

12. トリアジン系縮合剤を用いたアミドカップリング反応 によるハロ酢酸類の分析法について

○吉富 太一，西 以和貴，上村 仁

(神奈川県衛生研究所)

【研究目的】

ハロ酢酸類は，水中の有機物が浄水処理の塩素により生成する消毒副生成物である．我が国では，環境省が水道水中のクロロ酢酸(MCAA)，ジクロロ酢酸(DCAA)，トリクロロ酢酸(TCAA)に対し，水道水質基準項目として基準値を定めている．本研究では，トリアジン系縮合剤を用いたアミドカップリング反応によるハロ酢酸類の誘導体化を行い，特に危険が大きいジアゾメタン誘導体化法に代わる GC-MS 分析系の構築を目指した．

【研究の必要性】

ハロ酢酸類は，水中の有機物が浄水処理過程の塩素により生成する消毒副生成物である．現在，我が国では，環境省が水道水中のクロロ酢酸(MCAA)，ジクロロ酢酸(DCAA)，トリクロロ酢酸(TCAA)に対し，水道水質基準項目として基準値を定めている．この3成分は共通して目や皮膚などに腐食性を示し，DCAA と TCAA については，発がん性も懸念されている．

現在，これらの分析法については，ガスクロマトグラフ質量分析計(GC-MS)や液体クロマトグラフ質量分析計(LC-MS)で行うことが告示法で示されている．しかし，GC-MS は有毒で危険性の高いジアゾメタンによる誘導体化を経て分析される．本研究では，トリアジン系縮合剤を用いたアミドカップリング反応によるハロ酢酸類の誘導体化を行うことで，安全な GC-MS 分析系の構築を目指すものである．

日本の浄水技術は世界でもトップクラスであり，途上国と比べ安全性は高く，水道水汚染は無いことが前提となっている．しかし，近年有機フッ素化合物による飲料水汚染や製鉄工場からのシアン流出事故などが現実には発生しており，飲料水に対する国民の関心は，更なる高まりを見せるものと予想される．我が国における水道水検査は水道法に基づいており，行政機関から民間企業も含めて膨大な機関が関与している．したがって，今後も飲料水の安全性確保と共に，検査員の健康危害防止のために有害試薬を用いない分析法の構築が必要である．

【研究計画】

一般的なアミドカップリング反応は，1) 縮合剤によるカルボン酸の活性化，2) アミド結

合を形成するためのアシル化という 2 段階から成り立っている。この 1 段階目に用いた縮合剤や発生した反応中間体は、水やアルコールのようなプロトン性溶媒と高い反応性を示し構造変換の妨げとなることから、通常、無水条件が必須となる。ところが近年開発された縮合剤 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride (以下、DMT-MM) は無水条件の必要がなく、水やアルコール中でも反応が可能なのが最大の特徴である。DMT-MM は既に分析化学にも用いられており、水中における数種の短鎖脂肪酸や有機酸をアルキルアミンと反応させた GC-MS 分析が報告されている。この中でギ酸や酢酸といった単純な有機酸も誘導体化されることから、ハロ酢酸類のカルボン酸も同様に構造変換可能と予想される。分析対象によっては反応時間がかかる可能性もあるため、溶媒や温度等の検討を行い、反応条件を検討した。

【実施内容】

1. ハロ酢酸類の DMT-MM による誘導体化の検討

1) ハロ酢酸類を用いた水中での反応の検討

DMT-MM の誘導体化は東京化成工業株式会社のアプリケーションを参考とした¹⁾。精製水 4 mL に、MCAA(0.0188 g, 0.2 mmol), DCAA(0.0257 g, 0.2 mmol), TCAA(0.033 g, 0.2 mmol) をそれぞれ溶解させた。これらに 2-フェニルエチルアミン (40 µg, 0.3 mmol) を混合し、10 分程度攪拌した。その後、DMT-MM を加え、50°C で 90 分反応させた。各反応液をヘキサンで液液分配し、上清のヘキサン層を GC-MS で分析した。LC-MS 分析は、ヘキサンを乾固後、メタノールに転溶したものを分析した。

