

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
延長毒性試験－14日間

(試験番号：7B802G)

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
延長毒性試験－14日間

試験番号： 7B802G

本試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

1998年 3月31日

運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

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
延長毒性試験－14日間

試験番号： 7B802G

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	1998年 2月24日	1998年 2月24日
	1998年 3月10日	1998年 3月10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
延長毒性試験－14日間
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
延長毒性試験－14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： 〒100-8975 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24日～1998年 3月10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 -----	11
3 試験方法 -----	11
3.1 試験条件 -----	11
3.2 希釈水 -----	12
3.3 試験装置, 試験容器および恒温槽等 -----	12
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 -----	13
3.7 試験操作 -----	13
4 結果の算出 -----	14
4.1 最小致死濃度, 最小作用濃度および最大無作用濃度 -----	14
4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出 -----	14
5 結果および考察 -----	15
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 -----	15
5.2 試験液中の被験物質濃度 -----	15
5.3 毒性症状および摂餌状況 -----	15
5.4 供試魚の体重および体長 -----	15
5.5 最小致死濃度, 最小作用濃度および最大無作用濃度 -----	15
5.6 半数致死濃度 (LC50) -----	16
5.7 試験液の水温, 溶存酸素濃度および pH -----	16
Table 1~9 -----	17~25
Figure 1 -----	26
付属資料- 1 希釈水の水質 -----	27~28
付属資料- 2 試験液の分析方法 -----	29~38

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
延長毒性試験－14日間

試験番号

7B802G

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： 1,2,3-トリクロロベンゼン
- 2)暴露方式： 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用)
- 3)供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4)暴露期間： 14日間
- 5)試験濃度 (設定値)： 対照区, 助剤対照区, 0.100, 0.317, 1.01および3.19mg/L
(公比: 3.2)
- 6)試験液量： 32L/日 (22.55mL/min, 5.0L容ガラスビーカー使用)
- 7)連数： 1 容器/濃度区
- 8)供試生物数： 10尾/濃度区
- 9)照明： 16時間明/8時間暗
- 10)試験温度： 24±2℃
- 11)試験液の分析： HPLC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)14日間の最小致死濃度： 3.19mg/L

- 3) 14日間の最小作用濃度：1.01mg/L
- 4) 14日間の最大無作用濃度 (NOEC)：0.317mg/L
- 5) 7日間の半数致死濃度 (LC50)：>3.19mg/L
- 6) 14日間の半数致死濃度 (LC50)：2.22mg/L (95%信頼区間：1.01mg/L～>3.19mg/L)

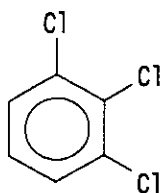
1 被験物質

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^{*2}: 181.44

沸点^{*2}: 221°C

融点^{*1}: 53.7°C

水溶解度^{*2}: 12mg/L (22°C)

logP_{oct}^{*2}: 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^{*1}: 100.0%

ロット番号^{*1}: TPG3364

供給者: XXXXXXXXXX

供給量^{*1}: 25g

入手日: 1997年12月8日

外観^{*1}: 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： 1.95 cm (1.70~2.14cm), n=10
- 4) 体重： 0.144 g (0.092~0.208g), 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 2月 5日~1998年 2月24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： 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用, 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： 14日間
- 3) 試験液量： 約32L/日 (22.55mL/min)
- 4) 連数： 1容器/濃度区
- 5) 供試生物数： 10尾/濃度区
- 6) エアレーション： なし
- 7) 試験温度： 24±2°C
- 8) 照明： 16時間明/8時間暗
- 9) 給餌： 市販のテトラミン[®]を毎日魚体重の2%与えた

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（CaCO₃換算）、pHは7.8であった。

[付属資料-1]

3.3 試験装置および機器等

流水式試験装置：試験水槽（5.0L容ガラスビーカー、180 mmφ × 270 mm）に約12 cmの排水用のガラスサイホンを取り付け24°Cの恒温水槽に設置した。これに下記に示した定量ポンプにより希釈水を22.5 mL/min、ストック溶液を0.05 mL/minの流速で供給した。合計流量は22.55 mL/minとなり試験水槽の換水率は約6回/日となった。

1) 希釈水ポンプ

モーター（駆動部）：Cole-Parmer 社製 MASTERFLEX® 7543-30

ポンプヘッド：Cole-Parmer 社製 MASTERFLEX® 7016-20

チューブ：Cole-Parmer 社製 MASTERFLEX® PharMed 6485-16

2) スtock溶液ポンプ

日本精密科学社製 ミニメカポンプ SP-D-2501(S)

