



# HOKKAIDO UNIVERSITY

|                     |                                                                                                 |
|---------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title               | リグニン分析法の再検証：蛍光測定法とderivatization followed by reductive cleavage (DFRC) 法                        |
| Author(s)           | 竹内, 啓一郎                                                                                         |
| Degree Grantor      | 北海道大学                                                                                           |
| Degree Name         | 博士(農学)                                                                                          |
| Dissertation Number | 甲第16777号                                                                                        |
| Issue Date          | 2026-03-25                                                                                      |
| DOI                 | <a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k16777">https://doi.org/10.14943/doctoral.k16777</a> |
| Doc URL             | <a href="https://hdl.handle.net/2115/99622">https://hdl.handle.net/2115/99622</a>               |
| Type                | doctoral thesis                                                                                 |
| File Information    | TAKEUCHI_Keiichiro.pdf, 全文                                                                      |



# リグニン分析法の再検証

-蛍光測定法と

**derivatization followed by reductive cleavage**

**(DFRC) 法-**

北海道大学大学院農学院

農学専攻環境フロンティアコース 博士後期課程

竹 内 啓 一 郎

## 目次

|                                                                |    |
|----------------------------------------------------------------|----|
| 第 1 章 研究の背景と目的.....                                            | 1  |
| 1.1 博士課程当初の研究課題設定に至る背景.....                                    | 2  |
| 1.1.1 セルロース                                                    |    |
| 1.1.2 ヘミセルロース                                                  |    |
| 1.1.3 リグニン                                                     |    |
| 1.2 博士課程当初の課題設定.....                                           | 10 |
| 1.2.1 単離リグニン                                                   |    |
| 1.2.1.1 磨砕リグニン (MWL)                                           |    |
| 1.2.1.2 クラフトリグニン (KL)                                          |    |
| 1.2.2 蛍光および Förster resonance energy transfer (FRET) の説明       |    |
| 1.3 博士課程研究の目的と検討項目.....                                        | 17 |
| 1.3.1 紫外光照射による単離リグニンの蛍光スペクトル、および化学構造に及ぼす影響                     |    |
| 1.3.2 リグニン化学分解法の再検証                                            |    |
| 1.3.2.1 チオアシドリシス法                                              |    |
| 1.3.2.2 Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC) 法 |    |
| 1.3.3 DFRC 法の再検証                                               |    |
| 1.4 本論文の構成.....                                                | 21 |

|                                         |    |
|-----------------------------------------|----|
| 第 2 章 リグニン蛍光測定法の再検証.....                | 22 |
| 2.1 緒言.....                             | 23 |
| 2.2 実験方法.....                           | 24 |
| 2.2.1 試料・試薬                             |    |
| 2.2.1.1 MWL の調製                         |    |
| 2.2.1.2 SKL の調製                         |    |
| 2.2.2 蛍光測定                              |    |
| 2.2.2.1 リグニン溶液の調製                       |    |
| 2.2.2.2 リグニン溶液の指紋蛍光測定                   |    |
| 2.2.2.3 リグニン溶液の蛍光測定                     |    |
| 2.2.2.4 リグニン溶液の UV 吸収分光法                |    |
| 2.2.2.5 UV 照射したリグニン溶液中のリグニン構造解析         |    |
| 2.2.2.5.1 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析       |    |
| 2.2.2.5.2 赤外分光 (FT-IR) 分析               |    |
| 2.3 結果と考察.....                          | 30 |
| 2.3.1 リグニン溶液の指紋蛍光                       |    |
| 2.3.2 280 nm の励起光を照射した MWL 溶液の蛍光スペクトル変化 |    |
| 2.3.3 280 nm の励起光を照射した MWL 溶液の吸光スペクトル   |    |
| 2.3.4 励起光を照射した溶液中の MWL の構造変化            |    |
| 2.3.5 280 nm の励起光を照射した SKL 溶液の蛍光スペクトル変化 |    |
| 2.3.6 280 nm の励起光を照射した SKL 溶液の吸光スペクトル   |    |
| 2.3.7 励起光を照射した溶液中の SKL の構造変化            |    |
| 2.4 第二章のまとめ.....                        | 63 |

|                                            |    |
|--------------------------------------------|----|
| 第3章 DFRC 法の再検証.....                        | 64 |
| 3.1 緒言.....                                | 65 |
| 3.2 実験方法.....                              | 66 |
| 3.2.1 試薬                                   |    |
| 3.2.2 $\beta$ -O-4'型の二量体モデルと高分子モデルの調製      |    |
| 3.2.3 <b>Compound D2</b> の分画および分画物の構造決定    |    |
| 3.2.4 DFRC 分析法                             |    |
| 3.3 結果と考察.....                             | 72 |
| 3.3.1 $\beta$ -O-4'型の二量体モデルの構造解析           |    |
| 3.3.2 $\beta$ -O-4'型モデルポリマーの構造解析           |    |
| 3.3.3 $\beta$ -O-4'型の二量体モデルに対する DFRC の分解効率 |    |
| 3.3.4 モデルポリマーの分解効率                         |    |
| 3.4 第三章のまとめ.....                           | 79 |
| 第4章 総括.....                                | 80 |
| 謝辞.....                                    | 85 |
| 参考文献.....                                  | 86 |

# 第 1 章

## 研究の背景と目的

## 第1章 研究の背景と目的

私は、細胞壁形成、特に、「木化」と呼ばれるリグニン形成に興味を持ち、本学院に入学した。当初の研究課題は、「リグニンの成長反応の解明」であった。しかし、この準備段階において、最終段階に用いるリグニン分析法に疑義を見出し、本論文の題目である「リグニンの分析法の再検証」という課題に変更するに至った。第一章では、この課題の変遷に関する経緯を説明するとともに、本文の目的について記す。

### 1.1 博士課程当初の研究課題設定に至る背景

リグニンが、セルロースとヘミセルロースと共に植物細胞壁を構成することはよく知られている。この証明は、1838年に公表された Anselme Payen の研究で最初になされた (Payen 1838)。彼は、木粉を濃硝酸で処理し、可溶成分と不溶成分があることを見出し、その不溶成分を”セルロース”と名付けた。可溶成分は、”リグニン”という名が付された。この名は、1819年に、de Candolle が木材を意味する「lignum」から派生した単語の呼称に因んでいる (Sjöström 1993)。現在では、その他にヘミセルロースも細胞壁成分として確認され、針葉樹の細胞壁は、セルロースが 45%、ヘミセルロースが 15~20%、リグニンが 25~30%、広葉樹の細胞壁では、セルロースは針葉樹と同量であるが、ヘミセルロースが 20~25%、リグニンが 20~25%と、ヘミセルロースがリグニンより多い (一般社団法人 日本木材学会 2023)。さらに、抽出成分が 5%以下含まれる。したがって、リグニンの形成過程を研究するには、セルロースなどの他の細胞壁成分についての知見も重要であるので、以下に細胞壁成分についてのこれまでの知見を概説する。

#### 1.1.1 セルロース

1900~1920年、セルロースは高分子でなく、グルコースとセロビオースの会合体であるという副原子価説が主流であった (Hon 1994)。しかし、Hermann Staudinger が提唱している

高分子説が 1929 年に認められ、セルロースも D-グルコースが $\beta$ -1,4 グリコシド結合した直鎖状高分子との認識が確定した (Staudinger 1920; Haworth 1928) (図 1.1.1)。セルロースは 2 回回転軸を持つ結晶構造のため、セルロースの基本単位はグルコース残基でなく、セロビオース単位を基本繰り返し単位とするのが正しい。セルラーゼなどの酵素もセロビオースを

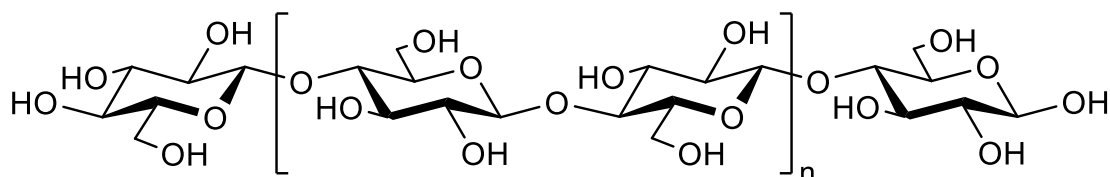


図 1.1.1 セルロースの化学構造。

基本単位として認識している。セルロースの結晶構造にはI~IV型が知られており、I型はさらにI $\alpha$ とI $\beta$ の allomorph に分類できる。I型の結晶構造では、分子内水素結合に加え、分子間水素結合により、分子鎖同士が結合し結晶平面を形成する。結晶平面同士は van der Waals 力で結びつき、強固な結晶構造となっている (セルロース学会 2008)。セルロースはその他に非晶領域を持ち、これらの比率から結晶化度が論じられる。

二次細胞壁における、細胞膜へのセルロースの堆積は、セルロース合成酵素群であるターミナルコンプレックスで作られたミクロフィブリルが、ヘミセルロース中に吐出されることで、生じるといわれている (Terashima *et al.* 1993; 福島ら 2024)。その結果、細胞壁形成の第一段階は、セルロースとヘミセルロースから成る多糖類マトリックスの形成といえる。

### 1.1.2 ヘミセルロース

1891 年に Ernst Schulze が、「水では溶出しないが希アルカリ水溶液で溶出し、温希酸で容易に加水分解する植物多糖類」に対して、ヘミセルロースと命名した (Schulze 1891)。現在では、ヘミセルロースは、主骨格に糖残基が分枝した構造や糖水酸基の一部が置換された構造を持つ、種々の単糖類から構成されるヘテロ多糖であることが知られている。樹種によって含まれるヘミセルロースの種類と量が異なる。(表 1.1) 一般的に、広葉樹では、グルク



ロノキシランが主要なヘミセルロースで 15~30%を占め、その他に、グルコマンナンを 2~5% 含む。針葉樹では、ガラクトグルコマンナンが主要なヘミセルロースで、ガラクトース含量が多いものは 5~8%、ガラクトース含有量が少なく単にグルコマンナンと呼ばれるものが 10~15%である。その他、アラビノグルクロノキシランが 7~10%存在する (Sjöström 1993)。針葉樹の中でもカラマツは特異的で、アラビノガラクトタンが主要なヘミセルロースであり、5~35%含まれる。しかし、アラビノガラクトタンは水への溶解度が高いために、ヘミセルロースには分類されないとの意見を持つ研究者もいる。

「ヘミセルロースの堆積はリグニン沈着の前に開始されると考えられており、リグニン合成の前駆物質であるモノリグノール (monolignol) が重合するための環境を提供していると考えられている。」(福島ら 2024)

表 1.1. 樹種ごとのヘミセルロース一覧、wood chemistry 64 頁から抜粋 (Sjöstrom 1993)

| Hemicellulose type    | Occurrence | Amount<br>(% of wood) | Composition                                                                |                           |                                                                                   | Solubility <sup>a</sup>                  | $\overline{DP}_n$ |
|-----------------------|------------|-----------------------|----------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|-------------------|
|                       |            |                       | Units                                                                      | Molar ratios              | Linkage                                                                           |                                          |                   |
| Galactoglucomannan    | Softwood   | 5-8                   | $\beta$ -D-Manp<br>$\beta$ -D-Glcp<br>$\alpha$ -D-Galp<br>Acetyl           | 3<br>1<br>1<br>1          | 1 $\rightarrow$ 4<br>1 $\rightarrow$ 4<br>1 $\rightarrow$ 6                       | Alkali, water*                           | 100               |
| (Galacto)glucomannan  | Softwood   | 10-15                 | $\beta$ -D-Manp<br>$\beta$ -D-Glcp<br>$\alpha$ -D-Galp<br>Acetyl           | 4<br>1<br>0.1<br>1        | 1 $\rightarrow$ 4<br>1 $\rightarrow$ 4<br>1 $\rightarrow$ 6                       | Alkaline borate                          | 100               |
| Arabinoglucuronoxylan | Softwood   | 7-10                  | $\beta$ -D-Xylp<br>4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA<br>$\alpha$ -L-Araf           | 10<br>2<br>1.3            | 1 $\rightarrow$ 4<br>1 $\rightarrow$ 2<br>1 $\rightarrow$ 3                       | Alkali,<br>dimethylsulfoxide*,<br>water* | 100               |
| Arabinogalactan       | Larch wood | 5-35                  | $\beta$ -D-Galp<br>$\alpha$ -L-Araf<br>$\beta$ -L-Arap<br>$\beta$ -D-GlcpA | 6<br>2/3<br>1/3<br>Little | 1 $\rightarrow$ 3,<br>1 $\rightarrow$ 6<br>1 $\rightarrow$ 3<br>1 $\rightarrow$ 6 | Water                                    | 200               |
| Glucuronoxylan        | Hardwood   | 15-30                 | $\beta$ -D-Xylp<br>4-O-Me- $\alpha$ -D-GlcpA<br>Acetyl                     | 10<br>1<br>7              | 1 $\rightarrow$ 4<br>1 $\rightarrow$ 2                                            | Alkali,<br>dimethylsulfoxide*            | 200               |
| Glucomannan           | Hardwood   | 2-5                   | $\beta$ -D-Manp<br>$\beta$ -D-Glcp                                         | 1-2<br>1                  | 1 $\rightarrow$ 4<br>1 $\rightarrow$ 4                                            | Alkaline borate                          | 200               |

<sup>a</sup> The asterisk represents a partial solubility.

### 1.1.3 リグニン

リグニンは、前述したように、A. Payen によるセルロースを包被する物質 (la matière incrustante) として発見 (Payen 1838) され、Franz Schulze により命名された (Schulze 1857)。

リグニンは、モノリグノールと呼ばれる *p*-ヒドロキシ桂皮アルコール類をモノマーとする重合体と提案された (Klason 1897)。K. Freudenberg らは、リグニンが C6-C3 のフェニルプロパン類であるモノリグノールから生合成されることを証明するために、*in vitro* での酵素によるモノリグノールの重合を検討し、リグニンがフェニルプロパノイドに分類されることを検証した (Freudenberg 1952, 1959, 1965)。この結果得られた人工リグニンは、脱水素重合物 (Dehydrogenation polymer: DHP) と呼ばれ、現在でもリグニンの構造研究に用いられるモデル物質である。

その後の研究から、現在では、木質細胞壁の形成には 3 種類のモノリグノールが関与すると、認識されている。それらのモノリグノールには、芳香環にメトキシ基が 1 つ置換したコ

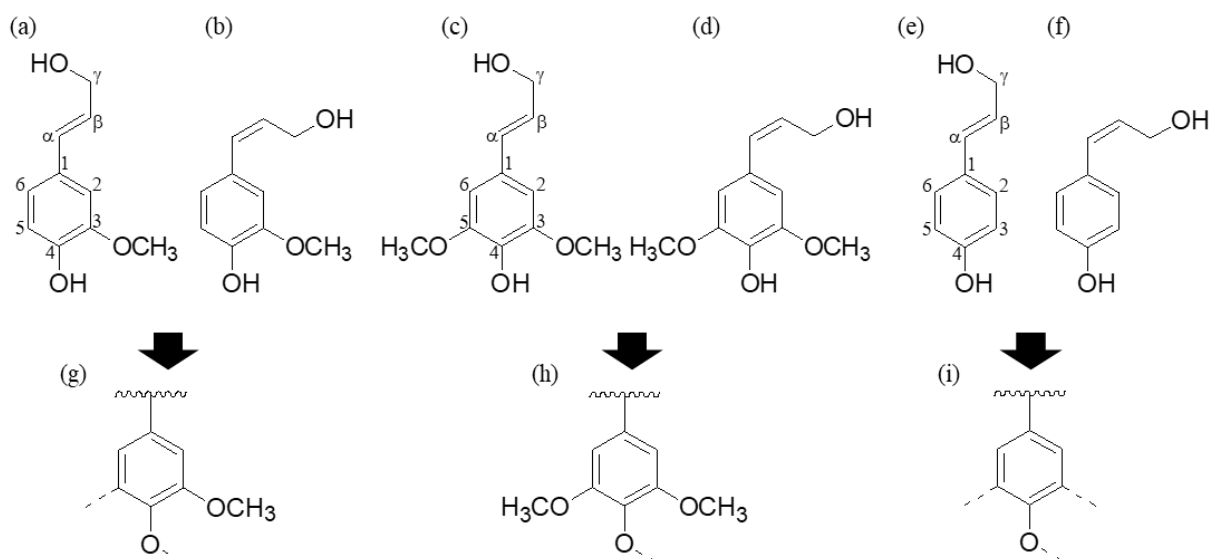


図 1.1.2 (a) コニフェリルアルコール (CA) の *E* 体、(b) CA の *Z* 体、(c) シナピルアルコール (SA) の *E* 体、(d) SA の *Z* 体、(e) *p*-クマリルアルコールの *E* 体、(f) *p*-クマリルアルコールの *Z* 体の構造式。形成されたリグニン中の (g) CA 由来のグアイアシル核 (G 核)、(h) SA 由来のシリンギル核 (S 核) と (i) *p*-クマリルアルコール由来の *p*-ヒドロキシフェニル核 (H 核) の芳香環構造。

ニフェリルアルコール (CA)、メトキシ基が2つ置換したシナピルアルコール (SA) と、メトキシ基がない *p*-クマリルアルコールという慣用名が付されている (図 1.1.2)。CA、SA と *p*-クマリルアルコールに由来するリグニン中の芳香核の構造は、それぞれ、グアイアシル核 (G 核)、シリングル核 (S 核)、*p*-ヒドロキシクマリル核 (H 核) と呼ばれる。一般的に、針葉樹リグニンは G 核と痕跡量の H 核、広葉樹リグニンは G 核と S 核と痕跡量の H 核で構成される。モノリグノールは、酸素存在下でのラッカーゼや、過酸化水素存在下でのペルオキシダーゼによるフェノール性水酸基の水素原子の引き抜きでフェノキシラジカルを生成し、そのラジカルが共鳴して5種類のラジカル種が形成される (図 1.1.3)。この段階のみ酵素が関与するリグニン生合成で、リグニン形成の開始反応ともいえる。次の段階は、ラジカル共鳴体同士のラジカルカップリングである。この結果、ジリグノールが生成するが、5種の共鳴体によるカップリングのため、現在では、8種以上の結合パターン (ジリグノールが生成) 明らかになっている。図 1.1.4 に、代表的なジリグノールの構造 (結合様式) を示す。ここまでの反応が、高分子合成における、開始反応とみなせる。

高分子であるリグニンの形成では、開始反応の後に成長反応が必要である。成長反応はモノリグノールとオリゴリグノール (およびリグニンポリマー) とのカップリング、オリゴリグノール同士のカップリング (リグニンポリマー同士も含む) が想定される (Freudenberg and Hübner 1952) (図 1.1.5)。しかし、この証明はなされていない。

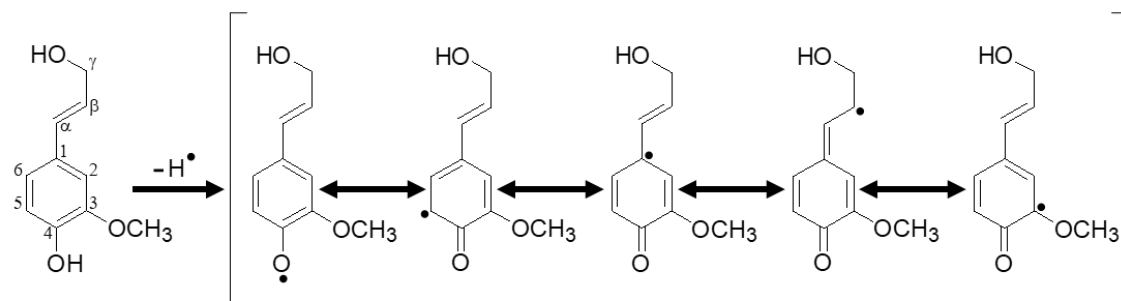


図 1.1.3 モノリグノールの脱水素により生じたフェノキシラジカルとそのラジカル共鳴体。

図1.1.4中のβ-O-4', α-O-4'結合はアリールエーテル結合に分類される。また、5-5'および4-

O-5'結合は縮合構造と呼ばれる。β-β'結合も炭素-炭素結合であるが、縮合構造とは呼ばれない (中野準三 1990)。

β-O-4'結合は、木材中のリグニン結合様式の半数以上を占めると示されており (Chakar and Ragauskas 2004)、パルプ化研究などでは、その開裂が主要な研究テーマである。図 1.1.6 に、β-O-4'結合の形成機構を示す。まず、フェノキシラジカルとβ位の炭素ラジカルがカップリングする。その過程で、キノンメチド中間体が生成され、このキノンメチドに水分子または水酸基が求核付加する (川田と伊藤 2021)。この 2 重結合の付加のため、*erythro* 体と *threo* 体が生成し、*erythro* / *threo* の比は針葉樹で 1/1、広葉樹で 3/1 である (Akiyama *et al.* 2005)。糖類の水酸基、現在ではヘミセルロースの水酸基が付加すると、リグニン-多糖類複合体 (LCC) が形成すると推定されている (Nishimura *et al.* 2018)。

リグニン形成過程に関する研究において、グルコースを出発物質とするモノリグノールの生合成経路はほぼ解明されたといえる (福島ら 2024)。一方で、ヘミセルロースが、モノリグノールのカップリングの反応の場となることが解明されつつある。Qiang Li らは、バクテリアセルロースにキシランを吸着させて多糖類マトリックスを形成させ、その物質存在下で DHP の形成を図った (Li *et al.* 2015)。その結果、マトリックス内部に人工リグニンを形成させるにはキシランが必須の物質であり、キシランがモノリグノールの重合場になることを立証した。その後、Yan Lyu らは、キシラン中に存在するアセチル基のリグニン形成に及ぼす影響も解明した (Lyu *et al.* 2023)。最近では、グルコマンナンのリグニン形成に及ぼす影響も解明され (Sato *et al.* 2025; Lyu *et al.* 2021)、リグニン形成におけるヘミセルロースの機能解明がほぼ完了したといえる。したがって、リグニン形成に関する残された課題は前述したように、リグニンの成長反応である。

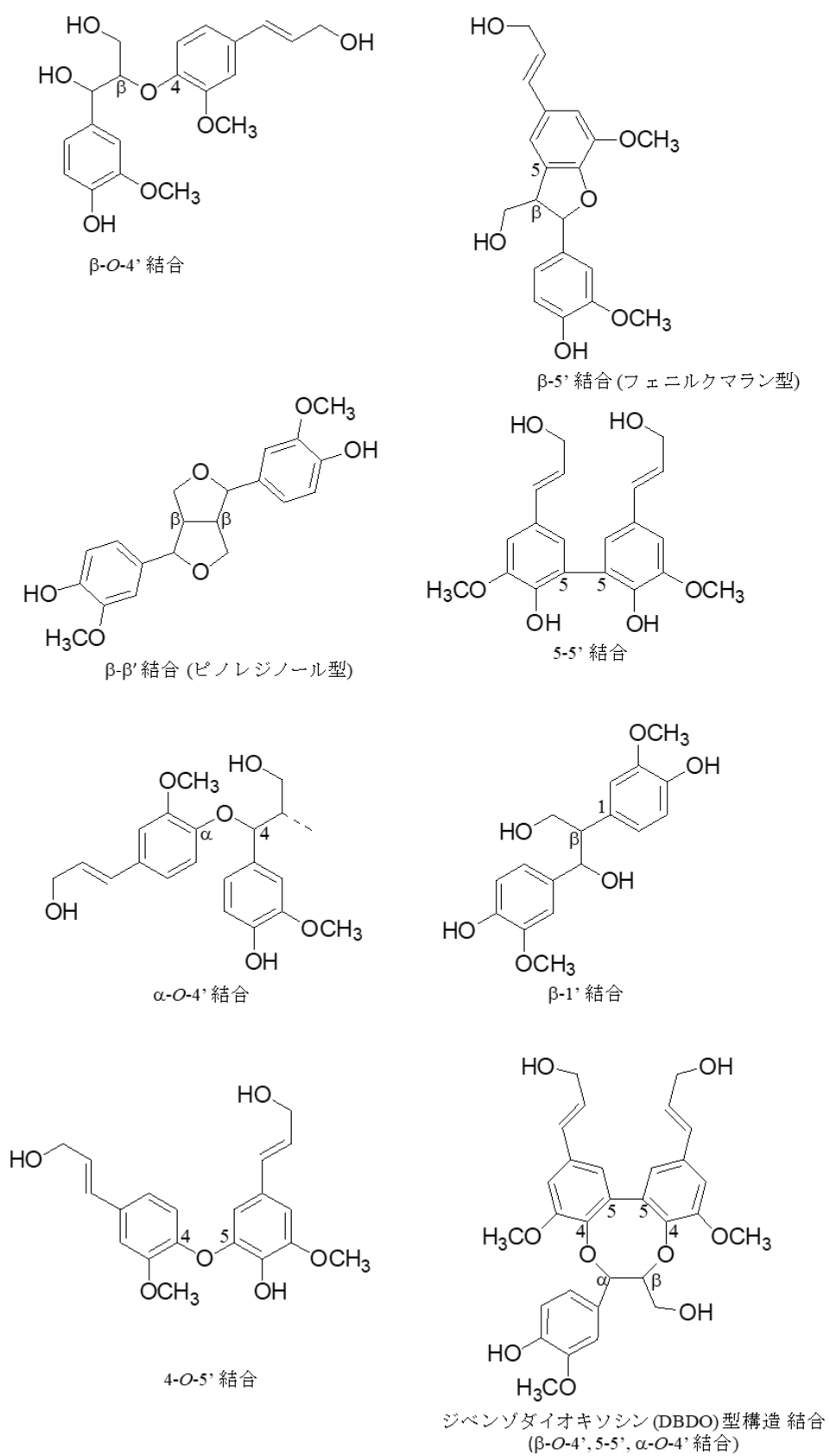


図 1.1.4 リグニンの主要な結合様式

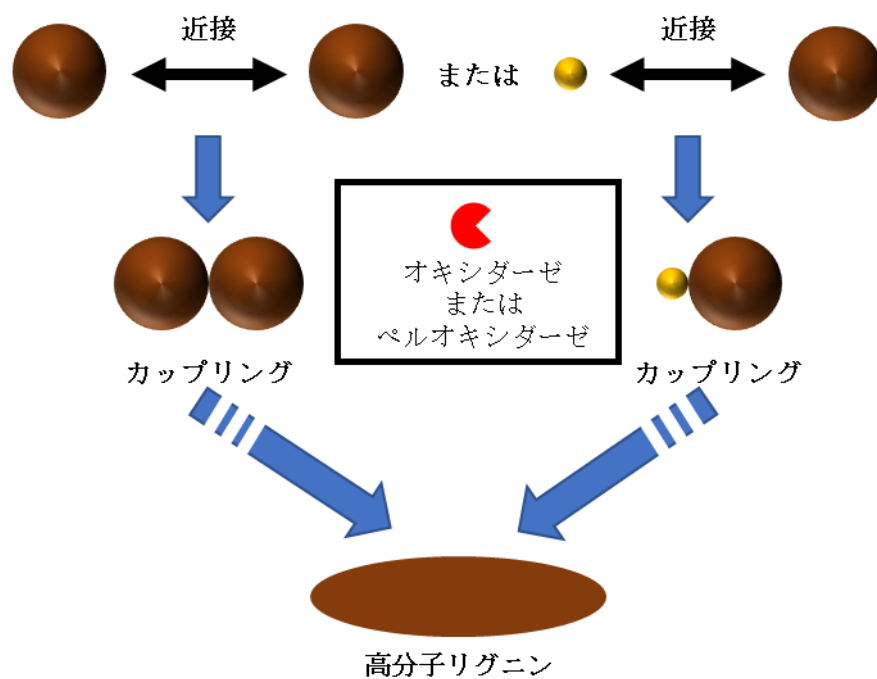


図 1.1.5 推定される 2 通りの高分子リグニンの成長反応

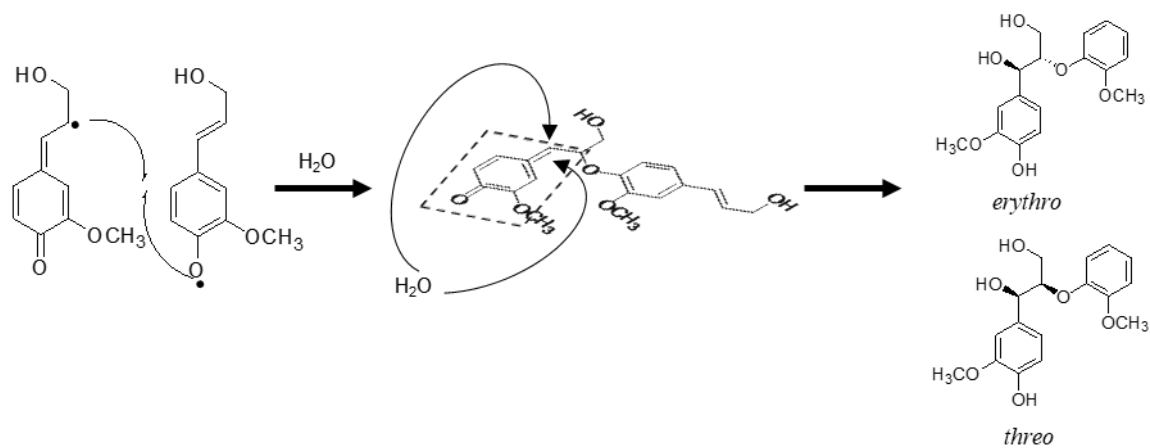


図 1.1.6.  $\beta$ -O-4' 結合形成

## 1.2 博士課程当初の課題設定

これまで、リグニン研究の背景を記してきたが、その背景から私が入学当初に立てた課題は「リグニンの成長反応の解明」である。その研究の第一段階として、基質となるモノリグノール、リグニンオリゴマー、リグニンポリマーがどのような空間配置で存在するか、すなわち、成長反応を可能にする基質間距離を明らかにすることを最初の目的とした。

この目的を達成する研究戦略として、モノリグノールおよび、種々の単離リグニンを実験試料として用い、成長反応が可能となる濃度条件を確立し、その時の基質間距離を Förster resonance energy transfer (FRET) と呼ばれるエネルギー移動 (Förster 1946) を蛍光測定から明らかにする方法を考えた。この準備研究を始めたところ、想定外の現象に遭遇し、課題の変更に至ることになった。準備研究に用いた実験試料などが、本論文の研究課題と密接に関連するため、準備研究について説明する。

### 1.2.1 単離リグニン

準備研究には、植物細胞壁中に存在する天然リグニンに近い構造とされる単離リグニンと、細胞壁から工業的に大量に調製可能とされる単離リグニンを用いることとした。そこでまず、各種単離リグニンについて概説する。

#### 1.2.1.1 磨砕リグニン (MWL)

1956 年に Anders Björkman により、MWL の調製法が示された (Björkman 1956, 1957; Björkman and Börje 1957)。MWL の調製は、まず、脱脂木粉を、トルエン共存下でボールミルを用いて 48 時間磨砕する。粉碎物から、96:4 のジオキサン : 水を用いて抽出物を得る。その後、酢酸に溶解させ、ジエチルエーテルで沈殿、沈殿物を再度、ジクロロエタン/エタノールに溶解させジエチルエーテルで沈殿させるという精製法が行われる。MWL は、ボールミルのメカノケミカルによる化学構造変化があるけれども、中性溶媒の使用のみで、さら

に、加熱も行わないことから、細胞壁中の構造を保持していると推定されている。この方法では、木材中に存在するリグニンの 10~30 wt%程度が抽出される (Björkman 1956; Fujimoto *et al.* 2005)。エゾマツから抽出した MWL を、準備研究では用いた。

