

環境庁殿

## 最 終 報 告 書

Di- $\alpha$ -cumyl peroxideのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

(試験番号：92179)

2000 年 3 月 31 日作成

環境庁  
化学物質評価研究機構  
残留物課

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構  
久留米事業所

試験委託者： 環境庁

表 題： Di- $\alpha$ -cumyl peroxideのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

試験番号： 92179

本試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

2000年 3 月 31日

運営管理者

A large black rectangular redaction box covering the signature area of the document.

## 信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構  
久留米事業所

試験委託者： 環境庁

表 題： Di- $\alpha$ -cumyl peroxideのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

試験番号： 92179

本試験は試験計画書及び標準操作手順書に従って実施され、本最終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。

監査又は査察内容	実施日	報告日(試験責任者)	報告日(運営管理者)
試験計画書監査	1999年12月7日	1999年12月7日	1999年12月7日
試験実施状況査察	2000年2月28日	2000年3月6日	2000年3月7日
試験実施状況査察	2000年3月3日	2000年3月6日	2000年3月7日
最終報告書監査	2000年3月31日	2000年3月31日	2000年3月31日

2000年〇月〇日

信頼性保証業務担当者



## 試験実施概要

- 1 表 題  
Di- $\alpha$ -cumyl peroxideのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験
- 2 試験目的  
Di- $\alpha$ -cumyl peroxideについて、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験を行い、半数致死濃度(LC50)を求める。
- 3 試験方法  
本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.203「魚類急性毒性試験」(1992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： (〒100-8975)東京都千代田区霞が関 1-2-2  
試験委託責任者： 企画調整局環境保健部環境安全課環境リスク評価室  
室長補佐 [REDACTED]
- 6 試験受託者  
名 称： 財団法人 化学物質評価研究機構  
住 所： (〒112-0004)東京都文京区後楽 1-4-25
- 7 試験施設  
名 称： 財団法人 化学物質評価研究機構  
実施施設名： 久留米事業所  
住 所： (〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14  
運営管理者： [REDACTED]

## 8 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

生物試験担当

[REDACTED]

分析担当

[REDACTED]

## 9 最終報告書の作成

2000年3月31日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

## 10 試験日程

試験開始日

1999年12月7日

試験終了日

2000年3月31日

暴露期間

2000年2月28日～2000年3月3日

## 11 記録及び試資料の保管

試験に関する下記の記録及び試資料は、最終報告書作成後10年間、久留米・事業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試験委託者と協議の上定める。

- 1) 試験計画書、同変更等の記録
- 2) 最終報告書
- 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 .....	1
1 被 験 物 質 .....	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状 .....	2
1.2 供 試 試 料 .....	2
1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性 .....	3
2 試 験 生 物 .....	3
3 試 験 方 法 .....	4
3.1 試 験 条 件 .....	4
3.2 希 積 水 .....	4
3.3 試験容器及び恒温槽等 .....	4
3.4 試験濃度の設定 .....	4
3.5 試験液の調製 .....	5
3.6 被験物質の分析 .....	5
3.7 試 験 操 作 .....	5
3.8 数値の取扱い .....	5
4 結果の算出 .....	6
5 結果及び考察 .....	6
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 .....	6
5.2 試験液中の被験物質濃度 .....	6
5.3 半数致死濃度 (LC50) .....	6
5.4 0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度 .....	6
5.5 毒 性 症 状 .....	6
5.6 試験液の水溫、溶存酸素濃度(DO)及びpH .....	7
5.7 試験液の状態 .....	7
Table 1～8 .....	8～14
Figure 1 .....	15
付属資料－1 希積水の水質	
付属資料－2 試験液の分析方法及び分析チャート	

## 要 旨

試験委託者

環境庁

表 題Di- $\alpha$ -cumyl peroxideのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験試験番号

92179

試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.203「魚類急性毒性試験」(1992年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： Di- $\alpha$ -cumyl peroxide
- 2) 試験生物： ヒメダカ(*Oryzias latipes*)
- 3) 生物数： 10尾/1試験区(1連につき5尾で1試験区10尾)
- 4) 暴露期間： 96時間
- 5) 暴露方式： 半止水式(1日に2回試験液を交換)
- 6) 試験濃度： 2.00、1.43、1.02、0.729、0.521 mg/L(公比：1.4)、助剤対照区及び対照区
- 7) 連 数： 1試験区につき2連
- 8) 試験液量： 1試験容器(1連)につき2.5 L
- 9) 試験水温： 24 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C
- 10) 照 明： 室内光、16時間明/8時間暗
- 11) エアレーション： なし
- 12) 試験液中の被験物質の分析： 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)  
(暴露開始時、換水前)

結 果

- 1) 試験液中の被験物質濃度  
被験物質の測定濃度が設定濃度の $\pm 20\%$ を超えたため、各影響濃度の算出には測定濃度(時間加重平均値)を採用した。
- 2) 96時間の半数致死濃度(LC50)： 0.469 mg/L (95%信頼限界：0.386~0.721 g/L)

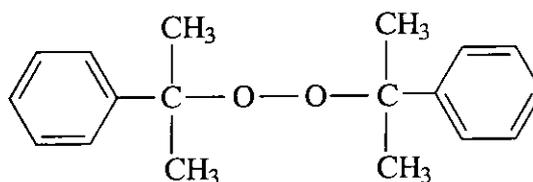
## 1 被験物質

本最終報告書においてDi- $\alpha$ -cumyl peroxideは、次の名称及び品質等を有するものとする。供試試料に関する情報については供給者提供の添付資料等によった。

