

環境省殿

最 終 報 告 書

Butanoic acid, 2-ethyl-の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

(試験番号：92328)

2001 年 4 月 26 日作成

財団法人
化学物質評価研究機構
久留米事業所

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： 環境省

表 題： Butanoic acid, 2-ethyl-の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害
試験

試験番号： 92328

本試験は環境省のGLP規則に従って実施したものである。

2001年 4 月 26 日

運営管理者

[Redacted Signature]

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： 環境省

表 題： Butanoic acid,2-ethyl-の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害
試験

試験番号： 92328

本試験は試験計画書及び標準操作手順書に従って実施され、本最終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。

監査又は査察内容	実施日	報告日(試験責任者)	報告日(運営管理者)
試験計画書監査	2000年12月25日	2000年12月25日	2000年12月25日
試験実施状況査察	2001年1月23日	2001年1月26日	2001年1月29日
試験実施状況査察	2001年1月26日	2001年1月26日	2001年1月29日
最終報告書監査	2001年4月26日	2001年4月26日	2001年4月26日

2001年4月26日

信頼性保証業務担当者



試験実施概要

1 表 題

Butanoic acid, 2-ethyl-の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

2 試験目的

被験物質の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験(72時間)を行い、50%生長阻害濃度(EC50)及び最大無作用濃度(NOEC)を求める。

3 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)に準拠した。

4 適用GLP

本試験は環境省のGLP規則に準拠した。

5 試験委託者

- 1) 名 称： 環境省
- 2) 住 所： (〒100-8975)東京都千代田区霞が関 1-2-2
- 3) 試験委託責任者： 総合環境政策局環境保健部環境安全課環境リスク評価室
室長補佐 [REDACTED]

6 試験受託者

名 称： 財団法人 化学物質評価研究機構
住 所： (〒112-0004)東京都文京区後楽 1-4-25

7 試験施設

名 称： 財団法人 化学物質評価研究機構
実施施設名： 久留米事業所
住 所： (〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14
運営管理者： [REDACTED]

8 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

生物試験担当

[REDACTED]

分 析 担 当

[REDACTED]

9 最終報告書の作成

2001年 4月 26日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

10 試験日程

試験開始日

2000年 12月 25日

試験終了日

2001年 4月 26日

暴露期間

2001年 1月 23日 ～ 2001年 1月 26日

11 記録及び試資料の保管

試験に関する下記の記録及び試資料は、最終報告書作成後10年間、久留米事業所試資料保管施設に保管する。その後の保管については別途試験委託者と協議の上定める。

- 1) 試験計画書、同変更等の記録
- 2) 最終報告書
- 3) 生 デ ー タ
- 4) 信頼性保証業務担当者の監査・査察記録
- 5) 被 験 物 質
- 6) その他必要なもの

目 次

	頁
要 旨	1
1 被 験 物 質	3
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	3
1.2 供 試 試 料	3
1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性	4
2 試 験 生 物	4
3 試 験 方 法	4
3.1 試 験 条 件	4
3.2 培 地	4
3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器	5
3.4 試験濃度の設定	5
3.5 試験液の調製	5
3.6 被験物質の分析	5
3.7 試 験 操 作	6
3.8 数値の取扱い	6
4 結果の算出	6
4.1 藻類生長曲線	6
4.2 藻類生長阻害率の算出	6
4.3 50%藻類生長阻害濃度(EC50)の算出	7
4.4 最大無作用濃度(NOEC)の算出	8
5 結果及び考察	8
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	8
5.2 試験液中の被験物質濃度	8
5.3 藻類生長曲線	8
5.4 50%藻類生長阻害濃度(EC50)及び最大無作用濃度(NOEC)	8
5.5 暴露終了時における細胞の状態	9
5.6 温度、照度及びpH	9
5.7 試験液の状態	9
Table 1～7	10～15
Figure 1～3	16,17

付属資料－1 OECD培地

付属資料－2 試験液の分析方法及び分析チャート

要 旨

試験委託者

環境省

表 題

Butanoic acid, 2-ethyl-の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試験番号

92328

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 : Butanoic acid, 2-ethyl-
- 2) 試 験 生 物 : *Selenastrum capricornutum* (ATCC 22662株)
- 3) 初期細胞濃度 : 1×10^4 細胞/mL
- 4) 暴 露 期 間 : 72時間
- 5) 培 養 方 式 : 振とう培養 (100 rpm)
- 6) 試 験 濃 度 : 100、62.5、39.1、24.4、15.3 mg/L(公比 : 1.6)及び対照区
- 7) 連 数 : 1試験区に付き3連
- 8) 試 験 液 量 : 1試験容器(1連)に付き100 mL
- 9) 試 験 水 温 : $23 \pm 2^\circ\text{C}$
- 10) 照 明 : 4,000~5,000 lux (連続照明)
- 11) 試験液中の被験物質の分析 : 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)
(暴露開始時、暴露終了時)

結 果

1) 試験液中の被験物質濃度

被験物質の測定濃度が開始時において設定の $\pm 20\%$ 以内であったため、下記の生長阻害濃度の算出には設定濃度を採用した。

2) 生長曲線下面積の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 EbC50(0-72) : 60.8 mg/L

