

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

(試験番号：A030420-2)

2004年11月25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) フェノールのオオ
ミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A030420-2

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G L P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11月25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) フェノールのオオ
ミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A030420-2

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10月12日	2004年10月12日
	ミジンの投入	2004年10月12日	2004年10月12日
	ミジンの観察	2004年10月14日	2004年10月14日
最終報告書監査		2004年11月25日	2004年11月25日

2004年11月25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)フェノールのオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験
(試験番号: A030420-2)
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 および 48 時間の半数遊泳阻害濃度 (EC50) 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. 202「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験および繁殖試験」(1984年)
(ただし, 同改訂案「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験」(2002年)*の内容を一部採用。)
*:OECD Guideline for Testing of Chemicals, Revised Proposal for Updating Guideline 202, ENV/JM/TG(2002)3/REV1(2002)
4. 適用GLP : 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11月25日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2004年11月25日)
(試験実施，報告書作成)

[redacted] [redacted] (2004年11月25日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2004年11月25日)
(試験実施)

[redacted] [redacted] (2004年11月25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10月12日
実験終了日 2004年10月14日
試験終了日 2004年11月25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	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	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 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	14
4.2 半数遊泳阻害濃度 (EiC50) の算出	14
4.3 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度	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 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	15
5.4 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度	15
5.5 試験液の水溫, 溶存酸素濃度, pHおよび硬度	16
5.6 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 希釈水の組成	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) フェノールのオオミジンコ
(*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験

試 験 番 号 : A030420-2

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. 202「ミジンコ類, 急性遊泳阻害試験および繁殖試験」(1984年)
- 2) 暴 露 方 式 : 止水式
水面をテフロンシートで被覆
- 3) 供 試 生 物 : オオミジンコ (*Daphnia magna*)
- 4) 暴 露 期 間 : 48時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 助剤対照区, 0.200, 0.360, 0.630, 1.10, 2.00 mg/L
(設定値) 公比: 1.8
助剤濃度一定: 38 μ L/L (ジメチルホルムアミド*使用)
- 6) 試 験 液 量 : 100 mL/容器
- 7) 連 数 : 4容器/試験区
- 8) 供 試 生 物 数 : 20頭/試験区 (5頭/容器)
- 9) 試 験 温 度 : 20 \pm 1 $^{\circ}$ C
- 10) 照 明 : 室内光, 16時間明 (800 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 91～98%、終了時において 90～96%であった。

2) 24時間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	0.467	0.337 ～ 0.601
0%阻害最高濃度	0.337	—
100%阻害最低濃度	1.04	—

3) 48時間暴露後の結果

	(mg/L)	95%信頼区間 (mg/L)
半数遊泳阻害濃度 (EiC50)	0.403	0.337 ～ 0.601
0%阻害最高濃度	0.180	—
100%阻害最低濃度	0.601	—

1 被験物質

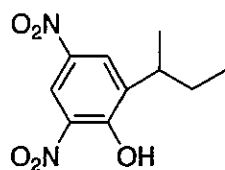
1.1 名称，構造式および物理化学的性状

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： オオミジンコ
- 2) 学名： *Daphnia magna*
- 3) 入手先： 環境庁国立環境研究所（現 独立行政法人国立環境研究所）
- 4) 入手日： 1995年 7月18日
- 5) 感受性： 定期的（約6ヶ月毎）に基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による急性遊泳阻害試験を行い、供試生物の感受性を調べている。1998年6月以降の48時間の半数遊泳阻害濃度（EC50）は、以下の通りである。