また、この方法のジオキサン水抽出残渣から、水、または、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)、ジメチルスルホキシド (DMSO)、50%酢酸水溶液などの溶剤を用いることで、LCC 画分が抽出可能であることも付記しておく (Watanabe *et al.* 1987)。

#### 1.2.1.2 クラフトリグニン (KL)

化学パルプ製造工程において、蒸解廃液から回収した単離リグニンを工業リグニンという。現在、世界的に主流な化学パルプ化は、クラフトパルプ化 (KP) 法である。KP 化法は 1884 年に Carl Ferdinand Dahl により発明された (Dard 1884)。KP 法は強度のある紙を作ることができるので、ドイツ語で「力」を意味する”kraft”の名を冠している。KP 化法は水酸化ナトリウムと硫化ナトリウムから成る蒸解液に、先ず、110~120 °Cでチップを浸漬させ、160~170 °Cに加熱して 2.5 時間蒸解する (紙パルプ技術協会 1996)。水酸化ナトリウムだけでも  $\beta$ -O-4'結合を開裂できるけれども (図 1.2.1)、硫化ナトリウムを加えることで、 $\beta$ -O-4'結合開裂がより促進する (川田と伊藤 2021; Sarkanen and Ludwig 1971)。図 1.2.2 に、反応機構を示す (一般社団法人木材学会 2023)。蒸解温度が 100 °C程度に達すると、 $\alpha$ 位の水酸基が脱離して、キノンメチドが生成する。そこに、硫化ナトリウムから生じた硫化水素イオン ( $S^{2-}+H_2O\rightarrow HS^-+OH^-$ ) が求核攻撃し、チオールが生成する。その後、チオールのプロトンが解離して生じたチオラートアニオンは、 $\beta$ 位の炭素に求核置換反応し、 $\alpha$ 位と $\beta$ 位に 3 員環を形成する。同時に、 $\beta$ -O-4'結合が開裂する。副反応として、硫化水素イオンではなくパルプ過程において生じたフェノール性芳香族化合物が、キノンメチドの $\alpha$ 位に付加すると、 $\beta$ -O-4'結合の開裂が阻害される (船岡と阿部 1983; Gierer and Pattersson 1977; Crestini *et al.* 2017)。類似の反応により、共役系が伸びた反応生成物も生じる。したがって、蒸解廃液中に含まれ



るリグニン分解物 (クラフトリグニン : KL) は、天然リグニンに比べ、 $\beta$ -O-4'結合が少なく、フェノール性水酸基に富む。さらに、長い共役構造から長波長の可視光も吸収する。KL は、KP 廃液を酸性にすると沈殿するので、ろ過等で容易に回収できる。しかし、完全クロールシステムが確立した KP 法では、KL は燃料として用いられるため、KL 単体としての生産量は低い。

その他の工業リグニンとして、リグノスルホン酸塩が KL より大量生産されているが、本研究では使用しないため、その説明は割愛する。また、木材中のリグニン量を定量する方法としてクラークソン法 (Klason 1908)があるが、この論文にはクラークソンリグニンを用いた記載がないのでこれも省略する。

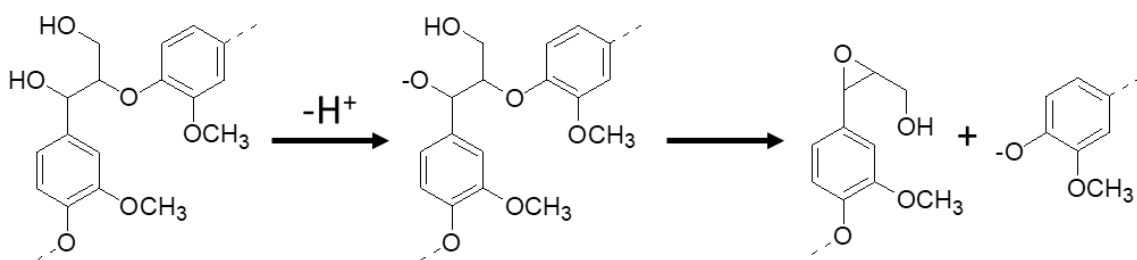


図 1.2.1 クラフト蒸解における、水酸化ナトリウムによる $\beta$ -O-4'結合の開裂

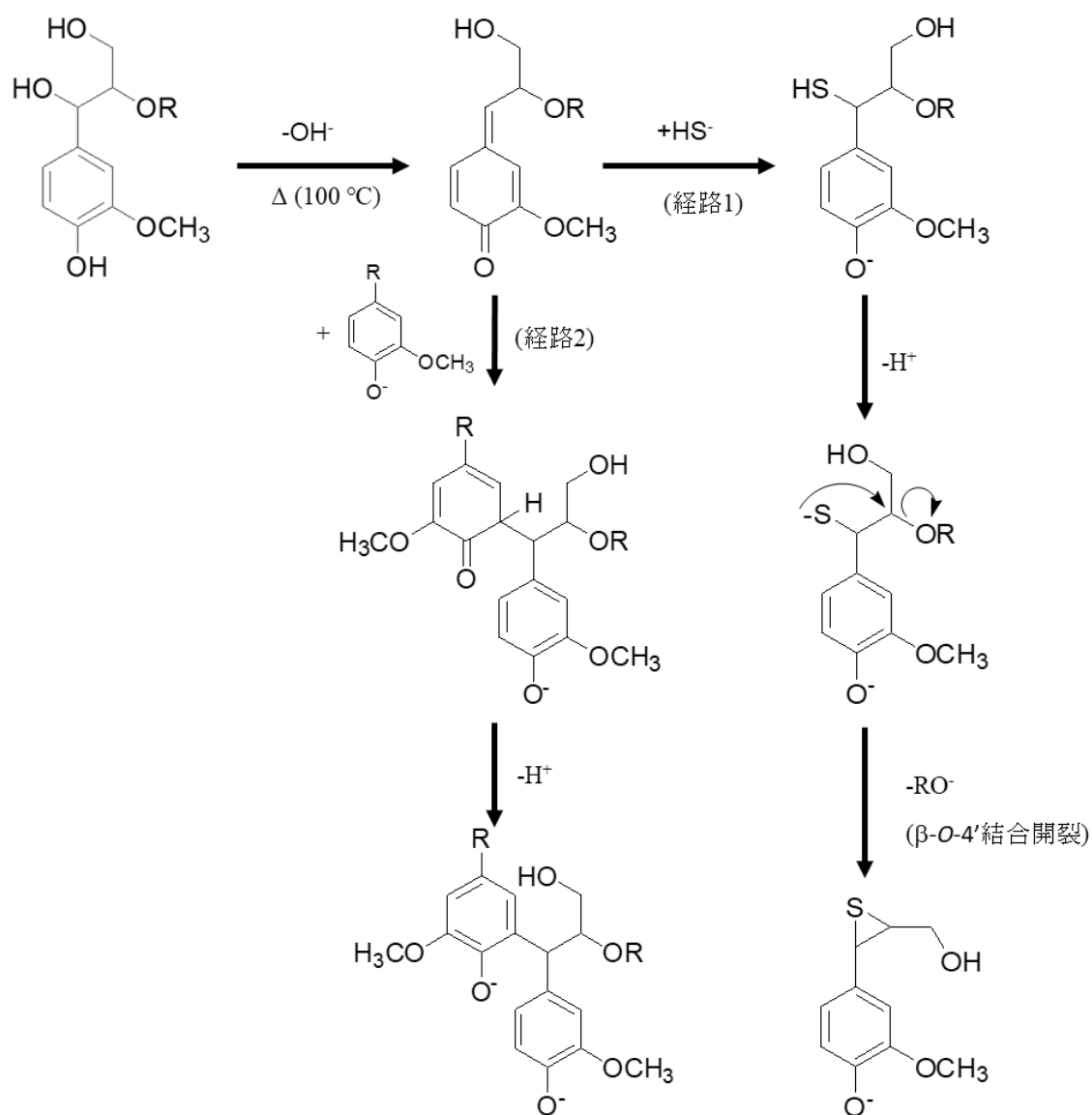


図 1.2.2 クラフト蒸解下で起こる、(経路 1) 硫化ナトリウムによる、β-O-4'結合の開裂と(経路 2) 芳香族性の蒸解分解物による高分子化 (副反応)

### 1.2.2 蛍光および Förster resonance energy transfer (FRET) の説明

博士課程当初の課題であった「リグニンの成長反応の解明」の戦略として予定していた FRET (Medintz and Hildebrandt 2014; Shah *et al.* 2016; Chirio-Lebrun and Prats 1998) について述べる前に、FRET の基本となる蛍光の発光原理 (Kasha 1987) について概説する。図 1.2.3 に、分子に光が当たり励起し基底状態に戻る様子を示す。分子は、構造に応じた光を吸収する。

この光吸収は紫外可視分光法 (UV-vis) により測定することができ、リグニン溶液の濃度決定法の 1 つである。次に、基底状態 ( $S_0$ ) で光を吸収した分子は、励起一重項状態 ( $S_1$ ) に昇位する。この励起状態の分子が、安定な基底状態に戻る過程を緩和過程と呼び、2通りの緩和過程がある。1つ目は振動や熱として、発光を伴はないエネルギー放出で緩和する無放射遷移である。2つ目は、発光する緩和過程で、特に、 $S_1$  から  $S_0$  の過程で放出される光が蛍光である。また、 $S_1$  から励起三重項 ( $T_1$ ) に項間交差し、 $T_1$  から  $S_0$  の過程で放出される光が燐光と呼ばれる。燐光は、マイクロ秒程度の時間で発光するけれども、蛍光はナノ秒程度の発光時間と短い。蛍光は蛍光分光光度法により、測定することが可能で、UV-vis と比べて検出感度が高く、UV-vis に必要な試料濃度よりも 5 桁小さい濃度で分析が可能である (Lakowicz 2006)。

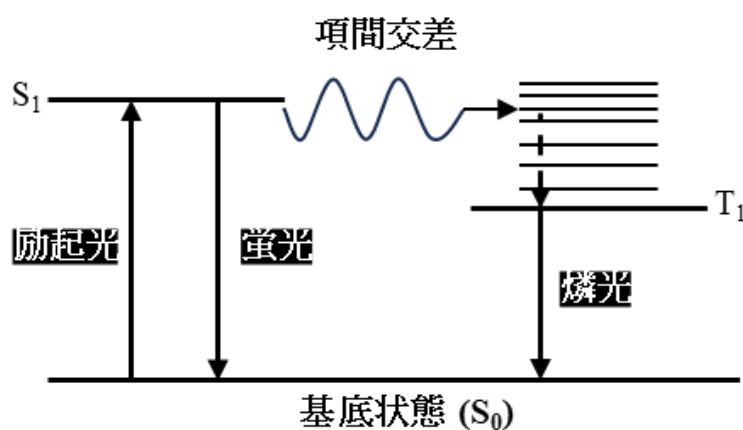


図 1.2.3. Jablonski (Jabłoński 1933) の図。  $S_1$ ,  $T_1$  はそれぞれ最低励起一重項状態、励起 3 重項状態を示す。(光化学協会 2014、30 頁の図 1 を一部改変)

リグニンは、紫外線 (UV) を吸収し (Erdmann 1866; Erdtman 1949; Erdtman and Sandén 1968; Herzog and Hillmer 1927; Johnson *et al.* 1961; Patterson and Hibbert 1943; Singh *et al.* 2006)、自家蛍光を放つ特性 (Albinsson *et al.* 1999; Lundquist *et al.* 1978) を持っている。この性質を利用して、サルファイトリグニン廃液中のリグニン濃度を測定する方法 (Patterson and Keays

1951; Almgren *et al.* 1975; Bublitz and Meng 1978; Bublitz and Wade 1979) が、提案された。蛍光測定は溶液ばかりでなく、植物細胞壁中のリグニン分布を可視化するために、蛍光顕微鏡が使用される (Singh and Donaldson 1999; Donaldson 2002; Donaldson and Radotic 2012; Donaldson *et al.* 1999)。しかし、通常の蛍光顕微鏡では、UV による励起が不可能なため、不鮮明である。そこで、FRET の原理を活用した観測方法がある (Donaldson *et al.* 2019; Terry *et al.* 2018)。次に、FRET について説明する。

FRET は、2 種類の蛍光を発する分子間でエネルギー移動が起こるときに観測される蛍光である (図 1.2.4)。具体的には、短波長の励起光を吸収して蛍光を発する分子 (ドナー) が、基底状態に戻るときに発するエネルギーを吸収できる分子 (アクセプター) が 10 nm 以内の

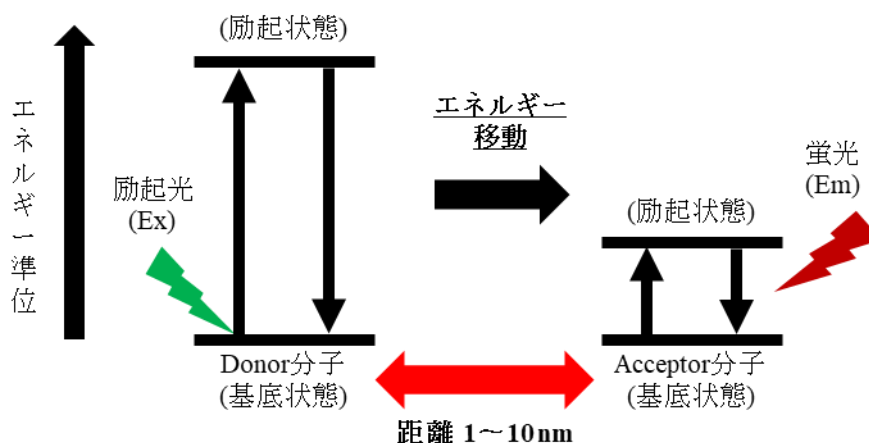


図 1.2.4. FRET の模式図

近傍に存在すると、そのアクセプターは励起され、基底状態に戻るときに蛍光を発する。このエネルギー移動が、FRET と呼ばれている。したがって、FRET で観測される蛍光は、アクセプターに由来する蛍光で、ドナー単独よりも長波長となる。この FRET 由来の蛍光強度と蛍光寿命から、ドナーとアクセプター間の距離を測定することができる。

リグニンに FRET 現象を起こさせる分析法の代表例は、蛍光試薬であるローダミン B (Rh B) をアクセプターとして用いる蛍光顕微鏡観察である (Donaldson *et al.* 2019)。具体的には、Rh B を細胞壁に含侵させ、通常のリグニン自家蛍光観察に用いられる励起光を照射し、Rh

B の蛍光波長の画像を取得する方法である。これにより、細胞壁中のリグニンの位置および分布が明確になった。

私は、リグニンの形成の基質間の距離を FRET で測る準備研究として、固体で生じていたリグニンと Rh B の FRET 現象が、溶液中でも観測できるかについて検討した。ドナーとしてのリグニンには SKL を用い、これの 0.05 g/L プロピレングリコール溶液に、励起光 400 nm の蛍光スペクトルを測定した [図 1.2.5 (a)]。また、アクセプターとしての Rh B のプロピレングリコール溶液 (1 mM) も、励起波長 400 nm で蛍光スペクトルを測定した [図 1.2.5 (b)]。最後に、単独溶液と同濃度になるような SKL と RhB の混合溶液を調製し、蛍光スペクトルを測定した [図 1.2.5 (c)]。SKL と Rh B は、それぞれ、486 nm と 572 nm に最大蛍光を与えるピークを示した。しかし、混合溶液では、SKL で観測された 486 nm の蛍光ピークが出現せず、572 nm の Rh B に由来する蛍光ピークのみ観測され、その強度は増加していた

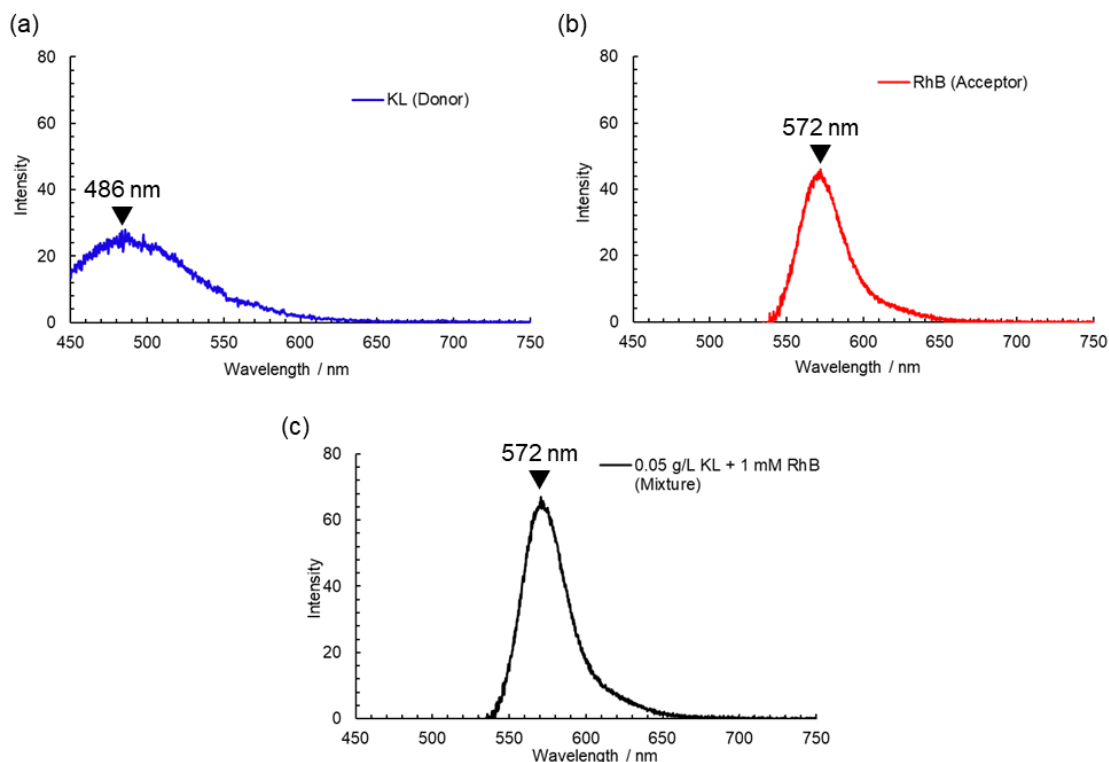


図 1.2.5. 励起波長 400 nm を照射した 0.5 g/L SKL 溶液 (a)、1 mM Rh B 溶液 (b)と、0.5 g/L SKL と 1 mM Rh B の混合液 (c) の蛍光スペクトル。

(図 1.2.5 (c))。この結果は、溶液中の SKL (ドナー) と Rh B (アクセプター) の間に FRET 現象が起きていることを明らかにした。

この準備研究から溶液中でも、ドナーとしてのモノリグノールと、アクセプターとしての SKL 間で FRET も観測できるとの期待を抱いた。SKL をアクセプターとした理由は、前述したように SKL 中には、長い共役構造を持つ画分も含まれるので (Crestini *et al.* 2017)、長波長の可視光も吸収して、蛍光を発することが期待できる。このことは、FRET のアクセプターとしての機能に適した特性と推定した。そこで、SKL の励起波長 (Ex) と蛍光波長 (Em) の関係を再度検証するために、指紋蛍光測定法を行うことにした。指紋蛍光とは、広範囲な励起光を 10 nm 以下の間隔で照射しながら蛍光スペクトルを得るもので、蛍光強度に応じた等高線として両者の関係を表すために、指紋の様な三次元スペクトルを意味する。SKL の指紋測定は、200-750 nm の励起光を 10 nm 毎に照射し、200-750 nm の蛍光スペクトルを測定した。この測定には、約 2 時間を要した。再現性を見るために、2 回目の測定を 1 回目の直後に行ったところ、1 回目とは異なる指紋蛍光スペクトルが得られた。この詳細は第 2 章で詳述するが、この再現性のない結果は、SKL が短時間の光照射でも、構造が変化していることを示唆した。この蛍光スペクトルに及ぼす現象は、これまで報告がなかった。そこで、私の博士論文の研究では FRET より先に、光照射によって引き起こされるリグニンの構造変化を詳細に検討すべきと考え、研究課題の変更に至った。

### 1.3 博士課程研究の目的と検討項目

本研究の第一の目的は、これまで述べてきたように、単離リグニンに光照射を行った時の構造変化を明らかにすることで、特に、単離リグニンは紫外光を吸光するため、紫外光照射による蛍光スペクトルの変化と、その原因となる構造変化を解明する。

また、当初の研究課題で予定していた「成長反応で得られたリグニンの解析」においても、従来の化学分析法では、その反応率を解明しないと正確な結果が得られないとの危惧から、

第二の目的としてリグニン分析法の再検討を行うこととし、本論文題目を「リグニン測定法の再検証」とした。

### 1.3.1 紫外光照射による単離リグニンの蛍光スペクトル、および化学構造に及ぼす影響

1996 年に、Jean-Nicolas Destiné らは、大気中の酸素が UV 照射に伴う溶液中の MWL の吸光スペクトル変化に影響を及ぼし、光分解を促すことを明らかにしている (Destiné *et al.* 1996)。このことから、UV 照射による蛍光スペクトル変化においても大気中の酸素が関与することが容易に予想された。そこで、SKL の他に MWL も研究対象とし、指紋蛍光測定から得られた最大蛍光強度を与える励起光 (280 nm) を、酸素雰囲気下およびアルゴン雰囲気下で 12 時間連続照射し、蛍光スペクトルを 10 分毎に測定した。照射によって生じた構造変化を、サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と赤外分光法 (IR) で追跡した。これらの詳細は、第 2 章で述べる。

### 1.3.2 リグニン化学分解法の再検証

リグニンのモノマー構成比や、リグニンの主要単位間結合である $\beta$ -O-4'で代表されるアリールエーテル結合の頻度を見積もる化学分解法として、チオアシドリシス法や derivatization followed by reductive cleavage (DFRC) 法などが開発されてきた。まず、これらの分解法について概説する。

#### 1.3.2.1 チオアシドリシス法

チオアシドリシス法は 3 フッ化ホウ素エーテル錯体を酸触媒として、ジオキサン中エタンチオールでリグニンを加溶媒分解する (Lapierre *et al.* 1985, 1986; Lin and Dence 1992)。この分解反応は、選択的に  $\beta$ -O-4' 結合を開裂する (図 1.3.1)。出発物質の立体構造に関わらず、分解物は 50/50 の *erythro* 体と *threo* 体の混合物となる。得られた分解生成物をガスク

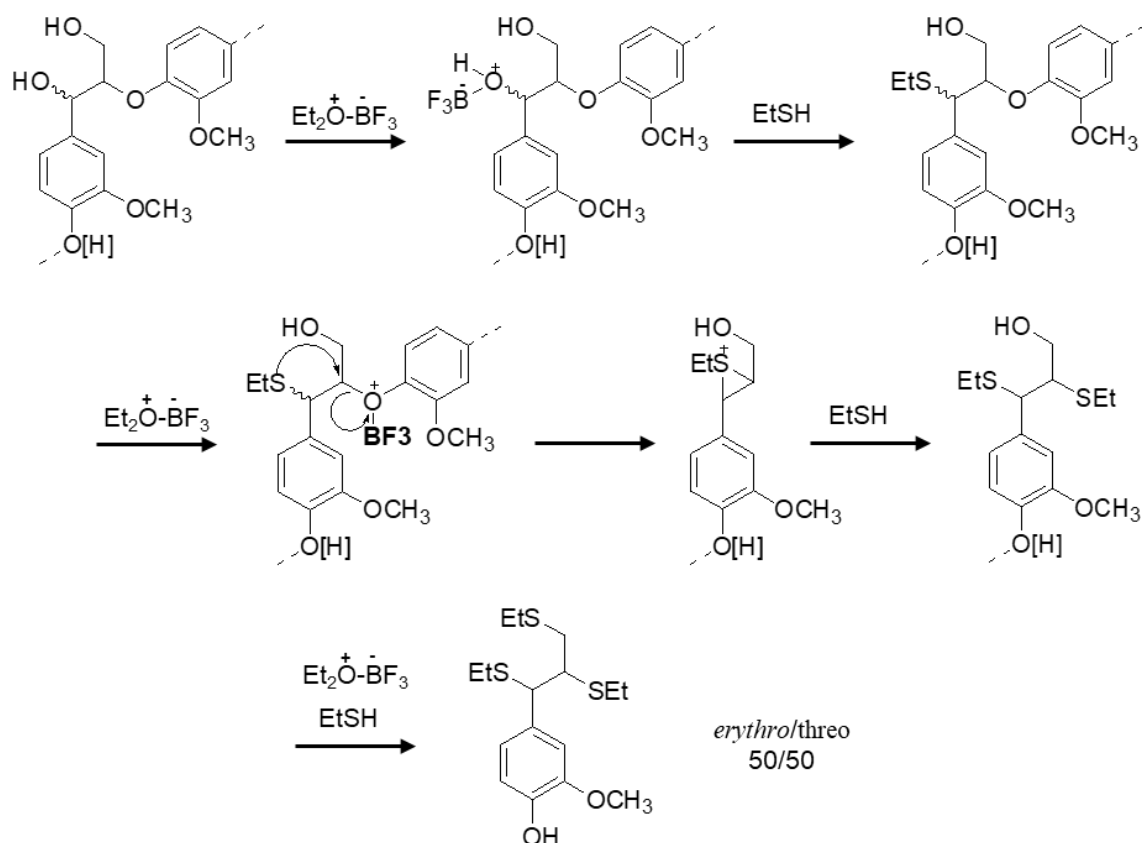


図 1.3.1 チオアシドリシス法による $\beta$ -O-4'結合の開裂

ロマトグラフィー (GC) により定量することで、S/G 比および $\beta$ -O-4'結合頻度を見積もることができる。また、Raney nickel を用いて分解生成物を脱硫処理により、 $\beta$ -O-4'結合で囲まれた縮合構造などに由来する二量体を定量できる (Lapierre *et al.* 1991, 1995)。

しかし、Yoshie Kanazawa らは、 $\beta$ -O-4'結合のみで繋がったリグニンモデルポリマーをチオアシドリシスに供した結果、二量体は定量的に分解するが、重量平均重合度 ( $DP_w$ ) 24.9 のモデルポリマーでは、モノマー収率が 74%となり、高分子リグニンに対してはこの反応は定量的に進行しないという反応性の低さを提示している (Kanazawa *et al.* 2009)。また、この方法で用いるエタンチオールは、少量でも人間が感知する悪臭である。この操作をドラフト中に行っても、極少量ドラフトから漏れ出るだけで、周囲に迷惑をかける。そこで、私はこの試薬を用いない DFRC 分析法で、リグニンの分析を行うことを考えた。



### 1.3.2.2 Derivatization followed by reductive cleavage (DFRC) 法

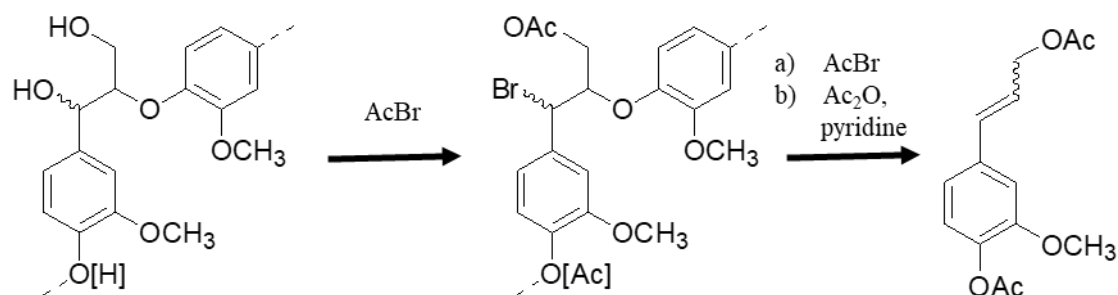


図 1.3.2 DFRC 法による $\beta$ -O-4'結合の開裂

DFRC 法は、Fachuang Lu と John Ralph らにより開発され、リグニン中の  $\beta$ -O-4'結合を選択的に開裂する (図 1.3.2) (Lu and Ralph 1997, 1998, 2008; Peng *et al.* 1998)。木粉や単離リグニン調製物に臭化アセチルを加えると、リグニンのフェノール性ヒドロキシ基と側鎖の脂肪族ヒドロキシ基がアセチル化されて臭化アセチルに可溶化する。同時に、 $\alpha$ 位に臭素化が起きる。溶媒除去後、ジオキサン水溶液と亜鉛を加えると、アリールエーテル結合の還元的開裂が起き、分解する。針葉樹の場合、アセチル化コニフェリルアルコールが分解生成物であり、これを GC で定量することで、リグニン中の  $\beta$ -O-4'結合頻度を見積もることができる。しかし、チオアシドリシスで見られたように、高分子リグニンに対する反応性は明確になっていない。

### 1.3.3 DFRC 法の再検証

本博士研究の第二の目的は、DFRC 法の反応性の再検証である。Y. Kanazawa らが行った研究と同様に、本研究でも、 $\beta$ -O-4'の二量体、さらに  $\beta$ -O-4'のリグニンモデル高分子を用いて、DFRC のこれらの試験体に対する反応効率を明らかにして、反応効率の分子量依存性を検証することとした。この結果は第三章で詳述している。

#### 1.4 本論文の構成

第一章では、研究の背景を記載した。第二章では、「リグニンの蛍光測定法の検証」について、第三章では、「DFRC 法の反応効率の検証」について詳述する。最後に、第四章として、本論文の成果を総括する。

## 第 2 章

# リグニン蛍光測定法の再検証

## 第2章 リグニン蛍光測定法の再検証

### 2.1 緒言

第1章で述べたように、リグニン溶液の連続指紋蛍光は、再現性のないスペクトルを与えた。このことより、励起光、特に、UV 領域の励起光がリグニンの構造を変化させることが予想されたので、この章では、UV 照射がリグニンの構造に及ぼす影響を明らかにすることを目的として、研究を行った。

J. N. Destiné ら (Destiné *et al.* 1996) が、UV 照射時間とともに MWL の UV 吸収スペクトルが変化することについて言及していることについて、第1章で述べた。その中で、空気中の酸素 ( $O_2$ ) が MWL の光分解に関与し、UV のスペクトル変化を引き起こしていることに、私は注目した。そこで、本研究は、不活性ガスである Ar 雰囲気下、および  $O_2$  雰囲気下で、UV を連続的に照射して、溶液中のリグニン自家蛍光の変化を検討した。リグニン試料は、針葉樹 KL (SKL) の他に、J. N. Destiné らの報告との整合性を図るために、針葉樹の MWL を用いた。溶媒には、測定中の溶媒揮発を防ぐために、沸点 188 °C のプロピレングリコールを使用した (Shah *et al.* 2016)。

リグニン溶液の最大蛍光を与える波長 (蛍光波長 :  $Em_{max}$ ) と励起光波長 (Ex) の関係を調べるために、まず、空気中で、指紋蛍光測定を行った。その後、この Ex を用いて、Ar および  $O_2$  雰囲気下で Ex を 12 時間照射し、10 分毎に蛍光スペクトルを測定した。さらに、特異な現象が現れた照射時間の試料に対し、構造解析を行った。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試料・試薬

MWL の材料であるエゾマツ (*Picea jezoensis*) は北海道大学雨竜研究林から提供された。クラフトパルプ黒液は日本製紙株式会社 (東京、日本) から頂戴した。プロピレングリコール、ドコサン (GC-MS grade)、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF, HPLC grade)、LiBr は関東化学株式会社 (東京、日本) から購入した。臭化アセチル (AcBr) は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。

