報 文

次亜塩素酸ナトリウム処理した L-チロシンより生成する
クロロホルムの中間生成物質に関する検討

(平成 19 年 1 月 9 日受理)

日 高 利 夫* 石 井 敬 子 桐ヶ谷忠司 神 田 宏

Study on Intermediate Products in Chloroform Formation from
L-Tyrosine Treated with Sodium HypochloriteToshio HIDAOKA*, Keiko ISHII, Tadashi KIRIGAYA
and Hiroshi KANDAYokohama City Institute of Health: 1-2-17 Takigashira, Isogo-ku,
Yokohama 235-0012, Japan; *Corresponding author

Possible intermediates in the formation of chloroform during by the sodium hypochlorite (NaClO) treatment of L-tyrosine were investigated using HPLC and LC/MS. One product showed the same MS characteristics as the substance formed by the NaClO treatment of 4-hydroxybenzyl cyanide (4-HBC), and it was suggested to be *m*-chloro-4-hydroxybenzyl cyanide (*m*-C-4-HBC). Since *m*-C-4-HBC is not commercially available it was synthesized by treating 4-HBC with NaClO, and purified by extraction with ethyl acetate, followed by HPLC on preparative isolation columns, using a column switching method. The product was confirmed to be 3-chloro-4-hydroxybenzyl cyanide (3-C-4-HBC), by means of NMR spectral analysis. When L-tyrosine or 4-HBC was treated with NaClO, 3-C-4-HBC and CHCl₃ were generated. When 3-C-4-HBC was treated with NaClO, CHCl₃ was generated. Judging from these results, 3-C-4-HBC was confirmed to be an intermediate in the formation of CHCl₃ from L-tyrosine.

Thus, the reaction pathway of CHCl₃ formation from L-tyrosine treated with NaClO is concluded to be: L-tyrosine→4-HBC→3-C-4-HBC→CHCl₃.

(Received January 9, 2007)

Key words: 次亜塩素酸ナトリウム sodium hypochlorite; L-チロシン L-tyrosine; クロロホルム chloroform; 3-クロロ-4-ヒドロキシベンジルシアニド 3-chloro-4-hydroxybenzyl cyanide; 高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 LC/MS

はじめに

水道の消毒には塩素や次亜塩素酸ナトリウムが用いられ、浄水処理過程でクロロホルムが生成することはよく知られている。一方、魚介類加工品や野菜類の殺菌にも次亜塩素酸ナトリウムが食品添加物として使用されている¹⁾。

著者らは既報において、次亜塩素酸ナトリウムで処理した野菜よりクロロホルムが生成することを報告^{2)~4)}した。

また、もやしにおけるクロロホルム前駆物質と考えられる成分の1つとして、L-アスパラギン、L-アラニンおよびL-チロシンなどのアミノ酸の存在を明らかにした⁵⁾。

さらに、キャベツにおけるクロロホルム前駆物質の検討を行い、その主要なクロロホルム前駆物質はL-アラニンであることを明らかにした⁶⁾。

そこで本報告では、もやしの前駆物質と考えられる成分のうち、次亜塩素酸ナトリウムで処理したときに短時間にクロロホルムが生成したL-チロシンを用いて、次亜塩素酸ナトリウム処理して生成した中間生成物質の同定を試み、L-チロシンからクロロホルムの生成に至る反応機構についての推定を試みた。

検討にあたっては、L-チロシンに次亜塩素酸ナトリウム処理を行い、中間生成物と考えられる物質について高速液体クロマトグラフ質量分析計などを用いて調べたところ、新しい知見が得られたので報告する。

実験方法

1. 試 料

L-チロシンについて、クロロホルムを除いた精製水で適宜希釈して用いた。

* 連絡先

横浜市衛生研究所: 〒235-0012 横浜市磯子区滝頭 1-2-17

2. 試 薬

1) 精製水: 日本ミリポア(株)製 MILLI-Q より得た精製水を 30 分間煮沸後, 冷却したものを用いた.

2) 次亜塩素酸ナトリウム: 和光純薬工業(株)製, 化学用を用いた.

3) L-チロシン: シグマ社製を用いた.

4) 4-ヒドロキシベンジルシアニド (4-HBC と略す): 東京化成(株)製試薬一級を用いた.

5) 3-クロロ-4-ヒドロキシベンジルシアニド (3-C-4-HBC と略す) 標準溶液: 林純薬工業(株)に調製を依頼した 3-C-4-HBC 標準原液 (5 mg/mL) を, 酢酸エチルで希釈して用いた.

