8EHQ-0697-13969

CERTIFIED MAIL/
RETURN RECEIPT REQUESTED

**Hoechst Celanese Corporation**
30 Independence Boulevard
P.O. Box 4915
Warren, New Jersey 07060-4915

June 23, 1997

Attn: TSCA Section 8(e) Coordinator
Document Processing Center (TS-790)
U. S. Environmental Protection Agency
401 M. Street S.W.
Washington, D.C. 20460

**Contains No CBI**

Dear Sir or Madam:

In accordance with the reporting requirements of TSCA Section 8(e), Hoechst Celanese Corporation hereby submits the results of an acute aquatic toxicity study involving an imported product, trade named Naphthol AS-PH, CAS No. 92-74-0. [2-Naphthalenecarboxamide, N-(2-ethoxyphenyl)-3-hydroxy-].

Naphthol AS-PH was tested for acute toxicity in zebrafish using the OECD guidelines for testing of chemicals, 203 Fish, Acute Toxicity Text, adopted April 4, 1984. Naphthol AS-PH, a yellow/brown powder, was dissolved in water. Fish were exposed at concentrations from 0.5-2.6 mg/l for 96 hours. The LC 50 in zebrafish after 48 and 96 hours was reported as 0.5-1.1mg/l. The LC 100 was reported as 2.6 mg/l. The material has the potential to result in environmental hazards.

The commercial use of this substance is the manufacture of pigments.

This submission contains no confidential business information.

If any further information in required, please contact Robert M. Stokes, Esq. of our Law Department at 908-231-3054.

Sincerely,

Susan Engelman Volkert
Vice President/Deputy General Counsel

8EHQ-97-13969

LEGAL FORM
6/20/97
RMS

Attachment

cc: Robert M. Stokes, Esq.

88970000219

[LOG206/004.DOC]

RECEIVED
OPPT NCIC
97 JUL -7 AM 9:

**Naphthol AS-PH, rein**

HOE CG 0349 OD ZD96 0001

Prüfung der akuten Toxizität am Fisch

Zebrabärbling (Brachydanio rerio)

über 96 Stunden

in einem semistatischen System

Verfasser

Dr. Zok, Dr. Jung

Versuchsende

11. Oktober 1991

Prüfstelle

Pharma Entwicklung Toxikologie
Hoechst Aktiengesellschaft
Postfach 80 03 20
6230 Frankfurt 80

Versuchsnummer

91.0422

Dieser Bericht enthält unveröffentlichte Forschungsergebnisse der Hoechst AG, die weder vollständig oder auszugsweise publiziert noch in anderen Veröffentlichungen ohne Zustimmung der Hoechst AG referiert oder zitiert werden dürfen.

ERKLÄRUNG

Dieser Versuch wurde in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Guten Laborpraxis durchgeführt. Es wurden keine unvorhergesehenen Umstände beobachtet, welche die Qualität und Integrität des vorliegenden Versuches beeinträchtigt haben könnten.

Versuchsleiter : _____
(Dr. Zok)

Gewerbetoxikologie : _____
(Dr. Jung)

GLP Erklärung

Hoechst Aktiengesellschaft
Referat GLP

18.11.1991

Titel : Naphthol AS-PH, rein
HOE CG 0349 OD ZD96 0001
Prüfung der akuten Toxizität am Fisch
Zebrabärbling (Brachydanio rerio)
über 96 Stunden
in einem semistatischen System

VERSUCH NR. : 91.0422

Dieser Versuch wurde in regelmässigen Abständen inspiziert und schriftliche, ordnungsgemäss unterzeichnete Unterlagen wurden der Leitung der Forschungseinrichtung und dem Versuchsleiter wie folgt vorgelegt :

| Inspektion | Bericht |
|---|---|
| 28.08.1991 | 30.08.1991 |
| 02.09.1991 | 04.09.1991 |
| 25.09.1991 | 25.09.1991 |
| 18.11.1991 | 18.11.1991 |
| 18.11.1991 | 18.11.1991 |

Referat GLP

Vorsitzender des Aufsichtsrats: Rolf Sammet · Vorstand: Wolfgang Hilger, Vorsitzender; Günter Metz, stellv. Vorsitzender; Jürgen Dormann, Martin Frühauf, Heinz Harnisch, Karl Holoubek, Hans Georg Janson, Justus Mische, Ernst Schadow, Karl-Gerhard Seifert, Uwe Jens Thomsen; stellv.: Utz-Hellmuth Fecht
Sitz der Gesellschaft: Frankfurt am Main · Handelsregister: Frankfurt am Main Abt. B Nr. 14500

INHALTSVERZEICHNIS

ERKLÄRUNG DER QUALITÄTSSICHERUNGSEINHEIT ..... 4

1. ZUSAMMENFASSUNG ..... 6

2. VORBEMERKUNGEN ..... 7

3. ÜBERSICHT ..... 8

4. MATERIAL UND METHODE ..... 9

4.1 Prüfsubstanz ..... 9

4.2 Testorganismus ..... 10

4.3 Versuchsgruppen ..... 11

4.4 Verdünnungswasser ..... 11

4.5 Versuchsanlage ..... 11

4.6 Herstellung der Prüfkonzentrationen ..... 12

4.7 Versuchsdurchführung ..... 13

4.8 Auswertung ..... 13

5. ERGEBNIS ..... 14

5.1 Letalität ..... 14

5.2 Aussehen und Verhalten ..... 15

5.3 Wasserparameter ..... 15

6. ANHANG ..... 16

6.1 Methodik der Wasserparameter-Bestimmung ..... 16

6.2 Wasserparameter - Einzelwerte ..... 17 - 22

6.3 Symptomatik - Einzelwerte ..... 23 - 26

6.4 Letalität - Einzelwerte ..... 27

6.5 Bericht der Analytik ..... 28 - 30

6.6 Analysenzertifikat ..... 31

## 1. ZUSAMMENFASSUNG

Da die analytischen Vortests keine ausreichende Stabilität von Naphthol AS-PH, rein in Wasser ergaben, wurde die Prüfung der akuten Toxizität am Zebrabärbling (Brachydanio rerio) über insgesamt 96 Stunden in einem semistatischen System mit 24-stündigem Wasserwechsel durchgeführt. Es ergaben sich folgende Letalitätswerte:

