

環境庁殿

試 験 報 告 書

2, 2' -アゾビス (2-メチルプロパニトリル) の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号: EAI96001)

平成 9 年 6 月 30 日作成

住化テクノス株式会社

最終報告書修正書

試験番号：EAI96001

修正書番号：1

表題：2, 2-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験施設：住化テクノサービス株式会社

修正内容：

1) 19ページ、Table 5のNOECr(24-72h)の値を以下の通り修正した。

修正前： 4.2

修正後： 2.1

修正理由：

1) 記載に誤りがあったため。

試験責任者

2002年4月18日

信頼性保証書

本修正事項は、当社の信頼性保証部門によって下記の監査を受けている

項 目	監査日	報告日	
	QAU	試験責任者	運営管理者
草 稿	2002年4月18日		
最終版	2002年4月18日	2002年4月18日	2002年4月18日

信頼性保証責任者：

2002年4月18日

陳 述 書

住化テクノス株式会社

試験委託者： 環境庁

表題： 2, 2' -アゾビス (2-メチルプロパニトリル) の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： E A I 9 6 0 0 1

上記試験は環境庁の「生態影響試験実施に関する基準」に従って実施したものである。

平成 9 年 6 月 30 日

運営管理者



信頼性保証証明書

試験表題： 2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する
生長阻害試験

試験番号： E A I 9 6 0 0 1

本最終報告書の試験は、当施設の信頼性保証部門に関する標準操作手順書に従って下記の
査察を受けている。

査察項目	査察日	報告日	
	QAU	試験責任者	運営管理者
試験計画書	平成8年12月27日	平成9年1月13日	平成9年1月30日
	平成9年2月21日	平成9年2月21日	平成9年2月21日
	平成9年3月3日	平成9年3月3日	平成9年3月3日
	平成9年3月17日	平成9年3月17日	平成9年3月17日
	平成9年3月31日	平成9年3月31日	平成9年3月31日
試験査察	平成9年3月17日	平成9年3月17日	平成9年3月17日
最終報告書	平成9年5月29日	平成9年5月29日	平成9年6月30日
	平成9年6月30日	平成9年6月30日	

本試験は適正に実施されており、本最終報告書は試験した方法、手順が正確に記録され、
かつ、試験の生データを正確に反映していることを認めます。

平成 9 年 6 月 30 日
住化テクノス株式会社
信頼性保証責任者



試験実施概要

1. 表題： 2, 2' -アゾビス (2 -メチルプロパニトリル) の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的： 2, 2' -アゾビス (2 -メチルプロパニトリル) について、藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験を行い、50%生長阻害濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC) を求める。
3. 適用ガイドライン：本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 201「藻類生長阻害試験」(1984年) に準拠した。
4. 適用GLP：本試験は環境庁の「生態影響試験実施に関する基準」に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境庁
住所： 〒100 東京都千代田区霞が関1丁目2番2号
委託責任者： XXXXXXXXXX
6. 試験受託者：
名称： 住化テクノス株式会社
所在地： 〒665 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号
7. 試験施設：
名称： 住化テクノス株式会社
所在地： 〒665 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

8. 試験関係者：

試験責任者



(平成 9 年 6 月 30 日)

試験担当者



(平成 9 年 6 月 30 日)

試験担当者



(平成 9 年 6 月 30 日)

9. 試験期間：

試験開始日

平成 9 年 2 月 21 日

試験終了日

平成 9 年 6 月 30 日

暴露期間

平成 9 年 3 月 17 日～平成 9 年 3 月 20 日

10. 保管：

試験計画書、生データ、記録文書および試験報告書は、試験報告書作成後10年間、住化テクノス株式会社の試資料保管施設に保管する。その後の保管については試験委託者と協議のうえ決定する。

目 次

	頁
要 旨 -----	7
1. 被験物質 -----	8
1.1 名称、構造式および物理化学的性状 -----	8
1.2 供試試料 -----	8
1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性 -----	8
2. 供試生物 -----	9
3. 試験方法 -----	9
3.1 試験条件 -----	9
3.2 培地 -----	9
3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器 -----	9
3.4 試験濃度の設定 -----	10
3.5 試験液の調製 -----	10
3.6 試験液の分析 -----	10
3.7 試験操作 -----	10
4. 結果の算出 -----	11
4.1 藻類生長曲線 -----	11
4.2 藻類生長阻害濃度の算出 -----	11
4.3 無影響濃度 (NOEC) の算出 -----	12
5. 結果および考察 -----	13
5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 -----	13
5.2 試験液中の被験物質濃度 -----	13
5.3 藻類生長曲線 -----	13
5.4 半数影響濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC) -----	13
5.5 温度およびpH -----	14
Table 1～7 -----	15～21
Figure 1～3 -----	22
付属資料－1 試験液の分析方法 -----	23

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

2, 2' -アゾビス (2-メチルプロパニトリル) の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に
対する生長阻害試験

試験番号

E A 1 9 6 0 0 1

試験方法

本試験は、OECD 化学品テストガイドライン No. 201「藻類生長阻害試験」(1984年)に準拠して実施した。

- 1) 被験物質 : 2, 2' -アゾビス (2-メチルプロパニトリル)
- 2) 培養方式 : 振盪培養 (100rpm)
- 3) 供試生物種 : *Selenastrum capricornutum* (ATCC22662)
- 4) 温度 : 23 ± 2 °C
- 5) 暴露期間 : 72時間
- 6) 試験液量 : 100 mL (OECD培地)
- 7) 照明 : 4200 ~ 4800lux (連続照明)
- 8) 初期細胞濃度 : 1×10^4 cells/mL
- 9) 試験濃度 : [設定] 0.46, 1.0, 2.2, 4.6および10mg/L
[実測値(0hr)] 0.46, 0.71, 2.1, 4.2および9.4 mg/L
[対照区] 対照区, 助剤対照区(助剤濃度: 100mg/L)
- 10) 試験液中の被験物質の分析: HPLC法 (暴露開始時および終了時)

結 果

1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度

E_bC50 (0-72h) : >9.4mg/L

NOEC (面積法 0-72h) : 4.2mg/L

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

E_rC50 (24-48h) : >9.4mg/L

NOEC (速度法 24-48h) : 9.4mg/L

E_rC50 (24-72h) : >9.4mg/L

NOEC (速度法 24-72h) : 2.1mg/L

(上記濃度は、全て暴露開始時の実測値に基づく値)

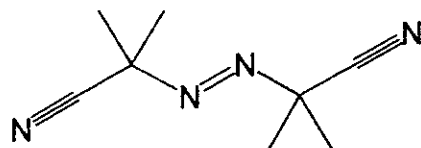
1. 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： 2, 2' -アゾビス (2 -メチルプロパニトリル)

(CAS番号: 78-67-1、略称: AMP、識別番号: 96E-1)

構造式:



分子式: $C_8H_{12}N_4$

分子量: 164.21

1.2 供試試料

購入先 : XXXXXXXXXX

入手日 : 平成 8 年 12 月 20 日

ロット番号 : DLE7785

外観 : 白色結晶性粉末

純度 : 99.3%

1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当社の冷蔵庫に保管した。

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の構造と矛盾が認められないことを確認した。暴露終了後にも同様にスペクトルを測定し、暴露開始前に測定したスペクトルと比較した結果、スペクトルに変化は無かったことより被験物質は当社の冷蔵庫に保管中は安定であったと判断された。

2. 供試生物

試験には、単細胞緑藻類である *Selenastrum capricornutum* を用いた。

本種は、American Type Culture Collection より入手した ATCC22662株を、当社において無菌的に継代培養しているものである。基準物質（重クロム酸カリウム、試薬特級、Lot No. KCE6888、和光純薬工業㈱）による72時間の生長阻害濃度（E_bC50）は、0.42mg/Lであった。

