

2. 植物体内運命に関する試験

2-1. ピラクロストロビンのぶどうにおける代謝試験

(代謝・分解 3)

試験機関: BASF 農業研究所 (ドイツ)

[GLP 対応]

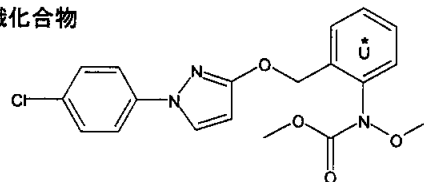
報告年: 1998 年

供試化合物:

1. ^{14}C -標識 BAS500F;

Methyl-N-[[[1-(4-chlorophenyl)pyrazol-3-yl]oxy]-o-tolyl]-N-methoxycarbamate

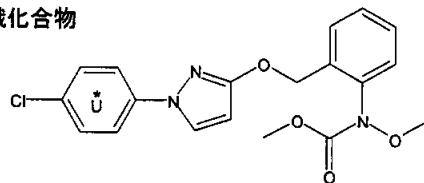
「T-環」標識化合物



放射化学的純度:

比放射能:

「C-環」標識化合物



放射化学的純度:

比放射能:

標識位置設定理由;

2. 代謝物同定用対照化合物; 本試験に使用した対照化合物を末尾に記載した.

申請者注: 本抄録中において

「T-環」標識化合物で処理した試料を「T-環」処理試料,

「C-環」標識化合物を処理した試料を「C-環」処理試料として表記した.

試験方法:

試料の調製:

本試験における供試作物, 栽培方法, 処理方法, 散布方法並びに試料採取は下表のとおりである.

供試作物	ぶどう (品種: Mueller-Thurgau). 樹齢約 5 年. 各標識化合物当り 4 樹で計 8 樹.
栽培方法	BASF 農業研究所の試験圃場で屋外栽培
散布方法	上述の各標識化合物を白試料に溶解して散布所定濃度とし、環境への影響を避けるため、果実周辺のみハンドスプレーヤーで均一に散布.
散布濃度及び時期	実用場面での出来るだけ高い濃度とし、各標識化合物で調製した散布液を生育期間中の 5~8 月に 16~19 日間隔でそれぞれ 6 回散布. 6 回散布の合計: 各標識化合物について 1500gA. l. /ha
最終散布から試料採取までの日数	最終処理 40 日後に果実及び葉を採取し、直ちに $\leq -18^{\circ}\text{C}$ に冷凍保存.

放射性成分の抽出及び同定:

凍結試料を室温で解凍後、ホモジナイズし、で 3 回抽出した。抽出物について、代謝物の分離を行い、単離した代謝物を質量分析並びに対照物質との HPLC-コクロマトグラフィーで比較して構造解析を行った。また、抽出物の有機溶媒あるいは水可溶性検討のため、及びで液液分配を行い、それぞれの有機溶媒相及び水相について分析及び放射活性を測定した。更に、マイナーな代謝物については、放射能残留量の多かった葉の試料について代謝物を分離・同定し、この成分とのコクロマトグラフィーにより検討した。

放射能は、液体試料についてはシンチレーターと混合後、固形試料については燃焼し発生する $^{14}\text{CO}_2$ をシンチレーションカクテルに吸収後、それぞれ液体シンチレーションカウンティングにより測定した。ぶどう果実試料の水分が多いことから、総放射能残留量 (TRR) は、抽出可能放射能残留量 (ERR) と非抽出性放射能残留量 (RRR) の合計とした。非抽出性放射能残留物については、で抽出し、更に非抽出成分についてはで処理して成分を検討した。

また、冷凍保存 (約 6 ヶ月) した処理試料中の被験物質の安定性検討のため、保存開始時及び保存終了時にそれぞれ抽出し、抽出液について代謝パターンを比較した。

試験結果:

果実試料からの放射性成分の抽出効率を「表 1」にまとめた。

表 1. 果実試料からの抽出 (数値は mg/kg, カッコ内は %TRR)

	「T-環」処理試料		「C-環」処理試料	
	果実	葉	果実	葉
総放射能残留量 (TRR)	1.559 (100)	40.266 (100)	0.951 (100)	49.673 (100)
抽出放射能 (ERR)	1.314 (84.3)	28.866 (71.7)	0.835 (87.8)	28.327 (57.0)
非抽出放射能 (RRR)	0.245 (15.7)	12.377 (30.7)	0.116 (12.2)	11.702 (23.6)
回収率%	(100)	(102.4)	(100)	(80.6)

結果にみられるように抽出効率は果実で 84%TRR~88%TRR、葉で 57~72%TRR であった。

抽出物の液液分配では、「表 2」にみられるように果実では全ての試料において有機溶媒可溶分が大部分で、73%TRR (「T-環」処理試料)~78%TRR (「C-環」処理試料) であった。一方、葉では

約 54%TRR が有機溶媒可溶性、約 14%TRR が水溶性であった。

表 2. 抽出物の液液分配 (数値は mg/kg, カッコ内は%TRR)

	「T-環」処理試料		「C-環」処理試料			
	果実		果実		葉	
	有機溶媒相	水 相	有機溶媒相	水 相	有機溶媒相	水 相
分配	1.011 (65.5)	- (-)	0.663 (69.7)	- (-)	12.326 (30.8)	- (-)
分配	0.119 (7.7)	0.096 (6.2)	0.077 (8.1)	0.075 (7.8)	9.086 (22.8)	5.615 (14.1)
合 計	1.130 (73.2)	0.096 (6.2)	0.740 (77.8)	0.075 (7.8)	21.412 (53.6)	5.615 (14.1)

葉 (「C-環」処理試料) の抽出物を液液分配して、分画し、以下の代謝物を同定した。これらの成分を用いて果実の代謝物を同定した。「T-環」処理試料の場合、BAS 500F 及び M07 以外の個々の代謝物は極めて少量であったので、これ以上の分析は行わなかった。

: BAS 500F 及び M07

: BAS 500F、M07、M54、M71、M04、M56、水酸化体の
抱合体

水相: M55

最終散布 40 日後のブドウ果実中の HPLC 分析及び LC/MS 分析による結果は「表 3」のとおりで、「T-環」処理試料では 56%TRR が親化合物、11%TRR が代謝物 M07、 「C-環」処理試料では、親化合物は 62%TRR、代謝物 M07 は 17%TRR であった。

表 3. 抽出可能放射性成分

HPLC ピーク	「T-環」処理試料		「C-環」処理試料		同定結果
	ppm	%TRR	ppm	%TRR	

抽出後の試料中の残留量 (非抽出可能放射能) 並びにそれらの抽出、更にでの非抽出分についての処理の結果は以下のとおりで、非抽出放射性成分のほぼ半分がセルロース及びリグニンと結合していることが確認された。

表 4. 非抽出可能放射性成分 (数値は mg/kg, カッコ内は%TRR)

	「T-環」処理試料	「C-環」処理試料
非抽出放射能 (RRR)	0.245 (15.7)	0.116 (12.2)
抽出放射能	0.023 (1.5)	0.006 (0.6)
粗リグニン	0.071 (4.6)	0.039 (4.1)
上澄み液中の放射能	0.111 (7.1)	0.027 (2.8)
: 粗セルローズ	0.044 (2.8)	0.017 (1.8)

冷凍保存開始時及び約 6 ヶ月間 -20℃ で冷凍保存後の処理試料中の代謝パターンには顕著な変化は認められず、被験物質は試料中において安定であることが確認された。

この試験から得られた「T-環」及び「C-環」標識化合物でそれぞれ処理したぶどう果実中の残留成分の同定及び解析の結果並びに同定効率を次頁の「表 5」にまとめた。

結果にみられるように、いずれの標識化合物処理においても、ブドウ果実中の主要残留成分は、親化合物()と代謝物 M07()であり、標識位置が異なっても代謝パターン

は同じであった。また、単環化合物への開裂は認められなかった。マイナーな代謝物として代謝物 M54, M55 及び M56 が確認され、これらは代謝物 M07 の誘導体か

(M55)の (M56)であった。非抽出放射能残留物の約半分がセルロース及びリグニンと結合していた。ぶどう果実中の繊維素は約 2%と低いことから、非抽出性放射性成分はブドウ果実そのものよりも、果実の茎に残留していると考えられ、分析用に果実試料を調製する際に果実と茎と一緒にホモジナイズしたことが非抽出性放射能残留量が検出されたことの原因と思われる。