| | nach 48 Stunden (mg/l) | nach 96 Stunden (mg/l) |
|---|---|---|
| LC0 | 0,5 | 0,5 |
| LC50 | 0,5 - 1,1 | 0,5 - 1,1 |
| LC100 | 2,6 | 2,6 |

In den Gruppen mit 1,1 und 2,6 mg/l traten Symptome und Letalität auf. Die Gruppe mit 0,5 mg/l zeigte Symptome, jedoch keine Letalität. Zur besseren Verteilung der Prüfsubstanz im Versuchswasser wurde die Prüfung unter Einsatz des Emulgators TWEEN 80 durchgeführt.

Geprüft wurden die Konzentrationen 1 / 2,2 und 5 mg/l sowie eine Negativkontrolle (0 mg/l) und eine Kontrollgruppe mit dem Emulgator TWEEN 80 in der Konzentration von 0,095 ml/l (im Folgenden mit 0* gekennzeichnet). Die angestrebten Konzentrationen wurden im Versuch nicht erreicht. Zur Bezeichnung der Konzentrationsgruppen wird jedoch im Folgenden die jeweilige Sollkonzentration verwendet.

Alle Prüfkonzentrationen lagen als farblose bis leicht gelbliche Lösungen vor. In der 2,2 mg/l Gruppe wurden geringe Substanzablagerungen am Beckenboden beobachtet.

Zur Bestimmung des Substanzgehaltes wurden aus 2 Ansätzen aller geprüften Konzentrationen nach 0 und 24 Stunden Wasserproben aus der Beckenmitte entnommen. Die Probenentnahme im 5 mg/l-Ansatz erfolgte lediglich aus dem ersten Ansatz, da alle Fische innerhalb von 24 Stunden starben.

Die Analysenwerte lagen zwischen 38 und 63 % der Sollkonzentrationen. Die Letalitätswerte wurden daher aus den Mittelwerten der gemessenen Konzentrationen bestimmt.

Es war auch durch semistatische Versuchsdurchführung nicht möglich, stabile Konzentrationen aufrechtzuerhalten. Einzelwerte wichen bis zu 28 % von ihrem Mittelwert ab.

## 2. VORBEMERKUNGEN

Die vorliegende Bestimmung der akuten Fischtoxizität von Naphthol AS-PH, rei wurde nach dem von der "Ad hoc Arbeitsgruppe des Umweltbundesamtes zur Entwick lung ökotoxikologischer Testverfahren in aquatischen Systemen" entwickelten Ver fahrensvorschlag (Stand: 01.05.84)

> "Letale Wirkung beim Zebrabärbling Brachydanio rerio"
> (LC0, LC50, LC100; 48 - 96 STUNDEN)
> Empfehlung des Umweltbundesamtes
> zur Durchführung der Prüfung nach §4 Abs.1 Nr.6
> der Verordnung über Anmeldeunterlagen und
> Prüfnachweise nach dem Chemikaliengesetz
> Texte 16/84, Umweltbundesamt

durchgeführt und erfüllt inhaltlich die Anforderung der EG-Guideline

> EG-Guideline C.1. Akute Toxizität für Fische
> Richtlinie 84/449/EWG:
> Richtlinie der Kommission vom 25. April 1984
> zur sechsten Anpassung der Richtlinie 67/548/EWG des Rates
> zur Angleichung der Rechts- und Verwaltungsvorschriften
> für die Einstufung, Verpackung und Kennzeichnung
> gefährlicher Stoffe an den technischen Fortschritt

sowie der OECD-Guideline

> OECD-Guideline for testing of chemicals,
> 203 Fish, Acute Toxicity Test,
> Adopted: 04. April 1984

## 3. ÜBERSICHT

| | | |
|---|---|---|
| Versuchsart | : | akute Toxizität an Fischen |
| Versuchs-Nr. | : | 91.0422 |
| Prüfsubstanz | : | **Naphthol AS-PH, rein** |
| Auftraggeber | : | GB D, Abt. UWS-D |
| Fischart | : | Zebrabärbling<br>Brachydanio rerio (HAMILTON-BUCHANAN) |
| Temperatur | : | 22 ± 1 °C |
| Testsystem | : | semistatisch, mit 24-stündigem Wasserwechsel |
| Versuchsdauer | : | 96 Stunden |
| Versuchsbeginn | : | 27.08.1991 |
| Versuchsende | : | 11.10.1991 |
| Prüfkonzentrationen | : | 0 / 0* / 1 / 2,2 und 5 mg/l |

