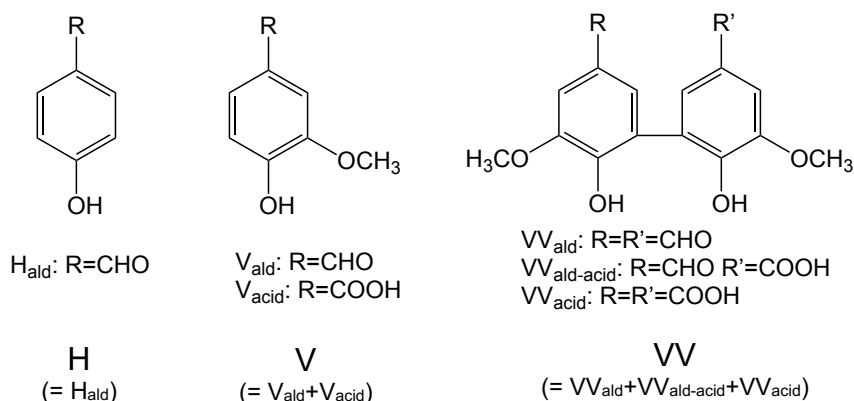


図 2-2 針葉樹のニトロベンゼン酸化生成物として定量した 6 種類の化合物。



表 2-4 混合溶液中の内部標準物質(EV)に対する各標品のモル比(針葉樹検量線用)。

物質名	内部標準物質に対するモル比( /EV*)					
<i>p</i> -ヒドロキシベンズアルデヒド (Hald)	0.13	0.04	0.033	0.020	0.017	0.0083
バニリン (V <sub>ald</sub> )	5.0	1.5	1.2	0.75	0.62	0.31
バニリン酸 (V <sub>acid</sub> )	0.51	0.26	0.15	0.051	0.0051	
ダイバニリン (VV <sub>ald</sub> )	0.30	0.089	0.074	0.044	0.037	0.019
バニリンバニリン酸 (VV <sub>ald-acid</sub> )	0.075	0.022	0.019	0.011	0.0093	0.0047
ダイバニリン酸 (VV <sub>acid</sub> )	0.088	0.026	0.022	0.013	0.011	0.0055

\*EV: エチルバニリン (50  $\mu$ mol = 50 mM  $\times$  1 ml)

混合溶液の詳細な調製方法を以下に示す。

乾燥した標品を用いて、表 2-5 に記した濃度の内部標準溶液、および溶液 D1、D2、E、F をピリジン溶液として調製した。

まず、V<sub>ald</sub>、VV<sub>ald-acid</sub> および VV<sub>acid</sub> の検量線を作成するために、溶液 D1、D2 の希釈を行った。溶液 D1、D2 とともに、ピリジンで所定の濃度(0.80～0.050 倍)に希釈した(表 2-5)。溶液 D1(1 ml)、溶液 D2(1 ml)、および内部標準溶液(1 ml)をそれぞれ混合し、7 種類の混合溶液を調製した。TMS 化後、3  $\mu$ l を GC 分析した。

次に、V<sub>acid</sub> の検量線を作成するために、溶液 E を所定の濃度(1.0～0.010 倍)に希釈した(表 2-5)。溶液 E(1 ml)にそれぞれ内部標準溶液(1 ml)を加え、6 種類の混合溶液を調製した。TMS 化後、2  $\mu$ l を GC 分析した。

次に、H<sub>ald</sub> の検量線を作成するために、溶液 F を所定の濃度(0.80～0.050 倍)に希釈した(表 2-5)。溶液 F(1 ml)にそれぞれ内部標準溶液(1 ml)を加え、7 種類の混合溶液を調製した。TMS 化後、2  $\mu$ l を GC 分析した。

最後に VV<sub>ald</sub> の検量線を作成するために、溶液 G を所定の濃度(1.0～0.25 倍)に希釈した(表 2-5)。溶液 G(1 ml)にそれぞれ内部標準溶液(1 ml)を加え、5 種類の混合溶液を調製した。TMS 化後、2  $\mu$ l を GC 分析した。

表 2-5 調製した溶液の濃度、およびその希釈率と混合量(表 2-4 の詳細)。

溶液名	調製濃度	検量線作成に用いた溶液の希釈率、および内部標準溶液との混合量							
D1	VVald-acid: 4.7 mM, VVacid: 5.5 mM	溶液名	0.80D1	0.40D1	0.32D1	0.20D1	0.16D1	0.10D1	0.050D1
		希釈率	×0.80	×0.40	×0.32	×0.20	×0.16	×0.10	×0.050
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
D2	Vald: 310.6 mM	溶液名	0.80D2	0.40D2	0.32D2	0.20D2	0.16D2	0.10D2	0.050D2
		希釈率	×0.80	×0.40	×0.32	×0.20	×0.16	×0.10	×0.050
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
内部標準	EV: 50.0 mM	希釈率	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
E	Vacid: 25.6 mM	溶液名	E	0.70E	0.50E	0.30E	0.10E	0.010E	
		希釈率	×1.0	×0.70	×0.50	×0.30	×0.10	×0.010	
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	
内部標準	EV: 50.0 mM	希釈率	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	
F	Hald: 8.3 mM	溶液名	0.80F	0.40F	0.32F	0.20F	0.16F	0.10F	0.050F
		希釈率	×0.80	×0.40	×0.32	×0.20	×0.16	×0.10	×0.050
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
内部標準	EV: 50.0 mM	希釈率	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
G	VVald: 24.7 mM	溶液名	G	0.90G	0.70G	0.50G	0.25G		
		希釈率	×1.0	×0.90	×0.70	×0.50	×0.25		
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml		
内部標準	EV: 50.0 mM	希釈率	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0		
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml		

針葉樹から得られたニトロベンゼン酸化生成物(図 2-2)の保持時間、検量線、相関係数  $R^2$ 、および内部標準物質(EV)との有効モル比範囲を以下に示す。

保持時間:  $H_{ald} = 7.8 \text{ min}$ 、 $V_{ald} = 14.2 \text{ min}$ 、 $EV = 16.8 \text{ min}$ 、 $V_{acid} = 29.8 \text{ min}$ 、 $VV_{ald} = 75.2 \text{ min}$ 、 $VV_{ald-acid} = 91.0 \text{ min}$ 、 $VV_{acid} = 101.9 \text{ min}$

#### 検量線

$H_{ald}$ :  $Y = 1.1855 X + 0.0002$ (相関係数  $R^2 = 1.0000$ )

モル比範囲( $H_{ald}/EV$ )、 $0.0083 \leq Y \leq 0.13$

$V_{ald}$ :  $Y = 1.0628 X + 0.0793$ (相関係数  $R^2 = 0.9995$ )

モル比範囲( $V_{ald}/EV$ )、 $0.31 \leq Y \leq 5.0$

$V_{acid}$ :  $Y = 0.8348 X + 0.0022$ (相関係数  $R^2 = 0.9999$ )

モル比範囲( $V_{acid}/EV$ )、 $0.0051 \leq Y \leq 0.51$

$VV_{ald}$ :  $Y = 0.5695 X + 0.0096$ (相関係数  $R^2 = 0.9983$ )

モル比範囲( $VV_{ald}/EV$ )、 $0.12 \leq Y \leq 0.49$

$VV_{ald-acid}$ :  $Y = 0.471 X + 0.001$ (相関係数  $R^2 = 0.9999$ )

モル比範囲( $VV_{ald-acid}/EV$ )、 $0.0047 \leq Y \leq 0.075$

$VV_{\text{acid}}$ :  $Y = 0.4236 X + 0.0028$  (相関係数  $R^2 = 0.9994$ )

モル比範囲( $VV_{\text{acid}}/\text{EV}$ )、 $0.0055 \leq Y \leq 0.088$

Y はモル比( /EV)、X は面積比( /EV)である。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 ニトロベンゼン酸化生成物の GC 分析条件

#### 広葉樹

広葉樹のニトロベンゼン酸化生成物( $V_{ald}$ 、 $V_{acid}$ 、 $S_{ald}$ 、 $S_{acid}$ 、 $VV_{ald}$ 、 $VV_{ald-acid}$  および  $VV_{acid}$ 、  
図 2-1)の GC 分析は、2.2.3 項で前記した測定条件およびカラム昇温条件 A に従った。  
全生成物のピークが十分に分離することを確認した(図 2-3)。

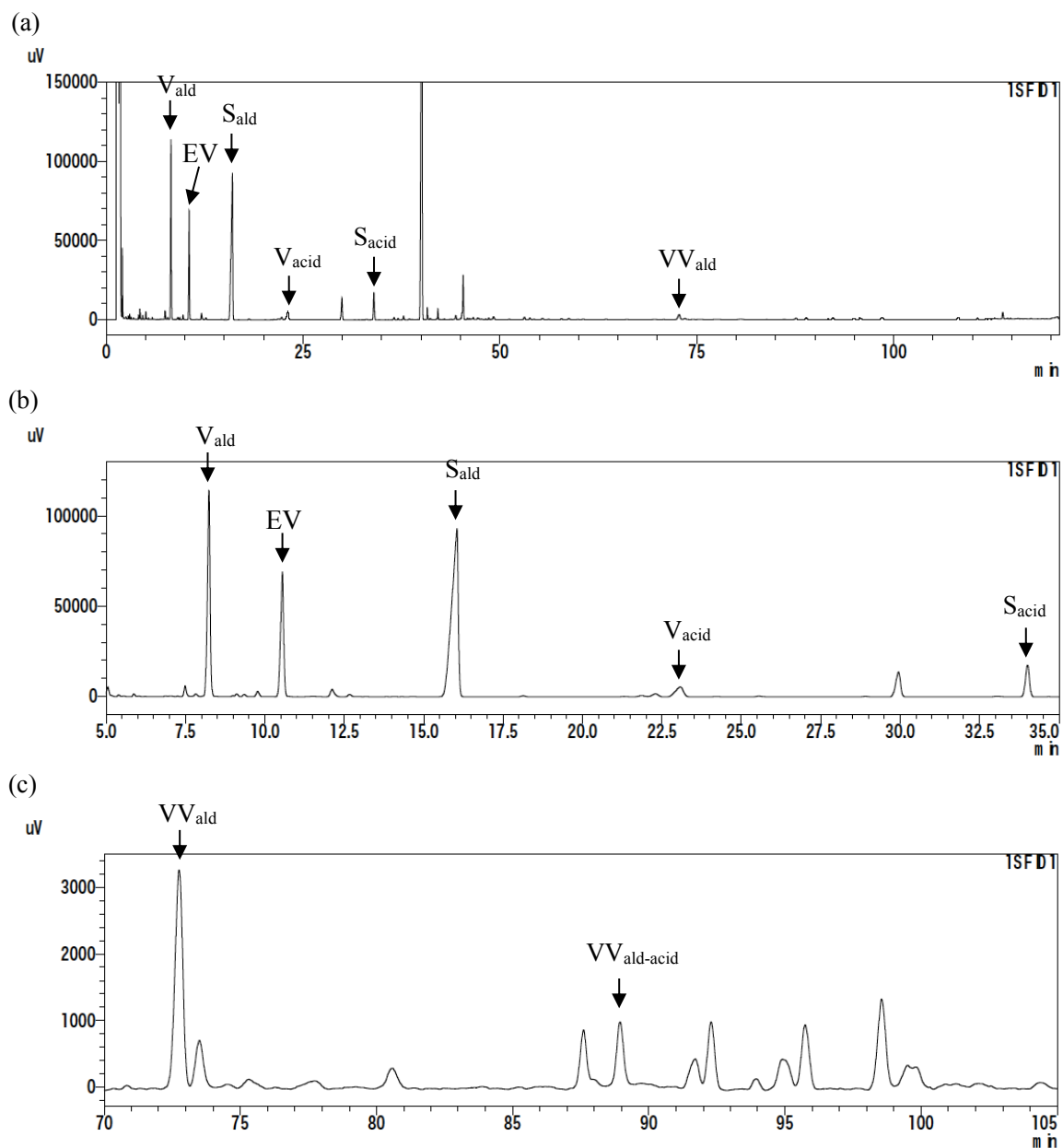


図 2-3 広葉樹(ゴムノキ)のニトロベンゼン酸化生成物の GC クロマトグラム(TMS 化物)。 (a)0～105 分、(b)5～35 分、および(c)70～105 分拡大。カラム昇温条件 A で分析。

## 針葉樹

針葉樹のニトロベンゼン酸化生成物( $H_{ald}$ 、 $V_{ald}$ 、 $V_{acid}$ 、 $VV_{ald}$ 、 $VV_{ald-acid}$  および  $VV_{acid}$ 、図 2-2)の GC 分析は、2.2.3 項の測定条件およびカラム昇温条件 B に従った。針葉樹の GC 分析を、広葉樹で用いたカラム昇温条件 A で行ったところ、 $H_{ald}$  のピークが分離不十分であった(図 2-4-a)。そこで、昇温条件を検討した結果、 $V_{ald}$ 、 $V_{acid}$ 、 $VV_{ald}$ 、 $VV_{ald-acid}$ 、 $VV_{acid}$  に加え、 $H_{ald}$  も分離する条件として、カラム昇温条件 B を得た(図 2-4-b、図 2-5)。

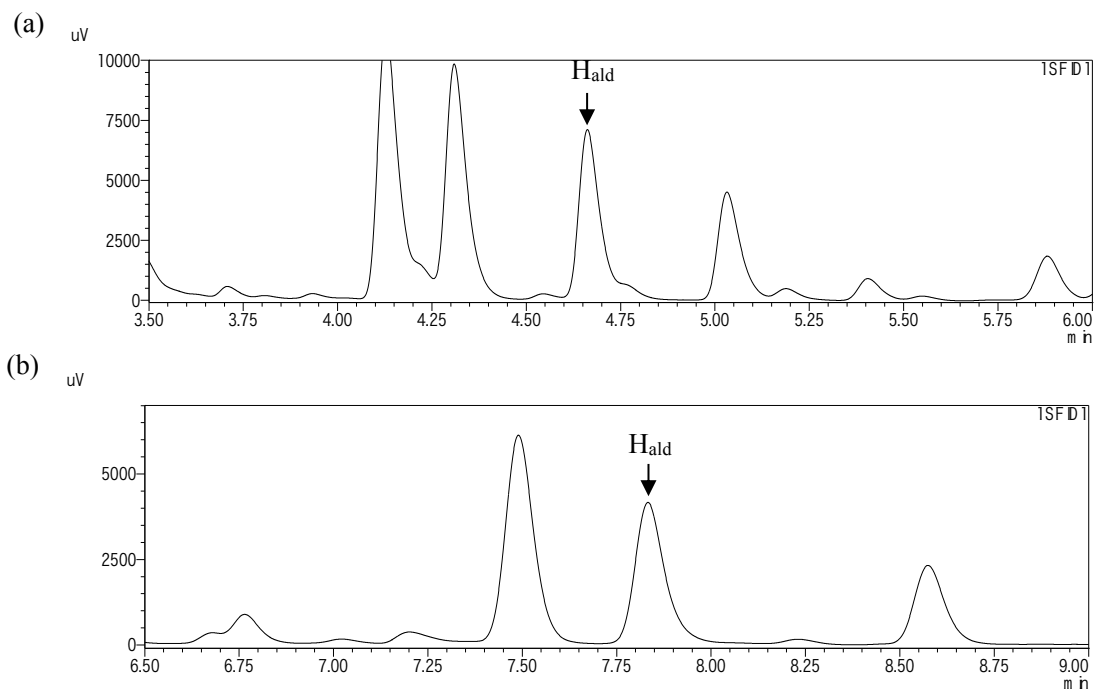


図 2-4 スギ木粉からのニトロベンゼン酸化生成物の GC チャート。 $p$ -ヒドロキシベンズアルデヒド( $H_{ald}$ )の保持時間領域を抜粋して表示。(a)カラム昇温条件 A、および(b)カラム昇温条件 B。

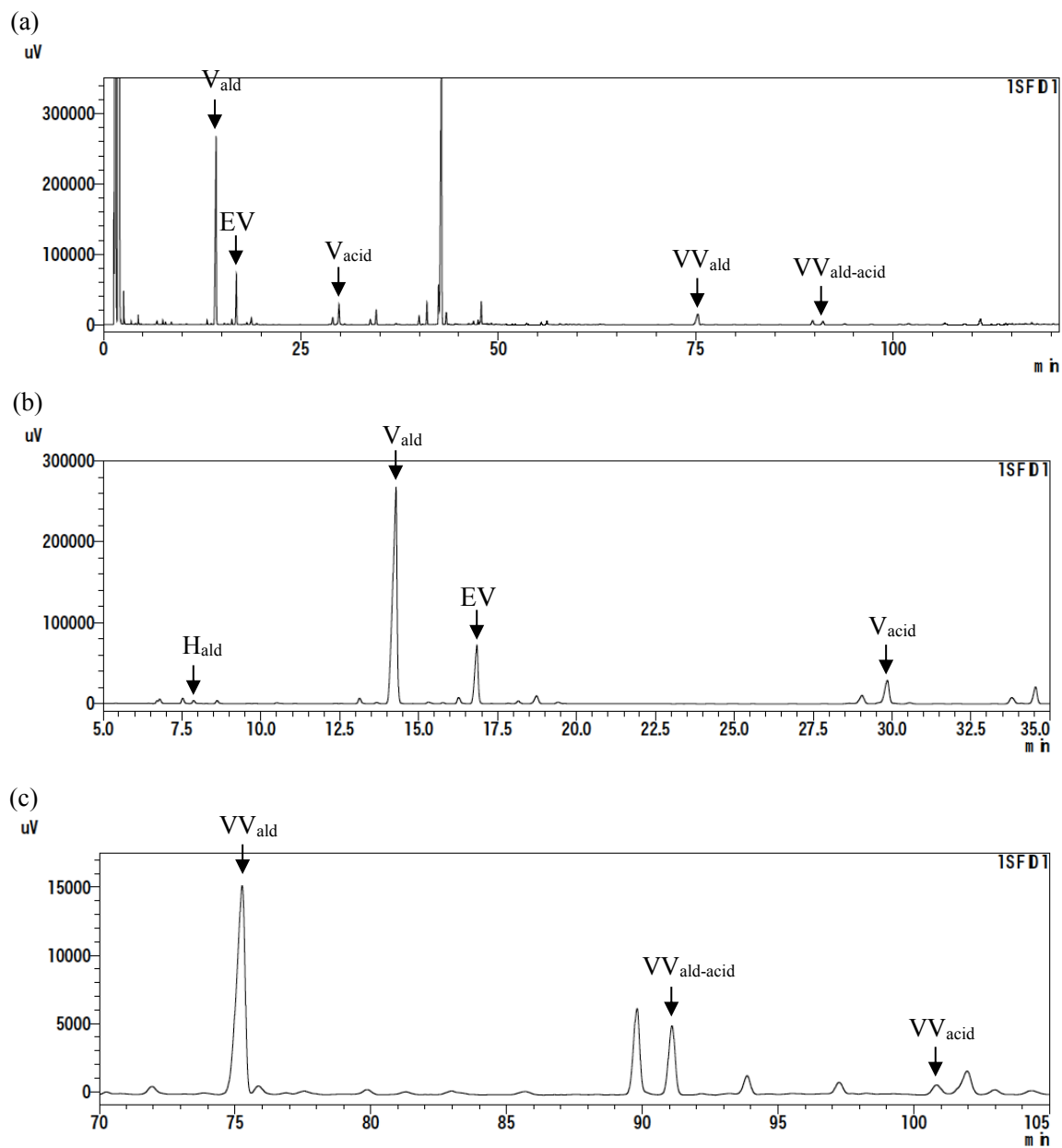


図 2-5 針葉樹(スギ)のニトロベンゼン酸化生成物の GC クロマトグラム(TMS 化物)。  
(a)0~105 分、(b)5~35 分、および(c)70~105 分拡大。カラム昇温条件 B で分析。

### 2.3.2 樹種間におけるビフェニル型構造量の多様性

広葉樹のニトロベンゼン酸化生成物として、G 核型の非縮合型生成物(V)、S 核型の生成物(S)および GG 型ビフェニル型生成物(VV)を定量した(図 2-1)。針葉樹では、V、VV に加え、H 核型の非縮合型生成物(H)を定量した(図 2-2)。収率は、リグニン単位の分子量を 200 と概算し、Klason リグニン 200 g あたりのモル収率として算出した。ただし、ビフェニル型生成物(VV)は 1 分子に 2 つの芳香核を有するため、芳香核量を議論する際にはモル収率に 2 を乗じた数値を用いた。

ニトロベンゼン酸化生成物として得られた芳香核の合計収率は、リグニンの芳香核 100 単位あたり、広葉樹(V+S+2VV)で 44.0-58.5 単位(以下%)、針葉樹(H+V+2VV)で 43.9-49.0% に達した(図 2-6-a)。この収率を他の代表的な化学分解法と比較した。非縮合型だけでなく縮合型生成物についても定量した研究例として、Yue らはテーダマツをチオアシドリシス法に供し、単量体および二量体生成物を定量して、芳香核の合計収率として 30.7%を得ている[Yue 2012, Yue 2017]。また、山崎らが、アカマツの MWL をアルカリ加水分解後、メチル化過マンガン酸カリウム酸化法に供して得た単量体および二量体の合計収率は、芳香核あたり 15.5%であった[Yamasaki 1971]。このように、本研究で得たニトロベンゼン酸化生成物の収率は、チオアシドリシス法や過マンガン酸カリウム酸化法による分解生成物の収率よりも高く、リグニン化学構造のより多くの部位を反映しているものと思われる。

広葉樹の GG 型ビフェニル型生成物の収率は、0.24-4.5%と樹種により大きく異なった(芳香核量 2VV として表示、図 2-6-b)。一方、針葉樹の VV 収率は 6.2-7.3%と樹種間の差異は広葉樹と比較して小さかった(図 2-6-b)。この理由として、針葉樹リグニンは主に G 核のみで構成されるのに対し、広葉樹リグニンには G 核に加え、GG 型ビフェニル型構造にはならないと想定される S 核も構成単位として含まれ、その含有率は樹種間で大きく異なることが考えられる(図 2-6-a、表 2-6)。そこで、2.3.3 項では VV 収率と S/G 比の関係を調べた。

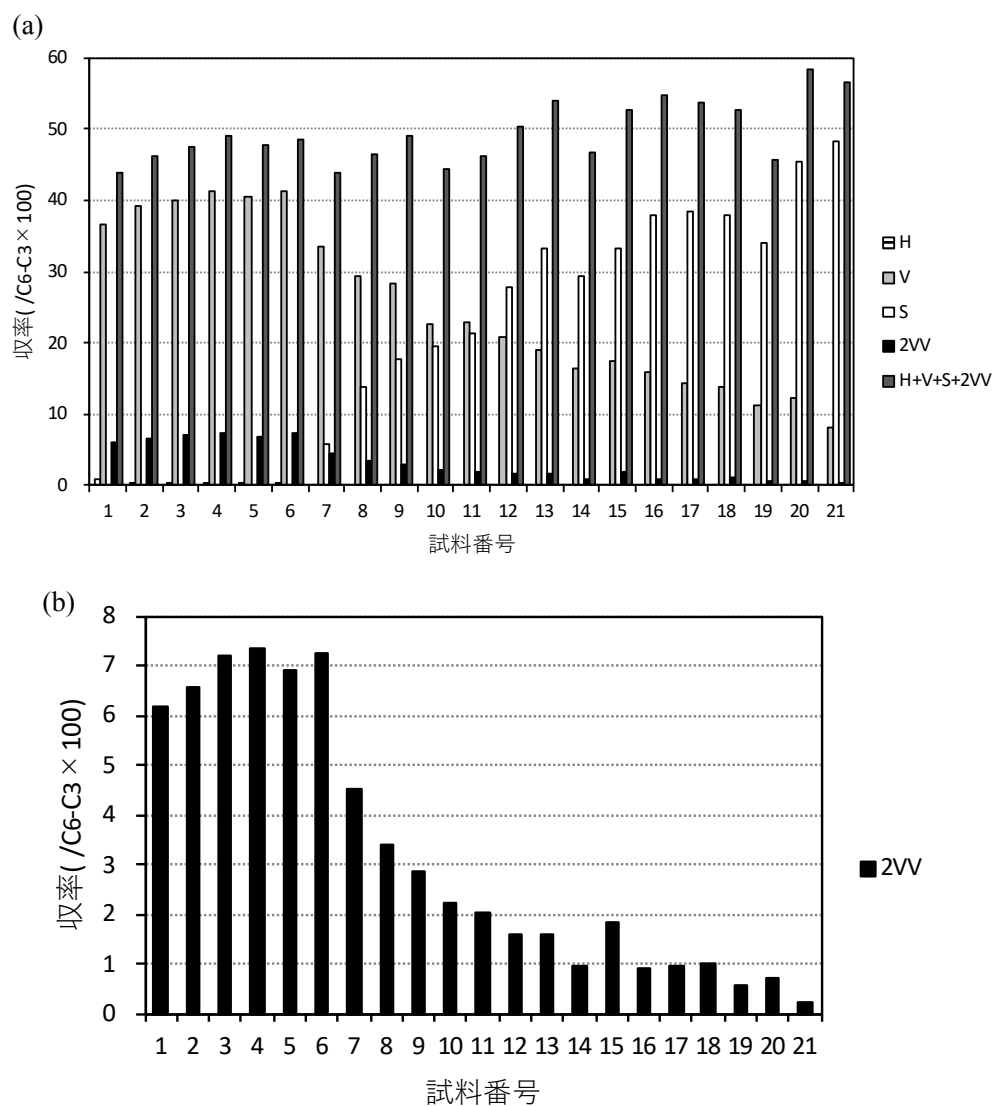


図 2-6 21 樹種の(a)ニトロベンゼン酸化生成物の収率、および(b)GG 型ビフェニル型生成物の収率(芳香核量 2VV として表示)。試料番号 1～6 は針葉樹、7～21 は広葉樹。試料番号の大きい広葉樹ほど、ニトロベンゼン酸化法による S/(V+S+2VV)比は大きい。非縮合型(H、V、S)および GG 型ビフェニル型生成物(VV)。



表 2-6 21 樹種(針葉樹 6 種、広葉樹 15 種、表 2-1)のニトロベンゼン酸化生成物の収率。

試料番号 <sup>a</sup>	ニトロベンゼン酸化生成物の収率 (mol% <sup>b</sup> )								合計 収率
	S <sub>ald</sub>	S <sub>acid</sub>	V <sub>ald</sub>	V <sub>acid</sub>	H <sub>ald</sub>	VV <sub>ald</sub>	VV <sub>ald-acid</sub>	VV <sub>acid</sub>	
針葉樹									
1	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	33.9	2.8	0.92	2.5	0.45	0.18	43.9
2	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	35.9	3.2	0.39	2.6	0.50	0.21	46.1
3	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	36.4	3.6	0.39	2.8	0.60	0.23	47.6
4	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	38.1	3.3	0.26	2.9	0.56	0.22	49.0
5	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	37.1	3.3	0.33	2.7	0.53	0.23	47.7
6	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	38.0	3.2	0.23	2.9	0.54	0.22	48.7
広葉樹									
7	5.3	0.55	30.8	2.8	— <sup>d</sup>	1.8	0.37	0.072	44.0
8	12.6	1.2	26.7	2.6	— <sup>d</sup>	1.3	0.28	0.099	46.5
9	16.3	1.5	26.2	2.2	— <sup>d</sup>	1.2	0.21	0.062	49.0
10	17.8	1.7	20.7	2.0	— <sup>d</sup>	0.90	0.17	0.045	44.4
11	19.7	1.7	21.0	1.8	— <sup>d</sup>	0.84	0.16	0.023	46.3
12	25.6	2.3	19.2	1.7	— <sup>d</sup>	0.68	0.13	0 <sup>c</sup>	50.4
13	30.8	2.5	17.3	1.7	— <sup>d</sup>	0.67	0.12	0 <sup>c</sup>	53.9
14	26.9	2.4	15.0	1.4	— <sup>d</sup>	0.40	0.070	0 <sup>c</sup>	46.8
15	30.5	2.8	15.8	1.7	— <sup>d</sup>	0.66	0.26	0 <sup>c</sup>	52.7
16	34.8	3.2	14.4	1.5	— <sup>d</sup>	0.40	0.073	0 <sup>c</sup>	54.9
17	35.4	3.0	13.0	1.4	— <sup>d</sup>	0.42	0.073	0 <sup>c</sup>	53.9
18	35.0	2.9	12.6	1.3	— <sup>d</sup>	0.44	0.071	0 <sup>c</sup>	52.8
19	31.3	2.7	10.1	1.1	— <sup>d</sup>	0.24	0.041	0 <sup>c</sup>	45.7
20	41.8	3.7	11.0	1.3	— <sup>d</sup>	0.31	0.052	0 <sup>c</sup>	58.5
21	44.6	3.6	7.0	1.0	— <sup>d</sup>	0.12	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	56.5

<sup>a</sup> 試料番号に対応する樹種は表 2-1 に記載、試料番号の大きい広葉樹ほど、ニトロベンゼン酸化法による S/(V+S+2VV)比は大きい。<sup>b</sup> リグニンの分子量を 200 と概算し算出。<sup>c</sup> 検出限界以下。<sup>d</sup> 未同定。

### 2.3.3 S/G 比と GG 型ビフェニル型構造量の関係

針葉樹 6 種と広葉樹 15 種から成る 21 樹種(表 2-1)を用いて、S/G 比と GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率との関係について調べた。S/G 比の指標として、ニトロベンゼン酸化生成物の全芳香核量に対する S 核型生成物の芳香核量の比を示す  $S/(V+S+2VV)$  比(以下、S 核比と略す)、および Klason 残渣のメトキシ基含量を用いた。その結果、S 核比の高い樹種ほど VV の収率は低くなる傾向が明瞭に示された( $R^2=0.95$ 、図 2-7-a)。また、メトキシ基含量を用いた場合にも同様に、S 核の割合が高い樹種ほど、VV 収率は低くなる傾向が示唆された( $R^2=0.76$ 、図 2-7-b)。これらの結果から、GG 型ビフェニル型構造の含有量は、S 核の割合が高い樹種ほど低くなることが推察される。

過去に Chen[Chen 1988]が、トウヒとカバを酸化第二銅の存在下でアルカリ加水分解した後、メチル化過マンガン酸カリウム酸化法で分析した際にも、GG 型ビフェニル型生成物の芳香核の収率は、S 核を含むカバの方が低かった(トウヒ:  $0.07/C_6-C_3$ 、カバ:  $0.02/C_6-C_3$ )。ただし、酸化第二銅の前処理によって、ビフェニル型構造が 2 次的に生成することがモデル実験で示されている[Bose 1998]。また、岸本ら[Kishimoto 2010]が、木粉(モミ、モクレン、ブナ、カバ)、MWL(モミ、ブナ)および 4 種類の DHP を、各々チオアシドリシス法で分析し、全生成物の GC ピーク面積に対する GG 型ビフェニル型生成物のピーク面積の比を調べたところ、同比は S/G 比と負の相関を示した(1.5 項を参照)。

本研究で、S/G 比が高い樹種ほど GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率が低い値を示した第一の原因として、G 核の減少に伴って、G 核同士の重合により生成するビフェニル型構造が減少したことが挙げられる。一方で、よく観察すると VV 収率と S/G 比の指標との相関は、直線に近似するよりもやや下に弓なりに分布し、S 核の割合が高い樹種ほどビフェニル型構造の形成は抑制されているようにみえた(図 2-7)。そこで、このことを確かめる目的で、次の 2.3.4 項で GG 型ビフェニル型構造の形成頻度について考察を行った。

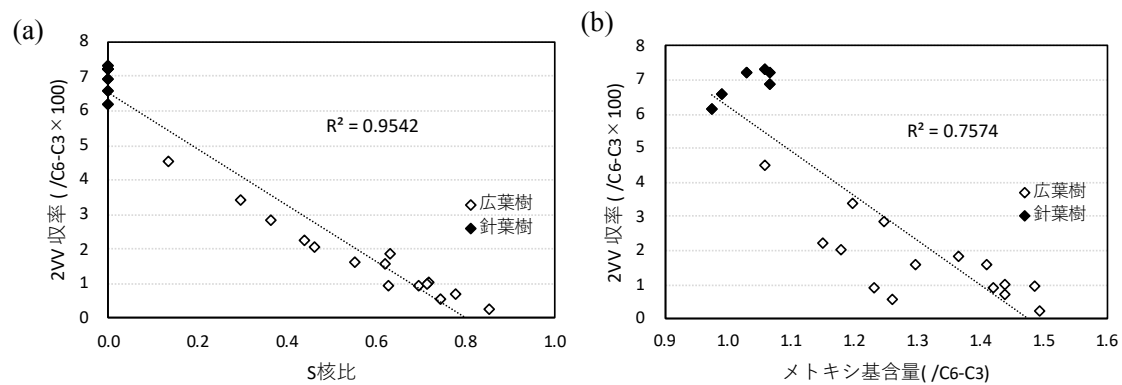


図 2-7 S/G 比と GG 型ビフェニル型生成物の収率(芳香核量 2VV として表示)の関係。S/G 比の指標として(a)S 核比{S/(V+S+2VV)比}、および(b)Klason 残渣のメトキシ基含量を使用。

#### 2.3.4 S/G 比とビフェニル型構造の形成頻度との関係

リグニン中の全 G 核から GG 型ビフェニル型構造の形成する頻度の指標として  $2VV/(V+2VV)$  比を調べた。ここで、分母の  $V+2VV$  は、ニトロベンゼン酸化生成物として得られた全 G 核の芳香核量を示しており、G 核含量の指標として用いた。

リグニン形成時、もし G 核から GG 型ビフェニル型構造が、系内に存在する S 核の影響を受けずに生成するならば、ビフェニル形成頻度の指標である  $2VV/(V+2VV)$  比は、S/G 比によらず常に一定となるはずである。例えば、S 核を含まない針葉樹の  $2VV/(V+2VV)$  比は約 0.15 で変動は非常に小さい(図 2-8)。一方、広葉樹の同比は S 核比が高い樹種ほど低くなった( $R^2=0.94$ 、図 2-8-a)。Klason 残渣のメトキシ基含量との間にも、同様に負の傾向が示唆された( $R^2=0.75$ 、図 2-8-b)。これらの結果から、ビフェニル型構造の形成は、確かに S 核の割合が高い樹種ほど抑制されていることが明らかとなった。この現象を説明する一つの仮説として、リグニン形成時、共存する S 核が G 核の一部と重合することで、GG 型ビフェニル型構造の形成が抑制された可能性が考えられる。例えば、フェノール性末端の G 核が、フェノール性水酸基または芳香核の 5 位で共存する S 核と重合して  $\beta$ -O-4、4-O-5 もしくは  $\beta$ -5 型構造を形成すると、その G 核は他の G 核とビフェニル型構造を形成することが困難となる(図 2-9)。

