

受理番号	E03-3190
試験番号	93190

最 終 報 告 書

p-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

2004 年 9 月 13 日

化学物質評価研究機構
大宮実業所

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *p*-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害
試験

試験番号 93190

本最終報告書(写し)は、原本を正確にコピーしたものです。

2004 年 11 月 1 日

運営管理者

[Redacted Signature]

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *p*-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験番号 93190

上記試験は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)に従って実施したものです。

2004 年 9 月 13 日

試験責任者

[Redacted signature block]

信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 環境省

試験の表題 *p*-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験番号 93190

上記試験は財団法人化学物質評価研究機構久留米事業所の信頼性保証部門が監査又は査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日（試験責任者）	報告日（運営管理者）
試 験 計 画 書	2004 年 6 月 25 日	2004 年 6 月 25 日	2004 年 6 月 25 日
	2004 年 9 月 3 日	2004 年 9 月 3 日	2004 年 9 月 3 日
	2004 年 9 月 3 日	2004 年 9 月 3 日	2004 年 9 月 3 日
試 験 実 施 状 況	2004 年 6 月 29 日	2004 年 7 月 2 日	2004 年 7 月 2 日
	2004 年 7 月 1 日	2004 年 7 月 2 日	2004 年 7 月 2 日
生データ及び最終報告書	2004 年 9 月 13 日	2004 年 9 月 13 日	2004 年 9 月 13 日

本最終報告書は、試験の方法が正確に記載されており、内容が試験計画書及び標準操作手順書に従い、かつ、生データを正確に反映していることを保証します。

2004年9月13日

信頼性保証部門責任者

目 次

	頁
要 約.....	1
1. 表 題.....	2
2. 試験委託者.....	2
3. 試験施設.....	2
4. 試験目的.....	2
5. 試験方法.....	2
6. 適用 G L P.....	2
7. 試験日程.....	2
8. 試験関係者.....	2
9. 最終報告書の承認.....	3
10. 記録及び試資料の保管.....	3
11. 被 験 物 質.....	4
12. 試験材料と方法.....	5
13. 試験結果.....	9
14. 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.....	9
Table1～5	10～12
Figure 1.....	13
Appendix 1 (Water quality of dilution water)	
Appendix 2 (Calibration curve and chromatogram)	
Appendix 3 (Statistical method for EC50 calculation)	
別添資料	
p-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験予備試験結果	

要 約

p-(フェニルアゾ)アニリンの48時間急性遊泳阻害試験をオオミジンコ(*Daphnia magna*)を用いて実施した。

試験は、1試験区20頭を用い、5濃度区[設定濃度:2.50、1.47、0.865、0.509及び0.299 mg/L(公比1.7)]、対照群、水温20±1℃、試験液を交換しない止水式で行った。

その結果、測定した試験液中の被験物質濃度は、設定濃度の89.5～95.0%の範囲に維持されていた。試験結果は測定濃度の時間加重平均値(前述の設定濃度を測定濃度表示にした場合、2.31、1.36、0.798、0.466及び0.276 mg/L)に基づいて算出した。

その結果、*p*-(フェニルアゾ)アニリンの24時間EC50(半数遊泳阻害濃度)は0.763 mg/L、48時間EC50は0.461 mg/Lであった。

48時間における100%遊泳阻害最低濃度は1.36 mg/Lであった。また、0%遊泳阻害最高濃度及びNOEC (最大無影響濃度)は、共に0.276 mg/Lであった。

試験番号：93 190

1. 表 題
p-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験
2. 試験委託者
名 称 環境省
所 在 地 (〒100-8975)東京都千代田区霞が関 1-2-2
3. 試験施設
名 称 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所
所 在 地 (〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14
TEL (0942) 34-1500
4. 試験目的
被験物質のミジンコ類に対する短期的影響を調べた。
5. 試験方法
段階的な濃度に調製した被験物質を含む試験液にオオミジンコを48時間暴露した。この間、オオミジンコの遊泳能力等への影響を調べ、その結果から24及び48時間EC50*を求めた。
試験は「OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Section 2: Effects on Biotic Systems, 202 “*Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test”, 1984」及び「OECD Guidance Document 23 “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”」に準じて行った。
* EC50 (Median Effective Concentration): 暴露期間において試験生物の50%を遊泳阻害する被験物質濃度を示す。影響の指標は遊泳阻害による。
6. 適用 GLP
この試験は、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)に適合して行った。
7. 試験日程
 - 1) 試験開始日 2004 年 6 月 25 日
 - 2) 実験開始日 2004 年 6 月 29 日
 - 3) 実験終了日 2004 年 7 月 1 日
 - 4) 試験終了日 2004 年 9 月 13 日
8. 試験関係者
試験責任者 XXXXXXXXXX
所 属 試験第四課

生物試験担当者 XXXXXXXXXX
分析担当者 XXXXXXXXXX

9. 最終報告書の承認
試験責任者

2004年9月13日

氏名



10. 記録及び試資料の保管

1) 被験物質

供試試料約5 g*を保管用容器に入れ密栓後、最終報告書作成後10年間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。ただし、保管中に品質が著しく変化する物質の保管期間は、その品質が保管に耐えうる期間とし、廃棄に際しては試験委託者の承認を得る。

* 試験番号93189、93190、93191及び93192についての共用保管試料とする。

2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、最終報告書作成後10年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。

