

最 終 報 告 書

パーフロロアルキル (C=4～12) スルホン酸塩 (Na, K, Li) [ペルフルオロオクタンスルホン酸カリウム (被験物質番号 K-1520) にて試験実施] のコイにおける濃縮度試験

(試験番号 : 51520)

化学物質環境研究機構
久留米研究所

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 経済産業省

試験の表題 パーフロロアルキル(C=4~12)スルホン酸塩(Na, K, Li)[ペルフルオ
ロオクタンスルホン酸カリウム(被験物質番号 K-1520)にて試験
実施]のコイにおける濃縮度試験

試験番号 51520

上記試験は、「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第4条に規定する試験施設に関する基準」(環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、平成12年3月1日改正)及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)に従って実施したものです。

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2001年2月20日

試験責任者

[Redacted Signature]

信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 経済産業省

試験の表題 パーフロロアルキル(C=4~12)スルホン酸塩(Na,K,Li)〔ペルフルオ
ロオクタンスルホン酸カリウム(被験物質番号 K-1520)にて試験実
施〕のコイにおける濃縮度試験

試験番号 51520

上記試験は財団法人化学物質評価研究機構久留米事業所の信頼性保証部門が監査及び査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日(試験責任者)	報告日(運営管理者)
試験計画書	2000年10月13日	2000年10月16日	2000年10月16日
	2000年10月31日	2000年10月31日	2000年10月31日
	2000年11月24日	2000年11月24日	2000年11月24日
試験実施状況	2000年10月17日	2000年10月30日	2000年11月2日
	2000年10月24日	2000年10月30日	2000年11月2日
	2000年10月25日	2000年10月30日	2000年11月2日
	2000年11月14日	2000年11月22日	2000年11月24日
	2000年11月15日	2000年11月22日	2000年11月24日
	2000年11月16日	2000年11月22日	2000年11月24日
	2000年11月22日	2000年11月22日	2000年11月24日
生データ及び最終報告書	2001年2月20日	2001年2月20日	2001年2月20日

本最終報告書は、試験の方法が正確に記載されており、内容が試験計画及び標準操作手順に従い、かつ、生データを正確に反映していることを保証します。

2001年2月20日

信頼性保証部門責任者



目 次

	頁
表 題	1
試験委託者	1
試験施設	1
試験目的	1
試験法	1
適用 G L P	1
試験日程	2
試験資料の保管	2
試験関係者	2
最終報告書の承認	2
要 約	3
1. 被 験 物 質	4
2. 急性毒性試験	6
3. 濃縮度試験の実施	8
4. 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	21
5. 試験結果	21
6. 参考試験	23
7. 考 察	27
8. 備 考	28

表 題	パーフロロアルキル(C=4～12)スルホン酸塩(Na, K, Li) [ペルフルオロオクタンスルホン酸カリウム (被験物質番号 K-1520) にて試験実施] のコイにおける濃縮度試験
試験委託者	経済産業省 (〒100-8901) 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号
試験施設	財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所 (〒830-0023) 福岡県久留米市中央町 19-14
試験目的	K-1520のコイにおける濃縮性の程度について知見を得る。
試験法	「新規化学物質等に係る試験の方法について」(環保業第5号、薬発第615号、49基局第392号、昭和49年7月13日、平成10年10月8日改正)に規定する〈魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験〉及び「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める“Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)”に準拠した。
適用 G L P	<p>(1) 化学物質GLP</p> <p>「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第4条に規定する試験施設に関する基準」(環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、平成12年3月1日改正)を適用した。</p> <p>(2) OECD-GLP</p> <p>「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)を適用した。</p>

試験日程

試験開始日	2000年10月13日
実験開始日	2000年10月25日
実験終了日	2000年12月22日
試験終了日	2001年 2月16日

試験資料の保管

(1) 被験物質

同一ロットの被験物質が分解度試験終了後にすでに保管されているため、本試験終了後には保管しない。

(2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、指示書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、試験委託者から通知を受けるまでの期間、久留米事業所資料保管室に保管する。

試験関係者

試験責任者

所属 試験第一課

試験担当者
(濃縮度試験の実施)

飼育管理責任者

急性毒性試験担当者

最終報告書の承認

2001年2月16日

試験責任者

要 約

試験の表題

パーフロアルキル(C=4～12)スルホン酸塩(Na, K, Li) [ペルフルオロオクタンスルホン酸カリウム (被験物質番号 K-1520) にて試験実施] のコイにおける濃縮度試験

試験条件

急性毒性試験

- | | |
|-----------|-----------------|
| (1) 供 試 魚 | ヒメダカ |
| (2) ばく露期間 | 96時間 |
| (3) ばく露方法 | 半止水式 (24時間毎に換水) |

濃縮度試験

- | | |
|-------------|-----------------------------|
| (1) 供 試 魚 | コイ |
| (2) 試 験 濃 度 | 第1濃度区 20 μ g/L |
| | 第2濃度区 2 μ g/L |
| (3) ばく露期間 | 58日間 |
| (4) ばく露方法 | 連続流水式 |
| (5) 分 析 方 法 | 高速液体クロマトグラフィーー質量分析法 |

試験結果

- | | |
|------------------------|------------|
| (1) 96時間LC50値 | 89.1mg/L |
| (2) 第1濃度区の定常状態における濃縮倍率 | 720倍 |
| (3) 第2濃度区の濃縮倍率 | 200倍～1500倍 |

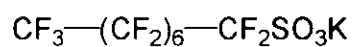
1. 被 験 物 質

本報告書においてK-1520は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 ペルフルオロオクタンスルホン酸カリウム

1.2 構造式等

構造式



分子式 $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{KO}_3\text{S}$

分子量 538.22

1.3 入手先、商品名及びロット番号^{*1}

(1) 入 手 先

(2) 商 品 名

(3) ロット番号 A37626B

^{*1} 入手先添付資料による。

1.4 純 度^{*1}

被 験 物 質 100.3% (カリウムによる重量法)

被験物質は純度100%として取り扱った。

1.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル (Fig. 20参照) 及び質量スペクトル (Fig. 21参照) により構造を確認した。

1.6 保管条件及び保管条件下での安定性

(1) 保管条件 冷蔵保存

(2) 安定性確認 実験開始前及び終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した結果、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した (Fig. 20参照)。

1.7 試験条件下での安定性

実験開始前に予備検討を行い、試験条件下で安定であることを確認した。

2. 急性毒性試験

2.1 試験方法

「工場排水試験方法，魚類による急性毒性試験」（JIS K 0102-1998 の 71.）の方法に準じて行った。

2.2 供試魚

- | | | |
|---------|---|---|
| (1) 魚 | 種 | ヒメダカ <u>Oryzias latipes</u> |
| | | 選択理由：コイと感受性が類似しており、供試魚として入手し易いため。 |
| (2) 供 | 給 | 源 |
| | | 小川商店
(住所 〒 830-0049 福岡県久留米市大石町 181) |
| (3) 蓄 | 養 | 条 |
| | | 件 |
| | | 魚の入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、蓄養槽で薬浴後、流水状態で23日間飼育した。 |
| (4) じゅん | 化 | 条 |
| | | 件 |
| | | 蓄養後、じゅん化水槽へ搬入し薬浴した後、じゅん化を行った。その間異常のあるものは除去し、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水温の流水状態で40日間飼育した。その後、再度選別及び薬浴を実施した後、流水状態で34日間飼育した。 |
| (5) 体 | | 重 |
| | | 平均 0.30g |
| (6) 全 | | 長 |
| | | 平均 3.1 cm |
| (7) 感 | 受 | 性 |
| | | 試 |
| | | 験 |
| | | 同一ロット (TF0-000801) の供試魚による基準物質PCP-Na[ペンタクロロフェノールナトリウム 試薬 東京化成工業製] の48時間LC50値は0.596mg/Lであった。 |

2.3 試験用水

(1) 種 類

久留米事業所敷地内で揚水した地下水

(2) 水質確認

久留米事業所にて2000年8月8日に採水し、測定又は分析を行った結果をReference 1に示す（測定頻度1回/6ヶ月）。各項目の測定又は分析値は「水道法に基づく水質基準」（平成4年12月21日改正 厚生省令第69号），「水産用水基準」（社団法人 日本水産資源保護協会 昭和58年3月），「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」"Fish, Early-life Stage Toxicity Test (Guideline 210, July 17, 1992)"，「水質汚濁に係る環境基準」（平成11年2月22日改正 環境庁告示第14号）又は「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」"Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)"に記載されている濃度以下であることを確認した。

2.4 試験条件

(1) 試験水槽	円形ガラス製水槽	
(2) 試験液量	4L/濃度区	
(3) 試験温度	ばく露開始時	24.6～24.7℃
	換水前	24.6～24.8℃
(4) 溶存酸素濃度	ばく露開始時	7.9～8.0mg/L
	換水前	5.8～6.3mg/L
(5) pH	ばく露開始時	8.1
	換水前	7.8～7.9
(6) 供試魚数	10尾/濃度区	
(7) ばく露期間	96時間	
(8) ばく露方法	半止水式（24時間毎に換水）	

2.5 原液調製法

被験物質をイオン交換水に溶解し、被験物質濃度として500mg/Lの原液を調製した。

2.6 試験の実施

(1) 実施場所	214LC50室
(2) 試験実施日	2000年10月16日 ～ 2000年10月20日

2.7 96時間LC50値の算出

Doudoroff法で行った。

2.8 試験結果

被験物質の96時間LC50値 89.1mg/L (Fig.3参照)

