

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

環境省殿

最 終 報 告 書

イソプレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号：A 0 0 0 4 6 4 - 4 G)

2 0 0 1 年 1 0 月 3 1 日 作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

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

修正番号：01

最終報告書修正書

試験委託者：環境省

表題：イソプレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号：A000464-4G

修正内容

修正箇所：5頁 10. 保管

修正前：5) 被験物質

修正後：5) 被験物質は保管しない（沸点がきわめて低く、正常な保管が困難なため）

理由

記載ミス

試験実施施設：株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

2001年12月26日 作成 試験責任者

2001年12月26日 確認 信頼性保証業務担当者

2001年12月26日 承認 運営管理者

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： イソプレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号： A000464-4G

本試験は環境省のGLP規則に従って実施したものである。

2001年10月31日

運営管理者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

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： 環境省

表題： イソプレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験


試験番号： A 0 0 0 4 6 4 - 4 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 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		2 0 0 0 年 1 1 月 2 2 日	2 0 0 0 年 1 1 月 2 2 日
試験の査察	試験液の調製	2 0 0 1 年 9 月 2 6 日	2 0 0 1 年 9 月 2 6 日
	魚の投入	2 0 0 1 年 9 月 2 6 日	2 0 0 1 年 9 月 2 6 日
	魚の観察	2 0 0 1 年 9 月 2 8 日	2 0 0 1 年 9 月 2 8 日
最終報告書監査		2 0 0 1 年 1 0 月 3 1 日	2 0 0 1 年 1 0 月 3 1 日

2 0 0 1 年 1 0 月 3 1 日

信頼性保証業務担当者： 





試験実施概要

1. 表題： イソプレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験
2. 試験目的： 被験物質のヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験を行い、96時間の半数致死濃度 (LC50) 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. 203 「魚類毒性試験」 (1992年) に準拠した。
4. 適用GLP： 本試験は環境省のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境省
住所： 〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目2-2
委託担当者： 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：
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

「10. 保管」について

次頁の「10. 保管」には、

5) 被験物質

と記載されているが、これは記載ミスのため、

5) 被験物質は保管しない（沸点がきわめて低く、正常な保管が困難なため）

と読み替えるものとする。

試験実施施設： 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所

2001年12月26日 作成 試験責任者

[Redacted]

[Redacted]

8. 試験関係者：

試験責任者

[REDACTED]

[REDACTED]

(2001年10月31日)

試験担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(2001年10月31日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(2001年10月31日)

[REDACTED]

[REDACTED]

(2001年10月31日)

分析担当者

[REDACTED]

[REDACTED]

(2001年10月31日)

9. 試験期間： 試験開始日 2000年11月22日
試験終了日 2001年10月31日
暴露期間 2001年 9月26日～2001年 9月30日

10. 保管：

試験に関する下記の記録及び試資料は、最終報告書作成後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
- 2) 最終報告書
- 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~~ 訂正
- 6) その他必要なもの

目 次

	頁
要 旨	7
1 被験物質	8
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状	8
1.2 供試試料	8
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性	9
2 供試生物	9
3 試験方法	10
3.1 試験条件	10
3.2 希釈水	10
3.3 試験容器および恒温槽等	10
3.4 試験濃度の設定	11
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 半数致死濃度算出に用いる被験物質濃度の決定	14
4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出	14
4.3 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	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 半数致死濃度 (LC50)	15
5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度	15
5.5 毒性症状	15
5.6 試験液の水温, 溶存酸素濃度およびpH	16
Table 1~8	17~23
Figure 1	24
付属資料-1 希釈水の水質	25~26
付属資料-2 試験液の分析	27~36

要 旨

試験委託者

環境省

表 題

イソプレンのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試験番号

A 0 0 0 4 6 4 - 4 G

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 203「魚類毒性試験」(1992年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質： イソプレン
- 2) 暴露方式： 半止水式 (24時間毎に試験液の全量を交換)，水面をテフロンシートで被覆
- 3) 供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴露期間： 96時間
- 5) 試験濃度 (設定値)： 対照区, 20.0, 36.0, 64.0, 112, 200 mg/L

公比：約1.8

(被験物質は水溶解度は高いが、沸点が非常に低く、水中に保持されにくいため、暴露開始時の濃度を上げる目的で、設定濃度の上限を上げた)

- 6) 試験液量： 5.0 L/容器
- 7) 連数： 1 容器/試験区
- 8) 供試生物数： 10尾/試験区
- 9) 試験温度： 24±1 ℃
- 10) 照明： 室内光, 16時間明/8時間暗
- 11) 分析法： ガスクロマトグラフィー (GC)

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が±20%を超える値があったため、結果の算出には測定値の幾何平均値を用いた。
- 2) 96 時間の半数致死濃度 (LC50)：14.8 mg/L (95%信頼区間：7.25 mg/L～20.1 mg/L)

1 被験物質

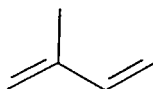
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

