



受付番号	642-06-S-4820
試験番号	44820

最終報告書

13F-AcOHのコイにおける濃縮度試験

2007年6月20日

財団法人化學物質評価研究機構



本文書は正本を正確に転写したものです。

財団法人 化學物質評価研究機構 久留米事業所

2007年6月20日

試験責任者

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-AcOHのコイにおける濃縮度試験

試験番号 44820

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。

2007年6月20日

試験責任者

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-AcOHのコイにおける濃縮度試験

試験番号 44820

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4月6日	2007年4月6日
試験計画書	2007年4月6日	2007年4月6日
急性毒性試験	2007年4月10日	2007年4月10日
脂質含量測定時	2007年4月16日 2007年4月17日	2007年4月17日
原液調製操作時	2007年4月17日	2007年4月17日
試験水分析操作時	2007年4月18日	2007年4月18日
供試魚分析操作時	2007年4月20日	2007年4月20日
生データ、最終報告書草案	2007年6月19日	2007年6月20日
最終報告書	2007年6月20日	2007年6月20日

2007年6月20日

信頼性保証部門責任者

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
試資料の保管	2
試験関係者	2
最終報告書の承認	2
要 約	3
1. 被 験 物 質	4
2. 供 試 試 料	5
3. 急 性 毒 性 試 験 の 実 施	6
4. 濃 縮 度 試 験 の 実 施	9
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	23
6. 試験結果	24
7. 備 考	25

Tables

- Table-1 試験水中の被験物質濃度 [本文中記載]
 Table-2 濃縮倍率 [本文中記載]
 Table-3 Calculation table for recovery and blank test
 (analysis of test water)
 Table-4 Calculation table for analysis of test water (Level 1)
 Table-5 Calculation table for analysis of test water (Level 2)
 Table-6 Calculation table for recovery and blank test
 (analysis of test fish)
 Table-7 Calculation table for analysis of test fish (Level 1)
 Table-8 Calculation table for analysis of test fish (Level 2)
 Table-9 Calculation table for analysis of test fish (Control)
 Reference 1 Analytical results of dilution water

Figures

- Fig.1 Correlation between exposure period and bioconcentration factor (Level 1)
- Fig.2 Correlation between exposure period and bioconcentration factor (Level 2)
- Fig.3 Concentration-mortality curve
- Fig.4-1 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for calibration curve (analysis of test item)
- Fig.4-2 Calibration curve of test item
- Fig.5 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for recovery and blank test (analysis of test water)
- Fig.6 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test water
- Fig.7 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for recovery and blank test (analysis of test fish)
- Fig.8 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 1)
- Fig.9 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 2)
- Fig.10 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Control)
- Fig.11 Mass spectrum of test item
- Fig.12 Mass/Mass spectrum of test item
- Fig.13-1 IR spectrum of test item measured before experimental start
- Fig.13-2 IR spectrum of test item measured after experimental completion
- Reference 2 IR spectrum supplied by sponsor

表題 13F-AcOHのコイにおける濃縮度試験

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 1-1

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-AcOHのコイにおける濃縮性の程度について知見を得る。

試験法 本試験は以下の試験法に従って行った。
 (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〈魚介類の体内における化学物質の濃縮度試験〉
 (2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」に定める "Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)"

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4月6日
実験開始日	2007年4月17日
実験終了日	2007年5月15日
試験終了日	2007年6月20日

試資料の保管

(1) 被験物質

供試試料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、又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又は廃棄に際しては試験委託者と協議の上決定する。

(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

試験担当者
(濃縮度試験の実施)

飼育管理責任者

急性毒性試験担当者

最終報告書の承認

2007年6月20日

試験責任者

要 約

試験の表題

13F-AcOHのコイにおける濃縮度試験

試験条件

急性毒性試験

供 試 魚	ヒメダカ
ばく露期間	96時間
ばく露方法	半止水式 (24時間毎に換水)

濃縮度試験

供 試 魚	コイ
試験濃度	第1濃度区 20 μg/L 第2濃度区 2 μg/L
ばく露期間	28日間
ばく露方法	連続流水式
分析方法	液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法

試験結果

96時間LC50値 >3.00mg/L

濃縮倍率	第1濃度区 1.1倍以下 第2濃度区 12 倍以下
------	------------------------------

1. 被験物質

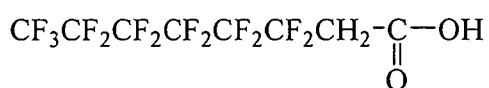
本報告書において13F-AcOHは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称^{*1}

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクタン酸

1.2 構造式等^{*1}

構 造 式



分 子 式 C₈H₁₃F₁₃O₂

分 子 量 378.09

*1 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^{*1}

供 給 者 ダイキン工業株式会社
ロット番号 S6X01

2.2 純 度^{*1}

被 験 物 質 99.4%
不 純 物 不明成分 0.6%

被験物質は純度100%として取り扱った。

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 (Fig.13、Reference 2参照)。

2.4 物理化学的性状

常温における性状	白色固体 ^{*1}
溶 解 度	ジメチルスルホキシド 可溶 ^{*1} アセトン 可溶 ^{*1} 水 114mg/L (25°C) (フラスコ法) (当機構測定データ)

*1 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 (Fig.13参照)。

2.6 試験条件下での安定性

実験開始前に予備検討を行い、試験条件下で安定であることを確認した。

3. 急性毒性試験の実施

3.1 試験方法

「工場排水試験方法、魚類による急性毒性試験」(JIS K 0102-1998 の 71.) の方法に準じて行った。

3.2 供試魚

(1) 魚種

ヒメダカ Oryzias latipes

選択理由 コイと感受性が類似しており、供試魚として入手し易いため。

(2) 供給源

財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

(住所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号)

供試魚受入日 2006年12月28日

(3) じゅん化条件

期間等 供試魚の受入時に目視観察をして異常のあるものを除去し、じゅん化水槽へ搬入し薬浴を実施した。その後、水温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ の流水状態で55日間じゅん化した。その間異常のあるものは除去した。再度選別して薬浴を実施した後、同温度の流水状態で45日間じゅん化した。

薬浴 じゅん化水槽へ搬入して、水産用OTC（塩酸オキシテトラサイクリン）50mg/Lと塩化ナトリウム6g/Lの混合薬浴を24時間実施した。再度選別して、水産用OTC 50mg/Lと塩化ナトリウム6g/Lの混合薬浴を24時間実施した。

(4) 体重

平均 0.26g

(5) 全長

平均 3.1cm

(6) 感受性試験

同一ロット(TFO-061228)の供試魚による基準物質PCP-Na [ペンタクロロフェノールナトリウム 試薬 東京化成工業製]の48時間LC50値は0.668mg/Lであった。

3.3 試験用水

(1) 種類

久留米事業所敷地内で揚水した地下水

(2) 水質確認

試験用水の水質については2007年1月29日に採水し、測定を行った結果をReference 1に示す。試験用水は以下に示す基準のいずれかに適合していることを確認した。

- ① 「水道法に基づく水質基準」（平成15年5月30日改正 厚生労働省令第101号）
- ② 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」 "Fish, Early-life Stage Toxicity Test (Guideline 210, July 17, 1992)"
- ③ 「水産用水基準」（社団法人日本水産資源保護協会 昭和58年3月）
- ④ 「水質汚濁に係る環境基準」（平成11年2月22日改正 環境庁告示第14号）
- ⑤ 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」 "Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)"

3.4 原液調製法

(1) 分散剤

2-メトキシエタノール

(2) 調製方法

供試試料を2-メトキシエタノールに溶解して、被験物質濃度として2000mg/Lの原液を調製した。

3.5 試験条件

(1) 試験濃度

3.00mg/L及び対照区

(2) 試験水槽

円形ガラス製水槽

(3) 試験液量

4L/濃度区

(4) 供試魚数

10尾/濃度区

(5) 試験温度

ばく露開始時	24.5°C
換水前	25.0°C

(6) 溶存酸素濃度

ばく露開始時	8.3mg/L
換水前	7.9mg/L

(7) pH

ばく露開始時	8.2
換水前	8.3

(8) ばく露期間

96時間

(9) ばく露方法

半止水式（24時間毎に換水）

(10) ばつ気

ばく露期間中連続してエアレーションを行った。

3.6 試験の実施

実施場所	アクアトロン室B
試験実施日	2007年4月9日～2007年4月13日

3.7 96時間LC50値の算出

Doudoroff法で行った。

3.8 試験結果

被験物質の96時間LC50値 >3.00mg/L^{*2} (Fig.3参照)

*2 この際の使用した分散剤（2-メトキシエタノール）の濃度は、約1500mg/Lとなり、その分散剤の96時間LC50値が15500mg/Lであることから、分散剤の毒性の影響を考慮してこれ以上の高濃度の試験は行わなかった。

4. 濃縮度試験の実施

4.1 供 試 魚

(1) 魚 種

コイ *Cyprinus carpio*

選択理由 過去の知見との整合性を考慮するため及び大きさが扱い易いため。

(2) 供 給 源

財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

(住所 〒839-0801 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号)

供試魚のふ化日 2006年 9月 3日

じゅん化開始日 2007年 1月 23日

(3) じゅん化条件

期 間 等 受入槽及び蓄養槽で試験魚サイズまで養成後、じゅん化水槽へ搬入して薬浴した。その後、水温 $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 未満の流水状態で48日間じゅん化した。その間異常のあるものは除去した。再度選別して試験水槽へ移し、薬浴した。その後、同温度の流水状態で34日間じゅん化した。

薬 浴 じゅん化水槽では水産用OTC 50mg/Lと塩化ナトリウム7g/Lの混合薬浴を24時間実施した。試験水槽ではエルバージュ20mg/Lと塩化ナトリウム7g/Lの混合薬浴を24時間実施した。

(4) 全 長

7.0～8.7cm

(5) ロ ッ ト

TFC-070123

(6) 年 齢

当才魚

(7) 餌 料	
種 類	コイ稚魚育成用配合飼料
組 成	たん白質含量 43.0%以上 脂質含量 3.0%以上
製 造 元	日本配合飼料株式会社
給餌方法	供試魚体重の約2%相当量を1日2回（休日は1回にまとめた。） に分けて給餌した。 ただし、供試魚の採取前24時間は給餌を止めた。

4.2 試験用 水

3.3に同じ。

4.3 試験及び環境条件

(1) 試験水供給方法

久留米事業所組立流水式装置を用いて供給した。

(2) 試験水槽

70L容ガラス製水槽

(3) 試験水量

原液0.02mL/分及び試験用水1000mL/分の割合で1440L/日を試験水槽に供した。

(4) 原液タンク

1L容褐色ガラス製びん

交換頻度 1回／月

(5) 試験温度

第1濃度区	24.6～25.0°C
第2濃度区	24.6～25.0°C
対 照 区	24.7～25.0°C

(6) 溶存酸素濃度

第1濃度区	8.1～8.3mg/L
第2濃度区	8.1～8.3mg/L
対 照 区	8.0～8.3mg/L

(7) pH

第1濃度区	8.0～8.1
第2濃度区	8.0～8.1
対 照 区	8.0～8.1

(8) 照 光 時 間

白色蛍光灯による人工照明（14時間明／10時間暗）

(9) 供 試 魚 数

第1及び第2濃度区	28尾（実験開始時）
対 照 区	12尾（実験開始時）

(10) ばく露期間

28日間

理由： 28日間で定常状態に達したため。

(11) 実 施 場 所

アクアトロン室A

4.4 原液調製法

(1) 分 散 剤

3.4の(1)と同じ。

(2) 調 製 方 法

第1濃度区

3.4の(2)と同様にして被験物質濃度として1000mg/Lの原液を調製した。

第2濃度区

3.4の(2)と同様にして被験物質濃度として100mg/Lの原液を調製した。

対照区

2-メトキシエタノールを原液とした。

4.5 試験濃度

各濃度区は以下の被験物質濃度とした。同時に、対照区を設定した。

第1濃度区	20 µg/L
第2濃度区	2 µg/L

4.6 観察、測定及び清掃

(1) 供試魚の観察

供試魚の健康状態等を1日に2回（休日は1回）目視観察した。

(2) 試験水量

メスシリンダーを用いて1日に1回測定記録した。

(3) 試験温度

アルコール温度計を用いて週1回測定記録した。

(4) 溶存酸素濃度

溶存酸素計を用いて週1回測定記録した。

(5) pH測定

pH計を用いて実験期間中に2回測定記録した。

(6) 清掃

実験期間中は、コイの排泄物、水槽壁の汚れ等を1日に1回程度除去した。

4.7 試験水及び供試魚の分析

試験水及び供試魚中の被験物質分析は液体クロマトグラフィータンデム質量分析法 (LC-MS/MS) により行った。

4.7.1 分析回数

(1) 試験水

試験水分析は第1、第2濃度区ともばく露期間中、最初の供試魚分析までに1回及び供試魚分析と同時に行った。1回当たりの分析試料は1点とした。

(2) 供試魚

供試魚分析は第1、第2濃度区ともばく露期間中に5回行い、1回当たりの採取尾数は4尾とし、2群（2尾1群）^{*3}に分けて行った。

対照区は実験開始前及び実験終了後に行い、1回当たりの採取尾数は4尾とし、2群（2尾1群）に分けて分析した。さらに、脂質含量測定用として2尾を追加で取り上げ、3群（2尾1群）とした。

*3 個体ごとの分析では、脂質含量測定のための保存用試料が十分得られないため2尾1群とした。

4.7.2 分析試料の前処理法

(1) 試験水中の被験物質

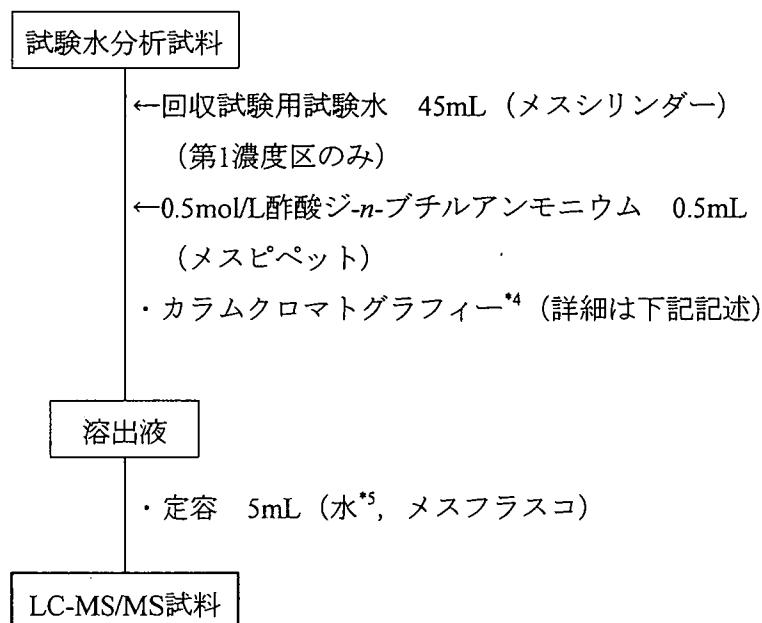
試験水槽から

第1濃度区 5mL

第2濃度区 50mL

を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、液体クロマトグラフィー－タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) 試料とした。

フロースキーム



*4 カラムクロマトグラフの条件

セッップパック プラス C₁₈

(洗浄法：メタノール、水*5 各10mL)

負荷法 全量負した。

溶出法 溶出液 メタノール*6 3mL

溶出液を分析に供した。

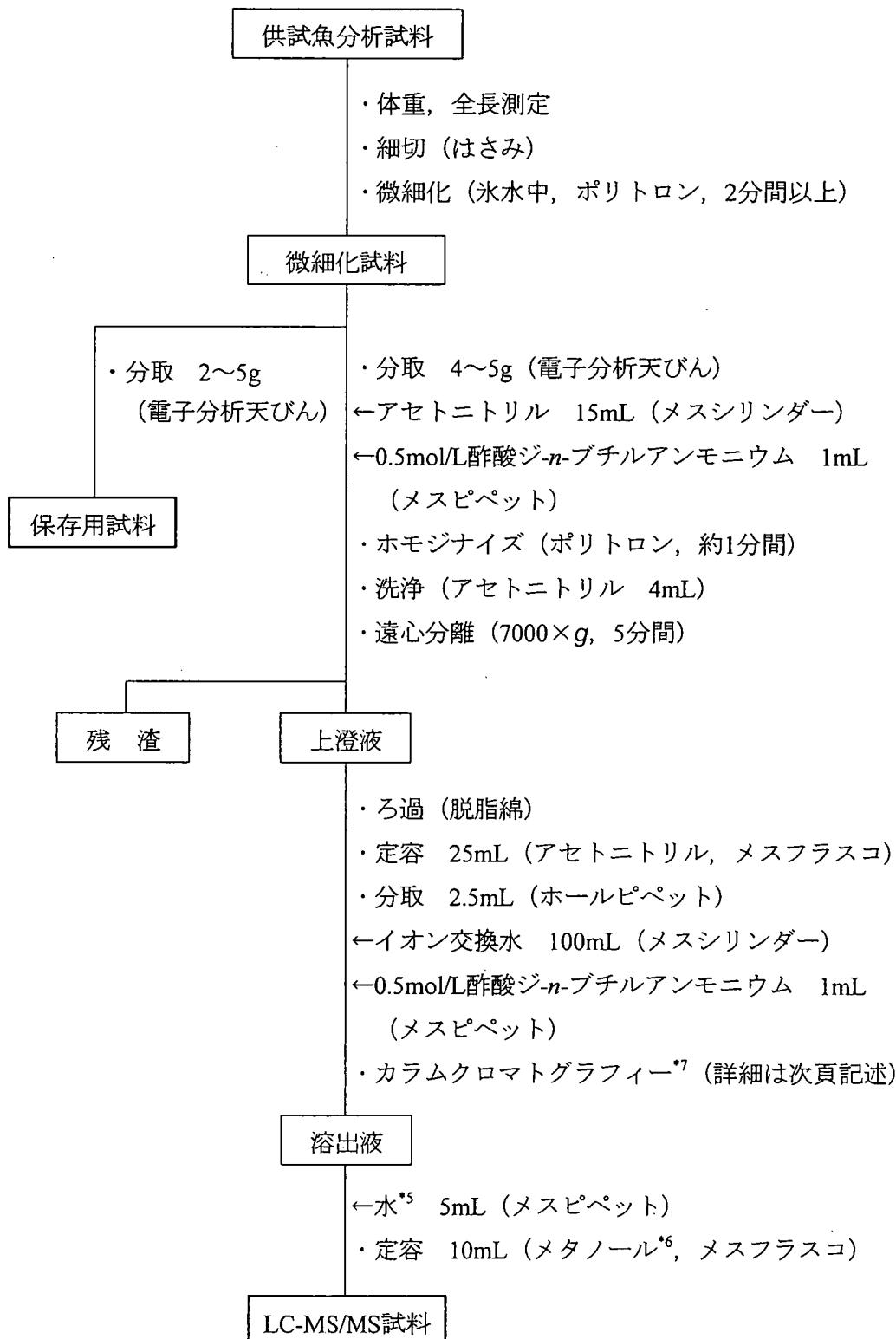
*5 水道水を超純水製造システムで処理した水。

*6 5mmol/L酢酸ジ-n-ブチルアンモニウム含有。

(2) 供試魚中の被験物質

試験水槽から供試魚を採取し、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、液体クロマトグラフィータンデム質量分析法（LC-MS/MS）試料とした。

フロースキーム



*7 カラムクロマトグラフの条件

セッピパック プラス C₁₈

(洗浄法 : メタノール、水^{*5} 各10mL)

負荷法 全量負荷した。

溶出法 溶出液 メタノール^{*6} 4mL

溶出液を分析に供した。

4.7.3 被験物質の定量分析

前処理を行って得られたLC-MS/MS試料について、下記の定量条件に基づき液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法により被験物質を分析した。LC-MS/MS試料中の被験物質濃度は、標準溶液及びLC-MS/MS試料のクロマトグラム上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた (Table-4, 5, Fig.6, Table-7, 8, 9, Fig.8, 9, 10参照)。

(1) 定量条件

機 器	液体クロマトグラフ-質量分析計
液体クロマトグラフ	Waters製 Alliance2695セパレーションモジュール
質量分析計	Micromass製 Quattro Ultima Pt

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column ODS (15cm × 2.1mm I.D., 化学物質評価研究機構製)
カラム温度	40°C
溶離液	B(80%) : メタノール ^{*6} D(20%) : 水 ^{*5,*6}
流量	0.2mL/min
注入量	10μL

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
検出イオン	負イオン
検出法	選択反応モニタリング (SRM)
プリカーサーイオン	m/z 377.1 (M-H) ⁻ (Fig.11参照)
プロダクトイオン	m/z 293.0 (M-CO ₂ , -2HF-H) ⁻ (Fig.12参照)
イオン源温度	150°C
脱溶媒システム温度	400°C
コーン電圧	40V
コリジョンエネルギー	10eV

(2) 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。

供試試料100mgを正確にはかりとり、メタノールに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをメタノールで希釈して10.0mg/Lの被験物質溶液を調製した。さらに、これをメタノール／水⁵ (1/1 V/V) で希釈して20.0μg/Lの標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

(2)の標準溶液の調製と同様にして10.0、20.0及び40.0μg/Lの標準溶液を調製した。これらを(1)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濃度により検量線を作成した。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して600 (被験物質濃度0.97μg/L) とした (Fig.4参照) 。

4.7.4 回収試験及びブランク試験

(1) 方 法

4.7.2の試験水及び供試魚分析操作における被験物質の回収率を求めるため、回収試験用試験水及び細切した魚(10g)に被験物質原液を添加し、回収試験を行った。また、被験物質を加えない回収試験用試験水及び細切した魚について、回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。供試魚分析の回収試験及びブランク試験における微細化試料の分取量は5gとした。回収試験及びブランク試験は、2点について測定した。

(2) 結 果

(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、被験物質ピーク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濃度を求める場合の補正值とした(Table-3, 6、Fig.5, 7参照)。

分析操作における回収率

試験水分析 (被験物質100ng添加)

92.3%, 94.7% 平均 93.5%

供試魚分析 (被験物質4000ng添加)