前培養

試験に供す藻類は試験条件と同じ条件で暴露開始前に3日間培養したものを使用した。

3. 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 培養方式 : 振盪培養 (100rpm)
- 2) 温度 : 23±2 °C
- 3) 暴露期間 : 72時間
- 4) 試験液量 : 100 mL (OECD培地)
- 5) 照明 : 4200 ~ 4800 lux (連続照明)
- 6) 初期細胞濃度 : 1×10⁴ cells/mL

3.2 培地

前培養および試験ともに OECD 化学品テストガイドラインに示されている培地を用いた。
[Table 1]

3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器

- | | |
|------------|--|
| 試験容器 | : 500mL容ガラス製三角フラスコ（通気性のシリコン栓） |
| 藻類培養試験装置 | : AGP-50RL（ダイキンプラント㈱；連続振盪培養、連続照明および一定照度の確保が可能） |
| 光学顕微鏡 | : BH-2（オリンパス光学工業株式会社） |
| pHメーター | : F-22（㈱堀場製作所） |
| 粒子計数装置 | : マルチサイザーⅡ（コールター株式会社） |
| 粒子計数装置用電解液 | : ISOTON Ⅱ（コールター株式会社） |
| 温度計 | : デジタル温度計（㈱カスタム） |
| 照度計 | : SPI-6A（㈱トプコン） |

3.4 試験濃度の設定

1.0 および 10mg/L で予備試験を実施したところ、最低濃度の 1.0mg/L で約 10%、10mg/L で約 56%の増殖阻害が認められた。以上の結果を基に最低濃度を 0.46mg/L とし、公比 2.2 で 1.0, 2.2, 4.6 および 10mg/L の 5 濃度を本試験の設定濃度とした。但し、10mg/L は最大助剤濃度 (100mg/L) で溶解可能な上限濃度である。

3.5 試験液の調製

必要量の被験物質を電子天秤を用いて秤量し、これに溶解助剤としてジメチルホルムアミドを 10 倍量添加して試験原液を調製した。この試験原液から各設定濃度に必要な量をそれぞれ量り取り、溶解助剤で定容した。これらの各濃度別に調製した試験原液の一定量を添加することにより、設定濃度 0.46, 1.0, 2.2, 4.6 および 10mg/L の試験液を調製した。ただし、助剤濃度は各試験液とも 100mg/L で一定とした。

対照区には培地だけのものと、濃度区と同じ濃度 (100mg/L) の助剤対照区を設けた。

3.6 試験液の分析

全試験区の試験液について、暴露開始時には分析試料用に調製した試験液 (採取液量が試験液量の 5%を越えるため別途調製した) を栓付ガラス製遠沈管に満水 (約 50mL) となるように採取した。また、暴露終了時には各試験区 3 連の試験容器から、ほぼ均等に試験液を採取し (栓付ガラス製遠沈管に満水 (約 50mL))、遠心分離 (3000rpm、10 分) により藻体を除去した。これらの試験液はフィルター濾過後、HPLC により分析した。試験液の分析に際しては、試料のピーク面積から絶対検量線法により定量した。

なお、実際の物理化学的試験は(株)住化分析センターに委託した。詳細は付属資料-1 に示した。

3.7 試験操作

前培養した藻類の細胞数を計数し、試験液中の細胞濃度が 1×10^4 cells/mL となるように、前培養液の一定量を試験液の入った容器に添加した。

各試験容器を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ の培養装置に設置して試験を開始し、24、48 および 72 時間に細胞濃度を測定した。細胞濃度の測定は各試験容器より試験液 2.0mL を採取し、電解液 (ISOTON-II) を 18mL 混合した後、粒子計数装置により計測した。

試験液調製時の pH は 3 連の他に分析試料用として調製した試験液について測定し、各試験区の暴露開始時の pH とし、暴露終了時には各試験区 3 連のうち 1 本を測定した。暴露期間中、藻類培養試験装置内の温度、照度、回転数を 1 日 1 回測定した。

4. 結果の算出

4.1 藻類生長曲線

濃度区および対照区、助剤対照区の細胞濃度の平均値を時間に対してプロットし生長曲線を作成した。

4.2 藻類生長阻害濃度の算出

次に下記の方法で生長阻害濃度を算出した。

1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度 (E_bC50)

生長曲線下の面積は次の式により算出した。

$$A = \frac{N_1 - N_0}{2} \times t_1 + \frac{N_1 + N_2 - 2N_0}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{N_{n-1} + N_n - 2N_0}{2} \times (t_n - t_{n-1})$$

ここで、

A : 生長曲線下の面積

N_0 : 暴露開始時の設定細胞濃度 (cells/mL)

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

生長曲線下の面積より各濃度区における生長の阻害百分率 (I_A) を次の式により算出した。

$$I_A = \frac{A_c - A_t}{A_c} \times 100$$

ここで、

A_c : 対照区の生長曲線下の面積

A_t : 各濃度区における生長曲線下の面積

各濃度区に対応する I_A 値を算出したところ、試験最高濃度の 10mg/L (設定値) で 50%未満であったため、統計手法による E_bC50 (0-72h) の算出はできなかった。

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 ($E_T C50$)

指数増殖している培養での細胞濃度の平均値から平均の生長速度 (μ) を次の式より算出した。

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_1}{t_n - t_1}$$

ここで、

N_1 : t_1 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N_n : t_n 時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t_1 : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 暴露開始後 n 回目に細胞濃度を測定した時間

平均の生長速度 (μ) より各濃度区における平均生長速度の低下百分率を次の式により算出した。

$$I_m = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

ここで、

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_t : 各濃度区における平均生長速度

各濃度区に対応する I_m 値を算出したところ、試験最高濃度の 10mg/L で 50%未満であったため、統計手法による E_rC50 (24-48h) および E_rC50 (24-72h) の算出はできなかった。

4.3 無影響濃度 (NOEC) の算出

統計的手法 (等分散性検定 (Bartlett)、一元配置分散分析および多重比較検定 (Dunnett)) により、対照区と比較して有意差 (有意水準 5%) が認められない試験最高濃度を無影響濃度 (NOEC) とした。その際、面積法により求めた場合は NOEC (面積法 0-72h)、速度法により求めた場合は NOEC (速度法 24-48h) または NOEC (速度法 24-72h) と記載した。

5. 結果および考察

5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

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は認められなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時の被験物質濃度は 0.46, 0.71, 2.1, 4.2 および 9.4mg/L (設定値 0.46, 1.0, 2.2, 4.6 および 10mg/L) であり、1.0mg/L 区を除いて設定値に対する実測値の割合が 90%以上であった。暴露 72 時間の被験物質濃度は 0.36, 0.53, 1.7, 3.6 および 6.4mg/L (設定値 0.46, 1.0, 2.2, 4.6 および 10mg/L) であり、設定値に対する実測値の割合は、53~79%に低下した。

これらの結果から、暴露開始時の分析において 1.0mg/L 区の試験液の濃度が設定値の±20%を越えたため、結果の表示は実測値を採用した。

[Table 2 (p.16), 付属資料-1]

5.3 藻類生長曲線

対照区および助剤対照区における細胞濃度は 72 時間の培養で、それぞれ 118、131 倍に増殖し、試験条件下で正常な生長を示した。

0.46, 0.71, 2.1, 4.2mg/L 区については、112~140 倍の増殖となり対照区と同等もしくはそれ以上の生長が見られた。しかし、試験最高濃度区の 9.4mg/L の増殖は、78 倍にとどまった。

[Table 3 (p.17), Figure 1 (p.21)]

5.4 半数影響濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC)

1) 生長曲線下の面積の比較による生長阻害濃度 (E_bC50)

試験最高濃度区における I_A 値が 22%であることから、 E_bC50 (0-72h) は >9.4mg/L であった。対照区と比較して有意差が認められない試験最高濃度 (NOEC(面積法 0-72h)) は 4.2mg/L (Dunnett)であった。

