

# 試 験 報 告 書

アルキルフェノキシベンゼンスルホン酸のナトリウム塩  
(被験物質No.K-396)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  
及 び [REDACTED]

試 験 担 当 者 九州試験所 蓄積試験課 [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 : アルキルフェノキシベンゼンスルホン酸のナトリウム塩  
(被験物質No.K-396)
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 250  $\mu\text{g}/\text{l}$   
          第2濃度区 25  $\mu\text{g}/\text{l}$   
飼育期間 : 8週間  
流 水 量 : 582  $\text{l}/\text{日}$   
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 : 0.6倍以下～ 4.9倍  
          第2濃度区 : 6.3倍以下～40 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	11
10. 試験結果	12

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アルキルフェノキシベンゼンスルホン酸のナトリウム塩（被験物質No.K-396）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 3 9 2 号 }

## 3. 試験期間

昭和59年7月25日～昭和60年3月22日  
（飼育期間 昭和60年1月14日～昭和60年3月13日）

## 4. 被験物質

4.1 名 称        アルキルフェノキシベンゼンスルホン酸のナトリウム塩  
                    （被験物質No.K-396）

純 度<sup>\*1</sup>        48%

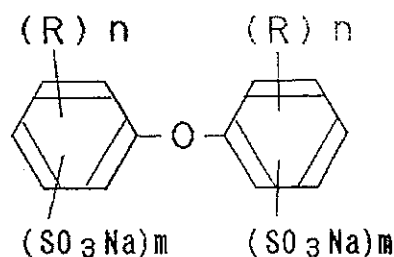
不純物<sup>\*1</sup>        NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1.5% 他は水

提供者

ロット番号



### 4.2 構造式



アルキル基の炭素数分布

C<sub>10</sub>    1%以下

C<sub>11</sub>    13～19%

C<sub>12</sub>    67～73%

C<sub>13</sub>    9～15%

C<sub>14</sub>    1%以下

n=0～1

m=0～1

#### 4.3 スペクトル

赤外線吸収スペクトル (図-13 参照)

紫外外部吸収スペクトル (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 黄褐色透明液体

沸 点<sup>\*1</sup> 100℃以上

比 重<sup>\*1</sup> 1.155 (26℃)

溶解性	水	:	1%以上
	ジメチルスルホキシド (DMSO)	:	18/ℓ以上
	メタノール	:	18/ℓ以上
	エタノール	:	18/ℓ以上
	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
	アセトニトリル	:	500mg/ℓ以下

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

3.11 mg/ℓ (図-1 参照)

\*1 被験物質提供者提示資料による。

\*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」に準じ、調製した試験液により得られた値。

なお、被験物質はほぼ50%の水を含む物質であるため、純度を考慮して被験物質を添加した。以後、数値は目的とするアルキルフェノキシベンゼンスルホン酸のナトリウム塩としての濃度である。

## 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<sup>\*3</sup>      20.9g  
平 均 体 長<sup>\*3</sup>      9.1cm  
平均脂質含量<sup>\*3</sup>      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 = 4ml / 分 : 400ml / 分)  
飼育密度        20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℃  
飼育水槽中溶存酸素濃度  
    第1濃度区 : 5.7~7.5mg/ℓ (図-11参照)  
    第2濃度区 : 6.9~7.6mg/ℓ (図-12参照)  
                    (飯島精密工業製 DOメーター)  
給 飼            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 : 250 µg/l

第2濃度区 : 25 µg/l

### 7.2 原液調製法

被験物質12.5 gを精秤し精製水で溶解して1 lとし、12.5 g/lの水溶液を調製した。

これをイオン交換水で希釈して

第1濃度区 : 25 mg/l

第2濃度区 : 2.5 mg/l

の各原液25 l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、3、4、6及び8週目の計5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