82.0%, 86.7% 平均 84.3%

4.7.5 供試魚中の脂質含量

対照区の供試魚微細化試料を用いて、クロロホルム／メタノール抽出を行い、重量分析により脂質含量の測定を行った。

4.7.6 分析試料中の被験物質濃度の算出及び定量下限

(1) 試験水分析試料中の被験物質濃度の算出

Table-4, 5の計算式に従って計算し、計算結果は有効数字3ヶタに丸めて表示した。

(2) 試験水中の被験物質定量下限濃度

4.7.3(3)の検量線の作成で求めた被験物質の定量下限より、試験水中の定量下限濃度^{*8}はそれぞれ、

第1濃度区 1.0 μg/L

第2濃度区 0.10 μg/L

と算出される。

(3) 供試魚分析試料中の被験物質濃度の算出

濃縮性が認められる場合、Table-7, 8, 9の計算式に従って計算するが、被験物質の測定値は定量下限以下であった。

(4) 供試魚中の被験物質定量下限濃度

4.7.3(3)の検量線の作成で求めた被験物質の定量下限より、供試魚中の定量下限濃度^{*8}は供試魚微細化試料を5gとしたとき23ng/gと算出される。

$$*8 \text{ 被験物質定量下限濃度 } (\mu\text{g}/\text{L} \text{ 又は } \text{ng}/\text{g}) = \frac{\text{A}}{\frac{\text{B}}{100} \times \frac{\text{C} \times \text{E}}{\text{D}}}$$

A : 検量線上定量下限濃度 (μg/L)

B : 回収率 (%)

C : 試験水採取量 (mL) 又は供試魚微細化試料 (g)

D : 最終液量 (mL)

E : 分取比

計算結果は有効数字2ヶタに丸めた。

4.7.7 ばく露期間における試験水の全平均被験物質濃度の算出法

$$\overline{C_{wt}} = \{Cw(1) + \dots + Cw(n)\} / n$$

$\overline{C_{wt}}$: 試験水の全平均被験物質濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)

n : 試験水分析の数 (測定回数)

Cw(1) : 1回目の試験水中被験物質濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)

Cw(n) : n回目の試験水中被験物質濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)

4.7.8 濃縮倍率 (BCF) の算出法

濃縮倍率 (BCF) は、以下の式に従って算出した。

(1) 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度の算出

$$\overline{C_w} = \{Cw(n-1) + Cw(n)\} / 2 \quad (\text{供試魚分析1回目})$$

$$\overline{C_w} = \{Cw(n-2) + Cw(n-1) + Cw(n)\} / 3 \quad (\text{供試魚分析2回目以降})$$

$\overline{C_w}$: 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)

Cw(n) : 供試魚分析と同時に求めた試験水分析n回目の被験物質濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)

(2) 濃縮倍率の算出

$$BCF = \frac{C_f}{\overline{C_w}}$$

BCF : 濃縮倍率

Cf : 供試魚中被験物質濃度 (FBを差し引いた値) (ng/g)

$\overline{C_w}$: 濃縮倍率算出のための試験水中平均被験物質濃度 ($\mu\text{g}/\text{L}$)

FB : 対照区における実験開始前及び終了後の供試魚中の被験物質又は被験物質の見掛け (プランク) 濃度の平均値 (ng/g)

(3) m回目の濃縮倍率の平均値

$$\overline{BCF}_m = (BCFa + BCFb)/n$$

\overline{BCF}_m : m回目の濃縮倍率の平均値 (群数2(a,b))

$BCFa, b$: m回目における各各群の濃縮倍率

n : m回目に分析した群数

ただし、不検出がある測定日の濃縮倍率の平均値は求めない。

4.7.9 定常状態に達したことの確認方法

定常状態に達したことの判断は、48時間以上の測定間隔で連続した3回の測定における濃縮倍率の変動が20%以内とする。濃縮倍率が100倍未満の場合、濃縮倍率の変動が20%を超えても28日後には定常状態に達しているとみなす。

定常状態に達したことの判定基準 : $V(m-2), V(m-1), V(m) \leq 20\text{ (%)}$

$$V(m-2) = \frac{|BCF(m-2) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$$V(m-1) = \frac{|BCF(m-1) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$$V(m) = \frac{|BCF(m) - \overline{BCF}|}{\overline{BCF}} \times 100$$

$V(m-2), V(m-1), V(m)$: 濃縮倍率の平均値からの乖離率 (%)

$BCF(m-2), BCF(m-1), BCF(m)$: m-2, m-1, m回目における群数nの濃縮倍率の平均値

\overline{BCF} : $\{BCF(m-2) + BCF(m-1) + BCF(m)\} / 3$

4.7.10 算出可能な濃縮倍率

4.7.6(4)で求めた供試魚中の被験物質定量下限濃度より、下記の倍率を超えて濃縮されたとき濃縮倍率の算出が可能となる。ただし、試験水中の被験物質濃度はすべての試験水分析における平均被験物質濃度を用いた。

第1濃度区	1.1 倍
第2濃度区	12 倍

4.7.11 脂質含量の算出法

脂質含量は次式により求めた。

$$\text{脂質含量 (\%)} = \frac{T - T_0}{S} \times 100$$

T_0 : 容器のひょう量値 (g)

T : 重量分析用試料 (容器を含む) のひょう量値 (g)

S : 供試魚微細化試料の分取量 (g)

4.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401：1999 規則Bの方法に従った。また、計算処理に用いた数値は途中で丸めずに使用した。

試験水中の被験物質濃度及び供試魚中の被験物質濃度は有効数字3ヶタに丸め、濃縮倍率は有効数字2ヶタに丸めて表示した。

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. 試験結果

6.1 試験水中の被験物質濃度

試験水中の被験物質濃度はTable-1に示されるように、設定値の93%以上が保持された。また、被験物質濃度の変動は測定値の平均に対して±20%以内に保たれた。

Table-1 試験水中の被験物質濃度

(単位 $\mu\text{g/L}$)

濃度区	1日後	3日後	9日後	15日後	22日後	28日後	平均 (標準偏差)	Table	Fig
1	20.9	19.6	20.9	18.5	20.8	19.7	20.1 (0.96)	4	6
2	1.96	2.06	1.97	1.91	2.04	2.05	2.00 (0.060)	5	

6.2 濃縮倍率

濃縮倍率をTable-2に示した。

Table-2の濃縮倍率とばく露期間との相関をFig.1及びFig.2に示した。ばく露期間中の濃縮倍率は第1濃度区において1.1倍以下、第2濃度区において12倍以下であった。

Table-2 濃縮倍率

濃度区	3日後	9日後	15日後	22日後	28日後	Table	Fig
1	≤1.1 ≤1.1	≤1.1 ≤1.1	≤1.1 ≤1.1	≤1.1 ≤1.1	≤1.1 ≤1.1	7	8
2	≤12 ≤12	≤12 ≤12	≤12 ≤12	≤12 ≤12	≤12 ≤12	8	9

6.3 定常状態における濃縮倍率

6.2の結果から、最後の連続した3回の分析においてすべて不検出であったため、定常状態における濃縮倍率は算出できなかった。しかし、濃縮倍率はすべて100倍未満であったため、28日後には定常状態に達しているとみなした。

6.4 供試魚の脂質含量

供試魚中の平均脂質含量は以下のとおりであった。

実験開始前 4.01%

実験終了後 3.61%

6.5 供試魚の外観観察等

異常は認められなかった。

7. 備 考

試験に使用した主要な装置・機器、特殊器具及び試薬等

(1) 試験系（飼育施設）に係わる装置

原液供給用微量定量ポンプ	： フロム製	型 301M
デガッサー	： フロム製	型 702
溶存酸素測定装置	： 飯島電子工業製	型 ID-100
pH計	： 東亜電波工業製	型 HM-14P

(2) 分析及び原液調製に使用した装置・機器、特殊器具及び試薬

装置・機器

液体クロマトグラフー質量分析計	： 17頁参照	
天びん	： ザルトリウス製	型 BP301S
	ザルトリウス製	型 CP324S
	エー・アンド・ディ製	型 FA-2000
フーリエ変換赤外分光光度計	： 島津製作所製	型 IRPrestige-21
ホモジナイザー（ポリトロン）	： キネマチカ製	型 PT3100
遠心分離機	： 日立工機製	型 CR21G

特 殊 器 具

セップパック プラス C ₁₈	： 日本ウォーターズ製
----------------------------	-------------

試 薬

アセトニトリル	： 和光純薬工業製	HPLC用
メタノール	： 和光純薬工業製	HPLC用
2-メトキシエタノール	： 和光純薬工業製	試薬特級
0.5mol/L酢酸ジ-n-ブチルアンモニウム	： 東京化成工業製	イオンペア試薬

(3) 脂質含量測定に使用した装置・機器及び試薬

装置・機器

天びん	: ザルトリウス製 メトラー製	型 BP301S 型 AB204-S
ロータリーエバポレーター	: 東京理化器械製 東京理化器械製	型 N-1000K 型 N-1000K2
ホモジナイザー（ポリトロン）	: キネマチカ製	型 PT3100
ホモジナイザー（オートセルマスター）	: アズワン製	型 CM-200
真空ポンプ	: 真空機工製 真空機工製 真空機工製	型 DA-20D 型 DTC-21 型 DTC-41
真空デシケータ	: 井内盛栄堂製	型 VL

試　　薬

精製水	: 高杉製薬製	日本薬局方
メタノール	: 和光純薬工業製	試薬一級
クロロホルム	: 和光純薬工業製	試薬特級
硫酸ナトリウム	: 関東化学製	試薬一級

Table-3 Calculation table for recovery and blank test (analysis of test water)

Sample description	A	B	C	D	E	F	Study No. 44820
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	12333						
Recovery a	11385	1	5	-	92.3	92.3	
Recovery b	11685	1	5	-	94.7	94.7	
					Average		
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	12175						93.5
Blank a	n.d.	1	5	-	-	-	
Blank b	n.d.	1	5	-	-	-	
					Average		
(a, b : individual sample)							
A : Peak area							
A(std) : Standard solution A(i) : Sample							
B : Ratio of portion used for analysis							
C : Final volume (mL)							
D : Amount of blank in test water (ng)							
E : Amount of test item recovered (ng)							
$E = P \times (A(i) / A(\text{std})) / B \times C - D$							
F : Recovery rate (%)							
$F = E / Q \times 100$							
P : Concentration of test item in standard solution 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$							
Q : Amount of test item added (100ng)							
See Fig. 5							

June 7, 2007

Name _____

Table-4 Calculation table for analysis of test water (Level 1)

Study No. 44820

Sample description	A	I
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	15084	
Test water after 1 day	14717	20.9
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	11581	
Test water after 3 days	10600	19.6
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	10089	
Test water after 9 days	9855	20.9
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	5991	
Test water after 15 days	5196	18.5
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	9680	
Test water after 22 days	9431	20.8
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	7651	
Test water after 28 days	7061	19.7
Average concentration of test item in test water		20.1 (S.D. 0.96)
A: Peak area		
A(std) : Standard solution A(t) : Sample		
B: Ratio of portion used for analysis 1		
C: Final volume 5mL		
F: Recovery rate 93.5%		
H: Volume of test water taken out 5mL		
I: Concentration of test item in test water ($\mu\text{g}/\text{L}$)		
I = P × (A(t) / A(std)) / B × C / F × 100 / H		
J: Average concentration of test item in test water ($\mu\text{g}/\text{L}$)		
J = (I(1) + ... + I(n)) / n		
n : Number of test water analyses (n = 6)		
I (1) : First analysis of test water I (n) : Last analysis of test water		
$\text{S.D.} = \sqrt{\frac{n \times \sum_{i=1}^n I(i)^2 - \left(\sum_{i=1}^n I(i) \right)^2}{n \times (n - 1)}}$		
P: Concentration of test item in standard solution 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$		
See Fig. 6		

June 7, 2007

Name _____

Table-5

Calculation table for analysis of test water (Level 2)

Study No. 44820

Sample description	A	I
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	15084	
Test water after 1 day	13848	1.96
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	11581	
Test water after 3 days	11140	2.06
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	10089	
Test water after 9 days	9285	1.97
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	5991	
Test water after 15 days	5344	1.91
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	9680	
Test water after 22 days	9226	2.04
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	7651	
Test water after 28 days	7340	2.05
Average concentration of test item in test water		2.00 (S.D. 0.060)
A: Peak area		
A(std) : Standard solution A(t) : Sample		
B: Ratio of portion used for analysis 1		
C: Final volume 5mL		
F: Recovery rate 93.5%		
H: Volume of test water taken out 50mL		
I: Concentration of test item in test water ($\mu\text{g}/\text{L}$)		
I = P × (A(t) / A(std)) / B × C / F × 100 / H		
J: Average concentration of test item in test water ($\mu\text{g}/\text{L}$)		
J = (I(1) + ... + I(n)) / n		
n : Number of test water analyses (n = 6)		
I (1) : First analysis of test water I (n) : Last analysis of test water		
S.D. = $\sqrt{\frac{n \times \sum_{i=1}^n I(i)^2 - \left(\sum_{i=1}^n I(i)\right)^2}{n \times (n - 1)}}$		
P: Concentration of test item in standard solution 20.0$\mu\text{g}/\text{L}$		
See Fig. 6		

Table-6

Calculation table for recovery and blank test (analysis of test fish)

Study No. 44820

Sample description	A	C	D	E	F	G
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	11888					
Recovery a	9749	2.5/25	10	-	3280	82.0
Recovery b	10306	2.5/25	10	-	3470	86.7
					Average	
						84.3
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	11634					
Blank a	n.d.	2.5/25	10	-	-	
Blank b	n.d.	2.5/25	10	-	-	
				Average		
(a, b : individual sample)						
A: Peak area						
A(std) : Standard solution A(t) : Sample						
B: Ratio of portion used for analysis (fine sample)			5/10			
C: Ratio of portion used for analysis (extracted solution)						
D: Final volume (mL)						
E: Amount of blank in test fish (ng)						
F: Amount of test item recovered (ng)						
$F = P \times (A(t) / A(\text{std})) / B / C \times D - E$						
G: Recovery rate (%)						
$G = F / Q \times 100$						
P: Concentration of test item in standard solution 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$						
Q: Amount of test item added (4000ng)						
See Fig. 7						

June 7, 2007

Name _____

Table-7 Calculation table for analysis of test fish (Level 1)

Sample description	A	D	G	K	H	J	M	Study No. 44820
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	10863							
Test fish after 3 days a	n.d.	1	5.00	-	20.2	-	-	
Test fish after 3 days b	n.d.	1	5.00	-	20.2	-	-	
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	10445							
Test fish after 9 days a	n.d.	1	5.00	-	20.4	-	-	
Test fish after 9 days b	n.d.	1	5.00	-	20.4	-	-	
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	6022							
Test fish after 15 days a	n.d.	1	5.00	-	19.7	-	-	
Test fish after 15 days b	n.d.	1	5.00	-	19.7	-	-	
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	9125							
Test fish after 22 days a	n.d.	1	5.00	-	20.1	-	-	
Test fish after 22 days b	n.d.	1	5.00	-	20.1	-	-	
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	7778							
Test fish after 28 days a	n.d.	1	5.00	-	19.7	-	-	
Test fish after 28 days b	n.d.	1	5.00	-	19.7	-	-	
(a, b : individual sample)								
A: Peak area								
A(std) : Standard solution	A(t) : Sample							
B: Ratio of portion used for analysis	2.5/25							
C: Final volume	10mL							
D: Dilution factor								
E: Average concentration of blank in analysis of control	0ng/g							
F: Recovery rate	84.3%							
G: Weight of fine sample (g)								
K: Concentration of test item in test fish (ng/g)								
$K = \{ P \times (A(t) / A(\text{std})) / B \times D \times C / G - E \} / F \times 100$								
H: Average concentration of test item in test water ($\mu\text{g}/\text{L}$)								
$H = \{ I(n-2) + I(n-1) + I(n) \} / m$								
n : Number of test water analyses ; m = 2 when n = 2, m = 3 when n ≥ 3								
I: Concentration of test item in test water ($\mu\text{g}/\text{L}$)								
J: BCF								
$J = K / H$								
M: Average value of BCF(a) and BCF(b)								
$M = \{ BCF(a) + BCF(b) \} / 2$								
P: Concentration of test item in standard solution	20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$							
See Fig. 8								

June 7, 2007

Name _____

Table-8 Calculation table for analysis of test fish (Level 2)

Study No. 44820

Sample description	A	D	G	K	H	J	M
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	10837						
Test fish after 3 days a	n.d.	1	5.00	-	2.01	-	-
Test fish after 3 days b	n.d.	1	5.00	-	2.01	-	-
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	10317						
Test fish after 9 days a	n.d.	1	5.00	-	2.00	-	-
Test fish after 9 days b	n.d.	1	5.00	-	2.00	-	-
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	5859						
Test fish after 15 days a	n.d.	1	5.00	-	1.98	-	-
Test fish after 15 days b	n.d.	1	5.00	-	1.98	-	-
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	9107						
Test fish after 22 days a	n.d.	1	5.00	-	1.97	-	-
Test fish after 22 days b	n.d.	1	5.00	-	1.97	-	-
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	8054						
Test fish after 28 days a	n.d.	1	5.00	-	2.00	-	-
Test fish after 28 days b	n.d.	1	5.00	-	2.00	-	-
(a, b : individual sample)							
A: Peak area A(std) : Standard solution A(t) : Sample							
B: Ratio of portion used for analysis 2.5/25							
C: Final volume 10mL							
D: Dilution factor							
E: Average concentration of blank in analysis of control 0ng/g							
F: Recovery rate 84.3%							
G: Weight of fine sample (g)							
K: Concentration of test item in test fish (ng/g) $K = \{ P \times (A(t) / A(\text{std})) / B \times D \times C / G - E \} / F \times 100$							
H: Average concentration of test item in test water ($\mu\text{g}/\text{L}$) $H = \{ I(n-2) + I(n-1) + I(n) \} / m$ n : Number of test water analyses ; m = 2 when n = 2, m = 3 when $n \geq 3$							
I: Concentration of test item in test water ($\mu\text{g}/\text{L}$)							
J: BCF $J = K / H$							
M: Average value of BCF(a) and BCF(b) $M = \{ BCF(a) + BCF(b) \} / 2$							
P: Concentration of test item in standard solution 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$							
See Fig. 9							

June 7, 2007

Name _____

Table-9 Calculation table for analysis of test fish (Control)

Sample description	A	E	G	I	Study No. 44820
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	7780				
Before the experimental start a	n.d.	-	4.00	-	
Before the experimental start b	n.d.	-	4.00	-	
Standard 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$	8060				
After the experimental completion a	n.d.	-	5.00	-	
After the experimental completion b	n.d.	-	5.00	-	
(a, b : individual sample)					Average
A: Peak area					
A(std) : Standard solution A(t) : Sample					
B: Ratio of portion used for analysis 2.5/25					
C: Final volume 10mL					
E: Amount of blank in analysis of control (ng)					
$E = P \times (A(t) / A(std)) / B \times C$					
G: Weight of fine smaple (g)					
I: Concentration of blank in test fish (ng/g)					
$I = E / G$					
P: Concentration of test item in standard solution 20.0 $\mu\text{g}/\text{L}$					
See Fig. 10					

June 7, 2007

Name _____

Item	Unit	Measured value	Standard value	Detection limit
Total hardness (Ca, Mg)	mg/L	14.2	< 300 *1	0.1
Suspended solid	mg/L	< 1	< 20 *2	1
pH	—	8.0	6.5 ~ 8.5 *3	—
Total organic carbon	mg/L	0.3	< 2 *2	0.1
Chemical oxygen demand	mg/L	2.3	< 5 *3	0.5
Residual chlorine	mg/L	< 0.02	< 0.02 *3	0.02
Ammonia nitrogen	mg/L	0.02	< 1 *3	0.01
Total cyan	mg/L	< 0.01	n.d. *3	0.01
Alkalinity	mg/L	101	—	1
Electric conductivity	μS/cm	278	—	—
Organic phosphorus	mg/L	< 0.1	n.d. *3	0.1
Alkylmercury	mg/L	< 0.0005	n.d. *3	0.0005
Mercury	mg/L	< 0.0005	< 0.0005 *3	0.0005
Cadmium	mg/L	< 0.001	< 0.01 *3	0.001
Cr ⁶⁺	mg/L	< 0.01	< 0.05 *3	0.01
Lead	mg/L	< 0.005	< 0.1 *3	0.005
Arsenic	mg/L	0.004	< 0.05 *3	0.001
Iron	mg/L	0.02	< 1.0 *3	0.01
Copper	mg/L	< 0.005	< 0.005 *3	0.005
Cobalt	mg/L	< 0.001	< 0.001 *3	0.001
Manganese	mg/L	< 0.01	< 0.05 *1	0.01
Zinc	mg/L	< 0.005	< 1.0 *1	0.005
Aluminium	mg/L	0.007	< 0.2 *1	0.001
Nickel	mg/L	< 0.001	< 0.001 *5	0.001
Silver	mg/L	< 0.0001	< 0.0001 *5	0.0001
Organochlorine pesticides				
1,2-Dichloropropane	mg/L	< 0.0001	< 0.06 *4	0.0001
Chlorothalonil	mg/L	< 0.0001	< 0.04 *4	0.0001
Propyzamide	mg/L	< 0.0001	< 0.008 *4	0.0001
Chlornitrofen	mg/L	< 0.0001	< 0.0001 *1	0.0001
Simazine	mg/L	< 0.001	< 0.003 *4	0.001
Thiobencarb	mg/L	< 0.0001	< 0.02 *4	0.0001
Organophosphorous pesticides				
Diazinon	mg/L	< 0.0001	< 0.005 *4	0.0001
Isoxathion	mg/L	< 0.0001	< 0.008 *4	0.0001
Fenitrothion	mg/L	< 0.0001	< 0.003 *4	0.0001
EPN	mg/L	< 0.0001	< 0.006 *4	0.0001
Dichlorvos	mg/L	< 0.0001	< 0.01 *4	0.0001
Iprobenfos	mg/L	< 0.0001	< 0.008 *4	0.0001
PCB	mg/L	< 0.0005	n.d. *4	0.0005
Coliform bacteria count	—	n.d.	n.d. *1	—
Fluorine compound	mg/L	1.3	< 1.5 *3	0.1
Anionic surfactant	mg/L	< 0.01	< 0.2 *1	0.01

*1 Ministerial ordinance of the Ministry of Health, Labour and Welfare No.101 (Revised May 30, 2003)

*2 OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Fish, Early-life Stage Toxicity Test (Guideline 210, July 17, 1992)

*3 Water quality criteria for fisheries (Japan Fisheries Resource Conservation Association, March 1983)

*4 Environmental Quality Standards for Water Pollutants No.14 (Revised February 22, 1999, Environment Agency)

*5 OECD Guidelines for Testing of Chemicals, Bioconcentration : Flow-through Fish Test (Guideline 305, June 14, 1996)

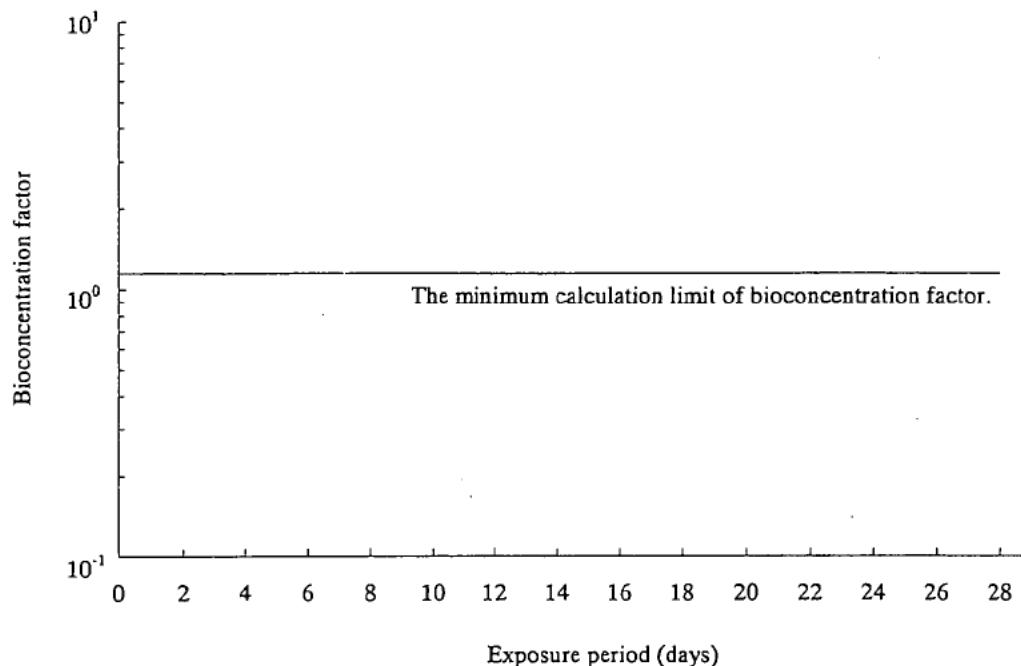


Fig.1 Correlation between exposure period and bioconcentration factor
(Level 1).
Ten data after 3, 9, 15, 22 and 28 days were lower than detection limit.

