

II. 植物体内運命試験

1. りんご（果実、葉）におけるスピロテトラマトの代謝（散布処理）

（資料No.運命9）

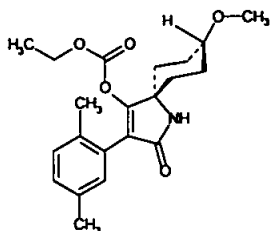
試験機関：

〔GLP 対応〕

報告書作成年：2005 年

供試標識化合物：

構造式：



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

放射化学的純度： (HPLC 及び TLC)

*：標識位置

化学名：シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ
[4.5]デカ-3-エン-2-オン
(以下、 とする。)

標識位置設定理由：

【試験方法】

作物及び栽培方法：

ドイツ Bayer CropScience AG 研究所における（自然太陽光及び自然温度条件下の）ガラス屋根付き栽培エリアでりんご（品種：Elstar）を栽培した。栽培容器の面積は 0.9m^2 であり、栽培土壌は砂壤土であった。給水方法は土壌への灌水であった。

薬剤処理及び試料採取：

$3\text{-}^{14}\text{C}$ -標識体を製剤白試料（FL 8030/039）と混合し、有効成分を $8.90\sim 10.80\%$ (w/w)含有する油分散型製剤（OD 100 製剤）を調製した。OD100 製剤の 0.5mL を水 20mL で 40 倍希釈し、りんご樹に 20 日間隔で計 2 回の散布処理（最終散布：収穫 63 日前）を行った。処理量は米国適正農業規範に基づく最大使用量（年間圃場施用量）の 2 倍とし、 1152g 有効成分/ha（ 576g 有効成分/ha \times 2 回散布）と設定した。本試験での実処理量は 1100g 有効成分/ha であり、設定施用量の 95.5% 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。

成熟期に果柄を除いたりんご果実 28 個（重量：3539.8g）を採取した。また葉（総重量：313.89g）を採取した。

試料の抽出処理及び分画（図 1：次頁）：

果実 14 個をジクロロメタン浸漬にて表面洗浄し、洗浄液の一部分を放射能測定に供した。洗浄液（330mL）を 4.5mL となるまで濃縮し、析出した白色物質（表皮ワックス層等）をアセトン 7.0mL 及びジクロロメタン 8.0mL にそれぞれ再懸濁させた。乳化剤 Dobanol（23mL）とともにこれら再懸濁液を濃縮洗浄液に合わせ、放射能検出器付き高速液体クロマトグラフィー（ラジオ HPLC）による放射性成分の定量に供した。

葉及び表面洗浄後の果実を液体窒素条件下で均一化し、アセトニトリル/水混合液（80/20 v/v）で計 3 回の抽出を行った。各抽出後、ろ過により抽出物と抽出残渣に分割し、それぞれの一部分を放射能測定に供した。アセトニトリル/水抽出物を水性残渣となるまで濃縮し、ジクロロメタン分配（250mL×3 回）により有機相（ジクロロメタン相）及び水相に分割し、放射能測定及び代謝物の同定/定量に供した。

放射能測定、放射性成分の同定及び定量

液体試料中の放射エネルギーは液体シンチレーションカウンター（LSC）で、また、抽出後の固体試料中の放射エネルギーはオキシダイザーで燃焼後、生じた¹⁴C₂を液体シンチレーションカウンターで測定した。

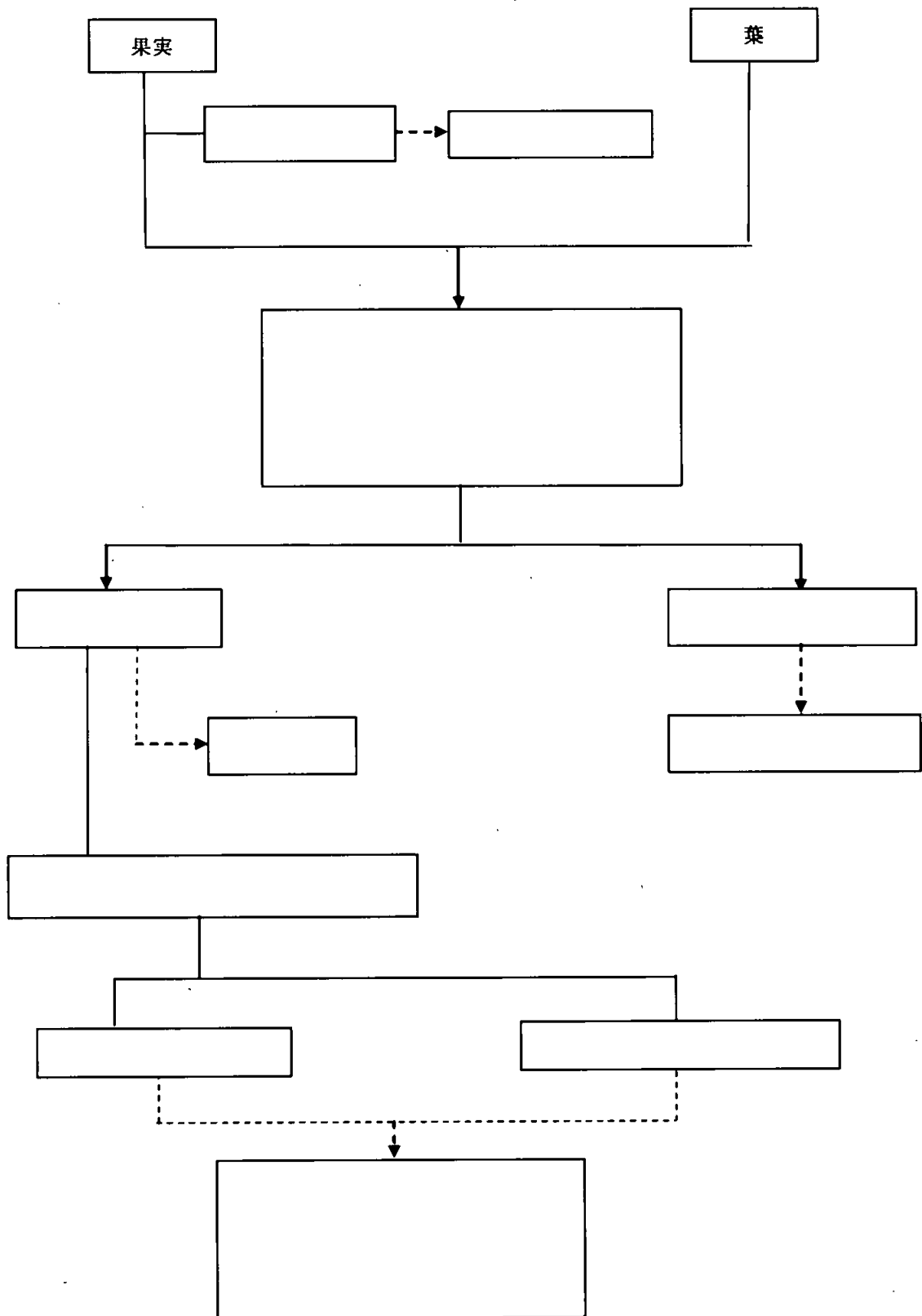
洗浄液中の代謝物の同定は、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）及び薄層クロマトグラフィー（TLC）における認証済標準品とのクロマトグラフィーにて行った。

またアセトニトリル/水抽出物中の代謝物の同定は、非標識標準品又は植物細胞との培養試験（資料No.運命 15）で得られた¹⁴C標識代謝物とのクロマトグラフィーにて行った。更に、表面洗浄後の果実から得たジクロロメタン相及び水相を分取高速液体クロマトグラフィー（分取HPLC）に供し、得られた画分を濃縮後に高速液体クロマトグラフィー-質量分析/質量分析（HPLC-MS/MS）、核磁気共鳴装置（¹H-NMR）及びフーリエ変換-質量分析（FT-MS）による構造同定に供した。

表面洗浄液及び抽出物中の放射性成分の定量は、放射能検出器付き HPLC（ラジオ HPLC）で行った。

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。

図1：抽出及び分画手順



【試験結果】

放射能分布及び総残留放射能（表1及び表2）：

表1に、りんご果実及び葉における放射能分布及び総残留放射能（TRR）を示す。またアセトニトリル/水混合液で抽出された放射能について、ジクロロメタン分配後の結果を表2に示す。

果 実

最終散布後61日における果実TRRは0.61 mg 有効成分当量/kg（以下、mg eq./kgと記載）であり、その98.0%（0.60 mg eq./kg）が表面洗浄液及びアセトニトリル/水抽出物として回収された。また表面洗浄液として回収された放射能は48.5%TRR（0.30 mg eq./kg）であり、抽出性放射能の約半分を占めた。

3回のアセトニトリル/水抽出によりTRRの49.5%（0.31 mg eq./kg）が抽出され、その内の65%（32.2%TRR、0.20 mg eq./kg）及び35%（17.3%TRR、0.11 mg eq./kg）がそれぞれジクロロメタン相及び水相として分配された。

アセトニトリル/水抽出後の抽出残渣放射能は、2.1%TRR（0.01 mg eq./kg）であった。

葉

葉TRRとして36.62 mg eq./kgが認められ、その94.6%（34.65 mg eq./kg）がアセトニトリル/水抽出物として回収された。アセトニトリル/水抽出放射能のジクロロメタン分配後、その93%（88.2%TRR、32.32 mg eq./kg）及び7%（6.4%、2.33 mg eq./kg）がそれぞれジクロロメタン相及び水相に分配された。

アセトニトリル/水抽出後の抽出残渣放射能として、5.4%TRR（1.97 mg eq./kg）が認められた。

表1：りんご果実及び葉における放射能分布及び総残留放射能

植物部位	設定処理量	総残留放射能（TRR）					
		抽出性放射能（#）		抽出残渣放射能		合計	
		%TRR	mg/kg	%TRR	Mg/kg	%TRR	mg/kg
果実	1152 g ai/ha	98.0 [48.5]	0.60 [0.30]	2.1	0.01	100.1	0.61
葉	1152 g ai/ha	94.6	34.65	5.4	1.97	100.0	36.62

(#)：表面洗浄液及びアセトニトリル/水（80/20 v/v、3回抽出）の合計。mg/kg：mg eq./kg
括弧〔〕内の数値は、表面洗浄液として回収された放射能。

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 : アセトニトリル/水抽出放射能のジクロロメタン分配後の分布

植物部位	アセトニトリル/水抽出物 (3回抽出の合計)		ジクロロメタン分配後			
			ジクロロメタン相		水相	
	%TRR	mg ai/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
果実	49.5	0.31	32.2	0.20	17.3	0.11
			[65%]		[35%]	
葉	94.6	34.65	88.2	32.32	6.4	2.33
			[93%]		[7%]	

括弧〔〕内の数値はアセトニトリル/水抽出放射能の分布率

代謝物の分布 (表 3) :

表 3 に果実及び葉における代謝物の分布を示す。

放射性成分として

が同定された。

果 実

果実表面洗浄液中の放射性成分として、親化合物スピロテトラマト【P】 (48.5%TRR、0.30 mg eq./kg) のみが認められた。

一方、果実 (アセトニトリル/水) 抽出物では多数の代謝物が認められた。

果実抽出物における親化合物【P】の存在量は僅かであり、2.8%TRR (0.02 mg eq./kg) を占めるのみであった。なお果実表面洗浄液と果実抽出物の合計において、親化合物【P】は51.3%TRR (0.32 mg eq./kg) を占めた。

果実抽出物で最も多く認められた主要代謝物は

であり、

を占めた。

に次ぐ代謝物とし

て、

が

認められた。また

認められた。

これら代謝物以外に、微量代謝物として

が認められ、

が認めら

れた。

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

葉

果実と同様に葉でも親化合物【P】が主要成分であり、その量は72.0%TRR (26.37 mg eq./kg) であった。葉において、代謝物として最も多く認められた成分は

であった。次いで、

が

認められ、

生成した。

表3：果実及び葉における代謝物の分布

	果実		葉	
	果実 TRR=0.61mg/kg		葉 TRR=36.63 mg/kg	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
表面洗浄液	48.5	0.30	試料	試料
親化合物スピロテトラマト【P】	48.5	0.30	未採取	未採取
アセトニトリル/水抽出物 (3回抽出の計)	49.5	0.31	94.6	34.65
親化合物スピロテトラマト【P】	2.8	0.02	72.0	26.37
総抽出放射能	98.0	0.60	94.6	34.65
同定放射能 (計)	91.9	0.57	94.6	34.65
HPLC 保持時間による特徴付け放射能 (未同定代謝物の合計)	6.0	0.04	n.d.	n.d.
抽出残渣放射能	2.1	0.01	5.4	1.97
合計	100.0	0.61	100.0	36.63

n.d. : 検出されず。括弧[]内の数値は個別成分の最大値。mg/kg : mg eq./kg

代謝経路：

本試験結果から、りんご（果樹及び葉）における親化合物スピロテトラマト【P】の代謝経路は次のとおり考えられた。

- ・ 主たる代謝反応は、親化合物【P】の生成であった。

本試験結果を以下に要約する。

スピロテトラマト【P】を設定処理量 1152 g 有効成分/ha (576 g 有効成分/ha×2 回散布、実処理量は 1100g 有効成分/ha) でりんご樹 (品種: Elstar) に 2 回散布処理 (20 日間隔、最終散布: 収穫 63 日前) し、果実成熟期に果実及び葉を採取した。

果実の総残留放射能 (TRR) は 0.61 mg eq./kg であり、果実表面洗浄液中の放射性成分は未変化の親化合物スピロテトラマト【P】のみであった。果実抽出物中には多数の代謝物が認められたが、親化合物スピロテトラマト【P】が占める割合は僅かであった。

果実における主要代謝物として、未変化の親化合物スピロテトラマト【P】が 51.3%TRR (0.32 mg/kg) が認められた他、

認められた。また

認められた。

また微量代謝物として

であった。

葉の TRR は 36.63 mg eq./kg であり、主要代謝物として未変化のスピロテトラマト【P】及びエノール体【MI】がそれぞれ 72.0%TRR (26.37 mg eq./kg) 及び認められた。微量代謝物として、

であった。また

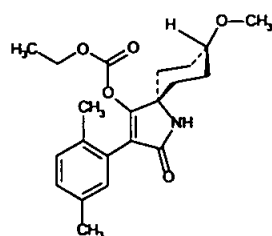
が認めら

れた。

次頁にりんごにおけるスピロテトラマト【P】の想定代謝経路を示す。

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。

りんごにおける代謝経路



スピロテトラマト【P】

II. 植物体内運命試験

2. レタスにおけるスピロテトラマトの代謝（散布処理）

（資料No.運命10）

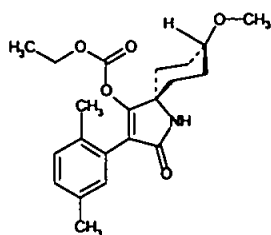
試験機関：

〔GLP 対応〕

報告書作成年：2006 年

供試標識化合物：

構造式：



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

放射化学的純度：

*：標識位置

化学名：シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ
[4.5]デカ-3-エン-2-オン
(以下、 標識体とする。)

【試験方法】

作物及び栽培方法：

ドイツBayer CropScience AG研究所の温室にて、レタス（品種：Alexandrina）を栽培容器（面積：1m²、栽培土壌：砂壤土）で栽培した。適時、栽培土壌に灌水してレタスへの給水を行った。

薬剤処理及び試料採取：

3-¹⁴C-標識体を製剤白試料（FL 8030/039）と混合し、有効成分を 9.89～10.90%(w/w)含有する油分散型製剤（OD 100 製剤）を調製した。製剤の調製量は 84.3mg（第1回散布用）及び 83.46mg（第2回散布用）であった。

レタスへの処理は計2回にわたって行い、製剤を水 90.5mL に希釈して BBCH コードの生育ステージ 41（第一回目、2003 年 10 月 7 日）及び同ステージ 45～46（第二回目、同年 10 月 21 日）にそれぞれ散布した。

設定処理量は最大年間施用量 144g 有効成分/ha（72g 有効成分/ha×2 回）とし、実処理量は 166.8 g 有効成分/ha（設定処理量の 116%）であった。

最終散布後第7日に土壌から上の植物体を採取した（総重量：約 1289g）。レタス頭部を裁断し、窒素条件下で均質化した。

試料の抽出処理及び分画（図1：次頁）：

アセトニトリル/水混合液（80/20 v/v、300mL）により、均質化したレタス頭部試料について計3回の連続抽出を行い、各抽出後に抽出懸濁液を遠心分離（6000rpm）によりアセトニトリル/水抽出物と固体物に分割した。

抽出物を水性残渣となるまで濃縮し、ジクロロメタン（200mL）で計3回の分配後に有機相（ジクロロメタン相）と水相を得た。水相及び濃縮した有機相を代謝物の同定及び定量に供した。

またアセトニトリル/水混合液（80：20 v/v）による抽出後の固体物に、過酷抽出（マイクロ波抽出）としてマイクロ波照射下の120°Cにおいて30分間のアセトニトリル/水混合液（1：1 v/v）による抽出を行った。濾過により抽出残渣と過酷抽出物を分離し、過酷抽出物は濃縮した。

放射能測定、放射性成分の同定及び定量

液体試料中の放射エネルギーは液体シンチレーションカウンター（LSC）で、また、抽出後の固体試料中の放射エネルギーはオキシダイザーで燃焼後、生じた¹⁴C₂O₂を液体シンチレーションカウンター（LSC）で測定した。

抽出物（ジクロロメタン分配後の有機相及び水相）そして過酷抽出物をHPLC及び薄層クロマトグラフィー（TLC、シリカ 60₂₅₄）に供し、それぞれ認証済標準品又は植物細胞との培養試験（資料No.運命15）で得られた¹⁴C標識代謝物とのクロマトグラフィーを行った。なお水相はSPE精製後（Mega Bond Elut C18カートリッジ）にクロマトグラフィーに供した。構造解析として、高速液体クロマトグラフィー-質量分析/質量分析（HPLC-MS/MS、ESIモード）及び核磁気共鳴分光測定（NMR）を行った。

また水相を酸（2N 塩酸、100°Cにて2時間）又はアルカリ（5N 水酸化ナトリウム、100°Cにて1時間）加水分解し、HPLCで分析した。

放射性成分の定量は、放射能検出器付き HPLC で行った。

【試験結果】

放射能分布及び総残留放射能（表 1）：

表 1 に、最終散布後第 7 日に収穫したレタスにおける総残留放射能（TRR）及び放射能分布を示す。

レタスの TRR は 3.13mg 有効成分当量/kg（以下、mg eq./kg と記す）であり、アセトニトリル/水（8/2 v/v）混合液による抽出で TRR の 96%（3.0 mg eq./kg）が抽出された。抽出物のジクロロメタン分配により、TRR の 76.9%（2.41 mg eq./kg）及び 19.0%（0.59 mg eq./kg）がそれぞれ有機相（ジクロロメタン相）及び水相に分配された。

過酷（マイクロ波）抽出後、植物体（固体物）には TRR の 4%（0.13 mg eq./kg）が認められた。固体物の過酷（マイクロ波）抽出により TRR の 2.8%（0.09 mg eq./kg）が遊離し、抽出残渣放射能は TRR の 1.4%（0.04 mg eq./kg）であった。

表 1：レタスにおける総残留放射能（TRR）及び放射能分布

		TRR 及び放射能分布	
アセトニトリル：水（8：2 v/v）抽出物		3.0 mg/kg（95.9%）	
ジクロロメタン分配後	有機相（ジクロロメタン相）	2.41 mg/kg（76.9%）	
	水相	0.59 mg/kg（19.0%）	
固体物		0.13 mg/kg（4.1%）	
過酷抽出後	過酷（マイクロ波）抽出物	0.09 mg/kg（2.8%）	
	抽出残渣	0.04 mg/kg（1.4%）	
合計		3.13 mg/kg（100.0%）	

括弧（ ）内の数値は TRR に対する%、mg/kg：mg eq./kg

代謝物の分布（表 2）：

表 2 に、代謝物の分布を示す。

なお代謝物として、親化合物スピロテトラマト【P】の他、
が同定された。

最終散布後第 7 日のレタスにおいて、親化合物スピロテトラマト【P】は 55.9%TRR（1.75mg eq./kg）を占め最も多く認められた。

がそれぞれ

を占め、また

の量で存在した。

これらの成分以外に、複数の未同定放射性成分が認められた。しかしながら、個別未同定放射性成分の最大値は
であった。

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

表 2: レタスにおける代謝物の分布 (最終散布後第 7 日)

	CH ₃ CN/水抽出 (DCM分配後)				過酷抽出物		合計	
	有機相 (DCM 相)		水相		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg				
親化合物【P】	55.9	1.75	—	—	—	—	55.9	1.75
合 計							98.6	3.09

CH₃CN: アセトニトリル、DCM: ジクロロメタン、—: 検出されず、mg/kg: 有効成分当量値
括弧 () 内の数値は個別成分の最大値

代謝経路:

本試験結果から、レタスにおける親化合物スピロテトラマト【P】の代謝経路は次のとおり考えられた。

- ・ 主たる代謝反応は、
であった。

本試験結果を以下に要約する。

スピロテトラマト【P】を設定処理量 144g 有効成分/ha (72g 有効成分/ha×2 回、実処理量は 166.8 g 有効成分/ha) でレタス (品種: Alexandrina) に 2 回散布処理 (処理日: 収穫 21 日前及び 7 日前) し、最終散布後第 7 日にレタスを収穫した。

レタスにおける総残留放射能 (TRR) は 3.13mg eq./kg であった。未変化の親化合物スピロテトラマト【P】が 55.9%TRR (1.75mg eq./kg) と最も多く認められ、代謝物として

が認められた。代謝物で

ある

の生成量

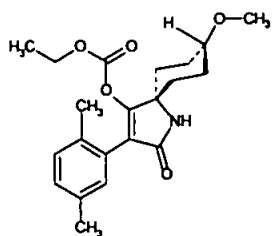
は、それぞれ

であった。

次頁にレタスにおける推定代謝経路を示す。

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。

レタスにおける代謝経路



スピロテトラマト【P】

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。

II. 植物体内運命試験

3. ばれいしょにおけるスピロテトラマトの代謝（散布処理）

（資料No.運命11）

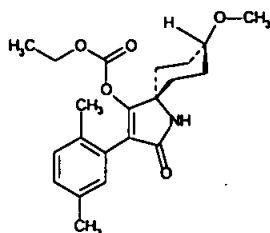
試験機関：

〔GLP 対応〕

報告書作成年：2005 年

供試標識化合物：

構造式：



比放射能： $\mu\text{Ci/mg}$ (MBq/mg)

放射化学的純度： (HPLC 及び TLC)

*：標識位置

化学名：シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ
[4.5]デカ-3-エン-2-オン

(以下、 標識体とする。)

【試験方法】

作物及び栽培方法：

ドイツBayer CropScience AG研究所の（自然太陽光及び自然温度条件下の）雨除け栽培エリアにて、ばれいしょ（品種：Grata）を栽培した。表面積 1m^2 の栽培容器（土壌：砂壤土）に 16 個の種いもを植え付け、収穫期まで栽培した。栽培期間中、必要に応じて土壌への灌水を行った。

