

環境庁殿

試 験 報 告 書

フタル酸－ジ－n－ブチルの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号：PRO/N01/0100)

平成8年 7月31日作成

株式会社東レリサーチセンター

陳 述 書

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者： 環境庁

表題： フタル酸－ジ－n－ブチルの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験

試験番号： PRO/N01/0100

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

平成 8 年 7 月 31 日

運営管理者

[Redacted Signature]

信頼性保証証明

株式会社東レリサーチセンター
名古屋研究部

試験委託者： 環境庁

表題： フタル酸-ジ-n-ブチルの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験

試験番号： PRO/N01/0100

本試験は試験計画書および標準操作手順書に従って実施され、本報告書には試験に使用した方法、手順が正確に記載されており、試験結果は生データを正確に反映していることを下記の通り確認した。

記

	実施日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験実施状況査察	平成 7 年 12 月 18 日 木曜 8 2 7	平成 8 年 1 月 19 日 お曜 8 2 16
試験報告書監査	平成 8 年 4 月 18 日	平成 8 年 4 月 19 日
	平成 8 年 7 月 31 日	

信頼性保証担当者：  

試験実施概要

1. 表題： フタル酸－ジ－n－ブチルの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的： フタル酸－ジ－n－ブチルについて、藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験を行い、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) に準拠して実施する。
4. 適用GLP： 本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境庁
住所： (〒100) 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2
委託責任者： 企画調整局環境保健部環境安全課 保健専門官 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者
名称： 株式会社東レリサーチセンター
所在地： (〒103) 東京都千代田区日本橋室町3-1-8
7. 試験施設
名称： 株式会社東レリサーチセンター
所在地： (〒455) 愛知県名古屋市港区大江町9-1

8. 試験関係者：

試験責任者	[redacted]	[redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)
試験担当者	[redacted]	[redacted]	(平成 8 年 7 月 31 日)

9. 試験期間：

試験開始日	平成 7 年 12 月 1 日
試験終了日	平成 8 年 7 月 31 日
曝露期間	平成 8 年 3 月 5 日 ～ 平成 8 年 3 月 8 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、株式会社東レリサーチセンター名古屋研究部の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 保管方法および保管条件下の安定性の確認	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等	10
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	11
3.7 試験操作	11
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	13
5 結果および考察	14
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	14
5.2 試験液中の被験物質濃度	14
5.3 藻類成長曲線	14
5.4 半数影響濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC)	15
5.5 温度およびpH	15
Table 1～7	16～22
Figure 1～3	23～25
付属資料－1 試験液の分析方法	

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

フタル酸-γ-ブチルの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号

PRO/N01/0100

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)に準拠して実施する。

- 1)被験物質： フタル酸-γ-ブチル
- 2)培養方式： 振とう培養 (100rpm)
- 3)供試生物種： *Selenastrum capricornutum* (NIES-35)
- 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： 4,030 ~4,740 lux (連続照明)
- 8)初期細胞濃度： 1×10^4 cells/mL
- 9)試験濃度 (設定)： 対照区、助剤対照区、0.20mg/L、0.40mg/L、0.80mg/L、
1.60mg/L、3.20mg/L
- 10)試験液中の被験物質の分析： HPLC法 (暴露開始時、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

$E_b C_{50} (0-72h) = 1.16 \text{ mg/L}$ (95%信頼区間: 1.04 mg/L ~ 1.28 mg/L)

無影響濃度 (NOEC) = 0.30 mg/L

(上記濃度は、全て暴露開始時と暴露72時間の実測濃度の相乗平均値に基づく値)

2)生長速度の比較による生長阻害濃度

$E_r C_{50} (24-48h) = 1.75 \text{ mg/L}$ (95%信頼区間: 1.60 mg/L ~ 1.92 mg/L)

無影響濃度 (NOEC)(24-48h) = 0.30 mg/L

$E_r C_{50} (24-72h) = 2.04 \text{ mg/L}$ (95%信頼区間: 1.84 mg/L ~ 2.30 mg/L)

無影響濃度 (NOEC)(24-72h) = 0.30mg/L

(上記濃度は、全て暴露開始時と暴露72時間の実測濃度の相乗平均値に基づく値)

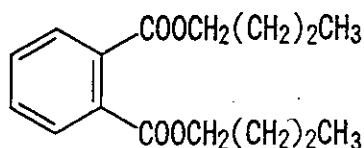
1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： フタル酸ジ-n-ブチル

識別符号： NB

構造式：



分子式： $C_{16}H_{22}O_4$

分子量： 278.35

1-オクタノール/水分配係数 ($\log P$)： 4.900

水溶性： 100～400 ppm (20℃～25℃)

蒸気圧(mmHg)： 0.100～1.100 (89.0～150.0℃)

融点： -35℃

沸点： 340℃

代謝性： フタル酸ジエチルヘキシルと異なり、速やかにフタル酸モノブチルになる。

(上記の数値は、MSDSのフタル酸ジブチルの値を引用した)

1.2 供試試料

購入先： XXXXXXXXXX
入手先： XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
入手日： 平成7年11月16日
ロット番号： FGA01
供給量： 25g入り2本
外観： 無色透明 液体
純度及び不純物： 98.0%以上

1.3 保管方法及び保管条件下の安定性の確認

1) 保管方法

被験物質は光遮断した試料保管庫に室温で保管した。

2) 被験物質の確認及び保管条件下の安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトルおよびNMRスペクトルを測定し、被験物質の特性ピークが認められることを確認した。試験終了時にも同様にスペクトルを測定し、試験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。

従って、被験物質は当研究部の試料保管庫に保管中は安定であったと判断した。

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、(財)地球・人間フォーラム(つくば市)より入手したNIES-35株を、当研究部において無菌的に継代培養しているものである。

また、基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による生長阻害試験を行い、藻類の感受性を調べた結果、基準物質による72時間の生長阻害濃度(EB₅₀)は、0.41mg/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(通常この培養で相乗増殖期の細胞が得られる)。変形や異常な細胞が現れた場合は、使用しないものとした。