平均値±標準偏差＝0.76±0.16 mg/L, n=13
（最小値～最大値＝0.57～1.02 mg/L）

- 6) 生育段階： 雌の幼体（24時間以内令）
- 7) 供試生物を得るための親ミジンコの飼育条件：
 - 飼育水： 希釈水（3.2 参照）
 - 飼育密度： 1頭／80mL（25頭／2L）以下
 - 飼育容器： 2L ガラス製容器
 - 水温： 20±1℃
 - 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60％以上
 - pH： 6～9
 - 照明： 室内光，16時間明（800 lux以下）／8時間暗
 - 飼育期間： 2004年 9月28日～2004年10月12日
 - 暴露開始前2週間の親の死亡率： 0％
 - 休眠卵および雄の発生： 無し
 - 餌の種類： *Chlorella vulgaris*（単細胞緑藻類）
（藻類培養液を遠心分離し、希釈水に置換して使用）
 - 給餌量： 0.2 mg C（有機炭素含量）／頭／日
 - 飼育水の交換： 定期的に（3回／週）交換。幼体は極力、毎日除去。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 止水式
水面をテフロンシートで被覆
- 2) 暴露期間： 48時間
- 3) 試験液量： 100 mL／容器
- 4) 連数： 4 容器／試験区
- 5) 供試生物数： 20頭／試験区（5 頭／容器）
- 6) 試験温度： $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の60％以上
- 8) pH： 試験液のpH調整は行わなかった
- 9) 硬度： 約 250mg/L (CaCO_3 換算)
- 10) 照明： 室内光, 16時間明 (800 lux以下) ／8時間暗
- 11) 給餌： 無給餌

3.2 希釈水

OECD 化学品テストガイドライン No. 211「オオミジンコ繁殖試験」に記載してある調製水, Elendt M4 を用いた。組成を付属資料－1に示した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 100mL容ガラスビーカー
(試験容器には蓋をし、水面をテフロンシートで覆った)
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽 (恒温装置, タイテック製 クールニットCL-80F型)
- 3) 水温計： ハンナ製 チェックテンプ
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10型
- 5) pH計： 東亜電波工業製 HM-40V型
- 6) 硬度測定キット： ハック社製 HA-DT
- 7) 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

3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験（各2連，10頭／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，0.200，0.360，0.630，1.10，2.00 mg/L

（公比：1.8）

予備試験結果

濃度 (mg/L)	遊泳阻害率 (%)	
	24時間後	48時間後
助剤対照区	0	0
0.0200	0	0
0.200	0	0
2.00	100	100

3.5 試験液の調製

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

調製した試験液は1区につき4個の試験容器に各100 mL入れた。

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：38 μ L/L）を調製した。

調製時の試験液の状態（外観）は対照区および助剤対照区において無色透明，0.200～2.00 mg/L 区においては淡黄色透明であった。

3.6 試験液の分析

暴露開始時および終了時に全試験区各 1 試験容器より試験液 0.75 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

試験液の水溫、溶存酸素濃度、pH および硬度を測定後、ガラスピペットを用いて供試ミジンコを投入し、その時点を暴露開始時とした。ミジンコ投入の際、試験液量に対するピペット内の飼育水が全量で 1 % 以内となるようにした。

暴露開始 24 および 48 時間後にミジンコの遊泳阻害数の観察を行った。試験容器を穏やかに動かした後、15 秒間泳げない場合は遊泳阻害されたとみなした。

水溫、溶存酸素濃度、pH および硬度は、暴露開始時および終了時に、全試験区各 1 試験容器の試験液について測定した。

4 結果の算出

4.1 阻害濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

阻害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 半数遊泳阻害濃度（EiC50）の算出

24および48時間の各試験区における、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（％）を求め、以下の方法で半数遊泳阻害濃度（EiC50）を決定した。

最高濃度区における阻害率	≥ 50%	< 50%
EiC50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－遊泳阻害率曲線の記載	記載する。	記載する。

4.3 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度

ミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度区（0%阻害最高濃度）を24および48時間について可能な限り記録した。同様に、全てのミジンコが遊泳阻害を受ける最低濃度区（100%阻害最低濃度）を記録した。

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

暴露開始時および終了時に試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果を Table 1, 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 91～98%, 終了時において 90～96%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をTable 2 に、濃度－遊泳阻害率曲線を Figure 1 に示した。

暴露期間中の対照区および助剤対照区における遊泳阻害率は共に0%, 水面に浮いたミジンコは共に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遊泳阻害濃度 (EiC50) を Table 3 および以下に、48 時間の算出結果を付属資料－4 に示した

24 時間 EiC50 : 0.467 mg/L (95%信頼区間: 0.337 ~ 0.601 mg/L)

48 時間 EiC50 : 0.403 mg/L (95%信頼区間: 0.337 ~ 0.601 mg/L)

