

環境庁殿

試 験 報 告 書

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのヒメダカ (*Oryzias latipes*)

に対する延長毒性試験－14日間

(試験番号：NMMP/E97/5060)

平成 9年 7月 4日作成

株式会社東レリサーチセンター

陳 述 書

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁

表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する延長毒性試験-14日間

試験番号 : NMMP/E97/5060

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

平成 9 年 7 月 4 日

運営管理者

[Redacted Signature]

信 頼 性 保 証 証 明

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者 : 環境庁


表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのヒメダカ (*Oryzias latipes*)
に対する延長毒性試験－14日間

試験番号 : NMMP/E97/5060

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通り確認した。

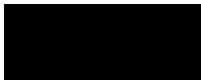
記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	平成 9 年 3 月 3 日	平成 9 年 3 月 25 日
試験報告書監査	平成 9 年 6 月 30 日	平成 9 年 7 月 3 日

平成 9 年 7 月 4 日
信頼性保証担当者 : 



試験実施概要

1. 表題 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－14日間
2. 試験目的 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンについて、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－14日間を行いヒメダカに対する致死、その他の観察される影響の閾値および最大無作用濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン : 本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.204「魚類延長毒性試験－14日間」(1984年)に準拠して実施した。
4. 適用GLP : 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称 : 環境庁
住所 : (〒100)東京都千代田区霞が関 1-2-2
委託担当者 : 環境庁企画調整局環境保健部環境安全課 保健専門官 
6. 試験受託者
名称 : 株式会社東レリサーチセンター
所在地 : (〒103)東京都千代田区日本橋室町3-1-8
7. 試験施設
名称 : 株式会社東レリサーチセンター 名古屋研究部
所在地 : (〒455)愛知県名古屋市港区大江町9-1

8. 試験関係者：

試験責任者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 7 月 4 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	平成 9 年 7 月 4 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	平成 9 年 7 月 4 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 7 月 4 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 7 月 4 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 7 月 4 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 9 年 7 月 4 日)

9. 試験期間： 試験開始日 平成 9 年 2 月 24 日
 試験終了日 平成 9 年 7 月 4 日
 暴露期間 平成 9 年 3 月 27 日 ～ 平成 9 年 4 月 10 日

10. 保管：

試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後 10 年間、株式会社東レリサーチセンター名古屋研究部の保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

目 次

要 旨	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 保管方法及び保管条件下の安定性の確認	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 試験装置、試験容器および恒温槽等	11
3.4 試験濃度の設定	11
3.5 試験液の調製	12
3.6 試験液の分析	12
3.7 試験操作	12
4 結果の算出	13
4.1 最小致死濃度、最小作用濃度、最大無作用濃度	13
5 結果および考察	13
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	13
5.2 試験水中の被験物質濃度	13
5.3 最小致死濃度、最小作用濃度	13
5.4 半数致死濃度 (LC50)	13
5.5 毒性症状	14
5.6 供試魚の体重	14
5.7 最大無作用濃度	14
5.8 試験水の pH、溶存酸素濃度および水温	14
Table 1 ～ 8	15～22
Figure 1	17
付属資料－1 希釈水の水質	23～24
付属資料－2 試験液の分析方法	25～32

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－14日間

試験番号

NMMP/E97/5060

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.204「魚類延長毒性試験－14日間」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質 : 3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン
- 2) 方式 : 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用)
- 3) 供試生物 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 試験濃度 : 対照区, 5.3, 9.5, 17.1, 30.9, 55.6, 及び 100 mg/L
(濃度公比 : 1.8)
- 5) 暴露期間 : 14 日間
- 6) 試験水槽 : 3.0 L
- 7) 生物数 : 10 尾/濃度区
- 8) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 9) エアレーション : 無し
- 10) 温度 : $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 11) 試験水中の被験物質の分析
: 高速液体クロマトグラフ法

結 果

- 1) 14日間の最小致死濃度 = 55.6 mg/L
- 2) 14日間の最小作用濃度 = 55.6 mg/L

- 3) 14日間の最大無作用濃度 (NOEC) = 30.9 mg/L
 - 4) 7日間の半数致死濃度 (LC50) = 100mg/L 以上 (95%信頼区間：求まらなかった)
 - 5) 14日間の半数致死濃度 (LC50) = 100mg/L 以上 (95%信頼区間：求まらなかった)
- (上記濃度は、全て設定値に基づく値)

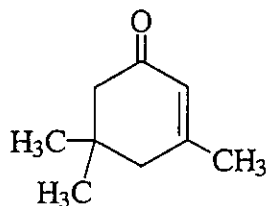
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称：3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン

(3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one)

構造式：



分子式： $C_9H_{14}O$

分子量： 138.21

1-オクタノール／水分配係数 (logP) : 1.70

水溶性： 12000 ppm (20℃)

融点： -8.10℃

沸点： 214.0 ~ 215.2℃

水への溶解度： 微溶 (1.2%/20℃)

蒸気圧 (mmHg)： 0.380 ~ 1.000 (20.0~38.0℃)

