



受付番号	662-06-E-4227
試験番号	94227

最終報告書

13F-SFMAのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

2007年7月26日

財団法人化学物質評価研究機構



久留米事業所

本文書は正本を正確に転写したものです。

財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所

2007年7月26日

試験責任者

松浦 武

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 ダイキン工業株式会社

試験の表題 13F-SFMA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 94227

上記試験は以下のGLPに従って実施したものです。

- (1) 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」
- (2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

試 験 責 任 者

2007年7月26日

松浦 武

松浦 武

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 ダイキン工業株式会社

試験の表題 13F-SFMA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 94227

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2007年6月18日	2007年6月18日
試験計画書	2007年6月18日	2007年6月18日
溶解度測定	2007年6月20日	2007年6月22日
	2007年6月21日	2007年6月22日
暴露開始時、暴露開始後	2007年6月19日	2007年6月22日
	2007年6月20日	2007年6月22日
	2007年6月22日	2007年6月22日
生データ、最終報告書草案	2007年7月21日	2007年7月24日
最終報告書	2007年7月26日	2007年7月26日

2007年7月26日

信頼性保証部門責任者

白石圭二

白石圭二

目 次

	頁
表 題	1
試験委託者	1
試験施設	1
試験目的	1
試験法	1
適用 GLP	1
試験日程	2
試験資料の保管	2
試験関係者	3
最終報告書の承認	3
要 約	4
1. 被 験 物 質	6
2. 供 試 試 料	7
3. 試験材料と方法	8
4. 試験結果及び考察	12
5. 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	14
6. 試験計画書から逸脱した事項	14

試験結果の表

- 表1 遊泳障害率
- 表2 観察された症状
- 表3-1 試験液の溶存酸素濃度
- 表3-2 試験液のpH
- 表3-3 試験液の水溫
- 表4 オオミジンコに対するEC₅₀

付属資料1 試験用水の水質

付属資料2 被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）濃度の分析方法及び測定結果

付属資料3 検量線及びクロマトグラム

付属資料4 試験用水への溶解度

別添資料 予備試験結果

表 題	13F-SFMAのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験
試験委託者	ダイキン工業株式会社 (〒566-8585) 大阪府摂津市西一津屋1番1号
試験施設	財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所 (〒839-0801) 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号
試験目的	13F-SFMAのミジンコ類に対する短期的影響を調べる。
試験法	本試験は以下の試験法及びガイダンス文書に従って行った。 (1)「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日、薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環保企発第031121002号)に規定する〈ミジンコ急性遊泳阻害試験〉 (2)「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める“ <i>Daphnia</i> sp., Acute Immobilisation Test (Guideline 202, April 13, 2004)” (3)「OECD Guidance Document 23 “Guidance Document on Aquatic Toxicity Testing of Difficult Substances and Mixtures”」(September 2000)
適用 GLP	本試験は以下の基準を適用した。 (1)「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号)に規定する「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準」 (2)「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

試験日程

試験開始日	2007年6月18日
実験開始日	2007年6月20日
溶解度測定開始日	2007年6月20日
生物暴露開始日	2007年6月20日
実験終了日	2007年6月22日
溶解度測定終了日	2007年6月21日
生物暴露終了日	2007年6月22日
試験終了日	2007年7月26日

試験資料の保管

(1) 被験物質

供試試料^{*1}を保管用容器に入れ密栓後、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（以下「化審法」と記す）第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、または品質低下をおこさないで安定に保管しうる期間のいずれか短い方の期間、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または廃棄に際しては試験委託者と協議の上決定する。

*1 試験番号94226、94227及び94228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、試験委託書、被験物質調査票、その他必要な資料等は最終報告書と共に、化審法第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後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。

試験関係者

試験責任者

松浦 武所属 試験第四課

生物試験担当者

田中真里子廣尾ゆみか

分析試験担当者

安達竜太鏡山知世井上仁美杉本弘子小野美香

最終報告書の承認

2007年7月26日

試験責任者

松浦 武

松浦 武

要 約

試験の表題

13F-SFMAのオオミジンコによる48時間急性遊泳阻害試験

試験条件

- | | |
|------------------------------------|--|
| (1) 被 験 物 質 | 13F-SFMA |
| (2) 試 験 生 物 | オオミジンコ (<i>Daphnia magna</i>) |
| (3) 暴 露 期 間 | 48時間 |
| (4) 試 験 濃 度 | 被験物質分散懸濁液（設定添加濃度：100mg/L）の中層採取液及び対照区 |
| (5) 試 験 生 物 数 | 20頭／試験区（5頭／試験容器） |
| (6) 試 験 用 水 | 脱塩素水道水 |
| (7) 試 験 方 式 | 半止水式（24時間後に換水）、密閉系 |
| (8) 試 験 液 の 調 製 | 供試試料を100mg/L（設定）になるように添加後、密栓し、約24時間攪拌した被験物質分散懸濁液を約1時間静置して採取した中層液を用いて調製 |
| (9) 連 数 | 4連／試験区 |
| (10) 試 験 液 量 | 約1000mL／試験区（約250mL／試験容器） |
| (11) 水 温 | 20±1℃ |
| (12) 照 明 | 室内灯、16時間明／8時間暗 |
| (13) 給 餌 | 無給餌 |
| (14) エアレーション | なし |
| (15) 試験液中の被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）の分析 | GC法（暴露開始時、換水前後及び暴露終了時） |

試験結果

(1) 被験物質の試験用水への溶解度 (20±1℃)	0.0587mg/L
(2) 試験液中の被験物質濃度 (対調製時濃度)	暴露開始時及び換水後 0.0508及び0.0426mg/L 換水前及び暴露終了時 0.0299及び0.0308mg/L (59.0及び72.3%)
(3) 試験液中の13F-EtOH濃度	暴露開始時及び換水後 <0.00592mg/L (定量下限値未満) 換水前及び暴露終了時 0.00606及び0.00647mg/L
(4) 48時間EC ₅₀ (半数遊泳阻害濃度)	>0.0376mg/L

[(4)は、測定した被験物質濃度の幾何平均値に基づく値]

結論

本試験は、被験物質の試験用水への溶解度付近における試験生物への影響の有無を確認するための限度試験として実施した。その結果、試験液調製時における被験物質濃度は溶解度付近であり、その条件下で試験生物に何ら影響はみられなかったことから、被験物質は溶解度付近の濃度において試験生物に対して急性的な影響を及ぼさないと判断された。

1. 被験物質

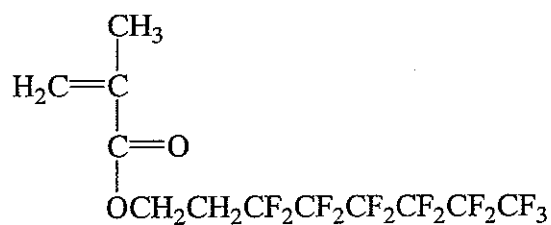
本最終報告書において13F-SFMAは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名称*2