表 5. 同定効率

		「T-環」 標識化合物		「C-環」 標識化合物		確認方法
		濃 度 (ppm)	%TRR	濃 度 (ppm)	%TRR	
同定代謝物	未変化の親化合物	0.860	55.7	0.588	61.79	
	代謝物 M07	0.170	11.0	0.159	16.68	
	小 計	1.030	66.7	0.747	78.47	
確認成分	マイナー代謝物； P3 (M55)			0.038	4.01	
	マイナー代謝物； P4 (M56)	0.048	3.1	0.016	1.69	
	マイナー代謝物； P6 (M54)	0.045	2.9	0.015	1.55	
	小 計	0.093	6.0	0.069	7.25	
未同定成分	マイナー代謝物； P1	0.072	4.7	0.020	2.09	
	マイナー代謝物； P2	0.050	3.2			
	マイナー代謝物； P5	0.034	2.2			
	マイナー代謝物*			0.006	0.60	
	小 計	0.156	10.1	0.026	2.69	
BOUND 残留物	粗リグニン	0.071	4.6	0.039	4.1	
	上澄み液	0.111	7.1	0.027	2.8	
	粗セルロース	0.044	2.8	0.017	1.8	
	小 計	0.226	14.5	0.083	8.7	
損 失		0.054	2.7	0.027	2.9	
総回収率		1.505	97.3	0.925	97.1	

* 非抽出物の水溶性成分

以上に述べたように、本試験ではBOUND残留成分も含め 80~92%TRRについて残留成分が解析され、主要残留成分は未変化親化合物 (56~62%TRR) とその 代謝物 M07 (11~17%TRR) であった。標識位置による代謝経路の違いは認められなかった。被験物質のぶどうにおける想定代謝経路を「図 1」に示した。代謝経路は、分子内の 3 箇所に代謝変化を受けることを示しており、1 つはトリル部位における側鎖の

抱合化、第 2 の部位であるクロロフェニルピラゾール部分では、
を受ける。次いで 開裂し、

抱合体を形成する。第 3 として クロロフェニルピラゾール部分
は 抱合化を受ける。非抽出性放射能残留量は微量で、リグニン及びセルロース等の高分子作物成分と結合すると考えられる。

図 1. ピラクロストロビンのぶどうにおける想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

同定に使用した対照化合物：

2-2. ピラクロストロビンの馬鈴薯における代謝試験

(代謝・分解 4)

試験機関：BASF 農業研究所(ドイツ)

[GLP 対応]

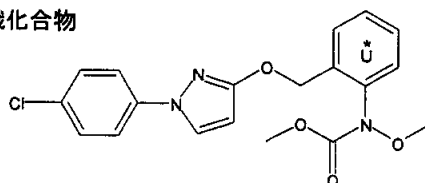
報告年：1999年

供試化合物：

1. ^{14}C -標識 BAS500F；

Methyl-N-[[[1-(4-chlorophenyl)pyrazol-3-yl]oxy]-o-tolyl]-N-methoxycarbamate

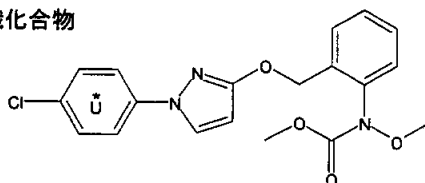
「T-環」標識化合物



放射化学的純度：

比放射能：

「C-環」標識化合物



放射化学的純度：

比放射能：

標識位置設定理由；

2. 代謝物同定用対照化合物；本試験に使用した対照化合物を末尾に記載した。

申請者注：本抄録中において

「T-環」標識化合物で処理した試料を「T-環」処理試料、

「C-環」標識化合物を処理した試料を「C-環」処理試料として表記した。

試験方法：

試料の調製；

本試験における供試作物、栽培方法、処理方法、散布方法並びに試料採取は下表のとおりである。

供試作物	馬鈴薯(品種:quarta)。各標識化合物当り 12 個体で計 36 個体。
栽培方法	苗を砂土を入れたプラスチックポットに移植し、温室内で栽培。
散布方法	上述の各標識化合物に白試料を添加後、水を加えて散布液を調製し、この散布液を馬鈴薯個体全体に散布した。
散布濃度及び時期	300gA. l. /ha の処理量で、第 1 回目散布は主茎伸長期、その後 6~10 日間隔で 5 回、計 6 回散布した。
試料採取までの日数	茎葉、塊茎及び根部の各試料を 2 回採取；1 回目(未成熟)は 3 回目の散布 7 日後、2 回目(成熟)は最終散布 7 日後に行った。採取後の試料は直ちに $\leq -18^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

放射性成分の抽出及び同定；

放射能は、固形試料についてはサンプルオキシダイザーで燃焼して、液体試料は液体シンチレーションカウンティングにより測定した。

燃焼分析により TRR を測定するため、凍結後試料をホモジナイズし、この試料について抽出した。試料を秤り取り、適当な抽出溶媒で抽出した。

抽出後、試料を遠心分離し、上澄み液を定容フラスコに濾過し、それぞれの抽出溶媒で定容とした。この試料を LSC で分析した。最後に抽出物を合わせ、乾固し、定容とした。

抽出物については、合わせた抽出物を乾固後、残留物を

で処理し、懸濁液を遠心分離した。

残渣を で再度溶解した。上澄み液は水で定容とした。代謝物の特徴付け及び抽出物のクリーンアップのため液/液分配を行った。

抽出物中の有機溶媒を

留去後、最初に で抽出し、各相を分離分取後、更に

で抽出した。それぞれの有機溶媒相(及び/又は混合溶媒相)及び残りの水相の各試料について LSC 及び HPLC で分析した。多くの 抽出物分析のため、適切な HPLC 分析条件を設定した。

抽出物中の同定及び特徴づけは

BOUND 残留物についての検討は、

抽出液の HPLC 分析を行った。

又、保存安定性を検討するため、「T-環」処理茎葉試料(未成熟試料)及び「C-環」処理塊茎試料(成熟試料)を実験開始時と終了時に分析した。茎葉試料については実験開始時と終了時のいずれにおいても で抽出した。その後の操作は両時点で異なっており、実験開始時点では

濃縮後の抽出物と残渣について検討し、その HPLC 分析結果を追加した。試験終了時点では

抽出物について分析した。塊茎試料については用いた抽出溶媒が異なり、実験開始時点では で抽出した。残留分析法での抽出効率を検討するため、3 回目の操作では

溶媒を使用した。

試験結果：

均一化した少量の試料を燃焼して総放射能残留量を測定した結果を「表 1」にまとめた。

表 1. 各試料部位における総放射能残留量(数値は mg/kg でカッコ内は茎葉に対する比率)

	「T-環」処理試料		「C-環」処理試料	
	1 回目採取試料	2 回目採取試料	1 回目採取試料	2 回目採取試料
茎 葉	12.686 (100)	58.293 (100)	24.047 (100)	68.761 (100)
塊 茎	0.014 (0.1)	0.049 (0.1)	0.010 (0.0)	0.039 (0.1)
根 部	0.208 (1.6)	0.678 (1.2)	0.450 (1.9)	0.986 (1.4)

結果にみられるように、「T-環」及び「C-環」いずれの処理試料においても茎葉部の TRR が最も高かった。塊茎部の TRR が最も低く茎葉部の残留量の 0.1%以下で、根部の残留量は最大でも茎葉部の 2%未満であった。しかしながら、試料が十分均一でなかったため繰り返し分析において結果にかなりの差が認められたことから、抽出効率等の計算における総放射能残留量(TRR)は抽出可

能放射能 (ERR) と非抽出性放射能 (RRR) の合計とした (表 2 参照)。

それぞれの試料について得られた抽出効率を「表 2」にまとめた。

表 2. 放射性成分の抽出効率 (数値は mg/kg でカッコ内は %TRR)

	「T-環」処理試料				「C-環」処理試料			
	1 回目採取試料		2 回目採取試料		1 回目採取試料		2 回目採取試料	
	茎 葉	塊 茎	茎 葉	塊 茎	茎 葉	塊 茎	茎 葉	塊 茎
総放射能 残留量 (TRR)	9.860 (100.0)	0.014 (100.0)	47.785 (100.0)	0.048 (100.0)	19.636 (100.0)	0.009 (100.0)	69.846 (100.0)	0.036 (100.0)
抽出 放射能 (ERR)	9.337 (94.7)	0.006 (39.1)	45.198 (94.6)	0.020 (41.6)	18.531 (94.4)	0.005 (48.7)	63.413 (90.8)	0.022 (61.9)
液/液分配								
有機溶媒相	9.108 (92.4)	—	43.767 (91.6)	0.004 (8.9)	17.304 (88.2)	—	35.941 (51.7)	0.016 (42.0)
水 相	0.235 (2.4)	—	0.889 (1.9)	0.014 (28.9)	0.143 (0.7)	—	1.292 (1.9)	0.004 (9.6)
非抽出 放射能 (RRR)	0.523 (5.3)	0.009 (61.0)	2.588 (5.4)	0.025 (51.8)	1.105 (5.6)	0.005 (51.3)	6.443 (9.2)	0.012 (32.6)

結果にみられるように、39.1～94.7%TRR が抽出され、茎葉試料からの抽出効率が 90.8 及び 94.7%TRR と最も高かった。塊茎試料では被験物質の標識位置の違いにより抽出効率にわずかな差が認められ、「T-環」処理試料では 39.1～41.6%TRR が で抽出されたが、「C-環」処理試料では 48.7～67.5%TRR が抽出された。また、代謝物を有機溶媒可溶成分と水溶性成分とに分類するための液/液分配では、「C-環」処理試料の放射能の大部分は有機溶媒相に検出されたが、「T-環」処理試料では塊茎部と茎葉部では挙動が異なっており、塊茎試料では放射能の大部分が水相に検出されたのに対して茎葉試料では有機溶媒可溶の代謝物が主であった。

