

環境省殿

## 最 終 報 告 書

Butanoic acid, 2-ethyl-のヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

(試験番号：92331)

2001 年 4 月 17 日作成

化学物質評価研究機構  
久留米事業所

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： 環境省

表 題： Butanoic acid, 2-ethyl-のヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

試 験 番 号： 92331

本試験は環境省のGLP規則に従って実施したものである。

運営管理者

2001年 4月 17日

[Redacted signature area]

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： 環境省

表 題： Butanoic acid, 2-ethyl-のヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

試験番号： 92331

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  | 2000 年 12 月 25 日 | 2000 年 12 月 25 日 | 2000 年 12 月 25 日 |
| 試験実施状況査察 | 2001 年 1 月 15 日  | 2001 年 1 月 19 日  | 2001 年 1 月 22 日  |
| 試験実施状況査察 | 2001 年 1 月 19 日  | 2001 年 1 月 19 日  | 2001 年 1 月 22 日  |
| 最終報告書監査  | 2001 年 4 月 17 日  | 2001 年 4 月 17 日  | 2001 年 4 月 17 日  |

2001 年 4 月 17 日

信頼性保証業務担当者

## 試験実施概要

### 1 表 題

Butanoic acid, 2-ethyl-のヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

### 2 試験目的

被験物質のヒメダカ(*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

本試験は環境省のGLP規則に準拠した。

### 5 試験委託者

名 称： 環境省

住 所： (〒100-8975)東京都千代田区霞が関 1-2-2

試験委託責任者： 総合環境政策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

2001 年 4 月 17 日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

10 試験日程

試験開始日

2000 年 12 月 25 日

試験終了日

2001 年 4 月 17 日

暴露期間

2001 年 1 月 15 日 ~ 2001 年 1 月 19 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 釈 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 .....                    | 4    |
| 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 .....                       | 5    |
| 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 .....     | 6    |
| 5.7 試験液の状態 .....                    | 7    |
| Table 1～8 .....                     | 8～14 |
| Figure 1 .....                      | 15   |
| 付属資料－1 希釈水の水質                       |      |
| 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

環境省

表 題Butanoic acid, 2-ethyl-のヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験試験番号

92331

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： Butanoic acid, 2-ethyl-
- 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1回試験液を交換)
- 6) 試験濃度： 100、50.0mg/L(公比：2.0)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±1℃
- 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±20%以内であったため、LC50の算出には設定濃度を用いた。
- 2) 96時間の半数致死濃度(LC50)： 85.4 mg/L





## 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： 2.1cm (2.0～2.2 cm) , n=10
- 4) 体 重： 0.16 g (0.13～0.19 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： 2000 年 12 月 28 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)=1.04 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=17)の範囲にある。]
- 8) 順 化 期 間： 2000 年 12 月 29 日～2001 年 1 月 15 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24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： 1回／1日
- 7) 試験水温：  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 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)
- 2) 恒温槽： 加温冷却機によって試験容器内の水温が $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持可能なもの
- 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100 mg/Lを最高濃度として公比2.0で2濃度区(100と50.0 mg/L)を設定した。また、希釈水のみの対照区を設けた。

#### 3.5 試験液の調製

必要量の被験物質を脱塩素水に添加し、超音波を照射しながら攪拌して溶解させ、10,000 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脱塩素水を混合して調製した。

### 3.6 被験物質の分析

暴露開始時及び換水前(24時間後)に採取した試験液をHPLCにより分析した。測定用試験液は各試験区の2試験容器の中層より等量採取して混合したものを用了。試験液中の被験物質の分析に際しては、標準溶液(濃度10.0 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 8401-1999 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、半数致死濃度(LC50)を算出した。Probit法が適用できなかったため、Binomial法により算出した。なお、被験物質の測定濃度が設定濃度の±20%以内であったため、各影響濃度の算出には設定濃度を用いた。

## 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

暴露開始時及び換水前(24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99.9～100%、換水前(24時間後)で99.3～100%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、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100 mg/Lでのみみられた。96時間LC50は50.0と100 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LC50：85.4 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に示した。

