土壤中ピレンの塩素化に及ぼす太陽光線照射の影響

杉山英俊

神奈川県環境科学センター

Effects of Sunlight Irradiation on the Chlorination of Pyrene in Soil

HIDETOSHI SUGIYAMA

*Kanagawa Environmental Research Center, 842, Nakahara-shimojuku,
Hiratsuka-shi, Kanagawa 254, Japan*

(Received May 18, 1995)

The influence of sunlight irradiation on the chlorination of pyrene in soil was investigated in this work. The reaction products including original pyrene and chloropyrenes in soil after the irradiation were extracted with benzene-ethanol mixture (4:1, v/v) using a sonication technique. The extracts were then cleaned up using florisil column chromatography before GC/MS (SIM) determination. 1-Chloropyrene and dichloropyrene were formed when the soil spiked with pyrene was irradiated with sunlight in the ordinary atmospheric air. The formation of chlorinated pyrenes in soil was also found to be strongly dependent on the irradiation time, kind of soil and water contents. In addition, the formation of chlorinated pyrenes in soil was extremely depressed by the washing of the soil with water, indicating the involvement of water soluble substances as a chlorine source.

Key words — pyrene; chloropyrene; dichloropyrene; chlorination; soil; sunlight

緒 言

環境中には人類活動由来の多種多様の微量化学物質が存在しており、これら化合物の人や生態系に対して及ぼす影響が懸念されている。また、こうした物質が環境中で相互に反応し、他の毒性の強い化学物質に変化する可能性も指摘されている。例えば、大気中でのニトロアレンの生成、¹⁾ 水中におけるトリハロメタンの生成²⁾ 等が良く知られている。しかし、表層土壤中におけるこれらに関する研究はあまり行われていない。

一般に、土壤中には微量の多環芳香族炭化水素類が存在するが、中でもピレンの含有量が最も多く、又、広範囲に存在していることが知られている。³⁾ 一方、ピレンの変異原性は現在までのところ認められていないが、塩素置換体であるクロロピレン、ジクロロピレンは強い変異活性を示すことが認められている。⁴⁾ 塩素化ピレンの生成については、水溶液中でピレンと次亜塩素酸を反応させたとき、^{4b,5)} また、塩

素化フルオランテンの生成についてはフルオランテンと次亜塩素酸との反応でおこることが報告されている。⁶⁾ しかし、土壤中におけるピレンの塩素化反応についての報告例は現在までのところ著者の知る限り報告されていない。

そこで今回、土壤中に広く存在するピレンを対象とし、土壤中のピレンが太陽光線の照射によりクロロピレン、ジクロロピレンに変化するかどうかについてモデル実験を行ったところ、若干の知見が得られたので以下に報告する。

実 験 方 法

1. 試薬 ピレンは和光純薬(株)製特級試薬及びジーエルサイエンス(株)製標準試料(99%)を、1-クロロピレン及びジクロロピレン類標準品は神奈川県衛生研究所森康明氏が合成したものをを用いた。⁵⁾ *n*-ヘキサン、エタノール、メタノール及びベンゼンは和光純薬(株)製の残留農薬試験用試薬を用いた。

カラムクロマトグラフィー用の充填剤には、和光純薬（株）製の残留農薬試験用フロリジルを使用前に 145°C で 8 時間加熱乾燥したあとデシケーター中で放冷して用いた。

2. 土壌 平塚市土屋山中の黒色土壌を 1 昼夜風乾後、240 μm のふるいでふるったもの（以下風乾処理土壌という）と、これを 160°C で 1 時間加熱処理後放冷したもの（以下加熱処理土壌という）の 2 種類を主に使用した。

加熱温度及び加熱時間は衛生試験法の乾熱滅菌法に準じた。⁷⁾

また、市販されている（財）日本土壌協会監修で、風乾してある土性土壌標本 7 種（岩本鉱産物商会）も使用した。

3. 器具及び装置 GC/MS は日本電子製 SX-102 を、超音波発生装置はシャープ製 UT-51 N (35 W, 32 kHz) を使用した。カラムクロマト管は直径 2 cm, 長さ 3 cm のガラス管を使用し、これに乾燥フロリジル 15 g を *n*-ヘキサンにより湿式充填して使用した。

