

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

## 2. 植物代謝試験

### 1) $^{14}\text{C}$ 標識 IPC を用いた大豆における代謝試験

(資料 No.代謝 4)

文献名 : .. 588-592、1976 年

(試験機関 : )

### 供試標識化合物

#### (1) IPC {イソプロピル N-(3-クロロフェニル)カーバメート}

#### (2) $^{14}\text{C}$ 標識 IPC

名 称	構造式 (* 標識部位)	比放射能
標識 IPC		d.p.m/mL ( $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ )

d.p.m : Disintegration per minutes

### 供試植物

大豆

### 実験方法

#### (1) 試料の栽培

##### ① 水耕栽培

大豆の種を、土壌と砂の混合土 (2 : 1) で 2 週間生育させてから、養液中に移した。

大豆が 2~3 葉期になった時、標識 IPC を 1 ppm ( $4.7 \times 10^{-6}$  M) 添加した養液中に移した。標識 IPC の放射活性は、 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$  であり、これは、d.p.m/mL になる。

2 本の大豆を 300 mL の処理液で各々育成させ、同時に非標識処理液でも試験した。

8 日後に、各容器から 1 本の大豆を採り、もう 1 本は 16 日後に採取した。根部を枝部から切り取り、分析まで冷蔵庫で保管した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

② 土壌栽培

大豆の苗木は 4 ft × 4 ft × 9 in. の箱で生育させた。箱には、1 インチの砂利層、4 インチの土壌（シルトローム、有機炭素 2~3%）1 インチの標識 IPC の処理層、1 Lb の大豆種子、そして上層に 1 インチの土壌を置いた。肥料を 50 Lb/エーカーの割合で土壌に混ぜた。処理量は IPC として 2 Lb/エーカーあるいは  $\mu\text{Ci}/\text{ft}^2$  となる。大豆は 24 日目で間引きし、35 日目で枝部を採取した。

(2) 代謝物の予測

Still と Mansager (1971~1973 年) らは、大豆中で下記の  
を報告し PPG Industries (1973 年) も大豆中で  
を確認し更に を予測した。

(3) 代謝物

の標準品の合成  
の合成は下図に従って行った。

(4) 代謝物の抽出方法

全ての抽出方法は、Still と Mansager の Bligh-Dyer 改良法 (1973 年) で実施した。組織抽出の溶媒として、まずメタノール、クロロホルムおよび水の混合比が 2 : 1 : 0.8 のものを用い、その後極性層と非極性層を分離させるために溶媒の混合比率を 2 : 2 : 1.8 に調整した。

水耕栽培の大豆の苗木 (1.2 g) については、混合比がその 50 倍となる様に溶媒を添加し、Virtis のホモジェナイザーを用いて破碎抽出した。非極性層については TLC で展開する前に、また極性層については加水分解の前に、エバポレータを用いて回転濃縮した。

土壌栽培の大豆の苗木について、比較的少量 (50 g) の場合は、混合比がその 3 倍となる様に溶媒を添加し、Tekmar のホモジェナイザーを用いて破碎抽出し、4.6 kg の苗木の場合は、Hobart フードチョッパーを用いて分解した。4.6 kg の苗木抽出物については、メタノールを取り除くためにエバポレータを用いて容量が 415 mL になるまで濃縮した後 2 等分し、それぞれを 20-50 mesh Amberlite XAD-2 樹脂カラム (21 cm×5 cm) に通した。カラムを水で洗浄し、Still と Mansager の手法 (1973 年) に倣ってメタノールで溶出した。メタノール溶出物は凍結乾燥によりメタノールを除去し、水に再溶解させた。

(5) 代謝物の分析方法

① 水耕栽培

抽出物中の代謝物の分離には 2 次元 TLC (シリカゲル F<sub>254</sub>) を用いた。第 1 次展開液には 60/40 の n-ヘキサン/アセトン溶液を、第 2 次展開液には 90/9/1 のクロロホルム/アセトン/酢酸を各々用いた。

HPLC は、DuPont 830 型 UV 検出器付 (254 nm) を用いた。また、GC は HP-7620AEC D 付 (³H) を用いた。

なお、TLC の R<sub>f</sub> 値は次表のようになった。

化合物	ヘキサン/アセトン (60/40) 展開液	クロロホルム/アセトン/酢酸 (90/9/1) 展開液

② 土壌栽培

抽出物からクロロホルムで抽出された CI-IPC [A] は、シリカゲルカラムで  
と分離し、CI-IPC [A] は加水分解して分析した。CI-IPC [A] を含む試料はこの  
方法で測定し、トータル IPC (CI-IPC [A]+ ) を求め、代謝物  
は、別の方法で求めた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

## 結果

### (1) 水耕栽培

① 標識 IPC の溶液に浸けた根部の 16 日後の分析結果は、以下の通りであった。

抽出物	<sup>14</sup> C 分布割合	化合物
無極性部分	10%	(TLC 処理後) Cl-IPC [A]
極性部分	79%	(HCl 加水分解後) クロロホルム抽出、クロロホルム層へ <sup>14</sup> C の 84% TLC 処理
不溶性部分	11%	—

### (2) 土壌栽培

① IPC 処理土壌中で生育させた大豆では、トータル IPC 残留量 (Cl-IPC [A]+ ) は 0.54 ppm であった。この内 Cl-IPC [A] は 0.03 ppm であったので、IPC 残留量の 94% は枝部で に代謝されたと思われる。

② 土壌栽培大豆の 4.6 kg からの抽出物中の標識化合物の分布は以下の通りであった。

抽出物	<sup>14</sup> C 分布割合	化合物
無極性部分	21%	—
極性部分	50.5%	(アルカリ加水分解後) 水蒸気蒸留、ヘキサン層に の GC 分析
不溶性部分	28.5%	—

③ 抽出物のアセチル化誘導体を HPLC 分析した結果、 が合計 、 その他不純物が 16% であった。

## まとめ

水耕栽培による大豆の分析結果から、同定された代謝物のわずかが の酸化で、残り は の水酸化であった。これを、土壌栽培の場合と比較すると、同定された代謝物の が が酸化された であった。従って、 は水耕栽培でも土壌栽培でも各々検出されるが、土壌栽培の方が

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

はるかに が代謝物の大部分を占めていたことになる。  
いくつかの水耕栽培の研究では は 以下であったが、今回の研究では土  
壌栽培の大豆中で は主要代謝物であった。  
IPC の大豆における想定代謝経路を図 1 に示す。

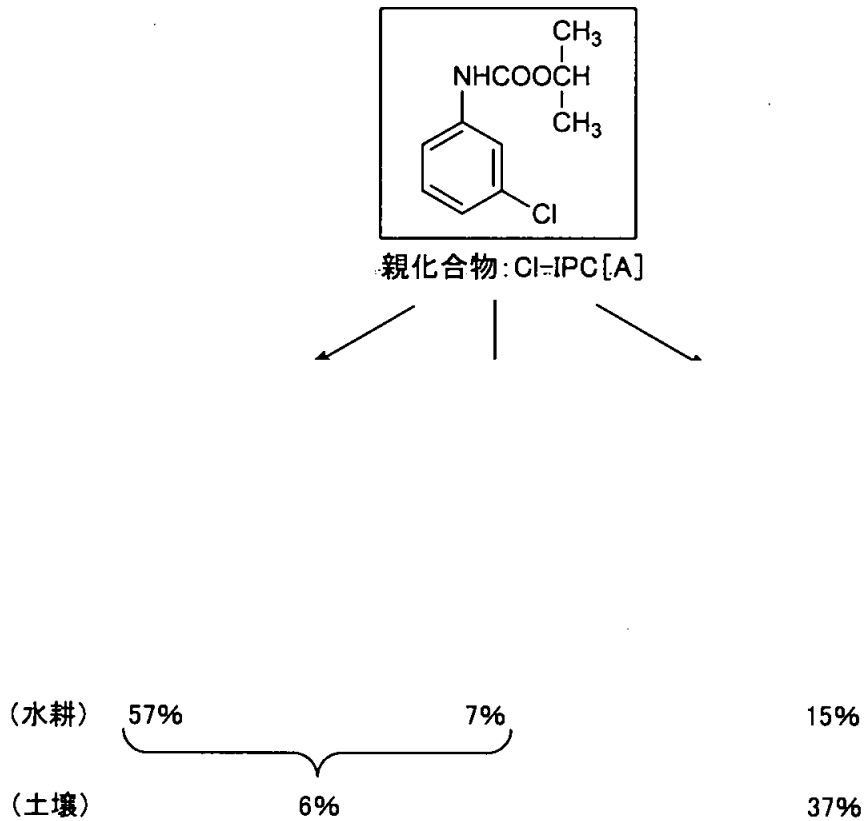


図 1 IPC の大豆における想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

2) [<sup>14</sup>C]IPC の春コムギを用いた植物代謝試験

(資料 No.代謝 5)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2006 年

供試標識化合物：

標識 IPC

\*： 標識位置

化学名： イソプロピル N-(3-クロロフェニル)カーバメート

ロット番号： CFQ14300

放射化学的純度： > % (TLC、2005 年 4 月の測定値)

比放射能： MBq/mg

供試植物：春コムギ (品種 Taifun、代表的食糧用コムギ)

試験方法：

春コムギの栽培及び放射能標識体の処理；同位体希釈した放射能標識体を、有効成分を含まない乳剤の基材に添加して、さらに水を加えて、処理用原液を調製した。処理前にこの溶液の放射化学的純度を HPLC 及び TLC で測定した。最終処理量は常用量処理区で 21.67 mg/0.33 m<sup>2</sup>、倍量処理区で 43.66mg/0.33 m<sup>2</sup>であった。処理は、播種後 37 日、BBCH 発育段階 14 の時点でドリフトを避けるようにシールドして、常用量処理区及び倍量処理区に均一に散布した。

試験植物は 100 × 114 × 50 cm の容器に深さ 45 cm まで土壌を満たし、2005 年 3 月 16 日に畝幅 10 cm 間隔で播種を行った。放射能標識体を処理する前に試験区を透明なプラスチックのシールドで 3 分割し、左右それぞれ 0.33 m<sup>2</sup>を試験区、中央を無処理対照区とした。栽培期間中は気温、地温及び降水量を自動記録するとともに、植物の成長を促すために、必要に応じて灌水した。また、うどん粉病を防除するために、栽培期間中 2 回 (2005 年 5 月 13 日及び 6 月 10 日) にわたって pyraclostrobin / epoxiconazol 混合剤を散布した。肥料は播種時に土壌に処理し、2005 年 5 月 2 日及び 6 月 8 日に窒素肥料の追肥を行った。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

試料採取及び分析；放射能標識体処理後 45 日（2005 年 6 月 6 日）に、根を除く未成熟植物体、100～200 g を採取した。また、深さ 30 cm までの土壌も採取した。これらは冷凍庫に保管したが、分析には供しなかった。

放射能標識体処理後 102 日（2005 年 8 月 3 日）、成熟した植物体を収穫し、風乾した後、藁と種子を分けて、以下に示す工程で放射能の画分および分析を行った。

		種子 50g/藁 20g																		
		5分間溶液*に浸漬 ホモジネート 30分間攪とう抽出	Blight-Dyer抽出溶液 (メタノール:クロロホルム: 水=2:1:0.8 v/v/v)																	
		非揮性抽出物 (抽出物 1a)	揮性抽出物 (抽出物 1b)																	
		濃縮&クロロホルム除去	濃縮																	
		メタノールで希釈	水で希釈	6M HCl, 65℃, 1時間処理																
		濃縮	遠心分離	クロロホルム抽出																
		均一にするためメタノール添加																		
			上層	濃縮	TLC															
		LSC & HPLC	LSC	移動相に再溶解																
				カラム溶出液分取																
				LSC																

図 1 試料中放射能抽出フロー

得られた各画分の放射エネルギーは LSC 法により測定し、植物試料中総放射エネルギーは燃焼法/LSC 法で測定した。また、抽出画分中放射エネルギーの HPLC 分析は、全般に放射エネルギーが低かったため、抽出物 1a 及び 1b のカラム溶出液の分取した画分（20 秒間隔）の再構成 HPLC クロマトグラムでピークの同定を行った。

TLC 分析も試みたが、放射エネルギーはほとんど原点に留まり、評価することはできなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