以上の結果から、以下の結論を得た。

0%死亡最高濃度：50.0 mg/L

100%死亡最低濃度：>100 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状(粘液凝固)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 試験液の水温、溶存酸素濃度(DO)及びpH

試験液の水温を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温は23.3～23.5℃であった。DOは6.8～8.6 mg/Lであり、飽和溶存酸素濃度の60%以上であった(23.0～25.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.11～8.39 mg/L、JIS K 0102-2000)。pHは4.3～7.2であった。被験物質区の試験液では試験濃度が高くなるにつれてpHは低くなっていた。

以上のことから、水温及びDO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 butanoic acid, 2-ethyl- in acute toxicity test using medaka (*Oryzias latipes*) under semi-static conditions

| Nominal concentration (mg/L) | Measured concentration (mg/L)<br>(Percentage of nominal) |                       |                    |
|------------------------------|--|-----------------------|--------------------|
|                              | 0-hour   | 24-hour <sup>a)</sup> | Mean <sup>b)</sup> |
| Control                      | n.d.   | n.d.                  | n.d.               |
| 50.0                         | 50.2<br>(100)  | 49.7<br>(99.3)        | 49.9<br>(99.9)     |
| 100                          | 99.9<br>(99.9)   | 100<br>(100)          | 100<br>(100)       |

n.d. : <1.00 mg/L

a) before renewal

b) The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$(C_0 - C_{24}) / (\ln C_0 - \ln C_{24})$$

where

$C_0$  : the measured concentration at 0-hour

$C_{24}$  : the measured concentration at 24-hour

$\ln C_0$  : the natural logarithm of  $C_0$

$\ln C_{24}$  : the natural logarithm of  $C_{24}$ .

Table 2. Mortality of medaka (*Oryzias latipes*) exposed to butanoic acid, 2-ethyl-

| Nominal<br>concentration<br>(mg/L) | Cumulative number of dead fish<br>(Percent mortality) |         |         |         |
|------------------------------------|---|---------|---------|---------|
|                                    | 24-hour   | 48-hour | 72-hour | 96-hour |
| Control                            | 0 (0)   | 0 (0)   | 0 (0)   | 0 (0)   |
| 50.0                               | 0 (0)   | 0 (0)   | 0 (0)   | 2 (0)   |
| 100                                | 0 (0)   | 5 (50)  | 6 (60)  | 7 (70)  |

Table 3. Calculated LC50 values for medaka (*Oryzias latipes*) exposed to butanoic acid, 2-ethyl- based on nominal concentrations

| Exposure time<br>(hour) | LC50<br>(mg/L) | 95-Percent<br>confidence limits<br>(mg/L) | Statistical<br>method |
|-------------------------|----------------|---|-----------------------|
| 24                      | >100           | —   | -                     |
| 48                      | 100            | —   | Binomial              |
| 72                      | 91.6           | —   | Binomial              |
| 96                      | 85.4           | —   | Binomial              |

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

| Exposure time<br>(hour) | Highest concentration in<br>0% mortality<br>(mg/L) | Lowest concentration in<br>100% mortality<br>(mg/L) |
|-------------------------|--|---|
| 24                      | 50.0   | -   |
| 48                      | 50.0   | -   |
| 72                      | 50.0   | -   |
| 96                      | -  | -   |



Table 5. Toxic symptoms observed in medaka (*Oryzias latipes*) during exposure to butanoic acid, 2-ethyl- under semi-static test condition

| Nominal<br>concentration<br>(mg/L) | Symptoms |         |         |             |         |
|------------------------------------|----------|---------|---------|-------------|---------|
|                                    | 3-hour   | 24-hour | 48-hour | 72-hour     | 96-hour |
| Control                            | -        | -       | -       | -           | -       |
| 50.0                               | -        | -       | -       | -           | -       |
| 100                                | -        | AB SS   | AB      | AB AR<br>IM | AB AR   |

AB : Abnormal behavior  
 AR : Abnormal respiration  
 IM : Immobility  
 SS : Specific symptoms  
 - : No symptom

