

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

環境庁殿

試 験 報 告 書

4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジブロモフェノール)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：9 B 4 5 6 G)

2000年 3月31日作成

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： 環境庁

表題： 4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジブロモフェノール)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： 9 B 4 5 6 G

本試験は環境庁のG L P規則に従って実施したものである。

2 0 0 0 年 3 月 3 1 日

運営管理者

[Redacted]

[Redacted]

信 頼 性 保 証 証 明

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： 環境庁

表題： 4, 4' -イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール) 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： 9 B 4 5 6 G

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通り確認した。

記

| | 実施日 | 運営管理者および 試験責任者への報告日 |
|----------|---------------------|------------------------|
| 試験実施状況査察 | 2 0 0 0 年 2 月 1 4 日 | 2 0 0 0 年 2 月 1 4 日 |
| | 2 0 0 0 年 2 月 1 6 日 | 2 0 0 0 年 2 月 1 6 日 |
| 試験報告書監査 | 2 0 0 0 年 3 月 3 1 日 | 2 0 0 0 年 3 月 3 1 日 |

2 0 0 0 年 3 月 3 1 日

信頼性保証担当者：









試験実施概要

1. 表題： 4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジブロモフェノール)のオオミジンコ (*Daphnia magna*) に対する急性遊泳阻害試験
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時間後の半数遊泳阻害濃度 (EC50) および最大無作用濃度 (NOECi) 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 No. 202「ミジンコ類、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」(1984年)に準拠した。
4. 適用GLP： 本試験は環境庁GLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境庁
住所： 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
委託担当者： 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 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所
所在地： 〒105-0014 東京都港区芝二丁目1-30
7. 試験施設：
名称： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所
所在地： 〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町1000番地

8. 試験関係者：

| | | | |
|-------|------------|------------|---------------|
| 試験責任者 | [REDACTED] | [REDACTED] | (2000年 3月31日) |
| 試験担当者 | [REDACTED] | [REDACTED] | (2000年 3月31日) |
| | [REDACTED] | [REDACTED] | (2000年 3月31日) |
| | [REDACTED] | [REDACTED] | (2000年 3月31日) |
| | [REDACTED] | [REDACTED] | (2000年 3月31日) |
| | [REDACTED] | [REDACTED] | (2000年 3月31日) |
| 分析担当者 | [REDACTED] | [REDACTED] | (2000年 3月31日) |

9. 試験期間： 試験開始日 1999年11月16日
試験終了日 2000年 3月31日
暴露期間 2000年 2月14日～2000年 2月16日

10. 保管：

試験に関する下記の記録および試資料は、試験報告書作成後10年間、当研究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協議の上定める。

- 1) 試験計画書，同変更の記録
- 2) 試験報告書
- 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 | 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 | 13 |
| 5 結果および考察 | 14 |
| 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 | 14 |
| 5.2 試験液中の被験物質濃度 | 14 |
| 5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50) | 14 |
| 5.4 最大無作用濃度 (NOECi) および100%阻害最低濃度 | 14 |
| 5.5 試験液の水温, 溶存酸素濃度およびpH | 15 |
| Table 1～7 | 16～21 |
| Figure 1 | 22 |
| 付属資料－1 希釈水の水質 | 23～24 |
| 付属資料－2 試験液の分析方法 | 25～34 |

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

4, 4' -イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール) 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

9 B 4 5 6 G

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、急性遊泳阻害試験および繁殖試験」(1984年) に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： 4, 4' -イソプロピリデンビス (2, 6-ジブロモフェノール)
- 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（設定値）：
対照区，助剤対照区，2. 00，3. 60，6. 30，11. 0，20. 0 mg/L
公比：1. 8
助剤濃度一定：80 mg/L（HCO-40 および 2-メチシエタノール 使用）
- 6) 試験液量： 100 mL／容器
- 7) 連数： 4 容器／濃度区
- 8) 供試生物数： 20頭／濃度区（5頭／容器）
- 9) 試験温度： 20±1℃
- 10) 照明： 16時間明／8時間暗
- 11) 分析法： HPLC法

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

被験物質の測定濃度がすべて設定値の±20%以内であったため、各影響濃度の算出には設定値を採用した。

2) 24 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : 9.25 mg/L (95%信頼限界 : 6.30～11.0 mg/L)

最大無作用濃度 (NOECi) : 6.30 mg/L

100%阻害最低濃度 : 20.0 mg/L

3) 48 時間暴露後の結果

半数遊泳阻害濃度 (EiC50) : 7.87 mg/L (95%信頼限界 : 6.87～9.03 mg/L)