4. GM/MS 測定条件 分離カラムはスペルコ製 PTE-5 (0.25 mm $\times$ 30 m, 膜厚 0.25 μm) を使用した。GC 操作条件は以下の通り。キャリアーガス；ヘリウム、カラムヘッド圧；60 kPa, スプリットレス；100：1, カラム温度；100°C（1 分間保持）, 30 °C/min で 240°C まで昇温し、240°C から 5°C/min で 280°C まで昇温を行った。注入口温度；280°C。また、MS 操作条件は以下の通り。イオン化電流；500 μA , イオン化電圧；10 kV, イオン化；陽イオンイオン化法 (PEI)。SIM 測定にはピレンは m/z 202 で定量、1-クロロピレンは m/z 236 で定量、238 で確認、ジクロロピレンは m/z 270 で定量、 m/z 272 で確認を行った。

5. 太陽光線照射実験 1) 照射方法——土壌 5 g（または 2.5 g）を直径 110 mm の時計皿に取り、直径約 70 mm 程度の円になるように均一に広げた。この土壌にピレンのメタノール溶液（0.5—250 ppm）2 ml を一様に加え、暗所で風乾後、この時計皿を太陽光線に一定時間照射した。

ここで、太陽光線の強さは日により時間により違うので、一連の照射実験は同一日に行うようにし、午前 9 時 30 分頃から午後 3 時 30 分頃までの間とした。また、これらの実験は 1993 年 11 月から 1994 年 5 月の間で、神奈川県環境科学センター（4 階建）の屋上で行った。

2) 塩素化ピレンの定量——照射の終わったピレ

ン添加土壌を三角フラスコに移し、ベンゼン—エタノール混液（4：1, v/v）100 ml を加えて 10 分間振とう、15 分間超音波照射を行った。抽出液を遠心分離後、ロータリーエバポレーターで濃縮し、*n*-ヘキサン 2 ml に転溶してフロリジルカラムクロマトグラフィーによるクリーンアップで試験溶液を得た。得られた試験溶液 1 μl を GC/MS に注入し SIM クロマトグラムを得、あらかじめ作成しておいた標準物質の検量線から目的物質の濃度を求めた。

なお、土壌中ピレン及び塩素化ピレン定量法の詳細は別に報告する予定である。⁸⁾

結果及び考察

1. ピレン標準物質

今回の実験に当って、和光純薬（株）製及びジーエルサイエンス（株）製のピレンを溶媒に溶かして GC/MS の測定を行った。その結果、いずれも 2000 ppm 溶液ではトレース量の 1-クロロピレンが検出された。さらに、ケンブリッジアイソトープラボラトリー（株）製でピレンの同位体である d_{10} ピレンを使用したところ、1-クロロピレンは検出されなかった。これら 3 標準ピレン溶液を土壌に添加して 1-クロロピレンの生成について検討を行ったところ、いずれもトレース量の 1-クロロピレンの存在は無視できるレベルであることが確認された。そこで、以下の実験ではジーエルサイエンス（株）製のピレンを本検討の標準品として使用することとした。

2. 土壌中における塩素化ピレンの生成と太陽光線照射時間との関係

この実験では加熱処理黒色土壌を用いて塩素化ピレンの生成に及ぼす太陽光線照射時間の影響を調べた。加熱処理黒色土壌 5 g を時計皿にとり、ピレンをそれぞれ土壌中 2, 10, 40 及び 100 ppm の濃度となるように添加し暗所で風乾後、太陽光線を 30 分、1, 3 及び 6 時間照射した。これらの試料の分析から得られた 1-クロロピレン及びジクロロピレンの生成量と照射時間との関係を Fig. 1 に示した。

Fig. 1 より、ピレン濃度 2 ppm 添加の試料ではいずれの照射時間においても 1-クロロピレンの生成は認められなかった。これに対し、ピレン濃度 10 ppm の土壌では、照射時間 30 分で 1-クロロピレンの生成（1.1 ppb）が認められ、照射時間に比例して増加する傾向が認められた。同様にピレン濃度 40 ppm では 5.2—15 ppb の範囲で、ピレン濃度 100 ppm では 13—50 ppb の範囲で 1-クロロピレンの生成することが認められた。

Fig. 1. Relation between the Concentration of Pyrene Added in Soil and Sunlight Irradiation Time in Formation of Chlorinated Pyrenes

Irradiation time: ▲, 30 min; ○, 1 h; ■, 3 h; △, 6 h, □, dark place for 6 h. Soil, heat-treated black soil (5 g).