3) 恒温槽：塩ビ製水槽（恒温装置、タイテック社製 クールニット CL-80F）

4) 水温計：横河電機社製 2455 02

5) 溶存酸素計：電気化学計器社製 DOL-10

6) pH計：東亜電波社製 HM-40V

3.4 試験濃度の設定

急性毒性試験の結果をもとに濃度範囲を決定した。試験の最高濃度は96時間-LC50付近の濃度とした。96時間-LC50は3.22 mg/Lであったので、0.100, 0.317, 1.01および3.19mg/L（公比：3.2）の3濃度区を設定した。

3.5 試験液の調製

被験物質1.44gにジメチルホルムアミドを7.20g添加し溶解した。この溶液に分散助剤（HCO-40）を21.60g添加し良く混合した後、純水で1000mLに定容し被験物質原液とした（被験物質濃度：1440 mg/L）。ジメチルホルムアミド 21.60gと分散助剤（HCO-40）64.80gを添加し良く混合した後、純水で3000mLに定容し助剤原液とした。被験物質原液を助剤原液で希釈し45, 143, 454, 1440 mg/Lのストック溶液を調製した。助剤対照区には助剤原液を1000mLを使用した。対照

区のストック溶液には純水を使用した。（試験計画書では対照区には希釈水を用いることになっていたが、被験物質原液を純水で調製したため、対照区にも純水を使用した）

3.6 試験液の分析

開始時（0日）、7日および14日に各試験水槽より試験液0.75mLを採取し、これにアトニトリルを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、被鱗体長で $2.0 \pm 0.5\text{cm}$ であることを確認した。

各試験水槽の試験液の水温、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。

暴露開始後、週3回各試験水槽の試験液の水温、溶存酸素濃度、pH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が、摂餌量の低下により減らすことはしなかった。

暴露開始後、週3回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水質の悪化が起こらないよう速やかに取り除いた。死亡個体および暴露終了時の生存個体の体重および被鱗体長を測定記録した。

*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

4.1 最小致死濃度，最小作用濃度および最大無作用濃度

死亡個体が観察された試験区の最も低い濃度を最小致死濃度とした。

試験魚に致死以外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統計的な有意差で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日および14日における半数致死濃度 (LC50) を Binomial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

該当する事象はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

試験開始時、7日後および14日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0.082~2.59mg/L（設定値0.100~3.19mg/L）であり、試験期間中の平均値は0.087~2.89mg/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.17), 付属資料-2]

5.3 毒性症状および摂餌状況

毒性症状として1.01mg/L以上の濃度区で異常遊泳および遊泳不能が観察された。対照区および助剤対照区では異常な症状は観察されなかった。

なお、1.01mg/L以上の濃度区で摂餌低下が認められた。

[Table 4(p.20)]

5.4 供試魚の体重および体長

体重および体長はすべての濃度区で対照区と比較して有意な差は認められなかった。

($\alpha=0.05$, 統計的方法: Dunnettの多重比較, 両側検定)

[Table 5~6(p.21~22)]

5.5 最小致死濃度, 最小作用濃度および最大無作用濃度

最小致死濃度は3.19mg/Lであった。

最小作用濃度は1.01mg/Lであった。

最大無作用濃度(NOEC)は0.317mg/Lであった。

[Table 2~6(p.18~22)]

5.6 半数致死濃度 (LC50)

7日および14日の半数致死濃度 (LC50) はそれぞれ3.19mg/Lおよび2.22mg/Lであった。

なお、対照区および助剤対照区の死亡率は0%であった。

[Table 2～3(p.18～19), Figure 1(p.26)]

5.7 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 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ であった。溶存酸素濃度は6.8～8.5 mg/Lであり，すべての濃度区で飽和溶存酸素濃度の60%以上であった。pHは7.3～7.7であった。

(24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25mg/L)

[Table 7～9(p.23～25)]

以 上

Table 1. Measured Concentrations of the Test Substance During a 14-Day Exposure

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)			Mean Measured Concentration mg/L
	0 Day	7 Day	14 Day	
Control	<0.007	<0.007	<0.007	----
Solvent Control	<0.007	<0.007	<0.007	----
0.100	0.082 (82)	0.086 (86)	0.094 (94)	0.087 (87)
0.317	0.289 (91)	0.291 (92)	0.283 (89)	0.288 (91)
1.01	0.850 (84)	0.961 (95)	0.917 (91)	0.909 (90)
3.19	2.59 (81)	3.12 (98)	2.97 (93)	2.89 (91)

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

Nominal Concentration mg/L	Mean Measured Concentration mg/L	Cumulative Mortality (Percent Mortality)													
		1 day		2 days		3 days		7 days		9 days		10 days		14 days	
Control	----	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
Solvent Control	----	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
0.100	0.087	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
0.317	0.288	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
1.01	0.909	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
3.19	2.89	0	(0)	0	(0)	0	(0)	4	(40)	5	(50)	6	(60)	8	(80)