5.4 0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度

0%阻害最高濃度および100%阻害最低濃度を Table 4 および以下に示した。

24 時間 0%阻害最高濃度 : 0.337 mg/L

24 時間 100%阻害最低濃度 : 1.04 mg/L

48 時間 0%阻害最高濃度 : 0.180 mg/L

48 時間 100%阻害最低濃度 : 0.601 mg/L

5.5 試験液の水温，溶存酸素濃度，pHおよび硬度

試験液の水温を Table 5，溶存酸素濃度を Table 6，pHを Table 7，硬度を Table 8に示した。

水温はすべての試験区で $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で，溶存酸素濃度はすべての試験区で飽和溶存酸素濃度（ 20.0°C の飽和溶存酸素濃度：8.8 mg/L）の60%以上であり，いずれも試験基準を満たした。pHはミジンコの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であった。また，硬度も適正範囲内（約250mg/L）と判断した。

5.6 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
(Static Condition)

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)				Geometric Mean During 48 Hours (mg/L)
	0 Hour New	Percent of Nominal	48 Hours Old	Percent of Nominal	
Control	< 0.0008	--	< 0.0008	--	--
Solvent Control	< 0.0008	--	< 0.0008	--	--
0.200	0.181	91	0.179	90	0.180
0.360	0.339	94	0.336	93	0.337
0.630	0.603	96	0.600	95	0.601
1.10	1.05	95	1.04	95	1.04
2.00	1.95	98	1.92	96	1.93

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 2 The Number of Immobilized *Daphnia magna* (Percent Immobility)

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured concentration (mg/L)	Cumulative Number of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility)	
		24 Hours	48 Hours
Control	--	0 (0)	0 (0)
Solvent Control	--	0 (0)	0 (0)
0.200	0.180	0 (0)	0 (0)
0.360	0.337	0 (0)	4 (20)
0.630	0.601	19 (95)	20 (100)
1.10	1.04	20 (100)	20 (100)
2.00	1.93	20 (100)	20 (100)

a: geometric mean

Table 3 Calculated EiC50 Values

Exposure Period (Hours)	EiC50* (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	0.467	0.337 - 0.601	Binomial
48	0.403	0.337 - 0.601	Binomial

*: Using the concentrations of 0.180 - 1.93 mg/L

Table 4 Highest Concentration in 0% Immobility and Lowest Concentration in 100% Immobility

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Immobility (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Immobility (mg/L)
24	0.337	1.04
48	0.180	0.601

Table 5 Temperature

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)	
		0 Hour New	48 Hours Old
Control	--	19.8	19.9
Solvent Control	--	20.0	20.0
0.200	0.180	20.0	20.1
0.360	0.337	20.0	20.0
0.630	0.601	20.0	20.0
1.10	1.04	20.0	20.0
2.00	1.93	20.0	19.9

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 6 Dissolved Oxygen Concentrations

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)	
		0 Hour New	48 Hours Old
Control	--	8.8	8.5
Solvent Control	--	8.8	8.5
0.200	0.180	8.7	8.4
0.360	0.337	8.8	8.6
0.630	0.601	8.7	8.4
1.10	1.04	8.7	8.6
2.00	1.93	8.4	8.6

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 7 pH Values

Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	pH	
		0 Hour New	48 Hours Old
Control	---	8.3	8.0
Solvent Control	---	8.3	8.0
0.200	0.180	8.2	8.1
0.360	0.337	8.3	8.1
0.630	0.601	8.2	8.1
1.10	1.04	8.3	8.1
2.00	1.93	8.2	8.0

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Table 8 Total Hardness (as CaCO₃)

