

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

1-10 イヌに経口投与 (20mg/kg 投与) したときの体内動態

(資料 M13)

試験機関: ()

[GLP 対応]

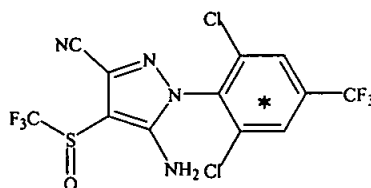
報告書作成:

報告書中の化合物番号は他の報告書の番号と異なっているので、混乱を避ける為、本抄録では下記の様に対応するコード番号に換えて記載した。

抄録中の記号	本報告書中のコード番号	他の報告書中のコード番号
A		
B		
C		

供試標識化合物: (以下 ^{14}C -標識体と言う)

構造式:



*: ^{14}C 標識部位

化学名: (±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α , α , α -トリフルオロ-p-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名: フィプロニル

比放射能: $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度:

供試動物: 雄ビーグル犬、8ヶ月齢、1群3頭、体重 8.5~11.8kg

試験方法:

投与: 非標識体で希釈した ^{14}C -標識体の所定量を秤取してカプセルに充填し、20mg/kg を強制経口投与した。

試料の採取: 以下の時点で採取した。血液は頸静脈から採取した。

尿・糞: 投与直前、投与後 0~24 時間、以降 168 時間まで 24 時間ごとに採取。

ケージ洗液: 投与直前、投与後 24 時間ごとに洗浄し、採取。

血液: 投与直前、投与後 1、3、6、8、10、24、32、48、72、96、120、144 及び 168 時間に採取。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

組織：投与 168 時間後に屠殺し、肝臓、腎臓、脳、甲状腺、消化管(幽門～盲腸まで)、腸内容物、脂肪(腎臓周囲)、皮下脂肪、腰背部皮膚、腹側部皮膚、咽頭部皮膚、被毛及び腸間膜リンパ節を採取。

試料の処理/放射能の測定：液体試料(尿、ケージ洗液、胆汁)は直接、血漿及び血液とも溶解剤を添加して溶解し、糞及び組織は蒸留水中でホモジナイズした後、溶解剤を添加して溶解し、シンチレーションカクテルを加え、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

試験結果：

血中濃度の推移： ^{14}C -標識体を経口投与後の血漿及び血液中の濃度推移を表 1、血漿中の薬物動態パラメータを表 2 に示す。

表 1 ^{14}C -標識体 (20mg/kg) を経口投与後の血漿中の放射能濃度の推移

時間	血漿中濃度 ($\mu\text{g-eq.}/\text{mL}$)
0	ND
1	0.275
3	1.649
6	2.237
8	2.264
10	2.278
24	2.501
32	1.935
48	1.888
72	1.662
96	1.432
120	1.215
144	1.026
168	0.958

ND:検出限界以下

表 2 ^{14}C -標識体 (20mg/kg) を経口投与後の血漿中の薬物動態パラメータ

薬物動態パラメータ	平均	範囲
C_{max} ($\mu\text{g-eq}/\text{mL}$)	2.5	2.4~2.7
T_{max} (時間)	24	24
$\text{AUC}_{0-168\text{時間}}$ ($\mu\text{g-eq. h.}/\text{mL}$)	260.9	253.3~275.8
$T_{1/2}$ (時間)	124.0	99.0~157.5

血漿中の最高濃度 C_{max} は $2.5 \mu\text{g-eq}/\text{mL}$ で、24 時間で最高濃度に達し (T_{max})、168 時間後でも依然として高く、 $1 \mu\text{g-eq}/\text{mL}$ 前後であった。AUC は $261 \mu\text{g-eq. h.}/\text{mL}$ で、消失半減期 $T_{1/2}$ は 124 時間であった。

尿及び糞中排泄：¹⁴C-標識体を経口投与後、尿及び糞中に排泄された放射能の推移を表 3 に示す。

表 3 ¹⁴C-標識体 (20mg/kg) を経口投与後の尿及び糞中放射能の累積排泄率 (投与量に対する割合%)

投与後時間	尿	糞	ケージ洗液	合計
0~24	0.3	30.1	0.02	30.4
0~48	0.6	66.8	0.04	67.4
0~72	0.8	70.2	0.05	71.1
0~96	1.0	73.3	0.06	74.4
0~120	1.2	75.1	0.07	76.4
0~144	1.3	77.1	0.08	78.5
0~168	1.4	79.0	0.09	80.5

排泄は、168 時間後までに投与量の 79%前後が糞中に排泄され、そのほとんどが投与後最初の 48 時間に排泄された。尿中への排泄は少なかった (1.4%)。総排泄量は約 80%であった。

組織内分布：¹⁴C-標識体を経口投与 168 時間後における組織内分布を表 4 に示す。

表 4 ¹⁴C-標識体 (20mg/kg) を経口投与 168 時間後における組織内分布

組織	残留量 ($\mu\text{g-eq/g}$)
肝臓	4.5
腎臓(右)	2.0
腎臓(左)	2.0
腎臓周囲脂肪	21.2
皮下脂肪	13.8
脳	1.2
被毛	ND
腰背部皮膚	4.9
腹側部	6.7
咽頭部皮膚	5.5
消化管	1.0
消化管内容物	1.9
甲状腺	2.8
腸間膜リンパ節	1.5
胆汁	46.3
血漿	1.0

ND: 検出限界以下

屠殺日に採取した胆汁から非常に高濃度の放射能 ($46\mu\text{g-eq/g}$) が検出された。

組織内濃度が最も高かったのは脂肪 ($14\sim 21\mu\text{g-eq/g}$)、各部位の皮膚 (約 $6\mu\text{g-eq/g}$) で、ついで、肝臓、腎臓及び甲状腺もかなり高かった (約 $2\sim 4\mu\text{g-eq/g}$)。被毛からは放射能は検出されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

以上、イヌに経口投与（20mg/kg 投与）したときの体内動態を検討した結果、24 時間で血漿中の最高濃度に達し、消失半減期 124 時間で、徐々に減少した。投与 168 時間後までに投与量の約 80% が排泄され、そのほとんどが糞中に排泄され、尿中への排泄は 2% 以下と少なかった。脂肪中の濃度が最も高く、ついで、皮膚の濃度が高かった。屠殺日に採取した胆汁から非常に高濃度の放射能が検出され、また投与 48 時間以降、屠殺時まで毎日投与量の数% が排泄されていることから、胆汁への排泄と腸肝循環の可能性が示唆された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

1-11 イヌに経口投与 (2mg/kg 投与) したときの体内動態

(資料 M14)

試験機関 :

()

(試料採取)

() (化学分析)

[GLP 対応]

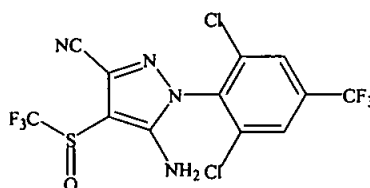
報告書作成 :

報告書中の化合物番号は他の報告書の番号と異なっているので、混乱を避ける為、本抄録では下記の様に対応するコード番号に換えて記載した。

抄録中の記号	本報告書中のコード番号	他の報告書中のコード番号
A		
B		
C		

供試標識化合物 : (以下 ^{14}C -標識体と言う)

構造式 :



* : ^{14}C 標識部位

化学名 : (±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α,α,α -トリフルオロ-p-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名 : フィプロニル

比放射能 : $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度 :

供試動物 : 雄ビーグル犬、7ヶ月齢、1群3頭、体重9.3~10.5kg

試験方法 :

投与 : 非標識体で希釈した ^{14}C -標識体を Transcutol/Peanut oil (20:80) に溶解し、投与液とし、容量 0.5mL/kg で、用量は 2mg/kg を強制経口投与した。

試料の採取 : 以下の時点で採取した。血液は頸静脈から採取した。

尿・糞 : 投与後 0~8、8~24、以降 168 時間まで 24 時間ごとに採取。

ケージ洗液 : 投与後 24 時間ごとに洗浄し、採取。

血液 : 投与後 1、3、6、8、10、24、32、48、72、96、120、144 及び 168 時間に採取。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

試料の処理/放射能の測定：尿、ケージ洗液及び血漿は直接、血液は溶解剤を添加して溶解し、糞は蒸留水中でホモジナイズした後、溶解剤を添加して溶解し、シンチレーションカクテルを加え、液体シンチレーションカウンターで放射能を測定した。

代謝物の分析：試料は以下のように前処理した後、HPLC に注入して分析した。

血漿：アセトニトリルを用いて除蛋白した後、上清を蒸発乾固し、残渣をアセトニトリル/水に再溶解した。

尿：濃縮後、直接注入した。

糞：メタノールで抽出、溶媒を留去後、アセトニトリル/水に再溶解した。

尿及び糞の加水分解：0~8 時間試料を用い、 β -グルクロニターゼ、スルファターゼまたは Helix Promatia 液のいずれかを用いて酵素加水分解をした後、上記のように処理した。

代謝物の同定は標品化合物との HPLC 保持時間の比較で行った。

試験結果：

血中濃度の推移： ^{14}C -標識体を経口投与後の血漿及び血液中の濃度推移を表 1、血漿中の薬物動態パラメータを表 2、血漿/血液濃度比率を表 3 に示す。

表 1 ^{14}C -標識体 (2mg/kg) を経口投与後の血漿及び血液中の放射能濃度の推移

時間	血液中濃度 (ng-eq./mL)	
	血漿	血液
1	389	
3	365	
6	576	440
8	539	
10	474	325
24	508	357
32	466	
48	440	288
72	383	
96	336	
120	288	
144	262	
168	218	

表 2 血漿中の薬物動態パラメータ

薬物動態パラメータ	平均	範囲
C _{max} (ng-eq/mL)	613	489~688
T _{max} (時間)	6.7	6.0~8.0
AUC 0-168 時間 (ng-eq. h./mL)	60863	58985~63936
T _{1/2} (時間)	120	89~149

血漿中の最高濃度 C_{max} は 613 ng-eq/mL で、6.7 時間で最高濃度に達し (T_{max})、消失半減期 $T_{1/2}$ は 120 時間であった。

表 3 血漿/血液濃度比率 = [血漿中濃度 × (1 - ヘマトクリット値)] / 血中放射能濃度

時間	平均	範囲
6	0.75	0.61~0.90
10	0.85	0.79~0.89
24	0.83	0.78~0.87
48	0.89	0.86~0.92

血漿/血液濃度比率から放射能はほとんど赤血球に結合しないことが示唆された。

尿及び糞中排泄： ^{14}C -標識体を経口投与後、尿及び糞中に排泄された放射能の推移を表 4 に示す。

表 4 ^{14}C -標識体 (2mg/kg) を経口投与後の尿及び糞中累積排泄放射能 (投与量に対する割合%)

投与後時間	尿	糞	ケージ洗液	合計
0~8	0.40	0.41		
0~24	0.80	5.13		
0~48	1.39	13.54		
0~72	1.73	22.70		
0~96	1.89	31.79		
0~120	2.11	37.92		
0~144	2.31	42.88		
0~168	2.41	48.06	0.21	50.68

排泄は、168 時間後までに約 50% が尿及び糞から排泄され、そのほとんどが糞中に排泄され (48%)、尿中への排泄は少なかった (2.4%)。

代謝物：血液、尿及び糞中代謝物のプロフィールを表 5 に示す。

血液 (血漿) 中の代謝物は、投与 1 時間後には A (親化合物) が主であったが、経時的に減少した。これに対し、代謝物 B が増加し、168 時間後には B のみ検出された。未知極性物質は 24 時間で最大になり、その後減少し、168 時間後には検出限界以下になった。

尿中の代謝物は、未同定の極性代謝物のみであった。酵素加水分解により極性のピークが 1 つのみみられた。

糞中の代謝物は、投与 24~48 時間後試料では、A (親化合物) が 21%、代謝物 B が 36%、未同定の極性代謝物が 39% 検出され、代謝物 C は少量 (4%) 検出された。一方、96~120 時間後試料では A (親化合物) 及び極性代謝物はそれぞれ 2 及び 26% に減少し、代謝物 B (72%) が主であった。酵素加水分解による HPLC クロマトグラムへの変化は認められなかった。

表 5 血液、尿及び糞中代謝物のプロフィール (各試料中における各代謝物の割合%)

試料	採取時期(時間)	未同定極性代謝物 ^a	A:	B:	C:
血漿	1	14	62		
	3	12	57		
	6	10	48		
	8	21	50		
	10	28	29		
	24	59	19		
	48	15	17		
	72	9	2		
	144	13	<1		
	168	<1	<1		
尿 ^b	0~8	100	<1		
	0~8+glu	99	<1		
	0~8+sul	100	<1		
	0~8+Hel	88	<1		
糞 ^b	24~48	39	21		
	24~48+glu	36	23		
	24~48+sul	35	23		
	24~48+Hel	36	21		
	96~120	26	2		
	96~120+glu	33	2		
	96~120+sul	32	2		
	96~120+Hel	34	3		

^a:極性代謝物の保持時間 血漿は2分、尿は2.1分、糞は2~4分

^b: glu、sul、Hel はそれぞれβ-グルクロニダーゼ、スルファターゼ、HPA (Helix Pomatia)で試料を加水分解したことを示す。

以上、イヌに経口投与(2mg/kg投与)したときの体内動態を検討した結果、親化合物及び代謝物を含めた総放射能の血漿/血液濃度比率から放射能の血球への移行は少なかった。

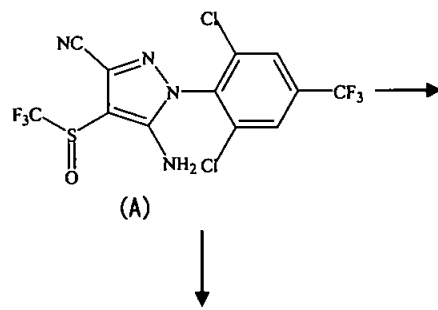
経口投与後、吸収は速やかで7時間後までに最高血中濃度に達し、以後、消失半減期120時間で、徐々に減少した。投与放射能の約50%が尿及び糞から排泄され、そのほとんどが糞から排泄され、尿からの排泄は非常に少なかった。

吸収された親化合物Aは速やかに代謝物Bに代謝され、血液中に存在する主代謝物であった。A及びBは尿中には排泄されず、極性代謝物のみが排泄され、糞中には投与初期にA、B及びほぼ同量の極性代謝物が排泄されたが、投与4~5日後にはAは代謝されほとんどなく、Bがほぼ2倍に増加していた。

推定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 BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

1-12 ¹⁴C 標識体を用いた泌乳ヤギにおける代謝試験

(資料 M15)

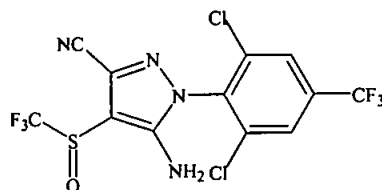
試験機関： ()

[GLP 対応]

報告書作成：

供試標識化合物：(以下 ¹⁴C-標識体と言う)

構造式：



* : ¹⁴C 標識部位

化学名：(±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名：フィプロニル

比放射能： $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度：

供試動物： British Saanen 系泌乳ヤギ、3~7 年 齢、体重約 60.8kg、1 群 1 頭

試験方法：

投与：非標識体で希釈した ¹⁴C-標識体をゼラチンカプセルに入れて給餌前に 1 日に 2 回、1 日量として設定用量 0.1、4 及び 20mg を 7 日間連続投与した。この用量は乾燥飼料 2.0kg/日として、設定用量 0.05、2 及び 10ppm に相当する。

群の構成は以下のとおりである。

群	動物番号	設定用量 (ppm)	投与放射能	
			μCi	MBq
低用量	068F	0.05	2.7	0.1
中用量	069F	2	108	4.0
高用量*	070F	10	540	20.0

*：投与 2 及び 3 日は設定用量の半分しか投与されなかった。

排泄試験：尿及び糞の採取：投与後約 24 時間間隔で採取(最終採取は約 23.5 時間)。

ミルク：各投与前に毎日、午前と午後の 2 回及び屠殺直前に採取。採取ミルクは 24 時間ごとにプールした。

血液：各投与前に頸静脈から採血。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

その他：各排泄物を採取後、ケージの残屑を除き、ケージを水で洗浄した。

組織分布：最終投与約 23.5 時間後に屠殺/瀉血して以下の組織を採取し、その他の残部体組織は廃棄した。

骨格筋(前肢及び後肢)、脂肪(大網及び腎臓)、肝臓、腎臓、血液/血漿

代謝物の特性検討：中及び高用量群の試験 7 日に採取した尿、糞及びミルク並びにこれらの群の ≥ 0.01 ppm 以上の放射能を有する全ての組織について検討した。

尿：尿中の大部分の放射能は極性物質であることが HPLC で確認されたので、脱共役処理(β -グルクロニダーゼ及びアリルスルファターゼ混合酵素で処理)を行った後、濾過して HPLC 分析に供した。

糞/ミルク/脂肪/筋肉：アセトニトリルを加えて混合/均質化抽出(2回)し、アセトニトリル層を合わせ、ヘキサンで 2 回洗浄し、減圧濃縮した。濃縮液をアセトニトリルに再溶解して、HPLC 分析に供した。

肝臓/腎臓：中用量群の肝臓と腎臓は上記のように抽出乾固した。さらに、高用量群の肝臓の抽出残渣はメタノールで 2 回抽出した。腎臓の残渣は再度アセトニトリルで抽出した。全ての抽出液をプールし、蒸発乾固した。この残渣をメタノールに再溶解後、水を加え、C18 Mega-Bond Elut カートリッジに添加し、放射能をメタノールで溶離した。溶離液を蒸発乾固し、アセトニトリルに再溶解して、同様に分析した。

HPLC 分析は非標識標品を同時に注入して行い、高用量群において 0.050ppm(親化合物当量)以上含有する尿並びに糞、ミルク及び組織抽出液については質量分析(GC-MS)に供した。

放射能の測定：液体試料(尿、ミルク、血漿及びケージ洗液)は直接、固体試料(糞、血液、ケージ残屑及び組織)は燃焼して、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集し、シンチレーションカウテルに添加して、LSC で放射能を計測した。

結果：

排泄(回収率)：7 回投与後、約 23.5 時間後までの放射能の排泄及び屠殺時の組織残留を次表に示す。

7 日間連続投与後、23.5 時間後の屠殺までに 0.05ppm 群では投与放射能の 83% が回収され、その内 64% は糞中に、18% は採取組織中に存在した。尿から放射能は検出されなかったが、投与量が少ない(合計約 $23\mu\text{Ci}$ 投与)ために、背景放射能より少ないか、わずかに多いのみであったことに起因している。2ppm 群では 50% が回収され、その内 25% は組織に、18% は糞、5% はミルク中に存在し、尿では 2% のみであった。10ppm 群では 77% が回収され、その内 61% は糞に、採取組織に 7%、尿に 7% が存

在し、ミルクでは 1.3%のみであった。回収率が最大でも 83%と低かったが、供試化合物の脂溶性が高いことから、特定の組織採取後に廃棄した残部体組織中にかなりの残留があったものと推定される。

尿及びミルクへの排泄及び組織中の残留率から算定した最低吸収率は 0.05、2 及び 10ppm 群でそれぞれ 19、33 及び 15%であった。

表 1 累積放射能の排泄及び組織中の残留(投与放射能に対する%)

投与量 (ppm)	投与日数	0.05	2	10
尿	1	ND	0.10	0.56
	2	ND	0.32	1.26
	3	ND	0.63	1.94
	4	ND	1.02	2.77
	5	ND	1.41	3.83
	6	ND	1.85	5.07
	7	ND	2.45	6.58
糞	1	6.34	0.56	2.80
	2	14.16	2.41	8.89
	3	21.35	4.17	16.39
	4	28.70	7.20	22.49
	5	36.74	9.04	32.51
	6	47.04	13.07	43.72
	7	64.16	17.80	61.28
ミルク	1	ND	0.18	0.11
	2	ND	0.55	0.16
	3	0.13	1.00	0.30
	4	0.29	1.64	0.48
	5	0.47	2.45	0.71
	6	0.61	3.33	0.96
	7	0.86	4.64	1.33
ケージ洗液		ND	0.04	0.14
ケージ残屑		ND	ND	0.54
組織 ^a		18.31	25.41	7.44
合計回収率		83.32	50.32	77.30
最低吸収率 ^b		19.17	32.50	15.35

ND: 検出せず。

^a 特定の組織採取後の残部体組織は廃棄した。

^b 尿及びミルクへの排泄+組織中の残留の合計として申請者が算出した。
日投与放射能に対する回収率で表した回収率を表 2 に示す。

回収率は 0.05ppm 群で投与 1 日(投与 0~24 時間)の 44%から、投与 7 日(最終投与後 23.5 時間)の 122%に増加した。その大部分は糞から回収され、ミルクでは<2%以下であった。投与 2~6 日の平均回収率は日投与放射能の約 57%で、投与放射能の排泄が定常レベルに達しているようであった。

2ppm 群では投与 1 日の 6% から、投与 7 日の 47% (尿 4%、糞 33%、ミルク 9%) に増加し、定常レベルはみられなかった。投与 2~6 日の平均回収率は日投与放射能の 17~38% の範囲にあった。試験した用量で最もミルクへの排泄率 (9%) が高かった。

10ppm 群では投与 1 日の 21% から、投与 7 日の 115% に増加したが、日排泄の変動が大きく、定常レベルはみられなかった。これは投与 2 及び 3 日は設定用量の半分しか投与されなかった影響と思われる。大部分は糞から回収され、ミルクでは 2% 以下であった。投与 2~6 日の平均回収率は 74% であった。

表 2 日投与放射能に対する回収率%

投与量 (ppm)	投与日数	尿	糞	ミルク	合計
0.05	1	ND	44.40	ND	44.40
	2	ND	54.74	ND	54.74
	3	ND	50.29	0.89	51.18
	4	ND	51.49	1.12	52.61
	5	ND	56.29	1.24	57.53
	6	ND	72.10	1.04	73.14
	7	ND	119.79	1.71	121.50
2	1	0.67	3.96	1.23	5.86
	2	1.60	12.96	2.60	17.16
	3	2.14	12.18	3.18	17.50
	4	2.67	20.93	4.36	27.95
	5	2.70	12.69	5.62	21.00
	6	3.18	28.91	6.33	38.43
	7	4.23	33.31	9.19	46.72
10	1	3.35	16.84	0.65	20.84
	2*	8.28	72.05	0.65	80.99
	3*	8.34	91.11	1.68	101.11
	4	4.94	36.31	1.05	42.31
	5	6.32	60.35	1.38	68.07
	6	7.58	68.39	1.53	77.49
	7	8.95	103.99	2.21	115.14

ND : 検出せず。 * : 設定用量の半分しか投与されなかった。

血中濃度 : 血中濃度の推移を表 3 に示す。

0.05ppm 群では血中に放射能は検出されなかった。2ppm 群では血中濃度は経時的に漸増したが、全般に濃度は低かった (全血 ≤ 0.023 、血漿 ≤ 0.034 ppm)。10ppm 群では全血中の濃度は投与 7 日まで漸増し、7 日の午後には 0.052ppm に達したが、血漿中濃度は一定の傾向が認められず、投与期間中の最大濃度は 0.086ppm であった。

