

環境省殿

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

最 終 報 告 書

ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドの
オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号 : A 0 3 0 4 3 2 - 2)

2 0 0 5 年 4 月 2 6 日

株式会社三菱化学安全科学研究所

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

修正番号：01

最終報告書修正書

試験委託者：環境省

表題：ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドのオオミジンコ (*Daphnia magna*)
に対する急性遊泳阻害試験

試験番号：A030432-2

修正内容

修正箇所：31頁，2 高速液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）測定条件

下線部分

修正前：溶離液：A液 5mM IPC-PFFA-5*水溶液 *:Nonafluorovaleric Acid

修正後：溶離液：A液 0.5mM IPC-PFFA-5*水溶液 *:Nonafluorovaleric Acid

理由

記載ミス

試験実施施設：株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

2005年 5月26日 承認 試験責任者

2005年 5月26日 確認 信頼性保証部門担当者

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 : 環境省

表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A030432-2

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、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知
「生態影響試験実施に関する基準の改正について」（別添）「生態影響試験実施に関する基準」（環保安第242号，2001年）

2005年 4月26日

試験責任者

■■■■■■■■■■

■■■■■■■■■■

信 頼 性 保 証 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 : 環境省
表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドのオオミジ
ンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験
試 験 番 号 : A030432-2

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、下記の査察および監査実施により確認した。

記

実 施 事 項	実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査		
試験計画書	2005年 2月21日	2005年 2月21日
変更書(変更番号:01)	2005年 3月 4日	2005年 3月 4日
変更書(変更番号:02)	2005年 3月15日	2005年 3月15日
試験の査察		
試験液の調製	2005年 2月23日	2005年 2月23日
ミジノの投入	2005年 2月23日	2005年 2月23日
ミジノの観察	2005年 2月25日	2005年 2月25日
試験液の調製	2005年 3月15日	2005年 3月15日
ミジノの投入	2005年 3月15日	2005年 3月15日
ミジノの観察	2005年 3月17日	2005年 3月17日
最終報告書監査	2005年 4月26日	2005年 4月26日

2005年 4月26日

信頼性保証部門担当者

試験実施概要

1. 表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験
(試験番号: A030432-2)
2. 試験目的 : 被験物質のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験を行い, 24 および 48 時間の半数遊泳阻害濃度 (EC50) を求める。
3. 適用ガイドライン : OECD 化学品テストガイドライン No. 202 「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984 年)
(ただし, 同改訂案「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験」 (2002 年) *の内容を一部採用。)
*: OECD Guideline for Testing of Chemicals, Revised Proposal for Updating Guideline 202, ENV/JM/TG(2002)3/REV1(2002)
4. 適用 G L P : 日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正について」 (別添) 「生態影響試験実施に関する基準」 (環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試験委託者 : 環境省
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2
委託責任者 総合環境政策局環境保健部環境安全課
環境リスク評価室 室長補佐 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
〒105-0014 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者： [redacted]
環境科学Cグループ

9. 試験担当者： [redacted] [redacted] (2005年 4月26日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年 4月26日)
(試験実施, 報告書作成)

[redacted] [redacted] (2005年 4月26日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年 4月26日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2005年 4月26日)
(分析実施)

10. 試験日程： 試験開始日 2005年 2月21日
実験開始日 2005年 3月15日
実験終了日 2005年 3月17日
試験終了日 2005年 4月26日

11. 保管： 試験計画書, 生データ, 被験物質, 記録文書および最終報告書は, 横浜研究所の保管施設に保管する。
保管期間は, 最終報告書作成後10年間とし, 以後の保管は試験委託者と協議の上, 決定する。
ただし, 被験物質については, 最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

目 次

	頁
要 約	7
1 被験物質	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	9
1.2 供試試料	9
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	10
2 供試生物	10
3 試験方法	11
3.1 試験条件	11
3.2 希釈水	11
3.3 試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	12
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	13
3.7 試験操作	13
4 結果の算出	14
4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	14
4.2 半数遊泳阻害濃度 (EiC50) の算出	14
4.3 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度	14
5 結果および考察	15
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	15
5.2 試験液中の被験物質濃度	15
5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	15
5.4 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度	15
5.5 試験液の水温, 溶存酸素濃度, p Hおよび硬度	16
5.6 試験計画書からの逸脱事項	16
Table 1～8	17～23
Figure 1	24
付属資料－1 希釈水の組成	25～26
付属資料－2 試験液の調製	27～28
付属資料－3 試験液の分析	29～38
付属資料－4 結果の算出	39～40

要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドのオオミジンコ
(*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A 0 3 0 4 3 2 - 2

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン : OECD 化学品テストガイドライン No. 202「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験および繁殖試験」(1984年)
- 2) 暴 露 方 式 : 半止水式 (24時間後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 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴 露 期 間 : 48時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 0.0100, 0.0180, 0.0320, 0.0560, 0.100 mg/L
(設定値) 公比 : 1.8
- 6) 試 験 液 量 : 100 mL/容器
- 7) 連 数 : 4 容器/試験区
- 8) 供 試 生 物 数 : 20頭/試験区 (5頭/容器)
- 9) 試 験 温 度 : 20±1℃
- 10) 照 明 : 室内光, 16時間明 (800 lux以下) / 8時間暗
- 11) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS)

