

環境庁殿

試 験 報 告 書

フタル酸ジ-*i*-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－21日間

(試験番号：PRO/N05/0200)

平成 8年 7月31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： フタル酸ジ-*i*-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－21日間

試験番号： PRO/N05/0200

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 8 年 7 月 3 / 日

運営管理者

[Redacted]

[Redacted]

[Redacted]

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： フタル酸ジ-*i*-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－21日間

試験番号： PRO/N05/0200

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

試験実施状況査察

平成 7 年 12 月 18 日
および 8 2 5~6

試験報告書監査

平成 8 年 4 月 18 日

運営管理者および
試験責任者への報告日

平成 8 年 1 月 19 日
および 8 2 16

平成 8 年 4 月 18 日

平成 8 年 7 月 31 日

信頼性保証担当者：

試験実施概要

1. 表題： フタル酸ジ-*i*-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－21日間
2. 試験目的： フタル酸ジ-*i*-ブチルについて、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長
毒性試験－21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
試験委託担当者： 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 都ビル内
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] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

9. 試験期間： 試験開始日 平成 7 年 12 月 1 日
試験終了日 平成 8 年 7 月 31 日
曝露期間 平成 8 年 3 月 3 日 ～ 平成 8 年 3 月 24 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、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

	頁
要 旨	7
1 被験物質	8
1.1 名称、構造式および物理化学的性状	8
1.2 供試試料	8
1.3 保管方法および保管条件下の安定性の確認	8
2 供試生物	9
3 試験方法	9
3.1 試験条件	9
3.2 希釈水	10
3.3 試験装置、試験容器および恒温槽等	10
3.4 試験濃度の設定	10
3.5 試験液の調製	10
3.6 試験液の分析	11
3.7 試験操作	11
4 結果の算出	11
4.1 最小致死濃度、最小作用濃度、最大無作用濃度	11
4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出	11
5 結果および考察	12
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	12
5.2 試験水中の被験物質濃度	12
5.3 最小致死濃度、最小作用濃度	12
5.4 半数致死濃度 (LC50)	12
5.5 毒性症状および摂餌状況	12
5.6 供試魚の体重	13
5.7 最大無作用濃度	13
5.8 試験水の pH、溶存酸素濃度および水温	13
Table 1～8	14～21
Figure 1	22

付属資料－1 希釈水の水質

付属資料－1 試験液の分析方法

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

フタル酸ジ-*i*-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験-21日間

試験番号

PRO/N05/0200

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： フタル酸ジ-*i*-ブチル
- 2)方式： 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用) 換水率 17 回/日
- 3)供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4)試験濃度： 対照区, 助剤対照区 (助剤濃度、104 mg/L)、0.30、0.67、1.70、4.09、および11.1mg/L (濃度公比:2.5) (設定濃度)
- 5)暴露期間： 21日間
- 6)試験液量： 4.0L
- 7)生物数： 20尾/濃度区
- 8)照明： 16時間明/8時間暗
- 9)エアレーション： 無し
- 10)温度： 24±1℃
- 11)試験水中の被験物質の分析: HPLC法

結 果

- 1)対照区と有意差の認められる21日間の最小致死濃度=3.88mg/L
 - 2)21日間の最小作用濃度=1.04mg/L
 - 3)21日間の最大無作用濃度 (NOEC) =0.39mg/L
 - 4)7日間の半数致死濃度 (LC50) =6.97mg/L (95%信頼区間:6.95mg/L~6.99mg/L)
 - 5)14日間の半数致死濃度 (LC50) =4.94mg/L (95%信頼区間:4.79mg/L~5.10mg/L)
 - 6)21日間の半数致死濃度 (LC50) =3.02mg/L (95%信頼区間:2.91mg/L~3.15mg/L)
- (上記濃度は、全て実測濃度に基づく値)

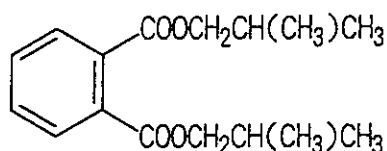
1 被験物質

1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

名 称 : フタル酸ジ-*i*-ブチル

識別符号 : I B

構造式 :



分子式 : $C_{16}H_{22}O_4$

分子量 : 278.35

1-オクタノール/水分配係数 ($\log P$) : 4.110

水溶性 : 400 ppm / 25°C

融点 : -64°C

沸点 : 340°C

(上記の数値は、MSDSのフタル酸ジ-*i*-ブチルから引用した)

1.2 供試物質

購入先 :

入手先 :

入手日 : 平成7年11月16日

ロット番号 : GA01

供給量 : 25 g入り2本

外観 : 無色透明

純度及び不純物 : 99.0%以上

1.3 保管方法および保管条件下の安定性の確認

1) 保管方法

被験物質は試料保管庫に室温で光を遮断して保管した。

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およびNMR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。試験終了時にも同様に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結果、スペクトルに変化は無かった。

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した。

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 $2.0 \pm 0.5 \text{ cm}$ であった。