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクチル=メタクリレート

1.2 構造式等*2

構造式



分子式 $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{F}_{13}\text{O}_2$

分子量 432.18

CAS番号 2144-53-8

*2 試験委託者提供資料による。

2. 供試試料

2.1 供給者及びロット番号^{*2}

供給者	ダイキン工業株式会社
ロット番号	6Y002

2.2 純度^{*2}

被験物質	99.8%
不純物	不明成分 0.2%

2.3 被験物質の確認

試験委託者提供の赤外吸収スペクトルと久留米事業所の当該測定スペクトルが一致することを確認した。

2.4 物理化学的性状^{*2}

常温における性状	無色透明液体	
沸点	92°C (8mmHg)	
密度	1.496g/cm ³ (25°C)	
溶解度	水	不溶
	ジメチルスルホキシド	可溶 (任意に混合)
	アセトン	可溶 (任意に混合)

*2 試験委託者提供資料による。

2.5 保管条件及び保管条件下での安定性確認

保管条件	室温暗所保存
安定性確認	実験開始前及び終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した結果、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した。

3. 試験材料と方法

3.1 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（ $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ）及び明暗周期（16時間明／8時間暗）下で14日間以上飼育したものの（21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0.1～0.2mgC（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（2007年4月9日～4月11日）したニクロム酸カリウム（和光純薬工業製 試薬特級）の急性遊泳阻害試験の48時間EC₅₀は0.270mg/Lであった。この値は久留米事業所におけるバックグラウンドデータの規定範囲内（平均 $\pm 2 \times$ 標準偏差：0.122～0.350mg/L）であった〔平均 \pm 標準偏差は $0.236 \pm 0.057\text{mg/L}$ （n=58）〕

(4) 幼体の選別

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。

3.2 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。定期的に測定した試験用水の水質測定結果を付属資料1に示す。

3.3 試験器具及び装置

(1) 試験器具

試験容器：腰高シャーレ（内径8.0cm、深さ5.0cm）

また、ほこりの混入や試験液の揮発を防ぐためガラス製の蓋をし、密閉した。

(2) 試験装置

恒温槽：プラスチック製水槽

加熱・冷却ユニット（佐藤工芸製 HCA250）

3.4 試験条件

(1) 暴露条件

(a) 方式

被験物質を含む試験液へ試験生物を暴露した。

試験は暴露開始24時間後に試験液の全量を交換する密閉系の半止水式で行った。

(b) 期間

48時間

(c) 試験濃度

予備試験の結果から試験用水への溶解度付近で試験生物に対して無影響と予測されたため、本試験では約24時間攪拌して調製した被験物質分散懸濁液（設定添加濃度：100mg/L）の中層採取液のみの限度試験を行った。予備試験結果を別添資料に示す。

(d) 対照群

被験物質を含まない試験用水に試験液と同様の攪拌処理をした対照区を設けた。

(e) 連数

4連／試験区

(f) 試験生物数

20頭／試験区（5頭／試験容器）

(g) 試験液量

約1000mL／試験区（約250mL／試験容器）

(2) 環境条件

(a) 水 温

20±1℃

(b) 溶存酸素濃度

試験は暴露期間を通して溶存酸素濃度として3mg/L以上で行った。また、暴露期間中、エアレーションは行わなかった。

(c) pH

試験はpHを調整せずに行った。

(d) 照 明

室内灯による16時間明／8時間暗

(e) 給 餌

暴露期間中、給餌を行わなかった。

3.5 試験液の調製法

調製時に純度補正は行わなかった。また、供試試料は密度 [1.496g/cm³ (25℃)] を用いて容量による添加を行った。

三角フラスコ内に試験用水を満たし、供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計（Eppendorf社製）により100mg/L（設定）になるように水面下で添加後、直ちに気相が無いように密栓した。その後、20±1℃の条件下でマグネティックスターラーにより約24時間緩やかに攪拌して被験物質分散懸濁液を調製した。攪拌停止後、約1時間静置して採取した中層液を試験液とし、各試験容器に分割後、直ちにガラス製の蓋により気相が無いように密閉した。

3.6 観察と測定

(1) 試験生物の状態

暴露開始24及び48時間後に遊泳障害及び症状を観察した。試験容器を穏やかに動かした後、15秒間一度も泳げない場合を遊泳障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換水前（24時間後）に観察した。

(3) 水 質

試験液の溶存酸素濃度、pH及び水温を暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に（調製時及びその24時間後を1セットとして2セット）測定した。調製時は調製容器より別途分取した試験液について測定し、その24時間後は各試験区につき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（YSI Incorporated製 YSI MODEL 58）、pHはガラス電極式水素イオン濃度計（東亜ディーケーケー製 HM-21P）、水温は検定済ガラス製棒状温度計で測定した。

(4) 試験液中の被験物質濃度

被験物質濃度の測定は、暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に（調製時及びその24時間後を1セットとして2セット）行った。また、本被験物質は加水分解により2-(ペルフルオロヘキシル)エタノール(略称 13F-EtOH, 試験番号94232~94234の被験物質)を生成するため、被験物質の濃度測定と同時に13F-EtOH濃度の測定を行った。調製時の測定用試験液は調製容器より別途分取したものをを用いた。その24時間後の測定用試験液は各試験区の試験容器の中層からそれぞれ均等量採取し、混合したものをを用いた。被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）濃度の分析はガスクロマトグラフィー（GC）により行った。被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）濃度の分析方法及び測定結果を付属資料2、検量線及びクロマトグラムを付属資料3に示す。

(5) 試験用水への溶解度

被験物質の試験用水への溶解度は100mg/L未満と予想されたため、本試験では試験用水への溶解度を測定した。溶解度測定の詳細及び測定結果を付属資料4に示す。

3.7 EC₅₀^{*3}の算出法

試験濃度で50%以上の遊泳阻害率が得られなかったため、EC₅₀は「>試験濃度」と表示した。

なお、結果の算出には試験濃度として暴露期間中に測定した試験液中の被験物質測定濃度の幾何平均値を用いた。

*3 EC₅₀ (Median Effective Concentration) : 暴露期間において試験生物の50%に影響を与える被験物質濃度を示す。影響の指標は遊泳阻害による。

3.8 有効性基準

- (1) 暴露期間中において対照群の遊泳阻害率が10%を超えてはならない。
- (2) 暴露期間中において10%を超える対照群のミジンコが脱色、水面に浮いているなどの異常な症状、行動を示してはならない。
- (3) 溶存酸素濃度は暴露終了時において、3mg/L以上でなければならない。

3.9 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則Bに従った。

4. 試験結果及び考察

4.1 遊泳阻害率

暴露期間中、試験濃度において試験生物の遊泳阻害は認められなかった。24及び48時間での遊泳阻害率を表1に示す。なお、暴露期間中の対照群において異常な症状や行動（脱色、水面に浮くなど）を示した個体はみられず、遊泳阻害率は0%であり、ともに有効性基準（10%を超えない）を満たしていた。

4.2 症状等の観察結果

対照群において、症状は認められなかった。

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、試験濃度において試験生物に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表2に示す。

