

環境庁殿

試 験 報 告 書

N-ニトロソジフェニルアミンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

(試験番号：6 B 6 9 5 G)

1997年3月31日作成

株式会社巨峯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

試験報告書修正書

試験委託者：環境省

表題：N-ニトロソジフェニルアミンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号：6B695G

修正内容

修正箇所：16, 17, 19～21 頁 Table 1, 2, 5～7 のタイトル中

修正前：～ Semi-Static ～

修正後：～ Static ～

理由

記載ミスのため

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

2002年 3月 8日 作成 試験責任者

(2002年 3月 8日 交替)

2002年 3月 8日 確認 信頼性保証業務担当者

2002年 3月 8日 承認 運営管理者

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： 環境庁

表題： N-ニトロソジフェニルアミンのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号： 6 B 6 9 5 G

本試験は環境庁のG L P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オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する
急性遊泳阻害試験

試験番号： 6 B 6 9 5 G

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 4日	1997年 2月 4日
	1997年 2月 6日	1997年 2月 6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オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験
2. 試験目的： N-ニトロソジフェニルアミンについて、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時間後の半数遊泳阻害濃度 (EC50) 及び最大無作用濃度 (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. 202 「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」 (1984年) に準拠した。
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	[REDACTED]	[REDACTED]	(1997年 3月31日)
試験担当者	[REDACTED]	[REDACTED]	(1997年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(1997年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(1997年 3月31日)
	[REDACTED]	[REDACTED]	(1997年 3月31日)
分析担当者	[REDACTED]	[REDACTED]	(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 4日～1997年 2月 6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	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	12
3.7 試験操作	13
4 結果の算出	13
5 結果および考察	14
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	14
5.2 試験液中の被験物質濃度	14
5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	14
5.4 最大無作用濃度 (NOECi) および100%阻害最低濃度	15
5.5 試験液の水温, 溶存酸素濃度およびpH	15
Table 1~7	16~21
Figure 1	22
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	25~34

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オオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試験番号

6 B 6 9 5 G

試験方法

本試験は、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）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： 止水式
- 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（設定値）： 対照区，助剤対照区， 3.00, 5.40, 9.30, 18.0 および
30.0 mg/L
(公比1.8, 助剤濃度一定：100mg/L, HCO-30およびDMSO使用)
- 6) 試験液量： 100 mL
- 7) 連数： 4 容器／濃度区
- 8) 供試生物数： 20頭／濃度区（1 連につき 5 頭で 1 濃度区20頭）
- 9) 試験温度： 20±1℃
- 10) 照明： 16時間明／8時間暗
- 11) 被験物質の分析： H P L C 法

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時および 48 時間後に測定した被験物質の全実測濃度が、設定値の±20%以内であったので、各影響濃度の算出には設定値を採用した。

2) 24 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : 13.5 mg/L (95%信頼限界 : 9.30~18.0 mg/L)
最大無作用濃度 (NOECi) : 9.30 mg/L
100%阻害最低濃度 : 30.0 mg/L

3) 48 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : 10.1 mg/L (95%信頼限界 : 8.73~11.9 mg/L)
最大無作用濃度 (NOECi) : 3.00 mg/L
100%阻害最低濃度 : 18.0 mg/L

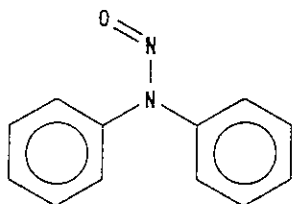
1 被験物質

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 6B695G)

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^{*2}: 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^{*2}: 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]

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は安定であったと判断された。

2 供試生物

試験には生後24時間令以内のオオミジンコ (*Daphnia magna*) の幼体を用いた。

本種は、1995年7月18日に国立環境研究所より入手したものを、当研究所において継代飼育しているものである。また、基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による48時間の半数遊泳阻害濃度（ EC_{50} ）は 0.23 mg/L であった。

供試する幼体を得るためのミジンコの飼育方法

継代中のものから幼体を抱えた肉眼的に健康かつ十分な大きさの雌成体を選別し、別に用意したビーカーに移し、翌日、産出された幼体を別のビーカーに分けた。この幼体（1997年 1月14日生まれ）を供試ミジンコの親とし、以下の条件で飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に2回以上幼体を除去した。3週目に入り暴露開始前日に、その前2週間の死亡率が10%以内で休眠卵や雄が発生しなかったバッチから、育房内に幼体を持つ雌成体を選別し、翌日（24時間以内）産出された幼体を試験に用いた（1997年 2月4日暴露開始）。

- 1) 飼育水: 希釈水 (3.2参照)
- 2) 飼育密度: 幼体時 35または70 頭/3L 飼育水
成体後 35 頭/3L 飼育水
- 3) 水温: $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4) 照明: 室内光, 16時間明/8時間暗
- 5) 餌: *Chlorella vulgaris*
- 6) 給餌量: ミジンコ 1 頭当たり 0.1~0.2 mgC (有機炭素含量) / 日