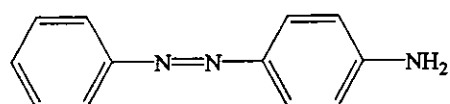
11. 被 験 物 質

被験物質に関する情報を以下に示す。供試試料に関する情報については供給者資料等によった。

1) 名 称
p-(フェニルアゾ)アニリン

2) C A S 番 号
60-09-3

3) 構 造 式 等
(1) 構 造 式



(2) 分 子 式
 $C_{12}H_{11}N_3$

(3) 分 子 量
197.24^{*2}

4) 物理化学的性質等

(1) 融 点
124.3℃^{*1}

(2) 沸 点
>360℃^{*2}

(3) 分配係数
 $\log Pow = 2.98$ (calculated)^{*2}

情 報 源

*1: 供給者提供の添付資料

*2: [REDACTED]

5) 供試試料に関する情報

(1) 純 度
99.0%

(2) ロット番号
PKH7121

(3) 供 給 者
[REDACTED]

(4) 供 給 量
25 g

(5) 入 手 日
2003年12月26日

(6) 外 観
だいたい色粉末

- 6) 被験物質の確認
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。
- 7) 保管条件及び保管条件下での安定性の確認
- (1) 保 管 条 件
試験中の被験物質は室温暗所で保管した。
- (2) 安定性の確認
実験開始前及び終了後に測定した被験物質の赤外吸収スペクトルに変化がなかったことから、実験期間中の被験物質が安定であったことを確認した。

12. 試験材料と方法

1) 試 験 生 物

(1) 種

オオミジンコ (*Daphnia magna* Clone A)

(2) 生物種選択の理由

テストガイドラインに推奨されている種類である。

(3) 供 給 源

英国Sheffield大学(所在地 Sheffield S10 2UQ, United Kingdom)より分譲された*Daphnia magna*(Clone A)の子孫で、久留米事業所で継代飼育している成体より産出された幼体を用いた。幼体を産出する成体は、試験条件と同じ水質(脱塩素水道水)、水温(20±1℃)及び明暗周期(16時間明/8時間暗)下で飼育したもの(18日齢)で成体の生存率が100%の群(ロット)を使用した。継代飼育中はミジンコ1頭当たり*Chlorella vulgaris*を0.1～0.2 mgC(有機炭素含量)/日の割合で1日に1回給餌した。また、試験系の再現性を確認するために実施した基準物質(二クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)の急性遊泳阻害試験の48時間EC50は0.141 mg/Lであった。この値は久留米事業所における基準物質の48時間EC50の規定範囲内(平均±2×標準偏差：0.113～0.352mg/L)であった[平均±標準偏差は0.233±0.060mg/L(n=44)]。

(4) 幼体の選別

成体群が産出した生後24時間以内の幼体を用いた。

(5) 群 分 け

無作為に抽出を行った。

2) 試験用水

十分にエアレーションし、温度調節した脱塩素水道水を用いた。使用時には、残留塩素濃度が0.02 mg/L以下であることを確認した。定期的に測定した試験用水の水質測定結果をAppendix 1に示す。

3) 試験器具及び装置

(1) 試験器具

試験容器： 100 mLガラスビーカー

また、ゴミの進入や試験液の蒸散を防ぐため蓋をした。

(2) 試験装置

恒温槽： 加熱冷却装置によって試験容器内の水温を $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ に維持可能なもの

4) 試験条件

(1) 暴露条件

①方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露した。

試験は試験液の交換をしない止水式で行った。

②期間

48時間

③試験濃度

試験は5濃度区[設定濃度：2.50、1.47、0.865、0.509及び0.299 mg/L(公比1.7)]で行った。試験濃度及び公比は予備試験の結果から決定した。試験濃度は純度(99.0%)補正を行った値で表示した。予備試験結果は別添資料に示す。

④対照群

被験物質を含まない試験用水のみの対照区を設けた。

⑤試験生物数

20頭／試験区(5頭×4試験容器)

⑥試験液量

400 mL／試験区(100 mL×4試験容器)

(2) 環境条件

①水温

$20\pm 1^{\circ}\text{C}$

②照明

室内灯による16時間明/8時間暗の明暗周期

③給餌

暴露期間中、給餌を行わなかった。

5) 試験液の調製法

試験原液の調製は純度(99.0%)補正して行った。

必要量の被験物質を秤量し、試験用水と混合後、超音波を照射して被験物質を粉砕後約1時間攪拌して溶解し、10.0 mg/Lの試験原液を調製した。調製容器に入れた試験用水に必要量の試験原液を添加後、攪拌して試験液を調製した。調製は試験区毎に行い、これを各試験容器に分割した。

6) 観察と測定

(1) 試験生物の状態

暴露開始24及び48時間後に遊泳阻害及び症状を観察した。試験液を穏やかに動かした後、15秒間泳げない場合を遊泳阻害されたとみなした。

(2) 試験液の状態

試験液の状態を暴露開始時及び暴露終了時に観察した。

(3) 水 質

試験液の溶存酸素濃度、pH、水温及び全硬度を暴露開始時及び暴露終了時に測定した。暴露開始時は調製容器より分取した試験液について測定し、暴露終了時には各試験区に付き4試験容器のうち1試験容器について測定した。溶存酸素濃度は溶存酸素計58型(Yellow Springs Instrument Co., Inc.)、pHはガラス電極式水素イオン濃度計HM-14P型(東亜ディーケーケー)、水温は検定済ガラス製棒状温度計、全硬度はEDTA滴定法で測定した。

