

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23510102

研究課題名(和文) 精密質量分析を用いた農薬塩素処理物からの変異原性物質の探索

研究課題名(英文) Exploring chlorination by-products from pesticides using high resolution mass spectrometry

研究代表者

高梨 啓和 (TAKANASHI, Hirokazu)

鹿児島大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：40274740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：農薬は、田畑などで散布された後、一部が加水分解などを受けて変化体(Pesticide Transformation Products in Water environments: PTPWs)となる。PTPWsは、浄水場で塩素処理を受けて、さらなる変化体を生成する可能性がある。生成した変化体の中には、変異原性を示す物質が存在すると考えられる。そこで本研究では、有機リン系殺虫剤fenitrothionのPTPWである3-methyl-4-nitrophenol (3M4NP)を塩素処理した際に生成する副生成物を探索し、その一部を同定した。

研究成果の概要(英文)：Pesticides are sprayed onto plants, weeds or soil for insect or weed control, and some of the pesticides will transfer to the water environment. These pesticides may undergo various reactions such as hydrolysis, photolysis and biodegradation in the water environment. Pesticides and Pesticide Transformation Products in Water environments (PTPWs) have been found in natural water. Natural water containing these pesticides and their PTPWs will often be chlorinated at waterworks. In this study, 3-methyl-4-nitrophenol (3M4NP) was focused as a possible precursor of mutagens in chlorinated fenitrothion. 3M4NP is a typical hydrolysate of fenitrothion and reported that 3M4NP itself has no mutagenicity. Chlorinated 3M4NP sample was analyzed by high resolution/accurate mass LC/MS and 1H-NMR to identify chlorination by-products from 3M4NP, resulting in successful identification of a chlorination by-product.

研究分野：環境化学

キーワード：農薬 変化体 塩素処理 質量分析 副生成物

1. 研究開始当初の背景

農薬は、環境中で速やかに分解されて環境中から検出されないことが望ましいとされ、分解性が高い農薬が開発されてきた。しかし、ここでいう分解性は一次分解であり、完全分解ではないことが多い。このため、環境水中からは、農薬に加えてその環境変化体 (Pesticide Transformation Products in Water environments: PTPWs) が検出されることがある¹⁾。

農薬および PTPWs を含む河川水が浄水場で塩素処理された際には、それらの塩素処理物が生成する可能性があるが、どのような塩素処理副生成物が生成するかはほとんど明らかにされていない。塩素処理副生成物の中には、変異原性物質が含まれている可能性がある^{2), 3)}ため、塩素処理副生成物の同定が望まれる。

2. 研究の目的

わが国において使用量が多い有機リン系殺虫剤であるフェニトロチオン (0, 0-ジメチル 0-(3-メチル-4-ニトロフェニル)ホスロチオエート) に着目し、フェニトロチオンの代表的な PTPW である 3-メチル-4-ニトロフェノール (3M4NP) が浄水場で塩素処理された際にどのような物質に変化するかを検討するとともに、同定された物質の変異原性を測定することを目的とした。

3. 研究の方法

東京化成工業 (株) から 3M4NP を、和光純薬工業 (株) から化学用の次亜塩素酸ナトリウム溶液を購入した。3M4NP 水溶液に次亜塩素酸ナトリウムを添加し、3M4NP を塩素処理した。その際、3M4NP に対する塩素添加率を変化させ、試料の変異原性強度を変化させた。最も変異原性強度が強くなったサンプルを対象に、塩素処理副生成物の探索を行った。

変異原性は、予めサンプル中の変異原性物質を Sep-pak plus CSP-800 (日本ウォーターズ) を用いて濃縮し、濃縮液の変異原性をサルモネラ菌 TA100 株を用いた Ames 試験 (TA100-S9、プレインキュベーション法) により評価した。塩素処理副生成物の探索は、高分解能・高質量精度 LC/MS を用いて行った。LC/MS による探索は、analyte を ESI の負イオン化モードでイオン化して実施した。LC/MS で発見された塩素処理副生成物の構造は、リサイクル分取 LC および固相抽出により精製した後、¹H NMR で決定した。

4. 研究成果

(1) 3-メチル-4-ニトロフェノール塩素処理サンプル中の主要イオンの分子式

変異原性が最も強くなる塩素添加率を検討したところ、4.3 mol/mol であった。このため、この条件で得られたサンプルを対象として LC/MS を用いて塩素処理副生成物を探索した。その結果、*m/z* 219.9574 のイオンが最