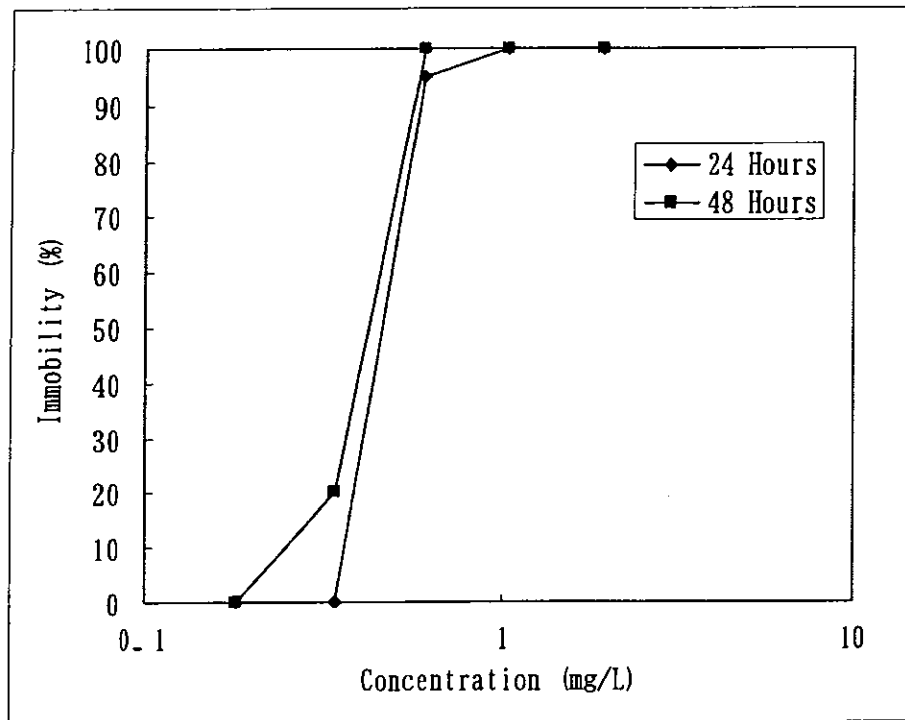
Nominal Concentration (mg/L)	Mean ^a Measured Concentration (mg/L)	Total Hardness (as CaCO ₃ , mg/L)	
		0 Hour New	48 Hours Old
Control	--	238	238
Solvent Control	--	236	242
0.200	0.180	232	240
0.360	0.337	236	238
0.630	0.601	238	238
1.10	1.04	238	236
2.00	1.93	238	238

a: geometric mean

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 hours exposure

Figure 1 Concentration-Immobiity Curve



付属資料－ 1

希釈水の組成

Table A-1 Elendt M4 medium recommended by OECD Guideline No. 211
used as dilution water

Macro nutrients	Concentration (mg/L)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	293.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	123.3
KCl	5.80
NaHCO_3	64.8
$\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$	10.0
NaNO_3	0.274
KH_2PO_4	0.143
K_2HPO_4	0.184

Trace elements	Concentration ($\mu\text{g/L}$)
H_3BO_3	2859.5
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	360.5
LiCl	306.0
RbCl	71.0
$\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	152.0
NaBr	16.0
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	63.0
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	16.8
ZnCl_2	13.0
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.0
KI	3.25
Na_2SeO_3	2.19
NH_4VO_3	0.575
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2500
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	995.5

Vitamines	Concentration ($\mu\text{g/L}$)
Thiamine hydrochloride	75.0
Cyanocobalamine (B12)	1.00
Biotine	0.750

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	→	250	mg
溶媒	→	N,N-ジメチルホルムアミド	
最終容量	→	5	mL
容器	→	メスボトル	
濃度	→	50000	mg/L
混合方式	→	手で転倒攪拌(溶解容易)	

② 被験物質原液Ⅱの調製

原液Ⅰ採取量	→	100	μL
溶媒	→	試験用水(十分暴気し20±1℃にしたElendt M4溶液)	
最終容量	→	1000	mL
容器	→	メスフラスコ	
濃度	→	5.00	mg/L
助剤濃度	→	95	μL/L
混合方式	→	スターラーで攪拌しながら添加後、超音波5分、密栓	

③ 助剤原液の調製

助剤	→	N,N-ジメチルホルムアミド	
採取量	→	190	μL
溶媒	→	試験用水(十分暴気し20±1℃にしたElendt M4溶液)	
最終容量	→	100	mL
容器	→	メスボトル	
助剤濃度	→	1900	μL/L
混合方式	→	手で転倒攪拌(溶解容易)	

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)	→	0.50	L
容器	→	メスフラスコ	
混合方式	→	手で転倒攪拌、密栓	
濃度公比	→	1.78	

(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	10.00	38
0.200	Conc.1	→ 20	9.00	38
0.360	Conc.2	→ 36	8.20	38
0.630	Conc.3	→ 63	6.85	38
1.100	Conc.4	→ 110	4.50	38
2.000	Conc.5	→ 200	0	38