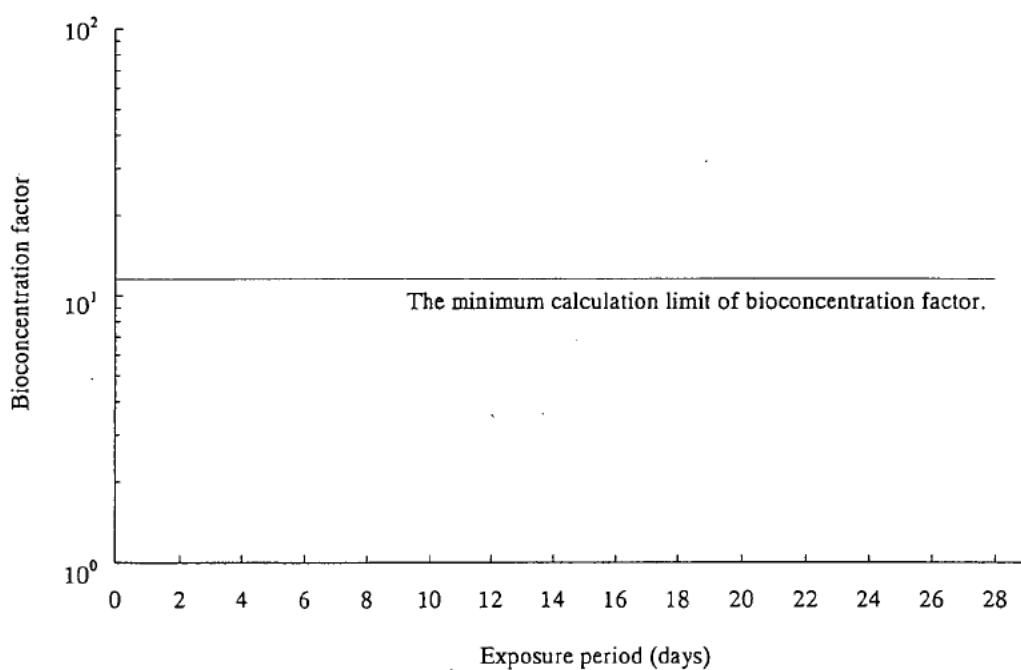
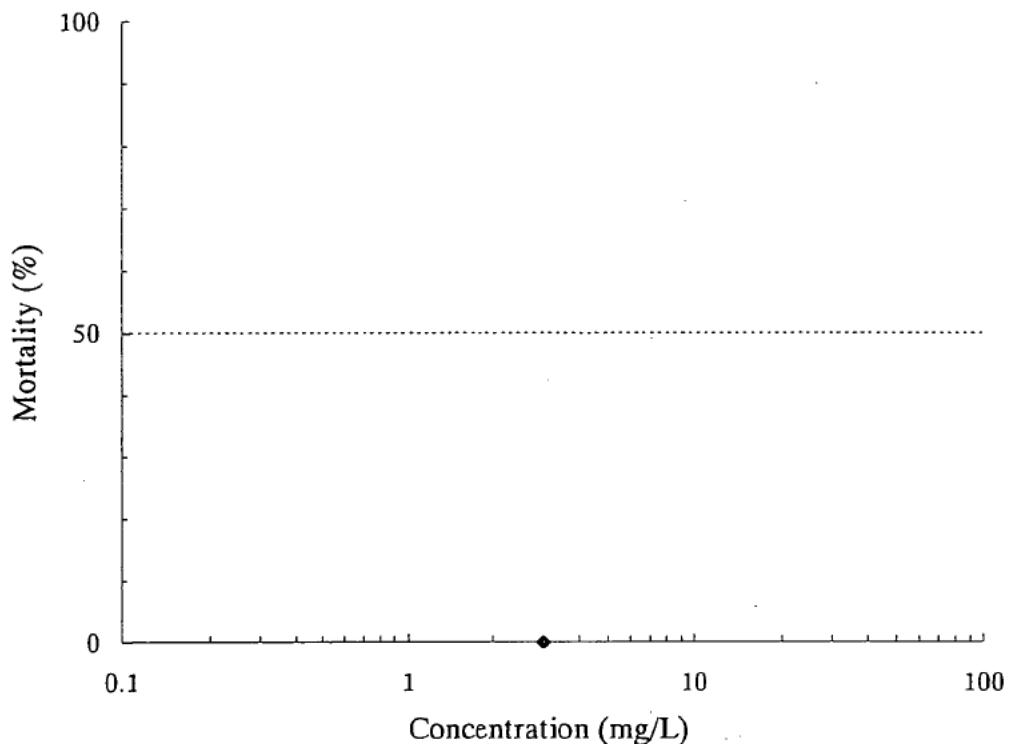


Fig.2 Correlation between exposure period and bioconcentration factor
(Level 2).
Ten data after 3, 9, 15, 22 and 28 days were lower than detection limit.

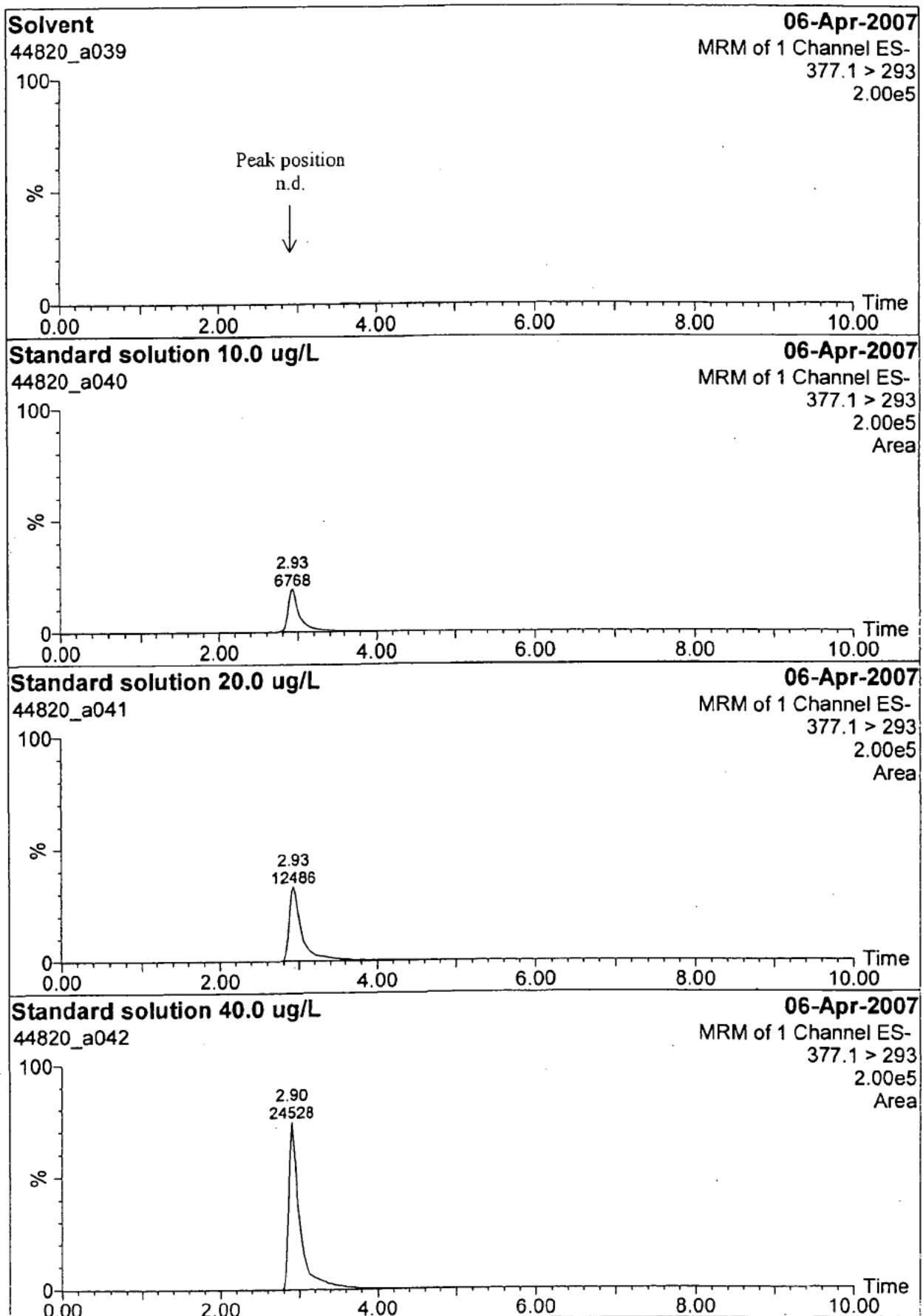
96-hour LC50 > 3.00 mg/L (Doudoroff)



Concentration (mg/L)	Cumulative Mortality (%)			
	24 hours	48 hours	72 hours	96 hours
Control	0	0	0	0
3.00	0	0	0	0

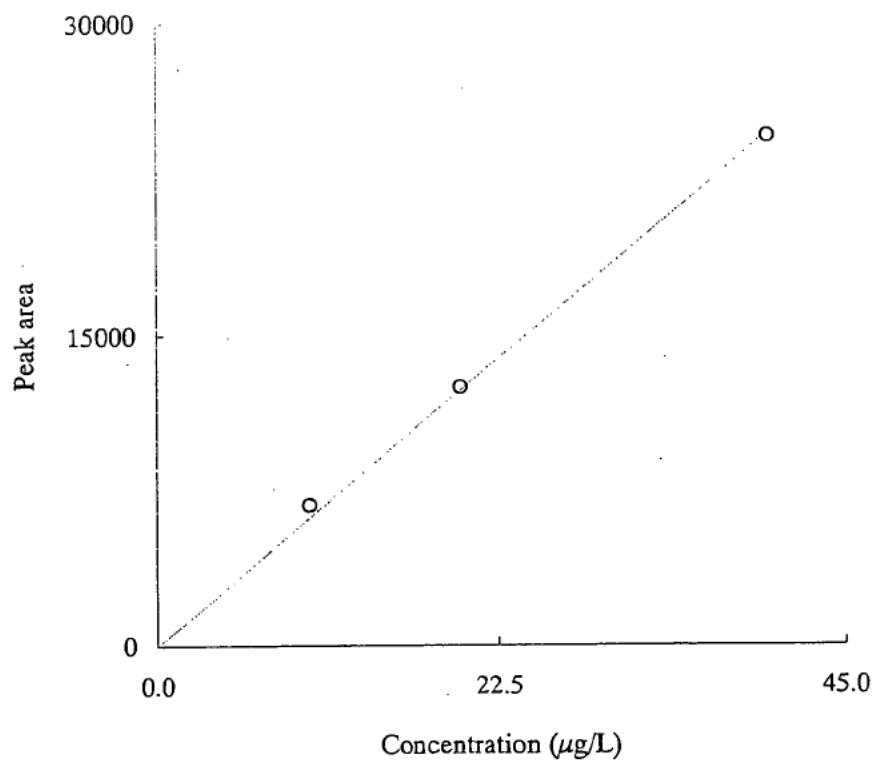
Fig. 3 Concentration - mortality curve.

Date : April 13, 2007 Name _____



44820 2007.4.6

Fig.4-1 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for calibration curve (analysis of test item).



$$y = 618x$$

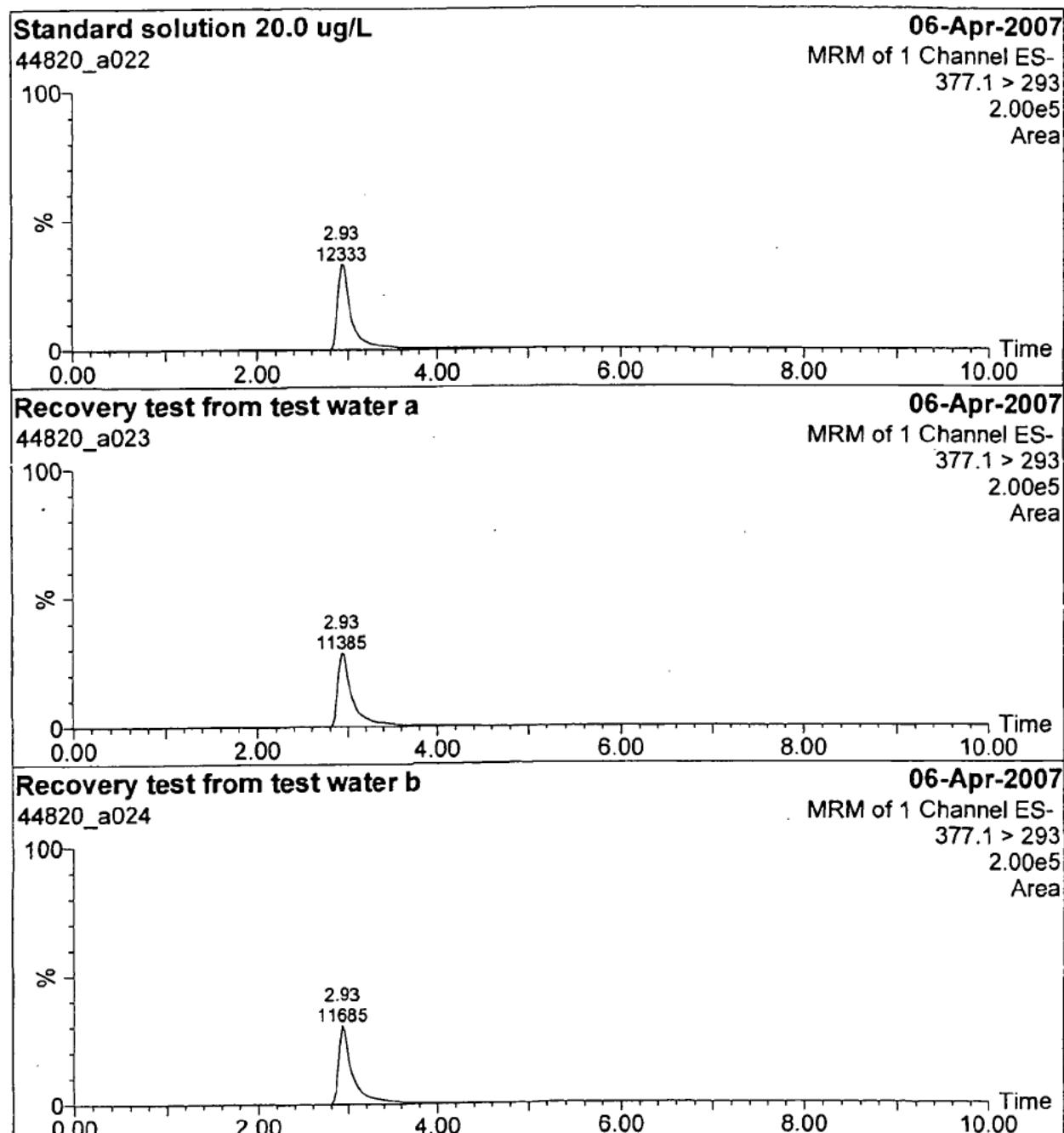
$r = 0.999$

Concentration ($\mu\text{g/L}$)	Peak area
10.0	6768
20.0	12486
40.0	24528

Fig. 4 - 2 Calibration curve of test item.

April 6, 2007

Name _____



44820

2007.4.6

Fig.5-1 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for recovery and blank test (analysis of test water).

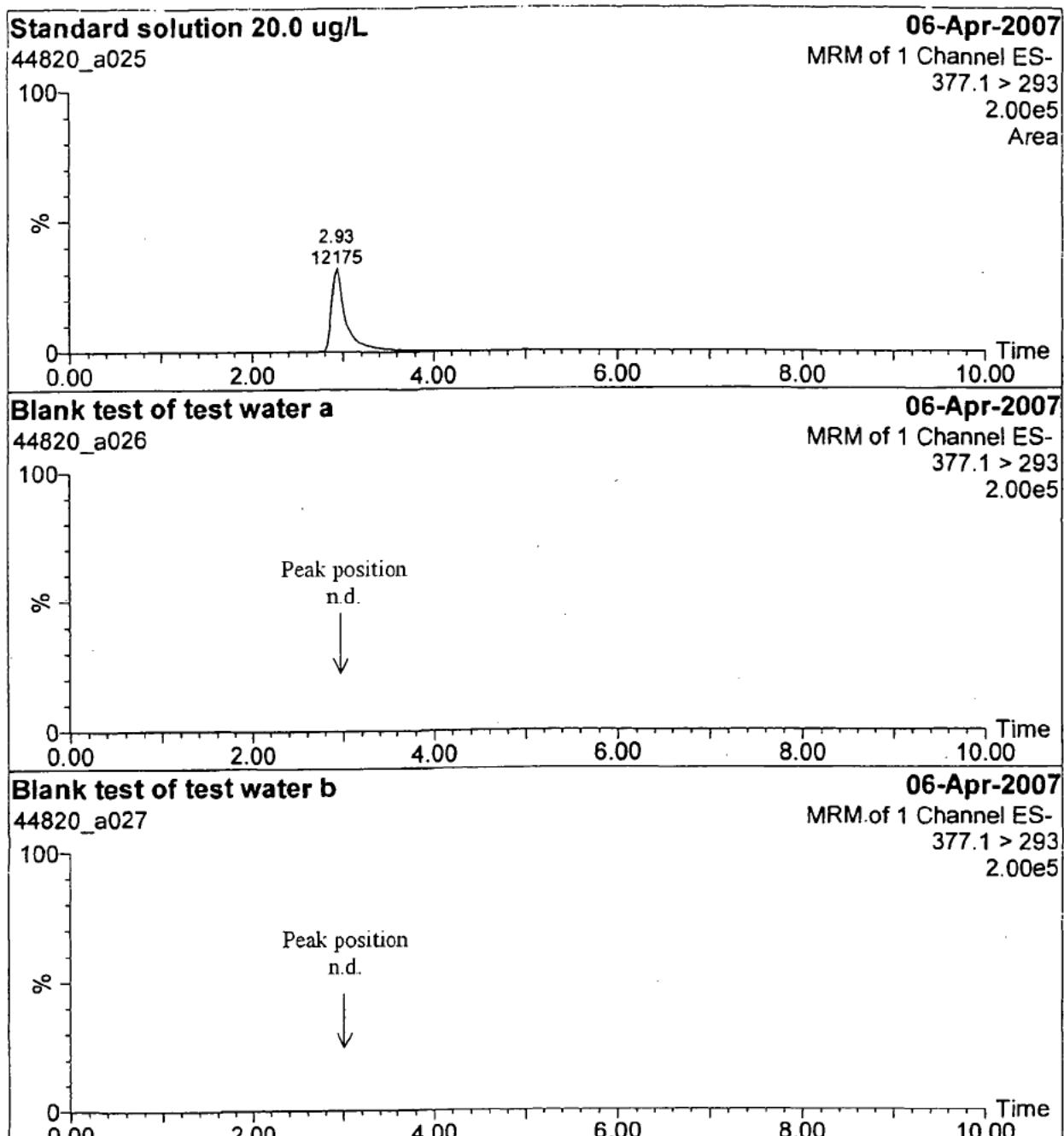
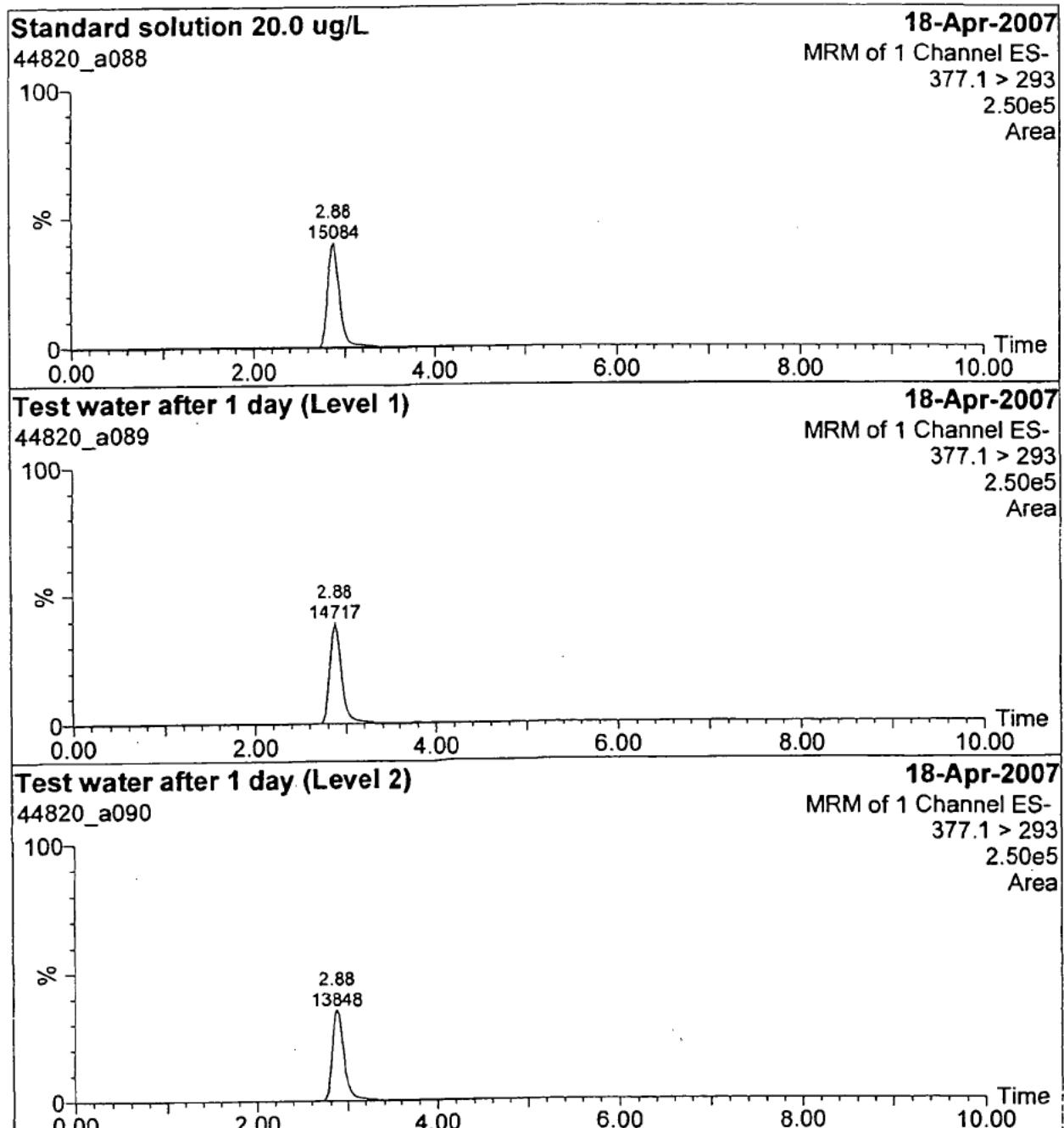


Fig.5-2 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for recovery and blank test (analysis of test water).