「T-環」処理茎葉試料：

1 回目採取試料 (未成熟試料) の 抽出物の HPLC クロマトグラムでは 20 のピークが認められたが、2 回目採取試料 (成熟試料) の HPLC クロマトグラムではピークは 3 つのみであった。1 回目採取試料中では、6.427mg/kg (65.2%TRR 相当) が親化合物であった。加えて、「M07」が 1.600mg/kg (16.2%TRR)、マイナーな代謝物として、「M54 (0.177mg/kg ; 1.8%TRR)」及び 「M68 (0.058mg/kg ; 0.6%TRR)」が検出された。これらの合計は総放射能の 83.8%であった。合計 12.3%TRR であった多くのマイナーなピーク成分 (何れも <5%TRR) について HPLC で特徴付けした。

2 回目採取試料の 抽出物での主要ピーク成分も親化合物 (30.888mg/kg ; 64.6%TRR) 及び 「M07 (10.231mg/kg ; 21.4%TRR)」で、合計 86.0%TRR であった。

「C-環」処理茎葉試料：

1 回目採取試料の 抽出物の HPLC クロマトグラムには 29 のピークが認められ、その内 5 つのピークについて同定できた。親化合物は 11.098mg/kg (56.5%TRR) であった。主代謝物は 「M07」で、3.157mg/kg (16.1%TRR) であった。HPLC で両者の比率が「T-環」処理試料と同等であることを確認した。0.570mg/kg (2.9%TRR) 検出されたピークは

「M68」及び/又は「M04」と同定された。マイナー成分として methoxy 誘導体「M54 (0.271mg/kg, 1.38%TRR)」及び「M79 (0.072mg/kg, 0.37%TRR)」が検出された。これら全ての同定ピークを合計すると 77.2%TRR となった。16.7%TRR (マイナーピーク；それぞれ<5%TRR) が HPLC で特徴付けされた (表 13, 14)。

2 回目採取試料では、抽出物及び溶解試料について HPLC で分離検討した。抽出物には 5 つのピークのみが明瞭に認められた。これらは溶解試料にも認められたが、他にかなりな未知成分も認められた。抽出物と溶解試料を合わせた試料では、1 回目採取試料の結果と極めて類似しており、親化合物が 55.1%TRR (38.515mg/kg), 「M07」が 20.8%TRR (14.502mg/kg), 「M68」及び/又は「M04」が 4.4%TRR (3.068mg/kg), 「M54」が 2.6%TRR (1.782mg/kg), 及び「M79」が 0.1%TRR (0.072mg/kg) であった。同定した抽出可能放射性成分の合計は 83.0%TRR で、更に 6.3%TRR (4.451mg/kg) が HPLC 保持時間及び抽出挙動から同定できた。

「T-環」処理塊茎試料：

1 回目採取試料の抽出物の HPLC により、17 の明瞭なピークから 3 成分が同定され、質量分析により「M72」は、10.0%TRR (0.001mg/kg) であった。親化合物は 2.5%TRR, 「M07」は 0.6%TRR のみであった。合計するとこれらの抽出可能放射能残留量は 13.1%TRR で、非抽出放射能残留量は 61.0%TRR (0.009mg/kg) であった。

2 回目採取試料では、抽出物及び抽出残渣について HPLC 分析を行った。何れのクロマトグラムも多くのピークを示しており、その内 1 成分についてのみ同定できた。「M72 ()」は 0.014mg/kg (29.2%TRR) であった。1 回目採取試料と同様に、同定は HPLC で保持時間の比較で行った。別の 18.0%TRR について HPLC で特徴付けし、51.8%TRR (0.025mg/kg) が非抽出性残留物であった。更に、抽出残渣について処理し、抽出物を HPLC で分析した。この試料においても多くのピークの内 1 成分についてのみ同定され、これはやはり代謝物「M72 ()」で 2.9%TRR であった。その他 20.5%TRR についてマイナーな代謝物の合計として特徴付けされた。38.5%TRR (0.019mg/kg) が非抽出性残留物であった。

「C-環」処理塊茎試料：

1 回目採取の「C-環」処理試料の HPLC 分析によりそれぞれ 13 及び 22 の明瞭なピークが認められ、その内の 5 成分について同定できた。抽出物及び抽出残渣を合わせると、親化合物は 21%TRR (0.002mg/kg), 「M07」は 5.8%TRR, 「M54」は 6.2%TRR であった。「M68」及び「M04」は 1.5%TRR であった。0.4%TRR 検出されたマイナーな成分は「M79」と同定した。合計 34.9%TRR について同定され、14.8%TRR について HPLC で特徴付けした。0.005mg/kg (51.3%TRR) が非抽出性残留物であった。

2 回目採取試料から得られた結果も極めて類似したもので、6 つのピークの内 5 成分について同定され、それらは 1 回目採取試料と同一であることが確認された。しかし、量的にわずかに異なっており、0.012mg/kg (29.4%TRR) が親化合物, 「M07」は 0.003mg/kg (6.6%TRR) であった。3.3%TRR 及び 2.6%TRR は「M79」及び「M54」であった。「M68」及び「M04」は 1.7%TRR であった。HPLC で更に 8.5%TRR が特徴付けされた。残りの 38.9%TRR (0.016mg/kg) は非抽出性残留物であった。

各標識化合物処理後、異なる採取時期における茎葉試料及び塊茎試料の分析結果に基づく同定効率を「表 3」にまとめた。結果にみられるように、茎葉中の主要残留成分は未変化の親化合物であった。塊茎中の主要残留成分も未変化の親化合物であったが、その量は親化合物残留量に比して極めて低かった。同定された代謝物は 7 種で、その内「M07」が茎葉試料中で 10%TRR を超える主要代謝物であった。その他の代謝物はいずれも <10%TRR であった。

尚、採取試料を 2 年間保存後、抽出効率及び HPLC での代謝パターンの比較を行った保存安定性試験の結果は、放射能残留物の質に明らかな差のないことが確認された。

本試験の結果、被験物質の馬鈴薯における主要な代謝経路は下記のとおりであった。

- 1) 脱メトキシ化
- 2) 水酸化後のグルコシル化あるいはメチル化
- 3) それぞれ環が離れて生成した分解物が天然のアミノ酸を生成

馬鈴薯の茎葉及び塊茎中に検出された被験物質関連の主要残留成分は親化合物と「M07」であった。

本試験の結果に基づく想定代謝経路を「図 1」に示した。

表 3 : 同定効率 (数値は mg/kg で、カッコ内は%TRR)

		「T-環」処理試料				「C-環」処理試料			
		1 回目採取試料		2 回目採取試料		1 回目採取試料		2 回目採取試料	
		茎	葉	塊	茎	茎	葉	塊	茎
同定 代謝物	未変化親化合物	6.427	(65.2)	0.000	(2.5)	30.888	(64.6)		
	代謝物 M04								
	代謝物 M07	1.600	(16.2)	0.000	(0.6)	10.231	(21.4)		
	代謝物 M54	0.177	(1.8)						
	代謝物 M68	0.058	(0.6)						
	代謝物 M72			0.001	(10.0)				
小 計		8.262	(83.8)	0.002	(13.1)	41.119	(86.0)	0.014	(29.2)
確認 成分	マイナー 抽出成分合計	1.212 ^{*2}	(12.3)	0.002 ^{*2}	(16.9)	2.251 ^{*2}	(4.7)	0.009	(18.0)
	水抽出成分	<16>		<14>		<1>		<9>	
	Rt 約 48 分成分			0.001	(9.7)	0.091	(0.2)		
小 計		1.212	(12.3)	0.003	(26.6)	2.342	(4.9)	0.009	(18.0)
抽出性同定・確認成分 合計		9.474	(96.1)	0.005	(39.7)	43.461	(91.0)	0.023	(47.2)
非抽出成分		0.523	(5.3)	0.009	(61.0)	2.588	(5.4)	0.025	(51.8)
総 計 (総放射能)		9.997	(101.4)	0.014	(100.7)	46.049	(96.4)	0.048	(99.0)

注 : 「マイナー抽出成分合計」欄の < > 内の数値は検出されたマイナー成分のピーク数

*1. 抽出物と抽出残渣の合計

*2. <5%TRR

*3. 報告書中の代謝物 M68 と M04 の合計値を 2 等分した

*4. <1%TRR

参考 : 非抽出成分の 抽出(「T-環」処理 2 回目採取試料 : 塊茎)

非抽出成分		0.026 (52.3)
同定成分	代謝物 M72	0.001 (2.9)
	小 計	0.001 (2.9)
確認成分	マイナー抽出成分合計	0.011*2(20.5) <14>
	小 計	0.011 (20.5)
抽出性同定・確認成分 計		0.012 (23.4)
非抽出成分		0.019 (38.5)

図 1. ピラクロストロビンの馬鈴薯における想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

同定に使用した対照化合物：

2-3a. ピラクロストロビンの小麦における移行性試験

(代謝・分解 5-1)

