

平成 21 年 4 月 1 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580190

研究課題名 (和文) 有機塩素系農薬の植物への取り込みとその消長

研究課題名 (英文) INCORPORATION OF CHLORINATED pesticide INTO PLANTS AND THEIR FATE

研究代表者

黒田 健一 (KURODA KEN-ICHI)

九州大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：80015908

研究成果の概要：4-クロロアニリン (4CA) を用いて有機塩素系農薬が植物中のリグニンのどの部位と反応するかを知るために、4CAと *p*-ヒドロキシけい皮アルコール (コニフェリルアルコール, シナピルアルコール, コニフェリルアルコール+シナピルアルコール) を酵素存在下で脱水素重合させ、3種類の重合体 (Cl-DHP) を得た。これらのDHPを核磁気共鳴スペクトロメトリー分析およびテトラメチルアンモニウムヒドロキシドの存在下での熱分解を行い、結果を対応するコントロールのDHPと比較した。 β -O-4型構造単位のフェニルグリセロール部分の α -一位に4CAが、およびC β 位のアルコール性水酸基を通じて β -O-4結合により他の構成単位と結合した β -5単位 (タイプA) の α -一位に4CAが取り込まれている可能性を提唱した。TMAH熱分解によりDHP中のタイプAとBの β -5型構造単位の存在比がほぼ1:1であることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,700,000	810,000	3,510,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・林産科学・木質工学

キーワード：リグニン, 4-クロロアニリン(4CA), β -O-4型構造単位, β -5型構造単位, テトラメチルアンモニウムヒドロキシド (TMAH), 熱分解-メチル化, GC/MS, 脱水素重合体 (DHP)

1. 研究開始当初の背景

(1) 産業の発展に伴う化学物質の利用による土壌汚染および植物汚染は世界的に深刻な問題となっている。特に、従来の経済効率追求型社会システムにおいて収量向上およ

び利便性追及のために過度に用いられてきた有機塩素系農薬が土壌汚染や水質の悪化と生物の多様性の低下を進行させていた。

(2) 化学物質のうち有機塩素系農薬による

土壤汚染が環境問題の一つとして取り上げられていた。これまでに、有機塩素化合物の土壤への取り込みには生分解中のリグニンおよびリグニンを前駆体とする腐植物質の関与が明らかにされていた。また、 β -エーテル型リグニンモデル化合物は 3,4-ジクロロアニリンと共有結合を持つことが報告されてきた。しかし、高分子のリグニンにおける他の構造単位との反応性や、有機塩素化合物が取り込まれる量については依然として不明である。

2. 研究の目的

(1) 土壤中に過剰に残留する有機塩素系農薬およびその代謝物を吸収・輸送・蓄積した樹木および作物などの植物の組成成分に注目して、そのキャラクタリゼーションを行い、植物中の有機塩素系農薬の消長をあきらかにしようとした。植物成分のうち、リグニンに焦点をあて、リグニンと有機塩素化合物として 4-クロロアニリン (4 CA) との反応生成物を明らかにし、4 CA がリグニンのどの部位に取り込まれるかを解明する。

(2) リグニン分析法としてテトラメチルアンモニウムヒドロキシド (TMAH) を用いる熱分解-メチル化法を深化させる。

3. 研究の方法

(1) リグニン様脱水素重合体 (DHP) および 4CA を用いて有機塩素化合物取り込みにおけるリグニンの関与を検討した。グアイアシル型、シリギル型、グアイアシル/シリギル型 DHP (G-DHP, S-DHP, GS-DHP), また、それぞれ 4 CA を含む DHP (G-C ℓ -DHP, S-C ℓ -DHP, GS-C ℓ -DHP) を混合法により調製した。G-C ℓ -DHP はコニフェリルアルコール : 4 CA = 1.56 : 1, S-C ℓ -DHP はシナピルアルコール : 4 CA = 1.32 : 1, GS-C ℓ -DHP はコニフェリルアルコール : シナピルアルコール : 4 CA = 0.8 : 0.8 : 1 のモル比の混合物から調製した。

(2) 上記の各 DHP をアセチル化後、 ^{13}C -核磁気共鳴スペクトロメトリー (NMR) により DHP 中の各構成単位を定量した。また、二次元 NMR も測定し、各構造を推定した。

(3) 上記の各 DHP 50 μg に 2.0 μl の 25% TMAH-メタノール溶液を加え、混合物をヘリウム雰囲気下で熱分解-メチル化 (315 度で 4 秒間) し、揮発性分解生成物をガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS) で分析した。GC/MS 運転条件は研究代表者が従来行ってきた条件に準じた。生成物の同定は、既報のデータあるいは MS データの解釈により行った。

(4) β -5 型構造単位を模した種々の 2-ア

リルクマラン化合物を合成し、DHP の熱分解-メチル化と同様の条件で TMAH とともに 315 度で 4 秒間熱分解し、分解生成物を GC/MS で分析した。

4. 研究成果

(1) DHP の収率

表 1 に得られた DHP の収率を示す。4 CA と p-ヒドロキシけい皮アルコールから得られたすべての重合体 (C ℓ -DHP) の収率はコントロールの DHP と比して著しく減少した。

