

環境庁殿

試 験 報 告 書

N-ニトロソジフェニルアミンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－14日間

(試験番号：6B734G)

1997年 3月31日作成

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： 環境庁

表題： N-ニトロソジフェニルアミンの
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－14日間

試験番号： 6B734G

本試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

1997年 3月31日

運営管理者



信頼性保証証明

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： 環境庁

表題： N-ニトロソジフェニルアミンの
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－14日間

試験番号： 6B734G

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	1997年 2月12日	1997年 2月12日
	1997年 2月26日	1997年 2月26日
試験報告書監査	1997年 3月31日	1997年 3月31日

1997年 3月31日

信頼性保証担当者：

[Redacted Signature]

[Redacted Signature]

[Redacted Signature]

試験実施概要

1. 表題： N-ニトロソジフェニルアミンの
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－14日間
2. 試験目的： N-ニトロソジフェニルアミンについて、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 東京都千代田区霞ヶ関一丁目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 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所
所在地： 〒105 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
所在地： 〒227 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

8. 試験関係者：

試験責任者

(1997年 3月31日)

試験担当者

(1997年 3月31日)

(1997年 3月31日)

分析担当者

(1997年 3月31日)

9. 試験期間： 試験開始日 1997年 1月16日
試験終了日 1997年 3月31日
暴露期間 1997年 2月12日～1997年 2月26日

10. 保管：

試験に関する下記の記録及び試資料は、試験報告書作成後10年間、当研究所試資料保管施設に保管する。その後の保管については別途協議の上定める。

- 1) 試験計画書，同変更の記録
- 2) 試験報告書
- 3) 生データ
- 4) 信頼性保証業務担当者の監査・査察記録
- 5) 被験物質
- 6) その他必要なもの

目 次

	頁
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 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 -----	11
3 試験方法 -----	11
3.1 試験条件 -----	11
3.2 希釈水 -----	12
3.3 試験装置，試験容器および恒温槽等 -----	12
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 最小致死濃度，最小作用濃度および最大無作用濃度 -----	14
4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出 -----	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 毒性症状および摂餌状況 -----	15
5.4 供試魚の体重および体長 -----	15
5.5 最小致死濃度，最小作用濃度および最大無作用濃度 -----	15
5.6 半数致死濃度 (LC50) -----	16
5.7 試験液の水温，溶存酸素濃度および pH -----	16
Table 1～9 -----	17～25
Figure 1 -----	26
付属資料－1 希釈水の水質 -----	27～28
付属資料－2 試験液の分析方法 -----	29～38

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

N-ニトロソジフェニルアミンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－14日間

試験番号

6 B 7 3 4 G

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： N-ニトロソジフェニルアミン
- 2)暴露方式： 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)暴露期間： 14日間
- 5)試験濃度（設定値）：対照区，助剤対照区，0.400，1.20，3.30および8.90mg/L
(公比：2.8) 助剤；ジメチルホルムアミドおよびHCO-30使用，濃度一定，98mg/L
- 6)試験液量： 32L/日 (22.55mL/min, 5.0L容ガラスビーカー使用)
- 7)連数： 1 容器/濃度区
- 8)供試生物数：10尾/濃度区
- 9)照明： 16時間明/8時間暗
- 10)試験温度： 24±2℃
- 11)試験液の分析：HPLC法

結 果

- 1)試験液中の被験物質濃度：測定濃度の設定濃度に対する割合はすべての濃度区において
±20%以内であった。したがって，結果の算出は設定濃度に基づいて行った。
- 2)14日間の最小致死濃度：3.30mg/L
- 3)14日間の最小作用濃度：1.20mg/L

- 4) 14日間の最大無作用濃度 (NOEC) : 0.400mg/L
- 5) 7日間の半数致死濃度 (LC50) : 8.90mg/L (95%信頼区間: 3.30mg/L~>8.90mg/L)
- 6) 14日間の半数致死濃度 (LC50) : 4.88mg/L (95%信頼区間: 3.30mg/L~8.90mg/L)

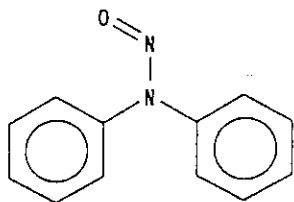
1 被験物質

1.1 名称，構造式および物理化学的性状

名 称： N-ニトロソジフェニルアミン

(略称 NDPA，識別符号 6B734G)

構造式：



分子式： $C_{12}H_{10}N_2O$

分子量^{*1}： 198.22

融点^{*2}： 66.5°C

水溶解度^{*3}： 不溶

1-オクタノール／水分配係数 (logP)： 2.38^{*2}， 3.13^{*3}

光分解性^{*3}： 低濃度で光分解性有り

*1:供給者提供資料

*2:化学物質分析法開発調査報告書総覧（上巻），環境庁環境保健部保健調査室編（平成3年）

*3: [REDACTED]
[REDACTED]

1.2 供試試料

純度^{*1}： >98%（当社測定値）

ロット番号^{*1}： CAG0075

供給者： [REDACTED]

供給量^{*1}： 100g (25gx4)

入手日： 1996年12月25日

外観^{*1}： 暗黄褐色結晶～結晶性粉末

*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

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始前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安定であったと判断された。

2 供試生物

- 1) 一般名： ヒメダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 被鱗体長： 1.75 cm (1.50~2.10cm), n=10
- 4) 体重： 0.089 g (0.049~0.138g), n=10
- 5) 供給源： 三京水産株式会社（東京都新宿区市谷田町一丁目1番地）
- 6) 入手日： 1996年11月 1日
- 7) 馴化期間： 1996年11月 1日~1997年 2月12日
- 8) 基準物質*の96時間半数致死濃度(LC50)：0.44mg/Lおよび0.80mg/L