名称: イソプレン (略称 ISP)

別名: 2-メチル-1,3-ブタジエン

CAS No: 78-79-5

構造式:



分子式: C_5H_8

分子量^{*1}: 68.11

沸点^{*2}: 34.1℃

融点^{*2}: -145.9℃

水溶解度^{*1}: 300 mg/L (20℃)

比重^{*2}: 0.681 (20℃)

オクタノール/水分配係数 (log P) ^{*2}: 2.30

安定性^{*2}: 酸化剤または酸と接触すると激しく反応する。

その他^{*2}: 揮発性, 特異臭

*1: Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals, 3rd ed. ed. by
Verschuieren, K., Von Nostrand Reinhold Company, New York (1996)

*2: 供給者提供資料

1.2 供試試料

純度^{*1}: 99.3% (GC法)

安定剤として 4-tert-ブチルヒドロキノンを約50ppm含有

ロット番号^{*1}: 207D2183

供給者: XXXXXXXXXX

受領量^{*1} (受領日): 25 mL (2000年11月14日)

25 mL (2001年 5月31日)

外観^{*1}: 無色液体

*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

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冷蔵庫に保管した。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安定であったと判断された。

2 供試生物

- 1) 和名： ヒメダカ
- 2) 学名： *Oryzias latipes*
- 3) 入手先： 三京水産株式会社（東京都新宿区市谷田町一丁目1番地）
- 4) 入手日： 2001年 8月27日
- 5) ロット番号： 01-H-0827
- 6) 被鱗体長： 1.71 cm (1.51~1.88 cm), n=10
- 7) 体重： 0.083 g (0.046~0.111 g), n=10
- 8) 感受性： 基準物質（硫酸銅（Ⅱ）五水和物、試薬特級）による96時間半数致死濃度 (LC50) = 0.94 mg/L（この値は当研究所における1995年以降のLC50値 0.44~1.5 mg/L, n=20の範囲内にある。）
- 9) じゅん化期間： 2001年 8月27日~2001年 9月26日
暴露開始前7日間の死亡率は5%以下で、試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した（暴露開始前14日間のじゅん化条件は以下に示す）。
- 10) じゅん化条件：
 - 飼育水： 希釈水（3.2 参照）
 - 飼育方式： 流水式（飼育密度：1.0 g/L/日以下）
 - 水温： 24±1 ℃
 - 溶存酸素濃度： 飽和濃度の80%以上
 - pH： 6.5~8.5
 - 照明： 室内光，16時間明（1000 lux 以下）／8時間暗
 - 餌の種類： テトラベルケ社テトラミン
 - 給餌量： 魚体重の約2%/日（暴露開始の24時間前からは無給餌）

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 暴露方式： 半止水式（24 時間毎に試験液の全量を換水），水面をテフロンシートで被覆
- 2) 暴露期間： 96 時間
- 3) 試験液量： 5.0 L／容器
- 4) 連数： 1 容器／試験区
- 5) 供試生物数： 10 尾／試験区
- 6) 試験温度： 24 ± 1 °C
- 7) 溶存酸素濃度：飽和濃度の 60% 以上
- 8) pH： 試験液の pH 調整は行わず
- 9) 照明： 室内光，16 時間明（1000 lux 以下）／8 時間暗
- 10) 給餌： 無給餌

3.2 希釈水

脱塩素水（横浜市水道水を活性炭処理し，残留塩素等を除去したもので，充分通気したもの）を使用した。希釈水水質測定結果を付属資料－1 に示した。使用時には，オルトトリジン法により残留塩素が無いことを確認した。魚飼育水として適正な水質であると判断した。

3.3 試験容器および恒温槽等

- 1) 試験容器： 5.0 L 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 クールネット CL-80F）
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型 No.4
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型 No.2
- 5) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型 No.1

3.4 試験濃度の設定

以下の表に示す予備試験（各1連，5尾／試験区）結果に基づき，10.0～100 mg/Lで5濃度（公比：約1.8）を設定し，本試験を一度実施したが，最高濃度区で死亡率が30％となり，半数致死濃度（LC50）が算出できなかった。この被験物質は水溶解度は高いが，沸点が非常に低く，水中に保持されにくいため，暴露開始時の濃度が予備試験の際より低くなったと判断された。そこで，確実に濃度を上げるために，設定濃度の上限を上げて本試験（2回目）濃度を次のように決定した。

本試験濃度： 対照区，

20.0, 36.0, 64.0, 112, 200 mg/L（公比：約1.8）

予備試験結果（1回目）

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率 (%)	毒性症状
1.00	0	無
10.0	0	無
止水式		

予備試験結果（2回目）

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率 (%)	毒性症状
1.00	0	無
10.0	0	無
100	100	有
半止水式（48時間後に換水）		

