

フサライド (4, 5, 6, 7-テトラクロロフタリド) の堆肥中における代謝*

徳田 卓郎, 西木 満彦, 星 元
篠田 喜一, 石田 正臣, 見里 朝正**

呉羽化学工業株式会社錦研究所
**理化学研究所

(昭和 51 年 2 月 6 日受理)

Metabolic Fate of Fthalide (4, 5, 6, 7-tetrachlorophthalide) in Compost*

Takuro TOKUDA, Mitsuhiko NISHIKI, Hazime HOSHI
Kiichi SHINODA, Masaomi ISHIDA and Tomomasa MISATO**

*Nishiki Research Laboratories, Kureha Chemical Industry, Co., Ltd.,
Iwaki, Fukushima 974, Japan*

***The Institute of Physical and Chemical Research, Wako, Saitama 351, Japan*

Fthalide, an effective fungicide for rice-blast, was easily degraded to water soluble compounds in a laboratory prepared compost. The following eighteen transient metabolites were identified in benzene extract and ethyl acetate extract of the compost treated with ^{14}C -labeled fthalide at the lactone ring or the metabolites: 4, 5, 6-trichloro-, 4, 6, 7-trichloro-, 4, 6-dichloro-, 4, 7-dichloro-, 4-chloro-, 4, 5, 6-trichloro-7-methylthio- and 4, 6, 7-trichloro-5-methylthio-phthalide; tetrachloro-, 3, 4, 5-trichloro-, 3, 5, 6-trichloro-, 3, 5-dichloro-, 3, 6-dichloro-, 4, 5-dichloro-, 4-chloro-, 3, 5-dichloro-4-methylthio-, 4, 5-dichloro-3-methylthio- and 4-chloro-5-methylthio-phthalic acid; 3,4,5,6-tetrachloro-2-hydroxymethylbenzoate. Metabolic pathways of fthalide were proposed. None of chlorinated benzoic acids were detected in the metabolites in spite of detailed investigation. Acute oral toxicity of the main metabolites to mammals was very low and phytotoxicity of them on vegetables in pre-emergence test was not so strong.

緒 言

フサライド (4, 5, 6, 7-テトラクロロフタリド) は呉羽化学工業株式会で開発されたイネいもち病防除剤であり, ラブサイド®の名称で販売されている. 本剤の効果や残留性, 毒性などの安全性に関してはすでに堀¹⁾, 山口²⁾, 見里³⁾, 石田⁴⁾らにより解説されている.

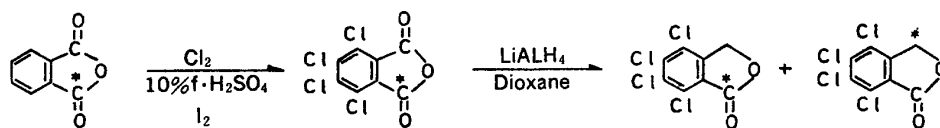
昭和 43 年に殺菌剤 PCBA 剤 (ペンタクロロベンジルアルコール) による残留薬害⁵⁾ が起こり, 薬害の本体は PCBA 剤が堆肥中および土壤中で代謝されて生成したポリクロロ安息香酸によるものであることがわかつ

た⁶⁾. 当時開発途上にあったフサライドも残留薬害について検討する必要を生じ, 全国の農業試験場においてフサライド散布イネわらを種々の方法で堆肥化し, その各種野菜に対する薬害試験が実施された⁷⁾. この試験と同時にフサライドの安全性を評価する基礎資料を得る目的で, 側鎖- ^{14}C -標識フサライドを用いて堆肥中での代謝過程および代謝産物の哺乳動物に対する毒性, 野菜に対する薬害について検討し, 若干の結果を得たので報告する.

実 験 材 料

1. 側鎖- ^{14}C -標識フサライドの合成
Juvalta⁸⁾ によるテトラクロロ無水フタル酸の合成,

* フサライドの生態系における代謝 (第 1 報)
Metabolic Fate of Fthalide in Ecosystem (Part 1)

Fig. 1 Synthetic route of ^{14}C -labeled-fthalide.

* Radioactive carbon.

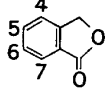
Perrini⁹⁾による 4,5,6,7-テトラクロロフタルイドの合成を ^{14}C -標識化合物の合成に適用した。すなわち、側鎖- ^{14}C -無水フタル酸 (比放射能 5 mCi/mmol) 153 mg を非放射性無水フタル酸 200 mg で希釈し、10% 発煙硫酸 3 ml に溶解し、ヨウ素 20 mg を加え、100°C から塩素ガスを通じ、順次温度を上げ、2時間で 210°C まで加熱塩素化した。冷却後、50% 硫酸を加え析出する結晶を濾別、十分水洗し、 ^{14}C -テトラクロロ無水フタル酸 658 mg を得た。融点 249°C, 収率 98%。

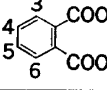
^{14}C -テトラクロロ無水フタル酸 586 mg を無水ジオキサン 10 ml に溶解し、水素化アルミニウムリチウム 70 mg を加え、100°C に加熱すると激しく発泡し、10分で反応は完結した。水を加え分解後、溶媒を除去し、0.5 N 水酸化ナトリウム液 15 ml を加え、濾過し、濾液に濃塩酸を加えた。析出する結晶を濾別し、水洗後、ジオキサンより 2回再結晶し、 ^{14}C -フサライド 303 mg を得た。融点 205~206°C, 収率 54%。放射性純度 98.0% (薄層クロマトグラフィ-ラジオスキャンおよび薄層クロマトグラフィ-ラジオオートグラフ) 比放射能 2.30 mCi/mmol。この ^{14}C -フサライドの一部を非放射性フサライドで希釈 (ジオキサンより 3回再結晶した) し、堆肥仕込用として用いた。放射性純度 99.9%。比放射能 172.1 $\mu\text{Ci}/\text{mmol}$ 。

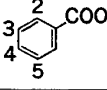
2. 標準物質の合成

フサライドの構造から代謝産物として塩素化フタルイド類および塩素化フタル酸類が生成することが予想さ

Table 1 Melting points, gaschromatography retention times and thin-layer chromatography *R_f* values of authentic samples.

