

環境省殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所
横浜研究所 運営管理者

最 終 報 告 書

2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル) フェノールの
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号 : A 0 3 0 4 2 0 - 4)

2 0 0 4 年 1 2 月 2 2 日

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 : 環境省

表 題 : 2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル) フェノールの
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A030420-4

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、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

日本国環境省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長通知
「生態影響試験実施に関する基準の改正について」(別添)「生態影響試験実施に関する基準」(環保安第242号, 2001年)

2004年12月22日

試験責任者





信 頼 性 保 証 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 : 環境省

表 題 : 2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル) フェノールの
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A030420-4

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、下記の査察および監査実施により確認した。

記

実 施 事 項		実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査		2004年10月 4日	2004年10月 4日
試験の査察	試験液の調製	2004年11月 8日	2004年11月 8日
	魚の投入	2004年11月 8日	2004年11月 8日
	魚の観察	2004年11月12日	2004年11月12日
最終報告書監査		2004年12月22日	2004年12月22日

2004年12月22日

信頼性保証部門担当者



試 験 実 施 概 要

1. 表 題 : 2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル) フェノールの
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
(試験番号: A030420-4)
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、96 時間の半数致死濃度 (LC50) を求める。
3. 適用ガイドライン : 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)
4. 適 用 G L P : 日本国環境省総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク
評価室長通知「生態影響試験実施に関する基準の改正につ
いて」 (別添) 「生態影響試験実施に関する基準」
(環保安第 242 号, 2001 年)
5. 試 験 委 託 者 : 環境省
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2
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 XXXXXXXXXX
6. 試 験 受 託 者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所
〒105-0014 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試 験 施 設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者 : [redacted]
環境科学Cグループ

9. 試験担当者 : [redacted] [redacted] (2004年12月22日)
(報告書作成)

[redacted] [redacted] (2004年12月22日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2004年12月22日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2004年12月22日)
(分析実施)

10. 試験日程 : 試験開始日 2004年10月 4日
実験開始日 2004年11月 8日
実験終了日 2004年11月12日
試験終了日 2004年12月22日

11. 保管 : 試験計画書, 生データ, 被験物質, 記録文書および最終報告書は, 横浜研究所の保管施設に保管する。
保管期間は, 最終報告書作成後10年間とし, 以後の保管は試験委託者と協議の上, 決定する。
ただし, 被験物質については, 最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

目 次

	頁
要 約	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	11
3.1 試験条件	11
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	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 半数致死濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	14
4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出	14
4.3 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	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 半数致死濃度 (LC50)	15
5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	15
5.5 毒性症状	15
5.6 試験液の水温, 溶存酸素濃度およびpH	16
5.7 試験計画書からの逸脱事項	16
Table 1~8	17~23
Figure 1	24
付属資料-1 希釈水の水質	25~26
付属資料-2 試験液の調製	27~28
付属資料-3 試験液の分析	29~38
付属資料-4 結果の算出	39~40

要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル) フェノールの
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A 0 3 0 4 2 0 - 4

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン: 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)
- 2) 暴 露 方 式 : 半止水式 (24時間毎に試験液の全量を交換)
水面をテフロンシートで被覆
- 3) 供 試 生 物 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴 露 期 間 : 96時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 助剤対照区, 0.0600, 0.0900, 0.130, 0.200, 0.300 mg/L
(設定値) 公比: 1.5
助剤濃度一定: 100 μ L/L (ジメチルホルムアミド 使用)
- 6) 試 験 液 量 : 5.0 L/容器
- 7) 連 数 : 1 容器/試験区
- 8) 供 試 生 物 数 : 10尾/試験区
- 9) 試 験 温 度 : 24 \pm 1 $^{\circ}$ C
- 10) 照 明 : 室内光, 16時間明 (1000 lux以下) / 8時間暗
- 11) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

試 験 結 果 :

1) 試験液中の被験物質濃度

試験液の分析の結果, 測定値の設定値に対する割合は, 暴露開始時において100~102%,
24時間後において95~101%であった。

2) 96時間暴露後の半数致死濃度 (LC50) : 0.280 mg/L (95%信頼区間: 0.233~0.430 mg/L)

1 被験物質

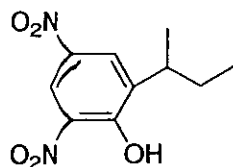
1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： 2,4-ジニトロ-6-(1-メチルプロピル) フェノール (略称 DNB P)

別 名： ジノ セブ

CAS No： 88-85-7

構造式：



分子式： $C_{10}H_{12}N_2O_5$

分子量^{*1}： 240.22

融点^{*1}： 41.7～42.0℃

溶解度^{*1}： エタノールに易溶

水溶解度^{*2}： 22.7mg/L (精製水^{*3}, 20℃, 48時間攪拌, HPLC分析)

*1：供給者提供資料

*2：当社測定値

*3：JIS K0557 A4グレードの水, ヤマト科学製 超純水製造装置 WR600A

1.2 供試試料

純度^{*1}： 99.9% (GC)

ロット番号^{*1}： 2274X

供給者： XXXXXXXXXX

受領量^{*1}： 100mg × 25

受領日： 2004年 8月10日

外観^{*1}： 橙黄色固体

*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

試験開始前に、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。

試験期間中、被験物質は当研究所の試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所）内に保管した。また、試験終了時にも赤外吸収スペクトルを測定し、試験開始時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は安定であったと判断された。

