

# 試 験 報 告 書

ビスフェノールA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：第 1 0 0 9 2 号)

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

# 目 次

	頁
試験概要 -----	1
要 旨 -----	3
1 被験物質 -----	4
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状 -----	4
1.2 供試試料 -----	4
1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性 -----	4
2 供試生物 -----	5
2.1 供試生物 -----	5
2.2 供試する幼体を得るための飼育方法 -----	5
3 試験方法 -----	5
3.1 試験条件 -----	5
3.2 希釈水 -----	6
3.3 試験容器, 恒温室及び測定機器等 -----	6
3.4 試験濃度の設定 -----	6
3.5 試験水の調製 -----	6
3.6 試験水の分析 -----	6
3.7 試験操作 -----	7
4 結果の算出 -----	7
4.1 50 %遊泳阻害濃度 (EiC <sub>50</sub> ) -----	7
4.2 最大無作用濃度 (NOECi) 及び100 %阻害最低濃度 -----	7
5 結果 -----	7
5.1 試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 -----	7
5.2 試験水中の被験物質濃度 -----	7
5.3 遊泳阻害数及び遊泳阻害率 -----	8
5.4 EiC <sub>50</sub> 値 -----	8
5.5 NOECi及び100 %阻害最低濃度 -----	8
5.6 試験水のpH, DO及び水温 -----	8
Table 1～7 -----	9～14
Figure 1 -----	15
付属資料－1 -----	希釈水の水質
付属資料－2 -----	試験水の分析方法

## 陳述書

試験委託者： 環境庁

試験の表題： ビスフェノールA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： 第10092号

上記試験は、環境庁GLP規則「生態影響試験実施に関する基準」を遵守して実施したものである。

1999 年 7 月 30 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

運営管理者



## 信 頼 性 保 証 証 明 書

試験委託者： 環境庁

試験の表題： ビスフェノールA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： 第10092号

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、本報告書には試験に用いた方法、手順が正確に記載されており、試験結果は試験の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。

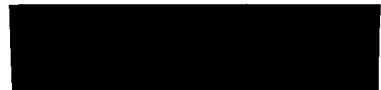
### 記

	実施日	試験責任者及び 運営管理者への報告日
査察実施期間	1999年 1月20日 ～1999年 7月30日	1999年 1月20日 ～1999年 7月30日
試験報告書監査	1999年 7月30日	1999年 7月30日

1999 年 7 月 30 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

信頼性保証責任者



## 試験概要

### 1 表題

ビスフェノールA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

ビスフェノールA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及び48時間後の50 %遊泳阻害濃度 (EiC<sub>50</sub>) 及び最大無作用濃度 (NOECi) 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 202「ミジンコ類，急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年) に準拠した。

### 4 適用GLP

本試験は環境庁GLP規則「生態影響試験実施に関する基準」に従い実施した。

### 5 試験委託者

- 1) 名 称：環境庁
- 2) 住 所：東京都千代田区霞が関 1丁目 2番 2号
- 3) 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

### 6 試験受託者

- 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター
- 2) 所 在 地：東京都渋谷区元代々木町52番 1号
- 3) 代 表 者：

### 7 試験施設

- 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
- 2) 所 在 地：東京都多摩市永山 6丁目11番10号
- 3) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所別館
- 4) 所 在 地：東京都多摩市永山 6丁目21番 6号

8 試験関係者

試験責任者

[Redacted]

(1999年7月30日)

生物担当責任者

[Redacted]

(1999年7月30日)

生物系試験担当者

[Redacted]

(1999年7月30日)

[Redacted]

(1999年7月30日)

[Redacted]

(1999年7月30日)

分析担当責任者

[Redacted]

(1999年7月30日)

理化学系分析担当者

[Redacted]

(1999年7月30日)

[Redacted]

(1999年7月30日)

9 試験期間

試験開始日：平成11年 1月20日

試験終了日：平成11年 7月30日

曝露期間：平成11年 5月18日～平成11年 5月20日

10 保管

試験計画書、生データ、記録文書及び試験報告書は、試験報告書作成後10年間、財団法人日本食品分析センター多摩研究所資料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。