最大無作用濃度 NOECr(0-72) : 39.1 mg/L

3) 生長速度の比較による阻害濃度

50%生長阻害濃度 ErC50(24-48) : 69.2 mg/L

最大無作用濃度 NOECr(24-48) : 39.1 mg/L

50%生長阻害濃度 ErC50(24-72) : 77.5 mg/L

最大無作用濃度 NOECr(24-72) : 39.1 mg/L

1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は久留米事業所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、被験物質の特性が認められることを確認した。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。

以上の結果から、被験物質は暴露終了時まで安定であったと確認された。

2 試験生物

- 1) 学 名 : *Selenastrum capricornutum*
- 2) 入 手 先 : American Type Culture Collection
- 3) 入手株番号 : ATCC 22662株
- 4) 入 手 日 : 1995 年 6 月 30 日
- 5) 入手後の管理 : AAP又はOECD培地を用い無菌的に継代培養
- 6) 感受性の確認 : 基準物質(二クロム酸カリウム、試薬特級、和光純薬工業株式会社)による72時間50%藻類生長阻害濃度(EbC50)=0.427 mg/L[久留米事業所における1995年12月以降のEbC50 : 0.295～0.427 mg/L(n=20)の範囲にある。]
- 7) 前 培 養 : 前培養期間 ; 2001 年 1 月 20 日～2001 年 1 月 23 日
この間、藻類は指数増殖した。(環境条件は試験と同様)

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 培養方式 : 振とう培養 (100 rpm)
- 2) 暴露期間 : 72時間
- 3) 連 数 : 1試験区に付き3連
- 4) 試験液量 : 1試験容器(1連)に付き100 mL(OECD培地、3.2参照)
- 5) 試験水温 : 23±2℃
- 6) 照 明 : 4,000～5,000 lux (連続照明)
- 7) pH : 暴露期間中、pHの調整は行わなかった。
- 8) 初期細胞濃度 : 1×10^4 細胞/mL

3.2 培 地

前培養及び試験ともに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。成分表を付属資料-1に示した。

3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器

- 1) 試験容器： 500 mL容ガラス製三角フラスコ(通気性のシリコン栓付)
- 2) 藻類培養試験装置： 温度維持及び連続振とう培養が可能で、連続照明及び一定の照度を保てる装置(TB-C-50RT型 高崎科学器械)
- 3) 光学顕微鏡： システム顕微鏡 BHS(オリンパス光学工業)
- 4) 粒子計数装置： コールターカウンター Z1型(ベックマン・コールター)
- 5) pH計： ガラス電極式水素イオン濃度計 HM-14P型(東亜電波工業)
- 6) 電解液： アイソトン II(ベックマン・コールター)
- 7) 温度計： 検定済ガラス製棒状温度計
- 8) 照度計： 照度計 SLX-1,330型(三商)

3.4 試験濃度の設定

本試験に先立って行った予備試験の結果から、試験濃度は100 mg/Lを最高濃度として公比1.6で5濃度区(100、62.5、39.1、24.4及び15.3 mg/L)を設定した。また、対照には培地のみを設けた。

3.5 試験液の調製

必要量の被験物質を培地に溶解させ1,000 mg/Lの試験原液を調製し、0.45 μ m メンブランフィルターで濾過滅菌した。試験液は、各濃度区毎に必要な量の試験原液と培地を混合して調製し、各試験容器に分割した。

3.6 被験物質の分析

暴露開始時及び終了時(72時間後)に採取した試験液をHPLCにより分析した。測定用試験液は暴露開始時については試験液分析用及び水質測定用にあらかじめ別途調製した試験容器(試験液)から一部を採取し、暴露終了時については各試験区の3試験容器より試験液を等量採取して混合した後、遠心分離(3,000 rpmで10分間)をして藻体を除去し、その上澄液を用いた。試験液中の被験物質の分析に際しては、標準溶液(濃度10.0 mg/L)の測定を行い、そのピーク面積比から定量した。詳細は付属資料-2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 細胞/mLとなるように、前培養液の一定量を試験液の入った試験容器に添加した。

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及び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を少量採取し、電解液(アイソトンII)で適宜希釈後、コールターカウンターにより計測した。また、暴露終了時には光学顕微鏡下で各試験区の細胞の状態を観察した。

暴露開始時のpHは水質測定用にあらかじめ別途調製した試験容器(試験液)について測定して各試験区のpHとした。暴露終了時には各試験区の3連のうち1試験容器を測定した。暴露期間中、培養装置内の温度、照度を1日1回測定した。

3.8 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401-1999 規則 Bによった。

4 結果の算出

得られたデータを基に以下の3項目の結果を算出した。なお、暴露開始時の被験物質の測定濃度が設定の $\pm 20\%$ 以内であったため、結果の算出には設定濃度を用いた。

4.1 藻類生長曲線

各試験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(片対数グラフ)。

4.2 藻類生長阻害率の算出

次に下記の方法(面積法及び速度法)で生長阻害率を算出した。

1) 生長曲線下の面積の比較(面積法)による生長阻害率(I_A)

生長曲線下の面積は次の式により算出した。

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

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

2) 生長速度の比較(速度法)による生長阻害率(I_μ)