	mp ¹⁰⁾ (°C)	GLC (<i>R_t</i>)*		TLC (<i>R_f</i>)	
		(A)	(B)	(C)	(E)
Fthalide	209-10	1.00	1.00	0.77	0.95
4,5,6-Trichloro	173- 4	0.49	0.41	0.76	
4,5,7-Trichloro	138- 9	0.55	0.52		
4,6,7-Trichloro	129-30	0.55	0.56	0.73	0.89
5,6,7-Trichloro	146- 7	0.90	1.16		
4,5-Dichloro	101- 2	0.30	0.18		
4,6-Dichloro	84- 6	0.33	0.20	0.77	
4,7-Dichloro	162- 3	0.36	0.33	0.64	
5,6-Dichloro	182- 3	0.42	0.41		
5,7-Dichloro	115- 7	0.44	0.52		
6,7-Dichloro	137- 8	0.60	0.70		
4-Chloro	87	0.17	0.15	0.61	
5-Chloro	154		0.21	0.45	
6-Chloro	112	0.24	0.23	0.48	
7-Chloro	149	0.33	0.33	0.41	

	mp (°C)	GLC (<i>R_t</i>)*		TLC (<i>R_f</i>)		
		(A)**	(B)**	(C)**	(D)	(E)
3,4,5,6-Tetrachloro	248- 9	1.00	0.48	0.63	0.72	0.43
3,4,5-Trichloro	193- 4 ¹¹⁾	0.72	0.33	0.51	0.68	0.38
3,4,6-Trichloro	147- 8 ¹²⁾	0.57	0.30	0.59	0.70	0.38
3,4-Dichloro	187- 9 ¹³⁾	0.46			0.68	0.33
3,5-Dichloro	160- 1 ¹⁴⁾	0.37	0.20	0.46	0.68	0.37
3,6-Dichloro	160 ¹³⁾	0.36	0.24	0.51	0.62	0.35
4,5-Dichloro	199 ¹³⁾	0.42	0.21	0.43	0.65	0.39
3-Chloro	183- 4 ¹⁵⁾	0.27	0.16	0.33	0.63	0.26
4-Chloro	149-50 ¹⁵⁾	0.26	0.14	0.35	0.64	0.36

	mp (°C)	GLC (<i>R_t</i>)*		TLC (<i>R_f</i>)		
		(A)**	(B)**	(C)**	(D)	(E)
2,3,4,5-Tetrachloro	190-2 ¹⁶⁾	0.46	0.18	0.99	0.84	0.63
2,3,5-Trichloro	163-4 ¹⁷⁾	0.22	0.11	0.81	0.83	0.63
2,4,5-Trichloro	161-3 ¹⁷⁾	0.22	0.11	0.90	0.83	0.63
3,4,5-Trichloro	208-9 ¹⁸⁾	0.21	0.10	0.90	0.85	0.57

* Gaschromatography retention times relative to fthalide: Retention times of fthalide were 4-5 minutes in condition (A) and 13-15 minutes in condition (B).

** Analyzed after methylation with diazomethane.

れたのでこれらのすべてを既知合成法に従って合成した。また塩素化安息香酸への脱炭酸も懸念されたので一部合成した。これらの標準物質はマススペクトル, NMR, IR 等でその構造を確認した。Table 1 にその構造と融点を示した。

3. 供試堆肥の調製法

フサライドまたはフサライド代謝産物の経時変化を追跡する堆肥として下記のように調製した。

1) ^{14}C -フサライド仕込堆肥

農薬無散布イネわら（動力カッターで長さ約 5 mm に切断したもの）100 g, 石灰窒素 4 g, 水 300 ml, ^{14}C -フサライド 40 mg (25.2 μCi , 5 ml アセトン溶液として添加し, 添加量はわらに対し 400 ppm, 湿重 100 ppm となる) を Fig. 2 のような 2 l セパラブルフラスコに入れ, 40°C の恒温器中で堆肥化した。空気および水の補給は, 1 週間に 1 回行なった。

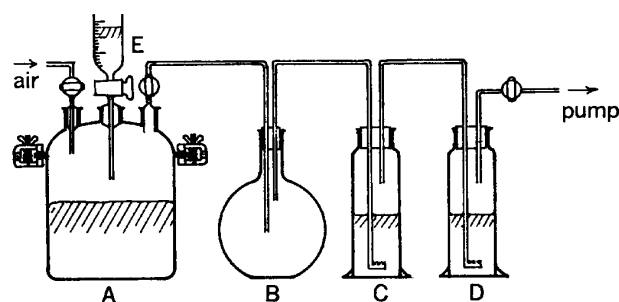


Fig. 2 Apparatus for compost experiment.

A: compost, B: vacant trap,
C: 10% NaOH trap, D: 10% NaOH trap,
E: water.

2) 非放射性フサライドまたはその代謝産物仕込堆肥
農薬無散布イネわら [1] と同様] 3.5 kg, 石灰窒素 150 g, 水 10 l, フサライドまたはその代謝産物 1.4 g (フサライドの場合は 50% 水和剤, 代謝産物の場合は 20 ml アセトン溶液として添加した) を 35 l ホーロー引タンクに入れ, 30°C, 湿度 90~100% の温調室内で堆肥化した。この堆肥は, 代謝産物の単離および代謝産物の堆肥中での変化を試験するために用いた。

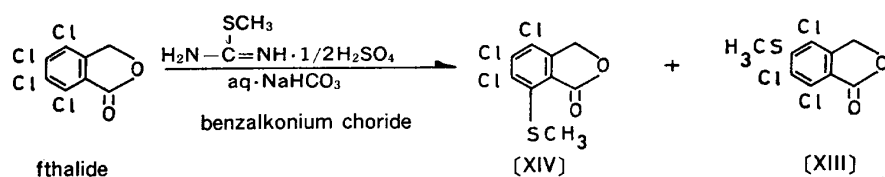


Fig. 3 Synthesis of 4,5,6-trichloro-7-methylthiophthalide [XIV] and 4,6,7-trichloro-5-methylthiophthalide [XIII].

4. 4,5,6-トリクロロ-7-メチルチオフタリド [XIV] および 4,6,7-トリクロロ-5-メチルチオフタリド [XIII] の合成

松本らによるニトロフェニルアルキルスルフィド類の合成法¹⁹⁾に準じて合成した。

フサライド 27.2 g (0.1 mol) をモノクロロベンゼン 200 ml に溶解し, 水 100 ml, メチルイソチオ尿素硫酸塩 16.7 g (0.12 mol), 塩化ベンザルコニウム 10% 水溶液 12 ml を加え, 温度 80~87°C で激しくかきまぜながら, 水 200 ml に溶解した炭酸水素ナトリウム 18.5 g を徐々に滴下した。滴下終了後, 2 時間同温度でかきまぜた。冷却後, モノクロロベンゼン層を分離し, 水洗, 減圧留去すると白色結晶 29 g を得た。これを酢酸エチルおよび *n*-ブタノールで分別再結晶をくり返し, マススペクトル, NMR, IR, ガスクロマトグラフィーでほぼ純粋な [XIV] 1.9 g (融点 148~9°C) および [XIII] 2.6 g (融点 143~5°C) をそれぞれ得た。

実験方法

1. 堆肥からの抽出法

Fig. 4 に示したように抽出し, ベンゼン, 酢酸エチル, 水および残渣を放射能測定し, ベンゼンおよび酢酸エチ

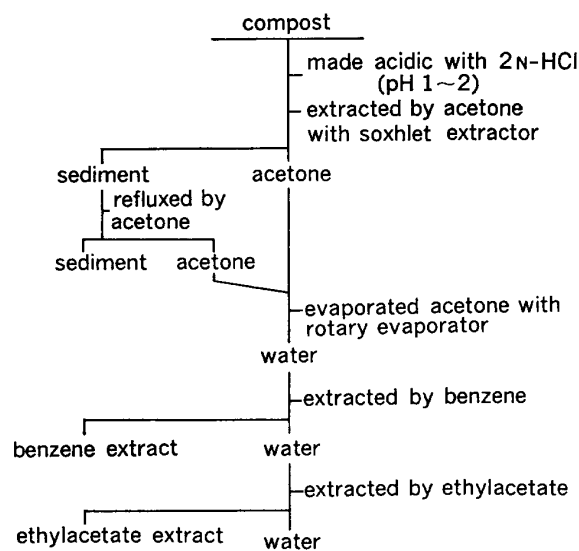


Fig. 4 Flow diagram for extraction.