## 要 旨

### 試験委託者

環境庁

### 表 題

ビスフェノールA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

第 1 0 0 9 2 号

### 試験方法

本試験はOECD化学品テストガイドライン 202「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験及び繁殖試験」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質: ビスフェノールA
- 2) 曝露方法: 止水式
- 3) 曝露期間: 48時間
- 4) 連 数: 1濃度区 4連
- 5) 供試生物: オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 6) 生 物 数: 20頭/濃度区 (1連 5頭, 1濃度区 20頭)
- 7) 試験水量: 100 ml/1連
- 8) 試験水温:  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 9) 照 明: 室内光, 16時間明/8時間暗
- 10) 試験濃度: 対照区, 5.6, 10, 18, 32及び56 mg/l
- 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 (曝露開始時及び終了時)

### 結 果

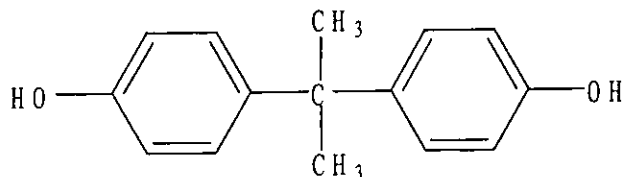
下記の結果は設定濃度より算出した。

- 1) 50 %遊泳阻害濃度 ( $\text{EC}_{50}$ )  
 $\text{EC}_{50}(24\text{hr})$ : 15 mg/l (Binominal法)  
 $\text{EC}_{50}(48\text{hr})$ : 13 mg/l (Binominal法)
- 2) 最大無作用濃度 ( $\text{NOECi}$ )  
 $\text{NOECi}(48\text{hr})$ : 5.6 mg/l
- 3) 100 %阻害最低濃度 (48hr): 18 mg/l

## 1 被験物質

### 1.1 名称，構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称：ビスフェノールA
- 2) 化学名：4,4'-イソプロピリデンジフェノール
- 3) 英 名：Bisphenol A (4,4'-Isopropylidenediphenol) (CAS No. 80-05-7)
- 4) 構造式：



- 5) 化学式： $(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{C}_6\text{H}_4\text{OH})_2$
- 6) 分子量：228.29
- 7) 安定性：－
- 8) pKa：－
- 9) logP<sub>ow</sub>：－
- 10) 水への溶解度：難溶
- 11) 蒸気圧：－

### 1.2 供試試料

- 1) 供給者：[REDACTED]
- 2) 入手日：1998年12月14日
- 3) ロット番号：007D2131
- 4) 外 観：白色粒状
- 5) 純 度：99.9 %
- 6) 供給量：250 g

### 1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

#### 1) 保管方法

被験物質は財団法人日本食品分析センター多摩研究所の被験物質保管庫(遮光，室温)に保管した。

#### 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。よって，被験物質は多摩研究所の被験物質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

### 2.1 供試生物

試験に供したオオミジンコ (*Daphnia magna*) を下記に示した。供試ミジンコは生後24時間以内の幼体を用いた。

供試ミジンコの基準物質(重クロム酸カリウム, 試薬特級)による急性遊泳阻害試験を行い, 48時間 $EC_{50}$ 値は0.42 mg/l(平成10年10月28日実施)及び0.44 mg/l(平成11年6月8日実施)であった。

- 1) 和 名 : オオミジンコ
- 2) 学 名 : *Daphnia magna*
- 3) 発育段階 : 生後24時間以内
- 4) 入 手 先 : 国立環境研究所(1998年6月23日)より入手したものを, 財団法人日本食品分析センターにおいて継代飼育している種である。

### 2.2 供試する幼体を得るための飼育方法

継代中のものから卵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, 別に用意した容器に移した。翌日, 産出された幼体を順化用容器(1 l容ガラス製ビーカー)に分け, この幼体を供試ミジンコ(以下「ミジンコ」と称す。)の親とし, 以下の条件で2~4週間飼育した。成熟し幼体を産むようになったら1週間に3回幼体を除去した。2~4週間後, 曝露開始前日に順化用容器から幼体を除去し, 翌日(24時間以内)産出された幼体を試験に用いた。なお, ミジンコに異常が認められた容器, 死亡個体の多い容器, 休眠卵や雄が生じた容器のミジンコは使用しなかった。

