

生態影響に関する化学物質審査規制／試験法セミナー

**試験困難物質の試験・評価方法
に係る検討状況**
(難水溶性物質の試験法に関する検討の状況)

2007年1月19日

(株)三菱化学安全科学研究所

試験困難物質とは

標準的な水生(生態)毒性試験手法に
改良や追加を必要とするような物質
(考え方や評価も含む)



極めて手間のかかる
面倒なもの



化学物質特性と試験実施困難性との関連

難水溶性
(疎水性)
吸着性
低濃度毒性

濃度維持
試験液調製
水溶解度測定
微量分析

コロイド状
着色性

光量減衰抑制
毒性解釈
(特に藻類)

揮発・揮散性

濃度維持
揮散防止

錯体形成

必須無機成分
濃度の解釈

光分解性
加水分解性
酸化性
腐食／変質性
生分解性

濃度維持
水溶解度測定
分析(親子?)
毒性解釈
雑菌増殖防止

解離性

濃度の定義
pH変動
毒性解釈

多成分物質

濃度の定義
試験液調製
微量分析

OECD ガイダンスドキュメント No23

Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures

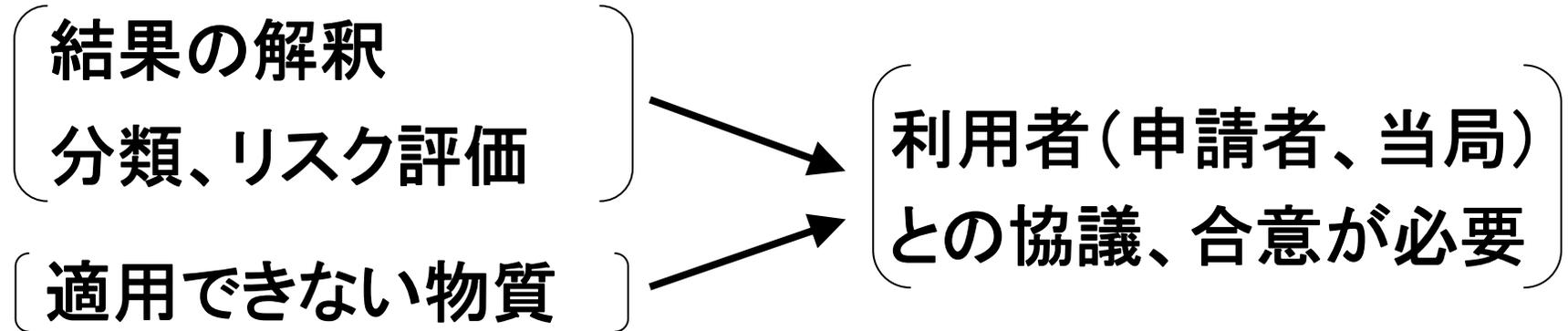
(試験困難物質および混合物の水生生物試験
に関するガイダンス文書)

2000年5月 最終版承認(9月作成)



水生生物の生態毒性試験において一般に困難と言われる物質の**実用面で有効な**試験のあり方を記載。

しかし



**試験の実施方法や結果の解釈に
困難や混乱を起こし易い**



平成17年度の検討は？

困難な性状の中で難水溶性物質に特化

それでも課題山積

微量分析

水溶解度測定

試験液調製

濃度維持

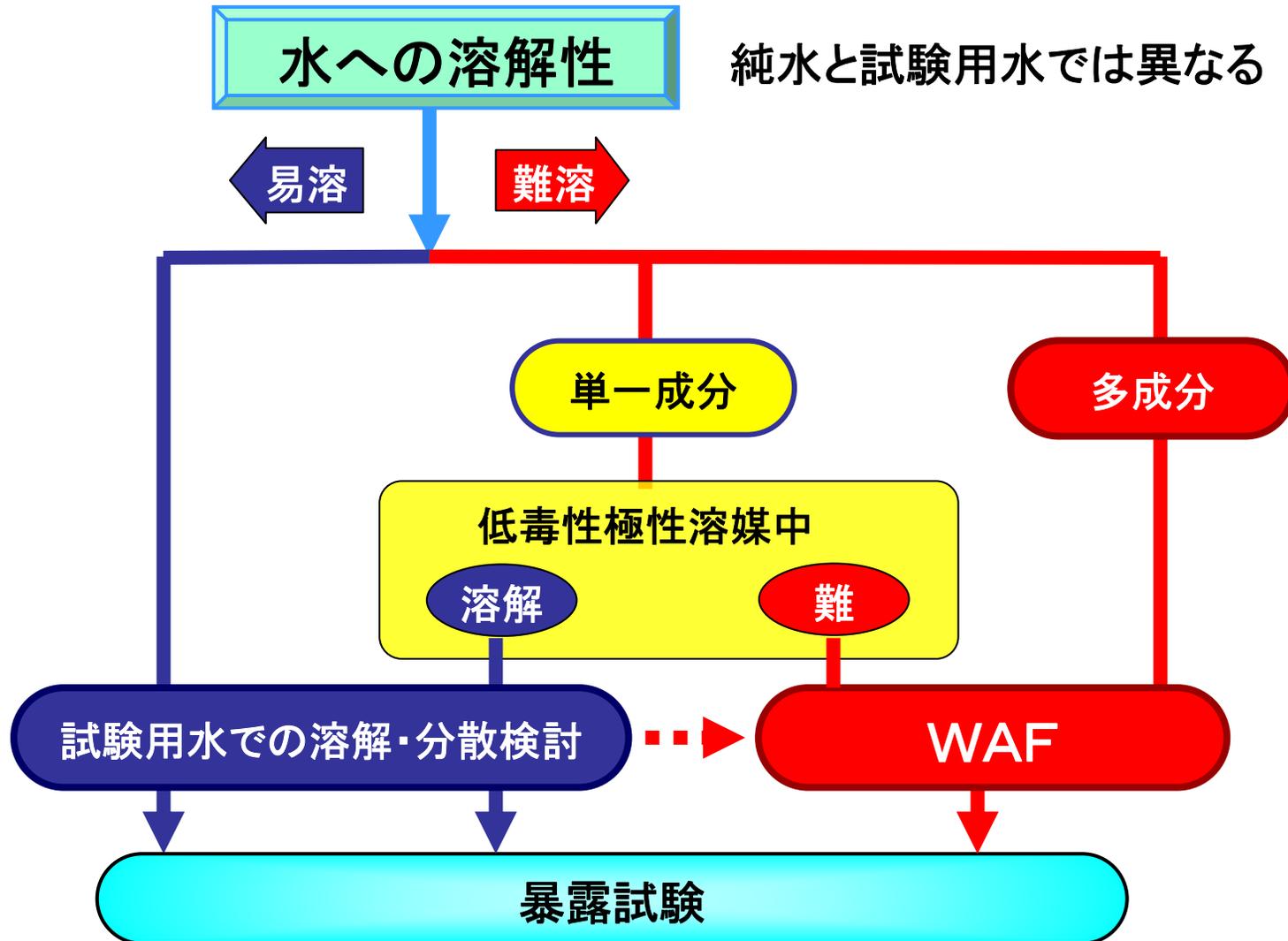
多成分の扱い

結果の解釈

試験液調製方法
一般化できないか？



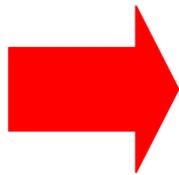
一般的な試験液調製法の流れ



WAF (法) とは？

Water-accommodated fractions (WAFs)

多成分物質の構成成分または物質の一部が溶解および安定に分散,または乳濁して存在している水相分画のこと。



溶解のみならず安定な分散液も含む

Water Soluble Fractions (WSFs)とは違う

平成17年度の検討内容と結果

目的：

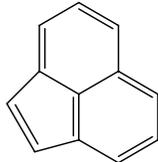
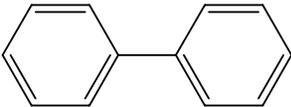
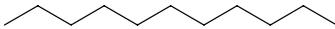
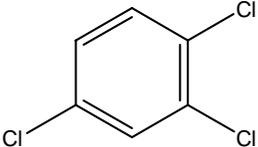
W A F 調製の基準とすべき手順の提案

方法：

異なる性状の難水溶性の単一物質 4 物質
条件の異なるW A F 調製法

- ・攪拌方法
- ・攪拌時間
- ・静置時間
- ・フィルター等

検討物質

化合物名	構造式	水溶解度 (文献値)	水溶解度 (安科研)
アセナフチレン 固体 浮遊性		16 mg/L *1 (20°C)	12 mg/L (20°C)
ビフェニル 固体 沈降性		7.5 mg/L *2 (25°C)	2.1 mg/L (20°C)
n-ウンデカン 液体 比重<1		0.044 mg/L *3 0.0044 mg/L *4 (25 °C)	0.024 mg/L (20°C)
1,2,4-トリクロロベンゼン 液体 比重>1		38 mg/L *1 (25°C)	18 mg/L (20°C)

