

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

1,2,3-トリクロロベンゼンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号：7 B 7 8 4 G)

1998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： 1,2,3-トリクロロベンゼンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する  
急性毒性試験

試験番号： 7 B 7 8 4 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。

1 9 9 8 年 3 月 3 1 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： 1,2,3-トリクロロベンゼンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する  
急性毒性試験

試験番号： 7 B 7 8 4 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<br>試験責任者への報告日 |
|----------|-------------|------------------------|
| 試験実施状況査察 | 1998年 2月 2日 | 1998年 2月 2日 ( )        |
|          | 1998年 2月 6日 | 1998年 2月 6日            |
| 試験報告書監査  | 1998年 3月31日 | 1998年 3月31日            |

1998年 3月31日

信頼性保証担当者：

[Redacted Signature]

## 試験実施概要

1. 表題： 1,2,3-トリクロロベンゼンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的： 1,2,3-トリクロロベンゼンについて、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を行い、96時間の半数致死濃度 (LC50) 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.203「魚類毒性試験」(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一丁目2-2  
委託担当者： 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 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： 〒105-0014 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： 〒227-0033 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

(1998年 3月31日)

試験担当者

(1998年 3月31日)

(1998年 3月31日)

分析担当者

(1998年 3月31日)

9. 試験期間： 試験開始日 1997年12月16日  
試験終了日 1998年 3月31日  
暴露期間 1998年 2月 2日～1998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 -----                        | 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 被験物質の確認および保管条件下での安定性 -----      | 9     |
| 2 供試生物 -----                        | 10    |
| 3 試験方法 -----                        | 10    |
| 3.1 試験条件 -----                      | 10    |
| 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 -----                   | 11    |
| 3.5 試験液の調製 -----                    | 11    |
| 3.6 試験液の分析 -----                    | 12    |
| 3.7 試験操作 -----                      | 12    |
| 4 結果の算出 -----                       | 12    |
| 5 結果および考察 -----                     | 13    |
| 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 ----- | 13    |
| 5.2 試験液中の被験物質濃度 -----               | 13    |
| 5.3 半数致死濃度 (LC50) -----             | 13    |
| 5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度 -----     | 13    |
| 5.5 毒性症状 -----                      | 13    |
| 5.6 試験液の水溫，溶存酸素濃度およびpH -----        | 14    |
| Table 1～8 -----                     | 15～21 |
| 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

1,2,3-トリクロロベンゼンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

### 試験番号

7 B 7 8 4 G

### 試験方法

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

- 1)被験物質： 1,2,3-トリクロロベンゼン
- 2)暴露方式： 半止水式 (24時間毎に試験液の全量を交換)
- 3)供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4)暴露期間： 96時間
- 5)試験濃度 (設定値)： 対照区, 助剤対照区, 1.00, 2.00, 4.00, 8.00および16.0mg/L  
(公比; 2.0)
- 6)試験液量： 5.0L
- 7)連数： 1 容器/濃度区
- 8)供試生物数： 10尾/濃度区
- 9)試験温度： 24±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：測定濃度の設定濃度に対する割合はすべて±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)96 時間の半数致死濃度 (LC50)：3.22mg/L  
(95%信頼区間：2.00mg/L～8.00mg/L)

## 1 被験物質

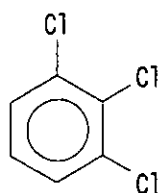
### 1.1 名称，構造式および物理化学的性状

名 称： 1,2,3-トリクロロベンゼン

(略称 1,2,3-TCB)

CAS No： 87-61-6

構造式：



分子式：  $C_6H_3Cl_3$

分子量<sup>\*2</sup>： 181.44

沸点<sup>\*2</sup>： 221°C

融点<sup>\*1</sup>： 53.7°C

水溶解度<sup>\*2</sup>： 12mg/L (22°C)

logPoct<sup>\*2</sup>： 4.02~4.11

\*1:供給者提供資料

\*2:環境化学物質要覧－環境庁環境化学物質研究会編，丸善（昭和63年）

### 1.2 供試試料

純度<sup>\*1</sup>： 100.0%

ロット番号<sup>\*1</sup>： TPG3364

供給者：

供給量<sup>\*1</sup>： 25g

入手日： 1997年12月8日

外観<sup>\*1</sup>： くすんだ白色塊

\*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： 1.88 cm (1.53~2.34cm), n=10
- 4)体重： 0.108 g (0.065~0.195g), 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： 1998年 1月 8日
- 7)馴化期間： 1998年 1月 8日~1998年 2月 2日
- 8)基準物質\*の96時間半数致死濃度(LC50)：0.73mg/L (95%信頼区間：0.53mg/L~1.0mg/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： 半止水式(24時間毎に試験液の全量を交換した。また，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： 96時間
- 3) 試験液量： 5.0L
- 4) 連数： 1 容器／濃度区
- 5) 供試生物数： 10尾／濃度区
- 6) イレージョン： なし
- 7) 試験温度： 24±1℃
- 8) 照明： 16 時間明／8 時間暗
- 9) 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63mg/L (CaCO<sub>3</sub>換算), pHは7.8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： 5.0 L容ガラスビーカー
- 2)恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック社製 クールユニットCL-80F）
- 3)水温計： 横河電機社製 2455 02
- 4)溶存酸素計： 電気化学計器社製 DOL-10
- 5)pH計： 東亜電波社製 HM-40V