- 1) 飼 育 水 : 希釈水(3.2参照)
- 2) 飼育密度 : 20~50頭/l(成熟個体の場合は, 25頭以下/l)
- 3) 飼育水温 :  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 4) 照 明 : 室内光, 16時間明/8時間暗
- 5) 給 餌 : *Chlorella vulgaris*
- 6) 給 餌 量 : ミジンコ1頭当たり約0.15 mgC(有機体炭素)/日

## 3 試験方法

### 3.1 試験条件

- 1) 曝露方法 : 止水式
- 2) 曝露期間 : 48時間
- 3) 連 数 : 1濃度区 4連
- 4) 生 物 数 : 20頭/濃度区(1連 5頭, 1濃度区 20頭)
- 5) 試験水量 : 100 ml/1連
- 6) 試験水温 :  $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 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

希釈水は脱塩素水(つくば市水道水を曝気処理し、残留塩素を除去したもの。)を使用した。なお、定期測定による希釈水の水質結果を付属資料-1に示した。

試験に使用した希釈水のpH及び硬度はそれぞれ7.8及び71 mg/l( $\text{CaCO}_3$ 換算)であった。

### 3.3 試験容器，恒温室及び測定機器等

- 1) 試験容器：270 ml容ガラス製密封瓶
- 2) 恒温室：21.84R-4410[日立冷熱株式会社]
- 3) 温度計：AP-210[安立計器株式会社]
- 4) pH計：HM-14P[東亜電波工業株式会社]
- 5) 溶存酸素計：DO-14P[東亜電波工業株式会社]
- 6) 残留塩素比色測定器：OT-I型[理研光学株式会社]

### 3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち、1.0、10及び56 mg/lの濃度区を設定し、予備試験を行った。本試験は56 mg/l以下の濃度を公比1.8で5段階設定した。各濃度区は以下の通りであった。

対照区，5.6，10，18，32及び56 mg/l

### 3.5 試験水の調製

被験物質を水に溶解させて被験物質原液及び溶液を調製し、希釈水に添加して試験水を調製した。また、希釈水のみを対照区を設定した。

### 3.6 試験水の分析

全濃度区について、曝露開始時及び終了時(48時間後)に試験水を採取した。

試験水の採取方法は、曝露開始時では分析用を含めた量の試験水を調製し、そこから50 ml採取して分析用試験水とした。また、終了時は各濃度区の試験容器(4連/濃度区)から試験水を適量採取し、等量混合して50 mlを分析用試験水とした。

分析用試験水は速やかに高速液体クロマトグラフを用いて分析を行った。試験水の分析に際しては、標準溶液のピーク面積を用いて検量線を作成し、試験水より得られたピーク面積から試験水中の被験物質濃度を算出した。なお、詳細は付属資料-2に示した。

### 3.7 試験操作

曝露開始時に順化用容器から生後24時間以内のミジンコの幼体を採取し、試験に用いた。

各濃度区のpH、溶存酸素濃度(DO)及び水温を測定後、比較的広口のガラスピペットを用いてミジンコを各試験容器に5頭ずつ(1濃度区当たり20頭)投入した。その際、試験水量に対して、ピペット内の飼育水は全量で1 %以内を目安とした。各試験容器を $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ の恒温室に設置した(試験条件は3.1参照)。

曝露開始時より24及び48時間後にミジンコの遊泳阻害数の観察を行った。遊泳阻害は、試験容器を穏やかに動かした後、15秒間泳げない個体とした(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。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。)

曝露終了時に各濃度区のpH、DO及び水温を測定した(全濃度区、各1容器)。

## 4 結果の算出

### 4.1 50 %遊泳阻害濃度( $\text{EiC}_{50}$ )

各濃度区のミジンコの遊泳阻害数及び死亡数と供試個体数(20頭)から遊泳阻害率(%)を算出し、統計的手法により24及び48時間後の $\text{EiC}_{50}$ 値を算出した。