#### 2.2.1.1 MWL の調製

MWL の調製は A. Björkman が開発した方法に従った (Björkman 1956)。エゾマツの木片 100 g を鉋がけし、その鉋粉を室温にて一晩乾燥させた。乾燥させた鉋屑をワンダーブレンダー (大阪ケミカル株式会社、大阪、日本) で粉碎し、篩にかけ、42 メッシュ篩を通過し 100 メッシュ篩に残った木粉を回収した。回収した木粉をソックスレー抽出器で、脱脂処理をした。具体的には、木粉を円筒濾紙 (WHA2800260, Whatman, Cytiva LLC, Upsala, Sweden) に 7 割程度入れ、ソックスレー抽出器に設置した。ソックスレー抽出器受け器にエタノール・ベンゼン混合溶媒 (1;2, v/v) を 150~170 mL 添加し、95 °C の恒温水槽で加熱処理し、脱脂処理を 6 時間行った。処理後、木粉を風乾し、脱脂木粉を得た。3 g の脱脂木粉をステンレス製のボールミル容器に入れ、ステンレス球を 5 個入れた。脱水トルエンを加えて、木粉を浸漬させた。ボールミル容器を遊星型ボールミル (PULVERISETTE 6, FRITSCH GmbH, Idar-Oberstein, Germany) に設置した。磨砕条件は回転数 600 rpm、30 分間稼働、30 分間休止の行程を 20 回繰り返した。磨砕した試料を 4700× g、4 °C、15 分間の条件で、遠心分離器 (himac SCR20B、エッペンドルフ・ハイマック・テクノロジーズ株式会社、茨城、日本) で遠心分離し、沈澱物を得た。その後、減圧乾燥して得た粉末に 96% ジオキサン水溶液を加

え、24 時間攪拌した。その後、遠心分離し、上清を取り、新しい 96%ジオキサン水溶液を加え、抽出を行った。以上の抽出を合計 2 回繰り返した。ジオキサン抽出液を合わせ、エバポレータで濃縮乾固した。その際、エバポレータの水槽の温度を 35 °C 以下に設定した。濃縮乾固させた試料に 90%酢酸を加えて溶解させ、過剰量の水に滴下した。遠心分離により沈殿を回収し、沈殿物を凍結乾燥した。その後、1, 2-ジクロロエタンとエタノール混合液 (2:1、v/v) に溶解させ、遠心分離機 (KN-70、株式会社久保田製作所、東京、日本) で 1000×g、15 分間で遠心分離した。沈殿物をジエチルエーテルに加え、一晩攪拌した。さらに、溶液を遠心分離し、沈殿物を回収する操作を 3 回繰り返した。沈殿物を風乾し、MWL を得た。各測定の前に 40 °C で一晩減圧乾燥して、以下の測定に供した。

#### **2.2.1.2 SKL の調製**

SKL は、黒液から Tomohiro Aso らの方法 (Aso *et al.* 2013) に従い調製した。黒液を塩酸で pH 2 以下に酸性化し、遠心分離した。沈殿物を脱イオン水で pH 7 になるまで洗浄し、繰り返し遠心分離して沈殿物を減圧乾燥して SKL 粉末を回収した。

#### **2.2.2 蛍光測定**

##### **2.2.2.1 リグニン溶液の調製**

1.5 mg のリグニン試料粉末と 50 mL のプロピレングリコールを自転公転型ミキサー (AR-100, 株式会社シンキー, 東京, 日本) で混合し、30 mg/L のリグニン溶液を調製した。混合条件は、2000 rpm で 1 時間とした。リグニン溶液は、遮光のためアルミホイルを巻いたサンプル瓶にいれ、4 °C で保管した。

#### 2.2.2.2 リグニン溶液の指紋蛍光測定

保管していたリグニン溶液 2.5 mL を、1 cm 角の蛍光測定用の石英セルに入れ、分光蛍光光度計 (F-7100, 株式会社日立ハイテク, 東京, 日本) に設置した。測定は側面測光方式 (図 2.1.1) で、光源は 150 W のキセノンランプを使用し、光源スリット幅は 20 nm に設定した。ホトマル電圧は 350 V とした。励起光波長設定は 200 から 750 nm の波長領域で、10 nm 間隔の波長とした。指紋蛍光スペクトルは 200 から 750 nm の波長範囲において 10 nm 間隔で得た。スキャンスピードは毎分 240 nm で、1 回の指紋蛍光測定に 2 時間要した。1 回目測定直後に、同じリグニン溶液で 2 回目の測定を行った。

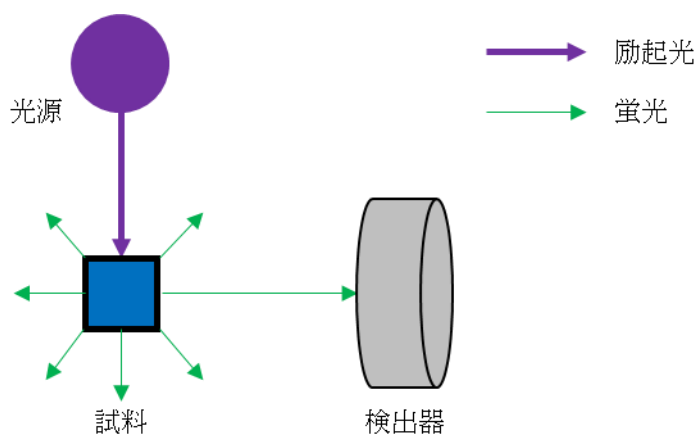


図 2.1.1. 側面測光方式

#### 2.2.2.3 リグニン溶液の蛍光測定

MWL と SKL のリグニン溶液 (30 mg/L) を 2.2.2.1 と同様に調製した。暗室でリグニン溶液内に  $O_2$  と Ar を以下の手順で溶存させた。石英セル中の 2.5 mL の各リグニン溶液にノズルを挿し込んで、 $O_2$  または Ar ガスを 5 分間バブリングした。その後、リグニン溶液が入った石英セルをデシケーターの中に入れ、 $O_2$  または Ar をデシケーター内に 15 分間流入させ、15 分間脱気する操作を 3 回繰り返して、溶存ガスを目的の気体に置換した。分光蛍光光度計は、2.2.2.2 と同じものを使用した。試料室に  $O_2$  または Ar を、チューブ経由で 0.2 L/min で

流入させた。光源は 150 W の Xe ランプで、光源スリット幅は 20 nm とし、ホトマル電圧は 350 V、スキャンスピードは 240 nm/min に設定した。280 nm の励起光を 12 時間継続的に溶液に照射し、蛍光波長 290 から 750 nm の強度を記録した。各測定を 3 反復行った。

#### 2.2.2.4 リグニン溶液の UV 吸収分光法

O<sub>2</sub> または Ar 雰囲気下で、280 nm の UV 照射したリグニン溶液の紫外可視吸光スペクトル (UV-vis) を測定した。Ar 雰囲気下で保管した未照射リグニン溶液 (30 mg/L) も UV-vis に供した。UV-vis 分光光度計 (U-2910、株式会社日立ハイテク、東京、日本) を用い、200 から 800 nm の吸光度を測定した。光源は 30 W の D2 ランプと 50 W の WI ランプで、340 nm で光源を D2 から WI に切り替えた。

#### 2.2.2.5 UV 照射したリグニン溶液中のリグニン構造解析

サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) と赤外分光法 (FT-IR) で、試料の構造解析を行った。まず、2.2.2.3 に倣い、O<sub>2</sub> および Ar 雰囲気下で、保管リグニン溶液に対し 2 および 12 時間 UV 照射する操作を 5 回行った。各条件で UV 照射したリグニン溶液を混合し (合計 12.5 mL)、cryovap 法 (Kolesnichenko *et al.* 2020) を一部改良した図 2.1.2 のシステムで、プロピレングリコールを除去した。具体的には 12.5 mL のリグニン溶液を 50 mL 容のナス型フラスコに入れアルミニウムブロックヒーターに設置した (図 2.1.2)。ナス型フラスコに U 字型の蒸留アダプターをつけ、ナス型二口フラスコを連結した。ナス型二口フラスコのもう片方の口には三方コックを取り付け、オイルポンプと接続した。連結部は系内の密閉性を確保するために、グリースを塗布した。最初にガラス管内を、ベルト駆動型油回転真空ポンプ (TSW-50N、佐藤真空株式会社、埼玉、日本) で真空引きした。この真空状態のまま、リグニン溶液を 50 °C で 4 時間攪拌しながら加熱し、ナス型二口フラスコは液体窒素に浸した。溶媒を除去した後、0.4 mg の粉末を回収し、SEC と FT-IR 分析に供した。



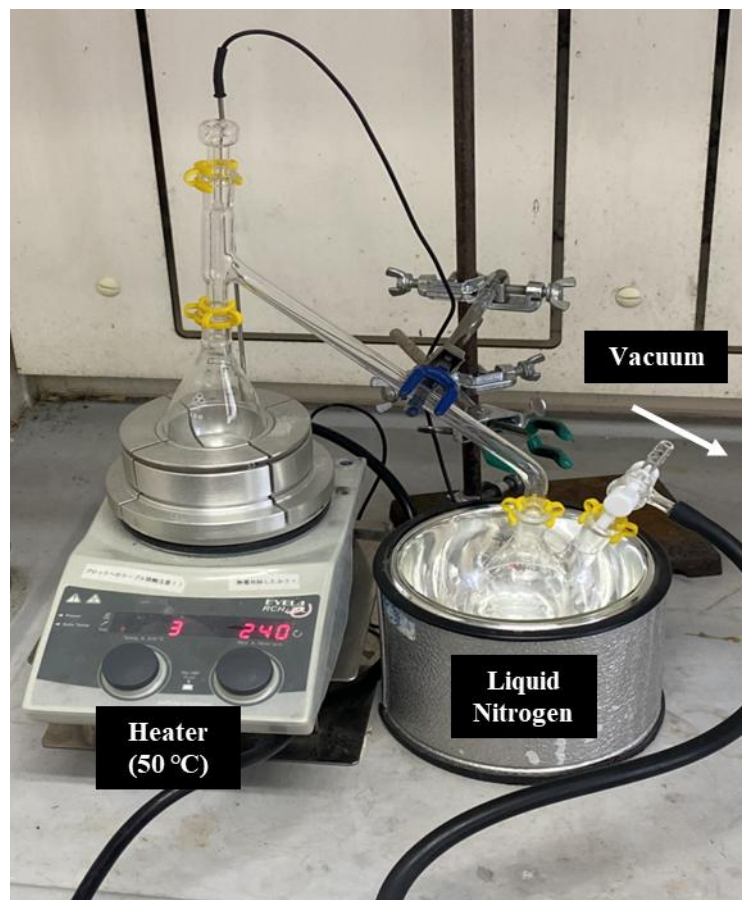


図2.1.2. Cryovapシステム

#### 2.2.2.5.1 サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) 分析

前項で得たリグニン粉末を 0.5% (w/v) の LiBr を含む DMF 100  $\mu$ L に溶かし、0.45  $\mu$ m $\Phi$  のポリテトラフルオロエチレン (PTFE) 膜 (アドバンテック東洋株式会社、東京、日本) でろ過した。SEC 分析は、フォトダイオードアレイ検出器を備えた L-7000 シリーズ高速液体クロマトグラフ (Chromaster、株式会社日立ハイテク、東京、日本) で行った。溶離液は 0.5% (w/v) LiBr/DMF であり、流速は 0.6 mL/min と設定した。カラムはガードカラム (GPC KD-G、株式会社レゾナック、東京、日本) と 2 本の SEC カラム (GPC KD-803) を直列に連結して、カラムオープンの温度を 50  $^{\circ}$ C に設定した。試料注入量は 20  $\mu$ L とした。分子量が 580 から 995,600 g/mol までの 12 種類のポリスチレン (PS) 標準物質 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, USA) を使って、分子量校正曲線を作成した。

#### 2.2.2.5.2 赤外分光 (FT-IR) 分析

未照射リグニン粉末と、O<sub>2</sub> および Ar 雰囲気下で 12 時間 UV 照射したリグニン溶液から得た粉末を、FT-IR に供した。測定は減衰全反射 (ATR PRO-450-S、日本分光株式会社、東京、日本) を装着したフーリエ変換赤外分光光度計 (FT/IR-4100) で行った。積算回数 128 回、分解能 4  $\text{cm}^{-1}$  の条件で測定した。スペクトルは、650 から 4000  $\text{cm}^{-1}$  までの波数範囲とした。リグニンのメトキシ基 C-H 非対称屈曲に帰属される 1455  $\text{cm}^{-1}$  のバンドでスペクトル全体を正規化した (Schwanninger *et al.* 2004)。

## 2.3 結果と考察

### 2.3.1 リグニン溶液の指紋蛍光

30 mg/L の MWL/プロピレングリコール溶液の励起光 (Ex) と、それに対する蛍光の関係を知るために、指紋蛍光を測定した。図 2.2.1 に、MWL の 1 回目および 2 回目測定の指紋蛍光を示す。1 回目の測定 [図 2.2.1 (a)] では、280 nm の Ex で、360 nm に  $Em_{max}$  が観測

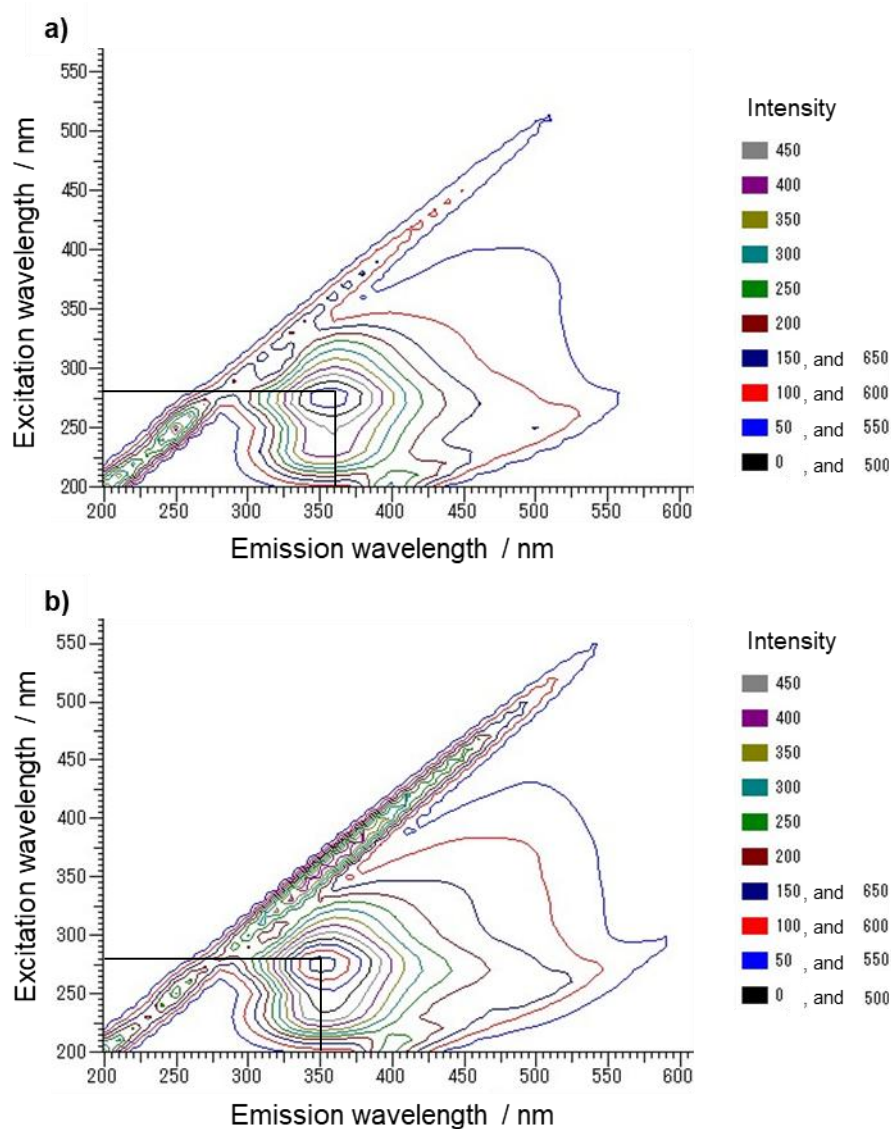


図 2.2.1 30 mg/mL の MWL/プロピレングリコール溶液の指紋蛍光 (a) 1 回目測定と (b) 2 回目測定。等高線の色は図の右に列挙された FI 値に対応する。2 回目測定は、測定 1 回目終了直後に実施した。Ex と Em の値が一致する図の対角線領域に検出された蛍光は 1 次光を表し、リグニン自家蛍光とは無関係である。

され、その FI は 580 であった。ここで、この分光光度計では、FI は無名数として表示されるため、本論文でも強度には単位を付さない。初回測定直後に、2 回目を測定すると、Ex 280 nm で  $Em_{max}$  350 nm が観測され、FI は 670 となった [図 2.2.1 (b)]。すなわち、Ex は変わらないが、2 回目は FI と  $Em_{max}$  が増加した。このように、指紋蛍光測定では  $Em_{max}$  を与える Ex の照射は約 2 分と短時間であるが、Ex や FI に有意な変化をもたらしたため、MWL の構造変化を引き起こすことが予期された。

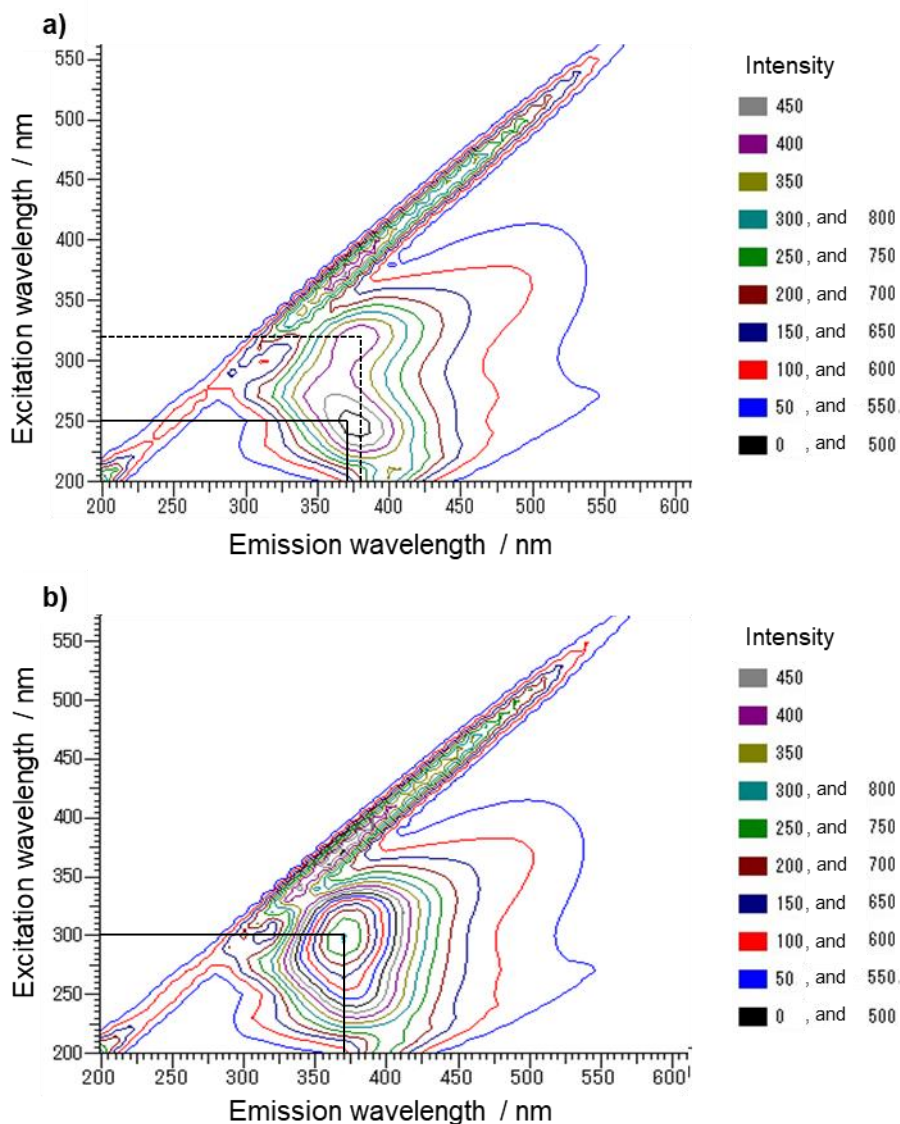


図 2.2.2 30 mg/mL の SKL/プロピレングリコール溶液の指紋蛍光 (a) 1 回目測定と (b) 2 回目測定。等高線の色は図の右に列挙された FI 値に対応する。2 回目測定は、測定 1 回目終了直後に実施した。Ex と Em の値が一致する図の対角線領域に検出された蛍光は 1 次光を表しリグニン自家蛍光とは無関係である。

SKL/プロピレングリコール溶液も、同様に指紋蛍光を測定した (図 2.2.2)。初回測定では、Ex 250 nm、Em<sub>max</sub> 370 nm で観測された最大蛍光ピーク (FI = 528) に加えて、Ex 320 nm、Em 380 nm に 2 番目の蛍光強度 (FI = 442) を与えるピークが示された。2 回目の測定では、蛍光ピークは 1 つとなり、それは Ex 300 nm、Em<sub>max</sub> 370 nm (FI = 807) で観測された。この結果も、励起光の波長の影響が大きいかは不明だが、指紋蛍光測定により SKL の構造変化が起きることを暗示している。そこで、励起光を長時間当てて、その間の蛍光スペクトル変化を追跡することにした。SKL は MWL とは異なる指紋蛍光のピークを示したが、両者を比較するために、MWL の Ex 280 nm を次の実験では用いた。

### 2.3.2 280 nm の励起光を照射した MWL 溶液の蛍光スペクトル変化

O<sub>2</sub> または Ar 雰囲気下で、MWL 溶液に 280 nm の励起光を連続的に照射し、その蛍光スペクトルを 10 分毎に測定した。O<sub>2</sub> 雰囲気下で得られた蛍光スペクトルを、図 2.2.3.1 から 2.2.3.4 に示す。また、Ar 雰囲気下で得られたスペクトルを、図 2.2.4.1 から 2.2.4.4 に示す。O<sub>2</sub> 雰囲気下において、初回測定の Em<sub>max</sub> は 364 nm で、その FI は 731 であった [図 2.2.3.1 (a)]。僅か UV 照射 10 min で、Em<sub>max</sub> は 2.8 nm 青方偏移し、FI は 14%減少した。この Em<sub>max</sub> と FI の減少傾向は、照射時間 2 時間 30 分まで継続した [図 2.2.3.1 (c)]。2 時間 30 分を超えると 12 時間まで Em<sub>max</sub> と FI はほとんど変化しなかった。しかし、430 nm 以上の Em において、その FI が増加する傾向を示した (図 2.2.3.1~図 2.2.3.4)。

一方、Ar 雰囲気下では、照射開始時の Em<sub>max</sub> は 365 nm で、その FI は 862 であった [図 2.2.4.1 (a)]。Em<sub>max</sub> は照射 3 時間 50 分まで赤方偏移を示し、その FI は増加した [図 2.2.4.2 (d)]。同時に、Em=350 nm 付近に照射 10 分からショルダーが出現し、その FI も 3 時間 50 分まで増加した。照射 4 時間では、このショルダーがピークを示すようになり、長波長側にあったピークより大きな FI を示した。よって、4 時間以降は、このピークが Em<sub>max</sub> となった。

以上の結果をより明確に可視化するために、Em<sub>max</sub> とその FI の時間変化を図 2.2.5 にまとめた。この測定は 3 反復行ったため、1 回目の測定結果を丸印、2 回目の結果を三角印、そ

して3回目の結果を四角印で記している。図 2.2.5 (a) には、 $E_{m_{max}}$  の変化を示し、Ar 雰囲気下において得られた  $E_{m_{max}}$  は黒色で示している。この黒色の印は、いずれの測定でも、照射4時間で急激な短波長シフトを示している。これは前述の通り、最大蛍光強度与える  $E_{m_{max}}$  が、新たに出現した低波長側の  $E_{m_{max}}$  に移動したためである。図 2.2.5 (b) は、 $E_{m_{max}}$  における FI の時間変化がプロットされ、Ar 雰囲気での4時間照射までの結果は黒点で示している。4時間以降はそれまで  $E_{m_{max}}$  を示していたピークの FI を橙色で示し、新たなピークの FI を青色で示した。1回目の測定の FI は、3時間10分からピーク移動が起きていたため、この測定に限り3時間10分以降の FI を青色丸印と橙色丸印で示している。図から明らかな様に、FI は青色と橙色とも単調に減少した。これらの結果から、UV 照射 (280 nm の励起光) は、不活性ガス中でも蛍光スペクトルに顕著な変化をもたらした。このことより、UV 照射が MWL の構造変化を引き起こしていることが示唆された。

一方で、 $O_2$  雰囲気下での  $E_{m_{max}}$  およびそれに対応する FI は、図 2.2.5 中で赤い印で記されている。丸印などの意味は、Ar 雰囲気下と同じである。 $O_2$  雰囲気下における  $E_{m_{max}}$  は、Ar 雰囲気下で観測されたような低波長側の新たなピーク出現ないため、照射直後からの短波長側へのシフトと、その後の僅かな長波長側へのシフトを示した [図 2.2.5 (a)]。また、FI は、若干の減少とそれに続く増加を示した。これは、Ar 雰囲気下と比べて逆な挙動であった。これらのことから、 $O_2$  雰囲気下では、UV 照射による MWL 構造変化に加え、 $O_2$  が関与する構造変化も生じていることが示唆された。

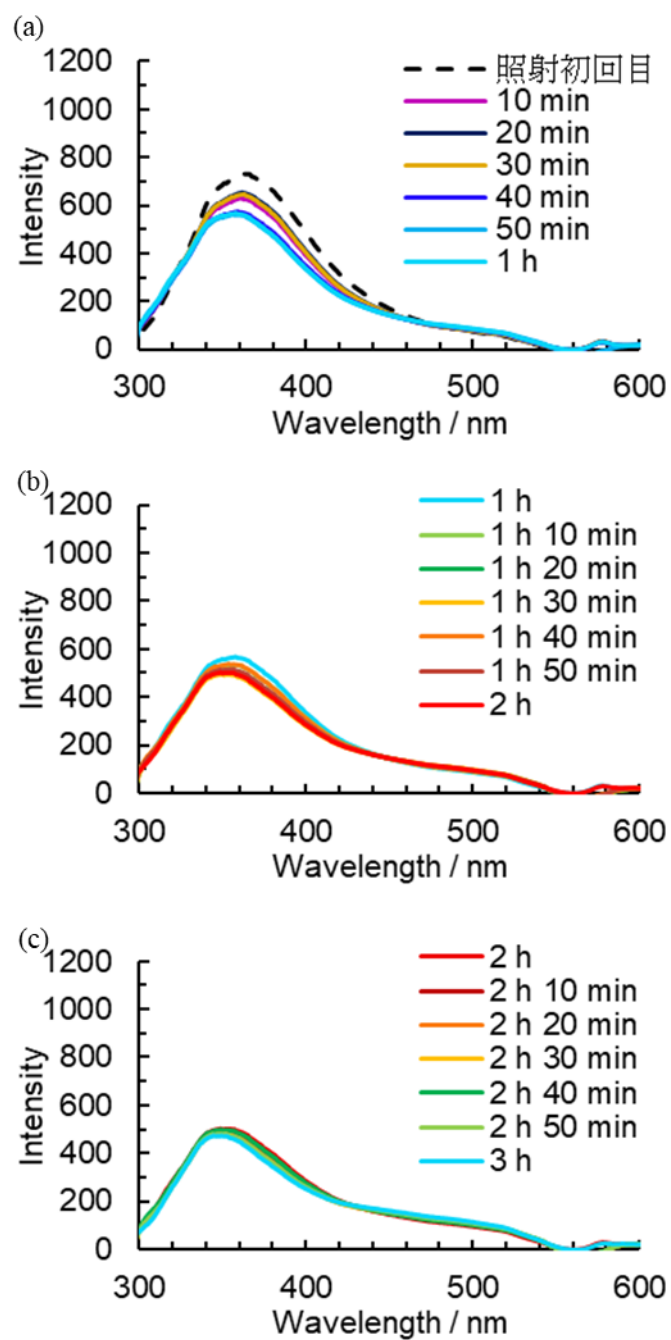


図 2.2.3.1.  $O_2$  雰囲気下で、280 nm の励起光 (Ex) を連続照射した MWL 溶液の  
 蛍光スペクトル変化 (a) 照射初回目 ~ 1 h、(b) 1 h ~ 2 h、(c) 2 h ~ 3 h。

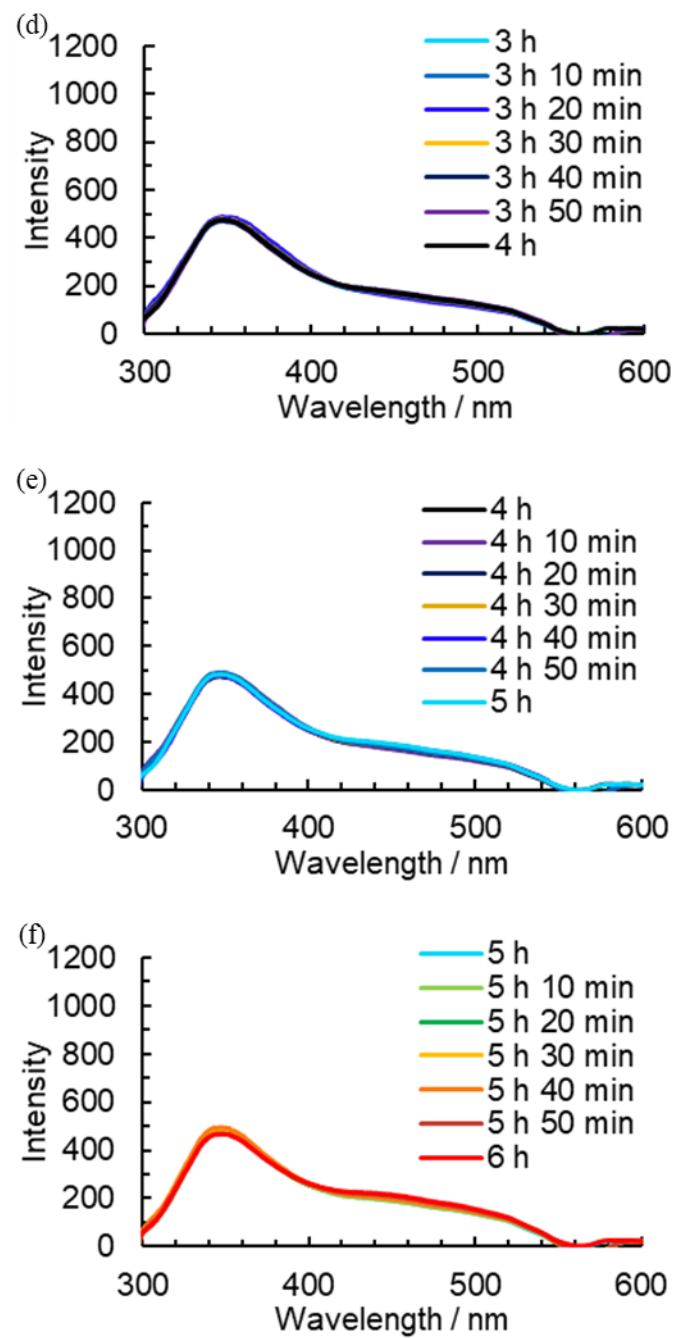


図 2.2.3.2.  $O_2$  雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した MWL 溶液の  
蛍光スペクトル変化 (d) 3 h ~ 4 h、(e) 4 h ~ 5 h、(f) 5 h ~ 6 h。



