

博士論文

酸素漂白条件下における 炭水化物と活性酸素種との反応に関する研究

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

中川明彦

目次

第 1 章 序論	1
1.1 緒言	3
1.1.1 クラフト蒸解におけるリグニン・多糖類の反応	3
1.1.2 酸素漂白におけるリグニン・多糖類の反応	8
1.1.3 酸素漂白条件下で生成する活性酸素種の変化	16
1.2 酸素漂白過程での多糖類の反応に関する既往の知見	18
1.2.1 糖モデル化合物とリグニンモデル化合物との反応性の比較	18
1.2.2 糖モデル化合物の反応機構における知見	21
1.3 本研究の目的	24
1.3.1 目的	24
1.3.2 実験系の特色	25
1.3.2.1 酸素－アルカリ処理	25
1.3.2.2 過酸化水素－アルカリ処理	26
1.4 参考文献	27
第 2 章 糖モデル化合物と活性酸素種との反応における糖モデル化合物の立体配置の影響	29
2.1 緒言	31
2.2 実験	34
2.2.1 モデル化合物	34
2.2.1.1 モデル化合物の調製	34
2.2.1.2 MAP の合成	39
2.2.2 反応、後処理、および、分析	42
2.2.2.1 酸素－アルカリ処理	42
2.2.2.2 過酸化水素－アルカリ処理	44
2.3 結果と考察	46
2.3.1 フェノール性化合物非共存下における糖モデル化合物の酸素－アルカリ処理	46
2.3.2 フェノール性化合物共存下における糖モデル化合物 1 種類の酸素－アルカリ処理	48

2.3.3	フェノール性化合物共存下における糖モデル化合物 2 種類の酸素-アルカリ処理	52
2.3.4	異なるフェノール性化合物を AOS 生成源とした酸素-アルカリ処理	64
2.4	まとめ	79
2.5	参考文献	81
第 3 章	活性酸素種との反応における糖モデル化合物の被攻撃部位の検討	83
3.1	緒言	85
3.2	実験	89
3.2.1	重水素化 MGP の合成	89
3.2.2	酸素-アルカリ処理	102
3.2.3	過酸化水素-アルカリ処理	103
3.3	結果	104
3.3.1	TMPH を AOS 生成源とした反応	104
3.3.2	VA を AOS 生成源とした反応	120
3.3.3	AOS を $O\cdot$ に限定した反応	138
3.4	考察	143
3.4.1	重水素化 MGP が MGP よりも速く分解される現象について	143
3.4.2	MGP-allD の分解について	144
3.4.3	観測された速度論的同位体効果の大小から行い得る考察	145
3.4.3.1	速度論的同位体効果の出現について	145
3.4.3.2	各炭素における水素引き抜き反応の頻度について	148
3.4.3.3	AOS による水素引き抜き反応における遷移状態の位置推定と MGP の各炭素-水素結合の抵抗性について	148
3.5	まとめ	151
3.6	参考文献	152
第 4 章	水素引き抜き反応に関与する活性酸素種の推定	153
4.1	緒言	155

4.2 実験	157
4.2.1 モデル化合物の調製	157
4.2.2 酸素-アルカリ処理と残存モデル化合物の定量	157
4.3 結果と考察	158
4.4 参考文献	161
第5章 総括	163
謝辞	169
投稿論文	170

第 1 章

序論

1.1 緒言

木材は種々の物質の集合体であり、それらのあるものは細胞壁の構成成分として、そして、あるものは細胞内腔の含有成分として存在する。主成分は、多糖類のセルロースとヘミセルロース、そして、フェニルプロパン構造からなるリグニンであり、これら 3 つで全体の約 95%を占める。

紙・パルプは、木材から生産される最も重要な製品の 1 つであり、現在製造されている化学パルプの中で、最も代表的なものはクラフトパルプである。製紙用パルプを製造するにあたり、多糖類を出来る限り保持した状態で、リグニンを分解・除去する必要がある。現在の化学パルプ製造法では、まず蒸解過程において大半のリグニンを除去し、続いて漂白過程においてパルプの劣化を抑制しながら、残存リグニンを除去する方法が用いられている (大江ら 1991)。

1.1.1 クラフト蒸解におけるリグニン・多糖類の反応

蒸解工程では、木材チップを 170°C のアルカリ混合液 (NaOH と Na₂S が約 7:3 程度で含まれる) で処理する。木材中のリグニンは、フェニルプロパン構造を基本的なユニットとしており、これらがエーテル結合や炭素—炭素結合で高分子を形成している。蒸解工程では、エーテル結合の 1 つである β -O-4 結合を開裂し、リグニンを低分子化することによって脱リグニンが達成される (Fig. 1-1) (Gierer 1980; Gierer 1985; 細谷 1992)。この工程で、木材チップ中のリグニンの約 92-93%が除去される。蒸解後のパルプ中の残存リグニンが有する構造として、Fig. 1-2 のような構造が挙げられる (Gierer 1970; Ljunggren 1986; 細谷 1992)。

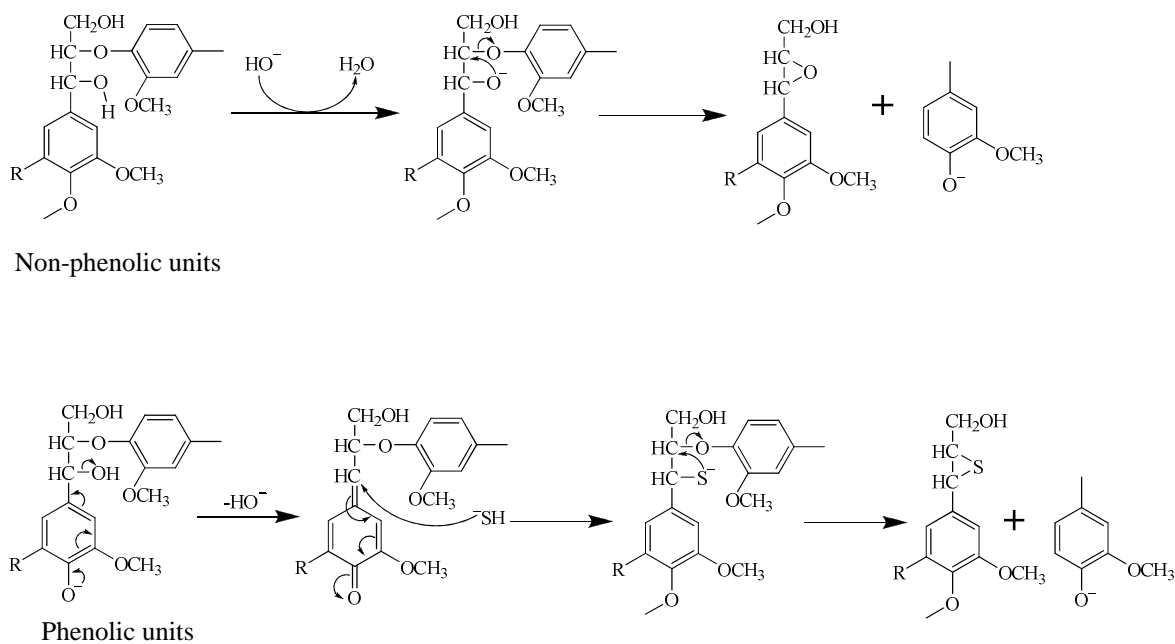


Fig. 1-1 Cleavage route of β -O-4 linkage in lignin during kraft cooking

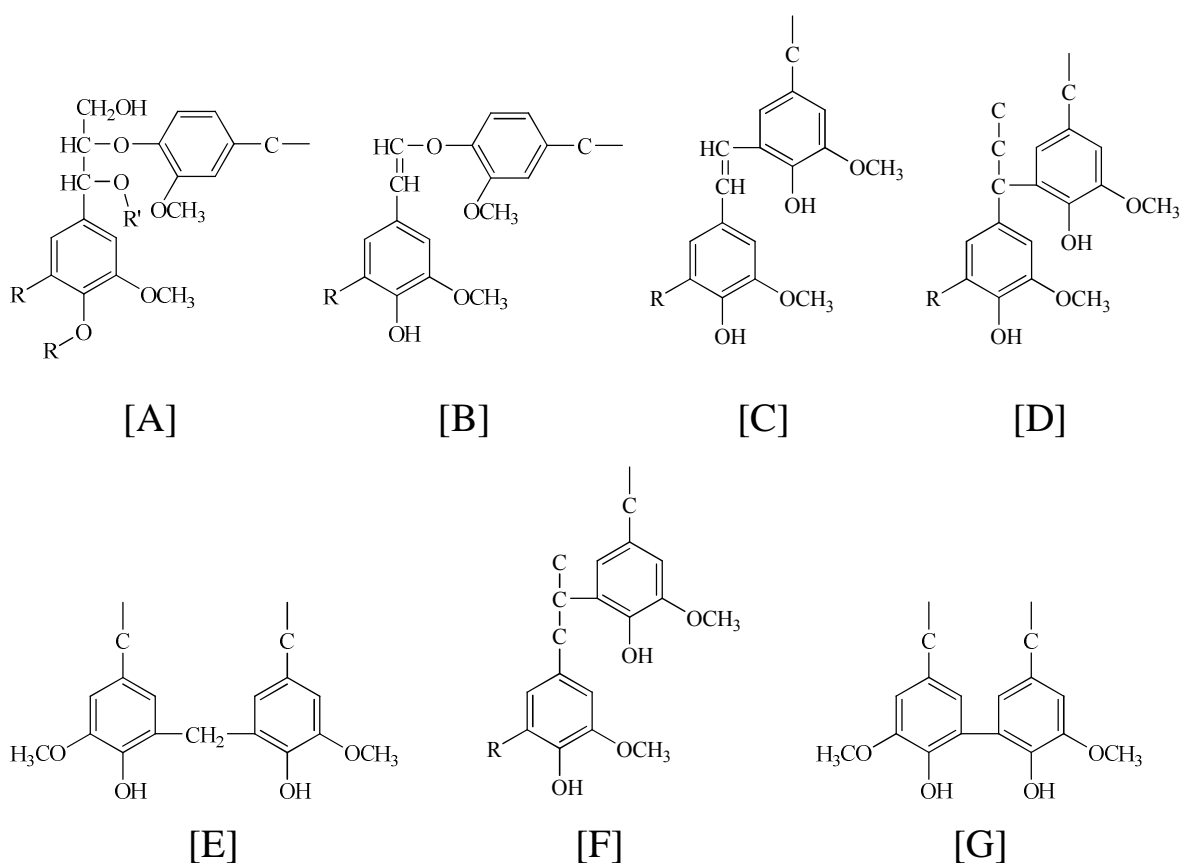


Fig. 1-2 Structural feature of residual lignin in kraft pulp (R: lignin R': carbohydrate or lignin)

一方、多糖類であるセルロースとヘミセルロースの単糖同士を結合しているグリコシド結合自身は、アセタール結合であり、アルカリ性では比較的安定である。しかし、木材中のセルロースとヘミセルロースの一部はリグニンと共に蒸解過程で分解・除去されてしまう。これは、蒸解過程で以下の 3 つの機構が起きていることに由来する。

①セルロース、ヘミセルロース分子の還元性末端から起こるピーリング反応 (Fig. 1-3) (Meller 1960; 石津 1973)

②蒸解後期の高温で起こるアルカリ加水分解反応 (Fig. 1-4) (石津 1973)

③グルコマンナンやキシランなどのアルカリ可溶性多糖類の溶出

Fig. 1-3 に挙げたピーリング反応は、セルロースを例にしたものであり、還元性末端にとって最も重要な反応である。セルロースの場合、グルコース型還元性末端 (1) はケト-エノール互変異性によってエノール型 (2) となり、続いてフルクトース型末端 (3) となる。(3) はアルカリ性下での β -アルコキシ脱離によって除去され (4)、不飽和フルクトース型化合物 (エノール型) (5) として放出される。したがって、アルカリ性下でセルロースの重量低下が起こる。(5) は 2,3-ジカルボニル型 (6) に異性化し、(6) はベンジル酸転移を経てグルコイソサッカリン酸 (7) に変換される。他のルートとして、(1) は β -アルコキシ脱離によって直接水分子を放出し、不飽和アルデヒド型末端 (エノール型) (8) を生成する。(8) は 3-デオキシグルコソン型末端 (9) に異性化された後、 β -アルコキシ脱離によってセルロースから (10) として放出される。また、(9) はベンジル酸転移を経てメタサッカリン酸型末端 (11) を生成し、ピーリング反応、すなわち、セルロースの解重合を防ぐ。(1) \rightarrow (8) \rightarrow (9) \rightarrow (11) までの反応ルートは、停止反応と言われる。グルコマンナンやキシランを含む他の多糖類においても、Fig. 1-3 のようなピーリング反応は起こりうる。

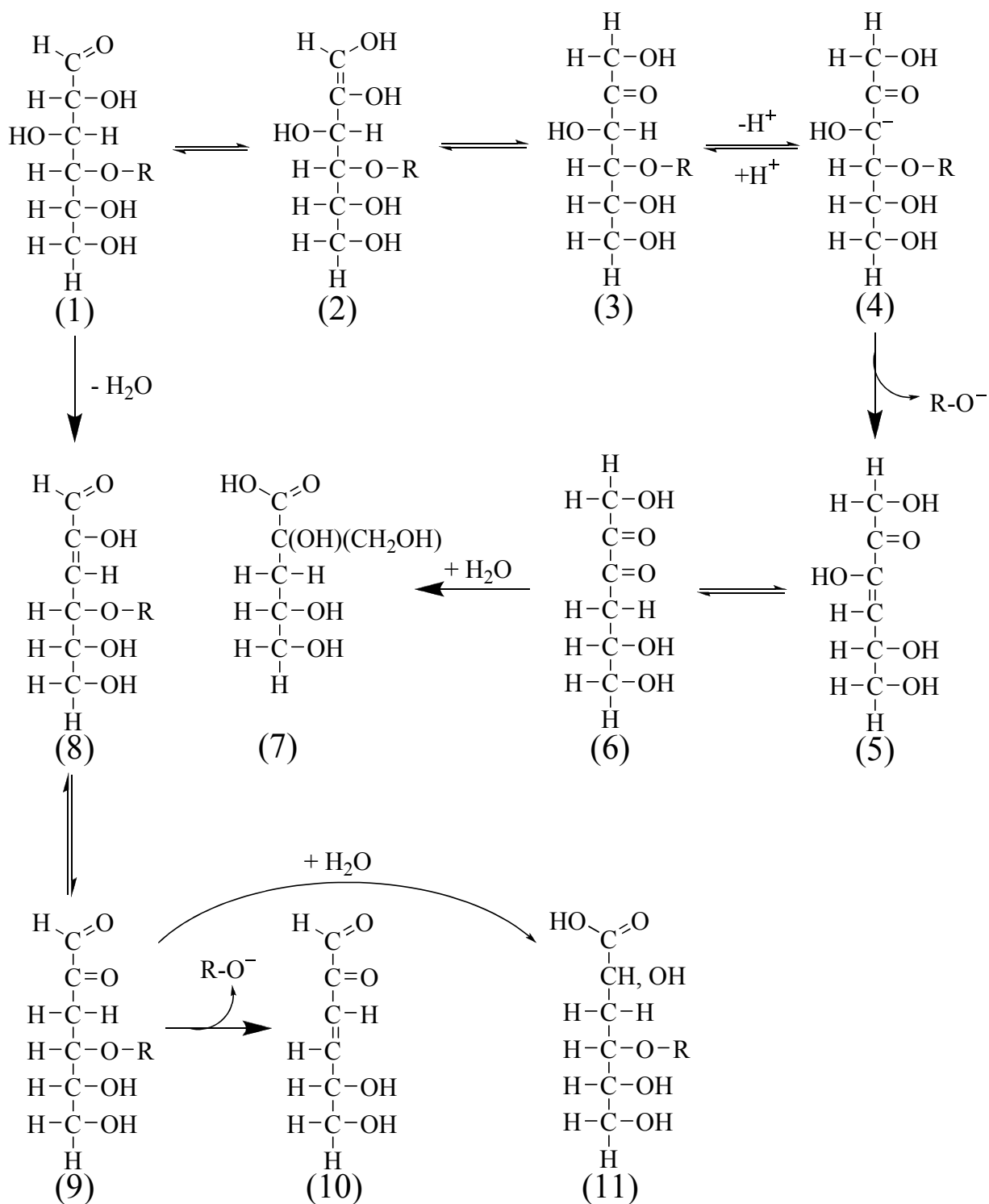


Fig. 1-3 Peeling and stopping reactions of cellulose under alkaline conditions

Fig. 1-4 に挙げたアルカリ加水分解反応は、セルロースを例にしたものであり、蒸解後期の高温にて多糖類の中間体で起こりうる。最初に、グルコース中間体 (12) の C-2 位水酸基がイオン化し (13)、アノマー位炭素を攻撃することでグリコシド結合が解裂し、エポキシ構造 (14) を生成する。これは、分子内求核置換反応である。続いて (14) は、アルカリ加水分解を経てグルコース型還元性末端 (15) あるいはマンノース型還元性末端 (16) を生成、または、C-6 位水酸基の水酸基による分子内求核置換反応を経て二環性型末端 (17) を生成する。したがって、これらのアルカリ加水分解は、多糖類の解重合だけでなく、ピーリング反応による重量低下も引き起こす。

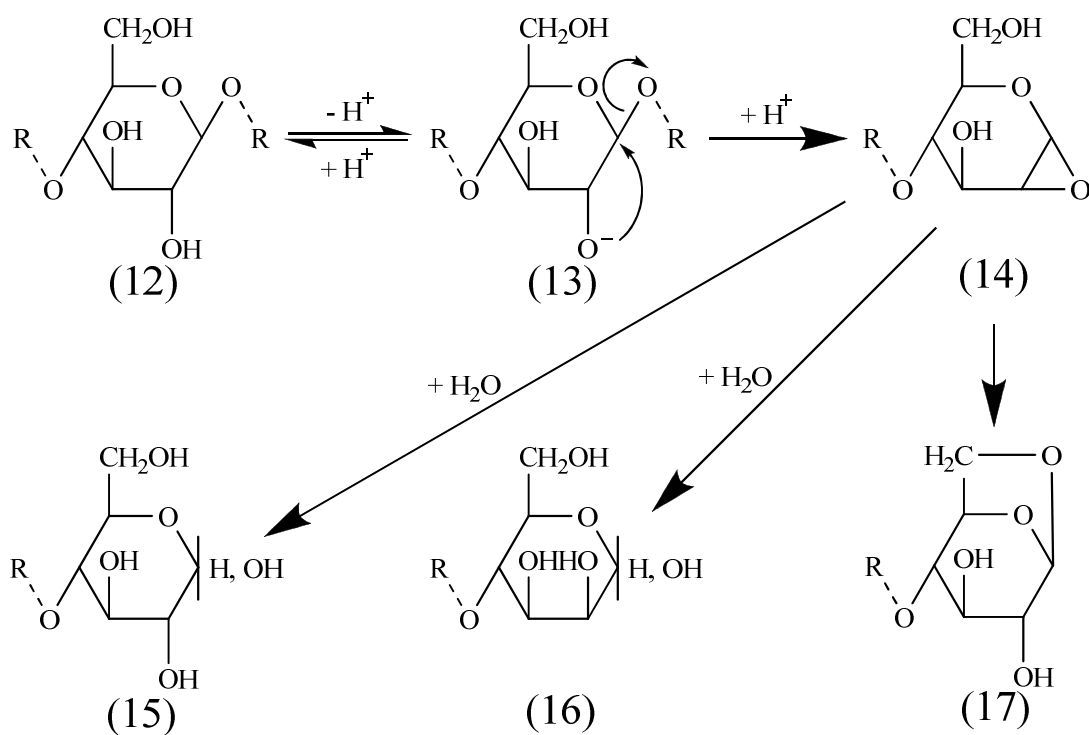


Fig. 1-4 Alkaline hydrolysis of cellulose in the intermediate glucopyranosyl residue

1.1.2 酸素漂白におけるリグニン・多糖類の反応

蒸解工程に引き続く漂白工程では、多糖類の分解を抑制しながらリグニンを選択的に分解してより白色度の高い化学パルプを得るため、かつては、塩素 (chlorine: C)、アルカリ抽出 (alkaline extraction: E)、次亜塩素酸塩 (hypochlorite: H)、そして、二酸化塩素 (chlorine dioxide: D) を組み合わせた多段漂白を行っていた。C 段は経済的、かつ、多糖類よりも残存リグニンなどの着色成分に対する反応性が非常に高い特性を持つため、多段漂白でも脱リグニンを担う初段に用いられていた。しかし近年、塩素漂白から生成する有機塩素化合物が問題視され、環境負荷低減の観点から漂白法の見直しが行われた。

塩素ガス (分子状塩素) による漂白排液には、毒性を有する塩素化ダイオキシン類や塩素化ダイベンゾフラン類なども含まれている。これらは自然界での安定性が高いため、分解されにくく蓄積しやすい。これらやクロロホルムなどの有機塩素化合物による環境負荷を減らすため、分子状塩素を使用しない ECF (Elemental Chlorine Free) 漂白や、二酸化塩素などの塩素系薬剤全てを用いずに酸素 (oxygen: O)、過酸化水素 (hydrogen peroxide: P)、オゾン (ozone: Z) などの酸素系薬剤のみを使用する TCF (Totally Chlorine Free) 漂白が検討・実用化されている。中でも酸素は、ECF・TCF 漂白の導入前から脱リグニン剤として重視されており、我が国では 70 年代後半以降パルプ製造工場で急速に採り入れられ、100°C ~ 130°C でクラフトパルプに酸素漂白処理が行われている (紙パルプ技術協会編 2000)。酸素は扱いが簡単で、排液や排ガスの環境負荷が少ないという利点がある。また、酸素漂白排液は、蒸解工程の薬品回収システムに取り込むことが可能である。これらのことにより、酸素漂白は ECF・TCF 漂白の初段として用いられる。

しかし、酸素漂白には多糖類の分解が比較的激しいという問題がある。酸素漂白のような比較的温和な条件下では、酸素分子は還元性末端以外の多糖類とは直接反応しない。しかし、酸素とリグニンのフェノール性部位との反応により生じる活性酸素種 (Active Oxygen Species, AOS) の中には、還元性末端以外の糖中間位の残基も分解するものがある。また、これらの AOS により多糖類中にラジカルが生じると、酸素分子と反応することが可能となり、ラジカル連鎖反応が開始される。これらが原因となって、パルプの収率・強度低下を引き起こす。酸素は水溶液、特に、アルカリ水溶液への溶解度が低いため (Brodén *et al.* 1978; Brodén *et al.* 1979)、反応が遅く、また、残存リグニン中には Fig. 1-2 [A] のように、酸素で分解できない構造もある。これらの理由により、未漂白パルプ中の残存リグニ

ンの 50%程度に到達した時点で、酸素漂白による脱リグニンを止めなければならない。更なる脱リグニンは、経済性でも酸素漂白に劣る二酸化塩素、オゾン、過酸化水素などの他の漂白試薬に頼らざるを得ないのが現状である。これらの酸素漂白の問題点を改善するための研究が活発に行われており、パルプの酸素漂白におけるリグニンの反応機構、そして、多糖類の分解機構として考えられているものを記述する。

酸素分子自体は温和な酸化剤であり、酸化力はあまり強くない。そのため、塩基によって解離したリグニン中のフェノール性水酸基や、多糖類の還元末端のようにカルボニル基を持つ部分としか反応しない。

一般に、酸素とリグニンや多糖類の還元性末端との反応は、フェノレートアニオンやカルバニオン (Fig. 1-5) から、酸素分子が 1 電子引き抜いて始まる (Gierer 1990a; Gierer 1990b)。塩基による脱プロトンによって、リグニン中のフェノール性水酸基からフェノレートアニオンが、多糖類中のカルボニル基の α 位からカルバニオンがそれぞれ生成する。酸素分子がフェノレートアニオンとカルバニオンから 1 電子引き抜くと、フェノキシラジカルとカルボニルの α 位ラジカルがそれぞれ生成し、酸素分子はスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\bullet-}$) に還元される (Fig. 1-7 (I))。生成するラジカルの共鳴混成体を Fig. 1-6 に示す。

フェノキシラジカル生成後、2 つの反応経路が考えられる。1 つ目は酸素圧が高い時に起こると考えられる反応で、フェノキシラジカルの共鳴混成体と酸素との結合により、リグニン過酸化物ラジカルが生成する (Fig. 1-7 (II))。リグニン過酸化物ラジカルは、リグニンのフェノレートアニオンや多糖類を 1 電子酸化して、これ自体は還元され、リグニン過酸化物となる (Fig. 1-7 (III))。フェノレートアニオンは酸化されてフェノキシラジカルとなり、再び酸素と結合するとリグニン過酸化物ラジカルを生成し、ラジカル連鎖反応となる。一方、多糖類が酸化されると、パルプ粘度低下の原因となる。もう 1 つの反応経路は、フェノール性リグニン部位と酸素分子との反応で生成するフェノキシラジカルと $O_2^{\bullet-}$ がそのまますぐに結合し、リグニン過酸化物を与える反応である (Fig. 1-7 (IV))。

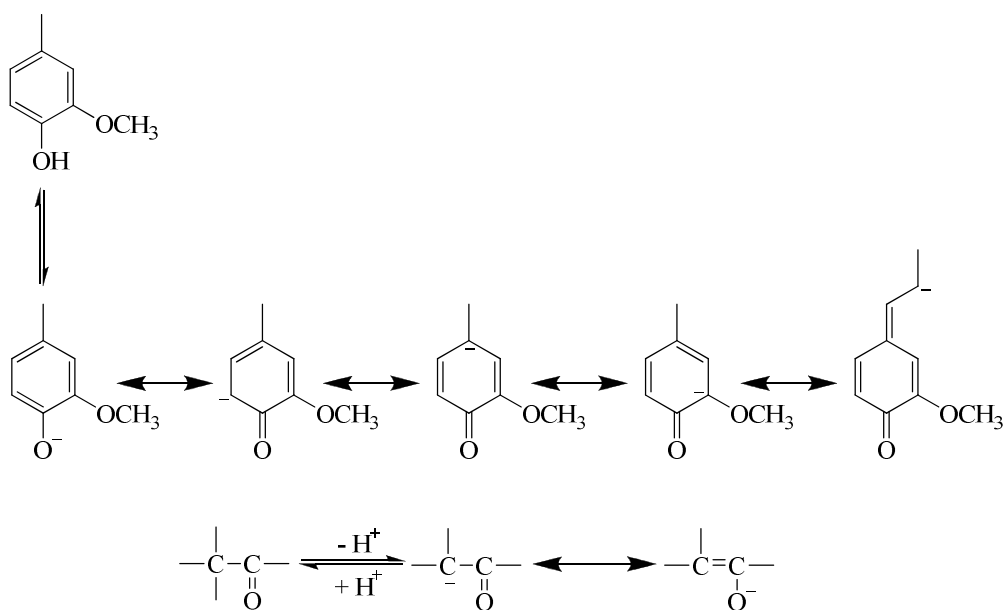


Fig. 1-5 Formation of carbanions on lignin and carbonyl group

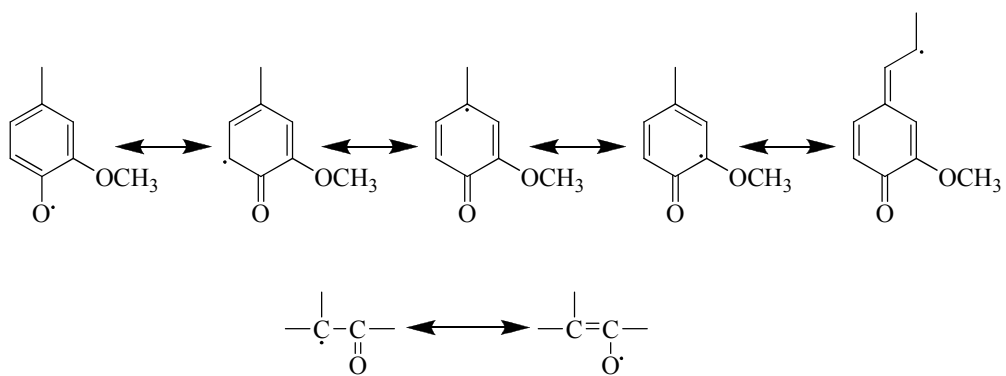


Fig. 1-6 Canonical structure of radical resonance hybrid in lignin and carbonyl group

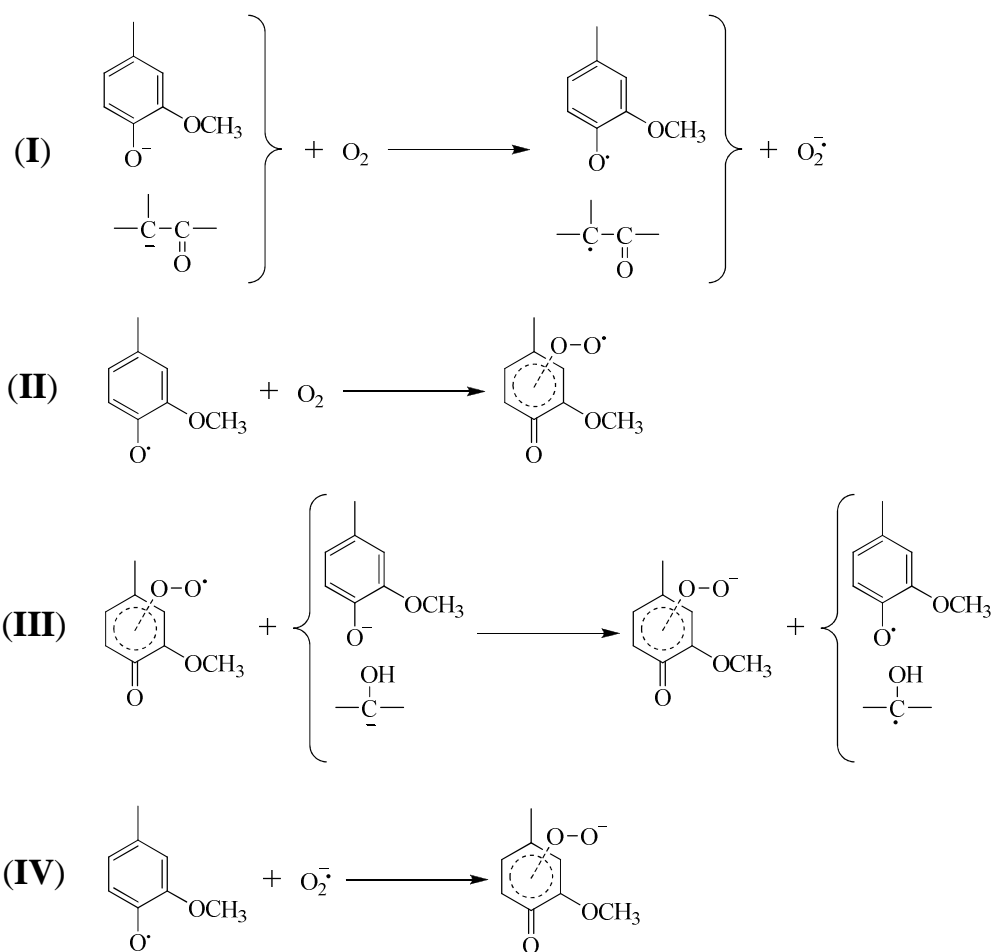


Fig. 1-7 Oxidation of phenolic lignin and carbonyl group initiated by oxygen

そして、リグニン過酸化物は、芳香核開裂によってムコン酸型誘導体になるか、側鎖の α - β 結合切断によって芳香族アルデヒドになるか、あるいは、側鎖部分の脱離によって *p*-キノン型構造になる (Fig. 1-8) などの反応を経る。

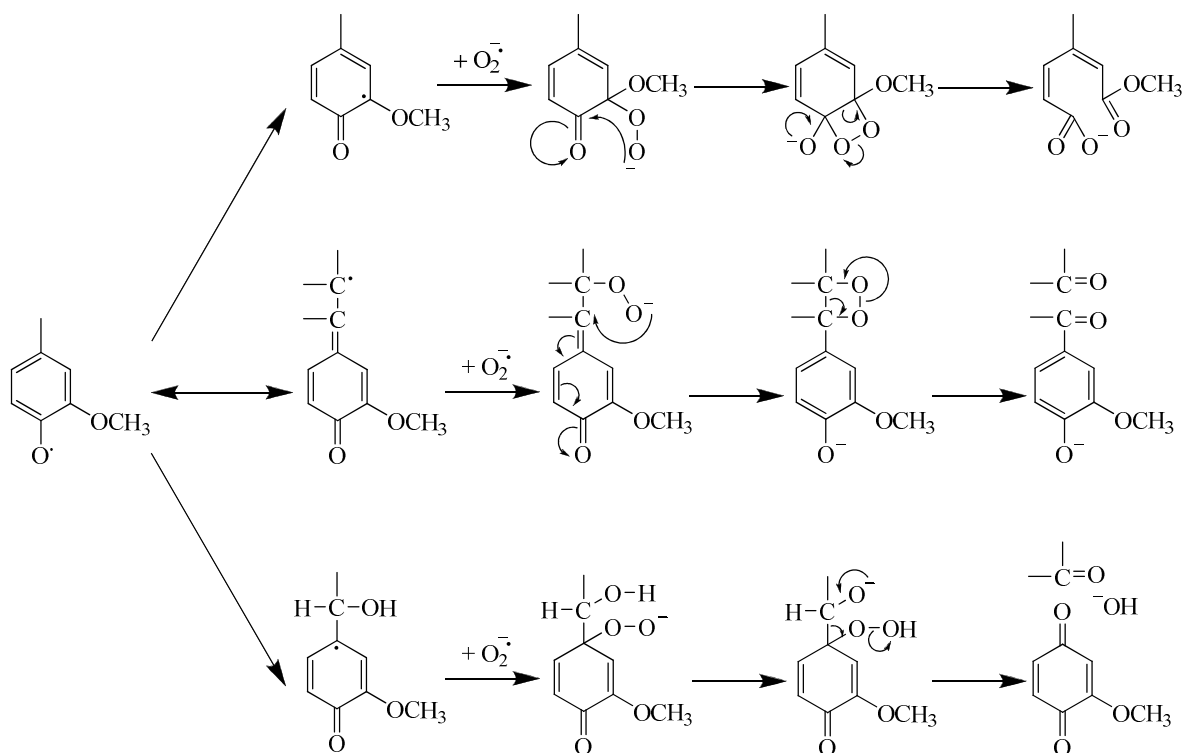
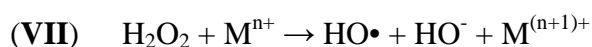
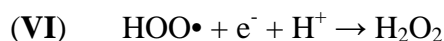
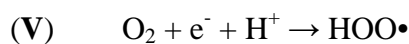


Fig. 1-8 Various types of oxidation of phenolic lignin structures

酸素は高温水中でリグニンのような有機物と共存すると、共存物質の酸化により過酸化水素 (H_2O_2) に変換される (V、VI)。過酸化水素は重金属イオンの存在によって分解され、AOS のヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$) が生じる (Fenton 反応) (VII) (Fenton *et al.* 1899)。



AOS は、フェノール性リグニン部位のみならず、酸素分子では分解できない非フェノール性リグニン部位も攻撃することが知られている (Yokoyama *et al.* 1999a)。しかし、AOS は多糖類も分解し、その主鎖の切断を引き起こし、その結果として、重合度・粘度の低下が起きる。このような反応系において、マグネシウムイオンの存在が重金属の触媒作用を低減し、過酸化水素や過酸化物からの AOS 生成を抑制するため、多糖類の分解が抑えられることが知られている (Sjöström *et al.* 1972; Sjöström *et al.* 1978)。

酸素漂白のような温和な条件下では、多糖類はアルカリ加水分解や酸素分子による酸化反応を受けにくいことが知られている (Ericsson *et al.* 1974)。酸素漂白条件下において、多糖類の構造中で直接酸素分子と反応するのは、還元末端のみである。還元末端では、高温・アルカリ性下で一般に起こるピーリング反応 (Fig. 1-3) や、酸化的ピーリング反応 (Fig. 1-9 (加納ら 1974; Theander 1980)) が起こっている。これらの反応は、多糖類の還元末端から単糖が 1 ユニットずつ脱離していく反応であり、還元末端以外にはほとんど影響がない。また、還元末端が酸化を受けるとグルコン酸、または、マンナン酸末端となるため、ピーリング反応の進行が抑制されると考えられている。そのため、これらの反応が、酸素漂白におけるパルプの粘度低下の主要因とは考え難い。

よって、酸素漂白でのパルプ粘度低下は、主として、系中に生じた AOS によるセルロース中間位残基の酸化に伴う主鎖の切断である、と考えられる。この切断例として、AOS による C-2 位、または、C-3 位の水素引き抜きから引き起こされる β -アルコキシ脱離 (Fig. 1-10 (Gierer 1997)) が挙げられる。この反応で新たに還元末端が生じ、上述のピーリング反応を増加させる。

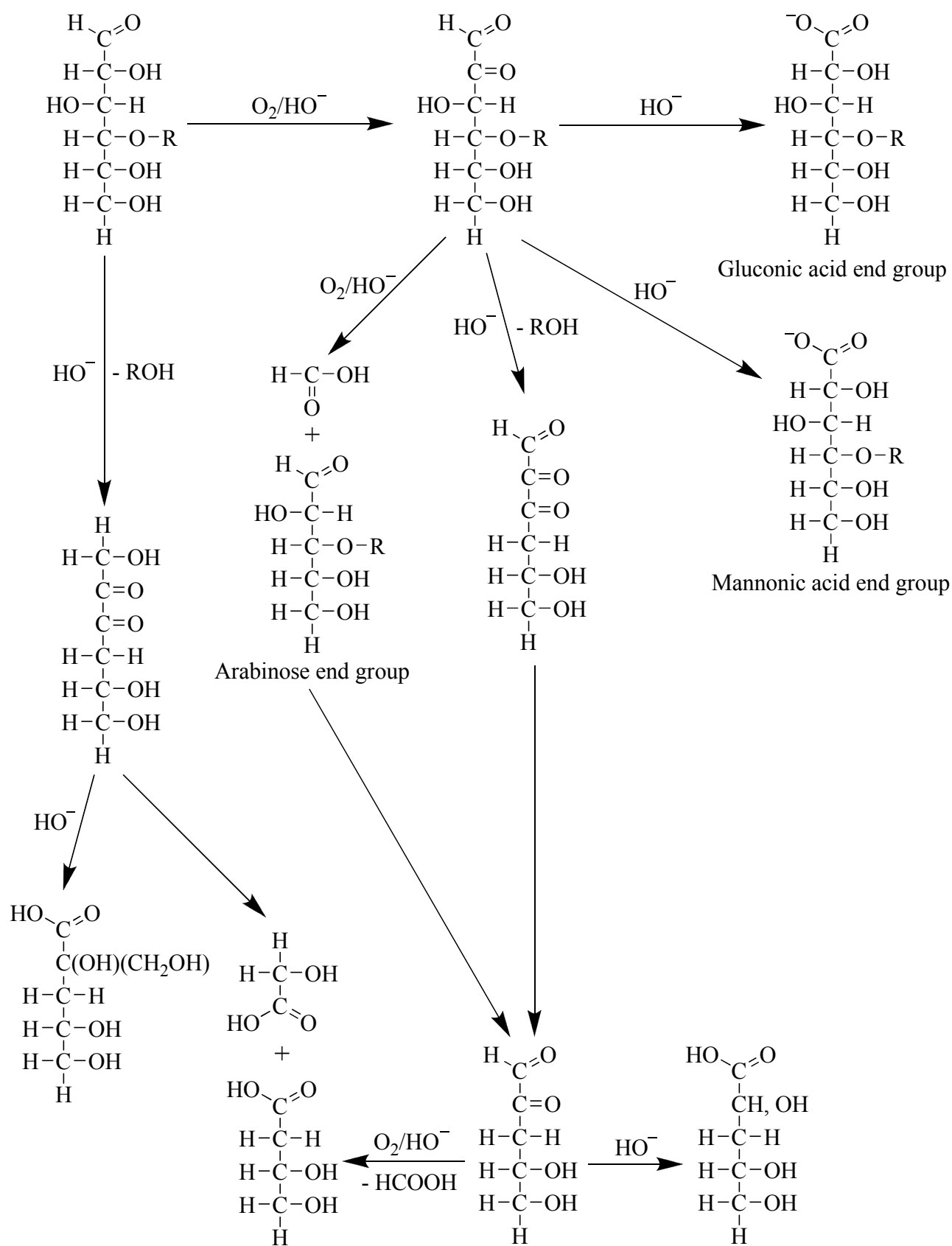


Fig. 1-9 Reactions occurred to reducing end group in oxygen bleaching (R = carbohydrate chain)

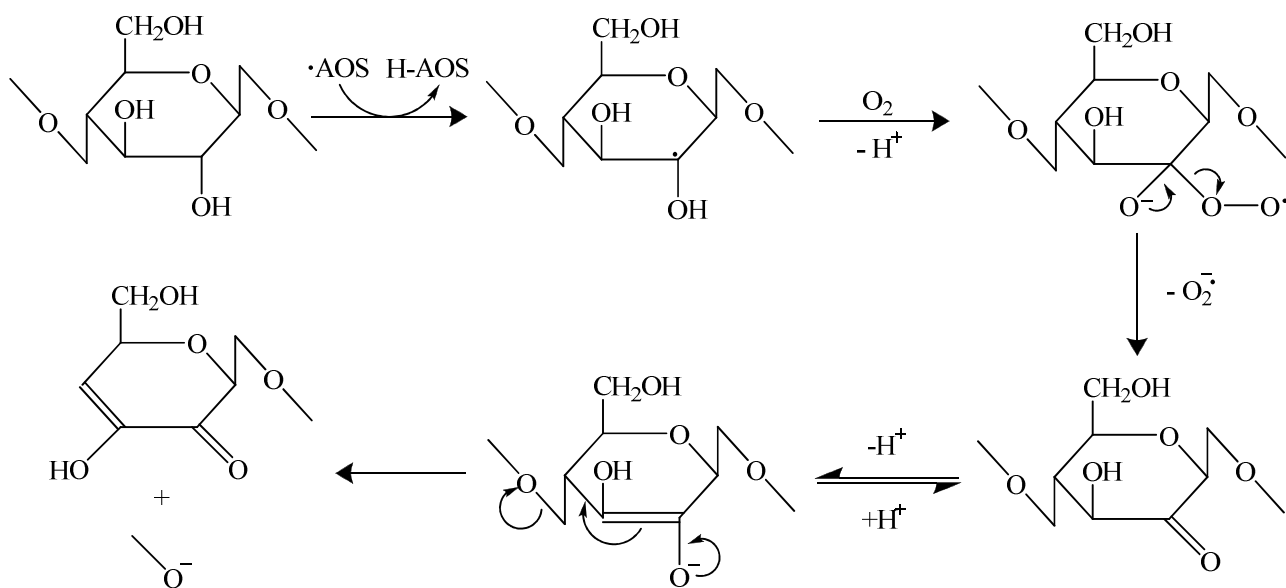
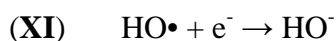
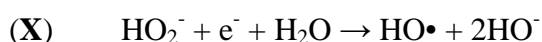
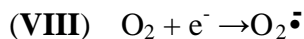


Fig. 1-10 Introduction of carbonyl group into cellulose and the successive chain cleavage by β -elimination mechanism

1.1.3 酸素漂白条件下で生成する活性酸素種の変化

酸素漂白溶液中に生成する AOS の種類や量は、添加物や溶液の pH によって異なり、それがリグニンおよび多糖類の分解量や反応性に影響を及ぼす。酸素漂白中では、下記のような酸素から水への 4 段階の 1 電子還元が起こり、その過程で $\text{HO}\cdot$ や ヒドロペルオキシラジカル ($\text{O}_2\cdot$) などの AOS が発生する (VIII、IX、X、XI) (松浦 1977)。



$\text{HO}\cdot$ は、水溶液中で最も強力な 1 電子酸化剤の 1 つであり、強い求電子性を示す。1.1.2 で記載した通り、 $\text{HO}\cdot$ は酸素分子では分解できないリグニンの非フェノール性構造も攻撃すると考えられている。このように、 $\text{HO}\cdot$ は酸素漂白中の脱リグニンにおいて、最も重要な役割を持つ AOS であると考えられているが、多糖類も分解することが大きな問題となっている。

一方、 $\text{O}_2\cdot$ は酸素が 1 電子還元されたもので、求核性、ラジカル反応性、その上、酸化性と還元性という複数の性質を持ち合わせている。水溶液中での反応性はあまり高くないと考えられており、直接にはリグニンおよび多糖類を酸化しないことが報告されている (Gierer 1997)。しかし、 $\text{O}_2\cdot$ がプロトン化されると、共役酸である ヒドロペルオキシラジカル ($\text{HO}_2\cdot$ ($\text{pK}_a = 4.8$)) を生じる。酸素漂白中で $\text{O}_2\cdot$ が引き起こす重要な反応は、不均化による過酸化水素の生成と、過酸化水素の還元的分解反応への関与による $\text{HO}\cdot$ の生成である。また、基質中に生成した炭素中心ラジカルと結合して過酸化物を生成することによって、Fig. 1-7 のような反応を引き起こし、リグニン分解に関与していることも重要である。

ヒドロペルオキシドアニオン (HO_2^- , $\text{pK}_a = 11.6$) は、過酸化水素の共役塩基であるが、その反応として、重金属触媒反応による還元的分解による $\text{HO}\cdot$ の生成や、カルボニルやエノン構造への求核付加による基質の分解への関与が報告されている (Ljunggren 1986)。

AOS の反応性は、溶液の pH によって異なると考えられる。例えば、HO• は pK_a 値が 11.9 であるため、 $pH < 11.9$ の場合、反応溶液中では HO• として多く存在する。HO• は、脂肪族の水素引き抜き反応よりも、芳香環への付加反応やベンジル位水素の引き抜き反応を起こしやすいため、多糖類に対するリグニンの相対反応性、すなわち、反応選択性は高いと考えられている。一方、 $pH > 11.9$ の場合、HO• はその共役塩基であるオキシルアニオンラジカル ($O^{\bullet-}$) として存在する。 $O^{\bullet-}$ は負電荷を帯びており、芳香環の π 電子系との反発があるため、リグニンの芳香核やオレフィン構造への攻撃よりも、脂肪族からの水素引き抜き反応を優先的に引き起こす。そのため、pH が高い場合、多糖類に対するリグニンの反応選択性は低いと考えられている (Bouchard *et al.* 2010; Gierer 1997)。

パルプ中には金属として、鉄、マンガン、銅などが存在するが、これら遷移金属の存在によって、AOS の生成量が大きく変化することが知られている (Ericsson *et al.* 1971)。また、これら金属の存在量や、AOS の生成を抑える添加剤として知られるマグネシウム塩との存在量比によって過酸化物の分解機構が異なり、漂白中の多糖類分解に大きな影響を及ぼすことが示唆されている (Bouchard *et al.* 2011; Sjöström *et al.* 1972; Sjöström *et al.* 1978, Yokoyama *et al.* 1999b)。マグネシウム塩の多糖類保護機構として、以下の諸説がこれまでに考えられているが、これら諸説に対する検証は行われていない。

- ①過酸化物が分解する時に生成すると考えられる $O_2^{\bullet-}$ を安定化することによって、過酸化物の分解過程であるラジカル連鎖反応を停止させ、HO• の生成を抑える (Croon *et al.* 1971; Samuelson *et al.* 1969; Samuelson 1970; Sinkey *et al.* 1974)。
- ②系中に存在していて過酸化物の Fenton 反応を起こす遷移金属を取り囲むことによって、その遷移金属を不活性化する。
- ③多糖類と直接錯体を形成し、多糖類を HO• のような AOS の攻撃から保護する (Ek *et al.* 1985; Defaye *et al.* 1974; Ericsson *et al.* 1971; Gilbert *et al.* 1973)。

1.2 酸素漂白過程での多糖類の反応に関する既往の知見

1.2.1 糖モデル化合物とリグニンモデル化合物との反応性の比較

1.1.2 でも述べた通り、酸素漂白中の多糖類分解には酸素分子は関与していないと考えられるので、多糖類の分解が起こるには、酸素分子と反応して AOS を生成するリグニンのようなフェノール性物質の存在が必要不可欠である (Draute *et al.* 2002; Ericsson *et al.* 1971; Yokoyama *et al.* 1996)。ここでは、糖モデル化合物とリグニンモデル化合物が共存した系で、AOS との反応性を比較した例について紹介する。

安本らは、糖モデル化合物として methyl β -D-glucopyranoside (MGP) を用い、リグニンの部分構造を持つ様々なモデル化合物を共存させ、酸素—アルカリ処理を行った (Yasumoto *et al.* 1996)。この結果から、MGP と共存するリグニンモデル化合物の構造と存在量が、両モデル化合物間の反応選択性 (リグニンモデル化合物分解量あたりの MGP 分解量) への影響を報告した。Table 1-1 に示す通り、veratryl aldehyde のようにカルバニオンを作らないものは酸素分子と反応しないため、糖モデルは分解されない。酸素—アルカリ中で安定な α 位にカルボニル基を持つ vanillin、acetoguaiacone 共存系でも糖モデルは分解されない。catechol や guaiacol、そして、 α 位に水酸基、あるいは、メチレン基を持つグアイアシル化合物は、酸素との反応性が高く、これらの共存系では MGP は同程度分解した。クラフト蒸解、および、酸素漂白中に生成すると考えられている α 縮合型モデルも酸素との反応性が高く、共存 MGP は大きく分解された。MGP がよく分解された反応溶液は酸素漂白排水と同じ褐色をしており、縮合反応が起こっていることが示唆される。

リグニンモデル化合物の添加量を増大させると MGP の分解も多くなるが、添加量を 2 倍にしても分解量は 2 倍にならない。これはリグニンモデル化合物の量が増加すると、生成する AOS がリグニンモデル化合物自体と反応する確率も高くなるためであろう。

Table 1-1 Dependence of methyl β -D-glucopyranoside (MGP) degradation on the structural feature of lignin model compound (Yasumoto *et al.* 1996)

Lignin model compound	Recovered MGP (%)	Recovered lignin model (%)
Blank	96	—
Guaiacol	53	0
Vanillyl alcohol	69	0
Apocynol	49	0
Homovanillic acid	61	—
Isoeugenol	63	0
Guaiacylglycol- β -guaiacyl ether	52	0
Vanillin	98	92
Acetoguaiacone	94	99
Veratryl aldehyde	96	—
Veratric acid	104	—
Acetoveratrone	98	—
Dibenzoylmethane	80	0
Bis(<i>p</i> -hydroxyphenyl)methane	54	—
Ethylguaiacol- α -veratrol	61	trace
Catechol	50	0
Dibasic acids	99	—

横山らは、酸素漂白を忠実に再現した条件下における、非フェノール性リグニンモデル化合物・糖モデル化合物に対する AOS の反応選択性について報告した (Yokoyama *et al.* 2005)。この系では、フェノール性化合物である 2,4,6-trimethylphenol (TMPh) と酸素分子との反応により AOS を発生させ、この AOS と両モデル化合物を反応させた。非フェノール性モデル化合物として 3,4-dimethoxybenzyl alcohol (veratryl alcohol, VeA)、または、1-(3,4-dimethoxyphenyl) ethane-1,2-diol (veratryl glycol, VeG) を、糖モデル化合物として MGP を用いた。各反応時間における両モデル化合物の残存濃度の比とその微小変化から両モデル化合物間の反応選択性 ($k_{\text{VeA}}(t)/k_{\text{MGP}}(t)$ および $k_{\text{VeG}}(t)/k_{\text{MGP}}(t)$) を算出し、初期 pH 13.1、11.8 それぞれにおいて結果を報告している (Table 1-2)。

Ek らは、水の γ 線放射によって発生させた $\text{HO}\cdot$ を、非フェノール性リグニンモデル化合物である veratrylglycerol- β -guaiacyl ether (VGE) と MGP を共存させた系で反応させることにより、これらの間の $k_{\text{VGE}}/k_{\text{MGP}}$ が 2.7 であることを報告した (Ek *et al.* 1989)。横山らは、この Ek らの結果と pH 11.8 における VeG と MGP 間の初期の反応選択性 ($k_{\text{VeG}}(t)/k_{\text{MGP}}(t) = 2.1$) の値が近いこと、そして、反応初期 (30 分以前) では AOS 生成源と

なる TMPH が存在し、ラジカル連鎖反応が顕著でないことを考慮して、反応初期において、モデル化合物の分解に最も寄与しているのは $\text{HO}\cdot$ である可能性を示唆した。一方、pH 13.1 における VG または VeA と MGP 間の反応初期の反応選択性 ($k_{\text{VeA}}(t)/k_{\text{MGP}}(t)$ または $k_{\text{VeG}}(t)/k_{\text{MGP}}(t)$) を比較すると、 $k_{\text{VeG}}/k_{\text{MGP}} > k_{\text{VeA}}/k_{\text{MGP}}$ となり、側鎖部分が大きい VeG の方が多く分解されている。また、pH 13.1 の反応初期においては、 $\text{HO}\cdot$ の共役塩基である $\text{O}\cdot$ が反応に関与するとすれば、脂肪族が優先的に攻撃されるという上記の結果を合理的に説明できると考えた ($k_{\text{VeG}}(t)/k_{\text{MGP}}(t) = 0.3$)。さらに、TMPH が全て消費された反応時間 30 分以降では、TMPH によるラジカル連鎖反応の停止がなくなること、そして、反応選択性値の pH 依存性が見られなくなることから、この範囲では徐々にラジカル連鎖反応による分解が重要になることを示唆した。

Table 1-2 Value of $k_{\text{VeG}}(t)/k_{\text{MGP}}(t)$ and $k_{\text{VeA}}(t)/k_{\text{MGP}}(t)$ at the initial pH 11.8 and 13.1 (Yokoyama *et al.* 2005)

Time	$k_{\text{VeG}}(t)/k_{\text{MGP}}(t)$		$k_{\text{VeA}}(t)/k_{\text{MGP}}(t)$	
	pH 11.8	pH 13.1	pH 11.8	pH 13.1
0	2.1	0.3	2.3	0.1
5	2.2	0.4	2.3	0.1
10	2.1	0.5	2.3	0.1
20	2.2	0.7	2.4	0.2
30	1.9	0.8	2.4	0.4
45	1.3	0.9	2.4	0.5
60	1.2	0.9	2.4	0.6
90	0.7	0.8	2.5	0.7
120	0.7	0.7	2.5	0.8
180	0.7	0.4	2.5	1.3
240	0.5	0.1	2.5	1.5
360	0.4	0.1	2.5	1.5

1.2.2 糖モデル化合物の反応機構における知見

既往の研究では、酸素漂白での多糖類の分解機構を解明するため、グリコシド結合を有する糖モデル化合物を用いて、通常の酸素漂白とは大きく異なる条件下で反応が行われた。これらの反応系で得られた反応生成物から、AOS に攻撃されやすい部位、および、反応機構を検討してきた (de Belder *et al.* 1963; Guay *et al.* 2001; Guay *et al.* 2000; Kishimoto *et al.* 1998; Schuchmann *et al.* 1978)。

de Belder らは、糖モデル化合物として MGP を用いて Fenton 反応 ($\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$) を行い、モデル化合物と $\text{HO}\cdot$ の反応生成物は主に、D-glucose、2-ケト誘導体、3-ケト誘導体、C-6 位のアルデヒド型化合物であった (de Belder *et al.* 1963)。他には、lactone が 2 種類得られたものの、MGP の反応機構に関する検討は行っていない。

Guay らは、糖モデル化合物として methyl β -D-cellobioside を用いて、 $\text{HO}\cdot$ との反応を行い、主要な反応生成物として、cellobiose、MGP、D-glucose、および、これらの二次的分解生成物を得た (Guay *et al.* 2001)。多糖類が分解されて一度還元末端が導入されると、一連の酸化や分解反応を経て低分子のアルドン酸やアルドースが生成する。上記の二次的分解生成物は、D-glucose や MGP を $\text{HO}\cdot$ と反応させた場合でも得られることが報告されている (Guay *et al.* 2000)。これらの分解生成物は、 $\text{HO}\cdot$ による C-2 位、または、C-3 位の水素引き抜き反応によっては得られないため、C-2 位、または、C-3 位の酸化に基づく β -アルコキシ脱離とは別の新たな反応機構が提案された (Fig. 1-11) (Guay *et al.* 2001)。

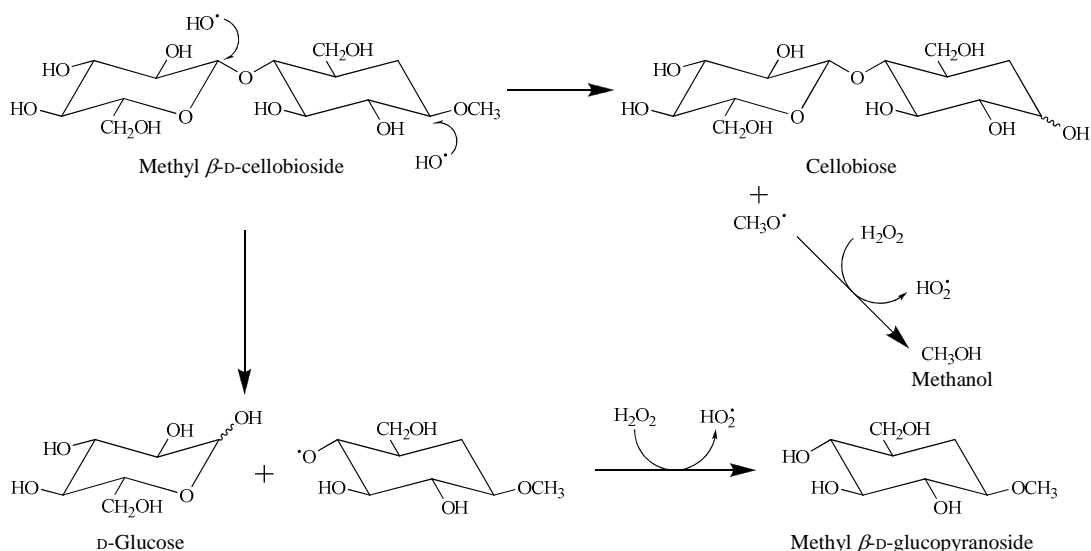


Fig. 1-11 Proposed mechanism for the formation of cellobiose, methyl β -D-glucopyranoside and D-glucose from the reaction between methyl β -D-cellobioside and hydroxyl radical (Guay *et al.* 2000)

新たに提案された反応機構では、HO• の攻撃はアノマー位炭素に対して起こり、そこで置換的な反応によって新たな還元末端とメトキシラジカル (CH₃O•) が生じる。さらにここで生じたラジカルは、共存する H₂O₂ から水素を引き抜いて、アルコールとなる (H₂O₂ は HO₂• となる)。実際に Guay らの実験では、HO• とモデル化合物との反応後に多くのメタノールが検出されており、彼らはこれが①の反応経路が実際に起こっている証拠だと結論付けている。また、分解生成物として methyl β -D-galactopyranoside が検出されなかったため、HO• はアノマー位炭素を攻撃し、グリコシド結合を介したもう一方のアグリコン側の炭素 (C-4 位) は攻撃しない、とも結論付けている。さらに、このようなアノマー位炭素への HO• による置換的攻撃は、多糖鎖の炭素から水素を引き抜く反応に比べ、理論計算上でも有利であると報告している (Guay *et al.* 2000)。しかし、上記の分解生成物の収率は全て低く、また、メタノールが生成する他の機構も十分に考えられることを考慮すると、Guay らの考察が合理的であるとは言い難い。

岸本らは、糖モデル化合物である methyl 4-O-ethyl- β -D-glucopyranoside を Fenton 反応系で処理し、分解生成物を同定した (Kishimoto *et al.* 1998)。同定された分解生成物から、HO• とこのモデル化合物との反応では、アノマー位が C-2 位、C-3 位、C-6 位と共に攻撃されることが示唆された。また、反応初期 pH が高いほどアノマー位への反応性が減少し、C-2

位、C-3 位、C-6 位への反応性が増加した (Fig. 1-12)。したがって、反応初期の pH が $\text{HO}\cdot$ のモデル化合物の各炭素原子への反応性に影響を与えることが示唆された。

