

称号及び氏名 博士（工学） 北田 耕大

学位授与の日付 令和 2 年 3 月 31 日

論 文 名 「Acceleration of Specific Reactions of Amines with Nitrite in Ice
(氷中におけるアミン類と亜硝酸の特異的な反応の促進)」

論文審査委員 主査 竹中 規訓
副査 松岡 雅也
副査 小川 昭弥

論文要旨

一般に化学反応は系中の温度が低いほど遅くなる。ところが 1992 年に亜硝酸イオンの酸化反応の速度が 4 °C の溶液条件下より -20 °C の凍結条件下で約 20 万倍促進されることが報告された。この理由について様々な検討がなされた。純水で作製された氷を 0 °C の亜硝酸溶液中に投入しても反応が促進されなかったことから氷表面での触媒反応ではない。遮光の有無で反応性に変化はみられなかったことから光反応でもない。溶液を攪拌し単結晶の氷ができるように凍結させても反応が促進されず、多結晶の氷の中でしか反応が促進されない。また、反応次数が 2 次以上でないとも反応は促進されない。反応速度は温度と濃度によって左右されるが、温度を下げても反応速度が上がる。以上のことから、凍結により促進される溶液反応は凍結濃縮によって説明されると結論付けられた。溶液が凍り始めると溶液中に微小な氷が多数析出する。このとき、溶質は氷の結晶の中に組込まれにくく、氷結晶からほとんど排除され、氷の周りの溶液に移動し、未凍結溶液の溶質濃度が上昇する。この濃縮された溶液はやがて

成長した氷の結晶間に閉じ込められ、最終的に極めて微小な氷結晶間の隙間で極端に濃縮され、反応が促進される。

上記のメカニズムが解明されて以降、凍結濃縮により促進されるさまざまな反応が報告された。2011年には酸性条件下で亜硝酸アンモニウムの脱窒反応が凍結濃縮により促進されることが報告された。この反応では反応速度がピークとなる pH が溶液条件下と凍結条件下（凍結条件下での pH とは、凍結させる前の溶液の pH の意）で異なる。その原因は凍結濃縮により水素イオン濃度が上昇することで pH が下がったからと説明されている。

この反応はアンモニウムイオンと亜硝酸イオンの *N*-ニトロソ化反応から始まる。*N*-ニトロソ化反応とは酸性条件下でアミン類と亜硝酸イオンが2次的もしくは3次的に反応してニトロソアミンを生成する反応である。ニトロソアミンは強い発がん性、変異原性をもつ物質である。アミン類は、アンモニアの水素原子を炭化水素基または芳香族原子団で置換した化合物の総称で、置換した数が1つであれば第一級アミン、2つであれば第二級アミン、3つであれば第三級アミンという。一般に第三級アミンは *N*-ニトロソ化反応を起こさず、第二級アミンは *N*-ニトロソ化反応を経てニトロソアミンを生成し、第一級アミンは生成する *N*-ニトロソアミンがジアゾ化され脱窒する。アミン類は生物の構成単位であるアミノ酸を始めとして、自然界に豊富に存在している。亜硝酸塩はボツリヌス菌の繁殖を抑制する効果があり、発色剤として加工肉中に含まれている。また、環境中にも亜硝酸ガスや亜硝酸イオンとして存在している。つまり、凍結により食品中や環境中でニトロソアミンが生成する可能性がある。

本研究は、これらの前提を踏まえ、凍結条件下におけるアミン類と亜硝酸の反応について体系的にまとめ、食の安全、環境保全に寄与するものである。以下、本研究で得られた成果を要約する。

第1章では、凍結条件下で促進される化学反応に関する研究の背景と、本論文がどのような目的で、かつ、どのような実験手法により実施したかを述べた。

第2章では、凍結条件下における第二級アミンと亜硝酸イオンの *N*-ニトロソ化反応に関する研究で、ジメチルアミンと亜硝酸イオンの *N*-ニトロソ化反応の凍結条件下における反応促進結果について述べた。特定の pH で反応速度が最大となることから、シミュレーションと照らし合わせて、凍結条件下での *N*-ニトロソ化反応は3次反応であることを明らかにした。 -20°C の凍結条件下では未凍結溶液の pH が 4.6 で反応速度が最大となったが、シミュレーションでは pH 3.7 でジメチルアミンと亜硝酸イオンの *N*-ニトロソ化の反応速度が最大となる。過去の報告では、この原因は凍結濃縮により