[Table 4, 5 (p.18, 19), Figure 2(p.22)]

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 (E_rC50)

試験最高濃度区における I_m 値が 15%以下であることから、 E_rC50 (24-48h) および E_rC50 (24-72h) は、いずれも >9.4mg/L であった。対照区と比較して有意差が認められない試験最高濃度 (NOEC(速度法 24-48h, 24-72h)) は、それぞれ 9.4mg/L(一元配置分散分析)、2.1mg/L(Dunnett)であった。

[Table 4, 5 (p.18, 19), Figure 3 (p.22)]

5.5 温度およびpH

72 時間の暴露期間中の藻類培養試験器内の温度は 23.1～23.5℃であり、その平均温度は 23.4 ± 0.2 ℃であった。試験液のpHは暴露開始時が 7.7～7.8 であり、暴露終了時が 7.6～7.8 であった。

[Table 6, 7 (p. 20)]

以 上

Table 1. OECD medium

Nutrient Salts	Concentration (mg/L)
H_3BO_3	0.185
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
ZnCl_2	0.003
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.08
$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0015
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.007
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.00001
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	18
NH_4Cl	15
KH_2PO_4	1.6
NaHCO_3	50
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	15

Table 2. Measured Concentrations of 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile) during a 72-Hour Exposure to *Selenastrum capricornutum*.

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hour	Percent of Nominal
Control	<0.1	—	<0.1	—
Solvent Control	<0.1	—	<0.1	—
0.46	0.46	100	0.36	78
1.0	0.71	71	0.53	53
2.2	2.1	95	1.7	77
4.6	4.2	92	3.6	79
10	9.4	94	6.4	64

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum* to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile).

Initial Measured Concentration (mg/L)	No.	Cell Density ($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour
Control	1	1.00	3.45	18.4	117
	2	1.00	3.68	21.2	126
	3	1.00	3.36	16.8	109
	Mean	1.00	3.50	18.8	118
	SD	0	0.17	2.2	9
Solvent Control	1	1.00	3.56	20.2	145
	2	1.00	3.56	18.7	116
	3	1.00	3.81	20.4	133
	Mean	1.00	3.64	19.8	131
	SD	0	0.14	0.9	14
0.46	1	1.00	3.79	18.9	125
	2	1.00	3.65	21.7	133
	3	1.00	3.81	19.3	127
	Mean	1.00	3.75	20.0	128
	SD	0	0.09	1.5	4
0.71	1	1.00	3.93	22.9	150
	2	1.00	3.66	19.9	134
	3	1.00	3.75	18.6	136
	Mean	1.00	3.78	20.4	140
	SD	0	0.14	2.2	8
2.1	1	1.00	3.70	18.6	122
	2	1.00	3.58	20.4	123
	3	1.00	3.72	21.8	138
	Mean	1.00	3.66	20.3	127
	SD	0	0.08	1.6	9
4.2	1	1.00	4.15	23.0	107
	2	1.00	4.07	23.3	112
	3	1.00	3.81	19.1	118
	Mean	1.00	4.01	21.8	112
	SD	0	0.18	2.4	6
9.4	1	1.00	4.05	21.6	83.5
	2	1.00	3.98	21.7	79.8
	3	1.00	3.86	19.4	69.5
	Mean	1.00	3.96	20.9	77.6
	SD	0	0.10	1.3	7.3

Each value represents the mean of three sample counts.

SD: Standard Deviation

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum* to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile).

Initial Measured Concentration		Area	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)
mg/L	No.	A(0-72h)	I _A (0-72h)	μ (24-48h)	I _m (24-48h)	μ (24-72h)	I _m (24-72h)
Control	1	18690480		0.0698		0.0734	
	2	20532960		0.0728		0.0737	
	3	17334960		0.0671		0.0725	
	Mean	18852800	0	0.0699	0	0.0732	0
Solvent Control	1	22479360		0.0724		0.0772	
	2	18676800		0.0692		0.0726	
	3	21167040		0.0700		0.0740	
	Mean	20774400	-10.2	0.0705	-0.9	0.0746	-1.9
0.46	1	19869120		0.0670		0.0729	
	2	21435600		0.0743		0.0749	
	3	20223120		0.0676		0.0731	
	Mean	20509280	-8.8	0.0696	0.4	0.0736	-0.6
0.71	1	23768400		0.0733		0.0758	
	2	21139440		0.0705		0.0751	
	3	21103200		0.0666		0.0748	
	Mean	22003680	-16.7	0.0702	-0.4	0.0752	-2.8
2.1	1	19393440		0.0673		0.0729	
	2	19878240		0.0726		0.0737	
	3	22109280		0.0736		0.0753	
	Mean	20460320	-8.5	0.0712	-1.8	0.0739	-1.0
4.2	1	18724080		0.0713		0.0676	
	2	19434480		0.0726		0.0691	
	3	19098960		0.0670		0.0716	
	Mean	19085840	-1.2	0.0703	-0.6	0.0694	5.1
9.4	1	15580560		0.0697		0.0630	
	2	15147600		0.0707		0.0625	
	3	13305840		0.0672		0.0602	
	Mean	14678000	22.1	0.0692	0.9	0.0619	15.4

Table 5. Calculated EC50 and NOEC Values for 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile).

Based on I _A Value		
Item	Value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
E _b C50 (0-72h)	>9.4	—
NOECb (0-72h)	4.2	—

Based on I _m Value		
Item	Value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
E _r C50 (24-48h)	>9.4	—
NOECr(24-48h)	9.4	—
E _r C50 (24-72h)	>9.4	—
NOECr(24-72h)	4.2 2.1	—

正 西

Table 6. Daily Temperature in the Incubation Chamber during a 72-Hour Exposure of *Selenastrum capricornutum* to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile).

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	23.1
24	23.5
48	23.3
72	23.5
Mean \pm SD	23.4 \pm 0.2

Table 7. pH Values at 0-Hour and 72-Hour Exposure

Initial Measured Concentration (mg/L)	pH	
	0 Hour	72 Hour
Control	7.8	7.6
Solvent Control	7.7	7.6
0.46	7.7	7.6
0.71	7.7	7.6
2.1	7.7	7.6
4.2	7.7	7.8
9.4	7.7	7.8

Figure 1. Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum* Exposed to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile).

