

環境省殿

## 最 終 報 告 書

Butanoic acid, 2-ethyl-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：92329)

2001 年 4 月 27 日作成

財団法人  
化学物質評価研究機構  
残留系事業所

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-のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳  
阻害試験

試験番号： 92329

本試験は環境省のGLP規則に従って実施したものである。

2001年 5月 / 日

運営管理者

\_\_\_\_\_

## 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-のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳  
障害試験

試験番号： 92329

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9日	2001年1月15日	2001年1月16日
試験実施状況査察	2001年1月11日	2001年1月15日	2001年1月16日
最終報告書監査	2001年5月1日	2001年5月1日	2001年5月1日

2001年5月1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

被験物質のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験を行い、24及び48時間後の半数遊泳阻害濃度(EiC50)及び最大無作用濃度(NOECi)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.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 27 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 27 日

暴露期間

2001 年 1 月 9 日 ~ 2001 年 1 月 11 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 .....	3
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状 .....	3
1.2 供 試 試 料 .....	3
1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性 .....	4
2 試 験 生 物 .....	4
3 試 験 方 法 .....	4
3.1 試 験 条 件 .....	4
3.2 希 釈 水 .....	5
3.3 試験容器及び恒温槽等 .....	5
3.4 試験濃度の設定 .....	5
3.5 試験液の調製 .....	5
3.6 被験物質の分析 .....	5
3.7 試 験 操 作 .....	6
3.8 数値の取扱い .....	6
4 結果の算出 .....	6
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 半数遊泳阻害濃度(EiC50) .....	7
5.4 最大無作用濃度(NOECi)及び100%阻害最低濃度 .....	7
5.5 試験液の水温、溶存酸素濃度(DO)及びpH .....	7
5.6 試験液の状態 .....	7
Table 1～7 .....	8～13
Figure 1 .....	14

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-のオオミジンコ(*Daphnia magna*)に対する急性遊泳阻害試験

### 試験番号

92329

### 試験方法

本試験は、OECD化学品テストガイドライン No.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： Butanoic acid, 2-ethyl-
- 2) 試 験 生 物： オオミジンコ(*Daphnia magna*)
- 3) 生 物 数： 20頭／試験区(1連につき5頭で1試験区20頭)
- 4) 暴 露 期 間： 48時間
- 5) 暴 露 方 式： 止水式
- 6) 試 験 濃 度： 150、100、66.7、44.4、29.6 mg/L(公比：1.5)及び対照区
- 7) 連 数： 1試験区につき4連
- 8) 試 験 液 量： 1試験容器(1連)につき100 mL
- 9) 試 験 水 温： 20±1℃
- 10) 照 明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 11) 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、暴露終了時)

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の $\pm 20\%$ 以内であったため、各影響濃度の算出には設定濃度を採用した。

2) 24時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度(EiC50) : 71.7 mg/L(95%信頼限界 : 44.4~100 mg/L)

最大無作用濃度(NOECi) : 44.4 mg/L

100%阻害最低濃度 : 100 mg/L

3) 48時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度(EiC50) : 71.7 mg/L(95%信頼限界 : 44.4~100 mg/L)

最大無作用濃度(NOECi) : 44.4 mg/L

100%阻害最低濃度 : 100 mg/L



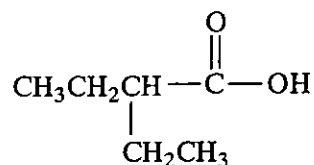
## 1 被驗物質

本最終報告書において被験物質は、次の名称及び品質等を有するものとする。  
供試試料に関する情報については供給者提供の添付資料等によった。

### 1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称: Butanoic acid, 2-ethyl-  
(CAS番号 88-09-5)

- 2) 構造式:



- 3) 分子式:  $C_6H_{12}O_2$
- 4) 分子量: 116.16
- 5) 沸点:  $194^{\circ}C^{*2}$
- 6) 融点: 不明
- 7) 密度:  $0.923\text{ g/mL}(20^{\circ}C)^{*1}$
- 8) 安定性: 不明
- 9) 1-オクタノール／水分配係数(logP): 不明
- 10) pKa: 不明
- 11) 水への溶解度: 不明
- 12) 蒸気圧: 不明

情報源

\*1: 供給者提供の添付資料

\*2:

## 1.2 供試試料

- 1) 純 度: 含量 100.0%
- 2) ロット番号: PAJ5700
- 3) 供 給 者: XXXXXXXXXX
- 4) 供 給 量: 25 mL×3 本
- 5) 入 手 日: 2000 年 12 月 1 日
- 6) 外 観: 無色澄明の液体

### 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 : オオミジンコ
- 2) 学 名 : *Daphnia magna* (Clone A)
- 3) 入 手 先 : 英国Sheffield大学(所在地 ; Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)
- 4) 入 手 日 : 1990 年 7 月 9 日
- 5) 入手後の管理 : 継代飼育(最大飼育期間 ; 31日間)
- 6) 感受性の確認 : 基準物質(ニクロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)による48時間の半数遊泳阻害濃度(EiC50)=0.171 mg/L [久留米事業所における1998年1月以降のEiC50 : 0.128~0.296 mg/L(n=20)の範囲にある。]
- 7) 親 の 順 化 : 順化期間 ; 2000 年 12 月 12 日~2001 年 1 月 9 日  
暴露開始前2週間の親の死亡率は5%以下で休眠卵及び雄の発生は認められなかった。(順化条件は以下に示す。)
- 8) 供 試 令 : 生後24時間令以内の幼体

### 順化条件

- 1) 飼 育 水 : 希釈水(3.2参照)
- 2) 飼 育 密 度 : 10~30頭/800 mL飼育水
- 3) 水 温 : 20±1℃
- 4) 照 明 : 室内光、16時間明/8時間暗
- 5) 餌 : *Chlorella vulgaris*
- 6) 給 餌 量 : ミジンコ1頭当たり0.1~0.2 mgC(有機炭素含量)/日

## 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、試験液の交換をしない止水式で行った。
- 2) 暴露期間 : 48時間
- 3) 連 数 : 1試験区に付き4連
- 4) 生 物 数 : 20頭/1試験区(1連に付き5頭で1試験区20頭)
- 5) 試験液量 : 1試験容器に付き100 mL

- 6) 試験水温： 20±1℃
- 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

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： 100 mLガラスビーカー
- 2) 恒 温 槽： 加温冷却機によって試験容器内の水温が20±1℃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150 mg/Lを最高濃度として公比1.5で5濃度区(150、100、66.7、44.4及び29.6 mg/L)を設定した。また、希釈水のみを対照区を設けた。

### 3.5 試験液の調製

必要量の被験物質に脱塩素水を加えて攪拌し、1,000 mg/Lの試験原液を調製した。試験液は、各濃度区毎に必要な量の試験原液と脱塩素水を混合し、調製した。この試験液を各試験容器に分割した。

### 3.6 被験物質の分析

暴露開始時及び終了時(48時間後)に採取した試験液をHPLCにより分析した。測定用試験液は暴露開始時については試験液調製容器より採取したものを、暴露終了時については各1試験容器より試験液の中層から採取したものをを用いた。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

試験生物を投入し、その時点を暴露開始時とした。先端が比較的広口のガラスピペットを用いて試験生物を投入した。その際、試験液量に対して、ピペット内の飼育水は全量で1%以内を目安とした。

暴露開始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。試験液を穏やかに動かした後、15秒間泳げない場合、遊泳阻害されたとみなした(ただし、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。水面で動くものについては水滴を落とす等の操作でミジンコを強制的に水中に沈めると遊泳することもあるが、再び浮上する場合は遊泳阻害に含めた。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)。

