

環境庁殿

最 終 報 告 書

アニリンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

(試験番号：91754)

1997 年 3 月 28 日作成

財団法人 化学物質検査協会
化学品安全センター 化学物質研究所

陳 述 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： アニリンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

試験番号： 91754

上記試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に準拠したものである。

1997年 3 月 28 日

運営管理者



信 頼 性 保 証 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： アニリンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

試験番号： 91754

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(運営管理者)	報告日(試験責任者)
試験計画書監査	1997年 2月14日	1997年 2月14日	1997年 2月14日
試験実施状況査察	1997年 2月24日	1997年 3月 4日	1997年 3月 3日
試験実施状況査察	1997年 2月28日	1997年 3月 4日	1997年 3月 3日
最終報告書監査	1997年 3月28日	1997年 3月28日	1997年 3月28日

1997年 3月28日

信頼性保証部門責任者



試験実施概要

1 表 題

アニリンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験

2 試験目的

アニリンについて、ヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験を行い、半数致死濃度(LC50)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.203「魚類急性毒性試験」(1992年)に準拠した。

4 適用GLP

本試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に準拠した。

5 試験委託者

名 称： 環境庁

住 所： (〒100)東京都千代田区霞が関 1-2-2

6 試験受託者

名 称： 財団法人 化学品検査協会

住 所： (〒136)東京都江東区亀戸 5-6-21

7 試験施設

名 称： 化学品安全センター 久留米研究所

住 所： (〒830)福岡県久留米市中央町 19-14

運営管理者： XXXXXXXXXX

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]

データ処理担当

[REDACTED]

試験資料管理部門責任者

[REDACTED]

9 最終報告書の承認

1997年 3 月 28 日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

10 試験期間

試験開始日

1997 年 2 月 14 日

試験終了日

199 年 3 月 28 日

暴露期間

1997 年 2 月 24 日 ～ 1997 年 2 月 28 日

11 保 管

試験計画書、生データ、記録文書、最終報告書及び被験物質は、最終報告書作成後10年間、財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター 久留米研究所の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。

目 次

	頁
要 旨	1
1 被 験 物 質	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	2
1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性	3
2 試 験 生 物	3
3 試 験 方 法	4
3.1 試 験 条 件	4
3.2 希 釈 水	4
3.3 試験容器及び恒温槽等	4
3.4 試験濃度の設定	4
3.5 試験液の調製	5
3.6 試験液の分析	5
3.7 試 験 操 作	5
3.8 数値の取扱い	5
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 半数致死濃度 (LC50)	6
5.4 0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度	6
5.5 毒 性 症 状	6
5.6 試験液の水温、溶存酸素濃度及びpH	7
5.7 試験液の状態	7
Table 1～8	8～14
Figure 1	15
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

環境庁

表 題アニリンのヒメダカ(*Oryzias latipes*)に対する急性毒性試験試験番号

91754

試験方法

本試験は、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)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： アニリン
- 2) 試験生物： ヒメダカ(*Oryzias latipes*)
- 3) 生物数： 10尾／1試験区(1連につき5尾で1試験区10尾)
- 4) 暴露期間： 96時間
- 5) 暴露方式： 半止水式(48時間後に試験液を交換)
- 6) 試験濃度： 150、100、66.7、44.4、29.6、19.8 mg/L(公比：1.5)及び対照区
- 7) 連 数： 1試験区につき2連
- 8) 試験液量： 1容器(1連)につき2.5 L
- 9) 試験水温： 24±1℃
- 10) 照 明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 11) エアレーション： なし
- 12) 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、換水前)

結 果

- 1) 96時間の半数致死濃度 (LC50) =27.2 mg/L (95%信頼限界：22.9～32.0 mg/L)
- 2) 0%死亡最高濃度は本試験の濃度範囲からは得られなかった。
- 3) 100%死亡最低濃度=44.4 mg/L
(上記濃度は、全て設定値に基づく値)

1 被 験 物 質

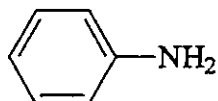
本報告書においてアニリンは、次の名称及び品質等を有するものとする。

被験物質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 : アニリン
(CAS番号 62-53-3)

- 2) 構 造 式 :



- 3) 分 子 式 : C_6H_7N
 4) 分 子 量 : 93.13
 5) 外 観 : ごくうすい黄色澄明の液体 ^{#1}
 6) 安 定 性 : 不明
 7) 1-オクタノール／水分配係数(logP) : $\log Kow = 0.90$ ^{#4}
 8) pKa : PKb 9.30 ^{#4}
 9) 水への溶解度 : 3.4 mL/100 mL (20°C) ^{#3}
 10) 蒸 気 圧 : 0.3 mmHg (20°C) ^{#2}
 11) 純度及び不純物 : 含量 100.0% ^{#1}
 水分 0.03% ^{#1}
 不揮発物 0.01%以下 ^{#1}
 ニトロベンゼン 0.003%以下 ^{#1}
 12) ロット番号 : LEG5649
 13) 供 給 者 : XXXXXXXXXX
 14) 供 給 量 : 500 mL
 15) 入 手 日 : 1996 年 12 月 25 日

情 報 源

- #1 : 供給者提供の添付資料
 #2 : Karel Verschueren, "Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals"
 2nd Ed., Van Nostrand Reinhold, 1983.
 #3 : 化学大事典編集委員会編「化学大事典」(共立出版) 1960.
 #4 : Hazardous Substances Data Bank(HSDB), U.S. National Library of Medicine
 (1995).

