

2. 植物代謝に関する試験

(1) ^{14}C -標識フロメトキンを用いたトマトにおける代謝試験 (資料代-3)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

供試標識化合物: ^{14}C -標識フロメトキン

名称	フロメトキン
構造式及び標識位置	
化学名	
比放射能	
放射化学的純度	

標識位置の設定理由:

供試植物: トマト ()

栽培条件:

- 栽培用土壌; 埼玉県農林総合研究センター園芸研究所 (久喜市) 畑圃場土壌
5月12日採取。
土性; 壤土 (USDA 法)、pH; 7.0 (水)、5.9 (KCl)、6.4 (CaCl₂)、
有機炭素含量; 6.1 g/kg、陽イオン交換容量; 11.7 cmol/kg
- 試験容器; ワグネルポット (1/2000a)
- 栽培用ポットの調製; ポットの底に中粒赤玉土を敷き、その上に肥料を混合した栽培土壌
約 14.0 kg/ポットを詰めて調製した。
肥料は粒状 15 炭酸苦土石灰及び五大州化成肥料 3・8 号を各約 1
g/kg 土壌で用いた。
- 試験植物の調製; 栽培用土壌をプラスチック製バットに入れ、6月15日にト
マトを播種し、ファイトロン内で栽培した。トマト幼植物を
7月13日に移植 (1本/ポット×6ポット) し、そのうち生育の
良好な3ポットを試験に使用した (処理区2ポット、無処理区1ポ
ット)。
- 栽培環境; ファイトロン内で栽培 (室温及び相対湿度は、トマトの慣行栽培
期の東京地方の気温及び相対湿度を基準にして設定)。
- 栽培管理; 上水道水を1又は2回/日、自動散水器を用いて1~2分/回給水した
ほか、適宜手動給水も実施。
- 追肥; 8月17日; 上記苦土石灰と化成肥料、各2.5g/ポット
9月14日; 上記化成肥料、2.5g/ポット
- 病虫害防除剤; 使用せず。

栽培期間； 幼植物： 6月15日～7月13日
移植後栽培期間： 7月13日～10月13日

方 法：

1) 試験方法

施用量； 目標施用量 1.500 mg a.i./ポット/1回
施用量の根拠； 慣行施用量 300 g a.i./ha
(5%乳剤の 500 倍希釈液を 3000 L/ha 散布) に基づく
施用液の調製； フロメトキンにフロメトキン 5% EC 白試料を加えて模
擬製剤を調製した。
施用回数及び時期； 2回
9月15日(初回収穫3週前)及び9月29日
施用方法； 植物体に散布処理
採取時期、採取部位 最終散布7日後(10月6日)；処理区の果実(2個)
及び量； 最終散布14日後(10月13日)；
処理区の果実(2個)及び葉(15枚×2)
無処理区の果実(1個)及び葉(15枚)

2) 分析方法

①果実試料及び葉試料の処理操作；

各採取時点で採取した果実試料及び葉試料は図1に示す抽出操作を行ない、放射能を
定量した。

図1 トマト果実及び葉試料中放射性残留物の抽出法

②放射性総残留物 (TRR) ;

表面洗浄液及び抽出液はLSCにて放射能を測定し、抽出後残渣は燃焼後LSC分析した。それらの合計により放射性総残留物 (TRR) を算出した。

③抽出液中の放射性成分の分析 ;

各試料の抽出液は図2に示す固相抽出 (SPE) を行った。表面洗浄液及びSPE溶出液画分のHPLC分析により放射性成分を定量した。

図2 C18ミニカラムを用いた果実及び葉試料中放射性残留物の固相抽出法

④代謝物の同定/特徴付け ;

代謝物は参照標準品とのHPLC及びTLCクロマトグラフィーにより同定/特徴付けを行った。また、葉の抽出液及び葉表面洗浄液の一部代謝物画分については、HPLCにより分取した画分のLC/MS(/MS)分析により同定/特徴付けを行った。

最終散布14日後の葉試料を別途追加抽出し、抽出液のSPE-メタノール溶出液中に含まれる放射性成分をHPLCで分取した。分取画分についてセルラーゼ及びグルコシダーゼによる酵素加水分解を行い、HPLC分析して特徴付けた。

さらに、果実及び葉の抽出後固形物 (PES) を図3に示す化学的加水分解処理により特徴付けた。

図3 PESの酸塩基処理による特徴付け

⑤ 試料中の保存安定性；

-20℃にて冷凍保存した最終散布14日後の果実試料及び果実表面洗浄液濃縮液を、果実試料は収穫265日後に図1及び図2に従い再抽出してHPLC分析し、表面洗浄液試料は収穫266日後に再HPLC分析し、初回抽出試料の結果と比較した。

結 果：

1) 施用液の放射化学的純度及び達成施用量

結果を下表にまとめる。

	第1回施用	第2回施用
施用液の放射化学的純度	98.1%	97.1%
達成施用量	1.524 mg/ポット	1.490 mg/ポット
目標施用量に対する%	101.6%	99.4%

2) 試料中の放射能濃度

最終散布7及び14日後に収穫した各試料におけるTRRレベル及び各画分の放射能濃度を表1に示す。

表1 トマト果実及び葉試料中の TRR レベル及び放射能濃度

	最終散布7日後		最終散布14日後	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
果実	0.4896	100.00	0.4563	100.00
表面洗浄液	0.1116	22.79	0.1105	24.21
抽出液	0.2770	56.57	0.2268	49.70
抽出後残渣	0.1011	20.64	0.1191	26.10
葉	---	---	7.2474	100.00
表面洗浄液	---	---	3.9056	54.24
抽出液	---	---	2.5128	34.43
抽出後残渣	---	---	0.8290	11.33

--- 試料なし、表中数値は2反復の平均値。

最終散布7及び14日後の果実試料の TRR レベルは、それぞれ 0.490 及び 0.456 mg eq./kg でほぼ同じであった。表面洗浄液、抽出液及び抽出後残渣中の放射能は、それぞれ 22.8~24.2%TRR、49.7~56.6%TRR 及び 20.6~26.1%TRR であり、抽出液に果実中放射能のほぼ 1/2 が回収された。

葉試料の TRR レベルは果実に比べて高かった (7.247 mg eq./kg)。その 1/2 以上が表面洗浄液 (54.2%TRR) 中に回収された。抽出液及び抽出後残渣中の放射能はそれぞれ 34.4%TRR 及び 11.3%TRR であった。

尚、無処理区の果実及び葉試料中にはバックグラウンドレベルの放射能が認められたのみであった。

3) 固相抽出 (SPE) による放射能の分布

各試料の抽出液を濃縮し、図2に従い SPE により分画した。各画分の放射能を LSC で測定した。結果を表2に示す。

表2 トマト抽出液試料の SPE 分析における放射能の分布

	果実				葉	
	最終散布7日後		最終散布14日後		最終散布14日後	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
抽出液中の初期 ¹⁴ C	0.2770	56.57	0.2268	49.70	2.5128	34.43
水溶出液	0.0066	1.36	0.0074	1.62	0.0567	0.77
ヘキサン/酢酸エチル溶出液	0.2429	49.61	0.1807	39.61	1.3590	18.61
メタノール溶出液	0.0316	6.46	0.0386	8.47	1.0693	14.68
総回収	0.2812	57.43	0.2267	49.69	2.4850	34.06

表中数値は2反復の平均値。

果実では、最終散布7及び14日後の抽出液の SPE-水溶出液から 1.4~1.6%TRR の放射能が回収された。SPE-ヘキサン/酢酸エチル溶出液中の放射性残留物は、最終散布7日後の 49.6%TRR から最終散布14日後の 39.6%TRR に減少した。SPE-メタノール溶出液中の放射性残留物は、最終散布7日の 6.5%TRR から最終散布14日後の 8.5%TRR に増加した。

葉では、最終散布14日後の SPE-水溶出液から 0.8%TRR の放射能が回収された。SPE-ヘキサン/酢酸エチル溶出液及び SPE-メタノール溶出液からはそれぞれ 18.6%TRR 及び 14.7%TRR が回収された。

4) 各試料中の放射能の分布

果実及び葉の表面洗浄液、SPE-ヘキサン/酢酸エチル溶出液及び SPE-メタノール溶出液を HPLC 分析し、放射能の分布を求めた。結果を表 3 に要約する。

表 3 各試料の洗浄液及び溶出液における主要放射性成分の残留レベル

	果実				葉	
	最終散布7日後		最終散布14日後		最終散布 14 日後	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
表面洗浄液						
フロメトキン	0.0968	19.77	0.0828	18.14	3.3250	46.35

その他						
計	0.1116	22.79	0.1105	24.21	3.9056	54.24
SPE-ヘキサン/酢酸エチル溶出液						
フロメトキン	0.0977	19.96	0.0701	15.37	0.1585	2.20

その他						
計	0.2429	49.61	0.1807	39.61	1.3590	18.61
SPE-メタノール溶出液						
フロメトキン	0.0016	0.32	ND	ND	ND	ND

その他						
計	0.0316	6.46	0.0386	8.47	1.0693	14.68

表中数値は 2 反復の平均、ND：検出せず、* 推定、FMzz：HPLC 画分番号。

果実の FM23 及び FM24 画分は未同定。

① 果実中の放射能の分布

表面洗浄液には、フロメトキンは、0.083～0.097 mg eq./kg (18.1～19.8%TRR) であった。また

_____ 認められた。その他の放射性成分は個々には 0.005 mg eq./kg (1.1%TRR) 以下であった。

SPE-ヘキサン/酢酸エチル溶出液には、主要放射性成分としてフロメトキン (0.070～0.098 mg eq./kg (15.4～20.0%TRR)) 及び _____ が認められた。

SPE-メタノール溶出液には、
認められた。その他の放射性成分は、個々には 0.004 mg eq./kg (0.9%TRR) 以下であった。

② 葉中の放射能の分布

表面洗浄液には、フロメトキンが 3.325 mg eq./kg (46.4%TRR) 認められた。また、
認められた。その他の放射性成分は個々には 0.042 mg eq./kg (0.5%TRR) 以下であった。

SPE-ヘキサン/酢酸エチル溶出液には、フロメトキン、
がそれぞれ
その他の放射性成分は、個々には 0.109 mg eq./kg (1.5%TRR) 以下であった。

SPE-メタノール溶出液には、
が認められた。また、
及び

) がそれぞれ
認められた。その他の放射性成分は個々には 0.115 mg eq./kg (1.6%TRR) 以下であった。

③ 果実及び葉における主要放射性成分

果実及び葉において放射性総残留物 (TRR) の 10%を超えて検出された主要放射性成分は下表に示すようにフロメトキン及び
であった。

	果実				葉	
	最終散布7日後		最終散布14日後		最終散布 14 日後	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
フロメトキン	0.196	40.1	0.153	33.5	3.484	48.6

表中数値は 2 反復の平均。

5) 代謝物の同定及び特徴づけ

6) 抽出後残渣の化学的抽出による放射性成分の特徴付け

最終散布 14 日後の果実及び葉の PES について、図 3 に示す方法で酸塩基処理による化学的抽出を行った。結果を表 4 に示す。

表 4 各試料 PES 中の放射能の酸塩基処理による特徴付け

	果実		葉	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
PES 中の初期 ¹⁴ C	0.1191	26.10	0.8290	11.33
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
—	—	—	—	—
総回収	0.0961	21.06	0.6542	8.95

表中数値は 2 反復の平均。

表に示すように、フロメトキン由来の放射性成分が、果実ではリグニン、ヘミセルロース及びセルロース、葉ではリグニン及びヘミセルロースなどの植物体構成に取り込まれた可能性が示唆された。

7) 試料の保存安定性

均質化した試料を-20°Cにて冷凍保存後、再分析し、初回の分析結果と比較した結果、主要放射性成分に大きな変動は認められなかった。従ってフロメトキン及び主要代謝物は、-20°Cの保存条件下では各試料中で比較的安定であることが確認された。

8) 代謝

フロメトキンのトマトにおける主代謝経路は β -グルコシダーゼによる β -D-グルコシドの生成と、それに続く β -D-グルコシドによる β -D-グルコシドの生成であった。さらに β -D-グルコシドは、植物体内で β -D-グルコシドを受けて β -D-グルコシドを生成した。また、フロメトキン由来の放射性成分は植物体構成成分に取り込まれて結合型残留物を形成すると考えられた。

推定代謝分解経路を図 4 に示す。

図4 フロメトキンのトマトにおける推定代謝経路

(2) ^{14}C -標識フロメトキンを用いたキャベツにおける代謝試験 (資料 代-4)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

供試標識化合物： ^{14}C -標識フロメトキン

名称	フロメトキン	フロメトキン
構造式及び 標識位置		
化学名		
比放射能		
放射化学的 純度		

標識位置の設定理由：

供試植物：キャベツ (品種：)

栽培条件：

試験区の設置場所；

試験区土壌の特性； 土性：砂壤土 (USDA 法)、pH：6.5 (水)、
有機炭素含量：5.8%、陽イオン交換容量：17.5 cmol⁺/kg、窒素
含有量：2044 mg/kg、リン含有量：967.7 mg/kg、
カリウム含有量：97.2 mg/kg

試験区の面積； 0.25 m² (0.5 m×0.5 m)

試験区の防護； 鳥類及び動物の侵入を防ぐため、試験区の周囲に金網製のネットをはった。

試験植物の栽培； キャベツ種子を播種し、環境制御ガラス温室内で栽培した。
BBCH 生育段階 15 の時点で試験区に移植した。移植密度は通常よりも高くし、適宜間引いて成熟期には、通常の株間とした。

栽培期間； 6月9日 (播種) ~ 12月9日 (第2回収穫)

栽培管理； 生育段階は、週1回 BBCH コードに基づき評価・記録した。
給水は必要に応じ灌漑用水で行った。
気象データは、地方気象台から入手した。

病虫害防除剤； 使用せず

方 法：

1) 試験方法

製剤調製法； 非標識フロメトキンで同位体希釈した フロメトキンまたは
フロメトキンにフロメトキン製剤白試料を加えて 5%
EC 模擬製剤を調製

施用回数及び時期； 2回
第1回散布： 11月11日（成熟期28日前）
第2回散布： 11月25日（成熟期14日前）

施用量； 約7.5 mg/区画、約75 mL/区画（500倍希釈）

施用量の根拠； 慣行施用量300 g a.i./ha、3000 L/haに基づく

施用方法； 葉面散布

採取時期及び採取部位； 処理試料：最終散布14日後（ 12月9日）
処理試料：最終散布7日後（ 12月2日）、
最終散布14日後（ 12月9日）
各採取時点でキャベツ全体試料を採取

2) 分析方法

①抽出及び放射能分析操作

キャベツ全体試料は、結球部と外葉に分け、外葉はアセトニトリルで洗浄した。洗浄液、洗浄後の外葉及び結球部は次の操作及び分析まで冷凍保存した。結球部及び洗浄後外葉の冷凍保存試料をフードプロセッサーでドライアイスと共に粉砕・均質化した。一部均質化試料を酸化燃焼/LSC分析し、放射能の顕著な試料について次の抽出操作を行った。一部均質化試料をアセトンで1回、次いでアセトン/水（8：2，v/v）で2回抽出し、全抽出液を混合し、単一の抽出液試料とした。抽出液試料及び洗浄液はLSCで放射能を測定した。抽出後固形物（PES）は酸化燃焼/LSCで放射能分析した。

②放射性総残留物（TRR）

表面洗浄液、抽出液（結球部と外葉）及びPES（結球部と外葉）中の放射能の合計により放射性総残留物（TRR）を求めた。

③放射性成分の分布

表面洗浄液及び抽出液試料についてHPLC分析を実施し、放射性成分の分布を求めた。

④放射性成分の同定/特徴付け

放射性成分は参照標準品とのHPLC保持時間の比較及びTLCクロマトグラフィーにより同定/特徴付けを行った。

で放射能測定して特徴付けた。

⑤試料中の保存安定性

両標識体最終散布14日後外葉の表面洗浄液及び洗浄後外葉の粉砕試料を約-20°Cで保存し、実験期間中の試料の安定性を調査した。外葉粉砕試料は再抽出し、抽出液及び表面洗浄液試料をHPLC分析した。HPLCプロファイルを初回の分析結果と比較した。

結果：

- 1) 施用液の放射化学的純度及び達成施用量
結果を下表にまとめる。

	第1回施用		第2回施用	
施用液の放射化学的純度	>96%			
達成施用量 (g/ha)	303.560	303.080	301.520	300.200
目標施用量に対する%	101.2%	101.0%	100.5%	100.1%

- 2) 放射性総残留物 (TRR)
最終散布7及び14日後に収穫したキャベツ試料のTRRレベル及び各画分における放射能濃度を表1-1に示す。

表1-1 試料中の放射能濃度 (キャベツ全体の総重量で除して計算した濃度)

	最終散布7日後		最終散布14日後				
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	
	表面洗浄液	1.016	53.0	0.265	24.9	0.306	19.6
外葉抽出液	0.383	20.0	0.354	33.3	0.179	11.4	
結球部抽出液	0.355	18.5	0.297	28.0	0.863	55.2	
残留物	外葉PES	0.130	6.8	0.111	10.4	0.094	6.0
	結球部PES	0.033	1.7	0.037	3.4	0.122	7.8
合計*	1.917	100.0	1.063	100.0	1.564	100.0	

*洗浄液+外葉抽出液+結球部抽出液+残留物

キャベツ全体における放射性総残留物 (TRR) は、
では、7日後で1.917 mg/kg
であり、14日後では1.564 mg/kgとなり減少した。また
では1.063 mg/kg
であった。

試料の洗浄後外葉抽出液の放射能濃度は、散布7日後の0.383 mg/kg (20.0%TRR) から14日後には0.179 mg/kg (11.4%TRR) に減少した。表面洗浄により除去された放射能は、最終散布7日後試料で53.0%TRR (1.016 mg/kg) であり、14日後試料では19.6%TRR (0.306 mg/kg) に減少した。

最終散布14日後の外葉では表面洗浄により、24.9%TRR (0.265 mg/kg) が除去され、洗浄後外葉抽出液中の残留物は33.3%TRR (0.354 mg/kg) であった。結球部抽出液は0.297 mg/kg (28.0%TRR) であった。

② 外葉抽出液の放射能の分布

全ての外葉抽出液で、フロメトキンが主要成分として検出され、
11.5%TRR (0.123 mg/kg) であった。7日後では、9.0%TRR (0.172 mg/kg)
であり、14日後では4.9%TRR (0.077 mg/kg) であった。

は全ての外葉抽出液に認められた。

その他の代謝物は、個々には2.1%TRR (0.022 mg/kg) を上回るものはなかった。

③ 結球部抽出液の放射能の分布

全ての結球部抽出液で、フロメトキンが主要成分として検出された。P 標識体では、
フロメトキンは 15.3%TRR (0.162 mg/kg) であった。では、7日後及び14
日後でそれぞれ11.2%TRR (0.215 mg/kg) 及び31.8%TRR (0.498 mg/kg) であった。

は全ての結球部抽出液で、
P 標識体 14 日後の結球部抽出液で同定された (0.8%TRR、0.012 mg/kg)。10%TRR を
超えて検出されたのは 14 日後) であった。

その他の代謝物は、個々には1.9%TRR (0.030 mg/kg) を上回るものはなかった。

④ キャベツ全体における放射能の分布

フロメトキンは、(46.0%TRR、0.489 mg/kg) 及び (52.2~65.9%TRR、
0.818~1.264 mg/kg) どちらにおいてもキャベツ全体における主要残留物であった。Q
標識体での TRR%レベルは経時的に減少した。