## 1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名称： Di- $\alpha$ -cumyl peroxide  
(CAS番号 80-43-3)

- 2) 構造式：



- 3) 分子式：  $C_{18}H_{22}O_2$   
 4) 分子量： 270.37  
 5) 沸点： 不明  
 6) 融点：  $39\sim 41^{\circ}C$  \*  
 7) 比重(  $d_{20}^{20}$  )： 1.02 \*  
 8) 安定性： 不明  
 9) 1-オクタノール/水分配係数(logP)： 不明  
 10) pKa： 不明  
 11) 水への溶解度：  $<1\text{ g/L}(23^{\circ}C)$  \*  
 12) 蒸気圧： 不明

情報源

\* : Richardson, M. L. et al "The Dictionary of Substances and their Effects" Royal Society of Chemistry, 1993.

## 1.2 供試試料

- 1) 純度： 98%  
 2) ロット番号： 12603PS  
 3) 供給者： XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX  
 4) 供給量： 100 g  
 5) 入手日： 1999年12月17日  
 6) 外観： 白色結晶性薄片

## 1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は久留米事業所の冷蔵庫に保管した。

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。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化は無かった。

以上の結果から、被験物質は暴露終了時まで安定であったと確認された。

## 2 試験生物

- 1) 和名：ヒメダカ
- 2) 学名：*Oryzias latipes*
- 3) 被鱗体長：1.9 cm (1.7~2.0 cm), n=10
- 4) 体重：0.091 g (0.059~0.12 g), n=10
- 5) 入手先：中島養魚場(〒869-0123 熊本県玉名郡長洲町大字長洲 2029)
- 6) 入手日：1999年1月7日
- 7) 感受性の確認：基準物質[硫酸銅(Ⅱ)五水和物、試薬特級、和光純薬工業株式会社]による96時間半数致死濃度(LC50)=0.859 mg/L[久留米事業所における1995年12月以降のLC50：0.427~2.00 mg/L(n=14)の範囲にある。]
- 8) 順化期間：2000年1月7日~2000年2月27日  
暴露開始前7日間の死亡率は5%以下で、試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。(順化条件を以下に示す。)

順化条件

- 1) 飼育水：希釈水(3.2参照)
- 2) 飼育方法：流水式
- 3) 水温：24±1℃
- 4) 照明：室内光、16時間明/8時間暗
- 5) 餌：テトラミン(テトラベルケ社)
- 6) 給餌量：平均魚体重の約2%/日(暴露開始の24時間前からは無給餌)

### 3 試験方法

#### 3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露する薬浴方式を用いた。試験は8及び16時間後に試験液を交換する半止水式で行った。
- 2) 暴露期間： 96時間
- 3) 連数： 1試験区につき2連
- 4) 生物数： 10尾／試験区(1連につき5尾で1試験区10尾)
- 5) 試験液量： 1試験容器(1連)につき2.5 L
- 6) 換水率： 2回／1日
- 7) 試験水温： 24±1℃
- 8) 照明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 9) 給餌： 無給餌
- 10) エアレーション： なし

#### 3.2 希釈水

脱塩素水(久留米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、温度調節したもの)を使用した。希釈水使用時には、オルトトリジン法により、残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。希釈水の水質は付属資料-1に示した。

#### 3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器： 3.0 L容のガラス製容器(直径16 cm、深さ17 cm)を用いた。
- 2) 恒温槽： 加温冷却機によって試験容器内の水温が24±1℃に維持可能な恒温槽を用いた。
- 3) 水温計： 検定済ガラス製棒状温度計
- 4) pH計： ガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P型(東亜電波工業)
- 5) 溶存酸素計： 溶存酸素計58型(Yellow Springs Instrument Co., Inc.)

#### 3.4 試験濃度の設定

本試験に先立って行った予備試験の結果から、試験濃度は2.00 mg/Lを最高濃度として公比1.4で5濃度区(2.00、1.43、1.02、0.729及び0.521 mg/L)を設定した。また、助剤対照区及び希釈水のみ対照区を設けた。

### 3.5 試験液の調製

必要量の被験物質をアセトンに溶解させ、被験物質の5倍量のHCO-40を加え、アセトンをロータリーエバポレーターで留去後、試験用水を加えて分散させ1,000 mg/Lの試験原液を調製した。試験液は、必要量の試験原液と希釈水を混合して調製した。

### 3.6 被験物質の分析

暴露開始時、換水前後(16、24及び40時間後)及び換水前(48時間後)に各試験区の2試験容器の中層より試験液を等量採取して混合した後、HPLCにより分析した。試験液中の被験物質の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液(濃度0.100 mg/L)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

暴露開始時に試験生物と同水槽で順化した魚10尾の重量及び被鱗体長を測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

各試験区(ただし、各1試験容器)の試験液の水温、溶存酸素濃度(DO)、pHを測定後、試験容器中に試験生物を1試験区当り10尾投入した。水温、DO、pHは暴露期間中毎日1回以上測定した。また、換水前後にも、水温、DO、pHを測定した。