ル区分はガスクロマトグラフィーおよび薄層クロマトグラフィーで分析した。

2. 代謝産物の分離法

代謝産物の分離, 同定には下記条件のガスクロマトグラフィー (以後 GLC と略す) および薄層クロマトグラフィー

ー (以後 TLCと略す) を用いた。

1) GLC

装置: 島津製作所 GC-3AE [検出器 ECD (3H)], 条件 (A); シリコーン DC-11.5%, Chromosorb GAW 60~80 mesh, 3 mm×1 m (ガラスカラム), 200°C. 条件 (B); Neopentylglycol succinate 3%, Chromosorb WAW 60~80 mesh, 4 mm×2 m (ガラスカラム), 200°C.

2) TLC

プレート: シリカゲル HF₂₅₄, 20 cm×20 cm, 厚さ 0.25 mm 130°C で1時間活性化. 検出法; UV 照射 (東芝蛍光検査灯 FI-3SA). オートラジオグラフィ. 展開溶媒; (C) ベンゼン, (D) *n*-プロピルアルコール:水:酢酸エチル (7:2:1), (E) エチルアルコール:濃アンモニア水:水 (80:13:7).

合成した標準物質の相対保持時間および *R_f* 値を Table 1 に示した.

3. 測定法

1) 放射能の測定

ベンゼン区分, 酢酸エチル区分はその 1.0 ml または 0.5 ml を, 水区分は 0.5 ml または 0.25 ml を, ジオキサン系シンチレーター (ナフタリン 100 g, DOP 8 g, POPOP 0.25 g, エチレングリコール 20 ml を含むジオキサン溶液 1 l) 15 ml に溶解し液体シンチレーションカウンター (Packard TRI-CARB model 3320 および Beckmann LS-150) で測定した. 残渣は乾燥後, 乳鉢でよく磨碎し, その一定量を同様に液体シンチレーションカウンターで測定した. TLC-ラジオスキャナーは Aloka 製 JTC-203 型を使用した.

2) GC-MASS, NMR, IR および蛍光X線の測定

GC-MASS は日本電子製 JEOL-06H, NMR は Varian 製 60 MHz, IR は日本分光製 DS-301 型, 蛍光 X 線は理学電機製 KG-3 型でそれぞれ測定した.

4. 急性経口毒性および野菜への薬害の検定法

急性経口毒性は, ICR-JCL 系マウス雌 (体重 20~25 g) および Wistar 系ラット雄 (体重 120~150 g) を用いて試験した. 薬害はインゲン (マスターピース) およびキウリ (ときわ) を用いて, 土壌混和による方法⁷⁾で試験した. すなわち, 風乾土壌 (水田砂壤土) を用い, 供試化合物が重量比で所定濃度になるように均一に混和したのち, 播種し, 25°C の温室で管理した. 30 日後に 7 段階薬害表示法により, 10 名の調査員で調査した.

実験結果

1. 堆肥中におけるフサライドの経時変化

^{14}C -フサライド仕込堆肥を Fig. 4 のように抽出し,

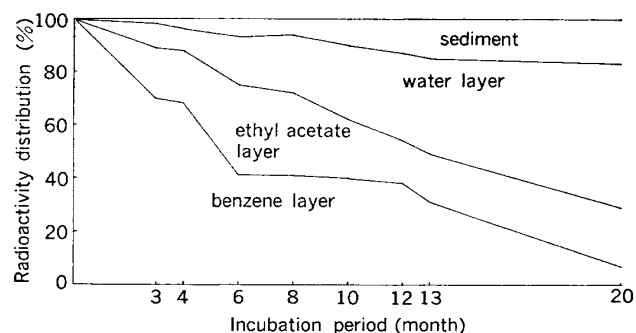


Fig. 5 Distribution of radioactivity of extraction layers in compost containing ^{14}C -labeled fthalide.

抽出区分別放射能分布を検討した. その結果を Fig. 5 に示したが, 水層区分の増加が顕著である. また, トラップ B に凝縮した水およびアルカリトラップ中には, 放射能はほとんど検出されなかった.

2. 代謝産物の構造決定

実験方法に従って調製した堆肥を 30°C, 湿度 90~100% の温調室で熟成した. 1~2 カ月経過した堆肥をベンゼンで抽出し, GLC 分析すると, 極少量のフサライドを認めるのみであるが, 堆肥に 2 N-塩酸を加えて酸性 (pH 1~2) にし, ベンゼン抽出, GLC 分析すると, 少量の代謝産物とともに未代謝のフサライドが検出された. これは, フサライドが開環した状態 [XVIII] で堆肥中に存在しているものと考えられる.

3~4 カ月経過した堆肥を溶媒抽出し, ベンゼン区分を GLC および TLC 分析すると, フサライドの減少とともにいとおおよそ Fig. 6 のようなクロマトグラムが得られ, 代謝産物と考えられる A, B, C₁, C₂, D, E のピークとスポットを認めた. また酢酸エチル区分をジアゾメタンでメチル化したのち, GLC および TLC 分析するとおおよそ Fig. 6 のようなクロマトグラムが得られ, 代謝産物と考えられる F, G, H, I のピークとスポットを認めた. これらの各成分の生成比は堆肥の作製条件や熟成期間あるいはフサライド添加量等により一定ではないが, フサライドを添加しない堆肥からは検出されない. 代謝産物と考えられる各成分の単離と構造決定を以下に行なった.

1) C₁ 成分の単離と構造決定

3 カ月間熟成した堆肥約 5 kg を Fig. 4 のように処理し, ベンゼン区分について C₁ 成分に相当する部分を TLC で分取し, メチルアルコールより再結晶したところ融点 126~7°C の結晶 5 mg を得た. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹ = 1,775, 1,430, 1,200, 1,075. NMR (CDCl₃) τ : 2.27 (s, 1H), 4.82 (s, 2H). GC-MASS *m/e*: 236 (M⁺, 238, 240, 242 のピーク比より塩素 3 個含有している), 207,

