

# 試 験 報 告 書

2, 2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)  
(被験物質No.K-825)のコイによる濃縮度試験

昭和60年9月9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

(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

試 験 責 任 者 九州試験所 蓄積試験課 副長

試 験 担 当 者 九州試験所 蓄積試験課

魚 飼 育 担 当 者 九州試験所 蓄積試験課

## 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	4～10
9. 濃縮倍率の算出	11
10. 試験結果	11～12
11. 備考	13～14

付表

付図

## 表 の 内 容

表－１ 試験水中の被験物質濃度（実測値）

表－２ 濃縮倍率

表－３ 水回収及び水ブランク計算表

表－４ 第１濃度区水分析計算表

表－５ 第２濃度区水分析計算表

表－６ 水槽濃度計算式

表－７ 魚体回収及び魚体ブランク計算表

表－８ 第１濃度区魚体分析計算表

表－９ 第２濃度区魚体分析計算表

表－１０ 濃縮倍率計算式

## 図 の 内 容

- 図－１ ４８時間ＬＣ５０試験結果
- 図－２ 第１濃度区濃縮倍率
- 図－３ 第２濃度区濃縮倍率
- 図－４ 検量用ＨＰＬＣチャート及び検量線
- 図－５ 水回収及び水ブランクＨＰＬＣチャート
- 図－６ 水分析ＨＰＬＣチャート
- 図－７ 魚体回収及び魚体ブランクＨＰＬＣチャート
- 図－８ 第１濃度区魚体分析ＨＰＬＣチャート
- 図－９ 第２濃度区魚体分析ＨＰＬＣチャート
- 図－１０ 第１濃度区試験水槽中の溶存酸素濃度
- 図－１１ 第２濃度区試験水槽中の溶存酸素濃度
- 図－１２ 被験物質の赤外吸収スペクトル
- 図－１３ 被験物質の質量スペクトル
- 図－１４ 被験物質の紫外吸収スペクトル
- 図－１５ 被験物質の核磁気共鳴スペクトル

# 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 : 2, 2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)  
(被験物質No.K-825)

## 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試験>  
薬 発 第 6 1 5 号 } による。  
49基局第392号 }

### 3.2 試験条件

試験濃度 : 第1濃度区 1 mg/l  
第2濃度区 0.1 mg/l  
飼育期間 : 8週間  
流 水 量 : 1158l /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 : 23倍～ 37倍  
第2濃度区 : 60倍～125倍

## 1. 試験の目的

既存化学物質の安全性確認の一環として2, 2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール) (被験物質No.K-825) 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試験 >  
薬 発 第 6 1 5 号 } による。  
49 基 局 第 3 9 2 号 }

## 3. 試験期間

昭和60年5月10日～昭和60年8月10日  
(飼育期間 昭和60年6月3日～昭和60年7月29日)

## 4. 被験物質

4.1 名 称 2, 2'-メチレンビス(6-tert-ブチル-4-メチルフェノール)  
(被験物質No.K-825)

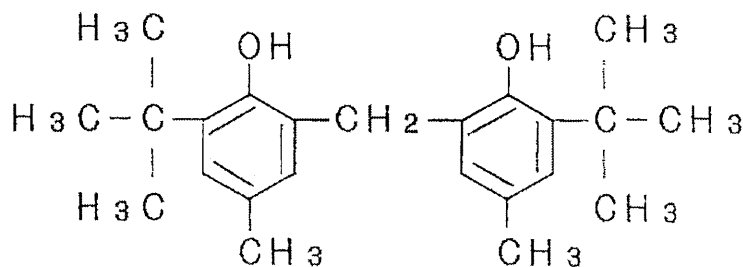
純 度<sup>\*1</sup> 99.9%

入手先

ロット番号 AU01

### 4.2 構造式, 分子式, 分子量

構造式



分子式  $C_{23}H_{32}O_2$

分子量 340.51

#### 4.3 スペクトル

赤外吸収スペクトル (図-12 参照)

