ムラサキイガイ中の除草剤クロルニトロフェン (CNP) の還元代謝物について

(昭和 61 年 12 月 5 日受理)

渡辺 貞夫* 渡辺 重信* 伊藤 和敏*

Reduction Metabolites of the Herbicide Chlornitrophen (CNP) in Mussel

Sadao WATANABE, Shigenobu WATANABE and Kazutoshi ITO

(Kanagawa Prefectural Public Health Laboratory: 52-2,
Nakao-cho, Asahi-ku, Yokohama, Japan)

The formation of chlornitrophen (CNP) reduction metabolites (CNP-NH₂, CNP-formamide and CNP-acetamide) in bivalve mussels (*Mytilus edulis*) was studied in artificial sea water containing 12 ppb of CNP. The accumulated concentration of CNP reached a plateau level of 30~35 ppm within 9 days in the whole body, and CNP-NH₂ and CNP-formamide were each produced at about 0.2 ppm concentration. CNP-acetamide was not detected. When the mussels were transferred to clean sea water, CNP was excreted with a biological half-life of 4~8 days, but the metabolites decreased less rapidly than CNP.

(Received December 5, 1986)

Key words: ムラサキイガイ mussel (*Mytilus edulis*); クロルニトロフェン chlornitrophen (CNP); CNP 還元代謝物 CNP reduction metabolites; CNP アミノ体 CNP-NH₂; CNP フォルムアミド CNP-formamide; CNP アセトアミド CNP-acetamide

緒 言

魚介類に除草剤クロルニトロフェン (CNP, 2,4,6-trichlorophenyl-4'-nitro-phenyl ether) は水田への使用時期に最も高濃度で検出され^{1)~3)}, 鈴木らは, 宮城県内で採取した魚介類から CNP と同時にその還元代謝物の CNP-formamide(2,4,6-trichlorophenyl-4'-formamide-phenyl ether) 及び CNP-acetamide(2,4,6-trichlorophenyl-4'-acetamide-phenyl ether) をそれぞれ検出している⁴⁾. CNP は灌水下の土壌中ではその相当量が還元生成物の CNP-NH₂(2,4,6-trichlorophenyl-4'-amino-phenyl ether) に変化し, さらに一部は CNP-formamide 及び CNP-acetamide となる⁵⁾. CNP そのものは低毒性であるが⁶⁾, CNP の微生物による分解生成物の変異原性は, CNP-NH₂ に還元されるとそれが増加

するとの報告^{*1)}もあり魚介類中で還元代謝を受け, より毒性の強いものが生成する可能性がある. 著者らは, さきに室内実験条件下でムラサキイガイ (*Mytilus edulis*) への CNP の蓄積及び排泄を調べ⁷⁾ 報告したが, 今回その過程で生成した CNP-NH₂ などの還元代謝物について追跡調査した結果を報告する.

実験方法

1. 試 料

神奈川県逗子海岸で採取したムラサキイガイは, 殻長 5~7 cm の大きさを選び, 人工海水 (アクアマリン®, (株)八洲薬品) 中で 1 日馴化させた後に実験に用いた.

* 神奈川県衛生研究所: 横浜市旭区中尾町 52-2

*1 古川秀之, 河井一明, 鍛塚昭三: 第 11 回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム講演要旨集 p. 82~84 (1984).

Fig. 1. Structural formulas of CNP metabolites

Formula	R
CNP	NO ₂
CNP-NH ₂	NH ₂
CNP-formamide	NHCHO
CNP-acetamide	NHCOCH ₃

2. 試 薬

CNP-NH₂ は下島ら⁸⁾, CNP-formamide 及び CNP-acetamide は鈴木ら⁴⁾の方法に準じ CNP より合成した。なお、これら代謝物の構造式を Fig. 1 に示した。その他試薬類は残留農薬用あるいは特級品を使用した。

3. 装置及び条件

ECD ガスクロマトグラフ

装置: (株)島津製作所製 GC-3BE (⁶³Ni 検出器)

充てん剤及びカラム: 5% OV-17 (Gaschrom Q 80~100 メッシュ), 3 mmφ×1.7 m, ガラスカラム

温度: カラムオープン 270°, 注入口-検出器 300°

キャリアーガス: 窒素 60 ml/min

N-P FID ガスクロマトグラフ

装置: Hewlett Packard 社製 5880A (nitrogen-phosphorus 検出器)

充てん剤及びカラム: 2% OV-101 (Uniport HP 100~120 メッシュ), 2 mmφ×0.5 m, ガラスカラム

温度: カラムオープン 170°, 注入口-検出器 250°

キャリアーガス: ヘリウム 50 ml/min

ガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC/MS)