Table 3. Calculated LC50 Values

Exposure Period (Days)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
7	>3.19	-- ~ --	--
14	2.22	1.01 ~ >3.19	Binomial

Table 4. Symptoms of Toxicity Observed in Orange killifish (Oryzias latipes)

Nominal Concentration mg/L	Mean Measured Concentration mg/L	Symptoms						
		1 Day	2 Days	3 Days	7 Days	9 Days	10 Days	14 Days
Control	----	N	N	N	N	N	N	N
Solvent Control	----	N	N	N	N	N	N	N
0.100	0.087	N	N	N	N	N	N	N
0.317	0.288	N	N	N	N	N	N	N
1.01	0.909	AS-5 LA	AS-5 LA	AS-5 LA	AS-5 LA	AS-8 LA	AS-8 LA	AS-10 LA
3.19	2.89	AS-2 AQ-8 LA	AQ-10 LA	AQ-10 LA	AQ-6 LA	AQ-5 LA	AQ-4 LA	AQ-2 LA

N : No toxicological symptom was observed

--: All fish were dead at this observation time

AS: abnormal swimming

AQ: paralization

LA: loss of appetite

Table 5. Fish Weight (g)

Nominal Concentration (mg/L)					
Cont.	Sol.Cont.	0.100	0.317	1.01	3.19
No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
0.137	0.117	0.160	0.141	0.183	0.129
0.117	0.125	0.106	0.142	0.118	0.110
0.130	0.157	0.185	0.136	0.131	0.190
0.160	0.146	0.189	0.153	0.151	0.090
0.152	0.138	0.177	0.129	0.137	0.134
0.138	0.164	0.157	0.145	0.124	0.112
0.112	0.171	0.144	0.186	0.173	0.135
0.212	0.169	0.100	0.171	0.159	0.137
0.195	0.151	0.133	0.153	0.116	0.123
0.163	0.112	0.133	0.137	0.131	0.124

Basic statistic

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance
1	10	0.1516	0.0102	0.0323	0.0010
2	10	0.1450	0.0068	0.0214	0.0005
3	10	0.1484	0.0098	0.0310	0.0010
4	10	0.1493	0.0055	0.0174	0.0003
5	10	0.1423	0.0073	0.0232	0.0005
6	10	0.1284	0.0082	0.0260	0.0007

S.E. Standard error

S.D. Standard deviation

Dunnett multiple comparison procedure

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	0.5733	2.5906	3.2055	0.9690
Dunnett	1 vs 3	2	0.2780	2.5906	3.2055	0.9988
Dunnett	1 vs 4	2	0.1998	2.5906	3.2055	0.9998
Dunnett	1 vs 5	2	0.8079	2.5906	3.2055	0.8854
Dunnett	1 vs 6	2	2.0153	2.5906	3.2055	0.1764

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the control.
(There was no sign in this test.)

** Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.
(There was no sign in this test.)

Table 6. Fish Length (cm)

Nominal Concentration (mg/L)					
Cont.	Sol.Cont.	0.100	0.317	1.01	3.19
No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6
2.01	1.97	2.14	2.12	2.20	2.02
1.95	1.98	1.84	2.05	1.93	2.12
2.02	2.10	2.40	2.13	1.98	1.90
2.15	2.09	2.25	2.05	2.06	1.89
2.14	1.94	2.17	2.02	1.98	2.06
1.91	2.14	2.20	2.00	1.98	2.04
1.88	2.19	2.08	2.31	2.09	2.05
2.23	2.11	1.86	2.24	2.19	2.04
2.23	2.04	2.09	2.16	2.01	2.05
2.13	1.88	2.09	2.02	2.07	1.99

Basic statistic

Group	Samples	Mean	S.E.	S.D.	Variance
1	10	2.0650	0.0406	0.1283	0.0165
2	10	2.0440	0.0312	0.0986	0.0097
3	10	2.1120	0.0531	0.1678	0.0282
4	10	2.1100	0.0326	0.1030	0.0106
5	10	2.0490	0.0288	0.0912	0.0083
6	10	2.0160	0.0227	0.0717	0.0051

S.E. Standard error

S.D. Standard deviation

Dunnett multiple comparison procedure

Method	vs	Side	Stat.	0.05	0.01	Prob.
Dunnett	1 vs 2	2	0.4109	2.5906	3.2055	0.9927
Dunnett	1 vs 3	2	0.9195	2.5906	3.2055	0.8245
Dunnett	1 vs 4	2	0.8804	2.5906	3.2055	0.8472
Dunnett	1 vs 5	2	0.3130	2.5906	3.2055	0.9979
Dunnett	1 vs 6	2	0.9587	2.5906	3.2055	0.8006

* Indicates a significant difference ($\alpha=0.05$) from the control.
(There was no sign in this test.)

