

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
[Redacted]

A050380

最 終 報 告 書

パルミチン酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*)

に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号：A050380)

2006年 9月25日

株式会社三菱化学安全科学研究所

陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : パルミチン酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A 0 5 0 3 8 0

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G L Pに従って実施したものである。

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」

(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号,
環保企発第 031121004 号, 最終改正: 平成 17 年 4 月 1 日)

2 0 0 6 年 9 月 2 5 日

試験責任者

[Redacted]

[Redacted]

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 : パルミチン酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A050380

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及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	2006年 7月19日	2006年 7月19日
試験の査察		
試験液の調製	2006年 8月 2日	2006年 8月 2日
ミジンコの投入	2006年 8月 2日	2006年 8月 2日
試験液の分析	2006年 8月 3日	2006年 8月 3日
ミジンコの観察	2006年 8月 4日	2006年 8月 4日
最終報告書監査	2006年 9月25日	2006年 9月25日

2006年 9月25日

信頼性保証部門担当者



試験実施概要

1. 表 題 : パルミチン酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験
(試験番号 : A050380)
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 : 「新規化学物質等に係る試験の方法について<藻類生長阻害試験, ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験>」(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号, 平成 15・11・13 製局第 2 号, 環企発第 031121002 号, 最終改正 : 平成 17 年 4 月 1 日)
4. 適用 G L P : 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121003 号, 平成 15・11・17 製局第 3 号, 環企発第 031121004 号, 最終改正 : 平成 17 年 4 月 1 日)
5. 試験委託者 : 環境省
東京都千代田区霞ヶ関一丁目 2-2
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
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
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地
8. 試験責任者 : XXXXXXXXXX
生態化学研究部

9. 試験担当者： [REDACTED] (2006年 9月25日)

(試験実施, 分析実施, 報告書作成)

[REDACTED] (2006年 9月25日)

(試験実施)

10. 試験日程： 試験開始日 2006年 7月19日
暴露開始日 2006年 8月 2日
暴露終了日 2006年 8月 4日
試験終了日 2006年 9月25日

11. 保管： 下記の試資料を，株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜
研究所の試資料保管施設に保管する。

- 1) 試験計画書
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 被験物質
- 5) 対照物質
- 6) その他必要なもの

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	10
1.3 保管法および安定性の確認	10
2 供試生物	11
3 試験方法	13
3.1 試験条件	13
3.2 希釈水	13
3.3 試験容器および恒温槽等	14
3.4 試験濃度の設定	14
3.5 試験液の調製	15
3.6 試験液の分析	15
3.7 試験操作	15
3.8 結果の算出	16
4 結果および考察	17
4.1 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	17
4.2 試験液中の被験物質濃度	17
4.3 半数遊泳阻害濃度 (EC50)	17
4.4 0%阻害最高濃度および 100%阻害最低濃度	17
4.5 試験液の外観および水温, 溶存酸素濃度, p H	18
Table 1~8	19~25
Figure 1	26
付属資料-1 赤外吸収スペクトル	27~28
付属資料-2 希釈水の水質	29~30
付属資料-3 試験液の調製	31~32
付属資料-4 試験液の分析	33~40
参考資料	

要 約

試験委託者

環境省

表題パルミチン酸のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験試験番号

A050380

試験方法

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について<藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験>」（平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号，平成 15・11・13 製局第 2 号，環境企発第 031121002 号，最終改正：平成 17 年 4 月 1 日）に準拠して実施した。

1) 暴露方式： 半止水式（24時間後に試験液の全量を交換）

2) 暴露期間： 48時間

3) 試験濃度（設定値）：対照区，助剤対照区，0.510 mg/L*

*：溶解度での限度試験

助剤濃度一定：N,N-ジメチルホルムアミド 100 μL/L

4) 試験液量： 100 mL／容器

5) 連数： 4 容器／試験区

6) 供試生物数： 20頭／試験区（5 頭／容器）

7) 試験温度： 20±1 °C

8) 照明： 室内光，16時間明（800 lux 以下）／8時間暗

9) 分析方法： 高速液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において90～99%、その24時間後において14～30%であった。

濃度減少の主な原因は、ミジンコへの吸着・取り込みが考えられる。また、浮遊物が見られたことから、析出も原因の一つとして考えられる。

2) 24 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EC50) : >0.250 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

0%阻害最高濃度 : >0.250 mg/L

100%阻害最低濃度 : >0.250 mg/L

3) 48 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EC50) : >0.250 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

