〔原 著 論 文〕

水溶性天然高分子の環境調和型ヒドロキシ基エステル化反応の開発

松井 栄樹^{*1}・吉田 竜二^{*1}・辻 大介^{*1}
木本 雄一朗^{*2}・大塚 雄市^{*3}

(受付 2016 年 6 月 30 日・審査終了 2016 年 8 月 10 日)

(早期公開 2016 年 9 月 14 日・DOI:10.1295/koron.2016-0041)

要 旨 本研究ではでんぷん(アミロース)をエステル化する方法として、水を溶媒として用い、環境負荷の少ない変換法であるショッテンバウマン反応を選択し検討を行った。まず、アミロースを飽和 Na_2CO_3 水溶液中で塩化ベンゾイルと反応を行ったところ、目的のベンゾイル化が進行し、得られた生成物を ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR, MALDI 測定により詳細な同定を行った。また、アミロースは同様の反応条件にてシンナモイル化および *p*-*t* プチルベンゾイル化が進行し、他の多糖類であるペクチンのベンゾイル化、シンナモイル化も進行することが明らかとなった。以上より、本手法は水溶性多糖類のエステル化反応として広く利用できることが明らかとなった。

1 緒 言

セルロースは天然で植物によって生成される多糖高分子の一種で、地球上で年間およそ 1 千億 t 生産されているものの工業利用は少量である。その理由としてセルロースが極めて安定な構造であること、ヘミセルロースやリグニンと共存しており分離が困難であり、操作が煩雑であること、セルロースが溶媒に溶解せず均一反応を行えないことが挙げられる。

セルロースは通常有機溶媒に溶解しないが、高極性有機溶媒と無機塩存在下の限られた条件でのみ溶解することが知られている。たとえば、ジメチルアセトアミドや *N*-メチルピロリドンと塩化リチウムの組合せや¹⁾、ジメチルスルホキシドとフッ化テトラブチルアンモニウム²⁾との組合せである。また、セルロースを水中に溶解させるためには、18% 水酸化ナトリウム水溶液を用いてアルカリセルロースを調整する方法があるが、反応条件が過酷なため分子量低下が起こっている³⁾。

一方、同じ多糖高分子でもでんぷん(アミロース)やペクチンはゲル化を伴うものの、熱水や水に溶けることが知られており、増粘安定剤やゲル化剤などの食品用途と

して広く利用されている。また、寒天(アガロース)は食品用途としてのみならず、生体分子である核酸分離のための電気泳動用ゲルとして用いられている。これらの水溶性多糖高分子を効率的に利便性の高い手法により変換することは、天然に存在する未利用バイオマスを有効に活用する一助となると考えられる。

筆者らはこれまでに水溶性多糖類骨格を樹脂の基材とする研究⁴⁾の一環として、通常ピリジンや DMF などの高極性有機溶媒中、無水条件下にて行われている多糖類のエステル化について、水中で反応を行うことが可能なショッテンバウマン反応による検討を行ってきた⁵⁾。

ショッテンバウマン反応は、酸ハライドにヒドロキシ基もしくはアミノ基を作用させ、対応するエステルもしくはアミドを得る反応であり、塩基として水酸化ナトリウムなどの塩基水溶液を用いる二層系条件の反応である。また、生成する中和塩は塩化ナトリウムであることから、処理が容易かつクリーンな反応系であることが知られている⁶⁾。

これらの特徴のあるショッテンバウマン反応を用いて、水溶性多糖類(アミロース、ペクチン)への芳香族アシル化反応を行い、生成物の多面的な機器分析により反応の詳細について解析を行うとともに、製法および製品のいずれもが環境に適し、利便性の高い高分子変換法の開発を目指して研究を行った。

^{*1} 福井工業高等専門学校物質工学科 (☎ 916-8507 鯖江市下司町)

^{*2} 長岡技術科学大学機械創造工学課程 (☎ 940-2188 長岡市上富岡町 1603-1)

^{*3} 長岡技術科学大学大学院技術経営研究科 (☎ 940-2188 長岡市上富岡町 1603-1)

2 実験

2.1 試薬

水溶性多糖類であるアミロースおよびペクチン(メチル化度 6.0%), 塩化ベンゾイル, 塩化シンナモイル, 塩化 *p*-*t*-ブチルベンゾイルは和光純薬(株)製を用いた。