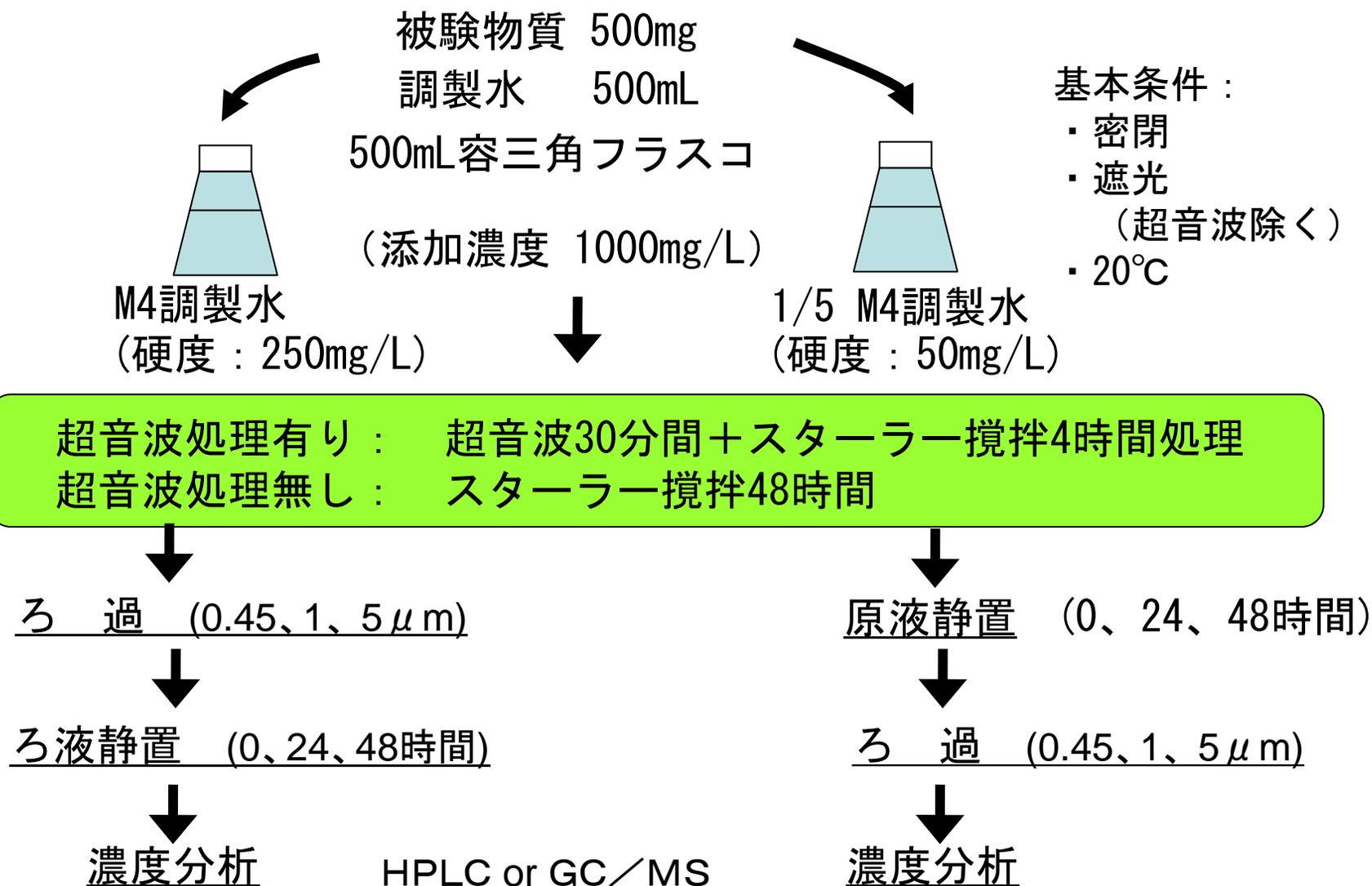
*1 Lide, D. R, (ed), CRC Handbook of Chemistry and Physics 84th Edition

*2 化学物質安全性 (ハザード) 評価シート 98-17

*3 Mackay D, Shiu WY; J Phys Chem Ref Data 10: 1175-99 (1982)←HSDBより

*4 YALKOWSKY, SH & DANNENFELSER, RM (1992)←U. S. EPAのEPI Suiteより

WAF調製法検討概要フロー



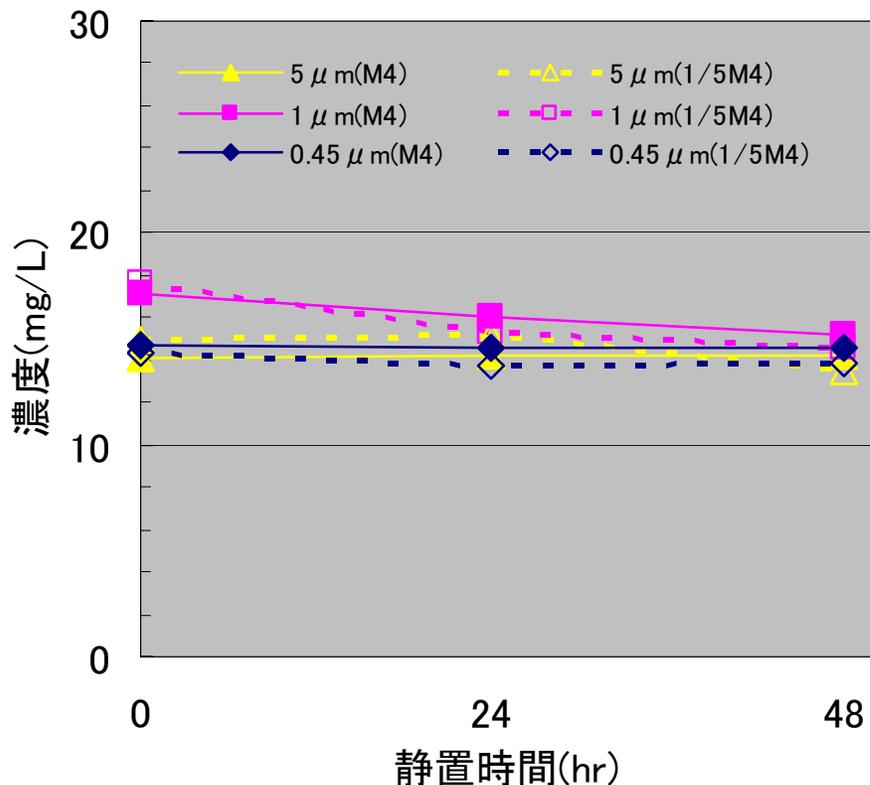
アセナフチレン

(固体, 浮遊性, 水溶解度 12, 16mg/L)

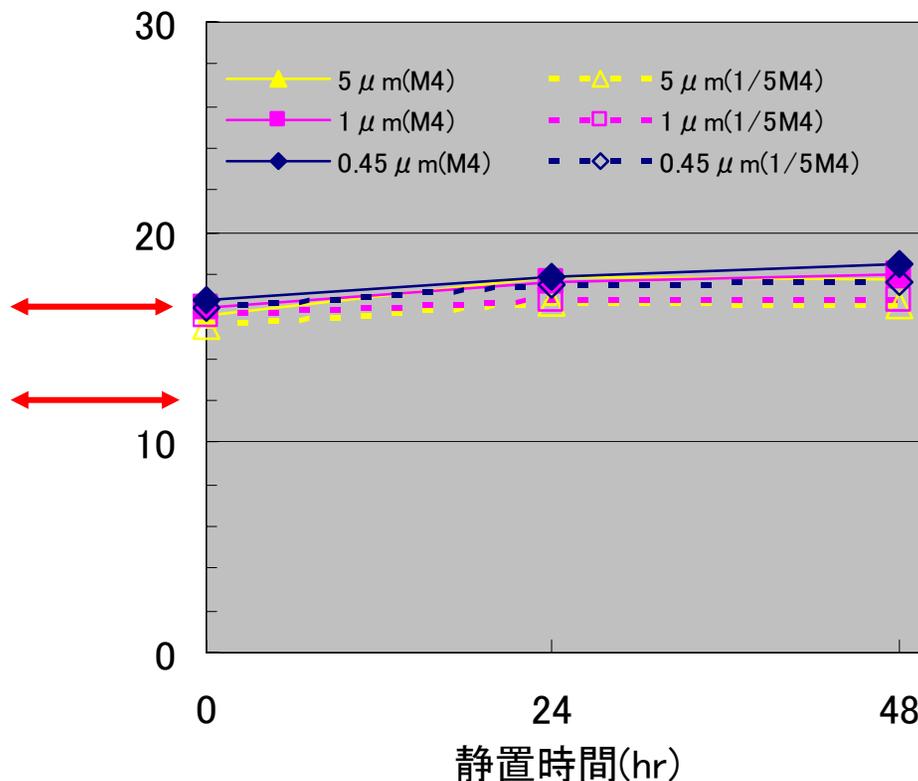
ろ液安定性

攪拌直後のろ液を48時間静置し、経時的に測定

超音波30min+スターラー4hr攪拌



スターラー48hr攪拌



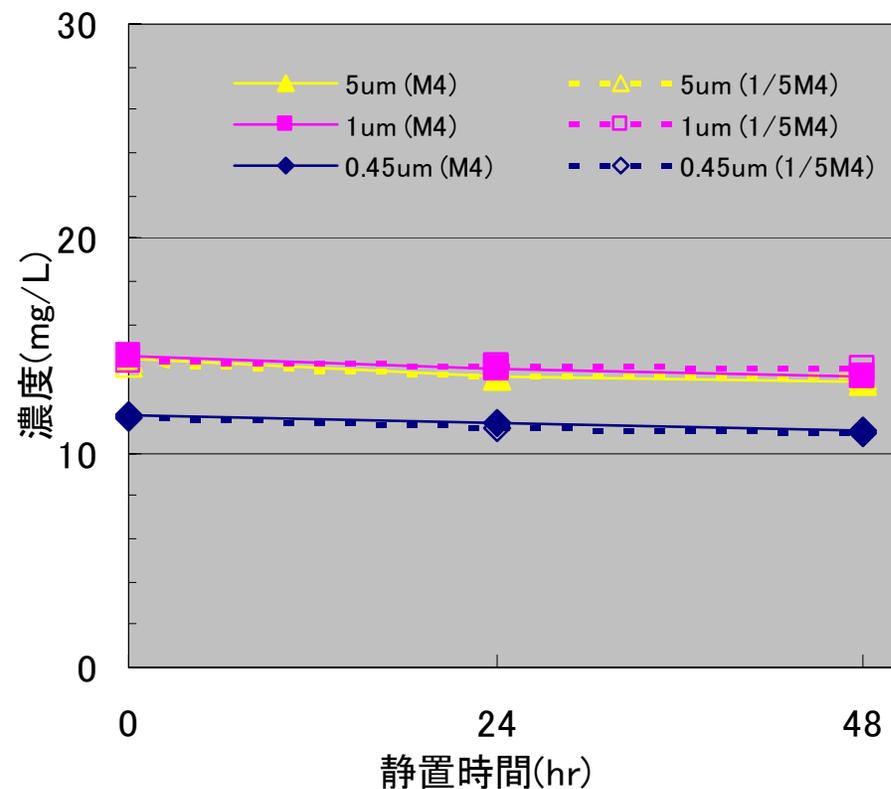
アセナフチレン

(固体, 浮遊性, 水溶解度 12, 16mg/L)

