クロルニトロフェン由来の塩素化ジオキシン によるシジミの汚染^{*1}

(昭和 59 年 6 月 23 日受理)

鈴木 滋^{*2} 佐藤 信俊^{*2} 高槻 圭悟^{*2}
菊地 秀明^{*2} 牛沢 勇^{*2}

Pollution of Corbiculae with Chlorinated Dibenzo-*p*-dioxins from a Herbicide, Chlornitrofen

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

Shigeru SUZUKI, Nobutoshi SATO, Keigo TAKATSUKI,
Hideaki KIKUCHI and Isamu USHIZAWA

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

Corbiculae (*Corbicula japonica prime*) were found to be highly polluted with a herbicide, chlornitrofen (CNP), during May and June in paddy fields in Miyagi Prefecture. Analytical procedures for residual 1,3,6,8- and 1,3,7,9-TCDD in corbiculae were developed and the corbiculae were also shown to be contaminated with small amounts of 1,3,6,8- and 1,3,7,9-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), which are considered to be formed as impurities during the production process of CNP.

Corbiculae were analyzed at regular intervals throughout a year at a fixed monitoring point in Miyagi Prefecture. The maximum concentrations of TCDD and CNP were 39 ppb and 11.2 ppm, respectively, in corbiculae on May 12, 1982, and then decreased rapidly after the end of the herbicide application period. The dissipation rate of TCDD was slower than that of CNP.

An analytical procedure for TCDD based on dechlorination to unsubstituted dibenzo-*p*-dioxin with sodium borohydride in the presence of nickel chloride was also investigated. The dechlorination procedure can be used for the screening of TCDD in relatively highly contaminated samples, and gives the value of total TCDD.

(Received June 23, 1984)

Key words: シジミ *Corbicula japonica prime*; 除草剤 herbicide; クロルニトロフェン (CNP) chlornitrofen; テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD); ジベンゾ-*p*-ジオキシン dibenzo-*p*-dioxin; 脱塩素化 dechlorination

^{*1} 水田除草剤の魚介類中残留 (第 5 報)

^{*2} 宮城県保健環境センター: 仙台市幸町 4-7-2

緒 言

ジフェニルエーテル系化合物であるクロロニトロフェン (CNP) は初期水田除草剤として田植前後に集中的に散布され、その後かんがい水路を経て河川に流出し、一過性ではあるが高濃度で魚介類を汚染することが知られている^{1)~6)}。特に宮城県は CNP の使用量が多く、そのため毎年 5~6 月には淡水性のシジミやドジョウ、フナ等に 10 ppm を超える CNP が検出されている^{7,8)}。

一方 CNP はその製造過程で種々の不純物を副生することが知られており^{9),10)}、その中には塩素化ジオキシン (PCDD)や塩素化ジベンゾフラン (PCDF) を含んでいる。

そこで今回は CNP が散布されている時期に県内の一定地域で採取したシジミを用い、CNP 中 PCDD の主成分である 1,3,6,8-テトラクロロジベンゾ-*p*-ジオキシン (1,3,6,8-TCDD) 及び 1,3,7,9-TCDD による汚染を検討すると共に、そのシジミ中濃度の経時変化を調べたので報告する。

また PCDD の中には強毒性の 2,3,7,8-TCDD も含め種々の異性体が存在しており、これらを分別定量するのは非常に困難である。そこで、これら異性体を還元脱塩素化し、無置換のジベンゾ-*p*-ジオキシン (ジオキシン) として分析する方法も検討したので併せて報告する。

実験方法

1. 試 料

宮城県内の一定地域で1982年4月から7月の期間中に採取したシジミを用いた。

2. 試薬及び標準品

CNP 標準品: 和光純薬工業(株)製

1,3,6,8-TCDD, 1,3,7,9-TCDD 標準品: Pohland ら¹¹⁾の方法に準拠して合成した後、1,3,6,8- 及び 1,3,7,9-TCDD を分離し純品を得た*1。