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0.75 mLを測定用バイアルに採取し、アセトニトリルを等量添加し混合後、HPLCにより分析した。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0.75 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。代表的なクロマトグラムをFigure A-3-2 (1), (6) に示した。
- 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 ミステーション (Windows NT)
デガッサ : G1322A 型
送液ポンプ : G1311A 型 (クォータリポンプ, 分析用)
G1311A 型 (クォータリポンプ, 濃縮用)
オートサンプラ : G1313A 型
カラムオープン : G1316A 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 : G1315B 型

(条件)

カラム : 分析用 GL サイエンス製 Inertsil ODS-3V 5 μ m 4.6mm i.d. \times 150mm
濃縮用 GL サイエンス製 Inertsil ODS-3 5 μ m 4.0mm i.d. \times 10mm
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 1.0mL/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 : 0min (濃縮側), 3min (分析側), 8min (濃縮側)
測定波長 : 267nm
試料注入量 : 100 μ L

3 検量線

アセトニトリルを用い, 0, 0.100~2.00 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 0.0008 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、試験液を採取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	0.100	13.9
3	0.200	27.9
4	0.500	69.5
5	1.00	138.7
6	2.00	277.2

$$Y = 139X$$

$$r = 1.00$$

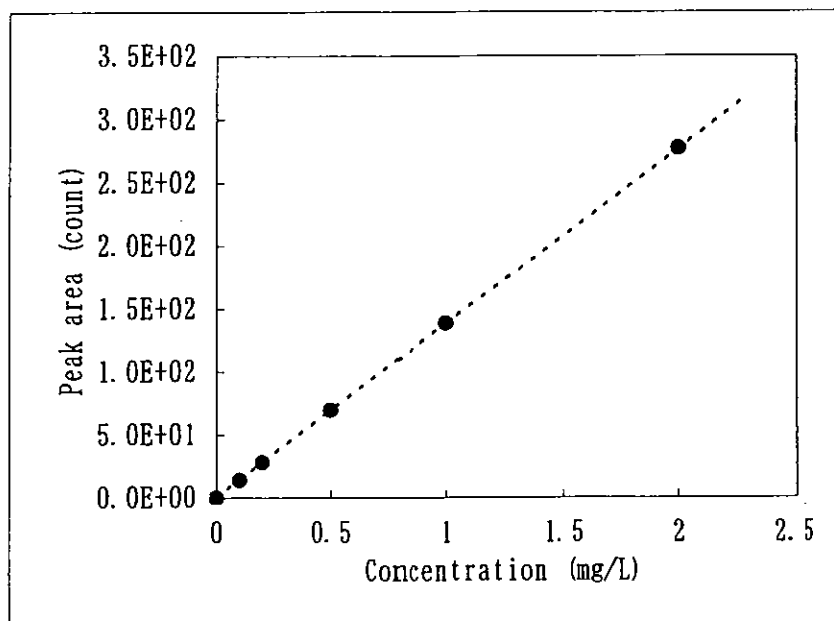
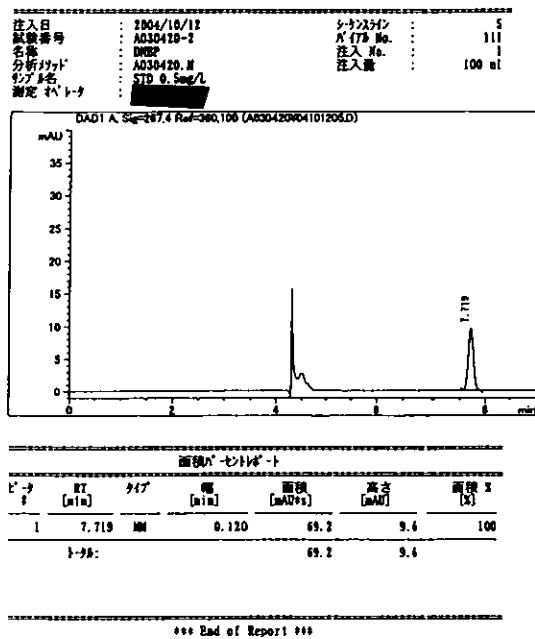