質量スペクトル (図-13 参照)

紫外吸収スペクトル (図-14 参照)

核磁気共鳴スペクトル (図-15 参照)

#### 4.4 物理化学的性状

外 観 白色粉末

融 点<sup>\*1</sup> 131~132℃

溶解性	水	:	0.02 mg/l (GCによる。)
	ヘキサン	:	10 g/l 以上
	ベンゼン	:	10 g/l 以上
	テトラヒドロフラン (THF)	:	10 g/l 以上
	クロロホルム	:	10 g/l 以上
	酢酸エチル	:	10 g/l 以上
	エタノール	:	10 g/l 以上
	メタノール	:	10 g/l 以上
	N,N-ジメチルホルムアミド (DMF)	:	10 g/l 以上

分配係数 (n-オクタノール/水)

$\log Pow = 6.25$  (OECD法による。)

#### 4.5 ヒメダカに対する48時間LC50値<sup>\*2</sup>

500 mg/l 以上 (図-1 参照)

\*1 被験物質入手先提示資料による。

\*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」に準ずる。  
試験原液は分散助剤として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(7.2項参照)。



## 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 850426  
平 均 体 重<sup>\*3</sup>      26.3 g  
平 均 体 長<sup>\*3</sup>      9.8 cm  
平均脂質含有率<sup>\*3</sup>      4.7 %  
薬 浴      止水状態で 0.005% 水産用テラマイシン散水溶液を用い 24 時間薬浴を行った。  
順 化      25 °C × 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      1158ℓ / 日  
                 (原液：希釈水 = 4 ml / 分 : 800 ml / 分)  
飼育密度      25 尾 / 飼育水槽 (試験飼育開始時)  
飼育期間      8 週間  
飼育温度      25 ± 2 °C  
飼育水槽中溶存酸素濃度  
                 第1濃度区 : 5.4 ~ 6.6 mg / ℓ (図-10 参照)  
                 第2濃度区 : 5.7 ~ 7.0 mg / ℓ (図-11 参照)  
                 (飯島精密工業製 溶存酸素測定装置)  
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 : 1 mg/ℓ

第2濃度区 : 0.1 mg/ℓ

### 7.2 原液調製法

被験物質と20倍量のHCO-40をアセトンに溶解後、ロータリーエバポレーターでアセトンを留去し、イオン交換水を加え1000 mg/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 : 200 mg/ℓ

第2濃度区 : 20 mg/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。試験水分析は、両濃度区とも飼育期間中、毎週2回計16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、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。供試魚分析は、両濃度区とも飼育開始後、2, 4, 6及び8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