一方、ジクロロピレンは、ピレン濃度 2 ppm の土壌では照射時間にかかわらずその生成は認められなかった。しかし、ピレン濃度 10 ppm の土壌では照射時間 6 時間で 0.5 ppb のジクロロピレンの生成が確認され、100 ppm においては照射時間 3 時間で 0.82 ppb、6 時間では 1.2 ppb が検出された。なお、それぞれの濃度において暗所に 30 分、1、3 及び 6 時間放置した試料からは 1-クロロピレン及びジクロロピレンは検出されなかった。

このように土壌中にピレンを添加し太陽光線を照射すると添加量に対してわずかではあるが 1-クロロピレンとジクロロピレンの生成することがわかった。その生成量はピレンの添加量の多いほど、太陽光線の照射時間が長いほど多くなることも明らかになった。

3. 土壌標本を用いた検討

土壌標本を試料として塩素化ピレンの生成に関する検討を行った。この検討には土壌標本 7 種類を用いた。また、前述までの検討に用いられた平塚市土屋山中の黒色土壌も併せて用いた。

まず、ピレンを添加する前の土壌 8 種のピレン類の分析結果を Table I に示した。ピレンについては 4 土壌が不検出であったが、他の土壌から 2.0–100 ppb の範囲で検出された。一方、1-クロロピレン及びジクロロピレンについてはすべての土壌で不検出であった。

これらの土壌にピレンを添加し、太陽光線照射実験を行った。なお、本検討における土壌ではメタノール溶液 2 ml が土壌 5 g に均一に分散できない場合

があったため、使用土壌量を 2.5 g とした。風乾土壌、これらの加熱処理土壌及び照射実験中に土壌表面が乾燥しないように風乾土壌に蒸留水を添加した 3 種について実験した。実験はピレン 125 ppm メタノール溶液 2 ml、すなわち、土壌中ピレン濃度が 100 ppm となるように添加し、これらに太陽光線を 4 時間照射する条件で行い、1-クロロピレン及びジクロロピレンの分析を行った。得られた結果を Fig. 2 に示した。

Fig. 2 にみられるように、加熱処理土壌ではいずれも 1-クロロピレンの生成が認められ、その生成量は最少 1 ppb (1 の黒ぼく土)、最大 1470 ppb (4 のシラス土) の範囲であった。一方、風乾土壌では、最小 6 ppb (2 の火山灰土)、最大 3600 ppb (4 のシラス土) の範囲であった。

又、加熱処理土壌と風乾土壌との 1-クロロピレン生成量を比較すると、後者の多いことがわかった。

ジクロロピレンは 1 の黒ぼく土、2 の火山灰土、3 の粗粒火山灰土の各試料では不検出であった。他の 5 種類の加熱処理土壌では 0.5–62 ppb、風乾土壌では 0.7–150 ppb の範囲で検出されており、この場合も加熱土壌試料よりも風乾土壌のほうが高いジクロロピレン量を示した。また、風乾土壌と、風乾土壌に蒸留水を添加した土壌との 1-クロロピレン生成量を比較すると、前者 (6–3600 ppb) は後者 (4–21 ppb) より高くなる傾向がみられた。

なお、ブランク試験として同試料を暗所で 4 時間放置した 8 種類の試料からは 1-クロロピレン及びジクロロピレンはいずれも検出されなかった。

TABLE I. Concentrations of Pyrene, 1-Chloropyrene and Dichloropyrenes and the Percentage of Water Content in Soil

