

環境省殿

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

## 最 終 報 告 書

4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) の  
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

(試験番号 : A020358-4)

2004年 2月27日

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 : 環境省

表 題 : 4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) の  
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A020358-4

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、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

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)

2004年 2月27日

試験責任者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

# 信 頼 性 保 証 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 : 4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) の  
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A020358-4

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、下記の査察および監査実施により確認した。

## 記

| 実 施 事 項 |        | 実 施 日       | 運営管理者および<br>試験責任者への報告日 |
|---------|--------|-------------|------------------------|
| 試験計画書監査 |        | 2003年 1月17日 | 2003年 1月17日            |
| 試験の査察   | 試験液の調製 | 2003年 3月10日 | 2003年 3月10日            |
|         | 魚の投入   | 2003年 3月10日 | 2003年 3月10日            |
|         | 魚の観察   | 2003年 3月14日 | 2003年 3月14日            |
| 最終報告書監査 |        | 2004年 2月27日 | 2004年 2月27日            |

2004年 2月27日

信頼性保証部門担当者




## 試験実施概要

1. 表 題 : 4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホニルヒドラジド) の  
ヒメダカ (*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験  
(試験番号: A020358-4)
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 : 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)
4. 適用 GLP : 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)
5. 試験委託者 : 環境省  
〒100-8975 東京都千代田区霞が関一丁目 2-2  
委託責任者 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 : 株式会社三菱化学安全科学研究所  
〒105-0014 東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
〒227-0033 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地

8. 試験責任者： [redacted]

生態科学研究部

(2003年 9月 1日付, グループ再編により名称変更)

(報告書作成)

9. 試験担当者： [redacted]

(試験実施)

[redacted] (2004年 2月27日)

[redacted]

(分析実施)

[redacted] (2004年 2月27日)

10. 試験日程：

|       |             |
|-------|-------------|
| 試験開始日 | 2003年 1月17日 |
| 実験開始日 | 2003年 3月10日 |
| 実験終了日 | 2003年 3月14日 |
| 試験終了日 | 2004年 2月27日 |

11. 保管： 試験計画書，生データ，被験物質，記録文書および最終報告書は，横浜研究所の保管施設に保管する。

保管期間は，最終報告書作成後10年間とし，以後の保管は試験委託者と協議の上，決定する。

ただし，被験物質については，最終報告書作成後10年間または品質低下をおこさないで安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

## 目 次

|                                     | 頁     |
|-------------------------------------|-------|
| 要 約 .....                           | 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 .....                        | 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 .....                       | 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 試験液の水溫, 溶存酸素濃度およびpH .....       | 16    |
| 5.7 計画書からの逸脱事項 .....                | 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 .....                 | 27～34 |

## 要 約

試 験 委 託 者 : 環境省

表 題 : 4,4'-オキシビス (ベンゼンスルホンヒドラジド) のヒメダカ  
(*Oryzias latipes*) に対する急性毒性試験

試 験 番 号 : A020358-4

試 験 方 法 :

- 1) 適用ガイドライン: 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)
- 2) 暴 露 方 式 : 半止水式 (24時間毎に試験液の全量を交換)
- 3) 供 試 生 物 : ヒメダカ (*Oryzias latipes*)
- 4) 暴 露 期 間 : 96時間
- 5) 試 験 濃 度 : 対照区, 助剤対照区, 20.0 mg/L (試験液調製可能最高濃度の  
(設定値) 限度試験)  
助剤濃度一定: 100  $\mu$  L/L (ジメチルホルムアミド使用)
- 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 $\pm$ 1  $^{\circ}$ C
- 10) 照 明 : 室内光, 16時間明 (1000 lux以下) / 8時間暗
- 11) 分 析 法 : 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

試 験 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は, 暴露開始時において95%, 24時間後において11%であった。水中で加水分解したと考えられるが, 詳細は確認できなかった。

2) 96時間暴露後の半数致死濃度 (LC50): >6.58 mg/L (95%信頼区間: 算出不可)

