

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

2. 植物における代謝試験

(3) フェンヘキサミドのトマトにおける代謝

(代謝資料 No. 4)

試験機関： 社 代謝・残留研究所 ()

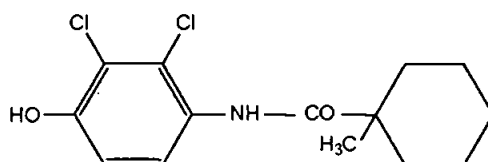
[GLP対応]

報告書作成年月日：1996年9月13日

供試標識化合物

化学名： *N*-(2,3-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-1-
メチルシクロヘキサンカルボキサミド

化学構造：



*：標識部位

標識： $-^{14}\text{C}$ -フェンヘキサミド [I]
(比放射能：4.08MBq/mg、放射化学的純度>97%)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は P. 代 - 10 に記す。

【方法】

1. 作物

用いたトマトの品種は Bonset F1 で 35L ポット中で生育させた。栽培は温室内で行い、適宜な灌水、及び、最小限の病害虫防除と加肥を行った。

2. 薬剤処理及び試料採取

(1) 代謝実験 (通常処理量)

$-^{14}\text{C}$ - [I] の水和剤 (含有量 50%) の懸濁液をトマト 50 個に約 10 日間隔で 3 回、先端にブラシチップを装着したシリンジを用い、各回、各個に 100 μL の懸濁液をトマト表面に均一に塗布した。最終処理後に、分析方法開発のためトマトを 5 個 (0 日後)、及び、最終処理後 10 日目に代謝研究用にトマトを 45 個採取した。処理は実圃場における使用方法 (3 回)、予想される残留量 (3 回処理直後で 3mg/kg) を模して行い、50 個のトマト全量に対して処理した有効成分は 10.82g、また、放射エネルギーは 44.16MBq であった (平均で、有効成分の残留濃度は約 2.1mg/kg)。

(2) トマト果実への移行性実験

代謝実験に用いるトマト樹からは分離して別に栽培しているトマト樹の2本の枝を用い、各枝の1個のトマトを標的とし、処理時には汚染を防止するためトマトにプラスチック袋をかぶせ、標的とするトマトに対して、直上、直下の葉各2枚に

$-^{14}\text{C}$ - [I] の水和剤 (含有量 50%) の懸濁液を、ブラシチップを装着したシリンジを用いて、代謝試験と同一日に各 190 μL を4枚の葉にそれぞれ塗布した。最終処理後10日に、標的とするトマト、葉、茎、花梗を採取し放射エネルギーを測定した。

3. 試料の抽出

(1) 代謝実験 (通常処理量)

最終処理10日後に採取したトマト果実はジクロロメタンに約10分間浸漬した後、表面を新鮮なジクロロメタンでさらに洗浄し、ジクロロメタンは混合して減圧下濃縮した (表面洗浄液)。表面洗浄後のトマトは小片に細切した後、ポリトロンで磨砕、均質化した。磨砕均質化したトマトは、メタノールを用いポリトロンで3回磨砕抽出し、抽出液は濃縮後、有機相と水相に分画した。

(2) 移行性実験

採取したトマト及び葉はメタノールを用い、ポリトロンで1回磨砕抽出した。

4. 分析

抽出物は有機相と水相に分画し、有機相は原則としてそのまま分析に付し、一方、水相は XAD-4 カラム、C-18 Sep Pac カートリッジで精製した後、また、抱合体は β -グルコシダーゼ、セルラーゼによる酵素分解、あるいは、1N 塩酸による酸加水分解 (還流、4時間) に付した後、分析した。さらに、抱合化の位置 (

) を確認するためにジアゾメタンによるメチル化 () を行った。各成分は TLC、HPLC、GC/MS、 ^1H -NMR で分析し、代謝物の構造を同定した。放射エネルギーは、液体試料は直接、また、固体試料は燃焼した後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

【結果】

1. 放射能の移行性 (表1)

トマト果実に対して直上、直下の葉各2枚に ^{14}C - [I] を塗布した後、10日にトマト、葉を採取して、放射能の移行量を測定したところ、果実には処理放射能に

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。
 対して<0.01~0.02%のみが見い出された。この結果より、葉に塗布した放射能はほとんど果実へは移行しないことが判明した。

表1. トマト樹の葉に処理した¹⁴C-[I]のトマト移行性

部位	処理量に対する割合 (%) ¹⁾
葉	63.5~66.7
トマト果実	<0.01~0.02
合計	63.6~66.7 ²⁾

1) 2反復の実験結果

2) 100%に対する差分は揮散によるものと考えられる。

2. 代謝試験

(1)放射能の総残留及び分布 (表2)

トマトの表面に¹⁴C-[I]水和剤(50%)の懸濁液を塗布した後、最終処理10日後に収穫して放射能を測定した。

10日後のトマト果実全体の総残留放射能(TRR)は親化合物換算値として1.67mg/kgであった。放射能は大部分が表面洗浄液中より回収され(トマトよりの回収放射能の89.3%、1.49mg/kg)、抽出後の水相(8.9%、0.15mg/kg)及びn-ヘキサン相(1.3%、0.02mg/kg)の放射能は少なかった。また、抽出後の固型残留物中にはわずか0.5%、0.01mg/kgが留まっていたにすぎなかった。

表2. ¹⁴C-[I]をトマト表面に塗布した後の放射能の残留及び分布

分画	回収放射能に対する割合	
	%	mg/kg
10日後		
表面洗浄液 (ジクロロメタン)	89.3	1.49
水相	8.9	0.15
n-ヘキサン相	1.3	0.02
固型残留物	0.5	0.01
合計	100	1.67

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(2) 表面洗浄液中で同定された成分 (表 3)

トマトの表面をジクロロメタンで洗浄した表面洗浄液中には未変化親化合物のみが存在し、NMR、MSスペクトル等から同定され、その量はトマトより回収された放射能の全量 89.3%、1.49mg/kg であった。

(3) 抽出後の水相中で同定された成分

トマトを表面洗浄した後、抽出し、水相 (回収量の 8.9%) と有機相 (1.3%) に分画した。水相から 種類の成分が確認され、このうち 種類が同定された。同定された成分のうち、親化合物の が合計で回収量の が検出された (

)。また、代謝物で最大の成分は である
る で、合計で 4 が検出された。同定された成分の構造は と
、及び、それぞれの

であった。また、 である
及び
がそれぞれ 検出された。その他の 種類の代謝物は構造決定されなかったが、それらの量は の範囲であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 3. トマトに¹⁴C-フェンヘキサミド [I] を塗布した後の代謝 (10 日後)

成分	回収放射能に対する割合 ¹⁾	
	%	mg/kg
<u>表面洗浄液</u>	(89.3)	(1.49)
フェンヘキサミド [I]	89.3	1.49
<u>水相</u>	(8.9)	(0.15)
<u>有機相</u>	1.3	0.02
<u>固体残留物</u>	0.5	0.01
<u>合計</u>	100	1.67

1) トマト中で回収された放射能を 100%とした割合

(4) 親化合物、代謝物の同定率

表面洗浄液、抽出後の水相中の放射能成分同定率はトマト中の TRR の 95.9%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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

(5) 推定代謝経路 (図1)

[I] のトマトにおける代謝経路は主に2種類の経路が認められ、1つの経路は
であり、別の経路は親化合物の
であった。しかし、これらの経路の割合は小さく、放射
能の大部分は未変化親化合物として残留していた。

図1. フェンヘキサミドのトマト中の推定代謝経路

2. 植物における代謝試験

(4) フェンヘキサミドのレタスにおける代謝

(代謝資料 No. 5)

試験機関： 社 代謝・残留研究所 ()

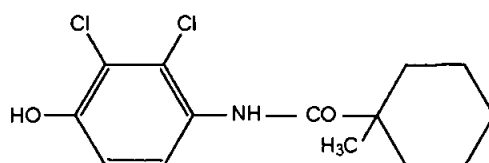
[GLP対応]

報告書作成年月日：1999年01月28日

供試標識化合物

化学名： *N*-(2,3-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-1-
メチルシクロヘキサンカルボキサミド

化学構造：



*：標識部位

標識： $-^{14}\text{C}$ -フェンヘキサミド [I]
(比放射能：1.70MBq/mg、放射化学的純度>99%)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由はP.代-10に記す。

【方法】

1. 作物

用いたレタスの品種はVictoria Kingで5葉期のレタス18株を1m²のプランタに移植し(1997年2月20日)、試験に用いた。栽培は温室内で行い、適宜な灌水と、最小限の加肥を行った。

2. 薬剤処理及び試料採取

以下の要領で2回散布処理をした。第1回目の散布はレタスが5葉期の時で1997年2月21日(移植1日後)に実施し、第2回目の散布はレタスが収穫期の大きさの約1/2の作物ステージであり、かつ、収穫の7日前に相当する1997年3月19日に行った。

$-^{14}\text{C}$ -[I]の顆粒水和剤(含有量50%)165.28mg(有効成分84.3mg、143.3MBq)を100mlの水で懸濁し、この懸濁液をコンピューター制御の自動散布機を用いて18株のレタスに散布した。この散布量は実圃場における散布量である有効成分843g/haに相当する。

10株のレタスを1997年3月26日に収穫した（第1回目の散布後約35日、最終散布後7日）。収穫したレタスは混合、秤量後、液体窒素で均一化し、約50gずつに分けて -20°C で保存した。

3. 試料の抽出

レタスはメタノール、水/メタノール（1:1, %）で磨砕抽出した。水/メタノール抽出液は溶媒を留去後、水相をジクロロメタンで抽出した。有機相、水相、抽出残留物はそれぞれ放射能を測定した。

4. 分析

抽出物は有機相と水相に分配し、水相は β -グルコシダーゼ、セルラーゼにより抱合体を酵素分解、あるいは、1N塩酸による酸加水分解に付した。TLC、HPLC、GC/MS、 $^1\text{H-NMR}$ で分析し、代謝物の構造を同定した。放射エネルギーは、液体試料は直接、また、固体試料は燃焼した後、液体シンチレーションカウンターで測定した。

【結果】

1. 放射能の残留量、分布

放射能はほとんど定量的に（総残留量TRRの98.1%）抽出され、そのうちでジクロロメタン相に92.2%（18.28 mg/kg）及び水相に5.9%（1.16mg/kg）が存在し、一方、未抽出分画として1.9%（0.39mg/kg）が観察された。

2. 代謝

（1）ジクロロメタン相

TRRの92.2%のうち、フェンヘキサミド[I]が大部分の90.7%（17.99mg/kg）を占め、少量の放射能（1.5%、0.29mg/kg）がTLCの原点に留まっていた。

（2）水相

TRRの5.9%に相当する水相中放射能からいずれも少量（TRRの<1%）の代謝物が検出され最大存在量の
がTRRの
が検出された他、
が
認められた。

3. 推定代謝経路 (図1)

[I]をレタスに茎葉散布した後の[I]の代謝は他の作物と同様に2種類の主要な経路によって進行した。第1の経路は[I]の _____ であり、第2の主要な経路は _____ を受けるものであった。代謝物の生成量は少なく、残留物の大部分は[I]であった。

図1. フェンヘキサミドのレタス中の推定代謝経路

2. 植物における代謝試験

(5) フェンヘキサミドのエンドウにおける代謝

(代謝資料 No. 6)

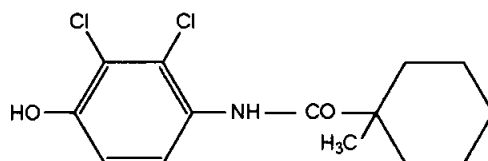
試験機関： 社 代謝・残留研究所（ドイツ）
[GLP対応]

報告書作成年月日：1999年9月9日

供試標識化合物

化学名： *N*-(2,3-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-1-
メチルシクロヘキサンカルボキサミド

化学構造：



*：標識部位

標識： $-^{14}\text{C}$ -フェンヘキサミド [I]
(比放射能：1.70MBq/mg、放射化学的純度>98%)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由はP.代-10に記す。

【方法】

1. 作物

供試したエンドウの品種はEdulaであり、砂壌土を詰めた1m²のプランターで栽培した。栽培は温室で行い、適宜な灌水、及び、最小限の病虫害防除と加肥を行った。

2. 薬剤処理及び試料採取

(1) 処理（散布）

$-^{14}\text{C}$ - [I] の水和剤（含有量50%）の散布液を、処理量750g有効成分/ha（散布水量1000L/ha）となるようにエンドウに対して計2回の散布処理を行った。第1回目の散布は開花開始時（生育ステージ61）に、第2回目（最終）の散布は花が満開となった時点（生育ステージ65）に実施した。2回にわたる散布の累計施用量（1686g有効成分/ha）は、圃場施用量に相当する。

(2) 試料の採取

下表に示す計 3 回の試料採取を行った。

採取時期	最終散布後の経過日数	植物のステージ	採取部位
第一回採取	9 日	花が満開後から莢形成に至る期間	青刈り体 (地上部)
第二回採取	21 日	莢及び実の徒長期	莢 (内部の実を含む)
			蔓
最終採取	77 日	成熟期	乾燥種実
			莢 (*)
			蔓 (*)