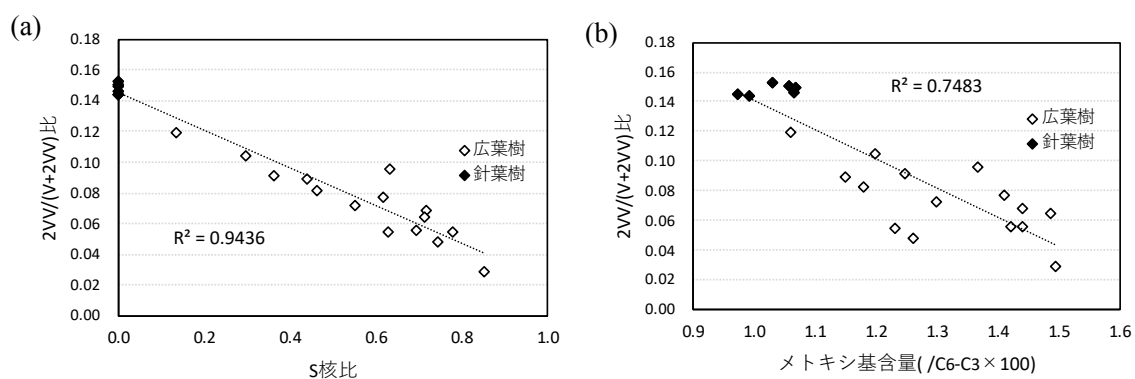


図 2-8 S/G 比と G 核から GG 型ビフェニル型構造が形成する頻度の指標との関係。S/G 比の指標として(a)S 核比{S/(V+S+2VV)比}、および(b)Klason 残渣のメトキシ基含量を使用。

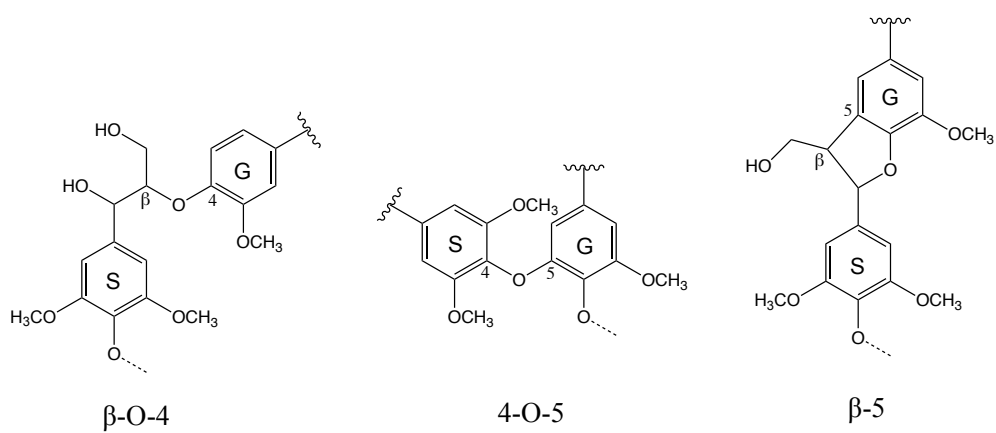


図 2-9 G 核が芳香核の 5 位またはフェノール性水酸基で共存する S 核ユニットと重合して形成される化学構造。

### 2.3.5 H/G 比と GG 型ビフェニル型構造量の関係

広葉樹の GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率は、樹種により大きく異なる値を示したが(図 2-7)、S 核を含まない針葉樹においても、6 樹種の間で VV 収率に若干の差異が認められた(6.2-7.3%、図 2-6-b)。僅かに含まれる H 核の影響を考えて、次に H/G 比と VV 収率の関係を調べた。H/G 比の指標として、ニトロベンゼン酸化生成物の全芳香核量に対する H 核型生成物の芳香核量の比を示す H 核比{ $H/(H+V+2VV)$ 比}、および Klason 残渣のメトキシ基含量を用いた。その結果、H 核比の高い樹種で、VV 収率は若干低い値を示すことが示唆された( $R^2=0.74$ 、図 2-10-a)。また、メトキシ基含量が低い、つまり H 核の割合が高いと考えられる樹種で、VV 収率は低くなることが示唆された( $R^2=0.73$ 、図 2-10-b)。

これらの結果から、H 核の割合が高い樹種ほど、GG 型ビフェニル型構造の含有量は僅かに低くなることが推測される。しかし、6 樹種間の H/G 比の差異は小さく、その傾向は明瞭とは言えなかった。また、広葉樹の時と同様に(2.3.4 項)、G 核から GG 型ビフェニル型構造の形成する頻度の指標として  $2VV/(V+2VV)$ 比を調べた。その結果、同比は、H 核比およびメトキシ基含量に対し明らかな傾向を示さなかった(図 2-11-a、b)。これについても、針葉樹 6 種間の H/G 比の差異が小さいために傾向が見られなかった可能性がある。第 4 章では、H 核含量が樹幹内で比較的大きく変化することの期待される針葉樹あて材を用いて、H 核含量がビフェニル型構造の生成にどのような影響を与えるかについて調べた。

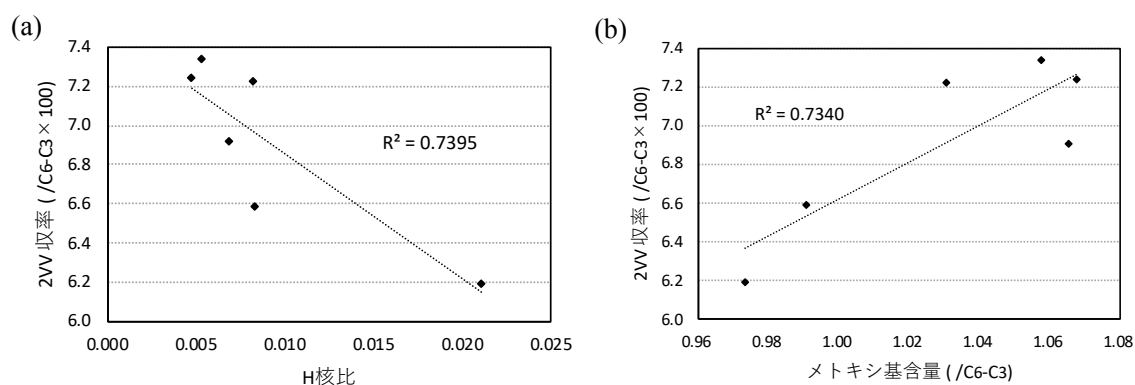


図 2-10 針葉樹 6 種をニトロベンゼン酸化法に供して得られた GG 型ビフェニル型生成物の収率(芳香核量 2VV として表示)と H/G 比の関係。H/G 比の指標として(a)H 核比 {H/(H+V+2VV)比}、および(b)Klason 残渣のメトキシ基含量を使用。

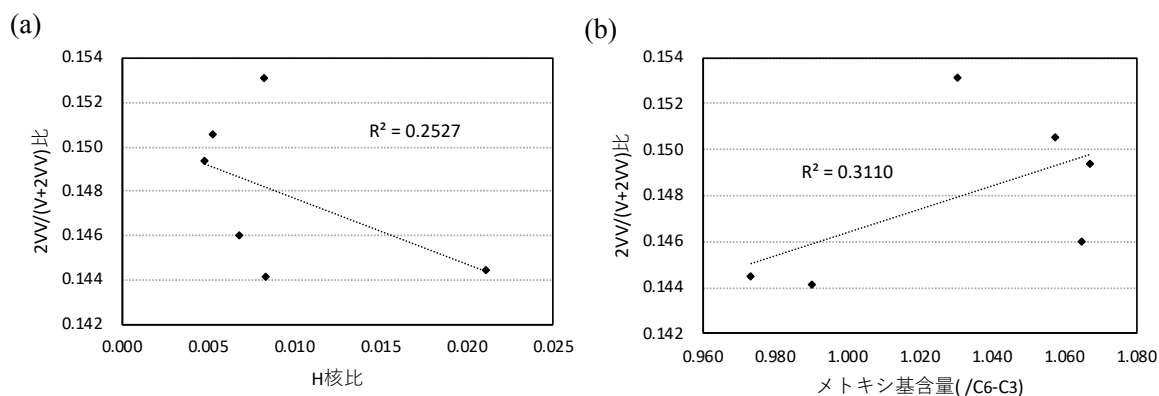


図 2-11 H/G 比と G 核から GG 型ビフェニル型構造の形成する頻度の指標との関係。H/G 比の指標として(a)H 核比 {H/(H+V+2VV)比}、および(b)Klason 残渣のメトキシ基含量を使用。

## 2.4 本章の結論

第2章では、21 樹種(針葉樹 6 種、広葉樹 15 種)をニトロベンゼン酸化法で分析し、GG 型ビフェニル型生成物の収率を樹種間で比較するとともに、ビフェニル収率と S/G 比もしくは H/G 比の関係を調べた。その結果を以下に示す。なお、S/G 比または H/G 比の指標として、Klason 残渣のメトキシ基含量に加え、ニトロベンゼン酸化生成物の収率から求めた  $S/(V+S+2VV)$  比または  $H/(H+V+2VV)$  比を用いた。

1. GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率は、リグニンの芳香核 100 単位あたり、広葉樹で 0.24-4.6 単位(以下、%)と樹種により大きく異なった。一方、針葉樹では 6.2-7.3%と樹種間の差異は広葉樹と比較して小さかった。収率は、Klason リグニン量あたりのモル収率として算出した(リグニン単位の分子量を 200 と概算)。また、ビフェニル型生成物は 1 分子に 2 つの芳香核を有するため、モル収率を 2 倍して芳香核の収率として表した。
2. S/G 比が高い樹種ほどビフェニル含有量は低くなることが、VV 収率と S/G 比の指標との負の相関として明確に示された。
3. S/G 比が高いリグニンほどビフェニル型構造が減少する第一の原因として、G 核量の減少が挙げられるが、その他の原因として共存する S 核の影響が示された。これは、リグニン中の全 G 核から GG 型ビフェニル型構造が形成する頻度の指標  $\{2VV/(V+2VV)\}$  比が、S/G 比の指標が高い樹種ほど低くなる傾向として示された。リグニン形成時、一部の G 核が共存する S 核と結合して、ビフェニル型構造を形成することができなくなったため、と説明できる。
4. 針葉樹リグニンの GG 型ビフェニル含有量は、樹種間で大きな違いはないものの、H/G 比が高い樹種でビフェニル含量は僅かに低くなることが示唆された。



## 2.5 本章の引用文献

Akiyama T, Goto H, Nawawi SD, Syafii W, Matsumoto Y and Meshitsuka G, *Erythro/threo* ratio of  $\beta$ -O-4-structures as an important structural characteristic of lignin. Part 4: Variation in the *erythro/threo* ratio in softwood and hardwood lignins and its relation to syringyl/guaiacyl ratio, *Holzforschung*, 59, 276 (2005)

Bose SK, Wilson KL, Francis RC and Aoyama M, Lignin analysis by permanganate Oxidation. I. Native spruce lignin, *Holzforschung*, 52, 297 (1998)

Capanema EA, Balakshin MY, Kadla JF, A comprehensive approach for quantitative lignin characterization by NMR spectroscopy, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 1850 (2004)

Chen CL, Characterization of lignin by oxidative degradation: use of gas chromatography-mass spectrometry technique, *Methods in Enzymology*, 161, 110 (1988)

Drumond M, Aoyama M, Chen CL and Robert D, Substituent effects on C-13 chemical shifts of aromatic carbons in biphenyl type lignin model compounds, *Journal of Organic Chemistry*, 9, 421 (1989)

Kishimoto T, Chiba W, Saito K, Fukushima K, Uraki Y and Ubukata M, Influence of syringyl to guaiacyl ratio on the structure of natural and synthetic lignins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 895 (2010)

Li Y, Akiyama T, Yokoyama T and Matsumoto Y, NMR assignment for diaryl ether structures (4-O-5 structures) in pine wood lignin, *Biomacromolecules*, 17, 1921 (2016)

Pew JC, Evidence of a biphenyl group in lignin, *Journal of Organic Chemistry*, 28, 1048 (1963)

Ralph J, Akiyama T, Kim H, Lu F, Schatz PF, Marita JM, Ralph SA, Reddy MSS, Chen F and Dixon RA, Effects of coumarate 3-hydroxylase down-regulation on lignin structure, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 8843 (2006)

Tamai A, Goto H, Akiyama T and Matsumoto Y, Revisiting alkaline nitrobenzene oxidation:

Quantitative evaluation of biphenyl structures in cedar wood lignin (*cryptomeria japonica*) by a modified nitrobenzene oxidation method, *Holzforschung*, 69, 951 (2015)

Yamasaki T and Higuchi T, *p*-Hydroxyphenyl component of grass lignin, *Mokuzai Gakkaishi*, 17, 117 (1971)

Yue F, Lu F, Sun RC and Ralph J, Syntheses of lignin-derived thioacidolysis monomers and their uses as quantitation standards, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 922 (2012)

Yue F, Lu F, Regner M, Sun R and Ralph J, Lignin-derived thioacidolysis dimers: reevaluation, new products, authentication, and quantification, *ChemSusChem*, 10, 830 (2017)

## 第 3 章

### 縮合型 H 核の ニトロベンゼン酸化による分析法の確立

### 3.1 本章の背景および目的

H/G 比とビフェニル型構造量との関係をニトロベンゼン酸化法で解析するために、本章では分析法の検討を行った。また、H 核含量が縮合型構造の生成にどう影響するかについても知見を得るために、ビフェニル型構造と並んで重要な縮合型構造であるフェニルクマラン型構造についても調べた。これまでに、リグニンモデル化合物や草本試料を用いた研究で、H 核型リグニンから得られるニトロベンゼン酸化生成物の収率の低さが指摘されている[Chan 1995, Iiyama 1990, Billa 1996, Min 2015]。しかし、上記の研究で用いられたリグニンモデル化合物は、*p*-ヒドロキシアセトフェノンやアセトグアイアコンを還元した  $\alpha$ -OH 型の比較的単純なモデル化合物であった。また、草本リグニンには *p*-クマール酸が多く含まれており、*p*-クマール酸も *p*-クマリルアルコールと同様のニトロベンゼン酸化生成物を与えることが報告されている[Iiyama 1990, Min 2015]。本章では、H 核を含むビフェニル型およびフェニルクマラン型モデル化合物、および H 核含量の高いことで知られる針葉樹圧縮あて材を同酸化法に供し、分解生成物の生成挙動を調べた。

## 3.2 実験

### 3.2.1 HG 型および HH 型ビフェニル型モデル化合物のニトロベンゼン酸化

#### 3.2.1.1 ビフェニル型モデル化合物の合成と予想されるニトロベンゼン酸化生成物の検討

HG 型のビフェニル型モデル化合物( $\alpha\text{CH}_3\text{-HV}$ )およびビフェニル型生成物( $\text{HV}_{\text{ald}}$ )の合成

図 3-1 の経路で、 $\alpha\text{CH}_3\text{-HV}$  および  $\text{HV}_{\text{ald}}$  の合成と精製を行った。

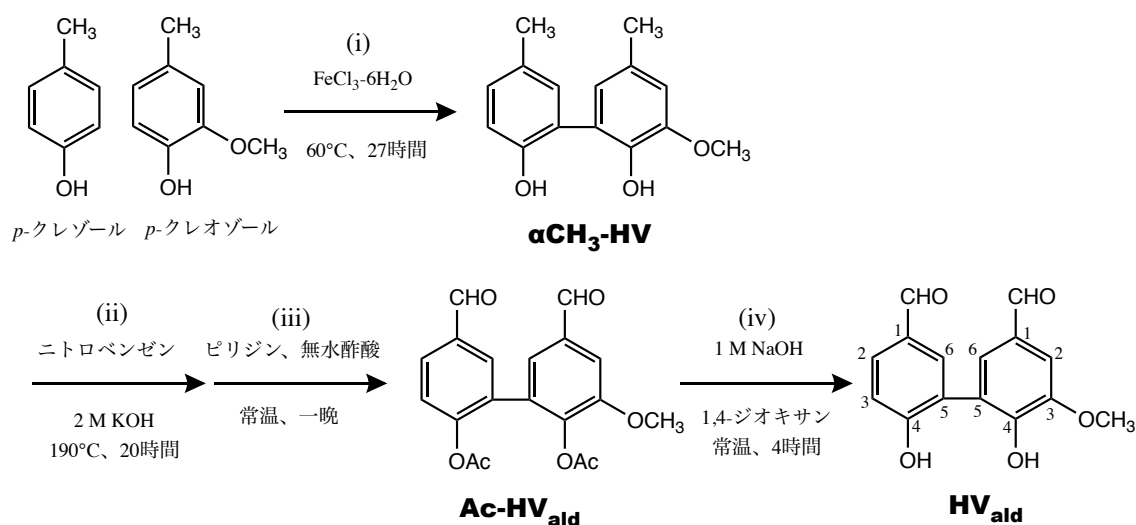


図 3-1 HG 型のビフェニル型モデル化合物( $\alpha\text{CH}_3\text{-HV}$ )およびビフェニル型生成物( $\text{HV}_{\text{ald}}$ )の合成経路。

(i)化合物  $\alpha\text{CH}_3\text{-HV}$ (4,4'-ジヒドロキシ-1,1'-ジメチル-3-メトキシ-5,5'-ビフェニル)の合成 [Reinhoudt 1981]

$\alpha$  位メチル基型の HG 型ビフェニル型化合物( $\alpha\text{CH}_3\text{-HV}$ 、図 3-1)を以下の手順で合成した。市販の *p*-クレゾール 21.6 g(0.2 mol)、*p*-クレオゾール 13.8 g(0.1 mol)および塩化鉄(III)六水和物 81.5 g(0.3 mol)を 300 ml 容のナスフラスコに加え、 $60^\circ\text{C}$ 、攪拌条件で 27 時間反応した。反応の進行は、薄層クロマトグラフィー(TLC)で確認した(展開溶媒; ヘキサン:酢酸エチル=10:5、v/v)。ナスフラスコの内容物、1 M 塩酸(200 ml)および酢酸エチル(200 ml)を 500 ml 容分液漏斗に加え振盪した。なお、1 M 塩酸は、塩化鉄(III)やこれに由来する物質をできるだけ除去する目的で加えた。有機層を 1 M 塩酸(200 ml)でさらに洗浄したところ、有機層と水層が明瞭に分離しなかったため、飽和塩化ナトリウム水溶液(100 ml)を加え分離した有機層を回収した。 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ を加え一晩静置した。 $\text{Na}_2\text{SO}_4$ をろ別した後、ろ液を  $40^\circ\text{C}$ 、減圧下で濃縮した。ヘキサンを満たしたシリカゲルカラム( $\phi 4.5 \times 19.5$  cm、ワコーゲル、C-300 HG、破

碎状、40-60  $\mu\text{m}$ )に、濃縮した生成物を少量の酢酸エチルで洗いながら加えた。展開溶媒としてヘキサン：酢酸エチル=10：2、10：5、0：10の混合溶媒を用いて、生成物を分離し出発物と TLC 上の原点付近の化合物をできるだけ除いた区画を得た。この画分を減圧下で濃縮すると、薄褐色の粉末が析出してきた。この粉末をジクロロメタンで再結晶化し、白色結晶として  $\alpha\text{CH}_3\text{-HV}$  1.9 g を得た(収率 7.7mol%、対 *p*-クレオゾール)。生成物は  $^1\text{H-NMR}$  測定によって確認した。

$^1\text{H-NMR}$  (acetone- $d_6$ , 500MHz),  $\delta_{\text{H}}$ : 2.27 (3H, s), 2.29 (3H, s), 3.86 (3H, s, OMe), 6.68 (1H, br d,  $J = 2\text{Hz}$ , G 核の 6 位(G6)), 6.80-6.84 (2H, m, G2 および H 核の 3 位(H3)), 7.01 (1H, br dd,  $J = 8.3, 2\text{Hz}$ , H2), 7.06 (1H, br d,  $J = 2\text{Hz}$ , H6)。

#### (ii)ビフェニル型モデル化合物( $\alpha\text{CH}_3\text{-HV}$ )のニトロベンゼン酸化によるベンジル位の酸化

$\alpha\text{CH}_3\text{-HV}$  (97.7、97.5、97.5、97.8、97.6 mg)を各々10ml 容オートクレーブに加え、さらに 2 M 水酸化カリウム(7 ml)、ニトロベンゼン(2 ml)を加えた。190°C に設定したオイルバス中で 20 時間反応した。なお、反応条件は、後述する 3.3.1.2 項の条件検討の結果を考慮し設定した。氷冷後、5 本全てのオートクレーブの内容物を 200 ml 容ビーカーに合わせた。さらに、オートクレーブ内を 0.1 M 水酸化ナトリウム(5 ml $\times$ 3)で洗浄し、その洗浄液と先の内容物を合わせた。500 ml 容分液漏斗を用いて、反応液をジクロロメタン(75 ml $\times$ 3)で洗浄した。水層の pH を 2 M 塩酸で 1 に調整し、これをジクロロメタン(100 ml $\times$ 2)およびジエチルエーテル(100 ml)の順に抽出した。これらの有機層を合わせ、イオン交換水(100 ml)で洗浄後、硫酸ナトリウムを加え 1 時間静置した。硫酸ナトリウムをろ別し、エバポレーターを用いてろ液を濃縮した。

#### (iii)粗生成物 $\text{HV}_{\text{ald}}$ のアセチル化とその精製

類似のビフェニル型化合物であるダイバニリン( $\text{VV}_{\text{ald}}$ )やバニリンバニリン酸( $\text{VV}_{\text{ald-acid}}$ )は、ジクロロメタンや酢酸エチル等、通常精製に用いる溶媒に難溶であることから、HG 型ビフェニル型化合物  $\text{HV}_{\text{ald}}$  もこれらの溶媒に難溶であることが想定される[Tamai 2015]。そこで、前項(ii)で得た粗生成物から化合物  $\text{HV}_{\text{ald}}$  を精製するにあたり、一旦各種溶媒に易容なアセチル化物として分離・精製し、得られた  $\text{HV}_{\text{ald}}$  アセチル化物を脱アセチル化することで化合物  $\text{HV}_{\text{ald}}$  を精製した。

#### 化合物 $\alpha\text{CH}_3\text{-HV}$ のニトロベンゼン酸化生成物のアセチル化

(ii)で得た  $\alpha\text{CH}_3\text{-HV}$  のニトロベンゼン酸化生成物をピリジン(5 ml)に溶解し、無水酢酸(5 ml)を加え、常温で一晩攪拌した。TLC(ヘキサン:酢酸エチル=6:4, v/v)で反応の進行を確

認した。この反応溶液にエタノールを加え 50°C で濃縮するという操作を、ピリジンや酢酸の臭いなくなるまで繰り返し、濃褐色のシロップ状のアセチル化物(0.72 g)を得た。

#### Ac-HV<sub>ald</sub> の精製

前記のアセチル化した粗生成物を、シリカゲルクロマトグラフィーにより分離・精製したところ、褐色のシロップとして化合物 Ac-HV<sub>ald</sub> 0.15 g を得た(収率 21.1mol%、対  $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HV)。

<sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>, 500MHz),  $\delta_{\text{H}}$ : 2.08 (3H, s, CH<sub>3</sub>-CO), 2.12 (3H, s, CH<sub>3</sub>-CO), 3.95 (3H, s, OMe), 7.39 (1H, d, J = 8Hz, H3), 7.43 (1H, d, J = 2Hz), 7.56 (1H, d, J = 2Hz), 7.85 (1H, d, J = 2Hz), 7.98 (1H, dd, J = 8.3, 2Hz, H2), 9.97 (1H, s, CHO), 10.02 (1H, s, CHO)。

#### (iv)Ac-HV<sub>ald</sub> の脱アセチル化

前項(iii)で精製した化合物 Ac-HV<sub>ald</sub> 150 mg(0.42 mmol)を、10 ml 容のナス型フラスコ内でジオキサン(1.2 ml)に溶解し、1M 水酸化ナトリウム(1.7 ml)を加え室温で 4 時間攪拌した。反応の進行は、TLC(展開溶媒: ヘキサン:酢酸エチル=1:2、v/v)で確認した。1 M 塩酸を加え pH を約 1 に調整した後、得られた懸濁液をガラスフィルターでろ過した。残渣は、水で洗浄した後、アセトンに溶かして回収した。減圧乾固後、薄褐色の粉末として化合物 HV<sub>ald</sub>(デヒドロバニリン-4-ヒドロキシベンズアルデヒド) 97.3 mg を得た(収率 85.2mol%、対化合物 Ac-HV<sub>ald</sub>)。

<sup>1</sup>H-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 500MHz),  $\delta_{\text{H}}$ : 3.91 (3H, s, OMe), 7.07 (1H, d, J = 8Hz, H3), 7.41 (1H, d, J = 2Hz, G2), 7.42 (1H, d, J = 2Hz, G6), 7.70 (1H, d, J = 2Hz, H6), 7.76 (1H, dd, J = 8, 2Hz, H2), 9.79 (1H, s, G 核の CHO), 9.81 (1H, s, H 核の CHO). <sup>13</sup>C-NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 125MHz),  $\delta_{\text{C}}$ : 56.12 (OMe), 109.21 (G2), 116.18 (H3), 124.84 (G5), 125.10 (H5), 127.88 (G1), 128.23 (H1), 128.32 (G6), 131.07 (H2), 133.80 (H6), 148.26 (G3), 150.54 (G4), 161.01 (H4), 191.28 (H 核の CHO), 191.44 (G 核の CHO)。

HH 型のビフェニル型モデル化合物( $\alpha\text{CH}_3\text{-HH}$ )およびビフェニル型生成物( $\text{HH}_{\text{ald}}$ )

HH 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha\text{CH}_3\text{-HH}$ 、図 3-2-a)は、秋山らが合成した化合物を用いた[Reinhoudt 1981]。また、HH 型ビフェニル型生成物( $\text{HH}_{\text{ald}}$ 、図 3-2-b)については、標品を用意できなかったことから、ニトロベンゼン酸化生成物を GC-MS 測定し、分子イオンピークの  $m/z$  値と分子量の一致を基に推定を試みた。

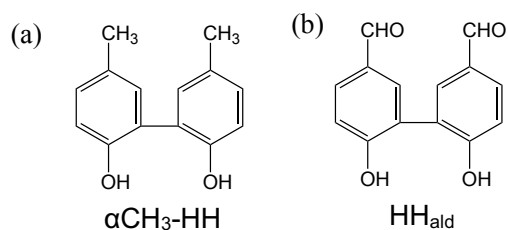


図 3-2 (a)HH 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha\text{CH}_3\text{-HH}$ )、および(b)ニトロベンゼン酸化法による HH 型ビフェニル型生成物( $\text{HH}_{\text{ald}}$ )。



### 3.2.1.2 ビフェニル型モデル化合物のニトロベンゼン酸化

HG 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HV、図 3-1)のニトロベンゼン酸化生成物をトリメチルシリル(TMS)化後、ガスクロマトグラフィー(GC-FID)で分析し、ビフェニル型生成物(HV<sub>ald</sub>)ピークの面積比( /EV)への反応条件(塩基の種類、反応温度および反応時間)の影響を調べた(表 3-1)。反応時間の影響は実験番号 1 と 2、塩基の種類の影響は実験番号 2 と 3、反応温度の影響は実験番号 4~6 の比較によりそれぞれ調べた。実験手順は基本的に 2.2.2 項の分析手順に従った。実験番号 1~3 では、2 M の水酸化ナトリウムまたは水酸化カリウム(4 ml)およびニトロベンゼン(250  $\mu$ l)を用いた。実験番号 4~6 では、2 M 水酸化カリウム(7 ml)およびニトロベンゼン(400  $\mu$ l)を用いた。内部標準物質としてエチルバニリン(EV、25  $\mu$ mol)を加えた。GC 分析には、2.2.3 項の測定条件およびカラム昇温条件 B を用いた。

表 3-1 HG 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HV)を用いて検討したニトロベンゼン酸化法の反応条件(塩基の種類、反応温度および反応時間)の詳細。

実験番号	$\alpha$ CH <sub>3</sub> -HV(mmol)	塩基の種類	温度(°C)	時間(h)
1	0.04	NaOH	170	2
2	0.03	NaOH	170	17
3	0.03	KOH	170	17
4	0.40	KOH	170	17
5	0.40	KOH	180	17
6	0.40	KOH	190	17.5

HH 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HH、図 3-2-a)のニトロベンゼン酸化には、3.3.1.2 項で後述する反応条件の検討結果を考慮し、2 M 水酸化カリウム、190°C、反応 17 時間の条件を用いた。内部標準物質としてエチルバニリン(EV)を加えた。反応生成物は TMS 化後 GC-MS で分析した。GC-MS の測定条件およびカラム昇温条件を以下に示す。

GC-MS 測定条件: GC GC-2010(SHIMADZU); MS PARVUM2(SHIMADZU); イオン化 70eV; カラム Inert-Cap-1, 30 m×0.25 mm; キャリアガス ヘリウム; インジェクション温度 260°C; インタフェース温度 260°C; イオン源温度 260°C; スキャン範囲 m/z 30-650

GC-MS カラム昇温条件: 130°C で 10 分保持→5°C/分で 145°C へ昇温、90 分保持→10°C/分で 200°C へ昇温、40 分保持→10°C/分で 215°C へ昇温、38 分保持→5°C/分で 260°C へ昇温、10 分保持 (分析時間 207.0 分)

### 3.2.1.3 ビフェニル型モデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の検討

HG 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HV、図 3-1)のニトロベンゼン酸化生成物と 3.2.1.1 項で合成した HG 型ビフェニル型生成物(HV<sub>ald</sub>、図 3-1)をトリメチルシリル(TMS)化後、ガスクロマトグラフィー(GC-FID)およびガスクロマトグラフ/質量分析計(GC-MS)で分析した。GC-FID の保持時間および GC-MS のマスフラグメントパターンを両者で比較することにより同定を試みた。GC 分析は、2.2.3 項の測定条件とカラム昇温条件 B を用いて行った。GC-MS 分析の測定条件およびカラム昇温条件を以下に示す。

GC-MS 測定条件: GC GC-2010(SHIMADZU); MS PARVUM2(SHIMADZU); イオン化 70eV; カラム Inert-Cap-1, 30 m×0.25 mm; キャリアガス ヘリウム; インジェクション温度 260°C; インタフェース温度 260°C; イオン源温度 260°C; スキャン範囲 m/z 30-650

GC-MS カラム昇温条件: 130°C で 10 分保持→5°C/分で 150°C へ昇温、13 分保持→3°C/分で 190°C へ昇温→10°C/分で 215°C へ昇温、45 分保持→10°C/分で 230°C へ昇温、20 分保持→10°C/分で 260°C へ昇温、10 分保持(分析時間 122.3 分)

HH 型ビフェニル型生成物(HH<sub>ald</sub>、図 3-2-b)については、標品がないために同定することができなかったが、HH 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HH、図 3-2-a)のニトロベンゼン酸化生成物を GC-MS で測定し、ピークの m/z 値と分子量の一致を基に推定を試みた。GC-MS の測定条件およびカラム昇温条件は 3.2.1.2 項の条件を用いた。

### 3.2.2 H 核型フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化

#### 3.2.2.1 フェニルクマラン型モデル化合物の合成

図 3-3 の合成経路で、デヒドロジ *p*-クマリルアルコール(化合物 4)を合成した。

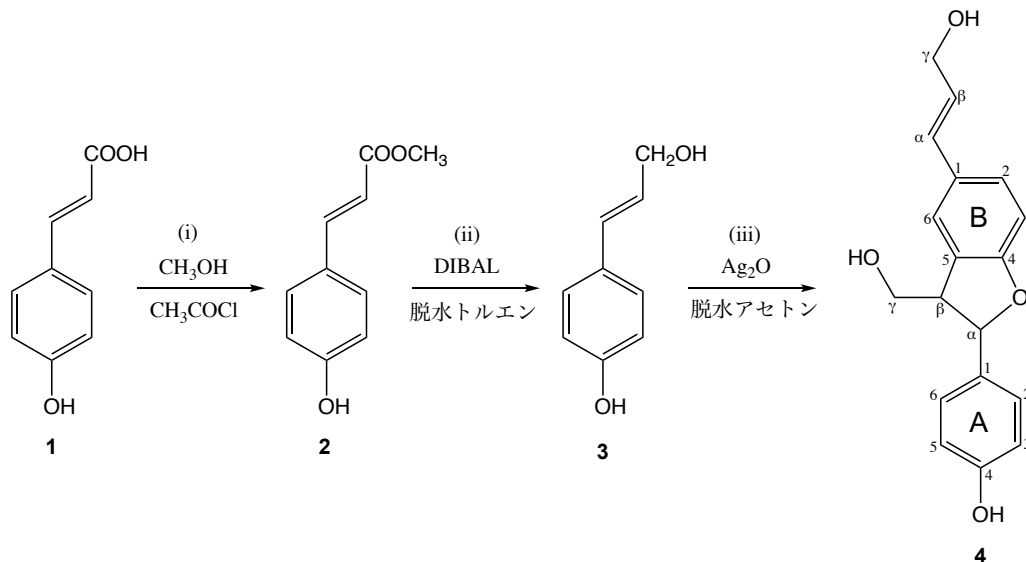


図 3-3 デヒドロジ *p*-クマリルアルコールの合成経路。

#### (i) *p*-ヒドロキシ桂皮酸メチルエステル(化合物 2)

*p*-ヒドロキシ桂皮酸 49.6 g(0.3 mol、化合物 1、図 3-3)を 1 L 容ナスフラスコに加え、メタノール(500 ml)に溶解した。*p*-ヒドロキシケイヒ酸のメタノール溶液に、塩化アセチル(42.6 ml、0.6 mol)を氷冷下で 20 分かけてゆっくりと滴下した。滴下後、再び常温に戻し一昼夜攪拌した。反応の進行は薄層クロマトグラフィー(TLC)で確認した(展開溶媒; ヘキサン: 酢酸エチル=1:3、v/v)。溶媒を減圧留去した後、*p*-ヒドロキシケイヒ酸メチルエステル(化合物 2)の粗結晶を得た。残存している塩酸を除去する目的で、少量のメタノールを加えエバポレータで濃縮・乾固し、この操作を計 5 回繰り返した。粗結晶をメタノールで再結晶化し、白色結晶 43.8 g(87.7mol%、対 *p*-ヒドロキシケイヒ酸)を得た。

<sup>1</sup>H-NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz),  $\delta_{\text{H}}$ : 3.71 (3H, s, CH<sub>3</sub>), 6.34 (1H, d, *J* = 16Hz,  $\beta$ ), 6.88 (2H, d, *J* = 9Hz, Ar), 7.53 (2H, d, *J* = 9Hz, Ar), 7.59 (1H, d, *J* = 16Hz,  $\alpha$ )

#### (ii) *p*-クマリルアルコール(化合物 3)[Quideau 1992]

*p*-ヒドロキシケイヒ酸メチルエステル 3.6 g(20 mmol、化合物 2)を 200 ml 容ナスフラスコに加え、シリコン栓をした。フラスコ内を窒素置換した後、脱水トルエン(50 ml)をシリンジで加えた。氷冷、攪拌の下、1.5 mol/l 水素化ジイソブチルアルミニウム(DIBAL)のトルエン溶液(3.3ml、80 mmol)をシリンジで 80 分かけて滴下した。さらに 2 時間攪拌を続けた