3. 濃縮度試験の実施

3.1 供試魚

(1) 魚	種	コイ <u>Cyprinus carpio</u>
		選択理由：過去の知見との整合性を考慮するため及び大きさが扱い易いため。
(2) 供	給	源
		福岡県矢部川漁業協同組合 (住所 〒 834-0012 福岡県八女市大字山内 748)
		供試魚受入日 2000年 9月 1日
(3) 蓄	養	条 件
		魚の入手時に目視観察をして異常のあるものを除去し、受入槽で薬浴後、流水状態で8日間飼育した。
(4) じゅん化条件		蓄養後、寄生虫駆除の薬浴を行った後、じゅん化水槽へ搬入し、再度薬浴した後、じゅん化を行った。その間異常のあるものは除去し、 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の水温の流水状態で15日間飼育した。さらに試験水槽へ移し、薬浴後、同温度の流水状態で27日間飼育した。
(5) 全	長	6.4～9.6cm
(6) ロ	ッ	ト
		TFC-000901
(7) 年	齢	当才魚
(8) 餌	料	
	種	類
	組	成
		コイ稚魚育成用配合飼料 たん白質含量 43.0%以上 脂 質 含 量 3.0%以上
	製 造 元	日本配合飼料株式会社
	給 餌 方 法	供試魚体重の約2%相当量を1日2回に分けて給餌した。ただし、供試魚の採取前24時間は給餌を止めた。

3.2 試験用水

2.3に同じ。

3.3 試験及び環境条件

(1) 試験水供給方法	久留米事業所組立流水式装置を用いて供給した。	
(2) 試験水槽	100L容ガラス製水槽	
(3) 試験水量	原液2mL/分及び試験用水1600mL/分の割合で2307L/日を試験水槽に供した。	
(4) 原液タンク	25L容ガラス製びん 交換頻度 1～2回程度/週	
(5) 試験温度	第1濃度区	25.0～25.4℃
	第2濃度区	25.5～25.8℃
	対照区	25.1～25.4℃
(6) 溶存酸素濃度	第1濃度区	7.9～8.1mg/L (Fig. 11参照)
	第2濃度区	8.0～8.1mg/L (Fig. 12参照)
	対照区	8.0～8.1mg/L (Fig. 13参照)
(7) pH	第1濃度区	7.6～7.8
	第2濃度区	7.6～7.8
	対照区	7.6～7.8
(8) 照光時間	白色蛍光灯による人工照明 (14時間明/10時間暗)	
(9) 供試魚数	第1及び第2濃度区	40尾 (ばく露開始時)
	対照区	14尾 (ばく露開始時)
(10) ばく露期間	58日間 設定理由：予備試験の結果、28日間では定常状態に達しないと予想されたため。	
(11) 実施場所	213アクアトロン室	

3.4 原液調製法

・第1濃度区

2.5と同様にして被験物質濃度として16mg/Lの原液を調製した。

・第2濃度区

2.5と同様にして被験物質濃度として1.6mg/Lの原液を調製した。

3.5 試験濃度

96時間LC50予備値及び被験物質の分析感度を考慮して、

第1濃度区 20μg/L

第2濃度区 2μg/L

に被験物質濃度を設定した。同時に、空試験として対照区を設定した。

3.6 観察、測定及び清掃

- | | |
|------------|------------------------------------|
| (1) 供試魚の観察 | 供試魚の健康状態等を1日に2回目視観察した。 |
| (2) 試験水量 | メスシリンダーを用いて1日に1回測定記録した。 |
| (3) 試験温度 | アルコール温度計を用いて1日に1回測定記録した。 |
| (4) 溶存酸素濃度 | 溶存酸素計を用いて1週間に2回測定記録した。 |
| (5) pH測定 | pH計を用いて1週間に1回以上測定記録した。 |
| (6) 清掃 | 実験期間中は、コイの排泄物、水槽壁の汚れ等を1日に1回程度除去した。 |

3.7 試験水及び供試魚の分析

試験水及び供試魚中の被験物質分析は高速液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）により行った。

被験物質を高速液体クロマトグラフィー質量分析計で分析したところ、3本の異性体ピークが検出された（Fig. 21参照）が、各々のピークの総面積で定量を行った。

3.7.1 分析回数

(1) 試験水

試験水分析は第1、第2濃度区ともばく露期間中、最初の供試魚分析までに1回及び供試魚分析と同時に行った。1回当りの分析試料は1点とした。

(2) 供試魚

供試魚分析は第1、第2濃度区ともばく露期間中に6回行い、1回当りの採取尾数は4尾とし、2群(2尾1群)*²に分けて行った。

対照区は実験開始前及び終了後に行い、1回当りの採取尾数は6尾とし、3群(2尾1群)に分けて分析した。

*2 個体ごとの分析では、脂質含量測定のための保存用試料が十分得られないため2尾1群とした。

3.7.2 分析試料の前処理

(1) 試験水中の被験物質

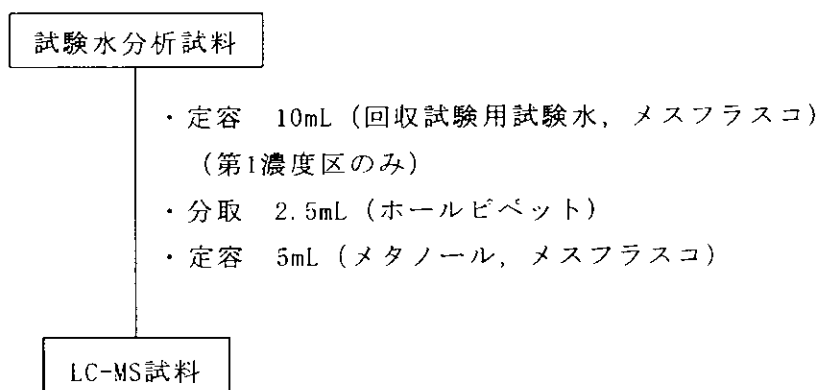
試験水槽から

第1濃度区 1mL

第2濃度区 10mL

を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、高速液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）試料とした。

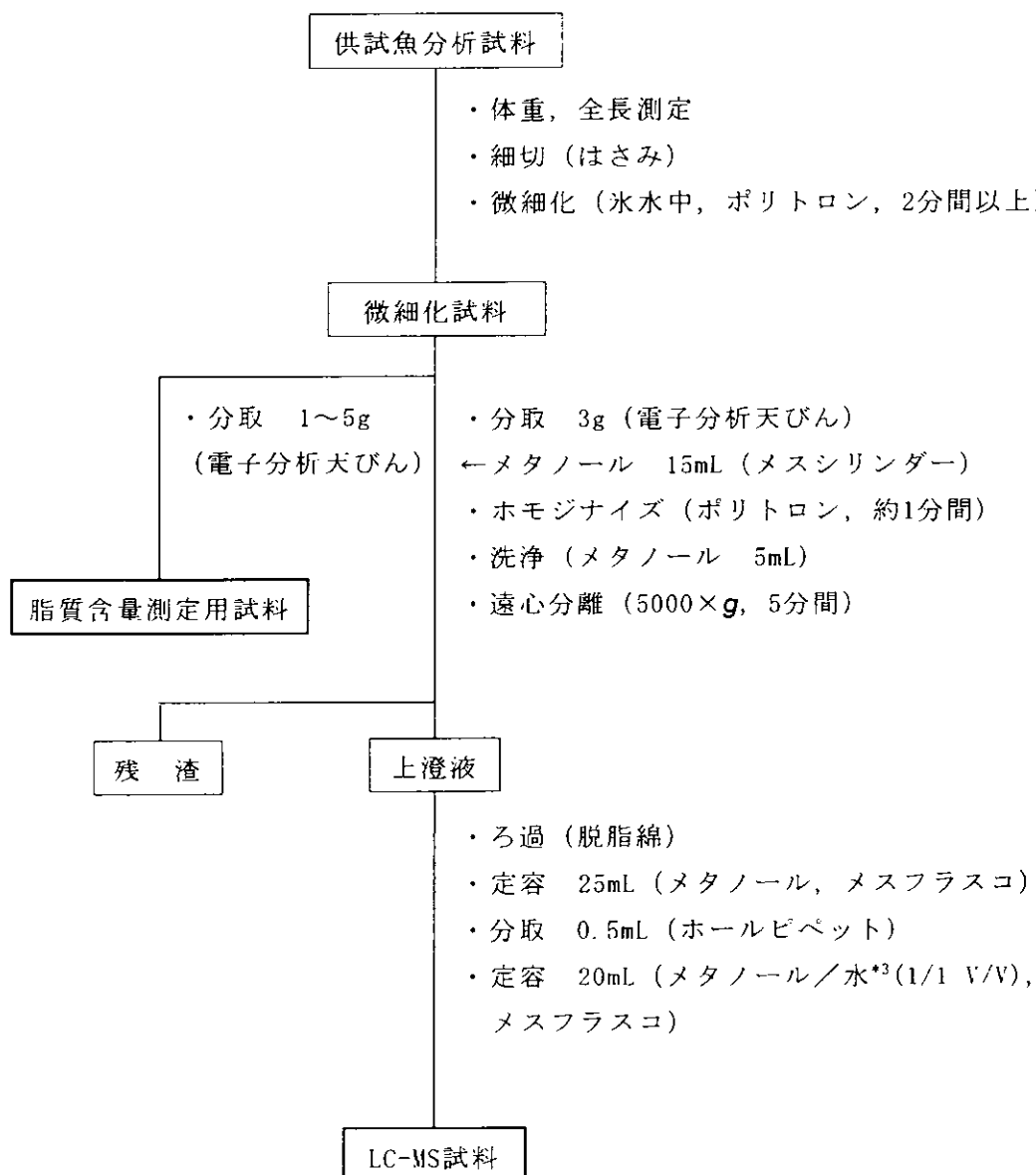
フロースキーム



(2) 供試魚中の被験物質

試験水槽から供試魚を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、高速液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）試料とした。

フロースキーム



*3 水道水を超純水製造システムを用いて処理した水。

3.7.3 被験物質の定量分析

前処理を行って得られたLC-MS試料について、下記の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィー質量分析法により被験物質を分析した。なお、供試魚分析において被験物質濃度が検量線の範囲を越えた場合は、その範囲にはいるように希釈し分析した。LC-MS試料中の被験物質濃度は、標準溶液及びLC-MS試料のマスクロマトグラム上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた (Table-6, 7、Fig. 5、Table-9, 10, 11、Fig. 8, 9, 10参照)。