- 1) 一般名： ヒメダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 体長： 2.0 cm (1.6~2.5cm), n=10
- 4) 体重： 0.16 g (0.07~0.32g), n=10
- 5) ロット番号： 960119
- 6) 購入先： 三輪養魚場
- 7) 購入日： 平成8年 1月19日

馴化

試験条件と同じ水を供給して試験施設内の飼育装置により試験条件（水質、温度等）で44日間、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0.61%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、96時間 $LC_{50}=0.37 \text{ mg/L}$ 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） 換水率 17 回/日
- 1) 温度： $24 \pm 1^\circ \text{C}$
- 2) 曝露期間： 21日間
- 4) 生物数： 20尾/濃度区
- 5) 試験液量： 4.0L
- 6) 連数： 1濃度区につき1連
- 7) 給餌： 市販のテトラミンを毎日魚体重の2%与えた
- 8) エアレーション： 無し
- 9) 照明： 16時間明/8時間暗

3.2 希釈水

愛知用水（河川水を簡単に処理して工業、農業用水として供給されている）を工場内で沈殿・ろ過処理した水をさらに、実験室でトレビーノ（東レ(株)製 浄水器：中空糸膜および活性炭）を通して用いた。

希釈水の主な水質として、硬度が 19.7mg/L (CaCO₃換算)、pHが 7.0であった。

[付属資料-1]

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： 5L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： 熱電対温度計 データーロガー（ティアンドディ TR-71型）

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 pHメーターF-22）

溶存酸素計： DO METER （堀場製作所 OM-14）

3.4 試験濃度の設定

急性毒性試験（試験No.PRO/N04/0300）の結果から半数致死濃度（LC50）2.83mg/L、0%死亡最高濃度 1.07mg/L および 100%死亡最低濃度 5.76mg/L を推定し、0.30mg/L、0.67mg/L、1.70mg/L、4.09mg/L、11.1 mg/L の5濃度区を設定した。

3.5 試験液の調製

フタル酸ジ-*i*-ブチル 20.00g を秤量し、200g の硬化ヒマシ油 HCO-50と蒸留水約 500mL を加えて60～70℃に温め、ホモジナイザーで微分散させた。2Lのメスフラスコで定容し、フタル酸ジ-*i*-ブチル 1.00wt% 原液を調製した。

原液 1.53～51.0mL を分取し、それぞれ2Lのメスフラスコで定容して試験液連続希釈装置の供給液とした。

3.6 試験液の分析

開始時（0日）、7日、14日および21日に各試験水槽より試験水1.0mLを採取し、HPLCにより分析した。試験水の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液（濃度1.0, 5.0 mg/L）の測定を行い、検量線から求めた測定値の正確度を確認した。

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20尾投入した。

暴露開始後、少なくとも週2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。

暴露開始後、少なくとも週3回死亡個体*数を記録した。死亡個体を発見した場合水質の悪化を防ぐため速やかに取り除き記録した。また、少なくとも週3回、観察された毒性の徴候或いは異常（例：外部刺激への反応異常、平衡感覚喪失、遊泳異常、呼吸機能の異常、体色変化、背曲がり、出血等）および摂餌量の低下を記録した。暴露終了時には全ての生存魚の重量および被鱗体長を測定記録した。

*：ガラス棒の先で尾部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした

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、試験区の死亡率が対照区と有意な差が認められた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、14日および21日における半数致死濃度（LC50）をProbit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

フタル酸ジ-*i*-ブチル はヒメダカを入れた水中で分解され、1.12 mg/L が24時間後に0.84 mg/L になる（予備試験結果）ことが判明した。設定濃度を維持するために流水式で17回/日の換水を行ったが、それでも暴露試験液中のフタル酸ジ-*i*-ブチル は設定濃度の80%を下回った。従って、半数致死濃度（LC50）等の計算は実測したフタル酸ジ-*i*-ブチル濃度の算術平均値を用いた。

5.2 試験水中の被験物質濃度

試験開始時、7日後、14日後および21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0.09~10.44 mg/L（設定濃度0.30~11.1 mg/L）であり、設定濃度に対する割合は12.4~98.8%であった。

[Table 1(p.14), 付属資料-2]

5.3 最小致死濃度、最小作用濃度

21日間のヒメダカの死亡率に関して、対照区と有意差が認められた試験区の最も低い濃度（最小致死濃度）は、3.88mg/L（実測濃度の算術平均値）であった。

（有意水準5%、統計的手法：累積カイ2乗検定 Yukms 統計ライブラリ-I 統計解析編）

[Table 2(p.15), Figure 1(p.22)]

試験において試験魚に致死以外の他の作用が観察された試験区の最も低い濃度（最小作用濃度）は1.04mg/L（実測濃度の算術平均値）であった。

[Table 4(p.17)]

5.4 半数致死濃度（LC50）

7日、14日および21日の半数致死濃度（LC50）はそれぞれ6.97 mg/L、4.94 mg/L および3.02 mg/L（測定濃度）であり、その95%信頼区間はそれぞれ6.95 ~6.99 mg/L、4.79~5.10 mg/L および2.91~3.15 mg/L であった。