1.2 被験物質の確認及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。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の特性と矛盾が認められないことを確認した。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ことより被験物質は当研究所の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

2 試験生物

試験に使用したヒメダカ(*Oryzias latipes*)を下記に示した。試験生物の体長(被鱗体長)は 2.0 ± 0.5 cmであった。

- 1) 一般名： ヒメダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 体長： 1.9 cm (1.7~2.1 cm), n=10
- 4) 体重： 0.10 g (0.072~0.14 g), n=10
- 5) ロット番号： LNR-961228
- 6) 購入先： 中島養魚場(〒869-01 熊本県玉名郡長洲町大明神)
- 7) 購入日： 1996 年 12 月 27 日

順化

試験条件と同条件(水質、温度等)で 12 日間以上、飼育順化した。順化開始時にエルバージュ(上野製薬製)を用いて止水状態で 24 時間薬浴を行った。餌は市販のテトラミン(テトラベルケ社)を与えた。暴露開始の 24 時間前からは給餌しなかった。試験には健康で肉眼的に正常な個体を使用した。暴露開始前 7 日間の死亡率は 5%以下であった。また、基準物質〔硫酸銅(Ⅱ)五水和物、試薬特級、和光純薬工業株式会社〕の 96 時間 LC50 は 0.945 mg/L であった。

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48時間後に試験液を交換する半止水式で行った。
- 2) 暴露期間： 96時間
- 3) 連 数： 1試験区に付き2連
- 4) 生物数： 10尾／1試験区(1連に付き5尾で1試験区10尾)
- 5) 試験液量： 1容器(1連)に付き2.5 L
- 6) 換水率： 1回／2日
- 7) 試験水温： $24\pm 1^{\circ}\text{C}$
- 8) 照 明： 室内光、16時間明／8時間暗
- 9) 給 餌： 無給餌
- 10) エレクション： なし

3.2 希 釈 水

脱塩素水道水(久留米市水道水を活性炭処理し、残留塩素等を除去したもので、充分通気した)を使用した。希釈水の主な水質として、硬度は $55.6 \text{ mg/L}(\text{CaCO}_3 \text{ 換算})$ 、pHは7.7であった。希釈水使用時にはオルトトリジン法によって残留塩素濃度が 0.02 mg/L 以下であることを確認した。

[付属資料-1]

3.3 試験容器及び恒温槽等

- 1) 試験容器： 3.0 L容のガラス製容器(直径16 cm、深さ17 cm)を用いた。
- 2) 恒温槽： 加温冷却機によって試験容器内の水温を $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持する恒温槽を用いた。
- 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-11P 型(東亜電波工業)
- 5) 溶存酸素計： 溶存酸素計51B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では 150 mg/L において100%死亡、 19.8 mg/L において0%死亡であったので、試験濃度は 150 mg/L を最高濃度として公比1.5で6濃度区(150、100、66.7、44.4、29.6及び 19.8 mg/L)を設定した。対照には希釈水のみを対照区を設けた。

3.5 試験液の調製

必要量の被験物質を希釈水に溶解させ10,000 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希釈水を混合して調製した。

3.6 試験液の分析

暴露開始時(0時間)及び換水前(48時間)に各試験区の2容器の中層より試験液を等量採取して混合した後、HPLCにより分析した。試験液の分析に際しては、標準溶液(濃度5.00 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

暴露開始時に試験生物と同水槽で順化した魚10尾の重量及び被鱗体長を測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

全試験区(但し、各1試験容器)の試験液の水温、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験容器中に試験生物を1試験区当り10尾投入した。全試験区(但し、各1試験容器)の水温、溶存酸素濃度、pHは暴露期間中毎日1回測定した。また、換水前後にも、水温、溶存酸素濃度、pHを測定した。

暴露開始後、3、24、48、72及び96時間後に死亡個体数を記録するとともに観察された一般的症例或いは特異的症例(背曲がり、出血、体色変化、粘液の分泌等)を記録した。一般的症例と定義を下記に示した*。死亡個体を発見した場合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。

3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考 3 規則 B によった。

4 結果の算出

各濃度区での死亡数と供試個体数(10尾)から死亡率(%)を算出し、Probit法により半数致死濃度(LC50)を算出した。また、その95%信頼限界も示した。なお、被験物質の測定濃度が設定値の $\pm 20\%$ 以内であったので、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

暴露開始時及び換水前(暴露開始後48時間)に試験液中の被験物質濃度を測定した。被験物質の測定濃度の設定値に対する割合は、暴露開始時で95.2~98.5%、換水前で95.7~101%であり、いずれもほぼ設定濃度に保たれていた。

[Table 1 (p.8), 付属資料-2]

5.3 半数致死濃度(LC50)

アニリンの設定濃度に基づく96時間の半数致死濃度(LC50)は27.2 mg/Lであり、その95%信頼限界は22.9~32.0 mg/Lであった。対照区の死亡率は0%であった。

[Table 2,3 (p.9,10), Figure 1 (p.15)]

5.4 0%死亡最高濃度及び100%死亡最低濃度

アニリンに96時間暴露したヒメダカの0%死亡最高濃度は、本試験の濃度範囲では得られなかった。100%死亡最低濃度は44.4 mg/L(設定濃度)であった。

[Table 4 (p.10), Figure 1 (p.15)]

5.5 毒性症状

毒性症状として150 mg/L区、100 mg/L区及び44.4 mg/L区において異常遊泳が、29.6 mg/L区及び19.8 mg/L区においては異常遊泳及び体色明化が観察された。対照区では暴露期間中に症状は観察されなかった。

(上記濃度は、全て設定濃度を示す。)

[Table 5 (p.11)]

5.6 試験液の水温、溶存酸素濃度及びpH

96時間の暴露期間中の水温は23.8～24.7℃であった。暴露期間中の溶存酸素濃度は6.2～8.2 mg/Lであり、全ての試験区で飽和溶存酸素濃度の60%以上であった。暴露期間中のpHは7.0～7.8であった。

(24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L)

[Table 6,7,8 (p.12～14)]

