

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

## 2. 植物における代謝試験

### (1) スピロジクロフェンのオレンジにおける代謝

(代謝資料 No. 6)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1999年11月2日

#### 供試標識化合物

化学名：3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン  
-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化学構造：

\*：標識部位

標識：[ <sup>14</sup>C ] 標識スピロジクロフェン [ I ]  
比放射能：3.60MBq/mg (約97 $\mu$ Ci/mg)  
放射化学的純度：>99% (HPLC)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20頁に記す。

#### 【方法】

##### 1. 作物

オレンジの樹(品種「Navelina iniasel」)10本を10L容ポット中で生育させた。ポットの土壌には適宜灌水を行い、植物の生長に最適な水分条件に保った。最小限の一般防除及び施肥を行った。

##### 2. 薬剤処理(2倍量)及び試料採取

[ <sup>14</sup>C ] [ I ] の240SC<sup>1)</sup>(フロアブル、含有量22.9%(w/v))を調製し、実際の散布に合わせて希釈液を着果早期のオレンジの樹10本に処理した(早期処理)。但し、本試験では実際の散布条件の希釈液(有効成分濃度=0.0075%)の約2倍の濃度の希釈液(有効成分濃度=0.0155%)を調製し、実際の散布条件に合わせた液量(4000L/ha)と

1) 240SCに関しては標識位置の設定理由と共に代-20頁に説明を記した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。  
して10本の樹全体に対して約900mL(有効成分換算=約140mg)を散布した。

処理後160日の成熟期にオレンジ(4859g)を収穫し、そのうち、大部分(4154g)は表面洗浄後に代謝試験のために用い、残りのオレンジ(705g)は表面洗浄をしないで放射能による残留分析法の確認用に供試した。

### 3. 試料の抽出

オレンジをアセトニトリルで表面洗浄した後、果皮と果肉に分離し、それぞれを均質化した。均質化した果皮をアセトニトリル/水(1回)及びアセトニトリル(2回)で順次磨砕抽出した。各抽出段階における懸濁液をろ過し、ろ液を合わせ抽出液1及び未抽出残留物1とに分けた。抽出液1の有機相を留去後、酢酸エチルで分配し、有機相と水相に分けた。果肉も同様に抽出し、抽出液2及び未抽出残留物2とに分けた。果肉については、放射エネルギーが少なかったため(詳細は後述)、抽出液2は有機相と水相に分画しなかった。

### 4. 分析

オレンジの表面洗浄液、果皮の抽出液1、さらに抽出液1を分配して得られた有機相及び水相の放射エネルギーはLSC(液体シンチレーションカウンター)で測定し、果皮の未抽出残留物1は風乾し均一化した後、放射エネルギーを燃焼分析によって測定した。果肉の抽出液2、未抽出残留物2の放射エネルギーについても果皮と同様に測定した。また、表面洗浄液、果皮抽出液1の分配後の有機相、水相に含まれる成分については濃縮した後、TLCコクロマトグラフィーで同定し、ラジオルミノグラフィーを用いて定量した。果肉に含まれる成分については検出された放射エネルギーが少なかったことから(詳細は後述)、同定、定量作業を行わなかった。未抽出残留物についても、いずれも検出された放射エネルギーが少なかったため放射エネルギーの定量のみを行い、更なる分析は行わなかった。

## 【結果】

### 1. 存在率及び濃度の単位

放射エネルギー成分の存在率(%)及び濃度(mg/kg)は、果皮、果肉においても特に記載しない限り全果実中における値を示している。

### 2. 放射エネルギーの分布(表1)

オレンジの総放射エネルギー残留量(TRR)は表面洗浄液、均質化したオレンジ果皮の抽出液1と未抽出残留物1、及び均質化したオレンジ果肉の抽出液2と未抽出残留物2に存在する放射エネルギーの合計から算出し、収穫時(処理後160日)のTRRは有効成分換算で0.072mg/kgであった。

オレンジのTRRの30.0%(0.022mg/kg)が表面洗浄で除去された。また、表面洗浄後の果皮から、TRRの56.3%(0.040mg/kg)が抽出され(抽出液1)、5.5%(0.004mg/kg)

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。  
 が未抽出残留物 1 として残留していた。以上より、オレンジの果皮中の放射能分布は TRR の 91.8 % (0.066 mg/kg) であった。また、抽出液 1 の酢酸エチル分配により得られた有機相と水相にはそれぞれオレンジの TRR の 17.6%(0.012mg/kg)及び 38.7%(0.028 mg/kg)が存在していた。

一方、果肉中に残存していた放射能はわずかであり (8.3 %、0.006 mg/kg)、抽出液 2 及び未抽出残留物 2 にはそれぞれ TRR の 7.0% (0.005 mg/kg) 及び 1.3% (0.001 mg/kg) が分布していた。

本試験においては試料を収穫後短期間 (果皮：保存期間 8 日、果肉：保存期間 20 日) で抽出、定量したので保存安定性試験は実施しなかった。またぶどうの代謝試験において親化合物の安定性が確認されている。

表 1. ジヒドロフラン-3-<sup>14</sup>C [I] を早期処理したオレンジの放射能分布 (処理後 160 日)

分画	全果実中総放射能残留量 (TRR) に対する割合	全果実量を基にした残留値	果皮、果肉各量を基にした残留値 <sup>1)</sup>
	%	mg/kg	mg/kg
果皮：	91.8	0.066	0.290
表面洗浄液	30.0	0.022	0.095
抽出液 1	(56.3)	(0.040)	(0.177)
有機相	17.6	0.012	0.055
水相	38.7	0.028	0.122
未抽出残留物 1	5.5	0.004	0.016
果肉：	8.3	0.006	0.008
抽出液 2	7.0	0.005	0.007
未抽出残留物 2	1.3	0.001	0.001
全果実中総放射能残留量 (TRR)	100.0 <sup>2)</sup>	0.072	0.072

1) 果皮、果肉の試料重量を基に各試料画分中の濃度を申請者が換算した。

2) 四捨五入による誤差があるが合計 100.0 として表現した。

### 3. 代謝

#### (1) 代謝物の分布 (表 2、表 3)

オレンジの表面洗浄液には親化合物 [I] のみが存在し、その割合は TRR の 30.0% (0.022 mg/kg) であった。また [I] は果皮抽出液を分配した後に得られた有機相及び水相にもわずかに含まれ、それぞれ 1.7% (0.001 mg/kg) と 2.5% (0.002 mg/kg) であった。有機相及び水相には [I] 以外に、それぞれ 17 種及び 9 種の代謝物が認められた (そのうち、同定代謝物 2 種 (

) 及び未同定代謝物 2 種の代謝物は両相に共通して存在していた)。総残留量のうち親化合物 [I] を除く、22 種の代謝物と TLC 原点物質の合計はオレンジの

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。  
TRR の 52.1% (0.038 mg/kg) を占めていたが、そのうち 10%及び 0.01 mg/kg を超える  
単一成分はなく、全果実として最大存在量を示した代謝物は  
で、その量は TRR の であった。オレンジの TRR の大部分は親化  
合物 [ I ] であつた (34.2 %、0.025 mg/kg、表 3) 。

## (2) 代謝物の構造 (表 2)

果皮抽出液 1 を分配して得られた有機相からは親化合物 [ I ] の加水分解後生成物  
である が同定された。また、

をコクロマトグラフィーで同定  
した。さらに、

の 3 種の代謝  
物が同定された。

果皮抽出液 1 の分配後の水相からは有機相でも同定された  
同定された。一方、有機相では認められなか  
った が検出され  
た。

## (3) 同定率 (表 3)

分析したオレンジのうち、TRR の 54.9%が同定され、31.4%が同定されなかった。こ  
れらの未同定代謝物のうち単一成分として 5.3%を超えるものはなかった。オレンジ果  
皮及び果肉を合わせた未抽出残留物 (未分析) は TRR の 6.8%を占めた。

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

表 2. 早期処理したオレンジにおける抽出物中の親化合物及び代謝物の分布

分画／放射能成分	全果実中総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg <sup>1)</sup>
<u>果皮：</u>		
<u>表面洗浄液：</u>	(30.0)	(0.022)
スピロジクロフェン [I]	30.0	0.022
<hr/>		
<u>有機相：</u>	(17.6)	(0.012)
スピロジクロフェン [I]	1.7	0.001
<hr/>		
<u>水相：</u>	(38.7)	(0.028)
<hr/>		
<u>果肉：</u>		
抽出液	7.0	0.005
未抽出残留物 (果皮部分+果肉部分)	6.8	0.005
全果実中総放射能残留量 (TRR)	100.0 <sup>3)</sup>	0.072

1) 全果実量に対する濃度を示す。

2) このうち2種は有機相と水相の両相に存在した。

3) 四捨五入による誤差があるが合計 100.0 として表現した。

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

表 3. 早期処理したオレンジにおける親化合物及び代謝物の分布 (全果実中の総合評価)

分画/放射能成分	全果実中総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg <sup>1)</sup>
<u>同定:</u>	(54.9)	(0.039)
スピロジクロフェン [I]	34.2	0.025
-----		
<u>未同定:</u>	(31.4)	(0.022)
未同定代謝物 15 種	26.1	0.018
TLC 原点	5.3	0.004
-----		
<u>未分析:</u>		
抽出液 (果肉)	7.0	0.005
未抽出残留物 (果皮部分+果肉部分)	6.8	0.005
<u>全果実中総放射能残留量 (TRR)</u>	<u>100.0<sup>2)</sup></u>	<u>0.072</u>

1) 全果実量に対する濃度を示す。

2) 四捨五入による誤差があるが合計 100.0 として表現した。

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

#### 4. 結論

処理後 160 日で収穫したオレンジの総放射能残留量 (TRR) は全果実で 0.072mg/kg (有効成分換算) であった。また、オレンジ果皮には TRR の 91.8% (0.066 mg/kg) が分布し、そのうち 30.0% はアセトニトリルによる表面洗浄で取り除かれた。さらに洗浄後の果皮から 56.3% が抽出され、未抽出残留物として 5.5% が残った。一方、果肉の抽出液中には TRR の 8.3% (0.006 mg/kg) が分布し、未抽出残留物は 1.3% であった。

親化合物 [ I ] がオレンジで大部分を占める放射性残留物であった (34.2%、0.025mg/kg) 。 [ I ] はオレンジで TRR の 52.1% に相当する 22 種の代謝物及び TLC 原点物質に分解され、単一成分で最大量を示した代謝物は

であった。と関連する 6 種の代謝物 (主要なものも含む) が同定された。そのうちの

化合物であった。さらに  
から由来する 4 種の代謝物

を同定した。15 種の未知代謝物は全て少量ずつ存在するのみであった (最大で TRR の 5.3%) 。

結論として、オレンジにおけるスピロジクロフェンの代謝過程は

- 1- 親化合物の が生成し、
- 2- が生じ、
- 3- を経て
- 4- この中間体が誘導体化 ( ) を受け、そして
- 5- 開環の中間体が分解して遊離の される。

これらの代謝過程の割合は低く、親化合物が主要な成分であった。  
以上の試験結果は、代謝試験に供した他の植物と共通のものであった。

オレンジにおけるスピロジクロフェンの推定代謝経路 (図 1) を以下に示す。

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

図1. オレンジにおけるスピロジクロフェンの推定代謝経路  
(申請者考察)



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

## 2. 植物における代謝試験

### (2) スピロジクロフェンのレモンにおける代謝

(代謝資料 No. 7)

試験機関： バイエル社 代謝・残留研究所 (ドイツ)

[GLP対応]

報告書作成年月日：1999年11月2日

#### 供試標識化合物

化学名：3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化学構造：

標識：[  $^{-14}\text{C}$  ] 標識スピロジクロフェン [I]

比放射能：3.60 MBq/mg (約 97  $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ )

放射化学的純度：>98% (TLC)、>99% (HPLC)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20頁に記す。

#### 【方法】

##### 1. 作物

20L (1樹)、10L (1樹) 及び 7.5L (4樹) のポットで栽培した接ぎ木のわい性品種「Eureka」計6樹を試験に用いた。栽培は温室内で行い、灌水を適宜行い、病害虫防除と施肥は最小限行った。

##### 2. 薬剤処理及び試料採取

###### (1) 通常処理量の散布実験 (1.5倍量)

[  $^{-14}\text{C}$  ] 標識スピロジクロフェン [I] のフロアブル製剤 (240SC<sup>1)</sup>：含有量 22.9% (w/v) ) 98.5 mg (有効成分：22.7 mg) に水 200 mL を加え処理懸濁液 (有効成分：0.01135%) を調製した。この濃度は通常処理濃度：0.0075 ai% の約 1.5 倍に相当する。この液をレモン樹 4 本 (大 2 本、小 2 本) に対し、大き

1) 240SC に関しては標識位置の設定理由と共に代-20頁に説明を記した。

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

な樹には 75 mL、小さな樹には 25 mL の液量で、フラットファンノズルを装着したハンドスプレーヤーを用いて 1 回、散布処理した。

以下に記載した量をレモン樹 4 本に対して処理した。

表 1：散布処理における調製量<sup>a)</sup>

調製した 製剤の量	含有 有効成分量	含有 放射能量
約 98.5 mg	約 22.7 mg	約 81.6 MBq

<sup>a)</sup> 散布中の損失分 (約<10%) を含む量で示す。

処理後 21 日の熟期にレモンを収穫した (4467 g)。収穫したレモンの大部分の果実表面をアセトニトリルで洗浄した後、果皮及び果肉に分け磨砕均質化して分析に供した。残りのレモン (686 g) は約-20℃で冷凍保存し、残留分析のバリデーションに使用した。

## (2) 高処理量の塗布実験 (代謝物の単離用)

レモン樹 2 本を用いて、レモン果実に直接処理液を塗布する実験を行った。 [<sup>14</sup>C] 標識スピロジクロフェン [I] のフロアブル製剤 24.11 mg に水 2 mL を加え処理懸濁液を調製した。この液をブラシチップを装着したピペットを用いて 1 果実あたり 1 mL の液量で塗布処理を 1 回行った。

下に記載した量を 2 個のレモン果実に対して塗布処理した。

表 2：塗布処理における調製量

調製した 製剤の量	含有 有効成分量	含有 放射能量
約 24.11 mg	約 5.5 mg	約 19.62 MBq

処理後 21 日の熟期にレモン果実 2 個を収穫し、通常処理量のレモンと同様に処理した。

## 3. 試料の抽出

### (1) 通常処理量の散布実験

レモン果実はアセトニトリル 500 mL で 3 回表面洗浄し、その後果皮 (1474 g) と果肉 (2297 g) に分け磨砕均質化した。磨砕均質化後の果皮の 1 部分 (202 g) はアセトニトリル/水 (1:1) 500 mL で浸漬した後、アセトニトリル 500 mL で 2 回磨砕抽出し、ろ過後、有機溶媒/水抽出物 1 (1720 mL) と未抽出残留物 1 (22 g) を得た。有機溶媒/水抽出物 1 は濃縮後、酢酸エチル 500 mL を用いて 3 回分配し、有機層 (1600 mL) と水層 (255 mL) に分画した。この後有機層は濃縮し 50 mL とした。果肉も果皮と同様に浸漬、磨砕抽出し、有機溶媒/水抽出物 2 と未抽出残留物 2 を得た。

## (2) 高処理量の塗布実験

2個のレモン果実を通常処理量と同様に表面洗浄後、果皮(263 g)と果肉(543 g)にわけ磨砕均質化後、凍結保存した。レモン固有の代謝物は検出せず、本試験ではぶどうの代謝試験で同定された代謝物を使用して代謝物の同定を行ったので、この試料は本試験ではこれ以上使用しなかった。

## 4. 測定・分析

液体試料中の放射エネルギーは直接、固体試料中の放射エネルギーは風乾後オキシダイザーで燃焼し、液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

表面洗浄液、抽出後の有機層及び水層画分をTLC及びHPLCで分析し、TLC上の各成分の放射エネルギーはイメージングプレートを用いたラジオルミノグラフィにより測定し、HPLCでは放射能検出器を用いて放射エネルギーを測定した。LC-MS/MS及び<sup>1</sup>H-NMRにより、各成分の構造を確認した。また、TLCを用いた場合には、次のいずれかの方法を最低2種組み合わせ対照化合物と比較し、同定した。

- 未知試料と非標識対照化合物を混合したクロマトグラフィー
- 1枚のTLC板での対照化合物と未知試料の同時クロマトグラフィー
- 異なったTLC板での対照化合物と未知代謝物とのR<sub>f</sub>値の比較

### 【結果】

#### 1. レモンにおける総残留量、果皮及び果肉における放射能の分布(表3)

レモンの総放射能残留量(TRR)は、収穫時(処理21日後)に0.263 mg/kg(親化合物換算)であった。レモンTRRの62.2%が果皮の表面洗浄で取り除かれ、その濃度は0.164 mg/kgであった。表面洗浄後の果皮から36.1%(0.095 mg/kg)が抽出され、そのうち24.7%(0.065 mg/kg)が有機層へ分配され、11.4%(0.030 mg/kg)が水層へ分配された。また1.5%(0.004 mg/kg)が未抽出残留物中に残存した。果肉にはほとんど放射能は残留しておらず(0.1%、< 0.001 mg/kg)、レモン果皮にTRRのほぼ全量が存在していた(99.8%、0.263 mg/kg)。

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

表 3. レモン果皮及び果肉における放射能の分布 (収穫時、処理 21 日後)

画分	レモン		
	k B q	% <sup>1)</sup>	mg/kg <sup>2)</sup>
レモン果皮:	(3577.9)	(99.8)	(0.263)
表面洗浄液	2229.9	62.2	0.164
有機溶媒/水 抽出物 1	(1294.0)	(36.1)	(0.095)
有機層	887.0	24.7	0.065
水層	407.0	11.4	0.030
未抽出残留物 1	54.0	1.5	0.004
小計 (表面洗浄液を除く)	(1348.0)	(37.6)	(0.099)
レモン果肉:	(5.0)	(0.1)	(<0.001)
有機溶媒/水 抽出物 2	4.4	0.1	<0.001
未抽出残留物 2	0.6	< 0.1	<0.001
総残留放射能量 (TRR)	3582.9	100.0 <sup>3)</sup>	0.263

1) レモン果実から回収された放射能量を 100%とした。

2) mg/kg 値表示は親化合物換算での数値である。

3) 四捨五入による偏差を含む

## 2. 親化合物 [ I ] 及び代謝物の同定及び分布

### (1) 各画分における同定及び分布 (表 4)

#### 表面洗浄液

表面洗浄液中には親化合物 [ I ] (60.9%、0.161 mg/kg) 及び  
の 2 成分が含まれていた。

#### 果皮抽出液

##### 有機層

果皮抽出液の有機層中では親化合物 [ I ] (14.1%、0.037 mg/kg) 、

が同定された。有機層に

はこれら 11 種の未同定代謝物が各々 TRR の 0.2~1.1%、<0.001~0.003 mg/kg の範囲で見い出された。

##### 水層

果皮抽出液の水層中では親化合物 [ I ] (0.3%、0.001 mg/kg) 、

の 化合物が同定された。水層には、これら 化合物以外に 9 種の未同定代謝物及び TLC 原点が TRR の 0.4~1.7%、0.001~0.005 mg/kg の範囲で認められたが、このうち 4 種類の未同定代謝物 (0.4~0.7%) については、共通部位として を含むことが確認された。

### 果肉

果肉は残留量が低かったため (0.1%、<0.001 mg/kg)、果肉に関しての同定作業は行わなかった。

表 4 : 各画分における親化合物及び代謝物の分布

画分/成分	レモン果実の TRR に対する割合	
	%	mg/kg
レモン果皮 :		
表面洗浄液 :	(62.2)	(0.164)
<u>同定成分</u>	(62.2)	(0.164)
スピロジクロフェン [I]	60.9	0.161
有機層 :	(24.7)	(0.065)
<u>同定成分 :</u>	(19.0)	(0.050)
スピロジクロフェン [I]	14.1	0.037
<u>未同定成分 11 種計 :</u>	(5.7)	(0.015)
水層 :	(11.4) <sup>2)</sup>	(0.030)
<u>同定成分</u>	(4.5) <sup>2)</sup>	(0.012)
スピロジクロフェン [I]	0.3	0.001
<u>未同定のうち特性化された成分 (共通部位 : ジクロマンテール酸)</u>	(2.1) <sup>2)</sup>	(0.005) <sup>2)</sup>
<u>特性化された以外の未同定成分 5 種計</u>	(3.8) <sup>2)</sup>	(0.011) <sup>2)</sup>
TLC 原点	(0.9)	(0.003)
レモン果肉		
有機溶媒/水 抽出物 2	0.1	<0.001
未抽出残留物 果皮+果肉 合計	1.5	0.004
総残留放射能 (TRR)	100.0 <sup>2)</sup>	0.263

1) : 報告書中で使用されている代謝物の識別番号。ジクロマンテール酸骨格を共通に有していると推定される (ぶどうの試験より)。

2) : 四捨五入による偏差を含む。

(2) レモン果実全体における各成分ごとの分布 (表 5)

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

レモンの TRR の主要な成分は親化合物 [ I ] (75.3%、0.199 mg/kg) であった。表面洗浄液及び果皮の抽出液中で検出された親化合物 [ I ] を除く 27 種の代謝物の中には、10%あるいは 0.01 mg/kg を超える化合物はなかった。

親化合物 [ I ] を除いた主要代謝物である の存在量は TRR  
のわずか であったが、レモンにおけるスピロジクロフェンの代  
代謝経路を明らかにするために、主要代謝物及びその他の代謝物に関して同定の作業を  
行った。

レモンの TRR のうち 85.7% は同定され、特性付けされた代謝物及び未同定代謝物 (合計 12.6%) のうち、1.7% を超えるものはなかった。未抽出残留物はレモン果皮と果肉を合わせて TRR の 1.5% であった。

表 5 : レモン果実全体における各成分の分布

成分	レモン果実の TRR に 対する割合	
	% <sup>2)</sup>	mg/kg
<u>同定成分</u>	(85.7)	(0.226)
スピロジクロフェン [ I ]	75.3	0.199
<u>未同定のうち特性化 (共通部位 : )</u>	(2.1)	(0.005)
<u>特性化された以外の未同定成分 16 種計</u>	(9.5)	(0.026)
代謝物小計 ( [ I ] を除く 27 代謝物の合計)	(22.0)	(0.058)
TLC 原点	0.9	0.003
レモン果肉での有機溶媒/水抽出物 2	0.1	<0.001
果皮及び果肉での未抽出残留物合計	1.5	0.004
総残留放射能量 (TRR)	100.0 <sup>3)</sup>	0.263

- 1) 報告書中で使用されている代謝物の識別番号。 骨格を共通に有していると推定される (ぶどうの試験より)。  
 2) レモン果実から回収された放射能量を 100% とする。  
 3) 四捨五入による偏差を含む

### 3. 保存安定性 (表 6~8)

表面洗浄を行った後の均質化したレモン果皮を 20 日及び 592 日間、冷凍保存 (-20°C) した試料を用いて保存安定性を確認した。

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

-20℃で20日及び592日冷凍保存した試料から抽出した有機溶媒/水抽出物から得られた有機層及び水層をそれぞれTLCに付し個々の成分のTLC上の%を求めた。求められたTLC上の%から親化合物と9種の代謝物[同定化合物(7種)及びレモンTRRの>1.0%の化合物(2種)]に関して、TRRに対する%及びmg/kg値を算出して、各成分ごとに合計し比較して安定性を評価した。

また表面洗浄液は直接保存安定性試験を行わなかったが、表面洗浄液に含まれる化合物(親化合物[I]及び )は果皮の有機層抽出物中の成分として保存安定性を評価した。この方法によりレモンTRRの88.5%と86.0%は保存安定性試験による評価の対象となった。

果皮抽出物のTRRに対する%値及びmg/kg値は保存期間20日及び保存期間592日で比較すると、592日間という長期間の保存で親化合物[I]が分解したことが示された。

しかしながら、本試験の実際の抽出操作は短期間の内に行った。すなわち収穫当日に表面洗浄及び果皮と果肉への分画を行った後、冷凍保存をし、収穫20日後に果皮からの抽出、収穫33日後に果肉からの抽出を実施した。従って収穫から抽出までの保存日数は短く、この間安定であると考察される。またぶどうの代謝試験で実施した403日間の保存安定性試験では親化合物は安定であった。

従って、本試験における保存安定性に問題はないと考えられる。

表6：保存安定性試験における各画分の放射能分布

画分	レモン果実のTRRに対する割合 1回目の抽出 保存期間：20日			レモン果実のTRRに対する割合 2回目の抽出 <sup>1)</sup> 保存期間：592日		
	kBq	TRRに対する%	mg/kg	kBq	TRRに対する%	mg/kg
<u>レモン果皮：</u>						
表面洗浄液	2229.9	62.2	0.164	2229.9	62.9	0.164
有機/水抽出物1	(1294.0)	(36.1)	(0.095)	(1269.5)	(35.8)	(0.093)
有機層	887.0	24.7	0.065	742.3	20.9	0.054
水層	407.0	11.4	0.030	527.2	14.9	0.039
未抽出残留物1	54.0	1.5	0.004	38.3	1.1	0.003
<u>レモン果肉：</u>						
有機/水抽出物2	4.4	0.1	<0.001	4.4	0.1	<0.001
未抽出残留物2	0.6	<0.1	<0.001	0.6	<0.1	<0.001
総残留放射能量 (TRR)	3582.9	100.0 <sup>2)</sup>	0.263	3542.7	100.0	0.260

1) 「表面洗浄液」及び「レモン果肉」のkBq値は1回目の抽出から引用した。

2) 四捨五入による偏差を含む

表 7: 保存安定性試験における各成分ごとの放射能分布

成分	1 回目の抽出及び分析 20 日後		2 回目の抽出及び分析 592 日後	
	TRR に対する %	mg/kg	TRR に対する %	mg/kg
スピロジクロフェン [I]	14.4	0.038	7.2	0.018

1) 報告書中で使用されている代謝物の識別番号。

#### 4. 結論

[ <sup>14</sup>C ] スピロジクロフェン [ I ] の代謝を 240SC 製剤の晩期 1 回散布処理で、通常施用量 (300 g a. i. /ha) をわずかに上回る処理量 (約 1.5 倍) で試験した。処理 21 日後に収穫したレモンの総残留放射能 (TRR) は果肉では非常に低く、0.1% (< 0.001 mg/kg) であった。TRR の 99.8% は果皮に存在し (0.263 mg/kg)、このうち 62.2% (0.164 mg/kg) はアセトニトリルによる表面洗浄によって除去できた。更に 36.1% (0.095 mg/kg) はレモン果皮から抽出された。未抽出残留物は果皮と果肉の合計で 1.5% (0.004 mg/kg) であった。

