

環境庁殿

試 験 報 告 書

フタル酸ジ-n-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験－21日間

(試験番号：PRO/N05/0102)

1996年 7月31日作成

株式会社東レリサーチセンター

陳 述 書

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者： 環境庁

表題： フタル酸ジ-n-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－21日間

試験番号： PRO/N05/0102

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

平成 8 年 7 月 31 日

運営管理者

[Redacted Signature]

信頼性保証証明

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者： 環境庁

表題： フタル酸ジ-n-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験－21日間

試験番号： PRO/N05/0102

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	平成 8 年 5 月 27 日	平成 8 年 6 月 1 日
試験報告書監査	平成 8 年 6 月 20 日	平成 8 年 6 月 24 日

平成 8 年 7 月 31 日

信頼性保証担当者：

試験実施概要

1. 表題： フタル酸ジ-n-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する
延長毒性試験-21日間
2. 試験目的： フタル酸ジ-n-ブチルについて、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延
長毒性試験-21日間を行いヒメダカに対する致死、その他の観察される影
響の閾値および最大無作用濃度 (NOEC) 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.204「魚類延長毒性試験-
14日間」(1984年) に準拠して実施した。
4. 適用GLP：本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境庁
住所： 〒100 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2
試験委託担当者：環境庁企画調整局環境保健部環境安全課 保健専門官 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：
名称： 株式会社東レリサーチセンター
所在地： (〒103) 東京都千代田区日本橋室町3-1-8
7. 試験施設：
名称： 株式会社東レリサーチセンター
所在地： (〒455) 愛知県名古屋市港区大江町9-1

8. 試験関係者：

試験責任者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

試験担当者 [redacted] (平成 8 年 7 月 31 日)

9. 試験期間： 試験開始日 平成 8 年 3 月 28 日
試験終了日 平成 8 年 7 月 31 日
曝露期間 平成 8 年 5 月 14 日 ~ 平成 8 年 6 月 4 日

10. 保管：

試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後 10 年間、株式会社東レリサーチセンター名古屋研究部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 -----	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 保管方法および保管条件下の安定性の確認 -----	8
2 供試生物 -----	9
3 試験方法 -----	9
3.1 試験条件 -----	9
3.2 希釈水 -----	10
3.3 試験装置、試験容器および恒温槽等 -----	10
3.4 試験濃度の設定 -----	10
3.5 試験液の調製 -----	10
3.6 試験液の分析 -----	10
3.7 試験操作 -----	11
4 結果の算出 -----	11
4.1 最小致死濃度、最小作用濃度、最大無作用濃度 -----	11
4.2 半数致死濃度 (LC50) の算出 -----	11
5 結果および考察 -----	12
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 -----	12
5.2 試験水中の被験物質濃度 -----	12
5.3 最小致死濃度、最小作用濃度 -----	12
5.4 半数致死濃度 (LC50) -----	12
5.5 毒性症状および摂餌状況 -----	12
5.6 供試魚の体重 -----	13
5.7 最大無作用濃度 -----	13
5.8 試験水の pH、溶存酸素濃度および水温 -----	13
Table 1～8 -----	14～21
Figure 1 -----	22

付属資料－1 希釈水の水質

付属資料－2 試験液の分析方法

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

フタル酸ジ-n-ブチルのヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する延長毒性試験-21日間

試験番号

PRO/N05/0102

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No.204「魚類延長毒性試験-14日間」(1984年)に準拠して実施した。

- 1)被験物質： フタル酸ジ-n-ブチル
- 2)方式： 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用)
- 3)供試生物： ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4)試験濃度： 対照区、助剤対照区 (助剤濃度 70mg/L)、1.07mg/L、1.71mg/L、2.73mg/L、4.38mg/L および 7.00mg/L (濃度公比:1.6) (設定値)
- 5)暴露期間： 21日間
- 6)試験水槽： 4.0L
- 7)生物数： 20尾/濃度区
- 8)照明： 16時間明/8時間暗
- 9)エアレーション： 無し
- 10)温度： 24±1℃
- 11)試験水中の被験物質の分析： HPLC法

結 果

- 1)対照区と有意差の認められる21日間の最小致死濃度 = 2.14mg/L
 - 2)21日間の最小作用濃度 = 2.14mg/L
 - 3)21日間の最大無作用濃度 (NOEC) = 1.12mg/L
 - 4)7日間の半数致死濃度 (LC50) = 4.09mg/L (95%信頼区間: 4.00mg/L ~ 4.18mg/L)
 - 5)14日間の半数致死濃度 (LC50) = 3.88mg/L (95%信頼区間: 3.63mg/L ~ 4.17mg/L)
 - 6)21日間の半数致死濃度 (LC50) = 2.58mg/L (95%信頼区間: 2.38mg/L ~ 2.81mg/L)
- (上記濃度は、全て実測濃度の算術平均値に基づく値)

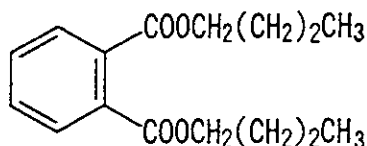
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： フタル酸ジ-n-ブチル

識別符号： NB

構造式：



分子式： $C_{16}H_{22}O_4$

分子量：278.35

1-オクタノール/水分配係数(log P)：4.900

水溶性：100～400 ppm (20℃～25℃)

蒸気圧：0.100～1.100 (mmHg) (89.0～150.0℃)

融点：-35℃

沸点：340℃

代謝性：フタル酸ジエチルヘキシルと異なり、速やかにフタル酸モノブチルになる。

(上記の数値は、MSDSのフタル酸ジブチルの値を引用した)

