

(2) トリホリンのラットにおける吸収、分布、排泄試験②

(資料 No. M-02)

試験機関：XenoBiotic Lab.社 (米国)

報告書作成年：1996年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式：

[¹⁴C]トリホリン

*：¹⁴C 標識位置

化学名： 1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

放射化学的純度： 98.03%

比放射能： $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

標識位置の設定理由¹⁾：過去実施した試験成績の結果から (資料 No.M-01 および M-03)、
および の試験結果に差が認められなかった
ため、本試験では のみを用いた。

供試動物：SD系 (CrI:CDBR または CVF) ラット、雌雄 6~10 週齢、

体重：雄；184.0~266.3 g、雌；182.9~260.7 g

投与方法； [¹⁴C]トリホリンを低用量 (10 mg/kg) はそのまま、高用量 (1000 mg/kg) は非標識化合物で希釈 (比放射能：0.47 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$) し、1%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液に懸濁してラットに単回経口投与した。

投与量の設定根拠；ラット代謝試験 (資料 No. M-01) に基づいて 10 および 1000 mg/kg の投与量を設定した。

以下に本試験の群構成を示す。

群 No.	試験項目	投与量 (mg/kg)	標識位置	投与方法	供試数	
					雄	雌
A	血中動態	対照群	-	-	2	2
B	血中動態	10 (低用量)	環	単回経口	4	4
C	血中動態	1000 (高用量)	環	単回経口	4	4

¹⁾ 申請者註：申請者が記載した。

(つづき)

群 No.	試験項目	投与量 (mg/kg)	標識位置	投与方法	供試数	
					雄	雌
D	組織分布	対照群	-	-	3	3
E	組織分布	10 (低用量)	環	単回経口	9	9
F	組織分布	1000 (高用量)	環	単回経口	9	9
G	胆汁排泄	対照群	-	-	4	4
H	胆汁排泄	10 (低用量)	環	単回経口	4	4
I	胆汁排泄	1000 (高用量)	環	単回経口	4	4

試料採取：

- (1) 血中動態 (A、B、C 群)；低および高用量投与したラットは代謝ケージに収容し、投与 0.25、0.5、1、2、4、8、12、24、48、72、96、120 および 144 時間後に尾静脈から血液を採取した。投与 168 時間後にラットを安楽死させ、心臓穿刺により血液を採取した。一部の血液は遠心分離して血漿と赤血球を得た。
- (2) 組織分布 (D、E、F 群)；低および高用量投与したラットは代謝ケージに収容し、ほぼ t_{max} 、24 および 168 時間後に以下の組織を採取した。対照群は投与 168 時間後に組織を採取した。
血漿、赤血球、副腎、骨、骨髓、脳、脂肪、消化管、消化管内容物、心臓、腎臓、肝臓、肺、筋肉、卵巣、膵臓、下垂体、脾臓、精巣、胸腺、甲状腺、子宮およびカーカス
- (3) 胆汁排泄 (G、H、I 群)；胆管カニューレを挿入した低および高用量群ラットは代謝ケージに収容し、胆汁を投与 2 時間前～投与時点、投与 0～2、2～4、4～24 および 24～48 時間に、糞を 2 日間毎日採取した。投与 48 時間後に屠殺して消化管およびその内容物を採取した。

分析方法： 血漿および胆汁は LSC により放射能を測定した。血液、赤血球、糞および各組織は燃焼後、LSC により放射能を測定した。Win Nonlin (Scientific Consulting Inc., Version 1.0) を用いて、血中放射能濃度から薬物動態パラメーター (C_{max} 、 t_{max} 、 $t_{1/2}$ および AUC) を求めた。

試験結果：結果の概要を表 1～7 に示す。

- (1) 血中動態 (表 1 および 2)；血中放射能濃度を表 1 に示し、血中放射能濃度から求めた薬物動態パラメーターを表 2 に示す。低用量群および高用量群で、それぞれ、2.0～3.5 時間および 5.5 時間で最高血中放射能濃度 (C_{max}) に達し、その時の濃度はそれぞれ 0.67～0.78 $\mu\text{g/g}$ および 7.62～8.10 $\mu\text{g/g}$ であった。なお、 $t_{1/2}$ は、低用量群で雄は 125.0 時間、雌は 95.7 時間と性差があり、高用量群においては性差がなく、

雌雄 98.8～111.5 時間であった。低用量群は AUC においても性差が認められた。

- (2) 胆汁排泄 (表 3) ; 胆汁および糞への放射能の排泄および消化管の放射能を表 3 に示す。低用量群において、48 時間以内に胆汁および糞中にそれぞれ、投与量の 8.69～13.35% および 14.00～19.57% が排泄され、消化管 (内容物を含む) には投与量の 1.19～7.36% が残っていた。高用量群では、48 時間以内に胆汁および糞中にそれぞれ、投与量の 2.28～3.73% および 30.94～55.85% が排泄され、消化管 (内容物を含む) には、雄および雌それぞれ、投与量の 40.38% および 19.85% が残っていた。本試験から吸収率 (100% - 未吸収放射能 (糞 + 消化管 + その内容物)) は、10 mg/kg 群で 78.64～79.24%、1000 mg/kg 群で 24.30～28.68% と推定された。
- (3) 組織分布 (表 4～7) ; t_{max} 時点に比較的高濃度の残留が認められた組織は、低用量群で肝臓 (7.216～9.460 $\mu\text{g/g}$)、腎臓 (3.671～3.727 $\mu\text{g/g}$)、肺 (2.361～7.315 $\mu\text{g/g}$)、脾臓 (2.080～3.237 $\mu\text{g/g}$)、副腎 (1.697～9.734 $\mu\text{g/g}$) および下垂体 (1.649～3.250 $\mu\text{g/g}$) であり、高用量群で肝臓 (26.750～38.516 $\mu\text{g/g}$)、腎臓 (20.923～33.721 $\mu\text{g/g}$)、肺 (21.231～32.038 $\mu\text{g/g}$)、副腎 (20.453～39.170 $\mu\text{g/g}$)、脾臓 (15.266～23.707 $\mu\text{g/g}$)、骨 (12.950～20.548 $\mu\text{g/g}$) および骨髄 (16.623～21.493 $\mu\text{g/g}$) であった。いずれの組織濃度も 168 時間までに速やかに減少した。

表 1 血中放射能濃度

採血時点 (時間)	血中濃度($\mu\text{g/g}$)			
	10 mg/kg		1000 mg/kg	
	雄	雌	雄	雌
0.25	0.14	0.14	1.41	1.64
0.5	0.28	0.29	3.26	3.93
1	0.43	0.47	4.89	5.41
2	0.64	0.67	6.58	6.08
4	0.78	0.55	7.06	6.90
8	0.58	0.33	7.44	7.00
12	0.46	0.21	5.81	5.19
24	0.31	0.09	4.35	1.99
48	0.21	0.07	2.62	0.98
72	0.17	0.05	2.04	0.81
96	0.13	0.04	1.69	0.65
120	0.13	0.03	1.44	0.55
144	0.11	0.03	1.34	0.61
168	0.10	0.03	1.10	0.49

数値は 4 匹の平均値 (申請者が計算した)

表 2 全血における薬物動態パラメーター

投与量 (mg/kg)	性別	t_{max} (時間)	C_{max} ($\mu\text{g/g}$)	$t_{1/2}$ (時間)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{hr/g}$)
10	雄	3.5	0.78	124.97	52.79
	雌	2.0	0.67	95.70	17.66
1000	雄	5.5	8.10	98.83	583.18
	雌	5.5	7.62	111.54	299.23

数値は 4 匹の平均値。

表 3 胆汁および糞への放射能の排泄、および消化管（内容物）中の放射能

試料	採取時間 (時間)	投与量に対する%			
		10 mg/kg		1000 mg/kg	
		雄	雌	雄	雌
胆汁	0~2	2.33	0.84	0.09	0.06
	2~4	3.59	1.78	0.12	0.08
	4~24	5.91	5.24	1.45	0.94
	24~48	1.52	0.83	2.07	1.20
	計	13.35	8.69	3.73	2.28
糞	0~24	13.78	10.15	13.79	29.56
	24~48	5.79	3.85	17.15	26.29
	計	19.57	14.00	30.94	55.85
消化管	48 時間後	0.17	0.35	1.25	0.51
消化管内容物	48 時間後	1.02	7.01	39.13	19.34
合計		34.11	30.05	75.05	77.98

数値は 4 匹の平均値

表4 低用量群 (10 mg/kg) における組織分布

組織	μg 当量/g (ppm)					
	雄			雌		
	t _{max} (4 時間)	24 時間	168 時間	t _{max} (2 時間)	24 時間	168 時間
血漿	0.575	0.177	<0.02	1.078	0.065	<0.02
赤血球	0.586	0.329	0.213	0.957	0.102	0.059
副腎	1.697	0.361	0.085	9.734	0.157	0.036
骨	0.498	0.192	0.085	0.804	0.060	0.028
骨髓	1.064	0.388	0.052	2.112	0.165	0.021
脳	0.218	0.052	0.029	0.604	0.023	<0.02
脂肪	0.323	0.066	0.040	1.050	<0.04	<0.04
消化管	4.966	0.288	0.040	11.452	0.172	0.020
消化管内容物	27.809	0.289	<0.02	31.200	0.360	<0.02
心臓	0.716	0.214	0.086	1.940	0.082	0.030
腎臓	3.671	0.668	0.144	3.727	0.205	0.047
肝臓	7.216	1.701	0.229	9.460	0.507	0.084
肺	2.361	0.389	0.106	7.315	0.183	0.039
筋肉	0.603	0.122	0.055	1.416	0.062	0.020
卵巣	—	—	—	2.263	0.095	0.022
膵臓	2.080	0.269	0.094	3.237	0.103	0.068
下垂体	1.649	0.421	0.168	3.250	0.176	0.034
脾臓	1.258	0.322	0.086	2.454	0.119	0.031
精巣	0.747	0.227	0.041	—	—	—
胸腺	0.693	0.174	0.048	1.578	0.063	0.025
甲状腺	1.671	0.428	0.175	2.073	0.383	0.079
子宮	—	—	—	1.345	0.079	0.023
カーカス	0.728	0.176	0.091	1.624	0.087	0.038

— : 該当せず

表 5 高用量群 (1000 mg/kg) における組織分布

組織	μg 当量/g (ppm)					
	雄			雌		
	t _{max} (6 時間)	24 時間	168 時間	t _{max} (6 時間)	24 時間	168 時間
血漿	7.861	2.532	<0.4	10.580	4.016	<0.4
赤血球	7.691	5.305	3.168	7.574	4.163	0.808
副腎	20.453	4.716	1.333	39.170	19.882	0.490
骨	12.950	2.586	0.921	20.548	2.774	<0.4
骨髄	16.623	3.038	0.900	21.493	7.649	<0.4
脳	3.202	0.752	<0.4	3.741	1.573	<0.4
脂肪	3.220	1.165	1.014	6.795	2.856	<0.8
消化管	237.121	9.757	0.791	326.951	70.193	<0.4
消化管内容物	2301.691	38.537	<0.4	4100.395	779.035	<0.4
心臓	8.016	3.144	1.147	12.422	5.281	0.506
腎臓	20.923	8.652	1.886	33.721	12.283	0.692
肝臓	38.516	14.380	2.777	26.750	21.213	1.097
肺	21.231	5.221	1.288	32.038	18.412	0.512
筋肉	7.007	1.627	0.909	8.556	5.107	<0.4
卵巣	—	—	—	12.621	6.605	<0.4
膵臓	15.266	3.859	1.175	23.707	10.694	<0.8
下垂体	14.487	7.079	1.976	18.457	10.181	0.983
脾臓	11.080	3.778	1.106	12.959	8.004	0.462
精巣	9.149	3.230	0.471	—	—	—
胸腺	6.698	2.153	0.786	8.037	5.154	<0.4
甲状腺	18.558	6.050	2.977	19.460	9.932	0.703
子宮	—	—	—	6.685	5.568	<0.4
カーカス	21.509	2.544	1.177	108.368	5.762	0.618

— : 該当せず

表 6 低用量群 (10 mg/kg) における組織分布

組織	投与量に対する%					
	雄			雌		
	t _{max} (4 時間)	24 時間	168 時間	t _{max} (2 時間)	24 時間	168 時間
血漿	0.06	0.02	0.00	0.12	0.01	0.00
赤血球	0.09	0.06	0.04	0.17	0.02	0.01
副腎	0.00	0.00	0.00	0.02	0.00	0.00
骨	0.01	0.01	0.00	0.02	0.00	0.00
骨髄	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脳	0.02	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00
脂肪	0.01	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
消化管	2.03	0.15	0.02	4.26	0.08	0.01
消化管内容物	37.43	0.63	0.02	44.18	0.70	0.01
心臓	0.02	0.01	0.00	0.06	0.00	0.00
腎臓	0.31	0.07	0.02	0.28	0.02	0.00
肝臓	2.63	1.00	0.15	2.70	0.23	0.04
肺	0.11	0.02	0.01	0.31	0.01	0.00
筋肉	0.04	0.01	0.00	0.12	0.00	0.00
卵巣	—	—	—	0.01	0.00	0.00
膵臓	0.04	0.01	0.00	0.08	0.00	0.00
下垂体	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脾臓	0.03	0.01	0.00	0.05	0.00	0.00
精巣	0.06	0.02	0.00	—	—	—
胸腺	0.02	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00
甲状腺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
子宮	—	—	—	0.03	0.00	0.00
カーカス	4.64	1.32	0.89	10.55	0.65	0.31

— : 該当せず

表7 高用量群 (1000 mg/kg) における組織分布

組織	投与量に対する%					
	雄			雌		
	t _{max} (6 時間)	24 時間	168 時間	t _{max} (6 時間)	24 時間	168 時間
血漿	0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00
赤血球	0.02	0.01	0.01	0.01	0.01	0.00
副腎	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
骨	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
骨髄	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脳	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脂肪	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
消化管	1.16	0.05	0.00	1.32	0.38	0.00
消化管内容物	39.42	0.98	0.00	74.28	15.45	0.00
心臓	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
腎臓	0.02	0.01	0.00	0.03	0.01	0.00
肝臓	0.16	0.08	0.02	0.10	0.11	0.01
肺	0.01	0.00	0.00	0.02	0.01	0.00
筋肉	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
卵巣	—	—	—	0.00	0.00	0.00
膵臓	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00
下垂体	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
脾臓	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
精巣	0.01	0.00	0.00	—	—	—
胸腺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
甲状腺	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
子宮	—	—	—	0.00	0.00	0.00
カーカス	1.62	0.20	0.12	8.39	0.45	0.05

— : 該当せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は全農グリーンリソース株式会社にある

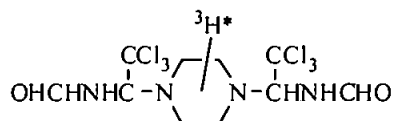
(3) トリホリンのラットにおける吸収、分布、排泄および代謝物の同定試験

(資料 No. M-03)

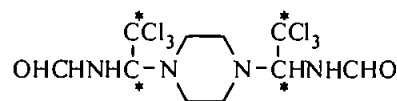
(文献名 : Pestic. Sci. 1977, 8, 193-202)

供試標識化合物 :

構造式 :



[³H]トリホリン



[¹⁴C]トリホリン

* : 標識位置

化学名 : 1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

比放射能 ; 以下に表示する。

標識位置	[³ H]トリホリン	[¹⁴ C]トリホリン
比放射能	340 mCi/g	22 mCi/g

標識位置の設定理由 : 全ての可能な代謝物の排泄物をあきらかにするために およ
び を標識位置とした。

供試動物 : ウイスター系 FW 49、Biberach ラット雄、体重 200~300 g

試験方法 : 下表に示す試験項目を実施し、各投与量をラットに経口投与した。

実験 No.	検討項目	標識体	トリホリン投与量 (mg/kg 体重)	放射活性投与量 (μCi/動物)	動物数
1	血中濃度	³ H	11.5	40.8	9
2a	尿および糞中排泄 (低用量)	³ H	11.5	36.4	10
2b	尿および糞中排泄 (低用量)	¹⁴ C	15.0	38.0	10
3a	胆汁中排泄	³ H	9.0	22.5	6 (4) *
3b	胆汁中排泄	¹⁴ C	9.0	38.5	2
4a	尿および糞中排泄 (高用量)	³ H	25、50、100、200	9.2	8
4b	尿および糞中排泄 (高用量)	¹⁴ C	50、100	3.2	4

* () 内は投与後 30 時間連続で胆汁を採取した動物数

投与液の調製：

1、2a および 3a：トリホリン標識化合物を非標識化合物で希釈し、乳濁液（25% a.i.w/v）（EC25）とし、投与前に水で希釈した。

上記以外： トリホリン標識化合物を非標識トリホリンで希釈し、1%カルボキシメチルセルロース水溶液により懸濁液とした。

試料の採取：血液は投与後 15、30、45 分および、1、2、4、8、10、24、30、48、72 および 96 時間に眼窩静脈叢より採取した。糞および尿は代謝ケージを用い、³H 標識体が 0～6、6～12、12～24、24～30、30～48、48～72、72～96 および 96～120 時間間隔、¹⁴C 標識体が 0～6、6～24、24～30、30～48 および 48～72 時間間隔で採取した。胆汁は、ラットを特殊なケージに保定し、ジエチルエーテル麻醉下で胆管にカテーテルを挿入して、投与後 30 時間にわたり 1 時間間隔で採取した。

分析方法：血液は脱色および可溶化後、尿および胆汁は直接 LSC により放射能を測定した。糞は燃焼分析、あるいは水とともにホモジナイズし、可溶化後、LSC により放射能を測定した。

尿および糞中代謝物の分析のため、尿試料を NaOH で pH 10 に調整後、2 倍量のクロロホルムで 3 回抽出後 TLC 精製し、糞はアセトン抽出後 TLC 分析した。代謝物の同定は、TLC 精製後、標品とのコクロマトグラフィーおよび MS 分析で行った。

試験結果：

血中濃度：血中の濃度推移を図 1 に示す。経口投与 4 時間後に血中の濃度は最高値（投与量の 1.3%）に達した。4～10 時間にかけて速やかに減少し、その後、徐々に減少した。投与 96 時間後には投与量の 0.3%となった。

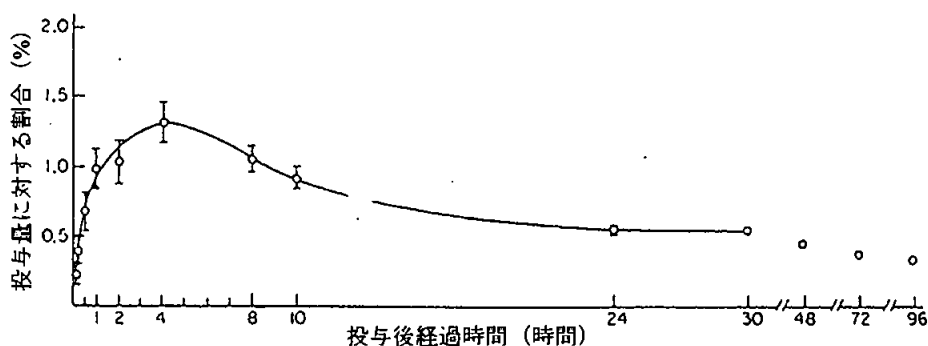


図 1 トリホリン投与後の血液中の放射能量（9匹の平均）

排泄： 低用量での尿および糞への放射能の排泄量を表 1 および表 2 に示す。両標識体において投与 24 時間までに投与放射能の 90.8～92.0%が排泄された。³H 標識体では、投与 24 時間までの尿および糞中に、それぞれ投与放射能の 74.3%および 16.5%が、¹⁴C 標識体ではそれぞれ 52.5%および 39.5%が排泄された。³H 標識

体では、次の4日間には尿中に3.2%、糞中に1.2%排泄された。¹⁴C標識体では投与3日までに尿および糞中から放射能は消失した。

また、高用量ラットにおける尿中排泄を表3に示す。

投与後48時間以内に尿中に、³H標識体は70.5~75.1%、¹⁴C標識体は51.6~57.4%が排泄された。

胆汁への放射能の排泄量を表4に示す。

経口投与後2~3時間に胆汁中放射能は最高値(投与量の2.4%)を示した。³Hおよび¹⁴C標識体は投与24時間までに18.6%および14.8%が排泄され、³H標識体はその後30時間までに排泄された量は0.6%だった。