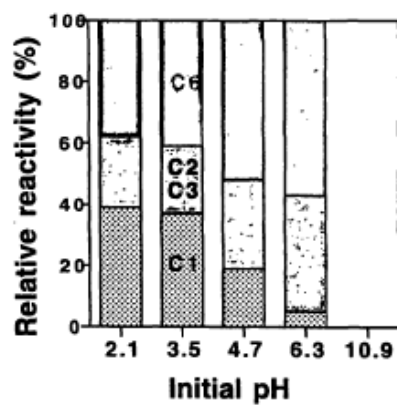


Fig. 1-12 Effect of initial pH on the relative reactivities of carbon atoms at C1~C6 positions in methyl 4-*O*-ethyl- β -D-glucopyranoside toward Fenton's reagent under atmosphere at room temperature (Kishimoto *et al.* 1998)

1.3 本研究の目的

1.3.1 目的

酸素漂白過程における重要な課題は、多糖類の分解を抑制することであるが、1.2.1 でも述べた通り、その多糖類の分解は、リグニンと酸素の反応によって生じる AOS が引き起こしている。また、AOS により開始される連鎖反応によっても多糖類は分解される上、これらの種は互いにその反応性に影響し合っているため、多糖類の分解機構を解明するのは複雑かつ困難である。

本研究では、実際の酸素漂白に近い条件下において、AOS と様々な糖モデル化合物を反応させることによって、次の 3 つの検討を行った。

- ①立体配置の異なる糖モデル化合物を用いて、酸素－アルカリ処理および過酸化水素－アルカリ処理を行い、糖モデル化合物の立体配置の相違が及ぼす AOS との反応への影響について検討する。
- ②一部の水素を重水素に置換した糖モデル化合物を用いて、酸素－アルカリ処理および過酸化水素－アルカリ処理を行い、速度論的同位体効果が出現するどうかを確認することによって、糖モデル化合物の炭素－水素結合の中でどれが AOS によって攻撃されやすいのかについて検討する。
- ③重水素置換糖モデル化合物を用いて、低酸素圧下で AOS と反応させ、酸素圧の相違が及ぼす速度論的同位体効果の大きさへの影響を調べることによって、どんな化学種が AOS として系中で働くのかについて検討する。

1.3.2 実験系の特色

本研究では、複数の糖モデル化合物と AOS との反応性を比較するため、酸素－アルカリ処理と過酸化水素－アルカリ処理を行った。本論に移る前に、この 2 つの実験系について説明する。

1.2.2 でも述べた通り、既往の研究では、反応機構の解析は、一般的に分解生成物を同定・定量して行われてきた。しかし、本実験の条件下では、糖モデル化合物の初期分解生成物がアルカリに対して非常に不安定であり、速やかに短炭素鎖の有機脂肪酸などに分解される。これらの収率は非常に低く、生成物からの機構を解析しづらいため、本研究では、分解生成物の同定および定量を行わなかった。

1.3.2.1 酸素－アルカリ処理

酸素－アルカリ処理では、糖モデル化合物とフェノール性化合物を用いて、アルカリ性下で酸素圧を加え、95°C で反応した。AOS はフェノール性化合物と酸素分子との反応によって生成され、糖モデル化合物は AOS によって分解される。金属塩として FeCl_3 を添加しており、これは AOS の生成を促す役割、および、系中に微量に存在する金属類の効果を遮蔽する役割を果たしている。Fig. 1-13 は上記の反応様式を示し、フェノール性化合物と酸素との反応により、様々な種類の AOS や他のラジカル種が生成される。したがって、本研究での反応系では、実際の酸素漂白の条件に非常に近く、 $\text{HO}\cdot$ だけでなく様々な種類の AOS の反応性を解析することができる。本研究の目的は、実際の酸素漂白の条件下で AOS と多糖類との反応を調べることである。今まで AOS の反応性を研究したものはいくつかあるが、1.2.2 で述べたように AOS は $\text{HO}\cdot$ に限定されているものが多い (Gierer 1997; Ek *et al.* 1989; de Belder *et al.* 1963; Schuchmann *et al.* 1978; Guay *et al.* 2001; Guay *et al.* 2000; Kishimoto *et al.* 1998; Gierer *et al.* 1993; Gierer *et al.* 1992; Gierer *et al.* 1994; Gierer *et al.* 1996a; Gierer *et al.* 1996b; Gierer *et al.* 2001; Sugimoto *et al.* 2000)。

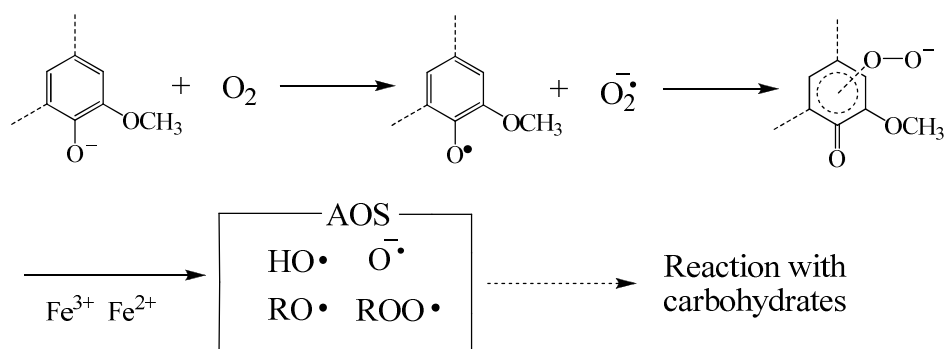
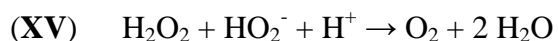
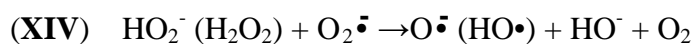
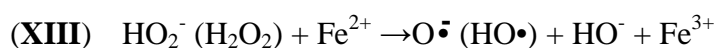
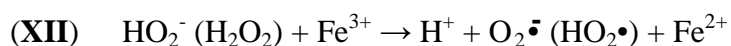


Fig. 1-13 Instances for the production of AOS during oxygen bleaching

1.3.2.2 過酸化水素－アルカリ処理

過酸化水素－アルカリ処理は、酸素－アルカリ処理と異なり、フェノール性化合物を加えず、糖モデル化合物を用いて、アルカリ性下、常圧下にて系中で過酸化水素を加え、反応した。過酸化水素－アルカリ処理でも金属塩として FeCl_3 を系中で加えており、過酸化水素が分解すると、AOS として O_2^\bullet と O^\bullet が生成し (XII、XIII) (Fenton *et al.* 1899; Haber *et al.* 1932)、これら自身のラジカル連鎖反応による過酸化水素の分解でも生じる (XIV)。また、過酸化水素はラジカル種が存在しなくても、二分子的に酸素と水に分解する (XV)。



O_2^\bullet が水素引き抜きを起こしにくいことを考慮すると、本反応系中で糖モデル化合物を分解可能な AOS は、 HO^\bullet の共役塩基である O^\bullet ($\text{pK}_a = 11.9$) のみと考えられる。

1.4 参考文献

- de Belder A. N., Lindberg B. and Theander O.: *Acta Chem. Scand.*, **17** (4), 1012 (1963)
- Bouchard J., Wang J. and Berry R.: *Holzforschung*, **64**, 153 (2010)
- Bouchard J., Wang J. and Berry R.: *Holzforschung*, **65**, 295 (2011)
- Brodén Å. and Simonson R.: *Svensk Papperstidn.*: **81** (17), 541 (1978)
- Brodén Å. and Simonson R.: *Svensk Papperstidn.*: **82** (16), 487 (1979)
- Croon I. and Andrew D. H.: *Tappi*, **54**, 1893 (1971)
- Defaye J. and Gadelle A.: *Pulp Pap. Can.*, **75** (11), 50 (1974)
- Draute A. P. and Lachenal D.: *Papperi ja Puu*, **84**, 275 (2002)
- Ek M., Gierer J., Jansbo K. and Reitberger T.: *Holzforschung*, **43** (6), 391 (1989)
- Ek M., Gierer J. and Reitberger T.: *Proc. 3rd Int. Symp. Wood and Pulp Chem.*, 209 (1985)
- Ericsson B., Lindgren B. O. and Theander O.: *Svensk Papperstidn.*, **74** (11), 757 (1971)
- Ericsson B., Lindgren B. O. and Theander O.: *Cellulose Chem. Technol.*, **8**, 363 (1974)
- Fenton H. J. H. and Jackson H.: *J. Chem. Soc.*, **75**, 1 (1899)
- Gierer J.: *Svensk Papperstidn.*, **73** (18), 571 (1970)
- Gierer J.: *Wood Sci. Technol.*, **14**, 241 (1980)
- Gierer J.: *Wood Sci. Technol.*, **19**, 289 (1985)
- Gierer J.: *Holzforschung*, **44** (5), 387 (1990a)
- Gierer J.: *Holzforschung*, **44** (6), 395 (1990b)
- Gierer J., Yang E. and Reitberger T.: *Holzforschung*, **46** (6), 495 (1992)
- Gierer J., Jansbo K. and Reitberger T.: *J. Wood Chem. Technol.*, **13** (4), 561 (1993)
- Gierer J., Yang E. and Reitberger T.: *Holzforschung*, **48** (5), 405 (1994)
- Gierer J., Yang E. and Reitberger T.: *Holzforschung*, **50** (4), 342 (1996a)
- Gierer J., Yang E. and Reitberger T.: *Holzforschung*, **50** (4), 353 (1996b)
- Gierer J.: *Holzforschung*, **51** (1), 34 (1997)
- Gierer J., Reitberger T., Yang E. and Yoon B. H.: *J. Wood Chem. Technol.*, **21** (4), 313 (2001)
- Gilbert A. F., Pavlovova E. and Rapson W. H.: *Tappi*, **56**, 95 (1973)
- Guay D. F., Cole B. J. W., Fort Jr. R. C., Genco J. M. and Hausman M. C.: *J. Wood Chem. Technol.*, **20** (4), 375 (2000)

- Guay D. F., Cole B. J. W., Fort Jr. R. C., Genco J. M. Hausman M. C. and Elder T. J.: *J. Wood Chem. Technol.*, **21** (1), 67 (2001)
- Haber F. and Weiss J.: *Naturwissenschaften*, **20**, 948 (1932)
- Kishimoto T. and Nakatsubo F.: *Holzforschung*, **52** (2), 180 (1998)
- Ljunggren S.: *J. Pulp Pap Sci*, **12** (2), 54 (1986)
- Meller A.: *Holzforschung*, **14**, 129 (1960)
- Samuelson O. and Stolpe L.: *Svensk Papperstidn.*, **72**, 662 (1969)
- Samuelson O.: *Das Papier*, **24**, 671 (1970)
- Schuchmann M. N. and von Sonntag C.: *Int. J. Radiat. Biol.*, **34** (4), 397 (1978)
- Sinkey J. D. and Thompson N. S.: *Pap. Puu*, **56** (5), 473 (1974)
- Sjöström E. and Välttilä O.: *Pap. Puu*, **54** (11), 695 (1972)
- Sjöström E. and Välttilä O.: *Pap. Puu*, **60** (1), 37 (1978)
- Sugimoto T., Morishita T., Matsumoto Y. and Meshitsuka G.: *Holzforschung*, **54** (3), 262 (2000)
- Theander O.: Chemistry of Delignification with Oxygen, Ozone and Peroxides, ユニ出版, 1980
- Yasumoto M., Matsumoto Y. and Ishizu A.: *J. Wood Chem. Technol.*, **16** (1), 95 (1996)
- Yokoyama T., Matsumoto Y., Yasumoto M. and Meshitsuka G.: *J. Pulp Pap Sci*, **22** (5), J151 (1996)
- Yokoyama T., Matsumoto Y. and Meshitsuka G.: *J. Pulp Pap. Sci.*, **25** (2), 42 (1999b)
- Yokoyama T., Matsumoto Y. and Meshitsuka G.: *Holzforschung*, **59** (3), 269 (2005)
- Yokoyama T., Matsumoto Y. and Meshitsuka G.: *J. Wood Chem. Technol.*, **19** (3), 187 (1999a)
- 石津敦: 紙パ技教誌, **27** (1), 37 (1973)
- 大江礼三郎, 臼田誠人, 上埜武夫, 尾鍋史彦, 村上浩二: パルプおよび紙, 文永堂出版 (1991)
- 加納直, 石津敦, 細谷修二, 中野準三: 繊維学会誌, **30** (5&6), T-260 (1974)
- 紙パルプ技術協会編: パルプの洗浄・精選・漂白, 紙パルプ技術協会 (2000)
- 細谷修二: 紙パ技教誌, **46** (11), 1344 (1992)
- 松浦輝男: 酸素酸化反応 ―酸素および酸素活性種の化学―, 丸善 (1977)

第 2 章

糖モデル化合物と活性酸素種 との反応における糖モデル化 合物の立体配置の影響

2.1 緒言

1.3.1 で述べた通り、本研究では、酸素－アルカリ漂白条件下における活性酸素種 (active oxygen species, AOS) による糖モデル化合物の分解機構の考察、を行うことを目的とする。本章では、糖モデル化合物の立体配置の相違が、AOS との反応にどのように影響するのか、について検討を行う。既往の研究には、様々な種類の立体配置の異なる糖モデル化合物を、アルカリ性下 (Dryselius *et al.* 1958)、Fenton 系 ($\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$) (Salam *et al.* 1982)、あるいは、酸素－アルカリ性下 (Millard *et al.* 1977; Hearne *et al.* 1991; Yokoyama *et al.* 1998; Schroeder *et al.* 2006; Konishi *et al.* 2009) における反応に供し、それらのモデル化合物の反応性を比較した例があるので、その一部を紹介する。

Dryselius らは、アノマー位、C-2 位あるいは C-4 位の立体配置の異なる methyl glycopyranoside 類を、アルカリ性下 (2.5 M NaOH) において 170°C での反応に供した (Dryselius *et al.* 1958)。その結果、環外グリコシド結合と C-2 位の水酸基が *trans* の関係にある methyl β -D-glucopyranoside (MGP) と methyl β -D-galactopyranoside (MGaP) は、これらが *cis* の関係にある methyl β -D-mannopyranoside (MMP) よりも速く分解された。この反応では酸素を用いていないので、アルカリによるグリコシド結合の加水分解が検討対象反応である。アルカリによるグリコシド結合の開裂は、一般的に C-2 位水酸基の解離に伴う隣接アノマー位炭素への C-2 位アルコキシドアニオンの分子内求核置換反応によって引き起こされる。環外グリコシド結合と C-2 位水酸基が *cis* の関係にある MMP の場合、 $^4\text{C}_1$ と $^1\text{C}_4$ のどちらのいす型配座においてもこの分子内求核置換反応が不可能であるため、アルカリ性下で安定なのであろう。

Salam らは、methyl α -D-glucopyranoside (MGP α) と methyl α -D-mannopyranoside (MMP α) を用いて 25°C で Fenton 反応 ($\text{H}_2\text{O}_2\text{-Fe}^{2+}$) を行い、MMP α の方が生成したヒドロキシラジカル ($\text{HO}\cdot$) によって分解されやすいことを報告したが、この結果に関する考察は行わなかった (Salam *et al.* 1982)。C-2 位における立体配置の相違が、 $\text{HO}\cdot$ との反応に影響を及ぼすことが、示唆される。

Millard らは、1,5-anhydroxylitol と 1,5-anhydroribitol を用いて 120°C で酸素－アルカリ処理を行い、後者の方が分解されやすいことを報告した (Millard *et al.* 1977; Schroeder *et al.* 2006)。また Hearne らは、methyl β -D-xylopyranoside と methyl β -D-ribofuranoside を 120°C での酸素－アルカリ処理に供し、後者の方が分解されやすいことを報告することによって、

cis の関係にある後者の C-2 位と C-3 位の水酸基との間に水素結合が存在することが、この高い反応性に関与することを提案した (Hearne *et al.* 1991)。

横山らは、いくつかのアルジトール類をフェノール性化合物である 2,4,6-trimethylphenol (TMPH, Fig. 2-1) との共存下での酸素-アルカリ処理に供し、酸素と TMPH との反応で生成する AOS とアルジトール類との反応について、検討を行った (Yokoyama *et al.* 1998)。その結果として、1 級水酸基よりも 2 級水酸基を多く持つアルジトール類の方が、AOS と反応しやすいことを示唆した。

小西らは TMPH と酸素との反応により AOS を発生させ、これらの AOS と共存する 2 つの糖モデル化合物 MGP および MGP α との反応を検討し、アノマー位の立体配置の相違が、AOS との反応に及ぼす影響について報告した (Konishi *et al.* 2009)。これによれば、TMPH を添加せずに MGP と MGP α を酸素-アルカリ処理した場合、これらは 6 時間後でも非常に安定であったが、TMPH、MGP および MGP α を共存させて処理した場合には MGP と MGP α は分解され、その速度は MGP の方が MGP α よりも大きかった。したがって、アノマー位の立体配置の相違が、これらの糖モデル化合物と AOS との反応に影響を及ぼすことが明らかにされた (Fig. 2-2)。この際、MGP の存在による MGP α の分解への影響、および、MGP α の存在による MGP の分解への影響について考慮する必要があることが、示唆された。

本章では、糖モデル化合物の立体配置の相違が、AOS との反応に及ぼす影響をより深く検討することを目的として、立体配置の異なる様々な糖モデル化合物を、小西らと同じ条件の下で TMPH が AOS 生成源となる酸素-アルカリ処理に供した。糖モデル化合物として、MGP および MGP の各炭素における立体配置が異なりエピマーとなる MGP α 、MMP、methyl β -D-allopyranoside (MAP) あるいは MGaP を用いた (Fig. 2-1)。また、AOS 生成源であるフェノール性化合物を変更することによって、生成する AOS に関する知見を得るため、4-hydroxy-3-methoxybenzyl alcohol (vanillyl alcohol, VA) を AOS 生成源とした酸素-アルカリ処理、そして、オキシルアニオンラジカル ($O_2^{\cdot-}$, HO^{\cdot} の共役塩基) が主な AOS となる過酸化水素-アルカリ処理も行った。

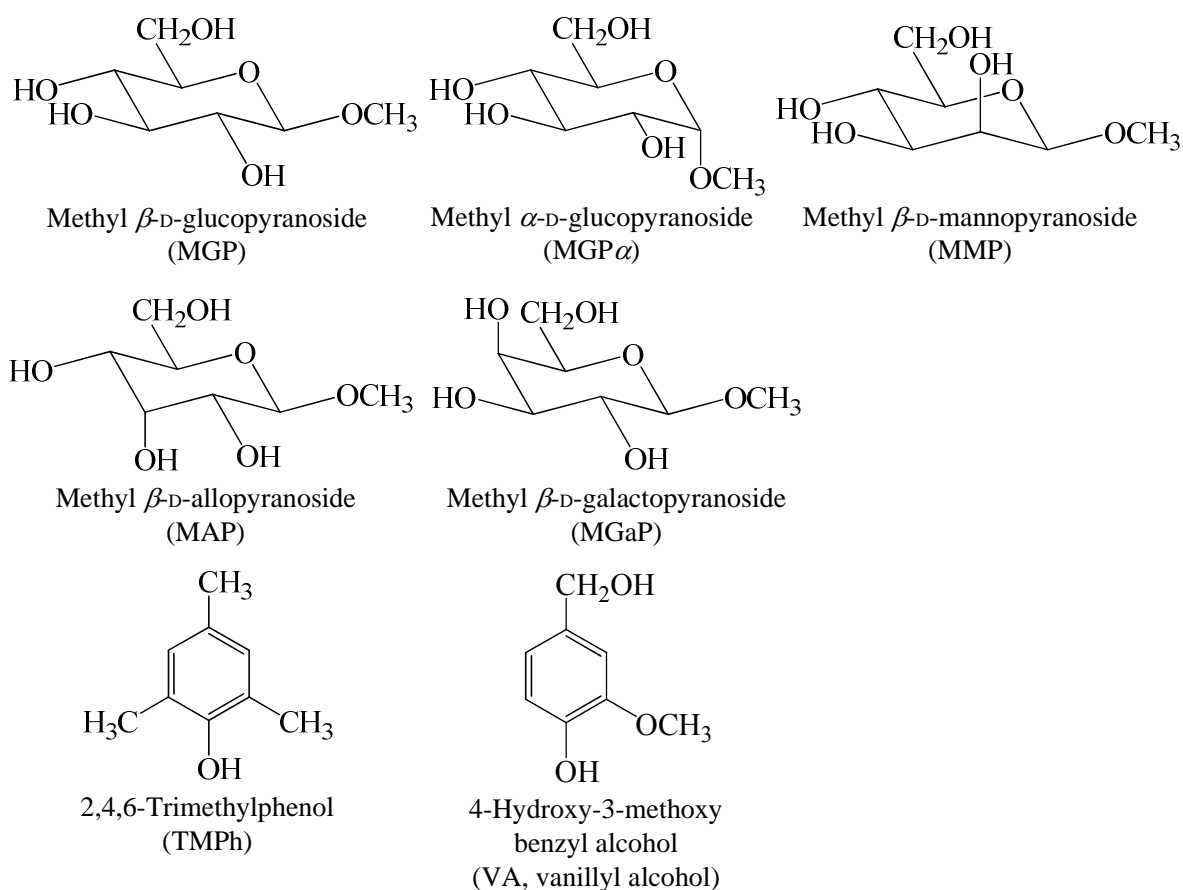


Fig. 2-1 Chemical structure of model compounds used in this chapter

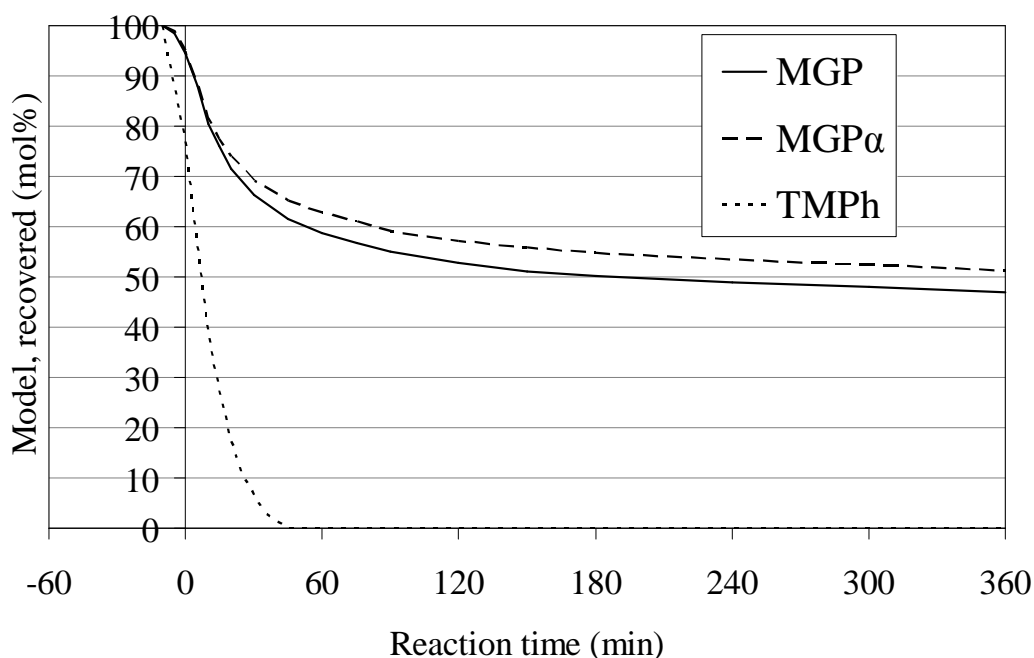


Fig. 2-2 Change in the yields of MGP, MGP α , and, TMPh when these compounds were reacted together in the oxygen-alkali treatment (Konishi *et al.* 2009)

2.2 実験

2.2.1 モデル化合物

2.2.1.1 モデル化合物の調製

本研究に用いたモデル化合物 (Fig. 2-1) のうち、MGP、MGP α 、MGaP および TMPH は、東京化成工業製のものを、MMP は Toronto Research Chemicals Inc. 製のものを、そして、VA は和光純薬工業製のものを、再結晶または精製して使用した。MAP は、MGP から合成して使用した。

MGP については、購入した MGP hemihydrate を、60°C 湯浴中でエタノール/ヘキサン = 4/1 の溶液に溶かし、4°C まで降温しながら再結晶を行って得たものを、真空乾燥器中で乾燥させてから使用した。MGP α および MGaP については、75°C 湯浴中でエタノールに溶かし、4°C まで降温しながら再結晶を行って得たものを、真空乾燥器中で乾燥させてから使用した。MMP については、購入した MMP isopropylate を水に溶かして濃縮し、60°C で真空乾燥させると、シロップ状の物質が得られた。これを $^1\text{H-NMR}$ で解析したところ、溶媒のピークは観測されなかった。また、同量の MGP と共にピリジン/無水酢酸 = 2/3 混液中 100°C で 1 時間アセチル化した後、FID を検出器とする GC で分析したところ、2 つのほぼ同面積のピークのみが観測された。これらの結果から、このシロップを純粋な MMP として使用した。MGP、MGP α 、MGaP、および、MMP の $^1\text{H-NMR}$ のスペクトルを、Fig. 2-3 ~ 2-6 に示す。

フェノール性化合物の TMPH については、室温でヘキサンに溶かし、4°C の恒温槽で再結晶を行って得たものを、風乾させてから使用した。VA に関しては、75°C 湯浴中でエタノールに溶かし、4°C まで降温しながら再結晶を行って得たものを、真空乾燥器中で乾燥させてから使用した。

GC 分析の内部標準物質として使用した *myo*-inositol (和光純薬工業製) については、105°C の恒温乾燥器中で乾燥させてから使用した。

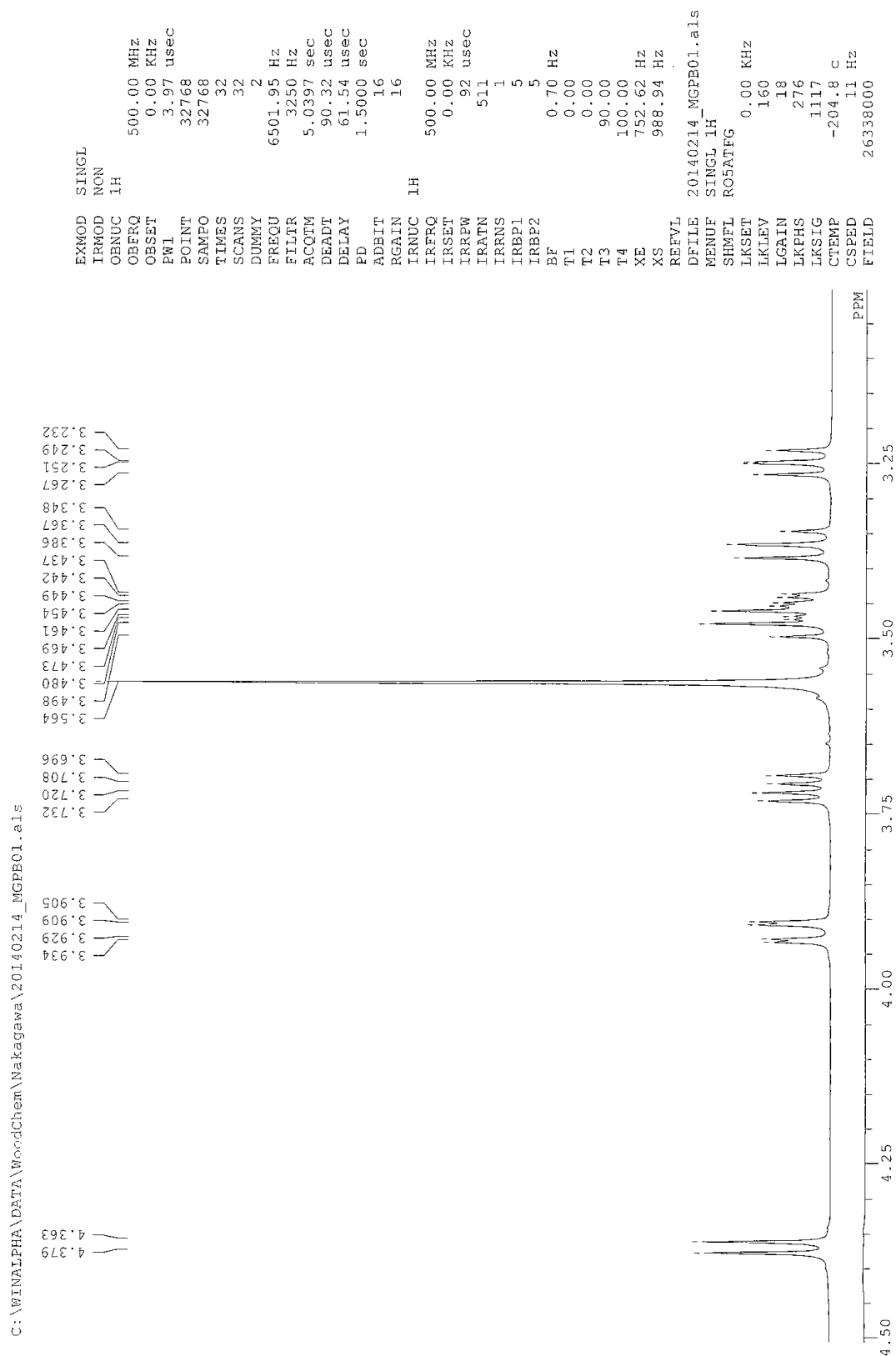


Fig. 2-3 ^1H -NMR spectrum of MGP in D_2O

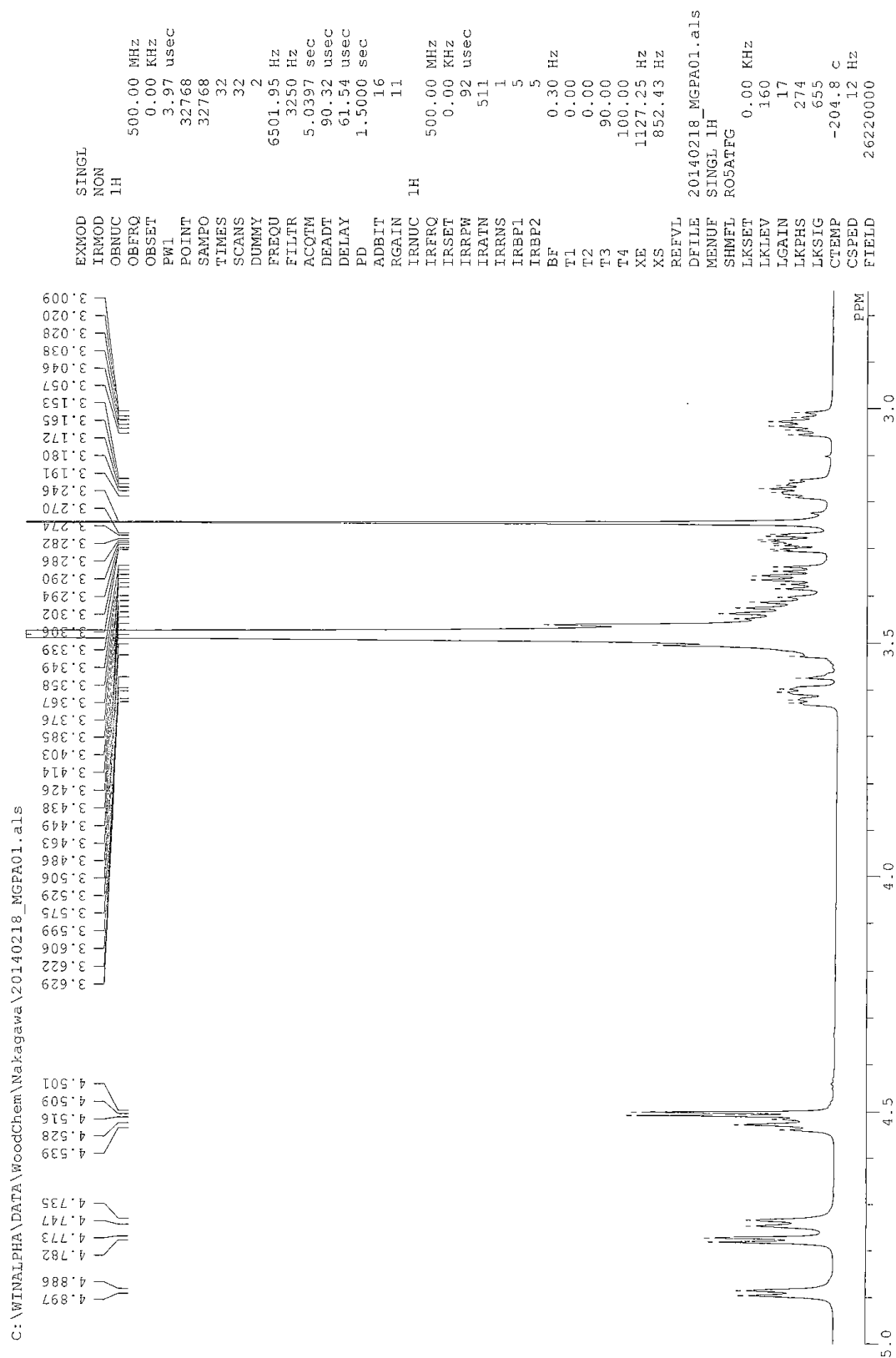


Fig. 2-4 ^1H -NMR spectrum of MGP α in deuterated DMSO

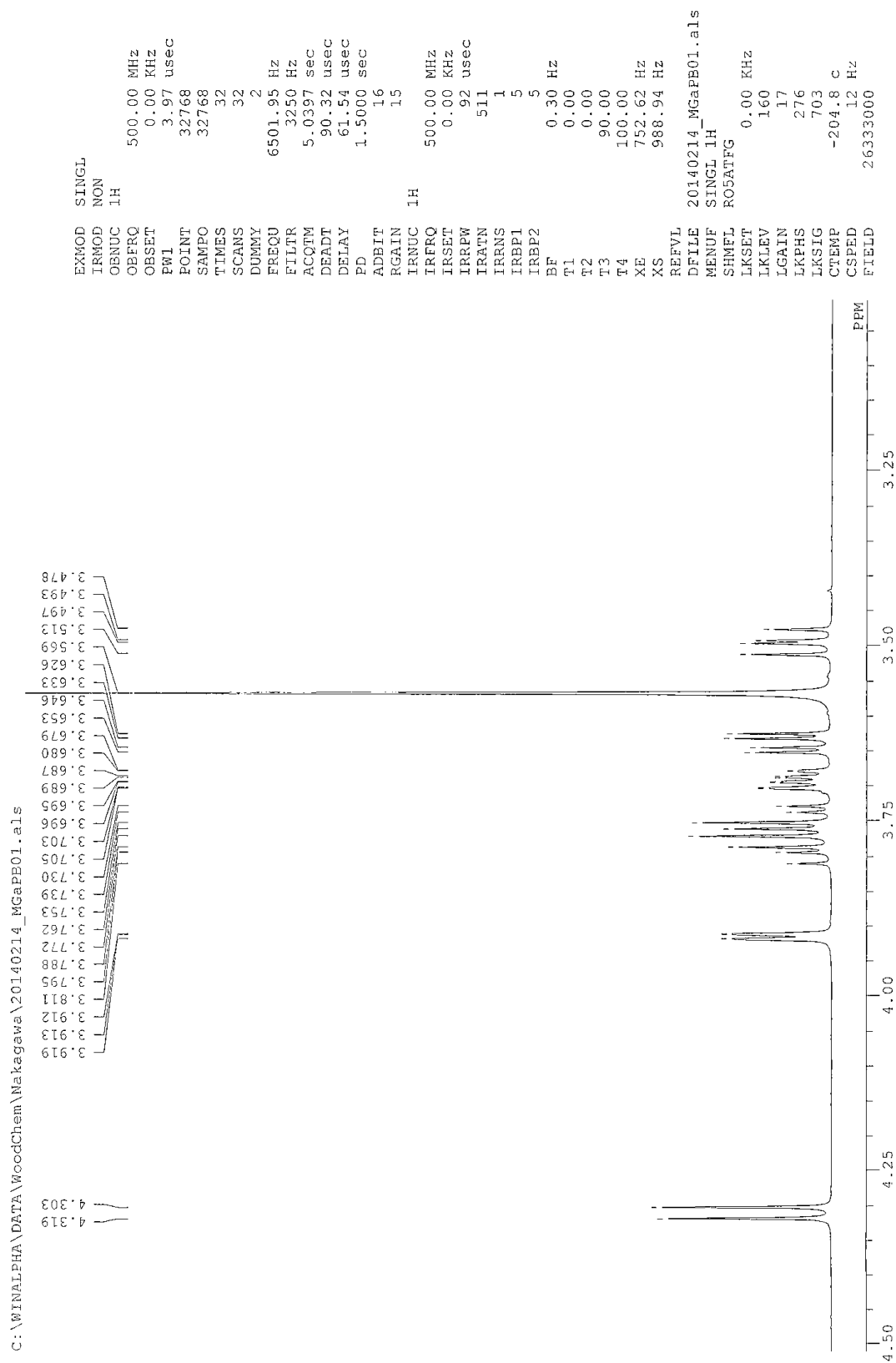


Fig. 2-5 ^1H -NMR spectrum of MGaP in D_2O

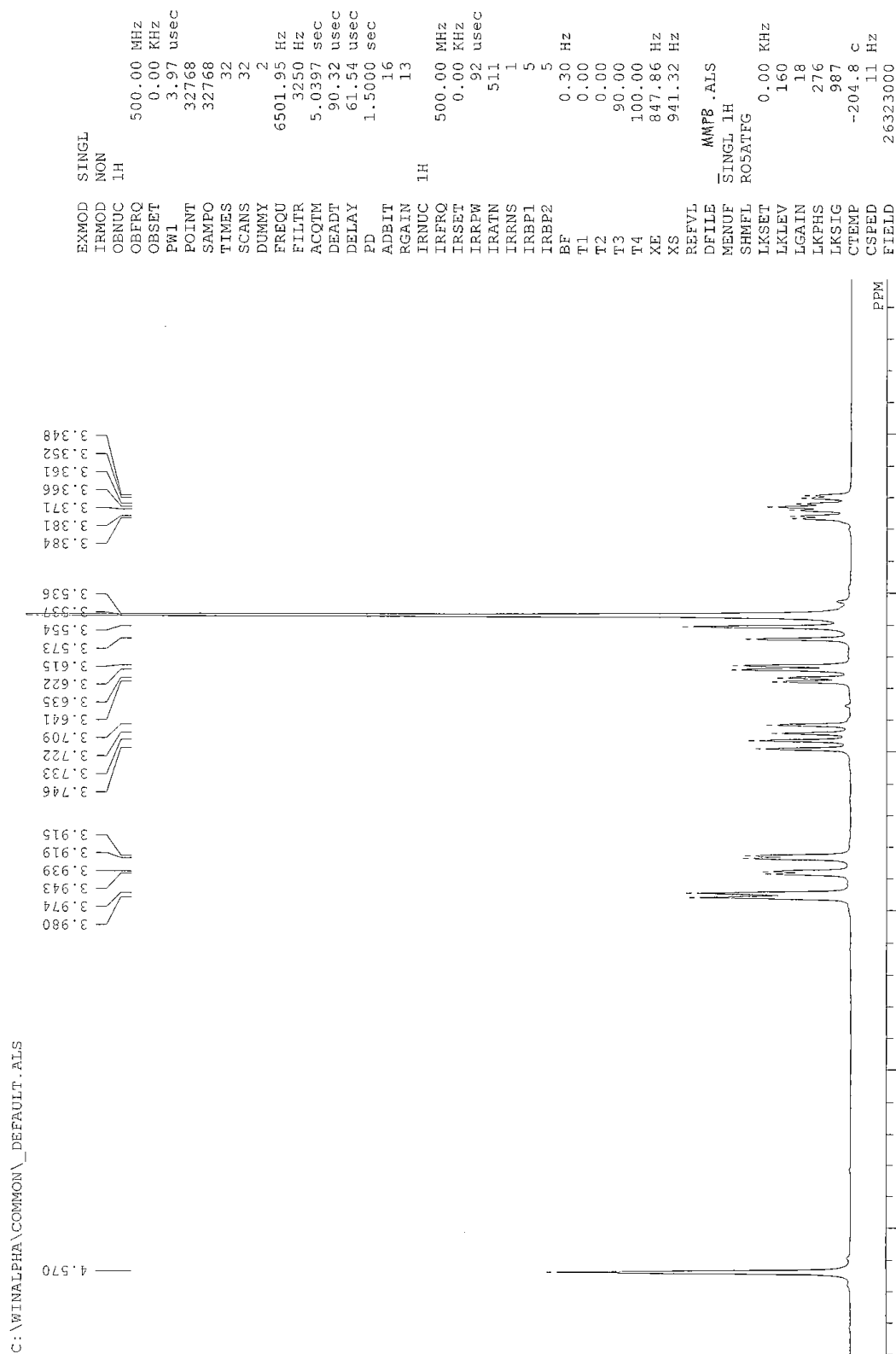


Fig. 2-6 ^1H -NMR spectrum of MMP in D_2O

2.2.1.2 MAP の合成

MAP の合成においては、Weinges らの手法 (Weinges *et al.* 1987) に基づき、光延反応を用いて MGP から合成した (Fig. 2-7)。

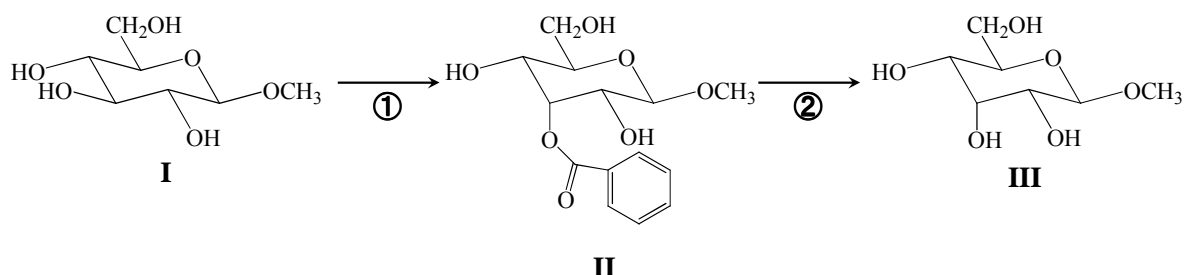


Fig. 2-7 Synthesis route of MAP (Weinges *et al.* 1987)

① MGP の C-3 位における光延反応

MGP 1.00 g (I)、トリフェニルホスフィン (Ph_3P) 6.49 g、安息香酸 3.02g を THF 50 mL に加え、 60°C でアゾジカルボン酸ジエチル (DEAD) 4.31 g を 5 分かけて滴下した後、1 時間反応させた。反応溶液を濃縮し、ベンゼンを適量加えて不溶物を濾別した。濾液の濃縮で得たシロップをジクロロメタンに溶解し、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で 2 回、冷水で 1 回、そして、飽和塩化ナトリウム水溶液で 1 回、順次洗浄した。このジクロロメタン溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、濾別、濃縮そして乾固の後、 P_2O_5 の存在下で真空乾燥した。

② 脱ベンゾイル化

①によって得られたシロップ状の II を、0.1 mol/L $\text{NaOCH}_3/\text{CH}_3\text{OH}$ 溶液 200 mL に加え、 40°C で 3 時間反応させた後、濃縮乾固した。これにジクロロメタンと 0.5 mol/L HCl 水溶液を加え抽出した後、水層に炭酸水素ナトリウムを加えて中性とした。この水層を、陽イオンおよび強塩基性陰イオン交換樹脂にこの順に通過させて脱塩した後、濃縮して MAP (III) のシロップを得た。

③ MAP の精製

②の操作で得られた III にピリジン 30 mL、無水酢酸 50 mL を加え、室温で攪拌しな

がら一昼夜反応させた後、トルエンを加えながら濃縮した。得られた結晶にクロロホルムを加え、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液で 2 回、冷水で 1 回、そして、飽和塩化ナトリウム水溶液で 1 回順次洗浄した。このクロロホルム溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水し、ろ別、濃縮そして乾固の後、真空乾燥した。乾燥後のシロップを 0.1 mol/L NaOCH₃/CH₃OH 溶液に加え、40°C で 3 時間反応させた後、濃縮した。得られたシロップに水を加え、これを陽イオン交換樹脂に通過させて脱塩した後、濃縮して **III** の粗結晶を得た。この粗結晶を、アセトニトリルと水を用いて再結晶し、**III** を得た。収率は、出発物質 **I** に対して 35% であった。MAP の ¹H-NMR スペクトルを、Fig. 2-8 に示す。

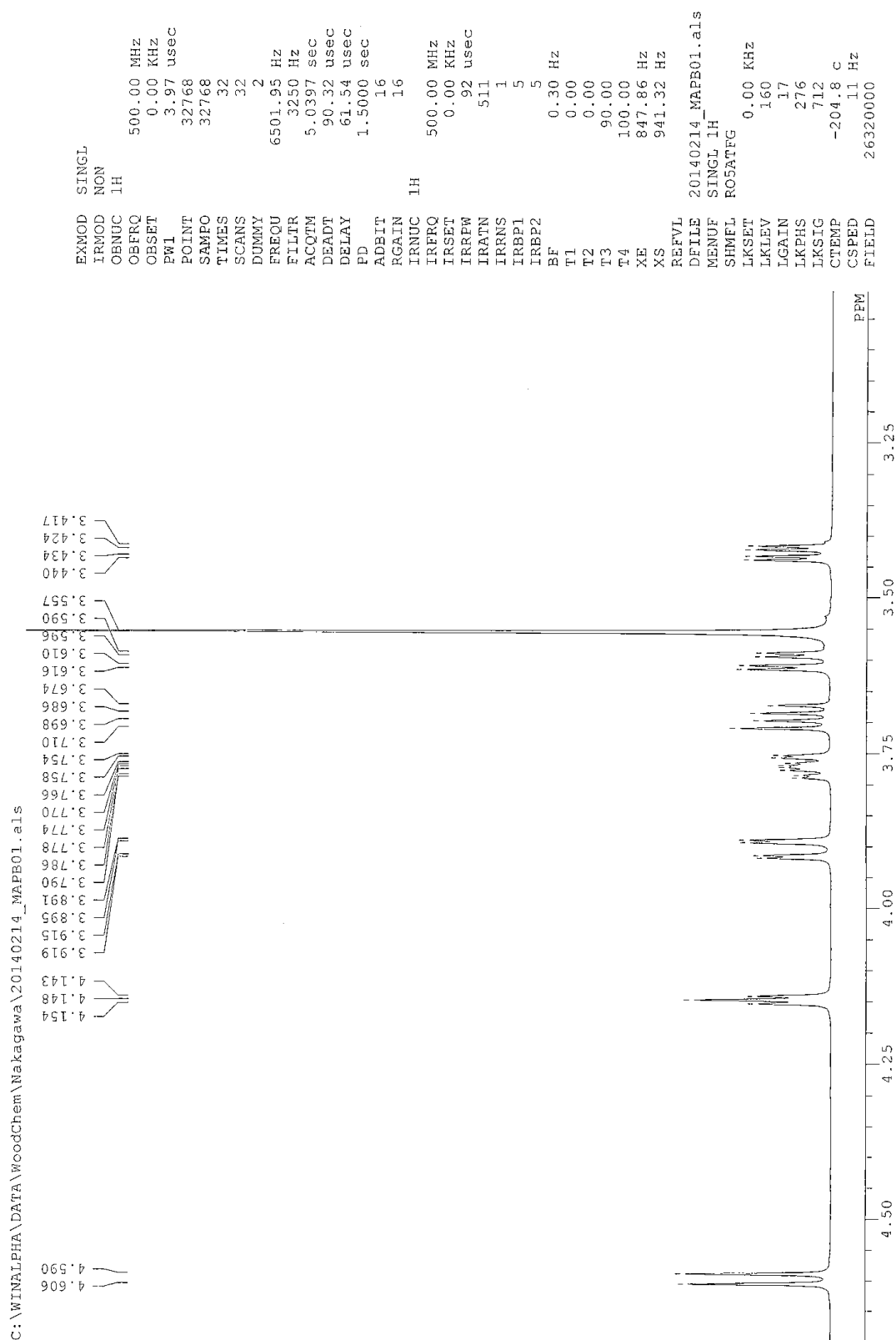


Fig. 2-8 ^1H -NMR spectrum of MAP in D_2O

2.2.2 反応、後処理および分析

2.2.2.1 酸素－アルカリ処理

反応装置

酸素－アルカリ処理は、テフロンコーティングされたステンレス製のオートクレーブ（耐圧硝子工業製）を用いて行った（Fig. 2-9）。この装置は、温度と酸素圧をかけた状態で反応溶液を回収できる仕組みになっている。また、酸素ボンベと直結しているため、反応中に酸素が消費されても、酸素圧が所定圧に保たれるようになっている。

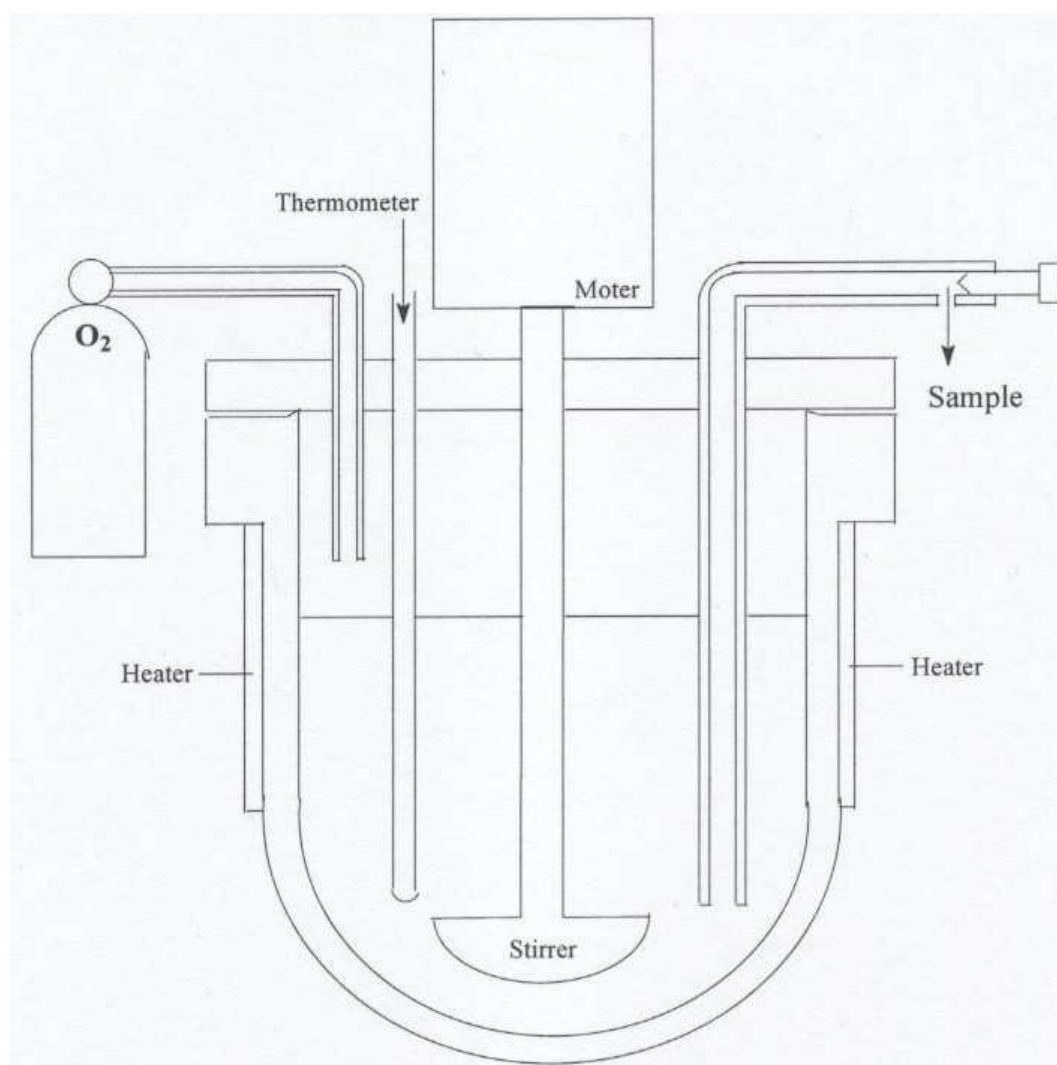


Fig. 2-9 Schematic description of the reaction vessel used in the oxygen-alkali treatment

溶液の調製

NaOH 溶液としては、Aldrich 製の 99.99+% NaOH を超純水に溶かし、10 mol/L 溶液としたものを用いた。FeCl₃ 溶液としては、Aldrich 製の 99.99+% 無水 FeCl₃ 873.9 mg および 37% HCl 2.94 g を超純水に溶かし、300 mL (18 mmol/L、Fe³⁺ として 1000 ppm) としたものを用いた。なお、本研究で用いた超純水は、オルガノ製超純水製造装置 (ピュアリーック Z) で製造した。

反応溶液の調製

反応溶液としては、上述の 10 mol/L NaOH 溶液 15 mL、18 mmol/L FeCl₃ 溶液 6 mL、フェノール性化合物 TPh 367 mg (2.7 mmol)、および、糖モデル化合物 1 種類 233 mg (1.2 mmol) あるいは 2 種類 (それぞれ 233 mg (1.2 mmol)) を超純水に加えて溶液とした後、メスフラスコ中で超純水により 300 mL にメスアップしたものを用いた。これにより、それぞれの濃度は、NaOH 0.5 mol/L、FeCl₃ 0.36 mmol/L、フェノール性化合物 TPh 9 mmol/L、そして、糖モデル化合物 4 mmol/L となった。なお、フェノール性化合物 TPh を加えない系についても実験を行うため、これを加えない溶液も調製した。また、異なるフェノール性化合物を AOS 生成源とした場合についても実験を行うため、TPh ではなくフェノール性化合物 VA 416 mg (2.7 mmol) を加えた溶液も調製した。

反応および残存モデル化合物の定量

反応溶液をオートクレーブに入れた後、オートクレーブ内の空気を酸素で置換した後、酸素圧をゲージ圧で 1.0 MPa (実際の圧力 1.1 MPa) とし、攪拌しながら昇温した。目標温度である 95°C に到達した時点を反応時間 0 分とし (約 10 分後)、6 時間反応を行った。サンプリング時には、酸素圧が下がらないように注意しながら、溶液を採取した。

サンプリング時には、採取管部分に残存する初流約 1~2 mL は捨て、さらに約 2 mL を取り出して直ちに冷却し、メスフラスコにホールピペットで正確に 2 mL 採取した後、酢酸で中和した。これに内部標準である 6 mmol/L *myo*-inositol 溶液 1 mL を加えてから減圧濃縮し、一晩真空乾燥した。真空乾燥後の試料に、無水酢酸 3 mL を入れて 120°C で 3 時間アセチル化を行い、GC で分析を行った。GC の分析条件は、以下の通りとした。

GC の分析条件 (GC-14B 島津製作所製)

カラム : TC-17 (GL サイエンス製、長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m)

キャリアガス : He

昇温条件 : 195°C—(1°C/min)—200°C—(4°C/min)—220°C—(10 min)—220°C (Total 20 min)

インジェクション温度 : 220°C

ディテクター温度 : 230°C

検出器 : FID (Flame Ionization Detector)

2.2.2.2 過酸化水素－アルカリ処理

反応装置

過酸化水素－アルカリ処理は常圧下で行ったため、酸素－アルカリ処理において用いた耐圧反応容器 (Fig. 2-9) ではなく、テフロン製の 50 mL 容ナス型フラスコを用いた。また、湯浴中では塩化ナトリウム水溶液を用いた。

反応溶液の調製

反応溶液としては、2.2.2.1 に記した方法と同様にして調製した 10 mol/L NaOH 溶液 1.5 mL と 18 mmol/L FeCl₃ 溶液 0.6 mL、および、糖モデル化合物 1 種類 23.3 mg (0.12mmol) あるいは 2 種類 (それぞれ 23.3 mg (0.12mmol)) を超純水に加えて溶液とした後、30 mL 容メスフラスコ中で超純水により約 29.8 mL に調整した。これにより、NaOH 約 0.5 mol/L、FeCl₃ 約 0.36 mmol/L、糖モデル化合物約 4 mmol/L、pH \approx 13.5 の反応溶液を得た。

反応および残存量の測定

反応溶液を上記のテフロン製ナス型フラスコに入れた後、攪拌しながら湯浴中で昇温した。反応溶液が目標温度である 95°C に到達した後、過酸化水素 (30%、安定剤なし、和光純薬工業製) を 0.2 mL 加え、系中での過酸化水素濃度を 58.8 mmol/L とした。この時点から反応時間 0 分としてサンプリングを行い、その後も同様に所定の反応時間にサンプリングをして、60 分で反応を終了した。

サンプリング時には、ホールピペットで正確に 2 mL 採ってから NaBH₄ 水溶液に加え、残存し得る過酸化水素を還元して分解した。40 ~ 60 分後、酢酸で酸性にし、内部標準であ

る 6 mmol/L *myo*-inositol 溶液 1 mL を加え、これをエバポレーターで減圧濃縮した。続いて、ホウ素を除去するため、メタノールを加えて減圧濃縮し、この操作を 4 回繰り返した。その後、試料を一晩真空乾燥した。真空乾燥後の試料に、無水酢酸 3 mL を入れて 120°C で 3 時間アセチル化し、GC で分析を行った。GC の分析条件は以下の通りとした。

GC の分析条件 (GC-14B)

カラム：TC-17 (GL サイエンス製、長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μ m)

キャリアガス：He

昇温条件：195°C—(1°C/min)→200°C—(4°C/min)→220°C—(10 min)→220°C(Total 20 min)

インジェクション温度：220°C

ディテクター温度：230°C

検出器：FID (Flame Ionization Detector)

2.3 結果と考察

2.3.1 フェノール性化合物非共存下における糖モデル化合物の酸素－アルカリ処理

序論でも記したように、酸素漂白過程における糖類の分解は、リグニン中のフェノール性部位と酸素との反応によって生成する AOS が引き起こすが、本項ではまず、酸素と反応して AOS の生成源となるフェノール性化合物が共存しない場合に糖モデル化合物が安定かどうかを確認するため、フェノール性化合物を加えずに酸素－アルカリ処理を行った。MGP α に関しては、以前小西らが本研究と同条件下で反応を行っており、6 時間後においてもほとんど分解しないことを報告した (Konishi *et al.* 2009)。

Fig. 2-10 に示すように、MGP は反応開始後 10 分程度までの期間にはわずかに減少したように見えるが、これ以降はほぼ一定で残存率が 96%を下回ることはなかった。MAP および MGaP の場合は、6 時間の反応中ほぼ 100%を維持した。MGP の場合、反応初期にわずかに分解されたが、これは反応容器中に混入した何らかの物質から生成した AOS が引き起こしたのではないかと推測される。これらの結果から、AOS 生成源であるフェノール性化合物の存在しない系においては、酸素－アルカリ漂白条件下で MGP、MAP および MGaP は安定で、ほとんど分解されないことが確認された。したがって、以降の本研究中で観測されるこれらの分解は、共存するフェノール性化合物と酸素との反応によって生成する AOS が引き起こすと結論される。

一方、MMP は酸素圧下では少量ではあるが徐々に分解し、6 時間後の残存率は約 91%であった (Fig. 2-10)。しかし、酸素ではなく窒素圧下の反応では非常に安定であり、6 時間後でも分解が観測されなかった (Fig. 2-11) ことから、酸素圧下での反応の場合、フェノール性化合物のような酸素と反応して AOS を生成する物質が共存しなくても、MMP は本実験条件下で多少分解されることが分かった。C-2 位の水酸基がアキシアル位に存在すると他の位置とは異なり、わずかではあるが、糖モデル化合物を酸素と反応しやすくするのも知れない。しかし、ここで観測された MMP の分解はわずかであって、以降の本研究中で観測される MMP の分解と比較すると重要でないことは、明らかである。したがって、以降の本研究中における MMP の分解も他の糖モデル化合物の分解と同様に、共存するフェノール性化合物と酸素との反応で生成する AOS によって引き起こされる、と考えらよう。