（装置）フーリエ変換赤外分光分析装置：Nicolet製 AVATAR 320型

2 供試生物

- 1) 和 名： ヒメダカ
2) 学 名： *Oryzias latipes*
3) 入手先： 自家繁殖
4) 採卵開始日： 2004年 2月 3日
5) ロット番号： 04-H-0203B
6) 被鱗体長： 平均 1.82 cm (1.73 ~1.97 cm) , n=10
7) 体 重： 平均 0.068 g (0.059~0.078 g) , n=10
8) 感受性： 基準物質（硫酸銅（Ⅱ）五水和物，試薬特級）による96時間半数致死濃度 (LC50) = 0.79 mg/L (95 %信頼区間：0.58~1.1 mg/L)

この値は、以下に示した当研究所におけるLC50値（1995年以降，n=26）
にはほぼ一致する（全て無水物換算値）。

平均値 ± 標準偏差 = 0.91 ± 0.29 mg/L

最小値 ~ 最大値 = 0.44 ~ 1.5 mg/L

- 9) 年 齢： 孵化後約9ヶ月

- 10) じゅん化期間： 2004年10月14日~2004年11月 8日

暴露開始前 7 日間の死亡率は 5%未満で，試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。じゅん化期間中は薬浴は行わなかった。（暴露開始前 14 日間のじゅん化条件は以下に示す。）

- 11) じゅん化条件：

飼育水： 希釈水（3.2 参照）

飼育方式： 流水式（飼育密度：1.0 g/L/日以下）

水温： 24±1 ℃

溶存酸素濃度： 飽和濃度の 80%以上

pH： 6.5~8.5

照明： 室内光，16 時間明（1000 lux 以下）／8 時間暗

餌の種類： テトラベルケ社テトラミン

給餌量： 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： 半止水式（24時間毎に試験液の全量を交換）
- 2) 暴露期間： 96時間
- 3) 試験液量： 5.0 L/容器
(試験液 1.0 L 当たり供試魚重量が 1.0 g を超えないようにした)
- 4) 連数： 1 容器/試験区
- 5) 供試生物数： 10 尾/試験区
- 6) 試験温度： 24 ± 1 °C
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の 60% 以上に維持した（エアレーションなし）
- 8) pH： 試験液の pH 調整は行わなかった
- 9) 照明： 室内光，16 時間明（1000 lux 以下）/8 時間暗
- 10) 給餌： 無給餌

3.2 希釈水

希釈水として、横浜市水道水を活性炭処理することにより残留塩素等を除去し、充分通気、 24 ± 2 °C に温度制御した脱塩素水道水を使用した。希釈水水質測定結果を付属資料-1 に示した。使用時には残留塩素が無いことを確認した。魚飼育水として適正な水質であると判断した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 5.0 L 容ガラス製水槽（水面をテフロンシート製蓋で覆う）
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 ケルニット CL-80F 型）
- 3) pH/DO/温度計： 堀場製作所製 D-55 型
- 4) 電子天秤：
 - メトラー製 AG204 型
 - メトラー製 AE163 型
 - メトラー製 PB3002 型
 - メトラー製 AB204 型

3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験（各 1 連，5 尾／3 L／試験区）結果に基づき，本試験濃度を次のように決定した。

本試験濃度： 対照区， 助剤対照区，

0.0600, 0.0900, 0.130, 0.200, 0.300 mg/L

公比：1.5

予備試験結果

(1回目)

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率 (%)
0.0500	0
0.500	100
5.00	100

(2回目)

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率 (%)
0.0800	0
0.300	100

3.5 試験液の調製

付属資料－2に示すように，被験物質原液Ⅱを用時調製し，希釈水で希釈混合することにより，試験液を調製した。

試験液調製時の希釈水は，調製前に恒温槽内で 24 ± 1 ℃にした。

対照区は希釈水のみとし，助剤対照区には助剤のみを含むもの（助剤濃度：100 μ L/L）を調製した。

調製時の試験液の状態（外観）は対照区，助剤対照区は無色透明，濃度区は黄色透明であった。

被験物質原液Ⅰは，暴露開始時に調製し，暴露期間中は冷蔵庫に保管，試験液調製時に使用した。この原液は，冷蔵，暗所で96時間以上安定であることを確認した。

3.6 試験液の分析

暴露開始時および24時間後（換水前）に各試験容器より試験液1 mLを採取し、アセトニトリルを等量添加し混合後、HPLCにより分析した。各試験液の被験物質濃度は、標準溶液のピーク面積との比から定量し、幾何平均値を求めた。詳細は付属資料-3に示した。

3.7 試験操作

暴露開始時に供試魚と同水槽でじゅん化した魚10尾の被鱗体長および体重を測定し、被鱗体長が 2.0 ± 0.5 cmであることを確認した。

試験液の水溫、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験液中に供試魚を1試験区当り10尾投入した。水溫、溶存酸素濃度、pHは暴露期間中少なくとも毎日1回（換水前後も含む）測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始24、48、72および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あるいは異常を記録した。一般的に記載する症例と定義を以下に示した*。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

4.1 半数致死濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

半数致死濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値（平均）とした。

4.2 半数致死濃度（LC50）の算出

暴露開始 24, 48, 72 および 96 時間後の各試験区における、ヒメダカの死亡数と供試個体数（10 尾）から死亡率（％）を求め、以下の方法で半数致死濃度（LC50）を決定した。

最高濃度区における死亡率	≥ 50%	< 50%
LC50の決定方法	Probit 法, Moving average 法, Binomial法 での算出結果から適切と判断されたものを採用。 可能な限り 95%信頼区間を算出。	推定される濃度領域を記載する。
濃度－死亡率曲線の記載	記載する。	記載する。

4.3 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

死亡率が0%である最高濃度および死亡率が100%である最低濃度を可能な限り記録した。

また、0%死亡最高濃度とは、死亡個体が観察されない試験最高濃度、100%死亡最低濃度とは全ての個体が死亡した試験最低濃度とした。

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

暴露開始時および24時間後（換水前）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、代表的なクロマトグラムを付属資料－3に示した。

