本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所 横浜研究所 運営管理者

環境庁殿

## 試 験 報告書

9,10-アントラキノンのヒメダカ (Oryzias latipes) に対する急性毒性試験

(試験番号:9B504G)

2000年 5月31日作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

#### 陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

試験委託者: 環境庁

表題:

9,10-アントラキノンのヒメダカ (Oryzias latipes) に対する急性毒性試験

試験番号: 9 B 5 0 4 G

本試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

2000年 5月31日

運営管理者

## 信頼性保証証明

株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

試験委託者: 環境庁

表題:

9,10-アントラキノンのヒメダカ (Oryzias latipes) に対する急性毒性試験

試験番号:

9 B 5 0 4 G

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した 方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを下記の 通り確認した。

記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況查察	2000年 4月17日	2000年 4月17日
	2000年 4月21日	2000年 4月21日
試験報告書監査	2000年 5月31日	2000年 5月31日

2000年 5月31日

信頼性保証担当者 :

## 試験実施概要

1. 表題: 9,10-アントラキノンのヒメダカ (Oryzias latipes) に対する急性毒性試験

2. 試験目的: 被験物質のヒメダカ(0ryzias latipes)に対する急性毒性試験を行い、96時

間の半数致死濃度(LC50)を求める。

3. 適用ガイドライン: 本試験は、0ECD 化学品テストガイドライン No. 203「魚類毒性試験」 (1992年) に準拠した。

4. 適用GLP:本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。

5. 試験委託者

名称: 環境庁

住所: 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2

委託担当者: 企画調整局環境保健部環境安全課環境リスク評価室 室長補佐

6. 試験受託者:

名称: 株式会社三菱化学安全科学研究所

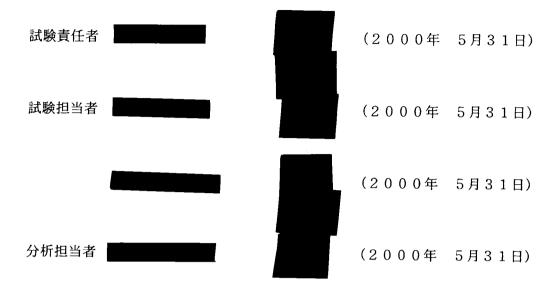
所在地: 〒105-0014 東京都港区芝二丁目1-30

7. 試験施設:

名称: 株式会社三菱化学安全科学研究所·横浜研究所

所在地: 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

#### 8. 試験関係者:



9. 試験期間:

試験開始日

1999年11月16日

試験終了日

2000年 5月31日

暴露期間

2000年 4月17日~2000年 4月21日

## 10. 保管:

試験に関する下記の記録及び試資料は、試験報告書作成後10年間、当研究所試資料保管施設に保管する。その後の保管については別途協議の上定める。

- 1) 試験計画書
- 2) 試験報告書
- 3) 生データ
- 4) 信頼性保証業務担当者の監査・査察記録
- 5) 被験物質
- 6) その他必要なもの

# 目 次

			頁
要	) H	j	7
1	被懸	转物質	8
	1. 1	名称,構造式および物理化学的性状	8
	1. 2	供試試料	8
	1. 3	被験物質の確認および保管条件下での安定性	9
2	供訂	<b>【生物</b>	9
3	試懸	<b>6</b> 方法	10
	3. 1	試験条件	10
	3. 2	希釈水	10
	3. 3	試験容器および恒温槽等	10
	3. 4	試験濃度の設定	11
	3. 5	試験液の調製	11
	3. 6	試験液の分析	12
	3. 7	試験操作	12
4	結果	<del>!</del> の算出−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−−	12
5	結果	! および考察	13
	5. 1	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	13
	5. 2	試験液中の被験物質濃度	13
	5. 3	半数致死濃度 (LC50)	13
	5. 4	0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	13
	5. 5	毒性症状	
	5. 6	試験液の水温, 溶存酸素濃度およびpH	
Tal	ole 1	~8	
		1	
. 16	3 <b>u</b> 1 C	•	22
付	属資料	↓-1 希釈水の水質	23~24
		├-2 分析方法	