### 4.2 最大無作用濃度( $\text{NOECi}$ )及び100 %阻害最低濃度

全てのミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度区の濃度を $\text{NOECi}$ とし、全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度区の濃度を100 %阻害最低濃度とした。

## 5 結果

### 5.1 試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因なし。

### 5.2 試験水中の被験物質濃度

曝露開始時及び終了時(48時間後)における試験水中の被験物質濃度は、それぞれ $5.66 \sim 58.0 \text{ mg/l}$ (設定濃度： $5.6 \sim 56 \text{ mg/l}$ )、 $5.37 \sim 17.6 \text{ mg/l}$ (設定濃度： $5.6 \sim 18 \text{ mg/l}$ )であり、設定濃度に対する割合は96～106 %であった。但し、32及び56 mg/l濃度区は24時間後に全数死亡したため、その時点で測定を行った。その時の被験物質濃度は30.6及び54.1 mg/lであり、設定濃度に対する割合は96及び97 %であった。よって、実測濃度は設定濃度の $\pm 20 \%$ を維持できた。

[Table 1 (p. 9), 付属資料-2]

### 5.3 遊泳阻害数及び遊泳阻害率

被験物質に48時間曝露したミジンコの遊泳阻害数及び遊泳阻害率は、18 mg/l濃度区以上において20頭(100 %)であった。また、5.6 mg/l濃度区は0頭(0 %)であった。

なお、対照区におけるミジンコが水面に浮く率は0 %、遊泳阻害率は0 %であり、試験成立条件である10 %以下の基準を共に満たした。

[Table 2 (p.10)]

### 5.4 $EiC_{50}$ 値

被験物質の設定濃度に基づく24時間の $EiC_{50}$ 値は15 mg/l(Binomial法)であった。また、48時間の $EiC_{50}$ 値は13 mg/l(Binomial法)であった。

なお、統計解析にはToxdat multi-method program(EPA/600/4-85/013, p. 205-216)を用いた。

[Table 3 (p.11), Figure 1 (p.15)]

### 5.5 NOECi及び100 %阻害最低濃度

48時間のNOECiは5.6 mg/l(以下設定濃度)であり、100 %阻害最低濃度は18 mg/lであった。

[Table 4 (p.11), Figure 1 (p.15)]

### 5.6 試験水のpH、D0及び水温

各濃度区の曝露開始時のpHは7.7～7.9、D0は9.1 mg/l及び水温は19.6～19.7℃であった。また、終了時のpHは7.7～7.8、D0は9.0～9.1 mg/l及び水温は19.6～19.9℃であった。よって、全ての試験容器でD0は飽和溶存酸素濃度(20.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.8 mg/l)の60 %以上であり、水温は設定範囲内(20±1℃)であった。

[Table 5 (p.12), Table 6 (p.13), Table 7 (p.14)]

以 上

Table 1. Measured concentrations of the test solutions of  
Bisphenol A in the 48-hour acute immobilisation test  
on *Daphnia magna* under the static test conditions

Nominal Concentration (mg/l)	Measured concentration(mg/l)		Time-weighted Mean (mg/l)	Percentage of nominal	
	0 hour Fresh	48 hours Old		0 hour Fresh	48 hours Old
Control	< 0.015	< 0.015	----	---	---
5.6	5.66	5.37	5.51	101	96
10	10.6	9.89	10.2	106	99
18	19.1	17.6	18.3	106	98
32	34.0	30.6 <sup>d</sup>	32.3	106	96 <sup>d</sup>
56	58.0	54.1 <sup>d</sup>	56.0	104	97 <sup>d</sup>

Fresh: Start of test

Old: End of test

d : Test solutions after 24 hours because all *Daphnia magna* were dead at  
this period.