1.2 供試試料

購入先：

入手先：

入手日：平成8年3月11日

ロット番号：FGA01

供給量：25 g入り2本

外観：無色透明 液体

純度及び不純物：98.0%以上

1.3 保管方法及び保管条件下の安定性の確認

1) 保管方法

被験物質は光を遮断した試料保管庫に室温で保管した。

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測定、NMRスペクトル測定およびガスクロマトグラフ分析を行い、被験物質の特性ピークが認められることおよび純度を確認した。

試験終了時にも同様に測定・分析し、試験開始前に測定したスペクトルおよびガスクロマトグラムと比較した結果、変化はなかった。

従って、被験物質は当研究部の試料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

試験に使用したヒメダカ (*Oryzias latipes*) を下記に示した。供試魚の体長 (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: 2.29 cm (2.11 ~ 2.45 cm), n=10
- 4) 体重: 0.20 g (0.12 ~ 0.25 g), n=10
- 5) ロット番号: 960119
- 6) 購入先: 三輪養魚場
- 7) 購入日: 平成8年 1月19日

馴化

試験条件と同条件 (水質、温度等) で12日間以上、飼育馴化した。餌は市販のテトラミンを与えた。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 1.74%であった。また、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の結果は 96時間LC50が 0.37mg/Lであった。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 方式: 流水式 (定量ポンプを用いる連続希釈装置を使用), 換水率 17回/日
- 2) 曝露期間: 21日間
- 3) 連数: 1濃度区につき1連
- 4) 生物数: 20尾/濃度区
- 5) 試験水槽: 恒温水槽
- 6) 温度: $24 \pm 1^\circ\text{C}$
- 7) 照明: 16時間明/8時間暗
- 8) 給餌: 市販のテトラミンを毎日魚体重の 2%与えた
- 9) エアレーション: 無し

3.2 希釈水

愛知用水（河川水を簡単に処理して工業、農業用水として供給されている）を工場内で沈殿・ろ過処理した水をさらに、実験室でトレビーノ（東レ(株)製 浄水器：中空糸膜および活性炭）を通して用いた。

希釈水の主な水質として、硬度が 16.2mg/L (CaCO₃換算)、pHが 6.95であった。

[付属資料－1]

3.3 試験装置、試験容器および恒温槽等

流水式試験装置：定量ポンプを用いる連続希釈装置

試験容器： 5L容ガラスビーカー

恒温槽： 水槽、恒温水循環装置 クールライン（ヤマト科学 CL100型）

水温計： 熱電対温度計 データーロガー（ティアンドティ TR-71型）

またはpHメーター付属温度計

pH計： pHメーター（堀場製作所 カスタニーLAB pHメーターF-22）

溶存酸素計： DO METER（堀場製作所 OM-14）

3.4 試験濃度の設定

急性毒性試験(試験No.PR0/N04/0100)の結果から半数致死濃度 (LC50) 2.75mg/L、0%死亡最高濃度 1.03mg/L および 100%死亡最低濃度 6.20mg/L を推定し、本試験では公比 1.6で 1.07 mg/L、1.71 mg/L、2.73 mg/L、4.38mg/L、および 7.00 mg/L の5濃度区を設定した。

3.5 試験液の調製

フタル酸ジ-n-ブチル 20.00gを秤量し、10倍量の硬化ヒマシ油 HCO-50と蒸留水約 1000mLを加えて60～70℃に温め、ホモジナイザーで微分散させた。2L メスフラスコで定容し、フタル酸ジ-n-ブチル 1.000wt% 原液を調製した。

原液 40mLを分取して 2L メスフラスコで定容し、試験液連続希釈装置の供給液とした。

3.6 試験液の分析

開始時(0日)、1日、2日、7日、14日および21日に各試験水槽より試験水1.0mLを採取し、HPLCにより分析した。試験水の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液(濃度 1.0, 10.0mg/L)の測定を行い、検量係数を求めて被験物質濃度を測定した。

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馴養した魚10尾の各重量および被鱗体長を測定し、被鱗体長で $2.0 \pm 0.5\text{cm}$ であることを確認した。各試験水槽の試験液のpH、溶存酸素濃度、水温を測定後、試験水槽中に供試魚を1濃度区当たり20尾投入した。

暴露開始後、少なくとも週2回各試験水槽の試験液の水温、pH、溶存酸素濃度を測定した。

暴露期間中、餌は一日当たり個体重量の約2%を与えた。死亡により個体数が減少した場合は、その分給餌量を減らした。

暴露開始後、少なくとも週3回死亡個体*数を記録した。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。また、少なくとも週3回、観察された毒性の徴候或いは異常（例：外部刺激への反応異常、平衡感覚喪失、遊泳異常、呼吸機能の異常、体色変化、背曲がり、出血等）および摂餌量の低下を記録した。暴露終了時には全ての生存魚の重量および被鱗体長を測定記録した。

*：ガラス棒の先で尾部に軽く触れ反応がない個体を死亡とみなした

4 結果の算出

4.1 最小致死濃度、最小作用濃度、最大無作用濃度

試験において、試験区の死亡率が対照区と有意な差が認められた最も低い濃度を最小致死濃度とした。

試験において試験魚に致死以外の他の作用が観察された試験区の最も低い濃度を最小作用濃度とした。

致死やその他の作用が認められない最高試験濃度区を最大無作用濃度(NOE C)とした。

4.2 半数致死濃度(LC50)の算出

7日、14日および21日における半数致死濃度(LC50)を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。

