

## EXPERIMENTAL

### Chemicals and reagents

MPP and MPP-sulfoxide were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd (Osaka, Japan). MPP-sulfone, MPP-oxon, MPP-oxon-sulfoxide, and MPP-oxon-sulfone were purchased from Dr Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Germany).

Standard solutions were prepared individually in acetone at concentrations of  $1,000 \text{ mg l}^{-1}$  for MPP and MPP-sulfoxide, and  $100 \text{ mg l}^{-1}$  for MPP-sulfone. The three oxon solutions were purchased at  $10 \text{ } \mu\text{g ml}^{-1}$  in acetonitrile solution. All standard solutions were stored at  $-20^\circ\text{C}$ . The working solutions were freshly prepared for every use by dilution of the standard solution with acetonitrile and/or 0.15% acetic acid, as necessary.

High quality acetone, acetonitrile, acetic acid, sodium hypochlorite solution, and L(+)-ascorbic acid sodium salt were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. Laboratory water was purified by a Milli-Q gradient A10 and Elix with EDS polisher system water-purification (Millipore, Bedford, Massachusetts). Methanol was not used in this study, because transesterification of organophosphorus pesticides may occur in methanol (Hong & Pehkonen 1998).

### Solid-phase extraction

Compounds in water samples were extracted and concentrated with solid-phase extraction (SPE) cartridges. The cartridges were equilibrated with 5 ml acetonitrile and 5 ml water, respectively. Extraction of water samples was carried out with a  $10 \text{ ml min}^{-1}$  flow rate using an automatic concentrator, Sep-Pak Concentrator Plus (Waters, Milford, Massachusetts). Air was then passed through the cartridges for 5 min. The compounds were eluted from the cartridges with 5 ml acetonitrile. The eluted solutions were concentrated to less than 0.3 ml under a gentle nitrogen stream, and for liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS) samples 0.15% acetic acid was added to a final volume of 1.0 ml. The final solution for LC/MS analysis was composed of 0.15% acetic acid/acetonitrile ( $v/v = 7:3$ ).

Standard solutions in acetonitrile were spiked into 500 ml purified water, for final concentrations of  $50 \text{ ng ml}^{-1}$  for

MPP,  $0.1 \text{ ng ml}^{-1}$  for MPP-sulfoxide,  $1 \text{ ng ml}^{-1}$  for MPP-sulfone,  $0.25 \text{ ng ml}^{-1}$  for MPP-oxon,  $1 \text{ ng ml}^{-1}$  for MPP-oxon-sulfoxide, and  $0.5 \text{ ng ml}^{-1}$  for MPP-oxon-sulfone. The recovery of compounds from water samples was performed using three cartridges: Oasis HLB Plus Extraction Cartridge, Sep-Pak Plus PS-2 Cartridge, and Sep-Pak Plus C18 Cartridge (Waters). The blank consisted of 500 ml of purified water.

### Analysis with LS/MS

The target compounds were analysed by LC/MS for qualitative and quantitative analysis.

LC was carried out using an Agilent 1100 series (Agilent, Waldbronn, Germany) instrument equipped with a Rheodyne Model 7750 injector. The analytical column was Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent),  $4.6 \text{ mm i.d.} \times 250 \text{ mm}$ ,  $5 \text{ } \mu\text{m}$  particle size. The column oven temperature was  $40^\circ\text{C}$ . Mobile phases were 0.15% acetic acid (A) and acetonitrile (B) with the following gradient programme: maintaining 70% A for 5 minutes; by a linear gradient from 70% A at  $t = 5$  minutes to 30% A at  $t = 20$  minutes; maintaining 30% A for 5 minutes. The flow rate was set to  $1.0 \text{ ml min}^{-1}$  and the injection volume was  $10 \text{ } \mu\text{l}$ . The MS system was an Agilent 1100 series (Agilent) quadrupole equipped with an electrospray ionization (ESI) source. The instrument was operated in scan mode and the positive and negative ionization mode of selected ion monitoring (SIM) mode. The operating conditions for ESI were nebulizer gas (nitrogen) 60 psi; drying gas (nitrogen) flow  $10 \text{ l min}^{-1}$ ; gas temperature  $350^\circ\text{C}$ . Capillary voltages were 4,000 V for positive and 2,000 V for negative. The fragmentor voltage was kept at 200 V. The scan mode was 50–500 m/z.

### Extraction of MPP and its products from water

MPP standard solution was added to purified water to a final concentration of  $0.001 \text{ mg l}^{-1}$ . Strict pH adjustment was not performed but the extraction was conducted in neutral conditions. After stirring at room temperature for 5 minutes, a 500 ml sample was taken for the original water sample, reaction time at 0 hour. With stirring at  $20^\circ\text{C}$ , 500 ml samples were taken at 1, 2, 4, 6, 24 and 48 hours. MPP and its products were extracted by SPE. The operations were done at room temperature, around  $25^\circ\text{C}$ .

### Light irradiation

Photolysis experiments were performed in purified water using an original laboratory photoreactor. An ultraviolet (UV) GL6 lamp (National, Osaka, Japan) with electrical power at 6 W and maximum wavelength of 254 nm was located at the centre of the reactor. The characteristics of this lamp were suitable to evaluate the effect in a narrow wavelength range because about 90% of the energy is concentrated in 254 nm spectrum. MPP solution of concentration  $1 \mu\text{g ml}^{-1}$  was put in a standard rectangular quartz cell (1 cm pathlength) and placed at a distance of 17 cm from the light source. MPP solutions were irradiated by UV light (254 nm) for 10, 20, 30, 45, 60, 90 and 120 seconds in the short irradiation experiment, and for 1, 2, 5, 10, 20 and 30 minutes in the long irradiation experiment. Sample solutions were analysed directly by LC/MS.

A  $250 \text{ mg l}^{-1}$  MPP solution was irradiated by UV light for 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3 and 4 hours for the detection of ChE inhibitory activity. The products were also analysed by LC/MS direct injection.

### Chlorination

We examined the behaviour of MPP and its products in chlorine water to investigate the effect of chlorination on MPP in water treatment plants, using sodium hypochlorite solution, which was generally used as a disinfectant providing an effective barrier to many pathogens, especially bacteria at treatment plants.

The chlorination experiment for the examination of MPP behaviour was carried out at low MPP concentration having regard to the real-world situation. The preparation of samples for the evaluation of chlorination products was performed at high MPP concentration on the basis of the sensitivity of bioassay and the yield of products.

MPP standard solution was added to purified water to a final concentration of  $0.001 \text{ mg l}^{-1}$ . After stirring at room temperature for 5 minutes, a 500 ml sample was taken for the original water sample, reaction time at 0 hour. A sodium hypochlorite solution was then added to a final concentration of free chlorine of  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . With stirring at  $20^\circ\text{C}$ , 500 ml samples of solution were taken at the reaction times of 5, 15, 30, 60 and 120 minutes for the short exposure experiment, and 1, 2, 4, 6, 24, 48 and 72 hours for the long exposure experiment.

A 1 ml solution of sodium ascorbic acid ( $10 \text{ g l}^{-1}$ ) was added to the sample solutions to eliminate chlorine. MPP and its products were extracted by SPE. The operations were done at room temperature, around  $25^\circ\text{C}$ .

Sodium hypochlorite solution was added to an aqueous solution of  $0.01 \text{ mg l}^{-1}$  MPP, to a final concentration of free chlorine of  $5 \text{ mg l}^{-1}$ . The solution was maintained at  $20^\circ\text{C}$  for 0.5, 1, 2, 4 and 24 hours. Chlorine was eliminated in the sample solutions by sodium ascorbic acid. MPP and its products were concentrated 250-fold by SPE.

### Evaluation of ChE activity

Stock solutions of ChE (Wako Pure Chemical Industries, Ltd) dissolved in water ( $1,250 \text{ IU l}^{-1}$ ) and 5-methyl-2-thienylthiocholine-iodide (MTTC) ( $2.0 \text{ mM}$ ) were prepared. A  $0.25 \text{ mM}$  chromogen solution of 5, 5'-dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB) was prepared in  $0.1 \text{ mol l}^{-1}$  phosphate buffer (pH 7.4). All chemicals were purchased from Wako Pure Chemical Industries, Ltd. They were stored at  $4^\circ\text{C}$ . The sample solutions were prepared in water. A solution of ChE and each appropriate sample were uniformly mixed in a ratio of 4:1, so that each sample contained 7 mIU ChE. MTTC substrate solution ( $63 \mu\text{l}$ ) was added to  $7 \mu\text{l}$  of each sample containing ChE in a 96 microwell plate, and  $280 \mu\text{l}$  of the DTNB chromogen solution was added. The plate was incubated at  $37^\circ\text{C}$  for 7 minutes, and the absorbance was measured at 405 nm using an Ultrospec Visible Plate Reader II 96 (Amersham Biosciences, Tokyo, Japan). All experiments were performed in triplicate wells.

The mechanism of colour development is as follows: active ChE enzymatically cleaves the substrate MTTC to release thiocholine. The released thiocholine reacts with the chromogen DTNB to generate a yellow product, quantifiable at 405 nm by UV absorption, and which is impeded when ChE activity is inhibited (Karahasanoglu & Özand 1967; Tahara *et al.* 2005).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Calibration curves and limit of detection by LC/MS

The following six compounds were targeted for examination: MPP, MPP-sulfoxide and MPP-sulfone (containing an



oxidized thio-methyl group); MPP-oxon, MPP-oxon-sulfoxide and MPP-oxon-sulfone (three oxon forms containing P = O moiety oxidized P = S moiety of the characteristic structure for organophosphorus pesticides).

The experiments were performed using two methods: liquid chromatography with mass spectrometric detection (LC/MS) or gas chromatography with mass spectrometric detection (GC/MS). As a result of the comparison of sensitivity for detecting MPP and five related compounds, we selected the LC/MS method. The analytical conditions established for LC/MS were as shown above in the Experimental section. The target compounds were analysed in the positive and negative ionization SIM mode for qualitative and quantitative analysis by detection of the signal from the more abundant daughter ions. The daughter ion was identified in the scan mode during the acquisition of the mass spectrum. The selected ion and ionization modes are summarized in Table 1. Calibration curves were determined from the results of measurements of seven concentrations of standard solutions in the SIM mode. Standard curves show excellent linearity with correlation coefficients higher than 0.999 for all six compounds. This indicates that the established analytical conditions performed well in quantitative analysis of these compounds.