Figure A-3-2 Representative chromatograms

(1) Standard 0.500 mg/L ; 0 Hour



(2) Solvent Control ; 0 Hour

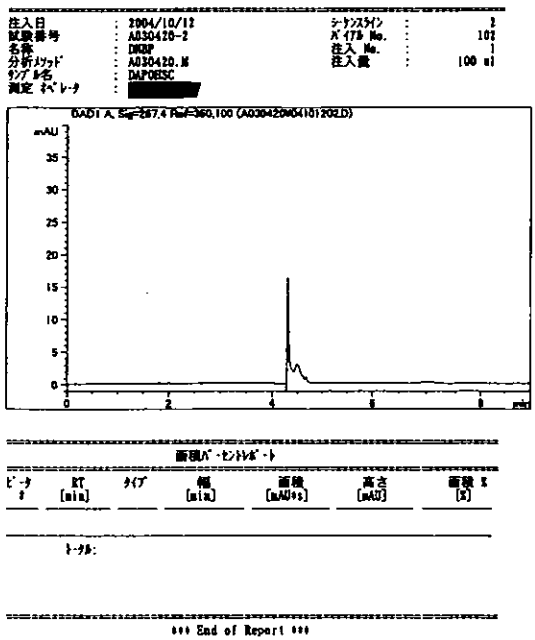
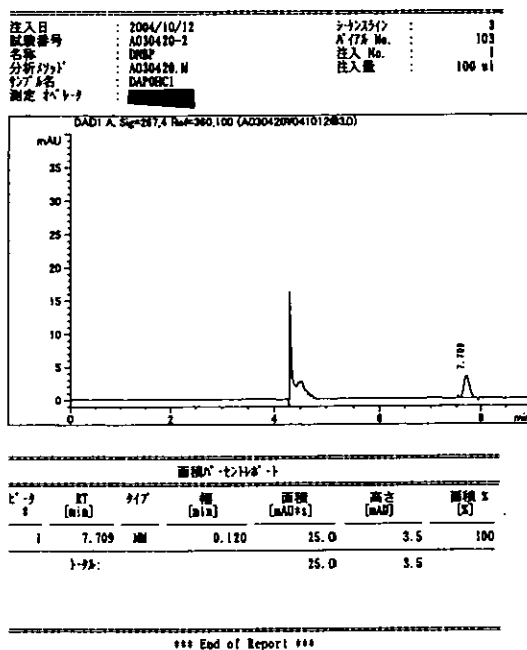


Figure A-3-2 Continued

(3) 0.200 mg/L nominal ; 0 Hour



(4) 0.630 mg/L nominal ; 0 Hour

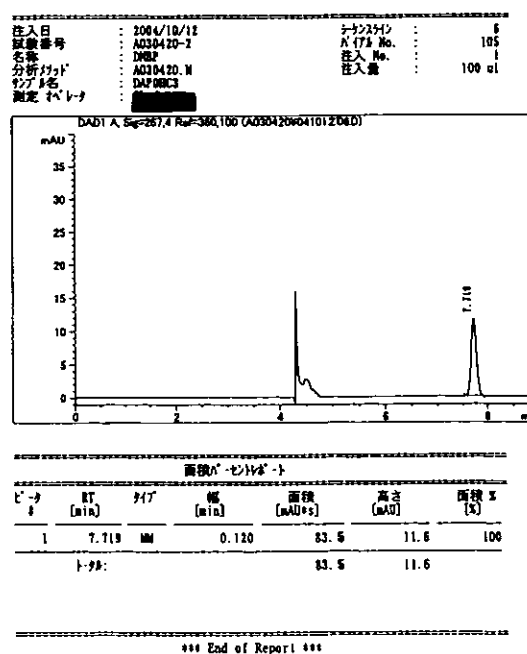
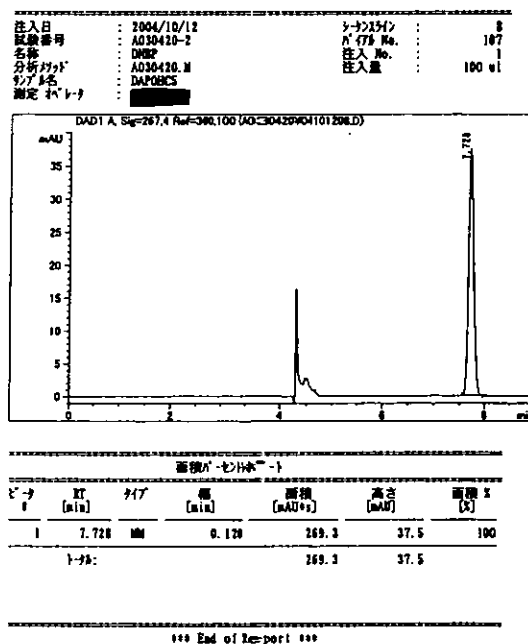


