

令和 4 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05757

研究課題名(和文) ニトロベンゼン酸化法の改良によるリグニンの単位間構造解析の拡張

研究課題名(英文) Extended analysis of interunitary linkages of lignin by improved nitrobenzene oxidation

研究代表者

幸田 圭一 (Koda, Keiichi)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：80322840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：木材細胞壁の主要構成成分の一つであるリグニンの分子構造解析手法として、古くから行われているアルカリ性ニトロベンゼン酸化法の改良を目的とした研究課題である。反応生成物の安定化による収率や再現性の向上、あるいは従来法では定量できなかった新奇な反応生成物の回収と定量も視野に入れ、種々の条件で検討を行った。具体的には、生成するフェノール類のヒドロキシ基保護を目的としたホウ酸類の添加や、反応促進を目指した酸化剤や相間移動触媒の助添を行い、その効果について実験的に検証した。その結果、ホウ酸類の添加による保護効果は見出せなかったが、相間移動触媒の助添により、一部の反応生成物について収率向上が見られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木質バイオマスに含まれるリグニンの化学構造分析の手法としては、二次元NMRなどの手法で解析する手法が最近の流行であるが、古典的な湿式化学分解法も、依然、重要な位置を占めている。そうした化学分解法の中で、ニトロベンゼン酸化法はフェノール系のアルデヒドや芳香族酸を比較的高収率で得ることで、試料が由来する高等植物を特徴づける上で、また試料が履歴した化学構造変化を追跡する上で、有用な手法である。本研究では、ニトロベンゼン酸化法が不均一系の反応であることから、反応性の向上などを試みた。一部の条件に限定されるが、反応生成物収率の向上が認められ、適用範囲の拡張に向けた基本知見を見出した。

研究成果の概要(英文)：Alkaline nitrobenzene oxidation (NBO), conventionally used for structural analysis of lignin, one of the major components of wood cell wall, was investigated under various reaction conditions. This research project was aimed at an expanded application of the modified NBO method, by stabilization and/or improved yields of the NBO products. Namely, the effect of addition of some reagents were empirically tested: borate for protection of phenolic hydroxy group of NBO products and tetraalkyl ammonium reagents for promoting intersurface reaction of heterogenous NBO. As a results, no improved yields of NBO products were observed by borate addition, while increased yields of some NBO products were observed by tetraalkyl ammonium reagents under a certain reaction condition.

研究分野：木質科学

キーワード：リグニン ニトロベンゼン酸化 不均一系 4級アンモニウム塩

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

木本植物や草本植物をはじめとする高等植物、あるいは維管束系を発達させた植物に広く含まれるリグニンの化学構造は、天然高分子の中では複雑であり、様々な方法で解析されてきた。近年では、リグニン試料を有機溶媒に可溶化した後、二次元 NMR などの手法を用いて単位間結合様式の存在頻度を解析する手法が流行になっている。他方、古典的な湿式化学分解法によるリグニンの低分子化反応と、その結果得られる反応生成物の解析も、依然として、重要な位置を占めている。そうした従来の湿式化学分解法の中で、アルカリ性ニトロベンゼン酸化法はリグニンから、バニリンに代表される低分子の芳香族(フェノール系)アルデヒド類や芳香族酸類を比較的高収率で得る方法である。この方法は、リグニン試料が由来する高等植物種を特徴づける上で重要な手法であり、また、リグニン試料が単離や化学修飾・改質などで履歴した化学構造変化を追跡する上でも有用な手法である。

一方で、ニトロベンゼン酸化法が水と混和しないニトロベンゼンを酸化剤(電子受容媒体)とする、アルカリ水溶液中での不均一系反応であるため、界面における反応性を改良する余地があること、また、強アルカリ性下、170°C程度の高温度条件での反応であるため、これまでに知られている反応生成物の安定性についても検証する余地があること、さらに、通常の反応条件下では不安定であるため、これまでに検出・定量されてこなかった反応生成物(例:カテコール核を有する芳香族アルデヒドや芳香族酸)が存在する可能性があり、その場合には、反応条件の再検討によってこれらを再現性良く定量できれば、この古典的な分析手法に新たな応用可能性が開けること、といった諸課題が想定された。

