畑土壌中のクロロタロニル消失過程における炭素同位体分別

山本幸洋*, 田中福代†, 藤原伸介†, 松丸恒夫

千葉県農業総合研究センター, †独立行政法人農業技術研究機構中央農業総合研究センター

(平成15年4月7日受付, 平成15年9月11日受理)

Carbon Isotope Fractionation during Chlorothalonil Dissipation in an Upland Soil

Yukihiro YAMAMOTO,* Fukuyo TANAKA,† Shinsuke FUJIHARA† and Tsuneo MATSUMARU

Chiba Prefectural Agriculture Research Center, 808 Daizenno-cho, Midori-ku, Chiba 266-0006, Japan

† National Agricultural Research Center, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

We investigated changes in the $\delta^{13}\text{C}$ value of a pesticide during its dissipation in an upland soil. Chlorothalonil (2,4,5,6-tetrachloro-1,3-isophthalonitrile) as a test chemical was added to the soil (Light-colored Andosol) and incubated at 30°C in the dark. The pesticide was periodically extracted from the soil and subjected to analysis with an isotope ratio mass spectrometer. The $\delta^{13}\text{C}$ value of chlorothalonil in the soil increased from -26.5 to -22.5‰ during the incubation period of 70 days. The enrichment factor in this study was -2.6‰ . These results suggest the occurrence of carbon isotope fractionation during the dissipation of chlorothalonil in the soil environment.

Keywords: isotope fractionation, stable isotope, $\delta^{13}\text{C}$, chlorothalonil, enrichment factor, gas chromatograph/combustion/isotope ratio mass spectrometry (GC/C/IRMS).

緒 言

農薬は、安定した農業生産を維持する上で必要不可欠な資材である。しかし、農薬はほ場という開放系で使用される化学物質であるため、環境中に放出され、水や大気、土壌を介して人体や非標的生物に影響を及ぼすことが懸念される。特に、近年では複数の農薬が「内分泌攪乱作用を有すると疑われる化学物質」としてリストアップされ¹⁾、社会的にも農薬の環境中における動態に対して関心が高まっている。今後、環境中に放出された農薬の安全性を評価するためには、その動態をより詳細に解明する必要がある。

一般に、環境中における農薬の消失過程には、蒸発、流亡、分解等、複数の要因が関与する²⁾。このような複数の要因が関与する現象において、特定の要因の寄与を推定する方法の一つが、物質の反応過程における安定同位体自然存在比の変化、すなわち、同位体分別を利用する方法である。この方法は、同位体分別の程度を表す濃縮係数(en-

richment factor)を用いて、同位体分別を伴う要因の寄与を推定する³⁾。しかし、現在までに、環境中における農薬の消失過程において同位体分別は確認されておらず、したがって、濃縮係数も明らかにされていない。

そこで、本研究では、畑土壌中のクロロタロニル消失過程における炭素同位体分別の存在を確認する。

材料および方法

供試薬剤は、クロロタロニル (2,4,5,6-tetrachloro-1,3-isophthalonitrile, 和光純薬社製, 残留農薬試験用, 純度 99.0%以上) とし、珪藻土 (Varian 社製 Chem Tube-Hydromatrix) とともに粉碎混合して 1% (w/w) の粉剤としたものを用いた。供試土壌は、淡色黒ボク土 (大川口統, 土性: CL, pH (H₂O): 5.39, 有機炭素含量: 5.3%, 採取地: 茨城県つくば市観音台) とし、2 mm の篩を通したものを用いた。

乾土 10 g 相当の供試土壌を 100 ml 容ビーカーにとり、供試薬剤を有効成分で 0.5 mg 添加後混合した。この添加

* To whom correspondence should be addressed.

量は、クロロタロニル 10%粉剤（商品名：ダコソイル）の散布量（40 kg/10 a）を想定している。さらに、蒸留水を添加して土壌の水分条件を最大容水量の 60%に調整し、慣行施肥窒素量に相当する硫酸アンモニウム 9.43 mg を添加後混合した。アルミ箔で軽くふたをして暗黒条件下、30°Cの恒温器内で培養した。培養期間は、培養開始から 0, 7, 21, 35, 49, 70 日とした。培養中の土壌含水量は、試料の全重量を週 2 回測定して把握し、蒸発による減少量を補充した。試験はすべて 3 反復で行った。

培養後の土壌からクロロタロニルを回収する方法は、操作中に炭素同位体分別が生じることを回避するため、以下のように従来法⁴⁾と比べて工程数を減らしたものとした。試料 1 g と珪藻土 0.2 g（Varian 社製 Chem Tube-Hydromatrix）を 10 ml 容ねじ口付き試験管にとり、酢酸エチル 5 ml で 2 回振とう抽出し、無水硫酸ナトリウムを少量加えろ紙を用いて脱水、ろ過後、減圧濃縮して酢酸エチルで 1 ml に定容した。定量には、ガスクロマトグラフ質量分析計（GC/MS, ヒューレットパッカード社製 HP-5971, 分離カラム Ultra ALLOY-5）を用いた。添加回収率は 50 ppm 添加相当で 47%, 10 ppm 添加相当で 42%, 2 ppm 添加相当で 50%であった。定量値は、50 ppm 添加相当の回収率で補正した。GC/MS による定量後、抽出液をクロロタロニル濃度が約 30~50 mg/l となるまで窒素気流下で濃縮し、炭素安定同位体の分析に供した。炭素安定同位体自然存在比の分析には、ガスクロマトグラフ/燃焼/安定同位体比質量分析計（GC/C/IRMS, サーモ・フィニガン社製 DELTA plus）を用いた。分析条件は Table 1 に示した。炭素安定同位体自然存在比は、(1)式による $\delta^{13}\text{C}$ 値で示した（単位はパーミル, ‰）。