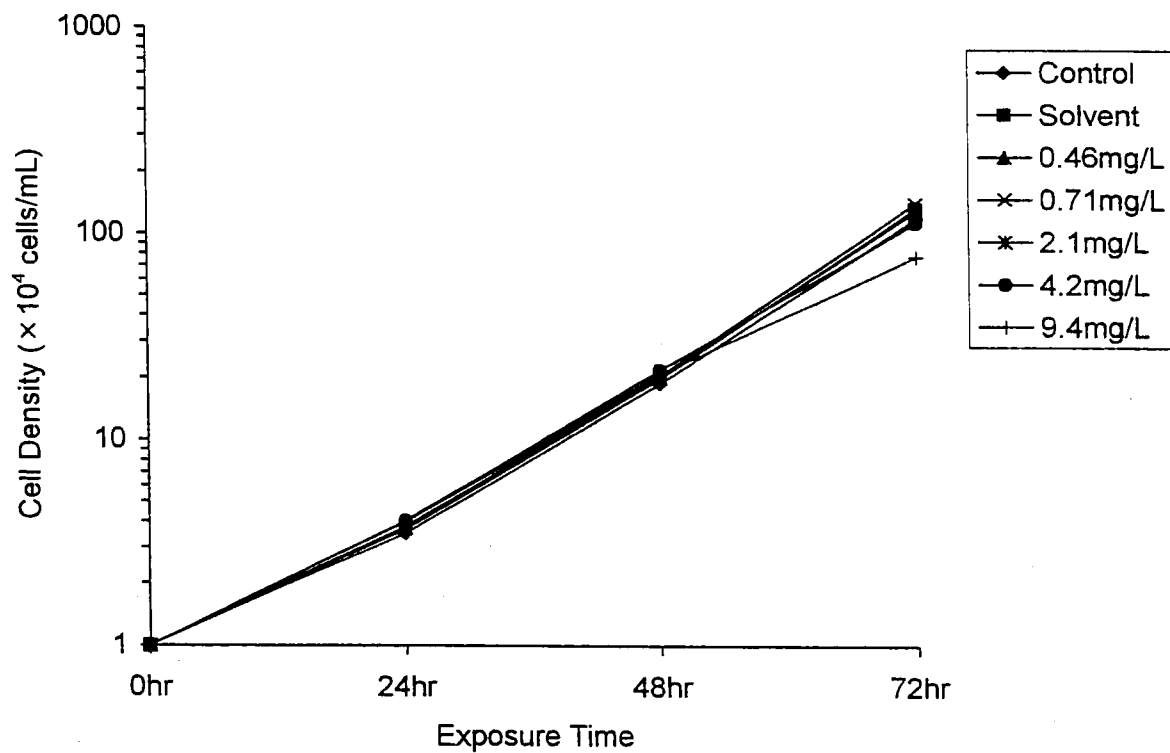


Figure 2. Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* Based on I_A (0-72h) Value to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile).

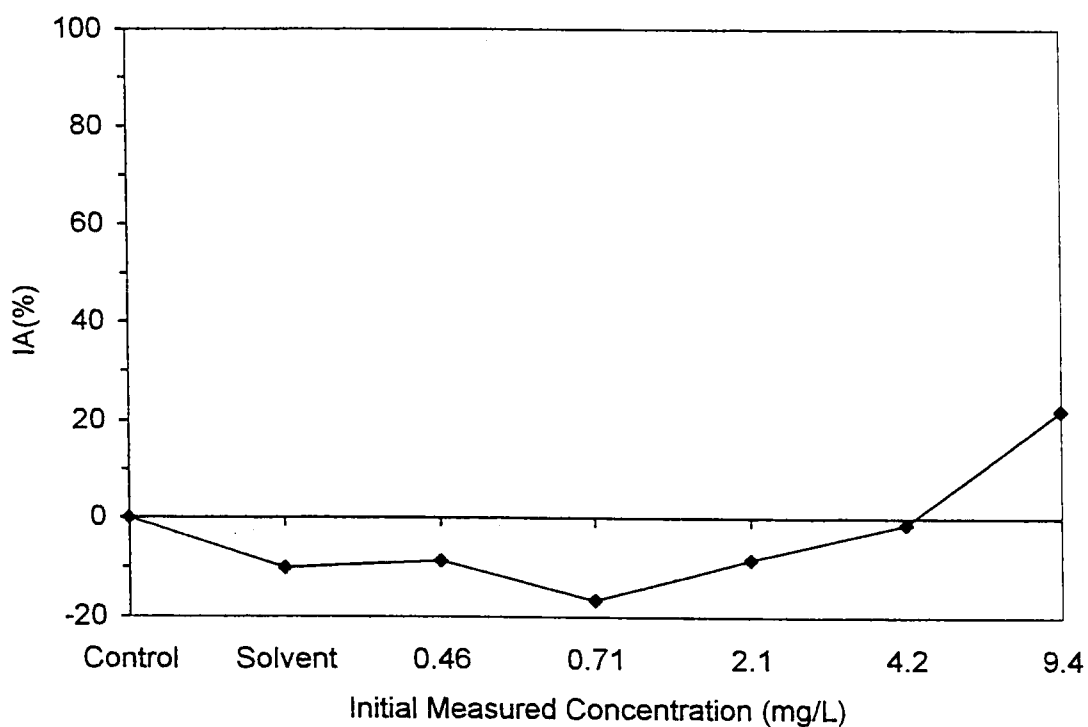
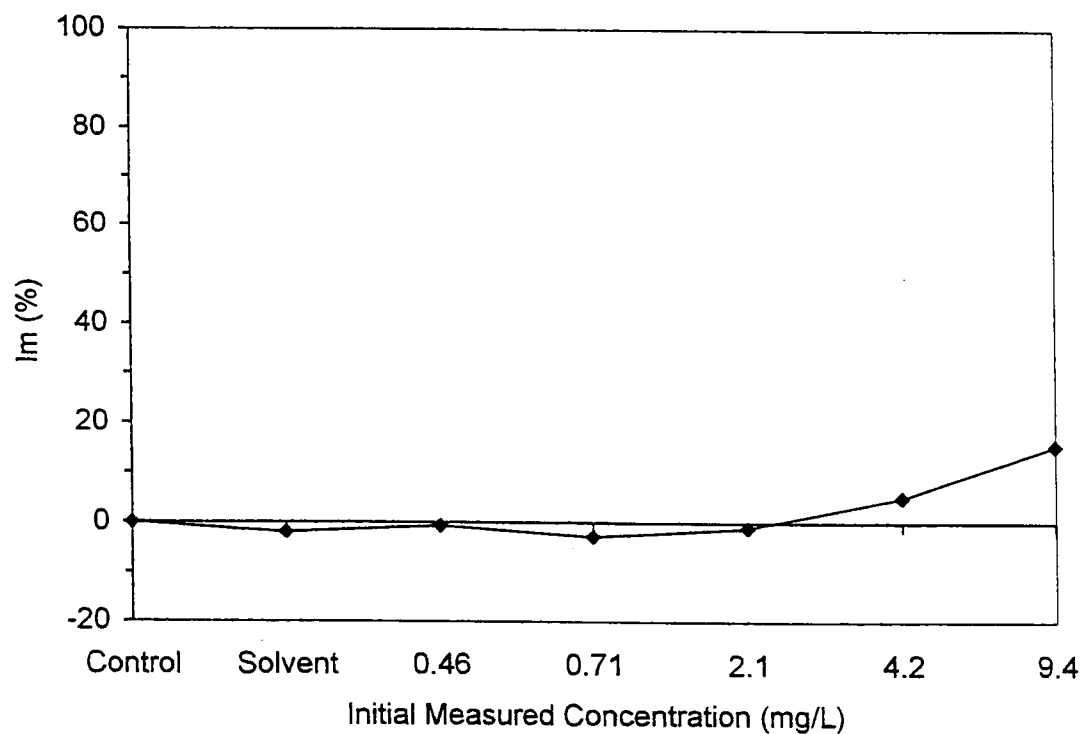


Figure 3. Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* Based on I_m (24-72h) Value to 2,2'-Azobis(2-methylpropanitrile).



付属資料－1

試験液の分析方法

（全16頁）

試験結果報告書

表題： 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)の藻類 (*Selenastrum capricornutum*)に対する
生長阻害試験 (物理・化学系)

(試験番号： EAI96001)

1997年3月25日

運営管理者

大阪事業所 所長

株式会社 住化分析センター

大阪事業所

ESOP/REC/011 RS-01

陳 述 書

試験委託者 :

名 称 住化テクノス株式会社
住 所 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

試験の表題 : 2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオニトリル)の藻類 (*Selenastrum capricornutum*)
に対する生長阻害試験 (物理・化学系)

試験番号 : EAI96001

上記試験は、環境庁の「生態影響試験実施に関する基準」に従って実施したものであり、
提出した資料は原本と相違ありません。

1997 年 3 月 25 日

(所属)

株式会社 住化分析センター
大阪事業所 所長

(氏名)

運営管理者

監査・査察報告書 (951025)

試験の表題: 2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)の藻類(*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験 (物理・化学系)

試験番号: EAI96001

本最終報告書の試験は、当施設の信頼性保証部門に関する標準操作手順書に従って
 下記の監査・査察を受けている。

QAU 監査・査察日	運営管理者および 試験責任者への報告日	監査・査察 項目
1997年 3月17日	1997年 3月17日	試験計画書
1997年 3月17日	1997年 3月17日	試験操作
1997年 3月25日	1997年 3月25日	最終報告書 (草稿)
1997年 3月25日	1997年 3月25日	最終報告書