The value of limit of detection (LOD) was calculated as three times the standard deviation of the slope of the calibration curve. LOD values obtained using LC/MS for MPP, MPP-sulfoxide, MPP-sulfone, MPP-oxon, MPP-oxon-sulfoxide and MPP-oxon-sulfone were 10, 0.02, 0.2, 0.05, 0.2 and 0.1 ng ml<sup>-1</sup>, respectively. Concentration ranges

and LOD values for the six compounds are summarized in Table 1. With LC/MS, low concentrations of the six compounds were measured at high accuracy.

#### Limit of quantification and recovery test by LC/MS

The value of the limit of quantification (LOQ) was determined at 10 times the value of the standard deviation and the lowest concentration that provided relative standard deviations (RSDs) of 10% or less in the recovery test. LOQ values obtained were 50 ng ml<sup>-1</sup> for MPP, 0.1 ng ml<sup>-1</sup> for MPP-sulfoxide, 1 ng ml<sup>-1</sup> for MPP-sulfone, 0.25 ng ml<sup>-1</sup> for MPP-oxon, 1 ng ml<sup>-1</sup> for MPP-oxon-sulfoxide, and 0.5 ng ml<sup>-1</sup> for MPP-oxon-sulfone.

The results of a comparison of recovery tests on extracting six compounds from tap water using three different types of solid-phase extraction cartridge showed that average recovery by the Oasis HLB Plus was 60.0–90.4% (RSD 1.2–9.8%), Sep-pack PS-2 58.3–83.9% (1.0–10.1%) and Sep-pack C18 39.8–86.1% (0.5–10.0%). There were discrepancies in recovery rates among the three cartridges. Oasis HLB Plus was selected to extract all the target compounds in these experiments, because it obtained satisfactory recovery rates for simultaneous analysis of all tested compounds.

#### The behaviour of MPP in water

MPP was added to purified water at a final concentration of 0.001 mg l<sup>-1</sup>, and the behaviour of MPP and its products in water was examined at reaction times of 1, 2, 4, 6, 24 and 48

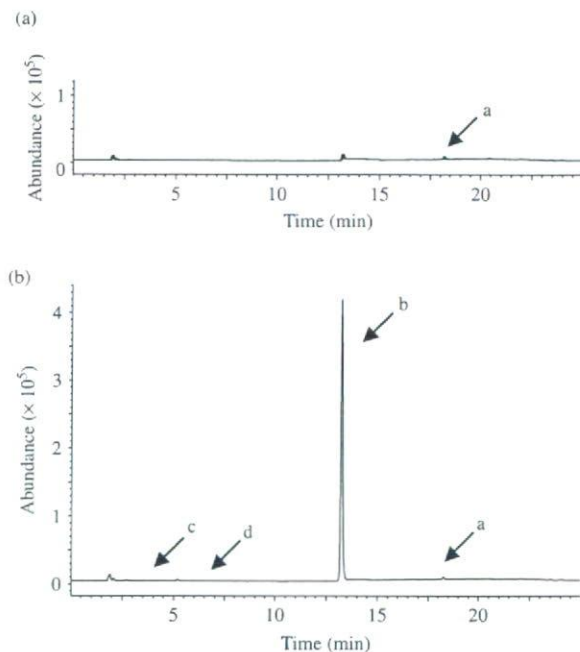
**Table 1** | Analytical conditions in SIM mode of MPP and related compounds by LC/MS (P: positive mode)

Compound	MW	Monitor ion	Retention time (min)	Range (ng ml <sup>-1</sup> )	Correlation coefficient	LOD (ng ml <sup>-1</sup> )	LOQ (ng ml <sup>-1</sup> )
MPP	278	279 P	18.3	10–1,000	0.999	10	50
MPP-sulfoxide	294	295 P	13.3	0.02–5	0.999	0.02	0.1
MPP-sulfone	310	311 P	16.9	0.2–20	0.999	0.2	1
MPP-oxon	262	263 P	16.2	0.05–10	0.999	0.05	0.25
MPP-oxon-sulfoxide	278	279 P	4.0	0.2–20	0.999	0.2	1
MPP-oxon-sulfone	294	295 P	6.6	0.1–20	0.999	0.1	0.5

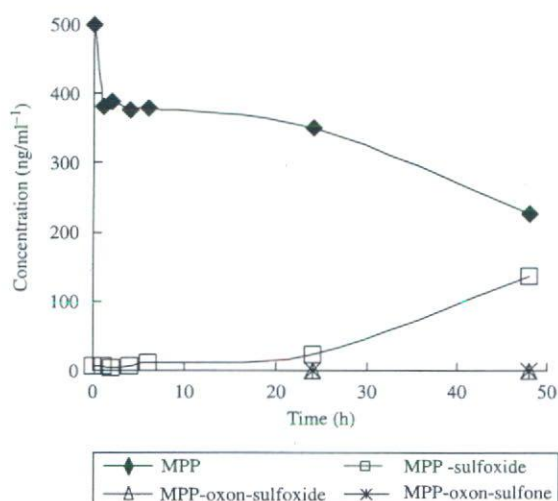
hours. The solution pH was about 6.0 after addition of MPP and was not changed during the reaction time. Though MPP itself decreased gradually, MPP-sulfoxide was formed immediately in water and its concentration increased in a time-dependent manner. At 48 hours, MPP-oxon-sulfoxide and MPP-oxon-sulfone were detected at low levels (Figure 1). The concentration of MPP and its products was calculated using the standard curve determined by the value of the peak area obtained by SPE (Figure 2). After 24 hours, 70% of MPP remained, and 5% of MPP changed to MPP-sulfoxide. After 48 hours, 50% of MPP remained and 30% was changed. We could not detect residual MPP. It was speculated that the residual might have decomposed to other products. Chemical hydrolysis played an important role in the behaviour of MPP in an aqueous environment.

#### The behaviour of MPP exposed to UV

The photochemical transformation of MPP in water was studied after irradiation with UV light, because compounds in natural water are irradiated by sunlight. No change was observed under dark conditions within the timescale of these



**Figure 1** | Chromatograms of MPP and its products in water (a) 0 hr, (b) after 48 h. a: MPP, b: MPP-sulfoxide, c: MPP-oxon-sulfoxide, d: MPP-oxon-sulfone.

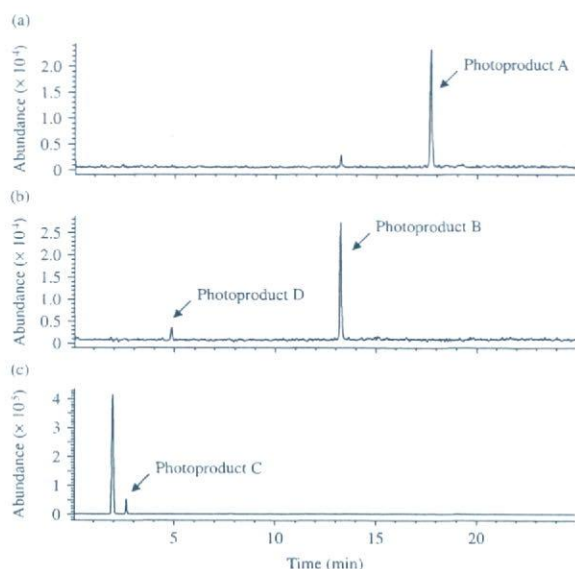


**Figure 2** | Behaviour of MPP in water.

experiments. Following irradiation, MPP itself disappeared rapidly, and four main photoproducts were confirmed on the chromatogram (Figure 3). Some photoproducts of MPP have already been reported (Chukwudebe *et al.* 1989; Minelli *et al.* 1996; Huang & Mabury 2000; Hirahara *et al.* 2003; Torrisi & Sortino 2004). Two products among them were found in purified water. One identified product was MPP-sulfoxide, according to mass spectral information. It was directly produced by the oxidative reaction of MPP. The other product, detected at a 17.6 minute retention time, showed the formation  $M + H^+ = 279$ . It was presumed to be *O*, *O*-Dimethyl *S*-[3-methyl-4-(methylthio)phenyl]phosphorothioate by the fragment ions of the mass spectrum (Figure 4). It was formed by the isomerization of thiono-thiolo (e. g.  $RO-P = S \rightarrow RS-P = O$ ) (Lacorte & Barceló 1994; Torrisi & Sortino 2004; Zamy *et al.* 2004). It involves the lowest excited singlet state of the pesticide and a  $\sigma$  cation as the key intermediate in the photodecomposition of MPP (Torrisi & Sortino 2004). Both products were detected at their highest concentration at 1 minute (Figure 5). These products were also confirmed by light irradiation using a chemical lamp (6 W, maximum wavelength 352 nm). Some minor peaks were present. However, we were not able to elucidate their structure from mass fragment information. The area values of these peaks were small compared with that of the main peak.