表1 尿および糞への放射能の排泄量(低用量、³H標識体)

時間	排泄量(投与量に対する%)		
	尿	糞	合計
0~6	29.4	0.1	29.5
6~12	34.5	1.8	36.3
12~24	10.4	14.6	25.0
24~30	0.6	0.3	0.9
30~48	1.3	0.6	1.9
48~72	0.6	0.2	0.8
72~96	0.3	0.1	0.4
96~120	0.4	NA	0.4
総計	77.5	17.7	95.2

10匹のラットの平均値を示す。

NA:適用せず。

表2 尿および糞への放射能の排泄量（低用量、¹⁴C 標識体）

時間	排泄量（投与量に対する%）		
	尿	糞	合計
0～6	20.3	NA	-
6～24	32.2	NA	-
(0～24)	NA	39.5	92.0
24～30	0.9	1.0	1.9
30～48	1.0	ND	1.0
48～72	0.6	ND	0.6
総計	54.9	40.5	-

10匹のラットの平均値を示す。

NA：適用せず。

ND：検出せず。

表3 尿への放射能の排泄量（高用量）

時間	排泄量（投与量に対する%）					
	³ H 標識体、投与量 mg/kg				¹⁴ C 標識体、投与量 mg/kg	
	25	50	100	200	50	100
0～24	66.8	69.2	72.9	71.4	50.8	48.7
24～48	5.1	1.3	2.3	1.8	6.6	2.8
総計	71.9	70.5	75.1	73.2	57.4	51.6

2匹のラットの平均値を示す（平均は申請者が計算した）。

表4 胆汁への放射能の排泄量

時間	排泄量（投与量に対する%）	
	³ H 標識体* ¹	¹⁴ C 標識体* ²
0～4	7.5	-
4～8	6.0	-
0～8	-	12.4 ¹⁾
8～24	5.1	2.4
24～30	0.6	
総計	19.1	14.8* ³

*1：4匹のラットの平均値を示す（平均は申請者が計算した）。

*2：2匹のラットの平均値を示す（平均は申請者が計算した）。

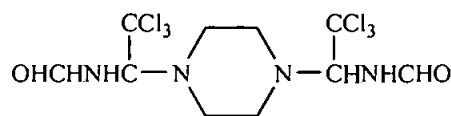
*3：0～24時間の総計

¹⁾ 申請者註：文献では4～8時間に記載されていたが、0～8時間の値だと考えられるため、0～8時間の欄に記入した。

代謝： 胆汁（0～8 時間）および尿（0～24 時間）中の代謝物分析の結果、代謝物として M1 および W1069 が検出された。胆汁（0～8 時間）中の代謝物の TLC スポット量に対する割合を表 5 に示す。0～24 時間の ^3H 標識体では主に W1069 が排泄され、 ^{14}C 標識体では W1069（投与量に対して 36%）および M1（投与量に対して 17%）が検出された。糞中では未変化のトリホリンが検出された。ラットにおける推定代謝経路を図 2 に示す。

表 5 0～8 時間における胆汁中の代謝物の割合

代謝物	TLC 添加量に対する割合 (%)	
	^3H 標識体	^{14}C 標識体
M1	48	52
W1069	37	20
M3+M4	微量	25



トリホリン (A)



M1

W 1069

図 2 トリホリンのラットにおける推定代謝経路²⁾

²⁾ 申請者註：申請者が作成した。

2. 植物代謝に関する試験

(1) トリホリンのトマトにおける代謝試験（代謝・分解）

（資料 No. M-04）

試験機関：Huntingdon Research Centre（英国）

報告書作成年：1993年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式：

[¹⁴C]トリホリン

*：¹⁴C 標識位置

化学名： 1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

放射化学的純度： > 98%

比放射能： mCi/mmol

標識位置の設定理由¹⁾：構造の安定した を標識位置とした。

供試植物：トマト（品種：Moneymaker）（環境制御室内にて栽培）

入手したトマト植物を1週間環境制御室内で順化させた後、ポットに移植した。

試験方法：

処理溶液；非標識体トリホリンで約 50 μCi/mg に希釈した [¹⁴C]トリホリン（約 12 mg）を製剤白試料 50 μL（EC 190 g/L）と混合して製剤（約 62 mg）を調製し、水 10 mL で希釈して約 0.6%の懸濁液を得た。

処理方法；シリンジにて処理液を果実 [120 μg (100 μL) /果実] および葉 [240 μg (200 μL) /葉] の表面に滴下処理した。処理は 8～10 日間隔で 4 回実施した。葉および果実の処理は別々の植物に行った。

試料の採取；処理果実は 1 回目処理の 2 時間後、ならびに最終処理の 2 時間および 3 日後に、処理葉は 1 回目処理の 2 時間後および最終処理の 3 日後に採取した。また、最終処理 3 日後には、葉に処理した植物から果実を採取（非処理果実と表記）し、移行性を調べた。

分析方法；処理果実、処理葉および非処理果実は図 1 のスキームに従い、抽出・分析した。

¹⁾ 申請者註：申請者が追記した。

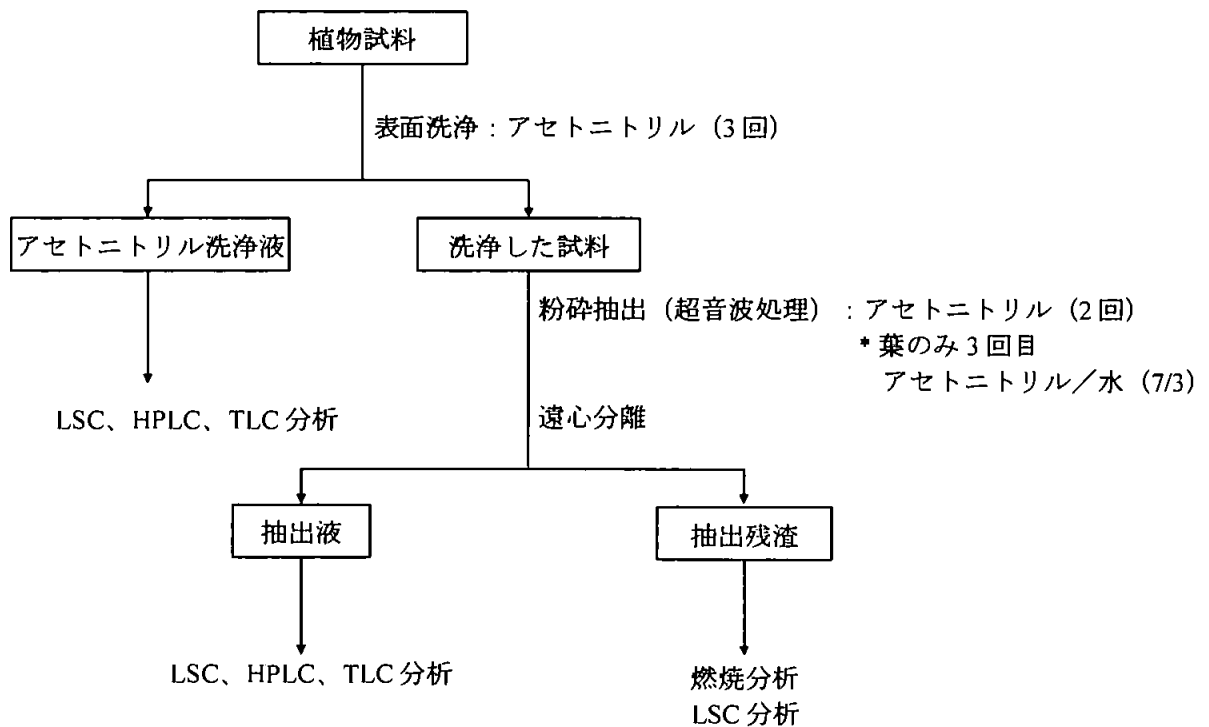


図1 処理果実、処理葉および非処理果実の抽出および分析スキーム

処理植物のみ、表面洗浄液および抽出液中の代謝物について、標品との HPLC および TLC コクロマトグラフィーにより分析した。分析は得られた表面洗浄液および抽出液を合わせて2連で実施した。

試験結果：

¹⁴C 分布・移行；

[¹⁴C]トリホリンの果実処理および葉面処理における ¹⁴C 分布をそれぞれ、表 1 および表 2 に示す。最終処理 3 日後の総放射能残留量 (TRR) は処理果実および処理葉でそれぞれ、9.7 μg/g および 88.5 μg/g であり、放射能の回収率は、それぞれ処理量の 93.5% および 92.1% であった。放射能の大部分は、表面洗浄から回収された。最終処理 3 日後の処理果実の表面洗浄液、抽出液および残渣は処理量に対して、それぞれ処理量の 85.1%、5.8% および 2.6%、処理葉ではそれぞれ処理量の 79.2%、9.4% および 3.5% であった。

なお、葉に処理した植物から採取した果実中に検出された放射能は 0.004 μg/g であり (表 3)、処理部位から非処理部位への放射能の移行が微量であることが示された。

表1 1回および最終処理後の処理果実中の放射能分布

試料	処理 ¹⁴ C 量に対する割合 (%)		
	1回処理2時間後	最終処理2時間後	最終処理3日後
試料数	3	7	8
表面洗液	93.6	92.2	85.1
抽出液	3.6	5.8	5.8
残渣	0.7	2.3	2.6
合計*	97.9 (6.2)	100.2 (15.6)	93.5 (9.7)

* () 内はトリホリン換算μg/g濃度

表2 1回および最終処理後の処理葉中の放射能分布

試料	処理 ¹⁴ C 量に対する割合 (%)	
	1回処理2時間後	最終処理3日後
試料数	2	8
表面洗液	93.0	79.2
抽出液	1.9	9.4
残渣	3.0	3.5
合計*	97.8 (16.9)	92.1 (88.5)

* () 内はトリホリン換算μg/g濃度

表3 最終処理3日後の非処理果実中の放射能分布

試料	%TRR
表面洗液	18
抽出液	34
残渣	48
合計	100 (0.004)

* () 内はトリホリン換算μg/g濃度

代謝: [¹⁴C]トリホリンを処理した果実における代謝物分布を表4~6に、葉における代謝物分布を表7および8に示す。

処理果実および処理葉のいずれにおいても検出された主要成分は未変化のトリホリン (91.9~97.0%TRR) であり、代謝物として W1069 および W625 が検出されたが、いずれも1%TRR未満であった。

表4 1回処理2時間後の果実中の代謝物分布

代謝物	表面洗液		抽出液		合計	
	%TRR	濃度*	%TRR	濃度	%TRR	濃度
表面洗液/抽出液	95.6		3.7			
トリホリン	94.6	5.87	2.44	0.15	97.04	6.02
W1069	<1.0	<0.06	0.22	0.014	0.22	0.014
	<1.0	<0.06	0.11	0.007	0.11	0.007
W625	<1.0	<0.06	0.3	0.019	0.3	0.019
未同定代謝物 A	<1.0	<0.06	0.15	0.009	0.15	0.009
未同定代謝物 B	<1.0	<0.06	0.07	0.0004	0.07	0.0004
未同定代謝物 C	<1.0	<0.06	0.26	0.016	0.26	0.016
その他	1.0	0.06	0.15	0.009	1.15	0.07
残渣			0.7	0.04	0.7	0.04
総回収放射能					100.0	6.2

*トリホリン換算 $\mu\text{g/g}$ 濃度

表5 最終処理2時間後の果実中の代謝物分布

代謝物	表面洗浄		抽出液		合計	
	%TRR	濃度*	%TRR	濃度	%TRR	濃度
表面洗液/抽出液	91.9		5.8			
トリホリン	88.7	14.9	3.93	0.64	92.58	15.555
W1069 **	<0.9	<0.15	0.57	0.11	0.57	0.11
	<0.9	<0.15	0.30	0.052	0.30	0.052
W625	<0.9	<0.15	0.21	0.036	0.21	0.036
未同定代謝物 A	<0.9	<0.15	<0.15	<0.029	<0.17	<0.085
未同定代謝物 B	<0.9	<0.15	0.21	0.036	0.21	0.036
未同定代謝物 C	<0.9	<0.15	0.39	0.068	0.39	0.068
その他	3.3	0.53	0.18	0.035	3.4	0.57
残渣			2.3	0.37	2.3	0.37
総回収放射能					100.0	15.6

値は2連の平均値(申請者が計算した。)

*: トリホリン換算 $\mu\text{g/g}$ 濃度

** : 2成分に分離した。

表6 最終処理3日後に採取した果実中の代謝物分布

代謝物	表面洗浄		抽出液		合計	
	%TRR	濃度*	%TRR	濃度	%TRR	濃度
表面洗液/抽出液	90.9		6.2			
トリホリン	88.2	8.8	3.7	0.39	91.90	9.21
W1069 **	<0.9	<0.09	0.92	0.092	0.92	0.092
	<0.9	<0.09	0.28	0.028	0.28	0.028
W625	<0.9	<0.09	0.35	0.037	0.35	0.037
未同定代謝物 A	<0.9	<0.09	0.25	0.026	0.25	0.026
未同定代謝物 B	<0.9	<0.09	0.29	0.031	0.29	0.031
未同定代謝物 C	<0.9	<0.09	0.37	0.039	0.37	0.039
その他	2.8	0.28	0.10	0.011	2.9	0.29
残渣			2.8	0.28	2.8	0.28
総回収放射能					100.0	9.7

値は2連の平均値（申請者が計算した。）

*：トリホリン換算 $\mu\text{g/g}$ 濃度

**：2成分に分離した。

表7 1回処理2時間後の葉中の代謝物分布

代謝物	表面洗液		抽出液		合計	
	%TRR	濃度*	%TRR	濃度	%TRR	濃度
表面洗液/抽出液	95.1		1.9			
トリホリン	94.1	15.9	1.69	0.29	95.79	16.19
W1069	<1.0	<0.17	<0.02	<0.003	<1.0	<0.17
	<1.0	<0.17	<0.02	<0.003	<1.0	<0.17
W625	<1.0	<0.17	<0.02	<0.003	<1.0	<0.17
未同定代謝物 A	<1.0	<0.17	0.06	0.010	0.06	0.010
未同定代謝物 B	<1.0	<0.17	<0.02	<0.003	<1.0	<0.17
未同定代謝物 C	<1.0	<0.17	<0.02	<0.003	<1.0	<0.17
その他	1.0	0.17	0.15	0.025	1.15	0.19
残渣			3.1	0.52	3.1	0.52
総回収放射能					100.0	16.9

*：トリホリン換算 $\mu\text{g/g}$ 濃度

表 8 最終処理 3 日後に採取した葉中の代謝物分布

代謝物	表面洗浄		抽出液		合計	
	%TRR	濃度*	%TRR	濃度	%TRR	濃度
表面洗浄液/抽出液	86.1		10.2			
トリホリン	83.0	79.4	7.9	7.1	90.94	86.5
W1069 **	<0.85	<0.82	0.74	0.70	0.74	0.70
	<0.85	<0.82	0.35	0.32	0.35	0.32
W625	<0.85	<0.82	0.35	0.32	0.35	0.32
未同定代謝物 A	<0.85	<0.82	0.21	0.19	0.21	0.19
未同定代謝物 B	<0.85	<0.82	0.17	0.14	0.17	0.14
未同定代謝物 C	<0.85	<0.82	0.31	0.28	0.31	0.28
その他	3.1	3.1	0.10	0.093	3.15	3.1
残渣			3.8	3.3	3.8	3.3
総回収放射能					100.0	88.5

値は 2 連の平均値 (申請者が計算した。)

*: トリホリン換算 $\mu\text{g/g}$ 濃度

** : この分画は 2 成分に分離した。

予想代謝経路 : トリホリンのトマトにおける予想代謝経路図は図 2 に示すように、
 の開裂、および の であった。

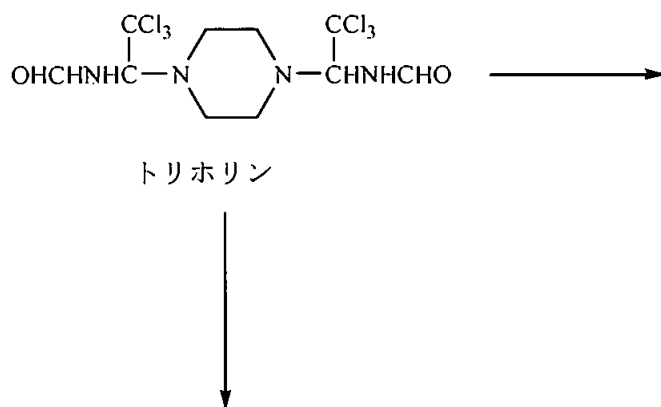


図 2 トマトにおける推定代謝経路

(2) トリホリンのりんごにおける代謝試験（代謝・分解）

（資料 No.M-05）

試験機関：Huntingdon Research Centre（英国）

報告書作成年：1993年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式：

[¹⁴C]トリホリン

*：¹⁴C 標識位置

化学名： 1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

放射化学的純度： > 98%

比放射能： mCi/mmol

標識位置の設定理由¹⁾：構造の安定した を標識位置とした。

供試植物：りんご（品種：Lord Lambourne）（屋外栽培）

容器で育成中の半矮性台木に接木した2~3年生りんご樹ポットを屋外に置いた。

試験方法：

処理溶液；非標識体トリホリンで約 50 μCi/mg に希釈した [¹⁴C]トリホリン（約 6 mg）を製剤白試料 25 μL（EC 190 g/L）と混合して製剤（約 31 mg）を調製し、水 5 mL で希釈して約 0.6%の懸濁液を得た。

処理方法；シリンジにて処理液を果実 [120 μg（100 μL）/果実] および葉 [120 μg（100 μL）/葉] の表面に滴下処理した。処理は 8 日間隔で 5 回実施した。

試料の採取；処理果実および葉は 1 回目処理の 2 時間後、ならびに最終処理の 14 日後に採取した。最終処理 14 日後には葉に処理した植物から果実を採取（非処理果実と表記）し、移行性を調べた。

分析方法；処理果実は図 1 のスキームに従い分析した。

¹⁾ 申請者註：申請者が追記した。

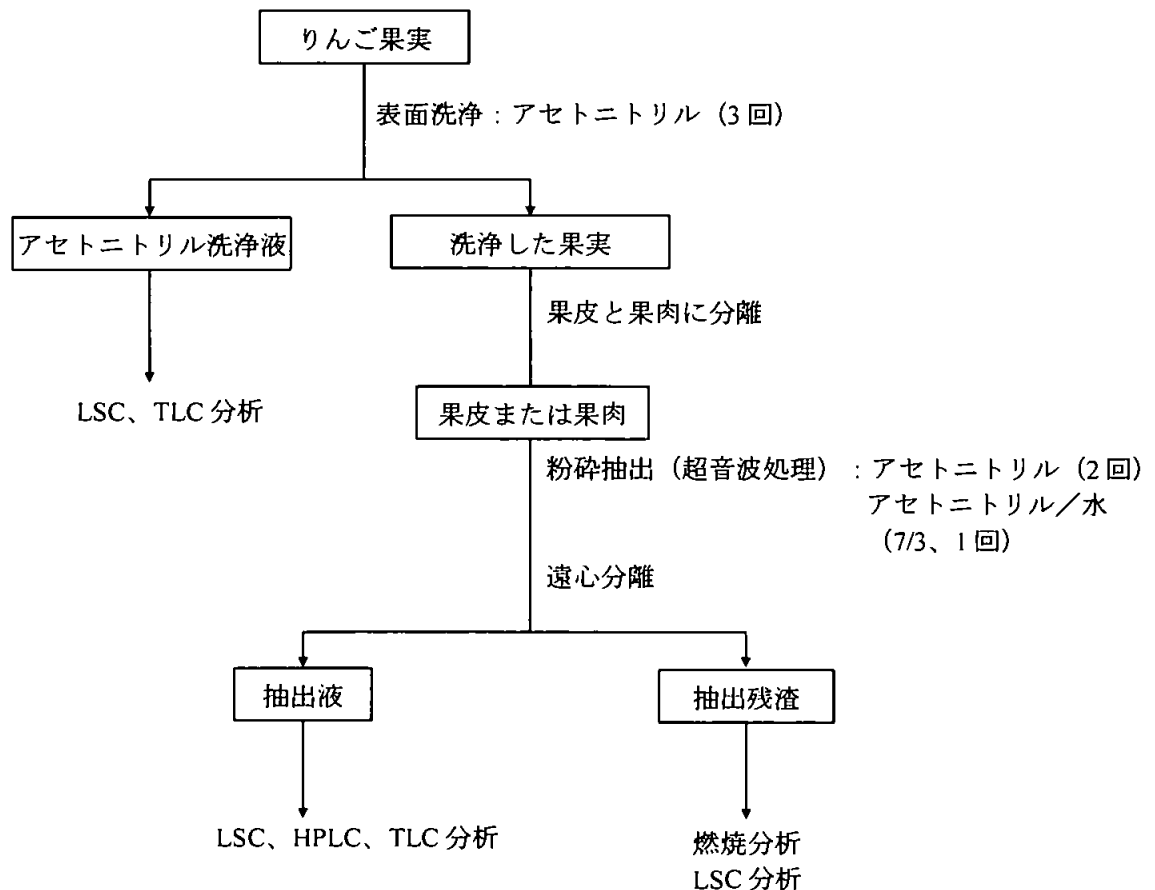


図1 処理果実の抽出および分析スキーム

処理果実は果皮と果肉を分離したが、非処理果実は果肉と果皮に分離せず、処理薬もそのまま、同様の抽出操作を行った。

処理植物のみ、表面洗浄液および抽出液中の代謝物について標品との HPLC および TLC コクロマトグラフィーにより分析した。

果皮の抽出残渣については、(37°C、18時間)、0.6 M 塩酸 (37°C、18時間) および 6 M 塩酸 (約 90°C、1時間) を用いて加水分解を行い、遊離代謝物の分析を行った。