後、2 ml の酢酸エチルを滴下し過剰の還元剤を失活させて反応を停止した。なお、反応停止直前に TLC(展開溶媒; ヘキサン:酢酸エチル=1:1、v/v)で出発物質のスポットの消失を確認した。500 ml 容分液ロートに酢酸エチル(100 ml)および細かく砕いた氷(約 150 ml)を加え、これに反応溶液と氷冷した 2 M 塩酸(100 ml)を加え激しく振とうした。有機層を回収した後、さらに水層を酢酸エチル(100 ml+50 ml)で 2 回抽出した。有機層を合わせ、2 M 塩酸(50 ml)で洗浄した。続けてこの有機層をイオン交換水で pH=4 になるまで繰り返し洗浄し、飽和塩化ナトリウム水溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムを加え 30 分間静置した。硫酸ナトリウムをろ別後、減圧下 25°C 以下で濃縮し、白色粉末として *p*-クマリルアルコール(化合物 3)を 2.9 g 得た(97.7mol%、対 *p*-ヒドロキシケイヒ酸メチルエステル)。

<sup>1</sup>H-NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz), δ<sub>H</sub>: 4.17 (2H, d, J = 5Hz, γ), 6.19 (1H, dt, J = 16, 5Hz, β), 6.49 (1H, d, J = 16Hz, α), 6.78 (2H, d, J = 9Hz, Ar), 7.25 (2H, d, J = 9Hz, Ar)

(iii)デヒドロジ *p*-クマリルアルコール(化合物 4、β-5 型二量体モデル化合物)

*p*-クマリルアルコール 0.75 g(5 mmol、化合物 3)、酸化銀(I)2.3 g(10 mmol)、および硫酸マグネシウムで脱水したアセトン(50 ml)を 100 ml 容ナスフラスコに加え、常温で 23 時間攪拌した。反応の進行は TLC で確認した(展開溶媒; ヘキサン:酢酸エチル=1:3、v/v)。セライトをろ過補助剤として用い、反応懸濁液をガラスフィルターでろ過し、ろ別後の残渣をアセトンで洗浄した。ろ液と洗浄液を合わせ、減圧下 30°C 以下で濃縮し、シロップを得た。この生成物を分取用 TLC(展開溶媒; ヘキサン:酢酸エチル=1:3、v/v)で繰り返し精製して、0.17 g のデヒドロジ *p*-クマリルアルコール(化合物 4)を白色固体として得た(収率 22.7mol%)。

<sup>1</sup>H-NMR (acetone-*d*<sub>6</sub>, 500 MHz), δ<sub>H</sub>: 3.48 (1H, m, Aβ), 3.81 (1H, dd, J = 11, 7Hz, Aγ1), 3.87 (1H, dd, J = 11, 6Hz, Aγ2), 4.19 (2H, d, J = 6Hz, Bγ), 5.54 (1H, d, J = 6Hz, Aα), 6.22 (1H, dt, J=16, 6Hz, Bβ), 6.53 (1H, d, J = 16Hz, Bα), 6.73 (1H, d, J = 9Hz, BAr), 6.81 (2H, d, J = 9Hz, AAr), 7.20 (1H, d, J = 9Hz, BAr), 7.23 (2H, d, J = 9Hz, AAr), 7.39 (1H, s, B6)

### 3.2.2.2 フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化

#### 試料

H 核型のフェニルクマラン型モデル化合物( $\beta$ -5 結合)として、デヒドロジ *p*-クマリルアルコール(化合物 4、図 3-3)を用いた。この  $\beta$ -5 型 2 量体モデル化合物をシリカゲル存在下、室温で一晩、減圧乾燥した後、2 mM のエタノール溶液を調製した。このエタノール溶液(4  $\mu$ mol、2 mM $\times$ 2 ml)を 10 ml 容オートクレーブに加え、乾燥窒素を吹き付けてエタノールを留去した。

#### ニトロベンゼン酸化

デヒドロジ *p*-クマリルアルコールのニトロベンゼン酸化は 2.2.2 項に準じて行った。デヒドロジ *p*-クマリルアルコール(4  $\mu$ mol)、2 M 水酸化ナトリウム(4 ml)およびニトロベンゼン(250  $\mu$ l)を 10 ml 容オートクレーブに加え、170°C に設定したオイルバス中で 2、4、8、16、24、36、48 時間反応した。氷冷後、内部標準物質としてエチルバニリン(EV、1  $\mu$ mol)を 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液としてオートクレーブに加え(0.5 mM $\times$ 2 ml)、蓋をして激しく振盪した。オートクレーブの内容物を 50 ml 容ビーカーに移し、さらにオートクレーブ内を 0.1 M 水酸化ナトリウム(5 ml $\times$ 3)で洗浄し、この洗浄液と先の内容物を合わせた。100 ml 容分液漏斗を用いて、反応液をジクロロメタン(15 ml $\times$ 3)で洗浄した。水層を上記 50 ml 容ビーカーに取り出し、2 M 塩酸で pH=1 に調整した。この水層を 100 ml 容分液漏斗に戻し、ジクロロメタン(20 ml $\times$ 2)、およびジエチルエーテル(20 ml $\times$ 1)で続けて抽出した。これらの有機層を合わせ、イオン交換水(20 ml $\times$ 1)で洗浄後、硫酸ナトリウムを加え静置した。硫酸ナトリウムをろ別し、溶媒を減圧留去した。濃縮乾固した反応生成物をピリジン 200  $\mu$ l に溶解し、N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(BSA)200  $\mu$ l を加え、100°C で 10 分間処理しトリメチルシリル化(TMS 化)を行った。放冷後、1  $\mu$ l をガスクロマトグラフィー(GC)で分析した。分解生成物の同定を目的に GC-MS 測定を行い、生成物の定量には GC-FID を用いた。それぞれの測定条件およびカラム昇温条件を以下に記す。

GC-FID 測定条件: GC GC-2014(SHIMADZU); カラム Inert-Cap-1, 30 m $\times$ 0.25 mm; キャリアガス ヘリウム; カラム流量 1.83 ml/分; インジェクション温度 250°C; デテクター温度 280°C; スプリット比 60

カラム昇温条件: 150°C で 15 分保持 $\rightarrow$ 3°C/分で 200°C まで昇温、保持時間なし $\rightarrow$ 10°C/分で 280°C まで昇温、5 分保持(分析時間 44.7 分)

GC-MS 測定条件: GC GC-2010(SHIMADZU); MS PARVUM2(SHIMADZU); イオン化 70eV; カラム Inert-Cap-1, 30 m×0.25 mm; キャリアガス ヘリウム; インジェクション温度 250°C; インタフェース温度 280°C; イオン源温度 250°C; スキャン範囲 m/z 20-660

GC-MS カラム昇温条件: 150°C で 15 分保持→3°C/分で 200°C まで昇温、保持時間なし→10°C/分で 280°C まで昇温、5 分保持(分析時間 44.7 分)

### 3.2.2.3 フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の同定

デヒドロジ *p*-クマリルアルコール(化合物 4、図 3-3)のニトロベンゼン酸化生成物として、想定される 6 種類の化合物を図 3-4 に示す。このうち、5-ホルミル-4-ヒドロキシ安息香酸(HA<sub>5</sub>-CHO)を除く 5 種類の化合物{4-ヒドロキシベンズアルデヒド(H<sub>ald</sub>)、4-ヒドロキシ安息香酸(H<sub>acid</sub>)、5-ホルミル-4-ヒドロキシベンズアルデヒド(H<sub>5</sub>-CHO)、5-カルボキシ-4-ヒドロキシベンズアルデヒド(H<sub>5</sub>-COOH)および 5-カルボキシ-4-ヒドロキシ安息香酸(HA<sub>5</sub>-COOH)}については、市販品が入手可能でありこれらを標品として用いた。HA<sub>5</sub>-CHO については、標品を用意できなかったことから、GC-MS を用いて、分子量から推測される分子イオンピークを示すピークが、分解生成物中に存在するかを調べた。

次に、HA<sub>5</sub>-CHO 以外の 5 種類の標品とデヒドロジ *p*-クマリルアルコールのニトロベンゼン酸化生成物をトリメチルシリル(TMS)化後、ガスクロマトグラフィー(GC-FID)およびガスクロマトグラフ/質量分析計(GC-MS)で分析し、GC-FID の保持時間および GC-MS のマスフラグメントパターンを両者で比較することで同定を試みた。GC-FID と GC-MS の測定条件およびカラム昇温条件は、3.2.2.2 項で前述した条件を用いた。

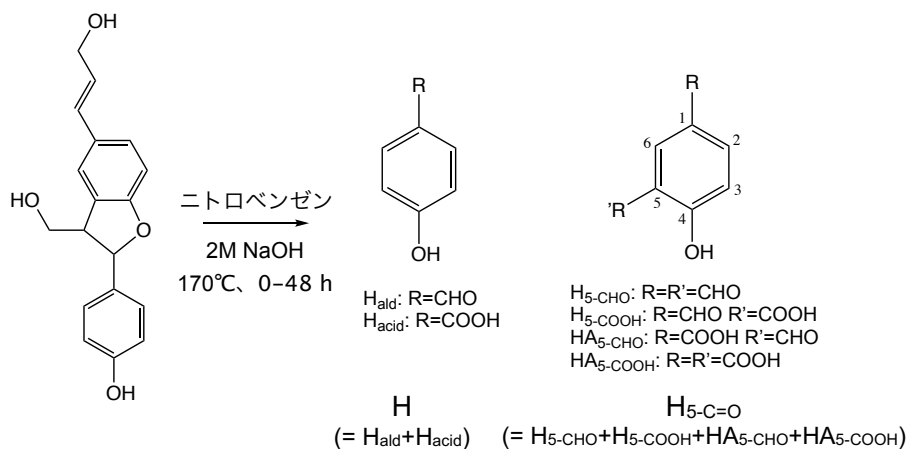


図 3-4 デヒドロジ *p*-クマリルアルコールのニトロベンゼン酸化生成物として想定される 6 種類の化合物。H: 非縮合型、および H<sub>5</sub>-C=O: β-5 型生成物。

### 3.2.2.4 検量線の作成

4 種類の標品( $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$ 、 $H_5-COOH$  および  $HA_5-COOH$ 、図 3-4)を用いて、内部標準法により検量線を作成した。なお、3.3.2.1 項で後述するように、 $H_5-CHO$  と  $HA_5-CHO$  は検出限界以下であったことから、これらの検量線は作成しなかった。内部標準物質としてエチルバニリン(EV)を用いた。以下にその手順を示す。

五酸化二リン存在下、 $40^{\circ}C$  で一晩、減圧乾燥した標品を用いて、表 3-1 に示すように EV に対してモル比( /EV)の異なる混合溶液をピリジン溶液として調製した。調製方法の詳細については後述する。 $H_5-COOH$  および  $HA_5-COOH$  がエタノール等の低沸点溶媒に難溶であったため、溶媒としてピリジンを用いた。 $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$ 、 $H_5-COOH$ 、 $HA_5-COOH$  の検量線は、すべて 4 点検量線として作成した。バイアル瓶に上記の混合溶液 200  $\mu l$  および N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(BSA)200  $\mu l$  を加え、 $100^{\circ}C$  で 10 分間処理し、トリメチルシリル化(TMS 化)を行った。TMS 化物をガスクロマトグラフィー(GC-FID)で分析した。GC 分析は、3.2.2.2 項の測定条件およびカラム昇温条件を用いた。

表 3-2 混合溶液中の内部標準物質(EV)に対する各標品のモル比。

物質名	内部標準物質に対するモル比( /EV*)			
4-ヒドロキシベンズアルデヒド( $H_{ald}$ )	1.5	1.0	0.50	0.25
4-ヒドロキシ安息香酸( $H_{acid}$ )	0.36	0.24	0.12	0.060
5-カルボキシ-4-ヒドロキシ ベンズアルデヒド( $H_5-COOH$ )	1.2	0.80	0.40	0.20
5-カルボキシ-4-ヒドロキシ 安息香酸( $HA_5-COOH$ )	0.12	0.080	0.060	0.040

\* EV: エチルバニリン (7.5  $\mu mol$  = 7.5 mM  $\times$  1 ml)

表 3-2 の混合溶液の詳細な調製方法を以下に示す。

乾燥後の標品を用いて、表 3-3 に記した内部標準溶液、および溶液 A1、A2 をピリジン溶液として調製した。溶液 A1 と A2 は、さらにピリジンで希釈した。溶液 A1 は 0.60、0.40、0.20 および 0.10 倍に、溶液 A2 は 0.12、0.080、0.060 および 0.040 倍に希釈した(表 3-2)。溶液 A1(1 ml)、溶液 A2(1 ml)、および内部標準溶液(1 ml)を混合し、4 種類の混合溶液を調製した。各混合溶液(200  $\mu l$ )を TMS 化後、2  $\mu l$  を GC 分析した。

表 3-3 調製した溶液の濃度、およびその希釈率と混合量(表 3-1 の詳細)。

溶液名	調製濃度	検量線作成に用いた溶液の希釈率、およびEV溶液との混合量				
A1	H <sub>ald</sub> : 18.8 mM, H <sub>acid</sub> : 4.5 mM H <sub>5</sub> -COOH: 15.0 mM	溶液名	0.60A1	0.40A1	0.20A1	0.10A1
		希釈率	× 0.60	× 0.40	× 0.20	× 0.10
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
A2	HA <sub>5</sub> -COOH: 7.5 mM	溶液名	0.12A2	0.080A2	0.060A2	0.040A2
		希釈率	× 0.12	× 0.080	× 0.060	× 0.040
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
内部標準	EV: 7.5 mM	希釈率	× 1.0	× 1.0	× 1.0	× 1.0
		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

デヒドロジ *p*-クマリルアルコールから得られたニトロベンゼン酸化生成物の GC-FID 保持時間、検量線、相関係数  $R^2$ 、および内部標準物質(EV)に対するモル比の有効範囲を以下に示す。

保持時間: H<sub>ald</sub> = 4.7 min、EV = 10.5 min、H<sub>acid</sub> = 13.0 min、H<sub>5</sub>-COOH = 21.4 min、HA<sub>5</sub>-COOH = 31.4 min。

検量線:

H<sub>ald</sub>:  $Y = 1.1638 X + 0.0108$  (相関係数  $R^2 = 1.000$ )

モル比範囲(H<sub>ald</sub>/EV) :  $0.25 \leq Y \leq 1.5$

H<sub>acid</sub>:  $Y = 0.8197 X + 0.0068$  (相関係数  $R^2 = 1.000$ )

モル比範囲(H<sub>acid</sub>/EV) :  $0.060 \leq Y \leq 0.36$

H<sub>5</sub>-COOH:  $Y = 0.8281 X + 0.0958$  (相関係数  $R^2 = 0.9984$ )

モル比範囲(H<sub>5</sub>-COOH/EV) :  $0.20 \leq Y \leq 1.2$

HA<sub>5</sub>-COOH:  $Y = 0.8149 X + 0.0289$  (相関係数  $R^2 = 0.9987$ )

モル比範囲(HA<sub>5</sub>-COOH/EV) :  $0.040 \leq Y \leq 0.12$

Y は内部標準 EV に対するモル比( /EV)、X は GC-FID の面積比( /EV)を示す。



### 3.2.3 スギあて材のニトロベンゼン酸化

#### 3.2.3.1 スギあて材のニトロベンゼン酸化

##### 試料

4.2.1 項で詳しく後述するように、スギのあて部 0°(360°)と対向部 180°から調製した脱脂木粉を試料として用いた(図 4-1)。

##### ニトロベンゼン酸化

スギのあて部と対向部をニトロベンゼン酸化法に 170°C、190°C、210°C、反応 2 時間の条件下で供した。反応後は 2.2.2 項に従い処理した。濃縮乾固した反応生成物は、ピリジン 200  $\mu$ l に溶解後、約 100  $\mu$ l を 1 ml 容ねじ蓋付きバイアル瓶に移した。このバイアル瓶に N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(BSA)100  $\mu$ l を加え、100°C で 10 分間加熱しトリメチルシリル化(TMS 化)を行った。GC-FID の測定条件およびカラム昇温条件を以下に示す。

GC-FID 測定条件: GC GC-2014(SHIMADZU); カラム Inert-Cap-1, 30 m $\times$ 0.25 mm; キャリアガス ヘリウム; カラム流量 1.83 ml/分; インジェクション温度 280°C; ディテクター温度 280°C; スプリット比 60

カラム昇温条件 D: 130°C で 10 分保持 $\rightarrow$ 5°C/分で 145°C  $\rightarrow$ 昇温、90 分保持 $\rightarrow$ 10°C/分で 200°C  $\rightarrow$ 昇温、40 分保持 $\rightarrow$ 10°C/分で 215°C  $\rightarrow$ 昇温、38 分保持 $\rightarrow$ 5°C/分で 280°C  $\rightarrow$ 昇温、10 分保持(分析時間 211.0 分)

#### 3.2.3.2 スギあて材のニトロベンゼン酸化生成物の同定

針葉樹あて材のニトロベンゼン酸化生成物として、図 3-5 の 14 種類の化合物を想定した。4-ヒドロキシベンズアルデヒド( $H_{ald}$ )、4-ヒドロキシ安息香酸( $H_{acid}$ )、バニリン( $V_{ald}$ )、バニリン酸( $V_{acid}$ )、5-ホルミル-4-ヒドロキシベンズアルデヒド( $H_{5-CHO}$ )、5-カルボキシ-4-ヒドロキシベンズアルデヒド( $H_{5-COOH}$ )および 5-カルボキシ-4-ヒドロキシ安息香酸( $HA_{5-COOH}$ )は、市販品を標品として用いた。ダイバニリン( $VV_{ald}$ )、バニリンバニリン酸( $VV_{ald-acid}$ )およびダイバニリン酸( $VV_{acid}$ )は玉井ら[Tamai 2015]が、5-ホルミルバニリン( $V_{5-CHO}$ )、5-カルボキシバニリン( $V_{5-COOH}$ )および 5-ホルミルバニリン酸( $VA_{5-CHO}$ )は奥野ら[奥野 2016]が合成した標品を使用した。また、デヒドロバニリン-4-ヒドロキシベンズアルデヒド( $HV_{ald}$ )は 3.2.2.1 項で合成した。

次に、これら 14 種類の標品とスギあて部のニトロベンゼン酸化生成物を TMS 化後、ガスクロマトグラフィー(GC-FID)およびガスクロマトグラフ/質量分析計(GC-MS)で分析し、GC-FID の保持時間および GC-MS のマスフラグメントパターンを両者で比較することで同定を試みた。HH 型ビフェニル型生成物(HH<sub>ald</sub>、図 3-2-b)については、標品がないために同定することができなかったが、スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物を GC-MS で測定し、ピークの m/z 値と分子量の一致を基に推定を試みた。GC-FID 分析には 3.2.3.1 項の、GC-MS 分析には 3.2.1.2 項の測定条件およびカラム昇温条件を用いた。

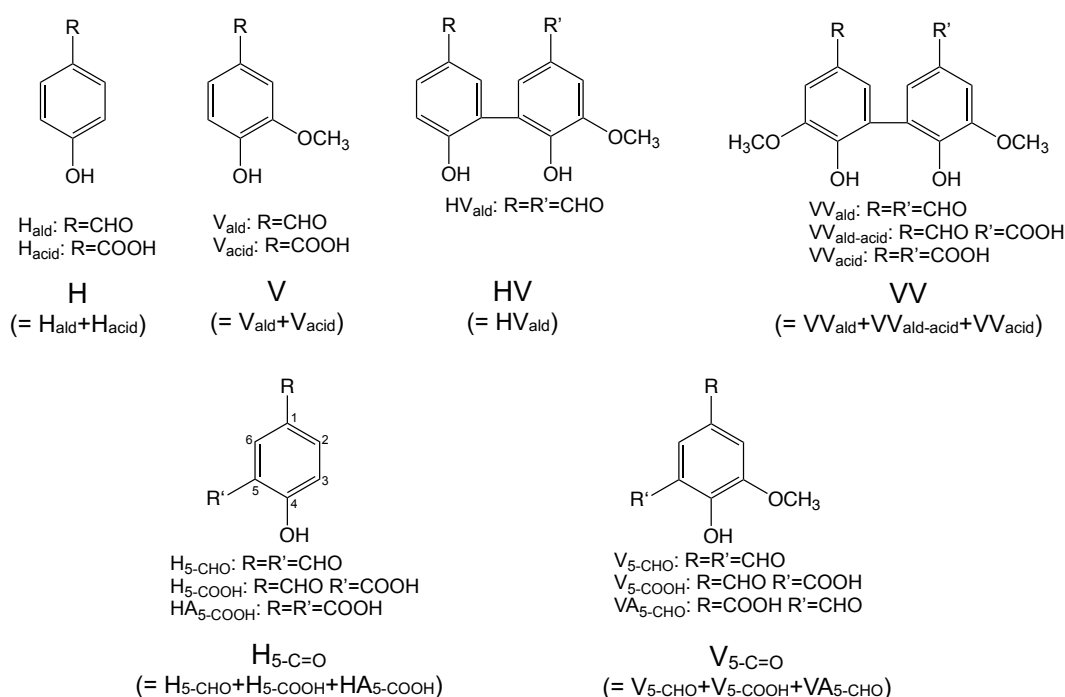


図 3-5 針葉樹あて材のニトロベンゼン酸化生成物として定量した 14 種類の化合物。  
H および V: 非縮合型、HV および VV: ビフェニル型、H<sub>5-C=O</sub> および V<sub>5-C=O</sub>: β-5 型生成物。

### 3.2.3.3 検量線の作成

14 種類の標品( $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$ 、 $V_{ald}$ 、 $V_{acid}$ 、 $HV_{ald}$ 、 $VV_{ald}$ 、 $VV_{ald-acid}$ 、 $VV_{acid}$ 、 $H_5-CHO$ 、 $H_5-COOH$ 、 $HA_5-COOH$ 、 $V_5-CHO$ 、 $V_5-COOH$ 、 $VA_5-CHO$ 、図 3-5)を用いて、内部標準法により検量線を作成した。内部標準物質としてエチルバニリン(EV)を用いた。以下にその手順を記す。

五酸化ニリン存在下、40°C で一晚、減圧乾燥した標品を用いて、表 3-4 に示すように EV に対してモル比( /EV)の異なる混合溶液をピリジン溶液として調製した。その詳細な調製方法については後述する。 $HV_{ald}$ 、 $VV_{ald}$  および  $VV_{ald-acid}$  はエタノール等の低沸点溶媒に難溶であるため、溶媒にはピリジンを用いた。バイアル瓶に上記の混合溶液(200  $\mu$ l)および N,O-ビス(トリメチルシリル)アセトアミド(BSA)200  $\mu$ l を加え、100°C で 10 分間処理し、トリメチルシリル化(TMS 化)を行った。EV の GC 注入量が木粉試料の分析時と同等となるように、3  $\mu$ l の TMS 化物をガスクロマトグラフィー(GC-FID)で分析した。GC 分析は、3.2.3.1 項の測定条件およびカラム昇温条件 D を用いた。

$VV_{ald-acid}$ 、 $VA_5-CHO$  および  $HA_5-COOH$  は 4 点検量線、 $V_{acid}$ 、 $V_5-CHO$ 、 $V_5-COOH$  および  $H_5-CHO$  は 5 点検量線、 $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$ 、 $V_{ald}$ 、 $HV_{ald}$ 、 $VV_{ald}$ 、 $VV_{acid}$  および  $H_5-COOH$  は 6 点検量線として作成した。

表 3-4 混合溶液中の内部標準物質(EV)に対する各標品のモル比。( )は検出限界以下。

物質名	内部標準物質に対するモル比( /EV*)					
4-ヒドロキシベンズアルデヒド( $H_{ald}$ )	1.6	1.1	0.67	0.20	0.10	0.020
4-ヒドロキシ安息香酸( $H_{acid}$ )	0.23	0.16	0.10	0.029	0.015	0.0029
バニリン( $V_{ald}$ )	7.5	5.3	3.2	0.95	0.47	0.095
バニリン酸( $V_{acid}$ )	1.3	0.88	0.53	0.16	0.079	(0.016)
デヒドロバニリン-4-ヒドロキシベンズアルデヒド( $HV_{ald}$ )	0.24	0.17	0.10	0.030	0.015	0.0030
ダイバニリン( $VV_{ald}$ )	0.55	0.38	0.23	0.069	0.035	0.0069
バニリンバニリン酸( $VV_{ald-acid}$ )	0.10	0.067	0.040	0.012	(0.0060)	(0.0012)
ダイバニリン酸( $VV_{acid}$ )	0.11	0.075	0.045	0.014	0.0068	0.0014
5-ホルミル-4-ヒドロキシベンズアルデヒド( $H_5-CHO$ )	0.26	0.18	0.11	0.033	0.017	(0.0033)
5-カルボキシ-4-ヒドロキシベンズアルデヒド( $H_5-COOH$ )	0.22	0.16	0.093	0.028	0.014	0.0028
5-カルボキシ-4-ヒドロキシ安息香酸( $HA_5-COOH$ )	0.19	0.14	0.081	0.024	(0.012)	(0.0024)
5-ホルミルバニリン( $V_5-CHO$ )	0.67	0.47	0.28	0.085	0.042	(0.0085)
5-カルボキシバニリン( $V_5-COOH$ )	0.81	0.57	0.34	0.10	0.051	(0.010)
5-ホルミルバニリン酸( $VA_5-CHO$ )	0.16	0.11	0.068	0.020	(0.010)	(0.0020)

\*EV: 33  $\mu$ mol = 33 mM  $\times$  1 ml

表 3-4 の混合溶液の詳細な調製方法を以下に示す。

乾燥した標品を用いて、表 3-5 に記した濃度の内部標準溶液、および溶液 A をピリジン溶液として調製した。溶液 A をピリジンで所定の濃度(1.0～0.013 倍)に希釈した(表 3-5)。溶液 A(1 ml)にそれぞれ内部標準溶液(1 ml)を加え、6 種類の混合溶液を調製した。これら各混合溶液 200  $\mu$ l を上述の方法に従い TMS 化後、GC 分析した。

表 3-5 調製した溶液の濃度、およびその希釈率と混合量(表 3-4 の詳細)。

溶液名	調製濃度		検量線作成に用いた溶液の希釈率、およびEV溶液との混合量						
A	Hald: 53.4 mM, Hacid: 7.8 mM, Vald: 250.6 mM, Vacid: 41.8 mM		溶液名	A	0.70A	0.42A	0.13A	0.063A	0.013A
	HVald: 7.9 mM, VVald: 18.4 mM, VVald-acid: 3.2 mM, VVacid: 3.6 mM		希釈率	×1.0	×0.70	×0.42	×0.13	×0.063	×0.013
	H5-CHO: 8.7 mM, H5-COOH: 7.3 mM, HA5-COOH: 6.4 mM		混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
	V5-CHO: 22.4 mM, V5-COOH: 26.9 mM, VA5-CHO: 5.5 mM								
内部標準	EV: 33.3 mM		希釈率	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0	×1.0
			混合量	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml

スギあて部から得られたニトロベンゼン酸化生成物(図 3-5)の保持時間、検量線、相関係数  $R^2$  および内部標準物質(EV)との有効モル比範囲を以下に示す。

保持時間:  $H_{ald} = 8.4 \text{ min}$ 、 $V_{ald} = 14.9 \text{ min}$ 、 $EV = 18.2 \text{ min}$ 、 $H_{5-CHO} = 19.3 \text{ min}$ 、 $H_{acid} = 21.9 \text{ min}$ 、 $V_{5-CHO} = 34.5 \text{ min}$ 、 $V_{acid} = 36.1 \text{ min}$ 、 $H_{5-COOH} = 37.5 \text{ min}$ 、 $V_{5-COOH} = 73.8 \text{ min}$ 、 $HA_{5-COOH} = 102.0 \text{ min}$ 、 $VA_{5-CHO} = 103.8 \text{ min}$ 、 $HV_{ald} = 146.8 \text{ min}$ 、 $VV_{ald} = 162.2 \text{ min}$ 、 $VV_{ald-acid} = 182.9 \text{ min}$ 、 $VV_{acid} = 196.3 \text{ min}$

検量線:

$H_{ald}$ :  $Y = 1.151 X + 0.0099$  (相関係数  $R^2 = 0.9995$ )  
モル比範囲( $H_{ald}/EV$ ):  $0.020 \leq Y \leq 1.60$   
 $H_{acid}$ :  $Y = 0.8498 X + 0.0008$  (相関係数  $R^2 = 0.9998$ )  
モル比範囲( $H_{acid}/EV$ ):  $0.0030 \leq Y \leq 0.23$   
 $V_{ald}$ :  $Y = 1.0756 X + 0.0285$  (相関係数  $R^2 = 0.9999$ )  
モル比範囲( $V_{ald}/EV$ ):  $0.095 \leq Y \leq 7.5$   
 $V_{acid}$ :  $Y = 0.8312 X + 0.0031$  (相関係数  $R^2 = 1.0000$ )  
モル比範囲( $V_{acid}/EV$ ):  $0.079 \leq Y \leq 1.3$   
 $HV_{ald}$ :  $Y = 0.6034 X + 0.0015$  (相関係数  $R^2 = 0.9989$ )  
モル比範囲( $HV_{ald}/EV$ ):  $0.0040 \leq Y \leq 0.32$   
 $VV_{ald}$ :  $Y = 0.5646 X - 0.0043$  (相関係数  $R^2 = 0.9994$ )  
モル比範囲( $VV_{ald}/EV$ ):  $0.0070 \leq Y \leq 0.55$   
 $VV_{ald-acid}$ :  $Y = 0.4905 X + 0.0017$  (相関係数  $R^2 = 0.9871$ )  
モル比範囲( $VV_{ald-acid}/EV$ ):  $0.012 \leq Y \leq 0.095$   
 $VV_{acid}$ :  $Y = 0.4221 X + 0.0005$  (相関係数  $R^2 = 0.9992$ )  
モル比範囲( $VV_{acid}/EV$ ):  $0.0010 \leq Y \leq 0.11$   
 $H_{5-CHO}$ :  $Y = 1.3155 X + 0.0081$  (相関係数  $R^2 = 0.9983$ )  
モル比範囲( $H_{5-CHO}/EV$ ):  $0.017 \leq Y \leq 0.26$   
 $H_{5-COOH}$ :  $Y = 0.873 X + 0.0009$  (相関係数  $R^2 = 0.9999$ )  
モル比範囲( $H_{5-COOH}/EV$ ):  $0.0030 \leq Y \leq 0.22$   
 $HA_{5-COOH}$ :  $Y = 0.6871 X + 0.0164$  (相関係数  $R^2 = 0.9913$ )  
モル比範囲( $HA_{5-COOH}/EV$ ):  $0.024 \leq Y \leq 0.19$   
 $V_{5-CHO}$ :  $Y = 1.1687 X + 0.0159$  (相関係数  $R^2 = 0.9994$ )  
モル比範囲( $V_{5-CHO}/EV$ ):  $0.042 \leq Y \leq 0.67$   
 $V_{5-COOH}$ :  $Y = 0.8608 X + 0.0072$  (相関係数  $R^2 = 0.9996$ )  
モル比範囲( $V_{5-COOH}/EV$ ):  $0.051 \leq Y \leq 0.81$   
 $VA_{5-CHO}$ :  $Y = 0.9276 X + 0.0171$  ( $R^2 = 0.9989$ )  
モル比範囲( $VA_{5-CHO}/EV$ ):  $0.020 \leq Y \leq 0.16$

Y は内部標準 EV に対するモル比 (/EV)、X は GC-FID の面積比 (/EV)を示す。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 HG 型および HH 型ビフェニル型モデル化合物のニトロベンゼン酸化

##### 3.3.1.1 ビフェニル型モデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の検討

HG 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HV、図 3-1)のニトロベンゼン酸化生成物および HG 型ビフェニル型生成物(HV<sub>ald</sub>、図 3-1)をそれぞれ TMS 化し GC 分析した。その結果、標品(HV<sub>ald</sub>)の GC 保持時間と一致するピークが、 $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HV の分解生成物の GC クロマト上に確認された(図 3-6-a)。次に、分解生成物および標品 HV<sub>ald</sub> の TMS 化物を GC-MS で分析し、マスフラグメントパターンを比較したところ両者で一致したことから、分解生成物中に HV<sub>ald</sub> を同定した(図 3-6-b、図 3-7)。

HH 型ビフェニル型生成物(HH<sub>ald</sub>、図 3-2-b)については、標品を所持していなかったため、HH 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HH、図 3-2-a)のニトロベンゼン酸化生成物(TMS 化物)を GC-MS で分析し、分子量から推定される分子イオンピークを調べた。その結果、HH<sub>ald</sub> の分子量に相当する  $m/z$  386 のピークが検出された(図 3-8)。

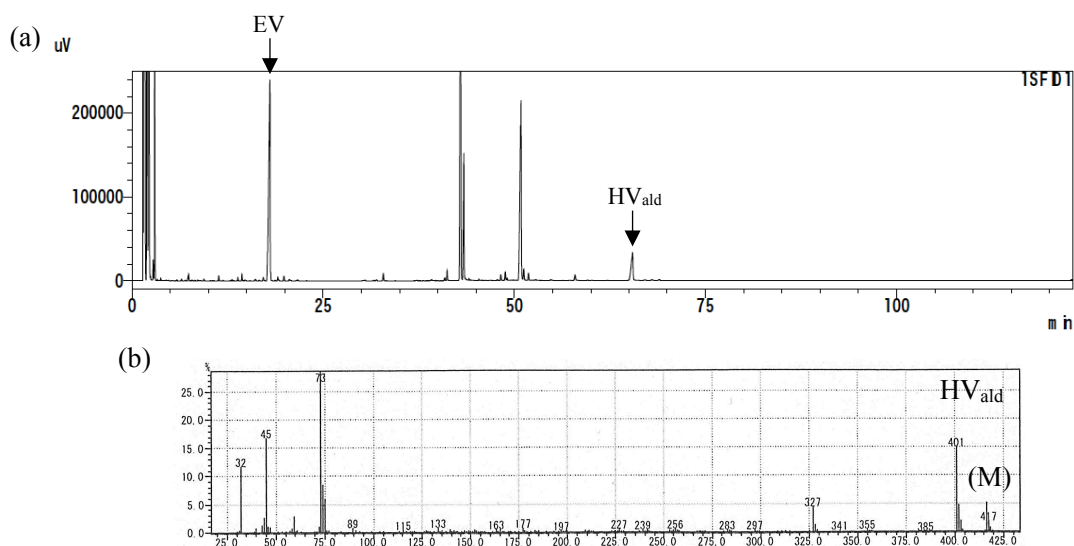


図 3-6 HG 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HH)のニトロベンゼン酸化生成物の(a)GC-FID クロマトグラム、および(b)HG 型ビフェニル型生成物(HV<sub>ald</sub>)のマススペクトル(TMS 化物)。