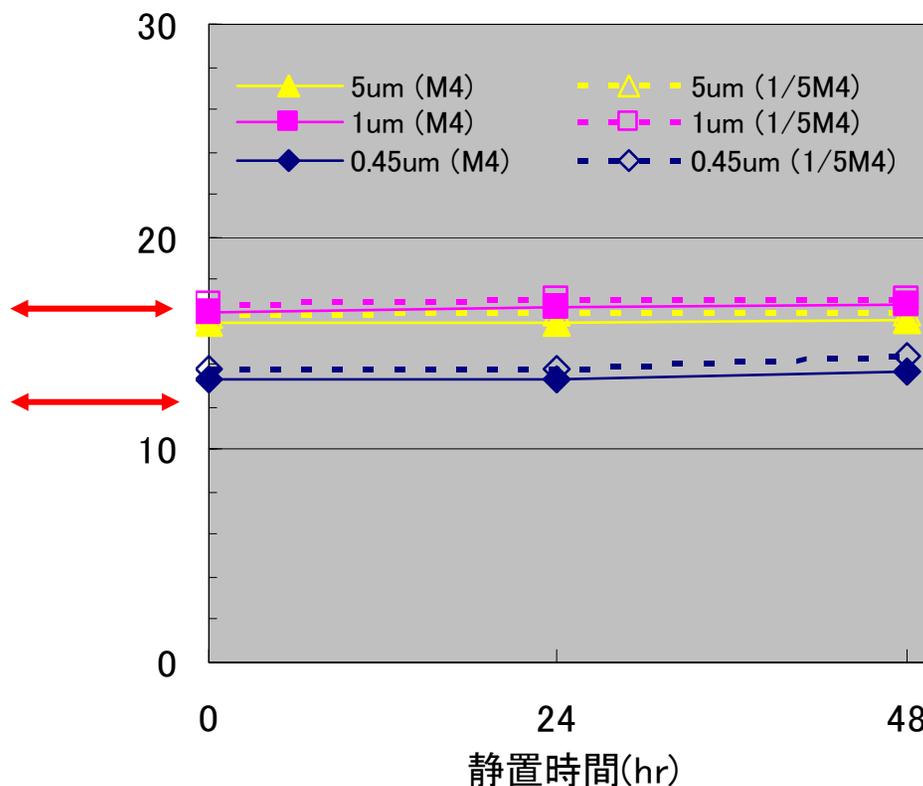
原液安定性

攪拌後、原液を48時間静置し経時的に中層部分をろ過し、ろ液を測定

超音波30min+スターラー4hr攪拌



スターラー48hr攪拌



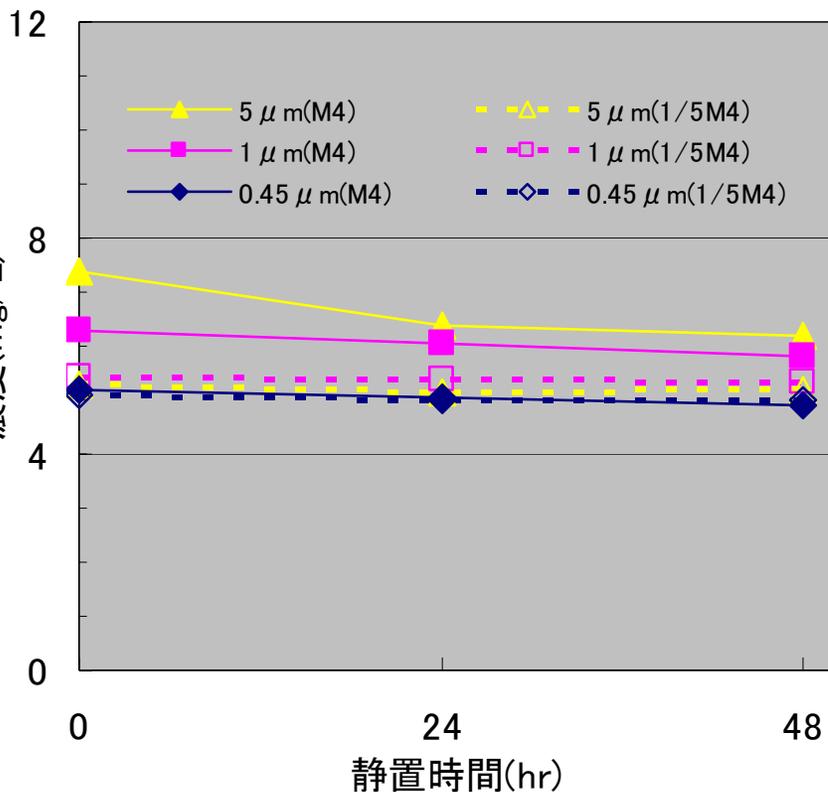
ビフェニル

(固体, 沈降性, 水溶解度 2.1, 7.5mg/L)

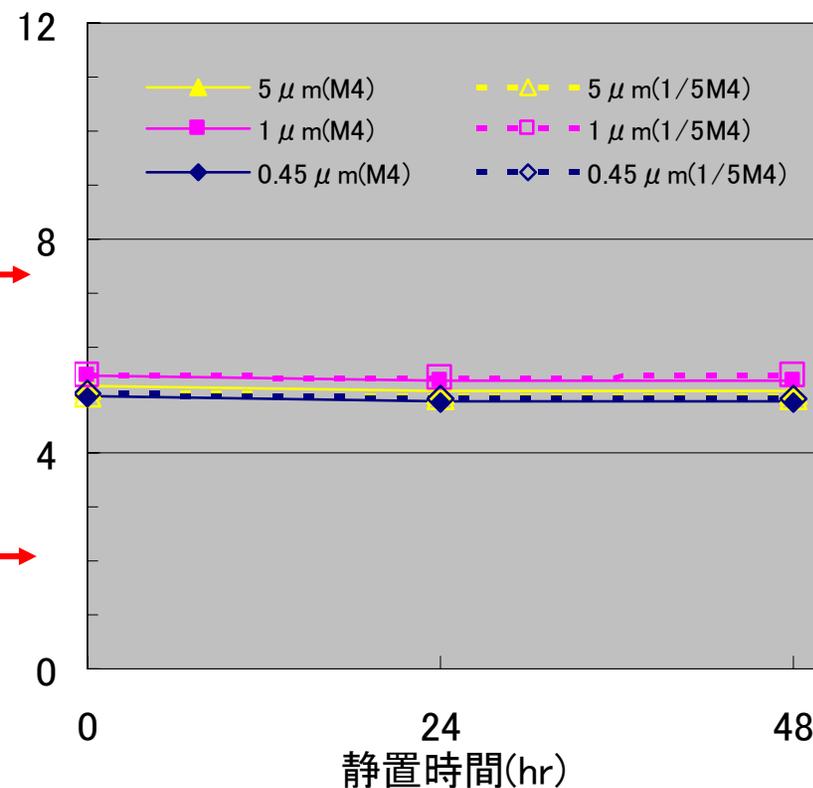
ろ液安定性

攪拌直後のろ液を48時間静置し、経時的に測定

超音波30min+スターラー4hr攪拌



スターラー48hr攪拌



ビフェニル

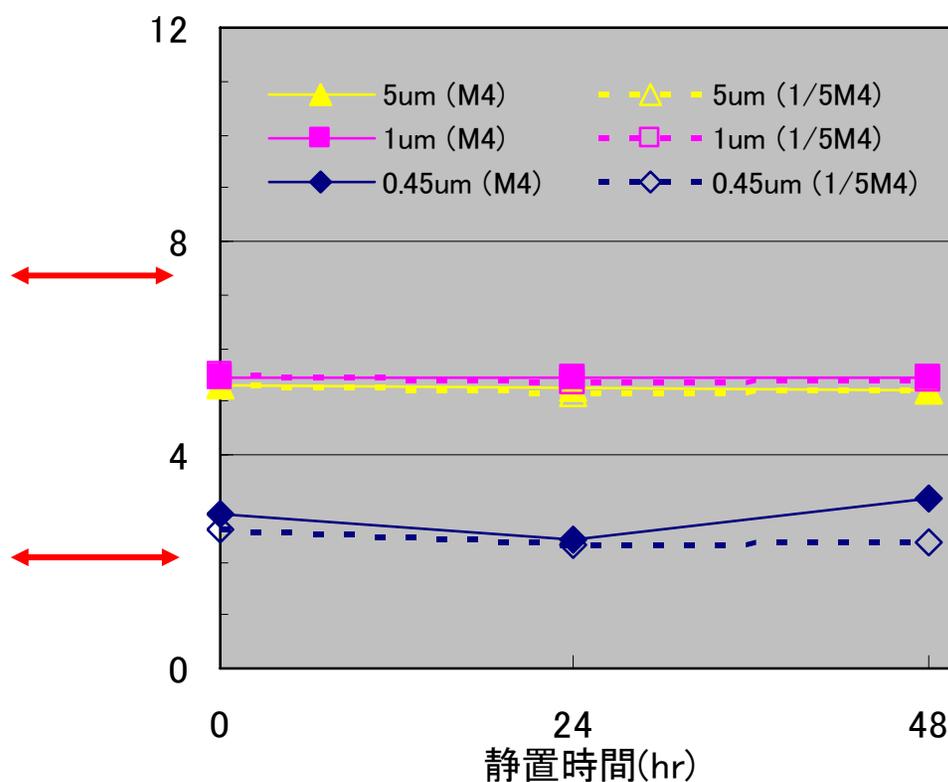
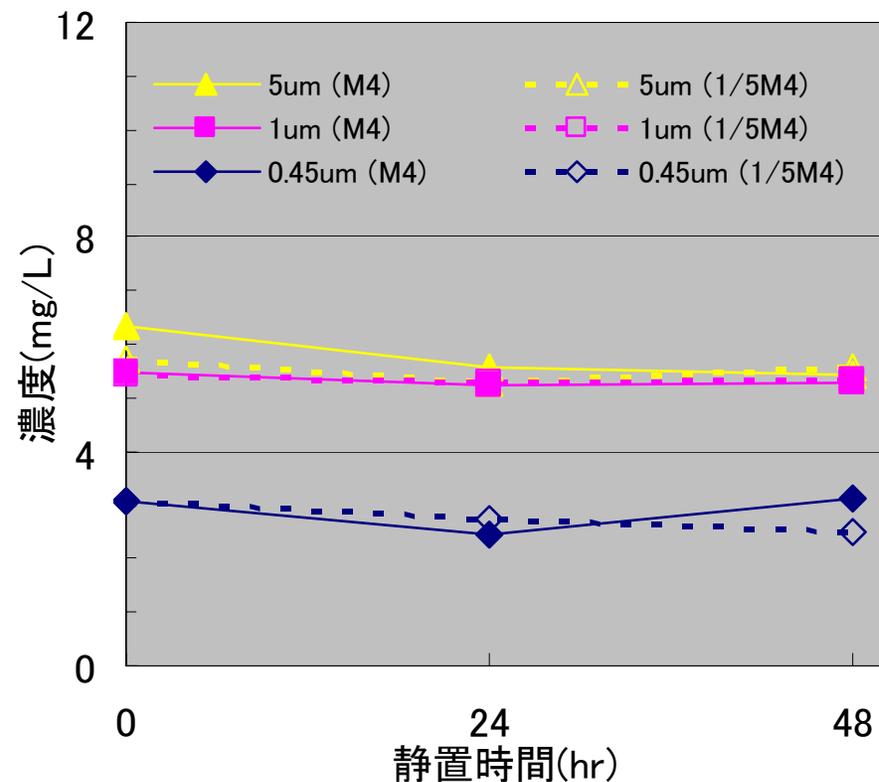
(固体, 沈降性, 水溶解度 2.1, 7.5mg/L)