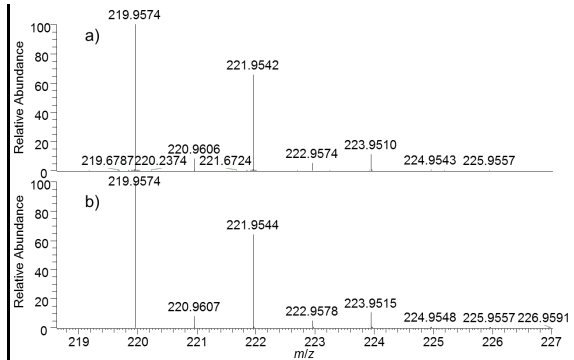


図1 3-メチル-4-ニトロフェノール塩素処理サンプルから発見された物質のマススペクトル (a) とその天然同位体パターンの計算結果 (b) (設定分解能 $R=7,500$)

も強度の高いピークとして検出された。*m/z* 219.9574 の抽出イオンクロマトグラム (extracted ion chromatogram: EIC) を描くと 3 つの異性体が確認された。そこで、3 つの異性体の中で最もイオン強度が強いイオンの分子式を解析した。

質量誤差 3 ppm 以下、構成元素を炭素、水素、酸素、塩素、窒素として解析したところ、*m/z* 219.9574 は $[M-H]^- = C_7H_4NO_3Cl_2$ と推定された。次に、同イオンの天然同位体パターン解析を行ったところ、¹³C および ³⁷Cl のピークが観察され、基準ピーク強度に対する相対強度から、同イオンは炭素を 6 ~ 8 原子、塩素を 2 原子有することが確認された。そこで、観察されたイオンの天然同位体パターンと $C_7H_4NO_3Cl_2$ の天然同位体パターンの計算結果を比較したところ、図 1 に示すように両者はよく一致した。このため、質量精度 0.038 ppm の高い精度で、同イオンを $[M-H]^- = C_7H_4NO_3Cl_2$ と判断した。

(2) 発見された物質の構造推定

3M4NP の構造をもとに $C_7H_5NO_3Cl_2$ の構造を推定したところ、ジクロロ-3-メチル-4-ニトロフェノールと推定された。ジクロロ-3-メチル-4-ニトロフェノールは、塩素の置換位置により異性体が 3 物質存在するため、3M4NP 塩素処理サンプルの EIC において 3 本のクロマトピークが存在したと考えられる。本研究では、最もイオン強度が強かった物質を検討対象としたため、量子化学計算ソフトである Gaussian 09W を用いて basis set/method を B3LYP/6-31G(d) として塩素の置換位置を推定した。その結果、同イオンは 2,6-ジクロロ-3-メチル-4-ニトロフェノールと推定された。

そこで、2,6-ジクロロ-3-メチル-4-ニトロフェノールの試薬を購入し、LC カラムの保持時間を同イオンの保持時間と比較したところ、よく一致した。さらに、リニアイオントラップを用いて衝突誘起解離 (collision-induced dissociation: CID) 実験を行い、購入した試薬と同イオンの主要なプロダクトイオンを測定したところ、両物質から *m/z* 189.9594 が観察され、第 2 世代ブ

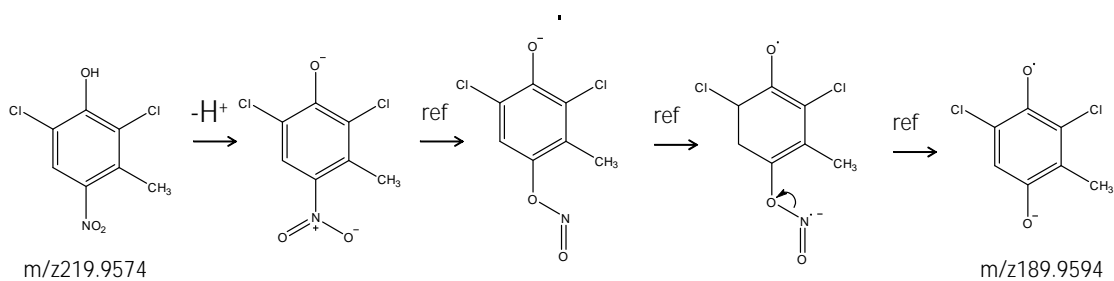


図2 $m/z189.9594$ 生成反応の推定結果

ロダクトイオンスペクトル (2nd generation product ion spectrum) が一致した。このため、 $m/z189.9594$ の生成反応を推定したところ、図2に示すように、ニトロ基の転移反応後、NO脱離が起こると推定された⁴⁾。

(3) 発見された物質の単離と¹H NMRによる構造決定

次に、同イオンの単離を試みた。ODS カラムを備えたりサイクル分取 HPLC で同イオンを含む画分を分取し、Sep-pak plus CSP-800 を用いて濃縮した。得られた物質の¹H NMR (アセトニトリル-*d*3) を測定したところ、図3 (a) に示すスペクトルを得た。¹H NMR で測定される 2,6-ジクロロ-3-メチル-4-ニトロフェノールのスペクトルは、すべて観察された。また、すべてのピークをアサインすることができた。そこで、次に、この¹H NMR スペクトルと 2,6-ジクロロ-3-メチル-4-ニトロフェノールの試薬の¹H NMR (アセトニトリル-*d*3) スペクトル (図3 (b)) と比較したところ、両者が一致した。