表 3 血中濃度の推移(親化合物 ppm 当量)

採血時期(投与日数)	全血			血漿		
	0.05ppm	2ppm	10ppm	0.05ppm	2ppm	10ppm
1	午前	ND	ND	ND	ND	ND
	午後	ND	ND	0.016	ND	0.011
2*	午前	ND	ND	0.018	ND	0.014
	午後	ND	0.007	0.030	ND	0.043
3*	午前	ND	0.009	0.018	ND	0.013
	午後	ND	0.011	0.028	ND	0.029
4	午前	ND	0.013	0.021	ND	0.012
	午後	ND	0.015	0.031	ND	0.020
5	午前	ND	0.016	0.030	ND	0.020
	午後	ND	0.017	0.043	ND	0.086
6	午前	ND	0.019	0.043	ND	0.057
	午後	ND	0.019	0.049	ND	0.031
7	午前	ND	0.023	0.047	ND	0.029
	午後	ND	0.023	0.052	ND	0.029
剖検時	ND	0.021	0.045	ND	0.031	0.075

ND: 検出せず。 *: 設定用量の半分しか投与されなかった。

ミルク中の濃度: ミルク中の濃度の推移を表 4 に示す。

表 4 ミルク中の経時的放射能濃度の推移(親化合物 ppm 当量)

投与日数	0.05ppm	2ppm	10ppm
1	ND	0.020	0.052
2	ND	0.039	0.033
3	0.001	0.051	0.068
4	0.001	0.071	0.097
5	0.001	0.088	0.119
6	0.001	0.096	0.142
7	0.001	0.107	0.166

ND: 検出せず。

0.05ppm 群ではミルク中の濃度は低く、絶えず ≤ 0.001 ppm であった。2 及び 10ppm 群では血中濃度以上に投与期間中に漸増し、投与 1 日から投与 7 日までにそれぞれ 0.020 から 0.107ppm 及び 0.052 から 0.166ppm に増加した。これらのデータはフィプロニルの脂溶性が高いことに起因していると思われる。ミルク中の濃度は 2ppm では定常状態に近づいているようであるが、10ppm ではこの傾向はまだ認められない。

組織内分布: 最終投与 23.5 時間後の組織内分布を表 5 に示す。

0.05ppm 群では組織中の残留は少なく、全て < 0.01 ppm であった。2 及び 10ppm 群では脂肪(大網及び腎)中の濃度が最も高く、それぞれ、約 1.3ppm 及び 1.9ppm であった。骨格筋、腎臓及び肝臓中の濃度は 2ppm 群でそれぞれ 0.072、0.099 及び 0.396ppm、10ppm 群でそれぞれ 0.079、0.151 及び 0.862ppm であった。腎臓及び筋肉への残留が

少なく、脂肪への蓄積が高いことは親化合物及びその代謝物の高い親油性のためで、脂肪が蓄積部位として働き、排泄が緩やかであることを示唆している。

表 5 7日間連投後 23.5 時間後における組織内分布

組織	濃度(親化合物 ppm 当量)			投与量に対する%		
	0.05ppm	2ppm	10ppm	0.05ppm	2ppm	10ppm
腎臓	ND	0.099	0.151	ND	0.06	0.02
肝臓	0.004	0.396	0.862	0.52	1.23	0.67
骨格筋 ^a	0.003	0.072	0.079	13.16	7.03	1.60
大網脂肪 ^b	0.008	1.320	1.919	4.63	17.09	5.16
腎脂肪 ^b	0.009	1.295	1.945			

ND: 検出せず。

^a: 骨格筋は体重の 45%と推定して投与量に対する%を算出。

^b: 大網及び腎脂肪は合計として、体重の 6%と推定して投与量に対する%を算出。

尿/糞/ミルク及び組織中の代謝物: 各組織の抽出効率を表 8 に示す。

表 8 抽出効率(各組織中の残留放射能に対する割合%)

投与量	2ppm	10ppm
腎臓	60.5	89.0
肝臓	76.4	71.6
腎脂肪	93.5	107.9
大網脂肪	89.3	87.3
骨格筋	85.2	91.1
ミルク	61.9	79.5
糞	93.8	96.9

組織の最終抽出液は各組織に存在する放射能の>60%が抽出できた。放射能の損失は濾過及び濃縮等の手順によるもので、特定の代謝物を選択的に抽出しているわけではない。

2 及び 10ppm 群における HPLC による分析及び同定結果を表 9 (2ppm 群) 及び 10 (10ppm 群) に示す。放射性代謝物は HPLC による標品と比較した溶出特性から暫定的に同定し、さらに 10ppm 投与群の試料について GC-MS 分析を行い確認した。

糞、ミルク、筋肉及び脂肪中の主要成分として親化合物 A () が、主要な代謝物として C () 及び B () が同定された。腎臓及び肝臓における主要成分は B であった。比較的多量の E () も筋肉及び肝臓で確認された。

尿: 尿中の主要成分は極性物質であったので、2 および 10ppm 群とも酵素処理した結果、7 ないし 10 ピークに分離し、HPLC クロマトグラフ特性から主要成分として B が確認された。しかし、放射能が少なく、成分を GC-MS で同定することはできなかった。

表 9. 2ppm を 7 日間連投後の排泄物及び組織中の代謝物

組織	同定ピーク	ピーク中の放射能の割合%	試料中の総用量に対する%	ピークの総用量に対する%	組織中の ppm 当量	ピークの ppm 当量	同定
濾過尿 ^a	UF1. 2 その他						
脱共役尿 ^a	UF1. 2 その他						
脱共役尿 ^b	UD2. 1. 2 UD2. 2. 2 UD2. 3. 2 UD2. 4. 2 UD2. 5. 2 UD2. 6. 2 UD2. 7. 2 その他						
糞	F1. 2 F2. 2 F3. 2 F4. 2 F5. 2 その他	21. 19		1. 000			未知物質 A() F() C() B()
ミルク	M1. 2 M2. 2 M3. 2 その他	26. 51	1. 303	0. 345	0. 107	0. 028	A() C() B()
筋肉	MU1. 2 MU2. 2 MU3. 2 MU4. 2 MU5. 2 その他	22. 18		0. 112		0. 016	E() A() 未知物質 C() B()
腎臓	K1. 2 K2. 2 K3. 2 K4. 2 K5. 2 K6. 2 K7. 2 その他	6. 67		0. 004		0. 007	未知物質 未知物質 E() A() 未知物質 C() B()
肝臓	L1. 2 L2. 2 L3. 2 L4. 2 L5. 2 L6. 2 L7. 2 その他	5. 36		0. 066		0. 021	未知物質 未知物質 E() A() 未知物質 C() B()
大網脂肪	OM1. 2 OM2. 2 OM3. 2 OM4. 2 OM5. 2 その他	36. 79		5. 779		0. 486	E() A() 未知物質 C() B()
腎脂肪	RF1. 2 RF2. 2 RF3. 2 RF4. 2 RF5. 2 RF6. 2 その他	31. 55		1. 609		0. 409	E() A() 未知物質 C() B() 未知物質

^a: HPLC 法 1 ^b: HPLC 法 2

糞：HPLCで5(2ppm)及び7(10ppm)ピークに分離し、そのうち2ppmでは3つ、10ppmでは4つのクロマトグラフ特性がE、A、C及びBに一致しており、さらに、2ppmでは1つがF()に一致していた。3つ(A、C及びB)はGC-MSで確認された。さらに、特徴的イオンから微量成分としてD()の存在が示唆されたが、HPLCでは認められなかった。Eと保持時間が一致したピークの成分はこの代謝物に由来する低分子量の特長的イオンを検出したが同定はできなかった。

ミルク：HPLCで3(2ppm)及び4(10ppm)ピークに分離し、そのうち3つはクロマトグラフ特性がA、C及びBに一致しており、これらはGC-MSで確認された。

筋肉：HPLCで5(2及び10ppm)ピークに分離し、そのうち4つはクロマトグラフ特性がE、A、C及びBに一致していた。A及びBはGC-MSで確認された。

腎臓：HPLCで7(2ppm)及び6(10ppm)ピークに分離し、クロマトグラフ特性が2ppm投与試料ではB、E、A、Cに一致し、10ppm投与試料ではA及びBのみに一致していた。GC-MSでBが確認された。

肝臓：HPLCで7(2ppm)及び12(10ppm)ピークに分離し、クロマトグラフ特性が2ppm投与試料ではB、E、A、Cに一致し、10ppm投与試料ではB、E、Aに一致していた。LC-MS及びLC-MS-MSでB、E、Aが確認された。分子イオン及びフラグメントイオンの情報が得られたピークもあったが、基質の影響が強く構造を同定できなかった。

大網脂肪：2及び10ppm投与試料とも5ピークに分離し、そのうち4つはクロマトグラフ特性がE、A、C及びBに一致しており、GC-MSで多い成分は親化合物のA、次いでBが、量は少ないが、C、Eも確認された。

腎脂肪：HPLCで6(2ppm)及び5(10ppm)ピークに分離したが、クロマトグラフ特性は大網脂肪とほとんど同じであった。GC-MSでも同様の成分が確認された。

表 10. 10ppm を 7 日間連投後の排泄物及び組織中の代謝物

組織	同定ピーク	ピーク中の放射能の割合%	試料中の総用量に対する%	ピークの総用量に対する%	組織中の ppm 当量	ピークの ppm 当量	同定
control 尿 ^a	UC1. 10 UC2. 10 UC3. 10 UC4. 10 その他	4.16		0.063			E() A() B()
脱共役尿 ^a	UD1. 10 UD2. 10 その他						未知物質 B()
脱共役尿 ^b	UD2. 1. 10 UD2. 2. 10 UD2. 3. 10 UD2. 4. 10 UD2. 5. 10 UD2. 6. 10 UD2. 7. 10 UD2. 8. 10 UD2. 9. 10 UD2. 10. 10 その他						
糞	F1. 10 F2. 10 F3. 10 F4. 10 F5. 10 F6. 10 F7. 10	24.63		4.325			未知物質 E() A() 未知物質() C() B() 未知物質
ミルク	M1. 10 M2. 10 M3. 10 M4. 10 その他	59.77	0.373	0.223	0.166	0.099	A() C() B() 未知物質
筋肉	MU1. 10 MU2. 10 MU3. 10 MU4. 10 MU5. 10 その他	60.76		0.073		0.048	E() A() C() B() 未知物質
腎臓	K1. 10 K2. 10 K3. 10 K4. 10 K5. 10 K6. 10 その他	3.21		0.001		0.005	未知物質 未知物質 未知物質 A() B() 未知物質
肝臓	L1. 10 L2. 10 L3. 10 L4. 10 L5. 10 L6. 10 L7. 10 L8. 10 L9. 10 L10. 10 L11. 10 L12. 10 その他	1.54		0.010		0.013	E() 未知物質 未知物質 未知物質 未知物質 A() B() 未知物質

^a: HPLC 法 1 ^b: HPLC 法 2

表 10 10ppm を 7 日間連投後の排泄物及び組織中の代謝物(続き)

組織	同定ピーク	ピーク中の放射能の割合%	試料中の総用量に対する%	ピークの総用量に対する%	組織中の ppm 当量	ピークの ppm 当量	同定
大網脂肪	OM1. 10 OM2. 10 OM3. 10 OM4. 10 OM5. 10 その他	73. 19		1. 209		1. 405	E() A() C() B() 未知物質
腎脂肪	RF1. 10 RF2. 10 RF3. 10 RF4. 10 RF5. 10 その他	72. 72		0. 893		1. 414	E() A() C() B() 未知物質

以上、¹⁴C-フィプロニルを 0.05、2 及び 10ppm に相当する量を泌乳ヤギに連続 7 日間、毎日午前及び午後の給餌前にカプセル投与し、放射能の吸収及び排泄について試験し、排泄物及び特定の組織中の放射性残留の特性について検討した。その結果、大量の放射能が主として糞から排泄された。2ppm 投与では投与量の多くが体内に保持されていることが示唆された。

尿、ミルク及び組織中の放射能から推定した最低吸収率は 0.05、2 及び 10ppm でそれぞれ約 19、33 及び 15%であった。

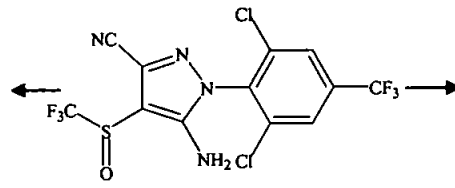
ミルク中の放射能濃度は 0.05ppm ではほとんど無視できる程度であった。2 及び 10ppm では経時的に増加していたが、2ppm では定常状態に近づいていると思われるが、確認はできなかった。

親化合物及びその代謝物の脂溶性が高いことから、多くの放射能が脂肪中に保持されており、回収されなかった投与放射能は廃棄した残部体組織中に保持されているものと推定された。親化合物 A()の他に、主要な代謝物として、B()、C()及び E()が同定され、さらに 1 微量代謝物はクロマトグラフ特性が F()と一致していた。

ヤギにおける推定代謝経路を以下に示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil



(A)
(糞、ミルク、筋肉、腎臓、脂肪)



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

1-13 ¹⁴C 標識体を用いた産卵鶏における代謝試験

(資料 M15-2)

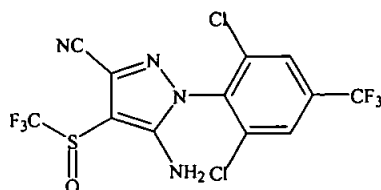
試験機関： ()

[GLP 対応]

報告書作成：

供試標識化合物：(以下 ¹⁴C-標識体と言う)

構造式：



* : ¹⁴C 標識部位

化学名：(±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α , α , α -トリフルオロ-p-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名：フィプロニル

比放射能： μ Ci/mg ()

放射化学的純度：

供試動物： Hisex 系鶏、試験開始時 22 週齢、対照群 1 羽、投与群各 5 羽

試験方法：

一般状態及び生死：毎日観察した。

投与：非標識体(純度 99.4%)で希釈した ¹⁴C-標識体をゼラチンカプセルに入れて 1 日量として設定用量 0.0075、0.3 及び 1.5mg を 28 日間連続経口投与した。この用量は乾燥飼料 150g/日として、設定用量 0.05、2 及び 10ppm に相当する。

群の構成は以下のとおりである。

群	設定用量 (ppm)	投与放射能	
		μ Ci	MBq
低用量	0.05	0.325	0.012
中用量	2	5	0.185
高用量	10	25	0.925

排泄試験：

排泄物の採取：投与後約 24 時間間隔で採取(最終採取は約 23.5 時間後)。

卵：各投与直前及び投与 5~7 時間後に採取し、動物別に 24 時間ごとにプールした。

ケージの残屑：各排泄物を採取後、残屑を除き、試験期間中の残屑をプールした。

ケージの洗浄：試験終了時にケージを水、次いでメタノールで洗浄した。

組織内分布：最終投与約 23.5 時間後に頸椎脱臼で屠殺し、以下の組織を採取し、その他の残部体組織は廃棄した。

骨格筋(胸部及び腿部筋肉を動物ごとにプール)、脂肪(腹膜)、肝臓、皮膚(皮下脂肪を含む)

代謝物の特性検討：試験 27 日に採取した排泄物及び卵、並びにこれらの群の ≥ 0.01 ppm(親化合物当量)の放射能を有する肝臓、皮膚、筋肉及び脂肪(腹膜)について、抽出・濃縮して HPLC で非標識標品と共に注入し、代謝物の数及び特性を検討した。

筋肉：中及び高用量群の各試料それぞれから 5 ないし 10%の筋肉試料を採り、プールした。これをアセトニトリル中で均質化し、抽出(2回)し、アセトニトリル層を合わせ、ヘキサンで2回洗浄し、減圧濃縮した。残渣をアセトニトリルに再溶解して、HPLC 分析に供した。低用量群の平均放射能量は < 0.01 ppmであったので、代謝物の検討は実施しなかった。

皮膚及び脂肪：全投与群の各試料から低用量群は約 40%、中及び高用量群は約 25%の試料を採り、プールし、筋肉と同様に抽出・濃縮し、分析に供した。

肝臓：全投与群の各試料から約 25%の試料を採り、プールし、前記のように抽出・濃縮した。この残渣をメタノールに再溶解後、水を加え、C18 Mega-Bond Elut カートリッジに添加し、放射能をメタノールで溶離した。溶離液を蒸発乾固し、アセトニトリルに再溶解して、同様に分析に供した。

卵：卵白及び卵黄に分け、それぞれ、約 25%及び 30~40%をプールした。このプール試料を筋肉と同様に抽出・濃縮し、分析に供した。しかし、低用量群の卵白の平均放射能濃度は < 0.01 ppmであったため、代謝物の検討は行わなかった。

排泄物：全投与群について、各動物の約 5%の代表的試料を採り、プールした後、筋肉と同様に抽出・濃縮し、分析に供した。

代謝物の同定：親化合物として ≥ 0.050 ppm 含有する 10ppm 群の抽出液について、GC-MS で分析し、同時に標品のスペクトルと比較し同定した。

放射能の測定：液体試料(ケージ洗液)は直接、固体試料(排泄物、ケージ残屑、卵及び組織)は燃焼して、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集し、シンチレーションカクテルに添加して、LSC で放射能を計測した。

結果:

一般状態及び生死：投与に起因する悪影響は認められなかった。

回収率：0.05、2及び10ppm群において、それぞれ総投与放射能の平均51.9、54.5及び57.5%が投与終了後23.5時間までに回収された。その多くは排泄物(28~42%)及び卵黄(13~16%)に存在し、卵白では1.5~2%と少なかった。

組織からの回収率は0.05ppm群では5.4%であったが、2及び10ppm群では $\leq 0.8\%$ と少なかった。代表的な一部組織のみ採取したことから、回収されなかった多くの放射能は残部体組織中に存在しているものと推察される。

表1 28日間反復経口投与終了後、23.5時間までの放射能の総回収率%

組織	経過日数	0.05ppm	2ppm	10ppm
排泄物 ^a	1	ND	1.52	1.06
	7	3.22	5.86	6.91
	14	9.74	14.24	18.01
	21	18.55	23.87	29.01
	28	28.35	36.28	41.67
卵白	28	1.99	1.68	1.44
卵黄 ^a	1	ND	<0.01	<0.01
	7	0.55	0.56	0.59
	14	4.33	3.08	3.39
	21	9.23	8.06	7.86
	28	16.11	15.11	13.26
ケージ洗液		ND	0.06	0.07
ケージ残屑		0.04	0.57	0.43
組織		5.40	0.82	0.65
合計		51.90	54.53	57.53

^a：投与期間中測定されているが1週間ごとの値のみ示した。

日投与放射能に対する排泄物及び卵の日平均回収率は試験期間中増加し、排泄放射能の定常状態には達しなかった。しかし、全ての用量でこの増加率は試験終了時には低下傾向にあると考えられた(表2)。

卵中の濃度：卵黄中の日平均放射能濃度は試験期間中増加し、試験終了時に0.05、2及び10ppm群でそれぞれ0.177、7.021及び30.113ppmと最大になり、定常状態には達しなかった。しかし、全ての用量でこの増加率は試験終了時には低下傾向にあると考えられた。卵白の日平均放射能濃度は0.05ppm群で ≤ 0.011 ppm、2ppm群で ≤ 0.300 ppm、10ppm群で ≤ 1.190 ppmであった。卵黄の濃度は用量に比例して増加し、卵白と比較して、20倍以上高かった(表2)。

表 2 日投与放射能に対する放射能の回収率%または濃度(親化合物当量 ppm) ^a

	経過日数	0.05ppm	2ppm	10ppm
排泄物 (日投与量に対する回収率%)	1	ND	40.58	29.78
	7	26.89	28.16	31.20
	14	32.40	36.41	48.37
	21	44.32	36.23	43.78
	28	50.93	75.58	69.07
卵白 (日投与量に対する回収率%)	1	ND	0.06	0.11
	7	0.40	1.26	1.37
	14	3.83	2.29	1.79
	21	2.40	2.22	2.01
	28	4.24	3.65	2.25
卵黄 (日投与量に対する回収率%)	1	ND	0.01	0.01
	7	8.12	6.43	6.17
	14	24.58	16.10	15.98
	21	28.88	21.07	22.19
	28	42.75	61.46	30.15
卵白 (放射能濃度 ppm)	1	ND	0.006	0.048
	7	0.001	0.135	0.629
	14	0.008	0.216	0.779
	21	0.005	0.253	0.911
	28	0.008	0.242	0.993
卵黄 (放射能濃度 ppm)	1	ND	0.003	0.005
	7	0.035	1.500	6.922
	14	0.100	3.610	17.511
	21	0.144	5.327	25.403
	28	0.177	7.021	30.113

^a: 投与期間中測定されているが1週間ごとの値のみ示した。

組織中濃度: 組織中の放射能濃度(表 3)は全ての投与群で脂肪が最も高く、次いで皮膚で、肝臓はさらに低く、筋肉は最も低かった。全ての組織で、残留量は用量相関性の増加がみられた。

表 3 28 日間反復経口投与終了後、23.5 時間後の組織中の放射能濃度 ppm

組織	0.05ppm	2ppm	10ppm
皮膚	0.101	3.865	17.037
脂肪	0.286	11.882	56.359
筋肉	0.005	0.165	0.731
肝臓	0.030	1.188	4.887

表4 組織の抽出・濃縮段階の最終回収率(総残留放射能に対する回収率%)

組織	0.05ppm	2ppm	10ppm
皮膚	85.97	95.53	86.57
脂肪	97.52	85.49	92.52
筋肉	74.08	86.65	90.53
肝臓	74.49	76.57	100.2
卵白	21.62	41.10	79.43
卵黄	81.07	95.37	90.60
排泄物	32.67	58.53	76.11

代謝物の濃度及び同定(表5) : 10ppm群の試料について、GC-MSで分析し、B()及びA()が同定された。卵白、卵黄、皮膚、腹膜脂肪、肝臓及び筋肉とも主要な代謝物はBで、親化合物Aは卵黄、皮膚、脂肪及び肝臓で微量検出されたが、卵白及び筋肉では検出されなかった。0.05及び2ppm群についてはGC-MS分析はしなかったが、HPLCで10ppm群と同じクロマトグラフ特性を示したので、主要な代謝物はBと想定した。

排泄物の主要な成分はB及びAであったが、0.05及び2ppm群ではBが親化合物より多く、10ppm群では親化合物Aが最も多く、吸収が不十分であったことを示している。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