44820 2007.4.18

Fig.6-1 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test water.

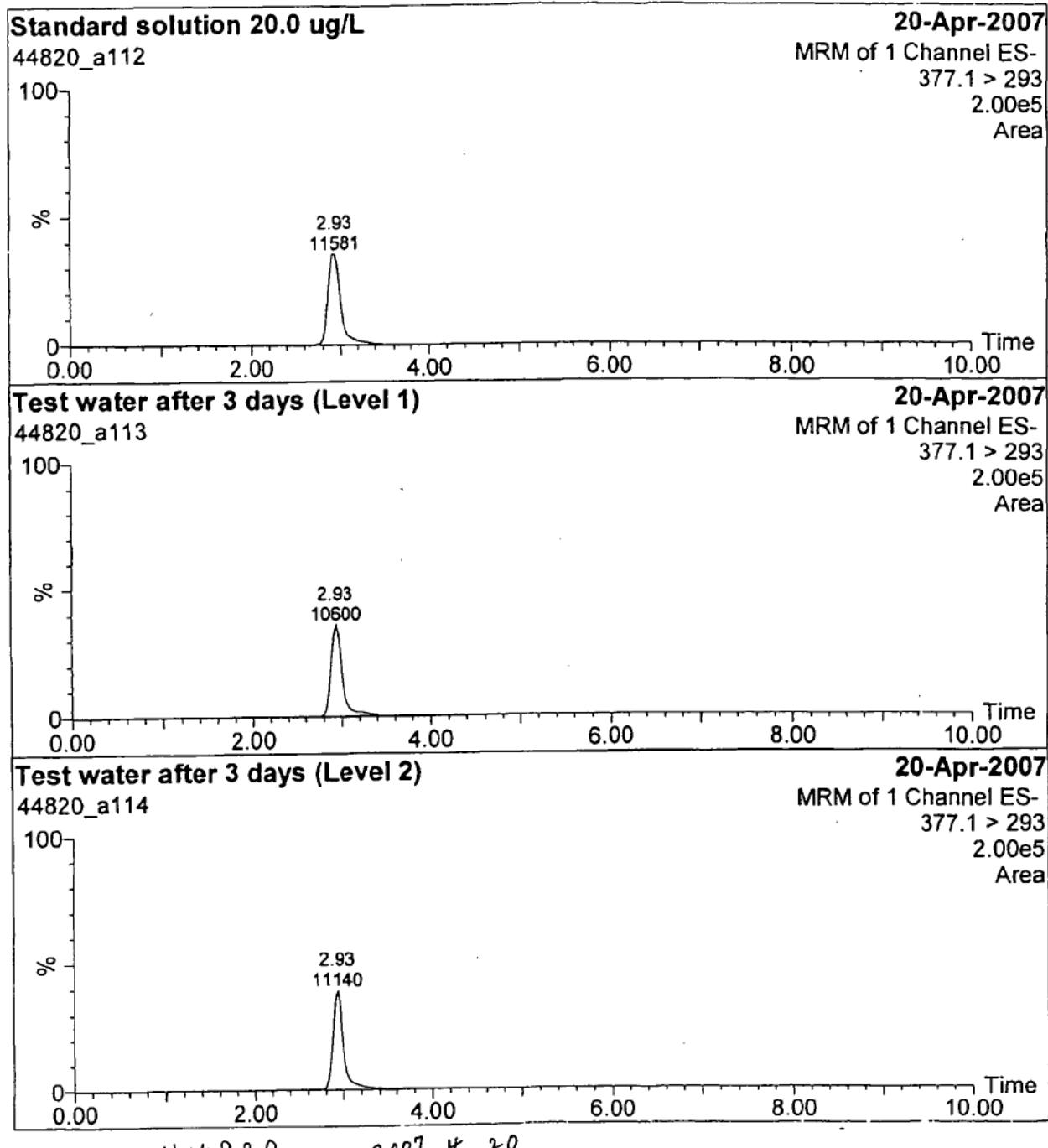
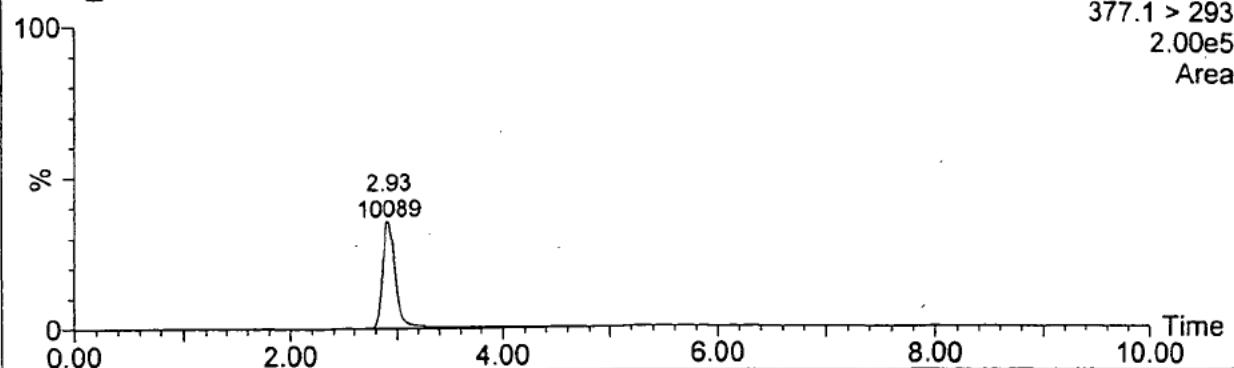


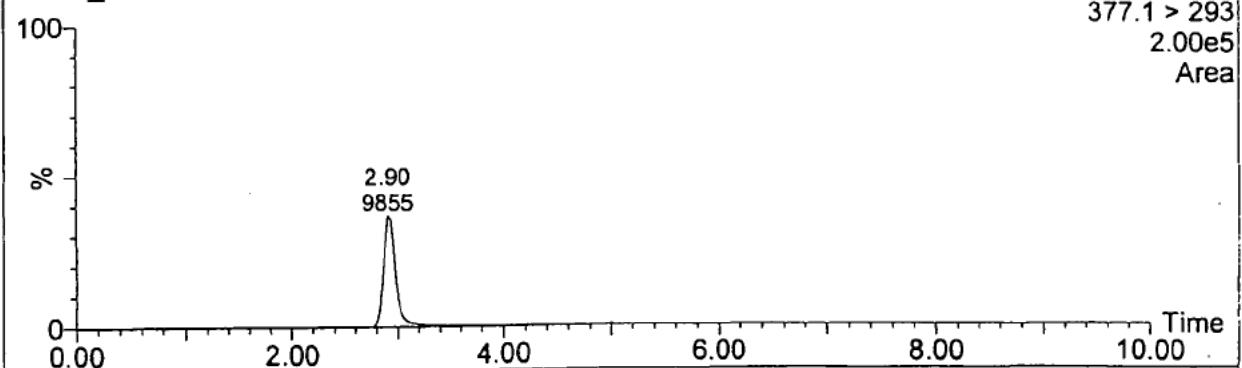
Fig.6-2 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test water.

Standard solution 20.0 ug/L

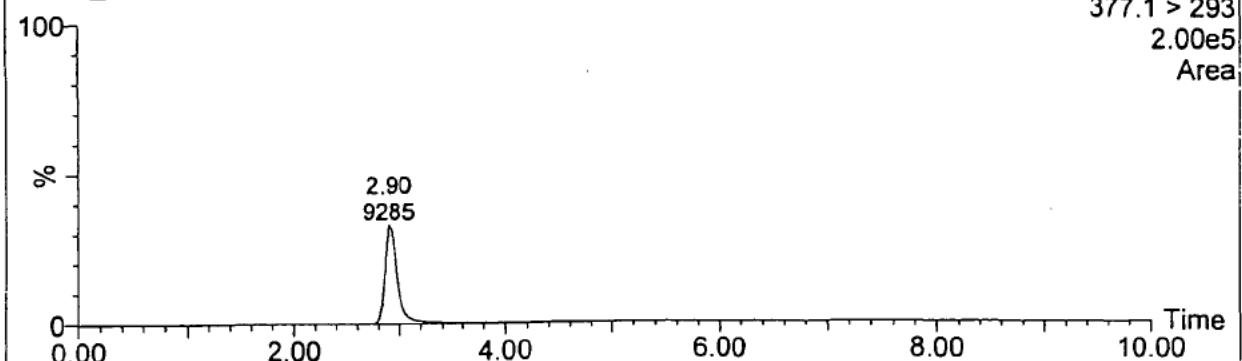
44820_a119

**Test water after 9 days (Level 1)**

44820_a120

**Test water after 9 days (Level 2)**

44820_a121



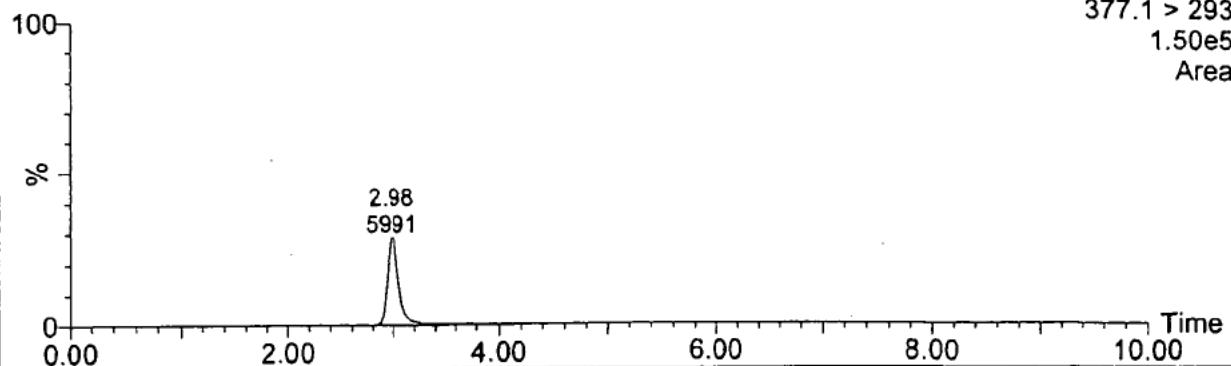
44820

2007.4.26

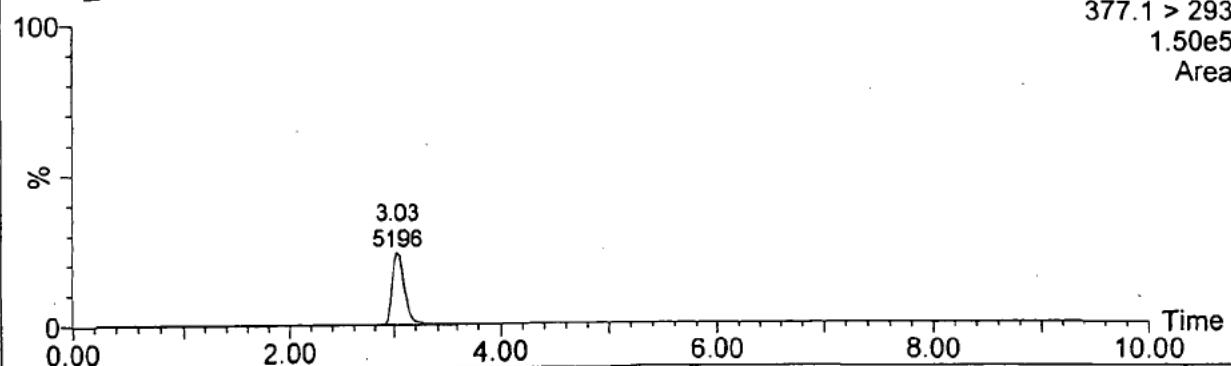
Fig.6-3 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test water.

Standard solution 20.0 ug/L

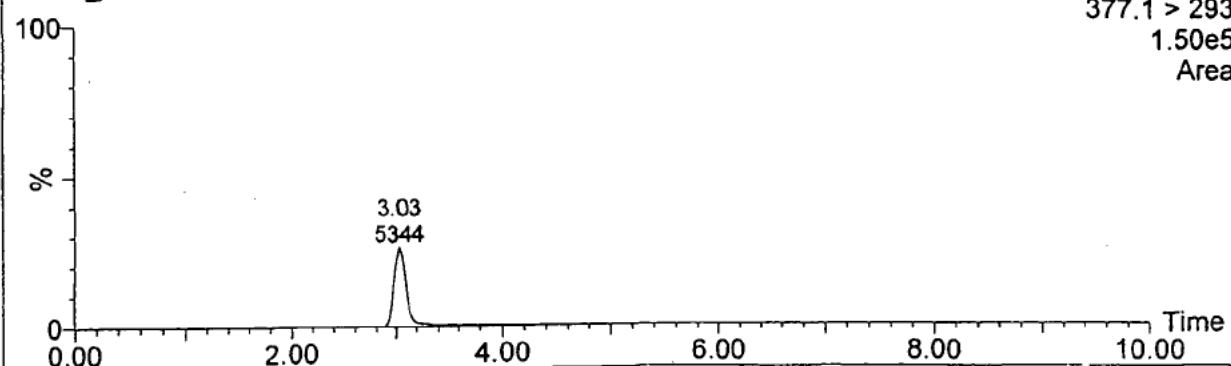
44820_a142

**02-May-2007**MRM of 1 Channel ES-
377.1 > 293
1.50e5
Area**Test water after 15 days (Level 1)**

44820_a143

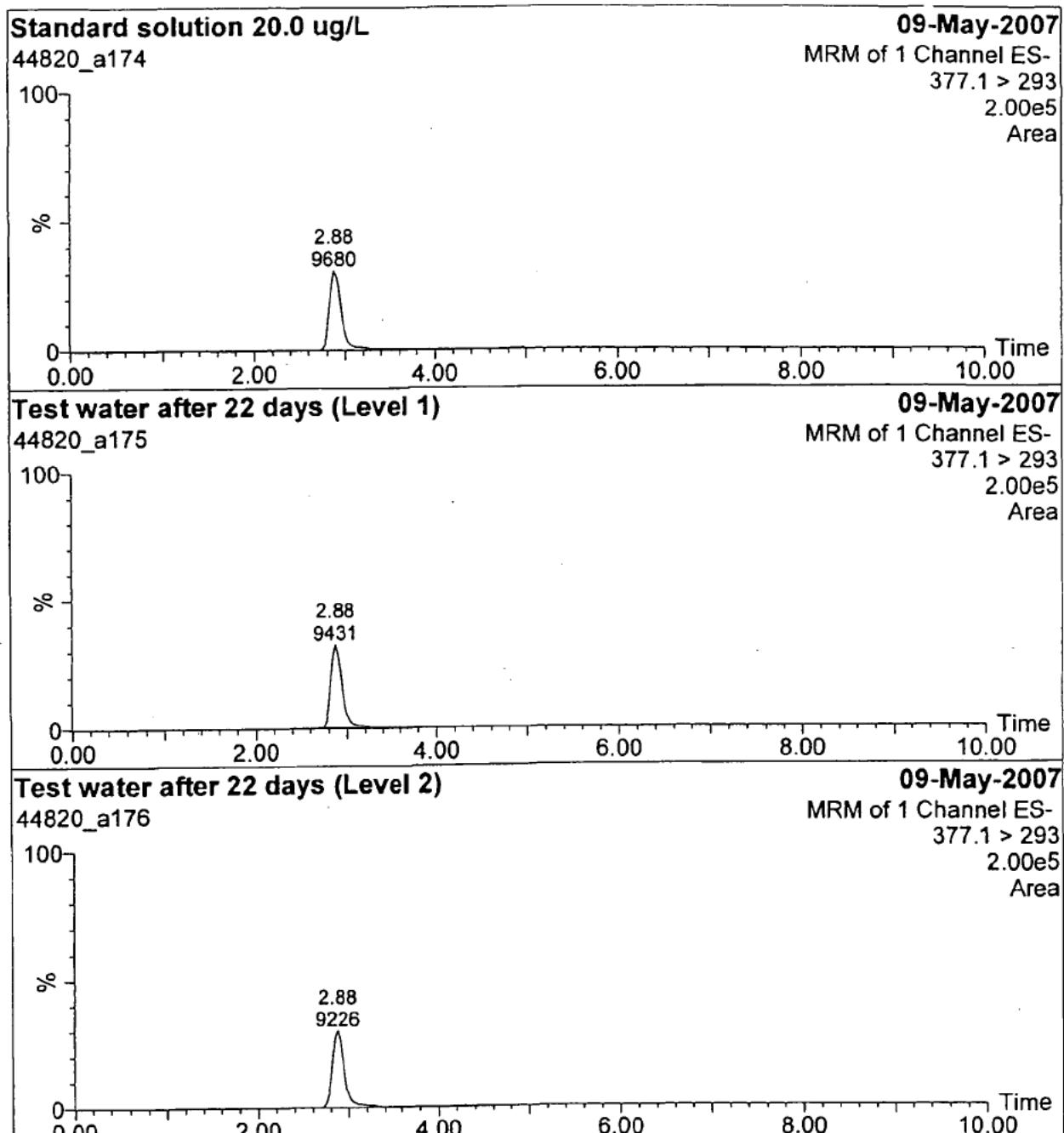
**02-May-2007**MRM of 1 Channel ES-
377.1 > 293
1.50e5
Area**Test water after 15 days (Level 2)**

44820_a144

**02-May-2007**MRM of 1 Channel ES-
377.1 > 293
1.50e5
Area

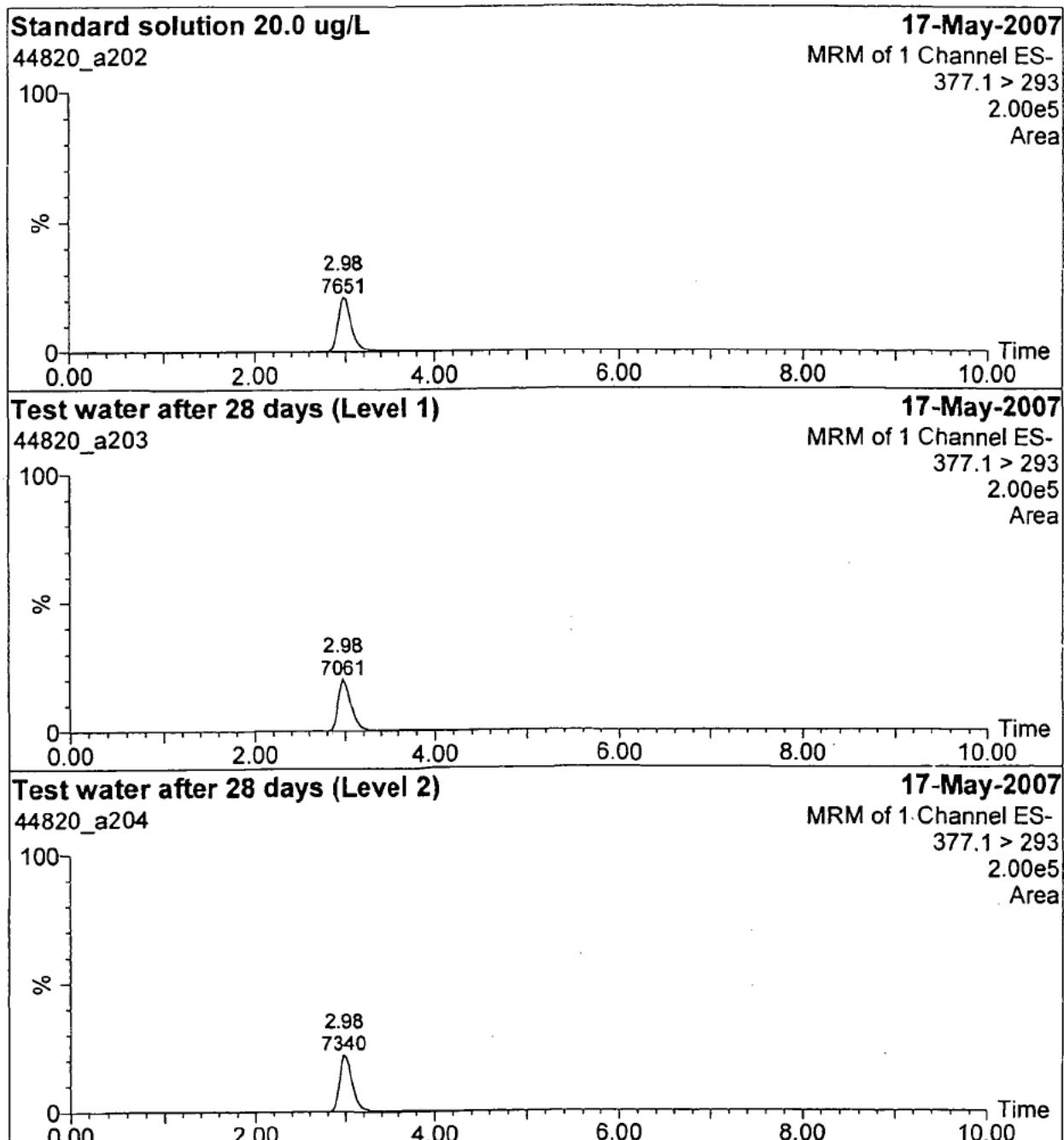
44820 2007.5.2

Fig.6-4 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test water.