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 止水式
- 2) 暴露期間： 48 時間
- 3) 試験液量： 100 mL
- 4) 連数： 4 容器／濃度区
- 5) 供試生物数： 20 頭／濃度区（1 連に付き 5 頭で 1 濃度区 20 頭）
- 6) 試験温度： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 照明： 室内光，16 時間明／8 時間暗
- 8) 給餌： 無給餌

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 65 mg/L (CaCO_3 換算)，pH は 8.2 であった。

[付属資料－1]

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
- 2) 恒温槽： PVC 製水槽（恒温装置 TAITEC 製 COOLNIT CL-80F 型）
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型
- 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

3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち、対照区および 1, 3, 10, 30 mg/L の 4 段階の濃度区（公比 3, 各 2 連, 10 頭/1 濃度区）を設定し予備試験を行った。

その結果、暴露開始 24 時間後の遊泳阻害率は 1~10 mg/L 区で 0%, 30 mg/L 区で 80%であった。暴露開始 48 時間後の遊泳阻害率は 1 および 3 mg/L 区で 0%, 10 mg/L 区で 30%, 30 mg/L 区で 100%であった。

対照区の遊泳阻害率は、いずれも 0%であった。

したがって、本試験における濃度を 3.00, 5.40, 9.30, 18.0 および 30.0 mg/L（公比 1.8）の 5 段階とした。

3.5 試験液の調製

被験物質を 150mg 秤取し、DMSO 150 mg に溶解後、HCO-30 を 350 mg 加え混合した。これを希釈水で希釈し、1000mL に定容とし、被験物質濃度 150 mg/L の原液を調製した。同時に被験物質を含まない助剤原液 500 mg/L（DMSO 150 mg/L, HCO-30 350 mg/L）を調製した。

500mL のメスフラスコに希釈水を入れ、上記被験物質原液を各濃度に応じて添加した後、助剤濃度が一定（100 mg/L）になるように助剤原液を加え、各試験液を調製した。

助剤対照区には被験物質のみを含まないもの（助剤濃度：100 mg/L）を調製した。

対照区には、希釈水のみを用いた。

3.6 試験液の分析

全濃度区（但し、各 1 試験容器）について、暴露開始時および暴露終了時の各試験液 0.75 mL を測定用バイアルに採取し、アセトニトリルを等量添加後 HPLC により分析した。アセトニトリルで調製した標準溶液は、等量の水で希釈したものを HPLC 測定試料とした。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た。

詳細は付属資料-2 に示した。

3.7 試験操作

試験液の水温，溶存酸素濃度（D.O.），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。その後，暴露終了時（暴露開始 48 時間後）まで飼育した。

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見なした（但し，遊泳とは水中を泳げることを意味し，水底を這って動くものは阻害に含めた。水面で動くものについては，水滴を落とす等の操作でミジンコを強制的に水中に沈めると遊泳するが，再び浮上した場合には遊泳阻害に含めた。また，正常な遊泳でない場合でも 15 秒間に 1 回でも水中を遊泳した場合は，阻害に含めなかった）。

水温，D.O. および pH は，暴露開始時および暴露終了時（暴露開始 48 時間後）に，全濃度区（但し，各 1 試験容器，換水前後）の試験液について測定した。

4 結果の算出

各濃度区での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，Binomial 法または Probit法により半数遊泳阻害濃度（ EC_{50} ）を算出した。同時に，その 95%信頼限界も算出した。

また，ミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度区を最大無作用濃度（ $NOEC_i$ ）とし，全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度を100%阻害最低濃度とした。

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

該当する事象はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時の被験物質実測濃度は 3.19~28.0 mg/L (設定値 3.00~30.0 mg/L) であり、暴露終了時 (暴露開始48時間後) の濃度は2.78~24.4 mg/Lであった。また、各濃度区の被験物質実測濃度の設定値に対する割合は、暴露開始時で 93~106%、暴露終了時で 81~98%であった。

したがって、全実測濃度が設定値の±20%以内であったので、各影響濃度の算出には設定値を採用した。

[Table 1(p.16), 付属資料-2]

5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)

暴露開始 24 時間後の遊泳阻害率は、対照区、助剤対照区および 3.00~9.30 mg/L 区でいずれも 0%、18.0 mg/L 区で 95%、30.0 mg/L 区で 100%であった。

暴露開始 48 時間後の遊泳阻害率は、対照区、助剤対照区および 3.00 mg/L 区でいずれも 0%、5.40 mg/L 区で 5%、9.30 mg/L 区で 30%、18.0 および 30.0 mg/L 区で 100%であった。

また、対照区において水面に浮いたミジンコは、全く観察されなかった。

24 時間暴露の半数遊泳阻害濃度 (EiC50) は 13.5 mg/L (Binomial 法)であり、その 95%信頼限界は 9.30~18.0 mg/L であった。