試験結果：

¹⁴C 分布・移行：

[¹⁴C]トリホリンの処理果実および処理薬における ¹⁴C 分布をそれぞれ、表 1 および表 2 に示す。最終処理 14 日後における総放射能残留量 (TRR) は処理果実および処理薬でそれぞれ、1.36 μg/g および 122 μg/g であった。放射能の回収率は、それぞれ処理量の 32.2% および 22.3% であり、トリホリンの流失が相当あったことが示された。放射能の大部分は、表面洗浄から回収された。最終処理 14 日後の処理果実の表面洗浄液に処理放射能の 23.8% が回収され、果皮の抽出液および残渣に、1.4 および 4.1% TRR、果肉の

抽出液および残渣に、2.2 および 0.6%TRR が検出された。処理葉では抽出液処理量に対して、それぞれ 14.7%、5.7%および 2.0%であった。

なお、非処理果実中に検出された放射能は 0.0009 $\mu\text{g/g}$ であり、処理部位から非処理部位への放射能の移行が微量であることが示された。

表 1 1回および最終処理後の処理果実中の放射能分布

試料	処理 ^{14}C 量に対する割合 (%)	
	1回処理 2 時間後	最終処理 14 日後
試料数	3	14
表面洗液	94.8	23.8
果皮		
抽出液	0.4	1.4
残渣	0.4	4.1
果肉		
抽出液	0.2	2.2
残渣	0.2	0.6
合計*	95.8 (1.59)	32.2 (1.36)

* () 内はトリホリン換算 $\mu\text{g/g}$ 濃度

表 2 1回および最終処理後の処理葉中の放射能分布

試料	1回処理 2 時間後	最終処理 14 日後
試料数	3	10
表面洗液	54.9	14.7
葉抽出液	2.9	5.7
抽出残渣	2.1	2.0
合計*	59.9 (92.4)	22.3 (122)

* () 内はトリホリン換算 $\mu\text{g/g}$ 濃度

代謝：[^{14}C]トリホリンを処理した果実における代謝物分布を表 3 および 4 に、葉における代謝物分布を表 5 および 6 に示す。

処理果実および処理葉のいずれにおいても検出された主要成分は未変化のトリホリン (76.0~94.6%TRR) であり、代謝物として W1069 、 および W625 が検出されたが、いずれも 1.5%TRR 以下であった。

また、最終処理 14 日後の果皮抽出残渣 (13%TRR) を加水分解処理した結果を表 7 に示す。 、0.6 M および 6 M 塩酸処理により、それぞれ 0.8、1.8 および 6.8%TRR が抽出された。

表3 1回処理2時間後の果実中の代謝物分布

代謝物	表面洗液		果皮抽出液		果肉抽出液		合計	
	%TRR	濃度*	%TRR	濃度	%TRR	濃度	%TRR	濃度
表面洗液/抽出液	98.8		0.4		0.2			
トリホリン	94.0	1.49	0.4	0.005	0.2	0.003	94.6	1.50
W1069	<1.0	<0.02	<0.004	<0.0001	<0.002	<0.0001	<1.0	<0.02
	<1.0	<0.02	<0.004	<0.0001	<0.002	<0.0001	<1.0	<0.02
W625	<1.0	<0.02	<0.004	<0.0001	<0.002	<0.0001	<1.0	<0.02
未同定代謝物 A	<1.0	<0.02	<0.004	<0.0001	<0.002	<0.0001	<1.0	<0.02
未同定代謝物 B	<1.0	<0.02	<0.004	<0.0001	<0.002	<0.0001	<1.0	<0.02
未同定代謝物 C	<1.0	<0.02	<0.004	<0.0001	<0.002	<0.0001	<1.0	<0.02
その他	4.9	0.08	0.004	0.00005	0.006	0.0001	4.9	0.08
残渣			0.4	0.006	0.2	0.003	0.6	0.01
総回収放射能							100.0	1.59

*トリホリン換算 $\mu\text{g/g}$ 濃度

表4 最終処理14日後の果実中の代謝物分布

代謝物	表面洗液		果皮		果肉		合計	
	%TRR	濃度*	%TRR	濃度	%TRR	濃度	%TRR	濃度
表面洗液/抽出液	73.2		4.5		7.0			
トリホリン	71.0	0.98	2.4	0.04	2.9	0.04	76.0	1.05
W1069	<0.75	<0.009	0.6	0.008	0.8	0.01	1.4	0.02
	<0.75	<0.009	0.4	0.005	0.9	0.01	1.2	0.02
W625	<0.75	<0.009	0.4	0.006	0.8	0.01	1.2	0.02
未同定代謝物 A	<0.75	<0.009	0.2	0.003	0.3	0.004	0.5	0.01
未同定代謝物 B	<0.75	<0.009	0.3	0.004	0.3	0.004	0.6	0.01
未同定代謝物 C	<0.75	<0.009	0.4	0.006	1.1	0.02	1.5	0.02
その他	2.0	0.03	0.02	0.0006	<0.07	<0.001	2.0	0.03
残渣			13.0	0.18	2.1	0.03	15.0	0.21
総回収放射能							100.0	1.36

値は2連の平均値(申請者が計算した。)

*トリホリン換算 $\mu\text{g/g}$ 濃度

表5 1回処理2時間後の葉中の代謝物分布

代謝物	表面洗液		葉抽出液		合計	
	%TRR	濃度*	%TRR	濃度	%TRR	濃度
表面洗液/抽出液	91.8		4.8			
トリホリン	88.0	81.0	4.6	4.3	92.6	86.0
W1069	<0.9	<0.8	<0.05	<0.05	<0.9	<0.8
	<0.9	<0.8	<0.05	<0.05	<0.9	<0.8
W625	<0.9	<0.8	<0.05	<0.05	<0.9	<0.8
未同定代謝物 A	<0.9	<0.8	<0.05	<0.05	<0.9	<0.8
未同定代謝物 B	<0.9	<0.8	<0.05	<0.05	<0.9	<0.8
未同定代謝物 C	<0.9	<0.8	<0.05	<0.05	<0.9	<0.8
その他	3.7	3.4	0.2	0.2	3.9	3.6
残渣			3.4	3.1	3.4	3.1
総回収放射能					100.0	92.4

*トリホリン換算µg/g 濃度

表6 最終処理14日後の葉中の代謝物分布

代謝物	表面洗液		葉抽出液		合計	
	%TRR	濃度*	%TRR	濃度	%TRR	濃度
表面洗液/抽出液	66.7		25.4			
トリホリン	63.0	76.5	23.0	28.05	85.0	104.50
W1069	<0.65	<0.8	0.9	1.14	0.9	1.14
	<0.65	<0.8	<0.25	<0.32	<0.65	<0.8
W625	<0.65	<0.8	0.6	0.75	0.6	0.75
未同定代謝物 A	<0.65	<0.8	0.4	0.52	0.4	0.52
未同定代謝物 B	<0.65	<0.8	<0.25	<0.32	<0.65	<0.8
未同定代謝物 C	<0.65	<0.8	<0.25	<0.32	<0.65	<0.8
その他	5.0	5.5	0.95	1.22	5.5	6.71
残渣			7.8	9.7	7.8	9.7
総回収放射能					100.0	122.0

値は2連の平均値(申請者が計算した。)

*トリホリン換算µg/g 濃度

表7 果皮の抽出残渣を加水分解処理後の放射能

画 分			塩酸 0.6 M		塩酸 6 M	
	%TRR	濃度*	%TRR	濃度	%TRR	濃度
抽出液	0.8	0.01	1.8	0.03	6.8	0.10
残 査	12.2	0.17	11.3	0.16	6.2	0.09
合 計	13.0	0.18	13.0	0.18	13.0	0.18

*トリホリン換算 $\mu\text{g/g}$ 濃度

予想代謝経路：トリホリンのりんごにおける予想代謝経路図は図2に示すように、
 の開裂、および の であつた。

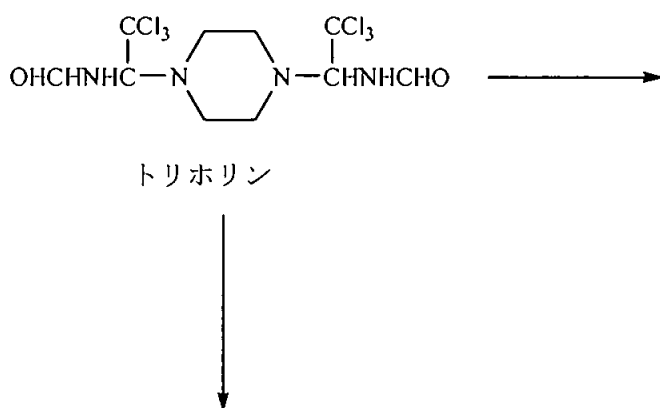


図2 りんごにおける推定代謝経路

(3) トリホリンの大麦における代謝試験

(資料 No. M-06)

(文献名 : Pestic. Sci. 1977, 8, 65-70)

供試標識化合物 :

構造式 :

[³H]トリホリン

* : ³H 標識位置

化学名 : 1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

比放射能 : 105 mCi/g

標識位置の設定理由¹⁾ : 構造の安定したピペラジン環を標識位置とした。

供試植物 : 大麦 (品種 Hebe) 、気象箱栽培 (湿度 50~60%)

処理液の調製 : 非標識トリホリン (30 mg/ポット) および [³H]トリホリン (2×10⁷ dpm/ポット) のメタノール溶液を乳剤に加え、処理液を調製した。

処理方法 : 播種後 4 週目 (草丈 35 cm) に処理液を土壌灌注した。

採取方法 : 処理後 30 日まで 8 時点で採取した (最終収穫は処理後 30 日)。各採取時点で大麦の地上 1 cm で刈り取り、茎葉部として採取した。

分析方法 : 採取した大麦茎葉部の抽出・分析方法のスキームを図 1 示す。

¹⁾ 申請者註 : 申請者が追記した。

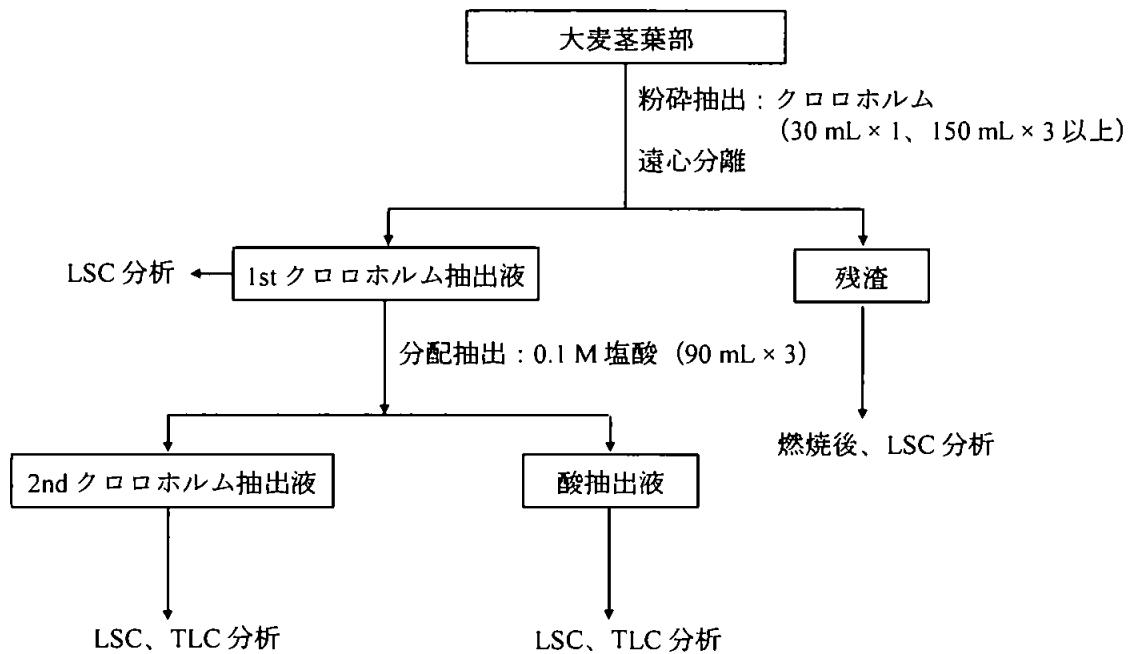


図1 茎葉部の分析スキーム

分配抽出後のクロロホルムおよび酸抽出液は TLC およびカラムクロマトグラフィーで精製し、各画分を LSC 分析した。代謝物の同定・定量は標品との TLC コクロマトグラフィーにより行った。代謝物の同定・定量は処理 15 日および 30 日後の試料を用いた。

試験結果：

放射能分布；処理後 30 日間の大麦の生育割合および茎葉部の放射能量を図 2 に示す。処理後 30 日間に大麦の茎葉部に取り込まれた放射能は処理放射能の約 5%であった。

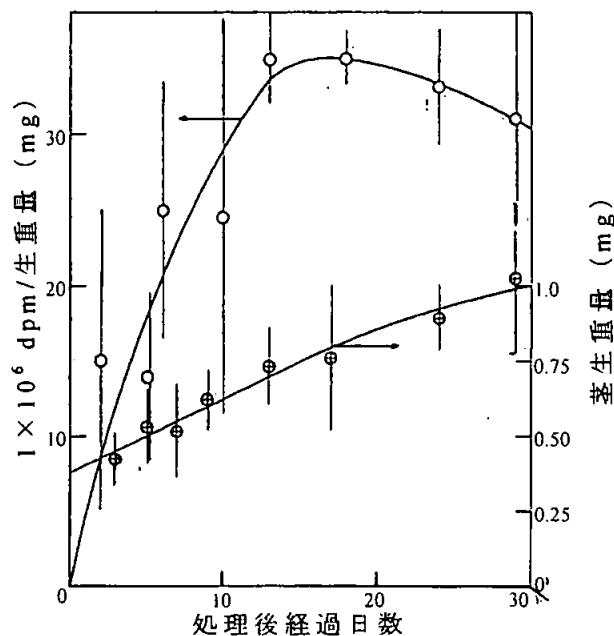


図2 処理後 30 日間の大麦の生育割合および茎葉部の放射能量

処理 15 および 30 日後の大麦茎葉部中の放射能分布を表 1 に示す。最初のクロロホルム抽出液および残渣中の放射能は、処理 15 日後にそれぞれ 76.9 および 23.1%TRR、30 日後にはそれぞれ 61.8 および 38.2%TRR であった。上記のクロロホルム抽出液を 0.1 M の塩酸で分液抽出したところ、クロロホルムおよび塩酸抽出液中の放射能は処理 15 日後にはそれぞれ 61.6 および 15.3%TRR、30 日後には 46.4 および 15.4%TRR であった。抽出残渣は処理 30 日後には 38.2%TRR に達し、これは生育過程でできる繊維物質に放射能が結合したためと考えられた。

表1 処理15および30日後の大麦中の放射能分布

画分	%TRR*	
	処理15日後	処理30日後
1stクロロホルム抽出液	76.9	61.8
2ndクロロホルム抽出液	61.6	46.4
酸抽出液	15.3	15.4
抽出残渣	23.1	38.2

* 総放射能残留量 (TRR) に対する割合 (%)

代謝；処理15および30日後の大麦茎葉部中の代謝物分布を表2に示す。主要代謝物は未変化のトリホリンであり、処理15および30日後でそれぞれ、57.5および43.2%TRRであった。主要代謝物はW1069でそれぞれ、12.9および8.4%TRR検出された。その他の代謝物としてはが最大4.0%TRR検出された。トリホリンの大麦における推定代謝経路図を図3に示す。

表2 処理15および30日後の大麦中の代謝物分布

代謝物	%TRR*	
	処理15日後	処理30日後
抽出液	76.9	61.8
トリホリン	57.5	43.2
W1069	12.9	8.4
	0.3	4.0
未同定画分1* ¹	4.1	3.2
未同定画分2* ²	2.1	3.0
抽出残渣	23.1	38.2

* 総放射能残留量 (TRR) に対する割合 (%)

*¹ 2ndクロロホルム抽出液中に存在。

*² 酸抽出液中に存在。

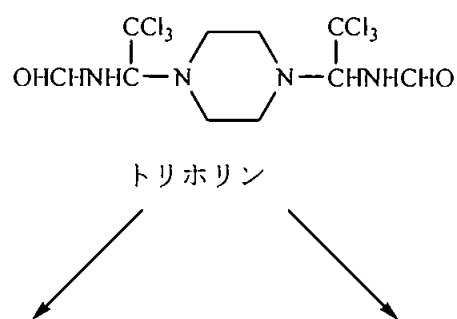


図3 トリホリンの大麦における推定代謝経路²⁾

²⁾ 申請者註：申請者が作成した。

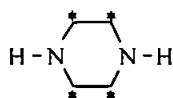
(4) ピペラジンの大麦における代謝試験

(資料 No. M-07)

(文献名 : Pestic. Sci. 1978, 9, 139-145)

供試標識化合物 :

構造式 :