2.2 ショッテンバウマン反応によるベンゾイル化および *p*-*t*-ブチルベンゾイル化⁵⁾

水溶性多糖類 10 g を飽和 Na₂CO₃ 水溶液 100 mL に溶解した後, 室温で塩化ベンゾイルまたは塩化 *p*-*t*-ブチルベンゾイル 5 mL をゆっくり滴下し, 12 時間かくはんした。生成した沈殿物をろ過後, 蒸留水で洗浄し, 50°C で 3 時間真空乾燥し, ベンゾイル化生成物を得た。それぞれの収率は, アミロースは 6 位の末端ヒドロキシ基が, ペクチンは 2 位のヒドロキシ基がベンゾイル化された化合物を基準として算出した結果, アミロースのベンゾイル化反応は収率 72%, ペクチンのベンゾイル化反応は収率 62%, アミロースの *p*-*t*-ブチルベンゾイル化反応は収率 23% で進行した。得られたベンゾイル化生成物については ¹H NMR, ¹³C NMR, IR, MALDI 測定により同定を行った。

2.3 ショッテンバウマン反応によるシンナモイル化

水溶性多糖類 5 g を飽和 Na₂CO₃ 水溶液 70 mL に溶解した後, 室温で塩化シンナモイル 2.5 g を溶解させた 30 mL の THF 溶液をゆっくり滴下し, 12 時間かくはんした。生成した沈殿物をろ過後, 蒸留水で洗浄し, 50°C で 3 時間真空乾燥し, シンナモイル化生成物を得た。アミロースのシンナモイル化反応は収率 48%, ペクチンのシンナモイル化反応は収率 38% で進行した。得られたシンナモイル化生成物については ¹H NMR, ¹³C NMR, IR 測定により同定を行った。

2.4 機器測定

¹H NMR, ¹³C NMR 測定については, Bruker 社製 Avance400 を用いて重 DMSO 中 64 回および 20480 回の積算を行った。リファレンスは観測された DMSO の溶媒シグナル (¹H NMR, 2.50 ppm および ¹³C NMR, 39.5 ppm) を用いた。IR 測定は PerkinElmer 社製 Spectrum 100 による ATR (attenuated total reflection) 測定 (1 回反射ダイヤモンド/ZnSe) により行い, 2 cm⁻¹ の分解能で 4 回の積算を行った。MALDI 測定は Bruker 社製 UltrafleXtreme を用いて DHBA をマトリックスとして使用し, 20000 回の積算を行った。

3 結果および考察

まず, ショッテンバウマン反応を本反応系に適用するにあたり, アミロースと塩化ベンゾイルを用いて反応を行った (Figure 1 上段)。アミロースの主鎖はグルコースが α-1,4 結合した直鎖状の天然多糖高分子である。

Figure 1. Preparation of benzoyl polysaccharides in water.

ショッテンバウマン反応は有機層である酸クロリドと水層に溶かした糖類のヒドロキシ基を界面で反応させるエステル化反応である。この方法では水溶媒中で反応を行うことができ, 反応生成物はベンゾイル化されることで疎水性が高くなるとともに不溶化し沈殿を生成する。また, 同時に生成する中和塩は塩化ナトリウムであり, 反応生成物を水で洗浄することで精製できるという利点がある。また, 有機溶媒に溶けにくい多糖類についても, 水や熱水に溶解すれば本反応系が適用可能である。