及び
mg/kg) でキャベツ全体において同定された。での TRR%レベルは経時的に
増加した。

及び
でキャベツ全体において同定された。での TRR%レベルは経時
的に増加した。

は、

未同定の代謝物は、最大で3.8%TRR (0.074 mg/kg) であった。

4) 放射性成分の同定

HPLC 及び TLC コクロマトグラフィーにより同定された放射性成分は、フロメトキン、
であった。

5) PES 中の放射性残留物の特徴付け

の散布 14 日後の外葉及び結球部の PES について、結合型残留

物を特徴付けするために、追加抽出を行った。結果を表3に要約する。

何れの試料においても水酸化カリウム (KOH) 抽出液に、最大の残留レベルが含まれていた (.....) で、それぞれ 1.6~5.3%TRR、0.017~0.056 mg/kg 及び 3.3%TRR、0.052 mg/kg)。連続抽出後に残存する抽出残渣の残留レベルは、両標識体で<0.1~0.1%TRR (<0.001~0.002 mg/kg) であった。

表3 結球部及び外葉 PES 中放射性残留物の特徴付け

	結球部抽出後 PES		外葉抽出後 PES		結球部抽出後 PES		外葉抽出後 PES	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
		0.001	0.1	0.005	0.5	0.008	0.5	0.008
	0.013	1.2	0.029	2.7	0.039	2.5	0.016	1.0
	0.017	1.6	0.056	5.3	0.052	3.3	0.052	3.3
	0.005	0.5	0.019	1.8	0.022	1.4	0.017	1.1
抽出残渣	<0.001	<0.1	0.001	0.1	0.002	0.1	<0.001	<0.1
合計	0.036	3.4	0.111	10.4	0.122	7.8	0.093	6.0

6) 試料中の保存安定性

両標識体最終散布 14 日後試料の表面洗浄液及び洗浄後外葉試料を-20℃にて実験期間中冷凍保存後、再分析し、初回の分析結果と比較した。結果を下表にまとめる。

		表面洗浄液				外葉抽出液			
		初回HPLC分析 2009年12月		再HPLC分析 2011年1月		初回分析 2009年12月		再分析 2011年1月	
		mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
試料	試料	0.265	24.9	0.265	24.9	0.354	33.3	0.354	33.3
	フロメトキン	0.204	19.2	0.215	20.2	0.123	11.5	0.030	2.8
	未同定								
試料	試料	0.306	19.6	0.306	19.6	0.179	11.4	0.179	11.4
	フロメトキン	0.243	15.5	0.244	15.6	0.077	4.9	0.050	3.2
	未同定								

ND: 検出せず。

表面洗浄液試料 (両標識体) 中のフロメトキン、
件下で長期間保存後も比較的安定して残存していた。

本試験で使用した条

外薬抽出液では、 試料で、フロメトキン及び の TRR レベルの減少ならびに の TRR レベルの増加が認められた。 試料では、フロメトキンの TRR レベルの減少ならびに の TRR レベルの増加が認められた。これら結果から、フロメトキン及び関連代謝物の残留物は外薬試料中で不安定であることが判明した。

7) 代謝

の TRR レベルが 2 回の収穫時期間で増加することが認められたことから、最初に親分子の により が生成し、量的に増加することが示唆された。加えて、 により、 生成することが示唆された。

推定代謝分解経路を図 1 に示す。

図 1 フロメトキンのキャベツにおける推定代謝経路

申請者注：試料中の放射能濃度及び主要放射性成分の残留レベル（キャベツの各部位毎の重量で除して計算した濃度）を以下の表1に示す。なお、以下の濃度は申請者にて計算した。

表1 試料中の放射能濃度及び主要放射性成分の残留レベル（キャベツの各部位毎の重量で除して計算した濃度）

	最終散布7日後			
	外葉		結球部	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
抽出液	0.551	74.7	1.165	91.4
フロメトキン	0.248	33.6	0.706	55.4
その他				
残渣	0.186	25.3	0.109	8.6
合計	0.737	100	1.274	100

	最終散布14日後				最終散布14日後			
	外葉		結球部		外葉		結球部	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
抽出液	0.559	76.2	0.808	89.0	0.402	65.5	1.556	87.6
フロメトキン	0.194	26.4	0.442	48.7	0.172	28.1	0.898	75.1
その他								
残渣	0.175	23.8	0.100	11.0	0.212	34.5	0.220	12.4
合計	0.734	100	0.908	100	0.614	100	1.776	100

ND：検出せず

- (3) ¹⁴C-標識フロメトキンを用いたオレンジにおける代謝試験 (資料代-5)
 試験機関：
 [GLP 対応]
 報告書作成年：

供試標識化合物：¹⁴C-標識フロメトキン

名称	フロメトキン
構造式及び標識位置	
化学名	
比放射能	
放射化学的純度	

標識位置の設定理由：

供試植物：オレンジ (品種：Navelina (New Hall))

栽培条件：

栽培段階の
 試験場所；

栽培土壌の特性； 土性：粘土、pH：7.0 (水)、有機物含量：57.9%、
 有機炭素含量：33.6%、陽イオン交換容量：102.8 meq/100g

試験容器； 直径 35 cm のプラスチック製容器 (容量：約 29 L)

試験区の防護； 鳥獣から保護するため、木の周囲を網かごで、試験区域全体を
 低い金網のフェンスで囲った。

試験植物の栽培； 試験容器にオレンジを植え (1本/容器) 屋外で栽培した。

栽培管理； 生育段階は、週 1 回 BBCH コードに基づき評価・記録した。
 給水は必要に応じ灌漑用水で行った。

病害虫防除剤； 気象データは、地方気象台から入手した。

使用せず

方 法：

1) 試験方法

処理溶液の調製； 非標識フロメトキンで同位体希釈したフロメトキン
 にフロメトキン製剤白試料を加えて 5% EC 模擬製剤を調製。
 散布前に超純水で 250 倍希釈
 同位体希釈 フロメトキンは試験施設 (試験機関) で調製し、5% EC 模擬製剤の調製、希釈及び施用は試験場所で行

った。

	2回
施用回数及び時期；	第1回散布： 11月3日（成熟期56日前） 第2回散布： 11月17日（成熟期42日前）
施用量；	700 g a.i./ha（施用量3500 L/ha）
施用量の根拠；	慣行施用量700 g a.i./ha（5%乳剤の250倍希釈液を3500 L/ha散布）に基づく
施用方法；	小型散布器を用い茎葉散布
採取時期及び採取部位；	最終散布14日後（ 年12月1日）：果実 最終散布42日後（ 年12月29日）：果実及び葉部

2) 分析方法

①果実及び葉部試料の抽出と放射能分析操作

試験場所で採取したオレンジの果実及び葉部はアセトニトリルで洗浄した。洗浄後ならびに洗浄後の果実及び葉部は-20℃で保存後、ドライアイスで保冷して試験施設に輸送した。試料は、受領後直ちに冷凍保存した。洗浄後果実は半解凍下で果皮及び果肉画分に分け、果肉画分はさらに果肉と果汁に分画した。果皮、果肉及び洗浄後葉部試料は、ドライアイスと共に粉碎・均質化後、一部試料を燃焼分析した。均質化試料は、液体窒素中でフリーザーミルを用いてさらに均質化した。一部均質化試料をアセトンで1回、次いでアセトン/水（8：2、v/v）で2回抽出し、全ての抽出液を混合し、単一の抽出液試料とした。抽出液試料及び洗浄液はLSCで放射能を測定し、抽出後固形物（PES）は酸化燃焼/LSCで放射能分析した。

②放射性総残留物（TRR）

果実は、表面洗浄液、果汁、抽出液（果皮と果肉）及びPES（果皮と果肉）中放射能の合計により放射性総残留物（TRR）を求めた。

葉部は、表面洗浄液、抽出液及びPES中放射能の合計により放射性総残留物（TRR）を求めた。

③放射性成分の分布

果実及び葉部の表面洗浄液及び抽出液試料について、必要に応じて濃縮後、HPLC分析を実施し、放射性成分の分布を求めた。

④放射性成分の同定/特徴付け

放射性成分は参照標準品とHPLC保持時間を比較して同定し、TLCクロマトグラフィーにより確認した。

最終散布42日後の果汁試料については、C18カラムによる固相抽出（SPE）を行った。C18カラムに保持された放射性残留物を順次ヘキサン：酢酸エチル（1：1、v/v）、メタノールで溶出させ、各画分をLSC分析し、特徴付けた。

最終散布42日後の果皮及び葉部PES試料の放射性残留物については、順次1%Na₂-EDTA（約30℃で約23時間）、DMSO（約80℃で約47時間）、24%KOH（約27℃で約23時間）及び72%H₂SO₄（室温で約4時間）で抽出した。抽出液はLSCで、抽出残渣は酸化燃焼/LSCで放射能測定して特徴付けた。

⑤ 試料中の保存安定性

最終散布42日後の果実及び葉部の表面洗浄液ならびに洗浄後の果皮及び葉部の均質化試料を約-20°Cで保存した後、均質化試料は再抽出し、抽出液及び表面洗浄液をHPLC分析した。HPLCプロファイルを初回の分析結果と比較し、実験期間中の試料中の安定性を調査した。

結果：

1) 施用液の放射化学的純度及び達成施用量

結果を下表にまとめる。

	第1回施用	第2回施用
施用液の放射化学的純度	>96%	
達成施用量	574.67 g/ha	664.08 g/ha
目標施用量に対する%	82.1%	94.9%
	88.5%	

2) 放射性総残留物 (TRR)

最終散布14及び42日後に収穫した各試料におけるTRRレベル及び各画分の放射能濃度を表1-1に示す。

表1-1 オレンジ果実及び葉試料中のTRRレベル及び放射能濃度（果実全体の重量で除して計算した濃度）

	最終散布14日後			最終散布42日後		
	mg eq./kg	%TRR	各組織中%	mg eq./kg	%TRR	各組織中%
果実						
表面洗浄液	0.361	62.7	/	0.315	48.1	/
果汁	0.005	0.9	/	0.008	1.3	/
果皮	0.200	34.7	/	0.320	48.8	/
抽出液	0.154	26.8	77.3	0.214	32.7	66.9
果皮PES	0.046	7.9	22.7	0.106	16.1	33.1
果肉	0.010	1.7	/	0.012	1.8	/
抽出液	0.007	1.3	74.0	0.008	1.2	65.6
果肉PES	0.003	0.4	26.0	0.004	0.6	34.4
合計	0.576	100.0	/	0.655	100.0	/
葉部						
表面洗浄液	---	---	---	7.282	44.8	/
抽出液	---	---	---	5.610	34.5	/
葉部PES	---	---	---	3.345	20.6	/
合計	---	---	---	16.237	100.0	/

--- 試料なし

果実中のTRRは0.576及び0.655 mg eq./kgで、2回の収穫期で同じレベルであった。果実中の放射能の大部分は表面洗浄液（48.1～62.7%TRR）及び果皮（34.7～48.8%TRR）に認められ、果肉（ $\leq 1.8\%$ TRR、 ≤ 0.012 mg eq./kg）及び果汁（ $\leq 1.3\%$ TRR、 ≤ 0.008 mg eq./kg）では極めて低レベルであった。

葉部のTRRは最終散布42日後（果実成熟期）で16.237 mg eq./kgであり、アセトニトリルで44.8%TRR（7.282 mg eq./kg）が洗浄された。

3) 放射性成分の分布

① 果実における放射能の分布

果実の表面洗浄液、果皮及び果肉の抽出液について HPLC 分析を実施し、放射性成分の分布を求めた。結果を表 2-1 に示す。

表 2-1 果実における主要放射性成分の残留レベル(果実全体の重量で除して計算した濃度)

	最終散布14日後		最終散布42日後	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
表面洗浄液	0.361	62.7	0.315	48.1
フロメトキン	0.319	55.3	0.271	41.3
その他*				
果皮抽出液	0.154	26.8	0.214	32.7
フロメトキン	0.072	12.5	0.044	6.7
—				
—				
その他*				
果肉抽出液	0.007	1.3	0.008	1.2
フロメトキン	0.002	0.3	0.001	0.2
—				
その他*				

ND：検出せず、*：申請者計算

表面洗浄液の主要成分はフロメトキンであり、最終散布 14 日後及び 42 日後において、それぞれ 55.3%TRR (0.319 mg eq./kg) 及び 41.3%TRR (0.271 mg eq./kg) であった。

が 0.9%TRR (0.005 mg eq./kg) ~2.1%TRR (0.014 mg eq./kg) で検出された。その他の代謝物は、個々には 3.3%TRR (0.019 mg eq./kg) 以下であった。

果皮抽出液中のフロメトキンは最終散布 14 日後で 12.5%TRR (0.072 mg eq./kg)、最終散布 42 日後で 6.7%TRR (0.044 mg eq./kg) であった。

で検出された。最終散布 42 日後試料においてのみ、及び が検出された。その他の代謝物は、個々には 2.6%TRR (0.017 mg eq./kg) 以下であった。

果肉抽出液中のフロメトキンは最終散布 14 日後の 0.3%TRR (0.002 mg eq./kg) から最終散布 42 日後に 0.2%TRR (0.001 mg eq./kg) となった。

であった。その他の代謝物は、個々には 0.4%TRR (0.003 mg eq./kg) 以下であった。

葉部における放射能の分布

葉の表面洗浄液及び抽出液について HPLC 分析を実施し、放射性成分の分布を求めた。結果を表 3 に示す。

表3 葉部における主要放射性成分の残留レベル

	最終散布 42 日後	
	mg eq./kg	%TRR
表面洗浄液	7.282	44.8
フロメトキン	5.935	36.6
—		
その他*		
葉部抽出液	5.610	34.5
フロメトキン	1.952	12.0
—		
その他*		

*：申請者計算

葉部の表面洗浄液中の主要成分はフロメトキンであった(36.6%TRR、5.935 mg eq./kg)。代謝物としてで検出された。その他の代謝物は、個々には 4.0%TRR (0.655 mg eq./kg) 以下であった。

葉部抽出液中では、最大残留物としてフロメトキンが 12.0%TRR (1.952 mg eq./kg) で検出された。その他の主代謝物としてであった。も認められ、であった。その他の代謝物は、個々には 2.3%TRR (0.376 mg eq./kg) 以下であった。

- ② オレンジ果実及び葉部における主要放射性成分
果実及び葉部における主要放射性成分の残留レベルを下表に示す。

	果実				葉部	
	最終散布 14 日後		最終散布 42 日後		最終散布 42 日後	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
フロメトキン	0.393	68.1	0.316	48.2	7.887	48.6
—						
その他*						

ND：検出せず、*：申請者計算

果実における主要放射性残留物はフロメトキンであり、48.2～68.1%TRR (0.316~0.393 mg eq./kg) であった。であった。

葉部においても、果実と類似の代謝物の残留パターンを示し、主要放射性残留物はフロメトキン (48.6%TRR、7.887 mg eq./kg) であり、

その

他の代謝物は、個々には 6.2%TRR (1.020 mg eq./kg) 以下であった。

4) 放射性成分の同定

HPLC 及び TLC コクロマトグラフィーにより同定された放射性成分は、フロメトキン、であった。

5) 果汁試料中放射能の固相抽出 (SPE) 分析による特徴付け

最終散布 42 日後の果汁を SPE により分画し、各画分の放射能を LSC で測定して特徴付けた。結果を表 4 に示す。

表 4 最終散布 42 日後の果汁試料の SPE 分析における放射能の分布

	mg eq./kg	%TRR
SPE 分析に供した ^{14}C	0.008	1.3
水溶出液	0.002	0.2
ヘキサン/酢酸エチル溶出液	<0.0005	0.1
メタノール溶出液	0.001	0.1
SPE 残留物*	0.005	0.9

* SPE 分析に供した ^{14}C -溶出 ^{14}C (水溶出液+ヘキサン/酢酸エチル溶出液+メタノール溶出液)

SPE 分析の結果、ヘキサン/酢酸エチル溶出液 (非極性画分) 及びメタノール溶出液 (極性画分) には、いずれも 0.1%TRR (それぞれ<0.0005 mg eq./kg 及び 0.001 mg eq./kg) が含まれていたが、大部分 (0.9%TRR、0.005 mg eq./kg) はカラムに保持され、放射性残留物が果汁画分内の微粒子に結合していることが示唆された。水溶出液 (水性画分) は 0.2%TRR (0.002 mg eq./kg) であった。

6) 果皮及び葉部 PES 中の放射性成分の特徴付け

最終散布 42 日後の果皮及び葉部 PES について、結合型残留物の特徴付けするために、化学的追加抽出を行った。結果を表 5 に要約する。

表 5 果皮及び葉部 PES 中の放射能の化学的追加抽出による特徴付け

	果皮		葉部	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
Na ₂ EDTA	0.006	0.9	0.487	3.0
DMSO	0.019	2.9	1.088	6.7
KOH	0.049	7.4	1.202	7.4
H ₂ SO ₄	0.026	4.0	0.536	3.3
抽出残渣	0.006	0.9	0.032	0.2
合計	0.106	16.1	3.345	20.6

果皮では、抽出残留物に、7.4%TRR (0.049 mg eq./kg) を上回るものはなく、抽出残渣は 0.9%TRR (0.006 mg eq./kg) であった。

葉部では、抽出残留物に 7.4%TRR (1.202 mg eq./kg) を上回るものはなく、抽出残渣は 0.2%TRR (0.032 mg eq./kg) であった。

7) 試料中の保存安定性

最終散布 42 日後の果実及び葉部の表面洗浄液ならびに果皮及び葉の均質化試料を約 -20°C で保存後再分析し、初回の分析結果と比較した。結果を下表にまとめる。

		表面洗浄液				抽出液			
		初回HPLC分析		再HPLC分析		初回抽出		再抽出	
		mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
果実	フロメトキン	0.271	41.3	0.281	42.8				
果皮	フロメトキン					0.044	6.7	0.058	8.9
薬部	フロメトキン	5.935	36.6	5.833	35.9	1.952	12.0	1.116	6.9

フロメトキン、
、約-20℃での凍結保存条件下で比較的安定であることが示された。

8) 代謝

フロメトキンは、最初に、
れ、 を生成した。その後の、 により少量の 代謝さ
が生成した。

推定代謝分解経路を図1に示す。

図1 フロメトキンのオレンジにおける推定代謝経路

申請者注：試料中の放射能濃度及び主要放射性成分の残留レベル（オレンジの各部位毎の重量で除して計算した濃度）を以下の表1に示す。なお、以下の濃度は申請者にて計算した。

表1 試料中の放射能濃度及び主要放射性成分の残留レベル（オレンジの各部位毎の重量で除して計算した濃度）

	果肉			
	最終散布 14 日後		最終散布 42 日後	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
抽出液	0.061	74.0	0.080	65.6
フロメトキン	0.015	17.8	0.014	11.4
その他	0.032	38.7	0.013	11.1
残渣	0.021	26.0	0.042	34.4
合計	0.082	100	0.122	100

	果皮			
	最終散布 14 日後		最終散布 42 日後	
	mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
抽出液	12.810	77.3	35.782	66.9
フロメトキン	5.957	35.9	7.335	13.7
その他				
残渣	3.766	22.7	17.681	33.1
合計	16.576	100	53.463	100