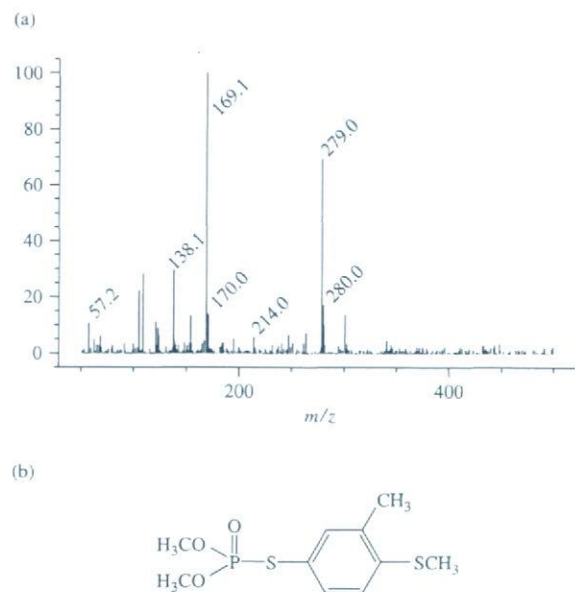
Although the strength of the UV wavelength range of sunlight is usually weak, the solar spectral intensity is typically



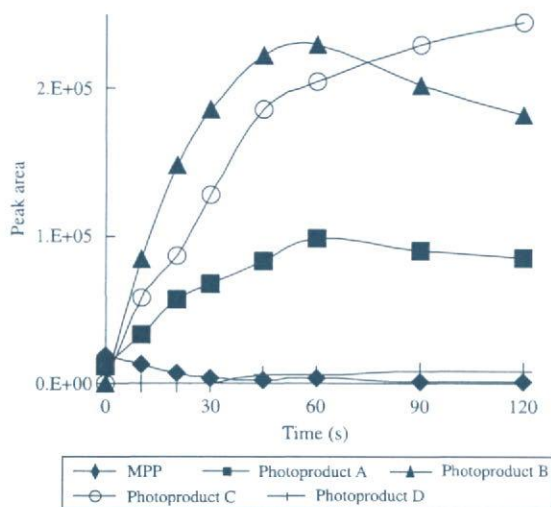


**Figure 3** | Chromatograms of MPP and its products irradiated for 120 s. (a)  $m/z$ : 279, positive mode, (b)  $m/z$ : 295, positive mode, (c)  $m/z$ : 141, negative mode.

sufficient to break down chemical bonds of the molecule. There is a report that MPP degrades much faster under sunlight conditions than in darkness (Lartiges & Garrigues 1995). Therefore, there is concern that these compounds are formed in the environment.



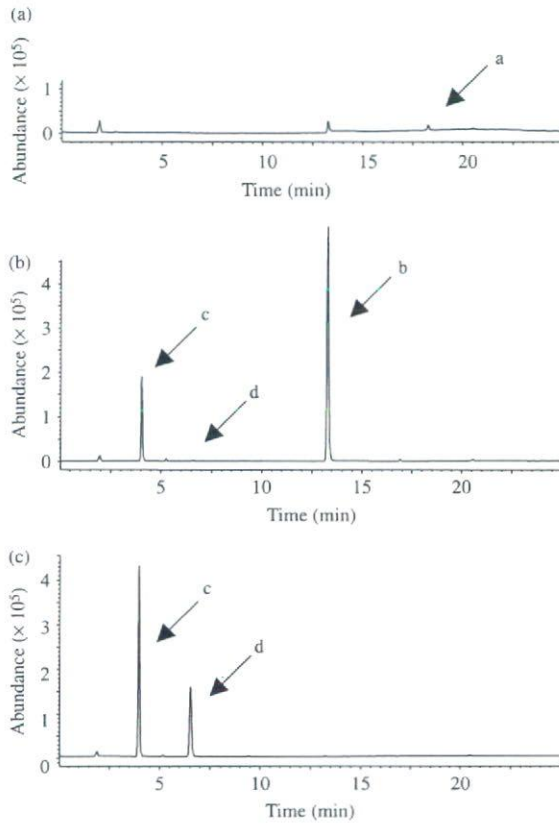
**Figure 4** | Photoproduct A. (a) MS spectrum, (b) chemical structure.



**Figure 5** | Time-dependent behaviour of MPP and its products treated by light irradiation.

#### MPP behaviour under conditions of chlorination

MPP standard solution was added to purified water to a final concentration of  $0.001 \text{ mg l}^{-1}$ . A 500 ml sample of the solution was taken as the original water sample, reaction time at 0 h, after stirring at room temperature for 5 minutes. A sodium hypochlorite solution was added so that the concentration of free chlorine was  $1 \text{ mg l}^{-1}$ . The solution pH was about 6.0 after addition of MPP to purified water and changed to about 8.0 when the chlorine was added. However, it was resulted to get to 6.0 with the reaction time. In water containing chlorine, MPP was undetectable within 5 minutes after contact with chlorine. MPP-sulfoxide and MPP-sulfone were detectable immediately, and increased in parallel with the decrease of MPP. The concentration of these products peaked at 5 and 15 minutes, respectively. Each compound was then gradually converted to its oxon form (Figure 6). The rates of conversion from MPP-sulfoxide and MPP-sulfone to their oxon forms were slow in comparison with the rate of conversion from MPP to MPP-sulfoxide and MPP-sulfone. In this experiment, MPP-oxon was undetectable. As a result of chlorination in the long exposure experiment of 1, 2, 4, 6, 24, 48, 72 and 96 hours, MPP-oxon-sulfoxide almost disappeared by 48 hours. MPP-oxon-sulfone concentration peaked at 24 hours and maintained the same concentration level until 48 hours. The concentration of free chlorine was  $0.79 \text{ mg l}^{-1}$  after 48 hours.



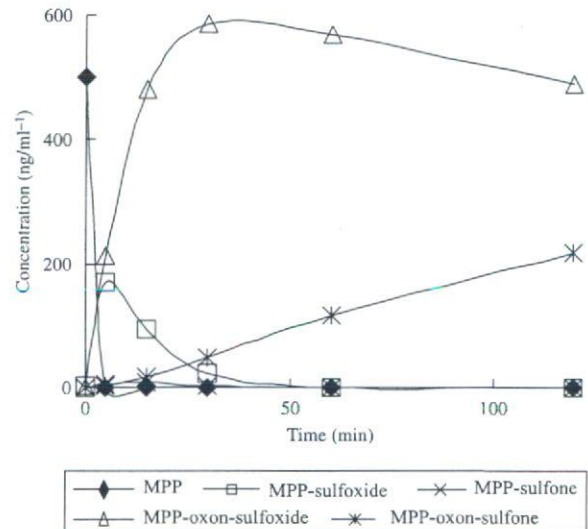
**Figure 6** | Chromatograms of MPP and its products after chlorination. (a) 0 min, (b) 5 min, (c) 120 min. a: MPP, b: MPP-sulfoxide, c: MPP-oxon-sulfoxide, d: MPP-oxon-sulfone.

The concentration of MPP and detected products in the short exposure experiment was calculated using the standard curve determined by the value of peak areas obtained by SPE (Figure 7). The results indicate that under chlorination conditions, MPP changed to related compounds and converted primarily into MPP-oxon-sulfone after 48 hours.

If MPP exists in sources of drinking water, and is not eliminated sufficiently at water purification plants, it will come into contact with chlorine. MPP is rapidly oxidized to MPP-sulfoxide and MPP-sulfone, and their oxons may persist in drinking water.

#### ChE inhibition activity

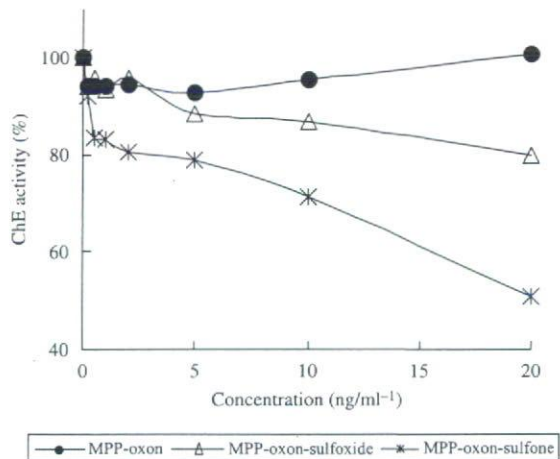
It is known that ChE, a key neuroregulatory enzyme, is targeted and inhibited by organophosphorus pesticides and



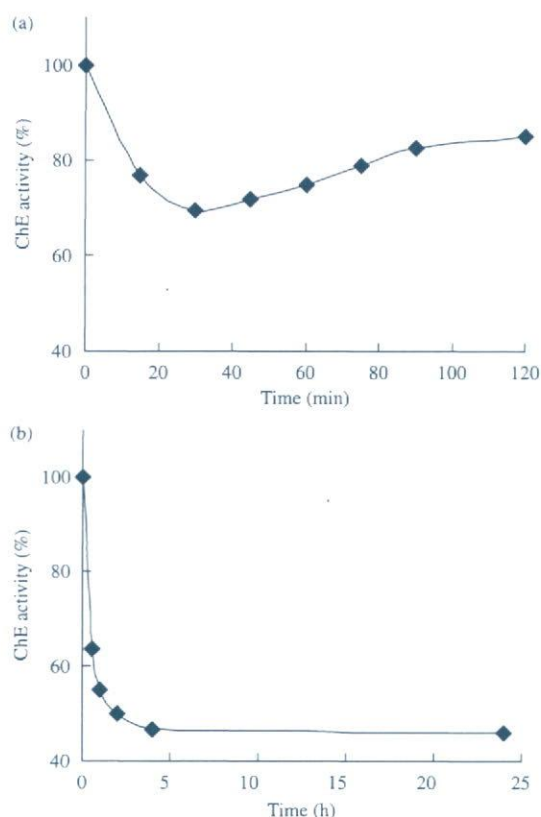
**Figure 7** | Time-dependent behaviour of MPP and its products after chlorination.

their active metabolites, causing acute toxicity (Rodnitzky 1975; Soliman *et al.* 1982; Nagymajtényi *et al.* 1988). In this study, ChE inhibition activity was examined by a previously established *in vitro* method that uses MTTC as an indicator of ChE activity, in order to evaluate the effect of MPP and related compounds on organisms.

MPP, MPP-sulfoxide and MPP-sulfone showed weak inhibitory activity. However, the oxon forms showed a high inhibitory effect at ng levels. The inhibition by oxons



**Figure 8** | Comparison of ChE inhibitory activities. The concentration at the beginning of the reaction was defined as 100%.



**Figure 9** | Effect of reaction products mixture on ChE activity. (a) light irradiation, (b) chlorination. The activity at the non-treated MPP solution was defined as 100%.

strengthened with the degree of oxidation, in the following order: MPP-oxon, MPP-oxon-sulfoxide and MPP-oxon-sulfone (Figure 8). Concentrations of chlorpyrifos oxon, diazinon oxon, EPN oxon and fenitrothion oxon causing 20% inhibition were, respectively, 1.1, 8.9, 140 and 330 ng ml<sup>-1</sup> (Tahara *et al.* 2005); and concentrations for MPP-oxon-sulfoxide and MPP-oxon-sulfone were 5.4 and 0.32 ng ml<sup>-1</sup>, respectively. The inhibitory activities of MPP-oxon-sulfoxide and MPP-oxon-sulfone are high compared with other oxons of organophosphorus pesticides. Therefore, the potential for adverse effects of MPP is high, because MPP is changed to MPP-oxon-sulfoxide and MPP-oxon-sulfone.