ジオキシン標準品: 富田ら¹²⁾の方法に従い合成した。

MO 粒剤: 三井東圧化学(株)製 (CNP 含量 9%)

p-フェニルフェノール (*p*-PP) 溶液: 和光純薬工業(株)製特級 *p*-PP (約 5 mg) をアセトン 10 ml に溶かした。

フロリジル: 和光純薬工業(株)製 60~100 メッシュを 650° で3時間加熱後、130° で3時間放置し密栓して保存する。

硝酸銀フロリジル: 石川ら⁷⁾の方法に従い調製した。

ポリアミド薄層: メルク社製ポリアミド, 11 F 254 (20×20 cm)

無水硫酸ナトリウム, アセトン, *n*-ヘキサン, エチルアルコール, メチルアルコール, ベンゼン: 和光純薬工業(株)製残留農薬分析用

イソプロパノール, 塩化ニッケル (5H₂O), 水酸化カリ

ウム, 硝酸銀, 水素化ホウ素ナトリウム: 和光純薬工業(株)製試薬特級

3. 装置及び器具

- 1) 濃縮器具: クデルナ・ダニッシュ (KD) 型濃縮器
- 2) 薄層クロマトグラフィー用展開槽: ハンギング式 204 展開槽 (東洋科学産業(株))
- 3) 紫外線照射灯: マナスライト (波長 253.6 nm) (マナスル工業(株))

- 4) ガスクロマトグラフ: (株)島津製作所製 GC-4CMPFE, ⁶³Ni 電子捕獲型検出器 (ECD)

- 5) ガスクロマトグラフ, 質量分析計 (GC/MS): 日本電子(株)製 JGC-20K 型 GC, 同社製 JMS-D300 型質量分析装置及び同社製 MS-DK400S コンピューターを連結したもの

4. ガスクロマトグラフ操作条件

- 1) カラム: 2% OV-17/Chromosorb W-HP, 80~100 mesh, 3 mmφ×2 m

カラム温度: 230°

注入口温度: 250°

キャリアーガス: N₂, 40 ml/min

- 2) カラム: 2% DEGS+0.5% H₃PO₄/Chromosorb W-HP, 80~100 mesh, 3 mmφ×2 m

カラム温度: 190°

注入口温度: 220°

キャリアーガス: N₂, 40 ml/min

- 3) カラム: 5% DEGS+1% H₃PO₄/Chromosorb W-HP, 80~100 mesh, 3 mmφ×3 m

カラム温度: 200°

注入口温度: 230°

キャリアーガス: N₂, 40 ml/min

5. ガスクロマトグラフ, 質量分析計操作条件

1) TCDD

- カラム: 2% OV-17/Chromosorb W-HP, 80~100 mesh, 2 mmφ×1 m

カラム温度: 240°

注入口温度: 260°

エンリッチャー温度: 300°

イオン化電圧: 70 eV

イオン化電流: 200 μA

2) ジオキシン

- カラム: 2% OV-17/Chromosorb W-HP, 80~100 mesh, 2 mmφ×1 m

カラム温度: 175°

その他は 1) と同じ

6. 実験操作

6.1. シジミ中 CNP の分析

前報⁷⁾に従った。

6.2. シジミ中 TCDD の分析

ホモジナイズしたシジミのむき身 10 g を 250 ml の

*1 牛沢 勇, 佐藤信俊, 鈴木 滋, 菊地秀明, 高槻 圭梧: 第 47 回日本食品衛生学会講演要旨集, p. 11 (1984)。

Fig. 1. Polyamide thin chromatograms of TCDD and PCB

Solvent: methanol

1, PCB; 2, 1,3,6,8-TCDD; 3, *p*-phenyl phenol (internal STD)