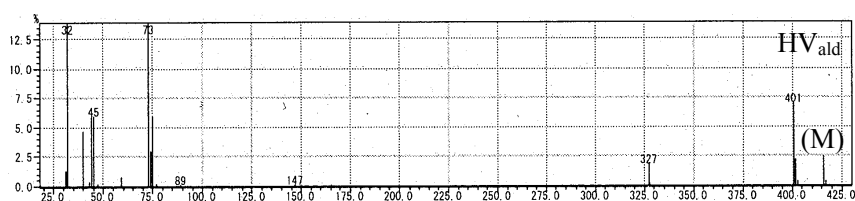


図 3-7 HG 型ビフェニル型生成物の標品(HV<sub>ald</sub>)のマススペクトル(TMS 化物)。

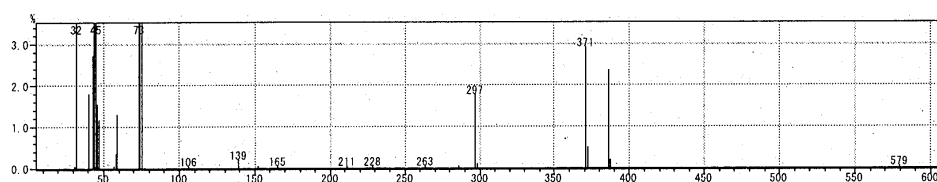


図 3-8 HH 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HH)のニトロベンゼン酸化生成物から検出された HH 型ビフェニル型生成物(HH<sub>ald</sub>)の候補ピークのマススペクトル (TMS 化物)。

### 3.3.1.2 HG 型ビフェニル型モデル化合物を用いたニトロベンゼン酸化法の反応条件の検討

HG 型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HV、図 3-1)をニトロベンゼン酸化法に供し、HG 型ビフェニル型生成物(HV<sub>ald</sub>、図 3-1)の内部標準物質(EV)に対する GC ピーク面積比 (/EV)への反応条件(塩基の種類、反応温度および反応時間)の影響を調べた。

その結果を表 3-6 に示す。実験番号 1 と 2 の比較により反応時間の影響を調べたところ、HV<sub>ald</sub> のピーク面積比は反応 2 時間より 17 時間で高い値を示すことが分かった。次に、実験番号 2 と 3 で塩基の種類の影響を調べたところ、HV<sub>ald</sub> の面積比は水酸化ナトリウムより水酸化カリウムを用いた方が高かった。さらに、実験番号 4～6 で反応温度(170℃、180℃および 190℃)の影響を調べたところ、面積比は 190℃ の条件下で最も高い値を示した。このように、HG 型ビフェニル型モデル化合物をニトロベンゼン酸化法に供して得られるビフェニル型生成物の収率は、一般的な反応条件(170℃、反応 2 時間、水酸化ナトリウム)に対して、190℃、反応 17 時間、水酸化カリウムの条件下で高くなることが示唆された。 $\alpha$  位メチレン型のリグニンモデル化合物から得られるニトロベンゼン酸化生成物の収率は、 $\alpha$  位 OH 型のモデル化合物よりも低いことが報告されている[Chan 1995]。このことから、今回  $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HV のニトロベンゼン酸化に比較的厳しい反応条件を要した原因として、H 核が含まれることに加え、 $\alpha$  位がメチル基であることも考えられる。

表 3-6  $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HV をニトロベンゼン酸化法に供して得られた HV<sub>ald</sub> の GC ピークの面積比 (/EV)に対する反応条件(塩基の種類、反応温度および反応時間)の影響。

実験番号	$\alpha$ CH <sub>3</sub> -HV(mmol)	塩基の種類	温度(℃)	時間(h)	GC面積比(HV <sub>ald</sub> /EV)
1	0.04	NaOH	170	2	0.2
2	0.03	NaOH	170	17	0.5
3	0.03	KOH	170	17	0.7
4	0.40	KOH	170	17	4.5
5	0.40	KOH	180	17	6.4
6	0.40	KOH	190	17.5	6.8

EV: エチルバニリン(内部標準物質)

### 3.3.2 H 核型フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化

#### 3.3.2.1 フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の同定

まず、デヒドロジ *p*-クマリルアルコールのニトロベンゼン酸化生成物、および 5 種類の標品( $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$ 、 $H_5-CHO$ 、 $H_5-COOH$ 、 $HA_5-COOH$ 、図 3-4)をそれぞれ TMS 化し GC 分析した (GC-FID)。その結果、4 種の標品( $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$ 、 $H_5-COOH$ 、 $HA_5-COOH$ )の GC 保持時間と一致するピークが、デヒドロジ *p*-クマリルアルコールの分解生成物の GC クロマト上に確認された (図 3-9)。 $H_5-CHO$  は検出限界以下であった。

次に、分解生成物および上記 4 種類の標品の TMS 化物を GC-MS で分析し、マスフラグメントパターンを比較した。その結果、 $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$  および  $H_5-COOH$  については、マスフラグメントパターンが両者で一致したことから、分解生成物中にこれらを同定した (図 3-10、3-11)。 $HA_5-COOH$  のピークは、分解生成物の GC-MS クロマト上で隣接する巨大なピークと重なっており、単独のマスフラグメントパターンを検出することはできなかった。なお、GC クロマト上では、分解生成物中の  $HA_5-COOH$  のピークは完全分離しており、保持時間は標品のそれと一致したことから  $HA_5-COOH$  を同定した。また、標品を GC-MS 測定した結果、 $H_5-COOH$  および  $HA_5-COOH$  については、分子イオンピーク(M)は観測されず M-15 に相当する  $m/z$  295、383 のイオンピークがそれぞれ得られた (図 3-10)。GC-MS 測定のイオン化過程で、トリメチルシリル基からメチル基がひとつ脱離した可能性が考えられる。

同酸化生成物として想定した  $HA_5-CHO$  に関しては、標品を所有していなかったため、分子量から推測される分子イオンピークとして  $m/z$  310(M)を調べた。しかし、同酸化生成物中にこれに相当するピークは確認されなかった。また、 $HA_5-CHO$  についても分子量より 15 小さい分子イオンピークとして  $m/z$  295(M-15)を調べたが、これに相当するピークは同酸化生成物中に確認されなかった。



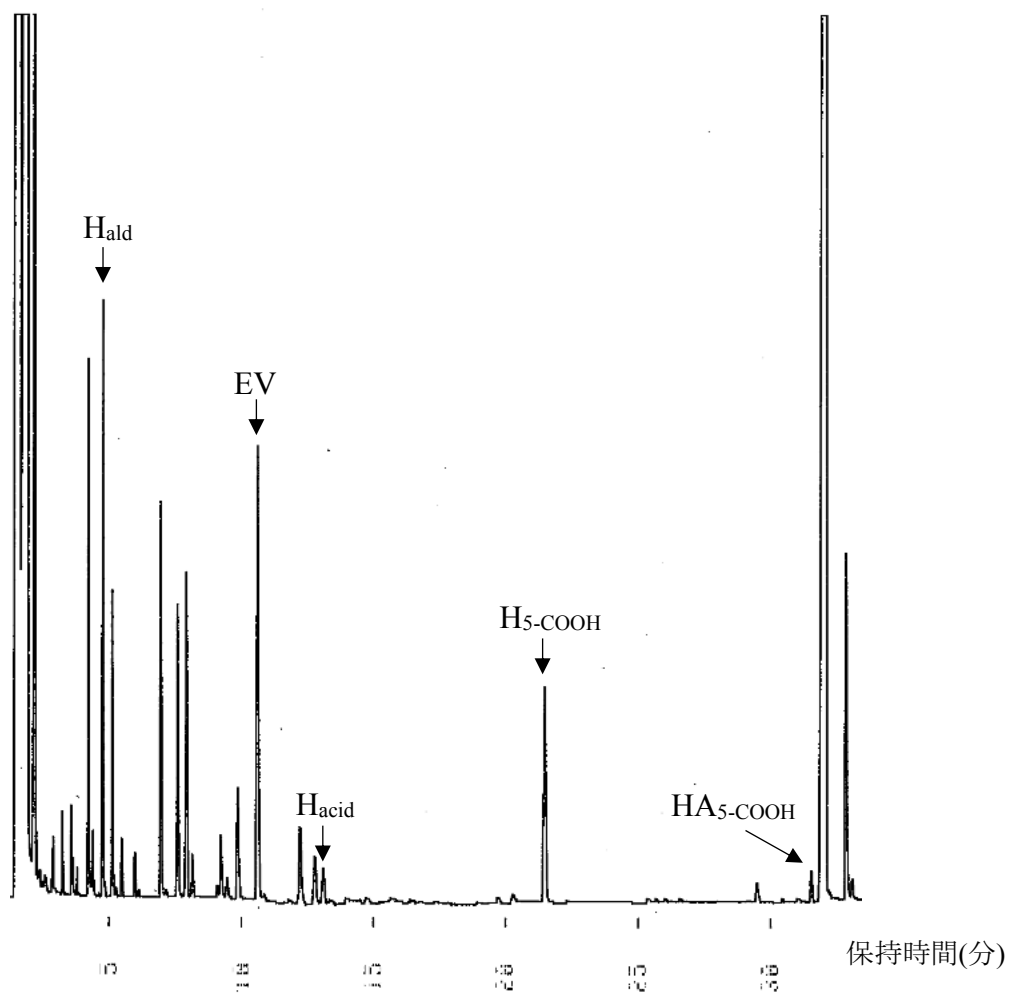


図 3-9 デヒドロジ *p*-クマリルアルコールのニトロベンゼン酸化生成物の GC-FID クロマトグラム(TMS 化物)(0~35 分拡大)。

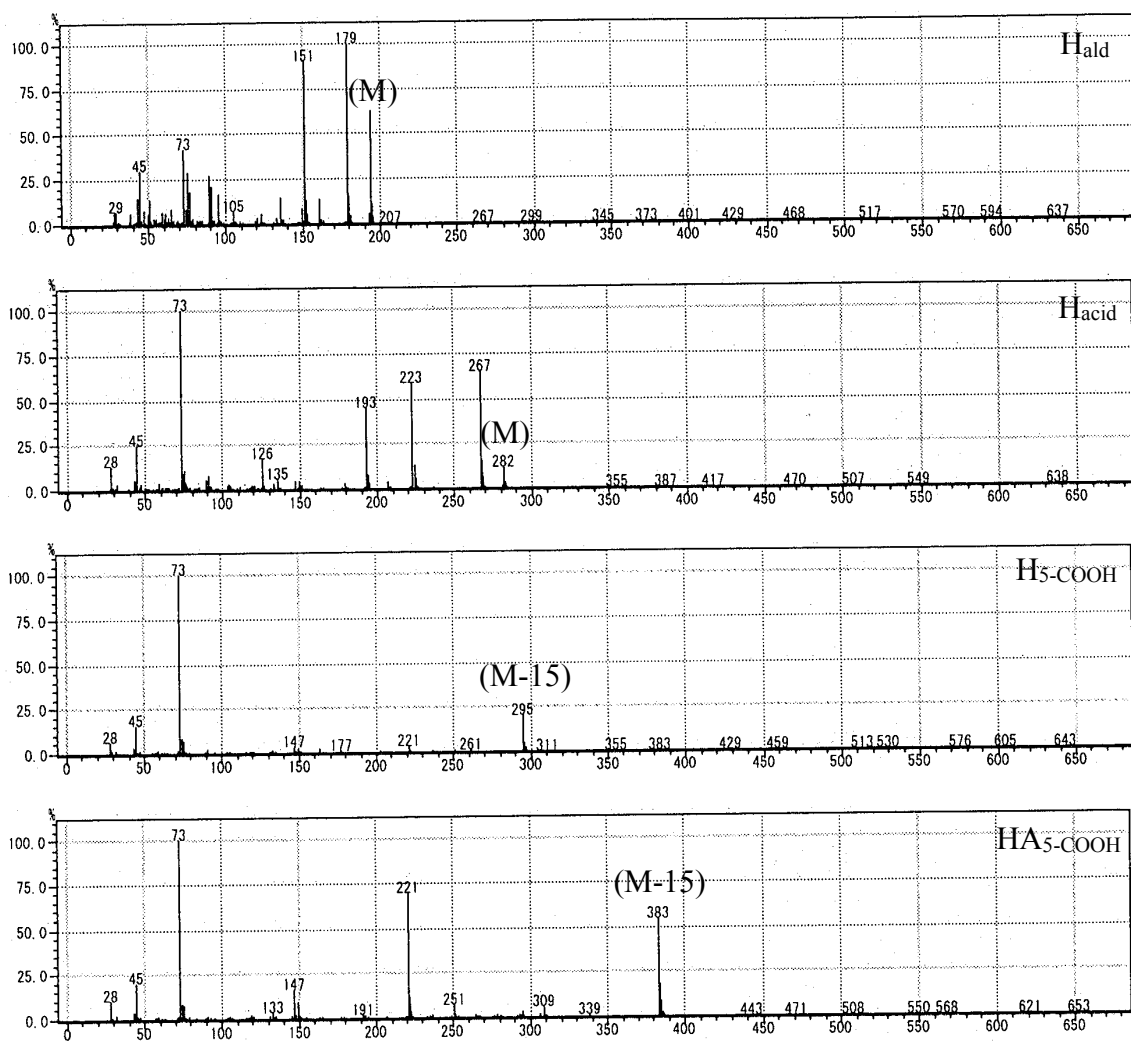


図 3-10 標品のマススペクトル(TMS 化物)。

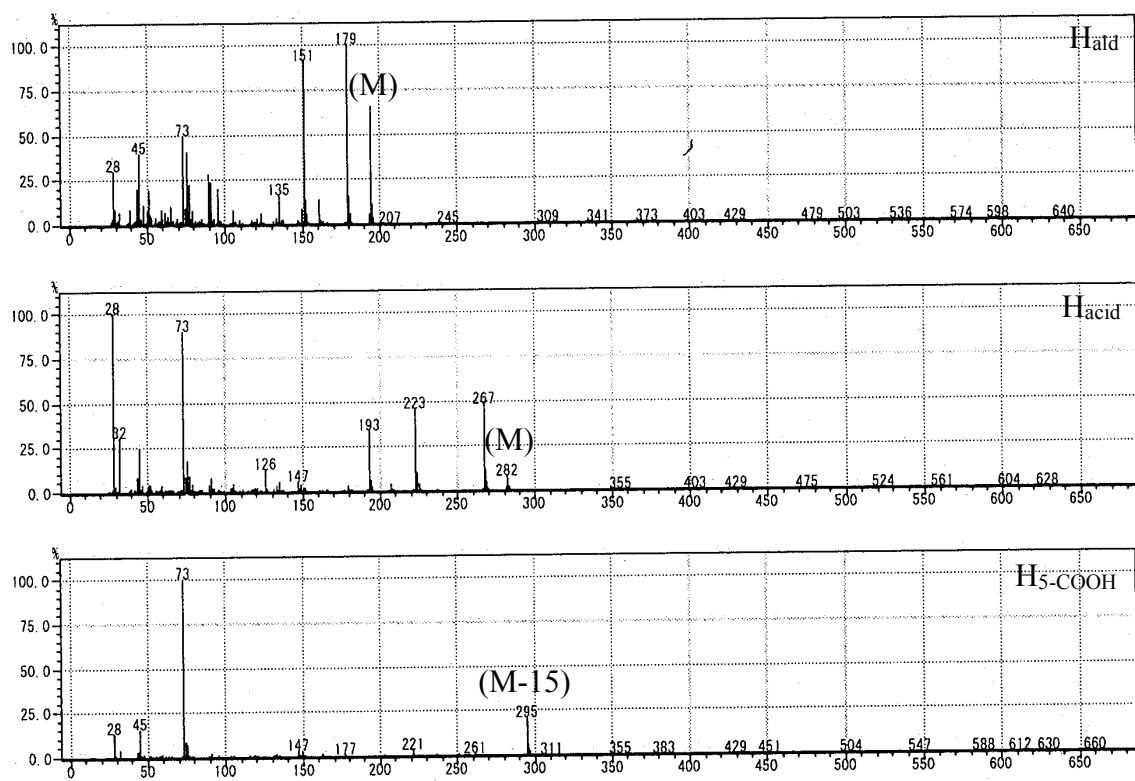


図 3-11 デヒドロジ *p*-クマリルアルコールのニトロベンゼン酸化生成物のマスペクトル (TMS 化物)。

### 3.3.2.2 フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の収率に対する反応時間の影響

H 核型フェニルクマラン型モデル化合物として合成したデヒドロジ *p*-クマリルアルコール(H 型  $\beta$ -5 モデル 4、図 3-12)をニトロベンゼン酸化法に供し、分解生成物の収率に対する反応時間の影響を調べた。分解生成物として、非縮合型生成物( $H=H_{ald}+H_{acid}$ )に加え、芳香核の 5 位がカルボキシ基で置換された  $\beta$ -5 型の生成物( $H_5-C=O=H_5-COOH+HA_5-COOH$ )を定量した(図 3-12)。

これら 4 種類の分解生成物について、反応時間に対する収率の変化を図 3-13-a に示す。H の収率は反応 16 時間で 60mol%に達し、その後は比較的安定であった。これに対し、 $H_5-C=O$  の収率は低く、反応 16 時間で最大の 36mol%となったがその後減少に転じた。一般的な反応条件 170°C、2 時間における収率は、H と  $H_5-C=O$  とともに上記の最大収率の半分弱であった。

次に、H 核型モデル化合物の分析データを、G 核型フェニルクマランモデル化合物(G 型  $\beta$ -5 モデル 5、図 3-12)について調べた奥野らの分析データと比較してみた[奥野 2016]。奥野らは、G 型  $\beta$ -5 モデル 5 を 170°C でニトロベンゼン酸化法に供し、分解生成物の収率に対する反応時間の影響を調べた。化合物 5 の同酸化生成物として、非縮合型生成物( $V=V_{ald}+V_{acid}$ )、および芳香核の 5 位がカルボキシ基で置換された  $\beta$ -5 型の生成物( $V_5-C=O=V_5-CHO+V_5-COOH+VA_5-CHO$ )を定量した(図 3-12)。その結果、H 型モデル 4 からは、 $H_5-CHO$  は検出されなかったのに対し、G 型モデル 5 からは  $V_5-CHO$  が主生成物として得られた(反応 0.5-2 時間、図 3-13-b)。また、H 型モデル 4 では H と  $H_5-C=O$  の収率は反応 16 時間で最大に達したが、G 型モデル 5 では V と  $V_5-C=O$  の収率はそれよりも短い反応 2 時間で最大となった(図 3-13-b)。このように、H 核型フェニルクマランモデル化合物のニトロベンゼン酸化には、G 核型よりも長い反応時間を要することが明らかとなった。

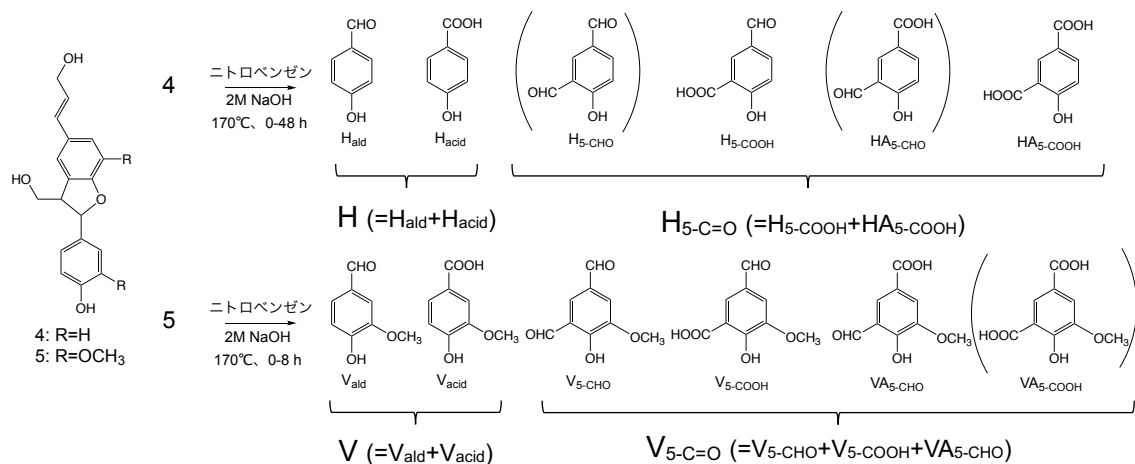


図 3-12 H 核型および G 核型フェニルクマランモデル化合物とそれらのニトロベンゼン酸化生成物。( )内の化合物は未同定、あるいは生成物量が検出限界以下。

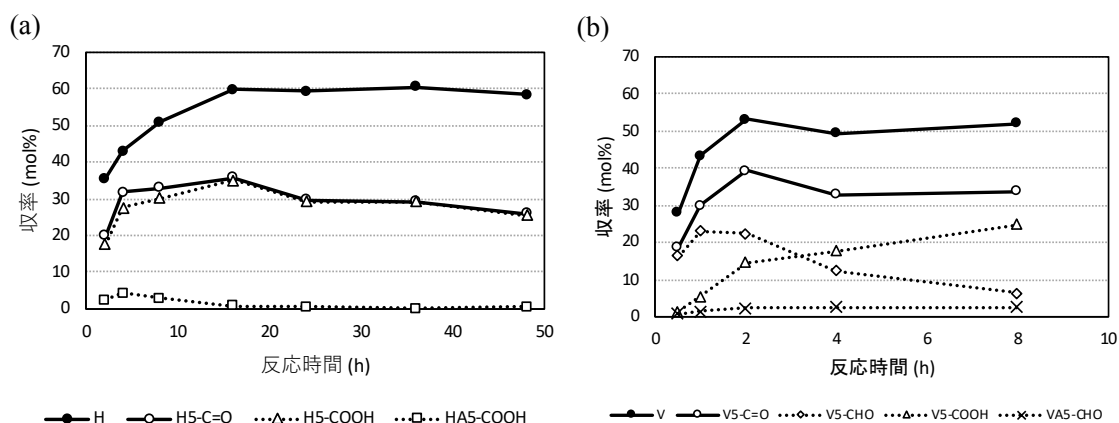


図 3-13 (a)H 核型、および(b)G 核型フェニルクマランモデル化合物のニトロベンゼン酸化生成物の収率に対する反応時間の影響。反応温度は 170°C。(b)は奥野ら[奥野 2016]の分析データを改編した。H ( $\text{H}_{\text{ald}} + \text{H}_{\text{acid}}$ )、 $\text{H}_5\text{-C=O}$  ( $\text{H}_5\text{-COOH} + \text{HA}_5\text{-COOH}$ )、V ( $\text{V}_{\text{ald}} + \text{V}_{\text{acid}}$ )、 $\text{V}_5\text{-C=O}$  ( $\text{V}_5\text{-CHO} + \text{V}_5\text{-COOH} + \text{VA}_5\text{-CHO}$ )。

### 3.3.3 スギあて材のニトロベンゼン酸化

#### 3.3.3.1 スギあて材のニトロベンゼン酸化生成物の同定

スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物および 14 種類の標品( $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$ 、 $V_{ald}$ 、 $V_{acid}$ 、 $HV_{ald}$ 、 $VV_{ald}$ 、 $VV_{ald-acid}$ 、 $VV_{acid}$ 、 $H_5-CHO$ 、 $H_5-COOH$ 、 $HA_5-COOH$ 、 $V_5-CHO$ 、 $V_5-COOH$ 、 $VA_5-CHO$ 、図 3-5)をそれぞれ TMS 化し GC 分析した。その結果、 $HA_5-COOH$  を除く 13 種類の標品( $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$ 、 $V_{ald}$ 、 $V_{acid}$ 、 $HV_{ald}$ 、 $VV_{ald}$ 、 $VV_{ald-acid}$ 、 $VV_{acid}$ 、 $H_5-CHO$ 、 $H_5-COOH$ 、 $V_5-CHO$ 、 $V_5-COOH$ 、 $VA_5-CHO$ )の GC 保持時間と一致するピークが、スギ木粉の分解生成物の GC クロマト上に確認された(図 3-14)。

次に、分解生成物および上記 13 種類の標品の TMS 化物を GC-MS で分析したところ、 $H_5-CHO$  を除く 12 種類の化合物について、カラム保持時間とマスフラグメントパターンがよく一致したことから、分解生成物中にこれらを同定した(図 3-7、図 3-10、図 3-15)[Tamai 2015, 奥野 2016]。このうち、HG 型ビフェニル型生成物  $HV_{ald}$  は、リグニンのニトロベンゼン酸化生成物として初めて同定された。 $H_5-CHO$  のピークは、分解生成物の GC-MS クロマト上で他ピークと重なっており、単独のマスフラグメントパターンを検出することはできなかった。なお、GC クロマト上では、分解生成物中の  $H_5-CHO$  のピークは完全に分離しており、保持時間は標品のそれと一致したことから  $H_5-CHO$  を同定した。

#### HH 型ビフェニル型生成物

HH 型のビフェニル型生成物( $HH_{ald}$ 、図 3-2-b)については、標品がないために同定・定量することができなかったが、スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物を GC-MS で測定し、ピークの  $m/z$  値と  $HH_{ald}$  分子量との一致を基に推定を試みた。

まず、スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物をトリメチルシリル(TMS)化後、GC-MS で分析した。 $HH_{ald}$  の分子量から推測される分子イオンピークとして  $m/z$  386(M)を調べたところ、候補ピークが、GC-MS のクロマト上で 85.9 分と 93.8 分に確認された(図 3-16-a)。さらに情報を得る目的で、 $\alpha$  位メチル基型のビフェニル型モデル化合物( $\alpha CH_3-HH$ 、図 3-2-a)をニトロベンゼン酸化法に供し、その分解生成物をスギあて部のデータと比較した。その結果、 $\alpha CH_3-HH$  の分解生成物として  $HH_{ald}$  の分子量に相当する  $m/z$  386 のピークが、86.0 分付近に検出された(図 3-17)。このピークは、あて部から得られた 2 つの候補ピークのうち、一方のピークと保持時間(85.9 分)およびマスフラグメントパターンがよく一致したことから、これを  $HH_{ald}$  由来と推定した(図 3-8、図 3-16-a、b、図 3-17)。また、このあて材で検出された  $HH_{ald}$  ピークの強度は、HG 型ビフェニル型生成物( $HV_{ald}$ )ピークのそれに比べかなり小さく(図 3-16-a)、また対向部では検出されなかった(図 3-16-c)。

斎藤ら[Saito 2005]が、クロマトあて部をチオアシドリシス法で分析した例においても

(1.5 項を参照)、GG および HG 型ビフェニル型生成物の GC ピーク面積の合計値に対する HH 型ビフェニル生成物のピーク面積の比は、0.02 未満とかなり小さかった。また、Erickson ら[Erickson 1973b]がモンタナマツのあて材を、アルカリ加水分解後メチル化過マンガン酸カリウム酸化法に供して得た分析データを用いて、GG および HG 型ビフェニル型生成物の合計量に対する HH 型ビフェニル型生成物量の比を算出したところ、同比はかなり小さかった(あて部: 0.03、対向部: <0.02)(1.4 項を参照)。

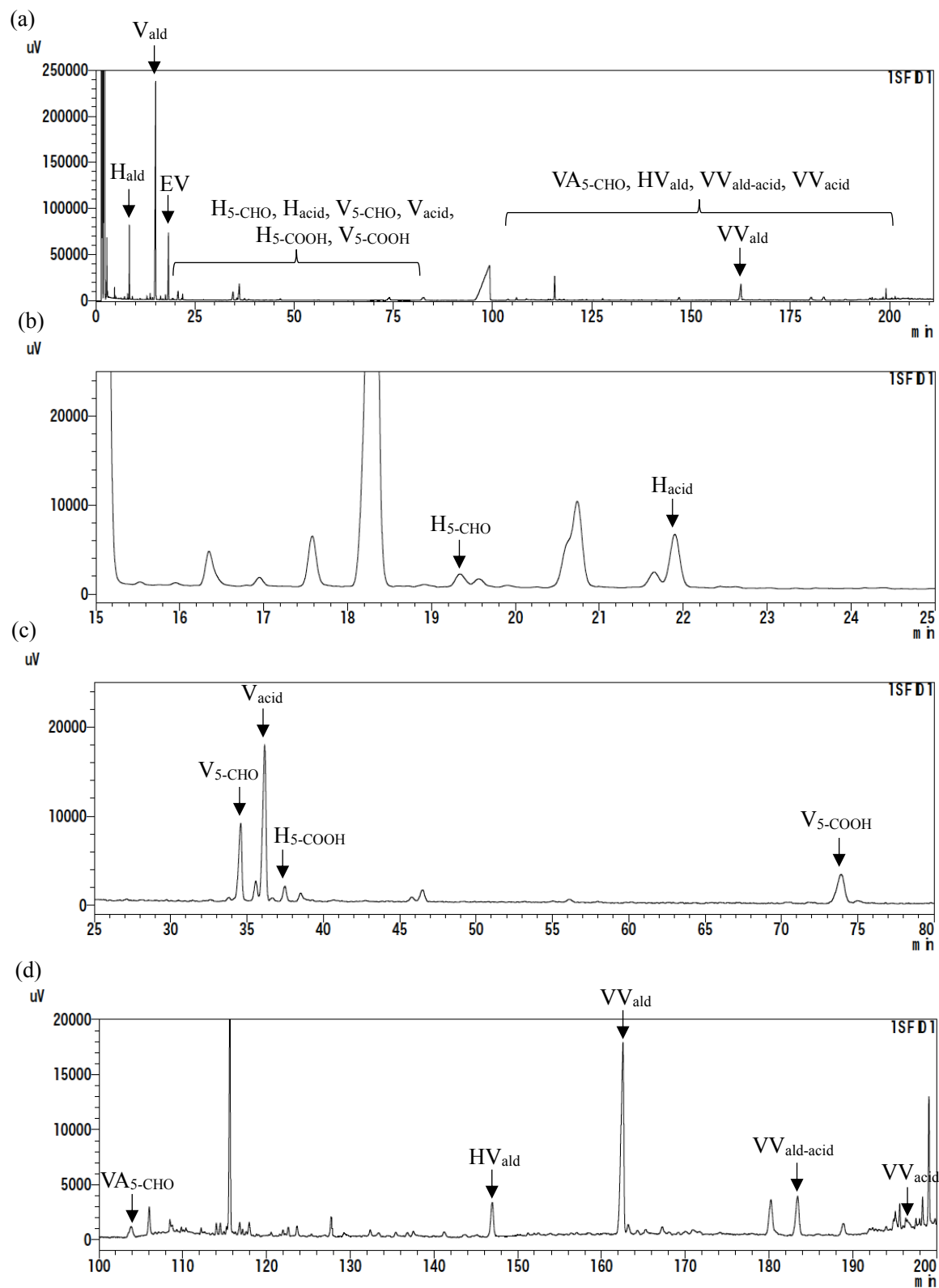
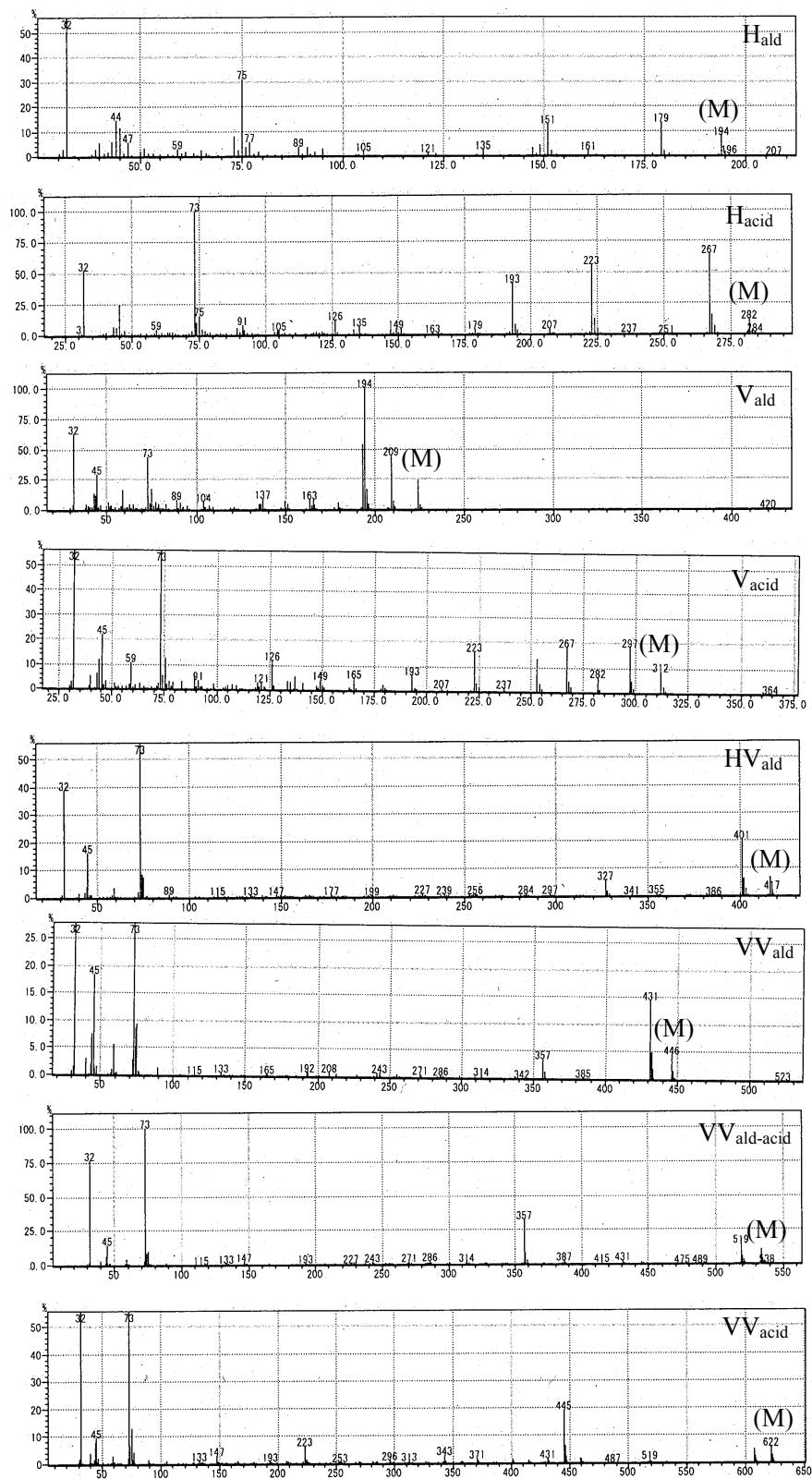


図3-14 スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物のGCクロマトグラム(TMS化物)。(a)0~211分、(b)15~25分拡大、(c)25~80分、および(c)100~200分拡大。カラム昇温条件Dで分析。