6) クロロホルム標準原液: 関東化学(株)社製, トリハロメタン分析用 (1 mg/mL) を用いた.

7) クロロホルム標準液: クロロホルム標準原液 1.0 mL をメスフラスコに採り, *n*-ヘキサンを加えて正確に 100 mL とし, 用時, *n*-ヘキサンで希釈して用いた.

8) L-チロシン溶液: L-チロシン 50 mg を精ひょうして精製水に溶かし, 正確に 50 mL とし 1,000 ppm とした.

9) モル濃度 L-チロシン溶液: L-チロシン溶液の濃度が 0.25 mmol/L および 0.05 mmol/L となるように精製水に溶かして調製した.

10) 4-HBC 溶液: 4-HBC 50 mg を精ひょうして精製水に溶かし, 正確に 50 mL とし 1,000 ppm とした. 用時, 精製水で希釈して用いた.

11) 次亜塩素酸ナトリウム溶液: 次亜塩素酸ナトリウム溶液はあらかじめヨウ素滴定法⁷⁾で定量し, 用時, 有効塩素濃度が 1,000 ppm となるように精製水で希釈して用いた.

その他, *n*-ヘキサン, ジエチルエーテルは和光純薬工業(株)製 残留農薬分析用を, 酢酸エチル, アセトニトリルは和光純薬工業(株)製 高速液体クロマトグラフ用を, 亜硫酸ナトリウム, 塩酸は和光純薬工業(株)製 試薬特級を用いた.

3. 装置および測定条件

1) 高速液体クロマトグラフ (HPLC): Agilent 社製 1100 Series

① 分析条件, カラム: Inertsil ODS-2, 内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, カラム温度: 40°C, 移動相: アセトニトリル-水 (50:50 v/v), 検出波長: 254 nm (定量波長: 280 nm), 流速: 1.0 mL/min, 注入量: 20 μ L.

② 分取条件, カラム: Inertsil ODS-2, 内径 7.6 mm, 長さ 150 mm, カラム温度: 40°C, 移動相: アセトニトリル-水 (25:75 v/v), 検出波長: 254 nm, 流速: 2.0 mL/min, 注入量: 1,000 μ L.

③ カラムスイッチング条件: 分取用試験溶液をバイアル瓶に 1.5 mL 詰めて, その 1,000 μ L を HPLC に注入し, HPLC に付属しているカラムスイッチングを

用いて, 11 分から 13 分にバルブを切り替えることにより分取を行った (リテンションタイム 20 分).

同様のバイアル瓶をほかに 9 本用意して, この操作を 10 回繰り返して中間生成物質の分取 (40 mL) を行った.

2) 高速液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS): Agilent 社製 LC/MS 1100

測定条件: 大気圧化学イオン化 (APCI), カラム: Inertsil ODS-2, 内径 4.6 mm, 長さ 150 mm, カラム温度: 40°C, 測定モード: ネガティブモード, 移動相: アセトニトリル-水 (50:50 v/v), 流速: 0.8 mL/min, ドライガス: N₂ 350°C, 4.0 L/min, ネブライザー圧力: N₂ 60 psi, 注入量: 20 μ L.

3) ガスクロマトグラフ (GC): Hewlett Packard 社製 HP5890 II (ECD ⁶³Ni)

カラム: DB-624 (J&W 社製), 0.53 mm $\times$ 30 m, 膜厚 3.0 μ m, カラム温度: 40°C (4 min) $\rightarrow$ 25°C/min $\rightarrow$ 200°C (5 min), 注入口温度: 220°C, 検出器温度: 240°C, キャリヤーガス: He, 4.0 psi, 流速: 5.7 mL/min, 注入量: 2 μ L.

4. 試験溶液の調製

1) L-チロシンより生成する中間生成物質の検索用試験溶液の調製

L-チロシンの 0.05 mmol/L 溶液 10 mL をビーカーに採り, 精製水 70 mL を加えて 80 mL とした. これに次亜塩素酸ナトリウム溶液 1,000 ppm を 20 mL 加え (pH 10.1), 15~120 秒間反応後, 亜硫酸ナトリウム 0.05 g を加えて反応を中止した. この反応液を塩酸で中和 (pH 7.0) 後, ジエチルエーテル 50 mL, 30 mL を加えて 2 回抽出し, エバポレータで濃縮した. この残留物にアセトニトリル-水 (50:50 v/v) を 2 mL 加えて, HPLC による中間生成物質の検索用試験溶液とした.