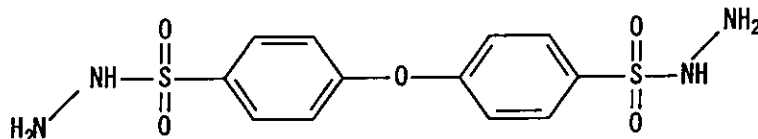
## 1 被験物質

### 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名称： 4,4'-オキシビス（ベンゼンスルホニルヒドラジド）（略称 OB SH）

CAS No： 80-51-3

構造式：



分子式：  $C_{12}H_{14}N_4O_5S_2$

分子量<sup>\*1</sup>： 358.4

分解温度<sup>\*1</sup>： 150～165℃（自己反応性物質、白煙を発生して分解）

溶解度<sup>\*1</sup>： ジメチルスルホキシド；易溶，ケトン類；反応して溶解

水溶解度<sup>\*1,\*2</sup>： 0.02g/100g（20℃）<sup>\*1</sup>

25.7mg/L（精製水<sup>\*3</sup>，20℃，48時間攪拌，HPLC測定）<sup>\*2</sup>

比重<sup>\*1</sup>： 1.525

\*1： 供給者提供資料

\*2： 当社測定値

\*3： JIS K0557 A4グレードの水，ヤマト科学製 超純水製造装置 WR600A

### 1.2 供試試料

純度<sup>\*1</sup>： 99.3 wt%

[不純物：4,4'-オキシビス（ベンゼンスルホン酸）及び4,4'-オキシビス（ベンゼンスルホニルクロライド）を微量に含有する]

ロット番号<sup>\*1</sup>： 403650

供給者：

受領量<sup>\*1</sup>： 100 g

受領日： 2002年12月12日

外観： 白色微粉末

\*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

試験開始前に、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試験物質保管用冷蔵庫（保管条件：冷蔵，暗所）内に保管した。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は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： 網島フィッシング（神奈川県横浜市港北区網島西五丁目18番1号）  
4)入手日： 2002年 7月29日  
5)ロット番号： 02-H-0729  
6)被鱗体長： 平均 2.29 cm (2.19 ~2.40 cm) , n=10  
7)体 重： 平均 0.197 g (0.161~0.229 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) = 1.2 mg/L (95%信頼区間：0.81~1.7 mg/L)

この値は、以下に示した当研究所におけるLC50値（1995年以降，n=23）にほぼ一致する（全て無水物換算値）。

平均値 ± 標準偏差 = 0.92 ± 0.29 mg/L

最小値 ~ 最大値 = 0.44 ~ 1.5 mg/L

- 9)年 齢： 孵化後約1年  
10)じゅん化期間： 2003年 2月21日~2003年 3月10日

暴露開始前 7 日間の死亡率は 5%未満で，試験には肉眼的に健康で正常な個体を使用した。じゅん化期間中は薬浴は行わなかった。（暴露開始前 14 日間のじゅん化条件は以下に示す。）

### 11)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 °C  
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交換）
- 2) 暴露期間： 96 時間
- 3) 試験液量： 5.0 L／容器  
(試験液 1.0 L 当たり供試魚重量が 1.0 g を超えないようにした)
- 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：  $24 \pm 1$  °C
- 7) 溶存酸素濃度： 飽和濃度の 60% 以上に維持した（エアレーションあり）
- 8) pH： 試験液の pH 調整は行わなかった
- 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）を希釈水として使用した。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
- 2) 恒温槽： 塩ビ製水槽（恒温装置，タイテック製 ケルニット CL-80F 型）
- 3) 水温計： 横河電機製 2455 02 型 Na4
- 4) 溶存酸素計： 電気化学計器製 DOL-10 型 Na2
- 5) pH 計： 東亜電波工業製 HM-40V 型 Na1

### 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、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，20.0 mg/L（試験液調製可能最高濃度の限度試験）

#### 予備試験結果

| 濃度 (mg/L) | 96時間の死亡率(%) |
|-----------|-------------|
| 2.00      | 0           |
| 6.32      | 0           |
| 20.0      | 0           |

### 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 $24 \pm 1$  °Cにした。

以下の表の通りに，被験物質原液を調製した。

|            |         | 被験物質原液      |
|------------|---------|-------------|
| 調製方法       | 被験物質採取量 | 2000 mg     |
|            | 定容液     | ジメチルホルムアミド  |
|            | 定容量     | 10 mL       |
|            | 溶解方法    | 手で振とう       |
|            | 被験物質濃度  | 200000 mg/L |
| 調製頻度       |         | 暴露開始時       |
| 保管条件等      |         | 冷蔵          |
| 上記条件下での安定性 |         | 96 時間以上安定   |

試験液は，濃度に応じた量の被験物質原液を採取し，希釈水で5.0 Lに定容した。

対照区は希釈水のみとし，助剤対照区には助剤のみを含むもの（助剤濃度：100 μL/L）を調製した。

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。

### 3.6 試験液の分析

暴露開始時および24時間後（換水前）に各試験容器より試験液 0.75 mLを採取し、アセトニトリルを等量添加し混合後、HPLC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、幾何平均値を求めた。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尾の被鱗体長および体重を測定し、被鱗体長が $2.0 \pm 0.5$  cmであることを確認した。

試験液の水温、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。水温、溶存酸素濃度、pHは暴露期間中少なくとも毎日1回（換水前後も含む）測定した。暴露期間中給餌は行わなかった。

暴露開始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以下に示した\*。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