5.7 試験液の状態

調製時の試験液は無色透明で、その状態は換水前まで変わらなかった。

以 上

Table 1. Concentrations of aniline in acute toxicity test using orange killifish (*Oryzias latipes*) under semi-static conditions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percent of nominal)		
	0-hour ^{a)}	48-hour ^{b)}	Mean ^{c)}
Control	n.d.	n.d.	n.d.
19.8	19.5 (98.5)	19.9 (101)	19.7 (99.6)
29.6	28.6 (96.6)	28.6 (96.8)	28.6 (96.7)
44.4	42.8 (96.3)	43.8 (98.7)	43.3 (97.5)
66.7	63.5 (95.2)	65.0 (97.5)	64.3 (96.3)
100	96.2 (96.2)	97.9 (97.9)	97.0 (97.0)
150	143 (95.4)	143 (95.7)	143 (95.5)

n.d. : < 0.200 mg/L

a) fresh solutions

b) expired solutions

c) 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. Mortality of orange killifish (*Oryzias latipes*) exposed to aniline

Nominal concentration (mg/L)	Cumulative number of dead fish (Percent mortality)			
	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour
Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
19.8	0 (0)	0 (0)	1 (10)	1 (10)
29.6	0 (0)	1 (10)	2 (20)	6 (60)
44.4	0 (0)	4 (40)	9 (90)	10 (100)
66.7	0 (0)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
100	1 (10)	10 (100)	10 (100)	10 (100)
150	7 (70)	10 (100)	10 (100)	10 (100)

Table 3. Calculated LC50 values for orange killifish (*Oryzias latipes*) exposed to aniline based on nominal concentrations

Exposure time (hour)	LC50 (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)			Statistical method
24	133	113	~	170	probit
48	43.9	37.1	~	52.0	probit
72	33.0	27.8	~	39.3	probit
96	27.2	22.9	~	32.0	probit

Table 4. Highest concentration in 0% mortality and lowest concentration in 100% mortality based on nominal concentrations

Exposure time (hour)	Highest concentration in 0% mortality (mg/L)	Lowest concentration in 100% mortality (mg/L)
24	66.7	-
48	19.8	66.7
72	-	66.7
96	-	44.4

Table 5. Toxic symptoms observed in orange killifish (*Oryzias latipes*) during exposure to aniline under semi-static test condition

Nominal concentration (mg/L)	Symptoms				
	3-hour	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour
Control	-	-	-	-	-
19.8	-	-	-	AB(5) LT(9)	AB(9) LT(8)
29.6	-	-	AB(9)	AB(8) LT(8)	AB(4) LT(4)
44.4	-	-	AB(6)	AB(1)	n
66.7	-	-	n	n	n
100	AB(2)	AB(2)	n	n	n
150	AB(9)	AB(3)	n	n	n

The values in parentheses express the number of fish showing the symptom.

AB : Abnormal behavior

LT : Light body color

- : No symptom

n : No observation was made because all orange killifish died at this observation time.

Table 6. Temperature of test solutions during 96-hour semi-static exposure of orange killifish (*Oryzias latipes*) to aniline

Nominal concentration (mg/L)		Temperature (°C)				
		0-hour	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour
Control	new	23.8		23.9		
	old		24.2	24.2	24.4	24.4
19.8	new	24.0		24.0		
	old		24.5	24.3	24.4	24.5
29.6	new	24.1		23.9		
	old		24.5	24.2	24.6	24.5
44.4	new	24.0		23.8		
	old		24.6	24.2	24.7	24.5
66.7	new	23.9		n		
	old		24.6	24.2	n	n
100	new	23.9		n		
	old		24.5	24.1	n	n
150	new	23.9		n		
	old		24.6	24.3	n	n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 24-hour and 48-hour after preparation

n : No measurement was made because all orange killifish died at this observation time.

Table 7. Dissolved oxygen concentrations of test solutions during 96-hour semi-static exposure of orange killifish (*Oryzias latipes*) to aniline

Nominal concentration (mg/L)		Dissolved oxygen concentration (mg/L)				
		0-hour	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour
Control	new	8.2		8.2		
	old		6.8	6.3	6.8	6.5
19.8	new	8.2		8.2		
	old		6.8	6.4	7.0	6.8
29.6	new	8.2		8.1		
	old		7.0	6.6	7.2	6.8
44.4	new	8.2		8.1		
	old		6.8	6.6	7.4	6.9
66.7	new	8.2		n		
	old		6.6	6.5	n	n
100	new	8.2		n		
	old		6.6	6.2	n	n
150	new	8.2		n		
	old		6.6	6.6	n	n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 24-hour and 48-hour after preparation

n : No measurement was made because all orange killifish died at this observation time.

Table 8. pH values of test solutions during 96-hour semi-static exposure of orange killifish (*Oryzias latipes*) to aniline

Nominal concentration (mg/L)		pH				
		0-hour	24-hour	48-hour	72-hour	96-hour
Control	new	7.3		7.5		
	old		7.4	7.4	7.1	7.0
19.8	new	7.4		7.6		
	old		7.4	7.1	7.3	7.1
29.6	new	7.5		7.7		
	old		7.5	7.2	7.4	7.2
44.4	new	7.6		7.7		
	old		7.5	7.3	7.4	7.3
66.7	new	7.7		n		
	old		7.5	7.3	n	n
100	new	7.7		n		
	old		7.5	7.4	n	n
150	new	7.8		n		
	old		7.5	7.6	n	n

new : freshly prepared test solutions

old : test solutions at 24-hour and 48-hour after preparation

n : No measurement was made because all orange killifish died at this observation time.