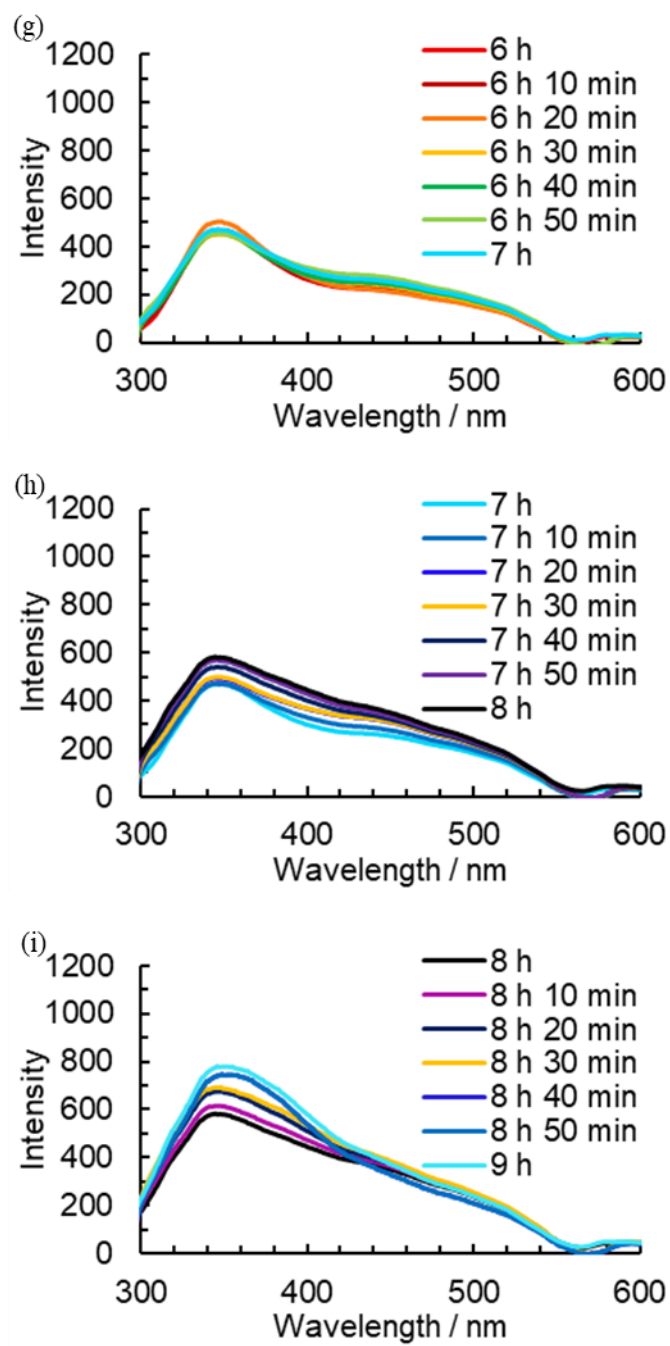


図 2.2.3.3.  $O_2$  雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した MWL 溶液の  
蛍光スペクトル変化 (g) 6 h ~ 7 h、(h) 7 h ~ 8 h、(i) 8 h ~ 9 h。

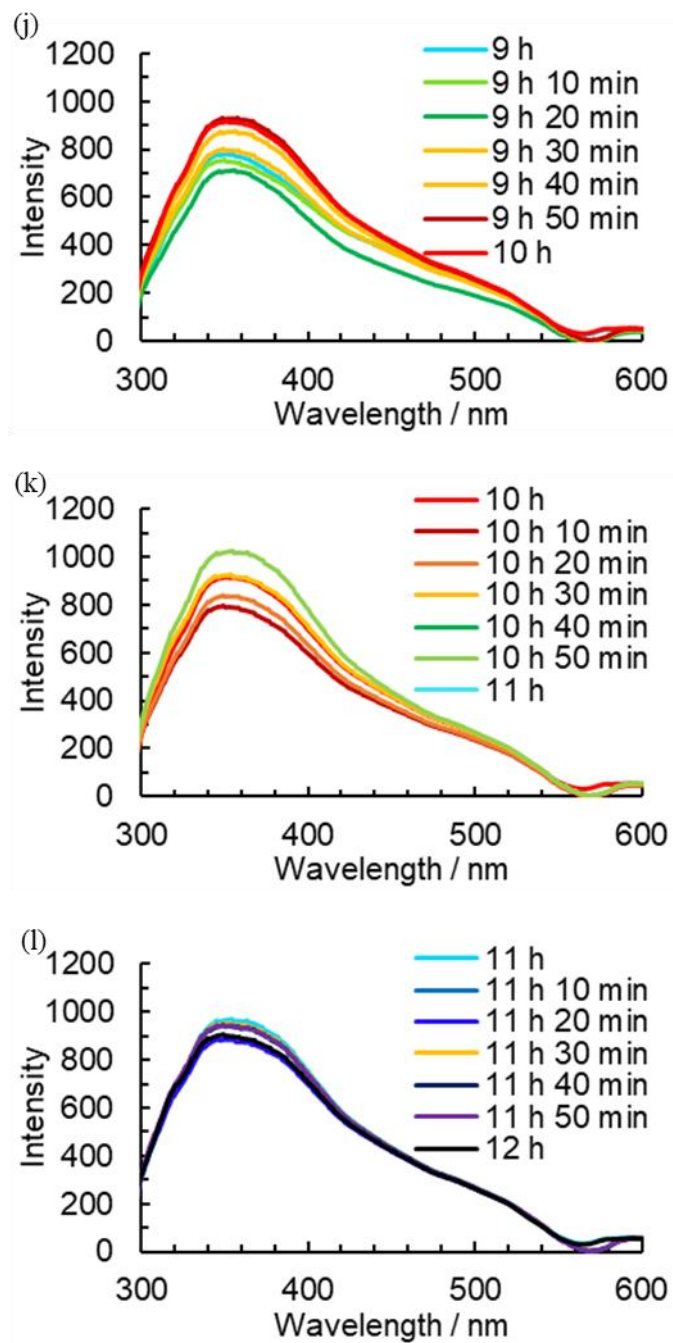


図 2.2.3.4.  $O_2$  雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した MWL 溶液の  
 蛍光スペクトル変化 (j) 9 h ~ 10 h、(k) 10 h ~ 11 h、(l) 11 h ~ 12 h。

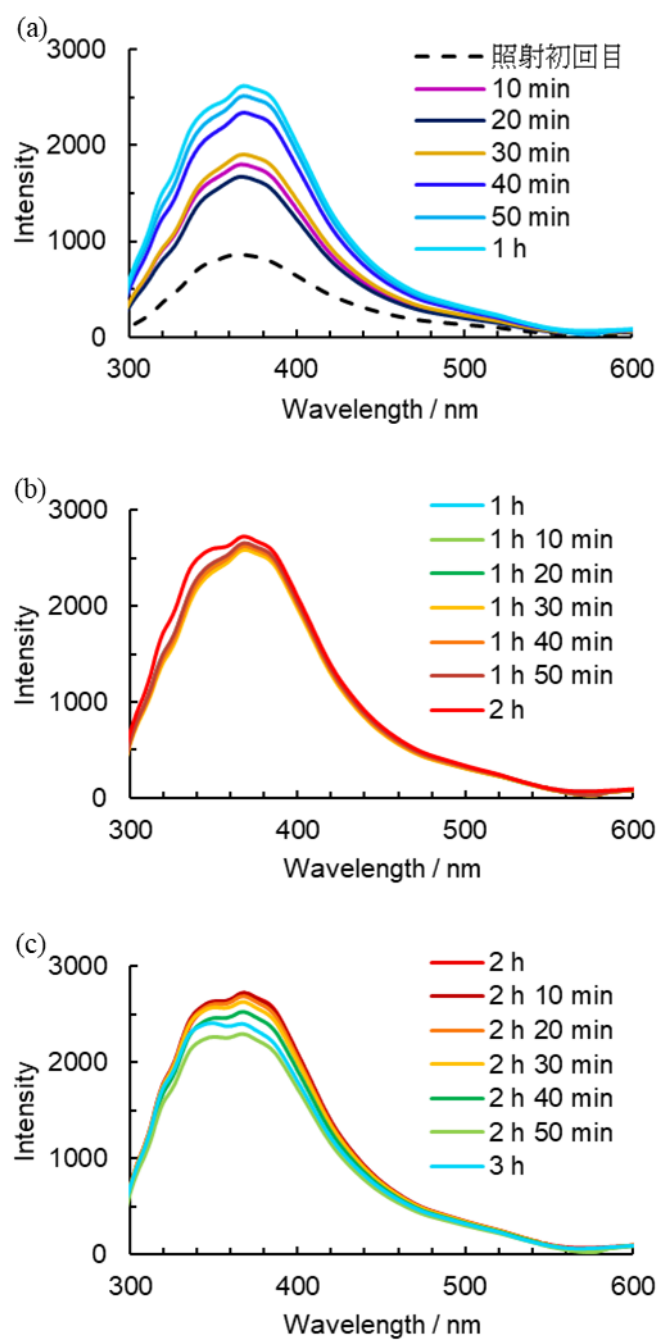


図 2.2.4.1. Ar 雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した MWL 溶液の  
 蛍光スペクトル変化 (a) 照射初回目～1 h、(b) 1 h～2 h、(c) 2 h～3 h。

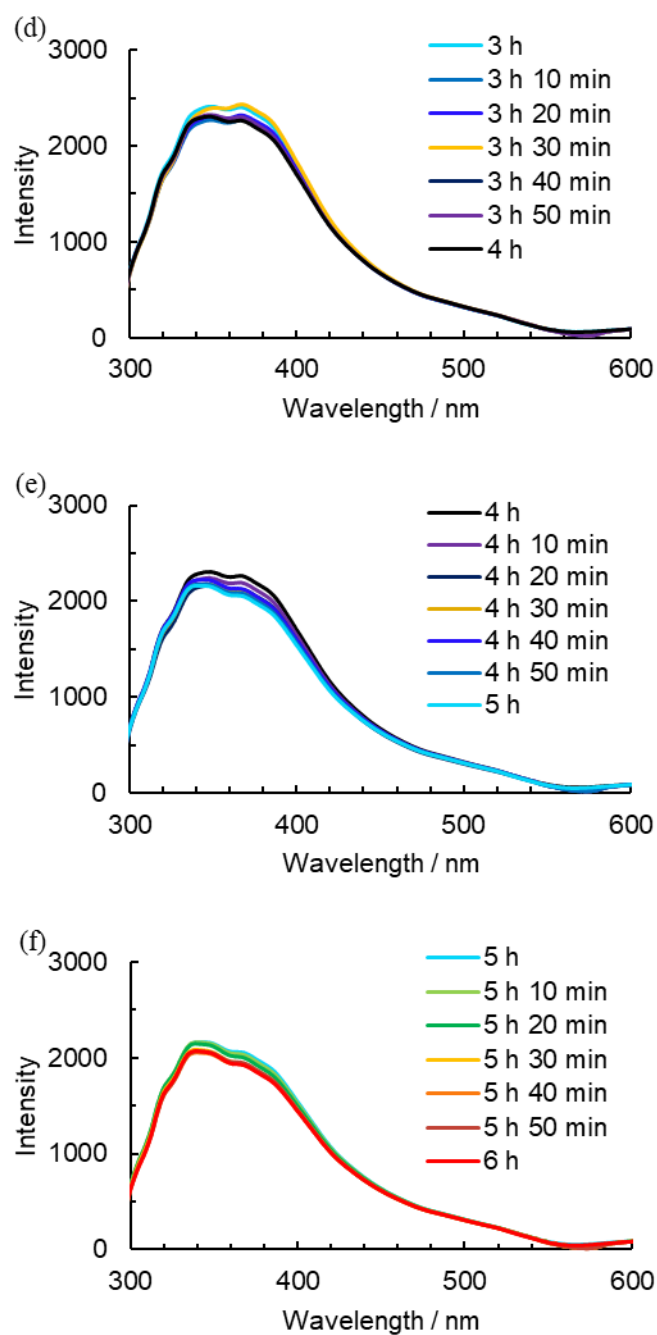


図 2.2.4.2. Ar 雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した MWL 溶液の  
 蛍光スペクトル変化 (d) 3 h ~ 4 h、(e) 4 h ~ 5 h、(f) 5 h ~ 6 h。

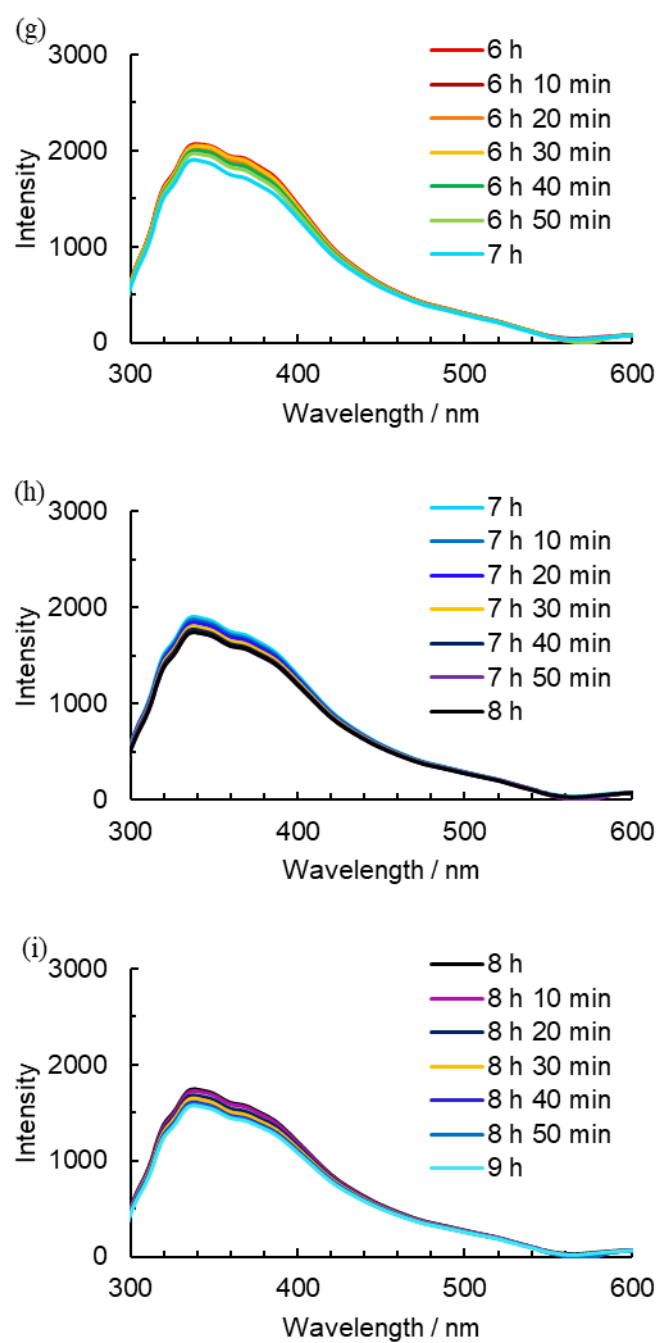


図 2.2.4.3. Ar 雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した MWL 溶液の  
蛍光スペクトル変化 (g) 6 h ~ 7 h、(h) 7 h ~ 8 h、(i) 8 h ~ 9 h。

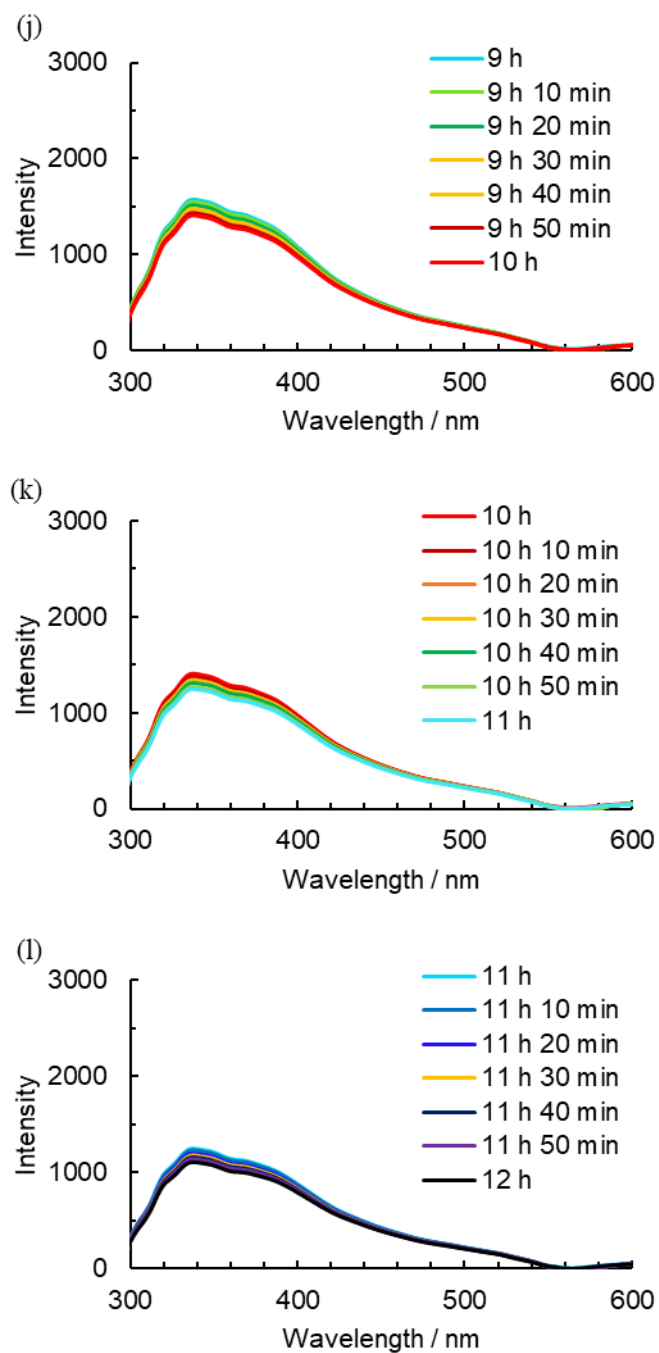


図 2.2.4.4 Ar 雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した MWL 溶液の  
 蛍光スペクトル変化 (j) 9 h ~ 10 h、(k) 10 h ~ 11 h、(l) 11 h ~ 12 h。

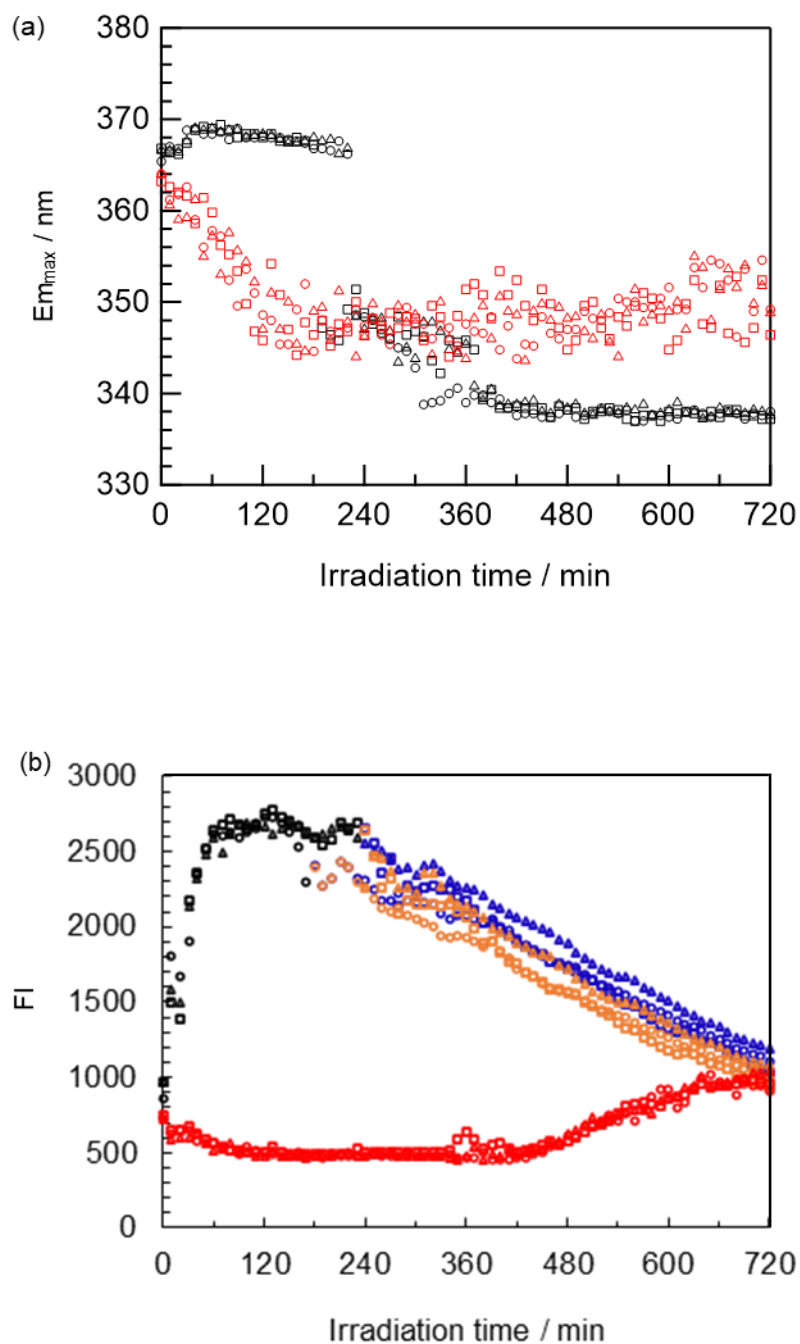


図 2.2.5.  $O_2$  および Ar 雰囲気下で、Ex 280 nm を連続照射した MWL 溶液の最大蛍光を示す (a) 波長 ( $E_{m_{max}}$ ) と (b) その蛍光強度 (FI)。赤の記号は、酸素雰囲気、黒の記号は Ar 雰囲気の結果を示す。(b) では、Ar 雰囲気下で最初の  $E_{m_{max}}$  の FI を、照射 4 時間以降は青色で、また、新たに  $E_{m_{max}}$  として得られた FI を橙色で示す。この測定は 3 反復行い、1 回目の測定は丸、2 回目の測定は三角、そして 3 回目の測定は四角で結果を示す。

### 2.3.3 280 nm の励起光を照射した MWL 溶液の吸光スペクトル

紫外線照射時の蛍光スペクトルと紫外線吸収スペクトルの関係調べるために、280 nm の励起光を照射した MWL 溶液の紫外線吸収スペクトルを測定した。Em<sub>max</sub> の青方偏移が完了した時点、すなわち O<sub>2</sub> 雰囲気下で 2 時間 30 分、Ar 雰囲気下で 4 時間照射した MWL 溶液の吸光スペクトルを、図 2.3 (a) と (b) にそれぞれ示す。図 2.3 には、未照射試料および 12 時間照射後の試料のスペクトルも掲載した。未照射 MWL 溶液は 280 nm でピークとなる極大吸光度を示し、これは MWL の指紋蛍光 (図 2.2.1) から予想できる結果であった。O<sub>2</sub> 雰囲気下で 2 時間 30 分照射された試料溶液は、未照射に比べ吸光度は 40% 減少し、ピークがショルダーに変化した [図 2.3 (a)]。12 時間照射では、2 時間 30 分照射と比較して 280 nm における吸光度は 22% 増加した。吸光度が増加すると励起エネルギーが大きくなり、基底状態に戻るときに多くの蛍光を発することが、単純な吸光度と蛍光の関係といえる。したがって、O<sub>2</sub> 雰囲気下で、2 時間 30 分以降の吸光度の増加したことにより、Em<sub>max</sub> の FI も増加したと考えられる。

一方、Ar 雰囲気下で 4 時間照射された試料溶液は、未照射試料と同じ極大吸収波長 (280 nm) を示したが、吸光度は 35% 減少していた [図 2.3 (b)]。図 2.2.5 (b) の蛍光測定では、FI は 4 時間以降で増加していたので、吸光度の減少とは、矛盾する挙動といえる。よって、この吸光度と蛍光測定から、Ar 雰囲気下での励起光照射は、特に、4 時間以降は、蛍光強度を増加させるような新たな蛍光発色団の生成を示唆していると考えられる。

12 時間照射後の試料では、極大吸収波長が 269 nm と低波長側にシフトしたが、280 nm の吸光度は 4 時間照射試料より著しく増加した。蛍光測定において Em<sub>max</sub> が低波長側にシフトしたことと、その FI が減少したことも考慮すると、これらの結果は、280 nm を吸収する発色団の分解を示唆している。したがって、この不活性ガス雰囲気下の吸光度測定の結果も、UV 照射がリグニンの構造を変化させていることを示したので、リグニン溶液の濃度測定のための蛍光および吸光度測定は、極めて短時間内に完了させるべきとの注意点が明らかに



なった。

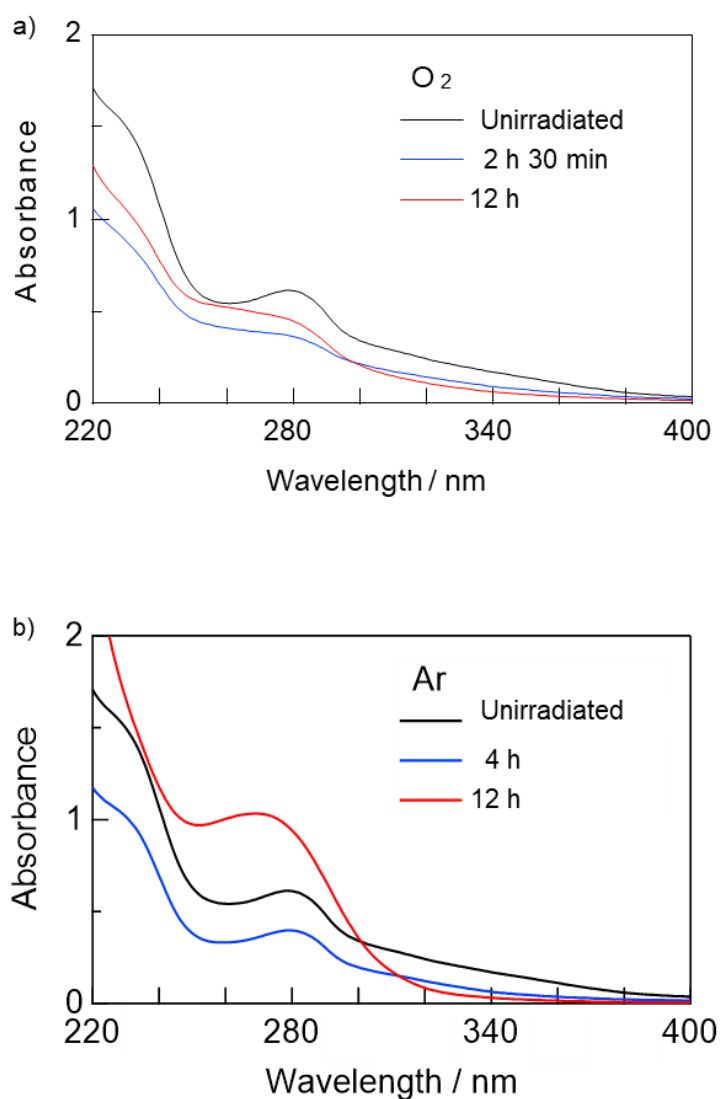


図 2.3. 未照射MWL溶液とUV 280 nm を (a) O<sub>2</sub>雰囲気下で2時間30分、12 時間照射したMWL 溶液と (b) Ar雰囲気下で4時間、12時間照射したMWL溶液のUV吸収スペクトル。

#### 2.3.4 励起光を照射した溶液中の MWL の構造変化

UV 照射した MWL の構造変化を調べるために、SEC 分析と FT-IR 分析を行った。本来であれば、核磁気共鳴法 (NMR) のような詳細な構造解析できる測定法を用いるべきであるが、蛍光測定用石英セルを使った照射系では照射 1 回あたり 75  $\mu$ g と限られた量しか調製

できない。NMR 測定に必要な 30 mg を、全試料分調達するには約 2 年半かかるために、非現実的と思われた。そこで、高照度な光源を用いて溶液調製の大量化を試みたけれども、照射した溶液の蛍光スペクトルが蛍光分光光度計の光源で照射した溶液のスペクトルと異なったため、大量調製もできず、NMR 測定は断念した。

構造解析する前に、2.2.2.5 のように、MWL 溶液の溶媒である難揮発性のプロピレングリコールを、Cryovap 改良法で除去した。残渣の粉末を溶離液に溶かして、SEC 分析に供した。SEC 分析は、未照射 MWL、2 時間 UV 照射した MWL、そして 12 時間 UV 照射した MWL に対して行った。ここで、改めて照射時間について説明する。照射 2 時間は、 $O_2$  雰囲気下では、FI の減少終了時点であり、Ar 雰囲気下では、FI の増加が終了する時点で [図 2.2.5 (b)]、ある構造変化の区切りの照射時間と考えた。これら MWL 試料のサイズ排除クロマトグラムを図 2.4 に示す。また、このクロマトグラムから求めたポリスチレンに対する相対的な数平均分子量 ( $M_n$ )、重量平均分子量 ( $M_w$ )、およびクロマトグラム中のピークの分子量 ( $M_p$ ) を表 2.1 に記す。

Ar 雰囲気下では、照射 12 時間まで全ての分子量 ( $M_n$ ,  $M_w$ , と  $M_p$ ) が単純に減少した[図 2.4 (b)]。不活性ガスがリグニン構造に影響を与えないと仮定すると、この結果は、UV 照射が MWL に対し光分解を生じさせていること (Argyropoulos and Sun 1996; Davidson 1996) を、示している。対照的に、 $O_2$  雰囲気下では照射 2 時間後に  $M_p$  が著しく減少し、その結果、 $M_n$  と  $M_w$  も減少した [図 2.4 (a)]。これも照射初期には、光分解が起きていることを示唆している。しかし、照射 12 時間では、照射 2 時間より  $M_p$  が増加し、光重合の可能性が示唆された。この  $O_2$  雰囲気下の分子量変化は、次のように説明できる。照射初期は、UV 光による一電子開裂により低分子化するが、2 時間後は、MWL 溶液中に溶存する  $O_2$  分子の 2 個の不對電子が、UV 光により生成したリグニンのラジカルと反応して、分子量の増加を引き起こした。または、 $O_2$  分子の不對電子が、更なるリグニンのラジカル生成に関与し、その結果、

