

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

2. 植物体内運命に関する試験

(資料 代-9)

[¹⁴C] 標識ピラクロニルを用いた水稻における代謝試験

試験機関：残留農薬研究所

[GLP対応]

報告書作成年：2004年

供試標識化合物：次表の2種類の標識化合物を使用した。

化学名及び名称	1-(3-chloro-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-5-[methyl(prop-2-ynyl)amino]pyrazole-4-carbonitrile (IUPAC)	
	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル	[P- ¹⁴ C] ピラクロニル
化学構造式及び標識部位 (*で表示)		
比放射活性		
放射化学的純度		
略 称	PP環標識体	P環標識体

標識位置の設定理由：

。

供試作物：イネ（品種：コシヒカリ、*Oryza sativa* L.）

水稻試料の調製：

イネ 幼 苗；育苗箱栽培状態のイネ幼苗（約2.5葉期）を財団法人 日本植物調節剤研究協会 研究所より入手

栽培用土壌；埼玉県農林総合研究センターの水田圃場より採取した新鮮な水田土壌

土壌の物理化学特性：分析結果を次表に示す。

測定項目	測定値
土性 (国際法)	CL
粒径組成 (wt%)	11.7 (粗砂)、34.6 (細砂)、29.2 (シルト)、24.5 (粘土)
pH	pH (H ₂ O) 5.5、pH (KCl) 4.3、pH (CaCl ₂) 4.9
有機炭素含量 (%)	0.86
陽イオン交換容量 (cmol _c /kg)	11.3

栽培用土壌ポットの調製：ポットを2種類の標識体用として2群に分け、隔離されたファイトトロンに移し、汲み置きした飲用水（殺菌井戸水）を水深約3 cmとなるように添加後、静置した。

処 理 区；1/2000 aの16個のワグネルポットに約12 kg（乾土重約10 kg）の土壌を充填（土壌の厚さは約18 cm）

非処理対照区；1/5000 aの2個のワグネルポットに約3.5 kg（乾土重約3 kg）の土壌を充填（土壌の厚さは約15 cm）

肥 料；市販の化成肥料（N:P:K=8:8:8）を約500 kg/ha の割合で添加

移植及び馴化：入手イネ幼苗の付着した育苗箱の土壌を水洗後、ポットに移植した。

移 植 日；2003年5月26日（約2.5葉期、入手日当日）

移植本数；処理区用ポットは、5 個体／ポット

非処理区用ポットは、2 個体／ポット

馴化期間；10日（処理日まで）

栽培条件：水稻の慣行栽培期の東京地方における気象条件を模してファイトトロンの温湿度条件を以下のように設定した。なお、実測温度は概ね設定値±2℃、実測相対湿度は概ね設定値±20%であった。

温 度；22.6～31.1℃（午前6時～午後6時：月間平均温度+4℃に設定）

15.6～24.1℃（午後6時～午前6時：月間平均温度-3℃に設定）

相対湿度；66～76%

光 源；自然太陽光

栽培管理：汲み置きした飲用水（殺菌井戸水）を適宜補給し、田面水の水深約3 cmを落水日（登熟期）まで維持した。病虫害防除のための薬剤は使用しなかった。

落 水 日；2003年8月27日（収穫の約1ヵ月前）、その後は畑条件

収 穫 日；2003年9月26日

追 肥；登熟期採取用の水稻には、「N:P:K=8:8:8」を1回（6月13日）、「N:K:P:Mg=10:10:10:1」を2回（7月2日、30日）施用した。中間期採取用水稻には、「N:P:K=8:8:8」を1回（6月13日）、「N:K:P:Mg=10:10:10:1」を1回（7月2日）施用した。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

方法：試験設計の概要を次表に示す。

処理標識体	採取時期	試験区	ポット数	採取試料
[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル	中間期	処理区	2	茎葉部
	登熟期 (収穫期)	処理区	6	玄米、籾殻、稲わら、根部
		非処理対照区	1	玄米、籾殻、稲わら、根部
[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	中間期	処理区	2	茎葉部
	登熟期 (収穫期)	処理区	6	玄米、籾殻、稲わら、根部
		非処理対照区	1	玄米、籾殻、稲わら、根部

施用量とその根拠：

目標施用量；200 g a.i./ha

根 拠；予定慣行施用量（2%粒剤を10 kg/ha）に相当

施 用 量；1.0 mg a.i. /ポット

施用用製剤溶液調製：

調 製 日；2003年6月5日（施用当日）

調 製 法；[PP-¹⁴C] ピラクロニルまたは [P-¹⁴C] ピラクロニル標品の保存溶液の一定量を分取し、溶媒を乾固後、少量のアセトン（製剤白試料392 mg当たり100 μL）に溶解し、ここに一定量の製剤白試料（粒剤）を加えて混合した。大部分のアセトンを60℃以下の湯浴上で留去後、窒素気流で溶媒を完全に除去して、約2% a.i.の施用用製剤を調製した。約50 mgずつ（8点）分取して、ポットへの処理用とした。残存試料は放射化学的純度測定用とした。

施用回数；1回

施用時期；2003年6月5日（イネ幼苗移植10日後）

施 用 法；処理区は田面水へ施用、非処理区は非処置

試料採取と調製（前処理）：試料の採取時期と前処理法の概略を次表に示す。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友グリ株式会社にある。

試料の種類	採取日	施用日からの経過日数	採取法と前処理法
中間期採取試料	2003年 7月17日	42日	イネ体を地表から約3 cmの位置で切断し、地上部を採取した。2ポットからのイネ茎葉部試料を合わせて1点の試料として生重量測定後、約1 cmに細断した後、約-20℃に凍結保存した。
登熟期試料 (処理区)	2003年 9月26日	113日	イネ体を地表から約3 cmの位置で切断し、地上部を採取した。地上部は稲わらと穀粒に分け、穀粒は籾摺り器を用いて籾殻と玄米に分けた。稲わらは約1~2 cmに細断した。根部は水洗して土壌を除き、室温乾燥後約1~2 cmに細断した。6ポットからの各試料を混合して生重量測定後、約-20℃に凍結保存した。
登熟期試料 (非処理区)	2003年 9月26日	—	1ポットから、登熟期試料(処理区)と同様にイネ体各試料を採取し、処理した。

分析法：

放射性総残留物 (TRR) の測定；

1) 処理区の茎葉部 (中間期採取)、稲わら及び玄米試料

玄米試料は溶媒抽出前にドライアイスと共にミキサーで粉碎して均一化した。各試料の一部にアセトニトリル/水 (8/2, v/v) 混液を加えて磨砕混合して抽出し、ろ過して抽出液と抽出残渣を得た。抽出に用いた溶液量は、茎葉部試料で10~20倍量 (v/w) 前後、玄米試料で5倍量 (v/w) 前後であった。抽出液は液体シンチレーション計測 (LSC) 後、固相抽出カラムを用い、水溶性成分 (水溶出画分)、低極性成分 (ヘキサン/酢酸エチル溶出画分) と極性成分 (メタノール溶出画分) に分画し、それぞれLSC測定した。各画分は濃縮後適切な溶媒に溶解し、約-20℃に凍結保存した。抽出残渣は乾燥後、燃焼/LSC測定した。抽出の概要を図 1に示す。

2) 籾殻、根部及び非処理対照区の植物体試料 (稲わらを除く)

上記の処理区玄米と同様に均一化し、各試料の一部を燃焼/LSC測定した。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 1 茎葉部（中間期採取）、稲わら及び玄米試料の抽出操作

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

放射性成分の定量；

植物体抽出液（SPE-ヘキサン／酢酸エチルとSPE-メタノール溶出液）中の放射性成分は、分析試料の一部をHPLCに注入して16画分に分画し、LSCで定量した（HPLC/LSC法）。分析の妥当性は、添加回収試験を行い、確認した（結果：98.0%）。

代謝物の同定／特徴付けのための分析法；

- 1) SPE-メタノール溶出画分中の主要代謝物の酸及び酵素加水分解性の調査
[PP-¹⁴C]ピラクロニル処理登熟期採取試料のSPE-メタノール溶出画分を用いて図2に示す方法に従って酸及び酵素加水分解性の調査を行った。加水分解後に得られた溶液試料はC₁₈ミニカラムを用いたSPE-分析に供し、得られた有機溶媒溶出画分をHPLCで分析し、加水分解前後のHPLCプロファイルを比較検討した。

図 2 SPE-メタノール溶出画分中の極性代謝物の酸及び酵素加水分解法

- 2) SPE-メタノール溶出画分中の主要代謝物のアグリコンの同定
[PP-¹⁴C]ピラクロニル処理の中間期採取の茎葉部試料を追加して抽出し（図 1）、

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

得られたSPE-メタノール溶出画分を図 2に示す方法に従って6 Mの塩酸で酸加水分解し、SPE-分析して得られたSPE-ヘキサン/酢酸エチル溶出画分をHPLCに注入し、主要な3種類のアグリコン（XII； 、 XIV； と ）を単離した。これらをHPLCで精製後、LC-ESI/MSで分析した。

3) コクロマトグラフィーによる放射性成分の同定/特徴付け

植物体抽出液（SPE-ヘキサン/酢酸エチル溶出画分、SPE-メタノール溶出画分とその酸加水分解処理後の溶液）中の放射性成分を参照標品とのHPLC及びTLCコクロマトグラフィーにより、同定/特徴付けを行った。

4) 抽出後の残渣中の放射性残留物の特徴付け

玄米試料は図 3に示す方法で、また稲わら試料は図 4に示す方法で分画し、各画分中の放射能レベルを測定した。

図 3 玄米試料の抽出残渣中の放射性成分の特徴付け

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 4 稲わら試料の抽出残渣中の放射性成分の特徴付け

結果：

- 1) 施用製剤中の [¹⁴C] 標識ピラクロニルの含有率及び放射化学的純度
結果を次表に示す。

調製製剤	[¹⁴ C] ピラクロニル含有率 (%)	放射化学的純度 (%)
[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル		
[P- ¹⁴ C] ピラクロニル		

[¹⁴C] 標識ピラクロニルの目標含有率：2%。 (*) 内は目標達成率

- 2) TRRレベル及び放射性残留物の抽出
燃焼/LSC測定によるTRRレベルの結果を表 1に示す。

表 1 燃焼/LSC測定によるTRRレベル

試料	試料部位	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル		[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	
		処理区	対照区	処理区	対照区
		mg eq./kg	mg eq./kg	mg eq./kg	mg eq./kg
登熟期採取 試料 (施用113日後)	玄米	0.0068	0.0012	0.0085	0.0009
	籾殻	0.1541	0.0015	0.1597	0.0012
	稲わら	1.6078	0.0029	1.3910	<0.0024
	根部	0.2182	<0.0011	0.2693	<0.0014

数値は5点分析の平均値

また、抽出後のTRRレベルの分布を表 2に示す。

表 2 抽出後のTRRレベルの分布

試料	試料画分	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル		[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	
		処理区		処理区	
		mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
中間期採取 茎葉部 (施用42日後)	抽出液	0.2499	76.64	0.2686	73.34
	残渣	0.0764	23.36	0.0976	26.66
	計	0.3263	100.00	0.3662	100.00
登熟期採取 玄米 (施用113日後)	抽出液	0.0026	37.84	0.0033	39.18
	残渣	0.0042	62.16	0.0052	60.82
	計	0.0068	100.00	0.0085	100.00
登熟期採取 稲わら (施用113日後)	抽出液	0.7606	47.34	0.6667	47.93
	残渣	0.8472	52.66	0.7243	52.07
	計	1.6078	100.00	1.3910	100.00

数値は2連分析の平均値

表 2より、[PP-¹⁴C] ピラクロニルまたは [P-¹⁴C] ピラクロニル施用42日後の茎葉部中のTRRレベルは、それぞれ0.326 mg eq./kg と0.366 mg eq./kgであり、2種標

識体で差は認められなかった。また、茎葉部中の放射性残留物の抽出率は、それぞれTRRの76.6%または73.3%で比較的良好であった。

表 1及び表 2より、[PP-¹⁴C] ピラクロニル施用113日後の茎葉部（稲わら）中のTRRレベルは、1.608 mg eq./kgであり、施用42日後の試料の約5倍に増加したが、可食部の玄米では、極めて低いレベルであった（0.007 mg eq./kg）。[P-¹⁴C] ピラクロニル処理区試料でもほぼ同様であった。対照区試料にも痕跡量の放射能が検出されたが、処理区と比較して顕著なレベルではなかった。

[PP-¹⁴C] ピラクロニル処理区玄米中の放射性残留物の抽出率は、37.8%であり、TRRの62.2%が固形物残渣中に残存した。また稲わら中の放射性残留物の抽出率も47.3%であり、施用42日後の試料と比較して低かった。[P-¹⁴C] ピラクロニル処理区試料でもほぼ同様であった。

3) 植物体試料の抽出液中の放射能の分布

施用42日後の茎葉部と施用113日後の玄米及び稲わらの抽出液をC₁₈ミニカラムを用いた固相抽出（SPE）法により分析した。分画した各分画中の放射能の測定結果を表 3に示す。

表 3 抽出液中の放射性残留物の分布

試料	試料画分	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル		[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	
		処理区		処理区	
		mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
中間期採取 茎葉部 (施用42日後)	抽出液(初期値)	0.2499	76.64	0.2686	73.34
	(A)水溶出液	0.0072	2.09	0.0043	1.17
	(B)ヘキサン/酢酸エチル溶出液	0.0517	15.87	0.0572	15.63
	(C)メタノール溶出液	0.1841	56.75	0.1922	52.49
	総回収(A+B+C)	0.2430	74.72	0.2538	69.30
登熟期採取 玄米 (施用113日後)	抽出液(初期値)	0.0026	37.84	0.0033	39.18
	(A)水溶出液	0.0002	3.47	0.0005	6.22
	(B)ヘキサン/酢酸エチル溶出液	0.0012	17.37	0.0014	16.53
	(C)メタノール溶出液	0.0010	14.58	0.0012	14.19
	総回収(A+B+C)	0.0024	35.42	0.0031	36.9
登熟期採取 稲わら (施用113日後)	抽出液(初期値)	0.7606	47.34	0.6667	47.93
	(A)水溶出液	0.0285	1.78	0.0469	3.37
	(B)ヘキサン/酢酸エチル溶出液	0.1603	9.99	0.1540	11.07
	(C)メタノール溶出液	0.5353	33.30	0.4356	31.31
	総回収(A+B+C)	0.7241	45.07	0.6364	45.75

数値は2連分析の平均値

表 3 より、施用42日後の茎葉部と施用113日後の稲わら抽出液中の放射性残留物は、SPE-ヘキサン/酢酸エチル溶出液中にTRRの10.0~15.9%、SPE-メタノール溶

出液中に31.3～56.8%が認められた。SPE-水溶出液中には微量の放射能が認められたのみであった（TRRの1.2～3.4%）。これらの結果は、茎葉部及び稲わら中の放射性残留物の多くが極性成分で構成されており、低極性成分の比率が低いことを示していた。2種標識体でのSPE溶出性パターンはほぼ同じであった。

一方、玄米抽出液中の放射性残留物は、SPE-ヘキサン／酢酸エチル溶出液中にTRRの17.4%または16.5%、SPE-メタノール溶出液中に14.6%または14.2%が認められた。SPE-水溶出液中には微量の放射能が認められたのみであった（TRRの3.5%または6.2%）。これらの結果は、玄米抽出液中の放射性残留物が低極性成分と極性成分をほぼ同じ割合で含有していることを示しているが、実測濃度はいずれも極めて低いレベルであった。

4) HPLCによる放射性成分の定量及び同定

3) 項で分画したSPE-ヘキサン／酢酸エチル溶出液及びSPE-メタノール溶出液をHPLC分析し、溶出液中の放射性成分を分画して、各画分中の放射性成分を定量した。その結果を表 4.1から表 4.6に示す。

中間期採取茎葉部（施用42日後）のSPE-ヘキサン／酢酸エチル溶出液の結果を表 4.1に、SPE-メタノール溶出液の結果を表 4.2に示す。

表 4.1 中間期採取茎葉部（施用42日後）のSPE-ヘキサン／酢酸エチル溶出液中の放射性成分のHPLC分析

代謝物	HPLCの 画分No.	識 別 (代謝物)	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル		[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	
			mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
XII						
XIII						
XIV						
XVIII						
I	14	ピラクロニル	0.0014	0.43	0.0013	0.35
	計					

表中の数値は2連分析の平均値

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

稲わら（施用113日後）のSPE-ヘキサン／酢酸エチル溶出液（表 4. 3）からは、
 主要な放射性成分としてXII（
 ））、XIV（
 ）の3種類の代謝物が検出された。これらの代謝物のレベルは低く、最大でもTRRの1.6%程度であった。また、中間期採取の茎葉部抽出液では微量成分であったXIII（
 ））、XVIII（
 ）及び未変化のI（ピラクロニル）は有意には検出されなかった。

稲わら（施用113日後）のSPE-メタノール溶出液（表 4. 4）には夾雑物が多かったが、XV（
 ））、XVII（
 ）の3種類の代謝物が確認された。これらの代謝物のレベルは低く、最大でもTRRの約4%（XV：
 ））であった。

玄米（施用113日後）のSPE-ヘキサン／酢酸エチル溶出液とSPE-メタノール溶出液の結果をそれぞれ表 4. 5と表 4. 6に示す。

表 4. 5 玄米（施用113日後）のSPE-ヘキサン／酢酸エチル溶出液中の放射性成分のHPLC分析

代謝物	HPLCの 画分No.	識 別 (代謝物)	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル		[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	
			mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
XII						
XIII						
XIV						
XVIII						
I	14	ピラクロニル	<0.0000	<0.35	<0.0000	<0.33
	計					

表中の数値は2連分析の平均値

表 6 植物体抽出液中で同定／特徴付けされた代謝物の要約

代謝物	検出された試料	同定／特徴付け方法	化合物名等
I (ピラクロニル)			1-(3-chloro-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-5-[methyl(prop-2-ynyl)amino]pyrazole-4-carbonitrile
XII			
XIII			
XIV			
XIV			
XV			
XVI			
XVII			
XVII			
XVIII			

植物体抽出液からは、未変化のピラクロニルのほか、XII () とそのグルコース抱合体であるXV ()、XIII () 及びピラクロニルの代謝物XIV () とこれらの糖抱合体であるXVI () 及びXVII ()、XVIII () の9種類の代謝物が同定／特徴付けされた。

6.2) 抽出後残渣中の放射性残留物の特徴付け

稲わらの抽出残渣中にはTRRの10%以上かつ0.05 mg eq./kgを超える有意な放射性残留物が、また玄米抽出残渣中にはTRRの60%強の放射性残留物が検出されたので、それぞれ、ソックスレー抽出を含む化学的抽出法と酵素処理法を用い、特徴付けを行った。結果を表 7に示す。

表 7 抽出後の抽出残渣中の放射性残留物の特徴付け

試料	試料画分	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル		[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	
		mg eq./kg	%TRR	mg eq./kg	%TRR
玄米					
稲わら					

玄米中の有機溶媒で抽出不能な放射性残留物は、いずれの標識体でも水溶性成分、デンプン、タンパク質などの正常成分のほか、酵素では遊離されない植物体構成成分に取り込まれていると推定された（TRRの約33～34%）。

また、稲わら中の有機溶媒で抽出不能な放射性残留物は、リグニン、ヘミセルロースなどの植物体を構成する正常成分に取り込まれていると考えられた。

7) ピラクロニルの水稲における代謝運命

ピラクロニルの水稲における代謝運命を図 5に示す。主代謝経路はピラクロニルの

(XIII: の生成) と (XVIII:)

及びその組み合わせによるXII () の生成であった。代謝物はグルコース抱合を含む糖抱合を受けるほか、リグニンやヘミセルロースなどの植物二次壁構成成分に取り込まれて結合型残留物を生成すると考えられた。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 5 ピラクロニルの水稻における想定代謝経路

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

3. 土壌中運命に関する試験

(資料 代-10)

(1) [¹⁴C] 標識ピラクロニルを用いた好氣的湛水土壌中運命試験

試験機関：PTRL West (米国)

[GLP対応]

報告書作成年：2004年

供試標識化合物：次表の2種類の標識化合物を使用した。

化学名及び名称	1-(3-chloro-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-5-[methyl(prop-2-ynyl)amino]pyrazole-4-carbonitrile (IUPAC)	
	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル	[P- ¹⁴ C] ピラクロニル
化学構造式及び標識部位(*で表示)		
比放射活性		
放射化学的純度		
略 称	PP環標識体	P環標識体

