

試 験 報 告 書

m-フェニレンジアミン（被験物質No.K-195）
のコイによる濃縮度試験

昭和60年1月23日

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター

試験実施機関

名 称 : 財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター
所 在 地 : (〒131) 東京都墨田区東向島四丁目1番1号
電話番号 : (03) 614-1106 (直通)
代 表 者 : 化学品安全センター 所 長 [REDACTED]

(1) 試験施設

名 称 : 財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター
九州試験所
所 在 地 : (〒830) 福岡県久留米市中央町19番14号
電話番号 : (0942) 34-1500

(2) 運営管理者など

運 営 管 理 者 九州試験所 所 長 [REDACTED]

試 験 責 任 者 九州試験所 蓄積試験課 副長 [REDACTED]

試 験 担 当 者 九州試験所 蓄積試験課 [REDACTED]

飼 育 担 当 者 九州試験所 蓄積試験課 [REDACTED]

報 告 書 要 旨

1. 試験の内容 : コイによる化学物質の濃縮度試験

2. 被 験 物 質 : m-フェニレンジアミン
(被験物質No.K-195)

3. 試験方法及び条件

3.1 試験方法

環 保 業 第 5 号 }
薬 発 第 6 1 5 号 } 〈魚介類の体内における化学物質の濃縮度
49基局第392号 } 試験〉による。

3.2 試験条件

試験濃度 : 第1濃度区 2 mg/l
第2濃度区 0.2 mg/l
飼育期間 : 6週間
流 水 量 : 582l /日
分析方法 : 高速液体クロマトグラフ法

4. 試 験 結 果

濃縮倍率 第1濃度区 : 1.3倍 ~ 4.6倍
第2濃度区 : 1.6倍以下~24 倍

目 次

	頁
1. 試験の目的	1
2. 試験方法	1
3. 試験期間	1
4. 被験物質	1～2
5. 供試魚	3
6. 飼育条件	3
7. 試験濃度及び原液調製法	4
8. 試験水及び供試魚中の被験物質の分析	4～12
9. 濃縮倍率の算出	13
10. 試験結果	13～14
11. 備考	15
付表	
付図	

1. 試験の目的

既存化学物質の安全性確認の一環としてm-フェニレンジアミン（被験物質No.K-195）のコイに対する濃縮度試験を実施し、濃縮性の程度についての知見を得る。

2. 試験方法

環 保 業 第 5 号 } 〈魚介類の体内における化学物質の濃縮度
薬 発 第 6 1 5 号 } 試験〉による。
49基局第392号

3. 試験期間

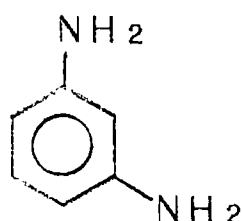
昭和59年8月16日～昭和59年12月19日
（飼育期間 昭和59年10月16日～昭和59年11月27日）

4. 被験物質

4.1 名 称 m-フェニレンジアミン
（被験物質No.K-195）
純 度*1 99%以上
入手先 XXXXXXXXXX
ロット番号 FBT03

4.2 構造式，分子式，分子量

構造式



分子式 $C_6H_8N_2$

分子量 108.14

4.3 スペクトル

赤外線吸収スペクトル (図-14 参照)
質量スペクトル (図-15 参照)
核磁気共鳴スペクトル (図-16 参照)
紫外可視吸収スペクトル (図-17 参照)

4.4 物理化学的性状

外 観 黒色塊状固体
融 点^{*1} 63～ 64℃
沸 点^{*1} 282～ 284℃/760mmHg
溶解性 水 : 900mg/ℓ
n-ヘキサン : 500mg/ℓ以下
ベンゼン : 500mg/ℓ以下
クロロホルム : 500mg/ℓ以下
酢酸エチル : 1000mg/ℓ以上
アセトン : 10g/ℓ以上
アセトニトリル : 10g/ℓ以上
N,N-ジメチルホルムアミド(DMF) : 10g/ℓ以上
ジメチルスルホキシド(DMSO) : 10g/ℓ以上
メタノール : 10g/ℓ以上

分配係数 (n-オクタノール/水)

$\log P_{ow} = -0.38$ (OECD法による)

4.5 ヒメダカに対する48時間LC50値^{*2}

500mg/ℓ以上 (図-1 参照)