(*) 分析には供しなかった。

エンドウの地上部を刈り取り、上記の採取部位に分割して重量を測定した後、液体窒素中にて均一化した。均一化した各採取部位の一定量について、即時抽出を行った。

(3) 試料の抽出及び放射能測定

試料の抽出として、通常抽出と徹底抽出を行った。

通常抽出 (青刈り体、莢、蔓、乾燥種実) : 均一化した一定量について、メタノール (約 200mL×2 回) 及びメタノール/水混合液 (1:1、約 200mL×1 回) の順で冷浸させた。各冷浸液を濾過して合わせ、固相 [通常抽出] (報告書では固相 1 と記載) とメタノール/水抽出液を得た。抽出液をロータリーエバポレーター (40°C) により蒸発させ、水性残渣を得た。この水性残渣についてジクロロメタン抽出 (約 200mL×3 回) を行い、ジクロロメタン相 [通常抽出] 及び水相 [通常抽出] (報告書ではそれぞれジクロロメタン相 1 及び水相 1 と記載) を得た。

徹底抽出① (青刈り体、莢、蔓) : 通常抽出で得られた固相 [通常抽出] について、ジオキサン/2 N 塩酸混合液 (9:1、20mL) で加水分解 (100°C、1 時間) 処理を行い、ジオキサン/2 N 塩酸抽出液及び固相 (非抽出性残渣) を得た。ジオキサン/2 N 塩酸抽出液に水を加え、ロータリーエバポレーター (40°C) によって蒸発させ、水性残渣を得た。この水性残渣についてジクロロメタン分配 (約 20mL×3 回) を行い、ジクロロメタン相 [徹底抽出] 及び水相 [徹底抽出] (報告書では、それぞれジクロロメタン相 2 及び水性相 2 と記載) を得た。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

莢（第二回採取）については、ジオキサン/2 N塩酸抽出液中の放射能が少なかつたため、ジクロロメタン分配は行わなかつた。

徹底抽出②（乾燥種実）：固相〔通常抽出〕についてジオキサン/2 N塩酸混合液（9：1、20mL）で徹底抽出①と同様に処理を行い、ジオキサン/2 N塩酸抽出液及び固相〔徹底抽出〕（報告書では、固相2と記載）を得た。

ジオキサン/2 N塩酸抽出液には徹底抽出①と同様に処理を行い、ジクロロメタン相〔徹底抽出〕及び水相〔徹底抽出〕（報告書では、それぞれジクロロメタン相2及び水性相2と記載）を得た。

固相〔徹底抽出〕について、更に1 N水酸化カリウムで加水分解処理（100℃、1時間）し、水酸化カリウム抽出液及び固相（非抽出性残渣）を得た。

通常抽出及び徹底抽出により得られた固相は、風乾後に燃焼させて液体シンチレーション（略称：LS）により放射能を測定した。また抽出により得られた放射性溶液も、液体シンチレーションにより放射能を測定した。

(4) 溶液の分析及び加水分解処理

各抽出処理により得られた溶液中の放射性成分は、3種類の溶媒系を用いるラジオ薄層クロマトグラフィー（略称：TLC）により分析した。

またアグリコンの分析として、通常処理の水性相1について抱合体のβ-グルコシダーゼ、セルラーゼによる酵素分解あるいは1N塩酸による酸加水分解（還流、4時間）を行い、酢酸エチルに分配した。得られた酢酸エチル相をラジオTLCにて分析した。

各成分はTLC、LC/MS、¹H-NMRで分析し、代謝物の構造を同定した。

(5) 抽出/加水分解及び分析のフローチャート

本試験で使用した抽出/加水分解及び分析のフローチャートを図1（通常抽出）、図2（徹底抽出：青刈り体、莢及び蔓）及び図3（徹底抽出：乾燥種実）に示す。

図 1：抽出工程（通常抽出）のフローチャート

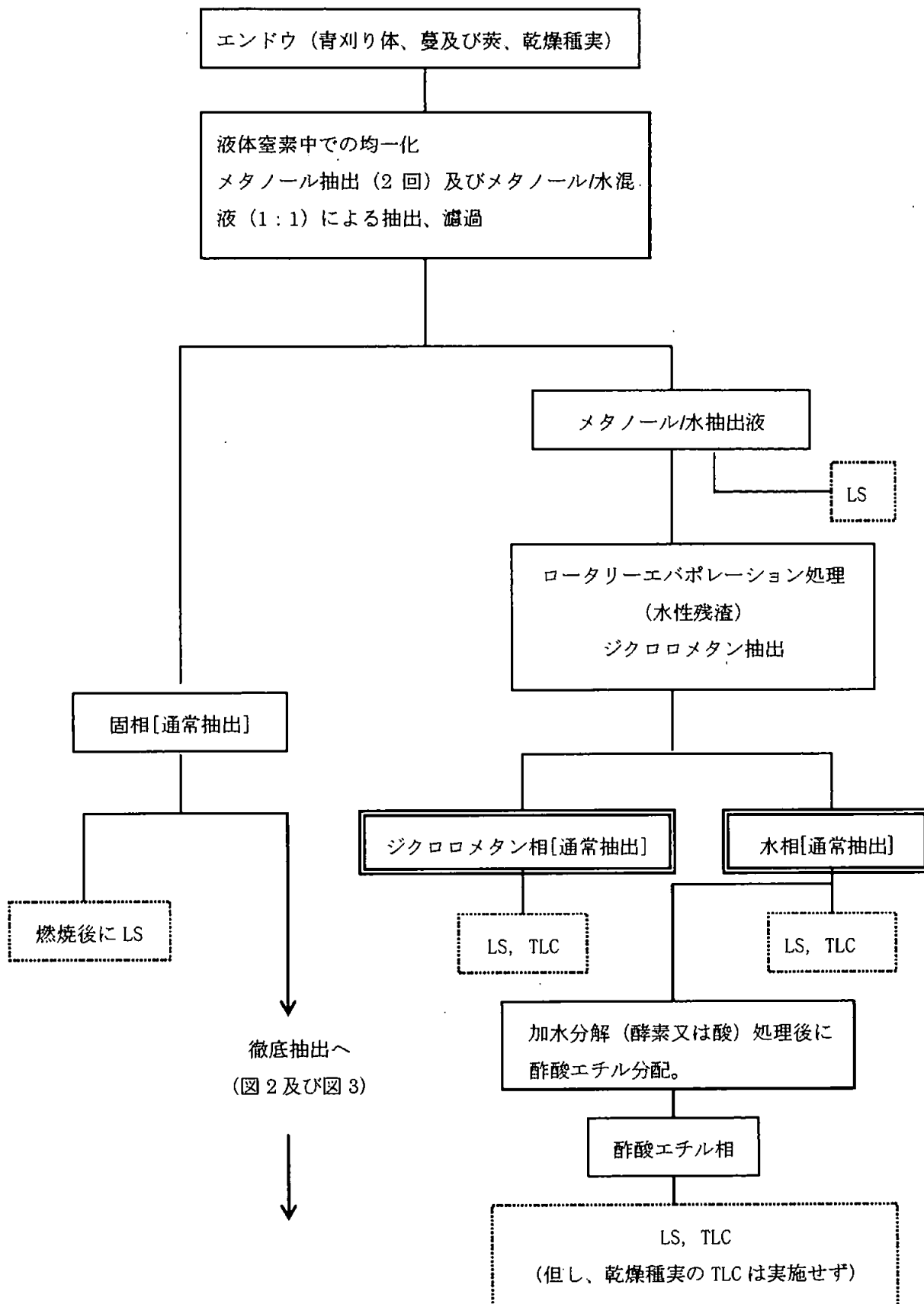


図 2：抽出工程（徹底抽出：青刈り体、莢及び蔓）のフローチャート

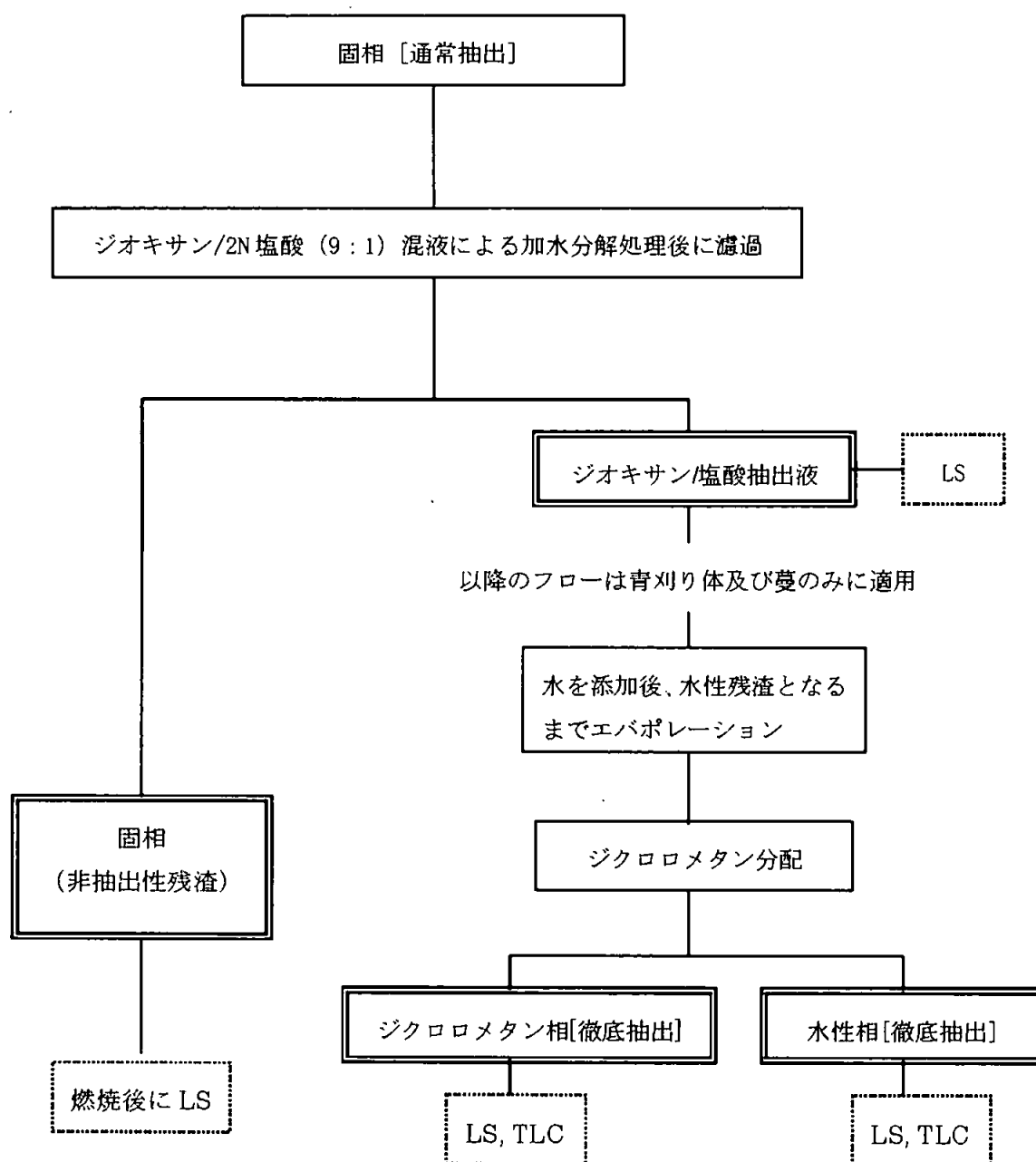
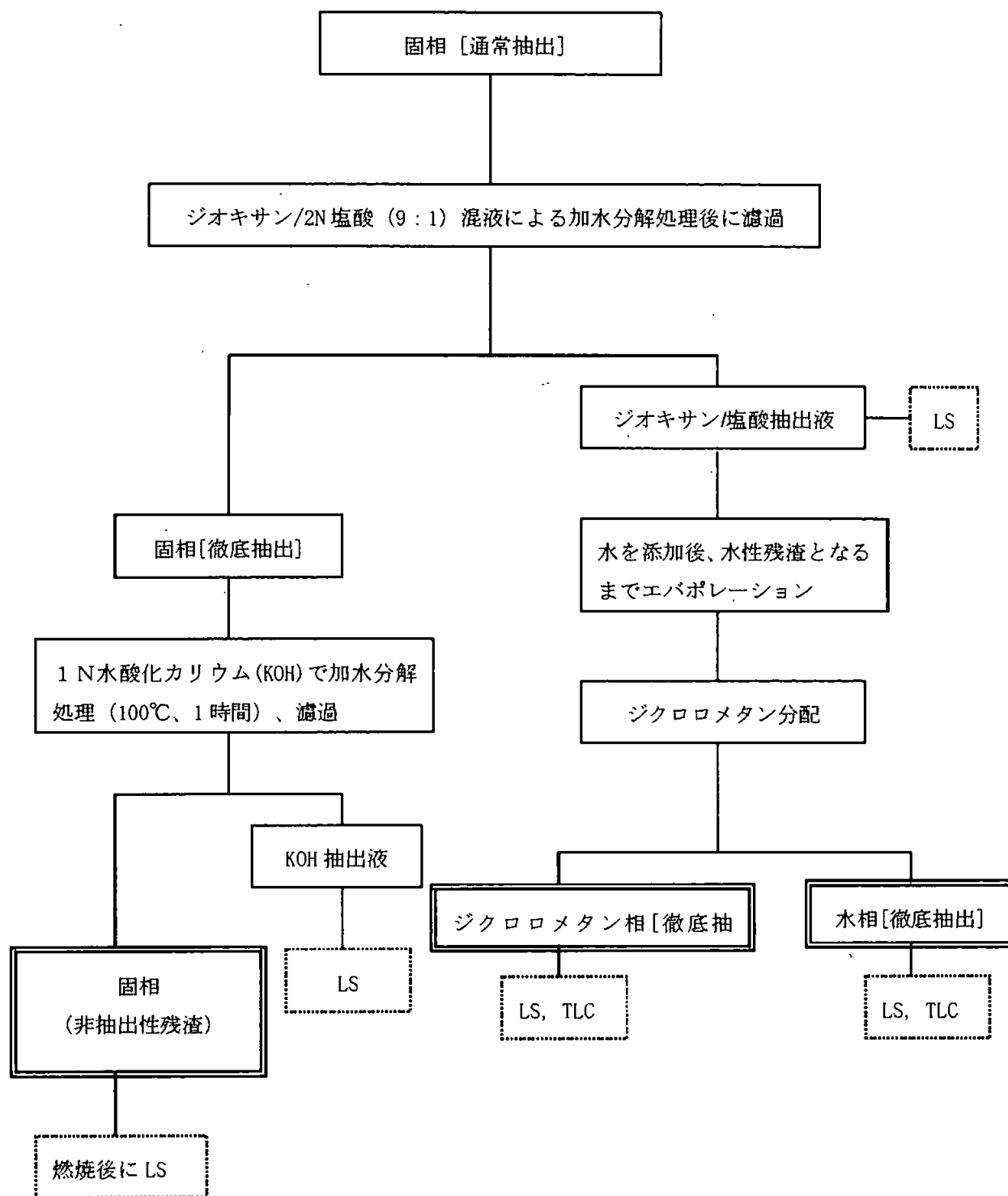