3 試験方法

3.1 試験条件

以下の条件で試験を行った。但し、試験容器は滅菌したものを使用し、必要に応じて
その他器具の滅菌も行った。また、藻類の接種も無菌条件下で行った。

- 1) 培養方式： 振とう培養(100rpm)
- 2) 温度： 23±2℃
- 3) 暴露期間： 72時間
- 4) 試験液量： 100 mL(OECD培地)
- 5) 照明： 4,030~4,740 lux(連続照明)
- 6) pH： 暴露期間中、pHの調整は行わなかった。
- 7) 初期細胞濃度： 1×10^4 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調製し、滅菌して使用した。

[Table-1 (p.16)]

3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器

試験容器： 300 mL容ガラス製三角フラスコ（通気性のシリコン栓付）

藻類培養試験装置：伊藤製作所 AGP-150RL

光学顕微鏡： ニコン 培養倒立顕微鏡 TMS-F

pHメーター： 堀場製作所 カタニ-LAB pHメーター F-22

コールドカウンター： コールター社製 コールター Z1型

電解液： コールター社製 アイソトンII

温度計： ティアンドティ社製 温湿度データロガー TR-72型

照度計： 東京光学機械 デジタル照度計 IM-2D

3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立って、0.20mg/L、0.50mg/L、1.00mg/L の3濃度区を設定した予備試験を行い、面積法(0-72h)による EC_{50} を 0.76 mg/L と推定した。

この予備試験結果に基づき、本試験では 0.80mg/L が中間濃度となるよう、公比 2.0で 0.20mg/L、0.40mg/L、0.80mg/L、1.60mg/L、3.20mg/Lの5段階の濃度区を設定した。

3.5 試験液の調製

- 1) 被験物質0.1wt%原液の調製は、供試 *Selenastrum capricornutum* に対して毒性の低い分散剤である硬化ヒマシ油 HCO-50を用い、ホモジナイザーで蒸留水に分散させて調製した。
- 2) 被験物質0.1wt%原液 あるいは 0.01wt%希釈原液と硬化ヒマシ油 1.0wt%溶液を試験培地に添加し、設定濃度の試験液を必要量調製した。
- 3) 試験液中の助剤濃度は、全試験濃度区について 50mg/L の一定とした。
- 4) 試験培地のための対照区と、試験濃度区と同濃度の助剤を添加した助剤対照区も設けた。
- 5) 1濃度区につき3個(分析用に1個追加して4個とした)の試験容器に、試験液を 100mL 入れた。
- 6) 試験液の状態(外観等)を記録した。

3.6 試験液の分析

試験液濃度の分析は高速液体クロマトグラフ（HPLC）法により行った。

試料の測定に際しては、試料測定毎に標準溶液（濃度 1.0mg/L, 5.0mg/L, 10.0mg/L）の測定を行い、検量線から求めた測定値の正確度を確認した。

試験開始時は、各試験濃度区及び各対照区について、pH測定に使用した三角フラスコより、試験量の5%以下の試験液を採取し、遠心分離(2000rpm, 25分)で藻体除去後、上澄み液をHPLCにより分析した。

72時間後は、3連の各三角フラスコより等量ずつ採取混合し、遠心分離(2000rpm, 25分)後、上澄み液をHPLCにより分析した。

詳細は添付資料－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になるよう、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 ± 2 °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 0.2mL を採取し、電解液(ISOTON-II)と混合して全量を 20mL とした後、コールタカウンターにより計測した。

試験液調製時のpHは、3連と予備1本の計4本のうちの1本のみについて測定した結果を暴露開始時のpHとし、終了時には3連の全てを測定した。

試験期間中、培養装置内の温度と照度を1日1回以上測定した。

4 結果の算出

4.1 藻類生長曲線

試験区および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（EbC50）

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。

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

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 値から Probit 法により EbC_{50} (0-72h) およびその95%信頼区間を算出した。(有意水準 5%、統計的手法: 吉岡義正教授 Probit法)

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 (ErC_{50})

相乗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 値から Probit 法により $ErC50$ (24-48h)、 $ErC50$ (24-72h) およびその95%信頼区間を算出した。(有意水準5%、統計的手法: 吉岡義正教授 Probit法)

4.3 無影響濃度(NOEC)の算出

統計的手法(等分散性検定および平均値の差の検定)により対照区と比較して有意差(5%水準)が認められない最高試験濃度を無影響濃度(NOEC)とした。

5 結果および考察

5.1 試験成績の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因

濃度区 0.40mg/L(設定値)は、暴露開始時の被験物質濃度が設定値に対して 82.5%であり、暴露72時間では試験液中の被験物質濃度が設定値の 70.0%まで低下した。

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 0.20~2.93 mg/L (設定値 0.20~3.20 mg/L) であり、暴露72時間の被験物質濃度は 0.17~2.92 mg/L (設定値 0.20~3.20mg/L) であった。

設定値に対する割合は、暴露開始時が 82.5~103.8%、暴露72時間が 70.0~92.5%であった。

尚、暴露開始時と暴露72時間の被験物質の実測濃度から算出した相乗平均値は、0.18~2.92 mg/L であり、設定値に対する割合は 75.0~97.5% であった。

[Table 2 (p.17)]

5.3 藻類成長曲線

- 1) 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200倍以上に増殖し、試験条件下で正常な生長を示した。
- 2) 0.20mg/L(設定値)と0.40mg/L(設定値)では、いずれも 72時間の培養で細胞濃度が 200倍以上に増殖し、各対照区とほぼ程度の生長を示した。また、0.80mg/L(設定値)は 72時間の培養で150倍以上に増殖した。
- 3) 1.60mg/L(設定値)では 72時間の培養で細胞濃度の増殖が50倍程度に留まり、3.20mg/L(設定値)では 72時間の培養で細胞濃度の増殖が 10倍程度と明らかな生長阻害を示した。

[Table 3 (p.18), Figure 1 (p.23)]