We also studied the ChE inhibition activity of MPP solutions irradiated by UV or treated with chlorine. The treated solutions may contain mixtures of MPP and its reaction products. The results in solutions from both treatments showed

strong ChE inhibitory activity in comparison with the non-treated MPP solutions (Figure 9). Photodegradation reactions may result in the formation of products with a high acute toxicity. The next step would be to isolate photodegradation products and elucidate their toxicity.

## CONCLUSIONS

The present work has shown that MPP converts easily to the oxidized compounds, MPP-sulfoxide, MPP-sulfone and their oxons by photo-irradiation and by treatment with chlorine in water. In an aquatic environment, MPP may be changed by passing through different physical, chemical and biological processes. It is important to control MPP and its reaction products, in order to protect human health and the ecosystem, because these compounds have adverse effects on organisms.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Grants-in-Aid from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan (H16-Kenko-Ippan-066).

## REFERENCES

- Chukwudebe, A., March, R. B., Othman, M. & Fukuto, T. R. 1989 Formation of trialkyl phosphorothioate esters from organophosphorus insecticides after exposure to either ultraviolet light or sunlight. *J. Agric. Food Chem.* **37**, 539–545.
- Hirahara, Y., Ueno, H. & Nakamuro, K. 2003 Aqueous photodegradation of fenthion by ultraviolet B irradiation: contribution of singlet oxygen in photodegradation and photochemical hydrolysis. *Water Res.* **37**, 468–476.
- Hong, F. & Pehkonen, S. 1998 Hydrolysis of phorate using simulated environmental conditions: rates, mechanisms, and product analysis. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1192–1199.
- Huang, J. & Mabury, S. A. 2000 The role of carbonate radical in limiting the persistence of sulphur containing chemicals in sunlit natural waters. *Chemosphere* **41**, 1775–1782.
- Jokanović, M. 2001 Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology* **166**, 139–160.
- Karahasanoglu, A. M. & Özand, P. T. 1967 Rapid test for serum cholinesterase. *J. Lab. Clin. Med.* **70**, 343–351.
- Lacorte, S. & Barceló, D. 1994 Rapid degradation of fenitrothion in estuarine waters. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 1159–1163.
- Lartiges, S. B. & Garrigues, P. P. 1995 Degradation kinetics of organophosphorus and organonitrogen pesticides in different



- waters under various environmental conditions. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 1246–1254.
- Minelli, E. V., Cabras, P., Angioni, A., Garau, V. L., Melis, M., Pirisi, F. M., Cabitza, F. & Cubeddu, M. 1996 Persistence and metabolism of fenthion in orange fruit. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 936–939.
- Nagafuchi, O., Inoue, T. & Ebise, S. 1994 Runoff pattern of pesticides from paddy fields in the catchment area of Rikimaru Reservoir, Japan. *Water Sci. Technol.* **30**, 137–144.
- Nagymajtényi, L., Dési, I. & Lorencz, R. 1988 Neurophysiological markers as early signs of organophosphate neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.* **10**, 429–434.
- Rodnitzky, R. L. 1975 Occupational exposure to organophosphate pesticides: a neurobehavioral study. *Arch. Environ. Health* **30**, 98–105.
- Soliman, S. A., Sovocool, G. W., Curley, A., Ahmed, N. S., El-Fiki, S. & El-Sebae, A. K. 1982 Two acute human poisoning cases resulting from exposure to diazinon transformation products in Egypt. *Arch. Environ. Health* **37**, 207–212.
- Tahara, M., Kubota, R., Nakazawa, H., Tokunaga, H. & Nishimura, T. 2005 Use of cholinesterase activity as an indicator for the effects of combinations of organophosphorus pesticides in water from environmental sources. *Water Res.* **39**, 5112–5118.
- Torrise, S. & Sortino, S. 2004 New insights into the photoreactivity of the organophosphorus pesticide fenthion: a  $\sigma$  aryl cation as a key intermediate in the photodecomposition. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5943–5949.
- Tsuda, T., Kojima, M., Harada, H., Nakajima, A. & Aoki, S. 1997 Acute toxicity, accumulation and excretion of isoprothiolane and its degradation products in killifish. *Water Res.* **31**, 323–327.
- Tsuda, T., Kojima, M., Harada, H., Nakajima, A. & Aoki, S. 1998 Pesticides and their oxidation products in water and fish from rivers flowing into lake Biwa. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**, 151–158.
- Wang, T. C., Lenahan, R. A. & Tucker, J. W. Jr 1987 Deposition and persistence of aerially-applied fenthion in a Florida estuary. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **38**, 226–231.
- Zamy, C., Mazellier, P. & Legube, B. 2004 Phototransformation of selected organophosphorus pesticides in dilute aqueous solutions. *Water Res.* **38**, 2305–2314.

First received 27 April 2007; accepted in revised form 25 July 2007



## (8-21)モデルシミュレーションによる除草剤プレチラクロールの河川中濃度に関する感度解析

○谷 幸二(北海道大学)                      土田 佳幸(北海道大学)  
 成田健太郎(日本上下水道設計)        大野 浩一(北海道大学)  
 松下 拓(北海道大学)                      松井 佳彦(北海道大学)

### 1. はじめに

河川水中での農薬濃度や流域内での農薬の挙動を把握する一つ的手段として、解析モデルは重要なツールとなる。本研究室では過去に解析モデルによって河川中の農薬濃度の推定と評価を行ってきた<sup>1)2)</sup>。解析モデルを用いて農薬の挙動を解析するには農薬の物性値や水文学データ、土地に関するデータ等のさまざまなデータが必要となる。それらのデータが結果に与える影響を評価する事により農薬の挙動を把握する上で役に立つ情報を得られると考えられる。よって本研究では、解析モデルを用いて農薬の挙動を推定し、入力データの変化による計算結果への影響を評価するために感度解析を行った。

### 2. 対象流域と解析モデル

対象流域は、岩手県雫石町を含む葛根田川流域とした。この流域では農家一軒一軒の農作業データ等、詳細な情報の提供を受けることができた。観測地点より上流の対象流域面積は約191km<sup>2</sup>である。流出解析モデルは農薬原体の移動モデルとその輸送媒体である水分の移動モデルによって構成されている。水と農薬原体の空間的分布を表現するため流域を1km×1kmメッシュに分割し、各メッシュに水田や河川などの特性の異なる13種類のコンパートメントを配置したコンパートメント型流出モデルを適用した。

### 3. 農薬原体

対象とする農薬原体は、対象河川において比較的高濃度で頻度よく観測されていた除草剤のプレチラクロールとした。流域内においてプレチラクロールは5月中旬から下旬にかけて水田に散布される。モデルシミュレーションに用いたプレチラクロールの物性値は文献<sup>3)4)</sup>に記載された数値を用いた(表1)。

表1. プレチラクロールの物性値

	プレチラクロール
土壌中分解係数	$2.3 \times 10^{-2}$ [1/day]
水中分解係数	$3.5 \times 10^{-3}$ [1/day]
土壌有機炭素吸着定数	628 [L/kg]
水溶解度	50 [mg/L]

### 4. 結果と考察

#### (1) 農薬動態予測

解析モデルによって算出された観測地点におけるプレチラクロール濃度の時間変化を図1に示す。計算により得られた初期の流出におけるピークの時期が観測値と若干ずれた形となっているが、ピークの濃度は近い値となった。低減期に関しては計算結果が観測値に近い値をとっている結果となった。

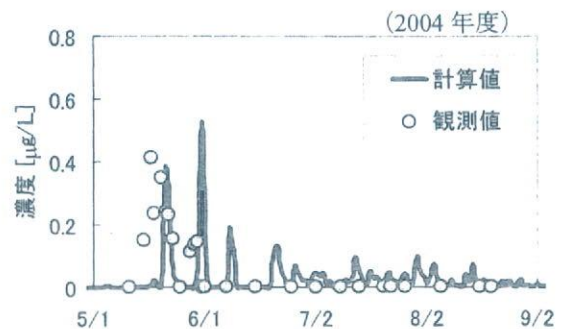


図1. プレチラクロールの濃度観測値と計算値

流域内で散布されたプレチラクロールの計算による物質収支を図2に示す。流域内に散布されたプレチラクロールの流域外への流出は9.9%に留まり、散布されたプレチラクロールの88.8%が土壌中で分解される結果となった。また水中で分解される量、流域内に残留する量は共に1%に満たなかった。



(2)感度解析による入力パラメータの評価

変化させるパラメータは散布量、土壌中分解係数、水中分解係数とした。予測値の平均濃度（以下予測値とする）は、解析モデルにより一日毎に算出されたプレチラクロールの濃度の5月から8月における平均値とした。

散布量の変化による予測値への影響を図3に示す。散布量に比例して平均濃度が高くなる結果となった。

次に、土壌中分解係数の変化による予測値への影響を図4に示す。土壌中分解係数の倍率が、0.05倍から3倍の間で、分解係数の増大と共に平均濃度が大きく下がる結果となった。土壌中分解係数を0.1倍にすると2003年では元の予測値（土壌中分解係数の倍率が1倍の予測値）の約3倍、2004年では約2.5倍となり、土壌中分解係数を10倍にすると2003年では元の予測値の約1/5、2004年では約1/2となった。プレチラクロールは土壌中分解係数の変化に比較的大きく影響される事を表す結果となった。

最後に、水中分解係数の変化による予測値への影響を図5に示す。水中分解係数を3倍以上にすると、分解係数の増大に伴い平均濃度が下がる結果となった。

5. おわりに

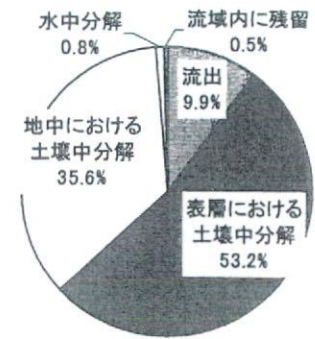
解析モデルを用いて時系列の農薬濃度を算出し観測濃度と比較した結果、プレチラクロールの河川中濃度は比較的高精度で推定できる事が示された。流域内に散布されたプレチラクロールの9割は土壌中において分解され流出は1割であった。水中におけるプレチラクロールの分解量は全体の1%に満たないと推定された。