本試験は適正に実施されており、本最終報告書は試験で使用した方法、手順が正確
 に記録され、かつ試験の生データを正確に反映していることを認めます。

1997年 3月25日

株式会社 住化分析センター 大阪事業所

QA責任者

ESOP/QAU/001 RS-11

試験番号：EAI96001

表 題 2,2'-ジヨードビス(2-メチル-5-ヒドロキシベンゾイル)の藻類 (*Selenastrum capricornutum*)
に対する生長阻害試験 (物理・化学系)

試験委託者











名 称 住化テクノス株式会社
住 所 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

試験期間

自: 1997年 3月 17日
至: 1997年 3月 25日

試験施設

名 称 株式会社 住化分析センター 大阪事業所
住 所 〒665 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

試験責任者			1997年 3月 25日
試験担当責任者			1997年 3月 25日
試験担当者			1997年 3月 25日
最終報告書作成者			1997年 3月 25日
運営管理者			1997年 3月 25日

目 次

1. 要約
2. 緒言
3. 試験物質、試薬および装置
4. 試験の実施
 - (1) 用いた試験方法
 - (2) 試験装置
 - (3) 試験液の分析
5. 試験結果
 - (1) 検出限界
 - (2) 添加回収試験結果
6. 試験成績の信頼性に及ぼしたと思われる環境要因
7. SOPまたは試験計画書からの逸脱
8. 資料の保管
9. 添付資料

1. 要約

生態影響試験「2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)の薬類に対する生長阻害試験(試験番号:EA196001)」時の試験液(試料)中の被験物質濃度を測定した。

2. 緒言

試料中の被験物質濃度を、高速液体クロマトグラフにて濃度を測定した。

3. 試験物質、試薬および装置

2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)標準品:

より提供された純度既知の被験物質

Lot. No. : DLE7785

純 度 : 99.3%

ジクロロメタン:	残留農薬試験用	関東化学㈱製
アセトニトリル:	高速液体クロマトグラフ用	関東化学㈱製
蒸留水:	高速液体クロマトグラフ用	関東化学㈱製
n-オクチルアルコール:	特級	和光純薬㈱製
無水硫酸ナトリウム:	残留農薬試験用	関東化学㈱製
フィルター:	DISMIC-13HP (PTFE 0.45 μ m)	ADVANTEC
高速液体クロマトグラフ用ポンプ:	LC-5A	㈱島津製作所製
紫外分光光度計検出器:	SPD-6A	㈱島津製作所製
自動注入装置:	KMT-60A-II型	㈱協和精密製作所製
データ処理装置:	C-R4A	㈱島津製作所製
天秤:	AT-250	メトラー社製

4. 試験の実施

(1) 用いた試験方法

試験液を液々抽出後、高速液体クロマトグラフにて定量した。

(2) 試験装置

高速液体クロマトグラフ操作条件

カラム: Sumipax ODS A-212

(粒径 5 μ m, 内径 6 mm, 長さ 15 cm)

移動相: アセトニトリル/水 = 2/3 (V/V)

カラム温度: 室温

流 量: 1.0 mL/min

保持時間： 約 12.5 分

測定波長： 205 nm

注 入 量： 50 μ L

(3) 試験液の分析

1) 検量線の作成

2,2'-アゾビス(2-メチルプロパニトリル)標準品約 30 mg を精密に秤り取り 30 mL 容メスフラスコに入れ、アセトニトリルを加えて溶かし、定容とした。この液より一定量を採取し、蒸留水で希釈し、約 1, 5, 10, 20 mg/L の標準溶液を調製した。

4. (2) の条件に調整した高速液体クロマトグラフに注入し、それぞれの標準溶液のピーク面積と標準品重量から検量線を作成し、最小自乗法により回帰直線式を求めた。

なお、検量線のバラツキの許容範囲は相関係数が、0.95 以上であることとした。

2) 試料の分析

- a. 試料は、50 mL 容遠沈管に満たした状態で試験委託者より受け取った。
- b. あらかじめ塩化ナトリウム 1 g を入れた 100 mL 容分液ロートに試料(a.)20 mL を採取し、ジクロロメタン(40 mL \times 2 回)を加え、振盪抽出(5 分間 \times 2 回)した。5 分間静置した後、ジクロロメタン層を無水硫酸ナトリウムを載せた三角ロートにて脱水濾過後、2% n-オクチルアルコール/ジクロロメタン 1 mL を加え、ロータリーエバポレーターを用いて、浴温 40℃ 以下で減圧濃縮した。

アセトニトリル/水 = 2/3 (V/V) で被験物質の濃度が 1~20 mg/L になるように希釈し、フィルターで濾過後、4. (2) の測定条件にて絶対検量線法で濃度を求めた。

感度確認のため、測定終了後に標準溶液を注入し、感度の変化のないことを確認した。

3) 検出限界

装置の最小検出量 : 50 ng

最終液量 : 2 mL

注入量 : 50 μ L

試料量 : 20 mL

$$50 \text{ ng} / 50 \mu \text{ L} \times 2 \text{ mL} / 20 \text{ mL} = 0.1 \text{ mg} / \text{L}$$

5. 試験結果

(1) 添加回収試験結果

検出限界の10倍濃度(1mg/L)における回収試験を行ったところ、以下の結果が得られた。なお、変動係数は10%以内であった。

設定濃度 mg/L	回収率 %	平均回収率 %
1.004	82.46	81.73
	81.53	
	81.20	

(2) 試験液測定結果

設定濃度 mg/L	測定値 mg/L	
	0 時間	72 時間
対照区	<0.1	<0.1
助剤対照区	<0.1	<0.1
0.46	0.4612	0.3581
1.0	0.7086	0.5333
2.2	2.086	1.717
4.6	4.246	3.642
10	9.411	6.441

6. 試験成績の信頼性に及ぼしたと思われる環境要因

試験成績の信頼性に及ぼしたと思われる環境要因は特に認められなかった。

7. SOPまたは試験計画書からの逸脱

SOPまたは試験計画書からの逸脱は特に認められなかった。

8. 資料の保管

試験計画書、生データ、資料、最終報告書は、試験報告書作成後10年間、当社施設の資料保管室に保管する。その後の保管については、試験委託者と協議のうえ決定する。

9. 添付資料

検量線

標準溶液のクロマトグラム

試料のクロマトグラム

Figure 1 Typical Calibration Curve of 2,2'-Azobis(2-methylpropanitorile)
by HPLC Analysis

Input Data

No.	Weight (n g)	Peak Area (μ v . s e c)
1	50.20	4299
2	251.0	23142
3	502.0	45718
4	1004	91918