環標識[¹⁴C]ピペラジン

* : 標識位置を示す

化学名 : ピペラジン

比放射能 : 350 mCi/g

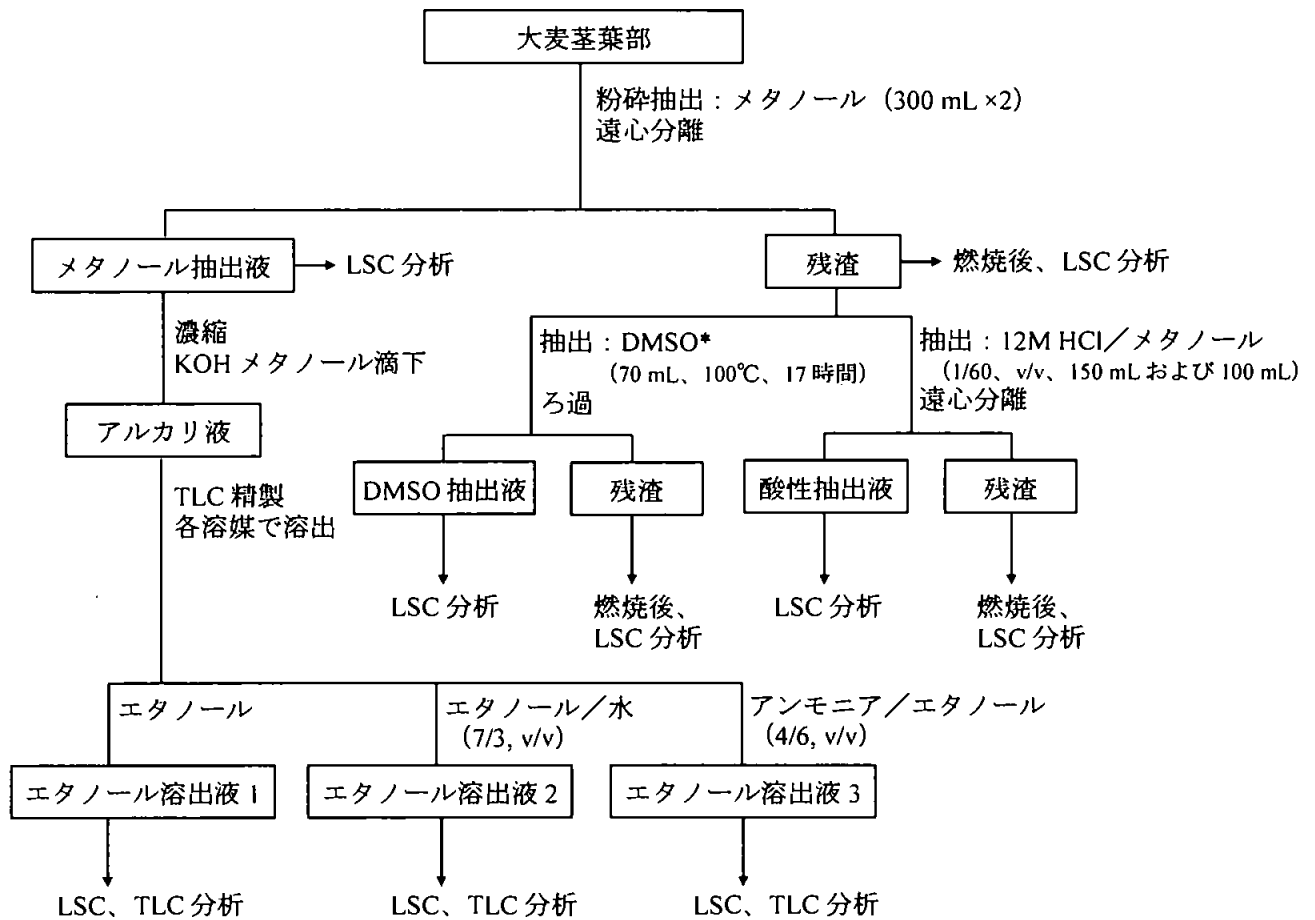
供試植物 : 大麦 (品種 Hebe) 、気象箱栽培 (湿度 50~60%)

処理液の調製 : 非標識ピペラジン (30 mg/ポット) および[¹⁴C]ピペラジン (10⁷ dpm/ポット) の混合水溶液とした。

処理方法 : 播種後 4 週目 (草丈 35 cm) に処理液を土壌灌注した。

採取方法 : 処理 30 日後に大麦の地上 1 cm で刈り取り、茎葉部として採取した。

分析方法 : 採取した大麦茎葉部の抽出・分析方法のスキームを図 1 示す。



*DMSO：ジメチルスルホキシド

図1 茎葉部の分析スキーム

メタノール抽出液はTLCおよびカラムクロマトグラフィーで精製し、溶出液それぞれについて標品とのTLCコクロマトグラフィーにより代謝物の同定・定量を行なった。一部の代謝物は誘導化後、TLCおよび/またはMS分析により代謝物の同定を行なった。

試験結果：

放射能分布；処理後30日後の大麦茎葉部中の放射能分布を表1に示す。メタノール抽出液および抽出残渣中の放射能はそれぞれ、68.1および31.9%TRRであった。抽出残渣からはDMSOおよび酸でそれぞれ、5.8および3.2%TRRが抽出された。

表1 処理30日後の大麦中の放射能分布

画分	%TRR*
メタノール抽出液	68.1
抽出残渣	31.9
DMSO抽出液	5.8
残渣	26.1
酸性抽出液	3.2
残渣	28.7

* 総放射能残留量 (TRR) に対する割合 (%)

代謝；処理30日後の大麦茎葉部中の代謝物分布を表2に示す。主要成分は、未変化のピペラジン (N) およびグリシン (S) であり、検出量はそれぞれ、16.8および15.4%TRRであった。その他の代謝物として、植物構成成分であるイミノジ酢酸 (R) およびシュウ酸 (T) が検出された。

以上のことから、大麦中のピペラジンは速やかに代謝され、極性化合物に変換することが示唆された。ピペラジンの大麦における推定代謝経路図を図2に示す。

表2 処理30日後の大麦中の代謝物分布

代謝物	%TRR*
メタノール抽出液	68.1
ピペラジン (N)	16.8
シュウ酸 (T)	7.2
イミノジ酢酸 (R)	8.6
グリシン (S)	15.4
未同定画分総量	20.1
(未同定画分1) * ¹	8.0
(未同定画分2) * ²	6.1
(未同定画分3) * ³	1.9
抽出残渣	31.9

* 総放射能残留量 (TRR) に対する割合 (%)

*¹ エタノール溶出液1中に存在。

*² エタノール溶出液2中に存在。

*³ エタノール溶出液3中に存在。

3. 土壌中動態に関する試験

(1) トリホリンの好氣的土壌中動態試験 (代謝・分解)

(資料 No. M-08)

試験機関 : RCC UMWELTCHEMIE AG (スイス)

報告書作成年 : 1993 年 [GLP 対応]

供試標識化合物 :

構造式 :

[¹⁴C]トリホリン

* : ¹⁴C 標識位置

化学名 : 1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

放射化学的純度 : > 98%

比放射能 : $\mu\text{Ci}/\text{mg}$

標識位置の設定理由¹⁾ : 構造の安定した を標識位置とした。

供試土壌 : 砂壤土 [USDA 分類] 粘土 8.2%、シルト 24.6%、砂 67.2%

採取場所 ; Porterville, CA, 米国

有機物含量 ; 1.4% (有機炭素 : 0.81%)

微生物量 ; 処理 2 日前 6.0 mgC/100 g 乾土

処理後 189 日 11.2 mgC/100 g 乾土

処理後 365 日 18.6 mgC/100 g 乾土

pH ; 7.73 (KCl)

陽イオン置換容量 ; 5.3 meq/100 g 乾土

最大容水量 ; 36.44 g 水/100 g 乾土

圃場容水量 ; 11.42 g 水/100 g 乾土

試験方法 :

処理溶液 ; [¹⁴C]トリホリンのアセトン溶液 (14.583×10^6 dpm) を用いた。

処理量は 0.51 mg a.i./kg 乾土 ; 0.38 kg a.i./ha に相当する。

¹⁾ 申請者註 : 申請者が追記した。

試験方法：2 mm の篩を通した乾土 100 g 相当の生土を 1 L 容ガラスフラスコに入れ、圃場容水量の 75% になるように水分調整し、各処理液を土壌表面に滴下し、土壌を十分混合した。処理土壌は $20 \pm 2^\circ\text{C}$ の暗条件下で 365 日間、好氣的条件下でインキュベーションを行った。

以下の時点で試料を（0 日目のみ 2 連で）採取し、図 1 のスキームに従って分析を行った。

試料採取時点：処理後 0、7、14、28、56、84、112、147、189、238 および 365 日目

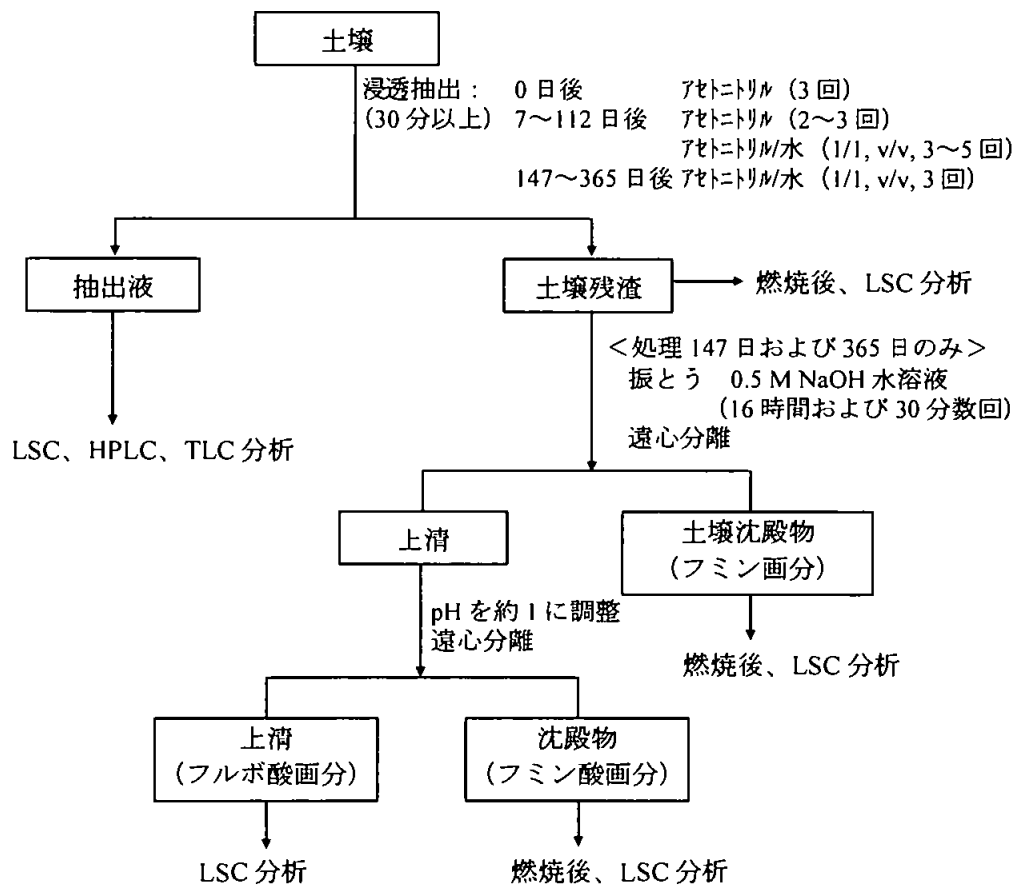


図 1 土壌の分析・抽出スキーム

試験期間中に生成した揮発性成分は、0.1 M HCl、2 M NaOH（2 個）およびエチレングリコールトラップで捕集した。捕集液は、最初の 4 週間は毎週、その後は 2 週間ごとに、新たな捕集液に交換した。捕集液は、適宜あるいは、代表的な試料採取日に採取した。捕集液の放射能は LSC で測定した。処理 28 および 84 日目の NaOH 捕集液は、BaCl₂ 飽和溶液添加後に生成する沈殿により、¹⁴CO₂ 量を確認した。

代謝分解物の同定は、HPLC および TLC を用いた標品とのクロマトグラフィーにより行った。

処理 147 および 365 日の抽出残渣試料は、0.5 M NaOH を添加して 16 時間振とう後、遠心分離と抽出を繰り返してフミン酸、フルボ酸およびフミン画分に分画することにより、結合性放射能の化学的特徴付けを行った。

試験結果：

^{14}C 分布：[^{14}C]トリホリンを処理した土壌における放射能分布の経時変化を表 1 および 2 に示す。物質収支は 91.0~105.9%であった。試験期間中に検出された揮発性物質はすべて $^{14}\text{CO}_2$ であった。 $^{14}\text{CO}_2$ および土壌残渣中の放射能は経時的に増加し、処理 365 日後にはそれぞれ処理放射能の 44.7 および 35.0%となった。処理 365 日後の土壌残渣についてアルカリ加水分解を行った結果、フルボ酸、フミン酸およびフミン画分中の放射能はそれぞれ、処理放射能の 17.4、3.5 および 11.3%であった（表 3）。

トリホリンは、処理 365 日後には 1.5%にまで減少した。分解速度は処理 84 日目以降、緩やかであった。0~84 日目の試料に基づいて、1 および 1.5 次動態モデルを用いて得られた消失動態パラメータを表 4 に示す。その結果、1.5 次動態モデルが最適であり、外挿した推定半減期は 日であった。

代謝分解：代謝分解物としては、主な放射性画分すなわち画分 BB および W1069 が検出され、それぞれ、処理 28 および 56 日後に処理量の 12.8 および 15.6%に達したが、その後、分解された。その他に代謝物 が検出され、最大での処理量の 3.5%であった。その他多数の放射能画分が存在したが、いずれも微量であった（処理量に対して 5%未満）。

以上のことからトリホリンは砂壌土において、速やかに分解・無機化され、多くの微量分解物を生成すると考えられた。予想代謝分解経路を図 2 に示す。

表1 放射能分布 (処理放射能に対する割合%)

画分		処理後日数										
		0	7	14	28	56	84	112	147	189	238	365
抽出 画分	トリチン	100.1	67.8	52.2	31.0	14.1	8.3	4.3	3.0	1.9	1.5	1.5
	その他	1.2	22.2	28.1	32.6	35.3	30.9	25.6	20.3	16.8	14.0	11.7
	合計 (画分数)	101.3 (np)	90.0 (8)	80.3 (11)	63.6 (13)	49.4 (15)	39.2 (14)	29.9 (20)	23.3 (19)	18.7 (14)	15.5 (19)	13.2 (18)
ACN ^a	トリチン	100.1	57.2	42.9	25.0	9.7	5.6	3.0	np	np	np	np
	画分1	nd	0.58	1.1	0.39	0.19	0.58	0.19	np	np	np	np
	画分2	nd	nd	nd	0.39	0.39	0.39	0.39	np	np	np	np
	画分3	1.1	nd	nd	0.19	0.39	0.58	0.39	np	np	np	np
	画分4	nd	nd	nd	0.39	0.19	0.19	0.19	np	np	np	np
	画分5	nd	nd	nd	0.19	0.19	0.19	<0.19	np	np	np	np
	画分6	nd	nd	nd	nd	nd	0.19	nd	np	np	np	np
	小計	101.3	57.8	44.1	26.3	11.1	7.9	4.2	np	np	np	np
ACN/水	AA	np	*	2.9	*	*	2.3	*	*	*	*	*
	BB	np	8.0	9.7	12.8	4.6	2.3	*	nd	nd	nd	nd
		np	3.5	2.1	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	DD	np	*	2.3	2.5	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	W1069	np	4.8	4.2	8.7	15.6	14.0	9.5	10.7	8.9	7.2	5.0
	FF	np	nd	nd	*	*	*	2.1	*	*	*	*
	GG	np	*	*	*	*	*	3.3	*	*	*	*
	HH	np	2.5	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	PP ^b	np	10.5	9.3	5.6	7.2	3.1	5.0	4.6	3.5	4.4	2.7
	<0.010	np	2.7	5.4	7.4	10.7	9.3	5.4	7.8	6.2	3.7	5.2
	小計	np	32.2	36.3	37.3	38.4	31.3	25.7	23.3	18.7	15.5	13.2
	トリチン ^c	np	10.6	9.3	6.0	4.4	2.7	1.3	3.0	1.9	1.5	1.5
土壌残渣	4.6	11.1	17.6	26.3	25.6	27.9	30.1	36.2	36.5	38.2	35.0	
揮発性物質	np	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
¹⁴ CO ₂	np	1.3	6.4	12.1	21.7	28.5	31.0	33.3	38.2	38.2	44.7	
合計	105.9	102.4	104.3	101.9	96.7	95.5	91.0	92.8	93.4	91.9	92.8	

代謝物の処理量に対する割合は申請者が計算した。

nd: 検出せず np: 分析せず

抽出溶媒: ACN = アセトニトリル; ACN/水 = アセトニトリル/水 (1/1, v/v)

a: 画分1~2は<0.010 mg/kgと濃度が低かったので特徴付けしなかった。

b: P画分は親化合物と微量成分を含む。

c: TLCで再分析して親化合物を定量した。

*: <0.010 mg/kgでこれらが該当画分に帰属するか明確でない。

表2 放射能分布 (mg トリホリン換算/kg 乾土)

画分		処理後日数										
		0	7	14	28	56	84	112	147	189	238	365
抽出 画分	トリホリン	0.513	0.347	0.268	0.159	0.073	0.043	0.022	0.015	0.010	0.008	0.008
	その他	0.006	0.114	0.143	0.167	0.180	0.158	0.131	0.104	0.086	0.071	0.059
	合計 (画分数)	0.519 (np)	0.461 (8)	0.411 (11)	0.326 (13)	0.253 (15)	0.201 (14)	0.153 (20)	0.119 (19)	0.096 (14)	0.079 (19)	0.067 (18)
ACN ^a	トリホリン	0.513	0.293	0.220	0.128	0.050	0.029	0.015	np	np	np	np
	画分1	nd	0.003	0.006	0.002	0.001	0.003	0.001	np	np	np	np
	画分2	nd	nd	nd	0.002	0.002	0.002	0.002	np	np	np	np
	画分3	0.006	nd	nd	0.001	0.002	0.003	0.002	np	np	np	np
	画分4	nd	nd	nd	0.002	0.001	0.001	0.001	np	np	np	np
	画分5	nd	nd	nd	0.001	0.001	0.001	<0.001	np	np	np	np
	画分6	nd	nd	nd	nd	nd	0.001	nd	np	np	np	np
	小計	0.519	0.296	0.226	0.135	0.057	0.040	0.022	np	np	np	np
ACN/水	AA	np	*	0.015	*	*	0.012	*	*	*	*	*
	BB	np	0.041	0.050	0.066	0.024	0.012	*	nd	nd	nd	nd
		np	0.018	0.011	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	DD	np	*	0.012	0.013	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
	W1069	np	0.025	0.022	0.045	0.080	0.072	0.049	0.055	0.046	0.037	0.026
	FF	np	nd	nd	*	*	*	0.011	*	*	*	*
	GG	np	*	*	*	*	*	0.017	*	*	*	*
	HH	np	0.013	*	*	*	*	*	*	*	*	*
	PP ^b	np	0.054	0.048	0.029	0.037	0.016	0.026	0.024	0.018	0.023	0.014
	<0.010	np	0.014	0.028	0.038	0.055	0.048	0.028	0.040	0.032	0.019	0.027
	小計	np	0.165	0.186	0.191	0.196	0.160	0.131	0.119	0.096	0.079	0.067
トリホリン ^c	np	0.054	0.048	0.031	0.023	0.014	0.007	0.015	0.010	0.008	0.008	
土壌残渣	0.024	0.057	0.090	0.134	0.131	0.143	0.154	0.185	0.187	0.196	0.179	
揮発性物質	np	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	
¹⁴ CO ₂	np	0.006	0.033	0.062	0.111	0.146	0.159	0.171	0.196	0.196	0.229	
合計	0.542	0.524	0.534	0.522	0.495	0.489	0.466	0.475	0.478	0.471	0.475	

nd: 検出せず

np: 分析せず

抽出溶媒: ACN = アセトニトリル; ACN/水 = アセトニトリル/水 (1/1, v/v)

a: 画分1~2は<0.010 mg/kgと濃度が低かったので特徴付けしなかった。

b: P画分は親化合物と微量成分を含む。

c: TLCで再分析して親化合物を定量した。

*: <0.010 mg/kgでこれらが該当画分に帰属するか明確でない。

表3 土壌残渣の分画

画分	処理 147 日後			処理 365 日後		
	割合(%)*	処理放射能 に対する%	濃度**	割合(%)*	処理放射能 に対する%	濃度**
土壌残渣		36.2	0.185		35.0	0.179
フルボ酸画分	58.0	20.9	0.107	49.8	17.4	0.089
フミン酸画分	9.9	3.5	0.018	10.3	3.5	0.018
フミン画分	24.7	9.0	0.046	32.5	11.3	0.058
回収率	92.6		0.171	92.6		0.166

各画分の処理放射能に対する割合は申請者が計算した。

* 土壌残渣中の放射能に対する割合 (%)

** トリホリン換算 mg/kg

表4 消失速度の動態パラメータ

調査間隔	0～84 日	0～84 日
調査時点数	6	6
適用動態モデル	1 次	1.5 次
処理時の濃度 (mg/kg 乾土)	0.423	0.520
速度定数 (k) = 勾配		
切片		
相関係数 (R)	0.9422	0.9986
DT-50 (日)		
DT-90 (日)		