試験機関：BASF 農業研究所(ドイツ)

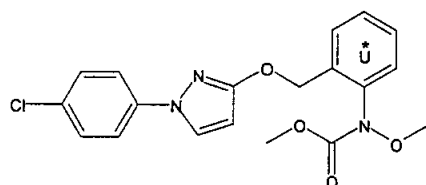
[GLP 対応]

報告年：1998年

供試化合物：

¹⁴C-標識 BAS500F；

Methyl-N-[[[1-(4-chlorophenyl)pyrazol-3-yl]oxy]-o-tolyl]-N-methoxycarbamate



放射化学的純度：

比放射能：

標識位置；本試験はトリル環標識化合物(=「T-環」標識化合物)で実施し、

試験方法：

試料の調製；

本試験における供試作物、栽培方法、処理方法、散布方法並びに試料採取は下表のとおりである。

供試作物	春小麦(品種:Eta)
栽培方法	BASF 農業研究所の試験圃場で栽培。土質:壤質砂土
散布方法	1 処理区当り 16x16cm のプラスチックポット 2 個使用； 0.05m ² /処理区。所定量の標識化合物、空試料及び水を混合して調製した処方の異なる 2 製剤(A, B)*1 の散布液を手動散布器で処理。
散布濃度及び時期	処理量:250gA. l. /ha 第 1 回目処理:BBCH スケールによるステージ 32/33*2 第 2 回目処理: BBCH スケールによるステージ 43/47*3
試料採取までの日数	第 1 回目処理区試料:処理 11 日後に 8 個体採取。 第 2 回目処理区試料:処理 15 日後に 20~21 個体採取。

*1. 活性剤の比率が異なる下記の 2 乳剤(製剤組成 g/L)を使用した。

製剤	有効成分	湿展剤	乳化剤	溶媒
B	250	250	100	400
A	250	0	100	650

*2. 第 2 葉が完全に展開し、止め葉は第 2 葉の葉鞘部に不完全に巻いた状態

*3. 未だ閉じている止め葉の葉鞘部に穂があることが感じられる状態。

葉鞘が開き、穂が視認出来る作物個体は散布前に除去した。

試料の処理；

燃焼分析は、第 1 回目処理試料では第 1 葉(止め葉)、第 2 葉及び第 3 葉それぞれについて、第 2 回目処理試料では穂、第 1 葉(止め葉)、第 2 葉についてそれぞれ行った。燃焼分析用の試料を秤り取る前に、各作物部位からの試料を混合し、試料にドライアイスを追加して実験室用粉砕機で粉砕した。

オートラジオグラム用に少なくとも 2 個体を各処理区から採取した。濾紙の間に試料を挟んで

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

室温で約 1 週間乾燥した後、厚紙に留め、X-線フィルムの上に 21 日間放置した。X-線フィルムを現像後、 ^{14}C -標識化合物の作物中での移行をオートラジオグラムにより確認した。

試験結果：

燃焼分析による各作物部位の放射能及びその結果に基づく移行率を「表 1」及び「表 2」にまとめた。

表 1. 第 1 回目処理試料の各作物部位の放射能及び移行率

(放射能数値は μg 親化合物相当量)

	処 理 部		無処理部	合 計	移行率 (%)
	第 3 葉	第 2 葉	第 1 葉 (止め葉)		
製剤 A	6.145	5.456	0.043	11.644	0.370
製剤 B	2.833	3.322	0.057	6.214	0.953

表 2. 第 2 回目処理試料の各作物部位の放射能及び移行率

(放射能数値は μg 親化合物相当量)

	処 理 部		無処理部	合 計	移行率 (%)
	第 2 葉	第 1 葉 (止め葉)	穂		
製剤 A	2.18	8.246	0.144	10.57	1.36
製剤 B	2.902	9.704	0.189	13.118	1.48

結果に見られるように、処理部から無処理部への移行は、第 1 回目処理試料では平均 0.370～0.953%，第 2 回目処理試料では 1.36～1.48%で、処理した葉から新たに展開した葉への放射能の移行は極めて小さいことが確認された。また、活性剤の比率が異なっても移行率への顕著な影響は認められなかった。

この移行性については各処理区から採取した個体のオートラジオグラムでも確認された。

2-3b. ピラクロストロビンの小麦における代謝試験

(代謝・分解 5-2)

試験機関：BASF 農業研究所(ドイツ)

[GLP 対応]

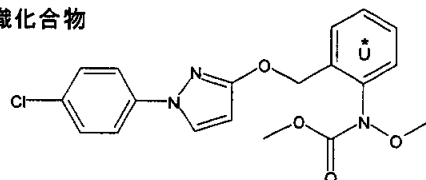
報告年：1999年

供試化合物：

1. ^{14}C -標識 BAS500F；

Methyl-N-[[[1-(4-chlorophenyl)pyrazol-3-yl]oxy]-o-tolyl]-N-methoxycarbamate

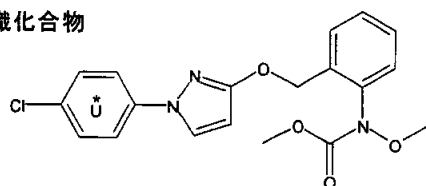
「T-環」標識化合物



放射化学的純度：

比放射能：

「C-環」標識化合物



放射化学的純度：

比放射能：

標識位置設定理由；

2. 代謝物同定用対照化合物；本試験に使用した対照化合物を末尾に記載した。

申請者注：本抄録中において

「T-環」標識化合物で処理した試料を「T-環」処理試料、

「C-環」標識化合物を処理した試料を「C-環」処理試料として表記した。

試験方法：

試料の調製；

本試験における供試作物、栽培方法、処理方法、散布方法並びに試料採取を下記とおりである。

供試作物	春小麦
栽培方法	屋外圃場で栽培した個体をプラスチックポットに植え替え、BASF 農業研究所のガラス屋根付き栽培研究室で自然状態で栽培した。
散布方法	1 処理区当り 16x16cm のプラスチックポット 60 個使用；1.54m ² /処理区。所定量の標識化合物、空試料及び水を混合して調製した製剤の散布液を小型散布機で処理。
散布濃度及び時期	処理量：300gA. l. /ha で 2 回処理。 - 第 1 回目処理：BBCH スケールによるステージ 32 - 第 2 回目処理：BBCH スケールによるステージ 61 ^{*2} ；1 回目の処理後 24~25 日
試料採取日採取部位	・第 2 回目の処理後、0 日（散布液が乾いた直後；以下「0DALT 試料」とする）、31 日（青刈り試料；以下「31DALT 試料」とする）及び 41 日（成熟個体で子実、籾殻、麦わらに分割；以下「41DALT 試料」とする） ・採取後の試料は直ちに -18℃ で冷凍保存した。

*1. 節間伸張期（第 2 節間が認識できる） *2. 開花始期

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

放射性成分の抽出及び同定；

放射性成分の抽出は、均一化した試料を で抽出した。試料に溶媒を加えて、Ultra Turrax で数分間攪拌した。次いで、遠心分離し、濾過後上澄み液を集めた。抽出の各段階における上澄み液を合わせて定容とし、LSC で測定した。抽出残留物の放射能は燃焼し、LSC で測定した。

抽出物中の可溶性放射性成分及び水抽出物の同成分については、液/液分配により更に分析した。

抽出物では、 を留去後、残った水相を定容とした後、この溶液を 分配した。 , LSC で測定した。

非抽出性放射能残留成分の同定は、 抽出残留物に 溶液を加えて Ultra Turrax で混合した。抽出残渣を同様に処理した。次いで抽出物を遠心分離 した。同じ操作を繰り返し、抽出液を合わせ、LSC で放射能を測定した。

Cellulose 及び lignin は、

残留物からそれぞれ分離した。 固形残留物については、還流抽出し、 乾燥した。濾液及び洗浄液を別々に集めた。残渣 乾燥 cellulose 及び上澄み液について放射能を測定した。濾液及び洗浄液から粗 (crude) lignin を 沈殿させた。沈殿物及び上澄み液について燃焼及び LSC で放射能を測定した。

残渣を 緩衝液と混合した。この溶液に、 酵素混合物)を加えた。次いで、 インキュベートした。遠心分離後、上澄み液と沈殿物について放射能を測定した。

青刈り試料 (31DALT) からの代謝物の分離

代謝物の分離は「C-環」処理試料についてのみ実施した

麦わら試料 (41DALT) からの代謝物の分離

抽出後、 分配し、有機溶媒相を更に精製した。

子実試料(41DALT)からの代謝物の分離

代謝物の分離は「T-環」処理試料についてのみ実施した。

試験結果：

1. 総放射能残留量 (TRR)

「表 1」にみられるように、全試料において実測値と計算値が同程度であった。しかし、幾つかの試料では繰り返し燃焼で得られた結果にバラツキがみられ、あるいは総放射能残留 (TRR) が抽出可能放射能 (ERR) と非抽出性放射能 (RRR) の合計値と異なることがあった。これは、試料の均一性が十分でなかったか、試料の水分含量によるものと考えられることから、TRR は ERR と RRR の合計値とし、この値 (表 1 の「計算値」) で抽出物及びクロマトグラムの放射能の算出基礎とした。