試験液の分析（3.6参照）の結果、測定値の設定値に対する割合は、暴露開始時において100～102%，24時間後において95～101%であった。なお、以下の結果（半数致死濃度，0%死亡最高濃度，100%死亡最低濃度）には測定値を用いた。

5.3 半数致死濃度（LC50）

各時間における死亡率を Table 2に、濃度－死亡率曲線を Figure 1に示した。

暴露96時間の対照区の死亡率は 0%，助剤対照区の死亡率は 0%であり、試験成立条件を満たした。

以上の結果に基づき算出された半数致死濃度（LC50）を Table 3 に、また暴露 96 時間における算出結果を以下および付属資料－4に示した。

96時間 LC50： 0.280 mg/L（95%信頼区間：0.233～0.430mg/L）

5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度を Table 4に、また暴露96時間における算出結果を以下に示した。

0%死亡最高濃度： 0.128 mg/L

100%死亡最低濃度： >0.301 mg/L

5.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table 5に示した。

対照区，助剤対照区，0.0600 mg/L ～ 0.130 mg/Lの濃度区では暴露期間中に異常な症状は観察されなかった。0.200 mg/Lの濃度区では異常遊泳（動作の緩慢），0.300 mg/Lの濃度区では異常遊泳（動作の緩慢）および表層遊泳が観察された。

5.6 試験液の水温，溶存酸素濃度および pH

試験液の水温を Table 6，溶存酸素濃度を Table 7，pH を Table 8 に示した。

水温はすべての試験区で 24 ± 1 °C で，溶存酸素濃度はすべての試験区で飽和溶存酸素濃度（24.0 °C の飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L）の 60% 以上であり，いずれも試験基準を満たした。pH はヒメダカの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であった。

5.7 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以上

Table 1 Measured Concentration of the Test Substance in Test Water

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)		Mean ^a Measured Concentration (mg/L)
	0 Hour (new)	24 Hours (old)	
Control	<0. 00005	<0. 00005	----
Solvent Control	<0. 00005	<0. 00005	----
0. 0600	0. 0610 (102)	0. 0577 (96)	0. 0593 (99)
0. 0900	0. 0914 (102)	0. 0912 (101)	0. 0913 (101)
0. 130	0. 133 (102)	0. 123 (95)	0. 128 (98)
0. 200	0. 199 (100)	0. 194 (97)	0. 196 (98)
0. 300	0. 306 (102)	0. 296 (99)	0. 301 (100)

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Table 2 Mortality of the Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to the Test Substance

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (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)
0.0600	0.0593	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.0900	0.0913	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.130	0.128	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.200	0.196	1 (10)	1 (10)	1 (10)	1 (10)
0.300	0.301	2 (20)	2 (20)	6 (60)	6 (60)

a: geometric mean

Table 3 Calculated LC50 Values

Exposure Period (Hours)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	>0.301	--	--
48	>0.301	--	--
72	0.280	0.233 - 0.430	Probit
96	0.280	0.233 - 0.430	Probit

--: Could not be determined

The LC50 value and its 95% confidence limits could not be determined by statistical method because the mortality of Medaka at the maximum concentration level was less than 50%.

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

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality (mg/L)
24	0.128	>0.301
48	0.128	>0.301
72	0.128	>0.301
96	0.128	>0.301

Table 5 Observed Toxicological Symptoms

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Symptoms (Symptom-number of fish)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	----	N	N	N	N
Solvent Control	----	N	N	N	N
0. 0600	0. 0593	N	N	N	N
0. 0900	0. 0913	N	N	N	N
0. 130	0. 128	N	N	N	N
0. 200	0. 196	N	N	ASR-1	ASR-1
0. 300	0. 301	ASR-1	ASR-2, SUR-3	ASR-4	ASR-4

a: geometric mean

N: No toxicological symptom was observed

ASR: abnormal swimming (reduced activity)

SUR: surfacing

Table 6 Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	23.6	24.2	24.0	24.1	23.9	24.2	24.0	24.2
Solvent Control	----	23.7	24.2	24.0	24.2	23.9	24.2	24.0	24.2
0.0600	0.0593	23.7	24.2	24.0	24.1	24.0	24.2	24.0	24.2
0.0900	0.0913	23.8	24.2	24.0	24.2	24.0	24.2	24.1	24.2
0.130	0.128	23.8	24.2	24.0	24.2	23.9	24.2	24.1	24.2
0.200	0.196	23.9	24.2	24.0	24.2	23.9	24.2	24.0	24.2
0.300	0.301	24.0	24.2	24.1	24.2	24.0	24.2	24.1	24.2

minimum: 23.6
maximum: 24.2

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Table 7 Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (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	----	8.3	6.9	8.3	7.1	8.3	7.1	8.3	7.1
Solvent Control	----	8.3	7.0	8.3	7.3	8.3	7.3	8.3	7.3
0.0600	0.0593	8.2	7.1	8.2	7.2	8.2	7.1	8.2	7.2
0.0900	0.0913	8.2	6.9	8.2	7.1	8.2	7.0	8.2	6.9
0.130	0.128	8.2	6.8	8.1	6.9	8.1	6.8	8.1	6.8
0.200	0.196	8.1	6.4	8.1	6.5	8.0	6.2	8.0	6.1
0.300	0.301	8.0	6.3	8.0	6.4	7.9	6.6	8.0	7.2

minimum:6.1
maximum:8.3

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Table 8 pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH							
		0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
		new	old	new	old	new	old	new	old
Control	----	7.2	6.8	7.2	7.2	7.3	7.2	7.4	7.1
Solvent Control	----	7.2	6.7	7.2	7.2	7.4	7.2	7.4	7.1
0.0600	0.0593	7.2	6.7	7.2	7.2	7.4	7.2	7.4	7.1
0.0900	0.0913	7.2	6.7	7.2	7.1	7.4	7.1	7.4	7.1
0.130	0.128	7.2	6.6	7.2	7.1	7.4	7.1	7.4	7.1
0.200	0.196	7.2	6.6	7.2	7.1	7.4	7.1	7.5	7.0
0.300	0.301	7.2	6.6	7.2	7.1	7.4	7.1	7.5	7.2