標識位置の設定理由：

供試土壌：水田土壌

採取場所；財団法人 日本植物調節剤研究協会古川試験地（宮城県古川市米倉筆塚73）

採 取 日；2003年5月20日

土壌調製；水田土壌を2 mmの篩に通して供試土壌を調製した。土壌の特性を次表にまとめる。

供試土壌の特性

測定項目	測定値
pH (H ₂ O)	5.3
pH (KCl)	4.2
pH (CaCl ₂)	4.8
有機炭素含量 (%)	3.13
有機物質含量 (有機炭素×1.72) (%)	5.38
陽イオン交換容量 (cmol _c /kg)	26.6
粒径 (wt%) 粗砂 (2.0~0.2 mm)	5.8
細砂 (0.2~0.02 mm)	20.3
シルト (0.02~0.002 mm)	41.5
粘土 (<0.002 mm)	32.4
土性 (国際分類)	LiC (軽埴土)
主要粘土鉱物	モンモリロナイト
最大容水量 (%)	56.2
微生物活性 (非滅菌土壌、試験開始時) CFU: コロニー形成数/g土壌 寒天培地法	好氣的細菌: 2.0, 2.6 (×10 ⁶ CFU) 放線菌: 0.40, 0.35 (×10 ⁶ CFU) 真菌: 0.0036, 0.0043 (×10 ⁶ CFU)
微生物活性 (滅菌土壌、試験開始時) 寒天培地法	好氣的細菌、放線菌及び真菌の コロニー形成なし

方法:

試験設計; 非滅菌土壌試験区; [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルを個々に施用し、揮発性物質の捕集を行った。

滅菌土壌試験区; [PP-¹⁴C] ピラクロニルを施用し、揮発性物質の捕集は行わなかった。

試験系の調製; 非滅菌土壌試験区は、2 mmの篩を通した土壌107.48 g (75 g乾土重相当) を36個の褐色瓶 (250 mL容) にとり、脱イオン水75 mLを加えて土壌層5 cm、水深約1~1.5 cmとした。これらを25℃に設定した恒温チャンバー内で28日間プレインキュベーションした。滅菌土壌試験区は12個の褐色瓶 (250 mL容) にとり、オートクレーブ滅菌して調製した。

実験装置; プレインキュベーション後の土壌試料に脱イオン水を追加して水深約1~1.5 cmとした。非滅菌土壌試験区には通気/捕集装置を連結した。即ち、土壌試料に10%水酸化ナトリウム溶液と脱イオン水を通したCO₂フリー加湿空気を通気し、捕集側に¹⁴CO₂及び揮発性物質捕集のための10%水酸化ナトリウム溶液と活性炭を配した。図1に装置の概略を示す。装置は25℃に設定した恒温チャンバー内暗所に置き、滅菌土壌試験区も同様に恒温チャンバー内暗所に静置した。

図 1 実験装置の概略 (非滅菌土壌試験区)

施用液の調製 ; [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルはHPLCで精製し、それぞれの放射化学的純度が100%の施用原液を調製した。原液の濃度は [P-¹⁴C] ピラクロニル溶液が約0.59 mCi/6 mL、[PP-¹⁴C] ピラクロニル溶液が約0.86 mCi/4 mLであった。この原液をアセトニトリル/水 (1:1, v/v) を用いて次表の割合で希釈し、施用液を調製した。

施用液	[¹⁴ C]ピラクロニル 施用原液 (μL)	アセトニトリル/水 (μL)
[P- ¹⁴ C] ピラクロニル, 非滅菌土壌試験区	720	2360
[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル, 非滅菌土壌試験区	650	2450
[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル, 滅菌土壌試験区	349	1351

施用及び施用濃度；

施用濃度の根拠；

試験系の維持管理；25±1℃の恒温チャンバー内でインキュベーションした。

土壌水分量の補充；非滅菌土壌試験区では2週間毎に容器重量を測定し、水分の損失量を脱イオン水で補充した。

¹⁴C₂捕集用溶液の交換；1ヵ月毎に新しい捕集液と交換した。

CO₂フリー加湿空気用溶液の交換；液量を確認し、必要に応じ脱イオン水または水酸化ナトリウム溶液を補充した。

試料採取；各採取時点において2連で採取した。

非滅菌土壌試験区の土壌及び捕集液；0, 3, 7, 14, 30, 59, 120, 183日後
滅菌土壌試験区の土壌；0, 14, 29, 59日後

分析法；

水酸化ナトリウム捕集液；直接、液体シンチレーション計測（LSC）した。

土壌試料；pH、酸素濃度及び酸化還元電位（Eh）を測定後、遠心分離（3500 rpm, 60分間）して水相と土壌を分離し、デカントにより水相を分取した。

水相試料；直接LSC分析後、C18固相カラムで濃縮・精製し、HPLCによる画分分析をして抽出液中の放射性成分の定量及び特徴付けを行った。

土 壤；アセトニトリル／水（4:1, v/v）100 mLで2回振とう抽出した。抽出後の土壌をアセトニトリル／水（4:1, v/v）を用いてスラリー化し、その一部を一夜ソックスレー抽出した。振とう抽出液とソックスレー抽出液をそれぞれLSC測定した後、各抽出液の等量を合わせてLSC測定した。溶媒を減圧濃縮して濃縮液をLSC測定後、C18固相カラムで濃縮・精製し、HPLCによる画分分析をして抽出液中の放射性成分の定量及び特徴付けを行った。ソックスレー抽出後の土壌残渣は一部を燃焼／LSC測定した（図 2）。さらに土壌残渣中の放射能の特徴付けを行うため、非滅菌試験区 183日後の土壌残渣の一部を 0.5 N 水酸化ナトリウム溶液により抽出し、土壌有機成分での分布を調べた（図 3）。

代謝分解物の同定／特徴付け；土壌抽出液中の代謝分解物の同定／特徴付けは、参照標準品とのHPLC及びTLCクロマトグラフィーにより行った。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 2 土壌の抽出操作

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 3 土壤残渣中の放射性成分の特徴付け

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

土壌中における減衰；ピラクロニルの土壌中における減衰には線形一次反応式を適用し、
DT₅₀及びDT₉₀は次式により計算した。

$$\ln C = -kt + \ln C_0$$

$$DT_{50} = t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

$$DT_{90} = \frac{\ln 10}{k}$$

結 果：

1) [¹⁴C] ピラクロニルの放射化学的純度と施用液の均一性

[P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルの放射化学的純度は100%であった。また施用液の均一性は、施用の前後で変動係数が1.1~1.8%であり確保されていた。

2) 物質収支

各試験区における各採取時点での回収率と放射能濃度をそれぞれ表 1~3 に示す。

表 1 [P-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌湛水土壌試験区の放射能分布及び物質収支

経過日数	施用放射能% (濃度：mg eq./kg)					回収率 (%)
	水相	土 壤			揮発性物質 捕集液	
		振とう抽出液	ソックスレー 抽出液	土壌残渣	10%水酸化 ナトリウム溶液	
0	6.1 (0.014)	42.1 (0.093)	36.7 (0.081)	7.2 (0.016)	-	92.1 (0.203)
3	2.5 (0.006)	57.1 (0.126)	29.3 (0.065)	4.6 (0.010)	0.0 (0.000)	93.4 (0.206)
7	1.7 (0.004)	52.7 (0.116)	31.4 (0.069)	6.4 (0.014)	0.0 (0.000)	92.0 (0.203)
14	1.6 (0.004)	51.3 (0.113)	35.6 (0.078)	7.2 (0.016)	0.0 (0.000)	95.6 (0.210)
30	1.5 (0.003)	49.2 (0.109)	38.0 (0.084)	7.9 (0.018)	0.0 (0.000)	96.5 (0.213)
59	1.3 (0.003)	46.4 (0.102)	35.3 (0.078)	11.0 (0.025)	0.1 (0.000)	94.1 (0.207)
120	1.1 (0.002)	40.4 (0.089)	38.2 (0.084)	17.1 (0.038)	0.1 (0.000)	96.7 (0.213)
183	0.8 (0.002)	42.2 (0.093)	30.0 (0.066)	18.4 (0.041)	0.1 (0.000)	91.3 (0.202)
					総平均回収率 =	93.9
					標準偏差 =	2.7

結果は2連分析の平均値。 - : なし

表 2 [PP-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌湛水土壌試験区の放射能分布及び物質収支

経過日数	施用放射能% (濃度 : mg eq./kg)					回収率 (%)
	水相	土 壤			揮発性物質 捕集液	
		振とう抽出液	ソックスレー 抽出液	土壌残渣	10%水酸化 ナトリウム溶液	
0	7.2 (0.016)	41.7 (0.096)	36.2 (0.084)	6.2 (0.014)	-	91.2 (0.210)
3	2.8 (0.007)	58.8 (0.136)	34.1 (0.078)	4.7 (0.011)	0.0 (0.000)	100.3 (0.231)
7	3.7 (0.009)	56.2 (0.130)	28.0 (0.064)	8.3 (0.019)	0.0 (0.000)	96.1 (0.221)
14	3.4 (0.008)	51.0 (0.117)	33.9 (0.078)	7.0 (0.016)	0.1 (0.000)	95.2 (0.219)
30	3.2 (0.007)	54.6 (0.126)	27.6 (0.064)	9.2 (0.021)	0.1 (0.000)	94.7 (0.217)
59	2.5 (0.006)	51.1 (0.118)	28.3 (0.065)	11.1 (0.026)	0.1 (0.000)	93.0 (0.214)
120	2.4 (0.006)	44.0 (0.101)	32.3 (0.074)	16.6 (0.038)	0.2 (0.000)	95.3 (0.219)
183	1.4 (0.004)	42.7 (0.098)	31.4 (0.072)	14.6 (0.034)	0.1 (0.000)	90.1 (0.207)
					総平均回収率 =	94.5
					標準偏差 =	3.3

結果は2連分析の平均値。 - : なし

表 3 [PP-¹⁴C] ピラクロニル滅菌湛水土壌試験区の放射能分布及び物質収支

経過日数	施用放射能% (濃度 : mg eq./kg)				回収率 (%)	
	水相	土 壤				
		振とう抽出液	ソックスレー 抽出液	土壌残渣		
0	9.1 (0.019)	73.0 (0.153)	19.1 (0.040)	0.2 (0.000)	101.2 (0.212)	
14	2.7 (0.006)	62.0 (0.130)	31.3 (0.066)	1.0 (0.002)	96.9 (0.204)	
29	2.6 (0.006)	56.0 (0.118)	35.4 (0.074)	1.7 (0.004)	95.6 (0.201)	
59	2.8 (0.006)	58.1 (0.122)	29.1 (0.061)	2.5 (0.005)	92.4 (0.194)	
					総平均回収率 =	96.5
					標準偏差 =	3.6

結果は2連分析の平均値。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

非滅菌湛水土壌における施用放射能（AR）の総平均回収率は、P環標識体及びPP環標識体でそれぞれ $93.9 \pm 2.7\%$ 及び $94.5 \pm 3.3\%$ であった。滅菌湛水土壌における総平均回収率は $96.5 \pm 3.6\%$ であり、全ての試験区で施用放射能は定量的に回収された。このため活性炭捕集剤は分析しなかった。

非滅菌湛水土壌試験区における放射能分布は、水相中に $0.8 \sim 6.1\%$ AR（P環標識体）、 $1.4 \sim 7.2\%$ AR（PP環標識体）、アセトニトリル／水混液による振とう抽出液中に $40.4 \sim 57.1\%$ AR（P環標識体）、 $41.7 \sim 58.8\%$ AR（PP環標識体）、ソックスレー抽出液中に $29.3 \sim 38.2\%$ AR（P環標識体）、 $27.6 \sim 36.2\%$ AR（PP環標識体）、抽出後の土壌残渣中に $4.6 \sim 18.4\%$ AR（P環標識体）、 $4.7 \sim 16.6\%$ AR（PP環標識体）であった。また両環標識体試験区で、極微量の放射能が水酸化ナトリウム捕集液中に検出された（P環標識体： $\leq 0.1\%$ AR、PP環標識体： $\leq 0.2\%$ AR）。水相中の放射能は時間の経過とともに減少し、逆に土壌残渣中の放射能は増加した。

滅菌湛水土壌試験区における放射能分布は、水相中では $2.6 \sim 9.1\%$ ARで時間と共に減少し、振とう抽出液中に $58.1 \sim 73.0\%$ AR、ソックスレー抽出液中に $19.1 \sim 35.4\%$ ARであった。土壌残渣中の放射能は59日後に最大 2.5% ARとなった。

以上の結果を図 4～6 に示す。

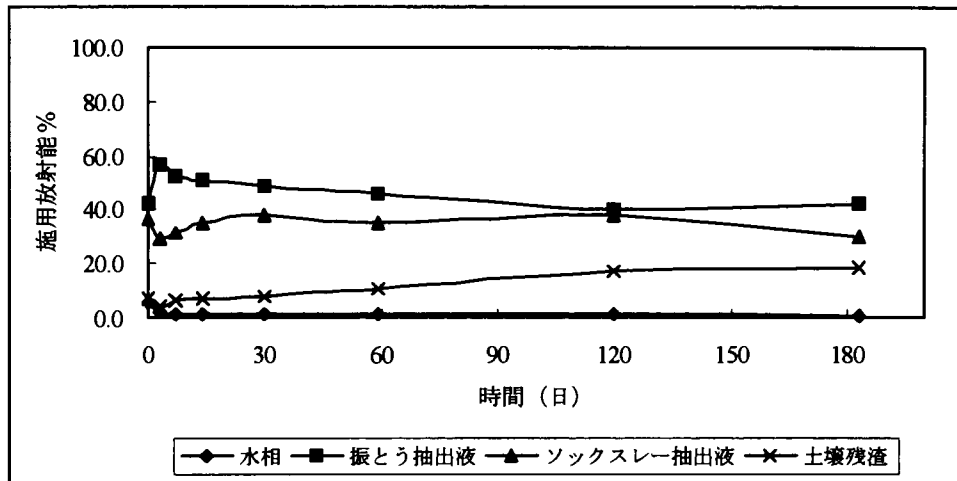


図 4 [P-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌湛水土壌試験区での放射能分布

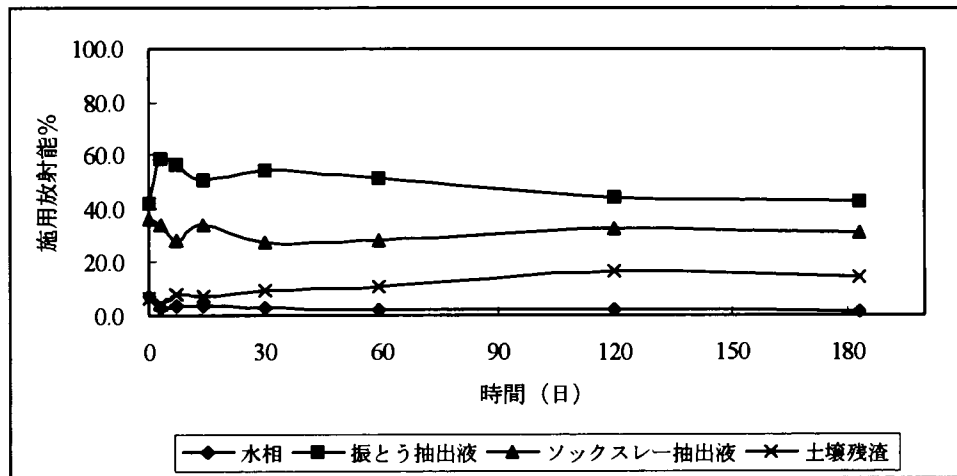


図 5 [PP-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌湛水土壌試験区での放射能分布

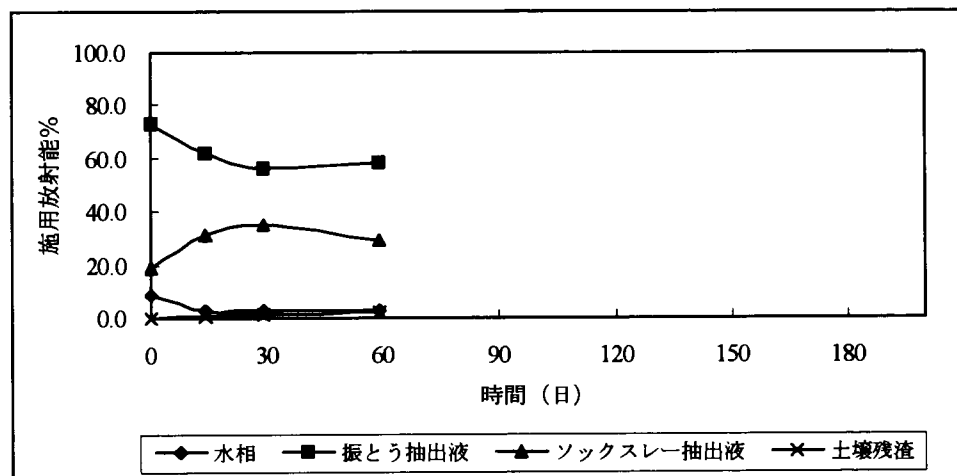


図 6 [PP-¹⁴C] ピラクロニル滅菌湛水土壌試験区での放射能分布

3) 試料中の放射性成分の定量及び同定

3.1) 非滅菌湛水土壌試験

[P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルの非滅菌試験区におけるピラクロニルとその代謝分解物のHPLC分析結果を以下にまとめる。表 4.1 及び表 4.2 に施用放射能%で、表 5.1 及び表 5.2 に濃度で示した。

表 4.1 [P-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌湛水土壌試験区の分析結果

経過 日数	試料	施用放射能%					
		水相及び土壌抽出液				土壌残渣	¹⁴ CO ₂
		I (ピラクロニル)					
0	水相	6.0				7.2	-
	土壌抽出液	77.3					
	合計	83.3					
3	水相	2.4				4.6	0.0
	土壌抽出液	83.6					
	合計	85.9					
7	水相	1.7				6.4	0.0
	土壌抽出液	80.6					
	合計	82.3					
14	水相	1.5				7.2	0.0
	土壌抽出液	74.1					
	合計	75.6					
30	水相	1.3				7.9	0.0
	土壌抽出液	70.9					
	合計	72.1					
59	水相	1.0				11.0	0.1
	土壌抽出液	61.9					
	合計	62.9					
120	水相	0.4				17.1	0.1
	土壌抽出液	44.6					
	合計	44.9					
183	水相	-				18.4	0.1
	土壌抽出液	32.1					
	合計	32.1					

水相と土壌抽出液の値は2連分析の平均値(申請者計算)。合計値は報告書の表から転記。
^a:クロマトグラム上のマイナーなピークの合計で、個々のピークは1.2%ARを超えなかった。
 -:なし。

表 4.2 [PP-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌湛水土壌試験区の分析結果

経過 日数	試料	施用放射能%					
		水相及び土壌抽出液				土壌残渣	¹⁴ CO ₂
		I (ピラクロニル)					
0	水相	7.1				6.2	-
	土壌抽出液	77.3					
	合計	84.3					
3	水相	2.8				4.7	0.0
	土壌抽出液	90.3					
	合計	93.0					
7	水相	3.6				8.3	0.0
	土壌抽出液	80.6					
	合計	84.2					
14	水相	3.2				7.0	0.1
	土壌抽出液	78.5					
	合計	81.7					
30	水相	2.8				9.2	0.1
	土壌抽出液	67.4					
	合計	70.1					
59	水相	1.9				11.1	0.1
	土壌抽出液	62.1					
	合計	64.0					
120	水相	1.0				16.6	0.2
	土壌抽出液	43.0					
	合計	44.0					
183	水相	0.5				14.6	0.1
	土壌抽出液	36.1					
	合計	36.6					

水相と土壌抽出液の値は2連分析の平均値(申請者計算)。合計値は報告書の表から転記。
 * :クロマトグラム上のマイナーなピークの合計で、個々のピークは1.1%ARを超えなかった。
 - :なし。

表 5.1 [P-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌湛水土壌試験区の分析結果

経過 日数	濃度 (mg eq./kg)				
	水相	土壌抽出液			土壌残渣
		I (ピラクロニル)			
0	0.014	0.170			0.016
3	0.006	0.184			0.010
7	0.004	0.177			0.014
14	0.004	0.163			0.016
30	0.003	0.156			0.018
59	0.003	0.136			0.025
120	0.002	0.098			0.038
183	0.002	0.071			0.041

結果は2連分析の平均値。^a : クロマトグラム上のマイナーなピークの合計で、個々のピークは0.003 mg eq./kgを超えなかった。

表 5.2 [PP-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌湛水土壌試験区の分析結果

経過 日数	濃度 (mg eq./kg)				
	水相	土壌抽出液			土壌残渣
		I (ピラクロニル)			
0	0.016	0.178			0.014
3	0.007	0.208			0.011
7	0.009	0.186			0.019
14	0.008	0.181			0.016
30	0.007	0.155			0.021
59	0.006	0.143			0.026
120	0.006	0.099			0.038
183	0.004	0.083			0.034

