

# 試 験 報 告 書

1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン (被験物質No.K-792)  
のコイによる濃縮度試験

昭和60年10月17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 [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 : 1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン  
(被験物質No.K-792)

### 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 50  $\mu$ g/l  
          第2濃度区 5  $\mu$ g/l  
飼育期間 : 8週間  
流 水 量 : 1155 l / 日  
分析方法 : ガスクロマトグラフ法

### 4. 試験結果

濃縮倍率      第1濃度区 : 26倍~59倍  
                 第2濃度区 : 37倍~65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	4～10
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

## 1. 試験の目的

既存化学物質の安全性確認の一環として1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン（被験物質No.K-792）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392号 }

## 3. 試験期間

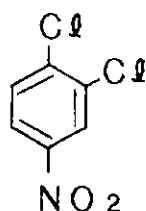
昭和60年5月27日～昭和60年9月30日  
（飼育期間 昭和60年8月2日～昭和60年9月27日）

## 4. 被験物質

4.1 名 称 1, 2-ジクロロ-4-ニトロベンゼン  
（被験物質No.K-792）  
純 度\*1 96.2%  
入手先 [REDACTED] 試薬  
ロット番号 FFW01

### 4.2 構造式，分子式，分子量

構造式



分子式  $C_6H_3Cl_2NO_2$

分子量 192.00

#### 4.3 スペクトル

赤外吸収スペクトル	(図-13参照)
ガスクロマトグラフ-質量スペクトル	(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	淡黄色結晶	
融 点 <sup>*1</sup>	40～ 41℃	
沸 点 <sup>*1</sup>	105～ 107℃/3Torr	
溶解性	水	: 140mg/ℓ (HPLCによる。)
	ヘキサン	: 10g/ℓ以上
	テトラヒドロフラン(THF)	: 10g/ℓ以上
	クロロホルム	: 10g/ℓ以上
	酢酸エチル	: 10g/ℓ以上
	アセトン	: 10g/ℓ以上
	メタノール	: 10g/ℓ以上
	アセトニトリル	: 10g/ℓ以上

分配係数 (n-オクタノール/水)

$$\log Pow = 2.95 \quad (\text{OECD法による。})$$

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

7.01mg/ℓ (図-1参照)

\*1 XXXXXXXXXX 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 850603  
平 均 体 重<sup>\*3</sup>      21.28  
平 均 体 長<sup>\*3</sup>      9.2cm  
平均脂質含量<sup>\*3</sup>      4.3%  
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  
                (揮散性化学物質用濃縮度試験装置を使用)  
飼育水槽      100ℓ 容ガラス製水槽  
流 水 量      1155ℓ/日  
                (原液：希釈水 = 2ml/分：800ml/分)  
飼育密度      15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 : 4.7~6.7mg/ℓ (図-11参照)  
                第2濃度区 : 4.7~6.6mg/ℓ (図-12参照)  
                (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 : 50 µg/l

第2濃度区 : 5 µg/l

### 7.2 原液調製法

被験物質をアセトンに溶解して10倍量のHCO-40を加え、アセトンを留去し、イオン交換水を加えて1000 µg/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 : 20 µg/l

第2濃度区 : 2 µg/l

の各原液10 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、ガスクロマトグラフ（GC）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、ガスクロマトグラフ（GC）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