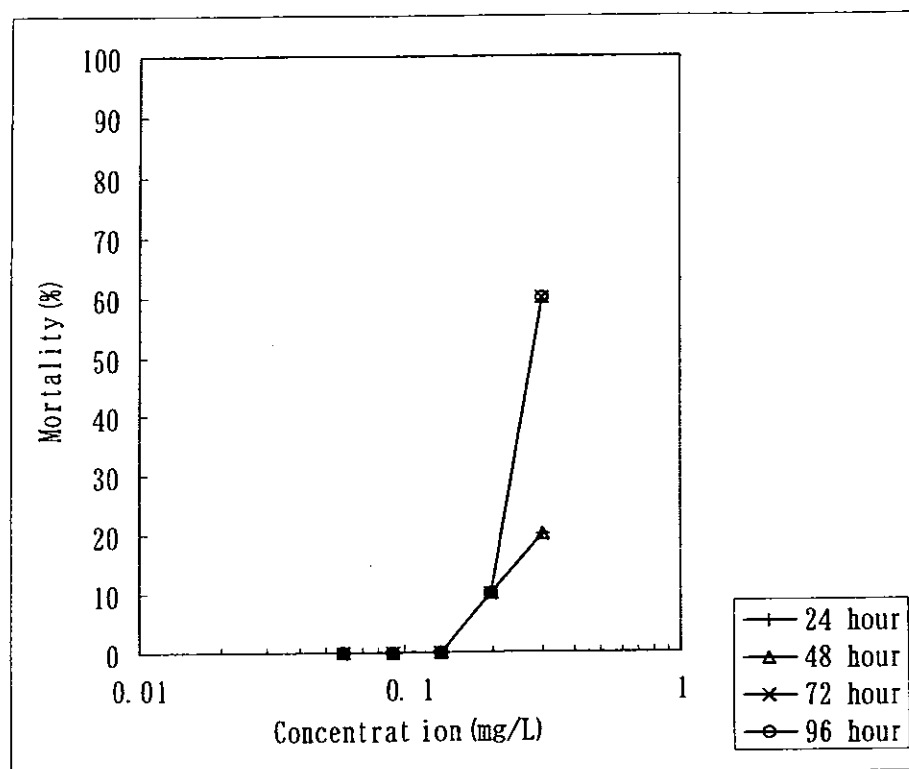
minimum:6.6
maximum:7.5

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Figure 1 Concentration-Mortality Curve



付属資料－ 1

希釈水の水質

Table A-1 Dilution water quality

Parameter	Concentration	
BOD	<1.0	mg/L
COD	1.3	mg/L
pH	7.4	(25°C)
Coliform group bacteria	N. D.	
Oil	N. D.	
Cadmium	<0.001	mg/L
Cyanide	N. D.	
Lead	<0.01	mg/L
Chromium	<0.005	mg/L
Arsenic	<0.005	mg/L
Mercury	<0.0001	mg/L
Free chlorine	<0.02	mg/L
Bromide	<0.1	mg/L
Fluoride	<0.08	mg/L
Sulfide	<0.03	mg/L
Total ammonium	<0.1	mg/L
Copper	<0.005	mg/L
Zinc	<0.01	mg/L
Aluminum	0.05	mg/L
Tin	<0.1	mg/L
Manganese	<0.1	mg/L
Iron	<0.1	mg/L
Nickel	<0.01	mg/L
Total phosphorus	<0.01	mg/L
Selenium	<0.005	mg/L
Phenol	<0.002	mg/L
Anionic surfactant	<0.02	mg/L
Evaporation residue	92	mg/L
Electric conductivity	109	μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	40	mg/L
Alkalinity	31	mg/L
Sodium	6.2	mg/L
Potassium	<1.0	mg/L
Calcium	12	mg/L
Magnesium	2.9	mg/L

sampling date: August 2, 2004

付属資料－ 2

試験液の調製

試験液の調製

1. 準備

① 被験物質原液Ⅰの調製

採取量	→	60.0	mg
溶媒	→	DMF	
最終容量	→	20	mL
容器	→	マスボトル	
濃度	→	3000	mg/L
混合方式	→	超音波5分	

② 被験物質原液Ⅱの調製

原液Ⅰ採取量	→	500	μL
溶媒	→	試験用水 = 希釈水	
最終容量	→	5000	mL × 3本
容器	→	メッシュ瓶	
濃度	→	0.300	mg/L
助剤濃度	→	100	μL/L
混合方式	→	スターラー15分	

③ 助剤原液の調製

助剤	→	DMF	溶媒をそのまま使用

2. 試験液の調製

②、③の各原液を下記の表の通り採取し、試験用水で希釈して試験液とする。

試験用水(最終容量)	→	5.00	L
容器	→	ガラス水槽	
混合方式	→	ガラス棒で攪拌	
濃度公比	→	1.5	

(以下の濃度表示は、最小桁数に合わせている)

設定試験濃度 mg/L	区No. (略称)	②原液Ⅱ mL	③助剤原液 mL	助剤濃度 μL/L
対 照 区	C	→ 0	0	0
助剤対照区	SC	→ 0	0.500	100
0.0600	Conc.1	→ 1000	0.400	100
0.0900	Conc.2	→ 1500	0.350	100
0.1300	Conc.3	→ 2167	0.283	100
0.2000	Conc.4	→ 3333	0.167	100
0.3000	Conc.5	→ 5000	0.000	100