水温、溶存酸素濃度(DO)、pHは、暴露開始時及び終了時に、全試験区(ただし、各1試験容器)の試験液について測定した。ただし、暴露開始時の水質は水質測定用に別途調製したものを測定した。

### 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

各濃度区でのミジンコの遊泳阻害数と供試個体数(20頭)から遊泳阻害率(%)を算出し、Binomial法により半数遊泳阻害濃度(EiC50)を算出した。また、その95%信頼限界も算出した。

ミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度を最大無作用濃度(NOECi)とした。

全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度を100%阻害最低濃度とした。

なお、被験物質の測定濃度が設定の $\pm 20\%$ 以内であったため、上記の結果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

暴露開始時及び終了時(48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101～103%、暴露終了時で101～102%であった。

### 5.3 半数遊泳阻害濃度(EiC50)

各時間における遊泳阻害率及びEiC50をそれぞれTable 2及びTable 3、濃度－遊泳阻害率曲線をFigure 1に示した。

48時間暴露の対照区の遊泳阻害率は0%、水面に浮いたミジンコは0%であり、試験成立条件を満たした。

遊泳阻害は、24及び48時間では66.7～150 mg/Lでみられた。24及び48時間EiC50は44.4～100 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。

24時間EiC50： 71.7 mg/L(95%信頼限界：44.4～100 mg/L)

48時間EiC50： 71.7 mg/L(95%信頼限界：44.4～100 mg/L)

### 5.4 最大無作用濃度(NOECi)及び100%阻害最低濃度

最大無作用濃度(NOECi)及び100%阻害最低濃度をTable 4に示した。

遊泳阻害は、24及び48時間では66.7～150 mg/Lでみられた。

以上の結果から、以下の結論を得た。

24時間NOECi： 44.4 mg/L

48時間NOECi： 44.4 mg/L

24時間100%阻害最低濃度： 100 mg/L

48時間100%阻害最低濃度： 100 mg/L

### 5.5 試験液の水温、溶存酸素濃度(DO)及びpH

試験液の水温をTable 5、DOをTable 6、pHをTable 7に示した。

暴露期間中に測定した水温は20.1～20.6℃であった。DOは8.4～8.8 mg/Lであり、飽和溶存酸素濃度の60%以上であった(19～21℃の飽和溶存酸素濃度：9.01～8.68 mg/L、JIS K 0102-2000)。pHは4.6～7.8であった。

以上のことから、水温及びDOについては、ミジンコの試験環境として適正範囲であったと考えられる。pHについては、高濃度区において被験物質の影響によると思われる低下がみられ、ミジンコの生存環境として適正範囲(pH=6-9)ではなかったと考えられる。

### 5.6 試験液の状態

調製時の試験液は無色透明で、その状態は暴露終了時まで変わらなかった。

以 上

Table 1. Concentrations of butanoic acid, 2-ethyl- acute immobilization test using *Daphnia magna* under static conditions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)		
	0-hour	48-hour	Mean*
Control	n.d.	n.d.	n.d.
29.6	30.2 (102)	29.9 (101)	30.0 (101)
44.4	45.8 (103)	45.4 (102)	45.6 (103)
66.7	67.1 (101)	67.7 (102)	67.4 (101)
100	101 (101)	102 (102)	102 (102)
150	152 (101)	153 (102)	153 (102)

n.d. : <1.00 mg/L

\* The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:  

$$(C_0 - C_{48}) / (\ln C_0 - \ln C_{48})$$

where

$C_0$  : the measured concentration at 0-hour

$C_{48}$  : the measured concentration at 48-hour

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

$\ln C_{48}$  : the natural logarithm of  $C_{48}$ .