(2) トリホリンの土壌における分解性試験

(資料 No. M-09)

試験機関：FMC（米国）

報告書作成年：1974年

供試標識化合物：

構造式：

[³H]トリホリン

[¹⁴C]トリホリン

*：標識位置

化学名：1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

標識位置	[³ H]トリホリン	[¹⁴ C]トリホリン
比放射能	mCi/mmol	mCi/mmol

標識位置の設定理由¹⁾：トリホリンの化学構造から推測して
 が想定され、
 後の代謝分解物の挙動が確認可能なように、
 および
 を標識位置とした。

供試土壌：下表記載の2種類の土壌を使用した。

採取場所	ニューヨーク州 ナイアガラ地方	ニューヨーク州 ナイアガラ地方
土性	Cosad 砂壤土	Dunkirk シルト質壤土
砂 (%)	75.2	25.2
シルト (%)	18.0	51.6
粘土 (%)	6.8	23.2
有機物含量 (%)	3.1	3.9
水分	13.0	22.2
陽イオン交換容量	7.3	16.8
pH	6.1	4.9

土壌の微生物学的活性を酸素の取りこみによって測定した結果、活性であることが確認された。

¹⁾ 申請者註：申請者が追記した。

試験方法：（好氣的条件）

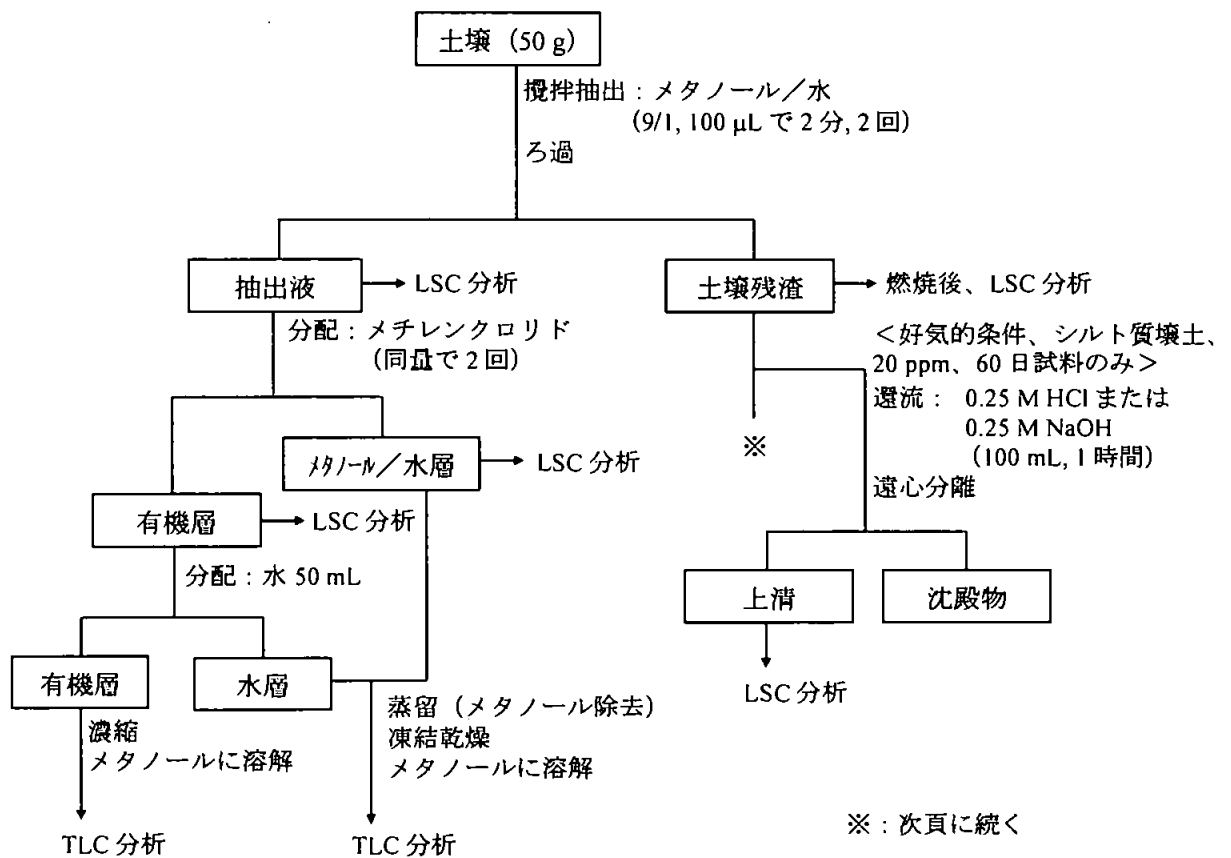
水分含量が 10~20%となるように風乾し、1/4 インチの篩を通した土壌 50 g を代謝フラスコに入れ、 $[^{14}\text{C}]$ または $[^3\text{H}]$ トリホリンのエタノール溶液（0.5 mL）を処理濃度が乾土当たり 2 および 20 ppm となるように、土壌表面に滴下した後、スパーテルで土壌を混合した。処理土壌は保水量の 70%となるように水分を加え、25~30°C で 60 日または 90 日間好氣的条件下でインキュベーションを行った。土壌試料の採取は、 $[^3\text{H}]$ トリホリン処理土壌は処理 0（2 ppm のみ）、7、14、30 および 60 日後に、 $[^{14}\text{C}]$ トリホリン処理土壌は処理 90 日後に行った。採取した土壌試料は図 1 のスキームに従って分析した。

また、オートクレーブ滅菌した 2 土壌（2 ppm のみ）を、 $[^3\text{H}]$ トリホリンを用いて非滅菌土壌と同じ条件で 30 日間インキュベーションした。

$[^{14}\text{C}]$ トリホリンを用いた試験では、試験期間中に生成した $^{14}\text{CO}_2$ を KOH で捕集した。最初の 1 週間は毎日、その後は週 1 回採取し、放射能を LSC で測定した。

（嫌氣的条件）

シルト質壤土 50 g を用いて $[^3\text{H}]$ トリホリンを処理（2 ppm および 20 ppm）し、好氣的条件下で 30 日間インキュベーション後、さらに窒素ガス存在下で 30 および 60 日間インキュベーションした。土壌の抽出は好氣的条件と同じ方法で行った。



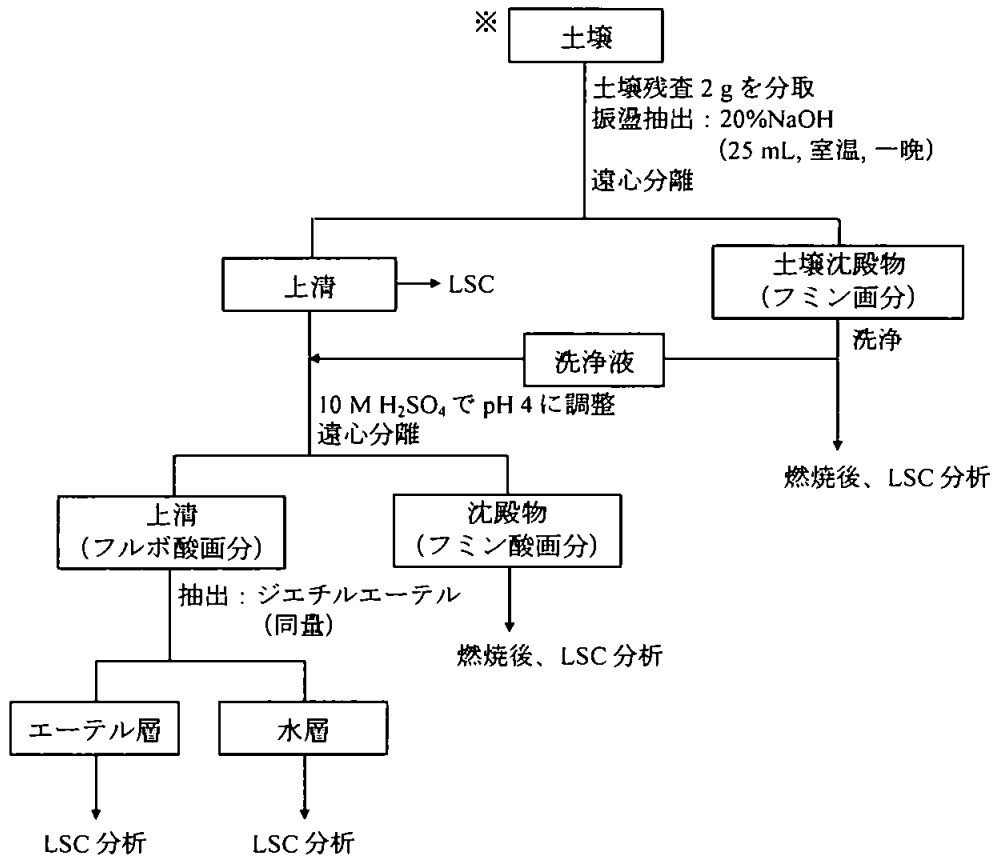


図1 土壌の分析・抽出スキーム

トリホリンおよび代謝分解物を分析標品との TLC コクロマトグラフィーにより同定・定量した。好氣的土壌 (20 ppm)、嫌氣的土壌 (20 ppm) および滅菌土壌 (2 ppm) について代謝物の同定を行った。土壌抽出残渣 (好氣的条件下の一部試料) は、さらに図 1 に従い抽出し、フミン酸、フルボ酸およびフミン画分に分画することにより、結合性放射能の化学的特徴付けを行った。

試験結果：

¹⁴C分布：³Hまたは¹⁴Cトリホリンを処理した土壌における放射能分布の経時変化を表1および2に示す。³Hトリホリンを2 ppm 処理した土壌では土壌残渣の放射能は経時的に増加し、処理60日後には、砂壌土およびシルト質壤土で、それぞれ回収された放射能の42.6%および65.0%に達した。¹⁴Cトリホリンを2 ppm 処理した土壌では、処理90日後の土壌残渣の放射能は、砂壌土およびシルト質壤土、それぞれ回収された放射能に対して、34.9%および58.5%に達し、生成した¹⁴CO₂はそれぞれ33.3および27.8%であった。一方、2 ppm 処理した滅菌土壌（処理30日）における土壌残渣中の放射能は非滅菌土壌（処理30日後）より多い結果となった（表1）。

一方、嫌氣的条件下では、放射能分布は60日後および90日後で同等であり、処理量（2 ppm および20 ppm）による差が認められた（表3）。

シルト質壤土の20 ppmにおける好氣的条件下60日と嫌氣的条件下60日の放射能分布は同様であった。

表1 好氣的条件下における放射能分布（2 ppm 処理）

経過日数	回収された放射能に対する割合 (%)						
	非滅菌土壌						滅菌土壌
	³ H					¹⁴ C	³ H
	0日	7日	14日	30日	60日	90日	30日
砂壌土							
有機層画分	90.4	72.6	59.3	44.1	44.5	24.3	33.8
水層画分	4.6	5.8	9.6	19.4	13.0	7.5	7.9
土壌残渣	5.0	21.7	31.1	36.5	42.6	34.9	58.3
¹⁴ CO ₂	NS	NS	NS	NS	NS	33.3	NS
合計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
シルト質壤土							
有機層画分	87.1	55.1	43.9	35.7	18.0	11.0	33.9
水層画分	1.7	11.7	10.8	22.1	17.1	2.8	11.3
土壌残渣	11.2	33.8	45.2	42.3	65.0	58.5	54.8
¹⁴ CO ₂	NS	NS	NS	NS	NS	27.8	NS
合計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

NS：採取せず

表 2 好氣的条件下における放射能分布 (20 ppm 処理)

経過日数	回収された放射能に対する割合 (%)				
	[³ H]				[¹⁴ C]
	7 日	14 日	30 日	60 日	90 日
砂壤土					
有機層画分	75.2	61.8	42.8	34.3	21.5
水層画分	6.6	8.2	22.3	22.0	6.3
土壌残渣	18.3	30.0	34.9	43.7	34.3
¹⁴ CO ₂	NS	NS	NS	NS	37.9
合計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
シルト質壤土					
有機層画分	51.6	42.1	22.1	12.2	6.3
水層画分	14.3	16.3	29.4	18.3	2.1
土壌残渣	34.1	41.7	48.5	69.5*	63.6
¹⁴ CO ₂	NS	NS	NS	NS	27.9
合計	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

NS : 採取せず

* 酸 (0.25 M HCl) およびアルカリ (0.25 M NaOH) 処理した結果、それぞれ放射能の 66.1 および 88.6% が遊離した。

表 3 嫌氣的条件下における放射能分布 (シルト質壤土)

経過日数	回収された放射能に対する割合 (%)			
	2 ppm		20 ppm	
	60 日	90 日	60 日	90 日
有機層画分	12.4	11.0	6.7	5.6
水層画分	25.6	31.7	18.3	23.4
土壌残渣	62.0	57.4	75.0	71.0
合計	100.0	100.0	100.0	100.0

代謝分解：好氣的条件下における [³H] トリホリン処理後の土壌中のトリホリンの減少割合を図 2 に、[³H] または [¹⁴C] トリホリンを 20 ppm 処理した土壌の代謝物分布を表 4 に示す。トリホリンは速やかに減少し、シルト質壤土における減少が砂壤土と比べ大きかった。処理 60 日後の砂壤土およびシルト質壤土、および処理 90 日後の砂壤土において検出されたトリホリンは、回収された放射能に対して、それぞれ、31.9、11.1 および 16.9% であった。検出された代謝分解物は、
、
、
および
であり、最大で回収された放射能の 7.3% であった。その他、90 日後の砂壤土の抽出画分には TLC により多数の成分が検出された。滅菌土壌においては有機層画分中にはトリホリンが有機層画分中の放射能の 87.0~87.6% 検出され、それ以外の代謝物としては、
が 6.7% 検出された (表 5)。また、嫌氣的条件下土壌の有機層画分中にはトリホリンが 90.2~90.8% 検出された (表 6)。

土壌残渣を分画したところ、放射能は主としてフルボ酸画分（土壌残渣中の放射能の71.3～79.2%）に結合しており、フミン酸およびフミン画分にはそれぞれ、土壌残渣中の放射能の4.5～16.8%および1.6～15.3%が確認された（表7）。

以上のことからトリホリンは、速やかに分解し、極性化合物となり、最終的に土壌に結合するか、無機化されることが示された。予想代謝分解経路を図3に示す。

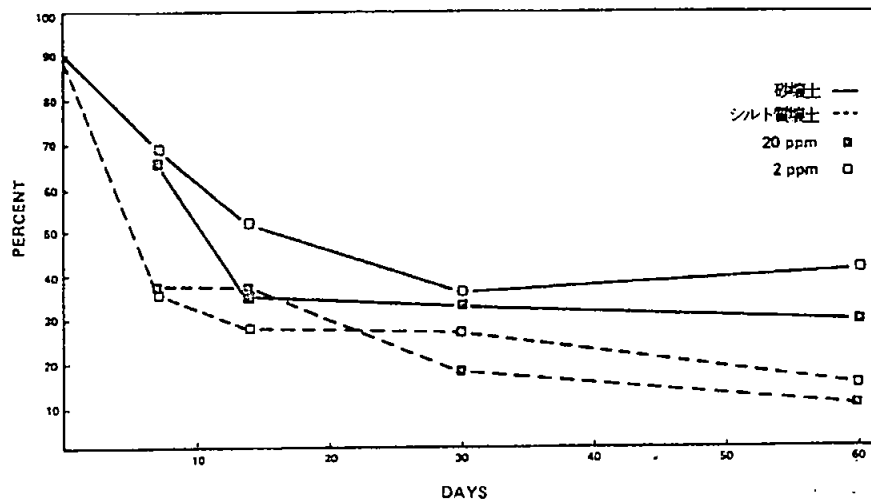


図2 好氣的条件下における土壌中のトリホリンの減少割合（ ^3H トリホリン処理）

表 4 好氣的条件下における代謝物分布 (20 ppm)

	回収された放射能に対する割合 (%)		
	[³ H] (60 日後)		[¹⁴ C] (90 日後)
	砂壤土	シルト質壤土	砂壤土
抽出画分	56.0	30.4	27.8
有機層画分			
トリホリン	31.9	11.1	16.9
	0.3	0.3	0.9
	0.3	0	-
	NA	NA	0.7
未同定画分	1.0	0.4	-
水層画分			
	7.3	4.0	0.5
	NA	NA	0.6
未同定画分	15.2	14.6	8.2*
残査	43.7	69.5	34.3
¹⁴ CO ₂	NS	NS	37.9
合計	100.0	100.0	100.0

* 11 成分以上からなる。

NA : 適用なし

NS : 採取せず

表 5 滅菌土壌の有機層画分における代謝物分布 (2 ppm 処理、処理 30 日後)

代謝物	有機層画分中の放射能に対する割合 (%)	
	砂壤土	シルト質壤土
トリホリン	87.6	87.0
	8.5	6.7
未同定代謝物	3.9	6.3
合計	100.0	100.0

表 6 嫌氣的条件下における土壌の有機層画分中の代謝物分布 (シルト質壤土、20 ppm)

代謝物	有機層画分中の放射能に対する割合 (%)	
	60 日後	90 日後
トリホリン	90.2	90.8
未同定代謝物	9.8	9.2
合計	100.0	100.0

4.水中動態に関する試験

(1) トリホリンの加水分解動態試験

(資料 No. M-10)

試験機関：Hazleton UK

報告書作成年：1993年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式：

[¹⁴C]トリホリン

[¹⁴C]トリホリン

* : ¹⁴C 標識位置

化学名：1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

標識位置	[¹⁴ C]トリホリン	[¹⁴ C]トリホリン
比放射能	MBq/mmol	MBq/mmol
放射化学的純度	≥ 98%	≥ 98%

標識位置の設定理由¹⁾：トリホリンの化学構造から推測して、が想定された
ため、後の代謝分解物の挙動が確認可能なように
を標識位置とした。および

供試水：下記の3種類の緩衝液を使用した。

pH 5；クエン酸溶液 (10 mM) にクエン酸三ナトリウム溶液 (10 mM) を滴下し、pH 5.0 とした。

pH 7；トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンマレイン酸塩溶液 (10 mM) に水酸化ナトリウム溶液 (10 mM) を滴下し、pH 7.0 とした。

pH 9；pH 9.0 の四ホウ酸ナトリウム (2.5 mM)

試験方法：トリホリン各標識体のアセトニトリル溶液を、滅菌済の各緩衝液に添加し、緩やかに混和し、最終濃度が 5.0 ppm となるよう試験水を調製した²⁾ (各標識体につき 78 個の試料)。25 ± 1°C の暗条件でインキュベートし、1 日 1 回、緩やかに混和した。被験物質処理後 0、12 時間、1、2、3、4、5、6、11、21、および 31 日後に試料を 2 連採取し、以下の方法で分析を行った。