2) アルコール系溶媒を用いた TCAA 反応性の検討

メタノール、エタノール、2-プロパノールそれぞれ 4 mL に TCAA(0.033 g, 0.2 mmol) を溶解させた。これらに 2-フェニルエチルアミン (40 µg, 0.3 mmol) を混合し、10 分程度攪拌した。その後、DMT-MM を加え、50°C で 90 分反応させた。反応液は各アルコールで希釈後、GC-MS で分析した。

3) 2-プロパノール：水混合溶媒系を用いた反応の検討

水：2-プロパノール=9:1 の混液 4 mL に MCAA(0.0188 g, 0.2 mmol), DCAA(0.0257 g, 0.2 mmol), TCAA(0.033 g, 0.2 mmol) を溶解させた。これらに 2-フェニルエチルアミン (40 µg, 0.3 mmol) を混合し、10 分程度攪拌した。その後、DMT-MM を加え、50°C で 90 分反応させた。反応液は 2-プロパノールで希釈後、GC-MS で分析した。

【結果】

1. ハロ酢酸類を用いた水中での反応の検討

本研究では、水道水中に含まれる消毒副生成物であるハロ酢酸類 (MCAA, DCAA, TCAA) を対象として、ジアゾメタン類などの危険性の高い誘導体化試薬を用いることなく、より安全かつ簡便に GC-MS 分析可能な誘導体化手法の構築を目的として、トリアジン系縮合剤

DMT-MM を用いた誘導体化反応の検討を行った。目的とするアミド誘導体（以下、アミド体）の構造を図 1 に示した。

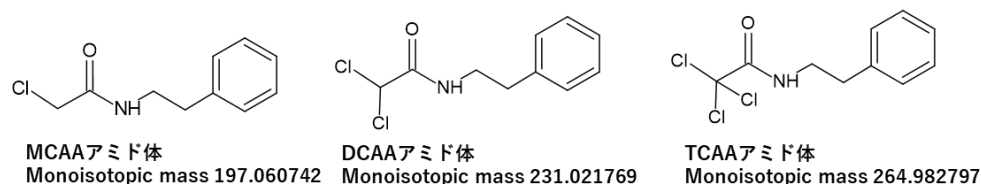


図 1 ハロ酢酸の DMTMM 誘導体化によるアミド体の推定構造

まず、反応溶媒として精製水のみを用い、反応に使用するアミンとしては 2-フェニルエチルアミンを用いて誘導体化を試みた。その結果、LC-MS 分析において、MCAA および DCAA では目的とするアミド体を確認されたが、同時に原料である MCAA や DCAA が残存しており反応は定量的には進行していないことが分かった(図 2a-1, 2a-2, 2b-1, 2b-2)。一方、TCAA については、LC-MS において明確なピークが認められず、TCAA アミド体が生成しているかの判断が困難であった(図 2c-2, 2c-3)。TCAA アミド体は極性官能基がマスクされることにより、LC-MS でのイオン化効率が低下している可能性も考えられたため、GC-MS を用いて確認を行った。その結果、MCAA および DCAA アミド体が検出され、MCAA アミド体については NIST ライブラリーとの一致も確認された。DCAA アミド体についても m/z 231 を示し、MCAA アミド体に類似したフラグメントパターンが観察されたことから、一部で反応が進んでいることが示唆された(図 3a, 3b)。一方で、TCAA アミド体は GC-MS においても検出できなかった(図 3c)。その後、DMT-MM や 2-フェニルエチルアミンの濃度を増加させることや、反応温度を高めることによる条件最適化を試みたが、反応性の改善は認められなかった。以上より、精製水のみを反応溶媒とする条件では、MCAA および DCAA の反応は一部進行するが定量的な誘導体化は難しく、TCAA に関しては反応が進まないことが明らかとなった。