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 (EbC50)

EbC50(0-72h) は1.16 mg/Lであり、その95%信頼区間は1.04 mg/L~1.28 mg/Lであった。

(有意水準 5 %、統計的手法：吉岡義正教授 Probit法)

対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度無影響濃度(NOEC)は、0.30mg/Lであった。(有意水準 5 %、統計的手法：F & t-test, Yukums 統計ライブラリ-I 統計解析編)

[Table 4,5 (p.19,20), Figure 2(p.24)]

(上記濃度は、全て暴露開始時と暴露72時間の実測濃度の相乗平均値に基づく値である。)

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 (ErC50)

ErC50 (24-48h) とErC50 (24-72h) は、それぞれ 1.75 mg/L、2.04 mg/L であり、それらの95%信頼区間はそれぞれ 1.60 mg/L~1.92 mg/L、1.84 mg/L~2.30 mg/L であった。

(有意水準 5 %、統計的手法：吉岡義正教授 Probit法)

対照区と比較して有意差が認められない最高試験濃度 (無影響濃度(NOEC)) は、いずれも 0.30 mg/L であった。

(有意水準 5 %、統計的手法：F & t-test, Yukums 統計ライブラリ-I 統計解析編)

[Table 4,5 (p.19,20), Figure 3 (p.25)]

(上記濃度は、全て暴露開始時と暴露72時間の実測濃度の相乗平均値に基づく値である。)

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 23.9~24.0℃であり、その平均温度は 23.9℃であった。

試験液のpHは暴露開始時が 7.5~7.7 であり、試験終了時が 7.6~8.6 であった。

[Table 6,7 (p.21,22)]

以 上

Table 1. OECD medium

Nutrient salts	concentration (mg/L)
H ₃ B ₃ O ₃	0.185 mg
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0.415 mg
ZnCl ₂	0.003 mg
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.08 mg
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0.1 mg
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0015mg
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.007 mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.00001 mg
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18 mg
NH ₄ Cl	15 mg
KH ₂ PO ₄	1.6 mg
NaHCO ₃	50 mg
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	15 mg

Table 2. Measured Concentrations of Di-n-butyl Phthalate During a 72-Hour Exposure of Selenastrum capricornutum

Nominal Concentration (mg/L)	Measured concentration,mg/L (Percent of Nominal)		
	0 Hour	72 Hour	Geometric Mean
Control	<0.05	<0.05	<0.05
Dispersant control	<0.05	<0.05	<0.05
0.20	0.20 (100.0)	0.17 (85.0)	0.18 (90.0)
0.40	0.33 (82.5)	0.28 (70.0)	0.30 (75.0)
0.80	0.83 (103.8)	0.73 (91.2)	0.78 (97.5)
1.60	1.56 (97.5)	1.48 (92.5)	1.52 (95.0)
3.20	2.93 (91.6)	2.92 (91.2)	2.92 (91.2)

Table 3. Cell Density of Selenastrum capricornutum

Nominal Concentration (mg/L)	No.	Cell Density($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour
Control	1	1.00	4.67	33.39	207.03
	2	1.00	4.90	33.41	217.50
	3	1.00	4.80	32.83	207.53
	Average	1.00	4.79	33.21	210.69
	S.D.	0.0000	0.1153	0.3292	5.9058
Dispersant control	1	1.00	4.73	31.21	206.48
	2	1.00	4.70	30.71	219.02
	3	1.00	4.87	36.65	208.62
	Average	1.00	4.77	32.86	211.37
	S.D.	0.0000	0.0907	3.2946	6.7081
0.20	1	1.00	4.68	34.20	203.65
	2	1.00	4.93	32.42	213.73
	3	1.00	4.57	31.60	206.83
	Average	1.00	4.73	32.74	208.07
	S.D.	0.0000	0.1845	1.3292	5.1531
0.40	1	1.00	4.71	33.79	203.10
	2	1.00	4.77	32.27	200.73
	3	1.00	4.62	32.95	198.95
	Average	1.00	4.70	33.00	200.93
	S.D.	0.0000	0.0755	0.7614	2.0820
0.80	1	1.00	4.67	27.34	153.90
	2	1.00	4.69	28.10	162.63
	3	1.00	4.44	27.87	157.65
	Average	1.00	4.60	27.77	158.06
	S.D.	0.0000	0.1389	0.3897	4.3794
1.60	1	1.00	4.29	13.39	59.38
	2	1.00	4.18	14.63	57.46
	3	1.00	4.21	12.92	52.71
	Average	1.00	4.23	13.65	56.52
	S.D.	0.0000	0.0569	0.8834	3.4336
3.20	1	1.00	3.94	5.78	11.07
	2	1.00	3.74	5.26	11.11
	3	1.00	3.86	5.03	11.45
	Average	1.00	3.85	5.36	11.21
	S.D.	0.0000	0.1007	0.3842	0.2088

Table 4. Growth Inhibition of Selenastrum capricornutum

Nominal Concentration		Area $\times 10^4$	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	3338		0.0820		0.0790	
	2	3469		0.0800		0.0790	
	3	3333		0.0801		0.0785	
	Average	3380		0.0807		0.0788	
Disp. control	1	3280		0.0786		0.0787	
	2	3418		0.0782		0.0800	
	3	3440		0.0841		0.0783	
	Average	3379	0.02	0.0804	0.30	0.0790	-0.22
0.20	1	3317		0.0829		0.0786	
	2	3401		0.0785		0.0785	
	3	3290		0.0806		0.0794	
	Average	3336	1.31	0.0806	0.05	0.0788	-0.02
0.40	1	3301		0.0821		0.0784	
	2	3238		0.0797		0.0779	
	3	3229		0.0819		0.0784	
	Average	3256	3.68	0.0812	-0.66	0.0782	0.75
0.80	1	2555		0.0736		0.0728	
	2	2679		0.0746		0.0739	
	3	2607		0.0765		0.0744	
	Average	2614	22.68	0.0749	7.15	0.0737	6.53
1.60	1	1077		0.0474		0.0547	
	2	1081		0.0522		0.0546	
	3	984		0.0467		0.0527	
	Average	1047	69.02	0.0488	39.47	0.0540	31.47
3.20	1	306		0.0160		0.0215	
	2	289		0.0142		0.0227	
	3	291		0.0110		0.0227	
	Average	295	91.26	0.0138	82.90	0.0223	71.73