最大無作用濃度 (NOECi) : 3.60 mg/L

100%阻害最低濃度 : 20.0 mg/L

1 被験物質

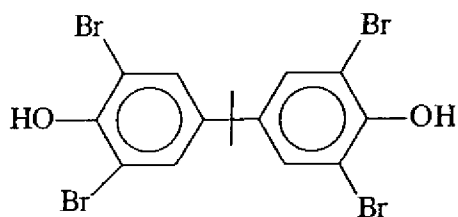
1.1 名称，構造式および物理化学的性状

名 称： 4,4'-イソプロピリデンビス(2,6-ジブロモフェノール)（略称 I P D B）

別 名： テトラブロモビスフェノールA

CAS No： 79-94-7

構造式：



分子式： $C_{15}H_{12}Br_4O_2$

分子量^{*1}： 543.87

融点^{*1}： 182.2℃

水溶解度^{*1}： 不溶

安定性^{*1}： 通常の取扱条件で安定，酸化剤との接触に注意

*1:供給者提供資料

1.2 供試試料

純度^{*1}： 99.7%（中和法）

ロット番号^{*1}： GG01

供給者： XXXXXXXXXX

供給量^{*1}： 50 g

入手日： 1999年9月3日

外観^{*1}： 白色結晶性粉末

*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

被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質の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。試験終了時にも赤外吸収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。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。

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
- 4) 入手日： 1995 年 7 月 18 日
- 5) 入手後の管理： 継代培養（最大飼育期間；4 週間，換水頻度；少なくとも週 3 回）
- 6) 感受性の確認： 基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）による 48 時間の半数遊泳障害濃度 (EiC50) = 0.57 mg/L （この値は当研究所における 1998 年 6 月以降の EiC50 値 0.59～1.02 mg/L (n=3) にほぼ一致する。）
- 7) 親の馴化： 馴化期間；2000 年 1 月 31 日～2000 年 2 月 14 日
暴露開始前 2 週間の親の死亡率は 0% で休眠卵および雄の発生は認められなかった。（馴化条件は以下に示す。）
- 8) 供試令： 生後 24 時間令以内の幼体

馴化条件

- 1) 飼育水： 希釈水（3.2 参照）
- 2) 飼育密度： 1 頭／80mL 飼育水（25 頭／2L）
- 3) 水温： 20±1℃
- 4) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 5) 餌： *Chlorella vulgaris*
- 6) 給餌量： ミジンコ 1 頭当たり 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： 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／濃度区
- 5) 供試生物数： 20 頭／濃度区（5 頭／容器）
- 6) 試験温度： 20±1℃
- 7) 照明： 室内光，16 時間明（800 lux 以下）／8 時間暗
- 8) 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。成分表を付属資料－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，テフロンシート製蓋
- 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）
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型
- 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

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／濃度区）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，

2.00, 3.60, 6.30, 11.0 および 20.0 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 |
| 対照区 | 0/10 | 0/10 |
| 助剤対照区 | 0/10 | 0/10 |
| 1.00 | 0/10 | 0/10 |
| 2.50 | 0/10 | 0/10 |
| 7.00 | 4/10 | 5/10 |
| 20.0 | 9/10 | 10/10 |

3.5 試験液の調製

被験物質を 50 mg 秤取し，2-メトキシエタノール 50 mg に溶解後，HCO-40 150 mg を加え混合した。これを純水で希釈して 50 mL に定容し，被験物質濃度 1000 mg/L の原液を調製した。同時に被験物質を含まない助剤原液 4000 mg/L（2-メトキシエタノール 1000 mg/L，HCO-40 3000 mg/L）を調製した。

500mL のメスフラスコに希釈水を入れ，上記被験物質原液を各濃度に応じて添加した後，助剤濃度が一定（80 mg/L）になるように助剤原液を加え，各試験液を調製した。

助剤対照区には被験物質のみを含まないもの（助剤濃度：80 mg/L）を調製した。

対照区には，希釈水のみを用いた。

調製時の試験液の状態（外観）は対照区，助剤対照区および全濃度区において無色透明であった。

3.6 試験液の分析

全濃度区（但し、各1試験容器）について、暴露開始時と暴露終了時の各試験液 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後、HPLCにより分析した。アセトニトリルで調製した標準溶液（5.00および 10.0 mg/L）は、等量の水で希釈したものをHPLC測定試料とした。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た。

詳細は付属資料－2に示した。

3.7 試験操作

試験液の水温、溶存酸素濃度、pH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。その際、ピペット内の飼育水が、全量で試験液量に対して1%以内となるようにした。その後、暴露終了時（暴露開始48時間後）まで飼育した。

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（但し、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が、再び浮上した場合に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、溶存酸素濃度およびpHは、暴露開始時および暴露終了時（暴露開始48時間後）に、全濃度区（但し、各1試験容器）の試験液について測定した。

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（%）を求め、Binomial法、Moving average法およびProbit法により、半数遊泳阻害濃度（ EC_{50} ）を算出し、いずれか適切な結果を採用した。同時に、その95%信頼限界も算出した。

また、ミジンコが遊泳阻害を受けない最高濃度区を最大無作用濃度（ $NOEC_i$ ）とし、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。

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

暴露開始時および暴露終了時（暴露開始 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。

設定濃度に対して±20%を超える分析結果は認められなかったため、以下の値（半数遊泳阻害濃度、最大無作用濃度および100%阻害最低濃度）は設定濃度を基に示した。

5.3 半数遊泳阻害濃度 (EiC50)