#### 要 旨

#### 試験委託者

環境庁

## 表 題

9,10-アントラキノンのヒメダカ (Oryzias latipes) に対する急性毒性試験

#### 試験番号

9 B 5 0 4 G

#### 試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 203「魚類毒性試験」(1992年)に準拠 して実施した。

1) 被験物質: 9,10-アントラキノン

2) 暴露方式:

半止水式(24時間毎に試験液の全量を交換),水面をテフロンシートで被覆

3) 供試生物:

ヒメダカ (Oryzias latipes)

4) 暴露期間:

96時間

5) 試驗濃度(設定値):対照区,助剤対照区,0.400mg/L

(分散可能最高濃度のみの限度試験)

助剤濃度;100 mg/L (テトラヒト゚ロフラン使用)

6) 試験液量:

5. 0L/容器

7) 連数:

1容器/濃度区

8) 供試生物数: 10尾/濃度区

9) 試験温度:

24±1℃

10) 照明:

室内光, 16時間明/8時間暗

11) 分析法: HPLC法

#### 結 果

- 1) 試験液中の被験物質濃度:測定濃度は設定濃度に対して±20%以内であった。したがって, 結果の算出は設定濃度に基づいて行った。
- 2)96 時間の半数致死濃度 (LC50) :>0.400 mg/L

#### 1 被験物質

#### 1.1 名称,構造式および物理化学的性状

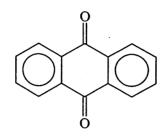
名 称:

9, 10-アントラキノン (ATQ)

CAS No.:

84-65-1

構造式:



分子式:

 $C_{14}H_8O_2$ 

分子量\*1:

208, 2

沸点\*1: 379~381℃

融点\*1:

286℃

水溶解度: 0.257mg/L(室温) (当社測定值)

比重\*1:

1.4 (20℃)

オクタノール/水分配係数 (log P) \*1:3.39

安定性\*2:

通常の取扱条件下で安定、酸化剤との接触に注意

その他\*2:

生分解性良好

\*1: Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 3rd ed.

ed. by Verschueren, K., Von Nostrand Reinhold Company, New York (1996)

\*2: 供給者提供資料

#### 1.2 供試試料

純度\*1:

99.4% (GC法)

Dy}番号\*1:

FGB01

供給者:

供給量\*1:

50 g

入手日: 1999年9月3日

外観\*1:

淡黄色粉体

\*1:供給者提供資料

#### 1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性が認められることを確認した。試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始前に測定したスペクトルと比較した。その結果、スペクトルに変化はなかったことより被験物質は保管中安定であったと判断された。

#### 2 供試生物

1) 和名: ヒメダカ

2) 学名: Oryzias latipes

3) 被鱗体長: 1.88 cm (1.67~2.48cm), n=10

4) 体重: 0.095 g (0.061~0.242g), n=10

5)入手先: 三京水産株式会社(東京都新宿区市谷田町一丁目1番地)

6)入手日: 2000年 3月10日

7) 感受性の確認: 基準物質(硫酸銅(Ⅱ) 五水和物, 試薬特級) による96時間半数致死濃

度(LC50) = 1.5mg/L (この値は当研究所における1995年以降のLC50値

0.44~1.4mg/L, n=11にほぼ一致する。)

8) 馴化期間: 2000年 3月10日~2000年 4月17日

暴露開始前7日間の死亡率は5%以下で、試験には肉眼的に健康で正常

な個体を使用した。(暴露開始前12日間の馴化条件は以下に示す。)

#### 馴化条件

1) 飼育水: 希釈水 (3.2 参照)

2) 飼育方法: 流水式

3) 水温: 24±1℃

4) 照明: 室内光, 16 時間明(10001ux 以下)/8 時間暗

5) 餌: 市販のテトラミン<sup>®</sup>

6) 給餌量: 魚体重の約2%/日 (暴露開始の24時間前からは無給餌)