図 3：抽出工程（徹底抽出：乾燥種実）のフローチャート



結果

(1) 総放射能残留

各採取試料における総放射能残留 (TRR) を表 1 に示す。

表 1 : 総放射能残留 (TRR)

(% : TRR に占める割合、mg/kg : 有効成分換算濃度)

採取試料		最終散布後 9 日		最終散布後 21 日				最終散布後 77 日	
		青刈り体		蔓		莢		乾燥種実	
		%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
通常抽出	ジクロロメタン相[通常抽出]	88.0	21.15	86.8	12.43	79.3	0.18	17.0	0.03
	水相[通常抽出]	5.4	1.30	6.0	0.86	14.2	0.03	14.0	0.03
	小計 (申請者が計算)	93.4	22.45	92.8	13.29	93.5	0.21	31.0	0.06
徹底抽出	ジオキササン/2N塩酸抽出液	(4.6)	(1.08)	(5.7)	(0.82)	3.0	≤0.01	(42.2)	(0.09)
	ジクロロメタン相[徹底抽出]	1.0	0.23	1.1	0.16	該当無し		14.2	0.03
	水相[徹底抽出]	3.6	0.85	4.6	0.66	該当無し		28.0	0.06
	水酸化カリウム抽出液	該当無し						17.2	0.03
	固相 (非抽出性残渣)	2.0	0.49	1.5	0.22	3.5	≤0.01	9.6	0.02
	小計 (申請者が計算)	6.6	1.57	7.2	1.04	6.5	≤0.02	69.0	0.14
合計 (総放射能残留) (通常抽出の小計 + 徹底抽出の小計)		100.0	24.02	100.0	14.32	100.0	0.23	100.0	0.20

()内の数値は申請者が計算。

第一回 (最終散布 9 日後) 及び第二回 (同 21 日後) の時点で採取された青刈り体、蔓及び莢における TRR は、いずれも通常抽出により各 TRR の大部分 (それぞれ TRR の 90% 以上) が容易に抽出された。青刈り体、蔓及び莢から通常抽出された放射能は、主としてジクロロメタン相 [通常抽出] から回収された。青刈り体、蔓及び莢の徹底抽出後、固相 (非抽出性残渣) として残存した放射能は、各 TRR の 1.5~3.5% (≤0.02~1.57 mg/kg) であった。

一方、最終時点 (最終散布 77 日後) で採取された乾燥種実の TRR は、通常抽出では 31.0% が抽出されたにとどまった。青刈り体、蔓、莢とは異なり、乾燥種実から通常抽出された放射能は、ジクロロメタン [通常抽出] 及び水相 [通常抽出] にほぼ同程度分配された。

通常抽出後に残存した放射能 (69.0%) は、乾燥種実の徹底抽出後にジクロロメタン相、水性相及び水酸化カリウム抽出液からそれぞれ 14.2%、28.0% 及び 17.2% 回収された。固相 (非抽出性残渣) として残存した放射能は TRR の 9.6% (0.02 mg/kg) であった。

(2) 各分画中の代謝物の定量

通常抽出処理で回収された放射能のラジオTLCによる分析結果を表2に示す。

表2. 通常抽出：ラジオTLCによる代謝物の組成及び生成量

(%：TRRに占める割合、mg/kg：有効成分換算濃度)

採取試料		最終散布後 9 日		最終散布後 21 日				最終散布後 77 日	
		青刈り体		蔓		莢		乾燥種実	
		%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
ジクロロ メタン相 [通常 抽出]	フェンヘキサミド[I]	85.7	20.60	84.5	12.10	77.5	0.18	9.5	0.02
	拡散放射能域 (非極性)	—	—	—	—	—	—	4.7	0.01
	TLC 原点	2.3	0.55	2.3	0.33	1.8	<0.01	2.8	<0.01
	小計	88.0	21.15	86.8	12.43	79.3	0.18	17.0	0.03
水 相 [通常 抽出]	フェンヘキサミド[I]	—	—	—	—	2.7	≤0.01	—	—
		TLC 原点	1.3	0.30	1.2	0.18	9.7	<0.02	14.0
	小計	5.4	1.30	6.0	0.86	14.2	0.03	14.0	0.03

ジクロロメタン相 [通常抽出] から回収された放射能は、青刈り体、蔓及び莢ではその大部分が未変化の親化合物フェンヘキサミド[I]であると認められ、その他にTLC原点に留まった微量の放射能が認められた。

一方、乾燥種実では、ジクロロメタン相 [通常抽出] から回収された放射能 (TRRに対して17.0%) の約半分 (TRRに対して9.5%) が、未変化の親化合物フェンヘキサミド[I]であると認められた。また、TLC上で拡散した放射能域が認められた (TRRの4.7%、0.01 mg/kg)。

水相〔通常抽出〕から回収された放射能は、青刈り体及び蔓ではいずれも多数の微量代謝物で構成されていた。莢では、代謝物 12~14 が合計して痕跡量のみ認められた。

乾燥種実では、水相〔通常抽出〕から回収された放射能（TRR の 14.0%、0.03 mg/kg）は全て TLC 原点に留まった。乾燥種実の水相〔通常抽出〕から回収された放射能は、更に加水分解（アグリコンの特徴付け）に供された。

徹底抽出処理で回収された放射能のラジオ TLC による分析結果を表 3 に示す。

表 3. 徹底抽出：ラジオ TLC による代謝物の組成及び生成量

(%：TRR に占める割合、mg/kg：有効成分換算濃度)

採取試料		最終散布後 9 日		最終散布後 21 日				最終散布後 77 日	
		青刈り体		蔓		莢		乾燥種実	
		%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
ジクロロメタン相 〔徹底抽出〕	フェンヘキサミド〔I〕	0.4	0.10	0.4	0.06	ジオキサン/2N 塩酸抽出液中の放射能が少なかったため、ジクロロメタン分配を実施しなかった。	11.4	0.02	
	TLC 原点	0.6	0.13	0.7	0.10		2.8	≤0.01	
	小計	1.0	0.23	1.1	0.16		14.2	0.03	
水相 〔徹底抽出〕	フェンヘキサミド〔I〕	—	—	—	—		—	—	
	拡散放射能域（非極性）	—	—	—	—		8.2	0.02	
	拡散放射能域	—	—	—	—	13.7	0.03		
	TLC 原点	2.6	0.61	3.3	0.47	6.0	0.01		
	小計	3.6	0.85	4.6	0.66	28.0	0.06		

ジクロロメタン相〔徹底抽出〕の放射能は、青刈り体、蔓及び乾燥種実いずれも親化合物フェンヘキサミド〔I〕及び TLC 原点の放射能で構成されていた。

水相〔徹底抽出〕の放射能パターンは青刈り体及び蔓で類似しており、種類の化合物（ ）が極微量認められた。

乾燥種実の水相〔徹底抽出〕の放射能は、TLC 原点に留まるか又は TLC 上で 2 種類の領域に拡散し、個別の成分に分離することはできなかった。

(3) 水相 [通常抽出] の加水分解 (アグリコンの特徴付け)

各採取部位の水相 [通常抽出] について、β-グルコシダーゼ、セルラーゼによる酵素分解あるいは 1N 塩酸による酸加水分解を行った結果、セルラーゼ及び酸加水分解処理は同様のパターンが得られたが、β-グルコシダーゼによる処理は効果的ではなかった。

青刈り体、蔓、莢及び乾燥種実の水相 [通常抽出] について酸加水分解を行った後、酢酸エチルに分配した。酢酸エチルへの分配率 (いずれも申請者が計算) は、青刈り体 : 44%、蔓 : 48.8%、莢 : 33.3% であり、一方、乾燥種実では 6.1% のみが酢酸エチル相に分配された。

得られた酢酸エチル相のラジオ TLC 結果を表 4 に示す。

表 4 : 水相 [通常抽出] - 酸加水分解後の成分

(% : TRR に占める割合、mg/kg : 有効成分換算濃度)

	最終散布後 9 日		最終散布後 21 日				最終散布後 77 日	
	青刈り体		蔓		莢		乾燥種実	
	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
水相 [通常抽出] における放射能	5.4	1.30	6.0	0.86	14.2	0.03	14.0	0.03
水相 [通常抽出] の酸加水分解後に酢酸エチル相に分配された放射能	2.4	0.57	2.9	0.42	4.7	0.01	0.9	<0.01
酢酸エチル相に分配された放射性成分 (内訳)	フェンヘキサミド [1]	1.0	0.24	1.5	0.22	3.7	≤0.01	酢酸エチル相に分配された放射能が極めて少ないため、TLC 分析を実施せず。
	TLC 原点	0.6	0.14	0.4	0.06	0.7	<0.01	

表 4 に示されるとおり、青刈り体、蔓及び莢では、水相 [通常抽出] の TLC 分析で認められなかった

が認められた。またフェンヘキサミドは、青刈り体及び蔓の水相 [通常抽出] の TLC 分析において認められなかったが、酸加水分解後に認められた。この加水分解の結果から、フェンヘキサミドは未抱合体/グルコシド抱合体として存在し、水酸化誘導体はアグリコンとして存在していると示された。

以上の結果から、フェンヘキサミドのエンドウにおける代謝を次のとおり要約する。

- ・エンドウにおいてフェンヘキサミドは二種類の経路で代謝される。第一の経路は
であり、第二の経路は
であった。

- ・エンドウの各採取部位 T R R における主たる構成成分は未変化の親化合物であると示された。本試験で得られたフェンヘキサミドの総量及びアグリコンの量を下表に示す。また同表には特徴付けられた成分量及び非抽出性残渣量も示す。

(% : T R R に占める割合、mg/kg : 有効成分換算濃度)

		青刈り体		莖		莢		乾燥種実	
		%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg	%	mg/kg
同 定 され た 成 分	フェンヘキサミド [I] (遊離体及びアグリコンとして)	87.1	20.94	86.4	12.38	81.2	0.19	20.9	0.04
	同定された成分の合計	87.7	21.06	87.1	12.47	81.6	0.19	20.9	0.04
特徴付けた成分量 (合計) (抽出/加水分解/TLC による)		10.4	2.47	11.5	1.64	15.0	0.03	69.4	0.14
非抽出性残渣		2.0	0.49	1.5	0.22	3.5	<0.01	9.6	0.02
合 計 (申請者が計算、小数点以下は四捨五入した)		100.0	24.02	100.0	14.33	100.0	0.22	100.0	0.20

- ・フェンヘキサミドのエンドウにおける代謝経路を次頁に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

フェンヘキサミドのエンドウにおける推定代謝経路

[]は推定代謝物を示す。

3. 土壤中動態

(1) フェンヘキサミドの好氣的土壤中動態

(代謝資料 No. 1)

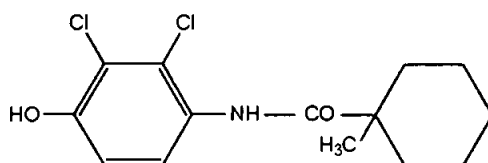
試験機関： 社 代謝・残留研究所 ()
[GLP対応]