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

フタル酸ジ-n-ブチル はヒメダカを入れた水中で分解され、1.31mg/L が24時間後に0.66mg/L になる（予備試験結果）ことが判明した。設定濃度を維持するために流水式で17回/日の換水を行ったが、それでも暴露試験液中のフタル酸ジ-n-ブチル は設定濃度の80%を下回った。従って、半数致死濃度（LC50）等の計算は試験開始時、1日後、2日後、7日後、14日後および21日後に測定したフタル酸ジ-n-ブチル濃度の算術平均値を用いた。

5.2 試験水中の被験物質濃度

試験開始時、1日後、2日後、7日後、14日後および21日後に試験水中の被験物質濃度を測定した。試験期間中の被験物質濃度は0.39～6.42 mg/L（設定値1.07～7.00 mg/L）であり、試験期間中の実測濃度の設定濃度に対する割合は36.4～91.7 %であった。

[Table 1(p.14) 付属資料-2]

5.3 最小致死濃度、最小作用濃度

21日間のヒメダカの死亡率に関して、対照区と有意差が認められた試験区の最も低い濃度（最小致死濃度）は、2.14mg/L（実測濃度の算術平均値）であった。

（有意水準5%、統計的手法：累積カイ2乗検定 Yukms 統計ライブラリ-I 統計解析編）

[Table 2(p.15), Figure 1(p.22)]

試験において、試験魚に致死以外の他の作用が観察された最も低い試験区の濃度（最小作用濃度）は、2.14mg/L（実測濃度の算術平均値）であった。

[Table 4(p.17)]

5.4 半数致死濃度（LC50）

7日、14日および21日の半数致死濃度（LC50）はそれぞれ4.09 mg/L、3.88 mg/L および2.58 mg/L（実測濃度）であり、その95%信頼区間はそれぞれ4.00～4.18 mg/L、3.63～4.17 mg/L および2.38～2.81 mg/L であった。

（有意水準5%、統計的手法：Probit法 Yukms 統計ライブラリ-II 生物検定編）

（上記濃度は、全て実測濃度の算術平均値に基づく値）

[Table 3(p.16)]

5.5 毒性症状および摂餌状況

毒性症状として、2.14mg/L（実測濃度）濃度区において、平衡喪失および遊泳異常が観察された。また、3.56mg/L（実測濃度）濃度区において、遊泳異常と呼吸機能の異常が観察された。対照区では試験期間中に異常な症状は観察されなかった。

ヒメダカの摂餌状況は、2.14mg/L と3.56mg/Lの濃度区において摂餌量低下が観察された。対照区では摂餌量の低下は観察されなかった。

[Table 4(p.17)]

5.6 供試魚の体重

フタル酸ジ-n-ブチルに21日間暴露したヒメダカの体重は、いずれの濃度区においても、対照区と有意な差は認められなかった。

(有意水準5%、統計的手法：F&t-test Yukms 統計ライブラリ-I 統計解析編)

[Table 5(p.18)]

5.7 最大無作用濃度

死亡率が対照区と比較して有意な差が認められない濃度区の最も高い濃度は1.12mg/L、毒性症状が観察されない濃度区の最も高い濃度は1.12mg/L、摂餌状況に異常が認められない濃度区の最も高い濃度区も1.12mg/Lであった。以上の結果より、致死やその他の作用が認められない最高試験濃度区である1.12mg/Lを最大無作用濃度(NOEC)と判断した。

(上記濃度は、全て実測濃度に基づく値)

5.8 試験水のpH、溶存酸素濃度および水温

試験期間中のpHは6.6～7.2であった。試験期間中の溶存酸素濃度は6.4～8.5 mg/Lであり、すべての濃度区において飽和溶存酸素濃度の60%以上であった。(24.0℃の飽和溶存酸素濃度：8.25mg/L)。

21日の試験期間中の水温は23.0～24.5であり、すべての濃度区において24±1℃の範囲にあった。

[Table 6(p.19)]

[Table 7(p.20)]

[Table 8(p.21)]

以 上

Table 1. Measured Concentrations of Di-n-butyl phthalate During a 21-Day Exposure of Orange killifish (Oryzias latipes) under Flow-Through Test Conditions

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L) (Percent of Nominal)						Mean
	0 Day	1 Day	2 Day	7 Day	14 Day	21 Day	
Control	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
Dispersant Control	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02	< 0.02
1.07	0.64 (59.8)	0.59 (55.1)	0.56 (52.3)	0.39 (36.4)	0.54 (50.5)	0.43 (40.2)	0.52 (48.6)
1.71	1.19 (69.6)	1.08 (63.2)	1.15 (67.3)	1.12 (65.5)	1.20 (70.2)	0.97 (56.7)	1.12 (65.5)
2.73	2.07 (75.8)	2.08 (76.2)	2.12 (77.7)	2.06 (75.5)	2.30 (84.2)	2.22 (81.3)	2.14 (78.4)
4.38	3.54 (80.8)	3.41 (77.9)	3.61 (82.4)	3.66 (83.6)	3.57 (81.5)	----a	3.56 (81.3)
7.00	6.10 (87.1)	6.42 (91.7)	----a	----a	----a	----a	6.26 (89.4)

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Table 2. Mortality of Orange killifish (Oryzias latipes) Exposed to Di-n-butyl phthalate under Flow-Through Test Conditions

Measured Concentration (mg/L)	Cumulative Number of Dead (Percent Mortality)								
	1 Day	4 Day	7 Day	9 Day	12 Day	14 Day	16 Day	18 Day	21 Day
Control	0 (0)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)
Dispersant Control	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
0.52	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	2 (10)	2 (10)
1.12	1 (5)	1 (5)	1 (5)	1 (5)	2 (10)	2 (10)	2 (10)	3 (15)	3 (15)
2.14	2 (10)	2 (10)	2 (10)	3 (15)	4 (20)	5 (25)	7 (35)	9 (45)	12 (60)
3.56	6 (30)	10 (50)	10 (50)	15 (75)	20 (100)	----a	----a	----a	----a
6.26	20 (100)	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a	----a

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Table 3. Calculated LC50 Values for Orange killifish (Oryzias latipes) Exposed to Di-n-butyl phthalate Based on Measured Concentrations under Flow-Through Test Conditions

Exposure Period (Day)	LC50 (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)	Statistical Method
7	4.09	4.00 ~ 4.18	Probit
14	3.88	3.63 ~ 4.17	Probit
21	2.58	2.38 ~ 2.81	Probit

These are based on mean values of measured concentrations.