（有意水準5%、統計的手法：Probit法 Yukms 統計ライブラリ-II 生物検定編）

（上記濃度は、全て実測濃度の算術平均値に基づく値）

[Table 3(p.16)]

5.5 毒性症状および摂餌状況

毒性症状として1.04mg/L（実測濃度）の濃度区において平衡感覚喪失の異常が観察された。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。

ヒメダカの摂餌状況は3.88mg/L の濃度区において摂餌低下が観察された。

[Table 4(p.17)]

5.6 供試魚の体重

フタル酸ジ-*i*-ブチルに21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比較して有意な差は認められなかった。

(有意水準5%、統計的手法：F&t-test Yukms 統計ライブラリーⅠ 統計解析編)

[Table 5(p.18)]

5.7 最大無作用濃度

死亡個体が対照区と比較して有意な差が認められない濃度区の最も高い濃度区は 1.04 mg/L、毒性症状が観察されない濃度区の最も高い濃度区は 0.39 mg/L、摂餌状況に異常が認められない濃度区の最も高い濃度区は 1.04 mg/L であった。これらの濃度区で最も低い濃度である 0.39 mg/L が最大無作用濃度 (NOEC) と判断した。

(有意水準5%、統計的手法：F&t-test Yukms 統計ライブラリーⅠ 統計解析編)

(上記濃度は、全て実測濃度に基づく値)

[Table 2(p.15)]

[Table 3(p.16)]

[Table 4(p.17)]

[Table 5(p.18)]

5.8 試験水のpH、溶存酸素濃度および水温

試験期間中のpHは6.9～7.8であった。試験期間中の溶存酸素濃度は7.2～10.2 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。10℃以下の水を恒温水槽により24±1℃に昇温して用いたため、溶存酸素濃度が過飽和状態になったと思われる。(24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25mg/L)

21日の試験期間中の水温は23.1～24.2℃であり、すべての濃度区において24±1℃の範囲内であった。

[Table 6(p. 19)]

[Table 7(p. 20)]

[Table 8(p. 21)]

以 上

Table 1. Measured Concentrations of Di-i-butyl Phthalate During a 21-Day Exposure of Orange killifish (Oryzias latipes) under Flow-through Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)				Mean
	0 Day	7 Day	14 Day	21 Day	
Control	< 0.05	< 0.05	----	----	----
Disp. Control	< 0.05	< 0.05	----	----	----
0.30	0.24 (80.0)	0.20 (66.7)	0.16 (53.3)	0.09 (30.0)	0.17 (56.7)
0.67	0.52 (77.6)	0.39 (58.2)	0.37 (55.2)	0.29 (43.3)	0.39 (58.2)
1.70	1.47 (86.5)	1.28 (75.3)	1.21 (71.2)	0.21 (12.4)	1.04 (61.2)
4.09	4.04 (98.8)	3.70 (90.5)	3.81 (93.2)	3.95 (96.6)	3.88 (94.9)
11.1	10.44 (94.1)	---- ^a ---- ^a	---- ^a ---- ^a	---- ^a ---- ^a	---- ----

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Table 2. Mortality of Orange killifish (Oryzias latipes) Exposed to Di-i-butyl Phthalate under Flow-through Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Dead (Percent Mortality)									
	1 Day	2 Day	4 Day	7 Day	9 Day	11 Day	14 Day	17 Day	19 Day	21 Day
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (5)	2 (10)	2 (10)	2 (10)
Dispersant Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.30	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.67	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)
1.70	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (5)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	2 (10)
4.09	0 (0)	2 (10)	3 (15)	4 (20)	5 (25)	10 (50)	10 (50)	14 (70)	17 (85)	17 (85)
11.1	20 (100)	--a	--a	--a	--a	--a	--a	--a	--a	--a

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Threshold Level of Lethal Effect: 4.09 mg/L (Nominal Concentration)

Table 3. Calculated LC50 Values for Orange killifish (Oryzias latipes) Exposed to Di-i-butyl Phthalate Based on Measured Concentrations under Flow-through Test Conditions

Exposure Period (Day)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
7	6.97	6.95 ~ 6.99	Probit
14	4.94	4.79 ~ 5.10	Probit
21	3.02	2.91 ~ 3.15	Probit

Table 4. Symptoms of Toxicity Observed in Orange killifish (Oryzias latipes) Exposed to Di-i-butyl Phthalate under Flow-through Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Symptoms									
	1 Day	2 Day	4 Day	7 Day	9 Day	11 Day	14 Day	17 Day	19 Day	21 Day
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dispersant Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.70	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4.09	2	2	1	0	1	0	2	1	2	0
11.1	0	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Threshold Level of Observed Effect: 1.70 mg/L (Nominal Concentration)

Table 5. Fish Weight (g)