Table 2. The cumulative number of deaths or immobility among *Daphnia magna*

Nominal Concentration (mg/l)	Cumulative number of deaths or immobility among <i>Daphnia magna</i> (Cumulative percentage mortality or immobility)	
	24 hours	48 hours
Control	0 ( 0)	0 ( 0)
5.6	0 ( 0)	0 ( 0)
10	0 ( 0)	1 ( 5)
18	17 ( 85)	20 (100)
32	20 (100)	20 (100)
56	20 (100)	20 (100)

Table 3. Calculated  $EiC_{50}$  values (based on nominal concentration)

Exposure Period (hours)	$EiC_{50}$ (mg/l)	95 % confidence limits (mg/l)	Statistical method
24	15	not calculated	Binominal
48	13	not calculated	Binominal

Table 4. No observed effective concentration (NOECi) and lowest concentration in 100 % mortality or immobility values (based on nominal concentration)

Exposure Period (hours)	NOECi (mg/l)	Lowest concentration in 100 % mortality or immobility (mg/l)
24	10	32
48	5.6	18

Table 5. The pH values of the test solutions in the 48-hour acute immobilisation test on *Daphnia magna* under the static test conditions

Nominal Concentration (mg/l)	pH	
	0 hour Fresh	48 hours Old
Control	7.2	7.5
5.6	7.7	7.8
10	7.8	7.8
18	7.9	7.8
32	7.9	7.7 <sup>d</sup>
56	7.9	7.7 <sup>d</sup>

Fresh: Start of test

Old: End of test

d : Test solutions after 24 hours because all *Daphnia magna* were dead at this period.



Table 6. Dissolved oxygen concentrations(DO) of the test solutions in the 48-hour acute immobilisation test on *Daphnia magna* under the static test conditions

Nominal Concentration (mg/l)	DO (mg/l)	
	0 hour Fresh	48 hours Old
Control	9.3	9.3
5.6	9.1	9.0
10	9.1	9.0
18	9.1	9.1
32	9.1	9.0 <sup>d</sup>
56	9.1	9.1 <sup>d</sup>

Fresh: Start of test

Old: End of test

d : Test solutions after 24 hours because all *Daphnia magna* were dead at this period.

Table 7. The temperature values of the test solutions in the 48-hour acute immobilisation test on *Daphnia magna* under the static test conditions

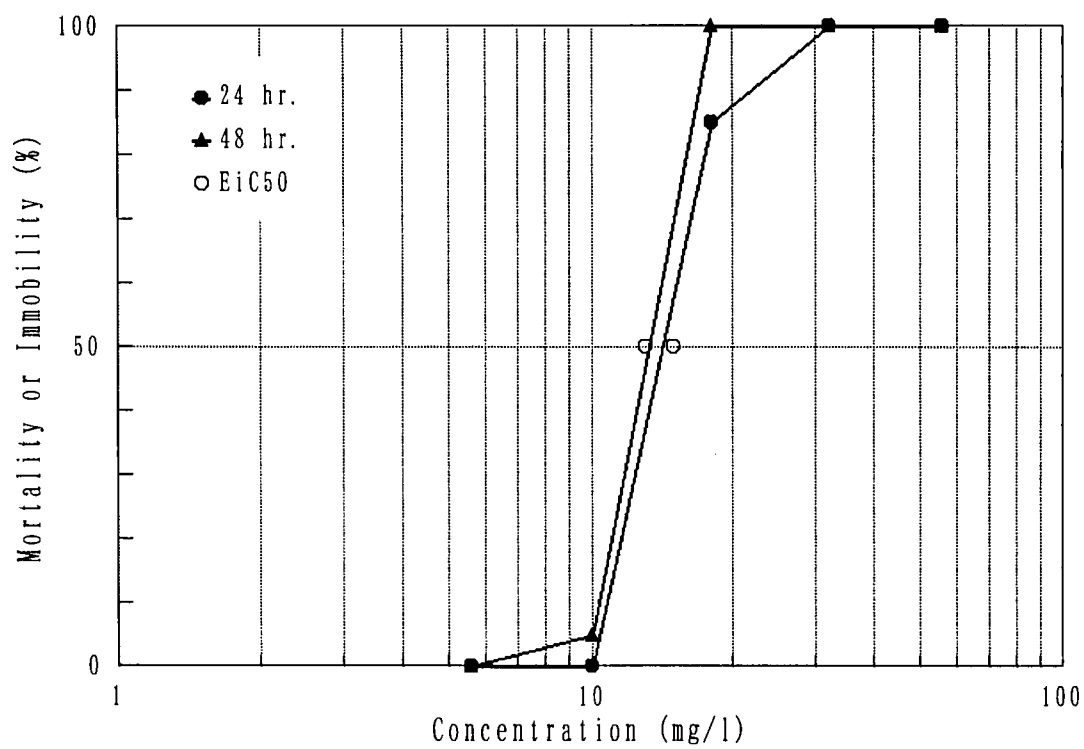
Nominal Concentration (mg/l)	Temperature (°C)	
	0 hour Fresh	48 hours Old
Control	19.3	19.6
5.6	19.7	19.6
10	19.6	19.7
18	19.6	19.7
32	19.6	19.9 <sup>d</sup>
56	19.7	19.9 <sup>d</sup>