暴露開始3、24、48、72及び96時間後に死亡個体数を記録するとともに観察された一般的症例或いは特異的症例(背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌等)を記録した。一般的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。

#### \* 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。
- 異常行動： 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。

### 3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考 3 規則 Bによった。

#### 4 結果の算出

各濃度区での死亡数と供試個体数(10尾)から死亡率(%)を算出し、Probit法により半数致死濃度(LC50)を算出した。Probit法が適用できなかったものについては、Binomial法により算出した。また、その95%信頼限界も算出した。なお、被験物質の測定濃度が設定の±20%を超えたため、上記の結果の算出には測定濃度(時間加重平均値)を用いた。

#### 5 結果及び考察

##### 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

該当する要因はなかった。

##### 5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時、換水前後(16、24及び40時間後)及び換水前(48時間後)に試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果をTable 1に示した。

被験物質の測定濃度の設定に対する割合は、暴露開始時で74.0～79.6%、換水前(16時間後)で56.5～67.2%、換水後(16時間後)で73.0～83.1%、換水前(24時間後)で62.9～74.8%、換水後(24時間後)で78.6～83.6%、換水前(40時間後)で58.8～66.2%、換水後(40時間後)で75.7～85.6%及び換水前(48時間後)で68.3～70.9%であった。

##### 5.3 半数致死濃度(LC50)

各時間における死亡率及びLC50をそれぞれTable 2及びTable 3に、濃度－死亡率曲線をFigure 1に示した。

対照区の死亡率は0%であり、試験成立条件を満たした。

死亡は、96時間では0.513～1.44 mg/Lでみられた。96時間LC50は0.386～0.721 mg/Lを用いて算出した。

以上の結果から、以下の結論を得た。

96時間LC50 : 0.469 mg/L(95%信頼限界 : 0.386～0.721 mg/L)

##### 5.4 0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度

0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度をTable 4及び以下に示した。

0%死亡最高濃度 : 0.386 mg/L

100%死亡最低濃度 : 0.721 mg/L

##### 5.5 毒性症状

観察された毒性症状をTable 5に示した。

毒性症状として異常呼吸、異常行動、遊泳不能及び特異的症狀が観察された。対照区では暴露期間中に異常な症状は観察されなかった。

5.6 試験液の水溫、溶存酸素濃度(DO)及びpH

試験液の水溫をTable 6、DOをTable 7、pHをTable 8に示した。

暴露期間中に測定した水溫は23.9~24.5℃であった。DOは7.2~8.4 mg/Lであり、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： 8.25 mg/L)。pHは7.3~7.7であった。

以上のことから、水溫、DO及びpHについては、ヒメダカの試験環境として適正範囲であったと考えられる。

5.7 試験液の状態

調製時の試験液は無色透明で、その状態は換水前まで変わらなかった。

以 上

Table 1. Concentrations of di- $\alpha$ -cumyl peroxide in acute toxicity using orange killifish (*Oryzias latipes*) under semi-static conditions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)			
	0-h <sup>a)</sup>	16-h <sup>b)</sup>	16-h <sup>a)</sup>	24-h <sup>b)</sup>
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Solvent control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
0.521	0.405 (77.8)	0.350 (67.2)	0.433 (83.1)	0.390 (74.8)
0.729	0.564 (77.3)	0.412 (56.5)	0.565 (77.5)	0.458 (62.9)
1.02	0.812 (79.6)	0.639 (62.7)	0.772 (75.6)	0.723 (70.9)
1.43	1.06 (74.0)	0.854 (59.8)	1.04 (73.0)	1.07 (74.7)
2.00	1.59 (79.3)	1.24 (61.8)	1.58 (78.8)	1.39 (69.3)

Table 1. (continued)

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)				Time-weighted mean <sup>c)</sup> (mg/L)
	24-h <sup>a)</sup>	40-h <sup>b)</sup>	40-h <sup>a)</sup>	48-h <sup>b)</sup>	
Control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
Solvent control	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
0.521	0.411 (79.0)	0.345 (66.2)	0.446 (85.6)	0.356 (68.3)	0.386 (74.2)
0.729	0.600 (82.4)	0.445 (61.0)	0.610 (83.7)	0.517 (70.9)	0.513 (70.3)
1.02	0.801 (78.6)	0.599 (58.8)	0.772 (75.7)	0.713 (69.9)	0.721 (70.7)
1.43	1.16 (81.5)	0.940 (65.8)	n	n	1.01 (70.7)
2.00	1.67 (83.6)	1.27 (63.3)	n	n	1.44 (72.1)

n.d. : &lt; 0.0200 mg/L

a) fresh solutions

b) expired solutions

c) The values are expressed as time-weighted means calculated

by the following equation:

$$\{16(C_0-C_{16})/(\ln C_0-\ln C_{16})+8(C_{16}-C_{24})/(\ln C_{16}-\ln C_{24})+16(C_{24}-C_{48})/(\ln C_{24}-\ln C_{48})+8(C_{40}-C_{48})/(\ln C_{40}-\ln C_{48})\}/48$$

$$\{16(C_0-C_{16})/(\ln C_0-\ln C_{16})+8(C_{16}-C_{24})/(\ln C_{16}-\ln C_{24})+16(C_{24}-C_{48})/(\ln C_{24}-\ln C_{48})\}/40 \quad (1.43\text{mg/L}, 2.00\text{mg/L})$$

where

 $C_x$  : the measured concentration at x-day $\ln C_x$  : the natural logarithm of  $C_x$ 

n : No measurement

Table 2. Mortality of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to di- $\alpha$ -cumyl peroxide