(4) 試験液中の被験物質濃度

①採水と分析回数

被験物質濃度の測定は暴露開始時及び暴露終了時に行った。暴露開始時は調製容器より分取した試験液について測定し、暴露終了時には各試験区につき4試験容器より均等量を試験液の中層から採取したものを混合して用いた。

②試験液の前処理操作

採取した試験液は、そのまま若しくは脱塩素水道水で適宜希釈し、分析試料とした。

③分析方法

前処理操作を行って得られる分析試料は、以下の定量条件に基づき高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により被験物質の定量を行った。最終試料溶液中の被験物質濃度はクロマトグラム上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。得られたクロマトグラムの一部をAppendix 2に示す。

分析機器の定量条件

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
フ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 15 cm×4.6 mmφ 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 65/35(v/v)
流 量	1.0 mL/min
測 定 波 長	382 nm
注 入 量	200 μ L
感 度	
検 出 器	0.5 AU/1 V

④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行った。また、標準溶液の調製は純度(99.0%)補正を行った。

被験物質20.2 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、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50.0 mg/Lの被験物質溶液を調製した。続いてこれを脱塩素水道水で希釈して2.50 mg/Lの被験物質溶液を調製した。さらにこれを脱塩素水道水で希釈して0.250 mg/Lの標準溶液を調製した。

⑤検量線の作成

④の標準溶液の調製と同様にして0.0250、0.125、0.250及び0.500 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを③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被験物質濃度により検量線を作成した。本試験に用いた検量線をAppendix 2に示す。なお、試験液中の被験物質の検出下限は検量線の濃度及びピーク面積値を用いて回帰分析を行い、得られた数値を基にして算出された濃度(0.0129 mg/L)とした。

7) 結果の処理

結果の算出には測定濃度の時間加重平均値を用いた。

(1) EC50の算出法

24時間については0.276～2.31 mg/L区を用い、Moving average法により算出した。48時間については0.276～2.31 mg/L区を用い、Probit法により算出した。また、それらの95%信頼限界も算出した。24及び48時間EC50算出時の入力データ及び出力結果をAppendix 3に示す。

(2) NOEC(最大無影響濃度)の評価

暴露期間中、対照群と比較して何ら影響が認められない最高濃度区をNOEC(No Observed Effect Concentration)とした。

8) 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 規則Bによった。

13. 試験結果

設定濃度と測定濃度の時間加重平均値の対比表を以下に示す。

設定濃度 (mg/L)	測定濃度の 時間加重平均値(mg/L)
0.299	0.276
0.509	0.466
0.865	0.798
1.47	1.36
2.50	2.31

以降の本文中の濃度区表示は測定濃度の時間加重平均値で示す。

1) EC50

p-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコに対する24時間EC50は0.763 mg/L、48時間EC50は0.461 mg/Lであった。各時間でのEC50をTable 1に示す。

2) 遊泳阻害率

48時間における100%遊泳阻害最低濃度は1.36 mg/L、0%遊泳阻害最高濃度は0.276 mg/Lであった。24及び48時間での遊泳阻害率をTable 2、48時間における濃度－遊泳阻害率曲線をFigure 1に示す。また、暴露期間中の対照群における遊泳阻害率は0%であり、試験成立条件(10%を超えない)を満たしていた。

3) 症状等の観察結果

以下の観察結果は全て対照群との比較に基づくものである。暴露期間中のNOECは0.276 mg/Lであった。暴露期間中に観察された症状は嗜眠状態、遊泳阻害及び活動度の低下であった。対照群では症状は認められなかった。暴露期間中における症状の観察結果をTable 3に示す。

4) 試験液の観察と測定結果

(1) 試験液の状態

暴露開始時は全濃度区において黄色澄明であり、その度合いは濃度依存的であった。暴露終了時も同様であった。

(2) 試験液の水質

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は8.4～8.8 mg/L、pHは7.4～7.6、水温は20.1～20.2℃、全硬度は39.0～43.0 mg CaCO₃/Lであった。試験液の水質をTable 4に示す。なお、溶存酸素濃度は試験成立条件(試験水温での飽和濃度の60%以上*)を満たしていた。

* 19～21℃の飽和溶存酸素濃度：9.01～8.68 mg/L(JIS K 0102)

(3) 試験液中の被験物質濃度

試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時では設定値に対して93.4～95.0%、暴露終了時では89.5～90.6%であった。被験物質濃度の測定結果をTable 5に示す。また、得られたクロマトグラムの一部をAppendix 2に示す。

14. 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

当該要因はなかった。

Table 1 EC50 to *Daphnia magna*

Exposure duration	EC50 (mg/L)
24 hours	0.763 (0.593~0.972)
48 hours	0.461 (0.404~0.528)

In parentheses are 95% confidence intervals.