薬剤処理及び試料採取：

$3\text{-}^{14}\text{C}$ -標識体を製剤白試料（FL 8030/039）と混合し、有効成分を表示値として 10.50%(w/w)含有する油分散型製剤（OD 100 製剤）を調製した。OD 100 製剤 107.2~112.9 mgを水 50mLで希釈し、14 日間隔で計 3 回の散布処理（最終散布：収穫 14 日前）をおこなった。

各散布時の設定処理量は 96 g 有効成分/ha であり、その合計処理量は年間圃場施用量である 288 g 有効成分/ha と同一であった。本試験で実処理量は合計 308 g 有効成分/ha であり、設定処理量を 7%上回った。

最終散布後第 14 日の収穫期（BBCH コード 95）に、ばれいしょ試料（茎葉及び塊茎）を採取した。茎葉試料は土壌から上の部分を切断し、その一部を液体窒素下の Ultra-Turrax 分散器で均質化した。塊茎試料は、水による付着土壌の洗浄及び室温で風乾後に液体窒素条件下で均質化した。

試料の抽出処理及び分画（図1：次頁）：

通常抽出（茎葉及び塊茎）

均質化した茎葉及び塊茎試料の一部をPolytron™ PT-MR 6000 ホモジナイザーでアセトニトリル/水混合液（4/1 v/v, 300mL）で3回抽出し、次いでアセトニトリル（300mL）で1回抽出した。濾過後、固形残留物（植物残渣）をアセトニトリルで洗浄し、洗浄液と抽出液を合わせて抽出物とした。塊茎の不溶性の植物残渣は以下の過酷抽出に供した。

茎葉及び塊茎の抽出物を残渣となるまで回転エバポレータで濃縮した後、ジクロロメタン150mL（茎葉）及び200mL（塊茎）で3回分配し、有機相（ジクロロメタン相）、水相及び濃縮時の蒸留物を得た。

また塊茎中の代謝物の分離のため、別途、均質化した塊茎試料を上記と同様に抽出/分配し、有機相と水相を得た。

過酷抽出（塊茎の不溶性植物残渣）

通常抽出後の植物残渣に、ジアスターゼ含有溶液とともに室温で6日間にわたって攪拌培養する過酷抽出を2回行い、過酷抽出物と最終残渣を得た。

放射能測定、放射性成分の同定及び定量

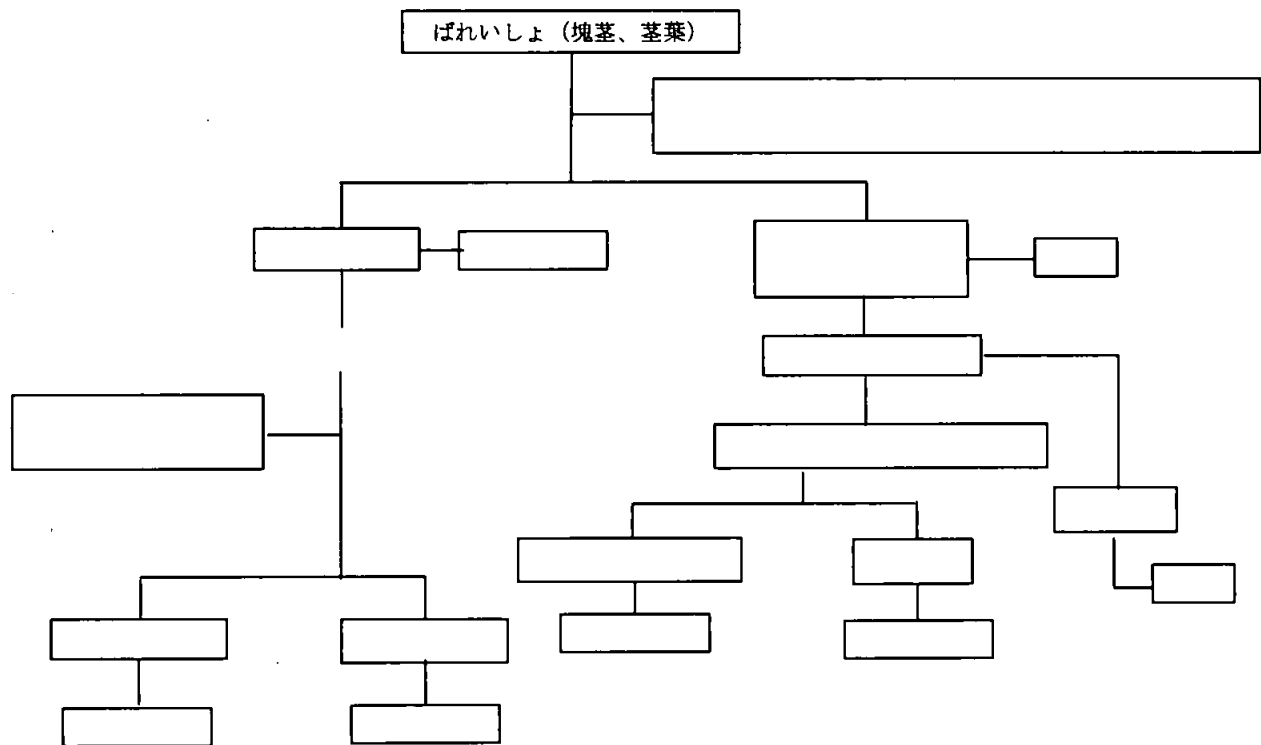
液体試料中の放射エネルギーは液体シンチレーションカウンター（LSC）で、また、抽出後の固体試料中の放射エネルギーはオキシダイザーで燃焼後、生じた¹⁴C₂O₂を液体シンチレーションカウンターで測定した。

各抽出物（通常抽出後の有機相及び水相の濃縮物、過酷抽出物）中の放射性成分の定量は、放射能検出器付き高速液体クロマトグラフィー（ラジオHPLC）で行った。

代謝物の同定として、各HPLCの主要放射性画分を収集し、薄層クロマトグラフィー（TLC）及び高速薄層クロマトグラフィー（HPTLC）での標準品とのコクロマトグラフィーを行った。他、核磁気共鳴装置による構造解析を行った。

また配糖体のアグリコンを確認するため、通常抽出で得た水相にセルラーゼによる酵素加水分解処理を行った。

図 1：抽出スキーム



【試験結果】

総残留放射能及び放射能分布 (表 1) :

表 1 に、最終散布後第 14 日におけるばれいしょ塊茎及び茎葉の総残留放射能 (TRR) 及び放射能分布を示す。

なお TRR はアセトニトリル/水抽出物 (通常抽出物) 及び植物残渣中の放射能の合計とした。通常抽出物の各分画 (ジクロロメタン相、水相及び蒸留物) の合計値は、分画操作における変動を含むため、合計値 (通常抽出物中の放射能) と異なる。

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。

総残留放射能 (TRR) は塊茎で 0.255 mg 有効成分当量/kg (以下、mg eq./kg と記す) (放射性成分定量用) 及び 0.239mg eq./kg (代謝物分離用) であり、茎葉では 11.057mg eq./kg であった。

塊茎ではアセトニトリル/水混合液による抽出 (通常抽出) で 80.2%TRR (0.205 mg eq./kg、放射性成分定量用) 及び 82.9% (0.198mg eq./kg、代謝物分離用) が抽出され、植物残渣中の放射能はそれぞれ 19.85%TRR (0.050mg eq./kg、放射性成分定量用) 及び 17.1% (0.041mg eq./kg、代謝物分離用) であった。

茎葉では、アセトニトリル/水混合液による抽出 (通常抽出) で 96.0%TRR (10.616mg eq./kg) が抽出され、植物残渣中の放射能は 4.0%TRR (0.442mg eq./kg) であった。

塊茎では、通常抽出物 (アセトニトリル/水抽出物) 中放射能のジクロロメタン分配により塊茎 TRR の 63.5% (0.162mg eq./kg、放射性成分定量用) 及び 63.9% (0.153mg eq./kg、代謝物定量用) がジクロロメタン相に分配され、水相には 16.7%TRR (0.043mg eq./kg、放射性成分定量用) 及び 19.0% (0.046mg eq./kg、代謝物分離用) が残存した。なお、ジクロロメタン分配前の濃縮操作における蒸留物 (放射性成分定量用のみ) に放射能は認められなかった。また塊茎 (放射性成分定量用) の植物残渣の過酷抽出により、14.3%TRR (0.036mg eq./kg) の放射能が遊離され、最終残渣中の放射能は 5.5%TRR (0.014mg eq./kg) となった。

茎葉では、通常抽出物 (アセトニトリル/水抽出物) 中放射能のジクロロメタン分配により茎葉 TRR の 80.1% (8.852mg eq./kg) がジクロロメタン相に分配され、水相には 16.0%TRR (1.764mg eq./kg) が認められた。ジクロロメタン分配前の濃縮時の蒸留物には、茎葉 TRR の 0.06% (0.008mg eq./kg) が認められた。

表 1 : 最終散布後第 14 日のばれいしよにおける総残留放射能 (TRR)

		塊茎				茎葉	
		放射性成分定量用		代謝物分離用			
		%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
CH ₃ CN/水 抽出物 (通常抽出物)	DCM 相	63.5	0.162	63.9	0.153	80.1	8.852
	水相	16.7	0.043	19.0	0.046	16.0	1.764
	蒸留物	n.d.				0.06	0.008
	計	80.2	0.205	82.9	0.198	96.0	10.616
植物残渣	過酷抽出物	14.3	0.036	/	/	/	/
	最終残渣	5.5	0.014	/	/	/	/
	計	19.8	0.050	17.1	0.041	4.0	0.442
総残留放射能 (TRR)		100.0	0.255	100.0	0.239	100.0	11.057

CH₃CN : アセトニトリル、DCM : ジクロロメタン、n.d. : 非検出。mg/kg : mg eq./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。

代謝物の分布（表 2～表 4）：

ばれいしょにおける代謝物の分布を表 2（塊茎）及び表 3（茎葉）にそれぞれ示し、また表 4 に各部位（塊茎及び茎葉）における代謝物の生成量比較を示す。

放射性成分として、親化合物スピロトラマト【P】、

が同定された。

塊茎（表 2 及び表 4）

未変化の親化合物【P】は検出されず、

であった。量的に に次ぐ代謝物として、

がそれぞれ

認められた。その他に

が

認められた。

また通常（アセトニトリル/水）抽出物のジクロロメタン分配後の水相において、

が認められた。最も多く認められた

であった。

茎葉（表 3 及び表 4）

茎葉では、未変化の親化合物【P】が最も多く認められ、その量は 49.4%TRR (5.455 mg eq./kg) であった。親化合物【P】は、主としてジクロロメタン相から 45.6%TRR (5.040 mg eq./kg) が回収された。親化合物【P】に量的に次ぐ代謝物として、

がそれぞれ

が認められ、また

認め

られた。

これら以外に、

が

認められた。

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

表 2 : 塊茎における代謝物の分布

	アセトニトリル/水抽出物 (通常抽出物)				植物残渣		合計	
	ジクロロメタン相		水相		過酷抽出物			
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
親化合物【P】	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
合計 (抽出放射能 計)	63.5	0.162	16.7	0.043	14.3	0.036	94.5	0.241
最終残渣							5.5	0.014
総残留放射能 (TRR)							100.0	0.255

n.d.: 検出されず。

表 3 : 茎葉における代謝物の分布

	アセトニトリル/水抽出物 (通常抽出物)				植物残渣		合計	
	ジクロロメタン相		水相		過酷抽出物			
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
親化合物【P】	45.6	5.040	3.8	0.415			49.4	5.455
合計 (抽出放射能 計)	80.1	8.852	16.0	1.764			96.0	10.616
植物残渣							4.0	0.442
総残留放射能 (TRR)							100.0	11.058

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：ばれいしょ塊茎及び茎葉における代謝物生成量（比較）

	代謝物生成量			
	塊茎 (TRR=0.255mg/kg)		茎葉 (TRR=11.057mg/kg)	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
親化合物【P】	n.d.	n.d.	49.4	5.455
合計（抽出放射能 計）	94.5	0.241	96.0	10.616

代謝経路：

本試験結果から、ばれいしょにおける代謝経路は次のとおり考えられた。

親化合物スピロテトラマト【P】は

を受けた。

がそれ

ぞれ認められた。

本試験結果を以下に要約する。

スピロテトラマト【P】を設定処理量 288g 有効成分/ha (96 g 有効成分/ha×3 回、実処理量は 308 g 有効成分/ha) でばれいしょ (品種 : Grata) に 14 日間隔で 3 回散布処理を行い、最終散布 14 日後の収穫期に塊茎及び茎葉を採取した。

塊茎における総残留放射能 (TRR) は 0.239~0.255mg eq./kg であり、茎葉の TRR は 11.057mg eq./kg であった。

塊茎において、親化合物スピロテトラマト【P】は検出されなかった。塊茎の主要代謝物として、

認められた。

塊茎での微量代謝物として、

が

認められ、その生成量は

であった。また

が、それぞれ

認められた。

茎葉での主要代謝物は、未変化の親化合物スピロテトラマト【P】及び
であり、それぞれ茎葉 TRR の 49.4%TRR (5.455mg eq./kg) 及び
を占めた。また

認められた。

茎葉での微量代謝物として、

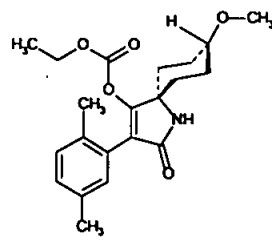
が認められ、

であった。

次頁にばれいしょにおける親化合物スピロテトラマト【P】の想定代謝経路を示す。

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。

ばれいしょにおける想定代謝経路



スピロテトラマト【P】

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。

II. 植物体内運命試験

4. 棉におけるスピロテトラマトの代謝（散布処理）

（資料No.運命12）

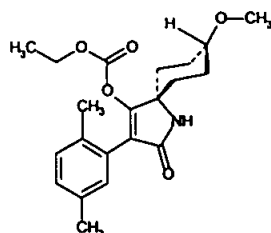
試験機関：

〔GLP 対応〕

報告書作成年：2006年

供試標識化合物：

構造式：



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

放射化学的純度： (HPLC 及び TLC)

*：標識位置

化学名：シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ
[4.5]デカ-3-エン-2-オン
(以下、標識体とする。)

【試験方法】

作物及び栽培方法：

ドイツBayer CropScience AG研究所のガラス温室で棉種子（品種：Cocker 315）を栽培ポット（容量 25L及び土壌面積 0.08m²）に1個/ポットの栽植密度で播種し、収穫（中間収穫及び成熟期収穫）まで栽培した。作物への給水は土壌に灌水して行い、必要に応じて施肥及び植物防疫剤を使用した。

試験区（実験区）の構成、薬剤処理及び試料採取

本試験では、通常量処理試験、ブリッジング試験及び過剰量処理試験の計3試験が行われた。

なお、過剰量処理試験は通常量処理区の試料の総残留放射能（TRR）が低くかつ代謝物の分離/同定が難しい場合に備えて行われたが、通常量処理試験での代謝物同定率が良好であったため、生データのみが記録された。

供試製剤として、十分に粉砕した 3-¹⁴C-標識体を製剤白試料と混合し、SC240（フロアブル）製剤を調製した。

通常量処理試験

計2回の散布処理が行われ、第1回及び第2回目の処理はそれぞれ第5本葉展開期及び綿花の50%開花時であった。

第1回目の処理では、メチル化菜種油を0.4%含む水で供試製剤 0.024mL（有効成分含有量 5.75mg）を総量 28mL まで希釈し、植物（棉）当たり散布液をおよそ 4mL 散布した。

第2回目の処理では、供試製剤 0.05mL（有効成分含有量 11.99mg）を誤ってメタノールで

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。

希釈した。このため、メタノール希釈液を 5mL まで濃縮後、メチル化菜種油を 0.4% 含む水で濃縮液を総量 180mL まで希釈し、植物（棉）当たり散布液をおよそ 30mL 散布した。

なお第 2 回散布溶液では、有効成分の 20% がエノール体【M1】に分解されていた。

第 1 回散布後第 19 日に、成熟前植物体として土壌から上の部位を刈り取り、裁断後に液体窒素流下で均質化した。また成熟期である最終（第 2 回）散布後第 39 日に、ボウル（円形の莢）、葉及び茎を棉植物から分離し、ボウルからリント（長繊維）及び棉毛除去種子を採取した。空のボウルを葉、萼、花卉及び茎と合わせて「棉残体」とし、液体窒素流下で均質化した。

ブリッジング試験

通常量処理試験において第 2 回散布処理溶液では約 20% の有効成分が分解したため、ブリッジング試験が行われた。

綿花の 50% 開花時にメチル化菜種油を 0.4% 含む水で供試製剤 0.017mL（有効成分含有量 4.17mg）を総量 60mL まで希釈し、植物（棉）当たり散布液をおよそ 30mL 散布した。

散布後第 1 日に、葉柄、ボウル及び茎を採取し、葉は裁断後に均質化させた。また散布後第 33 日に、通常量処理試験と同様にリント、棉毛除去種子及び棉残体を得た。

以下に試験構成を示す。

試験区	散布処理回数	設定処理量 (g 有効成分/ha)	処理時期	処理間隔	採取試料	採取日
通常量処理	計 2 回	96	第 5 本葉展開期	134 日	成熟前植物体	第 1 回散布後第 19 日
		216 (計 312)	綿花の 50% 開花時		・リント（長繊維）、 ・棉毛除去種子、 ・棉残体（葉、萼、花卉、茎及び空のボウル）	最終散布後第 39 日（成熟期）
ブリッジング試験	1 回	216	綿花の 50% 開花時	-	茎葉、綿花、葉柄	散布後第 1 日
					・リント（長繊維）、 ・棉毛除去種子、 ・棉残体（葉、萼、花卉、茎及び空のボウル）	散布後第 33 日（成熟期）
過剰量処理 (5 倍量処理)	計 2 回					

試料の抽出処理及び分画：

通常量処理試験及びブリッジング試験（成熟前植物体、リント、棉残体）（抽出スキーム：図 1）：

試料を Polytron ホモジナイザーにおいてアセトニトリル/水混合液（80:20 v/v）で 3 回抽出し、抽出液を吸引濾過した。固体物を風乾後に均質化した。抽出物を水性残渣となるまで濃縮し、この濃縮物をジクロロメタンで分配（200mL×3 回）し、有機相と水相を得た。

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

通常量処理試験及びブリッジング試験（棉毛除去種子）（抽出スキーム：図2）

通常抽出

通常量処理試験及びブリッジング試験の種子を窒素流下で均質化し、Polytron ホモジナイザーにおいてアセトニトリル/水混合液（80:20 v/v）で3回抽出し、抽出液を吸引濾過した。固体物1を風乾後に均質化した。抽出物を水性残渣となるまで濃縮し、この濃縮物をジクロロメタンで分配（200mL×3回）し、有機相1と水相1を得た。

過酷抽出（通常量処理試験）

固体物1に2N塩酸（300mL）による2時間の煮沸抽出を行い、抽出物をジクロロメタン（200mL×3回）で分配して有機相2と水相2を得た。更に2N塩酸抽出後に得た固体物2について、20%水酸化カリウム溶液（KOH、100mL）による3時間の煮沸抽出を行った。KOH抽出物には固形微粒子が含まれていたため、遠心分離により上澄み液と沈殿物1に分離した。上澄み液はジクロロメタン（150mL×3回）で分配して有機相3と水相3を得た。有機相3は沈殿物1のジクロロメタン抽出物と合わせ、RP18カラムで精製し、アセトニトリル/水洗浄液、アセトニトリル溶出液、酢酸エチル溶出液及びジクロロメタン/メタノール溶出液画分をそれぞれ得た。

また沈殿物1について、ジクロロメタン抽出後に更にアセトニトリル抽出及びメタノール抽出を行い、アセトニトリル抽出物及びメタノール抽出物を混合し、RP18カラムでの精製後にアセトニトリル/水洗浄液、アセトニトリル溶出液、酢酸エチル溶出液及びジクロロメタン/メタノール溶出液画分をそれぞれ得た。

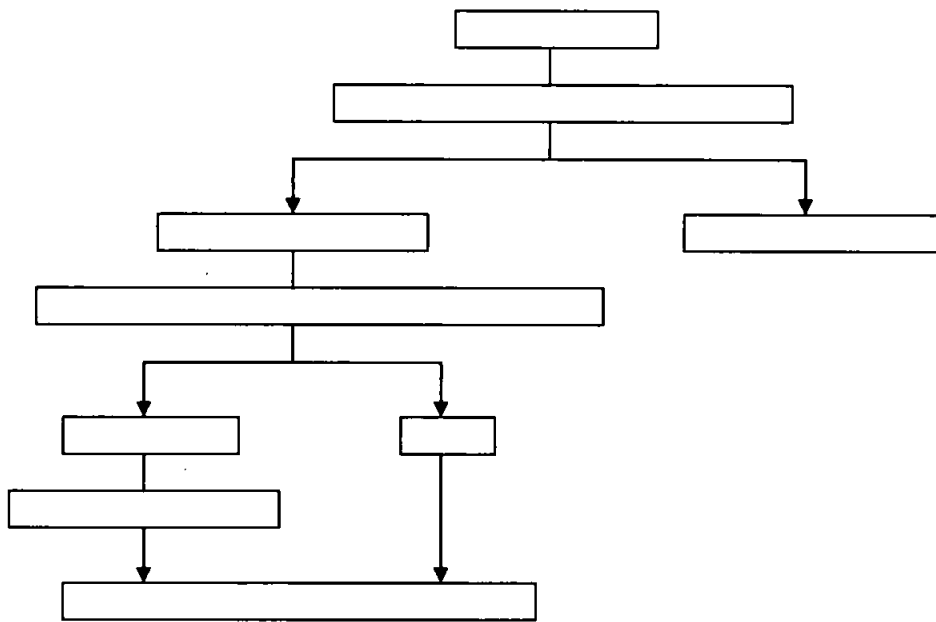
放射能測定、放射性成分の同定及び定量

液体試料中の放射エネルギーは液体シンチレーションカウンター（LSC）で、また、抽出後の固体試料中の放射エネルギーはオキシダイザーで燃焼後、生じた¹⁴C₂O₂を液体シンチレーションカウンターで測定した。放射性成分の定量及び分離は、放射能検出器付き逆相高速液体クロマトグラフィー（ラジオHPLC）及び放射能画像化薄層クロマトグラフィー（TLC）で行った。