** Indicates a significant difference ($\alpha=0.01$) from the control.
(There was no sign in this test.)

Table 7. Temperature

Nominal Concentration mg/L	Temperature, °C				
	0 Day	3 Days	7 Days	10 Days	14 Days
Control	24.6	24.2	24.4	23.8	24.2
Solvent Control	24.6	24.2	24.1	23.8	24.2
0.100	24.6	24.2	24.1	24.0	24.2
0.317	24.6	24.2	24.7	24.1	24.2
1.01	24.6	24.2	24.6	24.6	24.3
3.19	24.6	24.2	25.3	24.7	24.5

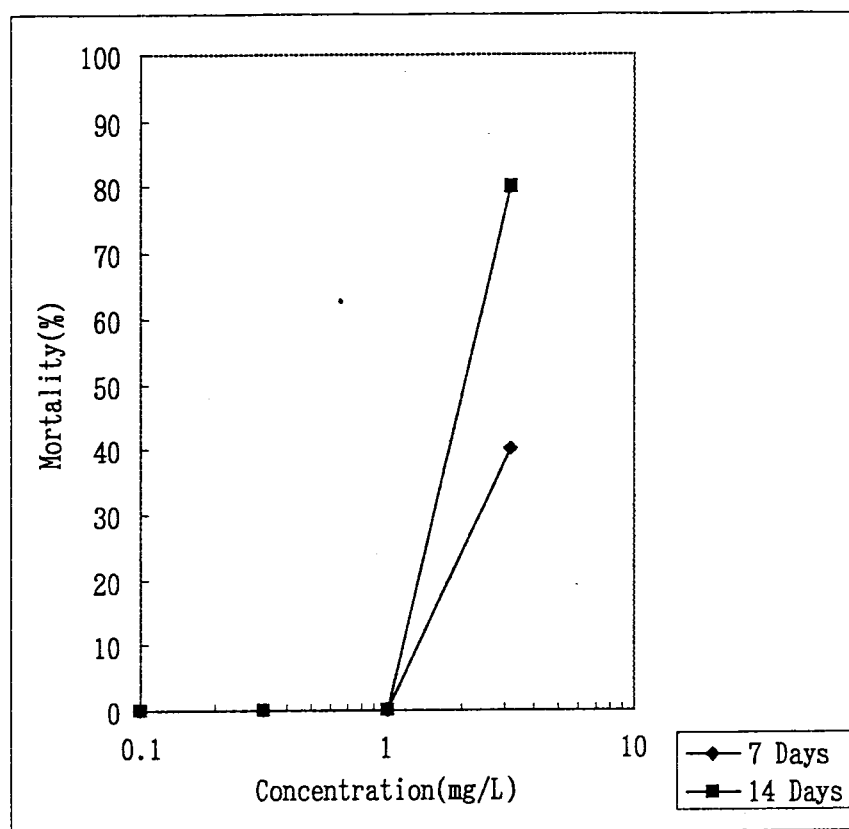
Table 8. Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration mg/L	Dissolved Oxygen Concentration mg-O ₂ /L				
	0 Day	3 Days	7 Days	10 Days	14 Days
Control	8.4	8.0	7.6	8.0	8.0
Solvent Control	8.4	7.6	7.1	7.2	7.6
0.100	8.5	7.2	6.8	7.2	7.4
0.317	8.3	7.8	7.1	7.3	7.4
1.01	8.5	7.9	7.6	7.8	7.8
3.19	8.5	8.0	7.6	7.8	8.1

Table 9. pH Values

Nominal Concentration mg/L	pH				
	0 Day	3 Days	7 Days	10 Days	14 Days
Control	7.6	7.3	7.7	7.6	7.7
Solvent Control	7.6	7.4	7.5	7.3	7.5
0.100	7.6	7.3	7.3	7.3	7.5
0.317	7.6	7.4	7.6	7.3	7.5
1.01	7.7	7.4	7.6	7.5	7.5
3.19	7.6	7.5	7.6	7.6	7.6

Figure 1 Concentration-Response Curve



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 μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	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 μ 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：50 μ L