生化学的性質： 濃縮性なし～低い

(上記の数値はMSDSから引用した)

1.2 供試試料

購入先：

XXXXXXXXXX

入手先：

XXXXXXXXXX

入手日： 平成8年12月26日

ロット番号： FGD 01

供給量： 500g

外観： 無色透明液体

純度： 97%以上

1.3 保管方法及び保管条件下の安定性の確認

1) 保管方法

被験物質は遮光した試料保管庫に室温で保管した。

2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトル測定、NMRスペクトル測定及び高速液体クロマトグラフ分析を行い、被験物質の特性ピークが認められること及び純度を確認した。試験終了時にも同様に測定・分析し、試験開始前に測定したスペクトル及び高速液体クロマトグラムと比較した結果、変化は認められなかった。従って、被験物質は当研究部の試料保管庫に保管中は安定であったと判断された。

2 供試生物

試験に使用したヒメダカ (*Oryzias latipes*) を下記に示した。供試魚の体長 (被鱗体長) は 2.0cm の±0.5cm 以内であった。

- 1) 一般名 : ヒメダカ
- 2) 学名 : *Oryzias latipes*
- 3) 体長 : 1.994 cm (1.69~2.25 cm)、n=10
- 4) 体重 : 0.08951 g (0.0557~0.1430 g)、n=10
- 5) ロット番号 : M961205
- 6) 購入先 : 六乙養魚場
- 7) 購入日 : 平成8年12月5日

馴化

試験条件と同条件 (水質、温度等) で 12 日間以上、飼育馴化した。餌は市販のテトラミンを与えた。暴露開始の 24 時間前からは給餌しなかった。試験には健康で肉眼的に正常な個体を使用した。暴露開始前 7 日間の死亡率は 0.0% であった。また、供試魚の基準物質 (硫酸銅 (Ⅱ) 五水和物、試薬特級) による急性毒性試験の結果は 96 時間 LC50 が 0.26 mg/L であった。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 方式 : 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用)
- 2) 暴露期間 : 14 日間
- 3) 連数 : 1 濃度区に付き 1 連
- 4) 生物数 : 10 尾/濃度区
- 5) 試験水槽 : 恒温水槽
- 6) 温度 : $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明 : 室内光、16 時間明/8 時間暗
- 8) 給餌 : 市販のテトラミンを毎日魚体重の 2%与えた
- 9) エアレーション : 無し

3.2 希釈水

名古屋市水道水を活性炭に通すことにより脱塩素して用いた。

希釈水の主な水質として、硬度が 21.8 mg/L (CaCO_3 換算)、pH が 6.8 であった。

[付属資料-1(p.23)]

3.3 試験装置、試験容器および恒温槽等

流水式試験装置 : 定量ポンプを用いる連続希釈装置

試験容器 : 3 L 容ガラスビーカー

恒温槽 : 水槽、恒温水循環装置 クールライン (ヤマト科学 CL100 型)

水温計 : クールラインおよび pH メーター内蔵温度計

pH 計 : pH メーター (堀場製作所 カスタニー LAB F-22)

溶存酸素計 : DO METER (東亜電波 DO-14P)

3.4 試験濃度の設定

急性毒性試験の結果、半数致死濃度 (LC_{50})、0%死亡最高濃度及び 100%死亡最低濃度はそれぞれ 100 mg/L 以上であった。そこで、100 mg/L のみの限度試験を実施したところ、毒性症状 (摂餌量の低下) が観測された。このため、公比 1.8 で 5.3, 9.5, 17.1, 30.9, 55.6, 及び 100 mg/L の 6 濃度区を設定した試験を追加実施した。

試験結果の算出には追加実施した試験の結果を用いた。

3.5 試験液の調製

- 1) 被験物質を蒸留水に溶解して被験物質原液を調製した。調製した原液は無色透明であり、不溶物等は認められなかった。
- 2) 100mg/L または 1000mg/L に希釈した被験物質原液と希釈水を連続希釈装置により混合して試験液を調製した。
- 3) 希釈水のみを対照区を設けた。

3.6 試験液の分析

開始時(0日)、7日、及び14日後に各試験水槽より試験水約1.0mLを採取し、高速液体クロマトグラフ分析した。試料測定日毎に標準溶液(1, 50, 100mg/L)の測定を行い、そこから検量係数を求めて被験物質濃度を測定した。詳細は付属資料-2(p.25)に示した。

3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽で馴養した魚10尾の各重量および被鱗体長を測定し、被鱗体長で 2.0 ± 0.5 cmであることを確認した。各試験水槽の試験液のpH、溶存酸素濃度、水温を測定後、試験水槽中に供試魚を1濃度区当たり10尾投入した。

暴露開始後、週3回以上計7回各試験水槽の試験液の水温、pH、溶存酸素濃度を測定した。

暴露期間中、餌は一日当たり個体重量の2%を与えた。死亡により個体数が減少した場合は、その分給餌量を減らした。

暴露開始後、週3回以上死亡個体数を記録するとともに観察された毒性の徴候或いは異常を記録した。記載する症例と定義は下記*に従った。その他特異的症例(背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌等)については観察された場合に別途具体的に記載した。死亡個体を発見した場合、水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。