*：硫酸銅（II）五水和物，試薬特級 和光純薬工業株式会社

馴化

試験条件と同条件（水質，温度等）で飼育馴化した。餌は市販のテトラミン®を与えた。暴露開始の24時間前からは給餌は行わなかった。試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。暴露開始前7日間の死亡率は5%以下であった。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 流水式（定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用，被験物質の水中からの揮発を防止するため水面をテフロンシートで覆った）
- 2) 暴露期間： 14日間
- 3) 試験液量： 約32L/日 (22.55mL/min)
- 4) 連数： 1容器/濃度区
- 5) 供試生物数： 10尾/濃度区
- 6) エアレーション： なし
- 7) 試験温度： 24±2℃
- 8) 照明： 16時間明/8時間暗
- 9) 給餌： 市販のテトラミン®を毎日魚体重の 2%与えた

3.2 希釈水

脱塩素水（横浜市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去した後、充分通気したもの）を使用した。希釈水の硬度は61mg/L (CaCO₃換算), pHは7.8であった。
[付属資料-1]

3.3 試験装置および機器等

流水式試験装置：試験水槽（5.0L容ガラスビーカー，180 mmφ × 270 mm）に約12 cmの排水用のガラスサイホンを取り付け24℃の恒温水槽に設置した。これに下記に示した定量ポンプにより希釈水を22.5 mL/min，ストック溶液を0.05 mL/minの流速で供給した。合計流量は22.55 mL/minとなり試験水槽の換水率は約6回/日となった。

1) 希釈水ポンプ

モーター（駆動部）：Cole-Parmer製 MASTERFLEX® 7543-30

ポンプヘッド：Cole-Parmer Inst. Co. MASTERFLEX® 7016-20

チューブ：Cole-Parmer Inst. Co. MASTERFLEX® PharMed 6485-16

2) ストック溶液ポンプ

日本精密科学製 ミニミカポンプ SP-D-2501(S)

3) 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）

4) 水温計：横河電機製 2455 02

5) 溶存酸素計：電気化学計器 DOL-10

6) pH計：東亜電波製 HM-40V

3.4 試験濃度の設定

急性毒性試験の結果をもとに濃度範囲を決定した。試験の最高濃度は96時間-LC50付近の濃度とした。96時間-LC50は10.2 mg/Lであったので，0.400，1.20，3.30および8.90mg/L（公比：2.8）の4濃度区を設定した。

3.5 試験液の調製

被験物質4000mgにジメチルホルムアミドを4.0g添加し溶解した。この溶液に分散助剤（HC0-30）を40.0g添加し良く混合した後，純水で1000mLに定容し被験物質原液とした（被験物質濃度：4000 mg/L）。ジメチルホルムアミド 12.0gと分散助剤（HC0-30）120.0gを添加し良く混合した後，純水で3000mLに定容し助剤原液とした。被験物質原液と助剤原液の下記に示した量を採取，混合しストック溶液とした。助剤対照区には助剤原液を1000mLを使用した。

試験濃度 mg/L	被験物質原液 添加量, mL	助剤原液 添加量, mL	ストック溶液濃度 mg/L
対照区	0	0	0
助剤対照区	0	1000	0
0.400	32	669	180
1.20	93	607	530
3.30	263	438	1500
8.90	700	0	4000

3.6 試験液の分析

開始時（0日）、7日および14日に各試験水槽より試験液0.75mLを採取し、これに7μLにトリルを0.75mL添加後よく混合したものを分析試料としHPLCにより分析した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2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尾の重量および被鱗体長を測定し、被鱗体長で $2.0 \pm 0.5\text{cm}$ であることを確認した。

各試験水槽の試験液の水温、溶存酸素濃度、pH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回各試験水槽の試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定した。

暴露期間中、餌は一日当たり個体重量の約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が、摂餌量の低下により減らすことはしなかった。

暴露開始後、週3回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。一般的に記載する症例と定義を下記に示した*。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。死亡個体および暴露終了時の生存魚の体重およ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。

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，最小作用濃度および最大無作用濃度

死亡個体が観察された試験区の最も低い濃度を最小致死濃度とした。

試験魚に致死以外の作用が観察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統計的な有意差で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。

4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出

7日および14日における半数致死濃度 (LC50) を Binomial法により算出した。また，それらの95%信頼限界も算出した。

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

試験開始時、7日後および14日後に試験液中の被験物質濃度を測定した。試験開始時の濃度は0.382～8.70mg/L（設定値0.400～8.90mg/L）であり、試験期間中の平均値は0.398～9.02mg/Lであった。測定濃度の設定濃度に対する割合はすべての濃度区において±20%以内であった。したがって、結果の算出は設定濃度に基づいて行った。

[Table 1(p.17), 付属資料－2]

5.3 毒性症状および摂餌状況

毒性症状として1.20mg/L以上の濃度区で異常遊泳および遊泳不能が観察された。対照区および助剤対照区では異常な症状は観察されなかった。

なお、1.20mg/L以上の濃度区で摂餌低下が認められた。

[Table 4(p.20)]

5.4 供試魚の体重および体長

体重および体長はすべての濃度区で対照区と比較して有意な差は認められなかった。

($\alpha=0.05$, 統計的方法: Dunnettの多重比較, 両側検定)

[Table 5～6(p.21～22)]

5.5 最小致死濃度, 最小作用濃度および最大無作用濃度

最小致死濃度は3.30mg/Lであった。

最小作用濃度は1.20mg/Lであった。

最大無作用濃度(NOEC)は0.400mg/Lであった。

[Table 2～6(p.18～22)]

5.6 半数致死濃度 (LC50)

