

試 験 報 告 書

4-*tert*-ペンチルフェノール

被験物質情報
分解度試験
濃縮度試験

一般財団法人化学物質評価研究機構
久留米事業所

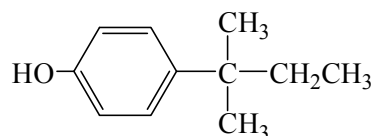
4-*tert*-ペンチルフェノールの被験物質情報

a) 名称等

名 称	4- <i>tert</i> -ペンチルフェノール
被験物質番号	K-2058
CAS 番号	80-46-6

b) 構造式等

構造式



分子式	C ₁₁ H ₁₆ O
分子量	164.24

c) 供試試料

被験物質純度	99.7% (GC)
不純物	残り 0.3%については不明
被験物質は純度 100%として取り扱った。	

d) 物理化学的性状

対水溶解度	168 mg/L (25°C) *1
-------	--------------------

*1 Yalkowsky et al. (2010) Handbook of Aqueous Solubility Data second edition

e) 保管条件

冷暗所保管した。

f) 被験物質の同一性及び保管条件下における安定性の確認

当試験施設において被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、独立行政法人産業技術総合研究所の有機化合物スペクトルデータベースに記載のスペクトルと一致することを確認した。また、実験開始前及び終了後の赤外吸収スペクトルを比較することにより、保管条件下における被験物質の安定性を確認した。

g) 取扱い上の注意

手袋、マスク、保護めがね及び白衣を着用し、皮膚、目への接触及び吸入を避けた。

4-*tert*-ペンチルフェノールの分解度試験

要 約

試験法

「新規化学物質等に係る試験の方法について」（平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号；一部改正 平成 24 年 4 月 2 日、薬食発 0402 第 1 号、平成 24・03・28 製局第 2 号、環保企発第 120402001 号）に定める「微生物等による化学物質の分解度試験」

GLP 基準

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」（平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号）に定める「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」

試験条件

被験物質濃度	100 mg/L
活性汚泥濃度	30 mg/L (懸濁物質濃度として)
試験液量	300 mL
試験液培養温度	25±1℃
試験液培養期間	28 日間 (遮光下)

分解度算出のための測定及び分析

- 閉鎖系酸素消費量測定装置による生物化学的酸素消費量 (BOD) の測定
- 全有機炭素分析法 (TOC) による溶存有機炭素 (DOC) の定量分析
- 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による被験物質の定量分析

試験結果

		(汚泥+被験物質) 系			
		[2]	[3]	[4]	平 均
BOD 分解度	%	-2	-4	-4	0 (-3) ^{*1}
DOC 分解度	%	-3	-2	-3	0 (-3) ^{*1}
被験物質分解度 (HPLC)	%	-1	1	0	0

*1 分解度の平均値が負の値に算出されたため、平均値を 0 としカッコ内にその計算値を示した。

結 論

本試験条件下において、被験物質は生分解されなかった。

1. 試験材料

1.1 対照物質

名 称	アニリン
CAS 番号	62-53-3

1.2 活性汚泥

試験法に従い、日本国内の 10 か所から汚泥（河川、湖沼及び内海の表土を含む表層水、下水処理場の返送汚泥）を採集し、当試験施設において調製及び管理を行った活性汚泥（採集時期：2012 年 11 月、使用開始日：2012 年 12 月 20 日）を使用した。試験には合成下水（グルコース、ペプトン、りん酸二水素カリウムを精製水に溶解し、pH を 7.0±1.0 に調整）を添加して 19 時間後の活性汚泥を用いた。

2. 分解度試験の実施

2.1 試験の準備

a) 活性汚泥添加量の決定

下記方法により測定した活性汚泥中の懸濁物質濃度に基づき、試験容器への活性汚泥の添加量を 3.23 mL とした。

測定方法	JIS K 0102-2008 の 14.1 準拠
測定実施日	2012 年 12 月 17 日
測定結果	2790 mg/L

b) 基礎培養基の調製

JIS K 0102-2008 の 21.に定められた組成の A、B、C 及び D 液各 3 mL に精製水（高杉製薬 日本薬局方）を加えて 1 L とする割合で 5 L 調製し、pH を 7.0 に調整した。

c) 活性汚泥の有効性の確認

アニリンを用いて活性汚泥が十分な活性度を有することを確認した。

2.2 試験液の調製

試験容器を 6 個用意し、試験液を下記の方法で調製した。これらの試験液について、2.3 の条件で培養を行った。

a) 被験物質及びアニリンの添加

1) （水+被験物質）系（1 個，試験容器 [1]）

被験物質濃度が 100 mg/L になるように、試験容器に精製水 300 mL 及び供試試料 30 mg を入れた。供試試料は電子分析天びんで正確にはかりとり添加した。

2) （汚泥+被験物質）系（3 個，試験容器 [2] [3] [4]）

被験物質濃度が 100 mg/L になるように、試験容器に基礎培養基 [300 mL から活性汚泥添加量 (3.23 mL) を差し引いた量] 及び供試試料 30 mg を入れた。供試試料は電子分析天びんで正確にはかりとり添加した。

3) （汚泥+アニリン）系（1 個，試験容器 [6]）

アニリンの濃度が 100 mg/L になるように、試験容器に基礎培養基 [300 mL から活性汚泥添加量 (3.23 mL) を差し引いた量] 及びアニリン 29.5 μ L (30 mg) を入れた。アニリンはマイクロシリンジで分取して添加した。

4) 汚泥ブランク系 (1 個, 試験容器 [5])