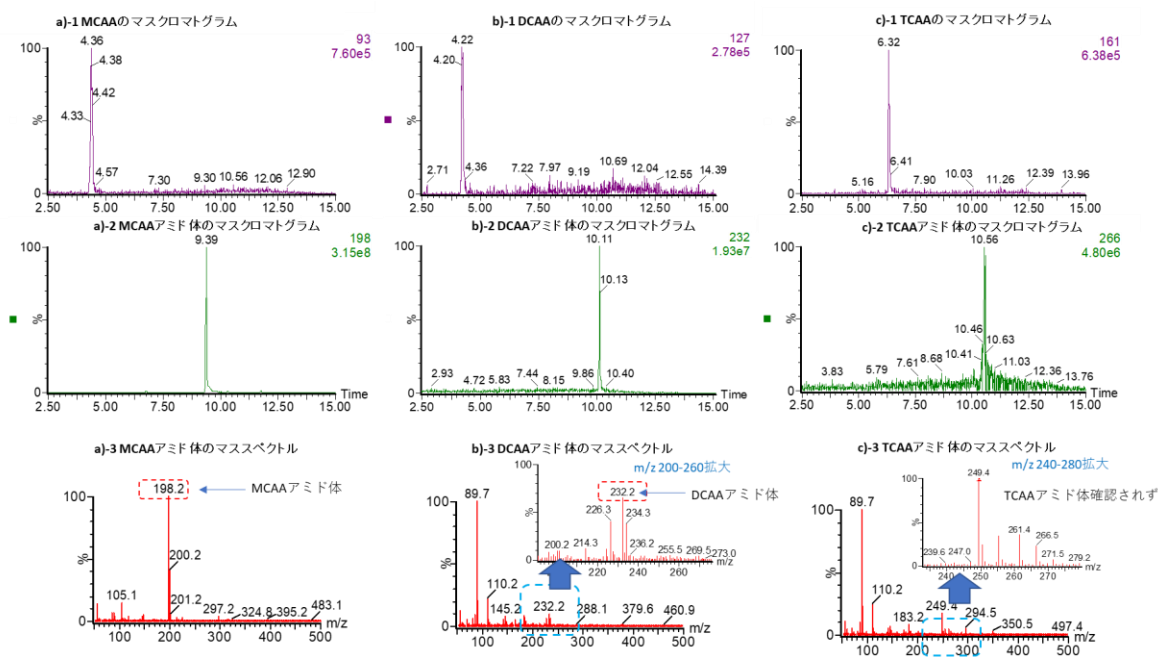


図 2 LC-MS による精製水を反応溶媒に用いた MCAA, DCAA, TCAA アミド体の反応確認

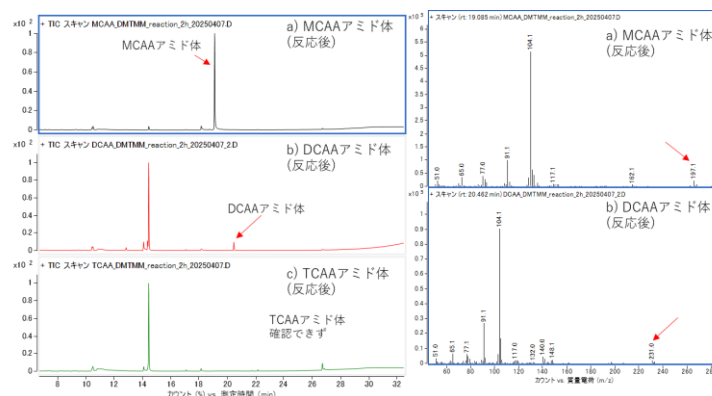


図 3 GC-MS による精製水を反応溶媒に用いた MCAA, DCAA, TCAA アミド体の反応確認

2. アルコール系溶媒を用いた TCAA 反応性の検討

次に、反応溶媒をアルコール系（メタノール、エタノール、2-プロパノール）に変更し、特に精製水で反応性が認められなかった TCAA について、その誘導体化反応を検討した。その結果、アルコール系溶媒では TCAA アミド体が生成されることが確認され、特にエタノールおよび 2-プロパノール溶媒条件下では強いピーク強度で検出された（図 4）。この結果から、アルコール系溶媒における TCAA の誘導体化反応は 2-プロパノール = エタノール > メタノールの順に高いことが明らかになった（図 4）。