Fresh: Start of test

Old: End of test

d : Test solutions after 24 hours because all *Daphnia magna* were dead at this period.

Figure 1. Concentration-response curve of Bisphenol A mortality or immobility in *Daphnia magna*



## 付属資料－ 1

希釈水の水質  
(全 2 頁)

Water Quality of Dilution Water-1

Parameter	Concentration
Coliform group	ND
Cadmium	< 0.001 mg/l
Mercury	< 0.0001 mg/l
Selenium	< 0.001 mg/l
Lead	< 0.005 mg/l
Arsenic	< 0.001 mg/l
Chromium(VI)	< 0.005 mg/l
Cyanide	< 0.005 mg/l
Nitrate and Nitrite	0.3 mg/l
Fluoride	0.14 mg/l
Carbon tetrachloride	< 0.0002 mg/l
1,2-Dichloroethane	< 0.0002 mg/l
1,1-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l
Dichloromethane	< 0.001 mg/l
cis-1,2-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l
Tetrachloroethylene	< 0.001 mg/l
1,1,2-Trichloroethane	< 0.0005 mg/l
Trichloroethylene	< 0.001 mg/l
Benzene	< 0.001 mg/l
Chloroform	0.011 mg/l
Dibromochloromethane	0.028 mg/l
Bromochloromethane	0.019 mg/l
Bromoform	0.017 mg/l
Trihalomethanes	0.075 mg/l
1,3-Dichloropropene	< 0.0002 mg/l
Simazine	< 0.0002 mg/l
Thiram	< 0.0005 mg/l
Thiobencarb	< 0.001 mg/l

Date : April 8, 1999

- continue -

# Water Quality of Dilution Water-2

Parameter	Concentration
Zinc	< 0.005 mg/l
Iron	< 0.03 mg/l
Copper	< 0.01 mg/l
Sodium	31 mg/l
Manganese	< 0.005 mg/l
Chloride	51 mg/l
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	79 mg/l
Total residue	210 mg/l
Surface active agents (anionic)	< 0.02 mg/l
1,1,1-Trichloroethane	< 0.001 mg/l
Phenols	< 0.005 mg/l
Permanganate reduction substances	2.2 mg/l
pH Value	7.2
Taste	normal
Odor	normal
Color	< 1°
Turbidity	< 1°
Phosphorus	0.04 mg/l
Aluminium	< 0.05 mg/l
Nickel	< 0.001 mg/l
Tin	< 0.1 mg/l
Free residual chlorine	< 0.01 mg/l
Bromide	< 0.5 mg/l
Sulfide	< 0.01 mg/l
Ammonium	< 0.05 mg/l
Electric conductivity	330 μS/cm
Alkalinity (as CaCO <sub>3</sub> )	44 mg/l
Potassium	5.5 mg/l
Calcium	19 mg/l
Magnesium	7.7 mg/l
PCB	< 0.0005 mg/l
Organophosphate	< 0.02 mg/l

Date : April 8, 1999

## 付属資料－ 2

試験水の分析方法  
(全9頁)