試験容器に基礎培養基 [300 mL から活性汚泥添加量 (3.23 mL) を差し引いた量] を入れた。

b) 活性汚泥の接種

2)、3)及び4)の試験液に懸濁物質濃度として 30 mg/L になるように活性汚泥を添加した。

2.3 試験液培養装置及び培養条件

a) 試験液培養装置

閉鎖系酸素消費量測定装置

恒温槽 (測定ユニットを含む) AI-0001 (旭テクネイオン)

データ処理装置 OM7000A (大倉電気)

試験容器 ガラス製培養瓶

炭酸ガス吸収剤 ソーダライム, No.1 (和光純薬工業 二酸化炭素吸収用)

b) 培養条件

温 度 25±1℃

期 間 28 日間 (遮光下)

攪拌方法 スターラーによる回転攪拌

c) 実施場所

機器室 1A

2.4 観察、測定等

a) 観 察

培養期間中、試験液の状況を毎日目視観察した。

b) 生物化学的酸素消費量 (BOD) の測定

培養期間中、試験液の BOD を連続的に閉鎖系酸素消費量測定装置で測定した。また、閉鎖系酸素消費量測定装置の恒温槽内の温度を毎日記録した。

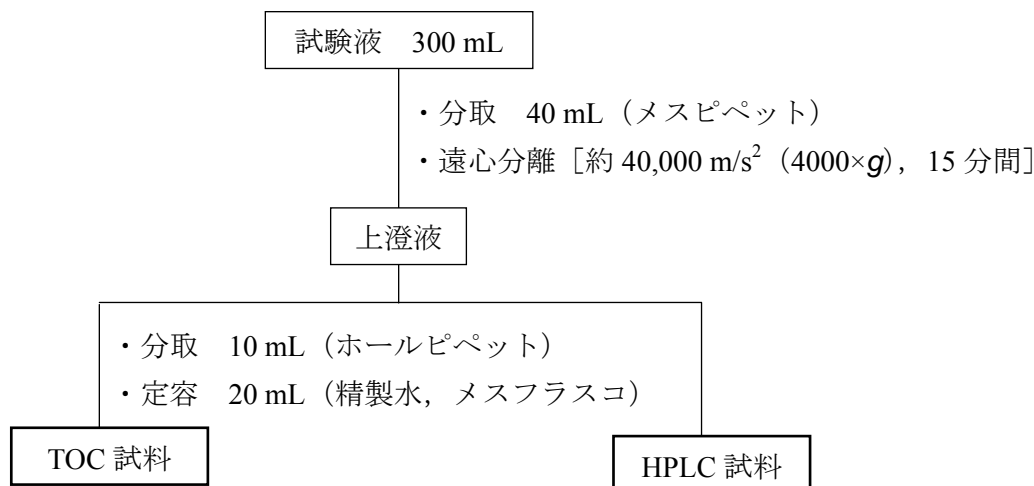
2.5 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中の溶存有機炭素 (DOC) 及び被験物質について分析した。また、(水+被験物質) 系及び (汚泥+被験物質) 系の試験液の pH を測定した。

2.5.1 試験液の前処理

(水+被験物質)系、(汚泥+被験物質)系及び汚泥ブランク系の試験液について以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、DOC を分析するための全有機炭素分析法 (TOC) 試料並びに被験物質を分析するための高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 試料を調製した。

フロースキーム



2.5.2 定量分析

a) DOC の定量分析

TOC 試料中の DOC 濃度は、全炭素 (TC) 濃度から無機炭素 (IC) 濃度を差し引いて求めた。TC 濃度及び IC 濃度は TC 標準溶液 80.0 mgC/L 及び IC 標準溶液 40.0 mgC/L と TOC 試料のピーク面積を比較し、比例計算して求めた。なお、TC 標準溶液はフタル酸水素カリウムを精製水に溶解し、IC 標準溶液は炭酸水素ナトリウム及び炭酸ナトリウムを精製水に溶解して調製した。

定量下限濃度は DOC 濃度 1.0 mgC/L とした。

分析条件

機 器	全有機体炭素計 TOC-LCPH (島津製作所)
TC 炉温度	680℃
流 量	150 mL/min
注入量	50 µL

b) 被験物質の定量分析

被験物質の定量分析は、HPLC で行った。

1) 定量方法

被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。

本定量方法の有効性を確認するため、25.0、50.0 及び 100 mg/L の 3 濃度の標準溶液を用いて検量線を作成した。その結果、得られた回帰式が原点を通る直線であったことから有効性が確認された。

2) 分析条件

機 器

高速液体クロマトグラフ

LC-2010A (紫外可視分光検出器内蔵)

(島津製作所)

カラム

L-column2 ODS

(150 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 5 μm, 化学物質評価研究機構)

カラム温度

40℃

溶離液

A (75%) : メタノール

B (25%) : 超純水

流 量

0.2 mL/min

測定波長

221 nm

注入量

3 μL

3) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 100 mg を電子分析天びんで正確にはかりとり、メタノールに溶解して 10000 mg/L の被験物質溶液を調製した。これを精製水で希釈して 100 mg/L の標準溶液とした。

HPLC 試料中の被験物質の濃度は、100 mg/L の標準溶液及び HPLC 試料のクロマトグラム上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して 15000 μAU・sec (被験物質濃度 0.75 mg/L) とした。

2.5.3 回収試験

被験物質の対水溶解度は 100 mg/L 以上であり、試験液中では溶解状態で存在するため、回収試験は実施しなかった。

2.6 分解度の算出法

分解度は下記の式に基づき算出し、小数点以下 1 ケタ目を丸めて整数位で表示した。

a) BOD 分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}} \times 100$$

BOD : (汚泥+被験物質) 系の生物化学的酸素消費量 (測定値 : mg)

B : 汚泥ブランク系の生物化学的酸素消費量 (測定値 : mg)

TOD : 被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる理論的酸素消費量
(計算値 : mg)

b) DOC 分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{DOCw} - \text{DOCs}}{\text{DOCw}} \times 100$$