3 検量線

被験物質の1000mg/L アセトニトリル溶液を調製し、アセトニ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0.007mg/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セトニ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 (mg/L)	Peak Area (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

$$Y = 69,600X$$

$$r = 1.000$$

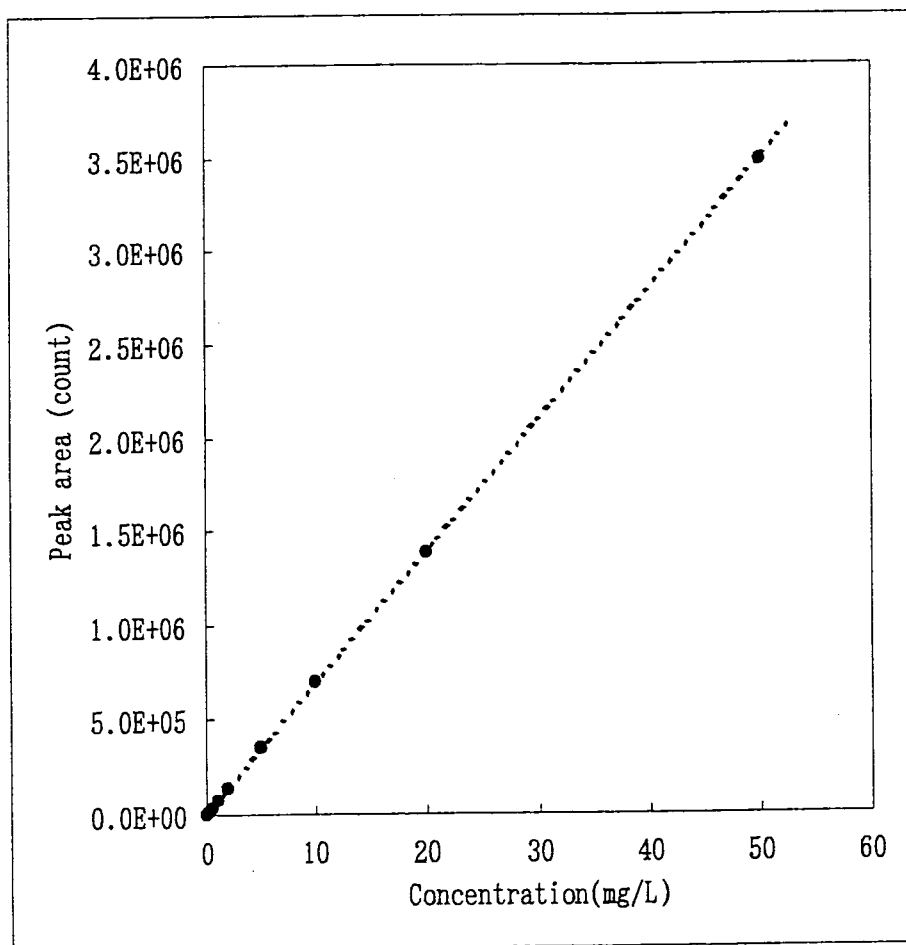
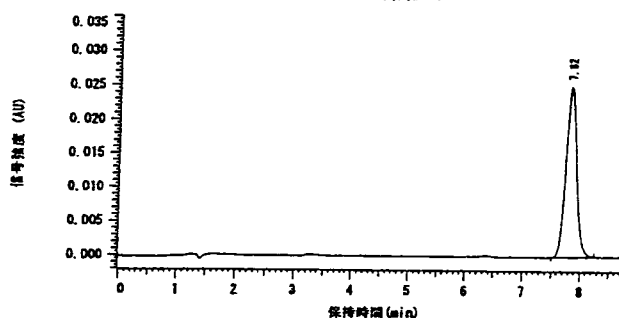


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 2.00mg/L ; Day -0

分析日時: 98/02/24 13:45 作成日時: 98/02/24 14:18
 テーブル用分析ファイル: 123-TCB (788026, fish)
 アナライザー: 123-TCB (788026, fish) シート: 0003
 検体名: 123-TCB (788026, fish) シート名: 2 mg/L St., Od
 検体ID: UNK 注入量: 50.0 ul
 注入回数: 1 シートID: 1

カラムID: HPLC チャンセル: 1



データ取得用分析ファイル: 123-TCB (788026, 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B: 30% Water
 コスト: 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%

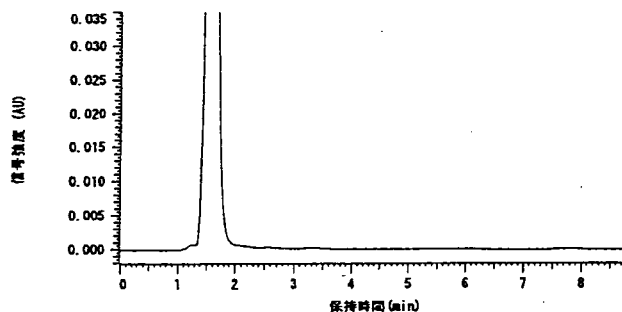
NO	保持時間	面積	面積%	BC
1	7.82	155173	100.000	MC
		155173	100.000	

ピーク-ピークの判定値: 0

(2) Control ; Day 0

分析日時: 98/02/24 12:34 作成日時: 98/02/24 14:25
 テーブル用分析ファイル: 123-TCB (788026, fish)
 アナライザー: 123-TCB (788026, fish) シート: 0003
 検体名: 123-TCB (788026, fish) シート名: Control, Od
 検体ID: UNK 注入量: 50.0 ul
 注入回数: 1 シートID: 1