## 試験水の分析方法

### 1 試験方法

#### 1-1 試料溶液の調製

##### 1) 対照区の試験水

試験水を試料溶液とした。

##### 2) 5.6 mg/l濃度区の試験水

試験水1 mlを50 mlのメスフラスコに正確に量り，水を加えて定容し，これを試料溶液とした。

##### 3) 10 mg/l濃度区の試験水

試験水1 mlを100 mlのメスフラスコに正確に量り，水を加えて定容し，これを試料溶液とした。

##### 4) 18 mg/l濃度区の試験水

試験水1 mlを10 mlのメスフラスコに正確に量り，水を加えて定容した。この液1 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り，水を加えて定容し，これを試料溶液とした。

##### 5) 32 mg/l濃度区の試験水

試験水1 mlを10 mlのメスフラスコに正確に量り，水を加えて定容した。この液1 mlを25 mlのメスフラスコに正確に量り，水を加えて定容し，これを試料溶液とした。

##### 6) 56 mg/l濃度区の試験水

試験水1 mlを10 mlのメスフラスコに正確に量り，水を加えて定容した。この液1 mlを50 mlのメスフラスコに正確に量り，水を加えて定容し，これを試料溶液とした。



### 1-2 標準溶液の調製

標準品0.050 gを精密に量りとり、メタノールに溶解して50 mlとし、これを標準原液とした。この標準原液から水を用いて適宜希釈し、0.015, 0.05, 0.1及び0.2 µg/mlの標準溶液を調製した。

### 1-3 定量

試料溶液20 µlを高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク面積と検量線から試料溶液中のビスフェノールA濃度を求め、試験水中のビスフェノールA濃度を算出した。

## 2 高速液体クロマトグラフ操作条件

機 種：PU-1580[日本分光株式会社]

検 出 器：FP-920S[日本分光株式会社]

カ ラ ム：YMC-Pack ODS-A A-312 φ6 mm×15 cm

移 動 相：アセトニトリル-水 (1:1 V/V)

測定波長：Ex 275 nm, Em 317 nm

流 速：1.0 ml/分

注 入 量：20 µl

データ処理装置：C-R7A plus[株式会社 島津製作所]

## 3 検量線

1-2で調製した標準溶液20 µlを高速液体クロマトグラフに注入し、濃度と得られたピーク面積から検量線を作成した。

## 4 添加回収試験

### 4-1 低濃度添加

飼育水に濃度が4.8 mg/lになるようにビスフェノールAを添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は97.7 %, 97.7 %及び97.7 %(平均97.7 %)であった。

### 4-2 高濃度添加

飼育水に濃度が60 mg/lになるようにビスフェノールAを添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は98.7 %, 98.8 %及び98.0 %(平均98.5 %)であった。

Figure 1. Calibration curve of Bisphenol A by HPLC analysis

Amount (ng)	Peak Area (μV·sec)
4	762067
2	374959
1	184012
0.3	56432

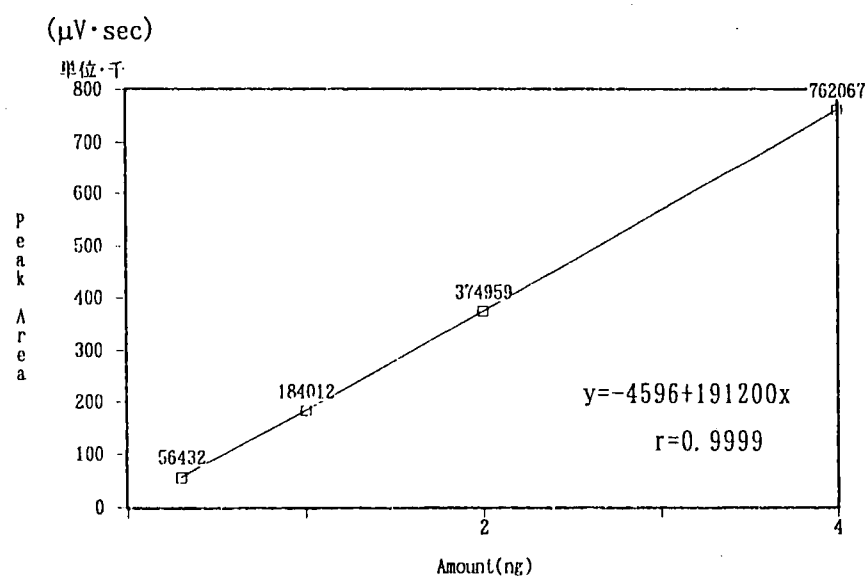
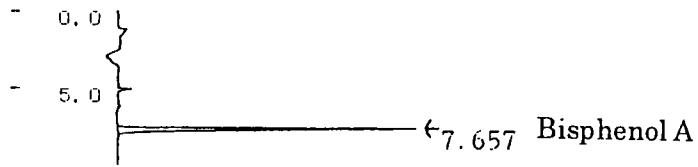