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阻害百分率(I_μ)を次の式により算出した。

$$I_\mu = \frac{\mu_c - \mu_t}{\mu_c} \times 100$$

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

4.3 50%藻類生長阻害濃度(EC50)の算出

4.2で算出した面積法及び速度法による藻類生長阻害率(I_A 値及び I_μ 値)を用いて50%生長阻害濃度(EC50)を算出した。

各濃度区に対応する阻害率を片対数紙にプロットし、直線性の認められる点を用いて直線回帰分析(最小二乗法)を行い、阻害率50%との交点からEC50(及び可能な限りその95%信頼区間)を算出した。その際、面積法により求めた場合は $E_bC50(0-72)$ 、速度法により求めた場合は $E_rC50(24-48)$ 又は $E_rC50(24-72)$ とした。

4.4 最大無作用濃度(NOEC)の算出

4.2で算出された各試験容器毎の生長曲線下面積については一元配置分散分析、生長速度については一元配置分散分析及びDunnnettの多重比較法により有意差の検定を行い、対照区と比較して有意差(5%水準)が認められない最高濃度を最大無作用濃度(NOEC)とした。その際、面積法により求めた場合はNOECb(0-72)、速度法により求めた場合はNOECr(24-48)又はNOECr(24-72)とした。

5 結果及び考察

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

該当する要因はなかった。

5.2 試験液中の被験物質濃度

暴露開始時及び終了時(72時間後)に試験液中の被験物質濃度を測定した。その結果をTable 1に示した。

被験物質の測定濃度の設定に対する割合は、暴露開始時で97.7～99.9%、暴露終了時で95.9～97.0%であった。

5.3 藻類生長曲線

暴露期間中の細胞濃度をTable 2及び生長曲線をFigure 1に示した。

対照区における細胞濃度は暴露終了時まで134倍以上に増殖した。これは本試験条件下で正常な生長したことを示す。各濃度区の生長は対照区と比較して以下のとおりであった。100 mg/L区では暴露期間を通して生長は著しく抑えられていた。62.5 mg/L区では阻害が認められたものの、指数増殖を示した。39.1～15.3 mg/L区では対照区と同様の生長を示した。

5.4 50%藻類生長阻害濃度(EC50)及び最大無作用濃度(NOEC)

各濃度区における生長阻害率をTable 3、50%生長阻害濃度(EC50)及び最大無作用濃度(NOEC)をTable 4、濃度－阻害率曲線をFigure 2及びFigure 3に示した。

以上の結果から、以下の結論を得た。

1) 生長曲線下面積の比較による生長阻害濃度

EbC50 (0-72) : 60.8 mg/L

NOECb(0-72) : 39.1 mg/L

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

ErC50 (24-48) : 69.2 mg/L

NOECr(24-48) : 39.1 mg/L

ErC50 (24-72) : 77.5 mg/L

NOECr(24-72) : 39.1 mg/L

5.5 暴露終了時における細胞の状態

暴露終了時において100 mg/L区において細くて小さい細胞が多数みられた。それ以外の濃度区では対照区とほぼ同様の細胞状態であった。

5.6 温度、照度及びpH

培養装置内の温度及び照度をTable 5及びTable 6、試験液のpHをTable 7に示した。

暴露期間中の藻類培養装置内の温度は22.9～23.3℃、照度は4,100～4,200 luxであった。試験液のpHは暴露開始時では5.2～7.8であり、暴露終了時は4.9～10.4であった。被験物質区の試験液では試験濃度が高くなるにつれてpHは低くなっていた。

以上のことから、温度及び照度については、藻類の試験環境として適正範囲であったと考えられる。pHについては、対照区においては適正範囲であったと考えられるが、被験物質濃度区では暴露開始時において全ての濃度区で対照区におけるpHを下回っており、中でも最高濃度区においては生長を阻害するような低いpHであった。供試藻類の酸性範囲での許容限界pHは約6と考えられるため、これを下回るような濃度区においては適正範囲外であったと思われる。

5.7 試験液の状態

全濃度区とも調製時の試験液は無色透明であり、暴露終了時では100 mg/L区では状態は変わらず、その他の濃度区では細胞増殖のため緑色を呈していた。

以 上

Table 1. Concentrations of butanoic acid, 2-ethyl- in growth inhibition test using *Selenastrum capricornutum*

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)		
	0-hour	72-hour	Mean *
Control	n.d.	n.d.	n.d.
15.3	15.2 (99.6)	14.8 (96.6)	15.0 (98.1)
24.4	24.0 (98.5)	23.7 (97.0)	23.8 (97.7)
39.1	38.2 (97.7)	37.5 (95.9)	37.8 (96.8)
62.5	61.8 (99.0)	60.0 (96.0)	60.9 (97.5)
100	99.9 (99.9)	96.8 (96.8)	98.3 (98.3)

n.d. : <10.0 mg/L

* The values are expressed as time-weighted means calculated by the following equation:

$$(C_0 - C_{72}) / (\ln C_0 - \ln C_{72})$$

where

C_0 : the measured concentration at 0-hour

C_{72} : the measured concentration at 72-hour

$\ln C_0$: the natural logarithm of C_0

$\ln C_{72}$: the natural logarithm of C_{72} .

