

3. 土壌中における運命

(資料 S-1)

(1) 好氣的土壌代謝試験(分解経路)

試験機関：ハンテインドン ライフ サイエンス
社(英国) [GLP 対応]

報告書作成年：1999 年

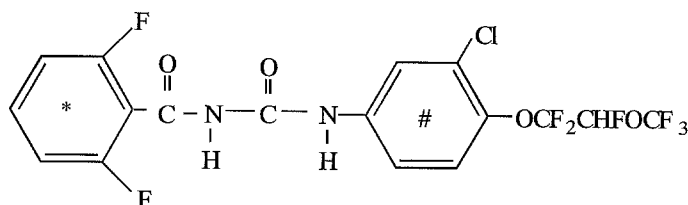
供試標識化合物：

供試化合物名； 1-[3-chloro-4-(1,1,2-trifluoro-2-trifluoromethoxyethoxy)
phenyl]-3-(2,6-difluorobenzoyl)urea

クロロフェニール-¹⁴C(U)標識ノバルロン(これ以降 A ラベルと記載する)

ジフルオロフェニール-¹⁴C(U)標識ノバルロン(これ以降 B ラベルと記載する)

化学構造および標識部位；



#：[Chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンの標識部位 (Aラベル；クロロフェニール環を¹⁴Cでユニフォーム標識)

*：[Difluorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンの標識部位 (Bラベル；ジフルオロフェニール環を¹⁴Cでユニフォーム標識)

| | クロロフェニール- ¹⁴ C(U)標識 (Aラベル) | ジフルオロフェニール- ¹⁴ C(U)標識 (Bラベル) |
|---------|--|--|
| 比放射活性 | | |
| 放射化学的純度 | | |

標識位置選定理由：

被験物質の同一性の確認：MS および MS/MS で確認

供試土壌：砂壤土 (Arrow)。

土壌は使用前に 2 mm 篩に通した。

表 1 に使用した土壌の特性およびバイオマス測定結果について示す。

表 1 土壌の特性およびバイオマス測定結果

| | | |
|-----------------------------|------|--|
| 土壌名 | | Arrow |
| 源 | | Henry Doubleday Centre, Derbyshire, UK |
| 土性分類 | SEEW | 砂壤土 |
| | USDA | 砂壤土 |
| 有機炭素 (%) | | 1.8 |
| 有機物 (%)* | | 3.1 |
| 陽イオン交換容量 (mEq/100g) | | 14.6 |
| pH (1 : 5) /水 | | 6.2 |
| pH /塩化カルシウム | | 5.5 |
| 最大容水量(%) | | 34.47 |
| 容水量 _{0.33bar} (%) | | 14.0 |
| バイオマス ($\mu\text{gC/g}$): | | |
| 被験物質処理日 (0 日) | | 466.7 |
| 実験終了 61 日前 (120 日) | | 146.4 |

* 有機物 (%) = 有機炭素 (%) \times 1.72

試験項目：

試験は実験室好気条件下暗所 $20 \pm 2^\circ\text{C}$ で実施した。

表 2 試験条件および試験項目

| 被験物質 | 施用濃度 (ppm) | 水分量 (% of 最大容水量) | 試験項目 |
|----------------|---------------|---------------------|---------------------------------|
| A ラベル B ラベル | 0.13 | 約 40 | TRR, 分布, 代謝, 代謝物の同定/特徴付け, 減衰 |
| A ラベル B ラベル | 5.0 | 約 40 | 代謝物の同定/特徴付け* |
| 非標識 | 0.13 | 約 40 | 微生物活性 |

* : 処理はなされたが未同定代謝物に 10% を超えるものはなく同定の必要がないことから試料の採取はなされなかった。

方法：

1) 試験装置

空気に加湿用水瓶, 試験土壌容器, ポリウレタン栓, 揮発性物質捕集用トラップを連結したガスフローシステムを使用。

2) 土壌の順化

乾土重 250 g の土壌を試験容器にはかり, 最大容水量の約 40% になるように水を添加後, 被

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

験物質処理前 7 日間約 20℃暗所でインキュベートして順化した。

3) 施用液の調製

0.13 ppm 試験区用施用液：

[¹⁴C]ノバルロンをアセトン (Bラベル) またはアセトニトリル (Aラベル) で溶解し、その一部を採取しアセトン溶液の場合は留去後アセトニトリルで再溶解する。水で希釈してアセトニトリル：水(15:85, v/v)混液の均一な施用液を調製した。

調製施用液の濃度：Aラベル；31.5 μg/5 mL

Bラベル；29.0 μg/5 mL

5.0 ppm 試験区用施用液：

[¹⁴C]ノバルロンをアセトン (Bラベル) またはアセトニトリル (Aラベル) で溶解し、アセトン溶液の場合は留去後アセトニトリルで再溶解する。各溶液の一部を非標識ノバルロンと共にアセトニトリルで溶解、希釈して施用液を調製した。

バイオマス測定用施用液：

非放射性ノバルロン(純度 99.3%)をアセトニトリルで溶解し、アセトニトリルおよび水で希釈してアセトニトリル：水(15:85, v/v)混液の添加用溶液(32.8 μg/5 mL)とした。

4) 処理の部位と方法

処理部位：土壤表面

添加後均一になるように土壤を混合した。

処理回数：1 回処理

処理濃度：0.13 ppm/乾土重, 5.0 ppm/乾土重。

処理方法：

0.13 ppm 区およびバイオマス測定区；施用液 5 mL を添加。

5.0 ppm 区；施用液 0.83 mL を添加。

処理濃度の設定根拠：0.13 ppm 区は圃場における慣行施用量 (約 100 g/ha) に相当する量とした。

5) 試験土壤のインキュベーションと管理

20℃の温度制御室暗所でインキュベートした。温度管理は温度測定器を用いて 60 分間隔で測定した。土壤試料は最大容水量の約 40%を保つ為、必要ならば水分補給した。空気を約 60 mL/min で流し一週間毎に確認して好気条件を維持した。

6) 採取時期

[¹⁴C]ノバルロン試験区：

土壤；処理直後, 処理後 1, 3, 7, 14, 30, 59, 90, 120 および 181 日後

(申請者註；90 は報告書本文には記載されていないが, 表には記載あり)