試験結果：

放射能分布；成熟期に収穫した種子及び藁中放射エネルギー及びその分布を下表に示す。

分析対象試料		種子		藁	
処理量 (kg/ha)		0.687	1.374	0.687	1.374
有機溶媒画分 (抽出物 1a)		14.4 (0.0018)	3.3 (0.0011)	7.1 (0.0125)	6.7 (0.0212)
水溶性画分 (抽出物 1b)		9.6 (0.0012)	10.2 (0.0033)	9.8 (0.0171)	12.8 (0.0405)
クロロホルム分配	水溶性画分	NA	7.5 (0.0024)	3.7 (0.0065)	4.9 (0.0154)
	有機溶媒画分	NA	0.9 (0.0003)	2.5 (0.0043)	3.2 (0.0102)
水抽出物 (抽出物 2)		0.0 (0.0000)	1.7 (0.0006)	5.3 (0.0093)	5.8 (0.0184)
0.1 M HCl 抽出物 (抽出物 3)		2.2 (0.0003)	1.7 (0.0006)	1.4 (0.0025)	1.7 (0.0054)
0.1 M NaOH 抽出物 (抽出物 4)		3.0 (0.0004)	3.5 (0.0011)	12.1 (0.0212)	9.8 (0.0311)
アセトン抽出物 (抽出物 5)		0.0 (0.0000)	0.0 (0.0000)	3.3 (0.0057)	2.6 (0.0084)
抽出残渣		70.8 (0.0089)	79.6 (0.0260)	61.0 (0.1071)	60.5 (0.1913)
合計		100.0 (0.0126)	100.0 (0.0326)	100.0 (0.1757)	100.0 (0.3162)
酸アルカリ加水分解					
6 M HCl		34.3 (0.0043)	46.1 (0.0150)	3.1 (0.0054)	3.5 (0.0112)
酢酸エチル分配	水溶性画分	34.2 (0.0043)	42.0 (0.0137)	NA	NA
	有機溶媒画分	<7.6 (<0.0010)	<2.9 (<0.0009)	NA	NA
6 M NaOH		27.6 (0.0035)	27.1 (0.0088)	22.2 (0.0390)	19.9 (0.0629)
酢酸エチル分配	水溶性画分	19.8 (0.0025)	15.2 (0.0049)	13.9 (0.0244)	11.4 (0.0360)
	有機溶媒画分	<5.6 (<0.0007)	<2.1 (<0.0007)	<1.0 (<0.0017)	0.8 (0.0026)
抽出残渣		9.0 (0.0011)	6.4 (0.0021)	35.7 (0.0628)	37.1 (0.1172)

上段：TRR%、下段：mg eq/kg

常用量処理区において、種子中総残留放射エネルギー (TRR) は極めて低かった (0.0126 mg/kg)。この残留放射エネルギーの 24% (0.003 mg/kg) が Bligh-Dyer 抽出液中に回収され、5.2% (0.0007 mg/kg) が他の抽出液中および 70.8% (0.089 mg/kg) が抽出残渣中から回収された。Bligh-Dyer 抽出液を分配した結果、有機溶媒画分中に 14.4%TRR および水溶性画分中に 9.6%TRR が分布した。抽出残渣中に大量の放射エネルギー (70.8%TRR)



が含まれていたため、酸および塩基抽出を行った。酸処理により 34.3%TRR (0.0043 mg/kg) が回収され、塩基抽出により 27.6%TRR (0.0035 mg/kg) が回収されて、9.0% TRR (0.0011 mg/kg) が抽出されないままに残った。酸および塩基抽出液を酢酸エチルと分配した結果、放射能の大部分が水溶性画分中に留まり、従って、遊離された放射能は極性物質であると特徴付けされた。

倍量処理区の種子中 TRR は、常用量処理区の種子より多く、0.0326 mg/kg であった。この残留放射能のうち、13.5%TRR (0.0044 mg/kg) が Bligh-Dyer 抽出液中に回収され、6.9%TRR (0.0023 mg/kg) が他の抽出液中および 79.6%TRR (0.0260 mg/kg) が抽出残渣中に回収された。Bligh-Dyer 抽出液を分配した結果、有機溶媒画分中に 3.3%TRR および水溶性画分中に 10.2%TRR が分布した。水溶性画分中放射能量が TRR の 10%以上であったことから、クロロホルム分配を行い、遊離された放射能の極性を確認した。その結果、放射能の大部分 (7.5%TRR) が水溶性画分中に存在し、0.9%TRR が有機溶媒画分中に存在していた。抽出残渣の酸処理により 46.1%TRR (0.0150 mg/kg) が回収され、塩基抽出により 27.1%TRR (0.0088 mg/kg) が回収されて、6.4%TRR (0.0021 mg/kg) が抽出されないまま残った。これらの酸/塩基抽出液のいずれからも、酢酸エチル分配で回収された放射能は極めて少量であり、酸性水溶性画分中には 42.0%TRR (0.0137 mg/kg) および塩基性水溶性画分中には 15.2%TRR (0.0049 mg/kg) が依然として留まっていた。従って、これらの画分に含まれていた放射能は主として極性物質であると特徴付けられた。

常用量処理区の藁中総放射能残留量は 0.1757 mg/kg であった。このうち、16.9%TRR (0.0296 mg/kg) が Bligh-Dyer 抽出液中に回収され、22.1%TRR (0.0387 mg/kg) が他の抽出液中に、61.0%TRR (0.1071 mg/kg) が抽出残渣中から回収された。Bligh-Dyer 抽出液を分配した結果、有機溶媒画分中に 7.1%TRR および水溶性画分中に 9.8%TRR が分布した。Bligh-Dyer 抽出物の水溶性画分をクロロホルム分配により、遊離された放射能が極性 (3.7%TRR) および非極性 (2.5%TRR) に特徴付けされた。抽出残渣中には 61.0%TRR が含まれており、酸および塩基加水分解処理を行った。酸処理により 3.1%TRR (0.0054 mg/kg) が回収され、塩基処理により 22.2%TRR (0.0390 mg/kg) が回収されて、35.7%TRR (0.0628 mg/kg) が抽出されないままに残った。塩基抽出物を酢酸エチル分配した結果、放射能の大部分が水溶性画分中に留まり、従って、遊離された放射能が極性物質であると特徴付けされた。

倍量処理区の藁中総放射能量は 0.3162 mg/kg であった。この残留放射能のうち、19.5%TRR (0.0617 mg/kg) が Bligh-Dyer 抽出液中に回収され、19.9%TRR (0.0633 mg/kg) が他の抽出液中に、60.5%TRR (0.1913 mg/kg) が抽出残渣中から回収された。Bligh-Dyer 抽出液を分配した結果、有機溶媒画分中に 6.7%TRR および水溶性画分中に 12.8%TRR が分布した。Bligh-Dyer 抽出物の水溶性画分をクロロホルム分配した結果、遊離された放射能が極性 (4.9%TRR) および非極性 (3.2%TRR) に特徴付けされた。抽出残渣に 60.5%TRR が含まれていたため、酸および塩基加水分解処理を行った。酸処理により 3.5%TRR (0.0112 mg/kg) が回収され、塩基処理により 19.9%

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

TRR (0.0629 mg/kg) が回収されて、37.1%TRR (0.1172 mg/kg) が抽出されないままに残った。塩基抽出液を酢酸エチル分配した結果、放射能の大部分が水溶性画分中に留まり、極性物質であると特徴付けされた。

抽出放射能の HPLC 分析：種子及び藁から抽出された放射能の HPLC 分析結果を下表に示す。

分析試料		種 子		藁	
処理量 (kg/ha)		0.687	1.374	0.687	1.374
代 謝 物					
	その他の合計				

上段：TRR%、下段：mg ep/kg

種子のメタノール：クロロホルム：水抽出された有機溶媒画分及び水溶性画分について、HPLC により分析した。その結果、主として Cl-IPC [A] (0.8%TRR) および幾つかの  
並びに既知代謝物

が含まれていた。これらの個別濃度は、

TRR 以下であった。藁のメタノール：クロロホルム：水抽出液中には、種子より多くの代謝物が含まれていた。検討した常用量処理区の抽出液中では、Cl-IPC [A] および  
が TRR および TRR 含まれていた。その他の既知代謝物は

であり、 TRR 以下であった。残りの放

射能には、最多で4種類の  
が、それ

ぞれは TRR 以下であった。しかし、これらの成分の濃度はいずれも 0.01 mg/kg には達していなかった。倍量処理区試料のプロファイルは、常用量処理区のプロファイルと類似しており、HPLC により同じ代謝物および  
が存在してい

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

ることが確認された。HPLC に基づく、代謝物の個別の残留量は TRR 以下、かつ 0.01 mg/kg 以下であった。

IPC の春コムギにおける想定代謝経路を図 1 に示す。IPC は春コムギにおいて、ベンゼン環およびイソプロピル基の水酸化を受けて代謝されると考えられた。

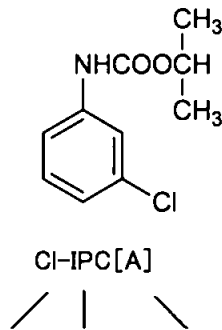


図 1 IPC の春コムギにおける想定代謝経路 \*

\* 申請者注：同定された代謝物をもとに、申請者が代謝経路図を作成した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

3) [<sup>14</sup>C]IPC のタマネギを用いた植物代謝試験

(資料 No.代謝 6)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2006 年

供試標識化合物：

標識 IPC

\*： 標識位置

学名： イソプロピル N-(3-クロロフェニル)カーバメート

ロット番号： CFQ14300

放射化学的純度： > % (TLC)

比放射能： MBq/mg

供試植物：タマネギ *Allium cepa* L. (品種 Forum F1)

試験方法：

試験植物の栽培及び放射能標識体の処理；放射能標識体及び非標識 IPC を、乳剤の基材に添加して、さらに水を加えて、処理液を調製した。各処理液の濃度及び比放射能を下表に示す。

処理区	[ <sup>14</sup> C]IPC 保存液 (μL)	非標識 IPC (mg)	乳剤基材 (μL)	水 (mL)	LSC 分析値 (mg/mL)	比放射能 (MBq/mg)
1 倍量	600	12.748	55	18.15	0.668	4.621
2 倍量	1200	25.006	110	18.1	1.340	4.675

3 個のプラスチック容器 (面積 0.17 m<sup>2</sup>、容積約 35 L) に John Innes No. 3 配合土壌 (砂壤土、pH 6.7、有機物 12.2%) を入れ、約 10 cm 離して 3 個の種子を蒔いた (2005 年 4 月 13 日)。播種した容器は閉鎖された野外に設置した。気温及び降水量を毎日記録し、必要に応じて灌水した。

薬剤処理は 2005 年 5 月 24 日、収穫 97 日前に実施した。3 個の試験植物栽培容器を対照、1 倍量、2 倍量処理区に割り当て、1 倍量及び 2 倍量処理区にハンドスプレーヤ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

一を用いて薬剤処理を行った。処理液の処理液量と処理被験物質量から算出した実際の処理量は1倍量区が1.319 kg/ha、2倍量区が2.611 kg/haであった。

試料採取及び分析；放射能標識体処理後97日に、各試験区の成熟した植物体をタマネギと葉に分けて収穫した。また、同時に土壌も採取したが、分析は行わなかった。植物試料は収穫時にアセトニトリルで表面を洗浄後、以下の工程で処理し、放射能成分の特徴付けを行った。

各植物試料は、ブレンダーを用いドライアイス中で均質化して粉末状とし、試料を冷凍保存してドライアイスが揮散して凍結した粉末状試料が残るようにし、抽出に供試した。各ホモジネートの部分試料を、メタノール：クロロホルム：水（2：1：0.8、v/v/v）、水、0.1 M 塩酸、0.1 M 水酸化ナトリウムおよびアセトンで順次抽出した。

#### タマネギ—抽出操作

プールしたメタノール：クロロホルム：水抽出液（抽出液2）を分液ロートに採取し、追加のクロロホルムおよび水を添加して、メタノール：クロロホルム：水の割合を2：1：0.8から2：2：1.8（v/v/v）に変更した。次いで、有機相および水相を別の容器に移し、一部2連を採取してLSCに供試した。次いで、2倍量処理区について水相をロータリーエバポレーターを用いて濃縮乾固した。抽出液を水に再溶解し、遠心して透明にした後に定量およびクロマトグラフィー分析に供試した。2倍量処理区の有機溶媒相は、ロータリーエバポレーターを用いて濃縮した。メタノールを加え、ロータリーエバポレーターを用いてさらに試料を濃縮した。濃縮した抽出液をメタノールに再溶解し、遠心して透明にした後に定量した。定量後、抽出液を遠心して上澄液を別の容器に採取した。次いで、残渣をメタノールで洗浄した。遠心後、残渣洗浄液の上澄液および元の抽出液の上澄液を合わせた後、定量およびクロマトグラフィー分析に供試した。次いで、残渣をクロロホルムに溶解し、LSCに供試した。0.1 M 水酸化ナトリウム抽出液（抽出液5）は分液ロートに移して、等量の酢酸エチルで2回分配した。得られた水溶性および有機溶媒相は、LSCにより定量した。定量後、有機溶媒相をロータリーエバポレーターで濃縮した。アセトニトリルを加え、抽出液をロータリーエバポレーターでさらに濃縮した。濃縮した抽出液をアセトニトリルに再溶解し、遠心して透明にした後に定量した。