半数致死濃度の算出に用いる被験物質濃度は、測定値（平均）とした。

##### 4.2 半数致死濃度（LC50）の算出

通常は暴露開始 24, 48, 72 および 96 時間後の各試験区における、ヒメダカの死亡数と供試個体数（10 尾）から死亡率（%）を求め、半数致死濃度（LC50）を決定するが、本試験においては試験上限濃度のみの限度試験のため、半数致死濃度（LC50）の計算はせずに「> 試験上限濃度」とした。

##### 4.3 0%死亡最高濃度および100%死亡最低濃度

通常は死亡率が 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するが、本試験においては試験上限濃度のみの限度試験のため、0%阻害最高濃度および100%死亡最低濃度は「> 試験上限濃度」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（換水前）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、代表的なクロマトグラムを付属資料－2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は、暴露開始時において95%、24時間後において11%であった。水中で加水分解したと考えられるが、詳細は確認できなかった。

なお、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）には測定値を用いた。

### 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。

暴露96時間の対照区の死亡率は0%、助剤対照区の死亡率は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、96時間の算出結果を付属資料－3に示した。

96時間 LC50 : >6.58 mg/L (95%信頼区間：算出不可)

### 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 : >6.58 mg/L

100%死亡最低濃度 : >6.58 mg/L

### 5.5 毒性症状

観察された毒性症状を Table 5に示した。

全ての試験区において、暴露期間中、生存魚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 $24 \pm 1$  °C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 °C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。

#### 5.7 試験計画書からの逸脱事項

該当する事象はなかった。

以 上

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

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/L) | Measured Concentration (mg/L)<br>(Percent of Nominal) |                | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/L) |
|------------------------------------|---|----------------|---|
|                                    | 0 Hour (new)  | 24 Hours (old) |   |
| Control                            | <0.02   | <0.02          | ----  |
| Solvent Control                    | <0.02   | <0.02          | ----  |
| 20.0                               | 18.9  | 2.29           | 6.58  |
|                                    | (95)  | (11)           | (33)  |

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<br>Concentration<br>(mg/L) | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/L) | Cumulative Mortality (Percent Mortality) |     |          |     |          |     |          |     |
|------------------------------------|---|--|-----|----------|-----|----------|-----|----------|-----|
|                                    |   | 24 Hours                                 |     | 48 Hours |     | 72 Hours |     | 96 Hours |     |
| Control                            | ----  | 0  | (0) | 0        | (0) | 0        | (0) | 0        | (0) |
| Solvent Control                    | ----  | 0  | (0) | 0        | (0) | 0        | (0) | 0        | (0) |
| 20.0                               | 6.58  | 0  | (0) | 0        | (0) | 0        | (0) | 0        | (0) |

a: geometric mean

Table 3      Calculated LC50 Values

| Exposure<br>Period<br>(Hours) | LC50<br>(mg/L) | 95-Percent<br>Confidence Limits<br>(mg/L) | Statistical<br>Method |
|-------------------------------|----------------|---|-----------------------|
| 24                            | >6.58          | --  | --                    |
| 48                            | >6.58          | --  | --                    |
| 72                            | >6.58          | --  | --                    |
| 96                            | >6.58          | --  | --                    |

--: Could not be determined

The LC50 value and its 95% confidence limits could not be determined by statistical method because the mortality of Medaka at the maximum concentration level was less than 50%.

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

| Exposure<br>Period<br>(Hours) | Highest Concentration in<br>0% Mortality<br>(mg/L) | Lowest Concentration in<br>100% Mortality<br>(mg/L) |
|-------------------------------|--|---|
| 24                            | >6.58  | >6.58   |
| 48                            | >6.58  | >6.58   |
| 72                            | >6.58  | >6.58   |
| 96                            | >6.58  | >6.58   |

Table 5 Observed Toxicological Symptoms

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/L) | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/L) | Symptoms<br>(Symtom-number of fish) |          |          |          |
|------------------------------------|---|-------------------------------------|----------|----------|----------|
|                                    |   | 24 Hours                            | 48 Hours | 72 Hours | 96 Hours |
| Control                            | -----   | N                                   | N        | N        | N        |
| Solvent Control                    | -----   | N                                   | N        | N        | N        |
| 20.0                               | 6.58  | N                                   | N        | N        | N        |

a: geometric mean

N: No toxicological symptom was observed

Table 6      Temperature

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/L) | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/L) | Temperature (°C) |          |      |          |      |          |      |          |
|------------------------------------|---|------------------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|
|                                    |   | 0 Hour           | 24 Hours |      | 48 Hours |      | 72 Hours |      | 96 Hours |
|                                    |   | new              | old      | new  | old      | new  | old      | new  | old      |
| Control                            | ----  | 23.9             | 23.8     | 23.6 | 23.7     | 23.6 | 23.4     | 23.4 | 23.9     |
| Solvent Control                    | ----  | 23.9             | 23.9     | 23.6 | 23.7     | 23.7 | 23.4     | 23.3 | 24.0     |
| 20.0                               | 6.58  | 23.7             | 23.9     | 23.9 | 23.8     | 23.6 | 23.3     | 23.4 | 23.9     |

minimum:23.3

maximum:24.0

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Table 7 Dissolved Oxygen Concentrations