またレモンの TRR のうち、親化合物 [ I ] が最も多く 75.3% (0.199 mg/kg) であり、ついで

が検出された。

レモンにおけるスピロジクロフェン [ I ] の代謝経路は

— 親化合物の

—

の

が生成する、

される

—

ことにより

を生成する、

— この中間体の誘導化 (

)、



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

一開環した中間体が更に分解して遊離の を生成し、続いて  
が起こった。

レモンでは親化合物を主な成分として残しながら、これらの代謝の段階すべてが低い濃度で発生した。以上の試験結果は、代謝試験に供した他の植物と共通のものであった。

推定代謝経路を次頁に図 1 として示した。

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

図1. スピロジクロフェンのレモンにおける推定代謝経路  
(←----- は申請者考察)

## 2. 植物における代謝試験

### (3) スピロジクロフェンのりんごにおける代謝

(代謝資料 No. 8)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1999年7月6日

#### 供試標識化合物

化学名：3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化学構造：

\*：標識部位

標識：[  $^{14}\text{C}$  ] 標識スピロジクロフェン [ I ]  
比放射能：2.87MBq/mg (約 77.6 $\mu\text{Ci}$ /mg)  
放射化学的純度：>99% (HPLC)、>98% (TLC)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20頁に記す。

#### 【方法】

##### 1. 作物

りんごの樹 (品種ゴールデンデリシャス) 2本を 0.5 m<sup>2</sup>ポットにおいて野外条件下で栽培し、適宜灌水を行い、植物の生長に最適な水分条件を保った。最小限の一般防除と施肥を行った。

##### 2. 薬剤処理及び試料採取

日本における圃場での推奨処理条件 (6000 L/ha、有効成分 1200 g/ha、希釈液中有効成分濃度 0.02%) に基づいて、散布時の損失量を加味して本試験での処理量を有効成分 60.9 mg/樹に設定した。[  $^{14}\text{C}$  ] [ I ] の 240SC<sup>1)</sup> (フロアブル、含有量 22.9% (w/v)) を用いて上述の散布条件の約 4 倍の濃度 (約 0.08%) で処理溶液を

1) 240SC に関しては標識位置の設定理由と共に代-20頁に説明を記した。

調製し、それぞれの樹に対して約 1/4 の液量すなわち四方から約 20 mL ずつ、計約 80 mL を散布して実際の薬剤投下量に合わせた。早期処理は着果後(収穫 84 日前)の樹 1 に対して行い、晩期処理は収穫 23 日前の樹 2 に対して行った。散布器具等に残存した量を差し引いた最終的な処理量は樹 1 で有効成分 49.338 mg/樹、樹 2 で 49.136 mg/樹であった、すなわち通常処理量の約 0.9 倍であった。成熟期にそれぞれの樹からりんご果実及び葉を採取した。果実は全量収穫(早期処理: 4936 g、晩期処理: 5694 g)し、残留分析の検討用にそれぞれ 3 個(早期処理: 341 g、晩期処理: 430 g)を分別した後、代謝試験用に早期処理及び晩期処理それぞれ残りの 4595 g 及び 5264 g のりんご果実を供試した。早期処理及び晩期処理とも葉を採取し、 $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。晩期処理の葉試料については、その一部 5.68 g を分析に供したが、早期処理の葉試料については分析を行わなかった。

### 3. 試料の抽出

#### (1) 早期処理のりんご果実

代謝試験用のりんご 4595 g から 3 個(361 g)を分取し、ジクロロメタン(68 mL)及びアセトン(62 mL)に各 1 回浸漬し表面洗浄して、それぞれの放射エネルギーを測定した。洗浄後のりんごは細切した後、サーモミックスブレンダーを用いてドライアイス中で均質化した。均質化後、アセトニトリルで 1 回、次いで 80%アセトニトリルで 2 回抽出し、それぞれの抽出液中の放射エネルギーを測定した後、抽出液を混合し濃縮した。濃縮後の水相を酢酸エチルで分配し、有機相(酢酸エチル相)及び水相を得た。更に、残りの水相を C18 カラムを用いて固相抽出(SPE)した後、水、アセトニトリル及びアセトニトリル/1%アンモニア画分に分画した。

残りのりんご(4234 g)をジクロロメタン(910 mL)及びアセトン(1070 mL)で各 1 回浸漬し、表面洗浄した。各洗浄液それぞれの放射エネルギーを測定後、各洗浄液中に含まれる成分を薄層クロマトグラフィー(TLC)で分析した。更に各洗浄液は混合濃縮し TLC、HPLC 及び LC/MS を用いて表面洗浄液における代謝物の同定及び定量に供した。

#### (2) 晩期処理のりんご果実

代謝試験用のりんご全量 5264 g を早期処理のりんごと同様に表面洗浄し、各洗浄液の放射エネルギーを測定し、各洗浄液中に含まれる成分を TLC で分析した。洗浄後のりんごは細切した後、早期処理のりんごと同様に均質化した。一部分(360 g)を早期処理と同様に抽出、分配し、有機相(酢酸エチル相)及び水相を得た。分配後に得られた水相に含まれる放射エネルギーが少なかったため、水相についてのこれ以上の分画・分析は行わなかった。

#### (3) 晩期処理のりんご葉

りんご葉 5.68 g をジクロロメタン及びアセトンで表面洗浄した。各洗浄液を混合する前にそれぞれの放射エネルギーを測定し、更に、各洗浄液中に含まれる成分を TLC で調べた。

洗浄後の葉を均質化後、80%アセトニトリルで3回磨砕抽出し、それぞれの抽出液中の放射エネルギーを測定した後、抽出液を混合し濃縮した。濃縮後の水相をn-ヘキサンで分配し、n-ヘキサン相及び水相1を得た。水相1は更に酢酸エチルで分配し、酢酸エチル層及び水相2を得た。

#### 4. 分析

##### (1) 早期処理のりんご果実

表面洗浄液、抽出液、抽出液を分配して得た有機相(酢酸エチル相)、分配後の水相をC18カラムにより分画した各画分の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター(LSC)で測定した。未抽出残留物中の放射エネルギーは風乾し均一化した後、燃焼分析によって測定した。

表面洗浄液、酢酸エチル相及び固相抽出後のアセトニトリル画分に含まれる放射エネルギーをTLCで分析し、クロマトグラフィーで同定し、ラジオルミノグラフィーで定量した。C18カラムからの水画分及びアセトニトリル/1%アンモニア画分ならびに未抽出残留物については、放射エネルギーが少なかったため、LSCによる総放射エネルギーの定量のみを行い、TLCでの分析は行わなかった。

##### (2) 晩期処理のりんご果実

表面洗浄液、抽出液、抽出液を分配して得た有機相(酢酸エチル相)及び水相に含まれる放射エネルギーをLSCで測定した。未抽出残留物中の放射エネルギーは風乾し均一化した後、燃焼分析によって測定した。

表面洗浄液及び酢酸エチル相に含まれる放射エネルギーをTLCで分析し、クロマトグラフィーで同定し、ラジオルミノグラフィーで定量した。水相及び未抽出残留物については、放射エネルギーが少なかったため、LSCによる総放射エネルギーの定量のみを行い、TLCでの分析は行わなかった。

##### (3) 晩期処理のりんご葉

表面洗浄液、抽出液、抽出液をn-ヘキサンで分配して得た有機相(n-ヘキサン相)及び更に酢酸エチルで分配して得た酢酸エチル相ならびに水相2中の放射エネルギーをLSCで測定した。未抽出残留物中の放射エネルギーは風乾し均一化した後、燃焼分析によって測定した。

表面洗浄液及び抽出液に含まれる放射エネルギーをTLCで分析し、クロマトグラフィーで同定し、ラジオルミノグラフィーで定量した。n-ヘキサン相、酢酸エチル相、水相2及び未抽出残留物については、放射エネルギーが少なかったため、LSCによる総放射エネルギーの定量のみを行い、TLCでの分析は行わなかった。

## 【結果】

### 1. りんご果実における代謝

#### (1) 放射能の分布 (表 1)

総放射能残留量 (TRR) は表面洗浄液、抽出液、抽出後の未抽出残留物に存在する放射能の合計から算出した。早期処理したりんご中の収穫時の TRR は 0.390 mg/kg であった。また、TRR の大部分の放射能 (82.75% ; 0.323 mg/kg) が表面洗浄により除去された。表面洗浄後、TRR の 16.34% (0.064 mg/kg) が抽出され、濃縮後の酢酸エチルによる分配で TRR の 10.34% が酢酸エチル相に分配され、TRR の 6.00% が水相に留まった。水相を C18 カートリッジで固相抽出し、TRR の 5.29% をアセトニトリル画分に回収した。水及びアセトニトリル/1%アンモニア画分にはそれぞれ TRR の 0.67% 及び 0.04% が含まれていた。TRR のわずか 0.92% (0.004mg/kg) のみが未抽出残留物として残った。

また、晚期処理したりんご中の TRR は 0.853 mg/kg であった。殆ど全量の放射能 (98.04% ; 0.837 mg/kg) が表面洗浄により除去された。表面洗浄後、1.89% (0.016 mg/kg) が抽出され、濃縮後の酢酸エチルによる分配で TRR の 1.67% が酢酸エチル相に分配され、TRR の 0.22% (0.002mg/kg) が水相に留まった。TRR のわずか 0.07% (<0.001mg/kg) のみが未抽出残留物として残った。

表 1.  $^{14}\text{C}$  [ I ] のりんごにおける放射能分布

画分	総放射能残留量 (TRR) に対する割合			
	早期処理		晚期処理	
	%	mg/kg	%	mg/kg
表面洗浄液	82.75	0.323	98.04	0.837
抽出液	16.34	0.064	1.89	0.016
有機相	10.34	0.040	1.67	0.013
水相	6.00	0.023	0.22	0.002
SPE C18 水面分	0.67	0.003	— <sup>1)</sup>	— <sup>1)</sup>
SPE C18 アセトニトリル画分	5.29	0.020	— <sup>1)</sup>	— <sup>1)</sup>
SPE C18 アセトニトリル/1%アンモニア画分	0.04	<0.001	— <sup>1)</sup>	— <sup>1)</sup>
未抽出物	0.92	0.004	0.07	<0.001
合計	100.01	0.390	100.00	0.853

1) 水相中放射エネルギーが少なかったため、C18 による分画は実施しなかった。

#### (2) 代謝物の分布

##### (2)-1 早期処理 (表 2、3)

表面洗浄液には親化合物 [ I ] のみが存在し、その割合は TRR の 82.75% (0.323 mg/kg) であった。また [ I ] は抽出液を分配した後に得られた有機相にも TRR の 6.56% (0.026 mg/kg) が認められ、有機相中でも最大量の成分であった。一方、水相には

[I] は認められなかった。従って早期処理りんご果実中の TRR の大部分は親化合物 [I] であった (89.31%、0.349 mg/kg、表 3)。有機相には [I] 以外に 11 種の代謝物が認められた。また、分配後の水相を固相抽出し、アセトニトリルで溶出した画分 (SPE C18 アセトニトリル画分) には 7 種類の代謝物が認められた (そのうち、1 種は両相に共通に存在していた代謝物である)。

有機相からは親化合物の加水分解物である

を同定した。更に、

の 2 種を同定した。

水相を固相抽出し、アセトニトリルで溶出した画分からは、有機相でも同定された  
を同定した。

以上より、早期処理したりんご中では親化合物 [I] は 89.31% (0.349 mg/kg)、

であった。

と微量検出された。

は検出されなかった。

早期処理したりんご果実の TRR の 95.22% が同定された。未同定代謝物は 4.79% (0.019 mg/kg) であり、単一成分として 1% (0.01 mg/kg) を上回るものはなかった。また未同定の内、未抽出残留物が TRR の 0.92% (0.004 mg/kg) を占めた。

#### (2)-2 晩期処理 (表 4、5)

表面洗浄液には親化合物 [I] のみが存在し、その割合は TRR の 98.04% (0.837 mg/kg) であった。また [I] は抽出液を分配した後に得られた有機相にも TRR の 1.45% (0.012 mg/kg) 認められ、酢酸エチル相中でも最大量の成分であった。TRR の大部分は親化合物 [I] であった (99.49%、0.849 mg/kg、表 5)。有機相には [I] 以外に 10 種の代謝物が認められた。また、分配後に得られた水相については、放射エネルギーが小さいため、これ以上分析しなかった。

有機相からは

の 3 種を同定した。早期処理のりんごにおいて見出された  
は検出されなかった。

以上より、晩期処理したりんご中では、親化合物 [I] は 99.49% (0.849 mg/kg) であり、

はいずれも TRR の 1% 未満 (<0.001 mg/kg) であった。

晩期処理したりんご果実の TRR の 99.60% を同定した。未同定代謝物は 0.40% (0.003 mg/kg) であった。未同定の内、未抽出残留物が TRR の 0.07% (<0.001 mg/kg) を占めた。

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

表 2. ジヒドロフラン-<sup>14</sup>C [ I ] を早期処理したりんご中の代謝物分布

分画/放射能成分	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
表面洗浄液:	(82.75)	(0.323)
スピロジクロフェン [ I ]	82.75	0.323
有機相:	(10.34)	(0.040)
スピロジクロフェン [ I ]	6.56	0.026
水相:	(6.00)	(0.023)
SPE C18 アセトニトリル画分:	(5.29)	(0.020)
SPE C18 水画分	0.67	0.003
SPE C18 アセトニトリル/1%アンモニア画分	0.04	<0.001 <sup>1)</sup>
未抽出残留物	0.92	0.004
総放射能残留量 (TRR)	100.01	0.390

1) 計算値のため報告書中では、0.000 と表記してあるが、抄録中では<0.001 と表記した

表 3. 早期処理したりんごにおける代謝物の分布 (各抽出液の総合評価)

分画/放射能成分	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
同定:	(95.22)	(0.371)
スピロジクロフェン [ I ]	89.31	
未同定:		
未同定代謝物	3.16	0.012
未分析:		
未抽出残留物	0.92	0.004
SPE C18 水画分	0.67	0.003
SPE C18 アセトニトリル/1%アンモニア画分	0.04	<0.001 <sup>1)</sup>
総放射能残留量 (TRR)	100.01	0.390

1) 計算値のため報告書中では、0.000 と表記してあるが、抄録中では<0.001 と表記した。



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

表 4.  $^{-14}\text{C}$  [ I ] を晩期処理したりんご中の代謝物分布

分画／放射能成分	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
表面洗浄液：	(98.04)	(0.837)
スピロジクロフェン [ I ]	98.04	0.837
有機相：	(1.67)	(0.013)
スピロジクロフェン [ I ]		
水相：	0.22	0.002
未抽出残留物	0.07	<0.001 <sup>1)</sup>
総放射能残留量 (TRR)	100.00	0.853

1) 計算値のため報告書中では、0.000 と表記してあるが、抄録中では<0.001 と表記した。

表 5. 晩期処理したりんごにおける代謝物の分布 (各抽出液の総合評価)

放射能成分	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
同定：	(99.60)	(0.849)
スピロジクロフェン [ I ]	99.49	0.849
未同定：		
有機相	0.11	0.001
水相	0.22	0.002
未抽出残留物	0.07	<0.001 <sup>1)</sup>
総放射能残留量 (TRR)	100.00	0.853

1) 計算値のため報告書中では、0.000 と表記してあるが、抄録中では<0.001 と表記した。

## 2. りんご葉における代謝

### (1) 放射能の分布 (表 6)

樹 2 (晩期処理) から採取した葉中の総放射能残留量 (TRR) は、表面洗浄液、有機溶媒/水抽出液、未抽出残留物に存在する放射能の合計から算出すると、親換算で 59.728 mg/kg に達した。殆ど全量の放射能 (96.66%; 57.733 mg/kg) が表面洗浄で除去され、その後の抽出により、更に 3.24% (1.936 mg/kg) が抽出された。抽出液を分配した後では、2.16% (1.291 mg/kg) が *n*-ヘキサン相、1.08% (0.645 mg/kg) が水相 1 に見出された。水相 1 は最終的に酢酸エチルと分配し、酢酸エチル相 (0.61%; 0.364 mg/kg) と水相 2 (0.47%; 0.281 mg/kg) を得た。未抽出残留物は 0.10% (0.059 mg/kg) であり、これ以上分析しなかった。

表 6.  $^{14}\text{C}$  [ I ] を晩期処理したりんご葉における放射能分布

分画	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
表面洗浄液	96.66	57.733
有機溶媒/水抽出液	3.24	1.936
<i>n</i> -ヘキサン相	2.16	1.291
水相 1	1.08	0.645
酢酸エチル相	0.61	0.364
水相 2	0.47	0.281
未抽出残留物	0.10	0.059
合計	100.00	59.728

### (2) 代謝 (表 7, 8)

表面洗浄液からは単一の放射能成分が検出され、未変化の親化合物 [ I ] (96.66%; 57.733 mg/kg) と同定された。

濃縮した有機溶媒/水抽出液の TLC 分析の結果、7 種の放射能成分が認められた。最大の化合物 (2.15%; 1.287 mg/kg) は [ I ] であり、また樹 1 (早期処理) のりんご抽出液との比較から、そのうちの 1 つが と同定された。

以上より、親化合物 [ I ] は 98.81% (59.020 mg/kg)、  
であった。他の代謝物は <0.3% であった。全てを合計すると、TRR の 99.23% が同定された。

表 7. 晩期処理したりんご葉中の代謝物分布

分画／放射能成分	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
表面洗浄液：	(96.66)	(57.733)
スピロジクロフェン [I]	96.66	57.733
有機溶媒/水抽出液：	(3.24)	(1.936)
スピロジクロフェン [I]	2.15	1.287
未抽出残留物	0.10	0.059
総放射能残留量 (TRR)	100.00	59.728

表 8. 晩期処理したりんご葉における代謝物の分布 (各抽出液の総合評価)

代謝物	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
同定：	(99.23)	(59.271)
スピロジクロフェン [I]	98.81	59.020
未同定代謝物 (5種代謝物の合計)	0.67	0.398
未抽出残留物	0.10	0.059
総放射能残留量 (TRR)	100.00	59.728

### 3. 結論

りんごにおけるスピロジクロフェン [I] の代謝分解の程度はかなり少なかった(代謝物の割合：樹 1 (早期処理) : TRR の<10%；樹 2 (晩期処理) : TRR の<1%)。いずれの場合も、大部分の放射能はりんごの表面に存在しており、その全てが未変化の親化合物であった。抽出液中の最大の放射性成分は親化合物であり、早期処理で 89.31% (0.349 mg/kg)、晩期処理で 99.49% (0.849 mg/kg) が [I] であった。

最初の代謝分解反応は の生成である。  
 推定中間代謝物 が生成した。本代謝物のみが樹 1  
 を経由して最終的に が生成した。本代謝物のみが樹 1  
 より得られたりんごの抽出液中に比較的多い量 検出された。  
を含む全ての他の代謝物は無視できる量であった(全て<1%；  
 <0.01 mg/kg)。

樹 2 (晩期処理) から得られたりんご葉でも同様の結果が認められ、表面洗浄液中及び葉抽出液中に多量の親化合物 [I] (98.81%；58.020 mg/kg)、また、代謝物として少量

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

の が見出された。 それゆえにりんご葉中の重要な残留物も [I] であつた。推定代謝経路を図 1 に示す。

図 1. スピロジクロフェンのりんごにおけるの推定代謝経路

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

## 2. 植物における代謝試験

### (4) スピロジクロフェンのぶどうにおける代謝

(代謝資料 No. 9)

試験機関 :

[GLP対応]

報告書作成年月日 : 1996年2月20日

#### 供試標識化合物

化学名 : 3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン  
-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化学構造 :

\* : 標識部位

標識 : [ <sup>14</sup>C ] 標識スピロジクロフェン [ I ]  
比放射能 : 2.87MBq/mg (約 77.6μCi/mg、分光分析補助のため 3.60MBq/mg の上記  
<sup>14</sup>C-スピロジクロフェンに約 20%の <sup>13</sup>C-スピロジクロフェンを加えた)  
放射化学的純度 : 早期処理 : 99.3% (通常及び過剰量)  
晚期処理 : 99.3% (通常量) 、 98.1% (過剰量)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20 頁に記す。

#### 【方法】

##### 1. 作物

ぶどうの樹 (品種「Mueller Thurgau」) 4本を約 35L のポットを用いて生育させた。ポットの土壌には適宜灌水を行い、植物の生長に最適な水分条件に保った。最小限の一般防除及び施肥を行った。

##### 2. 試験群及び薬剤処理

処理時期として早期及び晚期、処理量としてそれぞれに通常量と過剰量 (代謝物単離用) を設け、計 4 群で試験を行った。ぶどう樹は通常量試験の早期及び晚期処理に

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

各1本ずつ使用して樹全体に散布処理し、一方、過剰量試験の早期及び晩期散布では残りの2本の樹のそれぞれぶどう一房ずつを使用した。なお、早期処理とは、幼果が膨らみ始め、残りの花が全て落ちた着果期における散布のことを示し、晩期処理とは、収穫3週間前の果実の熟し始めに散布することを示している。

圃場での推奨使用量(2000L/ha、処理溶液中の有効成分濃度:0.01%、すなわち200g a. i./ha)及び供試したぶどう樹の茎葉表面積に基づき、処理中の損失量(約12%)を加味して、本試験での通常処理量を26.9mg a. i./樹とした。 -14C

[I]の240SC<sup>1)</sup>製剤(フロアブル、含有量:22.9%(w/v))を用いて約26.9mg a. i./40mLの水懸濁液を各処理時期毎に調製し、この懸濁液を各ぶどうの樹全体に対して、2方向から20mLずつ計40mL、それぞれ早期及び晩期に散布した。これは推奨処理量の約1.1倍の処理となる。

また、過剰量試験では約10.1mg a. i./0.4mL(早期)及び約10.1mg a. i./0.5mL(晩期)の水懸濁液を調製し、各樹のぶどう一房ずつに散布した。

表1:各群における処理量<sup>1)</sup>

試験	処理に使用した製剤量	含有有効成分量	含有放射能量
通常量:			
早期処理	約117.06mg	約26.9mg	約77.14MBq
晩期処理	約116.18mg	約26.9mg	約77.09MBq
過剰量:			
早期処理	約44.27mg	約10.1mg	約29.04MBq
晩期処理	約44.24mg	約10.1mg	約29.04MBq

1) 散布中の損失分(約12%)を含む量で示す。

### 3. 試料採取

早期処理: 処理64日後の成熟期に、124.0g(通常量試験)及び170.0g(過剰量試験)のぶどうをそれぞれ収穫した。

晩期処理: 処理21日後の成熟期に、543.3g(通常量試験)及び44.5g(過剰量試験)のぶどうをそれぞれ収穫した。

### 4. 試料の抽出

#### (1) 通常量試験

収穫した早期処理及び晩期処理のぶどうのうち一部(早期処理:50.0g、晩期処理:200.0g)をジクロロメタンで表面洗浄した。さらにメタノールで2回及びメタノール/水混液(1:1)で1回、順次磨砕抽出し、全抽出液をろ過して有機溶媒/水抽出液と未抽出残留物を得た。有機溶媒/水抽出液は有機溶媒を留去後、ジクロロメタンで3回分配し、有機相と水相に分画した。

1) 240SCに関しては標識位置の設定理由と共に代-20頁に説明を記した。

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

また、代謝物を単離する目的で早期処理のぶどうの一部 (54.0g) を上記と同様に分画し、得られた水相を RP-8 HPLC で分画し、代謝物 27 を含む画分を分取して再度 HPLC で分取し、単離した。

## (2) 過剰量試験

収穫した早期処理のぶどう (170.0g) をジクロロメタンで表面洗浄後、メタノールで 2 回及びメタノール/水混液 (1:1) で 1 回、順次磨砕抽出した。全抽出液をろ過した後、ろ液を濃縮して有機溶媒を留去した。次いで水相をジクロロメタンで 3 回分配した後、酢酸エチルで 3 回分配し、酢酸エチル抽出物を得た。この酢酸エチル抽出物を RP-8 HPLC で分画し、代謝物 12 及び代謝物 18 を単離した。

表 2 : 収穫量及び使用量

	通常量試験		過剰量試験	
	早期処理	晩期処理	早期処理	晩期処理
収穫量	124.0g	543.3g	170.0g	44.5g <sup>1)</sup>
定性・定量分析用	50.0g	200.0g	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>
代謝物単離用	54.0g	323.3g <sup>1)</sup>	170.0g	- <sup>2)</sup>
残留分析法の 確認用 <sup>2)</sup>	20.0g	20.0g	- <sup>2)</sup>	- <sup>2)</sup>

1) 表面洗浄後、冷凍保存し、供試しなかった。

2) 本試験では用いなかった

## 5. 分析

表面洗浄液及び分配後の有機相及び水相の放射エネルギーは直接 LSC で測定し、未抽出残留物は風乾及び小粉砕機で均一化した後燃焼し、<sup>14</sup>C<sub>2</sub> を LSC で分析した。

水相は RP-8 HPLC クロマトグラフィーに付した後、該当する画分を集めて、非標識対照化合物と共に TLC によるコクロマトグラフィーで分析した。有機相は直接 TLC によるコクロマトグラフィーで分析した。また TLC、HPLC、LC-MS、LC-MS/MS、<sup>1</sup>H-NMR で分析し代謝物の構造を同定した。さらに水相は酵素分解 (セルラーゼ)、酸 (5N HCl) 及びアルカリ (5N NaOH) による加水分解を行った後 TLC 分析を行い、特性付けを行った。代謝物の定量は TLC あるいは HPLC で行った。

### 【結果】

#### 1. 放射能の分布 (通常量処理)

早期通常量処理したぶどう中の総放射能残留量 (TRR) は、表面洗浄液、有機溶媒/水抽出液、抽出後の未抽出残留物に存在する放射能の合計から算出し、収穫時には 1.12mg a. i./kg であった (処理 64 日後)。ぶどうにおける TRR の 56.8% (0.64mg/kg) が表面洗浄により除去された。表面洗浄後、42.0% (0.47mg/kg) がぶどうから抽出され

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。  
有機相に 8.8% (0.10mg/kg)、水相に 33.2% (0.37mg/kg) が分配され、1.2% (0.01mg/kg) が未抽出残留物として残存した (表 3)。

