

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月2日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780157

研究課題名（和文） リグニン中の高反応性ジエノン型構造の解明

研究課題名（英文） Dienone structures contained as highly reactive structures in lignin

研究代表者

秋山 拓也（AKIYAMA TAKUYA）

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：50553723

研究成果の概要（和文）：ペルオキシダーゼと過酸化水素を用いたカップリング反応により、スピロジエノン型構造を有する新規の比較的単純なリグニンモデル化合物を得た。その NMR データとリグニンの二次元 NMR スペクトルを比較した。同スペクトル上の候補シグナルとモデル化合物の片方の側鎖（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、および  $\gamma$  位）の化学シフト値は良く一致し、このことから、同型構造がリグニン中に含まれる可能性が高いことが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：A novel lignin model compound of spirodienone structures was obtained by oxidative coupling of sinapyl alcohol  $\gamma$ -acetate with 1-(4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl) ethanol. The NMR chemical shifts of the acetylated model compound were compared with the signals on the HSQC spectrum of acetylated lignin. The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  chemical shifts of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ -positions in one side chain part of the model were in well agreement with the candidate correlation signals of spirodienone structures on the lignin HSQC spectrum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・木質科学

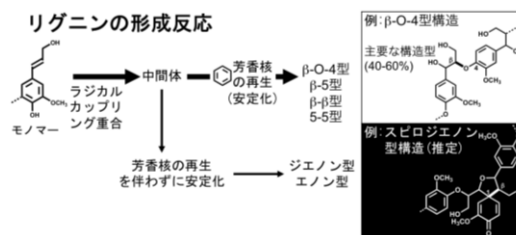
キーワード：リグニン・スピロジエノン

1. 研究開始当初の背景

リグニンはフェニルプロパン構造を基本骨格とした高分子であり、その骨格単位の多くは芳香核構造を有する（ $\beta$ -O-4、 $\beta$ -5、 $\beta$ - $\beta$ 、5-5型構造等）。これは、リグニン生成時、桂皮アルコール類のラジカルカップリング反応によって生成したキノンメチドやジエノン構造の多くは、水や水酸基の付加反応によって芳香核へ再生されるためである。

一方で、骨格単位の一部は、芳香核の再生を伴わずにジエノン型やエノン型構造としてリグニン構造に含まれているのではない

かと古くから想定されてきた。その存在は、実験的にも間接的に示され、リグニン中の隠れた（masked）構造として認識されてきたが詳細は不明なままであった。



1990年代になって、その中の一つ、スピロジエノン型構造が、リグニンの二次元NMRスペクトル上に帰属され、ジエノン型、エノン型構造の重要性が再認識された。しかしながら、モデル化合物のNMR測定データが無いために、その帰属の信頼性は高いとは言えない。

これまでに、芳香核構造を有する部分構造( $\beta$ -O-4,  $\beta$ -5,  $\beta$ - $\beta$ , 5-5型構造等)については、化学分解法とNMR法の両者を適用することで、リグニンに含まれることが明らかとなっている。一方で、スピロジエノン型構造に対して適用できる解析法はNMR法のみであり、加えて、含有量が低いことも原因となり、同構造がリグニンに含まれると想定されているものの、その確証を得るには至っていない。

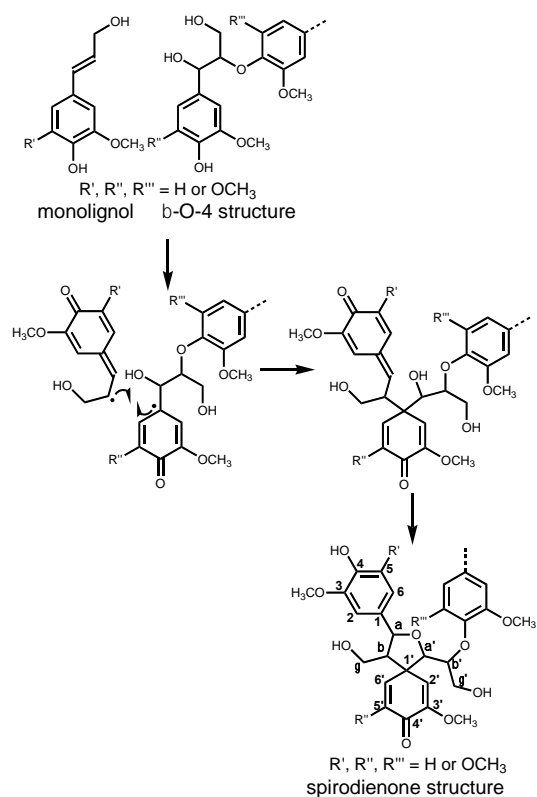


図1. 想定されるスピロジエノン型構造の生成機構

## 2. 研究の目的

(1) リグニン中に含まれると想定されるスピロジエノン型構造のモデル化合物を合成し、そのNMR化学シフトデータを得ること。

(2) 上記のモデル化合物のNMR化学シフト値と、リグニンのNMR(HSQC)スペクトル上のシグナルの化学シフト値を比較することにより、スピロジエノン構造の帰属を試みる。