付属資料－ 3

試験液の分析

1 試験液の分析方法

1) 各試験液 1 mL を採取し、さらにアセトニトリルを等量添加し混合後、HPLC により分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-3-2 (2), (3), (4), (5), (7), (8), (9), (10) に示した。

2) アセトニトリルで調製した標準溶液 1 mL を測定用バイアルに採取し、精製水*を等量添加し混合後、HPLC により分析した。クロマトグラムをFigure A-3-2 (1), (6) に示した。

*: JIS K0557 A4グレードの水, ヤマト科学製 超純水製造装置 WR600A

3) 各試験液の被験物質濃度は、各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて、一点検量法により定量した。

なお、暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し、直線性を確認している。（「3 検量線」参照）

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 (HPLC) :	Agilent 1100型 カラムスイッチング装置付 (No2)
ワークステーション :	Agilent 1100 シリーズ ケミステーション (Windows NT)
デガッサ :	G 1 3 2 2 A型
送液ポンプ :	G 1 3 1 1 A型 (クォータリポンプ, 分析用) G 1 3 1 1 A型 (クォータリポンプ, 濃縮用)
オートサンプラ :	G 1 3 1 3 A型
カラムオープン :	G 1 3 1 6 A型 (カラムスイッチングバルブ)
フォトダイオードアレイ検出器 :	G 1 3 1 5 B型

(条件)

カラム :	分析用	GLサイエンス製 Inertsil ODS-3V 5 μ m 4.6 mm i. d. \times 150 mm
	濃縮用	GLサイエンス製 Inertsil ODS-3 5 μ m 4.0 mm i. d. \times 10 mm
カラムオープン :	40 $^{\circ}$ C	
溶離液 :	分析用	0.1%リン酸水溶液/アセトニトリル=25/75 (v/v)
	濃縮用	0.1%リン酸水溶液/アセトニトリル=70/30 (v/v)
流 速 :	分析用	1.0 mL/min.
	濃縮用	0 ~ 3 min. 2.5 mL/min. 3 ~ 8 min. 0.05 mL/min. 8 ~ 12 min. 2.5 mL/min.
カラムスイッチングバルブ :	0 min. (濃縮側), 3 min. (分析側), 8 min. (濃縮側)	
測定波長 :	267 nm	
試料注入量 :	1600 μ L	

3 検量線

アセトニトリルを用い, 0, 0.00500~0.500 mg/L の標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し等量の精製水で希釈したものをHPLCで測定した。横軸に濃度 (mg/L) を, 縦軸にピーク面積 (count) をとり, 検量線を作成した。検量線の最小二乗法による直線回帰式の相関係数は 1.00 と良好であった。作成した検量線を Figure A-3-1 に示した。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 0.1count に設定し, これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.00005 mg/Lを検出限界とした。

5 添加回収試験

分析前処理は、「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なかった。したがって、回収率の補正は行わなかった。

Figure A-3-1 Calibration curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	0.00500	10.8
3	0.0100	21.2
4	0.0200	42.4
5	0.0500	108.9
6	0.100	209.9
7	0.200	434.1
8	0.500	1072.3

$$Y = 2,147X$$

$$r = 1.00$$

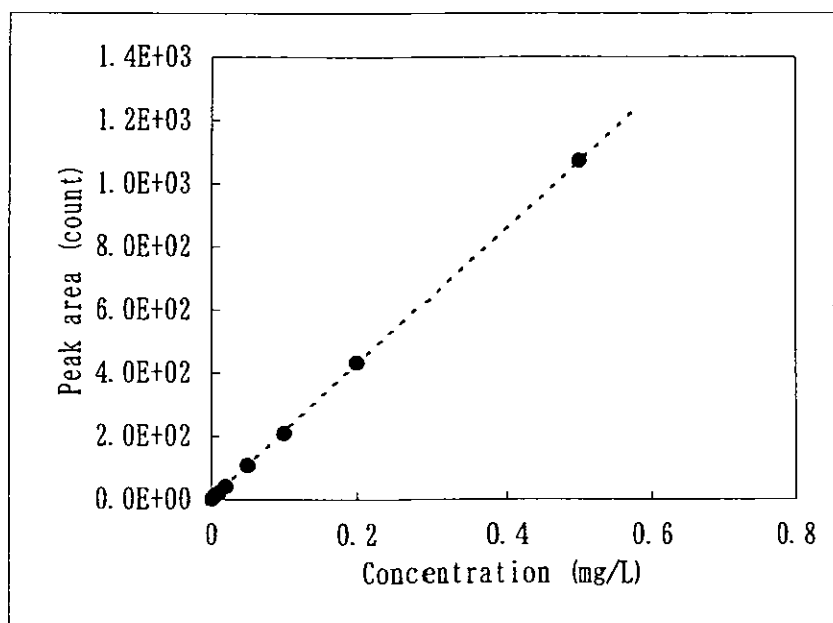
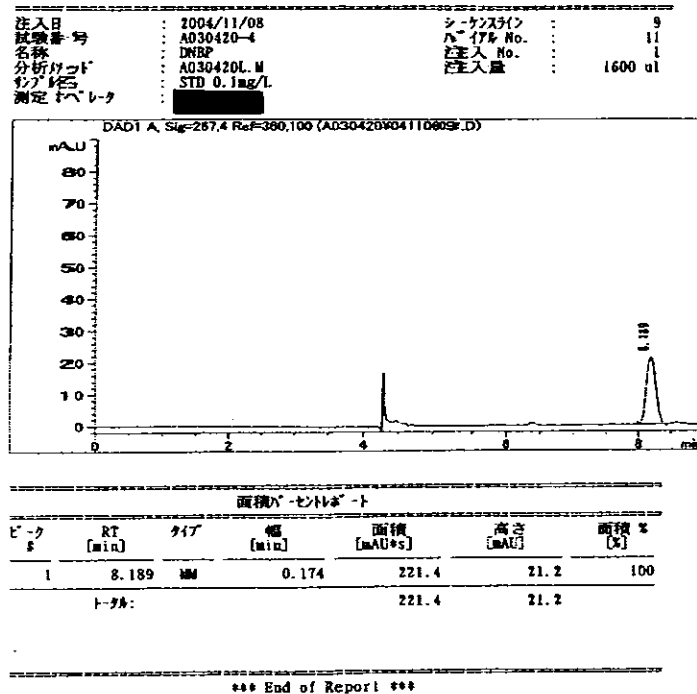