### 3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち予備試験を行った。1回目は0.20, 2.0, 20mg/Lの3段階（各1連, 5尾/濃度区）で, 2回目は10mg/Lの濃度区で, 3回目は2.0, 5.0mg/Lの2段階（各1連, 5尾/濃度区）で実施した。その結果, 96時間の死亡率は1回目0.20, 2.0mg/L区で0%, 20mg/L区で100%, 2回目10mg/L区で100%, 3回目2.0mg/L区で0%, 5.0mg/L区で100%であった。

予備試験の結果より, 本試験における濃度を1.00, 2.00, 4.00, 8.00および16.0mg/L（公比：2.0）の5段階とした。

### 3.5 試験液の調製

被験物質1000mgにジメチルホルムアミドを1000mgと分散助剤（HCO-40）を4000mg添加し混合・溶解した後, 純水で1000mLに定容し, 被験物質原液とした（被験物質濃度：1000mg/L）。助剤原液はジメチルホルムアミド1000mgと分散助剤（HCO-40）4000mgを良く混合した後, 純水で1000mLに定容した。試験液は被験物質原液と助剤原液の下記に示した量を採取し希釈水で5.0Lに定容とした。

| 試験液濃度<br>mg/L | 被験物質原液添加量<br>mL | 助剤原液添加量<br>mL |
|---------------|-----------------|---------------|
| 0（対照）         | 0               | 0             |
| 0（助剤対照）       | 0               | 80            |
| 1.00          | 5.0             | 0             |
| 2.00          | 10.0            | 0             |
| 4.00          | 20.0            | 0             |
| 8.00          | 40.0            | 0             |
| 16.0          | 80.0            | 0             |

### 3.6 試験液の分析

試験開始時および24時間後に各試験水槽より試験液0.75mLを採取し、これにアセトリルを0.75mL添加後よく混合したものを分析試料としHPLCにより分析を行った。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た。

各試験水槽の試験液の水溫、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。水溫、溶存酸素濃度、pHは試験開始時および24時間毎の換水前後に測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始後、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は、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

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、Binomial法により半数致死濃度(LC50)を算出した。また、その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

該当する事象は無かった。

### 5.2 試験液中の被験物質濃度

試験開始時および24時間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0.81~14.5mg/L（設定値：1.00~16.0mg/L）であり、24時間後の濃度は0.80~3.53mg/L（設定値：1.00~4.00mg/L）であった。試験開始時および24時間後の幾何平均濃度は0.80~14.5mg/Lであった。測定濃度の設定濃度に対する割合はすべて±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.15), 付属資料-2]

### 5.3 半数致死濃度 (LC50)

96時間の半数致死濃度 (LC50) は3.22mg/Lであり、その95%信頼区間は2.00mg/L~8.00mg/Lであった。なお、対照区の死亡率は0%であった。

[Table 2~3(p.16~17), Figure 1(p.22)]

### 5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

96時間の0%死亡最高濃度は2.00mg/Lであり、100%死亡最低濃度は8.00mg/Lであった。

[Table 2(p.16), Table 4(p.17)]

### 5.5 毒性症状

毒性症状として1.00mg/L以上の濃度区において遊泳異常および遊泳不能が観察された。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。

[Table 5(p.18)]

#### 5.6 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 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ であった。溶存酸素濃度は $8.8 \sim 6.4 \text{ mg/L}$ であり，すべての試験水槽で飽和溶存酸素濃度の60%以上であった。pHは $7.7 \sim 7.2$ であった。

( $24.0^\circ\text{C}$ の飽和溶存酸素濃度： $8.25 \text{ mg/L}$ )

[ Table 6～8(p.19～21)]

以 上

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance During a 96-Hour Exposure

| Nominal<br>Concentration<br>mg/L | Measured Concentration, mg/L<br>(Percent of Nominal) |              | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>mg/L |
|----------------------------------|--|--------------|---|
|                                  | 0 Hr(new)  | 24 Hr(old)   |   |
| Control                          | <0.02  | <0.02        | ----  |
| Solvent Control                  | <0.02  | <0.02        | ----  |
| 1.00                             | 0.81<br>(81)   | 0.80<br>(80) | 0.80<br>(80)  |
| 2.00                             | 1.87<br>(94)   | 1.63<br>(82) | 1.75<br>(88)  |
| 4.00                             | 3.81<br>(95)   | 3.53<br>(88) | 3.67<br>(91)  |
| 8.00                             | 6.48<br>(81)   | --           | 6.48<br>(81)  |
| 16.0                             | 14.5<br>(91)   | --           | 14.5<br>(91)  |

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

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

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

| Nominal<br>Concentration<br>mg/L | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>mg/L | Cumulative Mortality (Percent Mortality) |          |          |          |
|----------------------------------|---|--|----------|----------|----------|
|                                  |   | 24 Hours                                 | 48 Hours | 72 Hours | 96 Hours |
| Control                          | ----  | 0 (0)                                    | 0 (0)    | 0 (0)    | 0 (0)    |
| Solvent Control                  | ----  | 0 (0)                                    | 0 (0)    | 0 (0)    | 0 (0)    |
| 1.00                             | 0.80  | 0 (0)                                    | 0 (0)    | 0 (0)    | 0 (0)    |
| 2.00                             | 1.75  | 0 (0)                                    | 0 (0)    | 0 (0)    | 0 (0)    |
| 4.00                             | 3.67  | 3 (30)                                   | 7 (70)   | 8 (80)   | 8 (80)   |
| 8.00                             | 6.48  | 10 (100)                                 | 10 (100) | 10 (100) | 10 (100) |
| 16.0                             | 14.5  | 10 (100)                                 | 10 (100) | 10 (100) | 10 (100) |

a: geometric mean



Table 3. Calculated LC50 Values

| Exposure<br>Period<br>(Hours) | LC50<br>(mg/L) | 95-Percent<br>Confidence Limits<br>(mg/L) | Statistical<br>Method |
|-------------------------------|----------------|---|-----------------------|
| 24                            | 4.69           | 2.00 ~ 8.00                               | Binomial              |
| 48                            | 3.41           | 2.00 ~ 8.00                               | Binomial              |
| 72                            | 3.22           | 2.00 ~ 8.00                               | Binomial              |
| 96                            | 3.22           | 2.00 ~ 8.00                               | Binomial              |