暴露終了時には全ての生存魚の重量及び被鱗体長を測定・記録した。

*一般的症例と定義

死亡 : 刺激を与えた場合に反応の認められないもの。

摂餌量低下 : 軽度な症状の一つで、対照区の魚と比較して餌の食べ残しがあること。

異常呼吸 : 対照区の魚と比較して鰓蓋の動きが異なるもの。

異常遊泳 : 明らかに対照区の魚と異なる遊泳をしたもの。動作の緩慢、過敏、痙攣、反転等

遊泳不能 : 底部または水面で動いてはいるものの、水中を遊泳することが不可能なもの。横転、仮死を含む。

4 結果の算出

4.1 最小致死濃度、最小作用濃度、最大無作用濃度

試験において死亡個体が観測された試験区の最も低い濃度を最小致死濃度とした。

試験において試験魚に致死以外の他の作用が観測された試験区の最も低い濃度を最小作用濃度とした。

致死やその他の作用が認められない最高試験濃度区を最大無作用濃度 (NOEC) とした。

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

無し。

5.2 試験水中の被験物質濃度

試験開始時、7 日及び 14 日後に試験水中の被験物質濃度を測定した。試験期間中の被験物質濃度は 4.38 ~ 93.59 mg/L (設定値 5.3 ~ 100 mg/L) であり、設定濃度に対する割合は 81.2 ~ 95.4 %であった。 [Table 1(p.15)]

5.3 最小致死濃度、最小作用濃度

死亡個体が観察された試験区のうち最も低い濃度 (最小致死濃度) は 55.6 mg/L (設定値) であった。 [Table 2(p.16)]

試験魚に致死以外の他の作用が観測された試験区のうち最も低い濃度 (最小作用濃度) は 55.6 mg/L (設定値) であった。 [Table 4(p.18)]

5.4 半数致死濃度 (LC50)

7 日間及び 14 日間の死亡率は最も高い濃度区でも 50%以下であったことから、LC50 は計算できなかった。このため、7 日間及び 14 日間の LC50 はともに最高濃度区である 100mg/L 以上とした。 [Table 3, Figure 1(p.17)]

5.5 毒性症状

摂餌量低下が 55.6 及び 100 mg/L (設定値) の濃度区で見られた。また、異常遊泳が 100 mg/L (設定値) の濃度区で観察された。それ以下の濃度区及び対照区では試験期間中に異常な症状は観察されなかった。 [Table 4(p.18)]

5.6 供試魚の体重

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オンに 14 日間暴露したヒメダカの体重は、いずれの濃度区においても、対照区と有意な差は認められなかった。

(統計的手法 : Dunnet の多重比較, 有意水準 5%, Yukms 統計ライブラリ-I 統計解析編)

[Table 5(p.19)]

5.7 最大無作用濃度

死亡が観察されない濃度区のうち最も高い濃度は 30.9 mg/L (設定値)、毒性症状が観察されない濃度区のうち最も高い濃度は 30.9 mg/L (設定値) であった。また、魚体重に対照区と比較して有意な差が認められる濃度区はなかった。従って、これらの濃度区で最も低い濃度である 30.9 mg/L (設定値) が最大無作用濃度 (NOEC) と判断した。

5.8 試験水の pH、溶存酸素濃度および水温

14 日間の試験期間中の pH は 6.5 ~ 6.9 であった。試験期間中の溶存酸素濃度は 7.31 ~ 8.55 mg/L であり、すべての濃度区において飽和溶存酸素濃度の 60% 以上であった (24.0℃の飽和溶存酸素濃度 : 8.25mg/L)。試験期間中の水温は 23.6 ~ 24.3 °C であり、すべての濃度区において 24±2 °C の範囲内にあった。

[Table 6(p.20)]

[Table 7(p.21)]

[Table 8(p.22)]

以 上

Table 1. Measured Concentrations of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one During a 14-Day Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) under Flow-Through Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of Nominal)			
	0 day	7 day	14 day	Mean
Control	<0.05	<0.05	<0.05	----
5.3	5.06 (95.4)	4.52 (85.2)	4.38 (82.6)	4.65 (87.7)
9.5	8.96 (94.3)	8.953 (94.2)	8.95 (94.2)	8.95 (94.2)
17.1	13.91 (81.3)	16.02 (93.7)	16.06 (93.9)	15.33 (89.6)
30.9	25.08 (81.2)	26.84 (86.9)	26.95 (87.2)	26.29 (85.1)
55.6	52.04 (93.6)	48.56 (87.3)	47.57 (85.6)	49.39 (88.8)
100	93.59 (93.6)	92.32 (92.3)	91.46 (91.5)	92.46 (92.5)

Table 2. Mortality of Orange killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one under Flow-Through Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Dead (Percent Mortality)						
	1 Day	4 Day	6 Day	8 Day	11 Day	13 Day	14 Day
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
5.3	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
9.5	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
17.1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
30.9	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
55.6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
100	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	2 (20)	2 (20)