リグニン中のラジカルカップリングが高頻度で起き高分子化したと考えられる。

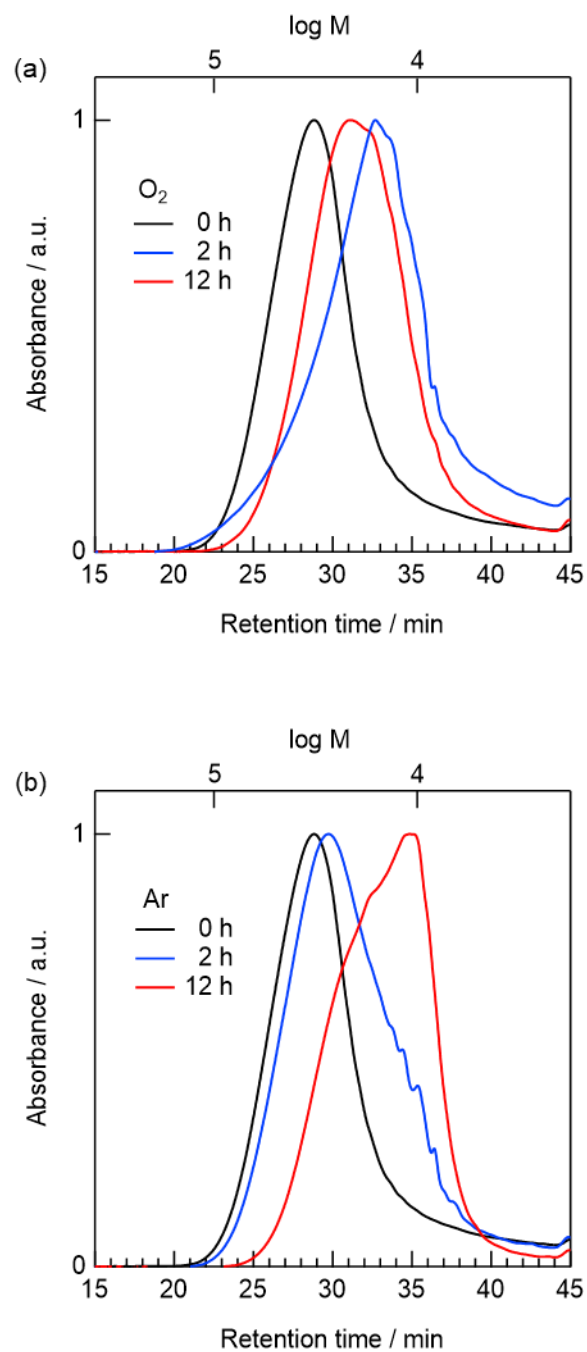


図 2.4. UV検出器を用いたSECにより測定した、(a)  $O_2$ と (b)  $Ar$ 雰囲気下で、UVを2時間照射、12時間照射したMWLと未照射MWLの分子量分布。

表 2.1. 未照射リグニンと O<sub>2</sub> と Ar 雰囲気下で 280 nm の UV 照射した MWL と SKL の分子量分布。

|                  | Atmosphere gas | Irradiation time (h) | $M_p (\times 10^4 \text{ g/mol})$ | $M_n (\times 10^4 \text{ g/mol})$ | $M_w (\times 10^4 \text{ g/mol})$ | $DP$ |
|------------------|----------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------|
| Unirradiated MWL |                | 0                    | 3.37                              | 1.88                              | 3.64                              | 1.93 |
| Irradiated MWL   | O <sub>2</sub> | 2                    | 1.55                              | 1.11                              | 2.00                              | 1.80 |
|                  |                | 12                   | 2.13                              | 1.38                              | 2.36                              | 1.70 |
|                  | Ar             | 2                    | 2.82                              | 1.64                              | 2.73                              | 1.67 |
|                  |                | 12                   | 1.00                              | 1.18                              | 1.78                              | 1.51 |
| Unirradiated SKL |                | 0                    | 1.24                              | 7.79                              | 1.71                              | 2.20 |
| Irradiated SKL   | O <sub>2</sub> | 2                    | 2.61                              | 14.1                              | 2.79                              | 1.96 |
|                  |                | 12                   | 1.52                              | 9.81                              | 1.86                              | 1.90 |
|                  | Ar             | 2                    | 1.56                              | 12.4                              | 3.01                              | 2.43 |
|                  |                | 12                   | 1.50                              | 11.1                              | 2.71                              | 2.43 |

図 2.5 は、未照射 MWL と、O<sub>2</sub>および Ar 雰囲気下で 12 時間照射した MWL の FT-IR スペクトルである。この図は、600-4000 cm<sup>-1</sup>の全波数領域のスペクトルと、その指紋領域のスペクトルを含む。未照射の MWL は、1710 cm<sup>-1</sup>に吸収バンドを示し、これはカルボニル基に帰属された (Schwanninger *et al.* 2004)。また、1510 cm<sup>-1</sup>と 1597 cm<sup>-1</sup>に明確なバンドが認められ、これらは芳香環に帰属された。

Ar 雰囲気下での UV 照射により、1510 cm<sup>-1</sup> のバンドの吸光度は減少し、非共役カルボニル基に由来する 1710 cm<sup>-1</sup> のバンドの吸光度が大幅に増加した。一方、O<sub>2</sub> 雰囲気下で照射した MWL では、1710 cm<sup>-1</sup> の吸光度が、未照射の MWL と Ar 雰囲気下で照射した MWL の中間的な値となった。このことは、Clemens von Sonntag が報告している、2 級アルコールが UV 照射によってホモ解離し、カルボニル基を生成するという現象を反映していると思われる (Sonntag 1968)。さらに、Uwe Müller らが報告している、β-O-4'結合の開裂によるカルボニルの生成も起きていることが考えられる (Müller *et al.* 2003)。これまでの報告

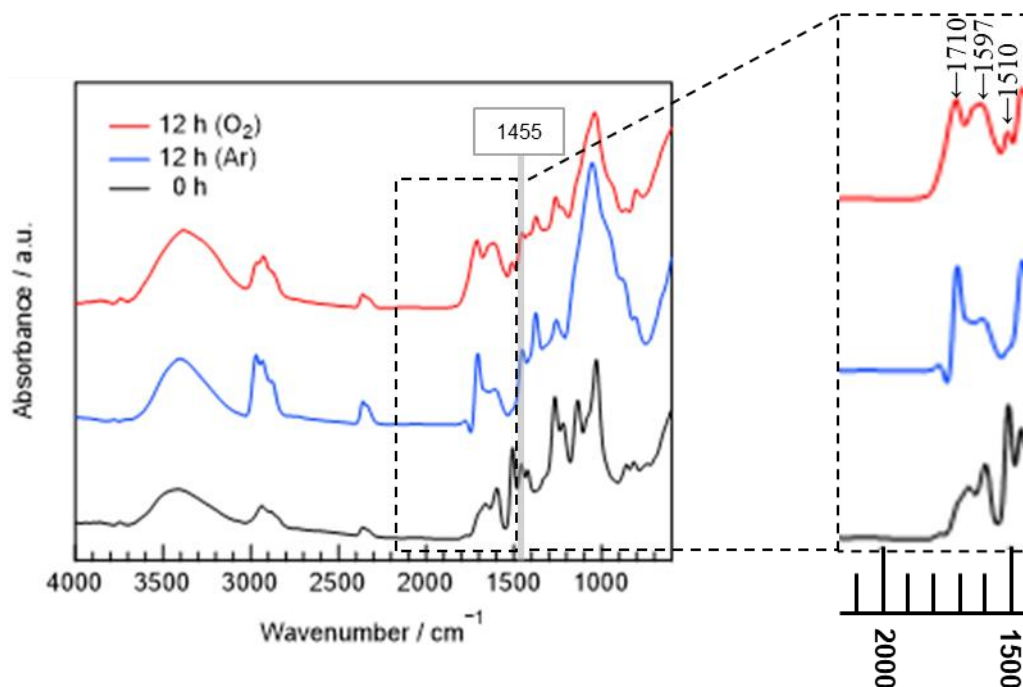


図 2.5. O<sub>2</sub> (赤色) と Ar (青色) 雰囲気下で 12 時間 UV 照射した MWL と未照射 MWL (黒色) の FT-IR スペクトル。全スペクトルを 1455 cm<sup>-1</sup> のバンドで正規化。

も考慮すると、UV 照射はリグニンにカルボニル基を生成させると結論付けられる。

### 2.3.5 280 nm の励起光を照射した SKL 溶液の蛍光スペクトル変化

O<sub>2</sub> および Ar 雰囲気下で、280 nm の励起光を 12 時間連続照射した SKL 溶液の蛍光スペクトルを測定した。O<sub>2</sub> 雰囲気下で得られた蛍光スペクトルを、図 2.6.1.1 から 2.6.1.4 に示す。MWL と同様に、SKL でも、これらの時間変化を図 2.6.3 に示す。図 2.6.3 (a) は、Em<sub>max</sub> の経時変化で、図 2.6.3 (b) は FI の変化であり、O<sub>2</sub> 雰囲気下でのデータは赤い印で示している。O<sub>2</sub> 雰囲気下では、初回測定の SKL の蛍光スペクトルの Em<sub>max</sub> は 383 nm で、その FI は 1035 であった [図 2.6.1.1 (a)]。UV 照射僅か 10 分間で、Em<sub>max</sub> は 7.6 nm 青方偏移し、その FI は 34%減少した。この変化は、照射 6 時間 40 分まで継続した [図 2.6.1.3 (g)]。その後照射 12 時間まで、Em<sub>max</sub> は赤方偏移を示すようになり、その FI も増加した [図 2.6.1.4 (l)]。この経時変化は、O<sub>2</sub> 雰囲気下における MWL の変化と類似していた。

Ar 雰囲気下での蛍光スペクトルを図 2.6.2.1 から 2.6.2.4 に示し、Em<sub>max</sub> とその FI の経時変化は図 2.6.3 中の黒印で示す。Ar 雰囲気下では、照射 50 分まで Em<sub>max</sub> の青方偏移を示し、FI は増加した [図 2.6.2.1 (a)]。ここで、O<sub>2</sub> 雰囲気と Ar 雰囲気を比較すると、Em<sub>max</sub> の青方偏移は同じであるが、FI の増加が異なる現象である。50 分以降は、Em<sub>max</sub> は変化しなかったが、FI は経過時間とともに単調に増加した [図 2.6.2.1 ~ 2.6.2.4]。図 2.6.3 は、O<sub>2</sub> 雰囲気と Ar 雰囲気の違い明確に表している。ここで、Ar 雰囲気 MWL と比較すると、MWL は FI の増加とその後の減少を示したのに対し、SKL では FI の単調増加という違いがあった。これらの結果は、ガス雰囲気だけでなくリグニンの調製法も、蛍光スペクトル変化に影響を与えることが明確となった。

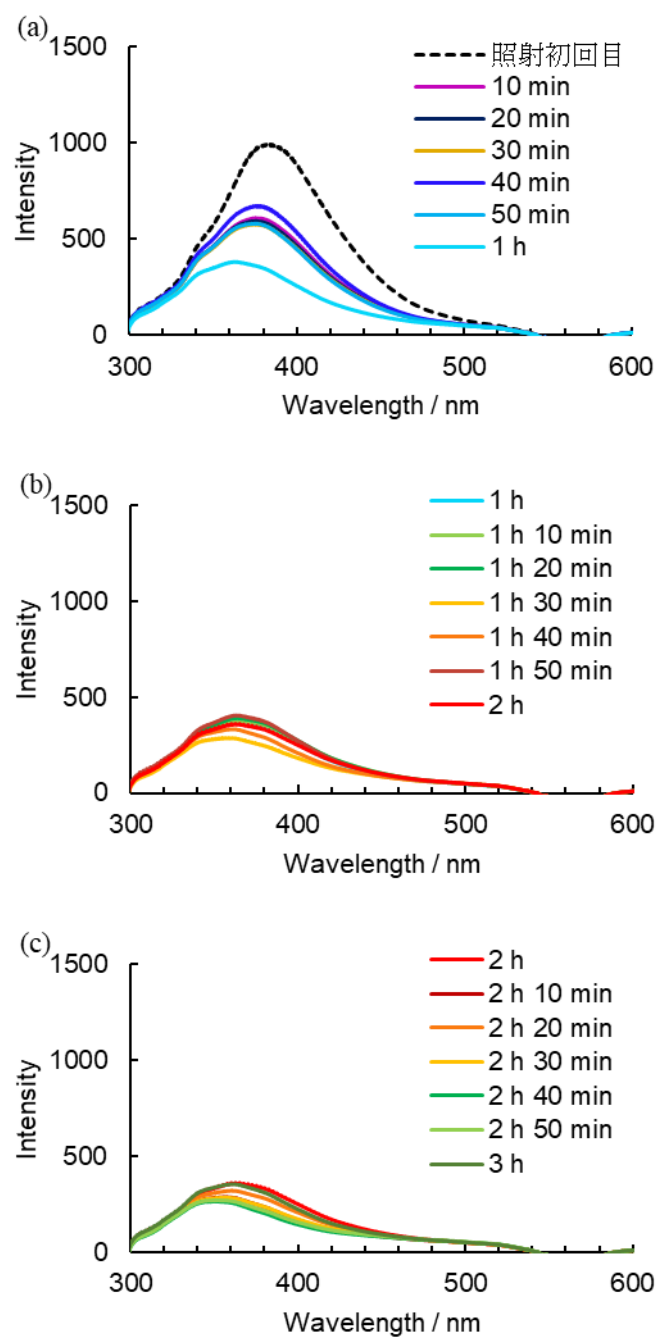


図 2.6.1.1.  $O_2$  雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した SKL 溶液の  
蛍光スペクトル変化 (a) 照射初回目 ~ 1 h、(b) 1 h ~ 2 h、(c) 2 h ~ 3 h。

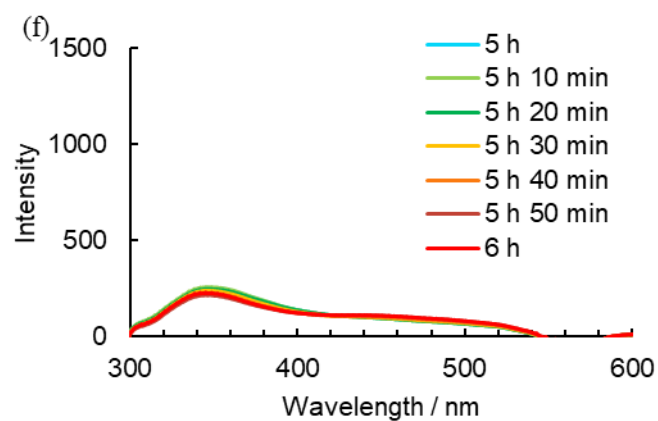
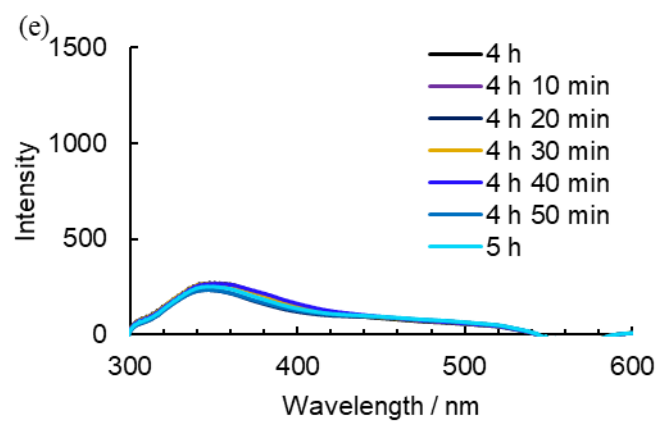
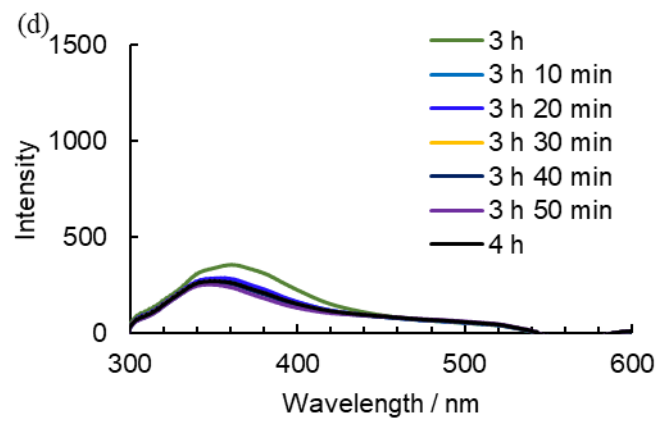


図 2.6.1.2.  $O_2$  雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した SKL 溶液の  
蛍光スペクトル変化 (d) 3 h ~ 4 h、(e) 4 h ~ 5 h、(f) 5 h ~ 6 h。



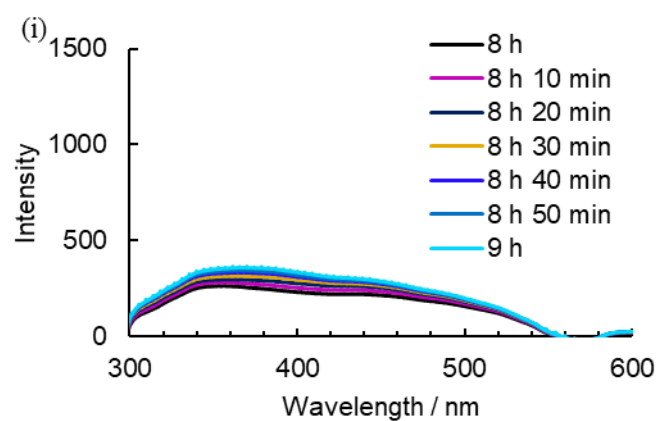
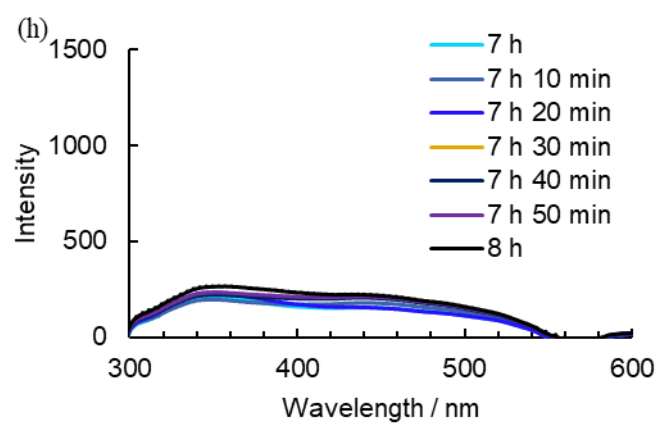
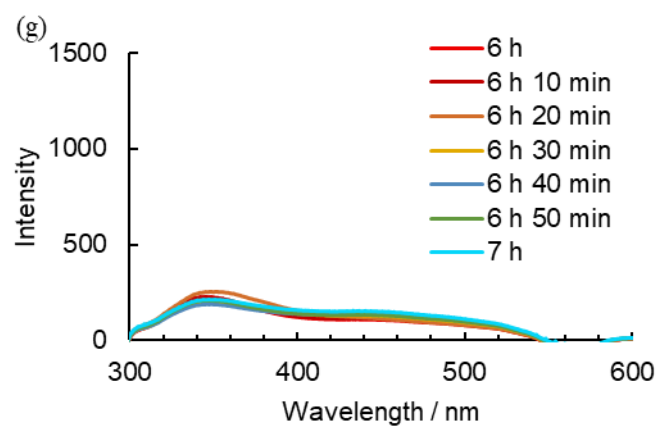


図 2.6.1.3.  $O_2$  雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した SKL 溶液の  
蛍光スペクトル変化 (g) 6 h ~ 7 h、(h) 7 h ~ 8 h、(i) 8 h ~ 9 h。

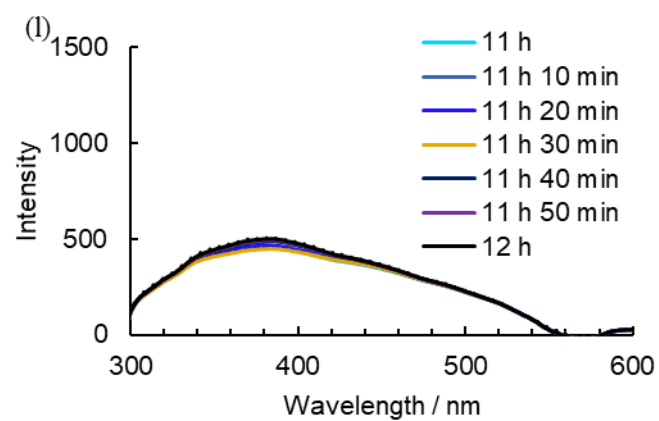
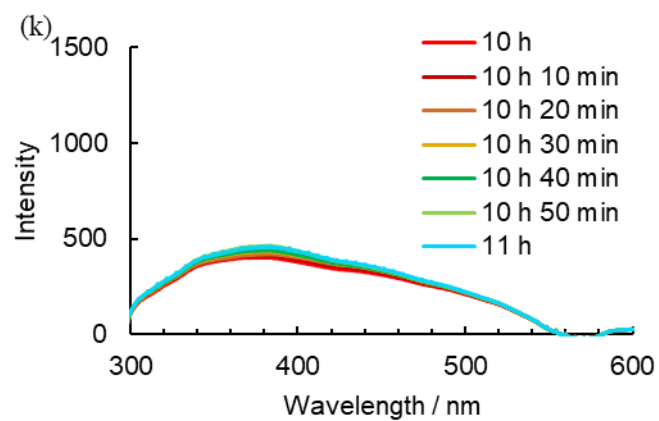
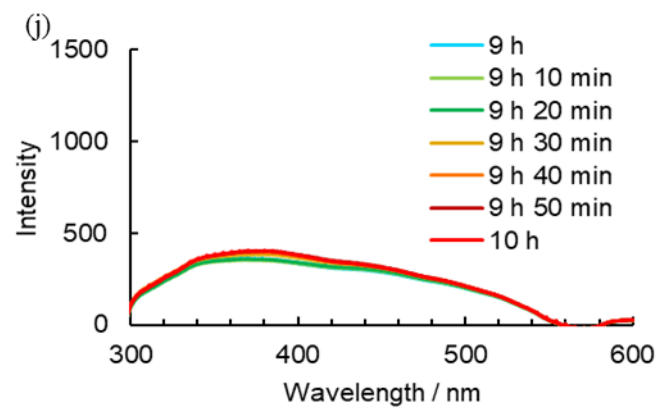


図 2.6.1.4.  $O_2$  雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した SKL 溶液の  
蛍光スペクトル変化 (j) 9 h ~ 10 h、(k) 10 h ~ 11 h、(l) 11 h ~ 12 h。

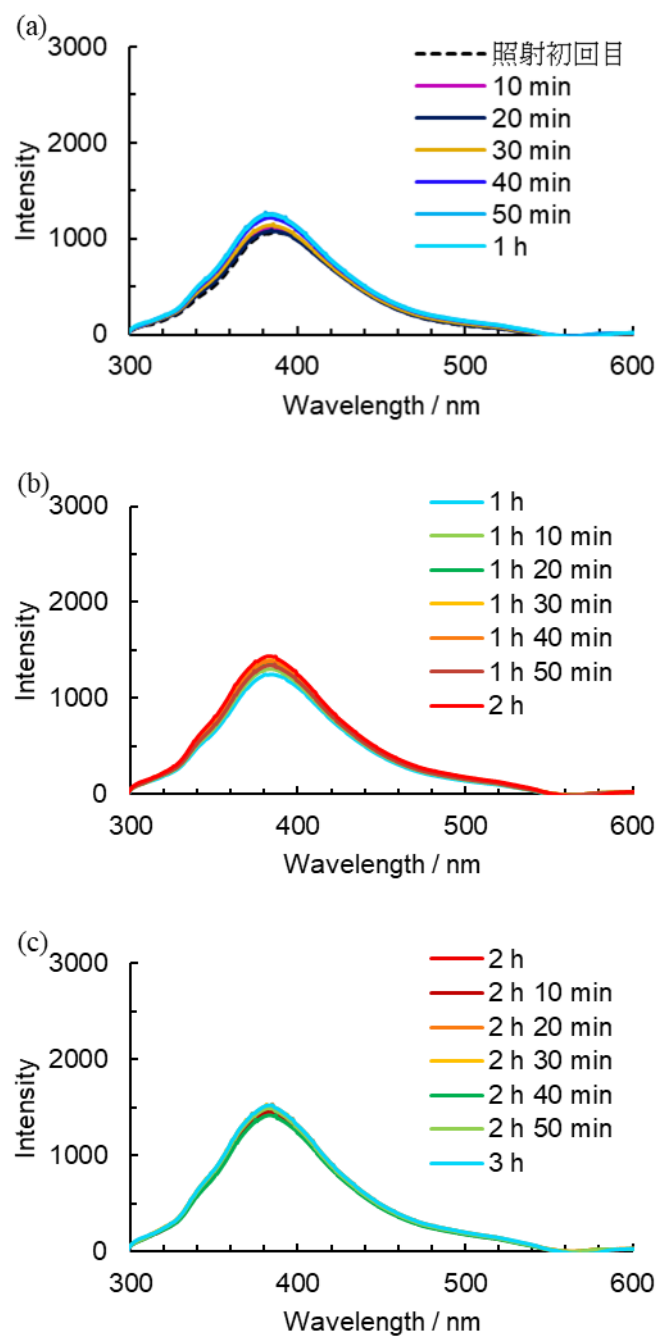


図 2.6.2.1. Ar 雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した SKL 溶液の  
 蛍光スペクトル変化 (a) 照射初回目 ~ 1 h、(b) 1 h ~ 2 h、(c) 2 h ~ 3 h。

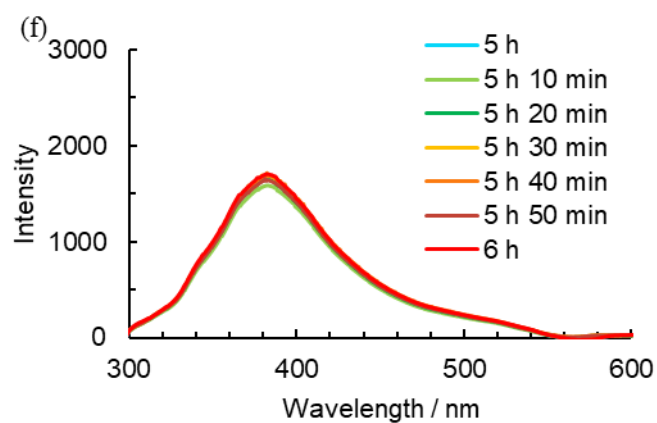
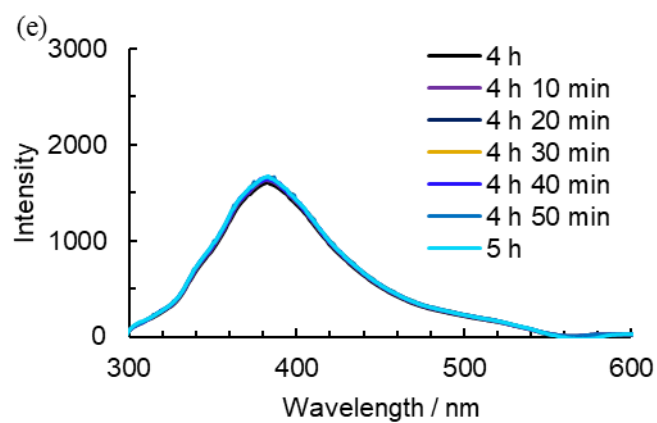
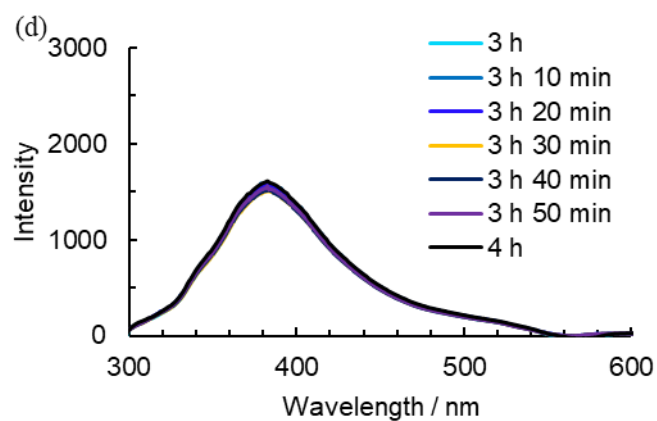


図 2.6.2.2. Ar 雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した SKL 溶液の  
蛍光スペクトル変化 (d) 3 h ~ 4 h、(e) 4 h ~ 5 h、(f) 5 h ~ 6 h。

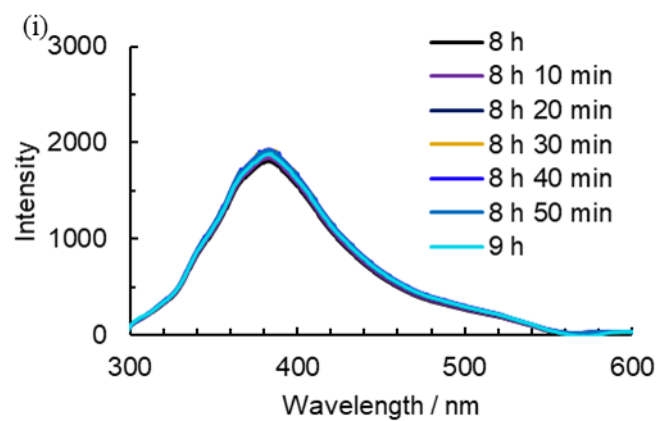
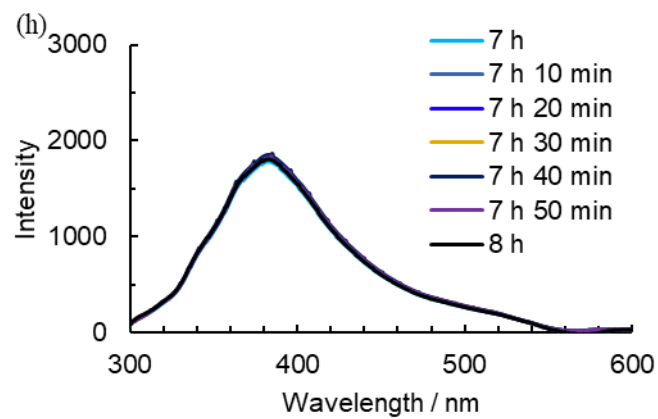
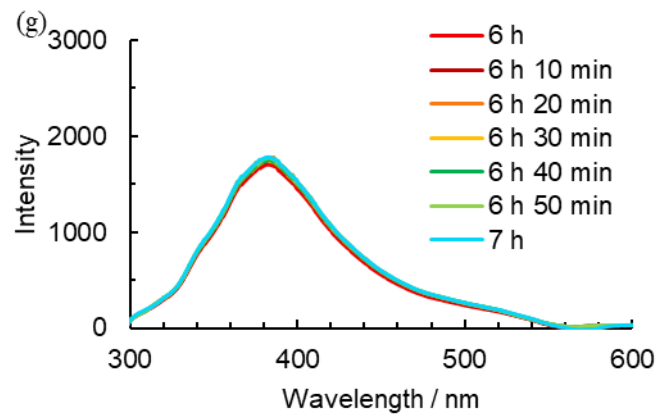


図 2.6.2.3. Ar 雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した SKL 溶液の  
 蛍光スペクトル変化 (g) 6 h ~ 7 h、(h) 7 h ~ 8 h、(i) 8 h ~ 9 h。