水素イオン濃度が上昇することで反応場の pH が下がったからだと説明されていた。しかし、反応溶液は緩衝溶液のため、すべての溶質が同じように濃縮すると仮定すると、どれだけ濃縮されても pH3.7 にはならない。このことから、溶液に含まれる各溶質が氷の結晶内へ取り込まれる量が異なり、未凍結溶液の pH 変化に影響を与えていることを明らかにした。

第3章では、第一級アミンと亜硝酸イオンの *N*-ニトロソ化反応に関する研究結果について述べた。環境中に豊富に存在する第一級アミンの例としてアミノ酸があるが、その中でも最も構造が簡単なグリシンの *N*-ニトロソ化反応について研究をおこなった。グリシンと亜硝酸イオンの *N*-ニトロソ化反応も凍結条件下で促進された。しかし、*N*-ニトロソ化反応はアミン類と亜硝酸イオンが 1:1 で反応するはずであるが、亜硝酸イオンの反応量がグリシンの反応量を上回り、*N*-ニトロソ化とは別の反応が並行で起こっていることが示唆された。*N*-ニトロソ化されたグリシンはジアゾ化を経て（ジアゾ化を経た段階の中間体を中間体 A とする）脱窒し、対応するカルボカチオンを生成する、もしくは求核置換反応を起こす。中間体 A は水による求核置換反応により、グリコール酸を生成したが、亜硝酸イオンはグリコール酸とも反応溶液に含まれる他の溶質とも反応しなかった。上記から、亜硝酸イオンは中間体 A とも反応していることが示唆された。この反応はグリシンの α -炭素と亜硝酸イオンが反応する *C*-ニトロソ化反応であると推定された。凍結条件下で反応温度を変化させると亜硝酸イオンの反応量のピークとなる温度は 2 つ現れた。これは *N*-ニトロソ化反応と *C*-ニトロソ化反応のピークを示す温度が異なることに起因すると推察された。脂肪族ジアゾ化合物は室温では速やかに分解されるが、ここで生成したジアゾ化合物は共鳴構造を取れることと系中が低温であることにより安定化したことで *C*-ニトロソ化が起こったものと考えられ、凍結条件下で反応ルートが変化する世界初の報告である。

さらに、グリシンの *N*-ニトロソ化反応で最も注目すべき点はシアン化物イオンが生成する点である。高濃度のグリシンと亜硝酸イオンの溶液中でわずかにシアン化物イオンが生成するという報告はすでになされているが、本研究のグリシンと亜硝酸イオンの存在量に対するシアン化物イオンの生成量比はそれをはるかに上回るものであった。これは、亜硝酸イオンがアミノ酸と冷凍食品中で反応して猛毒であるシアン化合物が生成する可能性を示す。冷凍食品中の反応で発生したシアン化物イオンによって消費者が死亡した報告はないが、冷凍食品を食べることで頭痛を引き起こすという報告はある。少量のシアン化合物の摂取で頭痛が生じることも報告されており、両者に何らかの因果関係がある可能性はある。また、シアン化物イオンは $-C\equiv N$ をもつこ

とから C-ニトロソ化反応が起こったこと、凍結条件下で特異的に生成することから C-ニトロソ化反応が凍結条件下で安定化されることを裏付ける。生成したシアン化物イオンは凍結後、溶液のまま放置すると増加することも確認された。これは低温で安定化されていたシアン化物イオンの前駆体が、温度の上昇によって不安定になり分解してシアン化物イオンになったものと思われる。