(1) 定量条件

機	器	高速液体クロマトグラフー質量分析計
	高速液体クロマトグラフ	
		ウォーターズ社製 2690
質	量	分析計
		ウォーターズ社製 ZMD

高速液体クロマトグラフ条件

カ	ラ	ム	L-column ODS
			15cm×2.1mmI.D. ステンレス製
カ	ラ	ム	温度
			40℃
溶	離	液	A(60%) : アセトニトリル
			B(40%) : 5mmol/L酢酸ジ- <i>n</i> -ブチルアミン
流		量	0.2mL/min
注	入	量	20μL

質量分析計条件

イ	オ	ン	化	法	エレクトロスプレー
検	出	イ	オ	ン	負イオン
コ	ー	ン	電	圧	47V
イ	オ	ン	源	温度	120℃
脱	溶	媒	シ	ス	テム
			温度		300℃
脱	溶	媒	ガ	ス	流量
					350L/hr
測	定	イ	オ	ン	m/z 499

(2) 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。

(a) 試験水分析

被験物質100mgを正確にはかりとり、メタノールに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをメタノール／回収試験用試験水(1/1 V/V)で希釈して1.00 μ g/Lの標準溶液とした。

(b) 供試魚分析

被験物質100mgを正確にはかりとり、メタノールに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをメタノール／水^{**}(1/1 V/V)で希釈して1.00 μ g/Lの標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

(a) 試験水分析

(2)(a)の標準溶液の調製と同様にして0.500、1.00及び2.00 μ g/Lの標準溶液を調製した。これらを(1)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのマスクロマトグラム上のピーク面積と濃度により検量線を作成した。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して300（被験物質濃度0.031 μ g/L）とした（Fig.4参照）。

(b) 供試魚分析

(2)(b)の標準溶液の調製と同様にして0.500、1.00及び2.00 μ g/Lの標準溶液を調製した。これらを(1)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのマスクロマトグラム上のピーク面積と濃度により検量線を作成した。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して300（被験物質濃度0.033 μ g/L）とした（Fig.6参照）。

3.7.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方法

3.7.2の供試魚分析操作における被験物質の回収率を求めるため細切した魚（10g）に被験物質原液を添加し、回収試験を行った。また、被験物質を加えない細切した魚について、回収試験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点について測定した。

(2) 結果

(1)の方法により測定した結果、ブランク試験においてマスクロマトグラム上、被験物質ピーク位置にピークが認められた。そこで、回収試験による被験物質質量からブランク試験によるブランク量を差し引き、回収率を求めた。分析操作における各2点の回収率及び平均回収率は下記に示すとおりであり、平均回収率を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（Table-8、Fig.7参照）。

供試魚分析操作における回収率（被験物質4 μ g添加）

90.6%, 89.3% 平均 89.9%

3.7.5 供試魚中の脂質含量

第1、第2濃度区及び対照区の供試魚微細化試料の脂質含量測定用試料（3.7.2(2)参照）を用いてクロロホルム／メタノール抽出を行い、重量分析により脂質含量の測定を行った。

3.7.6 分析試料中の被験物質濃度の算出及び定量下限

(1) 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

Table-6, 7の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字3ケタに丸めて表示した。

(2) 試験水中の被験物質の定量下限濃度

3.7.3(3)(a)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、試験水中の定量下限濃度*4はそれぞれ、

第1濃度区 0.63 µg/L

第2濃度区 0.063µg/L

と算出される。

(3) 供試魚分析試料中の被験物質濃度の算出

Table-9, 10, 11の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字3ケタに丸めて表示した。

(4) 供試魚中の被験物質の定量下限濃度

3.7.3(3)(b)の検量線作成で求めた被験物質の定量下限より、供試魚中の定量下限濃度*4は供試魚微細化試料を3gとしたとき12ng/gと算出される。

$$*4 \text{ 被験物質定量下限濃度 (}\mu\text{g/L又はng/g)} = \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

A : 検量線上定量下限濃度 (µg/L)

B : 回収率 (%)

C : 試験水採取量 (mL) 又は供試魚微細化試料 (g)

D : 最終液量 (mL)

E : 分取比

計算結果は有効数字2ケタに丸めた。

3.7.7 ばく露期間における試験水の全平均被験物質濃度の算出法

$$\overline{C_{wt}} = \{C_w(1) + \dots + C_w(n)\} / n$$

$\overline{C_{wt}}$: 試験水の全平均被験物質濃度 (μg/L)

n : 試験水分析の数 (測定回数)

$C_w(1)$: 1回目の試験水中被験物質濃度 (μg/L)

$C_w(n)$: n 回目の試験水中被験物質濃度 (μg/L)

3.7.8 濃縮倍率 (BCF) の算出法

濃縮倍率 (BCF) は、以下の式に従って算出した。

(1) 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度の算出

$$\overline{C_w} = \{C_w(n-1) + C_w(n)\} / 2 \quad (\text{供試魚分析1回目})$$

$$\overline{C_w} = \{C_w(n-2) + C_w(n-1) + C_w(n)\} / 3 \quad (\text{供試魚分析2回目以降})$$

$\overline{C_w}$: 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 (μg/L)

$C_w(n)$: 供試魚分析と同時に求めた試験水分析 n 回目の被験物質濃度 (μg/L)

(2) 濃縮倍率の算出

$$BCF = \frac{C_f}{\overline{C_w}}$$

BCF : 濃縮倍率

C_f : 供試魚中被験物質濃度 (ng/g)

$\overline{C_w}$: 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 (μg/L)

(3) m 回目の濃縮倍率の平均値

$$BCF_m = (BCF_a + BCF_b) / n$$

BCF_m : m 回目の濃縮倍率の平均値 (個体数又は群数2(a, b))

$BCF_{a, b}$: m 回目におけるそれぞれの濃縮倍率

n : m 回目に分析した個体数又は群数

3.7.9 定常状態に達したことの確認方法

定常状態に達したことの判断は、48時間以上の測定間隔で連続した3回の測定における濃縮倍率の変動が20%以内とする。（濃縮倍率が100倍未満の場合、濃縮倍率の変動が20%を超えても28日後には定常状態に達しているとみなす。）

定常状態に達したことの判定基準： $V(m-2)$ ， $V(m-1)$ ， $V(m) \leq 20$ (%)

$$V(m-2) = \frac{|BCF(m-2) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$$V(m-1) = \frac{|BCF(m-1) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$$V(m) = \frac{|BCF(m) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$V(m-2)$ ， $V(m-1)$ ， $V(m)$: 濃縮倍率の変動(%)

$BCF(m-2)$ ， $BCF(m-1)$ ， $BCF(m)$: $m-2$ ， $m-1$ ， m 回目における個体数又は群数 n の濃縮倍率の平均値

\overline{BCF} : $\{BCF(m-2) + BCF(m-1) + BCF(m)\} / 3$

3.7.10 定常状態における濃縮倍率（BCF_{ss}）の算出法

定常状態における濃縮倍率（BCF_{ss}）は、次の式により算出した。

(1) 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度の算出

$$\overline{Cws} = \{Cw(n-2) + Cw(n-1) + Cw(n)\} / 3$$

\overline{Cws} : 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度（原則として最後の供試魚分析までの3回の連続した試験水中の平均被験物質濃度）（μg/L）

$Cw(n)$: 供試魚分析と同時に求めた試験水分析n回目の被験物質濃度（μg/L）

(2) 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度の算出

$$\overline{Cfs} = \{Cf(m-2) + Cf(m-1) + Cf(m)\} / 3$$

\overline{Cfs} : 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度（ng/g）

$Cf(m)$: m回目の供試魚中平均被験物質濃度（FBを差し引いた値）（ng/g）

FB : 対照区における実験開始前及び終了後の供試魚中の被験物質又は被験物質の見掛（ブランク）濃度の平均値（ng/g）

(3) 定常状態における濃縮倍率の算出

$$BCF_{ss} = \overline{Cfs} / \overline{Cws}$$

\overline{Cfs} : 定常状態における供試魚中の平均被験物質濃度（ng/g）

\overline{Cws} : 定常状態における濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度（μg/L）

BCF_{ss} : 定常状態における濃縮倍率

3.7.11 算出可能な濃縮倍率

3.7.6(4)で求めた供試魚中の被験物質定量下限濃度より、下記の倍率を越えて濃縮されたとき濃縮倍率の算出が可能となる。ただし、試験水中の被験物質濃度はすべての試験水分析における平均被験物質濃度を用いた。

第1濃度区	0.76倍
第2濃度区	6.4 倍

3.7.12 脂質含量の算出法

脂質含量は次式により求めた。

$$\text{脂質含量 (\%)} = \frac{T - T_0}{S} \times 100$$

T_0 : 容器のひょう量値(g)

T : 重量分析用試料（容器を含む）のひょう量値(g)

S : 供試魚微細化試料の分取量(g)

3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401：1999 規則Bの方法に従った。また、計算処理に用いた数値は途中で丸めずに使用した。

試験水中の被験物質濃度及び供試魚中の被験物質濃度は有効数字3ケタに丸め、濃縮倍率は有効数字2ケタに丸めて表示した。

4. 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

当該要因はなかった。

5. 試験結果

5.1 試験水中の被験物質濃度

試験水中の被験物質濃度はTable-1に示されるように、第1濃度区において設定値の70%以上、第2濃度区において設定値の80%以上が保持された。また、被験物質濃度の変動は測定値の平均に対して±20%以内に保たれた。

Table-1 試験水中の被験物質濃度

(単位 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	1日後	7日後	14日後	21日後	28日後	43日後	58日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig.
1	15.1	14.5	15.7	16.5	17.7	15.4	16.8	16.0 (1.12)	6	5
2	1.78	1.76	1.87	1.93	1.89	1.92	2.01	1.88 (0.087)	7	

5.2 濃縮倍率

濃縮倍率をTable-2に示した。

Table-2の濃縮倍率とばく露期間との相関をFig. 1及びFig. 2に示した。ばく露期間中の濃縮倍率は第1濃度区において210倍～850倍、第2濃度区において200倍～1500倍であった。