試験結果：

1) 試験液中の被験物質濃度

試験液の分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、暴露開始 24 時間（換水後）において 65～101%，暴露開始 48 時間（終了時）において 61～83%であった。減少の主な原因は、容器およびミジンコへの吸着等が考えられた。

2) 24時間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	0.0394	0.0265 ～ 0.0862
0%阻害最高濃度	0.0265	—
100%阻害最低濃度	0.0862	—

3) 48時間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	0.0157	0.0132 ～ 0.0185
0%阻害最高濃度	0.00674	—
100%阻害最低濃度	0.0373	—

1 被験物質

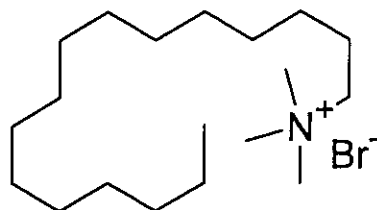
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名 称 : ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド (略称 CETAB)

別 名 : 臭化セチルトリメチルアンモニウム

CAS No. : 57-09-0

構造式 :



分子式 : $C_{19}H_{42}BrN$

分子量^{*1} : 364.45

融点^{*1} : 240℃

水溶解度^{*1,*2} : 水に易溶^{*1}

> 1000mg/L^{*2} (精製水^{*3}, 目視判定)

*1: 供給者提供資料

*2: 当社測定値

*3: JIS K0557 A4グレードの水, ヤマト科学製 超純水製造装置 WR600A

1.2 供試試料

純度^{*1} : 100%

ロット番号^{*1} : PKH1090

供給者 :

受領量^{*1} : 25g

受領日 : 2004年 1月22日

外観^{*1} : 白色粉末

*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

試験開始前に、入手した被験物質について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。

試験期間中、被験物質は当研究所の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所，窒素封入）内に保管した。また、試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始時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は安定であったと判断された。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet 製 AVATAR 320 型

2 供試生物

- 1) 和名： オオミジンコ
- 2) 学名： *Daphnia magna*
- 3) 入手先： 環境庁国立環境研究所（現 独立行政法人国立環境研究所）
- 4) 入手日： 1995年 7月18日
- 5) 感受性： 定期的（約6ヶ月毎）に基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による急性遊泳阻害試験を行い、供試生物の感受性を調べている。1998年6月以降の48時間の半数遊泳阻害濃度（EC50）は、以下の通りである。

平均値±標準偏差＝0.75±0.15 mg/L, n=14

（最小値～最大値＝0.57～1.02 mg/L）

- 6) 生育段階： 雌の幼体（24時間以内令）
- 7) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：
 - 飼育水： 希釈水（3.2 参照）
 - 飼育密度： 1頭／80mL（25頭／2L）以下
 - 飼育容器： 2L ガラス製容器
 - 水温： 20±1℃
 - 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60%以上
 - pH： 6～9
 - 照明： 室内光，16時間明（800 lux以下）／8時間暗
 - 飼育期間： 2005年 2月22日～2002年 3月15日
 - 暴露開始前2週間の親の死亡率： 0%
 - 休眠卵および雄の発生： 無し
 - 餌の種類： *Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）
（藻類培養液を遠心分離し，希釈水に置換して使用）
 - 給餌量： 0.2 mg C（有機炭素含量）／頭／日
 - 飼育水の交換： 定期的に（3回／週）交換。幼体は極力，毎日除去。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（24時間後に試験液の全量を交換）
水面をテフロンシートで被覆
- 2) 暴露期間： 48時間
- 3) 試験液量： 100 mL／容器
- 4) 連数： 4 容器／試験区
- 5) 供試生物数： 20頭／試験区（5 頭／容器）
- 6) 試験温度： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60%以上
- 8) pH： 試験液の pH調整は行わなかった
- 9) 硬度： 約 250mg/L (CaCO_3 換算)
- 10) 照明： 室内光，16時間明（800 lux以下）／8時間暗
- 11) 給餌： 無給餌

3.2 希釈水

OECD 化学品テストガイドライン No. 211「オオミジンコ繁殖試験」（1998 年）に記載されている調製水（Elendt M4）を用いた。組成を付属資料－1 に示す。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100mL容ガラスビーカー
(試験容器には蓋をし，水面をテフロンシートで覆った)
- 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型）
- 3) 水温計： ハンナ製 チェックテンプ
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10型
- 5) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V型
- 6) 硬度測定キット： ハック製 HA-DT
- 7) 電子天秤： メトラー製 AG204型
メトラー製 AE163型
メトラー製 PB3002型

3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験（各2連，10頭／試験区，止水式）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，0.0100，0.0180，0.0320，0.0560，0.100 mg/L（公比：1.8）

予備試験結果

1回目			2回目		
濃度 (mg/L)	遊泳阻害率 (%)		濃度 (mg/L)	遊泳阻害率 (%)	
	24時間後	48時間後		24時間後	48時間後
対照区	0	--	対照区	0	0
0.100	100	--	0.000100	0	0
1.00	100	--	0.00100	0	0
10.0	100	--	0.0100	0	0
100	100	--	0.100	100	100
--:観察せず					