Table 4. Observation of the Highest Concentration in 0% Mortality and the Lowest Concentration in 100% Mortality

| Exposure<br>Period<br>(Hours) | Highest Concentration in<br>0% Mortality<br>(mg/L) | Lowest Concentration in<br>100% Mortality<br>(mg/L) |
|-------------------------------|--|---|
| 24                            | 2.00   | 8.00  |
| 48                            | 2.00   | 8.00  |
| 72                            | 2.00   | 8.00  |
| 96                            | 2.00   | 8.00  |

Table 5. Symptoms of Toxicity Observed in the Orange killifish (Oryzias latipes)

| Nominal<br>Concentration<br>mg/L | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>mg/L | Symptoms |           |          |           |
|----------------------------------|---|----------|-----------|----------|-----------|
|                                  |   | 24 Hours | 48 Hours  | 72 Hours | 96 Hours  |
| Control                          | ----  | N        | N         | N        | N         |
| Solvent Control                  | ----  | N        | N         | N        | N         |
| 1.00                             | 0.80  | N        | AS-3      | AS-5     | AS-10     |
| 2.00                             | 1.75  | AS-10    | AS-4 AQ-6 | AQ-10    | AS-4 AQ-6 |
| 4.00                             | 3.67  | AQ-7     | AQ-3      | AQ-2     | AQ-2      |
| 8.00                             | 6.48  | --       | --        | --       | --        |
| 16.0                             | 14.5  | --       | --        | --       | --        |

a: geometric mean

N : No toxicological symptom was observed

--: All fish were dead at this observation time

AS: abnormal swimming

AQ: paralization

Table 6. Temperature

| Nominal<br>Concentration<br>mg/L | Temperature, °C |          |      |          |      |          |      |          |
|----------------------------------|-----------------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|
|                                  | 0 Hour          | 24 Hours |      | 48 Hours |      | 72 Hours |      | 96 Hours |
|                                  | new             | old      | new  | old      | new  | old      | new  | old      |
| Control                          | 23.8            | 24.0     | 23.9 | 23.9     | 23.8 | 24.0     | 23.9 | 23.9     |
| Solvent Control                  | 23.8            | 24.0     | 24.0 | 23.9     | 23.9 | 24.0     | 24.0 | 23.8     |
| 1.00                             | 23.8            | 24.0     | 23.9 | 24.0     | 23.8 | 24.0     | 24.1 | 23.7     |
| 2.00                             | 23.8            | 24.0     | 23.9 | 23.9     | 23.7 | 24.0     | 24.0 | 23.8     |
| 4.00                             | 23.8            | 24.0     | 23.9 | 23.9     | 23.7 | 24.0     | 24.0 | 23.7     |
| 8.00                             | 23.8            | --       | --   | --       | --   | --       | --   | --       |
| 16.0                             | 23.8            | --       | --   | --       | --   | --       | --   | --       |

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

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

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations

| Nominal<br>Concentration<br>mg/L | Dissolved Oxygen Concentration, mg/L |          |     |          |     |          |     |          |
|----------------------------------|--------------------------------------|----------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|
|                                  | 0 Hour                               | 24 Hours |     | 48 Hours |     | 72 Hours |     | 96 Hours |
|                                  | new                                  | old      | new | old      | new | old      | new | old      |
| Control                          | 8.5                                  | 6.8      | 8.3 | 7.5      | 8.0 | 7.1      | 8.7 | 6.8      |
| Solvent Control                  | 8.5                                  | 7.1      | 8.3 | 7.2      | 8.7 | 6.7      | 8.4 | 6.4      |
| 1.00                             | 8.5                                  | 7.2      | 8.3 | 7.3      | 8.7 | 7.2      | 8.3 | 7.0      |
| 2.00                             | 8.6                                  | 7.2      | 8.3 | 7.0      | 8.8 | 6.9      | 8.4 | 6.7      |
| 4.00                             | 8.5                                  | 7.1      | 8.3 | 7.7      | 8.7 | 7.5      | 8.4 | 7.4      |
| 8.00                             | 8.5                                  | --       | --  | --       | --  | --       | --  | --       |
| 16.0                             | 8.5                                  | --       | --  | --       | --  | --       | --  | --       |