Table 2. Cell density of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to butanoic acid, 2-ethyl-

Nominal concentration (mg/L)	Cell density ($\times 10^4$ cells/mL)				
	No.	0-hour	24-hour	48-hour	72-hour
Control	1	1.00	6.41	34.2	141
	2	1.00	6.37	34.9	134
	3	1.00	6.40	32.8	137
	Average	1.00	6.39	34.0	138
	S.D.	0	0.0219	1.10	3.59
15.3	1	1.00	6.20	33.6	134
	2	1.00	6.28	33.8	128
	3	1.00	5.98	35.0	133
	Average	1.00	6.16	34.1	132
	S.D.	0	0.157	0.781	2.76
24.4	1	1.00	6.36	33.7	135
	2	1.00	6.24	34.7	128
	3	1.00	5.57	34.5	143
	Average	1.00	6.06	34.3	135
	S.D.	0	0.427	0.525	7.86
39.1	1	1.00	6.40	32.2	139
	2	1.00	6.35	35.3	153
	3	1.00	5.47	33.3	123
	Average	1.00	6.08	33.6	138
	S.D.	0	0.526	1.56	14.9
62.5	1	1.00	2.90	10.9	41.5
	2	1.00	3.66	15.9	65.4
	3	1.00	4.00	14.5	68.1
	Average	1.00	3.52	13.8	58.3
	S.D.	0	0.567	2.54	14.6
100	1	1.00	1.11	1.05	1.07
	2	1.00	1.07	1.15	1.18
	3	1.00	1.17	1.12	1.22
	Average	1.00	1.12	1.11	1.16
	S.D.	0	0.0534	0.0528	0.0766

Table 3. Growth inhibition of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to butanoic acid, 2-ethyl-

Nominal Concentration (mg/L)	No.	Area ($\times 10^4$)	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)
		A (0-72h)	I_A (0-72h)	μ (24-48h)	$I\mu$ (24-48h)	μ (24-72h)	$I\mu$ (24-72h)
Control	1	2610	-	0.0698	-	0.0644	-
	2	2540	-	0.0709	-	0.0635	-
	3	2530	-	0.0680	-	0.0639	-
	Average	2560		0.0696		0.0639	
15.3	1	2500	2.35	0.0703	-1.08	0.0640	-0.0702
	2	2440	4.51	0.0701	-0.719	0.0629	1.65
	3	2520	1.69	0.0736	-5.79	0.0646	-0.996
	Average	2490	2.85	0.0714	-2.53	0.0638	0.195
24.4	1	2520	1.42	0.0695	0.175	0.0637	0.389
	2	2450	4.12	0.0714	-2.64	0.0629	1.66
	3	2620	-2.45	0.0760	-9.18	0.0677	-5.86
	Average	2530	1.03	0.0723	-3.88	0.0647	-1.27
39.1	1	2530	1.21	0.0673	3.34	0.0640	-0.177
	2	2770	-8.40	0.0714	-2.62	0.0663	-3.66
	3	2350	8.25	0.0753	-8.17	0.0649	-1.48
	Average	2550	0.353	0.0713	-2.48	0.0651	-1.77
62.5	1	770	69.9	0.0553	20.5	0.0555	13.2
	2	1190	53.4	0.0611	12.2	0.0601	6.00
	3	1200	53.1	0.0536	23.1	0.0590	7.65
	Average	1050	58.8	0.0567	18.6	0.0582	8.95
100	1	4.71	99.8	-0.00223	103	-0.000717	101
	2	7.43	99.7	0.00330	95.3	0.00211	96.7
	3	9.74	99.6	-0.00175	103	0.000831	98.7
	Average	7.29	99.7	-0.000229	100	0.000742	98.8

Table 4. Calculated EC50 and NOEC of butanoic acid, 2-ethyl- in *Selenastrum capricornutum*

Based on I_A value		
	butanoic acid, 2-ethyl- (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)
EbC50(0-72)	60.8	*
NOECb(0-72)	39.1	
Based on I_{μ} value		
	butanoic acid, 2-ethyl- (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)
ErC50(24-48)	69.2	*
NOECr(24-48)	39.1	
ErC50(24-72)	77.5	*
NOECr(24-72)	39.1	

* : Ninty-five percent confidence limits could not be determined.

Table 5. Temperature in the incubation chamber during 72-hour exposure to butanoic acid, 2-ethyl-

Exposure time (day)	Temperature (°C)
0	23.3
1	22.9
2	23.1
3	23.0
Average	23.1

Table 6. Light intensity in the incubation chamber during 72-hour exposure to butanoic acid, 2-ethyl-

Exposure time (day)	Light intensity (lux)
0	4,200
1	4,200
2	4,200
3	4,100
Average	4,200

Table 7. pH values of test solutions at 0-hour and 72-hour exposure to butanoic acid, 2-ethyl-

Nominal concentration (mg/L)	pH	
	0-hour	72-hour
Control	7.8	10.4
15.3	7.3	10.3
24.4	7.1	10.0
39.1	6.7	9.2
62.5	6.0	6.3
100	5.2	4.9