表 5 反復投与後の排泄物及び組織の抽出液中における代謝物の定量

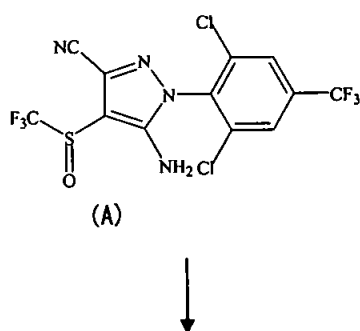
組織	同定 ピーク	ピークの 放射能の 割合%	試料中の 総用量に 対する%	ピークの 総用量に 対する%	組織中の ppm 当量	ピークの ppm 当量	同定	
0.05ppm 群								
排泄物	E1.05 E2.05 E3.05 E4.05 その他	8.72		0.132			未知物質 未知物質 A() B()	
	卵黄	EY1.05 EY2.05 その他	1.93	1.156	0.022	0.160	0.003	A() B()
		皮膚	S1.05 その他					B()
	腹膜脂肪	F1.05 F2.05 その他	2.49	3.651	0.091	0.283	0.007	A() B()
		肝臓	L1.05 その他					B()
2ppm 群								
排泄物	E1.2 E2.2 E3.2 E4.2 その他	26.63		0.406			未知物質 未知物質 A() B()	
	卵黄	EY1.2 EY2.2 EY3.2 EY4.2 EY5.2 その他	2.70		0.029		0.174	未知物質 未知物質 A() 未知物質 B()
卵白		EW1.2 EW2.2 その他	3.84	0.097	0.004	0.263	0.010	A() B()
	皮膚	S1.2 その他					B()	
腹膜脂肪	F1.2 F2.2 F3.2 その他	1.70	0.033	<0.001	11.794	0.200	A() 未知物質 B()	
	肝臓	L1.2 L2.2 その他	1.04	0.505	0.005	1.210	0.013	A() B()
筋肉		M1.2 その他					B()	

表 5 反復投与後の排泄物及び組織の抽出液中における代謝物の定量 (つづき)

組織	同定 ピーク	ピークの 放射能の 割合%	試料中の 総用量に 対する%	ピークの 総用量に 対する%	組織中の ppm 当量	ピークの ppm 当量	同定
10ppm 群							
排泄物	E1. 10 E2. 10 E3. 10 E4. 10 その他	51.34		0.788			未知物質 未知物質 A() B()
卵黄	EY1. 10 EY2. 10 その他	2.62	0.930	0.024	28.205	0.739	A() B()
卵白	EW1. 10 その他						B()
皮膚	S1. 10 S2. 10	1.64	NA	NA	18.501	0.303	A() B()
腹膜脂肪	F1. 10 F2. 10 その他	1.91	0.031	<0.001	53.518	1.022	A() B()
肝臓	L1. 10 L2. 10 その他	1.36	0.368	0.005	4.819	0.066	A() B()
筋肉	M1. 10 その他						B()

結論として、¹⁴C-フィプロニルを産卵鶏に 0.05、2 及び 10ppm の用量で 28 日間反復経口投与した結果、投与放射能の約 52~58% が最終投与後 23.5 時間までに回収され、その多くは排泄物から回収された。放射能の排泄及び組織残留に関して、定常状態には達しなかったが、卵黄及び卵白では定常状態に近いものと推定された。卵黄中の濃度は用量関連性のある増加を示した。組織中の残留は脂肪及び皮膚が多く、代謝物を含め親化合物の脂溶性が高いことを示唆している。全ての用量において、排泄物を含め組織中の主要な代謝物は B() であった。

推定代謝経路を下記に示す。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

2. 植物における代謝分解

2-1 水稻における代謝試験

(資料 M16)

試験機関：

(試料調製) ()

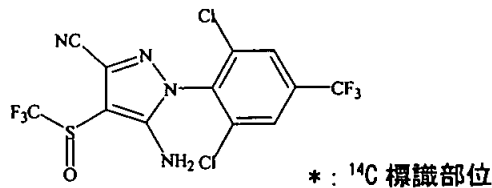
() (分析部分)

[GLP 対応]

報告書作成：

供試標識化合物：(以下 ^{14}C -標識体と言う)

構造式：



化学名：(±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α , α , α -トリフルオロ-p-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名：フィプロニル

比放射能： $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

放射化学的純度：

供試植物：水稻(品種：Supanburi 60)

発芽後約 21 日の苗(草丈 36~49 cm, 3~4 葉期)を 20 x 20 cm 間隔で、1 株当たり 2 本植えとした(100 株/区画)。

水田： 黒色ポリエチレンシートで 2 層に覆ったセメントブロックを用いて試験用の 6 区画(2 x 2 x 0.6 m/区画)を準備し、水田土壌を 0.4 m の深さに入れた後、水深 5~10 cm とし、水田とした。入水 10 日後に稲を移植した。

方法：

試験区：粒剤、乳剤処理区及び無処理区の 3 区、2 連制で試験した。

試験用製剤： ^{14}C -標識体は 0.3% 粒剤及び 5% 乳剤として調製し、使用した。

処理量：粒剤及び乳剤とも 5g/10a

なお、乳剤の 1 回目処理は目標の約 34%しか処理できていなかったが、試験の目的に影響はないと考えられた。

処理方法及び処理時期：粒剤は少量の砂と混合し、移植 20 日後に 1 回、区画全面に均一に散布した。乳剤は水で希釈して、移植 20 日及び 50 日後の 2 回、試験区をポリエチレン製テントで覆った後、小型噴霧器で茎葉全面に散布した(散布液量 50L/10a)。処理後水深は 9~15cm とした。

処理時の水稻の大きさ：

移植後 20 日：草丈約 64~69cm、分蘖数 6~9、葉数 3~4

移植後 50 日：草丈約 110cm

試料採取：以下の時期に採取した。

試料	試料採取時期		
	田植後	粒剤処理後	乳剤 2 回目処理後
緑色植物	51 日	31 日	1 日
収穫時試料	92 日	72 日	42 日

緑色植物の採取：田植後 51 日に各試験区の 5 カ所から無作為に 10 株を採取し、水で根を洗った。洗液は試験区に戻した。

収穫時試料の採取：田植後 92 日に穀粒を付けたままの稲穂を収穫し、紙袋に入れて 1 週間風乾した後、穀粒を手で取り、試験区ごとにプールして、45~50°C のオーブンでさらに 1 週間乾燥させた。乾燥後、試験区ごとに籾摺りをして玄米と籾殻、精米して白米と糠を得た。植物の残りの部分(葉及び根)は採取後、根を水で洗い、束ねて袋に入れて冷凍した。

発送と保存：上記のように試料を調製(タイ国)後、冷凍して、航空便で分析機関(英国)に送付した。試料は分析時まで冷凍庫で保存した。

分析方法：

試料の処理/放射能の抽出：

緑色植物試料：茎葉部(水面より上部)と根部に分割し、茎葉部は(50:50, v/v) で洗浄した後、茎葉部はドライアイスを追加後、粉碎して均質化し、を加えて抽出し、抽出液と残渣に分けた。根部はドライアイスを追加後、茎葉部と同様に処理した。

抽出液の を蒸発させた水性残渣をカートリッジ式カラムに添加し、(60:40, v/v) で 3 回溶出し、溶媒を留去後、(50:50, v/v) に溶解し、別のカートリッジ式カラムに添加した。これを、(90:10, v/v) で溶出し、減圧乾固後、

(1:1, v/v)に再溶解し、GPC カラムに添加し、
(1:1, v/v)を用い0.5 mL/分で溶出して、画分を10分間隔で分取した。

収穫時試料：根部及び葉については、緑色植物試料と同様に処理した。

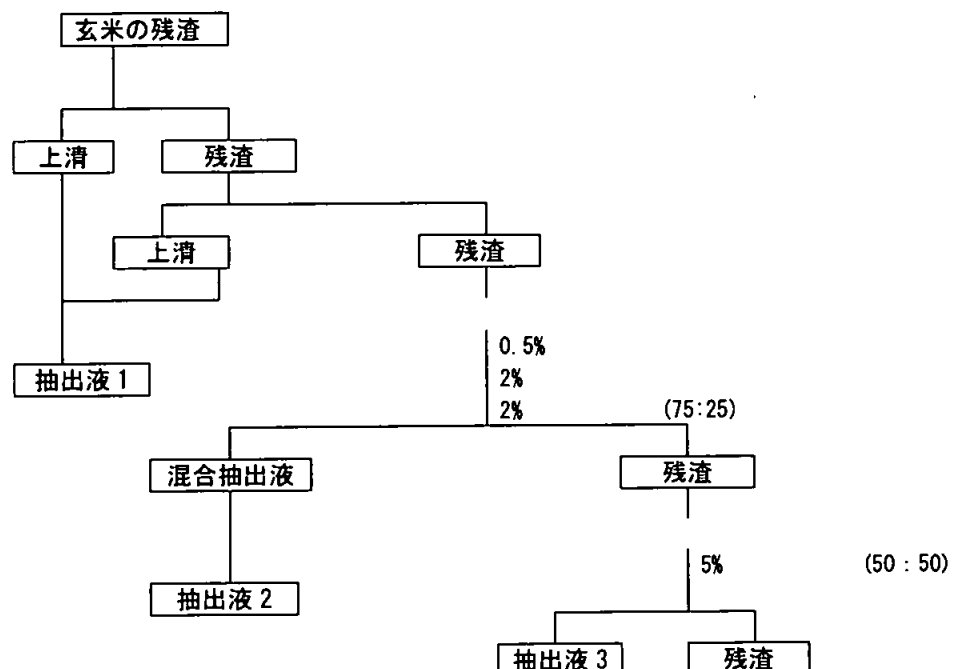
枝梗、籾殻、糠の試料は (50:50, v/v) で 抽出し、遠心を減圧留去した。濃縮液に トリッジ式カラムに添加し、 で抽出し、乾固後に溶解した。これに を加えた溶液をカートリッジ式カラムに添加し、 (90:10, v/v)、 (75:25, v/v) で順次溶出した。枝梗の場合はこの2溶出液を合わせて乾固した後、 に再溶解した。籾殻及び糠の場合は溶出液を合わせなかった。

玄米および白米の試料は粉碎後水を添加して暗黒下で一晩放置した。

(90:10, v/v) を加えて2回抽出した。溶媒を減圧留去し、濃縮液に を添加後、C18 カラムに添加し、 (10:90, v/v) および (25:75, v/v) で順次溶出した。この2溶液を合わせて乾固した後、 に再溶解した。

申請者注：報告書には玄米および白米試料の抽出方法に関する情報が不十分であったため、追加試料を基に上記を記載した。

抽出固形残渣の分析：抽出後の未抽出残留の特性を検討するために、乳剤茎葉全面処理区の玄米試料を用い、さらに以下の抽出スキームに従い抽出を行った。各抽出液を酢酸で中和時に硫化水素臭が発生した。



放射能の測定：液体試料はシンチレーションカクテルを加えた後、直接、液体シンチレーションカウンター(LSC)で放射能を計測した。

固体試料(枝梗、籾殻及び糠はそのまま、玄米及び白米は粉碎)は酸化燃焼して、発生した¹⁴C₂O₂を捕集液に捕集した後、液体試料と同様にして放射能を計測した。

代謝物の分析：抽出液中の各成分を定量し、暫定的に同定するために、試料抽出液と田植後 51 日に採取した茎葉(乳剤)処理区の茎葉の洗液については逆相 TLC を用い、想定代謝物の標品と共に展開し、ラジオ TLC スキャナーで定量した。また、必要に応じて GC/MSD あるいは GC/MS 法で構造を確認した。

結果

放射能分析結果：

緑色植物試料： 田植後 51 日に採取した緑色植物中の残留放射能を表 1 に示す。

表 1 田植後 51 日の水稻における各部位別残留放射能
(親化合物当量 $\mu\text{g-eq/g}$ として示した)

試料		乳剤茎葉全面処理区の残留量 ^a			粒剤処理区の残留量 ^b		
		試験区 1	試験区 3	平均値	試験区 2	試験区 5	平均値
茎葉部	抽出液+残渣	0.841	0.564	0.703	0.073	0.046	0.060
	表面洗液	0.972	0.630	0.801	0.005	0.001	0.003
	小計	1.813	1.194	1.504	0.078	0.047	0.063
根部	抽出液+残渣	0.093	0.131	0.112	0.091	0.044	0.068

a: 2 回目処理 1 日後採取

b: 処理 31 日後採取

粒剤処理区では、茎葉部(水面より上部)表面の洗液からはほとんど放射能が検出されず、茎葉部及び根部内(抽出液+残渣)に残留し、茎葉部及び根部の残留にほとんど差がなかった。このことから、処理した¹⁴C-標識体は茎葉に付着せず、根あるいは田面水中の茎葉から放射能が吸収され、水稻植物全体に分布したと考えられる。

乳剤の茎葉全面処理区では茎葉部残留放射能の約半分が表面洗液から検出され、残りは植物組織内の残留であった。根部から少量の残留放射能が検出された。従って、処理した¹⁴C-標識体は付着部位から水稻植物全体に吸収移行することが示唆された。

収穫時試料： 田植後 92 日の収穫試料中における各部位別残留放射能を表 2 に示す。

表 2 田植後 92 日の水稻における残留放射能 (親化合物当量 $\mu\text{g-eq/g}$ として示した)

試料		乳剤茎葉全面処理区の残留量 ^a			粒剤処理区の残留量 ^b		
		試験区 1	試験区 3	平均値	試験区 2	試験区 5	平均値
根部	抽出液+残渣	0.109	0.092	0.101	0.076	0.055	0.065
葉	抽出液+残渣	0.248	0.266	0.257	0.111	0.086	0.099
枝梗	抽出液+残渣	2.046	2.415	2.096	0.337	0.315	0.326
籾殻	抽出液+残渣	0.495	0.545	0.520	0.075	0.073	0.074
玄米	抽出液+残渣	0.025	0.023	0.024	0.005	0.006	0.006
糠	抽出液+残渣	0.155	0.128	0.142	0.022	0.022	0.022
白米	抽出液+残渣	0.012	0.014	0.013	0.004	0.004	0.004

^a: 2 回目処理 42 日後採取

^b: 処理 72 日後採取

粒剤処理区及び乳剤の茎葉全面処理区ともに残留放射能が最も高かったのは枝梗、葉、籾殻及び根部で、玄米中の濃度は最も少なかった。白米にも少量の残留が認められた。

乳剤茎葉全面処理区は粒剤処理区に比し、約 1.6 倍の処理薬量で、2 回目処理後収穫までの期間が 42 日と短い(粒剤処理区は 72 日)が、枝梗及び籾殻の残留放射能は粒剤処理区に比較して約 7 倍、玄米で約 4 倍、根部及び葉で約 2 倍高かった。

抽出効率: 各部位ごとの抽出効率を田植後 51 日の緑色植物試料については表 3、田植後 92 日の収穫時試料については表 4 に示す。

表 3 田植後 51 日の緑色植物試料の各部位ごとの抽出効率%

試料部位	乳剤茎葉全面処理区			粒剤処理区		
	試験区 1	試験区 3	平均	試験区 2	試験区 5	平均
茎葉	92.25	93.07	92.66	78.67	82.42	80.55
根部	91.23	93.88	92.56	79.40	83.78	81.54

表 4 田植後 92 日の収穫時試料の各部位ごとの抽出効率%

試料部位	乳剤茎葉全面処理区			粒剤処理区		
	試験区 1	試験区 3	平均	試験区 2	試験区 5	平均
葉	76.36	79.51	77.94	77.61	79.87	78.74
根部	77.98	75.26	76.62	79.35	92.16	85.76
枝梗	78.41	78.97	78.69	72.15	78.40	75.28
籾殻	74.91	73.65	74.28	86.50	83.09	84.80
玄米	79.81	81.70	80.76	73.89	73.19	73.54
糠	84.48	86.37	85.43	71.89	83.00	77.45
白米	79.66	81.48	80.57	79.93	68.82	74.38

粒剤及び乳剤処理区の緑色植物及び収穫時試料とも各試料部位の抽出効率は平均で約 74~93%の範囲にあったが、試験区ごとの各試料部位別抽出効率は一貫しており、同様の物質が同程度抽出されたことが示唆された。

固形残渣の抽出：総残留の約 80%が抽出された乳剤茎葉全面処理区の玄米試料の固形残渣(玄米中の残留放射能の 20%)について、前記の抽出スキームに従い抽出した結果、約 82%(抽出液 1、2 及び 3 でそれぞれ、33、23 及び 26%)が抽出された。抽出液 1 及び 2 は 抽出液 3 は に分配されたが、抽出液 3 は に分配されなかった。この結果から、玄米中の残留放射能の大半は天然物に取り込まれたのではなく、代謝の過程で天然物と化学的に結合した親あるいは代謝物であると考えられた。各抽出液を酢酸で中和時に硫化水素臭が発生したことから、このような結合物質は比較的穏やかな加水分解条件下で硫黄含有アミノ酸に富む天然物とともに加水分解したと考えられる。

代謝物分析結果：試料抽出液の TLC を評価した結果、混在物が少なく、意味のあるデータが得られると考えられたのは移植後 51 日に採取した乳剤茎葉全面散布処理した稲の洗液と玄米及び白米抽出液から得られたクロマトグラムのみであった。これら試料抽出液中の成分は GC/MS で構造を確認した。これ以外の試料から得られたクロマトグラムは他の混在物が多く含まれていたため、定量は困難であった。

洗液：乳剤茎葉全面処理区の移植後 51 日(2 回目処理 1 日目)の緑色植物の洗液の薄層クロマトグラムで親化合物を含む数種代謝物が確認され、GC/MS で、主要成分は親化合物 (A)、その他に (F; 光分解物) 及び (B) 及び (C; 酸化的、還元的機序により生成される分解物) が少量検出された。(表 5)

表 5 乳剤茎葉全面処理区の移植後 51 日(2 回目処理 1 日目)の緑色植物の洗液中における代謝物の構成比(%)

化合物	構成比%
A:	83.0
F:	
C:	
D:	
B:	
E:	

玄米及び白米：抽出液のクロマトグラムに基づく分析結果を表 6 に示す。

玄米及び白米において、主要成分は親化合物 (A) であった。代謝物として、(E)、(C)、(G)、(F) 及び (D) が同定された。主要代謝物は E で、粒剤処理区の方が茎葉全面処理区よりも残留割合が多かつ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

た。その他は 5%以下の微量成分であった。F 及び D は光分解物で茎葉全面処理区の試料からのみ検出され、粒剤処理区からは検出されなかった。

同定された残留放射能の割合は、粒剤処理区で約 44~48%、乳剤茎葉全面処理区で約 64~73%であった。未同定放射能は 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 以下であった(粒剤処理区は総残留放射能の約 26%；乳剤茎葉全面処理区は約 19%)。

表 6 玄米と白米中の代謝物の濃度 ($\mu\text{g}/\text{kg}$) 及び総残留放射能に対する比率 (%)

代謝物	玄 米				白 米			
	粒剤処理区		茎葉全面処理区		粒剤処理区		茎葉全面処理区	
	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%	$\mu\text{g}/\text{kg}$	%
A:	1.30	25.4	12.31	51.6	0.72	17.6	4.97	38.0
C:								
F:								
E:								
D:								
G:								
B:								
同定された総 残留放射能	2.24	43.7	17.33	72.7	1.96	48.0	8.39	64.2
未同定放射能	1.56	30.5	2.18	9.1	1.13	22.7	2.46	18.8
非抽出放射能	1.36	26.6	4.60	19.3	1.06	26.0	2.54	19.4
検出された総 残留放射能	5.16	100.8	24.11	101.1	4.15	101.7	13.39	102.4

ND: 検出されず

根部、茎葉あるいは葉、枝梗、籾殻及び糠：各部位別(玄米及び白米を除く)の抽出液の分析結果を表 7(乳剤茎葉全面処理区)及び 8(粒剤処理区)に示す。

表 7 乳剤茎葉全面処理区の抽出液の GC/MSD 法による分析結果

試料	部 位		代謝物の濃度 (μg/g) 及び総残留放射能に対する比率 (%)								
			総残留放射能	A:	C:	B:	F:	D:	E:	非抽出成分	合計
緑色植物	根 部	濃度	0.120	0.096						0.008	0.140
		比率	—	80.00						6.45	116.9
	茎 葉	濃度	0.755	0.271						0.054	0.527
		比率	—	35.85						7.11	69.84
収穫時	根 部	濃度	0.101	0.025						0.022	0.096
		比率	—	24.88						22.20	95.07
	葉	濃度	0.180	0.100						0.033	0.236
		比率	—	55.65						18.58	131.0
	枝 梗	濃度	2.096	0.478						0.447	1.864
		比率	—	22.79						21.32	88.95
	粗 殼	濃度	0.495	0.113						0.124	0.356
		比率	—	22.71						25.07	71.91
	糠	濃度	0.155	0.065						0.024	0.130
		比率	—	41.60						15.53	84.00

ND: 検出されず

乳剤茎葉全面処理区：田植後 51 日の緑色植物及び田植後 92 日の収穫時試料の各部位における主要成分は親化合物 (A) であった。代謝物として、(B)、(C)、(E)、(F) 及び (D) (D は収穫時根部及び葉からは検出されなかった) が同定された。主要代謝物は C 及び F、ついで B であった。

表 8 粒剤処理区の抽出液の GC/MSD 法による分析結果

試料	部 位		代謝物の濃度 (μg/g) 及び総残留放射能に対する比率 (%)								
			総残留放射能	A:	C:	B:	F:	D:	E:	非抽出成分	合計
緑色植物	根 部	濃度	0.070	0.010						0.014	0.051
		比率	—	14.75						19.96	72.76
	茎 葉	濃度	0.053	0.008						0.004	0.030
		比率	—	15.30						6.80	55.29
収穫時	根 部	濃度	0.066	0.004						0.010	0.050
		比率	—	6.30						15.12	75.87
	葉	濃度	0.099	0.012						0.021	0.093
		比率	—	12.06						21.29	93.92
	枝 梗	濃度	0.326	0.027						0.040	0.469
		比率	—	8.25						12.42	143.8
	粗 殼	濃度	0.073	0.015						0.012	0.091
		比率	—	20.54						16.86	124.8
	糠	濃度	0.022	0.004						0.004	0.017
		比率	—	17.23						17.08	74.51

ND: 検出されず

粒剤処理区：乳剤茎葉全面処理区と同様の代謝物が同定されたが、B は糠、D は収穫時試料の根部、藁、籾殻及び糠、E は収穫時試料の根部では検出されなかった。

まとめとして、フィプロニルの ^{14}C -標識体を含有する製剤を有効成分として 5g/10a の散布薬量で水稻の移植 20 日後に粒剤を 1 回、区画全面に均一に処理、また、乳剤を移植 20 日及び 50 日後の 2 回、茎葉全面に処理し、田植後 51 日（粒剤処理後 31 日、乳剤 2 回目処理後 1 日）に緑色植物を収穫し、また田植後 92 日（粒剤処理後 72 日、乳剤 2 回目処理後 42 日）の収穫時に試料を採取し、その代謝を調べた。その結果、

収穫時の稲では、粒剤処理区及び乳剤茎葉全面処理区ともに残留放射能は枝梗が最も高く、ついで藁、籾殻及び根部で、玄米中の濃度は最も少なかった。白米にも少量の残留が認められた。

乳剤の茎葉全面処理区は粒剤処理区に比し、約 1.6 倍の処理薬量で、2 回目処理後収穫までの期間が 42 日と短い（粒剤処理区は 72 日）が、枝梗及び籾殻の残留放射能は粒剤処理区に比較して約 7 倍、玄米で約 4 倍、根部及び藁で約 2 倍高かった。