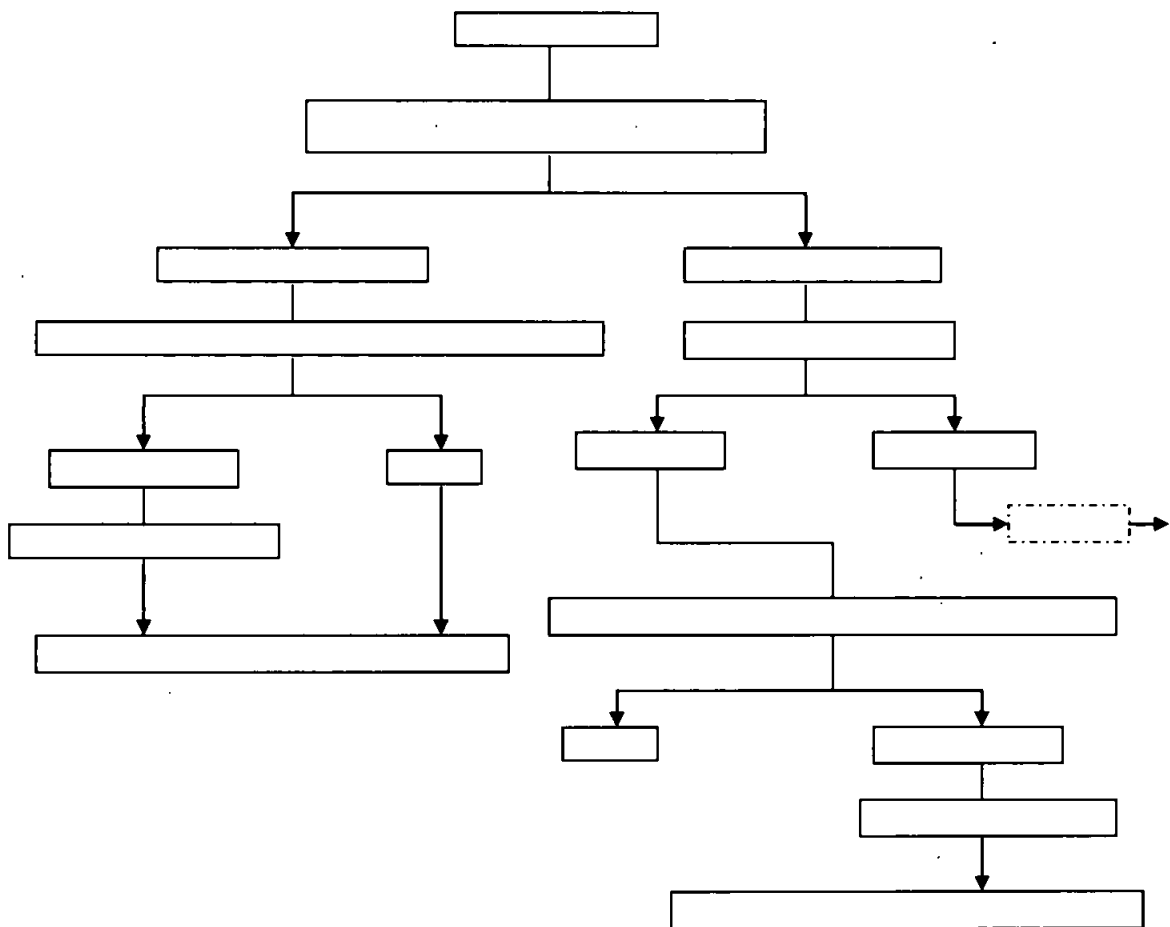
また代謝物の構造確認/同定は、認証済標準品とのTLCでのコクロマトグラフィー、質量分析計（MS）、核磁気共鳴（NMR）分析計、液体クロマトグラフィー/核磁気共鳴/質量分析計（LC-NMR-MS）で行い、またアグリコンの確認のため成熟前植物体、棉残体及びプリントの水相を酸及びアルカリ加水分解に供した。

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。

抽出スキーム 1 ()

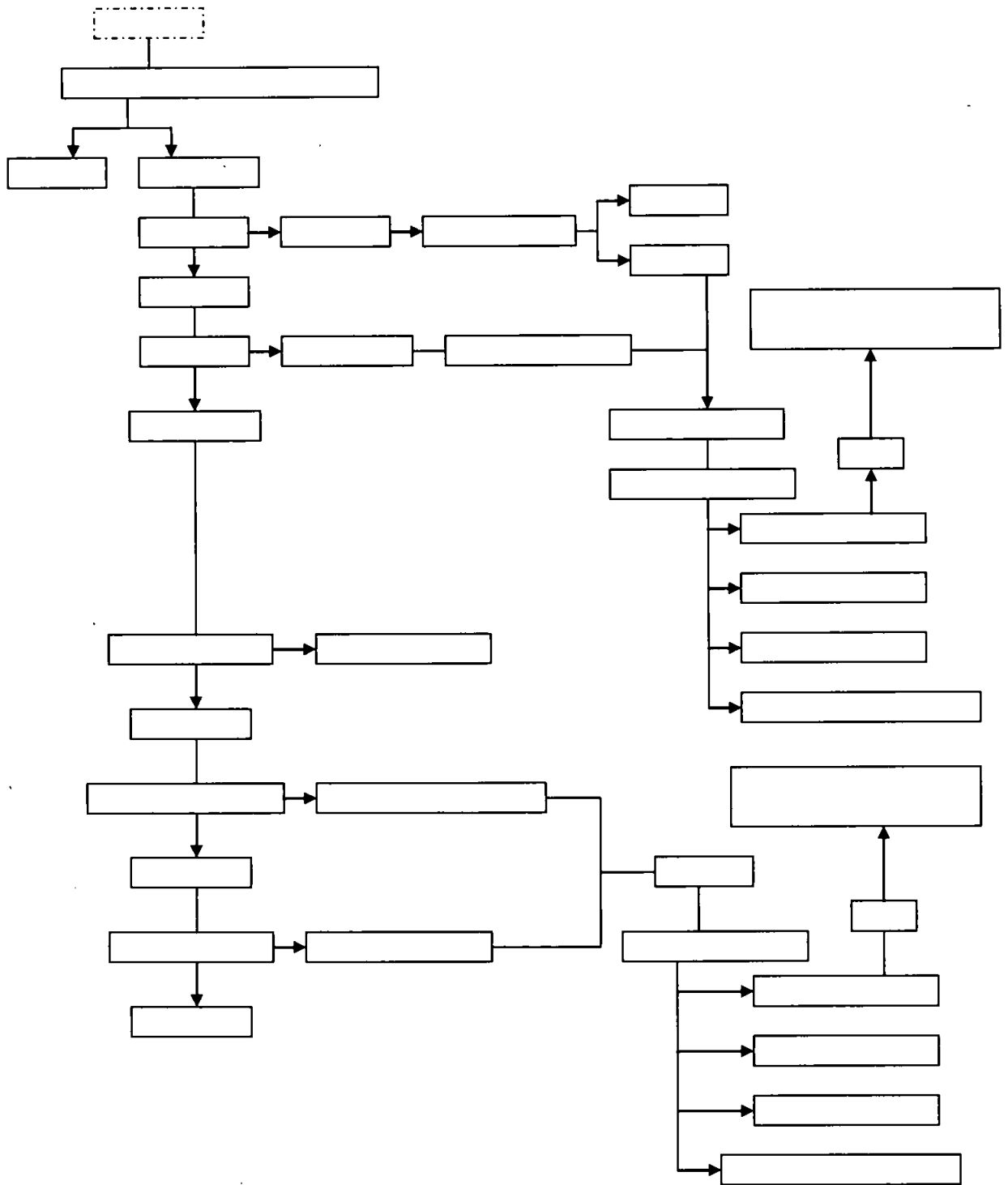


抽出スキーム 2 ()



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

抽出スキーム 2 ()



【試験結果】

通常量処理試験

総残留放射能及び放射能分布 (表 1) :

表 1 に通常量処理試験における各植物体の総残留放射能 (TRR) 及び放射能分布を示す。

第 1 回散布後第 19 日に採取した成熟前植物体では、2.381 mg 有効成分当量/kg (以下、mg eq./kg と記す) の TRR が認められ、その 84.1% (2.002 mg eq./kg) が抽出された。抽出放射能は主として有機相 (ジクロロメタン相) から回収された。

最終 (第 2 回) 散布後第 39 日の成熟期に採取した各植物部位 (棉残体、リント及び棉毛除去種子) では、0.119mg eq./kg (棉毛除去種子) ~1.614 mg eq./kg (棉残体) の TRR が認められた。植物部位間で抽出放射能に差が認められ、棉残体及びリントでは 88.6~92.5%TRR が抽出されたのに対し、棉毛除去種子では 36.1%TRR (0.043mg eq./kg) が抽出されたのみであった。また抽出放射能の分布も植物部位間で異なり、棉残体及びリントでは主として有機相から回収されたのに対し、棉毛除去種子では有機相及び水相からそれぞれ 15.9%TRR 及び 20.2%TRR とほぼ同等量が回収された。

棉毛除去種子の固体物 1 について塩酸次いで水酸化カリウムによる過酷抽出を行った結果、それぞれ 15.2%TRR (0.018mg eq./kg) 及び 29.1%TRR (0.034mg eq./kg) の放射能が放出され、結合型残留は 19.5%TRR (0.023mg eq./kg) であった。

表 1 : 各植物体の総残留放射能 (TRR)

	第 1 回散布後第 19 日		成熟期 : 最終 (第 2 回) 散布後第 39 日					
	成熟前植物体		棉残体		リント		棉毛除去種子	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
抽出物 (計)	84.1	2.002	88.6	1.430	92.5	0.997	36.1	0.043
有機相(DCM 相)	57.8	1.376	69.2	1.117	75.7	0.816	15.9	0.019
水 相	26.3	0.626	19.4	0.313	16.8	0.181	20.2	0.024
固体物 (固体物 1)	15.9	0.379	11.4	0.184	7.5	0.080	63.9	0.076
過酷抽出後							15.2	0.018
							29.1	0.034
							19.5	0.023
合計	100.0	2.381	100.0	1.614	100.0	1.077	100.0	0.119

DCM : ジクロロメタン、HCl : 塩酸、KOH : 水酸化カリウム

代謝物の分布 (表 2 及び表 3) :

表 2 に代謝物の合計生成量を、表 3 に有機相/水相/過酷抽出物への分布率をそれぞれ示す。

成熟前植物体

成熟前植物体では親化合物【P】が 46.94%TRR (1.1117 mg eq./kg) と最も多く認められ、その全量が有機相 (ジクロロメタン相) から回収された。親化合物【P】以外に 10%TRR 以上生成した代謝物は認められなかった。

親化合物【P】に量的に次ぐ代謝物として、

が

認められ、その生

成量は

であった。また

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。

も認められ、その生成量はそれぞれ
であった。

それぞれ は に認められ、その生成量は
であった。また

が認められたが、
であった。

棉残体

棉残体で認められた代謝物は成熟前植物体での代謝物と同一であった。

10%TRR 以上認められた主要代謝物として 親化合物【P】及び
エノール体【M1】が認められ、 された。こ
れら棉残体における主要代謝物の生成量は、
、19.78%TRR (0.319 mg eq./kg、親化合物【P】)
であった

の生成量は、それぞれ が認められた。

また、 であった。

生成量は 認められた。

であった。

リント

リントで認められた代謝物は成熟前植物体及び棉残体で認められた代謝物とほぼ同一であ
った。

主要代謝物として親化合物【P】 が
認められた。主要代謝物の生成量はそれぞれ 32.32%TRR (0.348 mg eq./kg、親化合物【P】)

であり、何れも から回収
された。

これら が挙げられ、その生成量は

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。

棉毛除去種子

10%TRR 以上生成した主要代謝物は
が認められた。なお

と考えられた。

認められた。

また

その生成量は

であった。

が認められ、

表 2：通常量処理試験における代謝物の生成量（合計）

	成熟前植物体		棉残体		リント		棉毛除去種子	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
スピロテトラマト【P】	46.94	1.1117	19.78	0.319	32.32	0.348	0.42	<0.001
その他特徴付け放射能（計）	8.8	0.210	9.4	0.152	14.8	0.160	13.9	0.017
	(a)		(b)		(c)		(d)	
未分析放射能	—	—	—	—	—	—	9.1(#)	0.011
結合型残留	15.9	0.379	11.4	0.184	7.5	0.080	19.5	0.023
合計	100.0	2.381	100.0	1.614	100.0	1.078	100.0	0.119

(#)：分配及び精製過程で得られた 4 種類の相

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：通常量処理試験における代謝物の分布率

代謝物	抽出画分		成熟前植物体		棉残体		リント		棉毛除去種子	
			%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
スピロテトラマト【P】	抽出物	有機相	46.94	1.1117	19.35	0.312	28.41	0.306	0.42	<0.001
		水相	—	—	0.43	0.007	3.92	0.042	—	—
その他の 特徴付け放射能（計）	抽出物	有機相	0.77 [0.57]	0.019 [0.014]	3.81 [1.61]	0.061 [0.026]	10.01 [2.71]	0.109 [0.029]	1.94 [1.27]	0.003 [0.002]
		水相	8.08 [6.31]	0.192 [0.150]	5.61 [0.97]	0.093 [0.016]	4.85 [0.48]	0.094 [0.008]	11.04 [9.44]	0.013 [0.011]
括弧[]内は個別成分 の最大値	過酷 抽出	KOH							0.63 [0.32]	<LOQ [<LOQ]
		HCl							2.54	0.003
未分析放射能（計）	過酷 抽出	KOH							6.58 [4.01]	0.008 [0.005]
			84.1	2.002	88.6	1.430	92.5	0.997	80.5	0.096

HCl：塩酸抽出画分、KOH：水酸化カリウム抽出画分、—：非検出

ブリッジング試験（表4及び表5）

表4に、ブリッジング試験における散布処理後第1日（散布処理翌日）に採取した棉試料（葉）での代謝物分布を示す。また表5に、通常量試験（最終処理後第39日）及びブリッジング試験（単回処理後第33日）で採取した棉残体での代謝物プロファイルを示す。

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。
 散布処理後第1日の葉における主要放射性成分は、親化合物【P】（60.3%TRR、3.241 mg eq./kg）、
 であり、およそ40%の親化合物【P】が処理後1日以内に代謝されていた。

表4：ブリッジング試験での散布処理後第1日の葉における代謝物分布

		通常量試験（棉残体）		
		最終処理後第39日		
		有機相	水相	合計
スピロテトラマト【P】	%TRR	60.3	非検出	60.3
	mg/kg	3.241	非検出	3.241
合計	%TRR	93.6	4.2	97.6
	mg/kg	5.034	0.228	5.262

また、通常量試験（最終処理後第33日）及びブリッジング試験（単回処理後第33日）で採取した棉残体での代謝物プロファイルと比較した結果、通常量試験およびブリッジング試験とも同一代謝物が認められた。なお親化合物【P】の存在量がブリッジング試験で43.56%TRR（0.798 mg eq./kg）であり、通常量試験での存在量（19.78%TRR、0.319 mg eq./kg）と比して高かった。この親化合物の存在量の差は、約1週間の収穫前日数の差（通常量処理試験：収穫39日前、ブリッジング試験：収穫33日前）に起因すると考えられた。

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

表 5 : 通常量試験及びブリッジング試験での棉残体における代謝物プロフィールの比較

	通常量試験 (棉残体)		ブリッジング試験 (棉残体)	
	最終処理後第 39 日		処理後第 33 日	
	%TRR	mg/kg	%TRR	mg/kg
スピロテトラマト【P】	19.78	0.319	43.56	0.798
同定放射性成分 (計)	79.2	1.278	87.1	1.596
その他特徴付け放射能 (計)	9.4	0.152	4.9	0.089
結合型残留	15.9	0.379	11.4	0.184
合計	100.0	2.381	100.0	1.614

代謝経路

以上の結果から、棉における親化合物スピロテトラマト【P】の代謝経路は次のとおり考えられた。

親化合物【P】の

が形成され、

となった。また

が考えられた。なお
も考えられた。

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

以下に本試験結果を要約する。

スピロテトラマト【P】を棉（品種：Cocker 315）に 96g 有効成分/ha（第1回散布、第5本葉展開期）次いで 216g 有効成分/ha（第2回散布、綿花の50%開花時）の処理量で計2回の散布処理が行われた。第1回散布後19日に成熟前植物体を採取し、最終散布後39日の成熟期に棉試料（リント、棉毛除去種子、棉残体）の収穫が行われた。

成熟前植物体の総残留放射能（TRR）は 2.381mg eq./kg であり、成熟期の棉試料（リント、棉毛除去種子、棉残体）の TRR はそれぞれ 1.077mg eq./kg（リント）、1.614mg eq./kg（棉残体）及び 0.119mg eq./kg（棉毛除去種子）であった。

成熟前植物体における主要代謝物は未変化の親化合物スピロテトラマト【P】であり、TRR の 46.94%TRR（1.1117mg eq./kg）を占めた。その他に認められた代謝物の生成量は何れも 10%TRR 未満であった。

成熟期の棉毛除去種子において、未変化の親化合物スピロテトラマト【P】は 0.42%TRR（<0.001mg/kg）と極微量であった。主要代謝物は

認められた。

家畜の飼料となりうる棉残体では、10%TRR 以上生成した主要代謝物として、未変化の親化合物スピロテトラマト【P】（19.78%TRR（0.319mg/kg）

が認められ、
認められた。

これらの代謝物以外に、

が認められたが、その生成量は であった。

リントにおいて 10%TRR 以上生成した代謝物は、未変化の親化合物スピロテトラマト【P】（32.32%TRR、0.348 mg eq./kg）

であった。また、

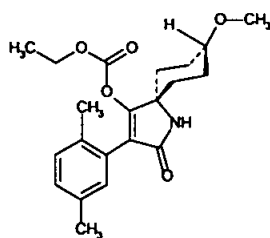
がそれぞれ認められ、

であった。

次頁に棉における想定代謝経路を示す。

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。

棉における想定代謝経路



スピロテトラマト [P]

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。

II. 植物体内運命試験

5. 植物(りんご果実)の従属栄養細胞培養液における代謝 (*in vitro* 試験)

(資料No.運命13)

試験機関:

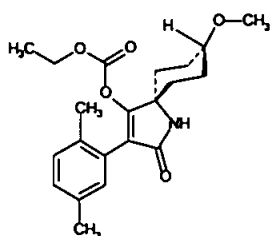
[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

申請者注:

供試標識化合物:

構造式:



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

放射化学的純度: (HPLC 及び TLC)

*: 標識位置

化学名: シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ
[4.5]デカ-3-エン-2-オン

(以下、 標識体とする。)

【試験方法】

供試植物細胞培養液:

本試験ではりんご果実(品種 Boskop)の従属栄養細胞培養液を使用した。改良 Murashige & Skoog 培地を用いた細胞培養液はドイツ Bayer CropScience AG 研究所において長期間にわたって維持され、その細胞株は安定であると特徴付けられている。

本試験に用いた細胞浮遊培養液は、暗所及び25℃条件下で40mLの栄養培地を含む200mL用三角フラスコにて生長させた。1週間毎に接種材料として6mL細胞懸濁液/40mL培養液を新鮮な培地に移した。

処 理:

非標識体で希釈した標識体をアセトンに溶解し、50 μM 処理溶液を調製した。この処理溶液を懸濁細胞に直接処理した(747 $\mu\text{g}/40\text{mL}$ 細胞懸濁液、細胞培養液中の有機溶媒濃度0.25%未満)。

細胞への処理時期は一定増殖速度期の開始時(新鮮な栄養培地への細胞接種後約3日)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。

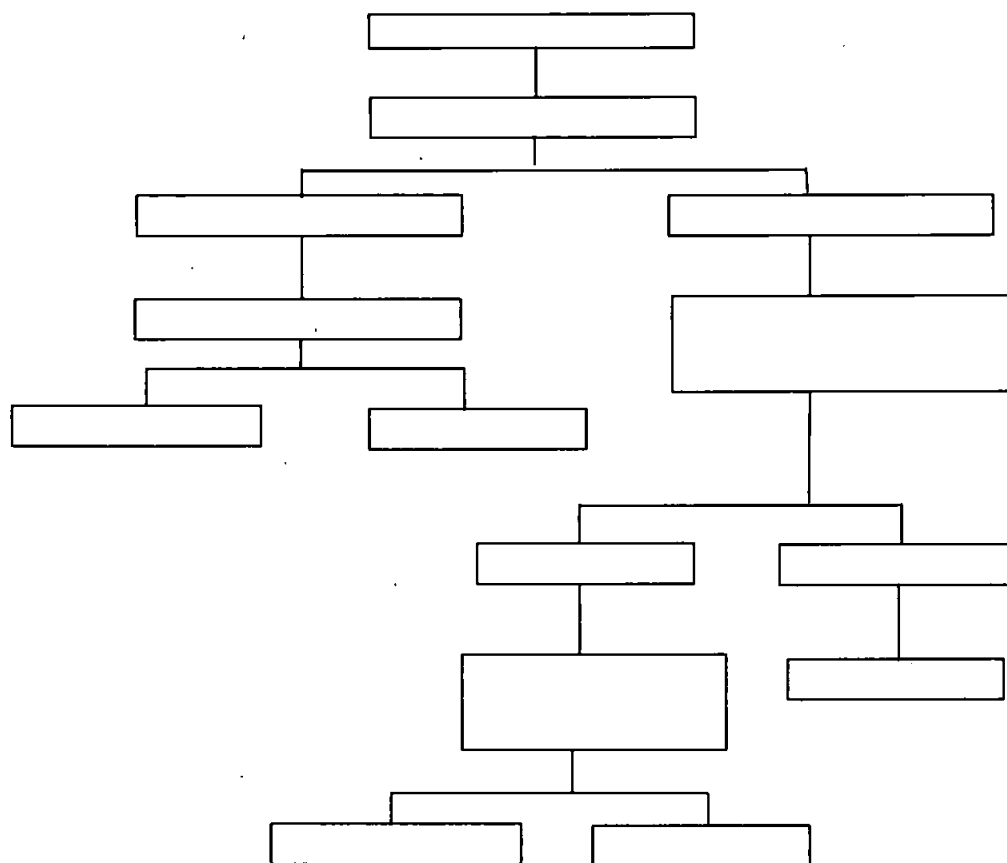
あり、被験物質の処理後は $25 \pm 2^\circ\text{C}$ の回転攪拌機 (120rpm) で攪拌する通常の生長条件下で培養した。

試料採取、分画及び抽出：

処理後第7日に全試料を採取し、直ちに濾過により植物細胞と培養液を分離した。細胞表面の可溶性放射能を除去するため細胞を水で洗浄し、洗浄液を培養液と合わせた。液体試料は濃縮後にアセトニトリルまたはアセトニトリル/水混合液に再溶解させた。

植物細胞はアセトニトリル/水混合液 (80 : 20 v/v) による抽出を連続して3回行い、抽出物を水性残渣となるまで濃縮した。その後、水性残渣を1.5倍量の酢酸エチルで3回分配し、酢酸エチル相 (有機相) と水相に分割した。酢酸エチル相はほぼ乾固するまで濃縮させた後、アセトニトリル 27mL に溶解させた。抽出後の繊維残渣は室温で乾燥させた。

培養液も植物細胞の抽出物と同様に処理を行い、酢酸エチル相 (有機相) と水相を得た。



放射能測定、放射性成分の同定及び定量

液体試料中の放射エネルギーは液体シンチレーションカウンター (LSC) で測定し、固体試料中の放射エネルギーはオキシダイザーで燃焼後、生じた $^{14}\text{CO}_2$ を液体シンチレーションカウンターで測定した。