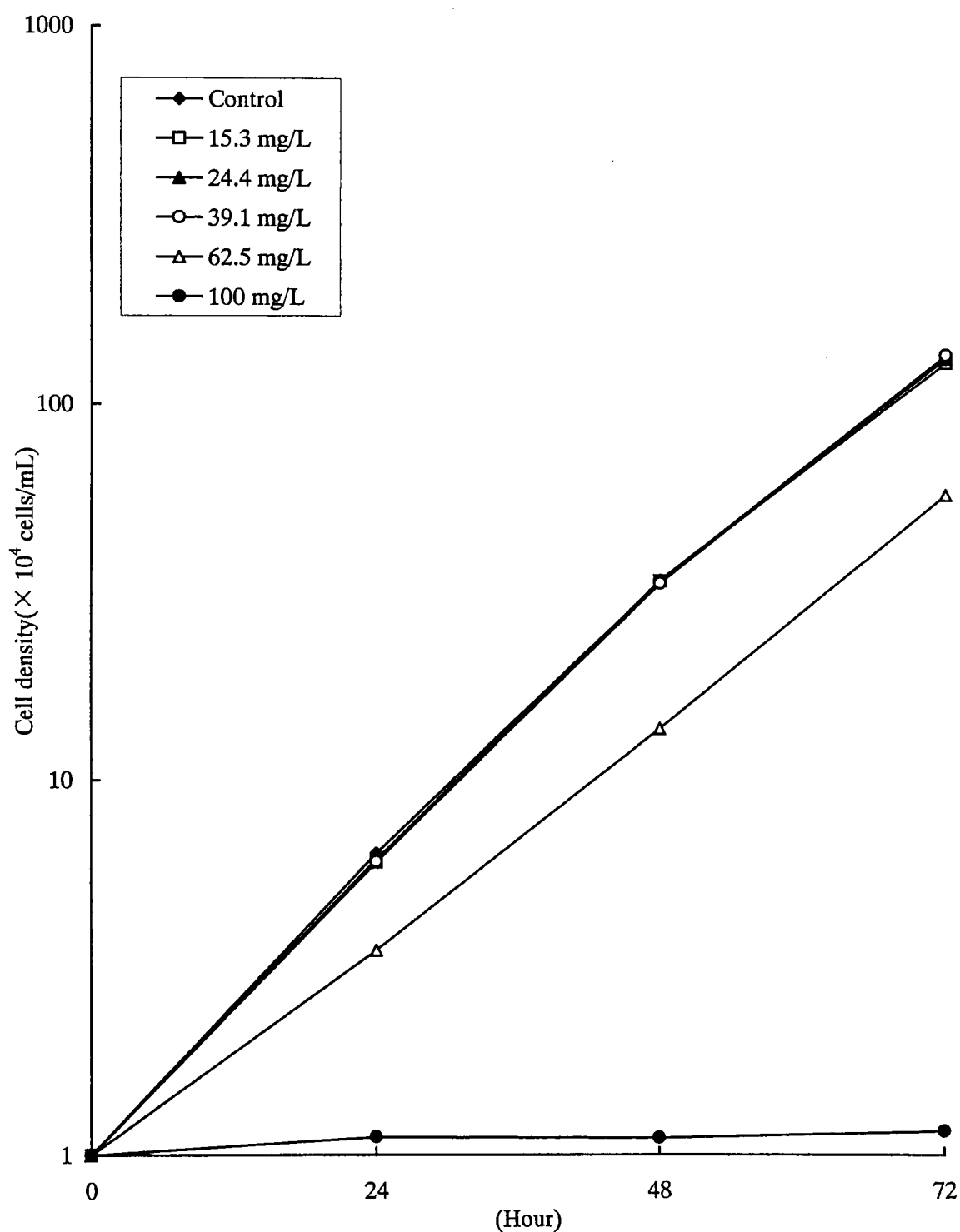


Figure 1. Growth curve of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to butanoic acid, 2-ethyl-.

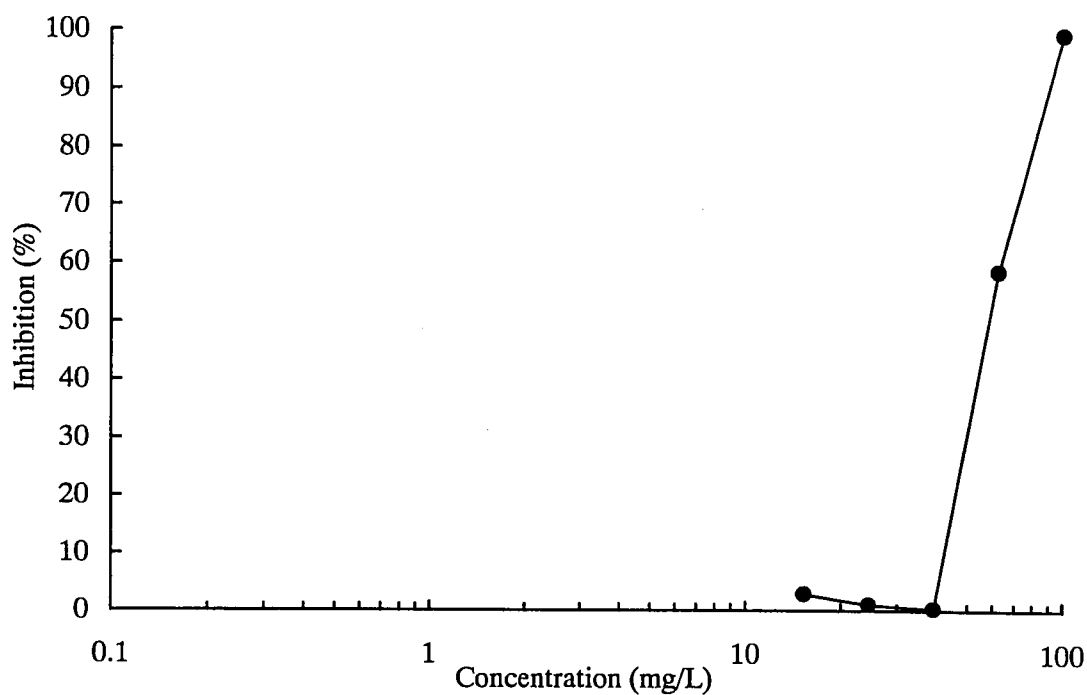


Figure 2. Concentration-Inhibition curve of butanoic acid, 2-ethyl- in *Selenastrum capricornutum* based on I_A value.