0%阻害最高濃度 : >0.250 mg/L

100%阻害最低濃度 : >0.250 mg/L

1 被験物質

1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

被験物質の名称	パルミチン酸		
別 名	(略称: P A L M)		
C A S 番 号	57-10-3		
構 造 式 又 は 示 性 式 (いずれも不明の場合は, その製法の概要)	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} - (\text{CH}_2)_{14} - \text{CH}_3 \\ \diagup \\ \text{HO} \end{array} \quad *1$		
分 子 量	256.43		
試 験 に 供 し た 物 質 の 純 度 (%)	98.7%		
試 験 に 供 し た 物 質 の ロ ッ ト 番 号	SDM2000		
不 純 物 の 名 称 及 び 含 有 率	—		
蒸 気 圧	0.998 mmHg (15℃) *1		
対 水 溶 解 度	0.00072% (20℃) *1		
1-オクタノール/水分配係数	—		
融 点	61.7℃		
沸 点	390℃		
常 温 に お け る 性 状	白色, 微粒		
安 定 性	—		
溶媒に対する溶解度等	溶媒	溶解度	溶媒中の安定性
	ジエチルエーテル	溶けやすい	—
	エタノール	やや溶けやすい	—

上記内容は供給者提供資料による。

ただし*の内容は以下の通り。

*1: 独立行政法人製品評価技術基盤機構ホームページ 化学物質総合検索システム
<http://www.safe.nite.go.jp/japan/db.html>

1.2 供試試料

供給者： XXXXXXXXXX

1.3 保管法および安定性の確認

被験物質は試験期間中、当研究所の試験物質保管用デシケータ（保管条件：室温，暗所）内に保管した。試験終了時に，保管した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは試験開始時に測定したスペクトルと一致したことから，被験物質は保管中安定であったと判断した。赤外吸収スペクトルを付属資料－1に示す。

（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) 一般名： 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) 継代飼育条件： 24時間以内齢の幼体を以下の条件で継代飼育した
 - 飼育水： Elendt M4 (OECD Guideline for Testing of Chemicals 202 (2004)
“*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test” に記載されている調製水)
 - 飼育密度： 1頭/80 mL (25頭/2 L) 以下
 - 飼育容器： 2～3 L ガラス製容器
 - 水温： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
 - 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60%以上
 - pH： 6.0～9.0
 - 照明： 室内光, 16時間明 (800 lux以下) / 8時間暗
 - 飼育期間： 2～4 週間 (この期間中に生まれる幼体を供試または継代)
 - 餌の種類： *Chlorella vulgaris* (単細胞緑藻類)
(藻類から培養液を遠心分離し, 希釈水に置換して使用)
 - 給餌量： 0.1～0.2 mg C (有機炭素含量) / 頭 / 日
(飼育密度, 成長度や繁殖状況等により変動する)
- 飼育水の交換: 定期的に (例えば3回/週) 交換。幼体は極力, 毎日除去
- 6) 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, オオミジンコ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 = 0.75 ± 0.14 mg/L, $n=17$
(最小値～最大値 = $0.57 \sim 1.02$ mg/L)

7) 供試生物を得るための親ミジンコのじゅん化条件：

通常、試験に用いる希釈水と飼育水が同じであるため、じゅん化期間は設けないが、本被験物質は、希釈水として脱塩素水道水を用いるため、以下の条件で親ミジンコをじゅん化した。

飼育水： 脱塩素水道水（3.2 参照）

じゅん化期間： 暴露開始前48時間

その他の条件： 継代飼育条件と同じ

暴露開始2週間前の親の死亡率： 0%

休眠卵および雄の発生： 無し

8) 供試生物： 雌の幼体（24時間以内齢）

3 試験方法

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について＜藻類生長阻害試験，ミジンコ急性遊泳阻害試験及び魚類急性毒性試験＞」（平成 15 年 11 月 21 日 薬食発第 1121002 号，平成 15・11・13 製局第 2 号，環保企発第 031121002 号，最終改正：平成 17 年 4 月 1 日）に準拠して実施した。

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）
- 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±1 ℃
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の 60%以上 エアレーションなし
- 8) pH： 試験液の pH 調整なし
- 9) 照明： 室内光 16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 10) 給餌： 無給餌

3.2 希釈水

被験物質が Elendt M4 に難溶であるため脱塩素水道水を使用した。脱塩素水道水は，横浜市水道水を活性炭処理後，活性炭で除去できない極微量の遊離塩素を中和するため希釈水にチオ硫酸ナトリウムを添加することにより準備した。希釈水の水質は 6 ヶ月毎に水質検査を行い，水産用水基準に適合していることを確認している。検査結果について付属資料－2 に示す。硬度は通常 30～100 mg/L（CaCO₃ 換算），pH は 6.5～8.5 である。暴露開始時に，硬度（250 mg/L 以下，CaCO₃ 換算）および pH（6.0 から 9.0）が適正範囲であり，残留塩素の無いことを確認した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100 mL 容ガラスビーカー（試験液の蒸散，被験物質の揮散防止のために水面をテフロンシートで覆い，さらに試験容器には蓋をした）
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 クールユニット 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 AB204-S 型
メトラー製 PB3002 型

3.4 試験濃度の設定

試験濃度は，当該被験物質の希釈水（脱塩素水道水）に対する溶解度 0.51 mg/L（当社測定値）以下に設定した。

以下の表に示す予備試験（各 2 連，10 頭／試験区）の結果に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