Threshold Level of Lethal Effect: 55.6 mg/L

Table 3. Calculated LC50 Values for Orange killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one Based on Nominal Concentrations under Flow-Through Test Conditions

Exposure Period (Day)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)			Statistical method
7	>100	-	~	-	-
14	>100	-	~	-	-

Figure 1. Concentration-Response Curve of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

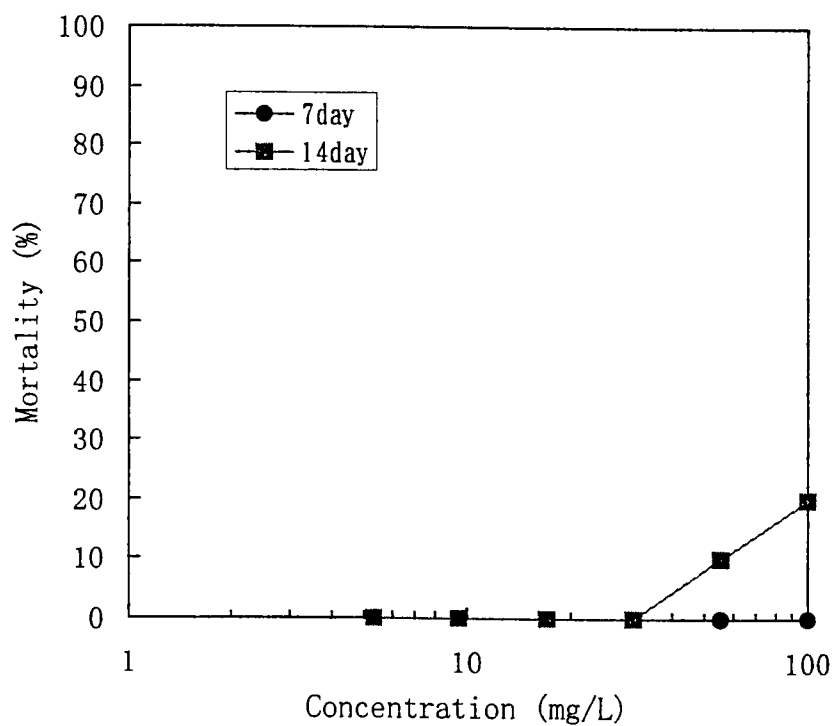


Table 4. Symptoms of Toxicity Observed in Orange killifish (*Oryzias latipes*) Exposed to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one under Flow-Through Test Conditions

Nominal Concentration(mg/L)	Symptoms						
	1 day	4 day	6 day	8 day	11 day	13 day	14 day
Control	0	0	0	0	0	0	0
5.3	0	0	0	0	0	0	0
9.5	0	0	0	0	0	0	0
17.1	0	0	0	0	0	0	0
30.9	0	0	0	0	0	0	0
55.6	A	A	A	A	A	A	A
100	A	A	A	A	A	A, C(1)	A, C(1)

Threshold Level of Observed Effect: 55.6 mg/L

- 0 : normal
- A : reduction of food intake
- B : abnormal respiration
- C : abnormal swimming behaviour
- D : loss of equilibrium or swimming ability
- E : other symptoms
- (n) : numbers of fish

Table 5. Fish Weight

Nominal Concentration(mg/L)	Fish Weight (g)										Mean
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 10	
Control	0.1166	0.1096	0.0975	0.1690	0.0908	0.1091	0.0693	0.0842	0.0895	n	0.1040
5.3	0.1513	0.0858	0.0683	0.0634	0.1256	0.0663	0.1021	0.1071	0.0605	0.0636	0.0894
9.5	0.0673	0.1421	0.1047	0.0429	0.0590	0.0654	0.1648	0.1726	0.0938	0.0948	0.1007
17.1	0.1806	0.0426	0.0731	0.0362	0.0781	0.0734	0.0982	0.0891	0.1016	0.0808	0.0854
30.9	0.0738	0.0718	0.0544	0.1412	0.0967	0.1246	0.0689	0.1255	0.1037	0.1920	0.1053
55.6	0.0871	0.1009	0.0663	0.0928	0.0909	0.0893	0.1352	0.0720	0.0560	n	0.0878
100	0.0557	0.0598	0.0667	0.0446	0.1099	0.1148	0.0556	0.0326	n	n	0.0675

n : No measurement was made because the Orange killifish was dead.

Table 6. pH Values During a 14-Day Flow-Through Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

Nominal Concentration(mg/L)	pH							
	0 day	1 day	4 day	6 day	8 day	11 day	13 day	14 day
Control	6.6	6.8	6.7	6.8	6.9	6.6	6.8	6.5
5.3	6.8	6.8	6.7	6.8	6.8	6.7	6.7	6.5
9.5	6.8	6.8	6.7	6.8	6.7	6.7	6.6	6.5
17.1	6.9	6.7	6.7	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6
30.9	6.9	6.7	6.7	6.8	6.7	6.7	6.6	6.6
55.6	6.9	6.7	6.8	6.8	6.8	6.7	6.6	6.6
100	6.9	6.7	6.8	6.8	6.8	6.7	6.6	6.7