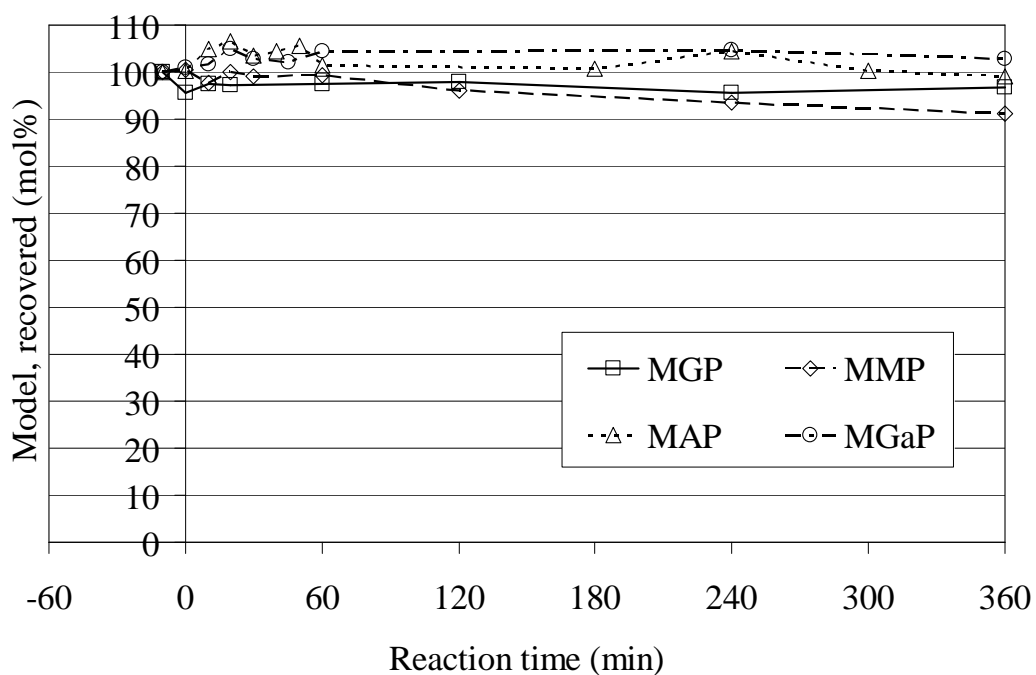


Fig. 2-10 Change in the yields of carbohydrate model compounds in the absence of phenolic compound during oxygen-alkali treatments

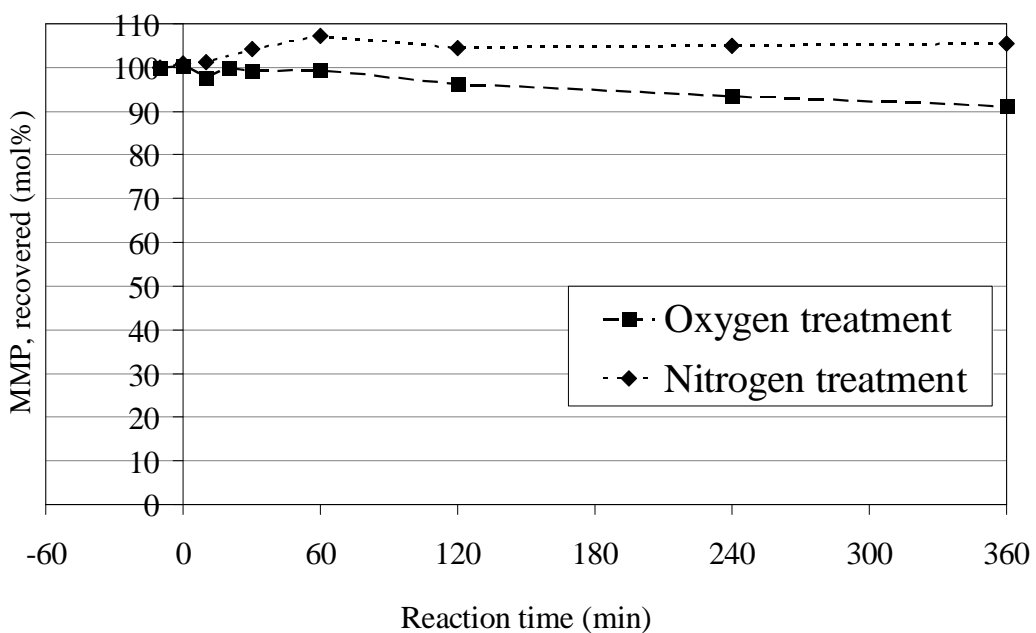


Fig. 2-11 Change in the yields of MMP in the absence of phenolic compound during oxygen- and nitrogen-alkali treatments

2.3.2 フェノール性化合物共存下における糖モデル化合物 1 種類の酸素－アルカリ処理

糖モデル化合物の各炭素における立体配置の相違が、TMPH と酸素との反応で生成する AOS と糖モデル化合物との反応にどう影響するのかについて検討するため、いずれかの糖モデル化合物 1 種類と TMPH とを共存させて酸素－アルカリ処理を行った。その結果を、Fig. 2-12 に示す。AOS 生成源である TMPH は、全ての反応系において反応時間 45 分までに全て消失した。AOS との反応性は MAP、MGaP、MMP、MGP そして MGP α の順に低くなり、中でも MAP は非常に激しく分解された (Fig. 2-12)。

これらの糖モデル化合物の分解挙動は類似しており、TMPH 消失時 (反応時間約 45 分) までの反応初期に急速に、その後 (反応時間約 45 分以降) は穏やかに分解されることが分かる。なお、これ以降の本論文での酸素－アルカリ処理に関する記述においては、前者および後者の期間をそれぞれ phase 1 および phase 2 と記す。phase 1 の詳細については、2.3.4 で説明する。この上記の現象は、Olm らも観測しており (Olm *et al.* 1979)、phase 1 では、TMPH と酸素との反応から速やかに生成する AOS の攻撃によって、糖モデル化合物が分解されと考えられる。phase 2 では、系中に残存する過酸化物の分解によって生じる AOS や、糖モデル化合物や分解生成物の間におけるラジカル連鎖反応によって、分解が穏やかに進行すると考えられる。

続いて、反応系中で働く AOS を $O_2^{\bullet-}$ のみに限定するために、TMPH を加えずに常圧下で糖モデル化合物 1 種類の過酸化水素－アルカリ処理を行った。その結果を、Fig. 2-13 に示す。過酸化水素－アルカリ処理では、AOS として $O_2^{\bullet-}$ のみではなくスーパーオキシドアニオンラジカル ($O_2^{\bullet-}$)、そして、連鎖的分解によって生成する糖モデル化合物由来の過酸化物ラジカル等も生成する、と考えられる。しかし次の 2 点から、すなわち、 $O_2^{\bullet-}$ の糖モデル化合物酸化能が低いこと、および、常圧の反応であるため、糖モデル化合物の分解における連鎖的分解の寄与が極めて小さく、後者の生成を考慮する必要がないことから、本過酸化水素－アルカリ処理において糖モデル化合物を分解可能な AOS が $O_2^{\bullet-}$ のみであると考えられることは、合理的であろう。Fig. 2-13 からわかるように、どの糖モデル化合物の分解も、反応時間 5 分までに終了した。したがって、 $O_2^{\bullet-}$ との反応性は、酸素－アルカリ処理の場合と同様に、MAP、MGaP、MMP、MGP そして MGP α の順に低くなり、MAP は非常に分解されやすいことが明らかにされた。なお、一部の反応溶液を硫酸酸性下でヨウ化カリウムと反応させ、続いてチオ硫酸ナトリウムによって遊離したヨウ素を滴定

することによって、反応溶液の酸化能に基づいて過酸化水素の残存量を調べたところ、反応時間 5 分までの間に全ての過酸化水素が消失したことが確認された。本研究室の石川は、本実験に近い条件下で過酸化水素の分解挙動を調べ、過酸化水素を添加してから少なくとも 5 分後には、これが全て分解して消失することを示した (石川 2011)。したがって、本実験系においても、反応の初期で全ての過酸化水素が分解し、糖モデル化合物の分解も完了したと考えられる。

本研究における過酸化水素－アルカリ処理では、反応溶液のサンプリング後にも過酸化水素が残存し、溶液中の糖モデル化合物を分解する可能性が考えられた。この過酸化水素を速やかに分解するため、サンプリングした反応溶液には直ちに水素化ホウ素ナトリウムを加え、45～60 分間反応させた。もし、反応溶液中に糖モデル化合物の水酸基が酸化されて生成するカルボニル基を持つ化合物が存在すれば、これは水素化ホウ素ナトリウムによって還元され、元の糖モデル化合物か、あるいは、カルボニル基の存在した位置が反転した元の糖モデル化合物のエピマーが、生成すると考えられる。しかし、例えば **MGP** を用いた反応においては、いずれかの位置が反転したエピマーに当たる **MMP**、**MAP** あるいは **MGaP** はまったく検出されなかった。したがって、反応溶液中には、この類のカルボニル基を持つ化合物は存在しないことが、確認された。この類の化合物は、もし生成したとしてもアルカリ性下で非常に不安定であるため、速やかに炭素数の小さい化合物に分解されることが考えられる。

酸素－および過酸化水素－アルカリ処理の結果から、糖モデル化合物の各炭素における立体配置の相違が **AOS** との反応に影響を及ぼすこと、そして、**MAP** の反応性から、**C-3** 位の水酸基がアキシアル位に存在すると、 O^\cdot を含む **AOS** によって非常に分解されやすくなること、が示唆された。Hearne らは、フェノール性化合物非共存下で **methyl β -D-ribose** および **methyl β -D-xylopyranoside** を高温の酸素－アルカリ処理に供し、前者の方が後者より分解されやすいことを示した (Hearne *et al.* 1991)。この反応では、これらの糖モデル化合物は初期反応としてまず酸素、あるいは、系中に混入した何らかの酸化剤によって酸化され、これに伴ってラジカル連鎖反応が開始する。したがって、この反応における糖モデル化合物の分解は、主にラジカル連鎖反応によって引き起こされる、と考えることができよう。なお、**methyl β -D-ribose** では **C-3** 位の水酸基がアキシアル位に存在するが、この Hearne らの結果と上記の本研究の結果とあわせて考えると、**C-3** 位の水酸基が

アキシアル位に存在する糖モデル化合物は、 $\text{O}\cdot$ を含む様々な AOS によって分解されやすいことが、示唆される。しかし、C-3 位の水酸基がアキシアル位に存在する MAP が AOS によって攻撃されやすい理由を、本研究で得た結果のみで合理的に説明することはできない。MAP のグリコン部位を形成する D-allose については、ESR を用いた分析によって、AOS の生成を抑制し、なおかつ、AOS を捕捉する能力を有することが報告されているが (Murara *et al.* 2003)、その機構に関しては推定されていない。

AOS との反応において、糖モデル化合物はいずれかの C-H 結合から水素を引き抜かれると考えられるが、その際、その C-H 結合の炭素は sp^3 から sp^2 混成軌道に変化する。このとき、糖モデル化合物の 6 員環は歪むが、いずれかの水酸基がアキシアル位に存在する場合、全ての水酸基がエクアトリアル位に存在する MGP と比較すると、環が歪みやすいと予想される。これが、MGP が他の糖モデル化合物よりも AOS との反応に対して抵抗性を持つことの原因の一つと、考えられよう。MGP の方が $\text{MGP}\alpha$ よりも分解されやすいことは、 $\text{MGP}\alpha$ の方が熱力学的に安定であることに起因する可能性が考えられる。水素引き抜き反応に限らず、酸加水分解反応やアルカリ加水分解反応等多くの化学反応において、MGP の方が $\text{MGP}\alpha$ よりも分解されやすいことが知られているが、これらも一般的に、 $\text{MGP}\alpha$ の方が熱力学的に安定であることで説明されている。

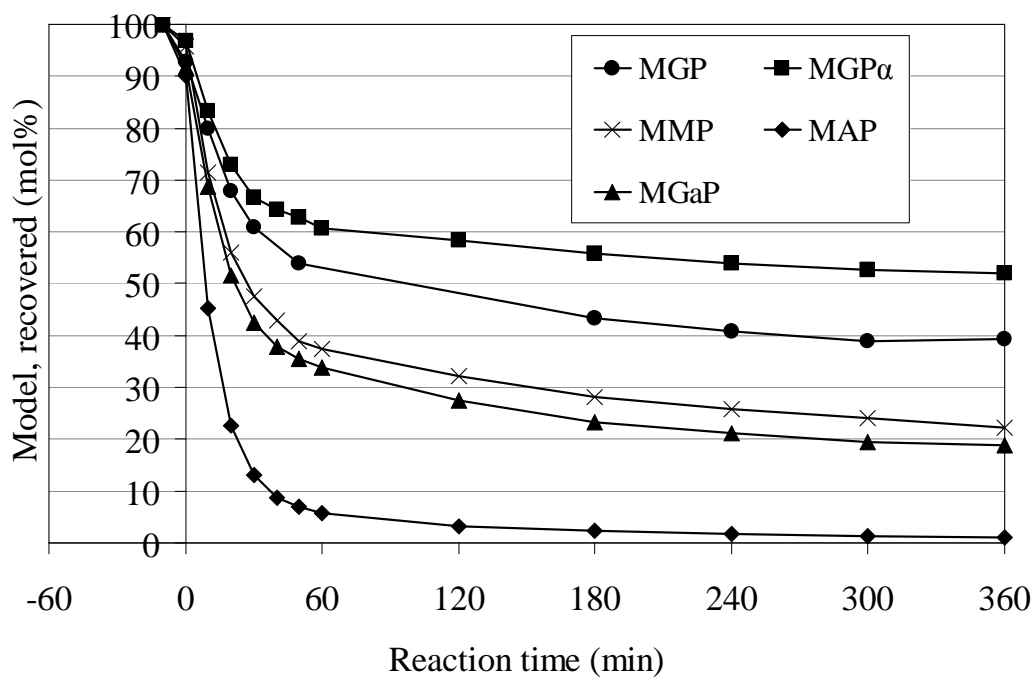


Fig. 2-12 Change in the yields of carbohydrate model compounds in the presence of TMPH during oxygen-alkali treatments when each compound was solely treated

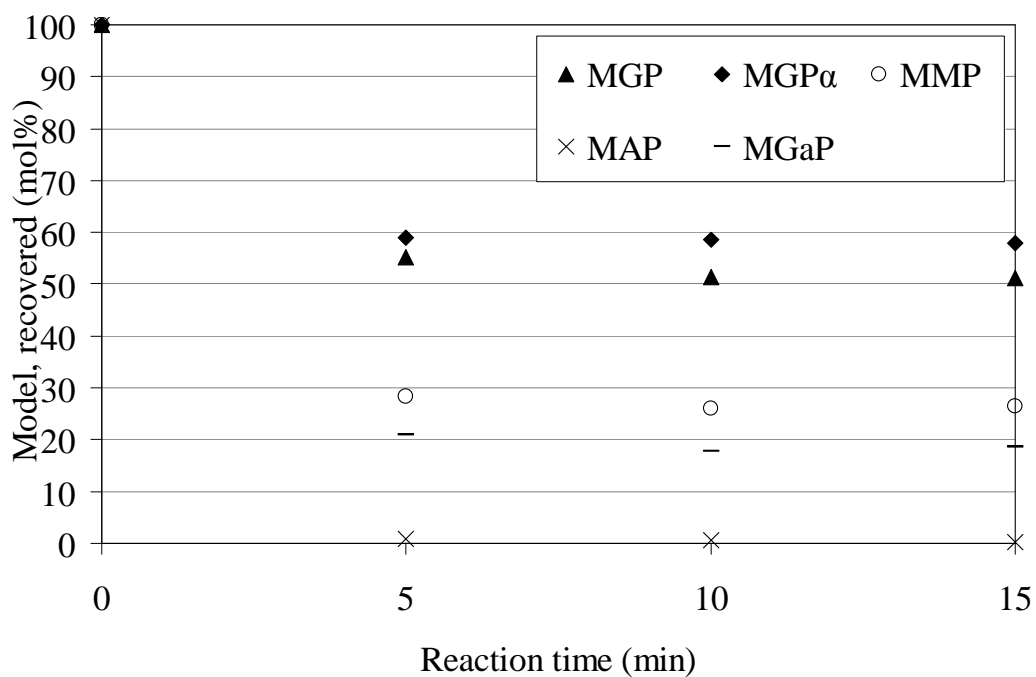


Fig. 2-13 Change in the yields of carbohydrate model compounds during alkaline hydrogen peroxide treatments when each compound was solely treated

2.3.3 フェノール性化合物共存下における糖モデル化合物 2 種類の酸素－アルカリ処理

2.1 で記述した通り、小西らは、糖モデル化合物として MGP および MGP とはアノマー位の立体配置が異なる MGP α の 2 種類を用い、AOS 生成源としてフェノール性化合物である TMPH を共存させて、酸素－アルカリ処理を行った (Konishi *et al.* 2009)。これを 2.3.2 で得られた結果、すなわち、糖モデル化合物として MGP あるいは MGP α の 1 種類を用い、TMPH 共存系で酸素－アルカリ処理を行った場合と比較すると、MGP α の分解はほぼ同様であったが、MGP α の共存は MGP の分解を抑制した。これらのことから、糖モデル化合物 2 種類を用いて反応を行った場合、それぞれの分解へ他方の存在が影響を及ぼす可能性が考えられた。また、アノマー位以外の立体配置の異なる糖モデル化合物を用いた場合においても、同様の現象が現れる可能性が考えられた。

そこで本項では、酸素漂白条件下で、共存する 2 種類の糖モデル化合物を AOS と反応させた場合に、一方の糖モデル化合物の存在が他方の糖モデル化合物の分解に及ぼす影響について、検討を行った。実験としては、MGP を含む糖モデル化合物 2 種類、すなわち、MGP および MMP、MGP および MAP、あるいは、MGP および MGaP を共存させ、TMPH を AOS 生成源として用いた酸素－アルカリ処理を行い、これら 2 種類の糖モデル化合物の分解挙動を詳しく調べた。なお、MGP および MGP α を共存させた反応については、小西らのデータを用いた。これらの反応では、セルロースモデル化合物である MGP の分解と比較することを目的としたため、MGP は全ての反応で使用した。

上記の反応における糖モデル化合物の分解挙動を、Fig. 2-14 ~ 2-22 に示す。それぞれの反応系において、昇温開始時を -10 分として 2 回分の実験結果をプロットし、それらと最も合致するような近似曲線を描いた (Fig. 2-14、15、17、18、20 および 21)。MGP/MMP 共存系におけるこれらの近似曲線を Fig. 2-16 に、MGP/MAP 共存系におけるこれらの近似曲線を Fig. 2-19 に、そして、MGP/MGaP 共存系におけるこれらの近似曲線を Fig. 2-22 に、それぞれ示す。なお、MGP/MGP α 共存系におけるこれらの分解のデータは小西らのものを用いるので、これらの近似曲線としては Fig. 2-2 を参照する。

各反応系において、前項での反応と同様に、AOS 生成源である TMPH は、全ての反応系において phase 1 (45 分まで) の間に全て消失し、糖モデル化合物は phase 1 では急速に、そして、phase 2 (45 分以降) では穏やかに分解された。

phase 2 における糖モデル化合物の分解挙動に注目すると、MGP/MGP α 共存系、

MGP/MMP 共存系、および、MGP/MGaP 共存系では、両糖モデル化合物の分解差がほぼ一定であるのに対し、MGP/MAP 共存系では、約 270 分から MGP の分解が速くなった。

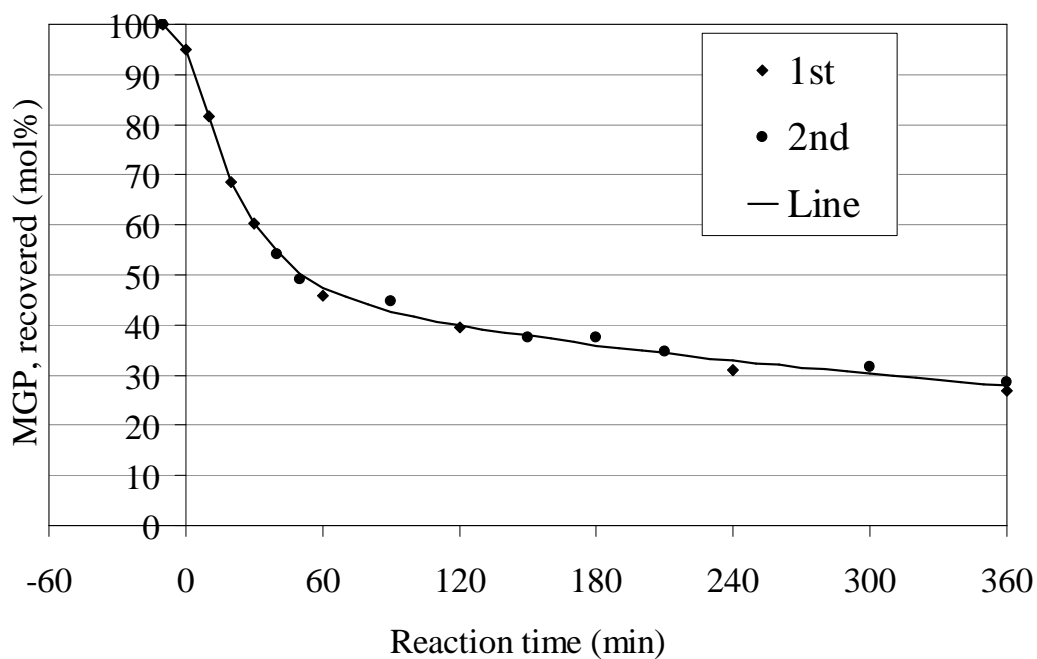


Fig. 2-14 Change in the yield of MGP and its best-fit curve when MGP, MMP, and, TPh were reacted together

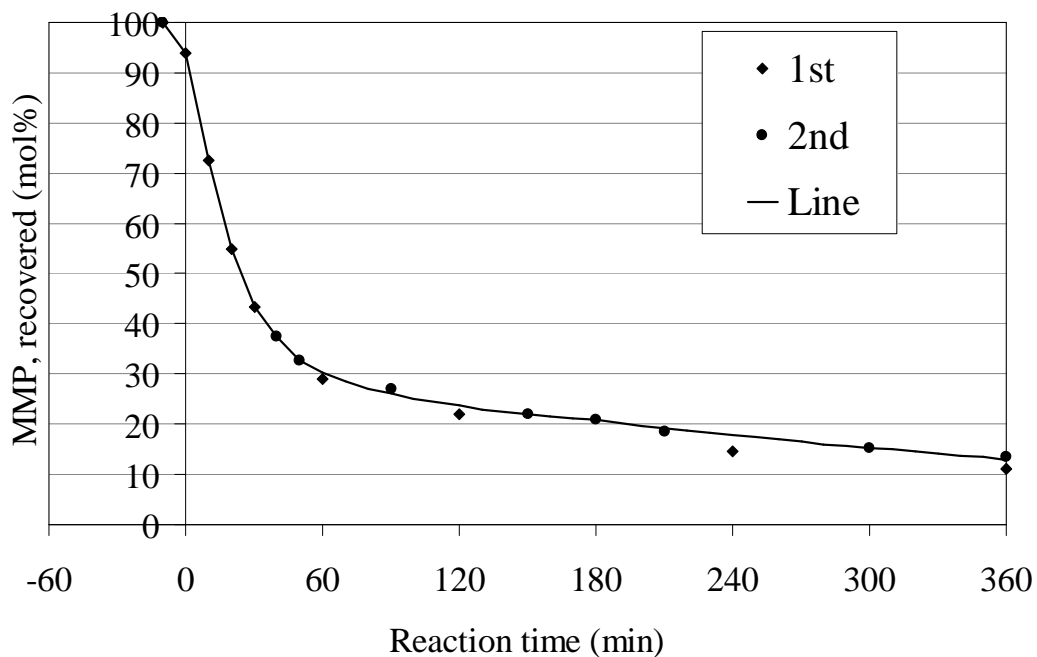


Fig. 2-15 Change in the yield of MMP and its best-fit curve when MGP, MMP, and, TPh were reacted together

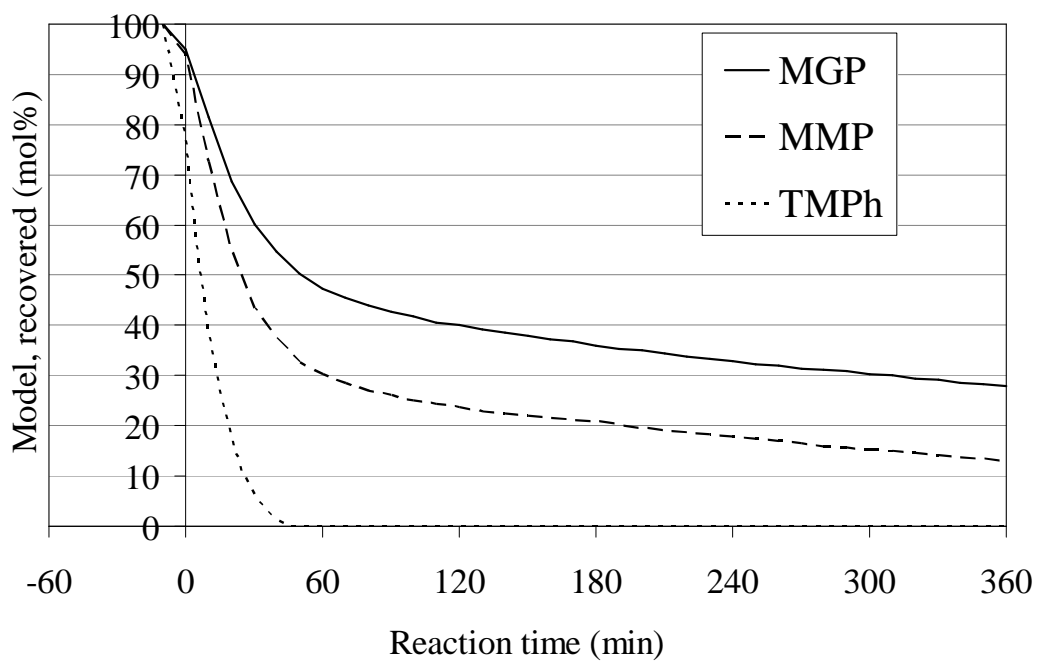
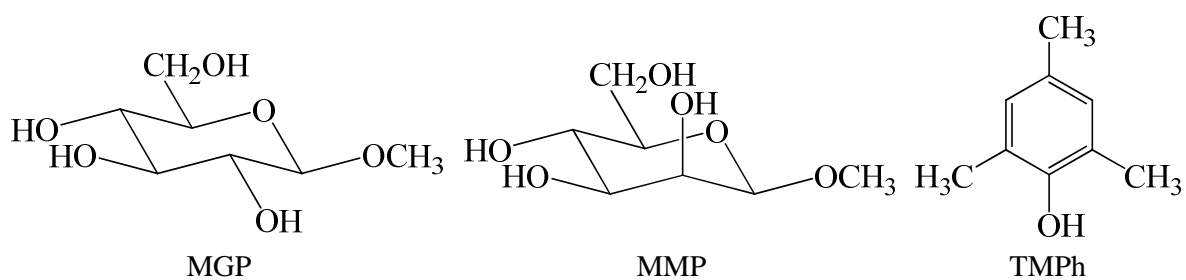


Fig. 2-16 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP, MMP, and, TMPh when these compounds were reacted together

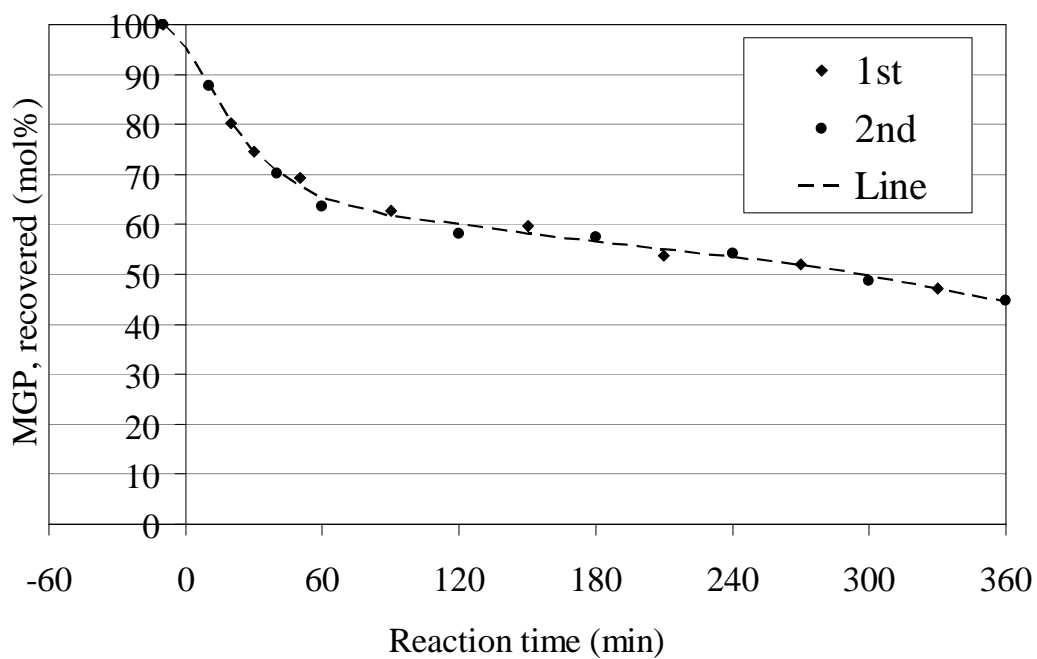


Fig. 2-17 Change in the yield of MGP and its best-fit curve when MGP, MAP, and, TMPH were reacted together

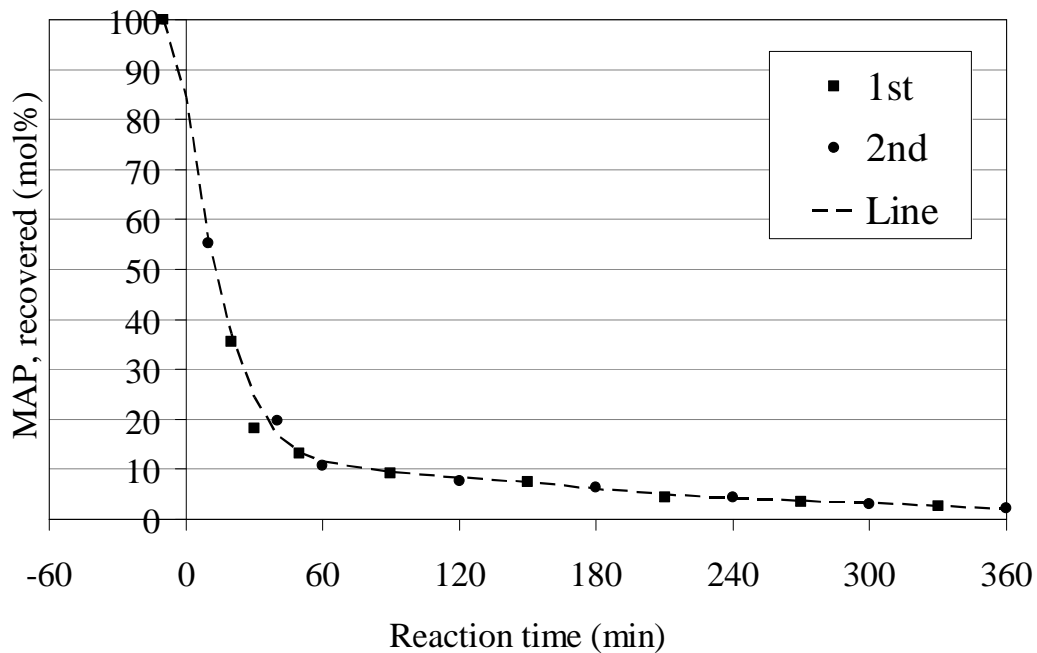


Fig. 2-18 Change in the yield of MAP and its best-fit curve when MGP, MAP, and, TMPH were reacted together

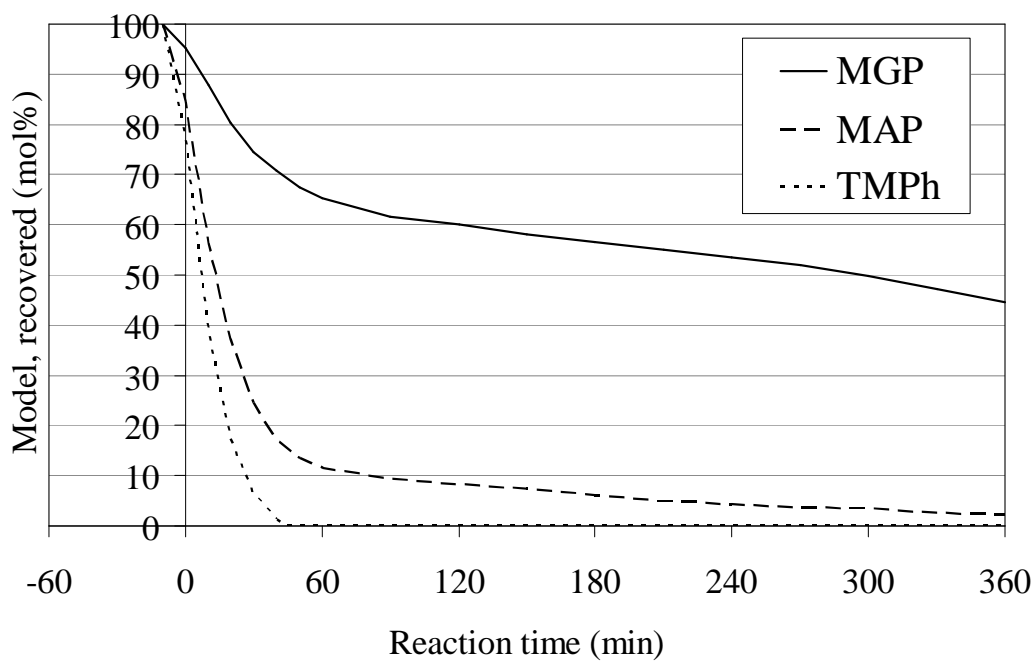
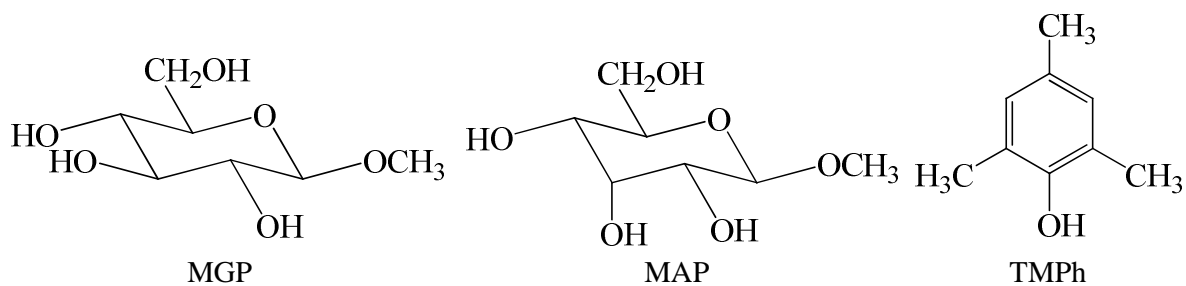


Fig. 2-19 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP, MAP, and, TMPh when these compound were reacted together

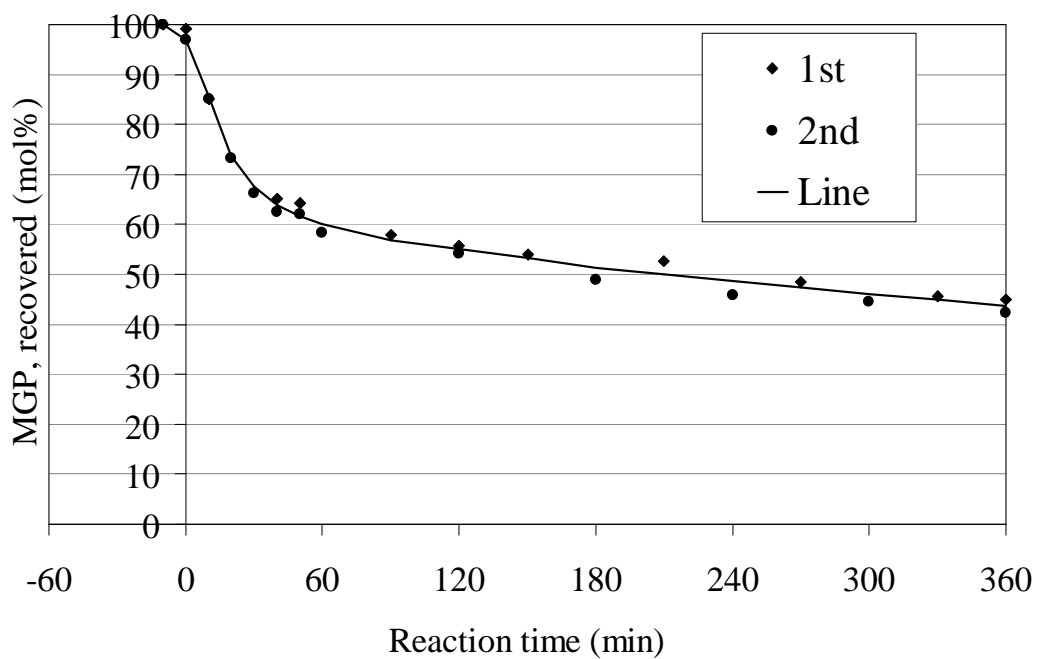


Fig. 2-20 Change in the yield of MGP and its best-fit curve when MGP, MGaP, and, TMPH were reacted together

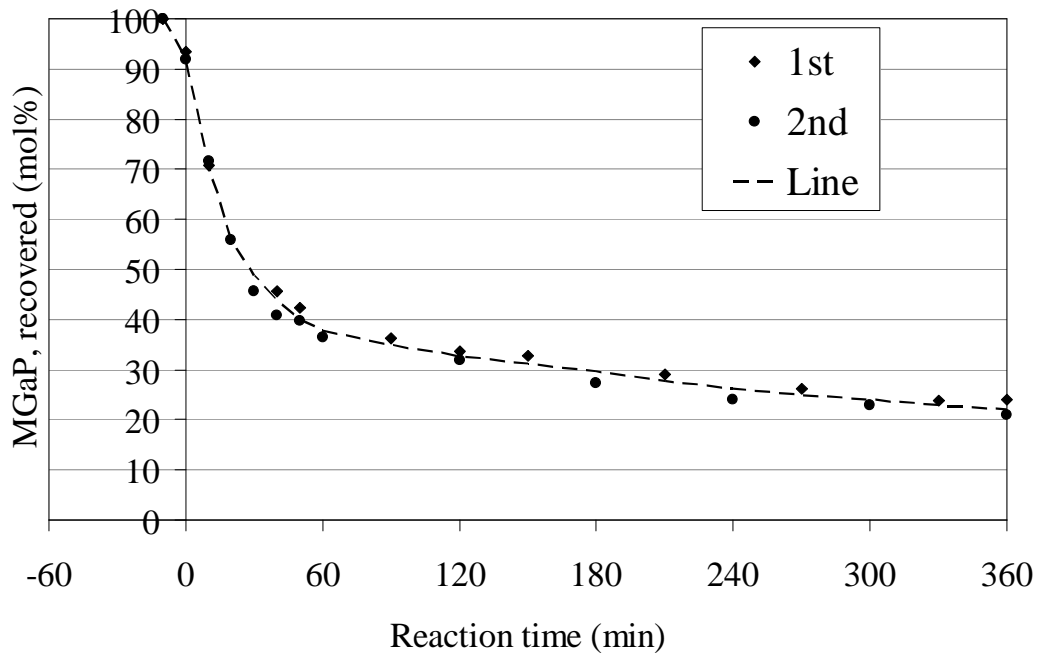


Fig. 2-21 Change in the yield of MGaP and its best-fit curve when MGP, MGaP, and, TMPH were reacted together

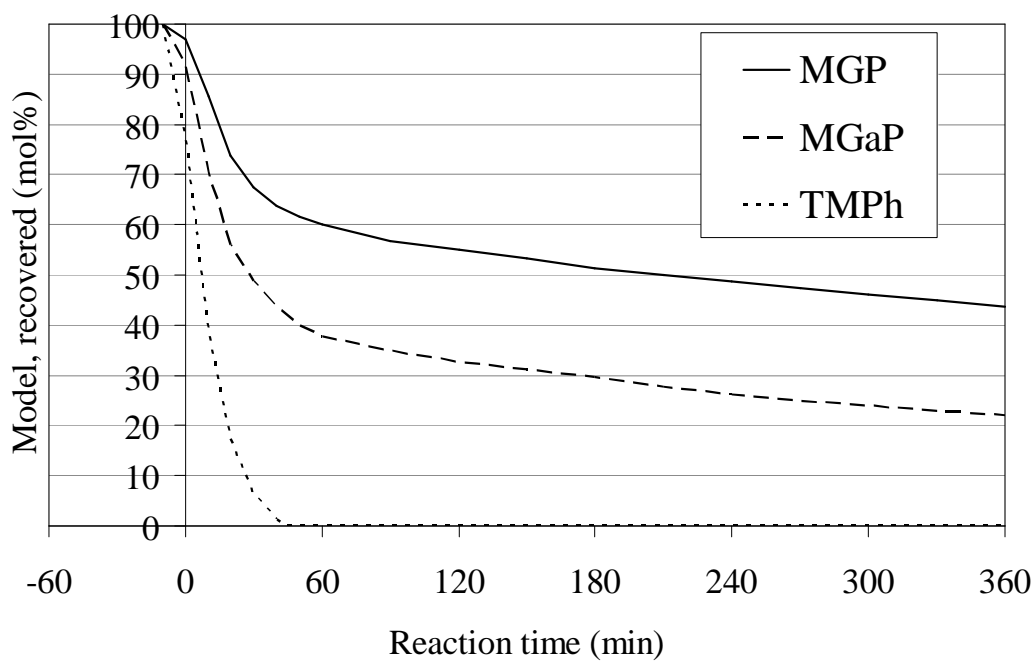
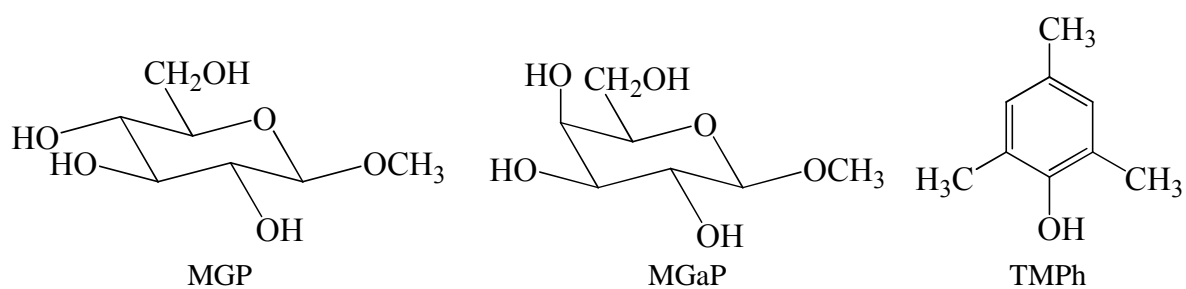


Fig. 2-22 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP, MGaP, and, TMPh when these compounds were reacted together

Fig. 2-23 に、TMPh 共存系で行った反応における MGP の分解挙動を、まとめて示す。これによって、糖モデル化合物として MGP を単独で用いた反応と、MGP およびもう 1 つの糖モデル化合物 MGP α 、MMP、MAP あるいは MGaP の共存下での反応とを比較することが可能であり、MGP 以外の糖モデル化合物の共存が MGP の分解に及ぼす影響について、検討することができる。Fig. 2-23 からわかるように、MGP と MMP を共に反応させた場合にのみ、MGP を単独で反応させた場合よりも MGP の分解が促進され、その他を共存させた場合には、MGP の分解は抑制された。これらの結果は、共存糖モデル化合物の影響として、以下の 2 つの現象のどちらがより大きいのか、によって説明され得ると考えられる。すなわち、共存糖モデル化合物の影響として AOS との反応において競合が起こるため、糖モデル化合物の分解が抑制される程度、あるいは、糖モデル化合物の分解に伴って新たな AOS が生成し、これらが糖モデル化合物を分解するため、糖モデル化合物の分解が促進される程度、の 2 つのどちらがより大きいのか、によって説明され得る。なお、新たに生成する AOS が糖モデル化合物を分解し難い化学種である可能性が考えられるが、これは後者の影響が小さい場合として理解し得よう。これらのことから、MMP を共存させた場合にのみ後者の影響の方が大きく、MMP 以外の糖モデル化合物の共存では、前者の影響の方が大きい可能性が、考えられる。MMP、すなわち、C-2 位の水酸基がアキシアル位に存在する場合にだけ後者の影響が大きくなる理由は不明であるが、上記の結果は、糖モデル化合物の立体配置が異なると、その分解過程で生成する AOS の量や種類が異なることを、示唆する。

Fig. 2-24 および 2-25 に、TMPh 共存系で行った反応における MGP α 、MMP、MAP および MGaP の分解挙動をまとめて示す。これらによって、MGP 以外の糖モデル化合物の単独での反応と、MGP 共存下でのこれらの反応とを比較することが可能となり、MGP の共存がこれらの分解に及ぼす影響について、検討することができる。MGP α の分解は、MGP を共存させても変化しなかった (Fig. 2-24)。MMP の分解は、MGP の共存により促進された (Fig. 2-24)。一方、MAP および MGaP の分解は、MGP の共存により抑制された (Fig. 2-25)。前述したように、これらの結果は、上記の 2 つの現象、すなわち、MGP の共存による AOS との反応への競合に起因する分解の抑制、および、MGP の分解に伴う AOS の生成に起因する分解の促進、の影響の大小によって説明され得ると考えられる。したがって、MGP が共存すると、MGP α の分解に対してはこれら 2 つの現象が同程度に、MMP の

分解に対しては後者の方がより大きく、そして、MAP および MGaP の分解に対しては前者の方がより大きく、影響すると考えられる。MGP α の共存は MGP の分解を抑制したので、これらの共存系でのみ、一方の共存が他方の分解に及ぼす影響がそれぞれで異なる。これらの結果は前述したように、糖モデル化合物の立体配置が異なると、その分解過程で生成する AOS の量や種類が異なることを、示唆する。

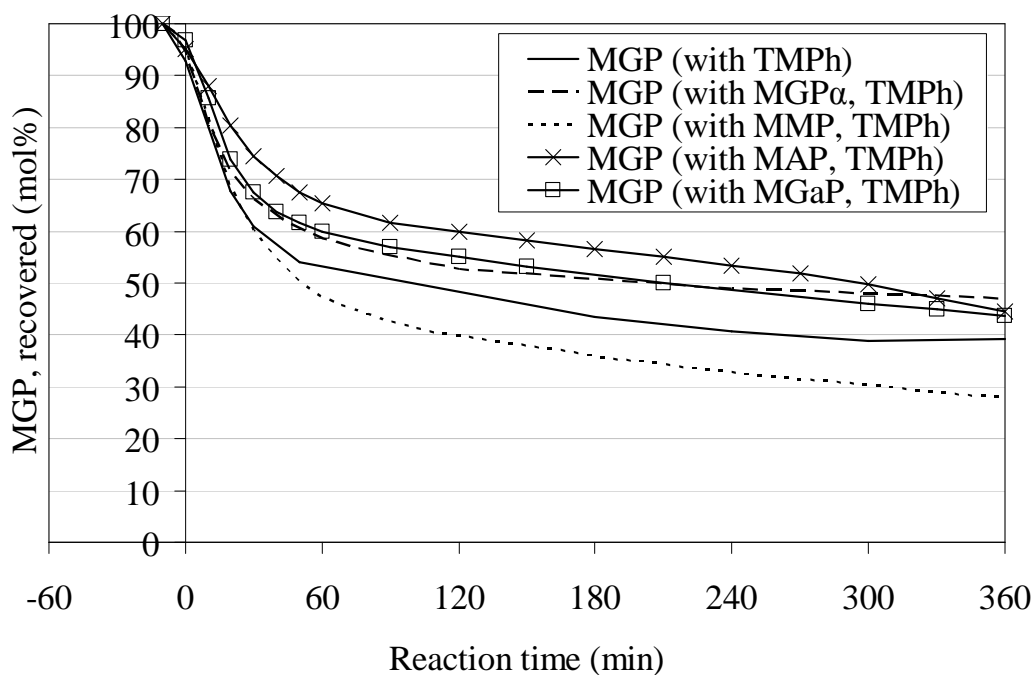


Fig. 2-23 Change in the yields of MGP when MGP was treated only with TPh or both with another carbohydrate model compound and TPh

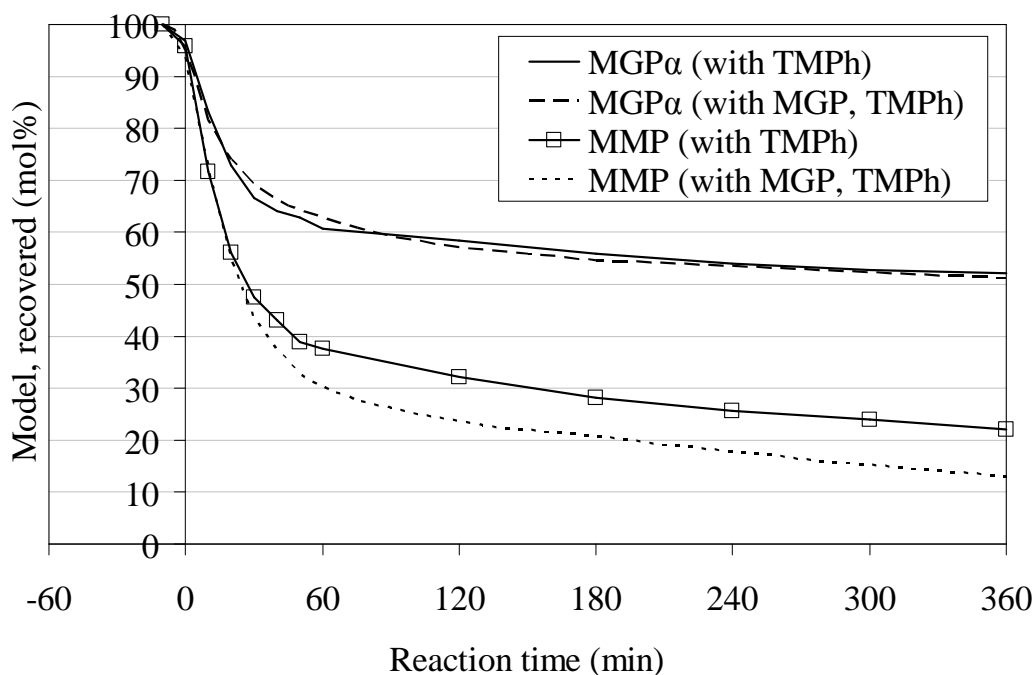


Fig. 2-24 Change in the yields of MGPa and MMP when each of these compounds was treated only with TPh or both with MGP and TPh

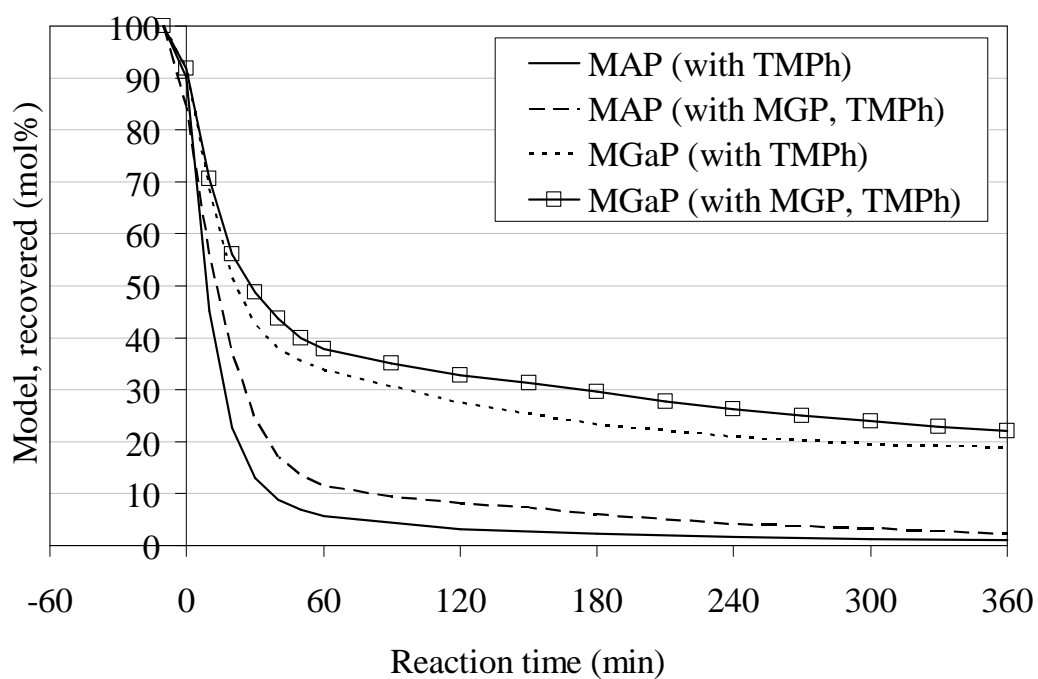


Fig. 2-25 Change in the yields of MAP and MGaP when each of these compounds was treated only with TPh or both with MGP and TPh

2.3.4 異なるフェノール性化合物を AOS 生成源とした酸素－アルカリ処理

1.2.1 でも記述したように、安本らは、AOS 生成源として異なるフェノール性化合物を用いて酸素－アルカリ処理を行うと、共存糖モデル化合物の分解に相違が現れることを報告した (Yasumoto *et al.* 1996)。そこで本項では、AOS 生成源としてこれまで用いた TMPH ではなく VA を用いて酸素－アルカリ処理を行い、糖モデル化合物の分解を TMPH 共存系における分解と比較した。なお本項では、前項と同じ MGP を含む糖モデル化合物 2 種類を用いて反応を行った。

上記の VA を AOS 生成源とした酸素－アルカリ処理における糖モデル化合物の分解挙動を、Fig. 2-26 ～ 2-37 に示す。それぞれの反応系において、昇温開始時を -10 分として複数回分の実験結果をプロットし、それらと最も合致するような近似曲線を描いた (Fig. 2-26、27、29、30、32、33、35 および 36)。MGP/MGP α 共存系におけるこれらの近似曲線を Fig. 2-28 に、MGP/MMP 共存系におけるこれらの近似曲線を Fig. 2-31 に、MGP/MAP 共存系におけるこれらの近似曲線を Fig. 2-34 に、そして、MGP/MGaP 共存系におけるこれらの近似曲線を Fig. 2-37 に、それぞれ示す。

前項で検討した MGP を含む糖モデル化合物 2 種類を、TMPH を AOS 生成源として用いた酸素－アルカリ処理に供した場合と同様に、MGP α は MGP よりも遅く、そして、MMP、MAP および MGaP は MGP よりも速く分解された。同様に、MAP の分解は激しかった。また、AOS 生成源である VA は、全ての反応系において 90 分までに全て消失し、糖モデル化合物は phase 1 (90 分まで) では急速に、そして、phase 2 (90 分以降) では穏やかに分解された。phase 2 における糖モデル化合物の分解に注目すると、全ての反応系において、両糖モデル化合物の分解量の差がほぼ一定であった。phase 2 における糖モデル化合物の分解を TMPH 共存系と VA 共存系との間で比較すると、どの糖モデル化合物も、TMPH 共存系の方がより分解された。2.3.2 でも記したように、phase 2 における糖モデル化合物の分解は、系中に残存する過酸化物の分解によって生じる AOS や、糖モデル化合物や分解生成物の間におけるラジカル連鎖反応等によって進行する、と考えられる。したがって、TMPH 由来の分解生成物は VA 由来の分解生成物と比較すると、過酸化物として残存しやすい性質、あるいは、ラジカル連鎖反応を引き起こしやすい性質を有する可能性が、考えられる。なお、以前に横山らは、糖モデル化合物として MGP のみを用い、本実験と同じ条件下で酸素－アルカリ処理を行った結果として、TMPH 消失直後の反応溶液

中には、二重結合や芳香核を持つ分解生成物が全く存在しないことを、報告した (Yokoyama *et al.* 1999)。

phase 1 における糖モデル化合物の分解の詳細については、この後に考察する。

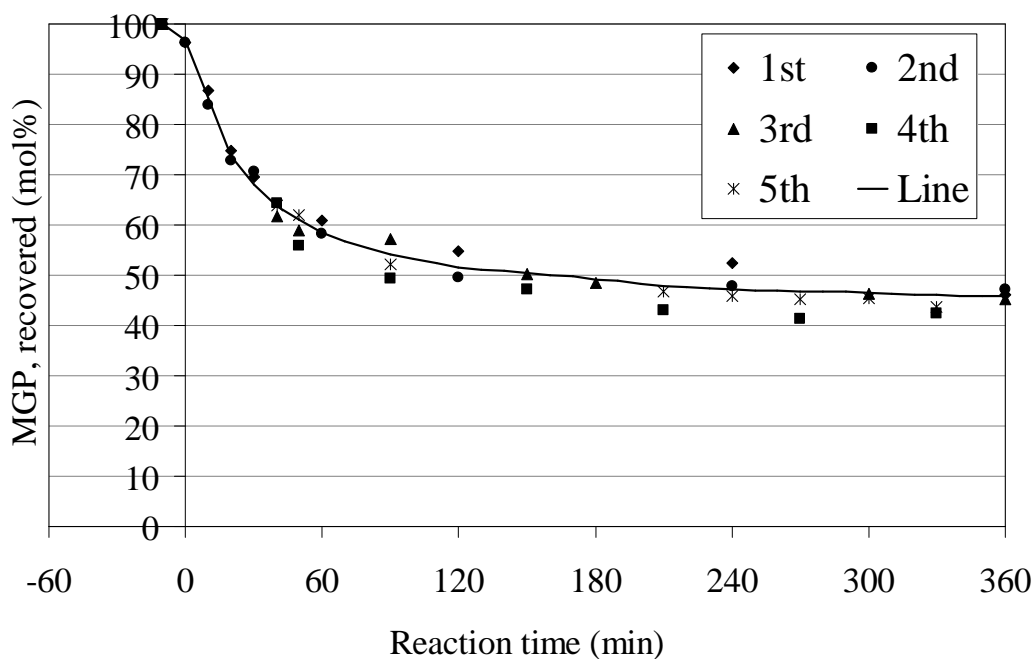


Fig. 2-26 Change in the yield of MGP and its best-fit curve when MGP, MGP α , and, VA were reacted together

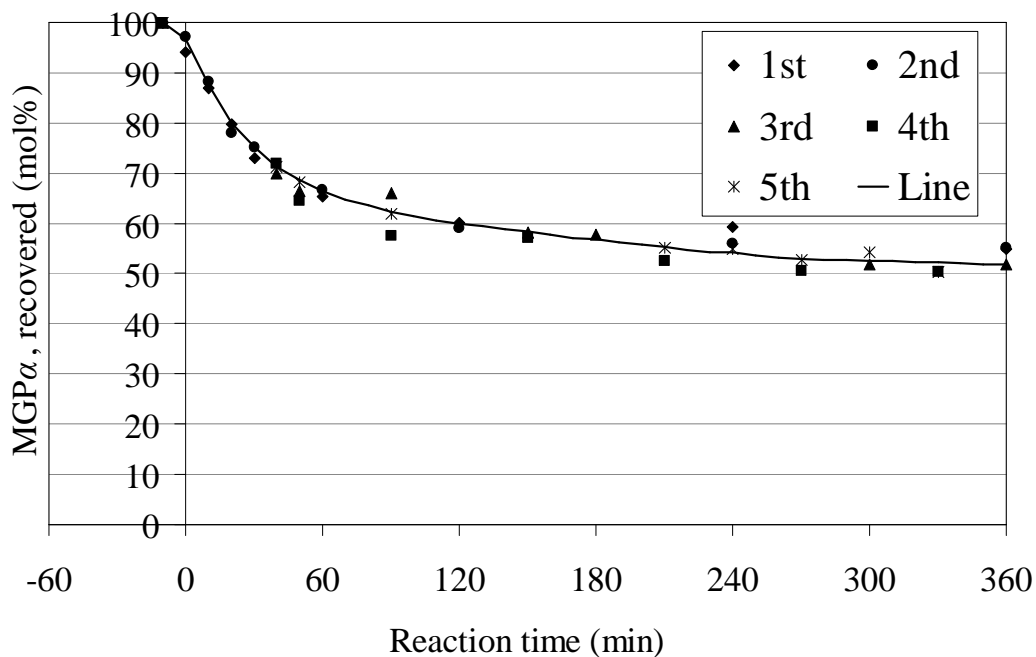


Fig. 2-27 Change in the yield of MGP α and its best-fit curve when MGP, MGP α , and, VA were reacted together