4.3 試験液の観察と測定結果

(1) 試験液の状態

暴露開始時は無色透明であった。換水前も同様であった。

(2) 試験液の水質

暴露期間中に測定した溶存酸素濃度は8.2~8.4mg/L、pHは7.7~7.8、水温は19.8~20.0℃であった。試験液の水質を表3-1、3-2及び3-3に示す。なお、溶存酸素濃度は有効性基準（暴露終了時において3mg/L以上）を満たしていた。

(3) 試験液中の被験物質濃度

測定した試験液中の被験物質濃度は、暴露開始時及び換水後では0.0508及び0.0426mg/L、換水前及び暴露終了時は0.0299及び0.0308mg/Lであり、調製時に対してそれぞれ59.0及び72.3%であった。また、測定した試験液中の13F-EtOH濃度は、暴露開始時及び換水後では<0.00592mg/L（定量下限値未満）、換水前及び暴露終了時は0.00606及び0.00647mg/Lであった。被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）濃度の測定結果を付属資料2に示す。

4.4 EC₅₀

13F-SFMAのオオミジンコに対する24及び48時間EC₅₀は>0.0376mg/L（測定した被験物質濃度の幾何平均値）であった。各時間でのEC₅₀を表4に示す。

4.5 考 察

本試験は被験物質の試験用水への溶解度付近における試験生物への影響の有無を確認する限度試験として行った。暴露期間中に測定した試験液調製時の被験物質濃度において、本試験と併行して測定した溶解度（0.0587mg/L）と比較して低い値（0.0426mg/L）となったものもあるが、溶解度の個別の測定結果には幅があり、その中には0.0402mg/Lという測定結果も含まれていたため、試験液調製時の被験物質濃度は概ね溶解度付近であったと判断した。調製24時間後には被験物質濃度が低下したが、本試験では濃度維持のために半止水式（24時間後に換水）を選択しているため、溶解度付近の試験として適切であったと判断した。上記の本試験条件下で試験生物に何ら影響がみられなかったことから、被験物質は溶解度付近の濃度において試験生物に対して急性的な影響を及ぼさないと判断された。一方、被験物質の加水分解物である13F-EtOHの濃度については暴露期間中に上昇傾向がみられ、<0.00592mg/L（定量下限値未満）~0.00647mg/Lの範囲で試験液中に存在したことが確認されたが、試験生物に何ら影響を及ぼさなかったことから加水分解物による影響は無かったと判断される。

5. 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。

6. 試験計画書から逸脱した事項

当該事項はなかった。

表1 遊泳阻害率

測定濃度*4 (mg/L)		遊 泳 阻 害 率 (%)			
		24時間		48時間	
		試験容器毎	試験区毎	試験容器毎	試験区毎
対照区	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	
0.0376	A	0	0	0	0
	B	0		0	
	C	0		0	
	D	0		0	

*4 測定した被験物質濃度の幾何平均値（以下測定濃度と表示する。）

表2 観察された症状

測定濃度 (mg/L)	観 察 結 果	
	24時間	48時間
対照区	—	—
0.0376	—	—

—は症状が認められなかったことを示す。

表3-1 試験液の溶存酸素濃度

測定濃度 (mg/L)	開始時	24時間後		終了時
		換水前	換水後	
対照区	8.2	8.4	8.3	8.3
0.0376	8.3	8.3	8.4	8.3

単位：mg/L

表3-2 試験液のpH

測定濃度 (mg/L)	開始時	24時間後		終了時
		換水前	換水後	
対照区	7.7	7.7	7.7	7.7
0.0376	7.8	7.7	7.7	7.7

表3-3 試験液の水温

測定濃度 (mg/L)	開始時	24時間後		終了時
		換水前	換水後	
対照区	19.8	20.0	20.0	20.0
0.0376	20.0	20.0	20.0	20.0

単位：℃

表4 オオミジンコに対するEC₅₀

暴露時間	EC ₅₀ (mg/L)	95%信頼限界 (mg/L) (回帰直線の傾き)	EC ₅₀ 算出法
24時間	>0.0376	— (—)	—
48時間	>0.0376	— (—)	—

—は得られなかったことを示す。

付属資料1

試験用水の水質

試験用水の水質 (採水日: 2007年1月9日)

項目	単位	検査結果	定量下限
全硬度 (CaCO ₃ として)	mg/L	41.9	0.1
浮遊物質	mg/L	< 1	1
pH値	—	7.9 (22℃)	—
有機体炭素	mg/L	0.2	0.1
化学的酸素要求量	mg/L	0.7	0.5
遊離塩素	mg/L	< 0.02	0.02
アンモニウム態窒素	mg/L	0.01	0.01
全シアン	mg/L	< 0.01	0.01
アルカリ度	mg/L	35	1
電気伝導率	mS/m	18.3	—
有機りん	mg/L	< 0.1	0.1
アルキル水銀	mg/L	< 0.0005	0.0005
総水銀	mg/L	< 0.0005	0.0005
カドミウム	mg/L	< 0.001	0.001
六価クロム	mg/L	< 0.02	0.02
鉛	mg/L	< 0.005	0.005
ヒ素	mg/L	< 0.001	0.001
ホウ素	mg/L	0.08	0.02
フッ素	mg/L	< 0.1	0.1
鉄	mg/L	< 0.01	0.01
銅	mg/L	< 0.005	0.005
コバルト	mg/L	< 0.001	0.001
マンガン	mg/L	< 0.01	0.01
亜鉛	mg/L	< 0.01	0.01
アルミニウム	mg/L	0.033	0.001
ニッケル	mg/L	< 0.001	0.001
銀	mg/L	< 0.0001	0.0001
硫酸イオン	mg/L	3.9	0.1
塩化物イオン	mg/L	16	1
ナトリウム	mg/L	14.3	0.01
カリウム	mg/L	3.7	0.01
カルシウム	mg/L	11.5	0.01
マグネシウム	mg/L	3.2	0.01
1,2-ジクロロプロパン	mg/L	< 0.0001	0.0001
クロロタロニル	mg/L	< 0.0001	0.0001
プロピザミド	mg/L	< 0.0001	0.0001
クロルニトロフェン	mg/L	< 0.0001	0.0001
シマジン	mg/L	< 0.001	0.001
チオベンカルブ	mg/L	< 0.0001	0.0001
ダイアジノン	mg/L	< 0.0001	0.0001
イソキサチオン	mg/L	< 0.0001	0.0001
フェニトロチオン	mg/L	< 0.0001	0.0001
EPN	mg/L	< 0.0001	0.0001
ジクロルボス	mg/L	< 0.0001	0.0001
イプロベンホス	mg/L	< 0.0001	0.0001
PCB	mg/L	< 0.0005	0.0005