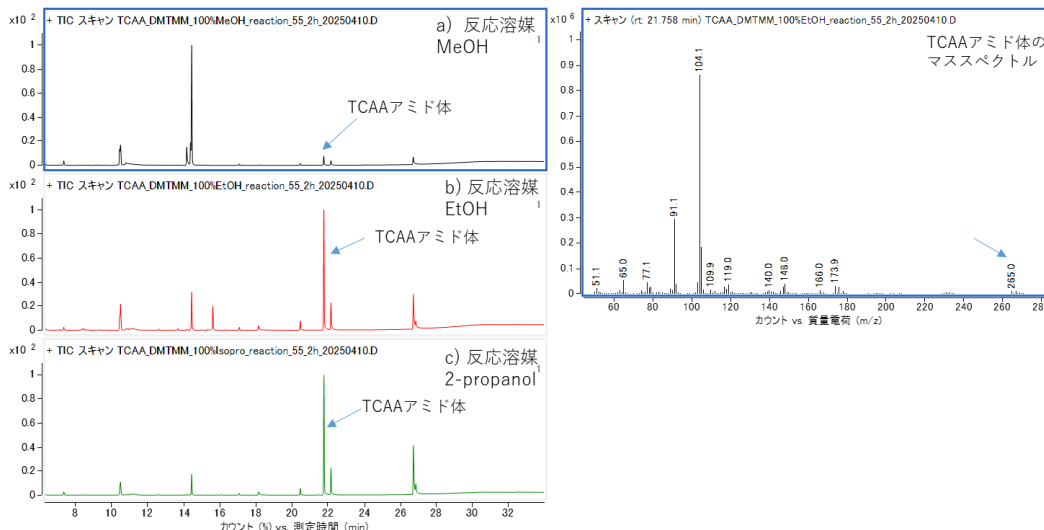


図 4 GC-MS による各アルコールを反応溶媒に用いた MCAA, DCAA, TCAA アミド体の反応確認

3. 2-プロパノール：水混合溶媒系を用いた反応の検討

以上の結果を踏まえ、水を主溶媒としながらも反応性の向上が期待される 2-プロパノールを少量添加した混合溶媒系（水：2-プロパノール = 9：1）を用いて、再度誘導体化反応を試みた。その結果、MCAA および DCAA に関しては、精製水のみの条件よりもアミド化が進行することが確認された(図 5)。しかし、TCAA については、この条件においても誘導体化の進行は認められなかった(図 5)。2-プロパノールの割合をさらに増加させることで TCAA の誘導体化反応性が向上する可能性は考えられるが、本来の目的である水道水試料へ

の適用を考えると、反応後にヘキサンを用いた有機溶媒抽出が必須となる。しかし、2-プロパノールの割合を増加させると反応液がヘキサンと相分離しにくくなり、試料回収が困難になることが懸念された。以上のことから、本手法は **TCAA** を含むすべてのハロ酢酸類の分析を対象とする場合、実用的な手法として成立しないことが明らかとなった。

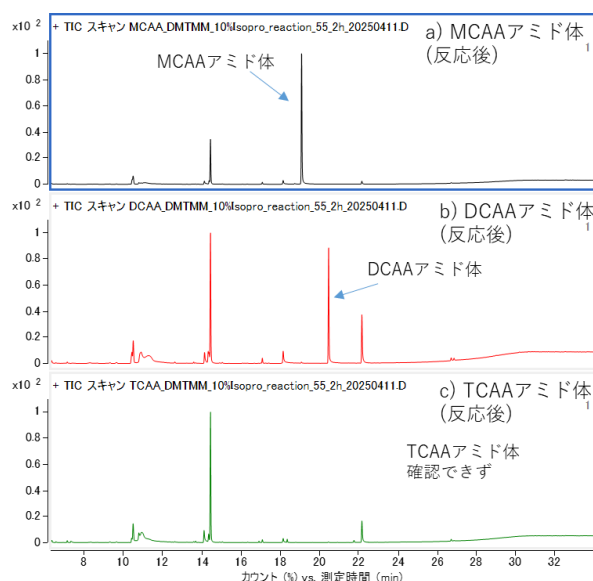


図 5 GC-MS による水：2-プロパノール = 9：1 を反応溶媒に用いた MCAA, DCAA, TCAA アミド体の反応確認

【考察】

本検討では、MCAA、DCAA および TCAA を 2-フェニルエチルアミンとともに水中で DMT-MM の存在下に反応させ、アミド化による誘導体化を試みたが、水もしくは水との混合溶媒系では、目的とするアミドの生成が不完全であった。その原因として、以下の点が想定された。