Table 4. Symptoms of Toxicity Observed in Orange killifish (Oryzias latipes) Exposed to Di-n-butyl phthalate under Flow-Through Test Conditions

Measured Concentration (mg/L)	Symptoms								
	1 Day	4 Day	7 Day	9 Day	12 Day	14 Day	16 Day	18 Day	21 Day
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Dispersant Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.52	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.14	0	0	0	0	1	2	1	1	0
3.56	1	1	1	1	2	---a	---a	---a	---a
6.26	0	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Table 5. Fish Weight (g)

No.	Measured Concentration (mg/L)						
	Cont.	Disp.Cont	0.52	1.12	2.14	3.56	6.26
1	0.176	0.248	0.236	0.384	0.178	---a	---a
2	0.218	0.202	0.186	0.251	0.293	---a	---a
3	0.153	0.124	0.108	0.195	0.218	---a	---a
4	0.196	0.203	0.296	0.208	0.140	---a	---a
5	0.189	0.288	0.330	0.178	0.209	---a	---a
6	0.213	0.208	0.235	0.258	0.065	---a	---a
7	0.247	0.168	0.294	0.188	0.191	---a	---a
8	0.298	0.231	0.280	0.231	0.210	---a	---a
9	0.142	0.169	0.222	0.221	---a	---a	---a
10	0.265	0.254	0.215	0.199	---a	---a	---a
11	0.193	0.274	0.200	0.256	---a	---a	---a
12	0.179	0.183	0.084	0.144	---a	---a	---a
13	0.185	0.200	0.109	0.072	---a	---a	---a
14	0.268	0.225	0.092	0.201	---a	---a	---a
15	0.279	0.189	0.298	0.141	---a	---a	---a
16	0.117	0.257	0.281	0.080	---a	---a	---a
17	0.185	0.152	0.162	0.213	---a	---a	---a
18	0.135	0.190	0.153	---a	---a	---a	---a
19	0.223	0.198	---a	---a	---a	---a	---a
20	---a	0.237	---a	---a	---a	---a	---a

^a No measurement was made because the orange killifish were dead before this observation time.

Table 6. pH Values During a 96-Hour Flow-Through Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to Di-n-butyl phthalate

Measured Concentration (mg/L)	pH									
	0 Day	3 Day	6 Day	8 Day	10 Day	13 Day	15 Day	17 Day	19 Day	21 Day
Control	6.7	7.0	6.7	6.6	6.8	6.6	6.9	7.1	7.1	7.1
Dispersant Control	6.8	7.0	6.8	6.7	6.9	6.6	6.8	7.0	7.0	7.1
0.52	6.9	7.0	6.8	6.7	6.9	6.6	6.8	7.1	7.1	7.1
1.12	6.9	7.1	6.8	6.7	7.0	6.6	6.8	7.1	7.1	7.1
2.14	6.9	7.1	6.9	6.8	7.0	6.6	6.9	7.1	7.1	7.2
3.56	7.0	7.1	6.9	6.8	7.0	---a	---a	---a	---a	---a
6.26	7.0	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Table 7. Dissolved Oxygen Concentrations During a 96-Hour Flow-Through Exposure of Orange killifish (*Oryzias latipes*) to Di-n-butyl phthalate

Measured Concentration (mg/L)	Dissolved Oxygen Concentration (mg/L)									
	0 Day	3 Day	6 Day	8 Day	10 Day	13 Day	15 Day	17 Day	19 Day	21 Day
Control	8.3	8.0	7.9	8.0	7.3	7.8	7.4	8.4	7.6	7.5
Dispersant Control	8.5	7.6	7.5	7.5	6.9	6.5	6.4	7.2	6.8	6.8
0.52	8.4	7.7	7.7	7.6	7.2	6.9	7.2	7.9	7.1	6.9
1.12	8.5	7.5	7.9	7.8	7.2	7.2	7.0	8.0	7.0	7.1
2.14	8.5	8.0	8.1	8.1	7.6	7.3	7.5	8.3	7.3	7.5
3.56	8.3	7.7	8.0	8.0	7.5	---a	---a	---a	---a	---a
6.26	8.4	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a