カラムID: HPLC チャンセル: 1



データ取得用分析ファイル: 123-TCB (788026, 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B: 30% Water
 コスト: 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	0.000		

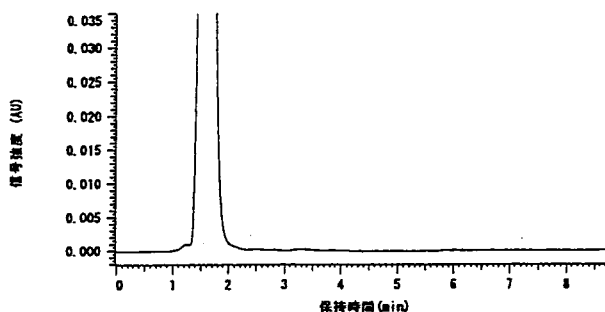
ピーク-ピークの判定値: 0

Figure A-2-2 Continued

(3) Solvent Control ; Day 0

分析日時: 98/02/24 12:46 作成日時: 98/02/24 14:22
 データ処理用分析ファイル: 123-TC8 (788026, fish)
 プリケーション: 123-TC8 (788026, fish) シー: 0003
 サンプル名: Sol, Control, 0d
 サンプル量: 50.0 ul
 サンプル濃度: 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-TC8 (788026, fish)
 システム: Inertsil ODS-3V
 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
 コントロール: 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%

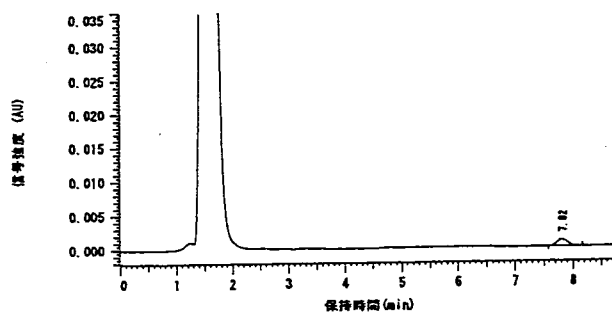
NO	保持時間	面積	面積%	BC
	0	0.000		

ピーク-ピークの判定レベル: 0

(4) 0.100mg/L nominal ; Day 0

分析日時: 98/02/24 12:58 作成日時: 98/02/24 14:21
 データ処理用分析ファイル: 123-TC8 (788026, fish)
 プリケーション: 123-TC8 (788026, fish) シー: 0003
 サンプル名: Conc. 1, 0d
 サンプル量: 50.0 ul
 サンプル濃度: 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-TC8 (788026, fish)
 システム: Inertsil ODS-3V
 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
 コントロール: 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	6160	100.000	NC
		6160	100.000	

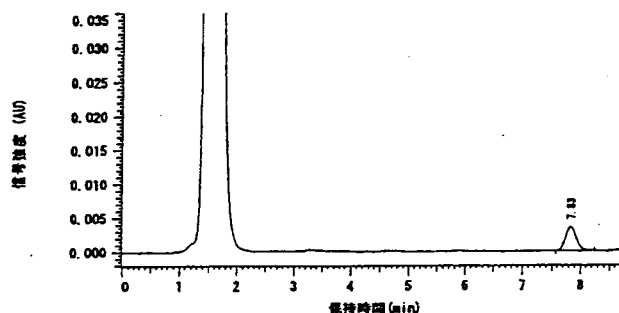
ピーク-ピークの判定レベル: 0

Figure A-2-2 Continued

(5) 0.317mg/L nominal ; Day 0

分析日時: 98/02/24 13:22 作成日時: 98/02/24 14:19
 データ処理用分析ファイル: 123-TCB (788026, fish) シート: 0003
 777 シーケン: 123-TCB (788026, fish) サンプル名: Conc. 2, 0d
 A イデ: 4 サンプル量: 50.0 ul
 A イデ: UNK サンプル量: 50.0 ul
 注入回数: 1

検出器: HPLC チャンセル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TCB (788026, 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 B: 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%

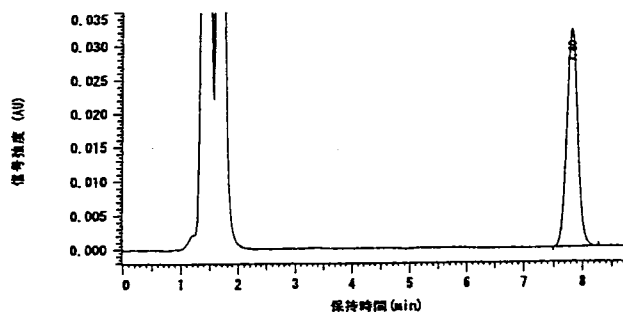
NO	保持時間	面積	面積%	BC
1	7.83	21768	100.000	MC
		21768	100.000	