48 時間暴露の半数遊泳阻害濃度 (EiC50) は 10.1 mg/L (Probit 法)であり、その 95%信頼限界は 8.73~11.9 mg/L であった。

[Table 2(p.17), Table 3(p.18), Figure 1(p.22)]

5.4 最大無作用濃度 (NOECi) および 100% 阻害最低濃度

本試験における24時間暴露の最大無作用濃度 (NOECi) は 9.30 mg/L, 48時間暴露のNOECi は 3.00 mg/Lと判断した。

また, 100%阻害最低濃度は24時間で 30 mg/L, 48時間で18.0 mg/Lであった。

[Table 4(p. 18)]

5.5 試験液の水溫, 溶存酸素濃度およびpH

暴露期間中の試験液の水溫は 19.9~20.4℃, pHは 7.7~8.1であった。

また, 試験液中の溶存酸素濃度は 6.7~8.3 mg/Lであり, 全ての試験液で飽和溶存酸素濃度の60%以上が維持された。(20℃水中の飽和溶存酸素濃度: 8.8 mg/L)

[Table 5(p. 19), Table 6(p. 20), Table 7(p. 21)]

以 上

Table 1 Measured Concentrations of the Test Substance under the Semi-Static Test Conditions during a 48-Hour *Daphnia magna* Immobilization Test

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration(mg/L)				Geometric Mean during 48 hours (mg/L)
	0 Hour new	Percent of Nominal	48 Hour old	Percent of Nominal	
Control	< 0.006	—	< 0.006	—	—
Solvent Control	< 0.006	—	< 0.006	—	—
3.00	3.19	106	2.78	93	2.98
5.40	5.70	106	4.91	91	5.29
9.30	9.63	104	8.51	92	9.05
18.0	18.7	104	17.7	98	18.2
30.0	28.0	93	24.4	81	26.1

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 48 hours exposure period

Table 1 Measured Concentrations of the Test Substance under the Static Test Conditions during a 48-Hour *Daphnia magna* Immobilization Test

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)				Geometric Mean during 48 hours (mg/L)
	0 Hour new	Percent of Nominal	48 Hour old	Percent of Nominal	
Control	< 0.006	--	< 0.006	--	--
Solvent Control	< 0.006	--	< 0.006	--	--
3.00	3.19	106	2.78	93	2.98
5.40	5.70	106	4.91	91	5.29
9.30	9.63	104	8.51	92	9.05
18.0	18.7	104	17.7	98	18.2
30.0	28.0	93	24.4	81	26.1

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 48 hours exposure period

Table 2 The Numbers of Immobile *Daphnia magna* Exposed to the Test Substance under the Semi-Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
	24 Hour	48 Hour
Control	0 (0)	0 (0)
Solvent Control	0 (0)	0 (0)
3.00	0 (0)	0 (0)
5.40	0 (0)	1 (5)
9.30	0 (0)	6 (30)
18.0	19 (95)	20 (100)
30.0	20 (100)	20 (100)

Table 2 The Numbers of Immobile *Daphnia magna* Exposed to the Test Substance under the Static Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
	24 Hour	48 Hour
Control	0 (0)	0 (0)
Solvent Control	0 (0)	0 (0)
3.00	0 (0)	0 (0)
5.40	0 (0)	1 (5)
9.30	0 (0)	6 (30)
18.0	19 (95)	20 (100)
30.0	20 (100)	20 (100)

Table 3 Calculated EiC50 Values Based on Nominal Concentrations

Exposure Period (Hour)	EiC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	13.5	9.30 ~ 18.0	Binomial
48	10.1	8.73 ~ 11.9	Probit

Table 4 Observation of No Observed Effect Concentration (NOEC) and the Lowest Concentration in 100% Immobility

Exposure Period (Hour)	No Observed Effect Concentration (NOEC) (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Immobility (mg/L)
24	9.30	30.0
48	3.00	18.0

Table 5 Temperature under a 48-Hour Semi-Static Condition

Nominal Concentration (mg/L)	Temperature, °C	
	0 Hour New	48 Hour Old
Control	19.9	20.4
Solvent Control	20.2	20.2
3.00	20.3	20.2
5.40	20.1	20.1
9.30	20.0	20.2
18.0	20.0	20.1
30.0	20.0	20.2*

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure period

* : This data was measured after 24 hours exposure period because all *Daphnia* were dead.

Table 5 Temperature under a 48-Hour Static Condition

Nominal Concentration (mg/L)	Temperature, °C	
	0 Hour New	48 Hour Old
Control	19.9	20.4
Solvent Control	20.2	20.2
3.00	20.3	20.2
5.40	20.1	20.1
9.30	20.0	20.2
18.0	20.0	20.1
30.0	20.0	20.2*

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure period

* : This data was measured after 24 hours exposure period because all *Daphnia* were dead.