$$\delta^{13}\text{C}(‰) = (R_{\text{sample}} / R_{\text{standard}} - 1) \times 1000 \quad (1)$$

Table 1. Analytical conditions of GC/C/IRMS to measure carbon isotope ratios of chlorothalonil

Isotope ratio mass spectrometer	Thermo Finnigan DELTA plus equipped with gas chromatograph Agilent Technologies 6890
Injection volume	4 μl
Carrier gas	He
Inlet	250°C, Splitless, 1.5 ml/min constant flow
Column	HP-5, I.D. 0.32 mm, length 30 m, film thickness 0.25 μm
Oven temperature	50°C (1 min)-20°C/min-250°C (5 min)
Retention time	692 sec
Combustion reactor temperature	850°C
Reduction reactor temperature	650°C

Fig. 1. GC/C/IRMS chromatograms of chlorothalonil.

(a) Standard (50 mg/l), (b) Sample (incubation period was 70 days).

ここで R_{sample} と R_{standard} はそれぞれ試料と標準物質の $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比を示し、標準物質には PDB（アメリカ白亜紀 Pee Dee 層の巻貝化石である Belemnite, CaCO_3 , $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.01124$ ）を用いた⁵⁾。GC/C/IRMS は、測定ごとに $\delta^{13}\text{C}$ 値が既知の CO_2 で補正した。GC/C/IRMS の分析精度は、クロロタロニル標準品の $\delta^{13}\text{C}$ 値の変動係数で 1.9%であった。土壌に添加前と添加直後のクロロタロニルの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、それぞれ $-26.4‰$ と $-26.5‰$ であり、土壌からの回収による炭素同位体分別は無視できると考えられる。

結果および考察

GC/C/IRMS によるクロロタロニルの分析例を Fig. 1 に示した。(a) は標準試薬 (50 mg/l) であり、(b) は培養期間 70 日の試料である。クロロタロニルのピークは、土壌由来の他のピークから十分に分離していた。

土壌中におけるクロロタロニルの濃度推移を Fig. 2 上段に示した。クロロタロニルの濃度は、培養期間が長くなるほど低下し、その半減期⁶⁾は 12.5 日であった。クロロタロニルの土壌中半減期は 5~36 日といわれており⁷⁾、本研究における結果もその範囲内にあった。

土壌中におけるクロロタロニルの $\delta^{13}\text{C}$ 値の推移を Fig. 2 下段に示した。クロロタロニルの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、培養開始時では $-26.5‰$ であったが経時的に高くなり、培養期間 70 日では $-22.5‰$ まで上昇した。すなわち、土壌中に残存するクロロタロニル中の炭素は、消失したクロロタロニル中の炭素と比べて ^{13}C の比率が高くなった。3 連の培養処理間における $\delta^{13}\text{C}$ 値の標準偏差は、培養期間が長くなるほど大きくなったが、培養開始時と培養期間 21 日以降の $\delta^{13}\text{C}$ 値

Fig. 2. Concentration and $\delta^{13}\text{C}$ value of chlorothalonil in upland soil.

* Bar: $\pm$ standard deviation.

は有意に差があった (Scheffe's F 検定, 危険率 1%)。以上のことから, 畑土壌におけるクロロタロニルの消失過程において炭素同位体分別が生じていると考えられた。

他の有機塩素化合物のテトラクロロエチレンやトリクロロエチレンでは, 微生物による脱塩素の過程で炭素同位体分別が生じることが知られている^{8,9)}。畑土壌におけるクロロタロニルが消失する要因の一つが微生物による分解であり¹⁰⁾, 代謝産物として 1 塩素が OH 基に置換した 4-hydroxy-2,5,6-trichloroisophthalonitrile 等が生成する^{11,12)}。これらのことから, 本研究における炭素同位体分別は, クロロタロニルの微生物分解により生じた可能性がある。炭素同位体分別が生じるメカニズムとしては, クロロタロニルの消失に関与する部位における ^{13}C の結合力が, ^{12}C と比べて強いことが考えられる⁹⁾。

本研究における炭素同位体分別の程度を評価するため, 濃縮係数 ε を Mariotti らにより導かれた, いわゆる Rayleigh の式により求めた^{3,13,14)}。

$$\delta_s = \delta_{s_0} + \varepsilon \ln C/C_0 \quad (2)$$

ここで

δ_s : 試料の $\delta^{13}\text{C}$ 値 (‰)

δ_{s_0} : 測定開始時の試料の $\delta^{13}\text{C}$ 値 (‰)

C : 試料のクロロタロニル濃度 (ppm)

C_0 : 測定開始時の試料のクロロタロニル濃度 (ppm)

Fig. 3. Relationship between concentration ($\ln C$) and $\delta^{13}\text{C}$ value of chlorothalonil in upland soil.