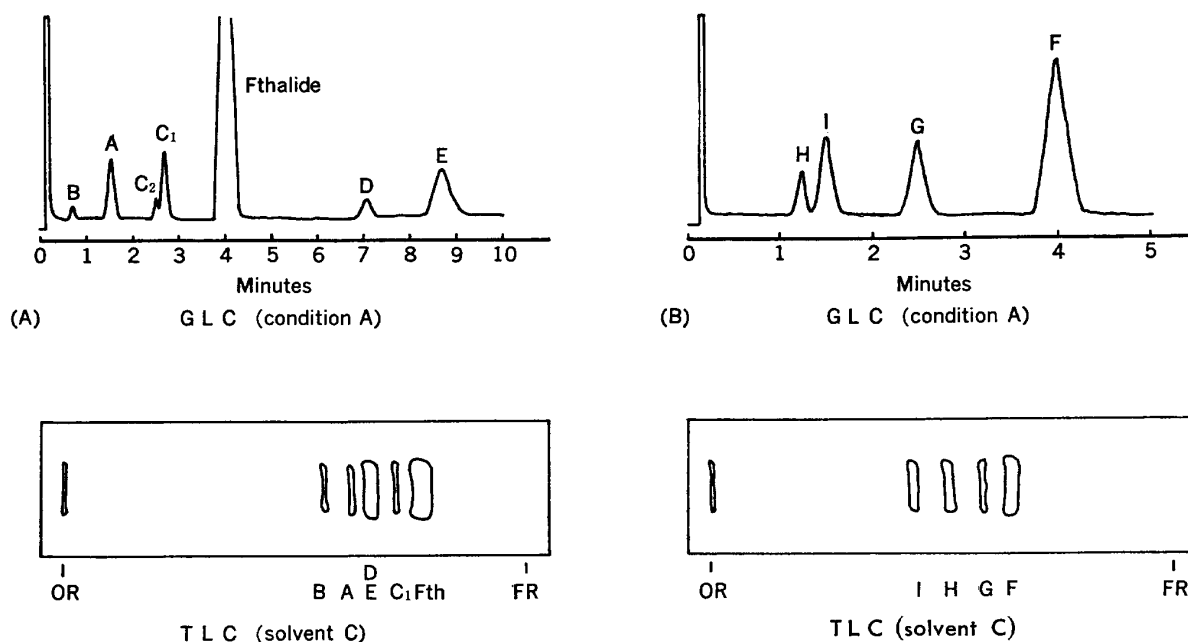


Fig. 6 Chromatograms of benzene extr. and ethylacetate extracts from 3-4 months incubated compost.

(A): Benzene extract.

(B): Ethyl acetate extract (methylated with diazomethane).

GLC (condition A): Shimadzu GC-3AE, Silicon DC-11 5%, chromosorb GAW, 60-80 mesh, 3 mm × 1 m (glass column), 200°C.

TLC (solvent C) : Silica gel HF₂₅₄, 20 cm × 20 cm, thickness 0.25 mm, solvent benzene.

この結果トリクロロフタリドであることが判明し、標準物質との IR の比較により、C₁ 成分は 4,6,7-トリクロロフタリド [I] であることがわかった。

2) DおよびE成分の単離と構造決定

3 カ月間熟成した堆肥約 20 kg を常法どおり処理し、ベンゼン区分についてDおよびE成分に相当する部分を TLC で分取した。次にケイ酸 (Mallinckrodt 製, 100 mesh) とセライトの混合物 (2:1) に、*n*-ヘキサン飽和ニトロメタンを吸着させ、これを固定相とする分配カラムクロマトグラフィー (展開溶媒: ニトロメタン飽和 *n*-ヘキサン) により D, E 両成分を分離し、ベンゼン-*n*-ヘキサンの混合溶媒より再結晶したところ、融点 148

~9°C のD成分 4 mg と融点 140~2°C のE成分 10 mg を得た。機器分析の結果は、下記のとおりである。

E成分; GC-MASS *m/e*: 282 (M⁺, 3Cl), 253. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹=1,777, 1,185, 1,065. NMR (CDCl₃) τ : 7.40 (s, 3H), 4.86 (s, 2H). 蛍光X線 (target Cr crystal EDDT, detector PC): *K_α* 59.85°, *K_β* 64.82° Cl. *K_α* 69.55°, *K_β* 75.05° S.

D成分; GC-MASS *m/e*: 282 (M⁺, 3Cl), 249. IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ cm⁻¹=1,755, 1,264, 1,082, 1,028. NMR (CDCl₃) τ : 7.48 (s, 3H), 4.82 (s, 2H).

この結果、フサライドの塩素1個がメチルチオ基 (-SCH₃) で置換されたものであり、両者は互いに位置異

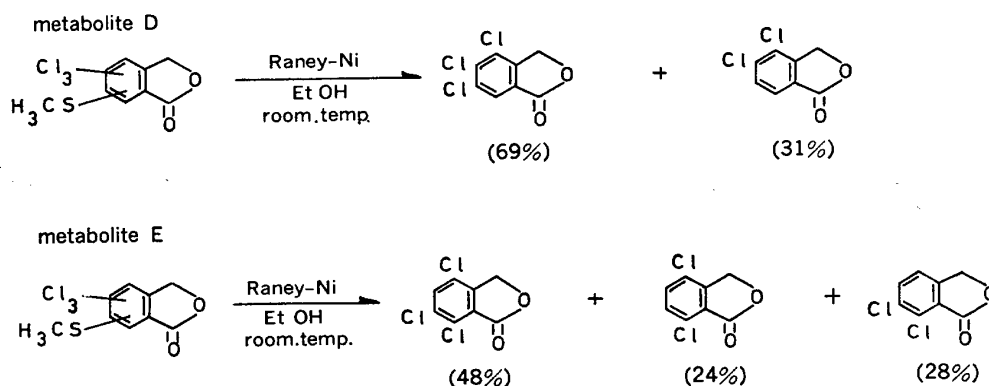


Fig. 7 Desulfurization of metabolite D and E by Raney-Nickel.

性体であることがわかった。この置換位置を決定するため、ラネーニッケル (W-2) による脱硫反応を行なって、生成するクロロフタリド類を GLC で標準物質と合わせることににより、その構造を決定した。その結果を Fig. 7 に示した。これらを総合し、D 成分は 4,5,6-トリクロロ-7-メチルチオフタリド [XIV], E 成分は 4,6,7-トリクロロ-5-メチルチオフタリド [XIII] であることがわかった。

3) A成分の単離と構造決定

6 カ月熟成した堆肥 3 kg を常法どおり抽出し、ベンゼン区分について、TLC で分取し、メチルアルコールで再結晶すると融点 $160\sim 1^\circ\text{C}$ の結晶 3.5 mg を得た。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{KBr}}$ $\text{cm}^{-1}=1,775, 1,362, 1,157, 1,050$. MASS m/e : 202 (M^+ , 2Cl), 173. NMR (CDCl_3) τ : 4.83 (s, 2H), 2.43 (d, 1H; J 8.4 Hz), 2.60 (d, 1H; J 8.4 Hz). この結果ジクロロフタリドであることがわかり、標準物質の IR の比較から A 成分は 4,7-ジクロロフタリド [III] であることがわかった。

4) B成分の単離と構造決定

6 カ月間熟成した堆肥 3 kg を常法どおり抽出し、ベンゼン区分について、TLC で分取し、淡黄色半固体 1 mg を得た。この B 成分は GC-MASS m/e : 168 (M^+ , 1Cl), 139, 78. および GLC で標準品の 4-クロロフタリド [V] に一致したことによりその構造を確認した。

5) F成分の単離と構造決定

2 カ月間熟成した堆肥 2 kg を常法どおり抽出し、酢酸エチル区分をジアゾメタンでメチル化後、GLC で F 成分に相当する部分を TLC で分取し、乳白色結晶 6 mg を得た。ここに得られた結晶の IR が標準品のテトラクロロフタル酸ジメチルと一致したことにより、F 成分はテトラクロロフタル酸 [VI] であることがわかった。