#### 葉部—抽出操作

プールしたメタノール：クロロホルム：水抽出液（抽出液2）試料にクロロホルムおよび水を添加し、放置して有機溶媒相および水相に分離させた。2相を分離し、タマネギについて記載したようにLSCにより定量した。抽出残渣の2回目の洗浄を有機溶媒抽出液（抽出液2c）について実施したことを除いては、2倍量処理区の水相および有機溶媒相についてはタマネギについて記載したように操作した。2倍量処理区の0.1 M 水酸化ナトリウム抽出液（抽出液5）は分液ロートに移して、等量の酢酸エチ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

ルで2回分配した。得られた水溶性および有機溶媒画分は、LSCにより定量した。定量後、有機溶媒相をロータリーエバポレーターで濃縮した。アセトニトリルを加え、抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮した抽出液をアセトニトリルに再溶解し、遠心して透明にした後に定量した。

#### タマネギおよび葉部—抽出残渣の還流抽出

上記の抽出操作で抽出されなかった抽出残渣は、6 M 塩酸で約2時間還流した。冷却後、試料を減圧ろ過し、さらに6 M 塩酸で洗浄した。次いで、抽出残渣を6 M 水酸化ナトリウム溶液で2時間還流抽出した。冷却後、試料を減圧ろ過し、さらに6 M 水酸化ナトリウム溶液で洗浄した。抽出後の残渣は風乾した後、粉碎して燃焼により定量した。6 M 塩酸および6 M 水酸化ナトリウムで抽出された試料は、酢酸エチルで分配して極性および非極性放射性物質に分けた。得られた水溶性および有機溶媒相はLSCにより定量した。定量後、6 M 塩酸の有機溶媒相（タマネギ）および6 M 水酸化ナトリウムの有機溶媒相（葉部）をロータリーエバポレーターで濃縮した。アセトニトリルを加え、抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮した。濃縮した抽出液をアセトニトリルに再溶解し、遠心して透明にした後に定量した。

#### タマネギおよび葉部—酸加水分解

2倍量処理区の濃縮したメタノール：クロロホルム：水抽出された水相（抽出液7）は、酸加水分解に供試した。各抽出液を濃塩酸と混合し、約65℃で約1時間加熱した。冷却後、試料をクロロホルムで抽出し、遠心分離した。抽出された放射能および水相中に残っている放射能をLSCにより測定した。窒素気流下で有機溶媒抽出液からクロロホルムを留去し、試料をアセトニトリルに再溶解してクロマトグラフィー分析に供試した。水相は約65℃で一夜インキュベーションした後、クロロホルムで分配した。得られた有機溶媒相および水相についてLSCにより定量した。定量後、有機溶媒相を窒素気流下で濃縮乾固した。アセトニトリルを加え、バイアルを超音波処理して混合した。次いで、抽出液を濃縮乾固した後、アセトニトリルに再溶解した。

濃縮したアセトニトリル表面洗浄液（抽出液1b）、最終のメタノール：クロロホルム：水抽出液（抽出液2dおよび2e、2倍量処理区のみ）および酸加水分解前後の抽出液（抽出液7、7cおよび8c）について、HPLCおよびTLCにより分析した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

試験結果：

放射能分布；成熟期に収穫したタマネギ及び葉中放射能量及びその分布を下表に示す。

分析対象試料 試験区	タマネギ			葉			
	1倍量処理 (1.3kg/ha)	2倍量処理 (2.7kg/ha)	対 照	1倍量処理 (1.3kg/ha)	2倍量処理 (2.7kg/ha)	対 照	
表面洗浄液 (抽出物 1)	2.6 (<0.001)	8.4 (0.009)	3.3 (<0.001)	0.8 (<0.001)	0.7 (0.007)	ND	
メタノール：クロロホルム：水抽出物 (抽出物 2)	64.3 (0.009)	57.3 (0.060)	ND	60.3 (0.019)	33.0 (0.331)	74.5 (0.004)	
有機溶媒画分 (抽出物 2a、2d、2e)	4.2 (0.001)	10.3 (0.011)	.	7.1 (0.002)	6.8 (0.068)	.	
水溶性画分 (抽出物 2b、7)	60.1 (0.008)	47.0 (0.049)	.	53.2 (0.017)	26.2 (0.263)	.	
水抽出物 (抽出物 3)	ND	1.4 (0.001)	ND	1.3 (<0.001)	3.8 (0.038)	ND	
0.1 M HCl 抽出物 (抽出物 4)	1.0 (<0.001)	1.1 (0.001)	ND	ND	1.4 (0.014)	ND	
0.1 M NaOH 抽出物 (抽出物 5)	5.2 (0.001)	6.6 (0.007)	ND	3.1 (0.001)	6.3 (0.063)	ND	
水溶性画分 (抽出物 5a)	.	6.0 (0.006)	.	.	5.6 (0.056)	.	
有機溶媒画分 (抽出物 5b)	.	0.6 (0.001)	.	.	0.7 (0.007)	.	
アセトン抽出物 (抽出物 6)	ND	0.9 (0.001)	ND	ND	1.3 (0.013)	ND	
抽出残渣	26.9 (0.004)	24.3 (0.026)	96.7 (<0.001)	34.5 (0.011)	53.5 (0.536)	25.5 (0.001)	
酸アルカリ加水分解							
6 M HCl 還流抽出	水溶性画分 (抽出物 9a)	12.9 (0.002)	8.8 (0.009)	.	10.2 (0.003)	9.9 (0.100)	.
	有機溶媒画分 (抽出物 9b)	ND	1.1 (0.001)	.	ND	1.2 (0.012)	.
6 M NaOH 還流抽出	水溶性画分 (抽出物 10a)	8.9 (0.001)	6.5 (0.007)	.	6.5 (0.002)	11.7 (0.118)	.
	有機溶媒画分 (抽出物 10b)	ND	ND	.	ND	0.6 (0.006)	.

上段：TRR%、下段：mg eq/kg

1倍量処理区のタマネギ中 TRR は極めて低かった (0.014 mg/kg)。この残留放射能のうち、3%が洗浄液中に回収され、64%がメタノール：クロロホルム：水抽出液中に、6%が他の抽出液中に回収され、27%が抽出残渣から回収された。メタノール：クロロホルム：水抽出液を分配した結果、有機溶媒相に 4%TRR および水相に 60% TRR が分布した。酸還流抽出により 13%TRR が回収され、塩基還流抽出により 9% TRR が回収されて、5%TRR が抽出されないままに残った。酸および塩基での還流抽出液を酢酸エチルで分配した結果、全て放射能が水相中に留まった。従って、遊離された放射能は極性物質であると特徴付けされた。

2倍量処理区のタマネギ中 TRR は、1倍量処理区のタマネギよりも多く、0.105 mg/kg であった。この残留放射能のうち、8%が洗浄液中に回収され、57%がメタノール：クロロホルム：水抽出液中に、7%が0.1 M アルカリ抽出液中に、3%が他の抽出液中に回収された。残りの抽出残渣中には、24%TRR が含まれていた。メタノール：クロロホルム：水抽出液を分配した結果、有機溶媒相に10%TRR、水相に47%TRR が分布した。抽出残渣の酸還流抽出により、10%TRR が回収され、塩基還流抽出により7%TRR が回収されて、8%TRR が抽出されないままに残った。

0.1 M アルカリおよび酸並びに塩基還流抽出液中放射能を酢酸エチルで分配して、遊離された代謝物が極性または非極性であるか検討した。これらの抽出液のいずれからも、酢酸エチル中に分配された放射能は極めて少量（1%TRR 以下、0.001 mg/kg 以下）であった。従って、これらの放射能は、主として極性であると特徴付けされた。対照のタマネギには痕跡程度の放射能（ $< 0.001$  mg/kg）が含まれているに過ぎず、その大部分（97%）は抽出されなかった。

抽出および分配の結果から、放射能の分布は1倍量処理区と2倍量処理区のタマネギ間で類似していることが判明した。1倍量処理区のタマネギ中 TRR が例外的に低いために、分析が殆ど困難であったことから、分析は2倍量処理区のタマネギについて実施した。1倍量処理区と2倍量処理区のタマネギ間で放射能分布が類似していたということは、代謝経路も類似していることを示している。

1倍量処理区の葉中 TRR は極めて低かった（0.031 mg/kg）。この残留放射能のうち、1%が洗浄液中に回収され、60%がメタノール：クロロホルム：水抽出液中に、4%が他の抽出液中に、35%が抽出残渣中から回収された。メタノール：クロロホルム：水抽出液を分配した結果、有機溶媒相に7%TRR および水相に53%TRR が分布した。抽出残渣の酸還流抽出により10%TRR が遊離され、塩基還流抽出により7%TRR が遊離され、18%TRR が抽出されないまま残った。酸および塩基還流抽出液を酢酸エチルと分配した結果、全ての放射能が水相中に留まった。従って、遊離された放射能は、極性の性質を有していると特徴付けされた。

2倍量処理区の葉中の TRR は、1倍量処理区の葉中における TRR よりも多く、1.00 mg/kg であった。この残留放射能のうち、 $< 1\%$ が洗浄液中に回収され、33%がメタノール：クロロホルム：水抽出液中に、6%が0.1 M アルカリ抽出液中に、7%が他の抽出液中に回収された。残りの抽出残渣中には、54%TRR が含まれていた。メタノール：クロロホルム：水抽出液を分配した結果、有機溶媒相中に7%TRR および水相中に26%TRR が分布した。抽出残渣の酸還流抽出により11%TRR が回収され、塩基還流抽出により12%TRR が回収されて、30%TRR が抽出されないままに残った。0.1 M アルカリおよび酸並びに塩基還流抽出液中放射能を酢酸エチル分配して、遊離された代謝物が極性または非極性であるか検討した。これらの抽出液のいずれからも、酢酸エチル中に分配された放射能は極めて少量（1%TRR 以下、0.01 mg/kg 以下）であった。従って、これらに含まれていた放射能は主として極性であると特徴付けされた。対照のたまねぎ葉部には痕跡量の放射能（ $< 0.01$  mg/kg）が含まれているに過ぎず、



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

その大部分（75%）は抽出された。

抽出放射能の HPLC 分析：タマネギ及び葉試料から抽出された放射能の HPLC 分析結果を  
下表に示す。

試験区	1 倍量 処理区	2 倍量処理区					
	タマネギ	タマネギ			葉		
分析試料	表面洗浄液 (抽出物 1b)	表面洗浄液 (抽出物 1b)	水溶性画分 (抽出物 7)	有機溶媒画分 (抽出物 2d)	表面洗浄液 (抽出物 1b)	水溶性画分 (抽出物 7)	有機溶媒画分 (抽出物 2e)
合 計	2.6 (<0.001)	8.4 (0.009)	47.0 (0.052)	10.3 (0.011)	0.7 (0.007)	26.2 (0.263)	6.8 (0.068)

上段：%TRR、下段：mg eq/kg

タマネギ洗浄液中には主として Cl-IPC [A]が含まれていたが、

を含む幾つかのマイナーな代謝物も存在していた。

は存在しなかった。2 倍量処理区のタマネギのメタノール：クロロホルム：水抽出  
の有機溶媒相には、洗浄液と類似した代謝物が含まれていた。メタノール：クロロホ  
ルム：水抽出の水相（ TRR）には、主として極性物質が含まれており、Cl-IPC [A]  
または は含まれていなかった。これらの極性物質は強酸条件下  
で加水分解されて、（ TRR）、（ TRR）および  
（ TRR）を生成した。 の抱合体は加水分解に対して緩慢  
に反応し、従って、加水分解されずに残っている抱合された放射能は、  
であると考えられた。

葉の洗浄液中には、少量の と  
共に Cl-IPC [A]が含まれていた。2 倍量処理の葉部のメタノール：クロロホルム：水

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

抽出の有機溶媒相（ TRR）には、洗浄液に類似した代謝物が含まれていた。メタノール：クロロホルム：水抽出の水相（ TRR）には、約 10 種類の極性化合物が含まれており、それぞれは TRR の 以下（0.03 mg/kg 以下）であった。化合物群の加水分解により、（ TRR）、（ TRR）および（ TRR）が生成された。2 倍量処理区のタマネギの TRR は 0.105 mg/kg であり、その は HPLC により分析された（洗浄液およびメタノール：クロロホルム：水抽出物）。CI-IPC [A]は 13% TRR を占め、 TRR は を含む の混合物として特徴付けされた。残りの放射能には、最多で約 7 個の が含まれ、それぞれは TRR 以下であり、幾つかは（それぞれ < TRR）を含む化合物として暫定的に同定された。