Table 2 Immobility

Measured concentration * (mg/L)		Immobility(%)			
		24 hours		48 hours	
Control	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
0.276	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
0.466	A	40	45	60	60
	B	20		40	
	C	80		100	
	D	40		40	
0.798	A	40	70	80	95
	B	80		100	
	C	80		100	
	D	80		100	
1.36	A	60	65	100	100
	B	80		100	
	C	80		100	
	D	40		100	
2.31	A	60	75	100	100
	B	60		100	
	C	100		100	
	D	80		100	

* The time-weighted mean

Table 3 Observed abnormal response

Measured concentration* (mg/L)	Observed abnormal response	
	24 hours	48 hours
Control	—	—
0.276	—	—
0.466	IM LETH	IM LETH
0.798	IM LETH	IM LETH
1.36	IM LETH	IM LETH
2.31	IM LETH RA	IM LETH

* The time-weighted mean

— : Normal (No abnormal response)

Abbreviation of symptoms

IM : Immobilization

LETH : Lethargic

RA : Reduced activity

Table 4 Measurement of test solutions

Measured concentration* (mg/L)	DO		pH		Temperature (°C)		Total hardness (mg CaCO ₃ /L)	
	at the start	at the end	at the start	at the end	at the start	at the end	at the start	at the end
Control	8.6	8.8	7.6	7.4	20.2	20.1	40.0	39.0
0.276	8.6	8.7	7.6	7.4	20.2	20.1	41.0	43.0
0.466	8.6	8.7	7.6	7.4	20.1	20.1	39.0	39.2
0.798	8.6	8.6	7.6	7.4	20.1	20.1	40.6	39.0
1.36	8.6	8.4	7.6	7.4	20.1	20.1	40.0	39.6
2.31	8.6	8.4	7.6	7.4	20.1	20.1	39.2	39.6

* The time-weighted mean

DO : Dissolved oxygen concentration (mg/L)

Table 5 Measured concentration of test substance in test solutions

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L)		
	at the start	at the end	Mean *
Control	n.d.	n.d.	—
0.299	0.284 (95.0)	0.268 (89.5)	0.276 (92.2)
0.509	0.475 (93.4)	0.457 (89.7)	0.466 (91.5)
0.865	0.814 (94.1)	0.781 (90.3)	0.798 (92.2)
1.47	1.39 (94.4)	1.33 (90.3)	1.36 (92.3)
2.50	2.36 (94.3)	2.26 (90.6)	2.31 (92.4)

Values in parentheses show percentage of nominal concentration.

n.d. : Not detected(<0.0129 mg/L)

* The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$[48(C_0 - C_{48}) / (\ln C_0 - \ln C_{48})] / 48$$

where

C_0 : the measured concentration at the start.

C_{48} : the measured concentration at the end.

$\ln C_0$: the natural logarithm of C_0 .

$\ln C_{48}$: the natural logarithm of C_{48} .