#### 3 試験方法

3.1 試験条件

1) 暴露方式: 半止水式(24 時間毎に試験液の全量を換水), 水面をテフロンシートで被覆

2) 暴露期間: 96 時間

3) 試験液量: 5. 0L

4) 連数: 1 容器/濃度区

5) 供試生物数: 10 尾/濃度区

6) エアレーション: なし

7) 試験温度: 24±1℃

8) 照明: 16 時間明 (1000 lux 以下) / 8 時間暗

9) 給餌: 無給餌

#### 3.2 希釈水

脱塩素水(横浜市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去した後、充分通気したもの)を使用した。希釈水水質測定結果を付属資料-1に示した。魚飼育水として適性な水質であると判断した。

#### 3.3 試験容器および恒温槽等

1) 試験容器: 5.0 L 容ガラスビーカー, テフロンシート製蓄

2) 恒温槽: 塩ビ製水槽(恒温装置, タイテック製 クールニット CL-80F)

3) 水温計: 横河電機製 2455 02 型

4) 溶存酸素計: 電気化学計器製 DOL-10 型

5) p H 計: 東亜電波工業製 HM-40V 型

## 3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験(各1連,5尾/濃度区)結果に基づき、本試験濃度を次のように決定した。

本試験濃度:対照区,助剤対照区,0.400mg/L(分散可能最高濃度のみの限度試験)

#### 予備試験結果

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率(%)
0. 400	0

#### 3.5 試験液の調製

被験物質100 mgをテトラヒドロフランで25 mLに定容し、被験物質原液とした(被験物質濃度:4000 mg/L)。

助剤原液はテトラヒドロフランを用いた。試験液は被験物質原液と助剤原液の下記に示した量を採取し希釈水で5.0Lに定容とした。

試験液濃度	被験物質原液添加量	助剤原液添加量
mg/L	mL	mL
0 (対照)	0	0
0 (助剤対照)	0	0. 50
0. 400	0. 50	0

## 3.6 試験液の分析

試験開始時および24時間後に各試験水槽より試験液0.75mLを採取し、これにアセトニトリルを0.75mL添加混合後、HPLCにより分析を行った。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2に示した。

#### 3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽で馴養した魚10尾の重量および被鱗体長を測定した。

各試験水槽の試験液の水温,溶存酸素濃度,pHを測定後,試験水槽中に供試魚を1濃度区当り10尾投入した。水温,溶存酸素濃度,pHは試験開始時および24時間毎の換水前後に測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始後,24,48,72及び96時間後に死亡個体数を記録するとともに観察された毒性の徴候或いは異常を記録した。一般的に記載する症例と定義を下記に示した\*。死亡個体を発見した場合は、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

#### \*一般的症例と定義

死亡:

刺激を与えた場合に反応の認められないもの。

異常呼吸:

対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。

異常遊泳:

明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、

反転等。

遊泳不能:

底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能な

もの。横転, 仮死を含む。

#### 4 結果の算出

水に分散可能な最高濃度(0.400mg/L)の限度試験でも死亡が観察されなかったため半数 致死濃度(LC50)の算出は行えなかった。

#### 5 結果および考察

5.1 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 該当する事象は無かった。

#### 5.2 試験液中の被験物質濃度

試験開始時および24時間後に試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果をTable 1に 示した。

設定濃度に対して±20%を超える分析結果がなかったため,以下の値(半数致死濃度,0% 死亡最高濃度、100%死亡最低濃度、毒性症状の現れる濃度)は設定濃度を基に示した。

#### 5.3 半数致死濃度 (LC50)

各時間における死亡率をTable 2に、 濃度-死亡率曲線を Figure 1に示した。 96時間暴露の対照区の死亡率は0%,助剤対照区の死亡率は0%であり、試験成立条件を満 たした。

以上の結果から半数致死濃度(LC50)を Table 3 および以下に示した。 96時間 LC50: >0.400 mg/L

## 5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度を Table 4および以下に示した。

0%死亡最高濃度:

>0.400 mg/L

100%死亡最低濃度: >0.400mg/L

#### 5.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table 5に示した。

対照区,助剤対照区および0.400mg/L区では試験期間中に異常な症状は観察されなかった。

## 5.6 試験液の水温,溶存酸素濃度およびpH

試験液の水温をTable 6、溶存酸素濃度をTable 7、pHをTable 8に示した。

水温はすべての濃度区で $24\pm1$ ℃で、溶存酸素濃度はすべての試験水槽で飽和溶存酸素濃度(24.0℃の飽和溶存酸素濃度:8.25mg/L)の60%以上であり、いずれも試験基準を満たした。pHはヒメダカの飼育環境として適正範囲(6.0~8.5)内であった。

以上

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in Test Water
(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration		Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				
<i>,</i> _		•	Concentration			
mg/L	0 Hour (new)	24 Hours (old)	mg/L			
Control	<0.001	<0. 001				
Solvent Control	<0.001	<0. 001				
0. 400	0. 459	0. 431	0. 445			
	(115)	(108)	(111)			

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

Table 2. Mortality of the Medaka (Oryzias latipes) Exposed to the Test Substance

Nominal Concentration	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration	Cumulative Mortality (Percent Mortality)									
mg/L	mg/L	24 Hour	S	48 Hour	S	72 I	lour	S	96	Hour	S
Control		0	(0)	0	(0)		0	(0)		0	(0)
Solvent Control		0	(0)	0	(0)		0	(0)		0	(0)
0. 400	0. 445	0	(0)	0	(0)		0	(0)		0	(0)

a: geometric mean

Table 3. Calculated LC50 Values

Exposur	e LC50	95-Percent	Statistical
Period	1	Confidence Limits	
(Hours)	) (mg/L)	(mg/L)	Method
24	>0. 400	~ <b></b>	
48	>0. 400	~	
72	>0. 400	~	
96	>0. 400	~	

Table 4. Observation of the Highest Concentration in 0% Mortality and the Lowest Concentration in 100% Mortality

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality (mg/L)
24	>0. 400	>0. 400
48	>0. 400	>0. 400
72	>0. 400	>0. 400
96	>0. 400	>0. 400

Table 5. Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration	Mean <sup>a</sup> Measured Concentration	Symptoms (Symtom-number of fish)					
mg/L	mg/L	24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours		
Control		N	N	N	N		
Solvent Control		N	N	N	N		
0. 400	0. 445	N	N	N	N		

a: geometric mean

N : No toxicological symptom was observed

Table 6. Temperature

Nominal	Temperature, ℃								
Concentration	0 Hour 24 Hours		48 H	48 Hours		72 Hours			
mg/L	new	old	new	old	new	old	new	old	
Control	23. 2	23. 2	23. 2	23. 3	23. 3	23. 3	23. 3	23. 2	
Solvent Control	23. 2	23. 2	23. 2	23. 3	23. 3	23. 3	23. 3	23. 2	
0. 400	23. 2	23. 2	23. 2	23. 3	23. 3	23. 3	23. 3	23. 2	

minimum:23.2

maximum:23.3

new: freshly prepared test solutions

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L									
Concentration	0 Hour	24 H	lours	48 Hours		72 H	lours	96 Hours		
mg/L	new	old	new	old	пеж	old	new	old		
Control	8. 4	6. 1	8. 4	6. 2	8. 4	6. 1	8. 4	6. 1		
Solvent Control	8. 4	5. 5	8. 4	5. 8	8. 4	5. 5	8. 4	5. 9		
0. 400	8. 4	6. 3	8. 4	6. 4	8. 4	6. 3	8. 4	6. 4		

minimum:5.5

maximum:8.4

new: freshly prepared test solutions

Table 8. pH Values

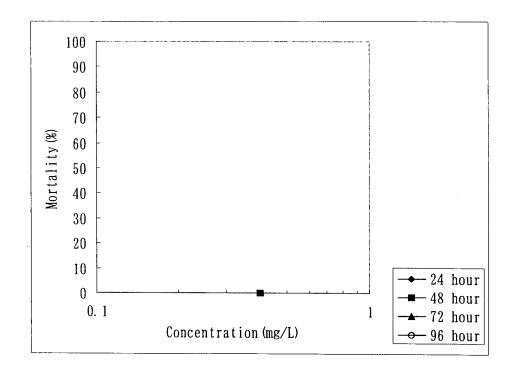
Nominal	рН									
Concentration	0 Hour		lours	48 Hours		72 Hours		96 Hours		
	new	old	new	old	new	old	new	old		
Control	7. 7	7. 2	7. 6	7. 1	7. 5	7. 1	7. 6	7. 2		
Solvent Control	7. 6	7. 1	7. 6	7. 1	7. 5	7. 1	7. 6	7. 2		
0. 400	7. 6	7. 2	7. 6	7. 1	7. 6	7. 1	7. 6	7. 2		