ND：検出せず

果汁中の濃度は、果実全体の重量から、果肉（パルプ）及び果皮の重量を減じた重量で除して計算した。最終散布 14 日後は 0.006 mg eq./kg、最終散布 42 日後は 0.009 mg eq./kg であった

3. 土壌中動態に関する試験

(1) 好氣的湛水土壌中動態試験成績

試験成績提出除外理由

「農薬の登録申請に係る試験成績について」（平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知）の別表 2 「土壌中動態に関する試験成績」の（1）の規定に基づき、下記の理由により試験を省略した。

- ・本剤は水田において使用されないため、試験成績提出の除外に該当。

(2) ^{14}C -標識フロメトキンを用いた好氣的土壤中動態試験 (資料 代-7)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

供試標識化合物： ^{14}C -標識フロメトキン

名称	フロメトキン
構造式および 標識位置	
化学名	
比放射能	
放射化学的純度	

標識位置の設定理由：

供試土壌：土壌の仕様および物理化学的特性を表 1 に示す。

土壌は、使用前に 2 mm の篩に通した。

表 1 供試土壌の物理化学的特性

入手先		
採取年月日	5月6日、採取後冷暗所(4°C)で保管	
土性 (USDA 分類)	壤土	
含量 (%)	砂	46.5
	シルト	41.0
	粘土	12.5
主要粘土鉱物	クロライト、パーミキュライト	
pH (水)	7.2 (22°C)	
pH (KCl)	5.9 (22°C)	
pH (CaCl ₂)	6.6 (23°C)	
有機炭素含量 (g/kg 乾土)	6.3	
陽イオン交換容量 (cmol _c /kg 乾土)	12.1	
最大含水量 (%)	54.12	

方法：試験は非滅菌土壌および滅菌土壌を用いた試験系で行った。

1) 試験系

① 非滅菌土壌試験系

内径 50 mm、200 mL 容のガラス製広口ビンに土壌約 47.3 g（乾土 40 g 相当、土壌層の厚さ約 2.5 cm）を入れ、土壌水分量を最大容量の 40% に調整した。25±2°C に設定した恒温室内の代謝チャンバーで暗所条件下、加湿空気を連続通気し、14 日間プレインキュベートした。施用後、CO₂ フリーの加湿空気を通気（30～50 mL/分）して、25±2°C、暗所でインキュベートした。2 週間ごとに試験系の総重量を測定し、必要に応じて土壌水分量を調整した。装置および試験設計の概要を図 1 および表 2 に示す。

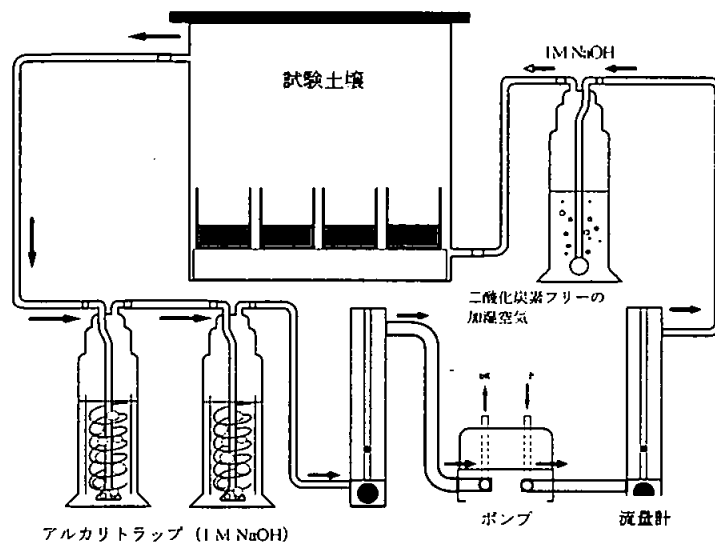


図 1 代謝チャンバーおよび通気システムの概要

表 2 試験設計

被験物質	フロメトキン	
名目施用濃度	0.35 mg/kg (圃場での予定慣行施用量 350 g a.i./ha に相当)	
施用液	下記濃度の施用液（アセトン溶液）を調製	
施用液の目標濃度および比放射能	350 mg/L、240,000 dpm/μg	
施用液の放射化学的純度	100.0%（非滅菌試料施用時（施用液調製 5 日後）） 97.1%（滅菌試料施用時（施用液調製 21 日後））	
施用方法	施用液 40 μL をマイクロシリンジで土壌に直接添加	
施用濃度実測値	0.3469 mg/kg	
インキュベーション	168 日間	
採取 時点	土壌試料*	0、1、3、7、28、56、84、126 および 168 日後
	捕集液	7、28、56、84、126 および 168 日後

* 各採取時点で試料 2 連を採取。

② 滅菌土壌試験系

非滅菌土壌試験系と同様に調製し、14日間プレインキュベートし、最後の3日間（1回/日）に、オートクレーブ滅菌（121℃、20分間）した。フロメトキンを0.35 mg/kg 乾土で施用後、揮発性成分採取用の捕集液は接続せず、25±2℃、暗所で84日間インキュベートした。また、2週間毎に滅菌水を補充し、土壌水分量を調整した。施用後14および84日に各1連の試料を採取した。

2) 土壌微生物の検定

非滅菌土壌の微生物活性が維持されていたことをバイオマス炭素のクロロホルム燻蒸法により確認した。

3) 分析方法

① 揮発性物質捕集液；LSC分析

② 土壌試料；採取後、図2に示す抽出操作を行い、各画分をLSC分析して、放射能を定量した。また抽出液中の放射性成分をHPLC分析により定量した。

図2 抽出操作の概要

③ $^{14}\text{CO}_2$ の確認；炭酸バリウム沈殿法により確認した。

④ フロメトキンおよび代謝物の同定；参照標準品とのHPLCコクロマトグラフィーおよびTLCコクロマトグラフィーにより、フロメトキンおよび代謝物を同定した。

4) 半減期の算定方法

① フロメトキン

FOCUS レポートを参照し、Double-First-Order in Parallel (DFOP)モデルを用いて算出した。

土壌中におけるフロメトキンの分解を2コンパートメントモデルと仮定すると、次式が得られる。

$$C = C_1 \exp(-k_1 t) + C_2 \exp(-k_2 t)$$

ここで、 C : 任意の時間 t におけるフロメトキンの濃度 (施用放射能%)、
 C_1 および C_2 : 各コンパートメントにおけるフロメトキンの初期濃度、
 k_1 および k_2 : 各コンパートメントにおける分解速度定数である。

試験系全体の初期濃度 (C_0) は、次式より得た。

$$C_0 = C_1 + C_2$$

DT_{50} および DT_{90} は、Microsoft Excel ソフトウェアのゴールシーク機能を用い、それぞれ $C=0.5C_0$ および $C=0.1C_0$ の値が得られる時間 t として算出した。

②

FOCUS レポートを参照し、Single first order (SFO)モデルを用いて算出した。

土壌試料におけるMIの分解が一次反応速度式に従うと仮定すると、次式が得られる。

$$C = C_0 \exp(-kt)$$

ここで、 C は時間 t におけるMI濃度 (施用放射能%)、 k = 分解速度定数、 C_0 = 初期濃度である。

DT_{50} および DT_{90} は次式を用いて算出した。

$$DT_{50} = -\ln(1/2)/k \quad , \quad DT_{90} = -\ln(1/10)/k$$

結 果 :

1) 物質収支

フロメトキンを施用した好氣的土壌における物質収支は、施用放射能 (AR) の約 99~105%であった (表 3、表 4)。

2) 放射能の分布

非滅菌土壌および滅菌土壌における放射能の分布を表 3 および表 4 にそれぞれ示す。

① 非滅菌土壌 (表 3)

土壌から抽出可能な放射能量は経時的に減少し、168 日後には約 84.2%AR となった。抽出液中の放射能の減少に伴い、抽出後固形物中の放射能が増加し、168 日後には約

13.0%となった。また、少量の¹⁴C₂が発生し、168日間の累積で4.0%ARであった。

表3 フロメトキンを施用した非滅菌好気的土壌における放射能の分布

フラクション	採取時点 (施用後経過日数)								
	0	1	3	7	28	56	84	126	168
フラクション	施用放射能 (AR) %								
土壌 ^a	103.15	102.71	101.35	102.56	101.14	99.15	97.36	96.13	97.26
抽出液 ^b	102.79	101.35	99.27	99.10	94.96	90.92	87.15	85.00	84.23
アセトニトリル	97.17	93.15	86.93	81.87	69.72	62.61	57.23	54.11	51.15
酸性アセトニトリル-1	4.95	7.04	10.70	14.84	21.65	23.75	25.51	25.58	27.89
酸性アセトニトリル-2	0.67	1.17	1.64	2.39	3.59	4.56	4.41	5.31	5.19
抽出後固形物	0.37	1.36	2.09	3.46	6.18	8.22	10.21	11.13	13.03
揮発性- ¹⁴ C	N.M.	N.M.	N.M.	0.24	0.79	1.50	2.19	3.16	4.00
総 ¹⁴ C-回収率 ^c	103.15	102.71	101.35	102.79	101.92	100.64	99.55	99.29	101.26
フラクション	濃度 (mg/kg)								
土壌 ^a	0.3579	0.3563	0.3516	0.3558	0.3509	0.3440	0.3378	0.3335	0.3374
抽出液 ^b	0.3566	0.3516	0.3444	0.3438	0.3294	0.3154	0.3024	0.2949	0.2922
アセトニトリル	0.3371	0.3231	0.3016	0.2840	0.2419	0.2172	0.1986	0.1877	0.1774
酸性アセトニトリル-1	0.0172	0.0244	0.0371	0.0515	0.0751	0.0824	0.0885	0.0887	0.0968
酸性アセトニトリル-2	0.0023	0.0040	0.0057	0.0083	0.0124	0.0158	0.0153	0.0184	0.0180
抽出後固形物	0.0013	0.0047	0.0072	0.0120	0.0214	0.0285	0.0354	0.0386	0.0452
揮発性- ¹⁴ C	N.M.	N.M.	N.M.	0.0008	0.0027	0.0052	0.0076	0.0110	0.0139
総 ¹⁴ C-回収率 ^c	0.3579	0.3563	0.3516	0.3566	0.3536	0.3492	0.3454	0.3445	0.3513

表中数値は2反復の平均値、N.M.: 測定せず

^a 抽出液+抽出後固形物

^b アセトニトリル抽出液+酸性アセトニトリル抽出液-1+酸性アセトニトリル抽出液-2

^c 「土壌」+「揮発性-¹⁴C」

② 滅菌土壌 (表4)

土壌から抽出可能な放射能量は、施用14日後および84日後で、それぞれ101.3%ARおよび100.3%ARであり、ほぼ一定であった。一方抽出後固形物中の放射能は施用14日後および84日後に、それぞれ2.4%および4.6%となりわずかに増加した。¹⁴Cバランスが104~105%であったことから、揮発性分解物は生成しなかったと考えられる。

表4 フロメトキンを施用した滅菌好気的土壌における放射能の分布

フラクション	採取時点 (施用後経過日数)			
	14	84	14	84
フラクション	施用放射能 (AR) %		濃度 (mg/kg)	
土壌 ^a	103.71	104.89	0.3598	0.3639
抽出液 ^b	101.32	100.31	0.3515	0.3480
アセトニトリル	89.13	78.39	0.3092	0.2719
酸性アセトニトリル-1	10.80	18.87	0.0375	0.0655
酸性アセトニトリル-2	1.39	3.06	0.0048	0.0106
抽出後固形物	2.39	4.58	0.0083	0.0159
総 ¹⁴ C-回収率 ^c	103.71	104.89	0.3598	0.3639

^a 抽出液+抽出後固形物

^b アセトリル抽出液+酸性アセトリル抽出液-1+酸性アセトリル抽出液-2

^c 「土壌」+「揮発性-¹⁴C」

3) 抽出性放射能の分布

非滅菌土壌および滅菌土壌における抽出性放射能の分布を表5および表6にそれぞれ示す。

① 非滅菌土壌 (表5)

フロメトキンは施用後速やかに分解され、施用28日後では10.1%ARに減少した。その後分解は穏やかとなり、最終時点である施用168日後に3.6%ARとなった。

主要代謝物である 〇〇〇〇 となった。その後はほぼ一定となり、168日後でも 〇〇〇〇 が認められた。

以外の放射性代謝物として 〇〇〇〇 が検出され、168日後ではそれぞれ 〇〇〇〇 であった。

その他はすべて5%AR未満であった。

表5 フロメトキンを施用した非滅菌土壌抽出液中の放射性成分の分布

フラクション (同定化合物)	採取時点 (日)									
	0	1	3	7	28	56	84	126	168	
	施用放射能 (AR) %									
—										
—										
—										
—										
—										
40(フロメトキン)	99.45	68.74	43.01	25.16	10.12	6.18	4.87	4.10	3.59	
43										
合計	102.79	101.35	99.27	99.10	94.96	90.92	87.15	85.00	84.23	
	濃度 (mg/kg)									
25										
27										
28(M4)										
29(M2)										
32(M1)	0.0082	0.1063	0.1837	0.2386	0.2693	0.2644	0.2516	0.2358	0.2301	
33										
34(M6)										
36										
40(フロメトキン)	0.3450	0.2385	0.1492	0.0873	0.0351	0.0214	0.0169	0.0142	0.0125	
43										
合計	0.3566	0.3516	0.3444	0.3438	0.3294	0.3154	0.3024	0.2949	0.2922	

表中数値は2反復の平均値、検出限界以上の放射能が認められた HPLC フラクションのみ記載、
<LOD: 検出限界未満。

② 滅菌土壌 (表 6)

フロメトキンは施用 14 日後では 29.6%AR に、施用 84 日後には 3.7%AR に減少した。主代謝物として、微量代謝物として が検出された。 施用後 14 日時点では 71.7%AR であった。

表 6 フロメトキンを施用した滅菌土壌抽出液中の放射性成分の分布

フラクション (同定化合物)	採取時点 (日)			
	14	84	14	84
	施用放射能 (AR) %		濃度 (mg/kg)	
29(M2)				
32(M1)	71.70	95.33	0.2487	0.3307
40(フロメトキン)	29.62	3.72	0.1028	0.0129
合計				

表中数値は 2 反復の平均値、検出限界以上の放射能が認められた HPLC フラクションのみ記載、<LOD : 検出限界未満。

以上の結果より、好氣的土壌においてフロメトキンは主に非生物的に に変換されることが確認された。また、 からその他の代謝物への酸化分解は、主に生物的要因が関与していることが明らかとなった。

4) $^{14}\text{CO}_2$ の確認

NaOH 捕集液中の放射能は、塩化バリウム沈殿法により $^{14}\text{CO}_2$ であることを確認した。

5) フロメトキンおよび代謝物の同定

HPLC コクロマトグラフィーおよび TLC コクロマトグラフィーによりフロメトキン、 が同定された。

6) 土壌バイオマス炭素の測定

インキュベーション開始時および終了時の土壌バイオマス炭素測定結果の比較から、試験期間を通して微生物活性が維持されていたことが確認された。

7) 分解速度

フロメトキンおよび の分解速度を算出した。

① フロメトキン

フロメトキンの好氣的土壌中の動態を施用直後から施用 84 日後までの 7 時点のデータを用いて DFOP モデルで最適化し、解析した。結果を表 7 に、減衰曲線を図 3 に示す。非滅菌好氣的土壌におけるフロメトキンの 50% 消失期間 (DT_{50}) は 2.3 日、90% 消失期間 (DT_{90}) は 36.2 日と算出された。

表7 非滅菌好氣的土壤におけるフロメトキンの消失に関するキネティックパラメータ

	解析モデル	A ₁	k ₁	A ₂	k ₂	DT ₅₀ (日)	DT ₉₀ (日)
フロメトキン	DFOP	71.77	0.4827	26.94	0.0278	2.3	36.2

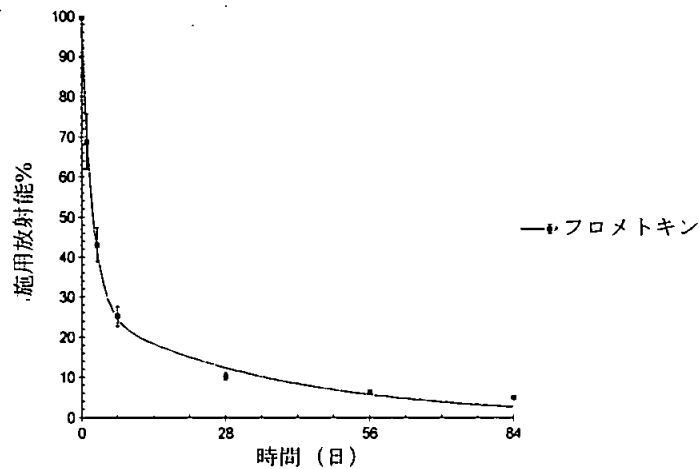


図3 非滅菌好氣的土壤における[Q-¹⁴C]フロメトキンの減衰

②

好氣的土壤における の動態を、施用56日を0日と仮定し、分解速度を一次反応とみなしてSFOモデルを用いて解析した。結果を表8に、減衰曲線を図4に示す。

の50%消失期間 (DT₅₀) は543.8日、90%消失期間 (DT₉₀) は1806.3日であった。

表8 非滅菌好氣的土壤における の消失に関するキネティックパラメータ

	解析モデル	k ₁	DT ₅₀ (日)	DT ₉₀ (日)
M1	SFO	0.0013	543.8	1806.3

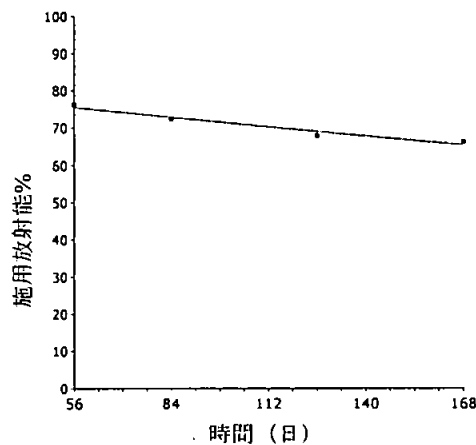


図4 非滅菌好氣的土壤における の減衰

8) 推定代謝経路

好氣的土壤に施用されたフロメトキンは速やかに分解され、施用 28 日後には施用量の約 90%が消失しその大部分は へ変換された。 はその一部が酸化し : および を生成し、 がさらに酸化して を生成するものと推定される。最終的に、土壤有機物に結合し腐植成分に親和した形態となるほか、少量は CO₂ まで無機化されると推定される。推定代謝経路を図 5 に示す。

図 5 フロメトキンの好氣的土壤における推定代謝経路

(3) 嫌氣的土壤中動態試験成績

試験成績提出除外理由

<フロメトキン>

「農薬の登録申請に係る試験成績について」（平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知）の運用について（13 生産第 3986 号農林水産省生産局生産資材課長通知）の「4. 試験成績の除外について」の（2）の⑩のエ. 及びオ. の規定に基づき、下記の理由により試験を省略した。

・好氣的土壤中動態試験の結果から、当該農薬の成分物質等の土壤中での推定半減期が 100 日を超えないため、試験成績提出の除外に該当。

・当該農薬の成分物質等の水溶解度が 10 mg/L 以下あるため、試験成績提出の除外に該当。

「農薬の登録申請に係る試験成績について」（平成 12 年 11 月 24 日付け 12 農産第 8147 号農林水産省農産園芸局長通知）の運用について（13 生産第 3986 号農林水産省生産局生産資材課長通知）の「3. 試験を実施するに当たって必要とされる条件について」の（1）の④のウ. の（イ）の規定に基づき、下記の理由により試験を省略した。