3.5 試験液の調製

付属資料－2に示すように，被験物質原液を調製し，希釈水で希釈混合することにより，試験液を調製した。被験物質原液は用時調製とした。

調製した試験液は1区につき4個の試験容器に各100 mL入れた。

対照区は希釈水のみとした。

調製時の試験液の状態（外観）は全試験区において無色であった。

3.6 試験液の分析

暴露開始24時間（換水後）および暴露開始48時間（終了時）に全試験区各1試験容器より試験液を分析用に採取した。対照，0.0100，0.0180，0.0320 mg/Lについては0.75 mLを採取し，メタノールを等量添加し混合した。0.0560，0.100 mg/L については精製水で5倍に希釈後，0.75 mLを採取し，メタノールを等量添加し混合した。分析は高速液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）により行った。各試験液の被験物質濃度は，標準溶液のピーク面積との比から定量し，幾何平均値を求めた。詳細は付属資料-3に示す。

3.7 試験操作

試験液の水温，溶存酸素濃度，pHおよび硬度を測定後，ガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し，その時点を暴露開始時とした。ミジンコ投入の際，試験液量に対するピペット内の飼育水が全量で1%以内となるようにした。

暴露開始 24 および 48 時間後にミジンコの遊泳阻害数の観察を行った。試験容器を穏やかに動かした後，15 秒間泳げない場合は遊泳阻害されたとみなした。

水温，溶存酸素濃度，pHおよび硬度は，暴露開始時および換水前に，全試験区各1試験容器の試験液について測定した。

4 結果の算出

4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

阻害濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値（平均）とした。

4.2 半数遊泳阻害濃度（ EiC_{50} ）の算出

24および48時間の各試験区における、ミジンコの遊泳阻害数と供試個体数（20頭）から遊泳阻害率（％）を求め、以下の方法で半数遊泳阻害濃度（ EiC_{50} ）を決定した。

最高濃度区における阻害率	$\geq 50\%$	$< 50\%$
EiC_{50} の決定方法	Probit法, Moving average法, Binomial法 での算出結果から適切と判断されたものを採用。可能な限り 95%信頼区間を算出。	推定される濃度領域を記載する
濃度－遊泳阻害率曲線の記載	記載する。	記載する。

4.3 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度

ミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度区（0%阻害最高濃度）を24および48時間について可能な限り記録した。同様に、全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度区（100%阻害最低濃度）を記録した。

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

該当する事象はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始24時間（換水後）および暴露開始48時間（終了時）に試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1, 代表的なクロマトグラムを付属資料－3に示す。

試験液の分析（3.6 参照）の結果、測定値の設定値に対する割合は、暴露開始 24 時間（換水後）において 65～101%, 暴露開始 48 時間（終了時）において 61～83%であった。減少の主な原因は、容器およびミジンコへの吸着等が考えられた。

5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)

各時間における遊泳阻害率をTable 2 に、濃度－遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示す。

暴露期間中の対照区における遊泳阻害率は 0%, 水面に浮いたミジンコは 0%であり、試験成立条件を満たした。

以上の結果に基づき算出された半数遊泳阻害濃度 (EiC50) を Table 3 および以下に、48 時間の算出結果を付属資料－4 に示す。

24 時間 EiC50 : 0.0394 mg/L (95%信頼区間 : 0.0265 ~ 0.0862 mg/L)

48 時間 EiC50 : 0.0157 mg/L (95%信頼区間 : 0.0132 ~ 0.0185 mg/L)

5.4 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度

0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度を Table 4 および以下に示す。

24 時間 0%阻害最高濃度 : 0.0265 mg/L

24 時間 100%阻害最低濃度 : 0.0862 mg/L

48 時間 0%阻害最高濃度 : 0.00674 mg/L

48 時間 100%阻害最低濃度 : 0.0373 mg/L

5.5 試験液の水温，溶存酸素濃度，pHおよび硬度

試験液の水温を Table 5，溶存酸素濃度を Table 6，pHを Table 7，硬度を Table 8に示す。

水温はすべての試験区で $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で，溶存酸素濃度はすべての試験区で飽和溶存酸素濃度（ 20.0°C の飽和溶存酸素濃度：8.8 mg/L）の60%以上であり，いずれも試験基準を満たした。pHはミジンコの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であった。また，硬度も適正範囲内（約250mg/L）と判断した。

5.6 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以 上

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

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)				Geometric Mean During 24 Hours (mg/L)
	24 Hour New	Percent of Nominal	48 Hours Old	Percent of Nominal	
Control	< 0.00007	--	< 0.00007	--	--
0.0100	0.00654	65	0.00694	69	0.00674
0.0180	0.0131	73	0.0134	74	0.0132
0.0320	0.0267	83	0.0264	83	0.0265
0.0560	0.0408	73	0.0341	61	0.0373
0.100	0.101	101	0.0736	74	0.0862

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 2 The Number of Immobilized *Daphnia magna* (Percent Immobility)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured concentration (mg/L)	Cumulative Number of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
		24 Hours	48 Hours
Control	--	0 (0)	0 (0)
0.0100	0.00674	0 (0)	0 (0)
0.0180	0.0132	0 (0)	7 (35)
0.0320	0.0265	0 (0)	18 (90)
0.0560	0.0373	9 (45)	20 (100)
0.100	0.0862	20 (100)	20 (100)

a: geometric mean

Table 3 Calculated EiC50 Values

Exposure Period (Hours)	EiC50* (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	0.0394	0.0265 - 0.0862	Binomial
48	0.0157	0.0132 - 0.0185	Probit

*: Using the concentrations of 0.00674 - 0.0862 mg/L

Table 4 Highest Concentration in 0% Immobility and Lowest Concentration in 100% Immobility