2) 中間生成物質の確認用試験溶液の調製

4-HBC の 100 ppm 溶液 1 mL を試験管に採り, 精製水を加えて 5 mL とした. これに次亜塩素酸ナトリウム溶液 1,000 ppm を 2 mL 加えて 10 秒間反応後, 直ちに亜硫酸ナトリウム 0.05 g を加えて反応を中止した. この反応液にジエチルエーテル 5 mL を加えて抽出し, エバポレータで濃縮した. 残留物にアセトニトリル-水 (50:50 v/v) を 2.0 mL 加えたものを HPLC および LC/MS による確認用試験溶液とした.

また, L-チロシンの 0.25 mmol/L 溶液 100 mL をビーカーに採り, 精製水 700 mL を加えて 800 mL とした. これに次亜塩素酸ナトリウム溶液 1,000 ppm を 200 mL 加えて 120 秒間反応後, 亜硫酸ナトリウム 6 g を加えて反応を中止した. この反応液を塩酸で中和 (pH 7.0) 後, ジエチルエーテル 200 mL, 200 mL, 100 mL を加えて 3 回抽出し, エバポレータで濃縮した. 残留物にアセトニトリル-水 (50:50 v/v) を 1.5 mL 加えたものを HPLC および LC/MS による確認用試験溶液とした.

Scheme 1. Synthesis of *m*-chloro-4-hydroxybenzyl cyanide

3) モノ-クロロ-4-ヒドロキシベンジルシアニド (*m*-C-4-HBC と略す) の合成および分取用試験溶液の調製

Scheme 1 に示したとおり, 4-HBC の 1,000 ppm 溶液 50 mL をビーカーに採り, 精製水を加えて 500 mL とした. これに次亜塩素酸ナトリウム溶液 1,000 ppm を 200 mL 加えて 10 秒間反応後, 亜硫酸ナトリウム 6 g を加えて反応を中止した. この反応液 700 mL に酢酸エチル 500 mL, 300 mL, 200 mL を加えて 3 回抽出し, 抽出液を合わせて精製水 100 mL で 4 回洗浄した後, 酢酸エチル層を濃縮した. 残留物にアセトニトリル-水 (25:75 v/v) を 20 mL 加えたものを, *m*-C-4-HBC の分取用試験溶液とした.

4) 3-C-4-HBC 生成量測定用の試験溶液の調製

L-チロシンおよび 4-HBC が 50 µg 相当量となるように, それぞれの 1,000 ppm 溶液を 0.05 mL 試験管に採り, これらに精製水を加えて 8 mL とした. これに次亜塩素酸ナトリウム溶液 1,000 ppm を 2 mL 加えて 20°C で 1 分間反応させた後, 亜硫酸ナトリウム 0.05 g を加えて反応を中止した. この反応液 10 mL に酢酸エチルを 3 mL, 2 mL, 2 mL 加えて 3 回抽出し, 抽出液を合わせてエバポレータで濃縮した. 残留物にアセトニトリル-水 (50:50 v/v) を 2 mL 加えたものを, HPLC による 3-C-4-HBC 生成量測定用の試験溶液とした.

5) クロロホルム生成量測定用の試験溶液の調製

L-チロシンおよび 4-HBC の 1,000 ppm 溶液をそれぞれ 0.05 mL 試験管に採り, ならびに 3-C-4-HBC の 500 ppm 溶液を 0.1 mL 試験管に採り, これら各 50 µg 相当量の試料に精製水を加えて 8 mL とした. 次に, それぞれに次亜塩素酸ナトリウム溶液 1,000 ppm を 2 mL 加えて 20°C で 1 分間反応させた後, 亜硫酸ナトリウム 0.05 g を加えて反応を中止した. この反応液に *n*-ヘキサン 2 mL を加

えて振とうした. 静置後に *n*-ヘキサン層を採り, GC によるクロロホルム生成量測定用の試験溶液とした.

実験結果および考察

著者らは既報において, 次亜塩素酸ナトリウムで処理した野菜よりクロロホルムが生成することを報告^{2)~4)}し, もやしにおけるクロロホルム前駆物質と考えられる成分の 1 つとして, L-アスパラギン, L-アラニンおよび L-チロシンなどのアミノ酸の存在を明らかにした⁵⁾.