付属資料2

被験物質及び $^{13}\text{F-EtOH}$ （加水分解物）濃度の分析方法及び測定結果

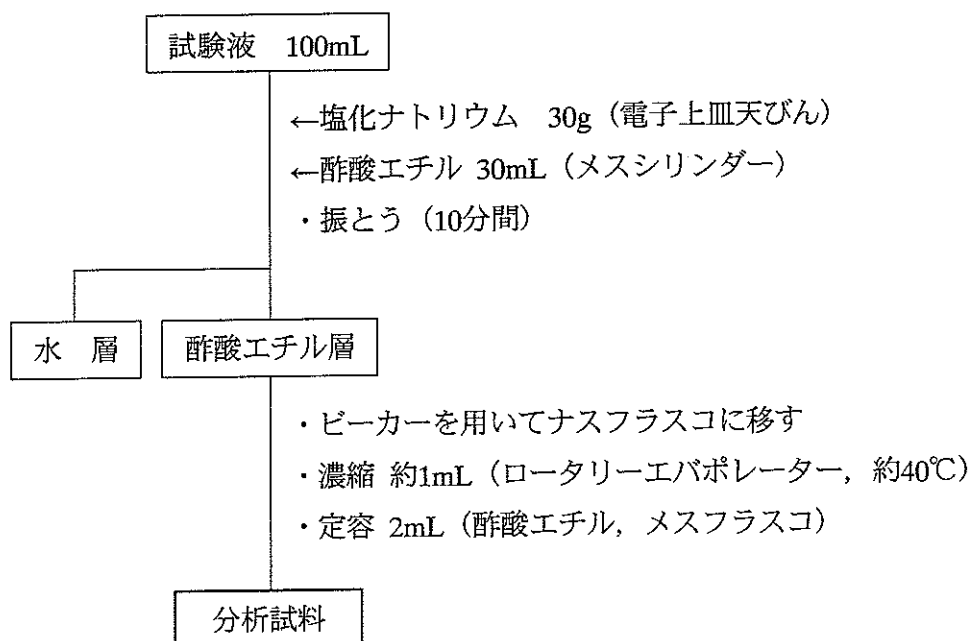
1. 試験液の分析

予備検討の結果より、暴露期間中に被験物質の加水分解生成物である13F-EtOHが生成するため、試験液の分析は、被験物質及び13F-EtOHについて実施した。

2. 試験液の前処理操作

採取した試験液について、以下のフロースキームにより前処理操作を行い、分析試料を調製した。

フロースキーム



3. 分析方法

前処理操作を行って得られた分析試料は、下記の定量条件に基づきガスクロマトグラフィー（GC）により被験物質及び13F-EtOH（加水分解物）の定量を行った。分析試料中の被験物質及び13F-EtOH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（一例）を付属資料3に示す。

定量条件

機 器	ガスクロマトグラフ
	Hewlett Packard製 HP 6890 Series GC System
自動試料導入装置	Hewlett Packard製 HP6890 Series
検 出 器	水素炎イオン化検出器（FID）
カ ラ ム	DB-WAX 膜厚 0.50 μ m（Agilent Technologies製）
	30m \times 0.32mmI.D. フューズドシリカ製
カラム温度	40 $^{\circ}$ C（5min） $\xrightarrow{\textcircled{1}}$ 150 $^{\circ}$ C（0min） $\xrightarrow{\textcircled{2}}$ 240 $^{\circ}$ C（2min）
昇温速度	①15 $^{\circ}$ C/min ②50 $^{\circ}$ C/min
試料導入部温度	200 $^{\circ}$ C
キャリアガス	ヘリウム
カラム流量	1.8mL/min
水 素	40.0mL/min
空 気	400mL/min
注 入 量	2 μ L
導 入 モード	スプリットレス
パージ流量	20.0mL/min
パージ時間	0.50min
検 出 器	
温 度	240 $^{\circ}$ C
感 度	レンジ2 $^{\circ}$

4. 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質及び $^{13}\text{F-EtOH}$ 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、標準溶液の調製はそれぞれ被験物質純度（99.8%）及び $^{13}\text{F-EtOH}$ 純度（99.8%）で補正して行った。

供試試料100.2mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、酢酸エチルに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。また、 $^{13}\text{F-EtOH}$ 分析用標品（試験番号94232～94234の供試試料）100.2mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、酢酸エチルに溶解して1000mg/Lの $^{13}\text{F-EtOH}$ 溶液を調製した。被験物質溶液を酢酸エチルで希釈する際に $^{13}\text{F-EtOH}$ 溶液を添加し、被験物質及び $^{13}\text{F-EtOH}$ 濃度がそれぞれ25.0mg/Lになるように被験物質及び $^{13}\text{F-EtOH}$ 溶液を調製した。これを酢酸エチルで希釈して被験物質及び $^{13}\text{F-EtOH}$ 濃度2.50mg/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被験物質及び $^{13}\text{F-EtOH}$ 濃度0.250、1.25、2.50及び5.00mg/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または $^{13}\text{F-EtOH}$ 濃度によりそれぞれ検量線を作成し、定量性を確認した。作成した検量線を付属資料3に示す。なお、被験物質の定量下限値は、定量性が確認された範囲内での最小の標準溶液濃度（0.250mg/L）とした。よって、試験液中の被験物質の定量下限値は前処理操作を考慮し0.00592mg/Lとした。また、 $^{13}\text{F-EtOH}$ の定量下限値は、定量性が確認された範囲内での最小の標準溶液濃度（0.250mg/L）とした。よって、試験液中の $^{13}\text{F-EtOH}$ の定量下限値は前処理操作を考慮し0.00592mg/Lとした。

6. 回収試験及びブランク試験

6.1 方 法

2.の試験液の前処理操作における被験物質の回収率を求めるため、脱塩素水道水に被験物質溶液（アセトンで調製）を添加し、回収試験を行った。また、同様に13F-EtOHの回収率を求めるため、脱塩素水道水に13F-EtOH溶液（アセトンで調製）を添加し、回収試験を行った。さらに、被験物質及び13F-EtOHを加えない脱塩素水道水（アセトンを添加）について、回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。回収試験及びブランク試験は、2点について実施した。

被験物質添加量 5.00 μ g、13F-EtOH添加量 5.00 μ g

6.2 結 果

6.1の方法により測定した結果、ブランク試験においてクロマトグラム上の被験物質及び13F-EtOH位置にはピークは認められなかった。分析操作における各2点の回収率及び平均回収率は下記に示すとおりであり、平均回収率を分析試料中の被験物質及び13F-EtOH濃度を求める場合の補正值とした。