Table 2. Immobility of *Daphnia magna* exposed to butanoic acid, 2-ethyl-

Nominal concentration (mg/L)	Number of immobilized <i>Daphnia</i> (Percent immobility)	
	24-hour	48-hour
Control	0 ( 0 )	0 ( 0 )
29.6	0 ( 0 )	0 ( 0 )
44.4	0 ( 0 )	0 ( 0 )
66.7	7 (35)	7 (35)
100	20 (100)	20 (100)
150	20 (100)	20 (100)

The values include dead *Daphnia* .

Table 3. Calculated EiC50 values for *Daphnia magna* exposed to butanoic acid, 2-ethyl- based on nominal concentrations

Exposure time (hour)	EiC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)	Statistical method
24	71.7	44.4 – 100	Binomial
48	71.7	44.4 – 100	Binomial

Table 4. No observed effect concentration (NOECi) of butanoic acid, 2-ethyl- and lowest concentration in 100% immobility based on nominal concentrations

Exposure time (hour)	No observed effect concentration (NOECi) (mg/L)	Lowest concentration in 100% immobility (mg/L)
24	44.4	100
48	44.4	100



Table 5. Temperature of test solutions during 48-hour static exposure of *Daphnia magna* to butanoic acid, 2-ethyl-

Nominal concentration (mg/L)		Temperature (°C)	
		0-hour	48-hour
Control	new	20.6	
	old		20.2
29.6	new	20.5	
	old		20.1
44.4	new	20.5	
	old		20.1
66.7	new	20.6	
	old		20.2
100	new	20.6	
	old		20.2
150	new	20.6	
	old		20.2

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 hours exposure

Table 6. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 48-hour static exposure of *Daphnia magna* to butanoic acid, 2-ethyl-

Nominal concentration (mg/L)		Dissolved oxygen concentration (mg/L)	
		0-hour	48-hour
Control	new	8.8	
	old		8.6
29.6	new	8.8	
	old		8.4
44.4	new	8.8	
	old		8.5
66.7	new	8.8	
	old		8.5
100	new	8.8	
	old		8.7
150	new	8.8	
	old		8.7

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 hours exposure

Table 7. pH values of test solutions during 48-hour static exposure of *Daphnia magna* to butanoic acid, 2-ethyl-

Nominal concentration (mg/L)		pH	
		0-hour	48-hour
Control	new	7.8	
	old		7.7
29.6	new	7.0	
	old		7.6
44.4	new	6.6	
	old		7.5
66.7	new	6.0	
	old		7.2
100	new	5.2	
	old		5.4
150	new	4.6	
	old		4.6

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions after 48 hours exposure