¹⁾ 申請者註：申請者が追記した。

²⁾ 申請者註：溶解助剤としてのアセトニトリル濃度は 0.5% であった。

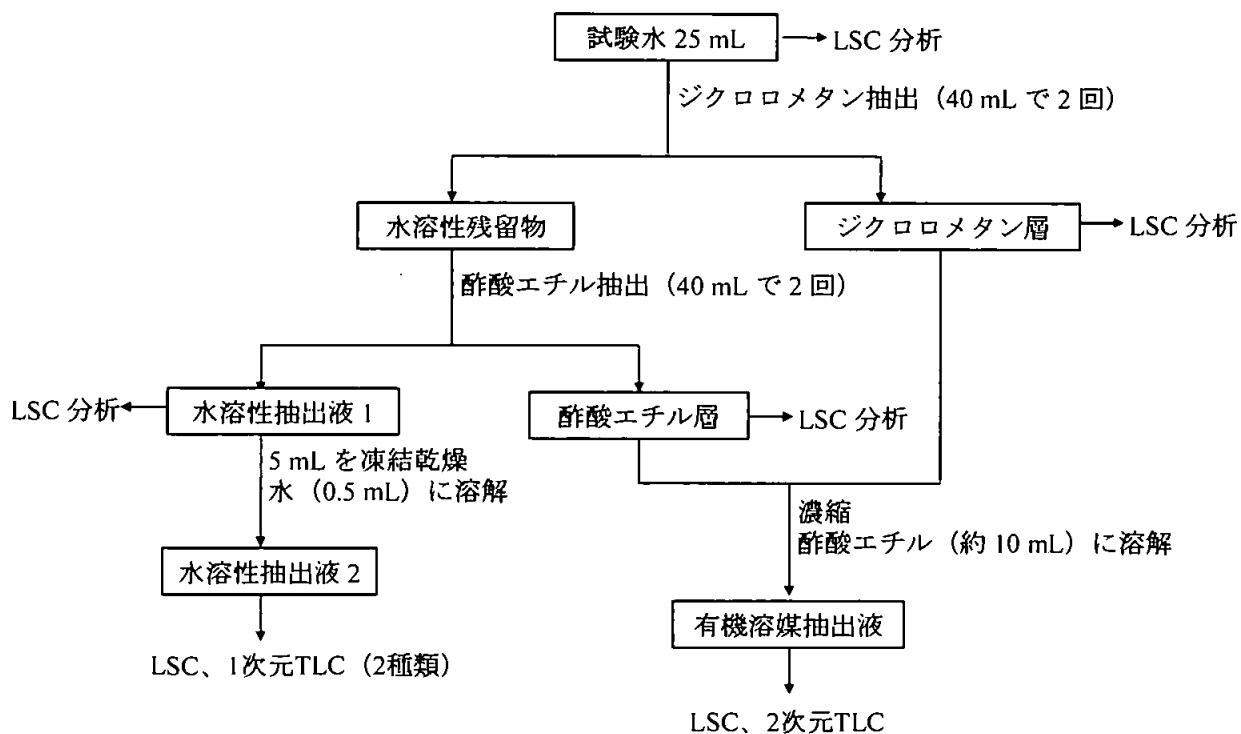


図1 分析スキーム

トリホリンおよび代謝分解物の同定は、TLC を用いた標品とのコクロマトグラフィーにより行った。また、処理放射能の 10% を超えて生成した標品のない分解物については加水分解物を大量に調製し、精製後、LC/MS 分析により同定した。

また、大量に加水分解溶液を調製し、スペクトル分析を行った。トリホリンをアセトニトリルおよび水に溶解して最終濃度約 1.0 mg/mL とした試料³⁾を脱気後、50℃でインキュベートした。分取用 TLC に供して、認められた領域をかき取り、液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC/MS) により分析を行った。

インキュベーション時間 (日) に対してトリホリンの量 (処理量に対する割合 (%)) の常用対数値をプロットした回帰直線の傾きから半減期を算出した。

試験結果：本試験における物質収支は 71.04%~117.14% の範囲であった。トリホリンおよびその分解物の経時変化を表 1~3 に示す。

³⁾ 申請者註：溶解助剤としてのアセトニトリル濃度は 50% であった。

半減期は以下の通りであった。

標識位置	pH	半減期 (日)	95%信頼区間 (日)
	5		± 0.2
	7		± 0.2
	9		± 0.1
	5		± 0.1
	7		± 0.1
	9		± 0.3

有機溶媒により抽出されない水溶性抽出液が経時的に増加した。水溶性抽出液を TLC コクロマトグラフィー分析した結果、複数の標品が同じ挙動を示した。よって水溶性抽出液中の代謝物は TLC 上の放射能領域と標品を一致させる、暫定的な同定しかなかった。

有機溶媒抽出液中の主要分解物は、 および であった。
は有機溶媒抽出後の水層にも認められた。水溶性抽出液の暫定的同定は、試験期間 (31 日間) 中に 、W625 、、、W1069 、 および あるいはそのいずれかが主要な分解物として生成する可能性を示唆する結果であった。

トリホリンの分解は、側鎖のホルムアミドの脱離による反応性の高い中間体の生成を経て進行すると考えられる。予想分解経路図を図 2 に示す。

表1 pH5緩衝液中におけるトリホリンおよびその分解物の分布の経時変化

環鎖標識トリホリン		処理量に対する割合 (%)										
時間 (日)		0	0.5	1	2	3	4	5	6	11	21	31
有機溶媒抽出液		97.77	95.60	85.42	89.16	82.95	84.72	76.58	78.40	54.44	45.08	30.75
トリホリン		97.77	88.14	73.94	63.46	47.14	44.01	27.91	20.62	5.05	1.13	0.75
W625		0.00	7.08	6.78	24.10	28.56	32.96	29.28	28.62	39.65	29.19	14.66
W1069		0.00	0.00	1.73	0.00	0.80	1.57	1.99	2.04	3.39	3.85	7.27
その他 ¹		0.00	0.39	1.56	4.41	5.65	4.99	15.95	25.64	2.45	2.32	2.46
水溶性抽出液 ²		0.00	0.00	1.44	0.00	0.62	1.06	0.47	1.57	2.83	8.14	2.96
その他 ¹		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.30	0.00	0.00	0.16	0.45
水溶性抽出液 ²		0.00	0.00	0.00	0.00	0.17	0.21	0.67	0.00	1.07	0.27	2.19
溶媒系 ¹	WOS613	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	W625	-	-	-	0.00	0.13	0.27	0.24	0.34	0.93	1.47	2.35
	+ W1069	-	-	-	1.15	1.80	2.54	4.24	3.93	9.49	17.78	20.51
	その他 ³	-	-	-	1.95	2.94	3.79	4.05	4.82	6.81	15.18	19.51
	その他 ³	-	-	-	4.36	4.24	4.42	4.60	6.36	7.01	6.39	4.98
溶媒系 ²	+ WOS613	-	-	-	1.41	2.94	3.72	4.71	6.78	13.90	22.30	22.17
	W1069	-	-	-	0.27	0.23	0.87	1.54	0.99	2.35	3.05	9.95
	+ W625	-	-	-	1.78	2.84	3.55	4.43	3.95	5.16	11.95	13.02
	その他 ³	-	-	-	1.46	1.51	2.20	3.09	3.47	4.21	6.87	6.62
	その他 ³	-	-	-	0.68	1.08	1.59	1.45	3.94	5.61	7.03	11.14
物質収支		98.89	99.15	90.84	97.67	95.48	100.26	94.41	99.56	88.45	99.65	97.94

側鎖標識トリホリン		処理量に対する割合 (%)										
時間 (日)		0	0.5	1	2	3	4	5	6	11	21	31
有機溶媒抽出液		98.55	99.46	91.84	88.50	96.54	88.56	87.89	89.95	68.39	48.96	42.19
トリホリン		98.55	92.94	82.34	66.19	55.21	44.55	33.65	26.08	8.00	2.84	2.26
W625		0.00	6.52	9.00	20.64	28.11	33.47	39.26	46.95	42.09	28.05	14.46
W1069		0.00	0.00	0.00	0.00	5.62	1.63	2.12	5.25	4.41	6.44	7.60
その他 ¹		0.00	0.00	0.55	1.67	4.29	7.55	6.49	2.50	6.50	0.00	1.13
水溶性抽出液 ²		0.00	0.00	0.00	0.00	2.92	0.00	3.34	3.29	1.64	2.40	2.01
その他 ¹		0.00	0.00	0.00	0.00	0.39	1.35	3.07	5.88	5.81	9.23	14.68
水溶性抽出液 ²		1.16	3.30	5.06	7.93	11.20	14.32	16.29	19.06	30.38	42.08	56.48
溶媒系 ¹	W625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	+ W1069	-	-	-	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.68	1.06	1.40
	その他 ³	-	-	-	0.97	1.94	3.01	4.26	5.94	12.57	18.17	19.50
	その他 ³	-	-	-	1.82	2.63	2.84	3.54	3.82	6.42	12.83	23.72
	その他 ³	-	-	-	4.54	5.70	6.07	6.92	7.51	8.31	7.05	7.87
溶媒系 ²	+ WOS613	-	-	-	0.59	0.92	2.39	1.57	1.78	2.39	2.97	3.98
	W1069	-	-	-	0.93	3.13	4.22	5.86	7.36	15.69	23.96	31.49
	+ W625	-	-	-	0.60	1.77	2.20	2.75	2.53	4.32	7.77	10.59
	その他 ³	-	-	-	1.60	4.15	3.98	4.86	5.33	5.77	4.71	6.08
	その他 ³	-	-	-	0.31	0.86	1.31	1.14	1.23	1.42	1.05	1.28
物質収支		99.71	102.76	96.90	96.43	107.74	102.88	104.18	109.01	98.77	91.04	98.67

-: データなし、数値は一部を除き、2連の平均値である。

1: 処理量の3.95%以下の数種類の未知化合物を含む。

2: 処理0~1日後は水溶性抽出液1、処理2~31日後は凍結乾燥後の水溶性抽出液2の測定値を示す。

3: 処理量の6.71%以下の未知化合物およびピークとして検出されなかった放射能を含む。

*溶媒系1: メタノール/アンモニア (80/20、v/v)、**溶媒系2: エタノール/メタノール/トリエチルアミン (13/2/1、v/v/v)

有機溶媒抽出液中の		と										の合計	
時間 (日)		0.5	1	2	3	4	5	6	11	21	31		
合計		7.47	8.34	28.51	34.21	37.95	45.23	54.26	42.10	31.51	17.12		
		6.52	9.55	22.31	32.40	41.02	45.75	49.45	48.59	28.05	15.59		

表2 pH7緩衝液中におけるトリホリンおよびその分解物の分布の経時変化

環標識トリホリン		処理量に対する割合 (%)										
時間 (日)		0	0.5	1	2	3	4	5	6	11	21	31
有機溶媒抽出液		100.02	95.11	90.21	90.33	NA	83.96	72.11	74.00	60.78	40.12	23.76
トリホリン		100.02	86.25	73.97	60.48	NA	38.12	27.89	21.13	6.17	1.07	1.13
W625		0.00	7.62	13.38	23.56	NA	32.63	35.82	32.23	31.87	17.58	6.83
W1069		0.00	0.00	0.00	0.00	NA	0.00	0.00	0.00	0.43	0.85	0.42
その他 ¹		0.00	1.24	2.90	6.37	NA	10.18	5.95	8.09	18.62	17.11	7.72
水溶性抽出液 ²		0.00	0.00	0.00	0.00	NA	0.00	0.00	0.00	0.55	1.47	0.00
その他 ¹		0.00	0.00	0.00	0.00	NA	2.15	0.50	0.43	0.67	0.44	0.77
その他 ¹		0.00	0.00	0.00	0.00	NA	0.88	1.91	9.74	2.81	1.61	2.93
水溶性抽出液 ²		0.77	3.12	4.93	8.78	12.79	16.51	17.91	21.30	34.35	54.23	93.38
溶媒系 ¹	W625 + W1069	-	-	-	0.07	0.11	0.27	0.00	0.41	1.47	2.64	4.93
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	0.25	0.45	0.76	1.35	0.98	2.67	4.33	9.21
		-	-	-	1.22	2.43	3.02	3.43	6.44	8.11	11.45	17.22
溶媒系 ²	W1069 + W625	-	-	-	1.30	2.17	2.41	3.42	2.32	7.71	16.80	16.07
		-	-	-	4.91	6.10	6.34	7.37	8.91	11.58	15.69	39.57
		-	-	-	1.03	1.52	3.56	2.07	2.23	2.80	3.62	6.38
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
溶媒系 ²	W1069 + W625	-	-	-	2.57	4.40	6.70	8.32	9.15	21.57	37.06	61.37
		-	-	-	2.25	3.08	3.09	3.93	4.68	5.78	12.30	17.12
		-	-	-	2.40	3.17	1.64	2.79	3.77	3.07	2.86	9.58
		-	-	-	0.29	0.42	0.62	0.50	0.34	0.60	0.31	0.29
溶媒系 ²	W1069 + W625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
溶媒系 ²	W1069 + W625	-	-	-	1.21	1.62	4.37	2.26	3.25	3.17	1.37	4.37
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
物質収支		100.79	98.23	95.14	99.11		100.47	90.02	95.30	95.13	94.35	117.14

側鎖標識トリホリン		処理量に対する割合 (%)										
時間 (日)		0	0.5	1	2	3	4	5	6	11	21	31
有機溶媒抽出液		99.87	95.44	96.09	89.11	83.00	77.07	81.99	77.12	78.85	43.92	27.92
トリホリン		99.87	87.25	80.92	66.30	50.56	43.46	32.06	26.15	8.24	3.38	3.14
W625		0.00	6.71	12.82	19.02	27.77	22.62	30.25	38.34	51.67	21.79	6.65
W1069		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	3.20	2.79	0.00	1.68	0.00	0.00
その他 ¹		0.00	1.48	2.35	3.70	4.66	3.71	4.18	7.95	6.69	11.46	7.02
水溶性抽出液 ²		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.19	0.90	0.00	1.03	0.00	0.00
その他 ¹		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.60	0.00	0.66	0.00	0.00	0.00
水溶性抽出液 ²		0.96	2.83	4.95	8.37	11.39	15.15	16.76	18.34	30.48	45.27	55.87
溶媒系 ¹	W625 + W1069	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	0.12	0.14	0.66	0.43	0.51	0.94	2.09	2.83
		-	-	-	0.07	0.17	0.87	0.53	0.68	1.39	2.52	3.81
		-	-	-	1.18	2.16	2.17	4.25	5.29	11.79	20.43	24.34
溶媒系 ²	W1069 + W625	-	-	-	1.29	1.72	1.78	2.03	2.40	3.79	7.01	9.72
		-	-	-	4.61	5.78	7.06	7.66	7.52	9.49	9.22	9.73
		-	-	-	1.08	1.41	2.60	1.85	1.94	3.11	4.70	5.43
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
溶媒系 ²	W1069 + W625	-	-	-	2.58	4.22	7.12	8.01	8.73	17.42	29.40	35.45
		-	-	-	0.25	0.00	0.00	0.00	1.05	1.98	3.18	4.97
		-	-	-	1.68	2.27	2.88	3.07	2.71	4.18	5.83	7.91
		-	-	-	0.48	0.61	0.62	0.58	0.77	0.99	1.11	1.16
溶媒系 ²	W1069 + W625	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
溶媒系 ²	W1069 + W625	-	-	-	3.39	4.28	4.52	5.09	5.10	5.92	5.74	6.37
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
物質収支		100.83	98.27	101.04	97.48	94.39	92.22	98.75	95.46	109.33	89.19	83.79

NA: 分析せず、-: データなし、数値は一部を除き、2 連の平均値である。

1: 処理量の 4.80% 以下の数種類の未知化合物を含む。

2: 処理 0~1 日後は水溶性抽出液 1、処理 2~31 日後は凍結乾燥後の水溶性抽出液 2 の測定値を示す。

3: 処理量の 6.16% 以下の未知化合物およびピークとして検出されなかった放射能を含む。

*溶媒系 1: メタノール/アンモニア (80/20、v/v)、**溶媒系 2: エタノール/メタノール/トリエチルアミン (13/2/1、v/v/v)

有機溶媒抽出液中の		と											の合計	
時間 (日)		0.5	1	2	3	4	5	6	11	21	31			
合計		8.86	16.28	29.93	NA	42.81	41.77	40.32	50.49	34.69	14.55			
		8.19	15.17	22.72	32.43	26.33	34.43	46.29	58.36	33.25	13.67			

表3 pH9緩衝液中におけるトリホリンおよびその分解物の分布の経時変化

環標識トリホリン		処理量に対する割合 (%)											
時間 (日)		0	0.5	1	2	3	4	5	6	11	21	31	
有機溶媒抽出液		102.15	97.47	89.90	85.36	79.04	76.74	67.87	66.33	52.74	25.74	13.36	
トリホリン		102.15	86.46	75.39	61.63	46.28	36.46	28.65	21.35	5.39	0.81	0.54	
W625		0.00	8.67	10.66	12.82	16.34	16.84	21.40	28.68	26.67	13.58	4.37	
		0.00	0.00	0.00	3.54	4.06	0.00	2.46	0.00	0.00	0.00	0.40	
W1069		0.00	0.92	1.83	3.14	4.42	5.09	4.12	2.32	3.17	1.03	0.62	
		0.00	0.00	0.00	1.62	2.20	0.00	1.49	0.00	0.00	0.00	0.00	
その他 ¹		0.00	1.41	1.56	2.39	3.61	7.24	4.28	6.83	8.83	2.79	3.22	
その他 ¹		0.00	0.00	0.40	0.26	2.18	11.08	5.25	7.13	8.65	7.50	4.19	
水溶性抽出液 ²		0.83	2.28	3.82	6.88	10.43	15.96	17.49	21.86	38.52	62.19	79.82	
溶媒系 ¹	W625 + W1069		-	-	-	0.17	0.17	0.31	0.44	0.00	1.20	3.21	4.07
			-	-	-	0.36	0.86	0.75	1.49	3.15	5.96	12.79	11.39
			-	-	-	1.41	2.06	1.60	3.03	3.59	2.80	3.27	11.79
			-	-	-	0.82	2.55	1.43	3.37	4.25	3.35	3.64	11.62
			-	-	-	1.41	1.13	1.67	2.22	3.28	13.07	20.10	14.93
その他 ³		-	-	-	0.00	0.00	4.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	
その他 ³		-	-	-	1.61	10.97	5.51	6.92	7.45	11.93	16.82	21.49	
溶媒系 ²	W1069 + W625		-	-	-	3.56	5.41	4.27	0.00	13.19	24.07	41.43	47.65
			-	-	-	0.22	0.73	1.46	0.00	1.44	3.49	3.13	7.37
			-	-	-	1.10	1.12	0.95	0.00	1.90	1.35	2.33	2.56
			-	-	-	0.39	0.68	1.55	0.00	1.80	4.98	10.31	13.93
			-	-	-	0.67	1.57	4.73	0.00	1.52	2.01	1.51	2.63
その他 ³		-	-	-	0.86	1.31	2.37	0.00	1.88	2.42	1.13	1.17	
物質収支		102.98	99.75	93.72	92.24	89.47	92.70	85.36	88.19	91.26	87.93	93.18	

側鎖標識トリホリン		処理量に対する割合 (%)											
時間 (日)		0	0.5	1	2	3	4	5	6	11	21	31	
有機溶媒抽出液		98.88	96.24	67.92	91.47	75.65	68.23	69.68	69.39	45.19	27.29	12.73	
トリホリン		98.88	88.73	58.62	69.97	50.80	41.12	29.88	23.43	7.82	2.80	2.55	
W625		0.00	6.46	7.90	19.30	20.14	13.74	30.19	24.64	26.47	15.52	4.79	
		0.00	0.53	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	8.55	0.00	3.95	2.13	
W1069		0.00	0.48	1.40	1.14	2.48	0.54	2.33	1.38	1.60	2.85	2.12	
		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	2.11	0.00	0.00	0.00	
その他 ¹		0.00	0.00	0.00	1.05	1.60	3.28	3.45	3.96	4.90	2.16	0.00	
その他 ¹		0.00	0.00	0.00	0.00	0.66	9.61	3.86	5.24	4.40	0.00	1.13	
水溶性抽出液 ²		1.05	2.35	3.12	6.54	9.86	13.98	15.80	20.55	35.16	54.25	60.81	
溶媒系 ¹	W625 + W1069		-	-	-	1.12	1.75	0.26	2.55	3.33	5.24	7.65	8.36
			-	-	-	0.65	1.00	0.03	1.32	1.78	2.59	3.39	4.30
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	0.53	1.18	1.25	2.19	2.48	3.59	6.39	5.57
			-	-	-	2.85	3.78	6.66	6.71	9.40	17.38	26.11	31.47
その他 ³		-	-	-	0.98	1.37	5.24	2.00	1.51	3.43	6.13	4.05	
その他 ³		-	-	-	0.39	0.78	0.53	1.03	2.03	2.94	4.55	7.06	
溶媒系 ²	W1069 + W625		-	-	-	3.41	5.11	2.45	8.08	11.01	19.54	29.51	34.75
			-	-	-	0.49	0.85	1.02	1.21	1.75	2.81	4.61	3.95
			-	-	-	1.10	2.02	3.91	3.42	4.46	8.56	14.18	17.41
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	0.57	0.51	1.09	0.81	0.89	1.00	1.48	0.83
その他 ³		-	-	-	0.97	1.36	5.51	2.27	2.46	3.25	4.46	3.86	
物質収支		99.93	98.59	71.04	98.01	85.51	82.21	85.48	89.94	80.35	81.54	73.54	