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Immobility (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Immobility (mg/L)
24	0.0265	0.0862
48	0.00674	0.0373

Table 5 Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	20.1	19.8
0.0100	0.00674	20.2	19.9
0.0180	0.0132	20.2	19.9
0.0320	0.0265	20.2	19.9
0.0560	0.0373	20.2	19.9
0.100	0.0862	20.2	19.9

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 6 Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	8.8	8.8
0.0100	0.00674	8.8	8.8
0.0180	0.0132	8.8	8.8
0.0320	0.0265	8.8	8.8
0.0560	0.0373	8.8	8.8
0.100	0.0862	8.8	8.8

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 7 pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	8.4	8.3
0.0100	0.00674	8.5	8.3
0.0180	0.0132	8.4	8.3
0.0320	0.0265	8.4	8.3
0.0560	0.0373	8.4	8.3
0.100	0.0862	8.4	8.3

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Table 8 Total Hardness (as CaCO₃)

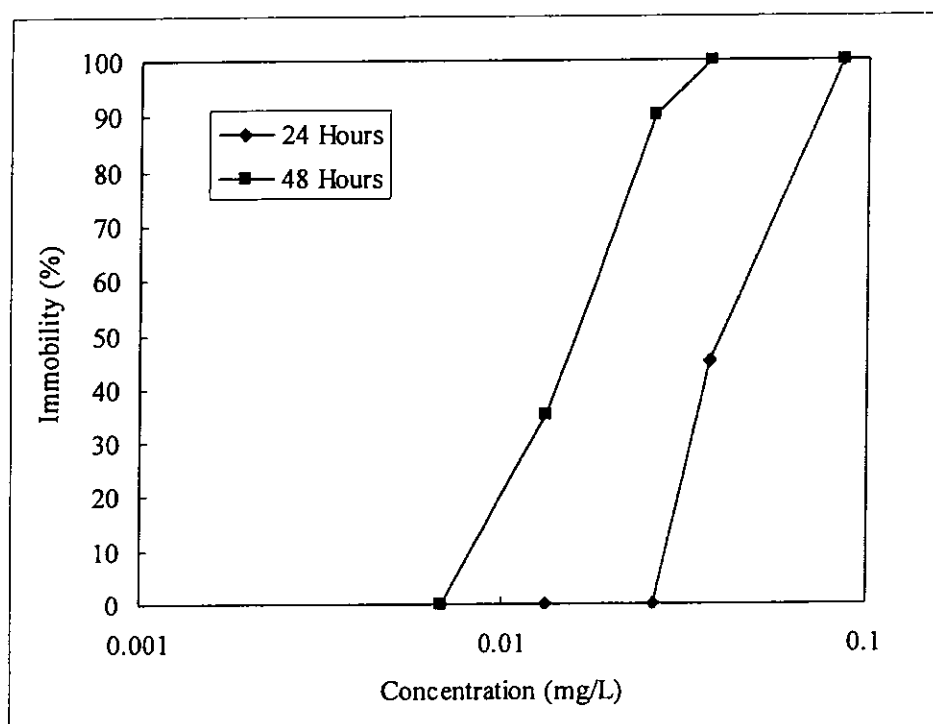
Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Total Hardness (as CaCO ₃ , mg/L)	
		0 Hour New	24 Hours Old
Control	--	240	240
0.0100	0.00674	238	240
0.0180	0.0132	242	240
0.0320	0.0265	240	240
0.0560	0.0373	240	240
0.100	0.0862	238	240

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 24 hours exposure

Figure 1 Concentration-Immobility Curve



付属資料－ 1

希釈水の組成

Table A-1 Elendt M4 medium recommended by OECD Guideline No.211
used as dilution water

Macro nutrients	Concentration (mg/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3
KCl	5.80
NaHCO_3	64.8
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0
NaNO_3	0.274
KH_2PO_4	0.143
K_2HPO_4	0.184

Trace elements	Concentration ($\mu\text{g/L}$)
H_3BO_3	2859.5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	360.5
LiCl	306.0
RbCl	71.0
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	152.0
NaBr	16.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	63.0
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	16.8
ZnCl_2	13.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0
KI	3.25
Na_2SeO_3	2.19
NH_4VO_3	0.575
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2500
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	995.5

Vitamins	Concentration ($\mu\text{g/L}$)
Thiamine hydrochloride	75.0
Cyanocobalamine (B12)	1.00
Biotine	0.750

付属資料－ 2

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

① 被験物質原液Ⅰの調製

採取量	——>	100	mg
溶媒	——>	試験用水（十分暴気し $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ にしたElendt M4溶液）	
最終容量	——>	100	mL
容器	——>	メスボトル	
濃度	——>	1000	mg/L
混合方式	——>	スターラーで10分攪拌後、超音波1分	

② 被験物質原液Ⅱの調製

原液Ⅰ採取量	——>	200	μL
溶媒	——>	試験用水（十分暴気し $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ にしたElendt M4溶液）	
最終容量	——>	2000	mL
容器	——>	ビューム瓶	
濃度	——>	0.100	mg/L
混合方式	——>	スターラー攪拌3分、密栓	

2. 試験液の調製

②の原液を下記の表の通り採取し、試験用水で希釈して試験液とする。

試験用水（最終容量）	——>	0.50	L
容器	——>	メスフラスコ	
混合方式	——>	手で転倒攪拌、密栓	
濃度公比	——>	1.78	

（以下の濃度表示は、最小桁数に合わせている）

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)	②原液Ⅱ mL
対 照 区	C	0
0.0100	Conc.1	50
0.0180	Conc.2	90
0.0320	Conc.3	160
0.0560	Conc.4	280
0.1000	Conc.5	500