minimum: 7.1

maximum:7.7

new: freshly prepared test solutions

Figure 1 Concentration-Response (Mortality) Curve



付属資料-1

希釈水の水質

Table A-1 Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	1 mg/L
Total phosphorus	0.02 mg/L
На	7. 6 (22℃)
Coliform group bacteria	N. D.
Mercury	<0.0001 mg/L
Copper	0.0018 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.01 mg/L
Lead	0.01 mg/L
Aluminium	0.07 mg/L
Nickel	<0.01 mg/L
Chromium	<0.005 mg/L
Manganese	<0.1 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	0.3 mg/L
Cyanide	N. D.
Free chlorine	<0.01 mg/L
Bromide	<0.05 mg/L
Fluoride	0.14 mg/L
Sulfide	<0.03 mg/L
Total ammonium	<0.05 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Selenium	<0.005 mg/L
Evaporation residue	130 mg/L
Electric conductivity	$170~\mu\mathrm{S/cm}$
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	60 mg/L
Alkalinity	48 mg/L
Sodium	12 mg/L
Potassium	2. 0 mg/L
Calcium	16 mg/L
Magnesium	5. 1 mg/L

Date of measurement: March 16, 2000

付属資料-2

分析方法

## 1 分析方法

- 1) 各試験液 0.75mL をHPLC測定用バイアルに直接採取し、アセトニトリルを等量の 0.75mL 加え混合したものをHPLC測定試料とした。
- 2) 標準液 (アセトニトリル溶液) はHPLC測定用バイアルに直接0.75mL採取し、これに純水を0.75mL加え混合したものをHPLC測定試料とした。

## 2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

#### (装置)

高速液体クロマトグラフ:日立製作所製L-7000型 (No. 1)

ワークステーション: Windows NT及びD-7000型HPLCシステムマネジャ

パソコン:

COMPAQ PROLINEA 590, ディスプレイ; 171FS

プリンター:

Canon LASER SHOT LBP-A404F

ポンプ:

L-7100型(2台)

カラムオーブン: オートサンプラ: L-7300型

オートサンフラ: 検出器: L-7200型 L-7400型

データ処理装置:

D-7000型

#### (条件)

カラム:

Inertsil ODS-3V,  $5 \mu m$ ,  $4.6 \times 150 \text{ mm}$  (GL Sciences Inc.)

溶離液:

Acetonitrile 80%, Water 20%

流速:

1.0 mL/min

測定波長:

251 nm

試料注入量:

 $20 \mu L$ 

カラムオーブン温度:

40 ℃

#### 3 検量線

被験物質の500mg/L アセトニトリル溶液を調製し、アセトニトリルで順次希釈し、0、0.010~1.00mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し純水で等量希釈したものをHPLCに注入しピーク面積を測定した。横軸に濃度を (mg/L) 、縦軸にピーク面積 (count表示)をとり、検量線を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり、最小二乗法による直線回帰式の相関係数は1.000と良好であった。

### 4 検出限界

最小検出ピーク面積を100countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.001mg/Lを検出限界とした。

## 5 添加回収試験

試験液の分析は「1 分析方法」に示したように、試験液とアセトニトリルを混合する操作だけであるので添加回収試験は実施しなかった。従って、回収率の補正は行っていない。

Figure A-2-1 Calibration Curve

Input Data

Input Data		
No.	Concentration	Peak Area
	(mg/L)	(count)
1	0	0
2	0. 010	995
3	0. 020	1964
4	0. 050	5088
5	0. 100	10282
6	0. 200	21298
7	0. 500	54260
8	1. 00	107263