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/L) | Mean* Measured<br>Concentration<br>(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                            | ----                                      | 8.4                                   | 7.2      | 8.3 | 7.1      | 8.4 | 7.2      | 8.5 | 7.2      |
| Solvent Control                    | ----                                      | 8.4                                   | 7.3      | 8.2 | 7.0      | 8.4 | 6.9      | 8.5 | 6.7      |
| 20.0                               | 6.58                                      | 8.3                                   | 7.4      | 8.4 | 7.2      | 8.3 | 7.2      | 8.3 | 7.3      |

minimum:6.7

maximum:8.5

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Table 8 pH Values

| Nominal<br>Concentration<br>(mg/L) | Mean <sup>a</sup> Measured<br>Concentration<br>(mg/L) | pH     |          |     |          |     |          |     |          |
|------------------------------------|---|--------|----------|-----|----------|-----|----------|-----|----------|
|                                    |   | 0 Hour | 24 Hours |     | 48 Hours |     | 72 Hours |     | 96 Hours |
|                                    |   | new    | old      | new | old      | new | old      | new | old      |
| Control                            | ----  | 7.6    | 7.7      | 7.6 | 7.5      | 7.4 | 7.7      | 7.6 | 7.7      |
| Solvent Control                    | ----  | 7.6    | 7.7      | 7.7 | 7.6      | 7.6 | 7.7      | 7.6 | 7.7      |
| 20.0                               | 6.58  | 7.6    | 7.7      | 7.6 | 7.6      | 7.6 | 7.7      | 7.7 | 7.7      |