Table 6. Temperature of test solutions during 96-hour semi-static exposure of medaka (*Oryzias latipes*) to butanoic acid, 2-ethyl-

| Nominal<br>concentration<br>(mg/L) |     | Temperature<br>(°C) |         |         |         |         |
|------------------------------------|-----|---------------------|---------|---------|---------|---------|
|                                    |     | 0-hour              | 24-hour | 48-hour | 72-hour | 96-hour |
| Control                            | new | 23.4                | 23.4    | 23.3    | 23.5    |         |
|                                    | old |                     | 23.5    | 23.3    | 23.5    | 23.5    |
| 50.0                               | new | 23.4                | 23.4    | 23.3    | 23.5    |         |
|                                    | old |                     | 23.5    | 23.3    | 23.5    | 23.5    |
| 100                                | new | 23.4                | 23.4    | 23.3    | 23.5    |         |
|                                    | old |                     | 23.5    | 23.3    | 23.5    | 23.5    |

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 24-hour after preparation

Table 7. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 96-hour semi-static exposure of medaka (*Oryzias latipes*) to butanoic acid, 2-ethyl-

| Nominal<br>concentration<br>(mg/L) |     | Dissolved oxygen concentration<br>(mg/L) |         |         |         |         |
|------------------------------------|-----|--|---------|---------|---------|---------|
|                                    |     | 0-hour                                   | 24-hour | 48-hour | 72-hour | 96-hour |
| Control                            | new | 8.4                                      | 8.4     | 8.4     | 8.6     |         |
|                                    | old |  | 6.8     | 7.3     | 7.3     | 7.0     |
| 50.0                               | new | 8.4                                      | 8.4     | 8.4     | 8.5     |         |
|                                    | old |  | 7.0     | 7.3     | 7.3     | 7.3     |
| 100                                | new | 8.4                                      | 8.4     | 8.4     | 8.5     |         |
|                                    | old |  | 7.3     | 7.8     | 7.8     | 8.1     |

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 24-hour after preparation

Table 8. pH values of test solutions during 96-hour semi-static exposure of medaka (*Oryzias latipes*) to butanoic acid, 2-ethyl-

| Nominal concentration (mg/L) |     | pH     |         |         |         |         |
|------------------------------|-----|--------|---------|---------|---------|---------|
|                              |     | 0-hour | 24-hour | 48-hour | 72-hour | 96-hour |
| Control                      | new | 7.0    | 7.0     | 7.0     | 7.0     |         |
|                              | old |        | 7.0     | 7.0     | 7.2     | 7.1     |
| 50.0                         | new | 5.4    | 5.4     | 5.4     | 5.6     |         |
|                              | old |        | 6.3     | 6.2     | 6.5     | 6.5     |
| 100                          | new | 4.3    | 4.3     | 4.3     | 4.5     |         |
|                              | old |        | 4.5     | 4.5     | 4.8     | 4.9     |