捕集剤；土壤の採取時点

バイオマス測定区：

土壤；処理時および処理後 120 日後

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

7) 分析方法

① 放射性総残留物 (TRR) の測定

土壌の抽出：

試料は採取後、直ちに分析開始。土壌試料は個々に分析し、下記溶媒および回数を用いて順次、15 分間超音波処理後 15 分間振とう抽出した。

アセトニトリル×2

[アセトニトリル：水 (1 : 1, v : v)] ×2

[アセトニトリル：200 mM 塩酸 (1 : 1, v : v), 約 18 時間リフラックス] ×3

各抽出後土壌と清澄液は遠心分離で分離した。清澄液を採取し、容量を測定後、LSC で放射能測定した。抽出完了後の土壌残渣を酸化燃焼し、放射能測定をした。

図 1 に分析法の概要を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図 1 分析法フローシート

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

②抽出物中の放射性成分の分析

図 1 で示された分析法により、得られた抽出物 (A, B, C) の混合液を調製した。初期試料では濃縮後直接 LSC 測定した。その他の試料は混合液をジエチルエーテルで抽出し、水層とジエチルエーテル層を分取、分取溶液の放射能を LSC で測定した。さらにジエチルエーテル層は濃縮後、LSC 測定した。

濃縮抽出物は HPLC 分析に供し、HPLC 溶出液を分画し、各画分を LSC で測定した。また試料は HPLC および TLC コクロマトグラフィーにより、成分の同定をした。

③微生物バイオマスの測定

くん蒸抽出法 (fumigation extraction) で測定した。

④放射能の測定

全液体試料は液体シンチレーション計測法 (LSC) で測定。固形物質は酸化燃焼処理後、LSC 測定した。

⑤TLC 分析

4 種の展開溶媒を用いて放射化学的純度の測定および試料のコクロマトグラフィーを実施した。

⑥質量分析

MS 分析 (負イオンモード) および MS/MS 分析 (プロダクトイオンモード) で代謝物の同定/特徴付けをした。

結果

1) 施用液

ノバルロンの処理濃度は 低施用濃度区では 0.13 mg ノバルロン/kg 乾土重であった。これは圃場施用濃度 100 g ai/ha に相当した。また高施用濃度区では 5 mg ノバルロン/kg 乾土重であった。放射化学的純度は %以上であった。

| 施用濃度 | 標識体 | μg/土壤容器 |
|--------------|--------------------------------------|------------|
| 低 (0.13 ppm) | [Chlorophenyl- ¹⁴ C(U)] | 31.7 |
| 低 (0.13 ppm) | [Difluorophenyl- ¹⁴ C(U)] | 31.1, 26.7 |
| 高 (5.0 ppm) | [Chlorophenyl- ¹⁴ C(U)] | 1250.0 |
| 高 (5.0 ppm) | [Difluorophenyl- ¹⁴ C(U)] | 1270.0 |

2) 試験土壌の微生物活性

結果を表 1 に示す。実験開始と 120 日時点で測定されたバイオマス値はそれぞれ 466.7 μgC/g および 146.4 μgC/g であり、120 日で減少した。また土壌有機炭素の 2.6% および 0.8% であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

3) 放射能回収率

結果を表 3-4 に示す。

施用放射能の総回収率は [chlorophenyl-¹⁴C(U)] ノバルロン および [difluorophenyl-¹⁴C(U)] ノバルロンの低施用濃度区でそれぞれ 96.6 - 103.4% および 93.9 - 98.5% であった。

抽出放射能は時間とともに減少し、7日までの試料からは両標識体とも 85%AR 以上が抽出されたが 181 日後では [chlorophenyl-¹⁴C(U)] ノバルロン および [difluorophenyl-¹⁴C(U)] ノバルロン 処理試料でそれぞれ 64.0%AR および 61.7% に減少した。

抽出放射能の減少に伴い、抽出不能放射能が増加した：1.1-2.2%(3 日) から 29.9-8.9%(181 日)。

揮発性放射能の生成は [chlorophenyl-¹⁴C(U)] ノバルロン 処理区では顕著でなく、4.3%AR (120 日) がピークであった。[Difluorophenyl-¹⁴C(U)] ノバルロン 処理区では 30 日で 15.3% の揮発性放射能を二酸化炭素として生成した。その後は二酸化炭素の発生は約 20% でほぼ一定となった。

表 3 [Chlorophenyl-¹⁴C(U)] ノバルロンの土壌からの回収率 (%AR)

| 処理後 経過日数 | 総抽出物 | 抽出残渣 | 揮発性物質 | | 計 |
|-------------|------|------|-------|-----------------|---|
| | | | 有機性* | CO ₂ | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

ns 試料なし。nd 検出せず (バックグラウンドの 2 倍)。

*有機性揮発性物質はポリウレタンフォームと ethyl digol の抽出物。

表 4 [Difluorophenyl-¹⁴C(U)] ノバルロンの土壌からの回収率 (%AR)

| 処理後採取時点 (日) | 総抽出物 | 抽出残渣 | 揮発性物質 | | 計 |
|----------------|------|------|-------|-----------------|---|
| | | | 有機性* | CO ₂ | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |
| | | | | | |

ns 試料なし。nd 検出せず (バックグラウンドの 2 倍)。

*有機性揮発性物質はポリウレタンフォームと ethyl digol の抽出物。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

4) 抽出不能放射能の特徴付け

結果を表 3, 4 および 5 に示す。

[Chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロン を処理した試料中の結合残留物は14日以降 %AR以上であったが, [difluorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロン処理試料では全ての採取時点で %未満であった。[chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンの一部残留物試料について分画した結果は土壤結合残留物の約 %がフミン画分, 約 %がフルボ酸画分その他残りはフミン酸画分であった。

表 5 土壤結合残留物の分画結果(%AR)

| 処理後採取時点 (日) | フミン | フルボ酸 | フミン酸 | 計 |
|----------------|--------------|------------|-------------|---------------|
| 59 | 18.8 (68) | 1.5 (5) | 7.4 (27) | 27.7 (100) |
| 120 | 16.2 (65) | 1.5 (6) | 7.1 (29) | 24.8 (100) |
| 181 | 19.5 (65) | 1.7 (6) | 8.8 (29) | 30.0 (100) |

