CNP 代謝物の魚介類中残留^{*1}

(昭和 57 年 10 月 8 日受理)

鈴木 滋^{*2} 佐藤 信俊^{*2} 高槻 圭悟^{*2} 加茂 えり子^{*2}
菊地 秀明^{*2} 牛沢 勇^{*2} 堺 敬一^{*2}

Residues of CNP Metabolites in Fish and Shellfish

(Residues of Paddy Herbicides in Fish and Shellfish. IV)

Shigeru SUZUKI, Nobutoshi SATO, Keigo TAKATSUKI,
Eriko KAMO, Hideaki KIKUCHI, Isamu USHIZAWA
and Kei-ichi SAKAI

(Miyagi Prefectural Institute of Public Health and Environment:
4-7-2 Saiwai-cho, Sendai, Japan)

CNP (chlornitrofen), widely used as a paddy herbicide in Japan, is known to be converted readily to the corresponding amino derivative by reduction of the nitro group in the environment. An unusually high level of CNP residue concentration was reported in fresh-water fish and shellfish during the application period. Therefore, the occurrence of CNP reduction products in samples with high CNP residue levels was investigated and two unknown compounds were detected which were not identical with any standard pesticides on GLC. These two compounds, obtained in preparative scale experiments, showed high sensitivity in ECD-GC and NP-FID GC and gave CNP-amino compound on alkaline hydrolysis. From the GC-MS analysis and the above mentioned chemical property, the structures of these compounds were elucidated as CNP-acetamide (CNP-a) and CNP-formamide (CNP-f); these structures were confirmed by comparison of the products with authentic samples prepared from CNP.

Analytical methods for residual CNP-a and CNP-f were established and the residual concentrations were investigated in fresh-water fish and shellfish at regular intervals through a year at a fixed location in Miyagi prefecture. The maximum concentrations of CNP derivatives were 0.58 ppm (CNP-a) and 0.24 ppm (CNP-f) in freshwater clam, 0.04 (CNP-a) and 0.05 ppm (CNP-f) in loach, and 0.06 ((CNP-a) and 0.13 ppm (CNP-f) in crucian carp during May and June, and these levels decreased rapidly after the end of the herbicide application period.

(Received October 8, 1982)

Key words: ジフェニルエーテル系除草剤 diphenyl ether herbicides; CNP chlornitrofen; CNP アセトアミド CNP acetamide (2,4,6-trichlorophenyl-4'-acetamide-phenyl ether); CNP フォルムアミド CNP formamide (2,4,6-trichlorophenyl-4'-formamide-phenyl ether); 魚介類 fish and shellfish; ガスクロマトグラフィー gaschromatography; シリカゲルカラム silicagel column

緒 言

ジフェニルエーテル系除草剤は水田除草剤として短期間に大量に使用されており、特に CNP は現在もっとも

*1 水田除草剤の魚介類中残留 (第 4 報)

*2 宮城県保健環境センター: 仙台市幸町 4-7-2

多量に使われている除草剤の一つである。その結果、近年田植時期の 5~6 月の期間中に各種の魚介類が CNP やその副産物により汚染されていることが報告されている^{1)~4)}。

筆者らもシジミ、ドジョウなどの淡水性の魚介類中に最高で 20 ppm と高濃度の CNP が残留していることを報告した⁵⁾。

一方、CNP は湛水条件下の土壌中ではそのニトロ基が容易に還元されることが知られている^{6)~8)}。

一般に芳香族アミン化合物や芳香族ニトロ化合物は 2-acetylaminofluorene-4-nitroquinolin-1-oxide などに代表されるように、いずれもそのヒドロキシアミノ体を重要な活性中間体として変異原性及び発ガン性を示すと言われている⁹⁾。

また宮内らは CNP の中間還元代謝物であるニトロソ体がサルモネラ菌 (TA 100) を用いた変異原性試験 (Ames test) で陽性であったと報告している¹⁰⁾。

以上のことから CNP が高い濃度で残留している魚介類中には同時にその還元代謝物も残留している可能性が示唆され、毒性についてもより問題になる可能性が考えられた。そこで特に CNP 汚染の高いシジミ、ドジョウなどについて CNP 還元代謝物の残留を検討した結果、新たに CNP-acetamide (2,4,6-trichlorophenyl-4'-acetamide-phenyl ether, 以下 CNP-a) 及び CNP-formamide (2,4,6-trichlorophenyl-4'-formamide-phenyl ether, 以下 CNP-f) を分離、同定した。さらにこれらの残留分析法を検討し、淡水性魚介類での残留量の経時変化についても調査を行ったので報告する。

