

## 第三章 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

### 第1節 緒言

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（金澤、1992）。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、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（enrichment factor）を用いて、同位体分別を伴う要因の寄与を推定する（朴ら、1996；川西ら、1991）。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、従って、濃縮係数も明らかにされていない。

そこで、本章では、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（山本ら、2004）。

### 第2節 材料および方法

供試薬剤は、クロロタロニル（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）と共に粉碎混合して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(H<sub>2</sub>O)：5.39、T-C：53g kg<sup>-1</sup>、採取地：茨城県つくば市観音台）とし、2mmの篩を通したものを用いた。

乾土10g相当の供試土壌を100mL容ビーカーにとり、供試薬剤を有効成分で0.5mg添加後混合した。この添加量は、クロロタロニル10.0%粉剤（商品名：ダコソイル）の施用量（0.40Mg ha<sup>-1</sup>）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含水量の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9.43mg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℃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。試験は全て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（上路ら、2001）と比べて工程数を減らしたものとした。試料1gと珪藻土0.2g（VARIAN社製 CHEM TUBE-HYDROMATRIX）を10mL容ねじ口付き試験管にとり、酢酸エチル5mLで2回振とう抽出し、無水硫酸ナトリウムを少量加えたる紙を用いて脱水、ろ過後、減圧濃縮して酢酸エチルで1mL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50mg kg<sup>-1</sup>添加相当で47%、10mg kg<sup>-1</sup>添加相当で42%、2mg kg<sup>-1</sup>添加相当で50%であった。定量値は、50mg kg<sup>-1</sup>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30~50mg L<sup>-1</sup>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



第3-1図 GC/C/IRMS

第3-1表 クロロタロニルの炭素安定同位体自然存在比分析条件

安定同位体比質量分析計	Thermo Finnigan DELTA plus (GC部 Agilent Technologies 6890)
注入量	4 μL
キャリアガス	He
注入口	250℃, スプリットレス, 1.5mL min <sup>-1</sup> , コンスタントフロー
カラム	HP-5, 内径 0.32mm, 長さ 30m, 膜厚 0.25 μm
オープン温度	50℃ (1 min) - 20℃ min <sup>-1</sup> - 250℃ (5 min)
保持時間	692 s
燃焼炉温度	850℃
還元炉温度	650℃

分析には、GC/C/IRMS (サーモ・フィニガン社製DELTA plus) を用いた (図3-1)。分析条件は表3-1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、‰)。

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

ここで  $R_{\text{sample}}$  と  $R_{\text{standard}}$  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,  $\text{CaCO}_3$ ,  $^{13}\text{C}/^{12}\text{C} = 0.01124$ ) を用いた (米山, 1987)。GC/C/IRMSは、測定毎に  $\delta^{13}\text{C}$  値が既知の $\text{CO}_2$ 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、土壌からの抽出と濃縮による炭素同位体分別は無視できると考えられる。

### 第3節 結果および考察

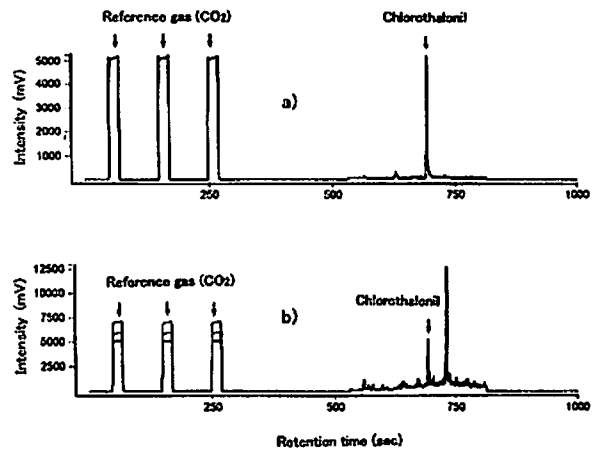
#### 1. 畑土壌中のクロロタロニル消失過程における炭素同位体分別の有無

GC/C/IRMSによるクロロタロニルの分析例を第3-2図に示した。a)は標準試薬 ( $50\text{mg L}^{-1}$ ) 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。