$$Y(\text{Peak Area}) = -160.0 + 91.70X (\text{Weight})$$

$$r = 1.000$$

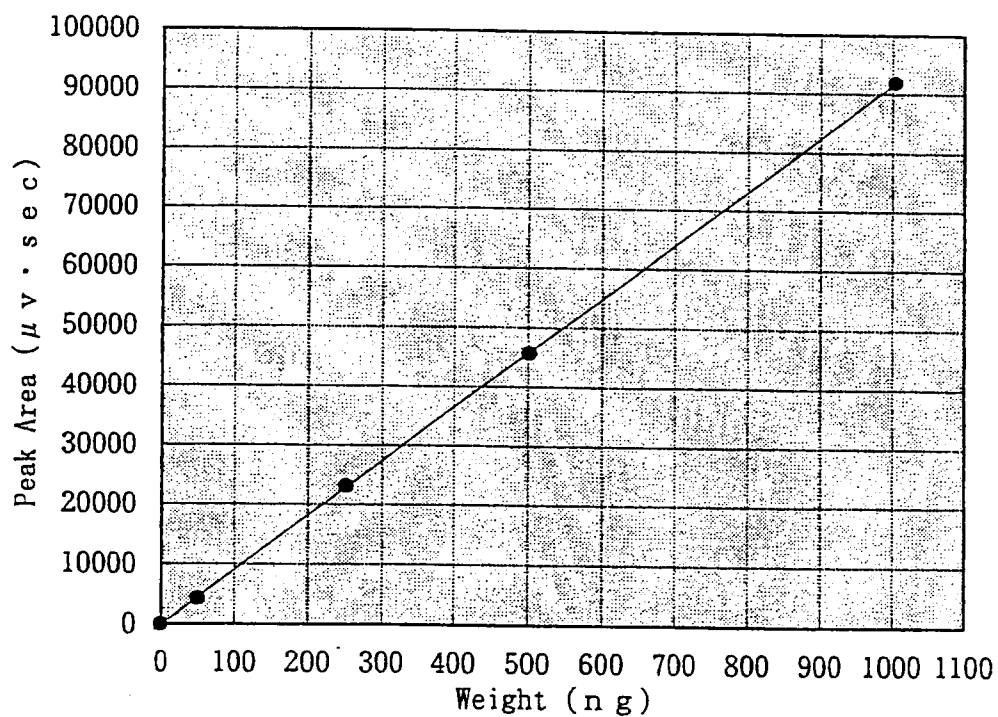
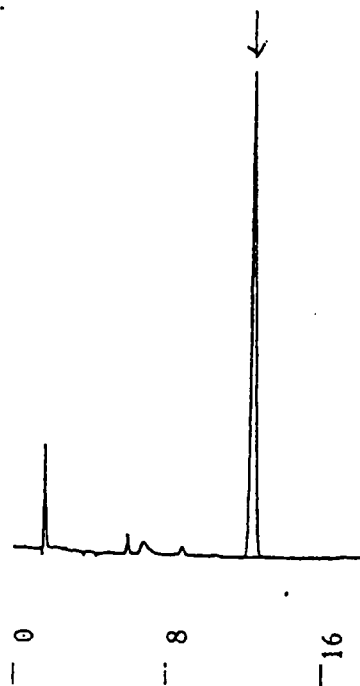


Figure 2 Representative Chromatograms

(1) Standard 10.04 mg/L

(2) Control: Hour 0

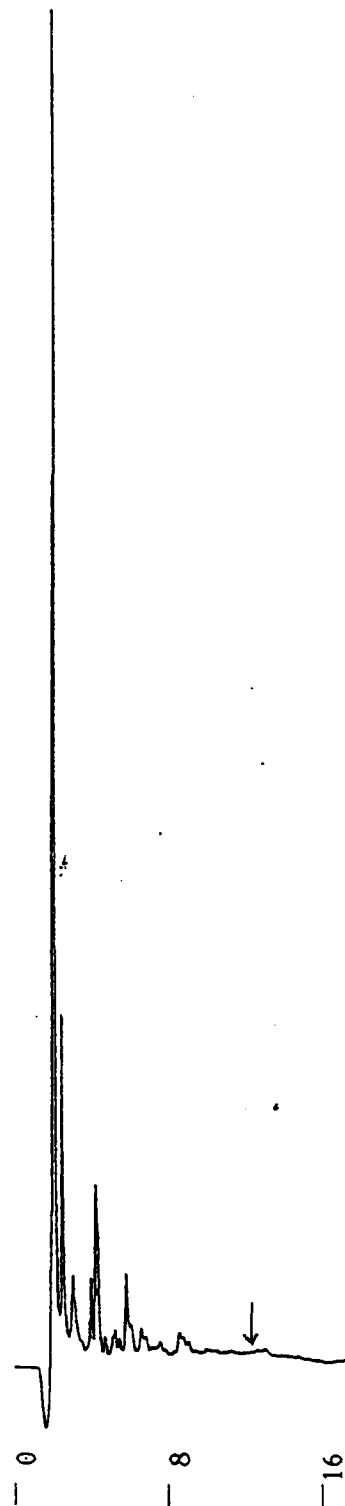
CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=69 クロマト=2:970317.C12 97/03/17 18:50:41



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.396	45718	2864			100	
TOTAL			45718	2864			100	

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=71 クロマト=2:970317.C14 97/03/17 19:31:36



** 定量計算結果 **

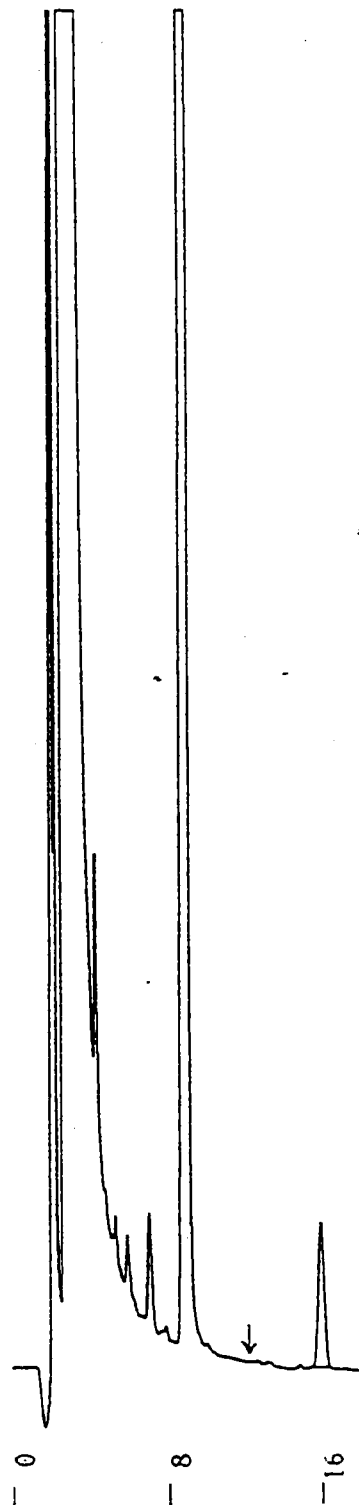
注意 17-有 CALERROR: 1

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
TOTAL			0	0			0	

Figure 2 Continued

(3) Solvent Control; Hour 0

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=72 クロマト=2:970317.C15 97/03/17 20:12:03

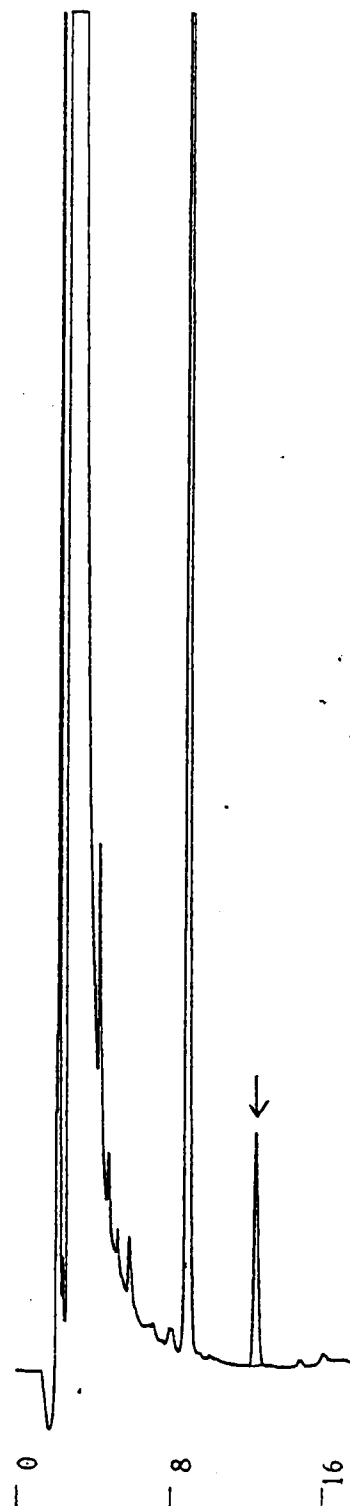


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	15.967	19208	854			100	
TOTAL			19208	854			100	