2 倍量処理区の葉中の TRR は 1.00 mg/kg であり、その中の は HPLC により分析された。その内容は、洗浄液中およびメタノール：クロロホルム：水抽出溶媒中に回収された放射能であった。CI-IPC [A]は 1%TRR を占め、残りの放射能は多くの で構成されていた。（ TRR）が存在し、（それぞれ ≤ TRR、≤0.03 mg/kg）も存在していた。加水分解の結果から、数種の が含まれていることが判明した。その理由は、その代謝物の混合物を加水分解した後に のレベルが TRR に上昇したからであった。

IPC のタマネギにおける想定代謝経路を図 1 に示す。IPC はタマネギにおいて、を受けて代謝されると考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

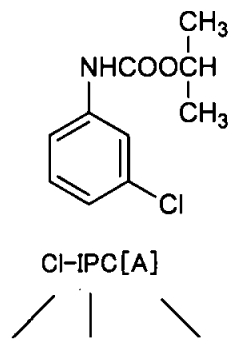


図1 IPCのタマネギにおける想定代謝経路\*

\* 申請者注：同定された代謝物をもとに、申請者が代謝経路図を作成した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

4) [<sup>14</sup>C]IPC のキャベツを用いた植物代謝試験

(資料 No.代謝 7)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2006 年

供試標識化合物:

標識 IPC

\*: 標識位置

化学名: イソプロピル N-(3-クロロフェニル)カーバメート

ロット番号: CFQ14300

放射化学的純度: > % (TLC)

比放射能: MBq/mg

供試植物: キャベツ *Brassica oleracea* L. (品種 Renton F1)

試験方法:

試験植物の栽培及び放射能標識体の処理; 放射能標識体及び非標識 IPC を、乳剤の基材に添加して、さらに水を加えて、処理液を調製した。各処理液の濃度及び比放射能を下表に示す。

処理区	[ <sup>14</sup> C]IPC 保存液 (μL)	非標識 IPC (mg)	乳剤基材 (μL)	水 (mL)	LSC 分析値 (mg/mL)	比放射能 (MBq/mg)
1 倍量	660	42.028	122.3	40.64	0.332	2.306
2 倍量	1315	84.604	244.6	40.51	0.665	2.298

5 個のプラスチック容器 (面積 0.20 m<sup>2</sup>、容積約 45 L) に John Innes No. 3 配合土壌 (砂壤土、pH 6.7、有機物 12.2%) を入れ、2 個の種子を蒔いた (2005 年 6 月 7 日)。播種した容器は閉鎖された野外に設置した。気温及び降水量を毎日記録し、必要に応じて灌水した。

薬剤処理は 2005 年 7 月 4 日、収穫 107 日前に実施した。5 個の試験植物栽培容器を対照に 1 容器、1 倍量、2 倍量処理区に各 2 容器を割り当て、1 倍量及び 2 倍量処理区にハンドスプレーヤーを用いて薬剤処理を行った。処理液の処理液量と処理被験物

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

質量から算出した実際の処理量は1倍量区が1.32及び1.34 kg/ha、2倍量区が2.64及び2.72 kg/haであった。なお、容器当たり植物体数は薬剤処理前に1本に調整した。なお、キャベツには処理薬剤がかからないように土壌処理した。

試料採取及び分析；キャベツは、下表に示すように1回（成熟収穫期）に採取した。

処 理	薬 量	採取部位	処理後経過時間(日)
[ <sup>14</sup> C]IPC	通常 (1倍量)	地上部	107日
[ <sup>14</sup> C]IPC	過剰 (2倍量)	地上部	107日
対 照	無処理	地上部	107日

採取時に、キャベツを処理群ごとにプールして試料を調製した。試料は重量を測定後、アセトニトリルで洗浄した（抽出液1）。1倍量および2倍量処理区のキャベツの洗浄液はロータリーエバポレーターで濃縮し、アセトニトリルに再溶解した後、LSCに供試した。各試料について、ドライアイス中で均質化して粉末状とし、試料を冷凍保存してドライアイスが揮散して凍結した粉末状試料が残るようにし、抽出に供試した。各試料を、メタノール：クロロホルム：水（2：1：0.8）、水、0.1 M 塩酸、0.1 M 水酸化ナトリウムおよびアセトンで順次抽出した。

#### キャベツ試料—抽出操作

メタノール：クロロホルム：水抽出液（抽出液2）にクロロホルムおよび水を添加して、メタノール：クロロホルム：水の割合を2：1：0.8から2：2：1.8（v/v/v）に変更した。試料を振とうし、有機溶媒相および水相を別の容器に移し、放射能をLSCにより定量した。次いで、水相をロータリーエバポレーターで濃縮した。抽出液を水に再溶解し、遠心して透明にした後に定量およびクロマトグラフィー分析に供試した。有機溶媒相は、ロータリーエバポレーターで濃縮した。メタノールを加え、ロータリーエバポレーターを用いてさらに濃縮し、メタノールに再溶解し、遠心して透明にした後にLSCにより定量した。水を数滴加えた後、試料をヘキサンで5回分配してクロロフィルを除去した。ヘキサン相から放射能を回収するために、ヘキサン相をメタノール：水で2回分配した。これらの分配液の最初の液を元の抽出した試料とプールして、後のクロマトグラフィー分析に用いた。試料をさらに濃縮した後、クロマトグラフィー分析に供試した。0.1 M 水酸化ナトリウム抽出液（抽出液5）は分液ロートに移して、等量の酢酸エチルと2回分配した。得られた水相および有機溶媒相をLSCにより定量した。

#### 抽出残渣の還流抽出

6 M 塩酸で2時間、続いて6 M 水酸化ナトリウムで2時間還流とした。次いで、抽出後の残渣を風乾し、残渣中の放射能を燃焼およびLSCにより定量した。6 M 塩酸および6 M 水酸化ナトリウムによる抽出液は、等量の酢酸エチルで2回分配して水溶性

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

画分及び有機溶媒画分を得た。

### 酸加水分解

濃縮したメタノール：クロロホルム：水抽出物の水相（抽出液 7）は濃塩酸と共に約 65℃で一夜インキュベーションした。加水分解した試料をクロロホルムで2回抽出し、抽出液を LSC により定量した。抽出液を濃縮した後にクロマトグラフィー分析に供試した。

メタノール：クロロホルム：水抽出液の有機溶媒相（抽出液 2d）を TLC で、水相（抽出物 7）を HPLC で分析して代謝物の推定を行った。

### 試験結果：

放射能分布；成熟期に収穫したキャベツ中放射能量及びその分布を下表に示す。

試験区	1 倍量処理 (1.3 kg/ha)	2 倍量処理 (2.7 kg/ha)	対 照
表面洗浄液 (抽出物 1)	0.2 (<0.001)	0.2 (<0.001)	ND
メタノール：クロロホルム：水抽出物 (抽出物 2)	58.8 (0.013)	40.1 (0.013)	ND
有機溶媒画分 (抽出物 2d)	8.1 (0.002)	-	-
水溶性画分 (抽出物 7)	50.7 (0.011)	-	-
水抽出物 (抽出物 3)	ND	4.2 (0.001)	ND
0.1 M HCl 抽出物 (抽出物 4)	ND	ND	ND
0.1 M NaOH 抽出物 (抽出物 5)	6.4 (0.001)	9.3 (0.003)	ND
水溶性画分	5.3 (0.001)	-	-
有機溶媒画分	1.1 (<0.001)	-	-
アセトン抽出物 (抽出物 6)	ND	ND	46.9 (0.002)
抽出残渣	34.6 (0.008)	46.3 (0.015)	53.1 (0.002)
酸アルカリ加水分解			
6 M HCl 還流抽出	水溶性画分	10.6 (0.002)	-
	有機溶媒画分	3.1 (0.001)	-
6 M NaOH 還流抽出	水溶性画分	4.0 (0.001)	-
	有機溶媒画分	1.4 (<0.001)	-

上段：TRR%、下段：mg eq/kg

1 倍量処理区のキャベツ中 TRR は極めて低かった (0.023 mg/kg)。この残留放射能のうち、0.2%が洗浄液中に回収され、5.1%がメタノール：クロロホルム：水抽出液中に、6%が 0.1 M 水酸化ナトリウム抽出液中に、35%が抽出残渣から回収された。メタノー

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

ル：クロロホルム：水抽出液を分配した結果、有機溶媒相中に 8%TRR および水相中に 51%TRR が分布した。残りの抽出残渣の酸還流抽出により 14%TRR が回収され、塩基還流抽出により 5%TRR が回収されて、16%TRR が抽出されないままに残った。酸および塩基還流抽出液を酢酸エチルと分配した結果、放射能の大部分が水相中に留まった（それぞれ 11 %TRR および 4%TRR）。従って、遊離された放射能の大部分は極性の性質を有していると特徴付けされた。

2 倍量処理キャベツ中の TRR (0.031 mg/kg) は、1 倍量処理キャベツよりも僅かに大きかった。この残留放射能のうち、0.2%が洗浄液中に回収され、40%がメタノール：クロロホルム：水抽出液中に、4%が水抽出液中に、9%が 0.1 M 水酸化ナトリウム抽出液中に回収された。残りの抽出残渣中に 46%TRR が含まれていた。表面洗浄液中には処理放射能の < 1%が含まれているに過ぎず、放射能が少なかったために分析は困難であった。葉部表面の放射能が低かったのは、植物には散布せずに周囲の土壤のみに散布したという事実に起因しているものと考えられる。1 倍量処理区 (59%) では、メタノール：クロロホルム：水抽出液中に 2 倍量処理区 (40%) よりも TRR が大きく、この画分中の放射能残留量は両処理区とも同じ (0.013 mg/kg) であった。従って、2 倍量処理試料中に多めの放射能が存在するといった利点がないことから、1 倍量処理の試料を分析に用いた。

抽出放射能の TLC/HPLC 分析：キャベツ及び葉試料から抽出された放射能の TLC/HPLC 分析結果を下表に示す。

1 倍処理区試料	有機溶媒画分 (抽出物 2)	水溶性画分 (抽出物 7)	合 計
	TLC	HPLC	
Cl-IPC [A]	2.0 (<0.001)	ND	2.0 (<0.001)
			8.5 (0.002)
			26.9 (0.004)
			18.7 (0.005)
			—
			—
			2.7 (0.001)
合 計	8.1 (0.002)	50.7 (0.011)	58.8 (0.013)

上段：TRR%、下段：mg eq/kg

メタノール：クロロホルム：水抽出物の有機溶媒相 (8%TRR) には極めて少量の放射能が含まれているに過ぎず、また同時に抽出される物質も多かった。HPLC 分析の実施は困難であった。TLC 分析を試みたが、質の良くないラジオルミノグラムが得られたことから、抽出液中には極性および非極性の化合物が存在していることが示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

幾らかの放射能が

および Cl-IPC [A]とクロマトグラフしたが、

とクロマトグラフする放射能は認められ

なかった。従って、最初の2個の化合物は存在した可能性があったが、後者の2個は存在しないものと結論した。Cl-IPC [A] (約2%TRR) は、2種の溶媒系における TLC クロマトグラフィーによる試料の精製後に良好に特徴付けされたが、この化合物が存在するメタノール：クロロホルム：水抽出物の精製した有機溶媒相中の放射能が余りにも少量であったために (TRR)、HPLC 分析による確認は困難であった。精製前の試料中においては、(約 TRR) として特徴付けされたが、精製した抽出液中では検出されなかった。

メタノール：クロロホルム：水抽出物の水相 (TRR) の HPLC 分析の結果、この抽出液中に存在する単一の化合物の最大レベルは TRR であることが判明した。存在した化合物の大部分は、極性の性質を有するものであり、いずれも参照標準品とクロマトグラフしなかった。加水分解により、この試料から TRR が遊離した。遊離した放射能は2個の成分より構成されていたが、そのいずれも参照標準品とはクロマトグラフしなかった。2個の成分のうちの多い成分は、タマネギ中において Cl-IPC [A]の代謝物として生成したと名付けられた化合物に類似したクロマトグラフィー特性を有していた。

IPC のキャベツにおける想定代謝経路を図1に示す。IPC はキャベツにおいて、

を受けて代謝されると考えられた。

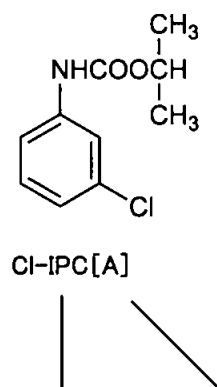


図1 IPC のキャベツにおける想定代謝経路



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

### 3. 土壌中動態試験

#### 1) IPC の好氣的湛水土壌中動態試験

(資料 No.代謝 8)