実験方法

1. 試料

宮城県内の定点で1980年4月から7月の期間中に採取したシジミ及び1981年4月から6月にかけて採取したドジョウ、フナを用いた。

2. 試薬及び標準品

ギ酸、塩酸、無水酢酸、トルエン、グリセリン、塩化第一スズ：いずれも和光純薬工業(株)製試薬特級

MO 粒剤：三井東圧化学(株)製 (CNP 含量 9%)

シリカゲル：メルク社製 Kieselgel 60 (70~230 mesh) を 130° で 8 時間活性化した後、密栓保存したものの。

無水硫酸ナトリウム：和光純薬工業(株)製 (残農用) を 650° で 4 時間焼いたもの。

その他の溶媒：すべて和光純薬工業(株)製残留農薬試験用

CNP 標準品：和光純薬工業(株)製

CNP-a 標準品：MO 粒剤 (三井東圧化学社製) 100 g にベンゼン 400 ml を加え室温で 30 分攪拌する。終了後ろ過し、ろ液を濃縮乾固した後エタノール 90 ml、塩酸 20 ml、塩化第一スズ 20 g を加え 100° で加熱還流す

る。2 時間反応後水 300 ml を加え 50% 水酸化カリウム水溶液 (w/w) で pH 11 とし、エチルエーテル 200 ml で抽出する。エチルエーテル層を 50 ml の水で洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥後、減圧下濃縮乾固し粗還元生成物として 8.3 g を得る。うち 4 g をベンゼン 50 ml に溶かし無水酢酸 100 ml を加え、よく攪拌後室温に放置する。一夜放置後、生成した結晶をろ別し、ベンゼンにて再結晶を繰返し白色針状晶 1.79 g を得る。

mp. 215~216°, Anal. Calcd. for $C_{14}H_{10}O_2NCl_3$ (%) C 50.86, H 3.05, N 4.24, Found C 50.76, H 2.89, N 4.23 MS m/e; 329 (M^+), 287, 108 (Fig. 4)

NMR ($CDCl_3$) δ ; 1.55 (1H, S), 2.13 (3H, S), 6.73 (2H, d, J=9.0), 7.27 (2H, d, J=9.0), 7.36 (2H, S)

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} ; 3300, 3090, 3070, 1653 (Fig. 1)

CNP-f 標準品; 50 ml 蒸留フラスコに粗還元生成物 4 g をトルエン 25 ml に溶かして入れ、ギ酸 3 ml を加える。グリセリン浴でフラスコを 140° に加熱し反応により生ずる水をトルエンと共沸させ系外に除去しながら 20 分反応させる。さらにトルエン 20 ml、ギ酸 3 ml を加え同様に共沸させながら 1 時間反応させる。室温に放置冷却後生じた結晶を吸引ろ別し粗生成物 1.31 g を得る。粗生成物をクロロホルムに溶解後、シリカゲルカラム (50 ml) に吸着しクロロホルム 200 ml で目的成分を溶出させ、濃縮乾固した後、ベンゼンで再結晶を繰返し白色針状晶を得る。

mp. 198~199°, Anal. Calcd. for $C_{13}H_8O_2NCl_3$ (%) C 49.32, H 2.55, N 4.42 Found C 49.36, H 2.43, N 4.46 MS m/e; 315 (M^+), 287, 108 (Fig. 4)

NMR ($DMSO-d_6$) δ ; 6.77 (2H, d, J=9.0), 7.50 (2H, d, J=9.0), 7.77 (2H, S), 8.21 (1H, d, J=2.0), 10.10 (1H, m)

IR ν_{max}^{KBr} cm^{-1} ; 3290, 3095, 3060, 1649 (Fig. 1)

3. 装置、条件

ガスクロマトグラフ：(株)島津製作所製 GC-4CMPFE (^{63}Ni -ECD), カラム 5% OV-17/W-HP, 80~100 mesh, 3 mm ϕ $\times$ 2 m ガラスカラム, 265°, N_2 40 ml/min