Table 6 Dissolved Oxygen Concentrations under a 48-Hour Semi-Static Condition

Nominal Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L	
	0 Hour New	48 Hour Old
Control	8.2	8.0
Solvent Control	8.1	7.2
3.00	8.3	6.8
5.40	8.2	6.7
9.30	8.2	6.8
18.0	8.2	7.0
30.0	8.2	8.0*

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure period

* : This data was measured after 24 hours exposure period because all *Daphnia* were dead.

Table 6 Dissolved Oxygen Concentrations under a 48-Hour Static Condition

Nominal Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L	
	0 Hour New	48 Hour Old
Control	8.2	8.0
Solvent Control	8.1	7.2
3.00	8.3	6.8
5.40	8.2	6.7
9.30	8.2	6.8
18.0	8.2	7.0
30.0	8.2	8.0*

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure period

* : This data was measured after 24 hours exposure period because all *Daphnia* were dead.

Table 7 pH under a 48-Hour Semi-Static Condition

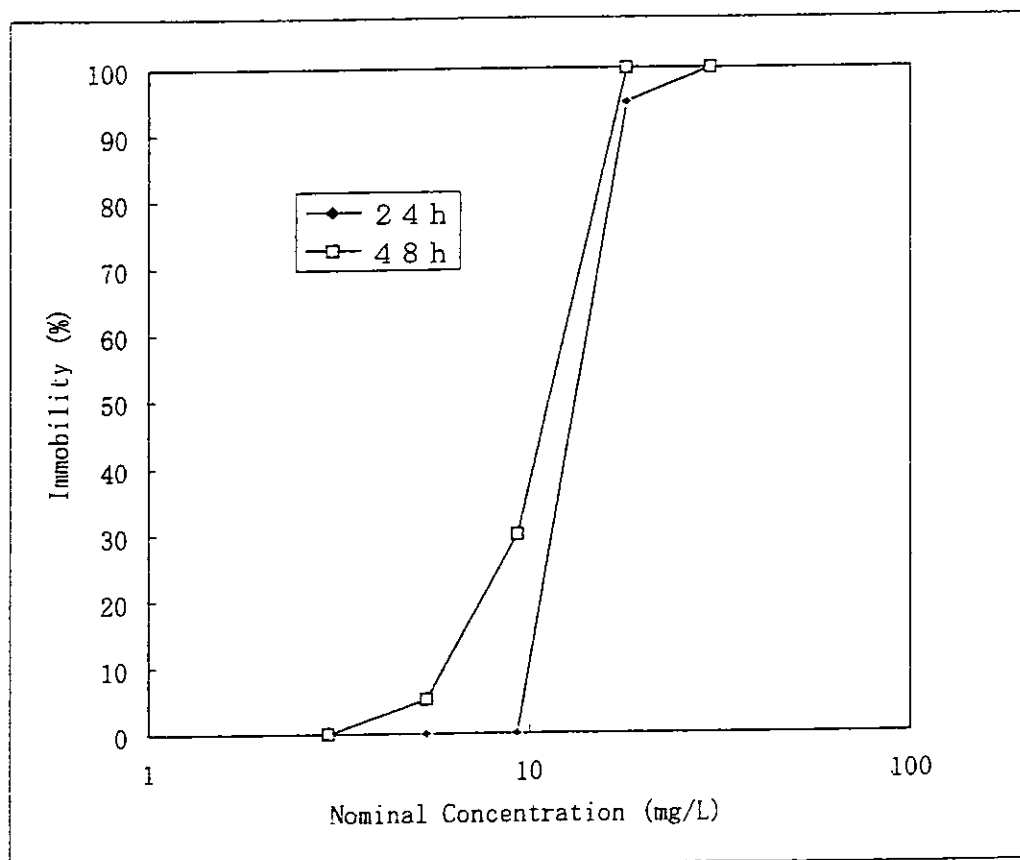
Nominal Concentration (mg/L)	pH	
	0 Hour New	48 Hour Old
Control	8.0	7.9
Solvent Control	8.1	7.8
3.00	8.1	7.7
5.40	8.1	7.7
9.30	8.1	7.7
18.0	8.1	7.7
30.0	8.1	7.9*

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure period

* : This data was measured after 24 hours exposure period because
all *Daphnia* were dead.

Figure 1 Concentration-Immobilization Curve for a 48-Hour *Daphnia magna* Immobilization Test



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	8.2 (22°C)
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.0001 mg/L
Copper	0.0007 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.01 mg/L
Lead	<0.01 mg/L
Aluminium	0.02 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	<0.10 mg/L
Fluoride	0.12 mg/L
Sulfide ion	<0.03 mg/L
Ammonium ion	<0.10 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)	65 mg/L
Alkalinity	52 mg/L
Sodium	10 mg/L
Potassium	1.6 mg/L
Calcium	18 mg/L
Magnesium	5.3 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

各試験液 0.75 mLを 測定用バイアルに採取し、アセトニトリル 0.75 mLを加え混合し、HPLCにより分析した。アセトニトリルで調製した標準溶液は、等量の水で希釈したものを HPLC測定試料とした。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た。