・フロメトキンを用いた好氣的土壤中動態試験における主要代謝物 M1 の水溶解度が 10mg/L 以下であるため、試験成績提出の除外に該当。

4. 水中動態に関する試験

(1) ¹⁴C-標識フロメトキンを用いた加水分解動態試験

(資料 代-9)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

供試標識化合物：¹⁴C-標識フロメトキン

名称	フロメトキン
構造式及び標識位置	
化学名	
比放射能	
放射化学的純度	

標識位置の設定理由：

試験方法：

供試水溶液；

pH 4.0 緩衝液 (0.01 M)：

0.01 M 酢酸ナトリウム溶液 180 mL 及び 0.01 M 氷酢酸溶液 820 mL を混合し、精製水で 1000 mL とした。得られた緩衝液の pH は 4.00 であった。

pH 7.0 緩衝液 (0.01 M)：

0.02 M リン酸一ナトリウム溶液 305 mL 及び 0.02 M リン酸二ナトリウム溶液 195 mL を混合し、精製水で 1000 mL とした。1M 塩酸を添加し、pH を 7.04 に調整した。

pH 9.0 緩衝液 (0.01 M)：

0.5 M ホウ酸溶液 20 mL を精製水で 1000 mL に希釈した。1M 塩酸及び 1M 水酸化ナトリウムを添加し、pH を 9.01 に調整した。

各緩衝液は、温度 120°C、15 psi で 30 分間オートクレーブ滅菌し、施用前に滅菌窒素で約 5 分間パージして酸素を除去した。施用前に、窒素パージした滅菌緩衝液の pH が 4.0 ± 0.1、7.0 ± 0.1 及び 9.0 ± 0.1 であることを確認した。

試験系；試験容器（褐色ガラスバイアル、4 mL 容）に滅菌緩衝液 4.0 mL を入れ、試験濃度約 5.0 ng/mL となるようフロメトキンを添加した。（溶解助剤のアセトニトリル濃度約 1%）

試験濃度；5.0 ng/mL (0.01 M 未満、20°C におけるフロメトキンの水溶解度 12.03 ng/mL の 1/2 未満)

施用液；フロメトキンの 0.515 µg/mL アセトニトリル溶液

試験設計；試験は、各試験系を各設定温度（10°C、25°C 及び 50°C）の暗所で 7 日間（50°C）及び 30 日間（10°C、25°C）インキュベートし、各採取時点で 2 点の試料を採取

して、分析した。[申請者注：尚、当試験施設で実施した予備試験（25°C、pH 4.0、7.0 及び 9.0 緩衝液、5 日間インキュベート）における物質収支結果が許容範囲内であったため、揮発性物質の捕集は実施しなかった。]

試料採取時点；

pH	試験温度	採取時点
4.0	10±0.5°C	0、1、3、7、14、21 及び 30 日後
	25±0.5°C	0、0.5 (12 hr)、1、3、7、14 及び 30 日後
	50±0.5°C	0、0.167 (4 hr)、0.333 (8 hr)、0.5 (12 hr)、1、2 及び 7 日後
7.0	10±0.5°C	0、1、3、7、14、21 及び 30 日後
	25±0.5°C	0、1、3、7、14、21 及び 30 日後
	50±0.5°C	0、0.167 (4 hr)、0.333 (8 hr)、0.5 (12 hr)、1、2、4 及び 7 日後
9.0	10±0.5°C	0、1、3、7、14、21 及び 30 日後
	25±0.5°C	0、0.5 (12 hr)、1、3、7、14 及び 30 日後
	50±0.5°C	0、0.021 (0.5 hr)、0.042 (1 hr)、0.083 (2 hr)、0.167 (4 hr)、0.333 (8 hr)、0.5 (12 hr)、1、2 及び 7 日後

分析方法：

試験系；予備試験の結果、フロメトキンのガラスへの吸着が認められたが、採取した試験系の試料にアセトニトリルを容量で 20% 添加することで、良好なフロメトキンの回収が得られることが判明した。従って各採取試験系試料にアセトニトリル 0.8 mL を添加し、十分に混合・超音波処理後、各試料の一部を直接 LSC 及び HPLC 分析した。フロメトキンとの同一性は、参照物質との HPLC コクロマトグラフィー及び HPLC/RAM/MS により、確認した。また、との同一性は HPLC/RAM/MS により同定した。

温度の確認；水槽又はインキュベーターの温度を連続的にモニタリングした。

pH の確認；フロメトキンの添加前に、各滅菌緩衝液の pH を測定した。また、0 日後及び試験終了時に試験試料の pH を測定した。

滅菌性の確認；滅菌緩衝液並びに 0 日後及び試験終了時の試料について、微生物培養法により確認した。

半減期の算出：

次式を用いて滅菌緩衝液中のフロメトキンの DT_{50} 及び DT_{90} 値を算出した。

$$\ln(C) = -k \times t + \ln(C_0)$$

ここで、

C = 試験系における時間 t (日) でのフロメトキン濃度

C_0 = 0 時点におけるフロメトキン濃度

k = 速度定数

従って、

$$DT_{50} = \ln(2) / k$$

$$DT_{90} = \ln(10) / k$$

アレニウスパラメータの算出：

次式を用いて温度 20 及び 25°C におけるアレニウスパラメータを推定した。

$$k = A \times e^{(-E_a / R \times T)}$$

ここで、
 k = 速度定数
 E_a = 活性化エネルギー (kJ/mol)
 T = 絶対温度 (K)
 R = 気体定数 (= 8.314 J/mol*K)
 A = 頻度因子

従って、

$$\ln k = (-E_a / R)(1/T) + \ln A$$

上記の式より、活性化エネルギーは勾配に-8.314 J/K-mol を乗じたものとした。

結 果：

- 1) 滅菌性の維持
 いずれの試験系においても、全ての試料が滅菌状態であることが確認された。
- 2) pH
 pH 4.0 滅菌緩衝液の pH は、処理前は 4.04 であり、0 日後及び 30 日後の加水分解試料では 3.99~4.10 であった。pH 7.0 滅菌緩衝液の pH は、処理前は 6.97 であり、0 日後及び 30 日後の処理加水分解試料では 6.97~7.01 であった。pH 9.0 滅菌緩衝液の pH は、処理前は 9.01 であり、0 日後及び 30 日後の加水分解試料では 8.98~9.01 であった。
- 3) 放射能の分布及び分解
 - ① 物質収支
 結果を表 1 に要約する。

表 1 放射能の物質収支

加水分解試料	物質収支 (% AR)	
	総平均	範囲
pH 4.0 滅菌緩衝液, 10°C	98.99	92.77-107.80
pH 4.0 滅菌緩衝液, 25°C	98.50	94.78-107.80
pH 4.0 滅菌緩衝液, 50°C	99.08	92.93-107.80
pH 7.0 滅菌緩衝液, 10°C	99.35	95.97-103.64
pH 7.0 滅菌緩衝液, 25°C	98.53	94.82-101.77
pH 7.0 滅菌緩衝液, 50°C	99.02	95.62-102.78
pH 9.0 滅菌緩衝液, 10°C	99.61	95.89-103.82
pH 9.0 滅菌緩衝液, 25°C	98.51	95.33-101.13
pH 9.0 滅菌緩衝液, 50°C	99.79	96.70-105.48

pH 4.0、7.0 及び 9.0 の滅菌緩衝液加水分解試料の物質収支は、施用放射能 (%AR) の 92.77%~107.80%であった。

- ② 放射能の分布
 各 pH におけるフロメトキンおよび分解物の分布を表 2~4 及び図 1~3 に示す。

②-1 pH 4.0 滅菌緩衝液 (表 2、図 1)

加水分解試料中のフロメトキンは、10°C では 0 日後の 101.83%AR から 30 日後に 13.57%AR となった。25°C では、0 日後の 101.83%AR から 14 日後に 4.09%AR となり、30 日後では検出されなかった。50°C では、0 日後の 101.83%AR から 2 日後に 4.05%AR となり、7 日後では検出されなかった。

加水分解試料中の加水分解物として が検出された。 は、10°C では 0 日後に 検出され、30 日後には最大 101.83%AR になった。25°C では 0 日後に 検出され、30 日後には最大 101.83%AR になった。50°C では 0 日後に 検出され、7 日後には最大 4.05%AR になった。

その他の加水分解物は、検出されなかった。

表 2-1 pH 4.0 試料における放射能の分布 (%AR)

試料	10°C		25°C		50°C	
	フロメト キン	合計	フロメト キン	合計	フロメト キン	合計
0 日後	101.83	102.99	101.83	102.99	101.83	102.99
0.167 日後	-	-	-	-	60.64	97.02
0.333 日後	-	-	-	-	51.80	100.42
0.5 日後	-	-	78.10	95.49	35.53	98.49
1 日後	90.47	100.49	62.19	98.87	11.47	99.52
2 日後	-	-	-	-	4.05	94.82
3 日後	76.08	97.98	36.54	99.03	-	-
7 日後	55.72	96.50	13.23	98.84	ND	100.29
14 日後	33.59	96.44	4.09	96.80	-	-
21 日後	20.64	101.81	-	-	-	-
30 日後	13.57	96.72	ND	97.45	-	-

結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず、-：測定せず

表 2-2 pH 4.0 試料における放射能の分布 (ng/mL)

試料	10°C		25°C		50°C	
	フロメト キン	合計	フロメト キン	合計	フロメト キン	合計
0 日後	5.19	5.25	5.19	5.25	5.19	5.25
0.167 日後	-	-	-	-	3.09	4.95
0.333 日後	-	-	-	-	2.64	5.12
0.5 日後	-	-	3.98	4.87	1.81	5.02
1 日後	4.61	5.12	3.17	5.04	0.59	5.07
2 日後	-	-	-	-	0.21	4.84
3 日後	3.88	5.00	1.86	5.05	-	-
7 日後	2.84	4.92	0.67	5.04	ND	5.11
14 日後	1.71	4.92	0.21	4.94	-	-
21 日後	1.05	5.19	-	-	-	-
30 日後	0.69	4.93	ND	4.97	-	-

結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず、-：測定せず

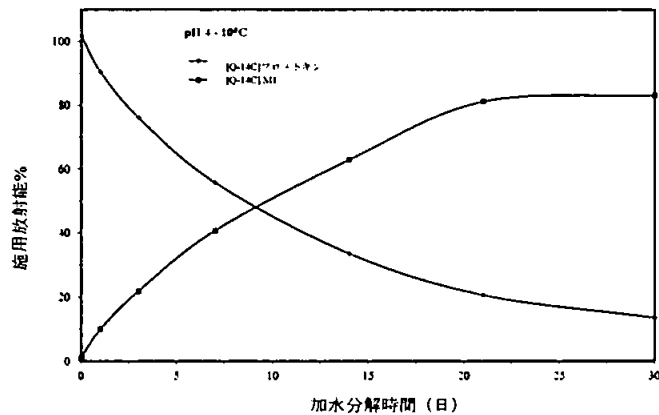


図 1-1 pH 4, 10°C における放射能の分布

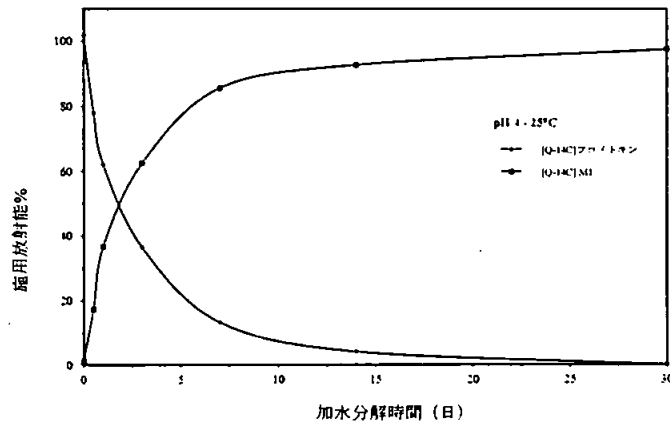


図 1-2 pH 4, 25°C における放射能の分布

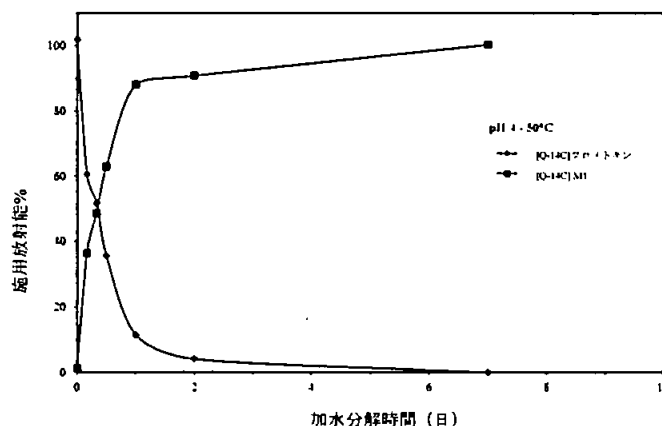


図 1-3 pH 4, 50°C における放射能の分布

②-2 pH 7.0 滅菌緩衝液 (表 3, 図 2)

加水分解試料中のフロメトキンは、10°C では 0 日後の 100.28%AR から 30 日後に 49.05%AR となった。25°C では 0 日後の 100.28% AR から 30 日後に 13.08%AR となった。50°C では 0 日後の 100.28%AR から 7 日後に 2.15%AR となった。

加水分解試料中の加水分解物として MI が検出された。MI は、10°C では 1 日後に 95.35%AR 検出され、30 日後に最大 49.05%AR になった。25°C では 1 日後に 84.94%AR 検出され、30 日後に最大 13.08%AR になった。50°C では 1 日後に 58.97%AR 検出され、7 日後に最大 2.15%AR になった。

その他の加水分解物は検出されなかった。

表 3-1 pH 7.0 試料における放射能の分布 (%AR)

試料	10°C		25°C		50°C	
	フロメトキン	合計	フロメトキン	合計	フロメトキン	合計
0 日後	100.28	100.28	100.28	100.28	100.28	100.28
0.167 日後	-	-	-	-	88.44	97.11
0.333 日後	-	-	-	-	90.05	99.90
0.5 日後	-	-	-	-	78.00	97.29
1 日後	95.35	99.08	84.94	95.55	58.97	97.10
2 日後	-	-	-	-	47.19	100.32
3 日後	90.11	96.83	73.93	99.36	-	-
4 日後	-	-	-	-	25.54	102.69
7 日後	84.71	103.59	51.52	97.45	2.15	97.51
14 日後	72.68	97.77	45.94	99.41	-	-
21 日後	67.08	100.40	23.95	99.32	-	-
30 日後	49.05	97.51	13.08	98.36	-	-

結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず、-：測定せず

表 3-2 pH 7.0 試料における放射能の分布 (ng/mL)

試料	10°C		25°C		50°C	
	フロメト キン	合計	フロメト キン	合計	フロメト キン	合計
0 日後	5.11	5.11	5.11	5.11	5.11	5.11
0.167 日後	-	-	-	-	4.51	4.95
0.333 日後	-	-	-	-	4.59	5.09
0.5 日後	-	-	-	-	3.98	4.96
1 日後	4.86	5.05	4.33	4.87	3.01	4.95
2 日後	-	-	-	-	2.41	5.12
3 日後	4.60	4.94	3.77	5.07	-	-
4 日後	-	-	-	-	1.30	5.24
7 日後	4.32	5.28	2.63	4.97	0.11	4.97
14 日後	3.71	4.99	2.34	5.07	-	-
21 日後	3.42	5.12	1.22	5.07	-	-
30 日後	2.50	4.97	0.67	5.02	-	-

結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず、-：測定せず

図 2-3 pH 7, 50°C における放射能の分布

②-3 pH 9.0 滅菌緩衝液 (表 4、図 3)

加水分解試料中のフロメトキンは、10°C では0日後の98.94%ARから30日後に42.47%ARとなった。25°C では0日後の98.94%ARから14日後に6.78%ARとなり、30日後では検出されなかった。50°C では0日後の98.94%ARから1日後に2.21%ARとなり、2日後では検出されなかった。

その他の加水分解物は検出されなかった。

表 4-1 pH 9.0 試料における放射能の分布 (%AR)

試料	10°C		25°C		50°C	
	フロメト キン	合計	フロメト キン	合計	フロメト キン	合計
0 日後	98.94	98.94	98.94	98.94	98.94	98.94
0.021 日後	-	-	-	-	78.09	97.29
0.042 日後	-	-	-	-	69.49	101.31
0.083 日後	-	-	-	-	52.14	99.74
0.167 日後	-	-	-	-	22.55	98.77
0.333 日後	-	-	-	-	7.80	99.50
0.5 日後	-	-	80.05	100.23	5.10	99.37
1 日後	84.42	95.94	71.90	98.03	2.21	100.71
2 日後	-	-	-	-	ND	101.96
3 日後	78.64	98.01	34.72	97.80	-	-
7 日後	71.75	99.59	9.53	99.78	ND	100.32
14 日後	67.13	103.20	6.78	96.02	-	-
21 日後	56.76	102.02	-	-	-	-
30 日後	42.47	99.59	ND	98.78	-	-

結果は2反復の平均値、ND：検出せず、-：測定せず

表 4-2 pH 9.0 試料における放射能の分布 (ng/mL)

試料	10°C		25°C		50°C	
	フロメト キン	合計	フロメト キン	合計	フロメト キン	合計
0 日後	5.05	5.05	5.05	5.05	5.05	5.05
0.021 日後	-	-	-	-	3.98	4.96
0.042 日後	-	-	-	-	3.54	5.17
0.083 日後	-	-	-	-	2.66	5.09
0.167 日後	-	-	-	-	1.15	5.04
0.333 日後	-	-	-	-	0.40	5.07
0.5 日後	-	-	4.08	5.11	0.26	5.07
1 日後	4.30	4.89	3.67	5.00	0.11	5.14
2 日後	-	-	-	-	ND	5.20
3 日後	4.01	5.00	1.77	4.99	-	-
7 日後	3.66	5.08	0.49	5.09	ND	5.12
14 日後	3.42	5.26	0.35	4.90	-	-
21 日後	2.89	5.20	-	-	-	-
30 日後	2.17	5.08	ND	5.04	-	-

結果は 2 反復の平均値、ND : 検出せず、- : 測定せず

4) 推定半減期

pH 4.0、7.0 及び 9.0 の滅菌緩衝液中のフロメトキンについて、10°C、25°C 及び 50°C における半減期を、下記データを用いて一次線形回帰分析により求めた。その結果を次表に示す。

pH4.0 : 10°C ; 0 日～30 日後、 25°C ; 0 日～7 日後、 50°C ; 0 日～1 日後
pH7.0 : 10°C ; 0 日～30 日後、 25°C ; 0 日～30 日後、 50°C ; 0 日～4 日後
pH9.0 : 10°C ; 0 日～30 日後、 25°C ; 0 日～7 日後、 50°C ; 0 日～0.333 日後

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

pH	温度 (°C)	速度定数 (日 ⁻¹)	DT ₅₀ (日)	DT ₉₀ (日)	r ²
4.0	10	0.0681	10.2	33.8	0.9905
	25	0.2803	2.5	8.2	0.9889
	50	2.1215	0.3	1.1	0.9907
7.0	10	0.0218	31.8	105.7	0.9780
	25	0.0640	10.8	36.0	0.9794
	50	0.3353	2.1	6.9	0.9799
9.0	10	0.0239	29.0	96.3	0.9513
	25	0.3334	2.1	6.9	0.9992
	50	7.6588	0.09	0.30	0.9929