*1 共立出版：化学大辞典による

*2 JIS K 0102に定める工場排水試験法「魚類による急性毒試験」に準じ、
DMSOを使用して調製した試験液により得られた値。

5. 供試魚

名 称 コイ (Cyprinus carpio)
入 手 先 熊本県八代市北村養魚場
ロット番号 TFC 840903
平均体重^{*3} 22.4 g
平均体長^{*3} 9.2 cm
平均脂質含量^{*3} 4.6 %
薬 浴 止水状態にて 0.005% 水産用テラマイシン散水溶液にて 24 時間薬浴を行った。
順 化 25 ℃ × 14 日間

*3 同一順化ロットからの代表供試魚 10 尾に対しての測定値

6. 飼育条件

試験施設 流水式水系環境調節装置
飼育水槽 100ℓ 容ガラス製水槽
流 水 量 582ℓ / 日
 (原液：希釈水 = 4 ml / 分 : 400 ml / 分)
飼育密度 20 尾 / 飼育水槽 (試験飼育開始時)
飼育期間 6 週間
飼育温度 25 ± 2 ℃
飼育水槽中溶存酸素濃度
 第 1 濃度区 : 7.0 ~ 7.7 mg / ℓ (図-12 参照)
 第 2 濃度区 : 7.2 ~ 7.9 mg / ℓ (図-13 参照)
 (飯島精密工業製 DOメーター)
給 餌 1 日 2 回に分けて、コイ用飼料 (日本配合飼料株式会社製) を
 魚体重の約 2 % 相当量与えた。

7. 試験濃度及び原液調製法

7.1 試験濃度

試験水槽中の被験物質濃度は次のように設定した。

第1濃度区 : 2 mg/ℓ

第2濃度区 : 0.2 mg/ℓ

7.2 原液調製法

被験物質10gを20倍量のDMSOに溶解し、脱塩水を加えて
10000mg/ℓの分散液を調製した。

これをさらに脱塩水で希釈して

第1濃度区 : 200mg/ℓ

第2濃度区 : 20mg/ℓ

の各原液25ℓを調製した。なお、各原液は飼育期間中、毎週2回調製した。

8. 試験水及び供試魚中の被験物質の分析

8.1 分析内容の概略

8.1.1 試験水分析

第1及び第2濃度区の各試験水槽より分析試料を採取し、前処理を行った後、高速液体クロマトグラフ（HPLC）法により被験物質を定量分析した。

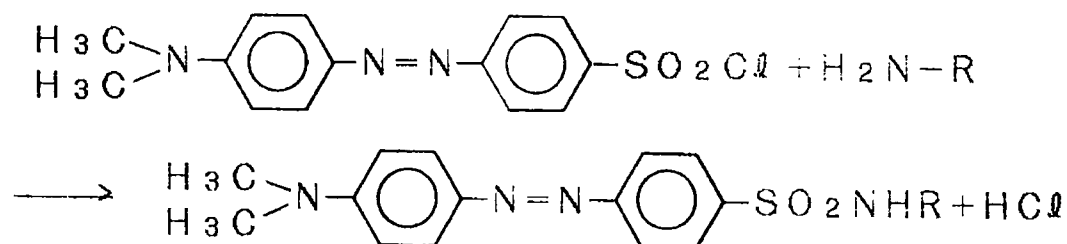
被験物質を定量するに際しては、前処理操作において有機溶媒抽出による濃縮操作が困難であったため、試験水分析試料をそのまま誘導体化（ダブル化^{*4}）し、HPLCによる分析感度の向上に努めた。

試験水分析は、両濃度区とも飼育期間中、毎週2回計12回行い、1回あたりの分析試料は1点とし、採水後ただちに分析操作を行った。

*4 ダブシルクロライド

(4-ジメチルアミノアゾベンゼン-4'-スルホニルクロライド)