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。

培養液から得た酢酸エチル相及び細胞から得た水相を放射能検出器付き高速液体クロマトグラフィー（ラジオ HPLC）にかけ、主要画分を収集し、高速液体クロマトグラフィー/質量分析計（HPLC/MS）、HPLC/MS/MS 及び核磁気共鳴分光計により構造を同定した。また、培養液及び細胞から得た酢酸エチル相及び水相のラジオ HPLC クロマトグラムを比較した。

【試験結果】

放射能分布及び総残留放射能（表 1）：

表 1 に放射能分布及び放射能回収率を示す。

7 日間の培養後、約 56% の処理放射能が培養液中に存在し、細胞抽出物中の放射能は約 43% であった。

表 1：放射能分布及び放射能回収率

		回収放射能	
		%	mg
培養液	酢酸エチル相	32.3	5.29
	水相	24.0	3.92
	小計	56.3	9.21
細胞抽出物	酢酸エチル相	26.2	4.30
	水相	17.2	2.80
	小計	43.4	7.10
固体（繊維残渣）		0.3	0.06
合計		100.0	16.37

代謝物の同定：

培養液：

酢酸エチル相：代謝物として

の存在が確認され、構造が同定された。

水相：代謝物として、

の存在が確認され、構造が同定された。

細胞抽出物：

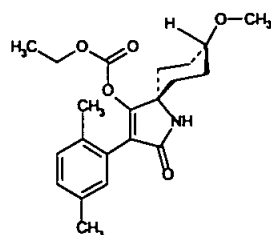
酢酸エチル相から、

の存在が確認され、構造が同定された。

培養液と細胞抽出物の代謝物プロファイルを比較した結果、細胞抽出物中に新たな代謝物は認められなかった。

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

以下に *in vitro* 条件下における植物（りんご果実）細胞での推定代謝経路を示す。



スピロトラマト【P】

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。

III. 土壌中運命試験

1. 好氣的土壌中運命試験

(資料No.運命14)

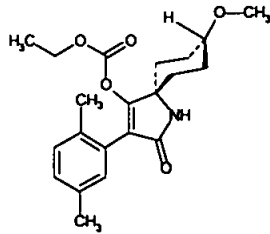
試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2006 年

供試標識化合物:

構造式:



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

放射化学的純度: % (HPLC 及び TLC)

*: 標識位置

化学名: シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン
(以下、 標識体とする。)

標識位置選定理由:

【供試土壌】

本試験では、次に示す米国土壌 1 種類及びドイツ土壌 3 種類が用いられた。

米国土壌 (試験土壌名: Molino) は土壌中での分解物 (分解経路) 及び分解速度の測定を目的として行われ、ドイツ土壌 3 種類は土壌中での分解物 (分解経路) 測定のみを目的としていた。

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。

供試土壌

土壌採取国		米国	ドイツ	ドイツ	ドイツ
土壌採取地		フロリダ	Monheim	Monheim	Burscheid
試験土壌名		Molino	Laacherhof AXXa	Laacherhof AIII	Hoefchen am Hohenseh 4a
土性	USDA 区分	砂壤土	砂壤土	シルト質壤土	シルト
	砂 (2000~50 μ m)	77.3%	72.4%	36.9%	8.5%
	シルト (<50~2 μ m)	12.7%	22.6%	51.1%	81.3%
	粘土 (<2 μ m)	10.0%	5.0%	12.0%	10.2%
有機炭素含有率		0.93%	1.02%	0.83%	2.11%
陽イオン交換容量 (meq/100 g 乾土)		6	8	8	15
pH	H ₂ O	6.1	7.2	7.4	7.6
	CaCl ₂	5.4	6.3	6.5	6.7
	KCl	測定せず	6.4	測定せず	7.0
最大容水量 (WHC _{max} , g/100g 乾土)		—	34.4	36.4	63.1
1/3bar での WHC (1/3 bar WHC, g/100g 乾土)		18.4	29.1	20.7	35.6
試験での土壌水分 (設定値)		1/3barWHC の 75%	WHC _{max} の 50%	WHC _{max} の 50%	WHC _{max} の 50%
微生物 バイオマス (mg microbial C/kg 乾土)	試験開始時 (DAT-0)	180	312	213	1341
	DAT-59	118	261	202	730
	DAT-119	77	—	—	—

— : 該当無し。DAT : 試験開始 (処理) 後経過日数。

【試験方法】

土壌の調製

地表層 (0~20cm 深) から各供試土壌を採取し、粒径 2mm の篩に通した。Nn

試験系の調製、試験温度及び培養期間

各供試土壌 100g (乾土重) を 300mL 容三角フラスコに秤取り、試験での土壌水分となるように脱イオン水を添加した。

標識体をアセトニトリルに溶解して処理溶液を調製し、下表の土壌中濃度となるようにエッペンドルフピペットで土壌表面に滴下した。各フラスコを緩やかに振とうして被験物質を土壌に混和し、有機溶剤を蒸散させた。

処理量

供試土壌	米国土壌	ドイツ土壌		
	Molino	Laacherhof AXXa	Laacherhof AIII	Hoefchen am Hohenseh 4a
圃場施用量 (g 有効成分/ha)	288	288	288	288
土壌中濃度 (μ g 有効成分/kg 乾土)	128	768	768	768
均一に分布したと仮定した土壌深	15cm	2.5cm	2.5cm	2.5cm

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

処理後第0日採取用のフラスコを除き、各三角フラスコにソーダ石灰 (CO₂捕集用) 及びポリウレタンフォーム栓 (揮発性有機物質捕集用) で構成された捕集器を接続し、20±1℃及び暗所のインキュベーションチャンバ内で所定期間 (米国土壤は最長360日間、ドイツ土壤 (3種類) は最長50日間) にわたって好氣的培養した。また土壤水分を維持するため、試料採取時点毎またはおよそ1ヶ月間隔毎に脱イオン水を添加した。

また土壤微生物バイオマス測定用として、被験物質を同処理量で処理した各供試土壤及び無処理供試土壤を同試験条件で培養した。土壤微生物バイオマス用土壤の採取及び測定は、米国土壤で処理後第0日、第59日、第136日及び第360日に行い、ドイツ土壤 (3種類) は処理後第0日及び第59日に行った。

試料採取 (分解経路及び分解率)

下表に示す試料採取時点において、試料 (土壤、揮発性物質トラップ: ソーダ石灰及びポリウレタンフォーム栓) を採取した。

インキュベーション期間及び試料採取時点 (表中の数値は採取試料数)

供試土壤	米国土壤		ドイツ土壤	
	Molino	Laacherhof AXXa	Laacherhof AIII	Hoefchen am Hohenseh 4a
処理後経過時間\試験目的	分解経路及び速度	分解速度	分解速度	分解速度
0日 (処理直後、1分)	2	2	2	2
0.25日 (6時間)	2	1	1	1
3日	2	1	1	1
7日	2	1	1	1
14日	2	1	1	1
30日	2	1	1	1
50日	2	1	1	1
86日	2	/	/	/
126日	2			
179日	2			
270日	2			
360日	2			

土壤試料及び揮発性物質トラップの抽出処理 (図1: 抽出スキーム)

全採取土壤試料について次の抽出処理を行った。

- ・通常抽出: 室温にて土壤を80mLのアセトニトリル/水混合液 (1/1 v/v、0.5%ギ酸含有、pH 約2.5) で3回攪拌抽出 (攪拌時間: 各30分間) し、遠心分離後に上澄み液を濾過した。各抽出の上澄み液を合わせ、放射能測定及び濃縮後の分析に供した。
- ・追加抽出: 通常抽出後の土壤試料に、80mLのアセトニトリル/1N塩酸混合液 (1/1 v/v、pH 1、2回) による攪拌抽出 (攪拌時間: 各30分間) を行い、それぞれ遠心分離後に上澄み液を濾過した。各抽出の上澄み液を合わせ、放射能測定及び濃縮後の分析に供した。

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。

揮発性物質トラップのうち、揮発性有機物質捕集用のポリウレタンフォーム栓には 50mL の酢酸エチルによる抽出を行った。ソーダ石灰に捕集された放射性二酸化炭素は 18%塩酸で遊離させ、液体シンチレーションカクテルに捕集した。

土壌結合型残留の特徴付け (図 2: 特徴付けスキーム)

追加抽出後の土壌について、土壌結合型残留のヒューミン画分、腐植酸画分及びフルボ酸画分への特徴付けを行った。風乾及び粉碎した追加抽出後の土壌 25g に 50mL の 0.5M 水酸化ナトリウム (NaOH) を加え、24 時間の攪拌抽出を行い、ヒューミン画分 (土壌残渣) と抽出物を得た。5M 塩酸で pH 1 に調整した抽出物を冷蔵庫で一夜保管し、沈殿物を生成させた。遠心分離で取り除いた沈殿物を 5M 塩酸で洗浄し、洗浄後の沈殿物を 0.5M 水酸化ナトリウムに溶解させて腐植酸画分とした。抽出物の遠心分離の上澄み液及び沈殿物の洗浄液を合わせ、フルボ酸画分とした。

土壌結合型残留の特徴付けは、各供試土壌で最高値またはそれに次ぐ値を示した時点の試料について行った。

試料中放射能の測定

液体試料中放射能の測定は液体シンチレーションカウンター (LSC) で行った。固形試料は粉碎後にオキサダイザーで燃焼させ、生成した放射性二酸化炭素を液体シンチレーションカクテルに捕集し、放射能を LSC で測定した。

分解物の定量、同定及び特徴付け

通常抽出物及び追加抽出 (強酸抽出) 物の各濃縮物を、それぞれ別個に放射能検出器付き逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

代謝物の同定及び特徴付けは、まず逆相 HPLC 及び薄層クロマトグラフィー (TLC) において認証済標準品とのコクロマトグラフィーで行い、次いで液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (LC-MS、エレクトロスプレーイオン化) 及び核磁気共鳴分光法 (NMR) により確認した。

放射性二酸化炭素 ($^{14}\text{CO}_2$) の同定は、18%塩酸で遊離させた $^{14}\text{CO}_2$ をバリウムイオンで炭酸バリウムとして沈殿させて確認した。

代謝物の単離

代謝物の単離のため、二種類の土壌 (米国土壌 Molino 及びドイツ土壌 Hoefchen am Hohenseh) に 5 倍量进行处理した。上述の培養条件における約 3 ヶ月の培養後、通常抽出及び追加抽出 (強酸抽出) を行い、放射能検出器付き逆相 HPLC で分析した。

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：抽出スキーム

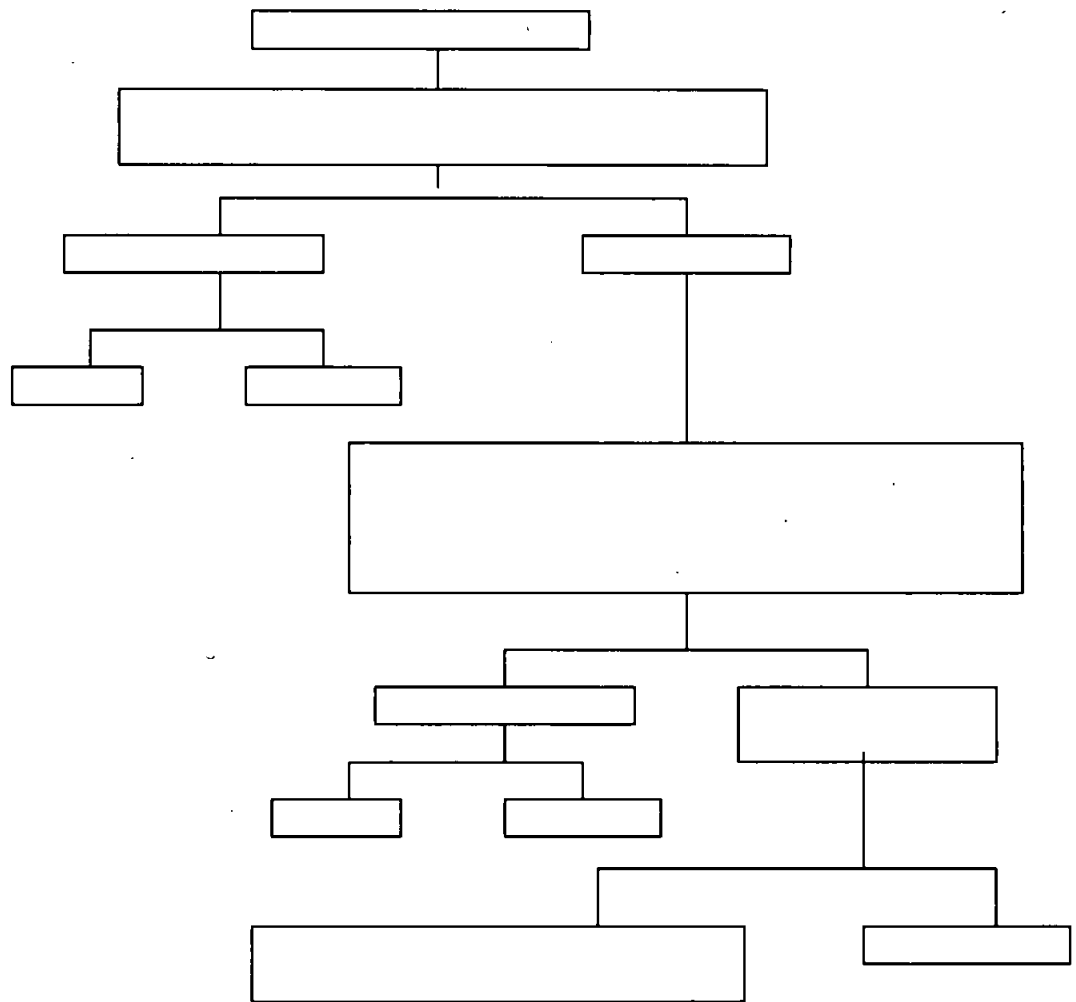
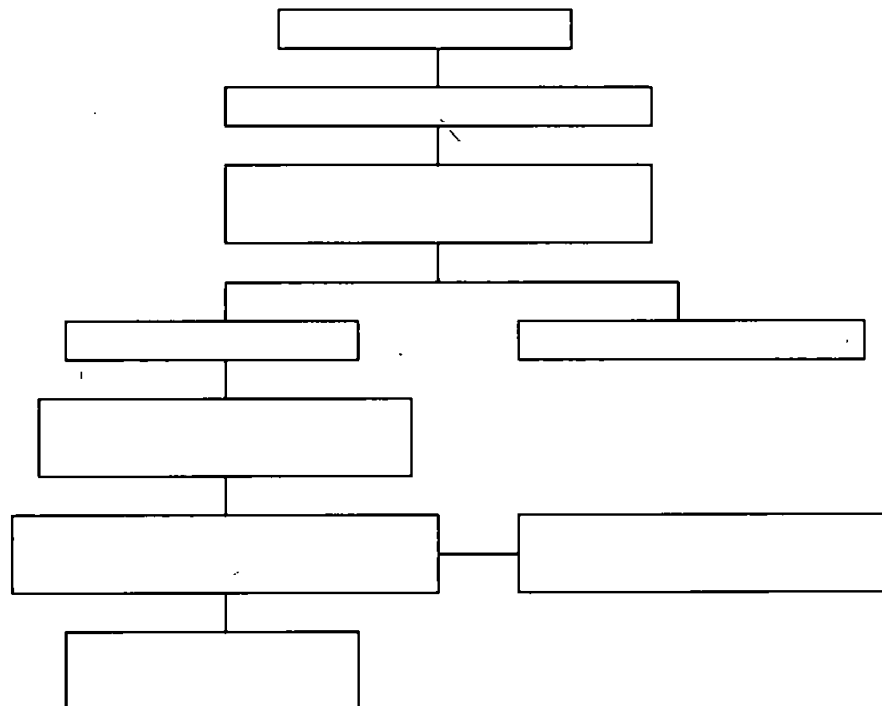


図2：土壌結合型残渣の特徴付け



【試験結果】

物質収支（表 1 及び表 2）

物質収支を表 1（米国土壌 1 種類）及び表 2（ドイツ土壌 3 種類）を示す。

米国土壌（砂壤土、表 1）

試験（培養）期間を通じて物質収支は良好であり、試験期間（360 日間）を通じた物質収支は処理放射能（AR）に対して 96.6%AR であった。

培養開始後は経時的な揮発性放射能の増加が認められ、培養開始後第 86 日には最高値 15.7%AR を示し、その大部分は放射性二酸化炭素（¹⁴CO₂）であった。揮発性放射能（放射性二酸化炭素）はその後培養終了（第 360 日）まで 12.1~15.4%AR の水準で認められた。

通常抽出及び追加抽出の合計である抽出放射能は、処理直後（第 0 日）の 97.7%AR から処理後 6 時間（第 0.25 日）及び第 1 日の 80.3%AR 及び 63.0%AR へと減少し、第 360 日の抽出放射能は 51.8%AR となった。通常抽出による放射能回収は、第 0 日の 94.2%AR から第 0.25 日（6 時間後）及び第 1 日での 68.1%AR 及び 40.1%AR へと急激に減少し、以降は増減が認められたが経時的に減少した。追加抽出による放射能回収は第 1 日及び第 3 日にそれぞれ 22.8%AR 及び 25.7%AR となり、以降は同水準で推移した。

土壌結合型残留は培養開始後から急速に増加し、第 3 日に最高値 35.2%AR を示した後は 27.0~33.0%AR の範囲で推移した。

表 1：米国土壌における物質収支（表中の数値は処理放射能に対する%、n=2 の平均値）

土壌	画分	培養期間（処理後経過日数、日）													
		0	0.25	1	3	7	14	30	50	86	126	179	270	360	
米国土壌 Molino 砂壤土	揮発性放射能	¹⁴ CO ₂	N.D.	0.5	1.7	3.7	5.9	7.6	8.4	9.7	15.5	12.1	15.4	14.8	15.3
		揮発性物質	N.D.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
		計	N.D.	0.5	1.7	3.7	5.9	7.6	8.4	9.7	15.7	12.1	15.4	14.8	15.3
	抽出放射能	通常抽出	94.2	68.1	40.1	30.0	30.4	27.1	33.1	31.1	30.6	31.9	28.9	29.5	26.0
		追加抽出	3.5	12.2	22.8	25.7	25.8	24.8	24.3	24.6	24.3	26.6	24.0	25.7	25.9
		計	97.7	80.3	63.0	55.7	56.2	51.9	57.5	55.6	54.9	58.5	52.8	55.1	51.8
	結合型残留	0.4	19.7	31.8	35.2	33.0	30.5	31.5	30.3	29.9	27.6	27.8	27.2	27.0	
	物質収支	98.1	100.5	96.5	94.6	95.1	90.1	97.4	95.6	100.4	98.2	96.0	97.1	94.2	
	物質収支	試験期間を通じた平均：96.6													

N.D.：測定せず。

ドイツ土壤（砂壤土、シルト質壤土及シルト、表 2）

3 土壤とも試験（培養）期間を通じて物質収支は良好であり、試験期間（50 日間）を通じた物質収支はそれぞれ 93.1%AR（砂壤土）、95.8%AR（シルト質壤土）及び 96.9%AR（シルト）であった。

米国土壤と同様に、ドイツ 3 土壤において培養開始後の経時的な揮発性放射能の増加が認められ、培養終了時（第 50 日）に何れも最高値が認められた。3 土壤とも揮発性放射能は放射性二酸化炭素で構成され、培養終了時（第 50 日）における放射性二酸化炭素の生成量は、それぞれ 12.2%AR（砂壤土）、15.4%AR（シルト質壤土）及び 19.4%（シルト）であった。

通常抽出及び追加抽出の合計である抽出放射能は、3 土壤とも処理直後（第 0 日）に 94.4%AR（シルト質壤土）～98.2%AR（シルト）であり、処理後 6 時間（第 0.25 日）に 65.8%AR（シルト）～81.1%AR（砂壤土）へと急速に減少した。また通常抽出のみによる放射能回収も処理後 6 時間（第 0.25 日）及び第 1 日に急速に減少したのに対し、追加抽出による放射能回収の増加が認められた。

3 土壤での土壤結合型残留は培養開始後 6 時間（第 0.25 日）または第 1 日以内に急速に増加し、以降の値はほぼ定常状態で推移した。土壤結合型残留の最高値は、砂壤土、シルト質壤土及びシルトでそれぞれ 27.9%AR（砂壤土、第 30 日）、21.5%AR（シルト質壤土、第 50 日）及び 34.5%（シルト、第 3 日）であった。

表 2：ドイツ 3 土壤における物質収支（表中の数値は処理放射能に対する%）

土壤	画分	培養期間（処理後経過日数、日）									
		0	0.25	1	3	7	14	30	50		
ドイツ Laacherhof AXXa 砂壤土	揮発性放射能	¹⁴ CO ₂	N.D.	0.3	1.8	3.1	6.3	8.3	10.0	12.2	
		揮発性物質	N.D.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	
		計	N.D.	0.3	1.8	3.1	6.3	8.3	10.0	12.2	
	抽出放射能	通常抽出	93.1	62.1	53.8	55.7	50.0	43.6	42.5	44.2	
		追加抽出	2.9	8.0	11.9	12.0	12.4	9.5	12.1	12.7	
		計	96.0	70.1	65.7	67.7	62.3	53.1	54.6	56.9	
	結合型残留		0.1	16.4	27.2	25.4	26.2	24.3	27.9	25.5	
	物質収支		96.2	86.8	97.8	96.1	94.8	85.7	92.5	94.7	
	物質収支		試験期間を通じた平均：93.1								
	ドイツ Laacherhof AIII シルト質壤土	揮発性放射能	¹⁴ CO ₂	N.D.	0.2	1.5	3.0	2.1	6.9	10.7	15.4
揮発性物質			N.D.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	
計			N.D.	0.2	1.5	3.0	2.1	6.9	10.7	15.4	
抽出放射能		通常抽出	91.8	72.8	61.1	60.7	63.6	57.8	55.0	49.1	
		追加抽出	2.6	8.2	10.9	12.5	10.9	11.1	11.3	13.6	
		計	94.4	81.1	71.9	73.2	74.6	68.9	66.3	62.7	
結合型残留		0.1	14.1	21.3	21.0	19.0	17.4	20.6	21.5		
物質収支		94.5	95.4	94.7	97.1	95.7	93.2	97.6	99.6		
物質収支（試験期間）		試験期間を通じた平均：95.8									

注：第 0 日の値は n=2 の平均値、その他の時点の値は n=1 の値。N.D.：測定せず。

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。

表 2 (続き) : ドイツ 3 土壌における物質収支 (表中の数値は処理放射能に対する%)

土壌	面分		培養期間 (処理後経過日数、日)							
			0	0.25	1	3	7	14	30	50
ドイツ	揮発性放射能	¹⁴ CO ₂	N.D.	0.3	1.3	3.2	4.8	11.4	13.3	19.4
		揮発性物質	N.D.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
		計	N.D.	0.3	1.3	3.2	4.8	11.4	13.3	19.4
Hoefchen am Hohenseh	抽出放射能	通常抽出	94.8	49.6	48.7	39.2	41.4	27.7	30.3	28.4
		追加抽出	3.5	16.3	15.1	18.7	19.9	18.3	18.7	18.8
		計	98.2	65.8	63.8	57.9	61.3	46.1	49.1	47.2
シルト	結合型残留		0.3	32.3	30.9	34.5	32.8	33.8	34.6	31.0
	物質収支		98.5	98.4	96.0	95.6	99.0	91.2	97.0	97.6
	物質収支		試験期間を通じた平均 : 96.9							