ナス型フラスコに入れ、50% 水酸化カリウム水溶液 (w/w) 5 ml, エチルアルコール 40 ml を加え水浴上 1 時間加熱還流する。冷後 300 ml の分液漏斗に移し水 25 ml を加え、*n*-ヘキサン 50 ml で 3 回抽出する。*n*-ヘキサン層を併せ無水硫酸ナトリウムで脱水後、グラスフィルターでろ過し KD 型濃縮器で濃縮する。この濃縮液を硝酸銀フロリジルカラム (硝酸銀フロリジル 3 g を内径 1.8 cm のガラスカラムに湿式充てんしたもの) に負荷し、*n*-ヘキサン 100 ml で溶出する。溶出液を KD 型濃縮器で濃縮した後、さらに窒素気流中で約 0.2 ml まで濃縮し、全量を竹下らの方法¹³⁾に準じ、ポリアミド薄層に塗布した。メタノールで展開後、溶媒を風乾した後 *p*-フェニルフェノール (*p*-PP) のスポットを紫外線照射下で観察し、原線からスポットの中心までの距離 *A* を求める。次に試料展開部について $A \times 0.1$ から $A \times 0.7$ までの部分を帯状にかき取り、内径 7 mm のガラスカラム (下端部に脱脂綿を詰める) に入れる。ベンゼン-*n*-

キサン混液 (1:1) 5 ml を加え、ガラス棒で気泡を除いた後、液を流下させる。さらにベンゼン-*n*-ヘキサン混液 (1:1) 30 ml を用いて溶出した後、全溶出液を KD 型濃縮器で 5 ml まで濃縮し ECD-GC 及び GC/MS を行った。

6.3. MO 粒剤中 TCDD の分析

MO 粒剤 (CNP 9%) 5 g を用い、6.2. に準じて処理を行い、ECD-GC 及び GC/MS を行った。

6.4. TCDD の還元

1,3,6,8-TCDD の標準溶液あるいはシジミの抽出液 (6.2. の硝酸銀フロリジルカラムからの溶出液を KD 型濃縮器で濃縮したもの) 2 ml にイソプロパノール 25 ml, 塩化ニッケルのメタノール溶液 (2 M) 1 ml を加えた後、使用直前に調製した水素化ホウ素ナトリウムの水溶液 (5 M) 12 ml を攪拌下滴下する。滴下終了後さらに室温で 30 分攪拌し水 150 ml, 無水硫酸ナトリウム 3 g を加え *n*-ヘキサン 50 ml で 2 回抽出する。*n*-ヘキサン層を併せ、水 50 ml で水洗後、無水硫酸ナトリウムで脱水し KD 型濃縮器で 2 ml まで濃縮後 GC/MS を行った。

結果及び考察

1. シジミ中 TCDD の同定

宮城県内では毎年 5 月中旬に CNP の魚介類汚染がピークになる^{7)~9)}。そこで昭和 57 年 5 月 12 日に採取したシジミ (CNP 11.2 ppm 検出) を用い TCDD の汚染を検討した。

合成により得られた 1,3,6,8- 及び 1,3,7,9-TCDD は PCB と同様に非常に難分解性であることから、その抽出法は、脂肪やタンパク質及び他の塩素系農薬除去の目的でアルカリ分解法を用いた。しかし ECD-GC による分析の際は検体中の PCB が妨害となるため、その除去法として竹下¹³⁾がポリ塩化ナフタレン (PCN) の分析に使用したポリアミド薄層を応用したところ良好に分離

Fig. 2. ECD-gaschromatograms of corbiculae extract

Fig. 3. ECD-gaschromatograms of corbiculae extract and CNP formulation extract

Fig. 4. GC-MS of authentic TCDD and corbiculae extract

(A), authentic 1,3,6,8-TCDD; (B), corbiculae extract; (C), selected ion monitoring (S.I.M.) of corbiculae extract 2% OV-17, 1 m, 240°C, 70 eV

されることが判明した (Fig. 1).

本法をシジミに応用したところ, Fig. 2 に示すように 2% DEGS+0.5% H_3PO_4 及び 2% OV-17 では 1,3,6,8-TCDD と保持時間 (Rt) が全く一致しているピークが認められた. しかし DEGS ではこのピークの裾部に分離不十分な他のピークが認められたことから, さらに 5% DEGS+1% リン酸 (3 m) カラムで検討した結果, 裾部のピークは完全に分離し, 1,3,7,9-TCDD の標準品と Rt が一致することが判った (Fig. 3). この化合物は 2,4,6-トリクロロフェノールの縮合反応の際にスマイル転位により生成することが知られている¹⁴⁾.

以上のピークについてさらに GC/MS を用いて検討を加えた (Fig. 4).