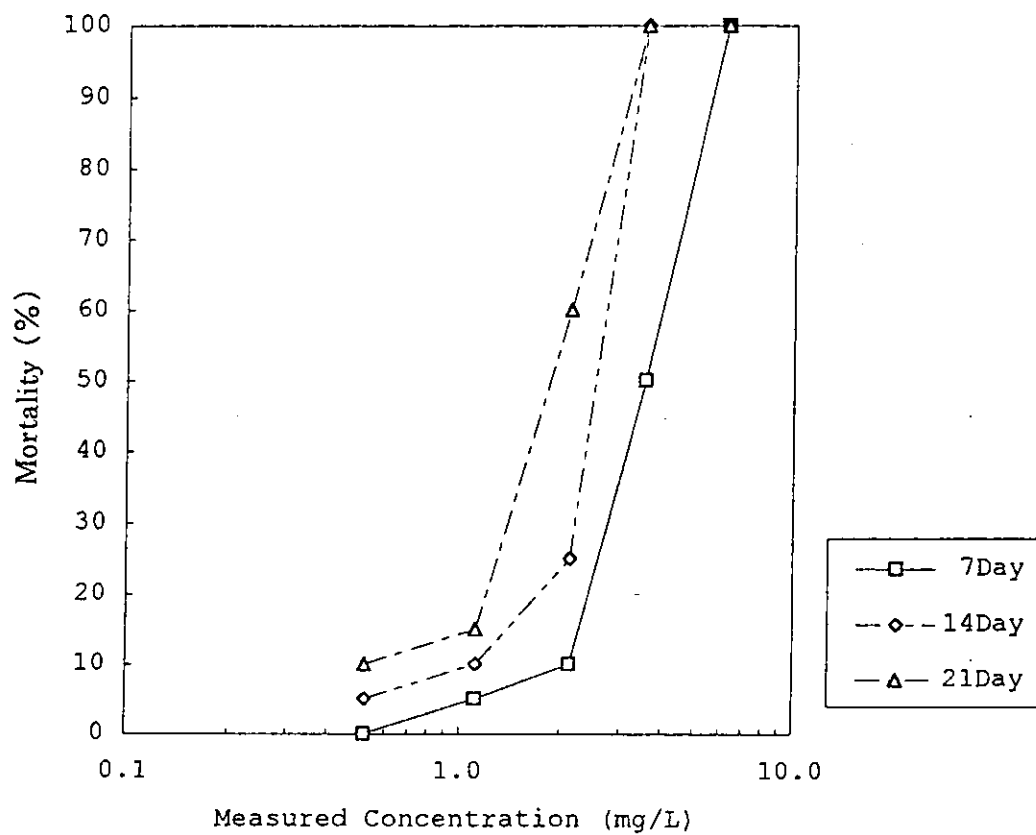
^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Table 8. Temperature Values During a 96-Hour Flow-Through Exposure of Orange killifish (Oryzias latipes) to Di-n-butyl phthalate

Measured Concentration (mg/L)	Temperature (°C)									
	0 Day	3 Day	6 Day	8 Day	10 Day	13 Day	15 Day	17 Day	19 Day	21 Day
Control	23.9	23.3	23.0	23.6	23.8	24.2	24.3	24.1	24.1	23.7
Dispersant Control	23.8	23.7	23.2	23.4	23.7	24.3	24.4	24.2	24.4	24.1
0.52	23.7	23.9	23.4	23.5	23.6	24.3	24.5	24.4	24.3	24.1
1.12	23.3	23.8	23.3	23.4	23.7	24.2	24.2	24.4	24.3	24.0
2.14	23.5	23.9	23.2	23.3	23.8	24.1	24.2	24.4	24.2	23.8
3.56	23.8	23.9	23.4	23.4	23.8	---a	---a	---a	---a	---a
6.26	23.8	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a	---a

^a No measurement was made because all orange killifish were dead at this observation time.

Figure 1 Concentration-Response Curve of Di-n-butyl phthalate
Mortality in Orange killifish



付属資料－ 1

希釈水の水質

(全 1 頁)

Water Quality of Dilution Water

Parameter	Concentration
BOD	0.8 mg/L
COD	<0.6 mg/L
pH	6.95
Coliform group bacteria	N.D.
Mercury	<0.00005mg/L
Copper	<0.001 mg/L
Cadmium	<0.001 mg/L
Zinc	0.006 mg/L
Lead	<0.005 mg/L
Chromium	<0.01 mg/L
Iron	0.005 mg/L
Free chlorine	<0.0 mg/L
Fluoride	<0.05 mg/L
Ammonium ion	<0.1 mg/L
Arsenic	<0.01 mg/L
Evaporation residue	52.0 mg/L
Electric conductivity	4.23 mS/m
Total hardness (as CaCO ₃)	16.2 mg/L
Alkalinity	18.8 mg/L
Total organophosphorus compounds	<0.1 mg/L
Herbicide Simazin	<0.0003 mg/L
Herbicide Thiobencarb	<0.002 mg/L
Fungicide Thiuram	<0.0006 mg/L

付属資料－ 2

試験液の分析方法

(全 6 頁)

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

各試験水槽より試験水 0.5～1.5 mL をバイアルに採取した。

測定濃度が20 mg/Lを越える場合は予め移動相で希釈した。

HPLCのオートサンプラーにセットして一定量を自動注入した。

検量線から被験物質濃度を求めた。

2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

カラム : C18 5 μ m 4.6 mm ϕ \times 150 mm

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

移動相 : 水/アセトニトリル = 13/87

流量 : 1.0 mL/min

注入量 : 20 μ L

3 検量線

標準原液を希釈して、予想測定濃度が含まれる5ポイント以上の標準液を測定し、直線性を確認した。 [Figure 1(p.27)]