本試験濃度（設定値）：対照区，助剤対照区，0.510 mg/L*

*：溶解度での限度試験

予備試験結果

濃度 (mg/L)	48時間後の 遊泳阻害率(%)
助剤対照区	0
0.00510	0
0.0510	0
0.510	0

3.5 試験液の調製

試験液の調製方法を付属資料－3に示す。対照区は希釈水のみとし、助剤対照区には助剤のみを含むもの（助剤濃度：100 $\mu\text{g/L}$ ）を調製した。調製した試験液を1試験区につき4個の試験容器に各100 mL入れた。調製に用いた原液は暴露開始時に調製し、冷蔵、暗所条件下で保存した（同条件下で48時間以上安定）。

3.6 試験液の分析

暴露開始時、換水前後および暴露終了時に分析を行った。全試験区の各1試験容器より試験液を採取し分析試料とした。これを高速液体クロマトグラフィー質量分析（LC/MS）により分析した。詳細を付属資料－4に示す。

3.7 試験操作

試験液の水溫、溶存酸素濃度、pH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。その際、ピペット内の飼育水が、全量で試験液量に対して1%以内となるようにした。

暴露開始後24および48時間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とみなした。

試験液の外観、水溫、溶存酸素濃度、pHは、暴露開始時、換水前後および暴露終了時に、全試験区各1試験容器の試験液について記録した。

3.8 結果の算出

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、測定値の平均値（時間加重平均）とした。

平均値の算出方法

$$\overline{mc}_n = \frac{ConcA_n - ConcB_n}{\ln(ConcA_n) - \ln(ConcB_n)}$$

$$\overline{MC} = \frac{\overline{mc}_1 + \overline{mc}_2 + \cdots + \overline{mc}_n}{n}$$

\overline{mc}_n : 各暴露期間の平均測定濃度

$ConcA_n$: 試験液調製時の測定濃度

$ConcB_n$: 試験液調製後24時間の測定濃度

($ConcA_n$ と $ConcB_n$ の値が同じ場合は、 $\overline{mc}_n = ConcA_n = ConcB_n$ とする。)

\overline{MC} : 平均測定濃度

2) 半数遊泳阻害濃度（EC50）の算出

通常は、暴露開始後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、半数遊泳阻害濃度（EC50）を決定するが、本試験においては溶解度での限度試験のため、半数遊泳阻害濃度（EC50）の算出はせずに「> 試験濃度」とした。

3) 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度の算出

通常は、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）を暴露開始後24および48時間について可能な限り記録し、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）を記録するが、本試験においては溶解度での限度試験のため、0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度は「> 試験濃度」とした。

4 結果および考察

4.1 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。

4.2 試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度の分析結果をTable 1に、代表的なクロマトグラムを付属資料-4に示す。

分析の結果、測定値の設定値に対する割合は、試験液調製時において90～99%、その24時間後において14～30%であった。

濃度減少の主な原因は、ミジンコへの吸着・取り込みが考えられる。また、浮遊物が見られたことから、析出も原因の一つとして考えられる。

4.3 半数遊泳阻害濃度 (EC50)

各時間における遊泳阻害率および濃度－遊泳阻害率曲線をそれぞれ Table 2 および Figure 1 に示す。

暴露期間中の遊泳阻害率は、対照区および助剤対照区において共に 0%であった。また、水面に浮いたミジンコは、対照区および助剤対照区において共に 0%であり、試験成立条件を満たした。

以上の結果から、半数遊泳阻害濃度 (EC50) を Table 3 および以下に示す。

24 時間 EC50 : >0.250 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

48 時間 EC50 : >0.250 mg/L (95%信頼区間 : 算出不可)

4.4 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 : >0.250 mg/L

48 時間 0%阻害最高濃度 : >0.250 mg/L

24 時間 100%阻害最低濃度 : >0.250 mg/L

48 時間 100%阻害最低濃度 : >0.250 mg/L

4.5 試験液の外観および水温，溶存酸素濃度，pH

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

試験液の外観は，全試験区において暴露開始時は無色であったが，換水前および暴露終了時に濃度区において浮遊物質を確認した。すべての試験区において，水温は $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ，溶存酸素濃度は飽和溶存酸素濃度（ 20.0°C の飽和溶存酸素濃度： 8.8mg/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（6.0～9.0）内であった。

以 上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal, %)				Mean ^a Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal, %)
	0 Hour	24 Hours	24 Hours	48 Hours	
	New	Old	New	Old	
Control	<0.0007	<0.0008	<0.0007	<0.0007	--
Solvent Control	<0.0007	<0.0008	<0.0007	<0.0007	--
0.510	0.458 (90)	0.0705 (14)	0.506 (99)	0.153 (30)	0.250 (49)

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

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)
Solvent Control	--	0 (0)	0 (0)
0.510	0.250	0 (0)	0 (0)

a: time weighted mean

Table 3 Calculated EC50 Values

Exposure Period (Hours)	EC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>0.250	--	--
48	>0.250	--	--

--: Could not be determined

The EC50 value and its 95% confidence limits could not be determined by statistical method because the immobility of *Daphnia* at the maximum concentration level was less than 50%.