各時間における遊泳阻害率および半数遊泳阻害濃度 (EiC50) をそれぞれ Table 2 および Table 3 に、濃度－遊泳阻害率曲線を Figure 1に示した。

48時間暴露の対照区および助剤対照区の遊泳阻害率は共に 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。

以上の結果から、以下の結論を得た。

24時間 EiC50： 9.25 mg/L (95%信頼区間：6.30～11.0 mg/L)

48時間 EiC50： 7.87 mg/L (95%信頼区間：6.87～ 9.03 mg/L)

5.4 最大無作用濃度 (NOECi) および 100%阻害最低濃度

最大無作用濃度 (NOECi) 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 NOECi： 6.30 mg/L

24時間 100%阻害最低濃度： 20.0 mg/L

48時間 NOECi： 3.60 mg/L

48時間 100%阻害最低濃度： 20.0 mg/L

5.5 試験液の水温，溶存酸素濃度およびpH

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

水温はすべての濃度区で $20 \pm 1^{\circ}\text{C}$ で，溶存酸素濃度はすべての試験液槽で飽和溶存酸素濃度（ 20.0°C の飽和溶存酸素濃度： 8.8mg/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（ $6.0 \sim 8.5$ ）内であった。

以 上

Table 1 Measured Concentrations of the Test Substance in Test Water
(Static Conditions)

| 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 | < 0.02 | -- | < 0.02 | -- | -- |
| Solvent Control | < 0.02 | -- | < 0.02 | -- | -- |
| 2.00 | 1.96 | 98 | 1.96 | 98 | 1.96 |
| 3.60 | 3.46 | 96 | 3.49 | 97 | 3.47 |
| 6.30 | 6.11 | 97 | 6.14 | 97 | 6.12 |
| 11.0 | 10.6 | 96 | 10.7 | 97 | 10.6 |
| 20.0 | 19.5 | 98 | 19.7 | 99 | 19.6 |

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 48 Hours exposure

Table 2 The Numbers of Immobile *Daphnia* (Percent Immobility)

| Nominal Concentration (mg/L) | Cumulative Numbers of Immobilized <i>Daphnia</i> (Percent Immobility) | |
|------------------------------------|--|----------|
| | 24 Hours | 48 Hours |
| Control | 0 (0) | 0 (0) |
| Solvent Control | 0 (0) | 0 (0) |
| 2.00 | 0 (0) | 0 (0) |
| 3.60 | 0 (0) | 0 (0) |
| 6.30 | 0 (0) | 4 (20) |
| 11.0 | 16 (80) | 18 (90) |
| 20.0 | 20 (100) | 20 (100) |

Table 3 Calculated EiC50 Values

| Exposure Period (Hours) | EiC50 (mg/L) | 95-Percent Confidence Limits (mg/L) | Statistical Method |
|-------------------------------|-----------------|---|--------------------|
| 24 | 9.25 | 6.30 ~ 11.0 | Binomial |
| 48 | 7.87 | 6.87 ~ 9.03 | Probit |

Table 4 No Observed Effect Concentration (NOECi) and Lowest Concentration in 100% Immobility

| Exposure Period (Hours) | No Observed Effect Concentration (NOECi) (mg/L) | Lowest Concentration in 100% Immobility (mg/L) |
|-------------------------------|--|--|
| 24 | 6.30 | 20.0 |
| 48 | 3.60 | 20.0 |

Table 5 Temperature

(Static Conditions)

| Nominal Concentration (mg/L) | Temperature, °C | |
|------------------------------------|-----------------|-----------------|
| | 0 Hour New | 48 Hours Old |
| Control | 20.1 | 20.0 |
| Solvent Control | 20.1 | 20.0 |
| 2.00 | 20.1 | 20.1 |
| 3.60 | 20.1 | 20.2 |
| 6.30 | 20.1 | 20.1 |
| 11.0 | 20.1 | 20.1 |
| 20.0 | 20.2 | 20.1 |

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 Hours exposure

Table 6 Dissolved Oxygen Concentrations

(Static Conditions)

| Nominal Concentration (mg/L) | Dissolved Oxygen Concentration, mg/L | |
|------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
| | 0 Hour New | 48 Hours Old |
| Control | 8.8 | 8.5 |
| Solvent Control | 8.8 | 7.7 |
| 2.00 | 8.6 | 7.7 |
| 3.60 | 8.6 | 7.6 |
| 6.30 | 8.5 | 7.6 |
| 11.0 | 8.8 | 7.7 |
| 20.0 | 8.8 | 7.7 |