DOCs : (汚泥+被験物質) 系における溶存有機炭素の残留量 (測定値 : mgC)

DOCw : (水+被験物質) 系における溶存有機炭素の残留量 (測定値 : mgC)

c) 被験物質分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{S_w - S_s}{S_w} \times 100$$

S_s : (汚泥+被験物質)系における被験物質の残留量 (測定値 : mg)

S_w : (水+被験物質)系における被験物質の残留量 (測定値 : mg)

2.7 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則 B に従った。また、各元素の原子量は日本化学会が定める 4 桁の原子量表 (2012) に従った。

3. 試験条件の確認

試験の有効性の基準値と本試験における値を下表に示す。本試験における値はいずれも基準値を満たしたことから、本試験は有効であった。なお、アニリンの BOD 分解度の算出において、窒素の形態をアンモニアとした。

		本試験における値	基準値
分解度の最大値と最小値の差	BOD 分解度	2%	<20%
	DOC 分解度	1%	
	被 験 物 質 分 解 度	2%	
ア ニ リ ン の BOD 分解度	7 日 後	52%	>40%
	14 日 後	89%	>65%

4. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

当該要因はなかった。

5. 試験結果及び考察

5.1 試験液の状況

試験液の状況は下表のとおりであった。

	試験液	状況 (目視確認)	pH
培養開始時	(水 + 被験物質) 系	被験物質は溶解しなかった。 試験液は無色であった。	-
	(汚泥+被験物質) 系	被験物質は溶解しなかった。 試験液は無色であった。	-
培養終了時	(水 + 被験物質) 系	不溶物は認められなかった。 試験液は無色であった。	[1] 6.5
	(汚泥+被験物質) 系	汚泥以外の不溶物は認められなかった。 汚泥の増殖は認められなかった。 試験液は無色であった。	[2] 7.2 [3] 7.2 [4] 7.2

5.2 試験液の分析結果

28 日後の分析結果は下表のとおりであった。

		(水+被験物質)系	(汚泥+被験物質)系				理論量
		[1]	[2]	[3]	[4]		
BOD*2	mg	2.0	-2.1	-3.5	-3.5	84.9	
DOC 残留量及び 残留率	mgC	23.7	24.5	24.1	24.4	24.1	
	%	98	102	100	101	-	
被験物質残留量 及び残留率 (HPLC)	mg	29.0	29.2	28.6	29.0	30.0	
	%	97	97	95	97	-	

*2 (汚泥+被験物質) 系は、汚泥ブランク系の値を差し引いて表示した。

5.3 分解度

28 日後の分解度は下表のとおりであった。

		(汚泥+被験物質) 系			
		[2]	[3]	[4]	平均
BOD 分解度	%	-2	-4	-4	0 (-3) ^{*3}
DOC 分解度	%	-3	-2	-3	0 (-3) ^{*3}
被験物質分解度 (HPLC)	%	-1	1	0	0

*3 分解度の平均値が負の値に算出されたため、平均値を 0 としカッコ内にその計算値を示した。

5.4 考 察

BOD 分解度、DOC 分解度及び被験物質分解度の平均値はいずれも 0%であった。また、被験物質の定量分析で得られた HPLC クロマトグラムにおいて、変化物に相当するピークは認められなかった。以上のことから、本試験条件下において、被験物質は生分解されずに残留したと考えられる。

6. 結 論

本試験条件下において、被験物質は生分解されなかった。

4-*tert*-ペンチルフェノールの濃縮度試験

要 約

試験法

「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 7 号、平成 23・03・29 製局第 5 号、環保企発第 110331009 号；一部改正 平成 24 年 4 月 2 日、薬食発 0402 第 1 号、平成 24・03・28 製局第 2 号、環保企発第 120402001 号) に定める「魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験」

GLP 基準

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 23 年 3 月 31 日、薬食発 0331 第 8 号、平成 23・03・29 製局第 6 号、環保企発第 110331010 号) に定める「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」

試験条件

a) 急性毒性試験

供試魚 ヒメダカ
 ばく露期間 96 時間
 ばく露方法 半止水式（24 時間ごとに換水）

b) 濃縮度試験

供試魚 コイ
 試験濃度 第 1 濃度区 10 µg/L
 第 2 濃度区 1 µg/L
 ばく露期間 28 日間
 ばく露方法 連続流水式
 分析方法 液体クロマトグラフィーー質量分析法