6) G成分の単離と構造決定

3 カ月間熟成した堆肥 2 kg を常法どおり抽出し、酢酸エチル区分をメチル化後、TLC で分取し、固体物 1 mg を得た。GC-MASS m/e : 296 (M^+ , 3Cl), 269, 267, 265] および GLC の保持時間が標準品の 3,4,6-トリクロロフタル酸ジメチルと一致した。したがって、G 成分は 3,4,6-トリクロロフタル酸 [VIII] であることがわかった。

7) H成分およびI成分の単離と構造決定

6 カ月間熟成した堆肥 3 kg を常法どおり抽出し、酢酸エチル区分をメチル化後、TLC で分取し、H 成分として淡黄色半固体約 1 mg と I 成分として乳白色固体 7 mg を得た。H 成分は GC-MASS m/e : 262 (M^+ , 2Cl), 233, 231] および GLC 保持時間が標準品の 3,6-ジクロロフタル酸ジメチルに一致し、また I 成分は GC-MASS m/e : 262 (M^+ , 2Cl), 233, 231], IR および GLC 保持時間が標準品の 4,5-ジクロロフタル酸ジメチルに一致したことにより、それぞれ 3,6-ジクロロフタル酸 [X] および 4,5-ジクロロフタル酸 [IX] であることがわかった。

8) その他の代謝産物について

4 カ月間熟成した堆肥 1.5 kg を常法どおり抽出し、ベンゼン区分および酢酸エチル区分を合わせジアゾメタンでメチル化後、ワコーゲル Q-23 20 g に吸着し、ベンゼン-*n*-ヘキサン (1:1) 溶媒で溶出し、10 ml ずつ 350 のフラクションに分画した。各フラクションを GLC (条件 A および B) で標準品と比較検討したところ、前記代謝産物の他に 4,5,6-トリクロロフタリド [C_2 , II], 4,6-ジクロロフタリド [IV], 3,4,5-トリクロロフタル酸 [VII], 3,5-ジクロロフタル酸 [XI] および 4-クロロフタル酸 [XII] に一致するものが認められた。このとき塩素化安息香酸の標準品を使って詳細に検討したがいずれも一致するものがなく、安息香酸への代謝は行なわれないものと考えられた。

Table 2 Fate of tetrachlorophthalic acid in compost.

	Incubation period (month)							
	1	2	3	4	5	6	8	12
	75.3*	71.1	44.0	33.6	1.3			
				8.2				
				18.6	82.5	66.1	49.1	15.1

* Metabolites were analyzed by GLC and expressed as molar percent of recovery.

3. 代謝産物の堆肥中における変化

フサライドの堆肥中における代謝産物は種々確認されたが、これらの代謝産物の堆肥中での生成経路および運命を明らかにするため、おもな代謝産物の標準品を混入した堆肥を作製し、その経時変化を検討した。代謝産物の同定および定量は GLC で行ない、新代謝産物については単離し、その構造を決定した。

1) テトラクロロフタル酸〔VI〕の経時変化

Table 2 に示したように熟成が進むにしたがって急激

に分解した。また、フタル酸の3位および6位の塩素が脱離しやすいことがわかった。

2) 4,6,7-トリクロロフタリド〔I〕の経時変化

Table 3 に示したように 3,4,6-トリクロロフタル酸〔VIII〕への酸化がおもな代謝過程であった。フサライドの場合と同様に初期の堆肥は酸化状態であり、酸化生成物がおもな代謝産物であることによるものと思われた。

3) 4,5,6-トリクロロ-7-メチルチオフタリド〔D, XIV〕の経時変化

Table 3 Fate of 4,6,7-trichlorophthalide in compost.

	Incubation period (month)							
	1	2	3	4	5	6	8	12
	100*	19.5	2.8	1.0	0.8	0.5		
		0.5	0.3					
		78.4	81.5	8.0				
		1.2	12.4	15.6	10.1	5.6	6.3	3.1
				4.8	11.7	8.8	5.0	

* Metabolites were analyzed by GLC and expressed as molar percent of recovery.

Table 4 Fate of metabolite D and E in compost.

	Incubation period (month)							
	1	2	3	4	5	6	8	12
	92.4*	45.3	9.8	5.0	4.2	5.6	3.8	1.0
D_x				3.0	14.7	44.0	76.2	26.7
	97.1	32.1	9.0	3.3	2.6	2.8	1.5	1.4
E_{x1}				1.3	2.0	12.4	10.4	
E_{x2}						5.2	12.9	5.8

* Metabolites were analyzed by GLC and expressed as molar percent of recovery.

Table 5 Fate of 4-chlorophthalic acid and 4,5-dichlorophthalic acid in compost.

	Incubation period (month)					
	1	2	3	4	5	6
	32.0*	7.5	3.3	2.0		
	88.5	83.8			77.0	77.6

* Expressed as molar percent of recovery.

Table 4 に示したように3カ月で約90%が消失し、それに見合う代謝産物はGLCで検出されなかった。しかし4カ月目から酢酸エチル区分に新しいピークが検出され、これは標準品と一致するものがなく、GLCの保持時間から新代謝産物と考えられたのでこれをD_xとした。その生成量はフサライドを基準にして求め、また構造については後述6)する。

4) 4,6,7-トリクロロ-5-メチルチオフタリド [E, XIII] の経時変化

Table 4 に示したように、前記 [XIV] と同様な挙動を示した。しかしこの場合は代謝産物と考えられるピーク2本が認められ、それぞれE_{x1}およびE_{x2}とした。

5) 4-クロロフタル酸 [XII] および 4,5-ジクロロフタル酸 [IX] の経時変化

Table 5 に示したように、[XII] は急速に消失するが代謝産物と思われるピークは認められなかった。また [IX] は6カ月まであまり減少せず、代謝産物も認められなかった。

6) D_x 成分の単離と構造決定

D成分を添加し6カ月間熟成した堆肥1kgを、塩酸性酢酸エチルで抽出し、ジアゾメタンでメチル化後、溶媒を留去し、ベンゼンで再抽出した。ベンゼン可溶部を濃縮後、GLC (相対保持時間1.18 A条件) でD_x成分を分取し、淡黄色半固体4.6mgを得た。IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CS}_2}$ cm⁻¹ = 2,925, 1,740, 1,268, 1,095. GC-MASS *m/e*: 308 (M⁺, 2Cl), 279, 277, 247, 245.