本試験結果（1回目）

濃度 (mg/L)	96時間の死亡率 (%)	毒性症状
10.0	0	無
18.0	0	無
32.0	10	無
56.0	0	有
100	30	有

半止水式（24時間毎に換水）

暴露開始時の被験物質濃度： 3.14～35.9 mg/L（設定値に対する割合： 27～36％）

3.5 試験液の調製

試験液調製時の希釈水は、調製前に恒温槽内で 24 ± 1 °C にした。

被験物質 3260 μ L (2220 mg) を希釈水で 5550 mL に定容し、被験物質原液とした（被験物質濃度：400 mg/L）。試験液は被験物質原液の下記に示した量を採取し希釈水で 5.0 L に定容とした。

調製時の試験液の状態（外観）は全試験区において無色透明であった。

試験液濃度 mg/L	被験物質原液添加量 mL
0（対照）	0
20.0	250
36.0	450
64.0	800
112.0	1400
200	2500

3.6 試験液の分析

暴露開始時および24時間後に、各試験容器より試験液 5 mLをバイアルに採取、または試験液0.5 mLを予め精製水 4.5 mLの入ったバイアルに採取（10倍希釈）し、そこへ2-メトキシエタノール50 μ Lを添加して混合後、GC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

暴露開始時に供試魚と同水槽でじゅん化した魚10尾の重量および被鱗体長を測定した。

試験液の水溫、溶存酸素濃度、pHを測定後、試験液中に供試魚を1試験区当り10尾投入した。水溫、溶存酸素濃度、pHは暴露開始時および24時間毎の換水前後に測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始後、24、48、72および96時間後に死亡個体数を記録するとともに観察された毒性の徴候あるいは異常を記録した。一般的に記載する症例と定義を下記に示した*。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。

*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。

4 結果の算出

4.1 半数致死濃度算出に用いる被験物質濃度の決定

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により，半数致死濃度の算出に用いる被験物質濃度を，以下の表に従い決定した。

測定値の 設定値に対する割合	全ての値が±20%以内	±20%を超える値が ひとつでもある
算出に使用する濃度 (全試験区)	設定値	測定値の幾何平均値

4.2 半数致死濃度（LC50）の算出

各試験区における，ヒメダカの死亡数と供試個体数（10 尾）から死亡率（%）を求め，以下の方法で半数致死濃度（LC50）を決定した。

最高濃度区における死亡率	≥ 50%	< 50%
LC50算出の可否	可	不可
LC50の決定方法	Binomial 法，Moving average 法， Probit 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。	> 最高濃度区 とする。
濃度－死亡率曲線の記載	記載する。	記載する。

4.3 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

死亡率が0%である最高濃度および死亡率が100%である最低濃度を可能な限り記録した。

また，0%死亡最高濃度とは，死亡個体が観察されない試験最高濃度，100%死亡最低濃度とは全ての個体が死亡した試験最低濃度とした。

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24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。

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が、±20%を超える値があったため、以下の結果（半数致死濃度、0%死亡最高濃度、100%死亡最低濃度、毒性症状の現れる濃度）には測定値の幾何平均値を用いた。

5.3 半数致死濃度（LC50）

各時間における死亡率をTable 2に、濃度－死亡率曲線を Figure 1に示した。

96時間暴露の対照区の死亡率は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致死濃度（LC50）を Table 3 および以下に示した。

96時間 LC50： 14.8 mg/L（95%信頼区間：7.25 mg/L～20.1 mg/L）

5.4 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度を Table 4および暴露96時間における各濃度を以下に示した。

0%死亡最高濃度： 7.25 mg/L（設定値：36.0 mg/L）

100%死亡最低濃度： 20.1 mg/L（設定値：112 mg/L）

5.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table 5に示した。

12.9 mg/L（設定値 64.0 mg/L）以上の濃度区において異常遊泳（動作の緩慢）が観察された。対照区では暴露期間中に異常な症状は観察されなかった。

5.6 試験液の水温，溶存酸素濃度およびpH

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

水温はすべての試験区で 24 ± 1 ℃で，溶存酸素濃度はすべての試験区で飽和溶存酸素濃度（24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25 mg/L）の60%以上であり，いずれも試験基準を満たした。pHはヒメダカの飼育環境として適正範囲（6.0～8.5）内であった。

以 上

Table 1. Measured Concentration of the Test Substance in Test Water
(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration, mg/L (Percent of Nominal)		Mean ^a Measured Concentration mg/L
	0 Hour (new)	24 Hours (old)	
Control	<0.001	<0.001	----
20.0	4.74 (24)	3.44 (17)	4.04 (20)
36.0	7.93 (22)	6.62 (18)	7.25 (20)
64.0	13.7 (21)	12.2 (19)	12.9 (20)
112	21.4 (19)	18.9 (17)	20.1 (18)
200	48.1 (24)	42.4 (21)	45.2 (23)

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Table 2. Mortality of the Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to the Test Substance