そこで本報告では, もやし中の前駆物質と考えられる成分のうち, 次亜塩素酸ナトリウムで処理したときに短時間にクロロホルムが生成した⁵⁾ L-チロシンを用いて, 次亜塩素酸ナトリウム処理して生成した中間生成物質の同定を試み, L-チロシンからクロロホルムの生成に至る反応機構について推定を試みた.

1. L-チロシンを次亜塩素酸ナトリウム処理して生成する中間生成物質の推定

L-チロシンに次亜塩素酸ナトリウム処理を行い, 中間生成物と考えられる物質について HPLC および LC/MS を用いて調べた.

1) 中間生成物質の HPLC クロマトグラムおよび UV 吸収スペクトル

4. 試験溶液の調製の項 1) により, L-チロシンを次亜塩素酸ナトリウムで 15 秒, 30 秒, 60 秒および 120 秒間処理した試験溶液を用いて, 生成物質の HPLC クロマトグラム上のピークについて調べた. この結果は Fig. 1 に示したように, ピーク保持時間約 2.6 分に, 時間とともに増加するピークが認められた. そこで, このピークについて UV 吸収スペクトルを調べたところ, 285 nm 付近に極大吸収のあるスペクトルが得られた. なお, ピーク保持時間約 2.2 分に経時的に増大しているピークが認められたが, 時間とともに保持時間が 2.1 分に近づき, また, UV 吸収スペクトルも一定のものは得られなかった.

2) 中間生成物質の検索

このピーク保持時間約 2.6 分の生成物質がどのような化学物質であるかについて検討を行った. L-チロシンは化学構造にフェノール基を持つことから, まず, フェノールおよびフェノールの複数の塩素系化合物について HPLC を用いて調べた. この結果は Fig. 2 に示したように, オルト, メタ, パラ位に塩素のある 3 つのクロロフェノール異性体, また 2,6-ジクロロフェノールなど 5 つの異性体, さらに 2,4,6-トリクロロフェノールなど 2 つの異性体については, すべてクロマトグラム上のピーク保持時間が 3 分を超えていた. このため, これらの物質は生成物質の保持時間約 2.6 分と一致せず, 生成物質でないことが分かった. 一方, フェノールについては, クロマトグラム上のピーク保持時間が約 2.6 分と生成物質と同様の保持時間であった. しかし, UV 吸収スペクトルを調べたところ, 270 nm 付近に極大吸収があり, 生成物質の 285 nm 付近の吸収とはスペクトルが一致せず, フェノールも中間生成

Fig. 1. HPLC chromatograms and UV spectrum of intermediate product in the generation of chloroform from L-tyrosine by sodium hypochlorite treatment

Conditions, column: Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm); column temp.: 40°C; mobile phase: acetonitrile–water (50 : 50) detection wavelength: 254 nm; flow rate: 1.0 mL/min; inj. volume: 20 μL

Fig. 2. HPLC chromatograms and UV spectra of phenol and intermediate product

Conditions, column: Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm); column temp.: 40°C; mobile phase: acetonitrile–water (50 : 50); detection wavelength: 254 nm; flow rate: 1.0 mL/min; inj. volume: 20 μL

①: Phenol ②: *o*-Chlorophenol ③: *p*-Chlorophenol ④: *m*-Chlorophenol ⑤: 2,6-Dichlorophenol ⑥: 2,5-Dichlorophenol ⑦: 3,4-Dichlorophenol ⑧: 2,4-Dichlorophenol ⑨: 3,5-Dichlorophenol ⑩: 2,4,6-Trichlorophenol ⑪: 2,4,5-Trichlorophenol

Fig. 3. Structural formulae of L-tyrosine and 4-hydroxybenzyl cyanide

物質と同一ではないことが分かった。

3) 4-HBC に次亜塩素酸ナトリウムを反応させて生成する物質の HPLC および LC/MS 分析

L-チロシンが次亜塩素酸ナトリウムにより塩素化されると考え、フェノールおよびフェノールの塩素系化合物について検討を行ったが、中間生成物質と同一の物質を見つけることはできなかった。そこで、次亜塩素酸ナトリウムは酸化剤でもあることから、L-チロシンを酸化して得られる物質、すなわち、L-チロシンを脱水および脱炭酸して得られる物質について調べた。その結果、Fig. 3 に示したように 4-HBC という物質が考えられた。この 4-HBC は劇物に指定されて、試薬メーカーより販売されていることが分かった。そこで、この 4-HBC を塩素化して得られる化学物質について検討を行った。