報告書作成年月日：1996年12月20日

供試標識化合物

化学名： *N*-(2,3-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-1-
メチルシクロヘキサンカルボキサミド

化学構造：



*：標識部位

標識： $-^{14}\text{C}$ -フェンヘキサミド [I]

(比放射能：3.85MBq/mg、放射化学的純度>98%)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由はP.代-10に記す。

【方法】

1. 土壌

以下の4種類の新鮮土壌を用いた。

土 壌	採取地	土 性 (USDA 法)	pH (H ₂ O)	有機炭素 含量(%)
Howe	Indiana (USA)	砂壤土	7.1	1.09
BBA2・1	Jockgrim (ドイツ)	砂土	5.9	0.7
BBA2・2	Hanhofen (ドイツ)	壤質砂土	6.6	2.58
Laacher Hof AXXa	Monheim (ドイツ)	砂壤土	7.0	1.41

2. 処理及び処理量

土壌は2mmの篩にかけ、土壌水分は試験期間を通じ、0.33バールにおける水分含量の75%(USA土壌Howe)、あるいは、最大容水量の40%(ドイツBBA2.1、BBA2.2、Laacher Hof)に保持した。

^{14}C -[I]のアセトニトリル溶液を少量の土壌(約390 μL /20-50g土壌)に加え、かき混ぜながら溶媒を留去した後、残りの土壌(1100~1200g)に加えて均一に混合した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

処理量は、167 μ g ai/100g 乾土で、この量は圃場において 3.75kg ai/ha（慣行処理量の約 1.1 倍）に相当した。

3. インキュベーション及び試料採取

300ml の三角フラスコに土壌を入れ、 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 及び揮発性有機化合物の捕捉装置（ソーダライム及びポリウレタンスポンジ）を取り付けて 20°C の暗所下で好氣的にインキュベーションした。

土壌試料の採取は、4 種類の土壌に共通して、インキュベーション 0、1、3、7、14、30、59、100 日後に、また、USA 土壌（Howe）については、さらに、121、181、269、365 日に採取し分析した。

土壌中微生物のバイオマスを 0、100 日後（USA 土壌はさらに 181、365 日後）に土壌試料を採取して測定した。

4. 抽出、測定

1) 揮発性物質及び $^{14}\text{C}\text{O}_2$

ポリウレタン栓（揮発性物質捕捉用）をエタノールで抽出した。

ソーダライム（ $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 捕捉用）に 18% 塩酸を徐々に滴下し、発生した $^{14}\text{C}\text{O}_2$ を冷却した 3 連のオキシダイザー用吸収剤（Carbosorb）と液体シンチレーション測定用カクテル（PermafluorE⁺）の混液に吸収させ、液体シンチレーションカウンターで測定した。

2) 土壌

土壌は混合溶媒系（アセトン：水：塩酸 94：5：1）及び水で抽出し、抽出物は有機相と水相に分割して、TLC、HPLC、 $^1\text{H-NMR}$ 、GC/MS、LC/MS、MS/MS により放射能成分の構造を同定した。

3) 結合性残留物

結合性残留物はメタノール中で還流（6 hr）、あるいは、アセトン/濃塩酸（3：1 v/v）で還流（2 hr）抽出した後、有機相と水相に分割し、クロマトグラフィーにより分析した。

一方、また、結合性残留物は 0.01M ピロリン酸ナトリウムで振とう抽出し、次いで、硫酸酸性化（pH 2）してフルボ酸分画（上清）と、フミン酸分画（沈降物）に分画した。また、抽出後の土壌残量をフミン分画として ^{14}C を測定した。

5. 滅菌土壌実験

結合性残留物の生成、構成物質に関してより詳細な知見を得るため、また、土壌抽出法により人工産物が生成するか否かについて調べるために実施した。試験方法は前述の方法に準じて実施した。

土壌はオートクープ中、121°C、1 気圧で約 1 時間滅菌処理した。無菌条件下、同様に薬剤を処理した後、28 日間インキュベーションし、経時的（0、2、7、28 日後）に採取し、滅菌性のチェックと抽出物をクロマトグラフィーで分析した。

【結果】

1. 土壌中の微生物活性

用いた4種類の土壌のバイオマスはインキュベーション 100 日後において以下に示すように減少した。

これらは、栄養物の消費、生育のためのエネルギーや炭素源となる有機物質の不足によるもので、室内実験ではやむを得ないものと考えられる。

インキュベーション	バイオマス残存割合 (%) ¹⁾			
	Howe (USA)	BBA2.1 (ドイツ)	BBA2.2 (ドイツ)	Laacher Hof (ドイツ)
100 日後	63	38	62	68
181 日後	52	— ²⁾	—	—
365 日後	50	—	—	—

1) 実験開始時のバイオマス量を 100 とする。

2) 実験せず。

2. 物質収支 (表 1)

抽出放射能、非抽出性残留物、揮発性物質の総量として総回収量を算出すると、4種類の土壌を総合して 94.9~103.7%であった。

表 1. ¹⁴C [1] が土壌中で対比的に代謝された後の¹⁴Cの分布

インキュベーション期間 (日)	処理量に対する割合 (%) ¹⁾															
	USA 土壌 Howe				ドイツ土壌 BBA 2.1				ドイツ土壌 BBA 2.2				ドイツ土壌 Laacher Hof			
	抽出 分画	未抽出 残留物	¹⁴ C O ₂	合計	抽出 分画	未抽出 残留物	¹⁴ C O ₂	合計	抽出 分画	未抽出 残留物	¹⁴ C O ₂	合計	抽出 分画	未抽出 残留物	¹⁴ C O ₂	合計
0	77.6	20.5	-	98.1	89.7	8.0	-	97.6	92.9	4.3	-	97.2	90.6	9.7	-	100.3
1	39.0	58.8	1.1	98.9	51.2	46.1	1.0	98.3	65.8	33.3	0.8	99.9	40.1	62.4	1.2	103.7
3	27.8	70.5	2.8	101.0	42.4	53.8	2.6	98.8	44.3	54.1	2.4	100.8	25.2	75.0	2.9	103.1
7	23.2	73.9	4.6	101.6	38.0	57.1	4.8	99.9	30.8	62.4	4.7	97.9	18.7	80.2	4.8	103.7
14	18.6	75.6	7.0	101.1	35.0	57.6	7.3	99.9	23.7	65.4	7.8	96.9	14.8	80.7	6.8	102.3
30	15.2	74.6	10.0	99.8	31.8	57.7	9.4	98.9	17.9	66.9	11.5	96.3	11.9	78.6	9.6	100.1
59	12.3	74.3	14.1	100.6	29.2	53.9	15.0	98.1	14.5	68.7	15.7	98.9	10.1	77.5	13.6	101.2
100	10.9	70.8	18.4	100.1	26.4	50.0	20.6	97.0	12.6	62.6	19.7	94.9	9.2	76.9	17.8	103.6
121	10.4	68.1	19.9	98.3												
181	9.5	68.0	23.0	100.4												
269	8.4	63.0	26.0	97.4												
365	8.5	61.1	29.9	99.4												

1) 2 反復の平均データ

3. 滅菌土壌による代謝

滅菌土壌中で ^{14}C -[I]を同条件下でインキュベーションすると、28日後の総回収率は処理量の99.6%であり、そのうち抽出分画は90.5%であった。また、結合性残留物は5.8%、 $^{14}\text{CO}_2$ は $\leq 0.1\%$ であった。

この結果、及び、次項以降に述べるように、土壌に添加した ^{14}C -[I]は好氣的に代謝を受け、結合性残留物が急速に増加することから、これらの結合性残留物は[I]の微生物による分解、変換と、生成した分解・変換化合物が土壌有機物に強く吸着したり、取り込まれたりした結果と考えられる。

4. 揮発性物質の生成

土壌中のバイオマス量は減少したが、土壌に添加した ^{14}C -[I]は好氣的に CO_2 にまで代謝され、発生した $^{14}\text{CO}_2$ 量は経時的に増加して、インキュベーション100日後においては4種類の土壌で処理量の17.8~20.6%であった。

また、米国土壌“Howe”は365日後において29.9%であった。

一方、揮発性有機化合物は検出されなかった。

5. 土壌の抽出及び放射能の分布

土壌は混合溶媒アセトン/水/1N塩酸(94:5:1 v/v)及び水で抽出した。抽出放射エネルギーは処理直後の77.6~92.9%から、100日後の9.2~26.4%へ減少した。抽出分画を有機相と水相に分けた場合、いずれの経過日数においても水相分画中の ^{14}C の割合は処理量の1%未満であった。

一方、結合性残留物中の ^{14}C は経時的に急速に増加し、14~30日に最大(57.7~80.7%)に達した後、減少し、100日後には50.0~76.9%であった。USA土壌においては365日後までインキュベーションを継続し、100日後に70.8%、365日後に61.1%であった。

6. 代謝物

土壌抽出物中の ^{14}C -[I]は急速に減少し、3日後で処理量の3.7~25.8%、7日後で2.3~12.2%、100日後0.9~2.3%であった(表3~6)。

一方、代謝物はTLC上12種類([I]を除く)の放射性バンドが確認され、そのうち種類([I]を除く)が同定あるいは特性化された。同定、特性化された代謝物はインキュベーション開始後1~3日で最大に達したが、その最大量は土壌の種類によっても異なるが、処理量の1~6%の範囲であった。以上より、[I]が代謝されて生成する代謝物は一旦は1~3日後に最大に達するが(表2)、その後、さらに代謝されて量が減少していくものと考えられた。

用いた4種類の土壌中で、比較的量が多く検出された代謝物は

であった。その他

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

同定、特性化された代謝物は、

であった。各代謝物が最大値を示した土壌種は異なるが、その他の土壌中でも同様の量が検出されており、土壌種、有機物含量による代謝様式、量に顕著な差はないと考えられた。

表 2. 同定、特性化された代謝物の最大量

代謝物	インキュベーション期間 (日)	最大量(処理量に対する割合%)	土 壌
			壤質砂土 BBA2.2
			砂土 BBA2.1
			砂土 BBA2.1
			砂土 BBA2.1
			砂壤土 Howe
			砂壤土 Howe

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 3. ^{14}C - [I] の砂壤土 Howe 中の好氣的分解による代謝物の割合

代謝物	処理放射エネルギーに対する割合 (%)									
	0	1	3	7	14	30	59	100	365 日	
<u>抽出物</u>	<u>77.6</u>	<u>39.0</u>	<u>27.8</u>	<u>23.2</u>	<u>18.6</u>	<u>15.2</u>	<u>12.3</u>	<u>10.9</u>	<u>8.5</u>	
・フェンキシミド [I]	50.8	12.7	4.5	2.6	1.4	1.3	1.3	0.9	<0.2	
<u>結合性残留物</u>	<u>20.5</u>	<u>58.8</u>	<u>70.5</u>	<u>73.9</u>	<u>75.6</u>	<u>74.6</u>	<u>74.3</u>	<u>70.8</u>	<u>61.1</u>	
・フェンキシミド [I]	—	—	—	—	—	4.5	4.2	4.4	4.1	
$^{14}\text{C}-\text{CO}_2$	—	1.1	2.8	4.6	7.0	10.0	14.1	18.4	29.9	
合計										

表 4. ^{14}C - [I] の砂土 BBA2.1 中の好氣的分解による代謝物の割合

代謝物	処理放射エネルギーに対する割合 (%)								
	0	1	3	7	14	30	59	100 日	
<u>抽出物</u>	<u>89.7</u>	<u>51.2</u>	<u>42.4</u>	<u>38.0</u>	<u>35.0</u>	<u>31.8</u>	<u>29.2</u>	<u>26.4</u>	
・フェンキシミド [I]	56.7	9.1	3.7	2.3	1.9	2.3	1.5	1.0	
<u>結合性残留物</u>	<u>8.0</u>	<u>46.1</u>	<u>53.8</u>	<u>57.1</u>	<u>57.6</u>	<u>57.7</u>	<u>53.9</u>	<u>50.0</u>	
・フェンキシミド [I]	—	—	—	—	—	2.7	—	2.6	
$^{14}\text{C}-\text{CO}_2$	—	1.0	2.6	4.8	7.3	9.4	15.0	20.6	
合計									

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 5. ^{14}C - [I] の壤質砂土 BBA2.2 中の好氣的分解による代謝物の割合

代謝物	処理放射エネルギーに対する割合 (%)							
	0	1	3	7	14	30	59	100 日
<u>抽出物</u>	<u>92.9</u>	<u>65.8</u>	<u>44.3</u>	<u>30.8</u>	<u>23.7</u>	<u>17.9</u>	<u>14.5</u>	<u>12.6</u>
・フェンヘキサミド [I]	85.5	50.3	25.8	12.2	6.9	3.9	2.9	2.3
<u>結合性残留物</u>	<u>4.3</u>	<u>33.3</u>	<u>54.1</u>	<u>62.4</u>	<u>65.4</u>	<u>66.9</u>	<u>68.7</u>	<u>62.6</u>
・フェンヘキサミド [I]	—	—	—	—	—	4.3	—	4.4
$^{14}\text{C}-\text{CO}_2$	—	0.8	2.4	4.7	7.8	11.5	15.7	19.7
合計								

