

# 試 験 報 告 書

o-sec.-ブチ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：第 1 0 0 1 4 号)

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

# 目 次

	頁
試験概要	1
要 旨	3
1 被験物質	4
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状	4
1.2 供試試料	4
1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性	4
2 供試生物	5
2.1 供試生物	5
2.2 順化飼育	5
3 試験方法	5
3.1 試験条件	5
3.2 希釈水	6
3.3 試験水槽, 恒温室及び測定機器等	6
3.4 試験濃度の設定	6
3.5 試験水の調製	6
3.6 試験水の分析	6
3.7 試験操作	7
4 結果の算出	7
4.1 半数致死濃度(LC <sub>50</sub> )	7
4.2 0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度	7
5 結果	8
5.1 試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因	8
5.2 試験水中の被験物質濃度	8
5.3 死亡数及び死亡率	8
5.4 LC <sub>50</sub> 値	8
5.5 0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度	8
5.6 毒性症状	8
5.7 試験水のpH, DO及び水温	9
Table 1～8	10～16
Figure 1	17
付属資料-1	希釈水の水質
付属資料-2	試験水の分析方法

## 陳述書

試験委託者： 環境庁

試験の表題： o-sec.-ブチ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： 第10014号

上記試験は、環境庁GLP規則「生態影響試験実施に関する基準」を遵守して実施したものである。

1999 年 7 月 30 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

運営管理者



## 信頼性保証証明書

試験委託者： 環境庁

試験の表題： o-sec.-ブチ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： 第10014号

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、本報告書には試験に用いた方法、手順が正確に記載されており、試験結果は試験の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	試験責任者及び 運営管理者への報告日
査察実施期間	1999年 1月20日 ～1999年 7月30日	1999年 1月20日 ～1999年 7月30日
試験報告書監査	1999年 7月30日	1999年 7月30日

1999 年 7 月 30 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

信頼性保証責任者



## 試験概要

### 1 表題

o-sec.-ブチルフェノールのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

### 2 試験目的

o-sec.-ブチルフェノールについて、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験を行い、96時間後の半数致死濃度(LC<sub>50</sub>)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 203「魚類急性毒性試験」(1992年)に準拠した。

### 4 適用GLP

本試験は環境庁GLP規則「生態影響試験実施に関する基準」に従い実施した。

### 5 試験委託者

- 1) 名 称：環境庁
- 2) 住 所：東京都千代田区霞が関 1丁目 2番 2号
- 3) 委託責任者：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  
[REDACTED]

### 6 試験受託者

- 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター
- 2) 所 在 地：東京都渋谷区元代々木町52番 1号
- 3) 代 表 者：[REDACTED]

### 7 試験施設

- 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
- 2) 所 在 地：東京都多摩市永山 6丁目11番10号
- 3) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所別館
- 4) 所 在 地：東京都多摩市永山 6丁目21番 6号

8 試験関係者

試験責任者

[Redacted]

(1999年7月30日)

生物担当責任者

[Redacted]

(1999年7月30日)

生物系試験担当者

[Redacted]

(1999年7月30日)

[Redacted]

(1999年7月30日)

分析担当責任者

[Redacted]

(1999年7月30日)

理化学系分析担当者

[Redacted]

(1999年7月30日)

[Redacted]

(1999年7月30日)

[Redacted]

(1999年7月30日)

9 試験期間

試験開始日：平成11年 1月20日

試験終了日：平成11年 7月30日

曝露期間：平成11年 5月10日～平成11年 5月14日

10 保管

試験計画書，生データ，記録文書及び試験報告書は，試験報告書作成後10年間，財団法人日本食品分析センター多摩研究所資料保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

## 要 旨

### 試験委託者

環境庁

### 表 題

o-sec.-ブチ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

第 1 0 0 1 4 号

### 試験方法

本試験はOECD化学品テストガイドライン 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：o-sec.-ブチルフェノール
- 2) 曝露方法：半止水式(24時間毎に全量換水)
- 3) 曝露期間：96時間
- 4) 連 数：1濃度区 2連
- 5) 供 試 魚：ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 6) 供試魚数：10尾／濃度区(5尾／1連)
- 7) 試験水量：8 l(4 l／1連)
- 8) 試験水温：24±1℃
- 9) 照 明：室内光，16時間明／8時間暗
- 10) 給 餌：無給餌
- 11) エアレーション：無し
- 12) 試験濃度：対照区，1.0，1.8，3.2，5.6及び10 mg/l
- 13) 試験水中の被験物質の分析：高速液体クロマトグラフ法(曝露開始時及び24時間後の換水前)

### 結 果

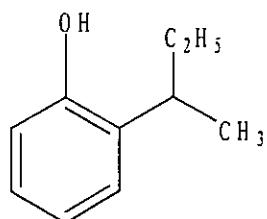
下記の結果は設定濃度より算出した。

- 1) 半数致死濃度(LC<sub>50</sub>)  
LC<sub>50</sub>(96hr)：6.0 mg/l (Binominal法)
- 2) 0 %死亡最高濃度(96hr)：3.2 mg/l
- 3) 100 %死亡最低濃度(96hr)：10 mg/l