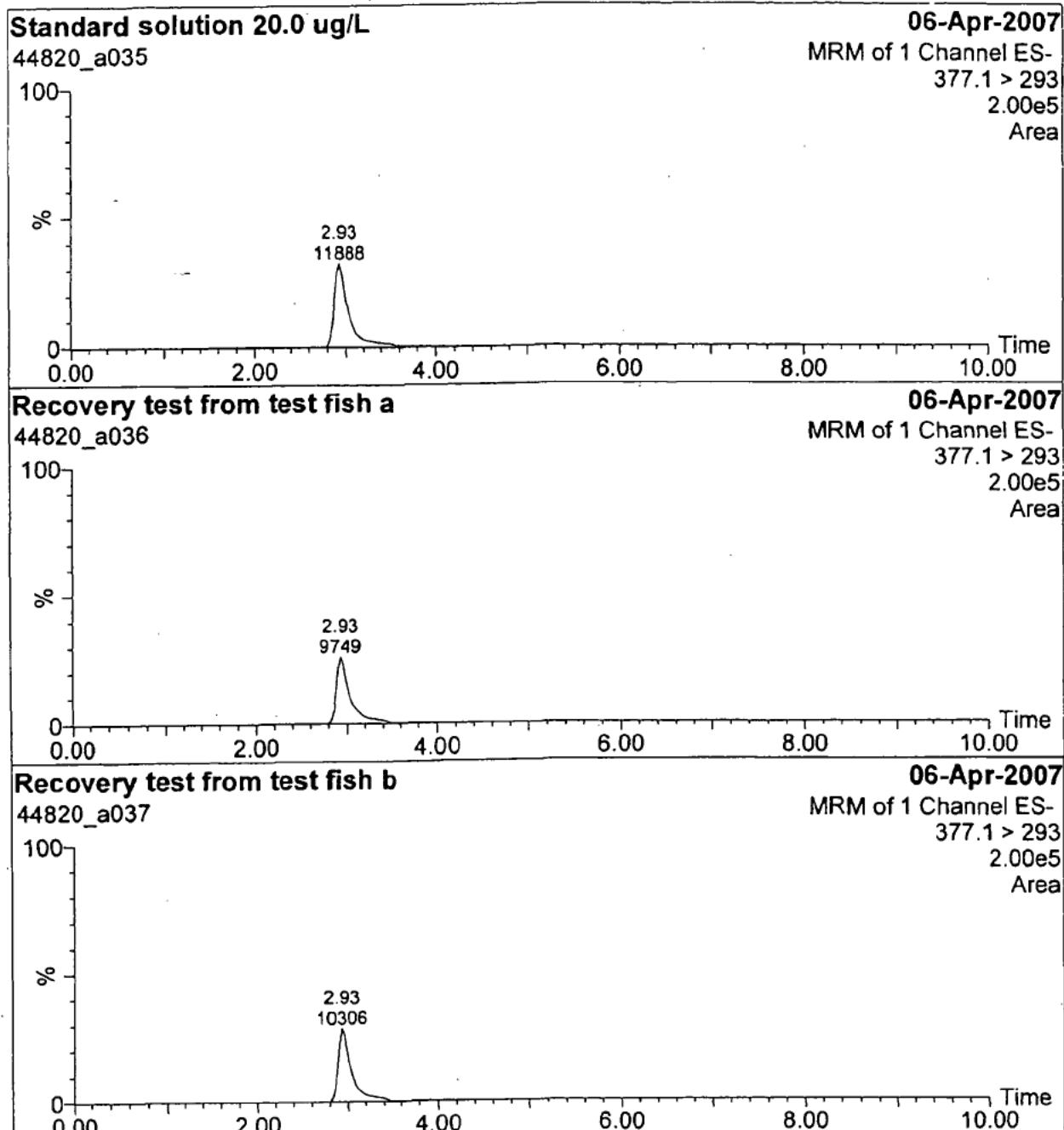
44820 2007. 5. 9

Fig.6-5 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test water.



44820 2007. 5. 17

Fig.6-6 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test water.



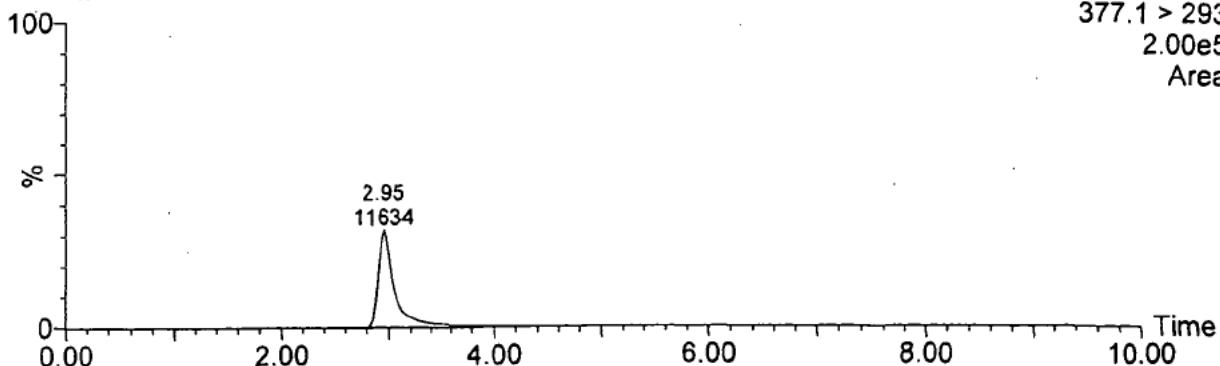
44820

2007. 4. 6

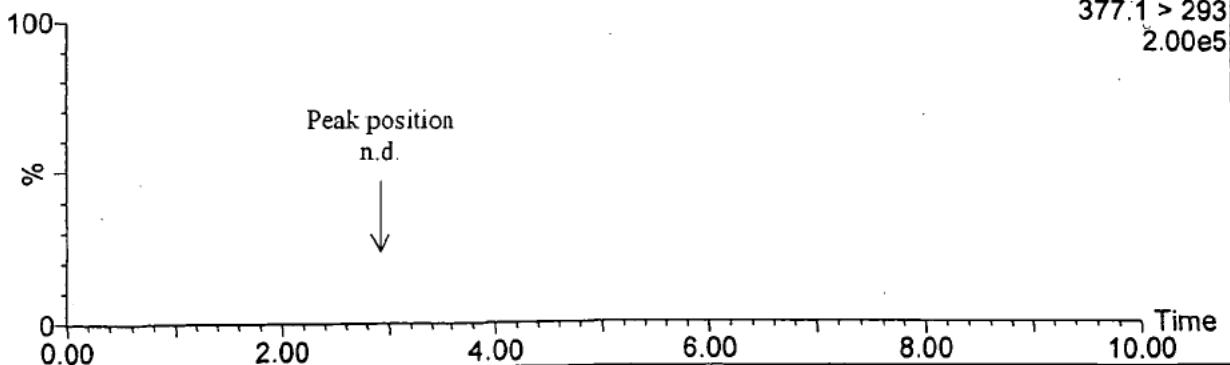
Fig.7-1 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for recovery and blank test (analysis of test fish).

Standard solution 20.0 ug/L

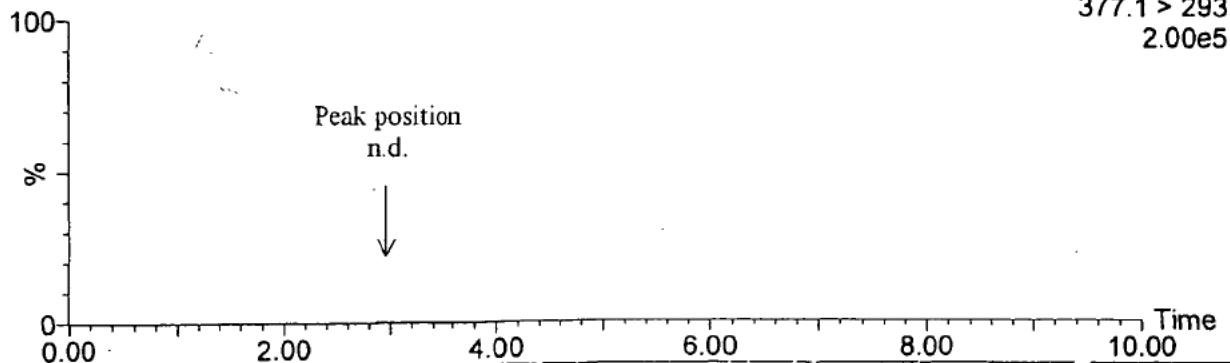
44820_a031

**Blank test of test fish a**

44820_a032

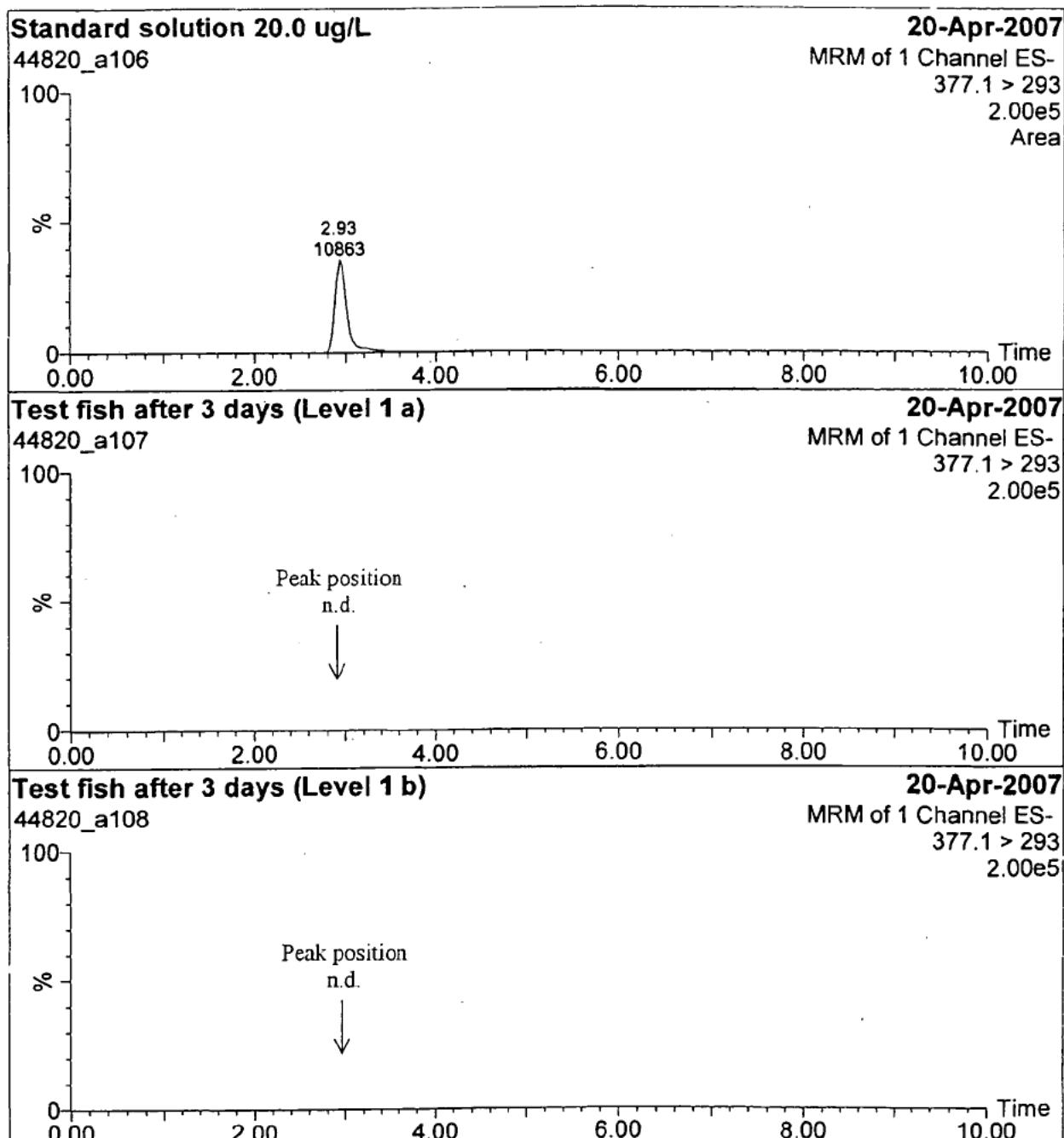
**Blank test of test fish b**

44820_a033



44820 2007. 4. 6

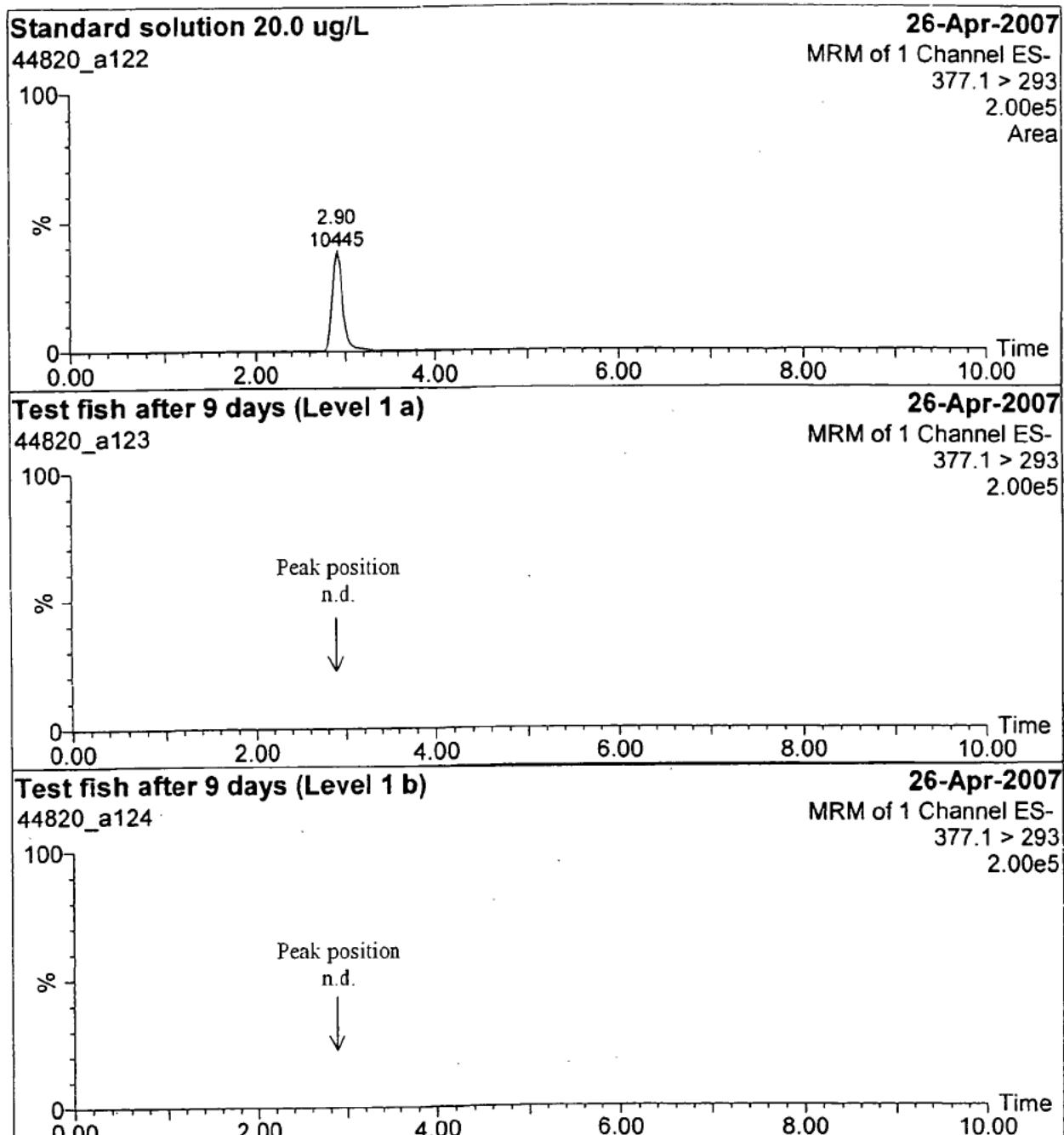
Fig. 7-2 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for recovery and blank test (analysis of test fish).



44820

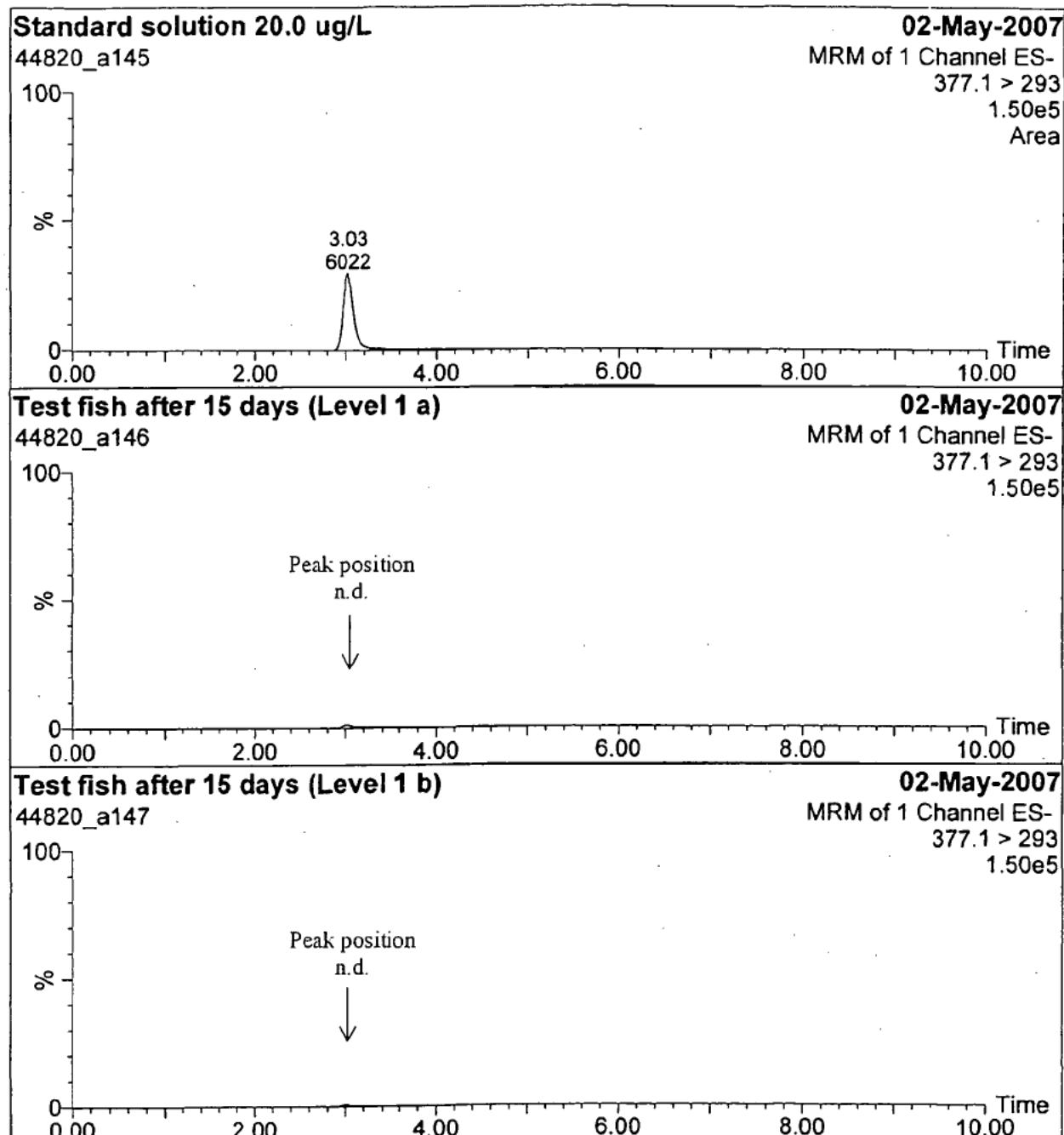
2007.4.20

Fig.8-1 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 1).



44820 2007.4.26

Fig.8-2 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 1).

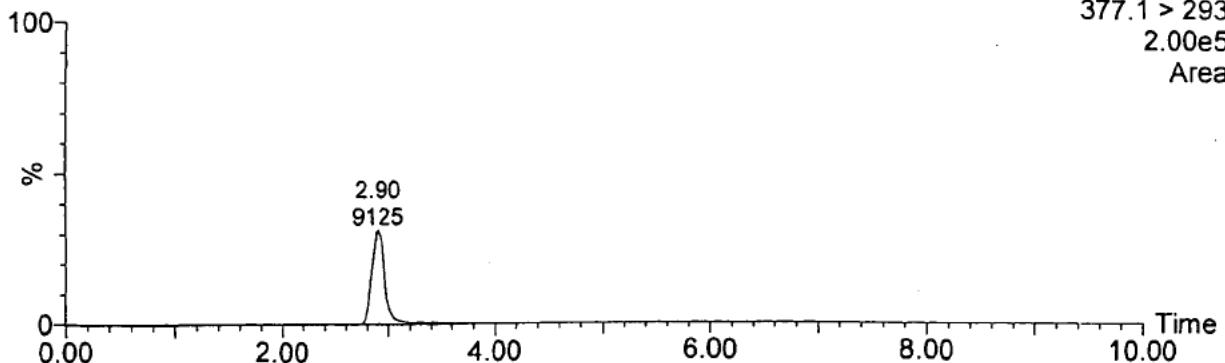


44820 2007.5.2

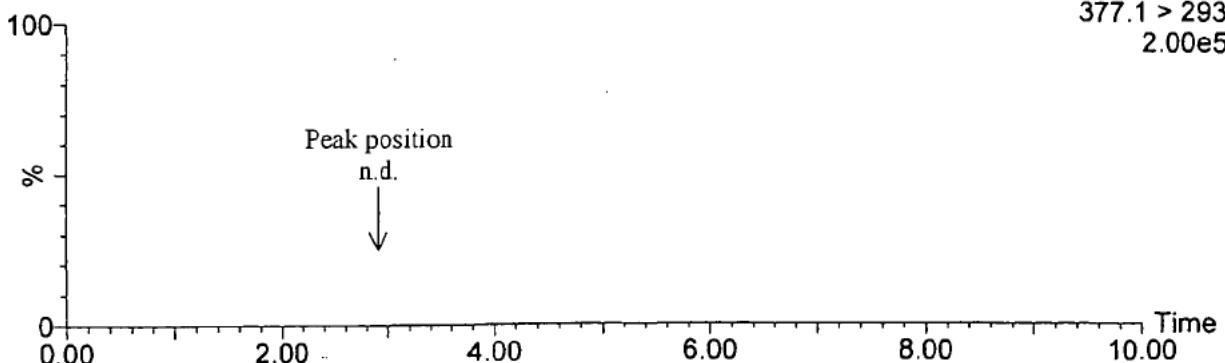
Fig. 8-3 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 1).

