



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	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16777
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99622
Type	doctoral thesis
File Information	TAKEUCHI_Keiichiro_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士 (農学)

氏名 竹 内 啓 一 郎

学 位 論 文 題 名

リグニン分析法の再検証

-蛍光測定法と derivatization followed by reductive cleavage (DFRC) 法-

博士課程当初の課題は、「リグニンの成長反応の解明」であった。この課題を達成するために立てた小課題は、蛍光を用いた基質間距離 (モノリグノール、オリゴリグノール、高分子リグニン間の距離測定) と、成長反応で得られたリグニンの構造解析法の確立であった。最初の小課題の準備研究として、各種の単離リグニンの励起波長と蛍光波長との関係を明らかにする指紋蛍光測定を行った。その結果、測定を繰り返すと、最大蛍光強度を与える蛍光波長 (E_m) が測定毎に変化することが明らかになった。そこで、紫外線 (UV) を吸収する単離リグニンは、UV 照射により、構造が変化することが示唆され、その詳細を明らかにする本研究課題を優先して実施することにした。

また、第 2 の小課題を遂行する分析手法として、J. Ralph らが提唱した、derivatization followed by reductive cleavage (DFRC) 法 (*Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45, 4655-4660) を想定したが、この反応効率にも疑義が持たれたので、リグニンのモデル化合物を用いて、反応効率を明らかにするという課題に変更した。したがって、本論文は、「リグニン分析法の再検証」と題し、従来からリグニン分析に有効とされていた手法に対し、その有用性および限界を明示することを目的とした。

リグニンの蛍光分析の再検証

前述した準備研究より、励起波長の紫外光を長時間単離リグニンの溶液に照射すると、最大蛍光を与える波長が変化することが予想された。さらに、UV 吸光に関する過去の文献から、照射による影響はガス雰囲気大きく依存することも予想された。そこで、単離リグニンとして、天然リグニンの構造に近いと推測されている針葉樹磨砕リグニン (MWL) と、工業リグニンに分類される針葉樹クラフトリグニン (SKL) を用い、両リグニンのプロピレングリコール溶液に、励起波長である 280 nm の紫外光を、酸素雰囲気とアルゴン雰囲気で 12 時間連続照射しつつ、その蛍光スペクトルを 10 分毎に測定した。

MWL では、初回の指紋蛍光測定で得られた最大蛍光強度 (FI_{max}) を与える励起波長を、酸素雰囲気下で照射すると、照射直後に、蛍光波長 ($E_{m_{max}}$) 364 nm において、 FI_{max} を示した。その後、僅か 10 分の照射延長で、 $E_{m_{max}}$ は 2.8 nm 青方偏移し、 FI_{max} が 14% 減少した。この $E_{m_{max}}$ の青方偏移と FI_{max} の減少は、照射 2 時間 30 分まで継続し、照射直後に比べ、19 nm の偏移と、35% の減少を示した。その後、12 時間照射まで、 $E_{m_{max}}$ はほぼ変化しなかったが、 FI_{max} は、増加するという逆の傾向が観察された。サイズ排除クロマトグラフィー (SEC) による分子量測定から、この MWL への照射は、照射初期には光分解による低分子化をもたらし、照射 2 時間以降は、光重合による高分子化が生じたことが示された。

一方、アルゴン雰囲気下では、3 時間 50 分照射まで、 $E_{m_{max}}$ の赤方偏移が観測され、同時に、 FI_{max} も増加した。これは、酸素雰囲気下とは、逆の現象であった。その後、照射時間を 12 時間まで延長すると、赤方偏移していた $E_{m_{max}}$ が、 FI_{max} の増加を伴いつつ青方偏移を示すとともに、18 nm 短い波長に新たな蛍光ピークが出現した。SEC 分析から、アルゴン中での UV 照射は、光分解のみをもたらすことが示唆された。したがって、酸素雰囲気下での高分子化には、酸素が関与することが推測される。

SKL の酸素雰囲気下での励起光照射では、照射 7 時間まで、 $E_{m_{max}}$ と FI_{max} の減少が観測され

た。それ以降は一転して、 Em_{max} が増加するとともに、 FI_{max} も増加した。一方、Ar 雰囲気では、 Em_{max} の有意な変化は観測されなかったが、 FI_{max} は単調に増加した。SEC 分析より、2 つのガス雰囲気共通で、照射初期に光重合が起き、12 時間以降は光分解が観測された。しかし、初期の分子量増加は、アルゴン雰囲気下で顕著であり、酸素が光重合を阻害したことが推測された。