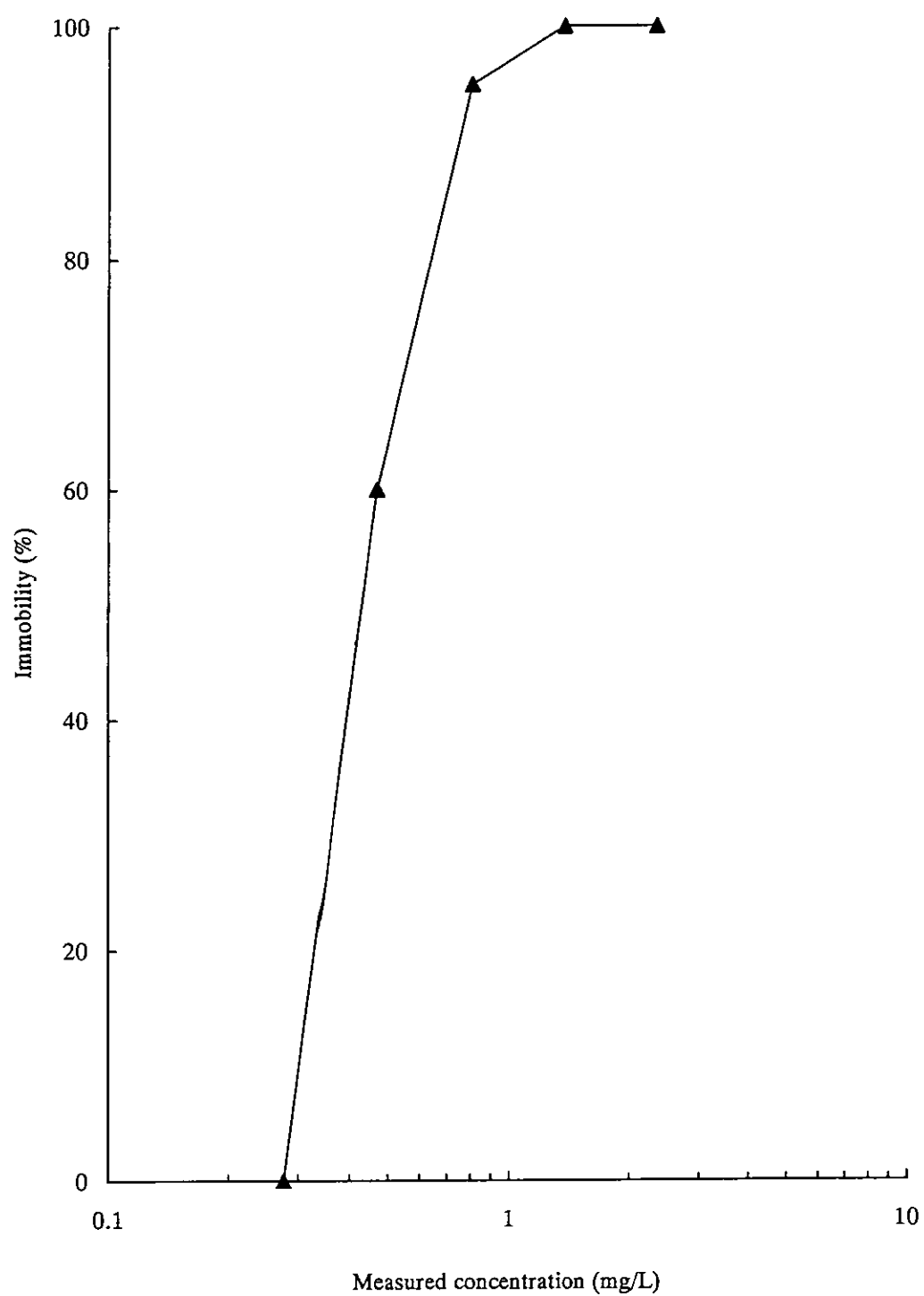


Figure 1 Concentration-Immobility curve at 48hours

Appendix 1

Water quality of dilution water

(one page)

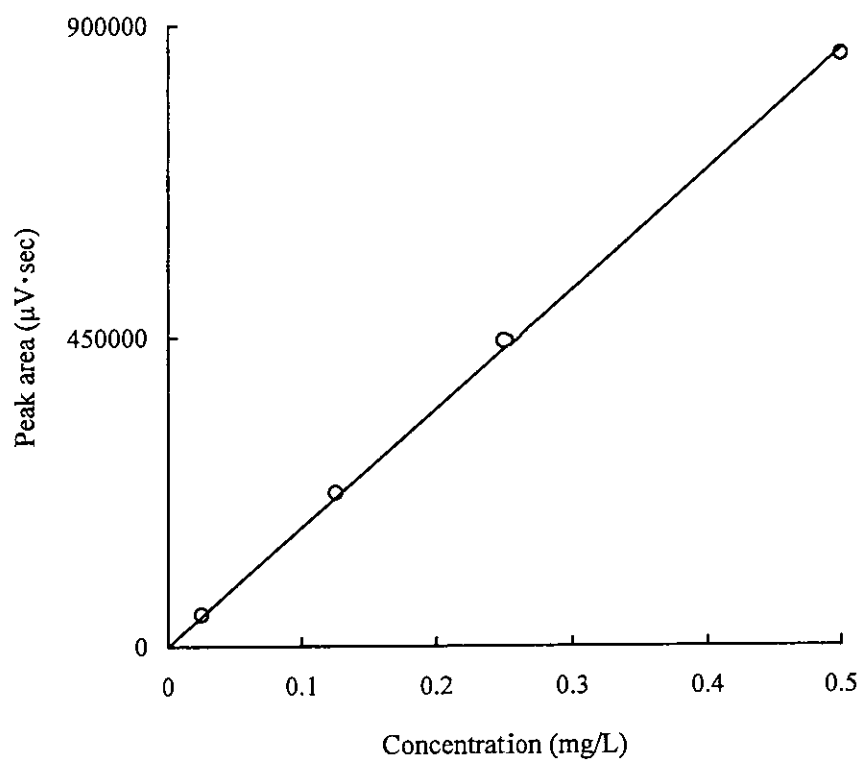
Water quality of dilution water (Sampling on February 3, 2004)

Parameter	Unit	Results	Lower limit of detection
Ca, Mg etc. (Hardness)	mg/L	41.4	0.1
Suspended substance	mg/L	< 1	1
pH	—	7.2	—
Organic carbon	mg/L	0.5	0.1
Chemical oxygen demand	mg/L	< 0.5	0.5
Free chlorine	mg/L	not detected	0.01
Ammonium nitrogen	mg/L	not detected	0.01
Cyanide	mg/L	not detected	0.01
Alkalinity	mg/L	37	1
Electric conductivity	mS/m	16.5	—
Organic phosphorous	mg/L	not detected	0.1
Alkyl mercury	mg/L	not detected	0.0005
Mercury	mg/L	not detected	0.0005
Cadmium	mg/L	not detected	0.001
Hexavalent chromium	mg/L	not detected	0.02
Lead	mg/L	not detected	0.005
Arsenicum	mg/L	not detected	0.001
Boron	mg/L	not detected	0.02
Fluorine	mg/L	not detected	0.1
Iron	mg/L	0.02	0.01
Copper	mg/L	not detected	0.005
Cobalt	mg/L	not detected	0.001
Manganese	mg/L	not detected	0.01
Zinc	mg/L	not detected	0.01
Aluminum	mg/L	0.052	0.001
Nickel	mg/L	not detected	0.001
Silver	mg/L	not detected	0.0001
Sulfate ion	mg/L	21.7	0.1
Chloride ion	mg/L	17	1
Sodium	mg/L	13	0.01
Potassium	mg/L	3.40	0.01
Calcium	mg/L	11.1	0.01
Magnesium	mg/L	3.33	0.01
1,2-dichloropropane	mg/L	not detected	0.0001
Chlorothalonil	mg/L	not detected	0.0001
Propyzamide	mg/L	not detected	0.0001
Chloronitrofen	mg/L	not detected	0.0001
Simazine	mg/L	not detected	0.001
Thiobencarb	mg/L	not detected	0.0001
Diazinon	mg/L	not detected	0.0001
Isoxathion	mg/L	not detected	0.0001
Fenitrothion	mg/L	not detected	0.0001
EPN	mg/L	not detected	0.0001
Dichlorvos	mg/L	not detected	0.0001
Iprobenfos	mg/L	not detected	0.0001
PCB	mg/L	not detected	0.0005