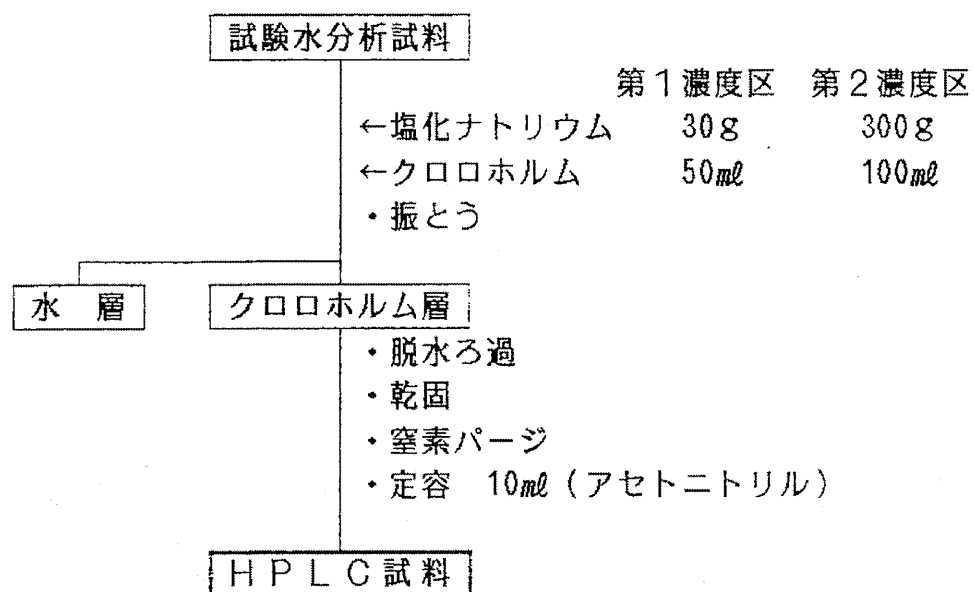
試験水槽より

第1濃度区 : 100 ml

第2濃度区 : 1000 ml

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。

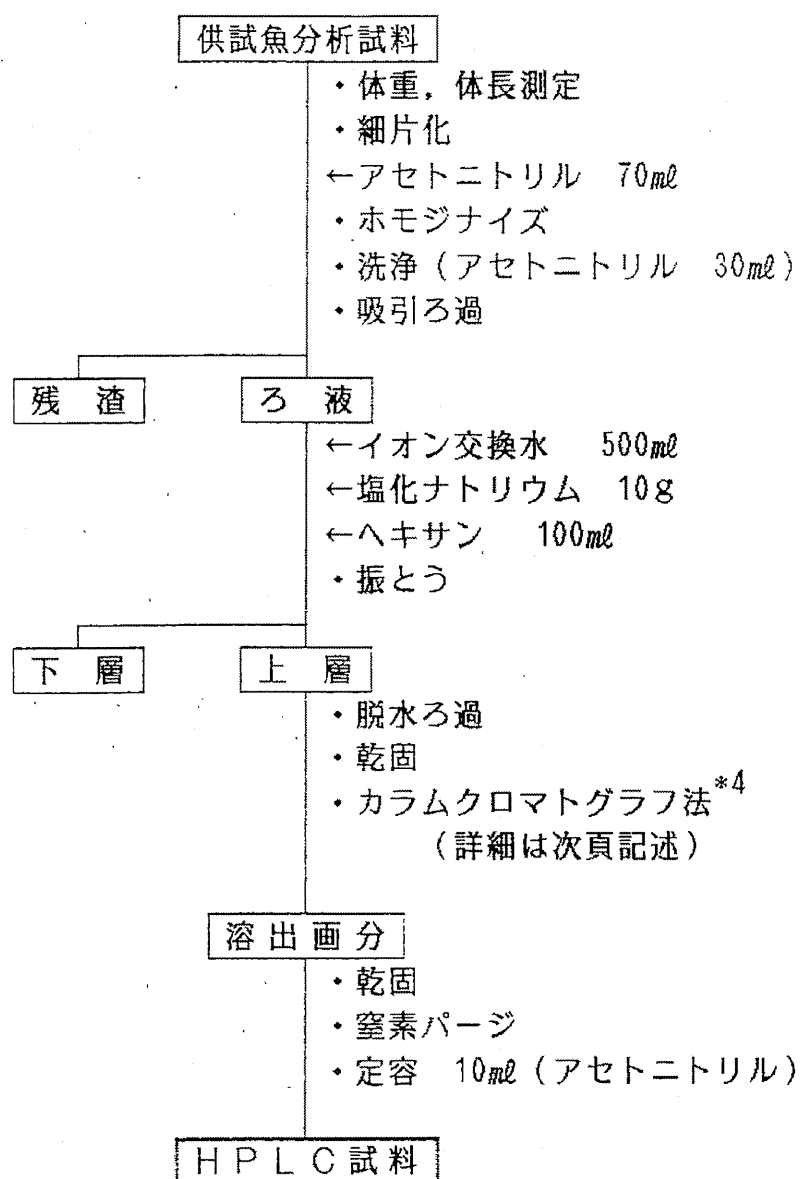
フローシート



### 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



\*4 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%含水シリカゲル 10 g (和光純薬工業製)  
(ヘキサン/ベンゼン(1/1 V/V) で充てん)