Measured concentration (mg/L)	Cumulative number of dead fish (Percent mortality)			
	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Solvent control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.386	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.513	2 (20)	5 (50)	7 (70)	8 (80)
0.721	5 (50)	8 (80)	9 (90)	10 (100)
1.01	8 (80)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
1.44	8 (80)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

Table 3. Calculated LC50 values for medaka (*Oryzias latipes*) exposed to di- $\alpha$ -cumyl peroxide based on measured concentrations

Exposure time (hour)	LC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)			Statistical method
24	0.732	0.617	—	0.919	Probit
48	0.557	0.484	—	0.644	Probit
72	0.509	0.447	—	0.582	Probit
96	0.469	0.386	—	0.721	Binomial

Table 4. Highest concentration in 0% mortality and lowest concentration in 100% mortality based on measured concentrations

Exposure time (hour)	Highest concentration in 0% mortality (mg/L)	Lowest concentration in 100% mortality (mg/L)
24	0.386	-
48	0.386	1.01
72	0.386	1.01
96	0.386	0.721

Table 5. Toxic symptoms observed in medaka (*Oryzias latipes*) during exposure to di- $\alpha$ -cumyl peroxide under semi-static test condition

Measured concentration (mg/L)	Symptoms				
	3-hour	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour
Control	-	-	-	-	-
Solvent control	-	-	-	-	-
0.386	-	-	-	-	-
0.513	-	AB	AB	IM	AB SS
0.721	-	AB	AB	AB	n
1.01	-	AB	n	n	n
1.44	AB	AB AR	n	n	n

AB : Abnormal behavior

AR : Abnormal respiration

IM : Immobility

SS : Specific symptoms

n : No observation was made because all medaka had died at this observation time.

- : No symptom

Table 6. Temperature of test solutions during 96-hour semi-static exposure of medaka (*Oryzias latipes*) to di- $\alpha$ -cumyl peroxide

Measured concentration (mg/L)		Temperature (°C)				
		0-hour	16-hour	24-hour	40-hour	48-hour
Control	new	24.0	24.0	24.2	23.9	24.2
	old		23.9	24.2	24.1	24.2
Solvent control	new	24.0	24.2	24.2	24.0	24.2
	old		24.1	24.1	24.1	24.3
0.386	new	24.0	24.2	24.1	24.1	24.3
	old		24.2	24.1	24.1	24.3
0.513	new	24.0	24.2	24.1	24.1	24.3
	old		24.2	24.1	24.0	24.3
0.721	new	24.0	24.2	24.0	24.0	24.2
	old		24.1	24.0	24.1	24.2
1.01	new	24.1	24.2	24.0	n	n
	old		24.1	24.0	24.0	n
1.44	new	24.1	24.2	24.0	n	n
	old		24.1	24.0	24.0	n

Measured concentration (mg/L)		Temperature (°C)			
		64-hour	72-hour	88-hour	96-hour
Control	new	24.4	24.1	24.0	
	old	24.4	24.0	24.1	24.2
Solvent control	new	24.4	24.1	24.0	
	old	24.5	24.1	24.0	24.2
0.386	new	24.4	24.1	24.1	
	old	24.4	24.2	24.1	24.2
0.513	new	24.4	24.1	24.0	
	old	24.4	24.1	24.1	24.2
0.721	new	24.4	24.1	n	
	old	24.4	24.1	24.0	n
1.01	new	n	n	n	
	old	n	n	n	n
1.44	new	n	n	n	
	old	n	n	n	n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 8-hour and 16-hour after preparation

n : No observation was made because all medaka had died at this observation time.

Table 7. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 96-hour semi-static exposure of medaka (*Oryzias latipes*) to di- $\alpha$ -cumyl peroxide

Measured concentration (mg/L)		Dissolved oxygen concentration (mg/L)				
		0-hour	16-hour	24-hour	40-hour	48-hour
Control	new	8.3	8.3	8.3	8.4	8.4
	old		7.6	7.9	7.7	7.9
Solvent control	new	8.3	8.3	8.4	8.4	8.3
	old		7.4	7.9	7.5	7.9
0.386	new	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3
	old		7.4	7.8	7.2	7.7
0.513	new	8.3	8.3	8.3	8.3	8.3
	old		7.4	7.7	7.4	7.8
0.721	new	8.3	8.3	8.4	8.3	8.3
	old		7.5	8.1	8.2	8.1
1.01	new	8.3	8.3	8.4	n	n
	old		7.8	8.1	8.2	n
1.44	new	8.3	8.3	8.4	n	n
	old		7.7	8.2	8.2	n

Measured concentration (mg/L)		Dissolved oxygen concentration (mg/L)			
		64-hour	72-hour	88-hour	96-hour
Control	new	8.4	8.3	8.3	
	old	7.8	7.7	7.4	7.9
Solvent control	new	8.3	8.3	8.3	
	old	7.6	7.8	7.4	7.8
0.386	new	8.3	8.3	8.3	
	old	7.3	7.9	7.4	7.5
0.513	new	8.3	8.3	8.3	
	old	7.4	7.9	7.3	8.0
0.721	new	8.3	8.3	n	
	old	8.1	8.1	8.2	n
1.01	new	n	n	n	
	old	n	n	n	n
1.44	new	n	n	n	
	old	n	n	n	n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 8-hour and 16-hour after preparation

n : No observation was made because all medaka had died at this observation time.