玄米中の残留放射能の大半は天然物に取り込まれたのではなく、代謝の過程で天然物と化学的に結合した親化合物あるいはその代謝物であると考えられた。

稲中の主要成分はいずれの部位とも、親化合物 (A) であった。代謝物として、(B)、(C)、(E)、(G)、(F) 及び (D) が同定された。主要代謝物は玄米及び白米では E で、粒剤処理区の方が茎葉全面処理区よりも残留割合が多かった。それ以外の部位では C 及び F、ついで B であった。G は微量であるが、玄米及び白米のみから検出された。

稲は酸化的及び還元的機序（比率は少ない）によりフィプロニルを代謝し、親化合物より毒性の低い少なくとも 3 種類の代謝物 [(B)、(C)、(E) 等] を生成することが明らかになった。

想定代謝経路を図 1 に示す。

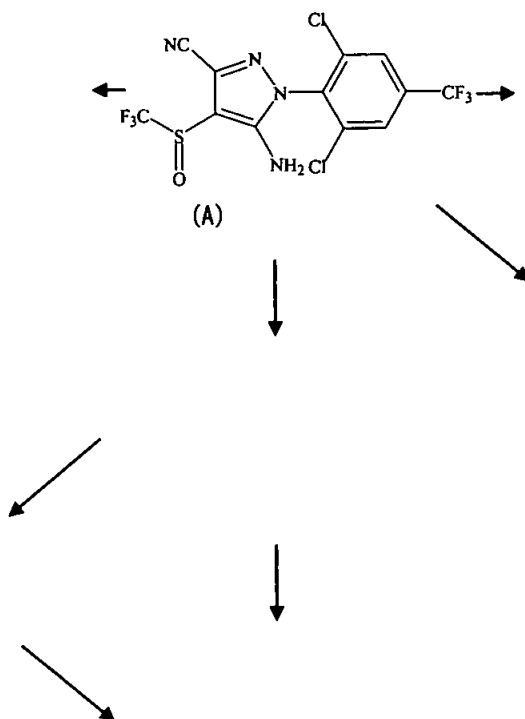


図1 水稻におけるフィプロニルの想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

2-2 キャベツにおける代謝試験

(資料 M17)

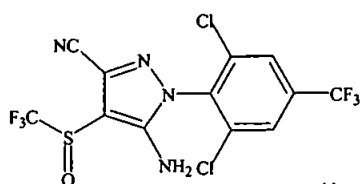
試験機関： (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年：

供試標識化合物：(以下 ^{14}C -標識体と言う)

構造式：



化学名：(±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名：フィプロニル

比放射能： MBq/mmol (mCi/mmol)

放射化学的純度：

供試植物：キャベツ(品種：HISPI)

栽培条件：種子を育苗用配合培土に播種後、50 日苗を育苗用配合培土を詰めたポット(直径 22.9cm)に移植した。ポットは温室内で管理し、給水は鉢底から行った。

方法：

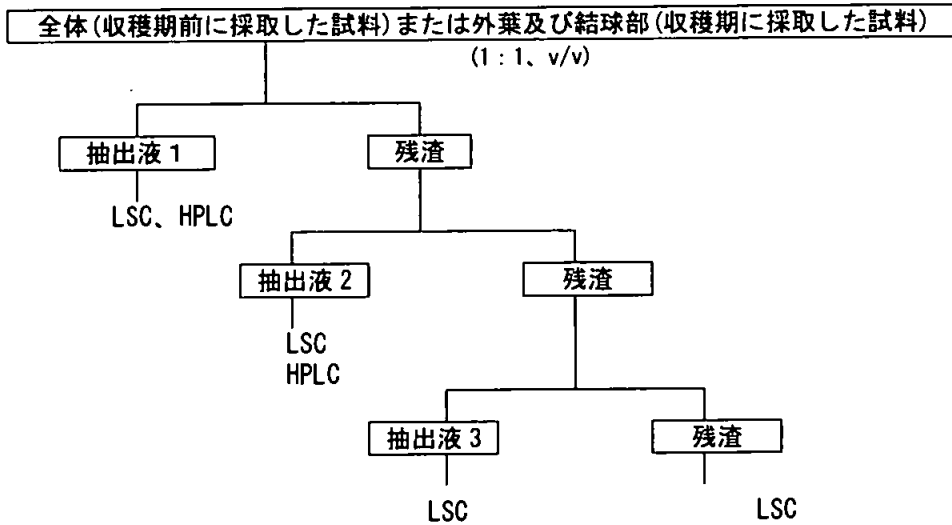
試験溶液の調製： ^{14}C -標識体 10.1mg は非標識体(純度)29.9mg 及び 0.2ml と混合し、50ml の (1:1, v/v) に溶解・希釈して、試験溶液とした。

処理量：20g a. i. /10a(最大実使用量の 2 倍量)

処理の部位及び方法：1 回目散布は結球開始時(試験 0 日)に葉の表面に噴霧処理し(設定処理量は 1 ポット当り上記溶液 1ml)、2 回目散布はその 14 日後に同様に行った。

試料採取時期：試験 0 日(散布後)、試験 14 日(2 回目散布直前及び直後)、試験 17、21、24、28 及び 35 日(収穫期)に採取した。対照試料は試験 0、14、28 及び 35 日に採取した。

分析方法：凍結したキャベツ全体(収穫期前に採取した試料)または外葉及び結球部(収穫期に採取した試料)を細かく碎き、試料の一部(収穫期前採取試料)または全量(収穫期採取試料)を以下に示すスキームに従い、抽出、分画した。



抽出液 1、2 及び 3 は凍結乾燥または濃縮した後、抽出溶媒に再溶解した。抽出液 3 は濃縮後も放射能が少なく HPLC 分析をしなかった。

代謝物の定量は HPLC で標品 (A: フィプロニル、C: 、B: 及び E:) と比較して行い、HPLC 保持時間の比較、GC/MS 及び/または NMR スペクトル分析により同定した。

放射能の測定: 液体試料はシンチレーションカクテルを加えた後、直接液体シンチレーションカウンタ (LSC) で放射能を計測した。固体試料は酸化燃焼して、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集液に捕集した後、液体試料と同様にして放射能を計測した。

結果:

回収放射能:

収穫期前試料 (1 回目散布後 28 日までの試料): 試料中における回収放射能を表 1 に示す。

処理後の時間の経過につれて回収放射能の減少が認められた。組織に結合残留の増加は認められないが、抽出可能成分の減少が見られた。

表 1 1 回目散布後 28 日までの試料中における回収放射能 ($\mu\text{g-eq/g}$ 生重)

1 回目処理後日数	0	14 ^b	14 ^c	17	21	24	28
抽出液 (1+2) ^a	2.00	0.71	1.96	1.22	1.19	0.84	0.93
残渣	0.00	0.06	0.10	0.07	0.08	0.08	0.10
合計	2.00	0.77	2.06	1.30	1.26	0.92	1.03

^a: 抽出液 3 () は放射能が少なくこれに含めなかった。

^b: 2 回目処理直前。 ^c: 2 回目処理直後

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

収穫期試料：試料中の残留放射能を表 2 に示す。収穫期の外葉及び結球部から回収された放射能の処理量に対する比率及び各試料の総残留に対する抽出率を表 3 に示す。

外葉における残留濃度は結球部の平均 5 倍 (3~12 倍) の濃度であった (表 2)。

表 2 収穫期試料中における回収放射能 ($\mu\text{g-eq/g}$ 生重)

鉢番号	試料	抽出液	残渣	合計	植物当たり濃度	結球と外葉の 残留比
18	外葉	2.65	0.12	2.78	1.28	1:5
	結球部	0.49	0.04	0.53		
25	外葉	2.30	0.11	2.42	1.15	1:12
	結球部	0.20	0.01	0.21		
36	外葉	1.97	0.10	2.07	1.12	1:6
	結球部	0.33	0.02	0.35		
26	外葉	2.36	0.15	2.51	1.67	1:3
	結球部	0.79	0.03	0.82		
平均	外葉	2.32	0.12	2.45	1.31	1:5
	結球部	0.30	0.03	0.48		

平均で処理量の 62% が外葉から、15% が結球部から回収され、外葉及び結球部とも 95% が抽出可能で、組織中の結合残留は 5% であった (表 3)。処理後 0 日の回収率を 100% とすると平均 78% であった。

表 3 収穫期の外葉及び結球部から回収された放射能の処理量に対する比率並びに各試料の総残留に対する抽出率

鉢番号	試料	処理量に対する			総残留量に対する		
		抽出率%	残留率%	合計%	残留量 (ppm)	抽出率%	結合残渣 %
18	外葉	61.58	2.85	64.43	2.78	95.3	4.8
	結球部	22.34	1.72	24.06	0.53	92.5	7.5
25	外葉	72.27	3.43	75.70	2.42 ^{a)}	95.6	4.4
	結球部	8.22	0.36	8.58	0.21	95.2	4.8
36	外葉	52.49	2.69	55.18	2.07	95.2	4.8
	結球部	8.77	0.50	9.27	0.35	94.3	5.7
26	外葉	48.43	3.16	51.59	2.51	94.0	6.0
	結球部	16.17	0.68	16.85	0.82	96.3	3.7
平均	外葉	58.69 ^{a)}	3.03	61.72 ^{a)}	2.47	95.0	5.0
	結球部	13.88	0.81	14.69	0.48	94.6	5.4

a) 報告書に記載誤記があったため、申請者が訂正した。

代謝物の定量：処理後の主要代謝物及び結合残留放射能の経時変化を表 4 に示す。

植物組織への結合残留が経時的に増加することはなかった。親化合物 (A) の濃度は処理後 14 日間で、処理直後 (0 日試料) の残留量の 25% にまで減少した。2 回目処理後で

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

もほぼ同期間で同程度の濃度に達したが、いずれの試料においても濃度及び試料中の割合ともに最も多かった。主要分解物は (F) で 0.14~0.30ppm の範囲内で生成し、ほとんど不変であった。(G) は試験 24 日までほとんど不変で 0.05ppm 生成したが、試験 28 日には 0.15ppm に増加した。収穫期までの期間中に、(E)、(C) 及び (B) が検出されたが、いずれの時期とも 0.05ppm 以下であった。

表 4 主要代謝物及び結合残留放射能の経時変化
(各画分の試料中放射能に対する割合%及び濃度 ppm)

1 回目処理後日数		0	14a*	14b*	17	21	24	28	35*(収穫期)		
採取部位		植物全体							合計	外葉	結球部
結合残留放射能	%	0	7.7	4.9	6.2	6.3	9.6	9.7	5.5	5.7	5.2
	ppm	0	0.06	0.10	0.08	0.08	0.09	0.10	0.07	0.13	0.03
A:フィプロニル	%	100	67.9	80.5	70.5	65.9	57.4	55.3	51.6	47.4	65.5
	ppm	1.98	0.53	1.65	0.91	0.83	0.54	0.57	0.66	1.08	0.38
G:	%										
	ppm										
F:	%										
	ppm										
E:	%										
	ppm										
C:	%										
	ppm										
B:	%										
	ppm										

14a*:2 回目散布直前 14b*:2 回目散布直後

* 収穫期の合計は以下の式を用いて算出した。

$$((\text{葉中 ppm} \times \text{抽出に用いた葉重量}) + (\text{結球部 ppm} \times \text{抽出に用いた結球部重量})) \div (\text{結球部} + \text{葉の総重量})$$

収穫時試料中の主要残留は親化合物の他に、F 及び G(光分解物)並びに E(加水分解物)が主要な分解物であった。これら分解物の濃度は主として外葉に多く存在し、結球部の濃度の約 5~10 倍であった。また、結球部では親化合物がほとんど代謝されず、代謝物はいずれも 0.1ppm 以下で、結合残留も 0.03ppm と極めて僅かであった。

まとめとして、キャベツの播種 50 日苗を結球開始時に 20g/10a を茎葉に噴霧処理し、さらに、14 日後に同様に 2 回目の処理をした。処理後収穫(1 回目処理後 35 日)まで経時的に試料を採取して、残留を調べた。その結果、残留の主要成分は親化合物(A)で、収穫時総残留(外葉+結球部)の約 50%を占めていた。3 種の主要代謝物が検出さ

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

れ、うち 2 種類 (F 及び G) は葉で生成した光分解物であり、総残留の 13 及び 16%、結球部では 5 及び 14% を占めていた。残りの 1 種は E (アミド体) で親化合物の加水分解物であり、総残留の 13% 及び結球部の 10% を占めていた。その他に微量の代謝物 B 及び C が検出されたが、結球部からは検出されなかった。結合残留は処理後 0.06 ~ 0.10ppm の範囲にあり増加することはない、収穫時の結球部で 0.03ppm であった。

想定代謝経路を図 1 に示す。

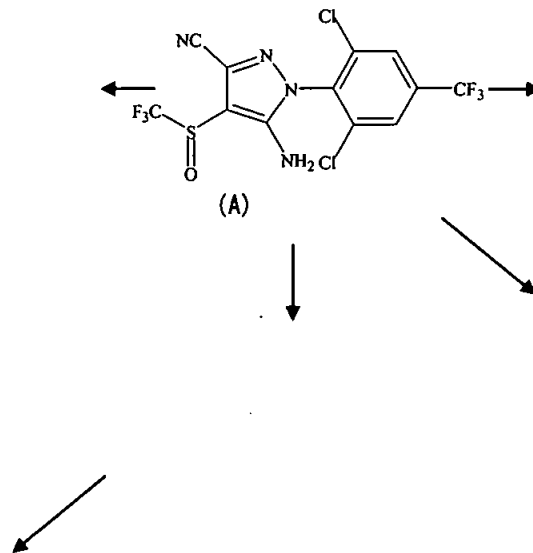


図 1 キャベツにおけるフィプロニルの想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

2-3 ヒマワリにおける代謝試験

(資料 M18)

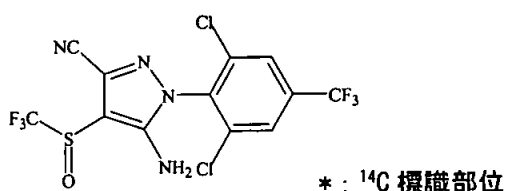
試験機関： (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年：

供試標識化合物：(以下 ^{14}C -標識体と言う)

構造式：



化学名：(±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α , α , α -トリフルオロ-p-トルイル)-4-トリフル
オロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名：フィプロニル

比放射能： MBq/mmol (mCi/mmol)

放射化学的純度：

供試植物：ヒマワリ(品種：Granosol)

栽培方法：砂壤土を詰めた鉢(直径 20cm)に種子 3 個を播種し、発芽後間引いて 1 本とした。
栽培は温室で、給水は鉢底から行なった。15 鉢用いた。

方法：

試験製剤の調製： ^{14}C -標識体及び非標識体(純度)を に溶解・混合して、顆粒状
白試料に含浸させて試験用顆粒製剤 (1.95%, w/w) とした。

処理量：20g a. i. /10a(実使用量)。本顆粒製剤を 1 鉢当り 31.5mg 処理。

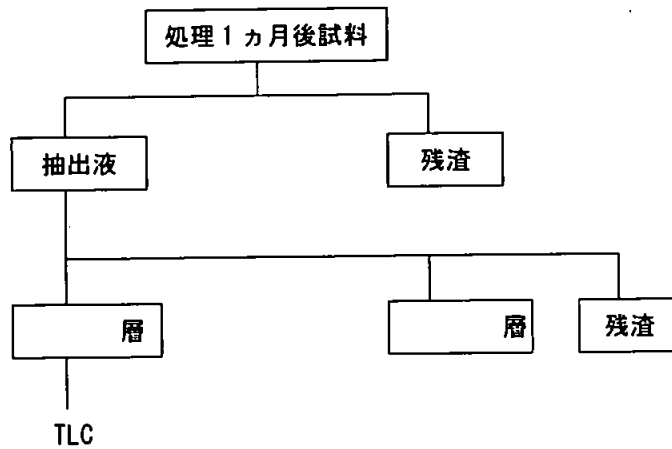
処理の方法：土壤に小穴を開け、調製した所定量の顆粒製剤を入れ、顆粒上に種子を置き、
覆土した。

試料採取時期及び方法：処理後 1 及び 2 ヶ月後に中間試料を無作為に 2 鉢から採取し、残りは
全て収穫時(種子が熟し、枯れ始めた時点;処理後約 4.5 ヶ月後)で採取した。

茎は土壤面で切断した。中間試料は植物全体を、収穫時の試料は葉、茎及び頭状花十
種子に分け、別々に保存した。分析前に頭状花と種子に分けた。

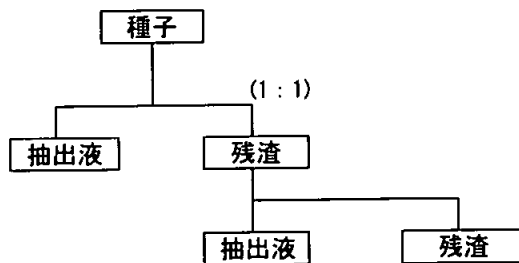
分析方法：

処理1ヶ月後試料の分析(2ヶ月目の試料は分析しなかった)：



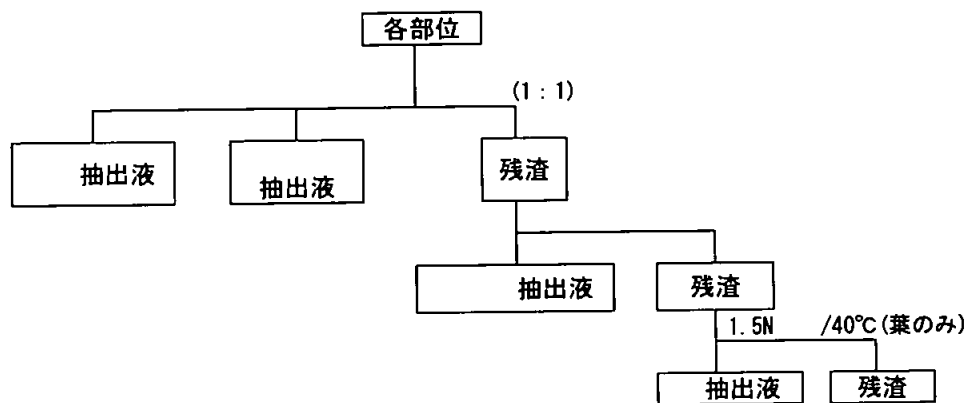
収穫時試料の放射能の分析：2株を無作為に取り、放射能を以下のように分画し測定した。

種子：

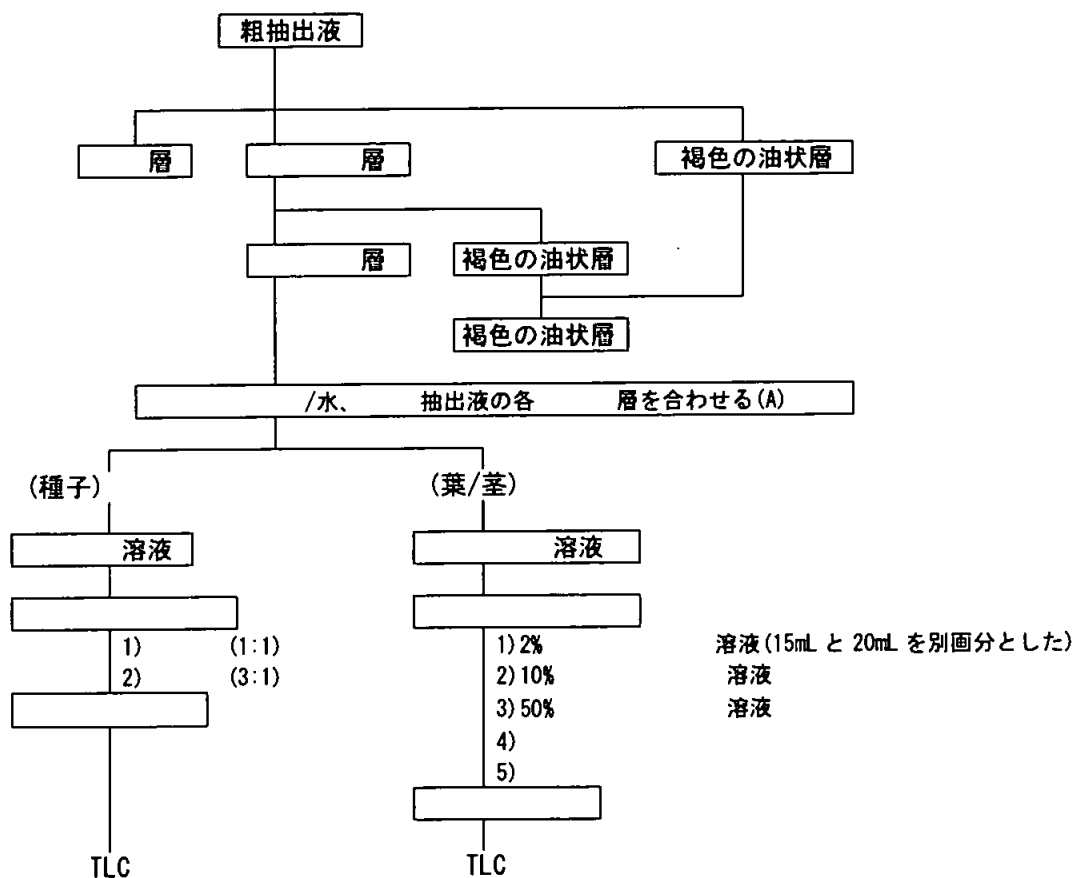


葉、茎及び頭状花： した後、 して計測した。

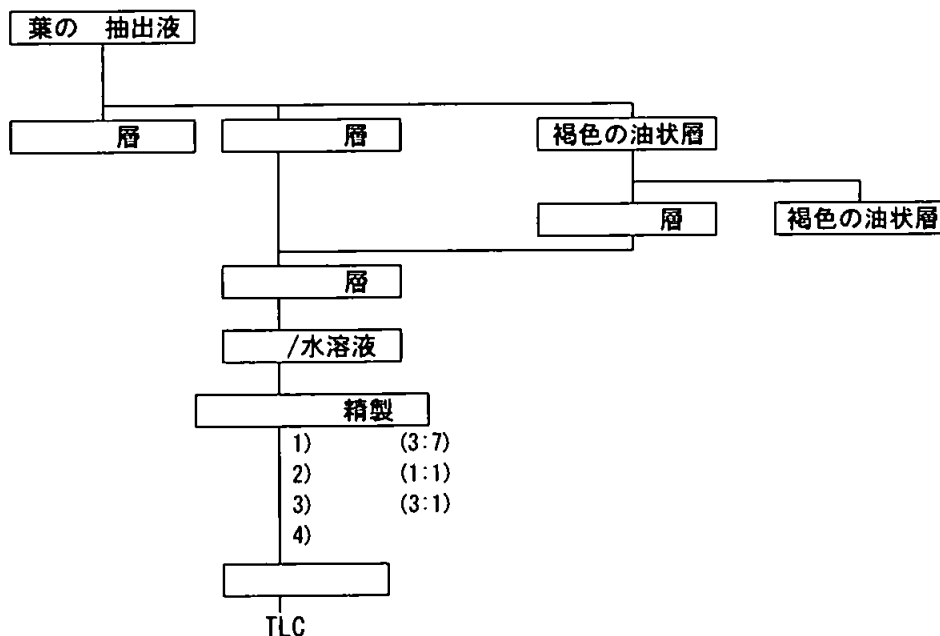
植物全体の分析、代謝物の単離/同定：残りの9株の種子、花、茎、及び頭状花をそれぞれ合わせて分析した。