Hewlett-Packard 社製 5710A (FID, N,P-FID), カラム 5% OV-17/W-HP, 80~100 mesh, 2 mm ϕ $\times$ 1 m ガラスカラム, 240°, N_2 20 ml/min

ガスクロマトグラフ, 質量分析計 (GC-MS): JMS-D 300 Mass Spectrometer 日本電子(株)製, カラム 2% OV-17/W-HP, 80~100 mesh, 2 mm ϕ $\times$ 2 m ガラスカラム 270°, イオン化電圧 20 eV

赤外分光光度計 (IR): (株)島津製作所製赤外分光光度計 IR-27G

核磁気共鳴 (NMR): (株)日立製作所 R-22 型 (90 MHz)

Fig. 1. IR spectra of CNP-a, CNP-f

4. 実験操作

4-1 試料の調製

1) シジミから未知成分の分離

よくホモジナイズしたシジミ (むき身 400 g) をアセトニトリル 250 ml で4回振とう抽出する。抽出液を併せ水 2.4 L を加えた後 *n*-ヘキサン 600 ml で洗浄し *n*-ヘキサン-ベンゼン混液 (1:1) 600 ml で再抽出する。濃縮後シリカゲルカラム (50 g) に負荷し、酢酸エチル-ベンゼン混液 (2:8) 400 ml でカラムを洗い、次いで酢酸エチル-ベンゼン混液 (3:7) 100 ml で溶出すると F-1 画分、さらに 300 ml 溶出すると F-2 画分を得る。

2) F-1, F-2 画分のアルカリ加水分解

前述の F-1, F-2 画分を 3 ml に濃縮後、その 0.5 ml を用いる。窒素気流中で溶媒留去後エタノール 3 ml, 50 % 水酸化カリウム水溶液 (w/w) 3 ml, 水 4 ml を加え 100° で 30 分加熱還流する。終了後、室温に冷却し水 10 ml を加え *n*-ヘキサン-ベンゼン混液 (1:1) 4 ml で抽出し水 2 ml で洗浄後無水硫酸ナトリウムで脱水し試料とする。

4-2 魚介類中残留 CNP-a, CNP-f の分析法

よく均一化した試料 10 g を 100 ml の共栓付遠沈管に秤量し無水硫酸ナトリウム 15 g, アセトニトリル 20 ml を加え1分間激しく振とうした後、2000 rpm で5分間遠心分離を行い上清液を 300 ml 分液漏斗に移す。残留物はさらにアセトニトリル 20 ml で2回上記の操作を繰返した後、併せた抽出液に水 150 ml, 無水硫酸ナトリウム 3 g を加え *n*-ヘキサン-ベンゼン混液 (1:1) 50 ml で2回抽出する。抽出液を KD 濃縮器で 5 ml に濃縮後、うち 2 ml をシリカゲルカラム (3 g を内径 1.8 cm のカラム管にベンゼンで湿式充てんし、無水硫酸ナトリウム 3 g を上積したもの) に負荷する。酢酸エチル-ベンゼン混液 (1:9) 40 ml で洗浄後、酢酸エチル-ベンゼン混液 (1.5:8.5) 120 ml で溶出し KD 濃縮器で

4 ml に濃縮した後 ECD-GLC により定量する。

4-3 魚介類中 CNP の分析

前報¹¹⁾に従った。

結果及び考察

1. シジミ中 CNP 還元代謝物の同定

Fig. 2 にシジミより得られた F-1, F-2 画分の FID, NP-FID 及び ECD の GLC チャートを示す。図から明らかなように unknown 1 及び unknown 2 の両成分は非常にその挙動が似ており、構造の類似した化合物と考えられた。いずれも ECD, NP-FID に感度よく検出され、FPD には検出されないことから窒素、ハロゲン を有しており、また GLC の保持時間は有機塩素系農薬や CNP などに比べ倍以上も長く比較的高沸点のものであると考えられた。(Table 1)

この F-1, F-2 画分をアルカリ性で加水分解すると、unknown の2成分とも消失し、同一の成分 (塩基性脂溶性物質) に変換した。(Fig. 3) この成分は CNP の塩化第一スズ・塩酸による還元物と GLC の保持時間や GC-MS の解裂パターンが一致したことから CNP アミノ体であることが判明した。