この結果、メチルチオ基および塩素2個置換したフタル酸ジメチルであることが判明し、その置換位置を決定するため、常法どおり脱硫反応を行なった。GLCで

4,5-ジクロロフタル酸ジメチルおよび4-クロロフタル酸ジメチルが認められ、D_x成分は4,5-ジクロロ-3-メチルチオフタル酸ジメチルであることがわかった。しかし、単離中にメチル化しているので、堆肥中で-SCH₃ また

は-SHのどちらの型で存在していたか疑問である。そこで酢酸エチル抽出液をジアゾエタンでエチル化後、GLC分析した。その結果、フサライドを基準にした相対保持時間は1.35 (A条件) であり、これはD_xをアルカリ加水分解し、酸性化後、酢酸エチル抽出、ジアゾエタンでエチル化したものに一致した。この事実から、D_xは堆肥中で4,5-ジクロロ-3-メチルチオフタル酸 [XVI] であったことが判明した。

7) E_{x1} および E_{x2} の単離と構造決定

E成分を添加し6カ月経過した堆肥1kgを前記6)と同様に処理し、E_{x1}成分として淡黄色油状物2.2mgを得た。GLC相対保持時間1.44 (A条件). IR $\nu_{\text{max}}^{\text{CS}_2}$ cm⁻¹ = 2,925, 1,738, 1,265, 1,194. GC-MASS *m/e*: 308 (M⁺, 2Cl), 279, 277. この結果E_{x1}はD_xの異性体と考えられ、常法通り脱硫反応でその置換位置を決定した。すなわち、GLC分析により3,5-ジクロロ-, 3-クロロ-, 4-クロロ- および無置換フタル酸ジメチルが得られたので、E_{x1}は3,5-ジクロロ-4-メチルチオフタル酸ジメチルであることがわかった。またE_{x2}は生成量が少なく単離するにいたらなかったが、GLC保持時間 (相対保持時間1.11 A条件) およびクロロフタル酸類の脱塩素化の位置から考え、E_{x2}は4-クロロ-5-メチルチオフタル酸ジメチルであろうと推定される。したがって、E成分は堆肥中でFig. 8のように代謝されるものと考えられる。

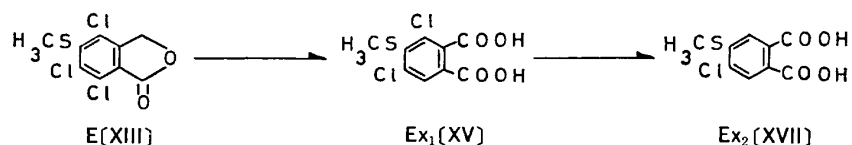


Fig. 8 Metabolic pathway of metabolite E in compost.

4. 代謝産物別経時変化

Fig. 5 に、抽出区分別の放射能分布を経時的に追跡した結果を示した。ここでは代謝産物の構造が決定されているので化合物別に、ベンゼン区分および酢酸エチル区

Table 6 Fate of fthalide and its metabolites in compost incubated with ^{14}C -labeled fthalide.

Incub. period (M)	Concentration (ppm) of fthalide (Fth) and its metabolites (I-IX)*								
	Fth	[I]	[III]	[V]	[XIII]	[XIV]	[VI]	[VII]	[IX]
3	151.5				26.4		52.4		
4	65.7	7.7	11.5	trace	16.4	4.4	21.5	22.9	19.9
6	3.1	trace	43.4	16.7		6.4			105.6
8		trace	28.9	13.4					74.4
10		1.9	27.0	9.1					26.8
12			17.9						12.0
13			12.4						3.2

* Forty milligrams of ^{14}C -fthalide was applied to 100 g of rice straw (400 ppm). [I]: 4, 6, 7-trichlorophthalide. [III]: 4, 7-dichlorophthalide. [V]: 4-chlorophthalide. [XIII]: 4, 6, 7-trichloro-5-methylthiophthalide. [XIV]: 4, 5, 6-trichloro-7-methylthiophthalide. [VI]: tetrachlorophthalic acid. [VII]: 3, 4, 5-trichlorophthalic acid. [IX]: 4, 5-dichlorophthalic acid.

Table 7 Solubility, acute oral toxicity, phytotoxicity of fthalide and its metabolites.

Compounds	Solubility in water (ppm, 25°C)	Acute oral toxicity (LD ₅₀ mg/kg)		Phytotoxicity (pre-emergence test at appointed concentration, ppm)						
		Mouse (♀)	Rat (♂)	kidney bean				cucumber		
				12.5	2.5	0.5	0.1	12.5	2.5	0.5
Fthalide	2.5	>10,000		±	—	—	—	—	—	—
Sodium 3, 4, 5, 6-tetra- chloro-2-hydroxy- methylbenzoate [XVIII]	83,000	3,160~4,640								
4, 6, 7-Trichlorophthalide [I]	31.8	>1,000		+	±	—	—	—	—	—
4, 7-Dichlorophthalide [III]	69.5	>1,000		+	±	—	—	+	—	—
4-Chlorophthalide [V]			>1,000	—	—	—	—	—	—	—
Tetrachlorophthalic acid [VI]	4,354	4,640~6,810		—	—	—	—	—	—	—
4, 5-Dichlorophthalic acid [IX]			>1,000	—	—	—	—	—	—	—
4, 6, 7-Trichloro-5- methylthiophthalide [XIII]	18.5	>1,000		—	—	—	—	—	—	—
4, 5, 6-Trichloro-7- methylthiophthalide [XIV]	4.1	>1,000		—	—	—	—	—	—	—
4, 5, 6-Trichlorophthalide [II]				—	—	—	—	—	—	—
4, 6-Dichlorophthalide [IV]				—	—	—	—	—	—	—
3, 4, 6-Trichlorophthalic acid [VIII]				—	—	—	—	—	—	—
Control	Pentachlorobenzoic acid			+++	+++	++	+	+++	+++	++
	2, 3, 4, 5-Tetrachlorobenzoic acid			++	±	—	—	±	—	—
	2, 3, 6-Trichlorobenzoic acid			+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

分を GLC で定量した結果を Table 6 に示した。

5. フサライドおよびその代謝産物の水に対する溶解度、哺乳動物に対する急性経口毒性および野菜への薬害について

Table 7 にまとめて示した。代謝産物はすべて水に対

する溶解度がフサライドよりも大きく、残留性の少ない方向へ代謝されているものと考えられる。急性経口毒性は強いものはなかった。薬害に関しては [I] および [III] がフサライドより若干強かったが、対照化合物にくらべるとはるかに弱いものであった。