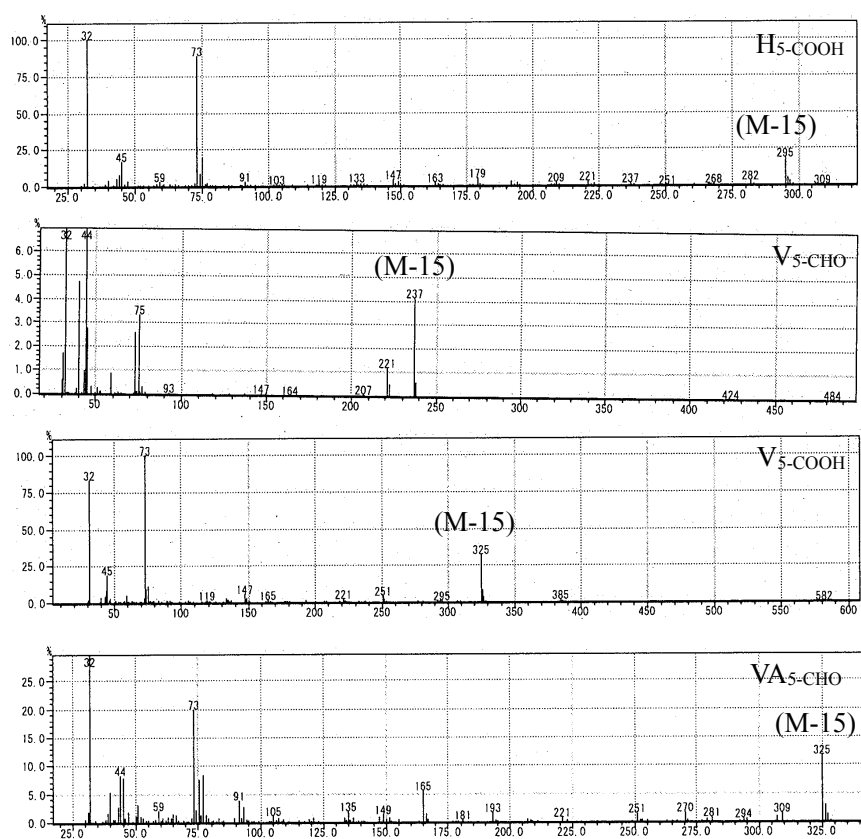


図 3-15 スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物のマスペクトル (TMS 化物)。

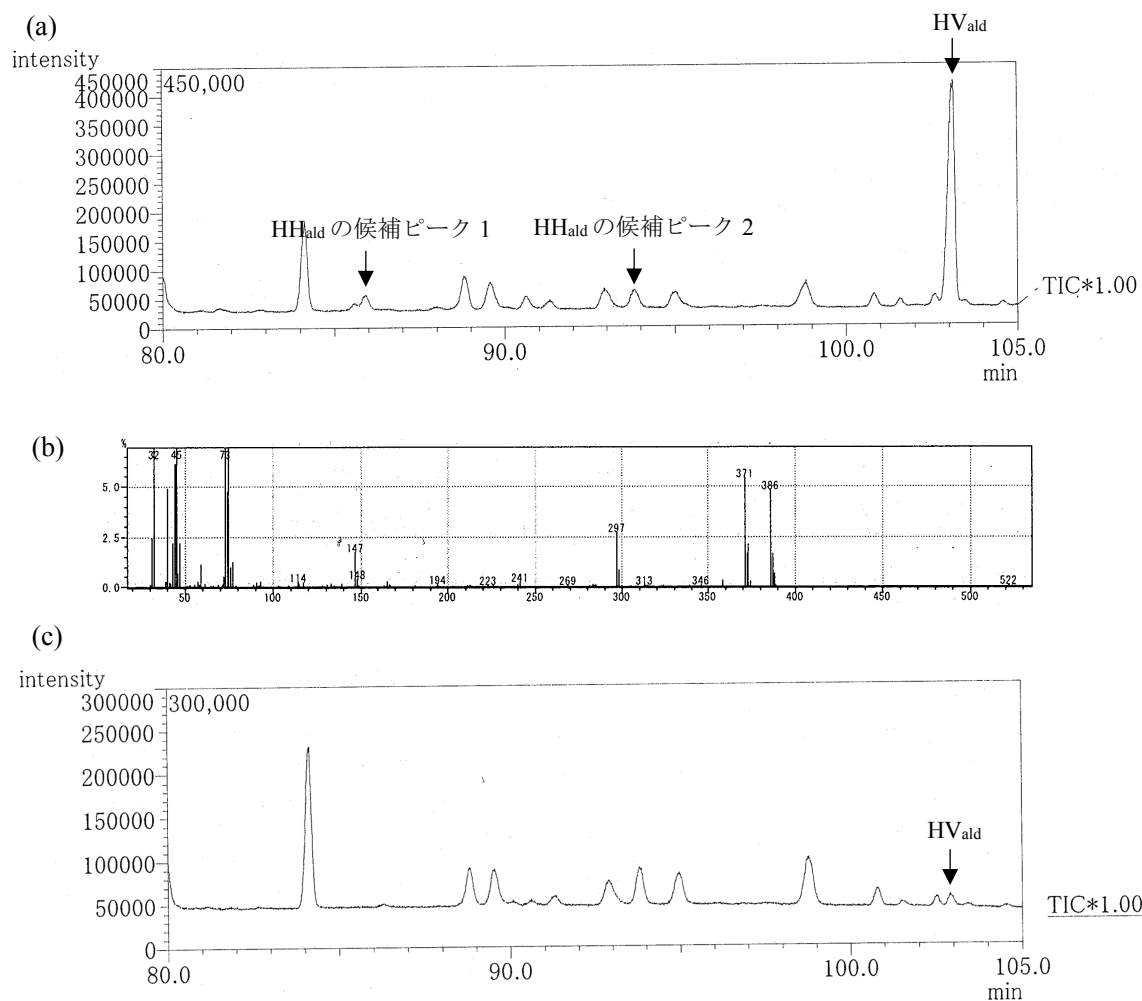


図 3-16 スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物の(a) GC-MS クロマトグラム(80-105 分拡大)、および(b)  $HH_{ald}$  候補ピーク 1(85.9 分)のマスペクトル。(c)スギ対向部のニトロベンゼン酸化生成物の GC-MS クロマトグラム(80-105 分拡大)。

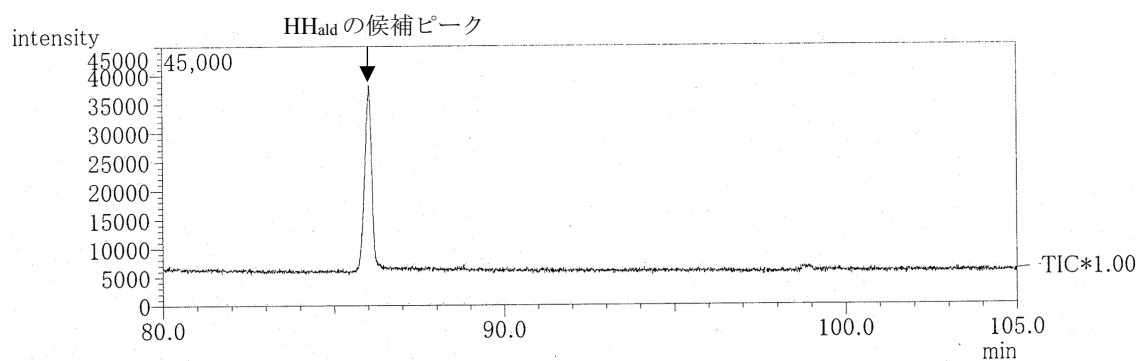


図 3-17  $HH$  型ビフェニル型モデル化合物( $\alpha CH_3-HH$ )のニトロベンゼン酸化生成物の(a) GC-MS クロマトグラム(80-105 分拡大)。

### 3.3.3.2 スギあて材のニトロベンゼン酸化生成物の GC 分析条件

針葉樹あて材のニトロベンゼン酸化生成物(図 3-5)の GC-FID 分析には、3.2.3.1 項の測定条件およびカラム昇温条件 D を用いた。

スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物を、針葉樹 6 種に適用したカラム昇温条件 B(2.2.3 項)で分析したところ、 $V_{acid}$  ピークの分離が不十分であったため(図 3-18-a)、分離条件を検討しカラム昇温条件 C を得た(図 3-18-b)。

カラム昇温条件 C: 130°C で 10 分保持→5°C/分で 145°C へ昇温、31 分保持→10°C/分で 170°C へ昇温、10 分保持→10°C/分で 190°C へ昇温、保持時間なし→10°C/分で 200°C へ昇温、40 分保持→10°C/分で 215°C へ昇温、20 分保持→10°C/分で 230°C へ昇温、10 分保持→5°C/分で 280°C へ昇温、10 分保持(分析時間 153.0 分)

しかし、昇温条件 C では、 $HA_5-COOH$  および  $VA_5-CHO$  のピークは、ともに保持時間 60 分付近の巨大なピークと重なる可能性が、標品との比較により示唆されたため(図 3-19-a、b)、さらに分離条件を検討した結果、両ピークの分離を満たす条件として、3.2.3.1 項に示したカラム昇温条件 D を得た(図 3-20-a、b)。

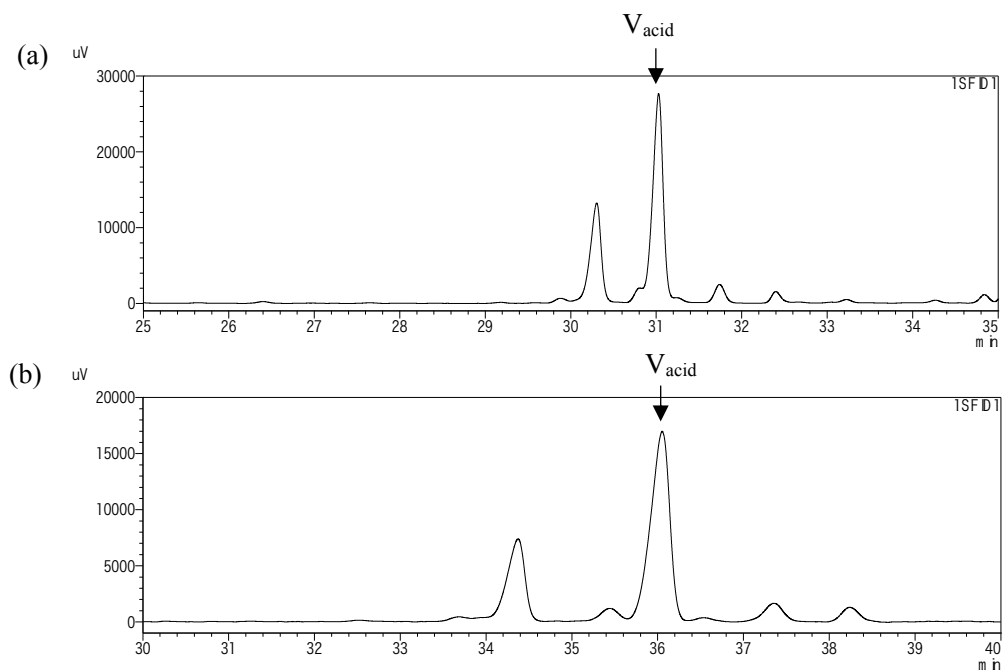


図 3-18 スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物の GC クロマトグラム(TMS 化物)。バニリン酸( $V_{acid}$ )の保持時間領域を抜粋して表示。(a)カラム昇温条件 B、および(b)カラム昇温条件 C。

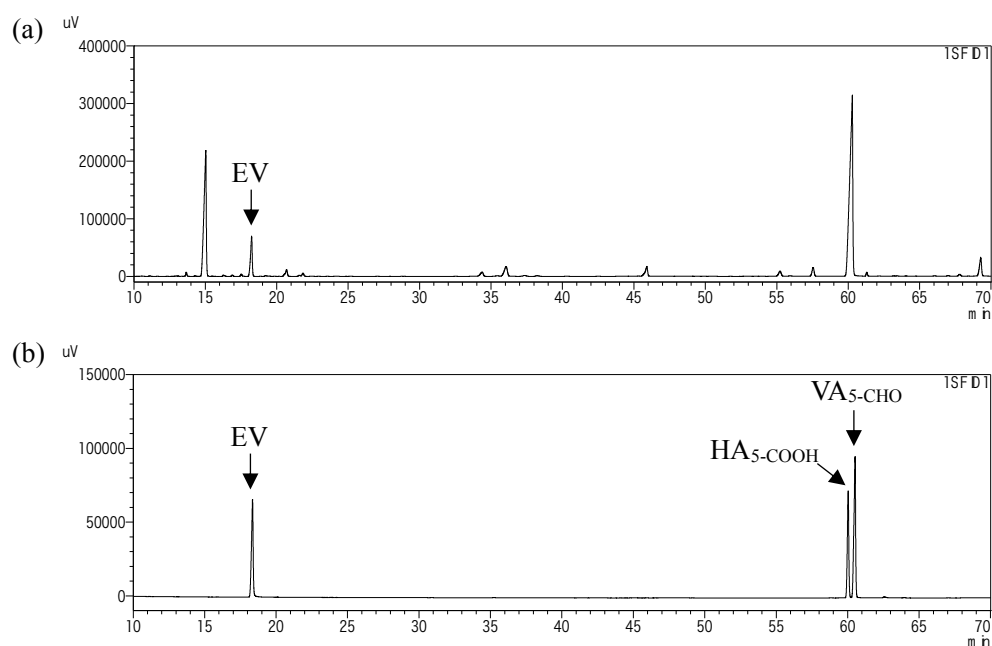


図 3-19 カラム昇温条件 C における、(a)スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物、および(b)標品(HA<sub>5</sub>-COOH および VA<sub>5</sub>-CHO)の GC クロマトグラム(10～70 分拡大)。エチルバニリン(EV): 内部標準物質。

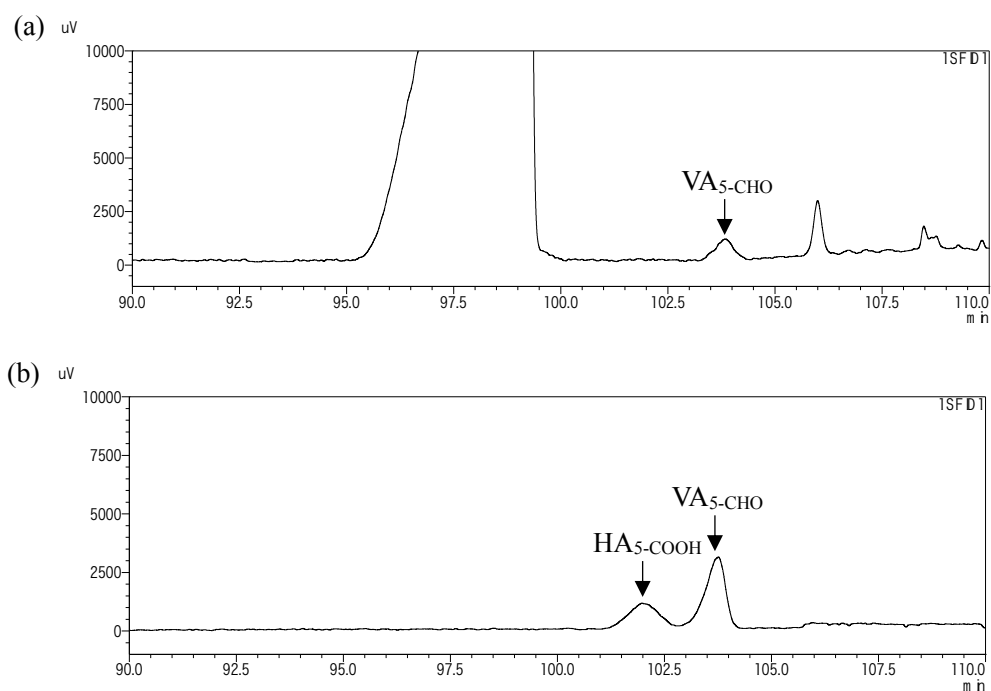


図 3-20 カラム昇温条件 D における、(a)スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物、および(b)標品(HA<sub>5</sub>-COOH および VA<sub>5</sub>-CHO)の GC クロマトグラム(90～110 分拡大)。

### 3.3.3.3 スギあて材のニトロベンゼン酸化生成物の収率に対する反応温度の影響

G 核型に比べ H 核型リグニン構造のニトロベンゼン酸化では生成物を与えにくく、強い反応条件が必要になることが草本リグニンの研究で報告されてきた。飯山ら[Iiyama 1990]は、麦の節間をニトロベンゼン酸化法に反応 2 時間、170°C または 180°C の条件下で供したところ、H 核型の非縮合型生成物( $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$ )の収率は、180°C の時の方が高い値を示した。Billa ら[Billa 1996]は、小麦の節間および葉を用いて、ニトロベンゼン酸化生成物の収率に対する反応温度(160°C、170°C、180°C、190°C)および反応時間(2、3、4 時間)の影響を調べ、*p*-ヒドロキシベンズアルデヒド( $H_{ald}$ )の収率は、反応温度が高くなる、もしくは反応時間が長くなるほど高くなることを示した。トウモロコシの茎葉を用いた研究においても、H 核型の非縮合型生成物( $H_{ald}$ 、 $H_{acid}$ )の収率は、反応温度が高くなる、または反応時間が長くなるほど高くなった[Min 2015]。

H 核のニトロベンゼン酸化法に対する反応効率の低さは、リグニンモデル化合物を用いた研究においても確認されている。Chan ら[Chan 1995]が、*p*-ヒドロキシアセトフェノンやアセトグアイアコンを還元した  $\alpha$ -OH 型のリグニンモデル化合物を同酸化法に供したところ、分解生成物の収率は H 核型モデル化合物の方が G 核型よりも低かった。また、3.3.2.2 項で H 核型のフェニルクマランモデル化合物をニトロベンゼン酸化法に 170°C、反応 2~48 時間の条件下で供したところ、縮合型生成物( $H_{5-c=o}$ )の収率は反応 16 時間で最大となることが明らかとなった。これに対し、G 核型フェニルクマランモデル化合物の場合には、縮合型生成物( $V_{5-c=o}$ )の収率は、170°C、反応 2 時間で最大となることが判っている[奥野 2016]。これらのことから、針葉樹圧縮あて材においても、H 核を含む HG 型ビフェニル型生成物(HV)および  $\beta$ -5 型生成物( $H_{5-c=o}$ )の収率は、一般的な反応条件 170°C、2 時間より厳しい条件を用いた方が高くなると予想した。スギのあて部と対向部を同酸化法に 170°C、190°C、210°C、反応 2 時間の条件下で供し、分解生成物(図 3-5)の収率を比較した。前述した H 核型のフェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化には、16 時間もの長い反応時間を要したことから、スギあて材では反応温度の影響を調べた。

既知の分解生成物である H 核型の非縮合型生成物(H)、G 核型生成物(V)、GG 型ビフェニル型生成物(VV)に加え、新たに HG 型ビフェニル型生成物(HV)を定量した(図 3-5)。さらに、 $\beta$ -5 型構造に由来する生成物として、芳香核の 5 位がアルデヒドまたはカルボキシ基で置換された H 核型の生成物( $H_{5-c=o}$ )および G 核型の生成物( $V_{5-c=o}$ )を定量した(図 3-5)。収率は、リグニン単位の分子量を 200 と概算し、Klason リグニン 200 g あたりのモル収率として算出した。ただし、ビフェニル型生成物は、1 分子に 2 つの芳香核を有するため、モル収率に 2 を乗じた芳香核の収率として表した。

H 核を有する縮合型生成物(HV および  $H_{5-c=o}$ )の収率は、あて部において 190°C の条件

で若干高い値を示したが、予想と反し 170～210℃ の範囲でほとんど変わらなかった(図 3-21-a)。このことから、4 章で針葉樹 3 樹種のあて材をニトロベンゼン酸化法で分析する際にも、一般的な反応条件(170℃、2 時間)を用いた。

また、興味深いことに、非縮合型生成物 H の収率は、反応温度に対しあて部と対向部で異なる傾向を示した(図 3-21-a、b)。H の収率は、あて部では HV や  $H_{5-C=O}$  と同様に 190℃ で僅かに高いのみで大きな違いは見られなかったのに対し、対向部では反応温度が高くなるほど高くなり、170℃<190℃<210℃ の順となった(図 3-21-a、b)。この原因の一つとして、H の起源構造があて部と対向部で異なる可能性が考えられる。これまでに、同酸化法による非縮合型生成物は、側鎖が  $\beta$ -5 結合したリグニン単位からも生成することが、H 核および G 核型のリグニンモデル化合物を用いた実験で示されている(3.3.2.2 項を参照)[Iiyama 1990, Chan 1995]。また、G 核型モデル化合物を用いた研究により、非縮合型生成物の収率は、側鎖構造の違いに影響される可能性が指摘されている[Tamai 2015, 奥野 2016]。もし、非縮合型生成物の生成効率が側鎖の結合様式に影響されるならば、反応温度に対して H の収率が、あて部と対向部で異なる傾向を示したのは、非縮合型 H 核の側鎖構造( $\beta$ -O-4 および  $\beta$ -5 型構造)の割合が両者で異なったためとも推測できる。

G 核型生成物(V、VV および  $V_{5-C=O}$ )の収率は、反応温度に対しあて部と対向部で同様の傾向を示した。VV の収率は 170℃ の条件で最も高い値を示し、反応温度が高くなるほど低くなった(図 3-21-a、b)。V の収率は、170℃ と 190℃ でほとんど変わらず、210℃ で低くなった(図 3-21-a、b)。  $V_{5-C=O}$  の収率は、VV や V と異なり 190℃ のとき最大となった(図 3-21-a、b)。

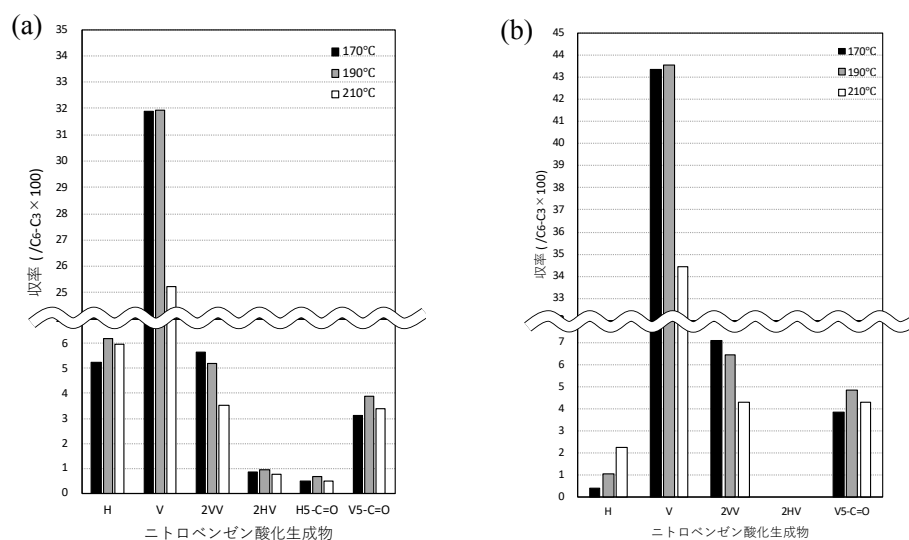


図 3-21 スギの(a)あて部、および(b)対向部のニトロベンゼン酸化生成物の収率に対する反応温度の影響。反応時間は 2 時間。\*対向部の HV は検出限界以下。\*H<sub>5</sub>-C=O は対向部からも検出されたものの、GC のクロマト上で他ピークと著しく重なっていたことから記載しなかった。



### 3.4 本章の結論

第3章では、H核リグニンの分析法としてニトロベンゼン酸化法の適用を検討した。H核を有するビフェニル型およびフェニルクマラン型( $\beta$ -5)モデル化合物とH核含量の高いことで知られる針葉樹あて材を同酸化法に供し、H核型生成物の生成挙動を調べた。

1. デヒドロジ *p*-クマリルアルコール(H核型  $\beta$ -5 モデル化合物)をニトロベンゼン酸化法に170°C、反応2~48時間の条件で供した。その結果、非縮合型生成物(H)、および芳香核の5位がカルボキシ基で置換された  $\beta$ -5 型生成物( $H_{5-C=O}$ )の収率は、ともに反応16時間で最大となった。一般的な反応条件170°C、2時間における収率は、両者ともに上記の最大収率の半分弱であった。一方、G核型  $\beta$ -5 モデル化合物では、非縮合型と  $\beta$ -5 型生成物の収率は反応2時間で最大となることが報告されている[奥野 2016]。H核型モデル化合物のニトロベンゼン酸化には、G核型よりも長い反応時間を要することが明らかとなった。
2.  $\alpha$ 位メチル基型のHG型ビフェニル型モデル化合物をニトロベンゼン酸化法に供したところ、HG型ビフェニル型生成物のデヒドロバニリン-4-ヒドロキシベンズアルデヒド(HV)が、GC-MS分析による合成した標品との比較により同定された。また、上記モデル化合物を用いて、HV収率に対するニトロベンゼン酸化法の反応条件の影響についても検討した。
3. スギあて部をニトロベンゼン酸化法に供したところ、HG型ビフェニル型生成物(HV)をリグニンの同酸化生成物として初めて同定した。
4. スギあて部をニトロベンゼン酸化法に170°C、190°C、210°C、反応2時間の条件で供したところ、H核を有する分解生成物(H、HV、 $H_{5-C=O}$ )の収率は、190°Cで僅かに高い値を示したもののほとんど変わらなかった。このことから、次章で3樹種の針葉樹あて材をニトロベンゼン酸化法で分析する際にも、一般的な反応条件である170°C、2時間を用いた。

### 3.5 本章の引用文献

Billa E, Tollies MT and Monties B, Characterization of the monomeric composition of *in situ* wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: Effect of temperature and reaction time, Journal of the Science of Food and Agriculture, 72, 250 (1996)

Chan FD, Nguyen KL and Wallis AFA, Contribution of lignin sub-structures to nitrobenzene oxidation products, Journal of Wood Chemistry and Technology, 15, 329 (1995)

Iiyama K and Lam TBT, Lignin in wheat internodes. Part 1: The reactivities of lignin units during alkaline nitrobenzene oxidation, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51, 481 (1990)

Min D, Xiang Z, Liu J, Jameel H, Chiang V, Jin Y and Chang HM, Improved protocol for alkaline nitrobenzene oxidation of woody and non-woody biomass, Journal of Wood Chemistry and Technology, 35, 52 (2015)

Quideau S and Ralph J, Facile large-scale synthesis of coniferyl, sinapyl, and *p*-coumaryl alcohol, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 1108 (1992)

Reinhoudt DN, de Jong F, van de Vondervoort EM, Crown ethers with converging neutral binding sites: Synthesis and complexation with *t*-butylammonium hexafluorophosphate, Tetrahedron, 37, 1753(1981)

Tamai A, Goto H, Akiyama T and Matsumoto Y, Revisiting alkaline nitrobenzene oxidation: Quantitative evaluation of biphenyl structures in cedar wood lignin (*Cryptomeria japonica*) by a modified nitrobenzene oxidation method, Holzforschung, 69, 951 (2015)

奥野芳樹、グアイアシル型フェニルクマラン化合物のニトロベンゼン酸化、卒業論文 (2016)

## 第 4 章

圧縮あて材における

GG 型および HG 型ビフェニル型構造量の分布

#### 4.1 本章の背景および目的

第2章では、S核を含まない針葉樹6種においても、わずかながらGG型ビフェニル型生成物(VV)の収率に樹種間で差異がみられた。VV収率は、H/G比が高いと思われる樹種ほど低くなる傾向が示唆されたが、その傾向は明瞭ではなかった( $R^2=0.73$ ) (2.3.5項を参照)。明瞭な傾向がみられなかった原因の一つとして、6樹種間のH/G比の差異が小さかったことが挙げられる。本章では、H核含量が樹幹内で比較的大きく変化することの期待される針葉樹圧縮あて材を試料として用いた[Morohoshi 1971b, Yasuda 1975, Fukushima 1991, Roland 1992, Nawawi 2017]。

また、ビフェニル型構造には、それを構成する芳香核構造の違いにより、GG型だけでなくHG型およびHH型も報告されている[Yamasaki 1971, Yamasaki 1972, Erickson 1973b, Yasuda 1977, Saito 2005, Ralph 2006, Akiyama 2009]。H核含有量の高いリグニンでは、これらも枝分かれの候補構造として、分岐の頻度に影響し得る重要な部分構造と思われる。そこで、本章では3章で確立された手法を用いて、GG、HG、HH型の全てのビフェニル型構造を分析対象として、ビフェニル型構造の含有量とH/G比との関係を調べることを目的とした。

## 4.2 実験

### 4.2.1 試料の調製

H/G比とビフェニル含有量との関係を明らかにすることを目的に、H核含量が樹幹内で比較的大きく変化する針葉樹圧縮あて材を試料として用いた[Nawawi 2017]。3樹種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)のあて材から円盤試料を切り出した(表4-1、図4-1-a、b)[Nawawi 2017]。スギおよびヒマラヤスギの円盤試料を、圧縮あて部を0°(360°)、対向部を180°として髓を中心に6つに分割し、同一の年輪部分からWiley Millで木粉(メッシュサイズは1 mm)を調製した(図4-1-c)。木粉は、エタノール-ベンゼン混液(1:2、v/v)で6時間、ソックスレー抽出した。メルクシマツは、Nawawiら[Nawawi 2017]が円盤試料の圧縮あて部を0°(360°)、対向部を180°として髓を中心に6つに分割後、各区画より調製した脱脂木粉を用いた。

表 4-1 分析した針葉樹 3 樹種のあて材。

樹種			試料部位	直径 (cm)
和名	学名	慣用名		
スギ	<i>Cryptomeria japonica</i>	Japanese Cedar	幹	13
ヒマラヤスギ	<i>Cedrus deodara</i>	Deodara Cedar	枝	8
メルクシマツ <sup>a</sup>	<i>Pinus merkusii</i>	Merkus Pine	幹	30

<sup>a</sup> [Nawawi 2017]。

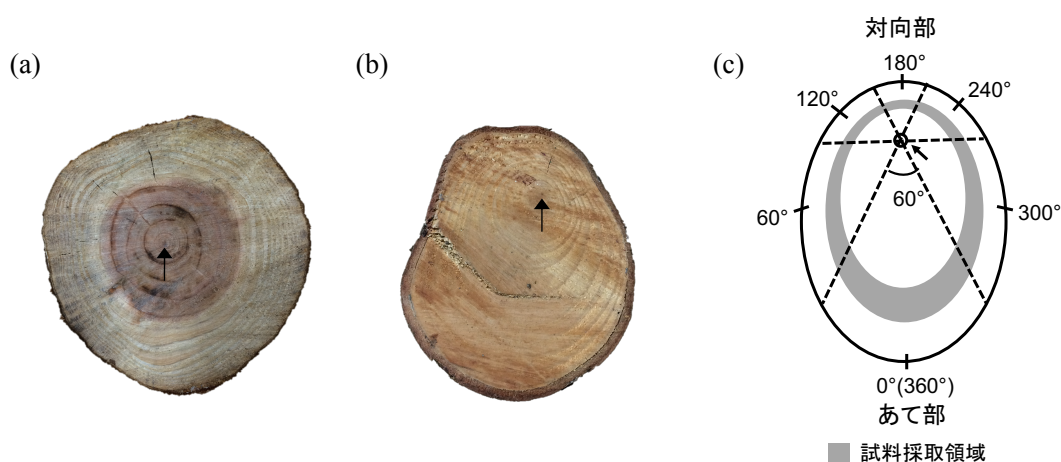


図4-1 (a)スギ、または(b)ヒマラヤスギの樹幹横断面と(c)分割のイメージ図。

矢印は、髓の位置を示している。

#### 4.2.2 光学顕微鏡による組織観察

スギの幹およびヒマラヤスギの枝試料(それぞれ傾斜下部および枝下側に偏心成長)を光学顕微鏡で組織観察し、圧縮あての発達の有無を調べた。まず、偏心成長した部位とその対向部から、滑走式ミクロトームにより横断面で 15  $\mu\text{m}$  厚の切片を作成した。次に、シワになった切片を平らに伸ばす目的で、2 枚のスライドガラスの間に切片を挟み、その上に重しを乗せた状態で、70°C のイオン交換水に 3 時間浸した。切片は、未染色又はフロログルシン・塩酸溶液で染色後、BX50(OLYMPUS)を用いて光学顕微鏡観察を行った[Nakano 1992]。

#### 4.2.3 Klason 法

針葉樹あて材の 3 樹種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)について、円盤試料の 6 つの区画(図 4-1)より得た脱脂木粉のリグニン含量を Klason 法で調べた。リグニン含量は Klason リグニン残渣(KL; Klason lignin)と酸可溶性リグニン(ASL; acid soluble lignin)の合計値として求めた。なお、メルクシマツについては、Nawawi らの分析データを用いた[Nawawi 2017]。

##### 4.2.3.1 分析に供する木粉重量の検討

一般的に、Klason 法に用いられる試料の重量は 1 g である[Dence 1992, 松下 2016]。一方で、スギおよびヒマラヤスギの円盤試料を分割後、各区画より得られた脱脂木粉の重量は、対向部(180°、図 4-1)で最も少なく、各々 4.1 g および 3.3 g であった。脱脂木粉は、Klason 法(1 g $\times$ 2 回の分析)、さらにニトロベンゼン酸化法に供することから、Klason 法に供する木粉の重量を 1 g よりも減らす必要が生じた。分析に供する木粉重量のリグニン含量に対する影響を調べることを目的に、異なる重量のアカマツ木粉(1、0.5 および 0.3 g)を Klason 法に供しリグニン含量を比較した。その際、木粉重量に対する硫酸量の比は一定の下に行った。分析の手順は 4.2.3.2 項に従った。

#### 4.2.3.2 Klason 法の分析手順

スギおよびヒマラヤスギの脱脂木粉を、五酸化二リン存在下 40℃ で一晩、減圧乾燥した。脱脂木粉(300 mg)と 72%硫酸(3 ml)を 30 ml 容ビーカーに加え、時々攪拌しながら室温下で 3 時間処理した。酸の濃度が 3%となるように、内容物をイオン交換水(112.5 ml)で 300 ml 容三角フラスコに定量的に移し、121℃ に設定したオートクレーブ中で 30 分加熱した[Yoshihara 1984, Dence 1992]。常温下で一晩、静置した後、沈殿物をガラスフィルター(1GP 100)で吸引ろ過し、残渣をイオン交換水で洗浄した。ガラスフィルターに捕集した Klason 残渣は、105℃ に設定した恒温乾燥器の中で一晩乾燥した後、秤量しこれを Klason リグニン (KL)として定量した。ろ液は、メスフラスコを用いて 200 ml に希釈した。さらに、吸光度 (A)が 0.3~0.7 の範囲に収まるように希釈し、可視・紫外分光光度計 UV-240(SHIMADZU)で 205 nm 付近の極大吸光度を測定した。UV 測定のブランク試料は、測定試料と同じ濃度に希釈した硫酸を用いた。ASL の濃度は、以下の関係式により算出した。なお、本実験では、リグニンの吸光係数(a)は  $110 \text{ L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  を、光路長(l)は 1 cm を用いた。

$$A = a \cdot c \cdot l$$

A: 吸光度、a: リグニンの吸光係数( $\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ )、  
c: 酸可溶性リグニンの濃度(g/L)、l: 光路長(cm)、

リグニン含量(L)は、Klason リグニン(KL)と酸可溶性リグニン(ASL)の合計重量から以下の式により算出した。ただし、S は試料の絶乾重量である。

$$L = \frac{KL + ASL}{S} \times 100$$

#### 4.2.4 メトキシ基の定量

針葉樹 3 樹種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)のあて材について、円盤試料の 6 つの区画(図 4-1-c)から得た Klason 残渣のメトキシ基含量を、後藤ら[Goto 2001]の手法に従って調べた。