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 24-hour after preparation

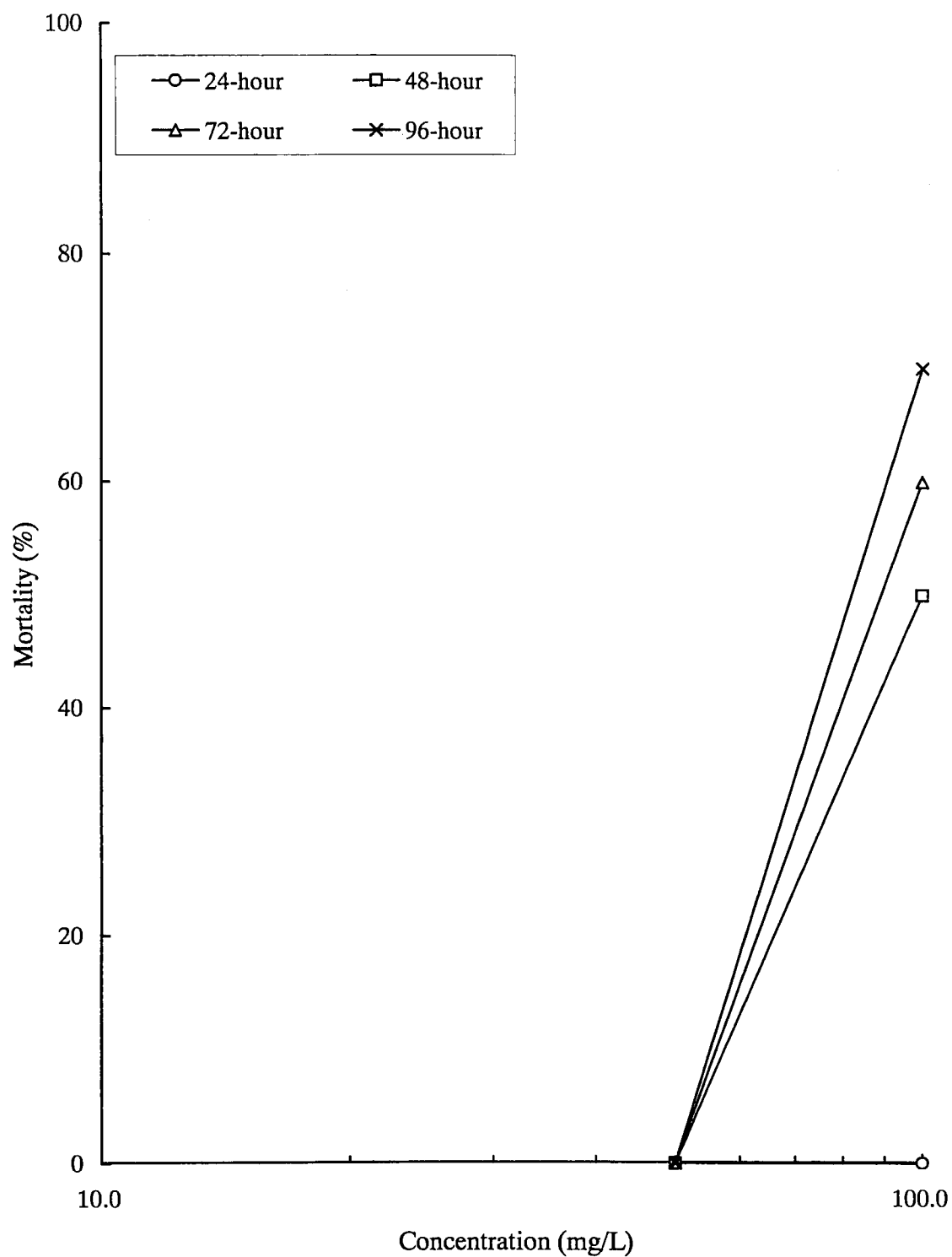


Figure 1. Concentration - toxicity curve of butanoic acid, 2-ethyl- in medaka (*Oryzias latipes*).

## 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)                                    | <0.5          |                          |
| Coliform group bacteria (MPN/100 mL)          | 0             |                          |
| Total phosphorus (mg/L)                       | 0.015         |                          |
| 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)                                   | 0.03          |                          |
| 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)                       | 0.01          |                          |
| Arsenic (mg/L)                                | n.d.          | 0.002                    |
| Selenium (mg/L)                               | n.d.          | 0.002                    |
| Evaporation residue (mg/L)                    | 145           |                          |
| Electric conductivity ( $\mu$ S/cm)           | 186           |                          |
| Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> ) (mg/L) | 61.0          |                          |
| Alkalinity (mg/L)                             | 36.5          |                          |
| Sodium (mg/L)                                 | 18.5          |                          |
| Potassium (mg/L)                              | 3.93          |                          |
| Calcium (mg/L)                                | 14.0          |                          |
| Magnesium (mg/L)                              | 6.32          |                          |

## 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 : August 7, 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 : ヒメダカ急性毒性試験

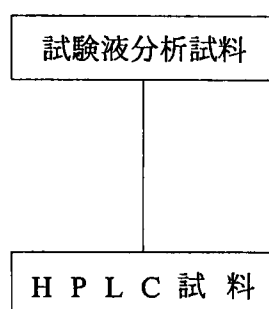
被験物質名 : Butanoic acid, 2-ethyl-

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



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、脱塩素水に溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを脱塩素水で希釈して100 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。100 mg/Lの被験物質溶液を脱塩素水で希釈して10.0 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/5 mM TBA溶液* 15/85 (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>3</sup>            |