Nominal Concentration mg/L	Mean ^a Measured Concentration mg/L	Cumulative Mortality (Percent Mortality)							
		24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours	
Control	----	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
20.0	4.04	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
36.0	7.25	0	(0)	0	(0)	0	(0)	0	(0)
64.0	12.9	0	(0)	1	(10)	2	(20)	2	(20)
112	20.1	0	(0)	2	(20)	10	(100)	10	(100)
200	45.2	5	(50)	10	(100)	10	(100)	10	(100)

a: geometric mean

Table 3. Calculated LC50 Values

Exposure Period (Hours)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
24	45. 2	-- ~ --	Binomial
48	23. 6	18. 8 ~ 33. 1	Probit
72	14. 8	7. 25 ~ 20. 1	Binomial
96	14. 8	7. 25 ~ 20. 1	Binomial

--: Could not be determined

Table 4. Observation of the Highest Concentration in 0% Mortality and the Lowest Concentration in 100% Mortality

Exposure Period (Hours)	Highest Concentration in 0% Mortality (mg/L)	Lowest Concentration in 100% Mortality (mg/L)
24	20. 1	>45. 2
48	7. 25	45. 2
72	7. 25	20. 1
96	7. 25	20. 1

Table 5. Observed Toxicological Symptoms

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration mg/L	Mean ^a Measured Concentration mg/L	Symptoms (Symtom-number of fish)			
		24 Hours	48 Hours	72 Hours	96 Hours
Control	----	N	N	N	N
20.0	4.04	N	N	N	N
36.0	7.25	N	N	N	N
64.0	12.9	N	AS-9	AS-8	AS-8
112	20.1	AS-10	AS-8	--	--
200	45.2	AS-5	--	--	--

a: geometric mean

N : No toxicological symptom was observed

--: All fish were dead at this observation time

AS: abnormal swimming (reduced activity)

Table 6. Temperature

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration mg/L	Temperature, °C							
	0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
	new	old	new	old	new	old	new	old
Control	23.4	23.5	23.5	23.4	23.5	23.8	23.7	23.7
20.0	23.4	23.5	23.5	23.4	23.5	23.8	23.8	23.8
36.0	23.4	23.5	23.5	23.4	23.4	23.8	23.7	23.7
64.0	23.4	23.5	23.5	23.4	23.4	23.8	23.7	23.7
112	23.4	23.5	23.7	23.4	23.4	--	--	--
200	23.1	23.5	23.7	--	--	--	--	--

minimum: 23.1

maximum: 23.8

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

--: No measurement was made because all Medaka were dead at this observation time.

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration mg/L	Dissolved Oxygen Concentration, mg/L							
	0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
	new	old	new	old	new	old	new	old
Control	8.5	6.8	8.4	7.2	8.4	7.4	8.4	7.1
20.0	8.5	6.8	8.3	6.9	8.3	7.1	8.4	6.9
36.0	8.4	6.3	8.4	6.1	8.3	6.4	8.4	6.8
64.0	8.4	6.5	8.2	5.9	8.3	6.7	8.4	7.0
112	8.3	6.2	8.4	5.9	8.2	--	--	--
200	8.1	6.6	8.2	--	--	--	--	--

minimum: 5.9

maximum: 8.5

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

--: No measurement was made because all Medaka were dead at this observation time.

Table 8. pH Values

(Semi-Static Condition)

Nominal Concentration mg/L	pH							
	0 Hour	24 Hours		48 Hours		72 Hours		96 Hours
	new	old	new	old	new	old	new	old
Control	7.3	7.1	7.3	7.1	7.3	7.1	7.4	7.1
20.0	7.3	7.1	7.3	7.1	7.2	7.2	7.4	7.1
36.0	7.4	7.1	7.3	7.0	7.3	7.1	7.4	7.2
64.0	7.4	7.0	7.4	7.0	7.3	7.1	7.4	7.2
112	7.4	7.0	7.4	7.0	7.4	--	--	--
200	7.4	7.1	7.4	--	--	--	--	--