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

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

Table 8. pH Values

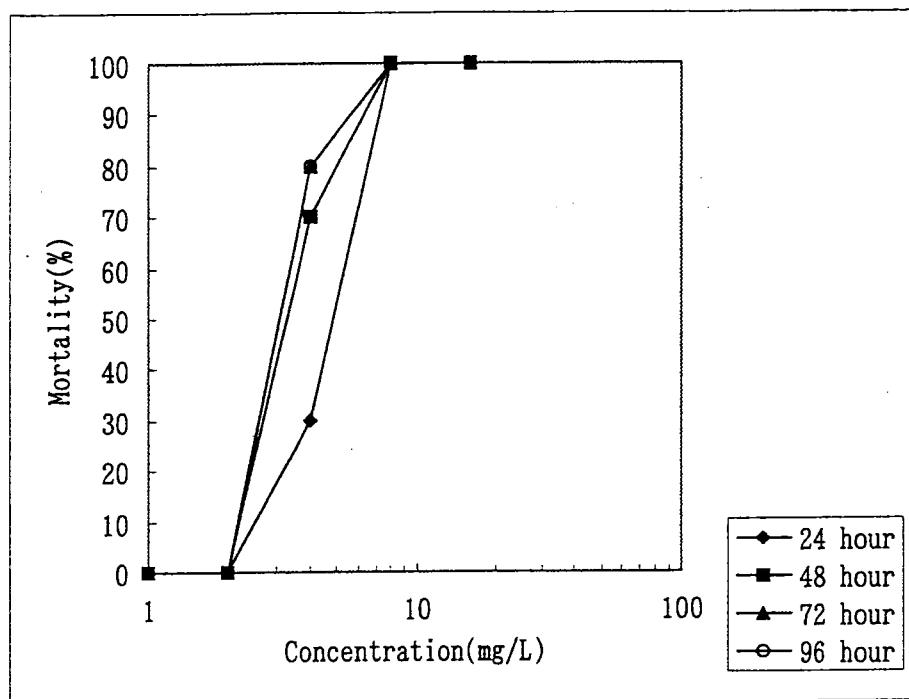
| Nominal<br>Concentration<br>mg/L | pH     |          |     |          |     |          |     |          |
|----------------------------------|--------|----------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|
|                                  | 0 Hour | 24 Hours |     | 48 Hours |     | 72 Hours |     | 96 Hours |
|                                  | new    | old      | new | old      | new | old      | new | old      |
| Control                          | 7.5    | 7.2      | 7.4 | 7.2      | 7.5 | 7.2      | 7.6 | 7.4      |
| Solvent Control                  | 7.5    | 7.2      | 7.5 | 7.2      | 7.5 | 7.2      | 7.6 | 7.4      |
| 1.00                             | 7.5    | 7.3      | 7.5 | 7.2      | 7.5 | 7.4      | 7.6 | 7.6      |
| 2.00                             | 7.5    | 7.4      | 7.6 | 7.3      | 7.6 | 7.3      | 7.6 | 7.5      |
| 4.00                             | 7.5    | 7.3      | 7.6 | 7.4      | 7.5 | 7.4      | 7.6 | 7.7      |
| 8.00                             | 7.6    | --       | --  | --       | --  | --       | --  | --       |
| 16.0                             | 7.6    | --       | --  | --       | --  | --       | --  | --       |

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

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

Figure 1 Concentration-Response Curve  
Mortality in Orange killifish



## 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                                 | 0.0009 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                                    | <0.1 mg/L      |
| Iron                                   | 0.1 mg/L       |
| Cyanide                                | N.D.           |
| Free chlorine                          | <0.01 mg/L     |
| Bromide                                | <0.05 mg/L     |
| Fluoride                               | 0.09 mg/L      |
| Sulfide                                | <0.03 mg/L     |
| Total Ammonium                         | <0.05 mg/L     |
| Arsenic                                | <0.005 mg/L    |
| Selenium                               | <0.005 mg/L    |
| Evaporation residue                    | 140 mg/L       |
| Electric conductivity                  | 180 $\mu$ S/cm |
| Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> ) | 63 mg/L        |
| Alkalinity                             | 44 mg/L        |
| Sodium                                 | 12 mg/L        |
| Potassium                              | 1.3 mg/L       |
| Calcium                                | 17 mg/L        |
| Magnesium                              | 4.9 mg/L       |

measured date: February 3, 1998



## 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-3V, 5 $\mu$ 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： 20  $\mu$ L (検量線作成時 50  $\mu$ L)

## 3 検量線

被験物質の 1000mg/L アトトリル溶液を調製し、アトトリルで順次希釈し 0, 0.050~100mg/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 検出限界