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 Hours exposure

Table 7 pH Values

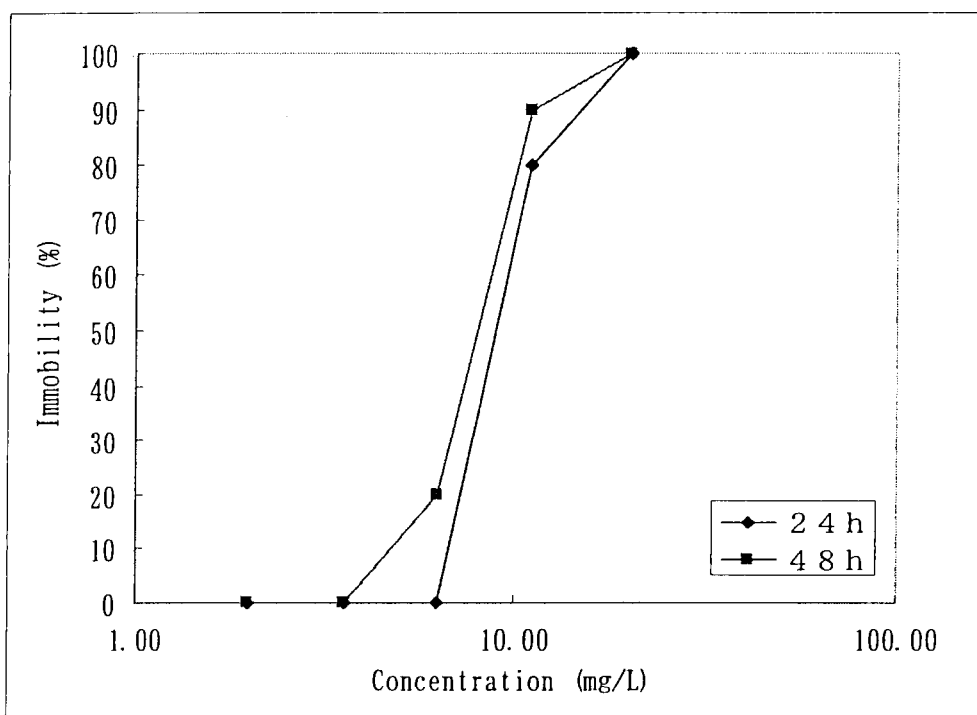
(Static Conditions)

| Nominal Concentration (mg/L) | pH | |
|------------------------------------|---------------|-----------------|
| | 0 Hour New | 48 Hours Old |
| Control | 8.4 | 8.3 |
| Solvent Control | 8.5 | 7.9 |
| 2.00 | 8.4 | 7.8 |
| 3.60 | 8.4 | 7.8 |
| 6.30 | 8.3 | 7.8 |
| 11.0 | 8.2 | 7.7 |
| 20.0 | 8.0 | 7.6 |

New: freshly prepared test solutions

Old: test solutions after 48 Hours exposure

Figure 1 Concentration-Response (Immobility) Curve



付属資料－ 1

希釈水の水質

Table A-1 Elendt M4 Medium Recommended by OECD Guideline No. 211
Used as Dilution Water

| Macro nutrients | Concentration | Unit |
|---|---------------|-----------------|
| $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 293.8 | mg /L |
| $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 123.3 | mg /L |
| KCl | 5.80 | mg /L |
| NaHCO_3 | 64.8 | mg /L |
| $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ | 10.0 | mg /L |
| NaNO_3 | 0.274 | mg /L |
| KH_2PO_4 | 0.143 | mg /L |
| K_2HPO_4 | 0.184 | mg /L |
| Trace elements | Concentration | Unit |
| H_3BO_3 | 2.8595 | mg /L |
| $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ | 0.3605 | mg /L |
| LiCl | 0.3060 | mg /L |
| RbCl | 0.0710 | mg /L |
| $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.152 | mg /L |
| NaBr | 0.0160 | mg /L |
| $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.0630 | mg /L |
| $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.0168 | mg /L |
| ZnCl_2 | 0.0130 | mg /L |
| $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.0100 | mg /L |
| KI | 3.25 | $\mu\text{g/L}$ |
| Na_2SeO_3 | 2.19 | $\mu\text{g/L}$ |
| NH_4VO_3 | 0.575 | $\mu\text{g/L}$ |
| $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 2.50 | mg /L |
| $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.9955 | mg /L |
| Vitamines | Concentration | Unit |
| Thiamine hydrochloride | 75.0 | $\mu\text{g/L}$ |
| Cyanocobalamine (B12) | 1.00 | $\mu\text{g/L}$ |
| Biotine | 0.750 | $\mu\text{g/L}$ |

付属資料－ 2

試験液の分析方法

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

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 0.75 mLを加え混合し、HPLCにより分析した。アセトニトリルで調製した標準溶液（5.00および10.0 mg/L）は、等量の水で希釈したものをHPLC測定試料とした。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た。

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： | Hewlett Packard製 HP-1100型 (No. 1) |
| ワークステーション： | HPケミステーション (Windows 95) |
| パソコン： | HP Vectra XM, ディスプレイ； Vectra VCA 1280 |
| プリンター： | HP製 LASER JET 4 PLUS |
| デガッサー： | G1322A型 |
| 送液ポンプ： | G1312A型 |
| オートサンプラ： | G1313A型 |
| カラムオープン： | G1316A型 |
| 紫外可視分光検出器： | G1314A型 |