Figure A-3-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.100 mg/L ; 0 Hour



(2) Solvent Control ; 0 Hour

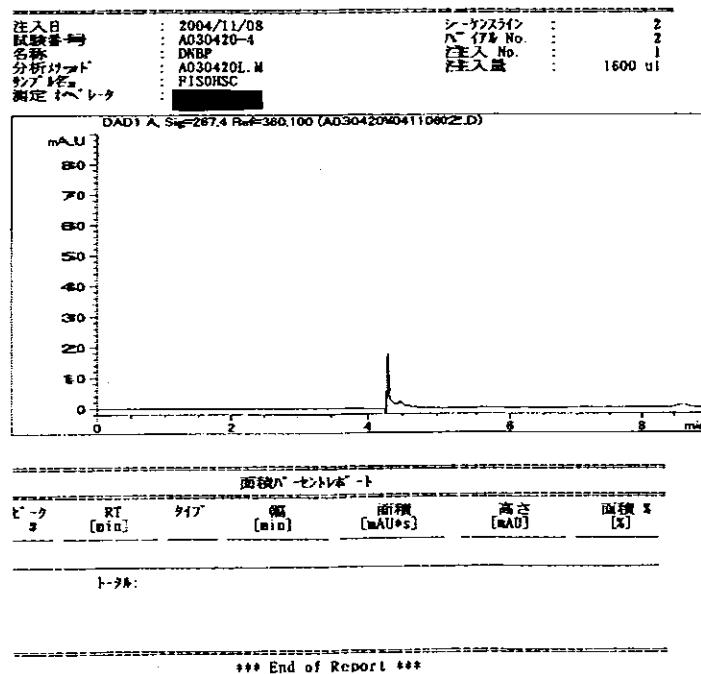
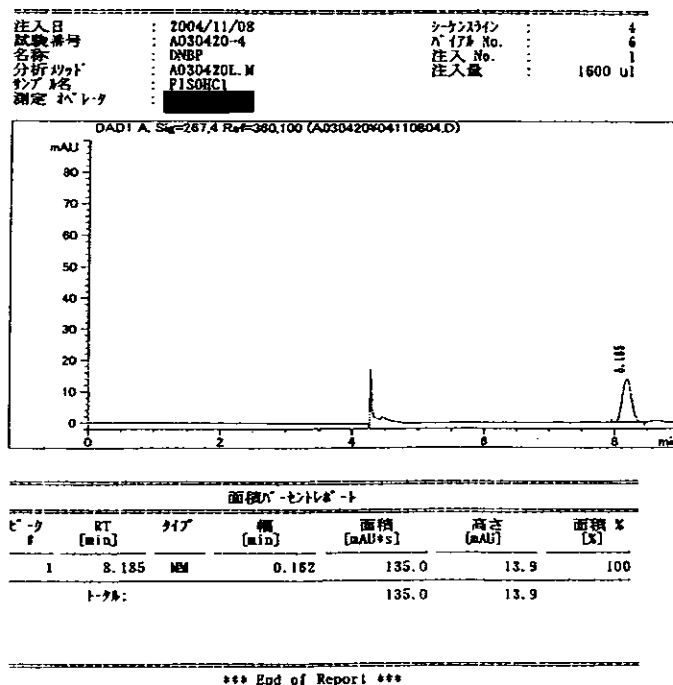