-: データなし、数値は一部を除き、2 連の平均値である。

1: 処理量の 7.84%以下の数種類の未知化合物を含む。

2: 処理 0~1 日後は水溶性抽出液 1、処理 2~31 日後は凍結乾燥後の水溶性抽出液 2 の測定値を示す。

3: 未知化合物およびピークとして検出されなかった放射能を含む。環標識、溶媒 1 において 3 日目に 10.33%、31 日目に 11.15%の未知化合物が認められたが、これを除く未知化合物は処理量の 9.39%以下であった。

*溶媒系 1: メタノール/アンモニア (80/20、v/v)、**溶媒系 2: エタノール/メタノール/トリエチルアミン (13/2/1、v/v/v)

有機溶媒抽出液中の		と 合計										
時間 (日)		0.5	1	2	3	4	5	6	11	21	31	
合計		9.59	12.49	15.96	20.76	21.93	25.52	31.00	29.84	14.61	4.99	
		6.94	9.30	20.44	22.62	14.28	32.52	26.02	28.07	18.37	6.91	

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は全農グリーンリソース株式会社にある

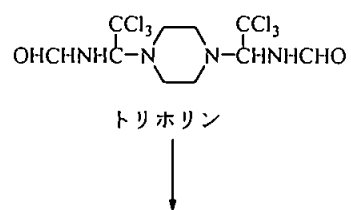


図2 トリホリンの推定加水分解経路

(2) トリホリンの水中光分解動態試験 (緩衝液)

(資料 No. M-11)

試験機関 : Hazleton UK

報告書作成年 : 1993 年 [GLP 対応]

供試標識化合物 :

構造式 :

[¹⁴C]トリホリン

[¹⁴C]トリホリン

* : ¹⁴C 標識位置

化学名 : 1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

比放射能および放射化学的純度 : 以下に表示する。

標識位置	[¹⁴ C]トリホリン	[¹⁴ C]トリホリン
比放射能	MBq/mmol	MBq/mmol
放射化学的純度	> 98%	> 98%

標識位置の設定理由¹⁾ : トリホリンの化学構造から推測して 〃が想定されたため、 〃後の代謝分解物の挙動が確認可能なように、 〃および 〃を標識位置とした。

供試水 : pH 7.0 緩衝液
10 mM トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタンマレイン酸塩に 10 mM 水酸化ナトリウム溶液を添加して pH を調整した。試験容器に入れてオートクレーブ滅菌して使用した。

人工光源 : キセノンランプ (Hanau Suntest CPS、290 nm 以下の波長を遮断するフィルター付き)
12 時間点灯、12 時間消灯の周期で 5 日間

放射光平均強度 : 535.8 W/m² (CV = 1.36%) (両標識物の光照射時の 9 回の測定の平均値)
(300-800 nm の波長を照射)¹⁾

¹⁾ 申請者註 : 申請者が追記した。

試験方法： $[^{14}\text{C}]$ トリホリン各標識体のアセトニトリル溶液を供試水 25 mL に添加し、被験物質濃度 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の試験溶液を調製した。アセトニトリル濃度は 1%未満であった。照射区は石英製蓋付ガラス容器を使用した。暗対照区はアルミ箔で覆ったバイアルを使用し、PTFE 加工したゴム製のクリップキャップで蓋をした。照射区試料は 25 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ で 5 日間、キセノンランプを照射し、揮発性化合物をエチレングリコールトラップ（極性物質用）、2%流動パラフィンを含むキシレントラップ（非極性物質用）およびエタノールアミントラップ（ $^{14}\text{CO}_2$ 用）で捕集した。暗対照区試料は、揮発性物質は捕集しなかった。

被験物質処理直後には暗対照区の 1 試料を分析に供した。その後、照射区および暗対照区の各 1 試料を、処理後 6、12、24、36、48 時間、および 3、4、5 日に採取して図 1 のスキームに従い、分析を行った。

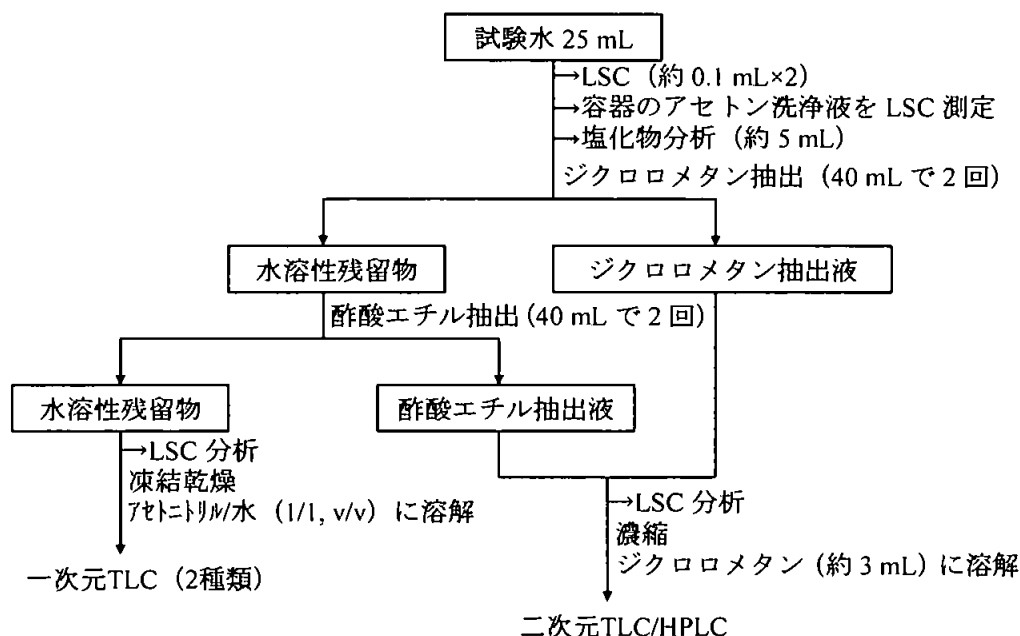


図 1 分析スキーム

水溶性残留物については、処理放射能の 5%以上を含有するものを TLC 分析に供した。一部の有機溶媒抽出液について HPLC 分析を行った。TLC 展開後に、放射能領域の位置確認および定量を行い、非標識標品とのクロマトグラフィーにより同定を行った。全トラップ中の放射能も LSC により定量した。有機溶媒抽出液を用いて、トリホリンの異性体比に関する TLC 分析も行った。

インキュベーション時間に対してトリホリンの割合 (%) の常用対数値 (log) をプロットし、回帰直線の傾きから半減期を算出した。

試験結果：

¹⁴C 分布：緩衝液中における放射能分布の経時変化を表 1 に示す。試験期間中の物質収支は、82.8～99.2%の範囲であった。揮発性物質はいずれも処理放射能の 1%未満であった。

トリホリンは、0 日目の 85.1～94.6%から、インキュベーション期間終了時には、照射区で 6.3～9.8%、暗対照区で 19.2～21.9%に減少した。2 組のトリホリンの異性体比は、インキュベーション期間を通して 3：1 のままであった。

光分解物：照射区および暗対照区において認められた主要分解物は同一であった。

主要分解物は、
であり、最大値は照射区および暗対照区において、それぞれ処理放射能の 16.2～15.0%および 10.2～22.2%であった。また、微量の W625 が検出された（処理放射能の 1%未満）。よって、トリホリンは、
により反応が進むと考えられる。予想分解経路図を図 2 に示す。

半減期： および ¹⁴C トリホリンの分解速度は同程度であった。照射条件におけるトリホリンの分解は暗条件下に比べて速かったが、加水分解反応による分解パターンに大きな変化を及ぼすことはなかった。
半減期を下表にまとめる。

標識位置	試験区	実験上の実測 半減期 (日)	東京春季 (北緯 35 度) における半減期 (日) ²⁾	フロリダ自然太陽光下 における半減期 (日)
	照射区			
	暗対照区			
	照射区			
	暗対照区			

NA：適用せず

²⁾ 申請者註：申請者が計算した。

計算の例；

人工光源による半減期： 日、 日

加水分解による半減期 (暗所条件)： 日、 日

加水分解と光分解の合計による半減期： 日、 日

$I_s = I_0 \times (300-800 \text{ nm の放射照度}) / (全波長の放射照度) = 14.6 \times 0.75 = 10.95 \text{ (MJ/m}^2\text{/d)}$

$IDT50 = (日) \times 535.8 \text{ (W/m}^2) \times 12 \text{ (時間)} \times 3600 \times 10^{-6} = (MJ/m^2)$

$DT50_{sun} = / = (日)$

同様の計算にて の半減期は、 日であった。

表1 側鎖標識トリホリン試料の放射能分布および分解物組成の経時変化

時間 (日)	0	0.25	0.5	1	1.5	2	3	4	5
照射区	処理量に対する割合 (%)								
有機溶媒抽出液									
トリホリン	94.61	87.14	70.82	59.71	44.23	36.52	24.80	17.62	6.29
	ND	1.20	3.59	6.17	9.38	6.20	14.44	11.52	15.04
W625	ND	ND	ND	ND	ND	0.57	ND	0.69	0.40
領域 OB 画分 ¹	ND	1.29	5.38	8.42	10.80	11.41	19.55	21.25	10.24
その他の未同定分解物 ²	1.57	2.77	4.31	6.33	7.41	10.98	9.77	13.37	10.14
分離不能バックグラウンド	2.06	ND	5.56	2.75	7.02	5.63	5.48	4.11	2.78
水溶性残留物 ³	1.00	4.36	8.15	9.54	15.82	19.00	22.27	23.81	37.14
非極性揮発性物質	NA	ND	ND	ND	0.01	0.01	ND	ND	0.04
極性揮発性物質	NA	ND	ND	ND	0.01	ND	ND	ND	0.02
CO ₂	NA	ND	ND	0.03	0.08	0.27	ND	0.57	0.72
物質収支	99.24	96.76	97.81	92.95	94.76	90.59	96.31	92.94	82.81
照射区	処理量に対する割合 (%)								
有機溶媒抽出液									
トリホリン	94.61	77.52	78.59	62.56	57.13	50.92	43.04	29.82	21.91
	ND	3.53	5.57	5.66	10.36	9.66	8.44	22.22	16.31
W625	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.36	0.41
領域 OB 画分 ¹	ND	0.65	1.11	5.83	10.36	9.91	16.95	5.30	13.65
その他の未同定分解物 ²	1.57	4.08	2.88	4.70	4.83	7.52	7.13	9.75	9.90
分離不能バックグラウンド	2.06	7.06	4.64	8.27	3.62	3.85	1.86	4.23	6.07
水溶性残留物 ⁴	1.00	2.71	4.08	7.05	8.58	11.57	15.45	19.47	24.59
物質収支	99.24	95.55	96.87	94.07	94.88	93.43	92.87	91.15	92.84

NA：適用せず、ND：検出せず

1：HPLC分析において数個の成分に分離し、それぞれ処理放射能の10%未満であった。

2：処理放射能の3.84%以下の6個の未同定分解物の領域を含む。

3：水溶性残留物の1次元TLC分析について、溶媒系1では、5個の領域に分離し、5日後に領域A2およびA4がそれぞれ10.45%および11.11%を示したが、その他に処理放射能の10%を超える領域は存在しなかった（最高で処理放射能の8.18%）。溶媒系2では7個の未知領域が認められたが、最高で処理放射能の6.44%であった。

4：暗対照区試料の水溶性残留物中では、処理放射能の10%を超える領域は存在しなかった（溶媒系1で7.88%以下、溶媒系2で4.80%以下）。

表 2 環標識トリホリン試料の放射能分布および分解物組成の経時変化

時間 (日)	0	0.25	0.5	1	1.5	2	3	4	5
照射区	処理量に対する割合 (%)								
有機溶媒抽出液									
トリホリン	85.07	78.36	68.38	55.40	44.30	36.40	25.67	14.41	9.84
	ND	4.62	7.87	16.17	11.65	11.80	11.59	10.96	12.66
W625	0.28	0.36	0.43	0.51	0.79	0.69	0.90	0.61	0.29
領域 OB 画分 ¹	ND	1.36	3.63	2.02	12.76	16.37	19.87	22.83	22.74
その他の未同定分解物 ²	1.20	1.99	3.54	7.58	7.12	7.93	8.42	8.53	10.72
分離不能バックグラウンド	5.92	3.90	2.59	2.53	2.62	2.97	2.55	3.21	2.65
水溶性残留物 ³	0.75	4.22	6.93	9.85	14.02	16.90	23.04	28.50	32.00
非極性揮発性物質	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
極性揮発性物質	NA	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.01	ND
CO ₂	NA	ND	ND	ND	0.04	ND	ND	0.07	0.03
物質収支	93.22	94.81	93.37	94.06	93.3	93.06	92.04	89.13	90.93

暗対照区	処理量に対する割合 (%)								
有機溶媒抽出液									
トリホリン	85.07	80.47	75.98	66.24	60.66	55.06	NR	28.17	19.24
	ND	2.54	5.05	7.18	8.62	8.46	NR	10.17	9.52
W625	0.28	0.36	0.45	0.61	0.52	0.67	NR	0.64	ND
領域 OB 画分 ¹	ND	0.27	1.35	4.38	5.60	9.72	NR	20.34	20.47
その他の未同定分解物 ²	1.20	1.80	2.25	3.77	5.43	5.78	NR	6.34	10.30
分離不能バックグラウンド	5.92	5.17	5.05	5.43	5.34	4.11	NR	5.48	5.25
水溶性残留物 ⁴	0.75	2.47	4.08	6.33	8.22	11.75	18.77	21.86	24.84
物質収支	93.22	93.08	94.21	93.94	94.39	95.55	NA	93	89.62

NA：適用せず、ND：検出せず、NR：報告せず

1：HPLC 分析において数個の成分に分離し、それぞれ処理放射能の 10%未満であった。

2：処理放射能の 3.12%以下の 5 個の未同定分解物の領域を含む。

3：水溶性残留物の 1 次元 TLC 分析について、溶媒系 1 では、5 個の領域に分離し、5 日後に領域 A2 が 11.61%を示したが、その他に処理放射能の 10%を超える領域は存在しなかった（最高で処理放射能の 9.09%）。溶媒系 2 では、7 個の未知領域が認められたが、最高で処理放射能の 6.46%であった。

4：暗対照区試料の水溶性残留物中では、処理放射能の 10%を超える領域は存在しなかった（溶媒系 1 で 8.60%以下、溶媒系 2 で 5.68%以下）。

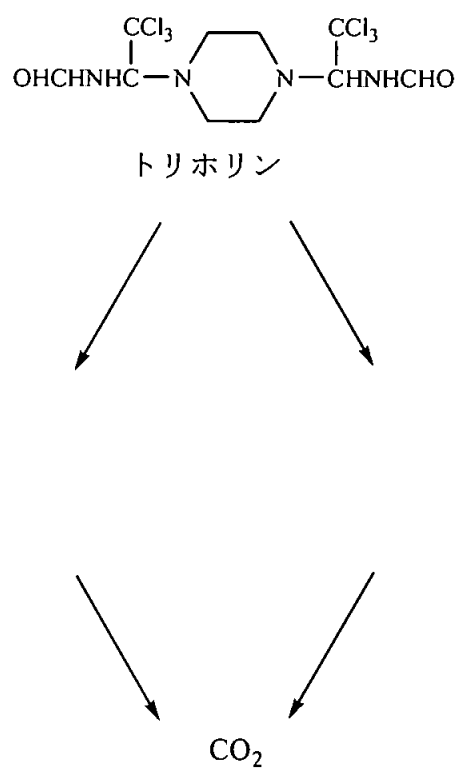


図2 トリホリンの滅菌緩衝液中の推定光分解経路

(3) トリホリンの 水中光分解動態試験 (滅菌自然水)

(資料 No. M-12)

試験機関：BASF (ドイツ)

報告書作成年：2007年 [GLP 対応]

供試標識化合物：

構造式：

[¹⁴C]トリホリン

* : ¹⁴C 標識位置

化学名： 1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

放射化学的純度： ≥ 97%

比放射能： mBq/mmol

標識位置の設定理由¹⁾：構造の安定した を標識位置とした。

供試水：以下の自然水 (池の水) を使用した。

採取場所	Kleiner Waldsee, Schifferstadt, ドイツ
採取日	2006年9月10日
pH	8.07
溶存酸素量 (mg/L, 19.6°C)	9.8
全有機炭素量 (TOC, mg/L)	14
電気伝導度 (μS/cm)	395
懸濁物質 (mg/mL)	7
全蒸発残留物量 (mg/kg, 105°C)	290

供試水は 0.2 μm の滅菌フィルターで濾過滅菌した。

人工光源：キセノンランプ (Suntest CPS、290 nm 以下の波長を遮断するフィルター付き)

光強度： 315-400 nm¹⁾の範囲で、約 3 mW/cm² (夏季晴天に相当)

試験溶液の調製： [¹⁴C]トリホリンのアセトニトリル溶液 (0.42 mg/mL) 3.0 mL に非標識トリホリンアセトニトリル溶液 (1.7 mg/mL) 0.74 mL を添加し、供試水で 500 mL に希釈し、5.04 μg/mL の試験溶液を調製した。試験溶液中のアセトニトリル濃度は 0.75% であった。

¹⁾ 申請者註：申請者が追記した。

試験方法：光照射区試料は、石英ガラスカバー付きの容量約 18 mL のガラス容器内に試験溶液を入れ、キセノンランプ装置内の長方形の恒温ブロック内に設置した。試料は $23 \pm 2^\circ\text{C}$ で 15 日間、キセノンランプを照射し、滅菌フィルターを通した空気を通気した。発生する揮発性物質はエチレングリコール、0.5 M H_2SO_4 および 0.5 M NaOH ($^{14}\text{CO}_2$ の捕集) 捕集液中に捕集した。

暗所対照区試料は三角フラスコを使用し、同期間暗条件下で静置し、揮発性物質は捕集しなかった。

試験試料は、光照射区および暗所対照区とも処理後 0、4、8 時間、1、3、6、9、15 日にそれぞれ 2 容器から採取した。

採取した試料溶液中の放射能を LSC で測定したのち、HPLC クロマトグラフィーに直接注入してトリホリンおよび代謝物の分離および定量を行った。代謝物の同定はマススペクトル分析で行った。揮発性物質のトラップ液はその一部を採取し、LSC で測定した。

試験結果：

^{14}C 分布：自然水中における放射能分布の経時変化を表 1 に示す。試験期間中の物質収支は処理放射能の 94.6~106.8%の範囲であった。光照射区において生成した揮発性物質は $^{14}\text{CO}_2$ のみで処理放射能の 1%未満であった。

光照射区のトリホリンは、0 日後の 100.0%から 15 日後には 8.2%まで減少した。暗所対照区においてもトリホリンは、0 日後の 100.0%から 15 日後には 5.2%まで減少した。

分解：光照射区における主要分解物は W1069 の W1069 であり、15 日後に処理放射能の 31.77%であった。暗所対照区においても W1069 の W1069 は主要分解物で、処理放射能の 64.6%であった。その他の代謝物としては W1069 および W1069 が検出され、最大値は光照射区でそれぞれ処理放射能の 4.9 および 7.1%、暗所対照区でそれぞれ処理放射能の 12.0 および 5.9%であった。

以上のことから、自然水中では段階的な加水分解を受け、 W1069 および W1069 を経て進行し、僅かであるが、無機化も進行した。トリホリンの自然水中の推定光分解経路図を図 2 に示す。