Figure 2. Representative chromatogram

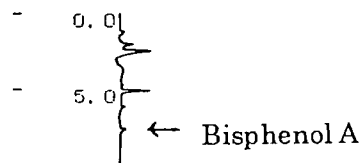
Standard (0.1 µg/ml): 0 hour



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.657	<u>374959</u>	35726			100	
TOTAL			374959	35726			100	

Control: 0 hour



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
TOTAL			0	0			0	

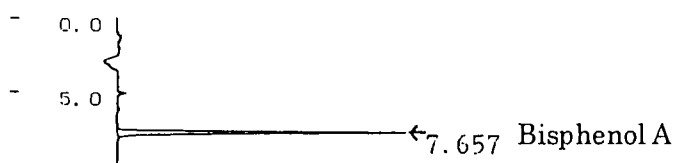
Test solution (5.6 mg/l): 0 hour



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.661	<u>427516</u>	40374			100	
TOTAL			427516	40374			100	

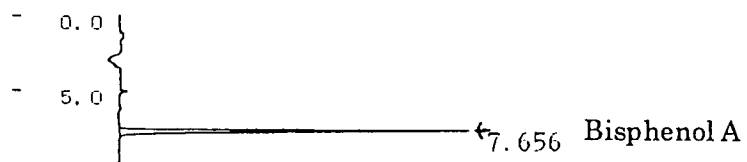
Test solution (18 mg/l): 0 hour



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.657	<u>360706</u>	34487			100	
TOTAL			360706	34487			100	

Test solution (56 mg/l): 0 hour



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.656	<u>438429</u>	41983			100	
TOTAL			438429	41983			100	

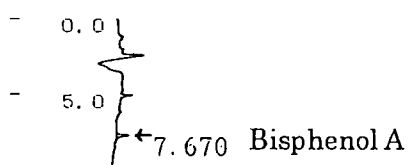
Standard (0.1 $\mu$ g/ml): 48 hours



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.673	<u>378143</u>	36627			100	
TOTAL			378143	36627			100	

Control: 48 hours



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.67	<u>15762</u>	1568			100	
TOTAL			15762	1568			100	

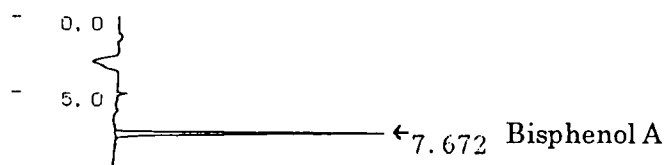
Test solution (5.6 mg/l): 48 hours



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.675	<u>413112</u>	39262			100	
TOTAL			413112	39262			100	

Test solution (18 mg/l): 48 hours



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.672	<u>338665</u>	32222			100	
TOTAL			338665	32222			100	

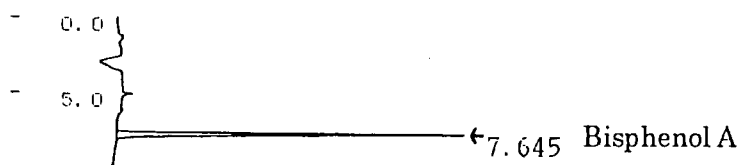
Standard (0.1 $\mu$ g/ml): 24 hours



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.657	<u>383434</u>	<u>37127</u>			100	
TOTAL			383434	37127			100	

Test solution (56 mg/l): 24 hours



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.645	<u>428274</u>	<u>41760</u>			100	
TOTAL			428274	41760			100	