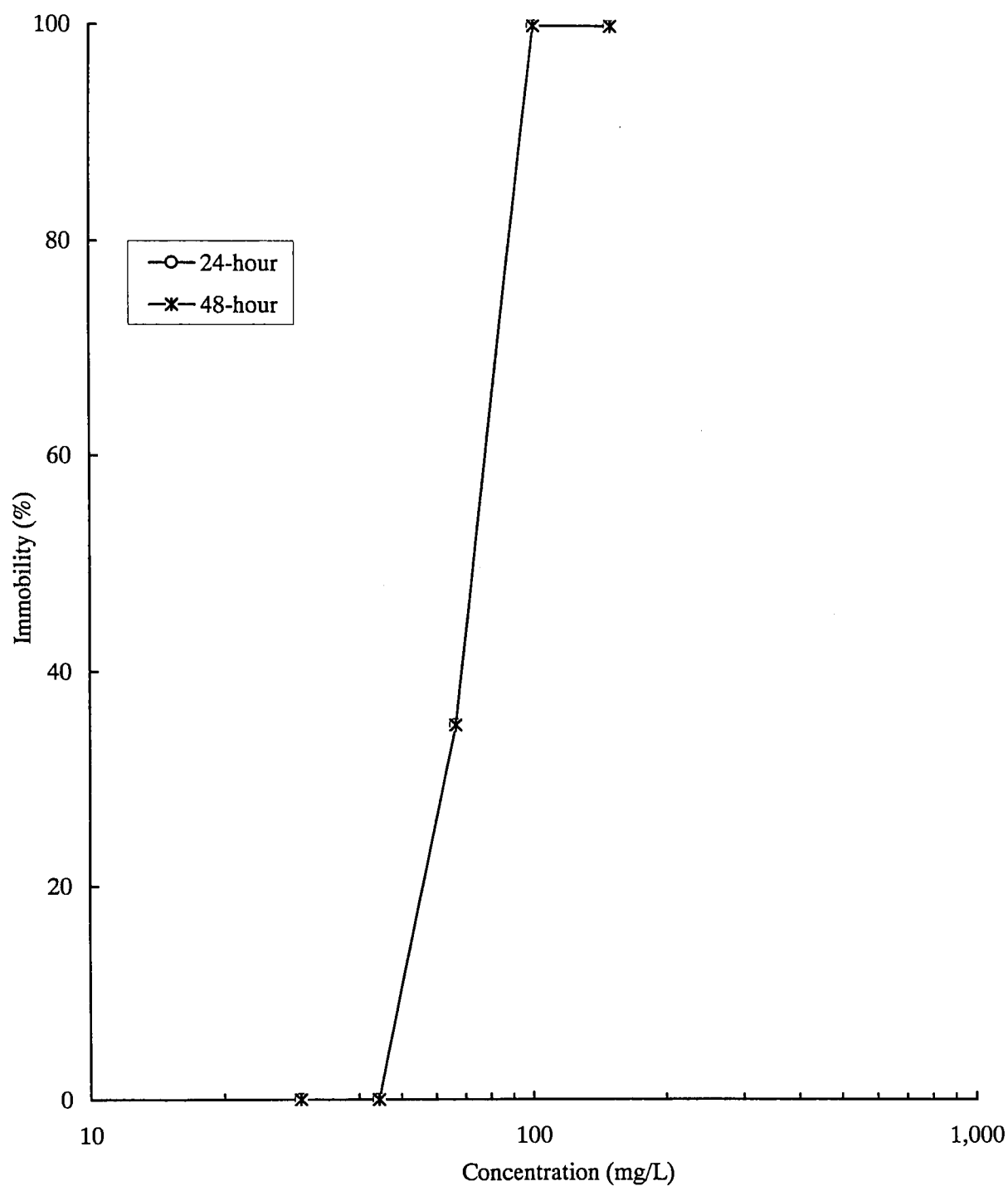


Figure 1. Concentration - toxicity curve of butanoic acid, 2-ethyl- in *Daphnia magna* .

## 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		0	
	(MPN/100 mL)		
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> )		61.0	
	(mg/L)		
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 : ミジンコ急性遊泳阻害試験