## 1 被験物質

### 1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称：o-sec.-ブチルフェノール（別名：2-sec.-ブチルフェノール）
- 2) 英 名：o-sec.-Butylphenol (CAS No. 89-72-5)
- 3) 構造式：



- 4) 化学式： $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$
- 5) 分子量：150.22
- 6) 安定性：安定
- 7) pKa：－
- 8) logP<sub>ow</sub>：－
- 9) 水への溶解度：不溶
- 10) 蒸気圧：－

### 1.2 供試試料

- 1) 供給者：[REDACTED]
- 2) 入手日：1998年12月14日
- 3) ロット番号：DLJ5725
- 4) 外 観：無色透明液体
- 5) 純 度：98.4 %
- 6) 供給量：100 g

### 1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

#### 1) 保管方法

被験物質は財団法人日本食品分析センター多摩研究所の被験物質保管庫（遮光，室温）に保管した。

#### 2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

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。試験終了時にも同様に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結果，スペクトルに変化は無かった。よって，被験物質は多摩研究所の被験物質保管庫に保管中は安定であったと判断された。



## 2 供試生物

### 2.1 供試生物

試験に供したヒメダカ (*Oryzias latipes*) を下記に示した。供試魚は被鱗体長 (以下「体長」と略す。) は  $2.0 \pm 0.5$  cm のものを用いた。

供試魚の基準物質 (硫酸銅 (Ⅱ) 五水和物, 試薬特級) による急性毒性試験を行い, 96 時間  $LC_{50}$  値は 0.69 mg/l (平成 11 年 4 月 19 日実施) であった。

- 1) 和 名 : ヒメダカ
- 2) 学 名 : *Oryzias latipes*
- 3) 体 長 : 2.1 cm (2.0 ~ 2.3 cm), n=10
- 4) 体 重 : 0.14 g (0.11 ~ 0.19 g), n=10
- 5) ロット番号 : F039811
- 6) 入手先 : 滝沢養魚場 (1997 年 1 月 29 日) より入手したものを, 財団法人日本食品分析センターにおいて継代飼育している種である。

### 2.2 順化飼育

継代中のものから体長が  $2.0 \pm 0.5$  cm の供試魚 (以下「ヒメダカ」と称す。) を選別し, 別に用意した順化水槽に移した。そこで試験条件と同条件 (水質, 温度等) で 7 日間以上, 順化飼育した。

餌は市販の配合飼料 (テトラミン・ステープルフード又はテトラ・メダカのえさ: テトラベルケ社製) を与え, 曝露開始の 24 時間前からは給餌をしなかった。また, 試験には健康で肉眼的に正常な魚を使用した。なお, 曝露開始前 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) 曝露方法 : 半止水式 (24 時間毎に全量換水)
- 2) 曝露期間 : 96 時間
- 3) 連 数 : 1 濃度区 2 連
- 4) 供試魚数 : 10 尾 / 濃度区 (5 尾 / 1 連)
- 5) 試験水量 : 8 l (4 l / 1 連)
- 6) 試験水温 :  $24 \pm 1^\circ\text{C}$
- 7) 照 明 : 室内光, 16 時間明 / 8 時間暗
- 8) 給 餌 : 無給餌
- 9) エアレーション : 無し

### 3.2 希釈水

希釈水は脱塩素水(東京都水道水を活性炭処理し、残留塩素を除去したもので、充分通気した。)を使用した。なお、定期測定による希釈水の水質結果を付属資料-1に示した。

試験に使用した希釈水のpH及び硬度はそれぞれ7.7及び44 mg/l(CaCO<sub>3</sub>換算)であった。

### 3.3 試験水槽、恒温室及び測定機器等

- 1) 試験水槽：5 l容丸形ガラス製水槽
- 2) 恒温室：21.84R-5510[日立冷熱株式会社]
- 3) 温度計：AP-210[安立計器株式会社]
- 4) pH計：HM-14P[東亜電波工業株式会社]
- 5) 溶存酸素計：D0-14P[東亜電波工業株式会社]
- 6) 残留塩素比色測定器：OT-I型[理研光学株式会社]

### 3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち、公比10で0.1から10 mg/lの濃度区を設定し、予備試験を行った。本試験は10 mg/l以下の濃度を公比1.8で5段階設定した。各濃度区は以下の通りであった。

対照区，1.0，1.8，3.2，5.6及び10 mg/l

### 3.5 試験水の調製

被験物質を水に溶解させて被験物質原液を調製し、希釈水に添加して試験水を調製した。また、希釈水のみに対照区を設定した。

### 3.6 試験水の分析

全濃度区について、曝露開始時及び換水前(24時間後)に各濃度区の試験水槽(2連/濃度区)から試験水を適量採取し、等量混合して100 mlを分析用試験水とした。

分析用試験水は速やかに高速液体クロマトグラフを用いて分析を行った。試験水の分析に際しては、標準溶液のピーク高さを用いて検量線を作成し、試験水より得られたピーク高さから試験水中の被験物質濃度を算出した。なお、詳細は付属資料-2に示した。