付属資料－ 3

試験液の分析

1 試験液の分析方法

- 1) 各試験液を分析用に採取した。対照, 0.0100, 0.0180, 0.0320 mg/Lについては0.75 mLを採取し, メタノールを等量添加し混合した。0.0560, 0.100 mg/L については精製水で5倍に希釈後, 0.75 mLを採取し, メタノールを等量添加し混合した。分析はLC/MSにより行った。代表的なクロマトグラムをFigure A-3-2 (2), (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10)に示す。
- 2) メタノールで調製した標準溶液0.75 mLを測定用バイアルに採取し, 精製水を等量添加し混合後, LC/MSにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-3-2 (1), (6)に示す。
- 3) 各試験液の被験物質濃度は, 各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて, 一点検量法により定量した。
なお, 暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し, 直線性を確認している。(「3 検量線」参照)

2 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ質量分析計 Agilent 1100 型 No.3

ワークステーション: Agilent 1100 シリーズ*ケミステーション (Windows NT)

高速液体クロマトグラフ (HPLC): Agilent Technologies 1100 型

デガッサ: G 1 3 7 9 A 型

送液ポンプ: G 1 3 1 2 A 型 (ハイパソン)

オートサンプラ: G 1 3 1 3 A 型

カラムオープン: G 1 3 1 6 A 型

質量選択検出器 (MSD): G 1 9 4 6 D 型

(条件)

[HPLC 条件]

カラム: GL Sciences 製 Inertsil ODS-3 5 μ m 3.0mm i.d. \times 150mm

カラムオープン: 40 $^{\circ}$ C

溶離液: A 液 5mM IPC-PFFA-5*水溶液 *:Nonafluorovaleric Acid

B 液 メタノール

0.00min A 液 20%, B 液 80%

0.75min A 液 5%, B 液 95%

7.00min A 液 5%, B 液 95%

7.01min A 液 20%, B 液 80%

試料注入量: 5 μ L

流速: 0.4 mL/min

[MSD 条件] API-ES (Atmospheric Pressure Ionization - Electrospray) で分析

Ionization: Electrospray

Fragmentor: 75V

Nebulizer: N₂ (30psi)

Drying gas: N₂ (10L/min, 300 $^{\circ}$ C)

Mode: Positive

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件:

Start Time= 0 min

Quant ion= m/z 284.50

3 検量線

メタノールを用い, 0, 0.005~0.050 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し等量の精製水で希釈したものを LC/MS で測定した。横軸に濃度 (mg/L) を, 縦軸にピーク面積(count)をとり, 検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 1.00 と良好であった。作成した検量線を Figure A-3-1 に示す。

2 高速液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ質量分析計 Agilent 1100 型 No.3

ワークステーション： Agilent 1100 シリーズ ミステーション (Windows NT)

高速液体クロマトグラフ (HPLC)： Agilent Technologies 1100 型

デガッサ： G1379A 型

送液ポンプ： G1312A 型 (ハイプレッシャー)

オートサンプラ： G1313A 型

カラムオーブン： G1316A 型

質量選択検出器 (MSD)： G1946D 型

(条件)

[HPLC 条件]カラム： GL Sciences 製 Inertsil ODS-3 5 μ m 3.0mm i.d. \times 150mmカラムオーブン： 40 $^{\circ}$ C

溶離液： A 液 0.5mM IPC-PFFA-5* 水溶液 *:Nonfluorovaleric Acid

B 液 メタノール

0.00min A 液 20%, B 液 80%

0.75min A 液 5%, B 液 95%

7.00min A 液 5%, B 液 95%

7.01min A 液 20%, B 液 80%

試料注入量： 5 μ L

流速： 0.4 mL/min

[MSD 条件] API-ES (Atmospheric Pressure Ionization - Electrospray) で分析

Ionization： Electrospray

Fragmentor： 75V

Nebulizer： N₂ (30psi)Drying gas： N₂ (10L/min, 300 $^{\circ}$ C)

Mode： Positive

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件：

Start Time= 0 min

Quant ion= m/z 284.50

3 検量線

メタノールを用い、0, 0.005~0.050 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し等量の精製水で希釈したものを LC/MS で測定した。横軸に濃度 (mg/L) を、縦軸にピーク面積(count)をとり、検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 1.00 と良好であった。作成した検量線を Figure A-3-1 に示す。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 1000 count に設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.00007 mg/Lを検出限界とした。

5 添加回収試験

分析前処理は、「1 試験液の分析方法」に示したように、試験液とメタノールを混合する操作だけであるので、添加回収試験の必要はなかった。したがって、回収率の補正は行わなかった。

Figure A-3-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.005	84802
3	0.010	175369
4	0.020	348653
5	0.050	850887