（条件）

| | |
|------------|--|
| カラム： | Inertsil ODS-3V, 5 μ m, 4.6 x150 mm (GL Sciences Inc.) |
| 溶離液： | Acetonitrile 90 %, 0.01Mリン酸二水素ナトリウム 10 % |
| 流速： | 1.0 mL/min |
| 測定波長： | 206 nm |
| 試料注入量： | 20 μ L |
| カラムオープン温度： | 40℃ |

3 検量線

被験物質の1000 mg/L アセトニトリル溶液を調製し、順次、アセトニトリルで希釈し 0, 0.10, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.0, 20.0 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を等量の水で希釈したものを、HPLC測定試料とした。横軸に濃度を (mg/L), 縦軸にピーク面積 (count表示) 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、1.000であった。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 1 countに設定し、これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.02 mg/Lを検出限界とした。

5 添加回収試験

HPLC直接注入法のため添加回収試験は実施しなかった。

Figure A-2-1 Calibration Curve

| No. | Concentration (mg/L) | Peak Area (count) |
|-----|-------------------------|----------------------|
| 1 | 0 | 0 |
| 2 | 0.10 | 7.0 |
| 3 | 0.20 | 14.4 |
| 4 | 0.50 | 37.0 |
| 5 | 1.00 | 75.0 |
| 6 | 2.00 | 119.3 |
| 7 | 5.00 | 377.1 |
| 8 | 10.0 | 759.7 |
| 9 | 20.0 | 1537.3 |

$$Y = 76.5X$$

$$r = 1.000$$

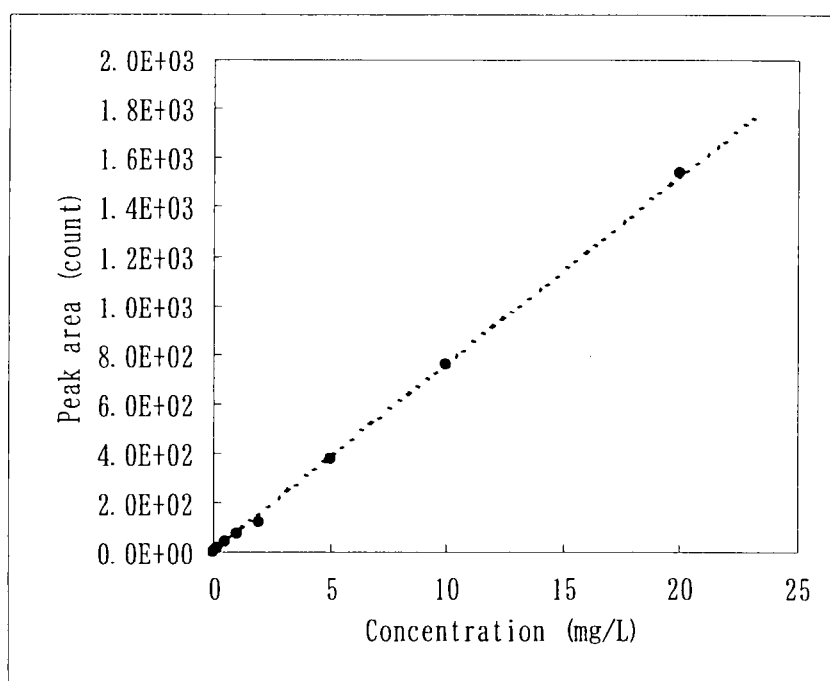
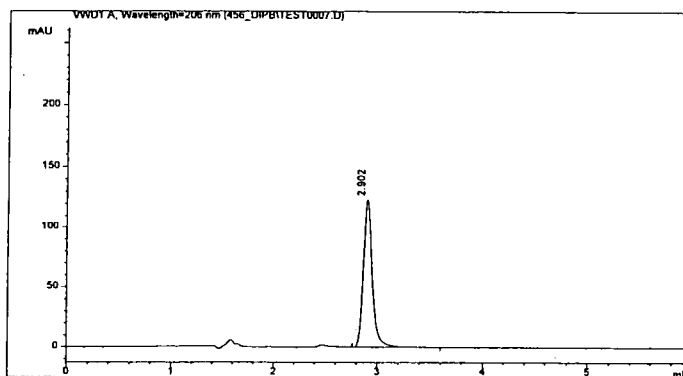


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 10.0 mg/L ; 0 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_DIPB\TEST0007.D

Injection Date :00/02/15 Seq Line : 7
 Test No. :9B456G Vial No. : 2
 Test Substance :IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name :STD 10ppm
 Acq Operator :
 Acq. Method :9B456G.M
 Analysis Method :C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M



Area Percent Report:

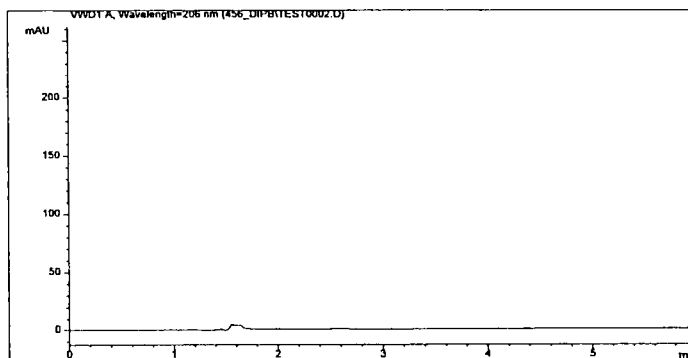
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % |
|---------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|--------|
| 1 | 2.902 | MM | 0.101 | 756.1 | 124.16 | 100 |
| Total : | | | | 756.1 | | |