ベンゾイル化後, 後処理を行い得られた生成物を ¹H NMR 測定を行ったところ, アミロースの糖骨格の水素原子のシグナル 5.57, 5.46, 5.10, 4.71 ppm がブロード化されるとともに 4~6 ppm へと幅広くシフトした。また 2 位の水素原子のシグナル 3.33 ppm についてはおもに 6 位のヒドロキシ基に置換したベンゾイル基の影響を受けて低磁場シフトし, さらにベンゾイル基に由来するシグナル 8.00, 7.87, 7.48 ppm が観測され, 重 DMSO 中の DMSO のシグナルも 2.52 ppm に観測された。また ¹H NMR のベンゾイル基 (8.8~6.7 ppm) および糖骨格 (6.4~2.8 ppm) の積分比より, アミロースを構成するグルコース骨格にベンゾイル基が 1 繰返し単位当たり 0.35 個ついていることが明らかとなった (Figure 2)。¹³C NMR 測定の結果からはフェニル基のシグナル 133.3, 129.3, 128.7 ppm, カルボニル炭素のシグナル 165.5 ppm, グルコース骨格のシグナル 100.2, 95.3 (C1), 78.7, 76.0, 73.1, 71.6, 71.6, 68.5 (C2~5), 63.6, 60.3 ppm (C6) が確認できた (Figure 3)。さらに IR 測定の結果からも, 芳香族エステルの C=O 伸縮振動 1715 cm⁻¹, C-C(=O)-O 伸縮振動 1270 cm⁻¹, フェニル基の環変角振動 708 cm⁻¹ が確認でき, ベンゾイル化に伴い, 原料と比較してヒドロキシ基の O-H 伸縮振動のピーク 3289 cm⁻¹ が弱くなっていることが確認できた (Figure 4)。以上よりアミロースへのショッテンバウマン反応によるベンゾイル化が進行したことが明らかとなった⁷⁾。

続いて, 得られた生成物のグルコース骨格へのベンゾ

Figure 2. ^1H NMR spectra of amylose and benzoyl amylose.

Figure 3. ^{13}C NMR spectra of amylose and benzoyl amylose.

イル基の置換様式について明らかにするため MALDI 測定を行った (Figure 5). 予備的な実験から多糖類の MALDI によるイオン化は困難であることが予測されたが、アミロースの測定結果からはグルコース骨格の糖鎖が Na^+ 付加体として観測された。たとえば 1661.608 のシグナルは $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_9\text{Na}^+$, 1823.666 のシグナルは $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_{10}\text{Na}^+$, 1985.720 のシグナルは $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_{11}\text{Na}^+$ として帰属され、それぞれマスパターンが一致するとともに、グルコース骨格に相当する 162 Mass ずつ増加する様子が確認できた⁸⁾。合成に用いたアミロースは一般的なものであり、数平均分子量は 10 万程度の高分子であるが、低分子量体のもののみがイオン化されて観測されたと考えられる。

ベンゾイル化体については、アミロースを構成するグルコース骨格にベンゾイル基がそれぞれ 2 個ついている糖鎖が Na^+ 付加体として強度が強く観測された。たとえば 1521.467 のシグナルは $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_3(\text{C}_7\text{H}_4\text{O})_8\text{Na}^+$, 1892.576 のシグナルは $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_4(\text{C}_7\text{H}_4\text{O})_{10}\text{Na}^+$, 2262.662 のシグナルは $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_5(\text{C}_7\text{H}_4\text{O})_{12}\text{Na}^+$ として帰属される。さらに 1417.435 は

Figure 4. IR spectra of amylose and benzoyl amylose.

Figure 5. MALDI TOF MS spectra of amylose and benzoyl amylose.

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_3(\text{C}_7\text{H}_4\text{O})_7\text{Na}^+$, 1625.491 のシグナルは $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_3(\text{C}_7\text{H}_4\text{O})_9\text{Na}^+$ として帰属され、ベンゾイル基に相当する 104 Mass ずつ増減の様子が確認できた。

さらに、ベンゾイル化以外のエステル化として、シナモイル化と *p*-*t* ブチルベンゾイル化について同様の条件下で検討を行った。

反応後、後処理を行い得られた生成物についてそれぞれ IR 測定を行ったところ、シナモイル化生成物については、 α,β -不飽和酸エステルの $\text{C}=\text{O}$ 伸縮振動 1711 cm^{-1} , $\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}$ 伸縮振動 $1330, 1309, 1282, 1252\text{ cm}^{-1}$, フェニル基の $\text{C}-\text{C}$ 伸縮振動 $1497, 1450\text{ cm}^{-1}$, $\text{C}-\text{H}$ 面内変角振動 1153 cm^{-1} , $\text{C}-\text{H}$ 面外変角振動 $765,$

Figure 6. IR spectra of cinnamoyl and *p-t* bubenzoyle amylose.