## V e r a n t w o r t l i c h k e i t

| | | |
|---|---|---|
| Laborleiter | : | Dr. Zok |
| Versuchsleiter | : | Dr. Jung |
| Analytik | : | Dr. Petrovic |
| Referat GLP | : | Ap. Harston |
| Prüfstelle und Archivierung | : | Pharma Entwicklung Toxikologie<br>HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT<br>Postfach 80 03 20<br>6230 Frankfurt 80 |

## 4. MATERIAL UND METHODE

### 4.1 Prüfsubstanz

| | | |
|---|---|---|
| Handelsname | : | Naphthol AS-PH, rein |
| Code | : | HOE CG 0349 OD ZD96 0001 |
| chemische Bezeichnung | : | 2-Hydroxy-naphtalin-3-carbonsäure-(2'-ethoxy-phenyl-1')-amid |
| Summenformel | : | $C_{19}H_{17}NO_3$ |
| Produkt-Nr. | : | ESAW 055 |
| CAS-Nummer | : | 000092-74-0 |
| Anwendungstyp | : | Zwischenprodukt zur Herstellung von Pigmentfarbstoffen |
| Reinheitsgrad | : | 96,4 % |
| Charge-Nr. | : | Gemisch 14/91 |
| Analysenzertifikat | : | Nr. 4340 vom 14.06.1991 |
| Datum des Probeneingangs | : | 25.06.1991 |
| Lagerung | : | im Dunkeln bei ca. 20 °C, im Abzug |
| Aussehen | : | gelb-braunes Pulver |
| Molmasse | : | 307,35 g/mol |
| Schmelzpunkt | : | 156 - 158 °C |
| pH-Wert in Wasser | : | 10,5 |
| Stabilität unter Lagerbedingungen | : | > 5 Jahre (Herstellerangabe) |
| Wasserlöslichkeit | : | 0,44 g/l (Herstellerangabe) |

## 4.2 Testorganismus

| | | |
|---|---|---|
| Fischart | : | Zebrabärbling<br>Brachydanio rerio (HAMILTON-BUCHANAN) |
| Herkunft | : | Eigenzucht Hoechst AG, Kastengrund |
| Schlupfdatum | : | 25.02.91 |
| Lieferdatum | : | 10.09.91 / 17.09.91 |

Die Hälterung erfolgte über einen Zeitraum von mindestens 14 Tagen vor Versuchsbeginn in Verdünnungswasser (siehe Pkt. 4.4) unter folgenden Bedingungen:

| | | |
|---|---|---|
| Temperatur | : | 22 ± 1 °C |
| Sauerstoffgehalt | : | ≥ 80 % des Sättigungswertes |
| Beleuchtungsdauer | : | 12 Stunden täglich |
| Besatzdichte | : | ≤ 1 g Fisch/l Wasser |
| Fütterung | : | täglich zweimal ad libitum |
| Futter | : | Tetra Min, Tetra Werke, Melle |

Aus jeder Fischcharge wurde von jeweils 10 Fischen die Körperlänge bestimmt.

| | | | | Körperlänge in cm | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Chargen-Nr. | Datum | n | Streubreite | $\bar{x}$ | s |
| 1. Teilversuch | 7/91/H6/L7 | 01.10.91 | 10 | 2,7 - 3,5 | 3,0 | 0,23 |
| 2. Teilversuch | 7a/91/H6/L6 | 08.10.91 | 10 | 2,7 - 3,5 | 3,1 | 0,31 |
| Gesamtstichprobe | | | 20 | 2,7 - 3,5 | 3,0 | 0,27 |

## 4.3 Versuchsgruppen

Der Versuch wurde in 2 Teiluntersuchungen durchgeführt. Pro Versuchsgruppe wu den 10 Fische eingesetzt. Aufgrund orientierender Vorversuche wurden folge Konzentrationen semistatisch geprüft:

| | Beginn | Versuchsbecken-Nr. | Konzentration (mg/l) |
|---|---|---|---|
| 1. Teilversuch | 30.09.91 | 31/32/14/15 | 0/0*/1/2,2 |
| 2. Teilversuch | 07.10.91 | 36/7 | 0/5 |

## 4.4 Verdünnungswasser

Als Verdünnungswasser wurde rekonstituiertes Wasser gem. Zusammensetzung r ISO/DIS 7346/1 eingesetzt.

Die Aufbereitung erfolgte in einer Anlage, bestehend aus zwei Stahlbecken Hostalen$^{R}$ - Auskleidung und einem Fassungsvermögen von jeweils 1 700 Liter.

Das aufbereitete Verdünnungswasser wurde bis zur Sauerstoffsättigung belüft Der pH-Wert wurde vor jedem Versuchsansatz gemessen und lag bei 8,4 - 8,5.

## 4.5 Versuchsanlage

Die Versuchsdurchführung erfolgte in einem semistatischen System mit 24-stün gem Wasserwechsel. Die auf 10 Liter kalibrierten Testbehälter bestanden aus G (Länge 30 cm, Breite 22 cm, Höhe 24 cm) und standen in einem aus Hostalit Z$^{R}$ fertigten Wasserbad mit einer Sichtscheibe aus Plexiglas. Das Wasserbad wu über ein Thermostat auf 22 ± 1 °C geregelt. Die Becken wurden in einem T Nacht-Rhythmus von jeweils 12 Stunden von oben beleuchtet. Die Beleuchtungsst ke betrug unmittelbar über den Becken ca. 700 Lux.

Während der gesamten Versuchszeit wurden die Becken nicht belüftet.