()の値は土壤結合残留物量に対する各画分の %。

5) 土壤中の放射性成分の比率

土壤試料抽出液を HPLC により測定した土壤中の放射性成分の結果を表 6-8 および図 2 に示す。

表 6 土壤抽出物中の放射性成分

| 被験物質 | 放射性成分 |
|---|---|
| [Chlorophenyl- ¹⁴ C(U)] ノバルロン | ノバルロン 代謝物 C(275-352 I): 代謝物 D(275-309 I): UKhh/A1, UKii/A2, UKjj/A3, UKkk/A4, UKll/A5 6 放射性領域 |
| [Difluorophenyl- ¹⁴ C(U)] ノバルロン | ノバルロン 代謝物 A(275-158 I): UKmm/B1, UKnn/B2, UKoo/B3, UKpp/B4, UKqq/B5, UKrr/B6 |

[Chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロン:

Arrow 土壤中 [chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンは施用後 30 日までは速やかに分解し 25.4%AR となった。その後ノバルロンの分解速度は遅くなり明らかな 2 相性を呈した。数多くの代謝物が検出され, 7 代謝物および未解明放射能の 6 領域を HPLC より検出した。

[Chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンの主要代謝物は代謝物 C

(コード名 275-352 I)と同定され, この代謝物は 7 日後に最大の 18.1%AR となり, 120 日後では 4.9%AR となった。他の同

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

定代謝物は代謝物 D [

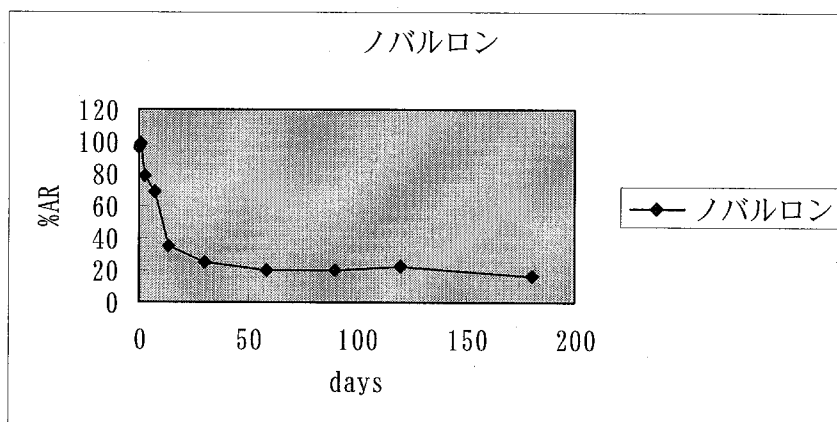
(275-309 I)]であり、14 日後から試験中約 5%認められた。

[Chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンは緩やかに二酸化炭素へと無機化され、それは 181 日後に 2.9%AR を示した。

表 7 [Chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロン処理土壌抽出物の HPLC による同定成分の結果(%AR)

| 同定放射性成分 | 代謝物 C (275-352 I) | 代謝物 D (275-309 I) | ノバルロン |
|---------|----------------------|----------------------|-------|
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |
| | | | |

図 2 [Chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロン処理土壌抽出物中のノバルロンの量



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

[Difluorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロン：

表 8 [Difluorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロン処理土壌抽出物の HPLC による同定成分の結果 (%AR)

| 同定放射性成分 | 代謝物 A 275-158 I | ノバルロン |
|---------|--------------------|-------|
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |
| | | |

Arrow 土壌中で [difluorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンの量は施用後 14 日までに 62.9%AR に減少した。この時点以降はノバルロンの分解はなかった。

[Difluorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンの主要代謝物は二酸化炭素であり、最大で 26.5%AR を示した。二酸化炭素の発生は約 59 日インキュベーション後からはプラトーになった(表 4)。

他の同定代謝物は代謝物 A ()であったがその量は僅かであり、さらに 6 未同定代謝物が 3.6%AR 以下で検出された。

[Difluorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンの代謝物は [chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロン処理土壌の抽出物試料中には検出されず、ノバルロンの代謝物が 2 つの芳香環を含まないことを示唆した。

6) 土壌におけるノバルロンの減衰速度および主要代謝物

[Chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンのデータを用いて Arrow 土壌中でのノバルロンおよび代謝物 C (275-352 I)の分解速度を 2 段階指数減衰曲線により求めた。結果を表 9 に示す。

土壌中のノバルロンの DT₅₀ および DT₉₀ 値はそれぞれ 9.9 日および試験期間(181 日)以上であった。

土壌中の代謝物 C (275-352 I)の DT₅₀ および DT₉₀ 値はそれぞれ 23.7 日および試験期間(181 日)以上であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表9 ノバルロンおよび 275-352 I の DT_{50} および DT_{90} 値

| 成分 | DT_{50} | DT_{90} |
|-----------------------------------|-----------|-----------|
| [Chlorophenyl- ^{14}C (U)]ノバルロン | 9.9 | 703.1 |
| 代謝物 C (275-352 I) | 23.7 | 382.3 |

7) 土壌における想定分解経路

好氣的 Arrow 土壌におけるノバルロンの想定分解経路を図 3 に示す。分子のウレアブリッジの開裂がノバルロンの分解を起こし、2 個の芳香環を含む代謝物は検出されなかった。

[Chlorophenyl- ^{14}C (U)]ノバルロンの生成物は代謝物 C

(コード名 275-352 I) および代謝物 D [

(コード名 275-309 I)] であった。

最終的には両者ともさらに二酸化炭素へと代謝された。[difluorophenyl- ^{14}C (U)]ノバルロン標識試料からは代謝物 A [

(275-158 I)] のみが同定された。Difluorophenyl

環はその後速やかに二酸化炭素へと無機化される。

図 3 想定分解経路

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

結論

[Chlorophenyl-¹⁴C (U)] ノバルロンおよび [difluorophenyl-¹⁴C (U)] ノバルロンの分解を設定濃度 0.13 ppm (約 100 g ai/ha 使用量に相当) で最大容水量の 40% 水分量の Arrow 土壌に処理し、暗所好氣的条件下で 181 日間インキュベートして試験した。