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	>0.250	>0.250
48	>0.250	>0.250

Table 5 Appearance of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Appearance of Test Solutions			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	--	C-	C-	C-	C-
Solvent Control	--	C-	C-	C-	C-
0.510	0.250	C-	C-, F+	C-	C-, F+

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

Color:

C-; colorless

Floating solids:

F+; observed as <roughly 10% of the surface were covered

Table 6 Temperature of Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	--	19.7	19.6	20.0	19.6
Solvent Control	--	19.8	19.7	20.0	19.6
0.510	0.250	19.8	19.7	20.0	19.6

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

Table 7 Dissolved Oxygen Concentrations in Test Solutions

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	--	8.8	8.6	8.7	8.3
Solvent Control	--	8.8	8.6	8.7	8.4
0.510	0.250	8.8	8.4	8.8	8.2

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

Table 8 pH Values of Test Solutions

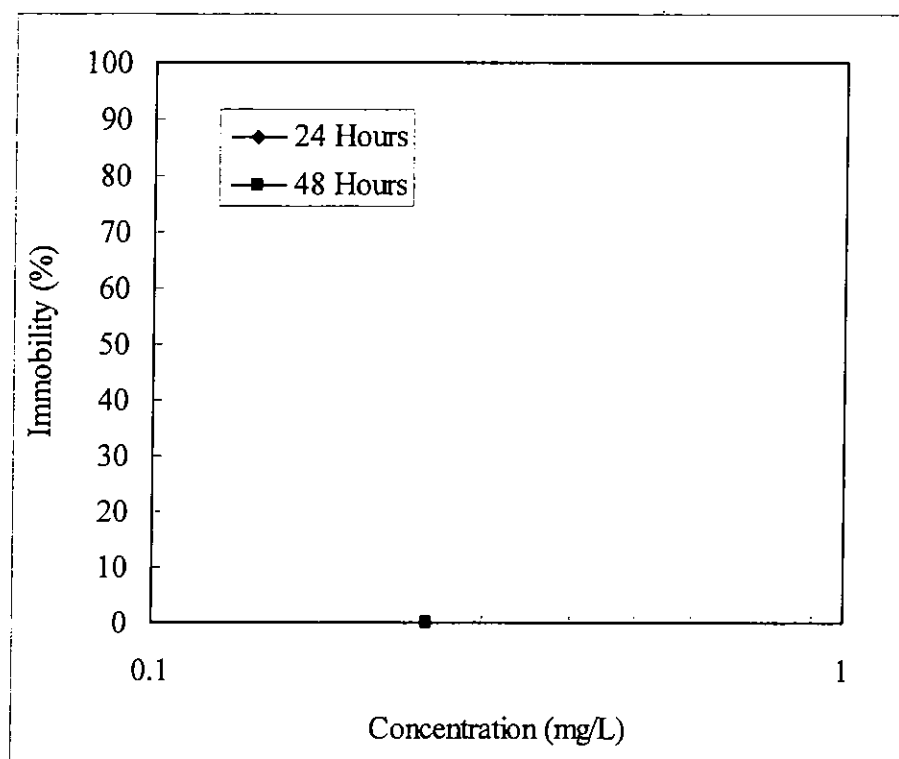
Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH			
		0 Hour New	24 Hours Old	24 Hours New	48 Hours Old
Control	--	8.2	8.1	8.2	8.0
Solvent Control	--	8.2	8.1	8.2	8.1
0.510	0.250	8.2	8.0	8.2	8.0

a: time weighted mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions on 24 hours after preparation of new solutions

Figure 1 Concentration-Immobility Curve



付属資料－ 1

赤外吸収スペクトル

Figure A-1-1 Infrared absorption spectrum of the test substance at the start of the study