試験結果

a) 急性毒性試験

96 時間 LC₅₀ 値 2.81 mg/L

b) 濃縮度試験

	濃縮倍率	定常状態における濃縮倍率
第 1 濃度区	31～49 倍	36 倍
第 2 濃度区	71 倍未満	-

-: 定常状態における濃縮倍率が求められなかったことを示す。

1. 試験材料

1.1 分散剤

急性毒性試験及び濃縮度試験の原液調製に下記の分散剤を使用した。

1.1.1 HCO-40

商品名 NIKKOL HCO-40

CAS 番号 61788-85-0

1.1.2 *N,N*-ジメチルホルムアミド

商品名 *N,N*-ジメチルホルムアミド

CAS 番号 68-12-2

1.2 供試魚

a) 急性毒性試験

魚 種 ヒメダカ *Oryzias latipes*

選択理由 コイと感受性が類似しており、供試魚として入手し易いため

供給源 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

ロット TFO-120801

体 重 0.21～0.24 g

全 長 3.0～3.1 cm

b) 濃縮度試験

魚 種 コイ *Cyprinus carpio*

選択理由 過去の知見との整合性を考慮するため及び大きさが扱いやすいため

供給源 一般財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

じゅん化条件 水産用 OTC（塩酸オキシテトラサイクリン 共立製薬）及び塩化ナトリウム（塩事業センター）を用いて薬浴した後に、以下の条件でじゅん化した。

期 間 40 日間

水 温 25±2℃未満

じゅん化期間中の全体の死亡率は 5%未満であった。

ロット TFC-121030

全 長 6.1～8.8 cm（実験開始時 6.1～6.5 cm）

年 齢 当歳魚

餌 料 種 類 こい稚魚育成用配合飼料

組 成 たん白質含量 43.0%以上

脂質含量 3.0%以上

製造元 日本配合飼料

給餌方法 供試魚体重の約 3%相当量を 1 日 2 回（休日は 1 回にまとめた）に分けて給餌した。ただし、供試魚の採取前 24 時間は給餌を止めた。

2. 急性毒性試験の実施

2.1 試験方法

JIS K 0102-2010 の 71.の方法に準じて行った。

2.2 感受性試験

同一ロットの供試魚による基準物質ペンタクロロフェノールナトリウム [PCP-Na CAS 番号 131-52-2 東京化成工業 ロット番号 GE01] の 48 時間 LC₅₀ 値は 0.660 mg/L であった。

2.3 試験用水

a) 種類

久留米事業所敷地内で揚水した地下水

b) 水質確認

試験用水は、測定した 41 項目のうち、アルカリ度及び電気伝導度を除く 39 項目について、以下に示す基準のいずれかに適合していることを確認した。

- ① 「水道法に基づく水質基準」(平成 15 年 5 月 30 日改正 厚生労働省令第 101 号)
- ② OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.210, July 17, 1992, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test"
- ③ 「水産用水基準」(社団法人日本水産資源保護協会 昭和 58 年 3 月)
- ④ 「水質汚濁に係る環境基準」(平成 11 年 2 月 22 日改正 環境庁告示第 14 号)
- ⑤ OECD Guidelines for Testing of Chemicals, No.305, June 14, 1996, "Bioconcentration : Flow-through Fish Test"

2.4 原液調製法

供試試料 (800 mg) とその 5 倍量の HCO-40 (4.0 g) を *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解して、被験物質濃度として 20.0 g/L の原液を 40 mL 調製した。

2.5 試験条件

試験濃度	5.00 mg/L、2.50 mg/L、1.25 mg/L、0.625 mg/L、0.310 mg/L 及び対照区
試験水槽	円形ガラス製水槽
試験液量	4 L/濃度区
供試魚数	10 尾/濃度区
試験温度	ばく露開始時 24.2～24.3℃ 換水前 (1 回目) 24.5～24.7℃
溶存酸素濃度	ばく露開始時 8.0 mg/L 換水前 (1 回目) 7.7～7.8 mg/L
pH	ばく露開始時 8.1 換水前 (1 回目) 8.1～8.3
ばく露期間	96 時間
ばく露方法	半止水式 (24 時間ごとに換水)
ばっ気	連続してエアレーションを行った。
照光時間	16 時間明/8 時間暗 (白色蛍光灯による人工照明)

2.6 試験の実施

実施場所 アクアトロン室 B
 試験実施日 2013 年 1 月 7 日 ～ 2013 年 1 月 11 日

2.7 96 時間 LC₅₀ 値の算出

Doudoroff 法で行った。

2.8 試験結果

被験物質の 96 時間 LC₅₀ 値 2.81 mg/L
 対照区において、症状は認められなかった。

3. 濃縮度試験の実施

3.1 試験用水

2.3 に同じ。

3.2 試験及び環境条件

試験水供給方法	久留米事業所組立流水式装置	
試験水槽	70 L 容ガラス製水槽	
試験水流量	原液 0.02 mL/分及び試験用水 400 mL/分の割合で 576 L/日を 試験水槽に供した。	
原液タンク	500 mL 容ガラス製褐色びん 交換頻度 1 回/2 週	
試験温度	第 1 濃度区	23.4～24.9℃
	第 2 濃度区	23.6～24.9℃
	対照区	23.7～24.8℃
溶存酸素濃度	第 1 濃度区	7.4～7.9 mg/L
	第 2 濃度区	7.5～8.0 mg/L
	対照区	7.3～8.0 mg/L
pH	第 1 濃度区	7.9、8.0
	第 2 濃度区	7.8、7.9
	対照区	7.8、7.9
ばっ気	連続してエアレーションを行った。	
照光時間	14 時間明/10 時間暗（白色蛍光灯による人工照明）	
供試魚数	第 1 及び第 2 濃度区	28 尾（実験開始時）
	対照区	16 尾（実験開始時）
ばく露期間	28 日間	
	設定理由	28 日間で定常状態に達したため
実施場所	アクアトロン室 A	

3.3 原液調製法

a) 第1濃度区

供試試料 (400 mg) とその 5 倍量の HCO-40 (2.0 g) を *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解して、被験物質濃度として 20.0 g/L の被験物質溶液を 20 mL 調製した。これを 5 mL 分取し、*N,N*-ジメチルホルムアミドで希釈して被験物質濃度として 200 mg/L の原液を 500 mL 調製した。

b) 第2濃度区

第1濃度区で調製した 20.0 g/L の被験物質溶液を 0.5 mL 分取し、*N,N*-ジメチルホルムアミドで希釈して被験物質濃度として 20.0 mg/L の原液を 500 mL 調製した。

c) 対照区

HCO-40 (2.0 g) を *N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解し、HCO-40 濃度として 100 g/L の溶液を 20 mL 調製した。これを 5 mL 分取し、*N,N*-ジメチルホルムアミドで希釈して HCO-40 濃度として 1.0 g/L の原液を 500 mL 調製した。