注 : 第 0 日の値は n=2 の平均値、その他の時点の値は n=1 の値。N.D : 測定せず。

分解物の同定

分解物として、親化合物スピロテトラマト【P】

が同定された。

分解物の生成量 (表 3 及び表 4)

分解物の生成量を表 3 (米国土壌 1 種類) 及び表 4 (ドイツ土壌 3 種類) を示す。

米国土壌 (砂壤土、表 3)

米国土壌 (砂壤土) において親化合物スピロテトラマト【P】は急速に分解され、培養開始後第 1 日には 15.3%AR となった。

処理放射能 (AR) に対して 10% 以上生成した主要分解物として、
が認められた。

の最高生成量はそれぞれ

であり、試験 (培養) 終

了時点 (第 360 日) にはそれぞれ

となった。また、放射性二酸化炭素も主要分解物で

あった。

その他の分解物として、

が認められた。これらの分解物のうち

と最も高く、他の分解物の最高生成量は

であった。

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

表 3 : 米国土壤 (Molino, 砂壤土) における分解物の生成量

(表中の数値は処理放射能に対する%、n=2の平均値)

放射性成分	培養期間 (処理後経過日数、日)												
	0	0.25	1	3	7	14	30	50	86	126	179	270	360
親化合物【P】	96.1	52.2	15.3	7.0	6.5	4.5	5.1	4.0	3.7	2.9	3.5	3.2	3.5
抽出放射能 (計)	97.7	80.3	63.0	55.7	56.2	51.9	57.5	55.6	54.9	58.5	52.8	55.1	51.8
¹⁴ CO ₂	N.D.	0.5	1.7	3.7	5.9	7.6	8.4	9.7	15.5	12.1	15.4	14.8	15.3
揮発性有機物質		—	—	—	—	—	—	—	0.1	—	—	—	—
結合型残留	0.4	19.7	31.8	35.2	33.0	30.5	31.5	30.3	29.9	27.6	27.8	27.2	27.0
回収率	98.1	100.5	96.5	94.6	95.1	90.1	97.4	95.6	100.4	98.2	96.0	97.1	94.2

— : 検出されず。N.D. : 測定せず。(#) : 18成分/時点(最多)で構成され、単一成分の最大値は4.0%AR。

ドイツ土壤 (砂壤土、シルト質壤土及シルト、表 4)

米国土壤 (砂壤土) と同様に、3種類のドイツ土壤における親化合物スピロテトラマト【P】の分解は急速であり、培養開始後第1日には10%AR未滿となった。

3土壤に共通して処理放射能に対して10%以上生成した主要分解物は、
であった。また放射性二酸化炭素も主要分解物として認められた。

3土壤における

であった。

なおシルト質壤土では、培養開始後第7日に の生成量が となった。また他の2土壤 (砂壤土及びシルト) でも

であり、 と比較して高かった。

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。

表4：ドイツ3土壤における分解物の生成量

(表中の数値は処理放射能に対する%、第0日はn=2の平均値であり、他の時点はn=1の値。)

土壤	画分	培養期間 (処理後経過日数、日)							
		0	0.25	1	3	7	14	30	50
ドイツ Laacherhof AXXa 砂壤土	親化合物【P】	91.8	38.3	8.3	3.1	3.5	2.6	2.2	2.5
	抽出放射能 (計)	96.0	70.1	65.7	67.7	62.3	53.1	54.6	56.9
	¹⁴ CO ₂	N.D.	0.3	1.8	3.1	6.3	8.3	10.0	12.2
	揮発性有機物質	N.D.	—	—	—	—	—	—	—
	結合型残留	0.1	16.4	27.2	25.4	26.2	24.3	27.9	25.5
	回収率	96.2	86.8	94.8	96.1	94.8	85.7	92.5	94.7
ドイツ Laacherhof AIII シルト質 壤土	親化合物【P】	91.6	41.2	8.9	3.4	3.5	2.8	3.0	3.4
	抽出放射能 (計)	94.4	81.1	71.9	73.2	74.6	68.9	66.3	62.7
	¹⁴ CO ₂	N.D.	0.2	1.5	3.0	2.1	6.9	10.7	15.4
	揮発性有機物質	N.D.	—	—	—	—	—	—	—
	結合型残留	0.1	14.1	21.3	21.0	19.0	17.4	20.6	21.5
	回収率	94.5	95.4	94.7	97.1	95.7	93.2	97.6	99.6
ドイツ Hoefchen am Hohenseh シルト	親化合物【P】	93.2	11.6	5.8	1.9	3.7	2.0	2.1	2.6
	抽出放射能 (計)	98.2	65.8	63.8	57.9	61.3	46.1	49.1	47.2
	¹⁴ CO ₂	N.D.	0.3	1.3	3.2	4.8	11.4	13.3	19.4
	揮発性有機物質	N.D.	—	—	—	—	—	—	—
	結合型残留	0.3	32.3	30.9	34.5	32.8	33.8	34.6	31.0
	回収率	98.5	98.4	96.0	95.6	99.0	91.2	97.0	97.6

注：第0日の値はn=2の平均値、その他の時点の値はn=1の値。—：検出されず。N.D：測定せず。

土壌結合型残留の特徴付け (表 5)

米国土壌 (砂壤土) 及びドイツ土壌 (砂壤土、シルト質壤土及びシルト) ともフルボ酸画分に最も多くの分布が認められ、次いでドイツ土壌のシルト質壤土以外の土壌では腐植酸画分に放射能分布が認められた。

表 5: 土壌結合型残留の特徴付け (表中の数値は処理放射能に対する%)

土壌	米国土壌		ドイツ	
	Molino (砂壤土)	Laacherhof AXXa (砂壤土)	Laacherhof AIII (シルト質壤土)	Hoefchen am Hohenseh 4a (シルト)
採取時点	第 7 日	第 30 日	第 60 日	第 3 日
土壌結合型残留 (*)	32.4	27.0	20.9	33.8
腐植酸画分	13.5	9.7	3.9	11.2
フルボ酸画分	16.7	12.9	12.8	16.0
ヒューミン画分	5.6	5.0	4.2	8.6

(*) : 抽出時の濾紙への残留を除くため、表 1 及び表 2 の該当時点の値と異なる。

分解速度 (表 6)

米国土壌 (砂壤土) 及びドイツ 3 土壌 (砂壤土、シルト質壤土及びシルト) における好氣的条件下の親化合物スピロテトラマト【P】の分解は速やかであり、DT₅₀値は 0.083~0.327daysであった。

表 6: 好氣的土壌における分解速度 (一次速度式に基づく)

	米国土壌		ドイツ土壌	
	砂壤土	砂壤土	シルト質壤土	シルト
速度定数 k (1/day)	2.12	3.30	2.99	8.32
DT ₅₀ (days)	0.327	0.210	0.232	0.083
DT ₉₀ (days)	1.090	0.697	0.770	0.277
相関係数R ²	0.974	0.991	0.989	0.991

分解経路

以上の結果から、好氣的土壌におけるスピロテトラマト【P】の分解経路は次のとおり考えられた。

- ・ 好氣的土壌において、スピロテトラマト【P】は
へと分解された。
- ・ 主分解経路として、
へと変換された。
最終的に二酸化炭素まで分解された。
- ・ 副分解経路として、

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。

が形成された。

・ これらの分解物は鉱化を受け、土壌結合型残留及び二酸化炭素へと至る。

以上の結果を要約する。

スピロテトラマト【P】は4種類の好氣的土壌（米国：砂壤土、ドイツ：砂壤土、シルト質壤土及びシルト）において急速に分解し、供試土壌におけるDT₅₀値は 0.083 日（2.0 時間）～0.327 日（7.8 時間）であった。

各供試土壌において、経時的な揮発性放射能の増加が認められた。

培養期間が 360 日間の米国土壌では、揮発性放射能は培養開始後第 86 日に最高値 15.7%AR を示し、その大部分は放射性二酸化炭素（15.5%AR）であった。揮発性放射能（放射性二酸化炭素）はその後培養終了（第 360 日）まで 12.1～15.4%AR の水準で認められた。また培養期間が 50 日間であったドイツ 3 土壌では、揮発性放射能は培養終了時点でそれぞれ最高値 12.2%AR（砂壤土）～19.4%（シルト）を示し、何れの土壌でも放射性二酸化炭素で構成されていた。

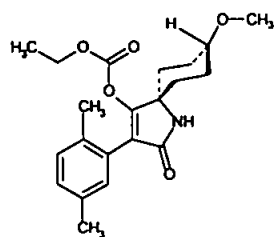
また各土壌とも、培養開始直後から急速な土壌結合型残留の形成が認められ、培養開始後第 1 日～3 日にかけて土壌結合型残留の最高値が認められた。

4 種類の好氣的土壌を通じて、主要分解物は
であった。

次頁に好氣的土壌中分解経路を示す。

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。

好氣的土壤中分解経路（想定）



スピロテトラマト【P】

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。

III. 土壌中運命試験

2. 主要土壌中分解物

の好氣的土壌中運命試験

(資料No.運命15)

試験機関：Bayer CropScience AG (ドイツ)

[GLP 対応]

報告書作成年：2006 年

供試標識化合物：

次の 2 種類の標識体を使用した。

標識体名	標識	標識
構造式		
化学名		
比放射能	$\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (MBq/mg)	$\mu\text{Ci}/\text{mg}$ (MBq/mg)
放射化学的純度 (HPLC)	%	%

【供試土壌】

本試験では、次に示す米国土壌 1 種類及びドイツ土壌 3 種類を使用した。

土壌採取国		米国	ドイツ	ドイツ	ドイツ
土壌採取地		フロリダ	Monheim	Monheim	Burscheid
試験土壌名		Molino	LH AXXa	LH AIII	Hoefchen
土性	USDA 区分	砂壤土	砂壤土	シルト質壤土	シルト
	砂 (2000~50 μm)	77.3%	72.4%	36.9%	8.5%
	シルト (<50~2 μm)	12.7%	22.6%	51.1%	81.3%
	粘土 (<2 μm)	10.0%	5.0%	12.0%	10.2%
有機炭素含有量 (%)		0.93	1.02	0.83	2.11
陽イオン交換容量 (meq/100 g 乾土)		6	8	8	15
pH	H ₂ O	6.1	7.2	7.4	7.6
	CaCl ₂	5.4	6.3	6.5	6.7
	KCl	—	6.4	—	7.0
pF 2.5 での WHC (g/100g 乾土)		18.4	29.1	20.7	35.6
最大容水量 (WHC _{max} , g/100g 乾土)		—	34.4	36.4	63.1
pF 2.5 での WHC (pF 2.5 WHC, g/100g 乾土)		18.4	29.1	20.7	35.6
試験での土壌水分 (設定値)		pF2.5 WHC の 75%	WHC _{max} の 50%	WHC _{max} の 50%	WHC _{max} の 50%
微生物バイオマス (mg microbial C/kg 乾土)					
DAT-21	無処理	103	627	363	1012
DAT 4	無処理	118	613	226	1001
DAT 62	無処理	88	478	159	686
	溶媒処理	78	422	184	712
DAT 119	無処理	55	366	123	572
	溶媒処理	55	374	77	565

—：該当無し。DAT：試験開始 (処理) 後経過日数。

【試験方法】

土壌の調製

地表層（0～20cm 深）から各供試土壌を採取し、粒径 2mm の篩に通した。被験物質の処理まで 20±1℃で試験での設定土壌水分の半分となるよう培養した。

処理量の設定根拠及び試験土壌中濃度

被験物質の処理量は、圃場施用量（288 g 有効成分/ha）で処理された親化合物スピロテトラマト【P】の に変換され、ドイツ土壌では土壌深 0～2.5cm に均一に分布すると仮定して設定した。また米国土壌では、同様に土壌深 0～15cm に分布すると仮定し、更に分析感度に基づく係数 2.5 を乗じた濃度を試験土壌中濃度とした。

供試土壌	米国土壌		ドイツ土壌					
	Molino (砂壤土)		LH AXXa (砂壤土)		LH AIII (シルト質壤土)		Hoefchen (シルト)	
標識体								
均一に分布すると仮定した土壌深 (cm)	15	15	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
仮定土壌中濃度 (mg 被験物質/kg)	0.051	0.051	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31
係数 (分析感度に基づく)	2.5	2.5	1	1	1	1	1	1
試験土壌中濃度 (mg 被験物質/kg)	0.13	0.13	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31	0.31

試験系の調製、試験温度及び培養期間

各供試土壌 100g (乾土重) を 300mL 容三角フラスコに秤取り、試験での土壌水分量となるように脱イオン水を添加した。

2 種類の標識体をそれぞれ別個にメタノールに溶解し、次いで 0.01M 炭酸水素ナトリウム溶液を加えて処理溶液を調製した。各標識体の処理溶液をエッペンドルフピペットで土壌表面に滴下し、各フラスコ緩やかに振とうして被験物質を土壌に混和させた。

処理後第 0 日採取用のフラスコを除き、各三角フラスコにソーダ石灰 (CO₂ 捕集用) 及びポリウレタンフォーム栓 (揮発性有機物質捕集用) で構成された捕集器を接続し、20±1℃及び暗所のインキュベーションチャンバ内で最長 119 日間にわたって好氣的培養した。また土壌水分を維持するため、脱イオン水を適時添加した。

また土壌微生物バイオマス測定用として、被験物質を同処理量で処理した各供試土壌及び無処理供試土壌を同試験条件で培養した。

試料採取

下表に示す試料採取時点において、試料 (土壌、揮発性物質トラップ: ソーダ石灰及びポリウレタンフォーム栓) を採取した。

インキュベーション期間及び試料採取時点（表中の数値は採取試料数）

供試土壌		米国土壌		ドイツ土壌					
		Molino (砂壤土)		LH AXXa (砂壤土)		LH AIII (シルト質壤土)		Hoefchen (シルト)	
標識									
処理後経過日数 (DAT)	予備試料	2	2	2	2	2	2	2	2
	0日 (処理直後)	1	2	1	2	1	2	1	2
	0.25日 (6時間)	1	1	1	1	1	1	1	1
	1日	1	1	1	1	1	1	1	1
	4日	1	1	1	1	1	1	1	1
	7日	1	1	1	1	1	1	1	1
	14日	1	1	1	1	1	1	1	1
	32日	1	1	1	1	1	1	1	1
	60日	1	1	1	1	1	1	1	1
	90日	1	1	1	1	1	1	1	1
	119日	1	1	1	1	1	1	1	1

土壌試料及び揮発性物質トラップの抽出処理（ ）

全採取土壌試料について次の抽出処理を行った。また次頁に抽出スキームを示す。

- ・ アルカリ性水抽出：室温にて土壌を 80mL の水 (0.025%アンモニアを含有) で 1 回攪拌抽出 (攪拌時間：30 分) し、遠心分離後にアルカリ性水抽出物を得た。アルカリ性水抽出物の pH は 7~8.5 の範囲にあった。
- ・ 通常抽出：アルカリ性水抽出後の土壌試料を室温にて 80mL のアセトニトリル/水混合液 (1/1 v/v, 0.1%の塩化アンモニウム及び 0.06%のアンモニアを含有、pH 約 8.5) で 3 回攪拌抽出 (攪拌時間：30 分間) し、それぞれ遠心分離後に上澄み液を濾過して合わせた。
- ・ 追加抽出：通常抽出後の土壌試料に、80mL のアセトニトリル/1N 塩酸混合液 (1/1 v/v, 0.1%の塩化アンモニウム及び 0.06%のアンモニアを含有、pH 約 8.5) で 70°C 及び 10 分間での超音波抽出を行った。室温まで冷却後、遠心分離により上澄み液を得た。

土壌結合型残留の特徴付け（ ）

追加抽出後の土壌について、過剰量のアルカリ処理により土壌結合型残留のヒューミン画分、腐植酸画分及びフルボ酸画分への特徴付けを行った。

風乾及び粉碎した追加抽出後の土壌 25g に 50mL の 0.5M 水酸化ナトリウム (NaOH) を加えて 24 時間の攪拌抽出を行い、ヒューミン画分 (土壌残渣) と抽出物を得た。5M 塩酸で pH 1 に調整した抽出物を冷蔵庫で一夜保管し、沈殿物を生成させた。遠心分離で取り除いた沈殿物を 5M 塩酸で洗浄し、洗浄後の沈殿物を 0.5M 水酸化ナトリウムに溶解させて腐植酸画分とした。抽出物の遠心分離後の上澄み液及び沈殿物の洗浄液を合わせ、フルボ酸画分とした。

各土壌の土壌結合型残留の特徴付けは、次に示す時点 (処理後経過日数) の試料で行った。

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。

各土壌の土壌結合型残留の特徴付け

土壌	採取時点 (処理後経過日数)
米国土壌 Molino (砂壤土)	第 119 日 (標識) 及び第 119 日 (標識)
ドイツ土壌 LH AXXa (砂壤土)	第 14 日 (標識) 及び第 30 日 (標識)
ドイツ土壌 LH AIII (シルト質壤土)	第 60 日 (標識) 及び第 60 日 (標識)
ドイツ土壌 Hoefchen (シルト)	第 0 日 (標識) 及び第 30 日 (標識)

試料中放射能の測定

液体試料中放射能の測定は液体シンチレーションカウンター (LSC) で行った。固形試料は粉碎後にオキサダイザーで燃焼させ、生成した放射性二酸化炭素を液体シンチレーションカクテルに捕集し、放射能を LSC で測定した。

分解物の定量、同定及び特徴付け

通常抽出物及び追加抽出物は濃縮し、アルカリ性水抽出物は濃縮せずにそれぞれ放射能検出器付き逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分析した。

代謝物の同定及び特徴付けは、まず逆相 HPLC 及び薄層クロマトグラフィー (TLC) において認証済標準品とのコクロマトグラフィーで行い、次いで液体クロマトグラフィー/マススペクトロメトリー (LC-MS、エレクトロスプレーイオン化) 及び核磁気共鳴分光法 (NMR) により確認した。

放射性二酸化炭素 ($^{14}\text{CO}_2$) の同定は、18%塩酸で遊離させた $^{14}\text{CO}_2$ をバリウムイオンで炭酸バリウムとして沈殿させて確認した。

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。

図 1 :

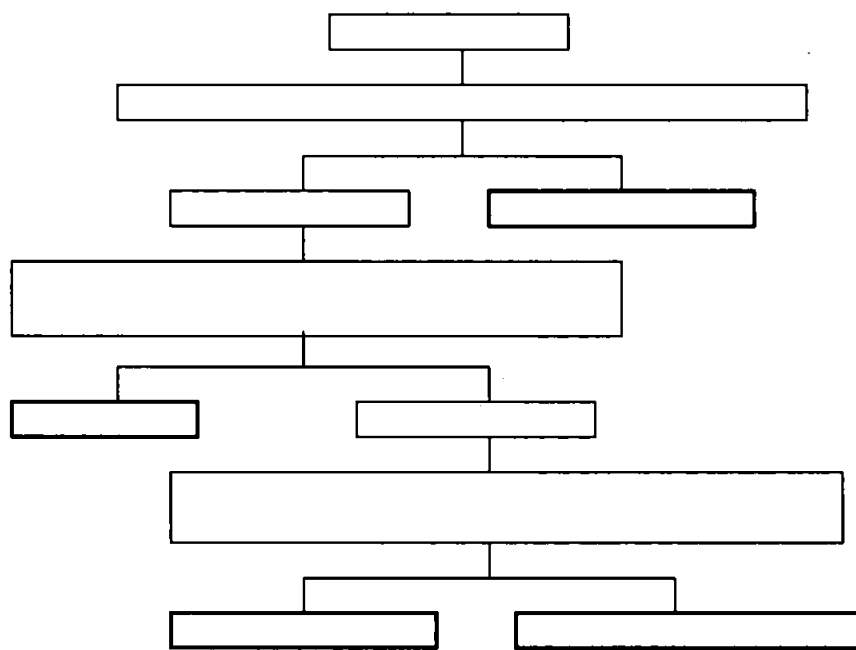
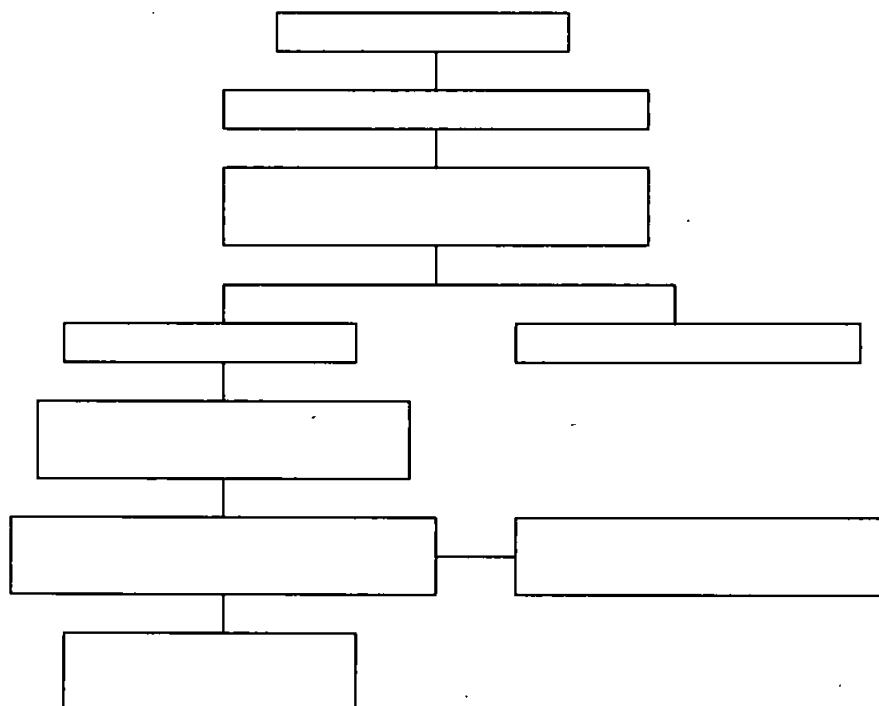


図 2 :



【試験結果】

物質収支 (表 1～表 4)

米国土壤 Molino (砂壤土)、ドイツ土壤 LHAXXa (砂壤土)、ドイツ土壤 LHAIII (シルト質壤土) 及びドイツ土壤 Hoefchen (シルト) における物質収支をそれぞれ表 1～表 4 に示す。

得られた物質収支は、土壤及び標識体 (標識位置) の違いに係わらず培養期間を通じて良好であった。各土壤及び各標識体処理において、経時的な放射性二酸化炭素 ($^{14}\text{CO}_2$) 発生量の増加が培養終了 (処理後第 119 日) まで認められ、放射性二酸化炭素以外の揮発性有機物質の発生は認められなかった。