(4) 0.46mg/L nominal; Hour 0

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=73 クロマト=2:970317.C16 97/03/17 20:52:31

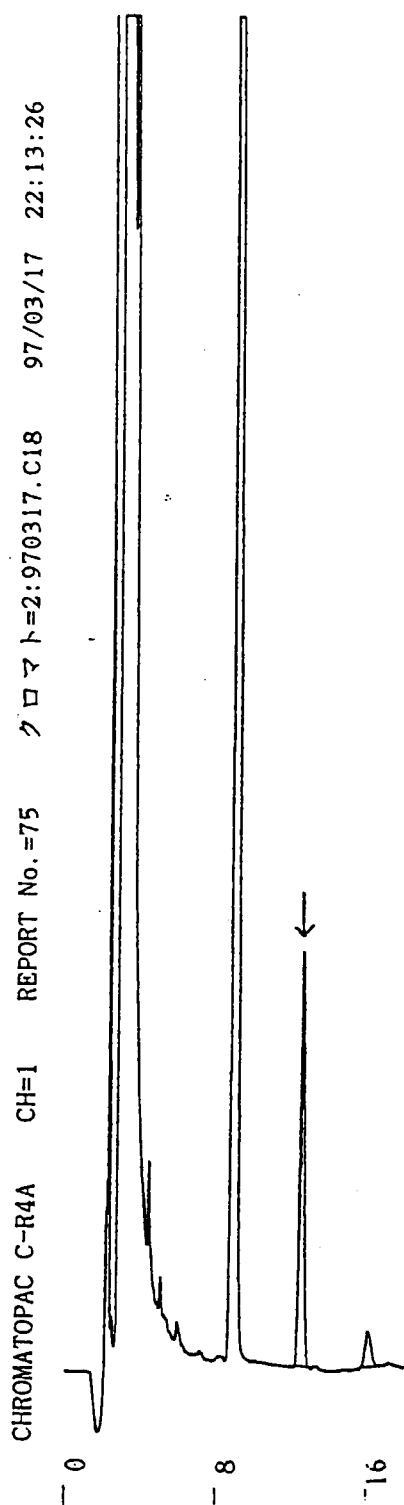


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.53	20986	1361			100	
TOTAL			20986	1361			100	

Figure 2 Continued

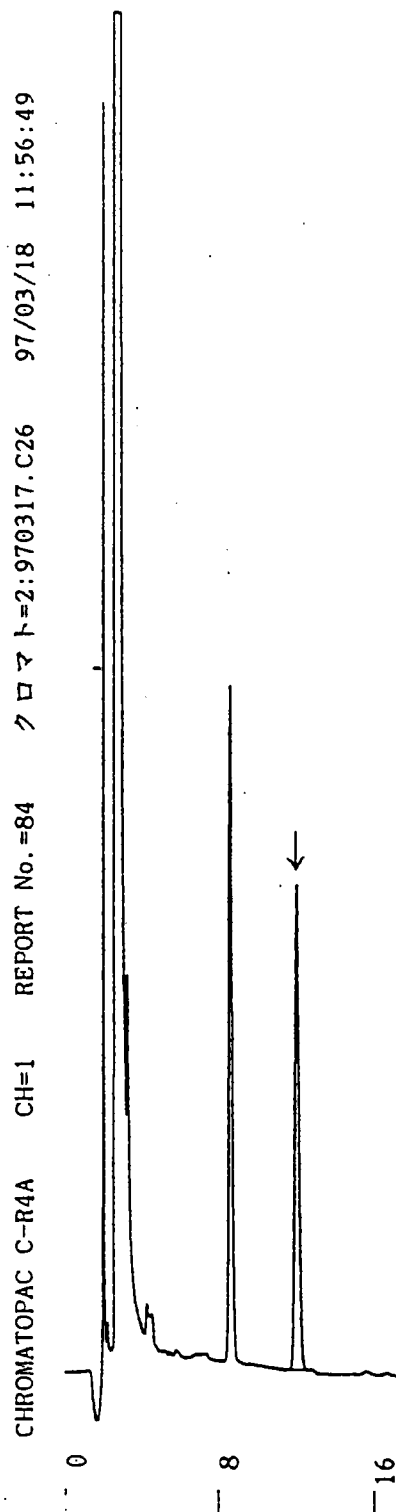
(5) 2.2 mg/L nominal; Hour 0



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.513	38091	2438			89.3998	
	2	16.067	4516	209			10.6002	
TOTAL			42607	2647			100	

(6) 10mg/L nominal; Hour 0



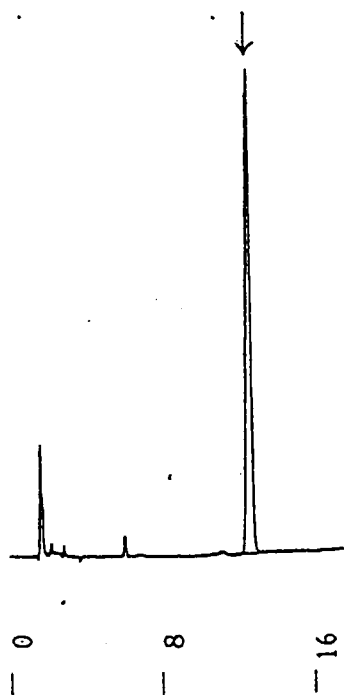
** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.083	42990	2851			100	
TOTAL			42990	2851			100	

Figure 2 Continued

(7) Standard 10.06 mg/L

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=112 クロマト=2:970320.C04 97/03/20 17:34:26

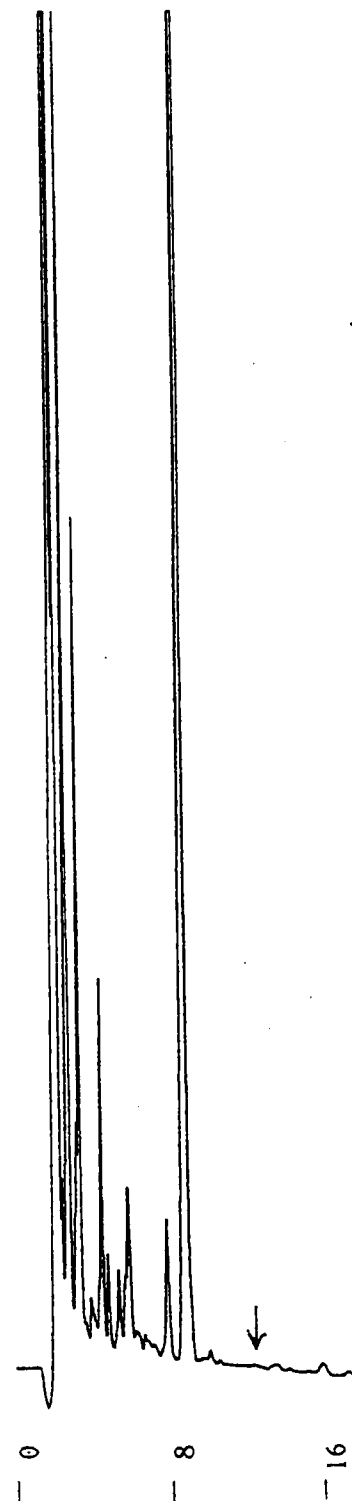


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.622	45767	2840			100	
TOTAL			45767	2840			100	

(8) Control: Hour 72

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=114 クロマト=2:970320.C06 97/03/20 18:15:21