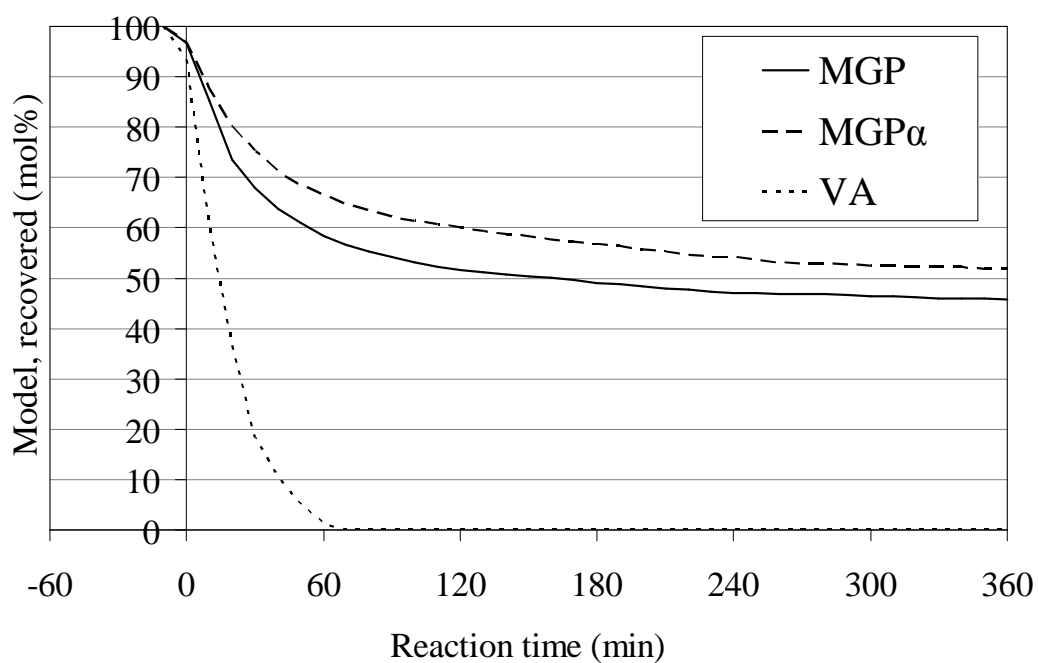
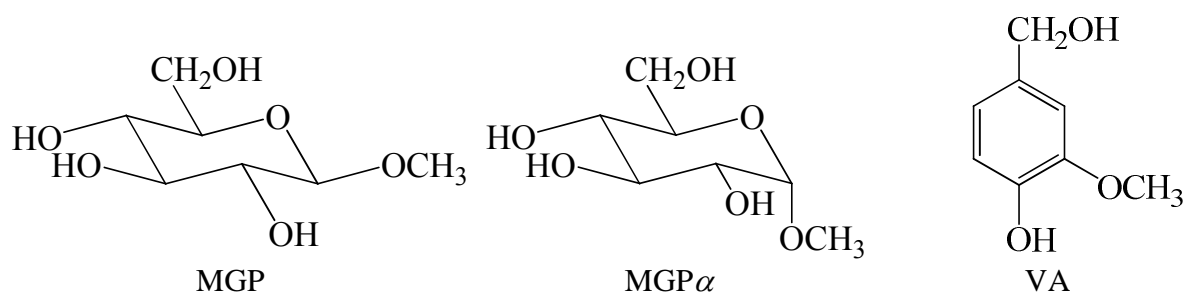


Fig. 2-28 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP, MGP α , and, VA when these were reacted together

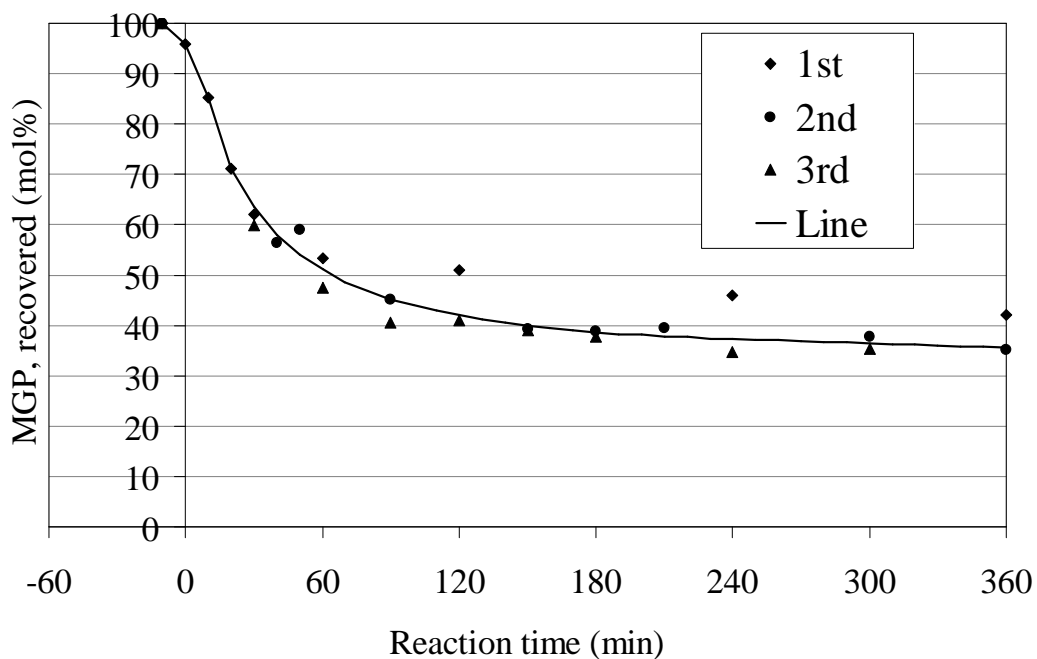


Fig. 2-29 Change in the yield of MGP and its best-fit curve when MGP, MMP, and, VA were reacted together

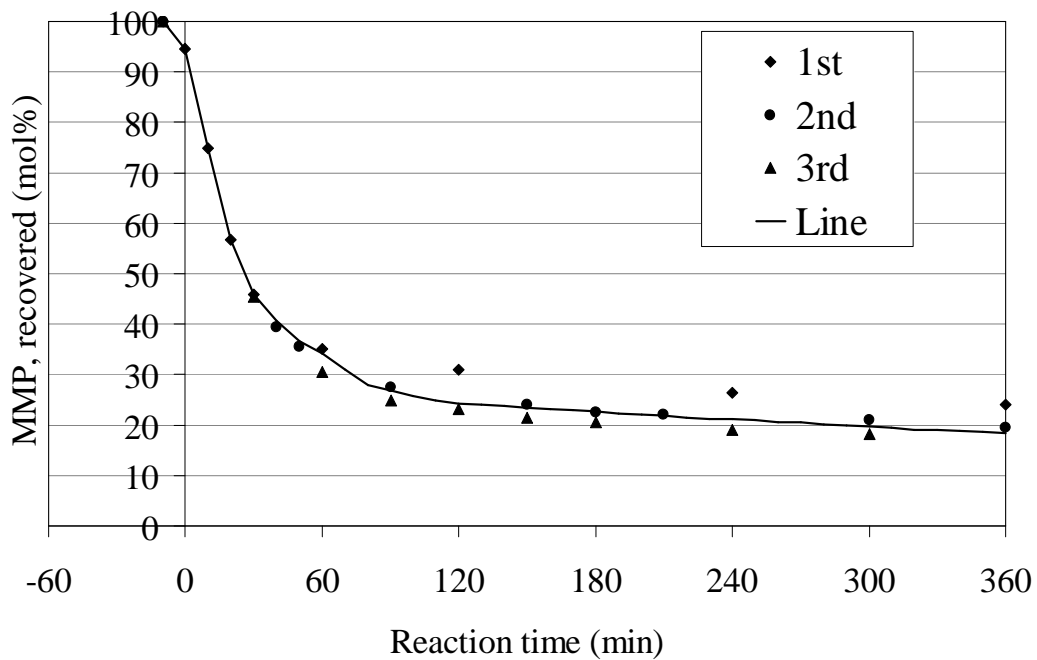


Fig. 2-30 Change in the yield of MMP and its best-fit curve when MGP, MMP, and, VA were reacted together

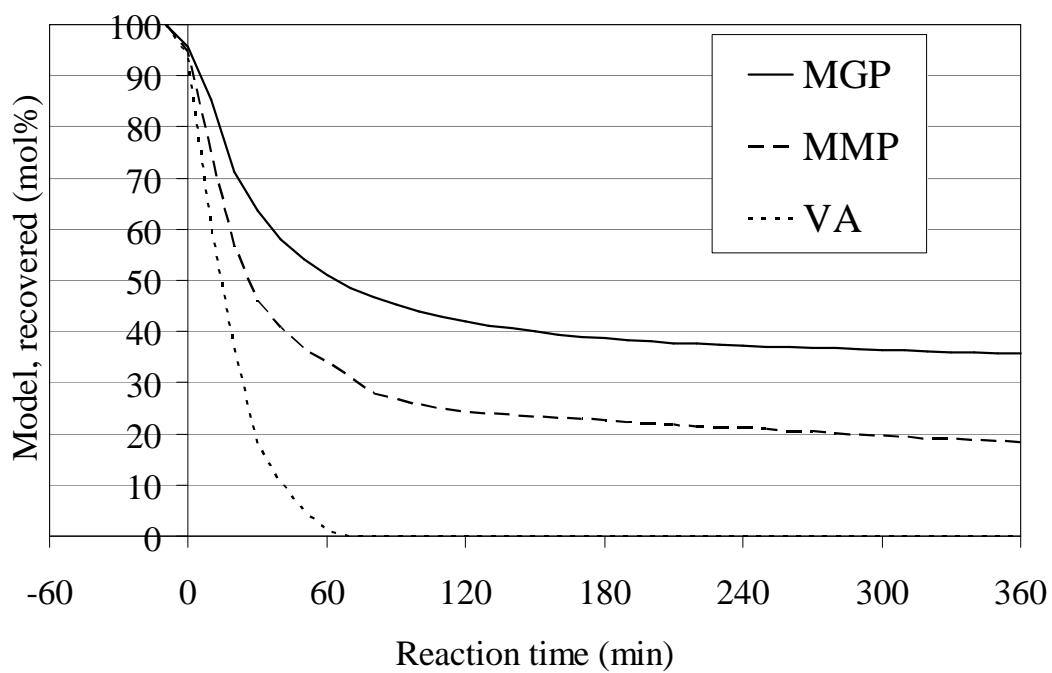
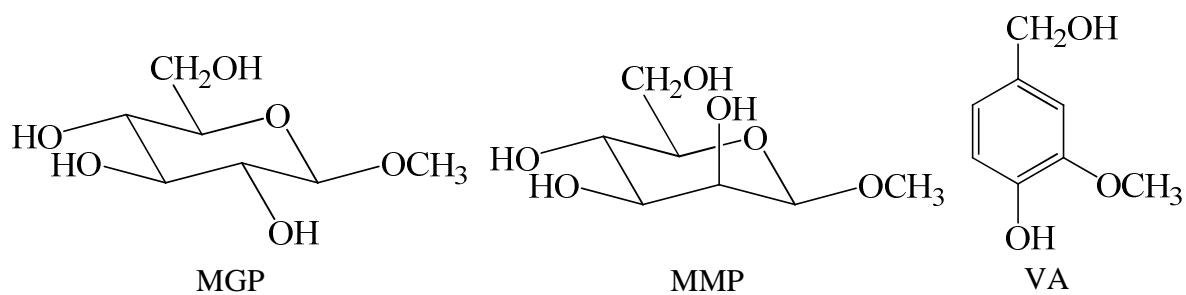


Fig. 2-31 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP, MMP, and, VA when these were reacted together

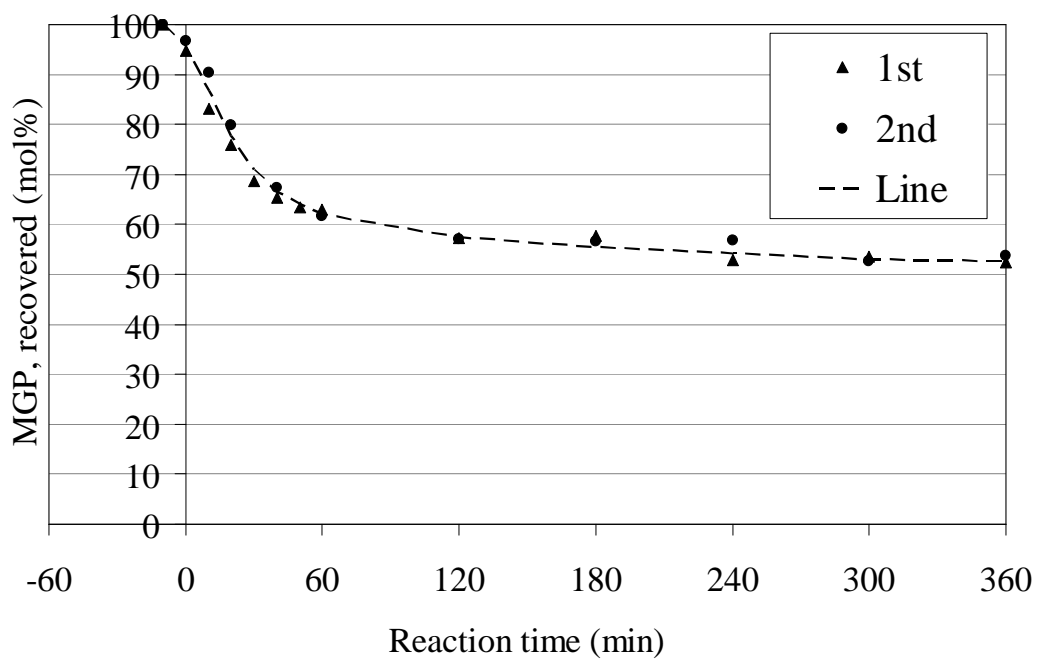


Fig. 2-32 Change in the yield of MGP and its best-fit curve when MGP, MAP, and, VA were reacted together

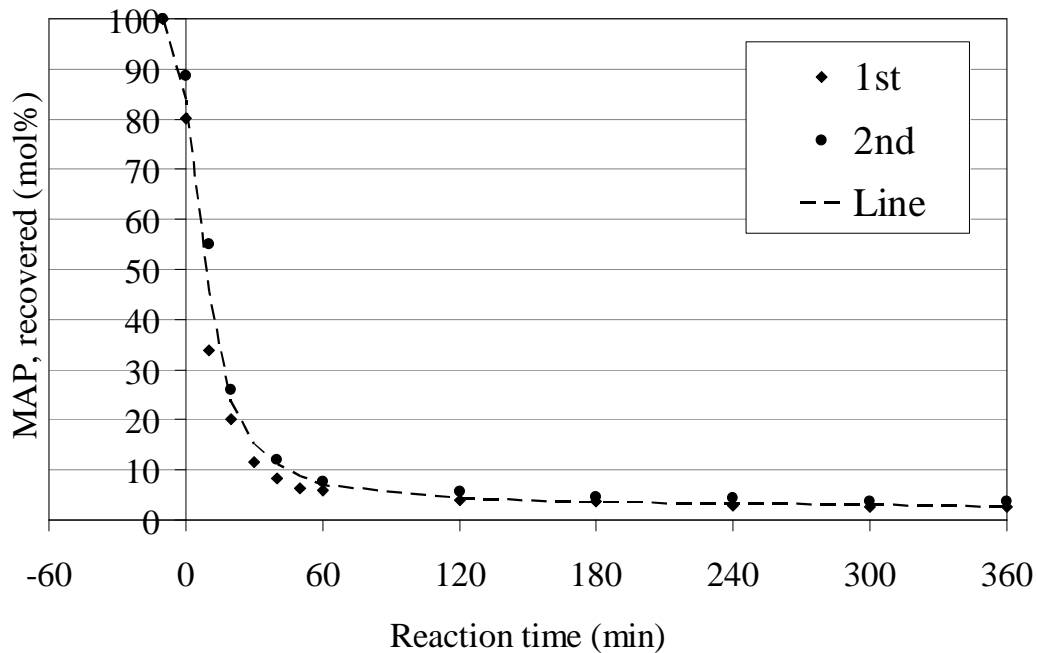


Fig. 2-33 Change in the yield of MAP and its best-fit curve when MGP, MAP, and, VA were reacted together

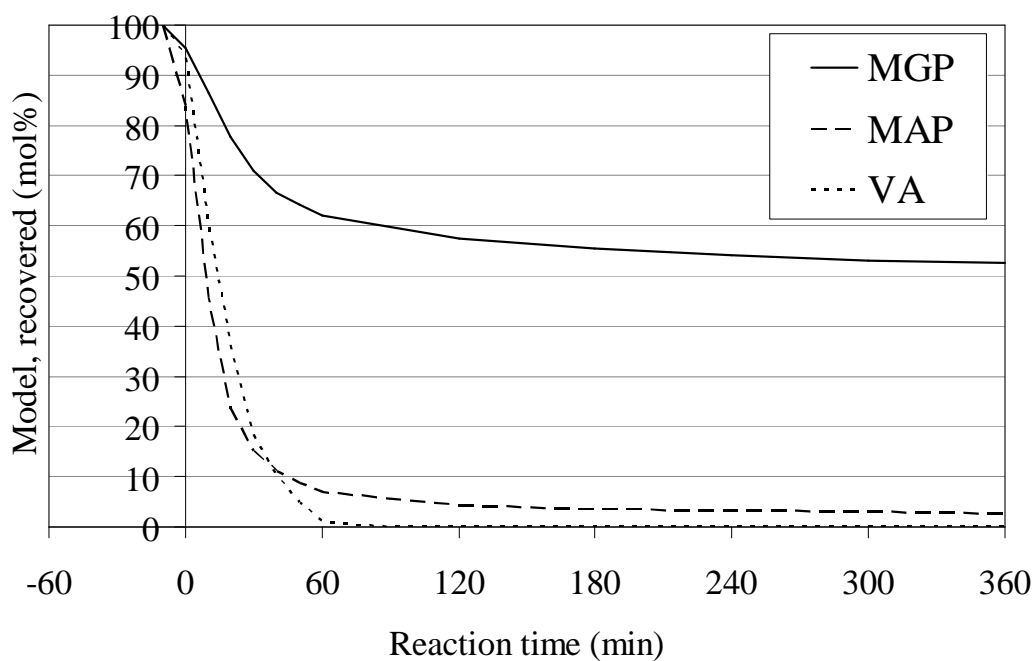
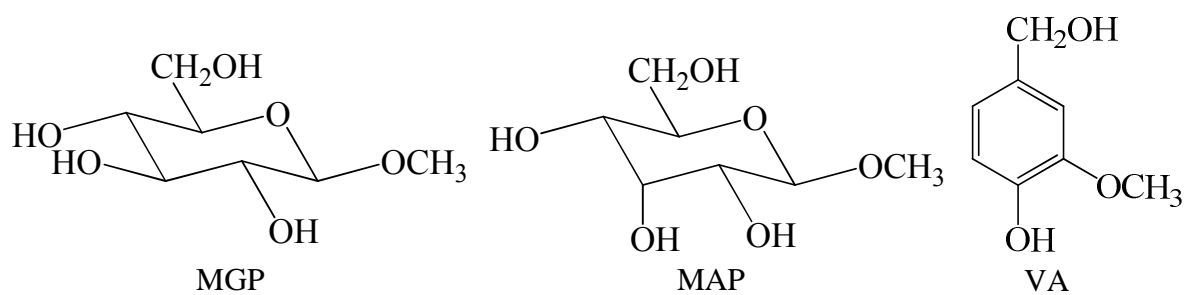


Fig. 2-34 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP, MAP, and, VA when these were reacted together

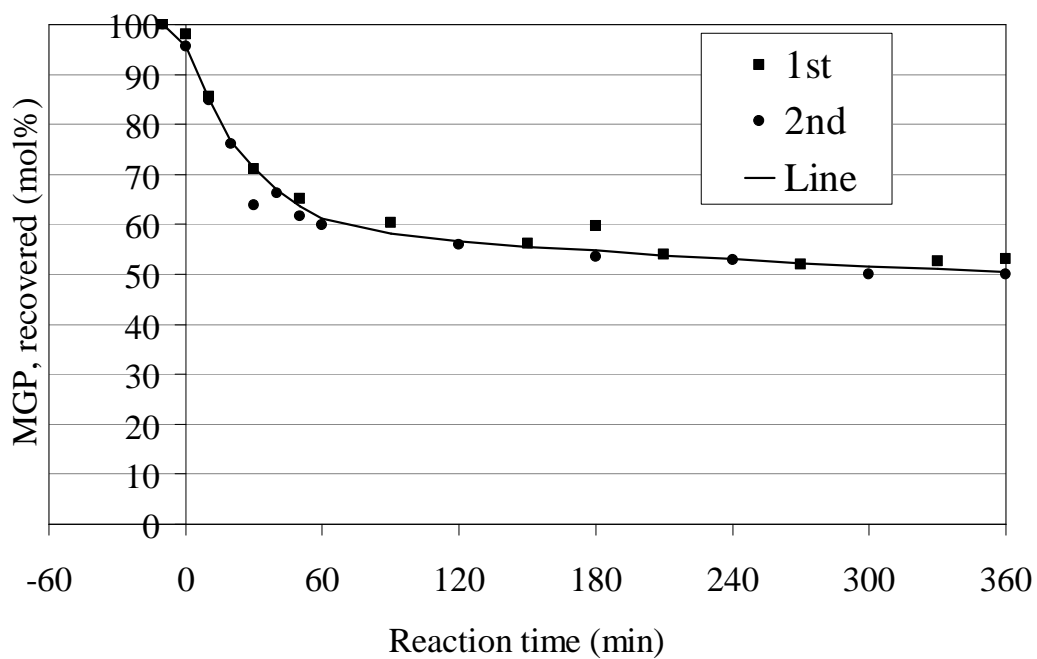


Fig. 2-35 Change in the yield of MGP and its best-fit curve when MGP, MGaP, and, VA were reacted together

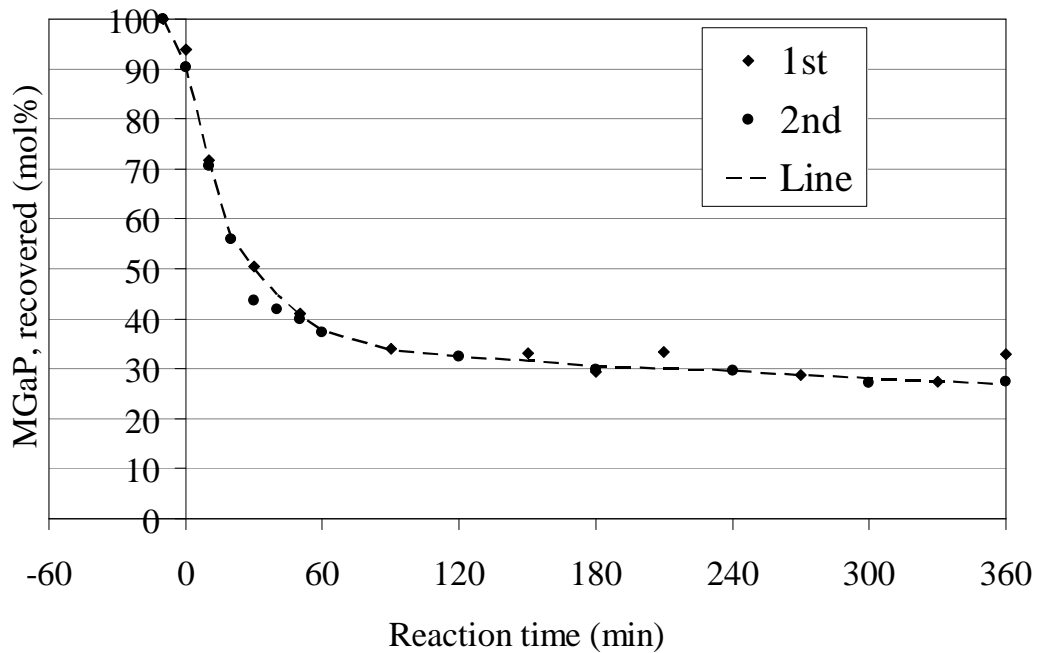


Fig. 2-36 Change in the yield of MGaP and its best-fit curve when MGP, MGaP, and, VA were reacted together

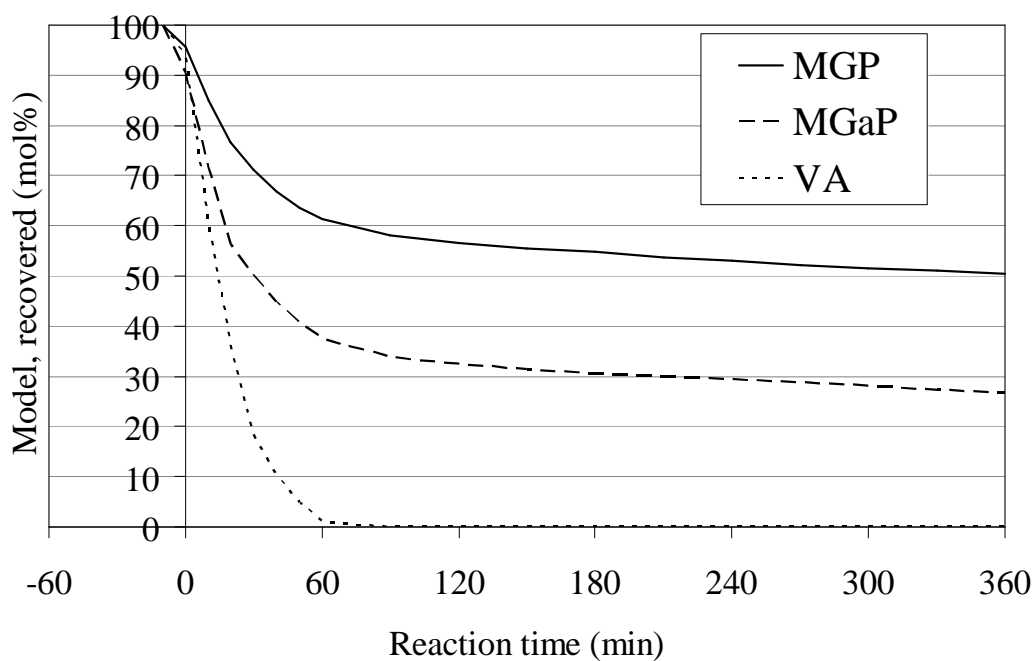
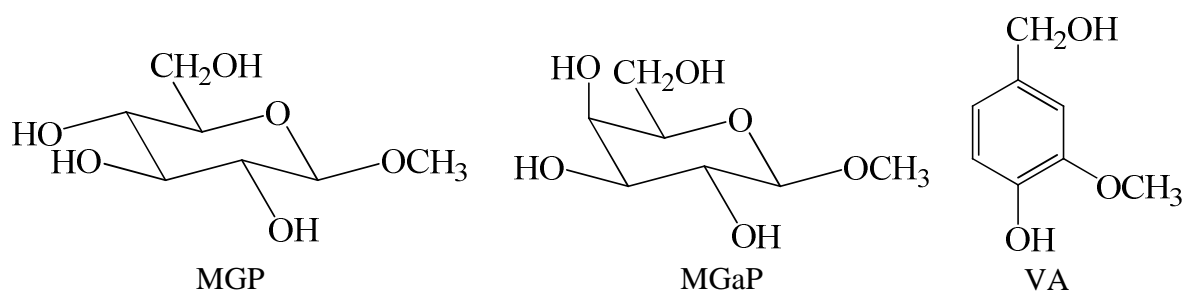


Fig. 2-37 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP, MGaP, and, VA when these were reacted together

Fig. 2-38 ～ 2-45 では、横軸に TPh あるいは VA の残存率を、そして、縦軸に 糖モデル化合物の残存率を示している。すなわち、横軸 >0 の範囲に phase 1 が、横軸 =0 に phase 2 が表されている。これらの Fig. では、データが上方にあるほど、フェノール性化合物分解量あたりの糖モデル化合物の分解量が少ないことを、すなわち、選択的にフェノール性化合物が分解されていることを示す。なお、Fig. 2-38 は小西らの結果を用いて作成したものである (Konishi *et al.* 2009)。

まず phase 1 に注目すると、どの糖モデル化合物の残存率も、TPh 共存系でよりも VA 共存系での方が低かった。したがって、AOS 生成源となるフェノール性化合物が残存する phase 1 では、TPh 共存系でよりも VA 共存系での方が、フェノール性化合物の分解量あたりに糖モデル化合物を分解する AOS が多く生成するか、あるいは、糖モデル化合物への反応性の高い AOS が生成する、と考えられる。また、TPh 共存系においては全ての反応の場合に、両糖モデル化合物の分解量の差が徐々に大きくなり、そして、実験データから描いた曲線は上に凸であった。これらの結果はそれぞれ、TPh 共存系において生成する AOS は、比較的高い選択性で攻撃されやすい糖モデル化合物の方を分解すること、そして、反応の進行とともに、AOS の糖モデル化合物分解効率が高くなることを示唆する、と考えられる。VA 共存系においては全ての反応系の場合に、VA の残存率が約 40% 程度以下の範囲では、両糖モデル化合物の分解量の差が一定となり、そして、実験データはやや直線的に並んだ。これらの結果はそれぞれ、VA 共存系において生成する AOS は TPh 共存系で生成する AOS と比較すると、異なる糖モデル化合物に対しても同程度の反応性を持つこと、そして、反応が進行しても AOS の糖モデル化合物分解効率がそれほど高くないことを示唆する、と考えられる。以上の糖モデル化合物の分解挙動、および、AOS の糖モデル化合物への反応性が低い場合に、異なる糖モデル化合物に対する攻撃がより選択的になると思われること、を考慮すると、TPh 共存系で生成する AOS は VA 共存系で生成する AOS と比較して、糖モデル化合物に対する反応性が低く、そして、連鎖的な分解を引き起こしやすい化学種である可能性が、考えられる。なお、phase 2 における分解については、前述した。

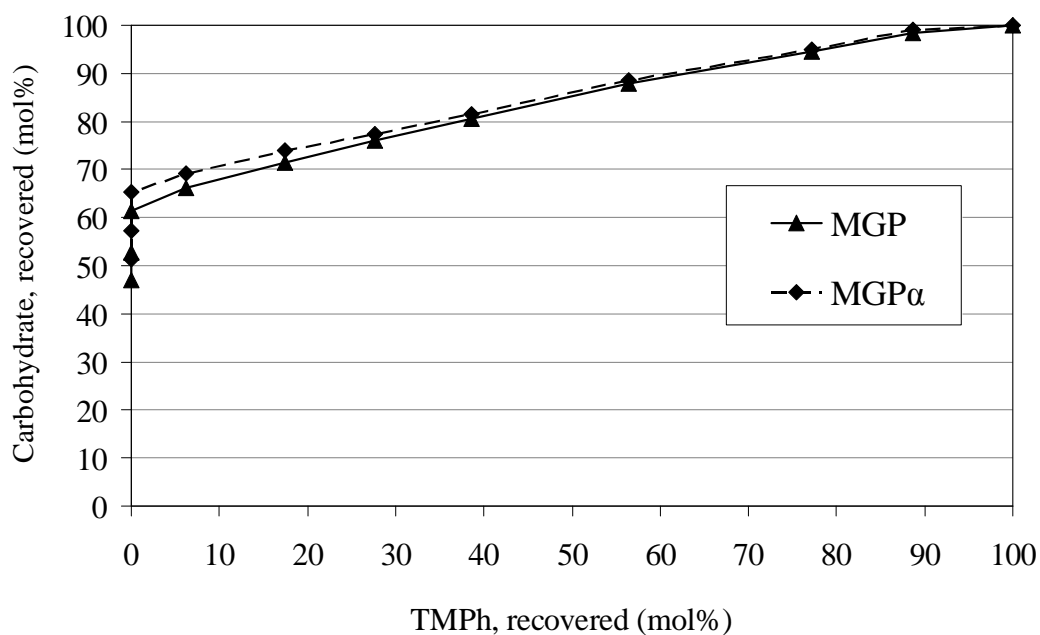


Fig. 2-38 Correlation of the amount of degraded MGP or MGP α with that of degraded TmPh when these compounds were reacted together

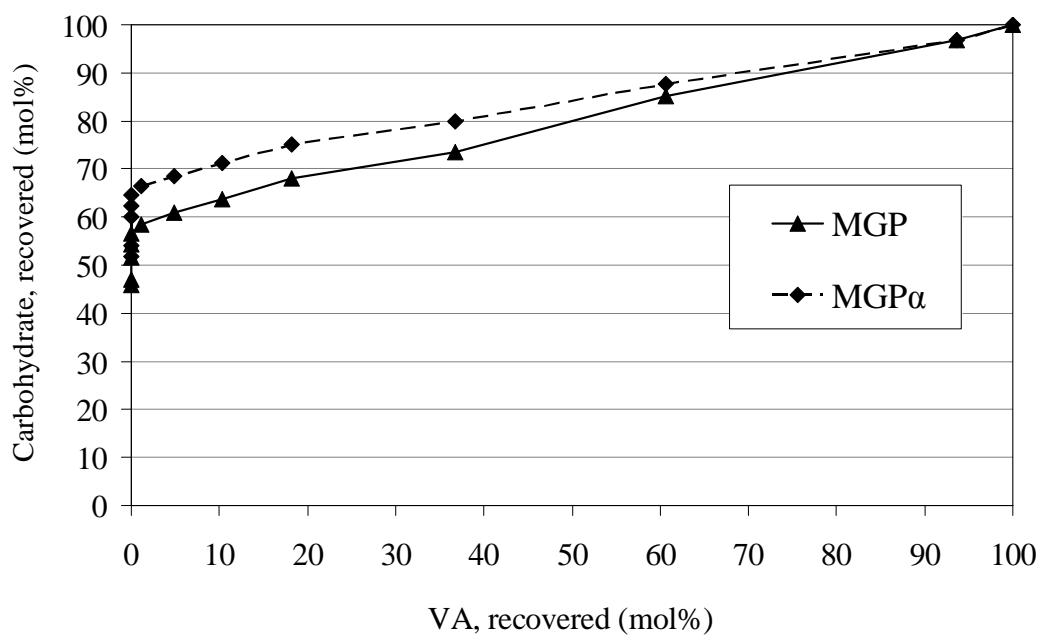


Fig. 2-39 Correlation of the amount of degraded MGP or MGP α with that of degraded VA when these compounds were reacted together

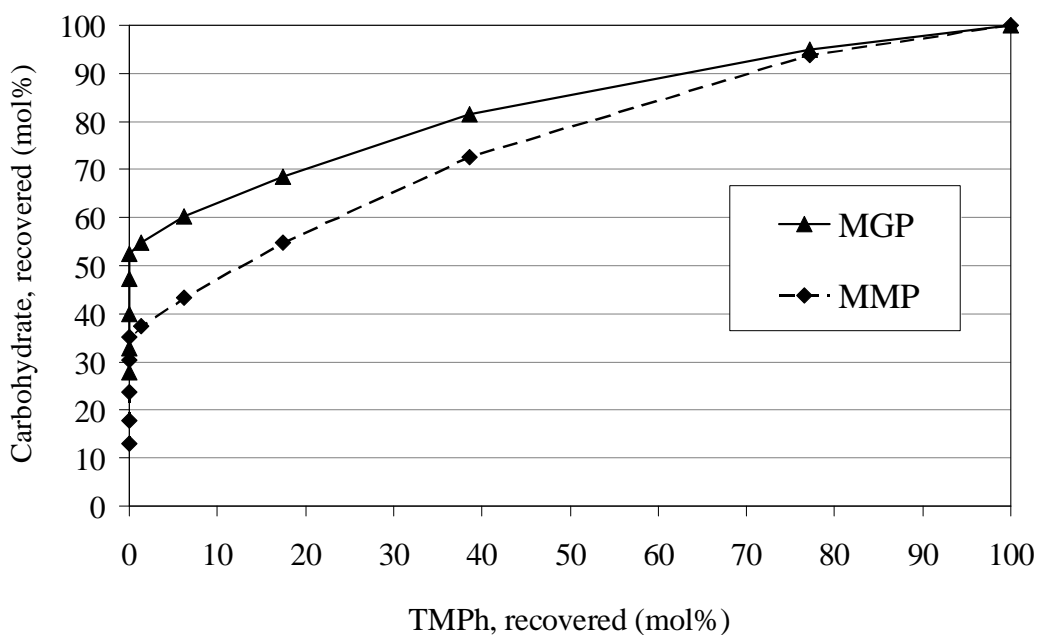


Fig. 2-40 Correlation of the amount of degraded MGP or MMP with that of degraded TmPh when these compounds were reacted together

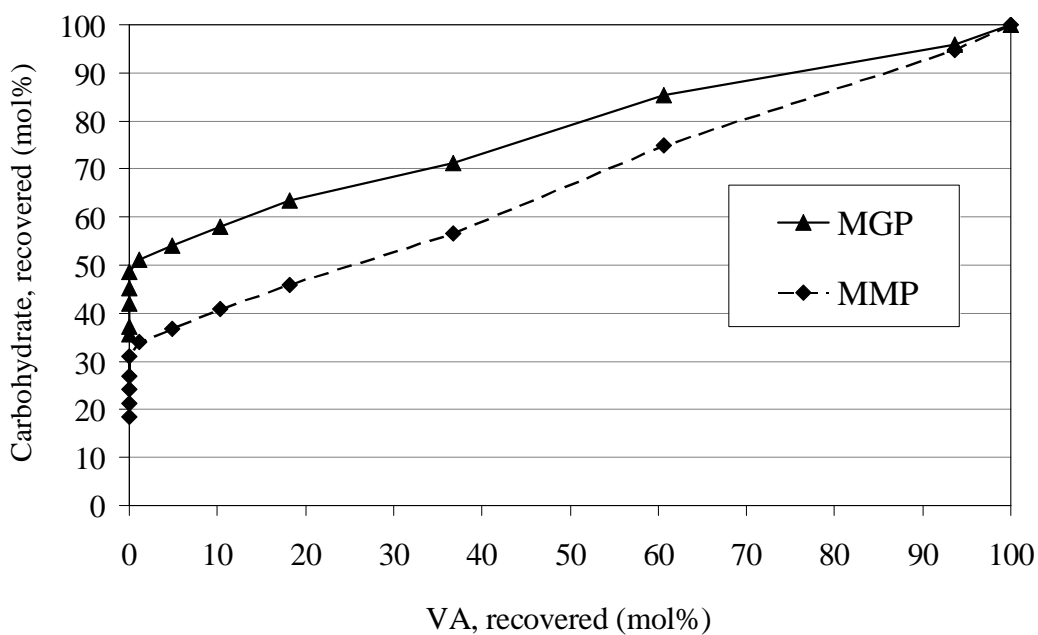


Fig. 2-41 Correlation of the amount of degraded MGP or MMP with that of degraded VA when these compounds were reacted together

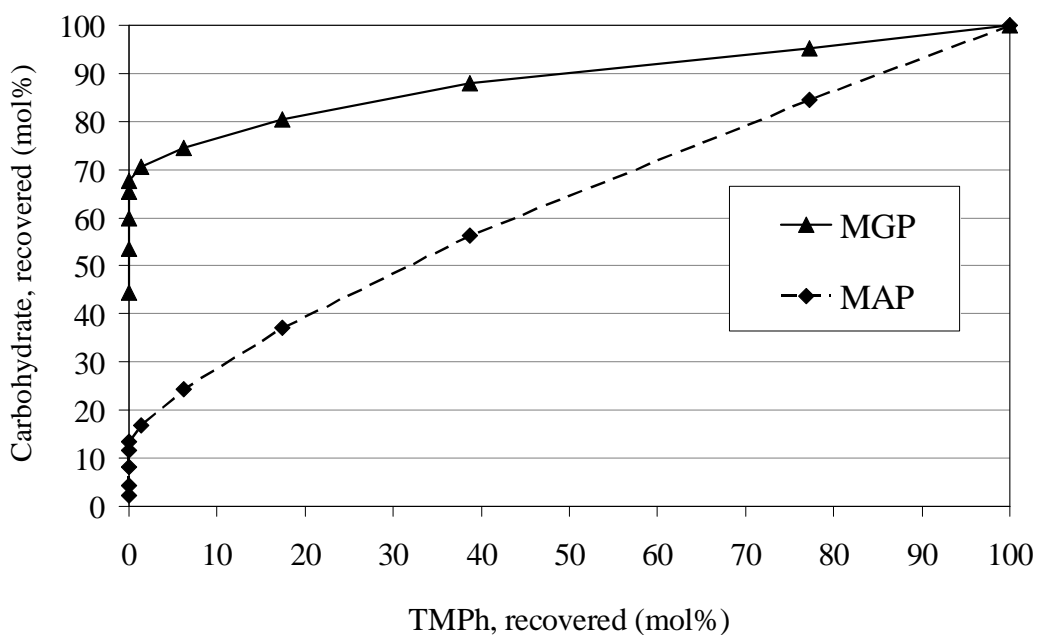


Fig. 2-42 Correlation of the amount of degraded MGP or MAP with that of degraded TmPh when these compounds were reacted together

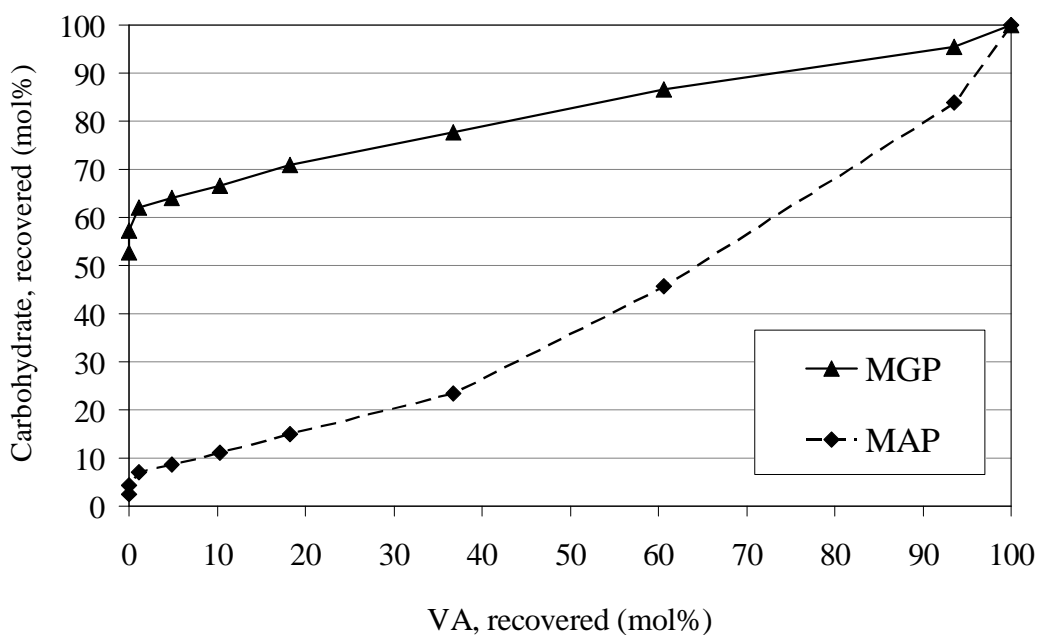


Fig. 2-43 Correlation of the amount of degraded MGP or MAP with that of degraded VA when these compounds were reacted together

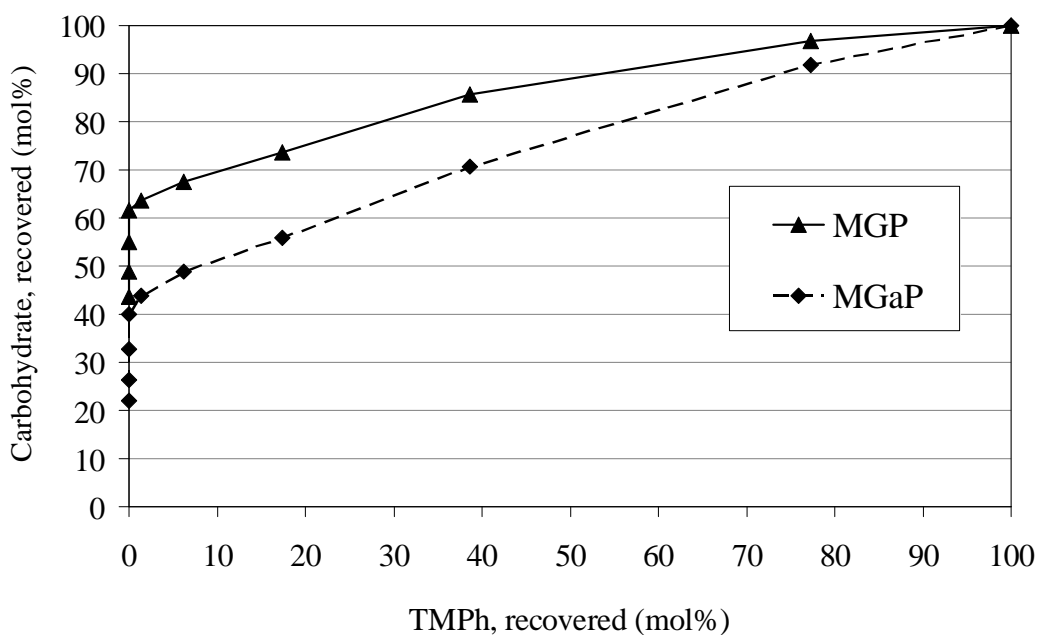


Fig. 2-44 Correlation of the amount of degraded MGP or MGaP with that of degraded TmPh when these compounds were reacted together

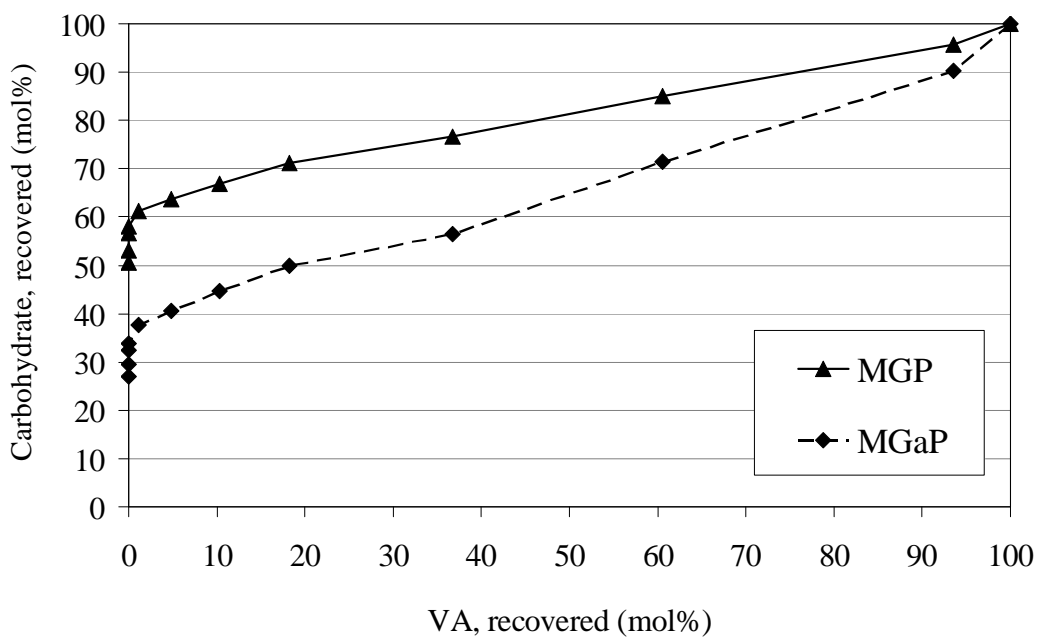


Fig. 2-45 Correlation of the amount of degraded MGP or MGaP with that of degraded VA when these compounds were reacted together

2.4 まとめ

糖モデル化合物の立体配置の相違が及ぼす AOS と糖モデル化合物との反応への影響を検討するため、立体配置の異なる糖モデル化合物 MGP、MGP α 、MMP、MAP および MGaP を用いて、酸素漂白条件下においてこれらを AOS との反応に供した。

AOS 生成源となるフェノール性化合物を共存させずに糖モデル化合物の分解を検討したところ、MGP、MGP α 、MAP および MGaP は、極めて安定であることが確認された。MMP は酸素圧下の反応において多少分解されたが、窒素圧下の反応では非常に安定であった。したがって、C-2 位の水酸基がアキシアル位に存在すると、酸素によって多少酸化を受けることが示唆された。しかし、この MMP の分解は少量であったので、AOS 生成源となるフェノール性化合物が共存する場合には、この酸素による分解は重要ではないことが、確認された。

フェノール性化合物である TMPH を AOS 生成源とした酸素－アルカリ処理、または、 $O_2^{\cdot-}$ のみが糖モデル化合物を分解する AOS として働く過酸化水素－アルカリ処理を、糖モデル化合物 1 種類を用いて行った結果、 $O_2^{\cdot-}$ を含む AOS との反応性は、MAP、MGaP、MMP、MGP そして MGP α の順に低くなり、MAP は非常に激しく分解された。したがって、糖モデル化合物の各炭素における立体配置の相違が AOS との反応に影響を及ぼすこと、そして、C-3 位の水酸基がアキシアル位に存在すると、 $O_2^{\cdot-}$ を含む AOS によって非常に分解されやすくなること、が示唆された。

糖モデル化合物の共存が他の糖モデル化合物の分解に及ぼす影響について検討するため、MGP を含む糖モデル化合物 2 種類を用いて、TMPH を AOS 生成源とした酸素－アルカリ処理を行った。MGP の分解に注目すると、MGP と MMP を共に反応させた場合にのみ、MGP を単独で反応させた場合よりも MGP の分解が促進されたが、その他の糖モデル化合物の存在は MGP の分解を抑制した。一方、MGP 以外の糖モデル化合物の分解に注目すると、MGP の存在は MMP の分解をやはり促進し、MGP α の分解には影響を与えず、そして、これら以外の分解は抑制した。共存糖モデル化合物が他方の糖モデル化合物の分解を抑制するのは、共存によって AOS との反応において競合が起こるためと考えられる。MMP が存在すると、TMPH 由来の AOS だけでなく MMP 由来の AOS も生成し、後者の AOS が MMP 自身だけでなく MGP の分解も促進する可能性が示唆された。

VA を AOS 生成源とした酸素－アルカリ処理を、MGP を含む糖モデル化合物 2 種類

を用いて行った結果、TMPh 共存系と比較すると、フェノール性化合物の消失前は VA 共存系の方が糖モデルの分解が大きかったが、フェノール性化合物の消失後においては TMPh 共存系の方が糖モデルの分解が大きかった。TMPh 共存系および VA 共存系での糖モデル化合物の分解挙動の相違から、AOS 生成源の種類により、生成する AOS の種類や量比が異なる可能性が示唆された。

2.5 参考文献

- Dryselius E., Lindberg B. and Theander O.: *Acta Chem. Scand.*, **12**, 340 (1958)
- Hearne D. O., Thompson N.S. and Schroder L.R.: *J. Wood Chem. Technol.*, **11** (3), 307 (1991)
- Konishi F., Yokoyama T. and Matsumoto Y.: *Holzforschung*, **63**, 52 (2009)
- Millard E. C., Schroeder L. R. and Thompson N. S.: *Carbohydr. Res.*, **56**, 259 (1977)
- Murata A., Sekiya K., Watanabe Y., Yamaguchi F., Hatano N., Izumori K. and Tokuda M.: *J. Biosci. Bioeng.*, **96** (1), 89 (2003)
- Olm L. and Teder A.: *Tappi*, **62** (12), 43 (1979)
- Salam M. A. and Isbell H. S.: *Carbohydr. Res.*, **101**, 255 (1982)
- Schroeder L. R. and Millard E. C.: *J. Wood Chem. Technol.*, **26**, 273 (2006)
- Weinges K., Haremsa S. and Maurer W.: *Carbohydr. Res.*, **164**, 453 (1987)
- Yasumoto M., Matsumoto Y. and Ishizu A.: *J. Wood Chem. Technol.*, **16** (1), 95 (1996)
- Yokoyama T., Maekawa I., Matsumoto Y. and Meshitsuka G.: *J. Wood Sci.*, **44** (5), 421 (1998)
- Yokoyama T., Matsumoto Y. and Meshitsuka G.: *J. Pulp Pap. Sci.*, **25** (2), 42 (1999)
- 石川裕剛: 修士論文 (2011)

第 3 章

活性酸素種との反応における 糖モデル化合物の被攻撃部位 の検討

3.1 緒言

第 1 章でも記述したように、酸素漂白過程における多糖類の分解では、二次的に生成する活性酸素種 (Active Oxygen Species, AOS) が、多糖類を構成する炭素から水素を引き抜くことが、開始反応となる。したがって、この多糖類の分解機構の解析においては、単糖残基を構成する炭素－水素結合の中でどの水素が引き抜かれやすいのか、について検討することが必要である。しかし、1.2.2 でも記述したように、この水素引き抜き反応に関する既往の研究では、糖モデル化合物を用いて、実際の酸素漂白とは非常に異なる条件下で、すなわち、中性付近や室温付近の条件下で反応を行い、得られた分解生成物の構造から、糖モデル化合物のどの水素が攻撃されやすいのか、を検討するに過ぎなかった。このような条件下で反応が行われた理由は、糖モデル化合物の初期分解生成物にあたるカルボニル基を保有する化合物がアルカリに対して非常に不安定であり、通常酸素漂白の条件下では、速やかに炭素鎖の短い有機酸等に分解されるため、どの水素が引き抜かれたのかを検討することができないから、であった。また、既往の研究において検討された分解生成物の収率は非常に低く、これらが主要なものであると考えることも困難であると思われた。

酸素漂白過程での AOS による多糖類からの水素引き抜き反応において、単糖残基のどの炭素に結合する水素が AOS によって引き抜かれやすいのか、について検討する方法として、次の実験が考えられた。すなわち、糖モデル化合物 methyl β -D-glucopyranoside (MGP) と MGP の特定の位置の水素を重水素に置換した重水素化 MGP とを共に、AOS 生成源となるフェノール性化合物 2,4,6-trimethylphenol (TMPh) または 4-hydroxy-3-methoxybenzyl alcohol (vanillyl alcohol, VA) との共存下で酸素－アルカリ処理に、あるいは、フェノール性化合物を用いない常圧下で過酸化水素－アルカリ処理に供し、MGP と重水素化 MGP の分解挙動の相違を、詳しく調べた。この実験の結果、MGP の分解の方が速ければ、すなわち、速度論的同位体効果が観測されれば、その位置の水素が AOS に引き抜かれることを示す、と考えられた。

これまでに、当研究室の小西らは、MGP のアノマー位から AOS によって水素が引き抜かれるかどうかを確認するため、MGP のアノマー位水素を重水素に置換した methyl β -D-(1- 2 H)glucopyranoside (MGP-1D) を合成し (Fig. 3-1)、これを MGP と共に TMPh の共存下で酸素－アルカリ処理に供した (Konishi *et al.* 2009)。その結果、MGP-1D よりも MGP の方が速く分解され、アノマー位からの水素引き抜き反応における速度論的同位体効果が

観測されたため (Fig. 3-2)、TMPH を生成源とする AOS によって、MGP のアノマー位水素が引き抜かれることが確認された。さらに小西らは、一般的に最も多糖類の分解に寄与する AOS と考えられているヒドロキシルラジカル ($\text{HO}\cdot$) の共役塩基であるオキシルアニオンラジカル ($\text{O}\cdot$, $\text{p}K_{\text{a}} = 11.9$) と MGP のアノマー位の反応を検討するため、MGP と MGP-1D を共に、フェノール性化合物非存在下での常圧下における過酸化水素－アルカリ処理に供した (Konishi *et al.* 2009)。その結果、MGP と MGP-1D の分解に明確な差は観測されなかった (Fig. 3-3)。なお、第 2 章でも記述したが、この反応系において糖モデル化合物を分解可能な AOS は、 $\text{O}\cdot$ のみであると考えられる。したがって、 $\text{O}\cdot$ による MGP のアノマー位水素の引き抜きは、確認されなかった。これらの結果から、前述の酸素－アルカリ処理において、少なくとも $\text{O}\cdot$ ではない他の AOS が、MGP のアノマー位水素を引き抜くことが示された。

本章では、上記の議論と小西らの結果に基づき、TMPH 由来の AOS によって MGP のどの水素が引き抜かれるのかを検討するため、MGP と重水素化 MGP を、TMPH を AOS 生成源とした酸素－アルカリ処理に供し、MGP のどの位置の水素が AOS によって引き抜かれやすいのかについて、検討を行った。また、AOS 生成源であるフェノール性化合物を VA とした酸素－アルカリ処理、および、AOS を $\text{O}\cdot$ に限定できる過酸化水素－アルカリ処理にも供し、AOS 生成源が異なることによる水素引き抜き反応への影響についても、検討した。

これらの目的の下で、本章において用いた糖モデル化合物を、Fig. 3-1 に示す。重水素化 MGP としては、アノマー位、C-2 位、C-3 位、C-4 位、C-5 位、C-6 位、アグリコン部位であるメトキシル基、および、全ての炭素に結合する水素を重水素に置換したそれぞれ MGP-1D、methyl β -D-(2- ^2H)glucopyranoside (MGP-2D)、methyl β -D-(3- ^2H)glucopyranoside (MGP-3D)、methyl β -D-(4- ^2H)glucopyranoside (MGP-4D)、methyl β -D-(5- ^2H)glucopyranoside (MGP-5D)、methyl β -D-(6,6- $^2\text{H}_2$)glucopyranoside (MGP-6D)、($^2\text{H}_3$)methyl β -D-glucopyranoside (MGP-MeD)、および、($^2\text{H}_3$)methyl β -D-(1,2,3,4,5,6,6- $^2\text{H}_7$)glucopyranoside (MGP-allD) を用いた。