Table-2 濃縮倍率

() 内は平均値

濃度区	7日後	14日後	21日後	28日後	43日後	58日後	Table	Fig.
1	210	540	300	590	820	850	9	8
	310	340	290	790	670	590		
	(260)	(440)	(300)	(690)	(750)	(720)		
2	200	590	260	600	830	1200	10	9
	270	450	550	1100	950	1500		
	(240)	(520)	(410)	(860)	(890)	(1300)		

5.3 定常状態における濃縮倍率

第1濃度区

5.2の結果から、28、43及び58日後における濃縮倍率（平均）はその3回の分析における濃縮倍率の平均値に対して変動が20%以内であったため、定常状態に達していると判断した。それらの結果を用いて、定常状態における濃縮倍率を算出した。

第2濃度区

5.2の結果から、最大値を含む連続した3回の分析における濃縮倍率（平均）は変動が20%以上であった。このため、定常状態における濃縮倍率は算出しなかった。

(1) 定常状態における試験水中の被験物質濃度

定常状態における試験水中の平均被験物質濃度はTable-3に示されるように、第1濃度区において設定値の83%であった。

Table-3 定常状態における試験水中の被験物質濃度

(単位 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	28日後	43日後	58日後	平均	Table	Fig.
1	17.7	15.4	16.8	16.6	6, 9	5

(2) 定常状態における濃縮倍率

定常状態における濃縮倍率は以下のとおりであった。

第1濃度区 720倍

5.4 供試魚の脂質含量

供試魚中の平均脂質含量は以下のとおりであった。

実験開始前	3.87%
実験終了後	3.08%

5.5 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

6. 参 考 試 験

6.1 試験目的

被験物質の供試魚の各部位への濃縮性の程度及び供試魚からの排泄性の程度の知見を得る。

6.2 部位別試験

6.2.1 試験方法

第1、第2濃度区とも、ばく露開始61日後の供試魚を外皮（頭部を除く皮、うろこ、ひれ、消化管、えら）、頭部、内臓（消化管及び肝臓以外の臓器）、肝臓及び可食部（前記の部分を除いた残部）の部位に大別した。各部位別試料を3.7に従って分析し、各部位への濃縮倍率を算出した。

6.2.2 試験結果

Table-12, 13の計算式に従って計算し、計算結果は被験物質濃度は有効数字3ケタに丸め、濃縮倍率は有効数字2ケタに丸めて表示した。

試験結果をTable-4に示した。

Table-4 部位別試験における濃縮倍率

濃度区	部 位	被験物質濃度 (ng/g)	濃 縮 倍 率	Table	Fig.
1	外 皮	22800	1400	12	14
		16700	1000		
	頭 部	23400	1400		
		17500	1100		
	内 臓	36000	2200		
		45300	2700		
2	肝 臓	37800	2300	13	15
		32000	1900		
	可食部	6260	380		
		5380	320		
	外 皮	5490	2800		
		4750	2400		
	頭 部	5600	2900		
		4730	2400		
	内 臓	9900	5100		
		7410	3800		
	肝 臓	9190	4700		
		7650	3900		
	可食部	1810	930		
		1390	720		

6.3 排泄試験

6.3.1 試験方法

第1、第2濃度区とも、ばく露開始61日後の供試魚を下記条件の被験物質及び分散剤を含まない試験用水を供給する試験水槽に移して行った。供試魚分析は、移した時から2日後、11日後、21日後及び37日後の計4回、3.7に従って行い、供試魚中の被験物質を経時的に分析した。

〈試験及び環境条件〉

試験水槽	100L容ガラス製水槽
試験水量	試験用水1600mL／分の割合で2304L／日を試験水槽に供した。
試験温度	25±2℃

6.3.2 供試魚中の被験物質の残留率

供試魚中の被験物質の残留率は、以下の式により計算し、計算結果は有効数字2ケタに丸めて表示した。

$$PFn = \frac{\frac{Fn}{W}}{CF} \times 100$$

PFn	: 排泄開始n日後の供試魚中の被験物質残留率 (%)
Fn	: 排泄開始n日後の供試魚中の被験物質絶対量 (ng)
W	: 魚体重 (g)
CF	: 供試魚中の平均被験物質濃度 (ng/g)

6.3.3 試験結果

供試魚中の被験物質の残留率は、第1濃度区は定常状態における供試魚中の被験物質濃度を100とし、第2濃度区はばく露終了時（58日後）の供試魚中被験物質濃度の平均値（2尾）を100として、排泄試験開始2、11、21及び37日後の供試魚中被験物質の残留率（%）を算出した（Table-14, 15、Fig. 16, 17参照）。

また、排泄試験における残留率と排泄期間との相関をFig. 18, 19に示した。

これらの結果から、排泄半減期は第1濃度区で49日、第2濃度区で152日であった。

Table-5 排泄試験における残留率 (単位 %)

濃度区	2日後	11日後	21日後	37日後	Table	Fig.
1	150 150	96 110	61 65	64 120 62 97	14	16
2	91 58	91 68	41 58	67 69	15	17

7. 考 察

(1) 供試魚分析のブランクについて

供試魚分析のブランク試験において被験物質のピーク位置にピークが検出された。これは被験物質と同じマスフラグメントを示し、溶出パターンも同じであった。また、対照区においても同様のブランクピークが検出されたので、本試験では試験区における魚体中の被験物質質量から実験開始前及び終了後の対照区における魚体中の平均ブランク量を差し引いて濃縮倍率を求めた。また、ブランクを考慮せずに求めた濃縮倍率と本試験の結果に大きな違いはなかった。

(2) 異性体の濃縮性について

本試験に使用した被験物質はLC-MSによる同定の結果、構造異性体の混合物であることがわかった（Fig. 21参照）。本試験では定量可能な3本のピーク面積の合計で定量を行った。3本のピークの内、前に溶出される2本のピークについては、供試魚分析のマスキロマトグラムから判断すると、全ピーク面積から求めた濃縮倍率よりも個々の濃縮倍率は低いと思われる。一方、主成分である3本目のピークについては本試験の結果とほぼ同等の濃縮倍率を有すると考えられる。

(3) 部位別及び排泄試験について

本試験の第2濃度区において濃縮倍率が1000倍を超えたため、第1、第2濃度区ともに部位別及び排泄試験を実施した。

部位別試験では肝臓への濃縮性について知見を得るために、内蔵を肝臓とその他の内蔵部に分けて実施した。各部位における被験物質の濃縮倍率はTable-4に示すように、内蔵及び肝臓が高い値を示し、内蔵と肝臓の濃縮倍率に差は認められなかった。

排泄試験を実施したところ、被験物質の排泄半減期は第1濃度区で49日、第2濃度区で152日となった。このことから、被験物質の魚体中からの排泄速度は遅いと考えられる。

8. 備 考

試験に使用した主要な装置・機器、試薬等

(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	: 東京理化工機製	型 GMW
溶存酸素測定装置	: 飯島電子工業製	型 F-102
pH計	: 東亜電波工業製	型 HM-14P

(2) 分析及び原液調製に使用した装置・機器及び試薬

装置・機器

高速液体クロマトグラフィー質量分析計

: 13頁参照

天びん	: ザルトリウス社製	型 BP301S
	島津製作所製	型 AEX-200B
	メトラー社製	型 AE163
	エー・アンド・ディ社製	型 FA-2000

ホモジナイザー（ポリトロン）	: キネマチカ社製	型 PT3100
遠心分離機	: 久保田製作所製	型 6900

試薬

アセトニトリル	: 和光純薬工業製	HPLC用
メタノール	: 和光純薬工業製	HPLC用
酢酸ジ- <i>n</i> -ブチルアミン（0.5mol/L水溶液）	: 東京化成工業製	イオン交換クロマト用

(3) 脂質含量測定に使用した装置・機器及び試薬

装置・機器

天びん	: ザルトリウス社製	型 BP301S
	メトラー社製	型 AE163
ロータリーエバポレーター	: 東京理化工機製	型 N-1
	東京理化工機製	型 N
ホモジナイザー（オートセルマスター）		
	: 井内盛栄堂製	型 CM-200
真空ポンプ	: 真空機工製	型 DA-20D
	真空機工製	型 DAH-20C
真空デシケータ	: 井内盛栄堂製	型 VL

試薬

精製水	: 高杉製薬製	日本薬局方
メタノール	: 和光純薬工業製	試薬一級
クロロホルム	: キシダ化学製	試薬特級
硫酸ナトリウム（無水）	: 片山化学工業製	試薬一級

(4) 被験物質の構造確認に使用した装置・機器

フーリエ変換赤外分光光度計	: 島津製作所製	型 FTIR-8200PC
高速液体クロマトグラフィー質量分析計		
	: ウォーターズ社製	型 ZMD

FINAL REPORT

Bioconcentration test of Salt (Na,K,Li) of perfluoroalkyl (C=4-12) sulfonic acid
[This test was performed using Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt
(Test substance number K-1520)] in carp

(Test number: 51520)

Kurume Laboratory
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

STATEMENT

Kurume Laboratory
Chemicals Evaluation and
Research Institute, Japan

Sponsor Ministry of Economy, Trade and Industry

Title Bioconcentration test of Salt (Na,K,Li) of perfluoroalkyl (C=4-12)
sulfonic acid [This test was performed using Perfluorooctane sulfonic
acid, potassium salt (Test substance number K-1520)] in carp

Test number 51520

I, the undersigned, hereby declare that this report provides a correct English translation
of the Final Report (Test No.51520, issued on February 16, 2001).

Date

July 5, 2002

Study director



GLP STATEMENT

Kurume Laboratory
Chemicals Evaluation and
Research Institute, Japan

Sponsor	Ministry of Economy, Trade and Industry
Title	Bioconcentration test of Salt (Na,K,Li) of perfluoroalkyl (C=4-12) sulfonic acid [This test was performed using Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt (Test substance number K-1520)] in carp
Test number	51520

This test was conducted in compliance with Good Laboratory Practice Standards for industrial chemicals, "Standard Concerning Testing Facility Provided in Article 4 of Ministerial ordinance Prescribing Test Items Relating to New Chemical Substances and Toxicity Research of Designated Chemical Substances" (March 31, 1984, Revised March 1, 2000, No.39, Planning and Coordination Bureau, Environment Agency; No.229, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare; and No.85, Basic Industries Bureau, Ministry of International Trade and Industry, Japan) and "OECD Principles of Good Laboratory Practice" (November 26, 1997).