Y= 17,089,293X
r= 1.00

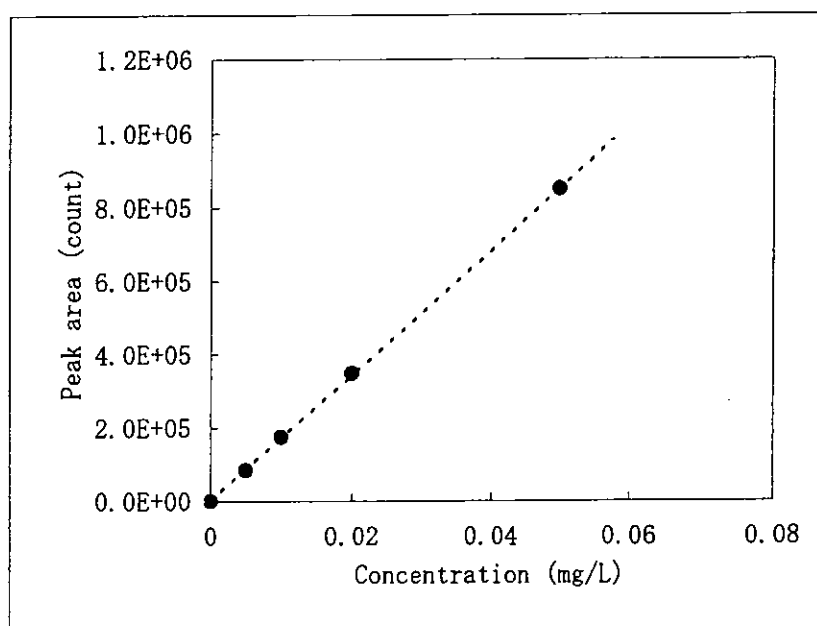
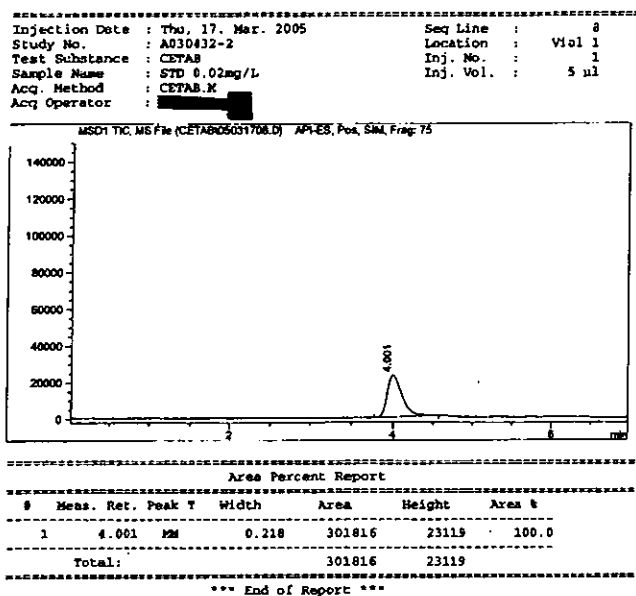


Figure A-3-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.020 mg/L ; 24 Hours



(2) Control ; 24 Hours - New

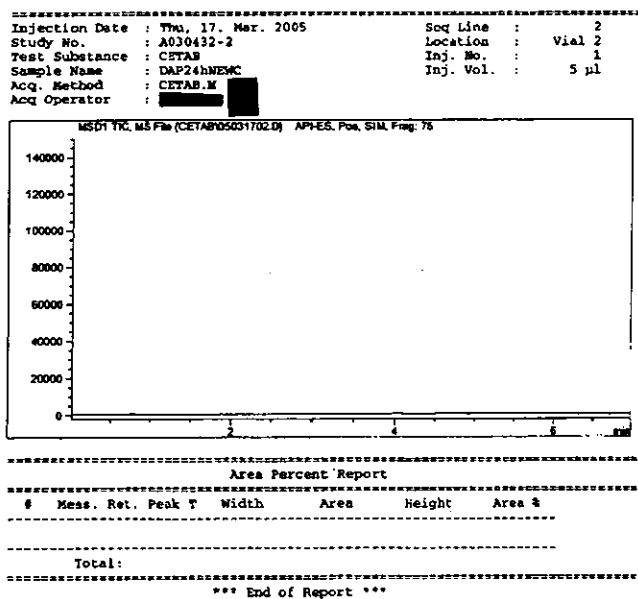
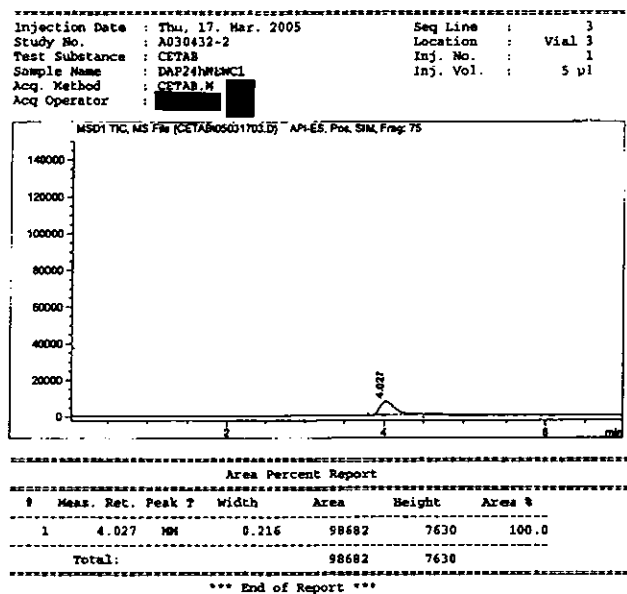