Table 8. pH values of test solutions during 96-hour semi-static exposure of medaka (*Oryzias latipes*) to di- $\alpha$ -cumyl peroxide

Measured concentration (mg/L)		pH				
		0-hour	16-hour	24-hour	40-hour	48-hour
Control	new	7.4	7.5	7.4	7.7	7.3
	old		7.5	7.4	7.5	7.5
Solvent control	new	7.4	7.5	7.4	7.6	7.4
	old		7.5	7.5	7.5	7.5
0.386	new	7.4	7.5	7.5	7.6	7.4
	old		7.5	7.5	7.5	7.5
0.513	new	7.4	7.5	7.4	7.6	7.4
	old		7.5	7.4	7.5	7.5
0.721	new	7.4	7.5	7.4	7.6	7.4
	old		7.5	7.5	7.6	7.6
1.01	new	7.5	7.5	7.5	n	n
	old		7.5	7.5	7.6	n
1.44	new	7.5	7.5	7.5	n	n
	old		7.5	7.5	7.6	n

Measured concentration (mg/L)		pH			
		64-hour	72-hour	88-hour	96-hour
Control	new	7.6	7.3	7.5	
	old	7.4	7.3	7.5	7.4
Solvent control	new	7.5	7.4	7.5	
	old	7.5	7.4	7.5	7.4
0.386	new	7.5	7.4	7.5	
	old	7.5	7.4	7.5	7.4
0.513	new	7.5	7.4	7.5	
	old	7.5	7.4	7.5	7.5
0.721	new	7.6	7.5	n	
	old	7.5	7.5	7.5	n
1.01	new	n	n	n	
	old	n	n	n	n
1.44	new	n	n	n	
	old	n	n	n	n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 8-hour and 16-hour after preparation

n : No observation was made because all medaka had died at this observation time.

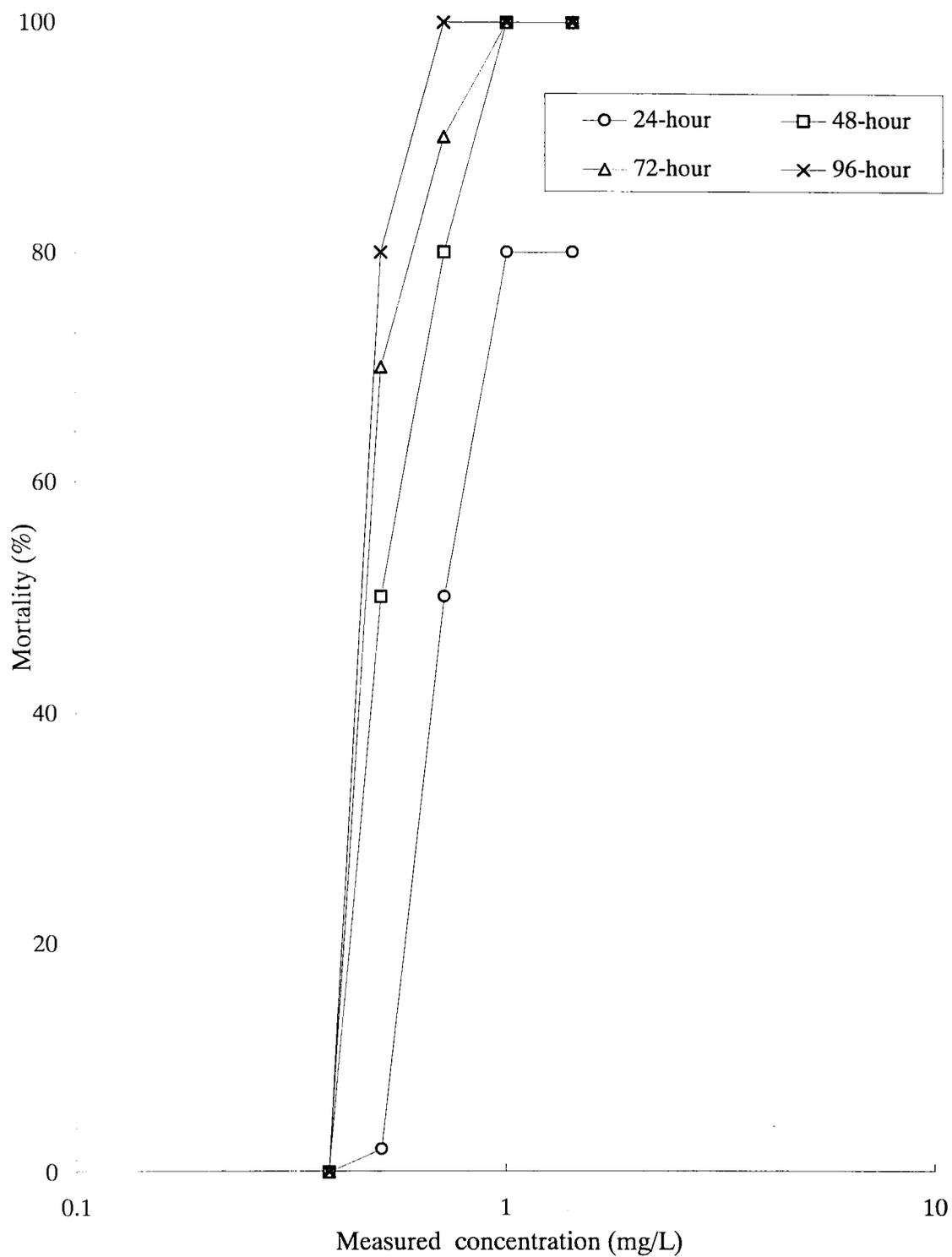


Figure 1. Concentration - toxicity curve of di-  $\alpha$  -cumyl peroxide in medaka (*Oryzias latipes*).