以上より、これら未知成分は CNP の誘導体であることが明らかになったが、さらに GC-MS (Fig. 4) より unknown 1 は分子量 315, unknown 2 は分子量 329 で、いずれも塩素 3 個を有していることがわかる。分子イオン以下の解裂パターンは両成分とも類似しており、*m/e* 287 及び 108 に分解ピークを与える。このパターンを CNP 及び CNP アミノ体のパターンと比較すると、CNP には *m/e* 287 ($M^+ - NO$) のピークは認められるが *m/e* 108 は存在せず、一方 CNP アミノ体では *m/e* 287 (M^+), *m/e* 108 ($M^+ - trichlorophenyl$) に顕著なピークが認められ未知成分と近いパターンを示した。これらのことから unknown 成分はいずれも CNP アミノ体のアシル誘導体であると推定され、その分子量から un-

Fig. 2. Gaschromatograms of fresh water clam extracts (F-1, F-2) using FID, N, P-FID and ECD detectors GLC conditions: FID, N, P-FID—5%OV-17/W-HP, 1 m, 240°C; ECD—5%OV-17/W-HP, 2 m, 265°C

Table 1. Relative Retention Times of Unknown Peaks

	DDE=1	CNP=1	
Unknown-1	4.8	2.4	5% OV-17, 2 m column temp. 265°C
Unknown-2	5.2	2.6	

known 1 は CNP-f, unknown 2 は CNP-a と考えられた。

以下、上述の構造を確認するため、MO 粒剤より抽出した CNP を原料とし塩化第一スズ・塩酸で還元した後、formyl 化及び acetyl 化により標準品を合成した。(Fig. 5)

これらは元素分析, NMR, IR, GC-MS などによりその構造が確認された。

Fig. 3. Gaschromatograms of hydrolisates of unknown-1 and unknown-2

unknown 1 及び unknown 2 をこれら標準品と比較した結果、GLC での挙動及び MS の解裂パターンとも一致したことにより、unknown 1 は CNP-f, unknown 2 は CNP-a と同定された。

2. 魚介類中 CNP-f, CNP-a の残留分析法の検討

分析法の検討は CNP の分析法¹¹⁾に準じて行った。

試料 10 g に芒硝を加えアセトニトリル 20 ml で 3 回抽出する。この抽出液に水を加え、溶媒で再抽出する際、*n*-ヘキサンで行くと回収されなかった。これは CNP-f 及び CNP-a の *n*-ヘキサンに対する溶解度が非常に低いためであり、*n*-ヘキサン-ベンゼン混液 (1:1) を用いたところ良好な結果を得た。カラムクロマトについては、前報の硝酸銀処理フロリジル¹¹⁾を用いると非可逆的に吸着され溶離されなかった。そこでシリカゲル (3 g) を用い酢酸エチル-ベンゼン (1:9) 40 ml で洗った後、酢酸エチル-ベンゼン (1.5:8.5) 120 ml で溶出することとした。

Table 2 に本法による魚介類中の CNP-f, CNP-a の回収率を示したが、平均 85% とほぼ満足できる値であった。

3. CNP-f, CNP-a の魚介類中残留経時変化

1980年に県内で採取したシジミ及び1981年に県内で採取したドジョウ、フナについて CNP 及び CNP-f, CNP-a の経時変化を Fig. 6, 7, 8 に示す。

最高値はシジミが 0.58 ppm (CNP-a, 6/5) 0.24 (CNP-f, 5/23), フナ 0.06 (CNP-a, 5/14), 0.13 (CNP-f,

Fig. 4. GC-MS spectra of diphenylether compounds

Fig. 5. Synthesis of CNP-derivatives

Table 2. Recoveries of CNP-f, CNP-a from Fish and Shellfish

	CNP-f	CNP-a
Fresh water clam	84.9%	85.0%
Loach	82.0	82.9
Crucian carp	87.0	87.5

Average of 3 trials; added, CNP-f 0.25 ppm, CNP-a 0.18 ppm

Fig. 6. Variation of CNP-a and CNP-f in fresh water clam

Fig. 7. Variation of CNP-a and CNP-f in loach

6/4), ドジョウ 0.04 (CNP-a, 5/20), 0.06 (CNP-f, 5/20)であった。

以上から明らかなように, CNP に比べると低レベル

Fig. 8. Variation of CNP-a and CNP-f in crucian carp

ではあるが, いずれのサンプルも5月から6月にかけてピークを示し以後減少していく傾向を示している。シジミ, フナでは CNP-f が CNP と同様な経時変化を示しているのに対し CNP-a は約2週間遅れてピークが現れている。しかしドジョウについては, そのような傾向は認められず CNP, CNP-f, CNP-a ともほぼ同じ経時変化を示した。