表 6. ^{14}C - [I] の砂壤土 Laacher Hof 中の好氣的分解による代謝物の割合

代謝物	処理放射エネルギーに対する割合 (%)							
	0	1	3	7	14	30	59	100 日
<u>抽出物</u>	<u>90.6</u>	<u>40.1</u>	<u>25.2</u>	<u>18.7</u>	<u>14.8</u>	<u>11.9</u>	<u>10.1</u>	<u>9.2</u>
・フェンヘキサミド [I]	76.7	20.5	6.0	3.2	2.3	1.3	1.1	1.0
<u>結合性残留物</u>	<u>9.7</u>	<u>62.4</u>	<u>75.0</u>	<u>80.2</u>	<u>80.7</u>	<u>78.6</u>	<u>77.4</u>	<u>76.9</u>
・フェンヘキサミド [I]	—	—	—	—	—	5.0	—	3.3
$^{14}\text{C}-\text{CO}_2$	—	1.2	2.9	4.8	6.8	9.6	13.6	17.8
合計								

7. 結合性残留物の特性化

1) メタノール還流抽出

抽出後の土壌をメタノール中で6時間還流抽出すると、抽出効率は全土壌で全結合性残留¹⁴Cの約1~3%で、これは処理量の0.8~1.9%に相当した。このうち、処理量の0.2~0.6%が [I] と同定された。

2) アセトン/濃塩酸 (3 : 1 v/v) 還流抽出

抽出後の土壌をアセトン/濃塩酸 (3 : 1 v/v) で2時間還流すると、抽出効率は全土壌で処理量の約36~48%であった。この分画を有機相と水相に分画すると、有機相が約11~17%、また水相が3~11%であり、検出された放射能成分は有機相から [I] が検出され、全土壌を通じて処理量の2.6~4.6%であった。

3) ピロリン酸溶液による抽出 (フルボ酸、フミン酸、フミンの分画)

砂壤土 (Howe) 及び壤質砂土 (BBA2.2) を用いてピロリン酸溶液より抽出すると、フルボ酸、フミン酸、フミンが以下のように分画された。土壌の種類及びインキュベーション期間による違いは認められなかった。

土 壤	インキュベーション期間	結合性残留物	結合性残留物中の割合 (%)		
			フルボ酸	フミン酸	フミン
Howe (砂壤土)	7	73.9	8.7	32.7	31.7
	100	71.2	8.6	29.9	31.2
	365	60.0	7.4	25.2	26.2
BBA2.2 (壤質砂土)	14	64.9	6.9	28.9	28.9
	100	62.1	6.6	29.9	27.4

1) 処理量に対する割合。2 反復試料の一方のデータ。

8. フェンヘキサミド [I] の消失速度

[I] は用いた全ての土壌で同様の分解性を示し、インキュベーション100日後において、抽出物中に0.9~2.3%認められ、半減期 $T_{1/2}$ は ≤ 1 日であった。

9. 代謝経路 (図1)

[I] の土壌中の好氣的分解の第1段階は、

れることである。

また滅菌土壌を用いた実験から、[I] の
は酵素反応によるものであることが確認された。

別の主要な代謝経路は

が形成さ

は微生物及び/又

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バイエルクロップサイエンス株式会社にある。

一方、フェニル環は は開裂し、二酸
化炭素まで無機化された。

[I] の土壌中における好氣的代謝で、放射能成分の同定、特性化率はフルボ酸、フミン酸、フミンを加えて砂壤土 Howe の 100 日後で約 93%、また、壤質砂土 BBA2.2 の 100 日後で約 90%であった。

図1. フェンヘキサミドの好氣的土壤中における推定代謝経路

- ▶ : 主要な代謝経路
- ▶ : 副次的な代謝経路
- ▶ : 起こりうる可能性のある代謝経路 (申請者注)

4. 加水分解動態試験

(1) フェンヘキサミドの緩衝液中における加水分解

(代謝資料 No. 8)

試験機関： 社 代謝・残留研究所 ()

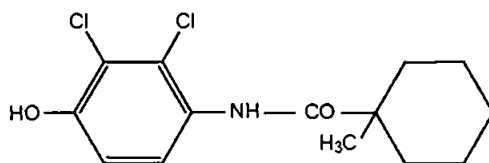
[GLP対応]

報告書作成年月日：1995年10月30日

供試標識化合物

化学名： *N*-(2,3-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-1-
メチルシクロヘキサンカルボキサミド

化学構造：



*：標識部位

標識： $-^{14}\text{C}$ -フェンヘキサミド [I]
(比放射能：3.43MBq/mg、放射化学的純度>98%)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由はP.代-10に記す。

供試水溶液： a) 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 5)
b) 0.02M トリス緩衝液 (pH 7)
c) 0.01M ほう酸緩衝液 (pH 9)

【方法】

実験はEPAガイドライン「加水分解試験」§161-1に基づいて実施した。 ^{14}C -[I]を1.25mg ai/Lの濃度で含むpH 5、7、9の3種類の緩衝液(1%以下のアセトニトリルを含む)を、最大30日間、25°Cの暗黒下でインキュベーションした。添加直後及びインキュベーション開始後3、7、14、20、24、30日目に試料を採取し、試料を直接高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に供試して、[I]及び加水分解生成物を分析した。また、供試溶液の滅菌性及びpHを0、7、20、30日後に測定した。

【結果】

1. 試験溶液の滅菌性及びpH

インキュベーション後0、7、20、30日に採取した試料を用いて滅菌性及びpHを確認した結果、試験期間を通じて滅菌条件が維持されていることが証明された。また、pHも調整した値におおよそ維持されていたことが確認された。

2. 物質収支 (表 1)

試験系からの放射能の総回収率は 30 日間のインキュベーションを通じ、処理量の約 99~102% (pH 5)、97~104% (pH 7)、95~102% (pH 9) であり、物質収支は完全であり、放射能の揮散は認められなかった。

また、HPLC の注入前後においても溶出が完全であった (回収: 約 99%)。

3. [I] 及び加水分解生成物の定量

pH 5、7、9 及びインキュベーション温度 25°C の条件において、全ての採取時点において分解生成物は全く認められず、HPLC 分析から全試料の放射能の全てが未変化親化合物 [I] であった。

4. [I] の緩衝液中の分解速度 (表 2)

[I] は緩衝液中、25°C で分解しなかったため、分解速度は算出されなかった。従って、半減期は 1 年以上と推定される (抄録作成者考察)。

表 1. 緩衝液中 (pH 5、7、9) の加水分解

緩衝液	試験期間 (処理後日数)	処理放射能に対する [I] の割合 (%)	
		割合 (%)	濃度 (ppm)
pH 5	添加直後	100.5	1.26
	3 日	100.4	1.27
	7 日	99.9	1.26
	14 日	98.7	1.25
	20 日	101.8	1.29
	24 日	100.1	1.27
	30 日	99.8	1.26
pH 7	添加直後	99.9	1.26
	3 日	99.2	1.25
	7 日	99.8	1.26
	14 日	99.8	1.25
	20 日	103.9	1.31
	24 日	97.1	1.22
	30 日	103.2	1.30
pH 9	添加直後	100.4	1.28
	3 日	99.6	1.28
	7 日	98.8	1.27
	14 日	97.5	1.25
	20 日	102.4	1.31
	24 日	95.2	1.22
	30 日	101.1	1.30

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

表 2. 推定半減期 (抄録作成者考察)

試験温度	p H	半減期
25°C	5	1年以上
	7	1年以上
	9	1年以上

5. 水中光分解動態試験

(1) フェンヘキサミドの水中光分解 (蒸留水)

(代謝資料 No. 9)

試験機関： 社 代謝・残留研究所 ()

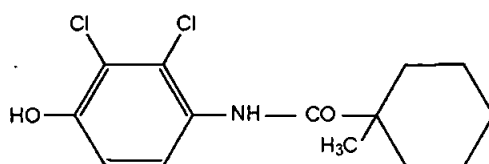
[GLP対応]

報告書作成年月日：1996年12月19日

供試標識化合物

化学名： *N*-(2,3-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-1-
メチルシクロヘキサンカルボキサミド

化学構造：



*：標識部位

標識： $-^{14}\text{C}$ -フェンヘキサミド [I]
(比放射能：3.43 MBq/mg、放射化学的純度 > 98%)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は P. 代 - 10 に記す。

【方法】

1. 材料

供試水：0.01M リン酸緩衝液、pH 7

光源：太陽光の類似波長を発するキセノンランプ
(UV ガラスフィルター付、低波長下限：290nm)
分光分布：280~830nm
光量：106 W/m² (波長範囲、300~400nm)

2. 操作

^{14}C -[I] のアセトニトリル溶液を供試水に添加し 1.10mg/L とした (アセトニトリル濃度：0.07%)。この溶液を 10mL ずつ蒸気圧滅菌した石英容器 (最大容量 25mL、長さ 52mm、幅 30mm、高さ 19mm、液表面面積 15cm²) に分注し、揮発性成分捕集装置 (揮発性有機化合物吸収用にポリウレタン栓、 $^{14}\text{C}\text{O}_2$ 吸着用にソーダライム層のカラム) を付けた。これらの容器を光照射装置に入れ、キセノンランプを用いて 25 ± 1 °C、1.5 日間連続照射で分解試験を行った。試料は 2 反復で試験開始時、0.5、1、3、

5、24時間、7、15日後に採取し、揮発性物質の発生の有無の測定、また、溶液中の総放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定、定量した。対照区として、全体をアルミホイルで覆って暗黒条件下とした石英容器を同温度条件下の乾燥器中に設定し、15日後に2反復試料を採取し、照射試料と同様に処理して回収量を測定した。また、全ての溶液を濃縮や前処理を行わずに直接HPLCで分析に付し、[I]及び代謝物の生成、及び、その生成量を測定した。代謝物はHPLCまたはTLCにより単離、精製し、GC/MS、LC/MS、NMRを用いて構造を解析した。

【結果】

1. 回収率

試験開始時の放射エネルギーを処理放射エネルギーとし、処理放射エネルギーに対する放射エネルギーの総回収率は92.1%~107.7%で、定量的に回収された(表1)。

2. 揮発性物質の発生

フェンヘキサミド [I] は光照射により速やかに分解され、CO₂への無機化は経時的に進行し、照射15日間に揮発した¹⁴C O₂は捕捉装置に吸着された量と溶液中に溶存している量を合わせ、処理放射エネルギーの41.1%であった。揮発性有機化合物は微量検出され、処理放射エネルギーに対して最大で約0.6%であった。暗所保管試料においては¹⁴C O₂は検出されなかった(表1)。

3. 推定半減期

キセノン光の連続照射による [I] の(実験条件下における)消失半減期は、擬似一次反応に基づき1.0時間であった。

環境中(北緯40度の真夏正午)における半減期を推定するため、[I]の光吸収波長295~400nmにおけるキセノンランプの光強度を、北緯40度の真夏正午における太陽光の光強度と比較したところ、キセノンランプの光強度は0.92倍であった。北緯40度における真夏の日照時間を12時間とすると、キセノンランプの連続照射を日照日数に換算すると換算係数は2[24時間(1日)÷12時間]であるから、北緯40度の環境中における [I] の推定半減期は

1.0時間(キセノン光照射での半減期)×0.92(光強度倍数)×2(換算係数)=1.8時間であった。

また、申請者が報告された実験条件下での消失半減期に基づいて算出した「東京における春期(4~6月)好条件下」の半減期は、13.6時間であった。

4. フェンヘキサミドの分解、代謝

[I]は非常に速やかに分解し、照射0.5時間後で処理量の53.5%、3時間後で6.7%、24時間後で検出限界以下であった。

緩衝液のHPLC分析により 種類の成分が確認され、そのうち 成分が

と同一とされた。これらの代謝物は
 まず、 の量が増加し、 時間後に最大()となり、そ
 の後減少し、 となった。一方、 は 時間
 後で最大(%)、また、 は 時間後に最大(%)となり、やはりそ
 の後減少して にまで減少した。[I]は段階的に
 が進行し、 は 時間後に %、
 は 時間後に %、 及び は含量
 で 時間後に %を示し、 してCO₂へ分解する
 は15日後に %と最大を示した。

表1. 緩衝液中における光照射後の代謝分解物の割合

分解物	処理放射エネルギーに対する代謝物の割合 (%) ¹⁾								
	照射時間 (時間)								対照区 ³⁾
	0	0.5	1	3	5	24 ²⁾	7日	15日	
フェンヘキサミド[I]	95.7	53.5	35.4	6.7	2.7	n. d.	n. d.	n. d.	103.1
合計	<u>97.9</u>	<u>85.6</u>	<u>85.7</u>	<u>91.6</u>	<u>89.0</u>	<u>88.2</u>	<u>63.7</u>	<u>53.3</u>	<u>104.5</u>
CO ₂ ⁵⁾	2.1	15.4	17.3	9.4	17.1	16.3	28.2	41.1	3.4
揮発性物質	-	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.2	0.1	-
総回収率	100.0	101.1	103.0	101.1	106.1	107.7	92.1	94.4	107.8