Appendix 2

Calibration curve and chromatogram

(three pages)

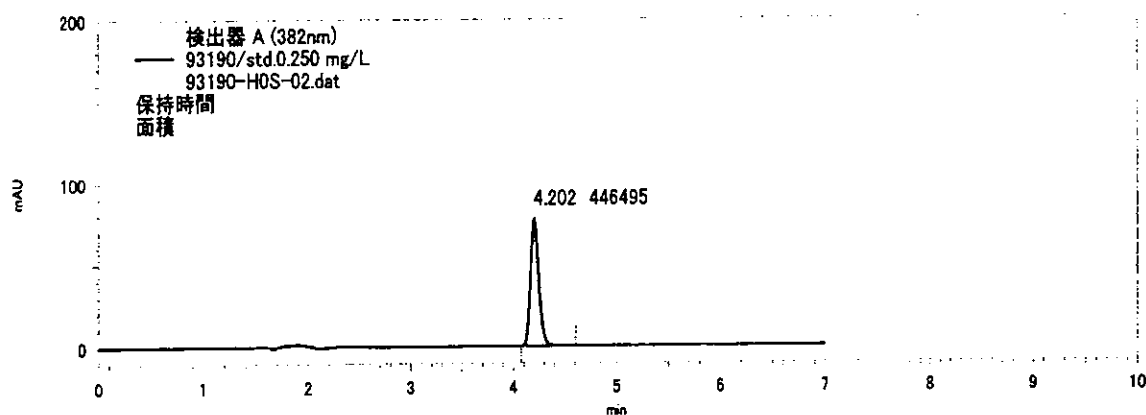


$$y = 1728153x$$

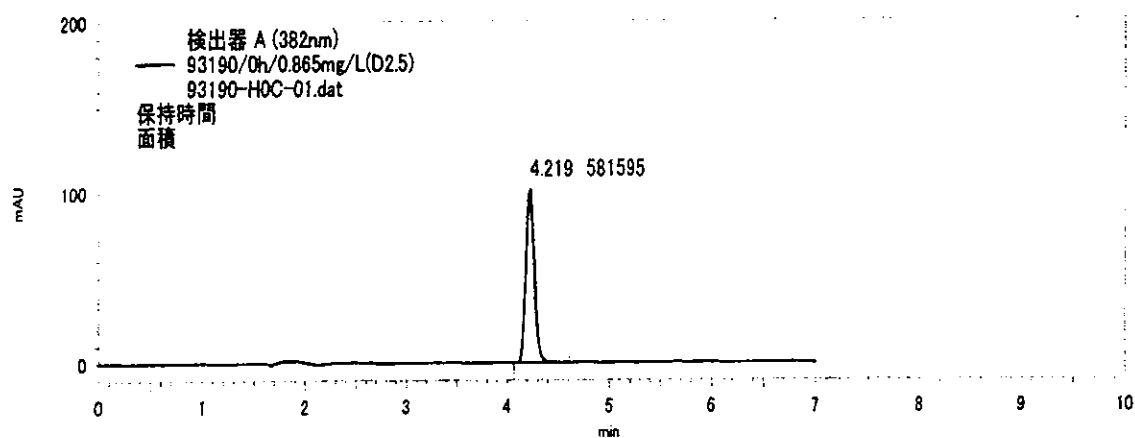
$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
0.0250	46419
0.125	223695
0.250	444054
0.500	855989

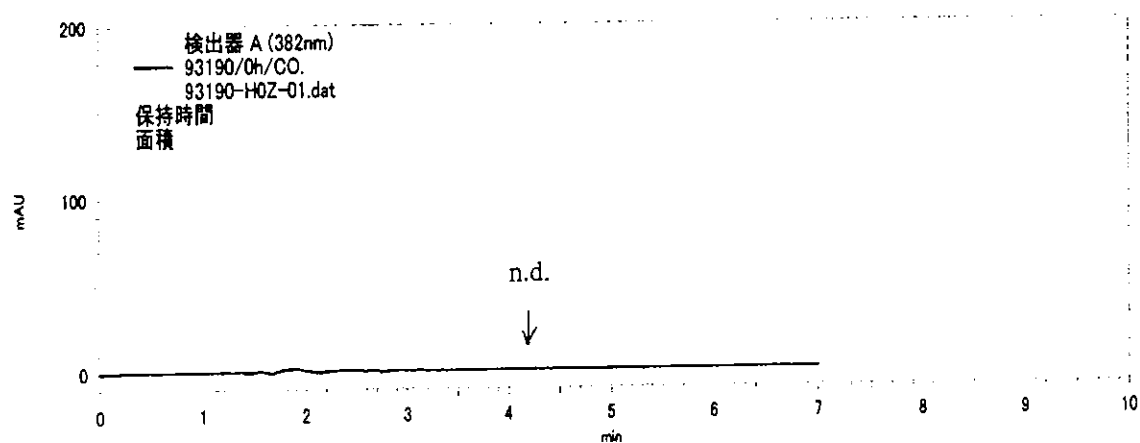
Appendix 2-1 Calibration curve of *p*-phenylazoaniline by HPLC analysis.