7日および14日の半数致死濃度 (LC50) はそれぞれ8.90mg/Lおよび4.88mg/Lであった。

なお、対照区および助剤対照区の死亡率は0%であった。

[Table 2~3(p.18~19), Figure 1(p.26)]

5.7 試験液の水温，溶存酸素濃度およびpH

試験期間中の水温はすべての濃度区で $24 \pm 2^\circ\text{C}$ であった。溶存酸素濃度は5.4~8.1 mg/Lであり，すべての濃度区で飽和溶存酸素濃度の60%以上であった。pHは6.8~7.8であった。

(24.0°C の飽和溶存酸素濃度：8.25mg/L)

[Table 7~9(p.23~25)]

以 上

Table 1. Measured Concentrations of the Test Substance During a 14-Day Exposure

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)			Mean Measured Concentration mg/L
	0 Day	7 Day	14 Day	
Control	<0.007	<0.007	<0.007	----
Solvent Control	<0.007	<0.007	<0.007	----
0.400	0.382 (96)	0.377 (94)	0.436 (109)	0.398 (100)
1.20	1.04 (87)	1.12 (93)	1.28 (107)	1.15 (96)
3.30	2.95 (89)	3.60 (109)	3.37 (102)	3.31 (100)
8.90	8.70 (98)	9.33 (105)	-- --	9.02 (102)

--: No measurement was made because all Orange killifish were dead at this observation time.

Table 2. Mortality of Orange killifish (Oryzias latipes) Exposed to the Test Substance

Nominal Concentration mg/L	Mean Measured Concentration mg/L	Cumulative Mortality (Percent Mortality)					
		2 days	5 days	7 days	9 days	12 days	14 days
Control	----	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Solvent Control	----	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.400	0.398	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1.20	1.15	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
3.30	3.31	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (10)	1 (10)
8.90	9.02	0 (0)	5 (50)	5 (50)	6 (60)	9 (90)	10 (100)

Table 3. Calculated LC50 Values

Exposure Period (Days)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
7	8.90	3.30 ~ >8.90	Binomial
14	4.88	3.30 ~ 8.90	Binomial

Table 4. Symptoms of Toxicity Observed in Orange killifish (Oryzias latipes)

Nominal Concentration mg/L	Symptoms							
	2 Days	5 Days	7 Days	9 Days	12 Days	14 Days		
Control	N	N	N	N	N	N		
Solvent Control	N	N	N	N	N	N		
0.400	N	N	N	N	N	N		
1.20	N	LA AS-1	LA AS-1	LA AS-2	AS-1	AS-1		
3.30	LA AS-10	LA AS-10	LA AS-10	LA AS-10	LA AS-9	LA AS-9		
8.90	LA AS-9	LA AS-5	LA AS-4	LA AS-1	LA AQ-1	--		
	AQ-1		AQ-1	AQ-3				

N : No toxicological symptom was observed

--: All fish were dead at this observation time

LA: loss of appetite

AS: abnormal swimming

AQ: paralization

Table 5. Fish Weight (g)

Nominal Concentration (mg/L)					
Cont.	Sol.Cont.	0.400	1.20	3.30	8.90
No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
0.096	0.093	0.085	0.116	0.061	0.111
0.090	0.111	0.054	0.076	0.094	0.074
0.113	0.104	0.107	0.081	0.072	0.077
0.070	0.078	0.110	0.119	0.062	0.050
0.131	0.086	0.104	0.067	0.096	0.071
0.055	0.102	0.100	0.091	0.082	0.078
0.053	0.082	0.079	0.098	0.062	0.051
0.045	0.055	0.067	0.064	0.085	0.120
0.099	0.056	0.104	0.085	0.091	0.081
0.097	0.090	0.066	0.094	0.084	0.087

Basic statistic

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance
1	10	0.0849	0.0089	0.0282	0.0008
2	10	0.0857	0.0060	0.0189	0.0004
3	10	0.0876	0.0064	0.0202	0.0004
4	10	0.0891	0.0059	0.0185	0.0003
5	10	0.0789	0.0043	0.0137	0.0002
6	10	0.0800	0.0071	0.0223	0.0005

S.E. Standard error

S.D. Standard deviation

Dunnett multiple comparison procedure

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	0.0862	2.5906	3.2055	1.0000
Dunnett	1 vs 3	2	0.2908	2.5906	3.2055	0.9985
Dunnett	1 vs 4	2	0.4524	2.5906	3.2055	0.9888
Dunnett	1 vs 5	2	0.6463	2.5906	3.2055	0.9498
Dunnett	1 vs 6	2	0.5278	2.5906	3.2055	0.9781

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the control.
(There was no sign this test.)

** Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.
(There was no sign this test.)

Table 6. Fish Length (cm)

Nominal Concentration (mg/L)					
Cont.	Sol.Cont.	0.400	1.20	3.30	8.90
No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
1.82	1.88	1.69	1.84	1.50	1.92
1.81	1.93	1.55	1.71	1.72	1.80
1.91	1.86	1.86	1.74	1.60	1.74
1.78	1.70	1.79	2.00	1.60	1.64
2.09	1.80	1.80	1.79	1.80	1.70
1.54	1.81	1.75	1.71	1.82	1.69
1.57	1.66	1.69	1.77	1.61	1.62
1.53	1.52	1.63	1.53	1.75	1.86
1.89	1.63	1.83	1.86	1.74	1.61
1.92	1.76	1.53	1.67	1.72	1.96

Basic statistic

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance
1	10	1.7860	0.0588	0.1859	0.0346
2	10	1.7550	0.0402	0.1270	0.0161
3	10	1.7120	0.0362	0.1146	0.0131
4	10	1.7620	0.0396	0.1253	0.0157
5	10	1.6860	0.0326	0.1030	0.0106
6	10	1.7540	0.0398	0.1257	0.0158

S.E. Standard error

S.D. Standard deviation

Dunnett multiple comparison procedure

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	0.5217	2.5906	3.2055	0.9791
Dunnett	1 vs 3	2	1.2452	2.5906	3.2055	0.6033
Dunnett	1 vs 4	2	0.4039	2.5906	3.2055	0.9932
Dunnett	1 vs 5	2	1.6828	2.5906	3.2055	0.3224
Dunnett	1 vs 6	2	0.5385	2.5906	3.2055	0.9761

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the control.
(There was no sign this test.)

** Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.
(There was no sign this test.)

Table 7. Temperature

Nominal Concentration mg/L	Temperature, °C						
	0 Day	2 Days	5 Days	7 Days	9 Days	12 Days	14 Days
Control	24.0	24.0	23.7	24.2	24.0	24.3	24.3
Solvent Control	24.0	24.0	23.7	24.1	24.0	24.3	24.3
0.400	23.9	24.0	23.6	24.0	23.8	23.9	24.0
1.20	23.9	24.0	23.6	23.9	23.8	23.9	24.0
3.30	23.9	24.0	23.6	24.0	23.8	23.9	24.0
8.90	23.9	24.0	23.6	24.0	23.8	23.9	----

--: No measurement was made because all Orange killifish were dead at this observation time.

Table 8. Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration mg/L	Dissolved Oxygen Concentration, mg-O ₂ /L						
	0 Day	2 Days	5 Days	7 Days	9 Days	12 Days	14 Days
Control	8.1	7.7	7.9	7.9	7.8	7.8	7.8
Solvent Control	8.1	7.0	6.6	7.6	7.9	7.5	7.1
0.400	8.1	7.6	6.7	7.3	6.7	7.6	6.9
1.20	8.0	7.7	6.8	7.7	7.1	6.6	7.4
3.30	8.1	7.4	6.5	7.1	6.5	6.5	7.2
8.90	8.1	7.0	6.9	7.6	6.4	5.4	----

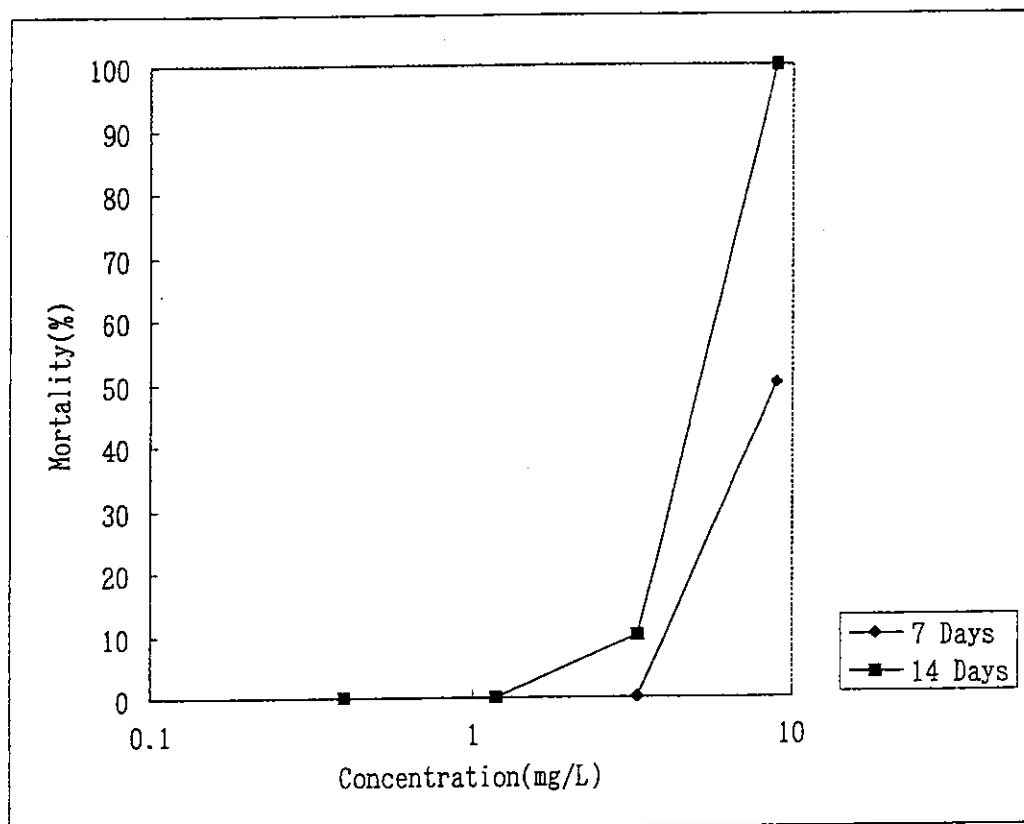
--: No measurement was made because all Orange killifish were dead at this observation time.

Table 9. pH Values

Nominal Concentration mg/L	pH						
	0 Day	2 Days	5 Days	7 Days	9 Days	12 Days	14 Days
Control	7.8	7.7	7.6	7.6	7.4	7.6	7.6
Solvent Control	7.8	7.7	7.5	7.6	7.6	6.8	7.6
0.400	7.8	7.7	7.5	7.6	7.6	7.6	7.5
1.20	7.8	7.7	7.5	7.6	7.6	7.5	7.6
3.30	7.8	7.7	7.5	7.6	7.5	7.5	7.6
8.90	7.8	7.7	7.5	7.6	7.5	7.5	----

--: No measurement was made because all Orange killifish were dead at this observation time.