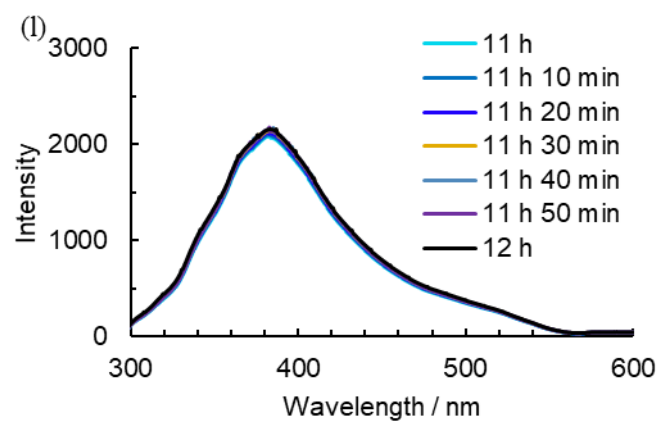
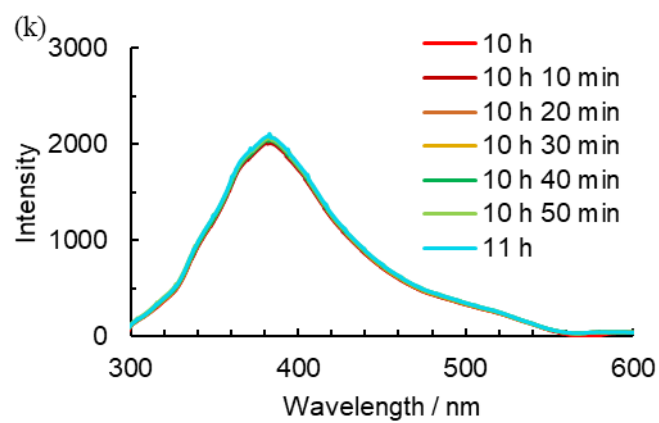
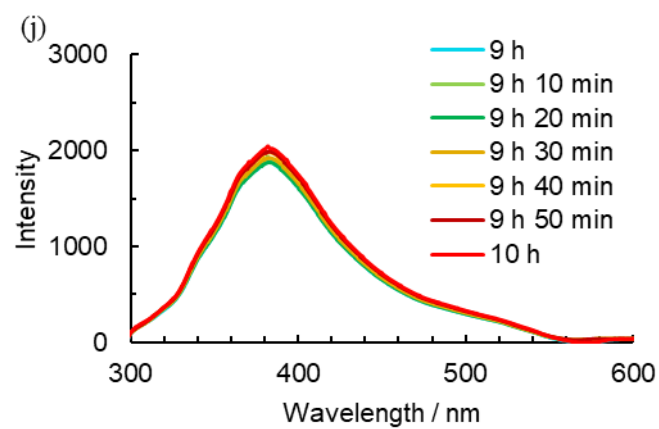


図 2.6.2.4. Ar 雰囲気下で、280 nm の Ex を連続照射した SKL 溶液の  
蛍光スペクトル変化 (j) 9 h ~ 10 h、(k) 10 h ~ 11 h、(l) 11 h ~ 12 h。

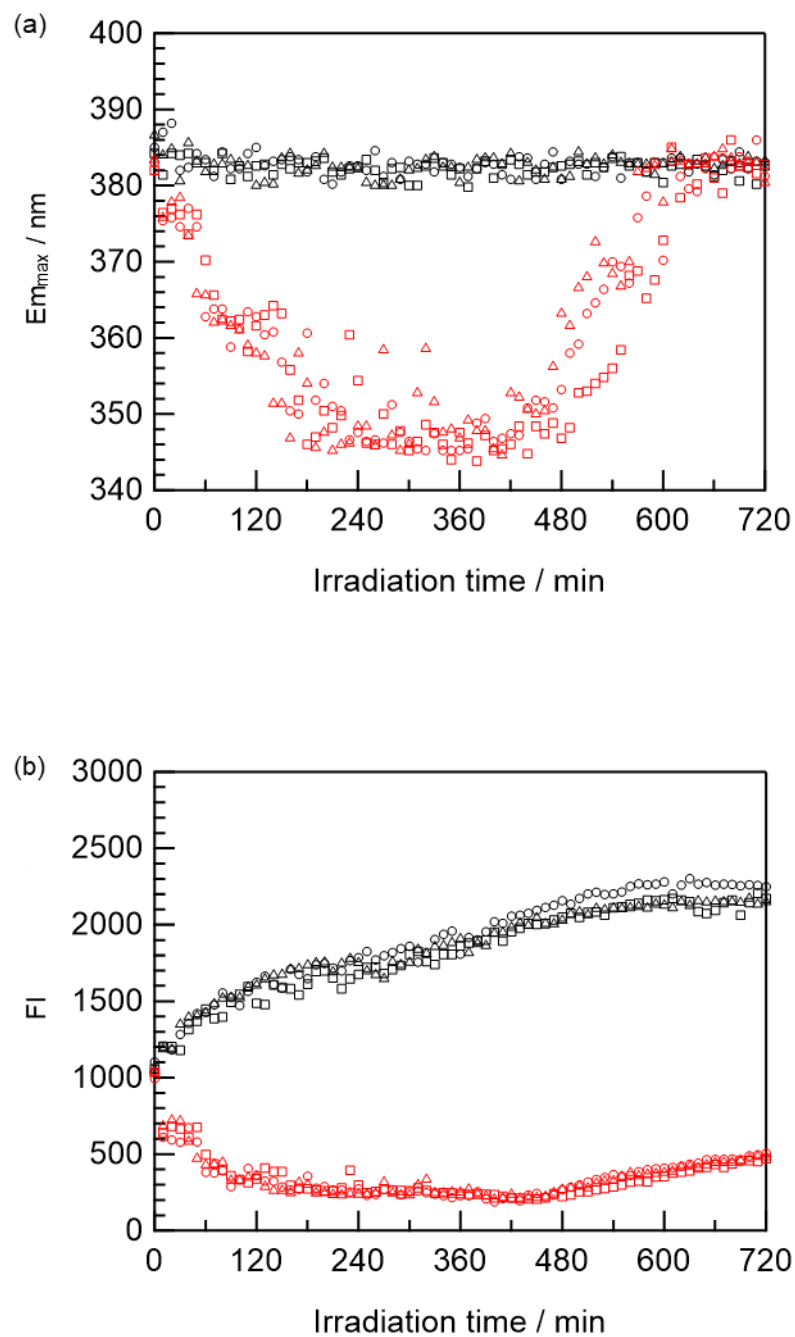


図 2.6.3.  $O_2$  および Ar 雰囲気下で、Ex 280 nm を連続照射した SKL 溶液の最大蛍光を示す (a) 波長 ( $Em_{max}$ ) と (b) その蛍光強度 (FI)。赤の記号は、酸素雰囲気、黒の記号は Ar 雰囲気の結果を示す。この測定は 3 反復行い、1 回目の測定は丸、2 回目の測定は三角、そして 3 回目の測定は四角で結果を示す。

### 2.3.6 280 nm の励起光を照射した SKL 溶液の吸光スペクトル

励起光照射した SKL 溶液の吸光スペクトルを測定した [図 2.7]。O<sub>2</sub> 雰囲気下では、青方偏移が終了する 6 時間 40 分照射試料と 12 時間照射試料の測定を行った [図 2.7 (a)]。また、Ar 雰囲気下では、青方偏移が完了した 50 分照射試料と 12 時間照射試料の測定を行った [図

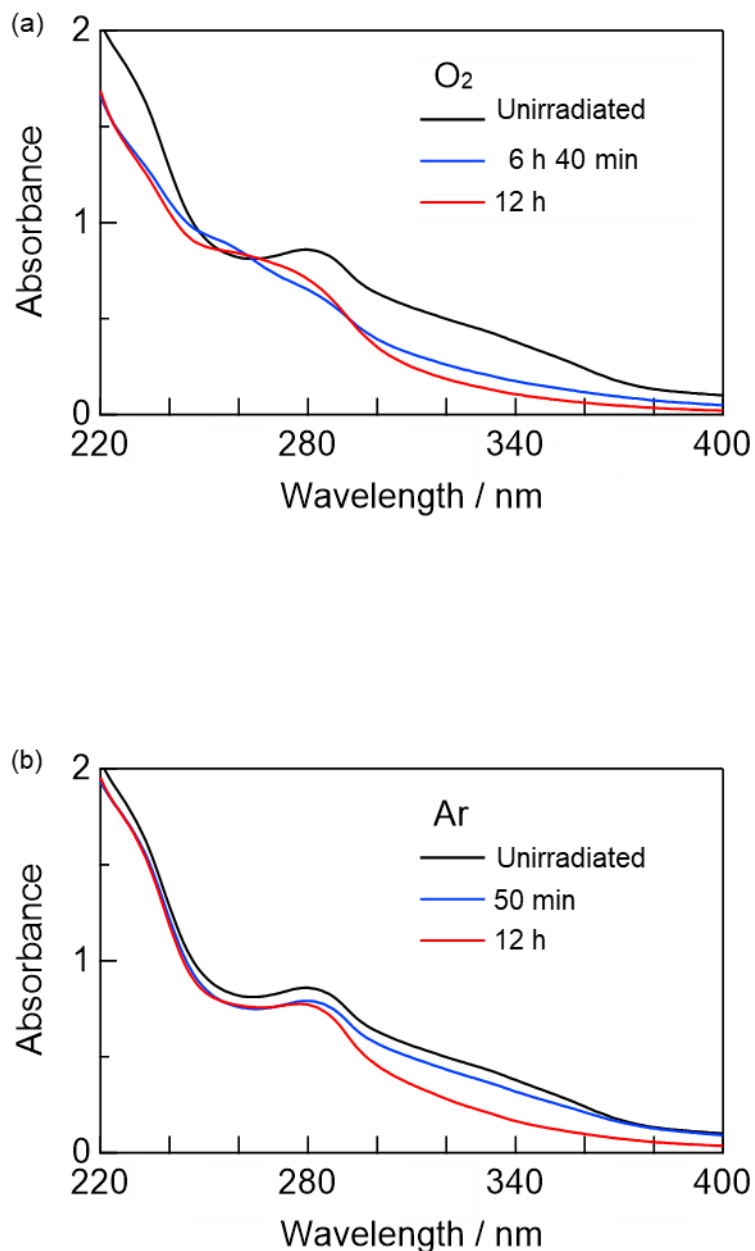


図 2.7. 未照射 SKL 溶液と UV 280 nm を (a) O<sub>2</sub> 雰囲気下で 6 時間 40 分、12 時間照射した SKL 溶液と (b) Ar 雰囲気下で 50 分間、12 時間照射した SKL 溶液の UV 吸収スペクトル。



2.7 (b)]。O<sub>2</sub> では、280 nm における吸光度は、照射初期に減少し、その後、僅かに増加した [図 2.7 (a)]。この吸光度変化は、図 2.6.3 (b) の蛍光測定における FI の減少と、それに続く、増加の現象と一致していた。一方、Ar 雰囲気下で処理した試料では、時間延長に伴い、極大吸収波長の吸光度がわずかに減少し続けた [図 2.7 (b)]。しかし、蛍光測定 [図 2.6.3 (b)] では FI の単調増加が観測され、新たな発色団の生成を予期させた。

### 2.3.7 励起光を照射した溶液中の SKL の構造変化

未照射 SKL、およびガス雰囲気に関わらず 2 時間と 12 時間照射した SKL の分析を、SEC および FT-IR 法を用いて行った。溶媒の留去法は、MWL と同様である。

O<sub>2</sub> 雰囲気下で 2 時間照射した SKL の SEC ピークは分子量が高い領域へシフトし、光重合の発生を示唆した [図 2.8 (a)]。12 時間後のピーク ( $M_p$ ) は低分子側に移動したけれども、未照射の  $M_p$  ピークより高分子側にあった。SKL の SEC 分析で興味深いのは、12 時間照射試料で、溶離時間 42.5 分 (ポリスチレン換算で分子量  $2.1 \times 10^3$  g/mol) に、新しいピークが出現したことである。これは、SKL の光分解で生じた低分子画分と推定される。

SKL においても、UV 光により一電子開裂が起きると仮定するならば、光分解した MWL と光重合した SKL の違いは、それらリグニンの構造、特に、結合様式に起因すると考えられる。 $\beta$ -O-4' 結合に富む MWL では、結合の開裂が優先的に起き (Fujimoto *et al.* 2005)、一方、すでに  $\beta$ -O-4' 結合の開裂が蒸解段階で進んでいる SKL では、フェノール性ヒドロキシ基が関与するラジカルカップリングが生じ、光重合が引き起こされたと推定される。

Ar 雰囲気下で照射した SKL のクロマトグラムは、O<sub>2</sub> 雰囲気下のものと同様の傾向を示した [図 2.8 (b)]。しかし、分子量の増加および、それに続く減少量は、O<sub>2</sub> 雰囲気下で観察されたものより小さかった。このことは、O<sub>2</sub> が、光重合反応と光分解反応を推し進めていることを示唆している。

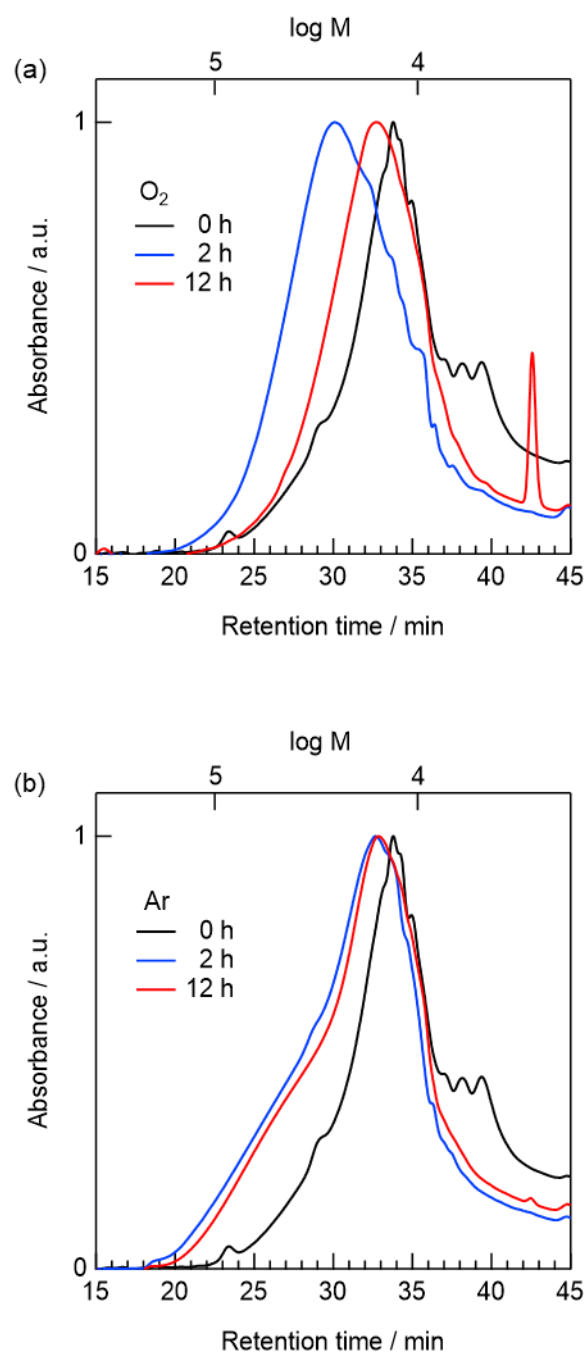


図 2.8. UV検出器を用いたSECにより測定した、(a)  $O_2$ と (b) Ar雰囲気下で、UVを2時間照射、12時間照射したSKLと未照射SKLの分子量分布。

未照射と12時間照射SKLのFT-IRスペクトルを図2.9に示す。未照射SKLのFT-IRスペクトルは、MWLと同様に1510、1597、1710  $\text{cm}^{-1}$ に明確なバンドを示した。Ar雰囲気下で照射したSKLのFT-IRスペクトルでは、1510および1597  $\text{cm}^{-1}$ のバンドの吸光度が減少したが、カルボニル基に帰属される1710  $\text{cm}^{-1}$ のバンドは増加した。O<sub>2</sub>雰囲気下では、1510および1597  $\text{cm}^{-1}$ の吸光度がさらに減少し、1710  $\text{cm}^{-1}$ の吸光度は著しく増加した。さらに、1666  $\text{cm}^{-1}$ に新たなバンドが出現し、これは共役カルボニル基由来であると推定した。この共役カルボニルの生成は、リグニンの $\alpha$ 位で酸化が起きていることを示唆している(Schwanninger *et al.* 2004)。しかし、MWLでは、共役カルボニルの生成は観測されなかったため、SKLに特有な現象である。

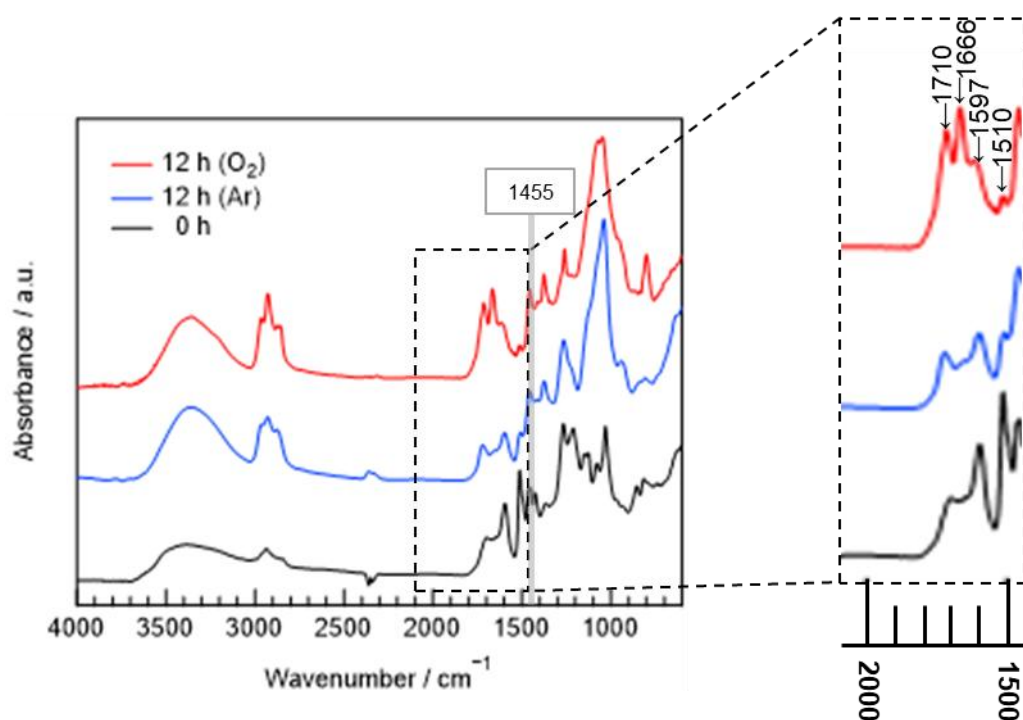


図2.9. O<sub>2</sub> (赤色) とAr (青色) 雰囲気下で12時間UV照射したSKLと未照射SKL (黒色) のFT-IRスペクトル。全スペクトルを1455  $\text{cm}^{-1}$ のバンドで正規化。

## 2.4 第二章のまとめ

本章の目的は、 $O_2$  雰囲気下および Ar 雰囲気において、継続的に励起光 (280 nm) 照射を受けたリグニン溶液の自家蛍光を追跡することを目的としていた。指紋蛍光測定から、再現性のある指紋蛍光スペクトルを取得するのが困難で、これは、空気中の  $O_2$  の影響と予想した。しかし、Ar 雰囲気という不活性条件下でも、短時間の励起光照射でリグニンの蛍光スペクトルが変化した。MWL では、光分解反応が優先し、SKL では、光重合とその後の若干の光分解が起きた。 $O_2$  が存在すると、MWL では、光分解反応が初期に起こり、照射時間の延長により光重合反応が起きるようになった。SKL では、光重合反応が初期に起き、その後、光分解反応が進行した。このように、UV 領域の励起光照射のみでも、リグニンの構造が容易に変化し、 $O_2$  があるとその反応が、より促進するという現象が観測された。しかし、これら光反応の進行は、ガス雰囲気およびリグニン調製物間で大きく異なったため、一定の規則性が見出せなかった。

本研究は、極低濃度のリグニン溶液の定量を可能にする蛍光測定やリグニンの自家蛍光を利用した顕微鏡観察を否定するものではないが、上記の予測不可能な光反応を考慮すると、濃度測定においては、リグニン溶液の完全遮光や照射時間の短縮化が必要であり、顕微鏡観察においても同様な注意の他に、長波長光を用いた観察部位の特定など短波長の光を照射しないなど細心の工夫が必要であることを示している。

## 第 3 章

# DFRC 法の再検証

## 第3章 DFRC の再検証

### 3.1 緒言

木材や単離リグニンの化学分解法として広く使われてきた、ニトロベンゼン酸化法 (Freudenberg 1939; Leopold 1950; Hayashi *et al.* 2023)、チオアシドリシス法 (Lin and Dence 1992; Ito *et al.* 2002; Lapierre *et al.* 1985, 1986)、DFRC 法 (Lu and Ralph 1997, 2014) は、リグニン中のグアイアシル核、シリングル核と、*p*-ヒドロキシフェニル核の比 (G/S/H 比) を見積もるのに有効な方法である。さらに、これらの方法は、リグニン構成残基間の $\beta$ -O-4' 結合で代表されるアリールエーテル結合を開裂するため、生じた分解生成物の収量から、その頻度の見積もりにも使用されることがある。

しかしながら、それらの分解効率に疑義を持つ論文も報告されている。Y. Kanazawa らは、 $\beta$ -O-4' 型のみで結合したモデルポリマーを使って、チオアシドリシス法の分解効率がモデルポリマーの重合度 (*DP*) 増加に伴い、著しく低下することを明らかにした (Kanazawa *et al.* 2009)。私は、この分解効率低下が、DFRC 法においても起きる可能性があるとの危惧を抱いた。そこで、Y. Kanazawa らと同様に、 $\beta$ -O-4' 型のみで結合したモデルポリマーを使って、DFRC 法の分解効率を調べることにした。

本章では、先ず、*erythro* 型と *threo* 型の $\beta$ -O-4' 型二量体を調製し、立体配置が DFRC の反応収率に及ぼす影響を調べた。その後、重合度 (*DP*) の異なる高分子量体の $\beta$ -O-4' 型モデルポリマーに対する DFRC 分解効率について調べた。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試薬

アセトニトリル (HPLC grade)、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF)、水素化ホウ素ナトリウム ( $\text{NaBH}_4$ )、そして テトラヒドロフラン (THF; HPLC grade) は関東化学株式会社 (東京, 日本) から購入した。酢酸、無水酢酸、臭化アセチル (AcBr)、塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ )、グアイアコール、ジクロロメタン ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ )、1,4-ジオキサン、2,2-ジメトキシプロパン、硫酸ナトリウム ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )、酢酸エチル (EtOAc)、塩酸、メタノール (MeOH)、*p*-トルエンスルホン酸ピリジニウム、炭酸カリウム ( $\text{K}_2\text{CO}_3$ )、トルエン および、亜鉛粉末は富士フィルム和光純薬株式会社 (大阪, 日本) から購入した。テトラコサン (GC-MS grade) は、メルク株式会社 (ダルムシュタット, ドイツ) から購入した。

### 3.2.2 $\beta$ -O-4' 型の二量体モデルと高分子モデルの調製

$\beta$ -O-4' 型の二量体モデルおよびモデルポリマーは、Takao Kishimoto らによる報告に従い、アセトバニロンから合成した **Compound 1** (ethyl 2-bromo-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-oxopropanoate) を原料とし、図 3.1 の経路で合成した (Kishimoto *et al.* 2006, 2008)。

まず、二量体モデル化合物 (**Compound D2**) の合成について記す (図 3.1)。2.0 mmol の **Compound 1** を 5 mL の DMF に溶解させ、それを 10 mM のグアイアコールと 10 mM の炭酸カリウムの DMF 溶液 14 mL に滴下した。滴下後、溶液を室温で 2 時間攪拌した。反応終了後、1 M の塩酸で溶液を酸性にし、水層の中にある反応生成物を EtOAc で 3 回抽出した。有機層は飽和食塩水で pH が中性になるまで洗い、無水  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  で脱水した。溶媒をエバポレーターで除去し、粗生成物を得た。粗生成物を、 $\text{CHCl}_3$  を溶離液としたフラッシュシリカゲルクロマトグラフィーにより精製し、溶媒をエバポレーターで留去し、シロップを得た。このシロップ状の精製物を 15 mL のメタノールに溶解し、700 mg の  $\text{NaBH}_4$ を加えて、50°C

で一晩攪拌した。その後、酢酸を混合物に気体が発生しなくなるまで加え、溶媒をエバポレーターで濃縮乾固した。得られた粉末に水を加えて溶液を得た。これを逆相カラム (Cosmosil C<sub>18</sub> 75、ナカライテスク株式会社、京都、日本) で、メタノール/水を溶離液として用い精製し、溶媒除去後、粉末状態の **Compound D2** を得た。出発物質 **Compound 1** に対する収率は、67%であった。

モデルポリマーは、所属研究室の重富顕吾講師より、ご提供頂いた。以下に、その合成方法について記載する。まず、10 g の **Compound 1** を、6.5 g の K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>を含む無水 DMF 50 mL に加え、混合物を 40 °C で 24 時間攪拌した。得られた懸濁液を 1 M HCl で酸性化した。得られた溶液を CHCl<sub>3</sub> で 3 回抽出した。合わせた有機層を飽和 NaHCO<sub>3</sub> 水溶液および飽和食塩水で洗浄後、芒硝で脱水した。溶媒を蒸発させてシロップ状の混合物を得た。このシロップ状液体に Milli-Q 水を加え、沈殿を生成させた。沈殿を遠心分離で回収し、凍結乾燥して

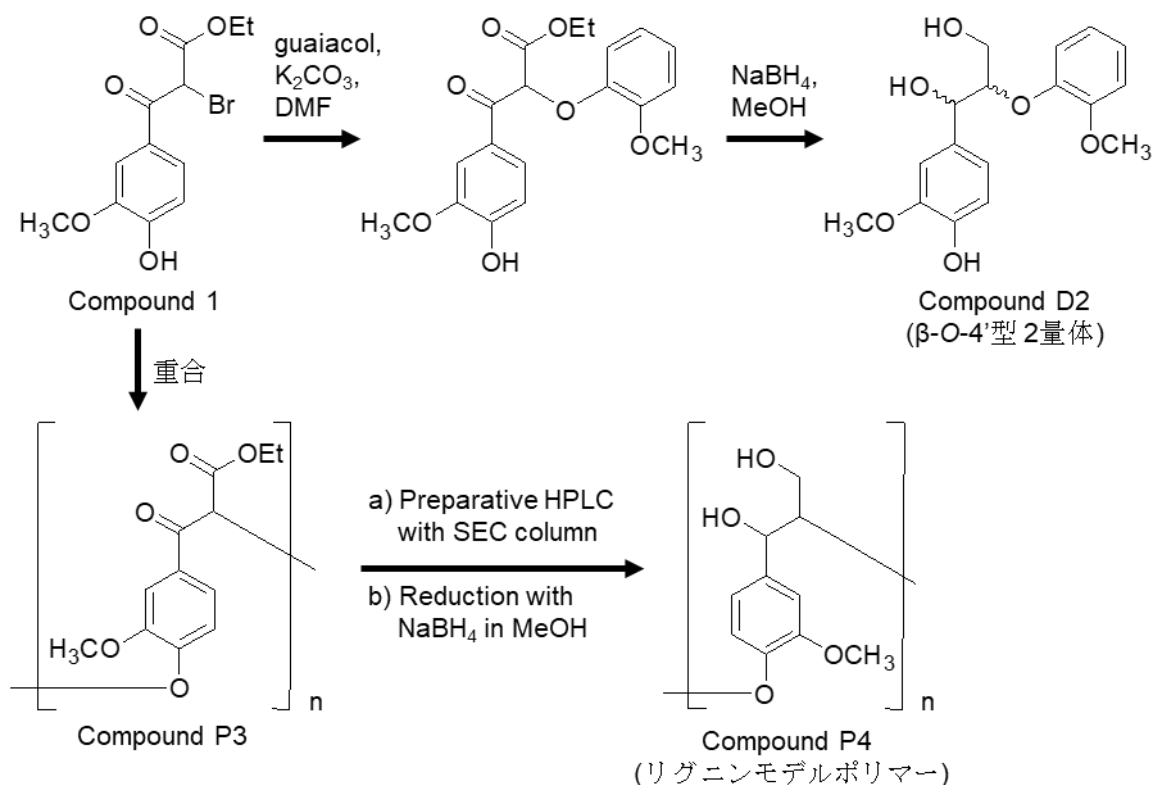


図 3.1 **Compound 1** を出発物質とした $\beta$ -O-4' 型二量体モデル化合物 (**Compound D2**) とモデルポリマー (**Compound P4**) の合成経路。



**Compound P3** を得た。

**Compound P3** を分取用 SEC に供した。この SEC は、HPLC システム (ジーエルサイエンス株式会社、東京、日本) を使って実施した。この HPLC システムは、ポンプ (PU714)、脱気装置 (PG-32) と UV 検出器 (UV702:280 nm) で構成されている。さらに、リサイクルバルブ (PLC-6RcA、ジーエルサイエンス株式会社) とフラクションコレクター (CHF122SC、株式会社東洋製作所、東京、日本) が装備されている。SEC カラムには、H-G 8B ガードカラムと GPC Shodex H-2003 カラム ( $\Phi 50$  mm  $\times$  300 mm、レゾナック株式会社、東京、日本) とを使用した。THF を溶離液として、カラム温度 40 °C、流速は 3.5 mL/min に設定した。

**Compound P3** を THF に溶解し、100 mg/mL の溶液を調製した。1 mL の溶液をカラムに注入した。カラムを通過した溶出液を、リサイクルバルブによって、カラムに再度導入した。

3 回カラムを通過した溶離液を 20 画分に分離した。この分画行程を 108 回繰り返し、各画分の溶媒を留去させて粉末状の試料を得た。各画分の数平均分子量 ( $M_n$ )、重量平均分子量 ( $M_w$ ) と分散度 ( $M_w/M_n$ ) を、分析用 SEC で測定した。この測定には、HPLC システム (Hitachi D-7000 system、株式会社日立ハイテク、東京、日本) を用いた。カラムは、KF-G ガードカラム (レゾナック株式会社、東京、日本) と 2 本の GPC KF-804L カラムを直列に接続したものを使用した。溶離液は THF で、流速は 1.0 mL/min、カラムオープン温度は 40 °C に設定した。分子量 580~ $5.0 \times 10^4$  g/mol のポリスチレン標準物質 (Waters Corp., MA, USA)、およびスチレン (分子量 104 g/mol) を用いて検量線を作成し、この検量線から相対分子量となる  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $D_M$  を求めた。

**Compound P3** の各画分をそれぞれ 60 mg/mL となるようにメタノールに溶解し、それに NaBH<sub>4</sub> メタノール溶液 (66 mg/mL) を添加した。この混合物を 50 °C で一晩攪拌し、その後、酢酸を加え、溶媒を減圧下で留去した。得られた固体に、水を加えて溶液または懸濁液とし、逆相オープンカラム ( $\Phi 10$  mm  $\times$  150 mm) に供した。このカラムは、Milli-Q 水で事前に平衡化しておいた。試料注入後のカラムを、カラム体積の 3~4 倍の水を用いて洗浄した後、メ

タノールで生成物を溶出させた。溶出液を減圧下で除去し、残渣を EtOAc : ヘキサン (1:4, v/v) で洗い、40 °C で減圧乾燥した。以降、この手法で得られた還元生成物を **Compound P4** とし、**Compound P3** の画分 (Frs) 1 からの **Compound P4** を LM-1 と表記する。他も同様に、LM の後の番号は **Compound P3** の画分を示す。LM-18~20 に関しては、順相シリカゲルカラムクロマトグラフィーに供し、MeOH/CHCl<sub>3</sub> (40:60, v/v) で溶出させて、さらに精製した。この LM シリーズにおいて、LM-1、5、9 と 19 を DFRC 法に供した。

LM-4、6、7、と 18 を、異種核 1 量子コヒーレンス 2 次元 NMR 法 (HSQC-NMR) に供した。測定は、400 MHz の JEOL JNM ECZ-400 spectrometer (日本電子株式会社、東京、日本) を用いて行った。この測定のパルスシーケンスは、K. Shigetomi らの報告に従った (Shigetomi and Uraki 2025)。化学シフト ( $\delta$ ) は ppm で示し、溶媒シグナルの化学シフトを (ピリジン-*d*<sub>5</sub>:  $\delta$ H/ $\delta$ C = 7.19/123.5 ppm) を内部基準として使用した。LM-18 のフィールドイオン化 (FI)-MS 測定は、北海道大学農学部 GC-MS・NMR 室に依頼し、JEOL JMS-T100GCV 装置を用いた。

### 3.2.3 Compound D2 の分画および分画物の構造決定

**Compound D2** はジアステレオマーであった。ジアステレオマーをオクタデシルシリルカラム (Mightysil RP-18 GP 250-50,  $\Phi$ 20 mm  $\times$  250 mm、関東化学株式会社、東京、日本) を用いた、分取用 HPLC システムで分画した。溶離液は、0.1% (v/v) AcOH を含む H<sub>2</sub>O/アセトニトリル=85:15 (v/v) とし、カラムオーブンを 35 °C で流速を 10 mL/min に設定した。注入した試料溶液は、リサイクルバルブを経て、10 回カラムを通過した。最終溶出液を 2 つの画分に分離した。両画分の溶媒留去後の残渣は、Shojiro Hishiyama らの方法に従いアセトニド誘導体へ変換した (Hishiyama *et al.* 2012)。簡潔に記載すると、2 mL の 2,2-ジメトキシプロパンと 7.5 mg のピリジニウム *p*-トルエンスルホン酸塩を **Compound D2** が 10 mg が含まれる CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液 1.5 mL に加え、反応混合物を室温で一晩攪拌した。その後、減圧下で溶媒を

除去した。上記の分取用 HPLC を用いて分画し、早期に溶出した画分から得られた誘導体を **Compound D3E**、後期画分の誘導体を **Compound D3T** と記す。各化合物をクロロホルム-*d* (CDCl<sub>3</sub>) に溶解し、上記の 400 MHz の NMR を用いて、テトラメチルシラン (TMS) を内部標準として加え、<sup>1</sup>H-NMR 測定した。以下に、各化合物の化学シフトなどを示す。ここでは、TMS を 0 ppm として、化学シフト ( $\delta$ ) は ppm、結合定数 (*J*) は Hz で表示する。

**Compound D2A:** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.04–6.68 (7H, m, aromatic), 4.89 (1H, d, *J* = 8.8 Hz, C $\alpha$ -H), 4.12–4.20 (2H, m, C $\beta$ -H and C $\gamma$ -Hb), 4.02 (1H, dt, *J* = 10.6, 10.4, and 2.4 Hz, C $\gamma$ -Ha), 3.84 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.76 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 1.64 (3H, s, isopropylidene), 1.51 (3H, s, isopropylidene) ppm. **Compound D2B:** <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.10 (7H, m, aromatic), 5.06 (1H, d, *J* = 2.1 Hz, C $\alpha$ -H), 4.19 (1H, dd, *J* = 12.8 and 2.1 Hz, C $\gamma$ -Hb), 4.14 (1H, dd, *J* = 12.7 and 2.1 Hz, C $\gamma$ -Ha), 4.08 (1H, q, *J* = 2.1 Hz, C $\beta$ -H), 3.88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.73 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 1.62 (3H, s, isopropylidene), 1.58 (3H, s, isopropylidene) ppm.