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)
ワークステーション：	Windows NT 及び D-7000 型 HPLC システムマネージャ
パソコン：	COMPAQ PROLINEA 590, ディスプレイ； 171FS
プリンター：	キヤノン製 LASER SHOT LBP-A404F
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 70 %, Water 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1000 mg/L アセトニトリル溶液を調製し、順次、アセトニトリルで希釈し、0, 0.01, 0.02, 0.05, 0.10, 0.20, 0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50 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水で等量希釈したものをHPLC測定試料とした。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 500 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.006 mg/Lを定量限界とした。

5 添加回収試験

HPLC直接注入法のため添加回収試験は実施しなかった。

Figure A-1-1

Calibration Curve by HPLC Analysis

Input Data		
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	10.0	833704
11	20.0	1701386
12	50.0	4251140

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

$$r = 1.000$$

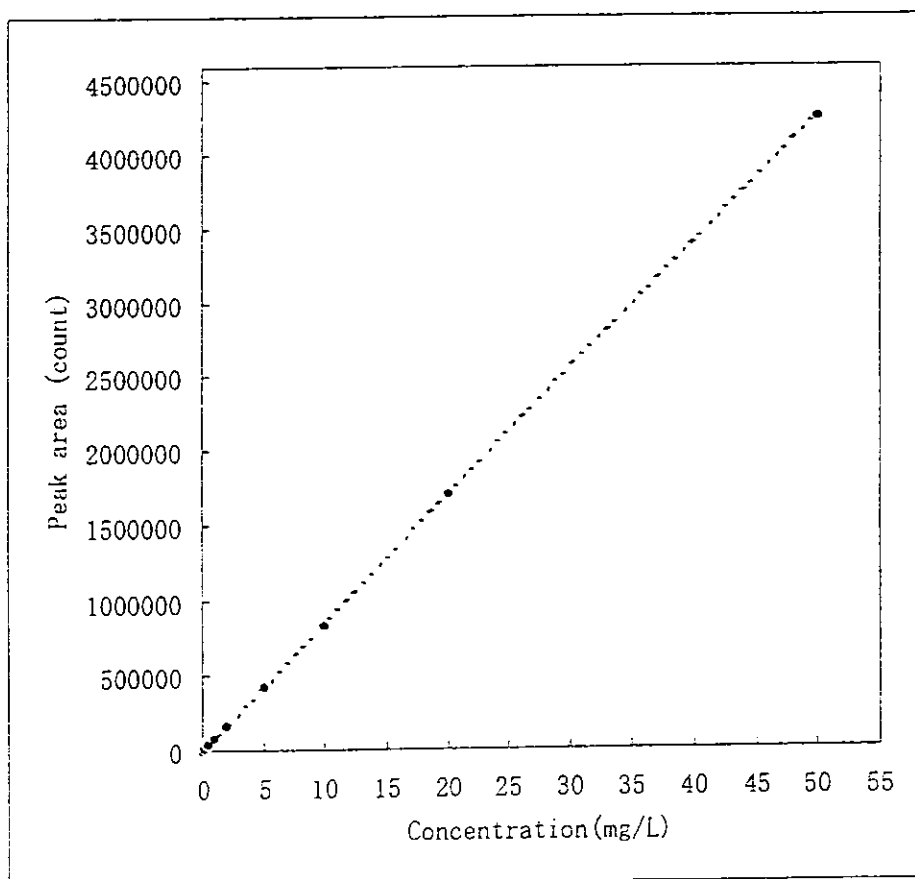
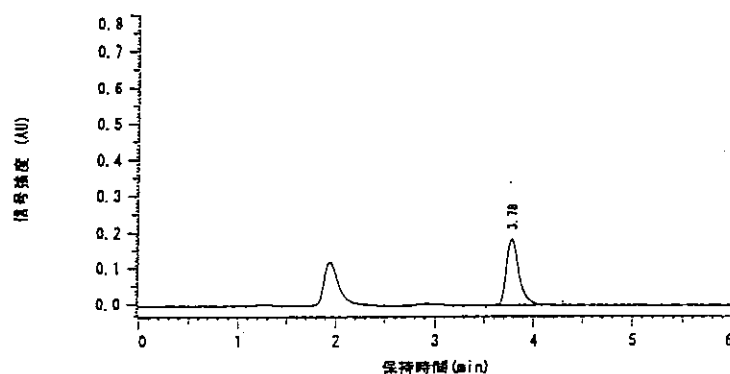


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 10.0 mg/L ; 0 hr



分析用分析ファイル: NDPA

試薬名: Inertsil ODS-2, 150mm

作成者:

ポンプA(メイン): L-7100

溶離液A: ACN 70%

ポンプB(補助): L-7100

溶離液B: Water 30%

コナト:

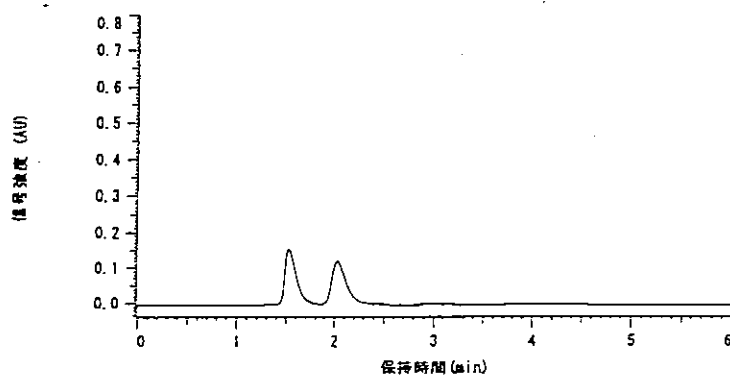
NDPA, 220nm, 70%ACN

定量方法: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.78	794560	100.000	BB
		794560	100.000	

(2) Control ; 0 hr



分析用分析ファイル: NDPA

試薬名: Inertsil ODS-2, 150mm

作成者:

ポンプA(メイン): L-7100

溶離液A: ACN 70%

ポンプB(補助): L-7100

溶離液B: Water 30%

コナト:

NDPA, 220nm, 70%ACN

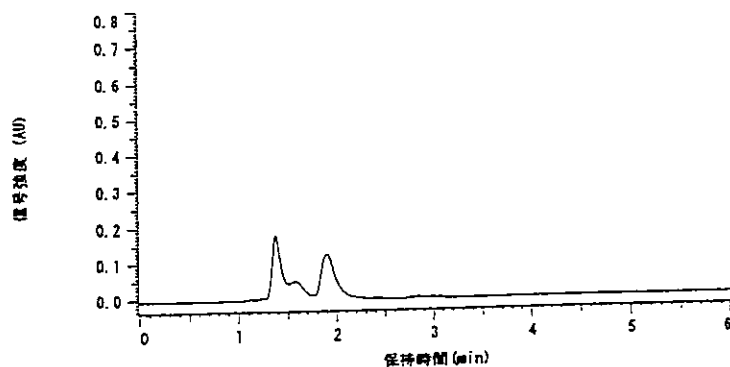
定量方法: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
	0	0.000		

Figure A-2-2 Continued

(3) Solvent Control ; 0 hr



データ収集用分析ファイル: NDPA
 作成者:
 モニタ A (メイン): L-7100
 溶離液A: ACN 70%
 モニタ B (補助): L-7100
 溶離液A: Water 30%
 コント: NDPA, 220nm, 70%ACN

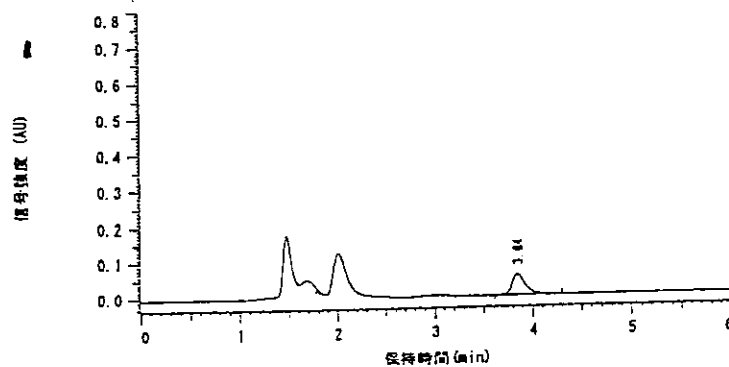
カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
	0	0.000		

(4) 3.00 mg/L nominal ; 0 hr



データ収集用分析ファイル: NDPA
 作成者:
 モニタ A (メイン): L-7100
 溶離液A: ACN 70%
 モニタ B (補助): L-7100
 溶離液A: Water 30%
 コント: NDPA, 220nm, 70%ACN

カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

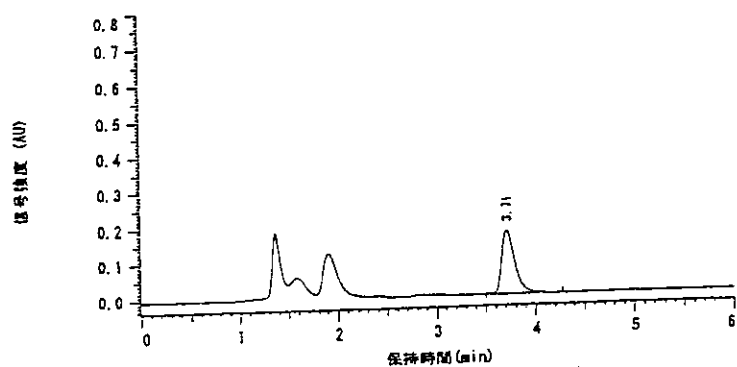
ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.84	253190	100.000	BS
		253190	100.000	