## 3. 研究の方法

(1) 酸化のカップリングによるスピロジエノンモデル化合物**1**の調製

図2に示す様に、アセトシリンゴン**2**のNaBH<sub>4</sub>による還元物**3**およびシナピルアルコール- $\gamma$ -アセテート**6**を基質として、過酸化水素とわさび由来ペルオキシダーゼを用いたクロスカップリングにより、スピロジエノン型リグニンモデル化合物**1**を調製した。ここで用いた基質の合成収率と、シリカゲルクロマトによる精製後の化合物**1**の収率を図2に示した。

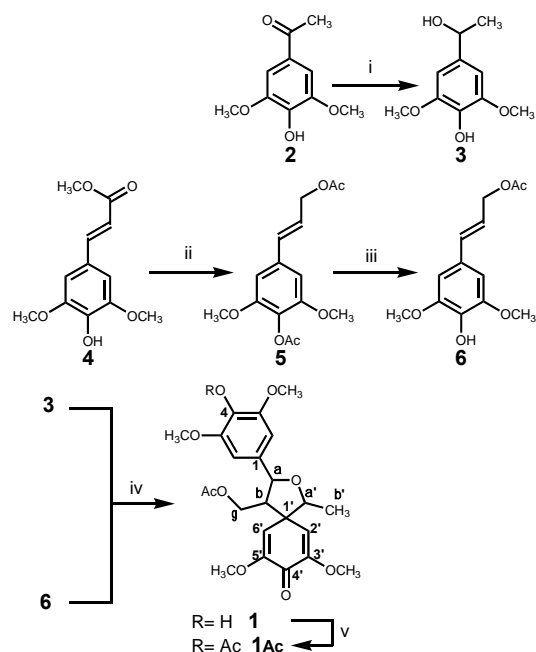


図2. スピロジエノン型モデル化合物**1**の合成経路とそのモル収率：(i) NaBH<sub>4</sub> (**3**, 76%), (ii) 1. DIBAL, 2. Ac<sub>2</sub>O, Py (**5**, 88%) (iii) ピロリジン (**6**, 81%), (iv) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ペルオキシダーゼ (**1**, 6.8%), (v) Ac<sub>2</sub>O, Py (**1Ac**, 85%)

(2) リグニン試料

広葉樹16種の木紛のニトロベンゼン酸化の結果において、最も高いS/V比を示したアビセニア樹種(S:V, 86:14)をシリングル核リグニンに富む試料として用いた。このアビセニアの辺材部から木紛(エタノールベンゼン抽出処理済み)を作製し、Björkmanらの方法に準じてmilled wood lignin (MWL)を調製した。ただし、磨碎木紛からの抽出には90%ジオキサン(ジオキサン-水, 90:10, v/v)を用い、この抽出物を乾燥、水洗後に得た残渣をリグニン試料(MWL)として、さらなる精製は行わずに用いた。

(3) NMR測定

アビセニアリグニン(MWL)のアセチル化物

を重クロロホルム中で NMR 測定した (HSQC、および、HSQC-TOCSY、Bruker Avance 700 MHz, クライオプローブ付)。

スピロジエノン型モデル化合物 (1 および 1Ac) の構造決定は種々の NMR 測定を用いて行った ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135, COSY, HSQC, および HMBC、JEOL Alpha 500 MHz、JNM-A500)。

#### 4. 研究成果

##### (1) スピロジエノンモデル化合物 1Ac

カップリング反応によるスピロジエノンモデル化合物の調製を試みた。化合物 3 および  $\gamma$  位をアセチル化したシナピルアルコール 6 のクロスカップリング生成物として、比較的単純なモデルではあるが、リグニンに含まれると想定されるヒドロキシメチル基を  $\gamma$  位に有するスピロジエノン型モデル化合物 1 が初めて得られた。

しかしながら、単離収率は 6.8 mol% と低く、また、カップリング反応の再現性が低いため、今後、反応条件のさらなる検討を必要とする。当初、同モデル化合物の酸性下での反応性を調べることを計画していたが、実験に必要な量のモデル化合物を得ることはできなかった。しかし、NMR データを得るには十分な量 (約 100 mg) のモデル化合物 1 が得られた。

下記 (3) 項でリグニンアセチル化物の HSQC スペクトルと比較することを目的に、同化合物 1 のアセチル化物 1Ac の NMR データを取得した (表 1)。