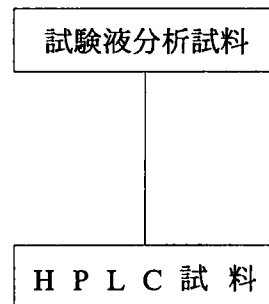
被験物質名 : Butanoic acid, 2-ethyl-

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>

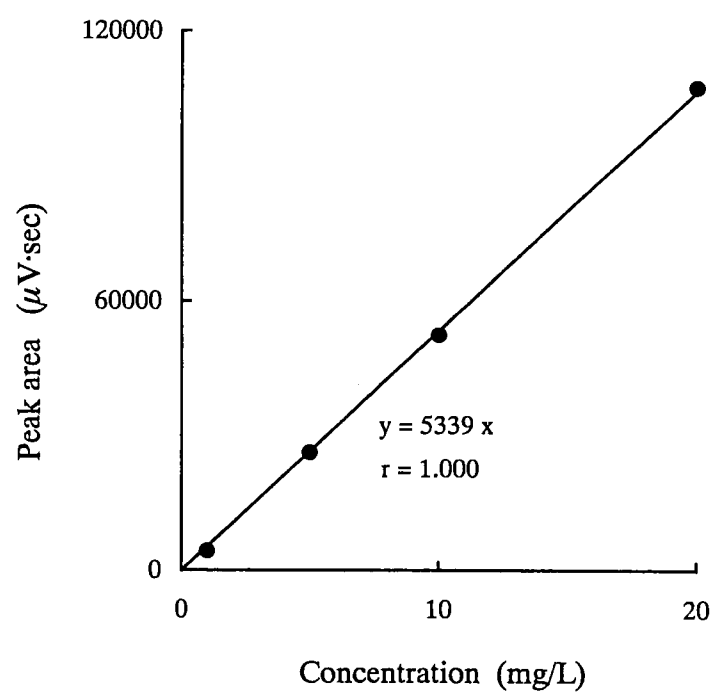
\* Tetra-n-butylammonium phosphate

## 3) 検量線の作成

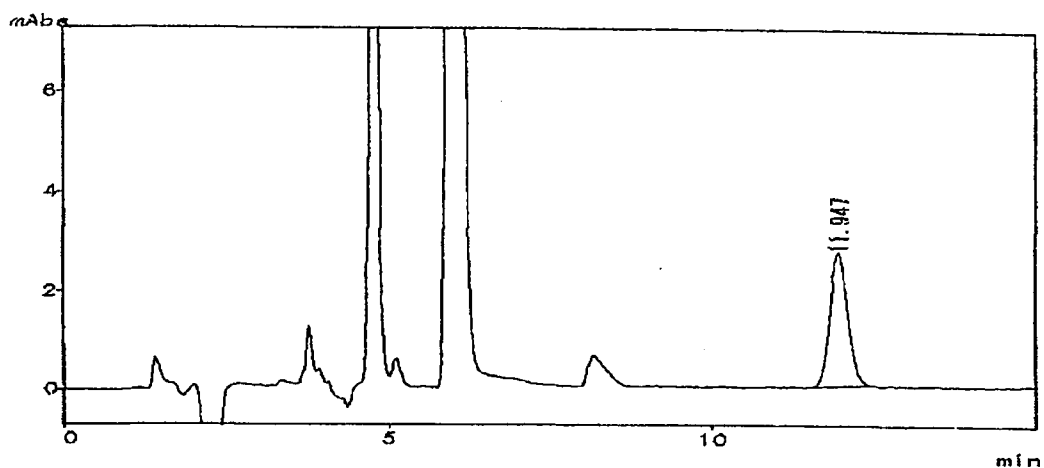
1)(3)の標準溶液の調製と同様にして1.00、5.00、10.0及び20.0 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

Input data

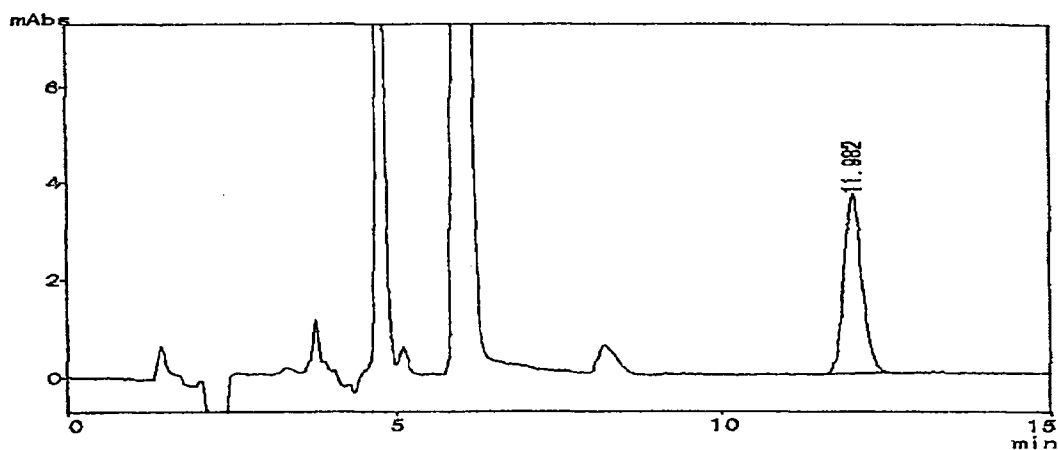
Run	Concentration (mg/L)	Peak area ( $\mu$ V·sec)
1	1.00	4260
2	5.00	26280
3	10.0	52254
4	20.0	107494