分析操作における被験物質の回収率

82.1% 86.8% 平均 84.4%

分析操作における13F-EtOHの回収率

82.9% 86.0% 平均 84.5%

7. 測定結果

試験液中の被験物質及び¹³F-EtOH濃度の測定結果を以下の表に示す。

付表2-1 試験液中の被験物質濃度

設定添加濃度 (mg/L)	被験物質測定濃度 (mg/L) (対調製時濃度%)				
	暴露開始時	24時間後		暴露終了時	幾何平均値
		換水前	換水後		
対照区	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
100	0.0508	0.0299 (59.0)	0.0426	0.0308 (72.3)	0.0376

n.d. : <0.00592mg/L

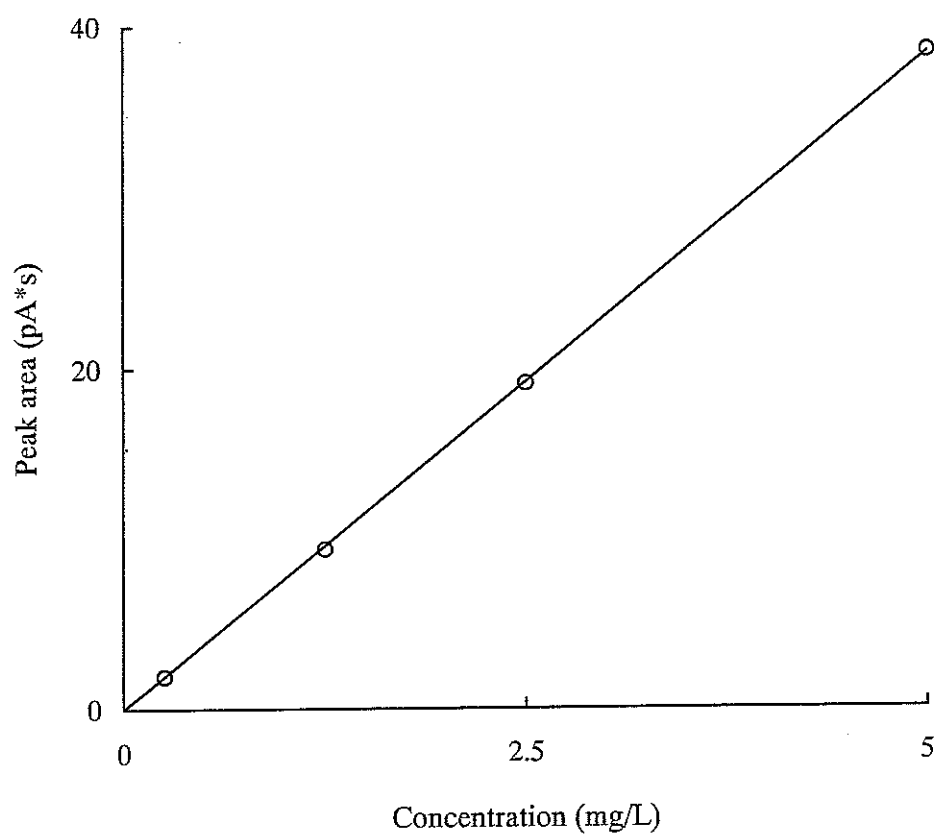
付表2-2 試験液中の¹³F-EtOH濃度

設定添加濃度 (mg/L)	¹³ F-EtOH測定濃度 (mg/L)			
	暴露開始時	24時間後		暴露終了時
		換水前	換水後	
対照区	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
100	n.d.	0.00606	n.d.	0.00647

n.d. : <0.00592mg/L

付属資料3

検量線及びクロマトグラム



$$y = 7.67x$$

$$r = 1.00$$

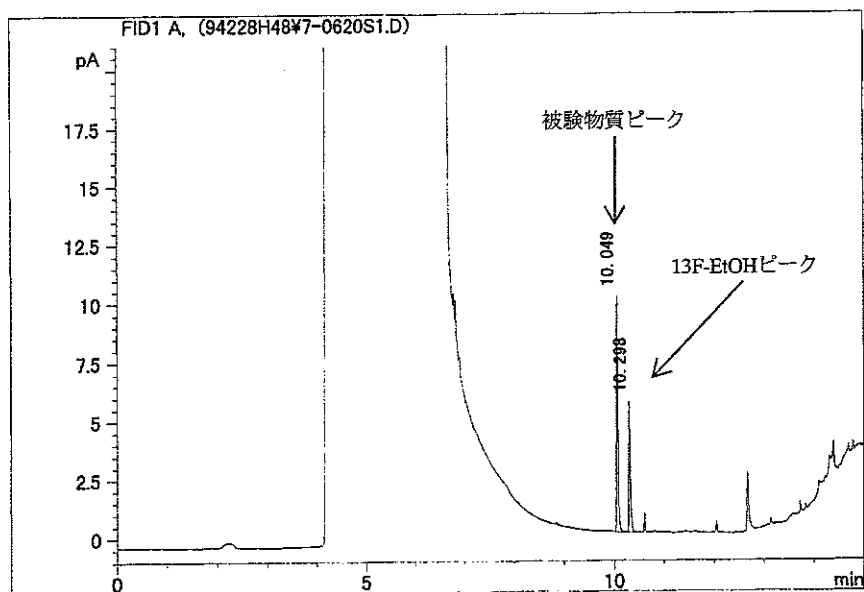
Concentration (mg/L)	Peak area (pA*s)
0.250	1.899
1.25	9.380
2.50	19.076
5.00	38.431

付図3-1 13F-SFMAのGCによる検量線

Standard solution 2.50mg/L

Study No. 94227

測定オペレータ : R. Adachi
 メソッド名 : C:\HPCHEM\1\METHODS\94226.M
 生データファイル名 : C:\HPCHEM\1\DATA\94228H48\7-0620S1.D
 サンプル名 : std 2.50mg/L



#	メインピーク面積	メインピーク高さ	実測 RT
1	19.163	10.072	10.049
2	12.324	5.593	10.298

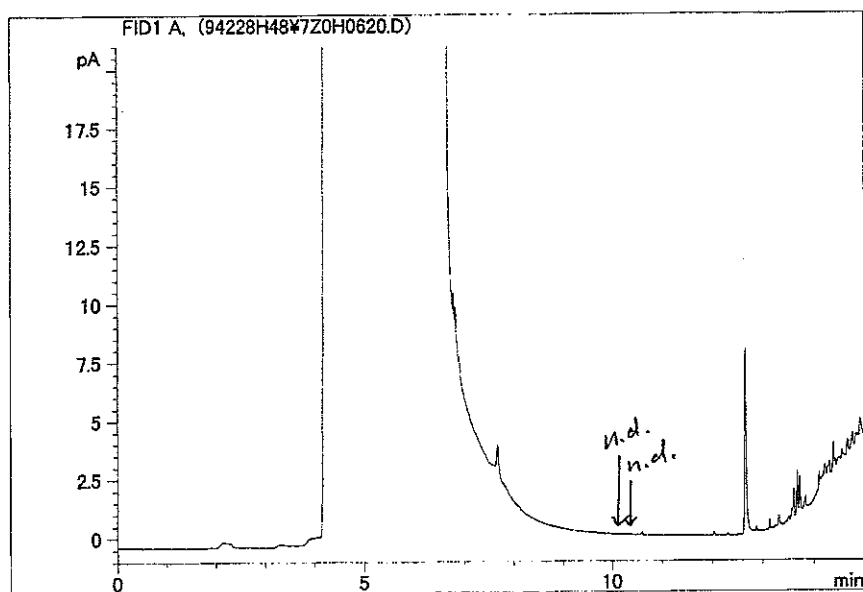


付図3-2-1 標準溶液のGCクロマトグラム (暴露開始時)