4.6 Herstellung der Prüfkonzentration

Alle 24 Stunden wurden neue Prüfbecken angesetzt. Die Prüfsubstanz wurde hierz mit 0,095 ml Tween 80/l als Lösungsvermittler angeteigt, mit Verdünnungswasse versetzt, mit dem Ultra-Turrax und Ultraschallbad homogenisiert und unter Rühre mit einem Glasstab in die Versuchsbecken eingebracht. Anschließend wurde de Beckeninhalt ca. 2 Stunden mit einem KPG-Rührer und Glasstab gerührt.

Alle Prüfkonzentrationen lagen als farblose bis leicht gelbliche Lösung vor. I der 2,2 mg/l Gruppe wurden geringe Substanzablagerungen am Beckenboden beobach tet.

Zur Bestimmung des Substanzgehaltes wurden aus 2 Ansätzen aller geprüften Kon zentrationsgruppen nach 0 und 24 Stunden jeweils ca. 100 ml mit einer Glas schraubflasche aus der Beckenmitte entnommen. Die Probenentnahme im 5 mg/l Ansatz erfolgte lediglich aus dem ersten Ansatz, da alle Fische innerhalb von 2 Stunden starben. Methodik und Einzelergebnisse der Analytik siehe Seite 28 - 30

Es ergaben sich folgende Werte:

| Soll (mg/l) | | Ist (mg/l) | Ist % |
|---|---|---|---|
| 1 | (1. Ansatz) | 0,62 (0 h) | 62 |
| | | 0,54 (24 h) | 54 |
| | (3. Ansatz) | 0,40 (0 h) | 40 |
| | | 0,38 (24 h) | 38 |
| | | $\bar{x}$: 0,5 | 50 |
| 2,2 | (1. Ansatz) | 1,23 (0 h) | 56 |
| | | 1,0 (24 h) | 45 |
| | (3. Ansatz) | 1,13 (0 h) | 51 |
| | | 0,89 (24 h) | 40 |
| | | $\bar{x}$: 1,1 | 50 |
| 5 | (1. Ansatz) | 3,16 (0 h) | 63 |
| | | 1,97 (24 h) | 39 |
| | | $\bar{x}$: 2,6 | 52 |

Die Analysenwerte lagen zwischen 38 und 63 % der Sollkonzentrationen. D Letalitätswerte wurden daher aus den Mittelwerten der gemessenen Konzentration bestimmt.

Es war auch durch semistatische Versuchsdurchführung nicht möglich, stabi Konzentrationen aufrechtzuerhalten. Einzelwerte wichen bis zu 28 % von ihr Mittelwert ab.

## 4.7 Versuchsdurchführung

Nach Vorlage des ersten Prüfansatzes und anschließender Messung der Wasserpar meter wurden pro Prüf- und Kontrollbecken jeweils 10 Fische zufallsverteilt ei gesetzt. Während der gesamten Versuchszeit wurden die Fische nicht gefütter Eine Kontrolle der Fische erfolgte jeweils 2 - 4 und 24 Stunden nach Substanzz gabe, wobei die Letalität sowie sichtbare Veränderungen im Aussehen und Verha ten protokolliert wurden. Tote Fische wurden aus dem Becken entfernt. Der Fis galt als tot, wenn keine Atembewegungen mehr zu erkennen waren und er auch a leicht mechanischen Reiz nicht mehr reagierte. Zum gleichen Zeitpunkt wurden d Wasserparameter gemessen und ebenfalls protokolliert. Dieser Vorgang wurde üb einen Zeitraum von 96 Stunden bei jedem neuen Prüfansatz wiederholt, wobei d Fische jeweils in das betreffende Becken transferiert wurden. Die Meßmethod sind in der Anlage (Seite 16) aufgeführt.

## 4.8 Auswertung

Die Durchführung einer Probitanalyse war aufgrund der vorliegenden Letalität rate nicht möglich. Da der Faktor der Konzentrationsstufen 2,2 (3. Wurzel 1 betrug, wurden keine weiteren Konzentrationen geprüft. Angegeben wurde der B reich der LC50.

## 5. ERGEBNIS

### 5.1 Letalität

Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen wurden bei Naphthol AS-PH, rein nach 48 und 96 Stunden in einem semistatischen System folgende Letalitätsraten erfaßt:

| Sollkonzentration /Analysenwert (mg/l) | Letalität 48 h absolut | 48 h relativ (%) | 96 h absolut | 96 h relativ (%) |
|---|---|---|---|---|
| 0 | 0/20 | 0 | 0/20 | 0 |
| 0* | 0/10 | 0 | 0/10 | 0 |
| 1 / 0,5 | 0/10 | 0 | 0/10 | 0 |
| 2,2 / 1,1 | 6/10 | 60 | 7/10 | 70 |
| 5 / 2,6 | 10/10 | 100 | 10/10 | 100 |
| LC0 (mg/l) höchste geprüfte Konzentration ohne Letalität | 0,5 | | 0,5 | |
| LC50 (mg/l) | 0,5 - 1,1 | | 0,5 - 1,1 | |
| LC100 (mg/l) niedrigste geprüfte Konzentration mit 100 % Letalität | 2,6 | | 2,6 | |

Einzelwerte zur Letalität sind dem Anhang (Seite 27) zu entnehmen.

## 5.2 Aussehen und Verhalten

In allen geprüften Konzentrationen wurde eine Beeinträchtigung des Schwimmverhaltens, der Atmung sowie ein verändertes Aussehen und Verhalten beobachtet. Die Einzelwerte sind dem Anhang (Seite 23-26) zu entnehmen.

Die gestorbenen Fische zeigten teilweise eine dunkel verfärbte oder aufgehellte Körperoberfläche sowie gerötete Kiemen.