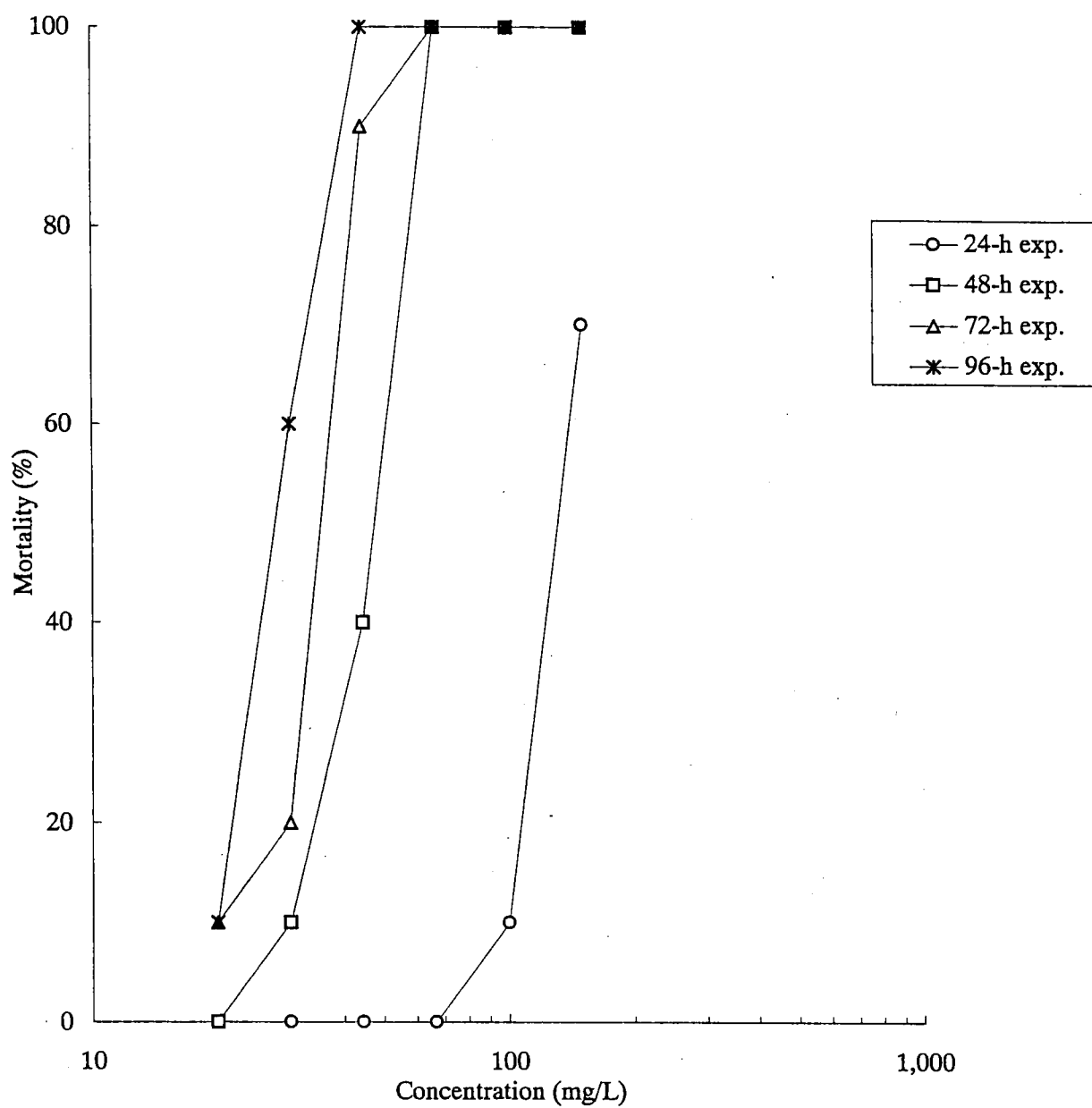


Figure 1. Concentration - toxicity curve of aniline in orange killifish (*Oryzias latipes*).

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
	1997.Feb.4	of detection
pH	7.7	
COD (mg/L)	0.2	
Coliform group bacteria (MPN/100mL)	0	
Total phosphorus (mg/L)	0.007	
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)	0.05	0.01
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)	N.D.	0.01
Arsenic (mg/L)	N.D.	0.002
Selenium (mg/L)	N.D.	0.002
Evaporation residue (mg/L)	120	
Electric conductivity (μs/cm)	171	
Total hardness (as CaCO ₃) (mg/L)	55.6	
Alkalinity (mg/L)	37.5	
Sodium (mg/L)	14.9	
Potassium (mg/L)	3.76	
Calcium (mg/L)	14.8	
Magnesium (mg/L)	4.52	

Appendix 1. (continued)

Parameter		Concentration	Lower limit of detection
		1997.Feb.4	
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

付属資料ー2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 10 頁)

試 験 名 : 魚類急性毒性試験

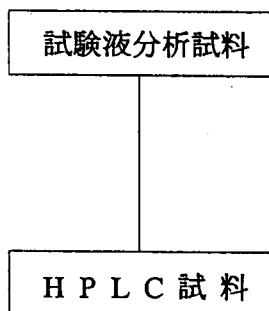
被験物質物質名 : アニリン

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

混合した溶液はそのまま若しくは希釈水で希釈して、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を正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して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の被験物質溶液を希釈水で希釈して5.00 mg/Lの標準溶液とした。

2) HPLCの分析条件

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 _{XL}
カラム	L-column ODS (化学品検査協会製) 15 cm×4.6 mm φ ステンレス製
カラム温度	40℃
溶離液	アセトニトリル/蒸留水 (30/70 V/V)
流量	1.0 mL/min
測定波長	280 nm
注入量	100 μL
感度	
検出器	1 AU/1 V
記録計	ATTEN 2 ⁵

3) 検量線の作成

(3)の標準溶液の調製と同様にして0.20、1.00及び5.00 mg/Lの標準溶液を調製した。また、1,000 mg/Lの被験物質溶液より25.0 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを分析機器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。