原液安定性

攪拌後、原液を48時間静置し経時的に中層部分をろ過し、ろ液を測定

超音波30min+スターラー4hr攪拌

スターラー48hr攪拌



1,2,4-トリクロロベンゼン

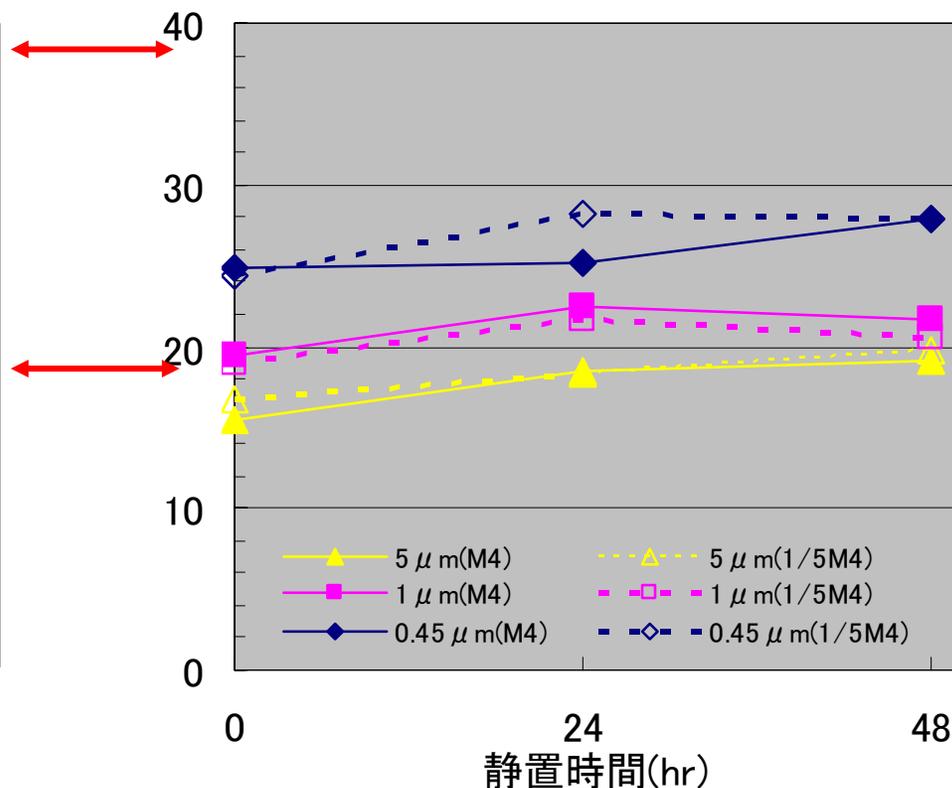
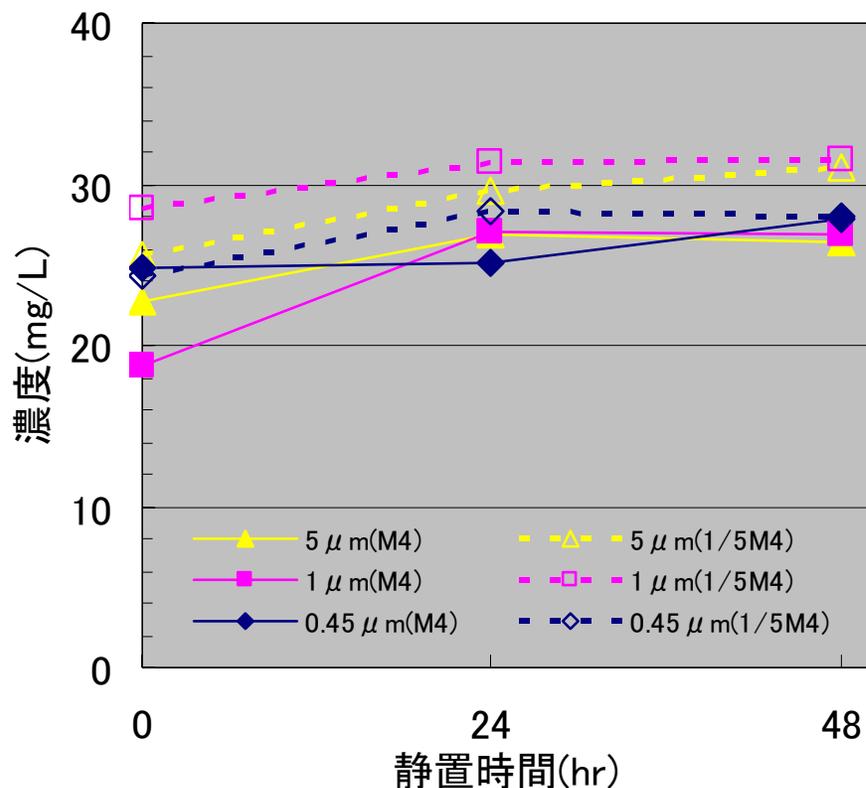
(液体, 比重 > 1, 水溶解度 18, 38mg/L)

ろ液安定性

攪拌直後のろ液を48時間静置し、経時的に測定

超音波30min+スターラー4hr攪拌

スターラー48hr攪拌



1,2,4-トリクロロベンゼン

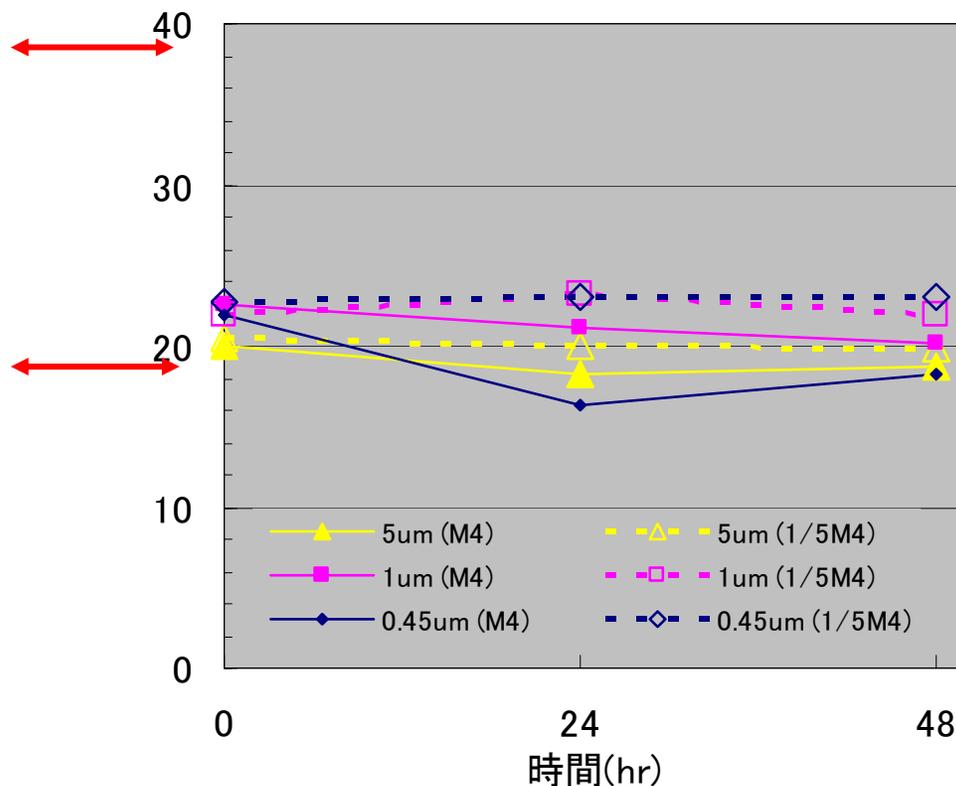
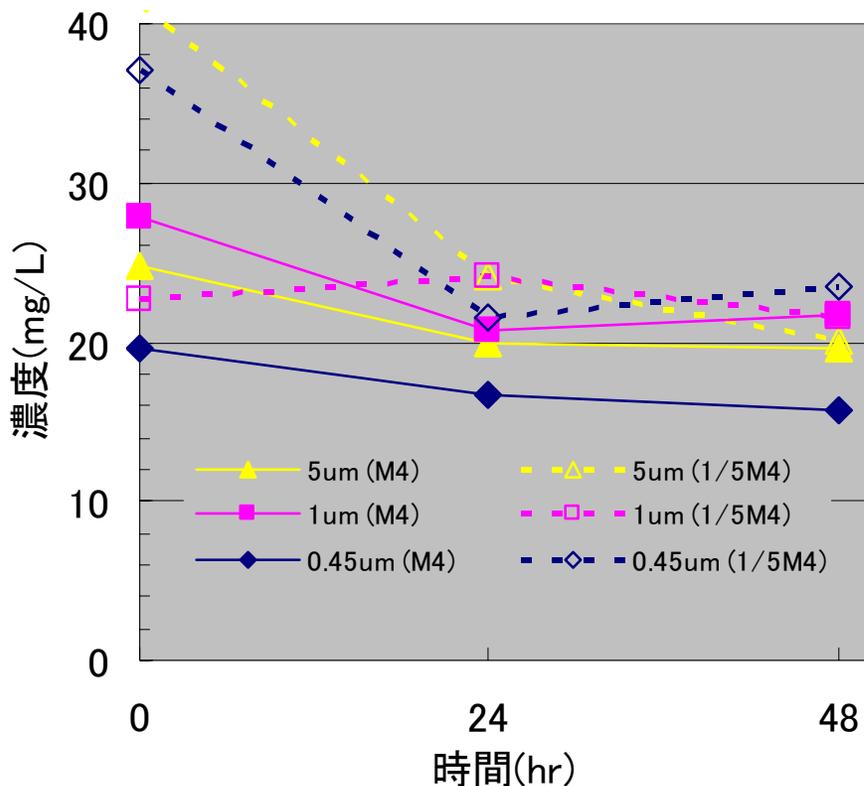
(液体, 比重 > 1, 水溶解度 18, 38mg/L)