### 3.7 試験操作

曝露開始時に順化水槽よりヒメダカを任意に10尾を採取し、体長及び体重を測定した。体長が $2.0 \pm 0.5$  cmであることを確認し、試験に用いた。

各濃度区のpH、溶存酸素濃度(DO)及び水温を測定後、ヒメダカを各試験水槽に1濃度区当たり10尾(5尾/試験水槽)ずつ投入した。各試験水槽を $24 \pm 1^\circ\text{C}$ の恒温室に設置した(試験条件は3.1参照)。

曝露開始時より24, 48, 72及び96時間後にヒメダカの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3.7.1に示した。その他特異的症例(背曲がり, 出血, 体色変化, 粘液の分泌等)が観察された場合には別途具体的にその旨を記録した。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。

試験水のpH、DO及び水温を換水前後に測定した。

#### 3.7.1 一般的症例と定義

- 1) 死 亡：刺激を与えた場合に反応の認められないもの。
- 2) 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。
- 3) 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。
- 4) 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(LC<sub>50</sub>)

各濃度区のヒメダカの死亡数と供試魚数(10尾)から死亡率(%)を算出し、統計的手法により24, 48, 72及び96時間のLC<sub>50</sub>値を算出した。

### 4.2 0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度

全てのヒメダカに死亡が認められない最高濃度区の濃度を0 %死亡最高濃度とし、全てのヒメダカが死亡した最低濃度区の濃度を100 %死亡最低濃度とした。

## 5 結果

### 5.1 試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因なし。

### 5.2 試験水中の被験物質濃度

曝露開始時及び換水前(24時間後)における試験水中の被験物質濃度は、それぞれ1.02~9.69 mg/l及び0.967~9.71 mg/l(設定濃度:1.0~10 mg/l)であり、設定濃度に対する割合は95~102 %であった。よって、実測濃度は設定濃度の±20 %を維持できた。

[Table 1 (p.10), 付属資料-2]

### 5.3 死亡数及び死亡率

被験物質に96時間曝露したヒメダカの死亡数及び死亡率は、10 mg/l濃度区において10尾(100 %), 3.2 mg/l濃度区以下では0尾(0 %)であった。

なお、対照区は0尾(0 %)であり、試験成立条件である10 %以下の基準を満たした。

[Table 2 (p.11), Figure 1 (p.17)]

### 5.4 LC<sub>50</sub>値

被験物質の設定濃度に基づく96時間のLC<sub>50</sub>値は6.0 mg/l(Binomial法)であった。

なお、統計解析にはToxdat multi-method program(EPA/600/4-85/013, p.205-216)を用いた。

[Table 3 (p.12)]

### 5.5 0 %死亡最高濃度及び100 %死亡最低濃度

被験物質の設定濃度に基づく96時間曝露したヒメダカの0 %死亡最高濃度は3.2 mg/lであり、100 %死亡最低濃度は10 mg/lであった。

[Table 4 (p.12)]

### 5.6 毒性症状

各濃度区を対照区と比較して観察を行った結果、濃度区では曝露期間中の毒性症状として、ヒメダカに異常遊泳、遊泳不能及び内出血または鬱血の異常が観察された。なお、96時間後に毒性症状が観察されなかった最高濃度は1.0 mg/lであった。また、対照区では曝露期間中に異常な症状は観察されなかった。

[Table 5 (p.13)]

#### 5.7 試験水のpH, D0及び水温

各濃度区の曝露開始時及び換水後のpHは7.2～7.7, D0は8.7～9.7 mg/l及び水温は23.7～24.2℃であった。また, 換水前及び終了時のpHは7.2～7.5, D0は7.3～8.0 mg/l及び水温は23.5～24.1℃であった。よって, 全ての試験水槽でD0は飽和溶存酸素濃度(24.0℃の飽和溶存酸素濃度: 8.3 mg/l)の60 %以上であり, 水温は設定範囲内(24±1℃)であった。

[Table 6 (p.14), Table 7 (p.15), Table 8 (p.16)]

以 上

Table 1. Measured concentrations of the test solutions of o-sec.-butylphenol  
in the 96-hour acute toxicity test on *Oryzias latipes*  
under the semi-static test conditions

Nominal Concentration (mg/l)	Measured concentration(mg/l)		Time-weighted Mean (mg/l)	Percentage of nominal	
	0 hour Fresh	24 hours Old		0 hour Fresh	24 hours Old
Control	< 0.01	< 0.01	---	---	---
1.0	1.02	0.967	0.993	102	97
1.8	1.83	1.76	1.79	102	98
3.2	3.23	3.12	3.17	101	98
5.6	5.44	5.30	5.37	97	95
10	9.69	9.71	9.70*	97	97