水田において使用されないため試験省略。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

## 2) IPC の好氣的土壤中動態試験

(資料 No.代謝 9)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2006 年

供試標識化合物:

標識 IPC

\*: 標識位置

化学名: イソプロピル N-(3-クロロフェニル)カーバメート

放射化学的純度: > % (TLC)

比放射能: GBq/mmol

供試土壌: 埴塚土 (UK 分類、茨城県牛久市の財団法人日本植物調節剤研究協会の試験圃場で採取した土壌)。UK 及び ISSS 基準に基づく土壌特性を以下に示した。

土壌分類	pH (H <sub>2</sub> O)	砂 (%)	シルト質 (%)	粘土 (%)	有機物量 (%)	陽イオン交換容量 (mEq/100 g)	最大保水量 (%、pF0)	微生物量 (µg/g)	
埴塚土 (USDA)	7.3	37	33	30	9.7	63.4	101.5	160 <sup>a)</sup>	197 <sup>b)</sup>
軽埴土 (ISSS)		49	21	30					

a) 試験前

b) インキュベーション終了時点

試験方法:

### 1) 試験土壌の調製

篩 (2 mm) にかけた土壌試料 (乾燥重量 50 g) を 22 の試験容器に入れ、後記の培養条件下で 21 日間前培養した後に被験物質を処理した。4 個の試験容器については微生物量測定用に当てた。

### 2) 放射能標識化合物添加及び培養条件

被験物質処理量は有効成分 4.12 kg/ha 相当量とした。土壌の比重を 1.0 g/cm<sup>3</sup>、10 cm

の深さに均等に混入すると仮定して、208  $\mu\text{g}/50\text{ g}$  乾燥土壌に処理した。被験物質のアセトニトリル溶液を各容器中の土壌に滴下し、混和後、被験物質処理土壌容器を下図のようにトラップに連結し、加湿空気を連続通気した。トラップは4個連結し、それぞれのトラップにはエタンジオール、0.2%パラフィン・キシレン溶液及び2 M NaOH 水溶液 (2本) を入れ、揮発性放射能を捕集した。試験系は25 $^{\circ}\text{C}$ ・暗所で維持した。土壌水分量はMWHCの50%とし、逆浸透水で調整した。

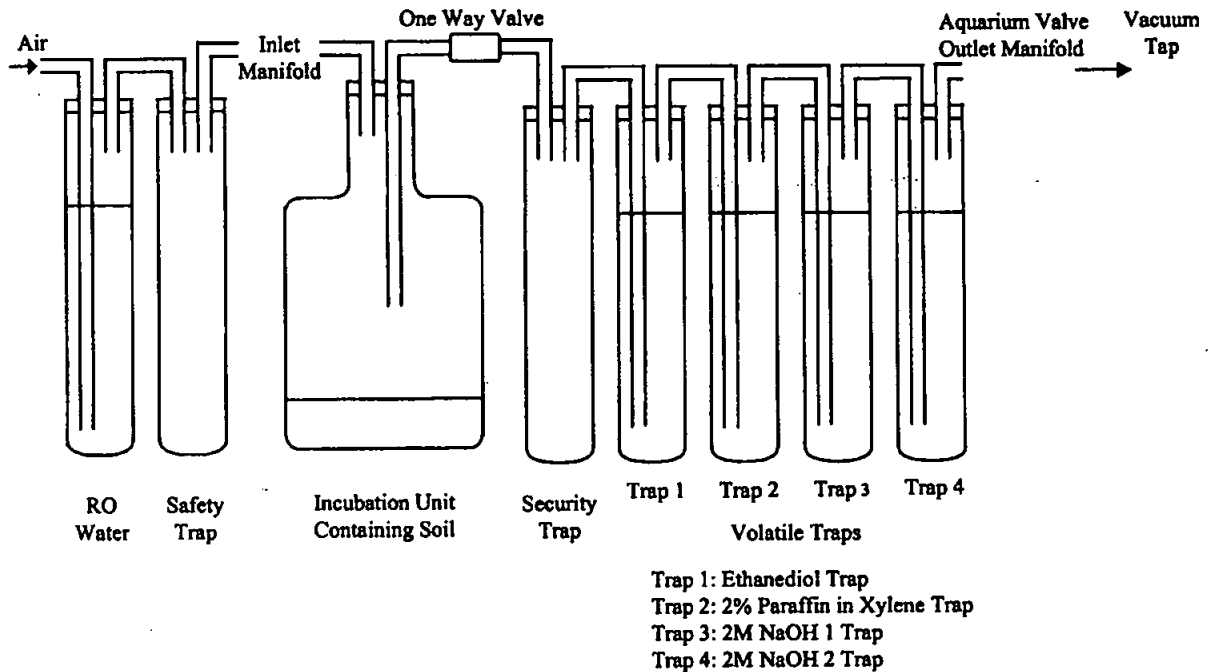


図 1 : 試験系の模式図

### 3) 試料採取

分析用試料の採取は、の 0 (処理直後)、2、5、8、14、30、44、61 日後に行った。試料採取時には各 2 容器を採取し、同時に各トラップも採取して新鮮なものと交換した。

### 4) 分析法

#### 土壌中放射能の抽出

土壌試料をアセトンで振とう抽出した。0 日試料の抽出は、被験物質添加処理直後に実施した。土壌抽出液をロータリーエバポレーターで濃縮した。次いでアセトニトリルに溶解し、ロータリーエバポレーターで濃縮した。さらに試料をアセトニトリルに再溶解した。遠心して透明にした後、LSC により分析した。

#### 還流抽出

土壌試料を、アセトン：水 (1 : 1 v/v) で 3 時間還流抽出した。試料を遠心して抽出

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

液を取り出し、残渣を洗浄して確実に抽出後の土壌から放射能を完全に回収するようにした。還流抽出液を水で希釈し、固相抽出 (SPE) カートリッジに添加した。カートリッジを水で洗浄した後、放射能をアセトニトリル中に溶出した。窒素気流下でアセトニトリルを濃縮した。

抽出後の土壌試料は風乾した後に粉碎し、燃焼により抽出されなかった放射能を定量した。

#### 結合残渣の画分

当初の結合残渣の画分は、アセトニトリルで抽出しさらに還流条件下で抽出した 61 日の土壌について実施した。分析上にエラーがみられたことから、後日に 44 日の試料についてこの分析を繰り返した。各試料を水酸化ナトリウム溶液中で振とうし、遠心して残渣 (ヒューミン画分) および上澄液に分離した。上澄液は濃塩酸で約 pH 1 の酸性とし、生成した沈殿を塩酸で洗浄した。上澄液を洗浄液と合わせ (フルボ酸画分)、洗浄済みの沈殿物 (フミン酸画分) は水酸化ナトリウムに再溶解した。フルボ酸および再溶解したフミン酸画分中の放射能を、LSC により測定した。ヒューミン画分中の放射能は、燃焼後に LSC により測定した。

#### 抽出液の分析

濃縮した土壌抽出液は、被験物質および該当する想定分解物標準品と共に HPLC によりクロマトグラフした。選抜した抽出液については TLC を用いてクロマトグラフし、HPLC により暫定的に同定した分解物の同一性を確認した。

#### 試験装置からの放射能の回収

各試験装置から土壌を取り出した後に、アセトニトリルによる装置の洗浄を実施した。次いで、洗浄液を LSC により定量した。

#### 捕集液の分析

捕集液中放射能は、LSC により定量した。NaOH トラップ中に捕集された放射能は塩化バリウム溶液の添加により  $^{14}\text{CO}_2$  であることを確認した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

試験結果：

1) 放射能の分布；

各試験土壌における放射能の分布及び物質収支を以下に示す。

培養期間 (日)	アセトン抽出物 (%)	還流抽出物 (%)	抽出残渣 (%)	容器洗浄液 (%)	揮発性有機物 (%)	<sup>14</sup> CO <sub>2</sub> (%)	物質収支 (%)
0	96.0	1.0	0.6	ND	NA	NA	97.6
2	83.0	8.8	5.2	ND	ND	0.9	97.9
5	62.5	14.1	16.7	ND	ND	3.2	96.4
8	49.5	14.5	26.0	ND	ND	4.9	94.9
14	38.4	16.0	36.0	ND	ND	4.7	95.1
30	19.5	11.6	51.0	ND	ND	11.0	93.0
44	10.1	11.4	58.8	ND	ND	13.9	94.1
61	6.0	8.0	58.8	ND	ND	22.2	94.9

NA：分析対象外、ND：未検出

処理放射能の回収率は、93%以上であった。アセトン抽出された放射能は、初期の96%から8日の50%および61日の6%に減少した。還流抽出された放射能は、初期の1%から14日の16%に増加し、その後61日の8%に減少した。抽出残渣中放射能は、処理後44～61日の期間中に59%のプラトーに達した。塩化バリウム沈殿生成法により確認された<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>は、61日に処理放射能の22%に達した。

2) 抽出残渣中放射能分布；

44日の試料を用いた抽出残渣中放射能の腐植酸構成(%AR)を下表に示す。

試料番号	抽出残渣中放射能量	フルボ酸	フミン酸	ヒューミン
A19 (44日)	58.3	10.9	15.4	30.6
A20 (44日)	59.3	7.9	20.3	31.6
平均	58.8	9.4	17.9	31.1

44日の結合残渣では、ヒューミン、フミン酸およびフルボ酸画分に処理放射能のそれぞれ約31、18および9%が存在していた。フルボ酸抽出液を酢酸エチルにより分配した結果、処理放射能の約3%が抽出され6%が水相中に留まった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

3) 抽出物の分析

アセトン抽出液及び還流抽出液の HPLC 分析結果 (%AR) を下表に示す。

培養期間 (日)	CI-IPC [A]				未分離放射能	合計
0	95.4					96.0
2	85.8					89.2
5	65.8					72.3
8	51.3					59.3
14	38.4					49.6
30	18.1					26.4
44	10.7					17.3
61	6.7					10.9

CI-IPC [A]は、0日の96%ARから8日の51%ARおよび61日の7%ARに減少した。

は、14日に最大 ARに増加し、その後61日の ARに減少した。が14日に最大 ARに増加した。他の全ての代謝物の合計は、全時点で AR以下であった。

4) CI-IPC [A]の減衰速度；

親化合物及び代謝物

の DT50 及び DT90 を以下に示す。

	DT <sub>50</sub> (日)	DT <sub>90</sub> (日)
CI-IPC [A]	11	37

5) 推定代謝経路

本試験結果に基づく IPC の好氣的土壌における想定代謝経路を図 1 に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

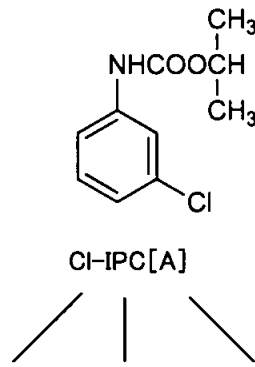


図1 IPCの好氣的土壤における想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

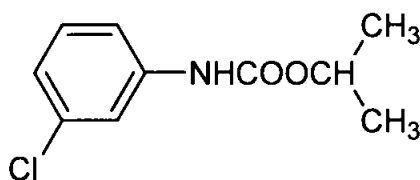
### 3) IPC を用いた土壤中微生物による分解動態試験

(資料 No.代謝 10)

文献名 : 、561-564、1965 年  
(試験機関 : )

#### 供試標識化合物

(1) IPC {イソプロピル N-(3-クロロフェニル)カーバメート}



(2) <sup>14</sup>C 標識 IPC

名 称	構造式 (* 標識部位)	比放射能
標識 IPC		μCi/mg

#### 供試土壤微生物

*Pseudomonas striata* Chester

#### 実験方法

(1) 酵素反応

- ① 酵素活性は、緩衝液中で IPC と共に加えた酵素を培養し、代謝された量を電気的に測定することで検討した。
- ② 反応は各物質の添加と共に始まり、30℃で 10 分後に酸性溶液 (IN-HCl/濃酢酸 = 8/1) を添加として終了した。

(2) 反応生成物の分析

- ① 反応生成物の確認は、FID-GC 及び TLC にて行った。
- ② 標識 IPC の μCi を酵素と共に培養し、30℃で 10 分後に停止し、メチレンクロライドで 3 回抽出した。  
このメチレンクロライドをシリカゲル HF254 にスポットし、ベンゼン/アンモニア系で 1 次展開し、続いてプレートを 90 度回転し、ベンゼン/酢酸系で 2 次展開した。