## 5.3 Wasserparameter

Für die Konzentrationsgruppen und die Kontrollen ergaben sich über den gesamten Versuchszeitraum folgende Streubereiche:

| Parameter | Konzentrationsgruppen | Kontrollen |
|---|---|---|
| pH-Wert (1) | 7,9 - 8,5 | 8,0 - 8,5 |
| Sauerstoffgehalt (mg/l) | 5,8 - 8,8 | 7,1 - 9,3 |
| Temperatur (°C) | 21,2 - 22,6 | 21,0 - 22,8 |

Die Einzelwerte sind dem Anhang (Seite 17-22) zu entnehmen.

Dr Zok/LH

Referat GLP

Tö

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
Pharma Entwicklung
Toxikologie

12. 11. 91

Dr. Zok
Versuchsleiter

12. 11. 91

Dr. Jung
Gewerbetoxikologie

# 6. ANHANG

## 6.1 Methodik der Wasserparameterbestimmung

| Parameter | Einheit | Methode |
|---|---|---|
| Temperatur | °C | elektronische Messung mit Sauerstoffmeßgerät OXI 196 (WTW) und Sauerstoff elektrode EO 196-1.5 mit eingebautem Temperaturfühler (Wissenschaftlich Technische Werkstätten, Weilheim) |
| Sauerstoffgehalt | mg/l | elektronische Messung mit Sauerstoffmeßgerät OXI 196 (WTW) und Sauerstoff elektrode EO 196-1.5 (Wissenschaftlic Technische Werkstätten, Weilheim) |
| pH-Wert | 1 | elektronische Messung mit pH-Meßgerät pH 763 (Knick) und Einstab-Meßkette (Schott-Geräte GmbH, Hofheim) |

## 6.2 Wasserparameter - Einzelwerte

### Erster Teilversuch

Konzentration : 0 mg/l (Kontrolle) Versuchsbeginn : 30.09.91
Versuchsbecken-Nr. : 31

| Datum | Zeit | pH-Wert | $O_2$ (mg/l) | Temp. (°C) |
|---|---|---|---|---|
| 30.09.91 | vor Zug. | 8,4 | 8,9 | 22,4 |
| | 0 h | 8,4 | 8,8 | 22,3 |
| 30.09.91 | 2-4 h | 8,3 | 8,5 | 21,7 |
| 01.10.91 | 24 h | 8,1 | 7,5 | 22,5 |
| | vor Zug. | 8,5 | 9,0 | 22,3 |
| | 0 h | 8,5 | 8,9 | 22,2 |
| 01.10.91 | 2-4 h | 8,4 | 8,5 | 21,5 |
| 02.10.91 | 24 h | 8,1 | 7,8 | 21,3 |
| | vor Zug. | 8,4 | 9,0 | 21,0 |
| | 0 h | 8,4 | 8,9 | 21,0 |
| 02.10.91 | 2-4 h | 8,4 | 8,7 | 21,6 |
| 03.10.91 | 24 h | 8,1 | 7,6 | 21,7 |
| | vor Zug. | 8,4 | 9,3 | 21,0 |
| | 0 h | 8,4 | 9,2 | 21,7 |
| 03.10.91 | 2-4 h | 8,3 | 9,1 | 21,7 |
| 04.10.91 | 24 h | 8,0 | 8,1 | 21,6 |

Die Sauerstoffsättigung (100 %) bei 22 °C und örtlichem Luftdruck betrug währen des gesamten Teilversuchs 8,6 - 8,9.

(Fortsetzung nächste Seite)

Erster Teilversuch

Konzentration : 0* mg/l (Lösungsmittelkontr.) Versuchsbeginn : 30.09.91

Versuchsbecken-Nr. : 32

| Datum | Zeit | pH-Wert | $O_2$ (mg/l) | Temp. (°C) |
|---|---|---|---|---|
| 30.09.91 | vor Zug. | 8,4 | 9,1 | 22,8 |
| | 0 h | 8,4 | 8,8 | 22,4 |
| 30.09.91 | 2-4 h | 8,3 | 8,5 | 21,7 |
| 01.10.91 | 24 h | 8,0 | 7,2 | 22,8 |
| | vor Zug. | 8,5 | 9,0 | 22,2 |
| | 0 h | 8,5 | 8,9 | 22,2 |
| 01.10.91 | 2-4 h | 8,4 | 8,6 | 21,5 |
| 02.10.91 | 24 h | 8,1 | 7,3 | 21,3 |
| | vor Zug. | 8,5 | 9,1 | 21,0 |
| | 0 h | 8,5 | 9,0 | 21,1 |
| 02.10.91 | 2-4 h | 8,4 | 8,7 | 21,6 |
| 03.10.91 | 24 h | 8,0 | 7,1 | 21,8 |
| | vor Zug. | 8,4 | 9,3 | 21,1 |
| | 0 h | 8,4 | 9,3 | 21,7 |
| 03.10.91 | 2-4 h | 8,3 | 9,0 | 21,8 |
| 04.10.91 | 24 h | 8,1 | 7,9 | 21,6 |

(Fortsetzung nächste Seite)