Figure A-3-2 Continued

(3) 0.0100 mg/L nominal ; 24 Hours - New



(4) 0.0320 mg/L nominal ; 24 Hours - New

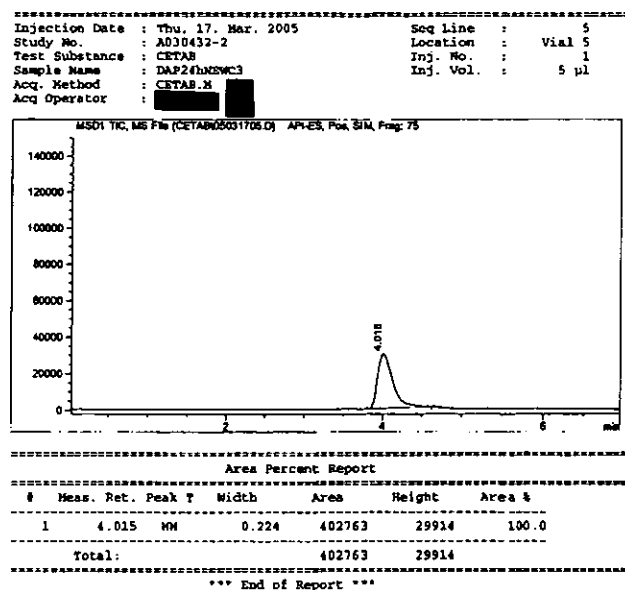
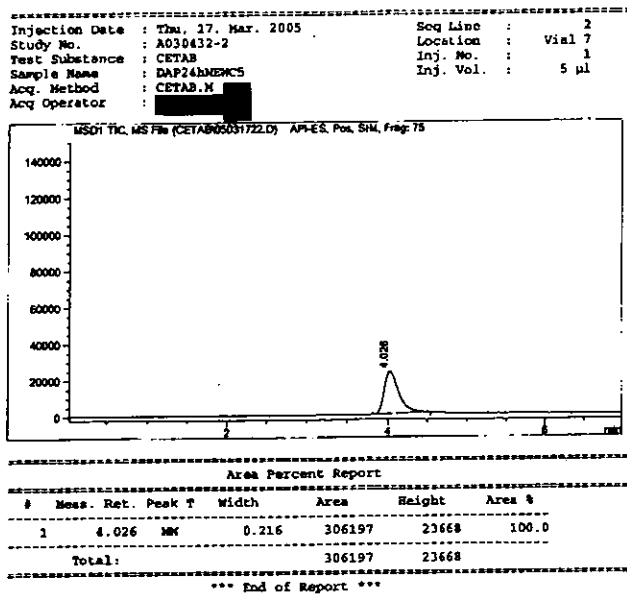


Figure A-3-2 Continued

(5) 0.100 mg/L nominal ; 24 Hours - New



(6) Standard 0.020 mg/L ; 48 Hours

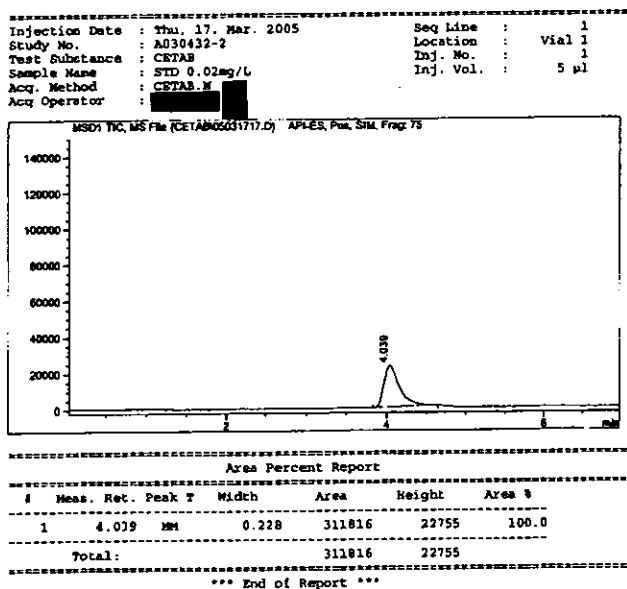
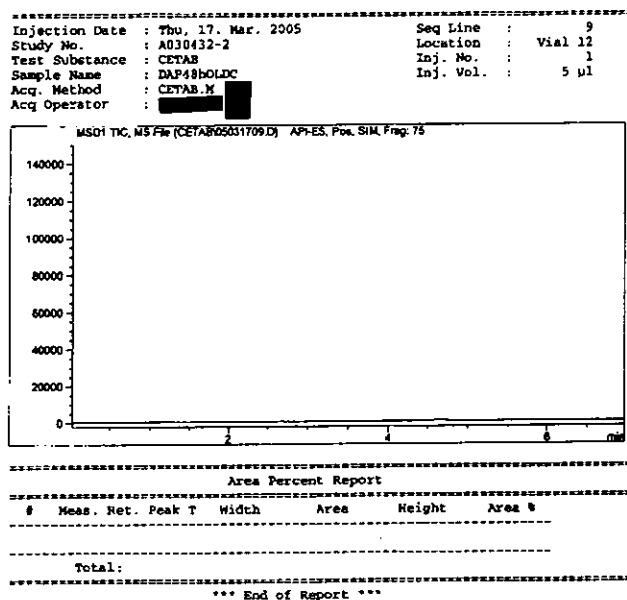