Figure A-2-2 Continued

(5) 9.30 mg/L nominal ; 0 hr



分析用分析剤: NOPA
 作成者:
 システム: L-7100
 溶離液A: ACN 70%
 システム(補助): L-7100
 溶離液A: Water 30%
 コント: NOPA, 220nm, 70%ACN

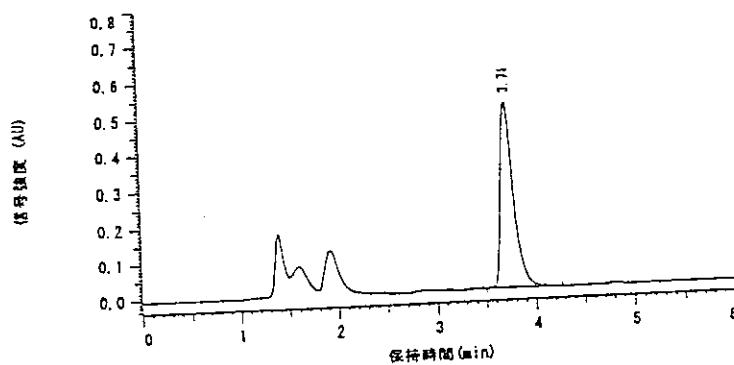
カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

定量方法: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.71	765232	100.000	BB
		765232	100.000	

(6) 30.0 mg/L nominal ; 0 hr



分析用分析剤: NOPA
 作成者:
 システム: L-7100
 溶離液A: ACN 70%
 システム(補助): L-7100
 溶離液A: Water 30%
 コント: NOPA, 220nm, 70%ACN

カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

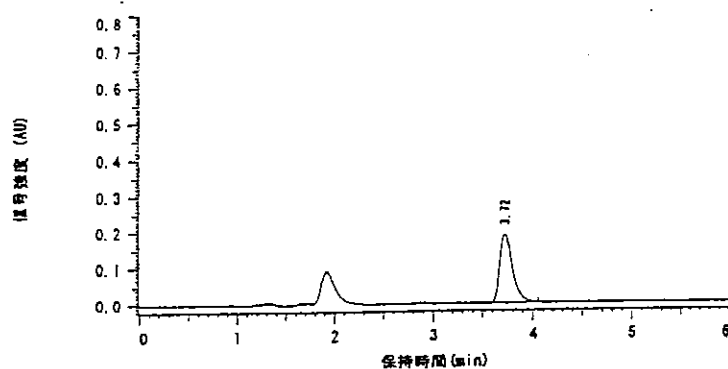
定量方法: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.71	2228508	100.000	BB
		2228508	100.000	

Figure A-2-2 Continued

(7) Standard 10.0 mg/L ; 48 hr



データ収集用分析ファイル: NDPA
 作成者:
 サンプル A (メイン): L-7100
 溶離液A: ACN 70%
 サンプル B (補助): L-7100
 溶離液A: Water 30%
 コラム:
 NDPA, 220nm, 70%ACN

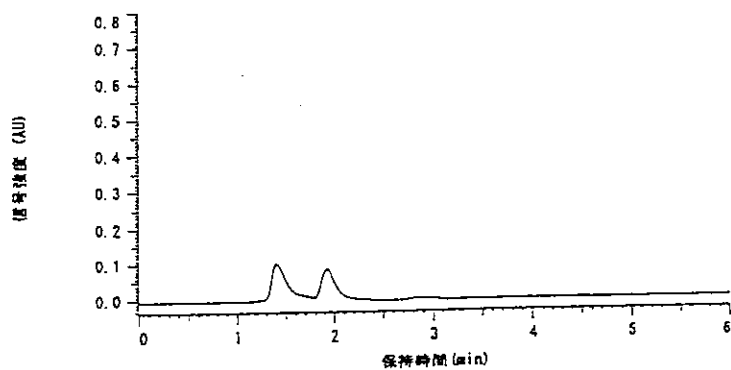
カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.72	811215	100.000	BB
		811215	100.000	

(8) Control ; 48 hr



データ収集用分析ファイル: NDPA
 作成者:
 サンプル A (メイン): L-7100
 溶離液A: ACN 70%
 サンプル B (補助): L-7100
 溶離液A: Water 30%
 コラム:
 NDPA, 220nm, 70%ACN

カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

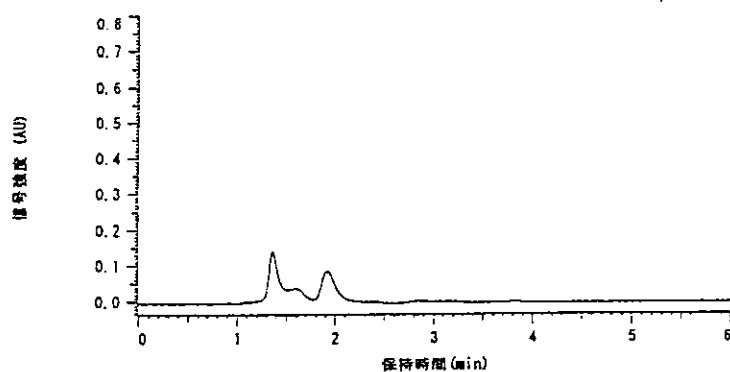
ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
		0	0.000	