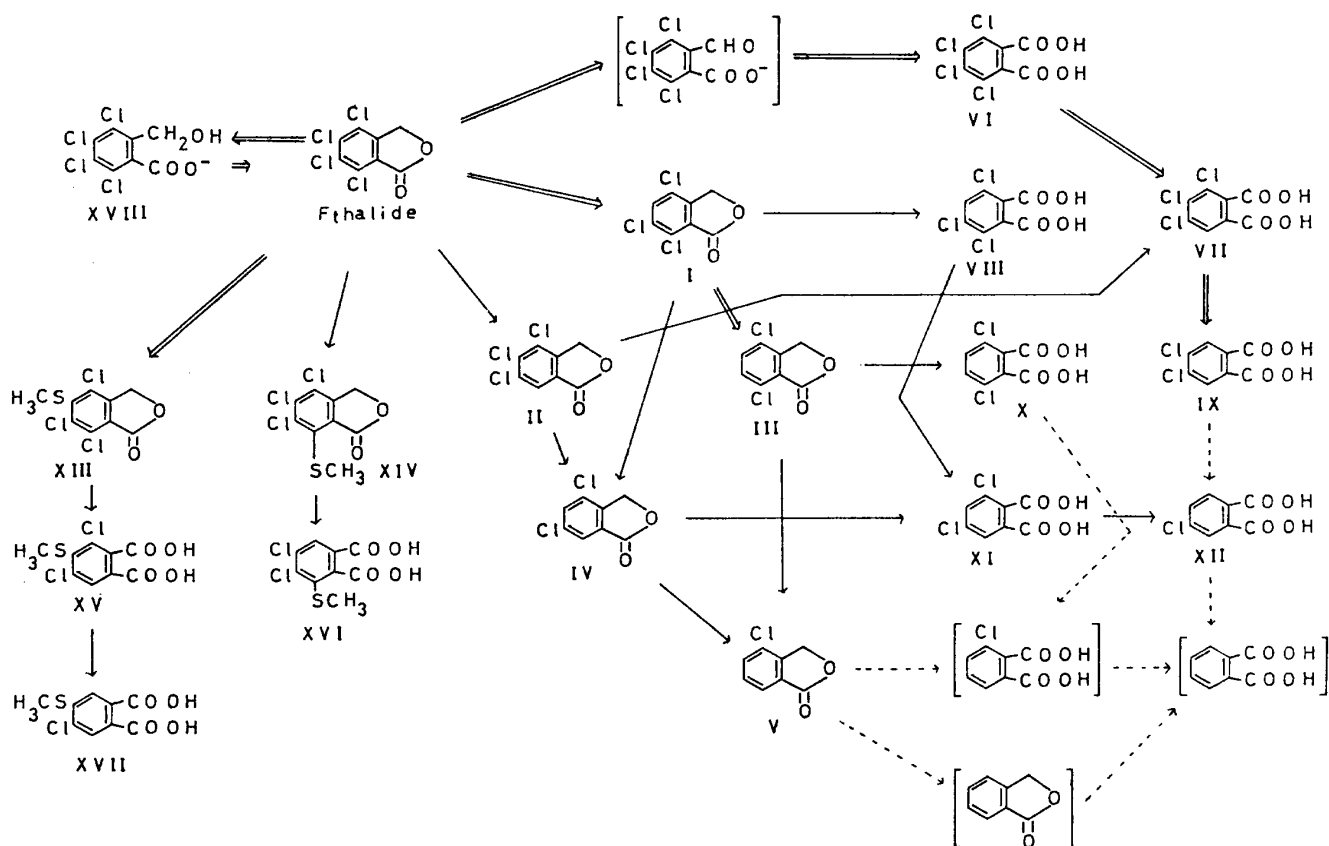
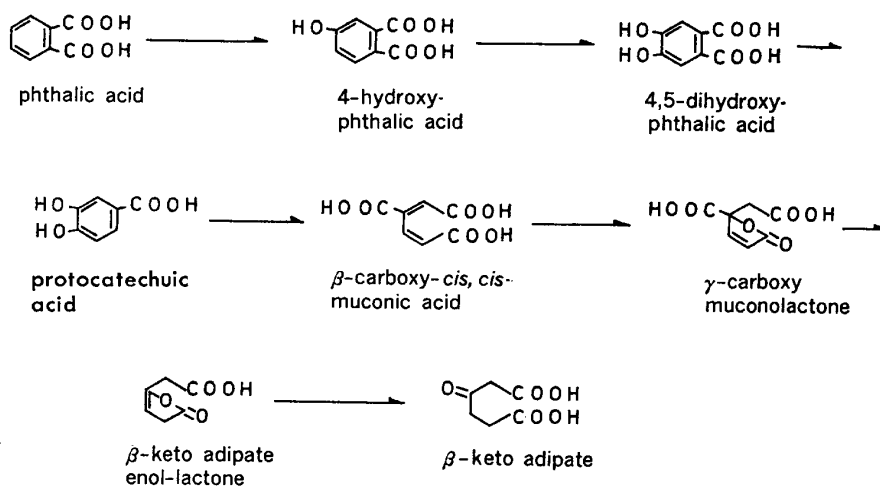


Fig. 9 Proposed metabolic pathways of fthalide in compost.

$\Longleftarrow$ major pathway, $\longrightarrow$ minor pathway, $\cdots$ hypothesized pathway.

Fig. 10 Metabolic pathway of phthalic acid in soil.^{20,21)}

考 察

フサライドは、堆肥中ですみやかに代謝された。代謝産物として 18 種の化合物が確認され、その推定代謝経路を Fig. 9 に示した。

抽出区分別経時変化では、ベンゼン区分の減少にともない水区分の増加が顕著であった。これより、ベンゼン核の水酸化または開裂反応の進行していることが推測さ

れる。土壤微生物によるフタル酸の代謝は Ribbons ら^{20,21)}により Fig. 10 の経路が報告されている。

フサライドが堆肥中で最初に受ける変化は環開裂であり、1~2 カ月経過堆肥中ではほとんど 3, 4, 5, 6-テトラクロロ-2-ヒドロキシメチル安息香酸塩 [XVIII] として存在していた。このように水溶性の大きい型で存在できることはその後の代謝を受けやすく、他の塩素系殺虫剤たとえば BHC, DDT, ドリン系と異なる点であろうと考えられる。

熟成期間の初期の堆肥 (1~2 カ月) は空気の流通もあり好気性菌の繁殖に適していると考えられ、おもに酸化反応が起こり、代謝産物としてフタル酸類が生成していた。テトラクロロフタル酸が生成する前段階の 4, 5, 6, 7-テトラクロロ-3-ヒドロキシフタルドまたは 3, 4, 5, 6-テトラクロロ-2-ホルミル安息香酸は GLC 分析上不安定な化合物でメチル化しても安定なピークが得られないため、その存在をたしかめることはできなかった。

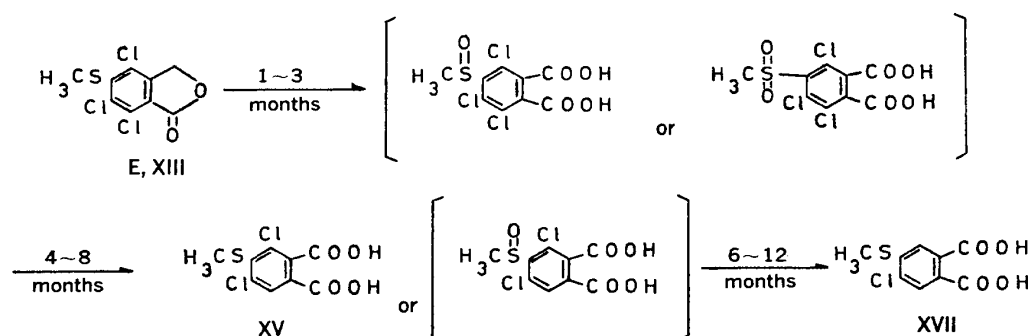


Fig. 11 Proposed metabolic pathway of metabolite E in compost.