その結果, 若干バックグラウンドが高いが, 1,3,6,8-TCDD (1,3,7,9-) と同一の Rt に分子量 320 で塩素 4 個を有する化合物が存在することが判明した. この GC/MS の条件では, 1,3,6,8- 及び 1,3,7,9-TCDD は分離出来なかったが前の ECD-GC での 3 種類のカラムでの結果と併せると, 主成分は 1,3,6,8-TCDD で副成分として 1,3,7,9-TCDD が含まれていることは明らかである.

さらに後述のように, シジミ中での CNP と TCDD の経時変化の推移が一致すること, 汚染のピーク時 (5月12日) でのシジミ中 CNP と TCDD の比率が CNP 製剤と類似していること, 還元脱塩素化によりジベンゾ-*p*-ジオキシン (ジオキシン) が生成する事実等も本物質が CNP 製剤由来と考えられる 1,3,6,8-, 1,3,7,9-TCDD であることを支持している.

2. シジミ中 TCDD, CNP の経時変化

宮城県内の一定地域で1982年に採取したシジミを用い 1,3,6,8+1,3,7,9-TCDD (T-TCDD) の汚染の経時変化を調べた (Fig. 5).

Fig. 5 から明らかにように T-TCDD は CNP の経時変化とほぼ一致した推移を示し, 最高濃度が検出された

Fig. 5. Variation of TCDD and CNP concentration in corbiculae extract

Fig. 6. TCDD/CNP ratio in corbiculae

5月12日にはCNP 11.2 ppm, T-TCDD 39 ppbを示し、以後速やかに減少していった。CNPとT-TCDDの比率を調べると(Fig. 6)5月12日では0.35%であったが、これは著者らが分析したMO粒剤(CNP 9%, T-TCDD 349 ppm)の比率0.39%と非常に近い値であった。また製剤中でのT-TCDDは1,3,6,8-TCDDが70.2%, 1,3,7,9-TCDDが29.8%であり、シジミ中(5月12日)の1,3,6,8-TCDD(73%), 1,3,7,9-TCDD(27%)と非常に類似していた(Fig. 3)。

以上の事実より、汚染初期のシジミ中には製剤とほぼ

同一組成のCNP, TCDDが含まれていることが明らかとなった。しかし、その後は時間の経過とともに徐々にTCDDの割合が上昇しており、7月14日の時点では5.2%までになっている。このことはシジミ中ではCNPよりTCDDの方が蓄積性が高いことを示している。

3. TCDDの還元

環境中に存在するすべてのPCDDを分別定量するのは技術的に非常に困難であり、また毒性の面からも完全に密閉された実験室を必要とする等の制約がある。そこ

Table 1. Recovery of Dioxin by Catalytic Dechlorination Method

Sample	Amount of 1, 3, 6, 8 TCDD added	Amount of dioxin dechlorinated	Average	Recovery
STD	0.53 μ g	0.24 ~0.27 μ g	0.25 μ g	84%
	1.05	0.47 ~0.48	0.48	80
	2.10	0.95 ~1.09	1.00	84
Corbiculae extract (caught 4/27 '82)	0.105	0.042~0.043	0.043	71

These values are the mean of 3 experiments.

Table 2. Analytical Results of Chlorinated Dibenzo-*p*-dioxin in Corbiculae by Catalytic Dechlorination Method

Sample	Amount of TCDD residue	Dioxin dechlorinated	Amount corresponding to TCDD
Corbiculae ext. (caught 5/12 '82)	0.078 μ g (39 ppb)	0.033 μ g (16.5 ppb)	0.058 μ g (29 ppb)
"	"	0.027 (13.5)	0.047 (23.5)
"	"	0.039 (19.5)	0.069 (34.5)
"	"	0.026 (13.0)	0.045 (22.5)

で著者らは Dennis らが PCB の無毒化に用いた、塩化ニッケル触媒下水素化ホウ素ナトリウムによる還元脱塩素化法¹⁵⁾を TCDD に適用し、PCDD 分析の一次スクリーニングとして応用の可能性を検討した。