また、晩期通常量処理したぶどう中の TRR は収穫時に 1.90mg a. i./kg であった (処理 21 日後)。表面洗浄により TRR の 95.8% (1.82mg/kg) が除去され、その後磨砕抽出により 4.1% (0.08mg/kg) が抽出され、有機相に 1.7% (0.03mg/kg)、水相に 2.4% (0.05mg/kg) が分配された。また、0.1% (<0.01mg/kg) が未抽出残留物として残存した (表 4)。

表 3：早期処理したぶどう中の放射能分布 (処理 64 日後、通常量)

分画	総残留放射能量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
表面洗浄液	56.8	0.64
有機溶媒/水抽出液	(42.0)	(0.47)
有機相	8.8	0.10
水相	33.2	0.37
未抽出残留物	1.2	0.01
総残留放射能量 (TRR)	100.0	1.12

表 4：晩期処理したぶどう中の放射能分布 (処理 21 日後、通常量)

分画	総残留放射能量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
表面洗浄液	95.8	1.82
有機溶媒/水抽出液	(4.1)	(0.08)
有機相	1.7	0.03
水相	2.4	0.05
未抽出残留物	0.1	<0.01
総残留放射能量 (TRR)	100.0	1.90

## 2. 代謝 (通常量処理)

### (1) 早期処理 (表 5、7)

ぶどう中の親化合物及び代謝物は、対照化合物との TLC コクロマトグラフィー、分光分析 [LC-MS/MS-SRM (Selected Reaction Monitoring)]、またレモン (晩期処理) 及びオレンジ (早期処理) の各試験からの試料を用いた TLC コクロマトグラフィーにより同定し、TLC で定量した。

表面洗浄液には親化合物 [I] (56.8%、0.64mg/kg) のみが認められた (表 5)。

有機相には僅かな量の親化合物 [I] (0.8%、0.01mg/kg) 及び 11 種の代謝物が確認された。代謝物として親化合物の加水分解物である  
が同定された。さらに、



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。  
が同定された。他に  
定された (表 5)。

水相には 7 種の代謝物が確認され、次の 3 種の代謝物が単離同定された。

である。  
は有機相中にも含まれる成分であり、両相合わせてであった。  
さらに水相は で処理し、を試みたがアグリコンは生成しなかった。しかし、強い酸性加水分解条件下 (5N HCl、100°C 3 時間) 及び強いアルカリ性加水分解条件下 (5N NaOH、100°C 3 時間) では水相中の全代謝物はに変換された。従って、水相中の

を有していることが特性付けられた (表 5)。

早期処理の親化合物を除く全 17 種の代謝物の割合は、TRR の 41.2% (0.46mg/kg) であった。このうち

が TRR の 5%を超え、そのうち  
を超えていた (表 7)。

ぶどうの TRR の 88.4%が同定され、7.4%が酸性条件下の加水分解により共通の骨格を有することが特性付けされた。また、未同定代謝物 (合計 3.0%) のうち、1.5%を超えるものはなかった (表 7)。

## (2) 晩期処理 (表 6、8)

早期処理したぶどうと同様に、親化合物及び代謝物の定量・同定を行った。

表面洗浄液には親化合物 [ I ] (95.8%、1.82mg/kg) のみが単一成分として同定された (表 6)。

有機相には僅かな親化合物 [ I ] (0.6%、0.01mg/kg) 及び 9 種の代謝物が確認され、そのうち

が同定された (表 6)。

水相には 3 種の代謝物が確認された。そのうち

代謝物が同定された。は有機相にも存在した (表 6)。

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

晩期処理の親化合物を除く 11 種の代謝物の割合は、TRR の 3.5% (0.07mg/kg) であった。11 種の代謝物のうち、TRR の 1%を超えるものは  
 であった (表 8)。

ぶどうの TRR のうち、99.4%が同定され、未同定代謝物 (合計 0.4%) のうち、0.3%を超えるものはなかった (表 8)。

表 5：早期処理したぶどうにおける抽出物中の代謝物の分布 (処理 64 日後、通常量)

分画/代謝物	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
表面洗浄液：	(56.8)	(0.64)
スピロジクロフェン [I]	56.8	0.64
有機相：	(8.8)	(0.10)
スピロジクロフェン [I]	0.8	0.01
水相：	(33.2)	(0.37)
特性化 (共通部位 )：	(7.4)	(0.08)
未抽出残留物	1.2	0.01
総放射能残留量 (TRR)	100.0	1.12

1) 報告書で使用されている代謝物番号であり、抄録中の代謝物番号とは異なる。

表 6：晩期処理したぶどうにおける抽出物中の代謝物の分布 (処理 21 日後、通常量)

分画/代謝物	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
表面洗浄液：	(95.8)	(1.82)
スピロジクロフェン [I]	95.8	1.82
有機相：	(1.7)	(0.03)
スピロジクロフェン [I]		
水相：	(2.4)	(0.05)
未抽出残留物	0.1	<0.01
総放射能残留量 (TRR)	100.0	1.90

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

表 7：早期処理したぶどうにおける代謝物の分布（総合評価、処理 64 日後、通常量）

代謝物	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
同定：	(88.4)	(1.00)
スピロジクロフェン [I]	57.6	0.65
-----		
特性化(共通部位ジクロロマンデル酸)：	(7.4)	(0.08)
-----		
未同定代謝物合計 (7 種)：	(3.0)	(0.03)
未抽出残留物	1.2	0.01
総放射能残留量 (TRR)	100.0	1.12

1) 報告書で使用されている代謝物番号であり、抄録中の代謝物番号とは異なる。

表 8：晚期処理したぶどうにおける代謝物の分布（総合評価、処理 21 日後、通常量）

代謝物	総放射能残留量 (TRR) に対する割合	
	%	mg/kg
同定：	(99.4)	(1.89)
スピロジクロフェン [I]	96.4	1.83
-----		
未同定代謝物合計 (5 種)：	(0.4)	(0.01)
未抽出残留物	0.1	<0.01
総放射能残留量 (TRR)	100.0	1.90

### 3. 保存安定性

早期処理の試料を約-20℃で 403 日間保存した後に、0 日及び 403 日間保存試料の表面洗浄液、有機相及び水相を調製し、TLC で定量して保存安定性を確認した。確認の対象は親化合物、同定代謝物及び TRR の 1.0%より多い未同定代謝物とし、収穫 0 日後に調製した試料と比較した。

0 日後及び 403 日後試料の TRR、各画分の%及び mg/kg 値は類似していた (表 9)。わずかな違いは、未洗浄ぶどう全体を保存したための植物体の不均一性のためと考えられる。有機相及び水相と同様、有機溶媒/水相抽出液中の放射能割合は、0 日後の抽出に比べて減少していた。このことは表面洗浄液中の放射能量の増加 (及び の存在) との対比により説明できる。

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

0日保存及び403日間保存の抽出液中のTLCクロマトグラムの成分パターンは非常に類似していた。また表10より、0日保存及び403日間保存の代謝物の相対割合は類似していた。以上のことから親化合物及び代謝物は保存条件下において安定であった。

表9：保存安定性試験における各画分の放射能分布

画分	1回目の抽出 (1997年9月11日) 収穫後の保存日数：0日			2回目の抽出 (1998年10月19日) 収穫後の保存日数：403日		
	kBq	%	mg/kg	kBq	%	mg/kg
	表面洗浄液	91.1	56.8	0.64	131.3	64.8
有機/水 抽出物	(67.4)	(42.0)	(0.47)	(69.4)	(34.2)	(0.45)
有機相	14.1	8.8	0.10	10.3	5.1	0.07
水相	53.3	33.2	0.37	59.1	29.1	0.38
未抽出残留物	2.0	1.2	0.01	2.0	1.0	0.01
合計	160.5	100.0	1.12	202.7	100.0	1.31

表10：保存安定性試験における各成分ごとの放射能分布

成分	1回目の抽出及び分析 0日後		2回目の抽出及び分析 403日後	
	TRRに 対する%	mg/kg	TRRに 対する%	mg/kg
スピロジクロフェン [I]	57.6	0.65	64.0	0.84

1) 報告書中で使用されている代謝物の識別番号。

#### 4. 結論

推奨使用量の約1.1倍の通常量で処理し、処理64日後に収穫した早期処理ぶどうの総放射能残留量 (TRR) は1.12mg/kg (親化合物換算) であり、そのうち56.8%がジクロロメタンによる表面洗浄で取り除かれた。その後42.0%がぶどうから抽出され、1.2%が未抽出残留物となった。

早期処理において、最大残留成分は親化合物 [I] (57.6%、0.65mg/kg) であったが、41.2% (0.46mg/kg) に相当する17種の代謝物が認められた。

同定代謝物は6種で、このうちの

を有していた。さらに中

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。  
間代謝物と仮定される に由来する

を同定した。

を有していることが特性付けされた。7種の未同定代謝物はいずれもごく少量ずつ存在しているのみであった（最大1.5%、0.02mg/kg）。

通常量晩期処理において、処理21日後に収穫したぶどうのTRRは1.90mg/kgであり、表面洗浄で95.8%が取り除かれ、その後4.1%がぶどうから抽出され、0.1%が未抽出残留物として残った。

最大残留成分は親化合物 [I] であったが、3.5% (0.07mg/kg) に相当する11種の代謝物が認められ、早期処理と同様の6種の代謝物が同定された。5種の未同定代謝物はいずれもごく少量ずつ存在しているのみであった（最大0.3%、0.01mg/kg）。

ぶどうにおける [I] の代謝経路は早期及び晩期処理共に、  
- 親化合物 [I] の を形成し、  
- その  
    され、  
- となり、  
- この中間体が誘導され て、  
- さらに分解して遊離の が形成され、次いで が起こる。

全ての代謝過程において、親化合物がぶどう中で最も多い成分であった。

ぶどうにおけるスピロジクロフェンの推定代謝経路（図1）を以下に示す。

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

図1. スピロジクロフェンのぶどうにおける推定代謝経路  
( ) は申請者考察

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

## 2. 植物における代謝試験

### (5) スピロジクロフェンのグレープフルーツにおける移行性

(代謝資料 No. 10)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1999年11月2日

#### 供試標識化合物

化学名：3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化学構造：

[\*：<sup>14</sup>C標識部位]

標識：[<sup>14</sup>C] 標識スピロジクロフェン [I]  
比放射能：3.6 MBq/mg  
放射化学的純度：>99% (HPLC)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20頁に記す。

#### 【目的】

本試験は、グレープフルーツの葉に1回処理した場合にスピロジクロフェン [I] が葉から果実に移行するかを試験することを目的とした。

#### 【方法】

##### 1. 作物

わい性のグレープフルーツ（品種：Citrus paradisi Macf.）1樹を約20Lポットにおいて温室内で栽培し、結実させた。適宜灌水を行い、植物の生長に最適な水分条件を保った。最小限の病害虫防除と施肥を行った。

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

## 2. 薬剤処理及び試料採取

処理量は圃場における推奨処理量（有効成分 300 g/ha）に基づいて、本試験での処理量をその 1.5 倍量、すなわち有効成分約 2.7 mg/樹に設定した。

すなわち、かんきつ類果樹園における樹冠量（CV）を約 11500 m<sup>3</sup>/ha と推定されるので、（ヨーロッパ数カ国における調査データで得られた値）、推奨処理量は 300 g a. i. /11500 m<sup>3</sup>CV=約 26 mg a. i. /m<sup>3</sup>CV となる。本試験で供試したグレープフルーツ樹の CV が約 0.07 m<sup>3</sup> であることから、樹には総量として 26 mg a. i. ×0.07=約 1.8 mg a. i. が推奨処理量では必要となる。これから 1.5 倍過剰量を算出すると、グレープフルーツ樹に対して約 2.7 mg a. i. となる。これは 240 SC 製剤の約 11.7 mg に相当する。

結実した 5 本の枝が果樹に認められたので、グレープフルーツ果実 1 個につき、その上方または下方の 3 枚の葉に各枝あたり約 0.5 mg a. i. を処理した（5 連で処理）。製剤化した有効成分約 11.6 mg を約 1.0 mL の水に懸濁させ、5 等分して 5 本の枝の葉に直接処理した。

<sup>14</sup>C [ I ] の 240SC<sup>1)</sup>（フロアブル、含有量 22.9%（w/v））を用いて、製剤 11.62 mg へ水 1.01 mL を加え懸濁液を調製した。ブラシを装着したピペットを用いて異なる 5 本の枝に結実したグレープフルーツ果実の上方または下方の葉 3 枚に塗布処理 [3 枚の葉へ計 200 μL、約 2.0 MBq（有効成分約 0.5 mg）] した。処理前にグレープフルーツ果実をプラスチック製カバーで覆い、処理後に蒸散を可能にするための通気孔をカバーに開けた。但し、カバーは収穫時まで装着したままとした。収穫 85 日前に処理し、成熟期に当たる処理 85 日後にグレープフルーツ果実 5 個（果実重量：平均 198.01 g（約 105 g～295 g））及び各果実に対応するそれぞれ 3 枚の処理葉（計 15 枚）を採取した。TLC を用いて処理前後の処理懸濁液中の被験物質の安定性を確認した。15 枚の葉に塗布処理した量を表 1 に示す。

表 1：処理懸濁液

樹当りの 処理製剤量	樹当りの 処理放射エネルギー	樹当りの処理 有効成分量	葉当りの処理 有効成分量
約 11.62 mg/樹	約 9.62 MBq	約 2.7 mg/樹	約 0.5 mg/3 葉

## 3. 試料の抽出及び分析

5 本の各枝から処理葉各 3 枚を採取した。以降の分析は各枝ごとに行った。処理葉 3 枚に対してアセトニトリル（200mL）を用いて磨砕抽出した。懸濁液を吸引ろ過し、有機溶媒抽出液と未抽出残留物に分けた。有機溶媒抽出液中の放射エネルギーは LSC で測定し、

1) 240SC に関しては標識位置の設定理由と共に代-17 頁に説明を記した。



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

未抽出残留物中の放射エネルギーは風乾後に磨砕均質化した後、燃焼分析により求めた。処理葉のある各枝から各1個の果実を採取した（計5個）。以降の分析は各果実ごとに行った。採取した各果実はアセトニトリル（300mL）に浸漬して表面洗浄した。表面洗浄後、果皮と果肉に分け抽出まで約-20℃で保存した。表面洗浄液中の放射エネルギーはLSCで測定した。果肉はアセトニトリル（150mL、2回）で磨砕抽出して、懸濁液を吸引ろ過し、2回の抽出液を混合して、有機溶媒抽出液と未抽出残留物に分けた。有機溶媒抽出液中の放射エネルギーはLSCで測定し、未抽出残留物中の放射エネルギーは風乾後、磨砕均質化して燃焼分析した。果皮は液体窒素を用いて磨砕均質化し、風乾後さらに粉砕して燃焼分析により放射エネルギーを求めた。

## 【結果】

回収率及び各画分における放射能分布を表2に示した。処理放射エネルギーの83.03%が果実及び葉から回収され、処理放射エネルギーの16.97%はおそらく揮発によって葉から損失したと考えられた。

以下回収放射能に対する割合（%）で結果を記載する。

99.91%が周辺3葉から検出され、果実からはわずか0.09%（0.0019 mg/kg）が検出されたのみであった。果実から検出された放射能のうち、表面洗浄液から<0.01%、果皮から0.04%、果肉から0.04%が検出された。葉から検出された放射能のうち、98.83%は有機溶媒で抽出された。葉から検出された放射能の1.08%が抽出されなかった。

表2：各画分における放射能分布及びTRR

画分	回収放射能 に対する%	処理放射能 に対する%	mg/kg (TRR)
グレープフルーツ果実：	0.09	0.07	0.0019
表面洗浄液	<0.01	<0.01	
果皮	0.04	0.03	
果肉	(0.04)	(0.04)	
有機溶媒抽出液	0.03	0.02	
未抽出残留物	0.01	0.01	
周辺3葉	(99.91)	(82.95)	
有機溶媒抽出液	98.83	82.06	
未抽出残留物	1.08	0.90	
小計	100.00	83.03	
揮発による損失		16.97	
1果実の周辺3葉に対して 処理した放射エネルギー		100.00 (1924.0 kBq)	

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

## 結論

[<sup>14</sup>C] スピロジクロフェン [I] をわい性のグレープフルーツ樹の葉へ塗布処理して果実への移行性を調査した。処理量は圃場における推奨使用量の1.5倍で実施し、処理85日後に果実及び葉を採取した。

採取した果実からは処理放射能のわずか0.07%が検出され、処理放射能はほとんど移行しないことが示された。またこの0.07%のグレープフルーツ中の放射能残留量は親化合物換算としてわずか0.0019 mg/kgの残留値に相当し、従って果実の残留にはほとんど寄与しないと考察される。

### 3. 土壌における運命

(1) [

-<sup>14</sup>C] スピロジクロフェンの好気土壌中の分解・代謝

(代謝資料 No. 11)

試験機関： バイエル社 代謝・残留研究所 (ドイツ)

[GLP対応]

報告書作成年月日：1999年4月8日

#### 供試標識化合物

化学名：3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキシ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン-4-イル=2,2-ジメチルプチラート

化学構造：

\*：標識部位

標 識： [ <sup>14</sup>C ] 標識スピロジクロフェン [ I ]  
比放射能：3.6 MBq/mg (約 97 μCi/mg)  
放射化学的純度：>99% (HPLC)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20 頁に記す。

#### 【方法】

##### 1. 土壌

本試験のために採取した4種の新鮮土壌を用いた(表1)。Fresno、Vero Beach、Hoefchenの各土壌は圃場より採取後速やかに使用した。BBA 2.2土壌は、採取後土壌微生物活性を維持するためにバイエル社代謝・残留研究所で植物を栽培し自然条件下で継続維持した土壌を採取後速やかに使用した。

表1. 供試土壌の採取地及び特性

土壌	採取地	土性	pH		有機炭素含量 (%)
			H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub>	
Fresno	California/USA	砂壤土	6.6	5.8	0.53
Vero Beach	Florida/USA	砂土	6.4	6.0	0.22
BBA 2.2	Hanhofen/Germany	壤質砂土	6.0	6.3	2.48
Hoefchen	am Hohenseh 4A /Germany	シルト	7.8	7.2	2.62

## 2. 処理量及び処理

米国（約 200 g a. i. /ha、りんご）及び EU（300 g a. i. /ha、かんきつ）における最大施用量の平均値である 250 g a. i. /ha を [ I ] の通常量の処理量として 4 種の土壤に処理した。更に [ I ] の消長に及ぼす処理濃度の影響を調べるために、Fresno 土壤においては日本における最大施用量である 1200 g a. i. /ha の高薬量の処理量でも実施した。被験物質が分布する土壤深を 15 cm、土壤の仮比重を 1.5 g/cm<sup>3</sup> と仮定すると、上記の処理量は 250 g a. i. /ha が 11.1 µg a. i. /100g 乾土（通常量）及び 1200 g a. i. /ha が 53.3 µg a. i. /100g 乾土（高薬量）となる。土壤の一部（約 20g 乾土相当量）をシャーレに採り、所定量の処理溶液を添加した後、葉さじを用いて溶媒が揮発するまで十分に混合し、残りの土壤に戻した後、土壤全量をミキサーを用いて 1 時間混合した。混合後、乾土 100g 相当の土壤を 300 mL の三角フラスコに分配した。土壤を分配した後、水分含量が 0.33 バールでの含水量の約 75%（Fresno 土壤及び Vero Beach 土壤）または最大容水量の約 40%（BBA 2.2 及び Hoefchen）となるように蒸留水を添加した。

## 3. インキュベーション及び試料採取

被験物質を処理後、三角フラスコを暗黒下、約 20°C でインキュベートした。三角フラスコ上部に CO<sub>2</sub> 捕集用のソーダライム及び揮発性有機化合物捕集用のポリウレタン栓を充填した捕集装置を取り付け、揮発性物質を捕集した。

試料採取、揮発性物質及び微生物バイオマス測定のための採取日を表 2 に示す。

表 2. 試料の採取、測定日

測定項目	採取、測定日（インキュベーション後の日数）
土壤試料及び	0、1、2、3、6、9、13、20、30、59、120
揮発性物質（CO <sub>2</sub> 、揮発性有機化合物）	（Fresno 土壤（通常量）では更に 181、272、360）
微生物バイオマス	0、120 （Fresno 土壤（通常量）は更に 181、360）

## 4. 抽出、放射エネルギー測定、分析

### 1) 揮発性有機化合物及び <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>

酢酸エチルを抽出溶媒に用いた圧搾装置により各々の捕集装置内のポリウレタン栓から揮発性有機化合物を抽出し、抽出液中の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンター (LSC) で測定した。

<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> を測定するために、三角フラスコに捕集装置内のソーダライムを移した後、滴下ろう斗を三角フラスコに取り付け、更に吸収剤（氷冷却した Carbosorb 10mL + PermafluorE+ 10 mL）を入れた 3 連のガラス容器を接続した。滴下ろう斗を用いて 18% 塩酸をゆっくり滴下してソーダライムを溶解し <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> を遊離させた。生じた <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> を吸収剤に吸収させた後、放射エネルギーを LSC で測定した。

## 2) 土壌

各容器中の土壌全量を遠沈管に入れ、表3に示す溶媒を用いて振とう抽出し、その後10000 gで15分間遠心分離した。遠心後の上清は土壌粒子が混入しないように穏やかにデカンテーションし、得られた上清を更にろ過して抽出液1-6を得た。抽出液1-4を混合して有機溶媒抽出液とした。また、抽出液5と抽出液6を合わせ水抽出液とした。有機溶媒抽出液と水抽出液の最終的な体積を測定し、それぞれの溶液1 mLをLSCにより測定した。その後、有機溶媒抽出液と水抽出液を合わせた後、薄層クロマトグラフィーに供し、抽出液中に含まれる成分をラジオルミノグラフィーで定量した。ろ紙は乾燥後、全量を燃焼分析に供した。土壌の未抽出残留物は乾燥し、粉碎均質化した後、燃焼分析によって放射能を測定した(約1 g、3反復)。

ほとんどの試料において未抽出残留物量は処理量の10%以下であったため、未抽出残留物量が10%を超える試料を代表してFresno土壌(通常量)の120日後試料の未抽出残留物についてのみアセトニトリル/水混液(80/20)を用いて1.5時間還流する苛酷抽出を実施した。

表3. 抽出溶媒の種類、量及び抽出時間

抽出液	抽出溶媒及び量	抽出時間
1	アセトニトリル 150 mL	30分
2、3	アセトニトリル 80 mL	30分
4	アセトニトリル/pH 5 緩衝液 (80/20) 80 mL	30分
5	pH 5 緩衝液 80 mL	30分
6	アセトニトリル 20 mL	5分

## 【結果】

### 1. 土壌中の微生物バイオマス (表4)

インキュベーション0及び120日後に土壌の微生物バイオマスを測定した。Fresno土壌(通常量)については更に181及び360日後にも測定した。全ての土壌において経過日数とともに微生物バイオマスが減少したが、微生物バイオマスの減少に被験物質の添加及び処理量の影響は認められなかった。

表4. 各土壌の微生物バイオマス

インキュベーション 期 間 (日)	微生物バイオマス (microbial Cg/kg 土壌)				
	Fresno (通常量)	Fresno (高薬量)	Vero Beach (通常量)	BBA 2.2 (通常量)	Hoefchen (通常量)
0 無処理	216	-	27	253	927
120 処理	102	93	10	174	475
120 無処理	107	-	12	183	506
181 処理	88	-	-	-	-
181 無処理	83	-	-	-	-
360 処理	38	-	-	-	-
360 無処理	41	-	-	-	-

-: 試料採取せず。

## 2. 物質収支 (表 5)

抽出放射能、未抽出残留物、揮発性物質の総量に基づき総回収量を算出した。 $^{14}\text{CO}_2$  が定量的に測定できなかった Hoefchen 土壌の 13 日後の試料及び  $^{14}\text{CO}_2$  を測定しなかった Hoefchen 土壌の 20 日後の試料では物質収支は低かったが、それら以外の試料における物質収支は全試験群で 94.1~105.6%の範囲であり良好であった。

## 3. 揮発性物質の生成 (表 5)

[I] は二酸化炭素まで代謝され、試験土壌中の微生物バイオマスはインキュベーション期間中に著しく減少したものの、[I] の無機化量は全土壌において経時的に増加した。被験物質の無機化速度は土壌により異なり、120 日後に無機化された被験物質の量は処理放射能の 22.5%~93.1%の範囲であった。また、Fresno 土壌 (通常量) においては 360 日後に処理量の 76.0%が無機化された。Fresno 土壌 (高薬量) の無機化速度は通常処理量の無機化速度よりもわずかに低かったものの、[I] の無機化速度に処理量の影響はないと推定された。

揮発性有機化合物はいずれの土壌のいずれの採取時点からも検出されなかった。

## 4. 未抽出残留物 (表 5)

未抽出残留物 (結合性残留物) は Hoefchen 土壌を除きインキュベーション期間中徐々に増加し、120 日後には Fresno 土壌の通常量及び高薬量で 10.1%及び 9.2%、Vero Beach 土壌、BBA 2.2 土壌及び Hoefchen 土壌でそれぞれ 14.4%、8.0%及び 6.8%であった。Hoefchen 土壌では、2 週間後に 10.4%まで増加した後、120 日後には 6.8%まで徐々に減少した。また、Fresno 土壌 (通常量) では 120 日後で 10.1%であったが 360 日後には 8.5%まで減少した。従って、未抽出残留物も土壌中で代謝を受け、二酸化炭素へ無機化されると推定された。

Fresno 土壌 (通常量) の 120 日後試料の未抽出残留物から 35%、すなわち処理放射能の 3.5%が苛酷抽出により抽出され、TLC により 等が確認された。

## 5. 抽出放射能の消長 (表 5)

処理直後には 95.0~99.1%であった抽出放射エネルギーが 120 日後には処理量の 1.5~61.1%へ減少した。Fresno 土壌 (通常量) では、処理 120 日後に 32.1%であった抽出放射エネルギーが 360 日後には 17.1%まで減少した。抽出放射エネルギーは  $^{14}\text{CO}_2$  の増加とともに経時的に減少し、 $^{14}\text{CO}_2$  の生成量が多い土壌 (BBA 2.2 土壌及び Hoefchen 土壌) で抽出放射エネルギーは少なく、 $^{14}\text{CO}_2$  の生成量が少ない土壌 (Fresno 土壌及び Vero Beach 土壌) で抽出放射エネルギーは多かった。Fresno 土壌 (高薬量) から抽出された放射エネルギーは通常処理量から抽出された放射エネルギーよりわずかに多かった。