処理直後 (第 0 日) の各土壤及び標識体処理において、土壤から抽出された放射能は米国土壤 (Molino: 砂壤土) 及びドイツ土壤 (LHAIII: シルト質壤土) で 90%AR 以上であり、対して他のドイツ土壤 (LHAXXa: 砂壤土及び Hoefchen: シルト) では約 76～77%AR であった。各土壤及び標識体処理とも抽出放射能は処理後第 0.25～1 日にかけて急速に低下し、試験終了時 (処理後第 119 日) の抽出放射能は処理放射能 (AR) に対して 25%AR 未満となった。

また各土壤及び各標識体処理とも、速やかかつ顕著な土壤結合型残留の形成が培養開始当日に認められた。ドイツ土壤 (LHAIII: シルト質壤土) を除く全土壤において、土壤結合型残留は処理後第 1 日に最高値またはその近辺の値となり、処理後第 119 日まで最高値近辺の水準で推移した。ドイツ土壤 (LHAIII: シルト質壤土) では、処理後第 60 日に最高値 (46.6～58.3%AR) となり、以降は他の土壤と同様に最高値近辺の水準で推移した。

表 1: 米国土壤 Molino (砂壤土) における物質収支 (表中の数値は処理放射能に対する%, n=1)

		標識	処理後経過日数 (日)									
			0	0.25	1	4	7	14	32	60	90	119
揮発性放射能	$^{14}\text{CO}_2$		n.a.	0.5	1.0	1.9	2.8	4.2	7.5	10.9	14.0	16.7
			n.a.	1.5	3.3	6.1	7.9	11.2	17.1	20.1	24.8	28.2
	有機物質		n.a.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
			n.a.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	計		n.a.	0.5	1.0	1.9	2.8	4.2	7.6	10.9	14.0	16.7
			n.a.	1.5	3.3	6.1	7.9	11.2	17.1	20.1	24.8	28.2
抽出放射能	アルカリ性水抽出物		55.9	11.9	9.1	8.2	9.5	6.3	5.8	5.7	4.5	3.5
			63.1	12.9	10.6	8.0	7.0	6.8	5.2	5.0	3.8	3.0
	通常抽出物		34.1	26.9	26.4	25.5	26.0	23.5	23.5	18.8	19.4	17.7
			34.4	25.7	27.5	25.7	25.8	24.2	21.0	16.9	16.3	13.1
	追加抽出物		1.9	11.5	10.6	10.3	10.2	10.1	7.5	7.1	13.2	3.5
			2.2	10.0	11.6	10.5	11.0	10.0	8.1	6.3	13.1	4.2
計		92.0	50.3	46.1	44.0	45.7	39.9	36.8	31.5	37.2	24.7	
		99.7	48.6	49.8	44.2	43.7	41.0	34.3	28.2	33.2	20.3	
土壤結合型残留			9.3	48.5	50.7	50.2	48.4	52.6	52.4	52.7	45.2	55.3
			8.7	50.5	50.3	50.3	46.9	49.6	49.4	49.8	42.7	52.3
物質収支			101.3	99.4	97.8	96.1	96.9	96.6	96.8	95.1	96.3	96.8
			108.4	100.6	103.5	100.6	98.5	101.8	100.8	98.1	100.7	100.8
	平均		104.8	100.0	100.6	98.3	97.7	99.2	98.8	96.6	98.5	98.8

注) n.a.: 分析せず。

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。

表2：ドイツ土壤 LHAXXa (砂壤土)における物質収支 (表中の数値は処理放射能に対する%、n=1)

		標識	処理後経過日数 (日)									
			0	0.25	1	4	7	14	32	60	90	119
揮発性放射能	¹⁴ CO ₂		n.a.	0.4	1.0	2.4	3.7	5.5	10.2	13.4	16.8	19.0
			n.a.	1.3	3.5	8.2	12.3	17.4	23.4	26.5	31.1	32.5
	有機物質		n.a.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
			n.a.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	計		n.a.	0.4	1.0	2.4	3.7	5.5	10.2	13.4	16.8	19.0
			n.a.	1.3	3.5	8.2	12.3	17.4	23.4	26.5	31.1	32.5
抽出放射能	アルカリ性水抽出物		38.7	8.0	6.5	5.4	4.9	3.7	2.7	2.1	1.8	1.5
			40.8	9.2	8.4	6.8	5.4	3.7	2.7	1.9	1.8	1.4
	通常抽出物		29.4	31.9	31.8	30.4	29.7	26.4	24.2	22.4	21.7	18.8
			31.7	32.0	31.2	28.2	26.2	21.8	19.0	17.1	15.7	14.4
	追加抽出物		7.8	8.8	10.6	10.1	10.4	8.8	7.0	6.4	12.4	2.6
			5.1	9.0	9.8	8.7	9.6	9.0	6.2	5.8	9.8	2.7
	計		76.0	48.8	48.9	46.0	44.9	38.9	33.9	30.9	35.9	22.9
			77.6	50.2	49.4	43.8	41.1	34.5	27.9	24.9	27.3	18.5
土壤結合型残留			28.4	49.7	50.2	46.2	51.1	52.9	54.7	44.9	36.3	54.3
			23.6	47.6	48.5	51.6	44.0	51.1	47.6	38.9	40.8	45.5
物質収支			104.4	98.8	100.1	94.6	99.8	97.3	98.8	89.2	88.9	96.2
			101.2	99.1	101.3	103.6	97.5	103.1	98.9	90.3	99.2	96.5
		平均	102.8	99.0	100.7	99.1	98.6	100.2	98.9	89.8	94.1	96.3

注) n.a.: 分析せず。

表3：ドイツ土壤 LH AIII (シルト質壤土)における物質収支 (表中の数値は処理放射能に対する%、n=1)

		標識	処理後経過日数 (日)									
			0	0.25	1	4	7	14	32	60	90	119
揮発性放射能	¹⁴ CO ₂		n.a.	0.2	0.8	2.1	2.9	6.0	11.6	19.2	23.4	27.8
			n.a.	0.3	2.3	5.8	9.1	16.0	25.8	34.9	40.3	43.0
	有機物質		n.a.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
			n.a.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	計		n.a.	0.2	0.8	2.1	2.9	6.0	11.6	19.2	23.4	27.8
			n.a.	0.3	2.3	5.8	9.1	16.0	25.8	34.9	40.3	43.0
抽出放射能	アルカリ性水抽出物		64.5	35.5	18.5	14.3	12.7	10.4	6.3	3.7	3.1	2.2
			61.0	37.0	19.5	15.1	13.1	11.1	6.3	4.1	2.7	2.2
	通常抽出物		37.4	31.2	29.8	27.1	27.1	21.5	16.9	12.9	11.3	8.5
			37.4	31.2	28.0	24.9	23.2	18.3	13.4	9.3	7.3	6.0
	追加抽出物		1.3	5.3	9.3	7.4	7.6	7.1	6.1	4.8	7.0	2.0
			1.1	5.1	8.3	8.4	6.9	6.8	4.9	3.5	4.6	1.7
	計		103.2	72.0	57.6	48.8	47.3	38.9	29.3	21.4	21.4	12.8
			99.6	73.3	55.8	48.4	43.2	36.2	24.5	16.9	14.6	9.9
土壤結合型残留			4.2	27.9	43.4	49.6	50.4	56.3	57.8	58.3	53.3	57.0
			4.4	26.1	40.9	44.2	45.7	45.0	46.5	46.6	43.1	44.8
物質収支			107.4	100.2	101.9	100.6	100.6	101.2	98.7	98.9	98.1	97.5
			103.9	99.7	99.1	98.4	98.0	97.2	96.8	98.4	98.0	97.7
		平均	105.6	99.9	100.5	99.5	99.3	99.2	97.8	98.7	98.0	97.7

注) n.a.: 分析せず。

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。

表 4 : ドイツ土壤 Hoefchen (シルト) における物質収支 (表中の数値は処理放射能に対する%、n=1)

		標識	処理後経過日数 (日)									
			0	0.25	1	4	7	14	32	60	90	119
揮発性放射能	¹⁴ CO ₂		n.a.	0.3	1.3	3.8	5.7	8.6	12.6	17.2	20.3	22.0
			n.a.	1.5	5.3	12.4	17.1	8.6(#)	27.2	31.9	35.2	36.9
	有機物質		n.a.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
			n.a.	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
	計		n.a.	0.3	1.3	3.8	5.7	8.6	12.6	17.2	20.3	22.0
			n.a.	1.5	5.3	12.4	17.1	8.6(#)	27.2	31.9	35.2	36.9
抽出放射能	アルカリ性水抽出物		40.0	7.9	5.8	4.7	3.6	2.5	1.6	1.3	1.0	0.9
			41.0	8.8	7.0	4.8	3.7	2.5	1.6	1.1	0.9	0.9
	通常抽出物		31.5	22.7	23.4	19.5	17.0	14.9	13.5	11.2	10.0	8.6
			30.1	23.6	22.7	17.5	13.8	11.8	10.1	7.7	6.6	6.3
	追加抽出物		5.7	8.2	10.8	9.6	8.7	7.2	5.8	4.7	8.7	2.3
			4.9	7.9	9.4	7.8	7.2	5.4	5.4	3.9	6.4	2.0
	計		77.1	38.8	40.0	33.8	29.3	24.6	20.9	17.1	19.8	11.8
			76.0	40.3	39.1	30.1	24.8	19.7	17.1	12.7	13.9	9.2
土壤結合型残留			25.6	59.6	57.9	60.1	60.9	59.3	63.0	62.0	44.8	62.5
			23.8	54.5	53.3	52.7	53.7	56.7	52.5	51.1	41.3	51.0
物質収支			102.7	98.8	99.2	97.7	95.9	92.6	96.5	96.3	84.8	96.3
			99.8	96.3	97.7	95.1	95.5	76.4(#)	96.7	95.8	90.4	97.1
		平均 (*)	101.2	97.6	98.5	96.4	95.7	92.6	96.6	96.0	87.6	96.7

注) n.a. : 分析せず。(#): 試験容器から放射能漏れが認められ、数値が低下した。また物質収支の平均値の算出に使用しなかった。

分解物の同定

分解物の生成量 (表 5~表 8)

米国土壤 Molino (砂壤土)、ドイツ土壤 LHAXXa (砂壤土)、ドイツ土壤 LH AIII (シルト質壤土) 及びドイツ土壤 Hoefchen (シルト) における分解物生成量をそれぞれ表 5~表 8 に示す。

供試 4 土壤において、被験物質は 2 相性の消失パターンを示して減衰した。第 1 相の消失として、処理された被験物質が処理後 1 日 (第 1 日) 以内に消失し、また第 2 相の消失では緩やかに消失した。

処理放射能 (AR) に対して 10%AR 以上生成した分解物は、4 土壤ともであった。

微量分解物であるの最高生成量はどれもドイツ土壤 LH AIII (シルト質壤土) のに認められ、それぞれであった。またの最高生成量は、それぞれドイツ土壤 LHAXXa (砂壤土) においてであった。

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

は同定されたのみであり、定量は不可能であった。

表 5 : 米国土壤 Molino (砂壤土) における分解物生成量

被験物質及び分解物	処理後経過日数 (DAT, 日)									
	標識及び		標識の平均値 (処理放射能ARに対する%)							
	0	0.25	1	4	7	14	32	60	90	119
未同定放射能 (*)	標識又は		標識の個別値 (処理放射能ARに対する%)							
抽出放射能	標識又は		標識の個別値 (処理放射能ARに対する%)							

表 6 : ドイツ土壤 LHAXXa (砂壤土) における分解物生成量

被験物質及び分解物	処理後経過日数 (DAT, 日)									
	標識及び		標識の平均値 (処理放射能ARに対する%)							
	0	0.25	1	4	7	14	32	60	90	119
未同定放射能 (*)	標識又は		標識エノール体の個別値 (処理放射能に対する%)							
抽出放射能	標識又は		標識エノール体の個別値 (処理放射能に対する%)							

表 7 : ドイツ土壤 LH AIII (シルト質壤土) における分解物生成量

被験物質及び分解物	処理後経過日数 (DAT, 日)									
	標識及び		標識の平均値 (処理放射能ARに対する%)							
	0	0.25	1	4	7	14	32	60	90	119
未同定放射能 (*)	標識又は		標識の個別値 (処理放射能に対する%)							
抽出放射能	標識又は		標識エノール体の個別値 (処理放射能に対する%)							

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。

表 8 : ドイツ土壤 Hoefchen (シルト) における分解物生成量

被験物質及び分解物	処理後経過日数 (DAT, 日)									
	標識及び		標識		の平均値 (処理放射能ARに対する%)					
	0	0.25	1	4	7	14	32	60	90	119
未同定放射能 (*)	標識又は		標識		の個別値 (処理放射能に対する%)					
抽出放射能	標識又は		標識		の個別値 (処理放射能に対する%)					

土壤結合型残留の特徴付け

土壤結合型残留の特徴付け結果は以下のとおりであった。

	処理後経過日数 (DAT, 日)							
	0	14	30	30	60	60	119	119
土壤結合型残留	49.74	48.03	53.6	62.47	57.72	44.17	54.33	44.11
ヒューミン画分								
フルボ酸画分								
腐植酸画分								
物質収支 (%)	108.0	95.9	99.2	106.6	97.7	101.0	102.3	102.8
供試土壤	ドイツ Hoefchen (シルト)	ドイツ LH AXXa (砂壤土)	ドイツ LH AXXa (砂壤土)	ドイツ Hoefchen (シルト)	ドイツ LH AIII (シルト 質壤土)	ドイツ LH AIII (シルト 質壤土)	米国 Molino (壤質 砂土)	米国 Molino (壤質 砂土)
標識位置								

分解速度

	米国土壤	ドイツ土壤		
	Molino (砂壤土)	LH AXXa (砂壤土)	LH AIII (シルト質壤土)	Hoefchen (シルト)
速度式	DFOP			
DT ₅₀ (days)				
DT ₉₀ (days)				
Chi ²				
R ²				

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

	米国土壤	ドイツ土壤		
	Molino (砂壤土)	LH AXXa (砂壤土)	LH IIIa (シルト質壤土)	Hoefchen (シルト)
速度式	一次速度式			
DT ₅₀ (days)				
DT ₉₀ (days)				
Chi ²				
R ²				

	米国土壤	ドイツ土壤		
	Molino (砂壤土)	LH AXXa (砂壤土)	LH IIIa (シルト質壤土)	Hoefchen (シルト)
速度式	一次速度式			
DT ₅₀ (days)				
DT ₉₀ (days)				
Chi ²				
R ²				

分解経路

資料 No. 運命 16 (親化合物スピロテトラマト【P】の好氣的土壤中運命試験) でも示されたとおり、被験物質
 であつた。

以上の結果を要約する。

は 4 種類の好氣的土壤 (米国: 砂壤土、ドイツ: 砂壤土、シルト質壤土及びシルト) において二相性の分解を示した。供試土壤における DT₅₀ 値は
 であつた。

経時的な二酸化炭素の発生量の増加が試験終了時 (処理後第 119 日) まで認められ、二酸化炭素以外の揮発性有機物質の発生は認められなかった。また土壤からの抽出放射能は処理後 0.25~1 日にかけて急速に低下し、その後も処理後 119 日の 25%AR 未満へと低下した。土壤結合型残留は、ドイツ土壤 (シルト質壤土) を除く全土壤において処理後第 1 日に最高値またはその近辺の値となり、処理後第 119 日まで最高値近辺の水準で推移した。またドイツ土壤 (シルト質壤土) での土壤結合型残留は、処理後第 60 日に最高値となり、以降は他の土壤と同様に最高値近辺の水準で推移した。

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。

次頁に の想定好氣的土壌中分解経路を示す。

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。

の好氣的土壤中分解経路

III. 土壌中運命試験

3. 好氣的土壌中運命試験（屋外試験）

（資料No.運命16）

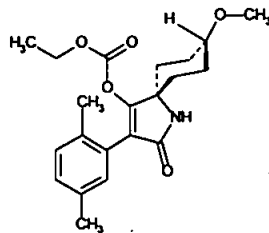
試験機関：

〔GLP 対応〕

報告書作成年：2006 年

供試標識化合物：

構造式：



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

放射化学的純度： (HPLC)

*：標識位置

化学名：シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン
 （以下、 標識体とする。）

【供試土壌】

本試験では、次に示す米国及びドイツ土壌各 1 種類が用いられた。

土壌採取国		米国	ドイツ
土壌採取地		フロリダ	Monheim
試験土壌名		Molino	Laacherhof AIIIa
土性	USDA 区分	砂壤土	壤土
	砂 (2000~50 μm)	77.9%	44.7%
	シルト (<50~2 μm)	13.6%	38.3%
	粘土 (<2 μm)	8.6%	17.1%
有機炭素含有率 (%)		0.8	1.0
陽イオン交換容量 (meq/100 g 乾土)		4.2	9.3
pH	H ₂ O	6.0	7.4
	CaCl ₂	5.4	6.7
	KCl	5.4	6.7
最大容水量 (WHC _{max} , g/100g 乾土)		22.6	45.6
試験での土壌水分		屋外試験のため規定せず。	
微生物 バイオマス (mg microbial C/kg 乾土)	DAT-2	99	349
	DAT-127	55	301

DAT：試験開始（処理）後経過日数

【試験方法】

試験系の調製

地表層（0~20cm深）から各供試土壌を採取し、石及び植物屑を取り除いて砂利を40cmの高さで敷いた栽培容器（125×80×60cm、縦×横×深さ）内に土壌深20cmとなるように充填した。なお土壌は篩に通過させずに使用した。土壌にはプラスチック製覆いをかけ、散布処理面（0.9m²）のみを露出させた。

処理量、散布処理溶液の調製及び散布処理

アセトニトリルに溶解させた 3-¹⁴C-標識体を OD (Oil Dispersible) 製剤の白試料と混合し、処理溶液 (OD 製剤) を調製した。処理溶液 (OD 製剤) 中の被験物質濃度は 0.75mg ai/mL 製剤 (有効成分 32mg/製剤 42.5mL) であった。設定処理量 288g 有効成分/ha となるように、処理溶液をコンピュータ制御のトラックプレイヤーにて 53cm の高さから均一に土壌表面に散布した。なお実処理量は 276g 有効成分/ha (設定処理量の 95.8%) であった。

試験系の維持

散布処理後、栽培容器をドイツ Bayer CropScience 社のガラス屋根下の開放条件かつ降雨の影響が無い栽培エリアにて所定の試験期間 (最長 127 日間) にわたって設置した。なお植栽は行わず、また定期的に灌水したが栽培容器からの排水は無かった。また土壌中の総残留放射能測定用として、同様に処理した試験系を処理後 207 日に採取した。

土壌試料の採取

各供試土壌及び以下に示す採取時点毎に、2 種類の土壌層 (0~10cm 及び 10~20cm) を土壌穿孔器で採取した。上層 0~10cm の土壌は室温で一夜風乾させ、ミルで均質化した。下層 10~20cm の土壌層は凍結保存したが、本試験での分析は行わなかった。

採取時点 (処理後経過日数) 及び採取試料 (反復) 数

土壌	採取土壌層	採取時点 (処理後経過日数)						
		1	7	14	28	63	127	207(#)
米国 (砂壤土)	0~10cm	2	2	2	2	2	2	1
	10~20cm	2	2	2	2	2	2	1
ドイツ (壤土)	0~10cm	2	2	2	2	2	2	1
	10~20cm	2	2	2	2	2	2	1

(#): 第 207 日試料は、総残留放射能 (TRR) の測定のみ行った追加試料。

土壌試料の抽出処理

室温にて土壌試料にアセトニトリル/水/ギ酸混合液 (1000/1000/1 v/v/v、80mL×3 回、通常抽出) 次いでアセトニトリル/1N 塩酸 (1/14 v/v、80mL×2 回、過酷抽出) による攪拌抽出を行った。通常抽出物及び過酷抽出物毎に放射能を測定し、通常抽出物と過酷抽出物を混合した。また過酷抽出後の土壌試料 (土壌結合型残留) の放射能も測定した。

試料中放射能の測定

液体試料中放射能の測定は液体シンチレーションカウンター (LSC) で行った。固形試料は粉碎後にオキサダイザーで燃焼させ、生成した放射性二酸化炭素を液体シンチレーションカクテルに捕集し、放射能を LSC で測定した。

分解物の定量、同定及び特徴付け

混合抽出物を放射能検出器付き逆相高速液体クロマトグラフィー (ラジオ逆相 HPLC) で分析した。

代謝物の同定は HPLC 及び薄層クロマトグラフィー (TLC) での認証済標準品とのコクロマトグラフィーで行い、またマススペクトロスコピー (LC-MS 及び LC-MS/MS) 及び核磁気共鳴 (NMR) スペクトロスコピーで確認した。

【試験結果】

放射能分布 (表 1)

処理後第 1 日の物質収支 (放射能回収率、処理放射能[AR]に対する%) は、米国土壤 (砂壤土) 及びドイツ土壤 (壤土) でそれぞれ 94.6%AR 及び 73.8%AR であった。ドイツ土壤 (壤土) の処理後第 1 日の物質収支が処理放射能の約 3/4 であったことは、恐らく鉱化によるものと考えられた。

両土壤とも物質収支が経時的に低下する傾向が認められた。なお米国土壤 (砂壤土) 及びドイツ土壤 (壤土) では、それぞれ処理後第 127 日及び第 63 日に前採取時点と比較して総残留放射能が増加した。米国土壤 (処理後第 127 日、59.6%AR) 及びドイツ土壤 (処理後第 63 日、74.0%AR) の物質収支は、恐らく散布処理における局所的な偏りに起因する外れ値と考えられた。このため、処理後第 207 日試料の放射能回収率を含めて対数回帰アルゴリズムで米国土壤 (処理後第 127 日) 及びドイツ土壤 (処理後第 63 日) の物質収支を外挿した結果、物質収支はそれぞれ 22.8%AR (米国土壤) 及び 43.3%AR と算出された。

処理後第 1 日の土壤からの抽出放射能は、米国土壤 (砂壤土) 及びドイツ土壤 (壤土) でそれぞれ 87.2%AR 及び 69.2%AR であり、処理後第 1 日の物質収支に対して 92% (米国土壤) 及び 94% (ドイツ土壤) を占めていた。土壤からの抽出放射能は、米国土壤 (砂壤土) 及びドイツ土壤 (壤土) とも経時的に減少し、処理後第 127 日ではそれぞれ 17.4%AR (米国土壤、外挿値) 及び 16.4%AR (ドイツ土壤) となった。

急速な土壤結合型残留の形成が処理直後から認められ、最高値は米国土壤で処理後第 63 日 (16.8%AR)、ドイツ土壤で処理後第 28 日 (13.2%AR) に認められた。米国土壤 (砂壤土) 及びドイツ土壤 (壤土) での土壤結合型残留は、処理後第 127 日でそれぞれ 5.4%AR (米国土壤、外挿値) 及び 8.5%AR (ドイツ土壤) となり、試験期間後半に増加を示すことはなかった。

表 1: 物質収支及び放射能分布 (表中の数値は処理放射能に対する%)