Figure A-3-2 Continued

(5) 2.00 mg/L nominal ; 0 Hour



(6) Standard 0.500 mg/L ; 48 Hours

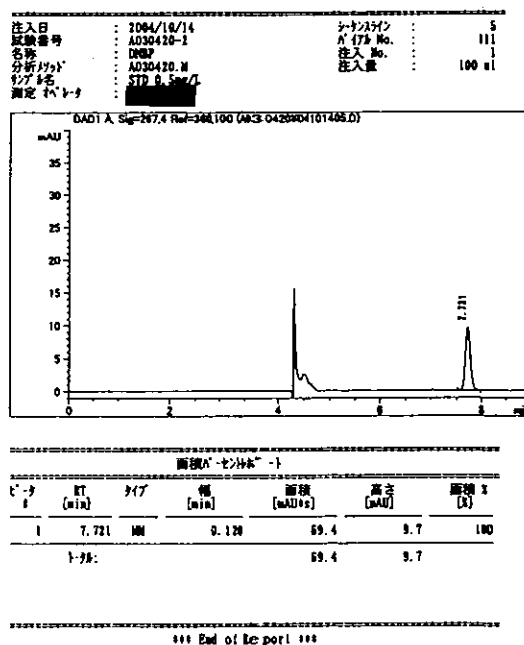
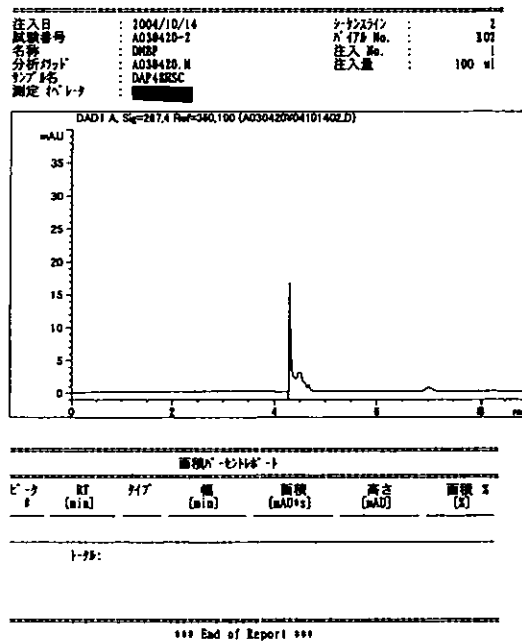