各粗抽出液(抽出液、抽出液、抽出液)を以下に示したスキームに従って、分配/精製した。



葉の抽出液は以下に示したスキームに従って、精製した。



: フィプロニルより極性の高い物質を多く含む抽出液はを行なった。

薄層クロマトグラフィー：以下の4種類の混合溶媒系を用いて展開した。

- 1) 9:1 (v/v)
- 2) 19:1 (v/v)
- 3) 95:3:2 (v/v/v)
- 4) 2:1 (v/v)

種子の一部と葉の分析には 2.5% 35:65 (v/v) が特に有用であった。

定量：薄層クロマトグラフィーにリニアアナライザーと Ambis100 を用いて ¹⁴C 含量の高い試料のピーク積分を行い、代謝物を定量したが、化学構造が極めて類似している想定代謝物 2 組 (F: と C: 及び E: と I: は GC/MS により比率を求めた。また定量には HPLC も用いた。

放射能測定：液体試料は液体シンチレーションカウンターで直接測定した。固体試料は、燃焼後、¹⁴CO₂ を捕集液に捕集し、液体試料と同様に測定した。

結果：

吸収、移行及び分布：処理 1 ヶ月後試料中の放射能の分布を表 1、収穫時の植物各部位における放射能 ($\mu\text{g-eq/g}$) 及び処理放射能に対する割合を表 2 に示した。また、総残留放射能に対する各部位の残留放射能の割合 (%) を表 3 に示した。

処理 1 ヶ月後試料中の放射能の分布：平均で $0.19 \mu\text{g-eq/g}$ (処理放射能の 1.32%) が吸収されていた。抽出液から得た抽出液の主要成分は親化合物で、少量の代謝物も検出されたが同定は行わなかった。

表 1 処理 1 ヶ月後試料中の放射能の分布

植物番号	$\mu\text{g-eq/g}$			処理放射能に対する%		
	抽出	非抽出	合計	抽出	非抽出	合計
6	0.11	0.016	0.13	1.00	0.14	1.14
14	0.22	0.026	0.25	1.33	0.16	1.49
平均	0.17	0.021	0.19	1.17	0.15	1.32

収穫時試料：放射能の主な残留部位は葉であった。その他の部位で検出された放射能は比較的少量であった。全体として、植物は処理量の 4.8 % を取り込んでおり、溶液によるソックスレー抽出 (葉は抽出も行なった) で 合計 80 % 以上 が抽出された (表 2)。

表 2 収穫時の植物各部における放射能 ($\mu\text{g-eq/g}$)

採取部位	分析植物数	画分					計	植物当たり平均値
$\mu\text{g-eq/g}$								
葉	1	-	-	-	-	-	2.31	1.43
	1	-	-	-	-	-	1.66	
	9	0.56	0.39	0.11	0.017	0.23	1.31	
茎	1	-	-	-	-	-	0.30	0.13
	1	-	-	-	-	-	0.21	
	9	0.048	0.017	0.018	-	0.017	0.10	
頭状花	1	-	-	-	-	-	0.099	0.033
	1	-	-	-	-	-	0.050	
	9	0.016	0.0035	0.0019	-	0.0020	0.023	
種子	1	0.016	0.024	0.012	-	0.0076	0.060	0.034
	1	0.010	0.015	0.0067	-	0.0073	0.039	
	9	0.011	0.012	0.0058	-	0.0018	0.031	
処理放射能に対する%								
葉	1	-	-	-	-	-	5.71	4.01
	1	-	-	-	-	-	4.95	
	9	1.59	1.11	0.31	0.047	0.66	3.72	
茎	1	-	-	-	-	-	0.55	0.60
	1	-	-	-	-	-	1.04	
	9	0.27	0.094	0.10	-	0.097	0.56	
頭状花	1	-	-	-	-	-	0.15	0.083
	1	-	-	-	-	-	0.082	
	9	0.051	0.012	0.0063	-	0.0066	0.076	
種子	1	0.023	0.034	0.018	-	0.011	0.086	0.12
	1	0.015	0.022	0.010	-	0.010	0.057	
	9	0.046	0.050	0.025	-	0.0079	0.130	
合計								4.81

総残留放射能に対する割合は葉に 83%、茎に 13%、頭状花及び種子に 2 ないし 3% が分布していた。抽出残渣は葉で 15%、茎で 2%、頭状花及び種子で 1% 以下であった(表 3)。

表 3 収穫物の総残留放射能に対する各部位の抽出画分別残留放射能の割合 (%)

(9 植物の平均値)

試料	画分				計	計
葉	35.45	24.65	6.97	1.05	14.75	82.9
茎	6.06	2.09	2.27		2.16	12.6
頭状花	1.14	0.26	0.14		0.15	1.7
種子	1.03	1.11	0.55		0.18	2.9

代謝物の検討： 溶液による抽出を合わせ 及び で したところ、ほとんどの放射能が 中に抽出され、その他の画分の放射能は無視できる程度であった。

葉及び茎における代謝物の同定結果を 0.01 $\mu\text{g-eq/g}$ 以上の成分について表 4 に示す。

表 4 収穫試料の葉及び茎の抽出液中における代謝物の同定

(及び 抽出液の合計)

化合物	葉		茎	
	$\mu\text{g/g}$	総残留放射能に対する%	$\mu\text{g/g}$	総残留放射能に対する%
A: フィプロニル	0.480	30.0	0.034	4.3
B:				
C:				
E:				
U48				
U52				
U54				
U58				
U59				
U60				
D6				

葉及び茎における、主要成分は親化合物(A)で、主要代謝物として (B)が同定された。葉ではさらに2成分 (C)及び (E)が同定された。これら以外に、約 $\mu\text{g-eq/g}$ 以上の未同定代謝物6成分があった。茎では $\mu\text{g-eq/g}$ の未同定代謝物1成分(D6)があった。その他に $\mu\text{g-eq/g}$ 以下の未同定代謝物11成分が検出された。

葉の抽出液には5成分以上の代謝物が検出されたが、0.01 $\mu\text{g-eq/g}$ を超えるものはなかった。

頭状花では放射能を有する5画分に分かれたが、0.01 $\mu\text{g-eq/g}$ を超えるものはなかった。

種子では、他の部位とは全く異なる代謝物のパターンがみられた。メチル化によりクロマトグラフ特性が変化したため、酸性基かフェノール基が存在することが示唆された。これら試料は多種の代謝物(14成分)を含んでいることが確認されたが、いずれも0.01 $\mu\text{g-eq/g}$ を超えるものはなかった。親化合物(A)及び (B)は種子内では検出されなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

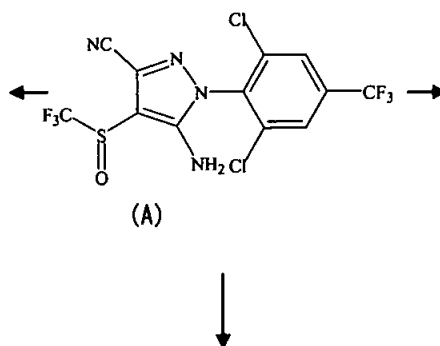
まとめとして、土壌に小穴を開け、処理量 20g/10a の ^{14}C -標識体顆粒剤を入れ、その上に直接種子を播き、覆土した。給水は鉢底から行なった。処理 1 カ月後の茎葉には処理量の 1.5% 以下が吸収されていた。

収穫時(処理後約 4.5 カ月後)に採取した試料では、植物全体で処理放射能の 4.8% が吸収され、その大部分は葉 ($1.43 \mu\text{g-eq/g}$; 総残留の 83%) に含まれ、種子では残留 ($0.034 \mu\text{g-eq/g}$; 総残留の 3%) は少なかった。

茎葉中の主要成分は親化合物で、主要代謝物は (B) であった。これ以外に C 及び E が代謝物として同定された。その他の多数の成分が検出されたが、同定できなかった。

種子では、他の部位とは全く異なる代謝物のパターンで、多種の代謝物が検出されたが、いずれも微量で同定できなかった。種子内では親化合物 (A) 及び (B) は検出されなかった。また、抽出液のメチル化により酸性基かフェノール基の存在が示唆された。

推定代謝経路を下図に示す。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

2-4 てんさいにおける代謝試験

(資料 M19)

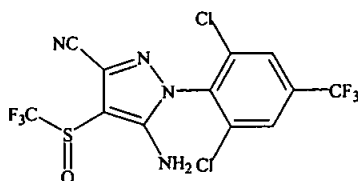
試験機関： (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年：

供試標識化合物：(以下 ^{14}C -標識体と言う)

構造式：



* : ^{14}C 標識部位

化学名：(±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名：フィプロニル

比放射能： mCi/mmol

放射化学的純度：

供試植物：てんさい(品種：Gala)

栽培条件：砂質壤土を詰めたポット(直径 30cm)を温室内に置き栽培した。播種 34 日後に間引いて 1 本とし、収穫(播種 185 日後)まで栽培した。処理区は 15 鉢/区、無処理区は 8 鉢とした。

方法：

試験溶液の調製： ^{14}C -標識体と非標識体(純度)の各 溶液を混合した溶液に粒剤の白試料を加えて攪拌した後、減圧乾固して、2%粒剤を調製した。

処理時期及び方法：土壌面に小穴(直径 7cm)を開け、所定量の粒剤を処理後、鉢当たり 5 種子を播き、覆土した。

処理量：20g/10a 相当量(通常使用量)及び 200g/10a 相当量(10 倍量)

収穫及び採取法：

中間試料の採取-播種 2 及び 4 ヶ月後に各区から 2 株ずつ採取した。

最終収穫-播種 6 ヶ月後に収穫し、葉部と根部に分け、冷凍保存した。最終収穫時試料のみを分析に供した。

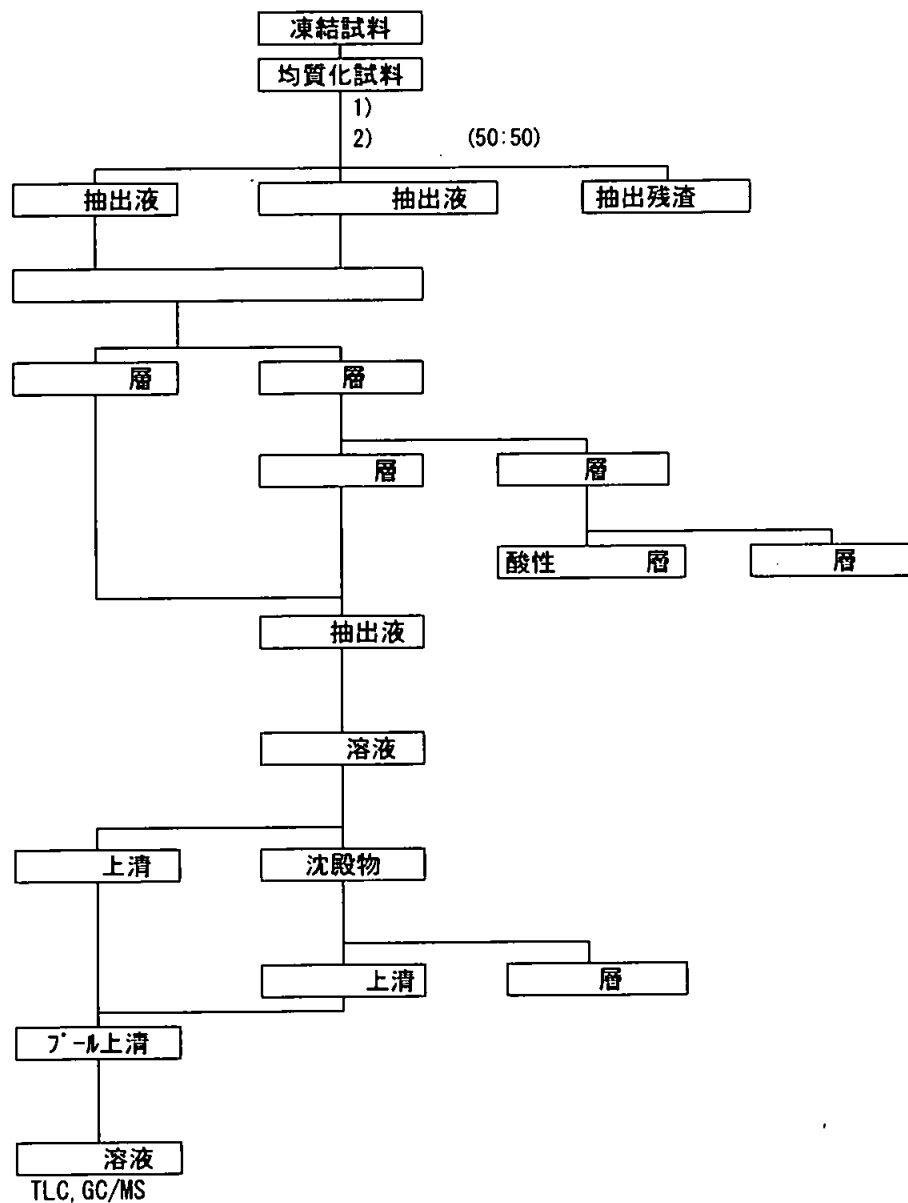
分析方法：

個別植物試料中の放射能の分析 — 各処理量で 2 株の冷凍試料を用い、均質化後、
に浸漬して抽出ろ過し、残渣は (1:1v/v) で抽出した後、ろ過した。
抽出液の放射能は LSC で、残渣は乾燥後、燃焼して放射能を測定した。

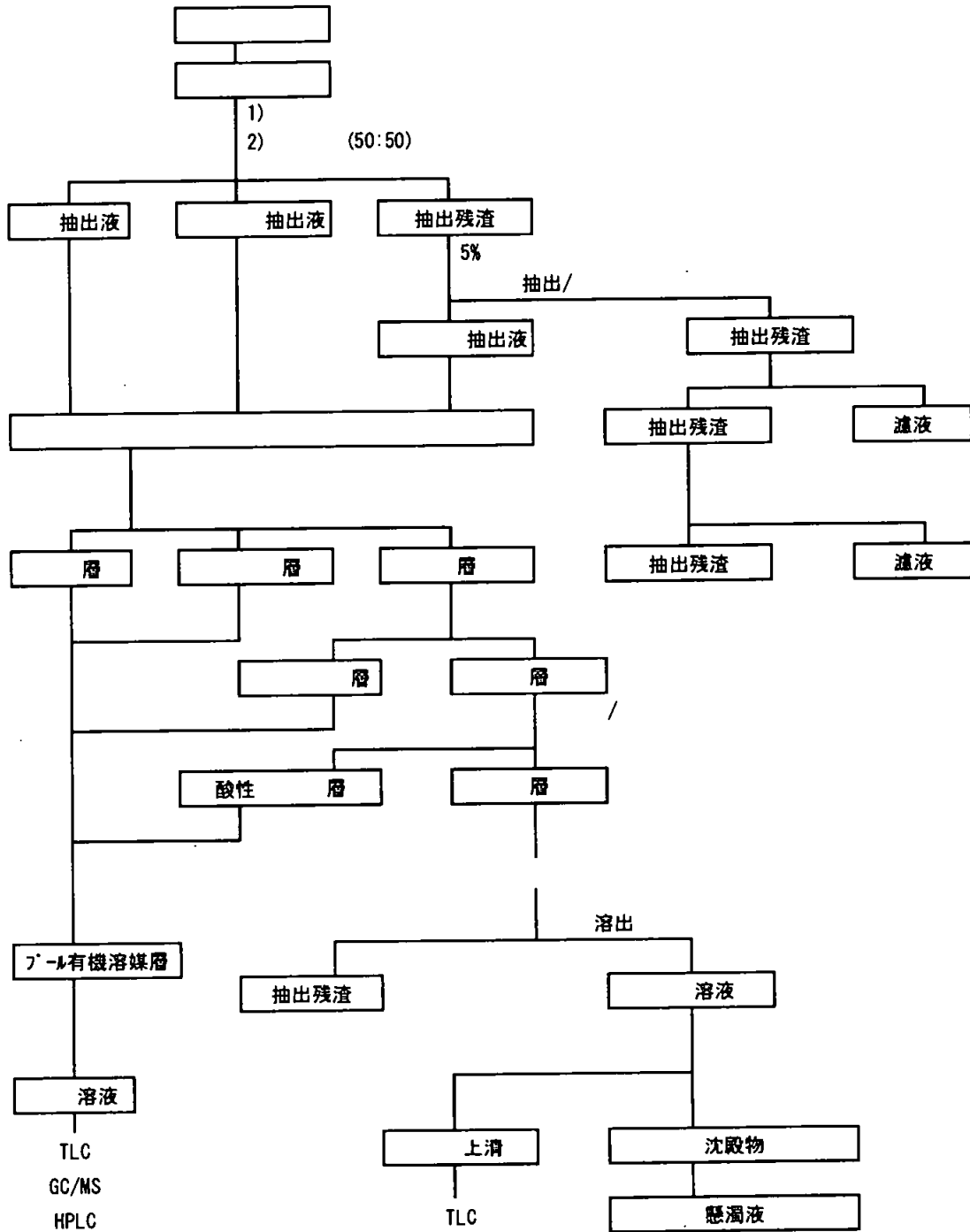
プール試料中の放射能の分析 — 葉部及び根部別に合わせて(通常使用量区は 9 株、10
倍量区は 8 株)均質化し、上記と同様に抽出、放射能の測定を行った。

代謝物の単離及び同定 — 以下のスキームに従って、単離精製し、最終の精製液を想
定代謝物の標品と共に TLC に供試、HPLC または GC/MS で分析した。

根部の抽出・精製スキーム



葉部の抽出・精製スキーム



放射能の測定：液体試料はシンチレーションカクテルを加えた後、直接、液体シンチレーションカウンター(LSC)で放射能を計測した。固体試料は酸化燃焼して、発生した¹⁴C₂を捕集液に捕集した後、液体試料と同様にして放射能を計測した。

結果：

放射能の分布：通常使用量(20g/10a)及び10倍使用量(200g/10a)処理区の放射能の分布をそれぞれ表1及び2に示す。

表1 通常使用量(20g/10a)処理区の放射能の分布(μg-eq/g)

試料部位	可溶性	可溶性	抽出	可溶性	可溶性	非抽出性	合計	%TRR	
根部	植物 15	0.052	0.009	ND	ND	ND	0.006	0.067	9.4
	植物 13	0.027	0.010	ND	ND	ND	0.009	0.046	6.4
	平均	0.040	0.010				0.008	0.057	7.9
	ブール試料	0.035	0.011	ND	ND	ND	0.009	0.055	8.2
葉部	植物 15	0.357	0.135	0.076	0.013	0.008	0.061	0.649	90.6
	植物 13	0.368	0.134	0.062	0.008	0.002	0.102	0.676	93.6
	平均	0.363	0.135	0.069	0.011	0.005	0.082	0.663	92.1
	ブール試料	0.333	0.121	0.073	0.007	0.005	0.074	0.612	91.8

ND:未分析

通常使用量における残留放射能は主として葉部に存在し、総残留放射能(TRR)の90%以上を占め、根部では10%以下であった。根部では による抽出で TRR の 80~90%が抽出できた。葉部では による抽出に加えて、 抽出、 及び による抽出を行い TRR の 85~90%を抽出できた。

10倍使用量における残留放射能は TRR の 82~87%が葉部に、14~18%が根部に存在した。 による抽出で根部の放射能の 83~89%が、葉部の 78~83%が抽出された。

表2 10倍使用量(200g/10a)処理区の放射能の分布(μg-eq/g)

試料部位	可溶性	可溶性	非抽出性	合計	%TRR	
根部	植物 22	0.203	0.077	0.036	0.316	17.7
	植物 19	0.174	0.055	0.046	0.274	13.7
	平均	0.189	0.066	0.041	0.295	15.6
	ブール試料	0.223	0.067	0.059	0.349	13.4
葉部	植物 22	0.942	0.272	0.253	1.467	82.3
	植物 19	0.953	0.391	0.379	1.723	87.3
	平均	0.948	0.331	0.316	1.595	84.8
	ブール試料	1.16	0.406	0.463	2.026	86.6

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

代謝物の同定・定量：通常使用量試料の根部及び葉部における代謝物の分析結果をそれぞれ表 3 及び 4 に示す。通常使用量の試料に分析に十分な放射能が含まれたため、10 倍使用量試料の結果は示さなかった。

表 3 通常使用量 (20g/10a) 処理区における根部の代謝物 ($\mu\text{g-eq/g}$)

試料部位	A:フィプロニル	B:	E:
植物 15	0.005		
植物 13	0.007		
平均	0.006		
プール試料	0.009		

根部における主要な代謝物は B()、A(フィプロニル)及び E()であった。GC/MS により微量の C()の存在も確認された。

表 4 通常使用量 (20g/10a) 処理区における葉部の代謝物 ($\mu\text{g-eq/g}$)

試料部位	B:	I:	E:	C:	D:	極性物質
植物 15						0.087
植物 13						0.089
平均						0.088
プール試料						0.088

分配により得た葉部の有機溶媒可溶性画分を TLC 及び HPLC により分析した結果、主要な代謝物は B、E、I()、D()及び C であった。GC/MS により微量の未変化の親化合物の存在も確認された。その他に極性物質が認められ、それは分取用 TLC で 4 成分以上からなることが示唆された。そのうちの約 40%を示す 1 成分はクロマトグラフ特性が G()と同様であった。

精製した MeOH 可溶性物質は少なくとも 3 成分から構成されていた。

まとめとして、てんさいに想定通常使用量 (20g/10a) 及びその 10 倍量 (200g/10a) を播種時に土壌処理し、6 ヶ月間栽培した後収穫した。収穫物を葉部と根部に分け、2 株は個別に分析し、その他の株は部位別にプールして 1 試料とし、分析した。

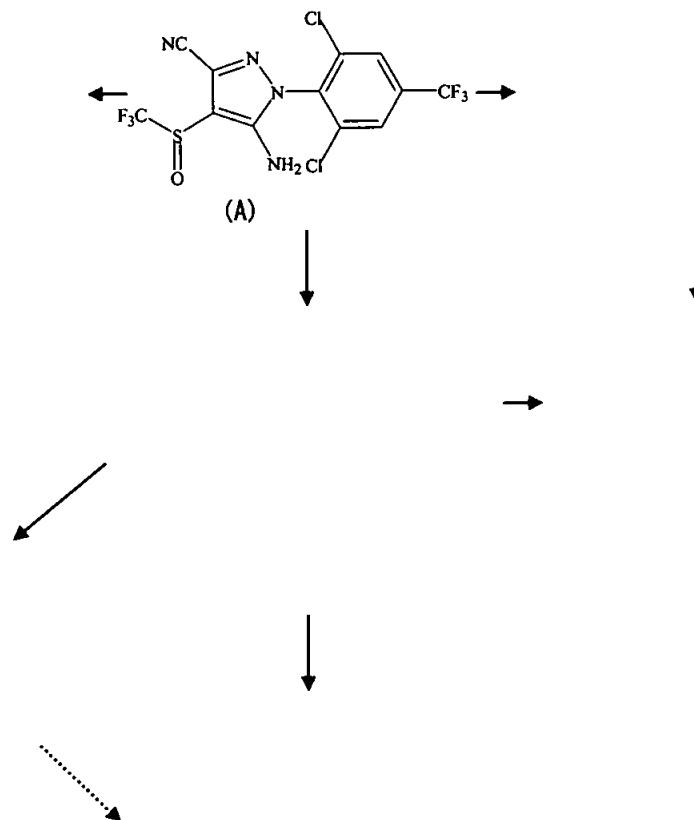
吸収された放射能は主に葉部に 90%以上存在し、根部には 10%以下であった。根部放射能の 80~90%が溶媒で抽出され、組織中の残留は 10~20%であった。葉部では 85~90%が抽出された。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