Fresh: Start of renewal period

Old: End of renewal period

\* : Arithmetic mean

Table 2. The cumulative number of deaths among *Oryzias latipes*

Nominal Concentration  (mg/l)	Cumulative number of deaths among <i>Oryzias latipes</i> (Cumulative percentage mortality)			
	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
1.0	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
1.8	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
3.2	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)	0 ( 0)
5.6	0 ( 0)	2 ( 20)	3 ( 30)	4 ( 40)
10	10 (100)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

Table 3. Calculated LC<sub>50</sub> values (based on nominal concentrations)

Exposure Period (hours)	LC <sub>50</sub> (mg/l)	95 % confidence limits (mg/l)	Statistical method
24	7.5	not calculated	Binominal
48	6.7	not calculated	Binominal
72	6.4	not calculated	Binominal
96	6.0	not calculated	Binominal

Table 4. Maximum concentration causing 0 % mortality and minimum concentration causing 100 % mortality of *Oryzias latipes* (based on nominal concentrations)

	Nominal concentration (mg/l)			
	24hr	48hr	72hr	96hr
Maximum concentration causing 0 % mortality	5.6	3.2	3.2	3.2
Minimum concentration causing 100 % mortality	10	10	10	10



Table 5. Visible abnormalities in the 96-hour acute toxicity test  
on *Oryzias latipes*

Nominal Concentration (mg/l)	Symptoms			
	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.
1.0	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.	n. a. d.
1.8	n. a. d.	le.	le.	le.
3.2	le.	le.	le.	le.
5.6	l. l.	l. l., h. o. c.	l. l., h. o. c.	l. l., h. o. c.
10	----- <sup>a</sup>	----- <sup>a</sup>	----- <sup>a</sup>	----- <sup>a</sup>

n. a. d. : No abnormalities are detected

le. : Lethargy

l. l. : Lying laterally

h. o. c. : Concealed hemorrhage or congestion

a : No observation was made because all *Oryzias latipes* were dead at this period.

96-hour maximum concentration causing no abnormality: 1.0 mg/l

Table 6. The pH values of the test solutions in the 96-hour acute toxicity test on *Oryzias latipes* under the semi-static test conditions

Hours	pH						
	Nominal Conc. (mg/l)	Control	1.0	1.8	3.2	5.6	10
0	Fresh	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7	7.7
24	Old 1	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4
	2	7.4	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4
24	Fresh	7.2	7.2	7.3	7.2	7.2	--- <sup>a</sup>
48	Old 1	7.4	7.2	7.3	7.2	7.2	--- <sup>a</sup>
	2	7.2	7.3	7.2	7.3	7.2	--- <sup>a</sup>
48	Fresh	7.5	7.4	7.4	7.4	7.4	--- <sup>a</sup>
72	Old 1	7.4	7.4	7.4	7.3	7.3	--- <sup>a</sup>
	2	7.4	7.4	7.3	7.3	7.3	--- <sup>a</sup>
72	Fresh	7.5	7.5	7.5	7.4	7.4	--- <sup>a</sup>
96	Old 1	7.4	7.3	7.3	7.3	7.3	--- <sup>a</sup>
	2	7.3	7.4	7.3	7.3	7.3	--- <sup>a</sup>

Fresh: Start of renewal period

Old: End of renewal period

d : No measurement was made because all *Oryzias latipes* were dead at this period.

Table 7. Dissolved dxygen concentrations(DO) of the test solutions  
in the 96-hour acute toxicity test on *Oryzias latipes*  
under the semi-static test conditions

Hours	DO(mg/l)						
	Nominal Conc. (mg/l)	Control	1.0	1.8	3.2	5.6	10
0	Fresh	8.9	8.9	8.9	8.8	8.9	8.8
24	Old 1	7.6	7.6	7.5	7.4	7.3	7.6
	2	7.5	7.7	7.5	7.7	7.5	7.6
24	Fresh	8.8	8.8	8.8	8.8	8.7	--- <sup>a</sup>
48	Old 1	8.1	7.9	7.9	7.8	7.7	--- <sup>a</sup>
	2	8.1	7.9	7.9	8.0	7.8	--- <sup>a</sup>
48	Fresh	9.7	9.7	9.7	9.7	9.6	--- <sup>a</sup>
72	Old 1	7.9	7.8	7.9	7.6	7.9	--- <sup>a</sup>
	2	7.8	8.0	7.7	7.9	7.9	--- <sup>a</sup>
72	Fresh	9.4	9.4	9.4	9.4	9.0	--- <sup>a</sup>
96	Old 1	8.1	7.8	7.9	7.7	7.7	--- <sup>a</sup>
	2	7.8	8.0	7.8	7.9	7.9	--- <sup>a</sup>

Fresh: Start of renewal period

Old: End of renewal period

d : No measurement was made because all *Oryzias latipes* were dead at this period.