Table 5. Calculated EC50 and NOEC Based on Measured Concentrations

Based on I_A value

	Calculated value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
EbC50 (0-72h)	1.16	1.04 ~ 1.28
NOECb(0-72h)	0.30	----

Based on I_m value

	Calculated value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
ErC50 (24-48h)	1.75	1.60 ~ 1.92
NOECr(24-48h)	0.30	----
ErC50 (24-72h)	2.04	1.84 ~ 2.30
NOECr(24-72h)	0.30	----

Table 6. Daily Temperature in the Incubation Chamber During a 72-Hour Exposure

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	24.0
24	23.9
48	23.9
72	23.9
Average	23.9

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

Nominal Concentration (mg/L)	No	pH	
		0 Hour	72 Hour
Control	1	7.6	8.3
	2	----	8.4
	3	----	8.3
Dispersant control	1	7.6	8.2
	2	----	8.5
	3	----	8.2
0.20	1	7.6	8.4
	2	----	8.5
	3	----	8.5
0.40	1	7.7	8.6
	2	----	8.2
	3	----	8.3
0.80	1	7.6	8.3
	2	----	8.0
	3	----	7.9
1.60	1	7.6	8.0
	2	----	8.0
	3	----	7.9
3.20	1	7.5	7.8
	2	----	7.6
	3	----	7.7

Figure 1. Algal Growth Curve of Selenastrum capricornutum

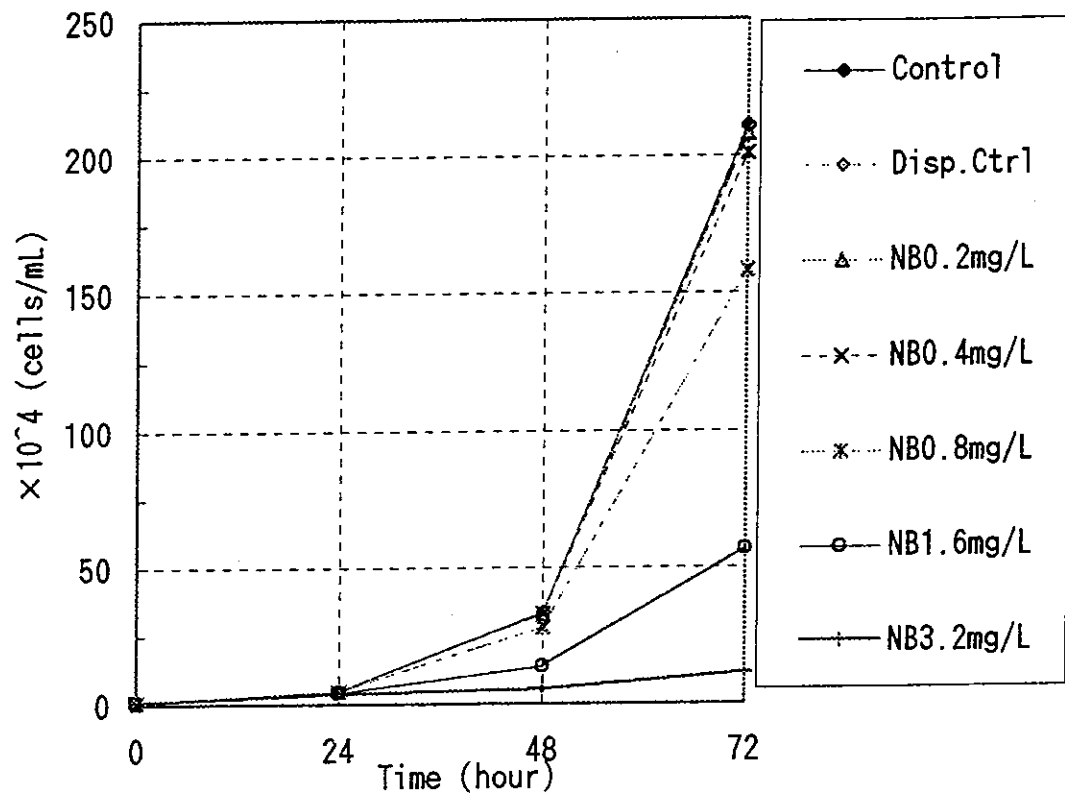


Figure 2. Concentration-Inhibition Curve of Selenastrum capricornutum based on I_i value