原液安定性

攪拌後、原液を48時間静置し経時的に中層部分をろ過し、ろ液を測定

超音波30min+スターラー4hr攪拌

スターラー48hr攪拌



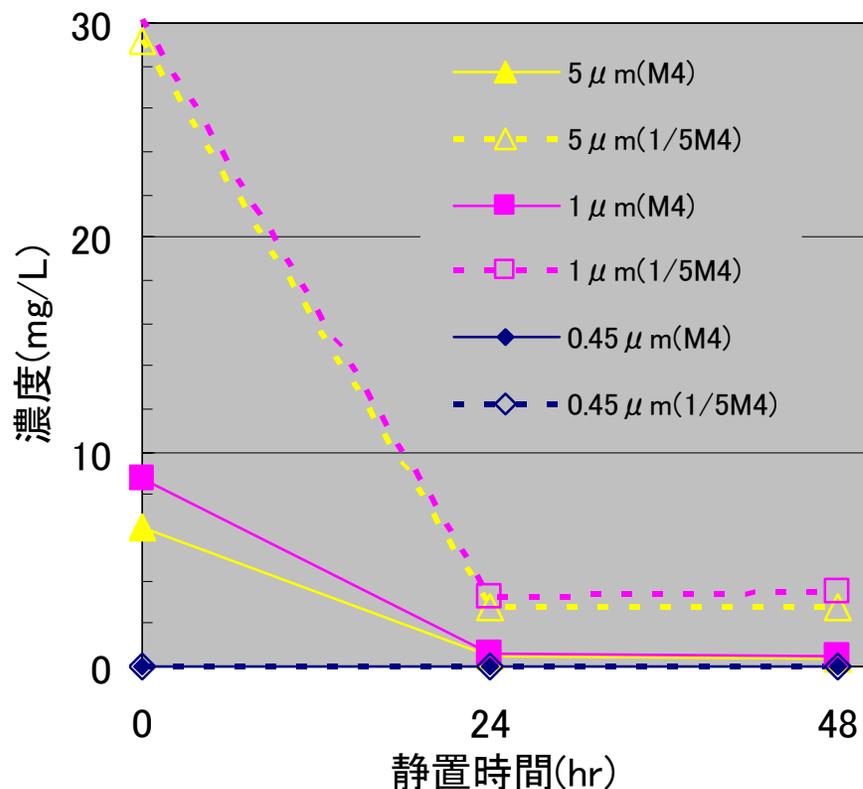
n-ウンデカン

(液体, 比重 <1 , 水溶解度 0.0044, 0.024, 0.044mg/L)

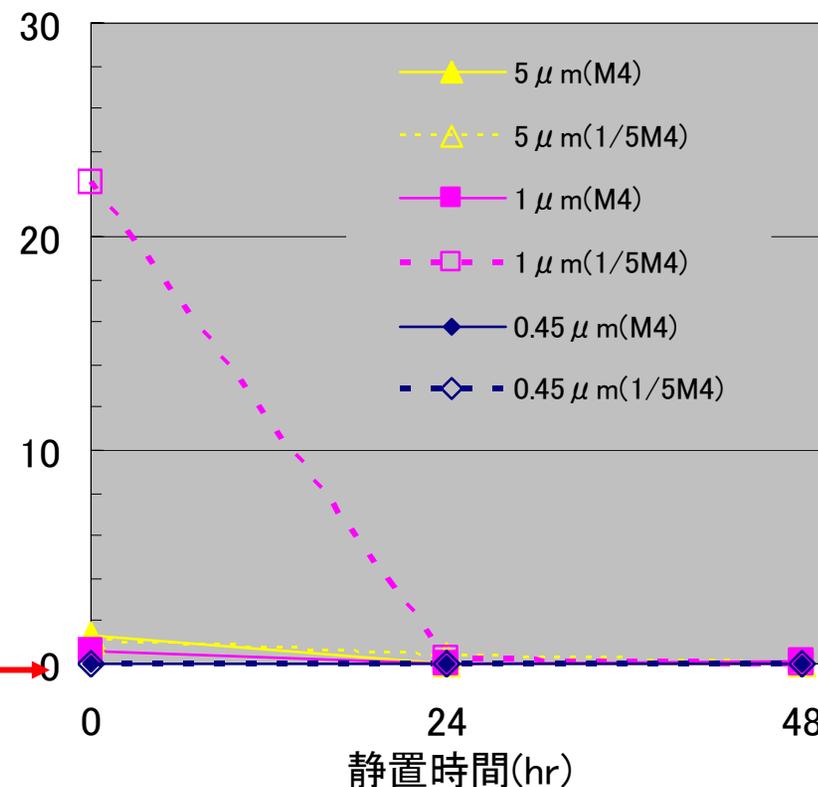
ろ液安定性

攪拌直後のろ液を48時間静置し、経時的に測定

超音波30min+スターラー4hr攪拌



スターラー48hr攪拌



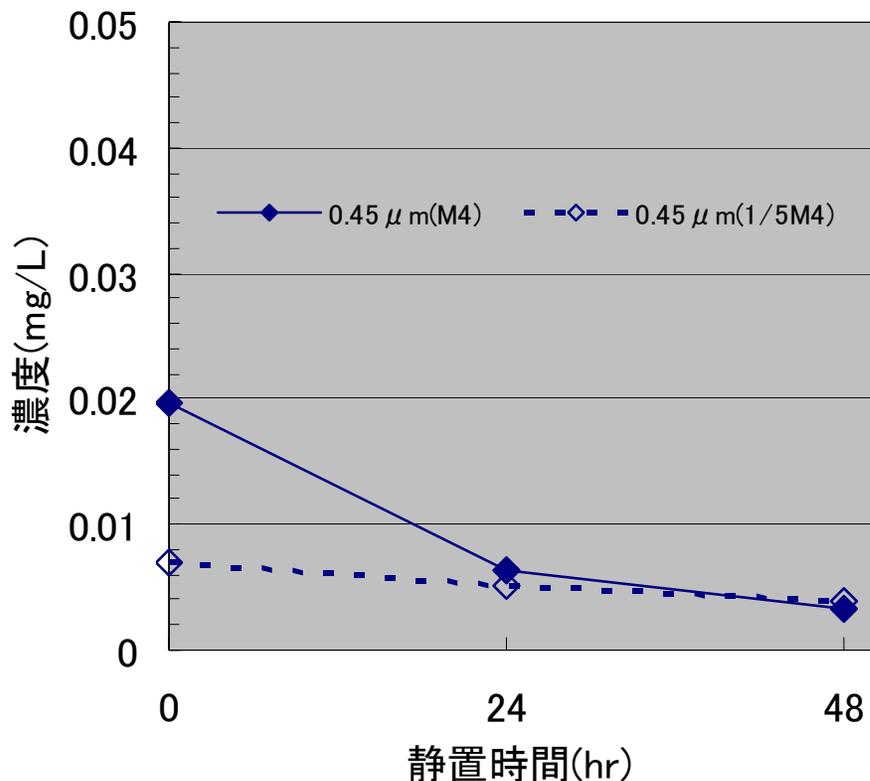
n-ウンデカン

(液体, 比重 <1 , 水溶解度 0.0044, 0.024, 0.044mg/L)