*** End of Report ***

(2) Control ; 0 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_DIPB\TEST0002.D

Injection Date :00/02/15 Seq Line : 2
 Test No. :9B456G Vial No. : 11
 Test Substance :IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name :control 0hr
 Acq Operator :
 Acq. Method :9B456G.M
 Analysis Method :C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M



Area Percent Report:

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|--------|
|--------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|--------|

No peaks found

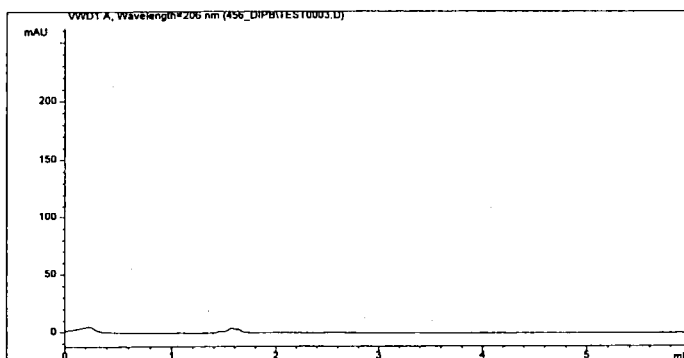
*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(3) Solvent Control ; 0 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_DIPB\TEST0003.D

Injection Date :00/02/15 Seq Line : 3
 Test No. :9B456G Vial No. : 12
 Test Substance :IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name :s-control 0hr
 Acq Operator :
 Acq. Method :9B456G.M
 Analysis Method :C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M



Area Percent Report:

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % [%] |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|------------|
|--------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|------------|

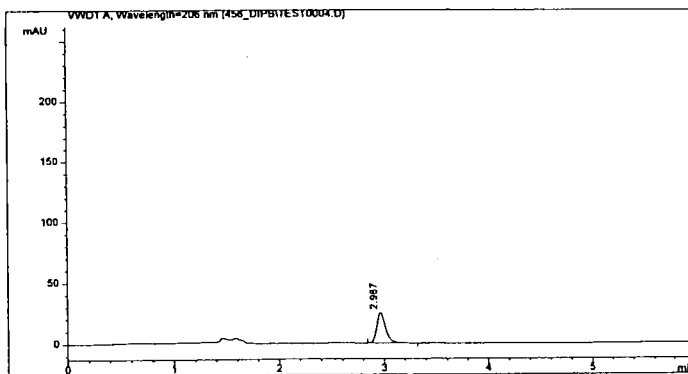
No peaks found

*** End of Report ***

(4) 2.00 mg/L nominal ; 0 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_DIPB\TEST0004.D

Injection Date :00/02/15 Seq Line : 4
 Test No. :9B456G Vial No. : 13
 Test Substance :IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name :conc-1 0hr
 Acq Operator :
 Acq. Method :9B456G.M
 Analysis Method :C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M



Area Percent Report:

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % [%] |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|------------|
| 1 | 2.967 | BV | 0.091 | 147.7 | 24.93 | 100 |

Total : 147.7

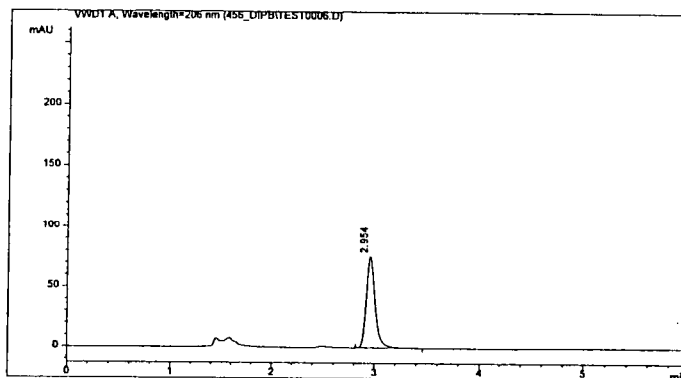
*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(5) 6.30 mg/L nominal ; 0 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_DIPB\TEST0006.D

Injection Date :00/02/15 Seq Line : 6
 Test No. :9B456G Vial No. : 15
 Test Substance :IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name :conc-3 0hr
 Acq Operator :
 Acq. Method :9B456G.M
 Analysis Method :C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M



Area Percent Report:

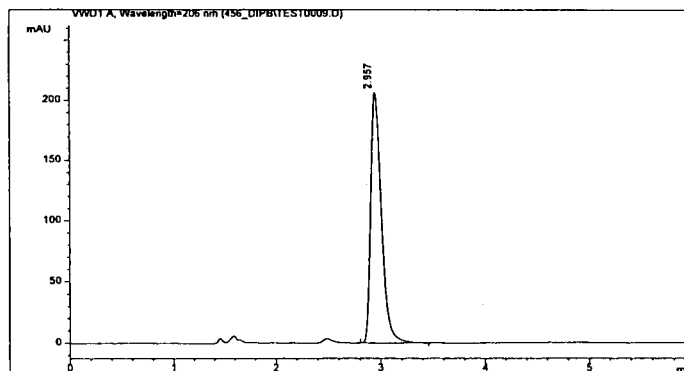
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % |
|---------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|--------|
| 1 | 2.954 | BV | 0.091 | 460.3 | 76.35 | 100 |
| Total : | | | | 460.3 | | |

*** End of Report ***

(6) 20.0 mg/L nominal ; 0 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_DIPB\TEST0009.D

Injection Date :00/02/15 Seq Line : 9
 Test No. :9B456G Vial No. : 17
 Test Substance :IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name :conc-5 0hr
 Acq Operator :
 Acq. Method :9B456G.M
 Analysis Method :C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M



Area Percent Report:

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % |
|---------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|--------|
| 1 | 2.957 | BV | 0.111 | 1472.1 | 206.93 | 100 |
| Total : | | | | 1472.1 | | |

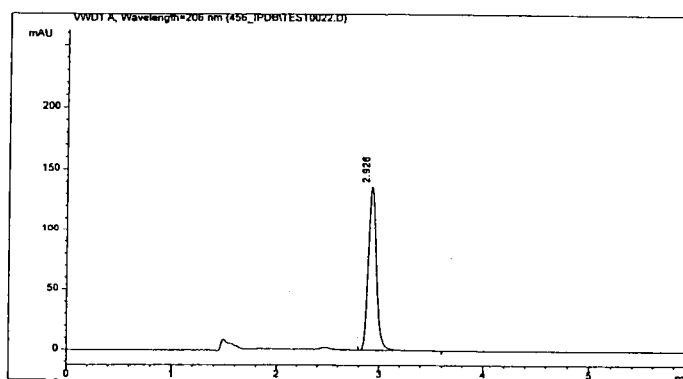
*** End of Report ***

Figure A-2-2 Continued

(7) Standard 10.0 mg/L ; 48 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_IPDB\TEST0022.D

Injection Date :00/02/16 Seq Line : 10
 Test No. :9B456G Vial No. : 2
 Test Substance :IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name :std 10ppm
 Acq Operator :
 Acq. Method :9B456G.M
 Analysis Method :C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M



Area Percent Report:

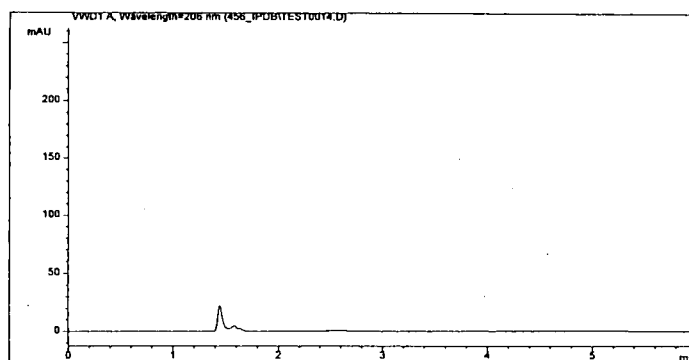
| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % |
|---------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|--------|
| 1 | 2.926 | VBA | 0.086 | 759.1 | 137.06 | 100 |
| Total : | | | | 759.1 | | |

*** End of Report ***

(8) Control ; 48 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_IPDB\TEST0014.D

Injection Date :00/02/16 Seq Line : 2
 Test No. :9B456G Vial No. : 11
 Test Substance :IPDB Inj. Vol. : 20 µl
 Sample Name :control 48hr
 Acq Operator :
 Acq. Method :9B456G.M
 Analysis Method :C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B500G.M



Area Percent Report:

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|--------|
|--------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|--------|

No peaks found

*** End of Report ***

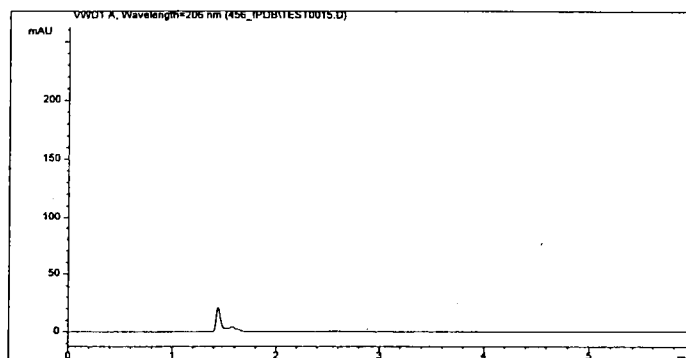
Figure A-2-2 Continued

(9) Solvent Control ; 48 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_IPDB\TEST0015.D

```

Injection Date : 00/02/16      Seq Line :      3
Test No.       : 9B456G        Vial No.  :     12
Test Substance : IPDB          Inj. Vol. :    20 µl
Sample Name    : s-control 48hr
Acq Operator   : 
Acq. Method    : 9B456G.M
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M
  