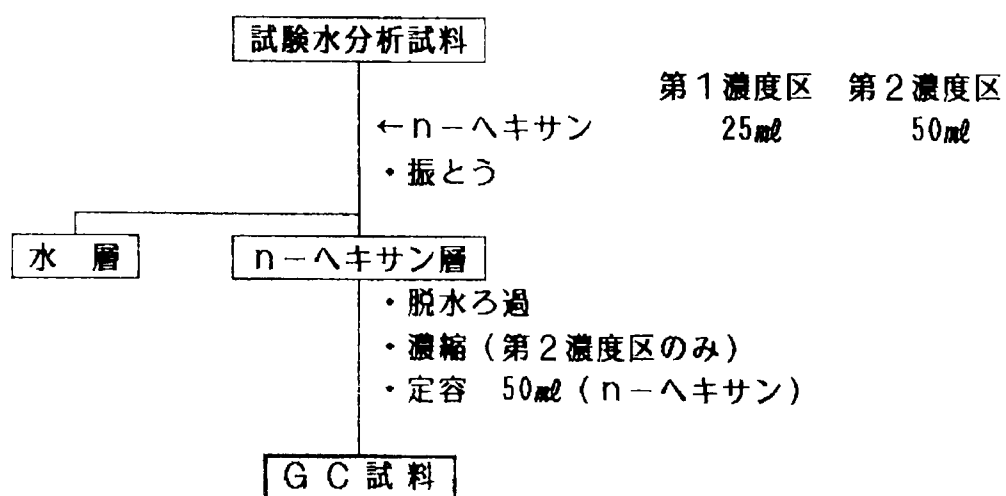
試験水槽より

第1濃度区 : 25 ml

第2濃度区 : 250 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。

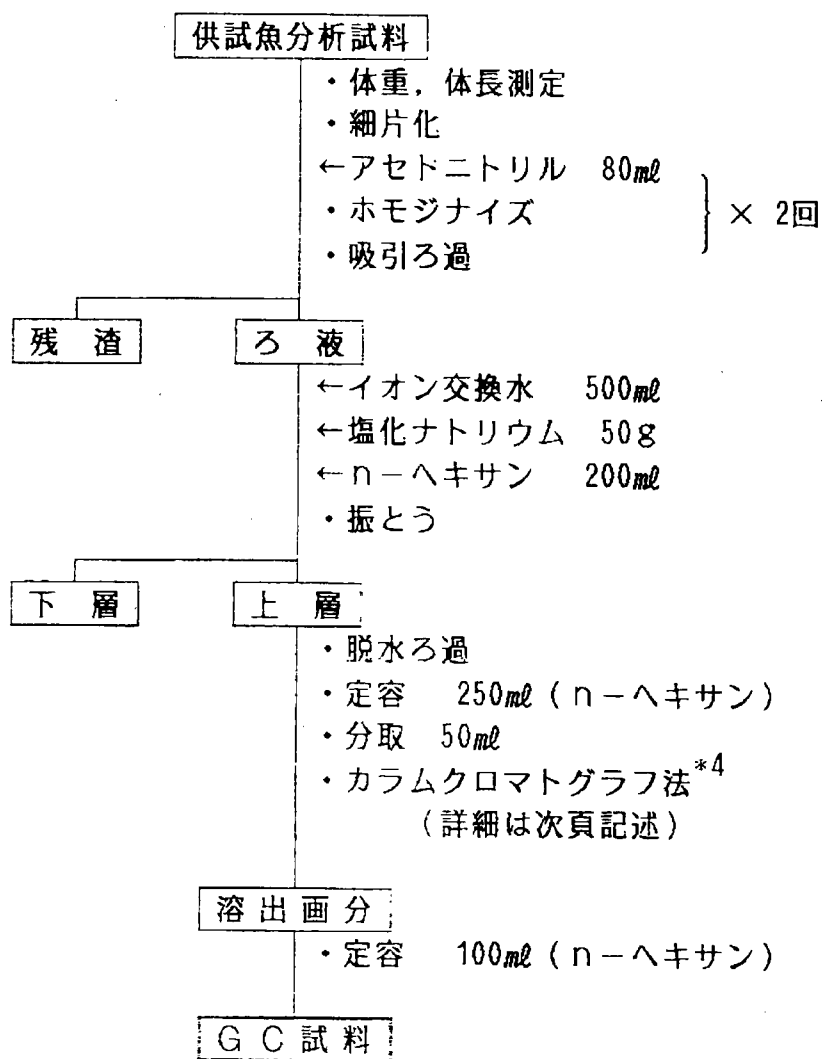
フローシート



### 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 2.0 mm  $\phi$ , ガラス製  
充てん剤 10%含水中性アルミナ 10 g (ウェルム社製)  
(n-ヘキサンで充てん)

分画法 第1画分 : 試料液 50 ml

第2画分 : n-ヘキサン 45 ml

被験物質は第1, 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試料は、次の条件でガス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-9，10，表-8，9参照）。

#### 〔定量条件〕

機 器	ガスクロマトグラフ 島津製作所製 型 GC-7A
カラム	1m×3mmφ ガラス製
液相	10% OV-17
固定相	クロモソルブW (HP)
カラム温度	170℃
キャリアガス	窒素
検出器	ECD
試料導入部温度	250℃
注 入 量	2μl

#### \*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。

##### （試験水分析）

被験物質0.1gを精秤し、n-ヘキサンに溶解して1000μg/mlの標準原液とし、さらにこれをn-ヘキサンで希釈して25μg/mlの標準溶液を調製した。

##### （供試魚分析）

被験物質0.1gを精秤し、n-ヘキサンに溶解して1000μg/mlの標準原液とし、さらにこれをn-ヘキサンで希釈して12.5μg/mlの標準溶液を調製した。

#### 8.4 定量性の確認

##### (試験水分析)

8.3の標準溶液調製法と同様にして12.5  $\mu\text{g/ml}$ 、25  $\mu\text{g/ml}$ 及び50  $\mu\text{g/ml}$ 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  $\mu\text{g/ml}$  (被験物質濃度0.76  $\mu\text{g/ml}$ )とした(図-4参照)。

##### (供試魚分析)

8.3の標準溶液調製法と同様にして6.25  $\mu\text{g/ml}$ 、12.5  $\mu\text{g/ml}$ 及び25  $\mu\text{g/ml}$ 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  $\mu\text{g/ml}$  (被験物質濃度0.42  $\mu\text{g/ml}$ )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, 8, 表-3, 7参照)。各分析操作における回収率は次頁のとおりであり、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 1.25 µg 添加）

第1濃度区 : 97.8%

第2濃度区 : 98.9%

供試魚分析（被験物質 7.5 µg 添加）

93.1%

## 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 : 1.6 ng/ml

第2濃度区 : 0.15 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7.4 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 : 0.2倍

第2濃度区 : 1.6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	40.0	41.5	41.2	41.2	表-4
第2濃度区	4.35	4.61	4.57	4.58	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	48 27	49 42	59 26	43 39	表-8	図-9
第2濃度区	47 65	56 49	47 37	42 41	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26倍～59倍、第2濃度区において37倍～65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

#### 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、試料保管室に「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、生データ及び調査表、その他必要な文献、資料等は資料保管室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。

### 11.2 試験に使用した機器、装置、特殊器具及び試薬

#### 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、特殊器具、試薬

#### 機器

ガスクロマトグラフ : 島津製作所製 型 GC-7A

#### 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

ウォーターバス : 東京理化学器械製 型 SB-35

#### 特殊器具

テドラーバッグ : 井内盛栄堂製

#### 試薬

n-ヘキサン（残留農薬分析用） : 片山化学工業製

アセトニトリル（一級） : 片山化学工業製

アセトン（特級） : 和光純薬工業製

塩化ナトリウム（特級） : 松永化学工業製

中性アルミナ : ウェルム社製

HCO-40 : 日光ケミカルズ製

以 上