Klason 残渣を五酸化二リン存在下、40°C で一晩、減圧乾燥した。この Klason 残渣(30 mg)と 57%ヨウ化水素酸(10 ml)を反応容器(30 ml 容アルミシールバイアル)に加え、密封後、130°C で数分ごとに振盪しながら 20 分間加熱した。氷冷後、内部標準物質としてヨウ化エチル(0.1 mmol)を四塩化炭素溶液として加え、攪拌した。反応容器を再び氷冷した後、四塩化炭素(10 ml)を加えよく攪拌した。上層の有機層の一部を採取し、硫酸ナトリウムで脱水後、1  $\mu$ l をガスクロマトグラフィー(GC-FID)で分析した。なお、収率は C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub> 単位の分子量を 200 と概算し、Klason リグニン残渣 200 g あたりのモル収率として算出した。

GC 測定条件: GC-2014(SHIMADZU)もしくは GC-17(SHIMADZU); カラム CP-SIL-13CB, 25 m $\times$ 0.32 mm; キャリアガス ヘリウム; カラム流量 1.7 ml/min(GC-2014)もしくは 2.3 ml/min(GC-17); インジェクション温度 200°C; ディテクター温度 230°C; スプリット比 50

カラム昇温条件: 40°C で 5 分保持 $\rightarrow$ 10°C/分で 180°C まで昇温、保持時間なし(分析時間 19 分)

保持時間: CH<sub>3</sub>I = 8.4 min、C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>I = 14.9 min

#### 4.2.5 圧縮あて材のニトロベンゼン酸化

4.2.1 項で調製した 3 樹種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)のあて材の脱脂木粉を、3.2.3.1 項に従いニトロベンゼン酸化法(170°C、反応 2 時間)で分析した。



### 4.3 結果と考察

#### 4.3.1 光学顕微鏡による組織観察

組織観察の結果、スギとヒマラヤスギともに、偏心成長した部位(図 4-2-a1、b1、図 4-3-a1、b1)は、対向部(図 4-2-a2、b2、図 4-3-a2、b2)と比較して、細胞壁の形状が丸く(図 4-2)、フロログルシン・塩酸で強く呈色し(図 4-3)、典型的な圧縮あての特徴を示した[馬場 2011, 林 2016]。

あて部のリグニン含量(Klason リグニンと酸可溶性リグニンの合計量)は、対向部の約 1.2 倍であったのに対し(4.3.2.2 項を参照)、あて部は対向部よりもフロログルシン・塩酸溶液でかなり強く呈色した(図 4-3)。フロログルシン・塩酸溶液は、リグニンの主要構造ではなく末端基のコニフェリルアルデヒド構造に対して呈色することから[Nakano 1992, 飯塚 2016]、今回、あて部が対向部よりも強く呈色したのは、リグニン含量が高かったからだけでなく、コニフェリルアルデヒド構造を多く含んだためかもしれない。

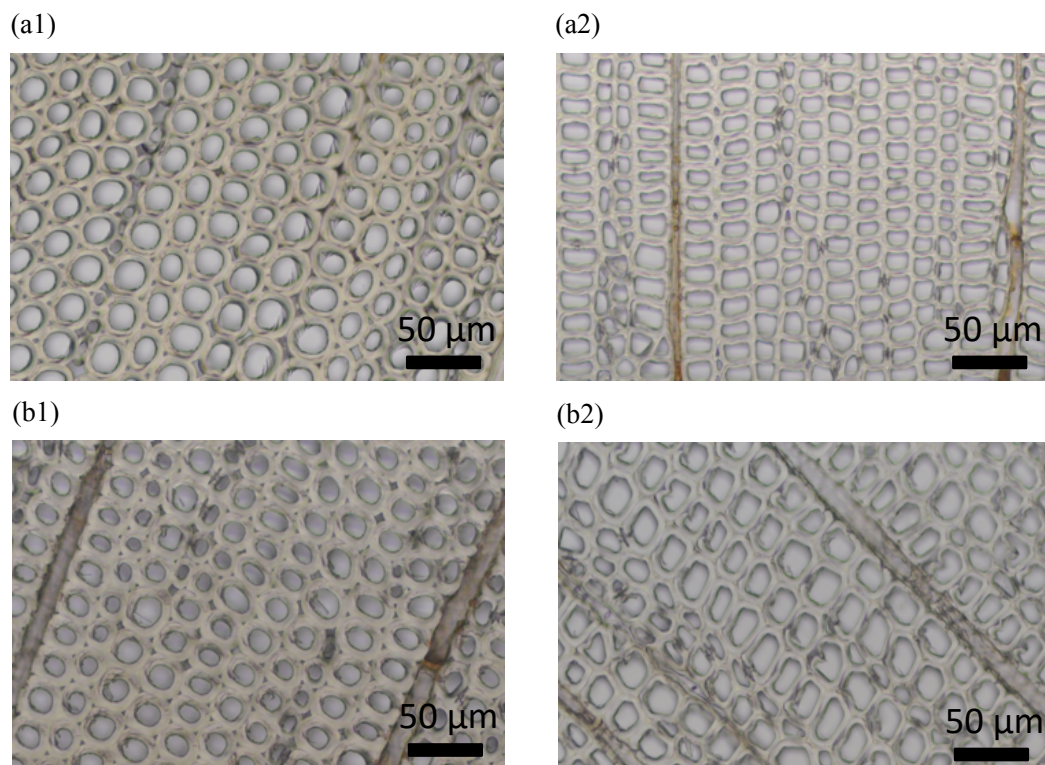
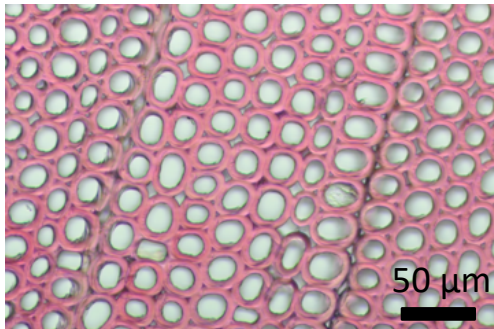
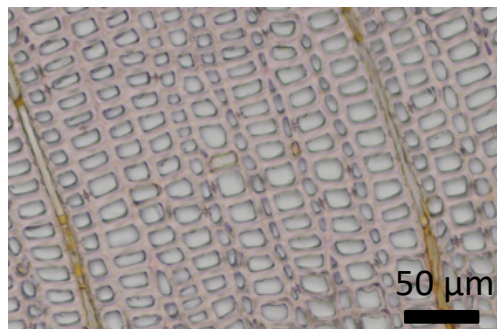


図 4-2 横断面の光学顕微鏡写真(15  $\mu$ m、未染色)。a)スギの(a1)圧縮あて部、および(a2)対向部。b)ヒマラヤスギの(b1)圧縮あて部、および(b2)対向部。

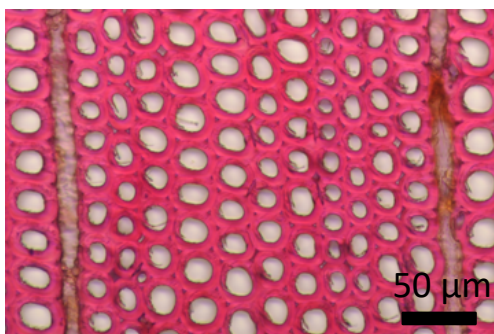
(a1)



(a2)



(b1)



(b2)

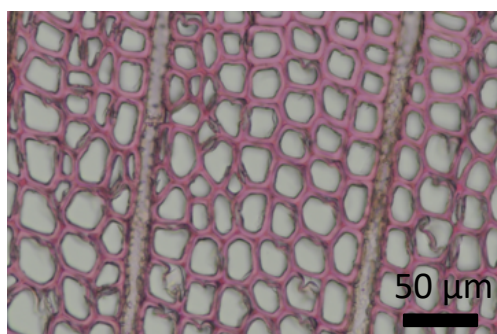


図 4-3 横断面の光学顕微鏡写真(15  $\mu\text{m}$ 、フロログルシン・塩酸で染色)。a)スギの(a1)圧縮あて部、および(a2)対向部。b)ヒマラヤスギの(b1)圧縮あて部、および(b2)対向部。

#### 4.3.2 Klason 法

##### 4.3.2.1 分析に供する木粉重量の検討

Klason 法に供する木粉重量がリグニン含量(Klason リグニンと酸可溶性リグニンの合計量)の値に与える影響を調べる目的で、異なる重量(1、0.5 および 0.3 g)のアカマツ木粉を Klason 法に供し、リグニン含量を比較した。その結果、0.5 g もしくは 0.3 g の木粉を用いた時のリグニン含量は、一般的に用いられる 1 g の木粉使用時のそれよりもわずかに低かったものの、ほとんど変わらなかった(表 4-2)。そこで、本研究では Klason 法に供する木粉の重量を一般的な 1 g から 0.3 g に減らした。

表 4-2 異なる重量のアカマツ木粉を Klason 法に供した時のリグニン含量。

木粉重量(g)	Klasonリグニン量(%)	酸可溶性リグニン量(%)	リグニン含量(%)
1	26.8	0.3	27.1
0.5	26.4	0.3	26.7
0.3	26.2	0.3	26.6

#### 4.3.2.2 あて樹幹内におけるリグニン含量の分布

3 樹種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)を用いて、あて樹幹内におけるリグニン含量(Klason リグニンと酸可溶性リグニンの合計収量)の変化を調べた。メルクシマツについては、Nawawi らの分析データを用いた[Nawawi 2017]。その結果、リグニン含量は、どの樹種においても、対向部 180° からあて部 0°(360°)に向かって高くなることが既往の知見と同様に示された(図 4-4-a)[Bland 1965, Morohoshi 1971a, Yasuda 1975, 馬場 2011, 石栗 2016, Nawawi 2017]。

あて樹幹内における酸可溶性リグニン量の差異はごく僅かであったが、リグニン含量の傾向とは反対に、対向部からあて部に向かって若干低くなる傾向が示唆された(図 4-4-b)。H 核含量はあて部に向かって高くなることが報告されていることから[Morohoshi 1971b, Yasuda 1975, Fukushima 1991, Roland 1992, Nawawi 2017]、酸可溶性リグニン量と H/G 比の相関を調べた。H/G 比の指標として、ニトロベンゼン酸化生成物の全ての芳香核量に対する H 核型生成物の芳香核量の比を示す  $(H+H_{5-C=O}+HV)/(H+V+H_{5-C=O}+V_{5-C=O}+2VV+2HV)$  比を用いた(以下、H 核比と略す)ところ、ヒマラヤスギとメルクシマツで、酸可溶性リグニン量は H 核比が高くなるほど僅かに低くなることが示唆された(図 4-5-a)。また、H/G 比の指標として Klason 残渣のメトキシ基含量を用いた場合にも同様に、メトキシ基含量が低い、つまり H 核の割合が高くなるほど、酸可溶性リグニン量はやや低くなることが、ヒマラヤスギとメルクシマツで示唆された(図 4-5-b)。スギでは明らかな傾向はみられなかった。

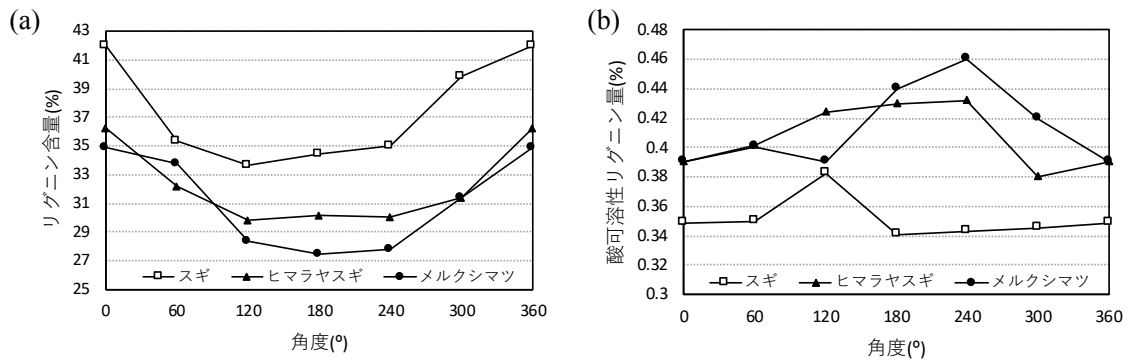


図 4-4 針葉樹 3 種のあて樹幹内の(a)リグニン含量(Klason リグニン+酸可溶性リグニン)、および(b)酸可溶性リグニン量の分布。

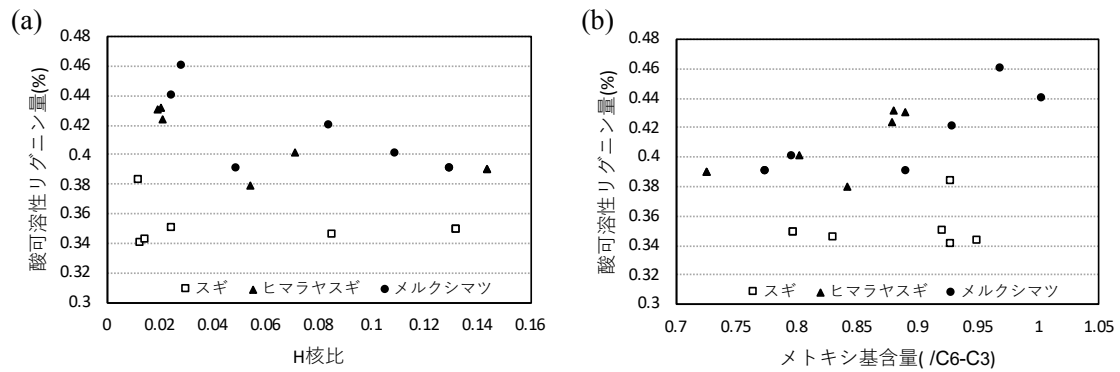


図 4-5 針葉樹あて材における酸可溶性リグニン量と H/G 比との関係性。H/G 比の指標として、(a)H 核比  $\{(H+H_{5-C=O}+HV)/(H+V+H_{5-C=O}+V_{5-C=O}+2HV+2VV)\}$  比、および (b)Klason 残渣のメトキシ基含量を使用。

#### 4.3.3 あて樹幹内におけるメトキシ基含量の分布

Klason 残渣のメトキシ基含量は、3 樹種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)において、対向部 180° からあて部 0°(360°)に向かって低くなり、H 核含量はあて部に向かって高くなるのが既往の知見と同様に示された(図 4-6)[Bland 1965, Morohoshi 1971b, Yasuda 1975]。また、4.3.4.1 項で後述するように、H 核を有するニトロベンゼン酸化生成物(H、 $H_5C=O$  および HV)の収率もあて部に向かって高くなった(図 3-5、図 4-8)。メトキシ基含量から試算した H 核の割合は、対向部からあて部に向かって、スギで+14%、ヒマラヤスギで+16%、メルクシマツで+23%増加した。これらあて樹幹内における H 核含量の差異は、針葉樹 6 種間における差異の 9%よりも大きく、H/G 比とビフェニル型構造量との関係を調べるのにより適した試料であることが確認された。

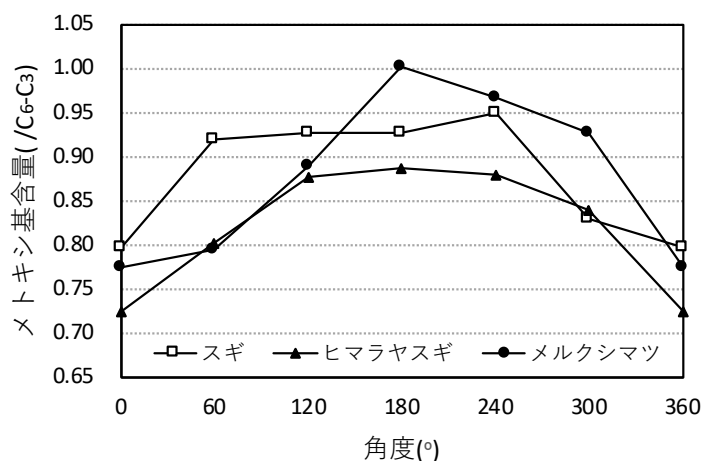


図 4-6 針葉樹のあて樹幹内における Klason 残渣のメトキシ基含量の分布。

#### 4.3.4 ニトロベンゼン酸化法

##### 4.3.4.1 あて樹幹内におけるニトロベンゼン酸化生成物の収率の分布

円盤試料の圧縮あて部を  $0^{\circ}(360^{\circ})$ 、対向部を  $180^{\circ}$  として髓を中心に 6 つに分割後、各区画より調製した脱脂木粉をニトロベンゼン酸化法で分析した(図 4-1)。分解生成物として、H 核および G 核型の非縮合型生成物(H と V)、GG および HG 型ビフェニル型生成物(VV と HV)、 $\beta$ -5 型構造に由来する H 核および G 核型の生成物( $H_{5-C=O}$  と  $V_{5-C=O}$ )を定量した(図 3-5)。収率は、リグニン単位の分子量を 200 と概算し、Klason リグニン 200 g あたりのモル収率として算出した。ただし、ビフェニル型生成物は 1 分子に 2 つの芳香核を有するため、芳香核量を議論する際にはモル収率を 2 倍した数値を用いた。

あて材 3 樹種から同酸化生成物として得られた芳香核の合計収率( $H+V+2HV+2VV+H_{5-C=O}+V_{5-C=O}$ )は、リグニンの芳香核 100 単位あたりスギで 45.1-54.0 単位(以下%)、ヒマラヤスギで 44.6-50.7%、メルクシマツで 44.5-48.7%とリグニンの芳香核の約 5 割に達した(図 4-7-a)。これらの収率は、チオアシドリシス法や過マンガン酸カリウム酸化法による分解生成物の収率よりも高かった[Yamasaki 1971, Yue 2012, Yue 2017](2.3.2 項)。

非縮合型生成物の収率( $H+V$ )は、どの樹種においても、対向部からあて部に向かって低くなり、過去の知見と一致した[Bland 1958, Morohoshi 1971b](図 4-7-b)。非縮合型生成物の収率( $H+V$ )はあて部の方が低かったことから、 $\beta$ -5 やビフェニル等の縮合型構造の割合は反対にあて部で高くなると予想される。しかし、 $\beta$ -5 型( $H_{5-C=O}+V_{5-C=O}$ )およびビフェニル型生成物の芳香核量( $2VV+2HV$ )も低くなった(図 4-7-c、d)、結果として全生成物の合計収率( $H+V+H_{5-C=O}+V_{5-C=O}+2VV+2HV$ )もあて部で低い値を示した(図 4-7-a)。

この原因の一つとして、あて部には対向部よりも、ニトロベンゼン酸化法に対する反応効率の低い H 核が多く含まれることが挙げられる。第 3 章で H 核型  $\beta$ -5 モデル化合物のニトロベンゼン酸化には、G 核型よりも長い反応時間を要することが明らかとなった。また、草本を用いた研究においても、H 核は G 核よりも同酸化法に対して反応効率が低いことが報告されている[Iiyama 1990, Billa 1996, Min 2015]。これらのことから、本研究でも H 核と G 核の反応効率の違いを検証してみた。Klason 残渣のメトキシ基含量から推測される、スギあて部の H 核と G 核の比率は 1:4 であった。一方、ニトロベンゼン酸化法による H 核型と G 核型生成物の量比は 1:7 と、H 核の割合はメトキシ基含量から試算した値よりも小さかった。スギ対向部でも同様に、メトキシ基含量による H 核と G 核の比 1:13 に対し、同酸化法では 1:113 と H 核の割合は小さかった。これらのことから、本研究においても、H 核リグニンは G 核リグニンに比べてニトロベンゼン酸化生成物を与えにくいことが示唆された。したがって、H 核型と G 核型生成物の収率を比較もしくは合算して議論する際には、H 核の方が G 核よりもニトロベンゼン酸化法に対する反応効率が低いことを念頭に置く必

要がある。

その他の原因として、本研究では、ジアリールエーテル型の縮合型生成物を定量していないことが考えられる[Li 2016](図 1-3)。また、4.3.4.6 項で後述するように、H 核が 3 量体またはそれ以上の縮合型構造を形成した可能性も考えられたが、3 量体 H 核の一つである HHH 型のトリフェニル生成物は検出限界以下であった。

次に、あて樹幹内における各分解生成物の収率の分布を調べた(表 4-3)。H 核を有する分解生成物(H、 $H_{5-C=O}$  および HV)の収率は、対向部  $180^\circ$  からあて部  $0^\circ(360^\circ)$  に向かって高くなり、4.3.3 項の Klason 残渣のメトキシ基含量の結果と一致した(図 4-8-a1、b1、c1)。一方、G 核型生成物(V、 $V_{5-C=O}$  および VV)の収率は、あて部に向かって低くなった(図 4-8-a2、b2、c2)。ビフェニル型生成物量の分布に着目すると、GG 型ビフェニル型生成物(VV)はあて部に向かって少なくなったが、HG 型ビフェニル型生成物(HV)は多くなり、互いに反対の傾向を示した(図 4-8-c1、c2)。しかし、対向部からあて部に向かったの HV の増加分は、VV の減少分を上回ることなく、結果としてビフェニル型芳香核の合計収率( $2VV+2HV$ )は、あて部に向かって若干低くなった(図 4-8-d)。このように、ニトロベンゼン酸化生成物の収率は、あて部に向かって一定の傾向を示した。次の 4.3.4.2 項以降で同酸化生成物の収率と H/G 比の相関を調べた。



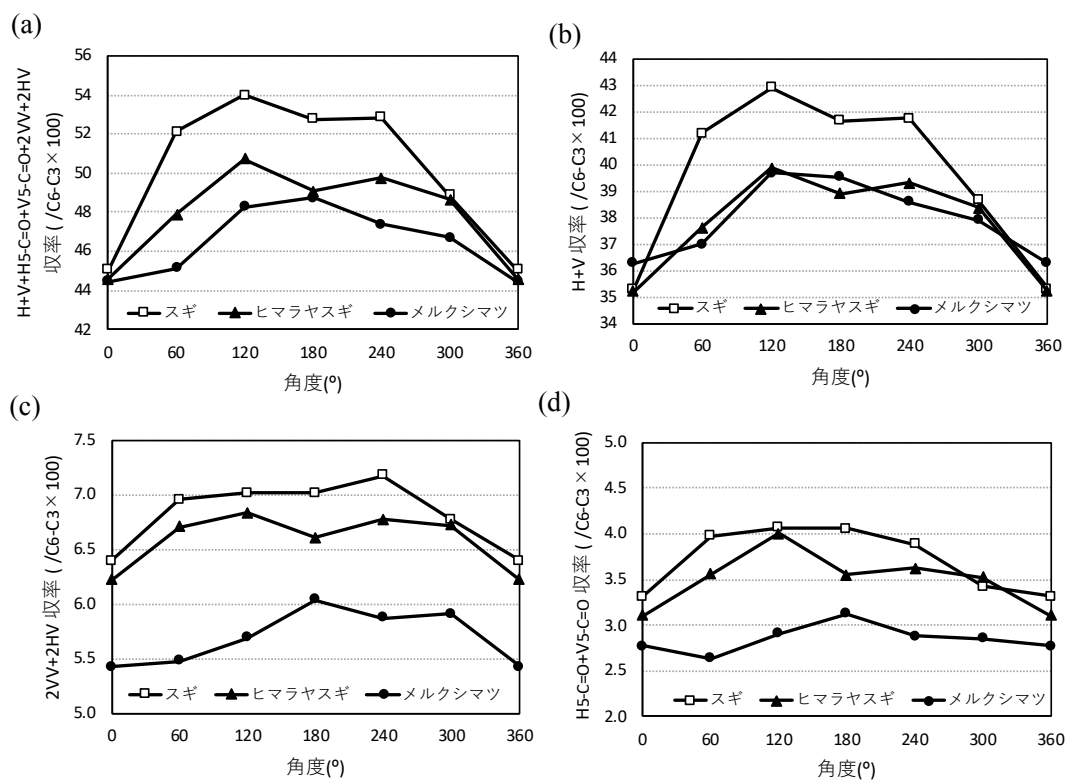


図 4-7 針葉樹 3 種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)のあて樹幹内におけるニトロベンゼン酸化生成物の収率の分布。(a)全ての分解生成物、(b)非縮合型、(c)ビフェニル型、および(d) $\beta$ -5 型生成物。0°(360°): あて部、180°: 対向部。

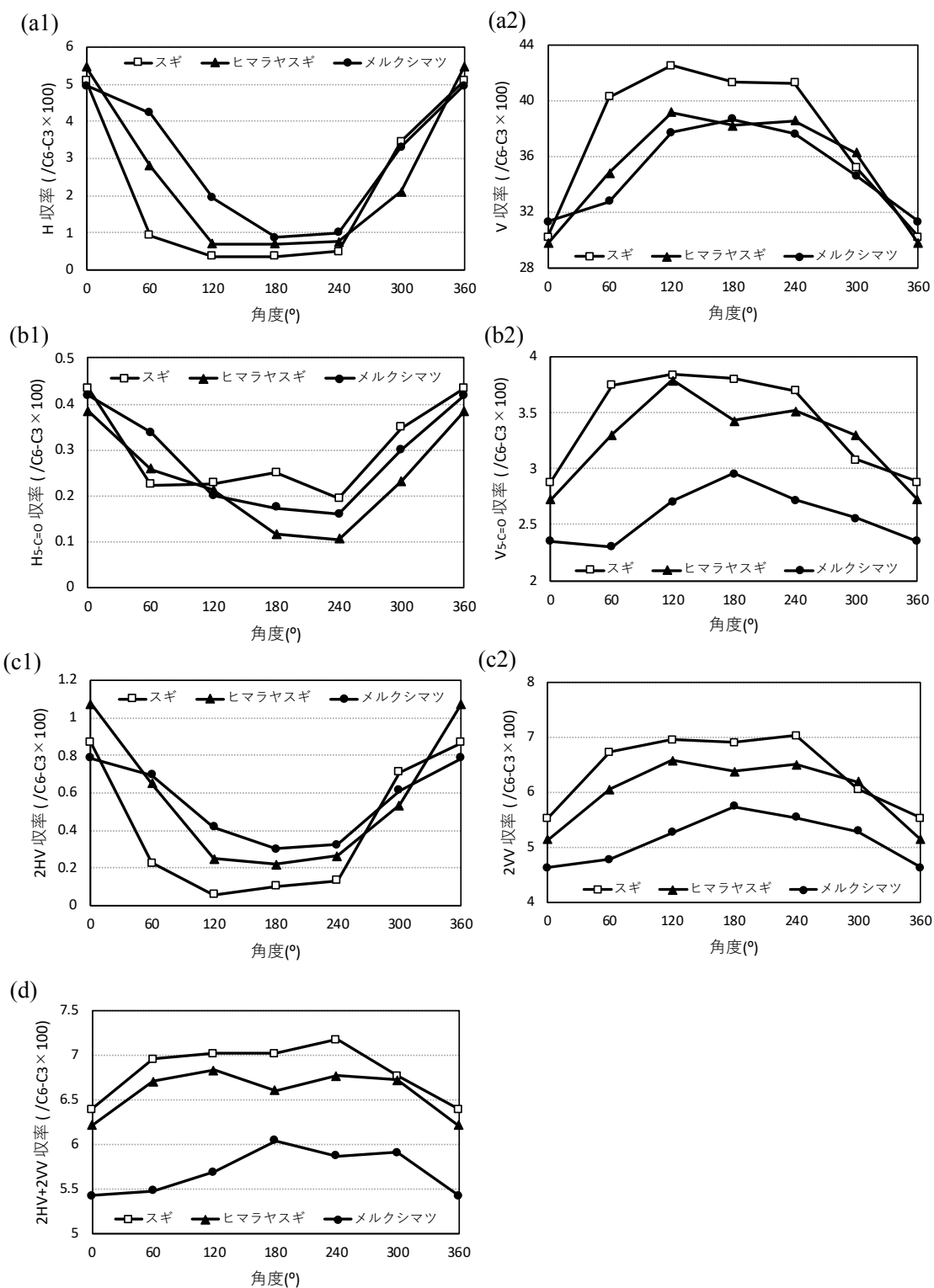


図 4-8 針葉樹 3 種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)のあて樹幹内におけるニトロベンゼン酸化生成物の収率の分布。(a)非縮合型、(b) $\beta$ -5 型、(c)と(d)ビフェニル型生成物。1)H 核を有する生成物、2)G 核型の生成物。

表 4-3 針葉樹 3 樹種(スギ、ヒノキ、ヒノヤスギ)のリグニン含量、メトキシ基含量、およびニトロベンゼン酸化生成物の収率。

樹種	スギ						ヒノヤスギ						メルカシマツ						
角度 (°) <sup>a</sup>	0°	60°	120°	180°	240°	300°	0°	60°	120°	180°	240°	300°	0°	60°	120°	180°	240°	330°	
Klason リグニン量 <sup>b</sup> (wt%)	42.0	35.3	33.6	34.5	35.1	39.8	36.3	32.2	29.9	30.1	30.1	31.4	34.9	33.7	28.4	27.5	27.9	31.4	
メトキシ基含量 <sup>c</sup> (mol/200 g-lignin)	0.80	0.92	0.93	0.93	0.95	0.83	0.73	0.80	0.88	0.89	0.88	0.84	0.77	0.80	0.89	1.0	0.97	0.93	
p 酸生成物の収率 (mol%) ベンゼン クロロ マ	H <sub>ald</sub>	4.7	0.85	0.35	0.33	0.46	2.9	5.0	2.6	0.66	0.67	0.69	1.9	4.5	3.8	1.8	0.80	0.93	3.0
	H <sub>acid</sub>	0.43	0.079	0.029	0.032	0.043	0.56	0.44	0.22	0.046	0.039	0.070	0.17	0.47	0.39	0.17	0.070	0.084	0.30
	V <sub>ald</sub>	28.1	37.8	40.0	38.8	38.8	33.0	27.6	32.5	36.7	35.8	36.1	33.9	28.8	30.3	35.0	35.9	34.9	32.0
	V <sub>acid</sub>	2.1	2.5	2.6	2.5	2.5	2.3	2.2	2.3	2.5	2.4	2.5	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8	2.7	2.6
	HV <sub>ald</sub>	0.43	0.11	0.029	0.053	0.068	0.36	0.54	0.33	0.13	0.11	0.13	0.27	0.39	0.35	0.21	0.15	0.16	0.31
	VV <sub>ald</sub>	2.2	2.8	2.9	2.9	2.9	2.5	2.1	2.5	2.7	2.6	2.7	2.6	1.9	1.9	2.2	2.4	2.3	2.2
	VV <sub>ald-acid</sub>	0.49	0.51	0.54	0.53	0.54	0.49	0.45	0.50	0.55	0.51	0.52	0.49	0.42	0.43	0.44	0.49	0.47	0.47
	VV <sub>acid</sub>	0.030	0.039	0.032	0.055	0.034	0.031	0.028	0.034	0.039	0.041	0.035	0.031	0.033	0.074	0.034	0.032	0.032	0.027
	H <sub>5-GHO</sub>	0.22	0.12	0.12	0.16	0.093	0.15	0.21	0.15	0.13	0.050	0.050	0.13	0.16	0.15	0.073	0.049	0.053	0.14
	H <sub>5-COOH</sub>	0.21	0.10	0.10	0.089	0.10	0.20	0.18	0.11	0.081	0.065	0.054	0.10	0.26	0.19	0.13	0.12	0.11	0.16
	HA <sub>5-COOH</sub>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>
	V <sub>5-GHO</sub>	1.6	2.4	2.4	2.4	2.3	1.8	1.6	2.0	2.4	2.2	2.1	2.1	1.4	1.2	1.6	1.8	1.6	1.4
	V <sub>5-COOH</sub>	0.91	0.91	1.0	0.93	0.94	0.91	0.78	0.86	0.96	0.85	0.99	0.83	0.67	0.76	0.74	0.80	0.77	0.81
	VAs-GHO	0.35	0.48	0.44	0.46	0.46	0.37	0.31	0.42	0.47	0.41	0.42	0.41	0.30	0.31	0.38	0.40	0.37	0.34

<sup>a</sup>円盤試料の角度(図 4-1)、<sup>b</sup>Klason リグニンと酸可溶性リグニンの合計収量、<sup>c</sup>Klason 残渣のメトキシ基含量は、リグニン単位  
の分子量を 200 g/mol と概算し算出、<sup>d</sup>検出限界以下、<sup>e</sup>リグニンの分子量を 200 g/mol と概算し算出。

#### 4.3.4.2 H/G 比と GG 型ビフェニル型構造量の関係(あて材樹幹内)

針葉樹あて材の 3 樹種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)のニトロベンゼン酸化生成物の分析データ(4.3.4.1 項)を用いて、H/G 比と GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率との関係について調べた。

H/G 比の指標として、ニトロベンゼン酸化生成物の全芳香核量に対する H 核型生成物の芳香核量の比  $\{(H+H_5-C=O+HV)/(H+V+H_5-C=O+V_5-C=O+2HV+2VV)\}$  比を用いた(以下、H 核比と略す)。その結果、H 核比が高くなるほど VV の収率は低くなる傾向が高い相関で示された( $R^2=0.91-0.99$ 、図 4-9-a1、b1、c1)。また、Klason 残渣のメトキシ基含量を用いた場合にも同様に、メトキシ基含量が低くなる、つまり H 核の割合が高くなるほど VV 収率は低くなる傾向が高い相関で示された( $R^2=0.94-0.99$ 、図 4-9-a2、b2、c2)。どの樹種においても、対向部からあて部に向かって H 核の割合が高くなるほど、VV 収率は低くなることが明らかとなり、針葉樹 6 種で示唆された結果と一致した(2.3.5 項を参照)。

H/G 比と GG 型ビフェニル型構造量の関係について、以下に示すようにいくつかの知見が報告されており、多くの場合、本研究の結果と同様の傾向がみられる。例えば、1.5 項に前記したように、山崎ら[Yamasaki 1972]が、G 核のみから成る DHP-c と G 核と H 核から成る DHP-pc を、アルカリ加水分解後メチル化過マンガン酸カリウム酸化法で分析したところ、DHP の分子量を 200 と概算した時の GG 型ビフェニル型生成物の収率は、DHP-c よりも H 核を含む DHP-pc で低かった(DHP-c: 0.015/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>、DHP-pc: 0.004/C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>、表 1-3)。また、Erickson ら[Erickson 1973b]がモンタナマツのあて材を、アルカリ加水分解後メチル化過マンガン酸カリウム酸化法で分析したところ、GG 型ビフェニル型生成物が木粉 1 g あたりあて部で 0.031 mmol、対向部で 0.033 mmol 得られている(表 1-1、1.4 項を参照)。一般に針葉樹あて材のリグニン含量は、あて部の方が対向部よりも高い[Bland 1958, Morohoshi 1971a, Yasuda 1975, 福島 2010, 石栗 2016]。これを考慮すると、上記のモンタナマツあて材のリグニン含量あたりの GG 型ビフェニル型生成物の収率も、あて部の方が低かったと考えられる。また、1.5 項に前記したように、斎藤ら[Saito 2005]はクロマツあて部を用いて、形成層から成熟木部に向かって 6 つの区画から木切片試料を採取し、チオアシドリシス法で分析した。その結果、全生成物の GC ピークの面積に対する GG 型ビフェニル型生成物のピーク面積の比は、最も形成層に近い区画を除いた 5 つの区画で、H/G 比が高くなるほど低い値を示した。一方で、例外として安田ら[Yasuda 1975]が、カラマツのあて部と対向部を、アルカリ加水分解の後、メチル化過マンガン酸カリウム酸化法に供して得られた GG 型ビフェニル型生成物の収率は、あて部のほうが対向部よりも高かった(あて部:0.14%、対向部:0.10%)。