プレチラクロールの感度解析の結果、散布量に比例して平均濃度が上がる事が示された。また、土壌中分解係数の変化による影響を大きく受け、水中分解係数による影響はあまり受けにくいことが示された。

流域内における農薬の挙動は農薬毎に異なり、特に農薬の物性値や散布時期、水文学的要素によって変化することが考えられる。そのため、今後他の農薬についても評価していく必要がある。

参考文献

- (1)成田健太郎ら, 第56回全国水道研究発表会講演集, 694-695, 2005.
- (2)土田佳幸ら, 第57回全国水道研究発表会講演集, 564-565, 2006.
- (3)金沢純, 農薬の環境特性と毒性データ集, 合同出版, 1996.
- (4)Tomlin, C., The Pesticides Manual, 13<sup>th</sup> ed., British Crop Protection Council, Hampshire, UK, 2003



2004年度：総散布量 67.1kg  
図2. プレチラクロールの物質収支

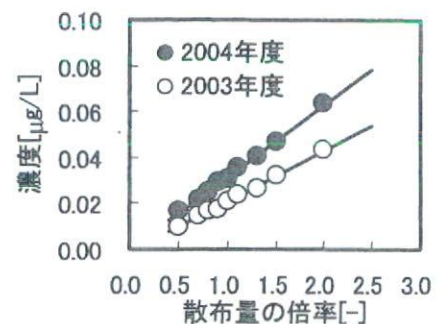


図3. 農薬散布量の変化による予測値への影響

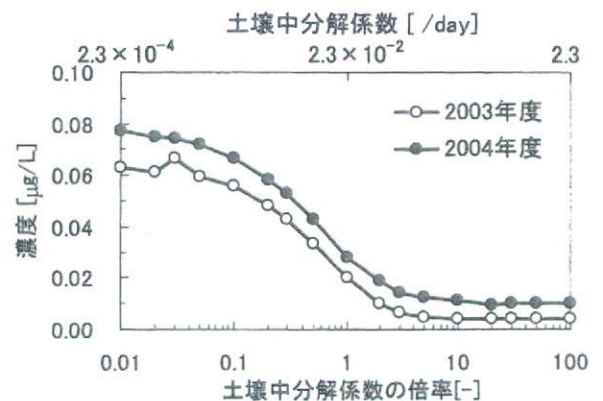


図4. 土壌中分解係数の変化による予測値への影響

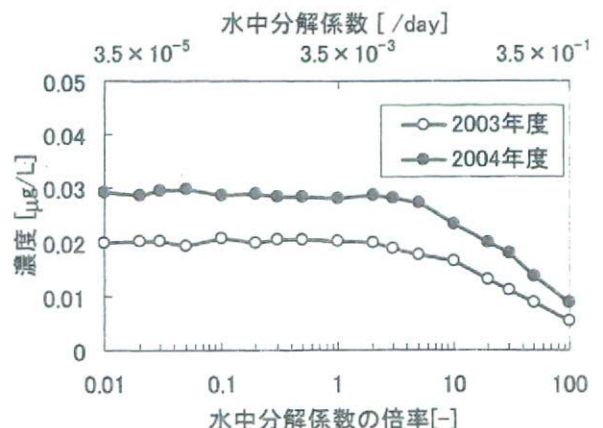


図5. 水中分解係数の変化による予測値への影響



(8-22)使用実態を反映した農薬監視への試み

○相澤 貴子(横浜市水道局) 鎌田 素之(関東学院大学)  
池貝 隆宏(神奈川県環境科学センター) 松井 佳彦(北海道大学大学院)

1. はじめに

平成 15 年の水道に関する「水質基準の省令」改正により、農薬類は水質管理設定項目に位置づけられ、各水道事業者が農薬使用の地域特性、トレンド、時期等の情報を精査し、測定農薬を選定してきた。我々は水道事業者が監視農薬を選定するためのスクリーニング的な手法とし、監視農薬プライオリティーリストを示すとともに、農薬出荷量、毒性、物性情報などを提供し、これらの情報に事業者の独自の情報も加え、農薬実態調査を行ってきた。表 1 に H18 年度に 12 水道事業者の協力を得て実施した農薬実態調査の概要を示す。

表1 H18 年度全国農薬実態調査の概要

原水	測定数	検出数	検出率	最大濃度	該当農薬名	最大個別農薬評価値	該当農薬名
第一群	102	68	8.5	4.10	プロモブチド	0.5200	モリネート
第二群	7	2	2.9	0.02	イミダクロプリド	0.0017	シハロホップブチル
第三群	9	5	5.4	0.06	ピリミノバックメチル	0.0100	MCPA
酸化物	16	4	3.3	0.53	MPPスルホキシド	0.5300	MPPスルホキシド
その他	2	2	6.6	0.37	オキサジクロメホン	0.0000	該当なし
すべて	136	81	8.0	4.10	プロモブチド	0.5300	MPPスルホキシド
浄水	測定数	検出数	検出率	最大濃度	該当農薬名	最大個別農薬評価値	該当農薬名
第一群	102	38	2.0	2.00	グリホサート	0.0375	プロモブチド
第二群	7	1	0.3	0.01	イミダクロプリド	0.0001	イミダクロプリド
第三群	9	2	0.6	0.02	MCPA	0.0040	MCPA
酸化物	16	4	1.0	0.12	プロモブチドデプロモ	0.0200	MEPオキソン
その他	2	2	4.9	0.05	XMC	0.0000	該当なし
すべて	136	47	1.9	2.00	グリホサート	0.0375	プロモブチド

結果から測定農薬と検出実態は必ずしも一致しておらず、この要因の一つとして農薬使用量に関する情報不足が挙げられる。これまで監視農薬プライオリティーリストでは農薬使用量に関しては農薬要覧<sup>1)</sup>から得た都道府県単位の農薬出荷量情報を用いていた。しかし、正確な予測を行う上で農薬使用量に関する情報は使用実態をできる限り反映していることが望ましい。そこで、本研究では詳細な農薬使用情報を流域単位で得ることを目的に 3 次メッシュ単位での情報の取得と汎用性の高い表計算ソフト Excel (Microsoft 社製) 用いた集計、解析を行った。また、得られた情報を効率的に活用するため簡易 GIS による表示についても検討を行った。

2. 農薬使用量算出に関する検討

**流域単位での土地利用情報に関する検討:** これまで都道府県単位での情報を流域単位で検討するため国土数値情報として提供されている<sup>2)</sup>土地利用情報と流域・非集水域情報を使用した。流域・非集水域情報は 3 次メッシュ単位ではないことから得られる情報が実際の河川名を反映しておらず不完全なものである。そこで今回は PRTR データ活用環境リスク評価支援ツール<sup>3)</sup>の情報も活用することで、3 次メッシュ単位で流域単位での土地利用情報をデジタルデータ化した。土地利用情報は 32 種の作物区分に対応している。得られた 3 次メッシュ単位の情報を Excel のセルとリンクさせ、情報に応じた書式を設定することで、簡易 GIS として視覚的な表示を試みた。

**流域単位での土地利用情報に関する検討:** 農薬原体使用量を算出は以下の手順で行っ



た。対象となる都道府県を選定し、これらの地域における作物区分別作付面積を算出した。各農薬製剤は 32 種の作物区分に対応するように散布回数、散布液量、希釈倍率を調査し、これらの情報に基づき単位面積あたりの農薬製剤ごとの作物区分別散布量を作成した。さらに、農薬要覧<sup>1)</sup>から得た都道府県・農薬製剤別出荷量情報と農薬製剤別農薬原体含有率情報を用いることで対象地域における作物区分別農薬原体使用情報を算出した。この情報と 2.1 で得た 3 次メッシュ単位で流域ごとの土地利用情報を併せることで流域ごとの農薬原体使用量を算出した。

### 3. 結果とまとめ

流域単位の把握に関して神奈川県、山梨県、静岡県を対象として検討を行った。得られた情報は簡易 GIS により流域区分ごとに表した(水域ブロック図)。一例を図 1 に示す。また、これらの情報に 2006 農薬年度における農薬出荷量情報を反映し、流域単位で年間使用量を集計した結果の一例を表 2 に示す。

本研究で用いた情報は農薬に関する情報を除いてすべてインターネット上で一般向けに公開されているデータを活用した。これらの汎用性の高い情報を、Excel を用いた簡易 GIS により、これまでの GIS における操作の煩雑さを解消でき、農薬やそれに付随する土地利用情報を簡便に表現することが可能となった。

また、流域単位での年間農薬使用量について検討を行ったところ、流域により上位にランクされた農薬原体の種類に大きな違いは認められなかったが、今回の対象とした流域で上位ランクされた農薬は測定法上の関係から十分にモニタリングできていない農薬が含まれており、農薬実態との検討を行う必要がある。

表 2 酒匂川、相模川、鶴見川における年間農薬使用量の算出結果

酒匂川		相模川		鶴見川	
農薬原体名	使用量(t/年)	農薬原体名	使用量(t/年)	農薬原体名	使用量(t/年)
D-D	17.7	D-D	93.2	D-D	28.8
ダゾメット	3.1	ダゾメット	20.3	ダゾメット	6.3
マンネブ	1.1	マンゼブ	6.3	マンゼブ	2.2
マンゼブ	1.1	アセフェート	4.2	アセフェート	1.7
ダイアジノン	1.0	DMTP	4.1	DMTP	1.5
DMTP	0.7	MEP	3.9	MEP	1.3
MEP	0.7	マンネブ	3.3	マンネブ	0.9
カルタップ	0.5	TPN	2.4	TPN	0.8
ジラム	0.5	ダイアジノン	2.0	DDVP	0.8
TPN	0.5	DDVP	1.9	ジラム	0.7