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 0.02mg/L を検出限界とした。

## 5 添加回収試験

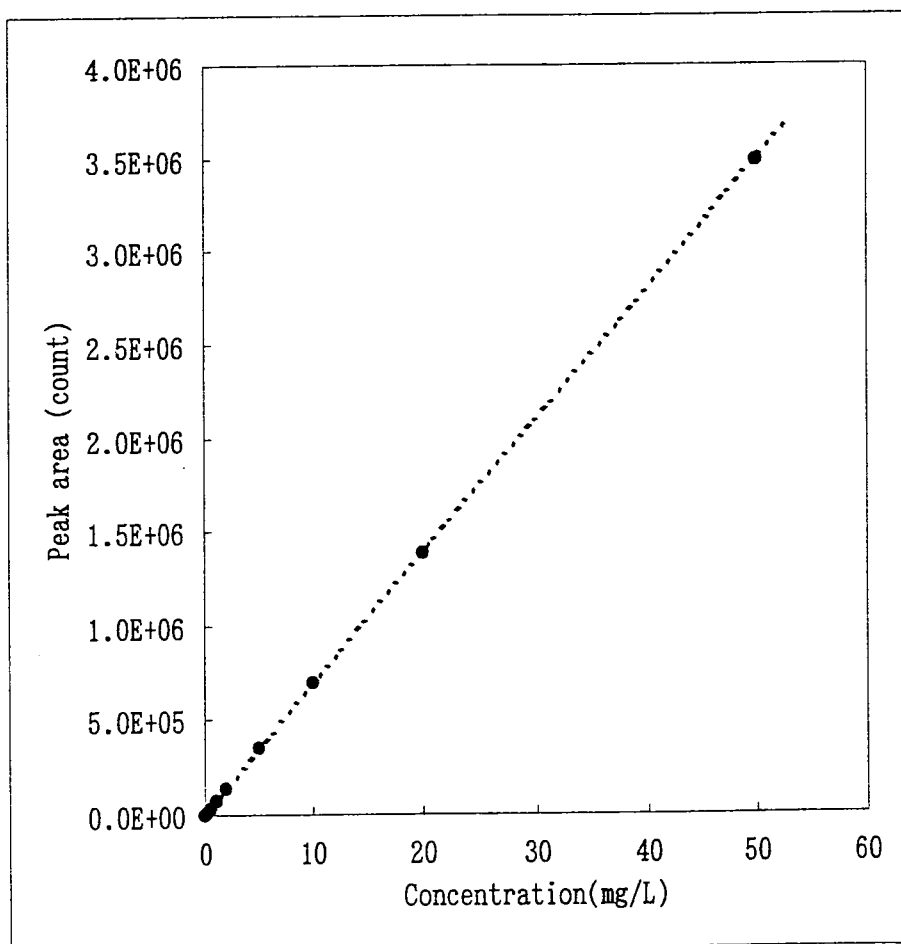
試験液の分析は、「1 試験液の分析方法」に示したように試験液とアトトリルを混合する操作だけであるので添加回収試験の必要は無かった。したがって、回収率の補正は行っていない。

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

| Input Data |                         |                      |
|------------|-------------------------|----------------------|
| No.        | Concentration<br>(mg/L) | Peak Area<br>(count) |
| 0          | 0                       | 0                    |
| 1          | 0.050                   | 3,515                |
| 2          | 0.100                   | 6,998                |
| 3          | 0.200                   | 14,067               |
| 4          | 0.500                   | 35,852               |
| 5          | 1.000                   | 70,973               |
| 6          | 2.000                   | 144,661              |
| 7          | 5.000                   | 353,201              |
| 8          | 10.000                  | 697,065              |
| 9          | 20.000                  | 1,388,026            |
| 10         | 50.000                  | 3,480,757            |

$$Y = 69,600X$$

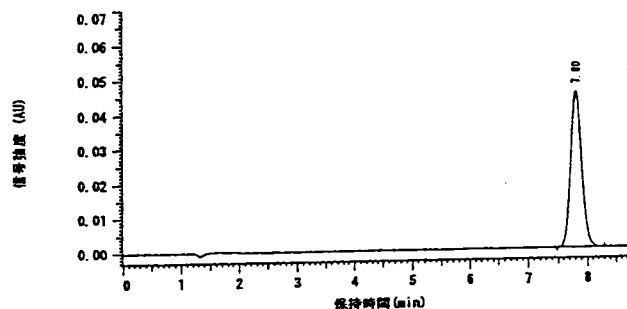
$$r = 1.000$$



# Figure A-2-2 Representative chromatograms

## (1) Standard 10.0mg/L; 0 hour

分析日時: 98/02/02 15:25 作成日時: 98/02/02 18:05  
 テーブル用分析ファイル: 123-TC8 (787846, fish)  
 テーブル名: 123-TC8 (787846, fish) シー: 0001  
 バージョン: 12 シー名: 10 mg/L St.  
 バージョン: UNK 注入量: 20.0 ul  
 注入回数: 1 シーコメント:  
 カラムタイプ: HPLC チャンネル: 1



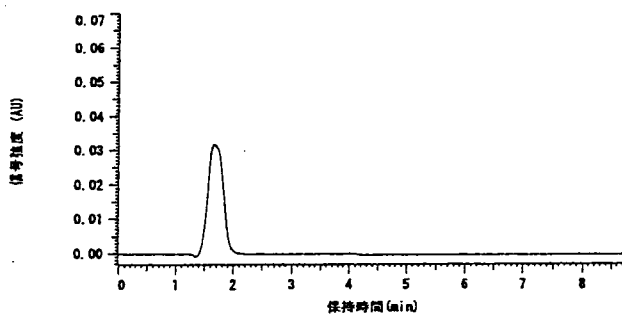
データ収集用分析ファイル: 123-TC8 (787846, fish)  
 カラム名: Inertsil ODS-3V 作成者:   
 カラム A (メイン): L-7100  
 溶剤 A: 70% ACN  
 カラム B (補助): L-7100  
 溶剤 B: 30% Water  
 コント: 220nm, 50°C, 1.0ml/min.  
 テーブル名: 面積 定量計算方法: 面積%

| NO | 保持時間 | 面積     | 面積%     | BC |
|----|------|--------|---------|----|
| 1  | 7.80 | 289587 | 100.000 | MC |
|    |      | 289587 | 100.000 |    |