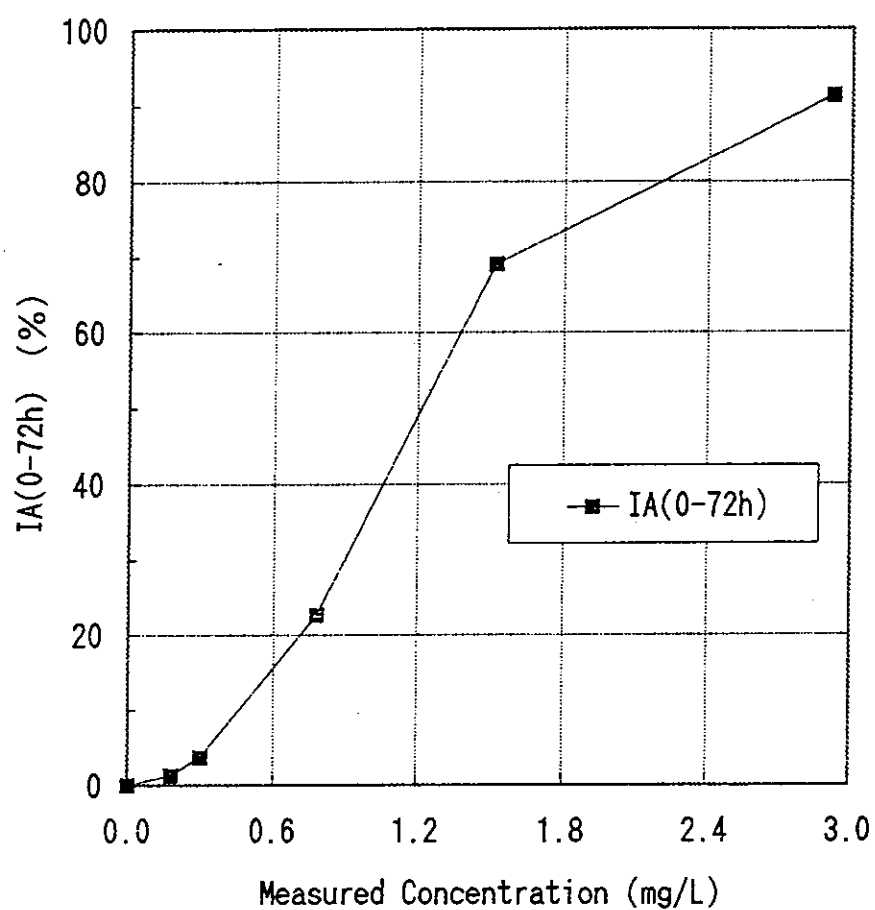
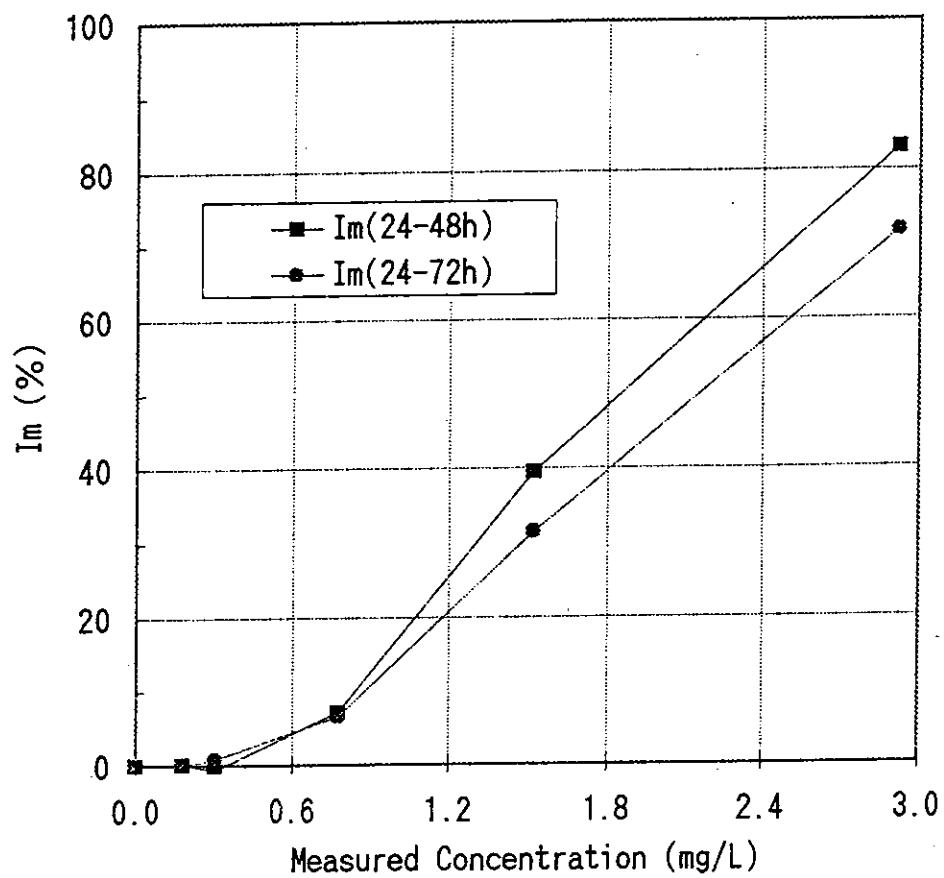


Figure 3. Concentration-Inhibition Curve of Selenastrum capricornutum based on I_m value



付属資料一1

試験液の分析方法

(全7頁)

試験液の分析方法

1 試験液の分析方法

各試験水槽より試験水 0.5～1.5 mL をバイアル瓶に採取する。

測定濃度が 20 mg/L を越える場合は予め移動相で希釈する。

HPLC のオートサンプラーにセットして一定量を自動注入する。

検量線から被験物質濃度を求める。

2 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 測定条件

カラム : C18 5 μ m ϕ , 4.6 mm ϕ \times 150 mm

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

注入量 : 20～100 μ L

移動相 : 水/アセトニトリル = 13/87

流量 : 1.0 mL/min

3 検量線

標準原液を希釈して定量限界付近から予想測定濃度が含まれる 5 ポイント以上の標準液を用意し、検量線を求め、傾きと直線性を確認した。

測定日毎に標準溶液 (2 ポイント以上) の測定を行い、相対誤差 10 % 以内で調整値と一致すれば検量線により定量する。相対誤差 10 % を越えた場合は検量線を作成し直す。

[Figure 1(p.28)]