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations During a 14-Day Flow-Through Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

Nominal Concentration(mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration							
	0 day	1 day	4 day	6 day	8 day	11 day	13 day	14 day
Control	8.55	7.55	7.58	7.36	7.50	7.49	7.90	7.48
5.3	8.47	7.57	7.57	7.46	7.45	7.39	7.69	7.45
9.5	8.48	7.55	7.49	7.31	7.39	7.32	7.55	7.35
17.1	8.50	7.63	7.53	7.32	7.40	7.41	7.63	7.41
30.9	8.48	7.49	7.46	7.41	7.47	7.36	7.46	7.38
55.6	8.45	7.59	7.48	7.33	7.52	7.51	7.58	7.54
100	8.44	7.74	7.63	7.51	7.76	7.71	7.80	7.72

Table 8. Temperature Values During a 14-Day Flow-Through Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one

Nominal Concentration(mg/L)	Temperature (°C)							
	0 day	1 day	4 day	6 day	8 day	11 day	13 day	14 day
Control	23.8	23.6	24.3	23.8	23.8	23.9	23.9	23.9
5.3	23.9	23.7	24.2	23.7	23.9	23.8	23.8	23.9
9.5	23.8	23.8	24.2	23.8	23.9	23.8	23.9	24.0
17.1	23.9	23.8	24.2	23.8	23.9	23.9	23.8	23.9
30.9	24.0	23.9	24.3	23.8	24.0	23.8	23.9	24.0
55.6	24.0	23.8	24.3	23.8	24.0	23.8	23.9	24.0
100	24.0	23.9	24.2	23.8	24.0	24.0	24.0	24.1

付属資料－ 1

希积水の水質

(全 1 頁)

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	<0.05 mg/L
COD	0.9 mg/L
pH	6.8
Coliform group bacteria	N. D.
Mercury	<0.00005 mg/L
Copper	0.001 mg/L
Cadmium	<0.005 mg/L
Zinc	0.006 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Chromium	<0.005 mg/L
Iron	<0.01 mg/L
Free chlorine	<0.05 mg/L
Fluoride	<0.02 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Evaporation residue	65.5 mg/L
Electric conductivity	84.1 μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	21.8 mg/L
Alkalinity	18.3 mg/L
Total organophosphorus compounds	<0.001 mg/L
Simazin	<0.0003 mg/L
Herbicide Thiobencarb	<0.002 mg/L
Fungicide Thiuram	<0.0006 mg/L

付属資料－ 2

試験液の分析方法

(全 7 頁)

試験液の分析方法

1. 試験液の分析方法

各試験約 1.0ml をバイアル瓶に採取する。

オートサンプラーにセットして一定量を自動注入する。

検量線から被験物質濃度を求める。

2. 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

カラム : C18 5 μ m , 4.6mm ϕ \times 150mm

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

注入量 : 20 μ L

移動相 : A ; 水 / アセトニトリル / 酢酸 = 84.5 / 15 / 0.5

B ; 水 / アセトニトリル / 酢酸 = 9.5 / 90 / 0.5

A / B = 50 / 50

流 速 : 1.0mL / min

検出波長 : 235nm

3. 検量線

0.1mg/L から 100mg/L までの 5 種類の標準液を分析し、その面積値から直線性を確認した。

[Figure 1(p.6)]

測定日毎に 3 種類 (1, 50, 100mg/L) の標準溶液の測定を行い、その面積値を用いて検量線を作成した。

4. 添加回収試験

希釈水に標準液の一定量を添加して、回収率を求めた。

3,5,5-トリメチル-2-シクロヘキセン-1-オン 10.0 mg/L の回収率は 97.3 %、25.0 mg/L の回収率は 96.0 %であった。

Figure 1 Calibration Curve of 3,5,5-Trimethyl-2-cyclohexen-1-one by HPLC Analysis

Input Data

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU·sec)
1	0.1	14.29652
2	1.0	98.60014
3	10.0	923.32434
4	50.0	4583.47314
5	100	9201.84570