結果は2連分析の平均値。^a : クロマトグラム上のマイナーなピークの合計で、個々のピークは0.003 mg eq./kgを超えなかった。

表 4.1 から表 5.2 に示したように、非滅菌湛水土壌中で生成した代謝分解物は、両標識体で共通していた。しかし、2連分析に多少のばらつきが見られたため、両標識体の結果を平均し、表 6 に示す。

表 6 非滅菌湛水土壌試験における放射性成分の分布 (2種標識体の平均値)

代謝分解物 (識別)	施用放射能%							
	経過日数							
	0	3	7	14	30	59	120	183
I (ピラクロニル)	83.8	89.5	83.3	78.7	71.1	63.5	44.5	34.4

- : なし

非滅菌湛水土壌では、ピラクロニルは0時点で83.8%AR認められたが、183日後には34.4%ARに減衰した。主要代謝分解物として、

XIX () が認められた。XIX () は0時点で0.4%AR認められたが次第に増加し、183日後には30.0%ARとなった。また、ピラクロニルまたはXIX () の により生成するXVIII () が認められ、その生成量は0.7~9.1%ARであった。その他の成分及びCO₂の生成は僅かであった。

3.2) 滅菌湛水土壌試験

[PP-¹⁴C] ピラクロニルの滅菌試験区におけるHPLC分析結果を表 7.1 (施用放射能%) と表 7.2 (濃度) に示す。

表 7.1 [PP-¹⁴C] ピラクロニル滅菌湛水土壌試験区の分析結果

経過 日数	試料	施用放射能%				土壌残渣
		水相及び土壌抽出液				
		I (ピラクロニル)				
0	水相	9.0				0.2
	土壌抽出液	81.8				
	合計	90.8				
14	水相	2.7				1.0
	土壌抽出液	82.1				
	合計	84.8				
29	水相	2.6				1.7
	土壌抽出液	83.3				
	合計	85.9				
59	水相	2.7				2.5
	土壌抽出液	75.2				
	合計	77.9				

水相と土壌抽出液の値は2連分析の平均値（申請者計算）。合計値は報告書の表から転記。^a：クロマトグラム上のマイナーなピークの合計で、個々のピークは1.6%ARを超えなかった。

表 7.2 [PP-¹⁴C] ピラクロニル滅菌湛水土壌試験区の分析結果

経過 日数	濃度 (mg eq./kg)					土壌残渣
	水相	土壌抽出液				
		I (ピラクロニル)				
0	0.019	0.172				0.000
14	0.006	0.172				0.002
29	0.006	0.175				0.004
59	0.006	0.158				0.005

結果は2連分析の平均値。^a：クロマトグラム上のマイナーなピークの合計で、個々のピークは0.003 mg eq./kgを超えなかった。

滅菌湛水土壌では、ピラクロニルは0時点の90.8%ARから59日後には77.9%ARに減少した。XIX（ ）は滅菌湛水土壌中では検出されなかった。代謝分解物としてXVIII（ ）が試験期間を通して検出され、その生成量は7.7～11.4%ARであった。XVIII（ ）の生成は、オートクレーブ滅菌による土壌の物理化学的特性の変化に起因するとも考えられるが、原因は明らかではない。

水相及び土壌抽出液中の親化合物と主要代謝分解物の推移を図7～9に示す。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 7 [P-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌湛水土壤試験区の放射性成分の推移

図 8 [PP-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌湛水土壤試験区の放射性成分の推移

図 9 [PP-¹⁴C] ピラクロニル滅菌湛水土壤試験区の放射性成分の推移

4) 土壌抽出残渣中の放射能の特徴付け

ソックスレー抽出後の土壌残渣中の放射能が非滅菌土壌試験区で10%を超えたので、183日後の土壌試料について残渣中の放射能の特徴付けを行った。結果を表 8 に示す。

表 8 土壌抽出残渣中の放射能の特徴付け

183日後 非滅菌土壌試料	施用放射能%			
	抽出残渣	フルボ酸画分	フミン酸画分	ヒューミン画分
[P- ¹⁴ C]ピラクロニル	18.4	1.6	1.9	14.9
[PP- ¹⁴ C]ピラクロニル	14.6	1.3	1.5	11.8

結果は2連分析の平均値。

両標識体で少量がフルボ酸画分(1.3~1.6%AR)及びフミン酸画分(1.5~1.9%AR)にあり、大部分の放射能は不溶性のヒューミン画分に存在した(11.8~14.9%AR)。

5) 代謝分解物のまとめ

水相及び土壌抽出液中の放射性成分を、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/特徴付けした結果の要約を表 9 に示す。

表 9 水相及び土壌抽出液中に検出された代謝分解物

代謝分解物 (識別)	検出された試料	標識体	想定生成機構

非滅菌湛水土壌中の代謝分解物は両標識体で共通であり、テトラヒドロピラゾロ[1,5-a]ピリジン環とピラゾール環の間での開裂は起きなかった。主要代謝分解物はXIX ()であった(表 4.1, 表 4.2)。

滅菌湛水土壌中にはXVIII ()が7.7~11.4%AR検出されたが、主要放射性成分は未変化のピラクロニルであった(表 7.1)。

6) 土壌中における減衰

好氣的湛水条件(水田)下の非滅菌土壌中のピラクロニルのDT₅₀とDT₉₀は、線形一次反応式を用いて計算した。結果を表 10 及び図 10, 11 に示す。

表 10 非滅菌土壌中におけるピラクロニルのDT₅₀とDT₉₀

標識体	DT ₅₀	DT ₉₀
[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	131日	435日
[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル	139日	461日

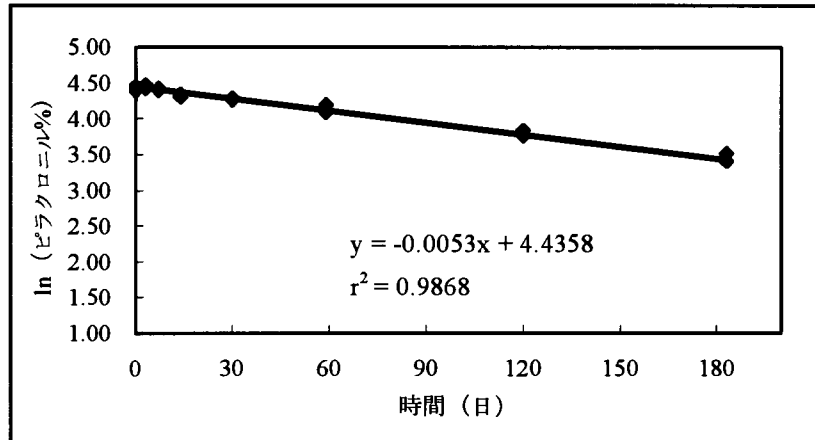


図 10 [P-¹⁴C] ピラクロニルの非滅菌好氣的湛水土壌代謝試験におけるピラクロニルの減衰曲線

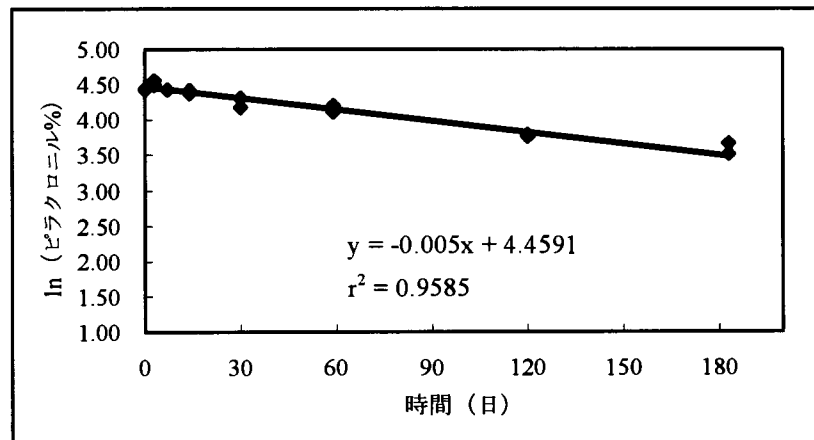


図 11 [PP-¹⁴C] ピラクロニルの非滅菌好氣的湛水土壌代謝試験におけるピラクロニルの減衰曲線

ピラクロニルの分解は比較的緩やかであった。DT₅₀は [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルでそれぞれ131日及び139日、DT₉₀はそれぞれ435日及び461日であった。

まとめ

[P-¹⁴C] ピラクロニルと [PP-¹⁴C] ピラクロニルの好氣的湛水土壤代謝試験を、非滅菌土壤と滅菌土壤を用いて実施した。試験期間中の物質収支は全試料について施用放射能の90%以上であった。

ピラクロニルは非滅菌湛水土壤中で分解し、DT₅₀は [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルでそれぞれ131日と139日、DT₉₀はそれぞれ435日と461日であった。滅菌湛水土壤中の分解速度は非滅菌湛水土壤中より顕著に遅かった。

XIX () が非滅菌湛水土壤における主要代謝分解物であり、試験期間中増加して試験終了時には30%ARとなった。XIX () は滅菌湛水土壤中では検出されず、の還元が微生物によることを示した。

XVIII () の生成が、非滅菌及び滅菌土壤中認められた。XVIII () の生成量は非滅菌土壤で0.7~9.1%AR、滅菌土壤で7.7~11.4%ARであった。

土壤結合残留物は、非滅菌土壤で0時点の6.7%ARから183日後には16.5%ARに増加した。滅菌土壤では少なかった(0.2~2.5%AR)。183日後の非滅菌土壤では、結合残留放射能は少量がフミン酸及びフルボ酸画分にある(各2.0%AR未満)、大部分は不溶性のヒューミン画分に存在した(11.8~14.9%AR)。

ピラクロニルの好氣的湛水土壤中における想定分解経路を図 12 に示す。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 12 ピラクロニルの好氣的湛水土壤中における想定分解経路

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 代-11)

(2) [^{14}C] 標識ピラクロニルの好氣的土壤中運命試験

試験機関：PTRL West (米国)

[GLP対応]

報告書作成年：2004年

供試標識化合物：次表の2種類の標識化合物を使用した。

化学名及び名称	1-(3-chloro-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-5-[methyl(prop-2-ynyl)amino]pyrazole-4-carbonitrile (IUPAC)	
	[PP- ^{14}C] ピラクロニル	[P- ^{14}C] ピラクロニル
化学構造式及び標識部位(*で表示)		
比放射活性		
放射化学的純度		
略 称	PP環標識体	P環標識体

標識位置の設定理由：

供試土壌：水田土壌

採取場所；財団法人 日本植物調節剤研究協会古川試験地（宮城県古川市米倉筆塚73）

採 取 日；2003年5月20日

土壌調製；水田土壌を2 mmの篩に通して供試土壌を調製した。土壌の特性を次表にまとめる。

供試土壌の特性

測定項目	測定値
pH (H ₂ O)	5.3
pH (KCl)	4.2
pH (CaCl ₂)	4.8
有機炭素含量 (%)	3.13
有機物質含量 (有機炭素×1.72) (%)	5.38
陽イオン交換容量 (cmol _c /kg)	26.6
粒径 (wt %) 粗砂 (2.0~0.2 mm)	5.8
細砂 (0.2~0.02 mm)	20.3
シルト (0.02~0.002 mm)	41.5
粘土 (<0.002 mm)	32.4
土性 (国際分類)	LiC (軽埴土)
主要粘土鉱物	モンモリロナイト
最大容水量 (%)	56.2
微生物バイオマス (非滅菌土壌) (mg C/g)	43 (呼吸法)
微生物活性 (滅菌土壌) 寒天培地法	好氣的細菌、放線菌及び真菌の コロニー形成なし

方 法 :

試験設計 ; 非滅菌土壌試験区 ; [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルを個々に施用し、揮発性物質の捕集を行った。

滅菌土壌試験区 ; [PP-¹⁴C] ピラクロニルを施用。揮発性物質の捕集は行わなかった。

試験系の調製 ; 非滅菌土壌試験区は、2 mmの篩を通した土壌に最大容水量の40~60%となるように脱イオン水を添加し、その30.7 g (21.2 g乾土重相当) を40個 (各標識体に20個) の褐色瓶 (250 mL容) にとる。これらを25℃に設定した恒温チャンバー内で14日間以上プレインキュベーションした。滅菌土壌試験区は12個の褐色瓶 (250 mL容) にとり、オートクレーブ滅菌して調製した。土壌の厚さは約1.5 cmであった。

実験装置 ; プレインキュベーション後の土壌試料に脱イオン水を加え、土壌水分量を最大容水量の55%とした。非滅菌土壌試験区には通気/捕集装置を連結した。即ち、土壌試料に10%水酸化ナトリウム溶液と脱イオン水を通したCO₂フリー加湿空気を通気し、捕集側に¹⁴CO₂及び揮発性物質捕集のための10%水酸化ナトリウム溶液と活性炭を配した。図1に装置の概略を示す。装置は25℃に設定した恒温チャンバー内暗所に置き、滅菌土壌試験区は綿栓をして同様に恒温チャンバー内暗所に静置した。

図 1 実験装置の概略 (非滅菌土壌試験区)

施用液の調製； [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルはHPLCで精製し、それぞれの放射化学的純度が100%の施用原液を調製した。原液の濃度は [P-¹⁴C] ピラクロニル溶液が約0.59 mCi/6 mL、 [PP-¹⁴C] ピラクロニル溶液が約0.86 mCi/4 mLであった。この原液をアセトニトリル／水 (1:1, v/v) を用いて次表の割合で希釈し、施用液を調製した。

施用液	[¹⁴ C]ピラクロニル 施用原液 (μL)	アセトニトリル/水 (μL)
[P- ¹⁴ C]ピラクロニル, 非滅菌土壌試験区		
[PP- ¹⁴ C]ピラクロニル, 非滅菌土壌試験区		
[PP- ¹⁴ C]ピラクロニル, 滅菌土壌試験区		

施用及び施用濃度；

施用濃度の根拠；

試験系の維持管理；25±1℃の恒温チャンバー内でインキュベーションした。

土壌水分量の補充；非滅菌土壌試験区は2週間毎、滅菌土壌試験区は1ヵ月毎に容器重量を測定し、損失量を脱イオン水または滅菌脱イオン水で補充した。

¹⁴CO₂捕集用溶液の交換；1ヵ月毎に新しい捕集液と交換した。

CO₂フリー加湿空気用溶液の交換；液量を確認し、必要に応じ脱イオン水または水酸化ナトリウム溶液を補充した。

試料採取；各採取時点において2連で採取した。

非滅菌土壌試験区の土壌及び捕集液；0, 3, 7, 13, 30, 59, 119, 181日後
滅菌土壌試験区の土壌；0, 14, 32, 67日後

分析法；

水酸化ナトリウム捕集液；直接、液体シンチレーション計測（LSC）した。

土壌；アセトニトリル／水（4:1, v/v）50 mLで2回振とう抽出した。抽出残渣をアセトニトリル／水（4:1, v/v）を用いてスラリー化し、その一部を一夜ソックスレー抽出した。振とう抽出液とソックスレー抽出液をそれぞれLSC測定した後、各抽出液の等量を合わせてLSC測定した。溶媒を減圧濃縮して濃縮液をLSC測定後、C18固相カラムで濃縮・精製し、HPLCによる画分分析をして抽出液中の放射性成分の定量及び特徴付けを行った。ソックスレー抽出後の土壌残渣は一部を燃焼／LSC測定した（図2）。さらに土壌残渣中の放射能の特徴付けを行うため、非滅菌試験区181日後の土壌残渣の一部を0.5 N水酸化ナトリウム溶液により抽出し、土壌有機成分での分布を調べた（図3）。

代謝分解物の同定／特徴付け；土壌抽出液中の代謝分解物の同定／特徴付けは、参照標準品とのHPLC及びTLCコクロマトグラフィーにより行った。

土壌中における減衰；ピラクロニルの好氣的土壌における減衰には非線形回帰曲線を適用し、グスタフソン式を用いて計算した。

$$\text{グスタフソン式： } C = C_0 (1 + \beta t)^{-\alpha}$$

ここで C = ピラクロニルの濃度 (%AR)
C₀ = ピラクロニルの初期濃度 (%AR)
t = インキュベーションの時間 (日)
α, β = 定数

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

パラメーター α と β はNLREGプログラムを用い、非線形回帰曲線を当てはめて推定した。 α は単位が無く、 β は“日⁻¹”である。DT₅₀及びDT₉₀は次式を用いて計算した。

$$DT_{50} = (0.5^{-1/\alpha} - 1) / \beta$$

$$DT_{90} = (0.9^{-1/\alpha} - 1) / \beta$$

また代謝分解物 M-1のDT₅₀の算出には線形一次反応式を適用して計算した。

$$\ln C = -kt + \ln C_0$$

$$DT_{50} = t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 2 土壌の抽出操作

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 3 土壤残渣中の放射性成分の特徴付け

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

結果：

1) [^{14}C] ピラクロニルの放射化学的純度と施用液の均一性

[$\text{P-}^{14}\text{C}$] 及び [$\text{PP-}^{14}\text{C}$] ピラクロニルの放射化学的純度は100%であった。また施用液の均一性は、施用の前後で変動係数が1.2%以内であり確保されていた。

2) 物質収支

各試験区における各採取時点での回収率と放射能濃度をそれぞれ表 1~3 に示す。

表 1 [$\text{P-}^{14}\text{C}$] ピラクロニル非滅菌土壌試験区の放射能分布及び物質収支

経過日数	施用放射能% (濃度 : mg eq./kg)				回収率 (%)
	土 壌			揮発性物質 捕集液	
	振とう抽出液	ソックスレー 抽出液	土壌残渣	10%水酸化 ナトリウム溶液	
0	91.3 (0.183)	8.2 (0.017)	0.2 (0.000)	-	99.7 (0.200)
3	75.9 (0.152)	13.1 (0.026)	8.8 (0.018)	0.1 (0.000)	97.8 (0.195)
7	69.1 (0.139)	14.6 (0.027)	15.5 (0.031)	0.1 (0.000)	99.3 (0.197)
13	66.7 (0.134)	19.4 (0.039)	16.6 (0.033)	0.1 (0.000)	102.8 (0.206)
30	60.3 (0.121)	22.7 (0.045)	19.8 (0.040)	0.2 (0.000)	102.9 (0.205)
59	52.9 (0.106)	25.8 (0.052)	22.4 (0.045)	0.3 (0.001)	101.4 (0.203)
119	45.3 (0.091)	33.5 (0.067)	20.4 (0.041)	0.3 (0.001)	99.4 (0.199)
181	45.1 (0.091)	32.9 (0.066)	23.1 (0.047)	0.4 (0.001)	101.4 (0.204)
総平均回収率 =					100.6
標準偏差 =					2.2

結果は2連分析の平均値。 - : なし

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

表 2 [PP-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌土壌試験区の放射能分布及び物質収支

経過日数	施用放射能% (濃度 : mg eq./kg)				回収率 (%)
	土 壤			揮発性物質 捕集液	
	振とう抽出液	ソックスレー 抽出液	土壌残渣	10%水酸化 ナトリウム溶液	
0	88.2 (0.177)	7.5 (0.015)	0.2 (0.000)	-	95.9 (0.192)
3	77.4 (0.155)	13.6 (0.027)	8.7 (0.018)	0.1 (0.000)	99.7 (0.200)
7	69.2 (0.139)	14.6 (0.029)	13.9 (0.028)	0.2 (0.000)	97.8 (0.195)
13	65.2 (0.131)	19.6 (0.039)	16.7 (0.034)	0.2 (0.000)	101.7 (0.203)
30	59.7 (0.119)	23.4 (0.047)	19.5 (0.039)	0.2 (0.000)	102.6 (0.205)
59	54.1 (0.109)	26.5 (0.053)	20.4 (0.041)	0.4 (0.001)	101.3 (0.203)
119	44.6 (0.090)	32.3 (0.065)	20.8 (0.042)	0.3 (0.001)	98.0 (0.197)
181	45.9 (0.092)	34.2 (0.068)	20.9 (0.042)	0.4 (0.001)	101.2 (0.202)
総平均回収率 =					99.8
標準偏差 =					2.4

結果は2連分析の平均値。 - : なし

表 3 [PP-¹⁴C] ピラクロニル滅菌土壌試験区の放射能分布及び物質収支

経過日数	施用放射能% (濃度 : mg eq./kg)			回収率 (%)
	土 壤			
	振とう抽出液	ソックスレー 抽出液	土壌残渣	
0	88.6 (0.177)	8.3 (0.017)	0.0 (0.000)	96.9 (0.194)
14	88.2 (0.177)	10.4 (0.021)	0.7 (0.001)	99.2 (0.198)
32	86.8 (0.174)	10.5 (0.021)	1.2 (0.003)	98.4 (0.197)
67	85.7 (0.172)	12.2 (0.024)	2.0 (0.004)	99.8 (0.200)
総平均回収率 =				98.6
標準偏差 =				1.4