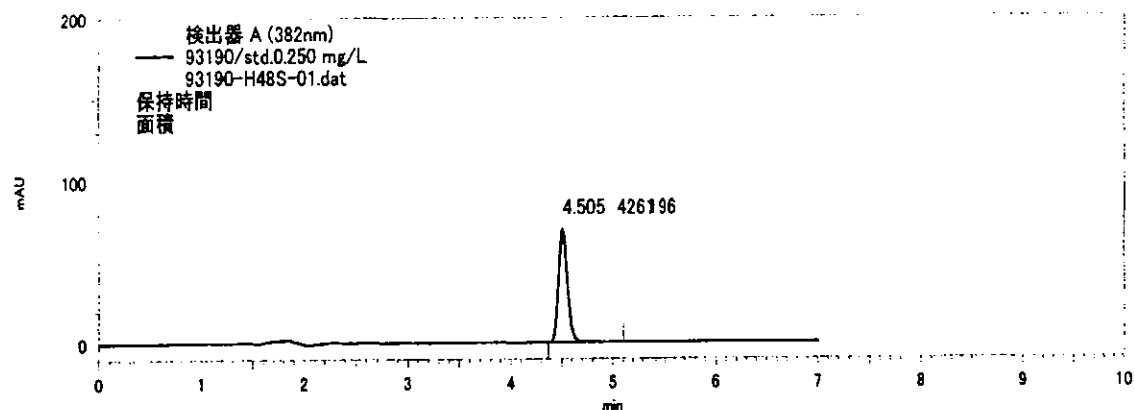
Appendix 2-2 HPLC chromatogram of 0.250 mg/L standard solution at the start of the exposure.



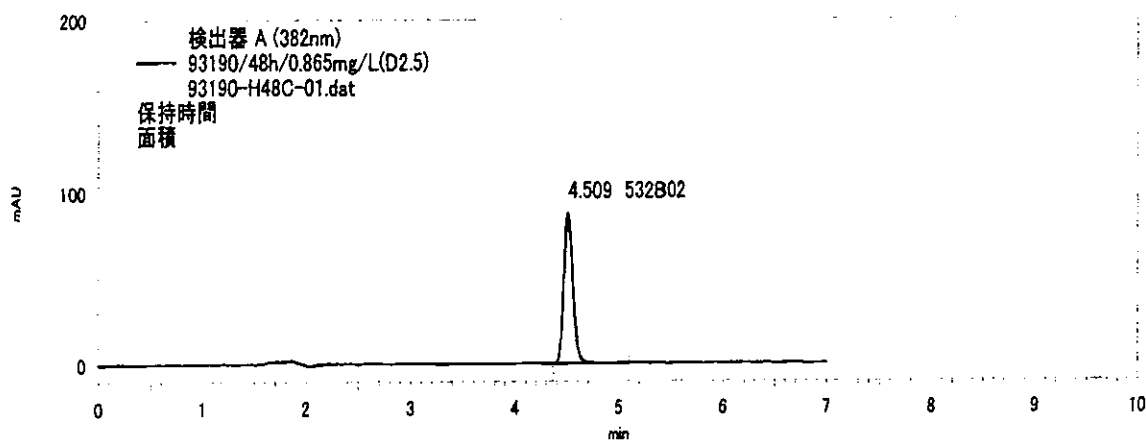
Appendix 2-3 HPLC chromatogram of 0.865 mg/L (nominal concentration) at the start of the exposure.



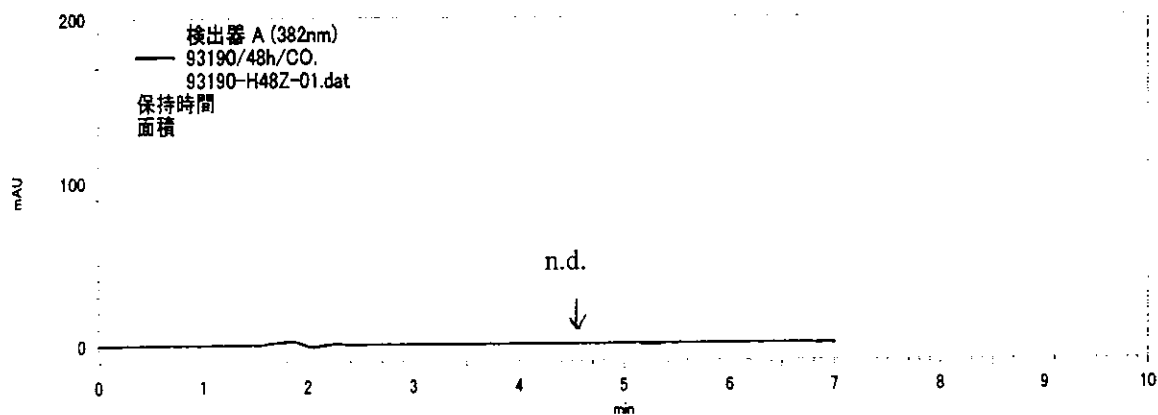
Appendix 2-4 HPLC chromatogram of control at the start of the exposure.



Appendix 2-5 HPLC chromatogram of 0.250 mg/L standard solution at the end of the exposure.