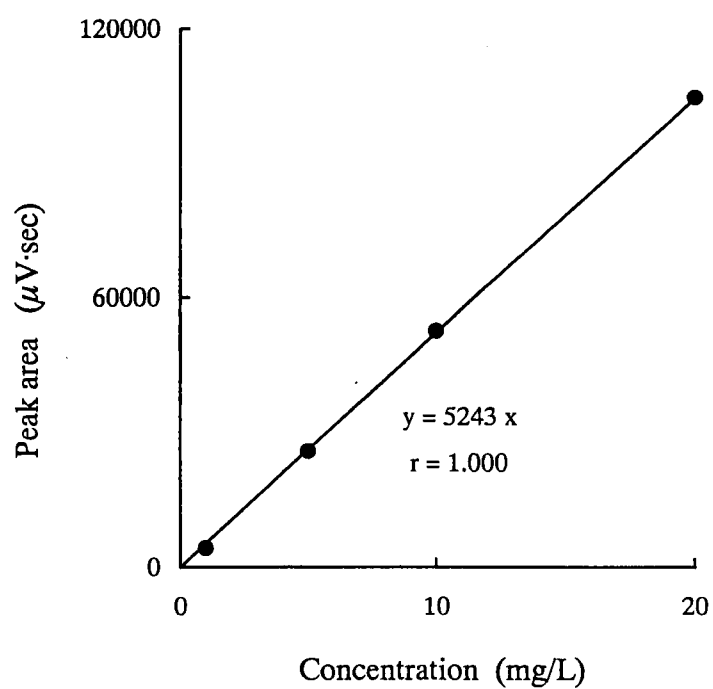
\* Tetra-n-butylammonium Phosphate

## 3) 検量線の作成

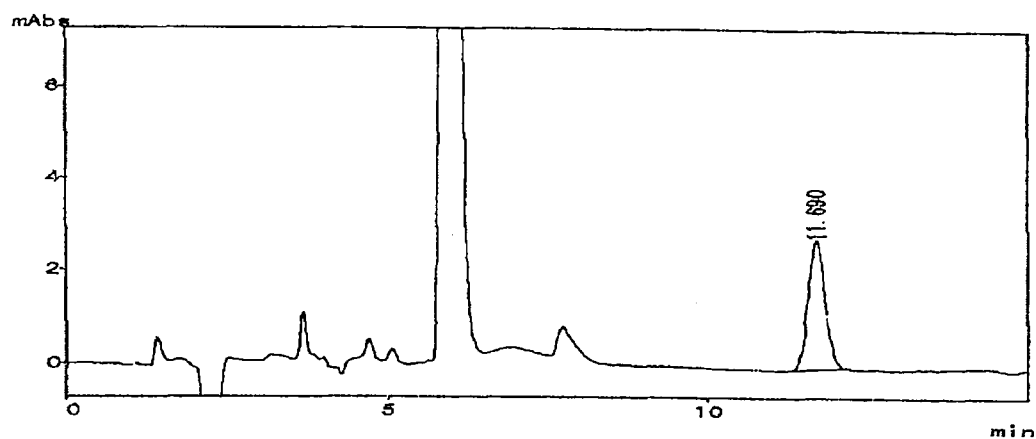
1)(3)の標準溶液の調製と同様にして1.00、5.00、10.0及び20.0 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