5) アレニウス式を用いた推定半減期

10、25 及び 50°C で収集した pH 4.0、pH 7.0 及び pH 9.0 の加水分解データを用いて ln (速度定数) 対 1/T Kelvin のアレニウスプロットを作成した (図 4)。

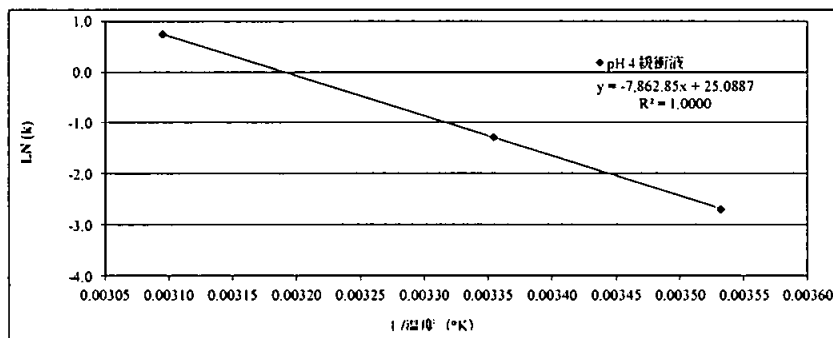


図 4-1 pH 4.0 滅菌緩衝液におけるフロメトキンの加水分解のアレニウスプロット

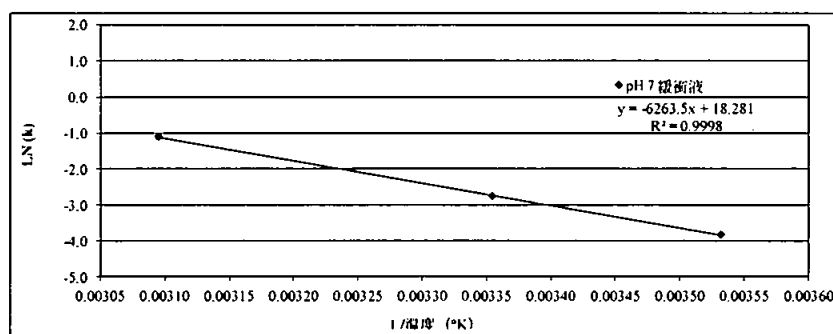


図 4-2 pH 7.0 滅菌緩衝液におけるフロメトキンの加水分解のアレニウスプロット

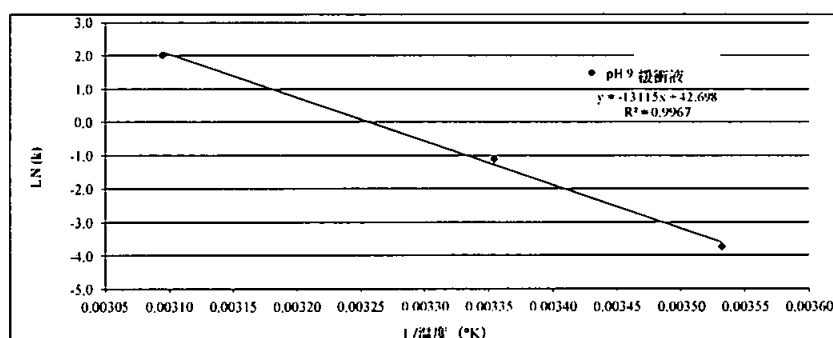


図 4-3 pH 9.0 滅菌緩衝液におけるフロメトキンの加水分解のアレニウスプロット

フロメトキン加水分解のアレニウス式を用いた温度 20°C 及び 25°C における推定半減期を次表に要約する。

緩衝液	1/T (温度 1/K)	lnk	線形回帰分析 (傾き及びy-切片)	25°C			20°C		
				ln k	k	半減期 (日)	ln k	k	半減期 (日)
pH 4.0	0.0035	-2.6873	傾き $-E_a/R = -7862.85$	-1.283	0.2771	2.5	-1.733	0.1767	3.9
	0.0034	-1.2721	切片 $\ln A = 25.0887$						
	0.0031	0.7521	$E_a = 65.37$						
pH 7.0	0.0035	-3.8267	傾き $-E_a/R = -6263.45$	-2.727	0.0654	10.6	-3.085	0.0457	15.2
	0.0034	-2.7483	切片 $\ln A = 18.2811$						
	0.0031	-1.0926	$E_a = 52.07$						
pH 9.0	0.0035	-3.7332	傾き $-E_a/R = -13114.88$	-1.289	0.2754	2.5	-2.040	0.1301	5.3
	0.0034	-1.0984	切片 $\ln A = 42.6980$						
	0.0031	2.0359	$E_a = 109.40$						

アレニウス式 $\ln k = -E_a/RT + \ln A$

k = 速度定数、異なる温度で測定

A = 頻度因子

E_a = 活性化エネルギー (KJ/mol)

T = 絶対温度 [K]

R = 気体定数 [8.314J/mol*K]

活性化エネルギーは pH 4.0 では 65.37 KJ/mol、pH 7.0 では 52.07 KJ/mol、pH 9.0 では 109.40 KJ/mol と算出された。アレニウスのプロットデータを用いたフロメトキンの 25°C における半減期は、pH 4.0 では 2.5 日、pH 7.0 では 10.6 日、pH 9.0 では 2.5 日と算出された。

6) 推定加水解経路

フロメトキンの

は であった。フロメトキンの推定加水分解経路を

図 5 に示す。

図5 フロメトキンの推定加水分解経路

以上の結果より、水中の非生物的加水分解は、通常の使用及びあるいは曝露に関連する条件下の環境 pH 範囲 4～9 におけるフロメトキンの分解の一因になると予想される。

(2) ^{14}C -標識フロメトキンを用いた水中光分解動態試験

(資料 代-10)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

供試標識化合物： ^{14}C -標識フロメトキン

名称	フロメトキン	フロメトキン
構造式および標識位置		
化学名		
比放射能		
放射化学的純度		
施用時放射化学的純度 (HPLC)		

標識位置の設定理由：

供試水：試験に用いた供試水の特性を次表に要約する。

供試水	自然水	0.01 M pH 7.0 緩衝液
調製方法等	1) の より採取した 河川水 (使用前は 8°C 未満で冷蔵保存)	0.02 M リン酸二水素ナトリウム溶液 および 0.02 M リン酸水素ナトリウム溶液を混合し、定容後、pH を確認
採取日	12 月 30 日	—
pH	6.9	7.0 ± 0.1 (処理前)
溶存酸素 (mg/L)	7.60	—
電気伝導率 (μS/cm)	103	1536
蒸発残留物 (ppm)	78	—
懸濁物質 (ppm)	6	—

1) 光源：キセノンアークランプ

光照射装置；Heraeus サンテスト CPS+ユニット

分光分布；290 nm～800 nm

光学フィルター；290 nm 未満の波長をカットオフするフィルターを使用

平均光強度 (波長範囲 300～400 nm)；47.46 W/m²

放射照度；4.10 MJ/m²/day

2) 試験方法：

施用液；フロメトキンおよびフロメトキンの約 0.5 µg/mL アセトニトリル溶液

試験濃度；名目濃度 5.0 ng/mL (0.01M 未満、20°C の水溶解度, 12 ng/mL の 1/2 未満)

初期実測濃度 4.88~5.20 ng/mL (フロメトキン) および 4.82~5.11 ng/mL (フロメトキン)

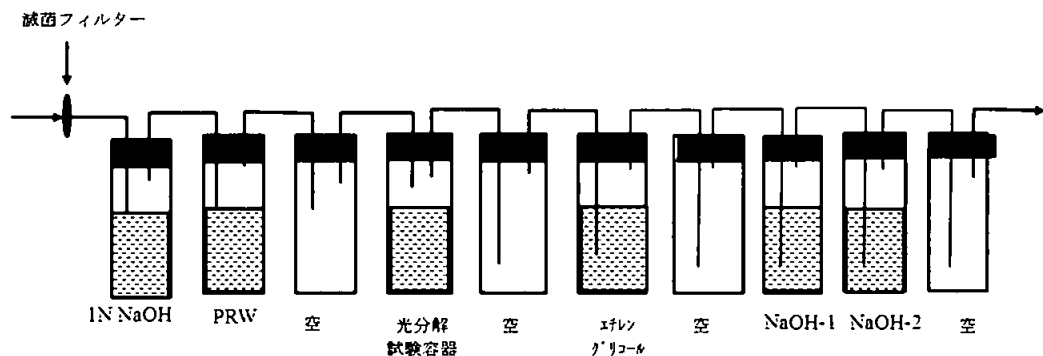
試験温度；25±1°C

試験期間；10 日間 (フロメトキン自然水) または 15 日間 (フロメトキン緩衝液及びフロメトキン試料)

試験容器；密閉石英製容器 (内径 4.8 cm、容器内高さ 2.0 cm)

照射区用試験容器は通気装置接続用空気流出入口付き

揮発性物質捕集装置；照射区の各試験容器に揮発性有機物質捕集用エチレングリコールトラップ 1 個および CO₂ 捕集用 1M 水酸化ナトリウムトラップ 2 個を接続した (下図)。暗所対照区試料には揮発性物質捕集装置を接続しなかった。



PRW：精製水

供試水の滅菌；自然水はろ過滅菌 (0.2 µm)、緩衝液は 121°C、15 psi で 30 分オートクレーブ滅菌した。

試験系の調製；反応容器にろ過滅菌済みの供試水 25 mL (暗所対照区試料は、フロメトキン：5 mL、フロメトキン：4 mL) を入れ、試験濃度約 5 ng/mL となるようフロメトキンおよびフロメトキン施用液を添加した。溶解補助剤アセトニトリルの濃度は 1% 以下であった。

インキュベーション；光照射区試料は、光源下の水浴に試験容器の一部を浸して静置し、光照射装置を用いて連続照射した。試験温度は、水浴の水温を 25±1°C に制御して維持した。暗所対照区は蓋付きの温度制御チャンバー内に静置した。

試料採取；次表に示す。

光条件	標識体	採取試料	採取時点
照射区	フロメトキン	自然水	施用直後 (0 日後)、3 時間 (0.125 日)、6 時間 (0.25 日) および 12 時間 (0.5 日) 後、1、2、5 および 10 日後
		pH 7.0 緩衝液	0 日後、3 時間 (0.125 日)、6 時間 (0.25 日) および 12 時間 (0.5 日) 後、1、2、5、10 および 15 日後
		揮発性物質捕集液	1 日後以降の各対応する採取時点
	フロメトキン	自然水	0 日後、3 時間 (0.125 日) および 12 時間 (0.5 日) 後、1、2、5、10 および 15 日後
		pH 7.0 緩衝液	0 日後、3 時間 (0.125 日) および 12 時間 (0.5 日) 後、1、2、5、10 および 15 日後
		揮発性物質捕集液	1 日後以降の各対応する採取時点
暗所対照区	フロメトキン	自然水	0、1、2、5 および 10 日後
		pH 7.0 緩衝液	0、1、2、5、10 および 15 日後
	フロメトキン	自然水	0、1、2、5、10 および 15 日後
		pH 7.0 緩衝液	0、1、2、5、10 および 15 日後

各試料は 2 連で採取した。

分析方法：

試験系；各試料溶液は採取当日にアセトニトリルで希釈し、その一部を直接 LSC および HPLC で分析した。放射性成分は、参照標準品との HPLC コクロマトグラフィーおよび HPLC/RAM/MS により同定した。また、極性成分は強陰イオン交換カラムを用いた HPLC および TLC 分析により特徴付けた。

CO₂ の確認；バリウム沈殿法により、NaOH 捕集液中の放射能は ¹⁴C₂O₂ であることを確認した。

温度の確認；試験水を入れたブランク試料に挿入した温度センサーを用いて連続的にモニタリングし、試験期間中試験温度範囲内に維持されていた。

pH の確認；各滅菌自然水及び pH 7.0 緩衝液は、フロメトキン及びフロメトキンの添加直前に、各試験系の試験溶液は、0 日後および試験終了時に測定した。

滅菌性の確認；0 日後および試験終了時の各試料について、微生物培養法により確認した。

半減期の算出；

次式を用いて試験系中のフロメトキンの半減期を算出した。

$$\ln(C) = -k \times t + \ln(C_0)$$

ここで、

C = 試験系における時間 t (日) でのフロメトキン濃度

C₀ = 0 時点におけるフロメトキン濃度

k = 速度定数

従って、

$$DT_{50} = \ln(2) / k$$

$$DT_{75} = \ln(4) / k$$

$$DT_{90} = \ln(10) / k$$

また、正味の光分解速度定数を次式より算出し、フロメトキンの正味の光分解半減期を推定した。

$$k_{\text{光分解}} = k_{\text{照射区測定値}} - k_{\text{加水分解 (暗所対照区測定値)}}$$

さらに、正味の光分解速度定数および換算係数 (C_F) 6.10 (キセノンの放射照度/春の東京における放射照度=4.10 MJ/m²/d/0.672 MJ/m²/d) を用いて春の東京における推定半減期を算出した。

量子収率の算出；化学光量計としてパラニトロアセトフェノン (PNAP) /ピリジン系を用い、PNAP の量子収率との比較からフロメトキンの量子収率を算出した。

結 果：

- 1) 滅菌性の維持
いずれの試験系においても、全ての試料が滅菌状態であることが確認された。
- 2) pH
滅菌自然水の pH は、処理前は 5.92~6.43 であり、0 日後および 10 日後、15 日後では 5.40~6.51 であった。
pH 7.0 滅菌緩衝液の pH は、処理前は 6.93~6.99 であり、0 日後および 15 日後試料では 6.88~7.00 であった。
- 3) 放射能の分布および分解
 - ① 物質収支
滅菌自然水および pH 7.0 滅菌緩衝液試料の物質収支を表 1 および表 2 に示す。

フロメトキン (表 1)

表 1-1 フロメトキン処理滅菌自然水における放射能の物質収支

試料	光照射区				暗所対照区		
	試験液	%AR		回収率	ng/mL		
		揮発性物質	累積%		濃度	回収率	濃度
		EG	NaOH				
0 日後	100.43	NA	NA	100.43	5.11	100.43	5.11
0.125 日後	96.31	NA	NA	96.31	4.90	NA	NA
0.25 日後	96.54	NA	NA	96.54	4.91	NA	NA
0.5 日後	99.37	NA	NA	99.37	5.05	NA	NA
1 日後	94.17	ND	5.60	99.77	5.08	98.18	4.99
2 日後	91.71	ND	6.56	98.27	5.00	96.19	4.89
5 日後	85.05	0.53	18.10	103.68	5.27	108.45	5.52
10 日後	70.83	0.56	26.88	98.28	5.00	98.58	5.01

結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず、NA：測定せず

表 1-2 フロメトキン処理 pH 7.0 滅菌緩衝液における放射能の物質収支

試料	光照射区				暗所対照区		
	試験液	%AR		回収率	ng/mL	% AR	ng/mL
		揮発性物質	累積%				
		EG	NaOH		濃度	回収率	濃度
0 日後	97.11	NA	NA	97.11	4.94	97.11	4.94
0.125 日後	96.25	NA	NA	96.25	4.90	NA	NA
0.25 日後	102.55	NA	NA	102.55	5.22	NA	NA
0.5 日後	96.43	NA	NA	96.43	4.91	NA	NA
1 日後	95.57	0.02	1.52	97.11	4.94	99.33	5.05
2 日後	94.09	0.30	3.81	98.20	5.00	100.30	5.10
5 日後	89.70	0.73	9.68	100.11	5.09	102.10	5.19
10 日後	85.58	0.73	15.39	101.70	5.17	95.46	4.86
15 日後	74.15	1.73	19.26	95.14	4.84	105.14	5.35

結果は 2 反復の平均値、ND : 検出せず、NA : 測定せず

フロメトキン処理試料の放射能の物質収支は 95.14~108.45%AR であった。エチレングリコール捕集液中に微量の ^{14}C が認められた (滅菌自然水および pH 7.0 滅菌緩衝液試料においてそれぞれ最大 0.56 および 1.73% AR)。NaOH 捕集液中の ^{14}C は、滅菌自然水および pH 7.0 滅菌緩衝液試料においてそれぞれ最大 26.88% AR (10 日後) および 19.26% AR (15 日後) であった。

フロメトキン (表 2)

表 2-1 フロメトキン処理滅菌自然水における放射能の物質収支

試料	光照射区				暗所対照区		
	試験液	%AR		回収率	ng/mL		
		揮発性物質	累積%		% AR	ng/mL	
		EG	NaOH		濃度	回収率	濃度
0 日後	97.48	NA	NA	97.48	4.90	97.48	4.90
0.125 日後	100.56	NA	NA	100.56	5.05	NA	NA
0.5 日後	95.51	NA	NA	95.50	4.80	NA	NA
1 日後	91.97	ND	4.88	96.85	4.87	96.28	4.84
2 日後	87.66	ND	12.80	100.46	5.05	93.04	4.67
5 日後	72.20	ND	24.26	96.46	4.85	95.46	4.80
10 日後	59.24	ND	32.36	91.60	4.60	95.90	4.82
15 日後	56.55	ND	37.58	94.13	4.73	94.49	4.75

結果は 2 反復の平均値、ND : 検出せず、NA : 測定せず

表 2-2 フロメトキン処理 pH 7.0 滅菌緩衝液における放射能の物質収支

試料	光照射区				暗所対照区		
	試験液	%AR		回収率	ng/mL		
		揮発性物質	累積%		% AR	ng/mL	
		EG	NaOH		濃度	回収率	濃度
0 日後	98.85	NA	NA	98.85	4.97	98.85	4.97
0.125 日後	94.35	NA	NA	94.35	4.74	NA	NA
0.5 日後	91.76	NA	NA	91.76	4.61	NA	NA
1 日後	86.74	ND	6.86	93.60	4.70	94.13	4.73
2 日後	89.12	ND	12.98	102.10	5.13	91.51	4.60
5 日後	81.98	0.02	19.95	101.95	5.12	94.79	4.76
10 日後	77.57	0.02	25.68	103.26	5.19	93.81	4.71
15 日後	70.74	0.02	29.17	99.93	5.02	95.18	4.78

結果は 2 反復の平均値、ND : 検出せず、NA : 測定せず

フロメトキン処理試料の放射能の物質収支は 91.51~103.26%AR であった。エチレングリコール捕集液中に極微量の ^{14}C が認められた (<0.5 %AR)。NaOH 捕集液中の ^{14}C は、滅菌自然水および pH 7.0 滅菌緩衝液試料においてそれぞれ最大 37.58% AR および 29.17% AR (15 日後) であった。

② 放射性成分の分布

(1) 光照射区試料

光照射区滅菌自然水および pH7.0 滅菌緩衝液における [^{14}C]フロメトキンおよび分解物の分布を表 3~4 および図 1~2 に示す。

フロメトキン (表 3、図 1)

滅菌自然水および滅菌 pH 7.0 緩衝液試料中の フロメトキンは、0 日後は 96.19% AR および 93.37% AR であり、2 日後には 12.39% AR および 3.62% AR となった。いずれの試料においてもその後は検出されなかった。