検討に当たっては、4. 試験溶液の調製の項 2) により調製した試験溶液を用いて、HPLC を用いて測定を行った。この結果は Fig. 4 に示したように、4-HBC に次亜塩素酸ナトリウムを反応させて生成する物質 (A) と L-チロシンに次亜塩素酸ナトリウムを反応させて生成する物質 (B) の

HPLC クロマトグラム上のピーク保持時間 2.6 分が一致するとともに、UV スペクトルも一致した。そこで、調製した試験溶液を用いて、さらに LC/MS 分析を行った。この結果は Fig. 5 に示したように、4-HBC に次亜塩素酸ナトリウムを反応させて生成する物質 (A) と中間生成物と考えられる物質 (B) のトータルイオンクロマトグラム (TIC) 上のピーク保持時間 3.4 分が一致するとともに、 m/z 166 の擬似分子イオンを主イオンとするマススペクトルも一致した。本測定条件はネガティブモードで測定していることから、この物質 (B) は親ピークが $[M-H]^-$ 166 の物質、すなわち、分子量 167 の物質であると推定された。なお、これらの物質についてポジティブモードでの測定を試みたが、ネガティブモードに比較して感度が低く、測定するには至らなかった。

4-HBC は分子量 133 の物質であり、4-HBC の水素原子 1 つが塩素原子に置換した物質は分子量 167 であることから、この L-チロシンを次亜塩素酸ナトリウム処理して生成する中間生成物質 (B) は *m*-C-4-HBC と推定された。

なお、Fig. 4 の HPLC クロマトグラム上のピーク保持

Fig. 4. HPLC chromatograms and UV spectra of product A, formed from 4-hydroxybenzyl cyanide by sodium hypochlorite treatment, and intermediate product B
Conditions, column: Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. × 150 mm); column temp.: 40°C; mobile phase: acetonitrile–water (50 : 50); detection wavelength: 254 nm; flow rate: 1.0 mL/min; inj. volume: 20 μL

Fig. 5. LC/MS analysis of product A, formed from 4-hydroxybenzyl cyanide by sodium hypochlorite treatment, and intermediate product B

Conditions, ionization: atmospheric pressure chemical ionization (APCI); column: Inertsil ODS-2 (4.6 mm i.d. $\times$ 150 mm); column temp.: 40°C; mode: negative; mobile phase: acetonitrile–water (50 : 50); flow rate: 0.8 mL/min; gas temp.: 350°C; drying gas: N₂ 4.0 L/min; nebulizer pres.: N₂ 60 psi; inj. volume: 20 μ L

時間 2.2 分付近のピークについて UV 吸収スペクトルで確認を行ったが、4-HBC は認められなかった。また、Fig. 5 の TIC 上のピーク保持時間約 2.6 分および 4.2 分に反応生成物と見られるピークが認められたが、これらのピークについても確認を行ったが、4-HBC は認められなかった。その理由としては、L-チロシンに次亜塩素酸ナトリウムを反応させた場合、4-HBC から同時あるいは速やかに *m*-C-4-HBC に反応するため、4-HBC が検出されないと考えられた。

2. *m*-C-4-HBC の合成および精製方法の検討

中間生成物質が *m*-C-4-HBC と推定されたことから、この物質についての詳細な情報を得るために、科学技術データベース (STN) により検索を行った結果、同物質についての情報や文献は見当らなかった。また、*m*-C-4-HBC の試薬についても調べたが、メーカーから販売されていないことが分かった。そこで、この中間生成物質と推定された *m*-C-4-HBC の合成、精製を行い、同定を試みた。

1) *m*-C-4-HBC の合成方法の検討

m-C-4-HBC の合成方法について検討を行った。まず、4-HBC に加える次亜塩素酸ナトリウムの反応時間について、1 秒、10 秒、30 秒および 60 秒後を調べた。この結果、10 秒後に *m*-C-4-HBC の生成量が最大となり、それ以降は時間とともに生成量が低下したことから、反応時間は 10 秒間とした。次に、*m*-C-4-HBC の抽出溶媒について、ジエチルエーテル、酢酸エチル、*n*-ヘキサンなどを調べた。この結果、酢酸エチルの抽出効率が一番良好であっ

たことから、抽出溶媒は酢酸エチルとした。これらのことから、Scheme 1 に示したように、4-HBC を次亜塩素酸ナトリウムで 10 秒間反応させ、亜硫酸ナトリウムを加えて反応を中止し、この反応液に酢酸エチルを加えて抽出して精製水で洗浄した後、酢酸エチル層を濃縮する方法が *m*-C-4-HBC の合成方法として効率的であった。