4 添加回収試験

助剤対照液に標準液の一定量を添加して、回収率を求めた。

フタル酸ジ-n-ブチル 1.07mg/L の回収率は 99.1%であった。

Figure 1. Calibration Curve of Di-n-butyl phthalate by HPLC Analysis

Input Data

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU.sec)
1	0	0
2	0.2	0.889421
3	0.5	2.12846
4	1.0	3.79770
5	2.0	7.85386
6	5.0	19.54005
7	10.0	37.66377

$$Y(\text{Peak Area}) = 3.79987 \times (\text{Concentration})$$

$$\gamma = 0.99986$$

γ : coefficient of correlation

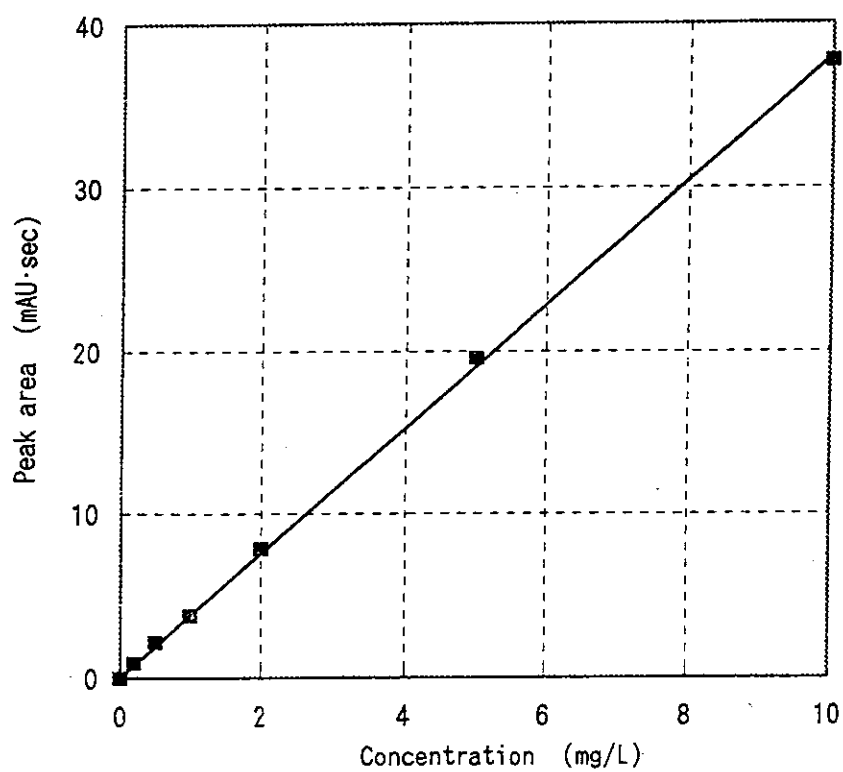


Figure 2. Representative chromatograms

(1) Standard 1.0 mg/L

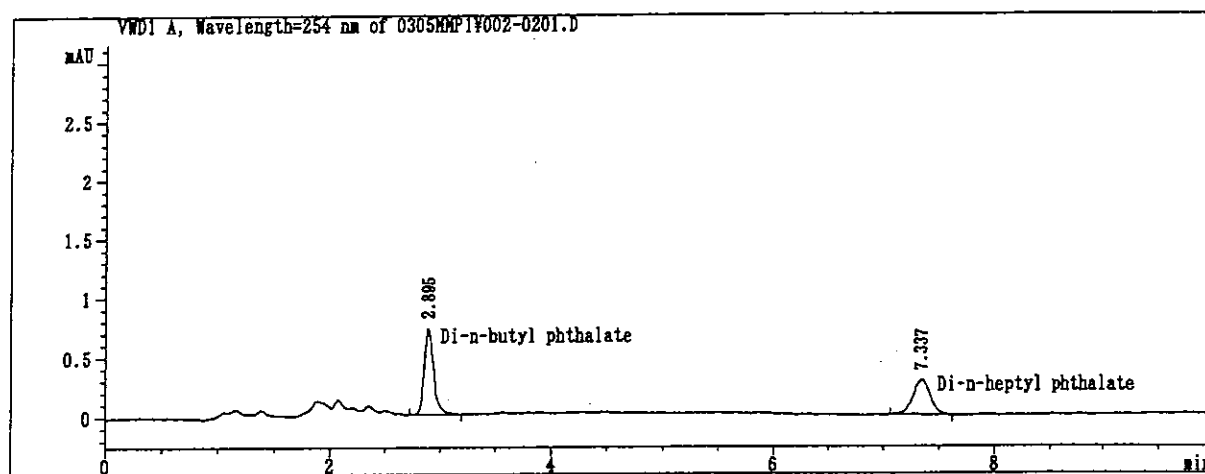
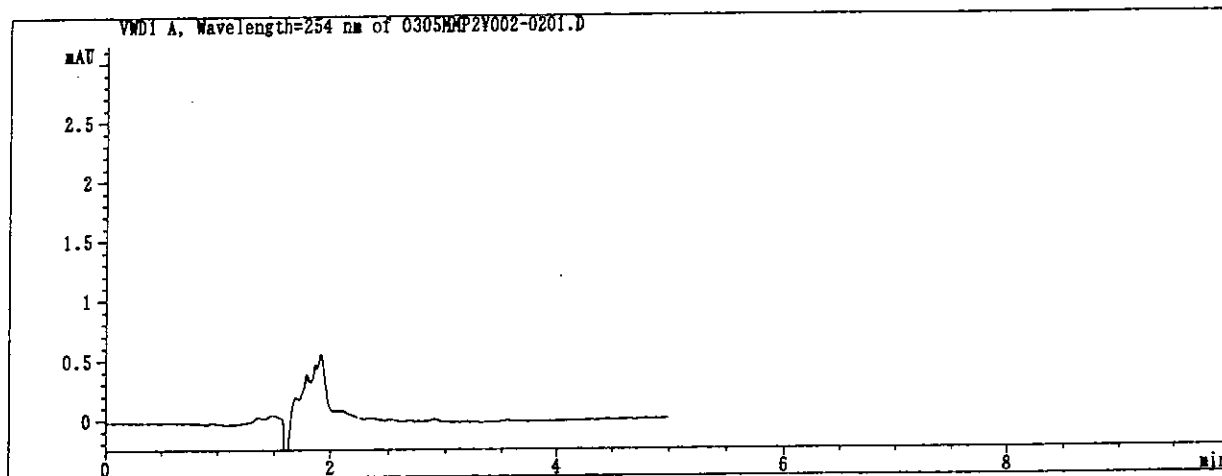