供試土壤	放射能画分		処理後経過日数 (日)						
			1	7	14	28	63	127	207
米国土壤 (砂壤土)	抽出放射能	通常抽出	79.2	51.4	49.9	37.4	17.7	29.1	n.a.
		過酷抽出	8.0	13.1	12.3	13.2	11.4	16.2	n.a.
		計	87.2	64.5	62.2	50.6	29.1	45.3 [17.4]	n.a.
	土壤結合型残留		7.3	15.2	10.6	14.6	16.8	14.2 [5.4]	n.a.
	物質収支		94.6	79.7	72.8	65.2	46.0	59.6 [22.8]	17.7
ドイツ土壤 (シルト質壤土)	抽出放射能	通常抽出	64.4	55.8	46.3	36.7	38.3	9.7	n.a.
		過酷抽出	4.7	8.1	8.2	10.1	21.4	6.8	n.a.
		計	69.2	63.9	54.6	46.8	59.6 [34.9]	16.4	n.a.
	土壤結合型残留		4.6	9.8	7.9	13.2	14.3 [8.4]	8.5	n.a.
	物質収支		73.8	73.7	62.5	60.0	74.0 [43.3]	24.9	36.4

n.a.: 分析せず。括弧 [] 内の数値は、処理後第 127 日 (米国土壤) 及び第 63 日 (ドイツ土壤) を除いた処理後第 207 日までの対数回帰アルゴリズムで算出した外挿値。

分解物の同定

分解物として、親化合物スピロテトラマト [P]、

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。

分解物の生成量 (表 2)

親化合物スピロテトラマト【P】の減衰は両土壌において急速であり、両土壌とも処理後第 28 日には 5%AR 未満となった。

生成量が処理放射能に対して 10%以上であった主要分解物として、両土壌とも

日に認め

られた。

生成量が処理放射能に対して 10%未満であった分解物として、

が認められた。

これらの分解物のうち、

した。また

であ

った。

であった。

表 2：分解物の生成量 (表中の数値は処理放射能に対する%)

	米国土壌 (砂壌土)						ドイツ土壌 (壤土)					
	処理後経過日数 (日)						処理後経過日数 (日)					
	1	7	14	28	63	127(#)	1	7	14	28	63(#)	127
親化合物【P】	72.2	17.8	10.2	4.5	1.4	1.0	53.6	13.4	3.8	2.5	2.5	1.0
抽出残留放射能 (計)	87.2	64.5	62.2	50.6	29.1	17.4	69.2	63.9	54.6	46.8	34.9	16.4
土壌結合型残渣	7.3	15.2	10.6	14.6	16.8	5.4	4.6	9.8	7.9	13.2	8.4	8.5
総回収率	94.6	79.7	72.8	65.2	46.0	22.8	73.8	73.7	62.5	60.0	43.3	24.9

分解速度

一次速度式に回帰させて算出した親化合物スピロテトラマト【P】の分解速度は次のとおりであった。

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。

分解速度

	米国土壤（砂壤土）	ドイツ土壤（壤土）
DT50 (days)	1.2	2.9
DT90 (days)	4.1	9.6
R ²	0.981	0.990

分解経路

本試験条件下において得られた大部分の分解物は、資料 No.運命 16（スピロテトラマト【P】の好氣的土壤中運命試験）、資料 No.運命 24（
の好氣的土壤中運命試験）及び資料 No.運命 23（スピロテトラマト【P】の土壤表面光分解試験）で認められたものであった。

屋外の好氣的土壤におけるスピロテトラマト【P】の主要分解経路は
であり、
へと変換された。

なお、

であった。

スピロテトラマト【P】の屋外における好氣的土壤中分解経路図を次頁に示す。

なお屋外における好氣的土壤中分解経路図における下線を付した分解物は本試験で認められず、それぞれ以下の試験で認められた分解物である。

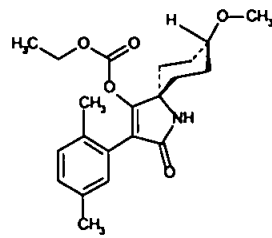
下線（波線_____）：資料 No.運命 16（スピロテトラマト【P】の好氣的土壤中運命試験）で認められた分解物

下線（破線_____）：資料 No.運命 24（
の好氣的土壤中運命試験）
で認められた分解物

下線（直線_____）：資料 No.運命 23（土壤表面光分解試験）で認められた分解物

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。

好氣的土壤中分解経路



スピロテトラマト【P】

IV. 水中運命試験

1. 加水分解運命試験

(資料No.運命17)

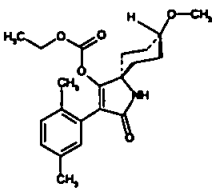
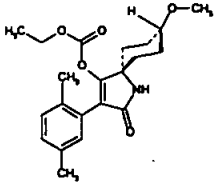
試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2004 年

供試標識化合物:

次の 2 種類の標識体を使用した。

標識体名	標識体 (報告書では label #1 と表記)	標識体 (報告書では label #2 と表記)
構造式		
化学名	シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ [4.5]デカ-3-エン-2-オン	シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ [4.5]デカ-3-エン-2-オン
比放射能	μCi/mg (MBq/mg)	μCi/mg (MBq/mg)
放射化学的純度 (HPLC)	%	%

【供試緩衝液】

以下の 3 種類の pH の緩衝液を調製した。

なお緩衝液の調製に使用した水は Milli-Q 精製水であった。緩衝液調整後に高圧蒸気圧滅菌を行い、酸素を除去した。

- ・ pH 4 緩衝液 (0.01M 酢酸ナトリウム/酢酸緩衝液)
1.36g の酢酸ナトリウム三水和物を 250mL の水に溶解し、この溶液を 0.01 mol/L (M) となるように水と混合 (混合比 1:3 v/v) した。pH の調製は必要に応じて酢酸で行った。
- ・ pH 7 緩衝液 (0.01M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン/塩酸緩衝液)
50mL の 0.1M トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン水溶液 (12.1g/L) を 46.6mL の 0.1N 塩酸水溶液 (3.65g/L) と混合し、水で 100mL 定容とした。この溶液を 0.01 mol/L (M) となるように水と混合 (混合比 1:4 v/v) した。pH の調製は必要に応じて 0.1N 塩酸水溶液及び/又は 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液で行った。
- ・ pH 9 緩衝液 (0.01M ホウ酸/水酸化ナトリウム緩衝液)
0.62g のホウ酸及び 0.75g の塩化カルシウムを 250mL の水に溶解し、この溶液 125mL に 53mL の 0.04M 水酸化ナトリウム水溶液 (1.6 g/L) を添加して水で 250mL 定容とした。この溶液を 0.01 mol/L (M) となるように水と混合 (混合比 1:1 v/v) した。pH の調製は必要に応じて 0.4M 水酸化ナトリウム及び/又はホウ酸で行った。

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。

【試験方法】

試験区及び試験条件の設定

当該試験は、予備試験、本試験及び追加試験で構成された。

これら3試験における pH、試験温度は下表のとおりであり、何れも暗条件下で培養した。また設定試験濃度は、水溶解度の 1/2 以下かつ分解物の同定が可能な濃度である 1mg/L とした。

試験の種類	設定試験濃度	pH\試験温度	20℃	25℃	30℃	50℃
予備試験	1mg/L	pH 4				○
		pH 7				○
		pH 9			○	
本試験	1mg/L	pH 4		○		
		pH 7		○		
		pH 9		○		
追加試験	1mg/L	pH 4	○			
		pH 7	○			

○：該当、空欄：該当せず。

処理溶液及び試験溶液の調製

標識体及び 標識体をそれぞれアセトニトリルに溶解し、 標識処理溶液及び 標識処理溶液を調製した。

各緩衝液を 100mL 含有するメスフラスコに、設定試験濃度 1mg/L となるように処理溶液を無菌的に添加し、標識体毎に試験溶液を調製した。試験溶液中の共存溶媒（アセトニトリル）濃度は 0.5% 以下であった。

処理終了後、各処理溶液 10mL を 10mL 容の密封可能なテフロン加工ガラスバイアルにピペットで無菌的に移し取り、所定期間にわたって密封して培養した。

試験期間及び試料の採取

物質収支、分解速度及び分解物の同定及び定量を目的として、以下の時点で標識体毎に 1 バイアルを採取した。

	pH 及び温度	最長培養期間	採取時点（培養開始後経過時間）
予備試験	pH 4 (50℃)	12 日間	0 及び 6 時間、3、4、5、6、7、10 及び 12 日
	pH 7 (50℃)	2 日間	0、2、4、8、10 及び 24 時間、1.25 日及び 2 日
	pH 9 (30℃)	7 時間	0、1、2、3、4、5、6 及び 7 時間
本試験	pH 4 (25℃)	31 日間	0、3、7、10、14、17、21、24 及び 31 日
	pH 7 (25℃)	29 日間	0、1、3、7、13、20、24 及び 29 日
	pH 9 (25℃)	30 時間	0、1、2、3、4、6、8、10、24 及び 30 時間
追加試験	pH 4 (20℃)	30 日間	0、5、8、13、16、19、23、26 及び 30 日
	pH 7 (20℃)	30 日間	0、5、8、13、16、19、23、26 及び 30 日

また pH 及び滅菌状態の確認のため、予備試験では開始後 0 時間及び最終採取時点、本試験及び追加試験では開始後 0 時間及び最終採取時点を含む数時点で培養バイアルを採取した。

なお、培養バイアルには揮発性物質捕集用のトラップを接続しなかった。

放射能測定、分解物の定量／同定及び半減期の算出

試験溶液中の放射能は液体シンチレーションカウンター (LSC) で測定し、放射性成分の定量は放射能検出器付き高速液体クロマトグラフィー (ラジオ HPLC) で行った。

分解物の同定は認証済標準品との HPLC 及び二次元薄層クロマトグラフィー (TLC) とのコクロマトグラフィーで行い、更に液体クロマトグラフィー/質量分析 (LC-MS) で構造を確認した。

親化合物スピロテトラマト【P】の半減期は、一次回帰直線分析により算出した。

【試験結果】

物質収支

予備試験、本試験及び追加試験における物質収支を表 1 に示す。

各試験及び各試験条件とも物質収支は良好であり、揮発性物質の生成または試料採取中の放射能の損失は認められなかった。

表 1: 物質収支

試験の種類	試験条件	最長培養期間	物質収支 (処理放射能に対する%)			
			最小値	最大値	平均値	標準偏差 (%)
予備試験	pH 4 (50°C)	12 日間	97.6	105.2	101.2	2.0
	pH 7 (50°C)	2 日間	100.0	104.5	102.3	1.6
	pH 9 (30°C)	7 時間	95.5	100.0	98.0	1.3
本試験	pH 4 (25°C)	31 日間	98.8	102.7	100.4	1.2
	pH 7 (25°C)	29 日間	99.1	103.4	101.3	1.3
	pH 9 (25°C)	30 時間	98.3	103.3	100.6	1.4
追加試験	pH 4 (20°C)	30 日間	97.3	101.0	99.5	0.9
	pH 7 (20°C)	30 日間	99.5	102.8	101.3	1.0

培養期間中の pH 及び滅菌状態の維持

各試験条件下において、試験溶液の pH は設定 pH に保たれ、また滅菌状態も維持されていた。

分解物の同定

親化合物スピロテトラマト【P】の他、分解物として が同定された。

分解物の生成量 (表 2～表 9)

予備試験、本試験及び追加試験における分解物の生成量をそれぞれ表 2～表 4、表 5～表 7 及び表 8～表 9 に示す。

予備試験、本試験及び追加試験とも、処理放射能に対して 10%以上 (10%AR 以上) 生成した主要分解物は であった。何れの試験条件 (pH 及び温度) においても、培養終了時までの の経時的な増加が示された。

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。

50°C (pH 4 及び 7) 及び 30°C (pH 9) で実施された予備試験において、培養終了時の親化合物【P】の残存量はそれぞれ 22.8%AR (pH 4、12 日間培養)、10.6%AR (pH 7、2 日間(48 時間)培養) 及び 21.8%AR (pH 9、7 時間培養) であった。

25°C (pH 4、7 及び 9) で実施された本試験でも親化合物【P】の分解が認められ、中でもアルカリ性域において親化合物【P】の分解が速く、加水分解の pH 依存性が示された。培養終了時の親化合物【P】の残存量はそれぞれ 52.0%AR (pH 4、31 日間培養)、9.6%AR (pH 7、29 日間培養) 及び 7.1%AR (pH 9、30 時間培養) であった。

本試験と比較して 5°C 低い温度 (20°C、pH4 及び 7) で行われた追加試験でも親化合物【P】の分解が認められ、培養終了時 (30 日間培養) の親化合物【P】の残存量はそれぞれ 64.1%AR (pH 4) 及び 20.5%AR (pH 7) であった。

表 2 : 予備試験 (pH 4、50°C) での分解物の生成量 (表中の数値は処理放射能に対する%)

分解物	標識位置	培養開始後経過時間 (日)								
		0	0.25	3	4	5	6	7	10	12
親化合物【P】	標識	100.0	99.9	71.3	62.6	54.7	51.0	44.0	30.2	23.2
	標識	100.0	98.0	69.6	60.3	52.3	48.6	43.4	29.8	22.4
	平均	100.0	98.9	70.4	61.4	53.5	49.8	43.7	30.0	22.8
抽出放射能 (=総回収放射能)	標識	100.0	103.0	103.4	102.4	100.2	105.2	104.3	102.6	100.5
	標識	100.0	102.1	100.8	99.3	97.6	101.2	99.8	99.0	99.8
	平均	100.0	102.5	102.1	100.9	98.9	103.2	102.1	100.8	100.1

表 3 : 予備試験 (pH 7、50°C) での分解物の生成量 (表中の数値は処理放射能に対する%)

分解物	標識位置	培養開始後経過時間 (時間)							
		0	2	4	8	10	24	30	48
親化合物【P】	標識	100.0	90.4	82.8	68.9	61.8	32.1	25.0	10.2
	標識	100.0	88.8	81.9	69.2	63.4	32.6	24.9	11.0
	平均	100.0	89.6	82.3	69.0	62.6	32.3	24.9	10.6
抽出放射能 (=総回収放射能)	標識	100.0	100.0	101.4	102.4	102.3	104.2	104.5	104.4
	標識	100.0	100.4	101.6	102.9	101.8	102.7	103.4	104.3
	平均	100.0	100.2	101.5	102.7	102.1	103.5	104.0	104.4

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 : 予備試験 (pH 9、30°C) での分解物の生成量 (表中の数値は処理放射能に対する%)

分解物	標識位置	培養開始後経過時間 (時間)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
親化合物【P】	標識	97.0	75.9	61.4	50.6	41.0	33.4	28.3	21.3
	標識	97.3	79.4	65.5	53.0	41.7	31.5	26.3	22.3
	平均	97.1	77.6	63.5	51.8	41.3	32.5	27.3	21.8
抽出放射能 (=総回収放射能)	標識	100.0	97.4	98.5	98.3	98.5	98.6	99.1	96.7
	標識	100.0	96.9	97.4	96.3	99.4	96.8	95.5	98.2
	平均	100.0	97.2	97.9	97.3	98.9	97.7	97.3	97.5

表 5 : 本試験 (pH 4、25°C) での分解物の生成量 (表中の数値は処理放射能に対する%)

分解物	標識位置	培養開始後経過時間 (日)								
		0	3	7	10	14	17	21	24	31
親化合物【P】	標識	100.0	96.4	86.4	79.6	74.7	69.8	65.4	60.7	52.9
	標識	100.0	94.1	85.7	79.4	74.0	68.0	64.4	59.4	51.0
	平均	100.0	95.2	86.1	79.5	74.3	68.9	64.9	61.0	52.0
抽出放射能 (=総回収放射能)	標識	100.0	102.7	100.8	98.8	100.7	100.6	101.5	100.3	102.7
	標識	100.0	100.9	100.7	99.2	100.0	99.0	101.4	98.9	98.8
	平均	100.0	101.8	100.8	99.0	100.3	99.8	101.4	99.6	100.8

表 6 : 本試験 (pH 7、25°C) での分解物の生成量 (表中の数値は処理放射能に対する%)

分解物	標識位置	培養開始後経過時間 (時間)							
		0	1	3	7	13	20	24	29
親化合物【P】	標識	100.0	89.8	77.4	55.7	35.8	19.2	15.0	10.3
	標識	99.5	90.9	79.5	56.0	35.3	19.8	14.0	8.9
	平均	99.8	90.3	78.5	55.8	35.6	19.5	14.5	9.6
抽出放射能 (=総回収放射能)	標識	100.0	99.4	100.4	100.2	101.0	102.0	99.1	101.7
	標識	100.0	101.2	102.7	101.4	102.7	103.4	102.6	102.4
	平均	100.0	100.3	101.5	100.8	101.9	102.7	100.8	102.0

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 : 本試験 (pH 9、25°C) での分解物の生成量 (表中の数値は処理放射能に対する%)

分解物	標識位置	培養開始後経過時間 (時間)									
		0	1	2	3	4	6	8	10	24	30
親化合物【P】	標識	98.0	87.2	79.0	72.4	64.9	55.6	47.3	N.A.	9.9	N.A.
	標識	97.6	87.7	81.0	73.3	65.4	58.1	45.9	38.7	12.5	7.1
	平均	97.8	87.5	80.0	72.9	65.2	56.9	46.6	38.7	11.2	7.1
抽出放射能 (=総回収放射能)	標識	100.0	98.9	99.6	100.2	99.9	99.1	99.6	N.A.	100.5	N.A.
	標識	100.0	99.5	101.3	101.6	100.6	102.8	102.1	103.3	102.7	100.3
	平均	100.0	99.2	100.5	100.9	100.3	101.0	100.9	103.3	101.6	100.3

N.A. : 測定せず。

表 8 : 追加試験 (pH 4、20°C) での分解物の生成量 (表中の数値は処理放射能に対する%)

分解物	標識位置	培養開始後経過時間 (日)								
		0	5	8	13	16	19	23	26	30
親化合物【P】	標識	100.0	91.5	88.3	82.3	78.6	76.0	69.8	67.2	63.5
	標識	99.2	91.7	89.1	83.4	78.9	75.5	71.7	68.7	64.8
	平均	99.6	91.6	88.7	82.8	78.8	75.7	70.8	68.0	64.1
抽出放射能 (=総回収放射能)	標識	100.0	98.7	99.2	99.9	99.6	99.9	97.3	98.2	98.5
	標識	100.0	99.1	99.9	100.7	99.2	101.0	99.9	99.9	99.3
	平均	100.0	98.9	99.6	100.3	99.4	100.4	98.6	99.1	98.9

表 9 : 追加試験 (pH 7、20°C) での分解物の生成量 (表中の数値は処理放射能に対する%)

分解物	標識位置	培養開始後経過時間 (日)								
		0	5	8	13	16	19	23	26	30
親化合物【P】	標識	100.0	77.5	65.5	50.2	42.0	36.6	28.7	26.4	20.4
	標識	100.0	75.2	65.3	48.5	44.5	35.8	30.3	25.0	20.5
	平均	100.0	76.3	65.4	49.4	43.2	36.2	29.5	25.7	20.5
抽出放射能 (=総回収放射能)	標識	100.0	101.5	101.8	102.0	102.3	102.1	101.1	101.8	101.5
	標識	100.0	100.2	101.1	102.8	102.2	100.4	102.5	99.5	100.4
	平均	100.0	100.8	101.4	102.4	102.3	101.3	101.8	100.6	101.0

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。

分解速度

以下に、一次回帰直線分析により算出した親化合物スピロテトラマト【P】の分解速度定数及び分解速度（DT50、DT75 及び DT90 値）を示す。

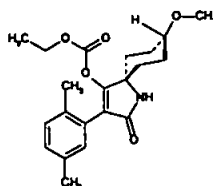
スピロテトラマト【P】の加水分解性には pH 依存性が認められ、アルカリ性域での分解速度が速かった。

	試験条件		分解速度				
	pH	温度	DT50	DT75	DT90	分解速度定数 k (1/time)	R ²
予備試験	4	50℃	137 時間 (5.7 日)	11.4 日	18.9 日	0.122 / 日	0.999
	7		15 時間 (0.62 日)	30 時間	50 時間	0.046 / 時間	1.00
	9	30℃	3.3 時間 (0.14 日)	6.5 時間	10.8 時間	0.212 / 時間	1.00
本試験	4	25℃	32.5 日	65 日	108 日	0.021 / 日	0.998
	7		8.6 日	17 日	29 日	0.080 / 日	1.00
	9		7.6 時間	15 時間	25 時間	0.092 / 時間	0.999
追加試験	4	20℃	48 日	95 日	158 日	0.015 / 日	0.999
	7		13 日	26 日	44 日	0.053 / 日	1.00

加水分解経路

本試験条件下において、親化合物スピロテトラマト【P】は加水分解された。以下に加水分解経路を示す。

加水分解経路



スピロテトラマト【P】

IV. 水中運命試験

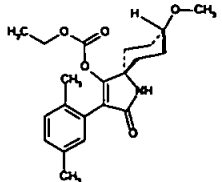
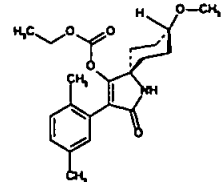
2. 水中（滅菌緩衝液中）光分解運命試験

(資料No.運命18)

試験機関：
[GLP 対応]
報告書作成年：2005 年

供試標識化合物：

次の2種類の標識体を使用した。

標識体名	標識体 (報告書では label A と表記)	標識体 (報告書では label B と表記)
構造式		
化学名	シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン	シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン
比放射能	MBq/mg	MBq/mg
放射化学的純度 (HPLC)	%	%

【試験系】

供試水：滅菌した 0.01M 酢酸緩衝液

(600mg の氷酢酸を 1000mL 容メスフラスコに秤取り、700mL の Milli-Q 精製水で溶解した。0.1M 塩酸水溶液で pH 5 に調整後、Milli-Q 精製水で定容とした。滅菌はオートクレーブで行った。)

設定試験濃度：1mg/L (共存溶媒としてアセトニトリルを 0.1% 含有)

試験温度：25±1℃

光照射装置：Suntest 照射装置

光照射容器：揮発性物質トラップ付きの石英ガラス製 (50mm×26mm×16mm)

光源：キセノンランプ (フィルターにより 290nm 未満の波長光を除去)

光強度：989.5W/m² (測定波長範囲：300~800nm)

照射期間：最長 7 日間 (北緯 35 度、春期太陽光条件下の 26.6 日間に相当)

【試験方法】

標識体 (3-¹⁴C 標識体及び 5-¹⁴C 標識体) をそれぞれ別個にアセトニトリルに溶解し、濃度が 1mg/mL の 2 種類の処理溶液を調製した。各処理溶液 200μL を三角フラスコに秤取り、設定試験濃度 1mg/L となるよう供試水 200mL を添加し、暗条件のマグネティックスターラ上でおよそ 1 時間攪拌した。試験水の調製は無菌的に行われた。