Erster Teilversuch

Konzentration : 1 mg/l
Versuchsbecken-Nr. : 14

Versuchsbeginn : 30.09.91

| Datum | Zeit | pH-Wert | $O_2$ (mg/l) | Temp. (°C) |
|---|---|---|---|---|
| 30.09.91 | vor Zug. | 8,4 | 9,0 | 22,3 |
| | 0 h | 8,4 | 8,6 | 22,6 |
| 30.09.91 | 2-4 h | 8,3 | 8,3 | 22,5 |
| 01.10.91 | 24 h | 8,0 | 6,9 | 22,6 |
| | vor Zug. | 8,5 | 8,9 | 22,2 |
| | 0 | 8,5 | 8,5 | 22,6 |
| 01.10.91 | 2-4 h | 8,4 | 8,5 | 22,5 |
| 02.10.91 | 24 h | 8,1 | 6,7 | 22,5 |
| | vor Zug. | 8,5 | 9,2 | 21,8 |
| | 0 h | 8,5 | 8,7 | 22,5 |
| 02.10.91 | 2-4 h | 8,4 | 8,5 | 22,5 |
| 03.10.91 | 24 h | 8,0 | 5,8 | 22,6 |
| | vor Zug. | 8,4 | 9,2 | 21,6 |
| | 0 h | 8,4 | 8,6 | 22,6 |
| 03.10.91 | 2-4 h | 8,4 | 8,6 | 22,5 |
| 04.10.91 | 24 h | 7,9 | 6,6 | 22,5 |

(Fortsetzung nächste Seite)

Erster Teilversuch

Konzentration : 2,2 mg/l
Versuchsbecken-Nr. : 15

Versuchsbeginn : 30.09.91

| Datum | Zeit | pH-Wert | $O_2$ (mg/l) | Temp. (°C) |
|---|---|---|---|---|
| 30.09.91 | vor Zug. | 8,4 | 9,0 | 22,1 |
| | 0 h | 8,4 | 8,6 | 22,6 |
| 30.09.91 | 2-4 h | 8,3 | 8,3 | 22,5 |
| 01.10.91 | 24 h | 8,0 | 7,4 | 22,6 |
| | vor Zug. | 8,5 | 8,9 | 22,1 |
| | 0 h | 8,5 | 8,4 | 22,6 |
| 01.10.91 | 2-4 h | 8,5 | 8,4 | 22,5 |
| 02.10.91 | 24 h | 8,2 | 7,5 | 22,5 |
| | vor Zug. | 8,5 | 9,1 | 21,8 |
| | 0 h | 8,5 | 8,7 | 22,5 |
| 02.10.91 | 2-4 h | 8,4 | 8,6 | 22,5 |
| 03.10.91 | 24 h | 8,1 | 7,2 | 22,6 |
| | vor Zug. | 8,4 | 9,2 | 21,5 |
| | 0 h | 8,4 | 8,8 | 22,6 |
| 03.10.91 | 2-4 h | 8,4 | 8,8 | 22,5 |
| 04.10.91 | 24 h | 8,1 | 7,4 | 22,4 |

(Fortsetzung nächste Seite)

Zweiter Teilversuch

Konzentration : 0 mg/l (Kontrolle) Versuchsbeginn : 07.10.91
Versuchsbecken-Nr. : 36

| Datum | Zeit | pH-Wert | $O_2$ (mg/l) | Temp. (°C) |
|---|---|---|---|---|
| 07.10.91 | vor Zug. | 8,4 | 8,4 | 22,3 |
| | 0 h | 8,4 | 8,2 | 22,1 |
| 07.10.91 | 2-4 h | 8,3 | 7,6 | 22,5 |
| 08.10.91 | 24 h | 8,2 | 7,4 | 22,5 |
| | vor Zug. | 8,5 | 9,3 | 21,9 |
| | 0 h | 8,5 | 8,7 | 22,5 |
| 08.10.91 | 2-4 h | 8,4 | 8,9 | 22,2 |
| 09.10.91 | 24 h | 8,2 | 7,8 | 22,5 |
| | vor Zug. | 8,4 | 9,2 | 22,0 |
| | 0 h | 8,4 | 8,9 | 22,1 |
| 09.10.91 | 2-4 h | 8,3 | 8,8 | 22,4 |
| 10.10.91 | 24 h | 8,3 | 8,0 | 22,5 |
| | vor Zug. | 8,5 | 9,5 | 21,8 |
| | 0 h | 8,5 | 9,1 | 22,0 |
| 10.10.91 | 2-4 h | 8,5 | 8,9 | 22,5 |
| 11.10.91 | 24 h | 8,1 | 8,2 | 22,5 |

Die Sauerstoffsättigung (100 %) bei 22 °C und örtlichem Luftdruck betrug währe
des gesamten Teilversuchs 8,7 - 8,8.

(Fortsetzung nächste Seite)

Zweiter Teilversuch

Konzentration : 5 mg/l
Versuchsbecken-Nr. : 7

Versuchsbeginn : 07.10.91

| Datum | Zeit | pH-Wert | $O_2$ (mg/l) | Temp. (°C) |
|---|---|---|---|---|
| 07.10.91 | vor Zug. | 8,4 | 8,4 | 21,5 |
| | 0 h | 8,4 | 7,8 | 21,4 |
| 07.10.91 | 2-4 h | 8,3 | 7,7 | 21,8 |
| 08.10.91 | 24 h | 8,3 | 7,9 | 21,7 |
| | vor Zug. | 8,5 | 9,3 | 21,1 |
| | 0 h | 8,5 | 8,7 | 21,7 |
| 08.10.91 | 2-4 h | 8,5 | 8,7 | 21,6 |
| 09.10.91 | 24 h | (8,4) | (8,3) | (21,2) |
| | vor Zug. | - | - | - |
| | 0 h | - | - | - |
| 09.10.91 | 2-4 h | - | - | - |
| 10.10.91 | 24 h | - | - | - |
| | vor Zug. | - | - | - |
| | 0 h | - | - | - |
| 10.10.91 | 2-4 h | - | - | - |
| 11.10.91 | 24 h | - | - | - |