10% AR 以上検出された放射性成分は、であった。また、極
性成分の主要成分は、と推定された。

表 3-1 フロメトキン処理 照射区滅菌自然水試料における放射能の分布

試料	フロメトキン			合計
	%AR			
0 日後	96.19			
0.125 日後	83.63			
0.25 日後	71.81			
0.5 日後	57.68			
1 日後	30.46			
2 日後	12.39			
5 日後	ND			
10 日後	ND			
0 日後	4.89			
0.125 日後	4.25			
0.25 日後	3.65			
0.5 日後	2.93			
1 日後	1.55			
2 日後	0.63			
5 日後	ND			
10 日後	ND			

・結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず ・極性成分の最大ピークは 21.16%AR
 ・「その他」の最大ピークは 10%AR 未満

表 3-2 フロメトキン処理 照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液試料における放射能の分布

試料	フロメトキン			合計
	%AR			
0 日後	93.37			
0.125 日後	71.17			
0.25 日後	61.30			
0.5 日後	43.01			
1 日後	19.27			
2 日後	3.62			
5 日後	ND			
10 日後	ND			
15 日後	ND			
0 日後	4.75			
0.125 日後	3.62			
0.25 日後	3.12			
0.5 日後	2.19			
1 日後	0.98			
2 日後	0.18			
5 日後	ND			
10 日後	ND			
15 日後	ND			

・結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず ・の最大ピークは 32.35%AR
 ・「その他」の最大ピークは 10%AR 未満

図 1-1 フロメトキン処理 照射区滅菌自然水試料における放射能の分布

図 1-2 フロメトキン処理 照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液試料における放射能の分布

フロメトキン (表 4、図 2)

滅菌自然水および滅菌 pH 7.0 緩衝液試料中の フロメトキンは 0 日後では 96.37% AR および 97.76% AR であり、それぞれ 2 日後に 34.74% AR、5 日後に 1.78% AR となり、いずれもその後は検出されなかった。

10% AR 以上検出された放射性成分は であった。

独には 10%AR を超えなかった。

極性画分の成分は、単

表 4-1 フロメトキン処理 照射区滅菌自然水試料における放射能の分布

試料	フロメトキン	合計	
		%AR	
0 日後	96.37		
0.125 日後	92.31		
0.5 日後	75.49		
1 日後	65.05		
2 日後	34.74		
5 日後	ND		
10 日後	ND		
15 日後	ND		
		ng/mL	
0 日後	4.84		
0.125 日後	4.64		
0.5 日後	3.79		
1 日後	3.27		
2 日後	1.75		
5 日後	ND		
10 日後	ND		
15 日後	ND		

・結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず ・ の最大ピークは 6.97%AR

表 4-2 フロメトキン処理 照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液試料における放射能の分布

試料	フロメトキン	合計	
		%AR	
0 日後	97.76		
0.125 日後	85.61		
0.5 日後	58.80		
1 日後	6.89		
2 日後	5.91		
5 日後	1.78		
10 日後	ND		
15 日後	ND		
		ng/mL	
0 日後	4.91		
0.125 日後	4.30		
0.5 日後	2.95		
1 日後	0.35		
2 日後	0.30		
5 日後	0.09		
10 日後	ND		
15 日後	ND		

・結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず ・ の最大ピークは 6.51%AR

図 2-1 フロメトキン処理 照射区滅菌自然水試料における放射能の分布

適用放射能%

図 2-2 フロメトキン処理 照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液試料における放射能の分布

(2) 暗所対照区試料

暗所対照区滅菌自然水および pH7.0 滅菌緩衝液における¹⁴Cフロメトキンおよび分解物の分布を表 5~6 および図 3~4 に示す。

フロメトキン (表 5、図 3)

滅菌自然水および滅菌 pH 7.0 緩衝液試料中のフロメトキンは、0 日後では 96.19% AR および 93.37% AR であり、それぞれ最終時点では 15.79% AR (10 日後) および 37.86% AR (15 日後) となった。

は が検出され、0 日後には 、最終時点で となった。

表 5-1 フロメトキン処理 暗所対照区滅菌自然水試料における放射能の分布

試料	フロメトキン	合計	
	%AR		
0 日後	96.19		
1 日後	69.09		
2 日後	50.81		
5 日後	52.15		
10 日後	15.79		
	ng/mL		
0 日後	4.89		
1 日後	3.51		
2 日後	2.58		
5 日後	2.65		
10 日後	0.80		

結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず

表 5-2 フロメトキン処理 暗所対照区滅菌 pH 7.0 緩衝液試料における放射能の分布

試料	フロメトキン	合計	
	%AR		
0 日後	93.37		
1 日後	85.11		
2 日後	68.16		
5 日後	56.79		
10 日後	44.43		
15 日後	37.86		
	ng/mL		
0 日後	4.75		
1 日後	4.33		
2 日後	3.47		
5 日後	2.89		
10 日後	2.26		
15 日後	1.93		

結果は 2 反復の平均値、ND：検出せず

図 3-1 フロメトキン処理 暗所対照区滅菌自然水試料における放射能の分布

図3-2 フロメトキン処理 暗所対照区滅菌 pH 7.0 緩衝液試料における放射能の分布

フロメトキン (表 6、図 4)

滅菌自然水および滅菌 pH 7.0 緩衝液試料中の フロメトキンは、0 日後は 96.37% AR および 97.76% AR であり、最終時点 (15 日後) には 6.88% AR および 25.42% AR となった。

表 6-1 フロメトキン処理 暗所対照区滅菌自然水試料における放射能の分布

試料	フロメトキン	合計	
	%AR		
0 日後	96.37		
1 日後	72.80		
2 日後	60.78		
5 日後	34.95		
10 日後	20.90		
15 日後	6.88		
	ng/mL		
0 日後	4.84		
1 日後	3.66		
2 日後	3.05		
5 日後	1.76		
10 日後	1.05		
15 日後	0.35		

結果は 2 反復の平均値、ND : 検出せず

表 6-2 フロメトキン処理 暗所対照区滅菌 pH 7.0 緩衝液試料における放射能の分布

試料	フロメトキン	合計	
	%AR		
0 日後	97.76		
1 日後	86.34		
2 日後	74.22		
5 日後	67.13		
10 日後	39.03		
15 日後	25.42		
	ng/mL		
0 日後	4.91		
1 日後	4.34		
2 日後	3.73		
5 日後	3.37		
10 日後	1.96		
15 日後	1.28		

結果は 2 反復の平均値、ND : 検出せず

図 4-1 フロメトキン処理 暗所対照区滅菌自然水試料における放射能の分布

図 4-2 フロメトキン処理 暗所対照区滅菌 pH 7.0 緩衝液試料における放射能の分布

- 4) 放射性成分の同定および特徴付け
 フロメトキン、参照物質との HPLC コクロマトグラフィーおよび

HPLC/RAM/MS により確認した。

フロメトキン処理試料中の極性画分は C18 カラムにて精製後、強陰イオン交換カラムを用いた HPLC により成分を分離し、TLC 分析によりグリオキサールが含まれていることが確認された。その他の成分は個々には 10%AR 未満であることが確認された。

5) 推定半減期

フロメトキンの推定半減期を フロメトキン照射区試料および フロメトキン照射区滅菌自然水試料では 2 日後までのデータを、 フロメトキン照射区滅菌 pH7.0 緩衝液試料では、5 日後までのデータを用いて算出した。また暗所対照区では、両標識体および両滅菌試料とも最終時点までのデータを用いて算出した。暗所対照区試料でフロメトキンの分解が認められたので、正味の光分解速度定数を用いた光分解半減期も算出した。結果を表 7 に要約する。

表に示すようにフロメトキンは滅菌自然水中で光分解により極めて急速に分解した。

表 7-1 フロメトキンの DT₅₀、DT₇₅ および DT₉₀ 値 (実験条件)

標識	試料	速度定数(日 ⁻¹)	DT ₅₀ (日)	DT ₇₅ (日)	DT ₉₀ (日)	r ²
フロメトキン	照射区滅菌自然水*	0.8714	0.80	1.6	2.6	0.9960
	照射区滅菌自然水**	1.0331	0.67	1.3	2.2	0.9960
	照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液*	1.5481	0.45	0.90	1.5	0.9990
	照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液**	1.6066	0.43	0.86	1.4	0.9990
	照射区 PNAP	1.0005	0.69	NC	NC	0.9982
	暗所対照区滅菌自然水	0.1617	4.3	8.6	14	0.9158
	暗所対照区滅菌 pH 7.0 緩衝液	0.0585	12	24	39	0.9314
フロメトキン	照射区滅菌自然水*	0.3390	2.0	4.1	6.8	0.9857
	照射区滅菌自然水**	0.5036	1.4	2.8	4.6	0.9857
	照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液*	0.6981	0.99	2.0	3.3	0.7762
	照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液**	0.7858	0.88	1.8	2.9	0.7762
	照射区 PNAP	0.8773	0.79	NC	NC	0.9622
	暗所対照区滅菌自然水	0.1647	4.2	8.4	14.0	0.9853
	暗所対照区滅菌 pH 7.0 緩衝液	0.0877	7.9	16	26	0.9893

* : 正味の光分解速度定数を用いた補正值、NC= 計算せず

** : 加水分解の影響による補正を行わない数値

表 7-2 春の東京におけるフロメトキンの DT₅₀、DT₇₅ および DT₉₀ 推定値

標識	試料	速度定数(日 ⁻¹)	DT ₅₀ (日)	DT ₇₅ (日)	DT ₉₀ (日)
フロメトキン	滅菌自然水における正味の光分解 ^a	0.1429	4.9	9.7	16
	滅菌 pH 7.0 緩衝液における正味の光分解 ^a	0.2538	2.7	5.5	9.1
	滅菌自然水における分解 ^b	0.3046	2.3	4.6	7.6
	滅菌 pH 7.0 緩衝液における分解 ^b	0.3123	2.2	4.4	7.4
フロメトキン	滅菌自然水における正味の光分解 ^a	0.0556	12	25	41
	滅菌 pH 7.0 緩衝液における正味の光分解 ^a	0.1144	6.1	12	20
	滅菌自然水における分解 ^b	0.2203	3.1	6.3	10
	滅菌 pH 7.0 緩衝液における分解 ^b	0.2021	3.4	6.9	11

^a 春の東京における半減期への換算係数 : 6.10 として算出。

^b 加水分解の影響による補正を行わない数値

代謝物 の推定半減期を、 フロメトキン照射区および フロメトキン照射区の滅菌自然水試料及び pH7.0 緩衝液試料について、 ModelMakerc Version 4.0 を用いて算出した。

表 7-3 の DT₅₀、DT₇₅ および DT₉₀ 値 (実験条件)

標識	試料	DT ₅₀ (日)	DT ₇₅ (日)	DT ₉₀ (日)
フロ メトキン	照射区滅菌自然水	0.09	0.19	0.31
	照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液	0.08	0.18	0.26
フロ メトキン	照射区滅菌自然水	0.30	0.54	0.90
	照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液	0.11	0.23	0.38

表 7-4 の DT₅₀、DT₇₅ および DT₉₀ 値 (東京春換算)

標識	試料	DT ₅₀ (日)	DT ₇₅ (日)	DT ₉₀ (日)
フロ メトキン	照射区滅菌自然水	0.55	1.16	1.89
	照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液	0.49	0.98	1.59
フロ メトキン	照射区滅菌自然水	1.83	3.29	5.49
	照射区滅菌 pH 7.0 緩衝液	0.67	1.40	2.32

6) 量子収率

フロメトキン及び フロメトキンの pH 7.0 滅菌緩衝液における量子収率は、 1.08×10^{-3} および 5.57×10^{-4} であった。

7) 推定光分解経路

フロメトキン及びフロメトキンの推定光分解経路を図5に示す。

図5 フロメトキン及びフロメトキンの推定光分解経路

以上の結果より、水中光分解は、通常の使用および/あるいは曝露に関連する条件下の自然水あるいはpH 7.0緩衝液におけるフロメトキン及びフロメトキンの分解の一因となり、環境からのフロメトキンの消失経路であると推定される。

5. 土壌吸着性試験

(1) ¹⁴C-標識フロメトキンの土壌吸着性試験

(資料 代-11)

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年：

供試標識化合物：¹⁴C-標識フロメトキン

名称	フロメトキン
構造式および 標識位置	
化学名	
比放射能	
放射化学的純度	

供試土壌：使用した5種類の土壌の採取場所とその特性を表1に示す。

表1 試験土壌の特性

供試土壌	青森土壌	福島土壌	栃木土壌 (火山灰土壌)	埼玉土壌	徳島土壌
土壌の種類 (OECD 分類)	3	5	4	2	7
採取場所					
土性 (USDA)	SL: 砂壤土	L: 壤土	SiL: シルト質 壤土	SiC: シルト 質埴土	S: 砂土
粘土含有率 (%)	12.9	17.2	19.0	46.6	3.5
有機炭素含有率 (%)	2.84	0.44	8.73	3.49	0.07
pH (0.01 mol/L CaCl ₂)	5.6	5.9	4.6	5.8	8.4
陽イオン交換容量 (cmol _c /kg)	22.0	11.2	35.0	31.9	2.3
土壌水分量 (%)	3.3~4.1	1.0~1.5	12.5~16.7	4.0~5.7	0.2~0.4

試験方法：

供試土壌の調整；

供試土壌は全て2mmの篩を通した。

施用液の調製；

目標濃度 6.0 µg/mL/アセトニトリルのフロメトキン施用液を調製し、LSC および HPLC により正確な濃度および放射化学的純度を測定した。

土壌/水比の設定；

各試験土壌について、下記試験容器に土壌および 0.01 mol/L 塩化カルシウム水溶液（土壌水分量を除いた容量）を加え、25°C で 12 時間振とうし、予備平衡化した。この試験系にフロメトキンを初期水相中濃度 0.006 µg/mL となるよう添加し、下記吸着振とう条件下、25°C で 24 時間振とう後、遠心分離機を用い、上澄液画分と土壌画分に分離した。各画分中のフロメトキンの濃度を求め、得られた結果および OECD テストガイドラインに基づき最適な土壌/水比を下記のように設定した。

試験条件；

試験温度：25±0.5°C

平衡化媒体：0.01 mol/L 塩化カルシウム水溶液

試験容器：100 mL 容テフロン製遠沈管

試験濃度：初期水相中濃度 0.006 µg/mL（水溶解度 0.01203 µg/mL の約 1/2）

土壌/水比：青森、埼玉 0.08（4.0 g/50 mL）、福島 0.03（1.5 g/50 mL）、
栃木 0.02（1.0 g/50 mL）、徳島 0.30（6.0 g/20 mL）

遠心分離条件：3119 × g、25°C、60 分間

吸着振とう条件：暗所条件下で振とう

溶解補助剤：アセトニトリル 0.1%以下

吸着平衡化時間の設定；

各試験土壌について、上記の土壌/水比で試験系を調製し、予備平衡化後フロメトキンを試験濃度になるよう添加して 25°C で 3、6、12、18 および 24 時間吸着振とうした。各吸着振とう時間後に上澄液および土壌画分中のフロメトキンの濃度を求め、その経時変化から、吸着平衡状態に達する吸着平衡時間を求めた。また吸着平衡時における土壌吸着パラメーターを算出した。なお、吸着振とう 24 時間の値は、土壌/水比の設定における結果を用いた。

コントロール；

0.01 mol/L 塩化カルシウム水溶液 50 mL にフロメトキンを試験濃度になるよう添加して土壌を含まないコントロール試料を調製し、25°C で 3、6、12、18 および 24 時間振とうした。各振とう時間後に水相中のフロメトキン濃度を測定し、フロメトキンの水相中での安定性および試験容器への吸着性について調査した。

分析法；

上澄液；

液体シンチレーションカウンター（LSC）により放射能を測定した。

上澄液中のフロメトキンの安定性は、上澄液中に HPLC 分析可能な放射能が含まれていなかったため、確認しなかった。

土壌画分；

アセトニトリル/水 (7/3、v/v) で2回抽出・遠心分離後、抽出液を混合し、LSC測定した。さらに土壌をヘキサンで1回抽出・遠心分離後、抽出液をLSC測定した。各抽出液を適宜濃縮、混合後HPLC分析した。土壌抽出残渣は燃焼処理後LSC測定した。

土壌抽出液中のプロメトキンの安定性は、抽出液をHPLC分析に供し、放射性ピークを分離後、全放射性ピークに対するプロメトキンおよび他の成分の分布率を求め、それぞれ残存率および生成率として確認した。

結 果

1) 吸着平衡時間の設定

各土壌における吸着率を表2に示す。

吸着振とう3時間後には吸着率が89~97%に達し、5種土壌の全ての時点において吸着率の変化率が10%を下回ったことから、全土壌において、吸着平衡時間は吸着振とう3時間とした。

表2 各土壌における吸着率

試料	土壌/水比	吸着振とう時間 (hr)	吸着率※ (%)	変化率 (%)
青森土壌 (OECDタイプ3)	0.08	3	96	-
		6	97	0
		12	96	-1
		18	97	2
		24	95	-3
福島 (OECDタイプ5)	0.03	3	93	-
		6	95	2
		12	94	-1
		18	94	0
		24	96	2
栃木 (OECDタイプ4)	0.02	3	89	-
		6	92	3
		12	90	-2
		18	94	4
		24	94	0
埼玉 (OECDタイプ2)	0.08	3	94	-
		6	95	1
		12	94	-1
		18	94	0
		24	95	1
徳島 (OECDタイプ7)	0.30	3	97	-
		6	97	0
		12	95	-2
		18	96	1
		24	95	-1

- : 初発の分析時点のため、計算せず。

※ : 吸着率は放射能としての数値。

2) コントロール試料および物質収支

コントロール試料のプロメトキンの回収率および各土壌における放射能の物質収支をそれぞれ表3および表4に示す。

表3 コントロール試料におけるプロメトキンの回収率

試料	吸着振とう時間 (hr)	回収率 (%)
コントロール試料	3	67
	6	67
	12	66
	18	66
	24	67

表4 各土壌における放射能の物質収支 (%)

試料	吸着振とう時間 (hr)				
	3	6	12	18	24
青森土壌 (OECD タイプ 3)	104	104	103	103	102
福島土壌 (OECD タイプ 5)	98	102	102	104	103
栃木土壌 (OECD タイプ 4)	94	97	96	99	97
埼玉土壌 (OECD タイプ 2)	101	102	100	100	104
徳島土壌 (OECD タイプ 7)	102	105	103	102	101

吸着平衡時 (吸着振とう 3 時間) におけるプロメトキンの回収率 (水相および試験容器抽出液の合計) は 67% であり、試験容器へのプロメトキンの吸着が認められた。しかし、各土壌における放射能の物質収支が 94%~104% と良好であったことから、土壌存在下では試験容器への吸着は無視できると判断した。

3) プロメトキンの安定性

各吸着振とう時間における土壌抽出液およびコントロール試料を HPLC 分析し、放射性ピークの分布率を求めた。プロメトキンの残存率を表5に、の生成率を表6に示す。なお、上澄液画分中に HPLC 分析が可能な放射能が含まれていなかったため、上澄液画分の HPLC による安定性の確認は実施しなかった。

表5 各吸着振とう時間における試料中のプロメトキンの残存率

試料\吸着振とう時間	残存率 (%)				
	3 時間	6 時間	12 時間	18 時間	24 時間
青森土壌抽出液	86	85	62	61	42
福島土壌抽出液	92	92	86	82	78
栃木土壌抽出液	93	93	88	84	77
埼玉土壌抽出液	83	77	60	59	52
徳島土壌抽出液	94	85	81	78	66
コントロール	100	100	100	96	100

