

試 験 報 告 書

p-ト-ブチル- α -メチルヒドロキシ酪酸
(p-ト-ブチル- α -メチルヒドロキシ酪アルデヒド
(被験物質No.K-387)の酸化物)
のコイによる濃縮度試験

昭和60年3月29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]
[REDACTED]

魚 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 : p-tert-ブチル- α -メチルヒドロキシ酪酸
(被験物質No.K-387の酸化物)

3. 試験方法及び条件

3.1 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

3.2 試験条件

試験濃度 : 第1濃度区 0.1 mg/l
 第2濃度区 0.01 mg/l
飼育期間 : 6週間
流水量 : 582l /日
分析方法 : ガスクロマトグラフ-質量分析法

4. 試験結果

濃縮倍率 第1濃度区 : 0.1倍以下～ 0.6倍
 第2濃度区 : 0.9倍以下～15 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	4～11
9. 濃縮倍率の算出	12
10. 試験結果	12～13
11. 備考	14～15
付表	
付図	

1. 試験の目的

p-トープチル- α -メチルハイドロケイ皮アルデヒド（被験物質No. K-387）は水中において酸化され、p-トープチル- α -メチルハイドロケイ皮酸となり、生分解されずに残留することが確認された（分解度試験報告書 昭和58年5月17日 No.A30987）。よって、既存化学物質の安全性確認の一環として p-トープチル- α -メチルハイドロケイ皮酸（K-387の酸化物）のコイによ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
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試験〉による。
49 基 局 第 3 9 2 号

3. 試験期間

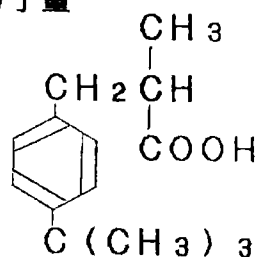
昭和59年4月19日～昭和60年3月19日
（飼育期間 昭和60年1月21日～昭和60年3月4日）

4. 被験物質

- 4.1 名 称 p-トープチル- α -メチルハイドロケイ皮酸
（被験物質No.K-387の酸化物）
純 度^{*1} 94.7%
合成法^{*1} 被験物質はp-トープチル- α -メチルハイドロケイ皮アルデヒドより合成した。

4.2 構造式，分子式，分子量

構造式



分子式 $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{O}_2$

分子量 220.31

4.3 スペクトル

赤外線吸収スペクトル	(図-12参照)
ガスクロマトグラフ-質量スペクトル	(図-13参照)
核磁気共鳴スペクトル	(図-14参照)

4.4 物理化学的性状

外 観	白色板状結晶	
融 点	106～108℃	
溶解性	水	: 約20mg/l (HPLCによる。)
	ジクロロメタン	: 1%以上
	テトラヒドロフラン(THF)	: 1%以上
	クロロホルム	: 1%以上
	アセトン	: 1%以上
	エタノール	: 1%以上
	N,N-ジメチルホルムアミド(DMF)	: 1%以上
	ジメチルスルホキシド(DMSO)	: 1%以上
	ジエチルエーテル	: 1%以上
	メタノール	: 1%以上
	n-ヘキサン	: 1g/l以上
	ベンゼン	: 1g/l以上
	酢酸エチル	: 1g/l以上
	アセトニトリル	: 1g/l以上

分配係数 (n-オクタノール/水)

$$\log P_{ow} = 3.39 \quad (\text{OECD法による。})$$

4.5 ヒメダカに対する48時間LC50値^{*2}

20mg/l以上 (図-1参照)

*1 11. 備考参照

*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、HCO-40 (ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油誘導体) 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 841204
平均体重 ^{*3}	20.9 g
平均体長 ^{*3}	9.1 cm
平均脂質含量 ^{*3}	4.0 %
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	: 6.5 ~ 7.1 mg/l (図-10 参照)
第 2 濃度区	: 6.7 ~ 7.5 mg/l (図-11 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 : 0.1 mg/l