水抽出される放射エネルギーは土壌により異なり、Fresno 土壌 (通常量)、Fresno 土壌 (高薬量) 及び BBA 2.2 土壌では水で抽出される放射エネルギーは最大で処理量の 1.8%、1.9% 及び 2.4%と低かったのに対し、Vero Beach 土壌及び Hoefchen 土壌では最大で処理量の 13.7%及び 7.6%とより多くの放射エネルギーが水で抽出された。

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

表 5.  $^{14}\text{C}$ -[I] を処理後好氣的に代謝された後の  $^{14}\text{C}$  の分布

インキュベーション 期間 (日)	処理量に対する割合 (%)																								
	Fresno 土壌 (通常量)			Fresno 土壌 (高薬量)			Vero Beach 土壌			BBA2.2 土壌			Hoefchen 土壌												
	溶解液抽出	水抽出	合計	溶解液抽出	水抽出	合計	溶解液抽出	水抽出	合計	溶解液抽出	水抽出	合計	溶解液抽出	水抽出	合計										
0	94.2	0.8	1.9	-	96.9	96.4	0.8	1.6	-	98.7	98.0	1.1	1.9	0.0	101.0	95.8	1.1	2.0	-	98.9	95.0	2.9	2.1	0.0	100.0
1	94.9	0.5	2.3	0.2	97.9	97.2	0.5	2.3	0.2	100.1	100.2	0.8	2.6	0.0	103.6	96.3	0.8	3.3	0.2	100.6	89.8	3.5	3.9	0.4	97.6
2	97.3	0.8	2.3	0.3	100.8	95.3	0.7	1.9	0.3	98.1	98.5	1.5	2.5	0.0	102.5	95.1	1.5	2.7	0.8	100.2	85.0	6.8	5.5	4.5	101.8
3	99.1	0.9	2.3	0.5	102.7	95.2	0.8	2.2	0.4	98.6	98.5	1.9	2.9	0.0	103.3	94.8	1.5	3.0	1.6	100.9	78.2	7.6	7.1	9.0	101.8
6	95.2	1.0	3.4	1.6	101.2	98.1	0.8	3.0	1.3	103.2	99.3	2.7	3.3	0.1	105.4	89.1	1.7	4.2	8.1	103.2	46.8	5.1	9.2	33.1	94.1
9	93.0	1.5	4.0	3.8	102.2	91.9	1.3	3.6	2.6	99.4	94.4	3.9	4.4	0.1	102.7	75.3	2.3	4.9	17.1	99.6	26.6	3.9	9.9	56.7	97.1
13	85.6	1.7	4.6	7.2	99.1	90.7	1.6	4.5	4.9	101.7	93.0	4.9	5.1	0.3	103.3	63.7	2.4	5.9	30.0	101.9	13.4	2.3	10.4	3.6*	29.6
20	76.3	1.7	6.4	14.2	98.6	83.6	1.7	5.4	9.9	100.6	90.3	5.8	6.2	0.5	102.7	42.6	1.9	6.9	49.6	101.1	6.0	1.3	9.5	-	16.8
30	66.0	1.8	7.8	23.1	98.8	73.2	1.9	6.8	17.7	99.5	85.2	8.1	7.9	1.7	102.9	26.1	1.5	7.3	64.9	99.7	3.2	0.6	8.7	87.8	100.3
59	46.7	1.7	9.7	42.3	100.4	51.7	1.7	9.1	38.5	101.0	74.4	11.8	12.6	6.8	105.6	10.6	0.9	7.3	78.3	97.1	2.0	0.4	8.2	88.3	98.9
120	30.5	1.6	10.1	60.1	102.2	33.5	1.4	9.2	55.3	99.4	47.4	13.7	14.4	22.5	98.0	5.4	1.8	8.0	86.3	101.5	1.2	0.3	6.8	93.1	101.5
181	22.7	1.5	9.7	65.6	99.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
272	18.0	1.1	9.3	71.7	100.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
360	16.0	1.1	8.5	76.0	101.6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

-: 試料採取せず。

\*: 定量的に測定できず。

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

## 6. 土壌中の代謝 (表 6~11、図 1~5)

実験期間中、未変化の [I] とともに少なくとも 13 種の放射性成分が検出された。分光分析 (LC-MS、LC-MS/MS 及び NMR) 及びコクロマトグラフィーによって、それらのうちの 4 種が実験期間中のいずれかの時点で最大で 10% を超える量で見出され、それらを

と同定した。その他の代謝物は最大でも処理放射エネルギーの 5% 未満であった。量的に少ない代謝物の 1 種を  と同定した (最大で処理量の 3.0%、Vero Beach 土壌 59 日後)。

[I] は速やかに減少し、120 日後に各土壌においてわずかに認められるのみであった (1.0%~5.3%)。360 日後に Fresno 土壌 (通常量) で検出された [I] の量は処理量の 2.3% であった。4 種の主要代謝物の最大値は土壌により異なり、 $^{14}\text{CO}_2$  の生成量が少ない土壌 (Fresno 土壌及び Vero Beach 土壌) で各代謝物の  $t_{\text{max}}$  は遅く、 $^{14}\text{CO}_2$  の生成量が多い土壌 (BBA 2.2 土壌及び Hoefchen 土壌) で各代謝物の  $t_{\text{max}}$  は速かった。各代謝物の  $t_{\text{max}}$  及び  $\text{DT}_{50}$  から、各代謝物の分解速度は土壌により異なるものの、いずれの代謝物も土壌中で速やかに分解されると推定された。  については Fresno 土壌及び Vero Beach 土壌に関して、  に関しては、Vero Beach 土壌に関して  $\text{DT}_{50}$  を求めることができなかったが、他の土壌での  $\text{DT}_{50}$  はいずれも速やかであった。

表 6. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の Fresno 土壌中における分解 (通常量)

放射能成分	処理放射エネルギーに対する割合 (%)													
	0	1	2	3	6	9	13	20	30	59	120	181	272	360 日
スピロジクロフェン [I]	91.9	82.9	75.4	71.4	57.4	47.4	36.0	25.2	20.1	8.4	4.7	2.9	2.5	2.3
二酸化炭素	-	0.2	0.3	0.5	1.6	3.8	7.2	14.2	23.1	42.3	60.1	65.6	71.7	76.0
同定率	93.6	94.8	97.1	98.8	95.4	94.2	90.8	85.7	88.0	84.8	88.9	86.9	87.8	90.9

n. d. = 検出限界未満

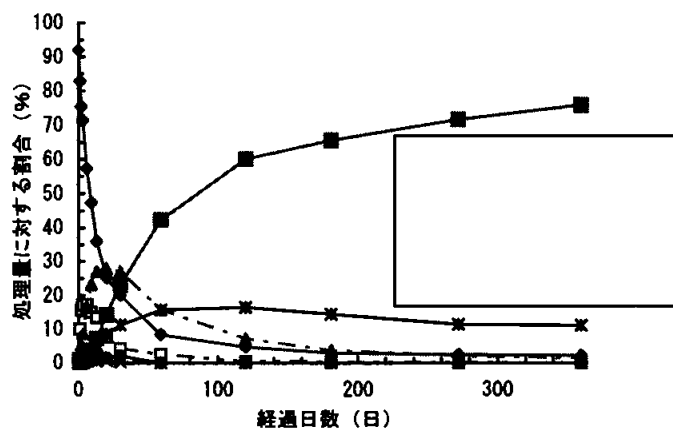


図 1. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の Fresno 土壌中における分解 (通常量)



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

表 7. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の Fresno 土壤中における分解 (高薬量)

放射能成分	処理放射能に対する割合 (%)										
	0	1	2	3	6	9	13	20	30	59	120日
スピロジクロフェン [I]	94.3	87.0	77.1	71.9	63.7	52.0	44.5	31.8	24.4	11.2	5.3
二酸化炭素	-	0.2	0.3	0.4	1.3	2.6	4.9	9.9	17.7	38.5	55.3
同定率	95.8	96.4	94.3	94.2	97.2	93.0	92.9	89.2	88.6	86.4	85.6

n. d. = 検出限界未満

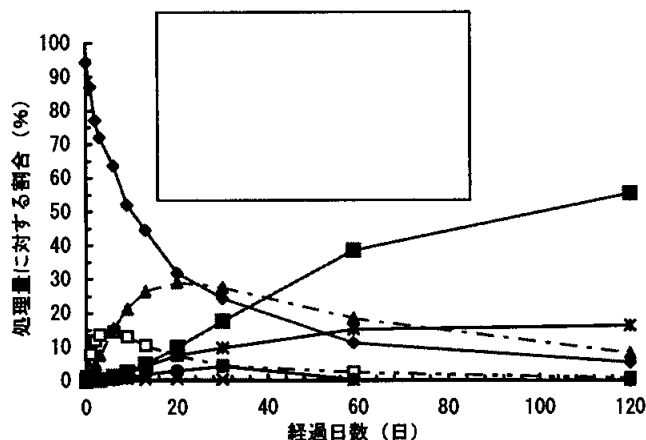


図 2. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の Fresno 土壤中における分解 (高薬量)

表 8. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の Vero Beach 土壤中における分解

放射能成分	処理放射能に対する割合 (%)											
	0	1	2	3	6	9	13	20	30	59	120日	
スピロジクロフェン [I]	96.0	88.6	74.9	68.4	53.8	38.3	28.4	14.6	7.8	1.9	1.0	
二酸化炭素	-	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	0.1	0.3	0.5	1.7	6.8	22.5	
同定率	98.1	100.1	98.4	99.8	101	96.8	95.1	91.4	90.3	86.5	80.6	

n. d. = 検出限界未満

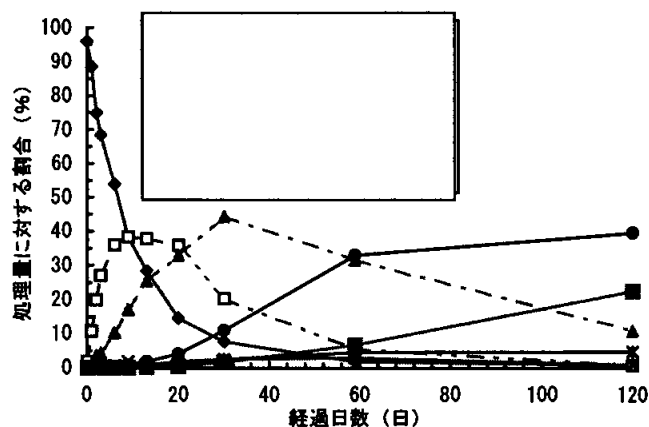


図 3. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の Vero Beach 土壤中における分解

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

表 9. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の BBA2.2 土壤中における分解

放射能成分	処理放射能量に対する割合 (%)										
	0	1	2	3	6	9	13	20	30	59	120日
スピロジクロフェン [I]	92.5	80.4	66.1	60.1	46.9	34.5	26.3	15.0	10.7	4.2	3.4
二酸化炭素	-	0.2	0.8	1.6	8.1	17.1	30.0	49.6	64.9	78.3	86.3
同定率	95.2	96.1	95.8	93.1	93.4	90.4	89.6	87.5	87.9	87.9	93.3

n. d. = 検出限界未満

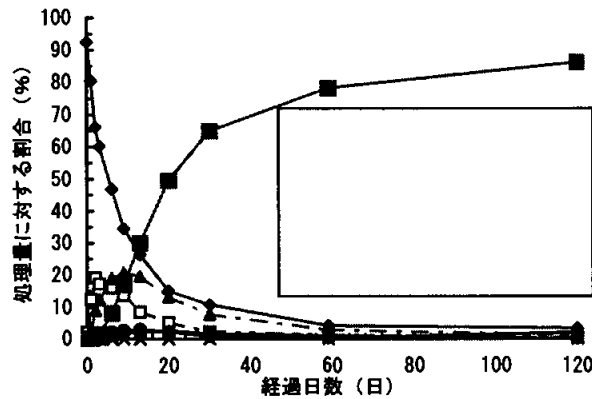


図 4. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の BBA2.2 土壤中における分解

表 10. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の Hoefchen 土壤中における分解

放射能成分	処理放射能量に対する割合 (%)										
	0	1	2	3	6	9	13	20	30	59	120日
スピロジクロフェン [I]	86.3	39.0	19.6	14.3	6.3	4.4	2.9	1.9	1.8	1.0	1.0
二酸化炭素	-	0.4	4.5	9.0	33.1	56.7	3.6 <sup>1)</sup> (74.0) <sup>3)</sup>	- <sup>2)</sup> (83.2) <sup>3)</sup>	87.8	88.3	93.1
同定率	97.2	92.2	91.3	88.2	78.8	83.8	87.6	88.4	90.7	90.1	94.1

n. d. = 検出限界未満

1) 実測値 ; 2) 試料採取せず ; 3) 9日目と30日目の間の曲線を滑らかに結ぶために使用した推定値

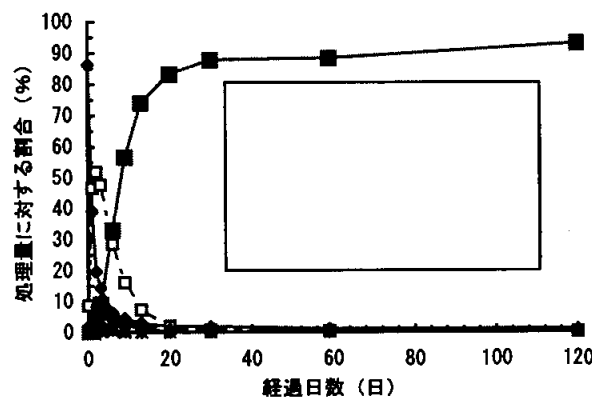


図 5. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の Hoefchen 土壤中における分解

表 11. 同定された各代謝物の各土壌における最大量(処理量に対する割合%)、 $t_{max}$ (日)及び  $DT_{50}$

成分	土 壌									
	Fresno 土壌 (通常量)		Fresno 土壌 (高薬量)		Vero Beach 土壌		BBA2.2 土壌		Hoefchen 土壌	
	最大量	$t_{max}$ $DT_{50}^{1)}$	最大量	$t_{max}$ $DT_{50}^{1)}$	最大量	$t_{max}$ $DT_{50}^{1)}$	最大量	$t_{max}$ $DT_{50}^{1)}$	最大量	$t_{max}$ $DT_{50}^{1)}$

- 1)  $t_{max}$  ~ 最高濃度の 1/2 になるまでの日数。最高濃度の 1/2 になる時点の前後のデータポイントから求めた一次式により算出した。申請者計算。  
 2) 最高濃度の 1/2 まで減少しなかったため、計算できず。  
 n. d. = 検出限界未満

7. 好気土壌中のスピロジクロフェンの半減期 (表 12)

[I] は全ての土壌で速やかに分解した。TIMME [9] による最適近似法で算出した半減期 ( $DT_{50}$  値) は土壌により異なり 0.5 日から 5.5 日と算出された。 $DT_{90}$  値も同様に土壌により異なり、約 14 日から 59 日までと算出された。被験物質の消失速度に処理量の影響は認められなかった。

表 12. 土壌中の [I] の  $DT_{50}$  及び  $DT_{90}$  値

土 壌	$DT_{50}$ (日)	$DT_{90}$ (日)
Fresno、通常量	5.3	58.6
Fresno、高薬量	6.0	66.4
Vero Beach	5.5	28.5
BBA 2.2	3.9	43.4
Hoefchen	0.5	13.6

8. 好気土壌におけるスピロジクロフェンの動態

好气的条件下の土壌中における有効成分の推定分解経路を図 6 に示す。

いずれかの試料において処理量の 10% を超える量で生成した主要代謝物 (

4 種といずれの時点においても処理量の 10% を超えなかった少量代謝物 (

) 1 種を同定した。代謝物の構造から、[I] は加水分解ならびに酸化及び還元により分解されることが推定された。[I] の分解の第一段階として、まず、側鎖の \_\_\_\_\_ が起こり、最初の代謝物である \_\_\_\_\_ を生成する。そ

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

その後、 $\text{CO}_2$  を生成する。 $\text{CO}_2$  は3種の経路を経て  $\text{CO}_2$  に変換された後、最終的には二酸化炭素に無機化されることが推定された。すなわち、 $\text{CO}_2$  が直接開裂される経路、転移により  $\text{CO}_2$  を生成した後  $\text{CO}_2$  を生成した後  $\text{CO}_2$  を生成することによって  $\text{CO}_2$  を生成することが推定された。また、 $\text{CO}_2$  の  $t_{\max}$  は  $\text{CO}_2$  の  $t_{\max}$  より遅く、また、 $\text{CO}_2$  の  $DT_{50}$  が  $\text{CO}_2$  の  $DT_{50}$  より同等か長いことから、 $\text{CO}_2$  は  $\text{CO}_2$  を経る経路と経ない経路の2経路で二酸化炭素まで分解すると推定された。いずれの土壌においても経時的に  $^{14}\text{CO}_2$  が増加したことから [I] 及び [I] の分解物が生物的分解を受けやすく、[I] 及び [I] の分解物は土壌中で容易に分解し、蓄積しないことが示唆された。各土壌における同定率は78.8%以上と良好であった。

図6. [  $^{14}\text{C}$ ] スピロジクロフェンの好気土壌中における推定代謝経路  
(----- : 申請者考察)

### 3. 土壌における運命

(2) [

<sup>14</sup>C] スピロジクロフェンの好気土壌中の分解・代謝

(代謝資料 No. 12)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：1999年3月31日

#### 供試標識化合物

化学名：3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン  
-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化学構造：

\*：<sup>14</sup>C 標識部位

標 識：[<sup>14</sup>C] 標識スピロジクロフェン [I]

比放射能：3.63 MBq/mg

放射化学的純度：>99% (HPLC)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20頁に記す。

#### 【方法】

##### 1. 土壌

[<sup>14</sup>C] 標識 [I] の土壌代謝試験 (代謝資料 No. 1) で用いた4種の土壌から [I] の分解速度が比較的緩やかな Fresno 土壌を選択した。但し、[<sup>14</sup>C] 標識 [I] の土壌代謝試験で供試した土壌とは異なる採取日の土壌を用いた。土壌は採取後、直ちに試験に供した。

表 1. 供試土壌の起源及び特性

土壌	採取地	土性	pH		有機炭素含量 (%)
			H <sub>2</sub> O	CaCl <sub>2</sub>	
Fresno	California/USA	砂壤土	7.3	6.6	0.17

##### 2. 処理及び処理量

供試土壌の一部 (約 20g 乾土相当量) をシャーレに採り、所定量の処理溶液を添加した後、葉さじを用いて溶媒が揮発するまで十分に混合し、残りの土壌 (約 1.2 kg) に戻した後、土壌全量をミキサーを用いて 1 時間混合した。混合後、乾土 100g 相当の土壌を 300 mL の三角フラスコに分配した。土壌を分配した後、水分含量が 0.33 バールでの含水量の約 75% となるように蒸留水を添加した。

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

[  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [ I ] の土壌代謝試験と同様、米国 (約 200g/ha、りんご) 及び EU (300g/ha、かんきつ) における最大施用量の平均値である 250g a. i. /ha を本試験での [ I ] の処理量とした。被験物質が分布する土壌深を 15 cm、土壌の仮比重を 1.5 g/cm<sup>3</sup> と仮定すると、上記の処理量は 11.1  $\mu\text{g}$  a. i. /100g 乾土に相当する。

### 3. インキュベーション及び試料採取

被験物質を処理後、三角フラスコを暗黒下、約 20°C でインキュベートした。三角フラスコ上部に CO<sub>2</sub> 捕集用のソーダライム及び揮発性有機化合物捕集用のポリウレタン栓を充填した捕集装置を取り付け、揮発性物質を捕集した。

試料採取、揮発性物質及び微生物バイオマスの測定のための採取日を表 2 に示す。

表 2. 試料の採取、測定日

測定項目	採取、測定日 (インキュベーション後の日数)
土壌試料	0、14、28、55、119
揮発性物質 (CO <sub>2</sub> 、揮発性有機化合物)	14、28、55、119
微生物バイオマス	0、119

### 4. 抽出、放射エネルギー測定、分析

#### (1) 揮発性有機化合物及び $^{14}\text{CO}_2$

酢酸エチルを抽出溶媒に用いた圧搾装置により各々の捕集装置内のポリウレタン栓から揮発性有機化合物を抽出し、抽出液中の放射エネルギーを液体シンチレーションカウンタ (LSC) で測定した。

$^{14}\text{CO}_2$  を測定するために、三角フラスコに捕集装置内のソーダライムを移した後、滴下ろし斗を三角フラスコに取り付け、更に吸収剤 (氷冷却した Carbosorb 10mL + PermafluorE+ 10 mL) を入れた 3 連のガラス容器を接続した。滴下ろし斗を用いて 18% 塩酸をゆっくり滴下してソーダライムを溶解し  $^{14}\text{CO}_2$  を遊離させた。生じた  $^{14}\text{CO}_2$  を吸収剤に吸収させた後、放射エネルギーを LSC で測定した。

#### (2) 土壌

各容器中の土壌全量を遠沈管に入れ、表 3 に示す溶媒を用いて順次極性を上げながら 6 回振とう抽出し、その後 5000 g で 20 分間遠心分離した。遠心後の上清は土壌粒子が混入しないように穏やかに遠沈管を傾けて上清を採取し、得られた上清を更にろ過して抽出液 1-6 を得た。抽出液 1-4 は混合して有機溶媒抽出液とした。また、抽出液 5 と抽出液 6 を合わせ水抽出液とした。有機溶媒抽出液と水抽出液の最終的な体積を測定し、それぞれの溶液 1 mL を LSC により測定した。その後、有機溶媒抽出液と水抽出液を合わせた後、薄層クロマトグラフィーに供し、抽出液中に含まれる成分をラジオルミノグラフィーで定量した。TLC の際には、[  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [ I ] を用いた試験で得られた抽出液とのコクロマトグラフィーを実施し、[

$^{14}\text{C}$  ] 標識 [ I ] では認められず、シクロヘキシル構造を有する成分

が生成するか確認した。ろ紙は乾燥後、全量を燃焼分析に供した。土壌の未抽出残留物は乾燥し、粉碎均質化した後、燃焼分析によって放射能を測定した（約 1 g、3 反復）。

表 3. 抽出溶媒の種類、量及び抽出時間

抽出液	抽出溶媒及び量	抽出時間
1	アセトニトリル 150 mL	30 分
2、3	アセトニトリル 80 mL	30 分
4	アセトニトリル/pH 5 緩衝液 (80:20) 80 mL	30 分
5	pH 5 緩衝液 80 mL	30 分
6	アセトニトリル 20 mL	5 分

## 【結果】

### 1. 土壌中の微生物バイオマス (表 4)

微生物バイオマスをインキュベーション 0、119 日後に測定した。試験開始時の微生物バイオマスは小さく、また、119 日のインキュベーション期間中にわずかに減少したが、微生物バイオマスの減少に被験物質の添加の影響は認められなかった。試験開始時の微生物バイオマスは [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [ I ] を用いた試験の開始時の微生物バイオマスの約 15% の値であった。 [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [ I ] を用いた試験において、試験期間中に微生物バイオマスが減少したにもかかわらず、 [ I ] は着実に無機化されつづけたことから、本試験における微生物バイオマスの量は試験結果に影響しなかったと推定された。

表 4. Fresno 土壌の微生物バイオマス

インキュベーション期間 (日)	Fresno 土壌における微生物バイオマス (microbial C g/kg 土壌)
0 (無処理)	32
119 (処理)	28
(無処理)	26

### 2. 物質収支 (表 5)

抽出放射能、未抽出残留物、揮発性物質の総量に基づき総回収量を算出した。物質収支は処理量の 95.8% から 101.8% の範囲であり良好であった。

### 3. 揮発性物質の生成 (表 5)

[ I ] は二酸化炭素まで代謝され、 [ I ] の無機化量は経時的に増加した。 [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [ I ] の被験物質の無機化速度は、 [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [ I ] の場合よりもやや速く、119 日のインキュベーション後には処理量の 69%

が無機化された〔 $^{14}\text{C}$ 〕標識〔I〕では120日後に処理量の60%。  
揮発性有機化合物はいずれの採取時点からも検出されなかった。

#### 4. 結合性残留物（表5）

未抽出残留物（結合性残留物）は処理55日後に19.5%まで徐々に増加した後、119日後には減少した。〔 $^{14}\text{C}$ 〕標識〔I〕由来の未抽出残留物の量は〔 $^{14}\text{C}$ 〕標識〔I〕の場合よりもやや多かったものの、増加後減少していることから未抽出残留物も土壌中で代謝を受け、二酸化炭素へ無機化されると推定された。

#### 5. 抽出放射能の消長（表5）

処理直後には98.9%であった抽出放射エネルギーが119日後には処理量の8.8%へ減少した。抽出放射能は二酸化炭素の増加とともに経時的に減少した。〔 $^{14}\text{C}$ 〕標識〔I〕を加えた場合の抽出放射エネルギーは、〔 $^{14}\text{C}$ 〕標識〔I〕の場合よりもやや少なかったが、水抽出される放射エネルギーの割合はの場合30日後に最大1.8%であったが〔 $^{14}\text{C}$ 〕標識〔I〕では28日後に5.3%と高くなった。

表5. 〔I〕を処理後好氣的に代謝された後の $^{14}\text{C}$ の分布

経過日数 (日)	溶媒 抽出液	水抽 出液	未抽出 残留物	$^{14}\text{CO}_2$	合計
0	98.5	0.4	1.4	- <sup>1)</sup>	100.3
14	76.5	4.0	6.8	10.6	98.0
28	46.1	5.3	18.0	32.4	101.8
55	19.0	4.2	19.5	57.9	100.7
119	6.3	2.5	17.9	69.1	95.8

1) 測定せず。

#### 6. 土壌中の代謝（表6、7、図1）

〔I〕は土壌中で速やかに減少し、インキュベーション119日後には処理量の2.1%のみが存在していた。また、〔 $^{14}\text{C}$ 〕標識〔I〕の試験で処理量の10%を超える量で見出された3種の主要代謝物（ $^{14}\text{C}$ ）は本試験でも認められたが、〔 $^{14}\text{C}$ 〕標識〔I〕を用いた試験で検出された量の2倍を超える量で検出され、その最大値は本試験では10%未満であった。その他の代謝物では、処理28日後に処理量のそれぞれ5.9%と4.7%に相当する代謝物が認められたが、これらも28日以降減少した（表7）。3種の主要代謝物の量的な分布が〔 $^{14}\text{C}$ 〕標識〔I〕を用いた試験結果とは異なったが、これは採取日の異なる土壌を用いたことにもよると推定された。