Table 8. Temperature values of the test solutions in the 96-hour acute toxicity test on *Oryzias latipes* under the semi-static test conditions

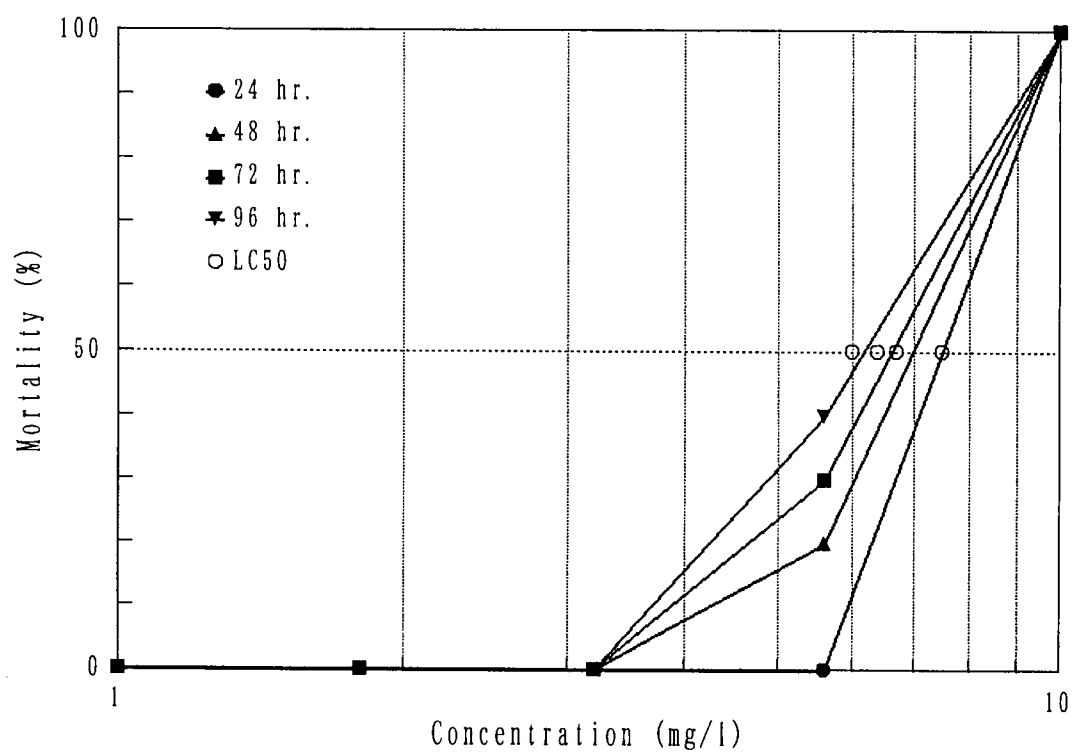
Hours	Temperature (°C)						
	Nominal Conc. (mg/l)	Control	1.0	1.8	3.2	5.6	10
0	Fresh	24.0	23.8	23.9	23.9	23.9	23.9
24	Old 1	23.5	23.5	23.6	23.6	23.7	23.7
	2	23.6	23.6	23.6	23.6	23.7	23.7
24	Fresh	24.1	24.0	24.1	24.2	24.2	----- <sup>a</sup>
48	Old 1	23.7	23.7	23.6	23.7	23.7	----- <sup>a</sup>
	2	23.6	23.6	23.6	23.7	23.7	----- <sup>a</sup>
48	Fresh	24.2	23.9	23.8	23.7	23.9	----- <sup>a</sup>
72	Old 1	24.1	24.0	24.0	23.9	24.1	----- <sup>a</sup>
	2	24.0	24.1	24.0	24.0	24.1	----- <sup>a</sup>
72	Fresh	24.1	24.0	24.0	23.9	23.9	----- <sup>a</sup>
96	Old 1	23.9	24.0	24.0	24.0	23.9	----- <sup>a</sup>
	2	23.9	23.9	23.9	23.9	24.1	----- <sup>a</sup>

Fresh: Start of renewal period

Old: End of renewal period

d : No measurement was made because all *Oryzias latipes* were dead at this period.

Figure 1. Concentration-response curve of o-sec.-Butylphenol mortality on *Oryzias latipes*



## 付属資料－ 1

希釈水の水質  
(全 2 頁)

Water Quality of Dilution Water-1

Parameter	Concentration
Coliform group	ND
Cadmium	< 0.001 mg/l
Mercury	< 0.0001 mg/l
Selenium	< 0.001 mg/l
Lead	< 0.005 mg/l
Arsenic	< 0.001 mg/l
Chromium(VI)	< 0.005 mg/l
Cyanide	< 0.005 mg/l
Nitrate and Nitrite	2.0 mg/l
Fluoride	0.12 mg/l
Carbon tetrachloride	< 0.0002 mg/l
1,2-Dichloroethane	0.0004 mg/l
1,1-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l
Dichloromethane	< 0.001 mg/l
cis-1,2-Dichloroethylene	< 0.001 mg/l
Tetrachloroethylene	< 0.001 mg/l
1,1,2-Trichloroethane	< 0.0005 mg/l
Trichloroethylene	< 0.001 mg/l
Benzene	< 0.001 mg/l
Chloroform	0.016 mg/l
Dibromochloromethane	< 0.001 mg/l
Bromochloromethane	0.001 mg/l
Bromoform	< 0.001 mg/l
Trihalomethanes	0.017 mg/l
1,3-Dichloropropene	< 0.0002 mg/l
Simazine	< 0.0002 mg/l
Thiram	< 0.0005 mg/l
Thiobencarb	< 0.001 mg/l