装置: (株)日本電子製 JMS-DX 300

充てん剤及びカラム: 2% OV-17 (Gaschrom Q 80~100 メッシュ), 3 mmφ×1.0 m, ガラスカラム

温度: カラムオープン 260°, 注入口-検出器 290°

キャリアーガス: ヘリウム 40 ml/min

イオン化電圧: 70 eV

イオン化電流: 300 μA

4. CNP 含有海水中におけるムラサキイガいの飼育

室内実験に用いた装置及び条件は既報⁷⁾に述べたように、人工海水を入れた 10 L のガラス製ビーカーにイガイ 25 個体を入れ、これにエタノールに溶解した一定濃度の CNP 溶液を添加するとともに、外部より 10 ml/min の流量で一定濃度の CNP 含有海水を定量ポンプで送水した。同時に、サイホンの原理によりビーカー内が一定量になるように外部に排水した。9 日目に清浄な人工海水を入れたビーカーにイガイを移すとともに外部より定量ポンプで清浄な海水を送った。実験期間中は常時エアレーションを行い、水槽内の CNP 濃度は定時的にモニターしながら、適時の間隔でイガイ 2, 3 個体をサンプリングして CNP 及び代謝物分析用試料とした。

5. CNP 及びその還元代謝生成物の分析

代謝生成物の分析は、既報のように組織部位ごとには

分けず、全組織を分析に供した。試料を高速ホモジナイザー (パイオトロネ BT 20S) を使いアセトニトリルで抽出後、CNP は既報⁷⁾により、また CNP-formamide 及び CNP-acetamide は鈴木ら⁴⁾の方法により精製し、ECD ガスクロマトグラフで測定した。土壌の CNP-NH₂ は、生成した大部分が土壌粒子と強固に結合し有機溶媒では抽出されないため、アルカリ溶液中で加温浸漬後抽出し、分析している^{4), 9)}。しかし、CNP, CNP-formamide 及び CNP-acetamide はアルカリ分解の条件によっては CNP-NH₂ に変化することもあると考えられ^{4), 10)}、これらを分離して測定する必要がある。そこで今回 CNP-NH₂ は、初めアセトニトリルで抽出後、残留物をアルカリ分解し抽出液とは別に分析した。すなわち試料を高速ホモジナイザーを使いアセトニトリル抽出し (25 ml×2), 抽出液に 1.5% 塩化ナトリウム溶液 75 ml を加え、*n*-ヘキサン 100 ml で再度抽出する。別に、アセトニトリル抽出後の残留物は、4 N 水酸化ナトリウム溶液 50 ml を加え 80°, 4 時間分解後、アセトン 50 ml を加え *n*-ヘキサン 100 ml で振とう抽出する。分離した *n*-ヘキサン層はそれぞれ 0.4 N 塩酸 50 ml で振とうし CNP-NH₂ を塩酸塩として水層へ移行させる。さらに水層をアルカリで pH>11 にして再度 *n*-ヘキサンで抽出し脱水濃縮後 N-P FID-ガスクロマトグラフで測定した。ガスクロマトグラフィーで検出された試料については GC/MS を使用して確認を行った。

結果及び考察

1. CNP 及び還元代謝物の添加回収

ホモジナイズしたイガイのむき身 5 g に CNP 及び 3 種の代謝物を 1 ppm の濃度となるように添加し上記の方法で分析した結果、CNP 95%, 3 種類の代謝物はそれぞれ約 80% (CNP-NH₂ はアセトニトリル抽出及びアルカリ分解後抽出分を加えて) の回収率でありほぼ満足な結果であった。

2. CNP の蓄積と代謝物の生成

実験開始前のイガイ中には CNP 及び代謝物は検出限界 (各物質それぞれについて 0.01 ppm) 以下であることを確認した。飼育海水中的 CNP 濃度は幾分一定してはいなかったが、平均すると約 12 ppb であった。イガイ中の CNP 及びその還元代謝物濃度を Fig. 2 及び Table 1 に示した。CNP 濃度は実験開始後 5 日目ではほぼ平衡状態の 30~35 ppm に達し、それとともに CNP-NH₂ 0.2 ppm, CNP-formamide 0.2 ppm の濃度で生成