表 6. 同定された各代謝物の最大量、 $t_{max}$  及び  $DT_{50}$  (Fresno 土壌)

被験物質	代謝物
[ <sup>14</sup> C] 標識 [I]	最大量(%)
	$t_{max}$ (日)
	$DT_{50}$ (日) <sup>2)</sup>
[ <sup>14</sup> C] 標識 [I] <sup>1)</sup>	最大量(%)
	$t_{max}$ (日)
	$DT_{50}$ (日) <sup>2)</sup>

1) 代謝資料 No. 1 から抜粋。

2)  $t_{max}$  ~ 最高濃度の 1/2 になるまでの日数。最高濃度の 1/2 になる時点の前後のデータポイントから求めた一次式により算出した。

3) 最高濃度の 1/2 まで減少しなかったため、計算できず。

表 7. Fresno 土壌中における <sup>14</sup>C- [I] の分解と代謝物の消長

代謝物	処理放射エネルギーに対する割合 (%)				
	0	14	28	55	119 日
スピロジクロフェン [I]	95.6	20.9	6.0	4.0	2.1
二酸化炭素	— <sup>1)</sup>	10.6	32.4	57.9	69.1
同定率	98.9	85.9	67.6	73.6	73.1

1) : 測定せず

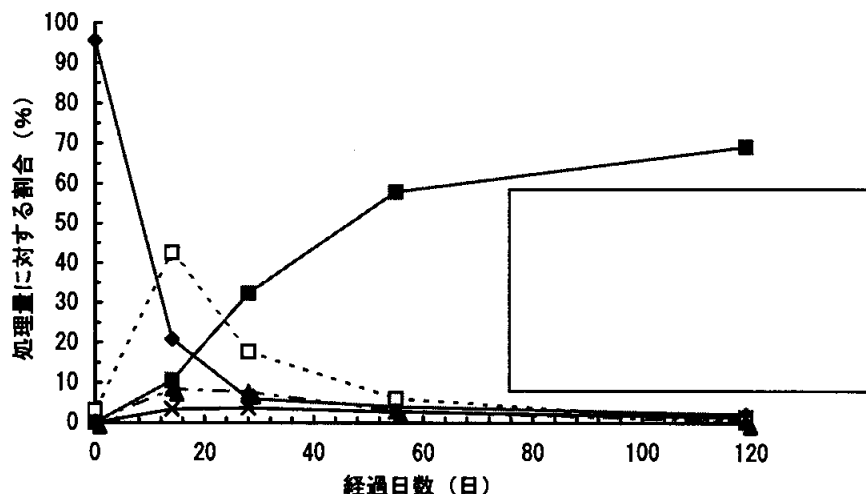


図 1. [I] 及び代謝物の好氣的条件下の Fresno 土壌中における分解

## 7. 好気土壌中のスピロジクロフェンの半減期（申請者考察）

[I] は土壌で速やかに分解した。0 日及び 14 日の値を擬一次反応速度に近似して求めた半減期は 6.4 日と算出された。この値は [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [I] を用いた試験で得られた半減期（5.3 日）とほぼ同じ値であった。

## 8. 好気土壌におけるスピロジクロフェンの動態

好气的条件下の土壌中における有効成分の推定分解経路を図 2 に示す。

$^{14}\text{C}$ -[I] は好气的条件下土壌中で速やかに分解代謝され、二酸化炭素まで分解され、119 日後に二酸化炭素量は処理放射エネルギーの 69% に相当した。

インキュベーション期間中 [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [I] が処理量の 10% 以上で生成した。他の主要代謝物で、既に [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [I] を用いた試験で同定された [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [I] は本試験でも検出されたが、その最大量は 8.4% 及び 3.7% と [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [I] を用いた試験で認められた量より少なく 10% 未満であった。また、[  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [I] を用いた試験では認められなかった代謝物が 2 種認められた。これら 2 種の代謝物は、 [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [I] では検出されない構造すなわち、 [  $^{14}\text{C}$  ] 標識 [I] の構造を保持しない構造と推定された。しかし、これら代謝物はいずれも 28 日後にそれぞれ最大 5.9% と 4.7% 検出されたのみであり、その後速やかに減少したため、それらの構造は同定されなかった。経時的に二酸化炭素が増加したことから、[I] 及び [I] の分解物は土壌中で容易に分解し、蓄積しないことが示唆された。

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

図 2. [ <sup>14</sup>C] スピロジクロフェンの好気土壌中における推定代謝経路  
(申請者作成)

#### 4. 加水分解試験

(1) [ <sup>14</sup>C ]スピロジクロフェンの滅菌緩衝液中における加水分解  
(代謝資料 No. 13)

試験機関 :

[GLP対応]

報告書作成年月日 : 2000年6月28日

#### 供試標識化合物

化学名 : 3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン  
-4-イル=2,2-ジメチルプチラート

化学構造 :

\* : 標識部位

標識 : [ <sup>14</sup>C ] 標識スピロジクロフェン [ I ]

比放射能 : 3.60 MBq/mg (約 97 µCi/mg)

放射化学的純度 : >99% (HPLC)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20頁に記す。

供試緩衝液 : a) 0.01M 酢酸緩衝液 (pH 4)  
b) 0.01M トリス緩衝液 (pH 7)  
c) 0.01M ホウ酸緩衝液 (pH 9)

#### 【方法】

試験は1995年版 EC Commission Directive 95/36/EC 及び1982年版 EPA Pesticide Assessment Guideline、Subdivision N、Section 161-1 に従って、50°Cにおける予備試験及び25°Cにおける本試験を pH 4、pH 7 及び pH 9 で実施した。

#### 1. 濃度設定

[ I ] の推奨使用量は1作期当たり最大 200 g a. i. /ha であるので、投下した [ I ] が水深 15 cm の水に均一に分布すると想定した場合、理論水中濃度は 0.13 mg a. i. /L と計算され、この濃度は [ I ] の水溶解度のほぼ 3 倍の値になる。準拠したガイドラインでは加水分解試験における試験濃度は水溶解度 (約 0.05 mg/L) の 1/2 を超えてはならないため、本試験は水溶解度の約 1/2 に相当する約 0.025 mg/L (90 Bq/mL) で実施した。

## 2. 試験系

試験容器にはテフロン加工のクリップキャップ付きの 10 mL 容のガラス製バイアルを用いた。[I] は容器に吸着する性質が認められたため、試験開始前に容器を次のように処理した。最初にクロム硫酸、次いで水で容器を洗浄した後、ガラス表面をジメチルジクロロシラン (0.75%メタノール溶液) で 30 分から 60 分間処理して失活させた。この後メタノール及びアセトニトリル/水 (1:1) で容器を洗浄し、滅菌した。

保存溶液から一定量を取り、アセトニトリルで希釈して処理溶液を調製した。上述の滅菌済容器に、滅菌した pH 4、7、9 の緩衝液 7.5 mL と処理溶液 75  $\mu$ L を加えた。従って、試験溶液中のアセトニトリル濃度は約 1% となる。暗黒条件下、一定温度 (予備試験: 50°C、本試験: 25°C) に設定した水浴中でインキュベーションを行った。

試験溶液の調製に使用した処理溶液の放射能濃度を処理前、処理時、処理後の計 3 回に渡り各 2 反復で液体シンチレーションカウンター (LSC) を用いて放射エネルギーを求め、試験溶液中の放射エネルギーとした (表 1)。

表 1: 試験溶液 (7.5 mL) 中の放射エネルギー及び濃度

試験	pH	試験溶液中の	
		放射エネルギー [Bq]	濃度 [mg/L]
本試験 (25°C)	pH 4	635.1	0.0235
	pH 7 (再試験) <sup>1)</sup>	718.0	0.0266
	pH 9	673.8	0.0250
予備試験 (50°C)	pH 4、pH 7	681.9	0.0253
	pH 9	751.9	0.0279

1) pH 7 の 1 回目の試験で微生物による汚染が認められたため、再試験を実施した

## 3. 試験群及び試料採取 (表 2)

25°C の本試験は pH 4、7 及び 9 それぞれ 30 日間の試験期間とした。表 2 に示す時点で各 pH の試験容器を採取し、それぞれの測定に供した。更に、溶液の pH 及び滅菌性を確認するため、化学分析とは異なる容器を準備して、各採取日に採取した。

表 2: 本試験 (25°C) 及び予備試験 (50°C) における試料採取

試験	pH	測定項目	採取日 (経過日数)
本試験 (25°C)	pH 4	化学分析	処理直後、2、4、7、14、21 及び 30 日後
		pH、滅菌性の確認	処理直後、4、14 及び 30 日後
		吸着成分の分析	1、30 日後
	pH 7 (再試験)	化学分析	処理直後、1、3、7、14、21 及び 30 日後
		pH、滅菌性の確認	処理直後、3、7、14、21 及び 30 日後
	pH 9	化学分析	処理直後、0.1、0.25、1、2、3、4、7、14、21 及び 30 日後
		pH、滅菌性の確認	処理直後、4、14 及び 30 日後
		吸着成分の分析	2、30 日後

表 2：(続)

試験	pH	測定項目	採取日 (経過日数)
予備試験 (50°C)	pH 4	化学分析	処理直後、0.25、1、2、3、4 及び 7 日後
	pH 7	化学分析	処理直後、0.25、1、2、3、4 及び 7 日後
	pH 9	化学分析	処理直後、0.04、0.1、0.25、1、2、3、4、7 及び 16 日後

#### 4. 分析

スピロジクロフェン [I] はアルカリ性で不安定であると予想されたため、採取後直ちに全ての試験溶液に酢酸 50 µL を加え pH を 3-4 に調整した後、試験溶液 (7.5 mL) から 500 µL を 3 反復で採取し LSC を用いて緩衝液画分の放射エネルギーを測定した。更に 500 µL を 2 反復で採取し、緩衝液画分に含まれる成分を 2 種の TLC を用いて分析した。

残りの試験溶液 (5 mL) にアセトニトリル 5 mL を加えてガラス壁面に吸着した放射エネルギーを溶解させた後、この溶液 500 µL を 2 反復で採取し LSC を用いてアセトニトリル/緩衝液画分の放射エネルギーを求めた。

被験物質及び分解生成物は TLC を用いて分離、定量した。分解生成物は TLC でのクロマトグラフィー及び LC-MS ならびに LC-MS/MS で同定した。

### 【結果】

#### 1. 試験温度

試験期間を通じて試験温度は本試験で  $25 \pm 0.1^\circ\text{C}$  (85 回測定し、その内 2 回が  $25 \pm 0.2^\circ\text{C}$  であった) に維持されていた。

#### 2. 試験溶液の滅菌性

pH 4 及び 9 では試験期間中、溶液の滅菌性が維持されていたが、pH 7 (1 回目) の 7 日後及び 30 日後では微生物が認められたので、pH 7 については再試験を行った。pH 7 の再試験では微生物が認められず、滅菌性が維持されていたため、以下に再試験の結果のみを記述する。

#### 3. 試験溶液の pH

各試験溶液の pH は試験期間を通じて設定した pH に保たれていた。

#### 4. 物質収支

##### 本試験 (25°C)

全期間において、pH 4 では処理量の 101.0% (RSD = 1.40%)、pH 7 では 100.2% (RSD = 2.12%) 及び pH 9 では 102.3% (RSD = 2.69%) であった。

##### 予備試験 (50°C)

予備試験でも本試験と同様物質収支は良好であった (97.5% ~ 106.6%)。

## 5. ガラスに吸着した放射能の同定

ガラスに吸着した放射能を同定するために、pH 4 の 1 日後及び 30 日後ならびに pH 9 の 2 日後及び 30 日後の 4 試料を用いた。これらの試験溶液を容器から採取した後、容器を水 (5 mL) で 3 回、次いでアセトニトリル (2mL) で洗浄し、アセトニトリル洗浄液を TLC で分析した。

この結果、容器のガラスに吸着している放射能をアセトニトリルにより抽出した抽出放射能は未変化の [I] のみで、加水分解物は含まれないことが確認された。そのため 3 種の pH の全ての容器においてガラスに吸着した物質は親化合物 [I] とした (pH 7 に関しては、[I] が非解離性であることから分析した上記の pH の結果と同等と推定した)。

## 6. 分析操作中の人工分解物

TLC 分析中にエノール体 [M1] が分解し、分析操作中の人工分解物が生成することが確認された。放射能標識エノール体 [M1] を用いて、分取用シリカゲル TLC を複数回行い分析操作中の人工分解物を単離し、LC-MS 及び LC-MS/MS で分析した。この分析操作中の人工分解物は主要成分と微量成分の 2 種から構成され、LC-MS/MS 及び土壌代謝試験の知見により主要成分をラクチド体、微量成分をケトヒドロキシ体と同定した。加水分解試験におけるこれらの人工分解物はエノール体由来であることが確認されたため、この 2 成分の放射エネルギーはエノール体に加算して、評価した。

## 7. 計算

採取した試験溶液 (7.5 mL) から 500  $\mu$ L を 3 反復で採取し LSC を用いて緩衝液画分の総放射エネルギー (W) を求めた。更に 500  $\mu$ L を 2 反復で採取し、緩衝液画分に含まれる成分を 2 種の TLC を用いて分析した。

残りの試験溶液 (5 mL) にアセトニトリル 5 mL を加えてガラス壁面に吸着した放射エネルギーを溶解させた後、この溶液 500  $\mu$ L を 2 反復で採取し LSC を用いてアセトニトリル/緩衝液画分の総放射エネルギー (S) を求めた。

ガラスに吸着した放射エネルギー (A) はアセトニトリル/緩衝液画分の総放射エネルギー (S) 及び緩衝液画分の総放射エネルギー (W) から下式により算出した。

$$A = S - 0.667 \times W \quad \left(0.667 = \frac{5}{7.5} = \frac{\text{分取液量}}{\text{試験液量}}\right)$$

試験溶液中のスピロジクロフェン [I]、エノール体 [M1] 及びその他の成分の量は、それぞれ、緩衝液画分の放射エネルギー (W) に 2 種の TLC 分析による各成分の TLC 上に塗布した放射エネルギーに対する % の平均値を乗して、次のように算出した。

$$\text{スピロジクロフェン (Bq)} = [W(\text{Bq})] \times [\text{TLC 上のスピロジクロフェン (\%)}] \div 100 \text{ (吸着部分を除く)}$$

$$\text{エノール体 (Bq)} = [W(\text{Bq})] \times [\text{TLC 上のエノール体 (\%)}] \div 100$$

$$\text{その他の成分 (Bq)} = [W(\text{Bq})] \times [\text{TLC 上のその他の成分の (\%)}] \div 100$$

また試験容器全体における放射エネルギーは緩衝液面分の総放射エネルギー(W)と吸着した放射エネルギー(A)を加算し求めた。

8. [I] 及び加水分解生成物の定性及び定量 (表 3~4)

25°Cの本試験において、pH 4、7 及び 9 いずれの pH においてもスピロジクロフェン [I] は分解したが、pH 9 で最も速やかに分解した。本試験でのインキュベーション 30 日後における [I] の残留量は pH 4、7 及び 9 それぞれで 70.3%、51.0%及び 1.1%であった。50°Cにおける予備試験期間はそれぞれ 7 日 (pH 4、pH 7) 及び 16 日 (pH 9) であり、pH 4、7 及び 9 における試験期間終了時のスピロジクロフェンの残存量は処理量の 21.1%、14.4%及び 4.6%であった。特に pH 9 で不安定であった。3種の pH 全てにおいて、[I] の減少に伴い  $\text{H}_2\text{O}$  が増加した。分析操作中に TLC 上で  $\text{H}_2\text{O}$  が分解し、分析操作中の人工分解物が生成した。この分析操作中の人工分解物は  $\text{H}_2\text{O}$  由来であることから、この分解物の値を  $\text{H}_2\text{O}$  に加算し、 $\text{H}_2\text{O}$  として評価した。その他の加水分解物は明らかにならなかったが、最大でも処理放射エネルギーの約 2%以下であった。

9. 緩衝液中のスピロジクロフェン [I] の分解動態 (表 3~4、図 1~2)

25°Cにおける本試験の結果を表 3 及び図 1 に示した。インキュベーション期間中にスピロジクロフェン [I] の濃度が明らかに減少し、特に pH 9 で不安定であった。

一次速度式から [I] の半減期を算出したが、pH 9 においては全試料採取日の値を用いた場合、一次反応速度は不連続となり、7 日以上試験期間以後は異なる次数の反応となる事が認められた。このことは、アルカリ性条件での長期間のインキュベーション後に、吸着した被験物質が脱着する現象が顕著であることから説明可能である。このことは、加水分解による消失と脱着による放出の間に定常状態を生じさせる。そのため、最初の 8 時点の値のみを用いて pH 9 における加水分解半減期を算出した。

25°Cにおける各 pH での半減期は、pH 4 で 63.6 日、pH 7 で 30.8 日、pH 9 で 1.9 日であった (表 5)。

50°Cにおける予備試験の結果を表 4 及び図 2 に示した。50°Cにおける各 pH における半減期を求めたが pH 9 においては、25°Cの本試験と同様に最初の 6 時点の値のみを用いて算出した。半減期はそれぞれ、pH 4 : 3.1 日、pH 7 : 2.5 日、pH 9 : 0.4 日であった (表 5)。

上記の結果をアレニウスの式に代入して 20°Cでの各 pH における加水分解半減期を求めた。20°Cにおける各 pH での半減期はそれぞれ、pH 4 : 119.6 日、pH 7 : 52.1 日、pH 9 : 2.5 日であった (表 5)。いずれの温度においても pH の上昇とともに加水分解速度が速やかになることが認められた。

10. 結論

[I] は室温で酸性、中性、アルカリ性のいずれの条件でも加水分解したが、加



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

水分解速度は pH に依存し、pH の上昇とともに速やかに分解した。試験した pH の範囲 (pH 4 から pH 9) では、遊離の [I] が加水分解物として確認されたが、その他の加水分解物は認められなかった。従って、[I] は [I] を生成する経路で加水分解すると推察された。図 3 にスピロジクロフェン [I] の推定加水分解経路を示す。

表 3: スピロジクロフェンの pH 4、7 及び 9 緩衝液中での 25°C における加水分解動態 (本試験、処理放射能に対する%)

pH 4			
インキュベーション 時間 [日]	スピロジクロフェン [I] (緩衝液中)	スピロジクロフェン [I] (ガラスに吸着)	[I] 計
0	53.1	41.7	94.9
2	65.5	28.2	93.6
4	59.8	31.8	91.6
7	37.0	54.6	91.5
14	49.1	33.6	82.7
21	53.3	20.3	73.6
30	39.5	30.8	70.3

pH 7			
インキュベーション 時間 [日]	スピロジクロフェン [I] (緩衝液中)	スピロジクロフェン [I] (ガラスに吸着)	[I] 計
0	83.5	17.8	101.3
1	83.5	12.3	95.8
3	77.5	9.8	87.3
7	69.9	14.2	84.1
14	58.2	12.8	70.9
21	46.9	11.7	58.6
30	39.9	11.1	51.0

pH 9			
インキュベーション 時間 [日]	スピロジクロフェン [I] (緩衝液中)	スピロジクロフェン [I] (ガラスに吸着)	[I] 計
0	90.6	9.8	100.4
0.1	82.7	11.7	94.3
0.25	66.6	15.9	82.5
1	53.9	8.7	62.5
2	35.8	7.9	43.6
3	23.4	4.2	27.6
4	13.2	4.3	17.5
7	4.8	2.8	7.7
14	0.7	1.7	2.4
21	1.1	1.7	2.8
30	1.2	0.0	1.1

- 1) の分析操作中の人工分解物  
2) 人工分解物の合計

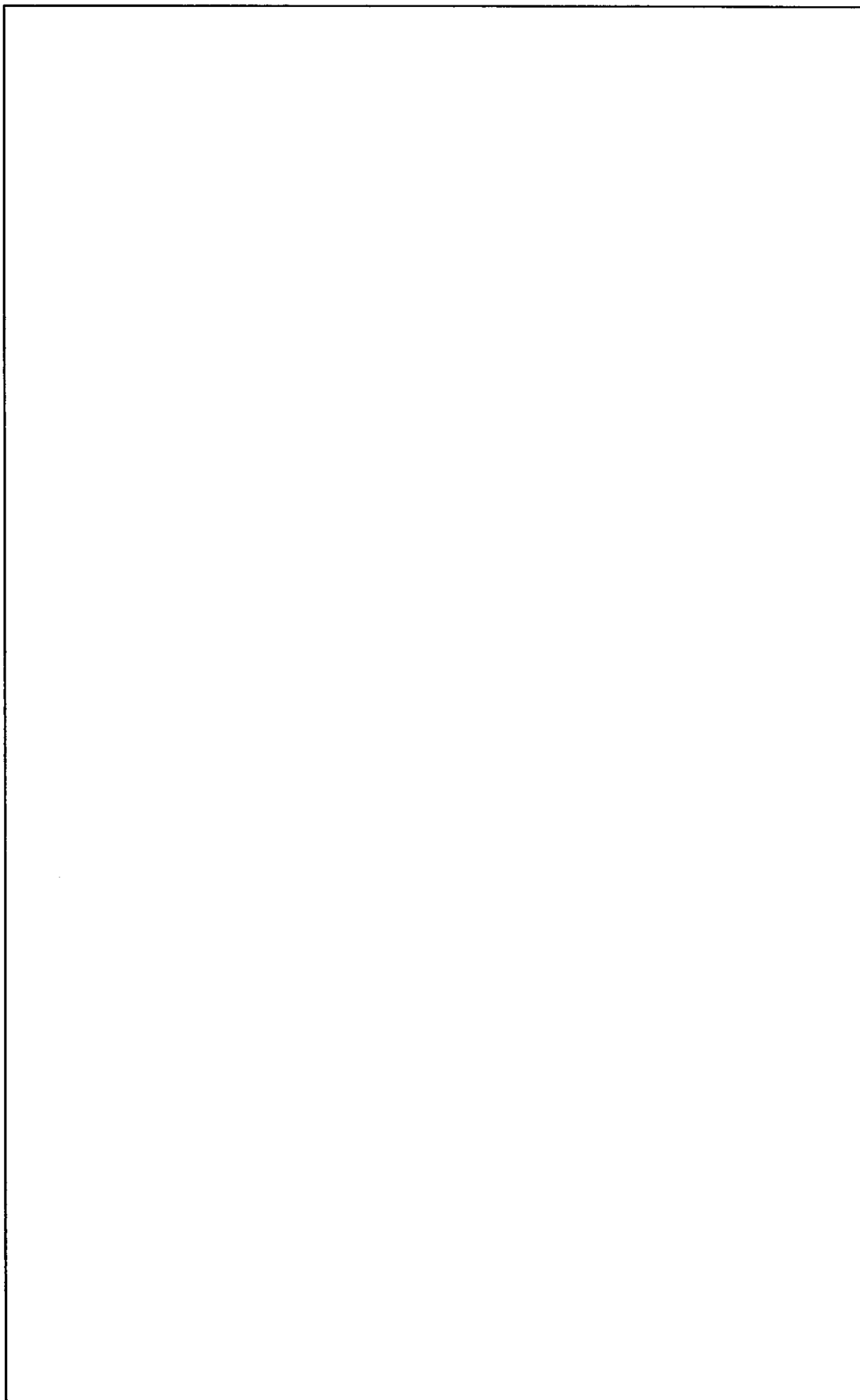


図 1 : 25°Cにおけるスピロジクロフェンの加水分解

表 4：スピロジクロフェンの pH 4、7 及び 9 緩衝液中での 50°C における加水分解  
(予備試験、処理放射能に対する%)

pH 4			
インキュベーション 時間 [日]	スピロジクロフェン [I] (緩衝液中)	スピロジクロフェン [I] (ガラスに吸着)	[I] 計
0	88.5	12.6	101.1
0.25	81.7	13.8	95.5
1	64.9	10.3	75.2
2	51.7	12.4	64.1
3	43.7	8.8	52.5
4	29.6	9.6	39.3
7	17.7	3.3	21.1

pH 7			
インキュベーション 時間 [日]	スピロジクロフェン [I] (緩衝液中)	スピロジクロフェン [I] (ガラスに吸着)	[I] 計
0	85.2	16.9	102.1
0.25	81.2	12.5	93.8
1	56.5	12.7	69.1
2	42.7	12	54.7
3	32	9.2	41.2
4	25.4	7	32.4
7	11.3	3.1	14.4

pH 9			
インキュベーション 時間 [日]	スピロジクロフェン [I] (緩衝液中)	スピロジクロフェン [I] (ガラスに吸着)	[I] 計
0	82.3	12.4	94.8
0.04	63.1	15.1	78.2
0.1	43.9	10.1	54
0.25	18.3	7.5	25.8
1	3.7	4.7	8.5
2	1.3	1.6	2.9
3	1.5	1.1	2.6
4	1.5	2	3.5
7	2.3	2.1	4.4
16	1.9	2.7	4.6