Number	Soil	Pyrene	1-Chloropyrene	Dichloropyrenes	Water content (%)
1	Ando soil (Kiyosato-mura, Yamanashi)	3.2	<1	<0.5	11.0
2	Volcanic ash soil (Hino-shi, Tokyo)	2.0	<1	<0.5	18.0
3	Coarse volcanic ash soil (Gotenba-shi, Shizuoka)	<1	<1	<0.5	0.8
4	Shirasu(Kagoshima-shi, Kagoshima)	<1	<1	<0.5	0.6
5	Red soil (Toyohashi-shi, Aichi)	<1	<1	<0.5	2.2
6	Alluvial soil (Nagaoka-shi, Niigata)	100	<1	<0.5	3.8
7	Alluvial soil (Ohho-cho, Yamanashi)	14	<1	<0.5	1.2
8	Black soil (Hiratsuka-shi, Kanagawa)	<1	<1	<0.5	1.8

Concentrations were calculated on dry bases(ppb).

Fig. 2. Formation of Chlorinated Pyrenes in various kind of Soil Samples under Sunlight Irradiation

■, heat treated soil; ▨, air dried soil; ▤, air dried soil added distilled water. Soil (2.5 g) : 1, ando soil; 2, volcanic ash soil; 3, coarse volcanic ash soil; 4, shirasu soil; 5, red soil; 6, alluvial soil; 7, alluvial soil; 8, black soil. Irradiation time, 4 h. Pyrene, 100 ppm.

Table I に示した水分含量の比較的多い 1 の黒ぼく土及び 2 の火山灰土を除くと、水分添加により 1-クロロピレン生成量が大幅に減少し、ジクロロピレンについても同様な傾向が認められた。これらの結果は、太陽光線照射におけるピレン添加土壌の塩素化ピレン生成に水分含量が重要な役割をもつことを示唆する。

さらに、1-クロロピレン及びジクロロピレンの生成量が一番多かったシラス土について塩素化が起こるピレン濃度の下限値を知るために、ピレン添加量を変化させて太陽光線を照射し、得られた試料の分析を行った。その結果を Fig. 3 に示した。

Fig. 3 より、ピレン濃度 2 ppm でも 1-クロロピレン及びジクロロピレンの生成が認められ、黒色土壌に比較してシラス土の塩素化ピレン生成能の高いことがわかった。

Fig. 3. Formation of Chlorinated Pyrenes in the Shirasu Soil with Sunlight Irradiation

△, 1-chloropyrene; ■, dichloropyrene. Soil, air dried soil (2.5 g). Irradiation time, 4 h.

4. 塩素化ピレンの生成に及ぼす水分の影響

加熱処理土壌は、微生物、水分等の影響を除去し、土壌本来の特性を知るために使用したが、実際の土壌表面はある程度の水分を含んでいるものと考えられる。この水分の影響について更に詳しく調べるために、8の加熱処理黒色土壌に蒸留水を添加し、太陽光照射実験を行った。この実験では加熱処理黒色土壌5gを時計皿にとり、この土壌に250 ppm ピレンのメタノール溶液2mlを加え暗所で風乾後、これらに蒸留水0.1 (含水率約2%相当)、0.5 (9.1%)、3 (38%) 及び5 ml (50%)をそれぞれ加えた後、太陽光線を30分、1、3及び6時間照射した。各試料の1-クロロピレン含量を求めた結果をFig. 4に示した。また、蒸留水を加えなかった場合の結果も併せて示した。

Fig. 4にみられるように、太陽光線照射による土壌中ピレンの塩素化ピレンへの変換は蒸留水の添加量の増加に従って、いずれの照射時間においても減少する傾向が認められた。これらの結果及び3における結果とから、表層土壌における過剰水分の存在は太陽光線による塩素化ピレン生成に抑制的に作用すると考えられる。しかし、多少の水分を含んでいる風乾土壌は、加熱処理土壌より塩素化ピレンの生成量が多いことから、適量の水分含量が塩素化ピレンの生成に関与しているものと思われた。

5. 土壌洗浄によるクロロピレンの生成機構の検討

土壌にピレンを添加し、太陽光線を照射すると1-クロロピレン及びジクロロピレンの生成すること

Fig. 4. Effect of Addition of Distilled Water on the Formation of 1-Chloropyrene in Soil with Sunlight Irradiation

□, 5 ml; ▲, 3 ml; ○, 0.5 ml; ■, 0.1 ml; △, without addition of distilled water. Soil, heat-treated black soil (5 g).