表 6 各吸着振とう時間における の生成率

試料\吸着振とう時間	生成率 (%)				
	3 時間	6 時間	12 時間	18 時間	24 時間
青森土壌抽出液					
福島土壌抽出液					
栃木土壌抽出液					
埼玉土壌抽出液					
徳島土壌抽出液					
コントロール					

N.D.: 検出せず 24 時間後は土壌/ 溶液比の設定における試験結果を引用

各吸着振とう時間における土壌抽出液中のプロメトキンの残存率は経時的に減少した(吸着平衡時で 83~94%、吸着振とう 24 時間後では 42~78%)。プロメトキンの分解に伴い、 が生成した(吸着平衡時で 6~17%、吸着振とう 24 時間後では 22~58%)。それ以外の分解物が認められなかったことから、プロメトキンは土壌存在下で経時的に へ分解されることが確認された。

一方、コントロール試料におけるプロメトキンの残存率は 96~100%であった。

4) 吸着等温線の作成による吸着性評価

プロメトキンは速やかに に分解されること、また水溶解度が 0.01203 µg/mL と低く試験指針(OECD テストガイドライン 106)で定められた 5 段階の濃度設定 (0.006 µg/mL 以下の範囲内で 2 桁の範囲を網羅する) が LSC の検出感度上、分析困難であることから、吸着等温線を作成しての吸着性評価は実施しなかった。

5) 土壌吸着パラメータ

吸着平衡時におけるプロメトキンの各種吸着パラメータを表 7 にまとめる。

表 7 各種吸着パラメータ

試験土壌	A (eq)	OC%	K _d (eq)	K _{oc} (eq)
青森	96	2.84	313	11013
福島	93	0.44	460	104569
栃木	89	8.73	415	4751
埼玉	94	3.49	204	5840
徳島	97	0.07	94	134677

※上記吸着パラメータは放射能として算出した数値である。

吸着平衡時における青森、福島、栃木、埼玉および徳島土壌でのプロメトキンの吸着率 (A (eq)) は、それぞれ 96%、93%、89%、94%および 97%であった。吸着平衡時における吸着係数 (K_d(eq)) は、それぞれ 313、460、415、204 および 94 であった。吸着平衡時における有機炭素含有率で補正した吸着係数 (K_{oc} (eq)) は、それぞれ 11013、104569、4751、5840 および 134677 であった。この K_{oc} (eq) 値から、McCall らの化学物質の移動度に関する報告¹⁾に基づきプロメトキンの移動性を分類すると、

「slight (栃木) ~immobile (徳島)」に該当した。

また、有機炭素含有率 (%) とフロメトキンの吸着係数 (K_d (eq)) の間に顕著な相関性は認められなかった。

- 1) P. J. McCall *et al.*: "Measurement of Sorption Coefficients of Organic Chemicals and Their Use in Environmental Fate Analysis", Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants, A.O.A.C. Symposium Proceeding, 94 th annual meeting, Oct.21-22, 1980, pp. 89-106.

(2) ^{14}C -標識 の土壌吸着性試験

(資料 代-12)

試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年:

供試標識化合物: ^{14}C -標識

名称	
構造式および 標識位置	
化学名	
比放射能 放射化学的純度	

供試土壌: 使用した 5 種類の土壌の採取場所とその特性を表 1 に示す。

表 1 試験土壌の特性

供試土壌	青森土壌	福島土壌	栃木土壌 (火山灰土壌)	埼玉土壌	徳島土壌
土壌の種類 (OECD 分類)	3	5	4	2	7
採取場所					
土性 (USDA)	SL: 砂壤土	L: 壤土	SiL: シルト 質壤土	SiC: シルト 質埴土	S: 砂土
粘土含有率 (%)	12.9	17.2	19.0	46.6	3.5
有機炭素含有率 (%)	2.84	0.44	8.73	3.49	0.07
pH (0.01 mol/L CaCl_2)	5.6	5.9	4.6	5.8	8.4
陽イオン交換容量 (cmol_c/kg)	22.0	11.2	35.0	31.9	2.3
土壌水分量 (%)	3.4	1.1	10.6	3.7	0.2

試験方法:

供試土壌の調製;

供試土壌は全て 2 mm の篩を通した。

施用液の調製;

目標濃度 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ /メタノールの 施用液を調製し、LSC および HPLC により正確な濃度および放射化学的純度を測定した。吸着/脱着等温線作成用試験では 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 濃度の施用液を適宜希釈して施用液を作成し、LSC により正確な濃度を測定した。

土壌/水比の設定；

栃木土壌および徳島土壌（有機物含量が最高と最低の土壌）を用いて予備検討を行った。その結果、OECD テストガイドラインで示された 50%以上の吸着率を達成することは容易であったが、土壌への吸着性が非常に高いことが明らかとなった。そのため、十分な水相中濃度を得るため、土壌/水比は実験的に可能な限り低く設定する必要があった。実験に用いる試験容器の大きさを考慮し、各試験土壌の土壌/水比を 0.025 (0.5 g/ 20 mL) に設定した。

試験条件；

試験温度：25±2°C

平衡化媒体：0.01 mol/L 塩化カルシウム水溶液

試験容器：25 mL 容ガラス製遠沈管（テフロンコーティングパッキンネジ蓋付き）

予備平衡化時間：12 時間

試験濃度：初期水相中濃度 0.005 µg/mL（水溶解度 0.0119 mg/L の 1/2 以下）

等温線作成の濃度は 0.005 µg/mL 以下の 5 段階濃度

土壌/水比 (w/v)：青森、福島、栃木、埼玉、徳島 0.025 (0.5 g/ 20 mL)

遠心分離条件：3948 × g、25°C、20 分間

吸着振とう条件：暗所条件下で振とう

予備実験；上記試験条件で 5 種土壌について実施し、振とう中の重量損失、pH 変動、物質収支、安定性について調査した。

コントロール；

は土壌懸濁液中において加水分解的に安定であることから、実施しなかった。

ブランク；

放射性被験物質を処理するため、実施しなかった。

物質収支；

予備実験において、24 時間の吸着平衡化時間における各試験土壌の物質収支（上澄液、土壌抽出液および土壌抽出残渣中の放射能回収率の合計）は 95.4～100.2%であった。結果を表 2 に示す。表 2 に示す通り、水相中の総放射能のほとんどがであり、安定であったことから、本試験では水相中の放射能を定量し、土壌中のキネティクスを評価した。

表 2 各土壌における物質収支

	物質収支	水相	
		総放射能	
青森	96.23	9.87	
福島	100.19	15.54	
徳島	95.44	38.00	
栃木	96.80	7.37	
埼玉	95.70	6.28	

単位：%

吸着平衡化時間の設定；

各試験土壌について、上記の土壌/水比で試験系を調製し、予備平衡化後を試験濃度になるよう添加して 25°C で 2、4、8、24 および 48 時間吸着振とうした。各吸着振とう時間後に水相中の放射能の濃度を測定し、その経時変化から吸着平衡状態に達する吸着平衡時間を求めた。また、吸着平衡時における土壌吸着パラメータを算出した。得られた吸着係数 (K_d) に土/水比 (R) を乗じ、その値から吸着等温線の作成が可能か否かについて判断した。

吸着等温線の作成（福島および徳島土壌）；

5 段階の施用初期濃度（徳島土壌：0.005、0.0025、0.0005、0.00025 および 0.00005 µg/mL、福島土壌：0.005、0.0025、0.001、0.0005 および 0.00025 µg/mL）を設定し、吸着平

衡時間（福島 24 時間、徳島 4 時間）振とう後の水相中の放射能濃度を測定し、吸着等温線を作成した。

また、Freundlich の吸着等温式から各種パラメータを求めた。

脱着キネティックスの測定および脱着パラメータの算出（徳島土壌および福島土壌）；
吸着キネティックス測定時と同様に試験系を調製し、吸着平衡時間（24 時間）振とう後、遠心分離、分取した上澄液画分と同量の 0.01 mol/L 塩化カルシウム水溶液を土壌画分に加え、2、4、8、24 および 48 時間脱着振とうした。各脱着振とう時間後に水相中の放射能の濃度を測定し、その経時変化から脱着平衡時間および脱着平衡時における脱着パラメータを算出した。

脱着等温線の作成（福島および徳島土壌）；

吸着等温線作成と同様に試験系を調製し、吸着平衡時間（24 時間）振とう後、遠心分離、分取した上澄液画分と同量の 0.01 mol/L 塩化カルシウム水溶液を土壌画分に加え、脱着振とうし、脱着平衡時（福島 4 時間、徳島 24 時間）の水相中の放射能濃度を測定し、脱着等温線を作成した。

また、Freundlich の吸着等温式から各種パラメータを求めた。

分析法：

上澄液；

上澄液は Empore™ C18 Extraction disk へ保持させ、メタノールで溶出し、液体シンチレーションカウンター（LSC）により放射能を測定した。

土壌画分（予備実験でのみ測定）；

メタノールで 2 回抽出後、抽出液を合し、濃縮後一部を TLC 分析した。抽出液中の放射能は、残存濃縮液の LSC 結果と TLC 分析結果を合計して求めた。土壌抽出残渣は燃焼処理後 LSC 測定した。

結 果

1) 吸着平衡時間の設定

① 吸着率

各土壌における上澄液画分中の の吸着率の経時変化を図 1 に示す。

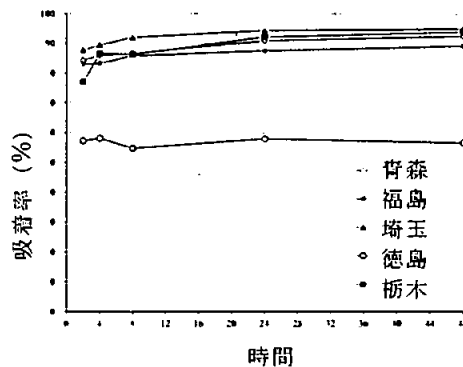


図1 上澄液画分中の の吸着率の経時変化

いずれの土壌においても吸着振とう4時間で吸着率の変化が10%を下回ったが、4時間以降も吸着率の上昇が認められたため、吸着平衡時間を48時間とした。

② 吸着パラメータ（吸着平衡時；48時間）

吸着平衡時における の各種吸着パラメータを表3に示す。

表 3 試験土壌における吸着パラメータ

項目	試験土壌				
	青森	福島	徳島	栃木	埼玉
%OC	2.84	0.44	0.07	8.73	3.49
A (eq) (%)	92.4	89.1	56.5	93.8	94.8
K_d	486.0	327.1	52.0	608.3	735.4
K_{oc}	17111.3	74333.6	74214.6	6967.6	21071.5
$K_d \times R$	12.1	8.2	1.3	15.2	18.4

R : 土壌/水比 (0.5 g/20 mL)

吸着平衡時における の吸着率 A(eq) は、福島 (89.1%) および徳島土壌 (56.5%) を除き 90%を超えていた。吸着係数 (K_d) は 52.0 (徳島) ~735 (埼玉) であった。土壌有機炭素含有率で補正した吸着係数 (K_{oc}) は、6968 (栃木) ~74334 (福島) であった。 の土壌中での移動度を、McCall らの化学物質の移動度に関する報告¹⁾に基づき分類すると、すべて「immobile」に該当し、 の土壌中での移行性は極めて小さいと推定された。

$K_d \times R$ の結果 (0.3~10 の範囲内) から、福島および徳島土壌について、吸着等温線の作成、脱着キネティックスの測定および脱着等温線の作成を行った。

2) 被験物質の吸着性と土壌特性値との相関性

各種土壌特性値と吸着係数 (K_d) の相関性を解析した結果を表 4 に示す。

表 4 各種土壌特性値と吸着係数 (K_d) の相関性

試験土壌	K_d	粘土含有率 (%)	有機炭素含有率 * (%)	pH (0.01 mol/L CaCl ₂)	陽イオン交換容量 (cmol _c /kg)
青森土壌	486.0	12.9	2.84	5.6	22.0
福島土壌	327.1	17.2	0.44	5.9	11.2
栃木土壌	608.3	19.0	8.73	4.6	35.0
埼玉土壌	735.4	46.6	3.49	5.8	31.9
徳島土壌	52.0	3.5	0.07	8.4	2.3
	$r^2 =$	0.6794	0.4716	0.6844	0.9161
	a =	13.556	52.451	-155.913	18.402
	b =	172.786	278.396	1386.560	64.847

* : 栃木を除く 4 土壌での r^2 は 0.8552

有機炭素含有率 (%) と K_d 値の相関係数 (r^2) は全土壌では 0.4716、栃木を除く 4 土壌では 0.8552 であった。従って、栃木土壌の土壌有機炭素は他土壌と質的に異なる可能性が示された。その他に K_d 値と相関性を示した土壌特性は粘土含有率 (%), pH および陽イオン交換容量 (CEC) であった。

3) Freundlich の吸着等温線

福島および徳島土壌における Freundlich の吸着等温線を図 2 および 3 にそれぞれ示す。また得られたパラメータを表 5 にまとめる。

相関係数は両土壌において >0.99 であり、吸着等温式 $1/n$ は 1.023 (福島) および 1.066 (徳島)、吸着係数 K_F^{ads} は 332.3 (福島) および 74.5 (徳島)、有機炭素含有率で補正した吸着係数 ($K_F^{ads}_{oc}$) は 75526 (福島) および 106459 (徳島) であった。

表 5 吸着等温線より得られた吸着パラメータ

試験土壌	1/n	K_{ads}^{ads}	r^2	%OC	$K_{ads}^{ads}_{FOC}$
福島土壌	1.023	332.3	0.9995	0.44	75525.6
徳島土壌	1.066	74.5	0.9970	0.07	106458.5

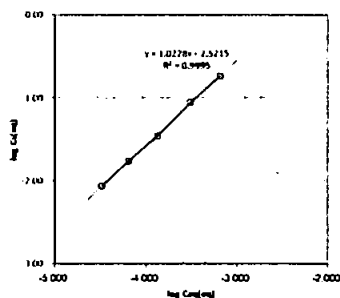


図 2 福島土壌における Freundlich の吸着等温線

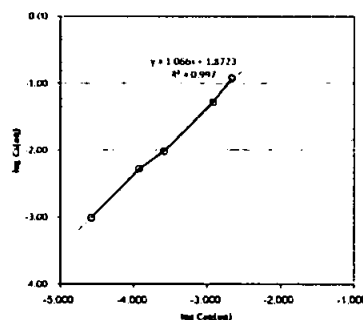


図 3 徳島土壌における Freundlich の吸着等温線

4) 脱着キネティクス

① 脱着平衡時間

福島および徳島土壌における水相中の の吸着率の経時変化を図 4 に示す。

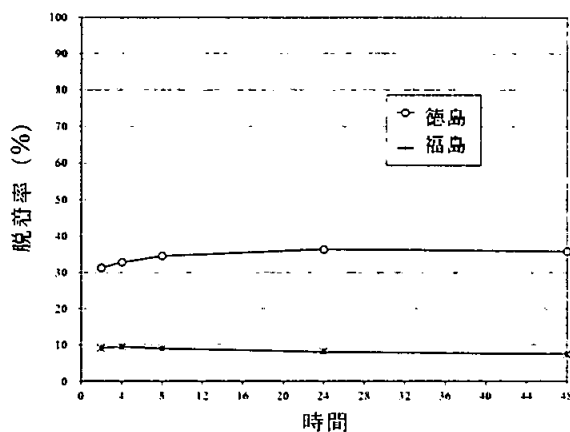


図 4 の脱着キネティクス

脱着率は徳島および福島土壌で、それぞれ 8 および 2 時間以降は平衡状態であると判断され、脱着平衡時間を徳島土壌では 24 時間、福島土壌では 4 時間とした。

② 脱着パラメータ

福島および徳島土壌における脱着平衡時における の脱着パラメータを表 6 に示す。

表 6 脱着パラメータ

試験土壌	脱着平衡時間	D(eq) (%)	$m_s(eq)$ (μ g)	$m_m^{des}(eq)$ (μ g)	$m_{aq}^{des}(eq)$ (μ g)	V_T (mL)	K_{des}
福島土壌	4	9.5	0.0908	0.0086	0.0086	39.4	757.4
徳島土壌	24	36.4	0.0587	0.0213	0.0211	39.5	141.1

脱着係数 K_{des} は、福島土壌で 757.4、徳島土壌で 141.1 であった。脱着平衡時（福島土壌：4 時間、徳島土壌：24 時間）における脱着率 $D(eq)$ は福島土壌では 9.5%、徳島土壌では 36.4% であり、 $\log C_{eq}$ の土壌への吸着は可逆的ではないと判定された。

5) Freundlich の脱着等温線

福島および徳島土壌における Freundlich の脱着等温線を図 5 および 6 にそれぞれ示す。また得られたパラメータを表 7 にまとめる。

相関係数は両土壌において >0.99 であり、脱着等温式 $1/n$ は 0.999 (福島) および 1.157 (徳島) であった。Freundlich の脱着係数 K_F^{des} はそれぞれ 368.1 (福島) および 222.5 (徳島) であった。

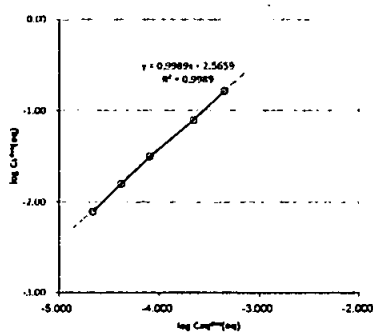


図 5 福島土壌における Freundlich の脱着等温線

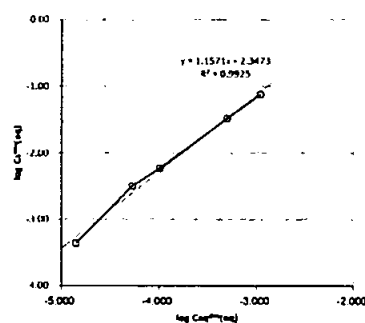


図 6 徳島土壌における Freundlich の脱着等温線

表 7 脱着等温線より得られた脱着パラメータ

試験土壌	$1/n$	K_F^{des}	r^2
福島土壌	0.999	368.1	0.9989
徳島土壌	1.157	222.5	0.9925

参考文献

- 1) P. J. McCall *et al.*: "Measurement of Sorption Coefficients of Organic Chemicals and Their Use in Environmental Fate Analysis", Test Protocols for Environmental Fate and Movement of Toxicants, A.O.A.C. Symposium Proceeding, 94 th annual meeting, Oct.21-22, 1980, pp. 89-106.