682 cm^{-1} , アルケンの C-H 伸縮振動 3064 cm^{-1} , C=C 伸縮振動 1633, 1578 cm^{-1} のピークがそれぞれ確認でき、シンナモイル基の導入が明らかとなった。また、*p-t* ブチルベンゾイル化生成物については、芳香族エステルの C=O 伸縮振動 1722 cm^{-1} , C-C(=O)-O 伸縮振動 1267 cm^{-1} , フェニル基の C-C 伸縮振動 1609, 1409 cm^{-1} , C-H 面内変角振動 1112, 1092 cm^{-1} , C-H 面外変角振動 772, 703 cm^{-1} のピークがそれぞれ確認でき、*p-t* ブチルベンゾイル基の導入が明らかとなった (Figure 6)。

また、得られた生成物は重 DMSO に溶解しにくいいため、 ^{13}C NMR 測定のスグナルの S/N 比は良好ではないが、シンナモイル化生成物についてはカルボニル炭素 166.6 ppm, フェニル基 134.3, 131.0, 129.3, 128.9 ppm, C=C 二重結合 145.7, 118.1 ppm のスグナルが確認でき、*p-t* ブチルベンゾイル生成物についてはカルボニル炭素 165.5 ppm, フェニル基 156.3, 129.7, 127.4, 125.5 ppm, *p-t* ブチル基 34.7, 30.6 ppm のスグナルが確認でき、それぞれのエステル化の進行が明らかとなった。また ^1H NMR の積分比からグルコース骨格 1 繰返し単位へのシンナモイル基導入について算出したところ 0.51 個、*p-t* ブチル基導入は 0.12 個であった。

以上の結果より、アミロースは高分子鎖を維持し、ベンゾイル化のみではなく、芳香族、ビニル基に結合したカルボニル基をシュottenバウマン反応により導入できることが明らかとなった。また、得られた生成物は蒸留水での洗浄により効率よく精製が可能であった。

続いて、ペクチンのシュottenバウマン反応によるベンゾイル化およびシンナモイル化を試みた (Figure 1 下段)。ペクチンはガラクトースのウロン酸であるガラク

Figure 7. ^{13}C NMR spectra of pectin and acyl pectin.

ツロン酸およびそのメチルエステルが α -1,4 結合したものである。同様の条件下にて反応後、後処理を行い、原料と得られた生成物について ^{13}C NMR 測定を行った。その結果、ペクチンでは糖骨格のスグナル 92.7, 73.5, 72.8, 72.4, 71.0, 61.7 ppm が確認できたが、ベンゾイル化後にはカルボニル炭素 173~164 ppm, フェニル基 136~128 ppm, ペクチン骨格 93~63 ppm に分類できる多くのスグナルが確認でき、またシンナモイル化後には、カルボニル炭素 167~165 ppm, フェニル基 137~117 ppm, C=C 二重結合 148~145, 118~117 ppm, ペクチン骨格 97~62 ppm のスグナルがそれぞれ確認できた (Figure 7)。

さらに IR 測定を行ったところ、ベンゾイル化生成物は芳香族エステルの C=O 伸縮振動 1726 cm^{-1} , C-C(=O)-O 伸縮振動 1253 cm^{-1} , フェニル基の C-C 伸縮振動 1601, 1451 cm^{-1} , C-H 面内変角振動 1092, 1068 cm^{-1} , C-H 面外変角振動 685 cm^{-1} のピークが確認でき、ベンゾイル基が導入できたことが明らかとなった (Figure 8)。また、ペクチンの骨格にはカルボキシ基が含まれるため、ヒドロキシ基の O-H 伸縮振動のピークの減少は見られず、3289 cm^{-1} から 3360 cm^{-1} へのシフトが見られた。また、シンナモイル化生成物についても α,β -不飽和酸エステルの C=O 伸縮振動 1712 cm^{-1} , C-C(=O)-O 伸縮振動 1330, 1310, 1282, 1267, 1244 cm^{-1} , フェニル基の C-C 伸縮振動 1495, 1450 cm^{-1} , C-H 面内変角振動 1153 cm^{-1} , C-H 面外変角振動 765, 684 cm^{-1} , アルケンの C-H 伸縮振動 3027 cm^{-1} , C=C 伸縮振動 1638, 1577 cm^{-1} , ヒドロキシ基 O-H 伸縮振動 3411 cm^{-1} のピークが確認でき、シンナモイル基が導入できたことが明らかとなった。

4 結 論

本研究では水溶性天然高分子をエステル化する方法と

Figure 8. IR spectra of pectin and benzoyl pectin.