minimum: 7.0

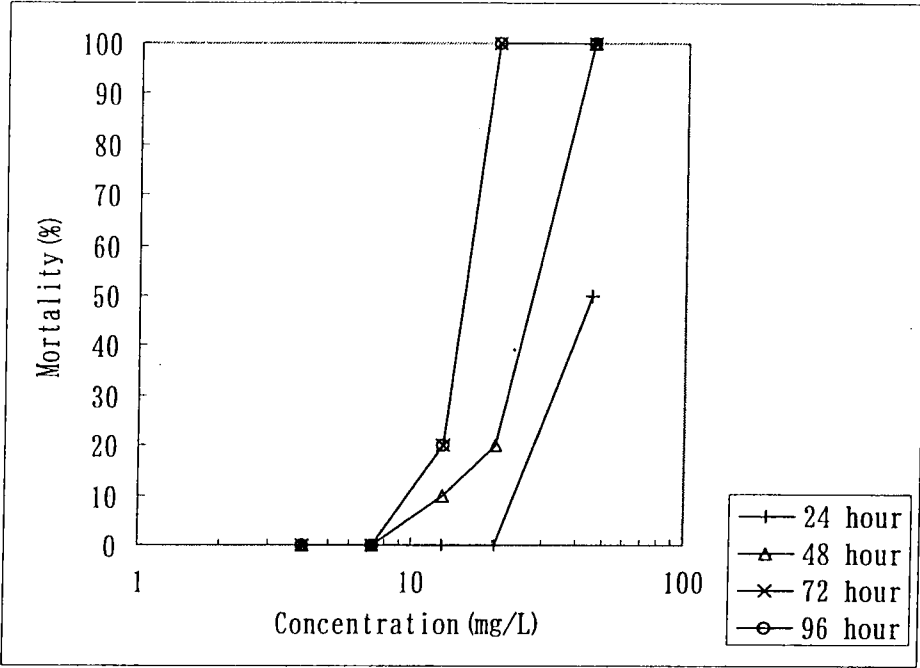
maximum: 7.4

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

--: No measurement was made because all Medaka were dead at this observation time.

Figure 1 Concentration-Mortality Curve



付属資料－ 1

希釈水の水質

Table A-1 Water Quality of Dilution Water

COD	1 mg/L
Total phosphorus	<0.01 mg/L
pH	7.6 (25°C)
Coliform group bacteria	N. D.
Mercury	<0.0001 mg/L
Copper	0.002 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	<0.01 mg/L
Lead	<0.01 mg/L
Aluminum	0.06 mg/L
Nickel	<0.01 mg/L
Chromium	<0.005 mg/L
Manganese	<0.1 mg/L
Tin	<0.1 mg/L
Iron	<0.1 mg/L
Cyanide	N. D.
Free chlorine	<0.01 mg/L
Bromide	0.09 mg/L
Fluoride	<0.08 mg/L
Sulfide	<0.03 mg/L
Total ammonium	<0.05 mg/L
Arsenic	<0.005 mg/L
Selenium	<0.005 mg/L
Evaporation residue	110 mg/L
Electric conductivity	150 μ S/cm
Total hardness (as CaCO ₃)	63 mg/L
Alkalinity	42 mg/L
Sodium	10 mg/L
Potassium	1.4 mg/L
Calcium	19 mg/L
Magnesium	4 mg/L

Date of measurement: August 21, 2001

付属資料－ 2

試験液の分析

1 試験液の分析方法

- 1) 暴露開始時および 24 時間後に試験液のサンプリングを行った。対照区は各試験容器より試験液 5 mL を測定用バイアルに採取し、そこへ 2-メトキシエタノール 50 μ L を添加した。濃度区は試験液 0.5 mL を、精製水 4.5 mL を予め入れておいた測定用バイアルに採取（10 倍希釈）し、そこへ 2-メトキシエタノール 50 μ L を添加した。それらのサンプルを GC により分析した。
- 2) 2-メトキシエタノールで調製した標準溶液 50 μ L を、精製水 5 mL を予め入れておいた測定用バイアルに添加し混合後、GC により分析した。
- 3) 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 ガスクロマトグラフィー (GC) 測定条件

(装置)

ガスクロマトグラフ質量分析計 (ヘッドスペースサンプラ付き), No. 1

ガスクロマトグラフ: Agilent (Hewlett Packard) 6890

ワークステーション: Agilent/ミステーション (Windows NT)

注入口: スプリット/スプリットレス

ヘッドスペースサンプラ (HSS): Agilent 7694

質量選択検出器 (MSD): Agilent 5973N MSD (Mass Selective Detector)

(条件)

GC条件

カラム: DB-5MS, 60 m×0.25 mm (i.d.), df=1.0 μm

キャリアーガス: ヘリウム (constant flow)

流速: 1.0 mL/min

カラムオープン温度: 40 °C (5 min) → 20 °C/min → 140 °C (3 min)

注入口温度: 200 °C (Front), MSインターフェース温度: 200 °C

注入方法: Split, Split ratio=1:250

試料注入量: 3.0 mL (HSSサンプルループ容量)

HSS条件

温度条件: Oven=60 °C, Loop=120 °C, Transfer Line=200 °C

イベント時間: Vial Equilibration Time=20 min

Pressurization Time=0.2 min

Loop Fill Time=0.03 min

Loop Equilibration Time=0.2 min

Inject Time=0.2 min

バイアルパラメータ: Shake=2

MSD条件

温度条件： イオン源温度=150 ℃，四重極マス・フィルタ温度=230 ℃

SIM (Selected Ion Monitoring) 条件：

Solvent Delay=6 min

Quant ion = 68 m/z

Qualifier ion = non

3 検量線

被験物質の1000 mg/L 2-メトキシエタノール溶液を調製し，2-メトキシエタノールで順次希釈し，0, 1.00～1000 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を50 μL採取し5 mLの精製水に添加したものを分析サンプルとしGC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，1.000と良好であった。

4 検出限界

最小検出ピーク面積を 1000 countに設定し，これに相当する試験液中の被験物質濃度 0.001 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」に示したように，試験液と精製水と2-メトキシエタノールを混合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-2-1 Calibration Curve