本研究は厚生労働科学研究費補助金「飲料水の水質リスク管理に関する統合的研究」(主任研究者:松井佳彦)における農薬分科会の成果によるものである。協力を頂いた水道事業体に謝意を表す。

### 参考文献

- 1) 農林水産省消費・安全局他(2006) 農薬要覧 2006, 日本植物防疫協会, pp.209-397
- 2) 国土数値情報ダウンロードサービス <http://nlftp.mlit.go.jp/ksj/>
- 3) 環境省, (社)環境情報科学センター(2007)PRTR データ活用環境リスク評価支援ツール

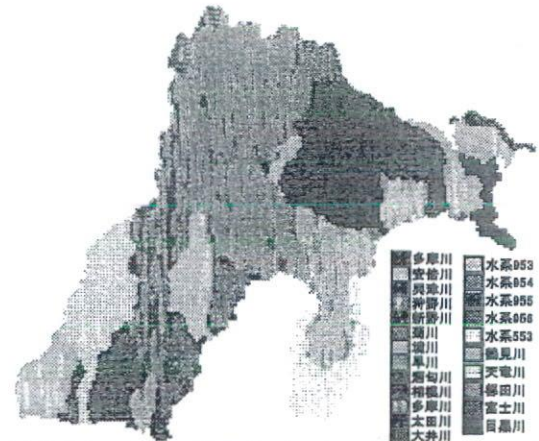


図 1 神奈川・山梨・静岡における水域ブロック図



## (8-47)塩素反応試料における挙動解析と生理作用への影響評価の重要性

○田原麻衣子(国立医薬品食品衛生研究所) 田中 美穂(東京医薬専門学校)  
久保田領志(国立医薬品食品衛生研究所) 中澤 裕之(星薬科大学)  
徳永 裕司(国立医薬品食品衛生研究所) 西村 哲治(国立医薬品食品衛生研究所)

### 1. はじめに

チオノ型有機リン系農薬は、環境中や生体内でオキソン体へと変化し、その有害影響は、原体に比べて強くなる傾向があることが知られている。水質管理目標設定項目 102 農薬にあげられているピリダフェンチオンおよび検討対象農薬第 3 候補群にあげられているクロルピリホスメチルはチオノ型有機リン系農薬であるが、浄水工程の塩素処理による挙動や反応生成物の有害影響が十分に把握されていない。そこで、ピリダフェンチオンおよびクロルピリホスメチルについて、塩素曝露における挙動と、急性毒性の発現機序として知られているコリンエステラーゼ(ChE)阻害活性により、反応生成物の生理作用への影響を検討した。

### 2. 実験

分析方法については、ガスクロマトグラフ/質量分析計(GC/MS)および液体クロマトグラフ/質量分析計(LC/MS)での条件の構築を行った。塩素処理は次亜塩素酸ナトリウムを用い、初期遊離塩素濃度 1 ppm で行った。固相抽出により濃縮後、GC/MS を用いて反応生成物を同定および定量した。ChE 活性は、7 mIU の ChE と試料を反応させた後、ヨウ化 5-メチル-2-テノイルチオコリン基質法を用い、405 nm における吸光度を測定した。本手法を用いて、塩素反応生成混合物の ChE 阻害活性を検討した。

### 3. 結果および考察

オキソン体標準品の ChE 活性の測定結果により、チオノ型有機リン系農薬であるクロルピリホス、ダイアジノン、イソキサチオンの浄水工程で生成するオキソン体は、ChE 阻害活性が強いことがわかった。ピリダフェンチオンおよびクロルピリホスメチルはこれら 3 種と同骨格(図 1)を有することより、オキソン体は ChE 阻害が強いと示唆されたため、対象物質とした。

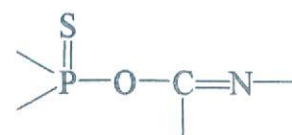


図1 共通構造

GC/MS および LC/MS を用いてそれぞれの分析法を構築した結果、クロルピリホスメチルにおいて、LC/MS ではピークが検出できなかったが、ピリダフェンチオンおよびクロルピリホスメチルの GC/MS に関しては、良好な分析結果が得られた(表 1)。

表1 GC/MSおよびLC/MSによる分析の検討結果

	ピリダフェンチオン		クロルピリホスメチル
	GC/MS	LC/MS	GC/MS
モニターイオン ( $m/z$ )	340	341 (Pos.)	286
検出限界値 ( $\mu\text{g/L}$ )	20	0.1	5
検量線範囲 ( $\mu\text{g/L}$ )	20-500	0.1-10	5-500
相関係数 ( $R^2$ )	0.9989	0.9983	0.9999

塩素処理による経時変化について検討を行ったところ、ピリダフェンチオンおよびクロルピリホスメチルともに原体は速やかに減少し、反応時間に伴って主生成物のピーク面積の増加が認められた。この主生成物はマススペクトルによりオキソン体と推定された。また、塩素反応の反応生成混合物のChE活性を測定した結果、原体と比較して、塩素反応時間に伴ってChE阻害が増強された。

検討後にピリダフェンチオンのオキソン体が市販されたため、標準品を用いて検討した結果、ChE阻害活性は非常に強かった(図2)。このChE 20%阻害濃度を他のオキソン体と比較した結果、強い阻害活性を示したクロルピリホス、ダイアジノン、イソキサチオンの3種と同等の値を示し、オキソン体の中でも強いChE阻害を示す農薬の一つであることが明らかとなった。同一の骨格がChE阻害に大きく影響することが懸念され、クロルピリホスメチルについてもChE阻害の強いオキソン体となることが予測された。標準品が入手できないクロルピリホスメチルについては、高濃度溶液における塩素反応により分取を行った。その結果、反応生成物粗抽出試料において強いChE阻害がみられた。

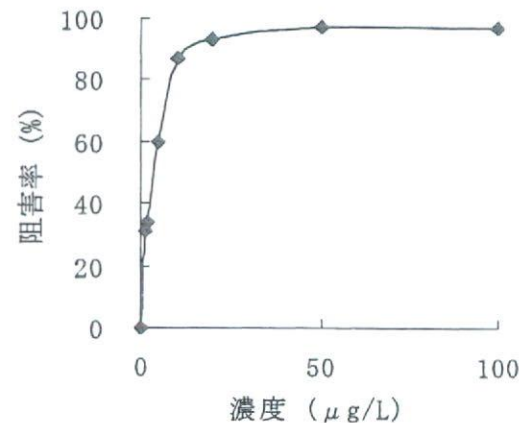


図2 ピリダフェンチオンオキシンのChE阻害活性

#### 4. まとめ

ピリダフェンチオンおよびクロルピリホスメチルについては、良好な分析条件を確立することができた。また、浄水工程における塩素処理によりオキソン体へ変化し、クロルピリホス、ダイアジノン、イソキサチオンと同様に、ChE阻害活性による有害影響が強くなることが明確となった。

塩素処理による挙動や反応生成物の有害影響が十分に把握されていない物質に関しては、分析法を確立し、生理作用に影響を及ぼすことが危惧されるものから優先性を上げて検討を行うことが重要であると示唆された。



[報 文]

## 塩素反応生成物を含めた有機リン系農薬のための 水道水の安全性評価

Safety Assessment of Tap Water for  
Organophosphorus Pesticides Including Products by Chlorination

田原麻衣子\* 久保田領志\* 中澤 裕之\*\*  
徳永 裕司\* 西村 哲治\*

有機リン系農薬は、環境中や浄水工程の間に、より有害影響の強いオキソン体を生成することが懸念される。本研究では、24種について塩素処理を行ない、反応生成物が急性毒性の標的であるコリンエステラーゼ(ChE)に及ぼす影響を評価した。その結果、すべて塩素と速やかに反応し、そのなかで、ChE阻害活性が増強された農薬は反応生成物の有害リスクが高いと考えられ、原体とともに評価する必要性が明らかとなった。また、反応前後のChE阻害活性を比較し、それぞれの農薬の急性毒性に対する評価対象物質が明確となった。さらに、ChE阻害活性と水道水質基準の水質管理設定項目の目標値を用いてリスク評価を行なった。

本研究により、水質管理における有機リン系農薬の浄水工程での挙動把握および有害影響評価の優先順位を明示できた。これらの結果より、使用実態を含めた総括的評価が可能となり、水道水の安全性への迅速な評価および緊急時対応のための有益な情報となると示唆される。

**Key words** : 有機リン系農薬, リスク評価, 水質管理, ChE阻害活性, 目標値, オキソン体

### 1. はじめに

散布や吸着土壌からの流出により水道原水に流入した農薬は、環境中や浄水工程において塩素に

曝露されることにより反応生成物を生じると考えられる<sup>1)2)</sup>。有機リン系農薬のヒトへの主要な急性毒性は、コリンエステラーゼ(ChE)阻害作用として発現されることが知られており<sup>3)</sup>、有機リン

\* Maiko TAHARA, Reiji KUBOTA, Hiroshi TOKUNAGA, Tetsuji NISHIMURA, 国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部 〒158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1, Division of Environmental Chemistry, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501 Japan (E-mail : nishimur@nihs.go.jp)

\*\* Hiroyuki NAKAZAWA, 星薬科大学薬品分析化学教室

系農薬のチオノ型(P=S)は、塩素やオゾンによる酸化反応を受けてオキソン型(P=O)に変化し、結果、ChE阻害作用が増強される<sup>4)5)</sup>。そのため、水道浄水処理でのオキソン体の生成挙動と健康への影響が懸念される。しかし、水道水質基準の水質管理目標設定項目101農薬および検討対象農薬第2候補群、第3候補群のチオノ型有機リン系農薬のうち、標準品としてチオノ型原体およびそのオキソン体の両方が市販されている農薬は10種のみで(平成19年6月現在)、それ以外のオキソン体は市販されていないため、評価は明確に行なわれていない。

そこで、本研究では、オキソン体が市販されていない14種のチオノ型有機リン系農薬において塩素処理を行ない、反応生成物がChE活性に及ぼす影響を、バイオアッセイにより評価した。さらに、オキソン体が入手可能な10種においてChE活性を測定し、ChE阻害と水道水質基準の水質管理目標設定項目に示されている目標値<sup>6)</sup>を用いたリスク評価を行なった。