Figure A-3-2 Continued

(7) Solvent Control ; 48 Hours



(8) 0.200 mg/L nominal ; 48 Hours

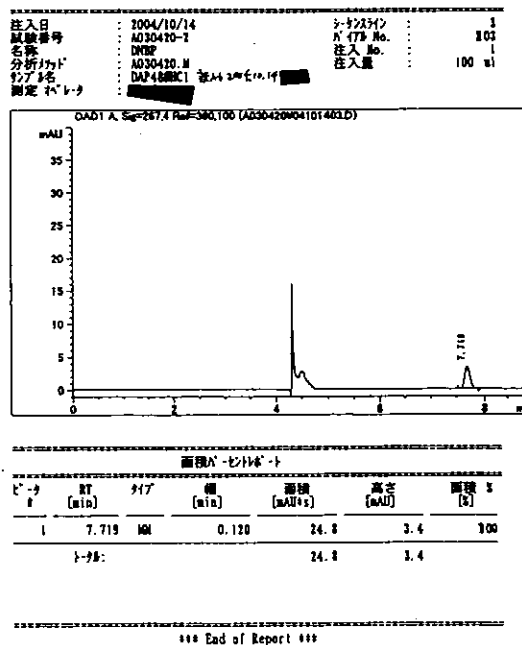
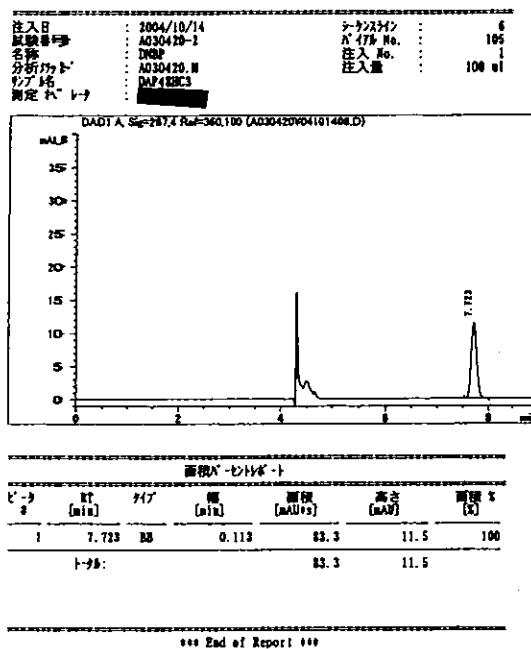
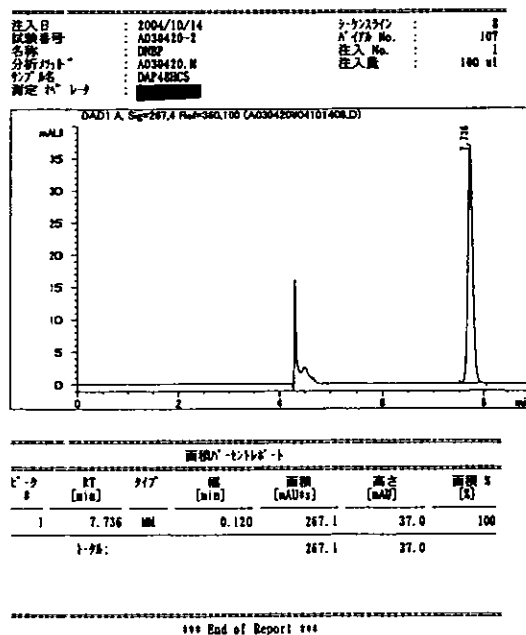


Figure A-3-2 Continued

(9) 0.630 mg/L nominal ; 48 Hours



(10) 2.00 mg/L nominal ; 48 Hours



付属資料－ 4

結果の算出

Table A-4 Calculation of the EC_{50} (Representative, 48hr.)

TOXDAT MULTI-METHOD PROGRAM (BINOMIAL, MOVING AVERAGE AND PROBIT METHODS)					
ミジンコ急性遊泳阻害試験					
Time: 48hr					
Conc. No	CONC. mg/L	NUMBER EXPOSED	NUMBER DEAD	PERCENT DEAD	BINOMIAL PROB. (%)
Control	0	20	0	0	---
Sol. cont.	0	20	0	0	---
Conc. 1	0.18	20	0	0	9.53674E-05
Conc. 2	0.337	20	4	20	0.590896606
Conc. 3	0.601	20	20	100	9.53674E-05
Conc. 4	1.04	20	20	100	9.53674E-05
Conc. 5	1.93	20	20	100	9.53674E-05

THE BINOMIAL TEST SHOWS THAT 0.337 AND 0.601 CAN BE
USED AS STATISTICALLY SOUND CONSERVATIVE 95 PERCENT
CONFIDENCE LIMITS SINCE THE ACTUAL CONFIDENCE LEVEL
ASSOCIATED WITH THESE LIMITS IS 99.409008026123 PERCENT.
AN APPROXIMATE EC_{50} FOR THIS SET OF DATA IS 0.403403999262999

WHEN THERE ARE LESS THAN TWO CONCENTRATIONS AT WHICH THE PERCENT
DEAD IS BETWEEN 0 AND 100, NEITHER THE MOVING AVERAGE NOR THE
PROBIT METHOD CAN GIVE ANY STATISTICALLY SOUND RESULTS.