Figure 1 Concentration-Response Curve



付属資料－ 1

希釈水の水質

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
COD	1 mg/L
Total phosphorus	<0.01 mg/L
pH	7.8 (22°C)
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.0001 mg/L
Copper	0.0011 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.02 mg/L
Lead	<0.01 mg/L
Aluminium	0.03 mg/L
Nickel	0.01 mg/L
Chromium	<0.005 mg/L
Manganese	<0.1 mg/L
Tin	<0.01 mg/L
Iron	0.12 mg/L
Cyanide	<0.001 mg/L
Free chlorine	<0.01 mg/L
Bromide ion	<0.1 mg/L
Fluoride	0.12 mg/L
Sulfide ion	<0.03 mg/L
Ammonium ion	0.1 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Selenium	<0.005 mg/L
Evaporation residue	150 mg/L
Electric conductivity	180 μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	61 mg/L
Alkalinity	49 mg/L
Sodium	12 mg/L
Potassium	1.9 mg/L
Calcium	18 mg/L
Magnesium	5.1 mg/L

measured date: February 4, 1997

付属資料－ 2

試験液の分析方法

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

(1) 各試験容器より試験液0.75mLをHPLC測定用バイアルに採取



(2) 各分析試料に アセトリル 0.75mLを加えよく混合



(3) HPLC測定

2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

(装置)

高速液体クロマトグラフ：日立製作所製 L-7000 型 (No. 1)

ポンプ：	L-7100 型 (2 台)
カラムオープン：	L-7300 型
オートサンプラ：	L-7200 型
検出器：	L-7400 型
データ処理装置：	D-7000 型

(条件)

カラム：	Inertsil ODS-2, 5 μ m, 4.6 x150 mm (GL Sciences Inc.)
溶離液：	Acetonitrile / Water = 70 / 30
流速：	1.0 mL/min
測定波長：	220 nm
試料注入量：	50 μ L

3 検量線

被験物質の 1000mg/L アセトリル溶液を調製し、順次、アセトリルで希釈し 0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液をそれぞれ 0.75mL 採取し、これに純水を 0.75mL 添加後よく混合した。この溶液を HPLC に注入しピーク面積を測定した。横軸に濃度を (mg/L)，縦軸にピーク面積 (count 表示) をとり、検量線を作成した。検量線はほぼ原点を通る直線となり、最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 1.000 と良好であった。

4 定量限界

最小検出ピーク面積を 500count に設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.007mg/L を定量限界とした。

5 添加回収試験

試験液の分析は、「1 試験液の分析方法」に示したように試験液とアセトリ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無かった。したがって、回収率の補正は行っていない。

Figure A-2-1 Calibration Curve of the Test Substance by HPLC Analysis

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
0	0	0
1	0.01	592
2	0.02	1280
3	0.05	3427
4	0.10	7436
5	0.20	14477
6	0.50	39466
7	1.00	81845
8	2.00	160827
9	5.00	418117
10	10.00	833704
11	20.00	1701386
12	50.00	4251140

$$Y = -3,570 + 85,100 X$$

$$r = 1.000$$

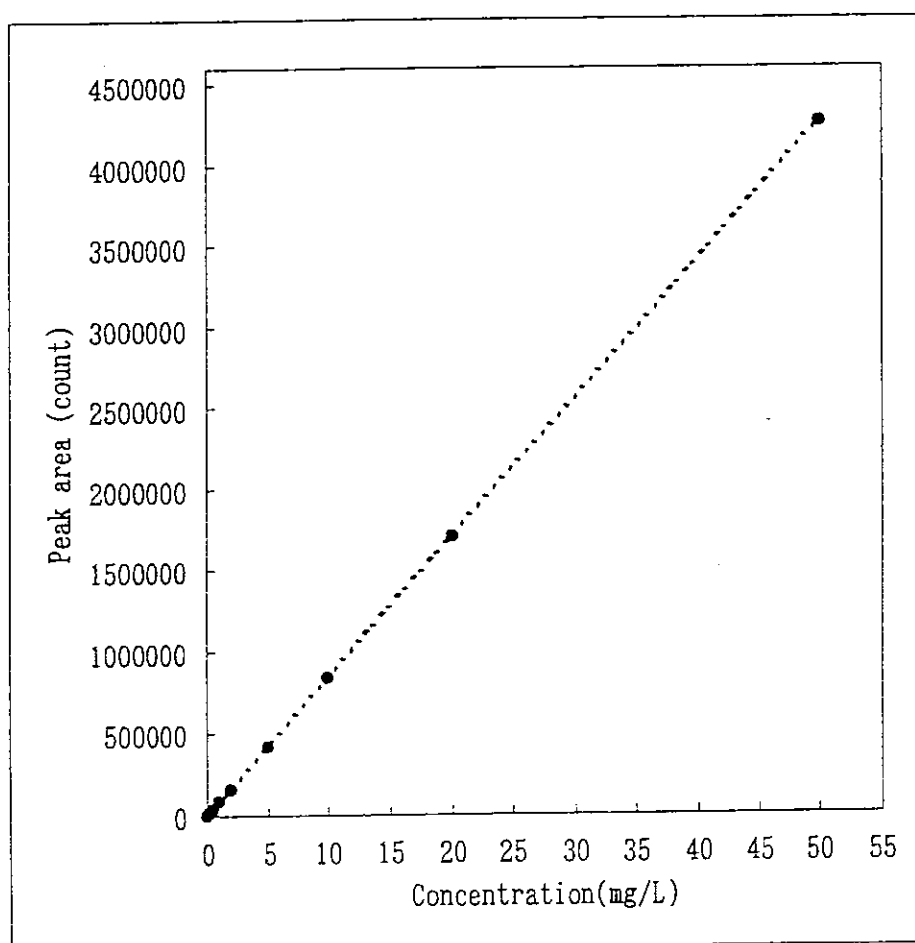
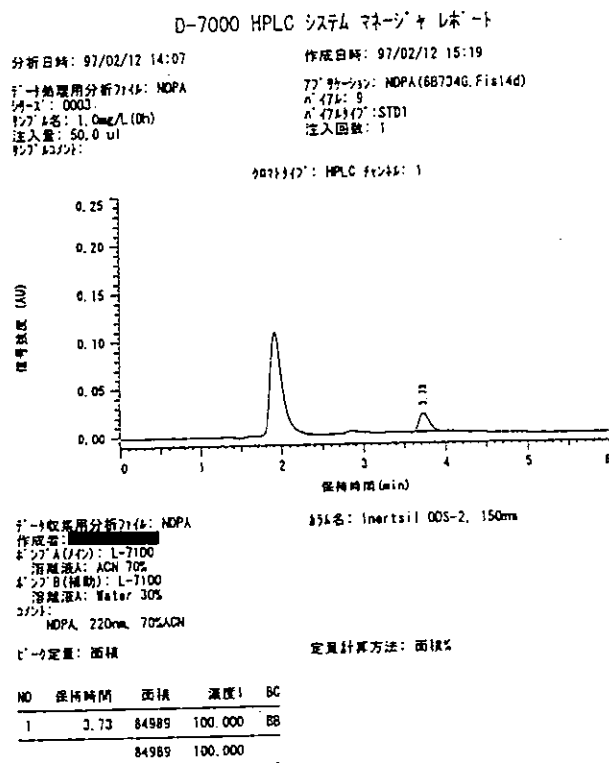