## 2. 実験

本研究で用いた有機リン系農薬は、イソキサチオン、イソフェンホス、EPN、クロルピリホス、ダイアジノン、トルクロホスメチル、フェントロフオン(MEP)、フェンチオン(MPP)、ブタミホス、プロチオホスの10種原体、およびそのオキソン体、さらに、ピリダフェンチオン、ベンスリド(SAP)、メチダチオン(DMTP)、アニロホス、ジメトエート、マラチオン、フェントエート(PAP)、エチルチオメトン、ピペロホス、シアノホス(CYAP)、クロルピリホスメチル、ピリミトスメチル、ジクロフェンチオン(ECP)、ホキシム<sup>7)</sup>の14種原体とした。MPPに関しては、類縁化合物であるMPPスルホキシド、MPPスルホン、およびそれらのオキソン体の計6種で検討を行なった。

### 2.1 試薬・試料

MPPスルホン、MPPオキソン、MPPオキソンスルホキシド、MPPオキソンスルホンおよびアニロホスはDr. Ehrenstorfer GmbH製、クロルピリホス、トルクロホスメチルおよびモノクロトホ

スはジーエルサイエンス(株)製、クロルピリホスオキソン、ブタミホスオキソンおよびトルクロホスメチルオキソンは林純薬工業(株)製を用いた。その他の有機リン系農薬の原体およびオキソン体は、和光純薬工業(株)製の残留農薬試験用を使用した。以下の溶媒はすべて和光純薬工業(株)製とし、アセトン5000は残留農薬・PCB試験用を、次亜塩素酸ナトリウムは食品添加物を、アスコルビン酸ナトリウムは特級、ジメチルスルホキシド(DMSO)は生化学用を用いた。精製水は、日本ミリポア(株)製Elix純水装置システムより得た水を使用した。

### 2.2 塩素反応試料の作製

塩素反応は、農薬1 mg/l水溶液に、遊離塩素の初期濃度が1 mg/lとなるよう次亜塩素酸ナトリウムを添加し、20℃の恒温槽中で5、10、20、30、60、120分まで反応させた。反応後、その塩素反応液にアスコルビン酸ナトリウムを添加して塩素を除去し、活性化した固相カートリッジ Oasis HLB Plus(Waters社製)に流速10 ml/minで通水した。カートリッジを通気脱水後、吸着成分をジクロロメタンで抽出し、窒素ガス気流下で乾固直前まで濃縮を行なった。試料はDMSO 1 mlに溶解した。

### 2.3 ChE活性を用いた生体影響評価

生体影響は、急性毒性の指標であるChE活性を指標として評価した。

測定は、われわれが確立した*in vitro*手法を用いた<sup>7)</sup>。以下に概略を記述する。ChEと基質とするヨウ化5-メチル-2-テノイルチオコリンを反応させると、チオコリンを遊離し、チオコリンが発色液とする5,5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)と反応して黄色を呈するため、波長405 nmにおける吸光度を測定する。この方法は簡便で、短時間に測定できる*in vitro*手法である。このChEに、農薬原体または塩素反応液から固相カラムを用いて抽出・濃縮した試料を曝露する。その後、ChE活性阻害物質を含まないブランクにおけるChE活性を100%とした相対%で、原体、塩素反応生成物単体または混合体の活性阻害強度を比較し、評価した。ヒト血漿由来のコリンエステラーゼ、基質液であるヨウ化5-メチル-2-テノイルチオコリン、および発色液である5,5-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)



は和光純薬工業(株)製を使用した。プレードーは、アマシヤム バイオサイエンス(株)ヘルスケアバイオサイエンス(株)製Ultrospec Plate Reader IIを用いた。

### 果および考察

#### 農薬原体のChE活性

究で対象とする、14種のチオノ型原体におけるChE活性を検討した。8種においてはChE阻害をほとんど示さなかったが、その他6種はチオノ型(P=S)の構造においてもChE阻害を示し、ピリダフェンチオンおよびPAP 5/1の反応液濃度で約50%の最大阻害が認められた(図1)。ピペロホス、アニロホス、ホキおよびクロルピリホスメチルの4種は、1/1の反応液濃度でほぼ完全にChEの活性を示した。

ChE活性を指標とした塩素反応生成物の評価

反応後、固相カートリッジおよび濃縮した試料に塩素反応生成混合物におけるChE阻害活性を検討し、塩素と反応させていない農薬の1/1水溶液を同様に抽出・濃縮して得られた試料を測定したChE活性を、塩素反応時間0分として図2に示した。

結果、ピリダフェンチオン、ピリミホスメチル、クロルピリホスメチルおよびホキシムでは、塩素反応に伴う活性の阻害増強がみられた。一方の結果は、塩素反応生成物に対しては、原体のChE活性があり、反応により阻害がさらに増強したピリダフェンチオン、クロルピリホスメチルおよびホキシムについて塩素反応生成物両者の把握

が必要であることが明らかとなった。原体に関してChE阻害活性はみられないが、反応により阻害作用が新たにみられたピリミホスメチルについては、原体よりもむしろ反応生成物の把握に重点を置く必要があると考えられる。また、原体でChE阻害活性がみられ、反応前後でChE阻害活性に大きな変化のなかったアニロホスやPAPは原体および生成物の相加量の把握が必要である。阻害活性がみられず、塩素反応後もChE阻害活性が認められなかった農薬に関しては、ChE活性による急性毒性の評価の優先順位は下位と考えることができる。このように、塩素反応前後のChE阻害活性を比較することにより、急性毒性におけるそれぞれの農薬の評価対象物質の違いが明らかとなった。

### 3.3 目標値およびChE阻害活性を用いたリスク評価

原体とオキソン体のリスク評価は、それぞれの

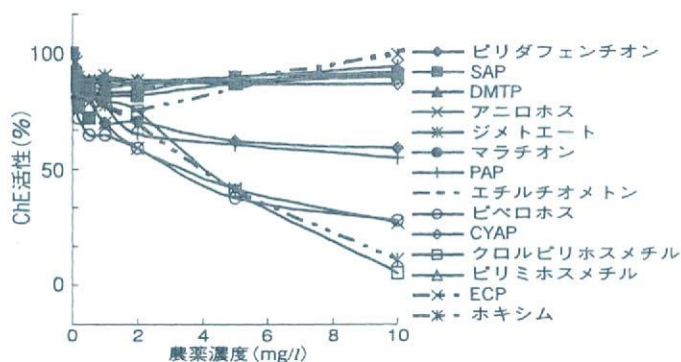


図1 14種チオノ型原体におけるChE活性

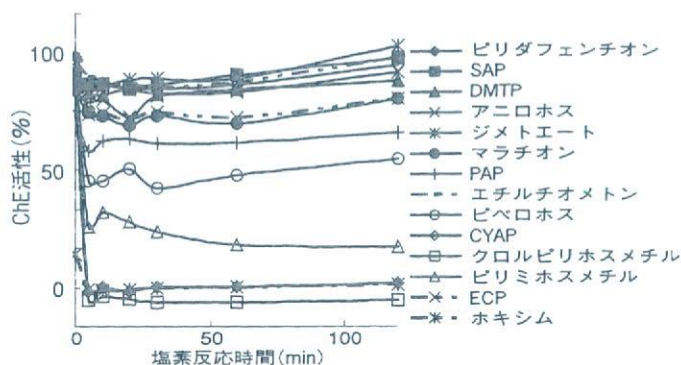


図2 塩素反応に伴うChE活性の変化

気体における目標値とChE活性20%阻害濃度より、以下の有害リスクの算出式により数値化し、両者を比較した。

$$\text{リスク率} = \frac{1/100\text{目標値}^*}{\text{ChE活性20\%阻害濃度}} \dots\dots(1)$$

\*：目標値＝

$$\frac{\text{ADI} \times \text{体重}(50\text{kg}) \times \text{飲料水の寄与率}(10\%)}{1 \text{日に飲用する水の量}(2\text{l})}$$

目標値は、水道水質基準の水質管理目標設定項目の101種農薬(平成19年8月現在)にそれぞれ定められており<sup>6)</sup>、この値と実際の検出濃度との相対比の総和である検出指標値が、浄水で1を超えないことが規定されている<sup>8)</sup>。

$$DI = \sum_i \frac{DV_i}{GV_i}$$

ここに、DIは検出指標値、DV<sub>i</sub>は農薬iの検出値、GV<sub>i</sub>は農薬iの目標値である。

本評価では、測定上の目安とされている目標値の1/100の濃度とChE活性の濃度比によって評価した。ChE活性は、阻害が強い農薬ほど濃度に対する活性変化が大きく、50%阻害濃度では農薬ごとの差が小さいこと、阻害活性の低い農薬は50%阻害濃度が求められないこと、環境水中の実際の農薬存在濃度は低く、検討を行なううえで実態に近い濃度で評価すること、などの観点から、ChE阻害の評価にはChE活性20%阻害濃度を用いた。

#### 3.4 塩素反応前後でのリスクの変化

オキソン体標準品が市販されている10種の農薬について、前述の14種の農薬と同様に生成物反応挙動の評価を行なった。10種は塩素と反応することで、速やかに主生成物としてオキソン体に変化した<sup>9)</sup>。よって、これら10種については、反応前である原体と生成物であるオキソン体の標準品を用いてChE活性を測定し、ChE活性20%阻害濃度をそれぞれ求めた。MPPに関しては、塩素反応により主反応としてMPP→MPPスルホキシド→MPPオキソンスルホンと反応するため<sup>10)</sup>、MPPの反応生成物はMPPオキソンスルホンとして算出した。

検討の結果、表1に示すように、イソフェンホスを除く9種は原体からオキソン体に変化することで有害作用の増大がみられた。リスクは、クロ

表1 塩素反応による反応前後のリスクの比較

農薬	原体の目標値 (mg/l)	原体	オキソン体
クロルピリホス	0.03	0.34	779.22
イソキサチオン	0.008	0.38	175.82
MPP	0.001	0.32	89.29
ダイアジノン	0.005	0.08	16.05
EPN	0.006	-	1.22
トルクロホスメチル	0.2	-	1.12
プロチオホス	0.004	-	0.88
ブタミホス	0.01	0.14	0.27
MEP	0.003	0.03	0.26
イソフェンホス	0.001	0.01	-