ノバルロンは速やかに分解し、DT₅₀ 値は 9.9 日であった。1 代謝物、代謝物 A [(コード名 275-352 I)] が 10%AR 以上存在し、かつ 23.7 日の DT₅₀ で分解することが認められた。この実験からのデータはノバルロンがウレアブリッジで開裂が生じ次いで chlorophenyl および difluorophenyl 環の無機化が生ずる。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

(資料 S-2)

(2) 好氣的土壌における代謝試験

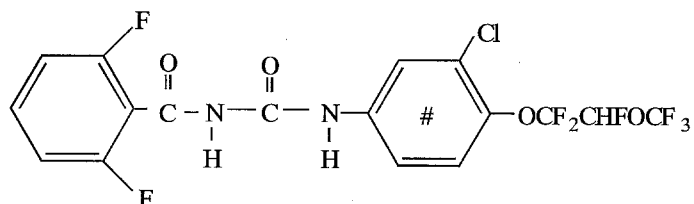
試験機関：ハンティンドン ライフ サイエンス
社(英国) [GLP 対応]
報告書作成年：1999 年

供試標識化合物：

供試化合物名；

クロロフェニール-¹⁴C(U) 標識ノバルロン(これ以降Aラベルと記載する)

化学構造および標識部位；



#：[Chlorophenyl-¹⁴C(U)]ノバルロンの標識部位 (Aラベル；クロロフェニール環を¹⁴Cでユニフォーム標識)

| | |
|---------|---|
| | クロロフェニール- ¹⁴ C(U) 標識 (Aラベル) |
| 比放射活性 | |
| 放射化学的純度 | |

標識位置選定理由：

被験物質の同一性の確認：MS および MS/MS で確認

供試土壌：3種類の土性の異なる土壌を用いた。表1に使用した土壌と試験条件について示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表1 土壌の特徴およびバイオマス測定結果

| 土壌名 | Evesham 3 | | Wick | Malham |
|---|----------------|----------------|-------------------------------|----------------|
| 起源 | Alconbury, UK | | Warwickshire, UK | Buxton, UK |
| 土性分類 | 粘土 | | 砂壤土 | シルト質埴壤土 |
| 有機炭素 (%) | 1.7 | | 0.8 | 3.7 |
| 陽イオン交換容量 (mEq/100g) | 18.1 | | 8.0 | 27.1 |
| PH (1 : 5) /水 | 8.8 | | 5.8 | 7.0 |
| 最大容水量 (%) | 56.2 | | 50.4 | 86.0 |
| 容水量 _{0.33bar} (%) | 24.5 | | 12.7 | 33.6 |
| 好気条件下温度条件 | 20℃暗所 | 10℃暗所 | 20℃暗所 | 20℃暗所 |
| バイオマス (μgC/g) : 被験物質処理日 (0 日) 実験終了日 (120 日) | 316.2 364.5 | 249.3 557.7 | 153.8 180.9 | 270.7 475.3 |
| 採取年月日 (申請者註) | 1998年2月19日 | | 1998年2月19日 (屋外設置のコンテナより採取) | 1998年2月13日 |

土壌は使用前に 2 mm 篩に通し、約 4℃で保存した。

試験項目：

試験は実験室好気条件下暗所で実施した。各試験区の温度条件および試験項目について表 2 に示す。

表 2 試験条件および試験項目

| 土壌 | 温度条件 (℃) | 水分量 (% of 最大容水量) | 試験項目 |
|-----------|----------|------------------|--------------------------------|
| Evesham 3 | 20 | 40 | TRR, 分布, 代謝, 代謝物の生成, 減衰, 微生物活性 |
| Evesham 3 | 10 | 40 | TRR, 分布, 代謝, 代謝物の生成, 減衰, 微生物活性 |
| Wick | 20 | 40 | TRR, 分布, 代謝, 代謝物の生成, 減衰, 微生物活性 |
| Malham | 20 | 40 | TRR, 分布, 代謝, 代謝物の生成, 減衰, 微生物活性 |

方法：

1) 土壌の馴化

乾土重 250 g の土壌を試験容器にはかり、最大容水量の 36 - 39%に成るように水を添加後、各試験温度で 7 日間インキュベートして馴化した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

2) 施用液の調製

[^{14}C]ノバルロンを水で希釈してアセトニトリル：水(15:85, v/v)混液の均一な施用液を調製した。

別にバイオマス測定用に非放射性ノバルロン(純度99.3%)をアセトニトリル:水(15:85, v/v)に溶解して添加用溶液とした。

3) 処理の部位と方法

処理部位：土壌表面

添加後均一になるように土壌を混合した。

処理回数：1回処理

処理方法：施用液5 mLを添加。添加時の有機溶媒量は乾土重の0.3%であった。この添加水分量で土壌中の水分量は最大容水量の40%となった。

処理量：0.13 ppm/乾土重

処理量の設定根拠：圃場における慣行施用量(約100 g ai/ha)に相当する量とした。

4) 試験土壌のインキュベーションと管理

20℃の温度制御室でまたは10℃の恒温槽内暗所でインキュベートした。温度管理は温度測定器または温度計を用いて測定した。土壌試料は一週間毎に最大容水量の約40%を保つ為、水分の補給をした。この操作時には、試験容器を空気で充満し、好気条件を維持した。

5) 採取時期

[^{14}C]ノバルロン試験区：

2試料の土壌を処理直後、処理後1, 3, 7, 14, 30, 59, 90および120日インキュベーション後に採取した。

バイオマス測定区：

2試料の土壌をAラベル処理時および非放射性ノバルロンの添加後120日インキュベーション後に採取した。

6) 分析方法

①放射性総残留物(TRR)の測定

土壌の抽出：

分析用2試料のうち1試料は採取後、直ちに分析開始。他の試料は予備試料として凍結保存。土壌試料は個々に分析し、下記溶媒および回数を用いて順次、15分間超音波処理後30分間振とう抽出した。