Y = 107, 432X

r= 1.000

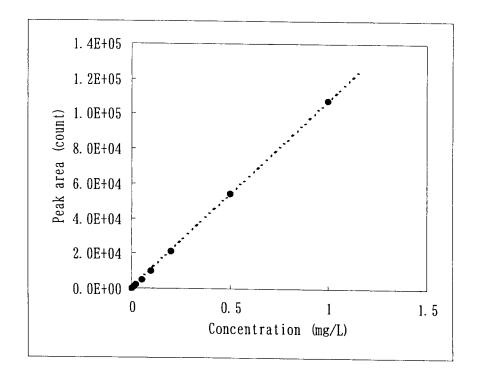
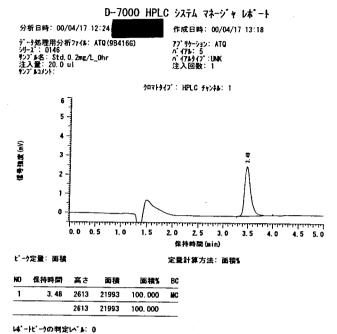


Figure A-2-2 Representative chromatograms

## (1) Standard O. 200mg/L; O hour



(2) Control: 0 hour

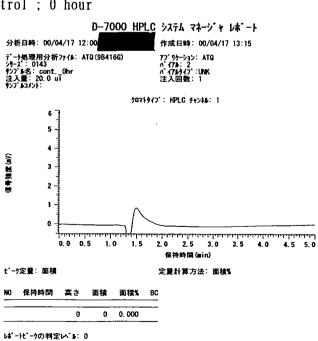
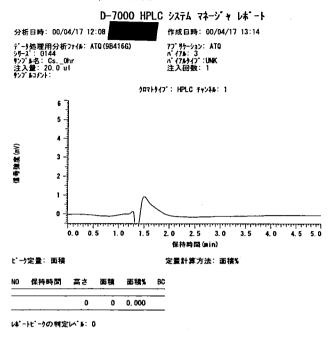
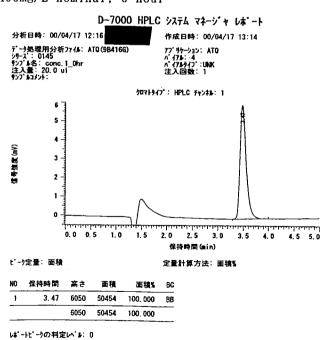


Figure A-2-2 Continued

## (3) Solvent Control; O hour



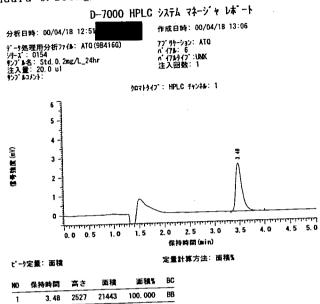
## (4) 0. 400mg/L nominal; 0 hour



## Figure A-2-2

## Continued

# (5) Standard O. 200mg/L; 24 hour



2527 21443 100.000

レポートピークの判定レペル: 0

## (6) Control; 24 hour

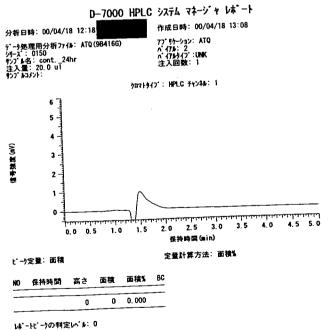
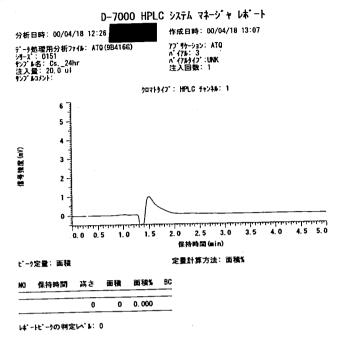


Figure A-2-2 Continued

## (7) Solvent Control; 24 hour



## (8) 0.400mg/L nominal; 24 hour