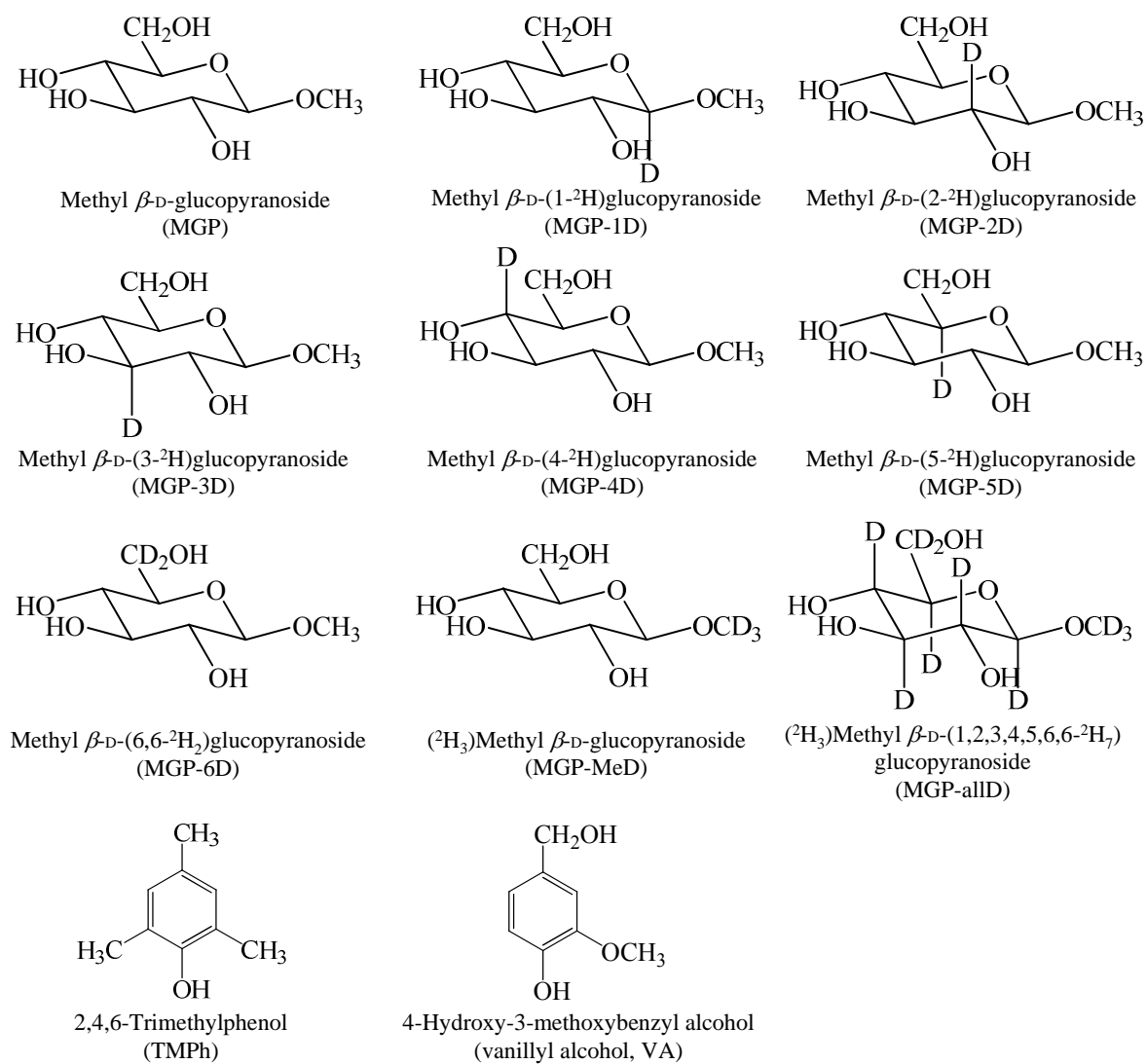


Fig. 3-1 Chemical structure of model compounds used in this chapter

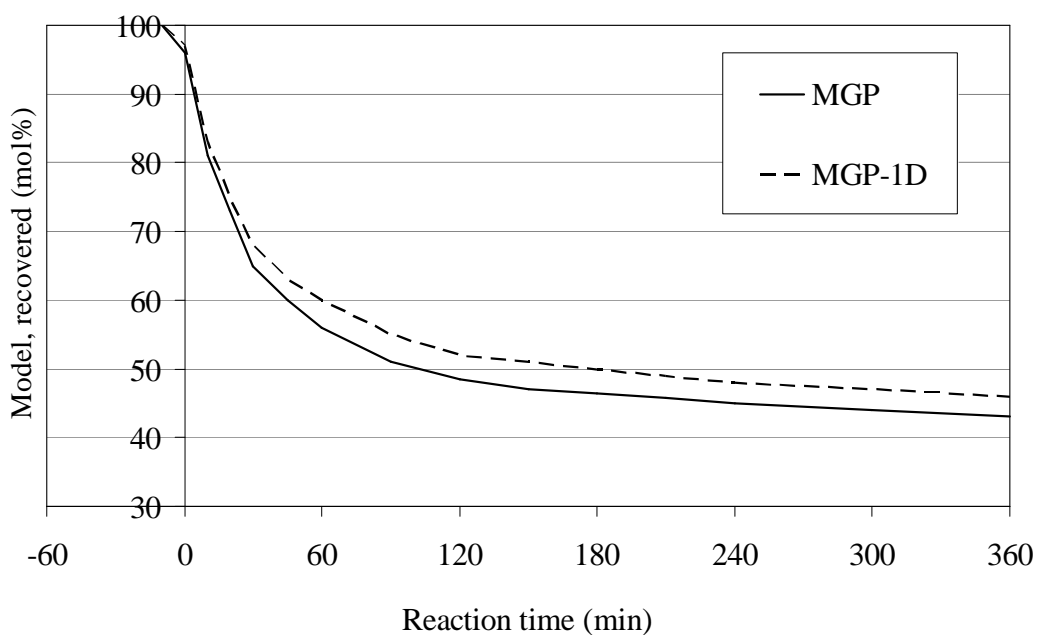


Fig. 3-2 Change in the yields of MGP, MGP-1D, and TMPH when these compounds were reacted together in the oxygen-alkali treatment (Konishi *et al.* 2009)

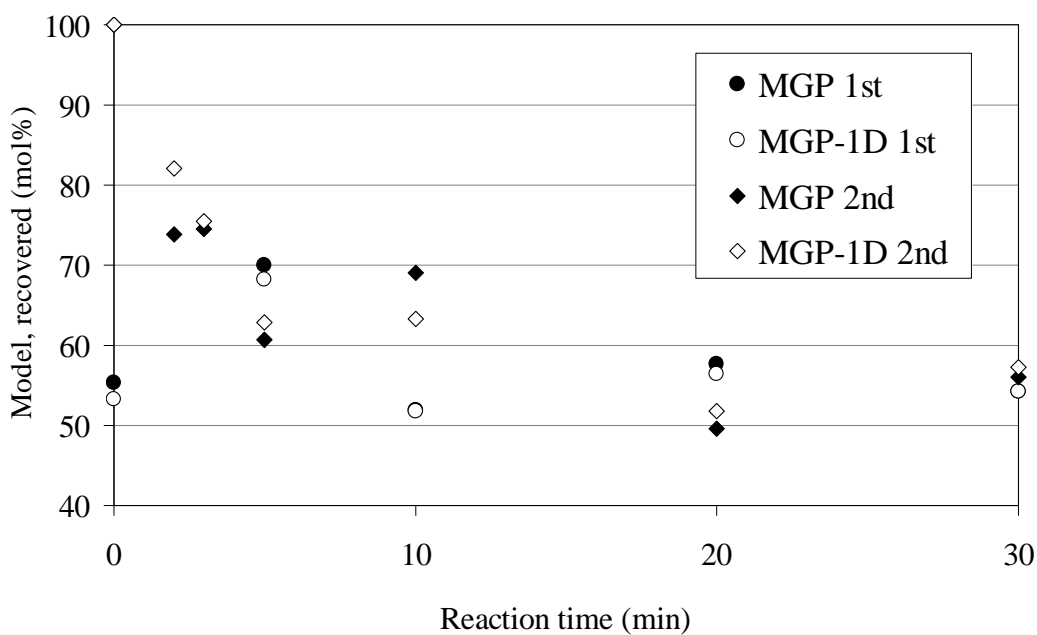


Fig. 3-3 Change in the yields of MGP and MGP-1D when these compounds were reacted together in the alkaline hydrogen peroxide treatment (H_2O_2 was added when the electrical heating was initiated or reaction time was 0 in the 1st or 2nd trial, respectively.) (Konishi *et al.* 2009)

3.2 実験

3.2.1 重水素化 MGP の合成

MGP-1D の合成は、Fig. 3-4 に示す小西らの方法に従った (Konishi *et al.* 2009)。MGP-2D、MGP-3D、MGP-4D、MGP-5D、MGP-6D および MGP-MeD は、Koenigs-Knorr 反応を用いて合成した (Koenigs *et al.* 1901)。MGP-2D は D-(2-²H)glucose (Cambridge Isotope Laboratories, Inc. 製) から、MGP-3D は D-(3-²H)glucose (Omicron Biochemicals, Inc. 製) から、MGP-4D は D-(4-²H)glucose (Omicron Biochemicals, Inc. 製) から、MGP-5D は D-(5-²H)glucose (Omicron Biochemicals, Inc. 製) から、MGP-6D は D-(6,6-²H₂)glucose (Omicron Biochemicals, Inc. 製) から、そして、MGP-MeD は D-glucose (和光純薬工業製) から、それぞれ合成した。Fig. 3-5 は MGP-2D の合成経路を示すが、MGP-3D、MGP-4D、MGP-5D、MGP-6D および MGP-MeD の合成もこれと全て同じ経路で行った。

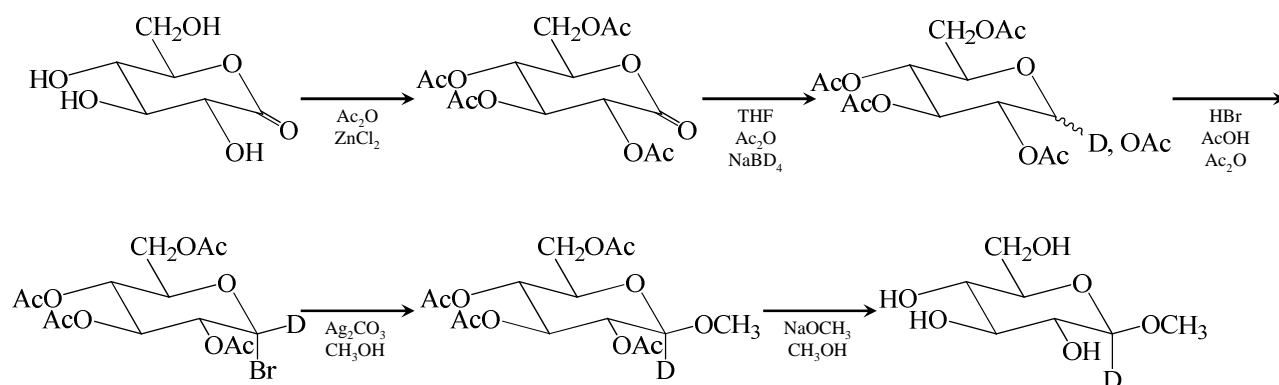


Fig. 3-4 Synthesis route of MGP-1D (Konishi *et al.* 2009)

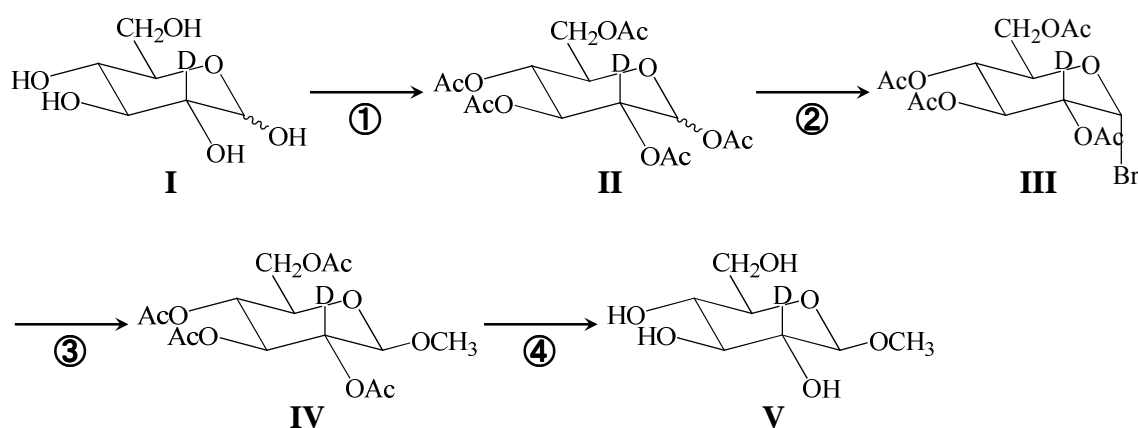


Fig. 3-5 Synthesis route of MGP-2D

①アセチル化

D-(2-²H)glucose (**I**) 3 g を無水酢酸 50 mL とピリジン 30 mL の混液に溶かし、室温で攪拌しながら 1 日以上遮光下で反応させた。反応終了後濃縮して溶液量を減らした後、トルエンを少量ずつ加えながらさらに濃縮することによって、**II** を主成分として含むシロップを得た。

②アノマー位アセトキシ基の臭素への置換

水 5.4 mL (0.30 mol) と 酢酸 22.4 mL (0.40 mol) の混液に、氷水で冷却しながら 25.5 mL (0.30 mol) のアセチルブロミドを滴下して、臭化水素酢酸溶液を調製した。これに、①で調製した **II** を含むシロップを全量加え、30°C の湯浴中で攪拌しながら無水酢酸 9.8 mL (0.18 mol) を加え、3 時間反応させた。反応終了後クロロホルム 375 mL を加えて、冷水 200 mL で 2 回、飽和炭酸水素ナトリウム溶液 200 mL で 1 回、冷水 100 mL で 2 回、そして、飽和塩化ナトリウム溶液 50 mL で 1 回洗浄した後、得られたクロロホルム溶液に無水硫酸ナトリウムを加えて、一晚脱水した。沈殿を自然濾過した後減圧濃縮し、**III** を主成分とするシロップを得た。

③アノマー位臭素のメトキシ基への置換

②で得た **III** を含むシロップ全量に、直ちにメタノール 500 mL 加えて溶液とし、炭酸銀 5 g を加えた後、攪拌しながら室温で一晩反応させた。反応終了後、GFP 濾紙を用いて吸引濾過し、炭酸銀を除去した。

④脱アセチル化

③で得た **IV** を含むメタノール溶液全量に、28%ナトリウムメトキシド/メタノール溶液 9.65 g を加え、全体として 0.1 mol/L ナトリウムメトキシド濃度のメタノール溶液とし、40°C で 3 時間反応させた。

⑤精製

④で得た **MGP-2D (V)** とナトリウムメトキシドを主成分として含むメタノール溶液を減圧濃縮し、シロップとした。このシロップに水 100 mL を加えた後、陽イオン交換樹脂 (H^+ 型)、および、陰イオン交換樹脂 (HO^- 型) で満たしたガラスカラムに順次通過させて、透明な水溶液とした。この水溶液を濃縮し、得られたシロップにアセトニトリルを少量加え、結晶を得た。これを 70°C の湯浴中で水とアセトニトリルを微量に加えることによって溶解し、室温まで徐々に温度を下げた。さらに 4°C 以下で一晩放置し、再結晶を行った。得られた結晶を濾過洗浄し、**MGP-2D (V)** を得た。収率は、82% (対出発化合物 **I**) であった。

MGP-3D、**MGP-4D**、**MGP-5D** および **MGP-6D** の収率はそれぞれ 76%、80%、76% および 69% (対出発化合物) であった。**MGP-MeD** の合成では、③においてメタノールではなく重メタノール (CD_3OD) を用いて 5 日間反応を行った。収率は、31% (対出発化合物) であった。**MGP-1D**、**MGP-2D**、**MGP-3D**、**MGP-4D**、**MGP-5D**、**MGP-6D** および **MGP-MeD** の 1H -NMR スペクトルを、Fig. 3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、3-11 および 3-12 にそれぞれ示す。

C:\WINALPHA\COMMON\DEFAULT.ALS

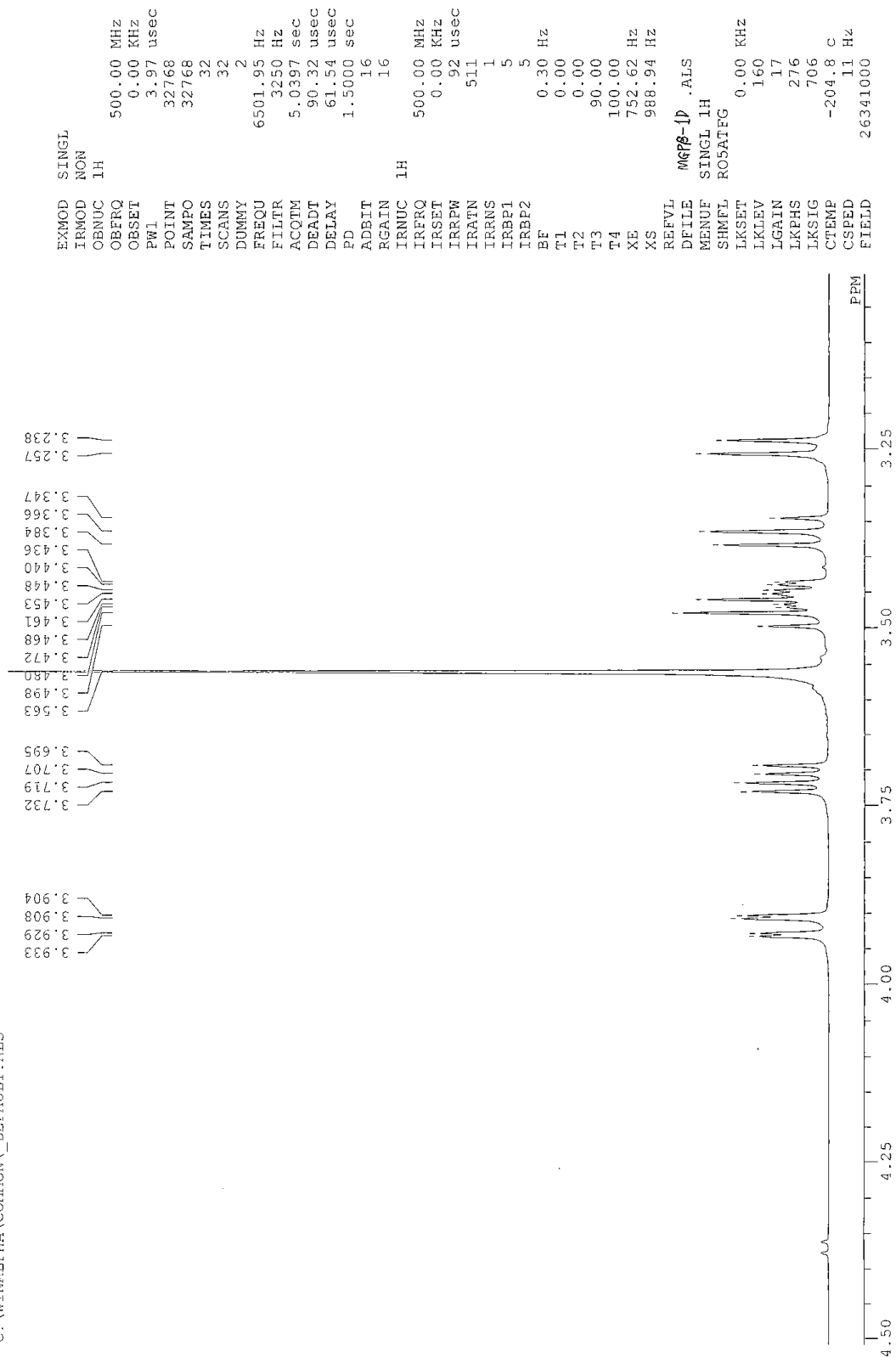


Fig. 3-6 ^1H -NMR spectrum of MGP-1D in D_2O

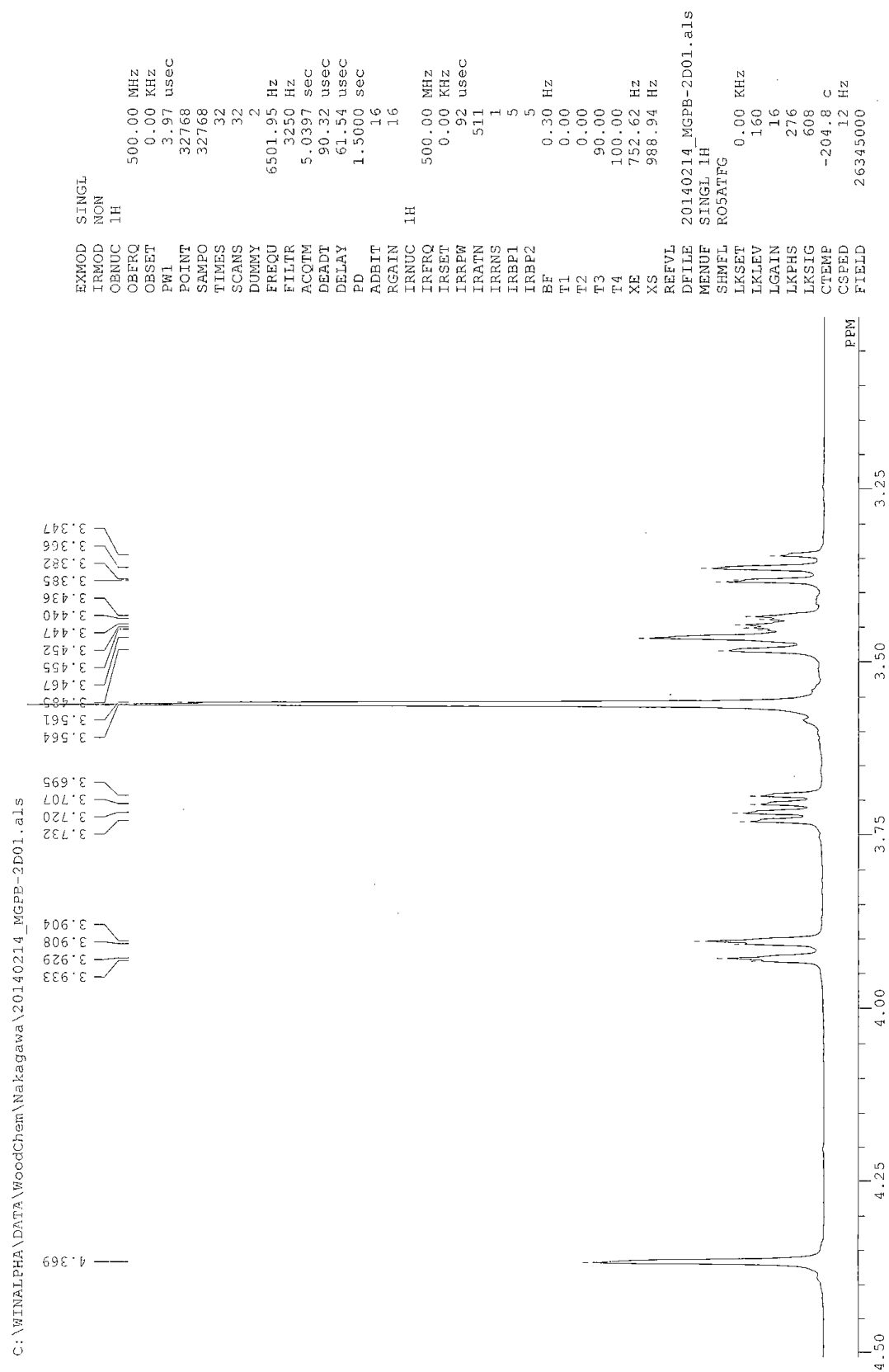


Fig. 3-7 ^1H -NMR spectrum of MGP-2D in D_2O

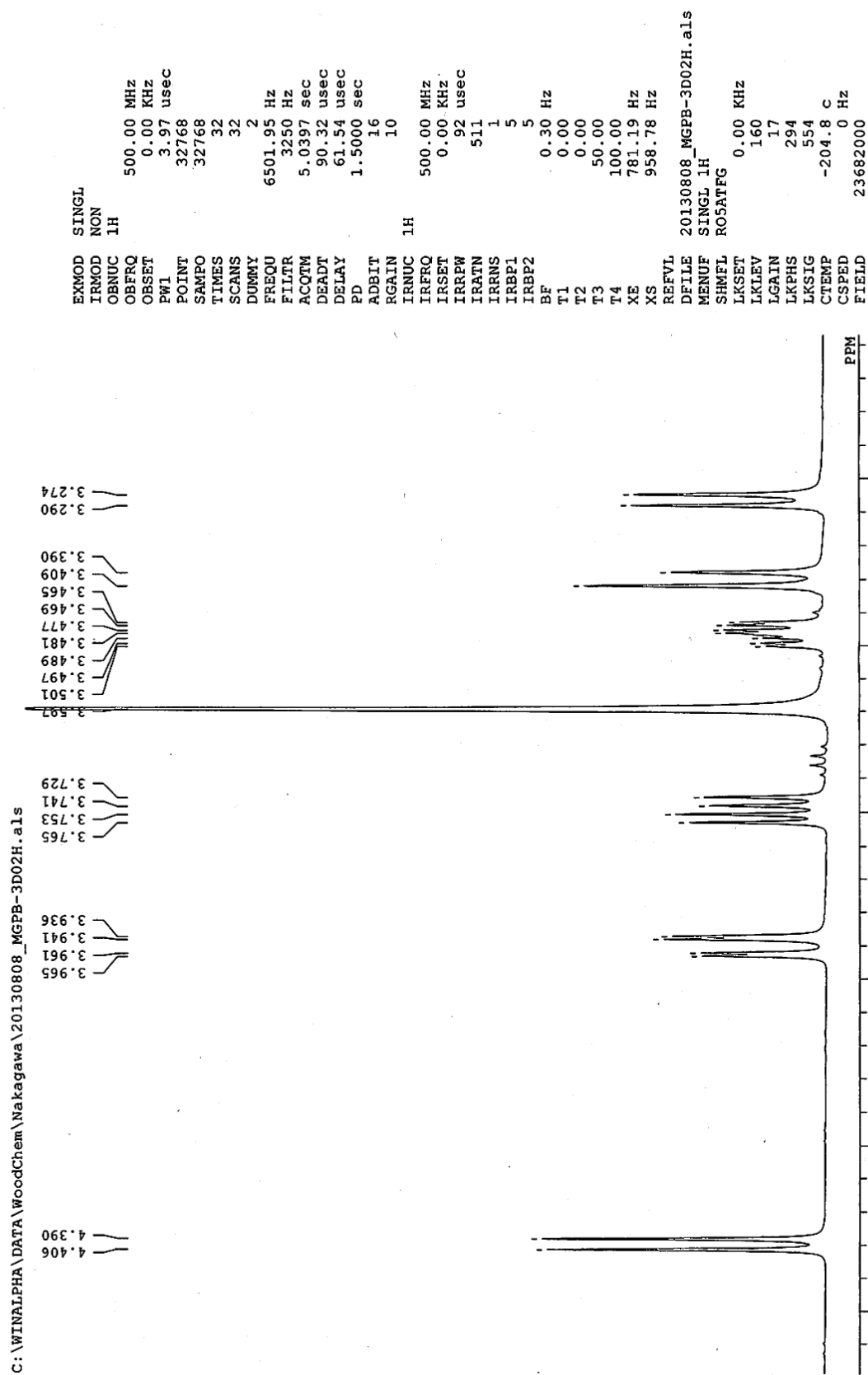


Fig. 3-8 ^1H -NMR spectrum of MGP-3D in D_2O

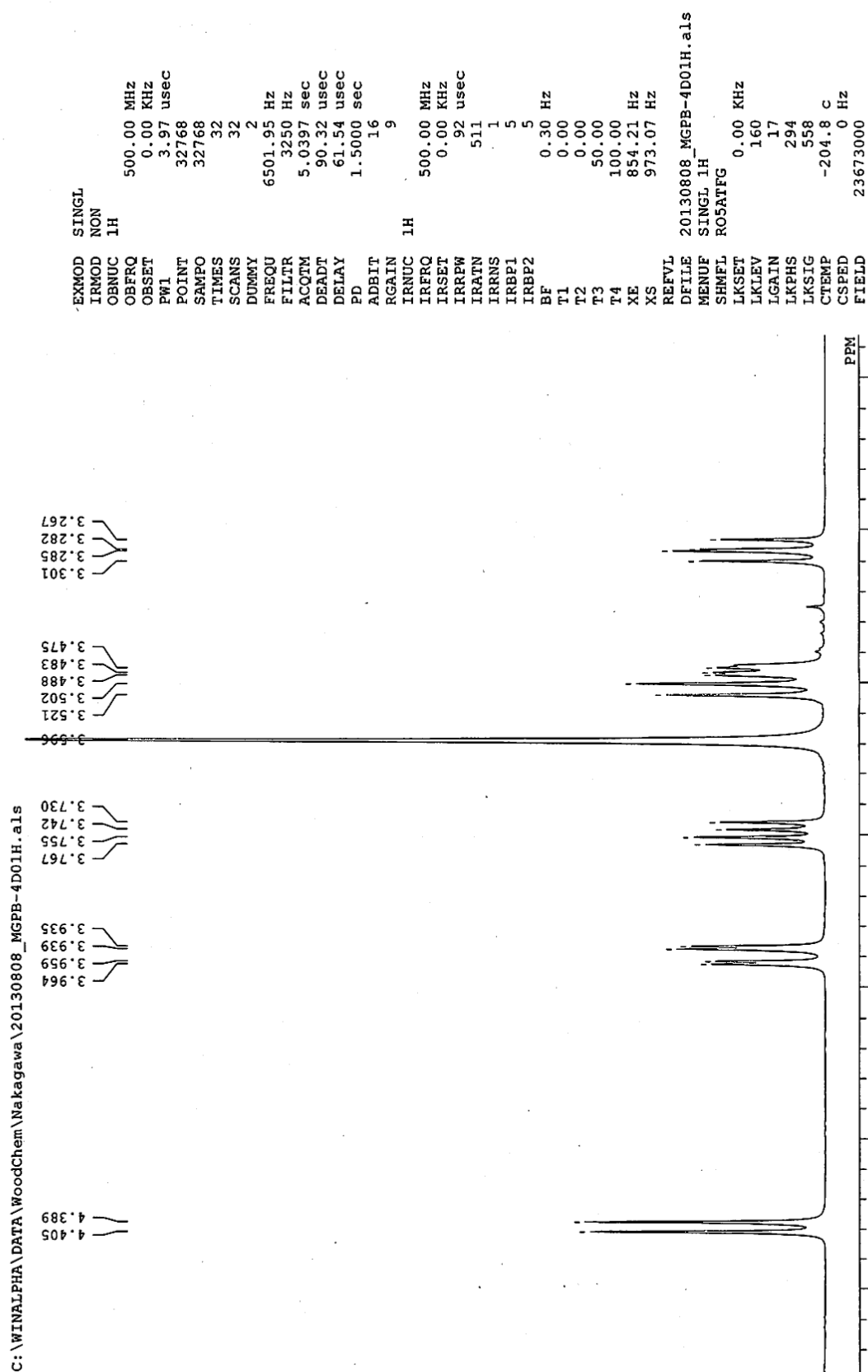


Fig. 3-9 ^1H -NMR spectrum of MGP-4D in D_2O

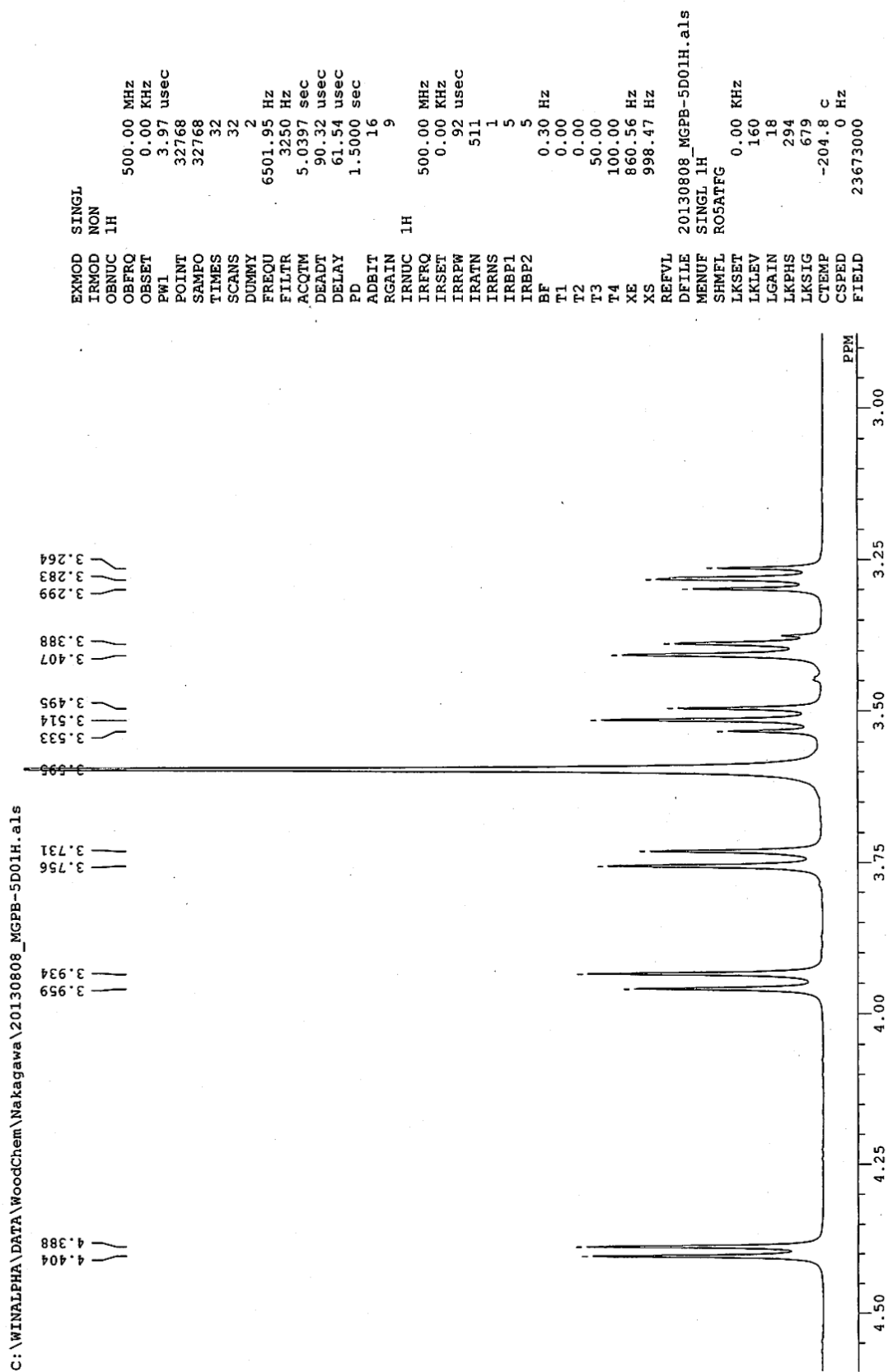


Fig. 3-10 ^1H -NMR spectrum of MGP-5D in D_2O

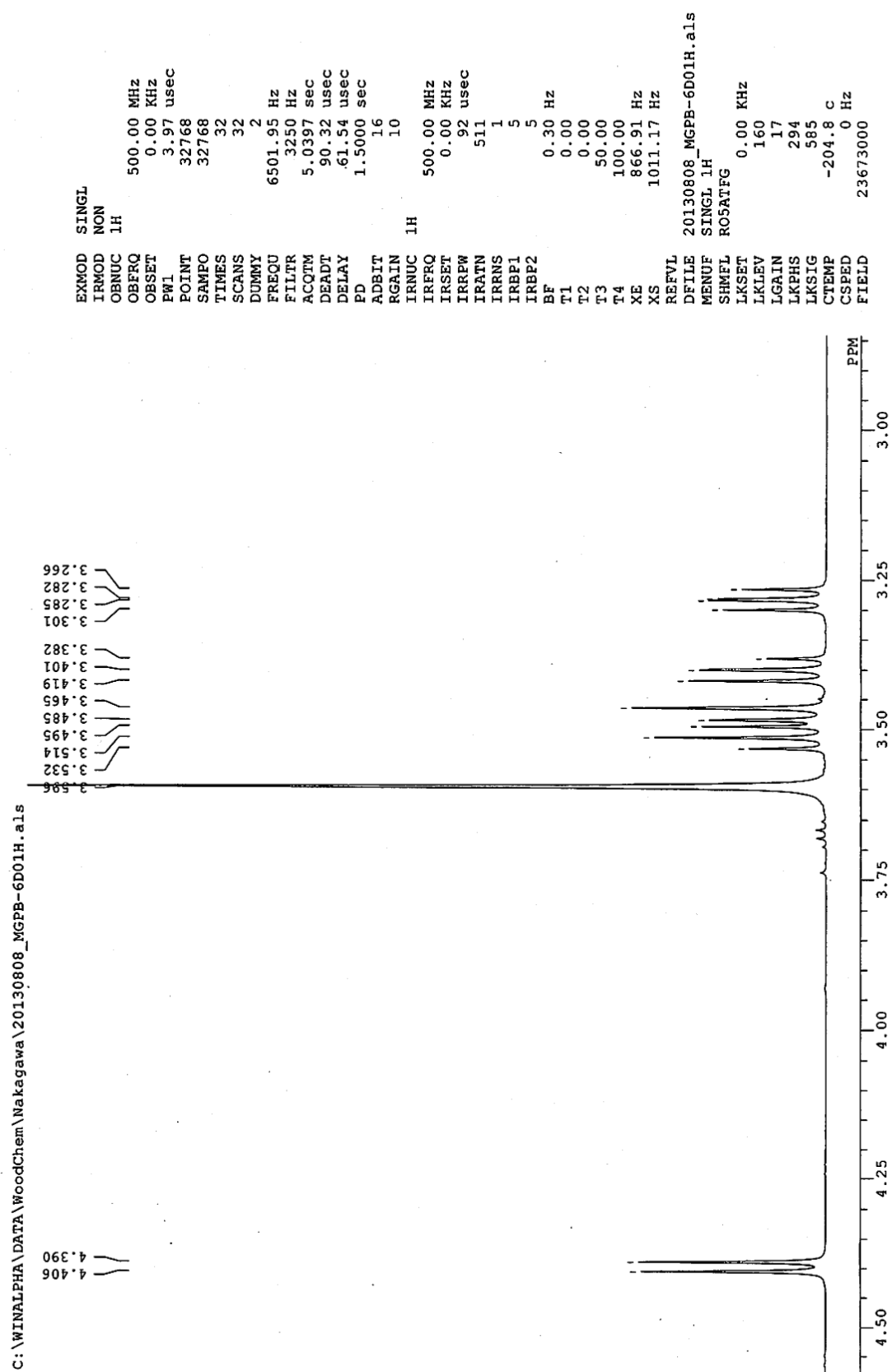


Fig. 3-11 ^1H -NMR spectrum of MGP-6D in D_2O

C:\WINALPHA\DATA\WoodChem\Nakagawa\20121205_1H.ALS

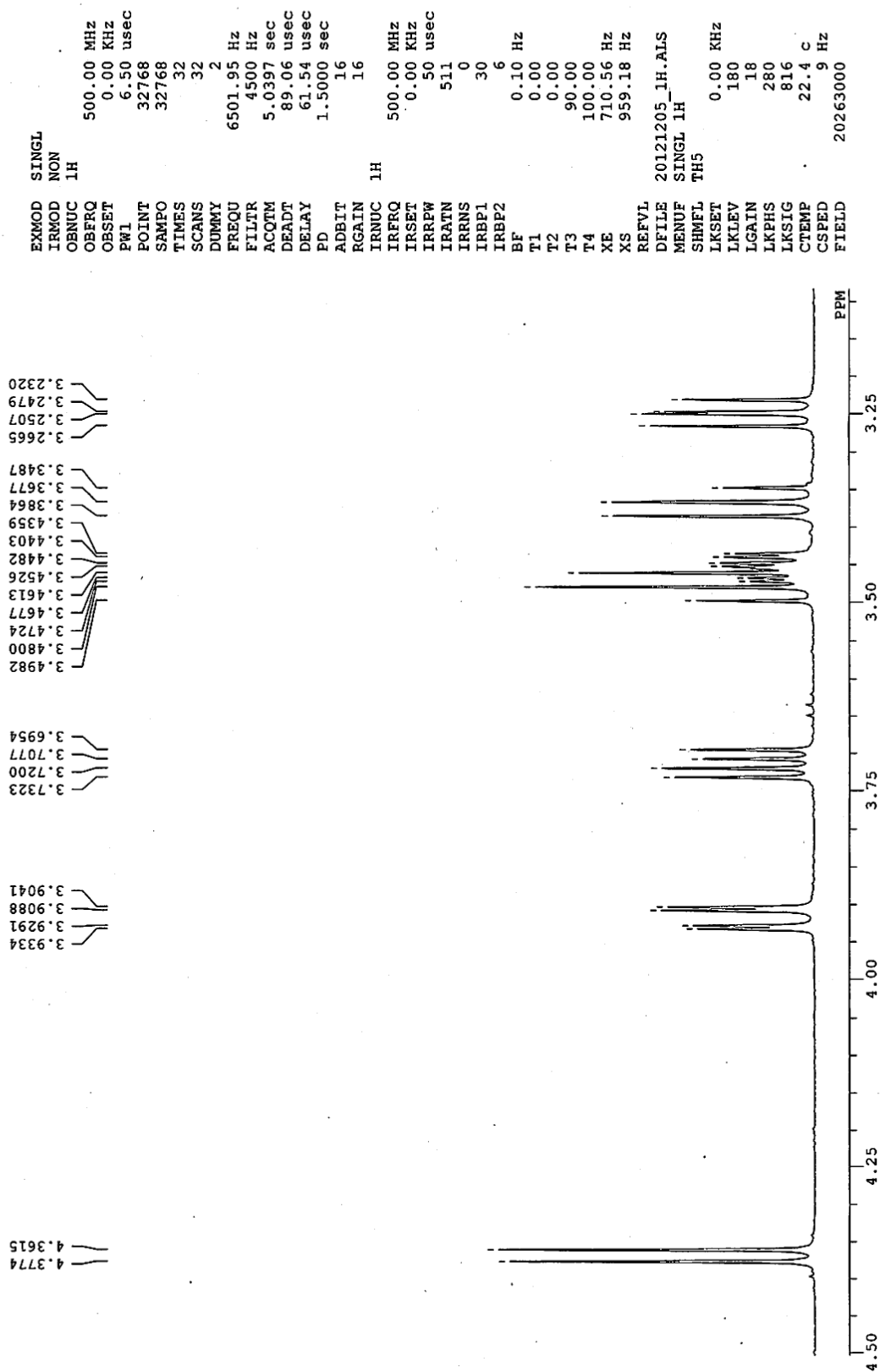


Fig. 3-12 ^1H -NMR spectrum of MGP-MeD in D_2O

MGP-allD は、Fig. 3-13 に示すように、D-(1,2,3,4,5,6,6-²H₇)glucose (太陽日酸製) から、酸性重メタノール中でのグリコシル化により、合成した。この方法では、MGP-allD だけでなく、アノマーにあたる (²H₃)methyl α-D-(1,2,3,4,5,6,6)glucopyranoside も生成するので、これらをベンゾイル化の後、分取用薄層クロマトグラフィーを用いて分離した。

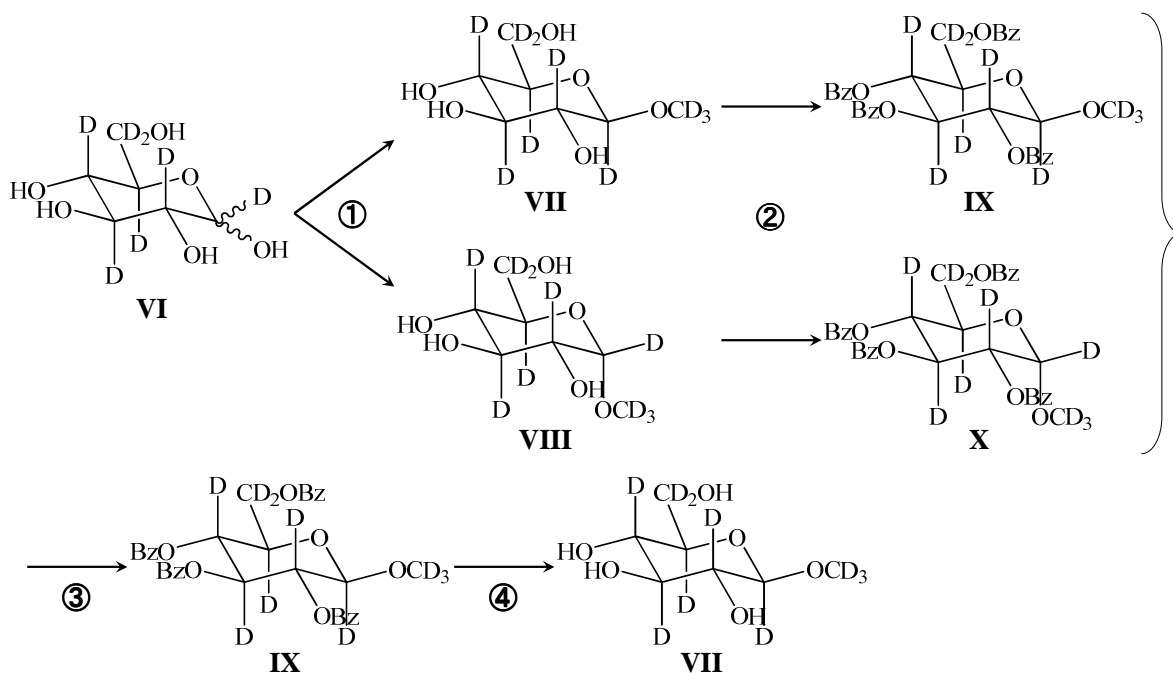


Fig. 3-13 Synthesis route of MGP-allD

①メチルグルコシド化

0.3 mol/L D₂SO₄ を含む CD₃OD 溶液に D-(1,2,3,4,5,6,6-²H₇)glucose (**VI**) 1 g を溶かし、室温で攪拌しながら 9 日間放置した。炭酸水素ナトリウムを加えて中和することによって反応を停止し、不溶物を濾別してから減圧濃縮することによって、MGP-allD (**VII**) と MGP-allD のアノマー (**VIII**) を主成分として含むシロップを得た。

②ベンゾイル化

①で得たシロップにピリジン 200 mL と塩化ベンゾイル 15 g を加え、室温で攪拌しながら一晩反応させた。これにジクロロメタン 200 mL を加えて 1 mol/L 塩酸で 3 回洗浄した後、飽和炭酸水素ナトリウム溶液 200 mL を加えて 1 晩攪拌しながら残存する塩化ベンゾイルと塩化水素を除去した。この飽和炭酸水素ナトリウムとの反応は、計 4 回行った。反応後、ジクロロメタン層を飽和塩化ナトリウム溶液 100 mL で洗浄した後、無水硫酸ナ

トリウムを加えて脱水した。沈殿を自然濾過して減圧濃縮し、ベンゾイル基を有する **IX** および **X** を含むシロップを得た。

③分取用 TLC による分離

②で得たシロップをジクロロメタン 100 mL に溶解し、分取用 TLC (シリカゲル) によって、**IX** と **X** を分離した。展開溶媒として、酢酸エチル : ヘキサン = 1 : 4 を用いた。**IX** に相当する位置からシリカゲルを剥ぎ取り、これを酢酸エチル中で攪拌しながら一晩抽出した。シリカゲルを濾別してから酢酸エチル溶液を減圧濃縮し、**IX** の結晶を得た。

④脱ベンゾイル化

③で得た **IX** の結晶に、0.1 mol/L ナトリウムメトキシド/メタノール溶液 200 mL を加え、40°C で 3 時間反応させた。

⑤精製

④で得た MGP-allD (**VII**) を含むメタノール溶液を減圧濃縮し、シロップとした。続いて、0.5 mol/L 塩酸 100 mL を加えて酸性化し、ジクロロメタン 100 mL で抽出した。水層を炭酸水素ナトリウムで中和した後、減圧乾固した。得られた結晶にエタノール 100mL を加え、攪拌しながら一晩溶解させた。沈殿を吸引ろ過した後、エタノール溶液を減圧濃縮してシロップとした。このシロップに水 100 mL を加えた後、陽イオン交換樹脂 (H^+ 型)、および、陰イオン交換樹脂 (HO^- 型) で満たしたガラスカラムに順次通過させ、透明な溶液を得た。この溶液を濃縮し、得られたシロップ状物質残渣にアセトニトリルを少量加えたところ、結晶が得られた。これを 70°C の湯浴中で水とアセトニトリルを微量に加えることによって溶解し、室温まで徐々に温度を下げた。その後、4°C 以下で一晩放置し、得られた結晶を濾過して MGP-allD (**II**) を得た。収率は、29% (対出発物) であった。MGP-allD の ^{13}C -NMR スペクトルを、Fig. 3-14 に示す。なお、MGP-allD の 1H -NMR スペクトルには、ピークが現れなかった。

¹³CNMR-5mg

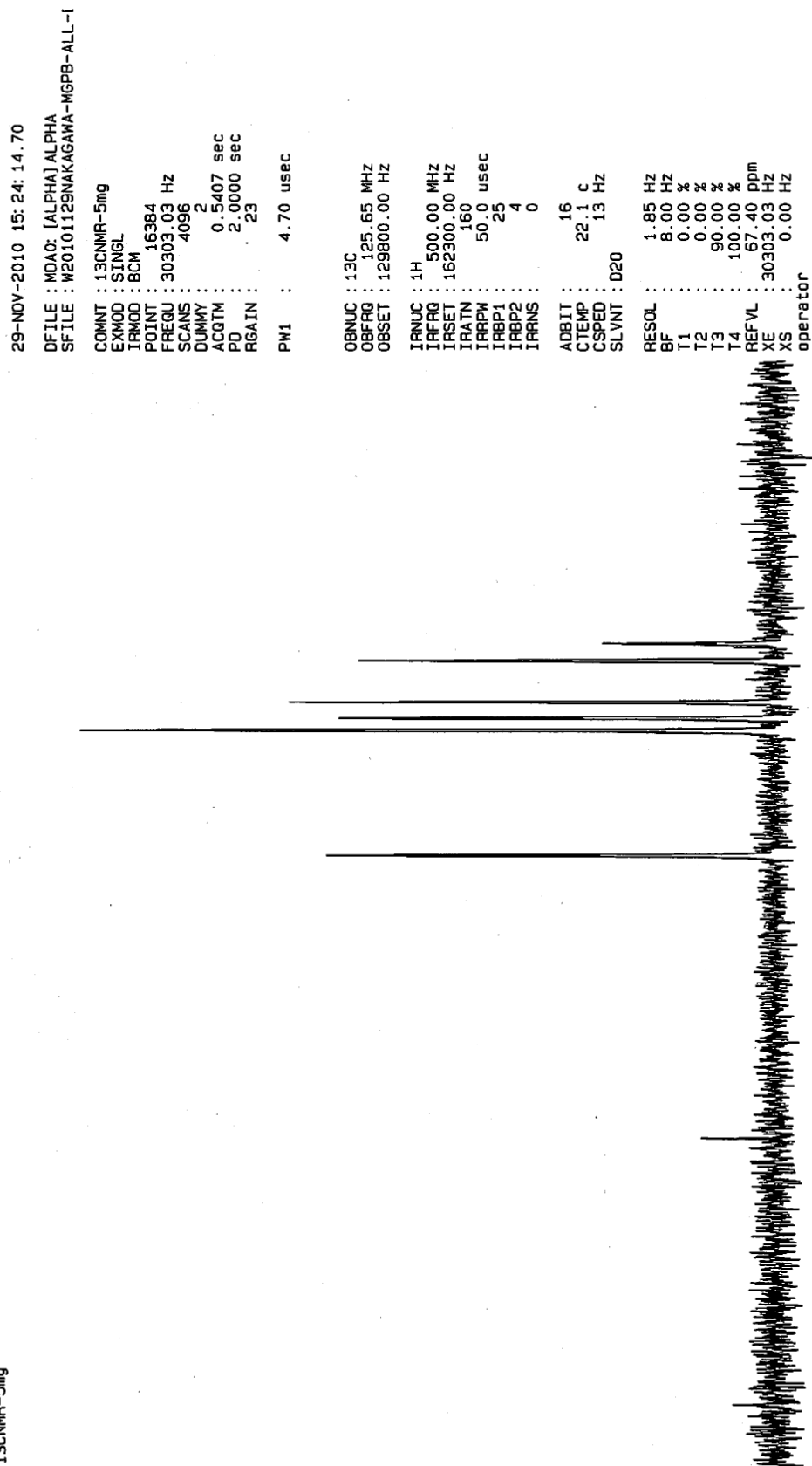


Fig. 3-14 ¹³C-NMR spectrum of MGP-allD in D₂O

3.2.2 酸素－アルカリ処理

糖モデル化合物として MGP および 重水素化 MGP の 2 種類を用いたこと以外は、全て 2.2.2.1 に記載した通りに行った。なお、MGP と MGP-allD 以外の重水素化 MGP の GC ピークは重なるため、これらの分析の場合は、GC/MS も使用した。MGP と MGP-allD の分析は、GC のみで行った。TIC (total ion chromatogram) における MGP および重水素化 MGP のピークの検出開始から終了までの期間の平均のマスペクトルから適当な 2 つの m/z ピークを選び、これら 2 つの相対強度比から検量線を作成することにより、これらの化合物の量比を測定した。MGP と MGP-1D の定量では 127 および 128 の m/z ピークを、MGP と MGP-2D の定量では 169 および 170 の m/z ピークを、MGP と MGP-3D の定量では 112 および 113 の m/z ピークを、MGP と MGP-4D の定量では 157 および 158 の m/z ピークを、MGP と MGP-5D の定量では 169 および 170 の m/z ピークを、MGP と MGP-6D の定量では 141 および 143 の m/z ピークを、そして、MGP と MGP-MeD の定量では 127 および 130 の m/z ピークを、それぞれ使用した。GC/MS の分析条件は、以下の通りとした。

GC/MS の分析条件 (GC-2010/PARVUM2 島津製作所製)

カラム : IC-1 (GL サイエンス製、長さ 30 m、内径 0.25 mm、膜厚 0.25 μm)

キャリアガス : He

昇温条件 : 100 $^{\circ}\text{C}$ —(5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$)→200 $^{\circ}\text{C}$ —(10 min)→200 $^{\circ}\text{C}$ (Total 30 min)

インジェクション温度 : 250 $^{\circ}\text{C}$

ディテクター温度 : 250 $^{\circ}\text{C}$

3.2.3 過酸化水素—アルカリ処理

糖モデル化合物として MGP および 重水素化 MGP の 2 種類を用いたこと以外は、全て 2.2.2.2 に記載した通りに行った。

糖モデル化合物の定量は、前項に記述した方法に従った。

3.3 結果

3.3.1 TMPH を AOS 生成源とした反応

TMPh 由来の AOS による MGP の各水素への攻撃について検討するため、MGP と重水素化 MGP の 2 種類を共存させ、TMPh と共に酸素-アルカリ処理に供した。Fig. 3-15 ~ 3-34 に、それぞれの組み合わせにおける MGP と重水素化 MGP の分解挙動を示す。Fig. 3-17、3-20、3-23、3-26、3-29 および 3-32 に示す曲線は、複数回の実験により得られたデータに最も合致するように描いた。なお、MGP と MGP-2D の反応は合計 3 回、そして、MGP と MGP-2D 以外の反応はそれぞれ合計 2 回ずつ行った。MGP と MGP-1D の反応については、小西らのデータ (Fig. 3-2) を使用する。

Fig. 3-2、3-17、3-20、3-23、3-26、3-29、3-32、3-33 および 3-34 から分かるように、全ての反応系における MGP と重水素化 MGP の分解挙動は類似しており、TMPh が消失する反応時間 45 分までに分解が大きく進行し、両者の分解の差異はこの期間に出現した。TMPh 消失後の 45 分以降は分解は穏やかになり、両者の分解差はほぼ一定であった。MGP と MGP-2D との分解量の差 (Fig. 3-17) は MGP と他の重水素化 MGP (MGP-allD は除く) との分解量の差よりも大きく、速度論的同位体効果が最も顕著に現れた。これは、小西らが得た MGP と MGP-1D との分解の量の差 (Fig. 3-2) よりも大きかった。また、MGP と MGP-2D の場合よりは小さいながらも、MGP と MGP-3D との間 (Fig. 3-20)、および、MGP と MGP-4D との間 (Fig. 3-23) でも分解量が明瞭に異なり、速度論的同位体効果が観測された。一方、MGP と MGP-5D との間 (Fig. 3-25)、および、MGP と MGP-6D との間 (Fig. 3-29) では分解量の差が非常に小さく、明瞭な速度論的同位体効果が観測されなかった。MGP と MGP-MeD (Fig. 3-32) の反応では、他の反応系とは異なり、MGP よりも MGP-MeD の方が多く分解された。MGP と MGP-allD との分解量の差はかなり大きく、明瞭な速度論的同位体効果が観測された (Fig. 3-33 および 3-34)。

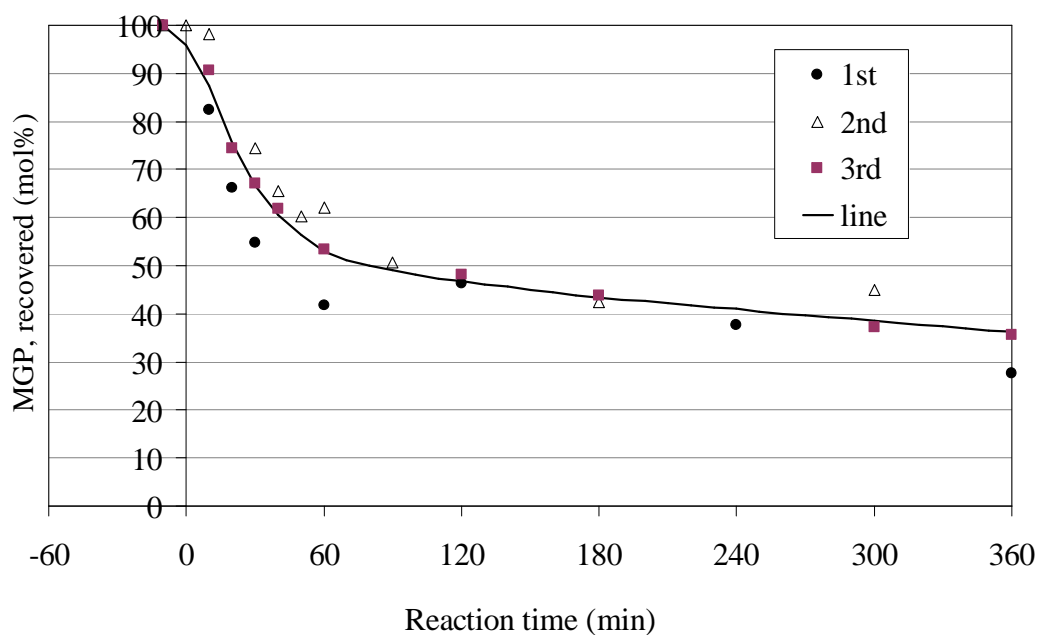


Fig. 3-15 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-2D, and TMPH were reacted together

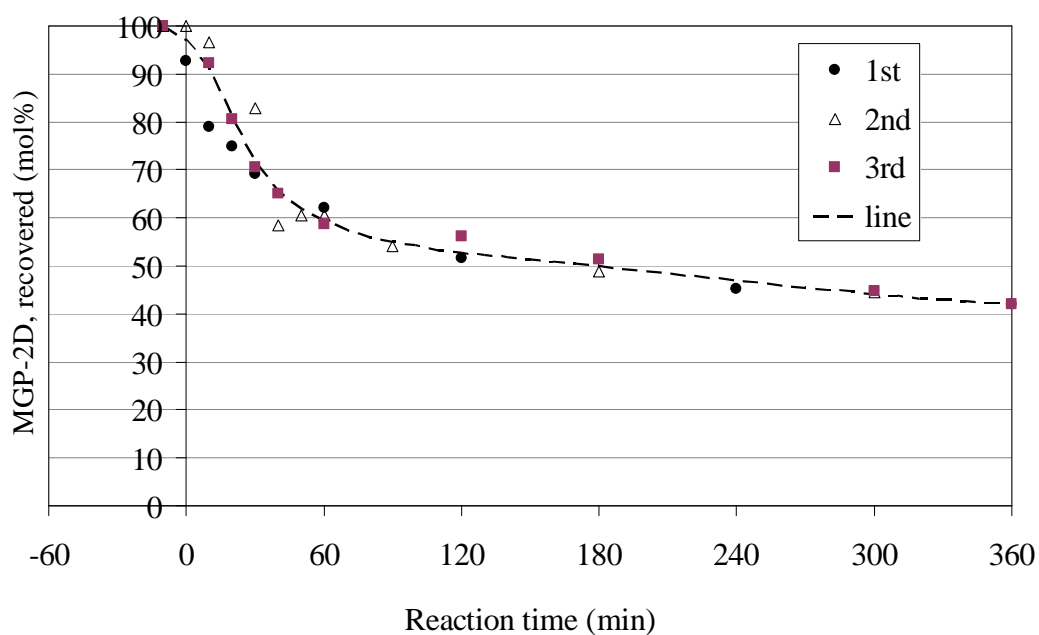


Fig. 3-16 Change in the yield of MGP-2D when MGP, MGP-2D, and TMPH were reacted together