$a = \delta_{s_0} - \varepsilon \ln C_0$ とすると (2) 式より,

$$\delta_s = a + \varepsilon \ln C \quad (3)$$

ただし, a , ε は定数である。

本研究における結果を (3) 式に当てはめると次の回帰直線が得られる (Fig. 3)。

$$\delta_s = -16.4 - 2.6 \ln C \quad R^2 = 0.9624$$

よって, 濃縮係数 ε は -2.6‰ と推定される。この値は, Bloom らが求めたトリクロロエチレンの脱塩素過程における濃縮係数 -2.5‰ と同等であった⁹⁾。

さらに, 炭素同位体分別の利用例を以下に示す。ここでは, 本研究におけるクロロタロニルの消失と炭素同位体分別が, ある A という要因でのみ生じたと仮定する。上記の濃縮係数 ε を (2) 式に当てはめると,

$$\delta_s = \delta_{s_0} - 2.6 \ln C/C_0$$

となる。すなわち, 濃度 C_1 から C_2 までのクロロタロニル消失による $\delta^{13}\text{C}$ 値の変化を $\Delta\delta^{13}\text{C}$ 値とすると,

$$\begin{aligned} \Delta\delta^{13}\text{C} (\text{‰}) &= \delta^{13}\text{C}_2 - \delta^{13}\text{C}_1 \\ &= 2.6 \ln C_2/C_1 \end{aligned}$$

となる。環境中におけるクロロタロニルの消失に要因 A と他の炭素同位体分別を伴わない要因が関与した場合, この式と $\delta^{13}\text{C}$ 値の差 ($\Delta\delta^{13}\text{C}$) から要因 A による消失量のみを推定できる³⁾。

本研究により, 畑土壌におけるクロロタロニルの消失過程において炭素同位体分別が生じていることが確認された。今後, 同位体分別という現象を環境中における農薬の動態研究に利用するため, 各種農薬の消失要因と同位体分別との関係を明らかにする必要がある。

要 約

環境中の農薬の炭素同位体分別の存在を確認するため,

畑土壌における農薬の炭素安定同位体自然存在比の経時変化を測定した。供試薬剤のクロロタロニル (2,4,5,6-tetrachloro-1,3-isophthalonitrile) を淡色黒ボク土に添加 (0.5 mg/10 g) し、暗黒条件下、30°Cで70日間培養した。クロロタロニルの $\delta^{13}\text{C}$ 値は、培養期間中に-26.5‰から-22.5‰にまで上昇した。このときの濃縮係数は、-2.6‰であった。以上から、畑土壌における本薬剤の消失過程において炭素同位体分別が生じていることが確認された。

本研究を実施するにあたり、独立行政法人農業技術研究機構中央農業総合研究センター土壌肥料部、ならびに千葉県農業総合研究センター生産環境部の各位に多大なるご協力を賜った。また、東京大学農学生命科学研究科米山忠克教授にご校閲を賜った。ここに記して深く感謝の意を表する。

引用文献

- 1) 環境庁：内分泌攪乱化学物質問題への環境庁の対応方針について—環境ホルモン戦略計画 SPPEED'98—, 2000年11月版, 35-36 (2000).
- 2) 金澤 純：農薬の環境科学, 合同出版, pp. 93-97, 1992.
- 3) 朴 光来, 山本洋司, 中西康博, 熊澤喜久雄：土肥誌 **67**, 314-316 (1996).
- 4) 上路雅子, 小林裕子, 中村幸二：2002年版残留農薬分析法, ソフトサイエンス社, pp. 112-113, 2001.
- 5) 米山忠克：土肥誌 **58**, 252-268 (1987).
- 6) 丸 論：千葉農試特報 **18**, 27-33 (1991).
- 7) "The Pesticide Manual," ed. by C. D. S. Tomlin, 12th Ed., British Crop Protection Council, Surrey, pp. 168-169, 2000.
- 8) D. Hunkeler, R. Aravena and B. J. Butler: *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2733-2738 (1999).
- 9) Y. Bloom, R. Aravena, D. Hunkeler, E. Edwards and S. K. Frape: *Environ. Sci. Technol.* **34**, 2768-2772 (2000).
- 10) A. Katayama, H. Isemura and S. Kuwatsuka: *J. Pestic. Sci.* **16**, 233-238 (1991).
- 11) K. Motonaga, K. Takagi and S. Matsumoto: *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 1469-1472 (1998).
- 12) 片山新太：農薬誌 **25**, 300-309 (2000).
- 13) A. Mariotti, J. C. Germon, P. Hubert, P. Kaiser, R. Letolle, A. Tardieux and P. Tardieux: *Plant Soil* **62**, 413-430 (1981).
- 14) A. Mariotti, A. Landreau and B. Simon: *Geochim. Cosmochim. Acta* **52**, 1869-1878 (1988).