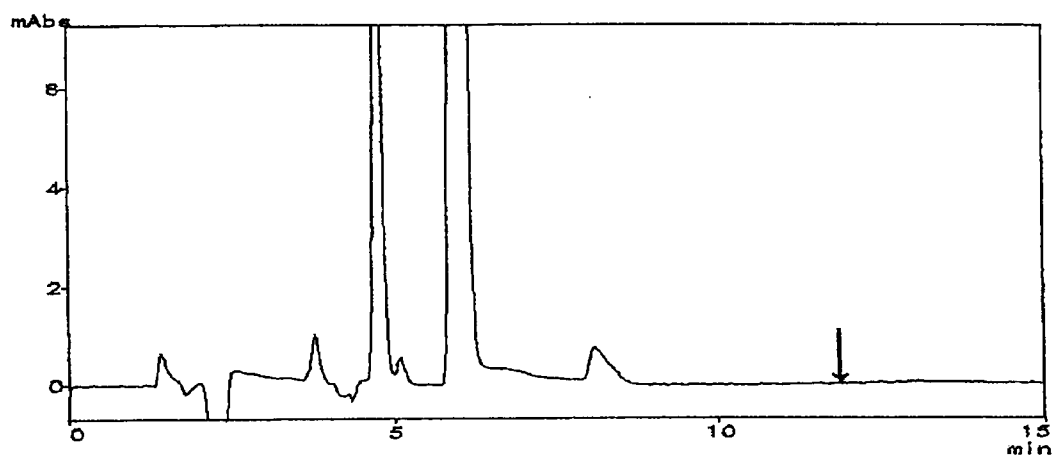
Appendix 2-1. Calibration curve of butanoic acid, 2-ethyl- by HPLC analysis.



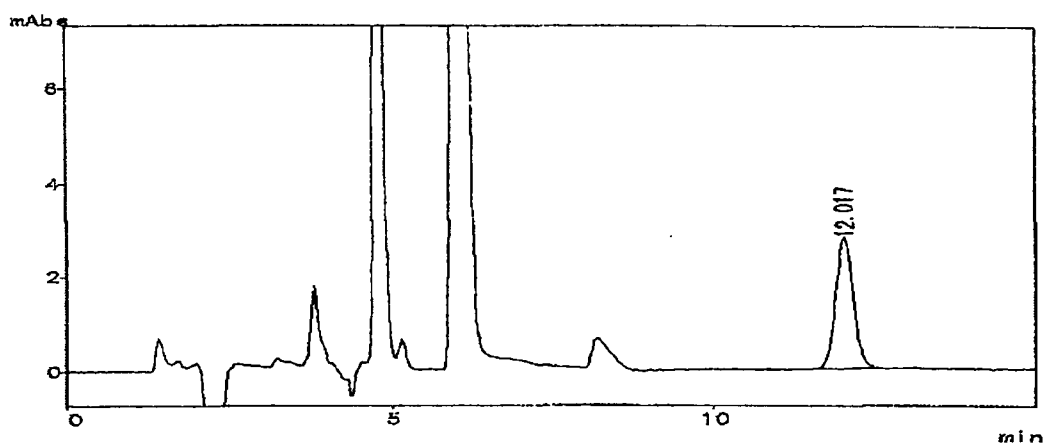
Appendix 2-2. Representative HPLC chromatogram of 10.0mg/L butanoic acid, 2-ethyl-standard at 0-hour.