Standard solution 20.0 ug/L

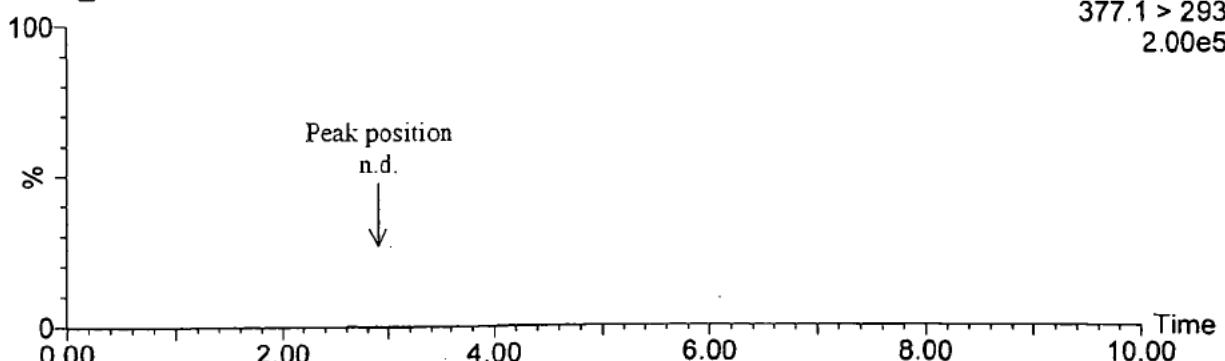
44820_a168

**Test fish after 22 days (Level 1 a)**

44820_a169

**Test fish after 22 days (Level 1 b)**

44820_a170



44820 2007.5.9

Fig.8-4 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 1).

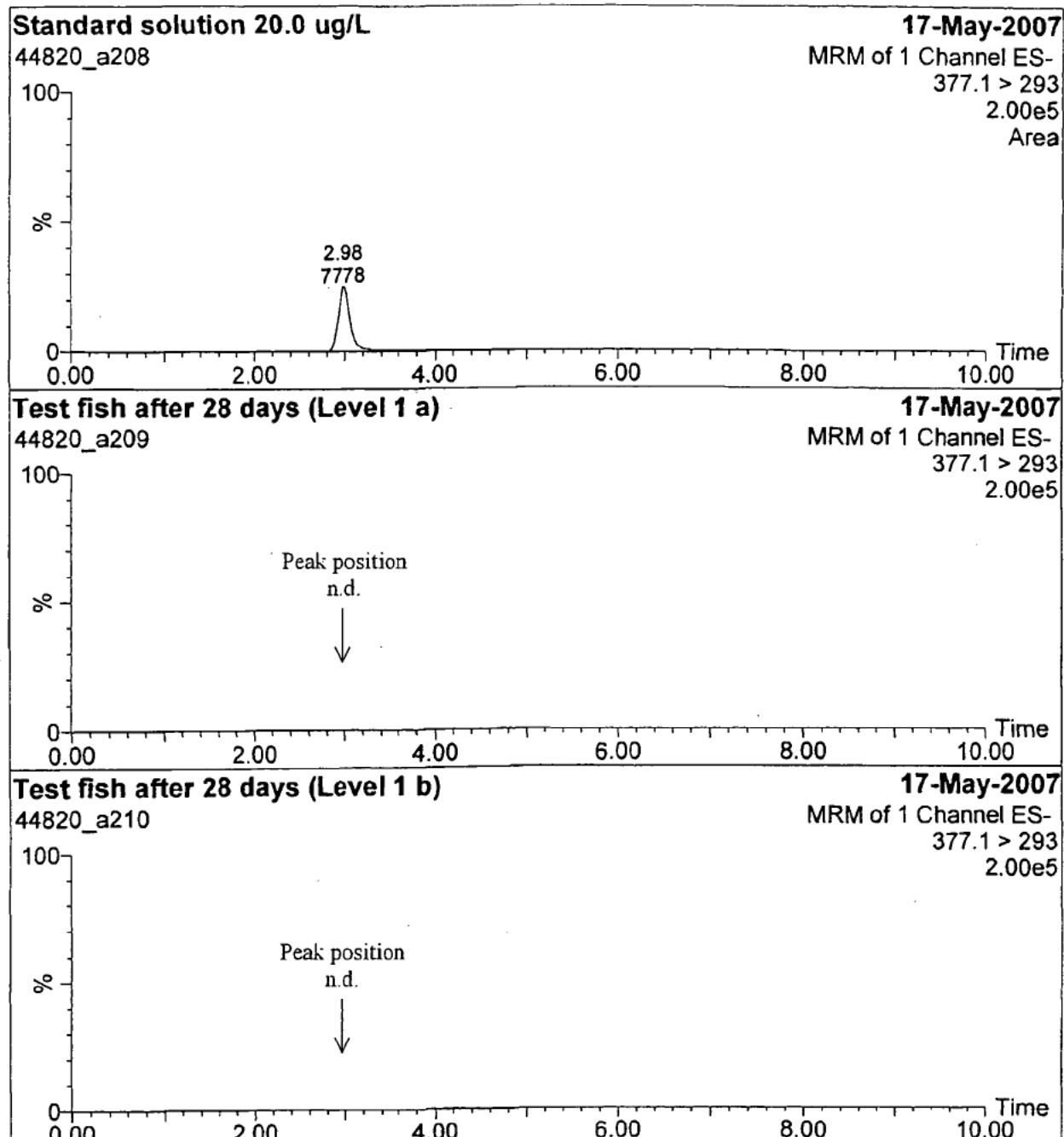
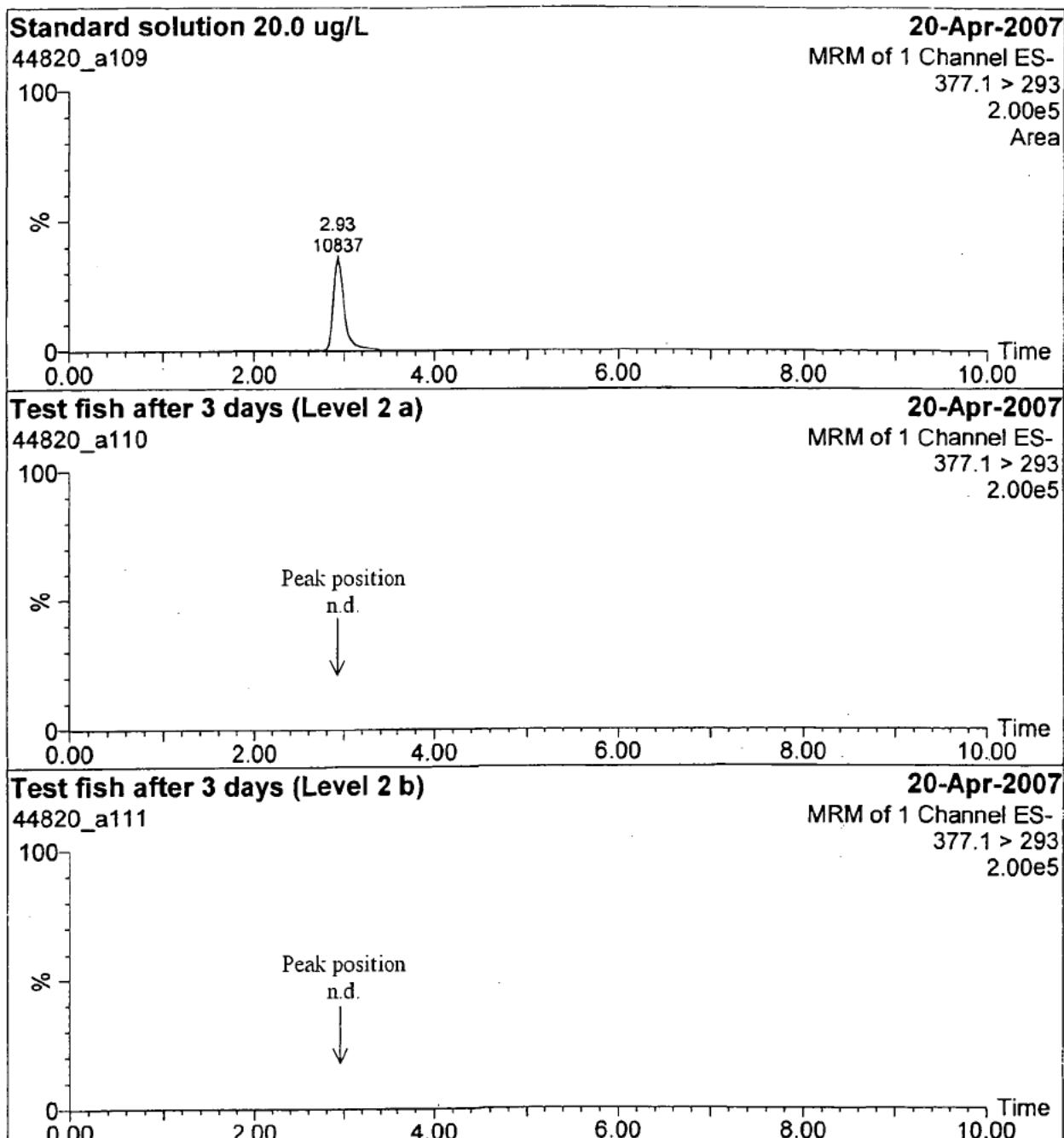


Fig.8-5 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 1).

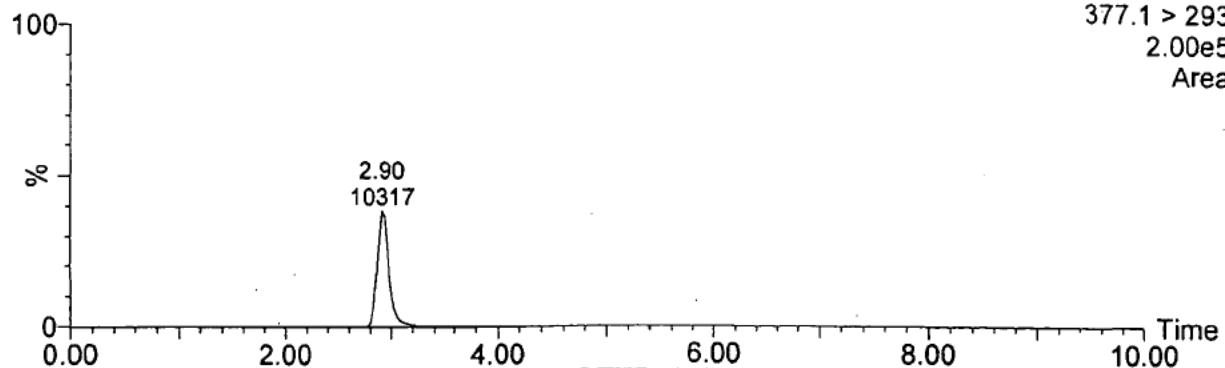


44820 2007.4.20

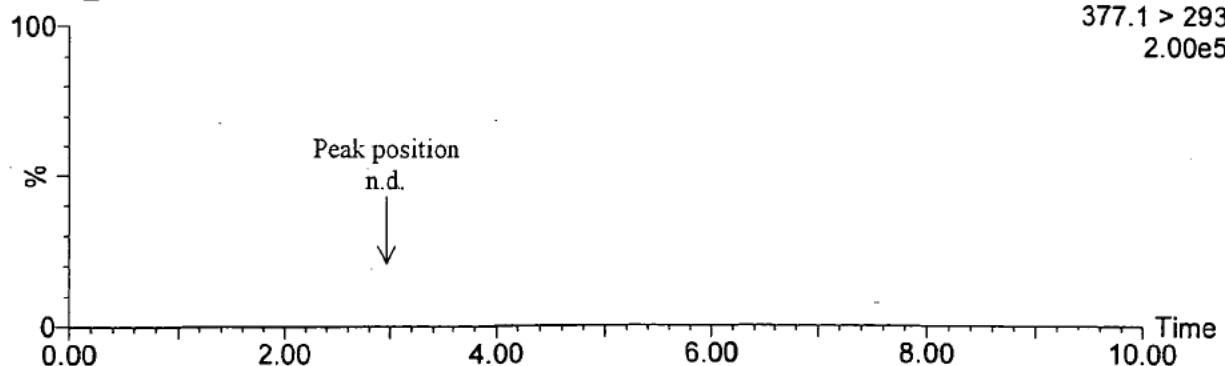
Fig.9-1 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 2).

Standard solution 20.0 ug/L

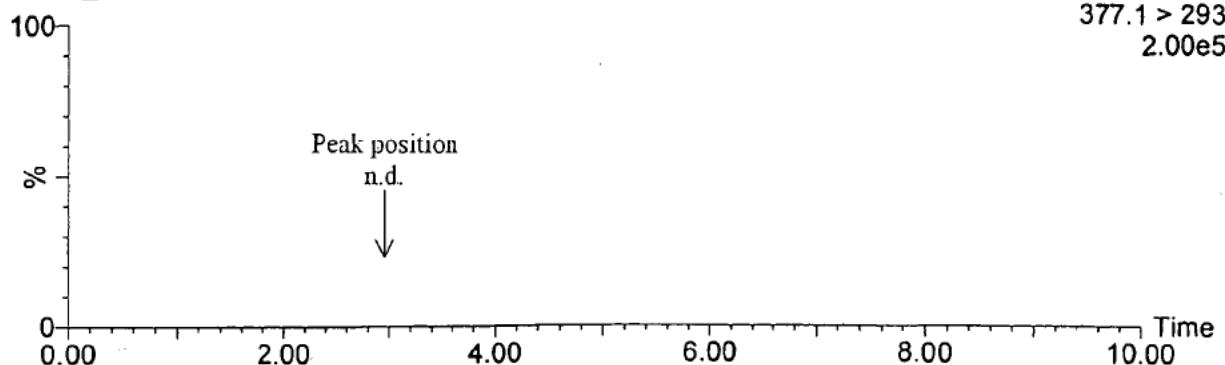
44820_a125

**Test fish after 9 days (Level 2 a)**

44820_a126

**Test fish after 9 days (Level 2 b)**

44820_a127



44820 2007.4.26

Fig.9-2 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 2).

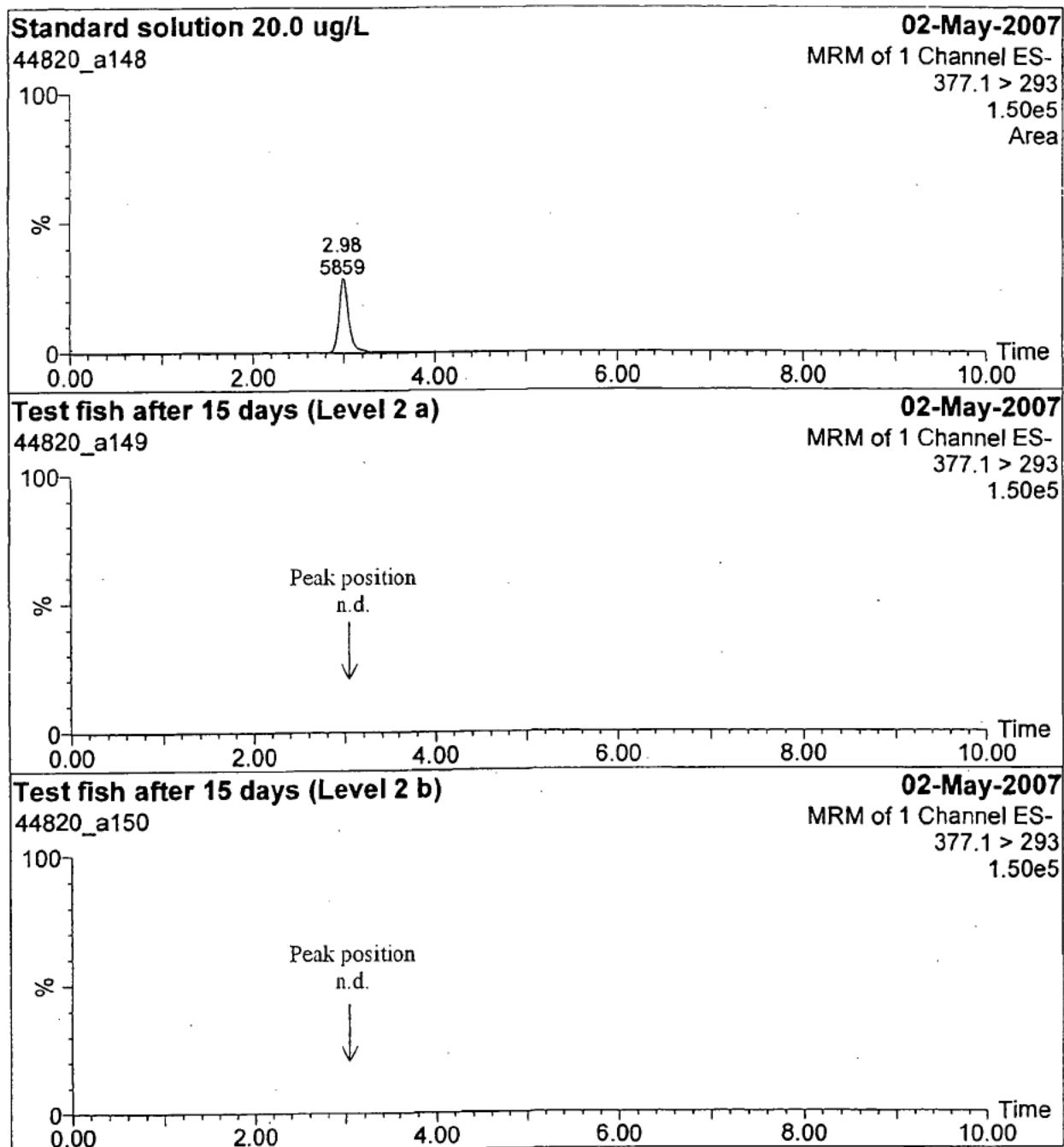
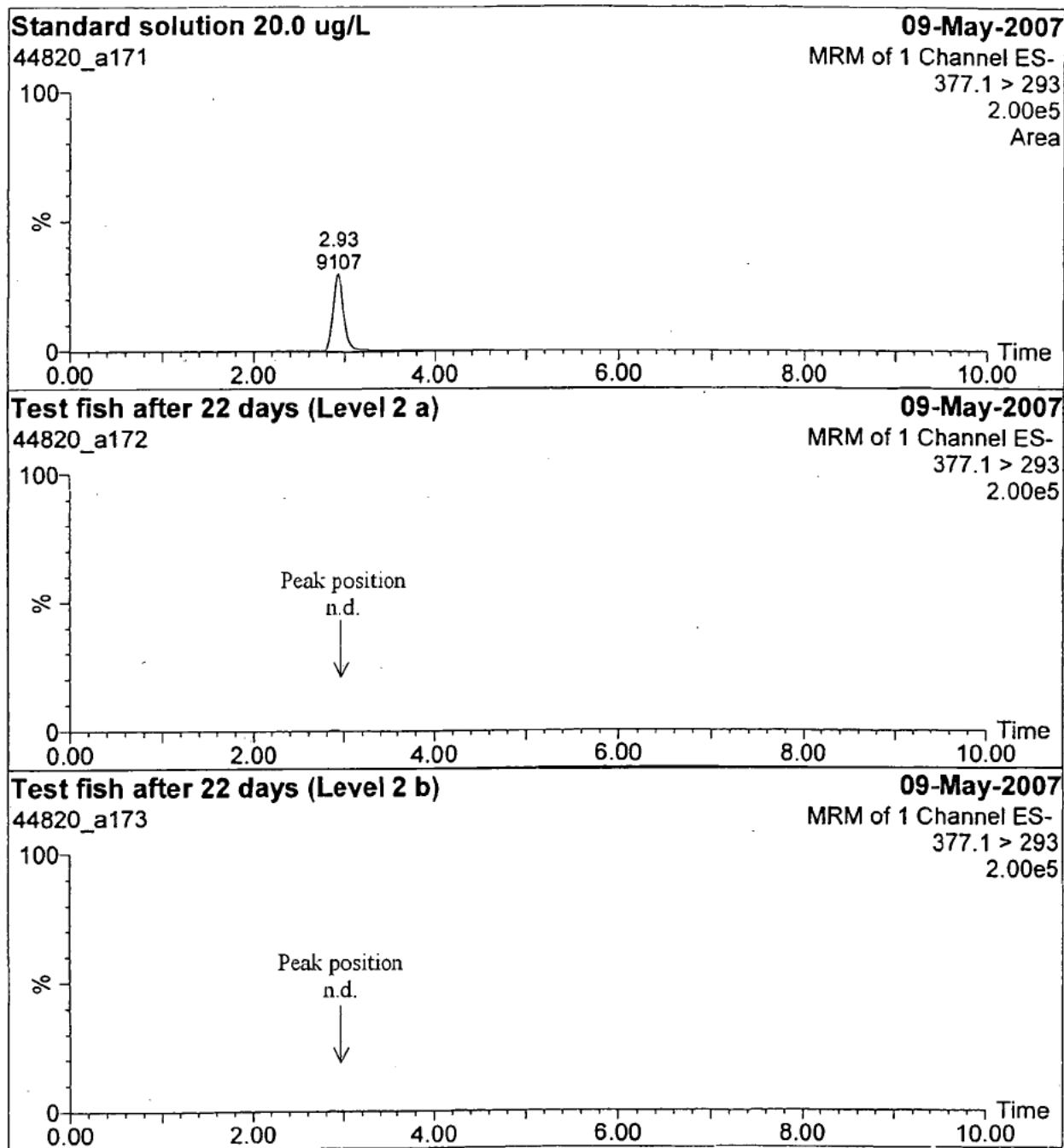


Fig.9-3 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 2).