アミノ基を有する物質と次式のように反応し、可視部又は紫外部における高感度検出を可能にすると同時に溶出状態を良好にする。



8.1.2 供試魚分析

第1及び第2濃度区の各試験水槽より分析試料を採取し、前処理を行った後、高速液体クロマトグラフ（HPLC）法により被験物質を定量分析した。

供試魚の分析においては、誘導体化（ダブシル化）を行った場合、魚体に由来するブランクが大きく、またこれを除去することが困難であったため、本体のままで分析を行った。

供試魚分析は、両濃度区とも飼育開始後、2、3、4及び6週目の計4回行い、1回あたりの分析試料は2点とし、採取後ただちに分析操作を行った。

8.2 分析試料の前処理

8.2.1 試験水分析試料の前処理

試験水槽より

第1濃度区 : 10 ml

第2濃度区 : 200 ml

を採水し、次頁のフローシートに従って前処理操作を行った。なお、前処理操作中の試料の分取比は第1濃度区は1、第2濃度区は1/2とし、25 mlに定容してHPLC試料とした。

フローシート

試験水分析試料

- ・濃縮
- ・定容 20ml (飼育水) } 第2濃度区のみ
- ・分取 10ml
- ←2%炭酸水素ナトリウム水溶液 0.5ml
- ←アセトニトリル 5ml
- ←発色試薬^{*5} 5ml
- ・密封加熱 (湯浴上, 70℃× 1時間)
- ・放冷
- ・定容 25ml (アセトニトリル/水 (8/2 V/V))

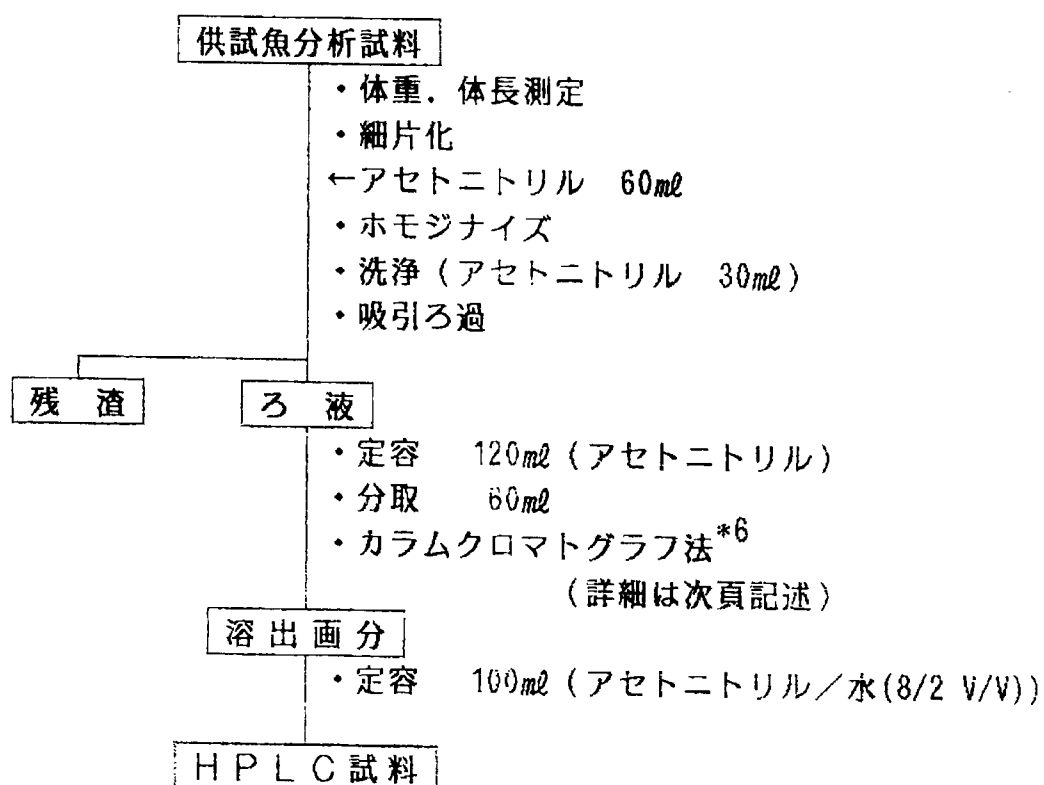
HPLC 試料

*5 2g/l ダブシルクロライド アセトニトリル溶液

8.2.2 供試魚分析試料の前処理

試験水槽より供試魚を採取し、以下のフローシートに従って前処理操作を行った。なお、前処理操作中の試料の分取比は1/2 とし、100 mlに定容してHPLC試料とした。

フローシート



*6 カラムクロマトグラフの条件

クロマト管 20 mmφ, ガラス製
充てん剤 5%含水塩基性アルミナ 10g (ウェルム社製)
(水/アセトニトリル(8/2 V/V) で充てん)