1) 試験開始時の放射エネルギーを処理放射エネルギーとした。

2) 1反復のデータ

3) 15日後のデータ

5) 溶存CO₂を含む

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

5. 代謝物の同定率

[I]の消失半減期である照射1時間後での[I]及び代謝物の同定率は約93%、また、15日後で約85%であった。

6. 推定代謝経路 (図1)

[I]は緩衝液中の光分解では、まず、の形成
から が起き、
が進み、次いで、
、CO₂への無機化が進む代謝経路が認められた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

図1. フェンヘキサミドの蒸留水中の光分解による推定代謝経路

5. 水中光分解試験

(2) フェンヘキサミドの水中光分解 (自然水)

(代謝資料 No. 10)

試験機関： 社 代謝・残留研究所 ()

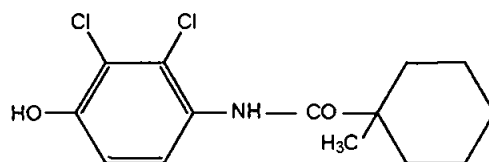
[GLP対応]

報告書作成年月日：1996年12月13日

供試標識化合物

化学名： *N*-(2,3-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-1-
メチルシクロヘキサンカルボキサミド

化学構造：



*：標識部位

標識： $-^{14}\text{C}$ -フェンヘキサミド [I]
(比放射能：3.43 MBq/mg、放射化学的純度>98%)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由はP.代-10に記す。

【方法】

1. 材料

供試水：自然水・ライン川、モンハイム/ドイツ
1995年11月22日に採取、pH7.98

光源：太陽光の類似波長を発するキセノンランプ
(UVガラスフィルター付、低波長下限：290nm)
分光分布：280~830nm
光量：142 W/m² (波長範囲、300~400nm)

2. 操作

^{14}C -[I]のアセトニトリル溶液を自然水に添加し、約2mg/Lとした(アセトニトリル濃度：0.07%)。この溶液を5mLずつ、石英容器(最大容量25mL、長さ52mm、幅30mm、高さ19mm、液表面面積15cm²)に分注し、揮発性成分捕集装置(揮発性有機化合物吸収用にポリウレタン栓、 $^{14}\text{CO}_2$ 吸着用にソーダライム層のカラム)を付けた。これらの容器を光照射装置に入れ、キセノンランプを用いて25±1℃、24時

間連続照射で分解試験を行った。試料は2反復で試験開始時、0.5、1、2、3、10、24時間後に採取し、揮発性物質の発生の有無の測定、また、溶液中の総放射エネルギーを液体シンチレーションカウンターで測定、定量した。対照区として、全体をアルミホイルで覆って暗黒条件下とした石英容器を同温度条件下の乾燥器中に設定し、24時間後に2反復試料を採取し、照射試料と同様に処理して回収量を測定した。また、全ての溶液を濃縮や前処理を行わずに直接HPLC分析に付し、[I]及び代謝物の生成、及び、その生成量濃度を測定した。

【結 果】

1. 回収率

試験開始時の放射エネルギーを処理放射エネルギーとし、処理放射エネルギーに対する放射エネルギーの総回収率は100.0%（試験開始時）から89.5%（10時間後）、90.0%（24時間後）となり、照射時間が長くなるに伴い、回収率は低下した。この原因は残留物が容器表面へ強く吸着したためと考えられ、採取後の容器を濃硫酸で洗浄する補充試験を行った結果、照射24時間後の回収率は97.7%となり、定量的に回収された（表1）。

2. 揮発性物質の発生

親化合物フェンヘキサミド [I] は光分解され、CO₂への無機化は経時的に進行し、照射24時間の試料で揮発した¹⁴C O₂は処理放射エネルギーの15.8%であった。さらに¹⁴C O₂は試料溶液中にも溶存した。暗所保管試料においては¹⁴C O₂は検出されなかった。揮発性有機化合物は最大で処理放射エネルギーの0.1%が検出されたにすぎなかった（表1）。

3. 推定半減期

キセノン光の連続照射による [I] の（実験条件下での）消失半減期は擬似一次反応に基づき0.4時間であった。

環境中（北緯40度の真夏正午）における半減期を推定するため、[I]の光吸収波長295~400nmにおけるキセノンランプの光強度を北緯40度の真夏正午における太陽光の光強度と比較したところ、キセノンランプの光強度は1.02倍であった。北緯40度における真夏の日照時間を12時間とすると、キセノンランプの連続照射を日照日数に換算すると換算係数は2[24時間(1日)÷12時間]であるから、北緯40度の環境中の自然水中における [I] の推定半減期は

0.4時間（キセノン光照射での半減期）×1.02（光強度倍数）×2（換算係数）=0.8時間となった。

また、申請者が報告された実験条件下での消失半減期に基づいて算出した「東京における春期（4~6月）好条件下」の半減期は、7.3時間であった。

4. フェンヘキサミドの分解、代謝

[I]は非常に速やかに分解し、照射0.5時間後で処理量の39.7%、1時間後で21.4%、3時間後で検出限界以下であった。

自然水のHPLC分析により 種類の成分が確認され、そのうち 成分が
であった。

これらの代謝物はまず、 の量が増加し、 時間後に最大()となり、その後減少し、 時間後には検出限界以下であった。一方、 は 時間後で最大()、また、 は 時間後に最大()となり、やはりその後減少して 時間後にはそれぞれ となった。

5. 代謝物の同定率、フェンヘキサミドの分解、代謝

[I]の消失半減期に近い照射0.5時間後の[I]及び代謝物の同定率は約79%であった。

表1. 自然水中における光照射後の代謝分解物の割合

代謝分解物	処理放射エネルギーに対する代謝物の割合 (%) ¹⁾							
	0時間	0.5時間	1時間	2時間	3時間	10時間	24時間	対照区 ²⁾
フェンヘキサミド [I]	98.0	39.7	21.4	4.2	n. d.	n. d.	n. d.	97.5
合計	<u>98.0</u>	<u>92.1</u>	<u>85.9</u>	<u>80.5</u>	<u>76.1</u>	<u>80.8</u>	<u>72.7</u>	<u>99.5</u>
CO ₂ ³⁾	1.6	4.9	8.0	10.2	14.6	6.3	15.8	0.4
揮発性物質	-	0.1	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
容器吸着残留物	0.7	1.0	1.3	1.6	1.9	2.5	1.6	3.4
総回収率	100.0	97.9	95.0	92.0	92.4	89.5	90.0	103.0

1) 試験開始時の放射エネルギーを処理放射エネルギーとした。

2) 15日後のデータ、3) 溶存CO₂を含む。

6. 推定代謝経路 (図 1)

[I] は自然水中の光分解では、まず、
から CO_2 が進み、次いで、 CO_2 が起き、
を経て、 CO_2 への無機化が進む代謝経路が認められた。

図 1. フェンヘキサミドの自然水中の光分解による推定代謝経路

6. 土壌吸着試験

(1) フェンヘキサミドの土壌吸着試験

(代謝資料 No. 11)

試験機関:

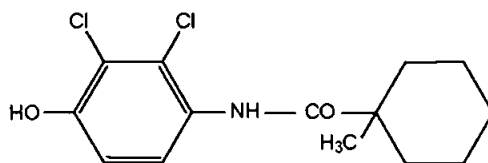
株式会社

報告年月日: 1996年5月13日

供試標識化合物:

化学名: *N*-(2,3-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-1-
メチルシクロヘキサンカルボキサミド

化学構造:



*: 標識部位

標識:

-¹⁴C-フェンヘキサミド [I]

(比放射能: 3.43MBq/mg、放射化学的純度 > 99%)

非標識:

フェンヘキサミド [I] (純度 %)

【方法】

¹⁴C-[I]を表1に示した4種類の畑地土壌を用いて、供試濃度 0.04、0.2、1.0、5.0mg/Lの4種濃度(土壌:水比=1:5、試験溶液の溶媒:0.01M塩化カルシウム水溶液、試験容器:ガラス製遠沈管)、温度25°C、平衡化時間9時間の条件で、OEC Dガイドラインに従って吸着試験を行った。加えて、1.0mg/L濃度区の試料を用いて総放射能を定量し、物質収支を算出した。

なお、平衡化到達時間は、¹⁴C-[I]及び非標識 [I] を 1.25mg/L 含む 0.01M塩化カルシウム溶液 20mL と純水 5mL で 24 時間平衡化した各供試土壌 (5g、風乾重) を最長 48 時間振とうして測定した。経時的 (振とう開始 3、6、9、12、24、36 及び 48 時間後) に水中の [I] の濃度を測定し、濃度の変化率 (前回測定の濃度との比較) が 10% 以下となった時点 (振とう開始 9 時間後) を平衡到達時間とした。

吸着試験における測定方法として、遠心分離した遠沈管の上澄み液 1mL を LSC で測定した。また、残りの上澄み液を凍結乾燥後にメタノールに溶解し、ラジオ TLC に供して安定性を確認した。

表 1. 供試土壌

土壌	採取場所	土壌群名	土性 ¹⁾	OC% ²⁾	pH ³⁾ (H ₂ O)	pH ⁴⁾ (KCl)	CEC ⁵⁾	PAC ⁶⁾	粘土鉱物の種類
1	道立十勝農試	淡色黒ボク土	CL	2.21	5.7	5.8	11.7	1330	アロフェン、パーミキュライト
2	石川農試	細粒グライ土	LiC	1.02	7.1	5.8	20.3	720	モンモリロナイト、カオリン鉱物
3	日植防(牛久)	褐色火山灰土	SiCL	3.30	6.4	6.9	21.4	2000	アロフェン、パーミキュライト
4	日植防(宮崎)	砂丘未熟土	LS	1.56	5.8	6.3	7.0	660	アロフェン、ハロイイト

- 1) 土性 : CL (埴質壤土)、LiC (軽埴土)、SiCL (微砂質埴壤土)、LS (埴質砂土)
- 2) 土壌中の有機炭素含有率 (%)
- 3) 蒸留水中で測定
- 4) KCl 溶液中で測定
- 5) 陽イオン交換容量 (me/100g 乾土)
- 6) リン酸吸収係数 (mg/100g 乾土)

【結果】

1. 物質収支

放射能の回収率は 91.2~99.9% と良好な値を示した。

2. K_F^{ads} (吸着係数) 及び $K_F^{ads_{OC}}$ (有機炭素吸着係数)

土壌	K_F^{ads} ¹⁾	$1/n$ ¹⁾	r ¹⁾	OC% ²⁾	$K_F^{ads_{OC}}$ ³⁾
1	7.20	1.06	0.999	2.21	326
2	9.10	1.10	1.000	1.02	892
3	12.66	1.08	0.999	3.30	384
4	2.45	1.12	0.999	1.56	157

- 1) Freundlich の吸着等温式による定数項と相関係数
- 2) 土壌中の有機炭素含有率
- 3) K を各土壌中の OC% で割り、求めた有機炭素吸着係数

4. 考察（申請者の考察を含む）

K 値と OC% の相関が低い理由は、他の土壌と比較して土壌 2（石川農試）における吸着係数が、有機炭素含有率に対して高いことによる。すなわち、土壌 2（石川農試）の土壌は土壌 1（道立十勝農試）及び土壌 3（日植防牛久）の土壌より有機炭素含有率は低かったが、一方、吸着率は高かった。

吸着の相違は [I] がフェノール性水酸基を有し酸性を示すことから、平衡溶液の pH 依存による影響が考えられるが、平衡溶液の pH は全て同程度 (4.9 ~ 5.3) であったため、pH の影響は否定された。一方、フェノール性水酸基は土壌のイオン性構造や鉱物との吸着も考えられ、文献的¹⁻²⁾ にモンモリロナイトとの吸着性が報告されている。土壌 2 のみがモンモリロナイトを含有していることからこの影響が考えられた。

1) 「土壌の吸着現象」日本土壌肥料学会編、博反社

2) C. S. Helling, Soil Sci. Soc. Amer. Proc., Vol. 35, 743(1971)

7. 生物濃縮性に関する試験

(1) 魚類濃縮性試験

(代謝資料 No. 12)

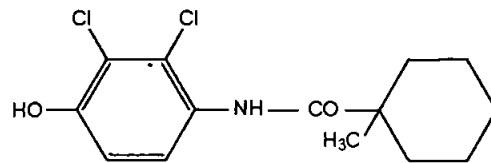
試験機関： 社 (ドイツ)
[GLP対応]

報告書作成年：1996年

供試標識化合物

化学名： *N*-(2,3-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-1-
メチルシクロヘキサンカルボキサミド

化学構造：



*：標識部位

標識： $-^{14}\text{C}$ -フェンヘキサミド [I]

比放射能：92.5kBq/mg(低濃度区)、9.62kBq/mg(高濃度区)
放射化学的純度 > 98%

供試生物： ブルーギル (*Lepomis macrochirus*)

【方法】

試験区： 対照区、低濃度区(0.02mg/L)、高濃度区(0.2mg/L)