分画法 第1画分 : ヘキサン/ベンゼン(1/1 V/V) 50 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<sup>\*5</sup>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]

機 器	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 UVIDEC-100-II
カ ラ ム	0.1m×6mmφ ステンレス製 ERC-ODS
溶 離 液	アセトニトリル/水(8/2 V/V)
測 定 波 長	284nm (図-14参照)
注 入 量	30μl

#### \*5 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。

被験物質0.1gを精秤し、アセトニトリルに溶解して1000μg/mlの標準原液とし、さらにこれをアセトニトリルで希釈して10μg/mlの標準溶液を調製した。

#### 8.4 定量性の確認

8.3の標準溶液調製法と同様にして $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ 、 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 及び $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 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 $0.29\text{ }\mu\text{g/ml}$ ）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、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。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ず、そこで回収率は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 $100\text{ }\mu\text{g}$ 添加）

第1濃度区   ： 94.2%

第2濃度区   ： 92.7%

供試魚分析（被験物質 $150\text{ }\mu\text{g}$ 添加）

90.9%

## 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 : 0.031  $\mu\text{g/ml}$

第2濃度区 : 0.0031  $\mu\text{g/ml}$

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0.11  $\mu\text{g/g}$ 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 : 1.2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	4 W	6 W	8 W	付 表
第1濃度区	0.964	0.955	0.950	0.949	表-4
第2濃度区	0.0942	0.0900	0.0905	0.0909	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	4 W	6 W	8 W	付 表	付 図
第1濃度区	37 28	32 31	24 23	30 23	表－8	図－8
第2濃度区	89 120	77 60	125 121	108 97	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23～37倍、第2濃度区において60～125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 試資料の保管等

#### 11.1.1 被験物質

被験物質は保管用として約20gを分取して保管用容器に密栓し、試料保管庫に「新規化学物質に係る試験の項目等を定める命令第3条に規定する試験施設に関する基準」第32条に定める保管期間保管する。

#### 11.1.2 生データ及び資料等

試験計画書、生データ及び依頼書、調査表、その他必要な文献、資料等は資料保管庫に最終報告書と共に「新規化学物質に係る試験の項目等を定める命令第3条に規定する試験施設に関する基準」第32条に定める保管期間保管する。

#### 11.1.3 標 本

標本は標本保管庫に「新規化学物質に係る試験の項目等を定める命令第3条に規定する試験施設に関する基準」第32条に定める保管期間保管する。

### 11.2 試験に使用した機器、装置及び試薬

#### 11.2.1 試験系（飼育施設）に係わる装置

原液供給用微量定量ポンプ	:	東京理化器械製	型 GMW
溶存酸素測定装置	:	飯島精密工業製	型 552

### 11.2.2 分析及び原液調製に使用した機器、装置及び試薬

#### 機器

##### 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 UVIDEK-100-II

#### 装置

ロータリーエバポレーター : 東京理化学器械製 型 N-1  
: 柴田化学製 型 SPC-12  
振とう機 : 入江商会製 TS式  
ホモジナイザー : スイス キネマチカ社製

#### 試薬

アセトン (特級) : 和光純薬工業製  
ヘキサン (特級) : 和光純薬工業製  
クロロホルム (特級) : キシダ化学製  
ベンゼン (特級) : 和光純薬工業製  
アセトニトリル (HPLC用) : 和光純薬工業製  
アセトニトリル (一級) : 片山化学工業製  
蒸留水 (HPLC用) : 和光純薬工業製  
塩化ナトリウム (一級) : 松永化学工業製  
無水硫酸ナトリウム (一級) : 片山化学工業製  
HCO-40 : 日光ケミカルズ製  
シリカゲル : 和光純薬工業製

以 上