Figure A-3-2 Continued

(7) Control ; 48 Hours - Old



(8) 0.0100 mg/L nominal ; 48 Hours - Old

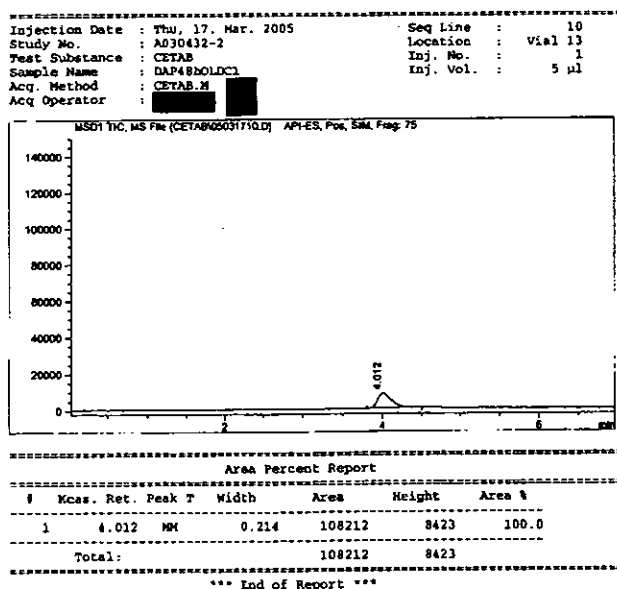
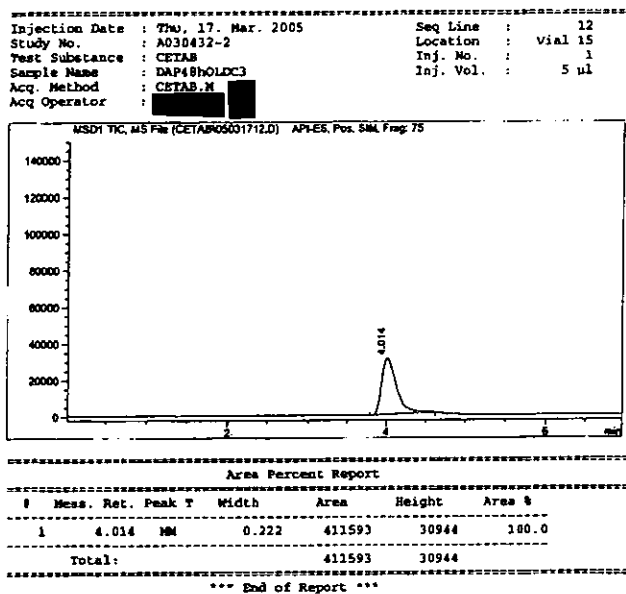
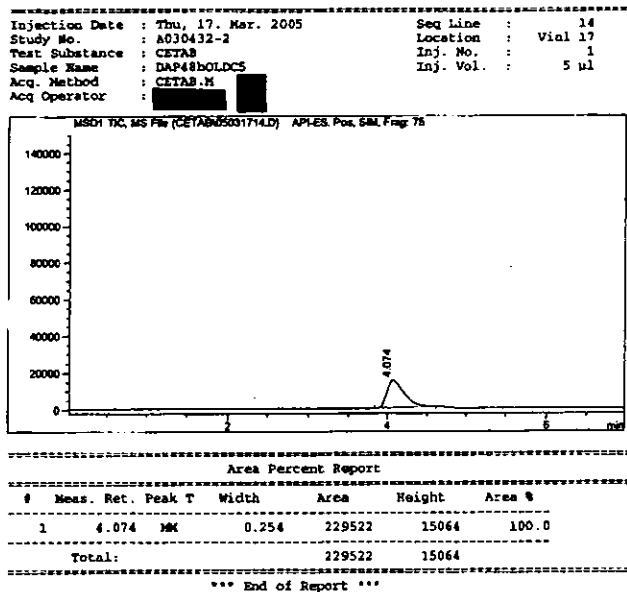


Figure A-3-2 Continued

(9) 0.0320 mg/L nominal ; 48 Hours - Old



(10) 0.100 mg/L nominal ; 48 Hours - Old



付属資料－ 4

結果の算出

Table A-4 Calculation of the EiC50 (Representative, 48hr.)

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
ミジンコ急性遊泳阻害試験					
Time: 48hr					
Conc. No.	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Control	0	20	0	0	---
Conc. 1	0.00674	20	0	0	9.53674E-05
Conc. 2	0.0132	20	7	35	13.15879822
Conc. 3	0.0265	20	18	90	0.020122528
Conc. 4	0.0373	20	20	100	9.53674E-05
Conc. 5	0.0862	20	20	100	9.53674E-05

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 0.00674 AND 0.0265 CAN BE USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.9797821044922 PERCENT. AN APPROXIMATE EC50 FOR THIS SET OF DATA IS 1.57144790662464E-02

>>>>>>>RESULTS CALCULATED USING THE MOVING AVERAGE METHOD

SPAN	G	EC50	95 PERCENT COFIDENCE LIMITS
3	0.048789212	0.015662325	0.013391709 AND 0.018038265

>>>>>>>RESULTS CALCULATED USING THE PROBIT METHOD

ITERATIONS	G	H	GOODNESS OF FIT PROBABILITY
7	0.132552367	1	0.874592962

SLOPE = 6.421425366
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 4.083529389 AND 8.759321343

EC50 = 0.01570815
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 0.013166123 AND 0.018503232

LC1 = 0.006819886
95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 0.003979573 AND 0.008941995