赤外分光 (FT-IR) 測定から、MWL、SKL の両者とも、ガス雰囲気に関わらず、励起光照射により、カルボニル基に由来するバンドの生成が観測された。特に、酸素雰囲気下で処理した SKL は、共役カルボニルに帰属されるバンドが確認された。よって、照射は、リグニンのヒドロキシ基の酸化を引き起こすと考えられた。

以上の励起光となる UV 照射は、リグニンの構造変化を引き起こすが、リグニン調製法およびガス雰囲気によって異なる変化を与えるため、予測は困難であるといえる。したがって、溶液の低濃度測定に好適な蛍光分析をリグニンに適用する時には、試料の遮光や、短時間測定など、より細心の注意が必要であることが示された。

derivatization followed by reductive cleavage (DFRC) 法の再検証

ニトロベンゼン酸化法、チオアシドリシス法や DFRC 法などの化学的リグニン分解法は、 β -O-4' 結合に代表されるアリールエーテル結合を開裂し、単量体サイズの反応生成物を与える。その生成物の収量および組成から、リグニンを構成するモノマー比の定量や単位間結合を見積もることができ、リグニンの構造研究に広く用いられてきた。しかし、これらの分解法の反応効率は二量体モデルを中心に検討され、高分子量リグニンに対する分解効率は不明であった。Y. Kanazawa らは、 β -O-4' 結合のみで繋がったリグニンモデルポリマーに対するチオアシドリシス法の分解効率を調べた結果、その効率は重合度 (DP) の増加に伴い、著しく低下することを明らかにした (Journal of Wood Chemistry and Technology, 2009, 29(2), 178–190)。私の当初の研究課題で用いようとした DFRC 法でも、その分解効率の DP 依存性があるとの危惧を抱き、 β -O-4' で繋がった二種の二量体ジアステレオマー (erythro 体と threo 体)、および DP の異なるリグニンモデルポリマーを用いて、DFRC 法の分解効率を明らかにすることにした。

二種のジアステレオマーはアセトバニロンから合成し、アセトニド誘導体で変換してその立体構造を 1H NMR で決定した。また、 $DP = 2.6, 10.3, 21.9$ と 35.8 のモデルポリマーは、所属する研究室に保管されているものを使用した。

DFRC 法では、分解反応の後にアセチル化を行うためアセチル化コニフェリルアルコール (Ac-CA) の *E* 型とその *Z* 型が生成物として得られ、それをガスクロマトグラフィーで定量化する。二量体モデルでは、erythro 体と threo 体の収率に有意差はなく、定量的に Ac-CA が得られた。さらに、*E* 型と *Z* 型の Ac-CA の比は 7 : 1 で、構造的に安定な *E* 型が主生成物であった。

数平均重合度 (DP_n) が 2.6 のモデルポリマーの分解効率は、二量体モデルの効率よりも 8% 低下した。 $DP_n = 10.3$ のモデルでは、79.9% であった。これは、 DP_n が同程度のモデルポリマーに対するチオアシドリシス効率 (74%) と類似していた。さらに、 $DP_n = 21.9$ と 35.8 のモデルの分解効率は、それぞれ 25.9% と 24.4% と著しく低下した。以上の結果から、DFRC 法の反応効率も、チオアシドリシス法と同様に、分子量に依存することが明らかとなった。低重合度のモデルから生成した Ac-CA の *E/Z* は、二量体と同程度となったが、20 量体以上のモデルでは、4.0 以下を示した。DFRC 法では、*E* 型 Ac-CA を与えるような、臭素付加反応と脱離を容易にするコンフォメーション変化が重要な反応であるが、高重合度モデルでは、この反応が良好に進行せず、*E* 型 Ac-CA 生成量の減少と反応効率の低下を招いたと推測している。

本研究では、リグニンの定量研究用いられる蛍光測定法の問題点や、リグニンの構造分析に用いられてきた DFRC 法の高分子リグニンに対する反応効率について明らかにした。これらの方法は、リグニン分析法として長年用いられてきたものであり、本研究はこれらを否定しているのではなく、正確な測定手順に対する知見、およびその定量化に関する新規な知見を与える研究になったと考えている。