minimum:7.4

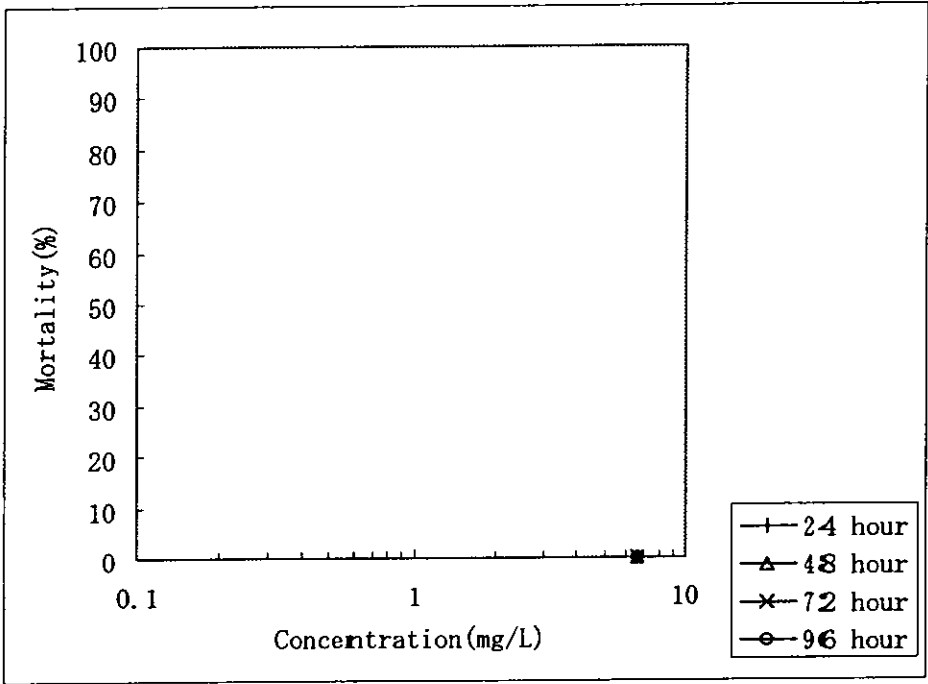
maximum:7.7

a: geometric mean

new: freshly prepared test solutions

old: test solutions after 24 hours exposure

Figure 1      Concentration-Mortality Curve



## 付属資料－ 1

希釈水の水質

Table A-1 Dilution water quality

| Parameter                              | Concentration |            |
|--|---------------|------------|
| BOD                                    | <1            | mg/L       |
| COD                                    | 1.0           | mg/L       |
| pH                                     | 7.6           | (21°C)     |
| Coliform group bacteria                | N. D.         |            |
| Oil                                    | N. D.         |            |
| Cadmium                                | <0.001        | mg/L       |
| Cyanide                                | N. D.         |            |
| Lead                                   | <0.01         | mg/L       |
| Chromium                               | <0.005        | mg/L       |
| Arsenic                                | <0.005        | mg/L       |
| Mercury                                | <0.0001       | mg/L       |
| Free chlorine                          | 0.01          | mg/L       |
| Bromide                                | <0.1          | mg/L       |
| Fluoride                               | 0.13          | mg/L       |
| Sulfide                                | <0.03         | mg/L       |
| Total ammonium                         | <0.05         | mg/L       |
| Copper                                 | <0.005        | mg/L       |
| Zinc                                   | <0.01         | mg/L       |
| Aluminum                               | 0.046         | mg/L       |
| Tin                                    | <0.1          | mg/L       |
| Manganese                              | <0.1          | mg/L       |
| Iron                                   | <0.1          | mg/L       |
| Nickel                                 | <0.01         | mg/L       |
| Total phosphorus                       | <0.01         | mg/L       |
| Selenium                               | <0.005        | mg/L       |
| Phenol                                 | <0.002        | mg/L       |
| Anionic surfactant                     | <0.02         | mg/L       |
| Evaporation residue                    | 130           | mg/L       |
| Electric conductivity                  | 170           | $\mu$ S/cm |
| Total hardness (as CaCO <sub>3</sub> ) | 73            | mg/L       |
| Alkalinity                             | 43            | mg/L       |
| Sodium                                 | 10            | mg/L       |
| Potassium                              | 1.3           | mg/L       |
| Calcium                                | 16            | mg/L       |
| Magnesium                              | 5.4           | mg/L       |

sampling date: February 10, 2003

## 付属資料－ 2

### 試験液の分析

## 1 試験液の分析方法

1) 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し混合後、HPLCにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-2-2(2), (3), (4), (6), (7), (8)に示した。

2) アセトニトリルで調製した標準溶液 0.75 mLを測定用バイアルに採取し、精製水を等量添加し混合後、HPLCにより分析した。代表的なクロマトグラムをFigure A-2-2(1), (5)に示した。

3) 各試験液の被験物質濃度は、各分析時に測定した標準溶液のピーク面積を用いて、一点検量法により定量した。

なお、暴露開始前に試験濃度範囲の全域にわたって検量線を作成し、直線性を確認している。（「3 検量線」参照）

## 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 (HPLC) : Agilent 1100 型 カラムスイッチング装置付 (No.2)  
ワークステーション : Agilent 1100 シリーズ クレスタション (Windows NT)  
デガッサ : G1322A 型  
送液ポンプ : G1311A 型 (クォータリポンプ, 分析用)  
                  G1311A 型 (クォータリポンプ, 濃縮用)  
オートサンプラ : G1313A 型  
カラムオープン : G1316A 型 (カラムスイッチングバルブ)  
フォトダイオードアレイ検出器 : G1315B 型

### (条件)

|                |                                     |   |
|----------------|-------------------------------------|---|
| カラム :          | 分析用                                 | GLサイエンス製 Inertsil ODS-3V 5 $\mu$ m 4.6mm i.d. $\times$ 150mm            |
|                | 濃縮用                                 | GLサイエンス製 Inertsil ODS-3 5 $\mu$ m 4mm i.d. $\times$ 10mm                |
| カラムオープン :      | 40 $^{\circ}$ C                     |   |
| 溶離液 :          | 分析用                                 | アセトニトリル/0.1% リン酸 = 25/75 (v/v)  |
|                | 濃縮用                                 | アセトニトリル/0.1% リン酸 = 10/90 (v/v)  |
| 流速 :           | 分析用                                 | 1.0mL/min   |
|                | 濃縮用                                 | 0 ~ 3 min 2.5 mL/min<br>3 ~ 13 min 0.05mL/min<br>13 ~ 15 min 2.5 mL/min |
| カラムスイッチングバルブ : | 0min (濃縮側), 3min (分析側), 13min (濃縮側) |   |
| 測定波長 :         | 247nm                               |   |
| 試料注入量 :        | 20 $\mu$ L                          |   |

## 3 検量線

アセトニトリルを用い, 0, 0.0500~50.0 mg/Lの標準溶液を調製した。この標準溶液を一定量採取し等量の精製水で希釈したものをHPLC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, 0.999と良好であった。作成した検量線をFigure A-2-1に示した。