測定日毎に標準溶液 (2ポイント以上) の測定を行い、この検量線により定量する。

4 添加回収試験

助剤対照液に標準原液もしくはこれを希釈して調製した標準液の一定量を添加して回収率を求めた。

フタル酸ジ-n-ブチル 1.003mg/L 標準液の回収率は 99.9%、10.03mg/L 標準液の回収率は 98.5%であった。

Figure 1 Calibration Curve of Di-n-butyl phthalate by HPLC Analysis

Input Data

No	Concentration mg/L	Peak Area mAU·sec
1	0.5	2.14130
2	1.0	3.98163
3	4.0	15.52237
4	10.0	38.83638
5	20.0	77.63517

$$Y(\text{Peak Area}) = 0.0811214 + 3.87691 X(\text{Concentration})$$

$$r = 1.00000$$

r : coefficient of correlation

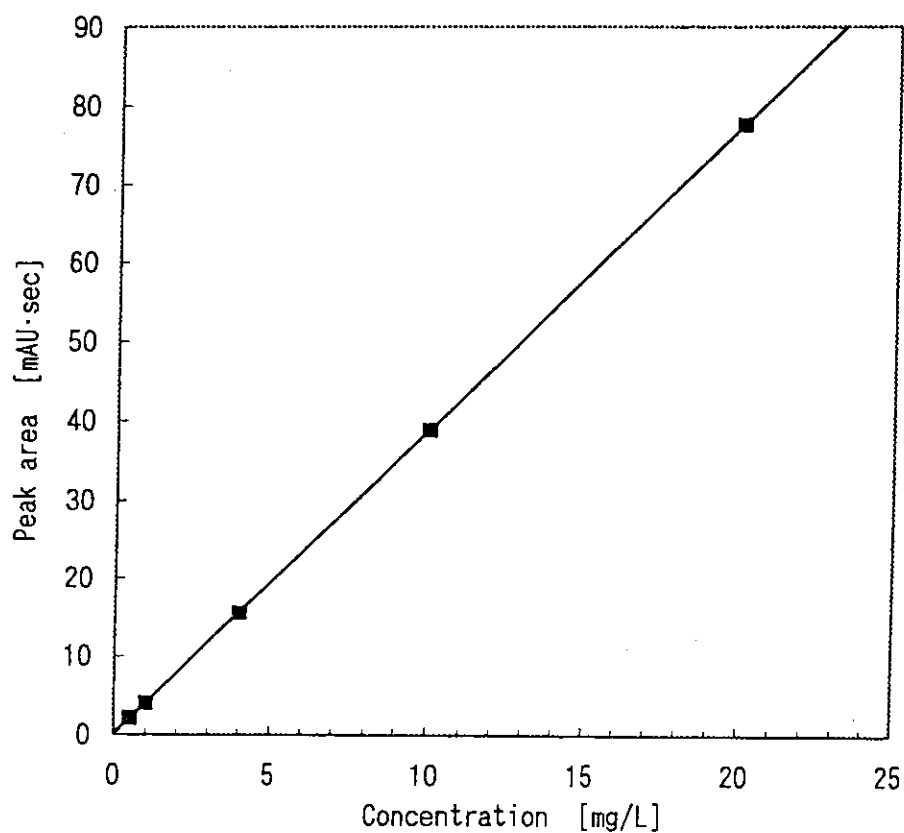


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 10.0mg/L

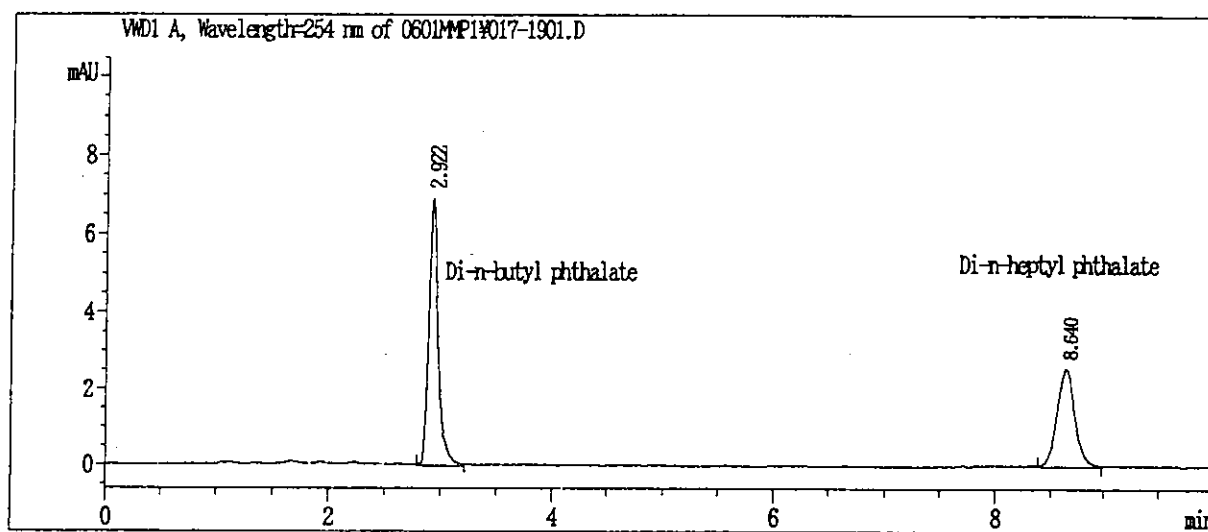
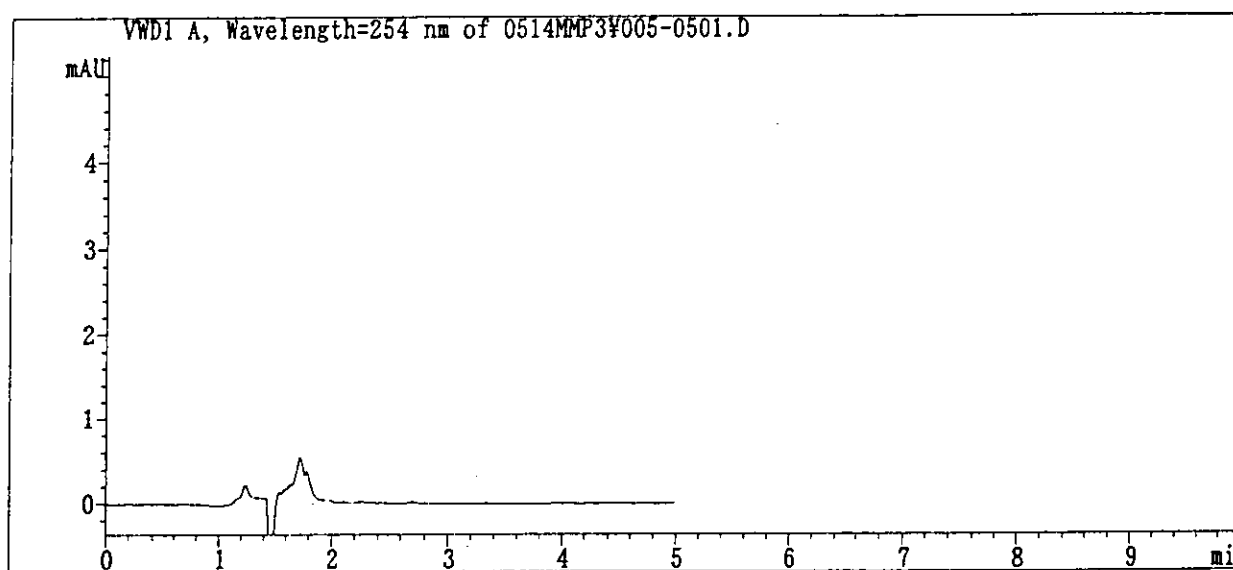