No.	Fish Weight (g)						
	Control	Disp.	Conc.1	Conc.2	Conc.3	Conc.4	Conc.5
	Control						
1	0.203	0.166	0.223	0.117	0.092	0.139	----a
2	0.227	0.163	0.167	0.134	0.193	0.165	----a
3	0.209	0.154	0.108	0.177	0.076	0.136	----a
4	0.220	0.211	0.192	0.120	0.090	----a	----a
5	0.142	0.167	0.128	0.127	0.112	----a	----a
6	0.135	0.146	0.113	0.164	0.165	----a	----a
7	0.125	0.121	0.188	0.224	0.161	----a	----a
8	0.265	0.222	0.151	0.230	0.200	----a	----a
9	0.160	0.136	0.091	0.142	0.146	----a	----a
10	0.148	0.208	0.167	0.212	0.101	----a	----a
11	0.214	0.192	0.144	0.092	0.109	----a	----a
12	0.184	0.090	0.150	0.169	0.279	----a	----a
13	0.118	0.122	0.143	0.166	0.189	----a	----a
14	0.198	0.146	0.178	0.075	0.153	----a	----a
15	0.147	0.162	0.199	0.142	0.200	----a	----a
16	0.079	0.240	0.118	0.108	0.185	----a	----a
17	0.169	0.218	0.160	0.161	0.252	----a	----a
18	0.210	0.173	0.154	0.174	0.132	----a	----a
19	----a	0.170	0.168	0.070	----a	----a	----a
20	----a	0.186	0.142	----a	----a	----a	----a

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Table 6. pH Values During a 21-Day Flow-through Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to Di-i-butyl Phthalate

Nominal Concentration (mg/L)	pH									
	0 Day	1 Day	4 Day	6 Day	8 Day	11 Day	14 Day	16 Day	19 Day	21 Day
Control	7.3	7.3	7.1	7.3	7.2	7.4	7.2	7.3	7.4	7.8
Dispersant Control	7.3	7.3	7.0	7.1	7.0	7.3	7.0	7.2	7.3	7.5
0.30	7.3	7.3	6.9	7.1	7.0	7.2	7.0	7.2	7.2	7.5
0.67	7.3	7.3	7.0	7.0	7.0	7.2	6.9	7.1	7.2	7.4
1.70	7.3	7.3	6.9	7.0	6.9	7.2	6.9	7.1	7.1	7.4
4.09	7.3	7.3	6.9	7.0	7.0	7.2	6.9	7.1	7.1	7.3
11.1	7.3	7.2	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations During a 21-Day Flow-through Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to Di-
i-butyl Phthalate

Nominal Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)									
	0 Day	1 Day	4 Day	6 Day	8 Day	11 Day	14 Day	16 Day	19 Day	21 Day
Control	9.7	8.4	8.5	8.2	8.2	8.4	7.5	7.5	7.2	7.2
Dispersant Control	10.0	8.3	8.4	8.1	7.9	8.4	7.6	8.0	7.6	7.4
1										
0.30	10.1	8.4	8.5	8.4	8.3	8.6	7.9	8.3	8.2	8.3
0.67	10.2	8.7	8.7	8.4	8.3	8.8	7.8	8.0	7.7	8.0
1.70	10.0	8.7	8.6	8.3	8.0	8.7	7.7	7.9	7.5	7.7
4.09	10.2	8.9	8.9	8.6	8.3	9.1	8.0	8.4	8.2	8.4
11.1	10.1	7.4	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a

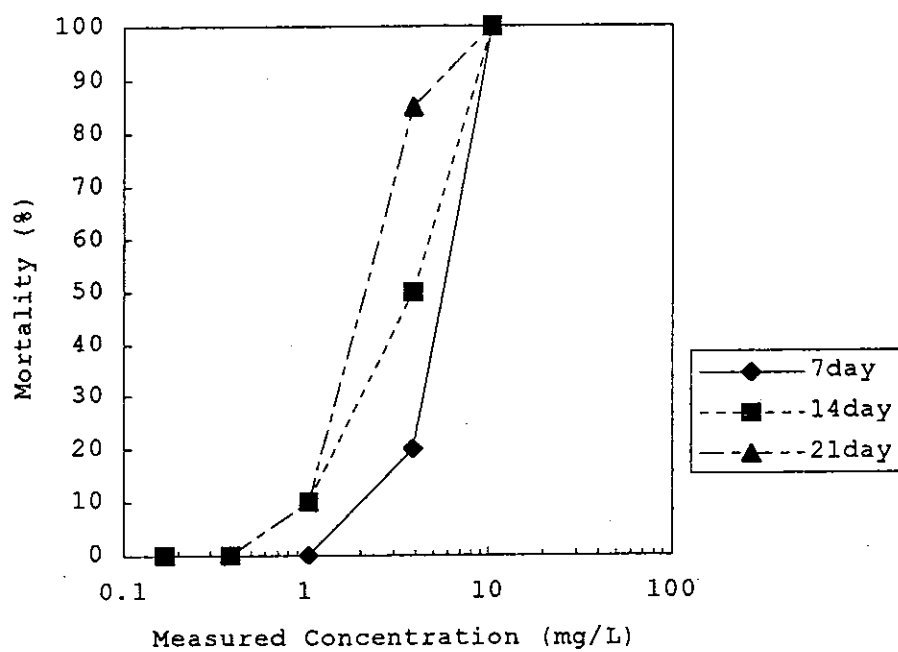
^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Table 8. Temperature Values During a 21-Day Flow-through Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to Di-i-butyl Phthalate