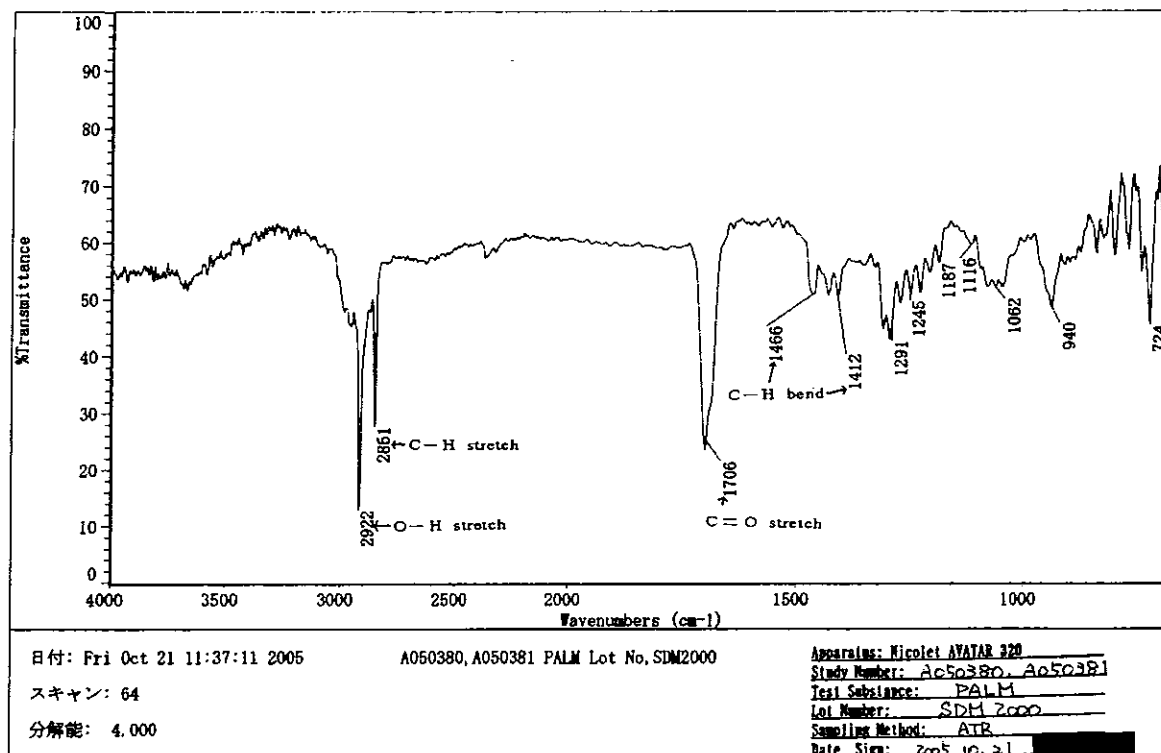
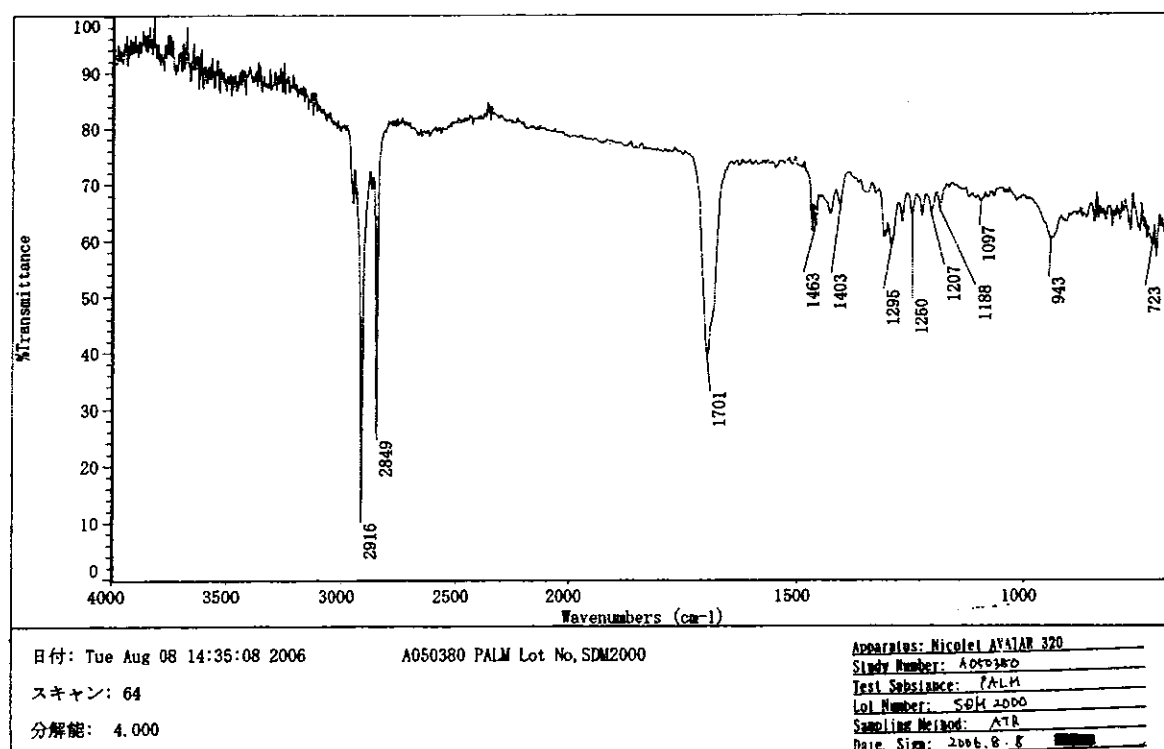


Figure A-1-2 Infrared absorption spectrum of the test substance at the end of the study