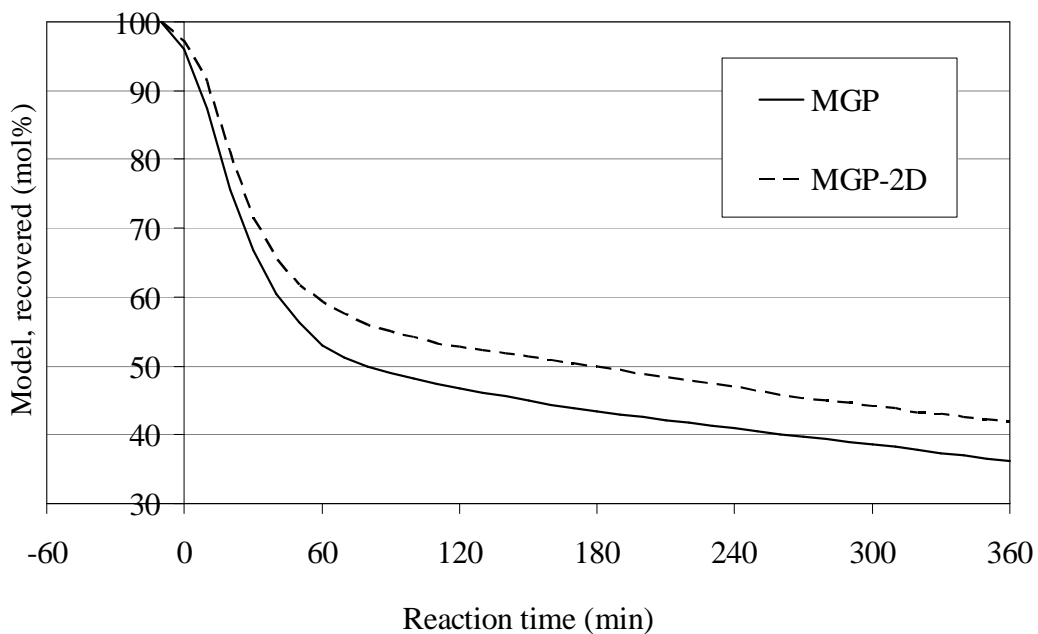
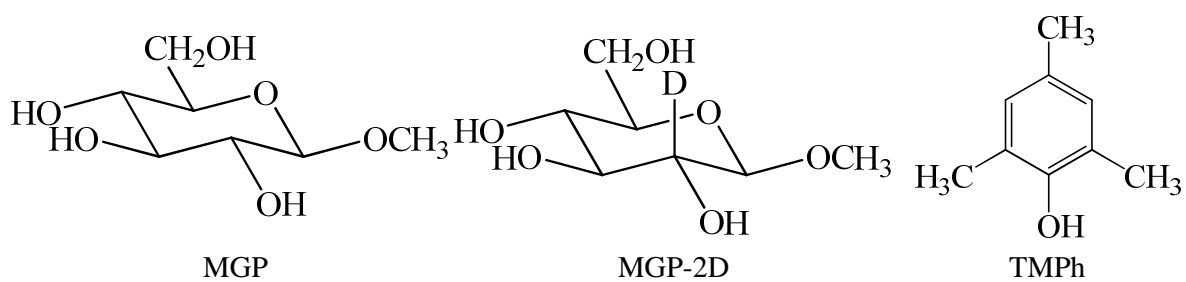


Fig. 3-17 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-2D when these compound were reacted together with TMPh

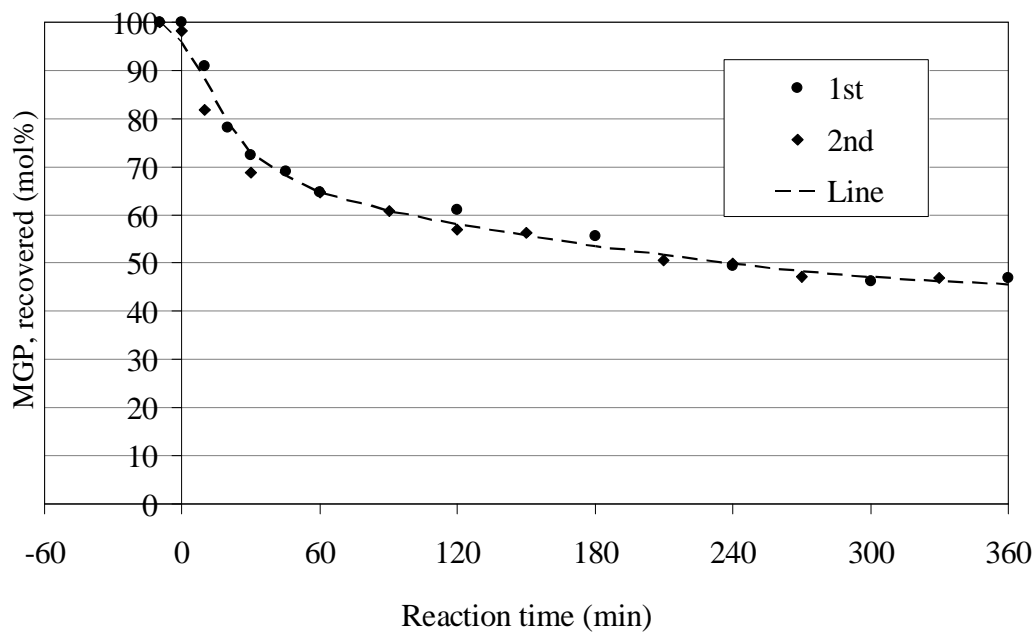


Fig. 3-18 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-3D, and, TPh were reacted together

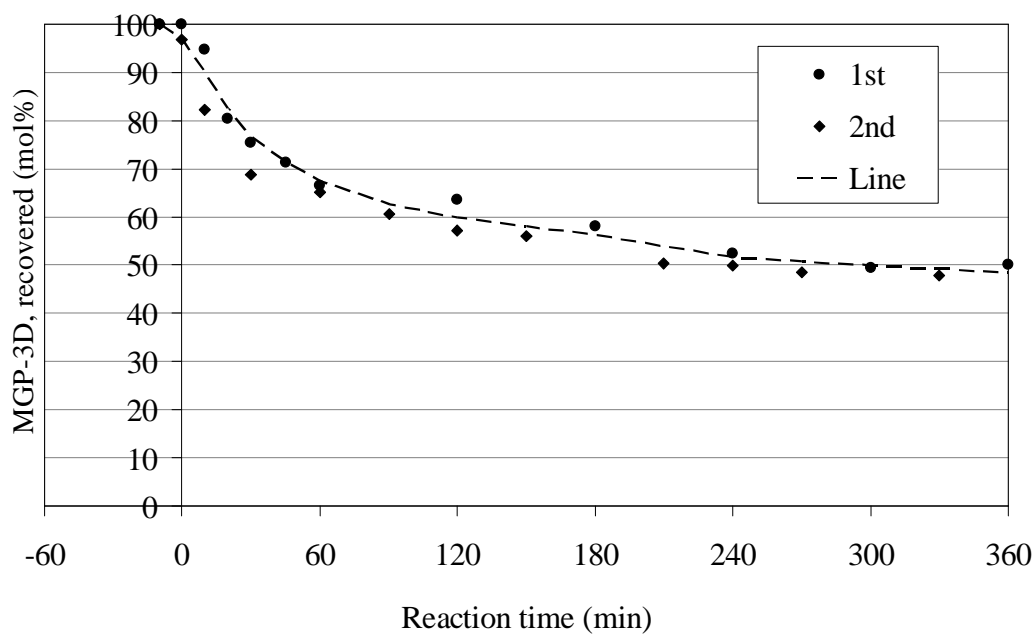


Fig. 3-19 Change in the yield of MGP-3D when MGP, MGP-3D, and, TPh were reacted together

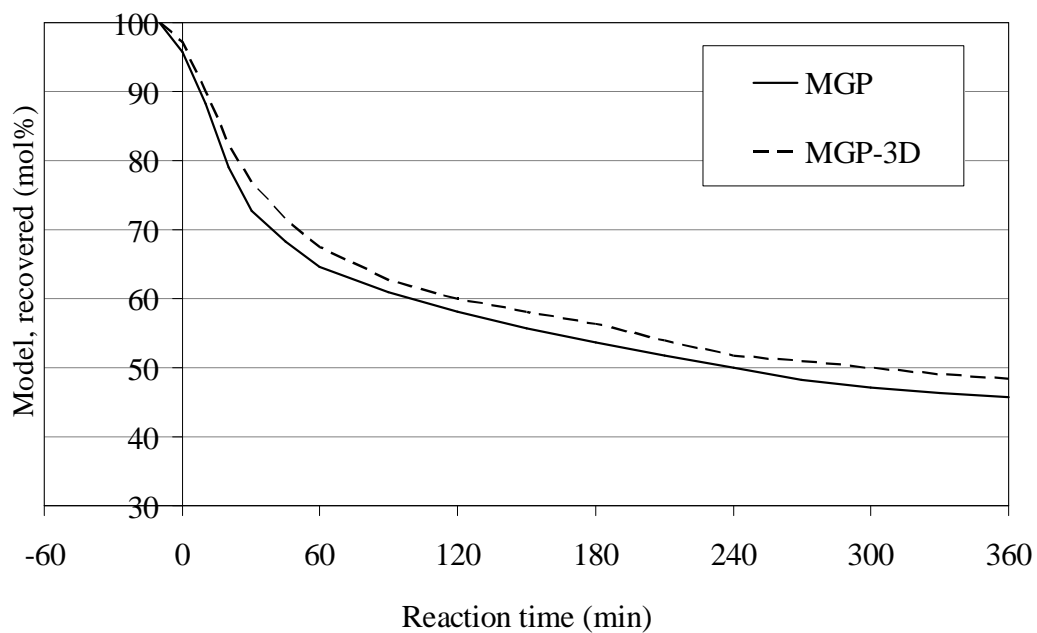
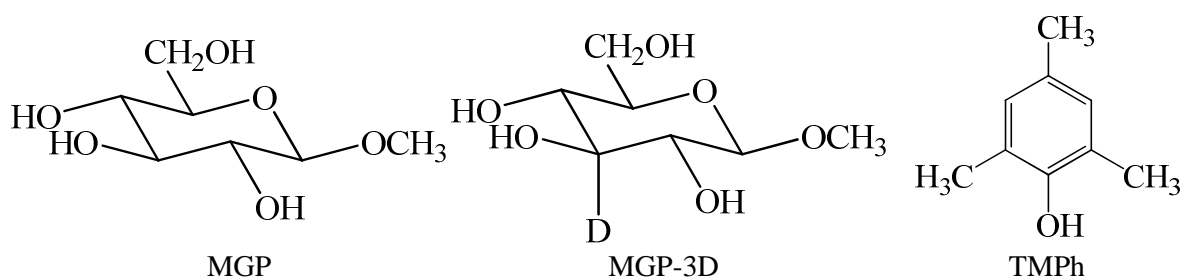


Fig. 3-20 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-3D when these compounds were reacted together with TMPh

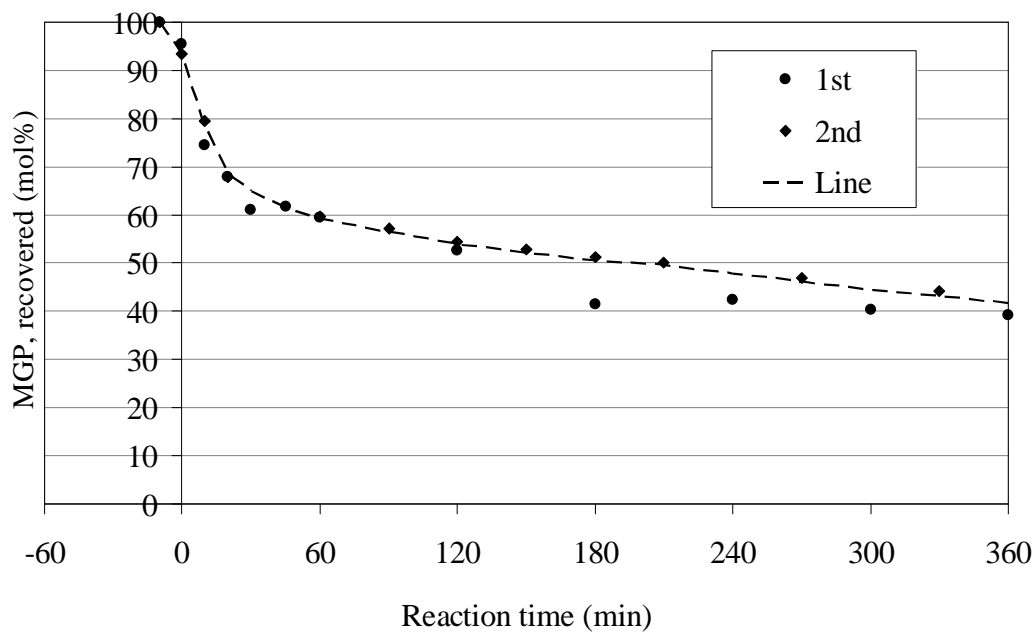


Fig. 3-21 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-4D, and, TPh were reacted together

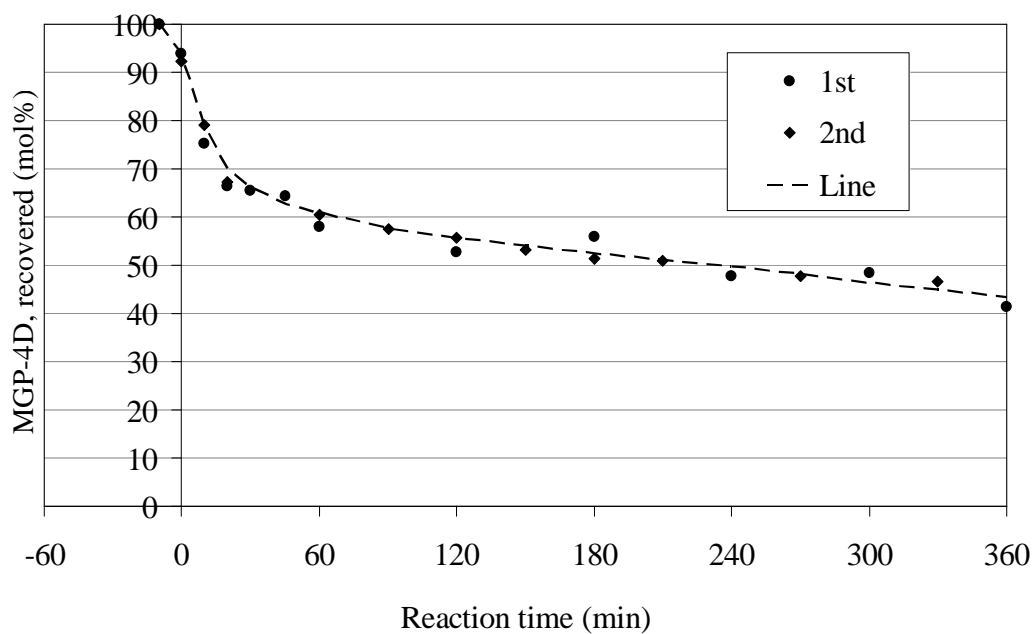


Fig. 3-22 Change in the yield of MGP-4D when MGP, MGP-4D, and, TPh were reacted together

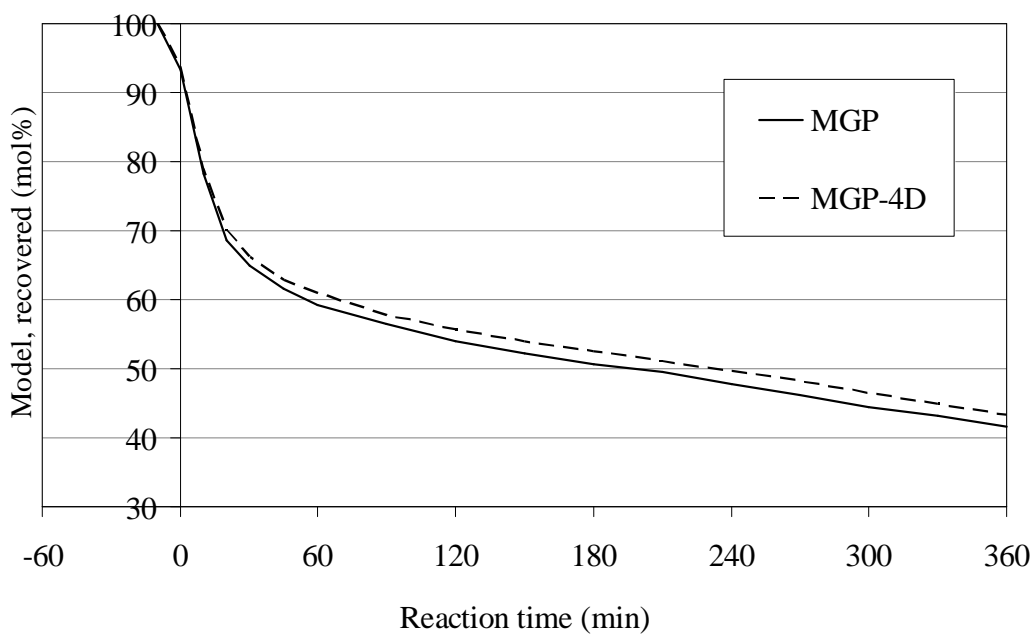
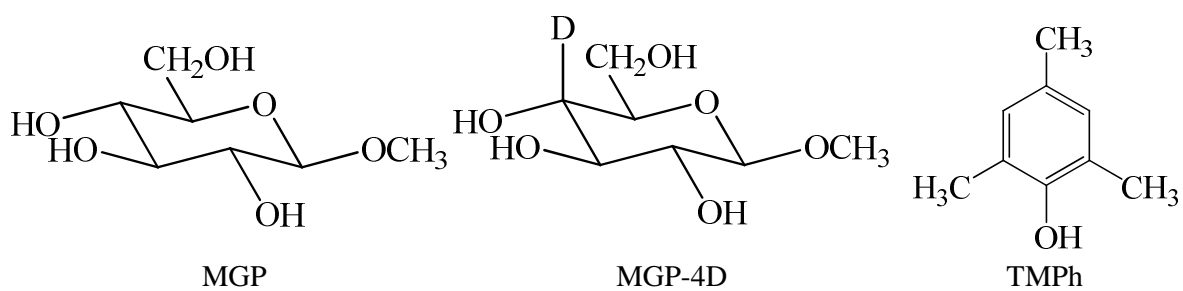


Fig. 3-23 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-4D when these compounds were reacted together with TMPh

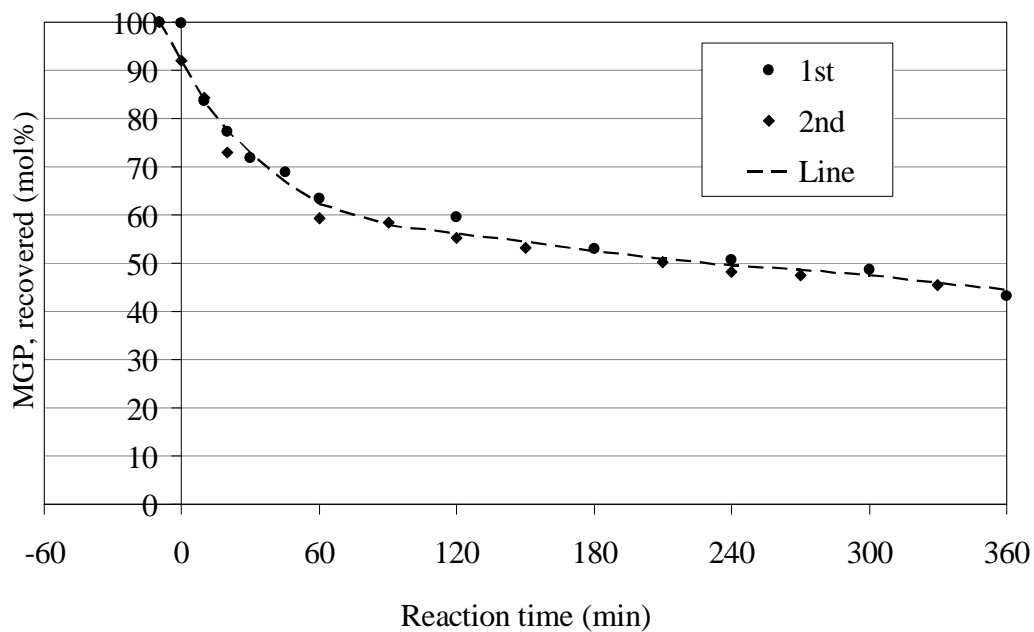


Fig. 3-24 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-5D, and, TMPh were reacted together

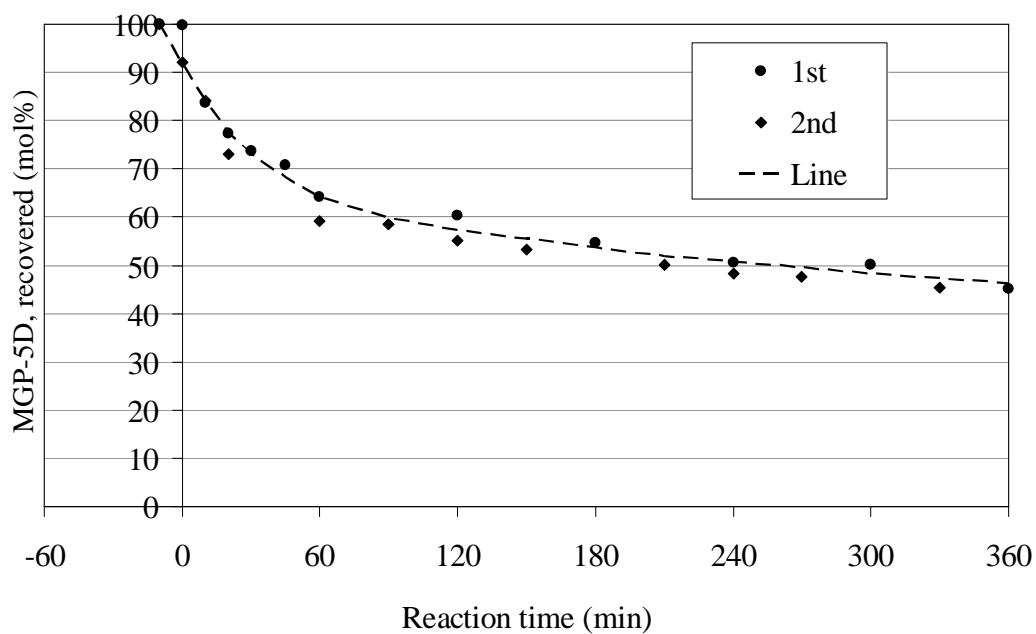


Fig. 3-25 Change in the yield of MGP-5D when MGP, MGP-5D, and, TMPh were reacted together

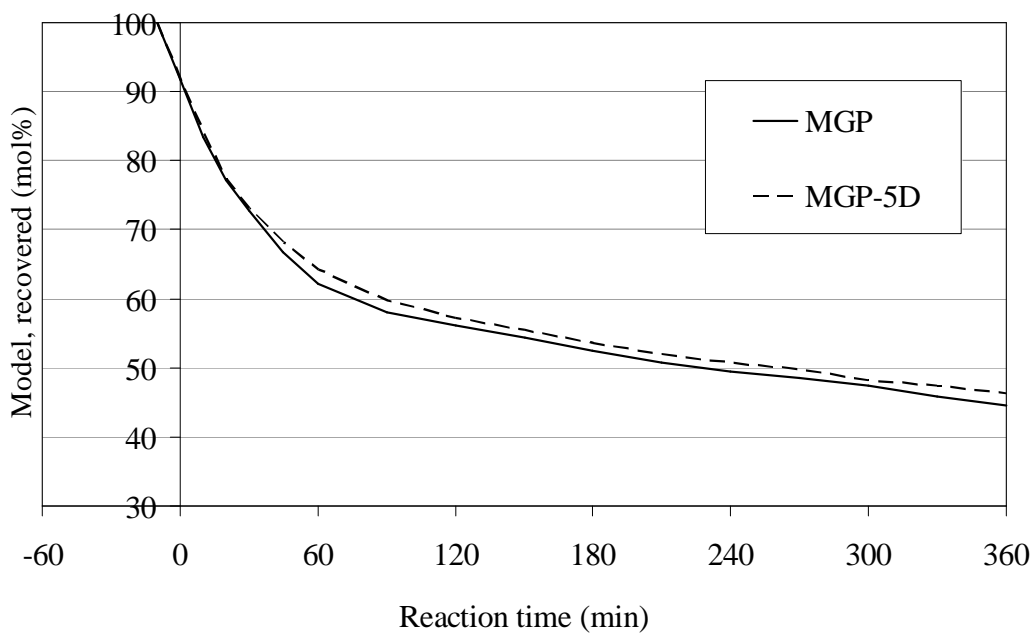
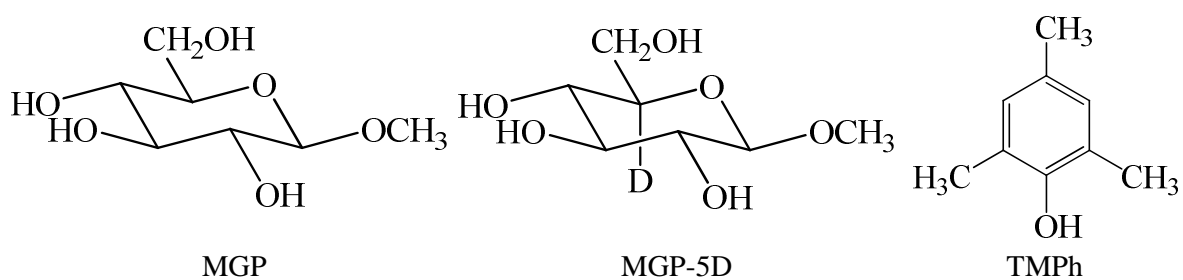


Fig. 3-26 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-5D when these compounds were reacted together with TMPh

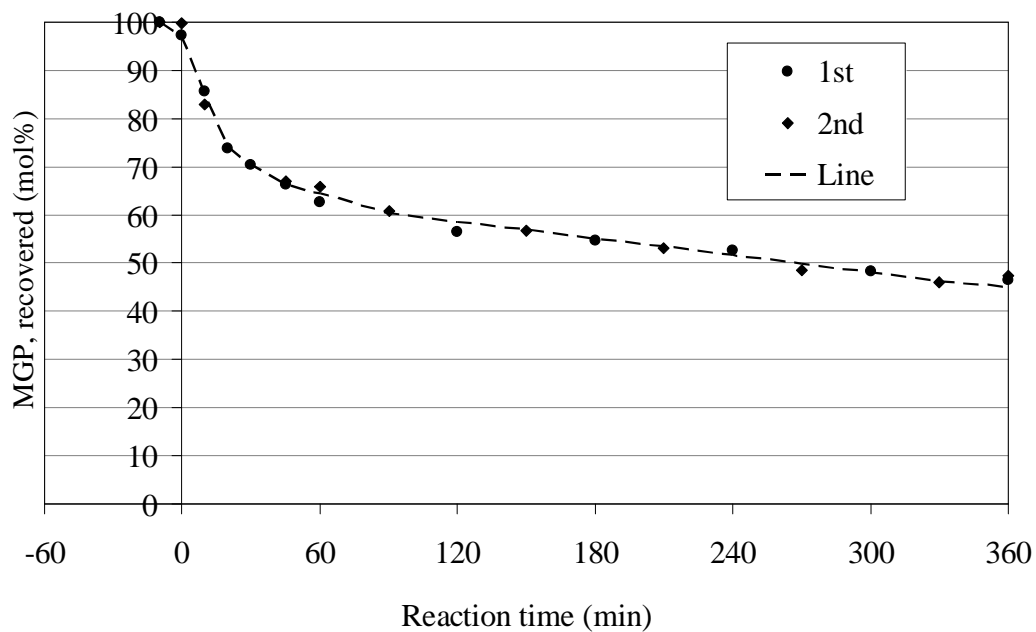


Fig. 3-27 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-6D, and, TMPh were reacted together

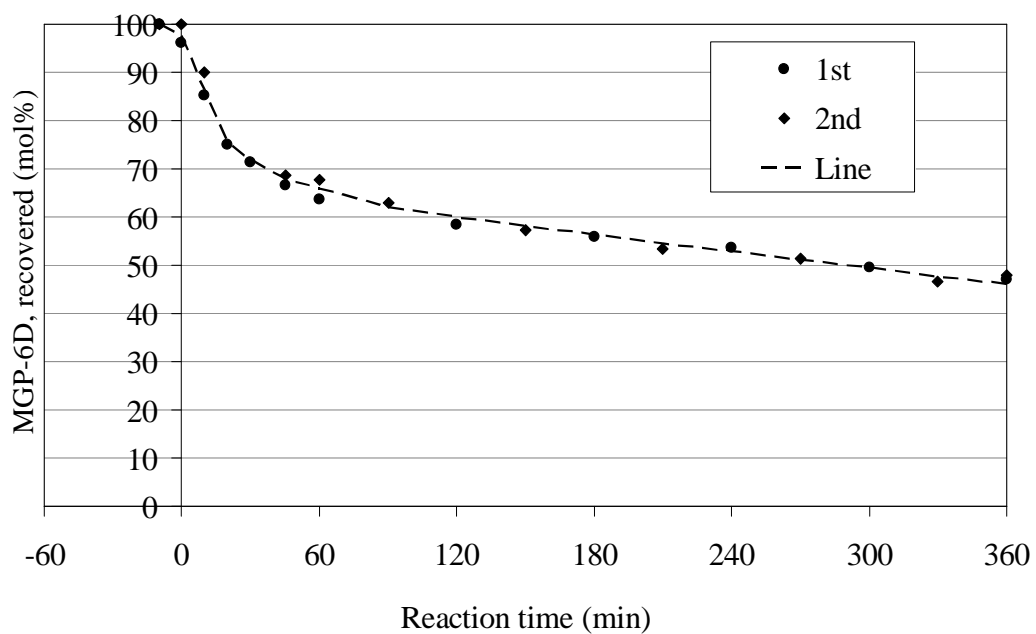


Fig. 3-28 Change in the yield of MGP-6D when MGP, MGP-6D, and, TMPh were reacted together

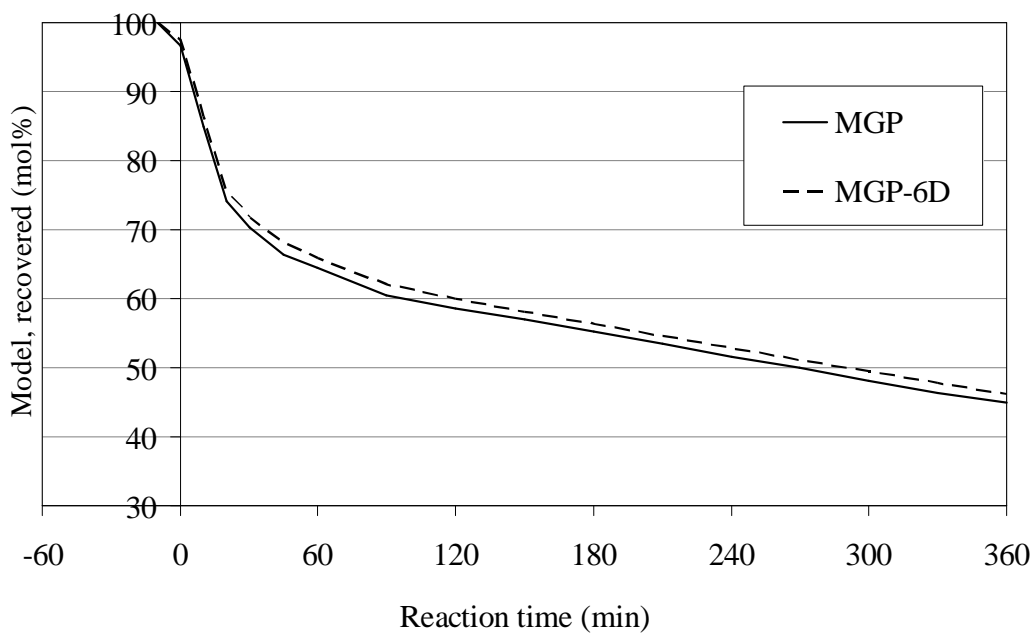
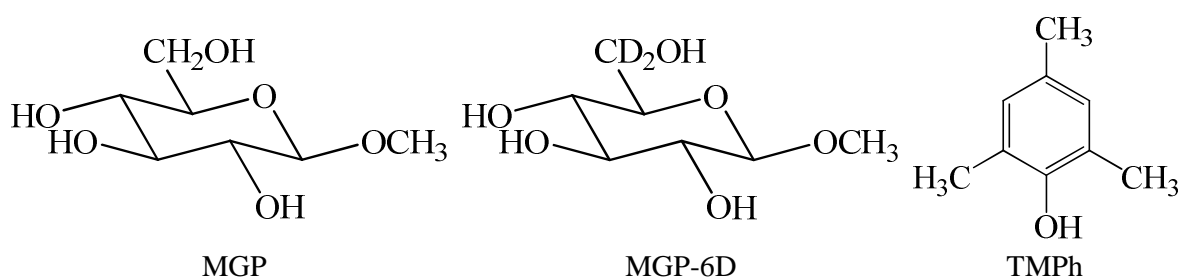


Fig. 3-29 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-6D when these compounds were reacted together with TMPh

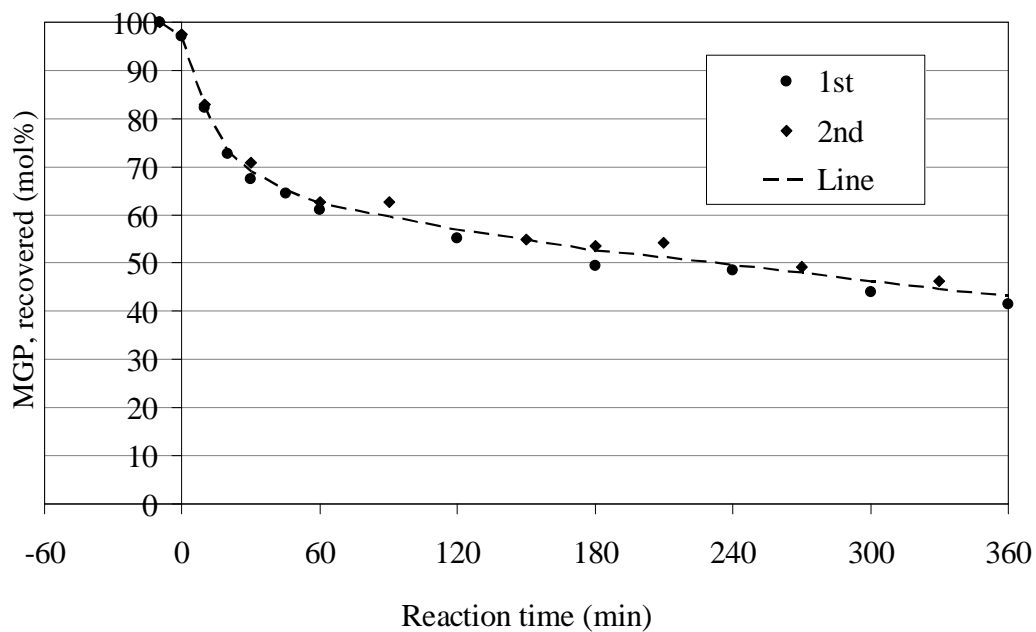


Fig. 3-30 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-MeD, and, TPh were reacted together

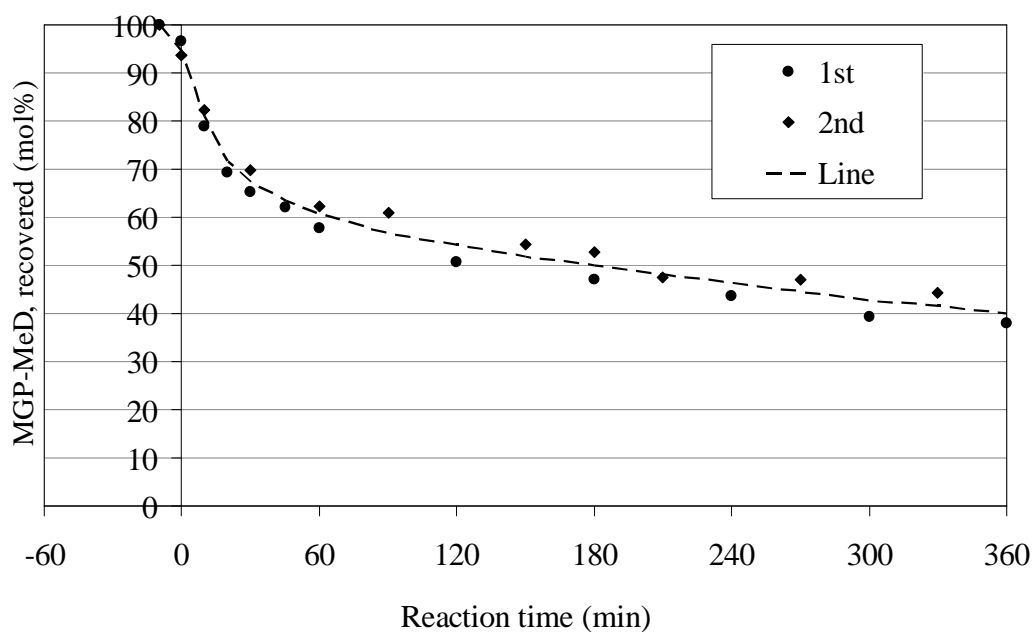


Fig. 3-31 Change in the yield of MGP-MeD when MGP, MGP-MeD, and, TPh were reacted together

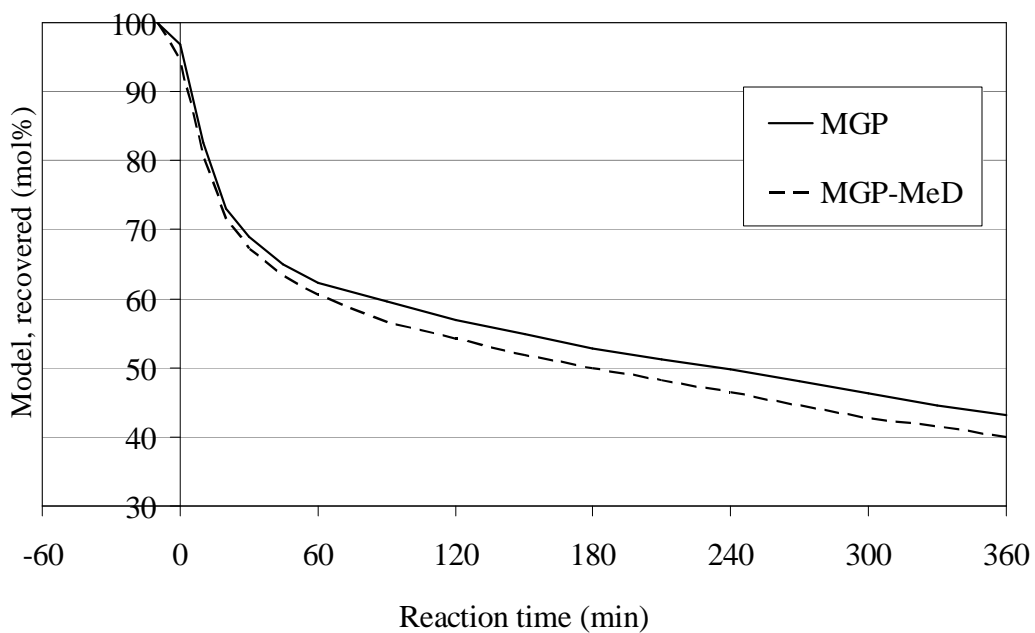
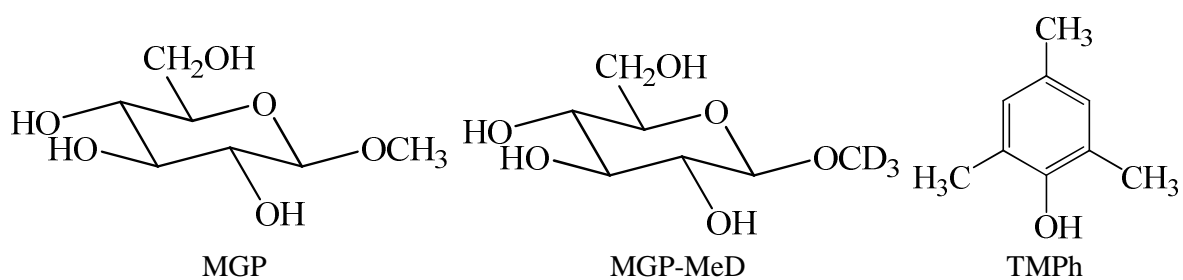


Fig. 3-32 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-MeD when these compounds were reacted together with TMPh

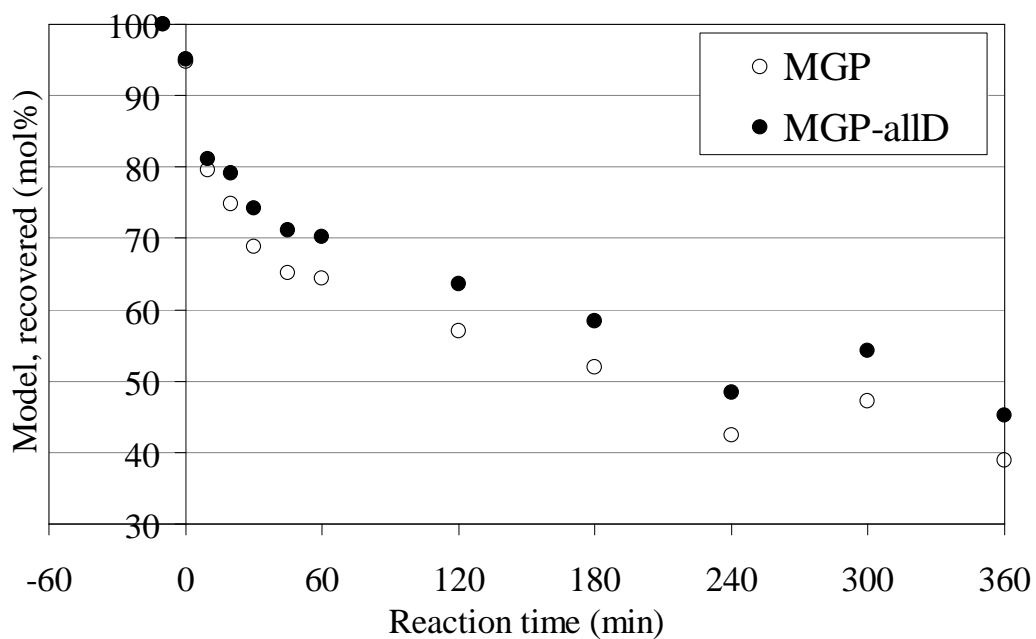
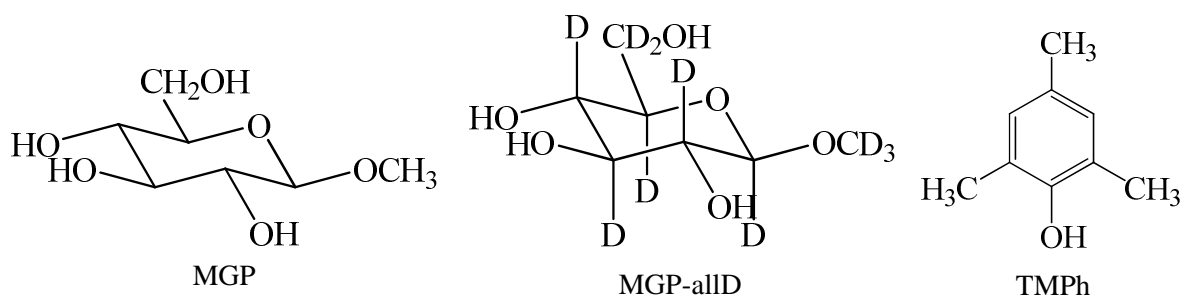


Fig. 3-33 Change in the yields of MGP and MGP-allD when MGP, MGP-allD, and, TMPh were reacted together (1st trial)

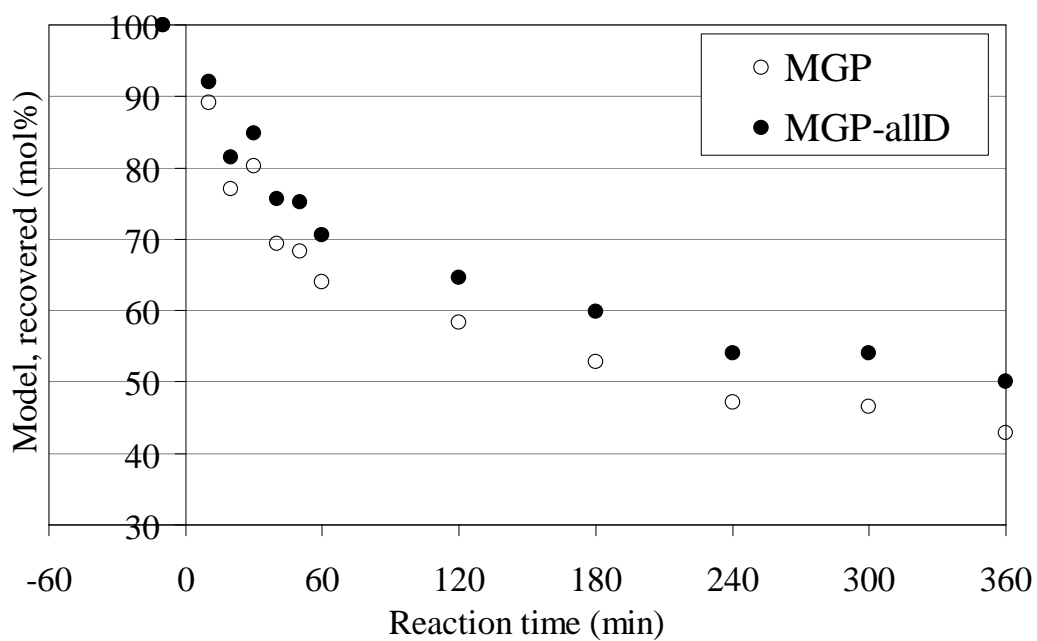


Fig. 3-34 Change in the yields of MGP and MGP-allD when MGP, MGP-allD, and, TPh were reacted together (2nd trial)

上記と小西らの結果 (Konishi *et al.* 2009) から、TMPh 共存系における各々の重水素化 MGP の残存量に対する MGP の残存量の比を反応時間に対してプロットした図を、Fig. 3-35 に示す。この残存量の比を小さいものから大きいものへと順番に記述すると、MGP/MGP-allD < MGP/MGP-2D < MGP/MGP-1D < MGP/MGP-3D \approx MGP/MGP-4D < MGP/MGP-5D \approx MGP/MGP-6D < MGP/MGP-MeD であった。なお上述したが、MGP と MGP-MeD を用いた場合には、MGP よりも MGP-MeD の方が分解されており、他の組み合わせとは異なっていた。

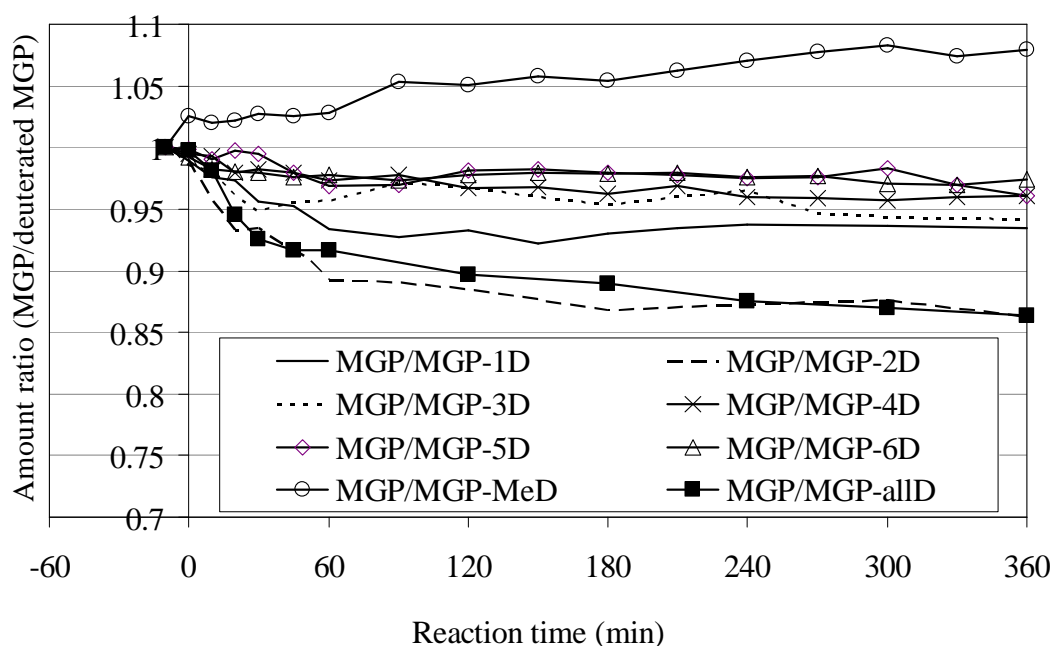


Fig. 3-35 Change in the ratio of the amount of residual MGP to residual deuterated MGP (MGP/deuterated MGP) when these compounds were reacted together with TMPh

3.3.2 VA を AOS 生成源とした反応

VA 由来の AOS による MGP の各水素への攻撃について検討するため、MGP と重水素化 MGP の 2 種類を共存させ、VA と共に酸素－アルカリ処理に供した。Fig. 3-36 ~ 3-58 に、それぞれの組み合わせにおける MGP と 重水素化 MGP の分解挙動を示す。Fig. 3-38、3-41、3-44、3-47、3-50、3-53 および 3-56 に示す曲線は、複数回の実験により得られたデータに最も合致するように描いた。なお、MGP と MGP-1D、および、MGP と MGP-2D の反応は合計 3 回、そして、MGP と これらの重水素化 MGP 以外の反応はそれぞれ合計 2 回ずつ行った。

Fig. 3-38、3-41、3-44、3-47、3-50、3-53、3-56、3-57 および 3-58 から分かるように、全ての反応系における MGP と重水素化 MGP の分解挙動は類似しており、VA が消失する反応時間 90 分までに分解が大きく進行し、両者の分解の差異はこの期間に出現した。VA 消失後の 90 分以降は分解は穏やかになり、両者の分解差はほぼ一定であった。TMPh 共存系における MGP と 重水素化 MGP の分解と比較すると、全般的にフェノール性化合物が消失するまでの期間では、VA 共存系での方がこれらの分解が多かったが、フェノール性化合物消失後では、TMPh 共存系での方が分解が多かった。これは、第 2 章で MGP と MGP のエピマーを用いて行った酸素－アルカリ処理の結果と同じ傾向である。

MGP と MGP-4D との分解量の差 (Fig. 3-47) は MGP と他の重水素化 MGP (MGP-allD は除く) との分解量の差よりも大きく、VA 共存系における反応の中では速度論的同位体効果が最も顕著に現れた。また、MGP と MGP-4D の場合よりは小さいながらも、MGP と MGP-1D との間 (Fig. 3-38)、および、MGP と MGP-2D との間 (Fig. 3-41) でも分解量が明瞭に異なり、速度論的同位体効果が観測された。一方、MGP と MGP-3D との間 (Fig. 3-44)、および、MGP と MGP-6D との間 (Fig. 3-53) では分解量の差が非常に小さく、明瞭な速度論的同位体効果が観測されなかった。MGP と MGP-5D (Fig. 3-50)、および、MGP と MGP-MeD (Fig. 3-56) の反応では、MGP よりも重水素化 MGP の方が多く分解された。MGP と MGP-allD との分解量の差はかなり大きく、明瞭な速度論的同位体効果が観測された (Fig. 3-57 および 3-58)。

TMPh 共存系における MGP と 重水素化 MGP との分解量の差と比較すると、VA 共存系におけるこれらの差は、全般的に小さかった。

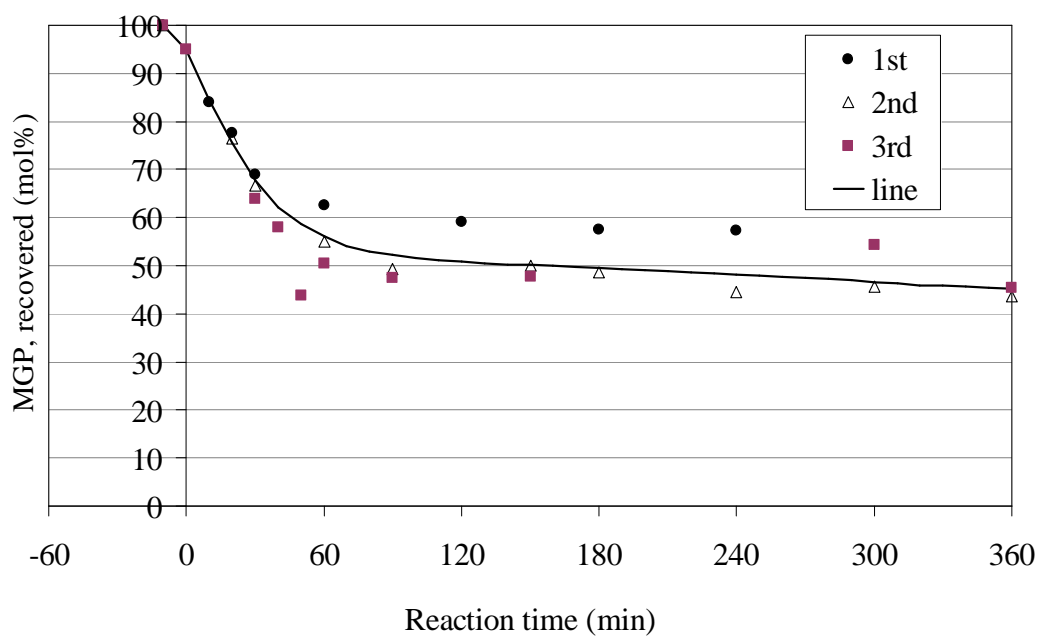


Fig. 3-36 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-1D, and, VA were reacted together

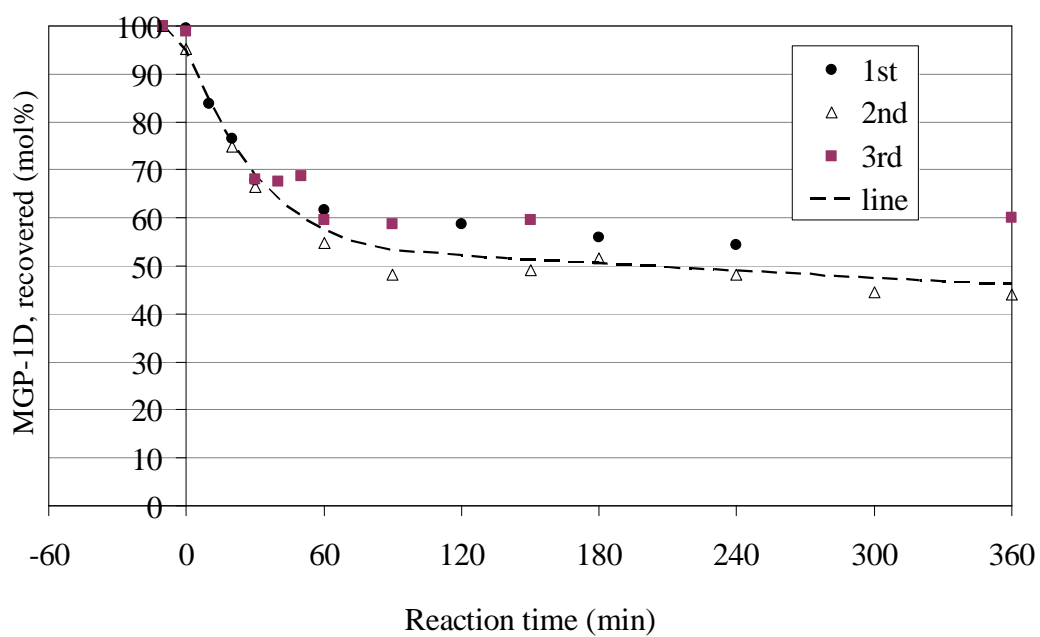


Fig. 3-37 Change in the yield of MGP-1D when MGP, MGP-1D, and, VA were reacted together

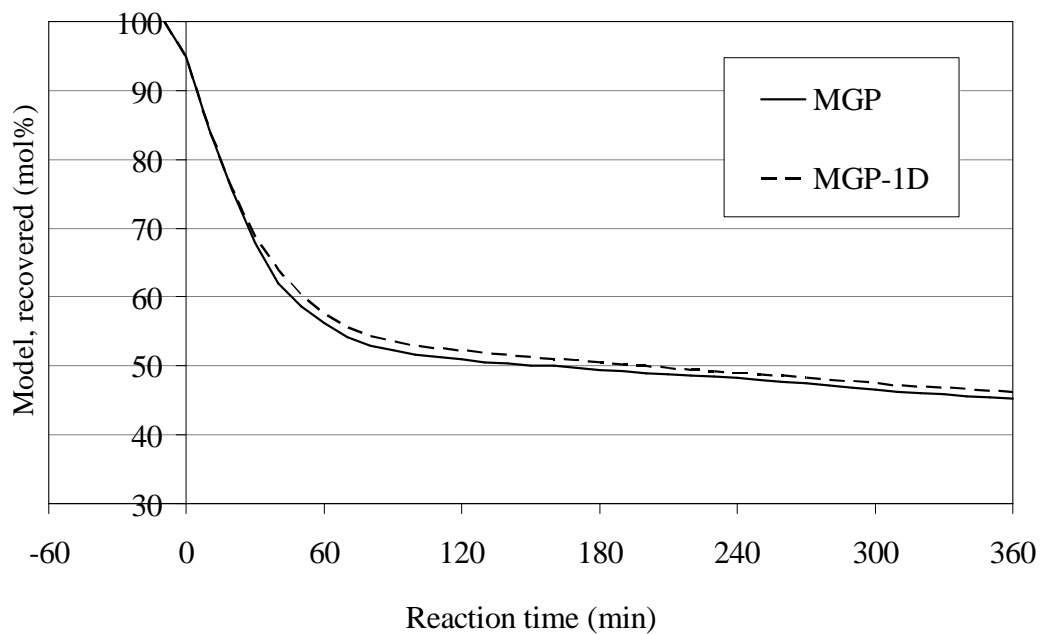
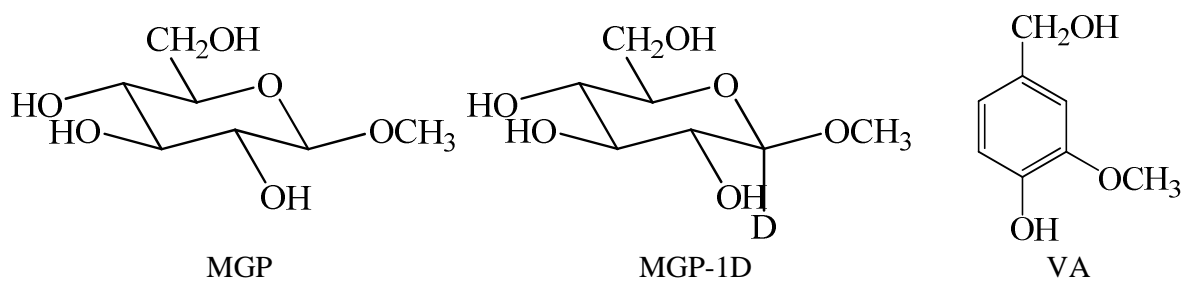


Fig. 3-38 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-1D when these compounds were reacted together with VA

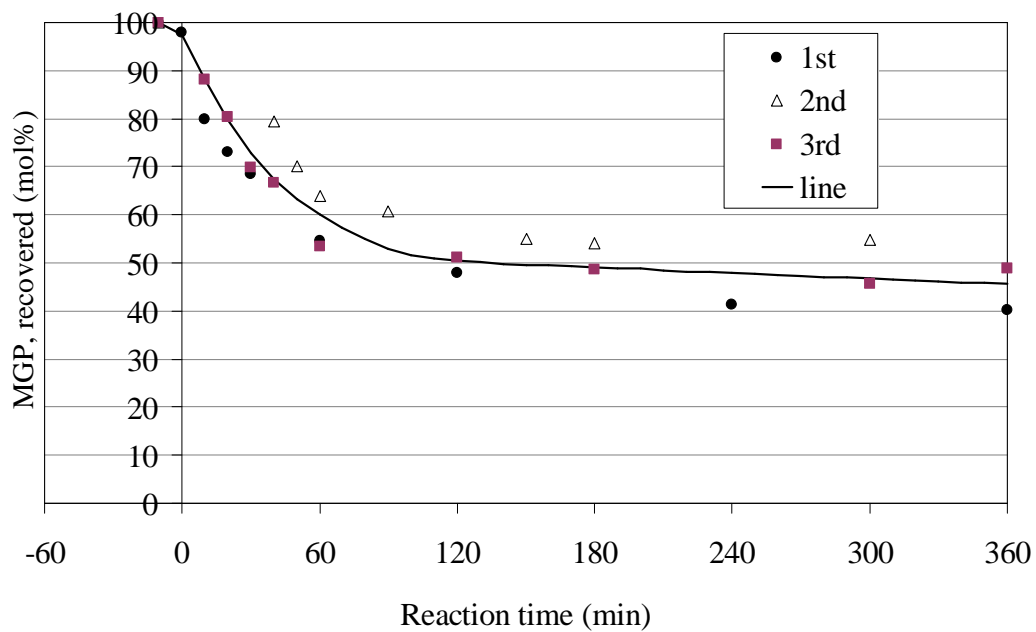


Fig. 3-39 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-2D, and, VA were reacted together