Input data

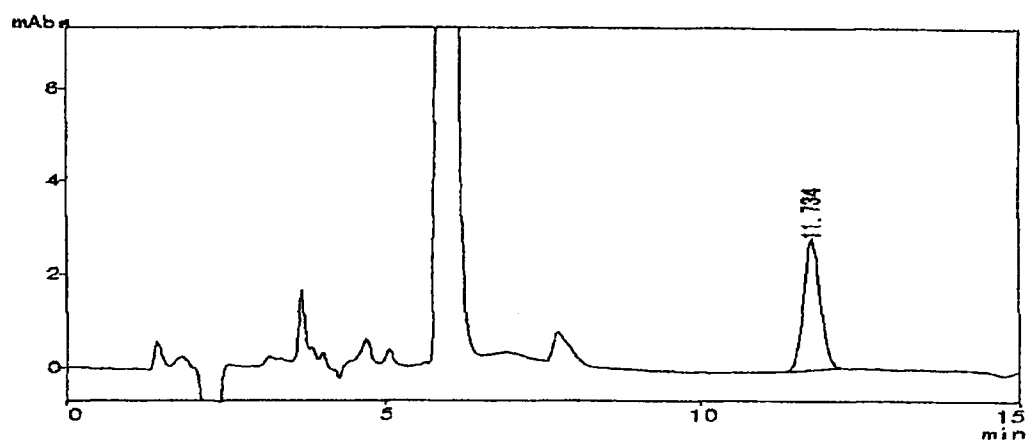
| Run | Concentration<br>(mg/L) | Peak area<br>( $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ ) |
|-----|-------------------------|---|
| 1   | 1.00                    | 4062  |
| 2   | 5.00                    | 25741   |
| 3   | 10.0                    | 52663   |
| 4   | 20.0                    | 104917  |



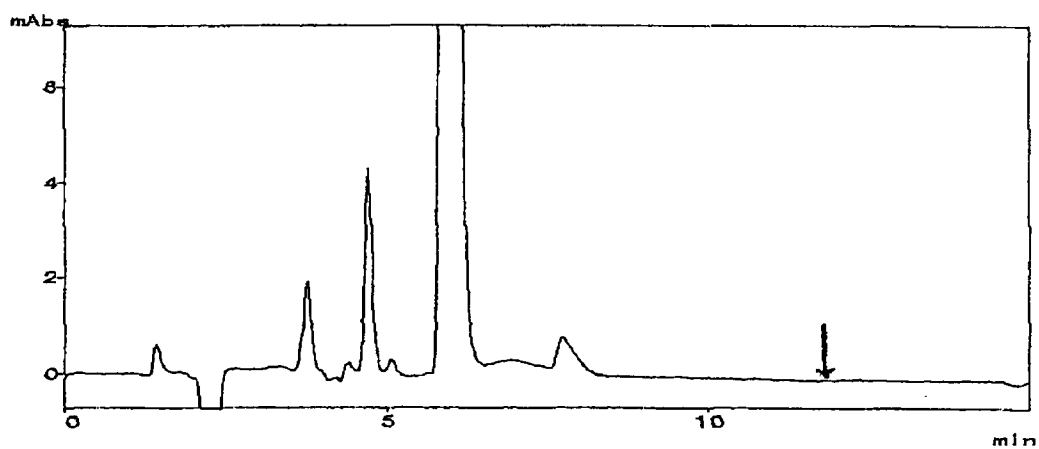
Appendix 2-1. Calibration curve of butanoic acid, 2-ethyl- by HPLC analysis.



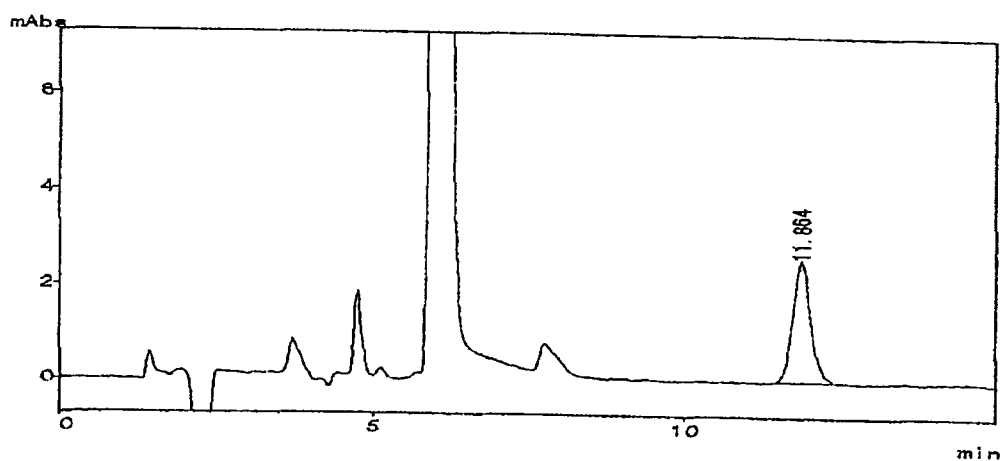
Appendix 2-2. Representative HPLC chromatogram of 10.0mg/L butanoic acid, 2-ethyl-standard at 0-hour.