分画法 第1画分 : アセトニトリル/水(8/2 V/V) 40 ml

被験物質は第1画分に溶出する。

8.3 分析試料の定量

8.2の前処理を行って得られたHPLC試料は、次の条件により高速液体クロマトグラフ法により定量を行った。被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質のピーク高さを既知濃度の標準溶液^{*1}のピーク高さと比較し、比例計算により求めた。(図-6, 表-4, 5及び図-10, 11, 表-8, 9参照)

[定量条件]

装置 高速液体クロマトグラフ
ポンプ 島津製作所製 型 LC-5A
検出器 日本分光工業製 型 UVIDE-100-II

水分析

カラム 0.1 m×6 mmφ, ステンレス製
固定相 ERC-ODS-1262
溶離液 アセトニトリル/水(65/35 V/V)
測定波長 435 nm (図-19参照)

魚分析

カラム 0.1 m×6 mmφ, ステンレス製
固定相 ERC-C₂-1161
溶離液 アセトニトリル/水 (1/1 V/V)
(0.005M ペンタンスルホン酸ナトリウム含有)
測定波長 290 nm (図-17参照)

*7 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。

(水分析第1濃度区)

被験物質0.1 gを精秤し、20倍量のDMSOに溶解した後、脱塩水を加えて1000 µg/mlの標準溶液とし、さらにこれを飼育水で希釈して2 µg/mlの標準溶液を調製し、これを10 ml分取しダブシル化反応を行い放冷し、25 mlに定容したものを水分析第1濃度区の標準溶液とした。

(水分析第2濃度区)

被験物質0.1 gを精秤し、20倍量のDMSOに溶解した後、脱塩水を加えて1000 µg/mlの標準溶液とし、さらにこれを飼育水で希釈して10 µg/mlの標準溶液を調製し、これを4 ml分取し飼育水196 mlを加えて、ロータリーエバポレーターで濃縮し20 mlに定容し、そのうち10 mlを分取してダブシル化反応を行い放冷し、25 mlに定容したものを水分析第2濃度区の標準溶液とした。

(魚分析)

被験物質0.1 gを精秤し、アセトニトリル/水(8/2 V/V)に溶解して1000 µg/mlの標準溶液とし、さらにこれをアセトニトリル/水(8/2 V/V)で希釈して1.5 µg/mlの標準溶液を調製した。

8.4 定量性の確認

(水分析)

8.3の標準溶液調製法と同様にして、反応ブランク液、 $0.4\ \mu\text{g/ml}$ 、 $0.8\ \mu\text{g/ml}$ 及び $1.6\ \mu\text{g/ml}$ の標準溶液を調製し、これらを8.3の定量条件に従ってHPLCに注入し、得られたそれぞれのクロマトグラム上の被験物質ピーク高さとそれぞれの濃度より検量線を作成した。第1濃度区水分析用検量線は原点を通る直線であることから定量性が良好であることが確認された。第2濃度区水分析用検量線は反応ブランクがあるため原点を通らないが、直線関係を示したため、定量性が良好であることが確認された。

また、検量線より被験物質ピーク高さの測定限界は $2\ \text{mm}$ （被験物質濃度 第1濃度区 $0.027\ \mu\text{g/ml}$ 、第2濃度区 $0.033\ \mu\text{g/ml}$ ）とした。（図-4参照）

(魚分析)

8.3の標準溶液調製法と同様にして $0.75\ \mu\text{g/ml}$ 、 $1.5\ \mu\text{g/ml}$ 及び $3\ \mu\text{g/ml}$ の標準溶液を調製し、これらを8.3の定量条件に従ってHPLCに注入し、得られたそれぞれのクロマトグラム上の被験物質ピーク高さとそれぞれの濃度より検量線を作成した。検量線は原点を通る直線であったことから定量性が良好であることが確認された。

また、検量線より被験物質ピーク高さの測定限界は $2\ \text{mm}$ （被験物質濃度 $0.038\ \mu\text{g/ml}$ ）とした。（図-8参照）