## 付属資料－1

希釈水の水質

(全2頁)

## Appendix 1. Water quality of dilution water

Parameter	Concentration	Lower limit of detection
pH	7.4	
COD (mg/L)	0.8	
Coliform group bacteria (MPN/100 mL)	0	
Total phosphorus (mg/L)	0.003	
Total mercury (mg/L)	n.d.	0.0005
Copper (mg/L)	n.d.	0.005
Cadmium (mg/L)	n.d.	0.005
Zinc (mg/L)	n.d.	0.01
Lead (mg/L)	n.d.	0.005
Aluminium (mg/L)	n.d.	0.1
Nickel (mg/L)	n.d.	0.01
Total chromium (mg/L)	n.d.	0.02
Manganese (mg/L)	n.d.	0.01
Tin (mg/L)	n.d.	0.5
Iron (mg/L)	0.02	
Cyanide (mg/L)	n.d.	0.1
Free chlorine (mg/L)	n.d.	0.01
Bromide ion (mg/L)	n.d.	0.1
Fluoride (mg/L)	n.d.	0.15
Sulfide ion (mg/L)	n.d.	0.1
Ammonia nitrogen (mg/L)	n.d.	0.01
Arsenic (mg/L)	n.d.	0.002
Selenium (mg/L)	n.d.	0.002
Evaporation residue (mg/L)	86.4	
Electric conductivity ( $\mu\text{s}/\text{cm}$ )	146	
Total hardness (as $\text{CaCO}_3$ ) (mg/L)	44.0	
Alkalinity (mg/L)	27.5	
Sodium (mg/L)	12.1	
Potassium (mg/L)	2.98	
Calcium (mg/L)	10.8	
Magnesium (mg/L)	4.13	

## Appendix 1. (continued)

Parameter	Concentration	Lower limit of detection
1,2-Dichloropropane (mg/L)	n.d.	0.006
Diazinon (mg/L)	n.d.	0.0005
Isoxathion (mg/L)	n.d.	0.0008
Fenitrothion (MEP) (mg/L)	n.d.	0.0003
Isoprothiolane (mg/L)	n.d.	0.004
Oxine copper (mg/L)	n.d.	0.004
Chlorothalonil (TPN) (mg/L)	n.d.	0.004
Propyzamide (mg/L)	n.d.	0.0008
EPN (mg/L)	n.d.	0.0006
Dichlorvos (DDVP) (mg/L)	n.d.	0.001
Fenobucarb (BPMC) (mg/L)	n.d.	0.002
Iprobenfos (IBP) (mg/L)	n.d.	0.0008
Chlornitrofen (CNP) (mg/L)	n.d.	0.0005
Thiram (mg/L)	n.d.	0.0006
Simazine (CAT) (mg/L)	n.d.	0.0003
Thiobencarb (mg/L)	n.d.	0.002
PCB (mg/L)	n.d.	0.0005

n.d. : not detected

Date of measurement : February 8, 2000

## 付属資料－2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 5 頁)

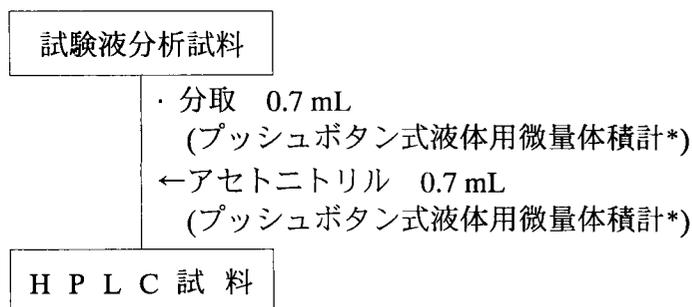
試験名 : 魚類急性毒性試験  
被験物質名 : Di- $\alpha$ -cumyl peroxide

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

採取した溶液はそのまま若しくは脱塩素水で希釈して試験液分析試料とし、以下のフロースキームに従い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。

フロースキーム



\* エッペンドルフ社製

HPLC試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。

(2) 被験物質溶液の調製

被験物質100 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して2.00 mg/Lの被験物質溶液を調製した。

(3) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のようにして行った。2.00 mg/Lの被験物質溶液をアセトニトリル/脱塩素水 1/1(v/v)になるように希釈して0.100 mg/Lの標準溶液とした。