$$Y (\text{Peak Area}) = 2.03757 + 91.92622 X (\text{Concentration})$$

$$r^2 = 1.00000$$

r^2 : coefficient of correlation

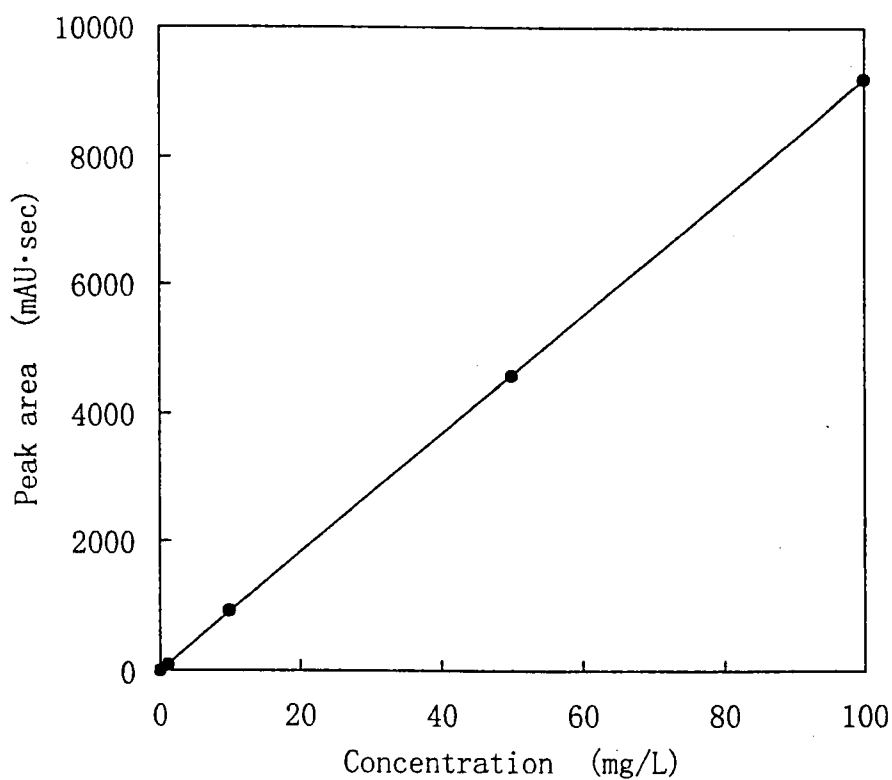
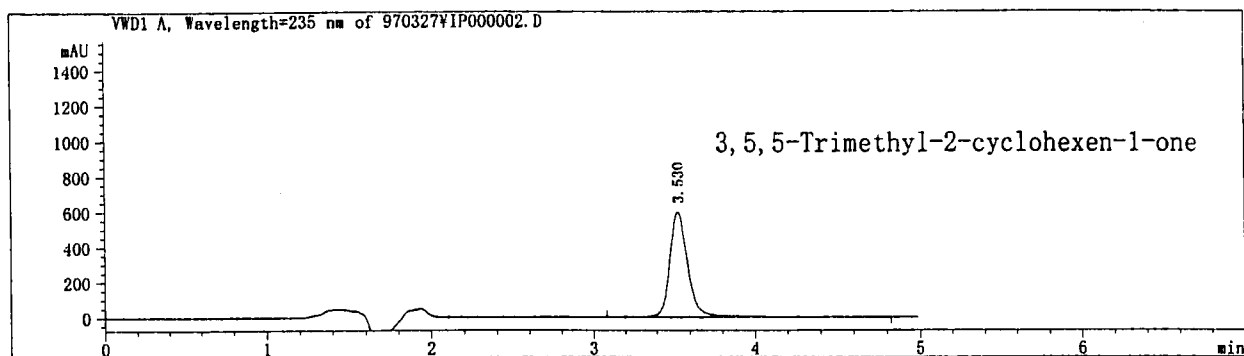


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 50 mg/L ; 0 day



(2) Standard 50 mg/L ; 7 day

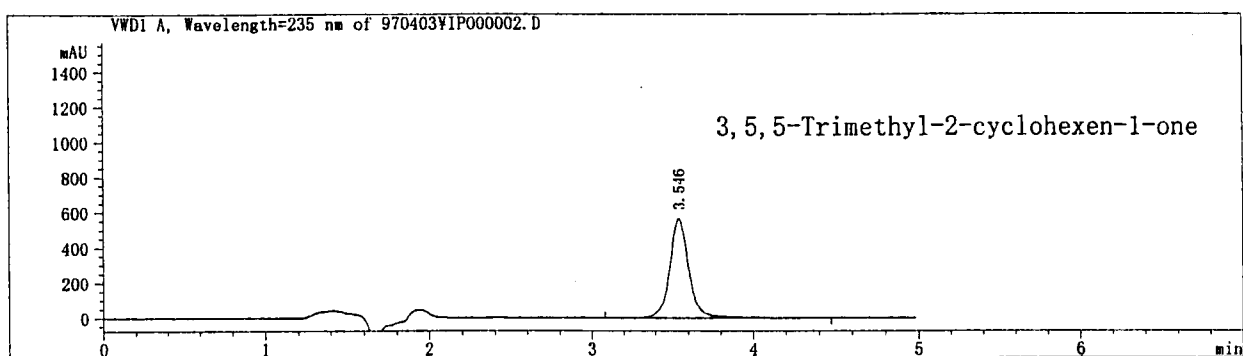
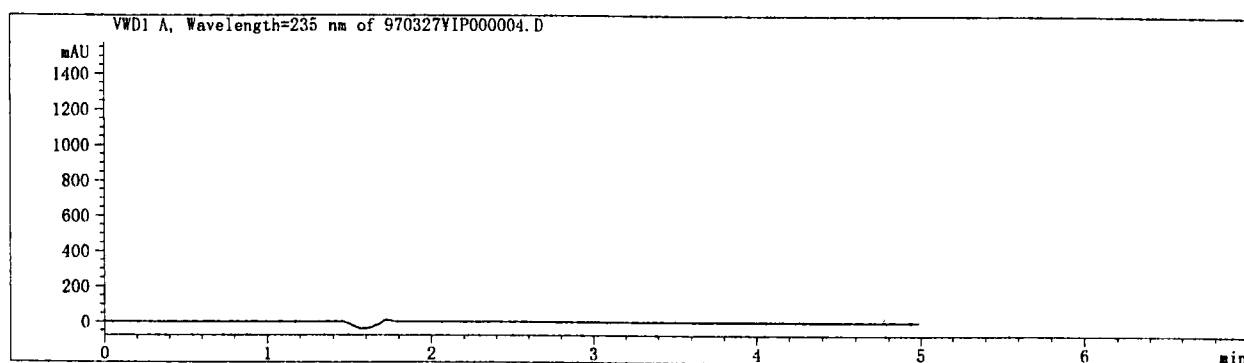