付属資料－ 2

希釈水の水質

Table A-2 Dilution Water Quality

Parameter	Concentration	
BOD	<2.0	mg/L
COD	<3.0	mg/L
pH	8.0	(20°C)
Coliform group bacteria	N.D.	
Oil	N.D.	
Cadmium	<0.01	mg/L
Cyanide	N.D.	
Lead	<0.1	mg/L
Chromium	<0.05	mg/L
Arsenic	<0.05	mg/L
Mercury	<0.0005	mg/L
Free chlorine	<0.02	mg/L
Bromide	<1.0	mg/L
Fluoride	<1.5	mg/L
Sulfide	<0.3	mg/L
Total ammonium	<1.0	mg/L
Copper	<0.005	mg/L
Zinc	<0.1	mg/L
Aluminum	<0.1	mg/L
Tin	<1.0	mg/L
Manganese	<1.0	mg/L
Iron	<1.0	mg/L
Nickel	<0.1	mg/L
Total phosphorus	<0.1	mg/L
Selenium	<0.001	mg/L
Phenol	<0.002	mg/L
Anionic surfactant	<0.02	mg/L
Evaporation residue	88	mg/L
Electric conductivity	131	μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	49	mg/L
Alkalinity	29	mg/L
Sodium	8.8	mg/L
Potassium	1.1	mg/L
Calcium	14	mg/L
Magnesium	3.6	mg/L

sampling date: February 6, 2006

付属資料－ 3

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

① 被験物質原液の調製

採取量	→	51	mg
溶媒	→	N,N-ジメチルホルムアミド	
最終容量	→	10	mL
容器	→	メスボトル	
濃度	→	5100	mg/L
混合方式	→	手で転倒攪拌(溶解容易)	

② 助剤原液の調製

助剤	→	N,N-ジメチルホルムアミドをそのまま使用	
----	---	-----------------------	--

2. 試験液の調製

①, ②の各原液を下記の表の通り採取し, 希釈水で希釈して試験液とする。
対照区は希釈水のみとする。

希釈水	→	十分暴気し $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ にした脱塩素水道水	
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	

(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)		①原液 mL	②助剤原液 mL	助剤濃度 $\mu\text{L/L}$
対 照 区	C	→	0	0	0
助剤対照区	SC	→	0	0.050	100
0.510	Conc.1	→	0.050	0	100

付属資料－ 4

試験液の分析

1 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 №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 : G 1 3 7 9 A 型

送液ポンプ : G 1 3 1 2 A 型 (ハイパポンプ)

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 C4 5 μ m 3.0mm i.d. \times 150mm

カラムオープン : 40℃

溶離液 : A液 20mM* 酸アモニウム水*溶液/ * 酸 = 1000/1

B液 メタノール

A液 25%, B液 75%

試料注入量 : 50 μ L

流速 : 0.4 mL/min

[MSD 条件]

Ionization : Electrospray

Fragmentor : 150V

Nebulizer : N₂ (30psi)

Drying gas : N₂ (10L/min, 300℃)

Mode : Negative

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件 :

Quant ion m/z 255.50

* : JIS K0557 A4グレードの水

2 検量線

テトラヒドロフランを用い、1000 mg/Lの標準液を調製した後、これをメタノールで希釈し、0, 0.0500～0.500 mg/Lの標準溶液を調製した。標準溶液の分析を以下のように行った。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0.9995と良好であった。作成した検量線を Figure A-4-1に示す。

標準溶液 0.75 mL 採取
 | ← 精製水 0.75 mL 添加
 混合
 |
 LC/MS測定

3 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 0.0008 mg/Lを検出限界とした。

4 試験液の分析方法

1) 試験液を以下のように分析した。クロマトグラムを Figure A-4-2 (2), (3), (5), (6)に示す。

分析試料 0.75 mL 採取
 | ← メタノール 0.75 mL 添加
 混合
 |
 LC/MS測定

2) 標準溶液を「2 検量線」と同様に分析した。代表的なクロマトグラムを Figure A-4-2 (1), (4)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。

5 添加回収試験

分析前処理は、「4 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、回収率による被験物質濃度の補正は行わなかった。

Figure A-4-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0.00	0
2	0.05	43370
3	0.10	83500
4	0.20	173823
5	0.50	457582