表 1. スピロジエノン型モデル化合物 (1Ac アセチル化物) の  $^1\text{H}$ - および  $^{13}\text{C}$ -NMR 化学シフト値 ( $\text{CDCl}_3$ )。

Position	compound 1Ac	
	$^1\text{H}$	$^{13}\text{C}$
1		140.1
2 and 6	6.63 (2H, s)	102.0
3 and 5		152.2
4		128.1
$\alpha$	4.96 (1H, d, $J$ 9)	82.1
$\beta$	2.92 (1H, ddd, $J$ 9, 7, 6)	57.1
$\gamma$ 1	3.98 (1H, dd, $J$ 12, 7)	61.9
$\gamma$ 2	4.07 (1H, dd, $J$ 12, 6)	61.9
3 OMe, 5 OMe	3.82 (6H, s)	56.1
4 OCO		168.5
4 OCO $Me$	2.30 (3H, s)	20.3
$\gamma$ OCO		170.2
$\gamma$ OCO $Me$	1.78 (3H, s)	20.3
1'		53.5
2'	5.90 (1H, d, $J$ 2)	111.5
3'		152.5
4'		176.3
5'		152.7
6'	5.62 (1H, d, $J$ 2)	115.2
$\alpha'$	4.41 (1H, q, $J$ 6)	83.1
$\beta'$	1.06 (3H, d, $J$ 6)	14.8
3' OMe, 5' OMe	3.75 (3H, s), 3.67 (3H, s)	55.3, 55.4

##### (2) アビセニアリグニンの HSQC および HSQC-TOCSY スペクトル

シリングル型のモデル化合物 1Ac の化学シフト値が、グアイアシル型化合物のそれとは大きく異なる可能性を考慮し、シリングル/グアイアシル比の極めて高いアビセニア樹種を試料として選定した。

過去のスピロジエノン構造に関する報告と、以下に示す HSQC-TOCSY 測定結果から、アビセニア MWL のアセチル化物の HSQC スペクトル上の 4.94/82.1, 2.91/56.8 および 3.95&4.05/61.2 ppm ( $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ) の 3 つのシグナル (図 3a) を、それぞれスピロジエノン構造の H  $\alpha$ /C  $\alpha$  ( $S\alpha$ )、H  $\beta$ /C  $\beta$  ( $S\beta$ )、および H  $\gamma$ /C  $\gamma$  ( $S\gamma$ ) に仮帰属した。

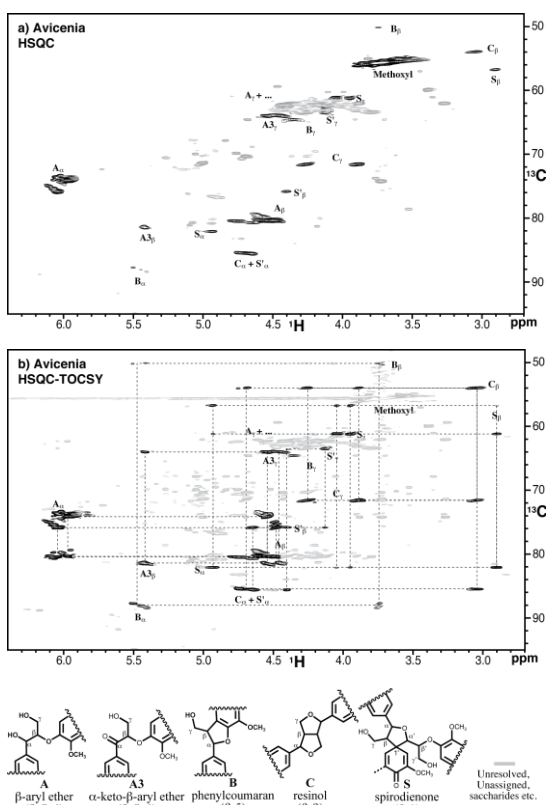


図 3. アビセニアリグニンの NMR スペクトル (アセチル化物、 $\text{CDCl}_3$ )。a) HSQC および b) HSQC-TOCSY スペクトル

HSQC-TOCSY スペクトル (図 3b) 上には、56.8 ppm の  $\beta$  位炭素の位置に、同炭素に直接結合した  $\beta$  位水素 (2.91 ppm) との相関シグナルが観測された他、隣接した  $\gamma$  位水素 (3.95 および 4.05 ppm)、および  $\alpha$  位水素 (4.94 ppm) との相関シグナルが現れたことから、上記の HSQC スペクトル上の 3 つのシグナルの関連が相関シグナルとして示された。また、61.2 ppm の  $\gamma$  位炭素と 82.1 ppm の  $\alpha$  位炭素についても、同 HSQC-TOCSY スペクトル上に、これらの隣接炭素に結合した水素との間に相関シグナルが観測された。