ルピリホスが最も高く、原体とオキソン体のリスクを比較すると、オキソン体は原体の約2,300倍の作用があることがわかった。クロルピリホス、イソキサチオン、MPPおよびダイアジノンの4種については、作用が200倍以上ととくに高かった。つまり、浄水中の農薬を原体量のみで評価すると、検出指標値が1を下回っても、有害作用の強い生成物が浄水に存在するおそれがあり、安全性を十分に保証できていないこともあることに注意すべきである。とくに、有機リン系農薬の場合にはオキソン体の評価も考慮しなければいけないことが本研究でも明らかになった。

目標値は、1日許容摂取量(ADI)や飲用する水の寄与を考慮して算出され<sup>7)</sup>、ADIは原体自体の有害影響作用と、体内で酸化されてオキソン体に変化した後発現する有害影響評価を合わせて評価されている。したがって、反応生成物のオキソン体の評価を加えることが重要であることが認識されていたが、これまでその手法が示されていなかった。前述の式(1)で求めた数値により、塩素反応による反応前後、およびそれぞれの物質における水からヒトへの急性有害リスクの相対評価が可能となった。これらの結果より、ChE活性阻害を指標とした塩素反応生成物の有害影響の違いを数値化することで、リスクを明瞭にし比較することができた。

#### 3.5 オキソン体標準品のない有機リン系農薬のリスク評価

3.4で作用の強かった農薬は塩素と速やかに反



応し、塩素反応時間5分でChE阻害活性が100%になった。このことから、3.2で検討したオキソニン体標準品のない有機リン系農薬で同様の挙動を示し、反応生成混合物においてChE阻害活性が増強されたピリダフェンチオン、ピリミホスメチル、クロルピリホスメチルおよびホキシムに関して、反応生成物の有害リスクが高い農薬であると示唆される。ピリダフェンチオンは平成19年2月に失効になり実際の使用がなされていないものの、浄水から検出されるおそれがあり、現在(平成19年8月)も水道水質基準の水質管理目標設定項目の101種農薬に含まれているため、4つのなかでもとくに優先した評価が問われる。ピリミホスメチル、クロルピリホスメチルおよびホキシムに関しては、国内出荷量が少ないため、今後の検討対象農薬リストである第3候補群に分類されているが、優先して使用実態の地域性や検出事例を精査し、検討を行なうことが必要である。

#### 4. まとめ

検討対象の有機リン系農薬のなかで、塩素と速やかに反応し、反応生成混合物においてChE阻害活性が増強された農薬に関しては、浄水工程における反応生成物の有害リスクが高いと考えられ、原体の有害性に加えて、反応生成物の評価が必要であると示唆された。つまり、水質管理において、浄水工程での挙動把握および有害影響評価の優先性が高く、生成物の同定・定量による個々の評価が課題である農薬と考えられる。使用実態に、地域性や季節変動などの考慮すべき要因を有する農薬に対して水道水の安全性を迅速に評価していくには、有害影響の強い農薬について優先的に対応していかなければならない。

本研究において、リスクの数値化により、検討項目およびそれぞれの農薬における測定対象物質を検討する手法を提案し、24種の有機リン系農薬を考察した結果を示した。本研究は、広く使用されている有機リン系農薬について、使用実態を含めて生体有害影響を総合的に評価し、農薬の水質管理における検査項目の優先順位の検討および選定農薬の更新への提案に対する有益な情報を提供

するものである。

#### 謝辞

本研究は、厚生労働科学研究費補助金の援助を受けて行なった。ここに謝意を表する。

#### —参考文献—

- 1) Tsuda, T., Kojima, M., Harada, H., Nakajima, A., Aoki, S.: Pesticides and their oxidation products in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 60(1)151~158(1998).
- 2) Roy, S., Kumar, R., Roy, S., Sharma, C. B.: Biodegradation of fenitrothion in soil, *Biomedical Chromatography*, 10(2)60~64(1996).
- 3) Amitai, G., Moorad, D., Adani, R., Doctor, B. P.: Inhibition of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase by chlorpyrifos-oxon, *Biochemical Pharmacology*, 56(3)293~299(1998).
- 4) 小野寺祐夫, 石倉俊治, 香川容子, 田中恵子: 塩素処理による水中有機物の化学変化(第1報)—P=S型有機リン系農薬からP=O型の生成—, *衛生化学*, 22(4)196~205(1976).
- 5) Jokanović, M.: Biotransformation of organophosphorus compounds, *Toxicology*, 166(3)139~160(2001).
- 6) 水質基準の見直しにおける検討概要, 農薬類の101項目の個別参考情報, 厚生労働省ホームページ(<http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/dl/nouyaku.pdf>).
- 7) Tahara, M., Kubota, R., Nakazawa, H., Tokunaga, H., Nishimura, T.: Use of cholinesterase activity as an indicator for the effects of combinations of organophosphorus pesticides in water from environmental sources, *Water Research*, 39(20)5112~5118(2005).
- 8) 化学物質に係る水質基準, 水質基準の見直し等について(厚生科学審議会生活環境部会水質管理専門委員会報告), 厚生労働省ホームページ(<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2003/04/dl/s0428-4e.pdf>).
- 9) Tahara, M., Kubota, R., Nakazawa, H., Tokunaga, H., Nishimura, T.: Analysis of active oxon forms of nine organophosphorus pesticides in water samples using gas chromatography with mass spectrometric detection, *Journal of Health Science*, 52(3)313~319(2006).
- 10) Tahara, M., Kubota, R., Nakazawa, H., Tokunaga, H., Nishimura, T.: The behaviour and cholinesterase inhibitory activity of fenthion and its products by light and chlorination, *Journal of Water Supply: Research and Technology - AQUA*, 57(3)143~151(2008).

(原稿受付日; 2007年8月18日)

(原稿受理日; 2007年11月19日)





## Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats

Makoto Ema<sup>a,\*</sup>, Sakiko Fujii<sup>b</sup>, Mutsuko Hirata-Koizumi<sup>a</sup>, Mariko Matsumoto<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Division of Risk Assessment, Biological Safety Research Center, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan

<sup>b</sup> Safety Research Institute for Chemical Compounds Co., Ltd., Sapporo 004-0839, Japan

Received 29 August 2007; received in revised form 14 December 2007; accepted 19 December 2007

Available online 28 December 2007

### Abstract

Male and female rats were fed a diet containing flame retardant hexabromocyclododecane (HBCD) at 0, 150, 1500 or 15,000 ppm throughout the study beginning at the onset of a 10-week pre-mating period and continuing through the mating, gestation and lactation periods for two generations. The mean daily intakes of HBCD during the whole period of administration were 10.2, 101 and 1008 mg/kg bw in F0 males, 14.0, 141 and 1363 mg/kg bw in F0 females, 11.4, 115 and 1142 mg/kg bw in F1 males, and 14.3, 138 and 1363 mg/kg bw in F1 females for 150, 1500 and 15,000 ppm, respectively. The incidence of rats with decreased thyroid follicles size was increased in F0 and F1 males and females at 1500 ppm and higher. Serum TSH levels were increased in F0 and F1 females at 1500 ppm and higher, and serum T4 levels were decreased in F0 males and females at 15,000 ppm. The number of the primordial follicles in the ovary of F1 females was reduced at 1500 ppm and higher. There were increases in the absolute and relative weights of the liver in male adults and male and female weanlings at 1500 ppm and higher, and in female adults at 15,000 ppm, and of the thyroid in male and female adults at 15,000 ppm. Decreased body weight and body weight gain associated with reduced food consumption were found in F1 males and females at 15,000 ppm. Decreases were found in the viability index of F2 pups and the body weight of male F1 and F2 pups and female F2 pups at 15,000 ppm. In F2 pups, there were low incidences of the completion of eye opening in males at 15,000 ppm and in females at 1500 ppm and higher, and of completed mid-air righting in females at 15,000 ppm. The data indicate that the NOAEL of HBCD in this study was 150 ppm (10.2 mg/kg bw/day). The estimated human intake of HBCD is well below the NOAEL in the present study.

© 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Hexabromocyclododecane; Brominated flame retardant; Two-generation reproductive toxicity; Developmental toxicity; Rat

### 1. Introduction

Although about 80 different brominated organic flame retardants are registered, tetrabromobisphenol A, the polybrominated diphenyl ethers and hexabromocyclododecane (HBCD) account for most of the total volume [1]. HBCD is a nonaromatic, brominated cyclic alkane used as an additive flame retardant. Total market demand for HBCD in 2001 was estimated as 2800 tons in America, 9500 tons in Europe, 3900 tons in Asia and 500 tons in the rest of the world [2]. The commercial product is a mixture of three stereoisomers, alpha, beta and gamma, which are typically present at approximately 6, 8 and 80%, respectively [3]. Its primary application is in extruded (XPS) and expanded

(EPS) polystyrene foam that is used as thermal insulation in the building industry. HBCD is the only suitable flame retardant for these applications. A secondary, although important, application of HBCD is as a flame retardant for upholstery textiles [3,4]. The partition coefficient (Log Kow) value of 5.6 suggests that this chemical is suspected to have high bioaccumulation potential [4]. HBCD has been used for about 20 years, and is detected in practically all environmental media [5]. HBCD was identified in sediment from several places along the River Viskan in Sweden [6] and the River Cinca in Spain [7]. HBCD was detected in fishes, pike (*Esox lucius*) [6] and barbel (*Barbus graellsii*) [7], indicating that it is bioavailable and bioaccumulates. The bioconcentration factor of this compound is reported to be 18,100 in fathead minnow (*Pimephales promelas*) [8]. HBCD was also detected from common whelk (*Buccinum undatum*), sea star (*Asterias rubens*), hermit crab (*Pagurus bernhardus*), gadoid fish species whiting (*Merlangius merlangus*), cod (*Gadus morhua*),

\* Corresponding author. Tel.: +81 3 3700 9878; fax: +81 3 3700 1408.  
E-mail address: [ema@nihs.go.jp](mailto:ema@nihs.go.jp) (M. Ema).