結果

(1) 酵素反応

- ① 図-1、-2 に示すように、生成量は、30 分までは時間と相関があること、また、プロテインが 2.0 mg までは酵素濃度と相関があることを示していた。

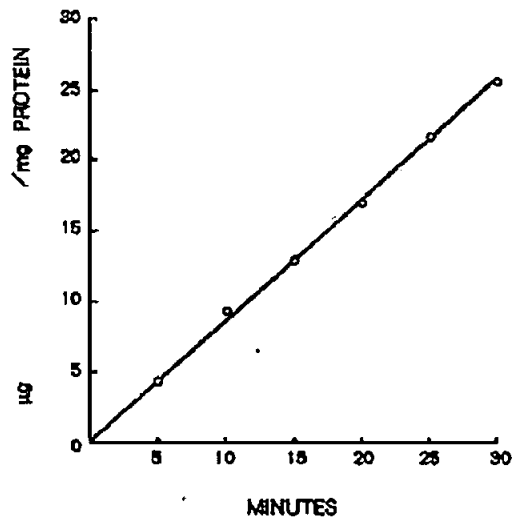


図 1 時間との相関

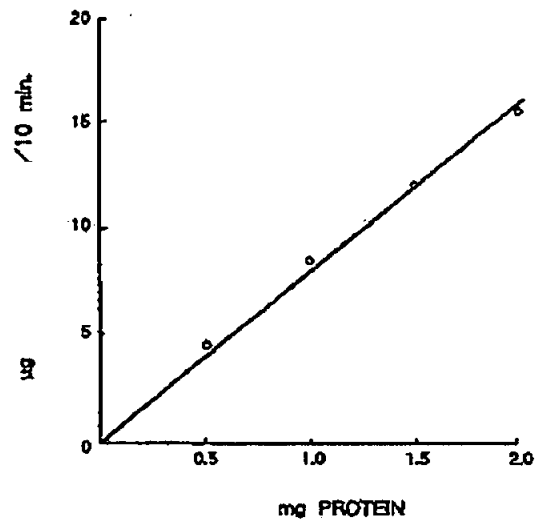


図 2 プロテインとの相関

(2) 反応生成物

- ① 図-3 に TLC の展開の様子を示した。  
 ② TLC 及び FID-GC から、反応生成物は であると確認できた。

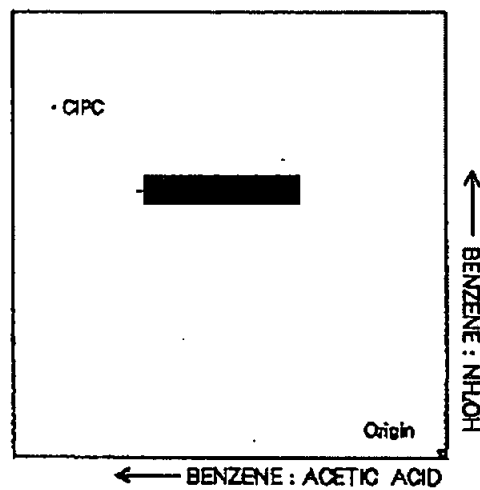


図 3 TLC による と IPC のスポット

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

まとめ

IPCの土壌中における分解は容易に起こり、この際、土壌微生物が大きく関与していることがわかった。

反応機構としては、次のことが考えられる。

- (i) エステル結合への酵素の攻撃で、  
が生成し、  
は不安定なので、自動的に  
とCO<sub>2</sub>になる。
- (ii) への酵素の攻撃で、直接  
が生成し、  
を生成するが、これは不安定なため分解する。

以上のことから、土壌微生物によるCl-IPC [A]の代謝経路は、図1のようになる。

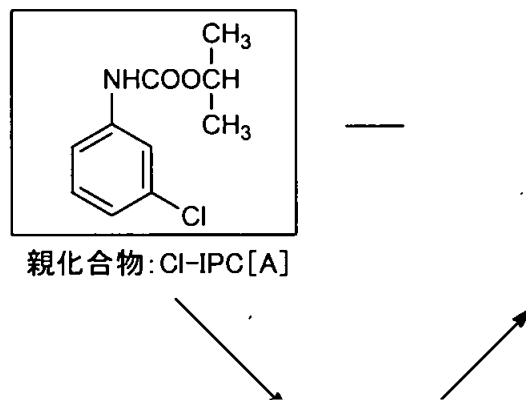


図1 IPCの土壌微生物による想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

4) IPC の嫌氣的土壤中動態試験

(資料 No.代謝 11)

好氣的土壤中動態試験において、有効成分等の半減期が 100 日を超えなかったため試験省略。

#### 4. 水中動態試験

##### 1) IPC の加水分解性試験

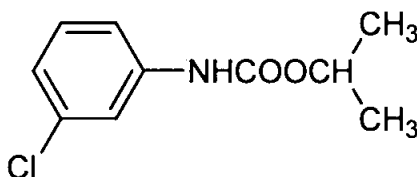
(資料 No.代謝 12)

試験機関

[GLP 対応]

報告書作成年 2000 年

供試化合物：IPC {イソプロピル N-(3-クロロフェニル)カーバメート}



供試水溶液：

pH	緩衝液
4.0	フタル酸水素カリウム/水酸化ナトリウム 緩衝液
7.0	りん酸二水素カリウム/水酸化ナトリウム 緩衝液
9.0	塩化カリウム含有ホウ酸/水酸化ナトリウム 緩衝液

試験方法：

- 1) 処理方法；各 pH の緩衝液はオートクレーブを用いて滅菌処理、窒素ガスを用いて溶存酸素を除去した。  
IPC 0.1 g をメタノールに溶かし 1000 mg/L の試験原液を調製した。
- 2) 試験濃度；5.00 mg/L (試験原液 1.00 mL を採取し、各 pH の緩衝液で希釈して試験液 (各 200 mL) を調製した。)
- 3) 試験条件及び期間；試験は恒温器内 (遮光、 $50 \pm 1^\circ\text{C}$ ) で行った。試験期間は 5 日間とし、処理 0 (処理直後) 及び 5 日後に採取を行なった。
- 4) 分析方法；試験水を採取後、高速液体クロマトグラフで測定 (測定波長：230 nm) し、被験物質標準溶液 (0.200~7.00 mg/L) の測定から作成された検量線から試験水中の IPC 量を算出した。
- 5) 残留率の算出方法；5 日後の試験液中における IPC 濃度 (mg/L) の調製直後 (0 日) の試験液中における IPC 濃度 (mg/L) に対する割合で残留率 (%) を求めた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

結 果：各 pH における 5 日後の平均被験物質濃度及び平均残留率は以下の通りであった。

pH	平均被験物質濃度 (mg/L)	平均残留率 (%)
4.0	5.04	102
7.0	5.05	102
9.0	5.05	101

以上の結果から、IPC は本試験条件 (50℃、5 日間) 遮光下にて、各 pH における平均残留率が 90%以上であったことから、OECD テストガイドライン (Test No. 111) の基準に従って、IPC は加水分解に対して安定な物質 (25℃での半減期が 1 年以上) と考えられる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

## 2) IPC の水中光分解動態試験

(資料 No.代謝 13)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

供試化合物:  $^{14}\text{C}$ -IPC

標識 IPC

\*:  $^{14}\text{C}$  標識位置

化学名; イソプロピル N-(3-クロロフェニル)カーバメート

標識位置;

放射化学的純度; > %

比放射能活性; GBq/mmol

非標識 IPC の純度; %

供試水:

自然水; 英国北ヨークシャーの Fountains Abbey 湖から 2004 年 8 月 4 日に採水し、0.2  $\mu\text{m}$  の滅菌フィルターを通した。自然水の性状は下表のとおりで、これらの項目に加えて波長 290~750 nm における吸収スペクトルを測定した。

項目	自然水
pH	7.62
浮遊固形物 (g/L)	0.001
溶存酸素濃度(飽和量に対する%)	98
電気伝導度 ( $\mu\text{S}$ )	444
溶解有機炭素 (DOC, mg/L)	5.30
全蒸発残留物量 (g/L)	019
全硬度 ( $\text{CaCO}_3$ として mg/L)	149

緩衝液; pH 5 緩衝液は 0.02 M オルトリン酸二水素ナトリウム緩衝液、pH 7 緩衝液は 0.02 M オルトリン酸二水素カリウム緩衝液、pH 9 緩衝液は 0.01 M 四ホウ酸ナトリウム緩衝液を用い、容器に分配後、オートクレープで滅菌した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

光源の種類：キセノンバーナーを用い、290nm未満の波長をカットした光を照射した。

光強度：約15W (1.3 MJ)/m<sup>2</sup>/日 (波長範囲 300~400 nm)。

試験方法：

供試化合物溶液；供試標識化合物をアセトニトリルに溶解して、濃度 0.297 mg/mL の溶液を調製した。別途、pH 測定および滅菌性検査用に非標識化合物の 0.281 mg/mL 溶液を調製した。

試験液；供試化合物溶液を滅菌した自然水および緩衝液に加えて最終濃度約 1 µg/mL の <sup>14</sup>C-IPC 試験液 84 µL を各試験容器に入れた。

試験容器；石英ガラス製蓋付き容器を用いた。自然水および各緩衝液それぞれに光照射 0 時間試料および光照射開始後各試料採取時点、pH 測定、滅菌性検査および温度モニター用の容器を用意した。暗所対照についても光照射試料と同様に容器を用意し、それらをラップで包んだ。

揮発性物質の捕集；光照射装置下で 15 日間 (太陽光 30 日間暴露に相当) 光照射した予備試験の結果、試料液における放射能回収率が 90% 以上であったことから、気流を通す捕集装置は不要と判断して揮発性物質を捕獲するポリウレタン製の栓を試験容器の両端に付けた。ただし、0 時間光照射試料および暗所対照の試料容器には栓を付けなかった。

光照射；水冷式 Suntest 加速光暴露装置で 15 日間、連続して光照射した。この装置による 1 日の照射量は太陽光照射 2 日に相当する。

試験温度；25±2℃に設定した。供試化合物を含まない供試水の容器に光照射して温度をモニターした。

試料採取；0 時間、光照射開始 1、3、6、9、12 および 15 日後に試料を採取した。暗所対照試料は 1 日および 15 日後に試料を採取した。

滅菌性検査および pH 測定；光照射開始前および光照射終了時に pH を測定し、また、寒天平板を用いて滅菌性を検査した。

放射能測定；試料にはシンチレーション液を加え、クエンチ補正付き液体シンチレーション計数器(LSC)で放射能を測定した。検出限界はバックグラウンド値の 1.5 倍に設定した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

分析方法；溶液試料は逆相 HPLC によって直接分析した。さらに、15 日後の試料は TLC 分析した。各試料は C18 固相抽出カラムを通過させ、アセトニトリルで溶出し、有機相および水相の量を測定した。有機相は窒素気流下で濃縮して放射能を測定した後、IPC および既知分解物の非標識標準品とのクロマトグラフにより放射能成分を同定した。

半減期の計算；各時点における試料中の IPC 残存量を処理放射能に対する割合(%)とし、この値を経過時間(日)に対してプロットして以下の式から  $DT_{50}$  および  $DT_{90}$  値を計算した。

$$y = Co \times e^{-kt}$$

y : t 日時点における被験物質の%

Co : 被験物質の初期濃度

K : 速度定数

人工太陽光 ( $I_a$ ) および自然太陽光 ( $I_s$ ) の照射比率に基づき、以下の式により日本の春季に換算した半減期を算出した：

$$DT_{50}(\text{自然光}) = DT_{50} \times I_a / I_s$$

日本の春季太陽光換算の計算に用いた  $I_s$  値は  $0.672 \text{ MJ/m}^2/\text{日}$  であった。

## 結 果:

滅菌性および pH；自然水および緩衝液の光照射試料および暗所対照試料いずれについても滅菌性が確認された。pH 5、7 および 9 の緩衝液は、光照射開始直前および終了時の pH がいずれも設定値  $\pm 0.2$  の範囲内であった。

光照射強度；自然水、pH 5 緩衝液、pH 7 緩衝液および pH 9 緩衝液の平均光強度はそれぞれ  $1.3017$ 、 $1.3154$ 、 $1.3835$  および  $1.3295 \text{ MJ/m}^2/\text{日}$  であった。

放射能回収率；光照射試料の放射能総回収率は全期間を通して  $94.8 \sim 97.2\%$  の範囲であり、この内、試験溶液中に  $92.3 \sim 96.4\%$  で、ポリウレタン栓から回収された揮発性物質は最大  $3.9\%$  であった。暗所対照試料の総回収率は  $93.0 \sim 96.1\%$  であった。表 1 に各時点の放射能回収率を示す。