## 4 検出限界

最小検出ピーク面積を0.1count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

分析前処理は「1 試験液の分析方法」に示したように, 試験液を採取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<br>(mg/L) | Peak Area<br>(Count) |
|-----|-------------------------|----------------------|
| 1   | 0                       | 0                    |
| 2   | 0.0500                  | 0.5                  |
| 3   | 0.100                   | 1.0                  |
| 4   | 0.200                   | 1.9                  |
| 5   | 0.500                   | 4.7                  |
| 6   | 1.00                    | 10.2                 |
| 7   | 2.00                    | 20.7                 |
| 8   | 5.00                    | 49.0                 |
| 9   | 10.0                    | 97.3                 |
| 10  | 20.0                    | 194.5                |
| 11  | 50.0                    | 443.2                |

$$Y = 9.02X$$

$$r = 0.999$$

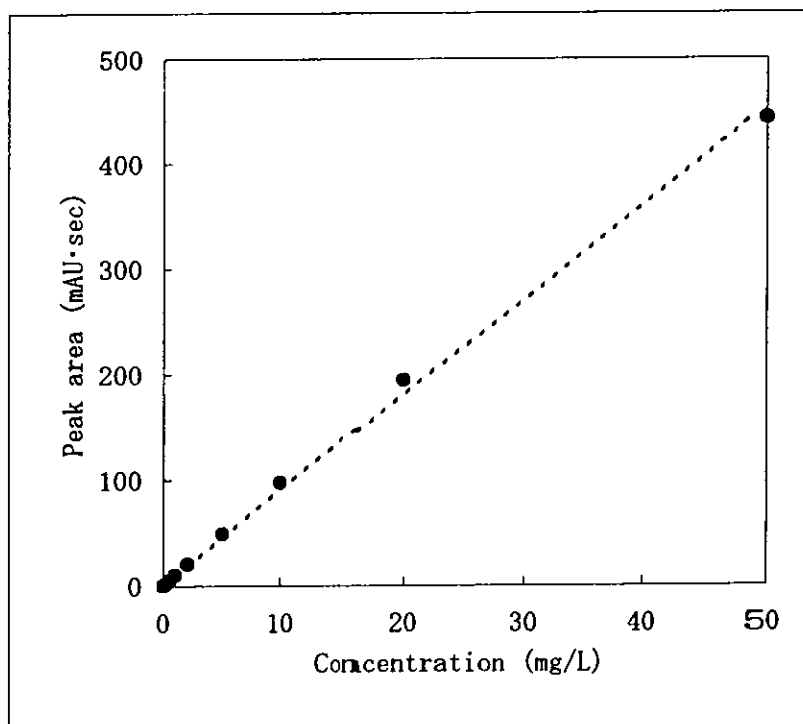
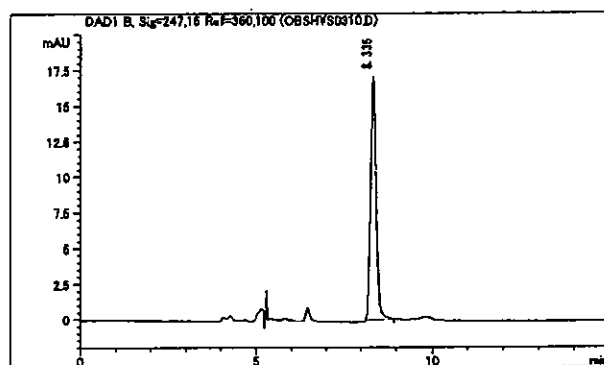


Figure A-2-2 Representative chromatograms

(1) Standard 20.0 mg/L ; 0 Hour

注入日 : 2003/03/10  
 試験番号, 名称 : A020358 OBSH  
 分析ロット : OBSH M  
 サンプル名 : std20mg/L  
 シーンサイン :  
 バイア No. : 10  
 注入 No. :  
 注入量 : 20 μl  
 測定 内ベータ :

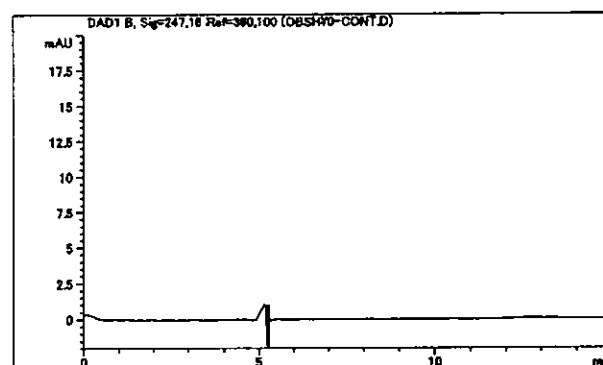


| 面積パーセントレポート |          |     |         |            |          |      |
|-------------|----------|-----|---------|------------|----------|------|
| ピーク         | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [mAU*s] | 高さ [mAU] | 面積 % |
| 1           | 8.335    | MM  | 0.187   | 192.9      | 17.2     | 100  |
| トータル:       |          |     |         | 192.9      | 17.2     |      |

\*\*\* End of Report \*\*\*

(2) Control ; 0 Hour

注入日 : 2003/03/10  
 試験番号, 名称 : A020358 OBSH  
 分析ロット : OBSH M  
 サンプル名 : f1s0hrcon1  
 シーンサイン :  
 バイア No. : 102  
 注入 No. :  
 注入量 : 20 μl  
 測定 内ベータ :