2. 研究の目的

木材化学分野において、樹木細胞壁構成成分であるリグニンの非縮合型構造の解析、とりわけフェニルプロパン構造単位(p-ヒドロキシフェニル核、グアイアシル核、シリングル核の比に関する情報)の解析に長く用いられてきたアルカリ性ニトロベンゼン酸化法に焦点を絞り、反応条件を見直し、生成物収量を主な指標として、その改良を試みる。端的には、従来法では、植物試料(固体粉末)と水系溶媒(水酸化ナトリウム水溶液)、非水系有機酸化剤(ニトロベンゼン)からなる不均一系での化学反応であることから、相間移動触媒(4級アンモニウム塩など)の添加による反応性の改善を目的として、反応条件を検討する。次にホウ酸塩等の添加により、これまでに知られてきた反応生成物の安定化による収率の向上を目指すとともに、従来の反応条件下では検出・定量が不可能だったカテコール核を有する芳香族アルデヒドや芳香族酸(例:プロトカテキアルデヒドやプロトカテキ酸)の検出・定量の可能性も、合わせて検討する。さらに、ニトロベンゼンの酸化力を補助する薬剤についても添加条件の検討を試みる。最後に、樹木以外の植物種ないし植物組織に由来する試料に対しても、改良した手法による適用範囲の拡大を目指す。

3. 研究の方法

本研究における、主要な検討課題は下記の5点である。

- (1) 相間移動触媒の添加等による、既知の反応生成物の収率向上
- (2) ホウ酸塩等の添加による、既知の反応生成物の二次的変質防止による安定化
- (3) ホウ酸塩等の添加による、従来未検出だった反応生成物、特にカテコール核を有するリグニン骨格構造単位の検出
- (4) 酸化助剤の添加による、反応生成物収率の向上
- (5) 以上の結果を踏まえた上で、様々な植物種や植物組織を対象とした、ニトロベンゼン酸化の改良法の適用可能性の検討

以下ではそれぞれの課題について、具体的な方法を記す。

- (1) 相間移動触媒の添加等による、既知の反応生成物の収率向上:

ニトロベンゼン酸化法は反応基質と試薬、溶媒とが互いに混和しない不均一系での化学反応である。そのため、相間移動触媒が共存すれば反応界面における反応の促進により、反応生成物収率の改善が期待できる。代表的な相間移動触媒である4級アルキルアンモニウム塩や4級アルキルホスホニウム塩の添加による、ニトロベンゼン酸化生成物の収率向上条件について検討する。加えて、試料(広葉樹脱脂木粉)の粒度や反応時間、温度などの反応条件の影響を検討し、条件的に可能であれば、従来よりも温和な反応条件の確立を目指す。

- (2) ホウ酸塩等の添加による、既知の反応生成物の二次的変質防止による安定化:

ニトロベンゼン酸化が高温度(170°C前後)、強アルカリ性(1~2 M NaOH水溶液)下にお

ける反応であることから、反応生成物であるフェノール類が二次的な反応を履歴し、結果として生成物の収率低下が起きる可能性を否定できない。そこで、既に知られている反応生成物(バニリンやバニリン酸など6種)の標品を用いてニトロベンゼン酸化の定法に供し、定量的に回収できるか検証し、この点をまず簡便に確認する。定量的に回収できなかった場合には、次に、有機合成において水酸基や水酸基に隣接するカルボニル基などの簡便な保護に使用されるホウ酸塩等の添加が生成物収率に与える影響について検討する。