結果は2連分析の平均値。

非滅菌土壌における施用放射能（AR）の総平均回収率は、P環標識体及びPP環標識体でそれぞれ $100.6 \pm 2.2\%$ 及び $99.8 \pm 2.4\%$ であった。滅菌土壌における総平均回収率は $98.6 \pm 1.4\%$ であり、全ての試験区で施用放射能は定量的に回収された。このため活性炭捕集剤は分析しなかった。

非滅菌土壌試験区における放射能分布は、アセトニトリル／水混液による振とう抽出液中に、0時点で $91.3\%AR$ （P環標識体）及び $88.2\%AR$ （PP環標識体）であったが、経時的に減少して181日後ではそれぞれ $45.1\%AR$ 及び $45.9\%AR$ となった。ソックスレー抽出液及び抽出後の土壌残渣中の放射能は経時的に増加した。ソックスレー抽出液中には0時点で $8.2\%AR$ （P環標識体）及び $7.5\%AR$ （PP環標識体）であったが、181日後ではそれぞれ $32.9\%AR$ 及び $34.2\%AR$ となった。

ソックスレー抽出後の土壌残渣中では、0時点で $0.2\%AR$ （両標識体）であったが、30日後には $19.8\%AR$ （P環標識体）及び $19.5\%AR$ （PP環標識体）と増加し、その後は僅かに増加して181日後ではそれぞれ $23.1\%AR$ 及び $20.9\%AR$ となった。水酸化ナトリウム捕集液中に検出された放射能は極微量であった（ $0.1 \sim 0.4\%AR$ ）。

滅菌土壌試験区では、振とう抽出液中の放射能の減少は非滅菌土壌より緩やかであり、0時点の $88.6\%AR$ から67日後では $85.7\%AR$ となった。ソックスレー抽出液中では0時点の $8.3\%AR$ から67日後には $12.2\%AR$ と多少増加した。土壌残渣中の放射能は $2.0\%AR$ 以下であった。

以上の結果を図4～6に示す。

図 4 [P-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌土壤試験区での放射能分布

図 5 [PP-¹⁴C] ピラクロニル非滅菌土壤試験区での放射能分布

図 6 [PP-¹⁴C] ピラクロニル滅菌土壤試験区での放射能分布

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

3) 土壤抽出液中の放射性成分の定量及び同定

3.1) 非滅菌土壤試験

[P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルの非滅菌土壤試験区における土壤抽出液中のピラクロニルとその代謝分解物のHPLC分析結果を表 4 及び表 5 に示す。

表 4 [P-¹⁴C] ピラクロニルの非滅菌土壤抽出液の分析結果

経過 日数	施用放射能% (濃度 : mg eq./kg)					
	I (ピラクロニル)					
0	98.9 (0.198)					
3	68.4 (0.137)					
7	48.1 (0.096)					
13	34.1 (0.068)					
30	14.2 (0.029)					
59	6.3 (0.013)					
119	3.0 (0.006)					
181	2.2 (0.004)					

結果は2連分析の平均値。^a : クロマトグラム上のマイナーなピークの合計で、個々のピークは4.5%ARを超えなかった。

表 5 [PP-¹⁴C] ピラクロニルの非滅菌土壌抽出液の分析結果

経過 日数	施用放射能% (濃度 : mg eq./kg)					
	I (ピラクロニル)					
0	95.7 (0.191)					
3	73.0 (0.146)					
7	53.1 (0.106)					
13	35.0 (0.070)					
30	14.1 (0.029)					
59	6.6 (0.014)					
119	3.8 (0.008)					
181	4.1 (0.009)					

結果は2連分析の平均値。 * : クロマトグラム上のマイナーなピークの合計で、個々のピークは5.3%ARを超えなかった。

土壌抽出液中のピラクロニルは、0時点でP環標識体では98.9%AR、PP環標識体では95.7%ARであった。その後速やかに減少し、13日後にはそれぞれ34.1%AR及び35.0%ARとなった。時間の経過とともにその減衰速度は緩やかになり、181日後ではそれぞれ2.2%AR及び4.1%ARとなった。

非滅菌土壌抽出液中に検出された放射性生成物は両標識体に共通であり、テトラヒドロピラゾロ [1,5-a] ピリジン環とピラゾール環との間で開裂は起きなかった。

第三級アミン部分が主な代謝部位であり、主要代謝分解物は

XVIII()であった。XVIII()はP環標識体で119日後に62.4%AR、PP環標識体で59日後に61.1%AR生成したのが最高で、181日後にはそれぞれ60.2%AR及び59.5%ARと減衰傾向を示した。

さらにXVIII()が XXI()は59日後から両標識体で検出されるようになり、181日後には3.5%AR (P環標識体) 及び3.8%AR (PP環標識体) となった。

XX()は、30日後に最大4.0%AR (P環標識体) 及び4.3%AR (PP環標識体) 検出されたが、181日後には両標識体で1.8%ARに減少した。

他のマイナーな生成物としてXVIII ()

XII () と、XVIII () 及びXXI () のそれぞれ
 XXIII () 及びXXII () が検出された。XII () 、
 XXII () 及びXXIII () はHPLCで完全には分離しなかったが、TLCクロ
 マトグラフィーにより特徴付けた。これら3化合物は、合計量として181日後に最
 大5.1%AR (P環標識体) 及び4.3%AR (PP環標識体) となった。

3.2) 滅菌土壌試験

[PP-¹⁴C] ピラクロニルの滅菌試験区における土壌抽出液のHPLC分析結果を表 6
 にまとめる。

表 6 [PP-¹⁴C] ピラクロニルの滅菌土壌抽出液の分析結果

経過日数	施用放射能% (濃度 : mg eq./kg)		
	I (ピラクロニル)		
0	96.2 (0.193)		
14	95.9 (0.192)		
32	95.4 (0.191)		
67	94.0 (0.188)		

結果は2連分析の平均値。^a クロマトグラム上のマイナーなピークの
 合計で、個々のピークは0.7%ARを超えなかった。

非滅菌土壌とは対照的に滅菌土壌中での分解は遅く、ピラクロニルは67日後に
 94.0%AR検出された。唯一の分解物はXVIII () であり、67日後で最大3.9%AR
 であった。

親化合物と主要代謝分解物の推移を図 7~9 に示す。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 7 [P-¹⁴C] ピラクロニルの非滅菌土壌抽出液中の放射性成分の推移

図 8 [PP-¹⁴C] ピラクロニルの非滅菌土壌抽出液中の放射性成分の推移

図 9 [PP-¹⁴C] ピラクロニルの滅菌土壌抽出液中の放射性成分の推移

4) 土壌抽出残渣中の放射能の特徴付け

ソックスレー抽出後の土壌残渣中の放射能が非滅菌土壌試験区で10%を超えたので、181日後の土壌試料について残渣中の放射能の特徴付けを行った。結果を表 7 に示す。

表 7 土壌残渣中の放射能の特徴付け

181日後 非滅菌土壌試料	施用放射能%			
	抽出残渣	フルボ酸画分	フミン酸画分	ヒューミン画分
[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	23.1	4.4	5.1	13.7
[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル	20.9	3.7	5.2	12.0

結果は2連分析の平均値。

両標識体で少量がフルボ酸画分 (3.7~4.4%AR) 及びフミン酸画分 (5.1~5.2%AR) にあり、残りの放射能は不溶性のヒューミン画分に存在した (12.0~13.7%AR)。

5) 代謝分解物のまとめ

土壌抽出液中の放射性成分を、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/特徴付けした結果の要約を表 8 に示す。

表 8 土壤抽出液中に検出された代謝分解物

代謝分解物 (識別)	検出された 試料	標識体	想定生成機構
XVIII			
XII			
XX			
XXI			
XXII			
XXIII			

非滅菌土壤中の代謝分解物は両標識体で共通であり、テトラヒドロピラゾロ [1,5-*a*]ピリジン環とピラゾール環の間での開裂は起きなかった。主要代謝分解物はXVIII ()であった(表4、表5)。

滅菌土壤中の主要放射性成分は未変化のピラクロニルであり、XVIII ()のみが分解物として検出された(表6)。

6) 土壤中における減衰

非滅菌土壤中におけるピラクロニルのDT₅₀とDT₉₀はグスタフソン式を、XVIII ()のDT₅₀は線形一次反応式を用いて計算した。結果を表9及び図10~11に示す。

表 9 非滅菌土壤中におけるピラクロニル及びXVIII ()のDT₅₀とDT₉₀

標識体	ピラクロニル		XVIII ()
	DT ₅₀	DT ₉₀	DT ₅₀
[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	6.8日	44.5日	約5年*
[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル	8.2日	44.8日	

* : [P-¹⁴C]及び [PP-¹⁴C]ピラクロニルの平均

ピラクロニルは非滅菌土壤中で分解し、DT₅₀は [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] 試料でそれぞれ6.8日及び8.2日、DT₉₀はそれぞれ44.5日及び44.8日であった。滅菌土壤では顕著な分解は起きなかった。

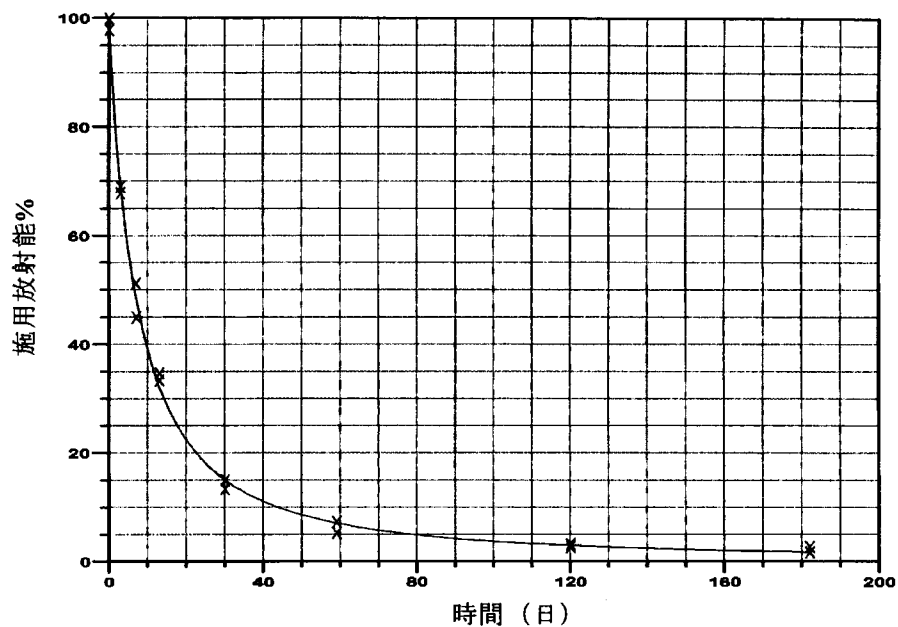


図 10 [P-¹⁴C] ピラクロニルの非滅菌好氣的土壤代謝試験におけるピラクロニルの減衰曲線 (グスタフソン式)

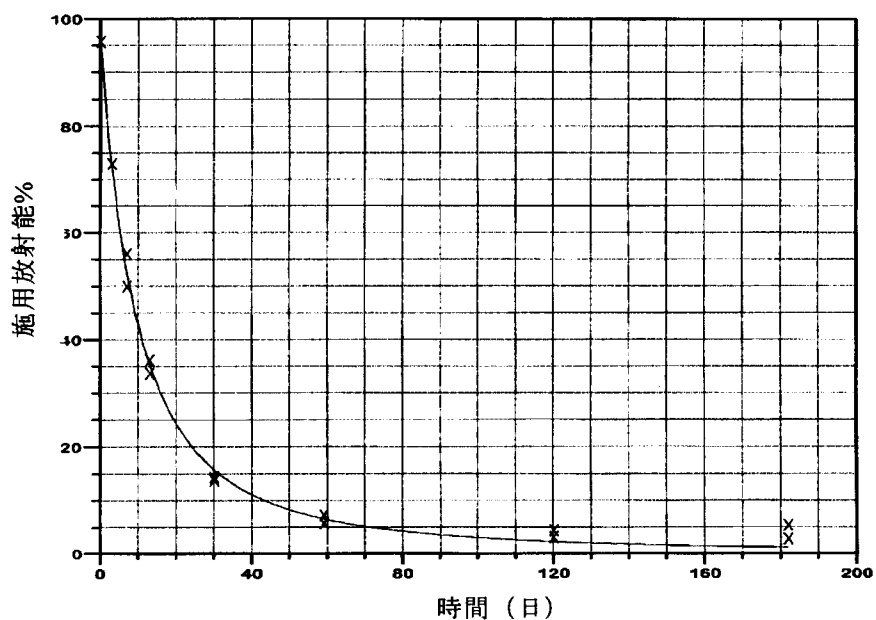


図 11 [PP-¹⁴C] ピラクロニルの非滅菌好氣的土壤代謝試験におけるピラクロニルの減衰曲線 (グスタフソン式)

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

まとめ

ピラクロニルは非滅菌土壤中で速やかに分解し、DT₅₀は [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルでそれぞれ6.8日と8.2日、DT₉₀はそれぞれ44.5日と44.8日であった。滅菌土壤中ではピラクロニルの顕著な分解はみられなかった。

好氣的土壤中でのピラクロニルの主要代謝分解物はXVIII () であった。

ピラクロニルの好氣的土壤中における想定代謝経路を図 12 に示す。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 12 ピラクロニルの好氣的土壤中における想定代謝経路

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 代-12)

(3) [^{14}C] 標識 の好氣的土壤中運命試験

試験機関：PTRL West (米国)

[GLP対応]

報告書作成年：2004年

供試標識化合物：次表の標識化合物を使用した。

化学名及び名称	
	[P- ^{14}C]
化学構造式及び 標識部位 (*で表示)	
比放射活性	
放射化学的純度	

標識位置の設定理由：

供試土壌：水田土壌

採取場所；財団法人 日本植物調節剤研究協会古川試験地（宮城県古川市米倉筆塚73）

採取日；2003年5月20日

土壌調製；水田土壌を2 mmの篩に通して供試土壌を調製した。土壌の特性を次表にまとめる。

供試土壌の特性

測定項目	測定値
pH (H ₂ O)	5.3
pH (KCl)	4.2
pH (CaCl ₂)	4.8
有機炭素含量 (%)	3.13
有機物質含量 (有機炭素×1.72) (%)	5.38
陽イオン交換容量 (cmol _c /kg)	26.6
粒径 (wt%) 粗砂 (2.0~0.2 mm)	5.8
細砂 (0.2~0.02 mm)	20.3
シルト (0.02~0.002 mm)	41.5
粘土 (<0.002 mm)	32.4
土性 (国際分類)	LiC (軽埴土)
主要粘土鉱物	モンモリロナイト
最大容水量 (%)	56.2
微生物バイオマス (mg C/g)	43 (呼吸法)
微生物活性 (非滅菌土壌、試験開始時) CFU : コロニー形成数/g土壌 寒天培地法	好気性細菌 : 6.8×10 ⁶ CFU 放線菌 : 2.1×10 ⁶ CFU 真菌 : 0.0145×10 ⁶ CFU

方法 :

試験設計 ;

試験系の調製 ; 2 mmの篩を通した土壌に最大容水量の40~60%となるように脱イオン水を添加し、その30.7 g (21.2 g 乾土重相当) を20個の褐色瓶 (250 mL容) にとる。土壌の厚さは約1.5 cmであった。これらを25℃に設定した恒温チャンバー内で14日間以上プレインキュベーションした。

実験装置 ; プレインキュベーション後の土壌試料に脱イオン水を加え、土壌水分量を最大容水量の55%とした。土壌試料には通気/捕集装置を連結した。即ち、10%水酸化ナトリウム溶液と脱イオン水を通したCO₂フリー加湿空気を通気し、捕集側に¹⁴CO₂及び揮発性物質捕集のための10%水酸化ナトリウム溶液と活性炭を配した。図1に装置の概略を示す。装置は25℃に設定した恒温チャンバー内暗所に置いた。

図 1 実験装置の概略

施用液の調製； [P-¹⁴C] をアセトニトリルで溶解して施用原液を調製した。その濃度は約 であった。この原液をアセトニトリル/水 (75:25, v/v) を用いて次表の割合で希釈し、施用液を調製した。

施用液	[P- ¹⁴ C]	アセトニトリル/水 (μL)
[P- ¹⁴ C]M-11		

施用及び施用濃度；

施用濃度の根拠；

試験系の維持管理；25±1℃の恒温チャンバー内でインキュベーションした。

土壌水分量の補充；定期的に土壌重量を測定し、必要に応じ損失量を脱イオン水で補充。

¹⁴CO₂捕集用溶液の交換；1ヵ月毎に新しい捕集液と交換した。

CO₂フリー加湿空気用溶液の補充；液量を確認し、必要に応じ脱イオン水または水酸化ナトリウム溶液を補充した。

試料採取；各採取時点において2連で採取した。

土壌及び捕集液；0, 3, 7, 14, 28, 63, 120日後

分析法；

水酸化ナトリウム捕集液；直接、液体シンチレーション計測（LSC）した。

土壌；アセトニトリル／水（4:1, v/v）50 mLで2回振とう抽出した。抽出残渣をアセトニトリル／水（4:1, v/v）を用いてスラリー化し、その一部を一夜ソックスレー抽出した。振とう抽出液とソックスレー抽出液をそれぞれLSC測定した後、各抽出液の等量を合わせてLSC測定した。溶媒を減圧濃縮して濃縮液をLSC測定後、C18固相カラムで濃縮・精製し、HPLCによる画分分析をして抽出液中の放射性成分の定量及び特徴付けを行った。ソックスレー抽出後の土壌残渣は一部を燃焼／LSC測定した（図2）。さらに土壌残渣中の放射能の特徴付けを行うため、120日後の土壌残渣の一部を0.5 N水酸化ナトリウム溶液により抽出し、土壌有機成分での分布を調べた（図3）。

代謝分解物の同定／特徴付け；土壌抽出液中の代謝分解物の同定／特徴付けは、参照標準品とのHPLC及びTLCコクロマトグラフィーにより行った。

土壌中における減衰；の土壌中における減衰には線形一次反応式を適用し、DT₅₀及びDT₉₀は次式により計算した。

$$\ln C = -kt + \ln C_0$$

$$DT_{50} = t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

$$DT_{90} = \frac{\ln 10}{k}$$

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 2 土壌の抽出操作

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 3 土壤残渣中の放射性成分の特徴付け

結果：

- 1) [P-¹⁴C] の放射化学的純度と施用液の均一性
 [P-¹⁴C] の放射化学的純度は であった。施用液の均一性は、施用の前後で変動係数が1.0%以内であり確保されていた。

2) 物質収支

各採取時点での回収率と放射能濃度を表 1 に示す。

表 1 非滅菌土壌試料における放射能分布及び物質収支

経過日数	施用放射能% (濃度：mg eq./kg)				回収率 (%)
	土 壤			揮発性物質 捕集液	
	振とう抽出液	ソックスレー 抽出液	土壌残渣	10%水酸化 ナトリウム溶液	
0					
3					
7					
14					
28					
63					
120					
総平均回収率 =					99.7
標準偏差 =					1.5

結果は2連分析の平均値。 - : なし

非滅菌土壌における施用放射能 (AR) の総平均回収率は99.7 ± 1.5%であった。施用放射能の回収が定量的であったので、活性炭捕集剤は分析しなかった。

以上の結果を図 4 に示す。

図 4 [P-¹⁴C] 好氣的土壤試料中の放射能分布

- 3) 土壤抽出液中の放射性成分の定量及び同定
土壤抽出液のHPLC分析結果を表 2 に示す。

表 2 土壤抽出液の分析結果

経過日数	施用放射能% (濃度 : mg eq./kg)			
0				
3				
7				
14				
28				
63				
120				

結果は2連分析の平均値。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

[P-¹⁴C] は0時点で95.7%ARであったが120日後には36.7%ARに減少した。XIX () の主な代謝分解物は、 XVIII () であり、 XVIII () は120日後には43.0%ARに増加した。マイナーな生成物として、 XVIII () のニトリル基の加水分解により生ずるカルバミド体 XXIII ()、及び XXII () が生成した。また、 XVIII () XII () が生成した。 XII ()、 XXII () 及び XXIII () は、HPLCでは完全に分離しなかったがTLCでは分離した。これら3生成物の合量は120日後で最大1.5%ARであった。

親化合物と主要代謝分解物の推移を図5に示す。

図5 [P-¹⁴C] 好氣的土壤試料中の放射性成分の推移

4) 土壤抽出残渣中の放射能の特徴付け

ソックスレー抽出後の土壤残渣中の放射能が10%を超えたので、120日後の土壤試料について残渣中の放射能の特徴付けを行った。結果を表3に示す。

表3 土壤抽出残渣中の放射能の特徴付け

120日後 非滅菌土壤試料	施用放射能%			
	抽出残渣	フルボ酸画分	フミン酸画分	ヒューミン画分
[P- ¹⁴ C]				