Appendix 2-6 HPLC chromatogram of 0.865 mg/L (nominal concentration) at the end of the exposure.



Appendix 2-7 HPLC chromatogram of control at the end of the exposure.

Appendix 3

Statistical method for EC50 calculation

(two pages)

24h-EC50

(Ver.97/9)

(濃度)		(阻害数)	(阻害率)	(観測probit)	(期待probit)	(重み)	(修正率)	[probit ⁻¹ (Y)]										(期待probit差)
Conc	Log(Conc)	R.Num	p%	Y	Y	nw	Z	p	y	nwx	nwy	nwx2	nwy2	nwxxy	Y1	Y1-Y		
0.276	-0.55909	0	0%	↓	4.148185	9.733879	0.277556	0.1971584	3.437848	-5.44212	33.46359	3.042642	115.0427	-18.7092	4.05278	0.095406		
0.466	-0.33161	9	45%	4.874338528	4.590157	11.97527	0.366805	0.3409604	4.887425	-3.97117	58.52826	1.316896	286.0525	-19.4088	4.528293	0.061864		
0.798	-0.098	14	70%	5.524401003	5.044058	12.72342	0.398555	0.5175709	5.501784	-1.24686	70.00149	0.122188	385.1331	-6.85994	5.016641	0.027417		
1.36	0.133539	13	65%	5.385321073	5.493916	11.64572	0.353131	0.6893171	5.382577	1.555157	62.684	0.207674	337.4015	8.370753	5.500639	0.006723		
2.31	0.363612	15	75%	5.674490366	5.940931	9.163505	0.256247	0.82663	5.641884	3.33196	51.69943	1.211541	291.6822	18.79853	5.981579	0.040648		
				↑														
				↑														
				↑														
				↑														
				↑														
				↑														
				↑														
						55.2418				-5.77303	276.3768	5.900941	1415.312	-17.8086	25.07993	0.232057		

傾き	切片
0.977222	5.348137
2.09038	5.221492

Xavg=	-0.1045
yAvg=	5.003037

Sxx=	5.297631
Syy=	32.58865
Sxy=	11.07406

傾き	切片
2.09038	5.221492

X2Cal	9.439664	0.02398198
X2(5%)	7.814725	
T(5%)		2.57057764

EC50 (mg/L)	95%信頼限界		算出方法
	X-95	X+95	
-	-	-	Probit
0.763	0.593	0.972	Moving average
0.518	0.276	2.31	Binomial

(濃度)		(阻害数)	(阻害率)	(観測probit)	(期待probit)	(重み)	(修正率)	[probit ⁻¹ (Y)]								(期待probit差)
Conc	Log(Conc)	R.Num	p%	Y'	Y	nw	Z	p	y	nwx	nwy	nwx2	nwy2	nwxy	Y1	Y1-Y
0.276	-0.55909	0	0%	↓	3.178158	3.483244	0.075888	0.0342394	2.726976	-1.94745	9.498725	1.088802	25.9028	-5.31065	3.119883	0.058275
0.466	-0.33161	12	60%	5.25334657	5.051317	12.72022	0.398417	0.5204635	5.250948	-4.2182	66.79319	1.398816	350.7276	-22.1496	5.038369	0.012948
0.798	-0.098	19	95%	6.644853	6.975036	2.733911	0.056737	0.9758681	6.51911	-0.26792	17.82267	0.026255	116.1879	-1.74657	7.008639	0.033603
1.36	0.133539	20	100%	↑	8.88162	0.017546	0.000213	0.9999481	9.124853	0.002343	0.160108	0.000313	1.460966	0.021381	8.96136	0.079739
				↑												
				↑												
				↑												
				↑												
				↑												
				↑												
				↑												
						18.95492				-6.43123	94.2747	2.514185	494.2793	-29.1854	24.12825	0.184565

傾き	切片
5.956358	7.228559
8.433764	7.835124

Xavg=	-0.33929
yAvg=	4.973627

$S_{xx} =$	0.332131
$S_{yy} =$	25.3921
$S_{xy} =$	2.801113

傾き	切片
8.433764	7.835124

X2Cal	1.768174	0.41309124
X2(5%)	5.991476	**
T(5%)		2.57057764

EC50 (mg/L)	95%信頼限界		算出方法
	X-95	X+95	
0.461	0.404	0.528	Probit
More N			Moving average
0.437	0.276	0.798	Binomial

別添資料

p-(フェニルアゾ)アニリンのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

予備試験結果

(全1頁)

予備試験結果

＜生物への影響＞

予備試験

試験区 (mg/L)	遊泳阻害率(%)及び症状			
	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率	症状	遊泳阻害率	症状
0.313	0	なし	0	活動度の低下
0.625	0	なし	60	嗜眠状態、活動度の低下
1.25	60	嗜眠状態、活動度の低下	100	嗜眠状態
2.50	90	嗜眠状態、活動度の低下	100	嗜眠状態
5.00	90	嗜眠状態、活動度の低下	100	嗜眠状態

供試生物数：10 頭

＜試験液中の被験物質濃度＞

設 定 濃 度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対設定濃度 %)		
	暴露開始時 (0時間)	24時間後	暴露終了時 (48時間)
0.313	0.284 (90.7)	0.278 (88.9)	0.281 (89.9)
5.00	4.55 (91.0)	4.40 (88.1)	4.71 (94.2)