**Compound D3E:** <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz):  $\delta$  6.82–7.09 (7H, m, aromatic), 4.97 (1H, d, *J* = 4.5 Hz, C $\alpha$ -H), 4.16 (1H, m, C $\beta$ -H), 3.89 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.66 (1H, d, *J* = 11.8 Hz, C $\gamma$ -Hb), 3.47 (1H, br d, *J* = 5.9 Hz, C $\gamma$ -Ha) ppm.

**Compound D3T:** <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub> 400 MHz):  $\delta$  6.89–6.98 (7H, m, aromatic), 4.97 (1H, d, *J* = 8.1 Hz, C $\alpha$ -H), 4.01 (1H, m, C $\beta$ -H), 3.92 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.90 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.62 (br d, C $\gamma$ -Hb), 3.50 (1H, br m, C $\gamma$ -Ha) ppm.

### 3.2.4 DFRC 分析法

本研究で合成した $\beta$ -O-4' 型二量体およびモデルポリマーの DFRC 分析は、以下の通り行った (Lu and Ralph 2014)。5 mg の試料と、内部標準物質としてのテトラコサン 0.5 mg を、2.5 mL の AcBr/AcOH (2:8(v/v)) 溶液に加え、50 °C で 3 時間攪拌した。エバポレーターを用い、10 分以内に溶媒を留去できるように、50 °C で減圧乾固した。残渣に 1,4-ジオキサン/酢酸/水溶液 (5/4/1, v/v/v) を 2.5 mL 添加した。その後、50 mg の亜鉛粉末を溶液に添加して、室温で 30 分間攪拌した。反応生成物を、分取漏斗を用いて CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で抽出した。水層を 1 M 塩酸で pH 3 以下に酸性化し、水層からも生成物を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> で抽出した。これらの有機層を併せて、飽和食塩水で洗浄した後、無水芒硝で脱水した。その後、減圧下で溶媒を除去した。0.5 mL の無水酢酸/ピリジン (1:1, v/v) を含む CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 溶液 1.5 mL を、残渣に加え、室温で 40 分間攪拌してアセチル化した。反応後、ピリジンはトルエンを用いて共沸蒸留により除去した。残渣として目的物であるジアセチル化コニフェリルアルコール (Ac-CA) を得た。この DFRC 処理は、各試料に対し 3 反復行った。

DFRC 処理で得られた Ac-CA を CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> に溶解し、ガスクロマトグラフィー (GC) 及び GC 質量分析 (GC-MS) に供した。GC は、炎イオン化検出器 (FID) を備えた島津 GC-2010 (株式会社島津製作所、京都、日本) 装置を用い、GC-MS は島津 GCMS-QP 2010 (株式会社島津製作所、京都、日本) 装置を用いて行った。両装置の GC の測定条件は、F. Lu らの方法 (Lu and Ralph 1997) に従い、キャリアガスは He、流速は 1.0 mL/min とした。カラムには、微極性のシリカベースのキャピラリーカラム (BPX-5, 30 m × 0.25 mm, 膜厚 0.25  $\mu$ m, Trajan Scientific Australia Pty Ltd., VIC, Australia) を使用した。インジェクター温度は 250 °C で、カラムは 160 °C から昇温させ、300 °C まで 10 °C/min の昇温速度で加熱し、この温度を 7 分間保持した。

Ac-CA の濃度は、予め作成した検量線から算出した。検量線作成のために、E 体のコニフェリルアルコールをアセチル化して、E 体の Ac-CA [(E)-Ac-CA] をまず調製した。この E-

Ac-CA と内部標準物質のレスポンスファクターを求め、検量線を作成した。Z 体の Ac-CA は合成しなかったため、E 体と同じレスポンスファクターとして定量した。試料間における DFRC 収率の有意差は、R ソフトウェアバージョン 4.5.1 (<https://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/4.5.1/>) を用いて、一元配置分散分析 (ANOVA) および事後検定として Tukey 検定 ( $p < 0.05$ ) により検定した。

### 3.3 結果と考察

#### 3.3.1 $\beta$ -O-4' 型二量体モデルの構造解析

Compound D2 の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルは、還元段階中にジアステレオマーの混合物が生成したことを示した。ジアステレオマー混合物は ODS カラムを用いた HPLC により分離できた (図 3.2 中のクロマトグラム)。これらのジアステレオマーは、*erythro* 体と *threo* 体と予想できた。そこで、本研究では、*erythro* 体と *threo* 体の立体配置を決め、それらの DFRC 収率を求めることを最初の目的とした。

*erythro* 体と *threo* 体を区別するために注目したプロトン ( $\alpha$ 位と $\beta$ 位) の化学シフトが近いため、 $^1\text{H-NMR}$  では立体配置の決定が不可能であった。そこで、S. Hishiyama らの方法

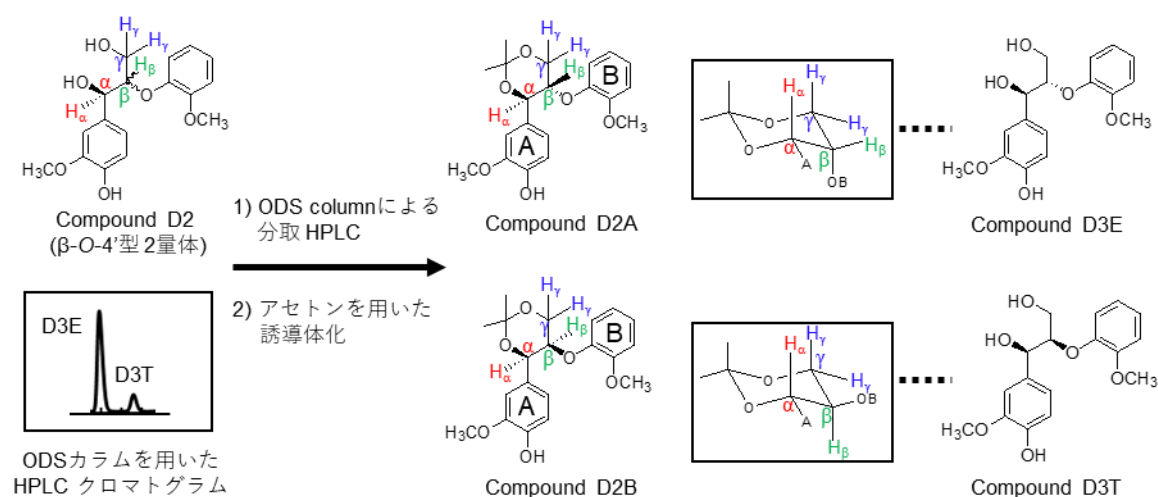


図 3.2 *erythro* 型および *threo* 型二量体リグニンモデルの相対立体配置決定戦略図。第 1 段階は誘導体化で、第 2 段階は NMR による配置決定である。

(Hishiyama *et al.* 2012) に基づき、環化させて $\alpha$ 位、 $\beta$ 位、 $\gamma$ 位の炭素を固定化し、その二面体角から、 $\alpha$ 位、 $\beta$ 位のヒドロキシ基の立体配置を決定することにした。ここで、問題となったのは、エナンチオマーの存在である。ODS カラムでは、旋光度以外の物性が同じエナンチオマーを分離することが不可能であったため、エナンチオマーを無視して立体配置を決めることにし、この論文では、ヒドロキシ基の相対的配向を示す「相対立体配置」という単語を使うこととする。

環化は分画した **Compound D2** と 2,2-ジメトキシプロパンの反応によるイソプロピリデン化で達成され、得られたアセトニド誘導体を  $^1\text{H-NMR}$  に供した。 $\alpha$  炭素の  $\text{H}_\alpha$  と、 $\beta$  炭素の  $\text{H}_\beta$  の結合定数 ( $J_{\text{H}\alpha\beta}$ ) から Karplus の式に基づいて、 $\angle\text{H}_\alpha\text{-C}_\alpha\text{-C}_\beta$  と  $\angle\text{C}_\alpha\text{-C}_\beta\text{-H}_\beta$  が成す二面体の角度を推定することができる。ジアステレオマー (**Compound D2A**) は、 $J_{\text{H}\alpha\beta}$  が 8.8 Hz を示し、これは二面角が  $60^\circ$  であることを示唆している (Karplus 1960)。したがって、**Compound D2A** は *erythro* 型から派生した誘導体と決定した。一方、**Compound D2B** は、2.1 Hz の  $J_{\text{H}\alpha\beta}$  を示し、二面角が  $180^\circ$  に相当することが分かった。それゆえ、**Compound D2B** は *threo* 型からの誘導体と決定することができた。これ以降、*erythro* 型 **Compound D2** を **Compound D3E** と記し、*threo* 型は **Compound D3T** と記すことにする (図 3.2)。

### 3.3.2 $\beta$ -O-4' 型モデルポリマーの構造解析

異なる重合度 ( $DP$ ) の  $\beta$ -O-4' 型モデルポリマーに対する DFRC の効率を明らかにするため、 $DP$  に基づいて **Compound P4** を分画する必要がある。しかし、**Compound P4** は一般的な有機溶媒に難溶であるため、その分画は困難であった。そこで、**Compound P4** の前駆体であり、THF に可溶な **Compound P3** を分取用 SEC-HPLC により、20 画分に分離した。分子量 ( $M_n$  および  $M_w$ ) ならびに数平均  $DP$  ( $DP_n$ ) は、SEC クロマトグラム (図 3.3) から求め、表 3.1 にまとめた。各画分の分散度 ( $D_M$ ) は 1.2 未満であり、SEC 分画により分子量分布の狭い LM が得られたことが明確となった。特に、低分子量画分の  $D_M$  は小さく、ほぼ単

分散であった。

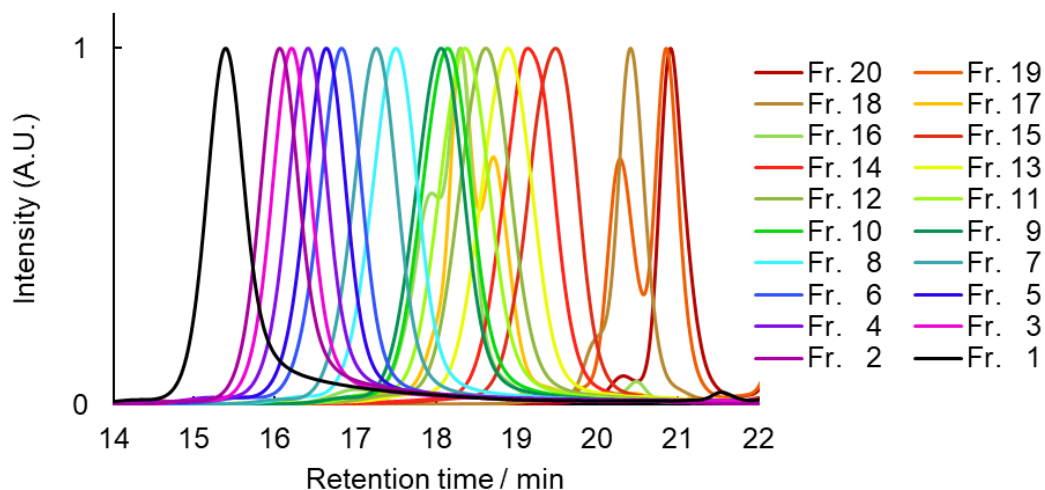


図 3.3 **Compound P3** 全画分の SEC クロマトグラム

表 3.1. 分析用 SEC により決定された **Compound P3** 全画分の分子量

| Fractions | $M_n$<br>$\times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $M_w$<br>$\times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $DP_n$ | $\bar{D}_M$ | Fractions | $M_n$<br>$\times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $M_w$<br>$\times 10^3 \text{ g} \cdot \text{mol}^{-1}$ | $DP_n$ | $\bar{D}_M$ |
|-----------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------|-------------|-----------|--------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|--------|-------------|
| 1         | 8.45                                                   | 10.14                                                  | 35.8   | 1.20        | 11        | 2.01                                                   | 2.18                                                   | 8.5    | 1.09        |
| 2         | 6.47                                                   | 7.21                                                   | 27.4   | 1.11        | 12        | 1.76                                                   | 1.89                                                   | 7.5    | 1.07        |
| 3         | 6.22                                                   | 6.81                                                   | 26.3   | 1.10        | 13        | 1.54                                                   | 1.65                                                   | 6.5    | 1.07        |
| 4         | 5.63                                                   | 6.17                                                   | 23.9   | 1.10        | 14        | 1.33                                                   | 1.39                                                   | 5.6    | 1.05        |
| 5         | 5.16                                                   | 5.56                                                   | 21.9   | 1.08        | 15        | 1.15                                                   | 1.20                                                   | 4.9    | 1.04        |
| 6         | 4.75                                                   | 5.07                                                   | 20.1   | 1.07        | 16        | 1.09                                                   | 1.17                                                   | 4.6    | 1.07        |
| 7         | 3.81                                                   | 3.98                                                   | 16.1   | 1.05        | 17        | 0.89                                                   | 0.94                                                   | 3.8    | 1.06        |
| 8         | 3.22                                                   | 3.47                                                   | 13.6   | 1.08        | 18        | 0.70                                                   | 0.72                                                   | 3.0    | 1.03        |
| 9         | 2.44                                                   | 2.58                                                   | 10.3   | 1.06        | 19        | 0.61                                                   | 0.72                                                   | 2.6    | 1.04        |
| 10        | 2.33                                                   | 2.46                                                   | 9.9    | 1.06        | 20        | 0.50                                                   | 0.52                                                   | 2.2    | 1.02        |

各画分を  $\text{NaBH}_4$  で還元して、 $DP$  の異なる目的のリグニンモデルポリマー (**Compound P4**) を得た。還元処理では、分子量の低下が生じないと考えられるために、**Compound P4** の  $DP_n$  は、**Compound P3** の  $DP_n$  と同じと見なした。**Compound P4** の各画分の収量が少ないために、同一画分から HSQC-NMR による測定と DFRC 法による分解は困難であった。そこで

LM-1 ( $DP_n=35.8$ )、5 ( $DP_n=21.9$ )、9 ( $DP_n=10.3$ )、1 ( $DP_n=2.6$ )を DFRC 法に供し、その隣接画分である LM-4 ( $DP_n=23.9$ )、6 ( $DP_n=20.1$ )、7 ( $DP_n=16.1$ )、18 ( $DP_n=3.0$ ) の HSQC-NMR を測定した。まず、NMR の結果を、図 3.4 に示す。

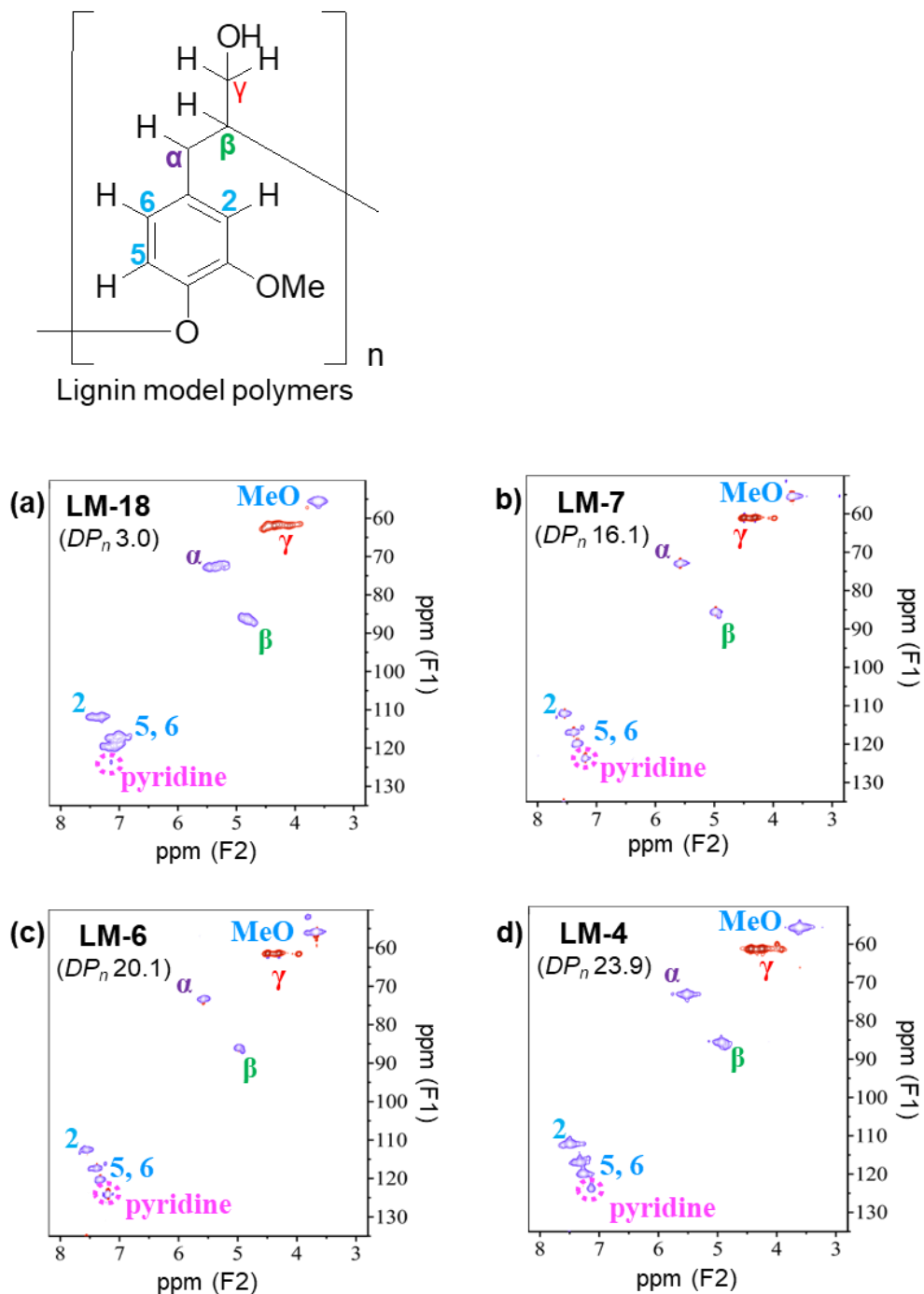


図 3.4 ピリジン- $d_5$  中における (a)  $DP_n=3.0$  の LM-18、(b)  $DP_n=16.1$  の LM-7、(c)  $DP_n=20.1$  の LM-6、(d)  $DP_n=23.9$  の LM-4 の HSQC-NMR スペクトル。



図 3.4 (a) で、LM-18 の芳香環の 2 位、5 位、6 位に帰属される C-H 相関シグナルとメトキシ基に帰属されるシグナル (Shigetomi *et al.* 2025; Ralph and Ralph 2025) が検出され、それらグアイアシル骨格に由来するシグナル以外は観測されなかった。さらに、 $\beta$ -O-4'結合のみに帰属される C- $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  位の C-H 相関シグナルのみの観測されたため、LM-18 は、 $\beta$ -O-4'結合のみで構成されていることが明確に示された。また、LM-4、6、7 においても、LM-18 と同じスペクトルを示し、 $\beta$ -O-4'結合リグニンモデルポリマーであることが確認された [図 3.4 (b)、(c)、(d)]。

### 3.3.3 $\beta$ -O-4' 型二量体モデルに対する DFRC の分解効率

**Compound D3E** と **Compound D3T** をそれぞれ DFRC 法に供した。得られた分解生成物のガスクロマトグラムをそれぞれ図 3.5 (a) と図 3.5 (b) に示し、その収率を表 3.2 に記す。両クロマトグラムには、3 つのピークのみが認められた。保持時間 16.9 分のピークは、内部標準物質であった。13.5 分のピークは、検量線作成のために調製した (*E*)-Ac-CA の保持時間と同じであった。12.4 分のピークは、(*E*)-Ac-CA と同様のフラグメントパターンから *Z* 体の Ac-CA [(*Z*)-Ac-CA] に帰属した。**Compound D3E** および **Compound D3T** の DFRC 収率は、それぞれ 96.2% および 98.9% であった (表 3.2)。Tukey 検定から、両収率に有意差は認められず、二量体の DFRC 分解は相対立体配置に関係なく完全に進行することが明示された。

両二量体モデルの DFRC 主生成物は、Ac-CA の *E* 体であり、*E/Z* 比は 7.0 と同一であった。この結果の理由は以下の通りである：DFRC の第一段階は、臭素とベンジルカチオンとの  $S_N1$  反応であると提案されている (Lu and Ralph 1996)。したがって、ベンジルカチオンの生成によりラセミ様中間体を得られ、ジアステレオマー間の立体化学が消失したと考えられる。その後の脱離反応は、導入された臭素とアリールオキシ置換基との相対立体配置、および/または、脱離反応を容易にするコンフォメーション変化の影響を受けて進行すると考えられる。よって、C $\alpha$ -C $\beta$  結合間のコンフォメーション変化が容易な二量体に対する DFRC では、構造的に安定な *E* 体が主要生成物として形成されたと推定している。

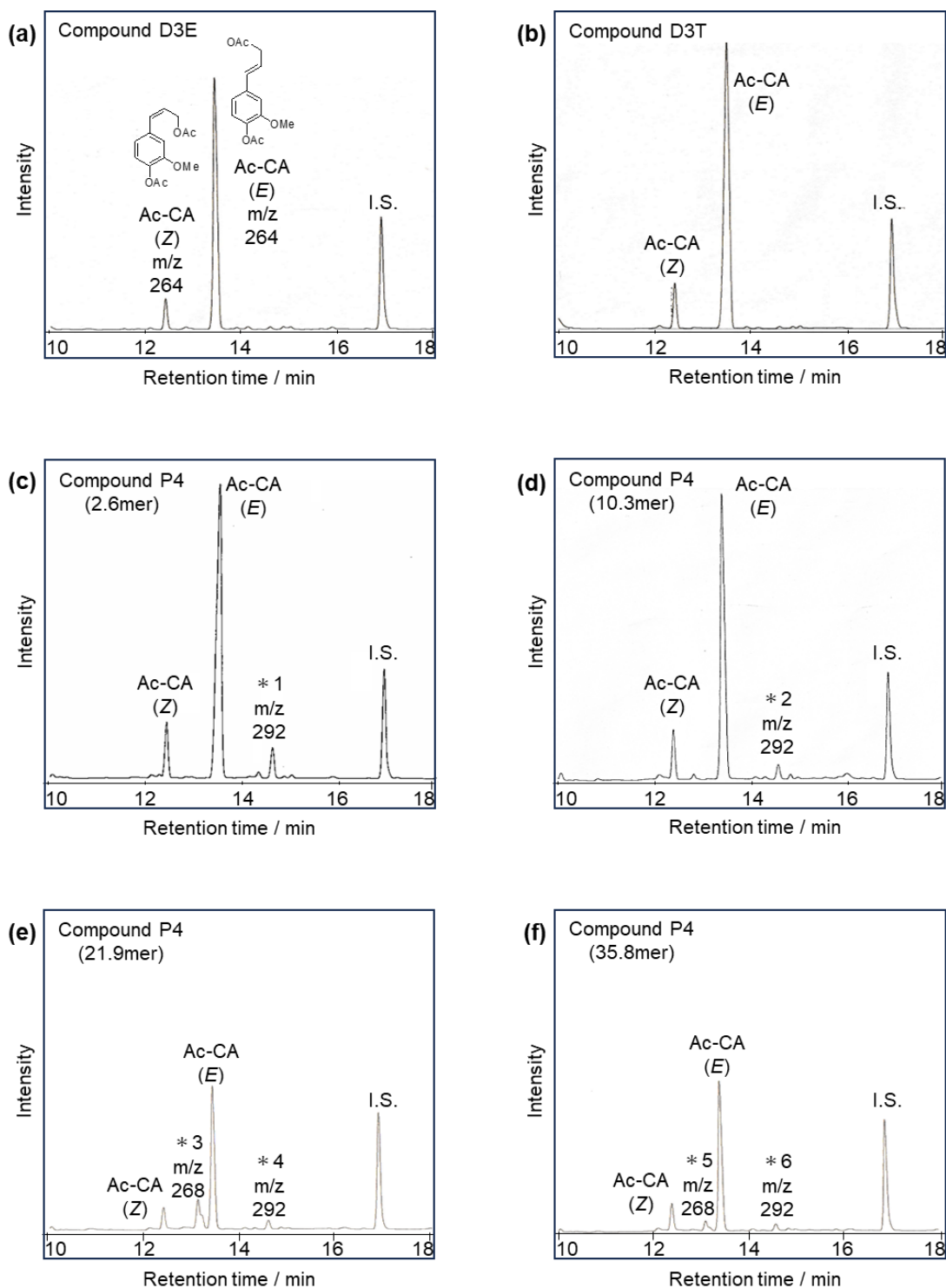


図 3.5 (a) Compound D3E, (b) Compound D3T, (c) Compound P4 の 2.6 量体, (d) Compound P4 の 10.3 量体, (e) Compound P4 の 21.9 量体, (f) Compound P4 の 35.8 量体からの DFRC 分解生成物の GC-FID クロマトグラム。図中の Ac-CA (E) および (Z) は、それぞれ Ac-CA の E 異性体および Z 異性体である。\* 1-6 は未同定の分解生成物。I.S.: 内部標準。全クロマトグラムのピーク面積は I.S. の面積を基準に正規化されている。

### 3.3.4 モデルポリマーの分解効率

LM-1 ( $DP_n=35.8$ )、5 ( $DP_n=21.9$ )、9 ( $DP_n=10.3$ ) と、19 ( $DP_n=2.6$ ) を、DFRC 法に供した。それらの DFRC 分解物のクロマトグラムを図 3.5 に示す。これらのクロマトグラムでは、(E)-Ac-CA と(Z)-Ac-CA が、主要な DFRC 分解物として検出された。このことは、二量体の DFRC 分解物と同様であった。しかし、図中で\*で示した小さなピークも観察された。各クロマトグラムにおいて、\*に異なる番号を付した。図 3.5 (c)~(f) の保持時間 14.6 分に出現した\*1、2、4 と 6 は、FI および EI-MS により  $m/z$  292 と示された。図 3.5 (e), (f) では、保持時間 13.1 分にも\*3 と\*5 が現れ、これは  $m/z$  268 であった。検出された両分子は、これらの  $m/z$  値が Ac-CA (分子イオン  $m/z$  264) の値に近いことから、単量体サイズの DFRC 分解生成物と考えられる。しかし、EI-MS のライブラリ検索をしても、それらの構造は推定できなかった。

LM の DFRC 収率も、表 3.2 に含めて示している。表中の上段の収率は、Ac-CA の E 体および Z 体のピーク面積から算出したものであり、下段の収率 (括弧内の値) は、\*が付された未同定分子を含む全ピークの和から求めたものである。下段の収率計算において、\*の分子の内部標準に対する応答係数は、Ac-CA と同じと仮定した。

LM-19 ( $DP_n=2.6$ ) の上段の DFRC 収率は 87.5%であり、Tukey 検定から、二量体の収率より有意に低かった。一方、下段の DFRC 収率は 93.2%であり、この計算方法では二量体の収率と有意差がなかった。したがって、三量体と見なせるモデルオリゴマーと二量体とでは、反応分解率はほぼ同等と見なせる。

LM-9 ( $DP_n=10.3$ ) の上段の DFRC 収率は、二量体の DFRC 収率と比較して 16%以上減少した。同様に、下段ラインの収率も著しく低かった。さらに、LM-5 ( $DP_n=21.9$ ) の上段および下段の DFRC 収率とも、LM-9 の収率よりも 50%以上低かった。しかし、LM-1 ( $DP_n=35.8$ ) の DFRC 収率は LM-5 より小さな値を示したが、検定より有意差はなかった。したがって、 $DP_n$  の増加に伴う DFRC 収率の減少は、 $DP_n=20$  でレベルオフになることが推定さ

れた。この推定の検証には、より高重合度のモデルポリマーを合成する必要があり、今後の課題である。

分解生成物である Ac-CA の *E/Z* 比を比較すると、LM-9 と 19 の *E/Z* は、二量体よりも若干大きかったが、 $DP_n=20$  を超える LM-1 と 5 では半減した (表 3.2)。この *E* 体の比率が減少した理由は次のように推測している。分子量に関係なく、DFRC 反応一段階目の  $\alpha$  位の臭素化が完全に進行すると仮定すると、DFRC の第二段階である脱離反応に問題があり、十量体以下のものとは異なる挙動を示した。それは、高分子量のために、*E* 体を与える  $C_\alpha-C_\beta$  結合間のコンフォメーション変化に制限が生じた、と推定している。この制限された脱離反応が、モデルポリマーの低い DFRC 収率ももたらしていると考えられる。