3.4 試験濃度

各濃度区は以下の被験物質濃度とした。同時に、対照区を設定した。

第1濃度区 10 µg/L

第2濃度区 1 µg/L

3.5 観察、測定及び清掃

各項目については、下記のとおり観察及び測定結果を記録した。さらに、コイの排泄物等を1日に1回程度除去した。

項目	頻度
供試魚の観察	実験期間中に1日2回観察した。ただし、休日は1回とした。
試験温度	実験期間中に毎日測定した。
試験水流量	実験期間中に1日1回測定した。
溶存酸素濃度	実験期間中に週1回測定した。
pH	実験期間中に2回測定した。

3.6 試験水及び供試魚の分析

試験水及び供試魚中の被験物質分析は液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) により行った。

3.6.1 分析回数

a) 試験水

試験水分析は第1及び第2濃度区ともばく露期間中、最初の供試魚分析までに1回及び供試魚分析と同時に行った。1回当たりの分析試料は1点とした。

b) 供試魚

供試魚分析は第1及び第2濃度区ともばく露期間中に5回行い、1回当たりの採取尾数は4尾とし、分析感度が十分得られないため2群 (2尾1群) に分けて行った。

最後の連続した3回の測定では、48時間以上の間隔となるように供試魚を採取し、最後の測定は28日後とした。

対照区は実験開始前及び実験終了後に行い、1回当たりの採取尾数は4尾とし、2群 (2尾1群) に分けて分析した。

3.6.2 分析試料の前処理法

a) 試験水中の被験物質

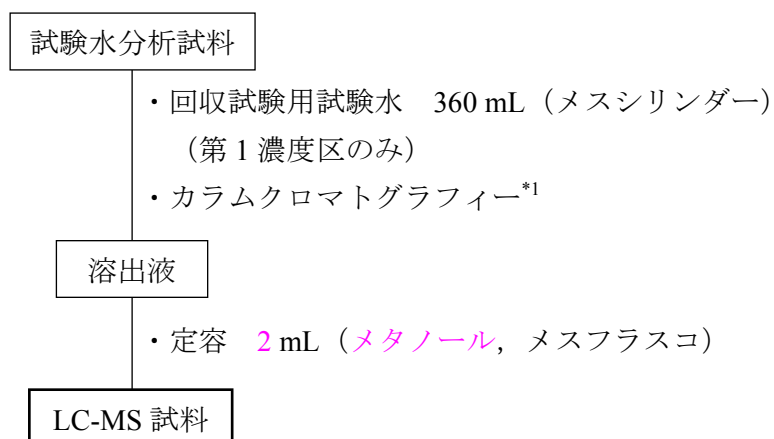
試験水槽から

第1濃度区 40 mL (メスシリンダー)

第2濃度区 400 mL (メスシリンダー)

を採取し、以下のフロースキームにより前処理操作を行い、LC-MS 試料とした。

フロースキーム



*1 カラムクロマトグラフの条件

Sep-Pak Plus C₁₈

(洗浄法: メタノール, イオン交換水 各約 10 mL)

負荷法 全量負荷した。

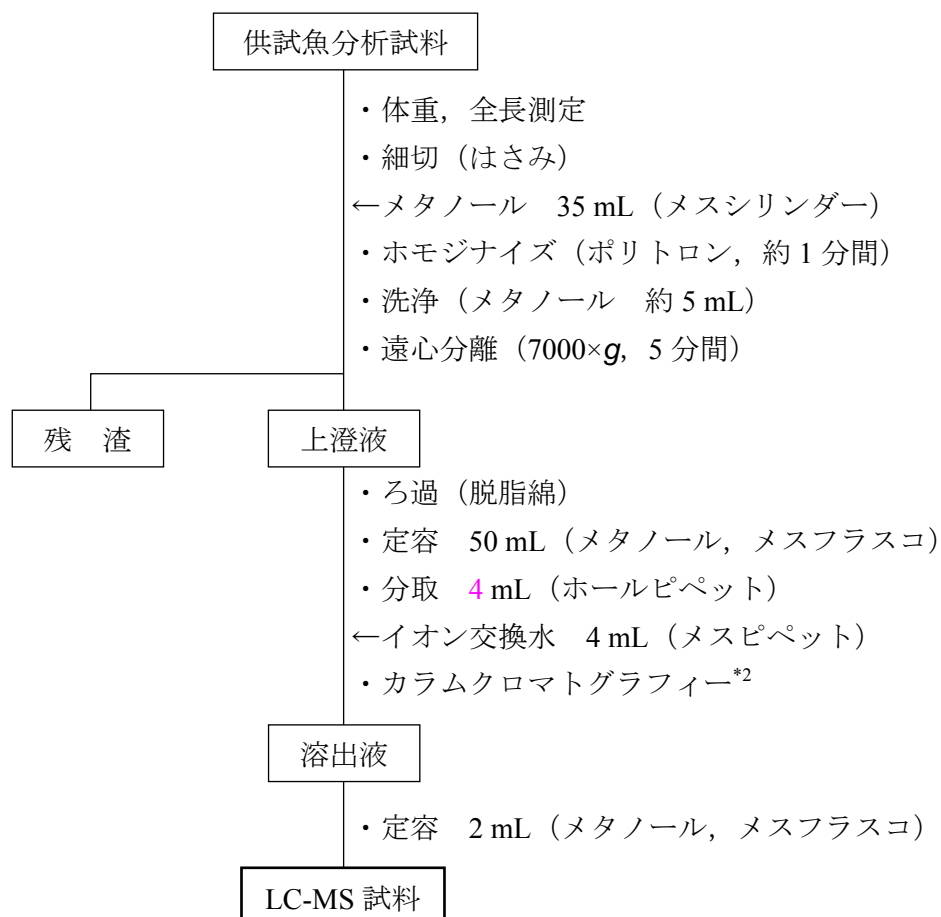
溶出法 溶出液 メタノール 1.8 mL

溶出液を分析に供した。

b) 供試魚中の被験物質

試験水槽から供試魚を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、LC-MS 試料とした。

フロースキーム



*2 カラムクロマトグラフの条件

Sep-Pak Plus C₁₈

[洗浄法: メタノール, メタノール/イオン交換水 (1/1 v/v) 各約 10 mL]