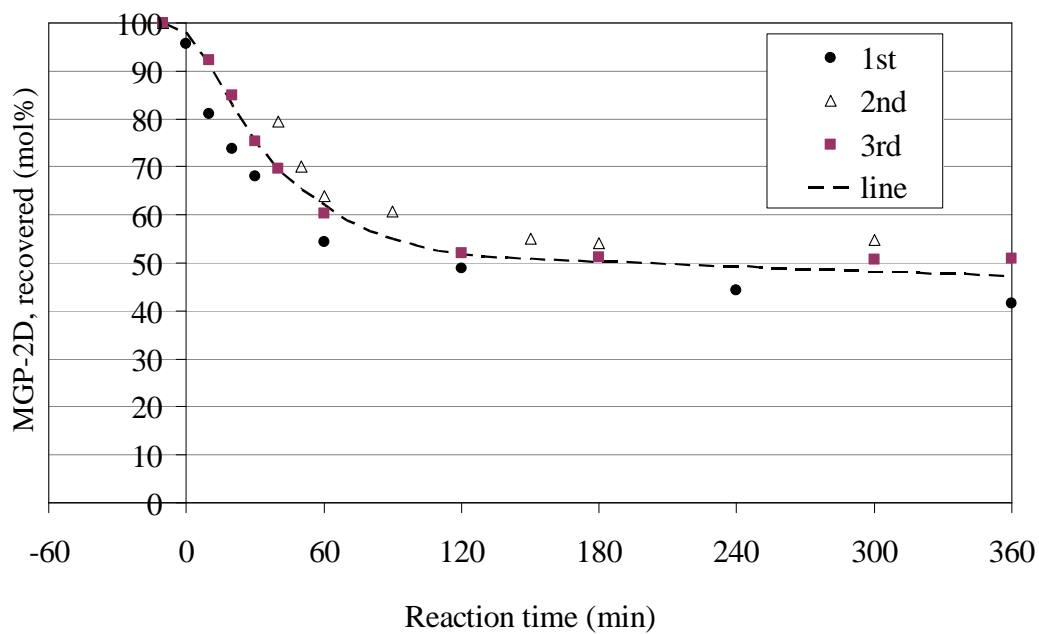


Fig. 3-40 Change in the yield of MGP-2D when MGP, MGP-2D, and, VA were reacted together

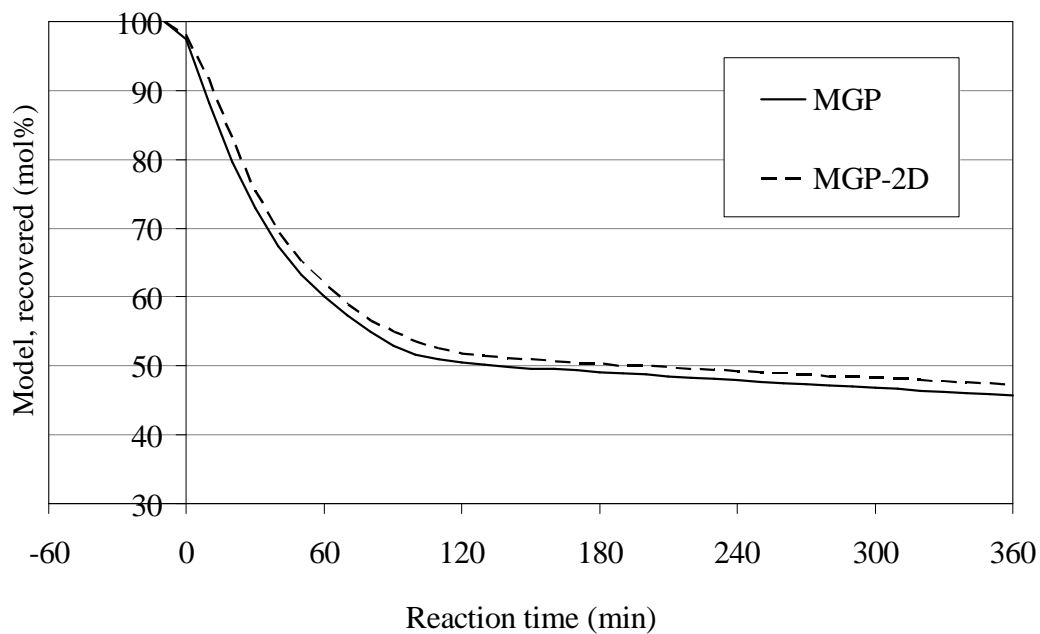
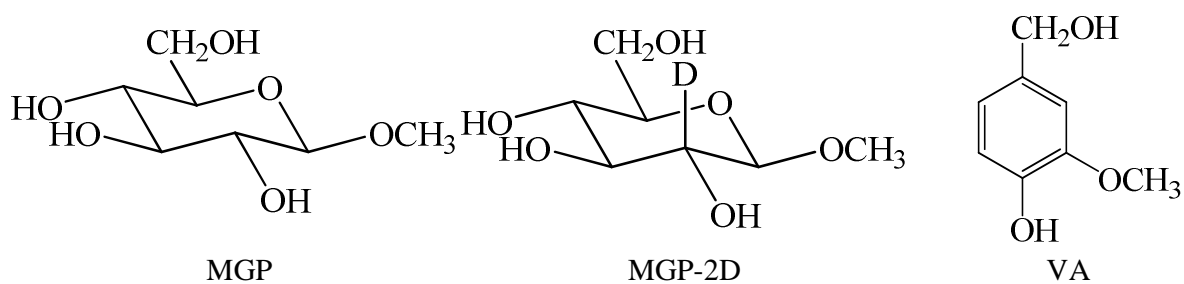


Fig. 3-41 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-2D when these compounds were reacted together with VA

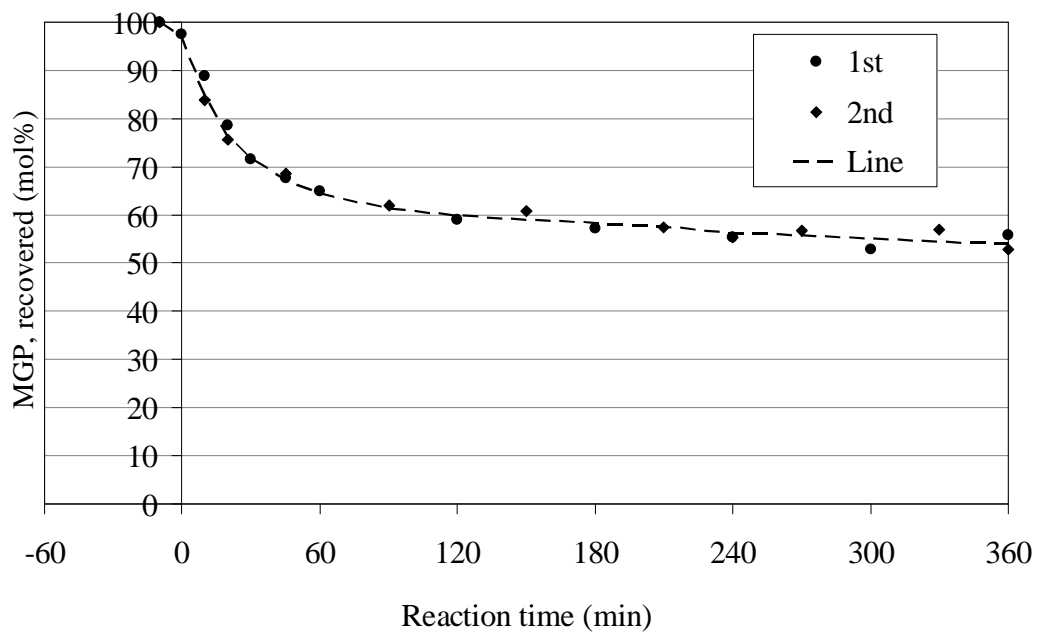


Fig. 3-42 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-3D, and, VA were reacted together

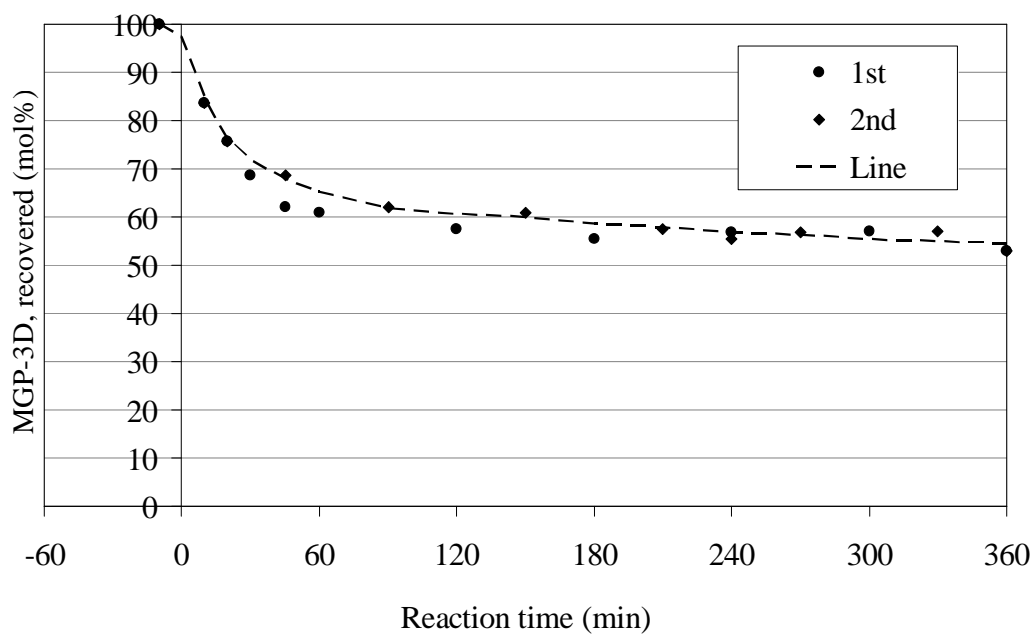


Fig. 3-43 Change in the yield of MGP-3D when MGP, MGP-3D, and, VA were reacted together

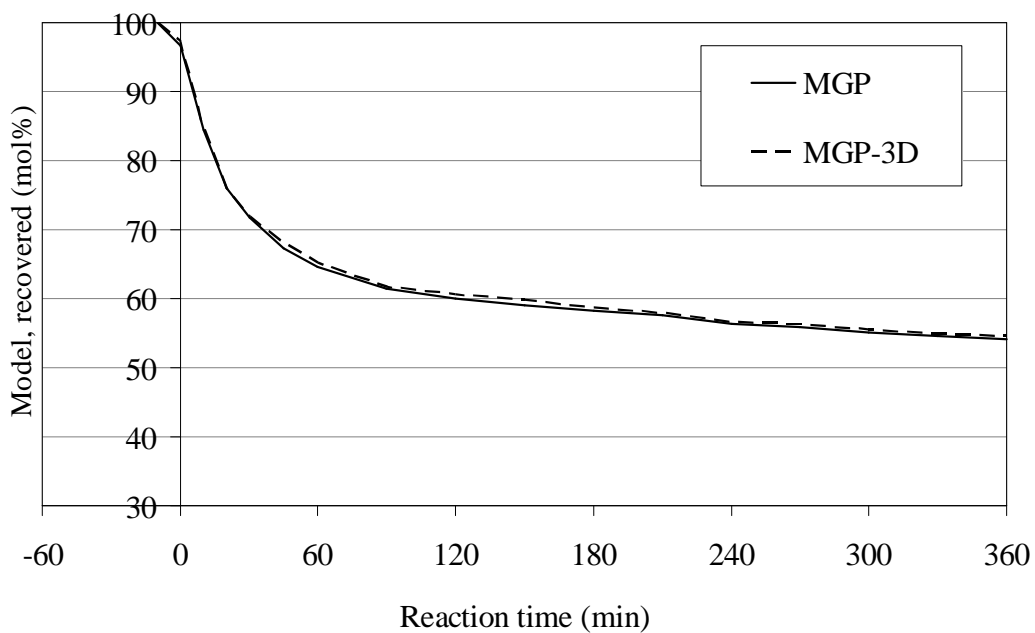
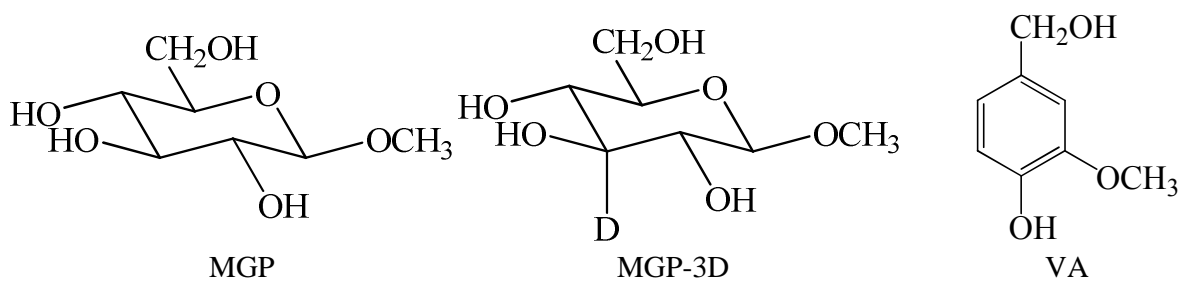


Fig. 3-44 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-3D when these compounds were reacted together with VA

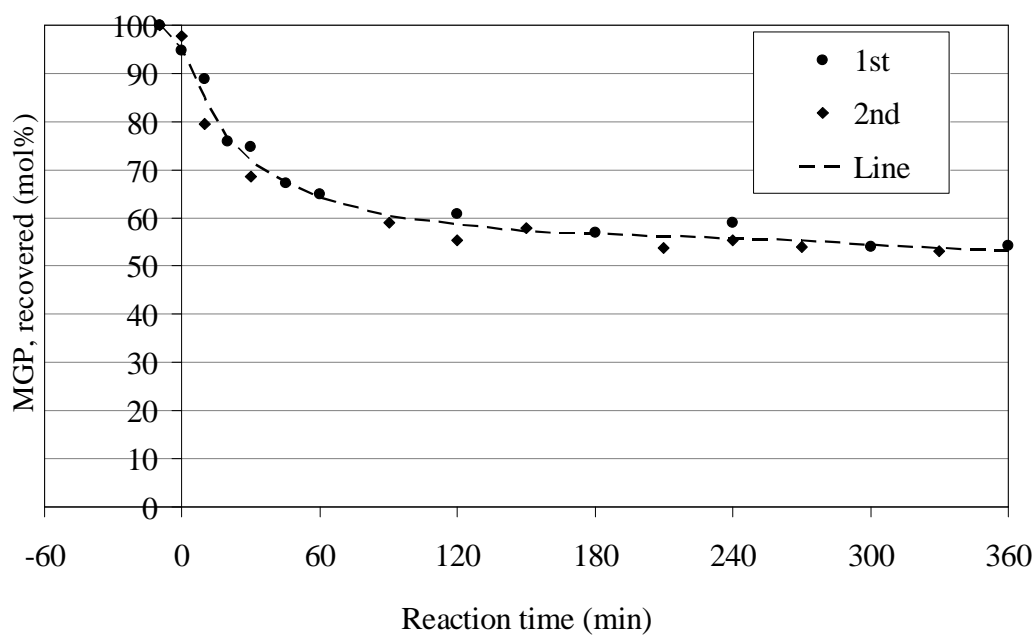


Fig. 3-45 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-4D, and, VA were reacted together

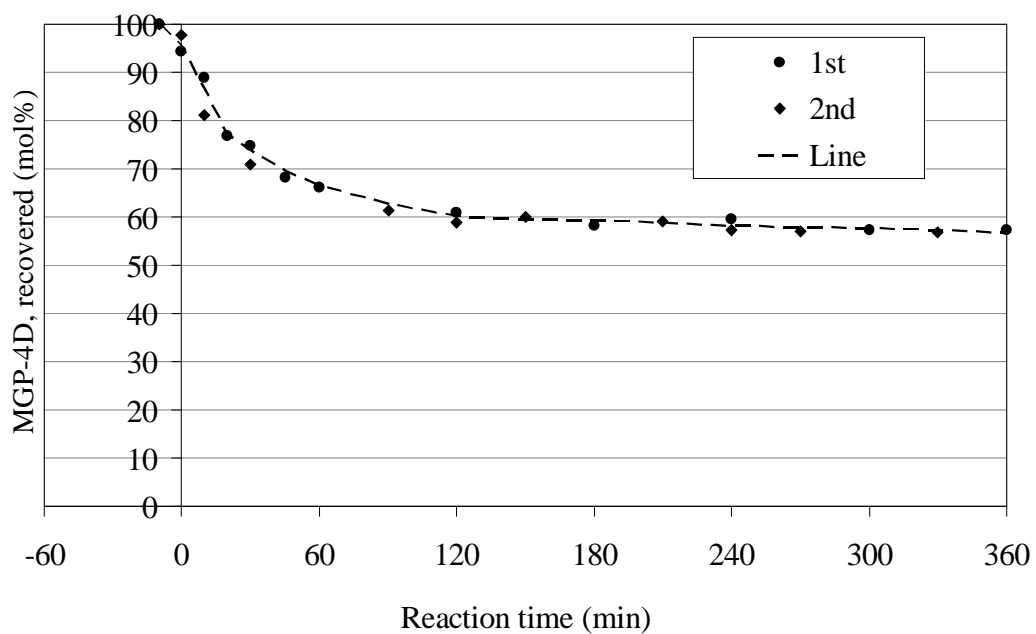


Fig. 3-46 Change in the yield of MGP-4D when MGP, MGP-4D, and, VA were reacted together

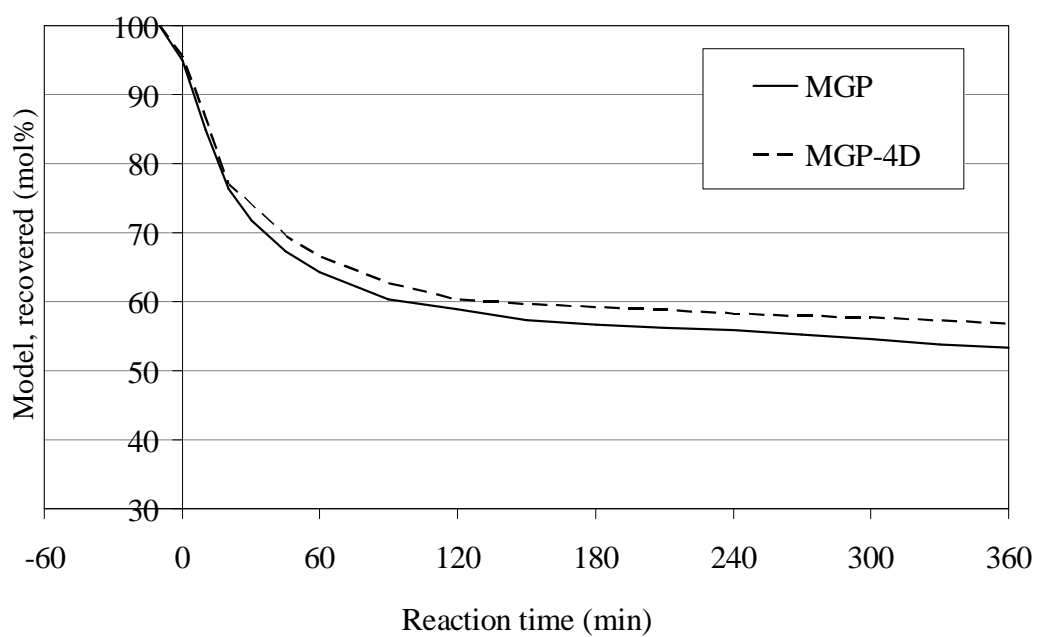
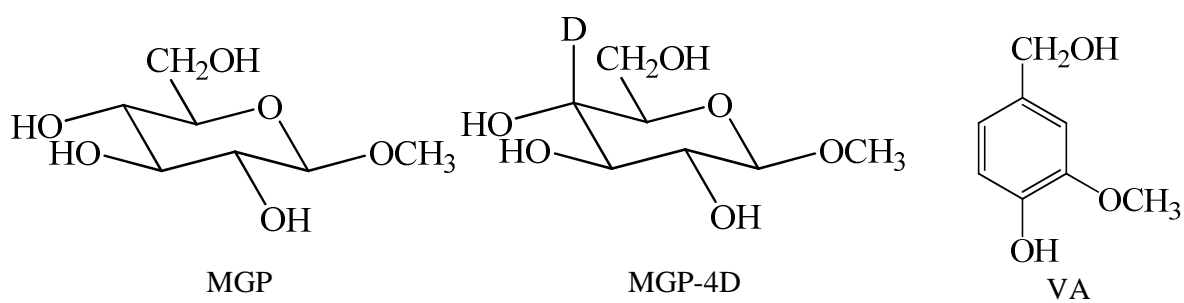


Fig. 3-47 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-4D when these compounds were reacted together with VA

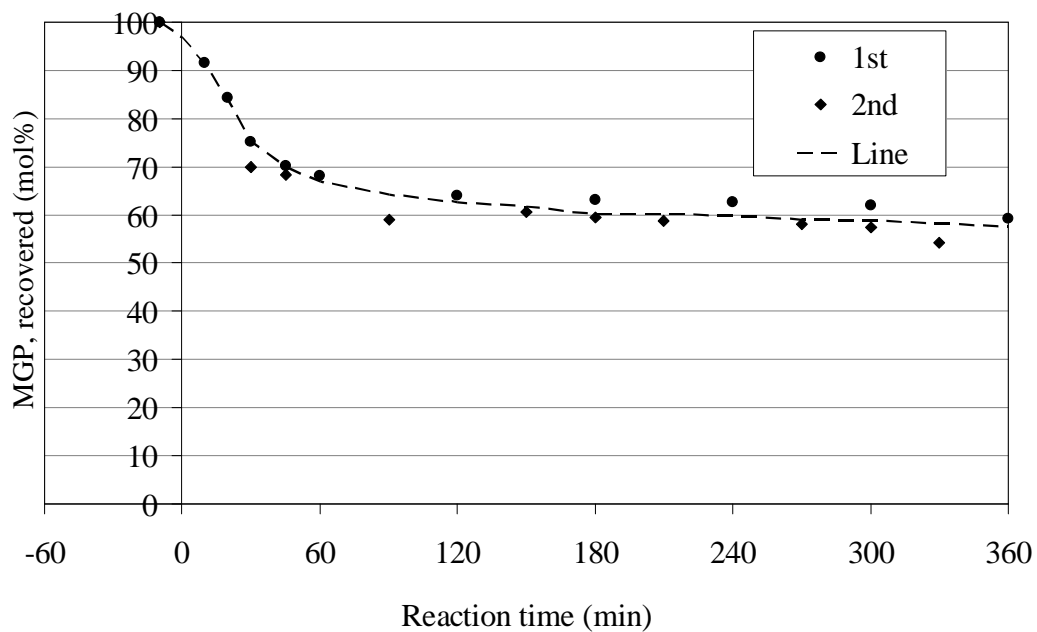


Fig. 3-48 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-5D, and, VA were reacted together

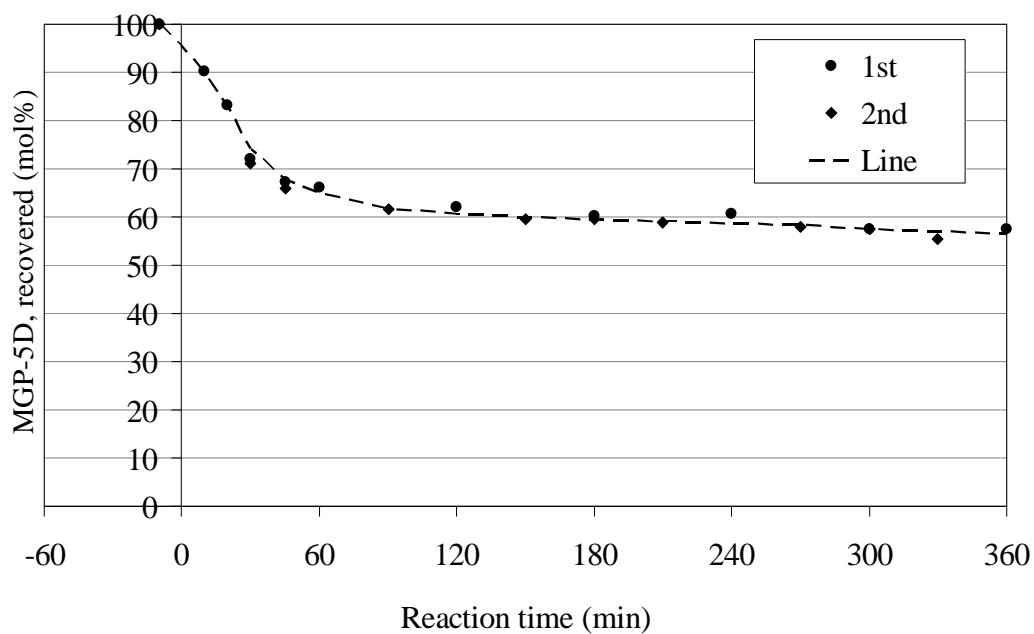


Fig. 3-49 Change in the yield of MGP-5D when MGP, MGP-5D, and, VA were reacted together

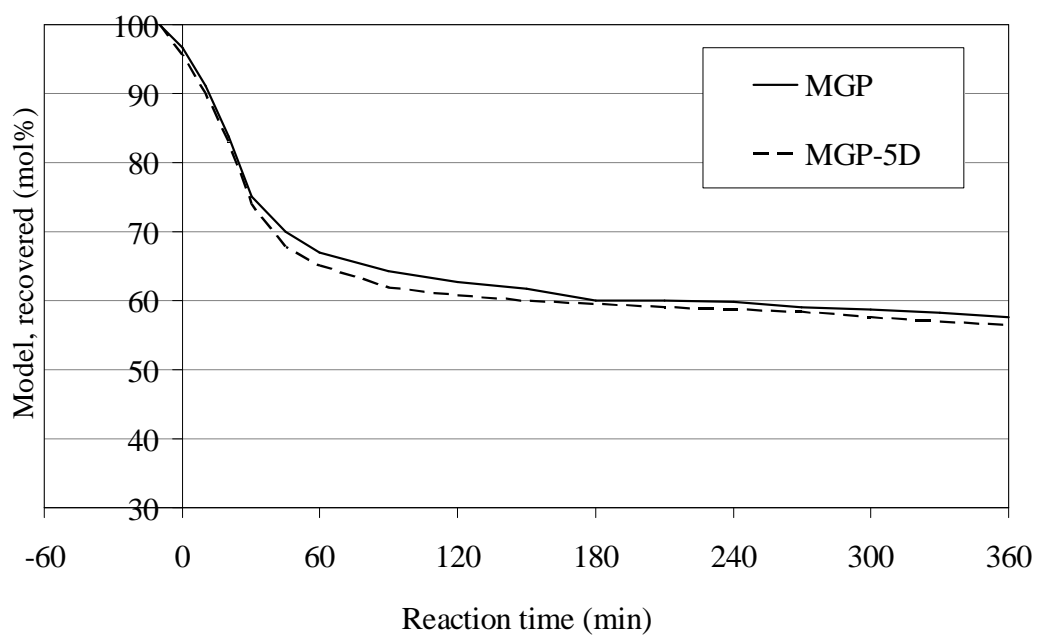
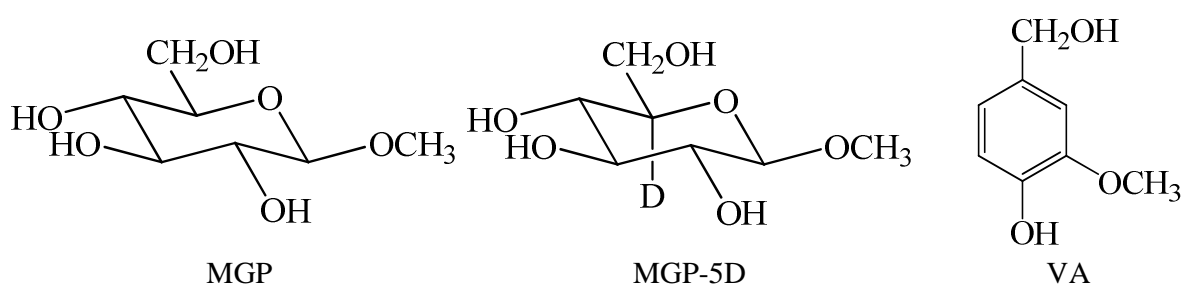


Fig. 3-50 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-5D when these compounds were reacted together with VA

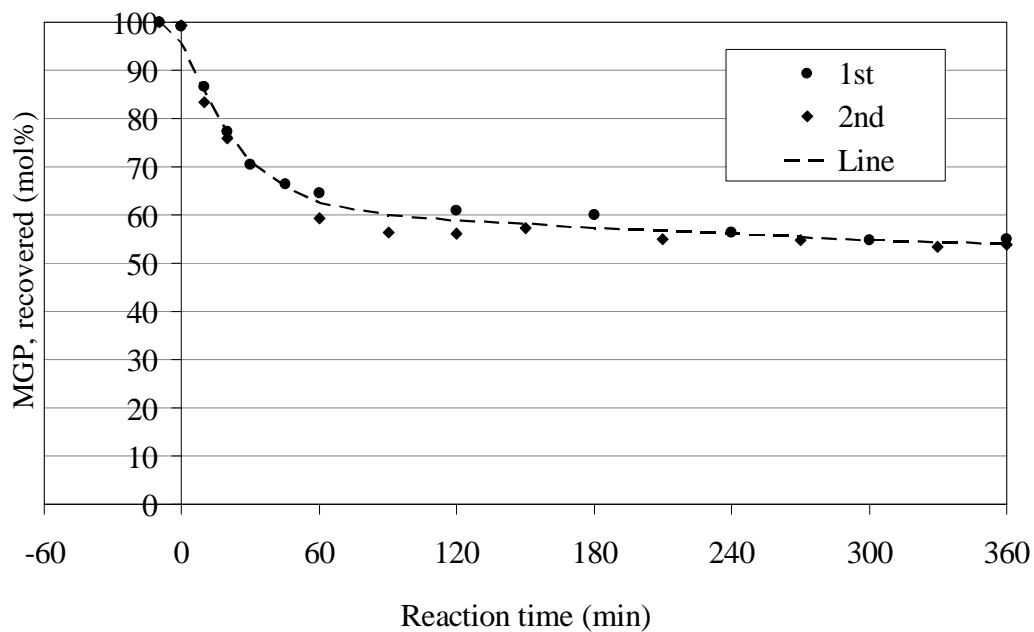


Fig. 3-51 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-6D, and, VA were reacted together

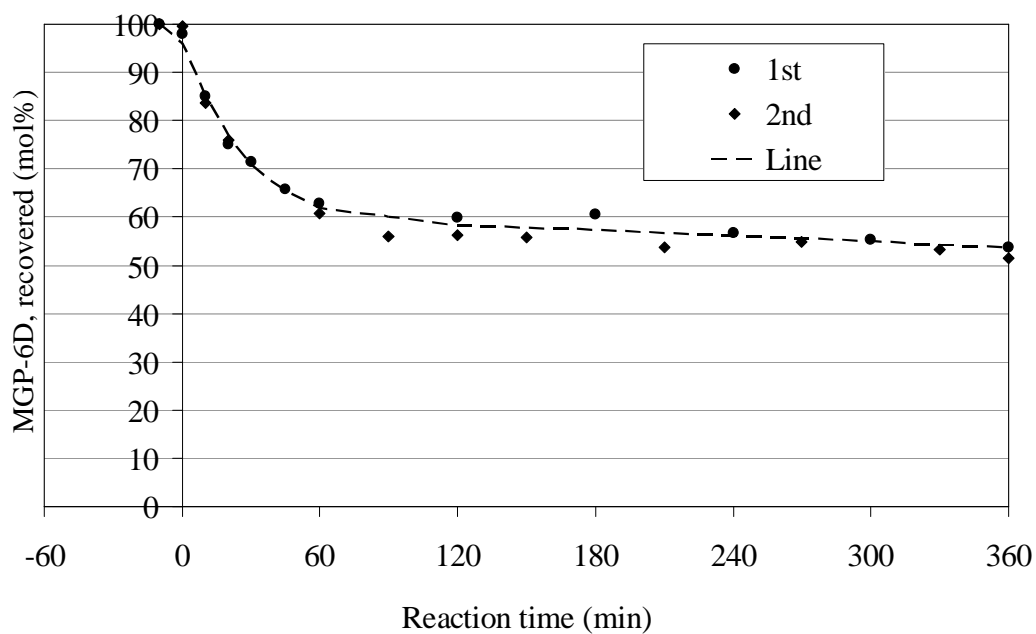


Fig. 3-52 Change in the yield of MGP-6D when, MGP, MGP-6D, and, VA were reacted together

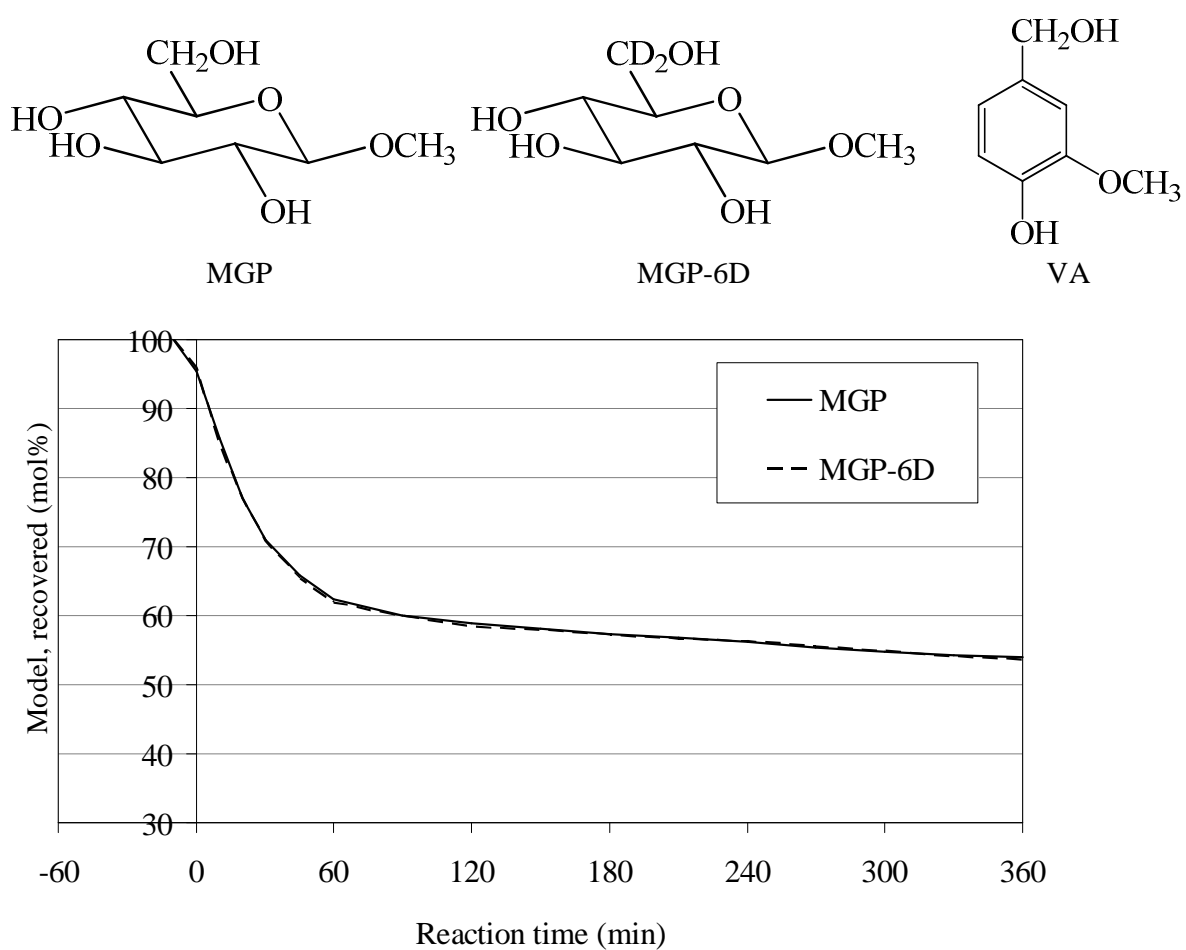


Fig. 3-53 Combined description of the best-fit curves for the change in the yield of MGP and MGP-6D when these compounds were reacted together with VA

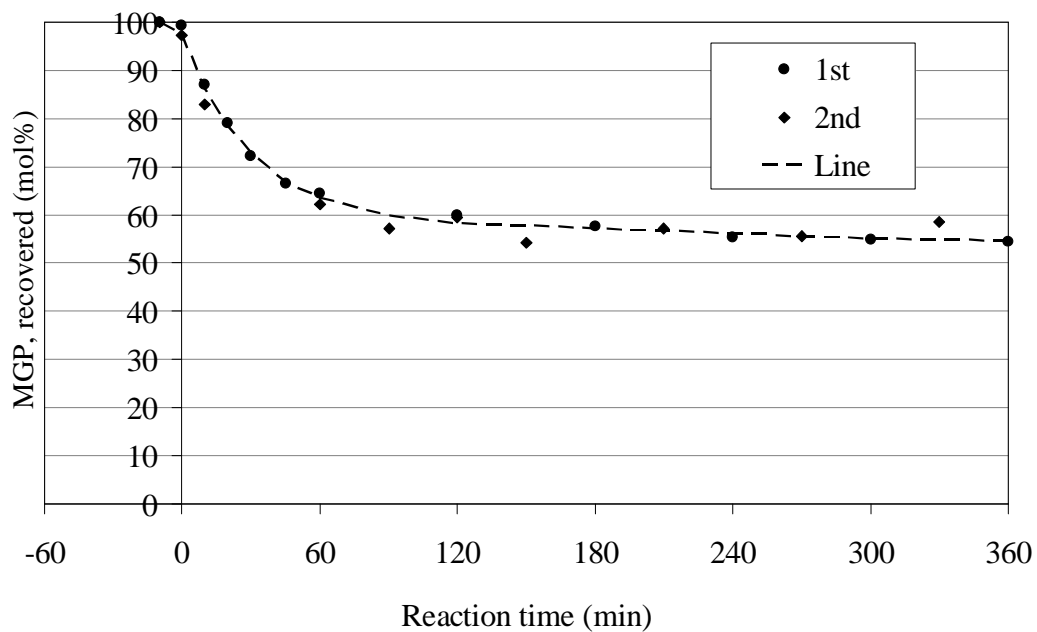


Fig. 3-54 Change in the yield of MGP when MGP, MGP-MeD, and, VA were reacted together

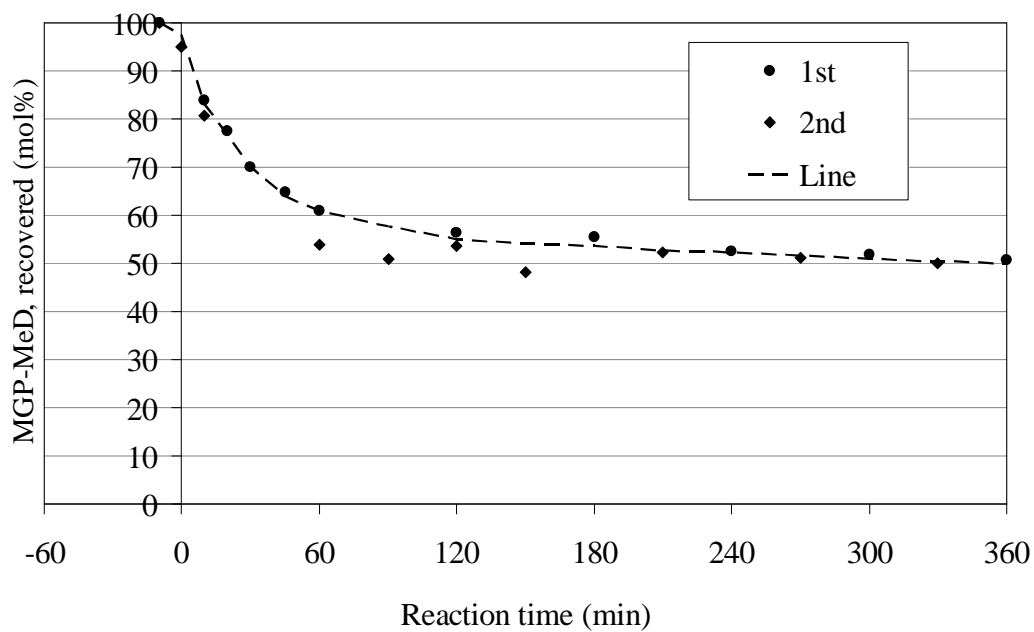


Fig. 3-55 Change in the yield of MGP-MeD when MGP, MGP-MeD, and, VA were reacted together

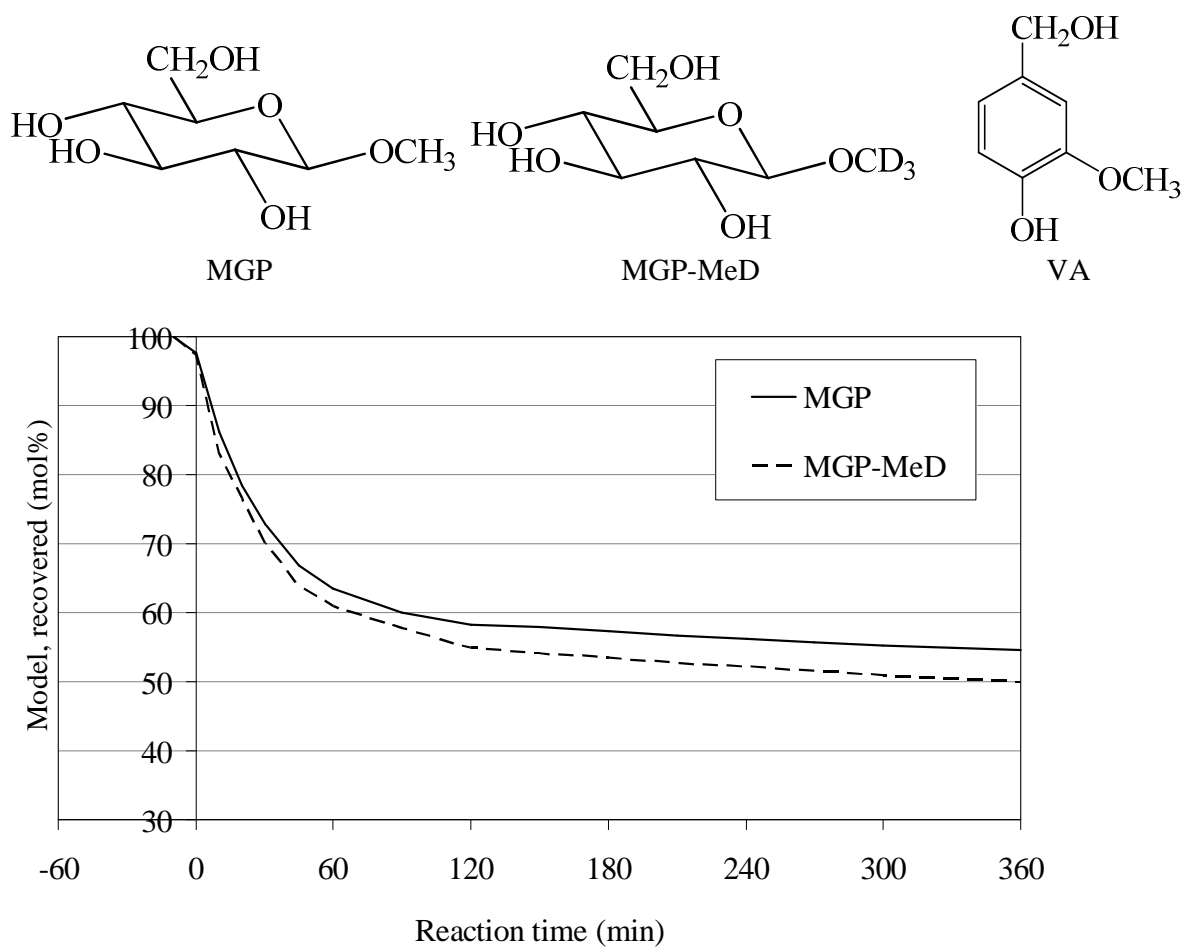


Fig. 3-56 Combined description of the best-fit curves for the change in the yields of MGP and MGP-MeD when these compounds were reacted together with VA

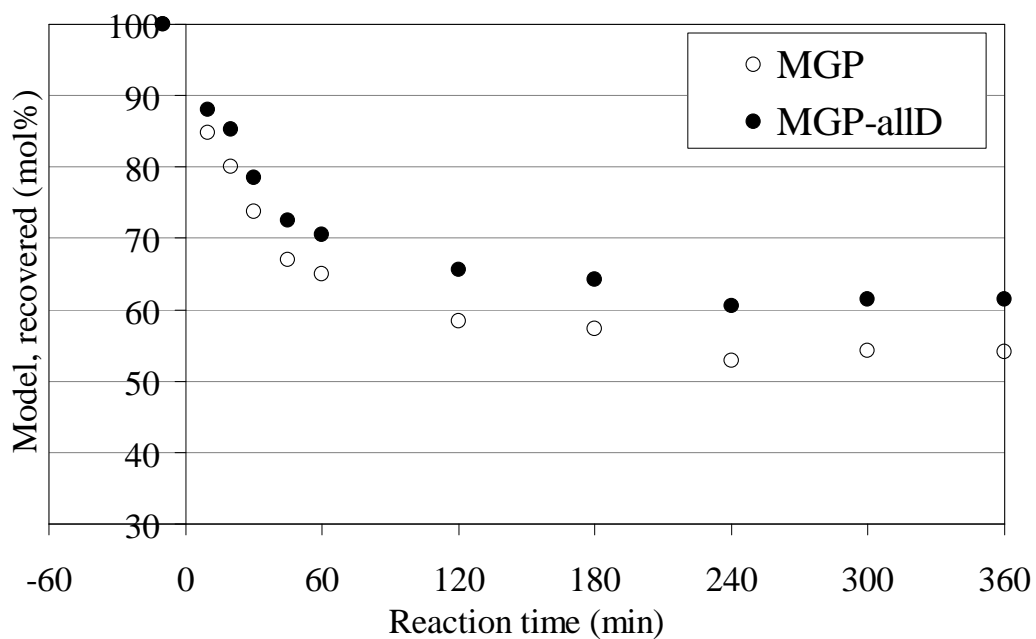
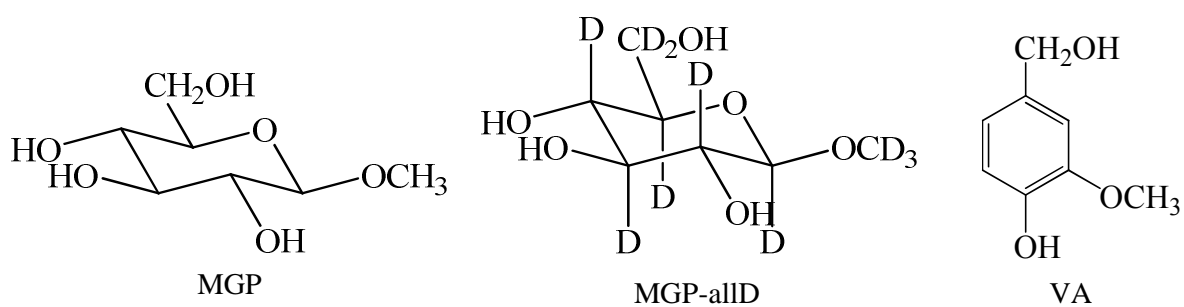


Fig. 3-57 Change in the yields of MGP and MGP-allD when MGP, MGP-allD, and, VA were reacted together (1st trial)

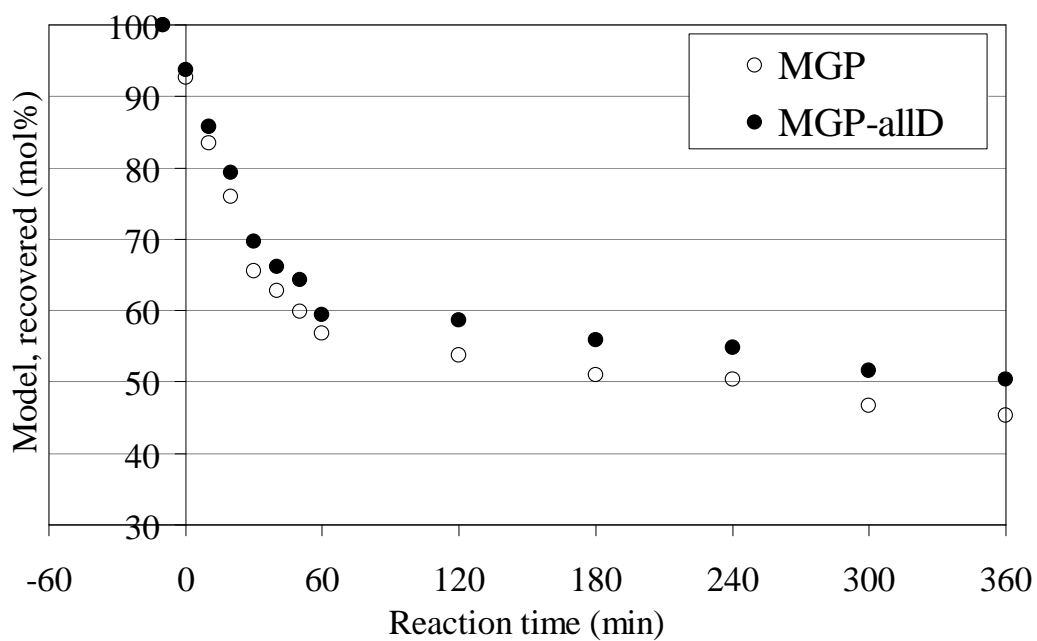


Fig. 3-58 Change in the yields of MGP and MGP-allD when MGP, MGP-allD, and, VA were reacted together (2nd trial)

上記の結果から、VA 共存系における各々の重水素化 MGP の残存量に対する MGP の残存量の比を反応時間に対してプロットした図を、Fig. 3-59 に示す。この残存量の比を小さいものから大きいものへと順番に記述すると、MGP/MGP-allD < MGP/MGP-4D < MGP/MGP-1D \approx MGP/MGP-2D < MGP/MGP-3D \approx MGP/MGP-6D < MGP/MGP-5D < MGP/MGP-MeD であった。なお上述したが、MGP と MGP-5D、および、MGP と MGP-MeD を用いた場合には、MGP よりも重水素化 MGP の方が分解されており、他の組み合わせとは異なっていた。

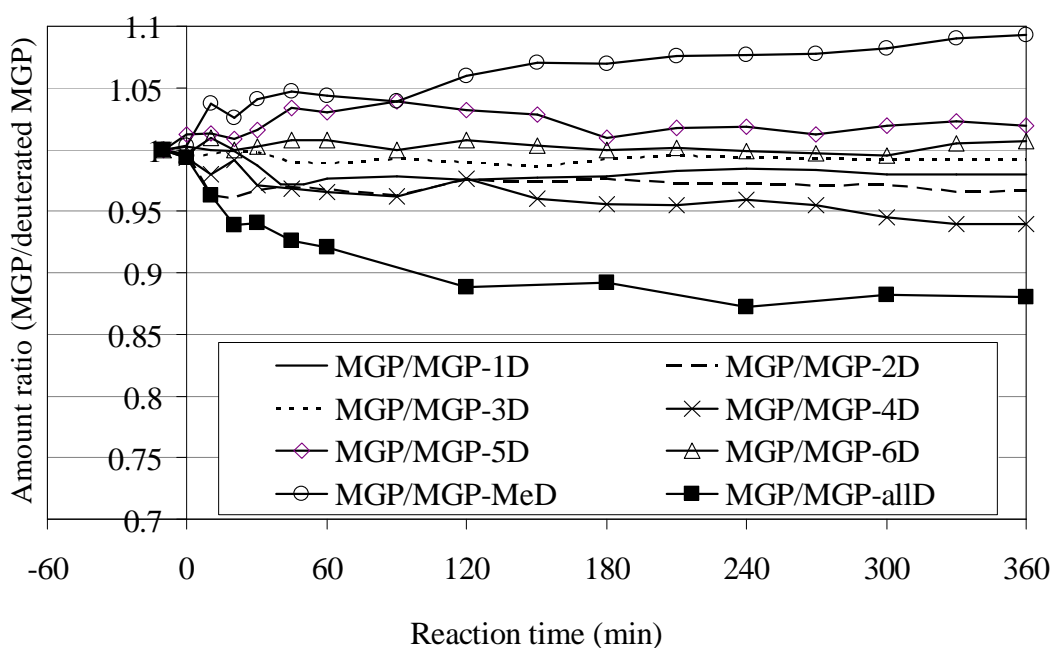


Fig. 3-59 Change in the ratio of the amount of residual MGP to residual deuterated MGP (MGP/deuterated MGP) when these compounds were reacted together with VA

3.3.3 AOS を $O^{\bullet -}$ に限定した反応

前述したように、フェノール性化合物非共存下における常圧での過酸化水素－アルカリ処理では、糖モデル化合物を分解する AOS は $O^{\bullet -}$ に限定される、と考えることが可能である。そこで、MGP と重水素化 MGP を共存させて過酸化水素－アルカリ処理に供し、 $O^{\bullet -}$ の反応について検討を行った。Fig. 3-60 ~ 3-66 に、それぞれの組み合わせにおける MGP と 重水素化 MGP の分解挙動を示す。なお、MGP と MGP-1D の反応については、小西らのデータ (Fig. 3-3) を使用する。

これらの図から分かるように、全ての反応系における MGP と重水素化 MGP の分解挙動は類似していた。最初のサンプリング時間である反応時間 3 分までに、どちらの分解も完了しており、その後はバラつきはあるものの、ほぼ一定量が存在していた。第 2 章にも記述したが、本実験条件下において、過酸化水素は反応初期で全て分解するため、これ以降の期間には、糖モデル化合物が分解されないと考えられる。MGP と MGP-4D との分解量の差は、MGP と他の重水素化 MGP (MGP-allD は除く) との分解量の差よりも大きく (Fig. 3-62)、 $O^{\bullet -}$ との反応の中では速度論的同位体効果が最も顕著に現れた。これら以外の組み合わせにおける MGP と重水素化 MGP との分解量には、差がほとんど観測されなかった。MGP と MGP-MeD の反応では (Fig. 3-65)、TMPh 共存系 (Fig. 3-32) および VA 共存系 (Fig. 3-56) での結果と同様に、MGP よりも MGP-MeD の方が分解された。MGP と MGP-allD との分解量の差はかなり大きく、明瞭な速度論的同位体効果が観測された (Fig. 3-66)。MGP と 重水素化 MGP との分解量の差は、VA 共存系と同様に、全般的に TMPh 共存系よりも小さかった。また、MGP と重水素化 MGP との間の分解量の差の大小は、どの重水素化 MGP を用いた場合にも、VA 共存系の場合と同様の傾向であった。

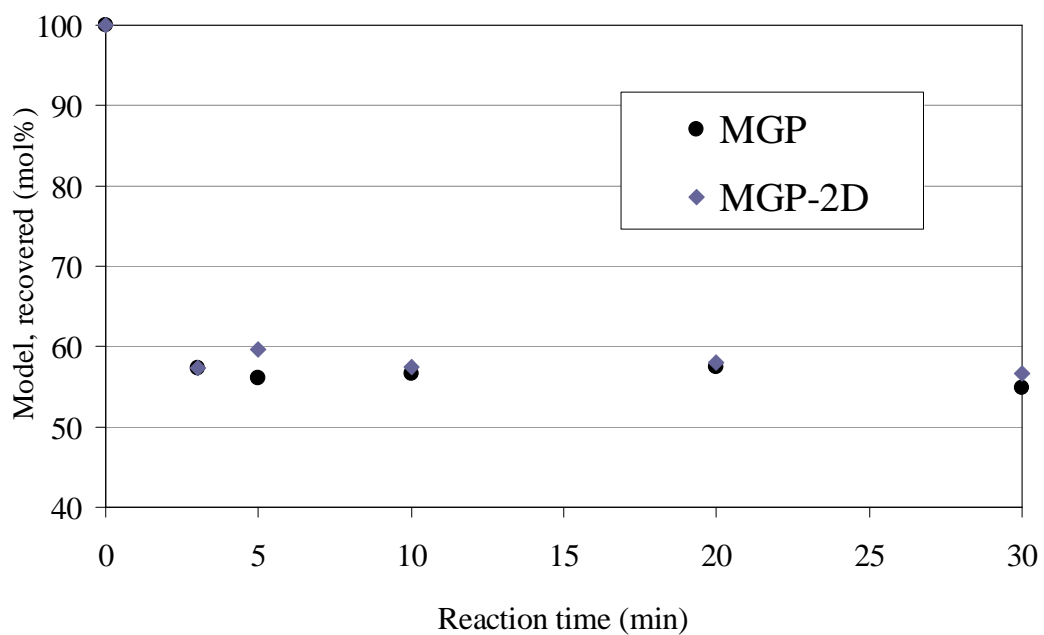


Fig. 3-60 Change in the yields of MGP and MGP-2D when these compounds were jointly treated with alkaline hydrogen peroxide

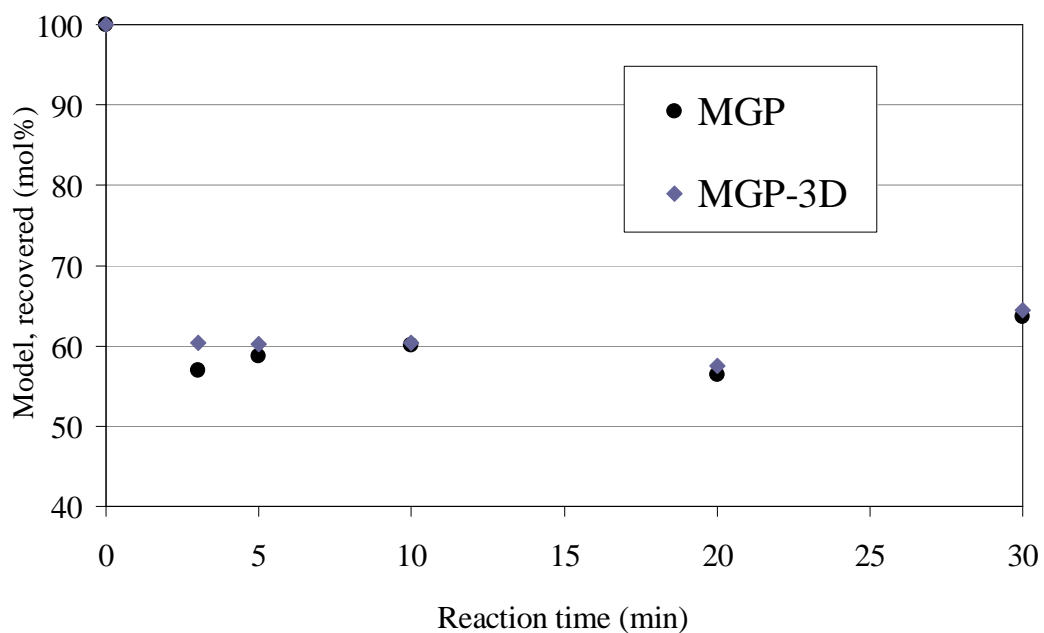


Fig. 3-61 Change in the yields of MGP and MGP-3D when these compounds were jointly treated with alkaline hydrogen peroxide