Content of figure

- Figure 1. Calibration curve of aniline by HPLC analysis.
- Figure 2-1. Example of chromatogram.
(standard solution of 5.00 mg/L, 0-hour)
- Figure 2-2. Example of chromatogram.
(fresh test solution of 66.7 mg/L as nominal concentration,
0-hour)
- Figure 2-3. Example of chromatogram.
(fresh test solution of control, 0-hour)
- Figure 2-4. Example of chromatogram.
(standard solution of 5.00 mg/L, 48-hour)
- Figure 2-5. Example of chromatogram.
(expired test solution of 66.7 mg/L as nominal concentration,
48-hour)
- Figure 2-6. Example of chromatogram.
(expired test solution of control, 48-hour)

Input data

Run	Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
1	0.200	20192
2	1.00	99246
3	5.00	475690
4	25.0	2270195

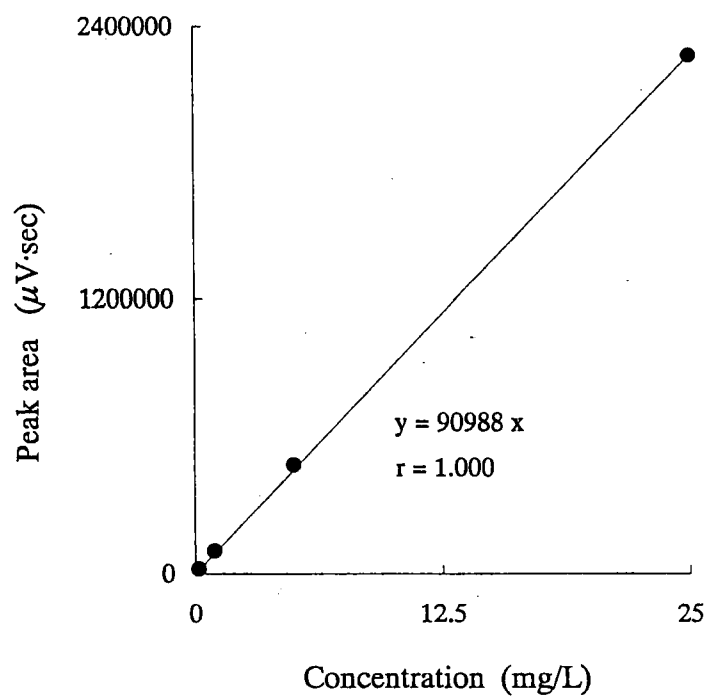


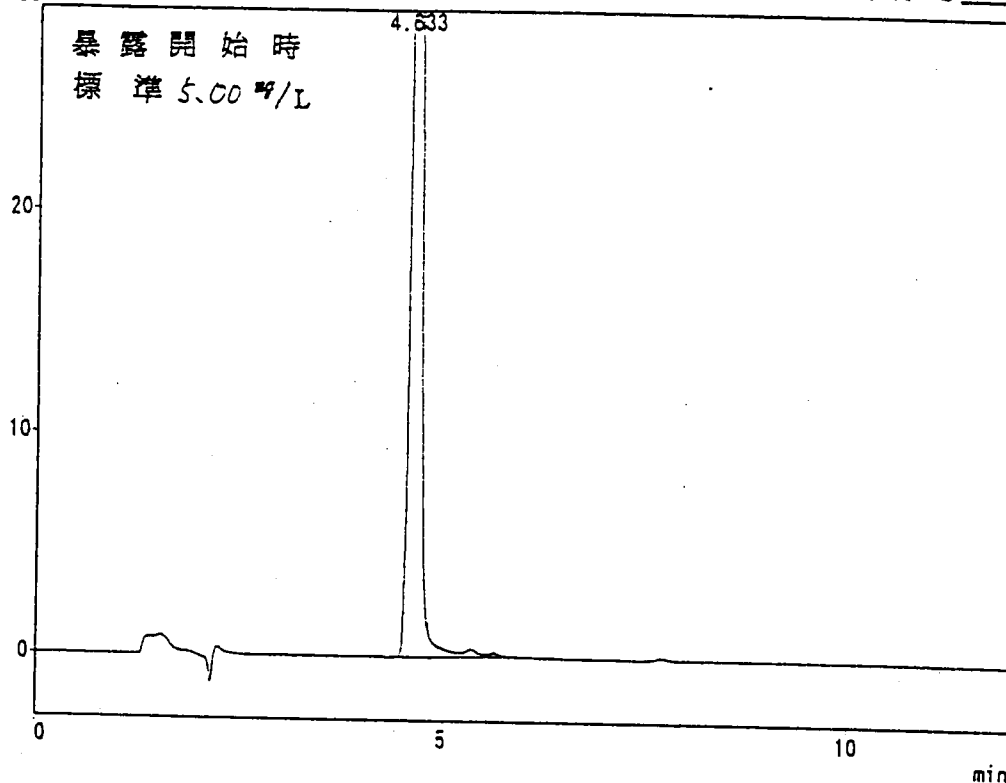
Figure 1. Calibration curve of aniline by HPLC analysis.