TABLE II. Formation of 1-Chloropyrene in the Washed Soil with Sunlight Irradiation

Soil	1-Chloropyrene (ppb)	Ratio (%)
A ^{a)}	49±1.6	100 (A/A×100)
B ^{b)}	10±1.3	20 (B/A×100)
C ^{c)}	54±2.2	110 (C/A×100)

a) Heat-treated black soil (5 g). b) Soil (5 g) washed for 3 times A with distilled water. c) Soil (5 g) washed for 3 times A with benzene. Pyrene concentration; 100 ppm. Irradiation time; 4 h. Average of 3 times.

が確認できたため、その塩素供給源について若干の検討を加えた。

加熱処理土壌を蒸留水又はベンゼンでそれぞれ3回ずつ洗浄し、1昼夜風乾後、さらに160°Cで1時間加熱乾燥後放冷した土壌にピレンを添加し、これらを用いて照射実験を行った。得られた試料中の1-クロロピレンの含有量をTable IIに示した。

Table IIより、洗浄を行っていない加熱処理土壌(A)と比較して水洗を行った土壌(B)の1-クロロピレン生成能は80%減少しており、ベンゼン洗浄を行った土壌(C)では生成量の減少は認められなかった。したがって、土壌中でピレンが塩素化するための主な塩素供給源として水溶性物質が考えられた。

ま と め

土壌中におけるピレンの塩素化に及ぼす太陽光線照射の影響について検討した。

加熱処理土壌にピレンを添加し、これに太陽光線を照射すると1-クロロピレン及びジクロロピレンが生成し、その生成量は照射時間及びピレン濃度に比例して増加することがわかった。8種類の土壌標本にピレンを添加し、同様に照射実験を行ったところ、いずれも1-クロロピレンの生成が認められ、5種類の土壌ではジクロロピレンの生成することもわかった。加熱処理土壌に蒸留水を添加すると水分は塩素化ピレンの生成に対して抑制的に作用すること、また、加熱処理土壌よりも風乾土壌が塩素化ピレンの生成能が高いことから、微量の水分及び何等かの要素も土壌中ピレンの塩素化に関与しているものと推定された。

土壌を蒸留水で洗浄するとクロロピレンの生成量が減少することから、塩素化のための主な塩素供給源は水溶性であると考えられた。

したがって、今後、この塩素供給源及び塩素化の

最適波長領域についての検討が必要である。また、
実態調査を含めた詳細な検討も必要である。

謝辞 本研究にあたり、1-クロロピレン、ジクロ
ロピレン標準品を供与下さった神奈川県衛生研究
所、森 康明氏に深謝致します。

引用文献

- 1) H. Tokiwa, Y. Ohnishi, *CRC Critical Rev. Toxicol.*, **17**, 23 (1986).
- 2) 鶴保謙四郎, 山本耕司, 福島 実, 小田国雄, 大阪市立環境科学研究所報告, **48**, 1 (1985).
- 3) a) 泉川碩雄, 吉岡秀俊, 清宮隆治, 東京都環境科学研究所年報, **1991**, 81; b) W.P. Eckel, T.A. Jacob, *US DOE Rep.*, **1992**, 81.
- 4) a) A. Colmsjo, A. Rannug, U. Rannung, *Mutat. Res.*, **135**, 21 (1984); b) 森 康明, 内藤昭治, 後藤純雄, 松下秀鶴, 衛生化学, **33**, 313 (1987).
- 5) 森 康明, 後藤純雄, 小野寺祐夫, 内藤昭治, 滝谷昭司, 松下秀鶴, 衛生化学, **38**, 282 (1992).
- 6) 高橋淳子, 木村栄作, 岩原繁雄, 安藤正典, 佐谷戸安好, 衛生化学, **30**, 268 (1984).
- 7) 日本薬学会編, “衛生試験法注解,” 金原出版, 東京, 1990, p.142.
- 8) 杉山英俊, 衛生化学, **42**, 92 (1996).