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 1.0mg/L; Day 0



(2) Control ; Day 0

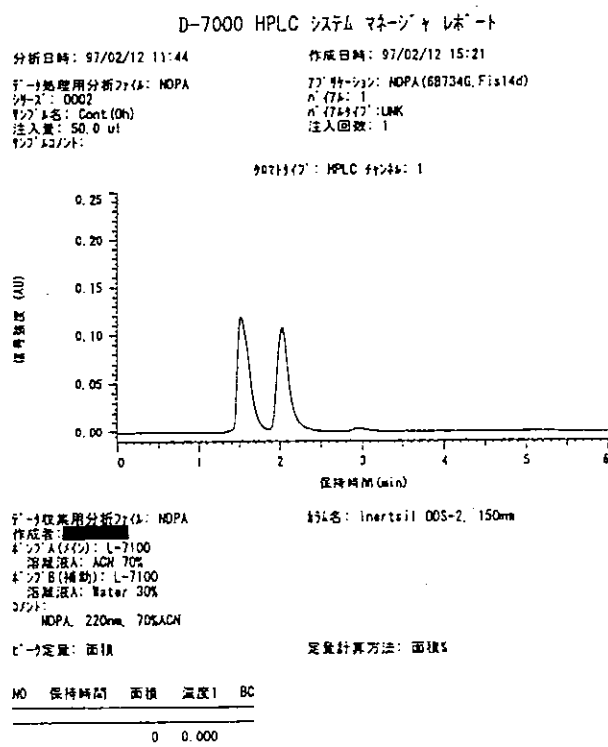
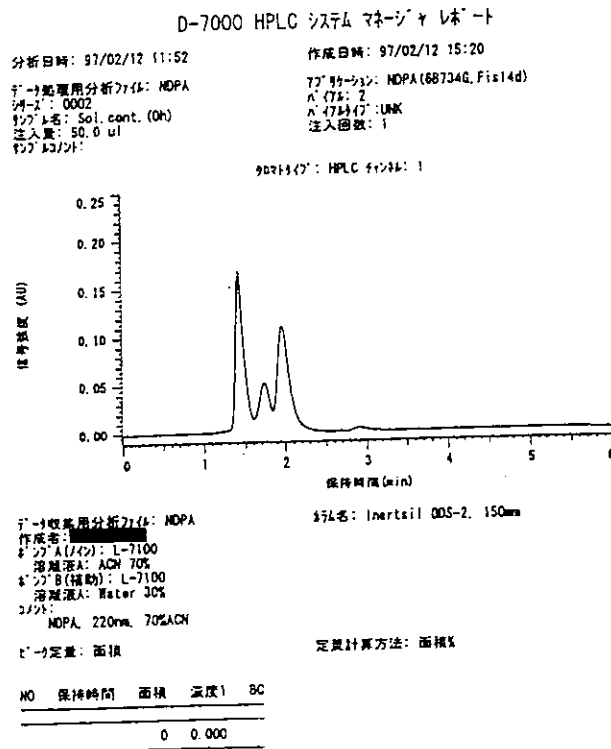


Figure A-2-2 Continued

(3) Solvent Control ; Day 0



(4) 0.400mg/L nominal; Day 0

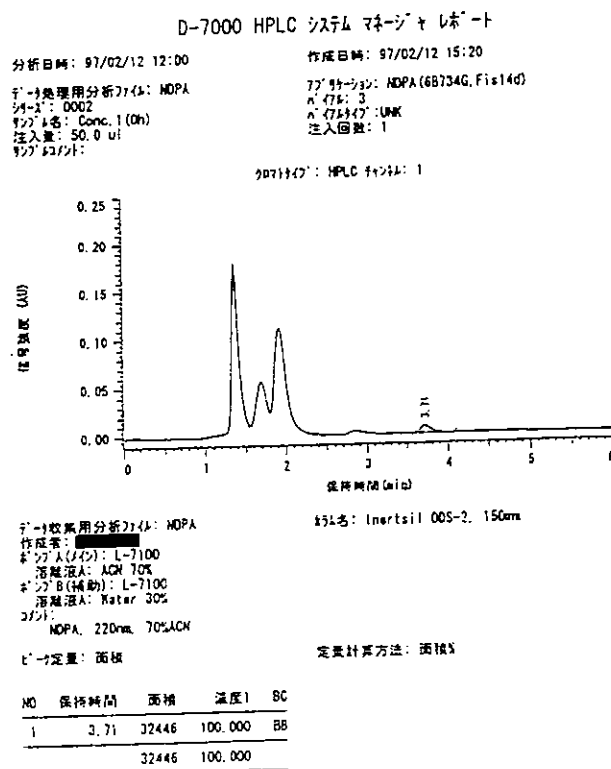


Figure A-2-2 Continued

(5) 3.30mg/L nominal; Day 0

D-7000 HPLC システム マネージメント レポート

分析日時: 97/02/12 12:23

作成日時: 97/02/12 15:19

データ処理用分析ファイル: NOPA

777 特許: NOPA(68734G, Fig14d)