Date : January 27, 1999

— continue —

Water Quality of Dilution Water-2

Parameter	Concentration
Zinc	0.013 mg/l
Iron	< 0.03 mg/l
Copper	< 0.01 mg/l
Sodium	20 mg/l
Manganese	< 0.005 mg/l
Chloride	28 mg/l
Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> )	71 mg/l
Total residue	180 mg/l
Surface active agents (anionic)	< 0.02 mg/l
1,1,1-Trichloroethane	< 0.001 mg/l
Phenols	< 0.005 mg/l
Permanganate reduction substances	< 1.0 mg/l
pH Value	6.6
Taste	normal
Odor	normal
Color	< 1°
Turbidity	< 1°
Phosphorus	< 0.01 mg/l
Aluminium	0.13 mg/l
Nickel	0.003 mg/l
Tin	< 0.1 mg/l
Free residual chlorine	< 0.01 mg/l
Bromide	< 0.5 mg/l
Sulfide	< 0.01 mg/l
Ammonium	< 0.05 mg/l
Electric conductivity	260 μS/cm
Alkalinity (as CaCO <sub>3</sub> )	34 mg/l
Potassium	2.4 mg/l
Calcium	22 mg/l
Magnesium	4.0 mg/l
PCB	< 0.0005 mg/l
Organophosphate	< 0.02 mg/l

Date : January 27, 1999



## 付属資料－ 2

試験水の分析方法  
(全8頁)

## 試験水の分析方法

### 1 試験方法

#### 1-1 試料溶液の調製

##### 1) 対照区の試験水

試験水10 mlを200 mlの分液漏斗に正確に量り、ヘキサン20 mlを加えて5分間振とうした。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にはさらにヘキサン20 mlを加えて同様な操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、2 %ジエチレングリコール-アセトン溶液0.5 mlを添加した後減圧濃縮乾固した。得られた残留物をアセトニトリル-水(7:3 V/V)2 mlに溶解し、これを試料溶液とした。

##### 2) 1.0 mg/l濃度区の試験水

試験水10 mlを200 mlの分液漏斗に正確に量り、ヘキサン20 mlを加えて5分間振とうした。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にはさらにヘキサン20 mlを加えて同様な操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、2 %ジエチレングリコール-アセトン溶液0.5 mlを添加した後減圧濃縮乾固した。得られた残留物をアセトニトリル-水(7:3 V/V)10 mlに溶解し、これを試料溶液とした。

##### 3) 1.8 mg/l濃度区及び3.2 mg/l濃度区の試験水

試験水10 mlを200 mlの分液漏斗に正確に量り、ヘキサン20 mlを加えて5分間振とうした。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にはさらにヘキサン20 mlを加えて同様な操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、2 %ジエチレングリコール-アセトン溶液0.5 mlを添加した後減圧濃縮乾固した。得られた残留物をアセトニトリル-水(7:3 V/V)20 mlに溶解し、これを試料溶液とした。

##### 3) 5.6 mg/l濃度区及び10 mg/l濃度区の試験水

試験水の2 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容する。この10 mlを200 mlの分液漏斗に正確に量り、ヘキサン20mlを加えて5分間振とうした。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にはさらにヘキサン20 mlを加えて同様な操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、2 %ジエチレングリコール-アセトン溶液0.5 mlを添加した後減圧濃縮乾固した。得られた残留物をアセトニトリル-水(7:3 V/V)10 mlに溶解し、これを試料溶液とした。

#### 1-2 標準溶液の調製

標準品0.025 gを精密に量りとり、アセトニトリルに溶解して50 mlとし、これを標準原液とした。この標準原液からアセトニトリル-水(7:3 V/V)を用いて適宜希釈し、0.05, 0.25, 1.0及び2.0 µg/mlの標準溶液を調製した。

### 1-3 定量

試料溶液40  $\mu$ lを高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さと検量線から試料溶液中のo-sec.-ブチルフェノール濃度を求め、試験水中のo-sec.-ブチルフェノール濃度を算出した。

## 2 高速液体クロマトグラフ操作条件

機 種：LC-10AD[株式会社 島津製作所]

検 出 器：SPD-10A[株式会社 島津製作所]

カ ラ ム：LUNA 5  $\mu$  C18(2),  $\phi$ 4.6 mm $\times$ 25 cm

移 動 相：アセトニトリル-水-リン酸 (700:300:2 V/V/V)

測定波長：270 nm

流 速：0.8 ml/min

温 度：40℃

注 入 量：40  $\mu$ l

データ処理装置：C-R4A[株式会社 島津製作所]