結果は2連分析の平均値。

少量がフルボ酸画分 () 及びフミン酸画分 () にあり、残りの放射能は不溶性のヒューミン画分に存在した () 。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

5) 代謝分解物のまとめ

土壌抽出液中の放射性成分を、参照標準品とのHPLC及びTLCコクロマトグラフィーにより同定／特徴付けした結果の要約を表4に示す。

表4 土壌抽出液中に検出された代謝分解物

代謝分解物 (識別)	想定生成機構

XIX () の好氣的土壌代謝試験における主要代謝分解物はXVIII () であった。その他にマイナーな代謝分解物としてXII ()、XXII () 及びXXIII () が検出されたが、それらは合計で1.5%AR以下であった。

6) 土壌中における減衰

非滅菌土壌中におけるXIX () のDT₅₀とDT₉₀は、線形一次反応式を用いて計算した。結果を表5と図6に示す。

表5 非滅菌土壌中におけるXIX () のDT₅₀とDT₉₀

標識体	DT ₅₀	DT ₉₀
[P- ¹⁴ C]	90日	299日

XIX () は非滅菌土壌中で分解し、DT₅₀は90日、DT₉₀は299日であった。これはピラクロニルの非滅菌好氣的土壌中の分解速度 (DT₅₀; 6.8~8.2日、DT₉₀; 44.5~44.8日) よりも遅かった。

図 6 非滅菌好氣的土壤代謝試験における [P-¹⁴C] の減衰曲線

まとめ

好氣的湛水条件下でピラクロニルの主要代謝分解物として生成するXIX()を、25°Cの好氣的条件下の非滅菌土壤に0.2 mg eq./kg相当量施用した。土壤は最大容水量の55%に調整して遮光状態に維持管理し、120日間にわたり試験した。全試料における放射性炭素の総平均回収率は施用放射能 (AR) の99.7±1.5%であった。

XIX()のDT₅₀は90日、DT₉₀は299日であった。

XIX()により生成する主要代謝分解物XVIII()は、120日後に43.0%ARとなった。マイナーな代謝分解物としてXXIII()及びXXII()が生成した。また、XVIII()XII()が生成した。XII()、XXII()及びXXIII()の含量は120日後で最大1.5%ARであった。

土壤結合残留物は試験期間中増加して120日後には1 に達し、その結合残留放射能はフルボ酸画分に 、フミン酸画分に 、ヒューミン画分に 存在していた。

XIX()の好氣的土壤中における想定分解経路を図7に示す。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 7 XIX () の好氣的土壤中における想定分解経路

4. 土壌吸着性試験

(資料 代-13)

[¹⁴C] 標識ピラクロニルを用いた土壌吸着性試験

試験機関：PTRL West (米国)

[GLP 対応]

報告書作成年：2004 年

供試標識化合物：次表の標識化合物を使用した。

化学名及び名称	1-(3-chloro-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-5-[methyl(prop-2-ynyl)amino]pyrazole-4-carbonitrile (IUPAC)
	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル
化学構造式及び 標識部位 (*で表示)	
比放射活性	
放射化学的純度	
略 称	PP 環標識体

標識位置の設定理由：

供 試 土 壤：米国土壌 4 種類と日本の火山灰土壌 1 種類を用いた。使用した土壌名とその特性を表 1 に示す。

表 1 供試土壌の特性

土壌識別名	007	008	009	001A	010
土性区分名 (USDA)	砂質 埴壤土	埴壤土	砂壤土	黒ボク 壤土	壤土
採取場所	North Dakota Mutchler	North Dakota Don Uglem	North Dakota Roger Myron	埼玉県 大里郡	North Dakota Ostlie East
OECD 土壌タイプ	3	2	5	4	2
土性 (USDA) 砂 (%)	59	33	75	43.9	47
シルト (%)	20	38	12	40.4	32
粘土 (%)	21	29	13	15.7	21
有機炭素含量 (%)	1.9	4.4	1.3	3.2	3.5
有機物含有率 (%)	3.2	7.5	2.3	5.5	6.0

施用液の調製：

表 3 施用液の調製方法

-：なし

試験操作手順：

段階 1；土壤／溶液比の設定試験

操作手順；

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

測定項目；

最適土壌／溶液比の決定；施用放射能の 20～80%が平衡化到達後、土壌に吸着されるように選定した。

物質収支；吸着溶液＋土壌の燃焼結果から求め、施用放射能%で表示した。

試験容器への吸着；コントロール試料の吸着溶液の濃度結果から求めた。

ブランク試料；溶液及び土壌中に放射能が存在しないことを確認した。

007, 008, 009, 001Aの4土壌で段階1を終了後、010土壌を試験に追加した。010土壌を用いた段階2の実験結果より、選抜した土壌／溶液比(1:5)が全ての土壌で適切であると確認されたため、段階1は省略した。

段階 2；平衡化時間の設定試験

操作手順；

測定項目；

吸着平衡化時間の決定；溶液中の放射能の連続する 2 時点の測定値の差が 5%未満の平衡化時間を求めた。

物質収支；吸着溶液＋土壌の燃焼結果から求め、施用放射能%で表示した。

試験容器への吸着；コントロール試料の吸着溶液の濃度結果から求めた。

[PP-¹⁴C] ピラクロニルの安定性；HPLC 分析結果を用いて評価した。

段階3；[PP-¹⁴C]ピラクロニルの吸着試験

操作手順；

測定項目；

pH；吸着溶液のpHを測定した。

吸着等温式及び等温線の作成；

吸着溶液及び土壌中の放射能の測定値から次式を用いて吸着等温式を求め、吸着等温線を作成した。

Freundlich の等温式モデル：

$$x/m = K_F^{ads} \times C_e^{(1/n)} \text{ または } \ln(x/m) = (1/n) \ln C_e + \ln K_F^{ads}$$

ここで：

x = 吸着されたピラクロニルの量 (μg)

m = 土壌の質量 (g)

C_e = 吸着溶液中におけるピラクロニルの平衡濃度 (μg/mL)

K_F^{ads} = 吸着係数

n = 定数

$\ln(x/m) = (1/n) \ln C_e + \ln K_F^{ads}$ として求められたFreundlichの等温式は直線式で表せる。 $\ln C_e$ を $\ln(x/m)$ に対してプロットした時に、定数 K_F^{ads} とnは直線式の切片 $\ln K_F^{ads}$ と傾き1/nから得られる。

有機炭素に基づいた吸着係数；次式で求めた。

$$K_{F_{oc}}^{ads} = (K_F^{ads} \times 100) / \text{有機炭素含量 \%}$$

物質収支；吸着溶液＋土壌の燃焼結果から求め、施用放射能%で表示した。

試験容器への吸着；コントロール試料の吸着溶液の濃度結果から求めた。

[PP-¹⁴C]ピラクロニルの安定性；HPLC分析結果を用いて評価した。

結果：

1) 段階 1 ; 土壌／溶液比の設定試験

段階 1 における土壌／溶液比の設定試験における物質収支を表 4 に示す。

表 4 土壌／溶液比の設定試験における物質収支

2 ppm 試験		施用放射能%		回収率%
土壌識別名	土壌／溶液比	吸着溶液	土壌	
007	1:25	72.0	23.9	95.9
	1:5	28.8	64.2	93.0
	1:2	10.6	79.4	90.0
008	1:25	80.7	14.5	95.2
	1:5	44.0	47.5	91.5
	1:2	18.9	72.9	91.8
009	1:25	81.5	16.3	97.8
	1:5	47.2	48.7	95.9
	1:2	20.3	77.8	98.1
001A	1:25	82.3	15.7	97.9
	1:5	48.6	46.0	94.6
	1:2	21.5	75.3	96.8
ブランク	1:2	0.0	0.0	0.0
コントロール		97.8	-	97.8
総平均回収率				95.1
標準偏差				3.1

数値は 2 連分析の平均値 (申請者計算) - : なし

表 4 に示すように、各土壌で 5 g の土壌と 25 mL の溶液比 (1:5) を用いると、吸着平衡化後に施用放射能の 46.0% から 64.2% が土壌へ吸着することが示された。

段階 1 での物質収支は、全試験試料の平均で $95.1 \pm 3.1\%$ であった。

以上より、施用液放射能の 20~80% が平衡化到達後に吸着された土壌／溶液比 (1:5) を、次の段階 2 及び段階 3 の試験における全土壌に選定した。

2) 段階 2 ; 平衡化時間の設定試験

2.1) 平衡化時点間の吸着溶液の濃度変化率を表 5 に、吸着溶液の分析結果を図 1~5 に示す。

表 5 平衡化時点間の吸着溶液の濃度変化

2 ppm 試験	平衡化時点間の濃度変化率 (%)			
	平衡化時間			
土壌識別名	4~6 時間	6~24 時間	24~29 時間	29~48 時間
007	2.7	10.0	-1.0	0.2
008	7.9	15.5	-1.4	2.9
009	5.4	6.3	-1.6	-0.3
001A	2.8	7.1	2.8	-0.8
010	3.6	5.4	3.9	2.9

数値は 2 連分析の平均値

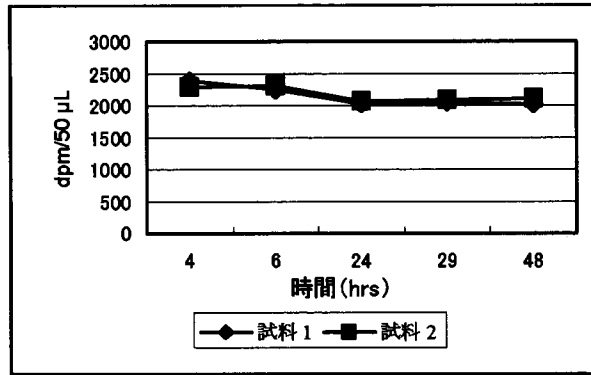


図 1 平衡化時間設定試験 (007) の吸着溶液分析結果 (50 μL中のdpm値)

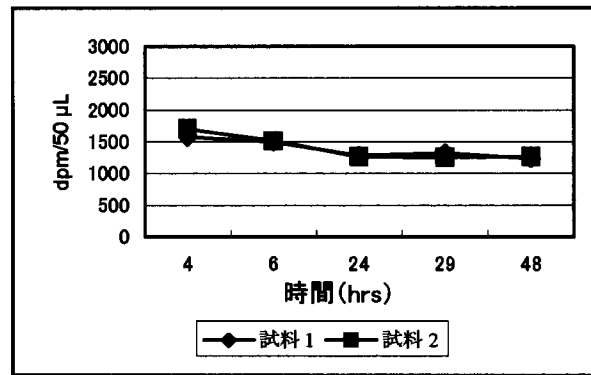


図 2 平衡化時間設定試験 (008) の吸着溶液分析結果 (50 μL中のdpm値)

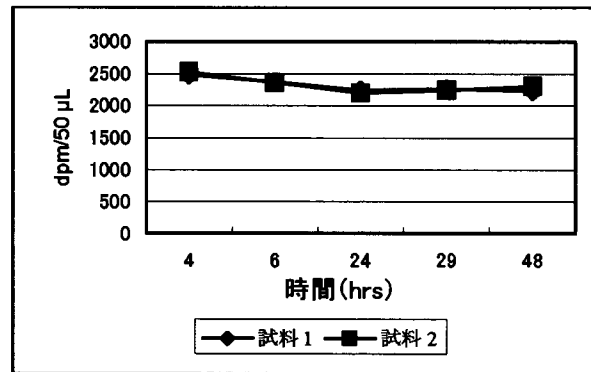


図 3 平衡化時間設定試験 (009) の吸着溶液分析結果 (50 μL中のdpm値)

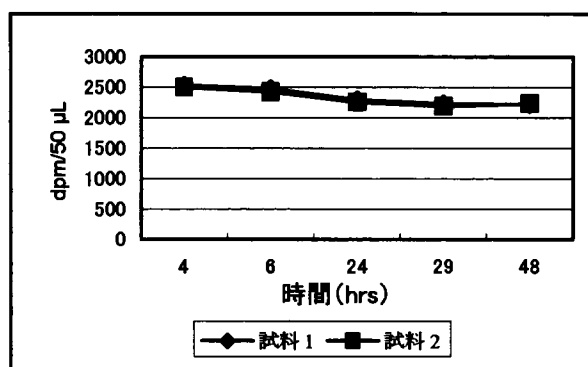


図 4 平衡化時間設定試験 (001A) の吸着溶液分析結果 (50 μL 中の dpm 値)

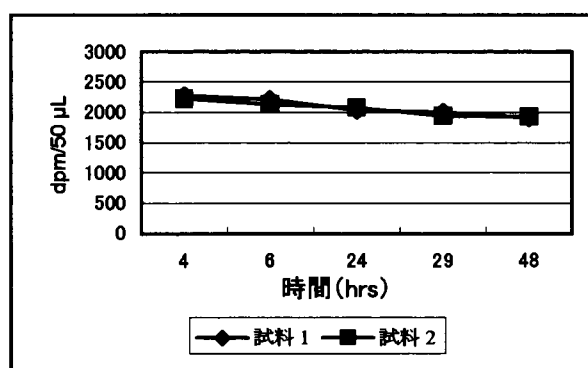


図 5 平衡化時間設定試験 (010) の吸着溶液分析結果 (50 μL 中の dpm 値)

以上より、吸着溶液中の放射能の連続する 2 時点での変化率が 5%未満である 24 時間を、全土壌の吸着平衡化時間とした。

2. 2) 平衡化時間の設定試験における物質収支
48 時間後の試料の物質収支を表 6 に示す。

表 6 物質収支

土壌識別名	施用放射能%		回収率%
	吸着溶液	土壌	
007	46.6	46.6	93.1
008	29.1	65.7	94.8
009	52.0	43.7	95.7
001A	49.1	49.4	98.4
010	52.5	55.8	108.3
コントロール*	101.2	-	101.2
コントロール**	105.4	-	105.4

数値は 2 連分析の平均値 (申請者計算) - : なし

* : 007,008,009,001A 土壌のコントロール ** : 010 土壌のコントロール

段階 2 での物質収支は 93%以上が得られ問題なかった。

3) 段階3 : [PP-¹⁴C]ピラクロニルの吸着試験

3.1) 吸着溶液のpH測定値

各吸着溶液のpH測定値を表7にまとめる。

表7 pH測定結果

土壌識別名	試験区				
	0.02 ppm	0.08 ppm	0.2 ppm	0.8 ppm	2.0 ppm
007	6.71	6.72~6.73	6.65~6.68	6.60~6.71	6.65~6.70
008	4.87~4.92	4.90~4.99	4.96~5.01	4.96~5.00	4.98~5.07
009	4.71~4.78	4.71~4.75	4.80~4.87	4.77~4.80	4.75~4.81
001A	5.17~5.24	5.19~5.21	5.18~5.22	5.28	5.26~5.29
010	7.50~7.55	7.53~7.55	7.50~7.51	7.50~7.54	7.51~7.58
コントロール	-	-	-	-	5.91~6.09

数値は3連の結果 - : なし

3.2) 物質収支

段階3における物質収支を表8~12に示す。

表8 0.02 ppm濃度における物質収支

0.02 ppm 試験 土壌識別名	施用放射能%		回収率%
	吸着溶液	土壌	
007	28.4	65.4	93.8
008	13.7	80.1	93.8
009	37.6	55.3	92.9
001A	37.6	58.0	95.6
010	29.2	71.0	100.2
総平均回収率			95.2

数値は2連分析の平均値

表9 0.08 ppm濃度における物質収支

0.08 ppm 試験 土壌識別名	施用放射能%		回収率%
	吸着溶液	土壌	
007	32.3	59.8	92.1
008	17.1	75.0	92.1
009	37.3	54.5	91.7
001A	39.6	53.2	92.8
010	30.8	66.1	96.8
総平均回収率			93.1

数値は2連分析の平均値

表 10 0.2 ppm 濃度における物質収支

0.2 ppm 試験 土壌識別名	施用放射能%		回収率%
	吸着溶液	土壌	
007	37.4	55.3	92.7
008	17.5	75.5	93.0
009	36.6	56.2	92.8
001A	40.5	52.9	93.4
010	35.2	58.9	94.1
総平均回収率			93.2

数値は2連分析の平均値

表 11 0.8 ppm 濃度における物質収支

0.8 ppm 試験 土壌識別名	施用放射能%		回収率%
	吸着溶液	土壌	
007	37.9	54.6	92.4
008	21.9	70.5	92.4
009	53.1	40.7	93.8
001A	42.6	51.1	93.7
010	40.5	52.5	93.0
総平均回収率			93.0

数値は2連分析の平均値

表 12 2 ppm 濃度における物質収支

2 ppm 試験 土壌識別名	施用放射能%		回収率%
	吸着溶液	土壌	
007	44.7	45.9	90.6
008	31.8	60.0	91.8
009	47.7	45.6	93.2
001A	44.8	50.3	95.1
010	46.0	48.9	94.9
コントロール*	97.7	-	97.7
コントロール**	96.5	-	96.5
総平均回収率			93.1

数値は2連分析の平均値 * : 007,008,009,001A土壌のコントロール

** : 010土壌のコントロール - : なし

総平均回収率は、0.02、0.08、0.2、0.8及び2 ppmの実験についてそれぞれ施用量の95.2、93.1、93.2、93.0及び93.1%であった。

また、段階1、2、3における土壌を含まないコントロール試料の平均回収率は、全ての実験において施用量の96.5%から105.4%の範囲であった。従って、ピラクロニルは実験中に容器壁に吸着されなかった。

3.3) 吸着等温式

結果を表 13 と表 14 及び図 6 ~10 に示す。

表 13 [PP-¹⁴C] ピラクロニルの吸着試験の結果

土壌識別名	初期濃度 (ppm)	吸着溶液濃度 C_{aq} (μg/mL)	土壌濃度 C_s (μg/g)	K_d **	Freundlich 吸着等温式
007	0.02	0.0069	0.0790	11.45	$1/n = 0.85088$ $\ln K_F^{ads} = 1.68955$ $K_F^{ads} = 5.42$ $r^2 = 0.99880$
	0.08	0.0300	0.2800	9.33	
	0.20	0.0840	0.6100	7.26	
	0.80	0.3500	2.4000	6.86	
	2.00	1.0100	5.3000	5.25	
008	0.02	0.0033	0.1200	36.36	$1/n = 0.80392$ $\ln K_F^{ads} = 2.55139$ $K_F^{ads} = 12.82$ $r^2 = 0.99638$
	0.08	0.0150	0.4400	29.33	
	0.20	0.0390	1.0400	26.67	
	0.80	0.2000	3.9000	19.50	
	2.00	0.6900	8.4000	12.17	
009	0.02	0.0088	0.0720	8.18	$1/n = 0.85528$ $\ln K_F^{ads} = 1.54927$ $K_F^{ads} = 4.71$ $r^2 = 0.98819$
	0.08	0.0330	0.2800	8.48	
	0.20	0.0800	0.6600	8.25	
	0.80	0.4600	1.9000	4.13	
	2.00	1.0400	5.3000	5.10	
001A	0.02	0.0094	0.0680	7.23	$1/n = 0.92672$ $\ln K_F^{ads} = 1.64111$ $K_F^{ads} = 5.16$ $r^2 = 0.99999$
	0.08	0.0380	0.2500	6.58	
	0.20	0.0940	0.5800	6.17	
	0.80	0.4000	2.2000	5.50	
	2.00	1.0300	5.3000	5.15	
010	0.02	0.0065	0.0920	14.15	$1/n = 0.82783$ $\ln K_F^{ads} = 1.83124$ $K_F^{ads} = 6.24$ $r^2 = 0.99936$
	0.08	0.0270	0.3300	12.22	
	0.20	0.0820	0.8000	9.76	
	0.80	0.3700	2.8000	7.57	
	2.00	1.0200	6.1000	5.98	

数値は 2 連分析の平均値 * : $C_{aq} = C_e$ 、 $C_s = x/m$ ** : $K_d = C_s/C_{aq}$

表 14 Freundlich 吸着等温式パラメーターの要約

土壌識別名	有機炭素含有率 (%)	K_F^{ads}	$K_F^{ads}_{oc}$	1/n	r^2
砂質埴壤土 (007)	1.9	5.42	285	0.851	0.999
埴壤土 (008)	4.4	12.82	291	0.804	0.996
砂壤土 (009)	1.3	4.71	362	0.855	0.988
黒ボク壤土 (001A)	3.2	5.16	161	0.927	1.000
壤土 (010)	3.5	6.24	178	0.828	0.999
総平均		6.87	255	0.853	0.996