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (count)
1	0	0
2	1.00	30919
3	2.00	56573
4	5.00	149135
5	10.0	294510
6	20.0	619337
7	50.0	1612919
8	100	3351277
9	200	6510411
10	500	17209551
11	1000	32736022

Each 2-methoxyethanol standard solution was added to 100-fold volume of water before injection.

$$Y = 33,057X$$

$$r = 1.000$$

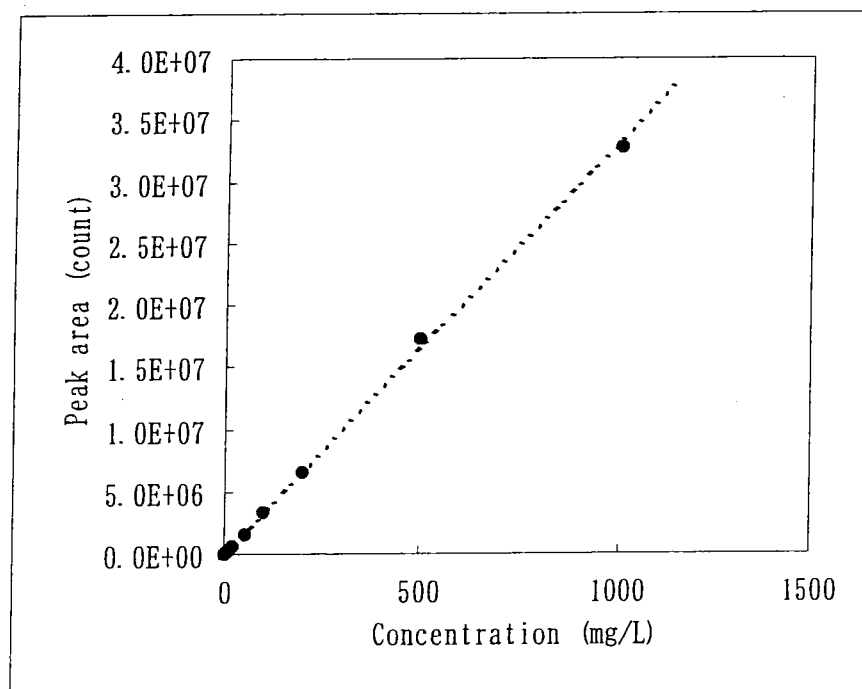
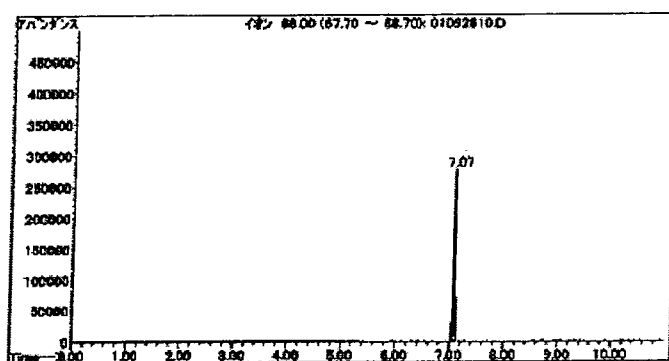


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 500 mg/L ; 0 Hour

(Standard solution was added to 100-fold volume of water before injection.)

Study No. : A000464-4G
 Date : 2001.09.26
 Operator :
 Sample Information: STD-500ppm (
 Sample Name : STD-500ppm } STD 500ppm 試液 61.9.26
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01092610.D
 Acquired : 26 Sep 2001 15:44 using AcqMethod ISP-2

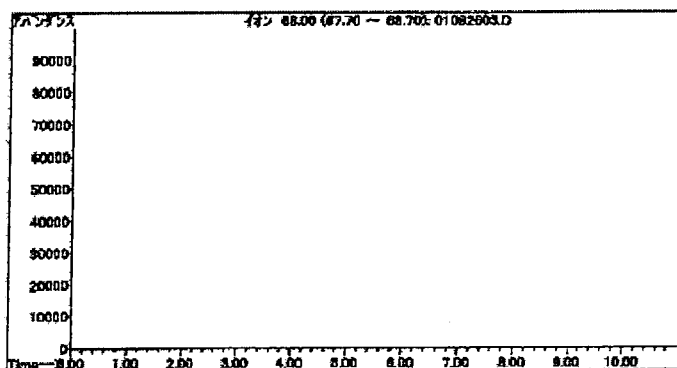


イシ 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01092610.D
 STD 500ppm

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.073	M	0.033	5587292	7.011	7.160

(2) Control ; 0 Hour

Study No. : A000464-4G
 Date : 2001.09.26
 Operator :
 Sample Information: control
 Sample Name : control
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01092603.D
 Acquired : 26 Sep 2001 13:13 using AcqMethod ISP-2