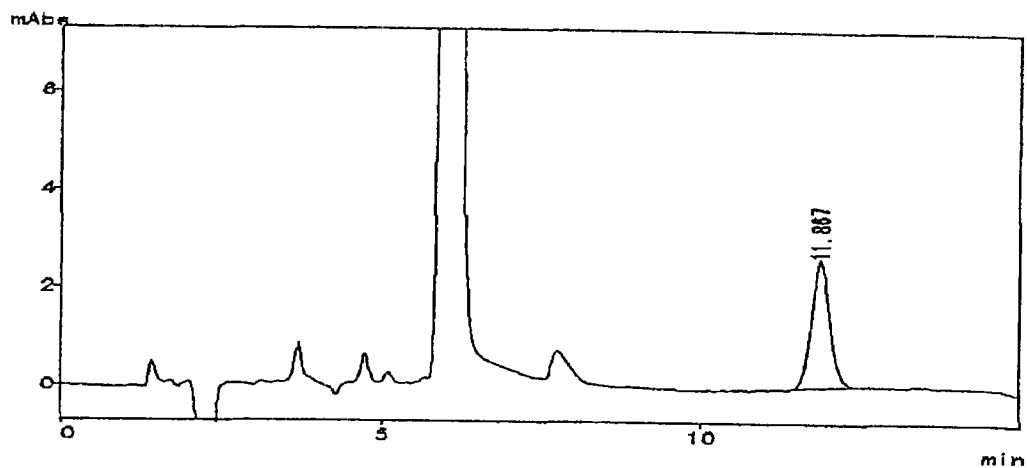
Appendix 2-3. Representative HPLC chromatogram of butanoic acid, 2-ethyl- in 100 mg/L test solution at 0-hour.



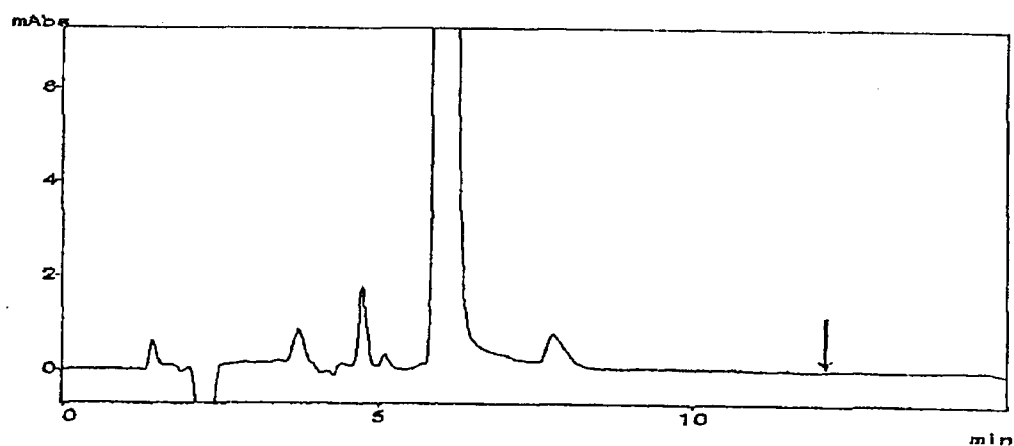
Appendix 2-4. Representative HPLC chromatogram of control solution at 0-hour.



Appendix 2-5. Representative HPLC chromatogram of 10.0mg/L butanoic acid, 2ethyl-standard at 24-hour.



Appendix 2-6. Representative HPLC chromatogram of butanoic acid, 2-ethyl- in 100 mg/L test solution at 24-hour.



Appendix 2-7. Representative HPLC chromatogram of control solution at 24-hour.