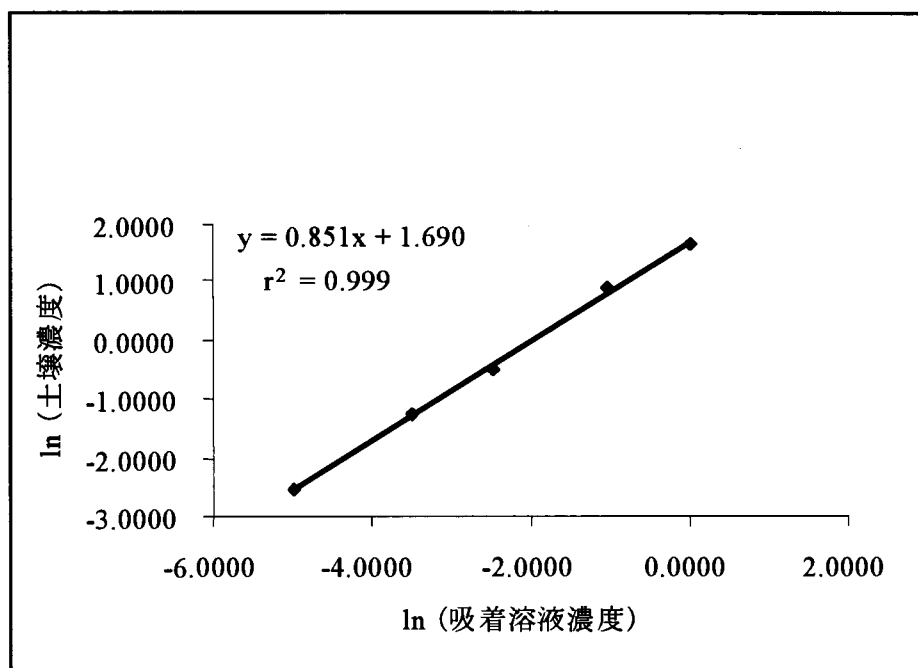


図 6 [PP-¹⁴C]ピラクロニルの Freundlich の吸着等温線 (007)

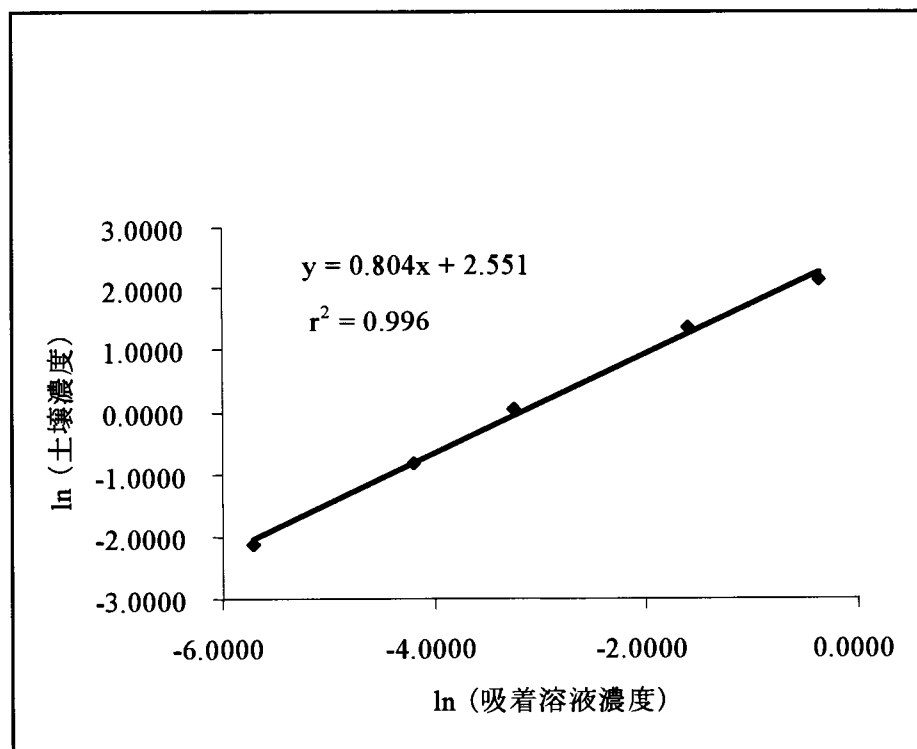


図 7 [PP-¹⁴C]ピラクロニルの Freundlich の吸着等温線 (008)

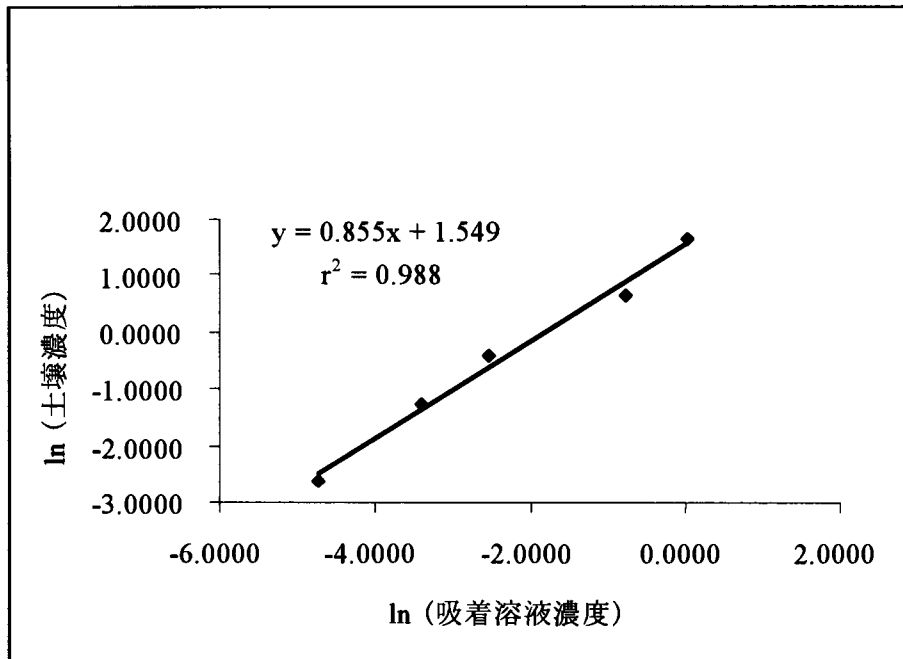


図 8 [PP-¹⁴C]ピラクロニルの Freundlich の吸着等温線 (009)

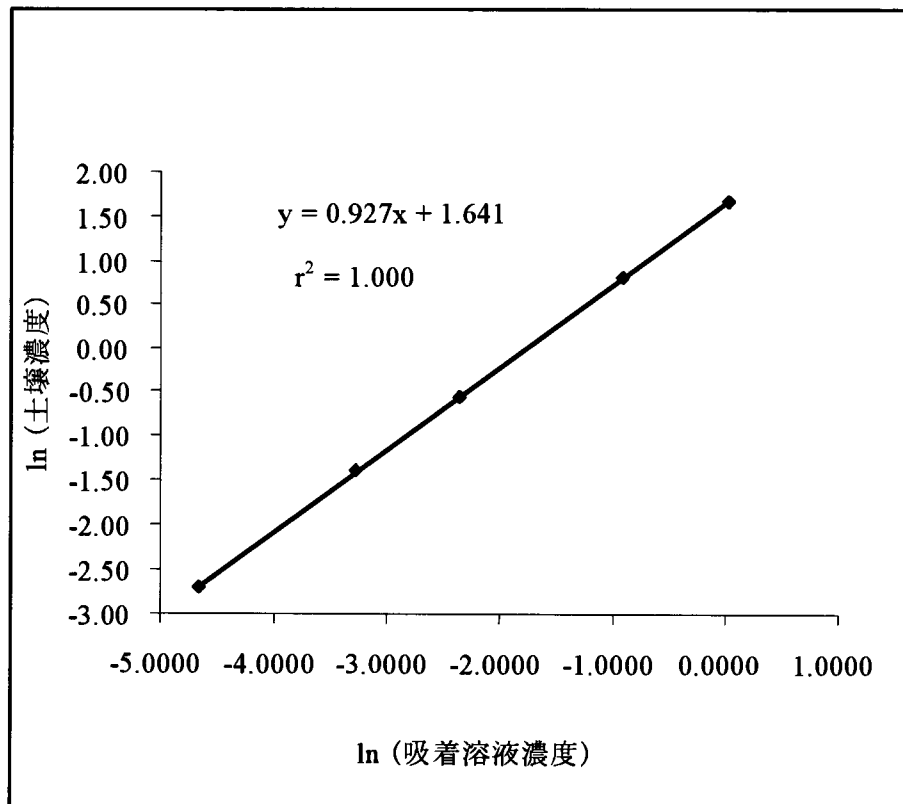


図 9 [PP-¹⁴C]ピラクロニルの Freundlich の吸着等温線 (001A)

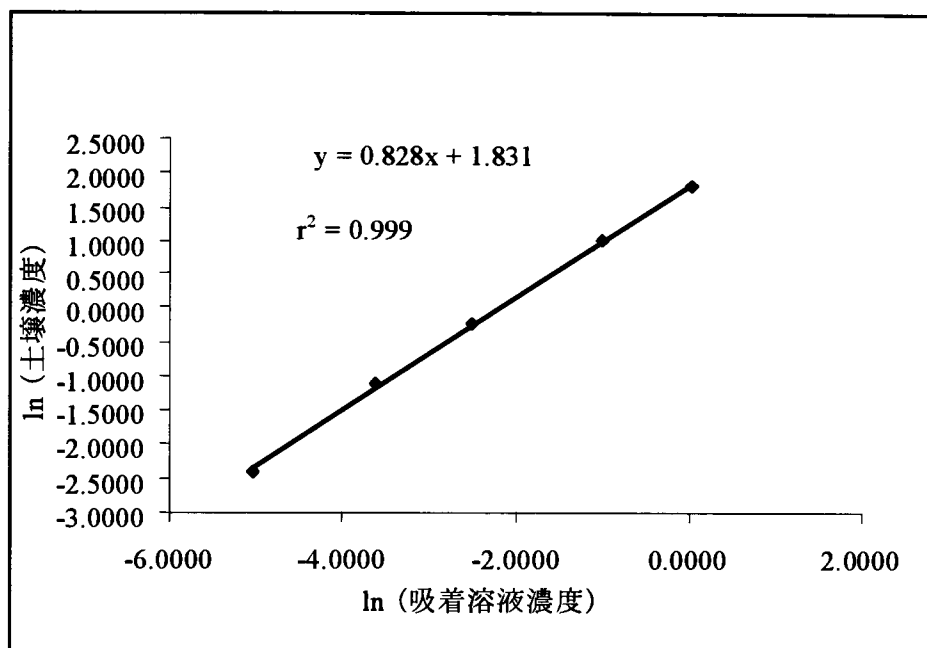


図 10 [PP-¹⁴C]ピラクロニルの Freundlich の吸着等温線 (010)

表 13と表 14及び図 6～10に示すように1/n値は、0.804から0.927の範囲であった。また、[PP-¹⁴C]ピラクロニルの Freundlich の吸着係数 (K_F^{ads} 値) は、砂質埴壤土 (007)、埴壤土 (008)、砂壤土 (009)、黒ボク壤土 (001A) 及び壤土 (010) についてそれぞれ5.42、12.82、4.71、5.16及び6.24であった。全土壌の平均 K_F^{ads} 値は6.87であった。吸着等温式の相関係数の二乗 (r^2) は平均で0.996であり、溶液濃度と吸着との間に直線相関性が認められた。

[PP-¹⁴C]ピラクロニルの有機炭素に基づいた Freundlich の吸着係数 $K_F^{ads}_{oc}$ 値は、161から362で平均255であった。 $K_F^{ads}_{oc}$ 値を用いて化合物の土壌中での移動性を予測できる。化合物の $K_F^{ads}_{oc}$ 値が50未満の時は極めて高い移動性を、50から150の時は高い移動性を、150から500の時は中程度の移動性を、また500から2000の時は低い移動性を示す。この基準を用いると [PP-¹⁴C]ピラクロニルは、本試験で使用した砂質埴壤土 (007)、埴壤土 (008)、砂壤土 (009)、黒ボク壤土 (001A) 及び壤土 (010) 中では中程度の移動性を持つと予測される。

4) 吸着係数と土壌の物理化学的特性との相関

土壌の有機物含量、粘土含量、pH 及び陽イオン交換容量と吸着係数 K_F^{ads} 値との比較を、直線回帰分析を用いて行った。結果を表 15及び図 11～12に示す。

表 15 吸着係数と土壌特性との回帰分析結果

土壌識別名	土壌特性				吸着係数 K_F^{ads}
	有機炭素 含量 (%)	陽イオン 交換容量 (meq/100g)	粘土含量 (%)	pH	
砂質埴壤土 (007)	1.9	20.2	21	6.8	5.42
埴壤土 (008)	4.4	21.7	29	5.0	12.81
砂壤土 (009)	1.3	11.7	13	4.8	4.71
黒ボク壤土 (001A)	3.2	24.6*	16	5.4	5.16
壤土 (010)	3.5	28.9	21	7.7	6.24
回帰直線式の結果					
傾き	0.284854	0.314665	1.616391	-0.10036	
切片	0.903621	19.25888	8.898625	6.629272	
r^2	0.589	0.028	0.801	0.072	

* : 報告書はcmol/kgで記載

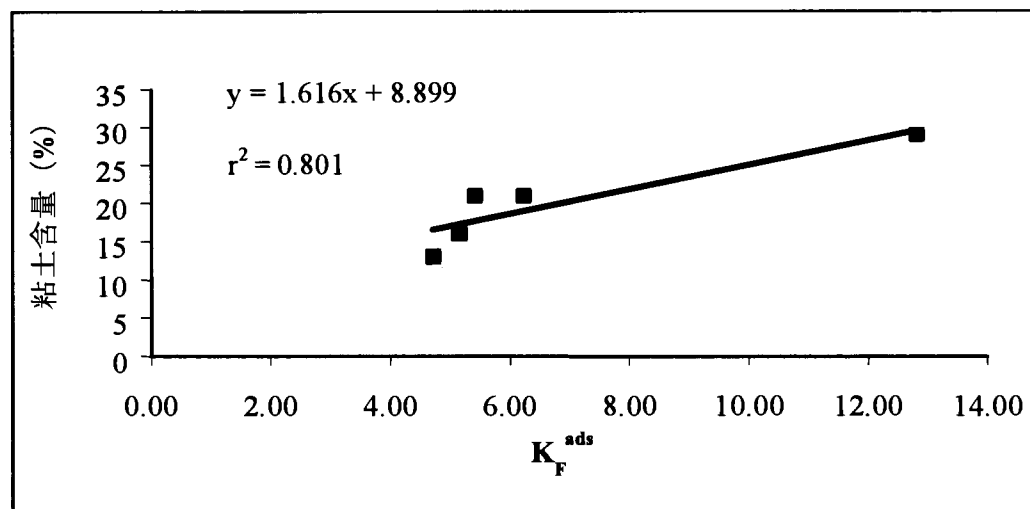


図 11 吸着係数と粘土含量との回帰曲線

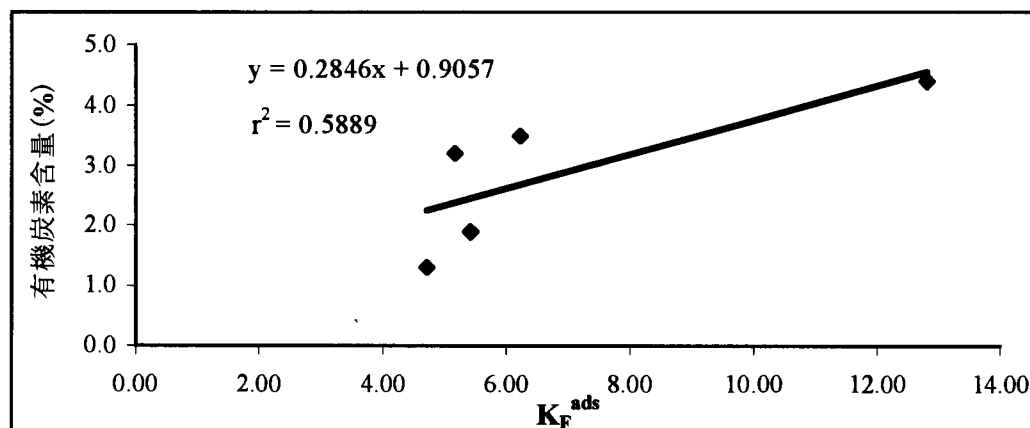


図 12 吸着係数と有機炭素含量との回帰曲線

吸着係数と土壌中の粘土含量との間に相関 ($r^2 > 0.8$) が認められ、土壌中の粘土含量が増加すると、ピラクロニルの吸着量は増加すると予測できる。吸着係数と有機炭素含量との相関は低かった ($r^2 = 0.589$)。吸着係数と土壌の陽イオン交換容量、pHとの関連はなかった ($r^2 < 0.1$)。

5) 試験中の[PP-¹⁴C]ピラクロニルの安定性

段階3における吸着溶液及び土壌抽出液のHPLC分析結果を表16にまとめる。

表16 段階3における平衡化24時間後の吸着溶液及び土壌抽出液のHPLC分析結果

土壌識別名	分析試料	ピラクロニル(%)	カラム回収率(%)
007	吸着溶液	99.7	106.0
	土壌抽出液	98.5	102.3
008	吸着溶液	99.1	102.8
	土壌抽出液	96.1	98.6
009	吸着溶液	98.9	107.4
	土壌抽出液	96.3	96.8
001A	吸着溶液	100.0	102.1
	土壌抽出液	99.6	103.5
010	吸着溶液	99.5	94.7
	土壌抽出液	99.0	97.1
コントロール*	9/29/03 分析	99.7	101.9
コントロール**	1/12/04 分析	100.0	92.3
平均回収率±標準偏差		98.9±1.3	100.5±4.6

* : 007,008,009,001A 土壌のコントロール ** : 010 土壌のコントロール

段階3の吸着試験におけるピラクロニルは、全溶液及び抽出液中で放射性炭素の96.1%以上を示し、安定であることが示された。放射性炭素のHPLCカラム回収率(溶出dpm/注入dpm)を算出した結果、平均100.5±4.6%であった。

まとめ

有機炭素含量、粘土含量、土性及びpHの異なる5種類の土壌を用いて、[PP-¹⁴C]ピラクロニルの吸着等温式を決定した。吸着係数 $K_F^{ads}_{oc}$ 値は、161から362の範囲で平均255であった。これらの $K_F^{ads}_{oc}$ 値は、ピラクロニルが本試験で使用した米国土壌と日本土壌中で中程度の移動性を示すと予測できる。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

5. 水中運命に関する試験

(資料 代-14)

試験未実施

(1) 加水分解運命試験

提出省略理由書
(試験成績が未提出の場合)

省 略 理 由

ピラクロニルは、一般環境条件下では加水分解的に安定であると判断されたため、加水分解運命試験は実施しなかった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(資料 代-15)

(2) [¹⁴C] 標識ピラクロニルを用いた水中光分解運命試験

試験機関：残留農薬研究所

[GLP対応]

報告書作成年：2004年

供試標識化合物：次表の2種類の標識化合物を使用した。

化学名及び名称	1-(3-chloro-4,5,6,7-tetrahydropyrazolo[1,5-a]pyridin-2-yl)-5-[methyl(prop-2-ynyl)amino]pyrazole-4-carbonitrile (IUPAC)	
	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル	[P- ¹⁴ C] ピラクロニル
化学構造式及び標識部位 (*で表示)		
比放射活性		
放射化学的純度		
略 称	PP環標識体	P環標識体

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まとめる。

試験に用いた供試水	緩衝液 (pH 7)	田面水 (自然水)
供試水の調製方法	0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液 118.6 mLと0.1 M リン酸一カリウム水溶液200 mLを混合後、高純度水で2 Lに調製	採取後ガラス繊維ろ紙でろ過
供試水の選定根拠	加水分解試験 (資料 物-10) で pH 7緩衝液中で安定であったことと、自然環境条件に近いこと	水田用の除草剤であるため
採取場所	—	
採取日	—	2004年4月30日

(つづき)

試験に用いた供試水	緩衝液 (pH 7)	田面水 (自然水)
pH	6.97	7.21
滅菌の有無	有り	有り
電気伝導率 (mS/m)	146.5	15.4
全蒸発残留物量 (mg/L)	—	130
懸濁物質量 (mg/L)	—	<2
溶存酸素量 (mg/L)	—	8.9
保存条件	用時調製	採取当日に調製後、使用時まで冷蔵保存 (約4℃)

光源：6.5 kW キセノンショートアークランプ

規格；WXP-300S-65型キセノン光照射装置 (株式会社ワコム製作所)

分光分布；290～800 nm

光学フィルター；290 nm以下の紫外線及び800 nm以上の赤外線をカットするフィルター2枚を使用

目標光強度； W/m^2 (波長範囲 290～800 nm)

光強度； W/m^2 (波長範囲 300～400 nm)

W/m^2 (波長範囲 290～800 nm)

試験方法：

反応容器；照射試料；100 mL容石英製試料瓶 (直径約50 mm＝光路長)