- 1) エノール体由来の分析操作中の人工分解物
- 2) 総エノール体はエノール体とこの人工分解物の合計

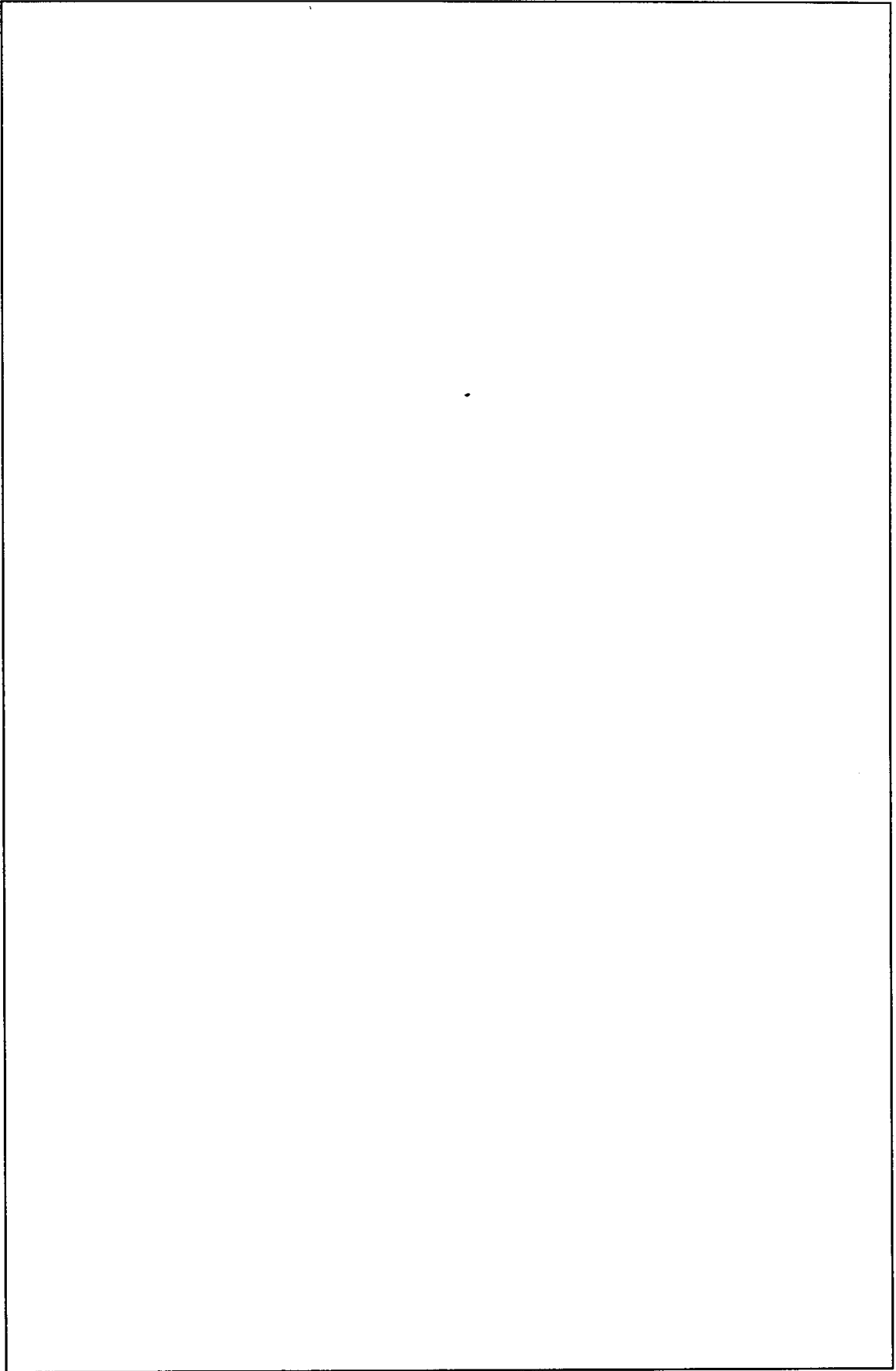


図 2 : 50°Cにおけるスピロジクロフェンの加水分解

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

表 5：スピロジクロフェンの加水分解半減期

試験溶液	50℃における 半減期 [日]	25℃における 半減期 [日]	20℃における 半減期 [日] <sup>1)</sup>
pH 4 (0.01M 酢酸緩衝液)	3.1	63.6	119.6
pH 7 (0.01M トリス緩衝液)	2.5	30.8	52.1
pH 9 (0.01M ホウ酸緩衝液)	0.4	1.9	2.5

1) 25℃及び50℃の結果をアレニウスの式へ代入し、外挿して求めた。

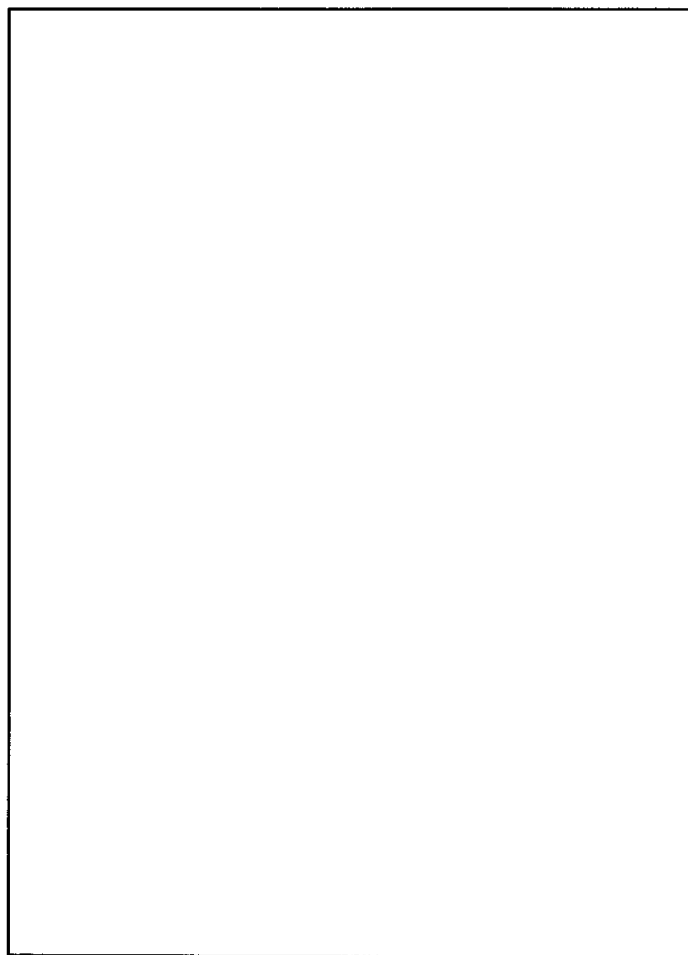


図 3：スピロジクロフェン [I] の推定加水分解経路

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

## 5. 水中光分解試験

### (1) スピロジクロフェンの水中光分解 (緩衝液)

(代謝資料 No. 14)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年月日: 2000年9月4日

#### 供試標識化合物

化学名: 3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化学構造:

A), B):  $^{14}\text{C}$  標識部位

標識 A): [  $^{14}\text{C}$  ] 標識スピロジクロフェン [ I ]  
比放射能 : 3.6 MBq/mg  
放射化学的純度 : >99% (TLC)  
化学的純度 : >98% (HPLC)

標識 B): [  $^{14}\text{C}$  ] 標識スピロジクロフェン [ I ]  
比放射能 : 3.63 MBq/mg  
放射化学的純度 : >99% (TLC)  
化学的純度 : >99% (HPLC)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20 頁に記す。

#### 【方法】

##### 1. 材料

供試水 : 0.01M 酢酸緩衝液、pH 4  
光照射装置 : サンテスト装置  
光源 : キセノンランプ (UV ガラスフィルター付、下限波長: 290 nm)  
光強度 本試験: 925 W/m<sup>2</sup>、追加試験 1092 W/m<sup>2</sup>、補足試験 1092 W/m<sup>2</sup>  
(測定波長範囲、300~800 nm)

## 2. 試験群及び濃度設定

標識位置の異なる2種の被験物質を用いた。[ <sup>14</sup>C ] [ I ] を用いて本試験を、本試験の結果の確認及び分解経路に関する更なる情報を得るための補足試験を [ <sup>14</sup>C ] [ I ] を用いて実施した。試験濃度は水溶解度 (約 0.05 mg/L) の2分の1である約 0.025 mg/L に設定した。0日試料を分析して実際の試験濃度を確認した (表 1)。加水分解試験結果から、スピロジクロフェンは pH 4 で最も安定で、pH 7 及び 9 では不安定であったことから、加水分解の影響を出来るだけ排除するために pH 4 の酢酸緩衝液中で実施した。

表 1 試験濃度

	供試被験物質	試験濃度
本試験	[ <sup>14</sup> C ] [ I ]	30.8 µg/L
追加試験	[ <sup>14</sup> C ] [ I ]	28.4 µg/L
補足試験	[ <sup>14</sup> C ] [ I ]	26.4 µg/L

## 3. 予備試験—溶解助剤濃度の影響

先に行われた加水分解試験から、スピロジクロフェン [ I ] の多くがガラス容器内壁に吸着することが確認された。加水分解試験では、ガラス容器をジクロロジメチルシランで処理したにもかかわらず、最高 60%もの [ I ] が吸着した。従って、この光分解試験では、容器表面への [ I ] の吸着を避け、水溶液中の光分解を評価するために石英容器表面へ [ I ] が吸着しなくなる濃度の溶解助剤 (すなわちアセトニトリル 20%) を試験容器に添加することとした。光増感作用及び減光作用がなく、水中での光分解性に影響を及ぼさないことが既知であることからアセトニトリルを用いた。また、アセトニトリルを 20%添加した場合の影響を調べるため、アセトニトリルを 1%あるいは 20%の濃度で含む pH 4 緩衝液に本試験と同じ条件で光を照射し、照射 0、5、12、15 日後にそれぞれの試料を採取して物質収支、分解速度及び分解物の生成パターンを調べた。

## 4. 操作及び試料採取

### 本試験及び追加試験

滅菌した石英容器 (容量 25 mL、長さ 50 mm、幅 30 mm、高さ 19 mm、液表面面積 15 cm<sup>2</sup>) に緩衝液 15 mL を入れ、[ <sup>14</sup>C ] [ I ] のアセトニトリル溶液 250 µL 及びアセトニトリル 1750 µL を加え、超音波に付した。更に、緩衝液 5 mL 及びアセトニトリル 3 mL を加えて最終液量を 25 mL とした (アセトニトリル濃度 20%)。これにポリウレタン栓及びソーダライムを充填した揮発性物質捕集装置を装着した。これらの容器をサンテスト装置中に入れ、

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

25±1°Cで19日間キセノン光を連続照射した。照射0、2、5、7、12、19日後に2反復の試料を採取した。暗対照試料として石英容器全体をアルミホイルで覆い、同じサンテスト装置中に設置し、19日後に2反復で試料を採取した。

本試験の暗対照試料において、ソーダライムが捕集装置から溶液中に落下し、暗対照試料で[I]が加水分解したため、試験期間18日で追加試験を実施した。照射試料は照射0、7、18日後に2反復の試料を採取し、暗対照試料は18日後に2反復の試料を採取した。

### 補足試験

被験物質として[<sup>14</sup>C] [I]を使用し、本試験と同様に実施した。照射0、3、10日後に2反復、17日後に4反復の試料を採取した。この試験では、17日後の試料については揮発性物質の捕集装置を装着した2反復及び捕集装置を装着しない2反復を実施し、その他の容器には揮発性物質の捕集装置を装着しなかった。

## 5. 分析

### 1) 溶液

採取した試料は容器を開ける前にデシケーターに移し、減圧によって容器上部空間に存在する揮発性物質を捕集装置に捕集した。採取した試料から100 µLの試験溶液を3反復で抜き取り、液体シンチレーションカウンター(LSC)を用いて試料溶液中の総放射エネルギーを定量した。0日試料の放射エネルギーを処理濃度とした。試料溶液中の放射性成分は、試料溶液500 µLを直接TLCに塗布し、分離後ラジオルミノグラフィを用いて定量した。放射性成分は標準物質とのクロマトグラフィにより同定した。

### 2) 揮発性有機化合物及び<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>

エタノールを抽出溶媒(20 mL、2回)に用いた圧搾装置により各々の捕集装置中のポリウレタン栓から揮発性有機化合物を抽出し、抽出液中の放射エネルギーをLSCで測定した。処理量の1%以上の放射エネルギーが認められた場合にのみクロマトグラフィにより分析した。

<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を測定するために、三角フラスコに捕集装置内のソーダライムを移した後、滴下ろし斗を三角フラスコに取り付け、さらに吸収剤(氷冷却したCarbosorb 10 mLとPermafluorE+ 10 mLの混液)を入れた3連のガラス容器を接続した。滴下ろし斗を用いて18%塩酸をゆっくり滴下してソーダライムを溶解し<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を遊離させた。生じた<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を吸収剤に吸収させた後、放射エネルギーをLSCで測定した。



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

## 【結果】

### 1. 予備試験—溶解助剤濃度の影響

試験期間中の物質収支の平均値は、20%アセトニトリルでは 98%であったが、1%アセトニトリルではわずかに 86%であった（表 2）。20%及び 1%アセトニトリルのいずれの溶液においても緩衝液中に含まれる成分の大部分は [I] であり、[I] の分解物の量は少なかったが、分解物の生成パターンは質的にも量的にも類似していた。1%アセトニトリル溶液における回収されなかった放射能は [I] と推察されること、及び緩衝液中の放射能の大部分が [I] であったことから、[I] の分解速度はいずれの溶液においても同等であると推察された。また、[I] の主分解物である二酸化炭素の生成量は両溶液で類似していた。以上から、20%アセトニトリルを用いた場合の [I] の光分解は 1%アセトニトリルと同様であると推察されたため、安定して高い回収率の得られる 20%アセトニトリル濃度で試験を実施することとした。

表 2 アセトニトリル濃度の違いによる各画分の放射能分布（処理量に対する割合）

照射期間 [日]	1%アセトニトリル含有緩衝液				20%アセトニトリル含有緩衝液			
	緩衝液	CO <sub>2</sub>	揮発性 有機物	物質収支	緩衝液	CO <sub>2</sub>	揮発性 有機物	物質収支
0	93	n. m.	n. m.	93	100	n. m.	n. m.	100
5	68	n. m.	n. m.	68	81	n. m.	n. m.	81
12	68	24	1	92	79	23	2	104
15	63	26	2	91	72	36	1	106
平均				86				98

n. m. : 測定せず

### 2. 滅菌性

試験期間を通して全ての実験で滅菌性が保たれていた。本試験の 12 日後の試料のうち 1 反復にのみ微生物の汚染が認められたが、反復試料のうちのもう 1 反復は滅菌性が保たれていた。この汚染は結果に影響を及ぼさなかった。

### 3. 温度及び pH（表 3）

試験期間の温度はいずれの試験でも 25±1℃で一定に保たれていた。本試験の暗対照試料を除き、試験溶液の pH は 4.33～5.13 の範囲であった（表 3）。

表 3 試験溶液の pH

本試験	期間 (日)	0	2	5	7	12	19	19 暗対照
	pH	4.46	5.06	5.13	5.03	4.87	5.03	8.68
追加試験	期間 (日)	0	7	18				18 暗対照
	pH	4.44	4.92	4.80				4.35
補足試験	期間 (日)	0	3	10	17			17 暗対照
	pH	4.33	4.42	4.82	4.44			4.34



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

表 4 [ <sup>14</sup>C ] [ I ] の水中光分解

(処理放射能に対する割合、2 反復の平均)

	期間 [日]	[ I ]			溶液中の 放射能量	CO <sub>2</sub>	揮発性有 機化合物	計
本試験	0	100.0			100.0	n. m.	n. m.	100.0
	2	90.1			91.6	1.2	0.8	93.6
	5	87.7			88.6	6.0	1.3	95.9
	7	88.1			89.7	9.2	1.5	100.4
	12	76.9			82.4	13.8	0.7	96.9
	19	61.0			71.4	21.8	3.7	96.9
追加試験	0	98.4			100.0	n. m.	n. m.	100.0
	7	86.9			89.4	n. m.	n. m.	89.4
	18	58.4			81.9	n. m.	n. m.	81.9
	18 暗対照	87.4			99.6	n. m.	n. m.	99.6

1) 5 種類の未知物質の合計、最高 5.1%

n. d. : 検出限界未満

n. m. : 測定せず

表 5 [ <sup>14</sup>C ] [ I ] の水中光分解

(処理放射能に対する割合、2 反復の平均)

照射期間 [日]	[ I ]			溶液中の 放射能量	CO <sub>2</sub>	揮発性有 機化合物	計
0	99.7			100.0	n. m.	n. m.	100.0
3	104.0			105.8	n. m.	n. m.	105.8
10	99.8			102.2	n. m.	n. m.	102.2
17	90.4			99.7	n. m.	n. m.	99.7
17 <sup>2)</sup>	91.0			105.0	2.3	0.5	107.8
17 暗対照	100.1			103.6	n. m.	n. m.	103.6

1) 6 種類の未知物質の合計、最高 4.0%

2) 揮発性物質の補集装置を装着した。

n. d. : 検出限界未満

n. m. : 測定せず

5. [ I ] の水中光分解半減期及び自然環境中における推定光分解半減期 (表 6~8)

実験条件下における [ I ] の光分解半減期が擬一次反応に従うと仮定して算出した水中光分解半減期は、本試験の [ <sup>14</sup>C ] [ I ] で 28.8 日、補足試験の [ <sup>14</sup>C ] [ I ] で 99.4 日と算出された。両標識における半減期の違いは試験溶液の pH の違いに起因し、 [

<sup>14</sup>C ] [ I ] の場合に試験溶液の pH が低かったため加水分解が抑制された結果、半減期が長くなったと推察された。

また、追加試験の暗条件下での [ I ] の残存率から、暗条件下での加水分解反応

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。  
 が擬一次反応に従うと仮定して算出した追加試験の暗条件における [I] の半減期は 105 日 (速度定数=0.0066 日<sup>-1</sup>) と算出された。従って、照射条件及び暗条件における速度定数から、加水分解反応を除去した [I] の正味の光分解半減期を算出すると、約 30 日と求められ、光による分解が認められた。

加水分解試験 (代謝資料 No. 3) 及びアセトニトリルを 1% 加えた緩衝液中光分解試験の暗対照に比べ、アセトニトリルを 20% 加えた緩衝液の暗対照中における [I] の分解は緩やかであった。これは、アセトニトリルを 20% 添加したことにより、加水分解速度が抑制された結果と推定された。

表 6 [I] の水中光分解半減期及び暗対照試料における半減期

	標識位置	半減期 (日)	速度定数 (日 <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup> (1 次回帰分析)	暗対照試料の半減期 (日)
本試験	[ <sup>14</sup> C ]	28.8	0.024	0.9535	— <sup>1)</sup>
追加試験	[ <sup>14</sup> C ]	23.1	0.030	0.9727	105 <sup>2)</sup>
補足試験	[ <sup>14</sup> C ]	99.4	0.007	0.7753	365 <sup>2)</sup>

1) 本試験における暗対照試料は、ソーダライム落下のため測定できなかった。

2) 申請者による計算

$$\text{自然環境中半減期 (東京)} = \frac{\text{平均光強度} \times \text{光分解半減期} \times 24 \text{時間} \times 3600 \text{秒} \times 10^{-6}}{14.6 \text{ MJ/m}^2/\text{日} \times 0.585}$$

東京の全天日射量：14.6 MJ/m<sup>2</sup>/日 (約 300~2800 nm)

全天日射量に占める 300~800 nm の照射強度の比率：58.5%

表 8 環境中での推定半減期

	標識位置	東京 (4 月~6 月) <sup>1)</sup>
本試験	[ <sup>14</sup> C ]	約 270 日
追加試験	[ <sup>14</sup> C ]	約 260 日
補足試験	[ <sup>14</sup> C ]	約 1100 日

1) 申請者による計算

本試験及び追加試験で求めた実測半減期から上式より自然環境中 (東京の 4 月~6 月における太陽光条件) での半減期はそれぞれ約 270 日、約 260 日及び約 1100 日と算出された。これらの計算値は、連続照射により得られた実験値を断続的な太陽光照射に外挿することにより得られた値である。一方、光分解と異なり加水分解は自然条件においても実験条件と同様連続的に起こるため、自然環境中の河川水の pH 及び本試験での暗条件における [I] の分解を考慮すると、環境水中における [I] の分解半減期は加水分解試験の pH 4 緩衝液で得られた半減期約 64 日を超えないと考えられる (申請者考察)。

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

## 6. [I] の水中における分解挙動

[I] の光分解は加水分解による [I] への変換と共に進行した。

[I] は水中で光により分解されるものの、その太陽光領域における光吸収は弱く、そのため、光分解速度も遅かった。一方、[I] に比べて太陽光領域により強い光吸収を有する [I] は親化合物より速やかに光分解すると推定されたが、照射試料における [I] の生成量は少なく、加水分解により生成した [I] が速やかに光分解を受けることを反映していた。[I] の水中光分解では、最終分解物である二酸化炭素を除き、分解物の量は少なく、[I] 以外の有機化合物は同定されなかった。

実験条件下における [I] の光分解半減期は、[I] (<sup>14</sup>C) [I] で 28.8 日、[I] (<sup>14</sup>C) [I] で 99.4 日と算出されたが、両標識における半減期の違いは試験溶液の pH の違いに起因し、[I] (<sup>14</sup>C) [I] の場合に試験溶液の pH が低かったため加水分解が抑制され、その結果半減期が長くなったと推察された。

以上のことから、環境水中における [I] の分解に光分解は大きな寄与をせず、環境水中における [I] の分解は主として加水分解により起こると推定された。また、[I] の光分解速度は速やかと推定されることから、[I] の加水分解により生成した [I] は環境水中から光分解により速やかに消失すると推定された。

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

## 7. 推定分解経路 (図 2)

[ I ] は溶液中で光分解し、とも  
を含む少量の分解物を生成した。主分解物は二酸化炭素であ  
った。以下に推定分解経路を示す (図 2)。



図 2 スピロジクロフェン [ I ] の緩衝液中の光分解による推定分解経路  
[ ] は申請者考察

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

## 5. 水中光分解試験

### (2) スピロジクロフェンの水中光分解 (緩衝液)

(代謝資料 No. 15)

試験機関:

[GLP対応]

報告書作成年月日: 2001年4月5日

#### 供試標識化合物

化学名: 3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]-3-デセン  
-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化学構造:

A), B):  $^{14}\text{C}$  標識部位

標識 A): [  $^{14}\text{C}$  標識スピロジクロフェン [I]

比放射能: 3.6 MBq/mg

放射化学的純度: >99% (TLC)

化学的純度: >98% (HPLC)

標識 B): [  $^{14}\text{C}$  標識スピロジクロフェン [I]

比放射能: 3.63 MBq/mg

放射化学的純度: >99% (TLC)

化学的純度: >99% (HPLC)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20 頁に記す。

#### 【方法】

##### 1. 材料

供試水: 0.02M 酢酸緩衝液、pH 4

光照射装置: サンテスト装置

光源: キセノンランプ (UV ガラスフィルター付、下限波長: 290 nm)

光強度: 668 W/m<sup>2</sup> (測定波長範囲、300~800 nm)

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

## 2. 試験群及び濃度設定

標識位置の異なる 2 種の被験物質を用いた。[ <sup>14</sup>C ] [ I ] 及び [ <sup>14</sup>C ] [ I ] を用いて各 1 反復で実施した。試験濃度は水溶解度 (約 0.05 mg/L) の 2 分の 1 である約 0.025 mg/L に設定した。0 日試料を分析して実際の試験濃度を確認した (表 1)。加水分解試験結果から、スピロジクロフェンは pH 4 で最も安定で、pH 7 及び 9 では不安定であったことから、加水分解の影響を出来るだけ排除するために pH 4 の酢酸緩衝液中で実施した。

表 1 試験濃度

供試被験物質	試験濃度
[ <sup>14</sup> C ] [ I ]	25.3 µg/L
[ <sup>14</sup> C ] [ I ]	25.6 µg/L

## 3. 操作及び試料採取

滅菌した石英容器 (容量 25 mL、長さ 40 mm、幅 30 mm、高さ 19 mm、液面の表面積 12 cm<sup>2</sup>) に緩衝液 10 mL を入れ、[ <sup>14</sup>C ] [ I ] または [ <sup>14</sup>C ] [ I ] のアセトニトリル溶液 100 µL を加え、穏やかに振り混ぜた後、1 時間静置した。これにポリウレタン栓及びソーダライムを充填した揮発性物質捕集装置を装着した。これらの容器をサンテスト装置中に入れ、25±1°C で 12 日間キセノン光を連続照射した。照射 0、1、2、4、7、10、12 日後にそれぞれの標識体を加えた試料を 1 反復で採取した。暗対照試料として石英容器全体をアルミホイルで覆い、異なる恒温装置中に静置し、10 日後にそれぞれの標識体を加えた試料を 1 反復で採取した。

## 4. 分析

### 1) 溶液

容器を開ける前に採取した試料をデシケーターに移し、減圧によって容器上部空間に存在する揮発性物質を捕集装置に捕集した。採取後、試料溶液の pH を pH メーターで測定した後、全量をねじ蓋付き試験管に移した。更に、試験容器及び pH ガラス電極をアセトニトリルで洗浄し、試験溶液を入れたねじ蓋付き試験管に加えた。この溶液 100 µL を 3 反復で採取し、液体シンチレーションカウンター (LSC) を用いて試料溶液中の総放射エネルギーを定量した。0 日試料の放射エネルギーを処理濃度とした。試料溶液中の放射性成分は、溶液 200 µL を直接 TLC に塗布し、分離後ラジオリミノグラフィーを用いて定量した。放射性成分は標準物質とのコクロマトグラフィーにより同定した。



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

## 2) 揮発性有機化合物及び $^{14}\text{C}$

酢酸エチルを抽出溶媒 (25 mL、2 回) に用いた圧搾装置により各々の捕集装置中のポリウレタン栓から揮発性有機化合物を抽出し、抽出液中の放射エネルギーを LSC で測定した。処理量の 1% 以上の放射エネルギーが認められた場合にのみクロマトグラフィーにより分析した。

$^{14}\text{C}$  を測定するために、三角フラスコに捕集装置内のソーダライムを移した後、滴下ろう斗を三角フラスコに取り付け、さらに吸収剤 (氷冷却した Carbosorb 10 mL と PermafluorE+ 10 mL の混液) を入れた 3 連のガラス容器を接続した。滴下ろう斗を用いて 18% 塩酸をゆっくり滴下してソーダライムを溶解し  $^{14}\text{C}$  を遊離させた。生じた  $^{14}\text{C}$  を吸収剤に吸収させた後、放射エネルギーを LSC で測定した。

## 【結 果】

### 1. 滅菌性及び物質収支

試験期間を通して全ての試験で滅菌性が保たれていた。物質収支も処理放射能に対して 97.1 から 107.1% が回収され良好であった。

### 2. 温度及び pH

試験期間の温度はいずれの試験でも設定した  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  で一定に保たれていた。試験溶液の pH は 4.03 に保たれていた。

### 3. [I] の分解及び分解物の生成 (表 2)

[I] はキセノン光照射により速やかに、かつ、継続的に分解し、照射 12 日後において処理量の 39.5% まで減少した。分解物は 0 日後から検出され、照射 12 日後に まで徐々に増加した。また、最大で処理量の 相当する分解物が認められ、この分解物を と同定した。その他の分解物として、 [  $^{14}\text{C}$  標識 [I] ] 及び [

$^{14}\text{C}$  標識 [I] ] に共通する分解物が 3 種 (Z2、Z3 及び Z4) 認められ、これらの分解物は量的に少なく、最大で処理量の 3.7% に相当するのみであった。これらの分解物の他に [  $^{14}\text{C}$  標識 [I] ] に由来する分解物が 2 種 (Z8 及び Z9) 認められたが、これらはクロマトグラフィー中に TLC プレート上で生成する分析操作中の人工分解物と推定された。