Control

Study No. 94227

測定オペレータ : R. Adachi
 メソッド名 : C:\MPCHEM\1\METHODS\94226.M
 生データファイル名 : C:\MPCHEM\1\DATA\94228H48\7ZOH0620.D
 サンプル名 : Cont. (*50)H0h



#	ピーク面積	ピーク高さ	実測 RT
---	-------	-------	-------

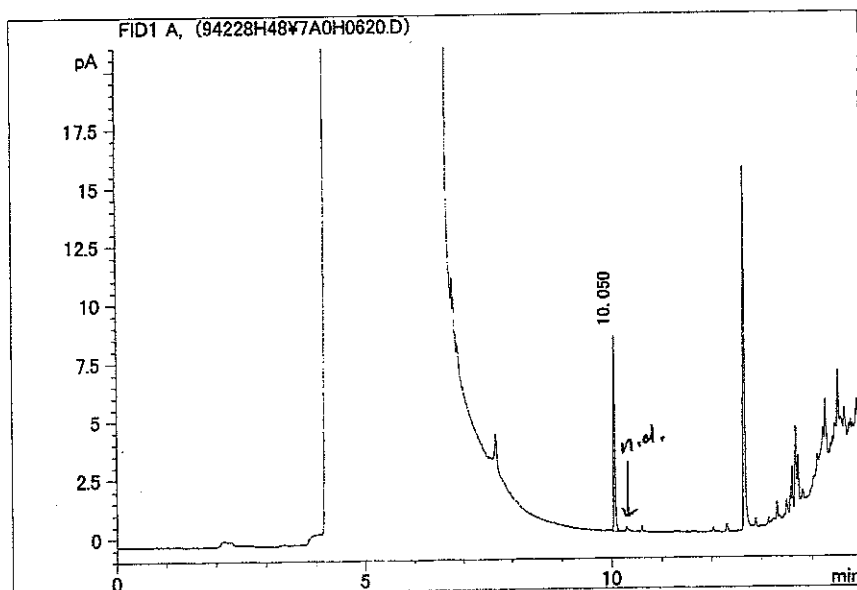


付図3-2-2 試験液のGCクロマトグラム (暴露開始時)

100mg/L (Nominal concentration)

Study No. 94227

測定オペレータ : R. Adachi
 メソッド名 : C:\VHPCHEM\1\METHODS\94228.M
 生データファイル名 : C:\VHPCHEM\1\DATA\94228H48\7A0H0620.D
 サンプル名 : 100 (*50) H0h



#	ピーク面積	ピーク高さ	実測 RT
1	16.417	8.396	10.050

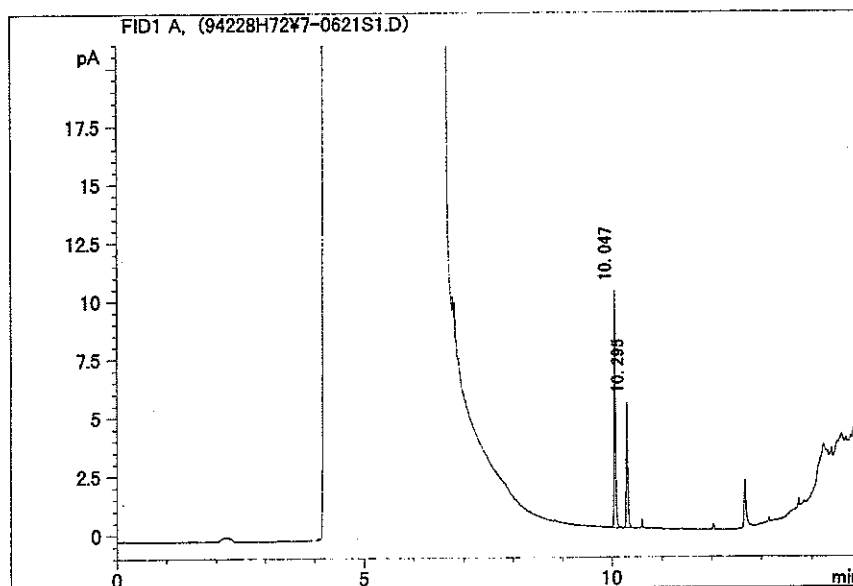


付図3-2-3 試験液のGCクロマトグラム (暴露開始時)

Standard solution 2.50mg/L

Study No. 94227

測定オペレータ : R. Adachi
 メソッド名 : C:\VHPCHEM\1\METHODS\94226.M
 生データファイル名 : C:\VHPCHEM\1\DATA\94228H72V7-0621S1.D
 サンプル名 : std 2.50mg/L



#	メインピーク面積	メインピーク高さ	実測 RT
1	19.099	10.163	10.047
2	12.214	5.349	10.295

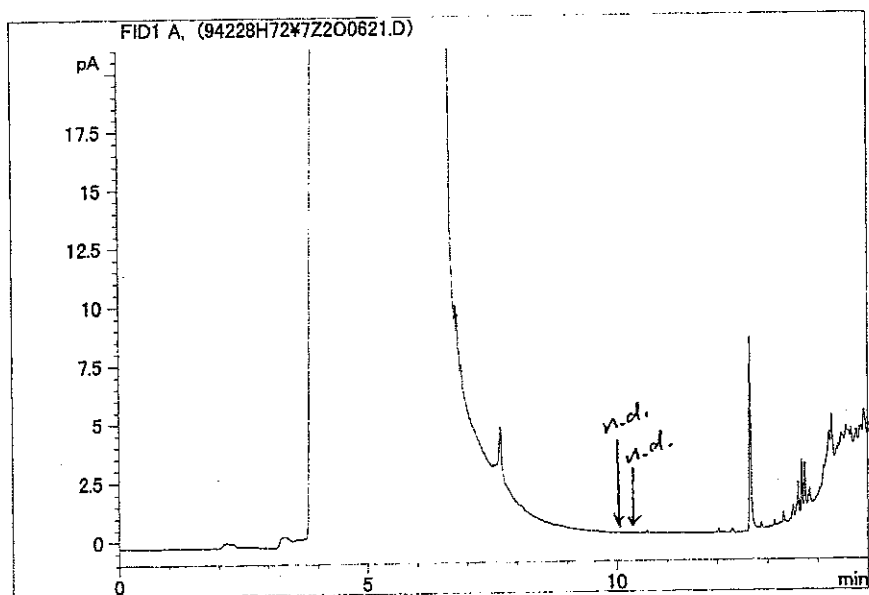


付図3-3-1 標準溶液のGCクロマトグラム (暴露24時間後換水前)

Control

Study No. 94227

測定オペレータ : R. Adachi
 メソッド名 : C:\MPCHEM\1\METHODS\94226.M
 生データファイル名 : C:\MPCHEM\1\DATA\94228H72\7Z200621.D
 サンプル名 : Cont. (*50)H24old