CLASS-LC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=95 データ=1754H0S.D11 97/02/24 19:29:44
 サンプル : ANR/std.
 ID : 5.0ppm
 サンプル量 : 100
 タイプ : 標準試料
 検出器 : SPD-10AV シンクル
 カラム名 :
 メソッド名 : ANR-1.M10

1997.2.28

*** クロマトグラム ***
 mAbs

試験番号 91754



*** ヒートマップ ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.633	494494	62803		1		7ニリン

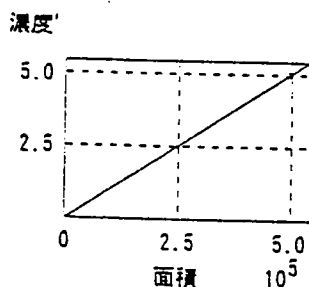
 494494 62803

*** キャリブレーション結果 ***

** ID テーブル **

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	7ニリン	4.63	5	1.011135e-005	

** 検量線 **



IDNO: 1
 NAME: 7ニリン
 TIME: 4.63

濃度	面積
(1) 5	494494

F1	F2
(1) 1.01114e-005	0

r2 = 1

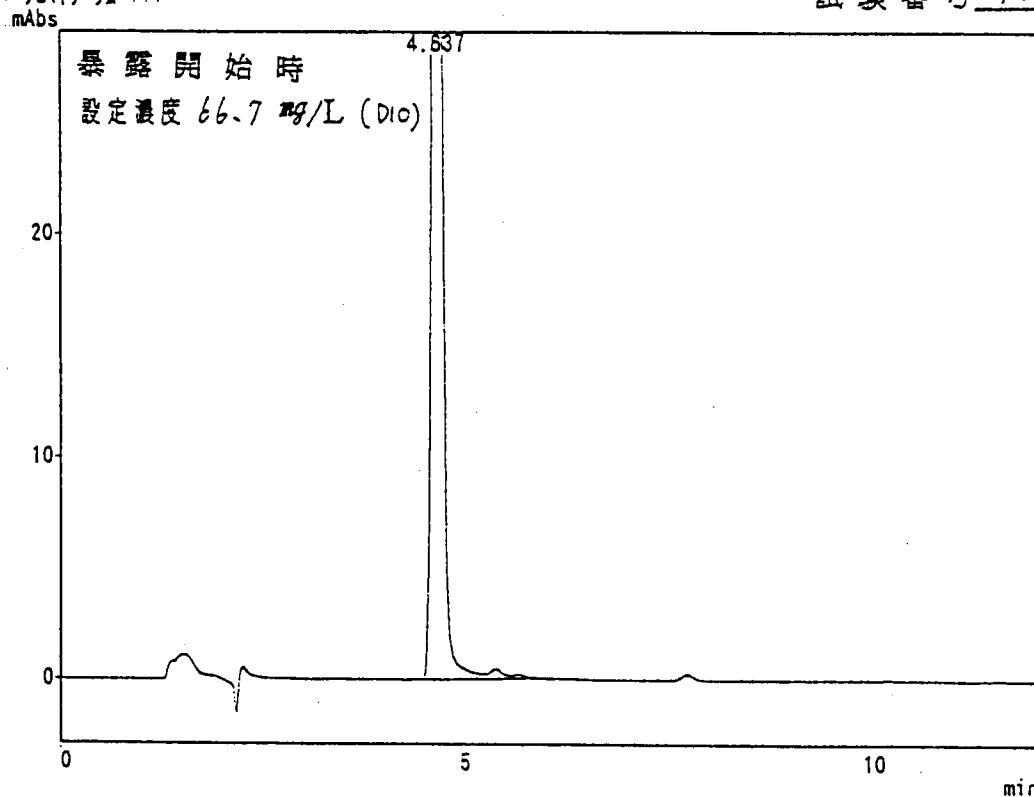
Figure 2-1. Example of chromatogram.
 (standard solution of 5.00 mg/L, 0-hour)

CLASS-LC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=99 テータ=1754H0C.D11 97/02/24 20:23:44
 サンプル : ANR/F3/0h
 ID : 66.7/10
 サンプル量 : 10
 タイプ : 未知試料
 検出器 : SPD-10AV シンクル
 モデラ名 :
 メソッド名 : ANR-1.M10

1997.2.23

*** クロマトグラム ***

試験番号 91754



*** ヒートマップ ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.637	628058	81699		1	63.5051	7ニリン
		628058	81699			63.5051	

Figure 2-2. Example of chromatogram.

(fresh test solution of 66.7 mg/L as nominal concentration, 0-hour)

CLASS-LC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=90 データ=1754H0Z.D11 97/02/24 17:28:10

サンプル : ANR/F7/0h

ID : 対照区

サンプル量 : 100

タイプ : 未知試料

検出器 : SPD-10AV シングル

オペレータ名: [REDACTED]