アセトニトリル×2

[アセトニトリル：水(1:1, v:v)]×2

[アセトニトリル：200 mM 塩酸(1:1, v:v), 分離前、約18時間リフラックス]×4

各抽出後土壌と上澄液は遠心分離で分離した。上澄液を採取し、容量を測定後、LSCで放射能測定した。得られた抽出液中の放射能が施用放射能の5%以下の時は次の抽出操作を中止した。抽出完了後の土壌残渣を酸化燃焼し、放射能測定をした。

別に120日時点での採取試料では土壌残渣の一部をエタノールアミンで加熱リフラックス後、得られたスラリーを酸化燃焼し、放射能測定をした。

図1に分析法の概要を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図 1 分析法フローシート

②抽出物中の放射性成分の分析

図 1 で示された分析法により、得られた抽出物(A, B, C)の混合液を調製した。初期試料では濃縮後直接 LSC 測定した。その他の試料は混合液をジエチルエーテルで抽出し、水相とジエチルエーテル相を分取、分取溶液の放射能を LSC で測定した。さらにエーテル相は濃縮後、LSC 測定した。

濃縮抽出物は HPLC 分析に供し、HPLC 溶出液を分画し、各画分を LSC で測定した。また一部試料は TLC コクロマトグラフィーにより、成分の同定をした。

③微生物バイオマスの測定

くん蒸抽出法(fumigation extraction)で測定した。

④放射能の測定

全液体試料は液体シンチレーション計数法(LSC)で測定。固形物質およびスラリーは酸化燃焼処理後、LSC 測定した。

結果

結果を表 1 と表 3-9 および図 2-5 に示す。

1) 施用液

ノバルロンの処理濃度は 0.128 mg ノバルロン/kg 乾土重であった。これは圃場施用濃度 100 g ai/ha に相当する。放射化学的純度は %以上であった。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

2) 試験土壌の微生物活性

結果を表 1 に示す。試験土壌のバイオマスは 120 日のインキュベーション期間中、比較的一定であったので試験土壌の活性は残存していた。全ての試験土壌で、実験開始と終了時に測定されたバイオマスの平均値は測定した土壌有機炭素の 1%以上であった。

3) 放射能回収率

定量結果は処理放射能に対するパーセント(%AR または%処理放射能)として表示した。ノバルロン 標識体の好氣的土壌中の代謝では顕著な揮発性放射能の生成が無かったこと(すなわち施用放射能の 20%以上)が先に報告されていたので、揮発性放射能は捕集しなかった。

放射能回収率の結果を表 3 に示す。

総放射能回収率は、Evesham 3, 20℃では 87–99.9%, Wick, 20℃では 90.1–103.9%, Malham, 20℃では 92.7–102.9%, および Evesham 3, 10℃では 89.1–103.6%, であった。

各土壌からの放射能抽出率の代表的な結果を表 4 に示す。全ての土壌で同様な結果であった。抽出操作は好気土壌の代謝試験で使用した方法であり、最終採取時点の試料の抽出には計 8 回の抽出が不可欠であった。

土壌から抽出可能な放射能は時間とともに減少した。早期の採取試料(0–7日)では 90%AR 以上が土壌から抽出されたが 120 日の試料では、抽出不能放射能は 29.2–46.7% AR となった。

4) 土壌中の放射性成分の比率

土壌試料抽出液を HPLC により測定した土壌中の放射性成分の結果を表 5–9 および図 2–5 に示す。

すべての土壌でノバルロンの減衰は 2 相性を示した(図 2–5)。半減期 DT_{50} は合成指数曲線式を用いて計算した。

20℃での全ての土壌中のノバルロンの最初の分解は速く、その 50%消失時間 DT_{50} は 5–12 日であった。20℃での全ての土壌中のノバルロンの分解はその後減速して続き、59 日で 80% 以上の分解が認められた。しかしながらこの時点以降もさらにごく僅かに分解がみられ、90% 消失時間は 120 日より大きかった。

10℃でのノバルロン分解の 50%消失時間 DT_{50} は 20 日であり、20℃で認められた期間の約 2 倍であった。

[Chlorophenyl- ^{14}C (U)]ノバルロンの 1 つの主要代謝物が検出され 10%AR 以上であった。この代謝物は [代謝物 C (コード名 275-352 I)] と特徴づけた。この代謝物は速やかに生成し、20℃で 7 日間インキュベーション後に 20–27%AR のピークに達した。この代謝物の DT_{50} 値は 20℃のインキュベーションで 46–64 日であり、10℃のインキュベーションで 110 日であった。その他にマイナーな分解物が検出されたが、10%AR を超える分解物は検出されなかった。このうちの 1 個は参照物質との HPLC コクロマトグラフィーにより

[代謝物 D(コード名 275-309 I)] と特徴づけた。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 3 試験土壌(処理濃度 0.13 mg/kg)からの放射能の抽出および回収(%処理放射能)

| 試験温度 土壌 | 20℃ | | | | 10℃ | | | |
|---------------------|-------------|-------|------------|-------|-------------|-------|------------|-------|
| | 処理後 経過日数 | 総抽出物 | 抽出不能 残渣 | 計 | 処理後 経過日数 | 総抽出物 | 抽出不能 残渣 | 計 |
| 粘土 (Evesham 3) | 0 | 97.7 | 0.8 | 98.5 | 0 | 98.7 | 0.6 | 99.3 |
| | 1 | 98.5 | 0.9 | 99.4 | 1 | 100.9 | 1.4 | 102.3 |
| | 3 | 95.5 | 2.6 | 98.1 | 3 | 100.5 | 1.4 | 101.9 |
| | 7 | 95.0 | 4.9 | 99.9 | 7 | 99.3 | 1.9 | 101.2 |
| | 14 | 88.2 | 9.9 | 98.1 | 14 | 95.6 | 8.0 | 103.6 |
| | 30 | 70.3 | 17.8 | 88.1 | 30 | 88.7 | 8.7 | 97.4 |
| | 59 | 60.4 | 26.6 | 87.0 | 59 | 75.3 | 18.0 | 93.3 |
| | 90 | 56.7 | 33.7 | 90.4 | 90 | 70.2 | 18.9 | 89.1 |
| | 120 | 53.0 | 35.3 | 88.3 | 120 | 64.9 | 29.2 | 94.1 |
| 砂壤土 (Wick) | 0 | 96.9 | 1.0 | 97.9 | | | | |
| | 1 | 103.2 | 0.7 | 103.9 | | | | |
| | 3 | 99.2 | 1.7 | 100.9 | | | | |
| | 7 | 96.4 | 5.9 | 102.3 | | | | |
| | 14 | 91.2 | 4.8 | 96.0 | | | | |
| | 30 | 80.1 | 12.8 | 92.9 | | | | |
| | 59 | 70.4 | 19.7 | 90.1 | | | | |
| | 90 | 72.0 | 24.3 | 96.3 | | | | |
| | 120 | 65.5 | 32.3 | 97.8 | | | | |
| シルト質埴壤土 (Malham) | 0 | 96.9 | 2.2 | 99.1 | | | | |
| | 1 | 101.6 | 1.3 | 102.9 | | | | |
| | 3 | 96.9 | 4.3 | 101.2 | | | | |
| | 7 | 90.4 | 8.8 | 99.2 | | | | |
| | 14 | 74.9 | 26.9 | 101.8 | | | | |
| | 30 | 61.0 | 36.3 | 97.3 | | | | |
| | 59 | 50.2 | 45.6 | 95.8 | | | | |
| | 90 | 51.5 | 45.1 | 96.6 | | | | |
| | 120 | 46.0 | 46.7 | 92.7 | | | | |