2) *m*-C-4-HBC の精製方法の検討

合成した *m*-C-4-HBC の溶液中には、原料とした 4-HBC も同程度含まれていた。このため、*m*-C-4-HBC を単離する精製方法について検討を行った。*m*-C-4-HBC と 4-HBC を分離する方法として、極性の異なる溶媒抽出による方法や、シリカゲルカラムと各種溶出液を用いた分画による方法について検討を行ったが、いずれの方法においても、これら構造式の近い 2 つの物質を分離することはできなかった。

そこで、Fig. 4 に示したように、HPLC の測定における 4-HBC のクロマトグラム上のピーク保持時間は 2.2 分であり、*m*-C-4-HBC のピーク保持時間は 2.6 分と HPLC のカラムにより両者がわずかに分離されていることから、HPLC を用いたカラムスイッチングによる精製方法について検討を試みた。なお、Fig. 4 の L-チロシンを次亜塩素酸ナトリウム処理して得られた HPLC クロマトグラム上のピーク保持時間 2.2 分付近の物質について、UV 吸収スペクトルを調べたところ、4-HBC とは異なるスペクトルであった。

4-HBC と *m*-C-4-HBC のクロマトグラム上のピークをさ

らに分離するために、HPLCの移動相のアセトニトリルと水の割合を50:50 v/vから25:75 v/vにするとともに、流速を1.0 mL/minから2.0 mL/minに変更した。この結果、クロマトグラム上の約7分後に4-HBCのピークが、また、約12分後に*m*-C-4-HBCのピークが認められ、両者を十分に分離することができた。このことから、HPLCに付属しているカラムスイッチングを用いて、11分後にバルブを切り替えて*m*-C-4-HBCをフラスコに捕集し、さらに、13分後にバルブを戻すことにより、*m*-C-4-HBCの分取による精製が可能であることが分かった。

3) *m*-C-4-HBCの大量分取方法の検討

m-C-4-HBCの大量分取を行うため、HPLCの分析用カラムから分取用カラムへのスケールアップの検討を行った。この結果、測定条件のうち、カラムの内径を4.6 mm、長さ150 mmから7.6 mm、長さ150 mmに変更し、注入量を20 μ Lから1,000 μ Lと多くした。また、分取用試験溶液1.5 mLのバイアル瓶をほかに9本用意し、このHPLCカラムスイッチングの分取操作を10回繰り返すことにより、約40 mLの*m*-C-4-HBCを含む溶液を分取することができた。Fig. 6にHPLCカラムスイッチングによる精製前後のクロマトグラムを示したが、分取した*m*-C-4-HBCには原料の4-HBCおよびピーク保持時間約6.5分、20分の反応生成物と見られる物質は含まれていないことが分かった。

これらのことにより、*m*-C-4-HBCを同定するための合成、精製および大量分取のための条件を確立することができた。

3. *m*-C-4-HBCの標準品の調製および同定

この合成、精製および大量分取を行って得られた、約40 mLの*m*-C-4-HBCを含む溶液をフラスコに移し、酢酸エチルで抽出後、エバポレータで濃縮した結果、フラスコの底にわずかに白い物質が認められた。しかし、mg単位での*m*-C-4-HBC標準品の調製には至らなかった。

L-チロシンに次亜塩素酸ナトリウム処理を行い、このときに生成すると考えられる*m*-C-4-HBC量を明らかにするためには、既知濃度の*m*-C-4-HBC標準品が必要不可欠である。このため、今回は*m*-C-4-HBCの合成、精製および大量分取の条件を試薬メーカーに提供し、この標準品の調製と、併せてNMRによる構造解析を依頼することとした。この結果、試薬メーカーより5 mg/mLの標準品を入手することができた。また、NMRによる構造解析の結果、Fig. 7に示したように、ベンゼン環部分のプロトンが6.55 ppm, 6.77 ppm および 6.90 ppm に3水素原子分あること、および、フェノール基部分はオルト、パラ位の順に塩素化されやすく、すでにパラ位にはメチレン基が存在していることから、塩素原子はオルト基に置換されると考えられ、*m*-C-4-HBCは3-C-4-HBCであると確認された。