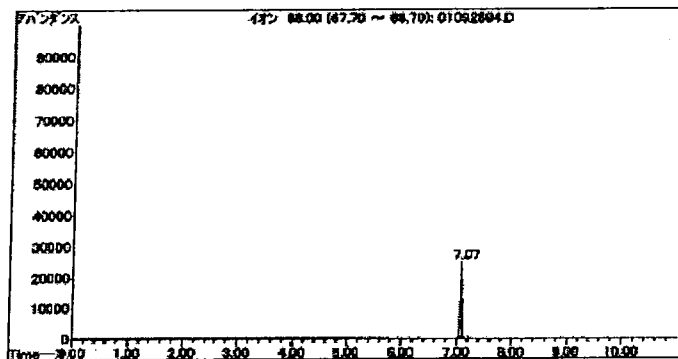
イシ 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01092603.D
 control

グラフが積分されていません

Figure A-2-2 Continued

(3) 20.0 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A000464-4G
 Date : 2001.09.26
 Operator :
 Sample Information: C1
 Sample Name : C1
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01092604.D
 Acquired : 26 Sep 2001 13:35 using AcqMethod ISP-2

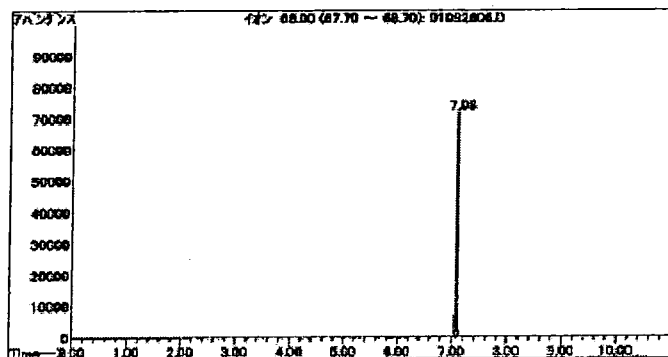


イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01092604.D
 C1

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.075	M	0.033	489425	7.019	7.141

(4) 64.0 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A000464-4G
 Date : 2001.09.26
 Operator :
 Sample Information: C3
 Sample Name : C3
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01092606.D
 Acquired : 26 Sep 2001 14:18 using AcqMethod ISP-2



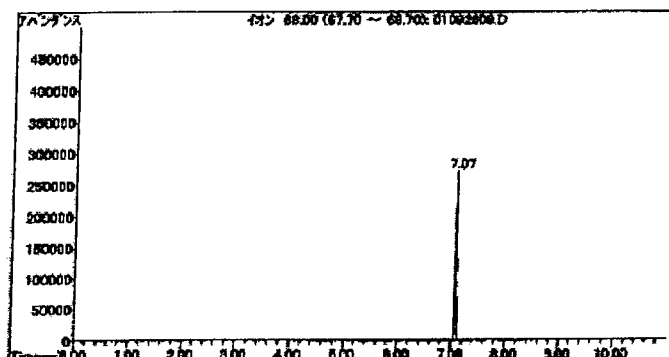
イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01092606.D
 C3

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.076	M	0.033	1413618	7.011	7.175

Figure A-2-2 Continued

(5) 200 mg/L nominal ; 0 Hour

Study No. : A000464-4G
 Date : 2001.08.26
 Operator :
 Sample Information: C5
 Sample Name : C5
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01092609.D
 Acquired : 26 Sep 2001 15:23 using AcoMethod ISP-2



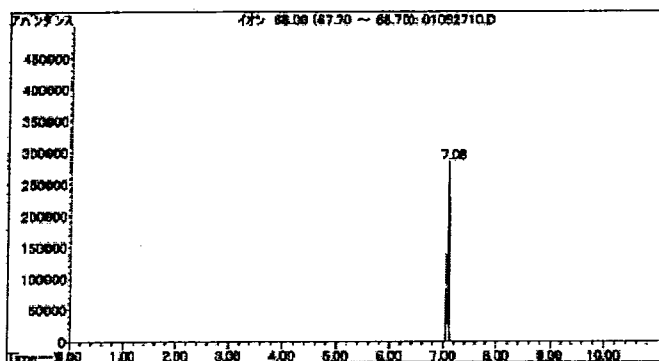
イン 68.00 (67.70 ~ 68.70) : 01092609.D
 C5

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.074	M	0.033	5373725	7.012	7.165

(6) Standard 500 mg/L ; 24 Hours

(Standard solution was added to 100-fold volume of water before injection.)