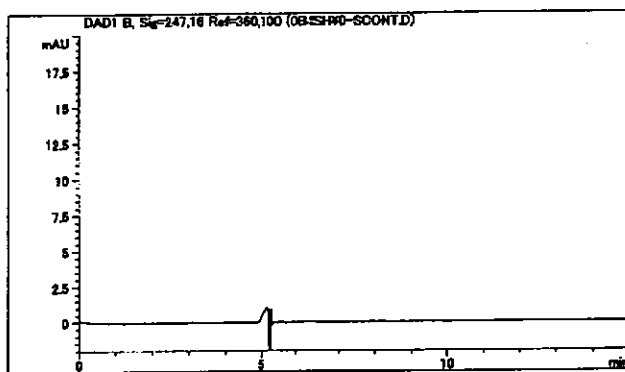
| 面積パーセントレポート |          |     |         |            |          |      |
|-------------|----------|-----|---------|------------|----------|------|
| ピーク         | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [mAU*s] | 高さ [mAU] | 面積 % |
| 1           | 8.335    | MM  | 0.187   | 192.9      | 17.2     | 100  |
| トータル:       |          |     |         | 192.9      | 17.2     |      |

\*\*\* End of Report \*\*\*

Figure A-2-2 Continued

(3) Solvent control ; 0 Hour

注入日 : 2003/08/10 シナジシン : 4  
 試験番号, 名称 : A020358 OESH ハイプ No. : 103  
 分析ロット : OESH M 注入 No. : 1  
 サンプル名 : fiso0hrs.con1 注入量 : 20 µl  
 測定 バレナ :



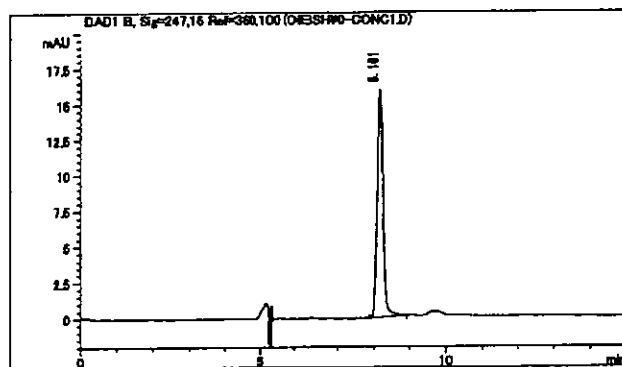
面積パーセントレポート

| ピーク # | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [mAU*s] | 高さ [mAU] | 面積 % [%] |
|-------|----------|-----|---------|------------|----------|----------|
| トータル: |          |     |         |            |          |          |

\*\*\* End of Report \*\*\*

(4) 20.0 mg/L nominal ; 0 Hour

注入日 : 2003/08/10 シナジシン : 5  
 試験番号, 名称 : A020358 OESH ハイプ No. : 104  
 分析ロット : OESH M 注入 No. : 1  
 サンプル名 : fiso0hrconc1 注入量 : 20 µl  
 測定 バレナ :



面積パーセントレポート

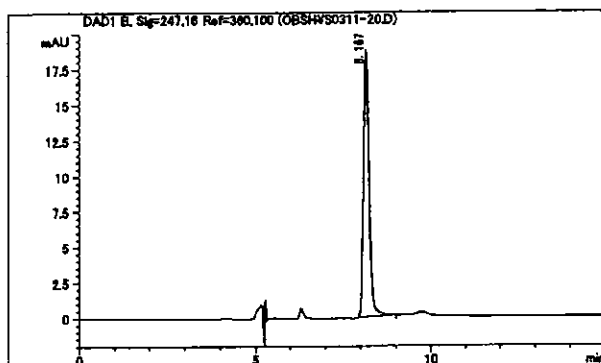
| ピーク # | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [mAU*s] | 高さ [mAU] | 面積 % [%] |
|-------|----------|-----|---------|------------|----------|----------|
| 1     | 8.161    | MM  | 0.190   | 182.2      | 18.0     | 100      |
| トータル: |          |     |         | 182.2      | 18.0     |          |

\*\*\* End of Report \*\*\*

Figure A-2-2 Continued

(5) Standard 20.0 mg/L ; 24 Hours

注入日 : 2003/03/11 シーンスイッチ : 1  
 試験番号, 名称 : A020358 OBSEH バイプ No. : 101  
 分析ロット : OBSEH M 注入 No. : 1  
 サンプル名 : std20mg/L 注入量 : 20  $\mu$ l  
 測定 4ペーラ :