3-C-4-HBCは、劇物として指定されている4-HBCのオルト位の水素原子が塩素原子に置換した物質である。そこで、3-C-4-HBCについて毒性などの詳細な情報を得るために、科学技術データベース(STN)により検索を行ったが、同物質についての情報や文献は見当たらなかった。このことから、同物質についての生体に対する影響が十分に

Fig. 6. Purification of *m*-chloro-4-hydroxybenzyl cyanide by HPLC with column switching
Conditions, column: Inertsil ODS-2 (7.6 mm i.d.×150 mm); column temp.: 40°C; mobile phase: acetonitrile-water (25:75); detection wavelength: 254 nm; flow rate: 2.0 mL/min; inj. volume: 1,000 μ L

Fig. 7. NMR spectrum of 3-chloro-4-hydroxybenzyl cyanide

は明らかになっていない部分もあり、今後さらに検討する必要があると思われる。

4. 次亜塩素酸ナトリウム処理したL-チロシンから生成するクロロホルムの反応機構の推定

3-C-4-HBCがL-チロシンから生成するクロロホルムの反応経路における中間生成物質であることの確認を試みた。

検討にあたっては、4. 試験溶液の調製の項4)および5)により調製した試験溶液を用いて、L-チロシンおよび4-HBCの各50 μg 相当量に次亜塩素酸ナトリウム濃度が200 ppmとなるように60秒間反応させ、このときに生成する3-C-4-HBC量およびクロロホルム量の測定を行った。また、3-C-4-HBCの50 μg 相当量に次亜塩素酸ナトリウムを同様に反応させ、このときに生成するクロロホルム量の測定を行った。この結果はTable 1に示したように、L-チロシンに次亜塩素酸ナトリウムを反応させた場合、3-C-4-HBCが0.6 μg およびクロロホルムが53 ng生成した。また、4-HBCに次亜塩素酸ナトリウムを反応させた場合、3-C-4-HBCが42 μg およびクロロホルムが19

Table 1. Amounts of intermediate product and of chloroform formed from L-tyrosine, 4-hydroxybenzyl cyanide and 3-chloro-4-hydroxybenzyl cyanide by sodium hypochlorite treatment

Chemical	Amounts formed	
	3-C-4-HBC (μg)	Chloroform (ng)
L-Tyrosine	0.6 $\pm$ 0.1	53.1 $\pm$ 2.8
4-HBC	41.9 $\pm$ 0.3	19.1 $\pm$ 0.3
3-C-4-HBC	—	26.6 $\pm$ 4.7

Chemicals 50 μg , Free chlorine dose 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 min, 20°C

Values are the mean ($\pm$ S.D.) of three trials

ng生成した。さらに、3-C-4-HBCに次亜塩素酸ナトリウムを反応させた場合、クロロホルムが27 ng生成した。以上のことから、3-C-4-HBCはL-チロシンから生成するクロロホルムの反応経路における中間生成物質であることが確認された。

今回、L-チロシンが次亜塩素酸ナトリウムにより酸化されて、脱水および脱炭酸して4-HBCになることが推定され、さらに塩素化されて3-C-4-HBCとなることが明らかになった。そこで、3-C-4-HBCからクロロホルムの生成経路について文献調査を行ったところ、フェノール基を持つ化学物質（レゾルシノール）に次亜塩素酸ナトリウムを反応させた場合の、クロロホルムに至る反応経路がすでにRookにより提示されている^{8),9)}ことが分かった。この反応経路を参考にすると、Fig. 8に示したように、3-C-4-HBCの芳香族環が次亜塩素酸ナトリウムにより酸化され、解裂後に塩素置換を受け、さらに分解してクロロホルムが生成すると考えられた。

以上のことから、L-チロシンに次亜塩素酸ナトリウムを反応させることにより、4-HBCから3-C-4-HBCを経てクロロホルムに至る、塩素処理副生成物の反応機構を推定することができた。

L-チロシンからクロロホルムが生成する場合、L-チロシンおよび次亜塩素酸ナトリウムの量、pH、温度、時間など

Fig. 8. Putative mechanism of chloroform formation from L-tyrosine by sodium hypochlorite treatment

の要因の複雑な支配を受け、多くの反応段階（生成物質）を経て生成していると考えられる。本論文では、それら反応機構中の 4-HBC から 3-C-4-HBC に至る経路について説明を行ったが、他の中間生成物質についても、今後検討を行っていく必要があると考える。