Study No. : A000469-4G
 Date : 2001.08.27
 Operator :
 Sample Information: STD 5ppm
 Sample Name : STD 5ppm
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01092710.D
 Acquired : 27 Sep 2001 15:21 using AcoMethod ISP-2



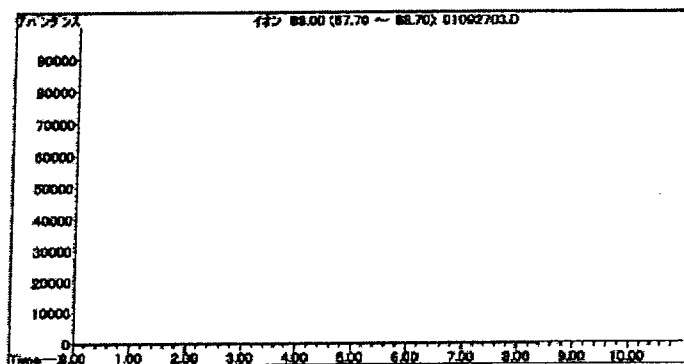
イン 68.00 (67.70 ~ 68.70) : 01092710.D
 STD 5ppm

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.075	M	0.033	5720827	7.015	7.155

Figure A-2-2 Continued

(7) Control ; 24 Hours

Study No. : A000459-4G
 Date : 2001.09.27
 Operator :
 Sample Information: control
 Sample Name : control
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01092703.D
 Acquired : 27 Sep 2001 12:50 using AcqMethod ISP-2

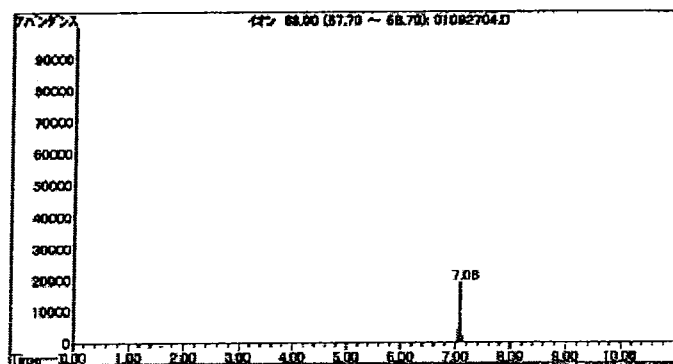


イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70) : 01092703.D
 control

クロマトグラムが積分されていません

(8) 20.0 mg/L nominal ; 24 Hours

Study No. : A000459-4G
 Date : 2001.09.27
 Operator :
 Sample Information: C1
 Sample Name : C1
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\01092704.D
 Acquired : 27 Sep 2001 13:11 using AcqMethod ISP-2



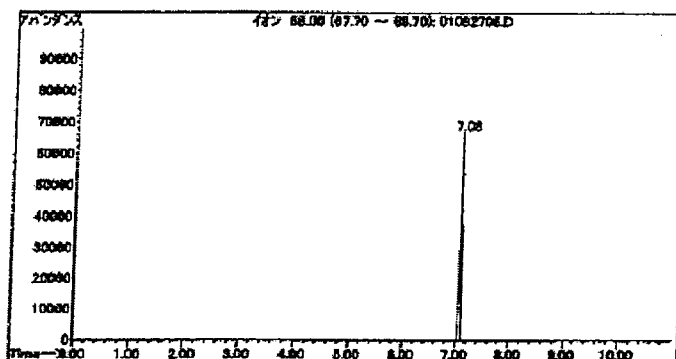
イオン 68.00 (67.70 ~ 68.70) : 01092704.D
 C1

ピーク	検出時間	タイ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.076	M	0.032	365740	7.024	7.149

Figure A-2-2 Continued

(9) 64.0 mg/L nominal ; 24 Hours

Study No. : A000469-4G
 Date : 2001. 09. 27
 Operator :
 Sample Information: C3
 Sample Name : C3
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\F01092705.D
 Acquired : 27 Sep 2001 13:55 using AcqMethod ISP-2

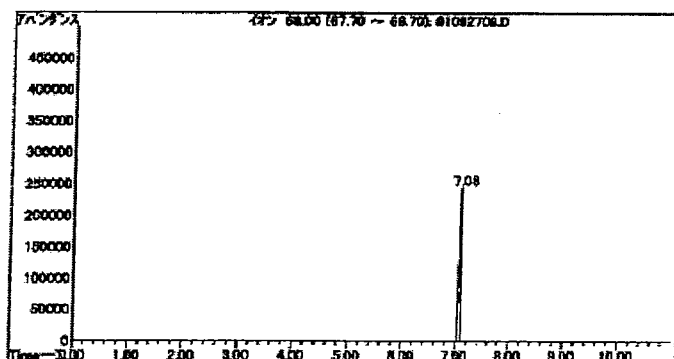


イン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01092705.D
 C3

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.075	M	0.033	1299093	7.022	7.159

(10) 200 mg/L nominal ; 24 Hours

Study No. : A000489-4G
 Date : 2001. 09. 27
 Operator :
 Sample Information: C5
 Sample Name : C5
 Misc Info :
 File Name : C:\MSDCHEM\1\DATA\ISP\F01092705.D
 Acquired : 27 Sep 2001 14:59 using AcqMethod ISP-2



イン 68.00 (67.70 ~ 68.70): 01092705.D
 C5

ピーク	リテンションタイム	タイプ	半値幅	面積	開始時間	終了時間
1	7.076	M	0.033	4852121	7.016	7.159