分解物の分布；供試化合物 IPC は、15 日間光照射後の自然水、pH 5 緩衝液、pH 7 緩衝液および pH 9 緩衝液試料に、それぞれ処理放射能の  $83.7$ 、 $83.2$ 、 $85.6$  および  $81.5\%$  に相当する量が残存し、単独で  $10\%$  以上となる分解生成物は検出されなかった。同定された分解生成物は



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

で、光照射 15 日後の量は、自然水中に 3.5%、pH 5、pH 7 および pH 9 の緩衝液にはそれぞれ 7.6、5.3 および 8.2%であった。他に HPLC 保持時間が 5 分未満の  
が複数認められた。IPC の

についてもクロマトグラフィーを実施したが検出されなかった。暗所対照試料の抽出液中に分解物は検出されなかった。表 2 および表 3 に分解物の分布および試験用液中の濃度を示す。

代謝経路；主要な分解経路は、Cl-IPC [A]が脱塩素により  
が形成される過程であった。この経路を図 1 に示す。

半減期；自然水および各緩衝液の  $DT_{50}$  は 63~91 日、 $DT_{90}$  は 209~302 日で、春季の東京における太陽光に換算するとそれぞれ 125~187 日、414~621 日であった。表 4 にこれらの計算結果を示す。

以上の水中光分解動態試験の結果から、IPC は自然水、pH 5、pH 7 および pH 9 の緩衝液中で光照射により緩やかに分解され、東京の春季太陽光換算で 30 日間の照射後には処理放射能の 81.5~85.6%の範囲で減少した。分解物として  
が同定され、処理量の 4~8%がこの分解物であった。この他、極性化合物が最大 4%検出された。分解速度は各試験液間で大差なく、 $DT_{50}$  は春季太陽光換算で 125~187 日であった。

量子収量の測定：水中光分解動態試験に付随して量子収量を測定した。

pH 7 の滅菌緩衝液で濃度 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の  $^{14}\text{C}$  標識-IPC の溶液を調製し、水中光分解試験と同じ装置により光強度約 15.5 W (1.3 MJ)/ $\text{m}^2$  日、温度  $25\pm 2^\circ\text{C}$  で 15 日間光照射した。公表されている計算式を用いた結果、pH7 における IPC の量子収量値は 0.001 であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

表 1. 回収放射能 [処理放射能に対する割合(%)]

処理時間 (日)	供試水	光照射試料			暗所対照試料
		溶液	栓*	合計	溶液
0	自然水	95.5	NA	95.5	95.5
	pH 5 緩衝液	96.0	NA	96.0	96.0
	pH 7 緩衝液	96.1	NA	96.1	96.1
	pH 9 緩衝液	95.6	NA	95.6	95.6
1	自然水	96.4	0.1	96.5	95.6
	pH 5 緩衝液	94.2	0.6	94.8	93.0
	pH 7 緩衝液	95.3	1.9	97.2	95.6
	pH 9 緩衝液	94.8	0.8	95.6	94.6
3	自然水	95.7	0.6	96.3	NA
	pH 5 緩衝液	96.4	0.5	96.9	NA
	pH 7 緩衝液	96.1	0.9	97.0	NA
	pH 9 緩衝液	95.4	2.2	97.6	NA
6	自然水	96.1	1.1	97.2	NA
	pH 5 緩衝液	95.5	1.4	96.9	NA
	pH 7 緩衝液	95.2	1.6	96.8	NA
	pH 9 緩衝液	95.0	2.1	97.1	NA
9	自然水	92.8	2.9	95.7	NA
	pH 5 緩衝液	94.4	1.6	96.0	NA
	pH 7 緩衝液	92.9	2.8	95.7	NA
	pH 9 緩衝液	92.9	3.9	96.8	NA
12	自然水	93.6	2.1	95.7	NA
	pH 5 緩衝液	94.5	1.9	96.4	NA
	pH 7 緩衝液	92.5	3.3	95.8	NA
	pH 9 緩衝液	93.0	3.7	96.7	NA
15	自然水	93.3	2.3	95.6	94.3
	pH 5 緩衝液	94.5	1.7	96.2	95.6
	pH 7 緩衝液	92.3	3.7	96.0	96.1
	pH 9 緩衝液	94.3	2.1	96.4	95.6

\*: 揮発性物質を捕獲するポリウレタン製の栓

NA: 該当データなし

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

表 2. 放射能成分の分布 [処理放射能に対する割合(%)]

処理	処理時間 (日)	供試水	Cl-IPC [A]	分解物				合計
							溶媒に 不溶な 成分	
光 照 射	0	自然水	95.3					95.5
		pH 5 緩衝液	95.8					96.0
		pH 7 緩衝液	95.9					96.1
		pH 9 緩衝液	95.4					95.6
	1	自然水	95.5					96.4
		pH 5 緩衝液	93.2					94.2
		pH 7 緩衝液	95.1					95.3
		pH 9 緩衝液	93.9					94.8
	3	自然水	93.8					95.7
		pH 5 緩衝液	93.4					96.4
		pH 7 緩衝液	94.8					96.1
		pH 9 緩衝液	91.5					95.4
	6	自然水	93.0					96.1
		pH 5 緩衝液	91.5					95.5
		pH 7 緩衝液	91.9					95.2
		pH 9 緩衝液	89.0					95.0
	9	自然水	87.1					92.8
		pH 5 緩衝液	89.7					94.4
		pH 7 緩衝液	89.5					92.9
		pH 9 緩衝液	85.9					92.9
	12	自然水	87.7					93.6
		pH 5 緩衝液	87.1					94.5
		pH 7 緩衝液	88.7					92.5
		pH 9 緩衝液	82.1					93.0
	15	自然水	83.7					93.3
		pH 5 緩衝液	83.2					94.5
		pH 7 緩衝液	85.6					92.3
		pH 9 緩衝液	81.5					94.3

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

処理	処理時間 (日)	供試水	Cl-IPC [A]	分解物				合計
							溶媒に 不溶な 成分	
暗 所	0	自然水	95.3					95.5
		pH 5 緩衝液	95.8					96.0
		pH 7 緩衝液	95.9					96.1
		pH 9 緩衝液	95.4					95.6
	1	自然水	95.3					95.6
		pH 5 緩衝液	92.8					93.0
		pH 7 緩衝液	95.6					95.6
		pH 9 緩衝液	94.4					94.6
	15	自然水	94.1					94.3
		pH 5 緩衝液	95.6					95.6
		pH 7 緩衝液	96.1					96.1
		pH 9 緩衝液	95.4					95.6

\* : HPLC 保持時間が 5 分未満の複数の極性化合物

ND : 検出せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

表 3. 放射能成分の試料溶液中濃度 (µg/mL)

処理	処理時間 (日)	供試水	Cl-IPC [A]	分解物			合計
光 照 射	0	自然水	0.95				0.95
		pH 5 緩衝液	0.95				0.95
		pH 7 緩衝液	0.95				0.95
		pH 9 緩衝液	0.95				0.95
	1	自然水	0.95				0.96
		pH 5 緩衝液	0.93				0.93
		pH 7 緩衝液	0.94				0.95
		pH 9 緩衝液	0.93				0.94
	3	自然水	0.93				0.95
		pH 5 緩衝液	0.93				0.95
		pH 7 緩衝液	0.94				0.95
		pH 9 緩衝液	0.91				0.94
	6	自然水	0.93				0.95
		pH 5 緩衝液	0.91				0.95
		pH 7 緩衝液	0.91				0.94
		pH 9 緩衝液	0.88				0.94
	9	自然水	0.87				0.92
		pH 5 緩衝液	0.89				0.94
		pH 7 緩衝液	0.89				0.92
		pH 9 緩衝液	0.85				0.91
12	自然水	0.87				0.92	
	pH 5 緩衝液	0.87				0.93	
	pH 7 緩衝液	0.88				0.91	
	pH 9 緩衝液	0.82				0.91	
15	自然水	0.83				0.91	
	pH 5 緩衝液	0.83				0.93	
	pH 7 緩衝液	0.85				0.91	
	pH 9 緩衝液	0.81				0.92	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

処理	処理時間 (日)	供試水	Cl-IPC [A]	分解物			合計
暗 所	0	自然水	0.95				0.95
		pH 5 緩衝液	0.95				0.95
		pH 7 緩衝液	0.95				0.95
		pH 9 緩衝液	0.95				0.95
	1	自然水	0.95				0.95
		pH 5 緩衝液	0.92				0.92
		pH 7 緩衝液	0.95				0.95
		pH 9 緩衝液	0.94				0.94
	15	自然水	0.94				0.94
		pH 5 緩衝液	0.95				0.95
		pH 7 緩衝液	0.96				0.96
		pH 9 緩衝液	0.95				0.95

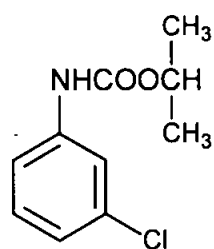
ND : 検出せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

表 4. 推定半減期 (日)

試験水	半減期(DT <sub>50</sub> )		90%減衰期(DT <sub>90</sub> )		相関係数 r <sup>2</sup>
	人工光	太陽光 換算値*	人工光	太陽光 換算値*	
自然水	79	154	263	510	0.933
pH 5 緩衝液	85	167	283	554	0.949
pH 7 緩衝液	91	187	302	621	0.980
pH 9 緩衝液	63	125	209	414	0.986

\* : 東京の春季太陽光



Cl-IPC [A]



図 1. 想定代謝分解経路図

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

## 5. 土壌吸着性試験

IPC の土壌吸着性試験

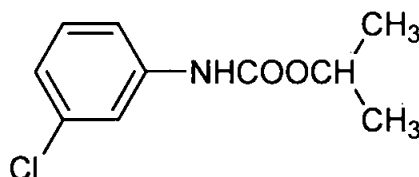
(資料 No.代謝 14)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2000 年

供試化合物：IPC {イソプロピル N-(3-クロロフェニル)カーバメート}



供試土壌：

土 壤 No.	I	II	III	IV	
採 取 場 所	宇都宮大学 農学部	日本植物防疫 協会牛久 研究所	農林水産省 農業研究センター 谷和原	保土谷化学 工業(株) 下妻圃場	
土 壤 群 名	畑地土壌	畑地土壌	畑地土壌	畑地土壌	
土 性					
粘土 (%)	29.3	28.1	24.9	22.4	
有機炭素含有率(%)	8.25	5.10	3.73	0.62	
pH	H <sub>2</sub> O	6.0	7.2	6.1	5.7
	KCL	5.3	6.3	5.4	4.3
陽イオン交換容量 (cmol(+)/kg)	41.9	40.4	25.8	1.6	
水分含有率(%)	31.3	24.0	3.06	15.3	

試験方法：

供試土壌の調製方法：試験に使用する土壌を 2 mm 以下にふるい分けし、ガラスシャーレ上で 100℃で 12 時間乾燥させ、その後デシケーター内で 1 時間放冷させて、乾燥重量を測定、並びに水分含有率を算出した。

試験溶液の調製：IPC を 0.01 M 塩化カルシウム溶液に溶解し、5.00 mg/L に希釈した。

吸着平衡時間の測定：乾土重量としてそれぞれ 25.0 g を試験容器に採取し、試験溶液 125 g を加えた後、25±1℃で 2、4、6、8 時間振とうし、遠心分離、分析を行った。各経過時間における水相濃度変化率を次式から求め、この変化率が全ての土壌で 10% 以下となった経過時間を吸着平衡時間とし、振とう時間を決定した。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

$$\text{変化率(\%)} = \frac{(\text{n 回時の濃度}) - (\text{n-1 回時の濃度})}{(\text{n-1 回時の濃度})} \times 100$$

本試験： 所定量の土壌をそれぞれ 50 mL 容遠沈管に秤り取り、4 濃度（5, 1, 0.2, 0.04 mg/L）の試験物質溶液を各々 2 本ずつ、土壌ブランクとして 0.01 M 塩化カルシウム水溶液を 1 本に加えた。これを 4 種の土壌について行った。コントロールとして土壌を入れない遠沈管に各濃度の試験物質溶液を 2 本ずつ入れた。これらを  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  所定時間振とう、遠心分離、分析を行った。

物質収支：本試験において 1 mg/L 溶液の分析を行った後の固相にアセトニトリル 20 mL を加え 15 分間振とうした。遠心分離後上澄みをフラスコに移した。同じ抽出操作を計 3 回行った。得られた上澄みを合わせて 100 mL に定容し、50.0  $\mu\text{l}$  に精製・濃縮後に HPLC で定量した。

結 果：

吸着試験結果；

土壌 No.	採取場所	$K_{\text{Fads}}^1)$	oc% <sup>2)</sup>	$K_{\text{Fadsoc}}^3)$
I	宇都宮	32.4	8.25	393
II	牛久	22.9	5.10	449
III	谷和原	10.5	3.73	282
IV	下妻	4.13	0.62	666