暗所対照試料；100 mL容褐色珪酸ガラス製試料瓶 (直径約50 mm)

両反応容器とも、PTFEコーティングパッキン付き密栓キャップを使用。

供試水及び容器の滅菌；供試水はろ過滅菌 (Steritop-SCGP、孔径0.22 μ m)、容器等は乾熱滅菌 (160℃、30分以上) 又はオートクレーブ滅菌 (121℃、20分間)。

施用液の調製；2種類の [14 C] 標識ピラクロニル標品の全量 (PP環標識体；10.4 mCi、P環標識体；14.6 mCi) を酢酸エチルに個々に溶解し、保存溶液を調製した。各保存溶液の一部を分取し、溶媒留去後アセトニトリルに溶解して、それぞれ約200 mg/Lの施用液を調製した。

試験系の調製；各滅菌供試水100 mLを滅菌反応容器に分注し、施用液1 mLを添加・攪拌して試験溶液を調製した。

溶解補助剤と濃度；アセトニトリル、1%

試験濃度とその根拠；約2 mg/L、ピラクロニルの水溶解度 (50.1 mg/L) の1/2以下。

試験温度；25±1℃

試験期間の設定とその根拠；21日間、予備試験でピラクロニルは光照射下で比較的安定であったため、太陽光照射に換算した時に、30日を越える期間とした。

試験系、採取時点及び分析点数；次表に示す。

試験系は各試験区について3試料を調製し、2試料を試験試料として用い、残り1試料は予備試料とした。各採取時点で、試験試料から1 mLをクリーンベンチ内で採取し、分析に供した。採取後、各試験試料に対し照射又は暗所条件下でのインキュベーションを直ちに開始した。

標識体名	試験水	試験区	試料採取時点
[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル	緩衝液 (pH 7)	照射区	0, 1, 3, 7, 10, 14, 21日
		暗所対照区	0, 1, 3, 7, 10, 14, 21日
	田面水	照射区	0, 1, 3, 7, 10, 14, 21日
		暗所対照区	0, 1, 3, 7, 10, 14, 21日
[P- ¹⁴ C] ピラクロニル	緩衝液 (pH 7)	照射区	0, 7, 14, 21日
		暗所対照区	0, 7, 14, 21日
	田面水	照射区	0, 7, 14, 21日
		暗所対照区	0, 7, 14, 21日

分析法；試験溶液中の放射性成分の測定、定量及び同定法を次表に要約する。

分析項目	分析法	分析日
試験溶液中の放射エネルギー	分析試料の一部を直接液体シンチレーション計測 (LSC)	採取当日
放射性成分の定量	分析試料の一部を直接HPLCで分析：HPLC溶出液を21分画し、HPLC画分中の放射能を放射能検出器で定量	試料は分析日まで冷凍保存 (約-20℃)
分解物の同定/特徴付け	参照化合物とのHPLC及びTLCクロマトグラフィー	

滅菌維持の確認；0時点と21日後の採取試料の一部を塗抹培養法（1週間、25℃）により確認。（結果：滅菌状態は維持されていた。）

半減期の算出方法；ピラクロニルの水中光分解を一次反応と見なし、次式を得た。

$$-dC/dt = kC$$

この式にdtを乗じ、積分して次式を得た。

$$\ln (C/C_0) = -kt$$

ここで、Cは任意の時間 t におけるピラクロニルの濃度、C₀は初期濃度、kは減衰速度定数である。

C/C₀は、[任意の時間 t におけるピラクロニルの残留率/t=0における残留率]と同じであるので、ピラクロニルの施用量%を時間に対してプロットし、

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

最小二乗法を用いて算出した回帰直線の傾きから減衰速度定数 k を求めた。半減期 ($T_{1/2} = DT_{50}$) は次式より算出し、また得られた一次減衰パラメーターから90%消失時間 (DT_{90}) を求めた。

$$T_{1/2} = 0.693/k$$

量子収率の測定：被験物質の量子収率はピリジン/*p*-ニトロアセトフェノン (PNAP) 系の化学光量計 (アクチノメーター) を用いてDulin及びMillの方法に準じて測定した。即ち、ピリジン及びPNAPアセトニトリル溶液の一部を水で溶解し、試験液を調製した。ピラクロニルの水中光分解試験と同様に光照射を行い、光照射0, 1, 3, 7, 10, 14, 21日後に試験液を採取して、試験液中のPNAPをHPLC / 内部標準法 (内部標準物質：*p*-ニトロトルエン) により測定した。さらに、PNAPと非放射性ピラクロニルの波長290~800 nmの吸収スペクトルを測定した。

被験物質の量子収率 (ϕ_{cE}) は次式により算出した。

$$\phi_{cE} = \phi_a \left[\frac{1 \sum L_\lambda \varepsilon_\lambda^a}{S \sum L_\lambda \varepsilon_\lambda^c} \right]$$

ここで、

- ϕ_a : アクチノメーターの量子収率 ($\phi_a=0.0169$ [ピリジン濃度 (M)])
 S : アクチノメーターの光分解速度定数 (k_p^a) / 被験物質の光分解速度定数 (k_p^c)
 a : アクチノメーター
 c : 被験物質
 L_λ : 波長 λ における照射光エネルギー
 ε_λ : 波長 λ における分子吸光係数

なお、ピラクロニルの水中光分解試験の予備検討の結果、光分解生成物は、[PP- ^{14}C] 及び [P- ^{14}C] ピラクロニル試験区で共通であった。このため、半減期、分解速度定数、量子収率等の減衰パラメーターは、[PP- ^{14}C] ピラクロニルでの試験結果に基づき算出した。

結果：

- 1) 施用液中の [^{14}C] 標識ピラクロニルの放射化学的純度と濃度
施用液中の [PP- ^{14}C] 及び [P- ^{14}C] ピラクロニルの放射化学的純度及び濃度は、それぞれ %と %及び とであった。
- 2) 物質収支
各試験区における各採取時点での放射能濃度と回収率をそれぞれ表 1. 1と1. 2及び表 2. 1と2. 2に示す。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

表 1.1 緩衝液 (pH 7) における各試験区の放射能濃度 (mg eq./L)

照射条件	[¹⁴ C] ピラクロニル	初期濃度 (mg eq./L)	濃度 (mg eq./L)						
			0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
照射区	PP環標識体	1.926	1.926	1.913	1.939	1.925	1.937	1.919	1.925
	P環標識体	1.889	1.889	-	-	1.919	-	1.920	1.952
暗所 対照区	PP環標識体	1.923	1.923	1.929	1.916	1.924	1.940	1.927	1.939
	P環標識体	1.900	1.900	-	-	1.904	-	1.912	1.927

数値は2連分析の平均値。 - : なし。

表 1.2 田面水における各試験区の放射能濃度 (mg eq./L)

照射条件	[¹⁴ C] ピラクロニル	初期濃度 (mg eq./L)	濃度 (mg eq./L)						
			0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
照射区	PP環標識体	1.917	1.917	1.922	1.950	1.946	1.954	1.920	1.954
	P環標識体	1.895	1.895	-	-	1.930	-	1.926	1.942
暗所 対照区	PP環標識体	1.926	1.926	1.912	1.928	1.924	1.924	1.901	1.923
	P環標識体	1.894	1.894	-	-	1.897	-	1.868	1.905

数値は2連分析の平均値。 - : なし。

表 2.1 緩衝液 (pH 7) における各試験区の放射能回収率 (%)

照射条件	[¹⁴ C] ピラクロニル	初期濃度 (mg eq./L)	初期放射能に対する割合 (%)						
			0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
照射区	PP環標識体	1.926	100.00	99.32	100.68	99.94	100.57	99.62	99.96
	P環標識体	1.889	100.00	-	-	101.57	-	101.65	103.32
暗所 対照区	PP環標識体	1.923	100.00	100.31	99.66	100.08	100.92	100.19	100.86
	P環標識体	1.900	100.00	-	-	100.19	-	100.60	101.40

数値は2連分析の平均値。 - : なし。

表 2.2 田面水における各試験区の放射能回収率 (%)

照射条件	[¹⁴ C] ピラクロニル	初期濃度 (mg eq./L)	初期放射能に対する割合 (%)						
			0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
照射区	PP環標識体	1.917	100.00	100.26	101.71	101.49	101.92	100.16	101.93
	P環標識体	1.895	100.00	-	-	101.87	-	101.65	102.49
暗所 対照区	PP環標識体	1.926	100.00	99.26	100.09	99.89	99.88	98.69	99.81
	P環標識体	1.894	100.00	-	-	100.17	-	98.65	100.59

数値は2連分析の平均値。 - : なし。

以上のように、各試験溶液中の放射能回収率 (¹⁴C-バランス) はPP環標識体では施用量 (初期値) の98.7~101.9%、P環標識体では98.7~103.3%であり、標識部位、試験区に係わりなくいずれの時点でも全量が試験溶液中に回収され、放射能の損失はなかった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

3) 放射性成分の定量

3.1) 緩衝液／暗所対照区試料

[PP-¹⁴C] 及び [P-¹⁴C] ピラクロニル試験における暗所対照区試料のHPLC分析の結果をそれぞれ表 3と表 4にまとめる。

表 3 緩衝液 (pH 7) における各採取時点での暗所対照区試料のHPLC分析

画分 No.	分解物 (識別)	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル						
		施用放射能% (濃度 : mg eq./L)						
		0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
	I (ピラクロニル)	94.86 (1.824)	95.63 (1.839)	95.38 (1.834)	94.37 (1.815)	95.04 (1.827)	95.36 (1.834)	95.44 (1.835)

数値は2連分析の平均値。 その他は1~11,13,16,18~21画分。 ND : 検出限界未満。
各採取時点における施用放射能%は0 時点における初期濃度に対する割合。

表 4 緩衝液 (pH 7) における各採取時点での暗所対照区試料のHPLC分析

画分 No.	分解物 (識別)	[P- ¹⁴ C] ピラクロニル						
		施用放射能% (濃度 : mg eq./L)						
		0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
	I (ピラクロニル)	96.36 (1.831)	-	-	95.14 (1.808)	-	94.64 (1.798)	95.90 (1.822)

数値は2連分析の平均値。 その他は1~11,13,16,18~21画分。 ND : 検出限界未満。
- : なし。 各採取時点における施用放射能%は0 時点における初期濃度に対する割合。

表 3と表 4に示すように、I (ピラクロニル) は0 時点では施用量の94.9% (PP環標識体) と96.4% (P環標識体) であり、21日後では95.4% (PP環標識体) と95.9% (P環標識体) であった。従って、ピラクロニルは緩衝液 (pH 7) 中、暗条件下で安定であった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

3.2) 緩衝液／照射区試料

[PP-¹⁴C] 及び [P-¹⁴C] ピラクロニル試験における照射区試料のHPLC分析の結果をそれぞれ表 5と表 6にまとめる。

表 5 緩衝液 (pH 7) における各採取時点での照射区試料のHPLC分析

画分 No.	分解物 (識別)	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル						
		施用放射能% (濃度 : mg eq./L)						
		0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
	I (ピラクロニル)	94.64 (1.823)	95.63 (1.842)	94.80 (1.826)	93.40 (1.799)	92.11 (1.774)	91.77 (1.768)	91.45 (1.761)

数値は2連分析の平均値。 其他は1~11,13,16,18~21画分。 ND : 検出限界未満。
各採取時点における施用放射能%は0 時点における初期濃度に対する割合。

表 6 緩衝液 (pH 7) における各採取時点での照射区試料のHPLC分析

画分 No.	分解物 (識別)	[P- ¹⁴ C] ピラクロニル						
		施用放射能% (濃度 : mg eq./L)						
		0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
	I (ピラクロニル)	95.50 (1.804)	-	-	92.33 (1.744)	-	92.23 (1.742)	91.55 (1.729)

数値は2連分析の平均値。 其他は1~11,13,16,18~21画分。 ND : 検出限界未満。
- : なし。 各採取時点における施用放射能%は0 時点における初期濃度に対する割合。

以上のように、I (ピラクロニル) は照射時間の経過とともに、極く僅かに減少した。即ち、0 時点では [PP-¹⁴C] 及び [P-¹⁴C] ピラクロニルはそれぞれ施用量の94.6%と95.5%であったが、照射21日後にはそれぞれ施用量の91.5%と91.6%になった。

試験溶液中には、施用量の10%を超える分解物は、両標識体試験区で検出されなかった。照射21日後までに痕跡量生成する分解物としてXVIII (: PP環標識体

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

(%)、P環標識体(%)及びXXI(:PP環標識体(%)、P環標識体(%))
 がそれぞれ検出された。XVIII()は0時点でも %存在した。またXX()
)は両標識体で試験期間を通して検出されたが、照射期間中に増加する傾向はみられなかった。

[PP-¹⁴C] 及び [P-¹⁴C] ピラクロニル試験で、それぞれに固有な放射性成分は検出されなかったことから、テトラヒドロピラゾロ [1,5-*a*] ピリジン環との生成はなかった。

3.3) 田面水/暗所対照区試料

[PP-¹⁴C] 及び [P-¹⁴C] ピラクロニル試験における暗所対照区試料の結果をそれぞれ表7と表8にまとめる。

表7 田面水における各採取時点の暗所対照区試料中の放射性成分のHPLC分析結果

画分 No.	分解物 (識別)	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル						
		施用放射能%						
		(濃度 : mg eq./L)						
		0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
	I (ピラクロニル)	95.71 (1.844)	95.57 (1.841)	95.53 (1.840)	95.06 (1.831)	95.59 (1.841)	95.48 (1.839)	95.81 (1.846)
		ND (ND)	ND (ND)	ND (ND)	ND (ND)	ND (ND)	ND (ND)	ND (ND)

数値は2連分析の平均値。 他は1~11,13,16,18~21画分。 ND : 検出限界未満。

各採取時点における施用放射能%は0時点における初期濃度に対する割合。

表 8 田面水における各採取時点の暗所対照区試料中の放射性成分のHPLC分析結果

画分 No.	分解物 (識別)	[P- ¹⁴ C] ピラクロニル						
		施用放射能% (濃度: mg eq./L)						
		0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
	I (ピラクロニル)	94.68 (1.793)	-	-	93.65 (1.774)	-	95.63 (1.811)	95.85 (1.815)

数値は2連分析の平均値。その他は1~11,13,16,18~21画分。ND: 検出限界未満。
- : なし。各採取時点における施用放射能%は0 時点における初期濃度に対する割合。

以上のように、I(ピラクロニル) は0 時点で施用量の95.7% (PP環標識体) と94.7% (P環標識体) であり、21日後では95.8% (PP環標識体) と95.9% (P環標識体) であった。従って、ピラクロニルは田面水中、暗条件下で安定であった。[PP-¹⁴C] ピラクロニル試験区において、0 時点で検出されたXX() : 施用量の()% は3日後には検出限界未満となり、それに伴いXVIII() が僅かに増加した(3日後: ()%、21日後: ())。さらに [P-¹⁴C] ピラクロニル試験区においても、0 時点で検出されたXX() は7日後には検出限界未満となり、[PP-¹⁴C] ピラクロニル試験区と同様にXVIII() が僅かに増加した。

3.4) 田面水/照射区試料

[PP-¹⁴C] 及び [P-¹⁴C] ピラクロニル試験における照射区試料の結果をそれぞれ表 9と表 10にまとめる。

表 9 田面水における各採取時点の照射区試料中の放射性成分のHPLC分析結果

画分 No.	分解物 (識別)	[PP- ¹⁴ C] ピラクロニル						
		施用放射能% (濃度: mg eq./L)						
		0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
	I (ピラクロニル)	96.08 (1.842)	92.92 (1.782)	87.60 (1.680)	81.23 (1.558)	77.02 (1.477)	71.33 (1.368)	68.68 (1.317)

数値は2連分析の平均値。 其他は1~7,9,13,16,18~21画分。 ND: 検出限界未満。
各採取時点における施用放射能%は0 時点における初期濃度に対する割合。

表 10 田面水における各採取時点の照射区試料中の放射性成分のHPLC分析結果

画分 No.	分解物 (識別)	[P- ¹⁴ C] ピラクロニル						
		施用放射能% (濃度: mg eq./L)						
		0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日
	I (ピラクロニル)	95.88 (1.817)	-	-	80.97 (1.535)	-	74.14 (1.405)	67.00 (1.270)

数値は2連分析の平均値。 其他は1~11,13,16,18~21画分。 ND: 検出限界未満。
- : なし。 各採取時点における施用放射能%は0 時点における初期濃度に対する割合。

以上のように、I(ピラクロニル) は照射時間の経過とともに、緩やかに減少した。
即ち、0 時点では [PP-¹⁴C] 及び [P-¹⁴C] ピラクロニルはそれぞれ施用量の96.1%
と95.9%であったが、照射21日後にはそれぞれ68.7%と67.0%に減少した。

両標識体試験区の試験溶液中で、 分解物はXVIII()であり、

照射21日後には [PP-¹⁴C] ピラクロニル試験区で % (0 時点で %)、[P-¹⁴C] ピラクロニル試験区で % (0 時点で %) であった。その他、照射21日後までに微量生成する分解物としてXXI(: %(PP環標識体)、 %(P環標識体)) がそれぞれ検出された。

[PP-¹⁴C] ピラクロニル試験区において、XX()は照射3日後に施用量の %に微増し、その後減少して照射21日後には検出限界未満となった。それに伴いXVIII()及びXXI()が僅かに増加したこと、また暗所対照区との比較から、XX()を介してXVIII()及びXXI()が生成する経路が示唆された。一方、[P-¹⁴C] ピラクロニル試験区でも暗所対照区との比較から、XX()が光反応により、極微量生成する可能性が示された。

[PP-¹⁴C] 及び [P-¹⁴C] ピラクロニル試験区で、それぞれに固有な放射性成分は検出されなかったことから、テトラヒドロピラゾロ [1,5-*a*] ピリジン環とピラゾール環の間で開裂を伴う分解物の生成はなかった。

4) 分解物

試験溶液中の放射性成分をHPLCクロマトグラフィー及びTLCクロマトグラフィーにより同定/特徴付けされた分解物及び想定生成機構を表 11に示す。

表 11 試験溶液中で生成した分解物

分解物 (識別)	生成が確認された試料	想定生成機構

[PP-¹⁴C] 及び [P-¹⁴C] ピラクロニルの両試験区では、分解物及びその生成量はほぼ同一であった。緩衝液 (pH 7) 中で直接光分解により、ピラクロニルから生成する分解物は微量のXVIII()とXXI()であった。一方、田面水中では施用量の10%を超える主要分解物としてXVIII()が生成し、その他にXX()及びXXI()も極微量生成した。

5) 推定半減期 (DT₅₀) と90%消失時間 (DT₉₀)

[PP-¹⁴C] ピラクロニル試験区の結果を用いて算定した結果と東京 (北緯35度)、春(4月から6月まで)の太陽光換算した推定半減期を表 12に示す。

表 12 ピラクロニルの推定半減期 (DT₅₀) と90%消失時間 (DT₉₀)

供試水	試験条件	キセノン光下		東京、春の 太陽光下換算	
		DT ₅₀	DT ₉₀	DT ₅₀	DT ₉₀
緩衝液 (pH 7)	光照射区	320日	1064日	823日	2734日
	暗所対照区	> 1年	> 3年		
田面水	光照射区	42日	140日	108日	359日
	暗所対照区	> 1年	> 3年		

ピラクロニルは、暗所条件下では田面水及び緩衝液 (pH 7) 中において、21日間のインキュベーション期間内で減衰せず安定であった。キセノン光照射下では、緩衝液 (pH 7) 中で極めて緩やか (半減期320日) に光分解 (直接的な光分解) された。一方、田面水中では間接的な光分解の寄与 (光増感作用) により、光分解が急速に加速された (半減期42日)。なお、キセノン光の試験期間中 (21日間) の積算放射照度は約54日間の太陽光照射 (東京、春) に相当した。

6) ピラクロニルの量子収率

化学光量計 (アクチノメーター、*p*-ニトロアセトフェノン/ピリジン系) の試験結果からアクチノメーターの光分解速度定数は /日、半減期は21.6日であった。前記に示した式を用いて算定したピラクロニルの量子収率 (ϕ_{cE}) はであった。

まとめ

ピラクロニルは、直接的な光分解による分解速度は極めて遅く、その半減期は320日であった。しかし、自然水中では間接的な光分解の寄与により、その分解速度が急速に加速され、半減期は42日であった。自然水中では施用量の10%を超える光分解生成物が検出され、その分解生成物はXVIII () であった。ピラクロニルの水中における想定光分解経路を図 1に示す。以上のことから、水中光分解はピラクロニルの環境水中での主要な分解要因の1つとなり得る。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

図 1 ピラクロニルの想定水中光分解経路

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

6. 生物濃縮性試験

(資料 代-16 (水-5))