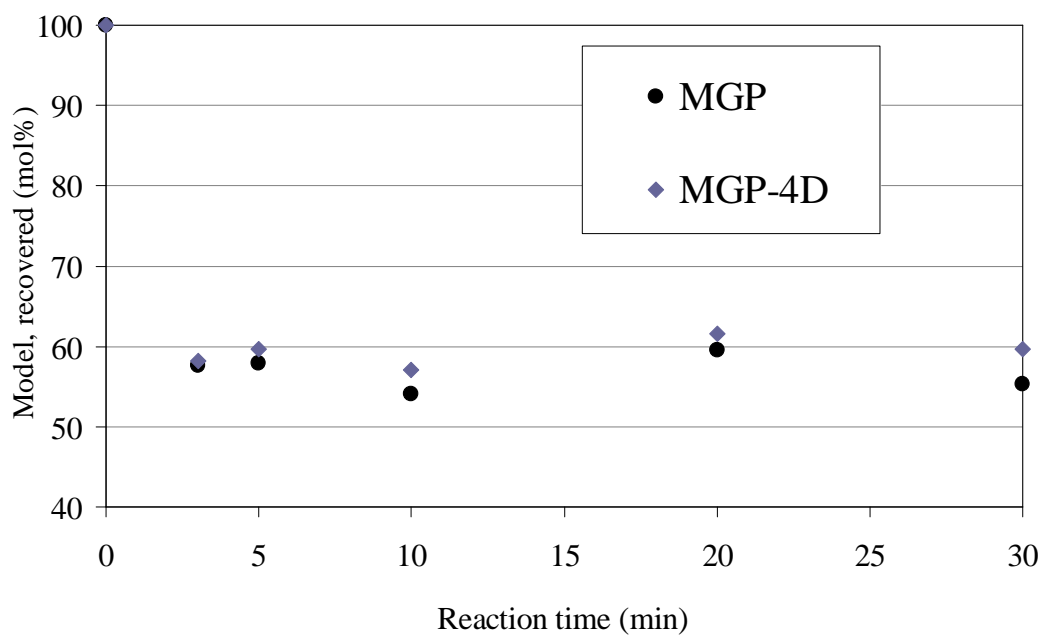


Fig. 3-62 Change in the yields of MGP and MGP-4D when these compounds were jointly treated with alkaline hydrogen peroxide

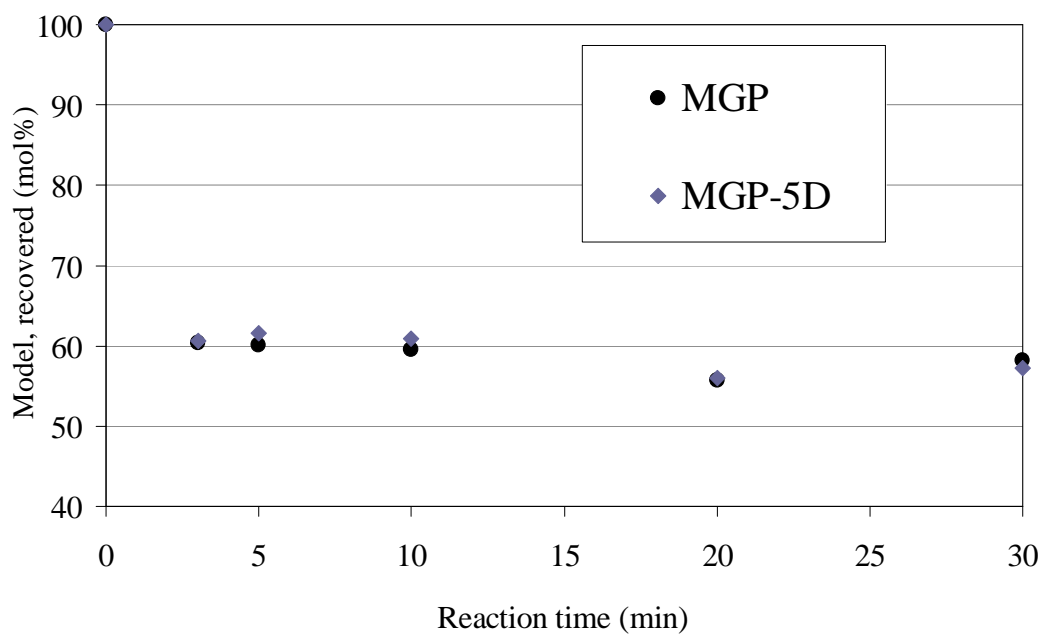


Fig. 3-63 Change in the yields of MGP and MGP-5D when these compounds were jointly treated with alkaline hydrogen peroxide

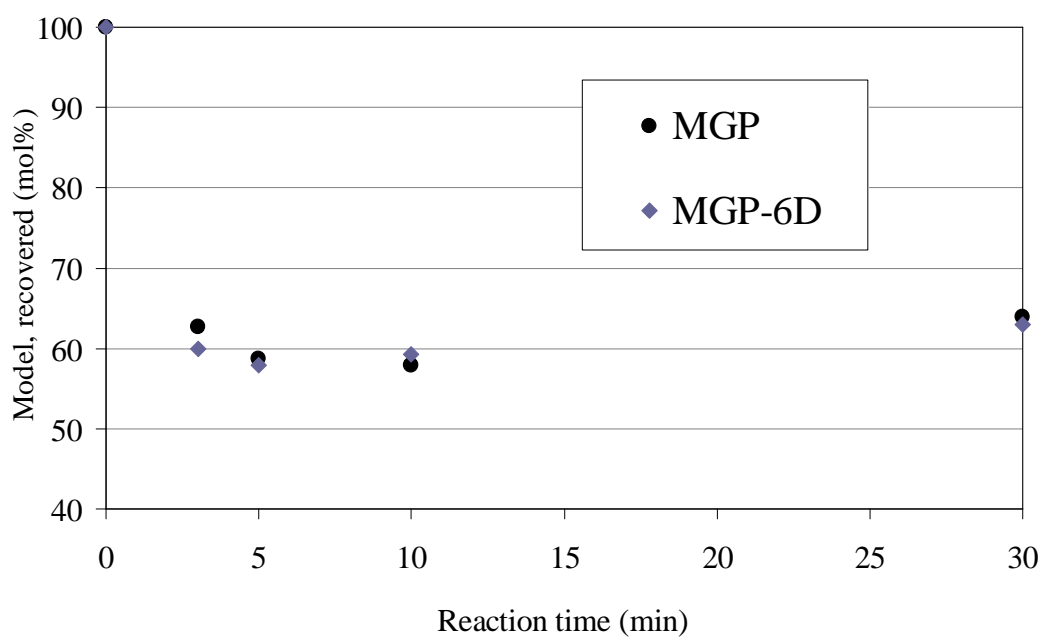


Fig. 3-64 Change in the yields of MGP and MGP-6D when these compounds were jointly treated with alkaline hydrogen peroxide

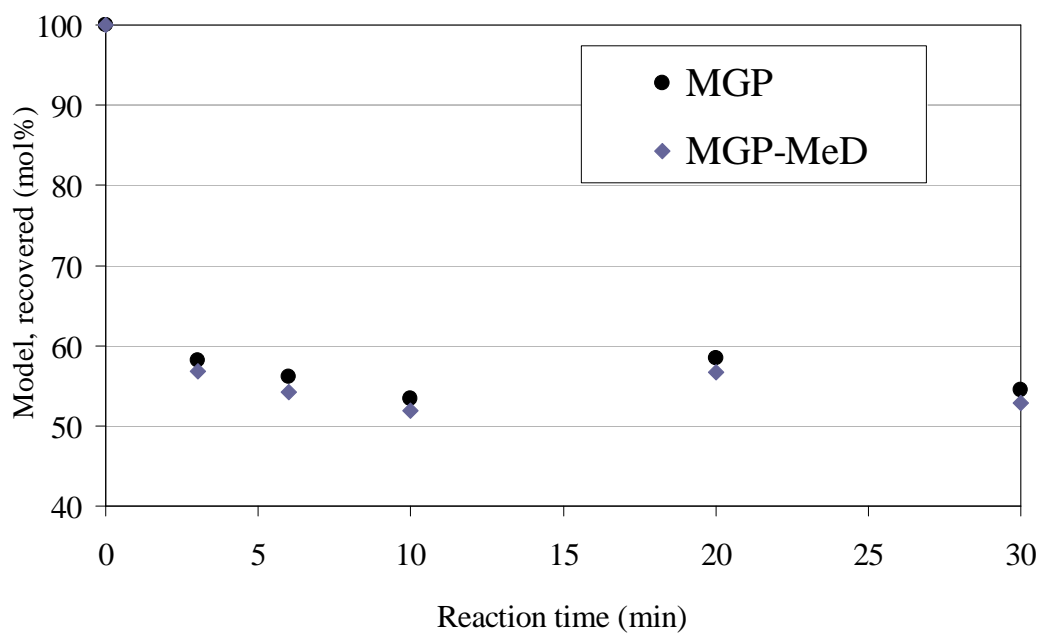


Fig. 3-65 Change in the yields of MGP and MGP-MeD when these compounds were jointly treated with alkaline hydrogen peroxide

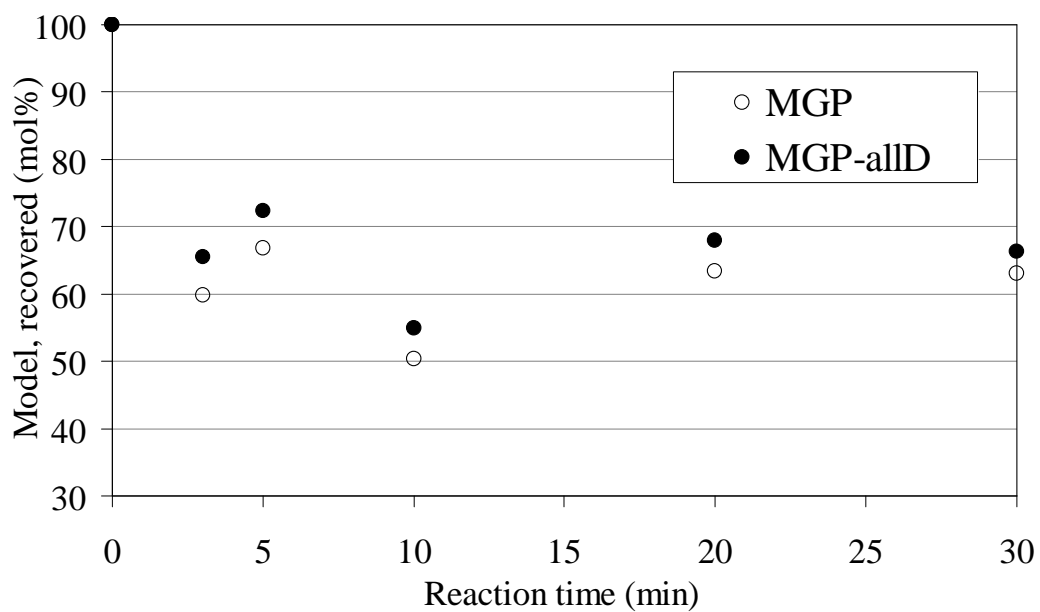


Fig. 3-66 Change in the yields of MGP and MGP-allD when these compounds were jointly treated with alkaline hydrogen peroxide

3.4 考察

3.4.1 重水素化 MGP が MGP よりも速く分解される現象について

ある 1 つの炭素－水素結合における開裂反応において、水素が軽水素の場合を水素が重水素の場合と比較すると、その速度は同等以上となり、これを速度論的同位体効果と呼ぶ。したがって、本研究における反応では、MGP は重水素化 MGP と同速度以上で分解される、と考えていた。しかし、3.3 で示したように、VA 共存系での酸素－アルカリ処理における MGP と MGP-5D の反応 (Fig. 3-50)、そして、全ての処理における MGP と MGP-MeD の反応 (Fig. 3-32、3-56 および 3-65) では、MGP よりも重水素化 MGP の方が速く分解された。この現象は、現時点では合理的に説明することができないが、分析対象となる炭素－水素結合の開裂に伴うものではない、と考えられる。どの位置に重水素が存在するのかに関係なく、重水素化 MGP の分子量が MGP よりも大きいことに起因して、重水素化 MGP は分子全体として、MGP よりも AOS によって分解されやすいのかも知れない。これが正しいとすれば、MGP と重水素化 MGP の分解量が同程度の場合であっても、AOS による対象水素の引き抜き反応によって、速度論的同位体効果が観測されたことを示す。そしてまた、VA 共存系での酸素－アルカリ処理および過酸化水素－アルカリ処理における MGP と MGP-5D の反応、そして、全ての処理における MGP と MGP-MeD の反応では、AOS による MGP の C-5 位そしてアグリコン部位それぞれにおける水素引き抜き反応が、他の部位における反応と比較して相対的に起こり難いことを示す可能性がある。以降の考察においては、上記の考え方が正しいと仮定し、重水素化 MGP の方が MGP よりも速く分解された場合については、これ以上言及しない。

3.4.2 MGP-allD の分解について

MGP を構成するどの炭素から水素が引き抜かれても速度論的同位体効果が出現可能な場合、これがどの程度の大きさで出現するのかについて検討するため、MGP と MGP-allD を共存させて反応に供した。なお、重水素化 MGP の重水素置換数が多くなると、AOS による水素引き抜き反応に関与する重水素の割合が増加するため、速度論的同位体効果が大きく出現することが予想された。したがって、MGP と MGP-allD の分解の差は、他のどの組み合わせよりも大きくなることが予想された。一方で、前章の考察が正しいとすれば、MGP-allD は重水素を 10 個持つため分子量がかなり大きい、これが MGP-allD の分解促進にどの程度関与するのかは不明であるため、MGP と MGP-allD を共存させた反応によって、正味で MGP-allD の分解が MGP の分解と比較してどの程度になるのか、についても検討し得ると考えられた。

Fig. 3-35、3-59 および 3-60 ~ 3-66 から分かる通り、VA 共存系における酸素-アルカリ処理および過酸化水素-アルカリ処理においては、MGP と MGP-allD を反応させた場合に、MGP と重水素化 MGP との分解の間に、8 つの組み合わせの中で最も大きな差が観測された。TMPH 共存系においても、MGP と MGP-allD との間の分解差は MGP と MGP-2D との間と同程度ではあったが、これらの差がやはり一番大きかった。したがって、重水素の数と観測される速度論的同位体効果の大きさの間には、正の相関が存在することが示唆された。しかし、MGP と MGP-allD との間の分解の差は、どの処理においても、その他の 7 つの組み合わせにおける分解の差の総和よりは小さいように見えた。この総和よりも小さい程度は、3.4.1 で記述した分子量増大による MGP-allD の分解促進効果の程度に対応するのかも知れない。

なお、MGP-allD を用いて得た結果に関する考察は以上とし、以下の考察においては、これについては言及しない。

3.4.3 観測された速度論的同位体効果の大小から行い得る考察

3.4.3.1 速度論的同位体効果の出現について

3.1 に記述したように、MGP と特定の位置に重水素を持つ重水素化 MGP を共存させて AOS と反応させた場合には、重水素が存在する位置において水素引き抜き反応が起これば、速度論的同位体効果が観測され MGP の方が速く分解される、と考えられた。また、速度論的同位体効果が大きく現れた場合に、すなわち、MGP の分解が重水素化 MGP の分解より速くこれらの差が顕著な場合に、AOS が行う水素引き抜き反応に関与する重水素の割合が大きいことが推測されるため、重水素を持つ部位における水素引き抜き反応が優先的に起こる、と考えられた。なおこれ以降、MGP の分解が重水素化 MGP の分解よりも速くこれらの間に分解差が生じる現象を、速度論的同位体効果が出現する、と記述する。上記の期待された考え方が成り立つためには、1 回の水素引き抜き反応で出現する速度論的同位体効果が、MGP のどの炭素－水素結合においても同じ大きさであることが、必要である。しかし、速度論的同位体効果出現の大小は、対象となる素反応の遷移状態が、その素反応の進行度においてどこに位置するのかによっても決定され、この位置が真中のときに最大となるが、出発系または生成系に近い場合には小さくなることが、知られている (Carey *et al.* 2000; O’Ferrall *et al.* 1967; Lowry *et al.* 1987; Thornton *et al.* 1962)。このように、速度論的同位体効果出現の大小は、上述した 2 つの要因、すなわち、**A**: 対象となる炭素－水素結合から水素が引き抜かれる頻度、および、**B**: 対象となる炭素－水素結合での水素引き抜き反応における遷移状態の位置、によって決定される。したがって、本研究における速度論的同位体効果の出現を評価するためには、これら 2 つの要因について、考察を行う必要がある。しかし、これら 2 つの要因の間に相関があるのかどうか等、これらの関係については不明であるため、これらを同時に考慮することは、現時点では不可能である。そこで以降の項において、**A** および **B** を別々に考察するが、その際、**A** の考察においては **B** が、そして、**B** の考察においては **A** が、MGP の全ての炭素－水素結合について一定であると仮定する。

なお、AOS の MGP への攻撃における初発反応が、炭素－水素結合からではなく、水酸基からの水素引き抜き反応である可能性が、考えられる。この初発反応に続いて、生成したアルコキシラジカルの炭素に結合する水素原子が酸素ラジカル上に転移し、炭素中心

ラジカルが生成することも、予想される。これらの反応の場合、前段が律速段階であれば、速度論的同位体効果は観測されないが、後段が律速段階の場合には、速度論的同位体効果が観測され得る。3.3 で記述した結果が、この反応も含んだ正味を示す可能性も考えられるが、これらの反応については、本研究の結果から考察を行うことは不可能である。したがって、以降の項目では、これらの反応は考慮せずに考察を進める。

また、重水素化 MGP の重水素が、アルカリ水溶液中で軽水素に置換された後、AOS による水素引き抜き反応が起きれば、速度論的同位体効果は観測されない。この可能性を検討するため、 $\text{D}_2\text{O}/\text{NaOD}$ 中 (95°C) で MGP を処理してから ^1H -NMR を測定したが、重水素化 MGP のスペクトルは検出されなかった。したがって、酸素-アルカリ処理中に重水素化 MGP が MGP に変換されるとは考えられず、上記の可能性は否定されよう。

3.4.3.2 各炭素における水素引き抜き反応の頻度について

上述のように、この項では、前述の **B** が **MGP** の全ての炭素－水素結合で一定であると仮定して、**AOS** がどの炭素から優先的に水素を引き抜くのかについて、考察を行う。**B** を一定と仮定する場合、**AOS** による **MGP** からのいかなる水素引き抜き反応であっても、同じ大きさの速度論的同位体効果が出現する、と考えることになる。この仮定の下では、速度論的同位体効果出現の大小が、水素引き抜き反応の頻度を表すことになる。

Fig. 3-35、3-59 および 3-60~3-66 から、水素引き抜き反応が優先的に起こる順に記述すると、以下の通りとなる。

TMPh 共存系における酸素－アルカリ処理：

C-2 位 > アノマー位 > C-3 位 \doteq C-4 位 > C-5 位 \doteq C-6 位

VA 共存系における酸素－アルカリ処理：

C-4 位 > アノマー位 \doteq C-2 位 > C-3 位 > C-5 位 \doteq C-6 位

過酸化水素－アルカリ処理：

上記 **VA** 共存系とほぼ同じ

酸素漂白過程における多糖類の分解は、一般的に単糖残基の C-2 位または C-3 位からの水素引き抜きが初発反応であると、考えられている (Gierer 1997)。**TMPh** 共存系における酸素－アルカリ処理では、この一般的な知見に比較的近い順番であるが、**VA** 共存系における酸素－アルカリ処理と過酸化水素－アルカリ両処理では、これとかなり異なる順番である。**VA** 共存系における酸素－アルカリ処理と過酸化水素－アルカリ両処理では、順番がほぼ同じであることから、前者では、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ が主要な **AOS** である可能性が、示唆される。また、3.3 にも記載したが、**TMPh** 共存系における酸素－アルカリ処理で出現した速度論的同位体効果は、**VA** 共存系における酸素－アルカリ処理と過酸化水素－アルカリ両処理で出現した速度論的同位体効果よりも、全般的に大きかった。これらのことから、**TMPh** 共存系における酸素－アルカリ処理では、 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 以外の **AOS** が水素引き抜き反応を行い、速度論的同位体効果を増大させる可能性が、示唆される。

3.4.3.3 AOS による水素引き抜き反応における遷移状態の位置推定と MGP の各炭素－水素結合の抵抗性について

本項では、前述の **A** が **MGP** の全ての炭素－水素結合で一定であると仮定し、**AOS** によるそれぞれの炭素－水素結合からの水素引き抜き反応において、遷移状態が反応の進行度に沿ってどこに位置するのか、について考察を行う。この考察の結果として、各炭素－水素結合の **AOS** による水素引き抜き反応に対する抵抗性についての示唆が、可能となる。

AOS による **MGP** の炭素－水素結合からの水素引き抜き反応において、その遷移状態の位置に影響を与え得る因子として、**AOS** の反応性、および、炭素－水素結合の水素引き抜き反応に対する抵抗性が、考えられる。すなわち、**AOS** の反応性が高い、あるいは、低い場合に、遷移状態がそれぞれ、出発系、あるいは、生成系に近い位置に現れると考えられる。一方、炭素－水素結合の抵抗性が低い、あるいは、高い場合に、同様にそれぞれ、出発系、あるいは、生成系に近い位置に現れると、考えられる。**AOS** による水素引き抜き反応において、対象となる炭素－水素結合の距離は次第に長くなるが、**AOS** の反応性が高い場合には、元の距離と大きく異ならない位置で遷移状態に到達すると考えられよう。また、炭素－水素結合の抵抗性が低い場合にも同様に、すぐに遷移状態に到達するであろう。これらのこと、および、前項で記述したように、**VA** 共存系での酸素－アルカリ処理においては、 O^\bullet が主要な **AOS** であると考えられること、を考慮すると、次段落以降に記述する手順によって、各炭素－水素結合からの水素引き抜き反応における遷移状態の位置が推定可能であり、その結果として、各結合の **AOS** による水素引き抜き反応への抵抗性が、示唆可能となる。

手順①：**TMPh** 共存系および **VA** 共存系において、最も大きな速度論的同位体効果が観測されたのは、それぞれ **C-2** 位および **C-4** 位における水素引き抜き反応であった (**Fig. 3-35** および **3-59**)。したがって、これらの場合における遷移状態は、他の部位における水素引き抜き反応と比較すると、反応の進行度が真中付近の時点で現れると仮定されよう (**Fig. 3-67**)。手順②： O^\bullet は **AOS** として最も反応性の高い化学種のうちの一つであるから、**VA** 共存系における **AOS** の反応性は、**TMPh** 共存系よりも高いと考えられる。したがって、ある特定の炭素－水素結合からの水素引き抜き反応においては、**VA** 共存系では **TMPh** 共存系よりも遷移状態が出発系に近い位置に現れるであろう。これを基にすると、**TMPh** 共存系における **C-4** 位、および、**VA** 共存系における **C-2** 位での水素引き抜き反応の遷移

状態は、真中よりも生成系側、および、出発系側にそれぞれ現れると、予想される (Fig. 3-67)。

手順③：アノマー位での水素引き抜き反応では、TMPh および VA 共存系のどちらにおいても明瞭な速度論的同位体効果が観測されたが、これと同じ傾向を示すのは C-2 位での水素引き抜き反応のみであった (Fig. 3-35 および 3-59)。したがって、アノマー位および C-2 位での水素引き抜き反応における遷移状態は、お互いに近い位置で現れると、予想される。

手順④：C-5 位および C-6 位での水素引き抜き反応では、TMPh および VA 共存系のどちらにおいても、明瞭な速度論的同位体効果が観測されなかった (Fig. 3-35 および 3-59)。したがって、これらの水素引き抜き反応では、遷移状態は出発系、あるいは、生成系のどちらかに近い位置に現れると、予想される。上述したが、一般的な知見によれば、C-2 位あるいは C-3 位の水素が引き抜かれやすいので、C-5 位および C-6 位の水素については、引き抜かれ難いと仮定する方が、合理的であろう。したがって、これらの水素引き抜き反応では、遷移状態は生成系に近い位置に現れると、予測される (Fig. 3-67)。また、TMPh および VA 共存系のどちらにおいても、C-6 位でよりも C-5 位での水素引き抜き反応の方が、速度論的同位体効果が小さいように見えるので、C-5 位での水素引き抜き反応の方が、遷移状態がより生成系に近い位置に現れると、予測されよう。

手順⑤：C-3 位での水素引き抜き反応における速度論的同位体効果は、TMPh 共存系では C-4 位と同程度でアノマー位と C-2 位よりは小さく、そして、VA 共存系ではこれら 3 つよりも小さかった。C-3 位での水素引き抜き反応における遷移状態としてこれらの結果と合致するのは、これが最も出発系に近い位置に現れる場合のみである (Fig. 3-67)。

以上の考察から予測された遷移状態の位置は、Fig. 3-67 に示すように以下の通りである。

出発系側 C-3 位 アノマー位 \rightleftharpoons C-2 位 C-4 位 C-6 位 C-5 位 生成系側

前述のように、本項における考察では、3.4.3.1 に記載の **A** が MGP の全ての炭素－水素結合で一定であると仮定しているので、上記の遷移状態の位置は、それぞれの炭素－水素結合の水素引き抜き反応に対する抵抗性に対応している。したがって、抵抗性は大きい順に、以下の通りとなる。

C-5 位 > C-6 位 > C-4 位 > アノマー位 \rightleftharpoons C-2 位 > C-3 位

実際には、この抵抗性の順番と、前項で示唆された水素引き抜き反応の頻度の両方が、優先的に引き抜かれる水素を決定するが、これらを合わせて考察することは、現時点では不可能である。どちらかと言えば、上記の抵抗性の順番は、引き抜かれやすい水素に関する一般的な知見と合致する部分が多いように見える。

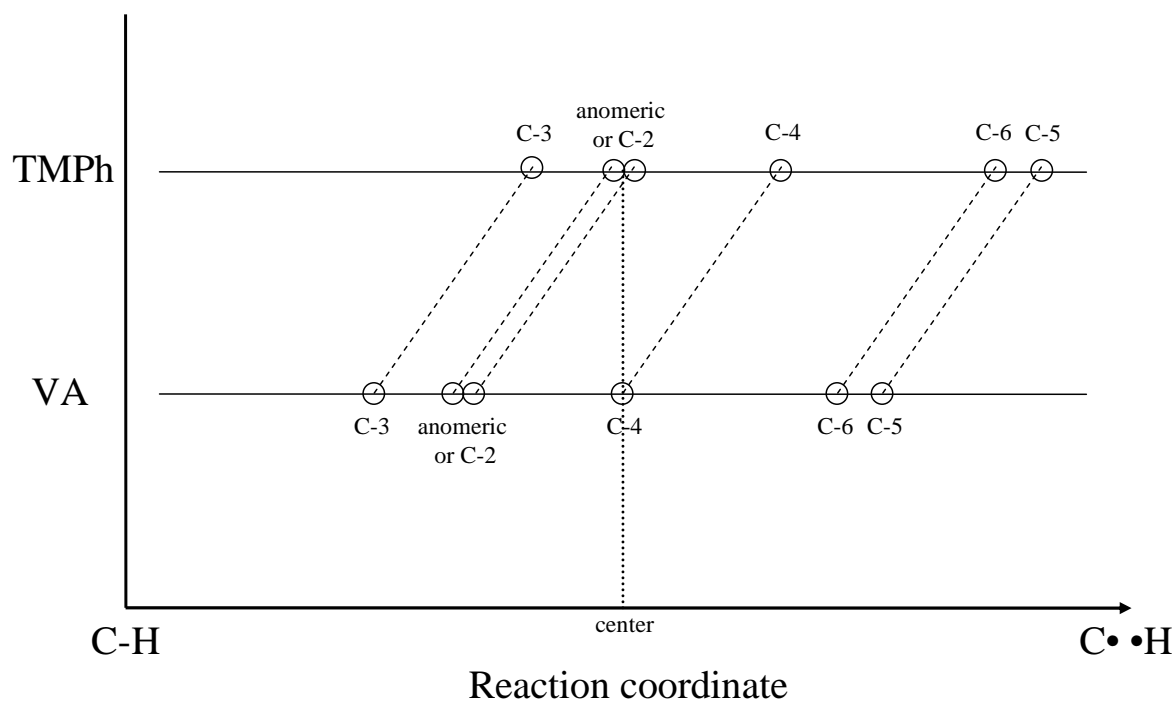


Fig. 3-67 Proposed location of the transition state along the reaction coordinate in the hydrogen abstraction from each carbon-hydrogen bond of MGP in the oxygen-alkali treatment together with TMPh or VA

3.5 まとめ

VA 共存系での酸素－アルカリ処理における MGP と MGP-5D の反応、そして、全ての処理における MGP と MGP-MeD の反応では、MGP よりも重水素化 MGP の方が速く分解された。この現象は、現時点では合理的に説明することができないが、分析対象となる炭素－水素結合の開裂に伴うものではない、と考えられた。そこで、どの位置に重水素が存在するのかに関係なく、重水素化 MGP の分子量が MGP よりも大きいことに起因して、重水素化 MGP は分子全体として、MGP よりも AOS によって分解されやすい、と考えた。

MGP の全ての炭素－水素結合が炭素－重水素結合である場合に、どの程度の速度論的同位体効果が観測されるのかについて知見を得るため、MGP と MGP-allD の反応を行った。その結果、全ての処理において、全ての MGP と重水素化 MGP の組み合わせの中で、最も大きな速度論的同位体効果が観測された。したがって、重水素の数と観測される速度論的同位体効果の大きさの間には、正の相関が存在することが示唆された。

速度論的同位体効果出現の大小を決定するのは、**A**: 対象となる水素が引き抜かれる頻度、および、**B**: 対象となる水素引き抜き反応の進行に伴って現れる遷移状態の位置、の 2 つの要因である。しかし、これらを合わせて考察することは不可能であるため、これらを別々に、他方が全ての炭素－水素結合において一定であると仮定した上で、考察を行った。**A** の考察では、優先的に引き抜かれる水素の順番として、TMPh 共存系における酸素－アルカリ処理：C-2 位 > アノマー位 > C-3 位 \simeq C-4 位 > C-5 位 \simeq C-6 位、VA 共存系における酸素－アルカリ処理：C-4 位 > アノマー位 \simeq C-2 位 > C-3 位 > C-5 位 \simeq C-6 位、過酸化水素－アルカリ処理：VA 共存系とほぼ同じ、が示唆された。**B** の考察では、AOS の水素引き抜き反応に対する抵抗性の高い順番に、C-5 位 > C-6 位 > C-4 位 > アノマー位 \simeq C-2 位 > C-3 位、であること、が示唆された。

3.6 参考文献

- Carey F. A. and Sundberg R.J.: *Advanced Organic Chemistry Part A: Structure and Mechanisms* (4th ed.), 222 (2000)
- O’Ferrall R. A. and Kouda J.: *J. Chem. Soc. B*, 985 (1967)
- Gierer J.: *Holzforschung*, **51** (1), 34 (1997)
- Koenigs W. and Knorr E.: *Chem. Ber.*, **34**, 957 (1901)
- Konishi F., Yokoyama T. and Matsumoto Y.: *Holzforschung*, **63**, 52 (2009)
- Lowry T. H. and Richardson K. S.: *Mechanism and Theory in Organic Chemistry* (3rd ed.), 232 (1987)
- Thornton E. R.: *J. Org. Chem.*, **27** (6), 1943 (1962)

第4章

水素引き抜き反応に関与する 活性酸素種の推定

4.1 緒言

これまでに記述したように、2,4,6-trimethylphenol (TMPH) または 4-hydroxy-3-methoxybenzyl alcohol (vanillyl alcohol, VA) 共存系における酸素－アルカリ処理の結果から、反応系中に生成する活性酸素種 (active oxygen species, AOS) について、次のことが示唆された。すなわち、TMPH および VA 両共存系において、様々な種類の AOS が共通して存在すると考えられるが、TMPH 共存系で生成するいくつかの AOS は VA 共存系には存在せず、これらの AOS は、methyl β -D-glucopyranoside (MGP) のアノマー位および C-2 位からの水素引き抜き反応において、非常に明瞭な速度論的同位体効果を示す。

Fig. 4-1 に、酸素－アルカリ処理における TMPH または VA の反応の概要を示す。これらの構造の中では、**II** (TMPH または VA 由来のペルオキシラジカル)、**III** (オキシルアニオンラジカル $O^{\cdot-}$ (ヒドロキシラジカル (HO^{\cdot}) の共役塩基))、および、**IV** (TMPH または VA 由来のアルコキシラジカル) が、MGP を分解し得る AOS と考えられる。これらのうち、TMPH 由来のペルオキシラジカル **II** と TMPH 由来のアルコキシラジカル **IV** は、TMPH 自体の部分構造を保持しているため、上記の TMPH 共存系のみで生成し明瞭な速度論的同位体効果を示す AOS の候補である。これらのうちアルコキシラジカル **IV** については、TMPH あるいは VA どちらの由来であっても比較的似た構造であるため、反応性が大きく異なるとは考え難い。一方、ペルオキシラジカル **II** についての既往の研究では、VA に構造の近いグアイアシル型芳香核を有する化合物を用いて、酸素漂白条件下において **I** (フェノキシラジカル) が酸素分子と結合してペルオキシラジカル **II** を生成するかどうかを検討されており、この結合反応が起こり難いことが提案されている (Gierer *et al.* 1992; Gierer *et al.* 1994; Gierer *et al.* 1996a; Gierer *et al.* 1996b; Sugimoto *et al.* 2000)。しかし、TMPH 由来のフェノキシラジカル **I** では、この酸素分子との結合反応が起こるかも知れない。もし、この結合反応が起こるのであれば、生成する TMPH 由来のペルオキシラジカル **II** は、TMPH 共存系でのみ生成し、上記のような最も明瞭な速度論的同位体効果を示す AOS の強力な候補となり得る。

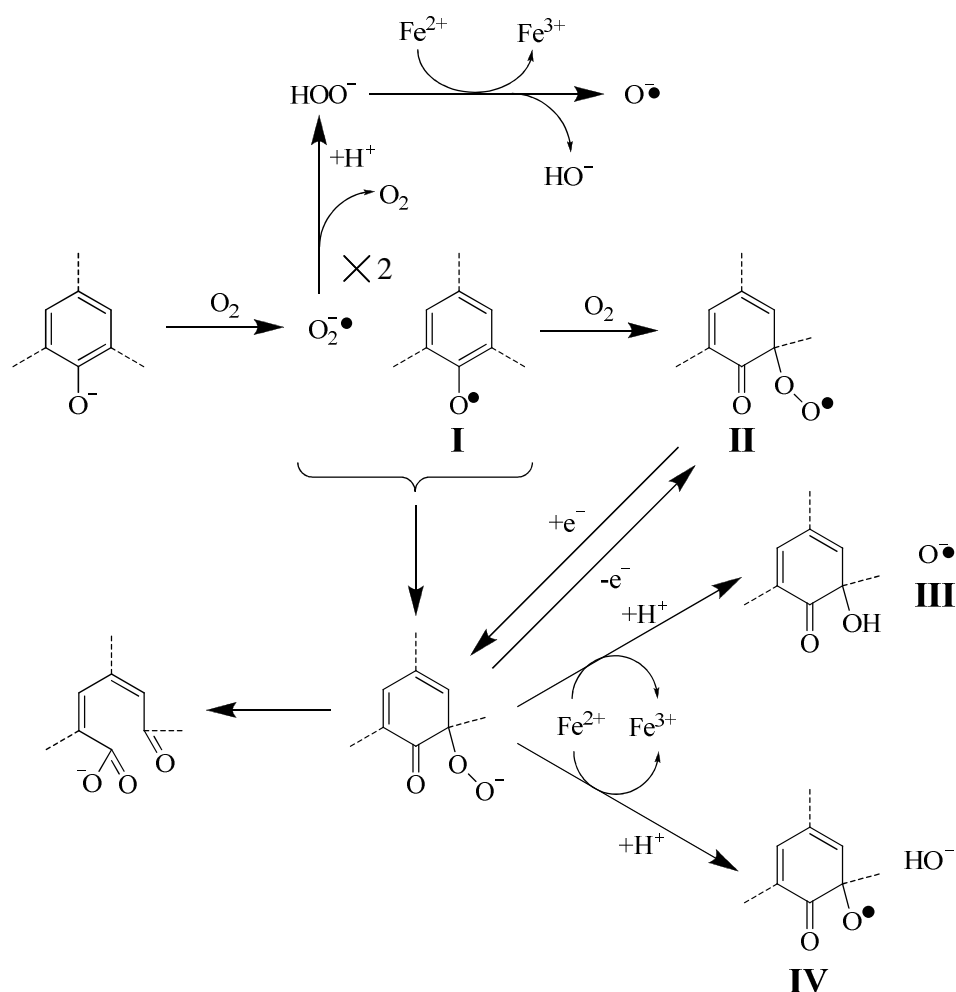


Fig. 4-1 Possible reaction scheme for TMPH or VA in the oxygen-alkali treatment

本章では、TMPH 由来のフェノキシラジカル **I** と酸素分子が結合するかどうか、そして、この結合反応によって生成するペルオキシラジカル **II** が MGP を分解するかどうか、について検討することを目的とした。そこで、反応に関与する酸素分子量が減少すれば、**I** が酸素分子と結合し難くなり、**II** の生成が抑制され得ると考え、以下の実験を行った。すなわち、酸素圧を 1.1 MPa ではなく 0.4 MPa とし、MGP および methyl β -D-(3- ^2H)glucopyranoside (MGP-3D) の 2 種類を TMPH または VA と共に酸素-アルカリ処理した場合に、速度論的同位体効果が観測されるかどうかについて、検討した。この実験の結果において、観測される速度論的同位体効果が小さくなれば、TMPH または VA 由来の **I** と酸素分子が結合し、生成する **II** が MGP の C-3 位炭素から水素を引き抜く可能性が、示唆される。

4.2 実験

4.2.1 モデル化合物の調製

Fig. 4-2 に、本章で用いた化合物 MGP、MGP-3D、TMPh および VA の構造を示す。これらの化合物の調製および精製については 2.2.1.1 を、そして、MGP-3D の合成については、3.2.1 に記述した。

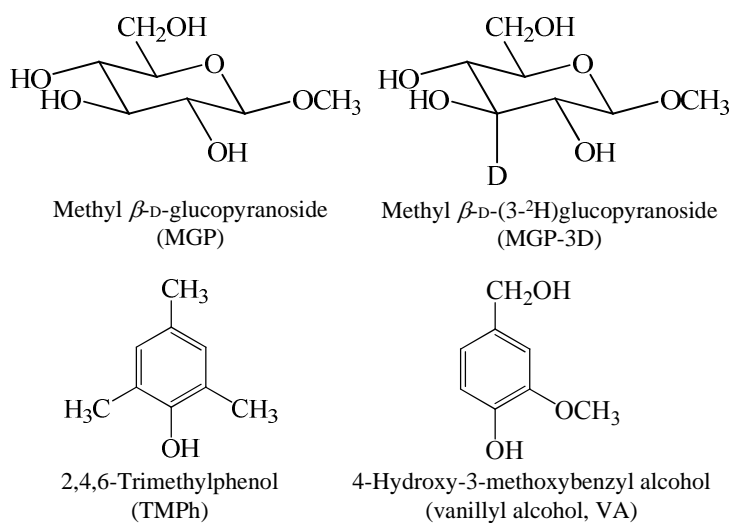


Fig. 4-2 Chemical structure of model compounds used in this chapter

4.2.2 酸素－アルカリ処理と残存モデル化合物の定量

酸素圧を 0.4 MPa とした以外は、使用した装置、反応溶液、反応条件、そして、定量方法の全てについて、2.2.2.1 および 3.2.2 に記載した内容に従った。

4.3 結果と考察

Fig. 4-3 および 4-4 に、酸素圧が 0.4 MPa の場合の TMPH および VA 共存系それぞれにおける MGP と MGP-3D の分解挙動を示す。対照として、Fig. 4-5 および 4-6 に、酸素圧が 1.1 MPa の場合の TMPH および VA 共存系それぞれにおける MGP と MGP-3D の分解挙動を示す。なお、Fig. 4-5 および 4-6 は、それぞれ Fig. 3-20 および 3-44 と同一である。

3.3 でも記述した通り、酸素圧が 1.1 MPa の場合、TMPH は反応時間 60 分までに、そして、VA は 90 分までに消失した。酸素圧が 0.4 MPa の場合には、TMPH は反応時間 120 分までに、そして、VA は 240 分までに消失した。TMPH 共存系において酸素圧を 0.4 MPa とした場合、どの反応時間においても MGP-3D の分解量が MGP よりも多かった (Fig. 4-3)。一方、酸素圧が 1.1 MPa の場合は、どの反応時間においても後者の分解量の方が多かった (Fig. 4-5)。したがって、TMPH 共存系においては、酸素圧を低下させることによって、速度論的同位体効果が観測されなくなった。すなわち、酸素圧が高い場合に生成量の多くなる AOS が、MGP の C-3 位から水素を引き抜くことが、示唆された。上記のように、この AOS としては、TMPH 由来のペルオキシラジカル **II** が有力な候補であり、TMPH 由来のフェノキシラジカル **I** が酸素分子と結合する可能性が、示唆される。

一方、VA 共存系においては、酸素圧が 0.4 MPa の場合でも 1.1 MPa の場合と同様に、MGP と MGP-3D との間に速度論的同位体効果がほとんど観測されなかった (Fig. 4-4 および 4-6)。したがって、VA 共存系においては、酸素圧を低下させても、速度論的同位体効果の大きさには影響がなかった。この結果は、VA 共存系においては、主要となる AOS が MGP の水素引き抜き反応において明瞭な速度論的同位体効果を示さない化学種であること、なおかつ、酸素圧が高い場合に生成が多くなり、前記の水素引き抜き反応において明瞭な速度論的同位体効果を示す AOS が存在しないことを、示唆する。VA 共存系では C-3 位以外の水素引き抜き反応のみによって MGP が分解される場合でも、上記の結果が得られるが、これが合理的な推測とは考え難い。したがって、VA 共存系において主要な AOS が $\text{O}_2^{\cdot -}$ である可能性、そして、既往の知見の通り、VA 由来のフェノキシラジカル **I** が酸素分子と結合しない可能性 (Gierer *et al.* 1992; Gierer *et al.* 1994; Gierer *et al.* 1996a; Gierer *et al.* 1996b; Sugimoto *et al.* 2000)、が示唆される。フェノキシラジカル **I** と酸素分子との結合反応の進行は、**I** の芳香核構造に依存する可能性が考えられる。

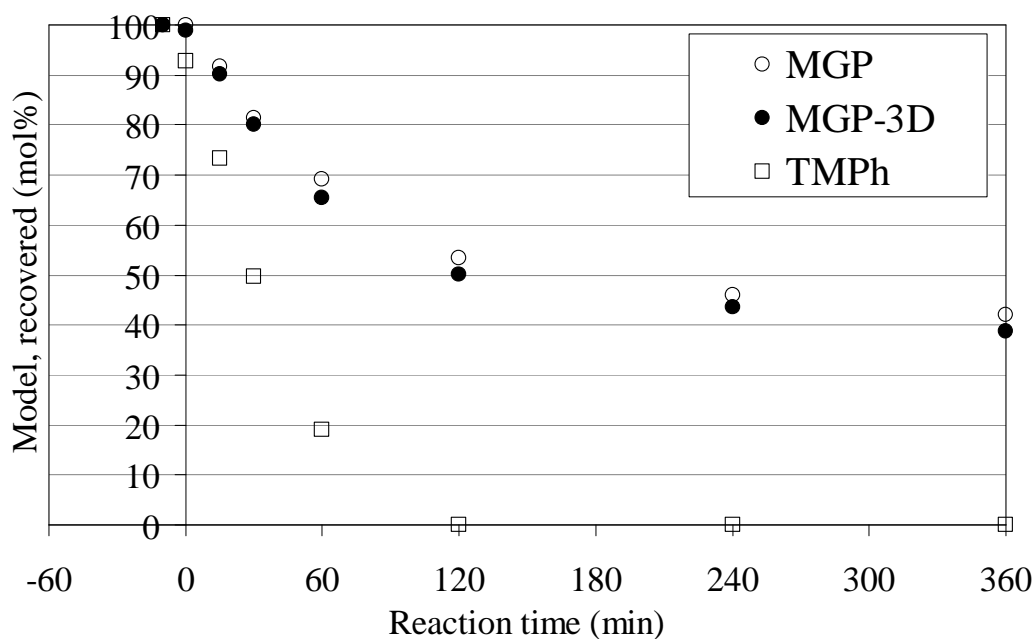


Fig. 4-3 Change in the yields of MGP and MGP-3D when MGP, MGP-3D, and TMPH were reacted together (O_2 pressure: 0.4 MPa)

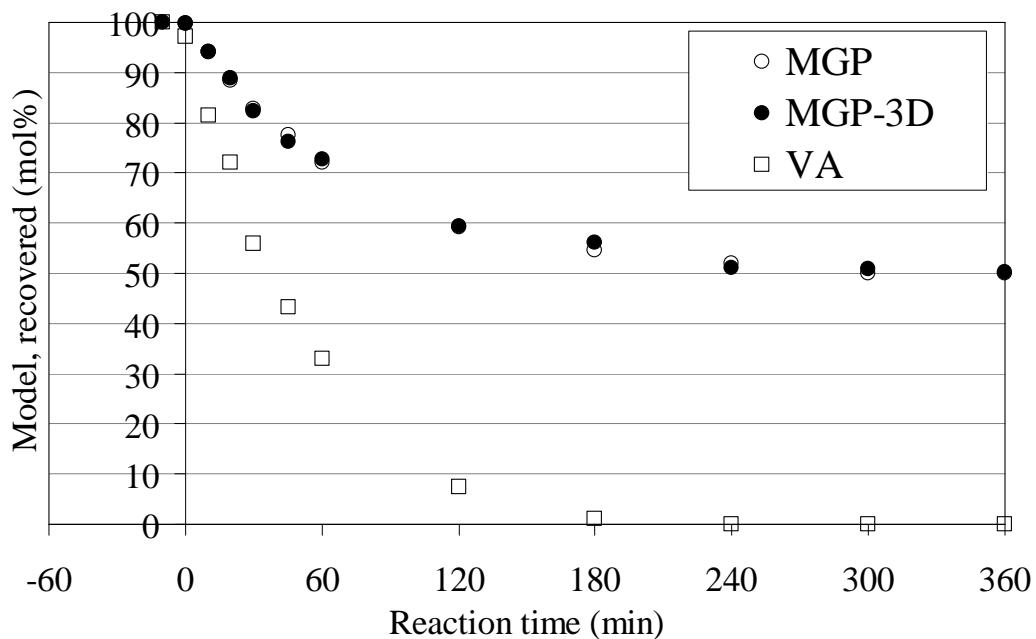


Fig. 4-4 Change in the yields of MGP and MGP-3D when MGP, MGP-3D, and VA were reacted together (O_2 pressure: 0.4 MPa)

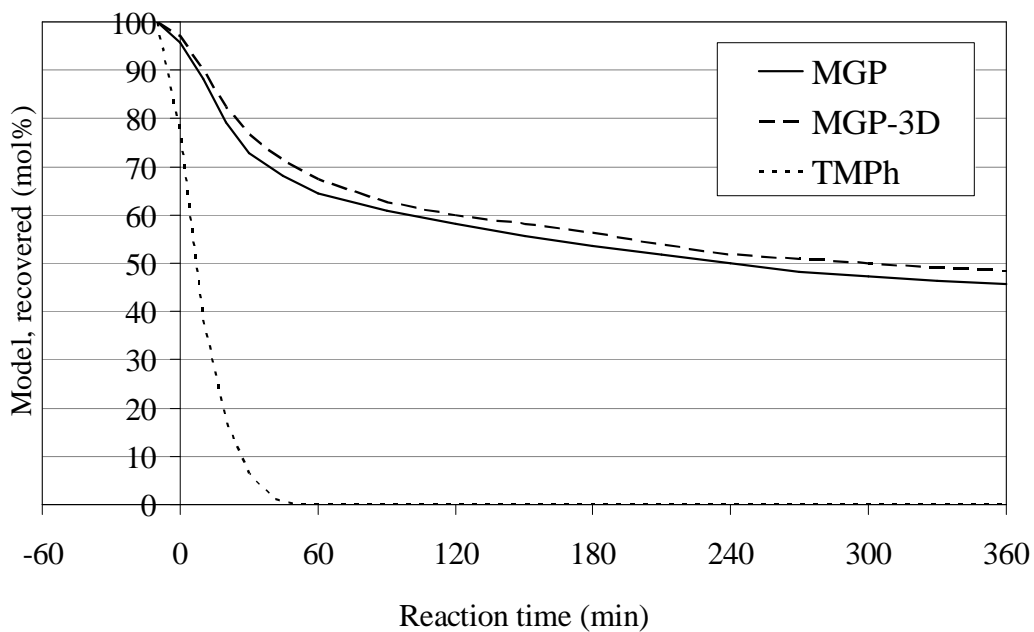


Fig. 4-5 Change in the yields of MGP and MGP-3D when MGP, MGP-3D, and TMPH were reacted together (O_2 pressure: 1.1 MPa)

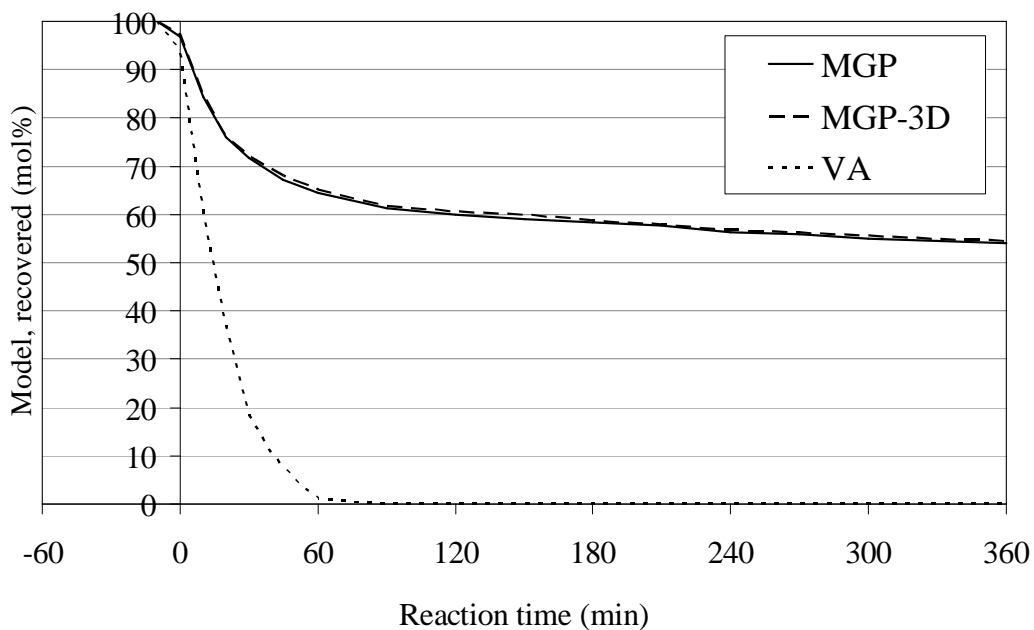


Fig. 4-6 Change in the yields of MGP and MGP-3D when MGP, MGP-3D, and VA were reacted together (O_2 pressure: 1.1 MPa)

4.4 参考文献

- J. Gierer, E. Yang and T. Reitberger: *Holzforschung*, **46** (6), 495 (1992)
- J. Gierer, E. Yang and T. Reitberger: *Holzforschung*, **48** (5), 405 (1994)
- J. Gierer, E. Yang and T. Reitberger: *Holzforschung*, **50** (4), 342 (1996a)
- J. Gierer, E. Yang and T. Reitberger: *Holzforschung*, **50** (4), 353 (1996b)
- T. Sugimoto, T. Morishita, Y. Matsumoto and G. Meshitsuka: *Holzforschung*, **54** (3), 262 (2000)

第 5 章

総括

酸素漂白過程における重要な課題は、多糖類の分解を抑制することであるが、この多糖類の分解は、主にリグニン中のフェノール性部位と酸素との反応によって生成する AOS によって引き起こされる。本研究では、実際の酸素漂白に近い条件下において、AOS と様々な糖モデル化合物を反応させることによって、次の 3 つの検討を行った。すなわち、①：MGP と MGP とは立体配置の異なる MGP α 、MMP、MAP または MGaP とを AOS と反応させ、糖モデル化合物の立体配置の相違が及ぼす AOS との反応への影響について、②：MGP と 重水素化 MGP である MGP-1D、MGP-2D、MGP-3D、MGP-4D、MGP-5D、MGP-6D、MGP-MeD または MGP-allD 2 種類を AOS と反応させ、速度論的同位体効果が出現するかどうかを確認することによって、MGP の炭素－水素結合の中でどれが AOS によって攻撃されやすいのかについて、そして、③：低酸素圧下で MGP と MGP-3D を AOS と反応させ、酸素圧の相違が及ぼす速度論的同位体効果の大きさへの影響を調べることによって、どんな化学種が AOS として系中で働くのかについて、検討を行った。なお、本研究では、実際の酸素漂白過程を模式するため、AOS はフェノール性化合物 TMPH または VA と酸素との反応で生成させた。また、AOS と限定する目的で、O \cdot のみが AOS として働くと考え得る過酸化水素－アルカリ処理も行った。

①：AOS 生成源が存在しない場合の糖モデル化合物の酸素－アルカリ処理における分解を検討したところ、MMP のみが酸素圧下の反応において多少分解されたことから、C-2 位の水酸基がアキシアル位に存在すると、酸素によって多少酸化を受けることが示唆された。しかし、この MMP の分解は少量であったので、AOS 生成源となるフェノール性化合物が共存する場合には、この酸素による分解は重要ではないことが、確認された。

O \cdot を含む AOS との反応性は、MAP、MGaP、MMP、MGP そして MGP α の順に低くなり、MAP は非常に激しく分解された。したがって、糖モデル化合物の各炭素における立体配置の相違が AOS との反応に影響を及ぼすこと、そして、C-3 位の水酸基がアキシアル位に存在すると、O \cdot を含む AOS によって非常に攻撃されやすくなること、が示唆された。

糖モデル化合物の存在が他の糖モデル化合物の分解に及ぼす影響について検討するため、MGP を含む糖モデル化合物 2 種類を用いて、TMPH を AOS 生成源とした酸素－アルカリ処理を行った。MGP の分解に注目すると、MGP と MMP を共に反応させた場合にのみ、

MGP を単独で反応させた場合よりも MGP の分解が促進されたが、その他の糖モデル化合物の存在は MGP の分解を抑制した。一方、MGP 以外の糖モデル化合物の分解に注目すると、MGP の存在は MMP の分解をやはり促進し、MGP α の分解には影響を与えず、そして、これら以外の分解は抑制した。共存糖モデル化合物が他方の糖モデル化合物の分解を抑制するのは、共存によって AOS との反応において競合が生じるためと考えられる。MMP が存在すると、TMPH 由来の AOS だけでなく MMP 由来の AOS も生成し、後者の AOS が MMP 自身だけでなく MGP の分解も促進する可能性が示唆された。

VA を AOS 生成源とした酸素—アルカリ処理を、MGP を含む糖モデル化合物 2 種類を用いて行った結果、TMPH 共存系と比較すると、フェノール性化合物の消失前と消失後で糖モデルの分解に違いが見られた。TMPH および VA 共存系での糖モデル化合物の分解挙動の相違から、AOS 生成源の種類により、生成する AOS の種類や量比が異なる可能性が示唆された。

②: MGP と重水素化 MGP との反応を行った結果、VA 共存系での酸素—アルカリ処理における MGP と MGP-5D の反応、そして、全ての処理における MGP と MGP-MeD の反応では、MGP よりも重水素化 MGP の方が速く分解された。この現象は、現時点では合理的に説明することができないが、分析対象となる炭素—水素結合の開裂に伴うものではない、と考えられた。そこで、どの位置に重水素が存在するのかに関係なく、重水素化 MGP の分子量が MGP よりも大きいことに起因して、重水素化 MGP は分子全体として、MGP よりも AOS によって分解されやすい、と考えた。

MGP の全ての炭素—水素結合が炭素—重水素結合である場合に、どの程度の速度論的同位体効果が観測されるのかについて知見を得るため、MGP と MGP-allD の反応を行った。その結果、全ての処理において、全ての MGP と重水素化 MGP の組み合わせの中で、最も大きな速度論的同位体効果が観測された。したがって、重水素の数と観測される速度論的同位体効果の大きさの間には、正の相関が存在することが示唆された。

多くの反応では、MGP の分解は重水素化 MGP の分解以上に速く、速度論的同位体効果がしばしば観測されたが、速度論的同位体効果出現の大小を決定するのは、対象となる水素が引き抜かれる頻度、および、対象となる水素引き抜き反応の進行に伴って現れる遷移状態の位置、の 2 つの要因である。しかし、これらを合わせて考察することは不可能で

あるため、これらを別々に、他方が全ての炭素－水素結合において一定であると仮定した上で、考察を行った。前者の要因の考察では、優先的に引き抜かれる水素の順番として、TMPH 共存系における酸素－アルカリ処理：C-2 位 > アノマー位 > C-3 位 \simeq C-4 位 > C-5 位 \simeq C-6 位、VA 共存系における酸素－アルカリ処理：C-4 位 > アノマー位 \simeq C-2 位 > C-3 位 > C-5 位 \simeq C-6 位、そして、過酸化水素－アルカリ処理：VA 共存系とほぼ同じ傾向、が示唆された。後者の要因の考察では、各炭素－水素結合での水素引き抜き反応における遷移状態の位置から、その炭素－水素結合の AOS による水素引き抜き反応に対する抵抗性を推定し、これが高い順番に、C-5 位 > C-6 位 > C-4 位 > アノマー位 \simeq C-2 位 > C-3 位、であること、が示唆された。

③：TMPH または VA のフェノキシラジカルと酸素が結合したペルオキシラジカルが、MGP の水素引き抜き反応に関与する AOS の 1 つであること、そして、低酸素圧下で MGP と重水素化 MGP の反応をこなうことによって、上記の結合反応とペルオキシラジカルによる水素引き抜き反応に関する知見が得られること、が推測されたため、MGP と MGP-3D を TMPH または VA と共に酸素－アルカリ処理に供した。その結果、低酸素圧下で反応を行うことによって、MGP と MGP-3D との分解の差が、TMPH 共存系では消失し、VA 共存系では変化しなかった。したがって、TMPH 由来のフェノキシラジカルが酸素と結合する可能性、および、TMPH 共存系で MGP の水素引き抜き反応に関与する AOS の 1 つが、TMPH ペルオキシラジカルである可能性、が示唆された。

謝辞

本研究を進めるにあたり、2008 年から 6 年間、終始懇切丁寧なご指導を頂き、叱咤激励をして下さいました、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内の松本雄二教授、並びに、横山朝哉准教授に心より御礼申し上げます。

特に、横山准教授には、6 年間の間、実験の手法から、結果に対する考察、学会発表、そして、論文作成に至るまで、様々な面で直接の、そして、細やかな御指導を頂きまして、心より深く感謝しております。

細かい実験手法、特にモデル化合物の合成および NMR の分析手法に関して、多数の御指導をして下さった、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内の秋山拓也助教に深く感謝しております。

三重大学生物資源学部共生環境学科木質分子素材制御学研究室に在籍していた時、御指導頂きました、野中寛准教授、船岡正光教授、そして、修士課程の時から、研究内容を始め、生活、そして、進路の面まで御指導頂き、相談にのって下さった、田中潤治博士 (川崎化成工業株式会社) に心より御礼申し上げます。

6 年の間に同じ研究室に所属していた先輩、後輩、そして友人達に多大な感謝をしております。6 年間同じ研究室にいた戸田守一様、酸素ーアルカリ処理の手法を教えて下さり、研究に関して貴重な考察をして頂いた大村知士博士 (現株式会社ハイテック)、研究に対して貴重な示唆を下さった山岬崇之博士 (現秋田県立大学)、今井貴章様 (現大王製紙株式会社)、石川裕剛様 (現株式会社ダイセル) には深く感謝しております。

最後になりましたが、長い間生活の面で支援して下さいました両親に多大な感謝をしております。

投稿論文

1. Akihiko Nakagawa, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto: Investigation on the hydrogen abstraction from methyl glucoside by active oxygen species under oxygen delignification conditions. Part 2: study on the C-2 position, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, **32** (1), 10 (2012)
2. Tomoya Yokoyama, Akihiko Nakagawa, Fumiko Konishi, Yuji Matsumoto: Investigation on the hydrogen abstraction from methyl glucoside by active oxygen species under Oxygen Delignification Conditions. III: effects of the origin of active oxygen species, *Journal of Wood Science*, **57** (6), 512 (2011)
3. Akihiko Nakagawa, Tomoya Yokoyama, Yuji Matsumoto: Investigation on the hydrogen abstraction from methyl glucoside by active oxygen species under oxygen delignification conditions. IV: appearance of kinetic isotope effect in the reaction between methyl glucoside and deuterated methyl glucoside, *Journal of Wood Science*, **58** (6), 563 (2012)
4. Tomoya Yokoyama, Akihiko Nakagawa, Yuji Matsumoto: Investigation on the hydrogen abstraction from methyl glucoside by active oxygen species under oxygen delignification conditions. Part 5: comprehensive results on experiments using deuterium labeled methyl glucosides, *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 投稿予定