1) Freundlich の吸着等温式による定数項と相関関係

2) 土壌中の有機炭素含有率

3) K 値を各土壌の oc で割り求めた有機炭素吸着係数

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

## 6. 生物濃縮性試験

IPC の魚類濃縮性試験

(資料 No.代謝 15)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：2008 年

被験物質：IPC (純度； %)

供試生物：コイ (*Cyprinus carpio*)

養鯉場から購入し、78 日間畜養後、試験条件で 17 日間順化させた。

平均体長；8.1cm、平均体重；6.8g、平均脂質含量；4.0%

方 法：OECD テストガイドライン 305C 及び「新規化学物質に係る試験の方法について」(環  
保第 5 号、薬発第 615 号、49 基局第 392 号) に規定する「魚介類の体内における化  
学物質の濃縮度試験」に準拠した。

コイを用いた急性毒性試験の結果、LC<sub>50</sub> 値 (96 時間) が 7.5 mg/L であったので、こ  
れらの結果を基に試験水中濃度を 0.020 mg/L 及び 0.0020 mg/L と設定した。

試験設定条件：

試験水；活性炭ろ過で脱塩素した水道水

試験容器；100 L 入りガラス製水槽

試験濃度；0.020 mg/L、0.0020 mg/L 及び助剤対照区 (0.004 ml/L 助剤；アセトン)

試験水の換水；900 ml/分の速度で連続換水

水温；25±2℃

溶存酸素；≥6.0 mg/L

給餌方法；コイ用配合飼料 (日本農産工業) を毎日体重の約 1~2% 程度を与えた。

生物密度；第 1 及び第 2 濃度区；4.35 g 体重/L (止水時の容量)

0.34 g 体重/L (24 時間当りの容量)、換水率 44.44 回/日

光周期；16 時間明、8 時間暗

通気；なし

暴露期間；28 日

試験水と魚体の分析：

試験水の分析頻度；4、7、11、14、18、21、25 及び 28 日に分析を行なった。

魚体の分析頻度；それぞれ 4 匹の供試魚を 4、7、14、21 及び 28 日に無作為に採取し、2 匹ず  
つ分析を行なった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

結果：

(1) 魚対中の被験物質濃度 (µg/g)

試験区(mg/L)	取込期間 (日)				
	4	7	14	21	28
0.0020	0.0830	0.0994	0.1125	0.1150	0.1134
0.020	1.09	1.12	0.78	0.72	0.80

(2) 試験水中の被験物質濃度 (µg/L)

試験区(mg/L)	取込期間 (日)				
	4	7	14	21	28
0.0020	0.00195	0.00196	0.00201	0.00198	0.00193
0.020	0.0197	0.0191	0.0194	0.0194	0.0196

試験水中の被験物質濃度は設定値と比較し、0.0020 試験区で 98%、0.020 試験区で 97%であった。

(3) 濃縮係数

①BCF<sub>ss</sub>

試験区(mg/L)	取込期間 (日)				
	4	7	14	21	28
0.0020	42.5	51	56	58	57.5
0.020	55	58.5	40.5	37	40.5

②BCF<sub>ss</sub>

申請者が計算したところ、以下のとおりであった。

0.0020 mg/L ; 平均 57.2 (14~28 日の 3 ポイントの平均)

0.020 mg/L ; 平均 39.3 (14~28 日の 3 ポイントの平均)

(4) 観察

暴露期間を通じて、対照区及び試験区のどの供試魚にも死亡や暴露に対する有害作用は観察されなかった。

(5) 脂質含量

暴露開始前及び暴露終了後の順化槽の魚体 5 匹を用いて脂質を測定した。その結果、平均 4.0% 及び平均 3.8%であった。

## 代謝分解のまとめ

IPC の哺乳動物、植物、土壌、水中における代謝分解の要約は下記の通りであり、代謝経路を図 1 に、結果の概要を表 1 に示す。

- (1) 動物における本剤 ( ) 標識) の尿および糞への排泄は、投与量に対する排泄率で、尿では 88.79~96.55% TAR、糞では約 4.22~7.27% TAR であった。また、呼気からはほとんど排出されなかった。なお、投与方法または性によって排泄に大きな差はなかった。組織分布については、低用量 (5 mg/kg) では単回および反復経口投与とも、また静脈内投与群においても、放射能はほとんど検出されなかった。一方、高用量単回経口投与群 (200 mg/kg) では、血液中で最大であり、雄および雌についてそれぞれ 1.49 µg/g および 2.21 µg/g であった。次いで、雌の脾臓および肝臓でそれぞれ 0.83 µg/g および 0.69 µg/g、雄の肝臓で 0.58 µg/g が検出された。

尿中では、合計 13 個の代謝物が同定され、 ( ) 標識) を超えたのは 3 つの代謝物で、 ( ) 標識) TAR)、 ( ) 標識) TAR) および ( ) 標識) TAR) であった。他に微量代謝物として、 ( ) 標識) が検出され

た。

糞中では、合計 7 個の代謝物が同定され、 ( ) 標識) が同定された。

なお、尿および糞中の代謝物プロファイルは、投与方法または性によって大差はなかった。

- (2) 動物における本剤の尿、糞、呼気への排泄は、投与量に対する排泄率で、尿では約 85% ( ) 標識) 及び約 50% ( ) 標識)、糞では約 4%、呼気では約 18% であった。また、尿への排泄速度は、投与後 24 時間以内に約 70% ( ) 標識) 及び約 44% ( ) 標識) が排泄された。

尿中代謝物の約 80% は、 ( ) 標識) であり、その他の代謝物としては、 ( ) 標識) が検出された。

更に、別途実験においては、代謝物として、 ( ) 標識) 等が検出された。

- (3) 大豆における代謝物として、 ( ) 標識) が検出された。水耕栽培では ( ) 標識) が、また土壌栽培では ( ) 標識) が、各々主要代謝物であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

- (4) 春コムギの種子及び藁中の代謝物として、  
が検出されたが、 TRR (%TRR : 残留放射能に対する割合) を超える  
代謝物は認められなかった。
- (5) タマネギ (鱗茎) 及び葉部中の代謝物として、  
が検出されたが、 TRR を超える代謝物は認められなかった。
- (6) キャベツにおける代謝物として が極く微量検出されたが、  
は検出されなかった。
- (7) 標識体を好氣的土壤に処理した後、25°Cの暗所に 61 日間インキュベートする  
と、IPC は半減期 11 日で消失した。代謝物として、 (最大処理量の  
、14 日後、但し半減期 25 日で消失) 及び  $^{14}\text{CO}_2$  (最大処理量の 22.2%、61 日後)  
が検出された。なお、 は土壤から単離した土壤微生物を用いた試験  
でも確認された。
- (8) 水中では光非照射ではほとんど分解されなかった。一方、光照射により IPC の分解は促進  
され、自然水及び各種緩衝液中での半減期は大差なく 125~187 日だった。代謝物として  
(処理量の 、処理 15 日後) が検出された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

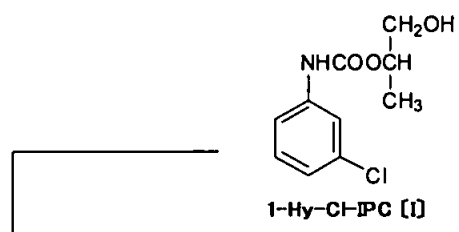


図1 IPCの動植物等における代謝分解経路図

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

## 参考文献

- Ⓐ<sup>1</sup> W. Grunow et al. Fd. Cosmet. Toxicol. Vol. 8 P. 277~288
- Ⓐ<sup>2</sup> A. Bobik, G. M. Holder et al. Fd. Cosmet. Toxicol. Vol. 10 P. 163~170
- Ⓟ<sup>1</sup> Genald G. Still et al. J. Agr. Food. Chem. Vol. 24 P. 588~592
- Ⓟ<sup>2</sup> Genald G. Still et al. Phytochemistry Vol. 11 P. 515~520
- Ⓟ<sup>3</sup> George G. Ecke et al. J. Agr. Food. Chem. Vol. 21 P. 792~794
- Ⓟ<sup>4</sup> Donald G. Rusness et al. Pesticide Biochem. & Physiology Vol. 7 P. 220~231
- Ⓢ<sup>1</sup> Philip C. Kearnoy et al. J. Agr. Food. Chem. Vol. 13 P.561~564
- Ⓢ<sup>2</sup> D. D. Kaufman et al. J. Agr. Food. Chem. Vol. 15 P. 582~591
- Ⓜ Henry G. Schwartz et al. J. Water. Pollnt. Control Fed. 39 (10). part I, 1701~1714

Ⓐ : 動物    Ⓟ : 植物    Ⓢ : 土壌    Ⓜ : 水

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

表 1 代謝分解の概要

数値は処理量に対する割合 (%)

代謝分解物		[A] 親化合物	[B]	[C]	[D]	[E]	[F]	[G]	[H]	[I]	[J]	[K]	[L]	投与量に対する 回収率	
動物	低用量 単回経口 5 mg/kg ラット	標識	尿	雄	ND									89.05	
			雌	ND										83.77	
		糞	雄	ND											5.16
			雌	0.36											3.05
	反復経口* 5 mg/kg ラット	標識	尿	雄	ND										92.35
			雌	ND											87.17
		糞	雄	0.21											4.00
			雌	ND											3.33
	高用量 単回経口 200 mg/kg ラット	標識	尿	雄	ND										90.96
			雌	ND											82.29
		糞	雄	0.11											5.19
			雌	1.77											4.25
単回静脈内 0.5 mg/kg ラット	標識	尿	雄	ND										84.89	
		雌	ND											86.90	
	糞	雄	ND											3.03	
		雌	ND											3.02	

\* : 非標識体を 1 日 1 回 14 日間投与後、15 日目に標識体を 1 回投与。

ND : 検出されず。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

数値は処理量に対する割合 (%)

代謝分解物			[A] 親化合物	[B]	[C]	[D]	[E]	[F]	[G]	[H]	[I]	[J]	[K]	[L]	投与量に対する 回収率	
動物	腹腔内 3.3 mg/ラット	標識	尿												87.6 ± 4.4	
			糞													0.2 ± 0.2
		標識	尿													51.1 ± 0.9
			糞													0.7 ± 0.7
	経口 3.5 mg/ラット	標識	呼気													16.6
			尿													83.8 ± 2.5
		標識	糞													4.5 ± 1.4
			尿													46.7 ± 3.8
	ネオマイシン 処理 経口 3.5 mg/ラット	標識	糞													3.2 ± 1.1
			呼気													19.9
		標識	尿													73.0 ± 4.3
			糞													10.3 ± 3.2
動物	経口 250~300 mg/ラット	酸性加水分解	尿												42.8 ± 5.4	
			糞												9.2 ± 2.7	
	ラット 経口	酵素分解	呼気												14.0	
			17 mg/kg												72.0	
植物	大豆	水耕栽培 (16日後)	100 mg/kg												77.6	
			250 mg/kg												60.9	
植物	大豆	土壌栽培 (35日後)													89	
															51	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

数値は処理量に対する割合 (%)

代謝分解物		[A] 親化合物	[B]	[C]	[D]	[E]	[F]	[G]	[H]	[I]	[J]	[K]	[L]	投与量に対する 回収率	
植物	春コムギ#	種子 (2倍量処理)	0.8 (0.0003)											100 (0.0326)	
		藁 (2倍量処理)	2.2 (0.0071)											100 (0.3162)	
植物	タマネギ#	タマネギ (2倍量処理)	12.7 (0.013)											100 (0.105)	
		葉部 (2倍量処理)	1.3 (0.013)											100 (1.002)	
植物	キャベツ#	キャベツ (1倍量処理)	2.0 ( $<0.001$ )											100 (0.023)	
土壌	好氣的土壌	14日後	土壌	38.4										90.4	
			$^{14}\text{CO}_2$										4.7		
		61日後	土壌	6.7											72.8
			$^{14}\text{CO}_2$												22.2
加水分解	pH 4.0	5日後	102											102	
	pH 7.0	5日後	102											102	
	pH 9.0	5日後	101											101	
水中光分解	光非照射	自然水	15日後	94.1										94.3	
		pH 5	15日後	95.6										95.6	
		pH 7	15日後	96.1										96.1	
		pH 9	15日後	95.4										95.6	
	光照射	自然水	15日後	83.7											93.3
		pH 5	15日後	83.2											94.5
		pH 7	15日後	85.6											92.3
		pH 9	15日後	81.5											94.3

# : 上段の数値は%TRR、下段の数値はIPC換算 mg/kgを示す。

ND : 検出されず。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は保土谷化学工業株式会社にある。

## 〔附〕 I P C の開発年表