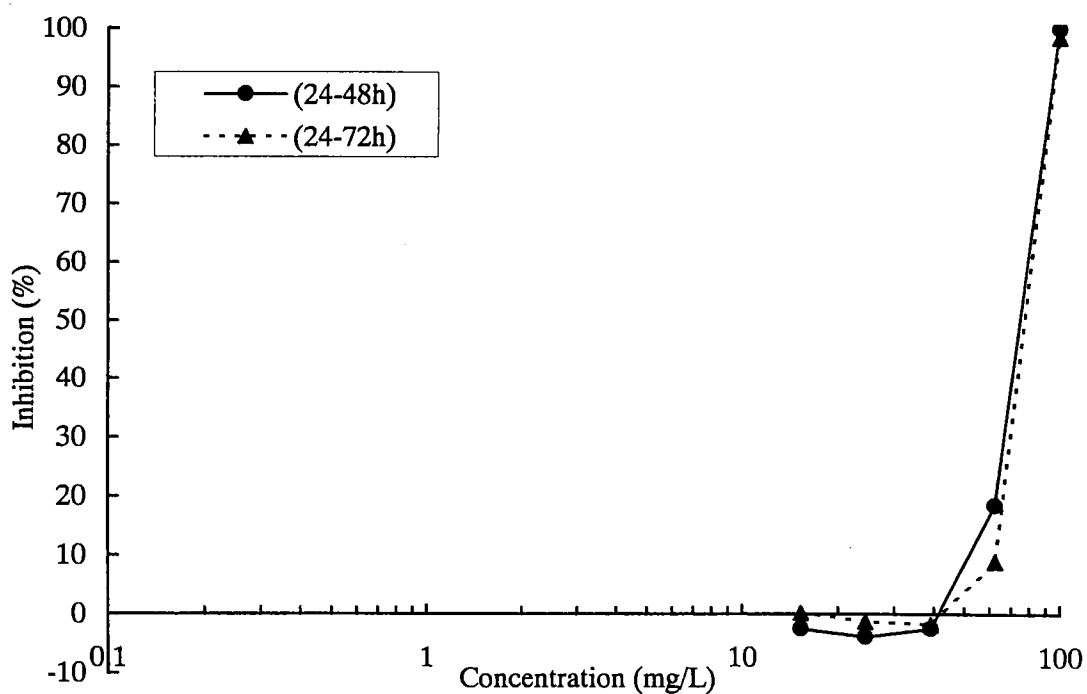


Figure 3. Concentration-Inhibition curve of butanoic acid, 2-ethyl- in *Selenastrum capricornutum* based on I_μ value.

付属資料－1

OECD培地

(全1頁)

Appendix 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

付属資料－2

試験液の分析方法及び分析チャート

(全5頁)

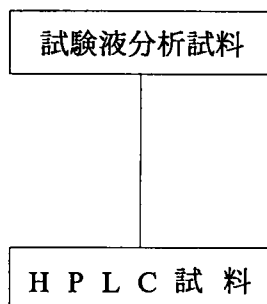
試 験 名 : 藻類生長阻害試験
被験物質名 : Butanoic acid, 2-ethyl-

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

採取した溶液はそのまま若しくは培地で希釈して試験液分析試料とし、以下のフロースキームに従い高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。

フロースキーム



HPLC試料中の被験物質濃度は、クロマトグラム上の被験物質のピーク面積を濃度既知の標準溶液のピーク面積と比較し、比例計算して求めた。

(2) 被験物質溶液の調製

被験物質100 mgを電子分析天びんで正確にはかりとり、培地に溶解して1,000 mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを培地で希釈して100 mg/Lの被験物質溶液を調製した。

(3) 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して行った。100 mg/Lの被験物質溶液を培地で希釈して10.0 mg/Lの標準溶液とした。

2) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ	島津製作所製 LC-10AD
検出器	島津製作所製 SPD-10AV
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A _{XL}
カラム	L-column ODS 15 cm×4.6 mm φ ステンレス製
カラム温度	40℃
溶離液	アセトニトリル/5 mM TBA*溶液 13/87 (v/v)
流量	1.0 mL/min
測定波長	210 nm
注入量	100 μL
感度	
検出器	1 AU/1 V
記録計	ATTEN 2 ³