負 荷 法 全量負荷した。

溶 出 法 溶出液 メタノール 1.8 mL

溶出液を分析に供した。

3.6.3 被験物質の定量分析

a) 定量方法

被験物質の定量は 1 濃度の標準溶液を用いた絶対検量線法で行った。

本定量方法の有効性を確認するため、100、200 及び 400 µg/L の 3 濃度の標準溶液を用いて検量線を作成した。その結果、得られた回帰式が原点を通る直線であったことから有効性が確認された。

b) 分析条件

機 器	液体クロマトグラフィー質量分析計	
液体クロマトグラフ	ACQUITY UPLC	(Waters)
質量分析計	Quattro Premier XE	(Waters)

液体クロマトグラフ条件

カラム	ACQUITY UPLC BEH C18 (50 mm × 2.1 mm I.D., 粒子径 1.7 µm, Waters)
カラム温度	40°C
溶離液	A: 5 mmol/L 酢酸アンモニウム溶液 B: 25 mmol/L 酢酸アンモニウムのメタノール溶液/ アセトニトリル (1/4 v/v)

グラジエント条件

時間 (min)	A (%)	B (%)
0.0	90	10
4.0	2	98
6.0	2	98

流 量	0.25 mL/min
注入量	7 µL (Partial Loop With Needle Overfill)

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
検出イオン	負イオン
検出法	選択イオンモニタリング (SIM)
測定イオン	m/z 163.1
コーン電圧	30 V
イオン源温度	120°C
脱溶媒システム温度	350°C

c) 標準溶液の調製及び被験物質濃度の算出

供試試料 (100 mg) を電子分析天びんで正確にはかりとり、メタノールに溶解して 1000 mg/L の被験物質溶液を 100 mL 調製した。これをメタノールで希釈して 200 µg/L の標準溶液とした。

LC-MS 試料中の被験物質の濃度は、200 µg/L の標準溶液及び LC-MS 試料のクロマトグラム上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた。

定量下限値を求めるために、100 µg/L の標準溶液を 5 回測定し、ピーク面積値の標準偏差の約 10 倍の値を定量下限のピーク面積 90 (被験物質濃度 23 µg/L) とした。

3.6.4 回収試験

a) 方 法

3.6.2 の試験水及び供試魚分析操作における被験物質の回収率を求めるため、回収試験用試験水及び細切した魚（10 g）に被験物質原液を添加し、添加後速やかに前処理操作を行った。また、被験物質を加えない回収試験用試験水及び細切した魚について、回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。回収試験及びブランク試験は、各 2 点について測定した。

b) 結 果

a)の方法により測定した結果、ブランク試験においてクロマトグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。分析操作における各 2 点の回収率及び平均回収率は下記に示すとおりであり、平均回収率を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。

分析操作における回収率

試験水分析

被験物質添加量（400 ng）

= 第 2 濃度区設定濃度（1 µg/L）× 採水量（400 mL）

添加方法（2.00 mg/L の被験物質原液を 200 µL）

101%, 98.1% 平均 99.5%

供試魚分析

被験物質添加量（5000 ng）

= 第 2 濃度区設定濃度（1 µg/L）× 仮定した濃縮倍率（500 倍）× 魚体重（10 g）

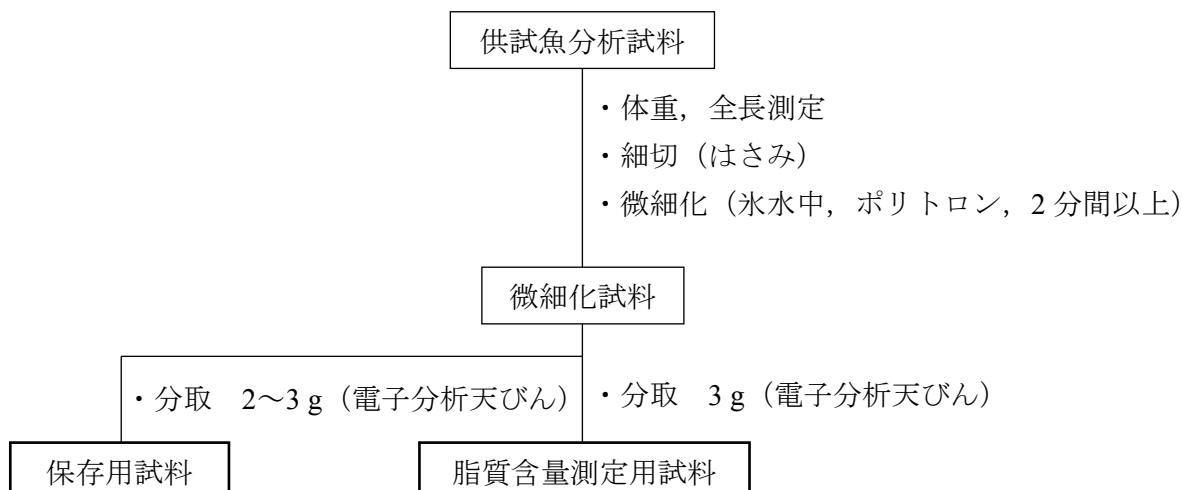
添加方法（50.0 mg/L の被験物質原液を 100 µL）

85.2%, 83.0% 平均 84.1%

3.6.5 供試魚中の脂質含量

実験終了後における供試魚の脂質含量が開始時の±25%以内であるか否かを確認するために、脂質含量の測定は、対照区の供試魚を用いて実験開始前及び実験終了後に行った。1 回当たりの採取尾数は 6 尾とし、3 群（2 尾 1 群）に分けて測定した。採取した供試魚は以下のフロースキームにより前処理操作を行い、脂質含量の測定用試料とした。これ以降は常法に従い、クロロホルム/メタノール抽出操作を行い、脂質含量を測定した。