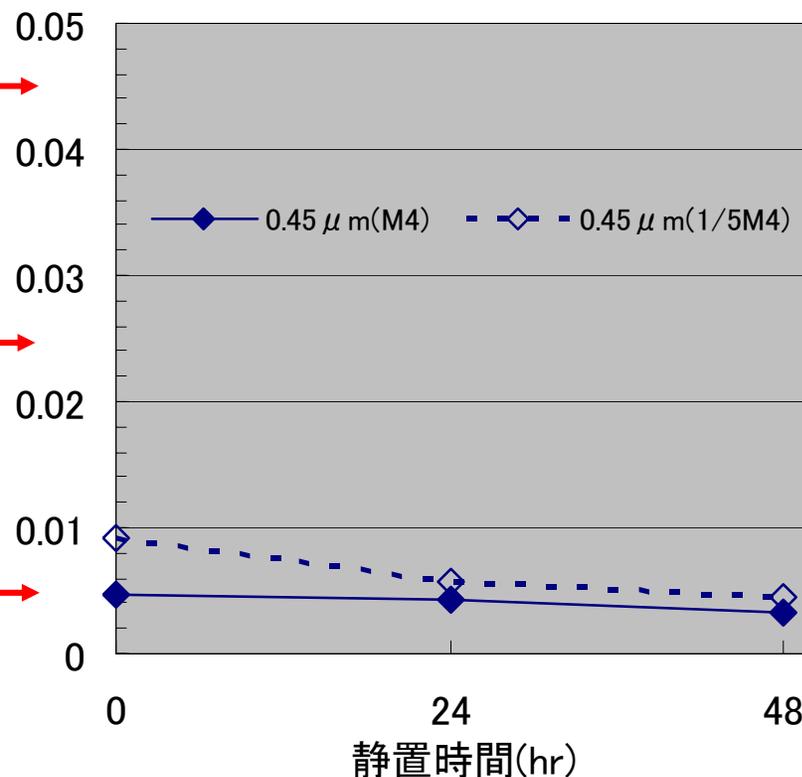
ろ液安定性

攪拌直後のろ液を48時間静置し、経時的に測定

超音波30min+スターラー4hr攪拌



スターラー48hr攪拌



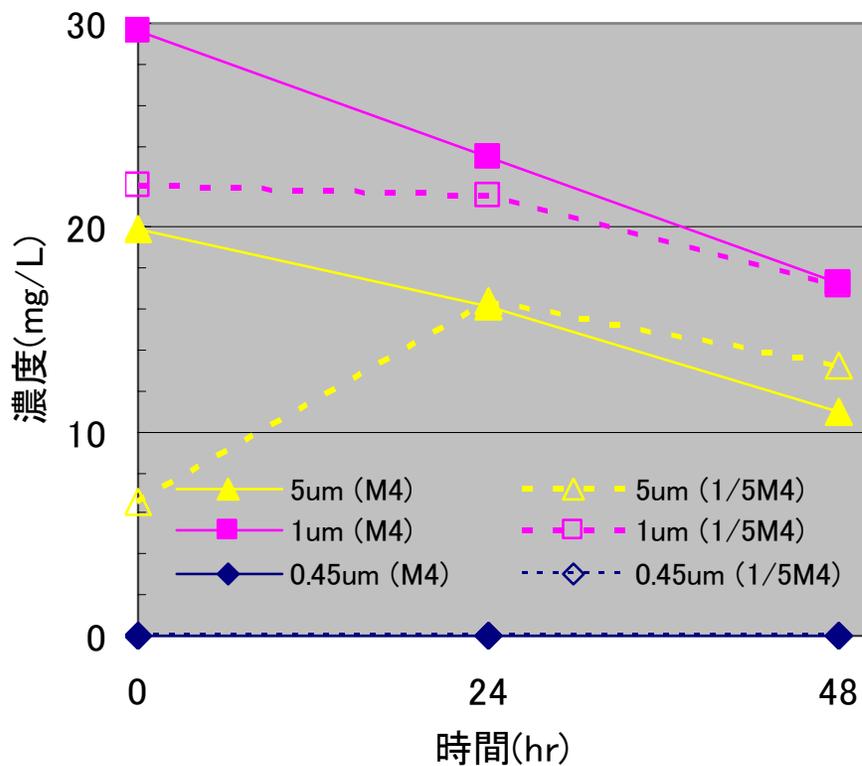
n-ウンデカン

(液体, 比重 <1 , 水溶解度 0.0044, 0.024, 0.044mg/L)

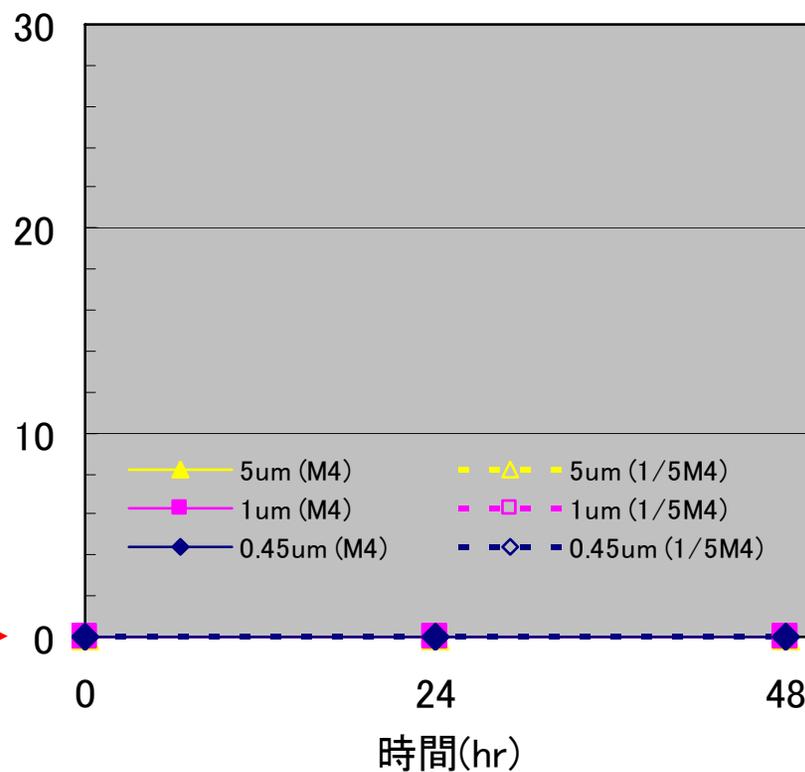
原液安定性

攪拌後、原液を48時間静置し経時的に中層部分をろ過し、ろ液を測定

超音波30min+スターラー4hr攪拌



スターラー48hr攪拌



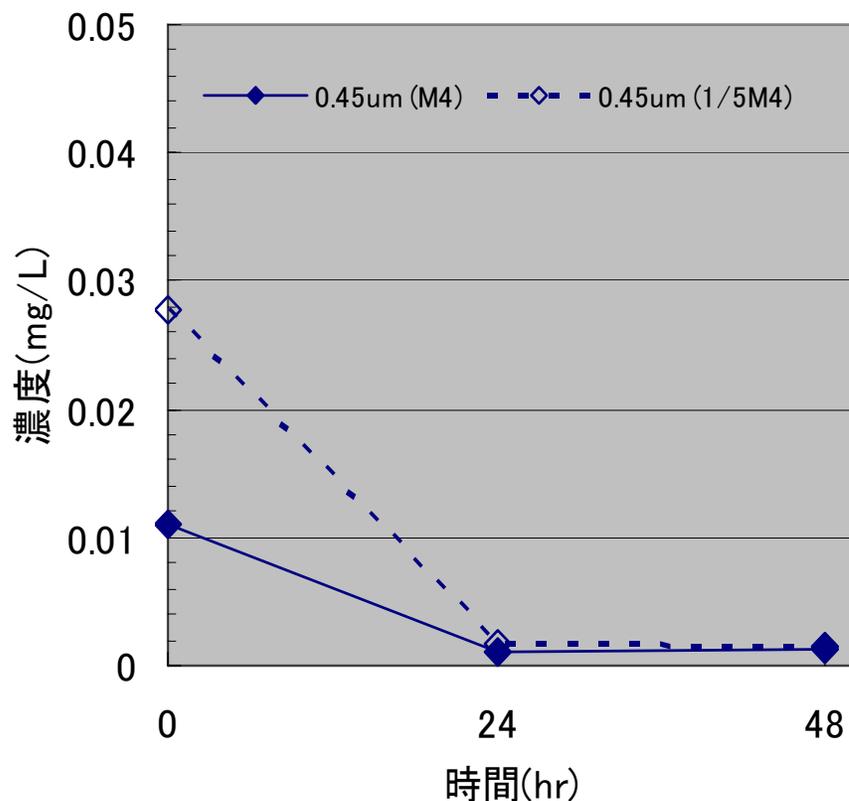
n-ウンデカン

(液体, 比重 <1 , 水溶解度 0.0044, 0.024, 0.044mg/L)