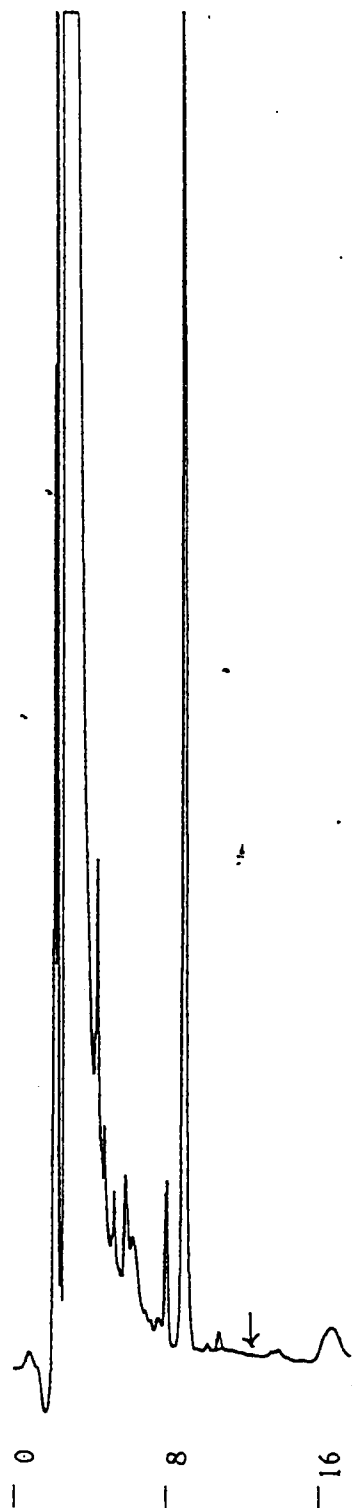
** 定量計算結果 ** 注意 17-有 CALERROR: 1

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
TOTAL				0			0	

Figure 2 Continued

(9) Solvent Control; Hour 72

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=115 クロマト=2:970320.C07 97/03/20 18:35:49

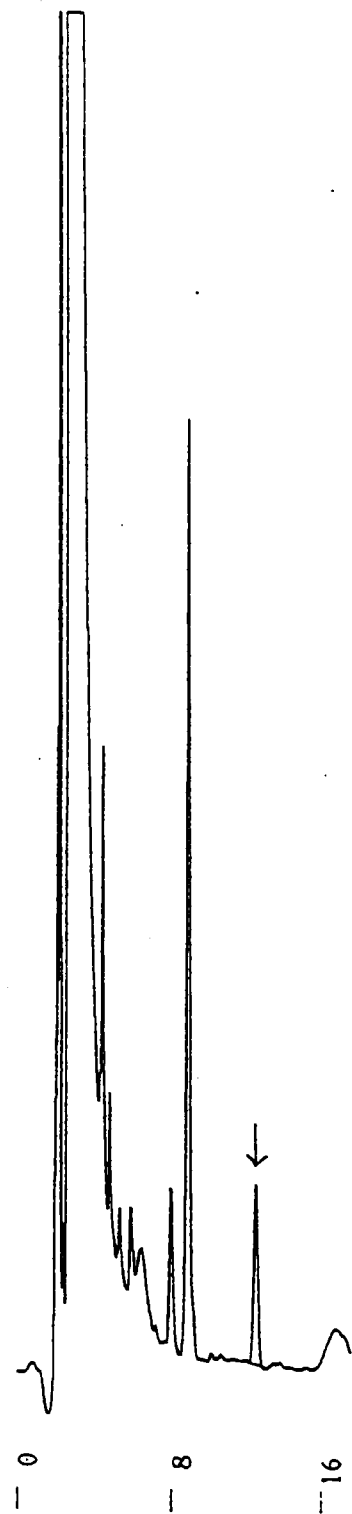


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	10.782	1261	99			100	
TOTAL			1261	99			100	

(10) 0.46mg/L nominal; Hour 72

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=116 クロマト=2:970320.C08 97/03/20 18:56:16



** 定量計算結果 **

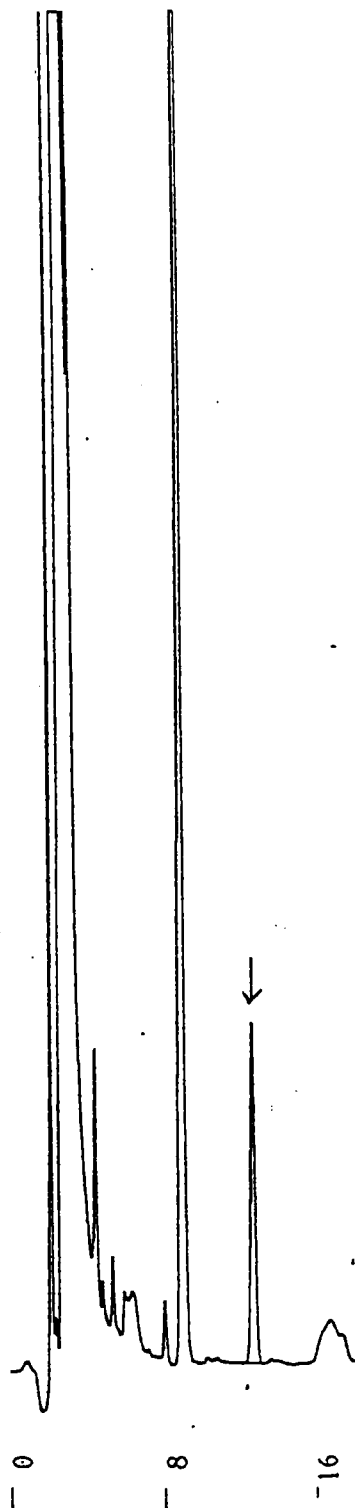
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.532	16166	1045			100	
TOTAL			16166	1045			100	

Figure 2 Continued

(11) 2.2 mg/L nominal; Hour 72

(12) 10mg/L nominal; Hour 72

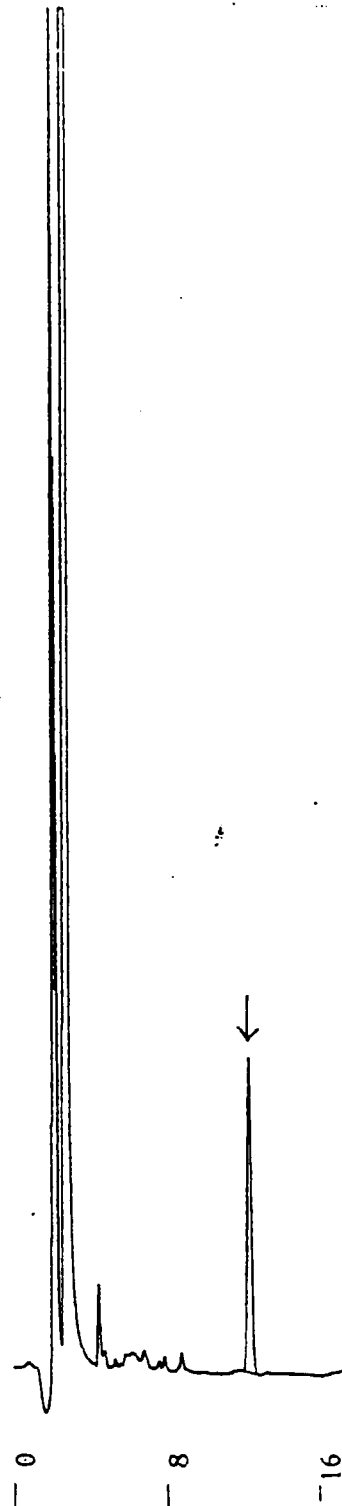
CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=118 クロマト=2:970320.C10 97/03/20 19:37:11



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.638	31001	1988			100	
TOTAL			31001	1988			100	

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=120 クロマト=2:970320.C12 97/03/20 20:18:05



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	12.39	29072	1847			100	
TOTAL			29072	1847			100	