4 CA との反応により分子の成長が抑えられたと思われる。ゲル浸透クロマトグラフィーは G-DHP および G-C ℓ -DHP の重量平均分子量が 993 および 925 と G-C ℓ -DHP の分子量が減少し、上記の推論を裏づけた。また、G-C ℓ -DHP の元素分析 (N 1.47%; C ℓ 3.44%) によりリグニン : 4 CA = 5 : 1 であり取り込み量は予想より少なかった。

表 1 DHP の収率 (%)

G-DHP	G-C ℓ -DHP	S-DHP	S-C ℓ -DHP	GS-DHP	GC-C ℓ -DHP
74.0	6.0	31.5	0.88	57.2	0.76

(2) β -0-4 型構造単位との反応

4 CA との反応で得られた重合体 (C ℓ -DHP) はいずれも 4 CA が付加した二量体を熱分解-メチル化生成物として与えた。針葉樹型リグニン G-C ℓ -DHP は [1-(3,4-dimethoxyphenyl)-2,3-dimethoxypropyl](4-chlorophenyl)amine (1) を、シリギル型リグニン S-C ℓ -DHP は [1-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2,3-dimethoxypropyl](4-chlorophenyl)amine (2) を与えた。また、広葉樹型リグニン GS-C ℓ -DHP からは 1 + 2 が得られた。これらは β -0-4 型構造単位中のアリルグリセロール部の α -位に 4 CA が付いた化合物であり、4 CA がリグニンの β -0-4 型構造単位に 4 CA が取り込まれたことを直接的に示すものである。このような構造単位が C ℓ -DHP 中に存在することは ^{13}C NMR によりあらたに β -0-4 型構造単位の C α 位にベンジ

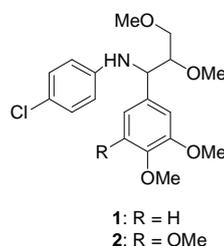


図 1. 4 CA を取り込んだ β -0-4 型構造単位からの熱分解-メチル化生成物 1, 2

ルアミン基を持つ C β に帰属されるシグナル

が生じていたことから明らかとなった。したがって、針葉樹リグニンおよび広葉樹リグニンの β -O-4 型構造単位のいずれもが 4 CA を取り込むことが明らかとなった (図 2)。また、 ^1H - ^{13}C 二次元 NMR も β -O-4 および β -O-4/ α -O-4 結合によるシグナルがまったく見られなかったことから、これらの結合部位はすべて 4 CA と反応しているとおもわれた。

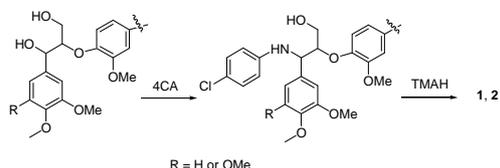


図 2 熱分解-メチル化生成物 1, 2 の起源

(3) β -5 型構造単位の 4 CA 取り込み

G-C0-DHP 中の塩素量は、1 および 2 に含有される塩素量では説明できなかつた。そこで、 β -O-4 型構造単位と同様に多量に G-DHP に存在する β -5 型構造単位 (A, B) のうち、 $-\text{G-p}(\beta\text{-O-4})\text{G-p}(\beta\text{-5})\text{G-p}(\beta\text{-O-4})\text{G}$ —あるいは $\text{G-p}(\beta\text{-5})\text{G-p}(\beta\text{-O-4})\text{G}$ —であらわされる A 型の β -5 型構造単位 (図 3) が 4 CA を取り込んでいると予想した。

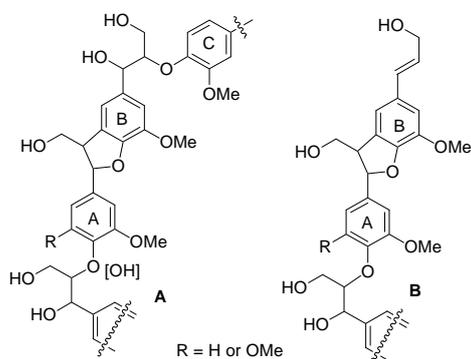


図 3. β -5 型構造単位 A, B

しかし、A-4CA 付加体の熱分解-メチル化生成物 3, 4 (図 4) は三量体のため我々の GC/MS 分析条件では検出できなかった。そこで、G-DHP および G-C0-DHP の TMAH-GC/MS を再検討したところ、G-DHP 中の A 型の β -5 型構造単位の主要生成物であったスチルベン 7, 8 (図 6) は G-C0-DHP ではまったくみられなかつた (スチルベンについては下記参照)。このことは、全 β -5 型構造単位のうち約半分を占める A 型の β -5 型構造単位の大部分が 4 CA と反応したことを示すものである。したがって、4 CA の取り込み部位として、G-DHP 中の β -5 型構造単