Nominal Concentration (mg/L)	Temperature (°C)									
	0 Day	1 Day	4 Day	6 Day	8 Day	11 Day	14 Day	16 Day	19 Day	21 Day
Control	23.3	23.6	23.6	23.4	23.1	23.7	23.5	23.6	23.9	24.2
Dispersant Control	23.5	23.4	23.1	23.1	23.7	23.5	23.3	23.4	23.6	24.1
0.30	23.6	23.4	23.1	23.2	23.2	23.7	23.5	23.4	23.6	24.1
0.67	23.6	23.5	23.4	23.4	23.5	23.8	23.5	23.3	23.6	24.1
1.70	23.6	23.5	23.4	23.4	23.4	23.7	23.4	23.3	23.6	24.0
4.09	23.7	23.4	23.2	23.4	23.4	23.8	23.3	23.2	23.7	24.2
11.1	23.7	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Figure 1. Concentration-Response Curve of Di-i-butyl Phthalate
Mortality in Orange killifish (*Oryzias latipes*)



付属資料－ 1

希釈水の水質
(全 1 頁)

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	0.8 mg/L
COD	0.6 mg/L
Mercury	<0.003 mg/L
Copper	<0.005 mg/L
Cadmium	<0.02 mg/L
Zinc	<0.03 mg/L
Lead	<0.2 mg/L
Chromium	<0.05 mg/L
Iron	<0.005 mg/L
Free chlorine	<0.05 mg/L
Fluoride	<0.05 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.001 mg/L
Evaporation residue	48.0 mg/L
Electric conductivity	8.9 mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	19.7 mg/L
Alkalinity	14.9 mg/L
Total organophosphorus compounds	<0.1 mg/L
Herbicide 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

各試験水槽より試験水 0.5～1.5 mL をバイアルに採取する。

測定濃度が 20 mg/L を越える場合は予め移動相で希釈する。

HPLC の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, 4.6 mm ϕ \times 150 mm

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

移動相 : 水/アセトニトリル = 13/87

流量 : 1.0 mL/min

注入量 : 20～100 μ L

3 検量線

標準原液を希釈して定量限界付近から予想測定濃度が含まれる 5 ポイント以上の標準液を用意し、検量線を求め、傾きと直線性を確認した。

測定日毎に標準溶液 (2 ポイント以上) の測定を行い、相対誤差 10 % 以内であればこの検量線により定量する。相対誤差 10 % を越えた場合は検量線を作成し直す。

[Figure 1(p. 27)]

4 添加回収試験

助剤対照液に標準原液もしくはこれを希釈して調製した標準液の一定量を添加して回収率を求めた。

フタル酸ジ-*i*-ブチル 1.07 mg/L の回収率は 100.7 %、10.93 mg/L の回収率は 100.1 % であった。

Figure 1. Calibration Curve of Di-i-butyl Phthalate by HPLC Analysis

Input Data

No	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU·sec)
1	0	0
2	0.2	0.82874
3	0.5	2.18561
4	1.0	3.90248
5	2.0	7.78383
6	5.0	19.89033
7	10.0	37.72279