次に熟成（3～4 カ月）が進むと堆肥の表面はべとつき、内部は酸酵熱のため 40～45℃ まで上昇した。この状態ではすでに空気の流通はなく嫌気性になり、還元状態になったものと考えられる。この状態ではまず 4,6,7-トリクロロ-5-メチルチオフタリド〔XIII〕が生成した。一般に、有機塩素化合物の脱塩素化代謝にはグルタチオンまたは他の含硫黄化合物が重要な役割をはたしていることはよく知られている^{22,23)}。しかし、この場合のようにベンゼン核塩素が SCH₃ 基に置換される反応は知られていないが、PCNB（ペンタクロロニトロベンゼン）の土壌微生物²⁴⁾または動物体内²⁵⁾での代謝産物としてニトロ基が SCH₃ 基で置換した化合物は知られている。BHC の代謝産物としてチオフェノール誘導体が発見されている²⁶⁾こと、また SH 化合物がメチル化される²⁷⁾ことが知られているところから、その生成機構としておそらくグルタチオンを介して生成する SH 化合物がメチル化される経路をへて生成したものと考えられる。また、〔XIII〕は堆肥中で代謝されフタル酸誘導体が生成した (Fig. 9)。これは Table 8 に示したように、3 カ月で 90% 以上分解が進んでいるにもかかわらず、それに相応する代謝産物が GLC で検出されない（これらメチルチオフタリドまたはメチルチオフタル酸のスルホキシド体、スルホン体は GLC で検出されない）こと、またトリクロロフタル酸類が発見されなかったことなどから Fig. 11 のような生成経路を推定した。

4 カ月以上熟成が進むと、塩素数の少ないクロロフタリドおよびフタル酸類が次々に生成した。フタリド類では 5 位塩素が最も脱離しやすく、次に 6 位、7 位の順であった。フタル酸類では 3 および 6 位塩素が非常に脱離しやすく、4 位および 5 位塩素の脱離は遅かった。これはカルボキシル基により活性化されているオルト位が優先的に脱離してゆくものと考えられるが、フタリド類では 5 位の次に 6 位塩素が脱離しやすい理由は不明である。土壌中での代謝では 5 位および 7 位が優先的に脱離し、4,6-ジクロロフタリドが代謝産物中最も多く生成し

た⁴⁾。

ジクロロフタリドまたはジクロロフタル酸からの脱塩素化は遅く、またモノクロロ体の生成量が少ないことから脱塩素化以外の代謝が多いものと考えられる。

Table 7 に示したようにすべての代謝産物はフサライドにくらべ溶解度が増加し、残留性、蓄積性の少ない化合物になってゆくものと考えられる。急性経口毒性に関してはとくに問題になる化合物はなく、野菜に対する薬害については、〔I〕および〔III〕が土壌混和試験でフサライドよりも強い薬害を示した。しかし、これも対照化合物にくらべはるかに弱く、またその生成量も添加したフサライドに対し最高濃度それぞれ 2% および 10% である。イネわら中のフサライドの残留量は 20 ppm を越えることはなく⁷⁾、また一般の山積堆肥では雨水による流亡などもあり、薬害を起こす濃度にはならないものと考えられる。

要 約

フサライドを実験室で調製した堆肥に添加しその代謝過程を検討し、生成した代謝産物について若干の生理作用を検討した。

(1) フサライドは、堆肥中ですみやかに代謝された。代謝産物としてベンゼンおよび酢酸エチル区分から 18 種の化合物が同定されたが、時間とともに水層区分の増加が認められた。

(2) フサライドは堆肥中で開環し、3,4,5,6-テトラクロロ-2-ヒドロキシメチル安息香酸塩として存在していた。このように水溶性の大きい型をとりうる性質はその後の代謝をうけやすく、残留性の大きい塩素系殺虫剤と異なる場所であると考えられる。

(3) 代謝過程はまずテトラクロロフタル酸への酸化である。次に核塩素の SCH₃ 化であり、おもに 4,6,7-トリクロロ-5-メチルチオフタリドが生成し、またこの化合物の代謝では酸化生成物のフタル酸誘導体のみ認められ、この生成機構に関しても推論した。

(4) クロロフタリドの脱塩素化は5位, 6位の順に起こり7位塩素の脱離は前者に比較し遅かった。またクロロフタル酸の脱塩素化は3位, 6位が非常に速く, 4位, 5位塩素の脱離は遅くなっていた。

(5) すべての代謝産物はフサライドより水によく溶け, 残留性や蓄積性の少ない化合物に変化してゆくことが予想された。また野菜に対する薬害はフサライドより若干強い代謝産物があったが, その生成量が少ないことから実際の場面で薬害を起こすことはないものと考えられる。

終りに臨み, 本試験にご懇切な指導を賜った理化学研究所微生物薬理研究室黄耿堂博士および同研究室の皆様ならびに GC-MASS 分析に多大の便宜をおはかりいただいた宮城教育大学 佐々木慎一教授および阿部英次氏に深く感謝を捧げます。また, 標準物質の合成および各種試験を担当された呉羽化学工業株式会社錦研究所, 東京研究所の各位に謝意を表します。

引用文献

- 1) 堀 正侃: 今月の農薬 **15** (4), 29 (1971)
- 2) 山口富夫: 農薬 **18** (3), 20 (1971)
- 3) 見里朝正: 農薬 **19** (2), 24 (1972)
- 4) 石田正臣, 南部慶一: 農薬科学 **3** (1), 10 (1975)
- 5) 能勢和夫: 化学と生物 **8**, 342 (1970)
- 6) M. Ishida: "Environmental Toxicology of Pesticides," ed. by F. Matsumura, G.M. Boush and T. Misato, Academic Press, New York, p. 281, 1972
- 7) 日本植物防疫協会: "ラブサイド (KF-32) の残留薬害に関する試験成績," 1971
- 8) N. Juvalta: D.R.P. 50177
- 9) V. Perrini: *Gazz. Chim. Ital.* **87**, 1147 (1957)
- 10) 青木勝道ら: 特公昭 48-24724
- 11) A. Claus & H. Kantz: *Chem. Ber.* **18**, 1370 (1885)
- 12) C. Graebe: *Chem. Ber.* **34**, 2107 (1901)
- 13) V. Villiger: *Chem. Ber.* **42**, 3538 (1909)
- 14) Crossley, Le Sueur: *J. Chem. Soc.* **81**, 1536 (1902)
- 15) A. Krueger: *Chem. Ber.* **18**, 1758 (1885)
- 16) P. Tust: *Chem. Ber.* **20**, 2439 (1887)
- 17) Cohen, Dakin: *J. Chem. Soc.* **81**, 1328 (1902)
- 18) Salkowski: *Ann.* **163**, 28 (1872)
- 19) 松本郁男ら: 特公昭 36-16623
- 20) D.W. Ribbons: *Biochem. J.* **73**, 20 (1959)
- 21) S. Dagley: "Soil Biochemistry," ed. by A.D. McLaren and G.H. Peterson, Marcel Dekker, Inc., New York, p. 291-296, 1967
- 22) T. Gessner & J.N. Smith: *Biochem. J.* **75**, 165 (1960)
- 23) A.G. Clark *et al.*: *Nature* **209**, 103 (1966)
- 24) 中西逸朗, 奥 八郎: 日植病報 **35**, 339 (1969)
- 25) E.J. Kuchar *et al.*: *J. Agr. Food. Chem.* **17**, 1237 (1969)
- 26) F.R. Bradbury & H. Standen: *Nature* **183**, 983 (1959)
- 27) G.A. Snow: *Biochem. J.* **65**, 77 (1957)