ピーク-ピークの判定レベル: 0

## (2) Control ; 0 hour

分析日時: 98/02/02 14:02 作成日時: 98/02/02 18:03  
 テーブル用分析ファイル: 123-TC8 (787846, fish)  
 テーブル名: 123-TC8 (787846, fish) シー: 0001  
 バージョン: 1 シー名: Control 0h  
 バージョン: UNK 注入量: 20.0 ul  
 注入回数: 1 シーコメント:  
 カラムタイプ: HPLC チャンネル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TC8 (787846, fish)  
 カラム名: Inertsil ODS-3V 作成者:   
 カラム A (メイン): L-7100  
 溶剤 A: 70% ACN  
 カラム B (補助): L-7100  
 溶剤 B: 30% Water  
 コント: 220nm, 50°C, 1.0ml/min.  
 テーブル名: 面積 定量計算方法: 面積%

| NO | 保持時間 | 面積    | 面積% | BC |
|----|------|-------|-----|----|
|    | 0    | 0.000 |     |    |

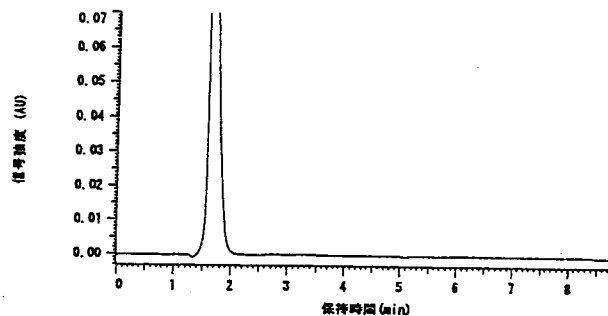
ピーク-ピークの判定レベル: 0

Figure A-2-2 Continued

(3) Solvent Control ; 0 hour

分析日時: 98/02/02 14:13 作成日時: 98/02/02 18:03  
 データ処理用分析ファイル: 123-TC8 (787846, fish)  
 ファイル名: 123-TC8 (787846, fish) シーズン: 0001  
 N (78): 2 サンプル名: Sol. Control 0h  
 N (78)タイプ: UNK 注入量: 20.0 ul  
 注入回数: 1 サンプルロット:

カラムタイプ: HPLC チャンネル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TC8 (787846, fish)  
 カラム名: Inertsil ODS-3V  
 サンプルA (4分): L-7100  
 溶離液A: 70% ACN  
 サンプルB (補助): L-7100  
 溶離液A: 30% Water  
 コント: 220nm, 50°C, 1.0ml/min.

作成者: [REDACTED]

ピーク定数: 面積

定量計算方法: 面積%

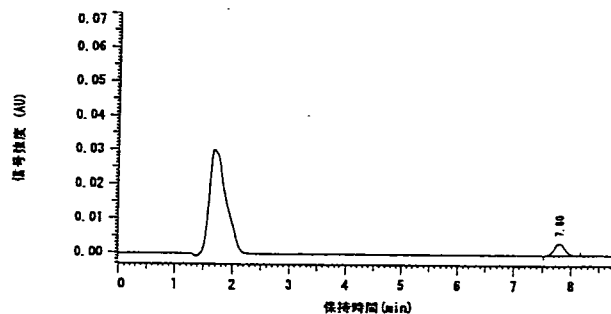
| NO | 保持時間 | 面積 | 面積%   | BC |
|----|------|----|-------|----|
| 0  |      | 0  | 0.000 |    |

ピーク-ピークの判定値: 0

(4) 1.00mg/L nominal; 0 hour

分析日時: 98/02/02 17:28 作成日時: 98/02/02 18:00  
 データ処理用分析ファイル: 123-TC8 (787846, fish)  
 ファイル名: 123-TC8 (787846, fish) シーズン: 0002  
 N (78): 3 サンプル名: Conc. 1 0h  
 N (78)タイプ: UNK 注入量: 20.0 ul  
 注入回数: 1 サンプルロット:

カラムタイプ: HPLC チャンネル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TC8 (787846, fish)  
 カラム名: Inertsil ODS-3V  
 サンプルA (4分): L-7100  
 溶離液A: 70% ACN  
 サンプルB (補助): L-7100  
 溶離液A: 30% Water  
 コント: 220nm, 50°C, 1.0ml/min.

作成者: [REDACTED]

ピーク定数: 面積

定量計算方法: 面積%

| NO | 保持時間 | 面積    | 面積%     | BC |
|----|------|-------|---------|----|
| 1  | 7.80 | 23498 | 100.000 | MC |
|    |      | 23498 | 100.000 |    |

ピーク-ピークの判定値: 0

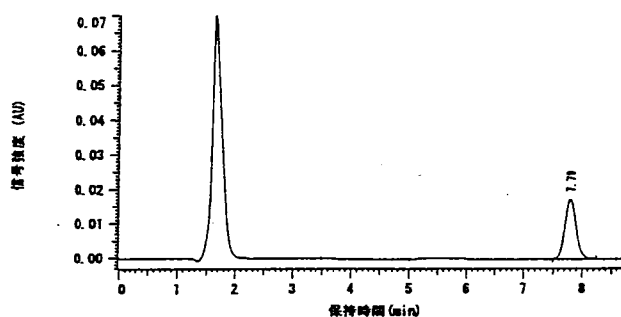
Figure A-2-2 Continued

(5) 4.00mg/L nominal; 0 hour

分析日時: 98/02/02 15:01 作成日時: 98/02/02 18:04

データ処理用分析ファイル: 123-TCB (787846, fish)  
 アナライザ: 123-TCB (787846, fish) シーテ: 0001  
 サンプル名: Conc. 3 0h  
 サンプル量: 20.0 ul  
 サンプル濃度: 4.00 mg/L  
 注入回数: 1

カラムタイプ: HPLC チャンセル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TCB (787846, fish)  
 カラム名: Inertsil ODS-3V  
 サンプル A (イソ): L-7100  
 溶媒液A: 70% ACN  
 サンプル B (補助): L-7100  
 溶媒液A: 30% Water  
 コント: 220nm, 50°C, 1.0ml/min.