本研究で H/G 比の指標が高くなるほど GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率が低くなったのは、G 核の減少に伴って G 核同士の重合により生成するビフェニル型構造が減少

したためと説明できる。これに加えて、リグニン形成時、共存する H 核が G 核の一部と重合することで 5 位でのさらなる結合の生成が困難となり、GG 型ビフェニル型構造の形成が抑制された可能性も考えられる。この可能性については、4.3.4.5 項で詳しく後述するが、リグニン中の全 G 核から GG 型ビフェニル型構造の形成する頻度の指標  $\{2VV/(V+V_{5-c=0}+HV+2VV)\}$  比}と H/G 比との間に明確な傾向は確認されなかった。

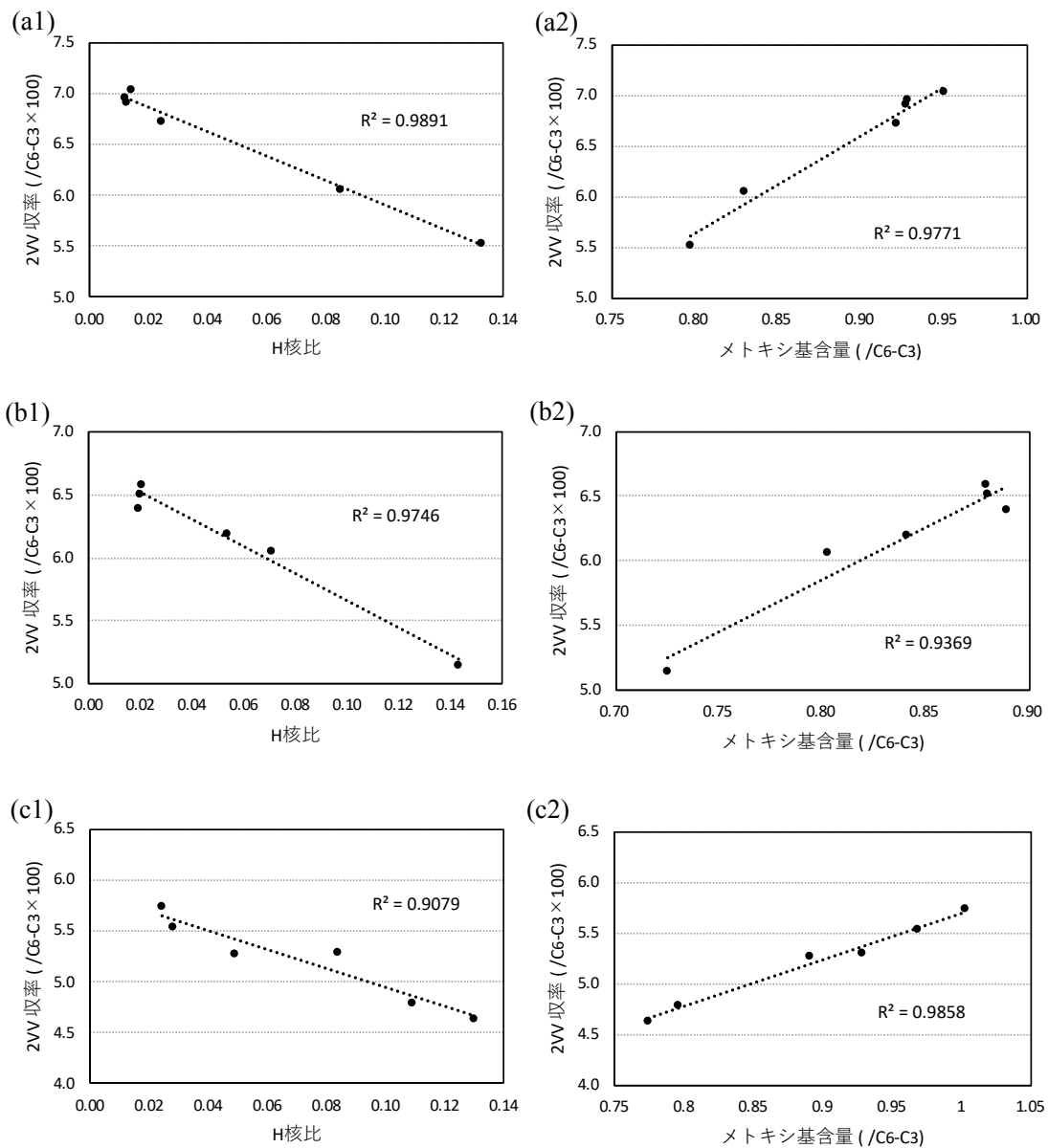


図 4-9 針葉樹あて材のニトロベンゼン酸化生成物として得られた GG 型ビフェニル型生成物の収率(芳香核量 2VV として表示)と H/G 比の関係。(a)スギ、(b)ヒマラヤスギ、および(c)メルクシマツ。H/G 比の指標として、(1)H 核比  $\{(H+H_5C=O+HV)/(H+V+H_5C=O+V_5C=O+2HV+2VV)\}$ 、および(2)Klason 残渣のメトキシ基含量を使用。

#### 4.3.4.3 H/G 比と HG 型ビフェニル型構造量の関係(あて材樹幹内)

H 核含量の高いリグニン試料として圧縮あて材を用いることで、GG 型のみだけでなく HG 型ビフェニル型構造をもったニトロベンゼン酸化生成物を検出・定量することが可能となった。そこで、4.3.4.1 項で得られた分析データを用いて、H/G 比と HG 型ビフェニル型生成物(HV)の収率との関係について調べた。

その結果、H 核比が高くなるほど HV 収率は高くなる傾向が高い相関と共に示された( $R^2=0.97-1.0$ 、図 4-10-a1、b1、c1)。また、メトキシ基含量が低くなる、つまり H 核の割合が高くなるほど HV 収率は高くなった( $R^2=0.80-0.99$ 、図 4-10-a2、b2、c2)。

H/G 比と HG 型ビフェニル型構造量の関係について、これまでにいくつかの研究結果が報告されている。Erickson ら[Erickson 1973b]は、モンタナマツのあて部と対向部を、アルカリ加水分解後メチル化過マンガン酸カリウム酸化法に供し、HG 型ビフェニル型生成物を木粉 1 g あたりあて部で 0.007 mmol、対向部で 0.002 mmol 得た(1.4 項を参照)。木粉のリグニン含量は不明である。一般に、針葉樹あて材では、あて部の方が対向部よりもリグニン含量が高いがその差は 2 倍以下であり[Bland 1958, Morohoshi 1971a, Yasuda 1975, 福島 2010, 石栗 2016]、リグニン量あたりの HG 型ビフェニル型生成物量を比較してもあて部のほうが高かったと思われる。また、斎藤ら[Saito 2005]は、クロマツあて部の形成層から成熟木部に向かって 6 つの木切片試料を採取し、チオアシドリシス法で分析した。その結果、全生成物の GC ピークの面積に対する HG 型ビフェニル型生成物のピーク面積の比は、H/G 比が高くなるほど高い値を示した。

これまでに、複合細胞間層のリグニンは H 核に富むことが示されてきた[Whiting 1982, Meshitsuka 1985, Terashima 1988]。また、過マンガン酸カリウム酸化法やチオアシドリシス法によるあて材や脱水素重合物(DHP)の研究では、H 核のほとんどがリグニンのフェノール性末端として存在すると報告されている[Erickson 1973a, Lapierre 1988, Jacquet 1997, Nanayakkara 2011]。これらの知見からは、対向部からあて部に向かって増加した H 核は、リグニン形成時、G 核とは共存せず互いに結合しにくい可能性が考えられる。もしそうであるならば、H 核と G 核が結合してできる HG 型ビフェニル型構造の含有量は、H/G 比に対しほとんど変わらないと推測される。一方で、放射性同位体で標識した H 核は、正常材や対向部では主に複合細胞間層に取り込まれたのに対し、あて部では複合細胞間層だけでなく 2 次壁にも多く取り込まれたと報告されている[Fukushima 1991]。今回、2HV と H/G 比の指標は正の相関を示し、あて部に向かって増加した H 核は、リグニン形成時、G 核と共存し結合することが示唆された。このことは、HH 型ビフェニル型生成物と思われるピークが、GC-FID および GC-MS でほとんど検出されなかったことと一致する(3.3.3.1 項を参照)。もし、植物細胞壁中で H 核が偏在しているならば、HH 型ビフェニル型生成物は多く検出される

と想定される。

また、あて材 3 樹種のリグニンの芳香核に占める H 核の割合は、Klason 残渣のメトキシ基含量から概算して最大でも 27%と G 核が半数以上を占めたが、もしリグニンの芳香核のうち H 核の割合が 50%を超えることがあれば、HG 型ビフェニル型構造を形成するのに G 核が不足することになり、本研究の結果とは反対に、H/G 比の指標が高くなるほど HV の収率は低くなる傾向を示すかもしれない。また、その場合 HH 型ビフェニル型構造も生成すると期待される。実際に、遺伝子組換えによって H 核の割合を高めたアルファアルファから単離したリグニン試料(H 核の割合 65%、NMR 法)では、HG 型に加え、少量の HH 型ビフェニル型構造が、ジベンゾジオキソシン構造として検出されたと報告されている[Ralph 2006, Akiyama 2009]。



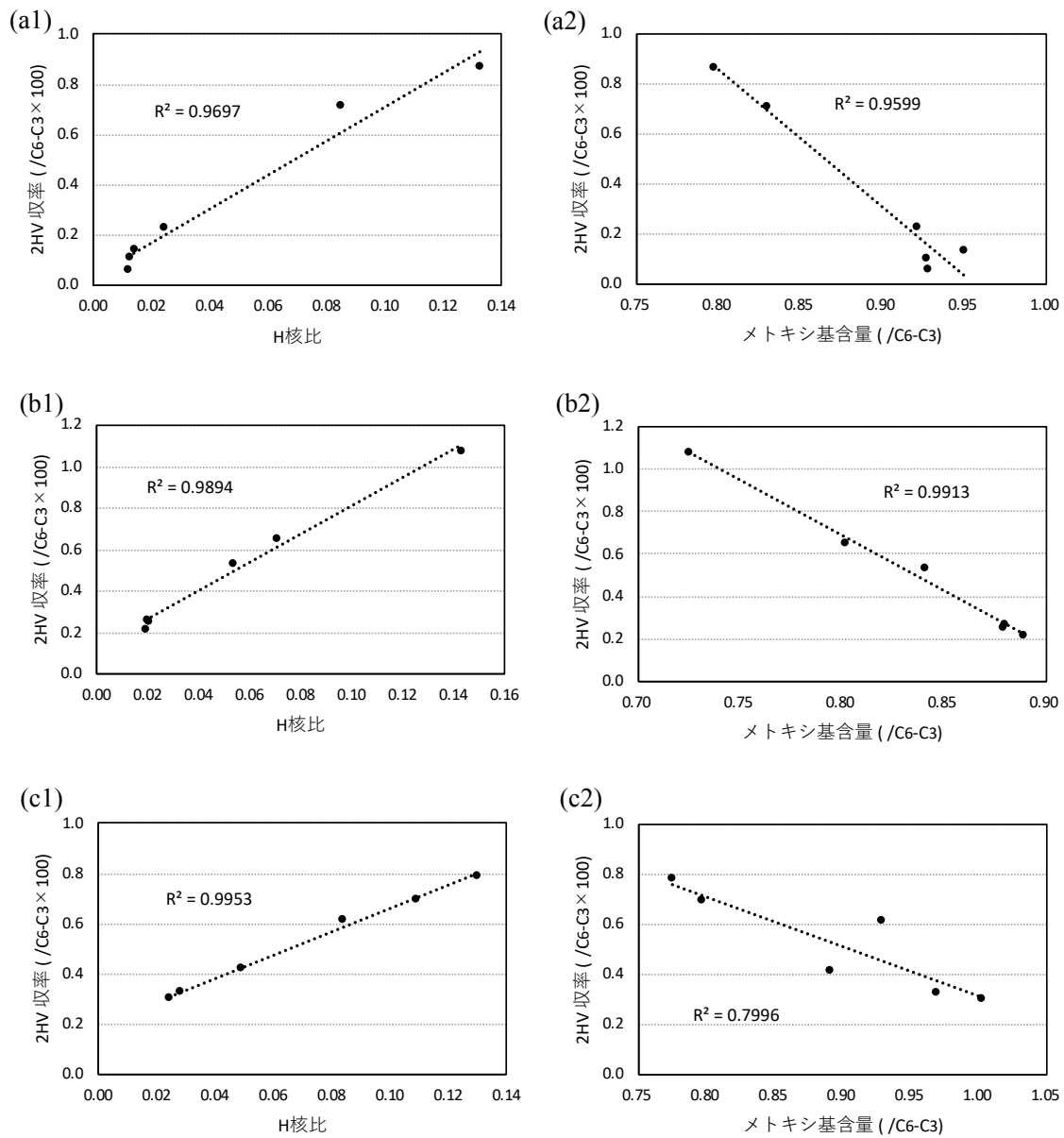


図4-10 針葉樹あて材をニトロベンゼン酸化法に供して得られたHG型ビフェニル型生成物の収率(芳香核量2HVとして表示)とH/G比の関係。(a)スギ、(b)ヒマラヤスギ、および(c)メルクシマツ。H/G比の指標として(1)H核比 $\{(H+H_5-C=O+HV)/(H+V+H_5-C=O+V_5-C=O+2HV+2VV)$ 比}、および(2)Klason残渣のメトキシ基含量を使用。

#### 4.3.4.4 樹種間における H/G 比と GG 型および HG 型ビフェニル型構造量の関係

H/G 比の指標と GG 型または HG 型ビフェニル型生成物量との相関は、3 樹種のあて樹幹内において 0.9 以上の高い相関係数を示した(4.3.4.2 項および 4.3.4.3 項を参照)。それでは、樹種の違いを超えても、これらは高い相関で成り立つのだろうか？このことを調べる目的で、あて材 3 樹種的全データ間の相関(以下、全樹種)と各樹種のあて樹幹内の相関(以下、各樹幹内)を比較した。

H 核比と GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率との相関係数は、全樹種のデータを用いた場合、各あて材樹幹内における相関よりも低い値を示した(全樹種:  $R^2=0.63$ 、各樹幹内:  $R^2=0.91-0.99$ )(図 4-9-a1、b1、c1、図 4-11-a1)。また、H/G 比の指標としてメトキシ基含量を用いた場合にも、樹種間の相関係数は、各あて樹幹内における相関係数よりもかなり低かった(全樹種:  $R^2=0.25$ 、各樹幹内:  $R^2=0.94-0.99$ )(図 4-9-a2、b2、c2、図 4-11-a2)。これは、図 4-11 の a1 と a2 にみられるように、メルクシマツの分布が、スギおよびヒマラヤスギの分布から下方に外れているためと推察される。

しかし、VV と同じ G 核型の非縮合型生成物(V)の収率は、H 核比と  $R^2=0.93$  の高い相関係数を示した(図 4-11-b1)。一方、メトキシ基含量との相関については、メルクシマツの分布の一部は、スギとヒマラヤスギより下方に外れ、全樹種間の相関係数は  $R^2=0.70$  と、各あて樹幹内の相関係数( $R^2=0.79-0.97$ )よりやや低い値を示した(図 4-11-b2)。

HG 型ビフェニル型生成物(HV)の収率と H 核比との相関係数は、全樹種間と各あて樹幹内ともに高い値を示した(全樹種:  $R^2=0.94$ 、各樹幹内:  $R^2=0.97-1.00$ )(図 4-10-a1、b1、c1、図 4-11-c1)。また、メトキシ基含量との相関係数は各樹幹内よりも若干低かった(全樹種:  $R^2=0.68$ 、各樹幹内:  $R^2=0.80-0.99$ )(図 4-10-a2、b2、c2、図 4-11-c2)。

これらのことから、メルクシマツでは、他の 2 樹種に比べ、HG 型ビフェニル型構造は同等の割合で形成されるが、GG 型ビフェニル型構造は形成されにくいことが推測される。それでは、VV 収率と H/G 比の指標との相関において、メルクシマツと他の 2 樹種のどちらが特異な分布を示しているのだろうか？このことを調べる目的で、あて材 3 樹種の分布を針葉樹 6 種の分布(2.3.5 項)と比較してみた。その結果、両者の分布はほとんど重ならず、今回の結果からはメルクシマツと他の 2 樹種のどちらが特異であるかの判断はつかなかった(図 4-12)。なお、針葉樹 6 種では、H 核由来の非縮合型生成物の一つ *p*-ヒドロキシ安息香酸( $H_{acid}$ 、図 3-5)を定量しなかったため、H/G 比の指標はメトキシ基含量を用いた。

このように、HG 型ビフェニル型生成物量については、全樹種間においても各あて樹幹内と同様に H/G 比と高い相関を示した。一方で、GG 型ビフェニル型生成物量と H/G 比との関係は、樹種間において各樹幹内ほど高い相関を示さなかった。

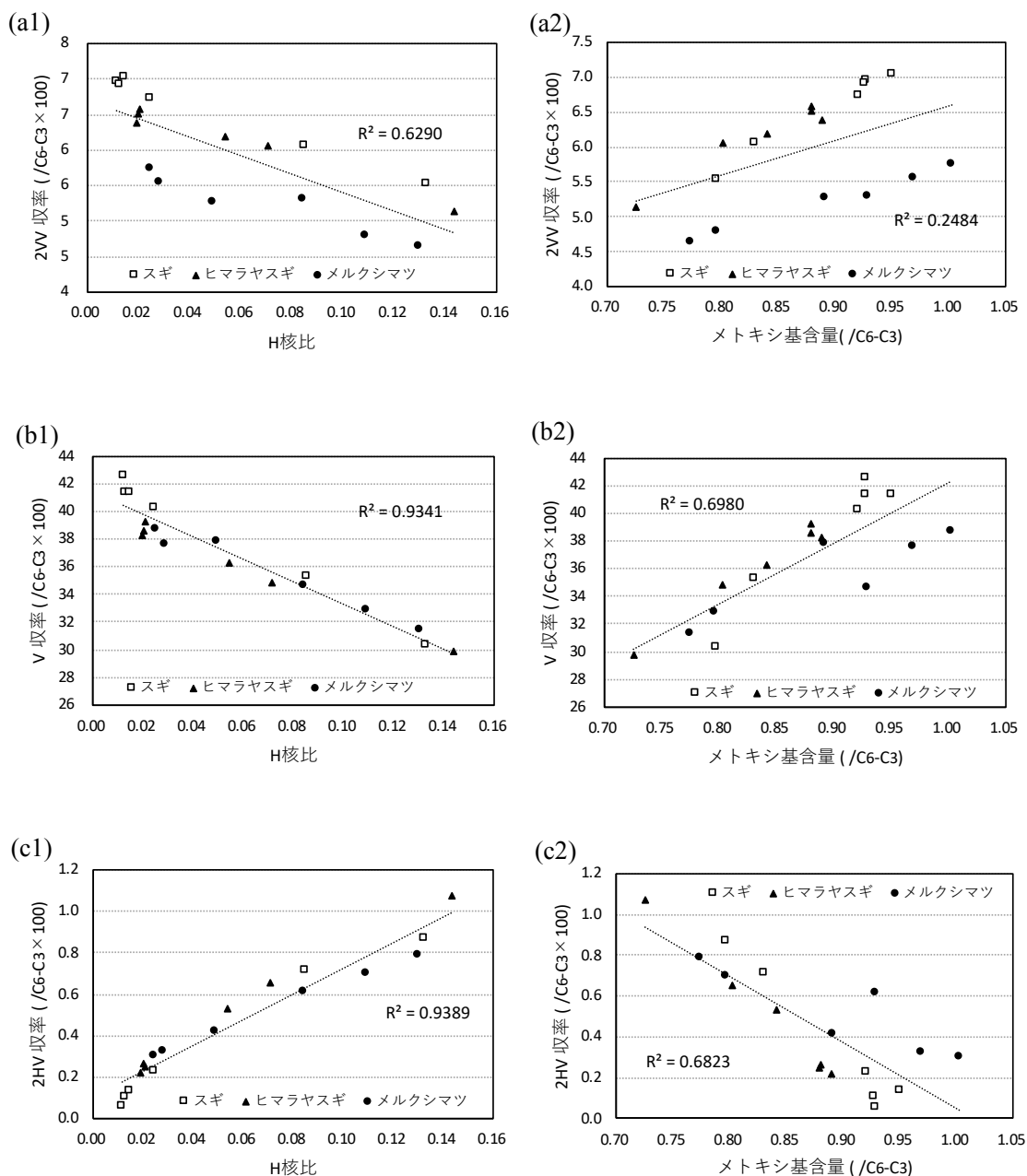


図4-11 3樹種の針葉樹あて材の全データ間におけるニトロベンゼン酸化生成物の収率とH/G比の関係。(a)GG型ビフェニル型生成物(VV)、(b)G核由来の非縮合型生成物(V)、および(c)HG型ビフェニル型生成物(HV)。H/G比の指標として(1)H核比  $\{(H+H_{5-C=O}+HV)/(H+V+H_{5-C=O}+V_{5-C=O}+2HV+2VV)\}$ 、および(2)Klason残渣のメトキシ基含量を使用。

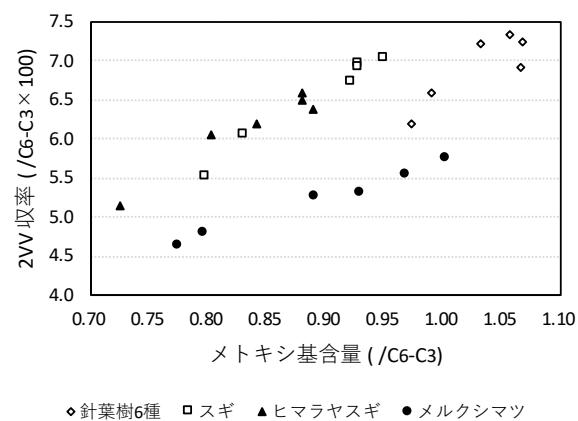


図 4-12 針葉樹 6 種および針葉樹あて材の 3 樹種(スギ、ヒマ  
ラヤスギおよびメルクシマツ)から得られた GG 型ビフェニル  
型生成物の収率(芳香核量 2VV として表示)と H/G 比の関係。

#### 4.3.4.5 H/G 比とビフェニル形成頻度の関係

あて材 3 樹種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)で、H/G 比の指標が高くなるほど GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率は低くなった(4.3.4.2 項を参照)。この理由の一つとして、第一に G 核の減少に伴い、G 核同士の 5-5 結合が減ったことが挙げられるが、の他にリグニン形成時、H 核が G 核の一部と重合することで、GG 型ビフェニル型構造の形成が抑制された可能性が考えられる。化学分解法を用いた既往の研究では、H 核と G 核から成る 2 量体生成物が報告されている[Yamasaki 1971, Erickson 1973b, Yasuda 1977, Saito 2005, Ralph 2006, Akiyama 2009]。そこで、この可能性について検証するために、H/G 比とビフェニル形成頻度との関係を調べた。

第 2 章において GG 型ビフェニル形成頻度を、リグニン中の全 G 核から GG 型ビフェニル型構造が形成される頻度と定義した。その指標として、ニトロベンゼン酸化法による全ての G 核型生成物の芳香核量に対する GG 型ビフェニル型生成物の芳香核量の比を用いた。21 樹種(針葉樹 6 種、広葉樹 15 種)の分析時には、 $\beta$ -5 型生成物( $V_{5-C=O}$ )と HG 型ビフェニル型生成物(HV)の標品がなく定量できなかったため、ビフェニル形成頻度の指標として  $2VV/(V+2VV)$  比を用いたが(2.3.4 項)、本章ではビフェニル形成頻度の指標をできるだけ真の値に近づける目的で、分母の全 G 核量に  $V_{5-C=O}$  と HV 中の G 核量を加えた  $2VV/(V+V_{5-C=O}+HV+2VV)$  比を用いた。

4.3.4.3 項で、HV 収率と H/G 比の指標は正の相関を示したことから、あて部に向かって増加した H 核は、細胞内で局所的に分布するなどして G 核と隔離されているというよりは、むしろ両者は共存し重合し得る環境にあると考える方が合理的だろう。この結果は、針葉樹あて材をオートラジオグラフィーで解析した研究結果とも一致した[Fukushima 1991]。もしリグニン形成時、H 核と G 核が互いに結合し得る状況にあるならば、一部の G 核は共存する H 核と重合し他の G 核とビフェニル型構造を形成できなくなる、つまり GG 型ビフェニル型構造の形成頻度は、H 核の増大に伴い低くなることが想定される。しかし、今回、ビフェニル形成頻度の指標である  $2VV/(V+V_{5-C=O}+HV+2VV)$  比のあて樹幹内における差異はごく僅かであり、H 核比または Klason 残渣のメトキシ基含量との間に、明らかな傾向は確認されなかった(図 4-13-a、b)。

HG 型ビフェニル型構造についても同様に、その形成頻度と H/G 比の指標との関係を調べた。HG 型ビフェニル形成頻度を、リグニン中の全 G 核、もしくは全 H 核から HG 型ビフェニル型構造が形成される頻度と定義し、各々について以下の指標を用いた。まず、前者の指標として、全 G 核の芳香核量に対する HG 型ビフェニル型生成物中の G 核量の比  $\{HV/(V+V_{5-C=O}+HV+2VV)\}$  比}を調べた。その結果、H 核比が高くなるほど、同比は高くなった( $R^2=0.99-1.0$ 、図 4-14-a1)。また、メトキシ基含量が低くなる、つまり H 核の割合が高く

なるほど同比は高くなった( $R^2=0.82-0.99$ 、図 4-14-a2)。これは、H/G 比が高くなるほど、ある一定量の G 核から形成される HG 型ビフェニル型構造の頻度が高くなるためと説明できる(図 4-15-a)。

次に、後者の全 H 核から HG 型ビフェニル型構造が形成される頻度の指標として、ニトロベンゼン酸化生成物として得られた全 H 核の芳香核量に対する HG 型ビフェニル型生成物中の H 核量の比である  $HV/(H+H_{5-C=O}+HV)$  比を調べた。その結果、ヒマラヤスギとメルクシマツにおいて、同比は H/G 比の指標が高くなるほど低くなった(図 4-14-b1:  $R^2=0.81-0.85$ 、b2:  $R^2=0.78-0.82$ )。これは、H/G 比が高くなると、ある一定量の H 核から形成される HG 型ビフェニル型構造の頻度が低くなるため、と説明できる(図 4-15-b)。スギでは、明確な傾向はみられなかった(図 4-14-b1、b2)。

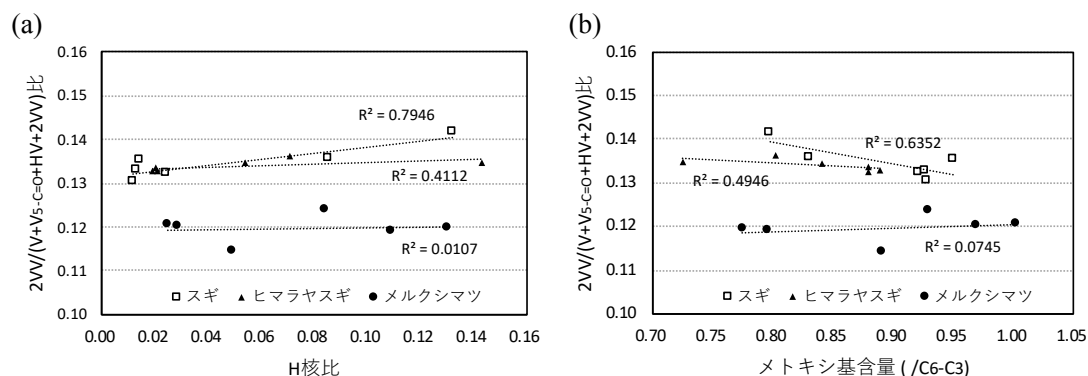


図 4-13 針葉樹あて材における GG 型ビフェニル形成頻度 $\{2VV/(V+V_{5-C=O}+HV+2VV)$ 比 $\}$ と H/G 比の関係。H/G 比の指標として(a)H 核比 $\{(H+H_{5-C=O}+HV)/(H+V+H_{5-C=O}+V_{5-C=O}+2HV+2VV)$ 比 $\}$ 、もしくは(b)Klason 残渣のメトキシ基含量を用いた。

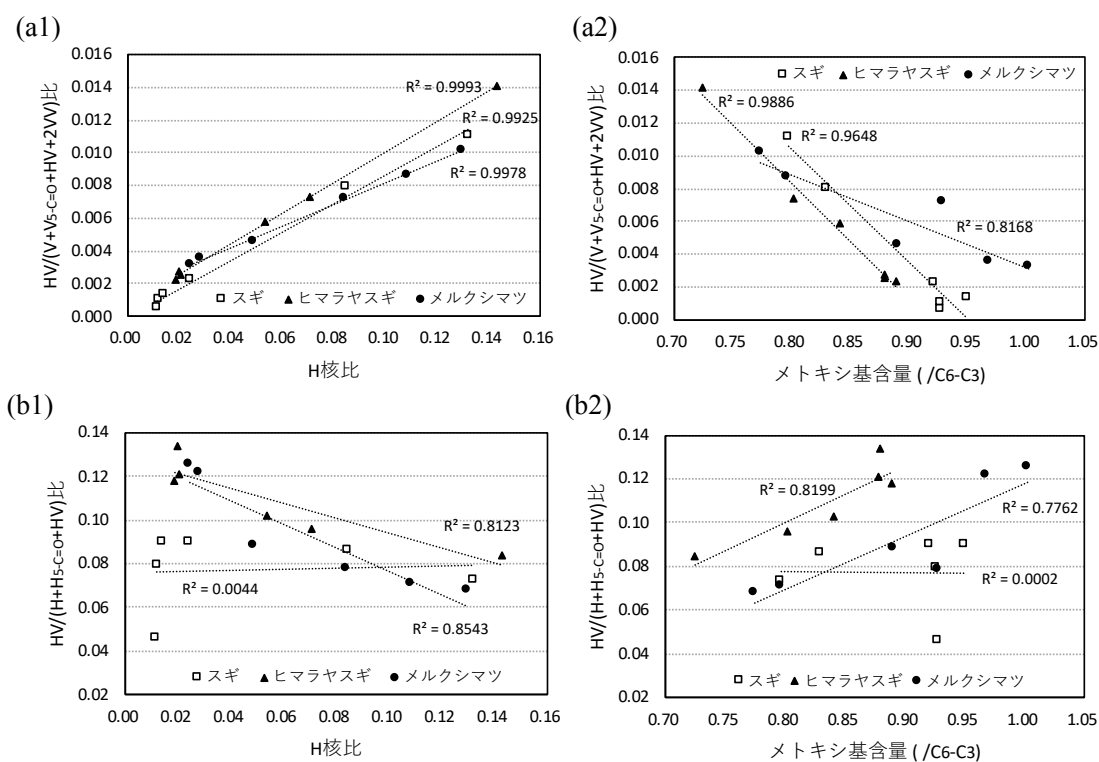


図 4-14 針葉樹あて材における HG 型ビフェニル形成頻度と H/G 比の関係。HG 型ビフェニル形成頻度の指標として(a) $HV/(V+V_{5-C=O}+HV+2VV)$ 比、もしくは(b) $HV/(H+H_{5-C=O}+HV)$ 比を用いた。また、H/G 比の指標として(1)H 核比 $\{(H+H_{5-C=O}+HV)/(H+V+H_{5-C=O}+V_{5-C=O}+2HV+2VV)$ 比 $\}$ 、もしくは(2)Klason 残渣のメトキシ基含量を用いた。

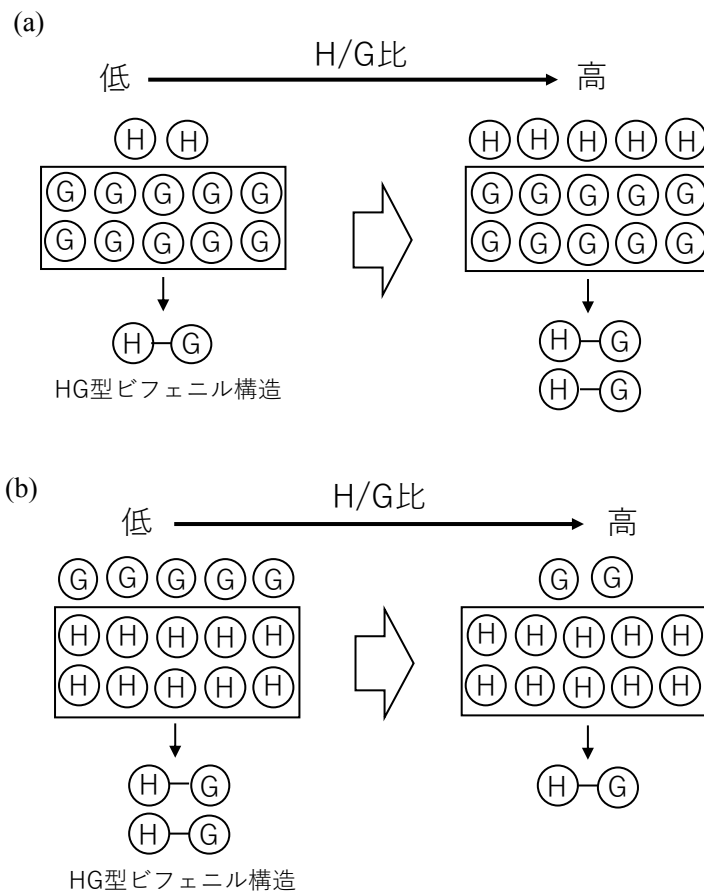


図 4-15 針葉樹あて材において、一定量の G 核または H 核から HG 型ビフェニル型構造が形成されるイメージ図。  
(a)G 核量一定の条件、(b)H 核量一定の条件。



#### 4.3.4.6 H/G 比とリグニンの枝分かれ頻度との関係

H/G 比の指標が高くなるほど、GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率は低く(4.3.4.2 項)、HG 型ビフェニル型生成物(HV)の収率は高くなり(4.3.4.3 項)、互いに反対の傾向を示した。それでは、ビフェニル型芳香核の合計収率(2VV+2HV)、つまりリグニンの分岐点候補の含量と H/G 比はどのような相関を示すのだろうか？ビフェニル型構造は、枝分かれの候補構造として、リグニン高分子の分岐の頻度に影響し得る重要な構造である。本研究では、H/G 比とリグニンの枝分かれ頻度との関係について情報を得る目的で、H/G 比とビフェニル型生成物の芳香核量(2VV+2HV)との関係を調べた。