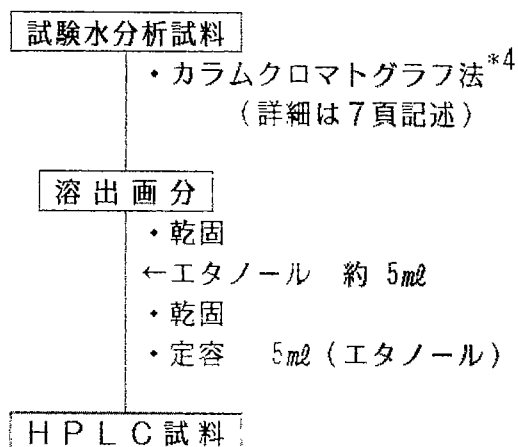
試験水槽より

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。

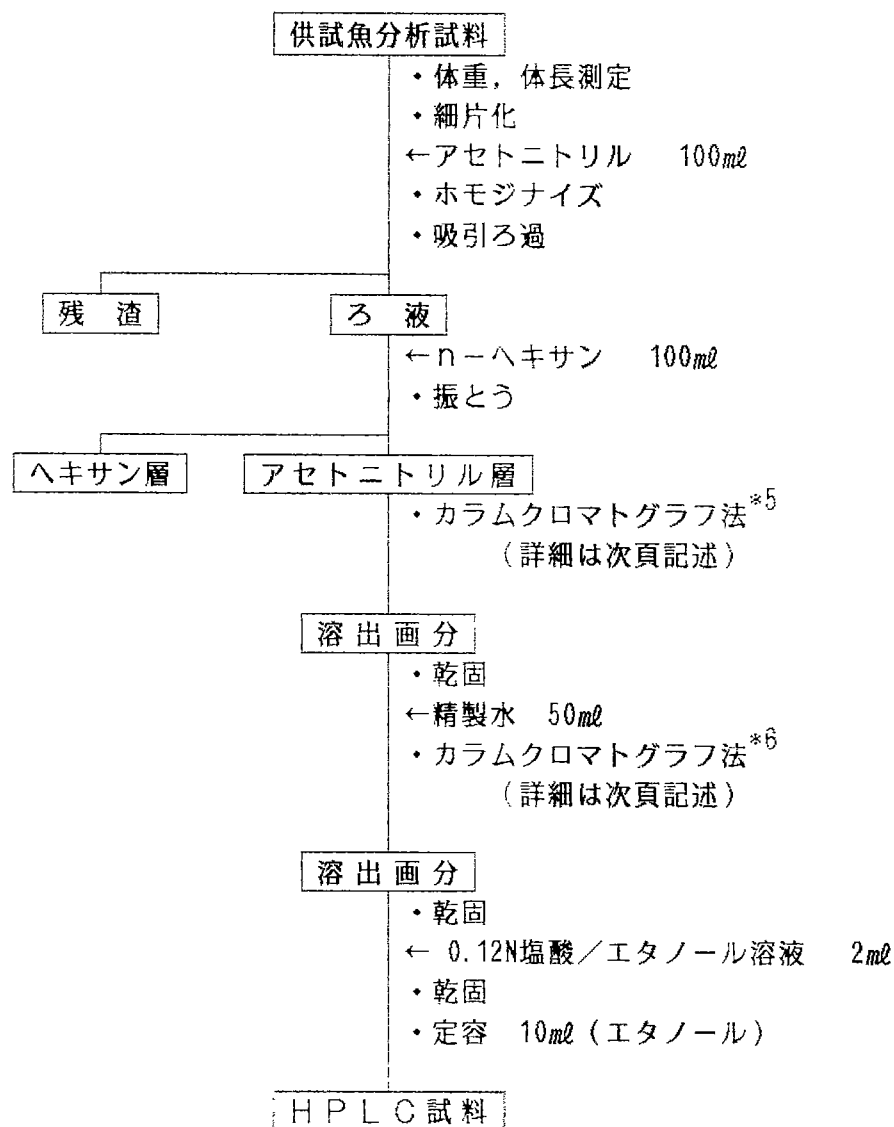
フローシート



### 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



## カラムクロマトグラフの条件

### \*4 セツパックC<sub>18</sub> (ウォータース社製)

分画法	第1画分	試験水分析試料	全 量
	第2画分	メタノール／精製水 (1/1 V/V 10 <sup>-4</sup> N NaOH含有)	10 ml
	第3画分	メタノール	10 ml