照射試料区として標識体毎に試験水 10mL を光照射容器に移し取り、ソーダ石灰 (二酸化炭素捕集用) 及びポリウレタンフォーム栓 (揮発性有機物質捕集用) で構成された滅菌トラップで密栓し (照射開始直後の試料を除く)、Suntest 装置内 (25±1℃) で最長 7 日間にわたって継続的に光照射した。

また暗対照試料区はトラップを接続せずに密栓し、気象チャンバ内の暗条件 (平均温度 25.2℃) に最長 7 日間設置した。

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。

照射開始後、次の時点で試料を採取した。なお照射試料の採取に際して、光照射容器をデシケータ内で吸引し、容器上部の空気に存在しうる揮発性物質をトラップに捕集させた。

採取時点（表中の括弧（ ）内の数値は標識体毎の採取試料数）

	採取試料	照射開始後経過時間（日）						
		0(直後)	1	2	3	4	6	7
照射試料区	試験水	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)
	トラップ	該当無し	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)
暗対照試料区	試験水	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)

また滅菌状態の確認を照射開始後第0（直後）、3、4及び7日に行い、溶存酸素の測定を照射開始後第0（直後）及び7日に行った。試験水のpHの確認を各採取時点で行った。

液体試料の放射能の測定は液体シンチレーションカウンター（LSC）で行った。またソーダ石灰及びポリウレタンフォーム栓トラップにそれぞれ18%塩酸処理による遊離及び酢酸エチルによる30分間の超音波抽出を行い、得られた放射能をLSCで測定した。

試験水中の放射性成分の定量は放射能検出器付き高速液体クロマトグラフィー（ラジオHPLC）で行い、同定は二次元薄層クロマトグラフィー（TLC）による認証済標準品とのコクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー/質量分析（LC-MS及びLC-MS/MS）及び液体クロマトグラフィー/核磁気共鳴スペクトロメトリー（LC-NMR）により行った。

また親化合物スピロテトラマト【P】の残存量を一次速度式に適合させ、光分解速度定数及び光分解速度（DT50及びDT90値）を算出した。

【試験結果】

試験水の滅菌状態、pH及び溶存酸素：

照射期間を通じて滅菌状態が維持されていた事が確認され、またpH及び溶存酸素はそれぞれpH5及び>95%で一定的に保たれていた。

物質収支（表1～2）：

光照射試料及び暗対照試料における物質収支をそれぞれ表1及び表2に示す。

光照射試料区及び暗対照試料区とも物質収支は良好であった。

光照射試料区では、処理放射能（AR）に対する各採取時点の物質収支は98.2%AR（標識体、第0日）～108.4%AR（標識体、第7日）であった。

標識体を処理した光照射試料区では、第6日まで二酸化炭素生成量の経時的増加が認められ、最高生成量は2.6%ARであった。標識体を処理した光照射試料区では、第4日以降に二酸化炭素の生成が認められ、その最高生成量は0.2%AR（第7日）であった。また揮発性有機物質の最高生成量は、標識体処理試料区及び標識体処理試料区でそれぞれ0.8%AR（標識体：第7日）及び0.3%AR（標識体：第0日）であり、極微量であった。

暗対照試料区における各採取時点の物質収支は、93.8%AR（5-¹⁴C標識体：第3日）～101.6%AR（5-¹⁴C標識体：第2及び6日）であった。

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

表 1：光照射試料区の物質収支（表中の数値は処理放射能に対する％）

	標識体	照射開始後経過時間（日）								
		0	1	2	3	4	6	7		
試験水	標識	100.2	100.1	100.7	101.6	102.7	103.1	105.0		
	標識	98.2	100.0	100.5	103.4	103.4	106.2	105.7		
	平均	99.2	99.9	100.6	102.5	103.1	104.6	105.4		
揮発性放射能	二酸化炭素	標識	測定せず	0.1	0.2	0.8	1.3	2.6	2.5	
		標識		0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.2	
		平均		0.0	0.1	0.4	0.7	1.3	1.3	
	有機物質	標識		0.1	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.8
		標識		0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
		平均		0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
	計	標識		0.1	0.2	0.9	1.3	2.6	3.4	
		標識		0.3	0.0	0.1	0.1	0.1	0.3	
		平均		0.2	0.1	0.5	0.7	1.3	1.8	
物質収支	標識	100.2	100.2	100.9	102.5	104.0	105.7	108.4		
	標識	98.2	100.0	100.5	103.5	103.5	106.3	106.0		
	平均	99.2	100.1	100.7	103.0	103.8	106.0	107.2		

表 2：暗対照試料区の物質収支（表中の数値は処理放射能に対する％）

	標識体	照射開始後経過時間（日）						
		0	1	2	3	4	6	7
試験水 (=物質収支)	標識	100.9	104.7	97.7	97.0	97.6	96.1	98.3
	5- ¹⁴ C標識	101.4	100.1	101.6	93.8	99.4	101.6	98.9
	平均	101.1	102.4	99.6	95.4	98.5	98.9	98.6

分解物の同定：

光照射試料区では、親化合物【P】の他に光分解物として

同定された。また暗対照試料区では親化合物【P】及び

が
が認められた。

分解物の生成量（表 3～5）：

光照射試料区及び暗対照試料区における分解物を、標識体（表 3）及び標識体（表 4）毎に示す。また親化合物【P】を含む主要分解物について標識体試料及び標識体試料の生成量を平均した値を表 5 に示す。

標識体及び標識体処理試料とも、光照射区において急速に光分解された。処理放射能（AR）に対する親化合物【P】の残存量は、標識体処理試料の光照射区では照射開始直後（第 0 日）の 100.2%AR から照射終了時（第 7 日）の 16.7%AR へと減少し、標識体処理試料の光照射区では第 0 日の 98.2%AR から第 7 日の 12.0%AR となった。両標識体処理試料（光照射区）の平均値では、親化合物【P】は第 0 日の 99.2%AR から第 7 日の 14.4%AR まで減少した。

処理放射能（AR）に対して 10%以上生成した主要光分解物として、

が認められた。

両標識体処理試料（光照射区）の平均値として算出した主要光分解物の最高生成量は次のとおりであった。

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。

主要光分解物の最高生成量 (標識体及び 標識体処理試料の平均値)

暗対照試料区では、親化合物【P】からエノール体【MI】への分解が認められた。
 両標識体処理試料(暗対照区)の平均値として算出した の生成量は、
 第0日の0%ARから第7日の13.8%ARへと経時的に増加した。 以
 外の分解物は暗対照区で認められなかった。

表3: 標識体処理試料における分解物(表中の数値は処理放射能に対する%)

		照射開始後経過時間(日)						
		0	1	2	3	4	6	7
親化合物【P】	光照射	100.2	72.9	64.0	36.4	34.6	16.8	16.7
	暗対照	100.9	102.4	93.5	90.5	88.5	84.5	84.6
試験水中の総放射能	光照射	100.2	100.1	100.7	101.6	102.7	103.1	105.0
	暗対照	100.9	104.7	97.7	97.0	97.6	96.1	98.3
¹⁴ C ₂	光照射	測定せず	0.1	0.2	0.8	1.3	2.6	2.5
	暗対照	測定せず						
揮発性有機物質	光照射	測定せず	0.1		0.1			0.8
	暗対照	測定せず						
総回収放射能	光照射	100.2	100.2	100.9	102.5	103.9	105.7	108.4
	暗対照	100.9	104.7	97.7	97.0	97.6	96.1	98.3

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

表 4: 標識体処理試料における分解物 (表中の数値は処理放射能に対する%)

		照射開始後経過時間 (日)						
		0	1	2	3	4	6	7
親化合物【P】	光照射	98.2	78.3	64.5	39.3	41.1	32.7	12.0
	暗対照	101.4	97.5	97.3	86.6	89.5	89.1	85.1
試験水中の総放射能	光照射	98.2	99.7	100.5	103.4	103.4	106.2	105.7
	暗対照	101.4	100.1	101.6	93.8	99.4	101.6	98.9
¹⁴ CO ₂	光照射	測定せず*				0.1	0.1	0.2
	暗対照	測定せず*						
揮発性有機物質	光照射	測定せず*						0.1
	暗対照	測定せず*						
総回収放射能	光照射	98.2	100.0	100.5	103.4	103.5	106.2	106.0
	暗対照	101.4	100.1	101.6	93.8	99.4	101.6	98.9

表 5: 主要分解物の生成量 (標識体及び 標識体処理試料の平均値、表中の数値は処理放射能に対する%)

		照射開始後経過時間 (日)						
		0	1	2	3	4	6	7
親化合物【P】	光照射	99.2	75.6	64.3	37.9	37.8	24.8	14.4
	暗対照	101.1	99.9	95.4	88.7	89.0	86.8	84.8
試験水中の放射能	光照射	99.2	99.9	100.6	102.5	103.1	104.6	105.4
	暗対照	101.1	102.4	99.6	95.4	98.5	98.9	98.6
総回収放射能	光照射	99.2	100.1	100.7	103.0	103.7	105.9	107.2
	暗対照	101.1	102.4	99.6	95.4	98.5	98.9	98.6

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。

光分解速度：

一次速度式に適合させて算出した光分解速度定数及び光分解速度 (DT50 及び DT90 値) を下表に示す。また申請者が算出した北緯 35 度及び春期太陽光 (4~6 月) 条件下における DT50 値も示す。

pH5 の緩衝液中における DT50 値 (実験条件下) は 2.7 日であり、親化合物【P】は速やかに光分解された。また北緯 35 度及び春期太陽光 (4~6 月) 条件下における DT50 値は 27.02 日と算出された。

	実験条件下			春期太陽光 (北緯 35 度) 条件での DT50 (days)
	分解速度定数 (days ⁻¹)	DT50 (days)	DT90 (days)	
光照射区	0.257	2.7	8.96	27.02
暗対照区	0.027	26.2	86.9	算出せず

以上の結果、スピロテトラマト【P】は pH 5 の緩衝液中で光分解を受け、実験条件下の DT50 値は 2.7 日であった。春期太陽光 (北緯 35 度) 条件での DT50 値は 27.02 日と算出された。

処理放射能 (AR) に対して 10% 以上生成した主要光分解物として、

られた。

が認め

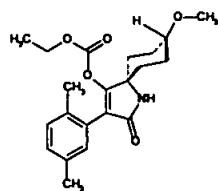
また暗対照区でもスピロテトラマト【P】の
れ、試験終了時の

分解が認めら
であった。

次頁に pH5 の緩衝液中における推定光分解経路を示す。

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。

pH 5 の緩衝液中光分解経路



スピロテトラマト【P】

IV. 水中運命試験

3. 水中（自然水中）光分解運命試験

(資料No.運命19)

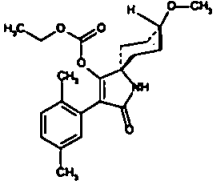
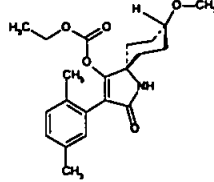
試験機関:

[GLP 対応]

報告書作成年: 2005 年

供試標識化合物:

次の2種類の標識体を使用した。

標識体名	標識体 (報告書では label A と表記)	標識体 (報告書では label B と表記)
構造式		
化学名	シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン	シス-4-(エトキシカルボニルオキシ)-8-メトキシ-3-(2,5-キシリル)-1-アザスピロ[4.5]デカ-3-エン-2-オン
比放射能	MBq/mg	MBq/mg
放射化学的純度 (HPLC 及び TLC)	%	%

【試験系】

供試水: 滅菌自然水

(2004年10月24日にドイツ Monheim のライン河畔で採取した河川水であり、16.5℃における pH は 7.93 であった。滅菌は高圧蒸気滅菌法で行われた。)

設定試験濃度: 1mg/L (共存溶媒としてアセトニトリルを 0.1% 含有)

試験温度: 25±1℃

光照射装置: Suntest 照射装置

光照射容器: 揮発性物質トラップ付きの石英ガラス製 (50mm×26mm×16mm)

光源: キセノンランプ (フィルターにより 290nm 未満の波長光を除去)

光強度: 700W/m² (測定波長範囲: 300~800nm)

照射期間: 最長 10 日間 (北緯 35 度、春期太陽光条件下の 69.6 日間に相当)

【試験方法】

本試験

標識体 (標識体及び 標識体) をそれぞれ別個にアセトニトリルに溶解し、濃度が 1mg/mL の 2 種類の処理溶液を調製した。各処理溶液 250µL を三角フラスコに秤取り、設定試験濃度 1mg/L となるよう供試水を加え、暗条件のマグネティックスターラ上でおよそ 1 時間攪拌した。試験水の調製は無菌的に行われた。

照射試料区として標識体毎に試験水 10mL を光照射容器に移し取り、ソーダ石灰 (二酸化炭素捕集用) 及びポリウレタンフォーム栓 (揮発性有機物質捕集用) で構成された滅菌トラップで密栓し (照射開始直後の試料を除く)、Suntest 装置内 (25±1℃) で最長 10 日間にわたって継続的に光照射した。

また暗対照試料区はトラップを接続せずに密栓し、気象チャンバ内の暗条件 (平均温度 25.1℃) に最長 10 日間設置した。

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。

照射開始後、次の時点で試料を採取した。なお照射試料の採取に際して、光照射容器をデシケータ内で吸引し、容器上部の空気に存在しうる揮発性物質をトラップに捕集させた。

採取時点（表中の括弧（ ）内の数値は標識体毎の採取試料数）

	採取試料	照射開始後経過時間（日）						
		0(直後)	1	2	3	6	8	10
照射試料区	試験水	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)
	トラップ	該当無し	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)
暗対照試料区	試験水	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)	2(各1)

また滅菌状態の確認を照射開始後第0（直後）、3及び10日に行い、溶存酸素の測定を照射開始後第0（直後）及び10日に行った。試験水のpHの確認を各採取時点で行った。

液体試料の放射能の測定は液体シンチレーションカウンター（LSC）で行った。またソーダ石灰及びポリウレタンフォーム栓トラップにそれぞれ18%塩酸処理による遊離及び酢酸エチルによる30分間の超音波抽出を行い、得られた放射能をLSCで測定した。

試験水中の放射性成分の定量は放射能検出器付き高速液体クロマトグラフィー（ラジオHPLC）で行い、同定は二次元薄層クロマトグラフィー（TLC）による認証済標準品とのコクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー/質量分析（LC-MS及びLC-MS/MS）及び液体クロマトグラフィー/核磁気共鳴スペクトロメトリー（LC-NMR）により行った。

親化合物スピロテトラマト【P】の残存量を一次速度式に適合させ、光分解速度定数及び光分解速度（DT50及びDT90値）を算出した。

分解物生成試験

分解物を生成させるため、本試験と同条件で 標識体の試験水（250mL）を石英ガラス容器に調製し、10日間にわたって光に曝露させた。得られたHPLCで分析した。

【試験結果】

試験水の滅菌状態、pH及び溶存酸素：

照射期間を通じて滅菌状態が維持されていた。また溶存酸素は>94%（照射開始直後）及び>97%（照射開始後第10日）と一定に保たれていた。なお照射開始直後のpHは8であり、暗対照試料区では試験期間を通じてpHは一定していたが、照射試料区のpHは9.4まで変化した。

物質収支（表1～2）：

光照射試料及び暗対照試料における物質収支をそれぞれ表1及び表2に示す。

光照射試料区及び暗対照試料区とも物質収支は良好であった。

処理放射能（AR）に対する物質収支（各時点の平均値）は、光照射試料区で102.0%AR（ 標識体）及び101.8%AR（ 標識体）であり、暗対照試料区では100.6%AR（ 標識体）及び99.9%AR（ 標識体）であった。

また光照射試料区における二酸化炭素及び揮発性有機物質の最高生成量は、それぞれ1.1%AR（ 標識体、照射開始後第10日）及び1.5%AR（ 標識体、照射開始後第3日）であり、揮発性放射能は何れの時点でも微量であった。

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

表 1 : 光照射試料区の物質収支 (表中の数値は処理放射能に対する%、n=2 の平均値)

		標識体	照射開始後経過時間 (日)						
			0	1	2	3	6	8	10
試験水	標識		96.7	103.2	103.1	101.6	101.9	101.0	100.6
	標識		96.8	103.2	103.2	102.3	101.7	102.2	102.2
	平均		96.8	103.2	103.2	102.0	101.8	101.6	101.4
揮発性放射能	二酸化炭素	標識	測定せず	0.0	0.0	0.1	0.3	0.7	1.1
		標識		0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.3
		平均		0.0	0.0	0.0	0.2	0.4	0.7
	有機物質	標識		0.0	0.0	1.5	0.7	1.0	0.7
		標識		0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1
		平均		0.0	0.0	0.8	0.4	0.6	0.4
	計	標識		0.0	0.1	1.6	1.0	1.7	1.8
		標識		0.0	0.0	0.1	0.1	0.3	0.4
		平均		0.0	0.1	0.8	0.6	1.0	1.1
物質収支	標識	96.7	103.3	103.2	103.2	102.9	102.7	102.3	
		各時点の平均値 : 102.0							
	標識	96.8	103.2	102.4	101.9	102.5	102.5		
		各時点の平均値 : 101.8							
	平均	96.8	103.2	103.2	102.8	102.4	102.6	102.4	
各時点の平均値 : 101.9									

表 2 : 暗対照試料区の物質収支 (表中の数値は処理放射能に対する%、n=2 の平均値)

		標識体	照射開始後経過時間 (日)					
			0	1	2	3	6	8
試験水 (=物質収支)	標識	96.2	99.3	100.3	101.0	102.4	102.3	102.7
		各時点の平均値 : 100.6						
	標識	94.8	98.4	100.3	99.8	101.2	103.0	102.0
		各時点の平均値 : 99.9						
	平均	95.5	98.8	100.3	100.4	101.8	102.7	102.4
各時点の平均値 : 100.3								

分解物の同定及び特徴付け :

光照射区試料区及び暗対照試料区とも、親化合物スピロトラマト【P】の他に
が同定された。また 標識体を処理した光照射試料区では、

が同定された。

分解物の生成量 (表 3~5) :

光照射試料区及び暗対照試料区における分解物を、 標識体 (表 3) 及び 標識体 (表 4) 毎に示す。また親化合物【P】及び について 標識体試料及び 標識体試料の生成量を平均した値を表 5 に示す。

光照射試料

標識体及び 標識体処理試料とも、光照射区において親化合物【P】は急速に光分解された。

処理放射能 (AR) に対する親化合物【P】の残存量は、 標識体処理試料の光照射区では照射開始直後 (第 0 日) の 80.6%AR から照射開始後第 2 日には非検出へと減少し、同じく 標識体処理試料の光照射区では第 0 日の 77.5%AR から第 2 日には非検出となった。両標識体処理試料 (光照射区) の平均値では、親化合物【P】は第 0 日の 78.9%AR から第 1 日の 2.0%AR 及び第 2 日の非検出となった。

標識体及び 標識体処理試料に共通する主要分解物として、 が認められた。 は、 標識体及び 標識体の光照射区におい

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。

て
 体処理試料の平均：)。両標識体処理試料（光照射区）において は
 と

なった。また暗対照試料においても、親化合物【P】の による
 の生成が認められ、 標識体及び 標識体処理試料とも
 となった。

標識体処理試料（光照射区）では、
 が主要光分解物として認められ、
 その最高値は であ
 った。

なお多数の分解物（ 標識体処理試料： 、 標識体処理試料： ）
 が認められたが、 であった。

暗対照試料

暗対照試料（ 標識体及び 標識体処理）において、スピロテトラマト【P】の
 への加水分解が認められた。

、照射終了時点（照射開
 始後第10日）には、暗対照試料中のスピロテトラマト【P】残存率は0%となった。

表3： 標識体処理試料における分解物（表中の数値は処理放射能に対する%、n=2の平均値）

		照射開始後経過時間（日）						
		0	1	2	3	6	8	10
親化合物【P】	光照射	80.6	2.6					
	暗対照	88.3	61.7	35.4	21.9	3.7	1.5	0.0
試験水中の総放射能	光照射	96.7	103.2	103.1	101.6	101.9	101.0	100.6
	暗対照	96.2	99.3	100.3	101.0	102.4	102.3	102.7
¹⁴ CO ₂	光照射	測定せず*	0.0	0.0	0.1	0.3	0.7	1.1
	暗対照	測定せず*						
揮発性有機物質	光照射	測定せず*	0.0	0.0	1.5	0.7	1.0	0.7
	暗対照	測定せず*						
総回収放射能	光照射	96.7	103.3	103.2	103.2	102.9	102.7	102.3
	暗対照	96.2	99.3	100.3	101.0	102.4	102.3	102.7

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: 標識体処理試料における分解物 (表中の数値は処理放射能に対する%, n=2 の平均値)

		照射開始後経過時間 (日)						
		0	1	2	3	6	8	10
親化合物【P】	光照射	77.5	1.5					
	暗対照	84.0	57.5	35.6	20.9	3.8	1.5	0.0
試験水中の総放射能	光照射	96.8	103.2	103.2	102.3	101.7	102.2	102.2
	暗対照	94.8	98.4	100.3	99.8	101.2	103.0	102.0
¹⁴ CO ₂	光照射	測定せず*	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.3
	暗対照	測定せず*						
揮発性有機物質	光照射	測定せず*	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1
	暗対照	測定せず*						
総回収放射能	光照射	96.8	103.2	103.2	102.4	101.9	102.5	102.5
	暗対照	94.8	98.4	100.3	99.8	101.2	103.0	102.0

表 5: 主要分解物の生成量 (標識体及び 標識体処理試料の平均値、表中の数値は処理放射能に対する%)

		照射開始後経過時間 (日)						
		0	1	2	3	6	8	10
親化合物【P】	光照射	78.9	2.0					
	暗対照	86.1	59.6	35.5	21.4	3.8	1.5	0.0
総回収放射能	光照射	96.8	103.2	103.2	102.8	102.4	102.6	102.4
	暗対照	95.5	98.8	100.3	100.4	101.8	102.7	102.4

光分解速度:

一次速度式に適合させて算出した光分解速度定数及び光分解速度(DT50及びDT90値)を下表に示す。また申請者が算出した北緯 35 度及び春期太陽光(4~6月)条件下におけるDT50値も示す。

滅菌自然水中におけるDT50値(実験条件下)は0.19日であり、親化合物【P】は速やかに光分解された。また北緯 35 度及び春期太陽光(4~6月)条件下におけるDT50値は1.35日と算出された。

	実験条件下			春期太陽光(北緯 35 度) 条件でのDT50(days)
	分解速度定数 (days ⁻¹)	DT50 (days)	DT90 (days)	
光照射区	3.68	0.19	0.63	1.35
暗対照区	0.45	1.54	5.11	算出せず

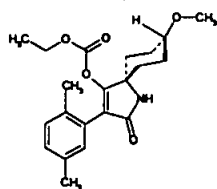
本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任はバイエルクロップサイエンス株式会社にある。

以上の結果、スピロテトラマト【P】は滅菌自然水中で光分解を受け、実験条件下のDT50値は0.19日であった。春期太陽光（北緯35度）条件でのDT50値は1.35日であった。

処理放射能（AR）に対して10%以上生成した主要光分解物として、
が認められた。

以下に自然水中における推定光分解経路を示す。

自然水中光分解経路



スピロテトラマト【P】