表 3.2. DFRC 分解化合物の収率および Ac-CA の *E/Z* 比。

|                  | <i>Erythro</i>              | <i>Threo</i>                | Model polymer                                                |                                                              |                                                              |                                                              |
|------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
|                  |                             |                             | LM-19                                                        | LM-9                                                         | LM-5                                                         | LM-1                                                         |
| $DP_n$           | 2                           | 2                           | 2.60                                                         | 10.3                                                         | 21.9                                                         | 35.8                                                         |
| Yields (%)       | 96.2 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup> | 98.9 $\pm$ 1.1 <sup>a</sup> | 87.5 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup><br>(93.2 $\pm$ 3.1) <sup>a</sup> | 79.9 $\pm$ 0.6 <sup>c</sup><br>(85.0 $\pm$ 2.9) <sup>e</sup> | 25.9 $\pm$ 2.6 <sup>d</sup><br>(30.1 $\pm$ 1.6) <sup>f</sup> | 24.4 $\pm$ 3.2 <sup>d</sup><br>(26.3 $\pm$ 3.4) <sup>f</sup> |
| <i>E/Z</i> ratio | 7.0                         | 7.0                         | 7.4                                                          | 7.2                                                          | 3.5                                                          | 3.8                                                          |

上段の収率値は Ac-CA の *E* 体と *Z* 体の合計収率である。下段の括弧内の収率は Ac-CA と \* で示された未同定化合物の合計である。収率値の上付き文字が同一でない場合、Tukey 検定により、 $p < 0.05$  で統計的に有意な差があることを示す。

### 3.4 第三章のまとめ

*erythro* 型および *threo* 型二量体と、 $DP_n$  の異なる  $\beta$ -O-4'型モデルポリマーを調製した。DFRC 法は相対立体配置に関わらず、二量体を定量的に分解した。しかし、 $DP_n$  の高いモデルポリマーに対しては、 $DP_n$  が上昇すると DFRC 法の分解収率は低減し、反応効率が重合度に依存することが明らかになった。この結果は、チオアシドリス法と同様な傾向を示したことにより、分解法に基づく他のリグニン分析法も、 $\beta$ -O-4'型モデルポリマーを用いて、反応効率を再検証する必要があると思われる。

## 第 4 章

### 総括

## 第4章 総括

博士課程当初の研究課題は「リグニンの成長反応の解明」であり、その小課題として、蛍光を用いた基質間距離測定 (FRET) と成長反応で得られたリグニン構造の化学分解解析を予定していた。しかし、小課題の基礎となる蛍光測定法と DFRC 法に疑義が持たれたので、本博士論文研究では、研究課題を「リグニン分析法の再検証」に変更し、従来から高頻度で用いられるリグニン分析法に潜在する問題点を明らかにし、その解決法を見出すことを目的とした。以下に、リグニンの蛍光測定法と DFRC 法に対して再検証した結果をまとめる。

### (1) リグニンの蛍光測定法の再検証

酸素雰囲気下とアルゴン雰囲気下で、280 nm の励起光を MWL と SKL に 12 時間連続照射して、蛍光スペクトルに与えた影響を以下に列記する。この結果を図式化したものを、図 4.1 に示す。

- ① ガス雰囲気に関わらず両リグニン溶液において、僅か照射 10 分間で蛍光スペクトルが変化した。このことは、短時間 UV に曝されることで、スペクトルに有意な変化をもたらすことを示した。したがって、この問題を解決する方法として、リグニン溶液の蛍光スペクトルおよび濃度を測定する際、リグニンの保管および、その溶液の調製は暗所で行い、測定直前まで励起光のシャッターを閉じるなどの十分な遮光が必要であることが明確になった。
- ② 希ガス (Ar) 雰囲気下で長時間照射すると、MWL と SKL では異なる蛍光スペクトル変化 ( $E_{\text{max}}$  と FI の増減) を示した。このことは、リグニンの光反応は、調製法に依存することを示した。しかし、酸素雰囲気下で照射を行うと、照射初期の  $E_{\text{max}}$  の減少と FI の減少、照射後期の  $E_{\text{max}}$  増加と FI の増加が、両リグニン溶液で観測された。このことから、両リグニンは酸素の影響を強く受け、類似の光反応を示すと推定された。
- ③ Ar 雰囲気下で、MWL は、照射により光分解を示した。一方、酸素雰囲気下では、照射初期に Ar 雰囲気よりも顕著な光分解を受けていた。しかし、照射後期に光重合すると

いう、Ar とは異なる挙動を示した。

- ④ SKL は、ガス雰囲気に関わらず、照射初期に光重合が優先し、後期には光分解を示し、MWL とは全く異なる光反応を示した。したがって、酸素雰囲気下での UV 光照射がリグニンの構造に及ぼす影響は、MWL で顕著であることが明示された。
- ⑤ リグニン溶液および雰囲気ガスに関わらず、UV 光照射により非共役カルボニル基の生成が確認された。しかし、酸素雰囲気下における SKL だけは、共役カルボニル基に帰属される赤外線吸収バンドを示し、SKL 中の $\alpha$ 位の第二級ヒドロキシ基が、UV 光照射と酸素の影響で酸化されたと推測された。このことは、MWL に比べ、SKL がフェノール性ヒドロキシ基に富むことと関連していると考えられた。

| MWL          |                                                                 | SKL                                                         |                                                         |
|--------------|-----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| アルゴン雰囲気      |                                                                 | アルゴン雰囲気                                                     |                                                         |
| 蛍光スペクトル      | 照射直後<br>(10 分)<br>$Em_{max} \uparrow$<br>$FI \uparrow$          | 照射中期<br>(4 時間)<br>新ピーク出現<br>$FI \downarrow$                 | 照射後期<br>(4時間~12 時間)<br>$Em_{max}$ 一定<br>$FI \downarrow$ |
| 構造変化 (SEC)   | 低分子化                                                            |                                                             | 低分子化                                                    |
| 構造変化 (FT-IR) |                                                                 |                                                             | 非共役<br>カルボニル生成                                          |
| 酸素雰囲気        |                                                                 | 酸素雰囲気                                                       |                                                         |
| 蛍光スペクトル      | 照射直後<br>(10 分~2 時間)<br>$Em_{max} \downarrow$<br>$FI \downarrow$ | 照射後期<br>(2時間~12 時間)<br>$Em_{max} \uparrow$<br>$FI \uparrow$ |                                                         |
| 構造変化 (SEC)   | 低分子化                                                            | 高分子化                                                        |                                                         |
| 構造変化 (FT-IR) |                                                                 | 非共役<br>カルボニル生成                                              |                                                         |
| 光分解反応が優先     |                                                                 | 光重合反応が優先                                                    |                                                         |

図 4.1 励起光照射によるリグニンの光反応のまとめ

本研究では、リグニンのプロピレングリコール溶液を研究対象としたが、プロピレングリコールには 280 nm を吸収するようなクロモフォアがないことから、UV 光照射によるリグ

ニンの構造変化はリグニンのみ由来すると推定される。したがって、溶液でなく固体状態においても、これらのリグニンは光反応を容易に起こすことが考えられる。このことは、リグニンを蛍光材などの用途に利用する時にも起きる現象と推測され、開発すべき材料の光安定性にも注視すべきことを示している。特に、酸素雰囲気下の結果は、空気中での長時間の光反応を反映するものであり、リグニンベースの工業原料の寿命予測に有益な情報となりうる。

## (2) DFRC 法の再検証

$\beta$ -O-4' 結合を完全に開裂させるといわれていたチオアシドリシス法が、 $\beta$ -O-4' 型のモデルポリマーを完全に分解できないという Y. Kanazawa らの報告 (Kanazawa *et al.* 2009) に基づき、本研究では、同じく  $\beta$ -O-4' 結合を開裂させるという DFRC 法の分解効率について検証した。その結果を列記する。

- ① *erythro* 体と *threo* 体の二量体に対する DFRC 分解物収率は、いずれもほぼ 100%を示した。このことより、DFRC 法における初期の反応は、ヒドロキシ基の相対配置には影響を受けないことが明らかになった。
- ② SEC から求められた数平均重合度 2.6 (ポリスチレンに対する相対重合度) のモデルオリゴマー (三量体と推定される) では、分解収率が 87.5%と、二量体の収率と比べて有意に減少した。したがって、DFRC 法は、重合度が少し増加するだけでも、定量的に進まないことが明らかになった。
- ③ DFRC 法の反応率の低下は、重合度の増加と共に進行し、10.3 量体では 79.9%、21.9 量体で 25.9%、35.8 量体では 24.4%へと減少した。しかし、統計的には、21.9 量体と 35.8 量体の間には有意な差がなかった。
- ④ 得られた DFRC 分解物モノマーの *E/Z* の値は、二量体では、7.0 であったが、モデルポリマーの *DP* が 20 以上になると 4 未満になった。このことは、DFRC 法における 2



段階目の脱離反応が、高分子量のモデルポリマーでは良好に進行しないことが理由と考えられた。さらに、この脱離反応の抑制が、モデルポリマーに対する低い分解収率につながっていると結論付けた。

④の解決法として、高分子量のモデルポリマーの収率向上は、分子運動を促進する高温での反応が好ましいと考えられるが、想定できない副反応も考えられるため、今後の課題である。

近年、HSQC や HMBC などの二次元 NMR を用いたリグニン構造解析が一般的となったが、これらの測定には、リグニンの溶液が必要である。したがって、細胞壁中のリグニン、言い換えれば、不溶性リグニンの構造を推定するには、本研究で対象にした DFRC 法やチオアシドリシス法が依然として主要な分析法として位置付けられる。しかし、本研究で明らかになったように、 $\beta$ -O-4'結合のみで長くつながった領域をもつリグニンの分解収率は、縮合構造に富むリグニンと同様に、低い収率で得られる可能性が高い。木材中には、実際、およそ百個のモノリグノールが、 $\beta$ -O-4'結合のみで結合している領域もあると報告されているので (Hori and Meshitsuka 2000)、DFRC 法などの化学分解法だけでは過小評価の問題が生じる。これを解決するには、リグニン単離法、特に、Cellulolytic enzyme lignin (CEL) の単離法と NMR を組み合わせた分析手法が有力な手段になると思われる。なぜなら、48 時間磨砕した木材から得られる CEL は、完全溶解するためであり (Chang *et al.* 1975)、種々の磨砕時間の CEL と NMR 測定とで、細胞壁リグニン構造の推定が可能となる。しかし、磨砕による結合開裂などを推定する補完分析法として、今後も、DFRC 法などの化学分解法は重要であり、その収率補正に本研究が寄与すると考えている。

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるに当たり、終始、懇切丁寧に御指導とご鞭撻頂いた北海道大学大学院農学院農学専攻環境フロンティアコース木材化学研究室の浦木康光教授、重富顕吾講師、鈴木栞助教に深く感謝いたします。また、論文の取りまとめに当たりご助言頂いた副査の玉井裕教授に感謝申し上げます。

MWL 調製に当たり、木材工学研究室の佐々木義久技術職員には、エゾマツの鉋掛けのご協力を頂き、林産製造学研究室からは遊星型ボールミルを貸し出して頂きました。また、北海道大学農学部 GC-MS・NMR 室の高田祐輔技術専門技士に FI-MS 測定依頼を引き受けて頂きました。農学院図書館の職員の皆様には、文献の検索や取り寄せにご協力頂きました。この場を借りて、感謝申し上げます。

日々の研究活動において多くご支援を頂いた、木材化学研究室の先輩、同期、後輩に感謝申し上げます。また、日々の事務処理のご協力をして頂いた第 8 事務室と第 6 事務室の職員の皆様に感謝します。

## 参考文献

- Akiyama, T.; Goto, H.; Nawawi, D. S.; Syafii, W.; Matsumoto, Y.; Meshitsuka, G. Erythro/threo ratio of  $\beta$ -O-4-structures as an important structural characteristic of lignin. Part 4: Variation in the erythro/threo ratio in softwood and hardwood lignins and its relation to syringyl/guaiacyl ratio. *Holzforschung* **2005**, *59*, 276–281.
- Albinsson, B.; Li, S.; Lundquist, K.; Stomberg, R. The origine of lignin fluorescence. *Journal of Molecular Structure* **1999**, *508*, 19-27.
- Almgren, T.; Josefsson, B.; Nyquist, G. A FLUORESCENCE METHOD FOR STUDIES OF SPENT SULFITE LIQUOR AND HUMIC SUBSTANCES IN SEA WATER. *Analytica Chimica Acta* **1975**, *78*(2), 411-422.
- Argyropoulos, D. S.; Sun, Y. Photochemically Induced Solid-State Degradation, Condensation, and Rearrangement Reactions in Lignin Model Compounds and Milled Wood Lignin. *Photochemistry and Photobiology* **1996**, *64*(3), 510-517.
- Aso, T.; Koda, K.; Kubo, S.; Yamada, T.; Nakajima, I.; Uraki, Y. Preparation of Novel Lignin-Based Cement Dispersants from Isolated Lignins. *Journal of Wood Chemistry and Technology*. **2013**, *33*, 286–298.
- Björkman, A. Studies on Finely Divided Wood Part 1. Extraction of Lignin with Neutral Solvents. *Svensk papperstidning* **1956**, *59*, 477-485.
- Björkman, A. Studies on Finely Divided Wood Part 5. The effect of milling. *Svensk papperstidning* **1957**, *60*, 329-335.
- Björkman, A.; Börje, P. Studies on Finely Divided Wood Part 2. The properties of lignins extracted with neutral solvents from softwood and hardwood. *Svensk papperstidning* **1957**, *60*, 158-169.
- Bublitz, W. J.; Meng, T. Y. The fluorometric behavior of pulping waste liquors. -A valuable tool for lignin and pulping research. *TAPPI* **1978**, *61*(2), 27-30.

- Bublitz, W. J.; Wade, D. C. Applying waste liquor fluorescence to control pulp quality. *Svensk papperstidning*, **1979**, *18*, 535–538.
- Chakar, F. S.; Ragauskas, A. J. Review of current and future softwood kraft lignin process chemistry. *Industrial Crops and Products* **2004**, *20*, 131-141.
- Chang, H-m.; Cowling, E. B.; Brown, W. Comparative Studies on Cellulolytic Enzyme Lignin and Milled Wood Lignin of Sweetgum and Spruce. *Holzforschung* **1975**, *29*, 153-159.
- Chirio-Lebrun, M-C.; Prats, M. Fluorescence resonance energy transfer (FRET): theory and experiments. *Biochemical Education* **1998**, *26*, 320-323.
- Crestini, C.; Lange, H.; Setta, M.; Argyropoulos, D. S. On the structure of softwood kraft lignin. *Green Chemistry* **2017**, *19*, 4104-4121.
- Dard, H. Papermaking The history and technique of an ancient craft; DOVER PUBLICATIONS, INC. New York. 1884; pp 575.
- Davidson, R. S. The Photodegradation of some naturally occurring polymers. *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **1996**, *33*, 3-25.
- Destiné, J-N.; Wang, J.; Heitner, C.; Manley, R. ST. J. The Photodegradation of Milled-Wood Lignin. Part I : The Role of Oxygen. *Journal of Pulp and Paper Science* **1996**, *22(1)*, 24-30.
- Donaldson, L. A. Abnormal Lignin Distribution in Wood from Severely Drought Stressed *Pinus Radiata* Trees. *IAWA Journal* **2002**, *23(2)*, 161-178.
- Donaldson, L. A.; Radotic, K. Fluorescence Lifetime Imaging of Lignin Autofluorescence in Normal and Compression Wood. *Journal of Microscopy* **2013**, *251(2)*, 178-187.
- Donaldson, L. A.; Singh, A. P.; Yoshinaga, A.; Takabe, K. Lignin distribution in mild compression wood of *Pinus radiata*. *Canadian Journal of Botany* **1999**, *77*, 41-51.
- Donaldson, L. A.; Singh, A.; Raymond, L.; Hill, S.; Schmitt, U. Extractive distribution in *Pseudotsuga menziesii*: effects on cell wall porosity in sapwood and heartwood. *IAWA Journal*. **2019**, *40(4)*,

721-740.

Erdtman, G. A.; Sandén, R. Spectrographic Contributions to Lignin Chemistry. *Acta Chemica Scandinavica* **1968**, 22, 1187-1209.

Erdtman, G. A. Ultraviolet Spectroscopy of Lignin and Lignin Derivatives. *TAPPI* **1949**, 32(4), 160-166.

Erdmann, J.; Ueber die concretionen in den Birenen. *Annalen der Chemie und Pharmacie. Justus liebig's annalen der chemie* **1866**, 138, 1-19.

Förster, TH. Energiewanderung und Fluorezenz. *Naturwissenschaften* **1946**, 33, 166-175.

Freudenberg, K. Über Lignin. *Angewandte Chemie* **1939**, 52(20), 362–363.

Freudenberg, K.; Hübner, H. H. Oxyzimtalkohole und ihre Dehydrierungs-polymerisate. *Chemische Berichte* **1952**, 85(12), 1181-1191.

Freudenberg, K. BIOSYNTHESIS AND CONSTITUTION OF LIGNIN. *Nature* **1959**, 183, 1152-1155.

Freudenberg, K. Lignin: Its Constitution and Formation from *p*-Hydroxycinnamyl Alcohols. *Science* **1965**, 148(3670), 595-600.

Fujimoto, A.; Matsumoto, Y.; Chang, H-M.; Meshitsuka, G. Quantitative evaluation of milling effects on lignin structure during the isolation process of milled wood lignin. *Journal of Wood Science* **2005**, 51, 89-91.

Gierer, J.; Pettersson, I.; Studies on the condensation of lignin in alkaline media. Part II ., The formation of stilbene and arylcoumaran structures through neighbouring group participation reactions. *Canadian Journal of Chemistry* **1977**, 55, 593-599.

Haworth, W. N. The structure of carbohydrates. *Helvetica Chimica Acta* **1928**, 11, 534-548.

Hayashi, T.; Hosoya, T.; Miyafuji, H. Vanillin Production Pathway in Alkaline Nitrobenzene  
Oxidation of Guaiacylglyceriol- $\beta$ -Guaiacyl Ether. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*

**2023**, 71, 10124-10132.

Herzog, O. R.; Hillmer, A. Das ultraviolette Absorptionsspektrum des Lignins. *Absorptionsspektrum des Lignins* **1927**, 60(2), 365-366.

Hishiyama, S.; Otsuka, Y.; Nakamura, M.; Ohara, S.; Kajita, S.; Masai, E.; Katayama, Y. Convenient synthesis of chiral lignin model compounds via optical resolution: four stereoisomers of guaiacylglycerol- $\beta$ -guaiacyl ether and both enantiomers of 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxy-phenoxy)-propan-1-one (erone). *Tetrahedron Letters* **2012**, 53(7), 842–845.

Hon, N-S. D. Cellulose: a random walk along its historical path. *Cellulose* **1994**, 1, 1-25.

Hori, K.; Meshitsuka, G. Structural Heterogeneity of Hardwood Lignin: Characteristics of End-Wise Lignin Fraction. In *Lignin: historical, biological, and materials perspectives.*; 2000; ACS symposium series vol. 742, chapter 6, pp 172-185.

Ito, T.; Kawai, S.; Ohashi, H.; Higuchi, T. Characterization of new thioacidolysis products of sinapyl aldehyde and coniferyl aldehyde. *Journal of Wood Science* **2002**, 48(5), 409–413.

Jabłoński, A. Efficiency of Anti-Stokes Fluorescence in Dyes. *Nature* **1933**, 131, 363.

Johnson, D. B.; Moore, W. E.; Zank, L. C. The Spectrophotometric Determination of Lignin in Small Wood Samples. *TAPPI* **1961**, 44(11), 793-798.

Kanazawa, Y.; Kishimoto, T.; Koda, K.; Fukushima, K.; Uraki, Y. Evaluation of Reaction Efficiency of Thioacidolysis for Cleavage of  $\beta$ -O-4 Interunitary Linkages by Using  $\beta$ -O-4 Type Artificial Lignin Polymer. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **2009**, 29(2), 178–190.

Karplus, M. THE ANALYSIS OF MOLECULAR WAVE FUNCTIONS BY NUCLEAR MAGNETIC RESONANCE SPECTROSCOPY. *Journal of Physical Chemistry* **1961**, 64(12), 1793–1798.

Kasha, M.; Fifty years of the Jabłoński diagram. *Acta Physica polonica A* **1987**, 71, 661-670.

Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. Chemical synthesis of  $\beta$ -O-4 type artificial lignin. *Organic and*

- Biomolecular Chemistry* **2006**, 4(7), 1343-1347.
- Kishimoto, T.; Uraki, Y.; Ubukata, M. Synthesis of Bromoacetophenone Derivatives as Starting Monomers for  $\beta$ -O-4 Type Artificial Lignin Polymers. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **2008**, 28(2), 97-105.
- Klason, P. Om sulfittcellulosaframställningens teori samt om granvedens eteriska olja. *Svensk Kemisk Tidskrift* **1897**, 9, 133–140.
- Klason, P. Bericht über die Hauptversammlung des Vereins der Zellstoffund Papierchemiker. **1908**. 52, 50.
- Kolesnichenko, I. V.; Goloverda, G. Z.; Kolesnichenko, V. L. A Versatile Method of Ambient-Temperature Solvent Removal. *Organic Process Research & Development* **2020**, 24, 25–31.
- Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. In *Principles of Fluorescence Spectroscopy*; 2006; pp 623–673.
- Lapierre, C.; Monties, B.; Rolando, C.; Chirale, L. THIOACIDOLYSIS OF LIGNIN: COMPARISON WITH ACIDOLYSIS. *Journal of Wood Chemistry and Technology* **1985**, 5(2), 277–292.
- Lapierre, C.; Monties, B.; Rolando, C. Thioacidolysis of Poplar Lignins: Identification of Monomeric Syringyl Products and Characterization of Guaiacyl-Syringyl Lignin Fractions. *Holzforschung* **1986**, 40(2), 113–118.
- Lapierre, C.; Pollet, B.; Monties, B.; Rolando, C. Thioacidolysis of spruce lignin: GC-MS analysis of the main dimers recovered after Raney nickel desulphuration. *Holzforschung* **1991**, 45(1), 61–68.
- Lapierre, C.; Pollet, B.; Rolando, C. NEW INSIGHTS INTO THE MOLECULAR ARCHITECTURE OF HARDWOOD LIGNINS BY CHEMICAL DEGRADATIVE METHODS. *Research on Chemical Intermediates* **1995**, 21(3–5), 397–412.
- Leopold, B. Aromatic Keto- and Hydroxy-polyethers as Lignin Models. III. *Acta Chemica*

*Scandinavica* **1950**, 4, 1523-1537.

Li, Q.; Koda, K.; Yoshinaga, A.; Takabe, K.; Shimomura, M.; Hirai, Y.; Tamai, Y. and Uraki, Y.

Dehydrogenative Polymerization of Coniferyl Alcohol in Artificial Polysaccharides Matrices: Effects of Xylan on the polymerization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2015**, 63, 4613-4620.

Lin, Y. S.; dence, W. C. thioacidolysis. *Methods in lignin chemistry*; 1992 ; pp. 334-349.

Lu, F.; Ralph, J. Reaction of Lignin Model  $\beta$ -Aryl Ethers with Acetyl Bromide. *Holzforschung* **1996**, 50(4), 360-364.

Lu, F.; Ralph, J. Derivatization Followed by Reductive Cleavage (DFRC Method), a New Method for Lignin Analysis: Protocol for Analysis of DFRC Monomers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45(7), 2590–2592.

Lu, F.; Ralph, J. DFRC Method for Lignin Analysis. 1. New Method for  $\beta$ -Aryl Ether Cleavage: Lignin Model Studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1997**, 45(12), 4655-4660.

Lu, F.; Ralph, J. The DFRC Method for Lignin Analysis. 2. Monomers from Isolated Lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, 46, 547-552.

Lu, F.; Ralph, J. The DFRC Method for Lignin Analysis. Part 3. NMR Studies. *Journal of Wood chemistry and Technology* **2008**, 18(2), 219-233.

Lu, F.; Ralph, J.; THE DFRC (DERIVATIZATION FOLLOWED BY REDUCTIVE CLEAVAGE) METHOD AND ITS APPLICATIONS FOR LIGNIN CHARACTERIZATION. In *Lignin: Structural Analysis, Applications in Biomaterials and Ecological Significance*, 1st ed., Lu, F., Ed., Nova Publishers Science Publishers, 2014; pp 30–33.

Lundquist, K.; Josefsson, B.; Nyquist, G. Analysis of Lignin Products by Fluorescence Spectroscopy. *Holzforschung* **1978**, 32, 27-32.

Lyu, Y.; Suzuki, S.; Nagano, H.; Shigetomi, K.; Tamai, Y.; Tsutsumi, Y. and Uraki, Y. Effects of



- hemicelluloses on dehydrogenative polymerization of monolignols with cationic cell wall-bound peroxidase. *Carbohydrate Polymers* **2023**, *301*, 120305-120313.
- Lyu, Y.; Matsumoto, T.; Taira, S.; Ijiri, K.; Yoshinaga, A.; Shigetomi, K.; Uraki, Y. Influences of polysaccharides in wood cell walls on lignification in vitro. *Cellulose* **2021**, *28*, 9907-9917.
- Medintz, I.; Hildebrandt, N. FRET- Förster resonance energy transfer from theory to application; Wiley-VCH: Weinheim, 2014.
- Müller, U.; Rätzsch, M.; Schwanninger, M.; Steiner, M.; Zöbl, H. Yellowing and IR-changes of spruce wood as result of UV-Irradiation. The *Journal of Photochemistry and Photobiology B* **2003**, *69*, 97-105.
- Nishimura, H.; Kamiya, A.; Nagata, T.; Katahira, M.; Watanabe, T. Direct evidence for  $\alpha$  ether linkage between lignin and carbohydrates in wood cell walls. *Scientific reports* **2018**, *8*, 6538-6547.
- Patterson, F. R.; Hibbert, H. Studies on Lignin and Related Compounds. LXXII. The Ultraviolet Absorption Spectra of Compounds Related to Lignin. *Journal of the American Chemical Society* **1943**, *65*, 1862-1869.
- Patterson, R. F.; Keays, J. L. The spectrophotometric determination of lignin in sulphite cooking liquor. *Pulp and paper magazine of Canada* **1951**, *52*, 105-111.
- Payen, A. Mémoire sur la composition du tissu propre des plantes et du ligneux. *Comptes Rendus Chimie* **1838**, *7*, 1052-1056.
- Peng, J.; Lu, F.; Ralph, J. The DFRC Method for Lignin Analysis. 4. Lignin Dimers Isolated from DFRC-Degraded Loblolly Pine Wood. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **1998**, *46*, 553–560.
- Ralph, S.; Ralph, J.; Lu, F. NMR database of lignin and cell wall model compounds.  
[https://www.glbrc.org/databases\\_and\\_software/nmrdatabase/NMR%20Database%202024-08%20Coniferyl%20Alcohol%203-](https://www.glbrc.org/databases_and_software/nmrdatabase/NMR%20Database%202024-08%20Coniferyl%20Alcohol%203-)

Dimer%20Mix%20Sidechain%20HSQC%20compilation.pdf (accessed Aug 15, 2025).

Sarkanen, K. V.; Ludwig, C. H. LIGNINS Occurrence, Formation, Structure and Reactions. Reactions in alkaline pulping; 1971; pp 639-694.

Sato, S.; Watanabe, R.; Shigetomi, K.; Tamai, Y.; Tsutsumi, Y.; Uraki, Y. Role of O-acetyl galactoglucomannan in softwood lignification. *Carbohydrate Polymers* **2025**, *369*, 124303-124309.

Schulze, E. Zur Kenntniss der chemischen Zusammen-setzung der pflanzlichen Zellmembranen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* **1891**, *24*, 2277-2287.

Schulze, F. Beitrage zur kenntnis des lignins. *Chemisches Zentralblatt* **1857**, *21*, 321-325.

Schwanninger, M.; Rodrigues, J. C.; Pereira, H.; Hinterstoisser, B. Effects of short-time vibratory ball milling on the shape of FT-IR spectra of wood and cellulose. *Vibrational Spectroscopy* **2004**, *36*, 23-40.

Shah, S.; Gryczynski, Z.; Chib, R.; Fudala, R.; Baxi, A.; Borejdo, J.; Synak, A.; Gryczynski, I. Demonstration of FRET in Solutions. *Methods and Applications in Fluorescence* **2016**, *4*, 15001-15009.

Shigetomi, K.; Uraki, Y. 5,5'-type coniferyl alcohol dimer as a potential lignin precursor: an investigation of reactivity in dehydrogenative polymerization. *Journal of Wood Science* **2025**, *71*(1), 38-47.

Shigetomi, K.; Onoda, T.; Miyazaki, J.; Suzuki, S.; Uraki, Y. Solubility and structures of  $\beta$ -O-4 type lignin model compounds with different molar masses in aqueous 1,4-dioxane. *Holzforschung* **2025**, *80*(2), 89-98.

Singh, A. P.; Donaldson, L. A. Ultrastructure of tracheid cell walls in radiata pine (*Pinus radiata*) mild compression wood. *Canadian Journal of Botany* **1999**, *77*, 32-40.

Singh, A. P.; Schmitt, U.; Möller, R.; Dawson, B. S. W.; Koch, G. Ray tracheids in *Pinus radiata* are

- more highly resistant to soft rot as compared to axial tracheids: relationship to lignin concentration. *Wood Science and Technology* **2006**, 40, 16-25.
- Sjöström, E. (1993) *Wood Chemistry: Fundamentals and applications*, 2nd ed. Academic Press, New York.
- Sonntag, C. V. STRAHLENCHEMIE VON ALKOHOLEN-I DIE WASSERSTOFFBILDUNG BEI DER UV-PHOTOLYSE DEUTERIIERTER ISOPROPANOLE. *Tetrahedron* **1968**, 24, 117-121.
- Staudinger, H. Über Polymerisation. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft A* **1920**, 53, 1073-1085.
- Terashima, N.; Fukushima, K.; HE, L-F.; Takabe, K. (1993) Forage Cell Wall Structure and Digestibility: Comprehensive Model of the Lignified Plant Cell Wall, American society of Agronomy, Madison.
- Terryn, C.; Paës, G.; Spriet, C. FRET-SLiM on native autofluorescence: a fast and reliable method to study interactions between fluorescent probes and lignin in plant cell wall. *Plant Methods* **2018**, 14, 74-84.
- Watanabe, T.; Azuma, J.; Koshijima, T. A Convenient Method for Preparing Lignin-Carbohydrate Complex from *Pinus densiflora* Wood. *Mokuzai Gakkaishi* **1987**, 33(10), 798-803.
- 紙パルプ技術協会 (1996) 紙パルプ製造技術シリーズ① クラフトパルプ、新日本印刷株式会社、16-17 頁
- セルロース学会 (2008) セルロースの事典、株式会社 朝倉書店、77-81 頁
- 中野準三 (1990) リグニンの化学 -基礎と応用- (増補改訂版)、ユニ出版株式会社、144-145 頁
- 川田俊成、伊藤和貴 (2021) 木材科学講座 4 木材化学、海青社、64-65 頁
- 船岡正光、阿部勲 (1983) クラフトリグニンの化学構造. 三重大學農學部演習林報告
- 光化学協会 (2014) 光化学の事典、株式会社 朝倉書店、30 頁

一般社団法人 日本木材学会 (2023) 木材学 -基礎編-、(株) 青海社、67-68 頁、268-172 頁  
福島和彦、船田良、杉山淳司、高部圭司、梅澤俊明、山本浩之 (2024) 木質の形成 第3  
版、(株) 青海社、281 頁、395-408 頁