第 4 章では、尿素と亜硝酸イオンの N-ニトロソ化反応に関する実験の結果について述べた。凍結条件下におけるアミン類と亜硝酸イオンの反応は食品中のみならず、自然界でも同様に起こりうる。哺乳類や両生類は窒素を尿素の形で排泄する。通常、環境中に排泄された尿素は微生物のもつウレアーゼという酵素により分解されてアンモニアとなる。しかし、寒冷地では微生物の活動が緩慢になるうえ、尿素を含む溶液が凍結されてしまった場合は微生物による分解が行われぬ。また、尿素は凍結防止剤としても使用されている。それにもかかわらず、自然界において尿素の滞在時間が短いのは亜硝酸イオンとの N-ニトロソ化反応に起因する可能性がある。実験の結果、尿素と亜硝酸イオンの N-ニトロソ化反応も凍結条件下で促進された。尿素も第一級アミンなので生成するニトロソアミンはジアゾ化して脱窒し、カルバミン酸が生成した。カルバミン酸は溶液中では不安定であり、氷が融解すると分解されてアンモニウムイオンとして検出される。凍結条件下でカルバミン酸として存在しているのかアンモニウムイオンとして存在しているのかは現段階では不明である。どちらの構造で存在しているにせよ、両物質は第一級アミンなので亜硝酸イオンとさらに N-ニトロソ化反応を起こし窒素となる。つまり、尿素の N-ニトロソ化反応により、分解はウレアーゼによる分解とは異なり、亜硝酸イオンが過剰量存在することにより N-ニトロソ化反応及び生成したアンモニウムイオンの脱窒反応である可能性がある。尿素 1 mM の条件下では、亜硝酸イオンの濃度比を尿素に対して 0 から 1 へ増加させるとアンモニウムイオンの生成量が増加し、比が 1 を超えるとアンモニウムイオンの生成量が減少した。他のアミンのニトロソ化反応と同様に pH における反応速度のピークが見られ、pH2.8 ~ pH3.0 付近でピークが観察されたが、pH3.5 以上でも反応は進行し、環境中でもこの反応が起こることが示唆された。また、尿素と亜硝酸イオンの濃度比が 1:1 のとき、反応温度が -20°C 付近でアンモニアの生成量が最大となった。以上の結果より、尿素と亜硝酸イオンが凍結により進み、環境中の尿素の寿命に影響を与えている可能性が示唆された。

第 5 章では、本研究で得られた成果を総括した。

審査結果の要旨

本論文は、凍結によるアミン類と亜硝酸の反応を詳細に調べた結果をまとめた研究論文である。アミン類はアミノ酸を含む生命の維持には欠かせない物質である。亜硝酸は野菜に含まれるほか、発色剤として加工肉に添加されている。本研究ではアミン類と亜硝酸が溶液ではほとんど反応をしないにもかかわらず同じ条件のものを凍結すると反応が促進され、人体や環境に影響を与える物質を生成する可能性を示した研究結果をまとめたもので、次のような興味深い新たな結果を得ている。

- (1) 二級アミンであるジメチルアミンと亜硝酸の反応が凍結によって促進され、発がん性物質として知られているニトロソアミンを生成することを示した。さらに、この反応が凍結濃縮によって促進されるが単純な濃縮では説明できないことを示し、反応物の一部が氷に取り込まれて、反応領域の pH を大きく変化させていること、さらにその pH 変化量から各反応物の氷への取り込み係数を推定した。これらの結果はいずれも世界で初めての報告である。
- (2) 最も単純なアミノ酸であるグリシンが亜硝酸の存在下で凍結させると、低濃度の試料から、基準を超える濃度のシアン化物を生成することを発見し報告した。反応機構を推定し、さらにどのような条件ではシアン化物イオンが生成しないかを報告した。温度による反応量の違いから反応の活性化エネルギーを求め、シアン化物を生成する未知の反応の活性化エネルギーを推定した。
- (3) 尿素はウレアーゼが存在すると直ちにアンモニアを放出する。しかし、凍土地帯など、凍結が起こる条件でウレアーゼの活性が低下している条件で亜硝酸が存在すると、尿素と亜硝酸の反応が促進され、アンモニアを生成することを報告した。アンモニアは毒性がありまた土壌中では酸性化にもつながる物質であるため、凍結による反応促進は凍結条件で重要であることを示した。

以上の結果は、全てこれまで報告されていない現象を発見、報告したもので、非常に貴重な研究結果である。凍結による反応促進は溶液中は起こらない過程も近年報告されるようになり、理論体系の確立が待たれている研究領域である。本研究は凍結による反応の研究領域で多大な貢献があるいくつかの研究結果を報告し、食品化学及び環境化学の研究分野の発展への貢献は極めて大きい。また、申請者が自立して研究活動を行うのに必要な能力と学識を有することを示したものである。