It has been confirmed that this final report reflects the raw data accurately and the test data are valid.

Date	February 20, 2001
Study director	Signed in original



QUALITY ASSURANCE STATEMENT

Kurume Laboratory
Chemicals Evaluation and
Research Institute, Japan

Sponsor Ministry of Economy, Trade and Industry

Title Bioconcentration test of Salt (Na,K,Li) of perfluoroalkyl (C=4-12) sulfonic acid [This test was performed using Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt (Test substance number K-1520)] in carp

Test number 51520

The inspections of this study were carried out and the results were reported to the test facility management and the Study Director by Quality Assurance Unit of Kurume Laboratory, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan as follows.

Item of inspection	Date of audit or inspection	Date of report to Study Director	Date of report to test facility management
Study plan	October 13, 2000	October 16, 2000	October 16, 2000
	October 31, 2000	October 31, 2000	October 31, 2000
	November 24, 2000	November 24, 2000	November 24, 2000
Test Conduct	October 17, 2000	October 30, 2000	November 2, 2000
	October 24, 2000	October 30, 2000	November 2, 2000
	October 25, 2000	October 30, 2000	November 2, 2000
	November 14, 2000	November 22, 2000	November 24, 2000
	November 15, 2000	November 22, 2000	November 24, 2000
	November 16, 2000	November 22, 2000	November 24, 2000
	November 22, 2000	November 22, 2000	November 24, 2000
Raw Data and Final Report	February 20, 2001	February 20, 2001	February 20, 2001

It has been assured that the final report describes accurately the test method used, that details in the report are in compliance with the study plan and Standard Operating Procedures and that the final report reflects the raw data accurately.

Date

February 20, 2001

Quality Assurance Unit. Head

Signed in original



CONTENTS

	page
Title	1
Sponsor	1
Testing facility	1
Objective	1
Test method	1
Applied GLP	2
Dates	2
Storage of test substance, raw data, etc.	2
Personnel	3
Approval of final report	3
SUMMARY	4
1. Test substance	5
2. Performance of acute toxicity test	7
3. Performance of bioconcentration test	10
4. Factors possibly affecting accuracy	23
5. Results	24
6. Reference test	26
7. Discussion	30
8. Remarks	31

Title

Bioconcentration test of Salt (Na,K,Li) of perfluoroalkyl (C=4-12) sulfonic acid [This test was performed using Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt (Test substance number K-1520)] in carp

Sponsor

Ministry of Economy, Trade and Industry
1-3-1 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8901, Japan

Testing facility

Kurume Laboratory
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
19-14 Chuomachi, Kurume, Fukuoka 830-0023, Japan

Objective

This test was performed to evaluate the bioconcentration potential of K-1520 in carp.

Test method

This study was performed according to the "Method for Testing the Degree of Accumulation of Chemical Substances in Fish Body" stipulated in the "Testing Methods for New Chemical Substances" (July 13, 1974, Revised October 8, 1998, No.5, Planning and Coordination Bureau, Environment Agency; No.615, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare; and No.392, Basic Industries Bureau, Ministry of International Trade and Industry, Japan), and "Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)" in the OECD Guidelines for Testing of Chemicals.

Applied GLP

(1) Chemical GLP

This test complied with "Standard Concerning Testing Facility Provided in Article 4 of Ministerial ordinance Prescribing Test Items Relating to New Chemical Substances and Toxicity Research of Designated Chemical Substances" (March 31, 1984, Revised March 1, 2000, No.39, Planning and Coordination Bureau, Environment Agency; No.229, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare; and No.85, Basic Industries Bureau, Ministry of International Trade and Industry, Japan).

(2) OECD-GLP

This test complied with "OECD Principles of Good Laboratory Practice" (November 26, 1997).

Dates

Study initiation date	October 13, 2000
Experimental starting date	October 25, 2000
Experimental completion date	December 22, 2000
Study completion date	February 16, 2001

Storage of test substance, raw data, etc.

(1) Test substance

Because the test substance of the same lot is already stored after the end of biodegradation test, the test substance is not stored after this test.

(2) Raw data and materials, etc.

Raw data, the study plan, documents about the test presented by the sponsor, the final report and necessary materials are stored in a archives in this laboratory.

Personnel

Study Director

Study personnel
(Operation of bioconcentration test)



Staff for fish care



Person to conduct of fish acute toxicity test




Approval of final report

Study director

Date

February 16, 2001

Signature

Signed in original



SUMMARY

Title

Bioconcentration test of Salt (Na,K,Li) of perfluoroalkyl (C=4-12) sulfonic acid
[This test was performed using Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt (Test substance number K-1520)] in carp

Test conditions

Acute toxicity test

- | | |
|--------------------------|--|
| (1) Test fish | Orange-red killifish (<u>Oryzias latipes</u>) |
| (2) Duration of exposure | 96 hrs. |
| (3) Exposure method | Semi static system (Renewal of test water, at 24 hrs.) |

Bioconcentration test

- | | |
|--|--|
| (1) Test fish | Carp (<u>Cyprinus carpio</u>) |
| (2) Nominal concentrations of test substance | |
| | High exposure level (Level 1) 20 µg/L |
| | Low exposure level (Level 2) 2 µg/L |
| (3) Duration of exposure | 58 days |
| (4) Exposure method | Continuous flow system |
| (5) Analytical method | High-performance liquid chromatography-mass spectrometry |

Results

- | | |
|--|-------------------------|
| (1) 96-hour LC50 value | 89.1 mg/L |
| (2) Bioconcentration factors at a steady state | |
| | Level 1 720 |
| (3) Bioconcentration factors | Level 2 200 – 1500 |

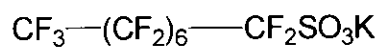
1. Test substance

In this report, K-1520 has the following chemical name, etc.

1.1 Chemical name Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt

1.2 Chemical structure, etc.

Structural formula



Molecular formula $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{KO}_3\text{S}$

Molecular weight 538.22

1.3 Manufacturer, name and lot number^{*1}

(1) Manufacturer

(2) Name

(3) Lot number

A37626B

^{*1} Information supplied by the manufacturer

1.4 Purity^{*1}

Test substance 100.3 % (gravimetric analysis by potassium)

The test substance was treated as 100 % in purity.

Confirmation of test substance

The structure of the test substance is confirmed by infrared (IR) spectrum (see Fig.20) and Mass spectrum (see Fig.21).

1.6 Storage and stability

(1) Storage condition

Cold storage place

(2) Stability

The test substance was stable under the storage condition as shown by the finding that IR spectra of the test substance before and after the experiment were identical (see Fig.20).

1.7 Stability under testing conditions

Prior to the bioconcentration test, a stability of the test substance under the testing conditions was confirmed by a preliminary test.

2. Performance of acute toxicity test

2.1 Test method

The test was performed in accordance with Japanese Industrial Standard (JIS K 0102-1998-71.), "Testing methods for industrial waste water, Acute toxicity test with fish".

2.2 Test fish

(1) Species Orange-red killifish (Oryzias latipes)

Reason for selection : This species is similar in sensitivity to carp and readily available as test fish.

(2) Supplier

Ogawa shoten

(Address : 181 Ooishi-machi Kurume-shi, Fukuoka 830-0049, Japan)

(3) Conditions for fish care before acclimatization

The fish were checked visually in the receiving and those demonstrating any abnormality were removed. The fish were reared for 23 days in a flow through system following an external disinfection.

(4) Conditions for acclimatization

After rearing, the fish were transferred to an acclimatizing aquarium and acclimatized there after the second external disinfection. The fish demonstrating any abnormality during this period were removed and the remainder of the fish were reared for 40 days in a flow through system at the temperature of 25 ± 2 °C. The fish were checked health conditions and reared another 34 days after the external disinfection.

(5) Weight average 0.30 g

(6) Length average 3.1 cm

(7) Certification

The 48-hour LC50 value of the reference substance*² for the fish of the same lot (TFO-000801) was 0.596 mg/L.

*² PCP-Na (pentachlorophenol sodium salt, Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.)

2.3 Dilution water for test

(1) Origin

Groundwater from the premises of Kurume Laboratory.

(2) Water quality assessment

The dilution water for test was taken out on August 8, 2000, and it was analyzed and measured (once every six months in this laboratory). The results are shown in Reference 1.

It was confirmed that the dilution water met the ministerial ordinance of the Ministry of Health and Welfare (December 21, 1992), water quality criteria for fisheries (Shadanhazin Nihon Suisansigen Hogokyokai, March 1983), OECD Guidelines for Testing of Chemicals, "Fish, Early-life Stage Toxicity Test" (Guideline 210, July 17, 1992) and environmental quality standards for water pollutants No. 14 (Revised February 22, 1999, Environment Agency) or OECD Guidelines for Testing of Chemicals, "Bioconcentration: Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)".

2.4 Test conditions

- | | |
|---|--|
| (1) Test tank | Round glass vessel |
| (2) Volume of test water | 4 L / level |
| (3) Temperature of test water | |
| At initial exposure | 24.6 - 24.7 °C |
| Before renewal of test water | 24.6 - 24.8 °C |
| (4) Concentration of dissolved oxygen in test water | |
| At initial exposure | 7.9 - 8.0 mg/L |
| Before renewal of test water | 5.8 - 6.3 mg/L |
| (5) pH of test water | |
| At initial exposure | 8.1 |
| Before renewal of test water | 7.8 - 7.9 |
| (6) Number of fish | 10 / level |
| (7) Duration of exposure | 96 hrs. |
| (8) Exposure method | Semi static system (Renewal of test water, at 24 hrs.) |

2.5 Preparation of stock solution

The test substance was dissolved with ion-exchanged water to prepare 500mg/L stock solution.

2.6 Performance of test

(1) Place 214 LC50 room

(2) Date October 16, 2000 - October 20, 2000

2.7 Estimation of 96-hour LC50 value

The 96-hour LC50 value was estimated by the Doudoroff method.