以上の結果から、3M4NP 塩素処理サンプル中の $[M-H]^- = C_7H_4NO_3Cl_2$ が 2,6-ジクロロ-3-メチル-4-ニトロフェノールであるとの結論を得た。

(4) 発見された物質の変異原性試験結果と今後の展開

そこで、2,6-ジクロロ-3-メチル-4-ニトロフェノールの変異原性を評価したところ、変異原性は陰性であった。

このため、改めて 3M4NP 塩素処理サンプルの LC/MS の測定結果である MS クロマトグラムと、同時に測定したフォトダイオードアレイ (PDA) のクロマトグラムを再検討した結果、MS ではピークが得られていないが PDA では明確なピークが得られている場合が見受けられた。このことから、3M4NP 塩素処理サンプルの変異原性強度を律している変異原性物質は、本研究で用いた ESI ではイオン化できない物質であることが示唆された。

このことから、3M4NP 塩素処理サンプル中の主要変異原性物質を探索するためには、ESI でイオン化できるように誘導体化を行う必要があることが示された。

<引用文献>

1) Takashi KAMEYA, Miho SAITO, Takashi KONDO, Wataru TORIUMI, Koichi FUJIE, Taku MATSUSHITA and Hirokazu TAKANASHI,

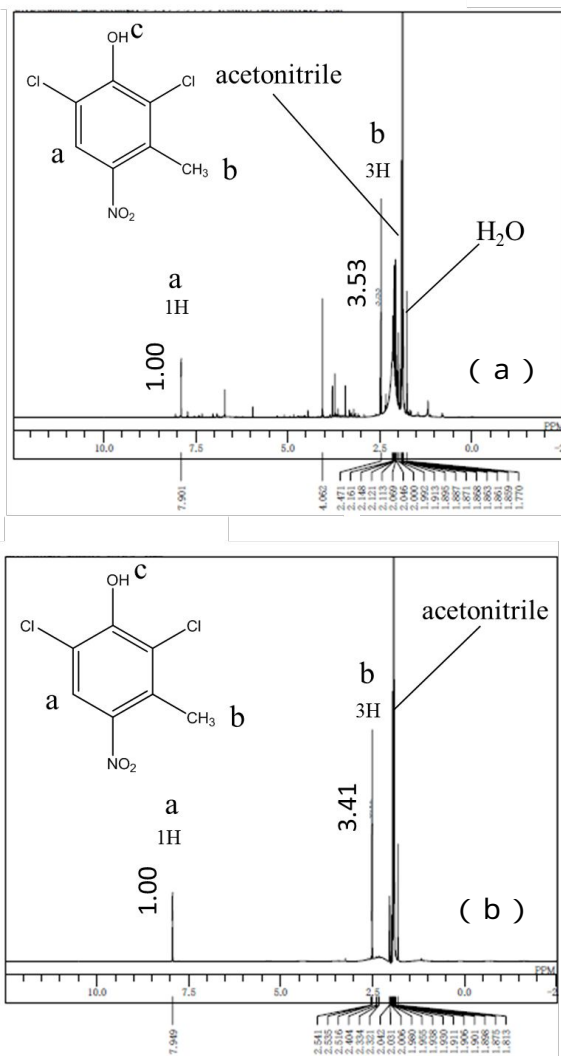


図3 3-メチル-4-ニトロフェノール塩素処理サンプルから発見された物質の¹H NMR スペクトル(a)と2,6-ジクロロ-3-メチル-4-ニトロフェノールの¹H NMR スペクトル(b) (アセトニトリル-*d*3)

Detection of Fenitrothion and its Degradate 3-methyl-4-nitrophenol in Water Environment, *J. Wat. Environ. Technol.*, **10**(4), 427-436, 2012.

2) Hirokazu TAKANASHI, Misako KISHIDA, Kazuya ABIRU, Takashi KONDO, Takashi KAMEYA, Taku MATSUSHITA, Tsunenori NAKAJIMA and Akira OHKI, A screening study on the mutagen formation potential of 44 pesticides, *J. Wat.*

Supply: Res. Technol.-Aqua, **62**(1), 14-22, 2013.