まず 1,3,6,8-TCDD の純品を用い本法の回収率を検

討した結果及び全く TCDD が検出されなかったシジミ (1982 年 4 月 27 日採取) に添加した場合の回収率の結果を Table 1 に示した。

標準品の場合は 80~84% とほぼ満足できる値であったが、シジミに添加した場合は 71% と若干収率が下がった。

さらに前記 TCDD を最も多く含んでいるシジミ (1982 年 5 月 12 日採取) の抽出液について本法を適用した。抽出液の還元前及び還元後の GC/MS による m/e 184 (ジオキシンの親イオン) での selected ion monitoring (S. I. M.) の結果を Fig. 7 に示したが、反応前はジオキシンは全く検出されていない (B)。しかし反応後は明らかにジオキシンが検出されており (C)、検体中の TCDD に由来するものであることは明白である。

検体からジオキシンとして検出された値は TCDD に換算すると平均 27.4 ppb となり還元前の T-TCDD の分析値 (39 ppb) よりやや低かったが、一次スクリーニングとしては適用できるものと考えられる (Table 2)。

一般に環境中の塩素化ジオキシン類は非常に低レベルであり、異性体の数も多い。本法をそれらの分析に適用するのは現時点では問題が多く、さらに検討を続ける必要があるが今回のシジミのように比較的高濃度の汚染のチェックには簡便で安全な方法と考えられる。

要 約

1. シジミ中に除草剤 CNP に由来すると考えられる 1,3,6,8- 及び 1,3,7,9-TCDD が残留していることを見い

Fig. 7. GC/MS-S.I.M. of dibenzo-*p*-dioxin 2%OV-17, 1 m, 175°C, 70 eV (A), authentic dibenzo-*p*-dioxin; (B), Corbiculae extract (prior to dechlorination); (C), Corbiculae extract (dechlorinated)

出し、そのシジミ中の分析法を開発した。

2. 宮城県内の一定地域で採取したシジミ中の TCDD の経時変化を調べた結果、5月上旬に最高 39 ppb を示し、以後日時の経過と共に減少した。また汚染初期には MO 粒剤と同じ割合で CNP, TCDD が含まれていたが、その後は徐々に TCDD の割合が上昇した。

3. TCDD 分析の一次スクリーニング法として、水素化ホウ素ナトリウムによる還元脱塩素化法を検討し、今回のシジミのような比較的高濃度な場合には十分適用できることを見い出した。

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) 渡辺信英, 石田紀郎, 石丸 優, 片山幸士, 喜多山 繁: 農薬誌, **6**, 31~36 (1981).
- 5) Watanabe, S., Watanabe, S., Ito, K.: J. Pest-

icide Sci. **8**, 47~53 (1983).

- 6) 渡辺貞夫, 渡辺重信, 伊藤和敏: 農薬誌, **9**, 33~38 (1984).
- 7) 石川 潔, 鈴木 滋, 佐藤信俊, 高槻圭悟, 堺敬一: 食衛誌, **22**, 56~59 (1981).
- 8) 鈴木 滋, 佐藤信俊, 高槻圭悟, 加茂えり子, 菊地秀明, 牛沢 勇, 堺 敬一: 同上, **24**, 187~193 (1983).
- 9) 佐藤信俊, 石川 潔, 鈴木 滋, 高槻圭悟, 堺敬一: 同上, **22**, 50~55 (1981).
- 10) Yamagishi, T., Miyazaki, T., Akiyama, K., Morita, M., Nakagawa, J., Horii, S., Kaneko, S.: Chemosphere, **10**, 1137~1144 (1981).
- 11) Albert, E. Pohland, George, C. Yang: J. Agric. Food Chem., **20**, 1093~1099 (1972).
- 12) 富田眞雄: 薬誌, **52**, 429~433 (1932).
- 13) 竹下隆三, 吉田 博: 衛生化学, **23**, 359~364 (1977).
- 14) Nestric, T. J., Lamparski, L. L., R. H. Stehl: Anal. Chem., **51**, 2273~2281 (1979).
- 15) Dennis, W. H., Jr., Yun H. Chang, Cooper W. J.: Bull. Environm. Contam. Toxicol., **22**, 750~753 (1979).