Table 1. Concentration of CNP and its Reduction Metabolites in Mussel

	Sampling day							
	CNP medium				Clean sea water			
	1	5	7	9	1	5	12	20 (Days)
CNP (ppm)	6.5	32	30	30	24	20	6.0	0.9
CNP-NH ₂ I	—	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CNP-NH ₂ II (ppm)	—	—	0.18	0.20	0.29	0.21	0.10	0.09
CNP-formamide (ppm)	—	—	0.25	0.21	0.13	0.07	0.03	0.07
CNP-acetamide (ppm)	—	—	ND	ND	ND	ND	ND	ND

ND: not detected (<0.01 ppm)

I: concentration in the fraction extracted with acetonitrile

II: concentration in the fraction extracted after hot alkaline treatment of the residue of I

Fig. 2. Accumulation and excretion of CNP and production of reduction metabolites in mussel

○: CNP; □: CNP-NH₂; △: CNP-formamide

が認められたが, CNP-acetamide は検出されなかった。

3. CNP の排泄と代謝物濃度の推移

イガイを清浄な海水に移すと蓄積された CNP は生物学的半減期 (体内濃度が半減するのに要する日数) 4~8 日で減少した。一方, CNP-NH₂, CNP-formamide の濃度は CNP のようには顕著でないが, 全般的には濃度低下していた。鈴木らは, 宮城県内で採取したシジミ, ド

ジョウ, フナから CNP-formamide と CNP-acetamide を CNP 量の 1/30~1/100 で同時に検出したと報告⁴⁾している。今回の実験では, CNP-acetamide は検出されなかったが, 検体採取ごとに測定した CNP 量に対する CNP-formamide 濃度の比率は 0.4~7.7% で数値的には鈴木らの報告とほぼ同程度であった。測定されたイガイ中の CNP-NH₂ は, 0.09~0.29 ppm の範囲で, アセトニトリルでは抽出されず, アルカリ分解により初めて抽出されたことから, 必ずしも CNP-NH₂ の形で存在していたと断定はできない。しかし, 土壌中の存在量の大部分は遊離の形ではなく, 土壌粒子と各種のコンプレックスを形成している^{5), 9)}ことから, 魚介類中でも同様に生体成分とコンプレックスを形成しているものと考えられる。清浄な海水に移して以降に水中に検出された CNP 量を経時的に加算すると, イガイ中の減少量の 90% 以上が未代謝の形で水中に排泄されたことはすでに報告した⁷⁾。またイガイ中のこれら還元代謝物の生成量は蓄積された CNP 総量に比べると微量であり, CNP の排泄速度ほど速やかではないが減少傾向を示しており, 長期にわたっては残留しないと考えられる。

要 約

CNP を約 12 ppb 含有した人工海水を用い, ムラサキイガイを飼育し, 3 種類の還元代謝物 (CNP-NH₂, CNP-formamide, CNP-acetamide) の生成量を経時的に測定した。

1. イガイ中の CNP 蓄積濃度は 5~9 日で 30~35 ppm に達し, 同時に CNP-NH₂, CNP-formamide がそれぞれ 0.2 ppm 濃度で生成が認められたが, CNP-acetamide は検出されなかった。

2. イガイを清浄な海水に移すと, CNP は生物学的半減期 4~8 日で減少し, CNP-NH₂, CNP-formamide はいずれも 0.2~0.3 ppm を最高値に, CNP ほど速や

かではないが減少した。

文 献

- 1) Yamagishi, T., Akiyama, K., Morita, M., Takahashi, R., Murakami, H.: J. Environ. Sci. Health **B13**, 417~424 (1978).
- 2) 佐藤信俊, 石川 潔, 鈴木 滋, 高槻圭悟, 堺 敬一: 食衛誌. **22**, 56~59 (1981).
- 3) Watanabe, S., Watanabe, S., Ito, K.: J. Pesticide Sci. **8**, 47~53 (1983).
- 4) 鈴木 滋, 佐藤信俊, 高槻圭悟, 加茂えり子, 菊池秀明, 牛沢 勇, 堺 敬一: 食衛誌. **24**, 187~193 (1983).
- 5) 遠山輝彦, 玉川重雄: 農薬科学. **3**, 178~184 (1976).
- 6) 高沢良夫: 雑草研究. **25**, 60 (1980).
- 7) 渡辺貞夫, 渡辺重信, 伊藤和敏: 食衛誌. **26**, 496~499 (1985).
- 8) Shimotori, H., Kuwatsuka, S.: J. Pesticide Sci. **3**, 267~275 (1978).
- 9) Yamada, T.: *ibid.* **8**, 33~39 (1983).
- 10) Wu, K. Y., Brink, D. L.: J. Agric. Food Chem. **25**, 692~698 (1977).