```



Area Percent Report:

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % [%] |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|------------|
|--------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|------------|

No peaks found

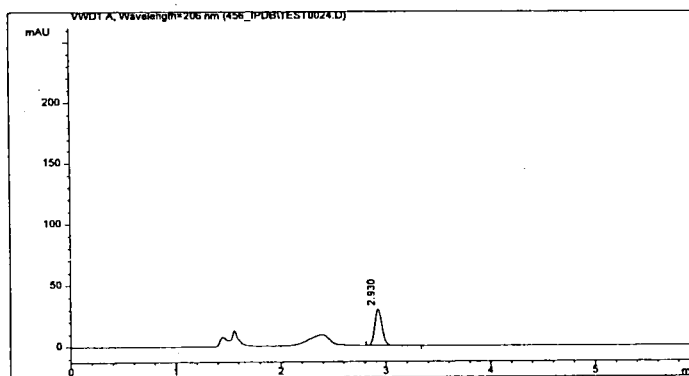
*** End of Report ***

(10) 2.00 mg/L nominal ; 48 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_IPDB\TEST0024.D

```

Injection Date : 00/02/16      Seq Line :      1
Test No.       : 9B456G        Vial No.  :     13
Test Substance : IPDB          Inj. Vol. :    20 µl
Sample Name    : conc-1 48hr
Acq Operator   : 
Acq. Method    : 9B456G.M
Analysis Method : C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M
  
```



Area Percent Report:

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % [%] |
|--------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|------------|
| 1 | 2.930 | BP | 0.076 | 147.5 | 30.02 | 100 |

Total : 147.5

*** End of Report ***

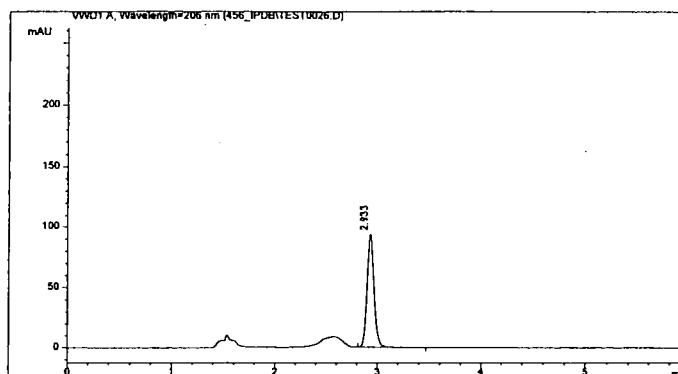
Figure A-2-2 Continued

(11) 6.30 mg/L nominal ; 48 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_IPDB\TEST0026.D

```

Injection Date :00/02/16          Seq Line :    3
Test No.       :9B456G           Vial No.  :   15
Test Substance :IPDB             Inj. Vol. :   20 µl
Sample Name    :conc-3 48hr
Acq Operator   :
Acq. Method    :9B456G.M
Analysis Method:C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M
  
```



Area Percent Report:

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % |
|---------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|--------|
| 1 | 2.933 | BP | 0.076 | 463.2 | 94.10 | 100 |
| Total : | | | | 463.2 | | |

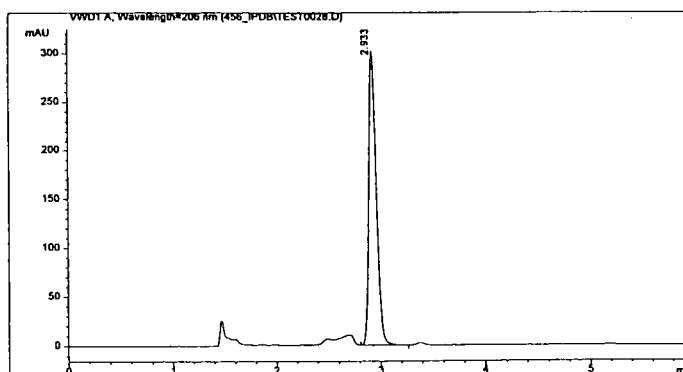
*** End of Report ***

(12) 20.0 mg/L nominal ; 48 hr

Data file :C:\HPCHEM\1\DATA\456_IPDB\TEST0028.D

```

Injection Date :00/02/16          Seq Line :    5
Test No.       :9B456G           Vial No.  :   17
Test Substance :IPDB             Inj. Vol. :   20 µl
Sample Name    :conc-5 48hr
Acq Operator   :
Acq. Method    :9B456G.M
Analysis Method:C:\HPCHEM\1\METHODS\1999.M\9B456G.M
  
```



Area Percent Report:

| Peak # | RetTime [min] | Type | Width [min] | Area [count] | Height [count] | Area % |
|---------|---------------|------|-------------|--------------|----------------|--------|
| 1 | 2.933 | VV | 0.077 | 1494.3 | 302.50 | 100 |
| Total : | | | | 1494.3 | | |

*** End of Report ***