( ) = Messung nach 100 % Letalität

6.3 Symptomatik - Einzelwerte

0 mg/l (Kontrollgruppen aller Teilversuche)

| Zeit nach Versuchsbeginn | 1. Tag | 2. Tag | | 3. Tag | | 4. Tag | | 5. Tag |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Zeit nach Substanzzugabe (Std.) | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 |
| Letalität (absolut) | 0/20 | 0/20 | 0/20 | 0/20 | 0/20 | 0/20 | 0/20 | 0/20 |
| In Aussehen und Verhalten unverändert | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 | 20/20 |

Lösungsmittelkontrolle mit 0,095 ml Tween 80/l

| Zeit nach Versuchsbeginn | 1. Tag | 2. Tag | | 3. Tag | | 4. Tag | | 5. Tag |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Zeit nach Substanzzugabe (Std.) | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 |
| Letalität (absolut) | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| In Aussehen und Verhalten unverändert | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |

(Fortsetzung nächste Seite)

1 mg/l

| Zeit nach Versuchsbeginn | 1. Tag | | 2. Tag | | 3. Tag | | 4. Tag | | 5. Tag |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Zeit nach Substanzzugabe (Std.) | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 |
| Letalität (absolut) | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| Atemfrequenz erhöht | m | a | m | - | - | m | - | m |
| Abstehen der Kiemendeckel | m | a | m | m | a | m | m | m |
| Atmung stoßweise | m | - | - | m | m | - | - | - |
| Schwimmen an der Wasseroberfläche | m | m | m | m | m | - | m | - |
| schwanzlastige Schwimmhaltung | m | m | m | m | a | a | m | a |
| Körperoberfläche dunkel verfärbt | m | e | e | - | - | m | m | m |
| Schreckreaktion gesteigert | m | - | - | m | m | a | - | a |
| Stehen am Beckenboden | - | m | m | m | m | e | e | - |
| kopflastige Schwimmhaltung | - | m | m | - | - | - | - | - |
| verminderte Aktivität | - | - | m | - | m | m | m | m |
| Atmung unregelmäßig | - | - | - | m | - | m | m | - |
| Schwimmen am Beckenboden | - | - | - | m | - | - | - | m |
| stark verminderte Aktivität | - | - | - | - | m | m | m | - |
| Stehen an der Wasseroberfläche | - | - | - | - | - | e | - | - |

e = Einer

m = Mehrere

a = Alle

(Fortsetzung nächste Seite)

2,2 mg/l

| Zeit nach Versuchsbeginn | 1. Tag | 2. Tag | | 3. Tag | | 4. Tag | | 5. Tag |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Zeit nach Substanzzugabe (Std.) | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 |
| Letalität (absolut) | 0/10 | 4/10 | 5/10 | 6/10 | 6/10 | 7/10 | 7/10 | 7/10 |
| verminderte Aktivität | m | - | - | - | e | - | - | - |
| Atemfrequenz erhöht | m | m | a | - | a | m | m | e |
| Stehen am Beckenboden | m | e | - | - | - | m | - | e |
| Schwimmen am Beckenboden | m | - | - | m | e | m | m | m |
| schwanzlastige Schwimmhaltung | m | a | m | m | m | m | m | - |
| Körperoberfläche dunkel verfärbt | m | m | m | e | - | - | m | m |
| Schreckreaktion gesteigert | m | - | - | - | - | a | - | m |
| Abstehen der Kiemendeckel | - | m | m | a | a | a | a | a |
| Atmung unregelmäßig | - | m | - | m | a | - | - | - |
| Schwimmen an der Wasseroberfläche | - | m | m | e | e | - | - | - |
| Stehen an der Wasseroberfläche | - | - | e | - | - | - | - | - |
| kopflastige Schwimmhaltung | - | - | e | - | - | m | - | - |
| Taumeln | - | - | e | - | - | - | - | - |
| Atmung stoßweise | - | - | - | m | - | - | - | - |
| Zittern | - | - | - | e | - | - | - | - |

e = Einer

m = Mehrere

a = Alle

(Fortsetzung nächste Seite)

5 mg/l

| Zeit nach Versuchsbeginn | 1. Tag | 2. Tag | | 3. Tag | | 4. Tag | | 5. Tag |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Zeit nach Substanzzugabe (Std.) | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 | 2-4 | 24 |
| Letalität (absolut) | 0/10 | 9/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |
| Atemfrequenz erhöht | m | - | - | - | - | - | - | - |
| Abstehen der Kiemendeckel | m | - | - | - | - | - | - | - |
| Schwimmen an der Wasseroberfläche | m | - | - | - | - | - | - | - |
| schwanzlastige Schwimmhaltung | m | - | - | - | - | - | - | - |
| verminderte Aktivität | - | e | - | - | - | - | - | - |
| Atmung unregelmäßig | - | e | - | - | - | - | - | - |
| Stehen am Beckenboden | - | e | - | - | - | - | - | - |
| Körperoberfläche dunkel verfärbt | - | e | - | - | - | - | - | - |
| Zittern | - | e | - | - | - | - | - | - |