作成者: [REDACTED]

ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

| NO | 保持時間 | 面積     | 面積%     | BC |
|----|------|--------|---------|----|
| 1  | 7.79 | 110321 | 100.000 | MC |
|    |      | 110321 | 100.000 |    |

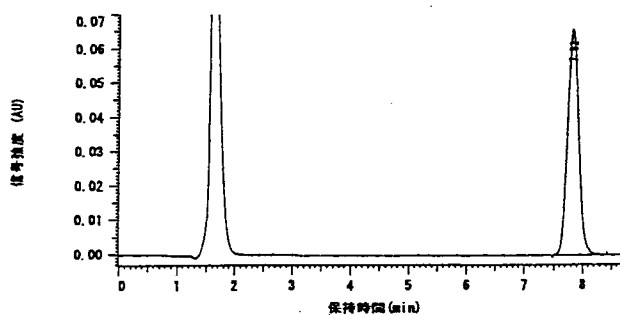
ピーク-ピークの判定値: 0

(6) 16.0mg/L nominal; 0 hour

分析日時: 98/02/02 15:37 作成日時: 98/02/02 18:09

データ処理用分析ファイル: 123-TCB (787846, fish)  
 アナライザ: 123-TCB (787846, fish) シーテ: 0001  
 サンプル名: Conc. 5 0h  
 サンプル量: 20.0 ul  
 サンプル濃度: 16.00 mg/L  
 注入回数: 1

カラムタイプ: HPLC チャンセル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TCB (787846, fish)  
 カラム名: Inertsil ODS-3V  
 サンプル A (イソ): L-7100  
 溶媒液A: 70% ACN  
 サンプル B (補助): L-7100  
 溶媒液A: 30% Water  
 コント: 220nm, 50°C, 1.0ml/min.

作成者: [REDACTED]

ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

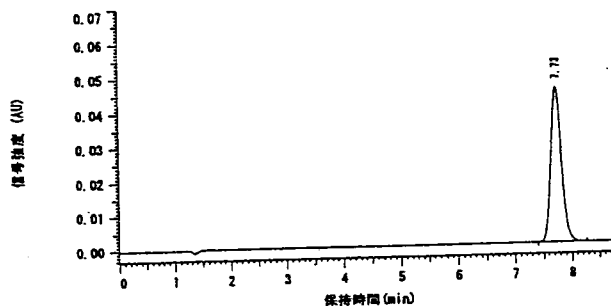
| NO | 保持時間 | 面積     | 面積%     | BC |
|----|------|--------|---------|----|
| 1  | 7.82 | 419533 | 100.000 | MC |
|    |      | 419533 | 100.000 |    |

ピーク-ピークの判定値: 0

Figure A-2-2 Continued

(7) Standard 10.0mg/L; 24 hour

分析日時: 98/02/03 16:46 作成日時: 98/02/03 17:07  
 テー処理用分析ファイル: 123-TCB (78784G, fish) ジョブ名: 0003  
 テー処理用分析ファイル: 123-TCB (78784G, fish) ジョブ名: 10 mg/L St.  
 パイル: 12 注入量: 20.0 ul  
 パイル: UNK 注入量: 20.0 ul  
 注入回数: 1  
 測定タイプ: HPLC チャンセル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TCB (78784G, fish) 作成者:   
 名前: Inertsil ODS-3V  
 カラム A (サイズ): L-7100  
 溶離液 A: 70% ACN  
 カラム B (補助): L-7100  
 溶離液 B: 30% Water  
 コント: 220nm, 50°C, 1.0ml/min.

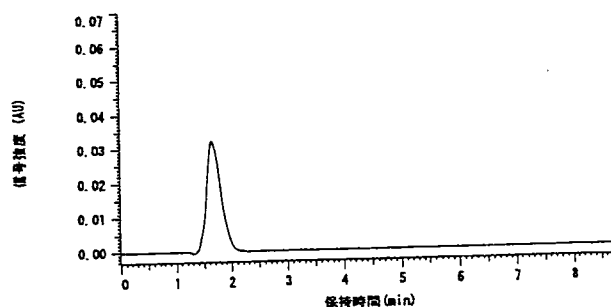
ピーク定量: 面積 定量計算方法: 面積%

| NO | 保持時間 | 面積     | 面積%     | BC |
|----|------|--------|---------|----|
| 1  | 7.73 | 288048 | 100.000 | MC |
|    |      | 288048 | 100.000 |    |

ピーク-ピークの判定レベル: 0

(8) Control ; 24 hour

分析日時: 98/02/03 15:34 作成日時: 98/02/03 17:17  
 テー処理用分析ファイル: 123-TCB (78784G, fish) ジョブ名: 0003  
 テー処理用分析ファイル: 123-TCB (78784G, fish) ジョブ名: Control 24h  
 パイル: 1 注入量: 20.0 ul  
 パイル: UNK 注入量: 20.0 ul  
 注入回数: 1  
 測定タイプ: HPLC チャンセル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TCB (78784G, fish) 作成者:   
 名前: Inertsil ODS-3V  
 カラム A (サイズ): L-7100  
 溶離液 A: 70% ACN  
 カラム B (補助): L-7100  
 溶離液 B: 30% Water  
 コント: 220nm, 50°C, 1.0ml/min.