根部の主要な分解物は B、A 及び E、この他に GC/MS により微量の C の存在も確認された。
葉部の主要な代謝物は B、E、I、D 及び C で、親化合物(A)は GC/MS で微量検出されたのみであった。

想定代謝経路を以下に示す。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

2-5-1 とうもろこしにおける代謝試験 (1)

(資料 M20)

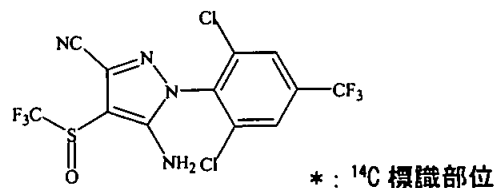
試験機関： (英国)

[GLP 対応]

報告書作成年：

供試標識化合物：(以下 ^{14}C -標識体と言う)

構造式：



化学名：(±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-p-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名：フィプロニル

比放射能： $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (mCi/mmol)

放射化学的純度：

供試植物：とうもろこし(品種：Jubilee)

栽培条件：砂質壤土を詰めたポット(1及び3ガロン)に2粒ずつ播種し、温室内で栽培した。発芽後間引いて1本仕立てにした。

方法：

試験溶液の調製： ^{14}C -標識体と非標識体(純度)の各 溶液を混合した溶液に粒剤の白試料を加えた後、減圧乾固して、1.69%粒剤を調製した。

茎に直接注入する溶液は ^{14}C -標識体と非標識体(純度)の各 溶液を混合した 19.7mg/mL 溶液を調製した。

処理の部位及び方法：

粒剤の処理—播種時に行い、3ガロンのポットではポットの中心に播種し、約18cm幅の長形状に処理した後、約2.5cmの覆土をした。1ガロンのポットは直径が約19cmであったので全面に処理し、同様に覆土した。

茎への注入処理—播種後35日(草丈約64cm)に土壌面から高さ約5cmのところに溶液を注射針で注入処理した。

処理量(実処理量)及び処理時期：

採取試料	処理方法	処理量 (g/10a)	処理時期	
青刈り飼料	粒剤土壌処理	42 ^a (1.19mg/ポット)	播種時	収穫 42 日前
青刈り飼料	粒剤土壌処理	421 ^b (11.9mg/ポット)	播種時	収穫 42 日前
青刈り飼料	粒剤土壌処理	0(対照)	播種時	収穫 42 日前
成熟茎葉	粒剤土壌処理	42 (2.21mg/ポット)	播種時	収穫 106 日前
穀粒	粒剤土壌処理	42 (2.21mg/ポット)	播種時	収穫 98 日前
成熟茎葉	粒剤土壌処理	420 (22.07mg/ポット)	播種時	収穫 106 日前
穀粒	粒剤土壌処理	420 (22.07mg/ポット)	播種時	収穫 98 日前
成熟茎葉	粒剤土壌処理	0(対照)	播種時	収穫 106 日前
穀粒	粒剤土壌処理	0(対照)	播種時	収穫 98 日前
青刈り飼料 ^c	茎に注入	1.97mg/ポット	播種後 35 日	収穫 7 日前
成熟茎葉 ^c	茎に注入	1.97mg/ポット	播種後 35 日	収穫 71 日前
穀粒 ^c	茎に注入	1.97mg/ポット	播種後 35 日	収穫 63 日前

^a : 42g/10a は想定使用量の 2.5 倍相当量である。

^b : 421g/10a は想定使用量の 25 倍相当量である。

^c : 抽出処理は行わなかった。

収穫及び採取法：

土壌処理群の試料：

青刈り飼料の採取：草丈が約 1m になった時点で地上部を刈り取り収穫した。

穀粒及び成熟茎葉：穀粒が成熟した時点で、雌穂を全て収穫し、雌穂以外の地上部(成熟茎葉)は細断した。雌穂から穀粒を取り外した後、穂梗、毛、穂軸と包葉は成熟茎葉と一緒にした。

茎に注入した試料：土壌処理群と同じように収穫したが、注射部位と注射部位より上部に分けた。

分析方法：残留放射能の抽出はすべて 0.01ppm 以上含まれている組織/画分について行なった。

青刈り飼料：冷凍試料を、ブレンダーでドライアイスと共に粉碎した。

穀粒：ミルで粉末とした。

成熟茎葉(穀粒を除く)：ミルで粉末とした。

放射能の抽出は以下のスキーム 1 に従い、

で順次抽出

した。さらに、0.01ppm 以上放射能が残存する残渣は

及び

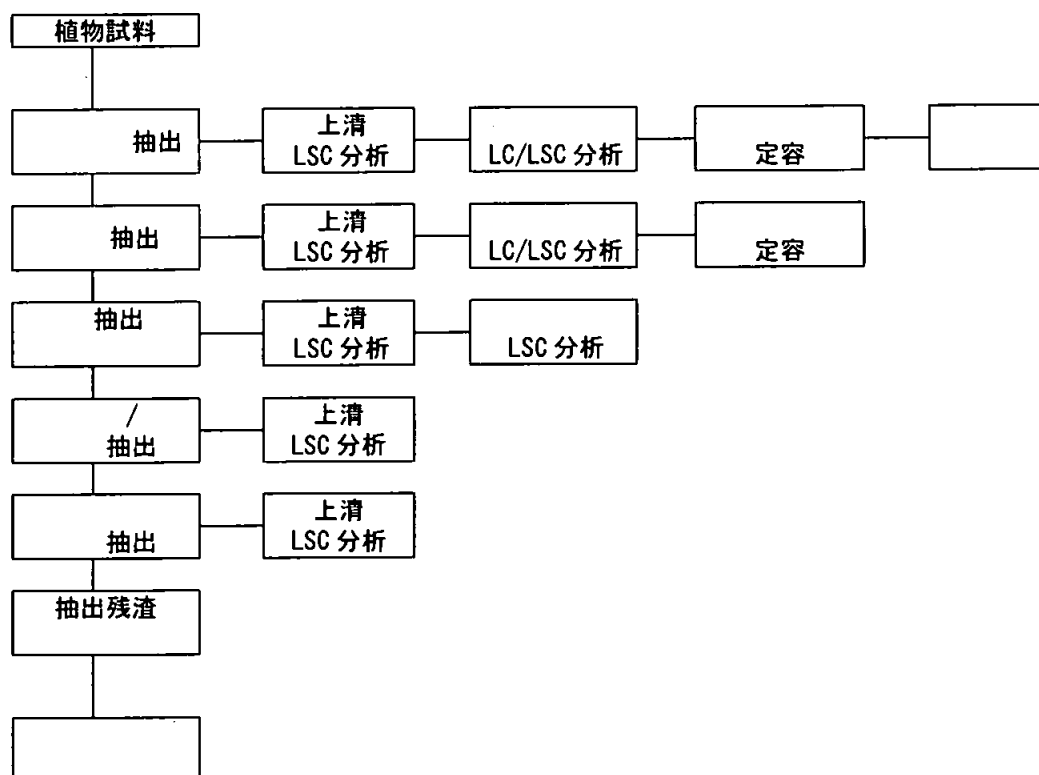
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

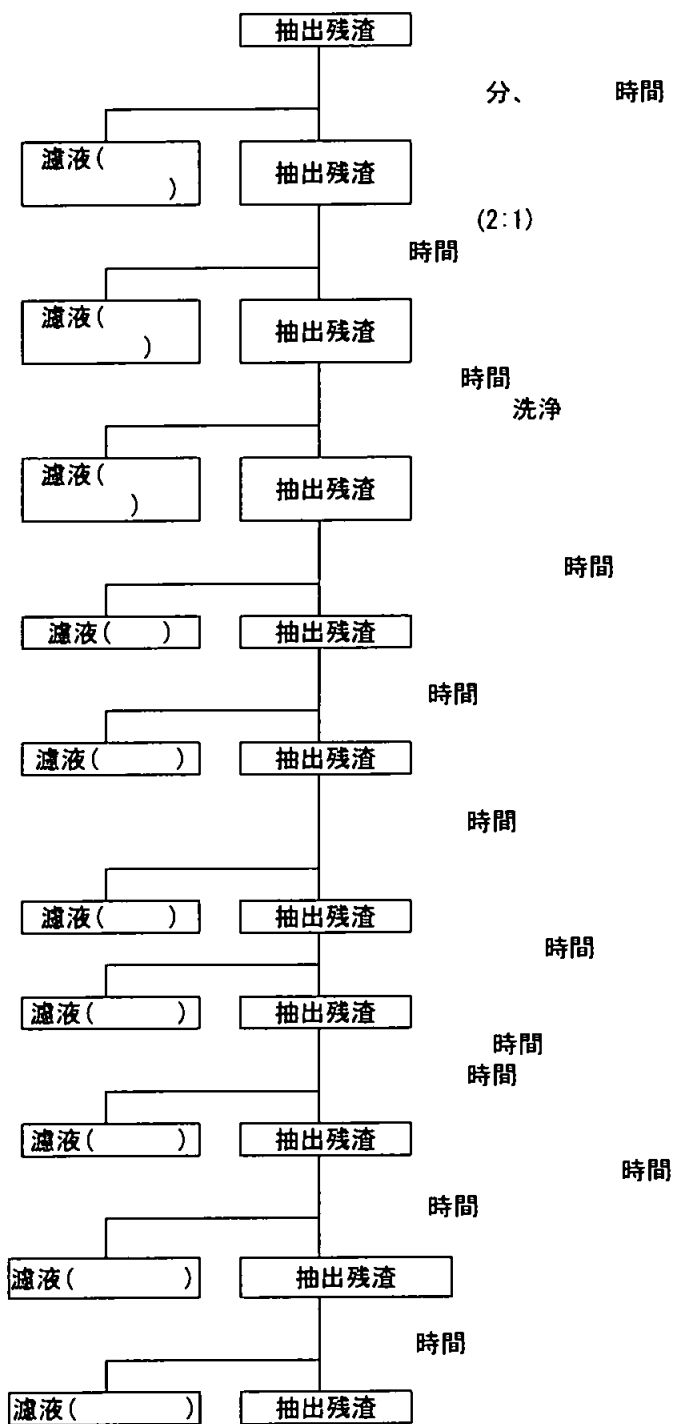
で還流、抽出した。抽出液は に添加し、
(50/50)、 及び で順次溶出して精製した。

抽出残渣はスキーム 2 に従い、結合残留放射能の特性検討のために を行
なった。

スキーム 1



スキーム 2



代謝物の定量/同定は HPLC で標品 (A: フィプロニル、F: 、C: 、D: 、B: 、G: 、E: 、J: 及び H:) との HPLC 保持時間の比較及び MS 分析により同定した。

放射能の測定: 液体試料はシンチレーションカクテルを加えた後、直接液体シンチレーションカウンター (LSC) で放射能を計測した。固体試料は酸化燃焼して、発生した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集液に捕集した後、液体試料と同様にして放射能を計測した。

結果:

放射能の移行パターン: 低用量 (42g/10a) の場合、処理放射能のうち吸収された量は 4%未満で、放射能の大半は青刈り飼料あるいは成熟茎葉中にあり、穀粒への移行は 7.5%未満であった。

総残留放射能は抽出法に基づく残留が燃焼法の場合よりも絶えず多かった。以降のデータは全て抽出放射能に対する割合%として表示した。

表 1 低用量 (42g/10a) の場合の燃焼法による総残留放射能及び抽出による抽出性放射能と非抽出性結合残留放射能の合計残留量との比較

採取試料	処理量 (g/10a)	処理時期 (収穫前日数)	総残留濃度 ppm		
			燃焼法	抽出法	%TRR
青刈り飼料	42	42	0.18	0.23	100.00
	0(対照)	42	0.00	0.02	100.00
成熟茎葉	42	106	2.07	3.74	92.98
穀粒		98	0.19	0.21	7.02
成熟試料合計					100.00
成熟茎葉	0(対照)	106	0.00	0.02	
穀粒		98	0.00	0.00	

注: 検出限界 燃焼法の場合 0.012ppm、抽出可能残留の場合 0.0045ppm。

各部位別/画分別放射能の分布: とうもろこしの部位別抽出性及び非抽出性放射能 (^{14}C -親化合物当量としての ppm または総残留放射能に対する割合%) を次表に示す。

表2 とうもろこしの部位別抽出性及び非抽出性放射能の分布

採取試料	処理量 (g/10a)	処理時 期(収穫 前日数)	総残留 ppm	抽出性残留						合計	非抽出性 結合残留
残留放射能 ppm											
青刈り飼料	42	42	0.23	0.13	0.05	0.00	NE	0.01	0.19	0.04	
	421 ^{a)}	42	0.18	0.12	0.01	0.00	NE	0.00	0.15	0.03	
	0(対照)	42	0.02	0.00	0.01	0.01	0	NE	0.02	0.00	
成熟茎葉 穀粒	42	106	3.74	0.78	0.91	1.06	0.35	0.22	3.31	0.43	
		98	0.21	0.00	0.14	0.01	0.05	NE	0.20	0.01	
成熟茎葉 穀粒	420 ^{a)}	106	4.32	1.58	0.76	0.78	0.35	0.24	3.72	0.60	
		98	0.26	0.03	0.15	0.04	0.04	NE	0.26	0.02	
成熟茎葉 穀粒	0(対照)	106	0.02	0.01	0.00	0.00	0.00	NE	0.02	0.00	
		98	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	NE	0.00	0.00	
総残留放射能 (TRR) に対する割合%											
青刈り飼料	42	42		55.37	21.49	1.67	NE	2.69	81.22	18.78	
	421 ^{a)}	42		68.99	8.30	2.63	NE	1.55	81.47	18.53	
	0(対照)	42		15.33	36.54	33.54	12.28	NE	97.69	2.31	
成熟茎葉 穀粒	42	106		20.76	24.24	28.23	9.38	5.80	88.41	11.59	
		98		1.03	66.49	4.35	22.2	NE	94.06	5.94	
成熟茎葉 穀粒	420 ^{a)}	106		36.62	17.55	18.12	8.10	5.65	86.05	13.95	
		98		11.17	51.56	15.53	15.42	NE	93.68	6.32	
成熟茎葉 穀粒	0(対照)	106		75.48	14.30	0.00	8.59	NE	98.37	1.63	
		98		0.00	0.00	100.00	0.00	NE	100.00	0.00	

NE: 抽出せず a) 最終報告書 187 頁以降に添付提出されている QA 査察前の草稿報告書 42 頁に記載

青刈り飼料では 0.04ppm (TRR の 18.8%)、穀粒では 0.01ppm (TRR の 5.9%) の結合残留が認められたが、濃度が低かったので特徴付けはしなかった。成熟茎葉(穀粒を除く)中には 0.43ppm (TRR の 11.6%) が認められ、酵素加水分解による特徴付けを行った。

結合残留の特性: 成熟試料(穀粒を除く)中の結合残渣の放射能の特性 [¹⁴C-親化合物当量として、ppm または総残留放射能に対する割合%:()内の数値は結合残留中の割合%] を表 3 に示す。

画分 (TRR の 0.6%)、 1 及び 2 画分 (合計 TRR の 0.6%)、

1 及び 2 画分 (合計 TRR の 2.7%) に放射能が含まれていた。結合残留のうち約 30% しか特徴付けできなかった。

表 3 成熟試料(穀粒を除く)中の結合残渣の特性

採取試料	処理量 (g/10a)	処理時期 (収穫前日 数)						
------	----------------	---------------------	--	--	--	--	--	--

¹⁴C-親化合物当量として、ppm

成熟茎葉	42	106	0.43	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00
	420 ^{a)}	106	0.60	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
								合計
成熟茎葉	42	106	0.00	0.01	0.01	0.08	0.02	0.14
	420 ^{a)}	106	0.00	0.02	0.01	0.09	0.02	0.16

総残留放射能 (TRR) に対する割合%

採取試料	処理量 (g/10a)	処理時期 (収穫前日 数)						
成熟茎葉	42	106	0.43	0.00	0.61	0.00	0.00	0.00
	420 ^{a)}	106	0.60	0.00	0.64	0.00	0.00	0.00
								合計
成熟茎葉	42	106	0.00	0.32	0.24	2.13	0.57	3.87
	420 ^{a)}	106	0.00	0.37	0.12	2.11	0.55	3.78

結合残留に対する割合%

成熟茎葉	42	106	0.43	0.00	5.28	0.00	0.00	0.00
	420 ^{a)}	106	0.60	0.00	4.61	0.00	0.00	0.00
								合計
成熟茎葉	42	106	0.00	2.78	2.1	18.55	4.93	33.64
	420 ^{a)}	106	0.00	2.63	0.85	15.17	3.95	27.21

a) 最終報告書 187 頁以降に添付提出されている QA 査察前の草稿報告書 42 頁に記載

代謝物の分析：粒剤の低用量 (42g/10a) を土壌処理したとうもろこしの抽出液の HPLC 分析結果を表 4 に示す。

育刈り試料における主要成分は未変化の親化合物 (A) と (J)^注であった。この試料の抽出液から MS 分析で (F) が同定されたが、¹⁴C-HPLC (検出限界 = 0.005ppm) では検証できなかった。

注：表 4 の注を参照

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

穀粒を除く成熟試料から 8 種の代謝物が検出され、このうち 5 種 [(J)、 (B)、 (E)、親化合物(A)、 (C)] を同定した。穀粒からは親化合物の他に未知物質 1 種が検出された。

表 4 代謝物の分布

処理時期(収穫前日数)	42 日		106 日			
	青刈り飼料*		成熟茎葉		穀粒	
	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
代謝物 (保持時間)						
未知物質 1 (3.4)						
未知物質 2 (4.9)						
未知物質 3 (16.5)						
J: (5.6) (注)						
E: (8.5)						
未知物質 4 (38.3)						
A: フィプロニル (23.2)	0.06	23.93	0.24	6.31	0.08	38.28
C: (29.8)						
B: (35.5)						
同定/特徴付け残留合計						

*: (F) は青刈り飼料抽出液から MS で同定されたが、¹⁴C-HPLC では検証できなかった。

NF: 検出せず

注: このピークは J: と同定されたが、の再分析及びの再試験で精力的にこの単離同定を試みたが、この代謝物を検出できなかった。したがって、この同定は明らかな間違いと判断された(次頁の「とうもろこしにおける代謝試験 (2)」を参照)。

以上、とうもろこしに想定通常使用量の 2.5 倍の 42g/10a を播種時に土壌処理し、青刈り飼料及び成熟茎葉を採取して、代謝について検討した結果、残留の大部分が青刈り飼料及び穀粒を除く成熟茎葉中に分布(約 93%)し、穀粒中には約 7%のみ残留していた。

代謝物として親化合物の他に 4 種類が同定された。さらに、1 種が MS で同定されたが、HPLC では検証できなかった。とうもろこしで想定される代謝経路は 3 通りあり、一つはスルフィニル基の酸化でスルホン酸体 (B) を生じ、二つ目はスルフィニル基の還元でスルフィド体 (C) を生じる。三つ目はシアノ基の加水分解でアミノカルバモイル体 (E) を生じる。この他に脱スルフィニル基体である (F) が MS で同定されたが、¹⁴C-HPLC では検証できなかった。穀粒からは親化合物の他に未知物質が 1 種検出されたのみであった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

2-5-2 とうもろこしにおける代謝試験 (2)

(資料 M21)

試験機関 : ()

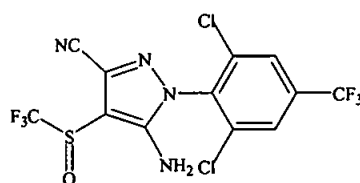
[GLP 対応]

報告書作成年 :

試験の目的 : 1) とうもろこし残留分析法の再検証用試料の調製、2) 既実施の代謝試験におけるフィプロニルの残留が 3 年間安定であるかどうか、3) とうもろこし中の残留成分の分布についてさらに明らかにすることであった。

供試標識化合物 : (以下 ^{14}C -標識体と言う)

構造式 :



* : ^{14}C 標識部位

化学名 : (±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ- α, α, α -トリフルオロ-*p*-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名 : フィプロニル

比放射能 : $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (mCi/mmol)

放射化学的純度 :

供試植物 : とうもろこし (品種 : Jubilee)

栽培条件 : 砂質壤土を詰めたポット (7 ガロン) に 6 粒ずつ播種し、温室内で栽培した。播種 21 日後に間引いて 4 本とした。

方法 :

試験溶液の調製 : ^{14}C -標識体と非標識体 (純度) の各アセトニトリル溶液を混合した 0.224mg/mL の溶液を調製した。

処理量 : 14.6g/10a 相当量 (4.48mg/ポット)

処理の部位及び方法 :

約 18cm 幅の長方形に播種溝を掘り、この溝に均一にピペットで滴下処理した後、中央部に 6 種子を条播し、3~4cm の覆土をした。

収穫：処理区及び無処理区とも青刈り飼料は播種後(処理後)35日に地上部を刈り取り収穫した(3本/ポット)。残り(1本/ポット)は成熟させ、播種後90~106日後に雌穂を収穫し、残りの茎葉(穂を除く成熟茎葉)は播種後106日に収穫した。

青刈り飼料は約30cmの長さに切断し、雌穂を除く成熟茎葉は11日間温室内で乾燥させた後、約60cmの長さに切断し、それぞれ同一部位をプール後、冷凍保存した。収穫した雌穂は冷凍保存し、雌穂の最終収穫時に穀粒を取り、穀粒と穂軸をそれぞれプールした後、冷凍保存した。