被験物質は第2，3画分に溶出する。

### \*5 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 (和光純薬社製) (アセトニトリルで充てん)

分画法	第1画分	アセトニトリル抽出液	全 量
	第2画分	アセトニトリル	50 ml

被験物質は第1，2画分に溶出する。

### \*6 セツパックC<sub>18</sub> (ウォータース社製)

分画法	第1画分	水溶液	全 量
	第2画分	メタノール／精製水 (1/1 V/V 0.01N NaOH 含有)	20 ml

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>\*1</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-9, 10, 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 島津製作所製 型 SPD-2A
カラム	(水分析) ERC-Silica-1252 5cm×6mmφ
	(魚分析) ① ERC-Silica-1252 5cm×6mmφ
	② UNISIL Q 100-5 シリカゲル 5cm×6mmφ
	③ ERC-Silica-1252 5cm×6mmφ
	①, ②, ③を連結
溶離液	エタノール／n-ヘキサン(1/3 V/V) (0.03%硫酸含有)
測定波長	238nm (図-14参照)
注入量	(水分析) 30μl
	(魚分析) 100μl

## \*7 標準溶液の調製

### (水分析)

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 0.1 g を精秤し、エタノールに溶解して 1000  $\mu\text{g/ml}$  の溶液とし、さらにこれをエタノールで希釈して 5  $\mu\text{g/ml}$  の標準溶液を調製した。

### (魚分析)

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液は、高速液体クロマトグラフのピーク形及び保持時間を同一にするため次のようにして調製した。

すなわち被験物質 0.1 g を精秤し、精製水に溶解して 1000  $\mu\text{g/ml}$  の溶液とし、これを精製水で希釈して 75  $\mu\text{g/ml}$  の溶液を調製する。次に、75  $\mu\text{g/ml}$  の溶液 1 ml をセップパック C<sub>18</sub> (ウォーターズ社) に負荷し、その後メタノール/精製水 (1/1 V/V 0.01N NaOH 含有) を 20 ml 流して溶出させた。溶出画分を濃縮乾固し、これに 0.12 N 塩酸/エタノール溶液を 2 ml 加え、再度濃縮乾固しエタノールで 10 ml に定容して 7.5  $\mu\text{g/ml}$  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 2.5  $\mu\text{g/ml}$ 、5  $\mu\text{g/ml}$  及び 10  $\mu\text{g/ml}$  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 mm (被験物質濃度 0.20  $\mu\text{g/ml}$ ) 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 3.25  $\mu\text{g/ml}$ 、7.5  $\mu\text{g/ml}$  及び 15  $\mu\text{g/ml}$  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 mm (被験物質濃度 0.31  $\mu\text{g/ml}$ ) とした。(図-7 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水溶液を添加し 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、そこで回収率は添加回収試験で得られた2点の値の平均値とした(図-5, 8, 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 25  $\mu$ g 添加)

第1濃度区 : 97.6%

第2濃度区 : 96.8%

供試魚分析(被験物質 75  $\mu$ g 添加)

71.4%

## 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 : 0.010  $\mu$ g/ml

第2濃度区 : 0.0010  $\mu$ 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0.14 µg/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 (µg/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) (µg/l)

$C_{fb}$  : 空試験における魚体中の被験物質濃度 (µg/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 : 0.6倍

第2濃度区 : 6.3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： $\mu\text{g}/\text{L}$ ）

	2W	3W	4W	6W	8W	付 表
第１濃度区	231	223	220	221	224	表－４
第２濃度区	22.2	22.0	22.6	22.3	22.9	表－５

### 10.2 濃縮倍率

濃縮倍率を表－２に示す。

表－２ 濃 縮 倍 率

	2W	3W	4W	6W	8W	付 表	付 図
第１濃度区	3.1 1.4	1.2 1.3	1.6 2.7	4.4 4.9	0.6以下 0.6以下	表－８	図－９
第２濃度区	6.3以下 6.3以下	6.3以下 11	12 6.3以下	20 40	16 32	表－９	図－10

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０．６倍以下～４．９倍、第２濃度区において６．３倍以下～４０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。

以 上