表 1. 各試料部位における総放射能残留量 (数値は mg/kg でカッコ内は麦わらに対する比率)

	「C-環」処理試料		「T-環」処理試料	
	実測値 ¹⁾	計算値 ²⁾	実測値 ¹⁾	計算値 ²⁾
青刈り	7.424 (14.5)	6.527 (17.3)	8.393 (17.7)	6.793 (16.8)
麦わら	50.511 (100)	37.768 (100)	47.539 (100)	40.461 (100)
子実	0.078 (0.2)	0.098 (0.3)	0.447 (0.9)	0.441 (1.1)
籾殻	26.297 (52.1)	24.251 (64.2)	34.456 (72.5)	30.617 (75.7)

1. 試料を直接燃焼して得られた値。

2. 抽出可能放射能 (ERR) と非抽出性放射能 (RRR) の合計値 (TRR)

非食用部位における TRR は、青刈りで 6.5mg/kg、麦わらで 40.5mg/kg で、籾殻では 24~31mg/kg であった。青刈りから麦わらへのかかなりな TRR の増加は、成熟期間中における水分損失のため乾燥作物中で残留物が濃縮されたためであると説明できる。食用部位である子実中の TRR は 0.45mg/kg と低かった。籾殻及び麦わら中の TRR レベルの点から、被験物質は「茎、葉あるいは包穎 (glumes)」から「実」へ殆ど移行しないことを意味している。更に、籾殻の主たる構成要素である包穎 (glumes) が散布液が直接「実」に付着することを効果的に妨げている。子実において「C-環」処理試料と「T-環」処理試料の間には 4.5 倍もの TRR 値の差が認められ、これは被験物質の開裂並びにその後のフラグメントの移行に起因していると考えられる。

2. 抽出効率

それぞれの試料について得られた抽出効率を「表 2」にまとめた (注：文中の成分については「表 5-1」参照)。

結果にみられるように、青刈り及び麦わら試料に対する抽出及びその後での抽出は極めて有効で、約 85%TRR が抽出された。TRR が主として非極性成分である未変化の親化合物「BAS 500 F」及び「代謝物 M07」で構成されていたことから、放射能の大部分は

で抽出された。子実試料からの抽出効率は劣り、「T-環」処理試料で 51%TRR、 「C-環」処理試料で 71%TRR であった。標識位置による総抽出効率、抽出効率 (25.6%TRR/55.8%TRR)、抽出効率 (25.6%TRR/15.2%TRR) に差が認められるが、これは「T-環」処理試料と「C-環」処理試料それぞれの抽出物の放射能の組成が異なることによるものである。青刈り及び麦わらと同様に、「C-環」処理子実試料からの代謝パターンは、「BAS 500 F」と「代謝物 M07」が主要な残

留成分で、これらのいずれも で容易に抽出された。他方、「T-環」処理試料における主たる残留成分は M24」で
及び で同量の放射活性が抽出された。

表 2. 放射性成分の抽出効率(数値は mg/kg でカッコ内は%TRR)

処 理 区	「T-環」処理区				「C-環」処理区			
	青刈り	麦わら	子 実	籾 殻	青刈り	麦わら	子 実	籾 殻
試料採取時期 ¹⁾	31DALT	41DALT			31DALT	41DALT		
総放射能 (TRR)	6.793 (100)	40.461 (100)	0.441 (100)	30.617 (100)	6.527 (100)	37.768 (100)	0.098 (100)	24.251 (100)
抽出放射能	5.436 (80.0)	31.777 (78.5)	0.113 (25.6)	18.183 (59.4)	5.282 (80.9)	28.191 (74.6)	0.055 (55.8)	13.257 (54.7)
有機溶媒相	4.785 (70.1)	32.011 (79.1)	0.064 (14.5)	17.424 (56.9)	4.495 (68.9)	29.214 (77.4)	0.054 (54.7)	12.998 (53.6)
水 相	0.545 (8.0)	1.303 (3.2)	0.045 (10.3)	1.63 (5.3)	0.781 (12.0)	0.918 (2.4)	0.007 (6.7)	1.166 (4.8)
抽出放射能	0.281 (4.1)	2.915 (7.2)	0.113 (25.6)	3.639 (11.9)	0.274 (4.2)	3.775 (9.9)	0.015 (15.2)	3.421 (14.1)
抽出可能放射能小計 (ERR)	5.717 (84.1)	34.692 (85.7)	0.226 (51.2)	21.822 (71.3)	5.556 (85.1)	31.946 (84.5)	0.070 (71.0)	16.678 (68.8)
非抽出性放射能 (RRR)	1.076 (15.8)	5.769 (14.3)	0.216 (48.8)	8.795 (28.7)	0.970 (14.9)	5.882 (15.4)	0.028 (29.0)	7.573 (31.2)

1) 31DALT : 第 2 回目処理 31 日後 41DALT : 第 2 回目処理 41 日後

青刈り及び麦わら試料の 抽出物を有機溶媒と水で分配すると、放射能の大部分は有機溶媒可溶分として検出された。これは、抽出放射性成分が主として何れも非極性物質である未変化の親化合物と「代謝物 M07」で構成されていることによるものである。これは「C-環」処理子実試料においても同様である。しかし、「T-環」処理の子実試料では主体は水溶性成分で、これは が主代謝物であるためである。

「表 2」にみられるように、同程度の非抽出性残留量が各標識化合物で処理した青刈り及び麦わら試料に検出され、約 15%TRR であった。この比較的低い率にかかわらず、絶対量は青刈り試料で 1mg/kg、麦わら試料では 5.8mg/kg であったので、詳細な特徴付けを行った。結果を次頁の「表 3」にまとめた。

最初の 処理では約 3%TRR が抽出され、これは非抽出性放射能残留量 (RRR) の最大限 20%に相当する。抽出物は主としてグルコシド並びに 2 種の代謝物で構成されていると推定された。抽出後の残留物について、生体高分子物質 (biopolymer) である cellulose 及び ligin に結合した放射能を更に分析したが、実施したどの方法も全 cellulose あるいは全 ligin を純粋に取り出すことができなかった。しかしながら、充分選択的ではないものの厳しい抽出条件であったので、多少なりとも粗 cellulose あるいは粗 ligin を得た。また、それぞれの方法が有する問題点から、ligin 及び cellulose を分離するため 2 乃至 3 種の異なる方法を実施し、得られた結果を平均してこれらの画分に結合した放射能の量を算出した。全体として、異なる分離方法で得られた結果は同程度であった。

表 3. 青刈り及び麦わら試料の非抽出性放射性 (RRR) 成分の検討 (数値は mg/kg でカッコ内は %TRR)

処 理 区 試 料	「T-環」処理区		「C-環」処理区	
	青刈り	麦わら	青刈り	麦わら
試料採取時期 ¹⁾	31DALT	41DALT	31DALT ¹⁾	41DALT
総放射能 (TRR)	6.221 (100)	44.482 (100)	5.738 (100)	47.018 (100)
抽出可能放射能 (ERR)	5.110 (82.1)	35.705 (80.3)	4.853 (84.6)	38.569 (82.0)
非抽出性放射能 (RRR)	1.111 (17.9)	8.777 (19.7)	0.885 (15.4)	8.449 (18.0)
抽出	0.159 (2.6) 14.3%RRR	1.261 (2.8) 14.4%RRR	0.173 (3.0) 19.5%RRR	1.582 (3.4) 18.7%RRR
非抽出	0.952 (15.3)	7.516 (16.9)	0.712 (12.4)	6.867 (14.6)
Cellulose ²⁾	0.068 (1.1)	0.663 (1.5)	0.039 (0.7)	0.300 (0.6)
Cellulose/ hemicelluloses ³⁾	0.148 (2.4)	1.086 (2.4)	0.168 (2.9)	0.766 (1.6)
Cellulose ⁴⁾	n. d.	1.818 (4.1)	n. d.	0.360 (0.8)
Cellulose 平 均	0.112 (1.8) 10.1%RRR	1.157 (2.6) 13.2%RRR	0.103 (1.8) 11.6%RRR	0.470 (1.0) 5.6%RRR
Lignin ²⁾	0.317 (5.1)	2.546 (5.7)	0.289 (5.0)	2.172 (4.6)
Lignin() ⁵⁾	0.528 (8.5)	4.460 (10.0)	0.221 (3.8)	4.183 (8.9)
Lignin 平 均	0.423 (6.8) 38.1%RRR	3.514 (7.9) 40.0%RRR	0.252 (4.4) 28.5%RRR	3.197 (6.8) 37.8%RRR
HCl で沈殿しない アルカリ可溶分	0.373 (6.0) 33.6%RRR	2.372 (5.4) 26.5%RRR	0.306 (5.3) 34.5%RRR	3.137 (6.7) 37.1%RRR

1) 31DALT : 第 2 回目処理 31 日後 41DALT : 第 2 回目処理 41 日後

2)

3)

4)

5)

青刈り及び麦わら試料の cellulose に結合した放射能の平均値は 1.0~2.6%TRR で、両試料の間には明確な差は認められなかった。

Lignin に結合した放射能はより高かった ; 4.4~7.9%TRR.