2.8 Result of test

96-hour LC50 value 89.1 mg/L (see Fig. 3)

3. Performance of bioconcentration test

3.1 Test fish

(1) Species Carp (Cyprinus carpio)

Reason for selection : The previous data conducted with this species can be compared and the size of this species is adequate for handling.

(2) Supplier

Fukuokaken yabegawa fishermen's cooperative association

(Address : 193-1 Yamauchi, Yame-shi, Fukuoka 834-0012, Japan)

Date received

September 1, 2000

(3) Conditions for fish care before acclimatization

The fish were checked visually in the receiving and those demonstrating any abnormality were removed. The fish were reared for 8 days in a flow through system following an external disinfection.

(4) Conditions for acclimatization

After rearing, the fish were medicated to eliminate parasites and transferred to an acclimatizing aquarium. After the second external disinfection, they were acclimatized. The fish demonstrating any abnormality during this period were removed and the remainder of the fish were reared for 15 days in a flow through system at the temperature of 25 ± 2 °C. The fish were then transferred to test tanks and reared at the same temperature in the flow through system for another 27 days, following the external disinfection.

(5) Length 6.4 – 9.6 cm

(6) Lot No. TFC-000901

(7) Age Yearling fish

(8) Feeding

Feed Feed for fry of carp

Composition Proteins content \geq 43.0 %

Lipid content \geq 3.0 %

Manufacturer Nippon Formula Feed Mfg. Co., Ltd.

Feeding amount and interval

Amount corresponding to about 2 % of total body weight was fed twice a day in halves.

The fish were starved for 24 hours before sampling.

3.2 Dilution water for test

The same as described in section 2.3.

3.3 Conditions of test and circumstances

(1) Supply of test water

Flow through system assembled at this laboratory was used.

(2) Test tank

100-L glass tank

(3) Flow rate of test water

2 mL/min for stock solution and 1600 mL/min for dilution water ; 2307 liters/day for test water were supplied.

(4) Stock solution bottle

25-L glass bottle

(Frequency of renewal 1 - 2 times/week)

(5) Temperature of test water

Level 1 25.0 - 25.4 °C

Level 2 25.5 - 25.8 °C

Control 25.1 - 25.4 °C

(6) Concentrations of dissolved oxygen in test water

Level 1 7.9 - 8.1 mg/L (see Fig.11)

Level 2 8.0 - 8.1 mg/L (see Fig.12)

Control 8.0 - 8.1 mg/L (see Fig.13)

(7) pH of test water

Level 1 7.6 - 7.8

Level 2 7.6 - 7.8

Control 7.6 - 7.8

(8) Time of irradiation with light

Artificial light of white fluorescent lamp (14 hrs./day)

(9) Number of fish (at the beginning of exposure)

Level 1 and 2 40

Control 14

(10) Duration of exposure

58 days

Reason for decision :

The time to reach a steady-state was not estimated to be within 28 days from preliminary test results.

(11) Place

213 Aquatron room

3.4 Preparation of stock solutions

- Level 1

16 mg/L stock solution was prepared in the same way as described in 2.5.

- Level 2

1.6 mg/L stock solution was prepared in the same way as described in 2.5.

3.5 Test concentrations

Based on preliminary test results for the 96-hour LC50 value and analytical detection limits, test concentrations of the test substance were decided as follows. The control was set as a blank test.

Level 1	20 µg/L
Level 2	2 µg/L

3.6 Observation, measurement, etc.

(1) Observation of test fish

Condition of test fish was observed visually twice a day.

(2) Flow rate of test water

Flow rate of stock solution and dilution water were measured with graduated cylinder and recorded once a day.

(3) Temperature of test water

Temperature of test water was measured with alcohol thermometer and recorded once a day.

(4) Concentration of dissolved oxygen in test water

Concentration of dissolved oxygen in test water was measured with dissolved oxygen probe and recorded twice a week.

(5) pH of test water

pH of test water was measured with pH meter once a week or more.

(6) Cleaning of test tank

In experimental period, excreta of carp, dirt on test tank, etc. were removed about once a day.

3.7 Analysis of test water and fish

Analysis of the test substance in test water and test fish was performed with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis.

3 peaks were detected with high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis of the test substance (see Fig.21). The concentration of test substance was determined using total area of the peak on the mass chromatogram.

3.7.1 Frequency of analysis

(1) Test water analysis

The test water of each level was analyzed once before first analysis of test fish and at the same time as analysis of test fish.

(2) Test fish analysis

Analysis of test fish was performed six times at each level in duration of exposure. Four fish were taken out at each sampling time and divided into two groups, then both were analyzed individually^{*3}.

Analysis of control fish was performed before the experimental starting and after the experimental completion. Six fish were taken out at each sampling time and divided into three groups, then both were analyzed individually^{*3}.

*3 Because one fish was too small to take out the stored sample for the measurement of lipid content, two fish a group were employed.

3.7.2 Pretreatment for analysis

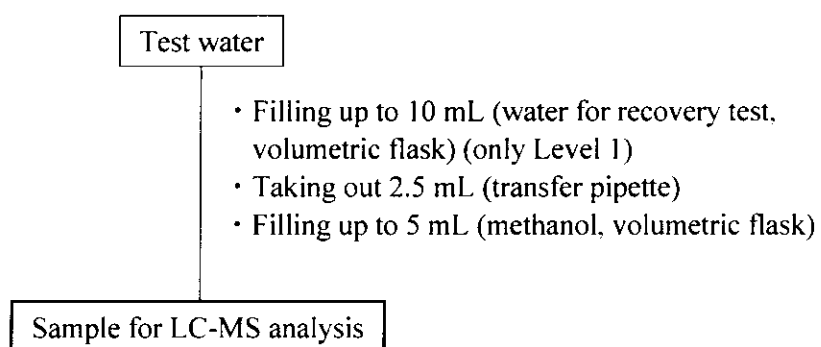
(1) Test water

An aliquot of the test water,

Level 1 1 mL

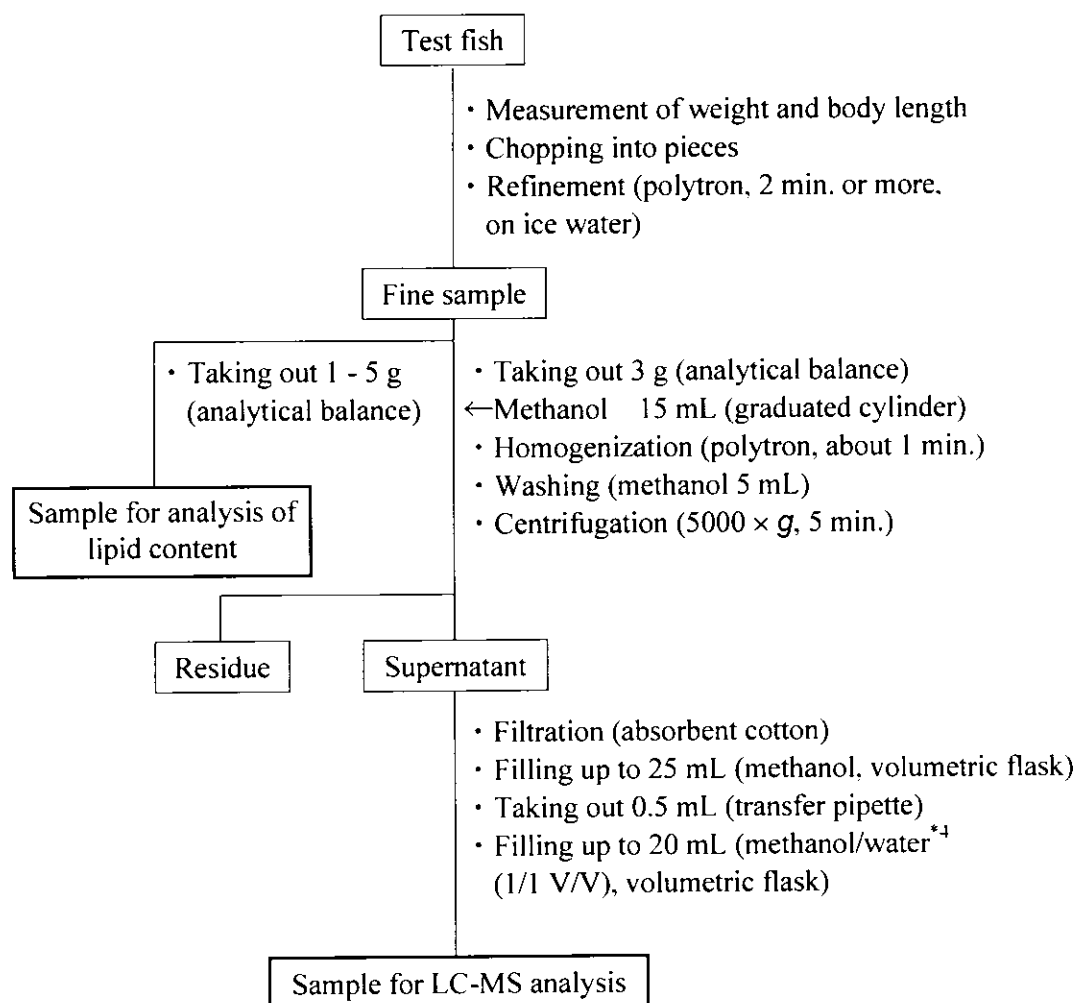
Level 2 10 mL

was taken from each test tank, and pretreated for high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis as follows :



(2) Test fish

Test fish were taken from each test tank and pretreated for LC-MS analysis as follows :



*4 City water was treated by Ultra pure water system.

3.7.3 Quantitative analysis for test substance

The samples for LC-MS analysis in pretreatment were analyzed by liquid chromatography-mass spectrometry under the following analytical conditions. When the concentration of the test substance in the sample for LC-MS analysis exceeded the range of the calibration curve in test fish analysis, the sample was analyzed after it was diluted to a concentration within the range of the calibration curve. The concentration of the test substance in each sample solution was determined on the basis of a comparison of the peak area on the mass chromatogram of the sample solution with that of a standard solution (see Tables-6, 7, Fig.5 and Tables-9, 10, 11, Figs.8, 9, 10).