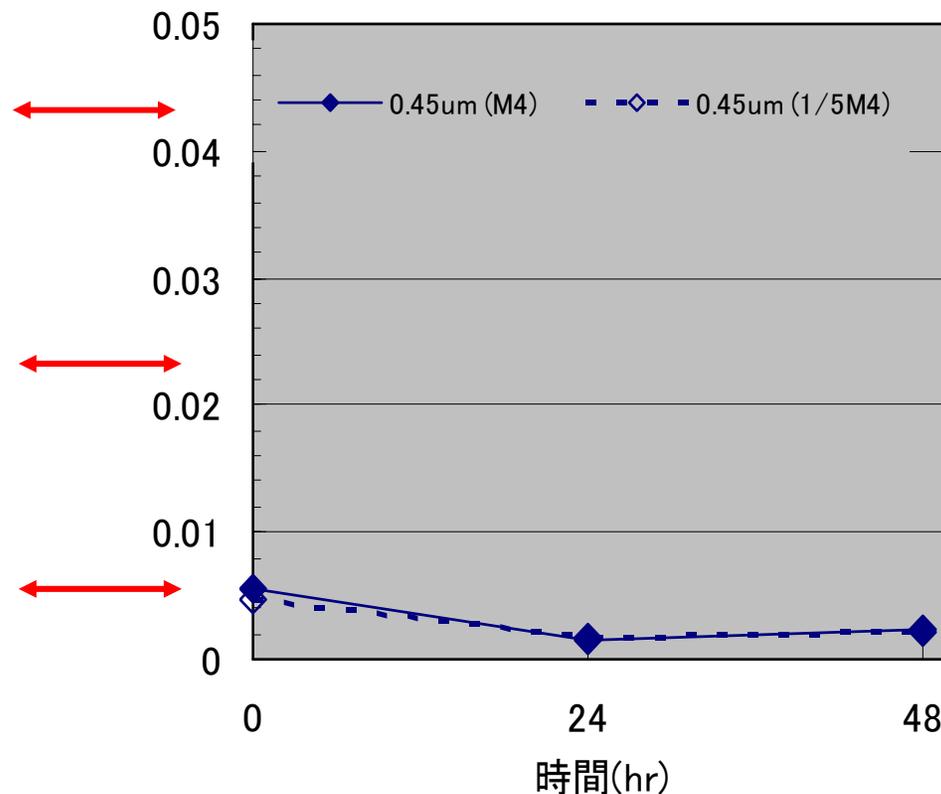
原液安定性

攪拌後、原液を48時間静置し経時的に中層部分をろ過し、ろ液を測定

超音波30min+スターラー4hr攪拌

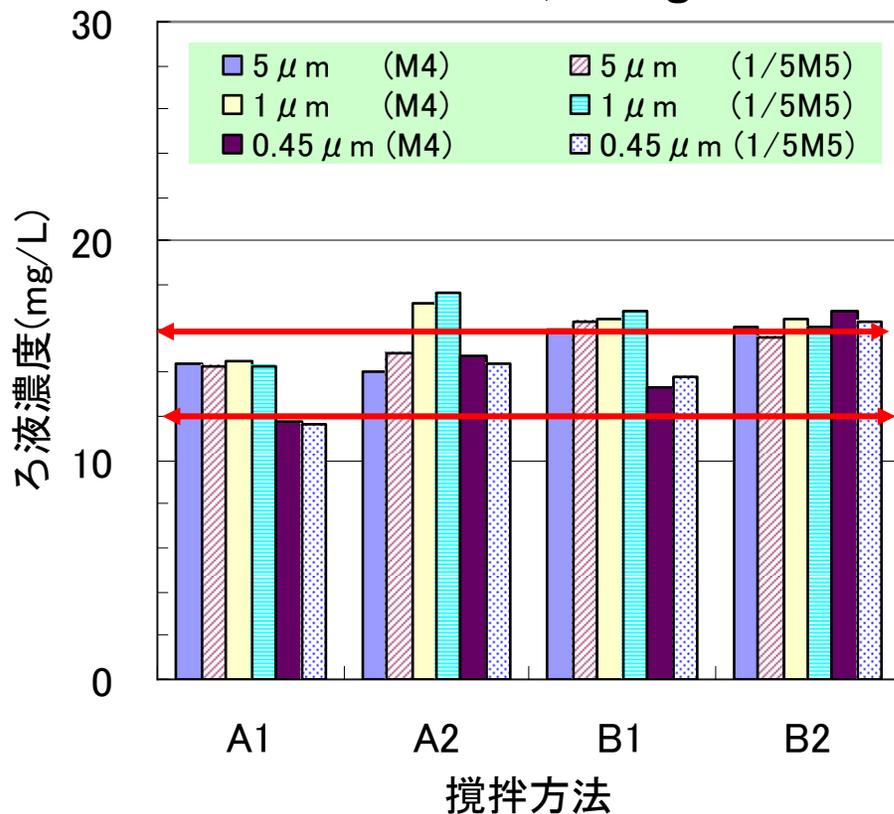


スターラー48hr攪拌

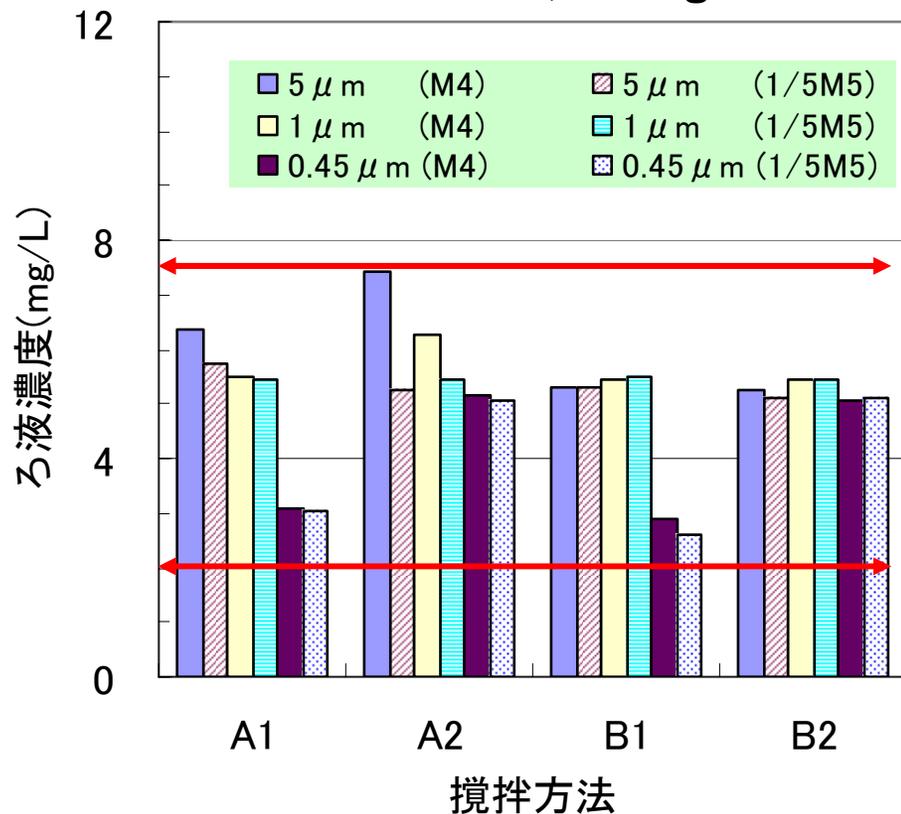


攪拌方法、ろ過孔径、用水硬度の違いとろ液中化学物質濃度(調製時)

アセナフチレン
(水溶解度 12, 16mg/L)



ビフェニル
(水溶解度 2.1, 7.5mg/L)

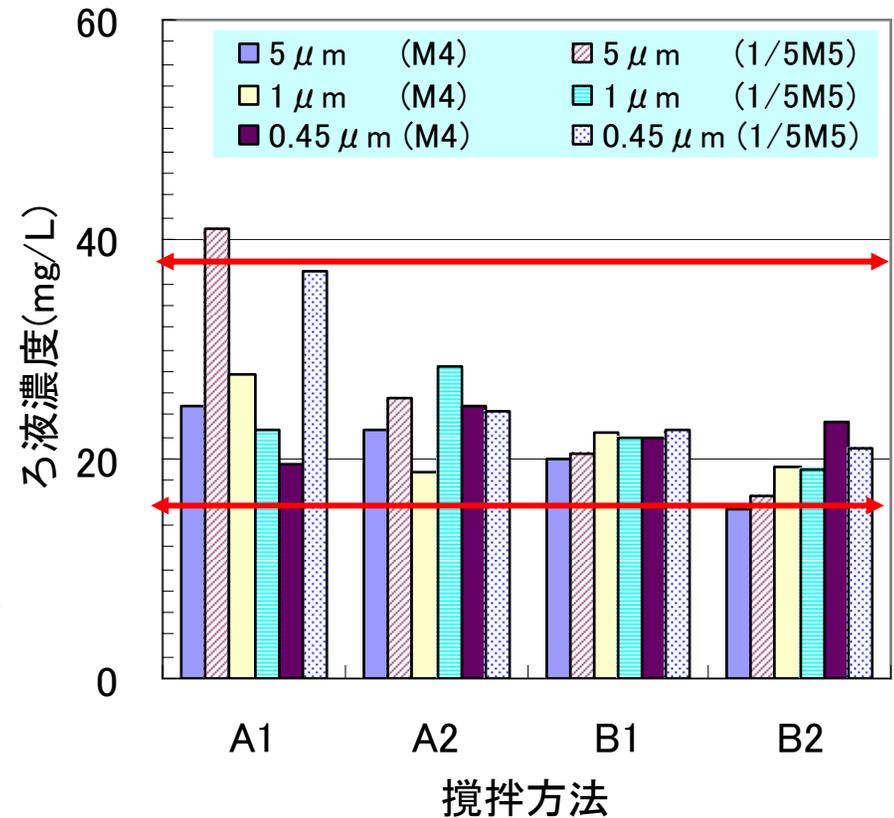
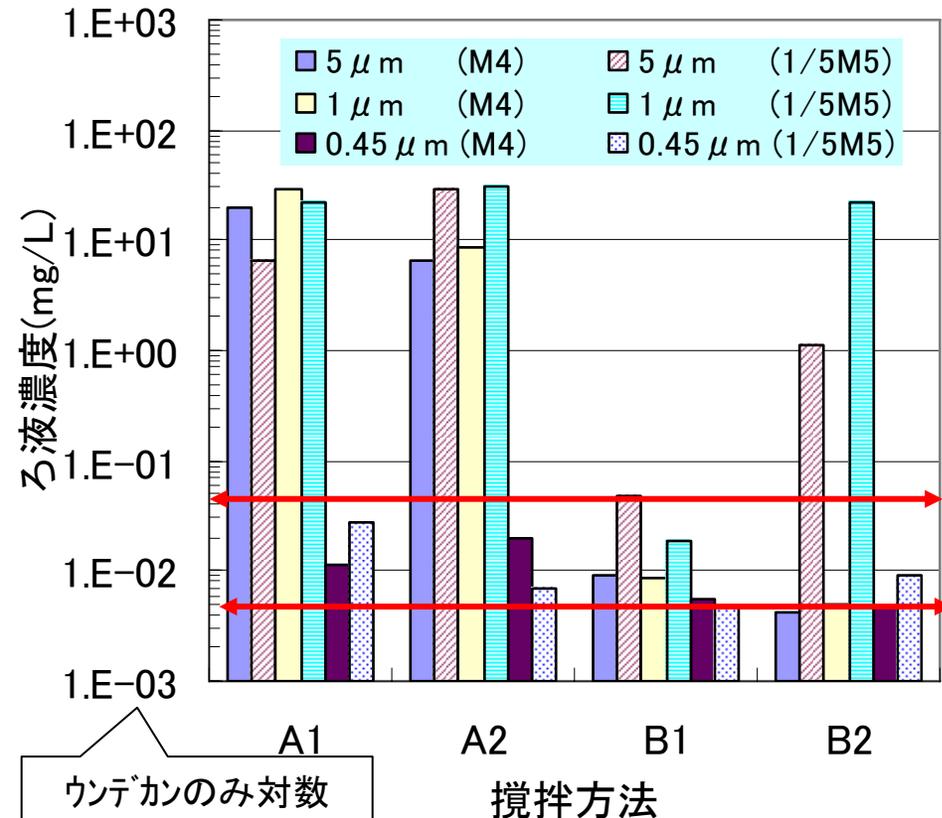


A 1,2: 超音波30min+スターラー4hr攪拌, B1,2 : スターラー48hr攪拌
(ろ液及び原液安定性試験の0時間目は同処理結果であり各々1,2とし比較した)

攪拌方法、ろ過孔径、用水硬度の違いとろ液中化学物質濃度(調製時)

n-ウンデカン
(水溶解度 0.0044, 0.024, 0.044 mg/L)

1,2,4-トリクロロベンゼン
(水溶解度 18, 38 mg/L)



A 1,2: 超音波30min+スターラー4hr攪拌, B1,2 : スターラー48hr攪拌
(ろ液及び原液安定性試験の0時間目は同処理結果であり各々1,2とし比較した)

ウンデカンのみ対数

結果(1)

- **硬度の違いによる差**

少なくとも今回の4物質では硬度の差による著しい濃度差は認められなかった。

- **超音波処理の有無による差**

液体2物質は超音波処理を加えることで溶解又は分散性が高まる傾向。特にウンデカンは、 $0.45 \sim 5 \mu\text{m}$ の微粒子が増、溶解度よりも3オーダー程度高い濃度のろ液も得た。

結果(2)