同様にしてもう一方の側鎖に関しても、HSQC-TOCSY 測定の結果から、HSQC スペクトル上の 4.69/85.5, 4.41/75.8 および 4.13/63.5 ppm のシグナルをそれぞれ  $S\alpha'$ 、 $S\beta'$ 、および  $S\gamma'$  に仮帰属した。

(3) モデル化合物 **1Ac** とアビセニアリグニンの NMR 化学シフト値の比較  
前項 (2) において、リグニンの HSQC スペクトル上に仮帰属した、スピロジエノン構造の片方の側鎖に位置する  $S\alpha$ 、 $S\beta$ 、および  $S\gamma$  の 3 つのシグナルの化学シフト値 ( $\delta$  lignin) を、モデル化合物 **1Ac** の化学シフト値 ( $\delta$  model) と比較した (図 3a および表 1)。

モデル化合物 **1Ac** の  $\alpha$  位の化学シフト値と、リグニンの HSQC スペクトル上の  $S\alpha$  の化学シフト値との差 ( $\Delta\delta = \delta$  model -  $\delta$  lignin) は、 $\Delta\delta^1\text{H}$  が 0.02 ppm、 $\Delta\delta^{13}\text{C}$  が 0.0 ppm と、極めて小さく、よく一致した。同側鎖の  $\beta$  位の化学シフト値についても、モデル化合物の値とリグニンの  $S\beta$  の値は良く一致した ( $\Delta\delta^1\text{H}$ : 0.01、 $\Delta\delta^{13}\text{C}$ : 0.3 ppm)。

これらモデル化合物 **1Ac** の  $\alpha$  位および  $\beta$  位の化学シフト値は、既報の  $\gamma$ -エステル型のスピロジエノン構造の化学シフト値 ( $\alpha$  位: 5.65/79.7 および  $\beta$  位: 3.38/63.1 ppm) と比較すると大きく異なっており、 $\gamma$  位置換基の違いが隣接した  $\beta$  位および  $\alpha$  位の化学シフト値に強く影響することがわかる ( $\Delta\delta^1\text{H}$   $\alpha$ : 0.69、 $\Delta\delta^{13}\text{C}$   $\alpha$ : 2.4、 $\Delta\delta^1\text{H}$   $\beta$ : 0.46、 $\Delta\delta^{13}\text{C}$   $\beta$ : 6.0 ppm)。

次に、モデル化合物 **1Ac** の  $\gamma$  位の化学シフト値 (非等価な二つのジェミナルプロトンを含む) を  $S\gamma$  の化学シフト値と比較したところ、 $\Delta\delta^1\text{H}$  が 0.02 および 0.03 ppm、 $\Delta\delta^{13}\text{C}$  が 0.7 ppm と、 $\delta^{13}\text{C}$  に若干の差が認められるものの、両者はかなり良く一致していた。以上の結果から、モデル化合物の NMR データを基に、リグニンの HSQC スペクトル上の上記 3 つのシグナルをスピロジエノン構造の  $S\alpha$ 、 $S\beta$  および  $S\gamma$  に帰属した。これによって、これまでに報告されてきた帰属の信頼性が高まったと考えられる。

これに対して、モデル化合物 **1Ac** のもう一方の側鎖に関しては、 $\alpha'$  位の化学シフト値は、明らかに  $S\alpha'$  の化学シフト値と異なっていた。その差は  $\Delta\delta^1\text{H}$  が -0.28 ppm、 $\Delta\delta^{13}\text{C}$  が -2.4 ppm と、大きな値を示した。この理由として、今回調製した比較的単純なスピロジエノン型モデル化合物 **1Ac** は、隣接する  $\beta'$  位がメチル基であり、この側鎖構造がリグニンに想定されるスピロジエノン構造を反映していないことが大きな原因の一つとして考えられる。今後、さらに適切なスピロジエノン型モデル化合物の NMR データを取得し、化学シフト値に対する隣接する官能基の影響を調べる必要がある。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 2 件)

- ① 秋山拓也、菊地淳、横山朝哉、松本雄二、 $\beta$ -1 型スピロジエノン型構造に関する研究: シリンギル型同モデル化合物と広葉樹リグニンの NMR 化学シフト値の比較、第 56 回リグニン討論会、2011 年 9 月 15 日、山形大学農学部
- ② Takuya Akiyama, Jun Kikuchi, Tomoya Yokoyama, and Yuji Matsumoto, A spirodienone compound with a  $\beta$ -1 linkage formed by oxidative cross coupling of sinapyl alcohol  $\gamma$ -acetate with a syringyl lignin model compound., 16th International Symposium on Wood, Fibre and Pulp Chemistry (ISWFPC), 2011 年 6 月 9 日、中国 (天津)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

秋山 拓也 (AKIYAMA TAKUYA)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号: 50553723