(1) Analytical conditions

Instrument	Liquid chromatograph-mass spectrometer
High-performance liquid chromatograph	Waters 2690
Mass spectrometer	Waters ZMD

Conditions of liquid chromatograph

Column	L-column ODS 15 cm × 2.1 mm I.D. stainless steel
Temperature	40 °C
Eluent	A (60%) : Acetonitrile B (40%) : 5 mmol/L Di- <i>n</i> -butylamine acetate
Flow rate	0.2 mL/min
Sample size	20 µL

Conditions of mass spectrometer

Ionization mode	Electrospray
Detection mode	Negative
Cone voltage	47 V
Ion source temp.	120 °C
Desolvation temperature	300 °C
Desolvation gas flow rate	350 L/hr
Measurement m/z	m/z 499

(2) Preparation of standard solution

The standard solution to determine the concentration of the test substance in the sample solutions was prepared as follows.

(a) Test water analysis

100 mg of the test substance was dissolved in methanol to prepare 1000 mg/L solution of the test substance. 1.00 µg/L standard solution was then prepared from this solution by dilution with methanol / water for recovery test (1/1 V/V).

(b) Test fish analysis

100 mg of the test substance was dissolved in methanol to prepare 1000 mg/L solution of the test substance. 1.00 µg/L standard solution was then prepared from this solution by dilution with methanol / water^{*4} (1/1 V/V).

(3) Calibration curve

(a) Test water analysis

0.500, 1.00 and 2.00 µg/L standard solutions were prepared by the same method as described in (2)(a). These solutions were analyzed according to the analytical conditions described in (1). A calibration curve was drawn on the basis of the relation between the peak area on the mass chromatograms and the respective concentrations.

In consideration of the noise level, the lowest detectable peak area of the test substance was regarded as 300 for analysis of test water, which corresponded to 0.031 µg/L of the test substance concentration (see Fig.4).

(b) Test fish analysis

0.500, 1.00 and 2.00 µg/L standard solutions were prepared by the same method as described in (2)(b). These solutions were analyzed according to the analytical conditions described in (1). A calibration curve was drawn on the basis of the relation between the peak area on the mass chromatograms and the respective concentrations.

In consideration of the noise level, the lowest detectable peak area of the test substance was regarded as 300 for analysis of test fish, which corresponded to 0.033 µg/L of the test substance concentration (see Fig.6).

3.7.4 Recovery and blank test

(1) Method

Chopped fish (10 g) spiked a specified amount of the test substance for the recovery test were prepared in the same way as described in section 3.7.2. The blank test was also performed in the same manner without the test substance. The recovery and blank tests were performed in duplicate.

(2) Results of recovery test

In the blank test, the mass chromatogram of LC-MS had peaks interfering with determination of the test substance concentration. Then, the amount of the blank by the blank test was deducted from amount of the test substance by the recovery test, and the recovery rate was determined. The duplicate recovery rates and the average of them in the pretreatment are shown below (see Table-8 and Fig.7). The average recovery rate was used as correction factors for the determination of the test substance concentrations in the analytical samples.

For analysis of test fish (4 µg test substance added)			
90.6 %	89.3 %	average	89.9 %

3.7.5 Lipid content in test fish

Lipid contents in the sample for analysis of lipid content of level 1, level 2 and the control test fish (see 3.7.2(2)) were determined after chloroform-methanol extraction with gravimetric analysis.

3.7.6 Calculation of the test substance concentration in sample and minimum limit of determination

(1) Calculation of the test substance concentration in test water

The equation in Tables-6, 7 was used to obtain the concentrations, and they were rounded off to 3 figures.

(2) Determination limit of the test substance in test water

The determination limit^{*5} of the test substance in test water was calculated on the basis of that obtained from the calibration curve in section 3.7.3 (3)(a) as follows.

Level 1	0.63 µg/L
Level 2	0.063 µg/L

(3) Calculation of the test substance concentration in test fish

The equations in Tables-9, 10, 11 were used to obtain the concentrations, and they were rounded off to 3 figures.

(4) Determination limit of the test substance in test fish

Assuming fine sample of fish to be 3 g, the determination limit^{*5} of the test substance in test fish was calculated to be 12 ng/g on the basis of that obtained from the calibration curve in section 3.7.3 (3)(b).

*5 Minimum determination limit of the test substance (µg/L or ng/g)

$$= \frac{A}{\frac{B}{100} \times \frac{C \times E}{D}}$$

where

A : Minimum determination limit of the test substance on the calibration curve (µg /L)

B : Recovery rate (%)

C : Sampling volume of test water (mL) or fine sample of fish (g)

D : Final volume of sample solution (mL)

E : Ratio of the portion, used for analysis to whole volume

Results were rounded off to 2 figures.

3.7.7 Calculation of mean concentration of the test substance in test water (duration of exposure)

$$\overline{C_{wt}} = \{ C_{w(1)} + \dots + C_{w(n)} \} / n$$

where

$\overline{C_{wt}}$	The mean concentration of the test substance in test water ($\mu\text{g/L}$)
n	Number of analysis for test water (measurement times)
$C_{w(1)}$	Concentration of the test substance in 1st analysis of test water ($\mu\text{g/L}$)
$C_{w(n)}$	Concentration of the test substance in n -th analysis of test water ($\mu\text{g/L}$)

3.7.8 Calculation of bioconcentration factor (BCF)

Bioconcentration factor (BCF) was calculated as follows.

- (1) Calculation of mean concentration of the test substance in test water for calculating BCF

$$\overline{C_w} = \{ C_{w(n-1)} + C_{w(n)} \} / 2 \quad (\text{only 1st analysis of test fish})$$

$$\overline{C_w} = \{ C_{w(n-2)} + C_{w(n-1)} + C_{w(n)} \} / 3 \quad (\text{from 2nd analysis of test fish})$$

where

$\overline{C_w}$	The mean concentration of the test substance in test water for calculating BCF ($\mu\text{g/L}$)
$C_{w(n)}$	Concentration of the test substance in n -th analysis of test water ($\mu\text{g/L}$)

- (2) Calculation of bioconcentration factor

$$\text{BCF} = \frac{C_f}{\overline{C_w}}$$

where

BCF	Bioconcentration factor
C_f	Concentration of the test substance in test fish (ng/g)
$\overline{C_w}$	The mean concentration of the test substance in test water for calculating BCF ($\mu\text{g/L}$)

(3) The mean bioconcentration factor in m-th analysis

$$BCF_m = (BCF_a + BCF_b) / n$$

where

BCF_m : The mean bioconcentration factor in m-th analysis (number of individual or group 2 (a,b))

$BCF_{a,b}$: Each bioconcentration factor in m-th analysis of test fish

n : Number of individual or group in m-th analysis of test fish

3.7.9 Confirmation of the steady-state was reached

It was evaluated that a steady-state had been reached when three successive analyses of BCFs made on samples taken at intervals of at least 48 hours were within $\pm 20\%$ of each other. When BCFs were less than 100, it was evaluated that a steady-state had been reached after 28 days even if BCFs were over $\pm 20\%$ of each other.

Criterion of the steady-state was reached : $V(m-2), V(m-1), V(m) \leq 20\%$

$$V(m-2) = \frac{|BCF(m-2) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$$V(m-1) = \frac{|BCF(m-1) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$$V(m) = \frac{|BCF(m) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$V(m-2), V(m-1), V(m)$: Variation of bioconcentration factor (%)

$BCF(m-2), BCF(m-1), BCF(m)$: The mean bioconcentration factor in m-2, m-1, m-th analysis of test fish

\overline{BCF} : $\{ BCF(m-2) + BCF(m-1) + BCF(m) \} / 3$

3.7.10 Calculation of bioconcentration factor at a steady-state (BCF_{ss})

Bioconcentration factor at a steady-state (BCF_{ss}) was calculated as follows.

- (1) Calculation of the mean concentration of the test substance in test water for calculating BCF_{ss}

$$\overline{C_{ws}} = \{ C_{w(n-2)} + C_{w(n-1)} + C_{w(n)} \} / 3$$

where

$\overline{C_{ws}}$ The mean concentration of the test substance in test water for calculating BCF_{ss}, which is calculated from three successive analyses of test water before last analysis of test fish as a general rule (µg/L)

$C_{w(n)}$ Concentration of the test substance in n -th analysis of test water (µg/L)

- (2) Calculation of the mean concentration of the test substance in test fish at a steady-state

$$\overline{C_{fs}} = \{ C_{f(m-2)} + C_{f(m-1)} + C_{f(m)} \} / 3$$

where

$\overline{C_{fs}}$ The mean concentration of the test substance in test fish at a steady-state (ng/g)

$C_{f(m)}$ The mean concentration of the test substance, from which FB is subtracted, in m -th analysis of test fish (ng/g)

FB The arithmetical mean concentration of the test substance or blank in the control test fish analyzed before and after the experiment (ng/g)

- (3) Calculation of BCF_{ss}

$$BCF_{ss} = \overline{C_{fs}} / \overline{C_{ws}}$$

where

BCF_{ss} Bioconcentration factor at a steady-state (ng/g)

$\overline{C_{fs}}$ The mean concentration of the test substance in test fish at a steady-state (µg/L)

$\overline{C_{ws}}$ The mean concentration of the test substance in test water for calculating BCF_{ss}

3.7.11 Calculable BCF

On the basis of the minimum determination limit of the test substance in section 3.7.6 (4), BCF can be obtained when BCF exceeds the following. The mean concentration of the test substance in test water obtained from all the analyzed sample was used to calculate the following calculable BCF.

Level 1	0.76
Level 2	6.4

3.7.12 Calculation of lipid content

Lipid contents were calculated according to the following equation.

$$\text{Lipid content (\%)} = (T - T_0) / S \times 100$$

where

- T₀ Weight of vessel (g)
- T Weight of sample for gravimetric analysis (containing vessel) (g)
- S Weight of fine sample taken out for analysis of lipid content (g)

3.8 Treatment of numerical values

Values were rounded off in accordance with JIS Z 8401:1999 rule B. The each value used for calculation was used without rounding off on the way of the calculation.