表 4 代表的な試験土壌(処理濃度 0.13mg/kg)からの放射能の抽出 (%処理放射能)

| 土壌 (温度条件) | 処理後 経過日数 | 抽出回数 | | | | | | | | 総 抽出物 |
|-----------------------|-------------|------|------|-----|-----|------|-----|-----|-----|----------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | |
| 粘土 (Evesham) (20℃) | 0 | 72.3 | 21.4 | 4.0 | na | na | na | na | na | 97.7 |
| | 1 | 82.6 | 13.1 | 2.8 | na | na | na | na | na | 98.5 |
| | 3 | 75.1 | 16.0 | 4.4 | na | na | na | na | na | 95.5 |
| | 7 | 75.5 | 13.0 | 4.3 | 2.2 | na | na | na | na | 95.0 |
| | 14 | 61.8 | 10.4 | 5.1 | 4.0 | 5.1 | 1.8 | na | na | 88.2 |
| | 30 | 33.8 | 6.0 | 5.7 | 2.3 | 13.3 | 5.8 | 3.4 | na | 70.3 |
| | 59 | 23.5 | 4.1 | 6.4 | 2.2 | 13.1 | 6.9 | 4.2 | na | 60.4 |
| | 90 | 20.2 | 3.7 | 5.9 | 2.6 | 13.1 | 6.9 | 4.3 | na | 56.7 |
| | 120 | 17.4 | 3.6 | 5.1 | 2.1 | 11.8 | 5.7 | 4.4 | 2.9 | 53.0 |

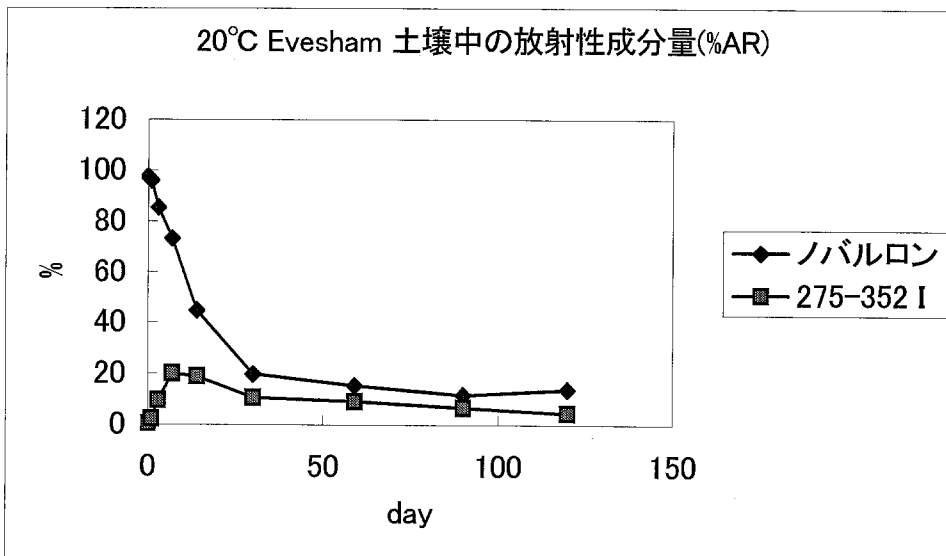
na : 抽出せず

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 5 A ラベル処理後(処理濃度 ; 0.13 mg/kg) の 20℃ Evesham 3 土壌中の放射性成分量 (%AR)

| | HPLC 保持時間 (分) | 採取 時点 (日) | | | | | | | | |
|--|---------------------|-----------|---|---|---|----|----|----|----|-----|
| | | 0 | 1 | 3 | 7 | 14 | 30 | 59 | 90 | 120 |
| | | | | | | | | | | |

図 2 A ラベル処理後(処理濃度 ; 0.13 mg/kg) の 20℃ Evesham 3 土壌中の放射性成分量 (%AR)

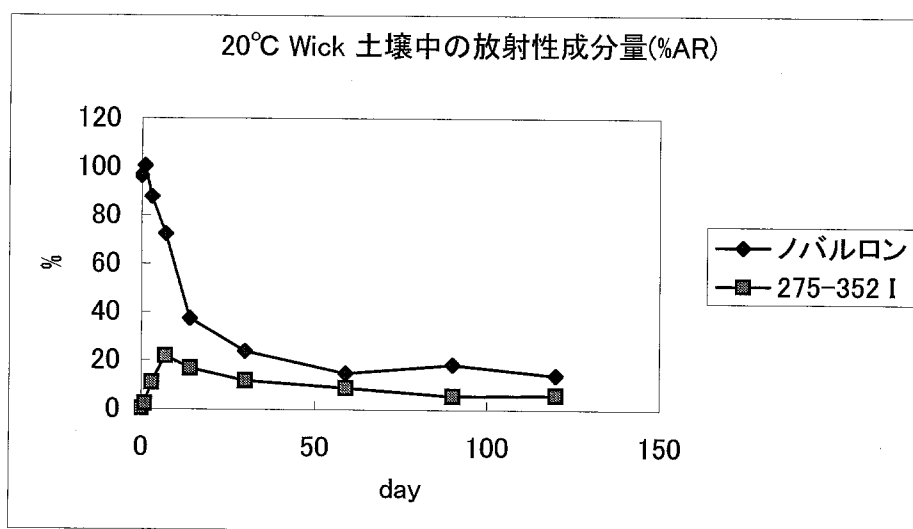


本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 6 A ラベル処理後(処理濃度 ; 0.13 mg/kg)の 20°C Wick 土壌中の放射性成分量(%AR)