$$Y = 906,030X$$

$$r = 0.9995$$

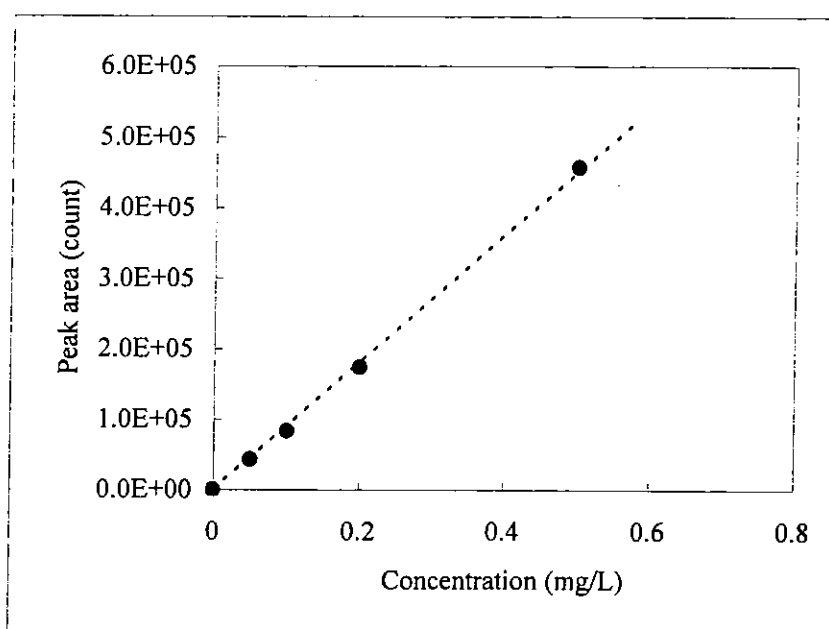
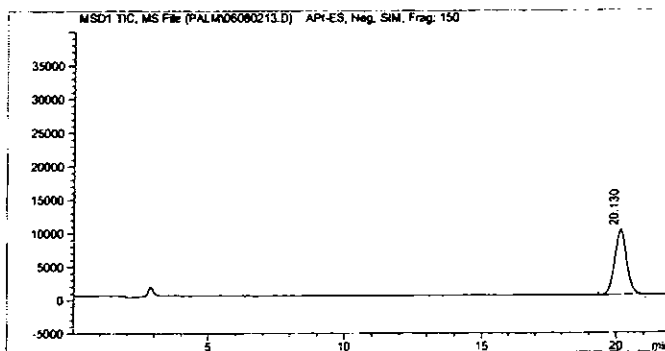


Figure A-4-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.20 mg/L ; 0 Hour

Injection Date : Wed, 2. Aug. 2006 Seq Line : 4
 Study No. : MJA050380 [JA050381] Location : Vial 14
 Test Substance : PALM Inj. No. : 1
 Sample Name : STD 0.2mg/L Inj. Vol. : 50 µl
 Acq. Method : PALM.M
 Acq. Operator :

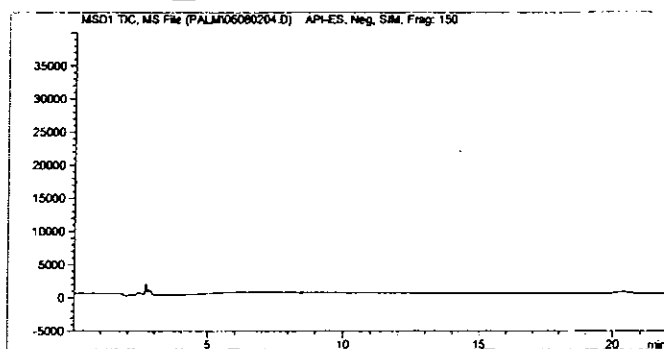


Area Percent Report						
#	Meas.	Ret. Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	20.130	MM	0.488	286673	9791	100.0
Total:				286673	9791	

*** End of Report ***

(2) Solvent Control ; 0 Hour – New

Injection Date : Wed, 2. Aug. 2006 Seq Line : 2
 Study No. : MJA050380 [JA050381] Location : Vial 2
 Test Substance : PALM Inj. No. : 1
 Sample Name : DAP0HSC Inj. Vol. : 50 µl
 Acq. Method : PALM.M
 Acq. Operator :



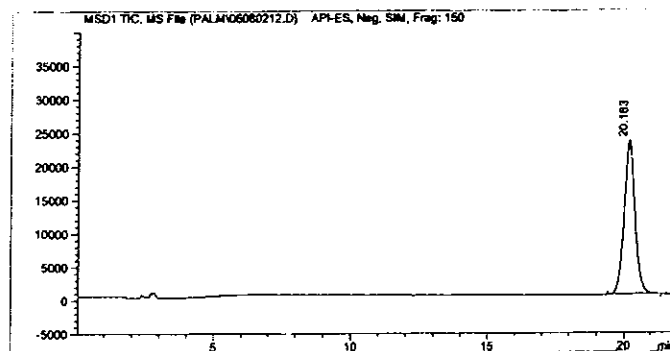
Area Percent Report						
#	Meas.	Ret. Peak T	Width	Area	Height	Area %
Total:						

*** End of Report ***

Figure A-4-2 Continued

(3) 0.510 mg/L ; 0 Hour – New

Injection Date : Wed, 2. Aug. 2006 Seq Line : 3
 Study No. : MA050380 [JA050381]
 Test Substance : PALM Location : Vial 3
 Sample Name : DAP0HC1 Inj. No. : 1
 Acq. Method : PALM.M Inj. Vol. : 50 µl
 Acq Operator :