Figure A-3-2 Continued

(3) 0.0600 mg/L nominal ; 0 Hour



(4) 0.130 mg/L nominal ; 0 Hour

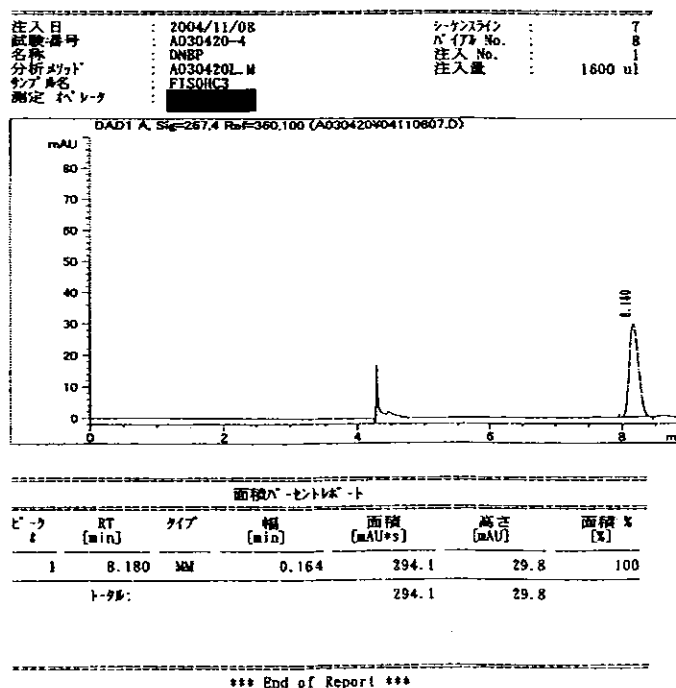
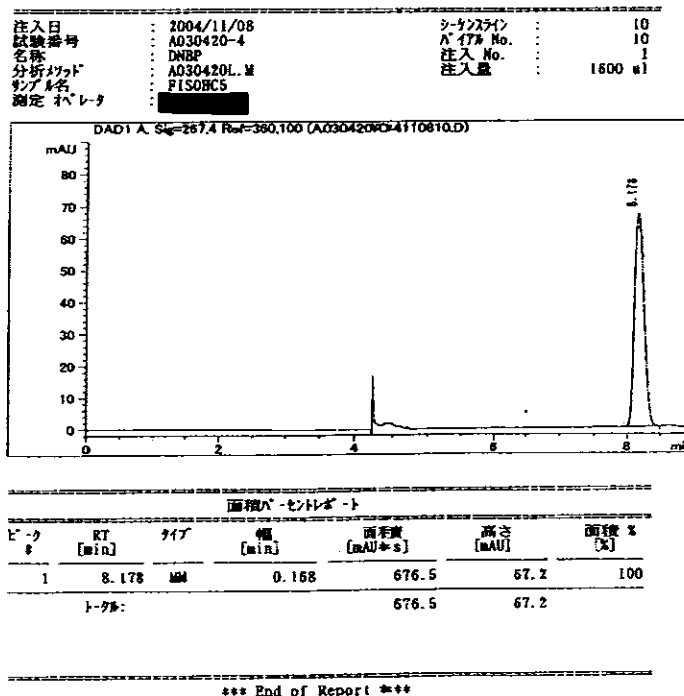


Figure A-3-2 Continued

(5) 0.300 mg/L nominal ; 0 Hour



(6) Standard 0.100 mg/L ; 24 Hours

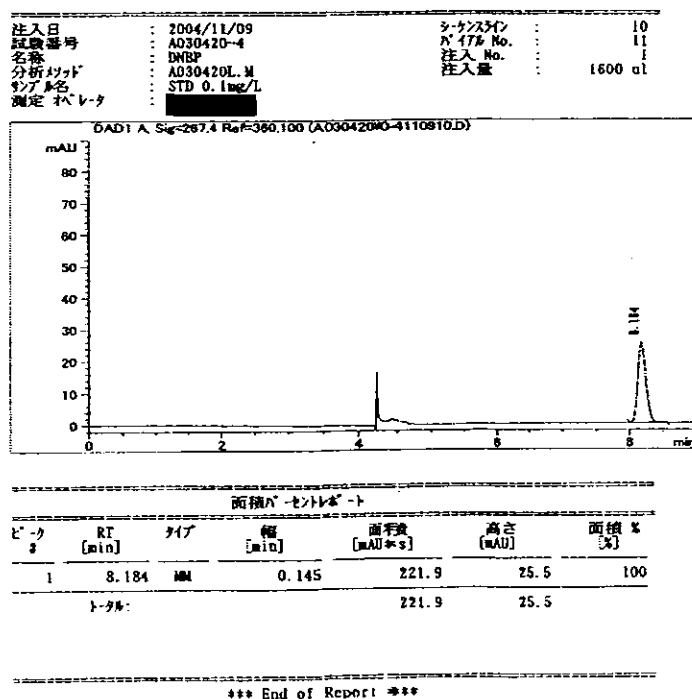
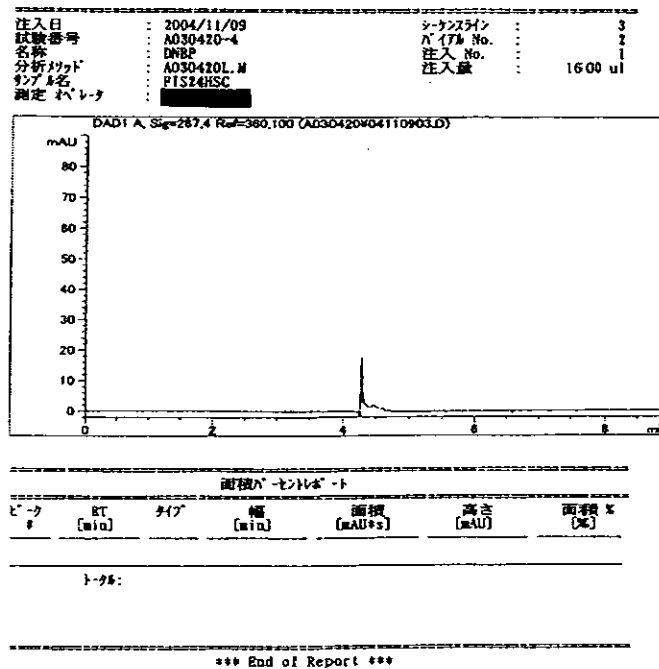