6. 生物濃縮性に関する試験

(資料 代-13)

(1) フロメトキンの生物濃縮性試験

試験機関：

[GLP 対応]

報告書作成年

被験物質：フロメトキン原体（純度 %）

供試生物：コイ（学名 *Cyprinus carpio*）、一群各 60 匹

全長：6.8～8.1 cm (7.48±0.38 cm)

体重：4.6～6.1 g (5.09±0.45 g)

方 法：

暴露条件；流水式（試験液流量 約 1000 L/日/試験区）

試験期間；28 日間（取込期間として）

試験濃度区；0.00020 及び 0.0020 mg/L（有効成分濃度）区〔助剤としてアセトン/ポリオキシエチレン（10）硬化ヒマシ油=8/2 溶液 0.1 ml/L を含む〕、無処理対照区

試験液の調製方法；被験物質を 104.6 mg 秤量してアセトン/ポリオキシエチレン（10）硬化ヒマシ油=8/2 溶液（以下、助剤溶液という）で 100 mL に定容し、1000 mg/L（有効成分濃度）溶液を調製した。この 1000 mg/L 溶液 10 mL を助剤溶液で 500 mL に定容して 20 mg/L 試験原液を、1000 mg/L 溶液 1 mL を助剤溶液で 500 mL に定容して 2.0 mg/L の試験原液を調製した。

各試験原液と希釈水とを約 1：10000 となるように混合させて攪拌し、試験水槽に流入させたものを試験液（0.00020 及び 0.0020 mg/L）とした。

無処理対照区は希釈水のみを試験水槽に流入させたものを試験液とした。

環境条件；試験には 100 L 容ガラス製水槽（60×45×45 cm）を用い、試験液中の被験物質濃度を安定させるため、暴露開始前 3 日より各試験液を調製した。約 100 mL/分の緩やかな曝気を連続して実施した。また、供試魚体重の 1～2% 量を給餌した（サンプリングによる魚数減少に伴い、給餌量を調節）。

照明； 16 時間明期/8 時間暗期

試験水温；21.7～22.8℃

試験水 pH；7.5～7.8

溶存酸素濃度；6.3～8.3 mg/L

観察及び測定；取込期間中、毎日、供試個体の生死及び症状（異常個体の有無）を観察した。

試験液中の被験物質及び の測定；暴露開始前 2 及び 1 日、取込期間 0、1、3、5、7、9、11、14、18、23 及び 28 日に、試験液を採取し、採取した試料 40 mL に塩化ナトリウム 10 g 及びジクロロメタン 20 mL を加えて 5 分間振とうし、ジクロロメタン層を分取した。水層にジクロロメタン 20 mL を加えて 5 分間振とうし、ジクロロメタン層を分取して先のジクロロメタン層に合わせ、抽出液とした。抽出液に無水硫酸ナトリウムを加えて脱水し、あらかじめアセトンで洗浄した

定性ろ紙を用いて無水硫酸ナトリウムをろ過した。抽出液を 40℃以下で減圧濃縮して窒素気流下で溶媒を留去し、残留物に一定量のアセトニトリルを加えて溶解し、シリンジフィルターでろ過して測定液とした。高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いて、試験液中の被験物質及び (代謝物) 濃度を各 2 連で測定した。

魚体中の被験物質及び の測定；取込期間 0、1、3、5、7、9、11、18 及び 28 日に、魚体を 4 尾採取し、採取した試料の重量を測定し、細断してアセトニトリル 25 mL を加えた。これを 1 分間ホモジナイズし、ハイフロースーパーセルでろ過した。残渣にアセトニトリル 25 mL を加えて 1 分間ホモジナイズし、ハイフロースーパーセルでろ過した。ろ液を合わせて有栓メスシリンダーに採り、アセトニトリルで 90 mL に定容してその 30 mL(試料重量の 1/3 相当、試料重量として 1 g 以上に相当)を分取した。抽出液を 40℃以下で減圧濃縮し、窒素気流下で溶媒を留去した。残留物に酢酸エチル及び n-ヘキサン(1/20)混液 4 mL を加え、超音波により溶解した。シリカゲルミニカラムを酢酸エチル 10 mL、次いで n-ヘキサン 10 mL で洗浄し、先の溶解液を注入して溶出液を捨てた。n-ヘキサン 4 mL、次いで酢酸エチル及び n-ヘキサン(1/20)混液 10 mL を注入して溶出液を捨てた。次に酢酸エチル及び n-ヘキサン(3/1)混液 20 mL を注入して溶出液を採取した。この溶出液を 40℃以下で減圧濃縮して窒素気流下で溶媒を留去し、残留物を所定量のアセトニトリルに溶解し、シリンジフィルターでろ過して測定液とした。高速液体クロマトグラフタンデム型質量分析計を用いて、魚体中の被験物質及び 濃度を測定した。

魚体中の脂質含量の測定；取込期間 0、1、3、5、7、9、11、18 及び 28 日に、クロロホルム/メタノール抽出法を用いて、魚体中の脂質含量を測定した。

結 果：

(1) 魚体中の被験物質及び 濃度 (mg/kg)

試験区 (mg/L)	取込期間 (日)								
	0	1	3	5	7	9	11	18	28
被験物質 (フロメトキン)									
対照区	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
0.00020	—	<0.0005	<0.0005	0.0010	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005	<0.0005
0.0020	—	0.0013	0.0029	0.0025	0.0009	0.0012	0.0007	0.0008	0.0006

定量限界：0.0005 mg/kg

—：測定せず

魚体中の被験物質濃度は、0.00020 mg/L 区では 0.0005 mg/kg 未満～0.0010 mg/kg の範囲で推移し、取込期間 5 日に最大濃度 0.0010 mg/kg を検出した以外は全て定量下限未満 (0.0005 mg/kg 未満) であった。0.0020 mg/L 区では 0.0006～0.0029 mg/kg の範囲で推移し、取込期間 3 日に最大濃度 0.0029 mg/kg を検出した。

(2) 試験液中の被験物質及び 濃度 (mg/L)

試験区 (mg/L)	取込期間 (日)						
	-2	-1	0	1	3	5	7
被験物質 (フロメトキン)							
対照区	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001
0.00020	0.00018	0.00018	0.00020	0.00018	0.00019	0.00017	0.00015
0.0020	0.0020	0.0020	0.0020	0.0018	0.0018	0.0018	0.0018

試験区 (mg/L)	取込期間 (日)						平均
	9	11	14	18	23	28	
被験物質 (フロメトキン)							
対照区	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001	<0.00001
0.00020	0.00016	0.00017	0.00021	0.00018	0.00020	0.00020	0.00018
0.0020	0.0019	0.0017	0.0020	0.0020	0.0020	0.0020	0.0019

定量限界 : 0.00001 mg/L

試験液中の被験物質濃度は、0.00020 mg/L 区では平均 0.00018 mg/L (濃度範囲 0.00015～0.00021 mg/L)、0.0020 mg/L 区では平均 0.0019 mg/L (濃度範囲 0.0017～0.0020 mg/L) であった。

(3) 濃縮係数

0.00020 mg/L 区及び 0.0020 mg/L 区共に濃縮倍率の変動は 20%以上で有り、定常状態及び BCF_{SS} は求められなかった。これは、0.00020 mg/L 区では魚体中のフロメトキン濃度が定量限界未満であったため、0.0020 mg/L 区では魚体中のフロメトキン濃度に個体差が認められたためと考えた。この要因としてはフロメトキンが魚体中に取り込まれた後に代謝物 に分解したためと推測された

取込期間において最大となる濃縮倍率を以下に示す。

試験区 (mg/L)	最大魚体中濃度 (mg/kg)	試験液中濃度 (mg/L)	最大濃縮倍率
0.00020	0.0010	0.000185 *	5.4
0.0020	0.0029	0.00187 **	1.6

* 取込期間 0 日から取込期間 5 日までの試験液中の被験物質濃度の平均

** 取込期間 0 日から取込期間 3 日までの試験液中の被験物質濃度の平均

各測定時における濃縮倍率

試験区 (mg/L)	取込期間 (日)								平均
	1	3	5	7	9	11	18	28	
0.00020	<2.7	<2.7	5.4	<2.9	<2.9	<2.9	<2.8	<2.8	(<2.7~5.4)
0.0020	0.68	1.6	1.4	0.49	0.65	0.38	0.43	0.32	0.74

この結果から、フロメトキンの濃縮倍率は、0.00020 mg/L 区では最大で 5.4、0.0020 mg/L 区では最大で 1.6 となることが推測された。

(4) 観察

全ての試験区において、取込期間中の死亡及び異常症状は観察されなかった。

(5) 脂質含量

各測定時における脂肪含量

試験区 (mg/L)	取込期間 (日)									平均± 標準偏差
	0	1	3	5	7	9	11	18	28	
対照区	2.5	2.0	1.5	1.7	1.6	1.4	1.6	1.4	1.9	1.7±0.4
0.00020	—	2.2	1.3	2.5	1.9	2.5	1.5	1.5	1.6	1.9±0.5
0.0020	—	2.1	1.9	1.6	1.3	1.4	1.9	1.4	1.9	1.7±0.3

— : 測定せず

取込期間における脂質含量は、0.00020 mg/L 区で平均 1.9±0.5%、0.0020 mg/L 区で平均 1.7±0.3%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Meiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

(2) の生物濃縮性試験

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

(3

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

代謝分解のまとめ

フロメトキン及びフロメトキンをを用いて実施した動物、植物、土壌及び水中における代謝、分解及び残留の概要は以下の通りであり、想定代謝・分解経路及び結果の概要を以降の項に示した。

動物（資料番号：代-1、2）

2 mg/kg、20 mg/kg の単回経口投与による雌雄ラットにおける動物代謝試験を行った。

フロメトキンを投与した排泄実験では、フロメトキンは投与後 168 時間までにほとんどが排泄された。性・用量に関わらず、尿及び糞への排泄率はそれぞれ約 6～8%AD 及び 89～91%AD であり、主排泄経路は糞中排泄であった。投与 168 時間後における消化管（含内容物）及びカーカスの残留量はそれぞれ投与量の 0.2～0.3%及び 1.2～1.8%AD であった。尿及び糞中においていずれかの試験群で投与量の 5%を超えて検出された主代謝物は、

その他のマイナ

が検出された。また、構造の決定に至らなかった代謝物として、及びが検出された。糞中ではフロメトキンは 1.5%AD 以下で検出され、また、その他の代謝物は個々には 2.8%AD 以下であった。尿中にはフロメトキンは検出されず、その他の代謝物は 1%AD 以下であった。

胆汁排泄実験では、投与したフロメトキンは投与後 48 時間までに速やかに排泄され、胆汁中への排泄率は、2 mg/kg 群では約 36～39%AD、20 mg/kg 投与群では約 20%AD であった。胆汁、尿及びカーカス中放射能の合計として求めた投与後 48 時間までの吸収率は 2 mg/kg 投与群で約 50～54%AD、20 mg/kg 投与群で約 30%AD と算出され、吸収されたフロメトキンの大部分は胆汁を経由して排泄されることが示された。胆汁中において、性・用量に関わらず投与量の 5%を超えて検出された主代謝物は、のみであった。当該代謝物には抱合部位が異なる異性体も確認された、また、フロメトキンは検出されなかった。

血中動態試験では、血漿中の薬物動態パラメータは、以下の通りであった。

用量	性	T _{max} (時間)	C _{max} (µg eq/g)	AUC _{0-last} (µg eq/g.h)	半減期 (時間)	分布容積 (g/kg)
2 mg/kg	雄	8	0.659	18.55	14.8	2264.4
	雌	4	0.866	24.79	15.9	1816.1
20 mg/kg	雄	24	10.97	412.1	15.1	1031.8
	雌	36	9.83	523.7	16.2	856.9

低用量と高用量の AUC 比は、10 倍の用量増加に対して、正比例より大きく増加した（血

漿：21.1～22.2 倍)。

組織分布試験において、組織及びカーカス中放射能の投与量に対する回収率(%AD)は、以下の通りであった。

	2 mg/kg		20 mg/kg	
	雄	雌	雄	雌
8 時間後	67.68%	68.07%	—	—
24 時間後	—	—	64.35%	69.01%
48 時間後	10.14%	12.48%	—	—
72 時間後	—	—	8.93%	10.88%
168 時間後	1.03%	0.98%	1.73%	1.59%

—：試料なし

低用量では、全組織中の最大濃度は投与後 8 時間 (T_{max}) に見られた。 T_{max} 時点で濃度が高かった組織は、GI 管及び内容物、肝臓、腎臓、心臓、副腎及び血漿であった。168 時間後までに肝臓を除く全組織で 0.08 $\mu\text{g}\cdot\text{eq}/\text{g}$ 未満となった。組織及びカーカス中放射能の投与量に対する回収率(%AD)は、以下の通りであった。投与 8 時間後及び 48 時間後で、%AD が高かった組織は、GI 管及び内容物、肝臓ならびにカーカスであった。

高用量では、全組織中の最大濃度は投与 24 時間後 (T_{max}) にみられた。 T_{max} 時点で濃度が高かった組織は GI 管及び内容物、肝臓、腎臓、副腎及び血漿であった。168 時間後までに肝臓を除く全組織で 0.60 $\mu\text{g}\cdot\text{eq}/\text{g}$ 未満となった。投与 24 時間後及び 72 時間後で、%AD が高かった組織は、GI 管及び内容物、肝臓並びにカーカスであった。

なお、別途実施したフロメトキン及びフロメトキンを用いた予備試験において、呼気中から顕著な量 (1%AD レベル) の放射能が検出されなかったため、本試験では呼気の捕集は実施しなかった。

植物 (資料番号：代-3、4、5)

トマト、キャベツ及びオレンジを用いて実用処理濃度で散布試験を行って実施した。

フロメトキンを用いたトマト試験では、トマト果実に最終散布 7 日後、14 日後でそれぞれ 0.49 ppm 及び 0.46 ppm の TRR レベルが認められた。最終散布 14 日後の試料では、抽出残渣に 0.12 ppm (TRR の 26%) が存在した。最終散布 7 日後、14 日後のトマト果実では、それぞれフロメトキンが 0.196 ppm (TRR の 40.1%) 及び 0.153 ppm (TRR の 33.5%) 検出され、主代謝物として 検出された。その他、マイナーな代謝物として が最終散布 14 日後試料においてそれぞれ 及び 検出された。また、薬においてはフロメトキン、

がそれぞれ 検出された。
フロメトキン及びフロメトキンを用いたキャベツ試験では、キャベツ全体

において最終散布 7 日後で 1.92 ppm、14 日後で 1.06 ppm 及び 1.56 ppm の TRR レベルが認められた。その内、外葉部では、0.094 ~0.130 ppm (TRR の 6.0~10.4%) が、結球部では、0.033 ~0.122 ppm (TRR の 1.7~7.8%) が抽出残渣に存在した。最終散布 7 日後においては、フロメトキンが最も多く、表面洗浄液、外葉部、結球部にそれぞれ 0.877 ppm (TRR の 45.7%)、0.172 ppm (TRR の 9.0%) 及び 0.215 ppm (TRR の 11.2%) 検出された。最終散布 14 日後においてもフロメトキンが最も多く、では表面洗浄液、外葉部、結球部にそれぞれ 0.204 ppm (19.2%)、0.123 ppm (11.5%) 及び 0.162 ppm (15.3%) 検出され、ではそれぞれ 0.243 ppm (15.5%)、0.077 ppm (4.9%) 及び 0.498 ppm (31.8%) 検出された。主代謝物は であり、最終散布 14 日後においてでは表面洗浄液、外葉部、結球部にそれぞれ 及び 検出され、ではそれぞれ 及び 検出された。その他のマイナー代謝物として、 がキャベツ全体としてそれぞれ最大で 検出された。

フロメトキンを用いたオレンジ試験では、オレンジにおける TRR は最終散布 14 日後及び 42 日後の果実でそれぞれ 0.576 及び 0.655 ppm であり、その大部分が表面洗浄液 (14 日後: 0.361 ppm (62.7%)、42 日後: 0.315 ppm (48.1%)) 及び果皮 (14 日後: 0.200 ppm (34.7%)、42 日後: 0.320 ppm (48.8%)) に認められ、果肉及び果汁における TRR は極めて低レベル (0.012 ppm (1.8%) 以下) であった。表面洗浄液における TRR の大部分はフロメトキン (0.271~0.319 ppm、41.3~55.3%) であった。最終散布 14 日後の果皮においては、フロメトキンが 0.072 ppm (12.5%)、主代謝物として 検出された。最終散布 42 日後の果皮においては、フロメトキンが 0.044 ppm (6.7%)、主代謝物として 検出された。その他のマイナー代謝物として、 が最終散布 42 日後の果皮試料においてそれぞれ 検出された。

土壌 (資料番号: 代-7)

好氣的条件下において フロメトキンを 0.35 mg/kg の濃度で処理して試験を実施した。その結果、フロメトキンの DT_{50} は 2.3 日、 DT_{90} は 36.2 日であり、 を生成して速やかに分解した。 の DT_{50} は、 DT_{90} は 日であった。168 日後の CO_2 への無機化率は 4.0%AR、抽出性放射能は 84.2%AR、抽出残渣中の放射能は 13.0%であった。フロメトキンは 168 日後には 3.6%まで減少した。主代謝物として が処理 28 日後に最大 検出され、168 日後には 66.3%まで減少した。その他の代謝物として、 及び がそれぞれ最大 検出された。

水中 (資料番号: 代-9、10)

加水分解動態試験を、フロメトキンを 5.0 ng/mL となるように pH 4、7 及び 9 の緩衝液に添加し、10、25 及び 50°C で最大 30 日間インキュベートして実施した。25°C でのフロメトキンの半減期は、pH4、7 及び 9 において、それぞれ 2.5 日、10.8 日及び 2.1 日と算出され、代謝物は のみであった。

また、水中光分解動態試験を、フロメトキンまたはフロメトキンを 5.0 ng/mL となるように pH 7 の緩衝液及び河川水に添加し、25°C で 47.46 W/m² (300-400 nm) のキセノン光を最大 15 日間連続照射して実施した。東京の春の太陽光照射下に換算したフロメトキンの自然条件下での半減期は、以下の通りであった。

	フロメトキン		フロメトキン	
	緩衝液	河川水	緩衝液	河川水
加水分解補正あり	2.7 日	4.9 日	6.1 日	12 日
加水分解補正なし	2.2 日	2.3 日	3.4 日	3.1 日

主代謝物として、フロメトキン処理の河川水において、
 が検出された。一方、フロメトキン処理では、
 が検出された。pH 7 の緩衝液でも同様であった。
 二酸化炭素も河川水において 26.9% (フロメトキン) 及び 37.6% (フロメトキン) が、pH 7 緩衝液では 19.3% (フロメトキン) 及び 29.2% (フロメトキン) が生成した。以上の結果より、加水分解及び水中光分解はフロメトキンの分解の一因となり、環境からのフロメトキンの消失経路の一つであると推定される。

土壌吸着 (資料番号: 代-11、12)

① フロメトキン

土壌吸着性試験では、日本の 5 種類の土壌 (砂土 (徳島)、壤土 (福島)、砂壤土 (青森)、シルト質埴土 (埼玉)、シルト質壤土 (栃木)) を用いて試験を行った。フロメトキンの分解が早いこと、及び水溶解度が低い (0.012 µg/mL) ことから、フロイントリッヒの吸着等温線の作成は困難であったため、吸着平衡時のパラメーターを求めたところ、Koc は 4751~134677 であった。McCall らの化学物質の移動に関する報告に基づく分類によると、「slight (栃木) ~immobile (徳島)」に該当した。

②

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

想定される代謝・分解経路は以下の通りである。

本資料に記載された に関する権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び「 薬株式会社にある。

代謝分解の概要 (1) 代謝分解の比較

代謝分解の概要 (2) 植物代謝

本資料に記載された に関する権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び「 薬株式会社にある。

代謝分解の概要 (3) 土壌中動態

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

代謝分解の概要(4) 水中動態 (加水分解)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はMeiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

代謝分解の概要 (5) 水中動態 (光分解)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は Meiji Seika ファルマ株式会社及び日本化薬株式会社にある。

フロメトキンの開発年表