ピラクロニル原体の生物濃縮性試験

試験機関：エスコ

報告書作成年：2004年

検 体：ピラクロニル原体（純度 %）

供試生物：コイ *Cyprinus carpio*、47 匹/区

体長（平均±標準偏差） 7.13 ± 0.46 cm、体重（平均±標準偏差） 4.49 ± 0.79 g

方 法：

結 果：

①試験液中の検体濃度 (mg/L)；

試験区 (mg/L)	取込期間 (h)						排泄期間 (h)				
	0	1	2	4	8	12	1	2	4	8	12
助剤	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.01	0.010	0.010	0.010	0.010	0.010	0.009	ND	ND	ND	ND	ND
0.4	0.38	0.38	0.38	0.38	0.40	0.40	ND	ND	ND	ND	ND

助剤：助剤対照区、ND：<0.002 mg/L

取込期間における試験液中の平均検体濃度は、0.01 mg/L 区では 0.010 mg/L であり、0.4 mg/L 区では 0.39 mg/L であった。助剤対照区は全ての測定時点において検出限界 (<0.002 mg/L) 以下であった。排泄期間では、いずれの濃度区においても全ての測定時点で検出限界 (<0.002 mg/L) 以下であった。

②魚体中の検体濃度 (mg/kg)；

試験区 (mg/L)	取込期間 (h)						排泄期間 (h)				
	0	1	2	4	8	12	1	2	4	8	12
助剤	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
0.01	ND	0.03	0.03	0.03	0.02	0.03	ND	ND	ND	ND	ND
0.4	ND	1.02	1.10	1.14	1.27	1.29	0.40	0.13	0.06	ND	ND

助剤：助剤対照区、ND：<0.01 mg/kg

魚体中の検体濃度は、取込期間では、0.01 mg/L 区において 1 時間後に 0.03 mg/kg に達し、以降 12 時間後まで 0.03 mg/kg に保たれた。定常状態 (1~12 時間後、8 時間後は±20%以内にならなかったため除外) では 0.03 mg/kg であった。0.4 mg/L 区においては、1.02~1.29 mg/kg で推移し、定常状態 (2~12 時間後) では平均 1.20 mg/kg であった。助剤対照区では全ての測定時点において検出限界 (<0.01 mg/kg) 以下であった。

排泄期間での魚体中の検体濃度は、0.01 mg/L 区では 0 時間で 0.03 mg/kg であったが、これ以降の全ての測定時間では検出限界 (<0.01 mg/kg) 以下であった。従って、検体が 95%排泄される時間は求められなかった。0.4 mg/L 区では、0 時間で 1.29 mg/kg であったが、徐々に減少し 4 時間後では 0.06 mg/kg となり、8 及び 12 時間後では検出限界 (<0.01 mg/kg) 以下であった。検体が 95%排泄される時間は 4 時間後と判断された。助剤対照区では全ての測定時点で検出限界 (<0.01 mg/kg) 以下であった。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

③濃縮係数；定常状態での試験液中並びに魚体中の検体濃度とともに濃縮係数（BCFss）を次表に示す。

試験区	試験液中検体濃度 (mg/L)	魚体中検体濃度 (mg/kg)	濃縮係数 (BCFss)
0.01 mg/L 区	0.010	0.03	3.00
0.4 mg/L 区	0.39	1.20	3.08

取込速度定数、排泄速度定数及び動的生物濃縮係数については検体の魚体中濃度変化が速く、濃度変動過程が測定できなかったため求められなかった。

観察及び脂質量；試験期間中全ての区の供試魚に死亡及び一般状態の異常は観察されなかった。試験終了時の平均魚体脂質量は 0.01 mg/L 区で 2.50%、0.4 mg/L 区で 3.33%であり、ともに試験開始時魚体脂質量 2.90%の±25%以内の変動であった。

<代謝分解のまとめ>

ピラクロニルの動物、植物、土壌における代謝、分解、残留の要約は以下のとおりであり、代謝分解経路を 574 頁に、代謝分解物の概要を 575 頁に示した。

代謝分解試験にはピラクロニルのピラゾール環を標識した [P-¹⁴C] ピラクロニルとテトラヒドロピラゾロ [1,5-*a*] ピリジン環を標識した [PP-¹⁴C] ピラクロニルの 2 種類の標識体を用いた。

動物代謝：

ラットを用いた [¹⁴C] 標識ピラクロニルの 25 mg/kg (低用量) 及び 500 mg/kg (高用量) の 2 用量群における投与後 72 または 96 時間までの薬物動態、尿・糞排泄及び体内分布、胆汁排泄、反復経口投与、代謝物同定 (250 mg/kg を追加) を調査した。

[予備試験]

予備試験 (資料 代-1) において、投与した [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルは 168 時間で尿中に投与量の 69~73% (低用量)、57~74% (高用量) が、糞中に 24~27% (低用量)、23~34% (高用量) が排泄され、標識体、用量及び雌雄に係わらず定量的に回収された。主排泄経路は尿中であり、呼気中には投与量の 0.03% 以下の ¹⁴CO₂ が検出されたにすぎなかったため、これ以降の試験では ¹⁴CO₂ の捕集は行わなかった。168 時間後の体内には標識体、用量及び雌雄に係わらず投与量の 0.5% 以下の僅かな放射能が残留していた。体内分布では、全血液、カーカス、腎臓、肝臓及び皮膚で僅かな放射能が検出されたが、最も高い分布率を示したカーカスでも投与量の 0.5% 以下であった。主排泄経路である尿中にはプロパルギル側鎖の N-脱アルキル化とテトラヒドロピラゾロ [1,5-*a*] ピリジン環の酸化 (水酸化) により生成した多数の代謝物が認められたが、尿、糞及び血漿中の代謝物プロファイルは 2 種標識体で質的に顕著な差は認められず、基本骨格に開裂がないことを示した。

[吸収]

血漿中キネティクス試験 (資料 代-5) では、[P-¹⁴C] ピラクロニルの単回経口投与での血漿中濃度推移から、低用量では T_{max} が 0.5 と 1.0 時間 (雄及び雌)、C_{max} が 17.59 と 14.47 µg eq./g (雄及び雌)、AUC_{0-∞} が 54.25 と 69.13 µg eq.h/g (雄及び雌) で、消失半減期は 30.84 と 42.39 (雄及び雌) 時間であった。高用量では T_{max} が 2.0 時間 (雌及び雄)、C_{max} が 42.96 と 40.44 µg eq./g (雄及び雌)、AUC_{0-∞} が 691.4 と 1445 µg eq.h/g (雄及び雌) で、消失半減期は 58.74 と 26.41 (雄及び雌) 時間であった。AUC_{0-∞} は低用量に比べて高用量は雄で約 13 倍、雌で約 21 倍を示し、雌では用量相関的 (20 倍) に増加した。

胆汁排泄試験 (資料 代-4) では、低用量での投与後 48 時間における放射能の回収率は、雄が 98.0%、雌が 98.3% で、共に投与した [PP-¹⁴C] ピラクロニルが定量的に回収された。胆汁中では投与量の 14.2% (雄) 及び 27.0% (雌)、尿中では 72.3% (雄) 及び 50.8% (雌)、糞中では 7.1% (雄) 及び 5.4% (雌)、ケージ洗液 (最終洗液を含む) では 2.9% (雄) 及び 8.1% (雌)、カーカスでは 1.4% (雄) 及び 6.7% (雌) であった。胆汁への排泄に雌雄で差が認められ、非カニューレーションラットに比べて雄では糞への、雌では尿及び糞への排泄

が減少し、尿中放射能の一部は腸肝循環して排泄されると推測された。胆汁、尿及びケージ洗液を合わせた低用量（投与後 48 時間）での消化管吸収率は雄で 89%、雌で 85%と算出された。高用量（投与後 72 時間）での消化管吸収率は雌雄とも最大でおよそ 88%と推定された。

[排泄]

排泄バランス試験（資料 代-2,3）では、単回経口投与した [PP-¹⁴C] ピラクロニルは用量及び雌雄に係わりなく消化管から速やかに吸収され、体内に広く分布し、主に尿中から急速に排泄された。低用量では投与後 24 時間で尿中に雄で投与量の 66.6%、雌で 66.7%、糞中に 21.2%（雄）及び 18.2%（雌）の放射能が排泄され、48 時間後の臓器・組織中の残留放射能レベルは 0.5 µg eq./g 未満であった。高用量では投与後 48 時間で尿中に投与量の 66.8%（雄）及び 60.6%（雌）、糞中に 24.9%（雄）及び 24.1%（雌）の放射能が排泄され、72 時間後のカーカスには投与量の 0.5%以下が残留した。高用量では雌の尿排泄が雄よりも遅く、性差が認められた。投与後 48 または 72 時間後の体内の残留放射能レベルは用量及び雌雄に係わらず肝臓、腎臓及び全血液で血漿よりも高い濃度が認められた。また、25 及び 500 mg/kg の用量で単回経口投与した [P-¹⁴C] ピラクロニルの尿及び糞への排泄パターン及び体内分布に関する補足試験（資料 代-7）の結果は、上述の結果と同様であり、ラットにおいてはピラクロニルの基本骨格であるテトラヒドロピラゾロ [1,5-*a*] プリジン環とピラゾール環とが開裂する可能性が低いことが示された。25 mg/kg の用量で [P-¹⁴C] ピラクロニルを 14 日間反復経口投与した試験（資料 代-6）では、最終投与後 24 時間に尿及び糞中（ケージ洗液含む）に、雄で 87%、雌で 82%が排泄され、反復投与によっても排泄経路及び排泄速度に有意には影響しないように思われた。

[体内分布]

組織分布試験（資料 代-5）では、25 及び 500 mg/kg の用量で単回経口投与された [P-¹⁴C] ピラクロニルは消化管から急速に吸収され、体内に広く分布した。T_{max} 時点における残留放射能は腎臓、肝臓、前立腺（雄）、甲状腺で高い値を示し、その他の臓器・組織にも広く分布したが、T_{max} 以降は急速に消失し、最終調査時点では低用量で 0.82 µg eq./g 以下、高用量では 6 µg eq./g 以下であった。全血液中濃度が血漿中濃度よりも増加し、赤血球への取り込みが示唆された。また、25 mg/kg の用量で [P-¹⁴C] ピラクロニルを 14 日間反復経口投与した試験（資料 代-6）での最終投与 24 時間後の体内分布パターン及び分布濃度は、単回経口投与 24 時間後の結果と雌雄とも類似していた。反復投与により臓器・組織中の放射性残留物の濃度は全臓器・組織で高まり、雄の脳下垂体（9.2 倍）と全血液（4.2 倍）、雌の全血液≒脳下垂体≒甲状腺（5.5 倍）>筋肉≒心臓（4.3 倍）は 4 倍以上の増加率を示し、その他の臓器・組織は 4 倍未満であった。最終投与 48 時間後では、雌の全臓器・組織と雄の過半の臓器・組織で残留濃度は有意に低下したが、雌雄とも全血液中濃度は血漿中濃度よりも常に 3~6 倍高かった。48 時間の休薬によって血漿中濃度は有意に低下したが、全血液中濃度は概ね同レベルに留まり、赤血球からの消失が遅いことを示唆していた。

[代謝]

代謝物の分析（資料 代-8）では、尿及び糞中から HPLC と LC/MS によって約 種類の代謝物ピークが認められ、 種類の代表的な構造が推定された。このうち 10 種類の代謝物（Ⅱ Ⅲ Ⅳ V, VI VII VIII X, XI: ）と未変化の親

化合物(I:)がNMRまたは標品とのクロマトグラフィーによって同定された。代謝物のプロファイルは雌雄とも用量に依存せず、反復投与でも有意には変化しなかったが、一貫して性差が認められた。尿及び糞中では投与量の5%を超える代謝物は、II, III, V, VI, X, XI ()の6種類で、未変化体は糞抽出液中に低用量で1.8~2.7%、高用量で9.0~9.7%が検出された。XI ()は雌の尿中にのみ検出され、尿中のVIIIとX ()は、雌に比べて雄が低用量で10~16倍、高用量で5~8倍多かった。

ラットへのピラクロニルの経口投与では、主排泄経路は尿中であり、投与後48時間で投与量の61~68%が尿中に、23~25%が糞中に排泄され、85~89%が消化管から吸収された。吸収された放射能は、腎臓、肝臓、全血液に高い濃度で分布したが、休薬により急速に消失した。赤血球では取り込みが示唆された。代謝は広範で多数の代謝物が生成し、代謝物が主要成分であった。未変化の親化合物は、高用量の糞中で有意に検出された。雌雄で代謝物の量的な差は認められたが、基本骨格であるテトラヒドロピラゾロ [1,5-*a*] ピリジン環とピラゾール環とが開裂した代謝物はなかった。

植物代謝:

[¹⁴C] 標識ピラクロニルの2%粒剤を、200 g a.i./ha (予定慣行施用量: 2%粒剤の10 kg/ha相当)の目標施用量で、イネ幼苗移植10日後に1回処理し、登熟期に穀粒(玄米及び籾殻)、稲わら及び根部を採取して分析した。

水稻における代謝試験(資料代-9)では、[P-¹⁴C]及び[PP-¹⁴C]ピラクロニルの2種標識体を粒剤で別々に田面水に施用した。施用113日後の登熟期採取試料のTRRレベルは、玄米で0.0068~0.0085 mg eq./kg、籾殻で0.1541~0.1597 mg eq./kg、稲わらで1.391~1.6078 mg eq./kg、根部で0.2182~0.2693 mg eq./kgであった。抽出液のTRRレベルは、玄米で0.0026~0.0033 mg eq./kg (TRRの38~39%)、稲わらで0.6667~0.7606 mg eq./kg (TRRの47~48%)であった。抽出残渣は玄米で0.0042~0.0052 mg eq./kg (TRRの61~62%)、稲わらで0.7243~0.8472 mg eq./kg (TRRの52~53%)であった。

代謝物としてXII ()、XIII ()、XIV ()とこれらの糖抱合体、それぞれXV ()、XVI ()、XVII ()とXVIII ()が同定/特徴付けされた。未変化の親化合物は玄米では検出されず、稲わらでも有意には検出されなかった。玄米及び稲わらでTRRの10%を超える代謝物はなかった。

ピラクロニルの水稻での主代謝経路は

(XIII:)、XIV:)の生成)と

(XVIII:)の生成)及びその組み合わせによるXII ()の生成であった。抽出不能残留物は、玄米では水溶性成分、デンプンやタンパク質などの正常成分のほか、酵素では遊離されない植物体構成成分に取り込まれたと推定された。稲わらではリグニンやヘミセルロース等の植物体を構成する正常成分に取り込まれたと考えられた。

土壤代謝及び土壤吸着：

[¹⁴C] 標識ピラクロニルを用いて好氣的湛水土壌代謝、好氣的土壤代謝及び土壤吸着の各試験を実施した。さらに、代謝分解物 [¹⁴C] 標識 を用いて好氣的土壤代謝試験を実施した。

[好氣的湛水土壌]

水田土壌（宮城県古川市）を用いて、施用濃度 0.2 mg/kg soil、温度 25±1℃、暗所の条件下で、ピラクロニルの好氣的湛水土壌代謝を調査した。

好氣的湛水土壌代謝試験（資料 代-10）では、施用した [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルは非滅菌湛水土壌中で分解し、その DT₅₀ 値は 131 日と 139 日であった。土壤結合残留物は 183 日後に 18.4 と 14.6%AR となり、主にヒューミン画分（14.9 と 11.8%AR）に存在した。2 種標識体間でほとんど差は認められなかった。施用量の 10%を超える代謝分解物として XIX（ ）が検出され、183 日後に最大 %AR となった。XIX（ ）は滅菌土壌中では検出されなかったことから、生成に微生物の関与が示唆された。このほかに親化合物が XVIII（ ）が 120 日後に最大 %AR 検出された。

ピラクロニルは、好氣的湛水土壌中では微生物の関与によって主に XIX（ ）となり、さらに XVIII（ ）を経て分解すると想定された。

[好氣的土壌]

水田土壌（宮城県古川市）を用いて、施用濃度 0.2 mg/kg soil、温度 25±1℃、暗所、土壤水分量を最大容水量の 55%の条件下で、ピラクロニルの好氣的土壤代謝を調査した。

好氣的土壤代謝試験（資料 代-11）では、施用した [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルは、非滅菌土壌中で分解し、その DT₅₀ 値は 6.8 日と 8.2 日であった。土壤結合残留物は 181 日後で 23.1 と 20.9%AR となり、主にヒューミン画分（13.7 と 12.0%AR）に存在した。2 種標識体間でほとんど差はなかった。施用量の 10%を超える代謝分解物として XVIII（ ）が検出され、最大 61.1～62.4%AR となった。XVIII（ ）の DT₅₀ 値は約 5 年と算出された。この他に XII（ ）、XXII（ ）、XXIII（ ）が最大 4.3～5.1%AR 検出され、XX（ ）と XXI（ ）も少量検出された。一方、滅菌土壌中では顕著な分解は見られなかった。

ピラクロニルは、好氣的土壌中では微生物の関与により少なくとも 6 種類の代謝分解物を生成し、速やかに分解すると想定された。

[の好氣的土壌]

水田土壌（宮城県古川市）を用いて、施用濃度 0.2 mg/kg soil、温度 25±1℃、暗所、土壤水分量を最大容水量の 55%の条件下で、[P-¹⁴C] の好氣的土壤代謝を調査した。

代謝分解物 XIX（ ）の好氣的土壤代謝試験（資料 代-12）では、施用した [P-¹⁴C] は非滅菌土壌中で分解し、その DT₅₀ 値は 90 日であった。土壤結合残留物は 120 日後で 14.2%AR となり、主にヒューミン画分（ ）に存在していた。施用量の 10%を超える代謝分解物として XVIII（ ）が検出され、120 日後に最大

43.0%AR となった。この他に XII ()、XXII ()、XXIII () が最大 1.5%AR 検出された。

好氣的湛水土壌試験における主代謝分解物である XIX () は、好氣的土壌中では XVIII () を生成し、さらにテトラヒドロピラゾロ [1,5-*a*] ピリジン環の酸化(水酸化)やニトリル基の加水分解及び N-脱メチル化反応により分解すると想定された。

[土壌吸着]

土壌吸着係数について、[PP-¹⁴C] ピラクロニルを用いて温度 25℃、日本の火山灰土壌を含む OECD の土壌タイプ 2, 3, 4, 5 に属する 5 土壌で試験した(資料 代-13)。K_F^{ads}_{oc} 値は、285 (OECD タイプ 3)、291 (OECD タイプ 2)、362 (OECD タイプ 5)、161 (OECD タイプ 4)、178 (OECD タイプ 2) であり、5 土壌の平均値は 255 であった。ピラクロニルは土壌中では中程度の移動性を示すと予測される。

水中運命：

非標識ピラクロニルを用いて行った加水分解試験では、ピラクロニルはいずれの条件でも分解しなかったため加水分解運命試験は行わず、[¹⁴C] 標識ピラクロニルを用いた緩衝液及び自然水中での水中光分解運命試験のみを行った。

[加水分解]

加水分解試験(資料 代-14、物-10)では、試験濃度 5 mg/L (水溶解度の約 10 分の 1) の非標識のピラクロニルを pH 4.0, 7.0, 9.0 の緩衝液中で 50℃、5 日間及び pH1.2 の緩衝液中で 37℃、2 日間インキュベーションした。ピラクロニルはいずれの条件でも分解せず、安定であった。

[水中光分解]

試験濃度 2 mg/L (水溶解度の約 25 分の 1)、温度 25±1℃の条件下で、ピラクロニルの pH7 滅菌緩衝液及び滅菌田面水中における水中光分解性をキセノン光照射により調査した。

水中光分解試験(資料 代-15)では、21 日間の光照射による [P-¹⁴C] 及び [PP-¹⁴C] ピラクロニルの残存率は、緩衝液中では 91.5 と 91.6%AR、田面水中では 68.7 と 67.0%AR であった。暗所対照区では、試験期間内で減少せず安定であった。また、2 種標識体間で有意な差はなかった。[PP-¹⁴C] ピラクロニル試験区の結果を用いて算出した緩衝液中または田面水中での水中光分解半減期(DT₅₀)は、自然太陽光換算値でそれぞれ 823 日と 108 日であった。田面水中では施用量の %を超える分解物として XVIII () が照射 21 日後で %AR 生成した。他に微量分解物として XX () と XXI () が検出された。揮発成分は認められなかった。

ピラクロニルは、直接的な光分解による分解速度は遅いものの、自然水中では間接的な光分解の寄与により速やかに分解すると考えられた。

[生物濃縮性]

コイを用いた生物濃縮性試験(資料 代-16(水-5))における BCFss は 0.01 mg/L 区で 3.00、0.4 mg/L 区で 3.08 であり、検体が 95%排泄される時間は 4 時間後と判断された。

本資料に記載された情報に係わる権利及び内容の責任は協友アグリ株式会社にある。

ピラクロニルの動植物等における代謝分解経路