8.5 回収試験及びブランク試験

前述した試験水及び供試魚分析における被験物質の回収率を求めるため、飼育水及び魚体ホモジネートに被験物質分散液を添加し 8.2及び 8.3の操作に準じて添加回収試験を行った。また、被験物質を加えない飼育水及び魚体ホモジネートについて、添加回収試験の場合と同じ操作によりブランク試験を行った。添加回収試験及びブランク試験は、2点について並行測定した。この結果、第1濃度区水回収試験においてはブランクピークは認められず、このため回収率は添加回収試験で得られた2点の平均値とした。第2濃度区水回収試験ではブランクピーク（反応ブランクピーク）が認められたため、回収率は、添加回収試験で得られたピーク高さから反応ブランクピークの高さを差し引いた値を用いて算出した2点の平均値とした。また、魚回収試験ではブランク試験においてブランクピークは認められなかったため、回収率は添加回収試験で得られた2点の平均値とした。（図-5，9，表-3，7参照）。各分析操作における回収率は次のとおりであり、分析試料中の被験物質濃度を求める場合の補正值とした。

[各分析操作における回収率]

試験水分析

第1濃度区 : 93.6% (被験物質20 μ g添加)

第2濃度区 : 95.0% (被験物質40 μ g添加)

供試魚分析 : 79.2% (被験物質300 μ g添加)

8.6 分析試料中の被験物質濃度の算出及び検出限界

8.6.1 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

試験水分析試料中の被験物質濃度は、表-6の計算式に従って計算した。

8.6.2 試験水中の被験物質の検出限界

8.3の定量条件において測定限界となる被験物質濃度(8.4参照)から、前処理操作での回収率を考慮すると、試験水中の被験物質検出限界濃度はそれぞれ、

第1濃度区 : 72 $\mu\text{g}/\text{l}$

第2濃度区 : 8.7 $\mu\text{g}/\text{l}$

と算出される。

8.6.3 供試魚分析試料中の被験物質濃度の算出

供試魚分析試料中の被験物質濃度は、表-10の計算式に従って計算した。

8.6.4 供試魚中の被験物質の検出限界

8.3の定量条件において測定限界となる被験物質濃度(8.4参照)から、前処理操作での回収率を考慮すると、供試魚中の被験物質検出限界濃度は魚体重を30gとしたとき0.32 $\mu\text{g}/\text{g}$ と算出される。

9. 濃縮倍率の算出

濃縮倍率（BCF）は、次式により算出した。

$$BCF = \frac{C_{fn} - C_{fb}}{C_{wn}}$$

C_{fn} : n週目に採取した供試魚分析試料中の被験物質濃度 ($\mu g/g$)

C_{wn} : n週目まで行った試験水分析による実測濃度の平均値 (平均水槽濃度) (mg/l)

C_{fb} : 空試験における魚体中の被験物質濃度 ($\mu g/g$)

なお、8.6.4で求めた供試魚中の検出限界を濃縮倍率で表わすと次のようになる。

第1濃度区 : 0.2倍

第2濃度区 : 1.6倍

10. 試験結果

10.1 試験水槽中の被験物質濃度

試験水槽中の被験物質濃度を表-1に示す。

表-1 試験水中の被験物質濃度（実測値）（単位： mg/l ）

	2 W	3 W	4 W	6 W	付 表
第1濃度区	1.89	1.93	1.94	1.98	表-4
第2濃度区	0.193	0.192	0.191	0.194	表-5

10.2 濃縮倍率

濃縮倍率を表－2に示す。

表－2 濃 縮 倍 率

	2 W	3 W	4 W	6 W	付 表	付 図
第1濃度区	2.3 1.3	1.9 1.6	4.6 2.8	1.3 2.2	表－8	図－10
第2濃度区	1.6以下 1.6以下	1.6以下 1.6以下	7.5 24	6.1 18	表－9	図－11

また、表－2の濃縮倍率と飼育期間の関係を図－2，3に示した。被験物質のコイに対する濃縮性の程度は、濃縮倍率で第1濃度区において1.3倍～4.6倍、第2濃度区において1.6倍以下～24倍であった。なお、供試魚は外観観察の結果、異状は認められなかった。

11. 備 考

第2濃度区試験水槽濃度の算出について

第2濃度区水分析において反応ブランクがあるため、反応ブランクのピーク高さを標準溶液及び水分析試料のそれぞれのピーク高さから差し引き、この値を真のピーク高さとして比例計算を行って水槽濃度を算出した。

以 上