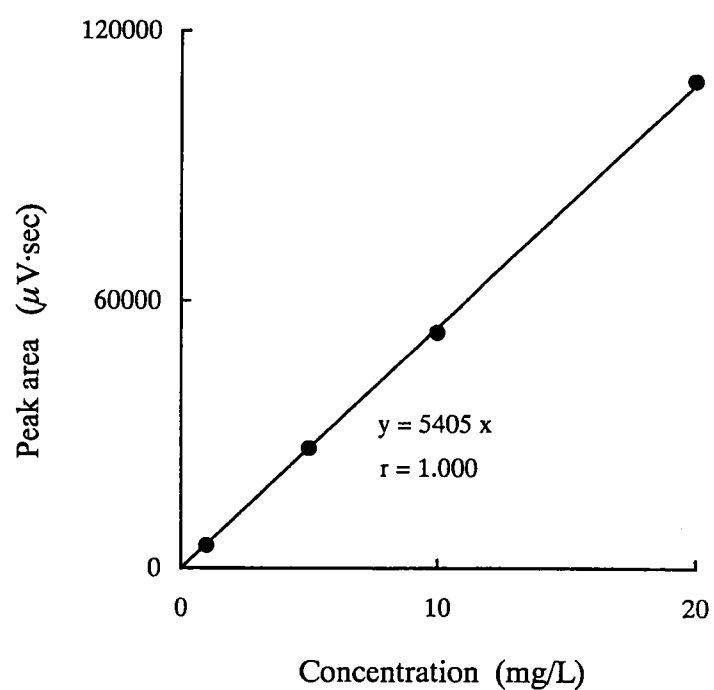
* Tetra-n-butylammonium phosphate

3) 検量線の作成

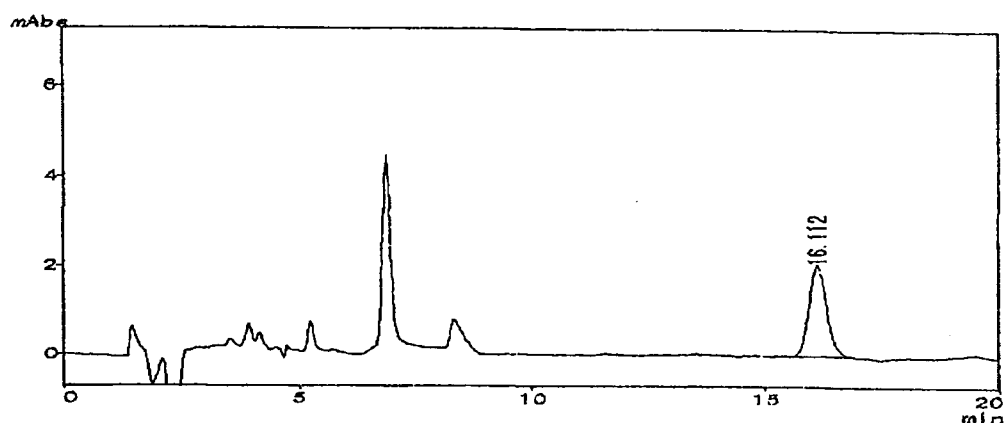
1)(3)の標準溶液の調製と同様にして1.00、5.00、10.0及び20.0 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

Input data

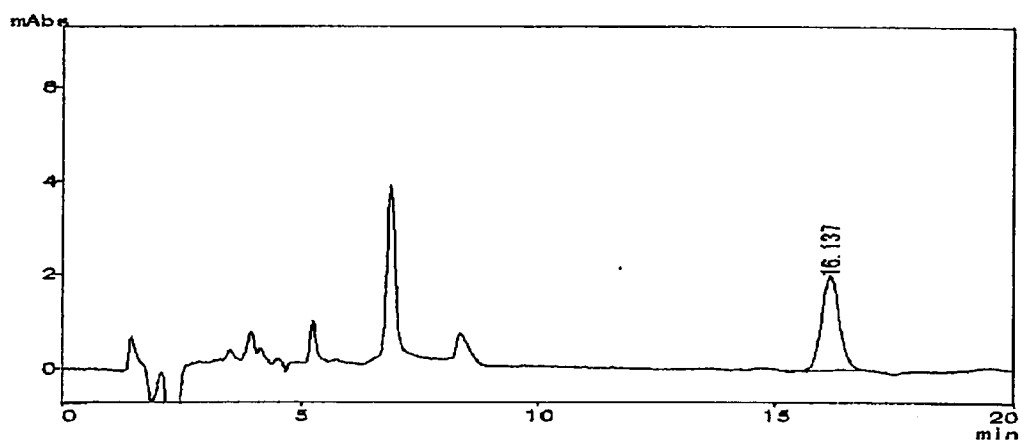
Run	Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
1	1.00	5028
2	5.00	26771
3	10.0	52816
4	20.0	108806



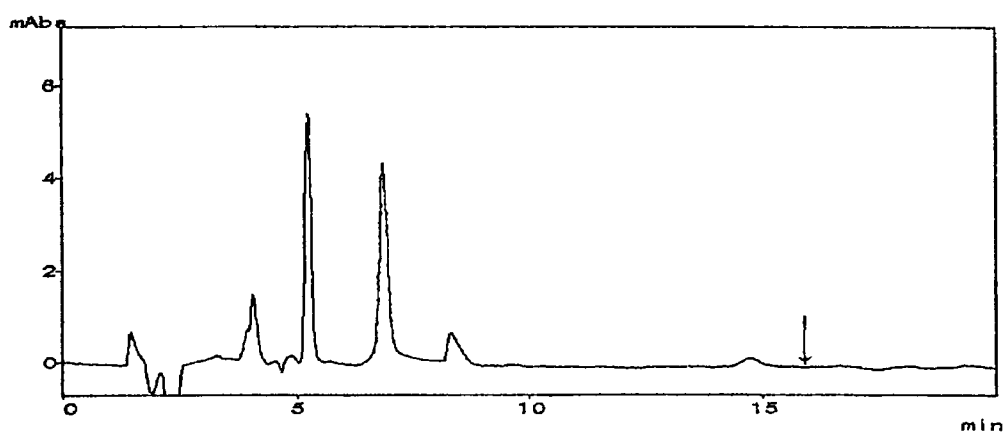
Appendix 2-1. Calibration curve of butanoic acid, 2-ethyl- by HPLC analysis.