用量設定根拠：高濃度区は、魚類急性毒性試験の結果から、 LC_{50} 値の5~10%に相当する0.2mg/Lを、低濃度区はその1/10の0.02mg/Lを選択した。

試験方法：28日間の取込期間中、通気した水を水槽に25L/時間の割合で流した。また、検体をDMFに溶解し200及び2000mg/L溶液を調製して、それぞれ2.5mL/時間の割合で注入し、試験濃度0.02及び0.2mg/L(試験液中のDMF濃度はいずれも0.1mL/L)で魚に暴露した。対照区にはDMF溶液を同様の割合で添加した。

取込期間終了後、検体を含まない水による流水下で14日間飼育し、排泄期間とした。

取込期間0、1、3、7、10、14、21及び28日、並びに排泄期間1、3、7、10及び14日に各区から4匹ずつ魚を採取し、可食部及び非可食部に分け、燃焼後、生じた $^{14}\text{CO}_2$ を液体シンチレーションカウンターにより測定した。

また、魚の採取日に試験水を採取し、液体シンチレーションカウンターにより放射エネルギーを測定した。

魚体及び試験水とも総放射エネルギーのみを測定し、親化合物及び代謝分解物の測定は行わなかった。

また、試験期間中、魚の死亡及び状態を観察し、試験水の pH、温度、溶存酸素を測定した。

試験温度： 20.3～22.7℃
 pH： 7.0～7.5
 溶存酸素： 飽和濃度の 80～115%
 水量あたり魚重量： 1.8g/L、0.30g/L/日

【結果】

(1) 魚体中の総放射能濃度

試験区 (mg/L)	部位	取込期間 (日)							排泄期間 (日)				
		1	3	7	10	14	21	28	1	3	7	10	14
0.02	可食部	0.623	0.618	0.938	0.850	1.51	0.660	2.139	1.39	0.166	0.343	0.130	0.0971
	非可食部	6.01	3.44	6.19	7.45	7.77	5.50	9.17	2.82	0.600	0.732	0.476	0.420
	魚体全体	2.82	1.96	3.52	3.79	4.47	3.05	4.57	1.89	0.333	0.483	0.264	0.248
0.2	可食部	6.48	5.50	6.57	7.68	5.63	6.23	6.88	6.09	1.10	1.03	0.712	0.451
	非可食部	40.1	51.0	41.6	47.2	35.2	42.2	56.0	29.1	4.54	3.72	2.58	2.34
	魚体全体	20.7	27.4	23.6	25.4	20.4	23.4	26.4	14.8	2.38	2.05	1.42	1.31

単位は mg/kg

魚全体は可食部及び非可食部の総放射能濃度から計算された値

各試験区の各部位において、魚体中総放射能濃度が定常状態の 90%に達する時間は 2.27～9.12 日と計算された。

また、暴露終了後の放射能の魚体からの排泄は非常に速やかであった。

(2) 試験水中の総放射能濃度

試験区 (mg/L)	取込期間 (日)								排泄期間 (日)				
	0	1	3	7	10	14	21	28	1	3	7	10	14
0.02	0.0168	0.0188	0.0208	0.0209	0.0221	0.0211	0.0207	0.0214	0.0010	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
0.2	0.154	0.180	0.208	0.202	0.205	0.203	0.201	0.206	0.0064	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

単位は mg/L

(3) 濃縮係数

① BCF_{ss}

試験区 (mg/L)	部位	濃縮倍率 (魚体中濃度/試験水中濃度)						
		取込期間 (日)						
		1	3	7	10	14	21	28
0.02	可食部	35.0	32.9	48.5	42.8	75.1	32.7	105
	非可食部	337	183	320	375	387	273	451
	魚体全体	158	104	182	191	222	151	225
0.2	可食部	38.8	30.4	35.3	40.5	29.4	32.3	35.3
	非可食部	241	282	224	249	184	219	288
	魚体全体	124	152	127	134	107	121	136

② BCF_k

試験区 (mg/L)	部位	取込速度定数 (k ₁)	排泄速度定数 (k ₂)	濃縮係数 (BCF _k)
0.02	可食部	15.2	0.25	60.1
	非可食部	345	1.02	339
	魚体全体	131	0.71	185
0.2	可食部	28.1	0.77	36.7
	非可食部	228	0.92	248
	魚体全体	125	0.94	132

(4) 観察

試験期間中、魚の死亡及び異常は認められなかった。

(5) 脂質含量

報告書に記載なし

8. その他

エージング土壌におけるカラムリーチング試験

(代謝資料 No. 13)

試験機関: 社 代謝・残留研究所()

報告年月日: 1996年7月9日

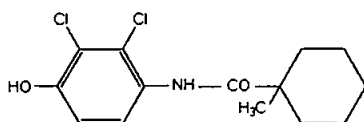
申請者注:

土壌カラムを用いたリーチング試験は、農薬の下方移行性について情報が得られる。本試験は、検体の下方移行性を調査するため、ドイツ BBA ガイドラインに準拠して行った。

供試標識化合物:

化学名: N-(2,3-ジクロロ-4-ヒドロキシフェニル)-1-メチルシクロヘキサニルカルボキサミド

化学構造:



*: 標識位置

標識: ¹⁴C-フェンヘキサミド [I]
(比放射能: 3.43MBq/mg、放射化学的純度: >98%)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は P. 代-10 に示す。

供試土壌: ドイツ BBA 土壌 2.1 を用いた。供試土壌の特性は次のとおりである。

土 壌 参 照 番 号		BBA 土 壤 2.1	
土 壌 入 手 先		Agricultural Institute for Analysis and Research Speyer	
土 性 分 類	USDA 及び DIN	砂 土	
	USDA	砂 (2000~50 μm)	89.4 %
		シルト (50~2 μm)	10.5 %
	粘 度 (<2 μm)	0.1 %	
有機炭素含有量		0.7 %	
pH	脱イオン水	5.3	
	CaCl ₂ (0.01M)	5.9	
カチオン交換容量 (meq/100g)		5.0	
最大含水量 (g H ₂ O / 100g 乾土)		12.0	
試験開始時点でのバイオマス (mg microbial C/kg 乾土)		51	

供試土壌を 2mm の篩に通し、風乾させた。

試験方法:

エージング用土壌への処理量

最大圃場施用量(有効成分 1250g/ha)を担保するため、処理量は「245 μ g 有効成分/100g 土壌」とした。

エージング用土壌への処理

14C-[I]のアセトニトリル溶液を少量の供試土壌(2775.6 μ g 有効成分/10g 土壌)に混合した。溶媒を留去後にこの土壌を十分にかき混ぜ、残りの供試土壌と均一に混合してエージング用土壌とした(全土壌の湿重量: 1249g、乾土重: 1200g)。実処理量は 231.3 μ g 有効成分/100g 土壌であり、設定処理量の 94%に相当した。

処理後、各インキュベーション容器(300mL 三角フラスコ)に、エージング用土壌 104.1g を秤量し、蒸留水を用いて土壌水分含有量を最大容水量の 40%に調整した。

土壌のエージング(有効成分のエージング)

暗所の 20 \pm 1 $^{\circ}$ Cにて、1日間及び 30 日間にわたって土壌を好氣的条件で培養して土壌(有効成分)のエージングを行った。

エージング期間中、土壌水分は最大容水量の 40%に維持した。また、エージング期間中に土壌から生成する揮発性物質は、捕集器(ソーダ石灰[14 C 18 O $_2$ 捕集用]及びポリウレタン栓[14 C 18 O $_2$ 以外の揮発性物質捕集用]で構成)により捕集した。

リーチング試験

土壌カラム用の土壌を風乾させた後に 1mm の篩に通過させ、エージング期間(1日及び 30 日間)毎に土壌カラム(内径 50mm、充填高さ約 28cm) 2 反復を調製した。土壌を蒸留水で飽和させた後、エージングさせた土壌をカラムに積層した。土壌カラムには、水 393mL を継続的に 48 時間溶出させた。溶出液は、約 100mL ずつ 4 回分取した(分種した順に溶出画分 I~IV とする)。

土壌カラムを凍結させた後、凍結土壌をカラムから押し出し、均等な長さの 6 分画に分割した(上層からの順に分画 1~分画 6 とした)。

放射能の測定

放射能の測定には、液体シンチレーション計測(LSC)を使用した。

揮発性化合物: ポリウレタン栓(14 C 18 O以外の揮発性物質の捕集用)は、酢酸エチルで抽出し、抽出液を LSCにて計測した。またソーダ石灰(14 C 18 O $_2$ 捕集用)は 18% 塩酸中に溶解させ、発生した 14 C 18 O $_2$ を吸収剤(Carbosorb)及び LSC用カクテル(Permaflour E+)に吸収させ、LSCにて計測した。

液体試料 エージング土壌の抽出液及びリーチング試験の溶出液: 液体試料は LSCにて計測した。

土壌試料: 土壌は風乾及び粉碎し、オキシダイザーで燃焼させて LSCにて計測した。

試料の抽出処理及びクロマト グラフィー分析

土壌の抽出処理、抽出液の分析

エージング後の土壌及びリーチング試験終了後の土壌(エージング期間: 1日の土壌カラムの分画1及び2)について、下記条件により振とう機を用いた抽出処理を行った。

振とう抽出条件

抽出溶媒	回数	容量	振とう時間
アセトン	3回	100 mL	0.5時間
水	1回	100 mL	1時間

各振とう抽出処理の後、遠心分離を行って上清を濾過した。各抽出液をラジオ薄層クロマトグラフィー(ラジオTLC)で分析した。

またリーチング試験で得られた溶出液もラジオTLCで分析した。

用いたラジオTLC条件は次のとおりである。

薄層板: Silica gel 60, F-254, Merck

溶媒系:

溶媒系1 アセトニトリル/水/アンモニア(25%)=80/18/2(v/v)

溶媒系2 アセトン/ヘキサン/アンモニア(25%)=60/40/2(v/v)

放射能定量: Fuji イメージアナライザー

結 果

エージング期間中における物質収支及び認められた分解物

エージング期間中における物質収支を表 1 に、また同期間中における分解物の生成量を表 2 に示す。

表 1: エージング期間中における物質収支

(表中の数値は処理放射能に対する割合%であり、2 反復の平均値である)

エージング期間	揮発性物質		土 壌 抽出物	未抽出 放射能	総計
	¹⁴ CO ₂	そ の 他 揮発性物質			
0 日	N D	N D	83.1	18.1	101.2
1 日	0.6	<0.1	46.7	51.2	98.5
30 日	13.7	<0.1	14.1	71.7	99.5

N D = 測定せず。

表 1 に示されるとおり、未抽出放射能はエージング期間 0 日の 18.1% から同 30 日の 71.7% へと増加した。一方、放射性に酸化炭素 (¹⁴CO₂) はエージング期間 1 日の 0.6% から同 30 日の 13.7% へと増加した。

表 2: エージング期間中における分解物の生成量

(表中の数値は処理放射能に対する割合%であり、2 反復の平均値である)

		エージング期間		
		0 日	1 日	30 日
土壌抽出物 (計)		83.1	46.7	14.1
分解物の内訳	フェンヘキサミド [I]	72.1	22.8	1.5
		原点	0.3	0.6

表 2 に示されるとおり、親化合物フェンヘキサミド [I] はエージング条件下において速やかに分解された。未変化のフェンヘキサミド [I] はエージング期間 1 日で 22.8% となり、同 30 日では 1.5% 回収されたのみであった。認められた分解物は、いずれも処理放射能の であつた。

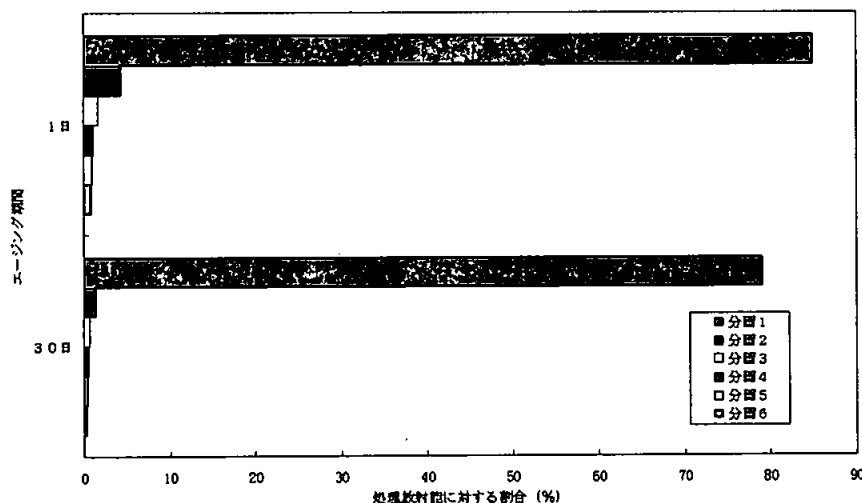
リーチング試験（放射能の下方移行性）

リーチング試験における溶出液中及び土壌カラム中の放射能の分布を表 3 に示す。また土壌カラム中の放射能分布を図 1 に示す。

表 3: リーチング試験における溶出液中及び土壌カラム中の放射能分布
(表中の数値は処理放射能に対する割合%であり、2 反復の平均値である)