Figure A-3-2 Continued

(7) Solvent control ; 24 Hours



(8) 0.0600 mg/L nominal ; 24 Hours

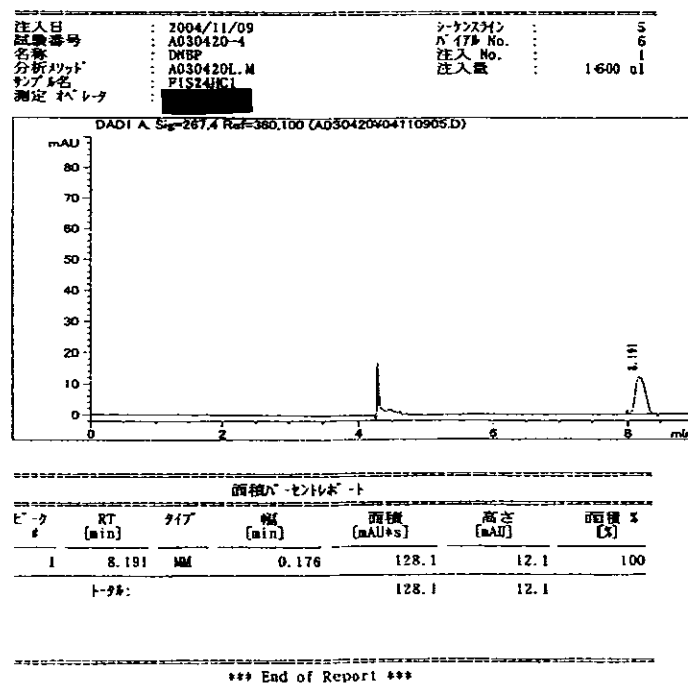
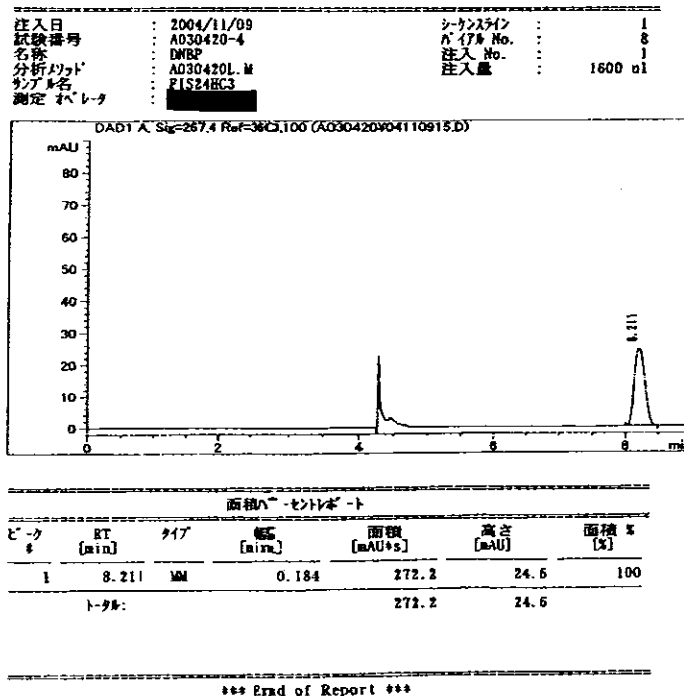
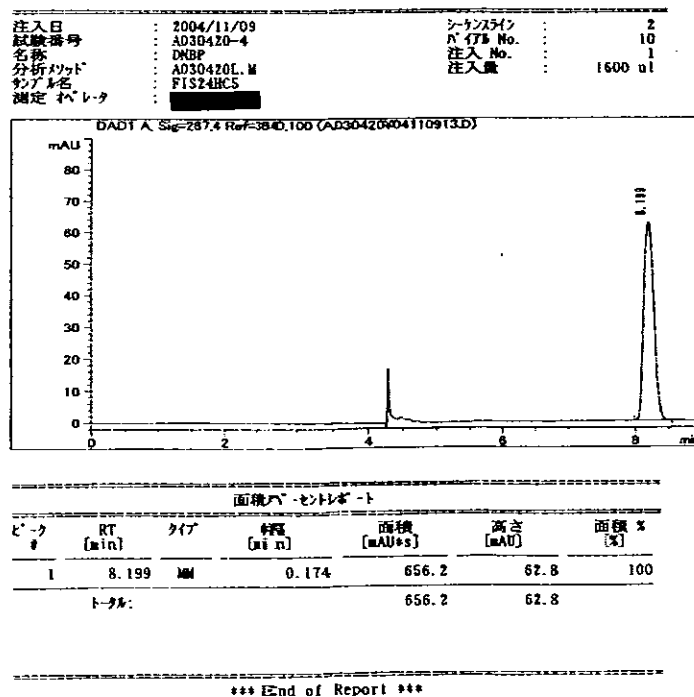


Figure A-3-2 Continued

(9) 0.130 mg/L nominal ; 24 Hours



(10) 0.300 mg/L nominal ; 24 Hours



付属資料－ 4

結果の算出

Table A-4 Calculation of the LC50 (Representative, 96hr.)

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
魚類急性毒性試験					
Time: 96hr					
Conc. No	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Control	0	10	0	0	----
Sol. cont.	0	10	0	0	----
Conc. 1	0.0593	10	0	0	0.09765625
Conc. 2	0.0913	10	0	0	0.09765625
Conc. 3	0.128	10	0	0	0.09765625
Conc. 4	0.196	10	1	10	1.07421875
Conc. 5	0.301	10	6	60	37.6953125

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 0.196 AND +INFINITY CAN BE
 USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT
 CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL
 ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 98.92578125 PERCENT.
 AN APPROXIMATE LC50 FOR THIS SET OF DATA IS 0.278364307140037

=====RESULTS CALCULATED USING THE MOVING AVERAGE METHOD

SPAN	G	LC50	95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS
1	0.720681519	0.278364308	0.230856674 AND 0.678242875

=====RESULTS CALCULATED USING THE PROBIT METHOD

ITERATIONS	G	H	GOODNESS OF FIT PROBABILITY
6	0.570427308	1	0.998966234

SLOPE = 8.490453928

95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 2.077899506 AND 14.90300835

LC50 = 0.280249361

95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 0.23306095 AND 0.430194521

LC1 = 0.149106597

95 PERCENT CONFIDENCE LIMITS= 0.027273561 AND 0.194752848