サンプル名: 0002

サンプル名: 0002

サンプル名: Conc. 3 (0h)

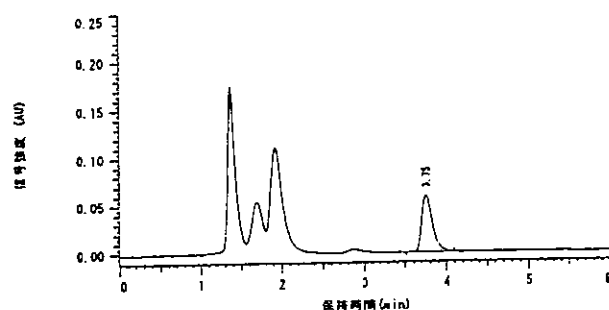
サンプル名: Conc. 3 (0h)

注入量: 50.0 ul

注入回数: 1

サンプル名: 0002

777 特許: HPLC システム



データ処理用分析ファイル: NOPA

サンプル名: Inertsil ODS-2, 150mm

作成者: [REDACTED]

サンプル名: L-7100

溶剤組成: ACN 70%

サンプル名: L-7100

溶剤組成: Water 30%

サンプル名: NOPA, 220mm, 70%ACN

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度	BC
1	3.75	252424	100.000	BB
		252424	100.000	

(6) 8.90mg/L nominal; Day 0

D-7000 HPLC システム マネージメント レポート

分析日時: 97/02/12 15:05

作成日時: 97/02/12 15:17

データ処理用分析ファイル: NOPA

777 特許: NOPA(68734G, Fig14d)

サンプル名: 0005

サンプル名: 0005

サンプル名: Conc. 4 (0h)

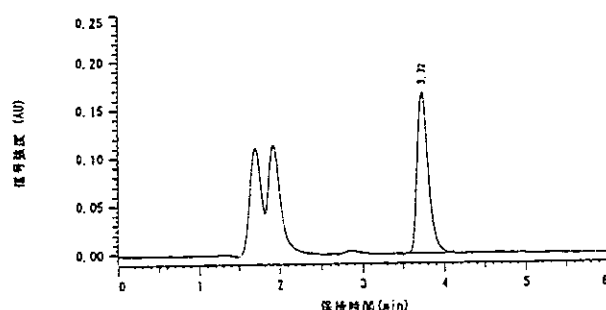
サンプル名: Conc. 4 (0h)

注入量: 50.0 ul

注入回数: 1

サンプル名: 0005

777 特許: HPLC システム



データ処理用分析ファイル: NOPA

サンプル名: Inertsil ODS-2, 150mm

作成者: [REDACTED]

サンプル名: L-7100

溶剤組成: ACN 70%

サンプル名: L-7100

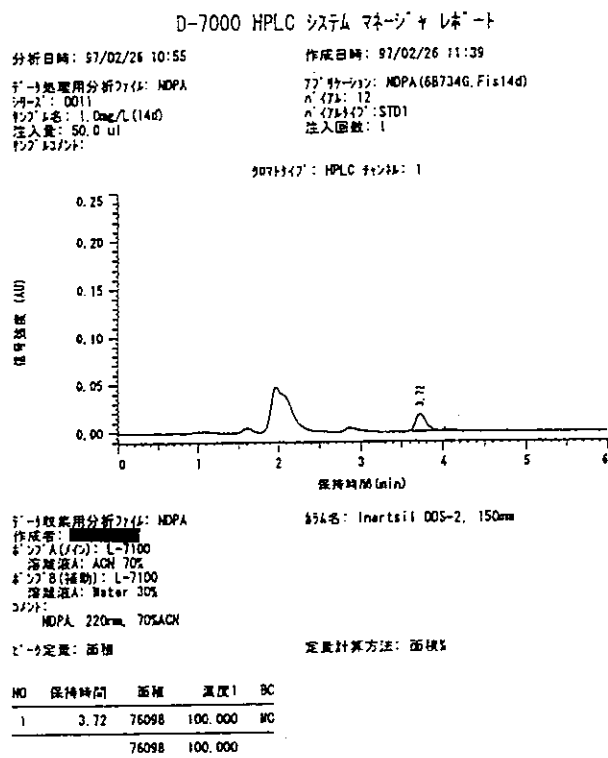
溶剤組成: Water 30%

サンプル名: NOPA, 220mm, 70%ACN

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度	BC
1	3.72	743444	100.000	BB
		743444	100.000	