アセトニトリルを 20% 加えた緩衝液中における主要分解物は二酸化炭素であったが、アセトニトリル 1% の緩衝液からは二酸化炭素は検出されなかった。従って、アセトニトリルを 20% 加えることでエノール以下の分解物の分解が促進される結果、二酸化炭素への無機化が促進されると推定された。一方、アセトニトリル 1% の緩衝液に比べてアセトニトリルを 20% 加えた緩衝液中において [I] の分解は、緩やかであり、これはアセトニトリルによる加水分解の抑制によると推定された。

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

[I] は暗対照でも分解し、10 日後には処理量の 73.0%まで減少した。分解物エノール [M1] がほぼ定量的に生成し、10 日後に処理量の 32.1%に相当した。

表 2 水中における [I] の光分解及び水中光分解物の生成(両標識体の平均)

成分	[I]									
RRf	1									
期間 (日)	0	88.0								
	1	91.0								
	2	86.0								
	4	76.3								
	7	62.2								
	10	48.8								
	12	39.5								
	10 暗対照	73.0								

RRf = 相対 Rf 値

n. d. = 検出限界未満

\*: [I] <sup>14</sup>C 標識 [I] に由来する分解物、TLC プレート上で生成する分析操作中の人工分解物

\*\* : スポット間にあり、明確なスポットを形成しない物質。

#### 4. [I] の水中光分解半減期及び自然環境中における推定光分解半減期 (表 3~4)

実験条件下における [I] の光分解反応が擬一次反応に従うと仮定して算出した水中光分解半減期は 10.8 日と算出された (表 3)。また、10 日間の暗条件下での [I] の残存率が 73.0%であったことから、暗条件下での加水分解反応が擬一次反応に従うと仮定して算出した本試験の暗条件下における [I] の半減期は 37 日(速度定数=0.0187)と算出された (表 3)。従って、照射条件及び暗条件下における速度定数から加水分解反応を除去した [I] の正味の光分解半減期は 18 日と算出され、[I] の水中における分解には加水分解の寄与が大きいものの、光によっても分解すると推察された(申請者考察)。

表 3 [I] の水中光分解半減期及び暗対照試料における半減期

半減期 (日)	速度定数 (日 <sup>-1</sup> )	R <sup>2</sup> (1 次回帰分析)	暗対照試料における 半減期 (日) <sup>1)</sup>
10.8	0.0642	0.9933	37

1) 申請者による計算

$$\text{自然環境中半減期 (東京)} = \frac{668 \text{ W/m}^2 \times 10.8 \text{ 日} \times 24 \text{ 時間} \times 3600 \text{ 秒} \times 10^{-6}}{14.6 \text{ MJ/m}^2/\text{日} \times 0.585} = \text{約 73 日}$$

キセノン光の平均光強度 : 668 W/m<sup>2</sup> (300~800 nm)

東京の全天日射量 : 14.6 MJ/m<sup>2</sup>/日 (約 300~2800 nm)

全天日射量に占める 300~800 nm の照射強度の比率 : 58.5%

本試験で求めた実測半減期より、上式を用いて自然環境中（東京の4月～6月における太陽光による断続的な照射条件）の半減期を算出すると、約73日と求められた（表4）。この計算値は、連続照射により得られた実験値を断続的な太陽光照射に外挿することにより得られた値である。一方、光分解と異なり加水分解は自然条件においても実験条件と同様連続的に起こるため、自然環境中の河川水のpH及び本試験での暗条件における〔I〕の分解を考慮すると、環境水中における〔I〕の分解半減期は本試験の暗条件で得られた分解半減期を超えることはなく、その半減期は37日を超えないと推察される（申請者考察）。

表4 環境中での推定半減期

	東京（4月～6月） <sup>1)</sup>
半減期	約73日

1) 申請者による計算

5. 〔I〕の水中光分解生成物の水中光分解半減期

〔I〕の水中光分解により 〃の主要水中光分解物が生成した。これら主要分解物が逐次一次反応に従い分解すると仮定すると、  
〃の水中光分解半減期はそれぞれ 〃と算出され、これら主要水中光分解物は水中で光により速やかに分解されることが示唆された。

6. 〔I〕の水中における分解挙動

〔I〕の光分解は加水分解による 〃への変換と共に進行した。  
〔I〕は水中で光により分解されるものの、その太陽光領域における光吸収は弱く、そのため、光分解速度も遅かった。一方、〔I〕に比べて太陽光領域により強い光吸収を有する 〃は親化合物より速やかに光分解し、〔I〕の水中光分解及び加水分解により生成した 〃が速やかに光分解を受けることが示唆された。  
〃以外に主要水中光分解物として 〃が認められ、その量は最大で処理量の9.8%認められたが、 〃と同様に水中で速やかに光分解を受けることが示唆された。アセトニトリルを20%加えた緩衝液を用いて得られた結果と合わせて考察すると、 〃は最終的には二酸化炭素に無機化されると推定された。

以上のことから、環境水中における〔I〕の分解に光分解の寄与は加水分解ほど大きくなく、〔I〕の分解は主として加水分解により起こると推定されたが、〔I〕の加水分解あるいは水中光分解により生成する 〃は速やかに光分解され消失し、最終的に二酸化炭素まで無機化されると推定された。

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

7. 推定分解経路 (図 2)

[ I ] は溶液中で光分解し、

標識、  
標識とも  
を含む少量の分解物を生成した。

以下に推定分解経路を示す (図 2) 。

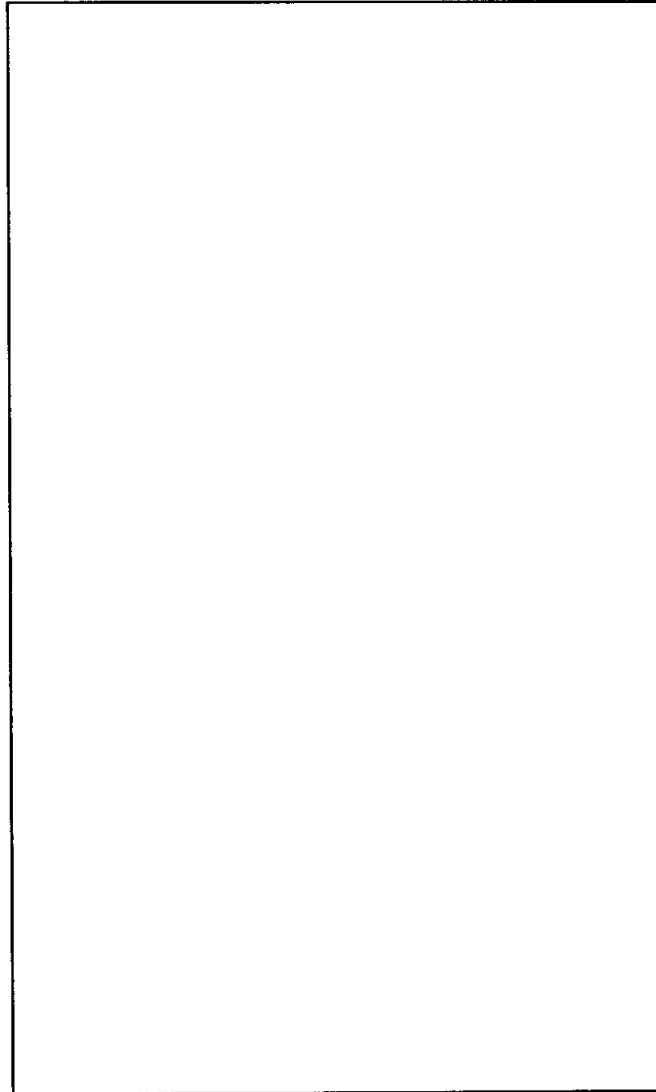


図 2 スピロジクロフェン [ I ] の緩衝液中の光分解による推定分解経路

[ ] は申請者考察

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

## 5. 水中光分解試験

### (3) スピロジクロフェンの水中光分解 (自然水)

(代謝資料 No. 16)

試験機関 :

[GLP 対応]

報告書作成年月日 : 2001 年 4 月 10 日

#### 供試標識化合物

化 学 名 : 3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]-3-デセン  
-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化 学 構 造 :

\* :  $^{14}\text{C}$  標識部位

標 識 : [  $^{14}\text{C}$  ] 標識スピロジクロフェン [ I ]  
比放射能 : 3.6 MBq/mg  
放射化学的純度 : >99% (TLC)  
化学的純度 : >98% (HPLC)

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20 頁に記す。

#### 【方 法】

##### 1. 材 料

供 試 水 : ライン川河川水、モンハイム/ドイツ  
1999 年 7 月 27 日採取 (実験開始前日)、pH 8.05  
光照射装置 : サンテスト装置  
光 源 : キセノンランプ (UV ガラスフィルター付、下限波長 : 290 nm)  
光強度 本試験 : 712 W/m<sup>2</sup>、補足試験 : 782 W/m<sup>2</sup>  
(測定波長範囲、300~800 nm)

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

## 2. 試験群及び濃度設定 (表 1)

[  $^{14}\text{C}$ ] [I] を用いて本試験を実施した。また、光照射中の揮発性物質に関する情報を得るために補足試験を実施した。試験濃度は水溶解度 (約 0.05 mg/L) の 2 分の 1 である約 0.025 mg/L に設定した。

表 1 試験濃度

試験の種類	試験濃度	分析対象
本試験	20.7 $\mu\text{g/L}$	溶液 (溶存 $\text{CO}_2$ を含む)、容器上部空間の $\text{CO}_2$
補足試験	26.2 $\mu\text{g/L}$	溶液 (溶存 $\text{CO}_2$ を含む)、揮発性有機化合物、容器洗浄液

## 3. 処理溶液の調製、実験操作及び試料採取

### (1) 処理溶液の調製

アセトニトリルを 1% 及び 20% の濃度で添加し、スピロジクロフェン [I] の光分解に対するアセトニトリル濃度の影響を調べた試験結果 (代謝資料 No. 3) から、アセトニトリル濃度は [I] の水中光分解に影響を及ぼさないことが確かめられている。また、加水分解試験 (代謝資料 No. 3) では、ガラス容器をジクロロジメチルシランで処理したにもかかわらず、最高 55% もの [I] が吸着が認められた、この光分解試験では、石英ガラス容器壁面への [I] の吸着を避け、溶液状態での光分解の結果を得るためにアセトニトリルを 20% 添加した。

1000 mL 容の三角フラスコに 120 mL のアセトニトリルを加えた後、[I] のアセトニトリル溶液を 400  $\mu\text{L}$  加え、さらにライン川河川水を 480 mL 加えた。これを 10 分間超音波に付した後、振とう機を用いて 1 時間攪拌して試験溶液を調製した。

### (2) 実験操作及び試料採取 (表 2)

#### 本試験

滅菌した石英容器 (容量 25 mL、長さ 50 mm、幅 30 mm、高さ 19 mm、液面の表面積 15  $\text{cm}^2$ ) に上記の試験溶液を 24 mL 加えた。石英容器はゴム栓で蓋をし、ゴム栓には注射針を 2 本突き刺し、これらの注射針には蓋をした。これらの容器をサンテスト装置中に入れ、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$  で 19 日間キセノン光を連続照射した。照射 0 日試料は褐色のガラス容器に入れた。照射 0、2、5、7、12、19 日後に 2 反復で試料を採取し、試料溶液及び容器上部空間の  $\text{CO}_2$  捕集液を液体シンチレーションカウンター (LSC) で放射エネルギーを測定し、TLC を用いて試験溶液中の成分を分析した。暗対照試料として石英容器全体をアルミホイルで覆い、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$  に設定した恒温槽へ置き、19 日後に 2 反復で試料を採取した。また、0、7 及び 19 日後の試料を用いて試験溶液の pH を確認した (表 2)。

## 補足試験

本試験と同様に補足試験を実施した。但し、試験容器には揮発性有機化合物を捕集するためのポリウレタン栓を充填した捕集装置を装着した。管の付いた針を2本突き刺したゴム栓で捕集装置に蓋をし、1本の管には蓋を、もう1本の管には二酸化炭素を吸収するためのソーダライムを入れたプラスチック製の注射筒を取り付けた。照射0、2、5、7、9、12日後に2反復で試料を採取し、試料溶液、揮発性有機化合物抽出液及び容器洗浄液をLSCで放射エネルギーを測定した。また、溶液中の代謝物をTLCを用いて試験溶液中の成分を分析した。この他に暗対照試料を12日後に採取した。また、0、7、12日後の試料を用いて試験溶液のpHを確認した(表2)。

表2: 試料採取日

測定項目 <sup>1)</sup>	試験の種類	試料採取日(日数)
LSC及びTLC	本試験	0、2、5、7、12、19及び19暗対照
	補足試験	0、2、5、7、9、12及び12暗対照
pH	本試験	0、7、19及び19暗対照
	補足試験	0、7、12及び12暗対照

1) 本試験においては試料溶液をLSC及びTLCで、CO<sub>2</sub>捕集液はLSCを用いて全採取日について測定した。補足試験では試料溶液をLSC及びTLCで、揮発性有機化合物抽出液及び容器洗浄液をLSCを用いて全採取日について測定した。

## 4. 分析

### (1) 揮発性物質

#### 本試験

容器のゴム栓に突き刺した一方の注射針は吸収剤(氷冷却したCarbosorb 9 mLとPermafluorE+ 10 mLの混液)を入れた3連のバイアルに接続した。容器を開ける前にゴム栓に突き刺した一方の管から窒素ガスを容器内に送り込み上部空間に存在する可能性のある二酸化炭素をもう一方の管から捕集した。その後、この混液中の放射エネルギーをLSCで測定した。先に行った緩衝液中の光分解試験(代謝資料No. 3)から揮発性有機化合物は生成しないことが予想されたため、本試験では揮発性有機化合物は捕集しなかった。

#### 補足試験

容器を開ける前に採取した試料をデシケーターに移し、10分間減圧し、容器上部空間に存在する揮発性物質を捕集装置に捕集した。

ポリウレタン栓は酢酸エチル 10 mLを用いて抽出し、抽出液中の放射エネルギーをLSCで測定した。

<sup>14</sup>CO<sub>2</sub>を測定するために、三角フラスコに捕集装置内のソーダライムを移した後、滴下ろう斗を三角フラスコに取り付け、さらに吸収剤(氷冷却したCarbosorb 10 mLと

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。  
PermafluorE+ 10 mL の混液) を入れた 3 連のガラス容器を接続した。滴下ろう斗を用いて 18%塩酸をゆっくり滴下してソーダライムを溶解し  $^{14}\text{CO}_2$  を遊離させた。生じた  $^{14}\text{CO}_2$  を吸収剤に吸収させた後、放射エネルギーを LSC で測定した。

## (2) 溶液

各採取日ごとに、溶液中の全放射エネルギー及び溶存二酸化炭素及び炭酸塩の放射エネルギーを測定した。

溶液中の全放射エネルギーを求めるため、採取した試料溶液 500  $\mu\text{L}$  (2 反復) に 0.1N NaOH を 100  $\mu\text{L}$  加えて溶存二酸化炭素を溶液中に捕捉した後 (アルカリ性条件下)、試料溶液 500  $\mu\text{L}$  に含まれる全放射エネルギーを LSC で測定した。また、溶存二酸化炭素及び炭酸塩の放射エネルギーを求めるため、試料溶液 500  $\mu\text{L}$  (2 反復) に 0.1N HCl を 100  $\mu\text{L}$  加えた後、超音波に 10 分間付し、試料溶液中に二酸化炭素としてあるいは炭酸塩として溶存している放射エネルギーを  $^{14}\text{CO}_2$  として揮発させた後 (酸性条件下)、LSC で溶液中に含まれる放射エネルギーを測定し、全放射エネルギーとの差から溶存二酸化炭素及び炭酸塩の放射エネルギーを求めた。

試料溶液中の放射性成分は、溶液 250  $\mu\text{L}$  を直接 TLC に塗布し、分離後ラジオルミノグラフィを用いて定量した。放射性成分は標準物質とのクロマトグラフィを用いて同定した。

補足試験では、容器から溶液を全て採取した後、アセトニトリル (5 mL、2 回) で容器を洗い、洗液中の放射エネルギーを求めた。

## 【結果】

### 1. 温度及び pH (表 3)

試験期間中の平均温度は、本試験では  $25.19 \pm 0.33^\circ\text{C}$  であり、設定した  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  に維持されていた。また、補足試験では  $24.61 \pm 1.5^\circ\text{C}$  であった。補足試験での温度が  $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$  の範囲から外れた時間は試験開始 6 日目以降に 2 回計約 5 時間であった。試験結果に影響を与えないと考察される。

補足試験の 12 日後の照射試料及び本試験の 19 日後の照射試料及び暗対照試料では pH が低下した (表 3)。

表 3 : 各採取日における pH (2 反復の平均値)

	0 日	7 日	12 日	19 日	暗対照
本試験	8.37	8.17	n. m.	7.73	7.04(19 日)
補足試験	8.19	8.42	6.47	n. m.	8.53(12 日)

n. m. : 測定せず



## 2. 物質収支 (表 4~5)

本試験の照射試料における各容器ごとの総回収率は 95.6%~110.7%であり、良好な物質収支が得られた。暗対照試料では回収率が 113%であった。暗対照試料でのアルカリ性条件及び酸性条件での放射エネルギー測定値はほぼ一致しており、暗対照試料溶液中には放射性的の溶存二酸化炭素及び炭酸塩は存在しないことが示された (表 4)。

補足試験における各容器ごとの総回収率は 89.0%~101.8%であった。12 日後の試料の二酸化炭素の計測値が 7 日後及び 9 日後の計測値と比べて明らかに低く、光照射中または前処理中に二酸化炭素が損失し、12 日後の回収率が低下したと考えられる。またアセトニトリルによる洗浄液画分には最大で処理量の 1.7%の放射能が存在した (表 5)。

表 4 : 物質収支 (本試験)

期間 (日)	全 CO <sub>2</sub> <sup>1)</sup> %	容器上部空間 の CO <sub>2</sub> %	溶液 (溶存 CO <sub>2</sub> を含む) %	溶液 (CO <sub>2</sub> を除く) %	合計 <sup>2)</sup> %
0	1.9	-	100.0	98.1	100.0
2	7.6	0.1	110.6	103.1	110.7
5	4.3	0.2	100.9	96.8	101.1
7	9.0	0.3	105.0	96.2	105.2
12	6.1	0.6	98.5	93.0	99.1
19	15.2	1.0	94.6	80.4	95.6
19 暗対照	0.1	0.1	112.9	113.2	113.0

1) 容器上部空間の CO<sub>2</sub>+溶存 CO<sub>2</sub>

2) 合計=容器上部空間の CO<sub>2</sub>+溶液 (CO<sub>2</sub>を含む)

表 5 : 物質収支 (補足試験)

期間 (日)	全 CO <sub>2</sub> <sup>1)</sup> %	揮発性 有機化合物 %	溶液 (溶存 CO <sub>2</sub> を含む) %	溶液 (CO <sub>2</sub> を除く) %	洗浄液 %	合計 <sup>2)</sup> %
0	<0.1	-	100.0	100.4	-	100.0
2	0.7	-	97.9	97.3	1.2	99.2
5	2.3	0.2	99.6	97.6	1.6	101.8
7	6.0	0.2	99.5	93.9	1.7	101.8
9	6.7	0.2	97.0	91.4	1.3	99.6
12	4.5	0.2	83.9	82.9	1.4	89.0
12 暗対照	0.8	0.4	97.3	96.6	1.5	99.2

1) 容器上部空間の CO<sub>2</sub>+溶存 CO<sub>2</sub>

2) 合計=全 CO<sub>2</sub>+揮発性有機化合物+溶液 (CO<sub>2</sub>を除く)+洗浄液

3. [I] の分解及び分解物の生成 (表 6)

[ <sup>14</sup>C] スピロジクロフェン [I] は、本試験及び補足試験のいずれにおいても水中で光により分解し、本試験の 19 日後における [I] の残存率は処理量に対して 52.3%であった。また、補足試験の 12 日後における [I] の残存率は 58.8%であった。暗対照試料においても [I] は分解し、その残存率は本試験で 63.4%、補足試験で 48.6%であった。本試験及び補足試験のいずれにおいても、照射試料と暗対照試料での [I] の残存率にほとんど違いがなかったことから、[I] の残存率には光照射の影響がほとんどなく、[I] の自然水中における分解には光による影響はほとんど認められないことが推定された。暗対照試料における [I] の分解は、アセトニトリルを 20%加えた緩衝液中における分解よりも速やかであったが、これは河川水の pH (約 7~8) が緩衝液の pH (約 4~5) よりも高かったためと推定された。

[ <sup>14</sup>C] スピロジクロフェン [I] の主要分解物として二酸化炭素が同定された。[I] の二酸化炭素への無機化は経時的に着実に増加し、この傾向は補足試験でより明確に確認された。本試験の試験終了時 (19 日後) における照射試料での <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の量は処理量の 15.2%に達した。これはアセトニトリルを 20%加えた緩衝液中の光分解試験 (代謝試料 No. 13) における <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> 発生量の 21.8% よりも少なかったが、<sup>14</sup>CO<sub>2</sub> の発生は本河川水中光分解試験においても確認された。試験溶液の pH が中性~弱アルカリ性であったため、大部分の <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> は溶液中に存在していた。揮発性有機化合物はほとんど生成しなかった (最大 0.4%)。

試験溶液中には 8 種の分解物が確認された。主分解物は 及び  
であり、本試験ではそれぞれ 19 日後及び 12 日後に最大 はそれぞれ 0 日  
5.3%及び 5.2%認められた。補足試験では、はそれぞれ 0 日  
後及び 9 日後に最大 7.8%及び 14.7%認められた。のいずれ  
も本試験及び補足試験の両試験において増加後、試験終了時には減少した。緩衝液中からは同定されなかった が自然水中に見出されたが、これは緩衝液中に  
比べ河川水中では [I] が多く分解し、の生成速度が速やかであったため  
と考えられた。その他の分解物の量は少なく、1 成分としては最大で 4.3%検出された分解物があったが、いずれの分解物も試験終了時には減少した。

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

表6：分解物の分布、処理放射能に対する割合（処理量に対する割合、%）

	期間 (日)	[ I ]				溶液中の 放射能量 計 <sup>2)</sup>	容器上部 空間の CO <sub>2</sub>	全 CO <sub>2</sub> <sup>3)</sup>
本試験	0	94.2				100.0	-	1.9
	2	98.2				110.6	0.1	7.6
	5	81.3				100.9	0.2	4.3
	7	80.0				105.0	0.3	9.0
	12	64.6				98.5	0.6	6.1
	19	52.3				94.6	1.0	15.2
	19 暗対照	60.8				113.0	0.1	0.1
補足試験	0	83.3				100.0	-	-
	2	80.9				97.9	0.1	0.7
	5	78.0				99.6	0.3	2.3
	7	63.2				99.4	0.4	6.0
	9	62.4				97.0	1.1	6.7
	12	58.8				78.9	3.5	4.5
	12 暗対照	48.6				97.2	-	-

-：検出せず

- 1) 未同定分解物 5~6 種、原点物質、分離不十分な放射能領域及び溶存 CO<sub>2</sub> を含む。
- 2) 四捨五入による誤差を含む。
- 3) 容器上部空間の CO<sub>2</sub> + 溶存 CO<sub>2</sub>

#### 4. [ I ] の水中光分解半減期及び自然環境中における推定光分解半減期（表 7~9）

本試験及び補足試験における半減期を直線回帰分析により求めた。河川水におけるスピロジクロフェン [ I ] の連続照射での光分解半減期は本試験で 20.7 日、補足試験で 21.3 日と求められた。しかし、本試験及び補足試験のいずれにおいても、照射条件及び暗条件下での [ I ] の残存率に違いがほとんど認められないことから、河川水中においては [ I ] の分解に光分解はほとんど寄与せず、加水分解の寄与が大きいと推察された（申請者考察）。

表 7 河川水における光分解半減期及び暗対照試料の半減期

試験の種類	半減期 (日)	速度定数 (日 <sup>-1</sup> )	暗対照試料の 半減期(日) <sup>1)</sup>
本試験	20.7	0.0335	30
補足試験	21.3	0.0325	15 <sup>2)</sup>

1) 申請者による計算

2) 照射試料では pH の低下が認められ、暗対照試料では pH の低下は認められなかったことから暗対照試料の半減期が光照射試料の半減期より短くなったと考察されます（報告書及び抄録にも記載）。

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

$$\text{自然環境中半減期 (東京)} = \frac{\text{平均光強度} \times \text{光分解半減期} \times 24\text{時間} \times 3600\text{秒} \times 10^{-6}}{14.6 \text{ MJ/m}^2/\text{日} \times 0.585}$$

東京の全天日射量：14.6 MJ/m<sup>2</sup>/日（約 300～2800 nm）

全天日射量に占める 300～800 nm の照射強度の比率：58.5%

表 9 環境中での推定半減期

	東京（4月～6月） <sup>1)</sup>
本試験	149 日
補足試験	168 日
平均	159 日

1) 申請者による計算

本試験及び補足試験で求めた実測半減期から上式を用いて自然環境中（東京の4月～6月における太陽光による断続的な照射条件）の半減期を算出すると、それぞれ 149 日及び 168 日と求められた。これらの計算値は、連続照射により得られた実験値を断続的な太陽光照射に外挿することにより得られた値である。一方、光分解と異なり加水分解は自然条件においても実験条件と同様連続的に起こるため、自然環境中の河川水の pH 及び本試験での暗条件における [I] の分解が照射試料における [I] の分解と同程度であることを考慮すると、環境水中における [I] の分解半減期は本試験の暗条件で得られた分解半減期を超えることはなく、その半減期は本試験における連続照射における半減期約 20 日を超えないと推察される（申請者考察）。

#### 5. [I] の水中における分解挙動

[I] の光分解は加水分解による への変換と共に進行した。

[I] は水中で光により分解されるものの（代謝資料 No. 4 及び 5）、その太陽光領域における光吸収は弱く、そのため、光分解速度も遅かった。特に pH が中性から弱アルカリ性の河川水中では [I] は光分解よりも加水分解により速やかに分解した。一方、[I] に比べて太陽光領域により強い光吸収を有する は [I] より速やかに光分解し、[I] の水中光分解及び加水分解により生成した は速やかに光分解を受けることが示唆された。 アセトニトリルを 20% 加えた河川水中ではアセトニトリルを 20% 加えた緩衝液中で見出された量よりも多くの が見出されたが、 [I] の分解量が河川水中でより多かつたためと推定された。