ピーク-ピークの判定レベル: 0

(6) 3.19mg/L nominal ; Day 0

分析日時: 98/02/24 13:57 作成日時: 98/02/24 14:17
 データ処理用分析ファイル: 123-TCB (788026, fish) シート: 0003
 777 シーケン: 123-TCB (788026, fish) サンプル名: Conc. 4, 0d
 A イデ: 6 サンプル量: 50.0 ul
 A イデ: UNK サンプル量: 50.0 ul
 注入回数: 1

検出器: HPLC チャンセル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TCB (788026, 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 B: 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	7.80	201103	100.000	MC
		201103	100.000	

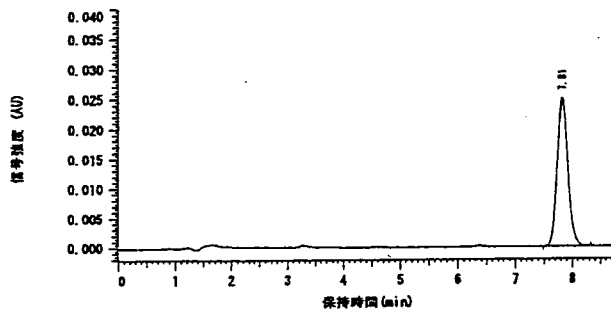
ピーク-ピークの判定レベル: 0

Figure A-2-2 Continued

(7) Standard 2.00mg/L; Day 14

分析日時: 98/03/10 14:39 作成日時: 98/03/10 15:05
 データ処理用分析ファイル: 123-TCB (788026, fish) シート: 0006
 T2 サンプル: 123-TCB (788026, fish) サンプル名: 2 mg/L St., 14d
 A17B: 12 サンプル量: 50.0 ul
 A17B17: UNK サンプル濃度:
 注入回数: 1

加算方法: HPLC チャンネル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TCB (788026, fish)
 カラム名: Inertsil 005-3V 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.

ピーク定量: 面積

定量計算方法: 面積%

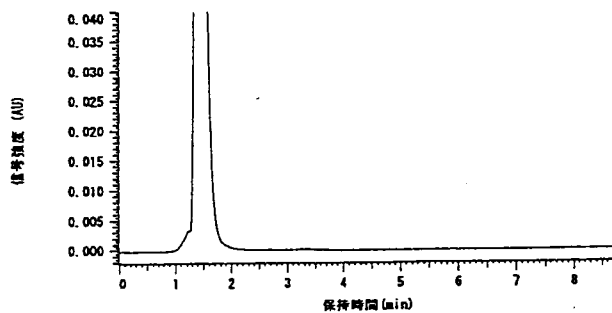
NO	保持時間	面積	面積%	BC
1	7.81	160009	100.000	MC
		160009	100.000	

ピーク-ピークの判定値: 0

(8) Control ; Day 14

分析日時: 98/03/10 13:27 作成日時: 98/03/10 15:08
 データ処理用分析ファイル: 123-TCB (788026, fish) シート: 0006
 T2 サンプル: 123-TCB (788026, fish) サンプル名: Control, 14d
 A17B: 1 サンプル量: 50.0 ul
 A17B17: UNK サンプル濃度:
 注入回数: 1

加算方法: HPLC チャンネル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TCB (788026, fish)
 カラム名: Inertsil 005-3V 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.

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	

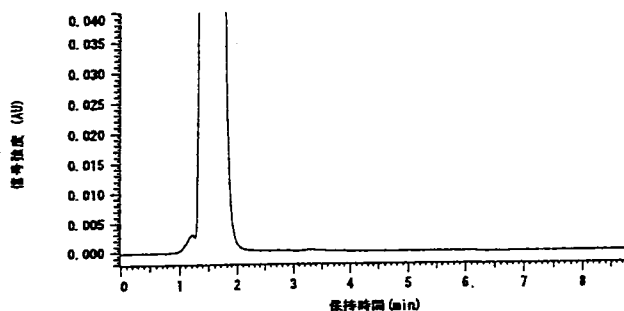
ピーク-ピークの判定値: 0

Figure A-2-2 Continued

(9) Solvent Control ; Day 14

分析日時: 98/03/10 13:39 作成日時: 98/03/10 15:08
 データ処理用分析ファイル: 123-TC8 (788026, fish)
 アナライザ: 123-TC8 (788026, fish) シート: 0006
 ページ: 2 サンプル名: Sol. Control, 14d
 サンプルID: UNKN 注入量: 50.0 ul
 注入回数: 1 サンプルロット:

カラムID: HPLC チャンセル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TC8 (788026, fish)
 カラム名: Inertsil ODS-3V
 シンク A (メイン): L-7100
 溶媒液 A: 70% ACN
 シンク B (補助): L-7100
 溶媒液 B: 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%

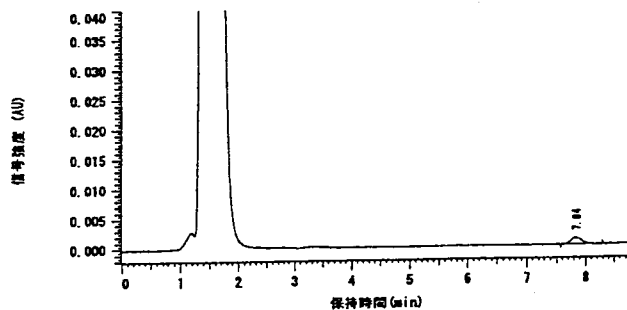
NO	保持時間	面積	面積%	BC
	0	0	0.000	

ピーク-ピークの判定レベル: 0

(10) 0.100mg/L nominal; Day 14

分析日時: 98/03/10 13:51 作成日時: 98/03/10 15:08
 データ処理用分析ファイル: 123-TC8 (788026, fish)
 アナライザ: 123-TC8 (788026, fish) シート: 0006
 ページ: 3 サンプル名: Conc. 1, 14d
 サンプルID: UNKN 注入量: 50.0 ul
 注入回数: 1 サンプルロット:

カラムID: HPLC チャンセル: 1



データ収集用分析ファイル: 123-TC8 (788026, fish)
 カラム名: Inertsil ODS-3V
 シンク A (メイン): L-7100
 溶媒液 A: 70% ACN
 シンク B (補助): L-7100
 溶媒液 B: 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	7.84	7241	100.000	MC
		7241	100.000	

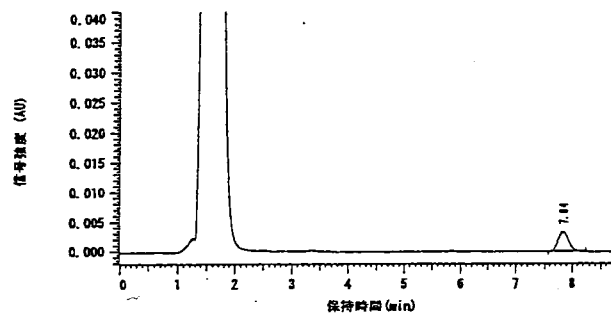
ピーク-ピークの判定レベル: 0

Figure A-2-2 Continued

(11) 0.317mg/L nominal ; Day 14

分析日時: 98/03/10 14:15 作成日時: 98/03/10 15:06
 テーブル用分析ファイル: 123-TC8 (788026, fish)
 テーブル名: 123-TC8 (788026, fish) シート: 0006
 A: 4 シート名: Conc. 2, 14d
 A: UNK 注入量: 50.0 ul
 注入回数: 1 シートコメント:

カラムタイプ: HPLC チャンネル: 1



テーブル用分析ファイル: 123-TC8 (788026, fish)
 カラム名: Inertsil ODS-3V
 カラムA(μm): 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%

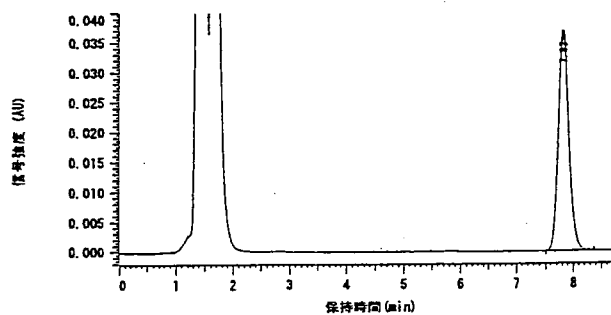
NO	保持時間	面積	面積%	BC
1	7.84	21711	100.000	MC
		21711	100.000	

ピーク-ピークの判定レベル: 0

(12) 3.19mg/L nominal; Day 14

分析日時: 98/03/10 14:50 作成日時: 98/03/10 15:04
 テーブル用分析ファイル: 123-TC8 (788026, fish)
 テーブル名: 123-TC8 (788026, fish) シート: 0006
 A: 6 シート名: Conc. 4, 14d
 A: UNK 注入量: 50.0 ul
 注入回数: 1 シートコメント:

カラムタイプ: HPLC チャンネル: 1



テーブル用分析ファイル: 123-TC8 (788026, fish)
 カラム名: Inertsil ODS-3V
 カラムA(μm): 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	7.82	237707	100.000	MC
		237707	100.000	

ピーク-ピークの判定レベル: 0