メトキシ基をもたない H 核は、芳香核の 3 位がメトキシ基で置換された G 核よりも、ビフェニル型構造を形成しやすく、ビフェニル型生成物の芳香核量(2VV+2HV)は H/G 比が高くなるほど高くなると予想される。しかし、HG 型ビフェニル型生成物の増加分が GG 型ビフェニル型生成物の減少分を上回ることにはなかった。その結果、予想とは反対に、ビフェニル型芳香核の合計収率(2VV+2HV)にあて部と対向部で大きな違いはなく、むしろ H 核比が高いあて部で若干低くなった( $R^2=0.68-0.92$ 、図 4-16-a1)。また、H/G 比のもう一つの指標として、メトキシ基含量を用いた場合にも同様に、メトキシ基含量が低い、つまり H 核の割合が高くなるほど、2VV+2HV はやや低くなった( $R^2=0.67-0.96$ 、図 4-16-a2)。ビフェニル以外の残りの分解生成物の収率( $H+V+H_5-C=O+V_5-C=O$ )についても、H/G 比の指標が高くなるほど低くなった(図 4-16-b1:  $R^2=0.85-0.98$ 、b2:  $R^2=0.67-0.92$ )。このことから、2VV+2HV が H/G 比と負の相関を示した原因の一つとして、3 章や 4.3.4.1 項で前述した H 核のニトロベンゼン酸化法に対する反応効率の低さが挙げられる。ビフェニル型構造に関しても、H 核を含む HG 型ビフェニル型構造の反応効率は GG 型よりも低かったためとも考えられる。つまり、HG 型ビフェニル型構造は多く含まれていたにも関わらず、同構造からの HV 収率が低いため、結果として H/G 比が高くなると 2VV+2HV は低くなったという可能性も否定できない。

また HG 型ビフェニル型構造は、GG 型と側鎖構造が異なり、そのためにビフェニル型生成物の収率が低かった可能性も考えられる。その他の理由として、諸星らが提案したように、H 核は 3 量体以上の縮合型構造として存在したために検出されなかった可能性も考えられる[Morohoshi 1971b]。そこで、3 量体の縮合型構造の一つの例として、HHH 型のトリフェニル型生成物(HHH<sub>ald</sub>、図 4-17-a)を調べた。この化合物を得る目的で、ベンジル位がメチルである HHH 型のトリフェニル型リグニンモデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HHH、図 4-17-b)を 190°C、反応 17 時間の反応条件下でニトロベンゼン酸化法に供し、その分解生成物(TMS 化物)を GC-FID と GC-MS で分析した。HHH<sub>ald</sub> の分子イオンピーク( $m/z$  578 (M))を調べたところ、これに相当するピークが、保持時間 231 分付近に得られた(図 4-18-a, c)。一方、スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物からは、HHH<sub>ald</sub> の分子量に相当するピークは検出限界以下で

あった(図 4-18-b)。このことから、H 核が 3 量体以上の縮合型構造を形成している可能性は低いと推測される。

ビフェニル型芳香核の合計収率(2VV+2HV)に、HH 型ビフェニル型生成物の収率を加味していないことも原因の一つとして考えられる。しかし、3.3.3.1 項で前述したように HH 型ビフェニル型生成物(HH<sub>ald</sub>、図 3-2-b)と思われるピークは、GC-MS のクロマト上で検出限界に近かった。標品がないため推定の域を出ないが、HH 型ビフェニル型生成物の収率は無視できる程度に近いと思われる。

このように、ビフェニル型芳香核の合計収率(2VV+2HV)が、H/G 比の指標が高くなるほど若干低くなったのは(図 4-16-a1、a2)、H 核型のリグニン構造の反応効率は、G 核型のそれに比べて低いためとも考えられる。そこで、この反応性の違いをできるだけ打ち消す目的で、リグニン量あたりの収率を比較する代わりに、全生成物(H+V+H<sub>5-C=O</sub>+V<sub>5-C=O</sub>+2VV+2HV)に対するビフェニル型芳香核(2VV+2HV)の相対収率を比較してみた。その結果、ビフェニル型芳香核の相対収率は、H 核比および Klason 残渣のメトキシ基含量に対し、ほとんど変化がみられなかった(図 4-16-c1:  $R^2=0.0049-0.83$ 、c2:  $R^2=0.19-0.72$ )。メトキシ基をもたない H 核は、芳香核の 3 位がメトキシ基で置換された G 核よりもビフェニル型構造を形成しやすく、ビフェニル型構造の含有量は H/G 比の増大に伴い高くなると予想していた。しかし、本研究の結果、H/G 比はビフェニル含有量に大きく影響しないことが示唆された。Erickson ら[Erickson 1973b]がモンタナマツあて材をアルカリ加水分解後メチル化過マンガン酸カリウム酸化法に供して得た分析データを用いて、本研究と同様に、ジアリールエーテル型生成物を除く全生成物に対する GG、HG および HH 型のビフェニル型芳香核の相対収率を調べた。その結果、H 核含量は、あて部の方が対向部よりも高かったが、ビフェニル型生成物の相対収率は両者の間でほとんど変わらなかった(あて部: 14%、対向部: 15%)。

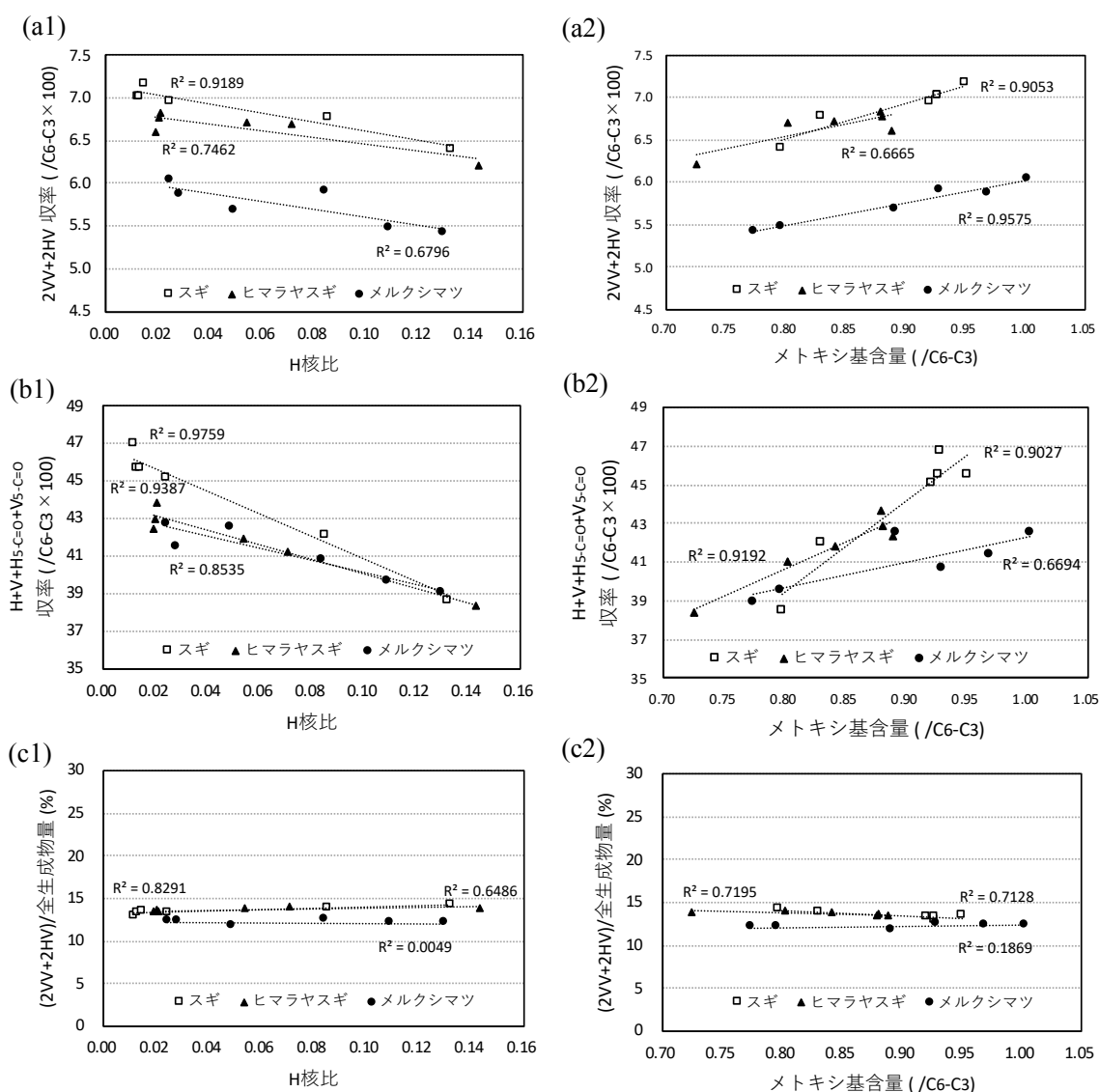


図 4-16 針葉樹あて材のニトロベンゼン酸化生成物の収率と H/G 比の関係。(a)GG 型および HG 型ビフェニル型芳香核の合計収率(2VV+2HV)、(b)非縮合型および  $\beta$ -5 型生成物の合計収率(H+V+H<sub>5</sub>-C=O+V<sub>5</sub>-C=O)、(c)全生成物に対するビフェニル型生成物の相対収率。H/G 比の指標として(1)H 核比 {(H+H<sub>5</sub>-C=O+HV)/(H+V+H<sub>5</sub>-C=O+V<sub>5</sub>-C=O+2VV+2HV)比}、および(2) Klason 残渣のメトキシ基含量を使用。ビフェニル型生成物量: 2VV+2HV、全生成物量: H+V+H<sub>5</sub>-C=O+V<sub>5</sub>-C=O+2VV+2HV。

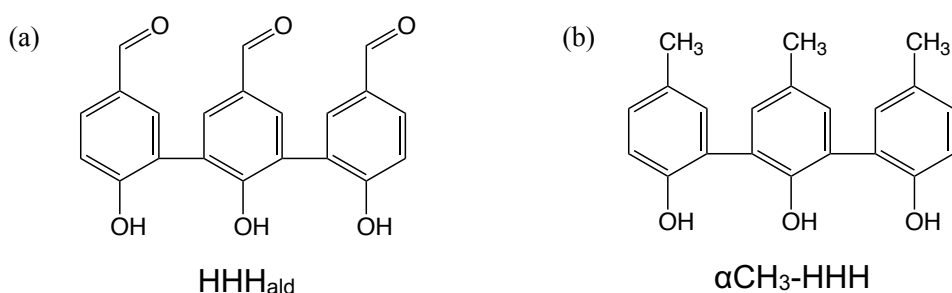


図 4-17 (a)ニトロベンゼン酸化法による HHH 型のトリフェニル型生成物(HHH<sub>ald</sub>)、および(b)HHH 型のトリフェニル型リグニンモデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HHH)。

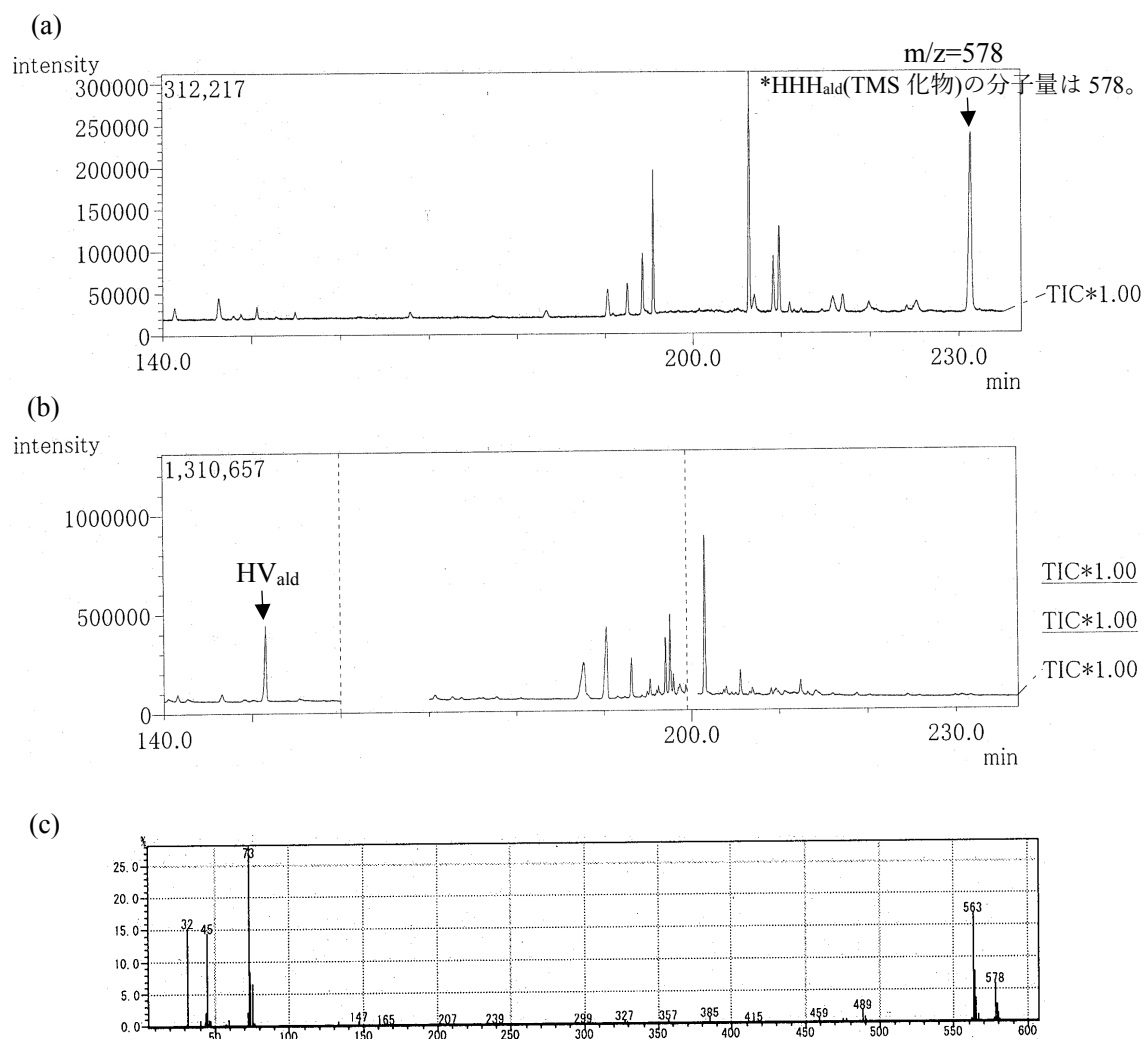


図 4-18 (a)HHH 型トリフェニル型リグニンモデル化合物( $\alpha$ CH<sub>3</sub>-HHH)、および(b)スギあて部のニトロベンゼン酸化生成物の GC-MS クロマトグラム (140-237 分拡大)。(c)上記(a)の HHH 型生成物(HHH<sub>ald</sub>)の候補ピーク 231 分のマスペクトル。

#### 4.4 本章の結論

本章では、3 樹種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)のあて材をニトロベンゼン酸化法で分析し、H/G 比と GG および HG 型ビフェニル型生成物の収率との関係性を調べた。その結果を、以下にまとめる。なお、H/G 比の指標として、ニトロベンゼン酸化生成物の収率から求めた H 核比  $\{(H+H_{5-C=O}+HV)/(H+V+H_{5-C=O}+V_{5-C=O}+2HV+2VV)\}$  比と Klason 残渣のメトキシ基含量を用いた。

1. H 核を有する非縮合型(H)、 $\beta$ -5 型( $H_{5-C=O}$ )および HG 型ビフェニル型生成物(HV)の収率は、対向部からあて部に向かって高くなった。一方、G 核型の非縮合型(V)、 $\beta$ -5 型( $V_{5-C=O}$ )および GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率は、あて部に向かって低くなった。
2. 非縮合型生成物の収率(H+V)は、対向部からあて部に向かって低くなった。非縮合型生成物(H+V)の収率が低くなれば、 $\beta$ -5 やビフェニル等の縮合型構造の割合は反対に高くなると予想される。しかし、 $\beta$ -5 型( $H_{5-C=O}+V_{5-C=O}$ )およびビフェニル型生成物の芳香核量( $2VV+2HV$ )も、あて部に向かって若干低くなった。この原因の一つとして、あて部にはニトロベンゼン酸化法に対する反応効率の低い H 核が、対向部よりも多く含まれることが挙げられる。
3. あて樹幹内において、H/G 比が高くなるほど GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率は低く、HG 型ビフェニル型生成物(HV)の収率は高くなり、互いに反対の傾向を示した。
4. GG および HG 型ビフェニル型芳香核の合計収率( $2VV+2HV$ )は、あて樹幹内で大きな違いはないものの、あて部に向かって H/G 比が高くなるほどやや低くなった。この原因の一つとして、ニトロベンゼン酸化法に対する H 核の反応効率の低さが挙げられる。次に、リグニン量あたりの収率を比較する代わりに、全生成物( $H+V+H_{5-C=O}+V_{5-C=O}+2VV+2HV$ )に対するビフェニル型芳香核( $2VV+2HV$ )の相対収率を比較したところ、H/G 比に対しほとんど変化がみられなかった。本研究の結果、H/G 比はビフェニル型構造、つまりリグニンの分岐候補の含有量に大きく影響しないことが示唆された。

#### 4.5 本章の引用文献

Akiyama T, Dixon RA, Kim H and Ralph J, Novel dibenzodioxocin structures involving *p*-hydroxyphenyl units on their biphenyl units, 第 53 回リグニン討論会要旨集, 静岡, 66 (2009)

Billa E, Tollies MT and Monties B, Characterization of the monomeric composition of *in situ* wheat straw lignins by alkaline nitrobenzene oxidation: Effect of temperature and reaction time, Journal of the Science of Food and Agriculture, 72, 250 (1996)

Bland DE, The chemistry of reaction wood part I. The lignins of *Eucalyptus gonicalyx* and *Pinus radiata*, Holzforschung, 12, 36 (1958)

Bland DE, The properties of syringyl, guaiacyl and *p*-hydroxyphenyl artificial lignins, Biochemical Journal, 95, 515 (1965)

Dence CW, The determination of lignin, In: Methods in lignin chemistry, Eds. Lin SY and Dence CW, Springer-Verlag, Berlin, 33-58 (1992)

Erickson M, Larsson S and Miksche GE, Gaschromatographische analyse von ligninoxidationsprodukten. VIII. Zur des lignins der fichte, Acta Chemica Scandinavica, 27, 903 (1973a)

Erickson M, Larsson S and Miksche GE, Zur der lignins des druckholzes von *Pinus mugo*, Acta Chemica Scandinavica, 27, 1673 (1973b)

Fukushima K and Terashima N, Heterogeneity in formation of lignin XV. Formation and structure of lignin in compression wood of *Pinus thunbergii* studied by microautoradiography, Wood Science and Technology, 25, 371 (1991)

Goto H, Koda K, Matsumoto Y and Meshitsuka G, Precise determination of methoxyl content as an important indication of the extent of lignin oxidation remaining in bleached pulp, Proceedings of the 11<sup>th</sup> ISWPC Main Symposium, 3, 417 (2001)

Iiyama K and Lam TBT, Lignin in wheat internodes. Part 1: The reactivities of lignin units during alkaline nitrobenzene oxidation, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 481 (1990)

Jacquet G, Brigitte P, Lapiere C, Francesch C, Roland C and Faix O, Thioacidolysis of enzymatic dehydrogenation polymers from *p*-hydroxyphenyl, guaiacyl, and syringyl precursors, *Holzforschung*, 51, 349 (1997)

Lapiere C and Monties B, Thioacidolyses of diazomethane methylated pine compression wood and wheat straw *in situ* lignins, *Holzforschung*, 42, 409 (1988)

Li Y, Akiyama T, Yokoyama T and Matsumoto Y, NMR assignment for diaryl ether structures (4-O-5 structures) in pine wood lignin, *Biomacromolecules*, 17, 1921(2016)

Meshitsuka G and Nakano J, Structural characteristics of compound middle lamella lignin, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 5, 391 (1985)

Min D, Xiang Z, Liu J, Jameel H, Chiang V, Jin Y and Chang HM, Improved protocol for alkaline nitrobenzene oxidation of woody and non-woody biomass, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 35, 52 (2015)

Morohoshi N and Sakakibara A, The chemical composition of reaction wood. I., *Mokuzai Gakkaishi*, 17, 393 (1971a)

Morohoshi N and Sakakibara A, The chemical composition of reaction Wood. II., *Mokuzai Gakkaishi*, 17, 400 (1971b)

Nakano J and Meshitsuka G, The detection of lignin, In: *Methods in lignin chemistry*, Eds. Lin SY and Dence CW, Springer-Verlag, Berlin, 23-32 (1992)

Nanayakkara B, Harris MM and Sackling ID, Understanding the degree of condensation of phenolic and etherified C-9 units of *in situ* lignins, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59, 12514 (2011)

Nawawi SD, Akiyama T, Syafii W and Matsumoto Y, Characteristic of  $\beta$ -O-4 structures in different reaction wood lignins of *Eusideroxylon zwageri* T. et B. and four other woody species, *Holzforschung*, 71, 11 (2017)

Ralph J, Akiyama T, Kim H, Lu F, Schatz PF, Marita JM, Ralph SA, Reddy MSS, Chen F and Dixon RA, Effects of coumarate 3-hydroxylase down-regulation on lignin structure, *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 8843 (2006)

Roland C, Monties B and Lapierre C, Thioacidolysis. In: *Methods in lignin chemistry*, Eds. Lin SY and Dence CW, Springer-Verlag, Berlin, 334-348 (1992)

Saito K and Fukushima K, Distribution of lignin interunit bonds in the differentiating xylem of compression and normal woods of *Pinus thunbergii*, *Journal of Wood Science*, 51, 246 (2005)

Terashima N and Fukushima K, Heterogeneity in formation of lignin XI. An autoradiographic study of the heterogeneous formation and structure of pine lignin, *Wood Science and Technology*, 22, 259 (1988)

Whiting P and Goring DAI, Chemical characterization of tissue fractions from the middle lamella and secondary wall of black spruce tracheids, *Wood Science and Technology*, 16, 261 (1982)

Yamasaki T and Higuchi T, *p*-Hydroxyphenyl component of grass lignin, *Mokuzai Gakkaishi*, 17, 117(1971)

Yamasaki T and Higuchi T, Chemical properties of enzymic dehydrogenation polymer from *p*-coumaryl alcohol, *Mokuzai Gakkaishi*, 18, 361 (1972)

Yasuda S and Sakakibara A, The chemical composition of lignin from reaction wood, *Mokuzai Gakkaishi*, 21, 363 (1975)

Yasuda S and Sakakibara A, Hydrogenolysis of protolignin in compression wood. III. Isolation of four dimeric compounds with carbon to carbon linkage, *Mokuzai Gakkaishi*, 23, 114 (1977)



- Yoshihara K, Kobayashi T, Fujii T and Akamatsu I, A novel modification of Klason lignin quantitative method, Japan Tappi, 38, 466 (1984)
- Yue F, Lu F, Sun RC and Ralph J, Syntheses of lignin-derived thioacidolysis monomers and their uses as quantitation standards, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60, 922 (2012)
- Yue F, Lu F, Regner M, Sun R and Ralph J, Lignin-derived thioacidolysis dimers: reevaluation, new products, authentication, and quantification, ChemSusChem, 10, 830 (2017)
- 石栗太、横田信三、あて材の化学成分量、吉澤信夫監修、あて材の科学、海青社、125-126 (2016)
- 林徳子、一般的な圧縮あて材、吉澤信夫監修、あて材の科学、海青社、50-53 (2016)
- 馬場啓一、あて材の構造と形成、福島和彦ら編、木質の形成、海青社、105-108 (2011)
- 福島和彦、リグニンの生合成、日本木材学会編、木質の化学、文永堂出版株式会社、22-33 (2010)
- 松下泰幸、クラークソン法/酸可溶性リグニン、石井忠ら編、植物細胞壁実験法、弘前大学出版会、117-118 (2016)
- 飯塚堯介、フェノール類および芳香族アミン類による呈色反応、石井忠ら編、植物細胞壁実験法、弘前大学出版会、105-106 (2016)



## 第 5 章

### 総括

リグニンは、非直鎖型の高分子と考えられており、これは分岐の候補構造の一つであるビフェニル型構造が、リグニンに含まれていることに基づいている。ビフェニル型構造の含有量が、リグニン試料の違いによりどの程度変動し、それらがリグニンの芳香核型とどの程度強い関連を有するのか、この2つを把握することは、リグニンの高分子構造を理解するために必要な基本的な事項と考えられる。本研究では、ビフェニル型構造の含有量を試料間で比較するとともに、ビフェニル型構造の生成頻度に影響し得る要因の一つとして、芳香核型との関係を明らかにすることを目的とした。様々な試料をニトロベンゼン酸化法で分析し、ビフェニル型分解生成物の収率と芳香核構造の構成比との関係を調べた。

ビフェニル型構造を構成可能な芳香核型は、*p*-ヒドロキシフェニル核(H 核)とグアイアシル核(G 核)の2種類であり、これらから GG 型、HG 型および HH 型の3種のビフェニル型構造が生成する(図 1-6)。リグニンに含まれる H 核は通常数%と僅かであることから、まず第2章では最も主要と考えられる GG 型について調べた。HG および HH 型ビフェニル型構造に関しては、第4章で議論を行った。針葉樹6種、広葉樹15種から成る21樹種[Akiyama 2005]をニトロベンゼン酸化法で分析し、ビフェニル型生成物の収率とシリリングル/グアイアシル核比(S/G 比)との関係を調べた。分解生成物として、G 核型の非縮合型生成物(V)、S 核型の生成物(S)および GG 型ビフェニル型生成物(VV)を定量した。収率は、リグニン単位の分子量を200と概算し、klason リグニン量あたりのモル収率として算出した。ビフェニル型生成物は1分子に2つの芳香核を有するため、芳香核量を議論する際にはモル収率に2を乗じた数値を用いた。

広葉樹木粉から得られた VV の芳香核の収率は、リグニンの芳香核100単位あたり0.24-4.6単位に相当し(以下、%)、樹種の違いにより約20倍もの差異があった。一方、針葉樹では6.2-7.3%と樹種間の差異は広葉樹と比較して小さかった。これは、広葉樹にはG核に加え、ビフェニル型構造を形成しないS核が含まれるためと考え、次にVV収率とS/G比との関係について調べた。S/G比の指標として、ニトロベンゼン酸化生成物の全ての芳香核量に対するS核型生成物の芳香核量の比を示す  $S/(V+S+2VV)$  比を用いた(以下、S核比と略す)ところ、VV収率はS核比の高い樹種ほど低くなる傾向が高い相関と共に示された( $R^2=0.95$ )。この第一の理由として、G核の減少に伴って、G核同士が5-5結合する機会が減ったことが挙げられる。一方で、両者の相関は、直線に近似するよりもやや下に凸に分布し、ビフェニル型構造はS核の割合が高い樹種ほど形成しにくいようにみえた。このことを確かめる目的で、次に、G核からGG型ビフェニル型構造の形成する頻度の指標として  $2VV/(V+2VV)$  比を調べた。その結果、同比はS核比の高い樹種ほど低くなり、ビフェニル型構造の形成はS核の高い樹種ほど確かに抑制されていることが明らかとなった。これは、リグニン形成時にG核が、反応場に共存するS核と結合することで、ビフェニル型構造を

形成できなくなったためと説明できる。これらの結果からは、S 核の割合が高いリグニンほど分岐の頻度は低くなることが推測される。しかし、ビフェニル型構造はリグニン中で確かに分岐点として存在しているのか、さらに分岐点となったビフェニル型構造についても、その含有量と S/G 比との間には負の相関が成り立つのかどうかを明らかにすることは、今後の重要な課題として残されている。また、1.2 項で前述したように、ビフェニル型構造は X 字型と Y 字型の 2 種類の分岐点となり得ることから、両者の存在比を調べれば、リグニンの高分子形状についてさらに詳しい知見を得ることができると思われる。

第 3 章では、H 核を有するビフェニル型構造(HH と HG 型)、および縮合型構造の中でもビフェニル型構造と並んで重要なフェニルクマラン型( $\beta$ -5 型)構造の分析法として、ニトロベンゼン酸化法の適用を検討した。まず、H 核型  $\beta$ -5 モデル化合物のデヒドロジ *p*-クマリルアルコールをニトロベンゼン酸化法に、170°C、反応 2~48 時間の条件下で供した。その結果、縮合型と非縮合型生成物の収率は、ともに反応 16 時間で最大となった。これに対し、G 核型  $\beta$ -5 モデル化合物の場合、縮合型と非縮合型生成物の収率は、反応 2 時間で最大となることが報告されている[奥野 2016]。H 核型フェニルクマラン型モデル化合物のニトロベンゼン酸化には、G 核型よりも長い反応時間を要することが明らかとなった。

次に、H 核含量の高いことで知られる針葉樹圧縮あて材を用いて、H 核を有するニトロベンゼン酸化生成物の収率に対する反応温度の影響を調べた。スギのあて部から調製した脱脂木粉を、ニトロベンゼン酸化法に 170°C、190°C、210°C、反応 2 時間の条件下で供した。分解生成物として、H 核および G 核型の非縮合型生成物(H と V)、GG および HG 型ビフェニル型生成物(VV と HV)、 $\beta$ -5 型構造に由来する H 核および G 核型の生成物( $H_5-C=O$  と  $V_5-C=O$ )を定量した。このうち、HG 型ビフェニル型生成物(HV)は、リグニンのニトロベンゼン酸化生成物として初めて同定された。HH 型ビフェニル型生成物と思われるピークは GC-MS のクロマト上で検出されたが、その強度は検出限界に近かった。全生成物において、収率は 210°C のとき 170°C や 190°C よりも低い値を示した。H 核を有する縮合型(HV と  $H_5-C=O$ )および非縮合型生成物(H)の収率は、190°C の条件で若干高い値を示したもののほとんど変わらなかった。このことから、第 4 章で H 核リグニンの化学構造をニトロベンゼン酸化法で分析する際にも、一般的な反応条件である 170°C、2 時間を用いた。

第 4 章では、3 章で確立した手法を針葉樹あて材に適用し、GG、HG、HH 型の全てのビフェニル型構造を対象に、*p*-ヒドロキシフェニル/グアイアシル核比(H/G 比)とビフェニル型生成物量の関係を調べた。あて材 3 樹種(スギ、ヒマラヤスギおよびメルクシマツ)の円盤試料を、髄を中心に 6 つに分割し、各区画より調製した脱脂木粉を試料として用いた。Klason 残渣のメトキシ基含量をもとに、3 樹種のあて部には 20-27%の H 核が含まれることを確認した。ニトロベンゼン酸化生成物として、H、V、VV、HV、 $H_5-C=O$  および  $V_5-C=O$  を定量し

た。

あて樹幹内における分解生成物の収率の分布として、H 核を有する分解生成物(H、H<sub>5</sub>C=O および HV)の収率は、対向部からあて部に向かって高くなった一方、G 核型生成物(V、V<sub>5</sub>C=O、VV)の収率は低くなった。非縮合型生成物の収率(H+V)は、あて部に向かって低くなった。非縮合型生成物の収率が低くなれば、β-5 やビフェニル等の縮合型構造の割合は高くなると予想される。しかし、β-5 型(H<sub>5</sub>C=O+V<sub>5</sub>C=O)およびビフェニル型生成物の芳香核の収率(2VV+2HV)もあて部に向かって若干低くなり、結果として全生成物の合計収率も低くなった。この原因の一つとして、前述した H 核の反応効率の低さが挙げられる。

次に、あて樹幹内における、H/G 比とビフェニル型生成物量との関係を調べた。H/G 比の指標として、ニトロベンゼン酸化生成物の全ての芳香核量に対する H 核型生成物の芳香核量の比である H 核比  $\{(H+H_5C=O+HV)/(H+V+H_5C=O+V_5C=O+2HV+2VV)\}$  比}を用いた。その結果、H 核比が高くなるほど、GG 型ビフェニル型生成物(VV)の収率は低く、HG 型ビフェニル型生成物(HV)の収率は高くなり、互いに反対の傾向を示した。その結果、これらのビフェニル型芳香核の合計収率(2VV+2HV)はあて部と対向部で大きな違いはないものの、H 核比が高くなるほどやや低くなる傾向がみられた。2VV+2HV が H 核比と負の相関を示したのは、H 核の反応効率が低いためとも考えられる。次に、リグニン量あたりの収率を比較する代わりに、全生成物(H+V+H<sub>5</sub>C=O+V<sub>5</sub>C=O+2VV+2HV)に対するビフェニル型芳香核(2VV+2HV)の相対収率を比較したところ、H 核比に対しほとんど変化がみられなかった。メトキシ基をもたない H 核は、芳香核の 3 位がメトキシ基で置換された G 核よりもビフェニル型構造を形成しやすく、ビフェニル型構造、つまりリグニンの分岐候補の量は H/G 比の増大に伴い高くなると予想していた。しかし、本研究の結果、H/G 比はビフェニル型構造の含有量に大きく影響しないことが示唆された。

## 謝辞

本研究を行うにあたって、多大なるご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻木材化学研究室の松本雄二教授に深く感謝するとともに、厚く御礼申し上げます。研究に関する数々の貴重な助言を下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻木材化学研究室の横山朝哉准教授に心より御礼申し上げます。実際に研究を進めるにあたり、終始温かいご指導を賜りました東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻木材化学研究室の秋山拓也助教に深く御礼申し上げます。初めて研究に取り組み、右も左も分からない学部生の私にも懇切丁寧にご指導下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻国際植物材料科学研究室の斎藤幸恵教授に心より御礼申し上げます。

また、貴重な木材試料を供与して下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習千葉父演習林の千嶋武技術職員、Associate professor Deded Sarip Nawawi, Department of Forest Products, Faculty of Forestry, Bogor Agricultural University(IPB)、東京大学大学院農学生命科学研究科生物材料科学専攻高分子材料科学研究室の木村聡特任准教授に深謝いたします。木村先生には、切片の作成や光学顕微鏡の操作方法についても一から懇切丁寧にご指導頂きました。NMR の使用にあたり、いつも適切な助言を下さいました東京大学大学院農学生命科学研究科核磁気共鳴施設の降旗一夫助教に厚く御礼申し上げます。

木材化学研究室と国際植物材料科学研究室の皆さんには、日々の研究生活において様々な面で大変お世話になりました。特に子どもが生まれてからは、ご迷惑をお掛けすることとも多々あったことと思います。研究と子育てを両立されてきた木材化学研究室の勝亦京子博士には、進路や私生活のことでたくさん相談にのって頂きました。これまでを振り返り「研究も子育ても楽しかったな」と思えるのは、皆さんが温かく見守って下さったからだ、と、心より感謝いたします。

最後に、長期に渡る研究生活をいつも傍で励まし支えて下さった夫の平山知宏、時に我慢して保育園に通ってくれた息子の竹寅、研究を続けることを理解し支援して下さいました両親と義両親に深い感謝を捧げます。

2019 年 3 月 平山晴加