エージング期間		1 日	30 日
放射性二酸化炭素		0.6	13.3
その他揮発性物質		<0.1	<0.1
溶出液	分画 I	<0.1	<0.1
	分画 II	0.1	<0.1
	分画 III	1.1	1.1
	分画 IV	1.0	0.7
	合計	2.2	1.8
	溶出液中の沈殿物	0.3	0.3
土 壌 カラム	分画 1 (最上層分画)	85.0	79.0
	分画 2	4.4	1.4
	分画 3	1.6	0.7
	分画 4	1.1	0.6
	分画 5	1.0	0.4
	分画 6 (最下層分画)	0.9	0.3
	合計	94.0	82.4
回 収 率		97.1	97.8

図 1: (申請者が作成した) 土壌カラム中における放射能分布



溶出液中に認められた放射能は、表 3 に示されるとおり、エージング期間 1 日では処理放射能の 2.2%、同 30 日では 1.8%であった。溶出液中の沈殿物は、エージング期間 1 日及び同 30 日とも処理放射能の 0.3%であった。

また土壌では、表 3 及び図 1 に示されるとおり、処理放射能の 80~90%が上層の 2 分画(分画 1 及び分画 2)に留まっていた。その他の土壌分画に認められた放射能は、エージング期間 1 日で 5%また同 30 日で 2%のみであった。

リーチング試験—溶出液及び溶出終了後の土壌における放射性成分

表 4 及び表 5 に、ラジオ TLC により分離した溶出液(エージング期間: 1 日及び 30 日)及び溶出終了後の土壌(エージング期間: 1 日の土壌カラムの分画 1 及び 2)における放射性成分の組成をそれぞれ示す。

表 4: 溶出液(エージング期間: 1 日及び 30 日)中の放射性成分の組成
(表中の数値は処理放射能に対する割合%であり、2 反復の平均値である)

エージング期間		溶出液中の放射能	放射性成分		TLC 原点
			フェンヘキサミド [I]		
1 日	分画 I	<0.1	N D		N D.
	分画 II	0.1	N D		N D.
	分画 III	1.1	<0.1		0.5
	分画 IV	1.0	<0.1		0.4
	合計	2.2	<0.1		0.9
30 日	分画 I	<0.1	N D		N D.
	分画 II	<0.1	N D		N D.
	分画 III	1.1	<0.1		0.4
	分画 IV	0.7	<0.1		0.2
	合計	1.8	<0.1		0.6

N D = 測定せず。

表 5: 溶出終了後の土壌(エージング期間: 1 日の土壌カラムの分画 1 及び 2)
 における放射性成分の組成

(表中の数値は処理放射能に対する割合%であり、2 反復の平均値である)

	土 壌	抽 出 放射能	放射能成分				T L C 原 点
			フェンヘ キサミド [I]				
分画 1	85. 0	9. 5	2. 7				0. 4
分画 2	4. 4	0. 6	N D.				N D

N D = 測定せず。

表 4 に示されるとおり、溶出液中のフェンヘキサミドは検出限界以下(<0. 1%)
 であった。

また表 5 に示されるとおり、土壌分画 1 には処理放射能の 85% が存在し、その内
 の 9. 5% が抽出された。最上層の土壌分画 1 には、処理放射能の約 2. 2% が未変化
 の親化合物として検出された。

以上の結果から、エージング後の土壌においてフェンヘキサミドは急速に分解し、そ
 の代謝物は急速かつ強い結合を起こして移動しない事が示された。従って、フェンヘ
 キサミドのエージング土壌での下方移行性は、非移行性に分類される。

9. フェンヘキサミドの代謝分解の要約

[I] の動物、植物、土壌における代謝分解、加水分解及び光分解に関する試験結果を以下に要約し、概要を表1に、全体の推定代謝経路を図1に示した。

(1) 動物

$-^{14}\text{C}$ - [I] をラットに1 mg/kgで十二指腸内投与した後の胆汁、尿、呼気、胃腸管を除く動物体内残留量の合計から吸収率を算出すると90～105%であった。

$-^{14}\text{C}$ - [I] をラットに1 mg/kgと100mg/kgで経口投与すると、放射能 (^{14}C) は速やかに糞、尿中へ排泄され、投与48～72時間後には糞に投与量の約56～79%が、尿には約14～33%が排泄され、総排泄率は投与量に対して約90～97%であった。

血漿中放射能の薬物動態学的解析から、 T_{\max} は1 mg/kgの1回経口投与で約0.2～1.5時間であった。また、平均滞留時間は12～16時間、臓器、組織中の消失半減期は約5時間であった。

糞、尿の排泄率は雄で約3～5：1、雌で約2～4：1であり、排泄速度は速く、経時的には糞、尿ともに投与後24時間までに投与量の70%以上が排泄された。

[I] をラットに経口投与した後の吸収、分布、排泄では、一部に若干の変動は認められたが、雌雄、投与量の間において顕著な違いはなかった。

ラット中の主代謝経路は N^{H} であり、腸管内に排泄された抱合体は加水分解をうけて親化合物にもどり、腸肝循環を受けた。また、別の代謝経路として、 N^{H} を受け、次いで、 N^{H} をうけて排泄される経路も認められた。

排泄物中の主成分は [I] で62～75%が検出され、そのほとんどが糞中で認められた。その他に少量の成分として N^{H} が主に尿に検出された。さらに少量の代謝物として、 N^{H} が認められ、 N^{H} に認められ、相対的に量が多く認められた代謝物は N^{H} であった。

十二指腸内投与では投与放射能の約95%が胆汁に見出された。

[I] を1 mg/kgで経口投与した後の全身オートラジオグラムでは、 ^{14}C は一旦は臓器、組織に分布し、その後、速やかに消失して排泄された。また、放射能が蓄積した臓器、組織は認められなかった。

放射能成分の同定率は経口投与後で81～87%、十二指腸内投与で104%であった。

(2) 植物

[I] の適用作物は多岐にわたるため、今日までにぶどう、りんご、トマト、レタス及びエンドウを用いた [I] の植物体内運命試験が実施されている。

ぶどう、りんご及びトマトの試験では、 ^{14}C -[I] をぶどう、りんご、トマトに散布、あるいは、塗布処理をして、吸収移行性（葉から果実）及び代謝を調べた。

果実に対して、直上、直下の近接した葉に ^{14}C -[I] を塗布した場合、 ^{14}C は果実へは移行せず、[I] の植物体における移行性は認められなかった。

いずれの作物においても、処理した放射能のほとんど（回収量の89~94%）が表面洗浄液から回収された。表面洗浄後、抽出すると、抽出放射能は有機相よりも水相にやや多く分布した（有機相：水相 = 1 : 2~7）。固型残留物中の放射能の量は<1%であった。

検出された放射能成分は [I] が大部分で、[I] が回収量の89~91%が検出された。また、代謝物として、

その合計量はそれぞれの代謝物とも
が認められ、
が認められた。放射能成分の同定率は、回収放射能の92~96%であった。

また、[I] をレタス及びエンドウに茎葉散布した場合も、他の作物と同様の代謝経路をたどり、遊離体及び抱合体の含量として [I] がTRRの大部分を占めていた。

植物体中の [I] の代謝経路は、

であった。

(3) 土壌

畑地条件下において4種類の土壌、砂土（ドイツ土壌BBA2.1）、砂壤土（USA土壌Howe、ドイツ土壌Laacher Hof）、壤質砂土（ドイツ土壌BBA2.2）に [I] を処理すると、[I] は速やかに土壌に吸着した。抽出物中の放射能は処理直後の78~93%から経時的に急速に減少し、7日後で19~38%、100日後には9~26%に減少した。また、 $T_{1/2}$ は ≤ 1 日であった。一方、結合性残留物の量は経時的に増加し、7日後に57~80%、100日後に50~77%であった。[I] は土壌中で CO_2 に無機化され、7日後で約5%、100日後で18~21%と経時的に上昇した。

[I] の土壌中の代謝経路の一つは、

をつくる経路と、一方、
であった。そして、これらは、さらに CO_2 にまで無機化された。

代謝物の
は約
は処理後、主に
日で最高に達し、それぞれの量は約
で、その後減少し、
となった。

USA 土壌Howeを用いて結合性残留物をフルボ酸、フミン酸、フミンに分画すると、総結合性残留物71.2% (100日後の場合) に対して、フルボ酸8.6%、フミン酸29.9%、フミン31.2%であった。

(4) 加水分解

[I] をEPA法に従い、pH 5、7、9の緩衝液中、25°Cで30日間加水分解試験を行ったところ、[I] は分解せず安定であった。25°Cにおける半減期は1年以上と推定された。

(5) 光分解 [蒸留水及び自然水 (河川水)]

[I] の蒸留水及び自然水中の光分解試験において、[I] は速やかに光分解を受け、野外環境中における推定半減期は0.8~1.8時間であった。

蒸留水及び自然水 (河川水) 中の光分解により [I] は速やかに分解、減少し、その結果、代謝物として CO_2 を発生し、次いで、フェニル環が順次水酸化を受け、 CO_2 にまで無機化された。

主要代謝物の生成量は照射後約5時間までに最大に達し、その後減少して検出されなくなった。

(6) 土壌吸着性

日本の4種類の畑地土壌 (有機物炭素% : 1.0~3.3%) を用いると、吸着係数Kは2.45~12.66、有機炭素吸着係数157~892であった。

(7) 土壌中での下方移行性 (エージング土壌でのカラムリーチング)

[I] の土壌中での下方移行性を、ドイツBBAガイドラインに従い1日間又は30日間エージングさせた土壌を用いたカラムリーチング試験で検討した。結果として [I] 及び代謝物の土壌中での移動性は認められず、「非移行性」に分類されたと考えられた。

全ての試験において、代謝物は [I] の基本骨格を保持していた。代謝様式は動物、植物では による排泄であり、土壌中では 、また、 の形成、そして土壌成分への吸着、取り込みによるフルボ酸、フミン酸、フミンの形成、一方、水中光分解では 、 による CO_2 への分解であった。 [I] は植物体上では比較的安定であったが、その他の環境条件下では蓄積性が認められる化合物は存在しなかった。

以上の結果より、フェンヘキサミド [I] 及びその代謝分解物はヒトを含めた自然環境中に長期間残留して悪影響を及ぼすことは少ないと判断される。

表 1. 代謝分解の概要

代謝分解物		処理放射能に対する割合 (%)														総回			
経口 ³⁾ mg/kg 72時間	糞尿	I															結合性 残留物	CO ₂	収量 (%)
動物	♂糞尿	57.53																	92.07
	♀糞尿	4.44																	94.93
	100mg/kg 48時間	52.00																	92.49
	♀糞尿	23.05																	92.17
ラット	経口 ³⁾ 100mg/kg 48時間	66.13																	97.20
	♀糞尿	2.38																	90.36
	♂糞尿	65.31																	106.2
	運投 ³⁾ 1mg/kg 48時間	2.41																	
ト	十二指腸 ³⁾ 1mg/kg 48時間	69.15																	
	砂壤土 USA Howe	5.08																	
	胆汁	49.35																	
	1日	20.45																	
土	砂土	7.43																	
	1日	0.37																	
	3日	20.75																	
	7日	12.7																	
壤	100日	4.5																	
	1日	9.1																	
	3日	3.7																	
	7日	2.3																	
壤質砂土	100日	1.0																	
	1日	50.3																	
	3日	25.8																	
	7日	12.2																	
Laacher Hof	100日	2.3																	
	1日	20.5																	
	3日	6.0																	
	7日	3.2																	
緩衝液、25°C	100日	1.0																	
	1日	35.4																	
	15日	nd																	
	0.5hr	39.7																	
水	緩衝液、25°C 1.10mg/L																		
	2mg/L																		
	緩衝液、25°C 1.25mg/L																		
	pH5.30日	99.8																	99.8
pH7.30日	103.2																	103.2	
pH9.30日	101.1																	101.1	

3) 経口投与、十二指腸内投与は抱合体を加えて算出した。

代謝分解物	回収放射能に対する割合 (%)													総回 収量 (%)	
	1												未同定		その他
ぶどう 散布、50%WP	87.9 (4.49) ³⁾												1.3 (0.07)	2.8 (0.1)	100 (5.1)
	88.4 (1.20)												8.0 (0.1)	0.8 (0.01)	100 (1.34)
	88.3 (1.49)												1.8 (0.09)	2.3 (0.09)	100 (1.67)
トマト 散布、50%WP	90.7 (18.0)												3.7 (0.73)	1.9 (0.39)	100 (19.8)
	81.2 (0.19)													18.5 (0.03)	100 (0.22)
エンドウ 散布、50%WG	21													79.0 (0.16)	100 (0.20)

3) 経口投与、十二指腸内投与は包合体を加えて算出した。
 4) 同定及び未同定代謝物以外の割合（エンドウの場合は特徴付けられた放射能 + 非抽出性残渣放射能の割合）。

A : 動物体内 P : 植物体内 S : 土壌中 L : 水中光分解
O : 主要代謝経路

フーエンヘキサミドの動植物等における代謝経路図

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

フェンヘキサミドの開発年表

□

□

□

□

□

□

□

□