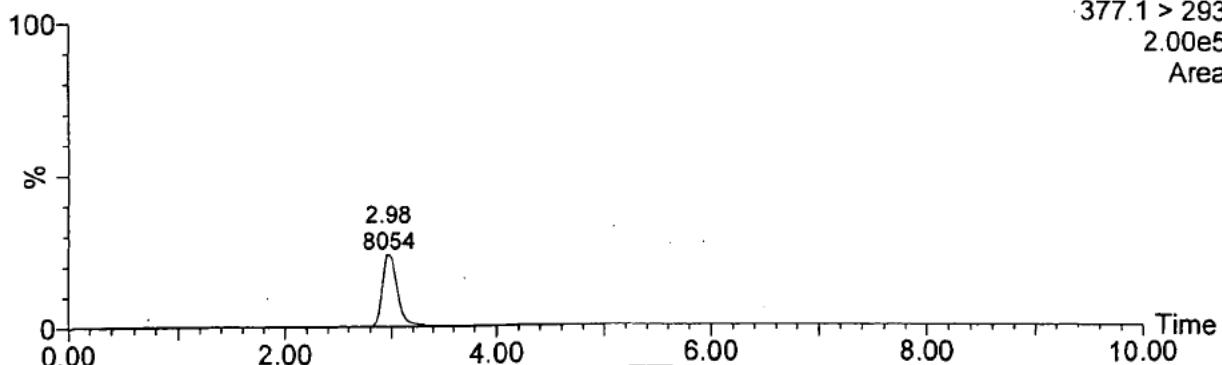


44820 2007.5.9

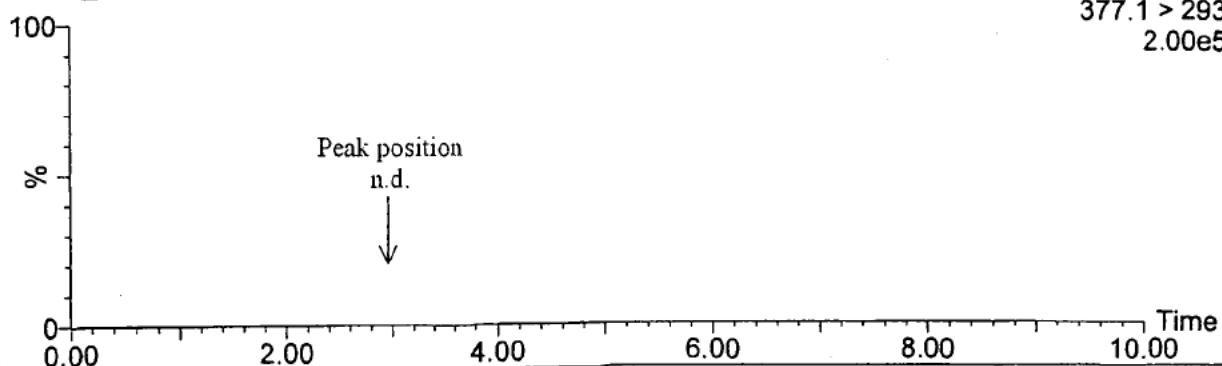
Fig.9-4 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 2).

Standard solution 20.0 ug/L

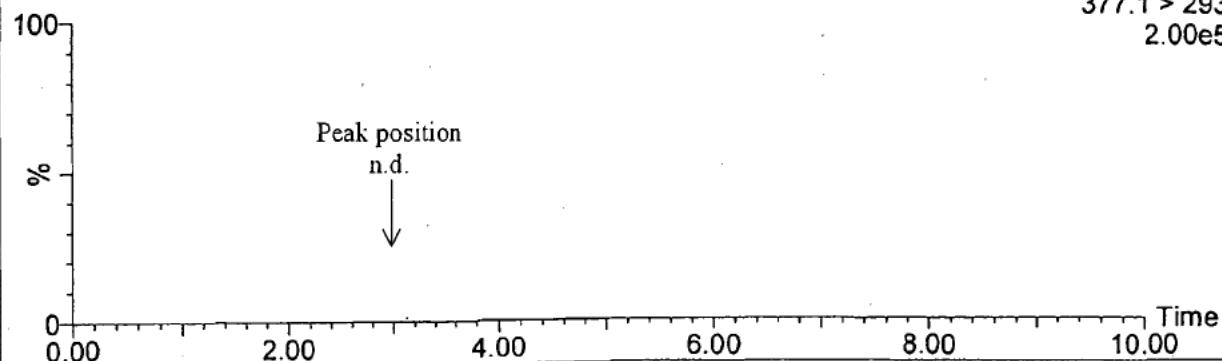
44820_a211

**Test fish after 28 days (Level 2 a)**

44820_a212

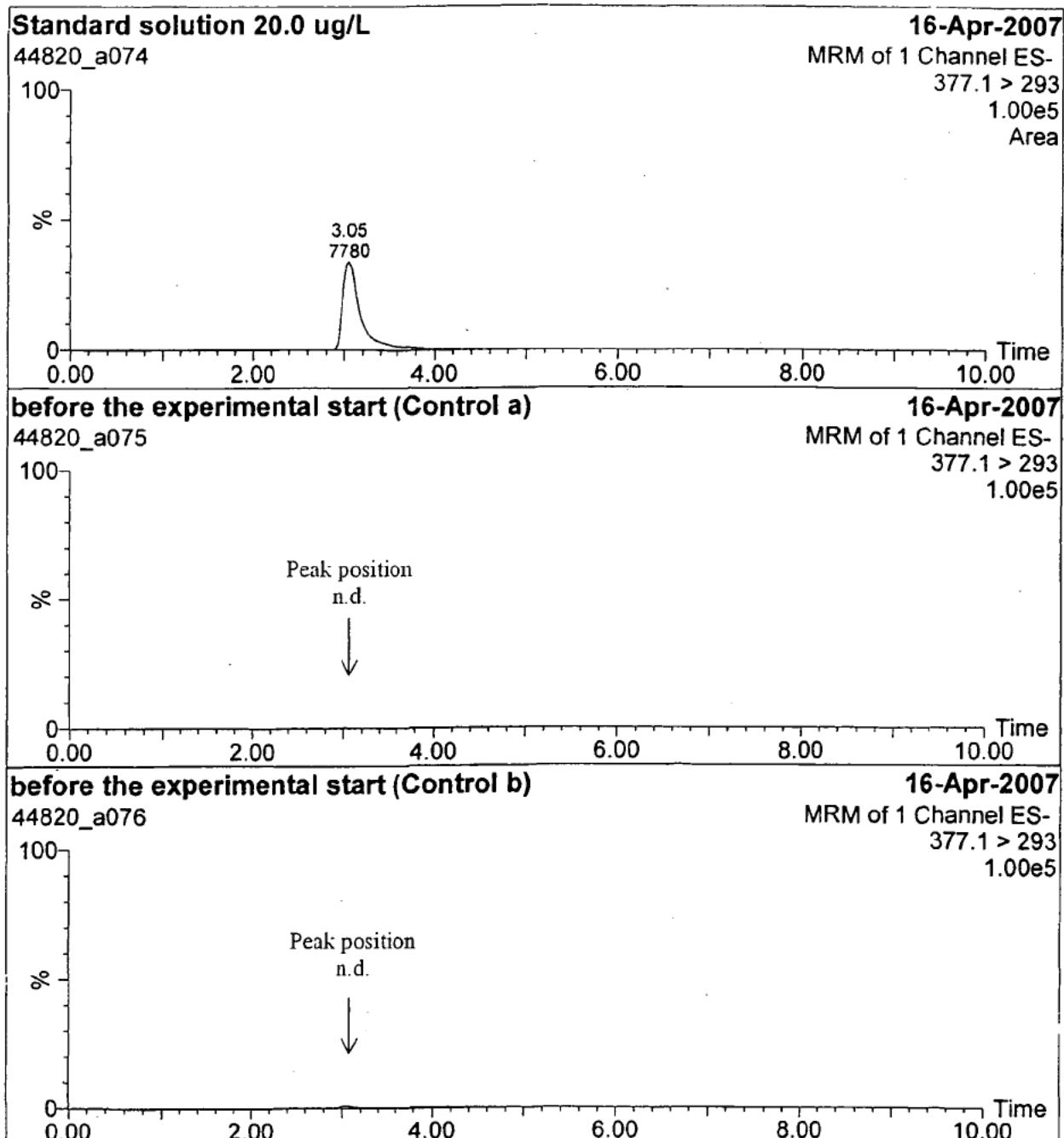
**Test fish after 28 days (Level 2 b)**

44820_a213



44820 2007.5.17

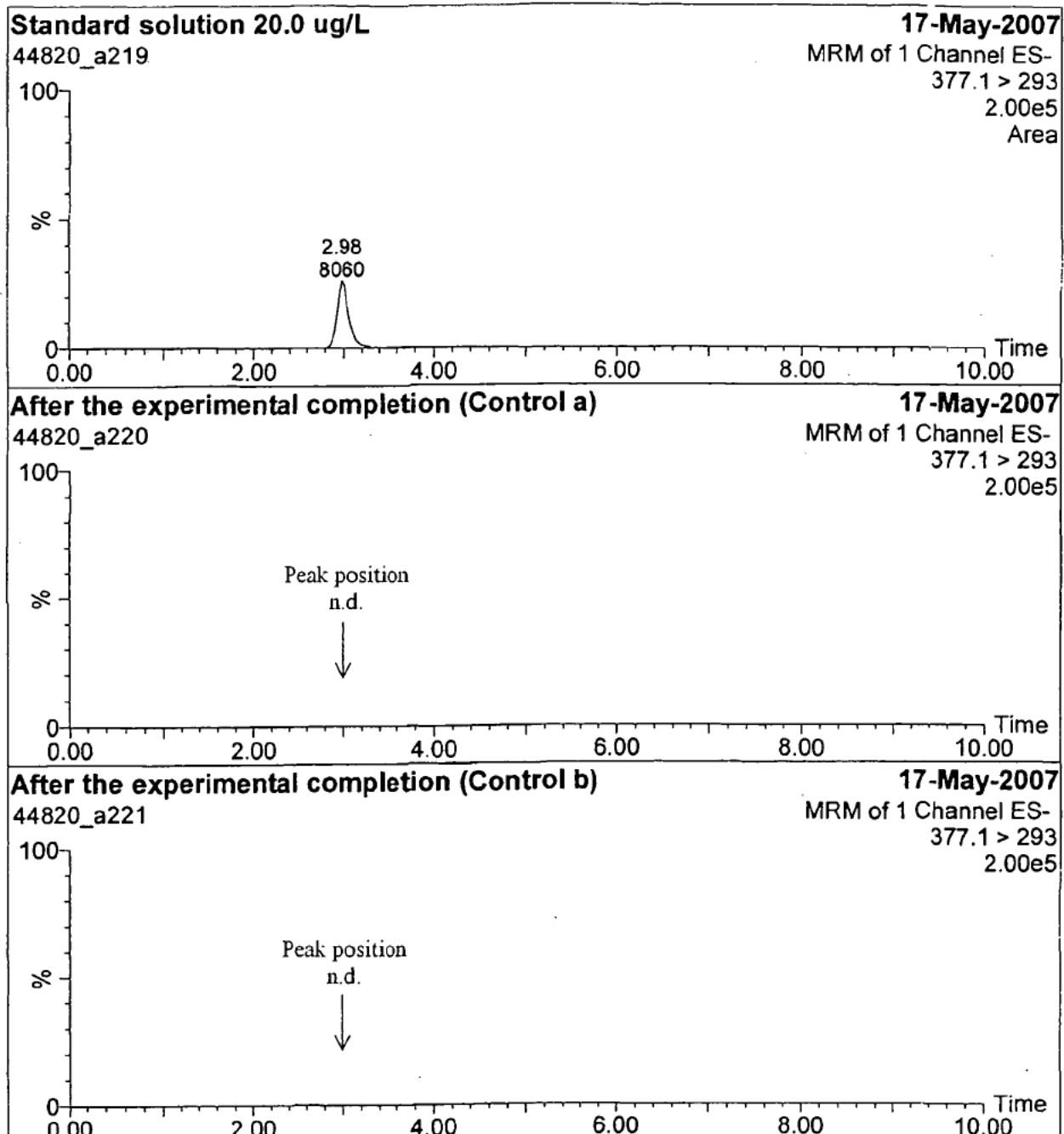
Fig.9-5 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Level 2).



44820

2007.4.16

Fig.10-1 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Control).



44820 2007.5.17

Fig.10-2 Chromatograms of LC-MS/MS analysis for test fish (Control).

Instrument MS : Micromass Quattro Ultima Pt
LC : Waters Alliance269

Sample Standard solution 10.0 mg/L (test item)

LC Conditions

Inlet system Column
Column L-column ODS
Column size 15 cm x 2.1 mm I.D.
Column temperature 40 °C
Eluent Methanol*/Water* (8/2 V/V)

*Containing 5mmol/L di-n-butylammonium acetate

Flow rate 0.2 mL/min
Sample size 5 µL
(Solvent Methanol/Water (1/1 V/V))

MS Conditions

Ionization mode ESI
Detection mode Negative
Function MS Scan
Scan range m/z = 100 - 800
Source block temperature 150 °C
Desolvation temperature 400 °C
Cone voltage 40 V

Fig. 11 – 1 Mass spectrum of test item (analytical conditions).

Date 2007/6/20 Operator

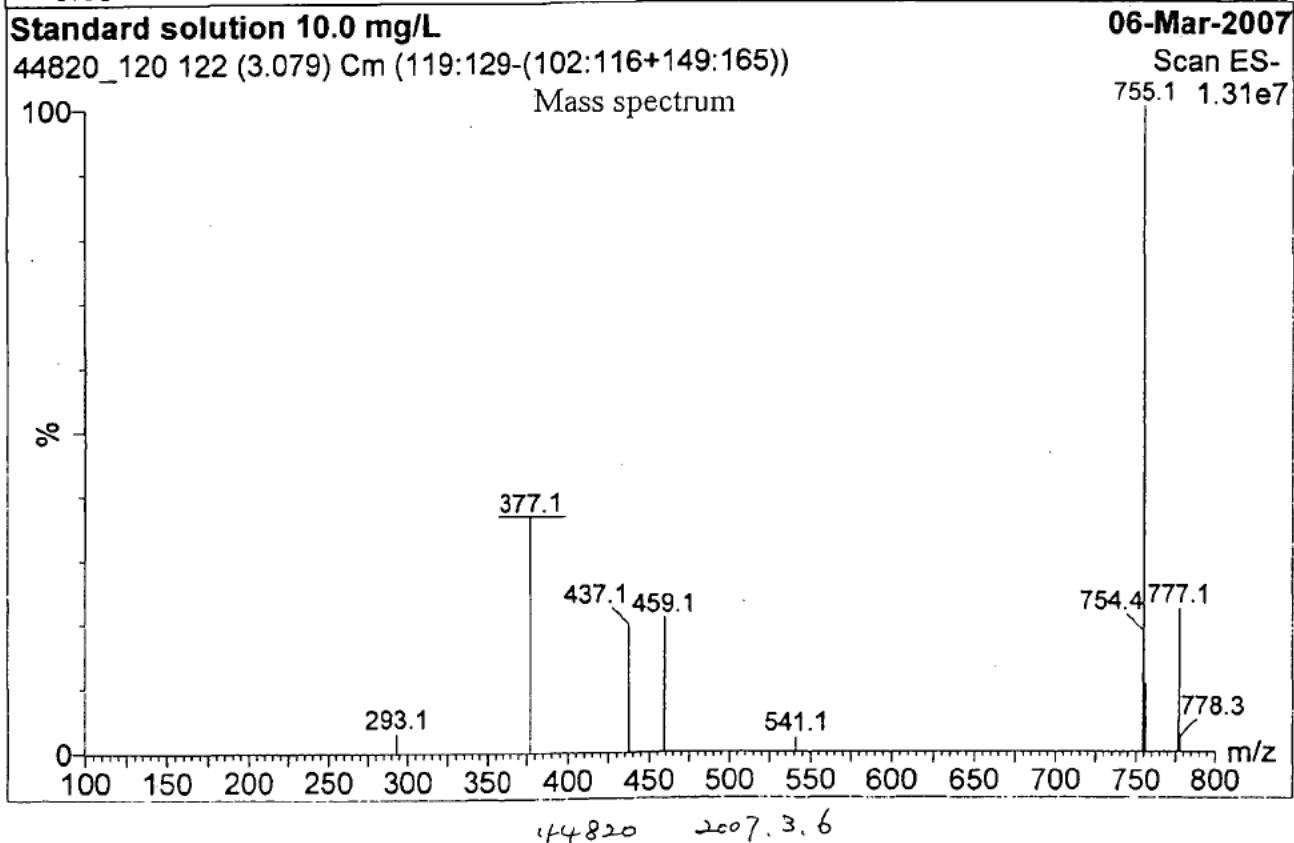
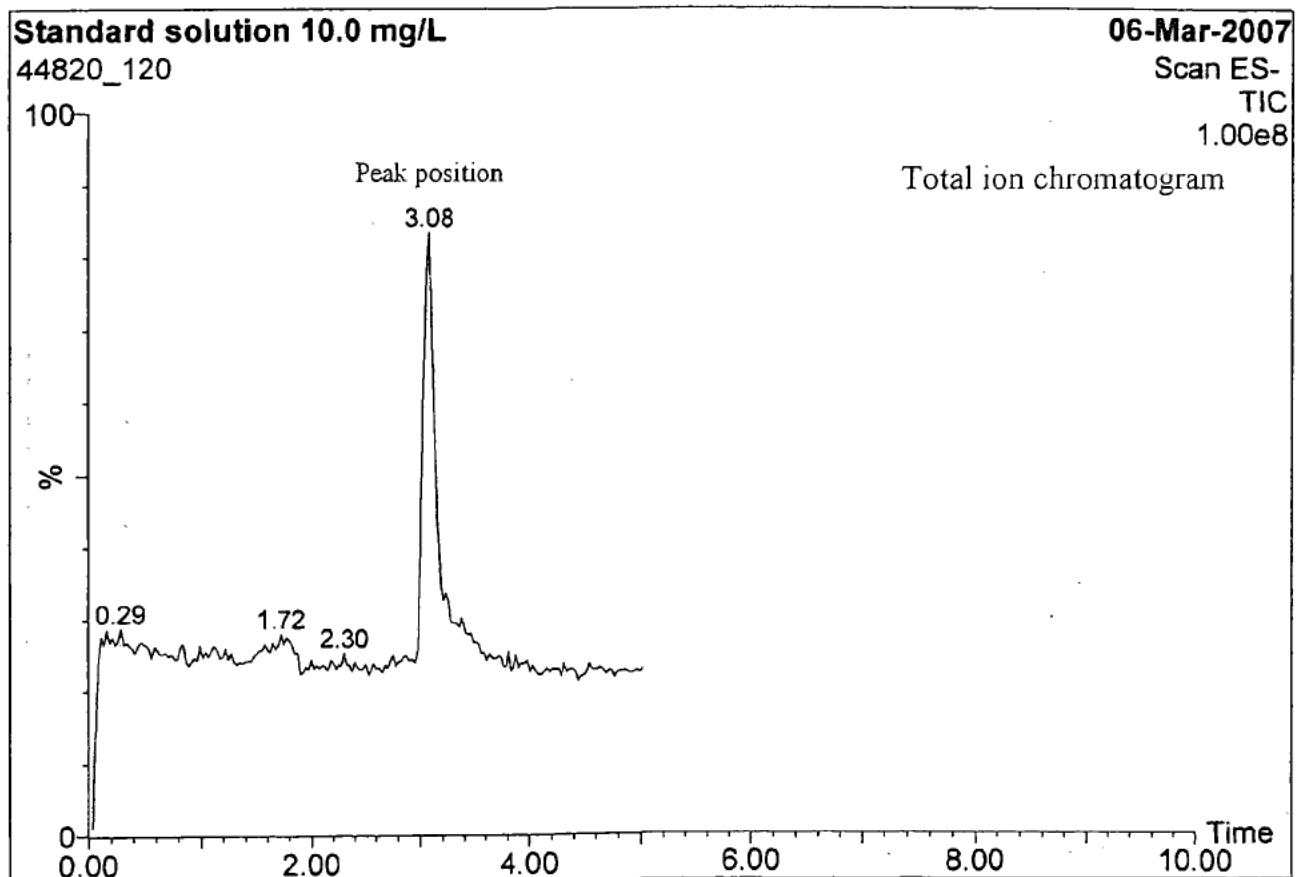
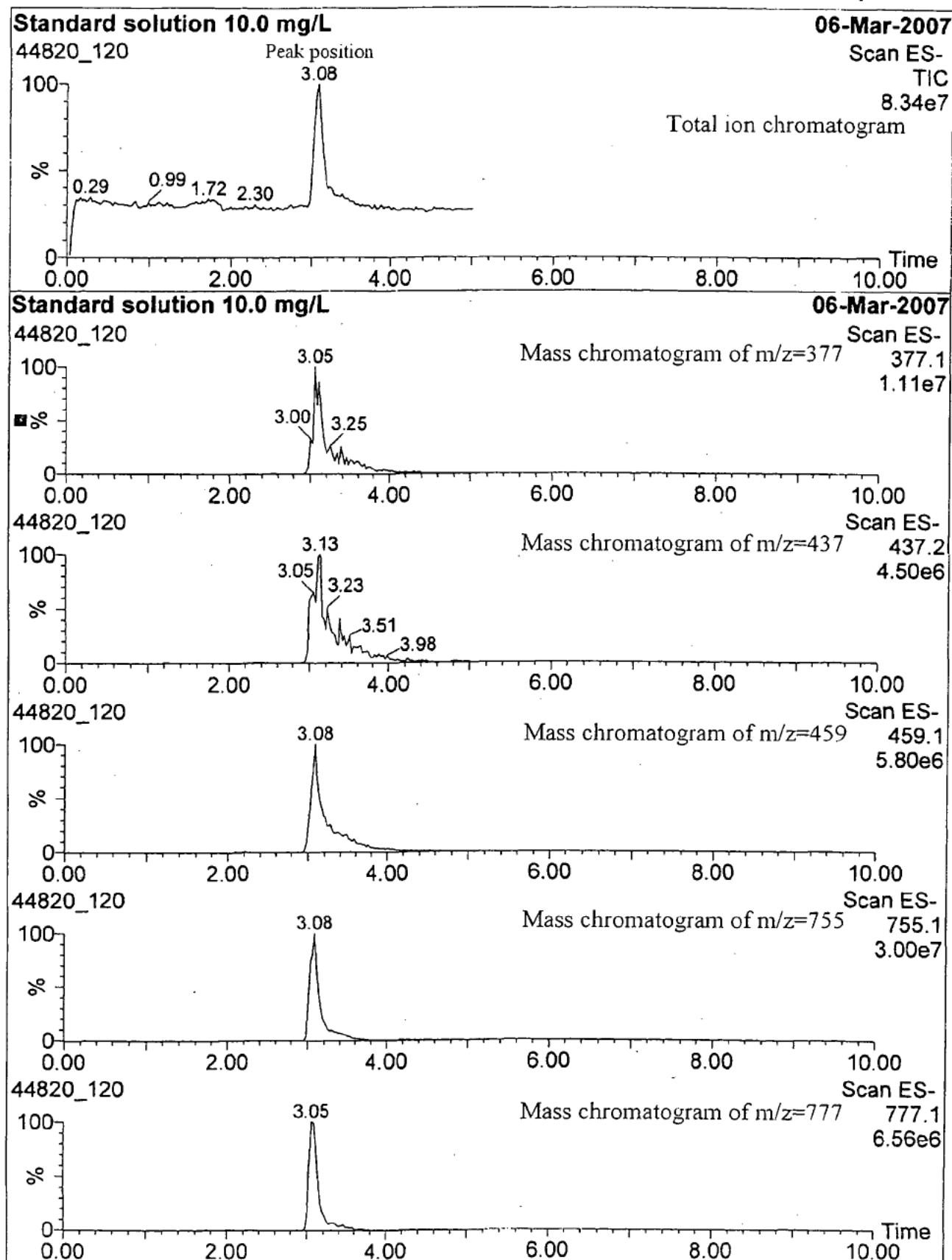
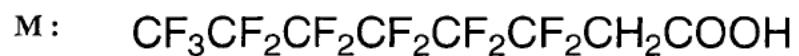


Fig. 11-2 Mass spectrum of test item.