Cellulose 及び lignin に結合した放射能を合計すると、非抽出性放射能残留量 (RRR) の約 40~50%がこれらの生体高分子物質 (biopolymer) に該当した。約 14~20%RRR が で抽出された (表 3)。残りの約 30~40%RRR は、HCl では沈殿しないアルカリ可溶性放射性成分として特徴付けられた。この画分は、hemicelluloses あるいは lignin-多糖類複合体を含むと考えられることから、本試験で用いた方法では分類できなかった。

「表 2」にみられるように、子実での抽出効率は「C-環」処理試料で 71.0%TRR、「T-環」処理試料では 51.2%TRR で、非抽出性放射能残留量 (RRR) はそれぞれ 29.0%TRR (0.028mg/kg) 及び 48.8%TRR (0.216mg/kg) となる。各標識化合物処理試料間に明らかな差があることから、非抽出性放射能残留成分の特徴付けはそれぞれの標識化合物処理試料について別々に行った。結果を「表 4」に示した。

表 4. 子実試料の非抽出性放射能 (RRR) 成分の検討 (数値は mg/kg でカッコ内は %TRR)

処 理 区	「T-環」処理区	「C-環」処理区
試 料	子 実	子 実
試料採取時期 ¹⁾	41DALT	41DALT ¹⁾
総放射能 (TRR)	0.441 (100)	0.082 (100)
抽出可能放射能 (ERR)	0.226 (51.2)	0.054 (66.4)
非抽出性放射能 (RRR)	0.216 (48.8)	0.027 (33.7)
抽出	0.113 (25.5)	0.009 (11.3)
上澄み液 ²⁾	0.089 (20.2)	n. d.
7ミ/酸画分 ³⁾	0.047 (10.7)	n. d.
非抽出	0.098 (22.1)	0.018 (22.4)
DMSO/水抽出後の澱粉沈殿物 ⁴⁾	0.022 (5.0)	0.009 (10.5)
DMSO/水抽出後の上澄み液 ⁵⁾	0.012 (2.7)	0.004 (5.2)
DMSO/水非抽出	0.065 (14.9)	0.008 (9.9)
DMSO/水非抽出成分の熱湯抽出	0.015 (3.4)	n. d.
熱湯非抽出成分の NaOH 抽出	0.043 (9.8)	n. d.
NaOH 非抽出成分 (cellulose)	0.007 (1.7)	n. d.

1) 41DALT : 第 2 回目処理 41 日後

2)

3)

4)

5)

「C-環」処理試料では 処理後の可溶性放射性成分は 11.3%TRR (0.009mg/kg) であった。抽出前の水抽出物 (15.2% TRR) では殆ど分離しない極めて多くのピークが認められ、これらは定量不能であった (図 1)。このため、抽出物についての分析は行わなかった。抽出後の DMSO/水処理により、10.5% TRR (0.009mg/kg) が澱粉に結合しており、別に 5.2%TRR が混合溶媒で可溶化された。しかし、添加による澱粉の沈殿は認められなかった。9.9%TRR (0.008mg/kg) 検出された DMSO/水抽出後の固形相については更なる特徴付けは行わず、これを最終残留物とした。

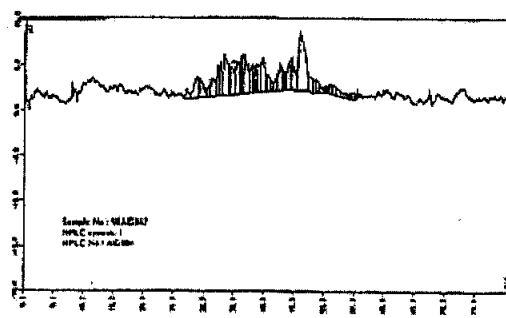


図 1. 水抽出物のクロマトグラム

「T-環」処理試料においては、での処理により 25.5%TRR (0.113mg/kg) が抽出され、RRR の半分以上であった。抽出物からの蛋白を沈殿させ、沈殿物を分解した結果、蛋白分解後の液相に 10.7%TRR (0.047mg/kg) が検出された。液相について HPLC クロマトグラフィー分析を行ったところ、クロマトグラムには 1 つの放射能ピークが認められ、が植物蛋白に取り込まれたことを示している。抽出後の残留物量は 22.1%TRR (0.098mg/kg) であった。「C-環」処理試料と同様に、次の解析は DMSO/水抽出による澱粉の分離で、抽出後で沈殿させた結果、5.0% TRR (0.022mg/kg) が澱粉に結合しており、別に 2.7%TRR が上澄み液に検出された。澱粉抽出後、14.9%TRR (0.065mg/kg) 含有していた残留物を熱水で処理し、DMSO/水抽出により全ての澱粉

が除去されたか否かを検討した結果、熱水中に検出された放射能は 3.4%TRR と微量であり、また I_2/KI 試薬での澱粉反応も認められなかったことから、澱粉が除去されたことが確認された。熱水処理後の残留物から主として「ふすま」に含まれるアルカリ可溶物質（例えば hemicelluloses）を取り出すため、残留物を還流下で希釈 NaOH で抽出した。NaOH 可溶画分に 9.8%TRR (0.043mg/kg) が検出された。残りのアルカリ不溶性放射能 (1.7%TRR, 0.007mg/kg) についてはこれ以上の分析は行わず、最終残留物とした。

3. 同定効率

質量分析を伴う種々の異なる条件での HPLC 分析により同定及び特徴付けしたそれぞれの試料部位についての結果を「表 5-1, -2, -3」にまとめた。

麦わら試料では 83.0%TRR 及び 82.1%TRR と極めて高率で同定でき、青刈り試料ではやや低く 74.3%TRR 及び 76.1%TRR であった（表 5-1）。クロマトグラフ的に特徴付けしたか、あるいは生物高分子物質に結合していることを確認した放射性成分の量を加えると、4 種の試料それぞれについての同定程度は >90%TRR となる（表 5-1, -2）。

子実試料の抽出可能放射性成分に基づく同定程度は、「C-環」処理試料で 50.9%TRR、「T-環」処理試料では 41.2%TRR であった（表 5-1）。このように低い同定程度は、子実中の非抽出性放射能残留量がより高かったためである。しかしながら、「T-環」処理試料の非抽出性放射能残留量から更に 17.5%TRR が「代謝物 M24」、tryptophan 並びに tryptophan 含有蛋白であるとした（表 5-3）ことを考慮すると、同定程度は 58.7%TRR となる。クロマトグラフ的に特徴付けしたか、あるいは非抽出性放射能残留量から取り出した放射活性成分の量を加えると、同定程度並びに特徴付けの程度は >90%TRR となる。

4. 保存安定性

20 ヶ月の試験期間中の保存安定性について試験した結果、保存した抽出物及び保存試料の抽出物いずれにおいても、保存開始時の試料の抽出物について得られた代謝パターンと明らかな差は認められなかった。

以上被験物質の小麦における代謝について試験した結果、代謝機構は小麦の部位により異なっており、青刈り及び麦わらでは同様な代謝パターンを示し、未変化の親化合物及びその

「代謝物 M07」のみが明らかな残留成分であった。別に、親化合物及び「代謝物 M07」の水酸化物が少量検出され、それらの幾らかはメチル化されあるいは glucose と結合していた。子実でも、未変化の親化合物と「代謝物 M07」が検出されたが、量的にははるかに少量であった。子実中における主要な代謝過程は、分子の開裂により「代謝物 M04」が生成し、次いで「代謝物 M24」となることである。その後大部分が更に代謝され天然のアミノ酸

となる。「代謝物 M04」とは対照的に、フリーのアミノ酸として子実中に蓄積 (>20%TRR) され、また貯蔵蛋白の 1 成分となる。被験物質の小麦中における想定代謝経路を「図 2」にまとめた。従って、天然物以外では、未変化の親化合物 (8~58%TRR) が最も主要な残留成分で、次いで「代謝物 M07」であった (3~15%TRR)。抽出物について同定された他の全ての代謝物は、明らかに <10%TRR で、大部分は <5%TRR であった。

表 5-1. 同定効率 (数値は mg/kg でカッコ内は %TRR)