これらが CNP として取り込まれた後, 体内で生成されるのか, 誘導体 (CNP-a, CNP-f) として取り込まれているかについては現在さらに検討中である。

また CNP の主要分解代謝物としては上記二種類のほか, アミノプロピオニル体, グルコースとの配糖体, 有機酸とのコンプレックス, 土壌中のヒューミンと結合したもの^{8), 13)}など様々なものが報告されている。現在までの我々の調査ではアミノプロピオニル体は魚介類中には検出されなかった。報告されている他の誘導体はいずれも極性物質であり, もし残留していれば水溶性画分に存在するものと考えられる。CNP が非常にアミノ体に変換しやすいことを考えると2種類だけでなく, まだまだ他の形の誘導体も残留しているものと考えられ今後さらに検討を要するところである。

結 語

CNP は光関与型で低毒性, 低魚毒性の除草剤として近年その使用量も増加の一途をたどってきた。昭和55年度の国内原体生産量も全除草剤の約2割を占めている¹²⁾環境中での分解も早く土壌中では速やかにアミノ基に還

元された後、土壤構成成分の有機物と強固に結合し自然条件下では外部には流出しにくいとされている⁶⁾。しかし本調査ではシジミ、ドジョウ、フナともに5~6月の除草剤の散布後にCNP、CNP-a、CNP-fともに残留値が上昇し6月上旬をピークに以後速やかに減少していった。残留量はCNPが最高20ppm、CNP-a、CNP-fがその1/30~1/100というレベルであったが、まだ他のCNP誘導体の残留も考えられる。

これらの食品の摂取による人体への影響についてはまだ不明な点が多く、特に変異原性、発ガン性とののかわりについては今後共検討が必要と思われる。

本研究の一部は(財)大同生命厚生事業団の医学研究助成金によるものである。

終りに臨み、元素分析並びにNMR測定に御尽力戴いた東北大学、上原忠夫氏、甲国信氏に深謝致します。

文 献

- 1) Yamagishi, T., Akiyama, K., Morita, M., Takahashi, R., Murakami, H.: J. Environ. Sci. Health. **B 13**, 417~424 (1978).
- 2) 山岸達典, 秋山和幸, 金子誠二, 堀井照三, 宮崎奉之, 森田昌敏: 東京都衛研年報. **30-1**, 123~132 (1979).
- 3) Gretch, F. M., Barry, T. L., Petzinger, G., Geltman, J.: Bull. Environm. Contam. Toxicol. **23**, 165~169 (1979).
- 4) Yamagishi, T., Miyazaki, T., Akiyama, K., Morita, M., Nakagawa, J., Horii, S., Kaneko, S.: Chemosphere **10**, 1137~1144 (1981).
- 5) 佐藤信俊, 石川 潔, 鈴木 滋, 高槻圭悟, 畠敬一: 食衛誌. **22**, 50~55 (1981).
- 6) 遠山輝彦, 玉川重雄: 農薬科学 **13**, 178~184 (1976).
- 7) 鉦塚昭三: 日本農薬学会誌 **2**, 201~213 (1977).
- 8) Shimotori, H., Kuwatsuka, S.: J. Pesticide, Sci. **3**, 267~275 (1978).
- 9) 出川雅邦, 橋本嘉幸: 変異原と毒性 **5**, 34~47 (1979).
- 10) Miyauchi, M., Takagi, M.: Bull. Japan. Soc. Sci. Fish. **47** (2), 243~250 (1981).
- 11) 石川 潔, 鈴木 滋, 佐藤信俊, 高槻圭悟, 畠敬一: 食衛誌. **22**, 56~59 (1981).
- 12) 日本植物防疫協会編: 農薬要覧 (1981).
- 13) Kuwatsuka, S.: J. Pesticide, Sci. **2**, 201~213 (1977).