(7) Standard 1.0mg/L; Day 14



(8) Control ; Day 14

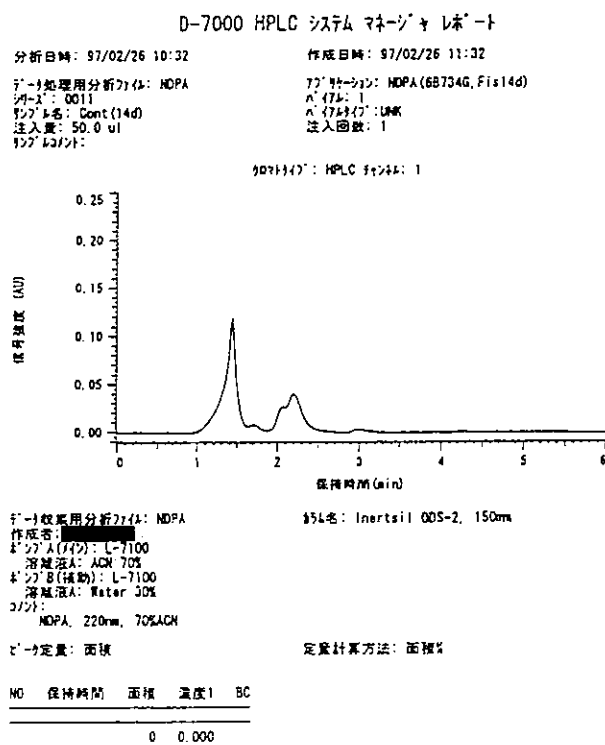
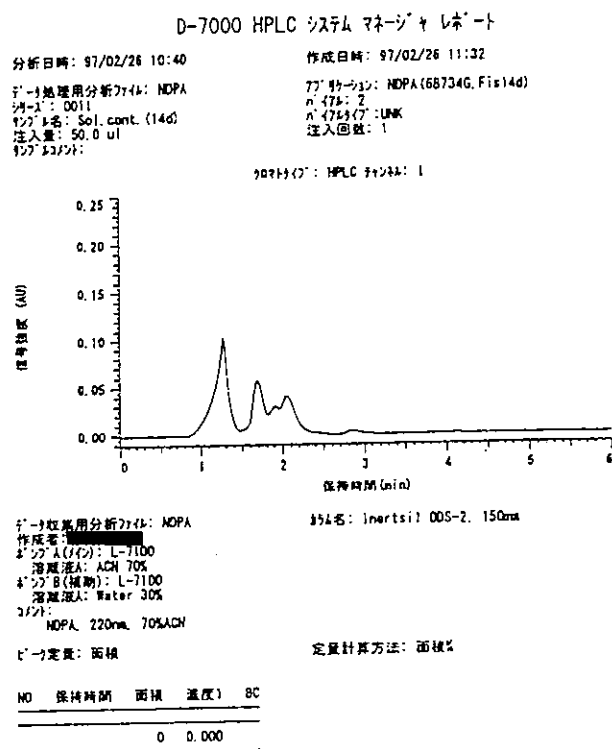


Figure A-2-2 Continued

(9) Solvent Control ; Day 14



(10) 0.400mg/L nominal; Day 14

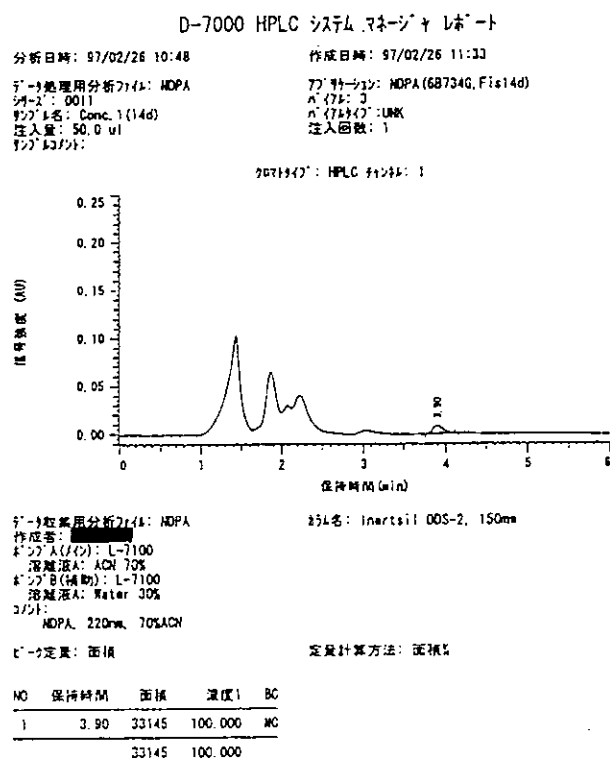


Figure A-2-2 Continued

(11) 3.30mg/L nominal; Day 14

D-7000 HPLC システム マネージメント レポート

分析日時: 97/02/26 11:30

作成日時: 97/02/26 11:40

分析対象物質: NDPA

分析条件: NDPA(68734G.Fis14d)

分析番号: 0012

分析回数: 5

分析名: Conc. 3(14d)

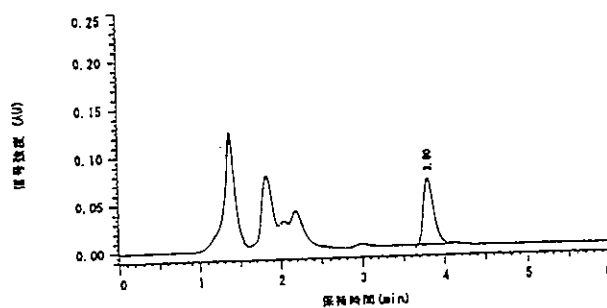
分析物質: UNK

注入量: 50.0 ul

注入回数: 1

分析装置:

分析条件: HPLC 分析条件: 1



分析装置: NDPA

分析条件: Inertsil ODS-2, 150mm

分析条件: L-7100

分析条件: ACN 70%

分析条件: L-7100

分析条件: Water 30%

分析条件: NDPA, 220nm, 70%ACN

分析条件: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保留時間	面積	濃度1	BC
1	3.80	294027	100.000	MC
		294027	100.000	