## 2) 定量条件

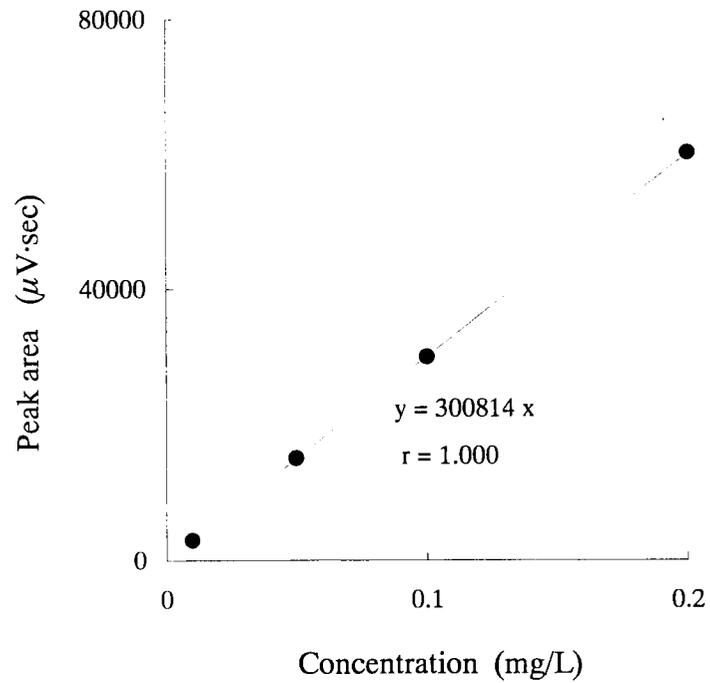
機 器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ	島津製作所製 LC-10AD
検出器	島津製作所製 SPD-10AV
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A <sub>XL</sub>
カラム	L-column ODS 15 cm×4.6 mmφ ステンレス製
カラム温度	40℃
溶離液	アセトニトリル/蒸留水 9/1 (v/v)
流量	1.0 mL/min
測定波長	210 nm
注入量	100 μL
感度	
検出器	1 AU/1 V
記録計	ATTEN 2 <sup>4</sup>

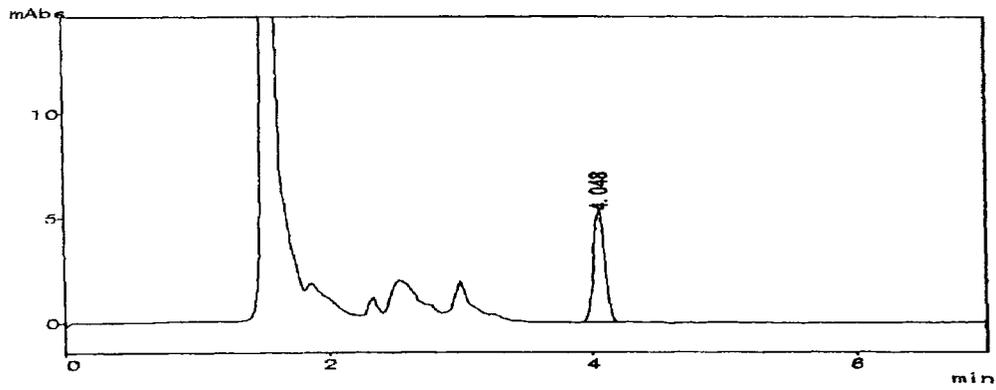
## 3) 検量線の作成

1)(3)の標準溶液の調製と同様にして0.0100、0.0500、0.100及び0.200 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

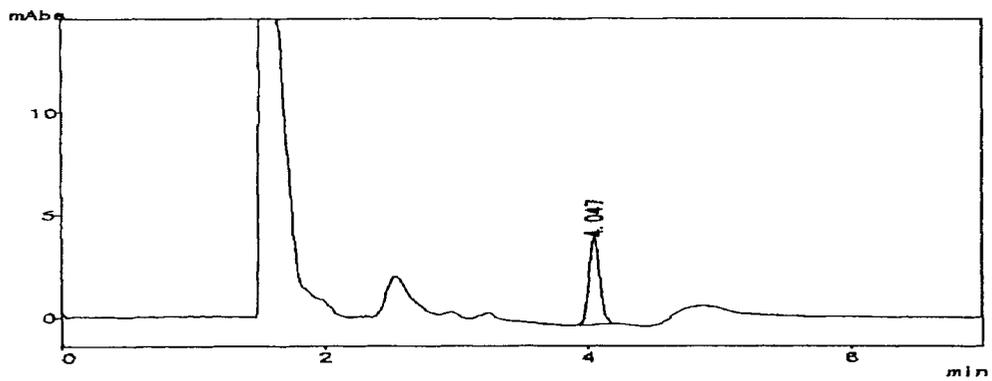
## Input data

Run	Concentration (mg/L)	Peak area ( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ )
1	0.0100	2911
2	0.0500	15046
3	0.100	29926
4	0.200	60244

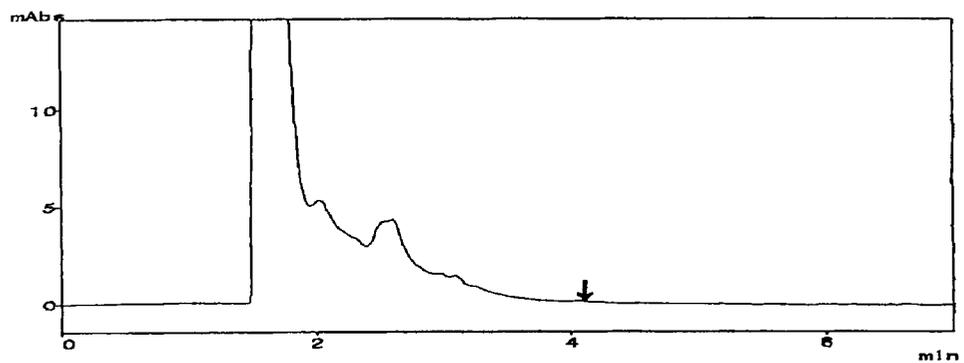
Appendix 2-1. Calibration curve of di- $\alpha$ -cumyl peroxide by HPLC analysis.