第2濃度区 : 0.01 mg/l

7.2 原液調製法

被験物質0.3gを少量のアセトンに溶解し、40倍量のHCO-40に混ぜスターラーで撹拌した。イオン交換水約200mlを入れて水浴上でアセトンを留去し、さらにイオン交換水を加えて300mlに定容し、1000mg/lの分散液を調製した。

これをイオン交換水で希釈して

第1濃度区 : 10mg/l

第2濃度区 : 1mg/l

の各原液25ml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

被験物質を定量するに際しては被験物質本体を直接定量することが困難であったため、誘導体化（ジアゾメタンによるメチルエステル化）^{*4}を行って得られる物質を定量することにより被験物質本体の定量に代えた。なお、便宜上、濃度の表示はすべて被験物質本体の濃度で示した。

*4 ジアゾメタンはカルボン酸を非常に緩やかな条件でメチルエステル化する。これにより揮発性を増し、カルボキシル基による吸着を抑えることができる。



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、ガスクロマトグラフー質量分析（GC-MS）法により被験物質を定量分析した。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、採取後ただちに分析操作を行った。

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、ガスクロマトグラフー質量分析（GC-MS）法により被験物質を定量分析した。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

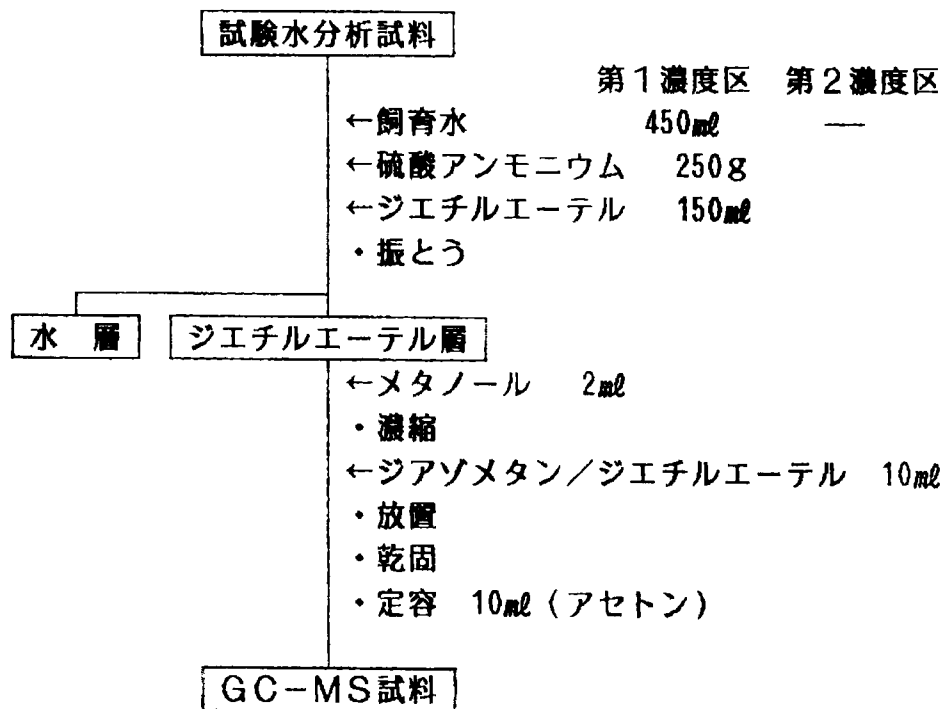
試験水槽より

第1濃度区 ： 50 ml

第2濃度区 ： 500 ml

を採取し、次頁のフローシートに従って前処理操作を行った。

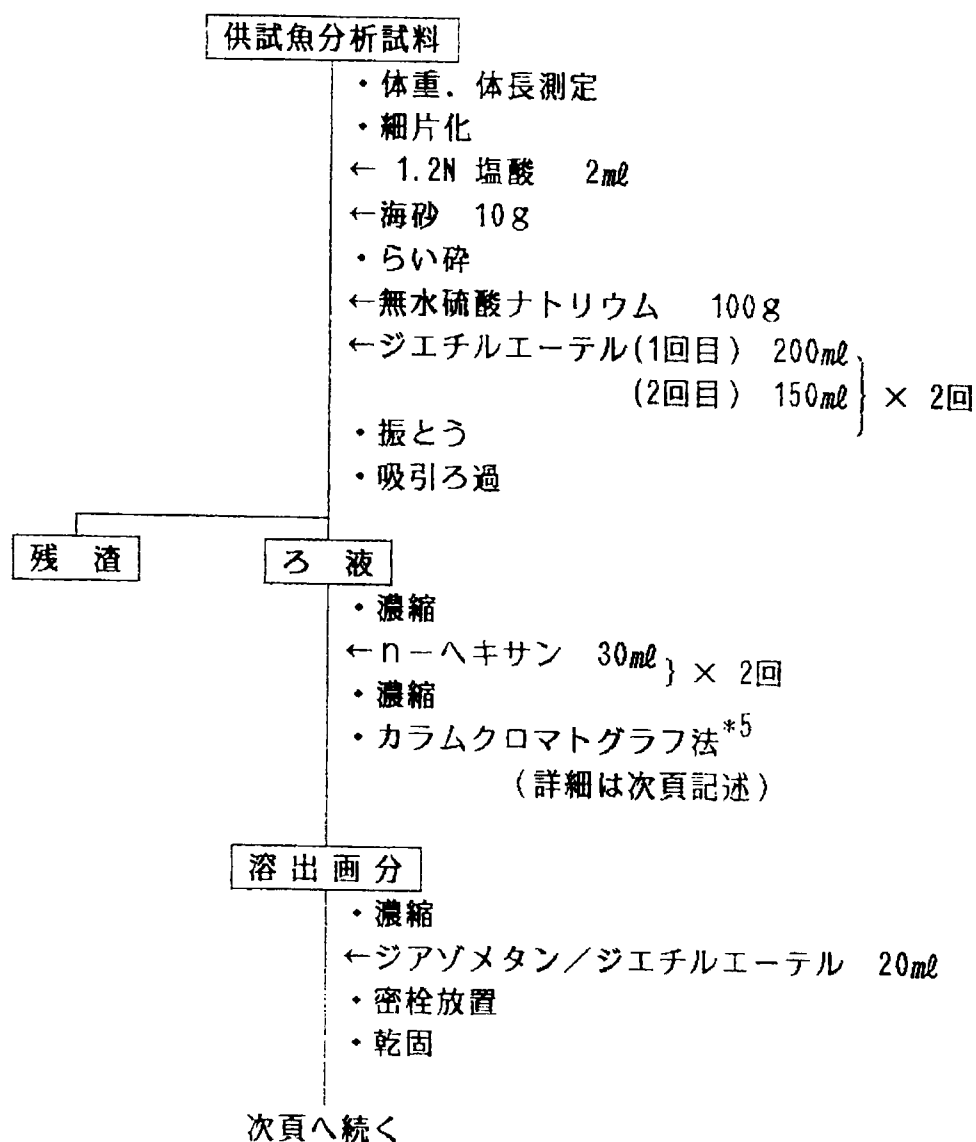
フローシート



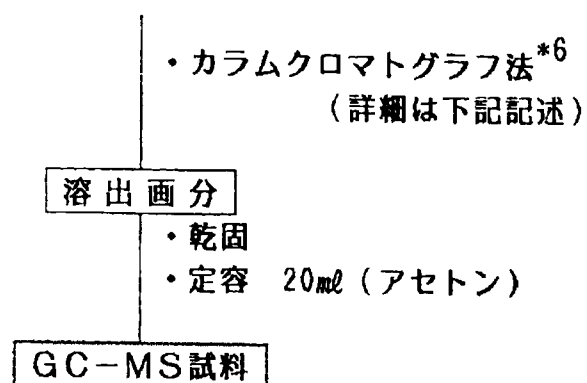
8.2.2 供試魚分析試料の前処理

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。

フローシート



前頁より続く



*5 カラムクロマトグラフの条件

クロマト管 20mmφ, ガラス製
充てん剤 5%含水シリカゲル 10g (和光純薬工業製)
(n-ヘキサンで充てん)