$$Y(\text{Peak Area}) = 3.81770 X(\text{Concentration})$$

$$r = 1.000$$

r : coefficient of correlation

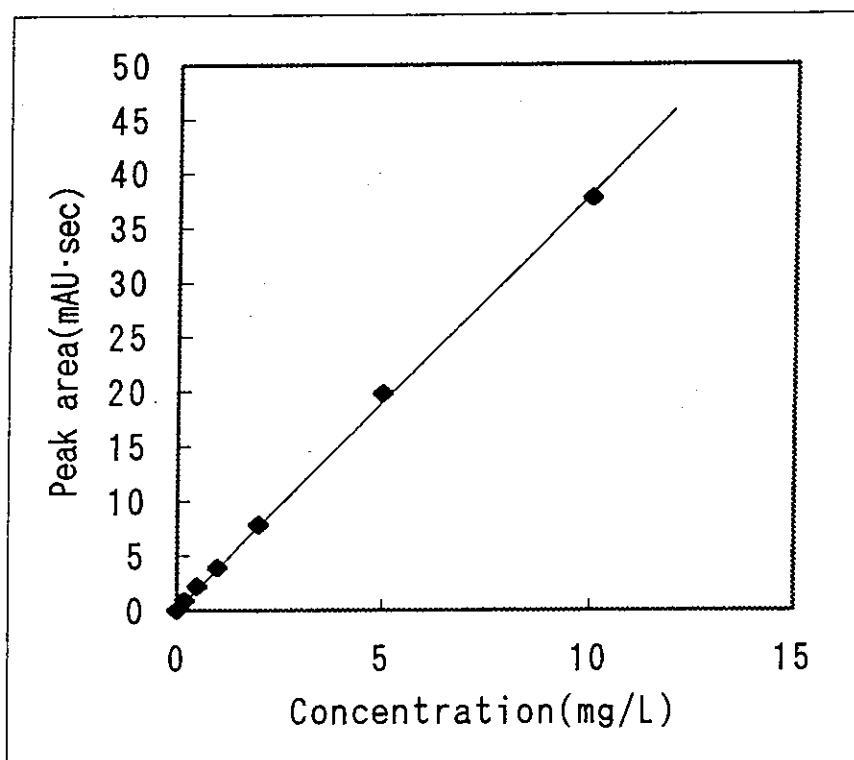


Figure 2. Representative chromatograms

(1) Standard 1.07 mg/L

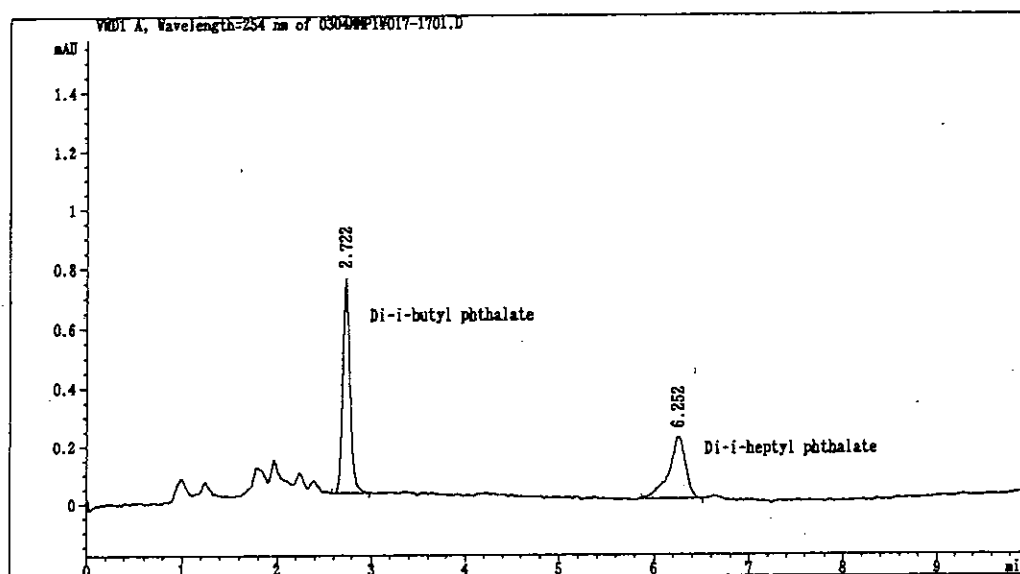
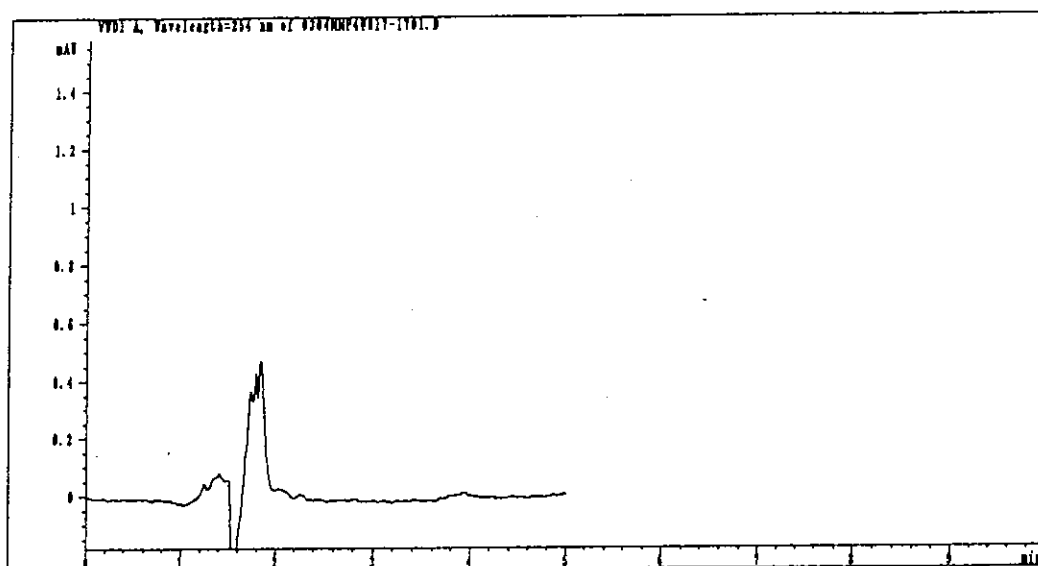