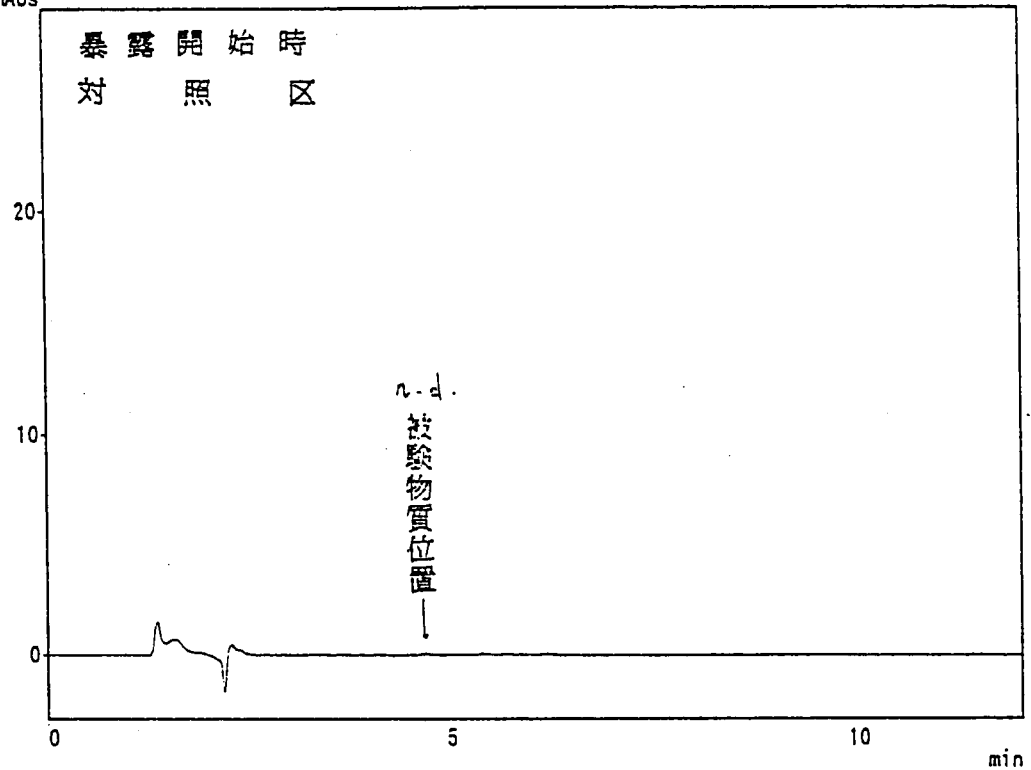
メソッド名 : ANR-1.M10

1997. 2. 28

試験番号 91754

*** クロマトグラム ***

mAbs



*** ピークレポート ***

!! ピークがありません !!

Figure 2-3. Example of chromatogram.
(fresh test solution of control, 0-hour)

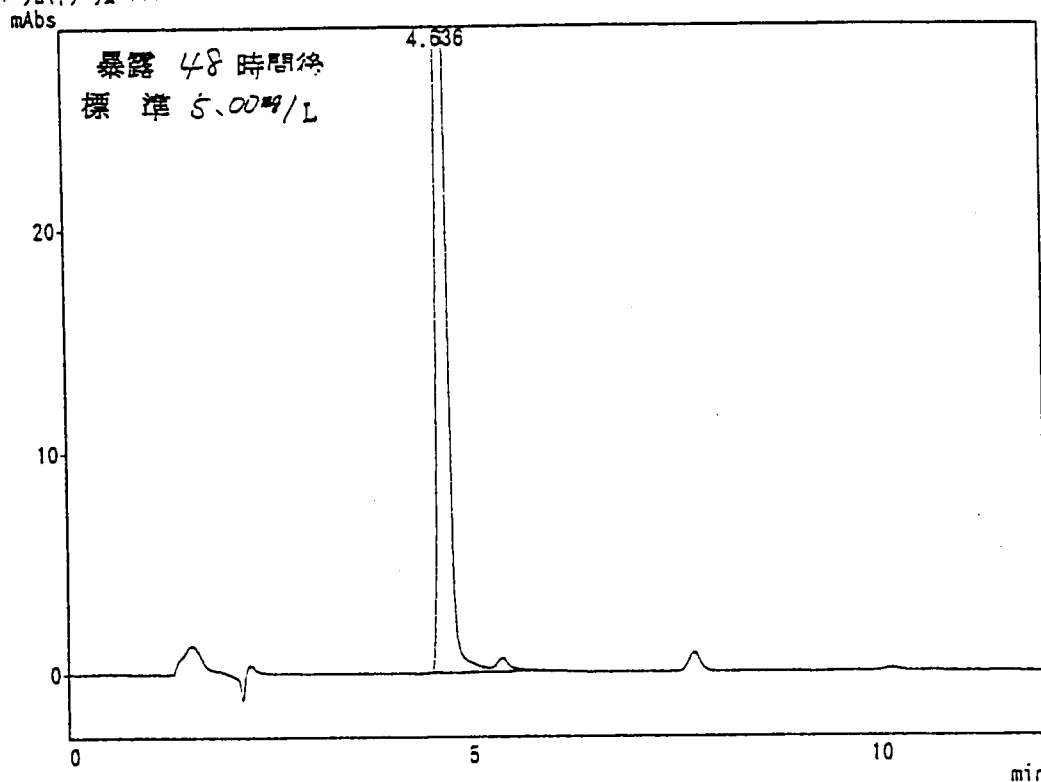
CLASS-LC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=75 データ=1754H48S.D12 97/02/26 15:12:50

サンプル : ANR/std.
ID : 5.0ppm
サンプル量 : 100
タイプ : 標準試料
検出器 : SPD-10AV シンク
オペレータ名 :
メソッド名 : ANR-1.M10