TCAA を例に挙げると、TCAA は pK_a が 0.77 と極めて強い酸性を示すため、水中ではほぼ完全に電離し、カルボキシレートアニオン (CCl_3COO^-) として存在している。しかし、この CCl_3COO^- は、3 つの塩素原子による強い電子吸引効果の影響で、求核性が著しく低下していたと予想された。DMT-MM によるアミド化は、カルボキシレートがトリアジン環に求核攻撃することで活性エステル中間体（アシルトリアジン体）を形成する必要があるが²⁾、この第一段階の反応が CCl_3COO^- の場合には、ほとんど進行しなかったことが考えられた。

次に、中間体が一時的に形成されたとしても、アシル部位が強い電子求引性を有していることに加え、水系溶媒という反応環境により、生成したアシルトリアジン体は加水分解を受けやすく、アミンとのカップリングに至る前に速やかに分解したことが推察された。

もう一つは、水中におけるアミンの状態である。TCAA のような強酸性物質が共存する系では、アミンは容易にプロトン化され、アンモニウムイオン (RNH_3^+) の形で存在する。アンモニウムイオンは求核性を大きく失っており、たとえ活性エステル中間体が存在しても、それに対する攻撃が起こりにくい。したがって、反応の前半段階（活性化）および後半段

階（カップリング）の双方が、水の存在および TCAA の化学特性により阻害されたと考えられた。これらの要因は、MCAA や DCAA においても、ある程度、共通して作用するものと推定された。実際に、精製水中では、MCAA は比較的反応が進行しやすい傾向を示したが、DCAA では反応性が低下しており、カルボン酸の酸性度と反応性には、相関があると予想された(MCAA; pKa 2.87, DCAA; pKa 1.25, TCAA; pKa 0.77)³⁾。

加えて、TCAA において、アルコール系溶媒を用いた場合に反応が一定程度進行することが確認された。特に、メタノールよりもエタノールや 2-プロパノールを溶媒とした条件下で、TCAA アミド体がより強いピーク強度で検出された。これは、アルコール溶媒の種類によって反応場の性質が異なるためと考えられる。2-プロパノールやエタノールのような疎水性の高いアルコール溶媒では、反応系中の水の活性が低下し、加水分解反応が抑制されたことが考えられた。これにより、DMT-MM によって生成されたアシルトリアジン体が分解されにくくなり、アミンとのカップリング反応が進行しやすいことが推定された。

以上のことから、水中における DMT-MM によるハロ酢酸類のアミド化反応は、通常の方法では困難であることが示唆された。今後の課題としては、反応性の高いアミンの選定や、アミンのプロトン化を抑制するための有機塩基（例：N,N-Diisopropylethylamine など）の併用が考えられた。

【参考文献】

- 1) 東京化成工業，TCI 反応実例：DMTMM を用いた縮合反応，
https://www.tcichemicals.com/JP/ja/product/tci-topics/TCIPracticalExample_20210208.
- 2) Kunishima M., *et al.*, 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methyl-morpholinium chloride: an efficient condensing agent leading to the formation of amides and ester, *Tetrahedron*, 55, 13159-13170, (1999).
- 3) 宮本ら., 水道水中のハロ酢酸類 9 種直接注入, 水道協会雑誌, 89(1), (2020).

【経費使途明細】

使 途	金 額
反応試薬，溶媒等	62,931 円
GC-MS カラム等	103,620 円
GC-MS 用高純度水素	43,450 円
GC-MS 用クリーンガス	44,000 円
TLC ガラスプレート	34,408 円
分析用試薬類	9,504 円
振込手数料	4,840 円
合 計	302,753 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円