| | HPLC 保持時間 (分) | 採取 時点 (日) | | | | | | | | |
|--|---------------------|-----------|---|---|---|----|----|----|----|-----|
| | | 0 | 1 | 3 | 7 | 14 | 30 | 59 | 90 | 120 |
| | | | | | | | | | | |

図 3 A ラベル処理後(処理濃度 ; 0.13 mg/kg)の 20°C Wick 土壌中の放射性成分量(%AR)

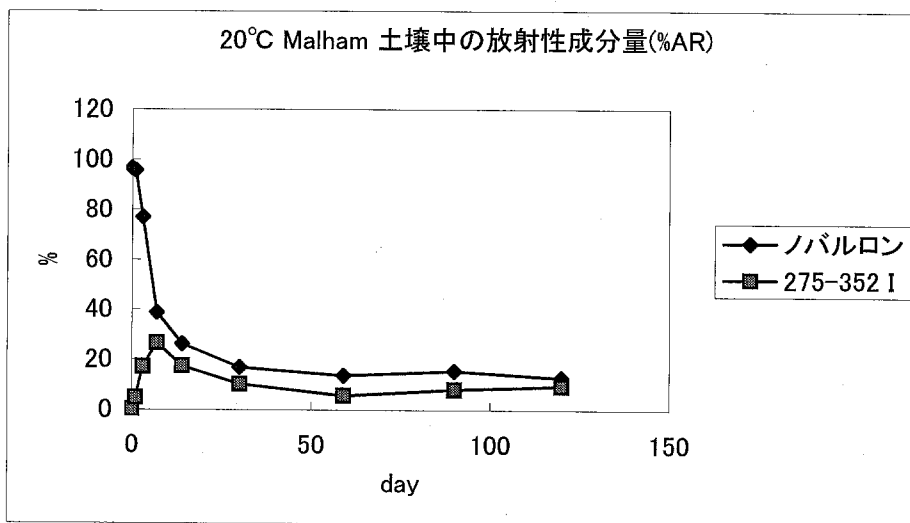


本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 7 A ラベル処理後(処理濃度 ; 0.13 mg/kg)の 20℃ Malham 土壌中の放射性成分量(%AR)

| | HPLC 保持時間 (分) | 採取 時点 (日) | | | | | | | | |
|--|---------------------|-----------|---|---|---|----|----|----|----|-----|
| | | 0 | 1 | 3 | 7 | 14 | 30 | 59 | 90 | 120 |
| | | | | | | | | | | |

図 4 A ラベル処理後(処理濃度 ; 0.13 mg/kg)の 20℃ Malham 土壌中の放射性成分量(%AR)



本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

表 8 Aラベル処理後(処理濃度; 0.13 mg/kg)の10°C Evesham 3 土壌中の放射性成分量(%AR)

| | HPLC 保持時間 (分) | 採取 時点 (日) | | | | | | | | |
|--|---------------------|-----------|---|---|---|----|----|----|----|-----|
| | | 0 | 1 | 3 | 7 | 14 | 30 | 59 | 90 | 120 |
| | | | | | | | | | | |

図 5 Aラベル処理後(処理濃度; 0.13 mg/kg)の10°C Evesham 3 土壌中の放射性成分量(%AR)

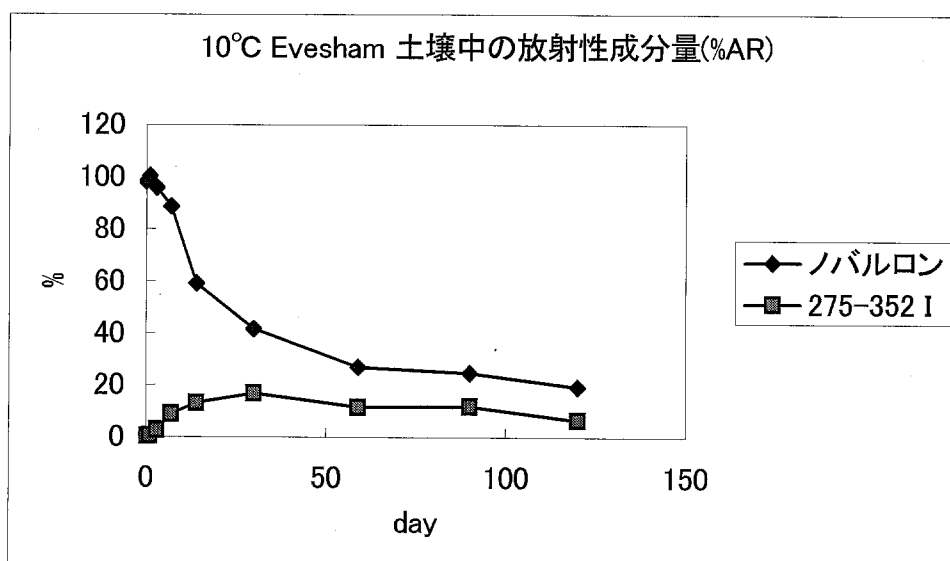


表 9 ノバルロン/P および代謝物 C (275-352 I) の分解における DT50 および DT90 値

ノバルロン

| 土壌 | 温度 (°C) | DT50 (日) | DT90 (日) |
|-----------|------------|-------------|-------------|
| Evesham 3 | 20 | 12 | >120 |
| Wick | 20 | 10 | >120 |
| Malham | 20 | 5 | >120 |
| Evesham 3 | 10 | 20 | >120 |