The concentration values of the test substance in test water and fish were rounded off to 3 figures. BCFss values were rounded off to 2 figures.

4. Factors possibly affecting accuracy

No adverse effects on the reliability of this test were noted.

5. Results

5.1 Concentration of test substance in test water

The measured concentrations of the test substance in test water are shown in Table-1. Each concentration of the test substance were maintained at more than 70 % at Level 1 and more than 80 % at Level 2 of each the nominated concentration. The variation of the concentrations of the test substance was within ± 20 % of the mean of the measured concentrations.

Table-1 Measured concentrations of the test substance in test water

(Unit : $\mu\text{g/L}$)

Level	After 1 day	After 7 days	After 14 days	After 21 days	After 28 days	After 43 days	After 58 days	Average (Standard deviation)	Table	Fig.
1	15.1	14.5	15.7	16.5	17.7	15.4	16.8	16.0 (1.12)	6	5
2	1.78	1.76	1.87	1.93	1.89	1.92	2.01	1.88 (0.087)	7	

5.2 Bioconcentration factors

BCFs are shown in Table-2.

BCFs in Table-2 plotted against duration of exposure are shown in Fig.1 and 2.

These BCFs of the test substance ranged from 210 to 850 at Level 1 and from 200 to 1500 at Level 2.

Table-2 BCFs

() : average value

Level	After 7 days	After 14 days	After 21 days	After 28 days	After 43 days	After 58 days	Table	Fig.
1	210	540	300	590	820	850	9	8
	310	340	290	790	670	590		
	(260)	(440)	(300)	(690)	(750)	(720)		
2	200	590	260	600	830	1200	10	9
	270	450	550	1100	950	1500		
	(240)	(520)	(410)	(860)	(890)	(1300)		

5.3 Calculation of BCFs at a steady-state (BCFss)

Level 1

Because the variation of BCFs (average value) after 28, 43 and 58 days from the initiation of exposure were within $\pm 20\%$ of the average for these days' BCFs (see 5.2), it was evaluated that a steady-state was reached. BCFss were calculated on the basis of these result.

Level 2

Because the variation of BCFs (average value) for three successive analyses containing maximum value were over $\pm 20\%$ of each other (see 5.2). BCFss were not calculated.

(1) Concentrations of test substance in test water at a steady-state

The mean concentration of the test substance in test water at a steady-state are shown in Table-3. The mean concentrations was 83 % at Level 1 of the nominated concentration.

Table-3 Concentrations of the test substance in test water at a steady-state
(Unit : $\mu\text{g/L}$)

Level	After 28 days	After 43 days	After 58 days	Average	Table	Fig.
1	17.7	15.4	16.8	16.6	6.9	5

(2) BCFs at a steady-state (BCFss)

BCFss was calculated as follows.

Level 1 720

5.4 Lipid content in test fish

The measured lipid contents in the test fish are shown as follows.

Before initiation of exposure	3.87 %
After termination of exposure	3.08 %

5.5 Results of test fish observation

No abnormality in behavior or appearance was noted.

6. Reference test

6.1 Objective

Those tests were performed to clarify the clearance process of the test substance from test fish and to determine the distributions of test substance in fish bodies.

6.2 Analysis in parts of test fish

6.2.1 Test method

The fish which were exposed for 61 days were separated into parts; tegument, head, viscera except liver, liver and remaining matter were weighed separately. The tegument consisted of the skin except head, scales, fin, alimentary canal or gills. The viscera consisted of internal organs except alimentary canal. The test substance in all the parts was determined with the same manner as described in section 3.7.

6.2.2 Result

BCFs were calculated according to the equation in Tables-12, 13. The concentration values of test substance were rounded off to 3 figures and BCFs values were rounded off to 2 figures.

Concentrations and BCFs of the test substance in each part were shown in the following Table-4.

Table-4 Concentrations and BCFs of the test substance in each parts

Level	Parts	Concentration in each part (ng/g)	BCF	Table	Fig.
1	Tegument	22800 16700	1400 1000	12	14
	Head	23400 17500	1400 1100		
	Viscera	36000 45300	2200 2700		
	Liver	37800 32000	2300 1900		
	Remainder Parts	6260 5380	380 320		
2	Tegument	5490 4750	2800 2400	13	15
	Head	5600 4730	2900 2400		
	Viscera	9900 7410	5100 3800		
	Liver	9190 7650	4700 3900		
	Remainder Parts	1810 1390	930 720		

Depuration test

6.3.1 Test method

After the test fish were exposed for 61 days, this depuration test was started by transferring them to another test tank (without test substance and dispersant). Analysis of the test substance in test fish after 2, 11, 21 and 37 days from the initiation of depuration was performed with the same manner as described in section 3.7.

<Test condition>

Test tank	100-L glass tank
Flow rate of test water	1600 mL/min for dilution water ; 2304 liters/day for test water were supplied.
Test temperature	25 ± 2 °C

6.3.2 Residual rate of the test substance

Residual rate of the test substance in the test fish were calculated as follows :

$$PF_n = \frac{\frac{F_n}{W}}{CF} \times 100$$

PF_n : Residual rate of the test substance in test fish on n day from start of this test (%)

F_n : Amount of the test substance on n day from start of this test (ng)

W : Weight of test fish (g)

CF : The average concentration of the test substance in test fish on steady-state at Level 1 and on 58 days at Level 2 (ng/g)

6.3.3 Results

The residual rates (%) of the test substance in test fish after 2, 11, 21 and 37 days from the initiation of depuration were calculated by comparison with the average concentration of the test substance in test fish on steady-state at Level 1 and the average concentration (two fish) of the test substance in test fish after 58 days at Level 2 (see Tables-14, 15, Figs.16, 17).

The residual rates (%) plotted against duration of depuration are shown in Figs.18, 19.

On the basis of this result, the depuration half-value ($t_{1/2}$) is 49 days at Level 1 and 152 days at Level 2.

Table-5 Residual rate of test substance (Unit : %)

Level	After 2 days	After 11 days	After 21 days	After 37 days	Table	Fig.
1	150 150	96 110	61 65	64 120 62 97	14	16
2	91 58	91 68	41 58	67 69	15	17

7. Discussion

(1) The blank of test fish analysis

In the blank test, the mass chromatogram of LC-MS had peaks interfering with determination of the test substance concentration. The mass fragment of the blank was the same as that of test substance, and pattern of mass chromatogram was the same. Because the same blank peak was detected by analysis of control fish, BCFs was calculated from that the mean value of the blank in control fish of before initiation of exposure and after termination of exposure was deducted from amount of test substance in test fish. Moreover, BCFs calculated without deducting a blank was practically equal to the result of this study.

(2) The bioconcentration of isomer

As the result of identification by LC-MS, the test substance was the mixture of isomers (see Fig.21). Quantitative analysis for test substance performed using the total area of three peaks. About two peaks which eluted faster than main peak, it is considered that BCF of each peak is lower than BCF calculated in a total peak area. On the other hand, the 3rd peak that is the main ingredients is considered to be the almost same BCFs as the result of this study.

(3) Analysis in parts of test fish and depuration test.

Because BCFs were over 1000 in level 2, analysis in parts of test fish and depuration test were performed at both of Level 1 and 2.

In analysis in part of test fish, analysis of viscera except liver and that of liver were performed separately, to determine the distribution of the test substance in liver. BCFs of the test substance in each part is shown in Table-4. BCFs of the test substance in viscera except liver and liver were higher than that in other parts. Then, there was no difference in BCFs of viscera except liver and liver.

The result of depuration test, the depuration half-value ($t_{1/2}$) was 49 days at Level 1 and 152 days at Level 2. Herefrom, it is considered that the depuration rate of the test substance from test fish is slow.

8. Remarks

8.1 Instruments, apparatuses and reagents, etc. for the test

(1) Instruments for fish care

Micro quantitative pump for supplying stock solution :
Tokyo Rika Kikai Co., Ltd. type GMW
Instrument for measuring concentration of dissolved oxygen :
Iijima Seimitsu Industries Co., Ltd.
type F-102
pH meter Toa Electronics Ltd. type HM-14P

(2) Instruments, apparatuses and reagents

Instruments and apparatuses

High-performance liquid chromatograph-mass spectrometer :
see page 16
Electronic analytical balance : Sartorius type BP301S
Shimadzu Corporation type AEX-200B
Metler type AE163
A&D CO., LTD FA-2000
Homogenizer (polytron) : Kinematica type PT3100
Centrifuge : Kubota Seisakusyo Co., Ltd type 6900

Reagents

Acetonitrile (HPLC grade) : Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Methanol (HPLC grade) : Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Di-*n*-butylamine acetate(0.5 mol/L aqueous solution)
(ion-pair chromatograph grade) Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.

(3) Instruments, apparatuses and reagents for gravimetric analysis of lipid content in test fish

Instruments and apparatuses

Electronic analytical balance :	Sartorius type BP301S Metler type AE163
Rotary evaporator :	Tokyo Rika Kikai Co., Ltd. type N-1 Tokyo Rika Kikai Co., Ltd. type N
Homogenizer (autocellmaster) :	Iuchiseieido Co., Ltd. type CM-200
Vacuum pump :	Sinku Kiko Co., Ltd. type DA-20D Sinku Kiko Co., Ltd. type DAH-20C
Vacuum desiccator :	Iuchiseieido Co., Ltd. type VL

Reagents

Purified water :	Takasugi Seiyaku Co., Ltd.
Methanol (extra pure) :	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.
Chloroform (guaranteed reagent) :	Kishida Chemical Co., Ltd.
Anhydrous sodium sulfate (extra pure) :	Katayama Chemical Industries Co., Ltd.

(4) Apparatuses and instruments for structural confirmation of test substance

Fourier transform infrared spectrometer :

Shimadzu Corporation type FTIR-8200PC

High-performance liquid chromatograph-mass spectrometer :

Waters type ZMD