ま と め

もやしにおけるクロロホルム前駆物質と考えられる成分のうち、L-チロシンを用いて、次亜塩素酸ナトリウム処理して生成した中間生成物質の同定を試み、L-チロシンからクロロホルムの生成に至る反応機構についての推定を試みた。

1) L-チロシンを次亜塩素酸ナトリウム処理して生成する中間生成物と考えられる物質について、HPLC および LC/MS 分析を行った。その結果、この物質は 4-HBC に次亜塩素酸ナトリウムを反応させて生成する物質とクロマトグラム上のピーク保持時間、UV 吸収スペクトルおよびマススペクトルが一致した。また、この生成物質はネガティブモードで親イオンピークが $[M-H]^-$ 166 の物質、すなわち、分子量 167 の物質であったことから *m*-C-4-HBC と推定された。

2) *m*-C-4-HBC が試薬として販売されていないため、標準物質を調製するために *m*-C-4-HBC の合成方法を検討した。その結果、4-HBC に次亜塩素酸ナトリウムを 10 秒間反応させ、酢酸エチルにより抽出する方法が合成方法として効率的であった。

3) *m*-C-4-HBC の精製方法を検討した結果、HPLC を使用したカラムスイッチング法により精製が可能であった。また、HPLC の分析用カラムから分取用カラムへのスケールアップを検討した結果、大量精製のための条件を確立することができた。

4) 大量精製のための条件を試薬メーカーに提供し、*m*-C-4-HBC の標準品の調製および NMR による構造解析を行った結果、この物質は 3-C-4-HBC と確認された。

5) L-チロシン 50 μ g 相当量に次亜塩素酸ナトリウムを反応させた結果、3-C-4-HBC が 0.6 μ g およびクロロホルムが 53 ng 生成した。また、4-HBC 50 μ g 相当量に次亜塩素酸ナトリウムを反応させた結果、3-C-4-HBC が 42 μ g およびクロロホルムが 19 ng 生成した。さらに、3-C-4-HBC 50 μ g 相当量に次亜塩素酸ナトリウムを反応させた結果、クロロホルムが 27 ng 生成した。これらのことから、3-C-4-HBC は L-チロシンから生成するクロロホルムの反応経路における中間生成物質であることが確認された。

以上、L-チロシンに次亜塩素酸ナトリウムを反応させることにより、4-HBC から 3-C-4-HBC を経てクロロホルムに至る、塩素処理副生成物の反応機構を推定することができた。

3-C-4-HBC については、生体に対する影響が十分には明らかになっていない部分もあり、今後さらに検討する必要があると思われる。

謝 辞

本研究に際し、3-C-4-HBC 標準品の調製および NMR による構造解析に協力をしていただきました、林純薬工業(株)商品企画部に深謝します。

文 献

- 1) 用途別添加物使用基準, “食品衛生関係法規集 3” p. 6, 305 (1989) 中央法規出版。
- 2) Hidaka, T., Kirigaya, T., Kamijo, M., Kikawa, H., Kawamura, T., Simultaneous determination of residual chlorine and volatile chlorinated organic compounds in vegetables by the head space method. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **32**, 308–314 (1991).
- 3) Hidaka, T., Kirigaya, T., Kamijo, M., Kikawa, H., Kawamura, T., Kawauchi, S., Disappearance of residual chlorine and formation of chloroform in vegetables treated with sodium hypochlorite. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **33**, 267–273 (1992).
- 4) Hidaka, T., Kirigaya, M., Kikawa, H., Kawamura, T., Kawauchi, S., Formation of chloroform in gel filtrations of vegetables treatment with sodium hypochlorite. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **35**, 357–364 (1994).
- 5) Hidaka, T., Kirigaya, M., Kawamura, T., Kawauchi, S., Studies on precursor of chloroform formed in soybean sprouts by sodium hypochlorite treatment. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **38**, 62–68 (1997).
- 6) Hidaka, T., Kirigaya, M., Kawamura, T., Kawauchi, S., Studies on precursor of chloroform formed in cabbage by sodium hypochlorite treatment. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi (J. Food Hyg. Soc. Japan)*, **40**, 143–148 (1999).
- 7) 石館守三, 谷村顕雄監修: “第 5 版食品添加物公定書解説書” D-383 (1987) 廣川書店。
- 8) Rook, J. J., Chlorination reaction of fulvic acid in natural waters. *Environ. Sci. Technol.*, **11**, 478–482 (1977).
- 9) 金子光美著: “水質衛生学” p. 407 (1996) 技報堂出版。