e = Einer

m = Mehrere

a = Alle

6.4 Letalität - Einzelwerte

| Konzentration (mg/l) | Versuchsbecken Nr. | Versuchsbeginn (Datum) | Letalität Zeit nach Substanzzugabe 1. Tag 2-4 h | 1. Tag 24 h | 2. Tag 2-4 h | 2. Tag 24 h | 3. Tag 2-4 h | 3. Tag 24 h | 4. Tag 2-4 h | 4. Tag 24 h | 5. Tag 2-4 h | 5. Tag 24 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 0 | 31 | 30.09.91 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| 0* | 32 | 30.09.91 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| 1 | 14 | 30.09.91 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| 2,2 | 15 | 30.09.91 | 0/10 | 4/10 | 5/10 | 6/10 | 6/10 | 7/10 | 7/10 | 7/10 | 7/10 | 7/10 |
| 0 | 36 | 07.10.91 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 | 0/10 |
| 5 | 7 | 07.10.91 | 0/10 | 9/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 | 10/10 |

Hoechst

Hoechst Aktiengesellschaft
Postfach 80 03 20 · Brüningstraße 50
6230 Frankfurt am Main 80

Abteilung: Analytisches Laboratorium
Verfasser: Dr.P.Petrovic, S. Ries

Datum: 04.11.91
Bericht-Nr.: 91.1062
Seite: 28 (31)

# Teilbericht

## Analytische Bestimmung des Gehaltes der Prüfsubstanz im Wasser

1. **Art der Gesamtuntersuchung :**

1.1 akute Fischtoxizität

1.2 Versuchs-Nr. : 91.0422

2. **Prüfsubstanz :**

2.1 Handelsname : Naphthol AS-PH rein

2.2 Chemische Bezeichnung :

2.3 Reinheitsgrad : 96.4% (m/m), AZ Nr.:04340 vom 14.06.199

2.4 orientierende Wasserlöslichkeit : >1000mg/L (1h)
100mg/L (24h)

3. **Methode** : HPLC (UV-Detektion) nach Trennung an einer unpolaren stationären Phase (RP-18).

3.1 Probenvorbereitung: Alle Proben wurden im Ultraschallbad homogenisiert.

3.2 Auswertung: Die Auswertung erfolgte nach der Methode de externen Standards. Als Standard wurde die Prüfsubstanz eingesetzt.

4. **Probenbeschreibung :**

4.1 Aliquoter Teil aus der Gesamtwassermenge von 10 l: ca.100 ml.

4.2 Aussehen : klare Lösungen

4.3 Prüftemperatur des Wassers während der Toxizitätsprüfung 22°C ±1°C

Abteilung: Analytisches Laboratorium
Verfasser: Dr.P.Petrovic, S.Ries



## 5. Substanzgehalte in Wasser

| Proben Nr. | Sollkonz. mg/L | Datum der Probenahme | mg/L gefunden nach Ansatz 0h | 24h | |
|---|---|---|---|---|---|
| 174a | 1.0 | 30.09.91 | 0.62 | | |
| 175a | 1.0 | 01.10.91 | | 0.54 | |
| 176a | 1.0 | 02.10.91 | 0.40 | | |
| 177a | 1.0 | 03.10.91 | | 0.38 | |
| | | | | | |
| 178 | 2.2 | 30.09.91 | 1.23 | | |
| 179 | 2.2 | 01.10.91 | | 1.00 | |
| 180 | 2.2 | 02.10.91 | 1.13 | | |
| 181 | 2.2 | 03.10.91 | | 0.89 | |
| | | | | | |
| 28 | 5.0 | 07.10.91 | 3.16 | | |
| 29 | 5.0 | 08.10.91 | | 1.97 | |
| | | | | | |
| | | | | | |

## 6. Anmerkungen : ---

7. Alle Rohdaten werden gemäß SOP 306-2/88 im Zentralarchi aufbewahrt.
Diese Prüfung wurde nach SOP 315-0/89 durchgeführt.

8. Allgemeines :

Prüfeinrichtung für Analysen :

Hoechst AG
Analytisches Laboratorium
Toxikologie Analytik
(Außenstelle Kastengrund)
Postfach 800 320
6230 Frankfurt/M. 80

Auftraggeber :

Hoechst AG
Pharma Entwicklung Toxikologie
Gewerbetoxikologie
Kastengrund
Postfach 800 320
6230 Frankfurt/M. 80

Qualitätssicherungseinheit im Rahmen von GLP :

Ap.S.J.Harston , Hoechst AG

An den Analysen beteiligte Personen :

Dr.P.Petrovic
S.Ries

Datum : 17.10.91

Verantwortlicher Wissenschaftler : (Dr.P.Petrovic)

91.1062* 031

Hoechst Aktiengesellschaft
6230 Frankfurt (M) 80

**Hoechst**

04340

Herrn Dr. Kern
UWS - Geschäftsbereich D
Werk Höchst

Analytisches Laboratorium

14.06.
Datum

Produkt: Naphthol AS-PH, rein
Chargen-Nr.: Gemisch 14/91
Hoe. Nr.:
HOE CG 0349 OD ZD96 0001

~~für Betrieb:~~ CG 0

~~xxxxxxxkg Abgangstag~~

**Untersuchungsbefund**

w(HOE CG 0349 .. 0001) = 96,4 % (m/m)

(aus dem C-Gehalt der Elementaranalyse)

Nebenkomponenten und Anmerkungen siehe Anlage

Rückstellmuster werden in den Archiven des Analytischen Laboratoriums gelagert

Leiter des
ANALYTISCHEN LABORATORIUMS

R. Fischbach

(Dr. R. Fischbach)

Best Available Copy