		「T-環」処理区			「C-環」処理区			
		青刈り試料	麦わら試料	子実試料	青刈り試料	麦わら試料	子実試料	
抽出可能成分	同定成分	未変化親化合物 (BAS 500 F)	3.598 (52.9)	23.616 (58.3)	0.035 (8.1)	3.724 (57.0)	21.603 (57.2)	0.036 (36.1)
		代謝物 M04				0.111 (1.7)	1.397 (3.7)	0.001 (1.4)
		代謝物 M07	0.892 (13.1)	6.480 (16.0)	0.015 (3.5)	0.782 (12.0)	5.333 (14.1)	0.010 (10.5)
		代謝物 M24			0.030 (6.7)			
		代謝物 M34	0.083 (1.2)	0.289 (0.7)			0.462 (1.3)	
		代謝物 M54	0.260 (3.8)	0.617 (1.6)		0.136 (2.1)	0.491 (1.2)	
		代謝物 M68, 70, 71	0.170 (2.5)	1.619 (4.0)		0.163 (2.5)	1.511 (4.0)	0.001 (1.4)
		代謝物 M72			0.101 (23.0)			
		代謝物 M76	0.054 (0.8)	0.607 (1.5)		0.052 (0.8)	0.567 (1.5)	0.001 (1.4)
	同定成分合計	5.057 (74.3)	33.228 (82.1)	0.181 (41.2)	4.968 (76.1)	31.363 (83.0)	0.050 (50.9)	
特徴づけ成分	マイナー成分 p2		0.099 (0.2)	0.001 (0.3)		0.112 (0.3)	0.002 (2.4)	
	マイナー成分 p3			0.003 (0.7)				
	マイナー成分 p5	0.120 (1.8)						
	マイナー成分 p6	0.125 (1.8)		0.018 (4.0)				
	マイナー成分 p7			0.018 (4.0)				
	マイナー成分 p9	0.081 (1.2)	0.289 (0.7)		0.233 (3.6)	0.335 (0.9)	0.003 (2.6)	
	マイナー成分 p13	0.053 (0.8)	0.467 (1.2)	0.005 (1.1)	0.078 (1.2)			
	水抽出 (注: <内>内は検出された成分又はピーク数)	0.281 (4.1)	0.612 (1.5)		0.274 (4.2)		0.015 (15.2)	
		<*>	<8>		<*>		<10 以上>	
抽出可能成分	特徴づけ抽出成分合計	0.660 (9.7)	1.467 (3.6)	0.045 (10.1)	0.585 (9.0)	0.447 (1.2)	0.020 (20.2)	
	同定・特徴づけ抽出成分合計	5.717 (84.0)	34.695 (85.7)	0.226 (51.3)	5.553 (85.1)	31.810 (84.2)	0.070 (71.1)	
	非抽出成分 (RRR)	1.076 (15.8)	5.769 (14.3)	0.216 (48.8)	0.970 (14.9)	5.822 (15.4)	0.028 (29.0)	
総計 (TRR)		6.793 (99.8)	40.464 (100.0)	0.442 (100.1)	6.523 (100.0)	37.632 (99.6)	0.098 (100.1)	

* マイナー成分 p9, p13, 未変化親化合物, 代謝物 M07, M34

表 5-2. 同定効率；非抽出成分の検討 (数値は mg/kg でカッコ内は%TRR)

	「T-環」処理区		「C-環」処理区	
	青刈り試料	麦わら試料	青刈り試料	麦わら試料
非抽出成分	抽出成分 (注：<内は検出されたピーク数)	0.159 (2.6) <8>	0.113 (25.5) 抽出及び非抽出成分についての検討結果を「表 5-3」に示した	0.173 (3.0) <10>
	粗メロース	1.261 (2.8) <5>		1.582 (3.4) <5>
	粗リグニン	1.157 (2.6)		0.470 (1.0)
	澱粉	3.514 (7.9)		0.252 (4.4)
	上澄み液			
小 計	HCl で沈殿しない7M可溶性成分	0.373 (6.0)	2.372 (5.4)	0.306 (5.3)
		1.067 (17.2) 96%RRR	8.304 (18.7) 94~95%RRR	0.834 (14.5) 94%RRR
				3.137 (6.7)
				8.386 (17.9) 99%RRR
				0.009 (10.5) 0.004 (5.2)
				0.022 (27.0) 80~81%RRR

表 5-3. 「T-環」処理区の子実試料の非抽出性放射性成分 (RRR) の特徴づけ

	「T-環」処理 子実試料	
	mg/kg	(%TRR)
抽出成分	0.113 (25.5)	
代謝物 M72 ()	0.014 (3.1)	
代謝物 M24	0.017 (3.7)	
リグニン成分 p13	0.013 (3.0)	
リグニン成分 p2	0.005 (1.1)	
リグニン成分 p3	0.009 (2.0)	
リグニン成分 p6	0.015 (3.3)	
リグニン成分 p7	0.010 (2.4)	
リグニン成分 p8	0.031 (6.9)	
上澄み液 (= 代謝物 M72 ;) ^{*1}	0.047 (10.7)	
澱粉 ^{*2}	0.022 (5.0)	
DMSO/水抽出後の上澄み液 ^{*3}	0.012 (2.7)	
DMSO/水非抽出成分の熱湯抽出	0.015 (3.4)	
熱湯非抽出成分の NaOH 抽出	0.043 (9.8)	
粗 cellulose (NaOH 非抽出成分)	0.022 (5.0)	
合 計	0.227 (51.4)	

注：表 5-1, -2, -3 の結果は同一試料について、異なる分析方法で操作して得られたものである。

*1.
*2.
*3.

図 2. ピラクロストロビンの小麦における想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

同定に使用した対照化合物：

2-4. ピラクロストロビンのハクサイにおける代謝試験

(代謝・分解 6)

試験機関：財団法人 残留農薬研究所

[GLP 対応]

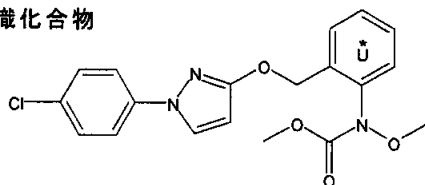
報告年：2000年

供試化合物：

1. ^{14}C -標識 BAS500F；

Methyl-N-[[[1-(4-chlorophenyl)pyrazol-3-yl]oxy]-o-tolyl]-N-methoxycarbamate

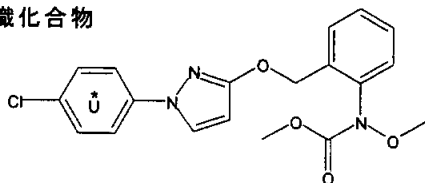
「T-環」標識化合物



放射化学的純度：

比放射能：

「C-環」標識化合物



放射化学的純度：

比放射能：

標識位置設定理由；

2. 代謝物同定用対照化合物；本試験に使用した対照化合物を末尾に記載した。

申請者注：本抄録中において

「T-環」標識化合物で処理した試料を「T-環」処理試料、

「C-環」標識化合物を処理した試料を「C-環」処理試料として表記した。

試験方法：

試料の調製；

本試験における供試作物、栽培方法、処理方法、散布方法並びに試料採取は次頁の表のとおりである。

供試作物	ハクサイ(品種:新京都3号)、各標識化合物当り3個体で計6個体。
栽培方法	ファイトロン [®] 内でポット育苗し、本葉が約5枚となった健全株を1個体/ポットに移植。以後、試験期間中ファイトロン [®] 内で栽培。光源は自然太陽光。
散布方法	上述の各標識化合物に白試料を添加後、水を加えて散布液を調製し、この散布液をハクサイ個体全体に散布した。
散布濃度及び時期	予定最大散布量(x3000, 200L/10a)に相当する13gA.l./10aを収穫前17,10及び3日の計3回散布。
最終散布から試料採取までの日数	最終処理3日後に結球部(可食部)と外葉部を切り取って収穫後、適度な大きさに切断し、直ちに $\leq -20^{\circ}\text{C}$ に冷凍保存。

*ファイトロンの設定条件

栽培日	昼間温度	夜間温度	相対湿度
'99.10.12~10.31	20.6	14.6	67
'99.11.1~11.30	15.6	9.6	61
'99.12.1~12.24	10.9	7.0	55

放射性成分の抽出及び同定；

凍結状態のまま各試料を適量のドライアイスと共に粉碎して均一化し、各試料を燃焼して LSC で総放射能残留量 (TRR) を測定した。抽出可能放射能残留量 (ERR) は、均一化した試料をメタノールで 2 回抽出して LSC で測定した。非抽出性放射能残留量 (RRR) は、抽出後の残渣を 1 日以上風乾後、各試料を燃焼して LSC で測定した。

抽出液を濃縮後、水で溶解し、この水溶液を逆相 C18 ミニカラムを用いた SPE 分析を行い、水溶液中に溶出する高極性水溶性成分以外の放射性成分をカラムに保持させた。保持された成分をで順次溶出させ、低極性成分と極性成分に分画した。の各溶出液について LSC で放射能を測定した。

抽出液中の放射性成分の同定/特徴づけは 2 種類の HPLC 条件下での対照化合物とのコクロマトグラフィー並びに TLC コクロマトグラフィーにより行った。また、SPE 分画を HPLC/フローシンチレーションアナライザー法 (HPLC/FSA 法) で分離・定量した。

試験結果：

ハクサイの外葉部及び結球部における放射能残留量は「表 1」にみられるように、それぞれの標識化合物で処理した試料間で差はなく、「C-環」処理試料の外葉部で 61.3%TRR、同結球部で 38.7%TRR であった。「T-環」処理試料ではそれぞれ 62.6%TRR 及び 37.5%TRR であった。