Figure 2. Continued

(2) Control ; Day 0



(3) Dispersant Control; Day 0

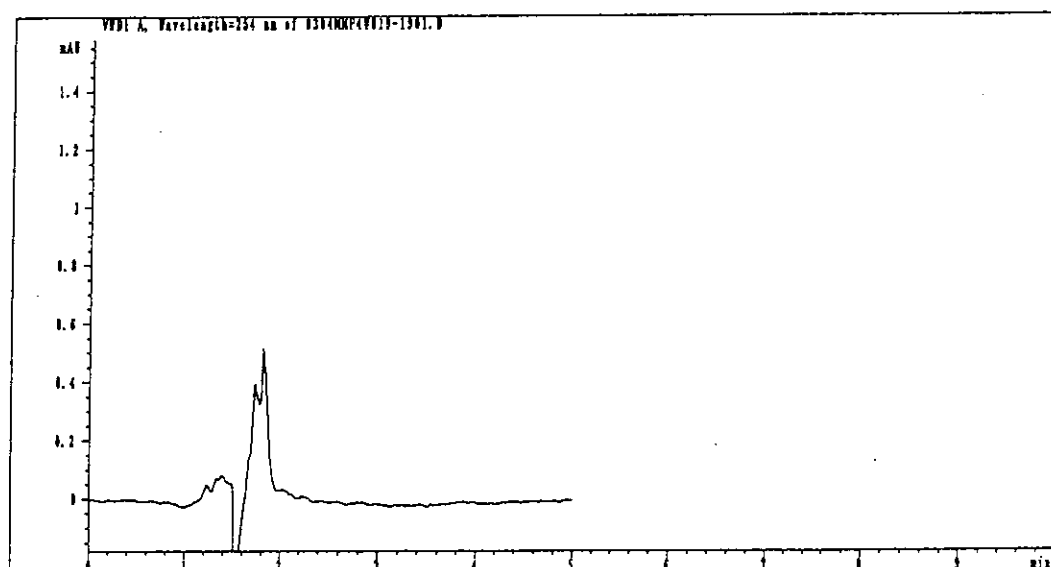
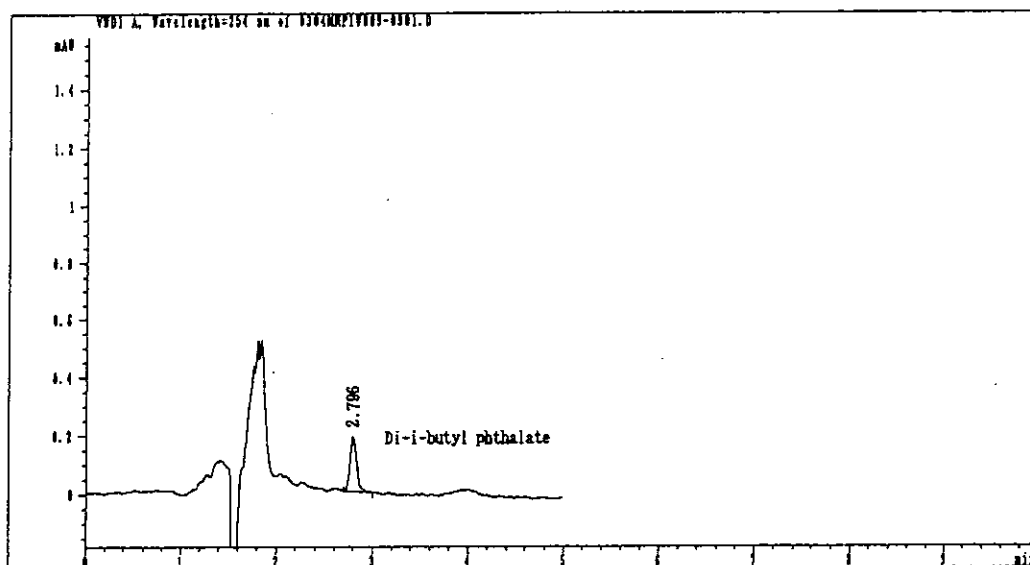