分画法	第1画分	:	n-ヘキサン	50ml
	第2画分	:	ベンゼン	50ml
	第3画分	:	クロロホルム	50ml
	第4画分	:	酢酸エチル	50ml

被験物質は第4画分に溶出する。

*6 カラムクロマトグラフの条件

クロマト管 20mmφ, ガラス製
充てん剤 5%含水シリカゲル 5g (和光純薬工業製)
(n-ヘキサンで充てん)

分画法	第1画分	:	n-ヘキサン	50ml
	第2画分	:	ベンゼン	50ml

被験物質は第2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GC-MS試料は、次の条件によりガスクロマトグラフィー質量分析法により定量を行った。被験物質濃度は、マスフラグメン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^{*7}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-8, 9, 表-8, 9参照)

[定量条件]

装 置

ガスクロマトグラフィー質量分析計

島津製作所製 型 GC-MS QP-1000

GC条件

カラム	1m×3mmφ, ガラス製
液相	5% サーモン3000
固定相	クロモソルブ W (HP)
キャリアガス	ヘリウム
流量	30ml/分
カラム温度	200℃
試料導入部温度	250℃
注入量	2μl

質量分析計条件

セパレーター温度	280℃
イオン化電圧	70eV
加速電圧	3kV
イオン源温度	250℃
測定 m/z	219

*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。

すなわち被験物質0.1gを精秤し、アセトンに溶解して1000μg/mlの溶液とし、さらにこれをアセトンで希釈して5μg/mlの溶液を調製した。これを1ml分取し、ジアソメタン/ジエチルエーテル5mlを加え、密栓して30分間室温にてメチルエステル化を行い、乾固後アセトンで10mlに定容したものを0.5μg/ml標準溶液とした。

8.4 定量性の確認

8.3の標準溶液調製法と同様にして0.25 $\mu\text{g/ml}$, 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 及び1 $\mu\text{g/ml}$ の標準溶液を調製し、これらを8.3の定量条件に従ってGC-MSに注入し、得られたそれぞれのマスフラグメン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50 (被験物質濃度0.012 $\mu\text{g/ml}$)とした。(図-4参照)

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、ブランク試験においてマスフラグメントグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められず、そこで回収率は添加回収試験で得られた2点の値の平均値とした(図-5, 7, 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 (被験物質 5 μg 添加)
98.4 %

供試魚分析 (被験物質 15 μg 添加)
92.8 %

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検出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 : 2.4 ng/ml

第2濃度区 : 0.24 ng/ml

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検出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8.6 ng/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（ $\mu\text{g/g}$ ）

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）（ $\mu\text{g/l}$ ）

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

なお、8.6.4で求めた供試魚中の被験物質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 : 0.1倍

第2濃度区 : 0.9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： $\mu\text{g/l}$ ）