ピーク定量: 面積 定量計算方法: 面積%

| NO | 保持時間 | 面積    | 面積% | BC |
|----|------|-------|-----|----|
|    | 0    | 0.000 |     |    |

ピーク-ピークの判定レベル: 0

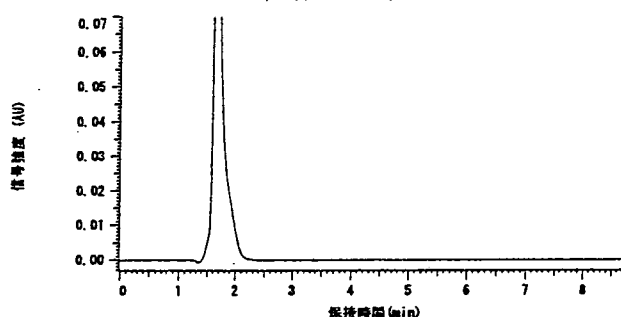


Figure A-2-2 Continued

(9) Solvent Control ; 24 hour

分析日時: 98/02/03 15:46 作成日時: 98/02/03 17:17  
 データ処理用分析ファイル: 123-TC8 (787846.fish) シート: 0003  
 プリケーション: 123-TC8 (787846.fish) サンプル名: Sol. Control 24h  
 ベイ: 2 サンプル量: 20.0 ul  
 ベイタイプ: UNK サンプル濃度:  
 注入回数: 1

カラムタイプ: HPLC カラム: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TC8 (787846.fish)  
 カラム名: Inertsil ODS-3V  
 カラム A (メイン): L-7100  
 溶離液 A: 70% ACN  
 カラム B (補助): L-7100  
 溶離液 A: 30% Water  
 コント: 220nm, 50°C, 1.0ml/min.

作成者: [REDACTED]

ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

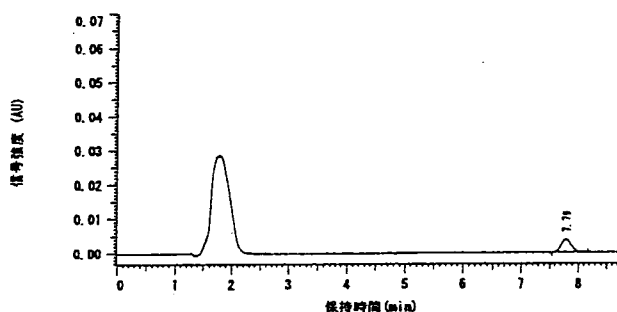
| NO | 保持時間 | 面積    | 面積% | BC |
|----|------|-------|-----|----|
|    | 0    | 0.000 |     |    |

ピーク-ピークの判定レベル: 0

(10) 1.00mg/L nominal; 24 hour

分析日時: 98/02/03 15:58 作成日時: 98/02/03 17:16  
 データ処理用分析ファイル: 123-TC8 (787846.fish) シート: 0003  
 プリケーション: 123-TC8 (787846.fish) サンプル名: Conc. 1 24h  
 ベイ: 3 サンプル量: 20.0 ul  
 ベイタイプ: UNK サンプル濃度:  
 注入回数: 1

カラムタイプ: HPLC カラム: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TC8 (787846.fish)  
 カラム名: Inertsil ODS-3V  
 カラム A (メイン): L-7100  
 溶離液 A: 70% ACN  
 カラム B (補助): L-7100  
 溶離液 A: 30% Water  
 コント: 220nm, 50°C, 1.0ml/min.

作成者: [REDACTED]

ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

| NO | 保持時間 | 面積    | 面積%     | BC |
|----|------|-------|---------|----|
| 1  | 7.79 | 23591 | 100.000 | MC |
|    |      | 23591 | 100.000 |    |

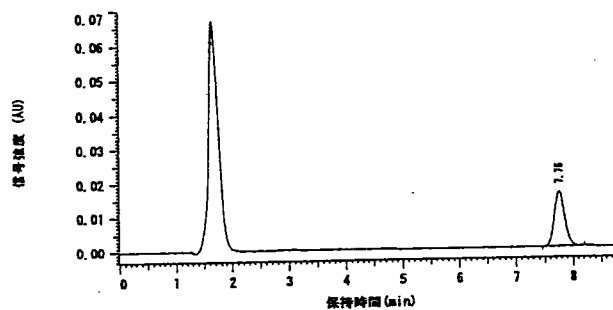
ピーク-ピークの判定レベル: 0

Figure A-2-2 Continued

(11) 4.00mg/L nominal; 24 hour

分析日時: 98/02/03 16:34 作成日時: 98/02/03 17:08  
 データ処理用分析ファイル: 123-TCB (787846, fish) シーズン: 0003  
 データソース: 123-TCB (787846, fish) サンプル名: Conc. 3 24h  
 試料ID: 5 注入量: 20.0 ul  
 試料ID: UNK 検出器: 1  
 注入回数: 1

検出器: HPLC チャンネル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TCB (787846, fish)  
 カラム名: Inertsil ODS-3V 作成者: XXXXXXXXXX  
 カラム A (メイン): L-7100  
 溶剤 A: 70% ACN  
 カラム B (補助): L-7100  
 溶剤 B: 30% Water  
 カラム: 220nm, 50°C, 1.0ml/min

ピーク定数: 面積

定量計算方法: 面積%

| NO | 保持時間 | 面積     | 面積%     | BC |
|----|------|--------|---------|----|
| 1  | 7.75 | 101688 | 100.000 | MC |
|    |      | 101688 | 100.000 |    |

ピーク-ピークの判定レベル: 0