以外に主要水中光分解物として が最大で処理量の 14.7% 認められた（補足試験 9 日後）。 本試験及び補足試験のいずれにおいても は試験終了時に減少したことから、 と同様に水中で速やかに光分解を

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。受けることが示唆された。 $^{14}\text{CO}_2$ が経時的に着実に増加したことから、これら分解物は $^{14}\text{CO}_2$ へと無機化されると推定された。はアセトニトリルを20%加えた緩衝液中では定量されていないが(TLC上にスポットは認められる、申請者考察)、河川水中では見出された。これも[I]の分解量が河川水中でより多く、の生成量が多かったためと推定された。

暗対照試料中でも[I]は分解し、その分解速度が照射試料と同様であったことから、自然水中における[I]の分解は主として加水分解によると推定された。

以上をまとめると、自然環境水中において、[I]は主として加水分解で分解し、光分解は大きな寄与をしないものの、[I]の分解(加水分解及び光分解)により生成したは光により速やかにに分解し、さらにも光により速やかに分解し、最終的には二酸化炭素へと無機化されると推定された。

## 6. 推定分解経路 (図1)

[I]は溶液中で光分解し、を含む少量の分解物を生成した。主分解物は二酸化炭素であった。[I]の光分解物に河川水でのみ見出された分解物はなく、緩衝液中あるいは河川水中のいずれにおいても[I]は以下の同じ経路で分解すると推定された(図1)。

図1 スピロジクロフェン [I] の河川水中の光分解による推定分解経路

## 6. 土壌吸着試験

(1) [ <sup>14</sup>C ] スピロジクロフェンの4種の土壌における吸着／  
脱着

(代謝資料 No. 17)

試験機関：

報告年月日：1999年1月18日

### 供試標識化合物

化学名：3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン  
-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化学構造：

\*：標識部位

標識：[ <sup>14</sup>C ] 標識スピロジクロフェン [ I ]  
比放射能：3.59MBq/mg  
放射化学的純度：>98.0%

供試化合物の一般情報及び標識位置の設定理由は代-20頁に記す。

### 【方法】

予備試験：吸着試験用に調製した [ <sup>14</sup>C ] [ I ] の 30µg/L 塩化カルシウム(0.01M)水溶液の放射化学的経変を、溶液調製後及び調製4日後に HPLC で分析した。

追加試験：被験物質 [ I ] の 0.01M 塩化カルシウム水溶液中での安定性を確認するため、[ <sup>14</sup>C ] [ I ] の 50µg/L 塩化カルシウム(0.01M)水溶液を調製し、2、6<sup>1)</sup>、22<sup>1)</sup>及び30時間後に HPLC を用いて分解物の注入放射エネルギーに対する割合を調べた。

1) 6時間及び22時間の結果はヒアリング回答として追加提出

【結果】

1 予備試験

試験溶液の HPLC 分析中に、被験物質由来の未同定分解物が 1 種類検出され、この未同定代謝物は被験物質 [I] の加水分解物と推定された。試験溶液調製 4 日後には溶液中に親化合物 [I] は存在せず、この加水分解物のみが認められた。

2. 0.01M 塩化カルシウム水溶液における分解性の確認試験

0.01M 塩化カルシウム水溶液における被験物質 [I] の分解性を確認するための追加試験を実施した。予備実験と同条件下の 0.01M 塩化カルシウム水溶液中において加水分解物の量は経時的に増加した。溶液調製後 2 時間経過した時点では、HPLC に注入した放射エネルギーの 10.81% がその加水分解物として帰属された。30 時間後にその割合は 49.18% へ増加した。

化合物	溶液中の割合 (%)			
	2 時間後	6 時間後	22 時間後	30 時間後
スピロジクロフェン [I]	89.19	81.62	58.67	50.82
未同定分解物	10.81	18.38	41.33	49.18

供試溶液中放射能のガラス壁面への吸着量は溶液中の放射エネルギーの測定から 20%、溶液中の放射エネルギーの割合は 80% であり、これらのデータを基に試験系全体に存在する [I] の残存量を算出すると下表のようになり、従って、被験物質は本試験条件下で安定に存在しないことが確認された。

スピロジクロフェン供試溶液のガラス壁面への吸着量 20% を基にした試験系全体のスピロジクロフェンの残存量 (供試量に対する割合 %)

化合物		供試量に対する割合 %			
		2 時間後	6 時間後	22 時間後	30 時間後
溶液中	スピロジクロフェン [I]	71.35	65.30	46.94	40.66
	未同定分解物	8.65	14.70	33.06	39.34
試験系全体	スピロジクロフェン [I]	91.35	85.30	66.94	60.66

以上のように、本試験条件下で [I] は溶液調製 30 時間後には約 50% に、また、4 日後には放射エネルギーすべてが加水分解物に分解され、残存率は 0% であった。このように本試験条件下で [I] の安定性は低く、平衡化に達することがないため、土壌吸着試験を実施することができなかった。

(申請者考察)

本試験条件における [I] の安定性の低さの原因は解明できなかったが、代謝資料 No. 8 において認められたように、[I] は土壌存在下で極めて不安定であるため、土壌吸着試験を実施することが出来なかった。

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

## 6. 土壌吸着試験



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

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

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

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

## 7. 生物濃縮性に関する試験

### [<sup>14</sup>C]-スピロジクロフェンのブルーギルにおける生物濃縮性試験

(代謝資料 No.19)

試験機関：

[GLP対応]

報告書作成年月日：2000年3月7日

#### 被験物質物質

化学名：3-(2,4-ジクロロフェニル)-2-オキソ-1-オキサスピロ[4.5]デカ-3-エン-4-イル=2,2-ジメチルブチラート

化学構造：

\*：標識部位

標識：[<sup>14</sup>C] 標識スピロジクロフェン [I]  
比放射能：0.925 MBq/mg (約 25  $\mu$ Ci/mg)  
放射化学的純度：>99% (HPLC)

供試生物：ブルーギル (*Lepomis macrochirus*)、

1群各60匹、体長：5.5 $\pm$ 0.3cm、体重：2.3 $\pm$ 0.5g

試験方法：検体濃度2 $\mu$ g/L及び20 $\mu$ g/Lの流水式条件下で29日間暴露し、その後13日間の排泄期間を設けた。

予め通気した希釈水(約25L/h)と検体の試料液(50 $\mu$ L/72秒(=2.5mL/h))を混合用の容器に入れて、それぞれの設定濃度となるように100Lの試験水槽に供給した。この量は100Lの試験水量を24時間で約6回交換できる。溶媒対照区を設け、対照区の水槽には曝露群に相当する酸性メタノール(100 $\mu$ L/L)を供給した。

試験期間中、1日1回、pH、溶存酸素及び水温を測定し、魚の死亡状況及び異常行動を観察した。魚体中の検体は、取込期間中は0、1、3、7、10、14、21及び29日後、排泄期間中は30、31、35、38及び42日後に、4匹採取し、可食部および非可食部(頭、ひれ、内臓)に分別した後、個体毎に残留放射エネルギーを測定した。試験水も同日に採取して測定した。脂質含量は0及び42日に更なる4匹を用いて測定した。

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

結果：

(1) 観察

試験期間中に死亡例、異常行動は認められなかった。

(2) 環境条件

試験期間中の試験水は、水温 21~22℃、pH 6.5~7.7、溶存酸素 83~106%であった。

(3) 魚体内の総残留量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )

試験区 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	部位	取込期間							
		1日	3日	7日	10日	14日	21日	29日	平均(mg/kg)
20	可食部	712.4	819.5	1294.4	890.4	1527.1	1799.5	1253.8	1.26
	非可食部	6205.8	15142.2	13040.2	11332.5	9699.8	13392.8	11206.0	12.6
	全体	3079.9	7531.8	6436.6	5431.9	4614.9	6925.3	5278.8	6.04
2	可食部	207.5	142.1	196.4	225.6	189.0	191.7	269.1	0.20
	非可食部	1085.5	1123.5	1405.1	1387.3	1567.8	2343.7	2327.3	1.69
	全体	576.5	582.4	651.4	722.5	787.1	1138.5	1078.6	0.83

\*：定常状態（3~29日）における平均値

試験区 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	部位	排泄期間				
		30日	31日	35日	38日	42日
20	可食部	432.9	255.3	72.4	71.3	31.0
	非可食部	3620.6	1142.6	438.4	373.3	288.8
	全体	1798.6	674.2	234.4	195.7	140.7
2	可食部	103.7	50.1	11.6	11.4	4.3
	非可食部	608.4	269.4	103.4	62.0	44.9
	全体	303.8	141.9	49.0	33.0	21.7

(4) 試験水中の総残留量 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )

試験区 ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	取込期間								
	0日	1日	3日	7日	10日	14日	21日	29日	平均
20	10.6	10.9	11.6	12.9	11.4	10.5	11.1	12.3	11.4
2	2.0	1.7	1.6	1.6	1.5	1.5	1.5	1.6	1.6

試験区	排泄期間
-----	------

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

( $\mu\text{g/L}$ )	30日	31日	35日	38日	42日
20	1.14	0.39	0.27	0.24	0.23
2	0.18	0.07	0.04	0.02	0.03

29日間の取込期間中の水中濃度は、低濃度区では $1.5\sim 2\mu\text{g/L}$ で平均濃度 $1.6\mu\text{g/L}$ 、高濃度区では $10.5\sim 12.9\mu\text{g/L}$ で平均濃度 $11.4\mu\text{g/L}$ であった。

### (5) 濃縮係数

#### ①BCF<sub>ss</sub> (総残留量に基づく)

試験区 ( $\mu\text{g/L}$ )	部位	取込期間							
		1日	3日	7日	10日	14日	21日	29日	平均*
20	可食部	66.2	74.2	112.6	77.5	134.9	159.4	109.9	111
	非可食部	576.5	1371.0	1133.9	986.6	856.8	1186.5	982.0	
	全体	286.1	681.9	559.7	472.9	407.7	613.5	462.6	533 <sup>1</sup>
2	可食部	113.1	81.3	114.5	135.3	114.8	117.7	166.0	122
	非可食部	591.7	642.7	819.3	831.6	952.3	1439.0	1330.4	
	全体	314.2	333.2	379.8	433.1	478.3	699.0	623.8	491

\*: 定常状態 (3~29日) の平均

#### ②BCF<sub>k</sub> (総残留量に基づく)

試験区 ( $\mu\text{g/L}$ )	取り込み速度定数(K1)			排泄速度定数(K2)			濃縮係数(BCF <sub>k</sub> )		
	可食部	非可食部	全体	可食部	非可食部	全体	可食部	非可食部	全体
20	43.7	1155	544	0.38	1.08	1.04	114	1067	521
2	152	829	472	1.16	0.76	0.88	131	1091	537

なお、定常状態 (3~29日) の高濃度区の代謝物を TLC および HPLC を用いて同定した結果から、親化合物の濃度は、可食部では検出されず、非可食部で総残留量の 0.33% (0.041mg/kg 湿重量) であった。

この結果に基づくと、親化合物の高濃度区における魚全体の濃縮係数は、1.8 であった。

### (6) 脂質含量

7.6%であった。

<sup>1</sup> 申請者注：報告書原文では 484 と記載されているが、ここでは報告書原文の表 20 の 3 日から 29 日の BCF 値をもとに申請者が計算した結果を記載した。

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

## 8. スピロジクロフェンの代謝分解の要約

スピロジクロフェン [I] の土壌等における代謝分解、加水分解及び光分解に関する研究結果を以下に要約し、結果の概要を表1に、推定代謝経路を図1に示した。

スピロジクロフェン [I] の動物、植物、土壌における代謝分解、加水分解及び光分解に関する研究結果を以下に要約し、結果の概要を表1に、推定代謝経路を図1に示した。

### 1) 動物

[<sup>14</sup>C] [I] をラットに2 mg/kgで経口投与し、経時的に屠殺、全身オートラジオグラムを作成し、臓器・組織中における経時的な放射能の分布、消長を調べた。代謝・排泄に寄与する肝臓、腎臓で高濃度の放射能が認められた。ホルモンを制御する分泌臓器あるいは組織には高濃度の放射能は認められなかった。経口投与後、速やかに放射能は体外に排泄され、経口投与48時間後には初期濃度に比較して臓器・組織中における放射能濃度は数桁の割合で減少していた。蓄積性を示す標的臓器は認められなかった。

[<sup>14</sup>C] [I] をラットに2 mg/kgで経口投与すると、投与48時間以内に投与量の約88%~97%が糞尿中へ排泄された。その内、約57%~74%が尿に、約23%~31%が糞に排泄された。100 mg/kgで1回経口投与した雄ラットでは、投与48時間以内に投与放射能の約96%が排泄された。その内、約35%が尿に、約61%が糞に排泄された。

親化合物 [I] は尿中には認められず、糞中に約1%~4% (2 mg/kg)、約16% (100 mg/kg、雄) 認められた。ラット排泄物中の主代謝物は親化合物 [I] が

で、それらが更に  
が認められたものの、その量はわ  
ずかであった。これら  
は尿中に多く存在しており、2  
mg/kgの雄で  
は投与放射能の  
であった。一方、2 mg/kgの雌では  
であった。  
糞中の  
の量には  
2 mg/kgの雄、雌で顕著な差は無く、  
であった。尿中で雌において  
が多く認められたが、排泄物中の  
の総量は雄で  
、雌で  
で顕著な差はな  
かった。これらは代謝の経路による差ではなく、代謝速度に若干の差が認められた  
ものと考察した。

一方、



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

が少量認められた。

100 mg/kgで雄ラットに経口投与したときの代謝動態には2 mg/kg投与の雄ラットと顕著な差はないものであった。

一方、50 ppmあるいは2500 ppmの濃度で親化合物 [ I ] を含む飼料を15週間亜急性的に摂取させた雌雄ラットに[  $^{14}\text{C}$  ] [ I ] を2 mg/kgで経口投与すると、投与48時間以内に投与量の約84%~103%が糞尿中へ排泄された。その内、約56%~75%が尿に、22%~31%が糞に排泄された。糞、尿の代謝物の構成は亜急性50 ppm群が2 mg/kgで1回経口投与群の雌雄と同様であり、また、亜急性2500 ppm群の雄は100 mg/kgの1回経口投与群の雄と同様であり、更に50 ppm、2500 ppmの雌同士において同様の代謝挙動を示していた。

[  $^{14}\text{C}$  ] [ I ] をラットに2 mg/kgで経口投与後、血漿、肝臓及び腎臓中の代謝物を調べた。血漿、肝臓及び腎臓中のいずれからも [ I ] は検出されなかった。雌雄の血漿中で同程度の濃度のエノール体 [ M1 ] が認められ、代謝物中で

が最も多かった。投与3時間~24時間後にかけて血漿中

濃度は雄ラットで

に、雌ラットで

に急速に減衰した。雄の血漿、雌雄の肝臓及び腎臓で少量のOH-エノール体が認められた。一方、その濃度は雌雄で異なり、雄ラットで雌ラットよりも多く認められ、チトクロームP 450活性が雄ラットでより高いことと相関し、尿中代謝物分布の性特異的な違いを反映していた。雌ラットの血漿中には が認められなかった。

## 2) 植物

[  $^{14}\text{C}$  ] [ I ] をフロアブルに製剤し、オレンジに散布処理すると、収穫期 (処理後160日) におけるオレンジ果実中の総放射能濃度は0.072 mg/kgであった。総放射能量の91.8%が果皮に分布し、その30.0%が表面洗浄により除去された。果肉には総放射能量の8.3%が分布した。果実中における総放射能量の34.2%を親化合物 [ I ] が占め、その残留量は0.025 mg/kgに相当した。表面洗浄液には親化合物 [ I ] のみが含まれていたが、果皮には親化合物 [ I ] 及び22種の代謝物、その他及びTLC原点物質が含まれていた。オレンジにおける主代謝物は

であった。親化合物 [ I ] が加水分解を受けた の量は少なかった

が された

も認められた。

果肉中の放射能量は少なかったため、果肉中の成分は調べなかったが、表面洗浄液及び果皮中の成分分析から、総放射能量の54.9%を同定した。

[  $^{14}\text{C}$  ] [ I ] をフロアブルに製剤し、レモンに散布処理すると、収穫期 (処理後21日) におけるレモン果実中の総放射能濃度は0.263 mg/kgであった。総放射能量の99.8%が果皮に分布し、62.2%が表面洗浄により除去された。果肉には

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

総放射エネルギーの0.01%が分布した。果実中における総放射エネルギーの75.3%を親化合物 [ I ] が占め、その残留量は0.199 mg/kgに相当した。表面洗浄液には親化合物 [ I ] (総放射エネルギーの60.9%、0.161 mg/kg) 及び (総放射エネルギーの

) が含まれていたが、果皮には親化合物 [ I ] 及び27種の代謝物及びTLC原点物質が含まれていた。親化合物 [ I ] はレモン中で27種の代謝物等に分解され、総放射エネルギーの87.8%を同定あるいは特性化した。レモンにおける主代謝物は

であった。

果肉中の放射エネルギーは少なかったため、果肉中の成分は調べなかったが、表面洗浄液及び果皮中の成分を調べ、総放射エネルギーの87.8%を同定あるいは特性化した。

[ <sup>14</sup>C ] [ I ] をフロアブルに製剤し、早期あるいは晩期にりんごに散布処理すると、収穫期 (早期処理 : 処理後84日、晩期処理 : 処理後23日) におけるりんご果実中の総放射エネルギー濃度は早期処理及び晩期処理でそれぞれ0.390 mg/kg 及び0.853 mg/kgであった。早期処理では総放射エネルギーの約83%が、また晩期処理では総放射エネルギーの約98%が表面洗浄により除去された。早期処理及び晩期処理のいずれにおいても表面洗浄液中には親化合物 [ I ] のみが含まれていた。早期処理及び晩期処理それぞれ、果実中における総放射エネルギーの約89%及び約99%を親化合物 [ I ] が占め、その残留量はそれぞれ0.349 mg/kg及び0.849 mg/kgに相当した。早期処理では、親化合物 [ I ] は未同定代謝物を含む少数の代謝物に分解され、総放射エネルギーの約95%を同定した。単一成分としては が最も多く検出されたが、その他の代謝物の量は少なく最大でも

されたのみであった。

は微量で

あったが検出された。晩期処理では、親化合物 [ I ] はほとんど分解しなかったが、早期処理と共通の少数の代謝物が少ない量で生成した。晩期処理では、総放射エネルギーの約99.6%を同定した。

[ <sup>14</sup>C ] [ I ] をフロアブルに製剤し、早期あるいは晩期にぶどうに散布処理すると、収穫期 (早期処理 : 処理後64日、晩期処理 : 処理後21日) におけるぶどう果実中の総放射エネルギー濃度は早期処理及び晩期処理でそれぞれ1.12 mg/kg 及び1.90 mg/kgであった。早期処理では総放射エネルギーの56.8%が、また晩期処理では総放射エネルギーの95.8%が表面洗浄により除去された。早期処理及び晩期処理それぞれで果実中における総放射エネルギーの57.6%及び96.4%を親化合物 [ I ] が占め、その残留量はそれぞれ0.65 mg/kg及び1.83 mg/kgに相当した。早期処理及び晩期処理のいずれにおいても表面洗浄液中には親化合物 [ I ] のみが含まれていた。早期処理では、親化合物 [ I ] は17種の代謝物に分解され、総放射エネルギーの95.8%を同定あるいは特性化した。ぶどうにおける主代謝物は

で

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。  
あった。 はいずれも微量  
量であった。晩期処理では、親化合物 [ I ] はほとんど分解しなかったが、早期処理と共通の少数の代謝物が少ない量で生成した。晩期処理では、総放射エネルギーの99.4%を同定した。

[ <sup>14</sup>C ] [ I ] をフロアブルに製剤し、グレープフルーツの葉に塗布処理し、葉から果実への移行を調べた。採取した果実からは処理放射能のわずか0.07%が検出されたのみであり、処理放射能はほとんど移行しないことが示された。

以上から、親化合物 [ I ] は植物中で共通の代謝様式により代謝されると推定された。すなわち、親化合物 [ I ] のエステル結合が開裂し、 を形成し、その  
のシクロヘキシル環の  
された後、 に分解され  
た後、更に分解して遊離の が生成され、次いで  
を生成する経路が推定された。また、遊離の  
が となり、更に分解  
して遊離の が生成され、次いで  
を生成する経路も推定された。

従って、植物体における親化合物 [ I ] の分解経路は動物における分解経路と類似し、親化合物 [ I ] の の生成とそれ  
に続く の生成により  
特徴づけられると考察された。

### 3) 土壌

好気条件下の畑地土壌4種類を用いた[ <sup>14</sup>C ] [ I ] の代謝試験における親化合物 [ I ] は半減期0.5日～6.0日で分解し、処理120日後には処理量の1.0%～5.3%に減少した。親化合物 [ I ] の分解物として の量的に多い4種  
の主要分解物と量的に少ない分解物 を同定した。

検出され  
た。 はいずれの土壌でも少なく、検出されないか最大 検出  
されたのみであった。 がVero Beach土壌で減衰しなかったことを除  
いて、これらの代謝物はいずれも土壌中で減衰した。土壌中では、

代謝物が生成するか確認するため、[ <sup>14</sup>C ] [ I ]  
をFresno土壌に添加して代謝試験を実施した。その結果、 構造を有

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

するものの 標識では検出されない構造の代謝物が2種検出されたが、いずれも生成量が最大 量的に少なく、速やかに減衰したことから同定されなかった。[  $^{14}\text{C}$ ] [I] 及び[  $^{14}\text{C}$ ] [I] のいずれも土壤中で二酸化炭素まで無機化された。

#### 4) 加水分解

親化合物 [I] は酸性～アルカリ性条件の全ての緩衝液中で加水分解し、加水分解速度はpHに依存し、pHの上昇に伴い速やかに分解した。25℃でのpH 4、7及び9における加水分解半減期はそれぞれ63.6日、30.8日及び1.9日であった。全てのpHで が加水分解物として同定され、親化合物 [I] は にほぼ定量的に加水分解した。

#### 5) 水中光分解

アセトニトリルを20%含むpH 4緩衝液中での照射条件下における親化合物 [I] の水中光分解半減期は約23日（追加試験結果）であり、暗条件下における分解速度から加水分解の影響を除いた親化合物 [I] の光分解半減期は約30日と算出された。一方、アセトニトリルを1%含むpH 4緩衝液中での照射条件下における親化合物 [I] の水中光分解半減期は約10.8日であり、暗条件下における分解速度から加水分解の影響を除いた親化合物 [I] の光分解半減期は約18日と算出された。以上から、pH 4の緩衝液中における水中光分解では、親化合物 [I] は暗対照に比べ速やかに分解し、光分解の寄与が認められたが、その寄与は大きくないと推定された。両試験に共通する光分解物として が同定されたが、その量は1%緩衝液中でより多かった。アセトニトリルを1%含む緩衝液中において比較的多く認められた はアセトニトリルを20%含む緩衝液中では定量されなかったが、その対応するRf値近辺に検出限界程度のスポットが認められることから、アセトニトリルを20%含む緩衝液中において は二酸化炭素への中間分解物として生成していたと推定される。従って、これら両試験における分解経路は共通であり、親化合物 [I] は緩やかな光分解及び加水分解により に分解された後、生成した は光分解により速やかに に変換され、生成した も光分解により最終的に二酸化炭素へと無機化されると考えられた。

アセトニトリルを20%含む自然水中の親化合物 [I] の光分解試験において親化合物 [I] は光分解を受けたものの、親化合物 [I] の分解速度に照射条件及び暗対照条件での違いは認められず、自然水中における親化合物 [I] の分解速度には光の影響は顕著に認められず、自然水のpH (=約 8) による加水分解が顕著に優先して分解が進行した。光分解物として 及び二酸化炭素が生成し、分解物は緩衝液中の成分と共通であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。  
及び はいずれも自然水中で速やかに分解し、最終的に二酸化炭素へと無機化された。

#### 自然環境中における加水分解、光分解

以上の結果から、自然環境中における親化合物 [I] の動態は以下の様に推定される。スピロジクロフェンは自然水中では主として加水分解により速やかに分解し、  
生成する。生成した は自然水中で光により速やかに分解され、  
を経て二酸化炭素へと無機化される。従って、スピロジクロフェン及びその分解物は自然環境中に長期間残留して悪影響を及ぼすことはないとは推定される。

#### 6) 生物濃縮性

試験濃度  $20 \mu\text{g/L}$  及び  $2 \mu\text{g/L}$  の流水式条件下で、ブルーギルを用いて 29 日間曝露し、13 日間の排泄期間を設けた。生物濃縮倍率は高濃度区で 1.8 であった。



試験群	代謝物の割合 (%)						総回収量
	I						
蒸 処理 23日後 (濃度/ppm)	96.81						
蒸 処理 84日後 (濃度/ppm)	89.31						
蒸 処理 21日後 (濃度/ppm)	96.4						
蒸 処理 64日後 (濃度/ppm)	57.6						
7/7# Fresno土壌 13日後	96.0						
120日後	4.7						
360日後	2.3						
7/7# Yero Bunch土壌 13日後	28.4						
120日後	1.0						
7/7# BBA 2.2土壌 13日後	26.3						
120日後	3.4						
7/7# Hoefchen土壌 13日後	2.9						
120日後	1.0						
7/7# Fresno土壌 14日後	20.9						
119日後	2.1						
加水 緩衝液 (pH)、25°C 30日後	70.3						
分 緩衝液 (pH)、25°C 30日後	51						
解 緩衝液 (pH)、25°C 30日後	1.1						
未 加水 緩衝液 (pH) 7日後	88.1						
20%7日-1日含有 10日後	61.0						
緩衝液 (pH) 20%7日-1日含有 10日後	99.8						
25.3 μg/L							
25.6 μg/L							
緩衝液 (pH) 7日後	62.2						
15%7日-1日含有 12日後	99.5						
20.7 μg/L							
河川水 7日後	80						
20%7日-1日含有 10日後	52.3						
26.2 μg/L							
河川水 7日後	63.2						
20%7日-1日含有 12日後	95.8						

1) 植物代謝物の代謝物は総回収量に対する割合。  
 2) 空欄：代謝物が認められなかった。  
 3) 加水分解試験の時の値は総回収量の値を記載。





## スピロジクロフェン開発年表