代謝物 C (275-352 I):

| 土壌 | 温度 (°C) | DT50 (日) | DT90 (日) |
|-----------|------------|-------------|-------------|
| Evesham 3 | 20 | 50 | >120 |
| Wick | 20 | 46 | >120 |
| Malham | 20 | 64 | >120 |
| Evesham 3 | 10 | 110 | >120 |

まとめ

[Chlorophenyl-14C(U)]ノバルロンを名目濃度 0.13 ppm(約 100 g ai/ha の使用量に相当)で最大容水量の 40%水分量の 3 種類の土壌に処理し、暗所好気条件下でインキュベート後ノバルロンの分解を試験した。さらに 10°C の 1 土壌で分解速度に対する温度の影響を試験した。

20°Cでの全ての土壌ではノバルロンは速やかに分解し、DT₅₀ 値は 5-12 日の範囲であった。その後分解はゆるやかとなり、59 日後ではノバルロンの 80%以上が分解した。10°C の 1 土壌では DT₅₀ 値は 20 日であった。

分解は全ての土壌で質的に同じであった。主要代謝物が 1 つ、処理放射能の 10%を超えて検出された。この代謝物は代謝物 C

(コード名 275-352I)であり、ノバルロンの difluorobenzoyl 部位の消失により生成された。この代謝物の DT₅₀ 値は 20°Cで 46-64 日の範囲であり、10°Cで 110 日であった。他に全ての試料で 10% AR を超える代謝物は検出されなかった。

図 6 にノバルロンの土壌中の想定代謝経路を示す。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

図 6 想定分解経路

(資料 PC-6)

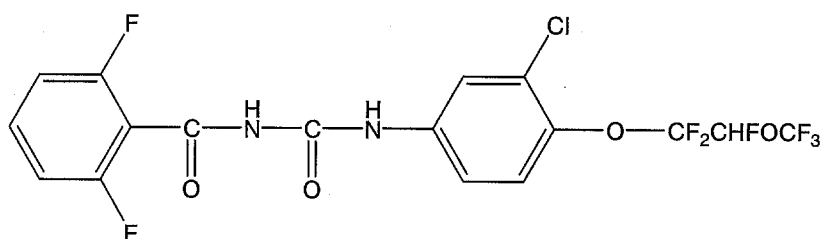
4. 土壌吸着試験

試験機関：日本エコテック株式会社

報告書作成年：2001年

ノバルロンの土壌吸着係数は、ノバルロンの水溶解度が小さく予備試験においてすべての土壌試験系水層から検出することができなかつたので、測定することができなかつた。

供試化合物： 化学構造：



化学名：1-[3-クロロ-4-(1,1,2-トリフルオロエチル)フェニル]-3-(2,6-ジフルオロフェニル)ウレア

純度： %

供試土壌：

| 採取場所 | 日植防 宮崎試験場 | 和歌山 和歌山農試 | 十勝 十勝農試 | 日植防 高知試験場 |
|-------------------------|----------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 土壌群名 | 砂丘未熟土 | 灰色低地土 | 淡色黒ボク土 (火山灰土壌) | 灰色低地土 |
| 土性 | 砂土 | 軽埴土 | 壤土 | 軽埴土 |
| 有機炭素含有率(%) | 0.96 | 2.17 | 2.45 | 1.24 |
| pH(H ₂ O) | 6.2 | 6.1 | 5.6 | 6.4 |
| 陽イオン交換容量 (me/ 100 g) | 6.4 | 14.3 | 12.0 | 9.8 |
| リン酸吸収係数 | 510 | 610 | 1470 | 500 |
| 粘度鉱物の種類 | アロフェン ハロサイト | カオリン鉱物 バ-ミクライト | アロフェン バ-ミクライト | クローイト イライト |

試験方法：

供試土壌の調製：

各土壌は、前処理として風乾されて2mmの篩を通してあったためそのまま試験に使用した。尚、試験開始前までは低温室(4℃)で保存した。

試験溶液の作成：

ノバルロン標準溶液は、ノバルロンをアセトニトリルに溶解することにより濃度を0.05 mg/lとした。また、試験に用いる0.01M塩化カルシウム溶液は蒸留水を用いて作成し調整後は冷蔵庫に保存した。

本資料に記載された情報に係る権利及び内容の責任は株式会社エス・ディー・エス バイオテックにある。

予備試験：

土壌(乾土相当)と水層の比が1：25となるように0.01M塩化カルシウム溶液を添加し、さらにノバルロン標準溶液1.5 µlをマイクロシリンジで添加した(水層中のノバルロンの初期濃度は0.003 mg/l相当)。

吸着試験操作は、25℃で約100 rpmの横振とうをあたえることにより行った。試験容器は遠沈管としアルミホイルで覆った。振とう4および16時間後に遠心分離機(3000 rpm、20分)で上澄液をえてこれを分析に供した。試験は2連で行った。同時に、土壌を入れない試験溶液のみの試料(コントロール)およびノバルロンを添加しない試料(ブランク)を供試した。

分析方法：

試験溶液を固相抽出カラムを用い抽出、アセトニトリルで溶出させ濃縮・乾固後、HPLC移動相で転溶してHPLC分析した。

結果：

予備試験

4種のすべての土壌試験系水層からノバルロンは検出されなかった。

| 試料 | 4時間振とう 分析値 mg/l (回収率%) | 16時間振とう 分析値 mg/l (回収率%) |
|-------------|---------------------------|----------------------------|
| コントローラー 1 | 0.002823 (94.2) | 0.003223 (107.5) |
| コントローラー 2 | 0.002716 (90.6) | 0.002784 (90.0) |
| 宮崎土壌(ブランク) | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 宮崎土壌 | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 宮崎土壌 | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 和歌山土壌(ブランク) | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 和歌山土壌 | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 和歌山土壌 | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 十勝土壌(ブランク) | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 十勝土壌 | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 十勝土壌 | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 高知土壌(ブランク) | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 高知土壌 | < 0.0005 | < 0.0005 |
| 高知土壌 | < 0.0005 | < 0.0005 |

定量限界：0.0005 mg/l

予備試験の結果より、水溶解度相当分を添加してもノバルロンが水層には検出されないため、ノバルロンの土壌吸着係数は測定不可能と判断した。