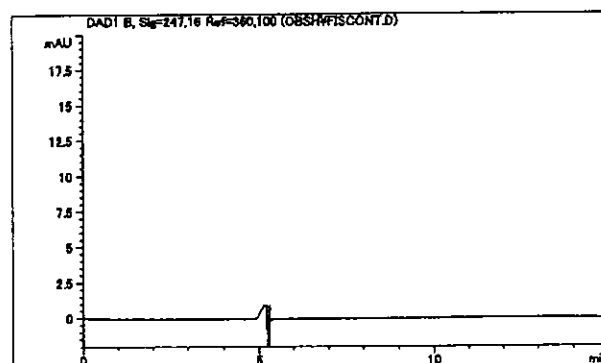


| 面積パーセントレポート |          |     |         |            |          |      |
|-------------|----------|-----|---------|------------|----------|------|
| ピーク #       | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [mAU*s] | 高さ [mAU] | 面積 % |
| 1           | 8.167    | NM  | 0.180   | 204.3      | 18.9     | 100  |
| トータル:       |          |     |         | 204.3      | 18.9     |      |

\*\*\* End of Report \*\*\*

(6) Control ; 24 Hours

注入日 : 2003/03/11 シーンスイッチ : 13  
 試験番号, 名称 : A020358 OBSEH バイプ No. : 113  
 分析ロット : OBSEH M 注入 No. : 1  
 サンプル名 : fisolcont 注入量 : 20  $\mu$ l  
 測定 4ペーラ :



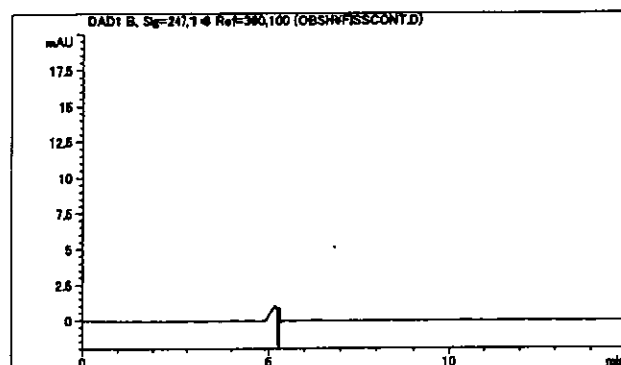
| 面積パーセントレポート |          |     |         |            |          |      |
|-------------|----------|-----|---------|------------|----------|------|
| ピーク #       | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [mAU*s] | 高さ [mAU] | 面積 % |
| トータル:       |          |     |         |            |          |      |

\*\*\* End of Report \*\*\*

Figure A-2-2 Continued

(7) Solvent control ; 24 Hours

注入日 : 2003/03/11 シナシイン : 14  
 試験番号 : A020358 OBSB ハイム No. : 114  
 分析ロット : OBSB II 注入 No. : 1  
 サンプル名 : fisolcis.conc 注入量 : 20 µl  
 測定オペレータ :



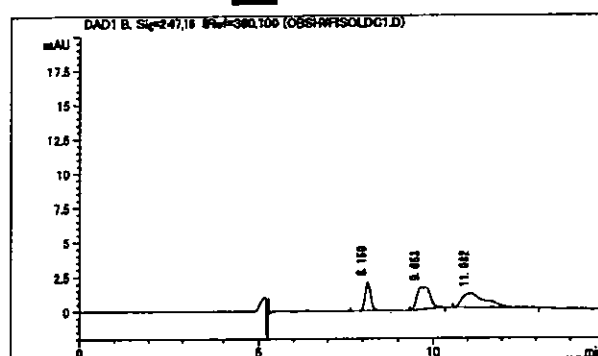
面積パーセントレポート

| ピーク # | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [mAU*s] | 高さ [mAU] | 面積 % |
|-------|----------|-----|---------|------------|----------|------|
| トータル: |          |     |         |            |          |      |

\*\*\* End of Report \*\*\*

(8) 20.0 mg/L nominal ; 24 Hours

注入日 : 2003/03/11 シナシイン : 15  
 試験番号 : A020358 OBSB ハイム No. : 115  
 分析ロット : OBSB II 注入 No. : 1  
 サンプル名 : fisolcis.conc 注入量 : 20 µl  
 測定オペレータ :



面積パーセントレポート

| ピーク # | RT [min] | タイプ | 幅 [min] | 面積 [mAU*s] | 高さ [mAU] | 面積 % |
|-------|----------|-----|---------|------------|----------|------|
| 1     | 8.150    | BB  | 0.185   | 23.4       | 2.1      | 19   |
| 2     | 9.653    | MM  | 0.449   | 43.6       | 1.9      | 38   |
| 3     | 11.082   | MM  | 0.834   | 52.6       | 1.1      | 44   |
| トータル: |          |     |         | 119.6      | 4.7      |      |

\*\*\* End of Report \*\*\*