して、塩基性水溶液中で反応を行うシュottenバウマン反応を選択し、反応溶媒に水を用いた、後処理による環境負荷の少ない変換法の開発を目指し実験を行った。水溶性天然高分子として多糖類であるアミロース、ペクチンを選択し、水溶液中での含有するヒドロキシ基のベンゾイル化、シンナモイル化、*p*-*t*-ブチルベンゾイル化反応を行った。得られた化合物の ^1H NMR, ^{13}C NMR, IR の測定により、エステル化された目的生成物の生成が明らかとなった。収率についてはベンゾイル化が最も良く、かさ高い *p*-*t*-ブチルベンゾイル化やシンナモイル化

ロリドを THF に溶解させて行うシンナモイル化については、収率が低下することが明らかとなった。固体の酸クロリドを用いる場合には溶媒の分配係数についても考慮した溶媒選択が必要と考えられる。またとくにアミロースのベンゾイル化体は MALDI により Na^+ 付加体として観測され、シグナルの解析からベンゾイル化が詳細に確認できた。得られた生成物はいずれも疎水性を有し、アミロースのベンゾイル化体およびペクチン誘導体は高極性有機溶媒に可溶であることが明らかとなった。

謝 辞 本研究の一部は長岡技術科学大学連携教育研究助成金を受領して実施した。また一部は、文部科学省ナノテクノロジープラットフォーム事業(分子・物質合成)の支援により北陸先端科学技術大学院大学で実施した。

文 献

- 1) Y. Nishio, S. K. Roy, and R. J. Manley, *Polymer*, **28**, 1385 (1987).
- 2) T. Heinze, R. Dicke, A. Koschella, A. H. Kull, E. A. Klor, and W. Koch, *Macromol. Chem. Phys.*, **201**, 627 (2000).
- 3) “セルロースの事典 新装版”, セルロース学会編, 第 4 章, 朝倉書店 (2008).
- 4) E. Matsui, T. Sakamoto, K. Fujita, and B. R. Noorfarahin, *Kobunshi Ronbunshu*, **69**, 646 (2012).
- 5) E. Matsui, R. Yoshida, and N. Uchida, *Kobunshi Ronbunshu*, **72**, 71 (2015).
- 6) N. O. V. Sonntag, *Chem. Rev.*, **52**, 237 (1953).
- 7) S. C. Fox, B. Li, D. Xu, and K. J. Edgar, *Biomacromolecules*, **12**, 1956 (2011).
- 8) “糖鎖の MALDI-TOFMS スペクトルデータブック”, 西村紳一郎, 福島信弘編, 三共出版 (2007).

[Original Papers]

Aromatic Acylation Reaction of Water-Soluble Polysaccharides by a Schotten-Baumann Condition

Eiki MATSUI^{*1}, Ryuji YOSHIDA^{*1}, Daisuke TSUJI^{*1}, Yuichiro KIMOTO^{*2}, and Yuichi OTSUKA^{*3}

^{*1}Department of Chemistry and Biology, National Institute of Technology, Fukui College (Geshi, Sabae 916-8507, Japan)

^{*2}Department of Mechanical Engineering, Nagaoka University of Technology (1603-1 Kamitomioka, Nagaoka 940-2188, Japan)

^{*3}Department of Information and Management Systems Engineering, Nagaoka University of Technology (1603-1 Kamitomioka, Nagaoka 940-2188, Japan)

The acylation of alcohols with acyl chlorides in aqueous base leads to the production of corresponding esters and salts. The use of biphasic aqueous basic conditions is often named Schotten-Baumann condition. We apply the Schotten-Baumann condition to the hydroxy acylation reaction of water-soluble polysaccharides such as amylose and pectin. These polysaccharides were easily converted to benzoyl compounds by reacting with hydroxyl groups and benzoyl chloride in saturated Na_2CO_3 aqueous solution. The aryl polysaccharide compounds were characterized by IR, NMR and MALDI TOF MS spectroscopy. These measurement results showed characteristic peaks for polysaccharides and aryl groups. These reactions can be achieved under waterborne conditions with simple handling and without using poisonous organic solvents.

KEY WORDS Schotten-Baumann Condition / Water-Soluble Polysaccharides / Benzoylation / Waterborne Conditions /

(Received June 30, 2016; Accepted August 10, 2016; Advance Publication September 14, 2016) [*Kobunshi Ronbunshu*, **73**, 570—574 (2016)]

©2016, The Society of Polymer Science, Japan