- (3) ホウ酸塩等の添加による、従来未検出だった反応生成物、特にカテコール核を有するリグニン骨格構造単位の検出：
リグニンを構成するフェニルプロパン骨格として p-ヒドロキシフェニル核、グアイアシル核、ならびにシリングル核が従来から知られているが、近年ではその範疇に入らない骨格構造も報告されている。例えば、いくつかの高等植物の種子(種皮)に含まれる、カテコール骨格を有する特殊なリグニンが近年では注目を集めているが、こうしたリグニンをニトロベンゼン酸化に供した場合には、その骨格構造に対応する、新規な芳香族アルデヒドや芳香族酸(プロトカテキュアルデヒドならびにプロトカテキュ酸)の生成が想定できる。しかしながら、これらの構造はニトロベンゼン酸化のような高温、強アルカリ条件では不安定とされているため、通常は検出されない。ホウ酸塩等の添加によりカテコール核は特に安定化が期待されるため、その添加条件を検討し、こうした新規反応生成物の検出、ひいては定量を試みる。
- (4) 酸化助剤の添加による、反応生成物収率の向上：
ニトロベンゼンは比較的穏やかな酸化剤として知られるが、リグニンの単位間エーテル結合やベンジル位を選択的に切断する補助的な薬剤を添加することで、ニトロベンゼンによる酸化反応を促進する可能性が期待できる。パルプ化工程において脱リグニン助剤としても知られるアントラキノンやリグニンのベンジル位を酸化的に切断する DDQ (2,3-ジクロロ-5,6-ジシアノ-1,4-ベンゾキノン)などを検討対象とする。
- (5) 様々な植物種や植物組織を対象とした、ニトロベンゼン酸化の改良法の適用可能性の検討：
前項までに検討した結果を踏まえ、従来よりも高収率で反応生成物を再現性良く与える条件を取りまとめてニトロベンゼン酸化の改良法を提案した後、その改良法の適用範囲の拡大についてさらに検討を進める。従来のニトロベンゼン酸化法では樹木の木部のみを分析対象としてきたが、対象とする植物の種や組織が異なれば、リグニンの特殊な部分構造から、これまでに想定されないニトロベンゼン酸化生成物が生じる可能性もある。改良法が提案できた場合には、高等植物に限定せず、幅広い維管束植物を分析対象とするとともに、リグニンを有しないと報告されている非維管束植物にまで分析対象を拡張し、従来の結果と比較検討する。

4. 研究成果

本研究課題に関して、実施年度中に得られた結果は下記の通りである。

- (1) 木粉試料に関して、特に粉碎粒子径が大きい場合を除き、粒度がニトロベンゼン酸化生成物収量に与える影響は極めて小さかった。そのため、以下の検討では調製しやすく、扱いやすい 60 mesh 通過画分を試料とした。相間移動触媒に関しては触媒量の添加で、従来定量対象とされてきた一部のニトロベンゼン酸化生成物に関して収量増加を示唆する結果が得られたが、他方で収量の減少した生成物も見られた。相間移動触媒の添加量を化学量論量まで増やすと、反応基質である木粉が油状に変化する現象が明確に見られ、反応の全体的な進行をうかがわせたが、使用した 4 級アルキルアンモニウム塩は両親媒性の物質であることから、その増添により、分液操作の段階で水層と有機層の分離に支障をきたすに至った。この困難は、ヨウ素のヨウ化カリウム溶液を加えることで、4 級アンモニウム塩を水不溶性の塩に導くことである程度克服できたが、全体の濃色化と界面付近に凝集する油状物質の存在により、水層と有機層の界面を見極めることには、なお課題が残った。こうした難点のためか、この条件下での定量結果(生成物収率)に関しては、再現性に問題が残った。
- (2) ニトロベンゼン酸化の定法で得られる芳香族アルデヒドや芳香族酸に関して、標品により安定性を検証したところ、反応中の変質による回収量の減少は特に観察されなかった。
- (3) ホウ酸類の添加によるフェノール基の保護効果についても検討を行ったが、カテコール核を有するプロトカテキュ酸に関し、標品を定量的に回収する条件を見出すには至らなかった。
- (4) 酸化助剤の添加効果についても検討した。DDQ に関しては、相間移動触媒を添加した場合と同様に、木粉試料の油状化現象がみられるとともに、分液操作で水層と有機層との分離に困難が生じ、非常に時間がかかる結果となった。アントラキノンの添加によっても、こうした現象が部分的にみられたが、分液操作には支障がなかった。過酸化水素の添加も試みたが、特に効果は認められなかった。
- (5) 従来使用されてきたニトロベンゼン酸化法よりも高収率で再現性良く反応生成物を与える

条件を確立できなかったため、研究課題の実施年度中に改良法の提案までには至らなかった。従って、幅広い植物種や植物部位に改良法を拡張するという最大の目標にまでは到達できなかった。

新型コロナ禍対応にも追われ、本研究課題に投入可能な時間・労力が不足する中で、最後の目標まで到達できなかったが、一部で見出された反応生成物の収量増加に関して再現性良く定量する条件を見出すなど、今後も改良法の提案に向けて、検討を続ける予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 富山脩太郎、幸田圭一、玉井 裕
2. 発表標題 白色腐朽材を対象としたリグニンの定量
3. 学会等名 第65回リグニン討論会（第2回リグニン学会年次大会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shutaro Tomiyama, Keiichi Koda, Toshizumi Miyamoto, Yasumitsu Uraki
2. 発表標題 A quantitative study on lignin in tree leaves, using methoxy content and yields of nitrobenzene oxidation products
3. 学会等名 The 1st International Lignin Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------