位 A を提唱した。他の DHP も同様と思われる。

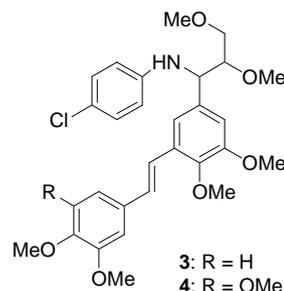


図 4 β -5 型構造単位 A からの熱分解-メチル化生成物 4

(3) β -5 型構造単位の熱分解-メチル化生成物

タイプ A の β -5 型構造単位が G-DHP 中どの程度存在することを明らかにするために β -5 型構造単位の熱分解-メチル化生成物を精査した。フェノール性 β -5 型構造単位は図 5 に示すように 2,3,3',4'-テトラメトキシスチルベン 5 および α -メトキシジフェニルエタン 6 の 2 つの生成物を与えることが明らかになった (図 5 はデヒドロジソオイゲノールの熱分解-メチル化生成物を示している)。

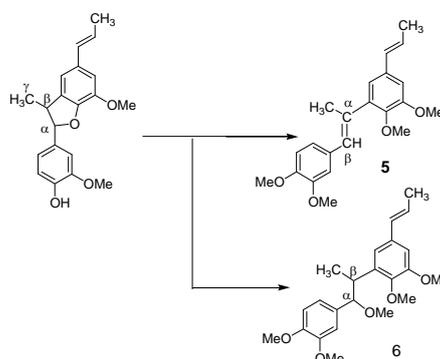


図 5 デヒドロジソオイゲノールの熱分解-メチル化生成物

しかし、実際のリグニン中には γ - CH_3 基は存在せず、 γ - CH_2OH は脱離するので、専らスチルベン型の生成物が得られた。逆アルドール反応なども伴い、A 型の β -5 型構造単位は TMAH/熱分解により B 環の側鎖がアルデヒド基およびアシル基を持つスチルベン (それぞれ 7, 8) を与えた (図 6)。特に 7 が主生成物であった。

(5) G-DHP 中の β -5 型構造単位 A と B の存在比
タイプ B の β -5 型構造単位は 9 を熱分解-メチル化生成物として与える。G-DHP は 7 +

8と9を等量ずつ生成した。このことより、G-DHP中にはA型のβ-5型構造単位とB型のβ-5型構造単位は約1:1存在すると推定した。¹³C-NMR解析からβ-5型構造単位量は約34%なので、タイプAのβ-5型構造単位はG-DHP中に約17%存在すると推定した。

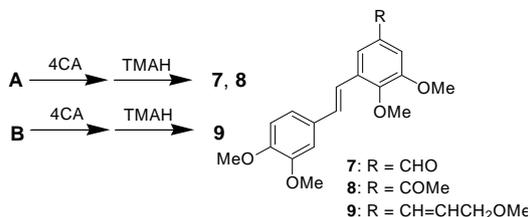


図6 β-5型構造単位A, Bからの熱分解—メチル化生成物

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

- ① K. Kuroda, A. Nakagawa-izumi, T. Ashitani, K. Fujita, Tetramethylammonium Hydroxide (TMAH) Thermochemolysis of β-5-type Lignin Model Compounds. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, in press. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① M. Hasumi, A. Nakagawa-izumi, B. Tomita, K. Kuroda (2005) Structural elucidation of chloroaniline-lignin matrix by pyrolysis-gas chromatography, Proceedings of 13th International Symposium on Wood, Fibre and Pulping Chemistry. III pp 139-142, May 16-19, 2005, Auckland, New Zealand.
- ② 黒田健一, 岸本崇生, 中川明子, 芦谷竜矢, 藤田弘毅: リグニンの熱分解: β-0-4構造単位由来の生成物, 第51回リグニン討論会講演要旨集 pp 140-143 (2006.10) 北海道大学.
- ③ 黒田健一, 中川明子, 芦谷竜矢, 藤田弘毅: β-5型リグニンモデル化合物の熱分解—メチル化, 第52回リグニン討論会 pp184-187, 宇都宮 (2007.11).
- ④ 中川明子, TR Filley, 黒田健一: ¹³C 標識テトラメチルアンモニウムヒドロキシドを用いた熱分解—メチル化法によるリグニン中のβ-0-4型構造およびシンナミ

ルアルコール末端基の検討, 第53回リグニン討論会 pp 70-73, 東京大学 (2008.10)

- ⑤ 黒田健一: 熱分解ガスクロマトグラフィーによるリグニンの分析, 第52回リグニン討論会, 宇都宮大学, pp 138-141 (2007.11).

[図書] (計1件)

- ① K. Kuroda, A. Nakagawa-izumi (2006) Application of Tetramethylammonium Hydroxide (TMAH) Thermochemolysis for Elucidation of Lignin Structure. In: *Floriculture, Ornament and Plant Biotechnology: Advances and Topical Issues (1st Edition)* Teixeira da Silva JA (ed), Global Science Books, London, UK, IV Chapter 7, pp 64-83.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田 健一 (KURODA KEN-ICHI)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 80015908