1997. 2. 23

試験番号 91754

*** クロマトグラム ***



*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.636	458248	58120		1		7ニリン

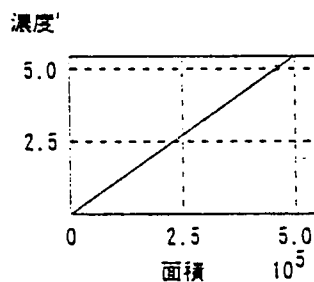
458248 58120

*** キャリブレーション結果 ***

** ID テーブル **

IDNO	成分名	時間	濃度	F1	F2
1	7ニリン	4.63	5	1.091113e-005	

** 検量線 **



IDNO: 1
NAME: 7ニリン
TIME: 4.63

(1) 濃度 面積
5 458248

F1 F2
(1) 1.09111e-005 0

r2 = 1

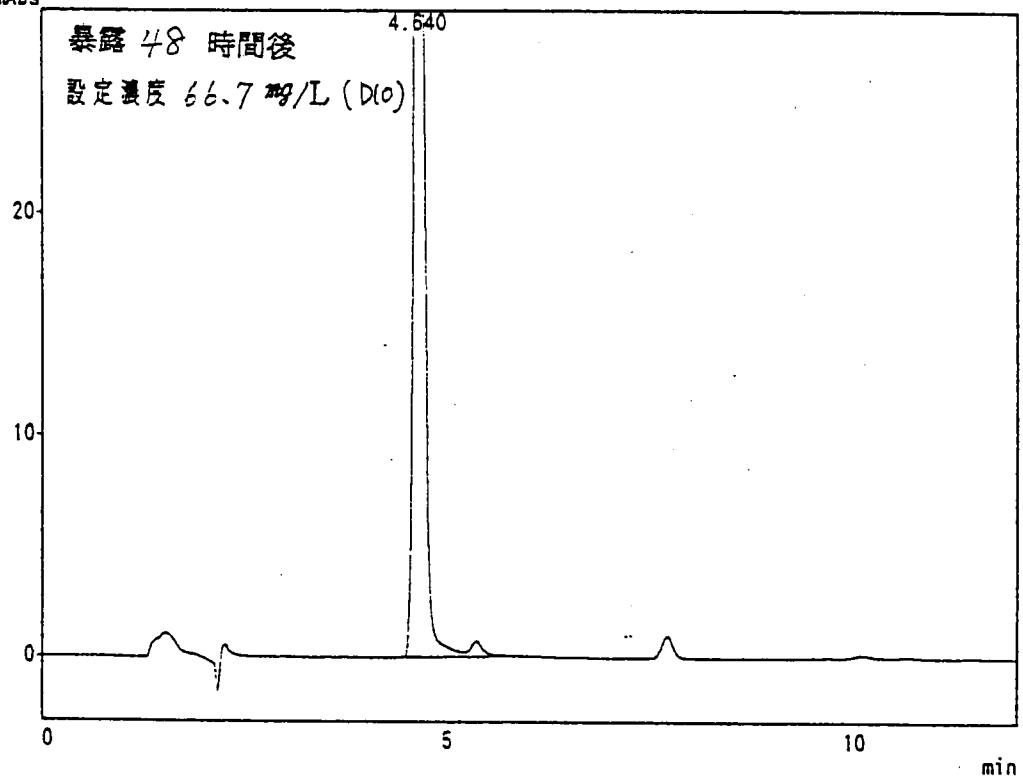
Figure 2-4. Example of chromatogram.
(standard solution of 5.00 mg/L, 48-hour)

CLASS-LC10 システム番号=1 Ch=1 レポート番号=79 データ=1754H48C.D11 97/02/26 16:06:50
 サンプル : ANR/F3/48h
 ID : 66.7/10
 サンプル量 : 10
 タイプ : 未知試料
 検出器 : SPD-10AV シングル
 オペレータ名 : XXXXXXXXXX
 メソッド名 : ANR-1.M10

1997. 2. 29

*** クロマトグラム ***
 mAbs

試験番号 91754



*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	4.640	595760	76431		1	65.0041	7ニリン
		595760	76431				
				65.0041			

Figure 2-5. Example of chromatogram.

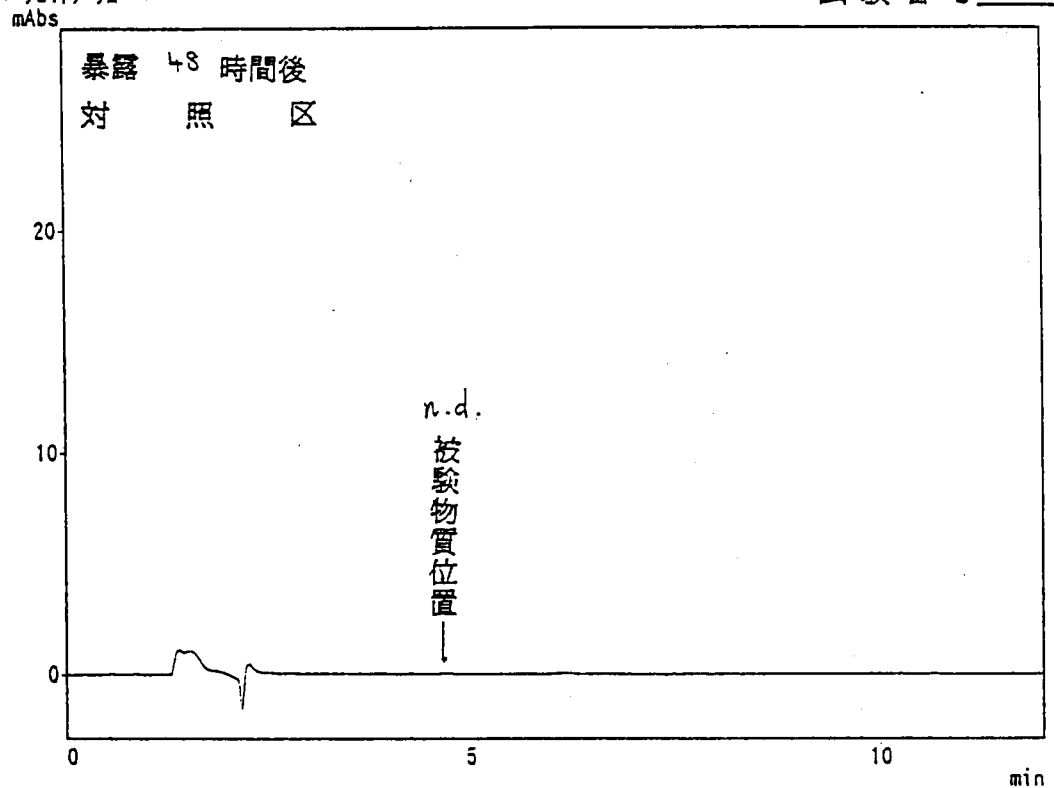
(expired test solution of 66.7 mg/L as nominal concentration, 48-hour)

サンプル : ANR/F7/48h
 ID : 対照区
 サンプル量 : 100
 タイプ : 未知試料
 検出器 : SPD-10AV シングル
 プローブ名 :
 メソッド名 : ANR-1.M10

1997.2.23

試験番号 91754

*** クロマトグラム ***



*** ピークレポート ***
 !! ピークがありません !!

Figure 2-6. Example of chromatogram.
 (expired test solution of control, 48-hour)