Figure 2 Continued

(2) Control ; Day 0



(3) Dispersant control ; Day 0

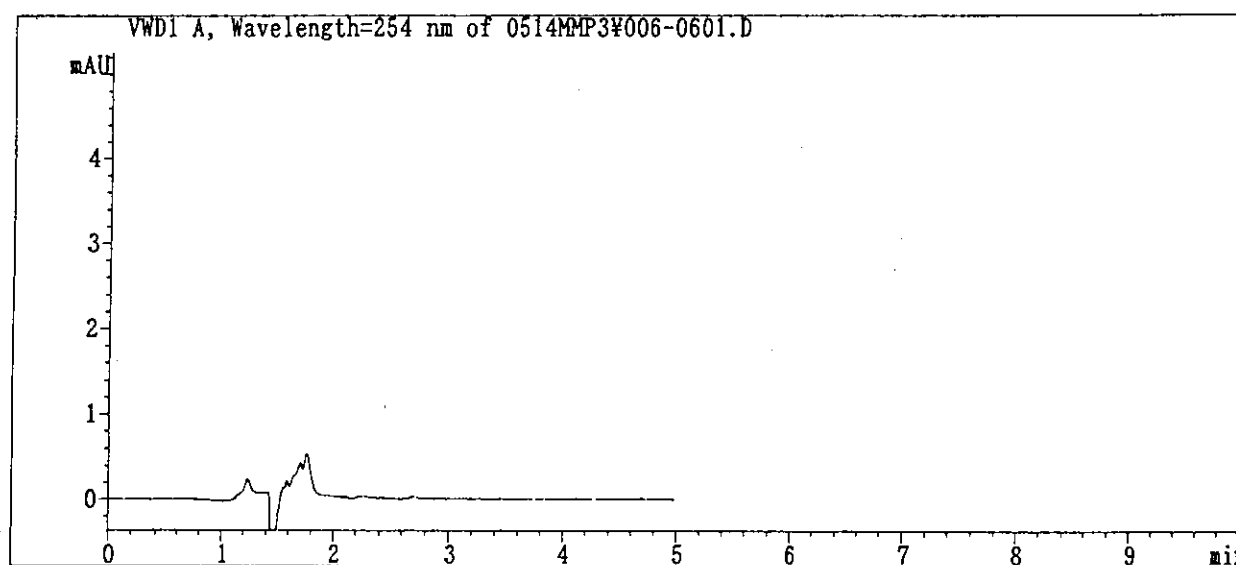
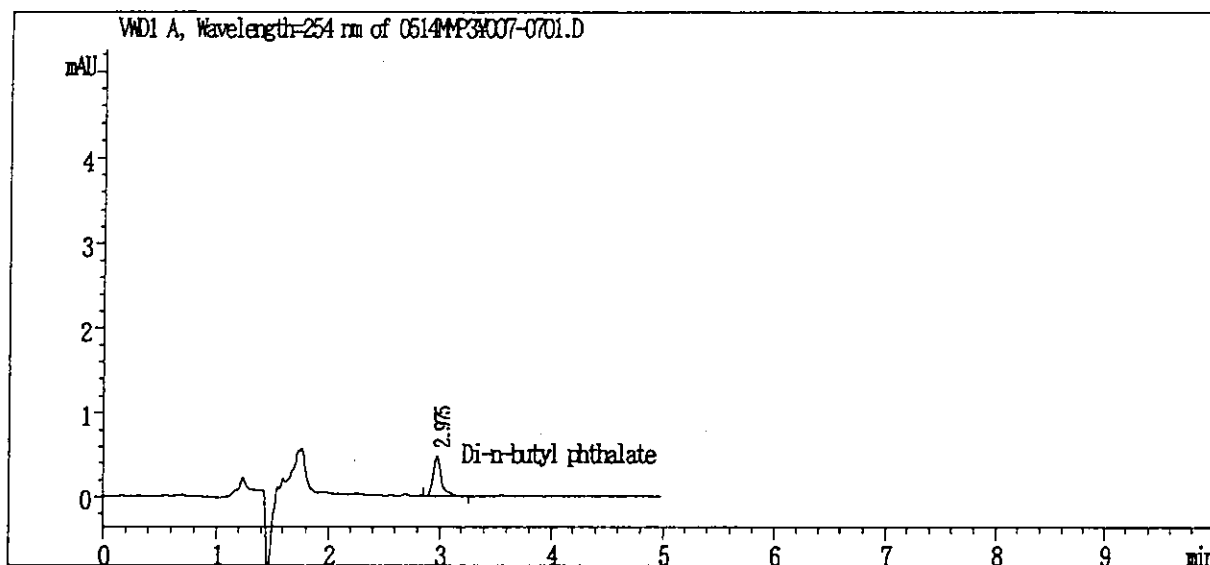