表1 トリホリンおよび光分解物の経時変化

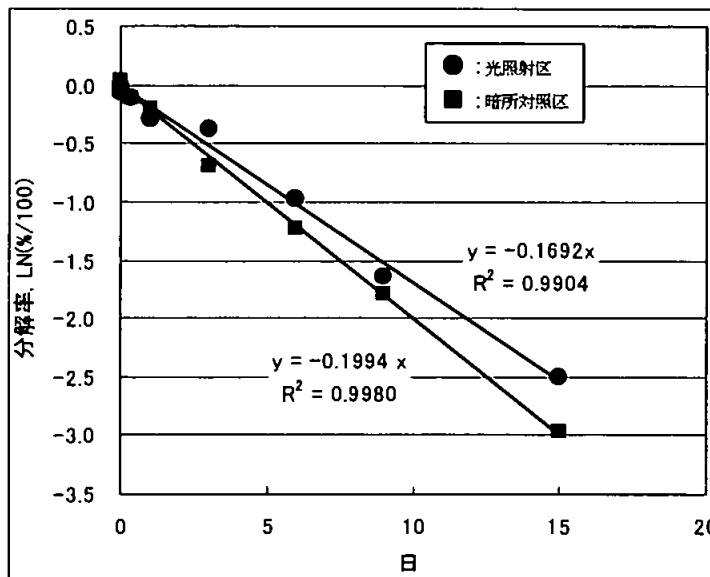
試験区	試料採取時点	処理放射能に対する割合 (%)							
		0 時間	4 時間	8 時間	1 日	3 日	6 日	9 日	15 日
光 照射区	試験水	100.0	98.4	96.5	94.4	104.9	102.2	97.2	109.5
	トリホリン	100.0	93.54	90.28	74.68	68.52	37.59	19.40	8.21
		ND	ND	ND	ND	ND	0.50	1.23	4.85
	W1069	ND	ND	ND	2.54	4.86	7.10	4.48	5.74
		ND	4.86	6.22	12.47	23.53	27.09	27.56	31.77
	その他の不明物 (数) ^{a)}	ND (--)	ND (--)	ND (--)	4.74 (8)	7.98 (7)	29.93 (20)	44.50 (31)	58.94 (31)
	揮発性物質 ^{b)}	--	0	0	0.13	0.22	0.57	0.84	0.57
	物質収支	100.0	98.4	96.5	94.6	105.1	102.8	98.0	110.1
暗所 対照区	試験水	100.0	106.8	95.2	105.2	100.9	107.1	106.6	103.0
	トリホリン	100.0	104.1	89.07	82.25	49.85	29.36	16.60	5.19
		ND	ND	ND	ND	2.50	4.20	6.94	12.02
	W1069	ND	ND	ND	2.34	3.29	5.61	3.04	5.86
		ND	2.76	6.14	20.64	41.51	62.42	71.40	64.56
	その他の未知物 (数) ^{a)}	ND (--)	ND (--)	ND (--)	ND (--)	3.75 (8)	5.48 (9)	8.66 (13)	15.34 (13)
	物質収支	100.0	106.8	95.2	105.2	100.9	107.1	106.6	103.0

a) 処理放射能の5%以下の未知物の合計量およびそれらの数

b) 0.5 M NaOH 捕集液中のみに検出、その他の捕集液中は≦処理放射能の0.1%であった。

推定半減期：光照射区および暗所対照区におけるトリホリンの減衰曲線および半減期を図1に示す。自然水中のトリホリンは、光照射区および暗所対照区とも加水分解により速やかに分解して15日後にそれぞれ8.2%および5.2%まで減少し、半減期がそれぞれ 日および 日であった。よって、自然水中ではトリホリンの分解に光照射による影響を及ぼさないことが示された²⁾。

²⁾ 申請者註：緩衝液を用いた水中光分解試験(資料 No. M-07) では、暗対照区より光照射区の方がトリホリンの分解が速く、わずかな光分解が認められた。しかしながら、自然水を用いた本試験では、光照射区と暗所対照区では同等の分解物が検出されており、半減期も同等であったことから、自然水中でのトリホリンの分解は加水分解によるものであり、光照射による影響はほとんどないと考えられた。そのため、自然水中での東京春の太陽光換算による半減期は算出しなかった。



半減期
 光照射区： 日
 暗所対照区： 日

図1 光照射区および暗所対照区におけるトリホリンの減衰曲線および半減期³⁾

³⁾ 申請者註：報告書データを基に申請者が作図および算出した。

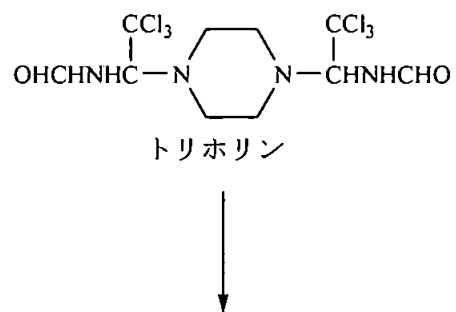


図2 トリホリンの滅菌自然水中の推定光分解経路

5. 土壌吸着試験

トリホリンの土壌吸着試験

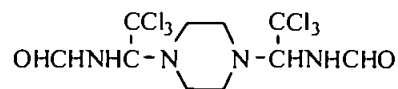
(資料 No. M-13)

試験機関：(財)化学物質評価研究機構

報告書作成年：2001年

供試化合物： トリホリン

構造式：



化学名： 1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミドエチル)ピペラジン

化学的純度： %

試験方法：

1) 処理液の調製

300 mg のトリホリンに 300 mL の 0.01 M 塩化カルシウム溶液を加え、25°Cで一晩攪拌後、メンブランフィルター (0.45 μm) でろ過して処理原液を調製した。

処理原液中のトリホリン濃度を測定したところ、9.20 mg/mL であった。調製した処理原液はさらに 0.01 M 塩化カルシウム溶液で 9 倍に希釈し、約 1 mg/mL の処理液を調製した。

2) 処理液の安定性試験

処理液を調製直後、24 時間および 48 時間後に処理液を直接 HPLC で分析した。

試験結果：

処理液の安定性試験の結果、トリホリンは処理 24 時間後に 47.2%、48 時間後に 27.4% に減少したことから、塩化カルシウム溶液中で不安定と考えられ、当該処理液を用いた土壌吸着係数の算出は不可能であると考えられた。

6. 参考

トリホリンの加水分解および光分解試験

(資料 No. M-参考 1)

(文献名 : Pestic. Sci. 1977, 8, 183-192)

供試標識化合物 :

構造式 :

[³H]トリホリン

[¹⁴C]トリホリン

* : 標識位置

化学名 : 1,4-ビス-(2,2,2-トリクロロ-1-ホルムアミド)ピペラジン

比放射能および放射化学的純度 ; 以下に表示する。

標識位置	[³ H]トリホリン	[¹⁴ C]トリホリン
比放射能	340 mCi/g	22 mCi/g

供試水 : 下記の 3 種類の緩衝液を使用した。

pH 4.7 ; 5 mM 酢酸ナトリウム

pH 6.8 ; 2.5 mM リン酸二水素カリウムと 2 mM リン酸二水素ナトリウム

pH 9.2 ; 5 mM 四ホウ酸ナトリウム

試験方法:

- 1) トリホリン試験液の加水分解および光分解 ; pH 4.7、6.8 および 9.2 の緩衝液中に非標識トリホリンは 25 mg a.i./L および標識トリホリンは 30 mg a.i./L とし、シールしたガラスビンで 21°C の暗所に 13 週間保存した。また、非標識のトリホリン溶液をシャーレに 2.4 cm の層を作り石英高圧ランプ(366 nm)で 30 cm の距離から 60 分間照射した。
- 2) トリホリン固体の光照射による分解 ; トリホリンをアセトンに溶解し、シャーレに注ぎアセトンを蒸散させた。太陽光暴露は 7 月および 8 月に、7、22、35 および 150 時間実施した。また、UV ランプ(254 nm)で 11 cm の距離から 1、16 および 64 時間照射した。
- 3) 分析方法 ; TLC により精製し、TLC およびガスクロマトグラフィーで単離、定量してコクログラフィー、マススペクトロメトリーで同定した。

試験結果:

1) トリホリン試験液の加水分解および光分解；緩衝液でトリホリンは塩素イオンの遊離により速やかに分解された。21℃の水溶液中では pH 4.7～9.2 の範囲内での pH による差はなく、図 1 の通り、試験開始 2 日間に約 50%が加水分解され、化合物 II、IV、V および VII が生成した。予想分解経路図を図 2 に示す。

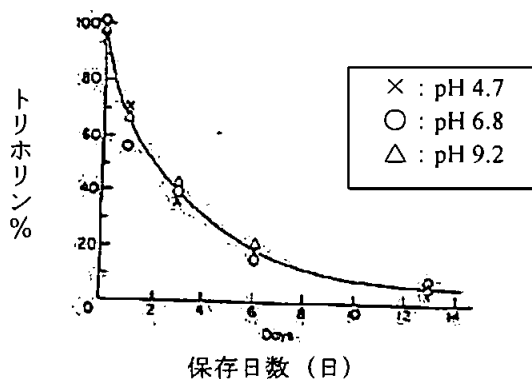


図 1 トリホリンの緩衝液中の加水分解

トリホリンは化合物 II、IV の中間体を経て、化合物 V および VII に分解された。

2) トリホリン固体の光照射による分解；トリホリン固体は太陽光により比較的緩慢に分解され、150 時間照射によりトリホリンの約半分が分解された。

紫外線照射による光分解物として化合物 III、VII、VIII および化合物 X が単離、同定された。予想分解経路図を図 3 に示す。

固体トリホリンの紫外線による経時的分解を次の表に示した。

化合物	1	16	64 (時間)
トリホリン	95	86	75(%)
化合物 III	1.8	2.5	11.9
化合物 VII	<0.1	<0.1	2.0
化合物 VIII	0.3	0.1	<0.1
化合物 X	<0.5	0.9	1.5

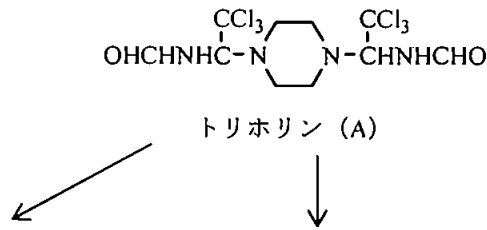
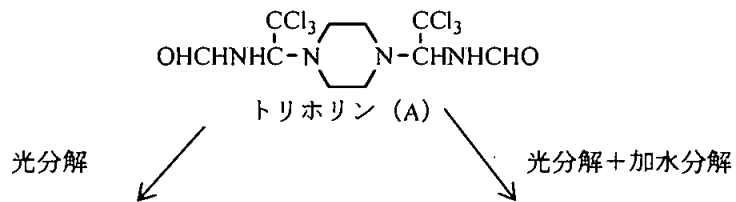


図2 トリホリン試験液の加水分解による推定分解経路



代謝分解のまとめ

トリホリンの哺乳動物、植物、土壌および水中における代謝・分解は下記の通りである。

1. 動物代謝：(資料 No.M-01～03)

あるいは を ^{14}C で標識したトリホリンまたは を ^3H で標識したトリホリンを雌雄ラットに単回(低用量、高用量)あるいは反復経口投与(低用量)した。

および 体をラットに投与した場合、一部を除いて、速やかに体外に排泄され、主要排泄経路は低用量では尿、高用量では糞であった。経口投与されたラットにおける体内吸収率は、胆汁排泄試験の結果から、低用量群および高用量群においてそれぞれ 78.6～79.2%および 24.3～28.7%と推定された。低用量では体内に吸収されたトリホリンは代謝され、主要代謝物(投与の10%を超える代謝物)として W1069

抱合体 および の抱合体 が検出され、少量代謝物として が検出された。高用量を単回投与した糞中には 71.0～78.8%が未変化のトリホリン として存在した。また、各組織における放射能濃度は、Tmax 時点において、低用量群で肝臓、腎臓、肺、脾臓、副腎および下垂体、高用量群で肝臓、腎臓、肺、副腎、脾臓、骨および骨髄で比較的高かったが、投与 168 時間までに減少し、投与方法および投与量にかかわらず投与量の 0.15%以下となった。

以上の結果、トリホリンのラットにおける代謝分解経路は、 および、ならびに抱合化であった。

2. 植物代謝：(資料 No.M-04～07)

(1) トマト (資料 No.M-04)

を ^{14}C で標識したトリホリンを葉面に 240 μg /葉または果実表面に 120 μg /果実の割合で 4 回(8～10 日間隔)滴下処理し、それぞれ最終処理 2 時間後(処理果実のみ)または 3 日後に処理部(葉部または果実)と非処理部(葉面処理の果実)を採取した。葉面処理において、最終処理 3 日後の放射能回収率は 92.1%であり、処理葉および果実(非処理部)における放射能濃度はそれぞれ 88.5ppm および 0.004 ppm であった。処理葉部における主要残留物は未変化のトリホリン (90.9%TRR) であり、0.7%TRR 以下の微量代謝分解物として W1069 および W625 が検出された。果実処理では、最終処理 3 日後の放射能回収率は 93.5% (9.7 ppm) であり、果実表面および果実内部に存在した放射能量はそれぞれ 90.9 および 6.2%TRR であった。処理果実における主要残留物は未変化のトリホリン (91.9%TRR) であり、1%TRR 未満の微量代謝分解物として W1069 および W625 が検出された。

以上の結果、トリホリンのトマトにおける代謝分解経路は、 の開裂、および の であった。

(2) りんご (資料 No.M-05)

を ^{14}C で標識したトリホリンを葉面に 120 μg /葉または果実表面に 120 μg /果実の割合で 5 回 (8 日間隔) 滴下処理し、それぞれ最終処理 14 日後に処理部 (葉部または果実) と非処理部 (葉面処理の果実) を採取した。葉面処理において、最終処理 14 日後の放射能回収率は 22.3% であり、処理葉および果実 (非処理部) における ^{14}C 濃度はそれぞれ 122 ppm および 0.0009 ppm であった。処理葉部における主要残留物は未変化のトリホリン (85.0% TRR) であり、0.9% TRR 以下の微量代謝分解物として W1069 および W625 が同定された。果実処理では、最終処理 14 日後の放射能回収率は 32.2% (1.36 ppm) であり、果実表面、果皮および果肉に存在した ^{14}C 量はそれぞれ 73.2、17.5 および 9.1% TRR であった。処理果実における主要残留物は未変化のトリホリン (76.0% TRR) であり、1.4% TRR 以下の微量代謝分解物として W1069 および W625 が検出された。

以上の結果、トリホリンのりんごにおける代謝分解経路は、の開裂、およびのであった。

(3) 大麦 (資料 No.M-06)

を ^3H で標識したトリホリンを 30 mg/ポットの割合で播種後 4 週目 (草丈 35 cm) の大麦を栽培しているポットに土壌灌注処理し、処理後 30 日まで 8 時点で採取した。処理 30 日後に大麦の茎葉部に取り込まれた放射能は処理量の 5% であった。茎葉部における主要残留物は処理 15 日後において未変化のトリホリン (57.5% TRR) であり、代謝物として W1069 が 12.9% TRR 検出された。その他、代謝物としてが 0.3% 検出されたが、を用いた大麦の代謝試験 (資料 No.M-07) から、は大麦において、および、植物構成成分であるおよびに代謝されることが示されている。

以上の結果、トリホリンの大麦における代謝分解経路は、のであった。

3. 土壌中動態 : (資料 No.M-08 および M-09)

好氣的条件下における土壌での代謝分解

を ^{14}C で標識したトリホリンまたはを ^3H で標識したトリホリンを砂壤土またはシルト質壤土に乾土あたり 2 または 20 ppm の濃度で処理し、好氣的条件下で 25~30°C で 60 日 () または 90 日間 () インキュベーションした。トリホリンは速やかに減少し、20 ppm 処理において 60 日および 90 日後に回収された放射能の 11.1~31.9% および 16.9% となり、主要代謝物としてはが最大 7.3% (60 日後) 検出された。その他の代謝物として、およびが検出されたが、いずれも 1% 未満であった。処理 60 日後 () の土壌残渣は 42.6~69.5% であり、処理 90 日後 () の $^{14}\text{CO}_2$ および土壌残渣は 27.9~37.9% および 34.3~63.6% であった。土壌残渣を分画したところ、大部分が画分に存在した。

を ^{14}C で標識したトリホリンを砂壤土またはシルト質壤土に乾土あたり 0.51 ppm の濃度で処理し、好氣的条件下で 20 \pm 2°C で 365 日間インキュベーションした。ト

リホリンの消失半減期は、 日であった。試験期間中に生成した代謝分解物は、W1069 (最大処理量の 15.6%、56 日後) および (同 3.5%、7 日後) であったがその後減少した。処理 365 日後の $^{14}\text{CO}_2$ および土壌残渣は 44.7 および 35.0% であり、土壌残渣は分画したところ、フルボ酸、フミン酸およびフミン画分にそれぞれ、17.4、3.5 および 11.3% 分布した。

以上のことから、好氣的条件下でトリホリンは速やかに分解し、最終的に土壌に結合するか、無機化されることが示された。

4. 水中動態試験：(資料 No.M-10～M-12)

(1) 加水分解 (資料 No.M-10)

あるいは を ^{14}C で標識したトリホリンを pH 5、7 および 9 の滅菌緩衝液に 5 ppm の濃度で処理し、 $25 \pm 1^\circ\text{C}$ の暗条件下で 31 日間静置した。トリホリンは速やかに加水分解を受け、半減期は ～ 日であった。加水分解液を抽出後の有機層画分に同定された主要分解物は (最大処理量の 51.7%、 、 pH 7、11 日後) および (同 25.6%、 、 pH 5、6 日後) であった。その他、W625 、 W1069 および が検出されたがいずれも処理量の 8% 未満であった。また、水溶性抽出画分には (との混合物として最大処理量の 61.4%、 、 pH 7、31 日後)、 (同 12.8%、 、 pH 9、21 日後)、W625 (同 14.7%、 、 pH 5、31 日後)、 (同 24.3%、 、 pH 7、31 日後)、 (同 17.1%、 、 pH 7、31 日後)、W1069 (同 17.4%、 、 pH 9、31 日後) および (同 39.6%、 、 pH 7、31 日後) が暫定的に同定された。

以上のことから、トリホリンの加水分解における分解経路は、 の を経て代謝されることが考えられた。

(2) 水中光分解 (資料 No.M-11 および M-12)

あるいは を ^{14}C で標識したトリホリンを pH 7 の滅菌緩衝液に $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で処理し、人工光を 5 日間照射した。トリホリンは半減期 1.4～1.6 日の速度で分解し、東京における春の太陽光換算の半減期は ～ 日と算出された。主要分解物は (最大処理量の 16.2%、 、 1 日後) であり、処理量の 1% 未満の W625 も検出された。試験期間中に生成した $^{14}\text{CO}_2$ は処理量の 1% 未満であった。

を ^{14}C で標識したトリホリンを自然水 (ドイツの池より採取、pH 8.1) に $5.04 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で処理し、人工光を 15 日間照射した。トリホリンは半減期 日の速度で分解した。主要分解物は であり (最大処理量の 31.8%、処理 15 日後)、その他の代謝物としては、 (同 %、15 日後) および W1069 (同 7.1%、6 日後) が検出された。試験期間中に生成した $^{14}\text{CO}_2$ は処理量の 1% 未満であった。

トリホリンの光分解における分解経路は、 および 、その後 を経て、僅かではあるが無機化も進行すると考えられた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は全農グリーンリソース株式会社にある

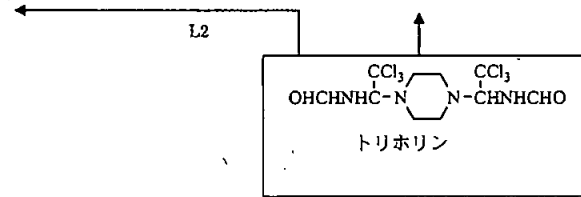
5. 土壌吸着：(資料 No.M-13)

土壌吸着

処理液の安定性試験の結果、トリホリンは塩化カルシウム溶液中で不安定であり、土壌吸着係数の算出は不可能であった。

図1 トリホリンの代謝分解経路図

- A: 動物代謝
- P: 植物代謝
- S: 土壤中動態 (好氣的条件)
- W: 加水分解
- L1: 水中光分解
- L2: 固体光分解
- []: 推定化合物



付録：トリホリンの開発年表

	1965	70	75	80	85	90	95	2000	05	10
化合物選抜										
特許										
物理化学的 性状										
有用生物等に 及ぼす影響										
農薬残留量										
適用農作物 および適用病害										
毒性										
代謝										
製造										