## 3 検量線

1-2で調製した標準溶液40  $\mu$ lを高速液体クロマトグラフに注入し、注入量(ng)と得られたピーク高さから検量線を作成した。

## 4 添加回収試験

### 4-1 低濃度添加

飼育水に濃度が1.0 mg/lになるようにo-sec.-ブチルフェノールを添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は100.6 %, 100.4 %, 100.8 % (平均100.6 %)であった。

### 4-2 高濃度添加

飼育水に濃度が10 mg/lになるようにo-sec.-ブチルフェノールを添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は99.6 %, 99.8 %, 99.6 % (平均99.7 %)であった。

Figure 1. Calibration curve of o-sec.-Butylphenol by HPLC analysis

Amount (ng)	Peak height (μV)
80	15, 595
40	7, 882
10	1, 798
2	375

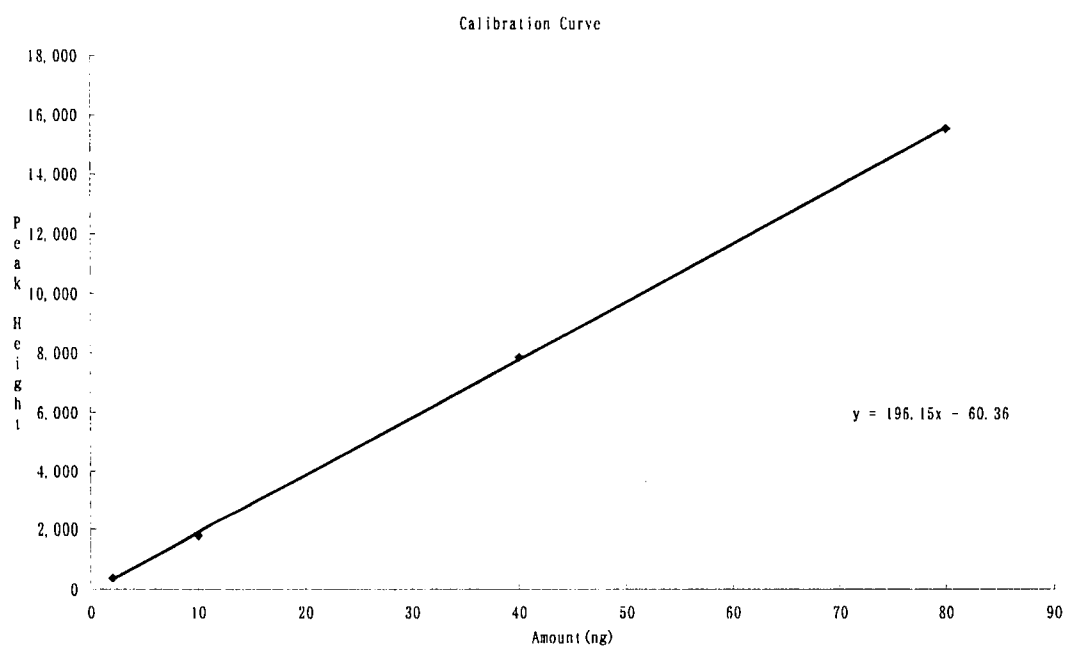
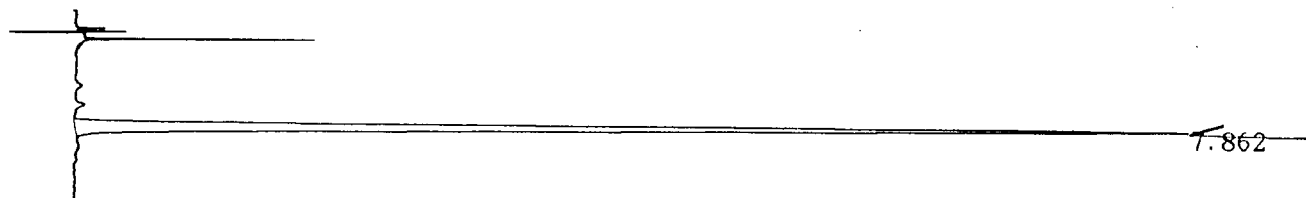


Figure 2. Representative chromatogram

Standard (80 µg/ml): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=28 クロマト=1:BUP002.C14 99/05/10 20:27:40



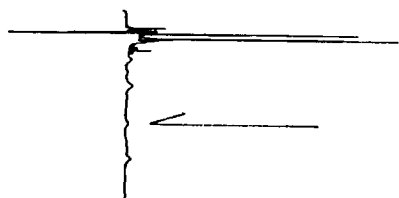
\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.862	141748	15595			100	
TOTAL			141748	15595			100	

Control: 0 hour

\* 波形処理/計算エラー\* Ch=1, 1: 生ピークがありません。

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=29 クロマト=1:BUP002.C18 99/05/10 21:13:47