Figure 2. Continued

(2) Control ; 0 h



(3) Dispersant Control; 0 h

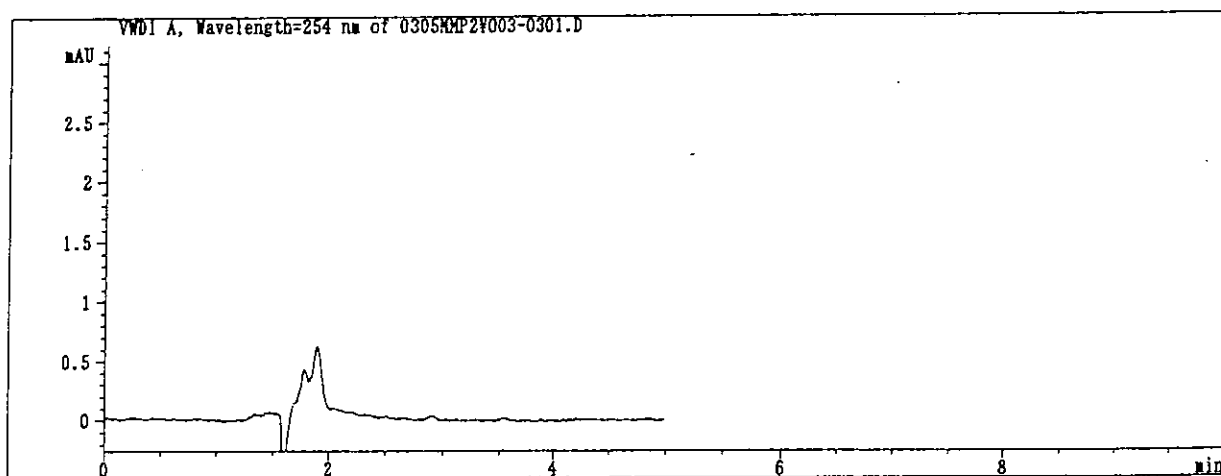
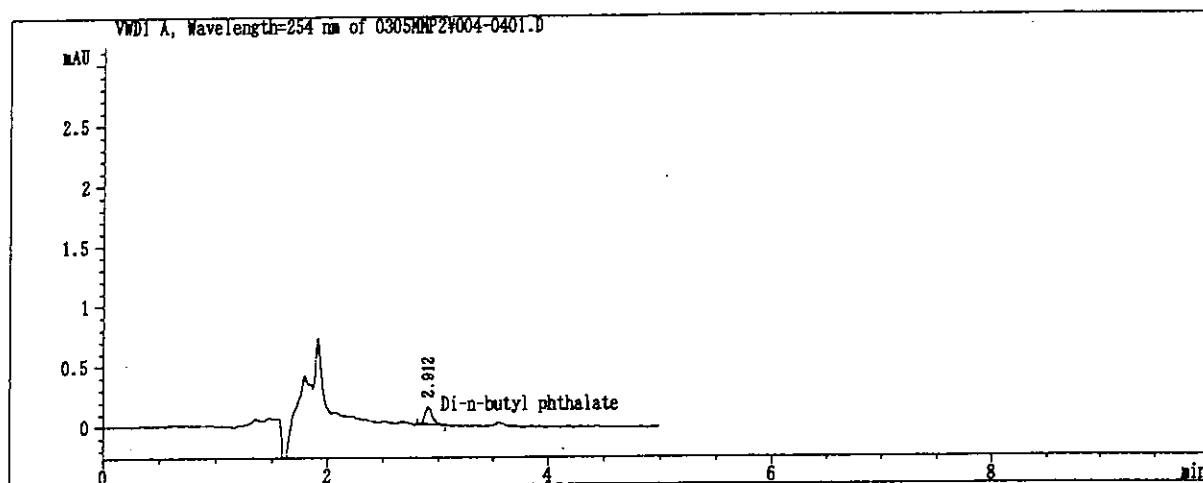


Figure 2. Continued

(4) 0.20 mg/L nominal; 0 h



(5) 0.20 mg/L nominal; 72 h

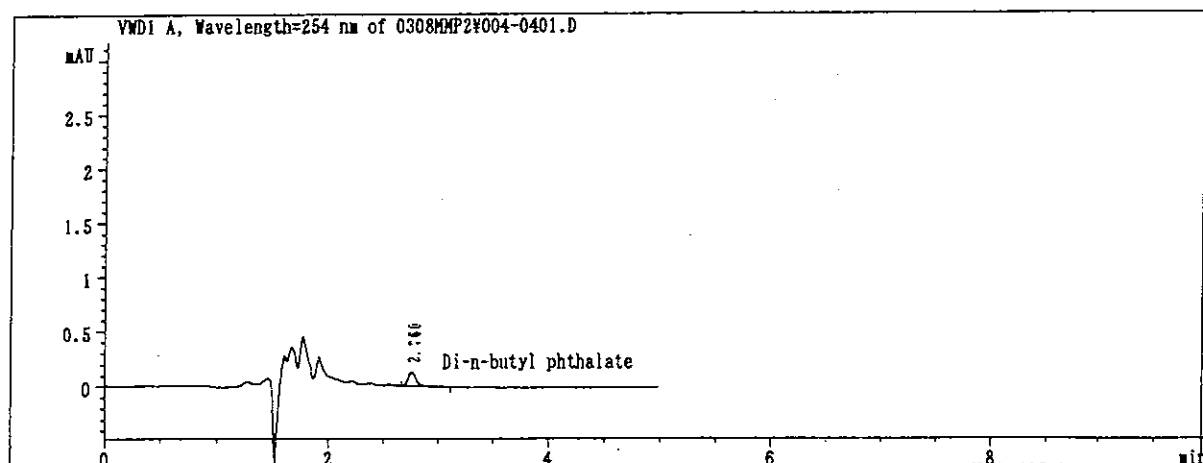
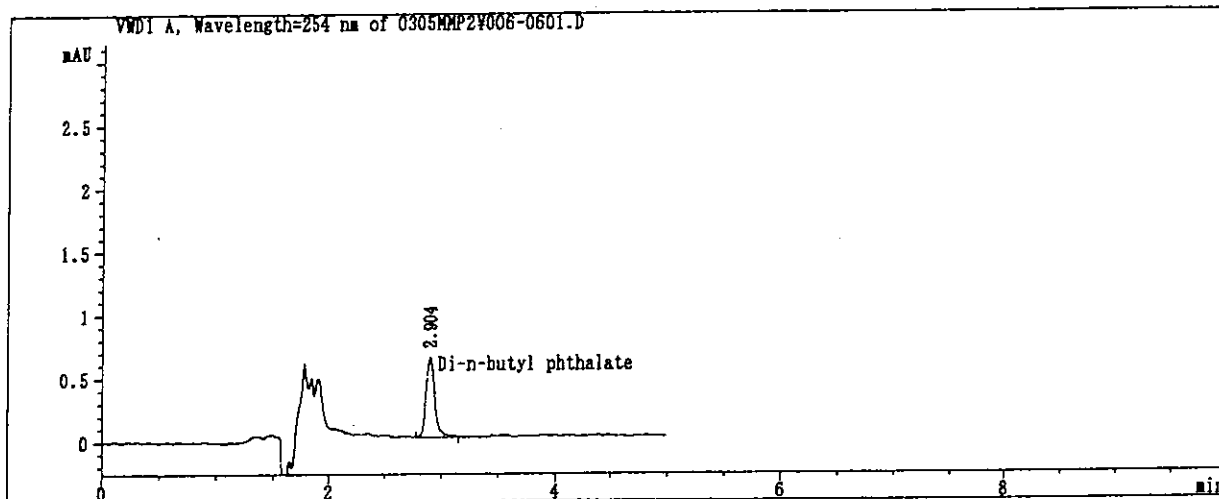