Figure 2. Continued

(4) 0.30 mg/L nominal; Day 0



(5) 0.30 mg/L nominal; Day 21

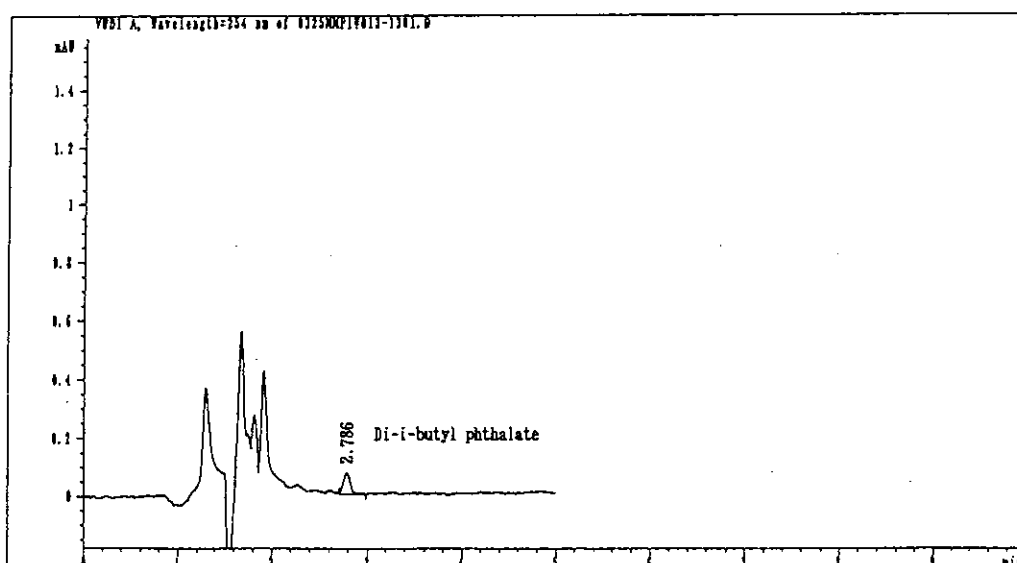
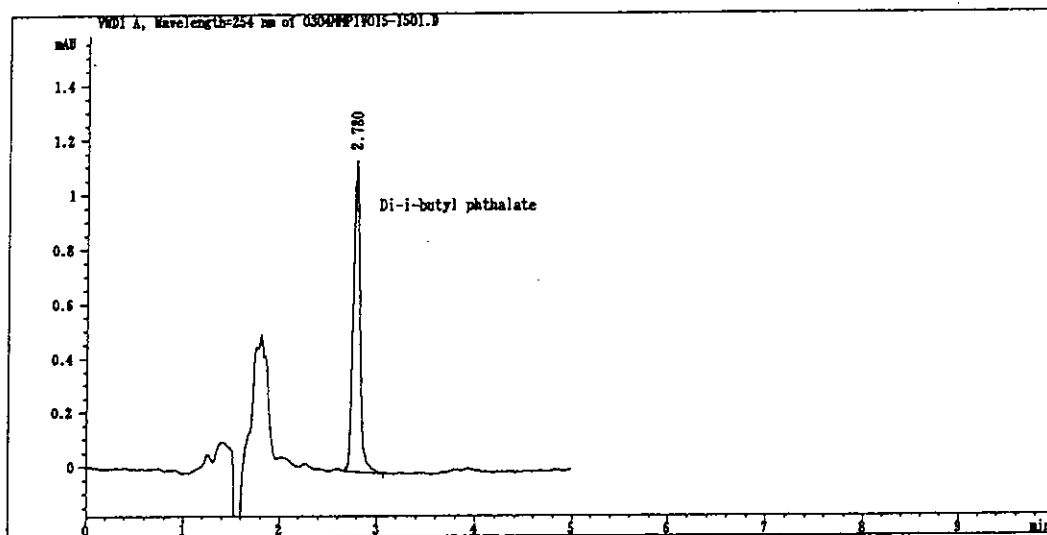


Figure 2. Continued

(6) 1.70 mg/L nominal; Day 0



(7) 1.70 mg/L nominal; Day 21

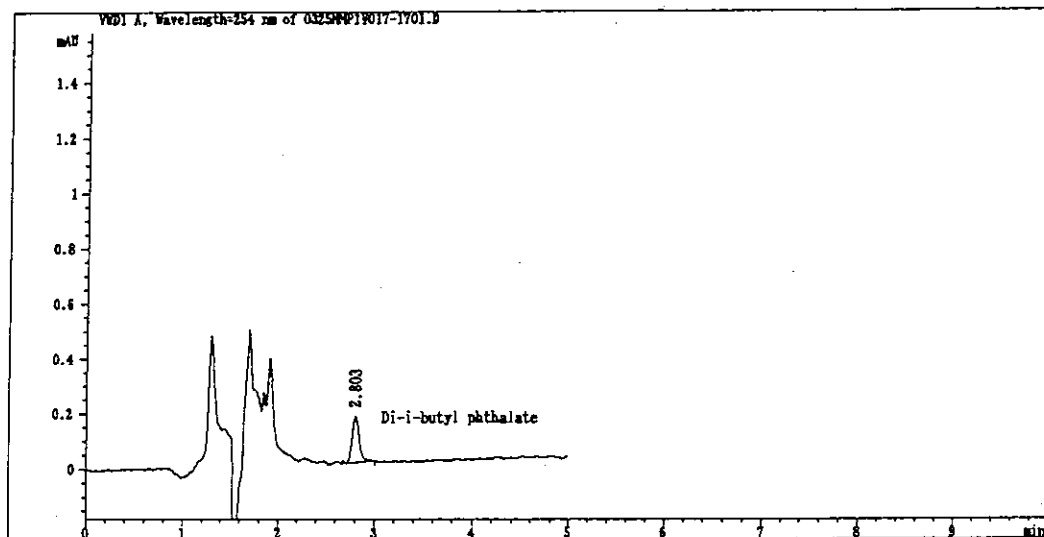


Figure 2. Continued

(8) 11.1 mg/L nominal; Day 0