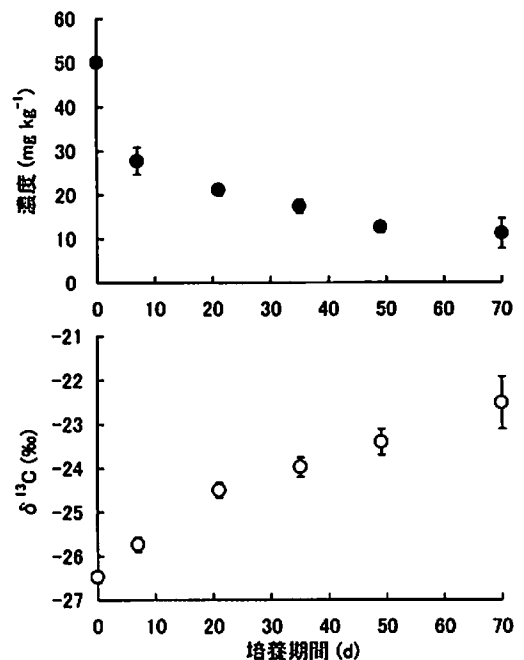
土壌中におけるクロロタロニルの濃度推移を図3-3に示した。クロロタロニルの濃度は、培養期間が長くなるほど低下し、その半減期 (丸, 1991) は12.5日であった。クロロタロニルの土壌中半減期は5~36日といわれており (British Crop Protection Council, 2000)、本研究における結果もその範囲内にあった。

土壌中におけるクロロタロニルの  $\delta^{13}\text{C}$  値の推移を第3-3図に示した。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 $^{13}\text{C}$ 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程大きくなったが、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。

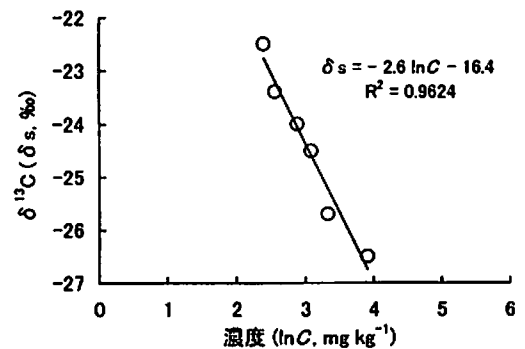
他の有機塩素化合物のテトラクロロエチレンやトリクロロエチレンでは、微生物による脱塩素の過程で炭素同位体分別が生じることが知られている (Bloomら, 2000; Hunkeler, 1999)。畑土壌におけるクロロタロニルが消



第3-2図 クロロタロニルのGC/C/IRMSクロマトグラム  
a) 標準品 ( $50\text{mg L}^{-1}$ )、b) 試料 (培養期間70日)



第3-3図 クロロタロニルの土壌中濃度と炭素安定同位体比の推移



第3-4図 畑土壌におけるクロロタロニルの濃度と  $\delta^{13}\text{C}$  値との関係

失する要因の一つが微生物による分解であり (Katayamaら、1991)、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 (片山、2000; Motonaga、1998)。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<sup>13</sup>Cの結合力が、<sup>12</sup>Cと比べて強いことが考えられる (Hunkeler、1999)。

## 2. 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利用

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 $\epsilon$ をMariottiらにより導かれた、いわゆるRayleighの式により求めた (朴ら、1996; 川西ら、1991; Mariottiら、1981; Mariottiら、1988)。

$$\delta s = \delta s_0 + \epsilon \ln C/C_0 \dots (2)$$

ここで

$\delta s$  : 試料の $\delta^{13}C$ 値 (‰)、

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

$C$  : 試料のクロロタロニル濃度 (mg kg<sup>-1</sup>)、

$C_0$  : 測定開始時の試料のクロロタロニル濃度 (mg kg<sup>-1</sup>)。

$a = \delta s_0 - \epsilon \ln C_0$ とすると(2)式より、

$$\delta s = a + \epsilon \ln C \dots (3)$$

ただし、 $a$ 、 $\epsilon$ 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(第3-4図)。

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

よって、濃縮係数 $\epsilon$ は-2.6‰と推定される。この値は、Bloomら(2000)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。

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 $\epsilon$ 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 $\delta^{13}C$ 値の変化を $\Delta\delta^{13}C$ 値とすると、

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

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 $\delta^{13}C$ 値の差( $\Delta\delta^{13}C$ )から要因Aによる消失量のみを推定できる(朴ら、1996)。

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。