Figure 2. Continued

(6) 0.8 mg/L nominal; 0 h



(7) 0.8 mg/L nominal; 72 h

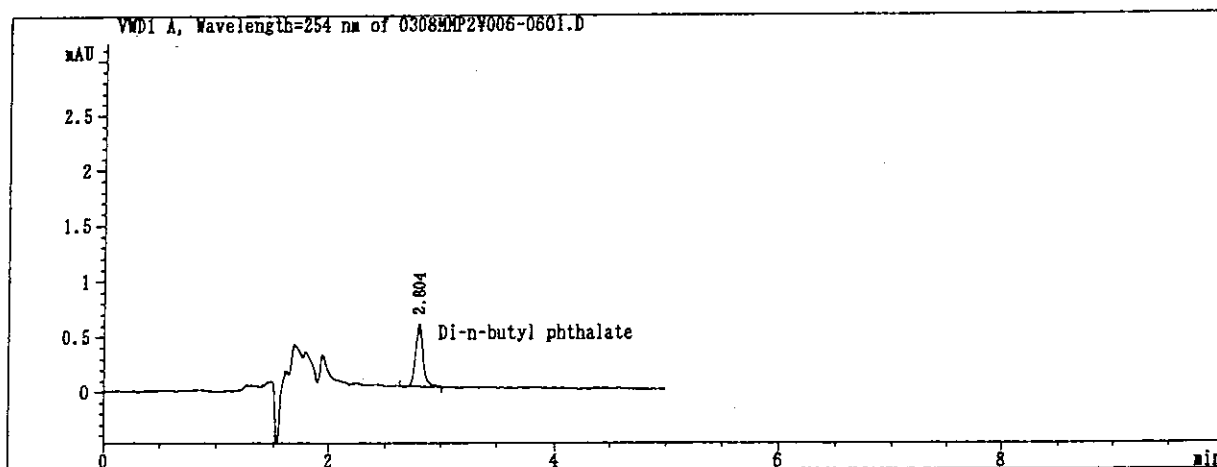
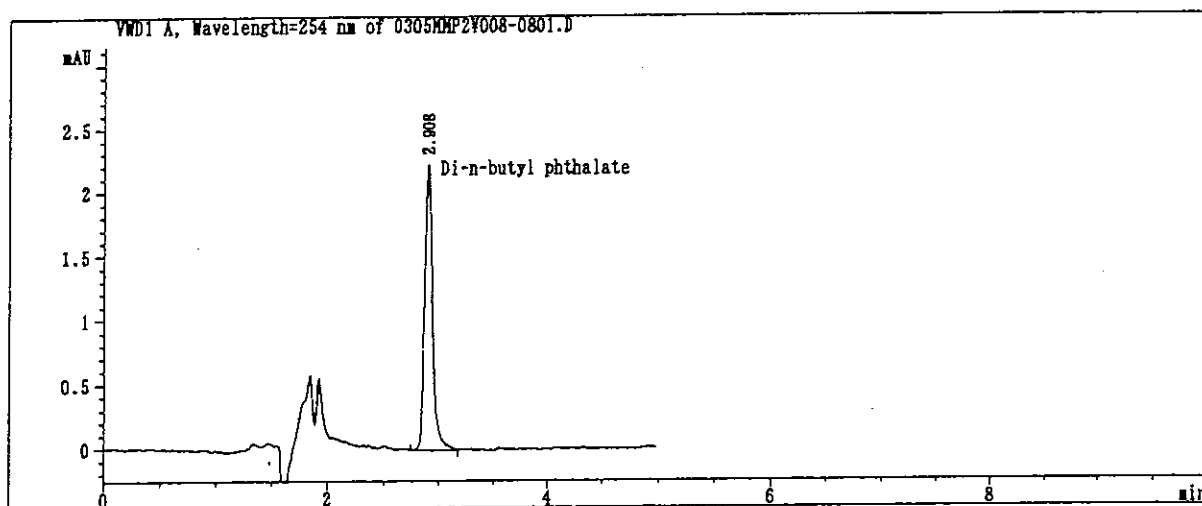


Figure 2. Continued

(8) 3.2 mg/L nominal; 0 h



(9) 3.2 mg/L nominal; 72 h