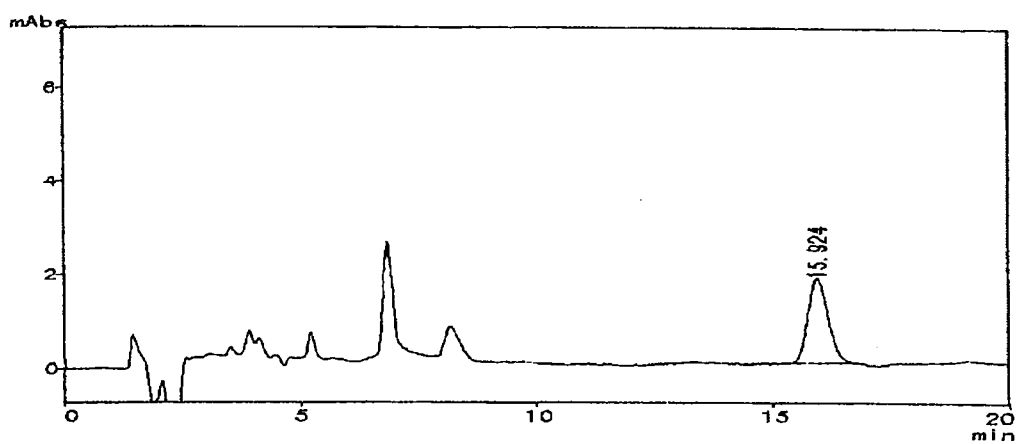
Appendix 2-2. Representative HPLC chromatogram of 10.0 mg/L butanoic acid, 2-ethyl-standard at 0-hour.



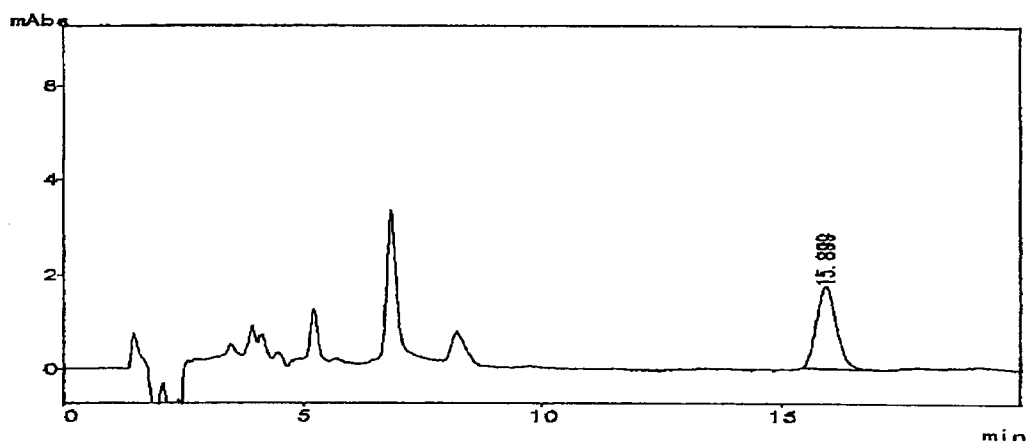
Appendix 2-3. Representative HPLC chromatogram of butanoic acid, 2-ethyl- in 39.1 mg/L test solution at 0-hour.



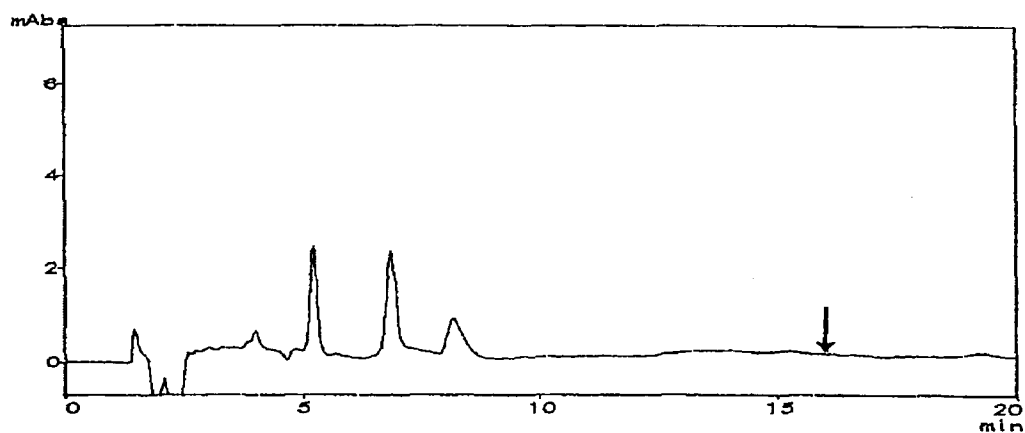
Appendix 2-4. Representative HPLC chromatogram of control solution at 0-hour.



Appendix 2-5. Representative HPLC chromatogram of 10.0 mg/L butanoic acid, 2-ethyl-standard at 72-hour.



Appendix 2-6. Representative HPLC chromatogram of butanoic acid, 2-ethyl- in 39.1 mg/L test solution at 72-hour.



Appendix 2-7. Representative HPLC chromatogram of control solution at 72-hour.