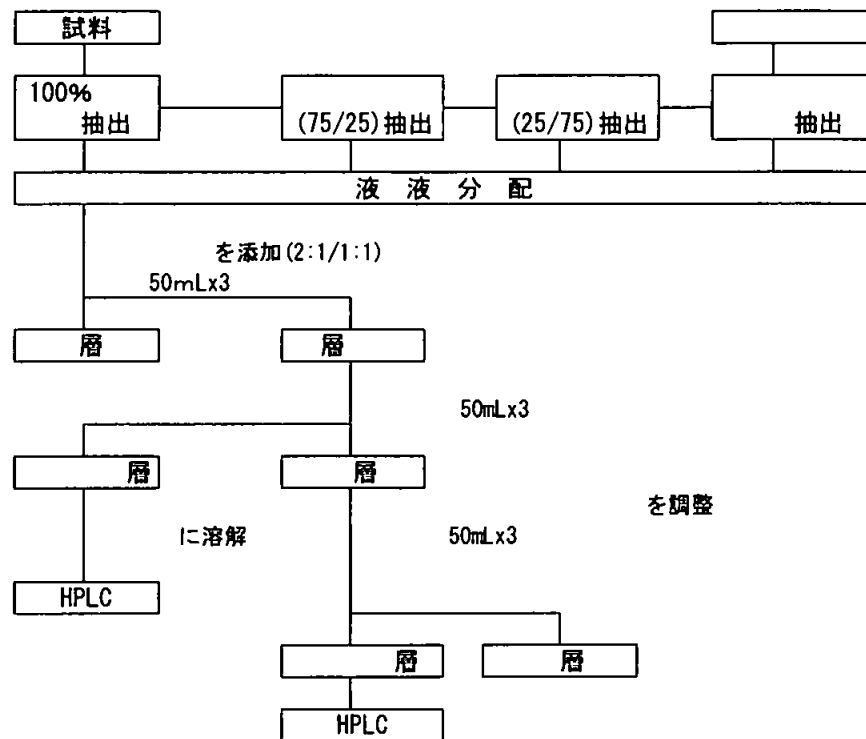
分析方法：残留放射能の抽出はすべて0.01ppm以上含まれている試料・画分について行なった。また、90%以上の放射能が抽出された場合、次段階の抽出はしなかった。

青刈り飼料：冷凍試料を、ブレンダーでドライアイスと共に粉碎した。

成熟茎葉、穀粒及び穂軸：ミルで粉末とした。

放射能の抽出及び分画は基本的に以下の抽出スキームに従い、2つの分析法で行ない、抽出液を液液分配して、濃縮及び精製を行なった。

抽出スキーム



分析法1は上記のスキームに示すように試料を最初に100% を用い、抽出残渣はさらに (75/25)、 (25/75)、 で順次抽出した。分析法2は (75/25)で抽出を開始し、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

(25/75)、 で順次、分析法 1 と同様に抽出した。これらの抽出は青刈り飼料、成熟茎葉及び穀粒について行なった。穂軸は残留が少なく(0.025ppm)、抽出しなかった。

代謝物の定量/同定は HPLC で標品 (A: フィプロニル、B: 、E: 、H: 、J: 、C: 、他 4 想定代謝物) との HPLC 保持時間の比較及び MS 分析により定量/同定した。

放射能の測定: 液体試料はシンチレーションカクテルを加えた後、直接液体シンチレーションカウンター(LSC)で放射能を計測した。固体試料は酸化燃焼して、発生した ¹⁴C₂ を捕集液に捕集した後、液体試料と同様にして放射能を計測した。

保存安定性: 親化合物及び想定代謝物の標品を青刈り飼料、成熟茎葉及び穀粒に添加し、冷凍保存 (<-15°C) して保存安定性を検討した。

分析法の検証: 成熟茎葉の一部を分析法 1 (100%) 及び 2 (75: 25) でそれぞれ抽出分析し、HPLC で ¹⁴C-放射能を定量した。一方、 で精製後、GC で定量し、分析結果の比較検討を行った。

結果:

総残留放射能及び分布: 次表に総残留放射能と分布を示す。

表 1 とうもろこしにおける総残留放射能と分布

試料	部位 ^a	ppm ^b	植物中の放射能の分布%	処理量に対する% ^c
青刈り飼料	下部	0.087	44.69	0.20
	中間部	0.061	49.31	0.22
	上部	0.060	6.00	0.03
	抽出用にプール ^d	0.112 ^e		
成熟茎葉	下部	0.480	42.26	0.34
	中間部	0.527	39.47	0.32
	上部	0.555	13.35	0.11
	抽出用にプール ^d	0.455 及び 0.506 ^f		
穂軸		0.025	1.84	0.01
穀粒		0.013	3.09	0.02

^a: 下部、中間部及び上部の 3 部位(青刈りは 30cm、成熟茎葉は 60cm)に分けた。

^b: 部位別の残留量

^c: 土壌処理した放射能に対する当該部位の放射能の割合%

^d: 風乾した試料の各部位を同量ずつプールした試料で、植物の総重量に対する割合でプールしたものでない。

^e: プール試料を燃焼前に部分的に風乾したので、部位別の残留量より多い。

^f: 分析法 1 で抽出したとき 0.455ppm、分析法 2 では 0.506ppm、平均 0.481ppm であった。

青刈り飼料(3 本/ポット)では処理放射能の 0.5%未満が吸収された。下部(土壌表面~30cm)に 45%、中間部(30~60cm の部位)に 49%、上部(>60cm)に 6%が含まれていた。

濃度 ppm で見ると中間部と上部で差は認められなかった。以降の抽出に用いた 3 部位のプール試料の濃度は 0.112ppm であった。

これに対し、成熟茎葉(1本/ポット)には処理放射能の 0.8%が吸収され、青刈り飼料と同様に地表面から 2 部位(下部+中間部=120cm)に大部分の放射能が含まれていたが、穂軸あるいは穀粒の放射能は 0.02%以下であった。3 部位のプール試料を抽出したとき、成熟茎葉中の濃度は、分析法 1 では 0.455ppm、分析法 2 では 0.506ppm と若干の差があった。穂軸は放射能が少なかった(0.025ppm)ので抽出はしなかった。穀粒の濃度は 0.013ppm であった。

青刈り飼料及び成熟茎葉の抽出方法の比較: 分析法における主要な差は最初に分析法 1 では 100% を用いたのに対して、分析法 2 では用いなかったことである。これ以外は同様の方法で抽出した。抽出結果の比較を次表に示す。

表 2 異なる分析法による残留放射能抽出結果の比較

試料 (ppm)	分析法 1	ppm	%TRR	分析法 2	ppm	%TRR
青刈り飼料 (0.112)	100%	0.12	109	100%		NE
	(75:25)	0.02	22	(75:25)	0.12	107
	(25:75)	<0.01	1	(25:75)	<0.01	3
		0.01	7		0.01	7
		<0.01	3		0.01	6
	抽出合計		142	抽出合計		123
	非抽出	<0.01	0	非抽出	<0.01	1
	総回収率		142	総回収率		124
成熟茎葉 (0.455 及び 0.506 ^a)	100%	0.13	28	100%		NE
	(75:25)	0.26	58	(75:25)	0.38	74
	(25:75)	0.03	6	(25:75)	0.04	8
		0.04	9		0.05	11
		0.04	8			NE
	抽出合計		109	抽出合計		93
	非抽出	<0.01	1	非抽出	0.02	3
	総回収率		110	総回収率		96
穀粒	100%	<0.01	21	100%		NE
	(75:25)	<0.01	36	(75:25)	0.01	95
	(25:75)	<0.01	0	(25:75)		NE
		<0.01	2			NE
		<0.01	0			NE
	抽出合計		59	抽出合計		95
	非抽出	<0.01	0	非抽出	<0.01	1
	総回収率		59	総回収率		96

^a: 0.455ppm=分析法 1、0.506=分析法 2

NE: この溶媒では抽出せず。

青刈り飼料では、分析法 1 の 100% で TRR の 109%、
 (75 : 25) で TRR の 22% と残留放射能のほとんどが抽出され、その他の溶媒での抽出量は極わずか (≤ 0.01 ppm)、合計抽出率は TRR の 142% であった。これに対し分析法 2 では (75 : 25) で TRR の 107% が抽出され、その他の溶媒では分析法 1 と同じで極僅かであり、合計抽出率は TRR の 123% であった。したがって、青刈り飼料からの放射性残留の抽出性に分析法による差はほとんどなかった、

成熟茎葉及び穀粒では最初の抽出溶媒での抽出性に差があり、分析法 2 の (75 : 25) での抽出性が高かった。分析法に関係なく成熟茎葉からの合計抽出放射能は 109% (分析法 1) 及び 93% (分析法 2) であった。

穀粒での合計抽出率は分析法 1 では 59%、分析法 2 では 95% で、総回収率は分析法 1 では 59% と低かったが、分析法 2 では 96% であった。穀粒の放射能は ≤ 0.01 ppm と少なかったため、穀粒についてはこれ以上の分析を行なわなかった。

非抽出性放射能は試料及び分析法による差はほとんどなく TRR の ≤ 0.02 ppm であり、これ以上の分析はしなかった。

分析法 2 で得られた抽出液の有機溶媒による抽出率及び濃度 : TRR の 0.001 ppm 以上含有する画分について、分析法 2 で得られた抽出画分の分配結果を次表に示す。

表 3 分析法 2 で得られた抽出画分の分配

	抽出	有機層			水層			合計回収率		
		抽出 %	% TRR	ppm	抽出 %	% TRR	ppm	抽出 %	% TRR	ppm
青刈り飼料	(75 : 25) 分配 ^a	73	79	0.088	17	18	0.020	90	97	0.108
	(75 : 25) /酸性 分配 ^b	78	14	0.016	19	3	0.004	97	17	0.020
成熟茎葉	(75 : 25) 分配 ^a	82	61	0.307	10	8	0.038	92	69	0.345
	(75 : 25) /酸性 分配 ^b	38	3	0.015	45	3	0.017	83	6	0.032
	(25 : 75) 分配 ^a	47	4	0.018	35	3	0.014	82	7	0.032
	(25 : 75) /酸性 分配 ^b	45	1	0.006	50	1	0.007	95	2	0.013
	^a	58	6	0.026	14	2	0.006	71	8	0.033
穀粒	(75 : 25) 分配 ^a	69	65	0.008	13	12	0.002	95	90 ^c	0.012 ^c

^a :

を抽出液の水層に添加して、最終濃度を として。

^c : 層には 0.001 ppm または TRR の 10.6% を含んでいた。分配操作時に LSC 分析用に採取した一部試料は TRR の 2% を占めていた。

青刈り飼料では (75 : 25) 抽出液の分配で 73% が で抽出され、その水層を塩酸酸性とし、 分配で、78% が で抽出された。分配後の水層には < 0.01 ppm が含まれているに過ぎなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

成熟茎葉では (75 : 25) 抽出液の分配で 82% が で抽出され、その水層を とし、 分配で、38% が で抽出された。(75 : 25) 抽出後の 層の (25 : 75) 抽出液を、ついで で分配し、合計で 92% が抽出された。最後に、し、抽出液の 分配で 58% が抽出された。残渣の 層には 0.01ppm が含まれているに過ぎなかった。

穀粒では (75 : 25) 抽出液の分配で 69% が で抽出され、残渣の 層には 0.01ppm が含まれているに過ぎなかった。

代謝物の分析: 抽出性残留放射能が 0.01ppm 以上の画分について HPLC で分析し、また MS 分析で代謝物を同定した。分析法 1 の成熟茎葉及び分析 2 での各試料より得られた結果は次表のとおりである。

表 4 代謝物の分析結果

代謝物	分析法 1 成熟茎葉		分析法 2					
			青刈り飼料		成熟茎葉		穀粒	
	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR	ppm	%TRR
初期 ppm	0.455		0.112	-	0.506	-	0.013	-
A: フィプロニル	0.052	11.5	0.044	39.1	0.061	12.1	NF	-
B:								
E:								
H:								
I:								
J:								
C:								
G:								
D:								
F:								
同定した TRR の合計	0.342	75.4	0.102	90.9	0.352	69.7	0.008	60.4
未知物質 1-22 分	0.002	0.5	<math><0.01</math>	2.0	0.003	0.5	NF	-
特徴付した TRR の合計	0.344	75.9	0.102	92.9	0.355	70.2	0.008	60.4
未分析抽出液/画分 ^a	0.110	24.2	0.022	19.2	0.037	7.5	0.003	23.0
非抽出性残留	0.003	0.7	0.001	0.8	0.017	3.4	<math><0.01</math>	0.0
分配時の損失	-	-	-	-	0.070	15.3	-	-
総合計	0.458	100.7	0.126	112.9	0.479	96.5	0.011	83.4

NF: 検出せず。

^a: これらの残留は放射能が 0.01ppm であったので分析しなかった。

分析 1 及び分析 2 において検出された代謝物に大きな違いはなかった。青刈り飼料及び成熟茎葉において、親化合物フィプロニル (A)、 (B)、 (E) 及び (H) が認められた。穀粒では (E) のみ HPLC で同定されたが、LC/MS で (H) と未知物質の存在が確認された。分析 2 の成熟茎葉にのみごく微量の (I) が検出されたが、想定代謝経路には含めなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

同定された成分は分析 2 の青刈り飼料、成熟茎葉及び穀粒でそれぞれ、TRR の 91、70 及び 60%であった。微量の未知物質が青刈り飼料及び成熟茎葉で認められた。総回収率は分析 2 の青刈り飼料、成熟茎葉及び穀粒でそれぞれ 113、97 及び 83%であった。

保存安定性:保存したとうもろこし中の親化合物及び代謝物の安定性を次表に示す。

表 5 標品添加試料の安定性

組織	経過時間(月)	添加化合物の回収率%				
		A フィプロニル	C	B	E	J
青刈り飼料	0	105				
	2.7	93				
	5.8	103				
	8.5	95				
	11.5	90				
成熟茎葉	0	95				
	2.7	90				
	5.8	103				
	8.5	94				
	11.5	90				
	24	110				
穀粒	0	112				
	2.7	88				
	5.8	108				
	8.5	94				
	11.5	86				
	24	99				

親化合物とその代謝物()はとうもろこしの試料中で 2 年間安定であった。

初回の代謝試験の試料の分析結果の比較:

初回の代謝試験は 1993 年に開始し、1994 年に分析した。この試験の試料を 1994 年に改良分析法で再分析した。今回の分析結果と比較し、次表に示した。

表 6 分析結果の比較

試料	代謝物	初回の代謝試験		本試験
		分析	再分析	分析
青刈り 飼料	初期 ppm	0.23	0.21	0.11
	A:フイプロニル	23.9	39.9	39.1
	B:			
	E:			
	H:			
	J:			
	HPLC で特徴付したが未同定	7.9	0.0	2.0
	分配で特徴付したが、微量のため未同定	0.0	0.0	-
	未分析 TRR	26.3	4.8	19.2 ^{a)}
	結合残留	18.7	20.6	0.8
	総回収率	100.4	86.7	112.9 ^{a)}
成熟茎 葉	初期 ppm	3.74	3.7	0.51
	A:フイプロニル	6.3	12.1	12.1
	B:			
	E:			
	H:			
	I:			
	J:			
	C:			
	HPLC で特徴付したが未同定	37.6	11.1	0.5 ^{c)}
	分配で特徴付したが、微量のため未同定	1.8	17.0	-
	特徴付した結合残留	3.9	-	-
未分析 TRR	-	-	7.5 ^{d)}	
結合残留	8.2	5.2	3.4	
総回収率	96.9	107.7	96.5	
穀粒	初期 ppm	0.21	0.16	0.013
	A:フイプロニル	38.3	-	-
	B:			
	E:			
	抱合体			
	分配で特徴付した残留	55.8	5.7	23.0
	結合残留	5.9	20.7	0.0
	総回収率	100	113.0	83.4

申請者注

- 報告書 59 頁、本試験、青刈り試料の未分析 TRR 及び総回収率 22.2 及び 115.9 は誤りであり、17 頁及び 56 頁に記載された 19.2 及び 112.9 が正しい。
- 報告書 59 頁では記載されていなかったため、56 ページに従って追記した。
- 報告書 59 頁、本試験、成熟茎葉試料の HPLC で特徴付したが未同定 7.5 は誤りであり、17 頁及び 56 頁に記載された 0.5 が正しい。
- 報告書 59 頁、本試験、成熟茎葉試料では未同定 TRR 7.5 が記載されていなかったため、17 頁及び 56 頁に従って追記した。

同じ試料の と の分析結果には定性的特性に顕著な差は見られなかったが、この両結果には矛盾があった。その一つは J: の同定の明らかな間違いで、 の分析では検出できなかった。したがって、本試験でこの代謝物の単離同定を精力的に行なったが、検出できなかった。主要 3 代謝物(親化合物 A、B: 及び E:)について比較したとき、これらの量は増加していた。これは精製及び定量方法の改善のためと考えられる。 及び本試験の比較では主要 3 成分については定性的に同じであった。

作残分析法の検証:分析法 1(最初に 100%)及び 2(最初に 75: 25)で抽出し、抽出液を、分画精製して HPLC で ¹⁴C-放射能を定量した場合(本代謝試験で行なった方法)と、抽出後シリカゲル/活性炭カラムで精製後 GC で定量した場合の代謝物定量結果の比較を次表に示す。

表 7 異なる分析法による代謝物の分析結果の比較

代謝物	総平均 残留 ppm ^a	分析法 1(100%)			分析法 2(75: 25)		
		抽出率 %TRR	ppm	残留に対 する割合% ^b	抽出率 %TRR	ppm	残留に対 する割合% ^b

HPLC で ¹⁴C-放射能を定量

全抽出液

28

74

F:							
C:							
A:フィプロニル	0.057		0.021	36.8	0.053		93.0
E:							
B:							

シリカゲル/活性炭カラムで精製後 GC で定量

全抽出液

19

72

F:							
C:							
A:フィプロニル	0.057		0.014	24.6	0.032		56.1
E:							
B:							

^a: 分析法 1 及び 2 で抽出した成熟茎葉中の各代謝物の総平均残留量

^b: 抽出液中の各代謝物の ppm を成熟茎葉中の各代謝物の総平均残留量 ppm で除した。

NF=検出せず

フィプロニル及び主要代謝物(B: 及び E:)について比較したとき、精製後 GC で分析した結果は分析法 1 では各代謝物が 18~28%が抽出されたのに対して、分析法 2 では 56~78%が抽出された。この結果は HPLC で ¹⁴C-放射能を定量した方法(本試験で行った方法)の分析法 2 の結果と類似していた。これらの結果は分析法 2 が明らかに良好であることを示している。

フィプロニル 14.6g/10a を播種溝に土壌処理後、とうもろこしを条播し、播種後 35 日に青刈り飼料を、106 日に成熟とうもろこしを採取した結果、処理量に対する吸収率は 0.8%以

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASF ジャパン株式会社にある。

Fipronil

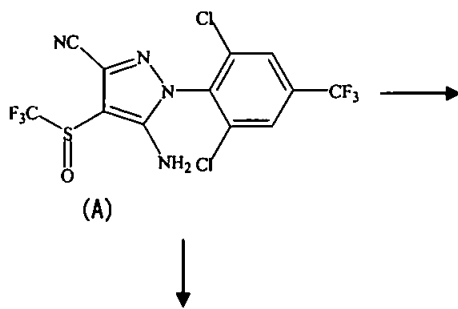
下であった。青刈り飼料には 0.112ppm、成熟茎葉には 0.481ppm(2 分析法の平均値)、穀粒には 0.013ppm、穂軸には 0.025ppm が含まれており、成熟とうもろこしでは吸収された放射能の 95%が成熟茎葉に、3%が穀粒に、2%が穂軸に分布していた。今回の試験(処理量 14.6g/10a)における残留濃度は青刈り飼料、成熟茎葉及び穀粒とも先の試験(処理量 42g/10a)の残留濃度より低かったが、これは処理量の差あるいは製剤の差(先の試験は粒剤、今回の試験は 溶液)を反映しているものと考えられた。

フィプロニルは加水分解されてアミド体(E:)及び酸化されてスルホン体(B:)となる。E はさらに加水分解されてカルボン酸体(H:)となった。先の代謝試験と比較したとき、質的に同様の結果が得られたが、先の試験で 1 代謝物が J: と同定されたが、1994 年の再分析及び今回の試験で精力的に単離同定を試みた が、この代謝物を検出できなかった。したがって、前回の J とした同定は明らかな間違いであった。

2 分析法の比較を行ったが、分析法 2 がとうもろこしの分析法としてより適切であると判断された。したがって、先に実施したとうもろこしの代謝試験の結果は代謝分解の概要表及び以下の代謝経路には含めなかった。

保存安定性は 2 年間の長期保存でも親化合物及び代謝物共に安定であった。

想定代謝経路を以下に示す。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASFジャパン株式会社にある。

Fipronil

3. 土壌中運命に関する試験

3-1 ^{14}C -フィプロニルの好氣的湛水土壌中運命試験

(資料 M22)

試験機関:

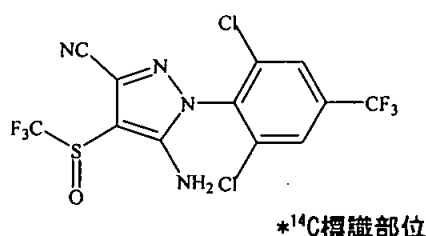
[GLP対応]

報告書作成年:

供試化合物: フィプロニルのフェニル環を ^{14}C 標識した化合物を使用した。

化学名: 5-アミノ-1-[2,6-ジクロロ-4-(トリフルオロメチル)フェニル]-4-[(トリフルオロメチル)スルフィニル]-1H-ピラゾール-3-カルボニトリル

化学構造:



分子式: $\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_2\text{F}_6\text{N}_4\text{OS}$

分子量: 437.15 g/mol (非標識)

比放射能: MBq/mg (= dpm/ μg)

放射化学的純度: (分析証明書による)

(本試験におけるラジオ-HPLCによる測定)

標識位置の設定理由: 標識部位は光分解に対して安定であるため。

供試土壌:

特性: 茨城水田土壌(埴壤土)、土壌pH値(H_2O) 6.3、有機炭素含有量4.69%、土壌水分31.8%(予備平衡開始前)

保存状況: 予備平衡を開始するまで、4~8°Cの暗所に14日間保存した。

試験容器: 生土 161.3g(乾土110.0g相当)/容器を充填したガラス容器28個(1組14容器 x 2反復)(非滅菌土壌)+4個(滅菌土壌)

湛水土壌の調製: 土壌を充填した容器に水約90 mLを入れ、約5cmの土壌層が沈降後、約1cmの水深になるようにした。そのうち滅菌土壌試料はオートクレーブで滅菌し、滅菌水を補充後、密封した。

予備平衡: 25°Cの恒温暗所で、非滅菌土壌試料は湿潤かつ炭酸ガスフリーの空気を通気しつつ、滅菌土壌試料は密栓して36日間インキュベーションした。

嫌氣的条件の確認：土壤及び水の酸化還元電位、又水層のpH値は処理36、16及び1日前並びに処理182日後に測定した。結果は表1のとおりで、酸化還元電位は処理1日前に、水層で+234 mV及び+248 mV、土壤深層で-2 mV及び-11 mVであった。又、試験終了時(182日後)には水層で+5mV及び+56mV、土壤深層で-89mV及び-103mVであり、これらの結果は、試験期間中、嫌氣的条件が確立されていたことを示した。

表1 土壤深層の酸化還元電位及び水層のpH

経過日数	酸化還元電位				pH	
	土壤層		水層		水層	
	系列1	系列2	系列1	系列2	系列1	系列2
36日前	+208	+212	+285	+298	5.90	5.90
16日前	+24	+26	+134	+128	6.26	6.11
1日前	-2	-11	+234	+248	6.45	6.36
182日後	-103	-89	+56	+5	6.71	6.65