Figure 2 Continued

(3) Control ; 0 day



(4) Control; 7 day

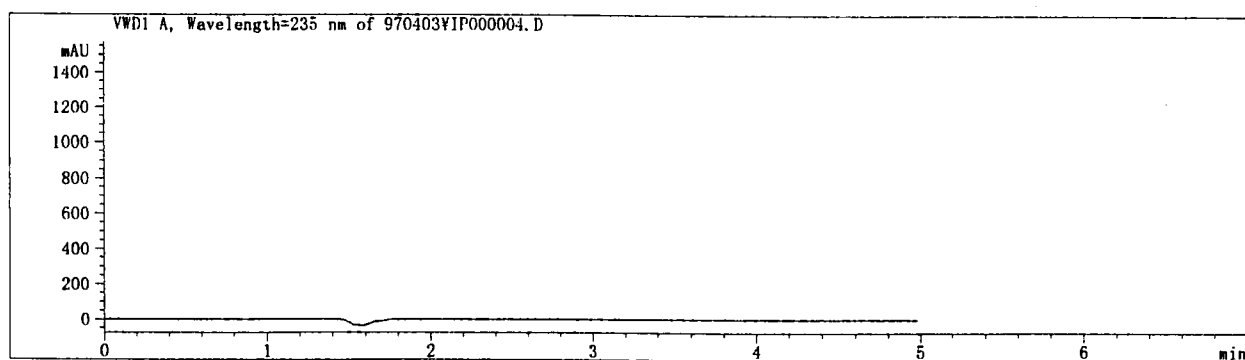
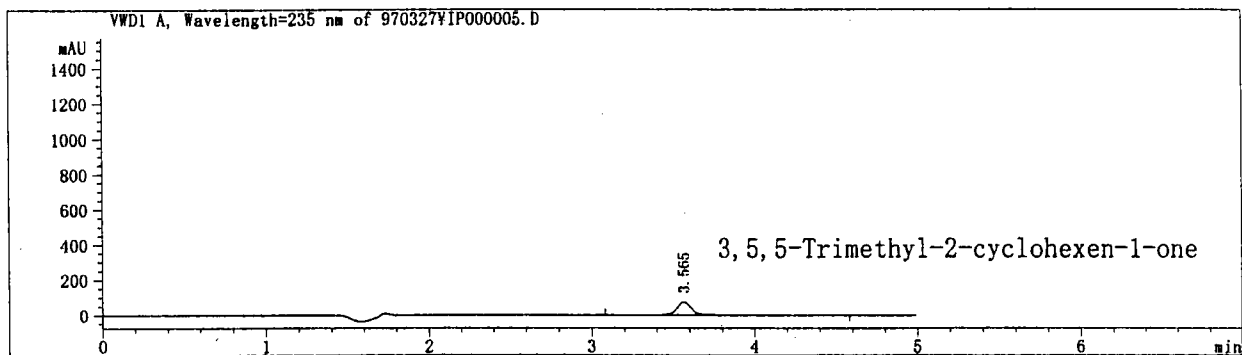