44820 2007, 3. 6

Fig. 11-3 Mass spectrum of test item.



Mass number 378

m/z	Molecular-related ion
377	(M - H) ⁺
437	(M + CH ₃ COOH - H) ⁺
459	(M - H + Na + CH ₃ COOH - H) ⁺
755	(2M - H) ⁺
777	(2M - H + Na - H) ⁺

448²⁰
2007.6.8

Fig. 11-4 Mass spectrum of test item (main presumed ions).

Instrument MS : Micromass Quattro Ultima Pt
LC : Waters Alliance269

Sample Standard solution 10.0 mg/L (test item)

LC Conditions

Inlet system Column
Column L-column ODS
Column size 15 cm x 2.1 mm I.D.
Column temperature 40 °C
Eluent Methanol*/Water* (8/2 V/V)

*Containing 5mmol/L di-n-butylammonium acetate

Flow rate 0.2 mL/min
Sample size 5 µL
(Solvent Methanol/Water (1/1 V/V))

MS Conditions

Ionization mode ESI
Detection mode Negative
Function Product Ion Scan
Precursor ion m/z = 377.1
Product ion m/z = 100 - 800
Source block temperature 150 °C
Desolvation temperature 400 °C
Cone voltage 40 V
Collision energy 10 eV

Fig. 12 – 1 Mass/Mass spectrum of test item (analytical conditions).

Date 2007 / 6 / 20 Operator _

Standard solution 10.0 mg/L

44820_122

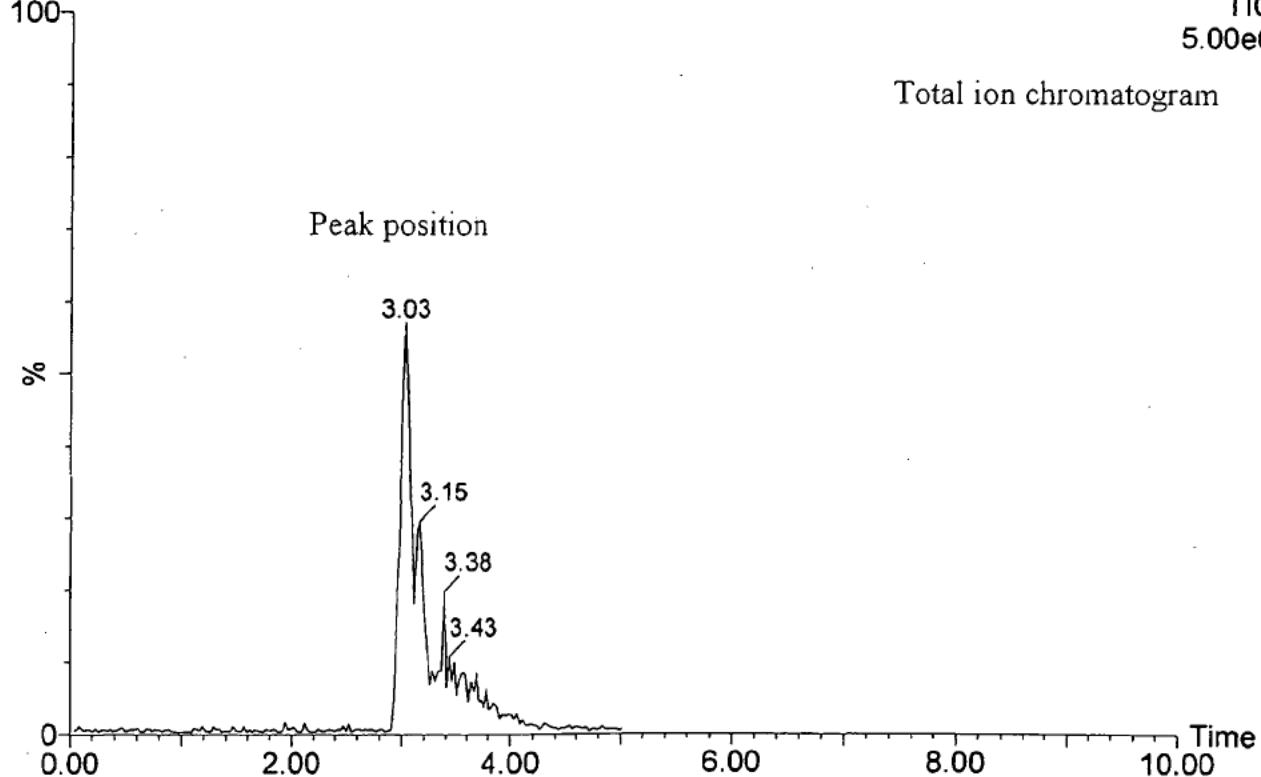
06-Mar-2007

Daughters of 377ES-

TIC

5.00e6

Total ion chromatogram

**Standard solution 10.0 mg/L**

44820_122 120 (3.028) Cm (118:127-(100:112+160:182))

06-Mar-2007

Daughters of 377ES-

1.29e6

293.0 Mass/Mass spectrum

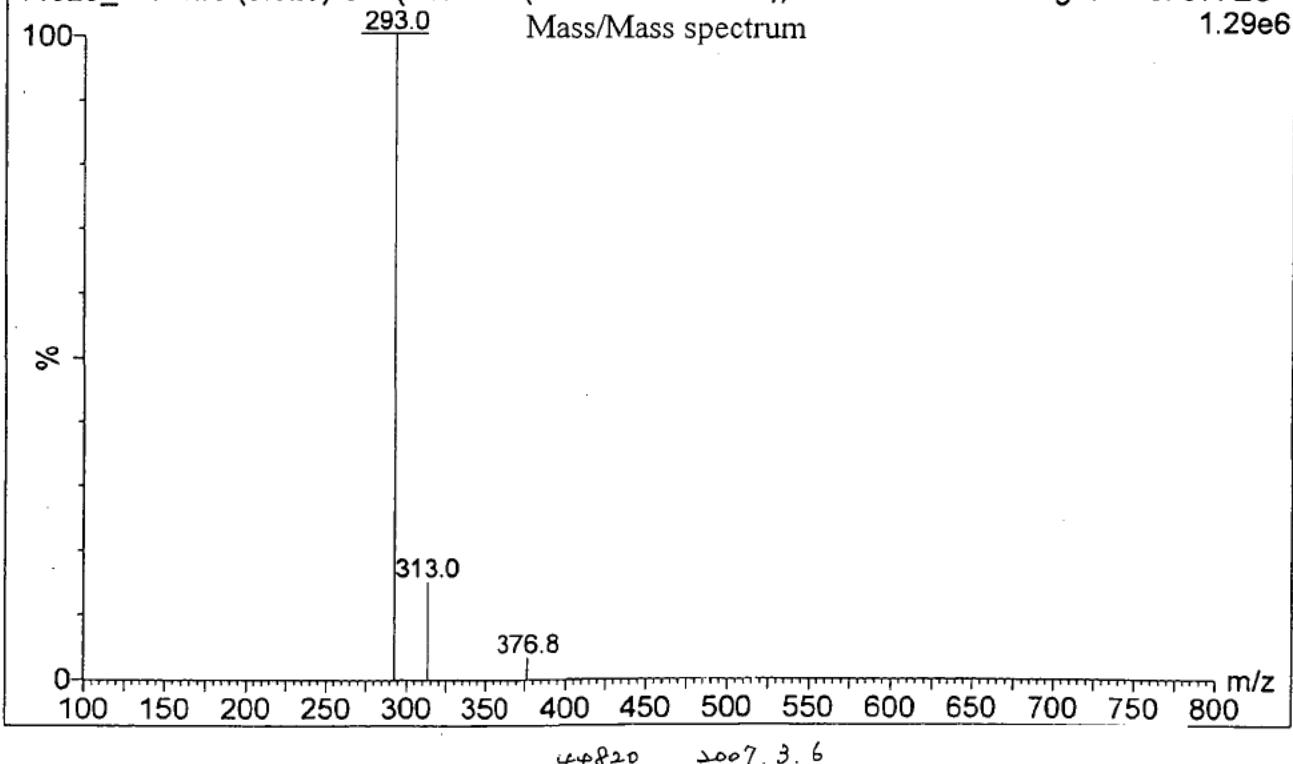


Fig.12-2 Mass/Mass spectrum of test item.

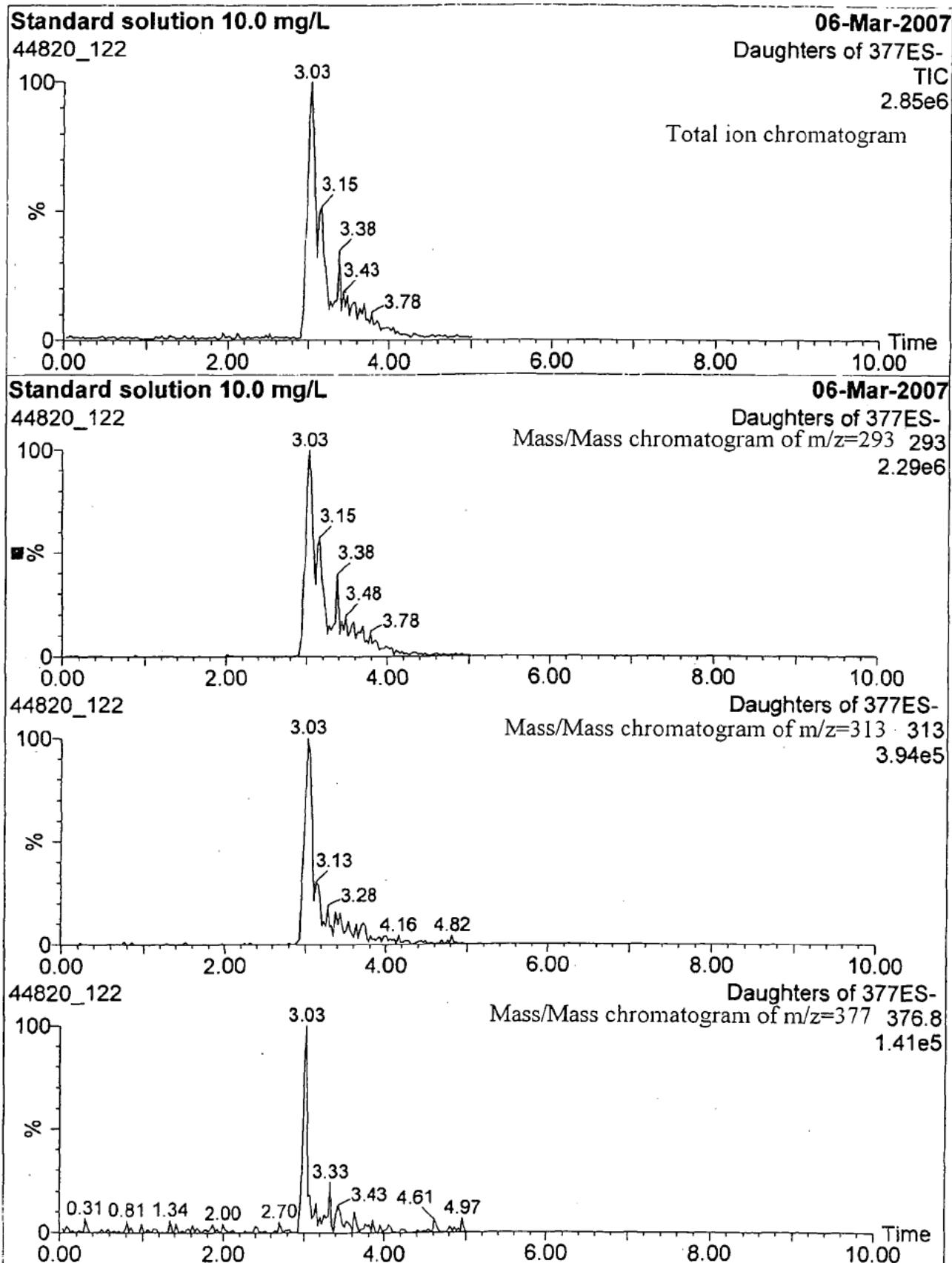


Fig.12-3 Mass/Mass spectrum of test item.



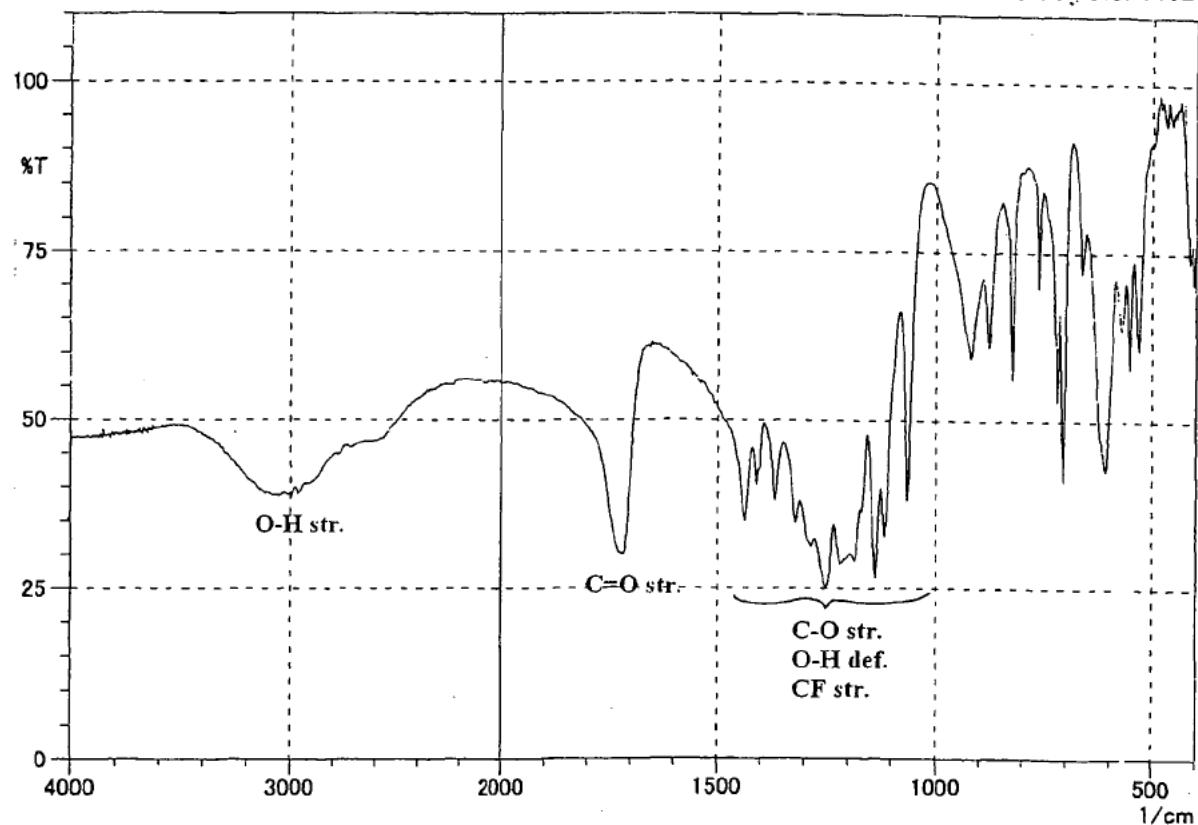
Mass number 378

m/z	Product ion
293	(M - CO ₂ , - 2HF - H) ⁺
313	(M - CO ₂ , - HF - H) ⁺
377	(M - H) ⁺

448 20
2007. 6. 20

Fig. 12-4 Mass/Mass spectrum of test item (main presumed product).

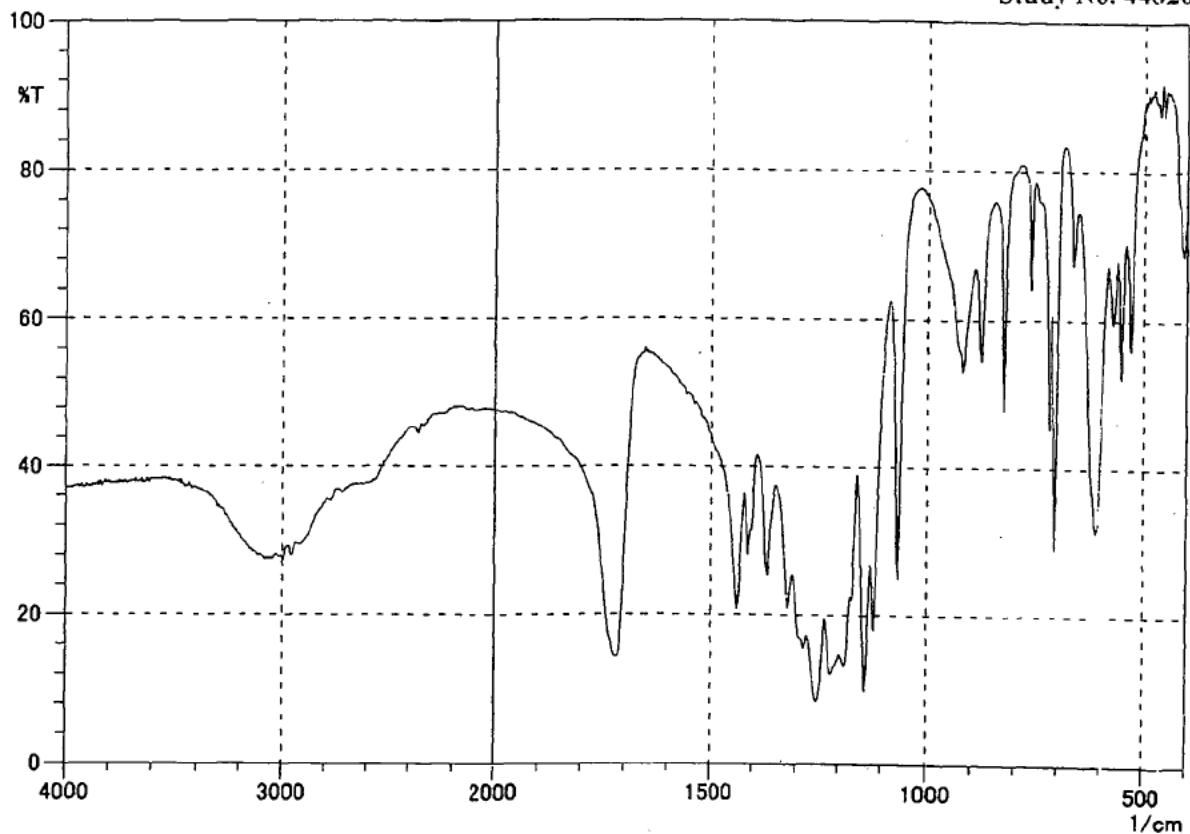
Study No. 44820



Instrument : Shimadzu IRPrestige-21
Study No. : 44820
Sample : Test item
Method : KBr tablet
Date : Dec. 20, 2006
Name :

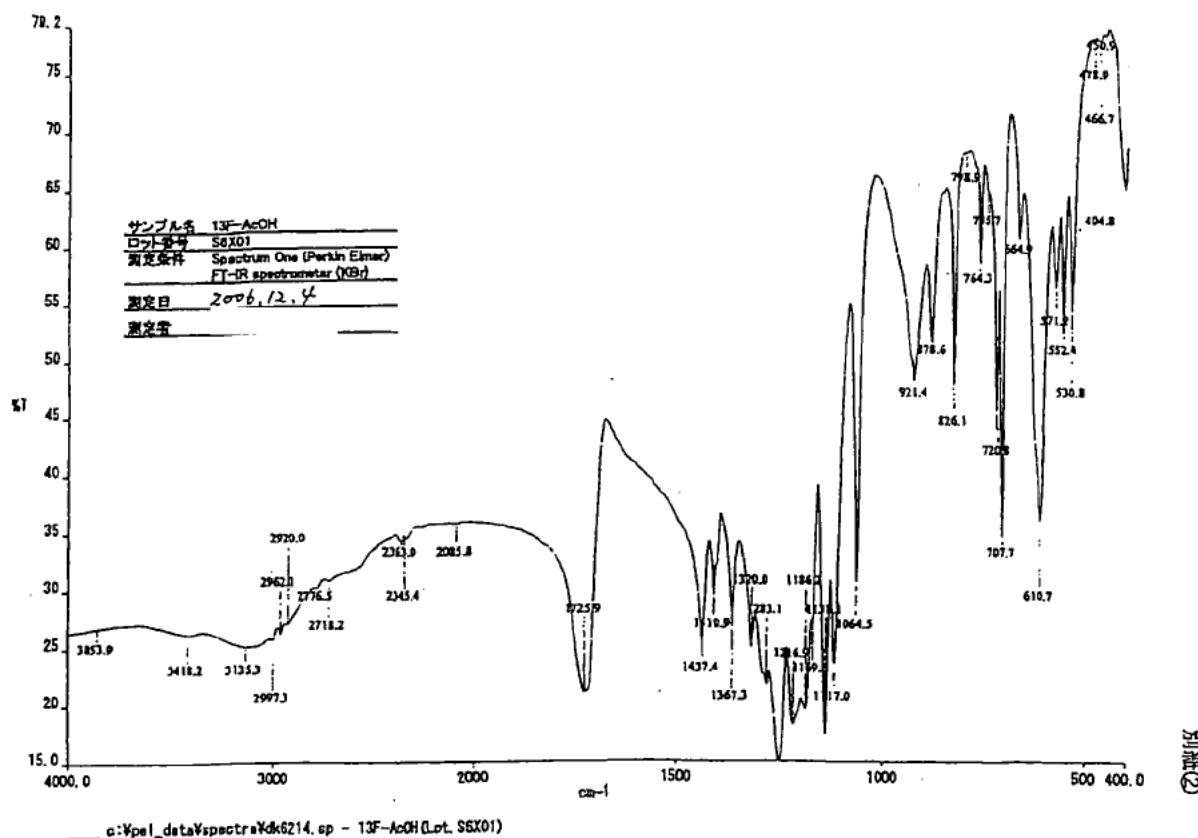
Fig. 13 - 1 IR spectrum of test item measured before experimental start.

Study No. 44820



Instrument : Shimadzu IRPrestige-21
Study No. : 44820
Sample : Test item
Method : KBr tablet
Date : May. 22, 2007
Name :

Fig. 13 - 2 IR spectrum of test item measured after experimental completion.



Reference 2 IR spectrum supplied by sponsor.