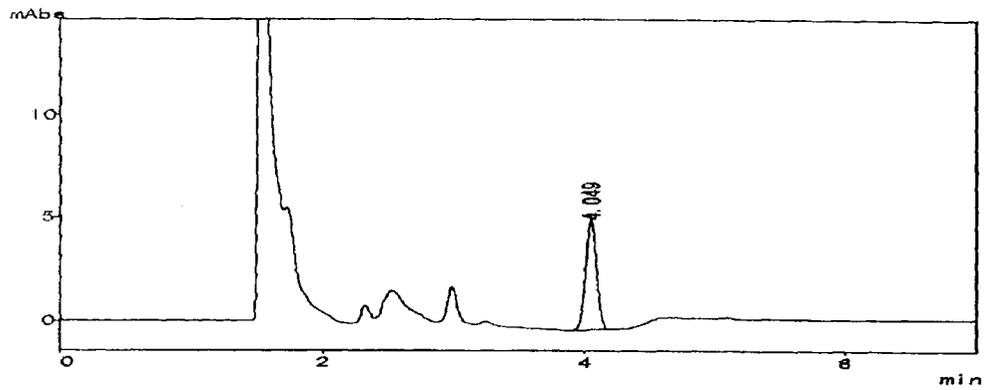
Appendix 2-2. Representative HPLC chromatogram of 0.100 mg/L di- $\alpha$ -cumyl peroxide standard at 0-hour.



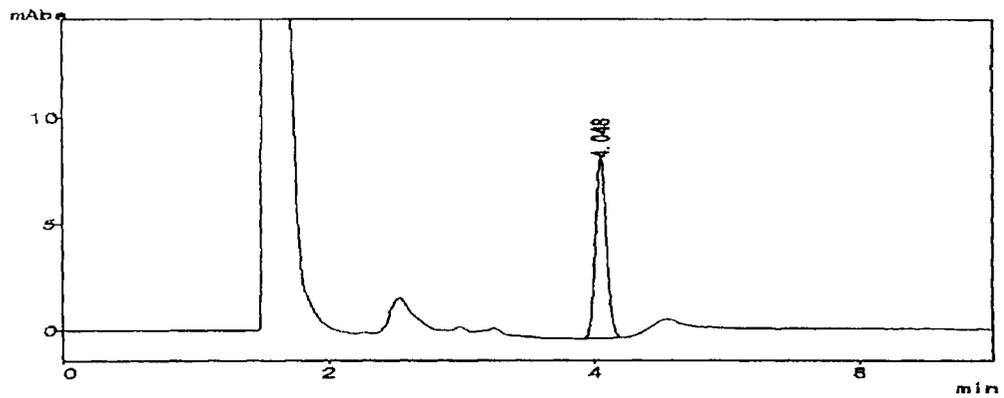
Appendix 2-3. Representative HPLC chromatogram of di- $\alpha$ -cumyl peroxide in 1.02 mg/L test solution at 0-hour.



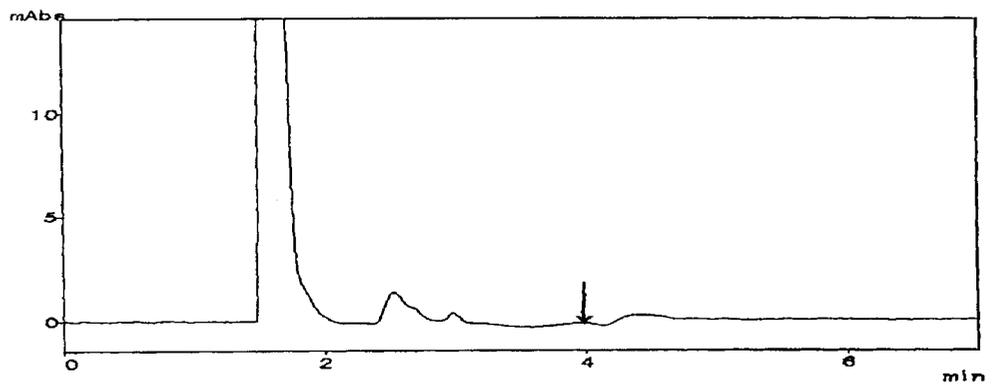
Appendix 2-4. Representative HPLC chromatogram of solvent control solution at 0-hour.



Appendix 2-5. Representative HPLC chromatogram of 0.100 mg/L di- $\alpha$ -cumyl peroxide standard at 16-hour.



Appendix 2-6. Representative HPLC chromatogram of di- $\alpha$ -cumyl peroxide in 1.02 mg/L test solution at 16-hour.



Appendix 2-7. Representative HPLC chromatogram of solvent control solution at 16-hour.