- 3) Hirokazu TAKANASHI, Tomohiro HAMA, Tsunenori NAKAJIMA, Akira OHKI, Takashi KONDO, Takashi KAMEYA and Taku MATSUSHITA, A screening study of mutagen formation potential (MFP) of pesticide transformation products in water environments (PTPWs) to investigate the MFP changes from their parent pesticides through transformations, *J. Wat. Environ. Technol.*, **12**(11), 2014.
- 4) Anne-Christine Schmidt, Rainer Herzschuh, Frank-Michael Matysik and Werner Engewald, Investigation of the ionisation and fragmentation behaviour of different nitroaromatic compounds occurring as polar metabolites of explosives using electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**;20(15):2293-302, 2006.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

1. Hirokazu TAKANASHI, Kazuya ABIRU, Hanako TANAKA, Misako KISHIDA, Tsunenori NAKAJIMA, Akira OHKI, Takashi KONDO, Takashi KAMEYA and Taku MATSUSHITA, Production of chloro-5-hydroxy-2-nitrobenzoic acid through chlorination of 3-methyl-4-nitrophenol, a typical hydrolysate of fenitrothion, *J. Wat. Environ. Technol.*, 査読有り、**10**(4), 2012, 437-447. (https://www.jstage.jst.go.jp/article/jwet/10/4/10_437/_pdf)

〔学会発表〕(計7件)

1. 田中華子、糸満桃子、高梨啓和、中島常憲、大木章、上田岳彦、近藤貴志、亀屋隆志、松下拓、殺虫剤 fenitrothion の環境変化体 3-methyl-4-nitrophenol 塩素処理副生成物の構造推定、第48回日本水環境学会年会、2014.3.17-19、仙台
2. Hirokazu TAKANASHI, Misaki Hama, Mai Nishiyama, Kazuya Abiru, Misako Kishida, Tsunenori Nakajima, Akira Ohki, Takehiko Ueda, Takashi Kondo, Takashi Kameya and Taku Matsushita, Exploring Photodegradation Products of Organophosphorus Pesticide Fenitrothion by LC/MS, *Proc. The 5th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition*, 2013, Daejeon, Korea, Sep. 8-12, 2013.
3. Hirokazu TAKANASHI, Kazuya ABIRU, Misako KISHIDA, Tsunenori NAKAJIMA, Akira OHKI, Taku MATSUSHITA and Takashi

KAMEYA, Qualitative analysis of chlorination byproducts of organophosphorus pesticide fenitrothion, *Proc. The IWA World Water Congress & Exhibition*, Busan Korea, Sep. 16-21, 2012.

4. Hirokazu TAKANASHI, Kazuya ABIRU, Hanako TANAKA, Misako KISHIDA, Tsunenori NAKAJIMA, Akira OHKI, Takashi KONDO, Takashi KAMEYA and Taku MATSUSHITA, Production of chlorophenols through chlorination of 3-methyl-4-nitrophenol, a typical hydrolysate of fenitrothion, *Proc. SETAC Asia/Pacific 2012 Annual Meeting*, Kumamoto, Sep. 24-27, 2012.
5. Hirokazu TAKANASHI, Kazuya ABIRU, Hanako TANAKA, Misako KISHIDA, Tsunenori NAKAJIMA, Akira OHKI, Takashi KONDO, Takashi KAMEYA and Taku MATSUSHITA, Production of chloro-5-hydroxy-2-nitrobenzoic acid through chlorination of 3-methyl-4-nitrophenol, a typical hydrolysate of fenitrothion, *Proc. the Wat. Environ. Technol. Conf. 2012*, Tokyo, Jun. 29-30, 2012.
6. Hirokazu TAKANASHI, Kazuya ABIRU, Hanako TANAKA, Misako KISHIDA, Tsunenori NAKAJIMA, Akira OHKI, Takashi KONDO, Takashi KAMEYA and Taku MATSUSHITA, Accurate Mass Analysis of Chlorination By-Products of Fenitrothion, *Proc. 10th China-Japan Wat. Environ. Sympo.-Water Reclamation, Remediation and Restoration towards a Greener Asia-*, Shenzhen, China, Apr. 13-15, 2012.
7. Hirokazu TAKANASHI, Kazuya ABIRU, Misako KISHIDA, Tsunenori NAKAJIMA and Akira OHKI, Accurate Mass Analyses of Chlorination By-Products of Organophosphorus Pesticide Fenitrothion, *Proc. The 4th IWA-ASPIRE Conference & Exhibition, Tokyo, Japan*, Oct. 2-6, 2011.

〔その他〕

1. TAKANASHI, Hirokazu, WET Excellent Research Award, Japan Society on Water Environment, Jun. 2013.
2. TAKANASHI, Hirokazu, WET Excellent Presentation Award, Japan Society on Water Environment, Jun. 2012.

6. 研究組織

(1)研究代表者

高梨 啓和 (TAKANASHI, Hirokazu)
鹿児島大学・大学院理工学研究科・准教授
研究者番号：40274740