表 1. 外葉部及び結球部の総放射能残留量 (TRR)

試料部位	「T-環」処理試料		「C-環」処理試料	
	TRR (mg eq/kg)	分布 (%)	TRR (mg eq/kg)	分布 (%)
外 葉 部	3.7219	62.55	2.7484	61.32
結 球 部	1.2013	37.45	1.1161	38.68
合 計	---	100.00	---	100.00

放射性成分の抽出効率は、下表にみられるように外葉部あるいは結球部に関わらず、また標識位置の違いによる差もなく、放射能の大部分が抽出可能で、非抽出性放射活性は $\leq 5\%$ TRR であった。

表 2. 抽出効率 (数値は mg eq/kg, カッコ内は %TRR)

	「T-環」処理試料		「C-環」処理試料	
	外葉部	結球部	外葉部	結球部
総放射能残留量 (TRR)	3.7219 (100)	1.2013 (100)	2.7484 (100)	1.1161 (100)
抽出放射能 (ERR)	4.0166 (109.40)	1.2911 (108.95)	2.9260 (106.46)	0.9889 (88.60)
非抽出放射能 (RRR)	0.1511 (4.22)	0.0414 (3.49)	0.0978 (3.56)	0.0284 (2.54)
合 計	4.1716 (113.63)	1.3324 (112.44)	3.0238 (110.02)	1.0172 (91.14)

SPE 分画後の水溶出液 (高極性水溶性成分)、溶出液 (低極性成分) 及び溶出液 (極性成分) における放射活性は「表 3」のとおりで、水溶出液中の放射能は標識位置あるいは試料部位に関わらず全て 0.5%TRR を超えるものではなかった。溶出液中に大部分の放射能が回収され、溶出液中の放射能はいずれの試料においても $<10\%$ TRR であった。このことは「T-環」あるいは「C-環」いずれの処理においても、高極性の代謝物が生成する比率が低いことを示している。

表 3. SPE 分画後の各溶出液中の放射能 (数値は mg eq/kg, カッコ内は %TRR)

	「T-環」処理試料		「C-環」処理試料	
	外葉部	結球部	外葉部	結球部
総放射能残留量 (TRR)	3.7219 (100)	1.2013 (100)	2.7484 (100)	1.1161 (100)
抽出放射能 (ERR)	4.0166 (109.40)	1.2911 (108.95)	2.9260 (106.46)	0.9889 (88.60)
水溶出液	0.0116 (0.32)	0.0058 (0.49)	0.0046 (0.17)	0.0030 (0.27)
溶出液	3.7343 (101.71)	1.1831 (99.84)	2.6982 (98.17)	0.9097 (81.51)
溶出液	0.3128 (8.52)	0.0785 (6.63)	0.2421 (8.81)	0.0672 (6.02)
合 計	4.0587 (110.55)	1.2674 (106.95)	2.9448 (107.15)	0.9798 (87.79)

SPE 分画からの溶出液を合わせ HPLC/FSA 法で分析し、得られた HPLC ラジオクロマトグラムを 22 画分に分画して、それぞれの画分についての定量結果を「表 4」にまとめた。

「表 4」にみられるように、外葉部及び結球部に検出された放射活性の大部分は未変化の親化合物で、外葉部で 82.5～82.9%TRR、結球部で 74.2～85.1%TRR であった。主代謝物としては M07 が検出され、「C-環」処理試料の外葉部で 8.5%TRR、同結球部で 5.6%TRR であった。「T-環」処理試料ではそれぞれ 11.9%TRR 及び 10.6%TRR であった。

主代謝物 M07 以外にも数種類の微量代謝物が検出されたが、いずれも HPLC 及び TLC コクロマトグラフィーにおいて対照化合物とは一致しなかった。未知代謝物の内の 2 種類 C1 及び C2 は「C-環」標識化合物に固有な成分で、その他は「C-環」及び「T-環」標識化合物に共通な代謝物と考えられた。しかしながら、これらの未知代謝物の中で最も放射能が高かった未知代謝物 CT1 においても最大 3.7%TRR（「T-環」処理試料の外葉部）にすぎなかった。

以上、BAS 500 F のハクサイにおける代謝試験の結果は次のようにまとめられる。

- ・ BAS 500 F の主代謝経路は代謝物 M07 であり、この代謝速度は比較的遅い。
- ・ 他に、「C-環」と「T-環」の間での開裂反応及び代謝物 M07 より高極性の未知非開裂代謝物にも変換される。但し、開裂反応を伴う代謝の速度、及び代謝物 M07 以外の非開裂代謝物の生成速度は極めて遅い。
- ・ 高極性の水溶性代謝物及び BOUND 残留物の生成はほとんど認められなかった。
- ・ また、ハクサイにおける知見は他の作物で得られた結果と同様と判断された。

本試験の結果に基づく想定代謝経路を「図 1」に示した。

表 4. 各画分中の放射能(数値はmg eq/kg、カッコ内は%TRR)

画分	総放射能残留量 (TRR)	「T-環」処理試料		「C-環」処理試料		備考
		外葉部	結球部	外葉部	結球部	
		3.7219 (100)	1.2013 (100)	2.7484 (100)	1.1161 (100)	
1	0.0~2.0	<0.0044 (<0.12)	<0.0018 (<0.16)	0.0045 (0.17)	<0.0018 (<0.16)	
2	2.0~4.0	<0.0044 (<0.12)	<0.0018 (<0.16)	<0.0039 (<0.14)	<0.0018 (<0.16)	
3	4.0~6.0	0.0076 (0.21)	<0.0018 (<0.16)	<0.0039 (<0.14)	<0.0018 (<0.16)	代謝物M72の溶出域*
4	6.0~8.0	0.0051 (0.14)	<0.0018 (<0.16)	0.0049 (0.18)	<0.0018 (<0.16)	
5	8.0~10.0	0.0383 (1.04)	0.0153 (1.29)	0.0128 (0.47)	0.0026 (0.23)	
6	10.0~11.1	0.0535 (1.46)	0.0095 (0.80)	0.0540 (1.96)	0.0078 (0.70)	マイナー未知代謝物 C1*2
7	11.1~12.1	0.0301 (0.82)	0.0029 (0.25)	0.0574 (2.09)	0.0119 (1.07)	マイナー未知代謝物 C2*2
8	12.1~13.1	0.0384 (1.05)	0.0049 (0.41)	0.0126 (0.46)	0.0029 (0.26)	
9	13.1~14.4	0.0434 (1.18)	0.0100 (0.85)	0.0440 (1.60)	0.0077 (0.69)	代謝物M04の溶出域*
10	14.4~15.5	0.1339 (3.65)	0.0203 (1.71)	0.0708 (2.58)	0.0173 (1.55)	マイナー未知代謝物 CT1*3
11	15.5~17.0	0.0234 (0.64)	0.0025 (0.21)	0.0119 (0.43)	0.0036 (0.32)	
12	17.0~19.0	0.0146 (0.40)	0.0046 (0.39)	0.0155 (0.56)	0.0023 (0.20)	
13	19.0~20.4	0.0136 (0.37)	0.0042 (0.35)	0.0051 (0.19)	<0.0012 (<0.11)	
14	20.4~21.4	0.0320 (0.87)	0.0134 (1.13)	0.0248 (0.90)	0.0071 (0.64)	
15	21.4~23.4	0.0201 (0.55)	0.0050 (0.43)	0.0181 (0.66)	0.0048 (0.43)	
16	23.4~24.4	0.0478 (1.30)	0.0094 (0.79)	0.0328 (1.19)	0.0096 (0.86)	
17	24.4~26.0	0.0302 (0.82)	0.0061 (0.51)	0.0138 (0.50)	<0.0015 (<0.13)	
18	26.0~27.1	0.4355 (11.86)	0.1254 (10.58)	0.2335 (8.49)	0.0624 (5.59)	代謝物M07の溶出域*
19	27.1~29.0	3.0279 (82.47)	1.0086 (85.11)	2.2789 (82.92)	0.8281 (74.20)	親化合物の溶出域*
20	29.0~31.0	0.0213 (0.58)	0.0074 (0.63)	0.0250 (0.91)	0.0034 (0.31)	
21	31.0~33.0	0.0195 (0.53)	0.0045 (0.38)	0.0136 (0.50)	<0.0018 (<0.16)	
22	33.0~35.0	0.0108 (0.29)	0.0037 (0.31)	<0.0039 (<0.14)	0.0020 (0.18)	
合計		4.0471 (110.23)	1.2616 (106.46)	2.9402 (106.98)	0.9769 (87.53)	

*1. HPLCによるRt測定値： 化合物 Rt測定値(分) *2. 「C-環」処理試料のみに検出(ラジオラクトグラム)

親化合物 27.0~27.4

代謝物 M07 26.3~26.7

代謝物 M04 13.1~13.2

代謝物 M72 5.2~5.3

*3. 「C-環」及び「T-環」処理いずれにも検出(ラジオラクトグラム)

図 1. ピラクロストロビンのハクサイにおける想定代謝経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は BASF アグロ株式会社にある。

同定に使用した対照化合物：