フロースキーム



3.6.6 分析試料中の被験物質濃度の算出及び定量下限

a) 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

試験水中の被験物質濃度は以下の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字 3 ケタに丸めて表示した。

試験水中被験物質濃度の計算法

$$C_w = \left(\frac{P \times A(t) \times C}{A(\text{std}) \times B} \right) \times \frac{100}{E \times D}$$

C_w : 試験水中被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

P : 標準溶液の濃度 ($\mu\text{g/L}$)

$A(\text{std})$: 標準溶液の測定値

$A(t)$: 試料の測定値

B : 分取比

C : 最終液量 (mL)

D : 試験水採取量 (mL)

E : 回収率 (%)

b) 試験水中の被験物質定量下限濃度

3.6.3 c)で求めた被験物質の定量下限より、試験水中の定量下限濃度^{*3}はそれぞれ、

第 1 濃度区 1.1 $\mu\text{g/L}$

第 2 濃度区 0.11 $\mu\text{g/L}$

と算出される。

$$*3 \quad \text{被験物質定量下限濃度 } (\mu\text{g/L}) = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

A : 検量線上定量下限濃度 ($\mu\text{g/L}$)

B : 回収率 (%)

C : 試験水採取量 (mL)

D : 最終液量 (mL)

E : 分取比

計算結果は有効数字 2 ケタに丸めた。

c) 供試魚分析試料中の被験物質濃度の算出

供試魚中の被験物質濃度は以下の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字 3 ケタに丸めて表示した。

供試魚中被験物質濃度の計算法

$$C_f = \left[\frac{P \times A(t) \times C \times E}{A(\text{std}) \times B \times D} - FB \right] \times \frac{100}{F}$$

C_f : 供試魚中被験物質濃度 (ng/g)

P : 標準溶液の濃度 (μg/L)

$A(\text{std})$: 標準溶液の測定値

$A(t)$: 試料の測定値

B : 分取比

C : 最終液量 (mL)

D : 供試魚体重 (g)

E : 希釈倍率

F : 回収率 (%)

FB : 平均ブランク濃度^{*4} (ng/g)

*4 対照区における実験開始前及び終了後の供試魚中の被験物質又は被験物質の見掛け (ブランク) 濃度の平均値

d) 供試魚中の被験物質定量下限濃度

3.6.3 c)で求めた被験物質の定量下限より、供試魚中の定量下限濃度^{*5}は供試魚体重を 10 g としたとき 68 ng/g と算出される。

$$*5 \text{ 被験物質定量下限濃度 (ng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

A : 検量線上定量下限濃度 (μg/L)

B : 回収率 (%)

C : 供試魚体重 (g)

D : 最終液量 (mL)

E : 分取比

計算結果は有効数字 2 ケタに丸めた。

3.7 試験結果の算出法

3.7.1 ばく露期間における試験水の全平均被験物質濃度の算出法

$$\overline{C_{wt}} = \{C_{w(1)} + \cdots + C_{w(n)}\} / n$$

$\overline{C_{wt}}$: 試験水の全平均被験物質濃度 (μg/L)

n : 試験水分析の数 (測定回数)

$C_{w(1)}$: 1 回目の試験水中被験物質濃度 (μg/L)

$C_{w(n)}$: n 回目の試験水中被験物質濃度 (μg/L)

3.7.2 濃縮倍率（BCF）の算出法

濃縮倍率（BCF）は、以下の式に従って算出した。

a) 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度の算出

$$\overline{C_w} = \{C_w(n-1) + C_w(n)\} / 2 \quad (\text{供試魚分析 1 回目})$$

$$\overline{C_w} = \{C_w(n-2) + C_w(n-1) + C_w(n)\} / 3 \quad (\text{供試魚分析 2 回目以降})$$

$\overline{C_w}$: 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

$C_w(n)$: 供試魚分析と同時に求めた試験水分析 n 回目の被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

b) 濃縮倍率の算出

$$BCF = C_f / \overline{C_w}$$

BCF : 濃縮倍率

C_f : 供試魚中被験物質濃度（FB を差し引いた値）(ng/g)

$\overline{C_w}$: 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

FB : 対照区における実験開始前及び終了後の供試魚中の被験物質又は被験物質の見掛け（ブランク）濃度の平均値 (ng/g)

3.7.3 定常状態に達したことの確認方法

定常状態に達したことの判断は、48 時間以上の測定間隔で連続した 3 回の測定における濃縮倍率の変動が 20%以内とする。濃縮倍率が 100 倍未満の場合、濃縮倍率の変動が 20%を超えても 28 日後には定常状態に達しているとみなす。

定常状態に達したことの判定基準： $V(m-2), V(m-1), V(m) \leq 20$ (%)

$$V(m-2) = \frac{|BCF(m-2) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$$V(m-1) = \frac{|BCF(m-1) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$$V(m) = \frac{|BCF(m) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$V(m-2), V(m-1), V(m)$: 濃縮倍率の平均値からの乖離率 (%)