- ・ 保留粒子径の違いによる差

0.45 μm によるろ液が概して最小濃度，静置による変化も少（攪拌方法に依存しない）。

- ・ 静置による安定性

水溶解度以上の高濃度となったウンデカン(1～5 μm ろ過)のろ液を除き，比較的安定。

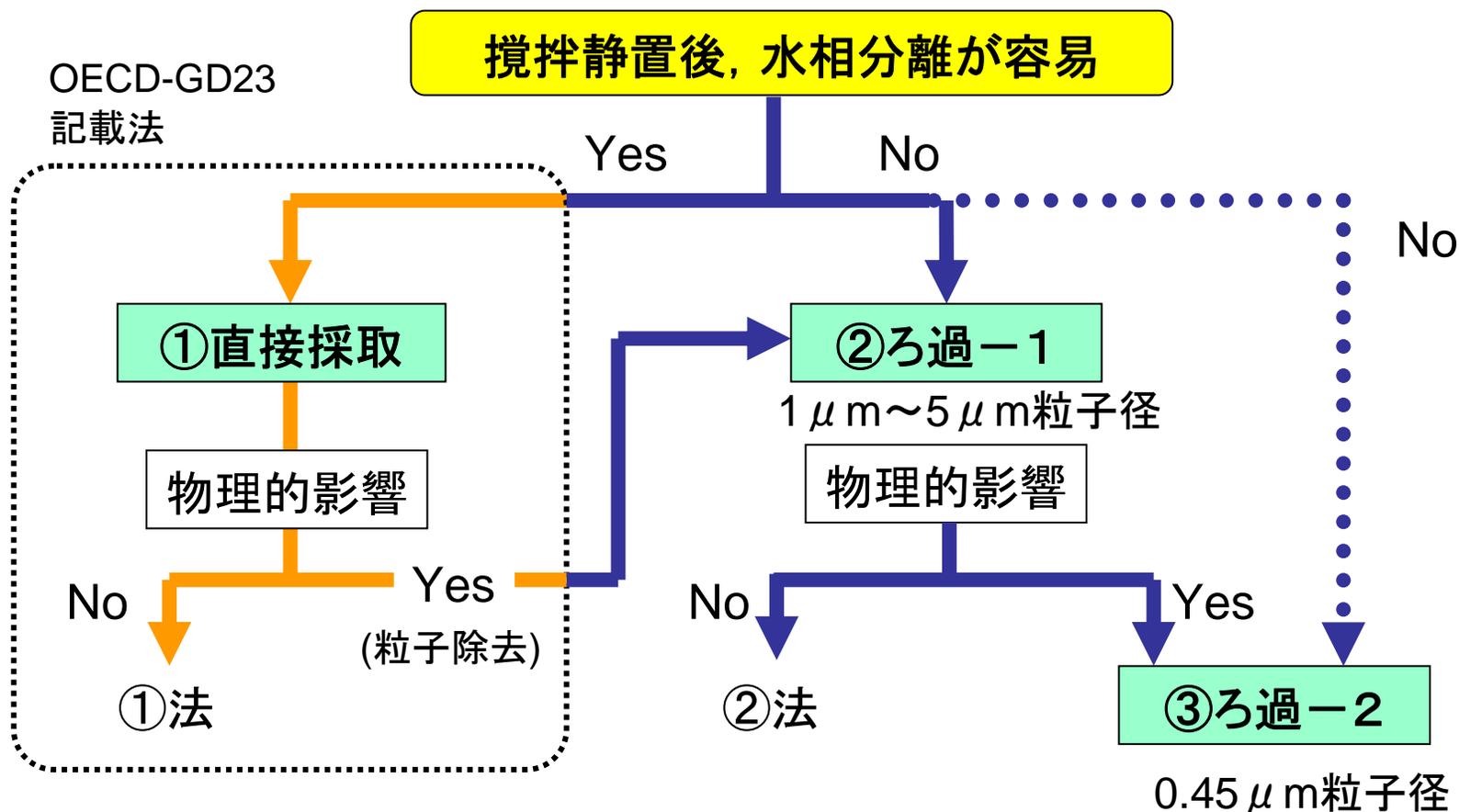
ウンデカンは比重小，故に，微粒子化したものが上部へ移行し濃度勾配形成か。

WAF調製：手順例（案）

<p>攪拌方法</p>	<p>①スターラー48時間 又は ②超音波0.5時間＋スターラー4時間</p> <ul style="list-style-type: none"> ・ エマルジョンや微粒子を形成しやすい液体物質は特に理由がなければ①推奨 ・ 攪拌時間は確認がとれていれば変更可
<p>フィルター 孔径 素材</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ 基本は0.45 μm（前処理：1, 5 μm使用可） ・ 分析困難物質は生物影響がなければ 1, 5 μm使用可 ・ 吸着しない素材を選択
<p>（遠心分離）</p>	<p>確認の上使用可（平成17年度検討範囲外）</p>
<p>静置</p>	<p>溶解度近辺ならば基本は調製時使用 溶解度を大きく超えるような場合は静置後の安定確認（不溶分の目視確認必要）</p>

注： 対照区も試験区同様処理

GD23直接採取法との関係



化学物質性状，溶解性，濃度レベル，安定性，
生物影響等の要因を考慮の上，適宜選択。

今後の検討課題

WAF調製の適用拡大

- ・多成分物質(モデル物質＝検討中)
- ・多成分物質(既存物質＝検討中)

直接添加法と段階希釈法によるWAF比較

- ・濃度組成の変化
- ・生態毒性の違い

事前検討事項

フィルター種類によるろ液中濃度比較

実験条件

- 被験物質 : ビフェニル
- 添加濃度 : 1g/1000mL (M4調製水)
- 攪拌方法 : 超音波処理30分
+ スターラー処理4時間
- 静置 : 約5分
- ろ過 : 各種フィルター (n=3)
- 濃度分析 : HPLC法

フィルター種類

孔径	メーカー	種類	材質
0.45 μm	ミリポア ミリポア	MF-ミリポアHA HVLP	セルロース混合エステル系 ポリビニリデンジフロライド
1 μm^*	アドバンテック Whatman	GA-100 GF/B	何れもガラス繊維
5 μm^*	アドバンテック Whatman	No.2 2	何れも定性ろ紙 (JIS P3801 2種相当)

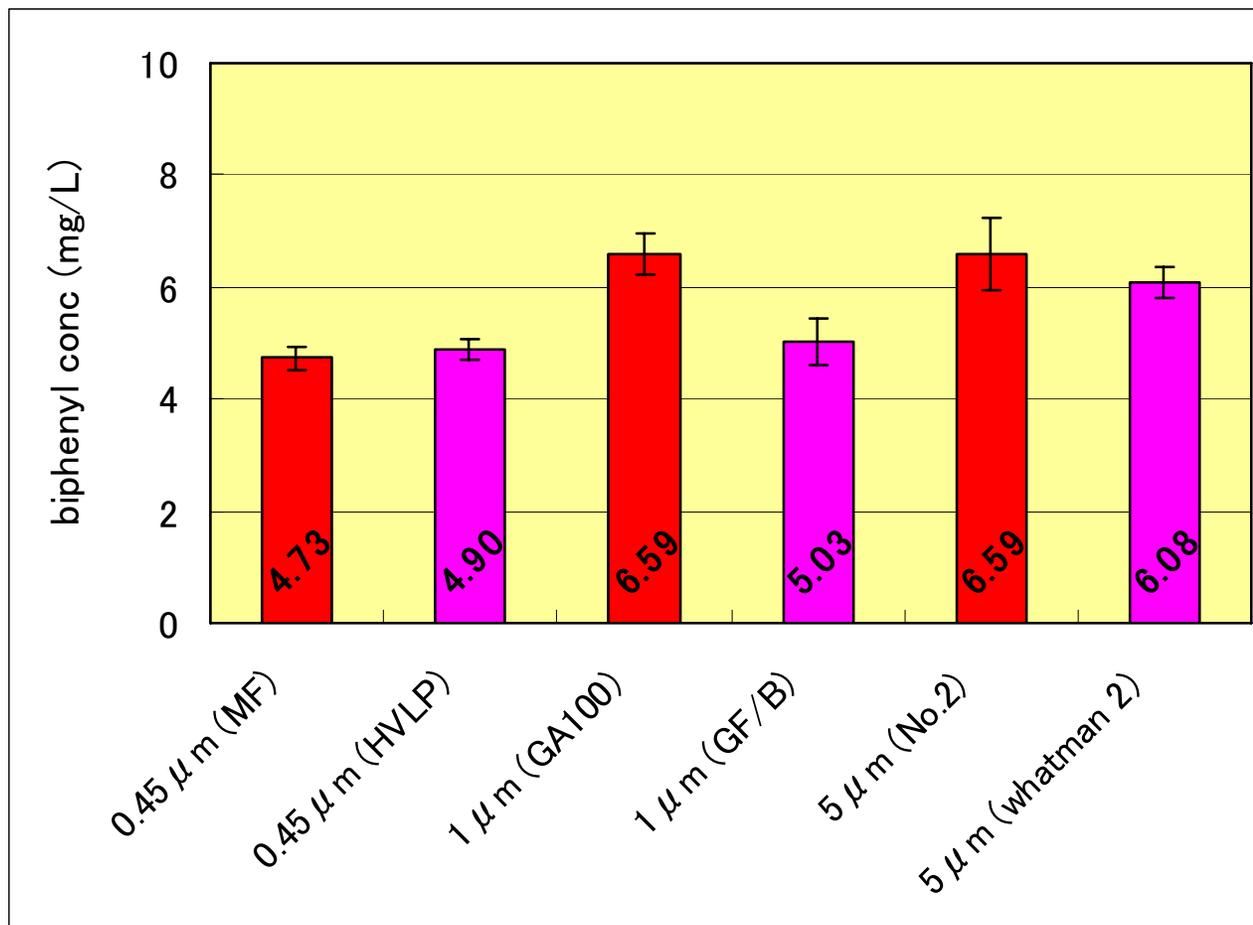
* : 保留粒子径

フィルター種類によるろ液中濃度比較

孔径	フィルター	n	測定値	平均値	標準偏差	変動
			(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(%)
0.45 μm	MF	1	4.83	4.73	0.215	4.55
		2	4.48			
		3	4.87			
	HVLP	1	4.97	4.90	0.180	3.67
		2	4.70			
		3	5.04			
1 μm *	GA-100	1	6.40	6.59	0.391	5.93
		2	7.04			
		3	6.33			
	GF/B	1	4.89	5.03	0.414	8.23
		2	4.71			
		3	5.50			
5 μm *	No.2	1	5.85	6.59	0.657	9.97
		2	7.11			
		3	6.80			
	Whatman 2	1	6.22	6.08	0.272	4.47
		2	5.77			
		3	6.26			

ビフェニル水溶解度 2.1mg/L, 7.5mg/L

フィルター種類によるろ液中濃度比較



孔径および保留粒子径が同一で種類の異なるフィルターでろ過した結果、同一粒子径で著しい違いは認められなかった。