試験方法：

処理液の調製：¹⁴C-標識供試化合物を に溶解し、濃度0.142015 mg a. i. / mL、かつ比放射能 dpm/μgの処理溶液を調製した。

処理量：圃場使用量10g/10aに相当する乾土kg当たり0.1 mg(表層10 cmの土壤層に均一に分布し、土壤の比重を1.0g/cm³と仮定)。

処理：予備平衡36日後、各ガラス容器の水層に処理溶液77.5 μL(有効成分約11.0 μg)を処理して、緩やかに攪拌し、水層及び上部土壤層に均一に分布させた。滅菌試料には予め濾過滅菌した処理溶液を用いた。

インキュベーション：予備平衡と同一の条件下で行なった。

揮発性物質の捕集：揮発性物質は0.5M NaOH、0.5M H₂SO₄及びエチレングリコールを満たした一連の捕集液に通気して捕集した。なお、滅菌湛水土壤の容器には通気せず、密栓してインキュベーションした。

試料の採取：非滅菌処理区は、処理0、3、7、14、30、62、90、120及び181日後に2反復で採取。捕集液は処理0日後を除いて同時期に採取し、ついで新たな捕集液を再充填した。

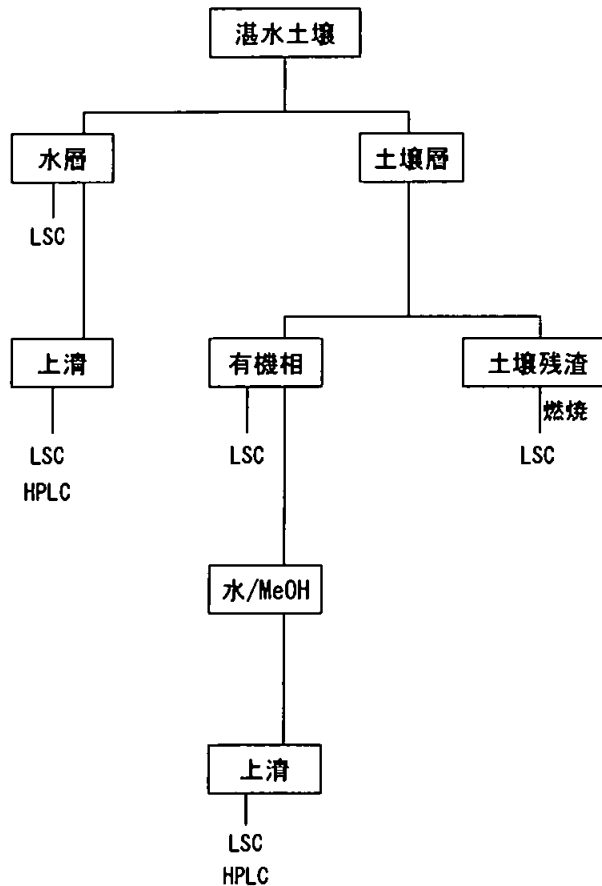
滅菌処理区は処理後90及び181日後に採取した。揮発性物質は採取しなかった。

処理量の確認：処理後0日の試料(2反復)を抽出し、抽出性放射性残留(ERR)及び非抽出性結合残留(NER)の平均値の合計として算出した。結果は乾土kgあたり0.09835 mg(a. i.)であり、これは設定濃度の98%であった。

土壌試料の抽出：全ての試料採取日に、2 反復試料の抽出を行なった。

以下の抽出スキームに従い抽出した。

抽出スキーム



放射能の測定：液体試料は直接、固体試料は燃焼して発生した¹⁴C-CO₂をシンチレーションカウンタに捕集してLSCで放射能を計測した。

代謝物の分析：HPLC(カラム：

、移動相：

を用いて、クロマトグラフの保持時間の比較並びにLC-MS及びLC-MS/MSを用いて、代謝物の同定を行なった。

試験結果の表示：全ての放射性残留及び代謝物の量は親化合物当量として、乾土当りで示した。各段階、画分等における放射能の割合は実測処理総放射能 (TRR) に対する割合 (%) として示した。

結果：

放射能の分布及び物質収支(表2)：

水層の放射能は処理0日でTRRの40.6% から処理3日後TRRの3.7%、又処理181日後TRRの0.2% まで速やかに減少した。同時に、土壌抽出液中の放射能は処理0日でTRRの58.7% から処理3日後TRRの91.1% まで増加し、処理181日後TRRの82.4%まで再び減少した。

非抽出性残留は処理181日後の試験終了時でTRRの14.0%の最大に達した。

揮発性物質の生成は処理181日の試験期間中認められなかった。

物質収支は全ての試料に関してTRRの95.7~104.3% の範囲にあり、平均は98.5%であった。

表2 湛水水田土壌中における放射能の分布及び物質収支(2反復の平均)

経過 日数	水層	土壌層		揮発性物質(累積)				物質収支
		抽出性 (ERR)	非抽出性 (NER)	CO ₂	H ₂ SO ₄	エチレン グリコール	合計	
処理放射能(100%=0.098mg/kg)に対する割合%								
0	40.6	58.7	0.7	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	100.0
3	3.7	91.1	3.2	0.0	0.0	0.0	0.0	98.0
7	2.3	90.3	5.0	0.0	0.0	0.0	0.0	97.6
14	1.3	91.7	5.8	0.0	0.0	0.0	0.0	98.8
30	0.8	88.4	7.5	0.0	0.0	0.0	0.0	96.8
62	0.4	89.2	8.7	0.0	0.0	0.0	0.1	98.4
90	0.3	88.6	9.9	0.0	0.0	0.0	0.1	99.0
120	0.3	88.7	12.0	0.0	0.0	0.0	0.1	101.1
181	0.2	82.4	14.0	0.0	0.0	0.0	0.1	96.7
平均								98.5
処理放射能の回収量mg/kg								
0	0.040	0.058	0.001	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	0.098
3	0.004	0.090	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.096
7	0.002	0.089	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.096
14	0.001	0.090	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.097
30	0.001	0.087	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000	0.095
62	0.000	0.088	0.009	0.000	0.000	0.000	0.000	0.097
90	0.000	0.087	0.010	0.000	0.000	0.000	0.000	0.097
120	0.000	0.087	0.012	0.000	0.000	0.000	0.000	0.099
181	0.000	0.081	0.014	0.000	0.000	0.000	0.000	0.095
平均								0.097

水層及び土壌中の放射性残留の特徴付け及び同定(表3及び4)：

全ての水試料及び土壌抽出液をラジオ-HPLCで分析した結果、合計で5つの分離ピークが検出され、親化合物A()の他に、4代謝物(C: 、K: 、E: 及びB:)が同定された。

親化合物Aは有意な量で水層中に存在する唯一の化合物であった。しかし、親化合物は水層に留まることはなく、数日以内に水層から土壌中に移行した(水層では処理0日にTARの38.0%から3日後にTARの2.9%、又14日後にはTARの0.5%以下に減少)。従って、土壌抽出液中の親化合物の量は処理0日にTARの58.3% から3日後最大値であるTARの75.9%に増加した後減少に転じ試験終了時にTARの1.4%となった。

水層及び土壌抽出液の合計で見ると、親化合物は湛水土壌中で容易に分解し、処理0日後にTARの96.3%から181日後にTARの1.4%まで減少した。

湛水土壌試料中における主要な代謝物は処理3日後に出現し、スルフィド体C()として同定した。Cは徐々に増加し、処理120日後に最大値である82.2% TARに達したが、ついで、処理181日後の試験終了までに再び78.1% TARまで減少した。

主要代謝物Cの加水分解物であるK()は、処理14日後に出現し、処理90日後に最大である3.0% TARに達し、試験終了までにTARの2.0% まで再び減少した。この代謝物はクロマトグラムの保持時間が2標品(K及びI)と全く同じであったが、LC-MS/MSで最終的にKと同定した。

この他に、さらに2代謝物が標品(E及びB)とのクロマトグラフの保持時間の比較で同定できた。Eは処理3~30日の間のみ、 $\leq 1.3\%$ TARの量で検出された。Bは最初の2週間のみ、 $\leq 0.7\%$ TARの量で検出された。

さらに、未知物質が検出されたが、いずれも全ての試料採取時点でTARの1.4%を超えるものはなかった。これらは量が少ないために、同定できなかった。

表3 湛水水田土壤中に処理後の水層及び土壌抽出液のラジオ-HPLC分析結果

- 処理放射能に対する割合% (2反復の平均)

	経過日数	K	E	A	C	B	その他合計 ^{a)}	合計
水層	0			38.0				40.6
	3			2.9				3.7
	7			1.5				2.3
	14			0.5				1.3
	30			0.1				0.8
	62			0.1				0.4
	90			-				0.3
	120			-				0.3
	181			-				0.1
土壌抽出液	0			58.3				58.5
	3			75.9				91.1
	7			65.1				90.3
	14			30.8				91.7
	30			12.1				88.4
	62			5.0				89.2
	90			4.1				88.6
	120			2.6				88.7
	181			1.4				82.4
水層+土壌抽出液	0			96.3				99.1
	3			78.8				94.8
	7			66.7				92.6
	14			31.3				93.0
	30			12.2				89.2
	62			5.1				89.6
	90			4.1				88.9
	120			2.6				89.0
	181			1.4				82.5

a) 処理放射能の1.4%より小さい割合成分の合計

-: 未検出

表4 湛水水田土壤中に処理後の水層及び土壤抽出液のラジオ-HPLC分析結果

- 親化合物相当量mg/kg (2反復の平均)

	経過日数	K	E	A	C	B	その他合計 ^{a)}	合計
水層	0			0.037				0.040
	3			0.003				0.004
	7			0.002				0.002
	14			0.000				0.001
	30			0.000				0.001
	62			0.000				0.000
	90			-				0.000
	120			-				0.000
	181			-				0.000
土壤抽出液	0			0.057				0.058
	3			0.075				0.090
	7			0.064				0.089
	14			0.030				0.090
	30			0.012				0.087
	62			0.005				0.088
	90			0.004				0.087
	120			0.003				0.087
	181			0.001				0.081
水層+土壤抽出液	0			0.095				0.097
	3			0.078				0.093
	7			0.066				0.091
	14			0.031				0.091
	30			0.012				0.088
	62			0.005				0.088
	90			0.004				0.087
	120			0.003				0.088
	181			0.001				0.081

a) 処理放射能の1.4%より小さい割合成分の合計

- : 未検出

滅菌試料(表5及び6) : 処理181日後、水層及び土壤抽出液中に処理放射能の88.8%が存在し、TARの7.9%が結合残留中に存在していた。検出された放射能のほとんど全ては未変化の親化合物であり、これは本被験物質が滅菌条件下では分解しないことを示した。

非滅菌試料中で若干分解物が検出されたのは、滅菌しきれなかった微生物の作用のためと考えられる。

表5 滅菌湛水水田土壌中に処理後の放射能の分布及び物質収支
(2反復の平均)

経過日数	水層	土壌層		物質収支
		抽出性 (ERR)	非抽出性 (NER)	
処理放射能 (100%=0.098mg/kg) に対する割合%				
90日	1.5	89.2	5.7	96.4
181日	0.9	87.9	7.9	96.7
平均				96.5
親化合物相当量mg/kg				
90日	0.001	0.088	0.006	0.095
181日	0.001	0.086	0.008	0.095
平均				0.095

表6 滅菌湛水水田土壌中に処理後の水層及び土壌抽出液のラジオ-HPLC分析結果
(2反復の平均)

	経過日数	A	C	その他合計	合計
処理放射能 (100%=0.098mg/kg) に対する割合%					
水層	90	1.4			1.5
	181	0.7			0.9
土壌抽出液	90	86.1			89.2
	181	87.9			87.9
水層+土壌抽出液	90	87.6			90.6
	181	88.7			88.8
親化合物相当量mg/kg					
水層	90	0.001			0.001
	181	0.001			0.001
土壌抽出液	90	0.085			0.088
	181	0.086			0.086
水層+土壌抽出液	90	0.086			0.089
	181	0.087			0.087

半減期の推定：一次動態(単純一次式)の結果で得られた分解速度から、以下のDT₅₀及びDT₉₀値を親化合物A及びその代謝物(C及びK)について算出した。

親化合物Aの半減期は87日、スルフィド体Cは1225日であった。

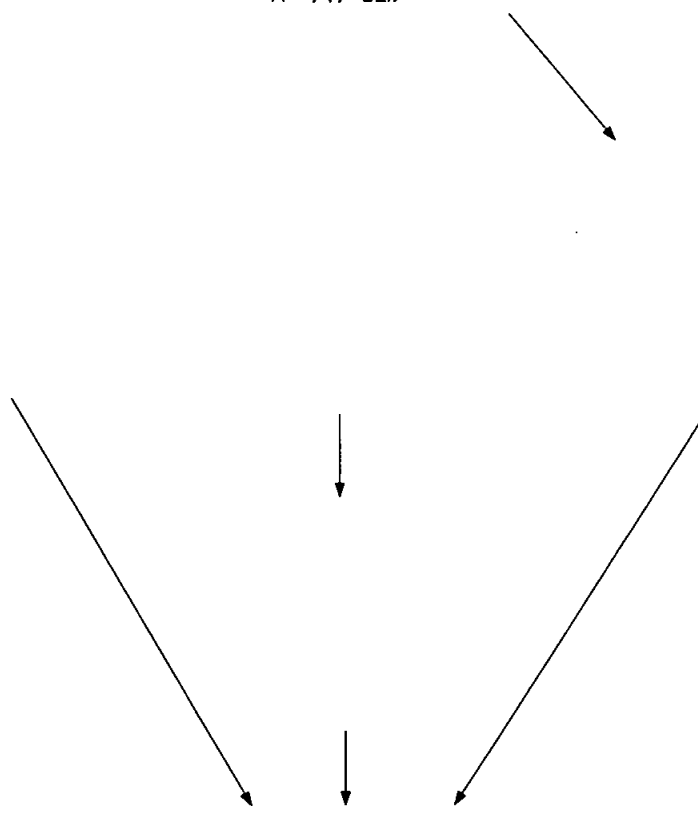
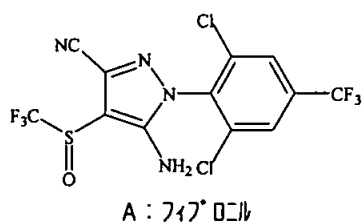
物質	DT ₅₀ (日)	DT ₉₀ (日)	係数
A:	87	290	0.976
C:			
K:			

n. a. =適用できず：動態パラメータ(k)が信頼できないので計算できなかった。

以上、好氣的湛水土壤条件下において、フィプロニルは25°Cで半減期87日で分解した。滅菌土壤では親化合物の分解がほとんど見られなかったことから、これは微生物による分解と考えられる。

フィプロニルは水層から土壤に速やかに移動し、そこでスルホキッド分子の還元によってスルフィド体C()に容易に分解される。これはさらに加水分解経路で徐々に分解し、アミド体K()を生成する。親化合物の酸化によるスルホン体B()及び加水分解によるアミド体E()の生成は極僅かであった。生成した全ての代謝物は湛水土壤中でさらに分解が進行、あるいは結合残留に組み込まれる。

分解経路を以下に示す。



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASFジャパン株式会社にある。

Fipronil

3-2 フィプロニルの嫌氣的土壌代謝試験

(資料M23)

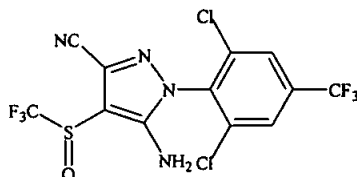
試験機関: ()

[GLP対応]

報告書作成年:

供試標識化合物: (以下¹⁴C-標識体と言う)

構造式:



*: ¹⁴C標識部位

化学名: (±)-5-アミノ-1-(2,6-ジクロロ-α,α,α-トリフルオロ-p-トルイル)-4-トリフルオロメチルスルフィニルピラゾール-3-カルボニトリル

一般名: フィプロニル

比放射能: μCi/mg (kBq/mg)

放射化学的純度:

供試土壌: 英国Manningtreeで採取した下記の土壌を風乾することなく、使用前に2mmの篩を通して試験に供した。

採取場所	Manningtree (英国)		
土性 (USDA)	砂壤土	酸化還元電位 (処理前)	-145.5mV
粒径組成%	砂 (>50 μm) シルト (2-50 μm) 粘土 (<2 μm)	有機炭素 (%)	1.0
		有機物含量 (%)	1.7
		陽イオン置換容量 (meq/100g)	6.4
		微生物バイオマス (μgC/g土壌)*	66.07 (153.85)
pH (KC1) (H2O)	7.1	微生物数 (コロニー形成単位/g)*	590,000 (1,200,000)
	7.8		

*: ()内は試験終了時に測定した無処理区の値

方法:

予備培養: 試験容器 (直径: 4.5cm) に土壌を5cmの深さに詰め、脱イオン水を土壌表面上12cmまで加えた。これを25°Cのインキュベーターに静置し、加湿窒素を通した。必要に応じて脱イオン水を添加し、水位を一定に維持した。52日間経過後、試験に供した。また、有機物含量を増やすために予備培養開始4日目、薬剤処理4日前、また薬剤処理後42日及び100日にコーンスターチを添加した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はBASFジャパン株式会社にある。

Fipronil

試験溶液の処理： ^{14}C -標識体0.160mgを 480 μl に溶解し、各容器の水面上に滴下処理した。その他、 500 μl に溶解した非標識体0.159mgを同様に別の容器に滴下処理し、試験終了時に微生物バイオマス及び微生物活性を測定した。処理量は100g a. i./10a相当とした。

試料採取：処理0、1、3、7、14、30、59、120、179、269および365日後に2連で採取した。

揮発性物質の捕集：揮発性物質は および 捕集液に順次通気して捕集した。捕集液は毎月あるいは上記の試料採取時に採取し、新しい捕集液に交換した。

試料分析：採取試料は、表面水および土壌に分け、各々下記のように分析した。代謝物はガスクロマトグラフィー/質量分析(GC/MS)で確認した。

表面水：表面水は濾過により土壌と分離し、濾液を C_{18} カートリッジに添加、 で 溶出した。得られた は濃縮後、代謝物の標品と共に薄層クロマトグラフィー(TLC)、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で分析した。

土壌：土壌(表面水の濾過に使用したろ紙を含む)は を用い を行なった。得られた抽出液を濃縮後、表面水と同様に分析した。

放射能の測定：液体試料はシンチレーションカクテルを添加して直接、抽出残渣土壌は風乾後燃焼し、生成した $^{14}\text{CO}_2$ を捕集して液体試料と同様にLSCで放射能を計測した。

結果：

物質収支：土壌及び表面水からの放射能の回収結果(処理放射能(AR)に対する割合%)を表1に示す。

全体の放射能の回収は、ARの86%~97%と概ね良好であった。

(A)の添加直後ではARの93%以上が表面水から回収された。その後、日時の経過に伴い、放射能は徐々に土壌に移行し、最終365日では平均でARの17%が表面水から、ARの約69%が土壌から回収された。土壌中の放射能の大半(各試料でARの約62%以上)は で抽出された。

各試料での試験容器の洗液からARの2%未満の放射能が回収された。捕集液に捕集された放射能は極めて少なくARの0.1%未満であった。

表-1 土壌及び表面水からの放射能の回収結果- ARに対する割合%
(2反復の平均)

経過 日数	土壌			表面水	試験容器 の洗液	揮発性物質捕集液			合計
	抽出液	抽出 残渣	小計						
0日	4.15	0.07	4.22	93.43	0.01	NA	NA	NA	97.66
1日	4.43	0.36	4.79	84.33	0.00	0.00	0.00	0.00	89.11
3日	8.65	1.17	9.82	80.74	0.00	0.00	0.00	0.00	90.56
7日	26.30	1.68	27.98	63.93	0.00	0.01	0.00	0.00	91.91
14日	19.36	5.85	25.21	65.39	0.00	0.00	0.00	0.02	90.61
30日	26.38	4.70	31.08	57.42	0.00	0.00	0.00	0.00	88.50
59日	45.81	5.09	50.90	37.91	0.05	0.01	0.00	0.00	88.86
120日	46.50	17.04	63.54	23.88	0.65	0.01	0.01	0.00	88.07
179日	49.38	17.77	67.15	23.26	0.11	0.01	0.01	0.01	90.54
269日	55.77	8.41	64.18	23.62	0.14	0.00	0.01	0.00	87.95
365日	58.86	9.77	68.63	17.00	0.63	0.02	0.02	0.00	86.28

代謝物の分析：表面水及び土壌の

抽出液のHPLC分析結果を表2に示す。HPLC

による分析結果とTLCによる分析結果がほぼ同じであったので、HPLCによる分析結果のみを示す。

親化合物(A)は処理後の日時の経過に伴い徐々に減少し、最終365日にはARの約9%にまで減衰した。365日後における主要な代謝分解物は (C) および (E) であり、生成量はそれぞれTARの39.6%及び18.0%であった。この両代謝物は処理後の日時の経過に伴い徐々に増加した。その他の代謝物としては (D)、 (F) および (B) がみられたが、生成量はいずれもARの1%以下であった。また、未知代謝物が4~5個検出されたが最大でも処理量の4%以下であった。

半減期の推定：親化合物の半減期は、親化合物の総処理放射能に対する割合の対数を取り、それを時間に対して回帰分析することによって推定した。その結果、HPLC分析結果に基づく半減期は116日、TLC分析結果に基づく半減期は130日と算出され、平均123日であった。

表2 表面水および土壌の抽出液のHPLCによる分析結果
-処理放射能(AR)に対する割合% (2反復の平均)

経過 日数	画分	化合物名/代謝物略称							未同定 代謝物	合計
		A:	B:	C:	D:	E:	F:			
		A	B	C	D	E	F			
0日	表面水	99.33								99.33
	土壌	4.10								4.10
	合計	103.43								103.43
1日	表面水	85.54								85.54
	土壌	4.31								4.39
	合計	89.85								89.93
3日	表面水	80.22								80.22
	土壌	8.54								8.78
	合計	88.76								89.00
7日	表面水	56.08								56.51
	土壌	25.5								25.63
	合計	81.58								82.14
14日	表面水	63.71								63.87
	土壌	18.70								19.06
	合計	82.41								82.93
30日	表面水	46.65								48.44
	土壌	29.43								32.50
	合計	76.08								80.94
59日	表面水	34.07								36.47
	土壌	35.03								45.10
	合計	69.10								81.57
120日	表面水	17.42								22.21
	土壌	28.72								45.63
	合計	46.14								67.73
179日	表面水	11.57								20.76
	土壌	30.89								48.83
	合計	42.46								69.59
269日	表面水	5.69								18.82
	土壌	15.49								55.52
	合計	21.18								74.34
365日	表面水	1.10								15.20
	土壌	7.65								57.72
	合計	8.75								72.92

以上より、フィプロニル(A)は嫌氣的条件下の湛水土壤中ですだに分解し、半減期は約123日であつた。主な代謝物として親化合物の還元体である (C)及び (E)が徐々に増加した。微量代謝物として、(D)、(F)および (B)が同定された。その他に、微量の未知代謝物が4~5個検出された。

推定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BASFジャパン株式会社にある。

Fipronil