Figure 2 Continued

(5) 5.3 mg/L nominal; 0 day



(6) 5.3 mg/L nominal; 7 day

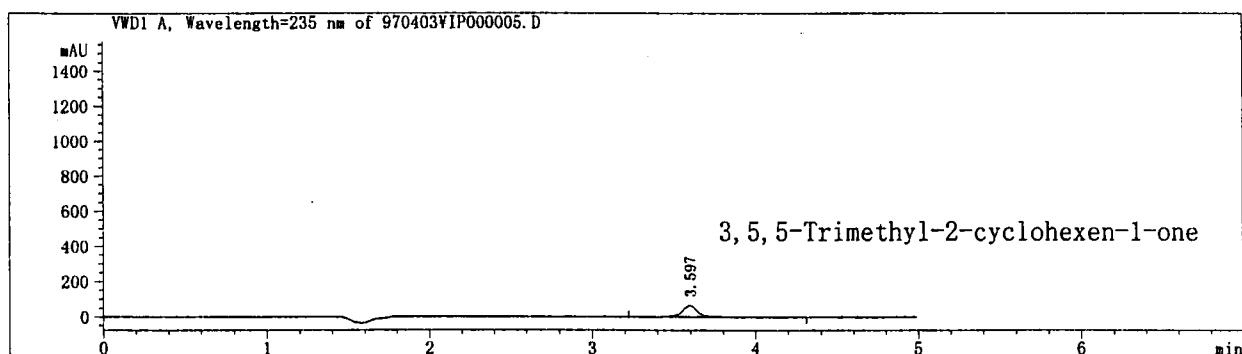
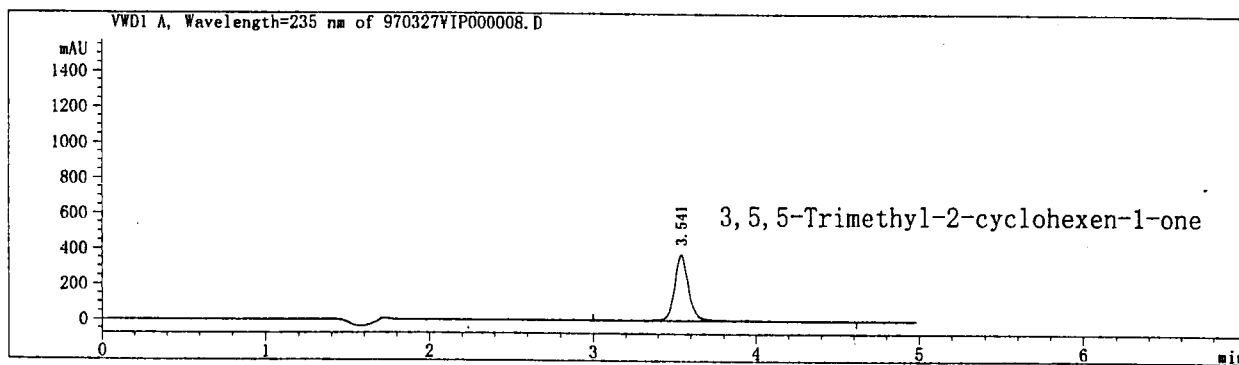


Figure 2 Continued

(7) 30.9 mg/L nominal; 0 day



(8) 30.9 mg/L nominal; 7 day

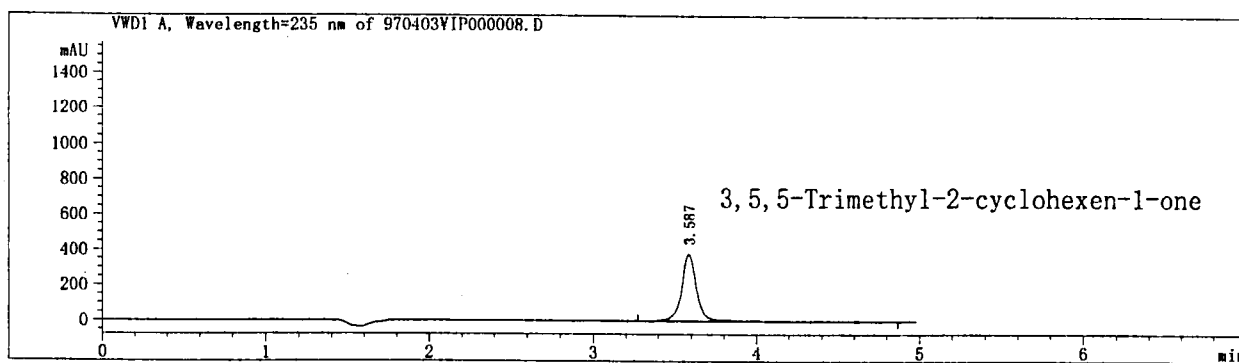
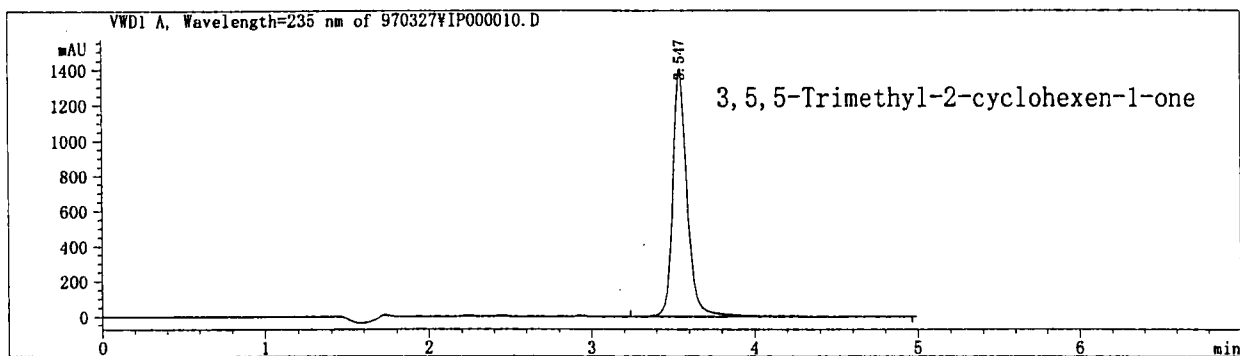


Figure 2 Continued

(9) 100 mg/L nominal; 0 day



(10) 100 mg/L nominal; 7 day