Figure A-2-2 Continued

(9) Solvent Control ; 48 hr



分析用分析剤: NDPA
 作成者:
 分析機: L-7100
 溶剤A: ACN 70%
 溶剤B(補助): L-7100
 溶剤A: Water 30%
 コント: NDPA, 220nm, 70%ACN

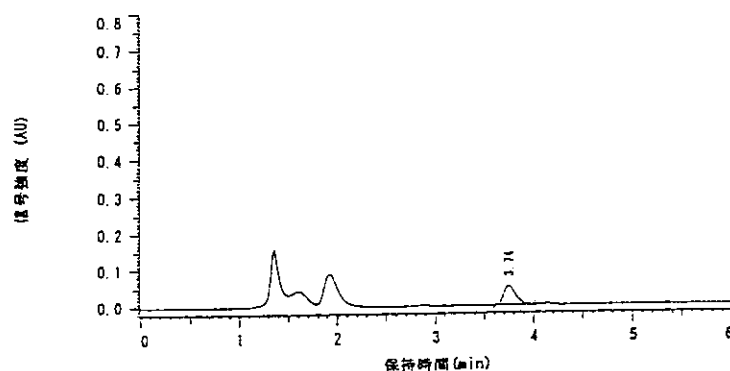
カラム: Inertsil ODS-2, 150mm

定量方法: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
	0	0.000		

(10) 3.00 mg/L nominal ; 48 hr



分析用分析剤: NDPA
 作成者:
 分析機: L-7100
 溶剤A: ACN 70%
 溶剤B(補助): L-7100
 溶剤A: Water 30%
 コント: NDPA, 220nm, 70%ACN

カラム: Inertsil ODS-2, 150mm

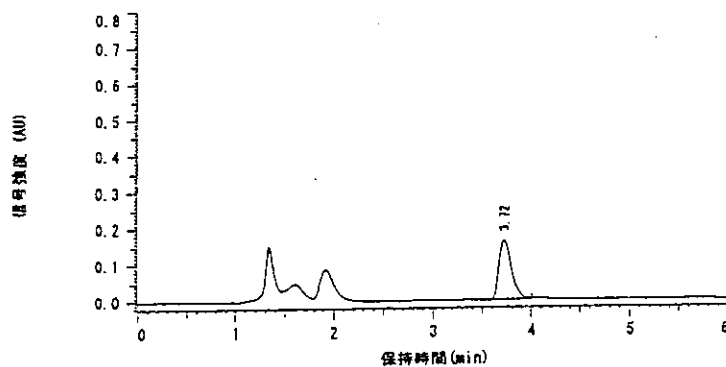
定量方法: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.74	225840	100.000	BB
		225840	100.000	

Figure A-2-2 Continued

(11) 9.30 mg/L nominal ; 48 hr



分析用分析剤: NDPA
作成者:
* シリ A (メイン): L-7100
溶離液A: ACN 70%
* シリ B (補助): L-7100
溶離液A: Water 30%
コリト:
NDPA, 220nm, 70%ACN

カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

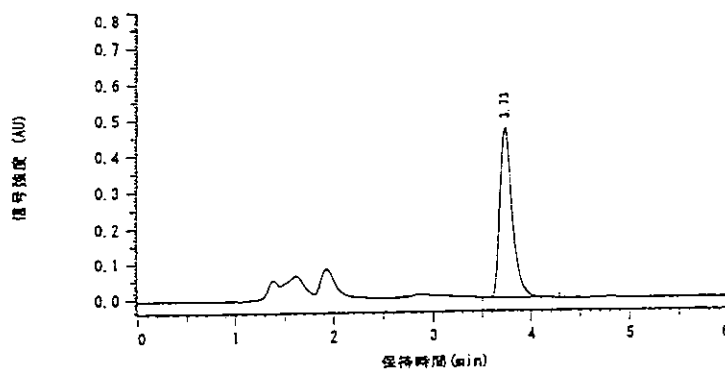
ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.72	689977	100.000	BS
		689977	100.000	

(12) 30.0 mg/L nominal ; 24 hr

(This chromatogram was made after 24 hours exposure period because all *Daphnia* were dead.)



分析用分析剤: NDPA
作成者:
* シリ A (メイン): L-7100
溶離液A: ACN 70%
* シリ B (補助): L-7100
溶離液A: Water 30%
コリト:
NDPA, 220nm, 70%ACN

カラム名: Inertsil ODS-2, 150mm

ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

NO	保持時間	面積	濃度1	BC
1	3.73	2016651	100.000	BS
		2016651	100.000	