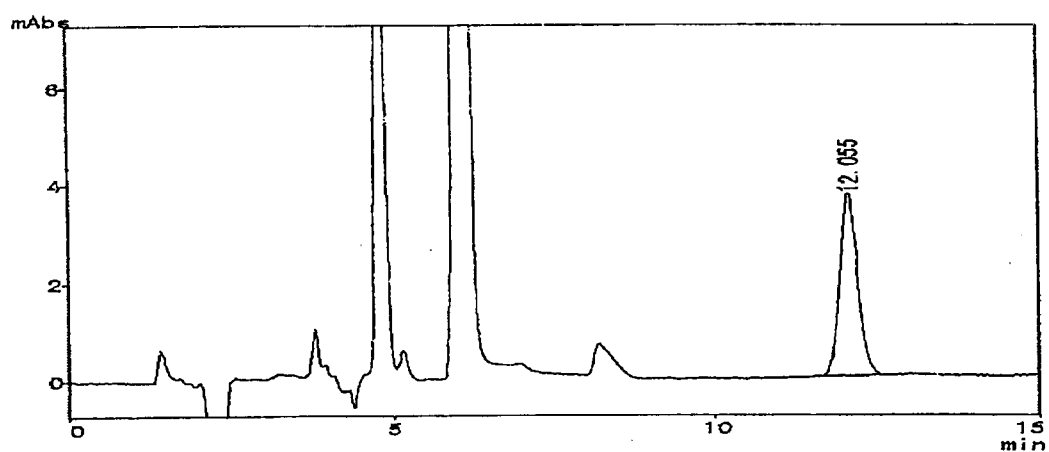
Appendix 2-3. Representative HPLC chromatogram of butanoic acid, 2-ethyl- in 66.7 mg/L test solution at 0-hour.



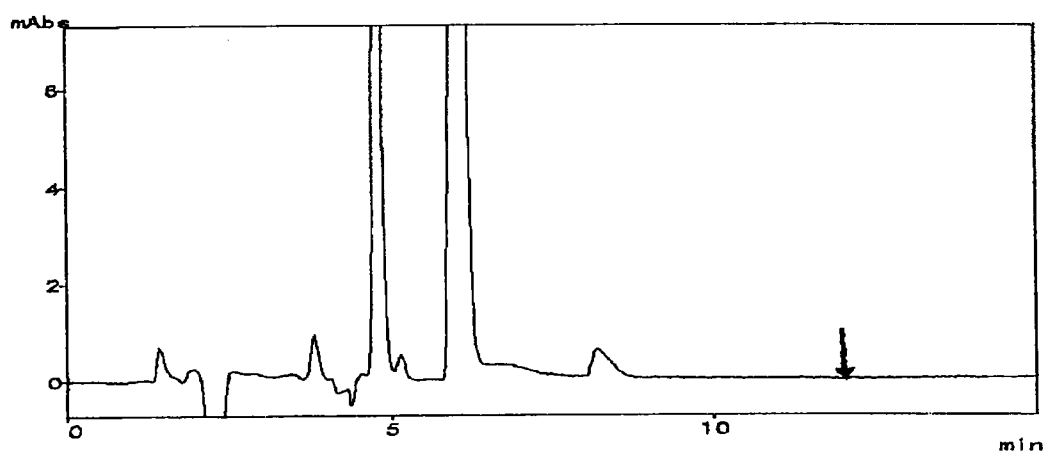
Appendix 2-4. Representative HPLC chromatogram of control solution at 0-hour.



Appendix 2-5. Representative HPLC chromatogram of 10.0mg/L butanoic acid, 2ethyl-standard at 48-hour.



Appendix 2-6. Representative HPLC chromatogram of butanoic acid, 2-ethyl- in 66.7 mg/L test solution at 48-hour.



Appendix 2-7. Representative HPLC chromatogram of control solution at 48-hour.