$BCF(m-2), BCF(m-1), BCF(m)$: m-2, m-1, m 回目における群数 n の濃縮倍率の平均値

\overline{BCF} : $\{BCF(m-2) + BCF(m-1) + BCF(m)\} / 3$

3.7.4 定常状態における濃縮倍率（BCFss）の算出法

定常状態における濃縮倍率（BCFss）は、次の式により算出した。

a) 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度の算出

$$\overline{C_{ws}} = \{C_w(n-2) + C_w(n-1) + C_w(n)\} / 3$$

$\overline{C_{ws}}$: 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度（原則として最後の供試魚分析までの 3 回の連続した試験水中の平均被験物質濃度）($\mu\text{g/L}$)

$C_w(n)$: 供試魚分析と同時に求めた試験水分析 n 回目の被験物質濃度 ($\mu\text{g/L}$)

b) 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度の算出

$$\overline{Cfs} = \{Cf(m-2) + Cf(m-1) + Cf(m)\} / 3$$

\overline{Cfs} : 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度 (ng/g)

$Cf(m)$: m 回目の供試魚中平均被験物質濃度 (FB を差し引いた値) (ng/g)

FB : 対照区における実験開始前及び終了後の供試魚中の被験物質は被験物質の見掛 (ブランク) 濃度の平均値 (ng/g)

c) 定常状態における濃縮倍率の算出

$$BCF_{ss} = \overline{Cfs} / \overline{Cws}$$

BCF_{ss} : 定常状態における濃縮倍率

\overline{Cfs} : 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度 (ng/g)

\overline{Cws} : 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中の平均被験物質濃度 (μg/L)

3.7.5 算出可能な濃縮倍率

3.6.6 d) で求めた供試魚中の被験物質定量下限濃度より、下記の倍率以上濃縮されたとき濃縮倍率の算出が可能となる。ただし、試験水中の被験物質濃度は Table-1 に示したすべての試験水分析における平均被験物質濃度を用いた。

第 1 濃度区 7.0 倍

第 2 濃度区 71 倍

3.7.6 脂質含量の算出法

脂質含量は次式により求めた。

$$\text{脂質含量 (\%)} = (T - T_0) / S \times 100$$

T_0 : 容器の質量 (g)

T : 容器を含む脂質重量のひょう量値 (g)

S : 供試魚微細化試料の分取量 (g)

3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則 B の方法に従った。また、計算処理に用いた数値は途中で丸めずに使用した。

試験水中の被験物質濃度及び供試魚中の被験物質濃度は有効数字 3 ケタに丸め、濃縮倍率は有効数字 2 ケタに丸めて表示した。

4. 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

当該要因はなかった。

5. 試験結果及び考察

5.1 試験水中の被験物質濃度

試験水中の被験物質濃度を Table-1 に示した。被験物質濃度は設定値の 92%以上が保持され、その変動は測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内に保たれた。

Table-1 試験水中の被験物質濃度 (単位 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	7 日後	10 日後	14 日後	20 日後	23 日後	28 日後	平均 (標準偏差)
1	9.57	9.61	9.66	9.33	9.80	9.88	9.64 (0.191)
2	1.00	0.967	0.944	0.922	0.969	0.945	0.958 (0.0277)

5.2 濃縮倍率

濃縮倍率を Table-2 に示した。ばく露期間中の濃縮倍率は第 1 濃度区において 31 倍～49 倍、第 2 濃度区において 71 倍未満であった。

Table-2 濃縮倍率 () 内は平均値

濃度区	10 日後	14 日後	20 日後	23 日後	28 日後
1	47	49	36	31	34
	40	49	43	33	39
	(43)	(49)	(40)	(32)	(37)
2	<71	<71	<71	<71	<71
	<71	<71	<71	<71	<71

5.3 定常状態における濃縮倍率

5.2 の結果から、第 2 濃度区については、最後の連続した 3 回の分析においてすべて不検出であったため、定常状態における濃縮倍率は算出しなかった。

一方、第 1 濃度区については、濃縮倍率の変動を Table-3 に示し、計算途中の数値とみなし、値を丸めずに 5 ケタの数値を用いて定常状態に達したかどうかを確認した。

Table-3 濃縮倍率の変動

濃度区		20 日後	23 日後	28 日後	3 回の平均
1	平均濃縮倍率	39.769	32.087	36.580	36.146
	3 回の平均からの乖離率 (%)	10.024	11.227	1.2028	

上記の結果から、20、23 及び 28 日後における濃縮倍率（平均）はその 3 回の分析における濃縮倍率の平均値に対して変動が 1～11%と 20%以内であったため、定常状態に達していると判断した。それらの結果を用いて、定常状態における濃縮倍率を算出した。

a) 定常状態における試験水中の被験物質濃度

定常状態における試験水中の平均被験物質濃度は Table-4 に示すように、設定値の 97% であった。

Table-4 定常状態における試験水中の被験物質濃度 (単位 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	20 日後	23 日後	28 日後	平均
1	9.33	9.80	9.88	9.67

b) 定常状態における濃縮倍率

定常状態における濃縮倍率は以下のとおりであった。

第 1 濃度区 36 倍

5.4 供試魚の脂質含量

供試魚中の平均脂質含量は以下のとおりであった。実験終了後の脂質含量 (平均値) の変動は、実験開始前に対して -20% であり $\pm 25\%$ 以内であった。

実験開始前 3.37%

実験終了後 2.71%

5.5 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

5.6 考 察

試験の有効性

本試験において、試験法に規定された試験の有効性を下記のとおり満たしており、被験物質の濃縮性を妥当に評価できると考えられる。

a) 試験温度の変動は、設定値 25°C の $\pm 2^{\circ}\text{C}$ 未満であった。

b) 溶存酸素濃度は、 25°C の飽和濃度 8.1 mg/L の 60% 以上であった。

c) 試験水中の被験物質濃度の変動は、実験期間中の測定値の平均に対して $\pm 20\%$ 以内であった。

d) 対照区及び試験区の供試魚において、死亡又は病気などの異常はみられなかった。