Figure 2 Continued

(4) 1.07mg/L nominal; Day 0



(5) 1.07mg/L nominal; Day 21

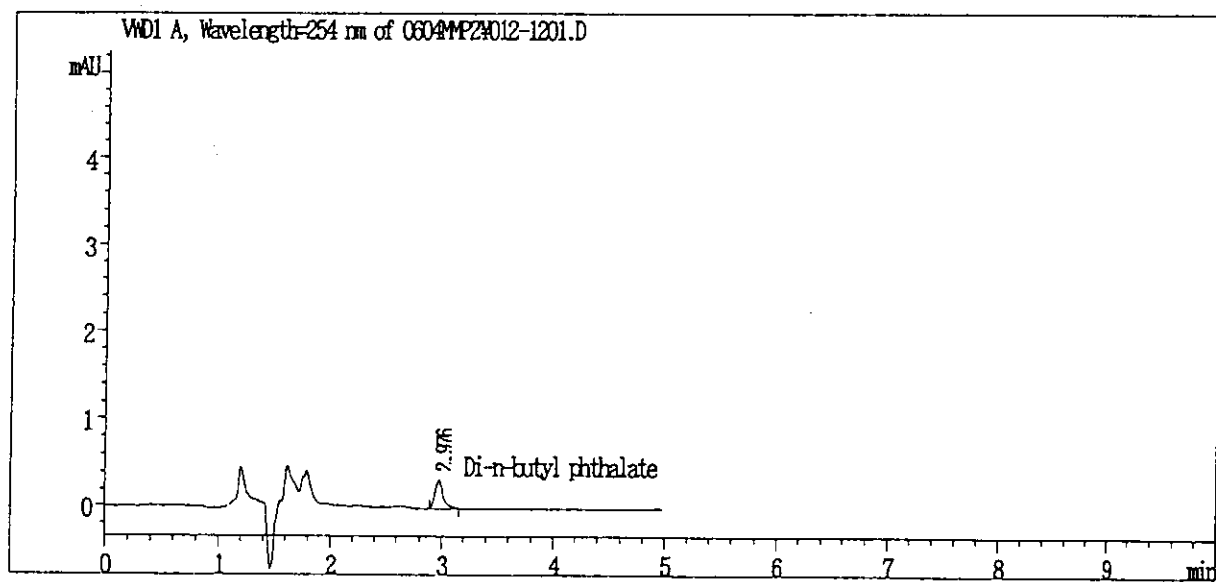
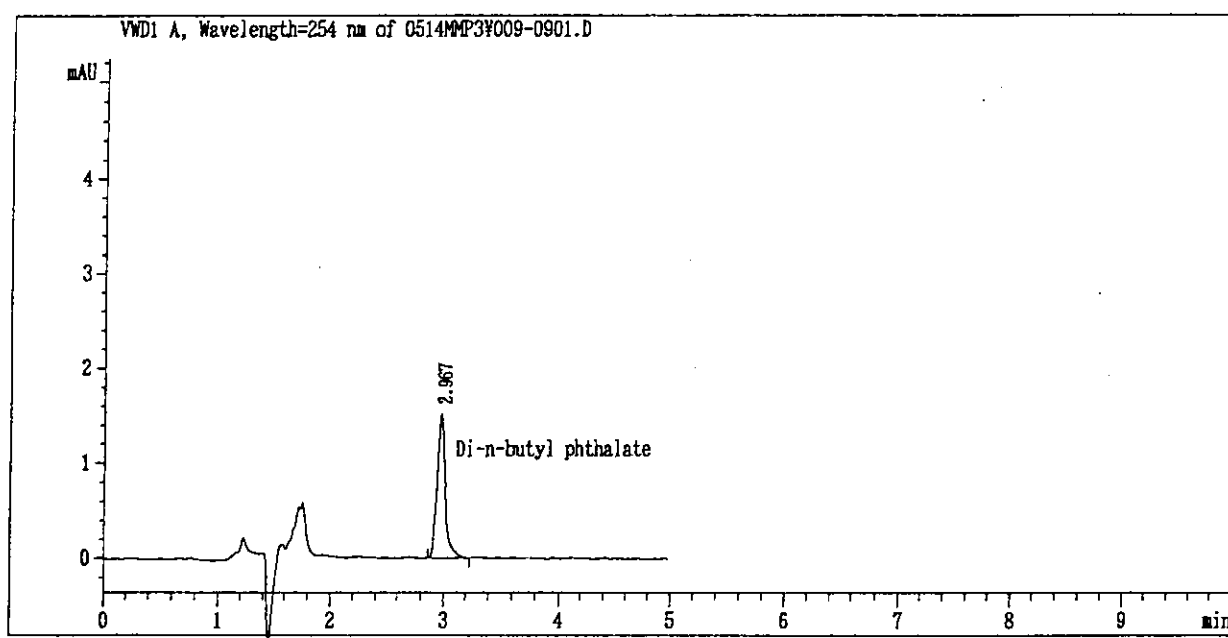


Figure 2 Continued

(6) 2.73mg/L nominal; Day 0



(7) 2.73mg/L nominal; Day 21