	2 W	3 W	4 W	6 W	付 表
第1濃度区	96.0	96.5	94.8	92.4	表-4
第2濃度区	9.79	9.51	9.47	9.24	表-5

10.2 濃縮倍率

濃縮倍率を表－2に示す。

表－2 濃 縮 倍 率

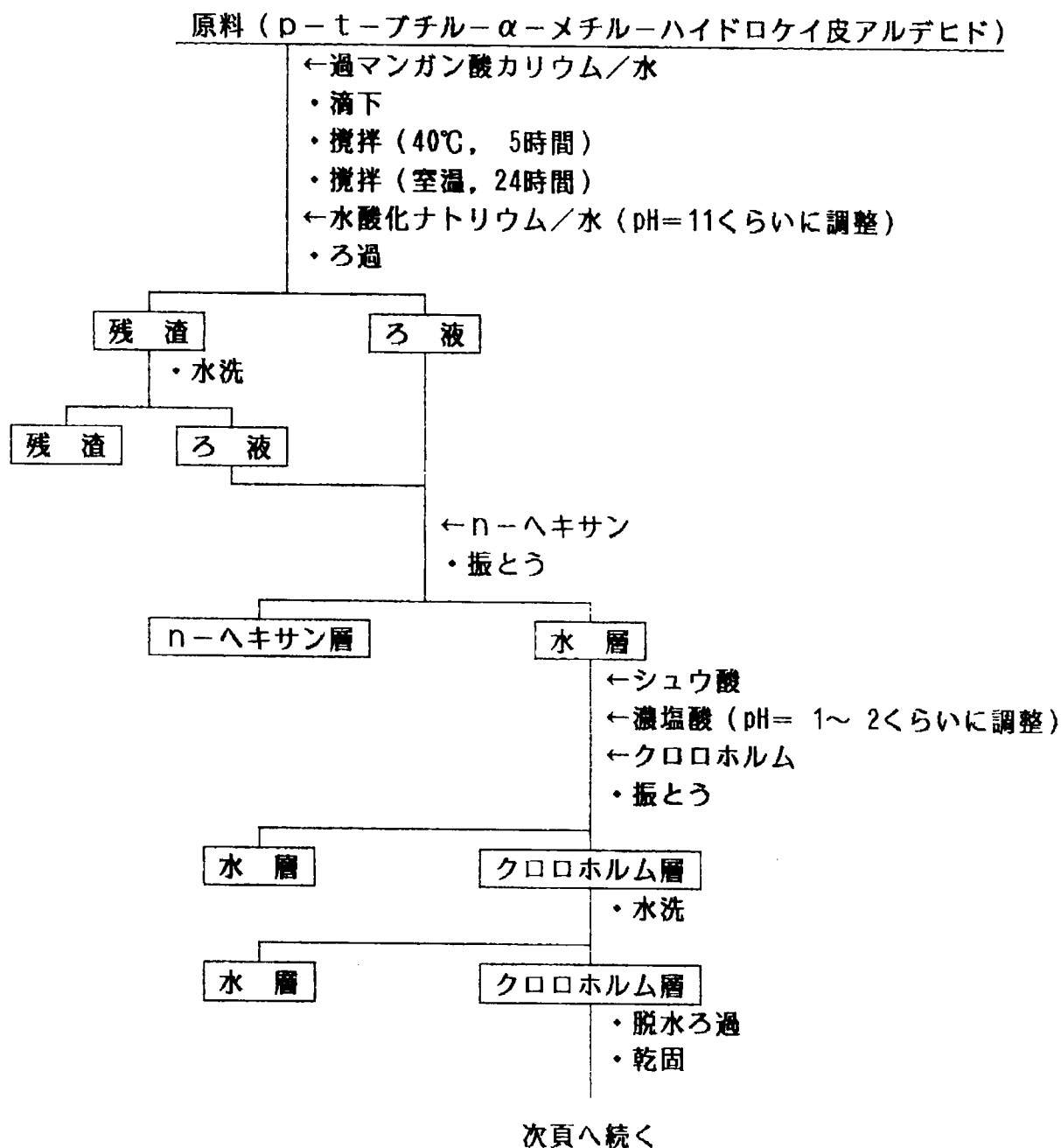
	2 W	3 W	4 W	6 W	付 表	付 図
第1濃度区	0.1以下 0.1以下	0.3 0.3	0.4 0.3	0.6 0.5	表－8	図－8
第2濃度区	0.9以下 0.9以下	15 0.9以下	0.9以下 0.9以下	0.9以下 0.9以下	表－9	図－9

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0.1倍以下～0.6倍、第2濃度区において0.9倍以下～15倍であった。

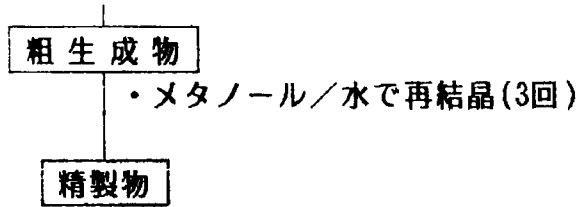
なお、供試魚は外観観察の結果、異状は認められなかった。

11. 備 考

11.1 被験物質合成法



前頁より続く



D-トープチル- α -メチル-ハイドロケイ皮酸

11.2 被験物質の純度について

前記の方法により合成した被験物質は、ガスクロマトグラフ及び融点測定の結果から、高純度のものであることが確認された。

ガスクロマトグラフによる純度測定結果 94.7% (図-15参照)

以 上