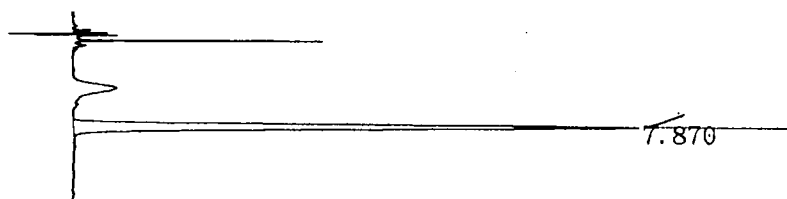
\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
TOTAL			0	0			0	

注意 エラー有 CALERROR: 1

Test solution (1.0 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=30 クロマト=1:BUP002.C19 99/05/10 21:25:19

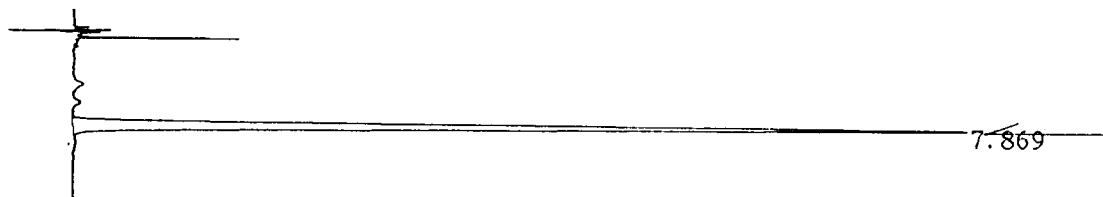


\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.87	71172	7950			100	
TOTAL			71172	7950			100	

Test solution (3.2 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=31 クロマト=1:BUP002.C21 99/05/10 21:48:22

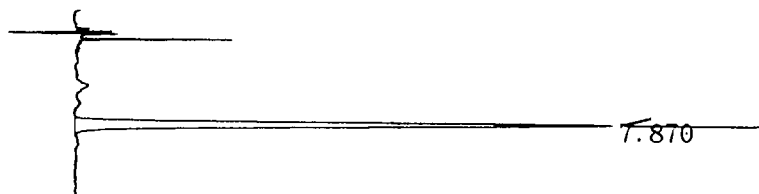


\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.869	112974	12594			100	
TOTAL			112974	12594			100	

Test solution (10 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=32 クロマト=1:BUP002.C23 99/05/10 22:11:25



**\*\* 定量計算結果 \*\***

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.87	67724	7542			100	
TOTAL			67724	7542			100	

Standard (80 µg/ml): 24 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=33 クロマト=1:BUP003.C12 99/05/11 19:43:29

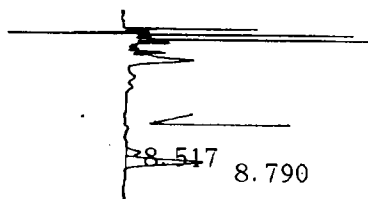


**\*\* 定量計算結果 \*\***

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.86	143002	15746			100	
TOTAL			143002	15746			100	

Control: 24 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=34 クロマト=1:BUP003.C16 99/05/11 20:31:36

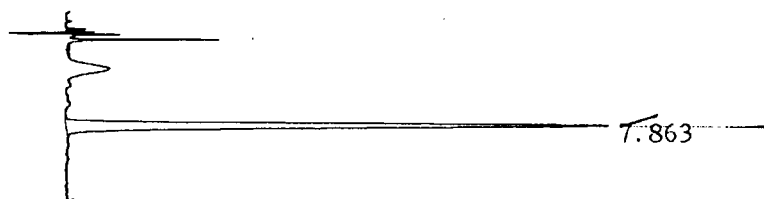


\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	8.517	1722	171			14.3197	
	2	8.79	10300	1084	V		85.6803	
TOTAL			12022	1255			100	

Test solution (1.0 mg/l): 24 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=35 クロマト=1:BUP003.C17 99/05/11 20:43:38



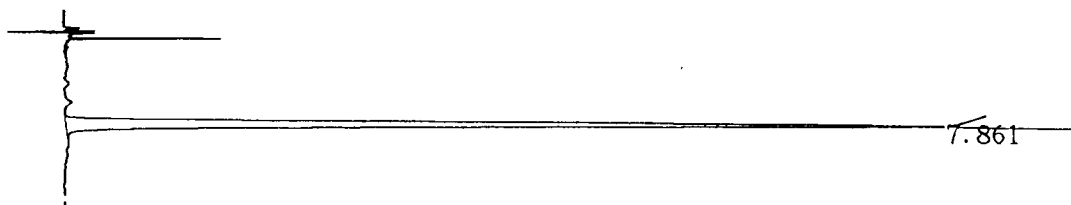
\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.863	68047	7628			100	
TOTAL			68047	7628			100	



Test solution (3.2 mg/l): 24 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=36 クロマト=1:BUP003.C19 99/05/11 21:07:41



**\*\* 定量計算結果 \*\***

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.861	110464	12317			100	
TOTAL			110464	12317			100	

Test solution (10 mg/l): 24 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=37 クロマト=1:BUP003.C21 99/05/11 21:31:44



**\*\* 定量計算結果 \*\***

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.862	68360	7661			100	
TOTAL			68360	7661			100	