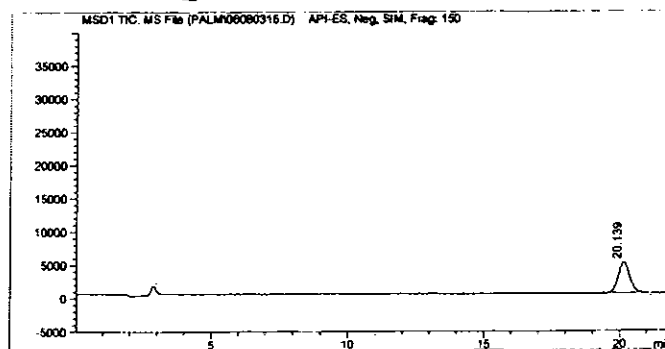


Area Percent Report						
#	Meas.	Ret. Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	20.183	MM	0.476	656017	22984	100.0
Total:				656017	22984	

*** End of Report ***

(4) Standard 0.10 mg/L ; 24 Hours –Old

Injection Date : Thu, 3. Aug. 2006 Seq Line : 7
 Study No. : MA050380 [JA050381]
 Test Substance : PALM Location : Vial 13
 Sample Name : STD 0.1mg/L Inj. No. : 1
 Acq. Method : PALM.M Inj. Vol. : 50 µl
 Acq Operator :



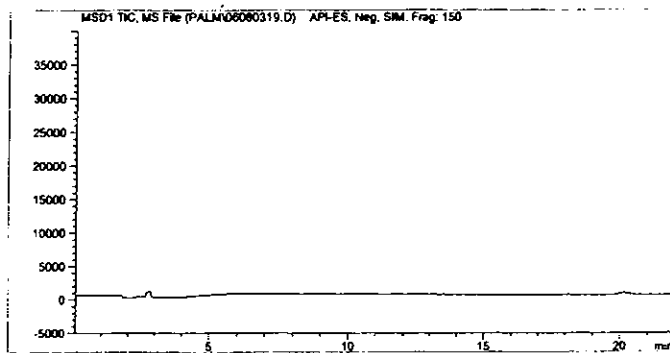
Area Percent Report						
#	Meas.	Ret. Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	20.139	MM	0.502	140266	4657	100.0
Total:				140266	4657	

*** End of Report ***

Figure A-4-2 Continued

(5) Solvent Control ; 24 Hours – Old

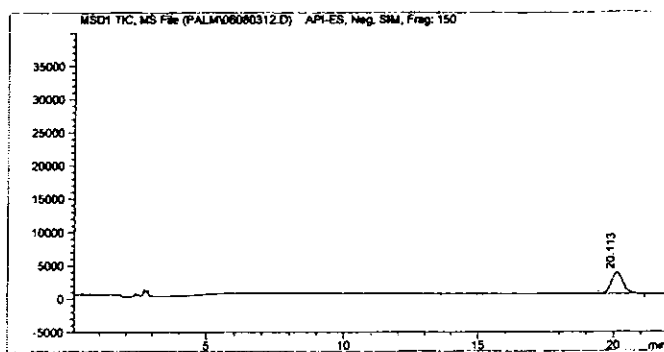
Injection Date : Thu, 3. Aug, 2006 Seq Line : 10
 Study No. : J1A050380 (J1A050381)
 Test Substance : PALM Location : Vial 22
 Sample Name : DAP24HSC-old Inj. No. : 1
 Acq. Method : PALM.M Inj. Vol. : 50 µl
 Acq Operator :



Area Percent Report						
#	Meas.	Ret. Peak T	Width	Area	Height	Area %
Total:						
*** End of Report ***						

(6) 0.510 mg/L ; 24 Hours – Old

Injection Date : Thu, 3. Aug, 2006 Seq Line : 3
 Study No. : J1A050380 (J1A050381)
 Test Substance : PALM Location : Vial 23
 Sample Name : DAP24HSC-old Inj. No. : 1
 Acq. Method : PALM.M Inj. Vol. : 50 µl
 Acq Operator :



Area Percent Report						
#	Meas.	Ret. Peak T	Width	Area	Height	Area %
1	20.113	PM	0.510	98907	3231	100.0
Total:				98907	3231	
*** End of Report ***						

参考資料

被験物質の濃度減少に関する検討

被験物質の濃度減少に関する検討

試験液中の被験物質濃度の減少理由を検討するため、予備試験の際に供試生物のありなしによる試験液中の被験物質濃度の減少の検討を行った。

供試生物のありなしによる試験液中の被験物質濃度の比較

設定濃度 (mg/L)	調製時 設定値に対する割合 (%)	24時間後 設定値に対する割合 (%)	
		ミジンコなし	ミジンコあり
0.510	103	92	64

本試験と同条件下で、容器に試験液100 mLをいれ、テフロンシートの蓋をして、24時間後のミジンコなし・ありの被験物質濃度を比較した。

ミジンコなしの系では11%の濃度減少しか認められなかったが、ミジンコありの系では39%の濃度減少が認められた。

以上の結果より、濃度減少の主な原因は、ミジンコへの吸着・取り込みが考えられる。

また、本試験では浮遊物が見られたことから、析出も試験液中の濃度減少の原因の一つとして考えられる。