#	メインピーク面積	メインピーク高さ	実測 RT
---	----------	----------	-------

安達
07.6.22

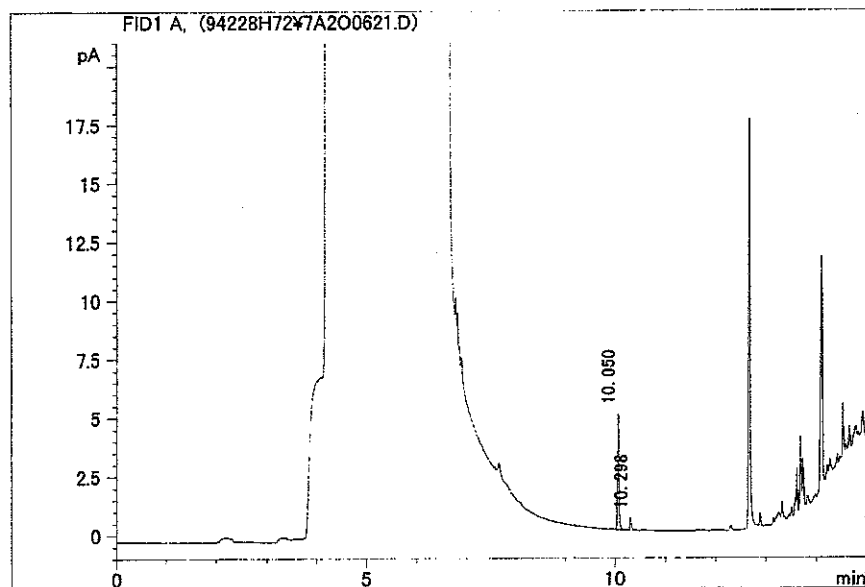
松浦
07.6.22
式

付図3-3-2 試験液のGCクロマトグラム (暴露24時間後換水前)

100mg/L (Nominal concentration)

Study No. 94227

測定オペレータ : R. Adachi
 メソッド名 : C:\HPCHEM\1\METHODS\94226.M
 生データファイル名 : C:\HPCHEM\1\DATA\94228H72\7A200621.D
 サンプル名 : 100(*50)H24old



#	メインピーク面積	メインピーク高さ	実測 RT
1	9.647	4.960	10.050
2	1.251	0.527	10.298



付図3-3-3 試験液のGCクロマトグラム (暴露24時間後換水前)

付属資料4

試験用水への溶解度

1. 表 題

試験用水への溶解度

2. 試験目的

生態毒性試験における被験物質の試験用水への溶解度を測定する。

3. 試験の概要

被験物質と試験用水を混合し、生態毒性試験と同様の温度条件下で24時間攪拌後、静置して試験液の中層を分析に用いた。

4. 試験の実施

4.1 試験装置及び器具

恒温槽：プラスチック製水槽

加熱・冷却ユニット（佐藤工業製 HCA250）

攪拌装置：マグネティックスターラー

容器：改良型ガラス製容器（全容量 約600mL）

4.2 試験条件

(1) 試験温度：20±1℃

(2) 分析回数：1回（攪拌24時間後）

(3) 試験用水：脱塩素水道水

(4) 試験連数：n=3（試料-1、試料-2及び試料-3とする）

4.3 試験操作

- (1) 供試試料と試験用水を約100mg/L*になるように改良型ガラス製容器にて混合し、気相のないように密閉して試験液とした。

* 供試試料の密度1.496g/cm³を用いて添加容量（40.1μL）を算出し、添加した。

- (2) 試験温度に設定された恒温槽中で、マグネティックスターラーにより緩やかに攪拌した。
- (3) 攪拌24時間後に試験液の攪拌を停止させ、恒温槽中にて約1時間静置した。
- (4) 静置後、被験物質及び予想される被験物質の加水分解生成物である13F-EtOHの定量分析を行った。

4.4 試験液の分析

(1) 試験液の前処理操作

改良型ガラス製容器の分取口から、シリンジで試験液の中層を慎重に採取した。採取した液について付属資料2の2.試験液の前処理操作のフロースキームにより前処理操作を行い、分析試料を調製した。

(2) 分析方法

付属資料2の3.分析方法参照。

4.5 標準溶液の調製

付属資料2の4.標準溶液の調製参照。

4.6 検量線の作成

付属資料2の5.検量線の作成参照。

4.7 回収試験及びブランク試験

付属資料2の6.回収試験及びブランク試験参照。

5. 試験結果

被験物質の試験用水への溶解度は0.0587mg/Lであった。また、同時に測定した¹³F-EtOH濃度は<0.00592mg/L（定量下限値未満）であった。測定結果を以下の表に示す。

付表4-1 攪拌24時間後の測定値（被験物質）

試料名	測定値 (mg/L)	算術平均値 (mg/L)
試料-1	0.0452	0.0587
試料-2	0.0906	
試料-3	0.0402	

付表4-2 攪拌24時間後の測定値（¹³F-EtOH）

試料名	測定値 (mg/L)	算術平均値 (mg/L)
試料-1	n.d.	n.d.
試料-2	n.d.	
試料-3	n.d.	

n.d. : <0.00592mg/L

別添資料

予備試験結果

1. 被験物質の試験用水への溶解度

被験物質の試験用水への溶解度が 100mg/L 未満であることが予想されたため、溶解度測定を検討を行った。なお、溶解度測定予備試験 2 は魚類急性毒性試験（試験番号 94228）にて実施したものである。

1) 溶解度測定予備試験1

(1) 内 容

被験物質は揮発性を有していることが疑われたため、改良型ガラス製容器に約 100mg/L 相当になるように供試試料と試験用水（脱塩素水道水）を混合して密閉し、試験条件下（ $20 \pm 1^\circ\text{C}$ ）にて 24 及び 48 時間緩やかに攪拌した後、約 1 時間静置して中層液を採取した。被験物質は、遠心分離やメンブランフィルターろ過を行うことで濃度低下することが判明していることから、不溶物除去のために遠心分離やメンブランフィルターろ過は行わなかった。採取した中層液は前処理操作を行い、ガスクロマトグラフィー（GC）により濃度分析を実施した（ $n=2$ ）。

(2) 結 果

設定添加濃度 (mg/L)	測定濃度 (mg/L)	
	攪拌 24 時間後	攪拌 48 時間後
約 100 (試料-1)	0.0400	—
約 100 (試料-2)	0.0351	—
約 100 (試料-3)	—	0.0404
約 100 (試料-4)	—	0.0324

被験物質の試験用水への溶解度は 0.03～0.05mg/L 付近と考えられた。

2) 溶解度測定予備試験2

(1) 内 容

被験物質は加水分解性を有していることが疑われたため、被験物質の溶解濃度測定と同時に、予想される加水分解生成物である 13F-EtOH（試験番号 94232～94234 の被験物質）の分析を行った。はじめに、改良型ガラス製容器に約 100mg/L 相当になるように供試試料と試験用水（脱塩素水道水）を混合して密閉し、魚類急性毒性試験の温度条件下（ $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ）にて 24 及び 48 時間緩やかに攪拌した後、約 1 時間静置して中層液を採取した。採取した中層液は前処理操作を行い、ガスクロマトグラフィー（GC）により被験物質及び 13F-EtOH の濃度分析を実施した（ $n=2$ ）。

(2) 結 果

被験物質濃度分析

設定添加濃度 (mg/L)	被験物質測定濃度 (mg/L)	
	攪拌 24 時間後	攪拌 48 時間後
約 100 (試料-1)	0.0218	—
約 100 (試料-2)	0.0303	—
約 100 (試料-3)	—	0.0351
約 100 (試料-4)	—	0.0221

13F-EtOH 濃度分析

設定添加濃度 (mg/L)	13F-EtOH 測定濃度 (mg/L)	
	攪拌 24 時間後	攪拌 48 時間後
約 100 (試料-1)	0.0157	—
約 100 (試料-2)	0.0162	—
約 100 (試料-3)	—	0.0364
約 100 (試料-4)	—	0.0283

被験物質の溶解濃度は 0.02~0.04mg/L 程度であり、24 及び 48 時間攪拌ではほぼ同様であった。また、被験物質の加水分解生成物である 13F-EtOH は、24 時間攪拌で 0.01~0.02mg/L、48 時間攪拌で 0.02~0.04mg/L 程度生成していた。

3) 被験物質の試験用水への溶解度検討結果のまとめ

被験物質は揮発性を有していることが疑われたため、溶解度測定用の飽和液の調製には改良型ガラス製容器を用い、攪拌は緩やかに行った。溶解度測定予備試験 1 の結果において、被験物質の試験用水への溶解度は 0.03~0.05mg/L 付近と考えられたが、溶解度予備試験 2 においては、脱塩素水道水に対して 0.02~0.04mg/L 程度しか溶解しておらず、攪拌条件や被験物質性状、濃度レベルなどを考慮すると、被験物質の試験用水への溶解度は 0.01~0.1mg/L 付近であると考えられた。また、溶解度測定予備試験 1 及び 2 の結果より、被験物質が 24 時間攪拌と 48 時間攪拌ではほぼ同様な溶解濃度を示すのに対し、溶解度測定予備試験 2 の結果より、13F-EtOH 濃度は 48 時間攪拌で 24 時間攪拌の約 2 倍となっており、13F-EtOH 生成量は増加傾向を示した。

以上の結果より、本試験では改良型ガラス製容器を使用することとし、被験物質が既に 48 時間攪拌時と同等以上に溶解しており、かつ生成した変化物が少ない 24 時間攪拌により溶解度測定を実施することとした。

2. 試験生物への影響

1) 予備試験

(1) 内 容

三角フラスコ内に試験用水を満たし、供試試料をプッシュボタン式液体用微量体積計（Eppendorf社製）により100mg/L相当になるように水面下で添加後、直ちに気相が無いように密栓した。その後、 $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ の条件下でマグネティックスターラーにより約48時間緩やかに攪拌して被験物質分散懸濁液を調製し、約1時間静置して中層を採取した。この中層採取液を試験液とし、密閉系で止水式及び半止水式（24時間後に換水）にて生物を暴露して影響を確認した。また、同時に試験液中の被験物質濃度の測定を行った。なお、供試試料は密度 $[1.496\text{g}/\text{cm}^3 (25^{\circ}\text{C})]$ を用いて容量による添加を行った。

(2) 結 果

設定濃度区 (mg/L)	24 時間		48 時間	
	遊泳阻害率 (%)	その他の症状	遊泳阻害率 (%)	その他の症状
100(止水)	0	—	0	—
100(半止水)	0	—	0	—

試験生物数：10 頭/試験区（5 頭/試験容器）、密閉系
—はその他の症状が観察されなかったことを示す。

設定濃度区 (mg/L)	測定濃度 (mg/L) (対開始時濃度 %)		
	暴露開始時	24時間後	暴露終了時 (48時間後)
100	0.0349	0.0215 (61.7)	0.0173 (49.6)

止水式及び半止水式とも生物への影響は何ら認められなかった。

暴露開始時の被験物質濃度は溶解度付近であったが、経時的な濃度低下が認められた。

2) 試験生物への影響（予備試験結果）のまとめ

化審法試験の試験上限濃度（100 mg/L）になるように供試試料と試験用水を混合後、約48時間攪拌して調製した被験物質分散懸濁液の中層採取液において試験生物に影響は認められなかった。本被験物質は揮発性が予測されたため、密閉系にて検討を行ったが、試験液中の被験物質濃度については減少傾向が認められたため、半止水式にて試験を行うこととした。

3. 予備試験結果（まとめ）

溶解度予備試験においては、被験物質は攪拌24時間で飽和濃度に達していると考えられた。また、被験物質の加水分解物（13F-EtOH）の生成が経時的に増加していくことが確認された。

生物への影響予備試験においては、通常的手法である攪拌48時間で調製した被験物質飽和溶液で試験生物に影響は認められなかった。しかしながら溶解度予備試験より、攪拌24時間で調製した被験物質飽和溶液と48時間での飽和溶液では被験物質の濃度は同程度であるのに対し、加水分解物は48時間での飽和溶液の方がより多く生成されていることが予想された。このため、本試験においては被験物質の飽和濃度（溶解濃度）が同等であれば加水分解物の生成がより少ない試験液を用いることが妥当であると判断し、攪拌時間24時間で調製した被験物質飽和液にて本試験を実施することとした。なお、試験生物への影響は攪拌時間24時間で調製した被験物質飽和液においても影響は認められないと推測された。

4. 本試験の実施

1) 試験用水への溶解度測定

溶解度測定予備試験結果から、試験用水への溶解度測定は、約100mg/Lとなるように供試試料と試験用水を混合後、密閉して20±1℃の条件下で24時間緩やかに攪拌した試験液を用いて実施した。不溶物除去としては、遠心分離やフィルター過等の手法は使用せず、攪拌停止後試験液を約1時間静置し中層液を採取することにより可能な限り不溶物を取り除くこととし、この試験液について被験物質濃度分析とともに被験物質の加水分解生成物である13F-EtOHの濃度分析を行った。

2) 本試験

予備試験の結果から試験用水への溶解度付近で無影響と予測されたため、本試験では試験法での試験上限濃度（100mg/L）を設定濃度とし、約24時間攪拌して調製した被験物質分散懸濁液の中層採取液のみで密閉系にて試験を行った。試験液の調製については、三角フラスコ内に試験用水を満たし、供試試料をプッシュ

ボタン式液体用微量体積計により100mg/L（設定）になるように添加（密度換算による容量添加）後、直ちに気相が無いように密栓し、その後、 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ の条件下でマグネティックスターラーにより約24時間攪拌して被験物質分散懸濁液を調製した。攪拌停止後、約1時間静置して採取した中層液を試験液とした。なお、調製時に純度補正は行わなかった。被験物質及び $^{13}\text{F-EtOH}$ 濃度の測定は、暴露開始時、換水前後及び暴露終了時に行った。