

環境庁殿

最 終 報 告 書

6-tert-ブチル-m-クレゾールの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

(試験番号：92041)

1999 年 3 月 31 日作成

財団法人 化学製品検査協会
化学品安全センター 化学物質研究所

陳 述 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： 6-tert-ブチル-m-クレゾールの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する
生長阻害試験

試 験 番 号： 92041

上記試験は契約書別添2「生態影響試験実施に関する基準」(平成7年9月26日)に準拠
したものである。

1999年 3 月 31 日

運営管理者

信 頼 性 保 証 書

財団法人 化 学 品 検 査 協 会
化学品安全センター 久留米研究所

試験委託者： 環境庁

表 題： 6-tert-ブチル-m-クレゾールの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する
生長阻害試験

試験番号： 92041

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(運営管理者)	報告日(試験責任者)
試験計画書監査	1999年1月7日	1999年1月7日	1999年1月7日
試験実施状況査察	1999年2月9日	1999年2月15日	1999年2月15日
試験実施状況査察	1999年2月12日	1999年2月15日	1999年2月15日
最終報告書監査	1999年3月31日	1999年3月31日	1999年3月31日

1999年3月31日

信頼性保証部門責任者



試験実施概要

1 表 題

6-tert-ブチル-m-クレゾールの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

2 試験目的

6-tert-ブチル-m-クレゾールについて、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)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)に準拠して実施した。

4 GLPの適用

本試験は契約書別添 2「生態影響試験実施に関する基準」(平成 7 年 9 月 26 日)に準拠した。

5 試験委託者

名 称： 環境庁

住 所： (〒100-0013)東京都千代田区霞が関 1-2-2

6 試験受託者

名 称： 財団法人 化学品検査協会

住 所： (〒136-0071)東京都江東区亀戸 5-6-21

7 試験施設

名 称： 化学品安全センター 久留米研究所

住 所： (〒830-0023)福岡県久留米市中央町 19-14

運営管理者： XXXXXXXXXX

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

1999 年 3 月 31 日

試験責任者

氏名

[REDACTED]

10 試験期間

試験開始日

1999 年 1 月 7 日

試験終了日

1999 年 3 月 31 日

暴露期間

1999 年 2 月 9 日 ~ 1999 年 2 月 12 日

11 保管

試験計画書、生データ、記録文書、最終報告書及び被験物質は、最終報告書作成後10年間、財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター 久留米研究所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	1
1 被 験 物 質	2
1.1 名称、構造式及び物理化学的性状	2
1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性	3
2 試 験 生 物	3
3 試 験 方 法	3
3.1 試 験 条 件	3
3.2 培 地	3
3.3 試験容器、藻類培養試験装置及び機器	4
3.4 試験濃度の設定	4
3.5 試験液の調製	4
3.6 被験物質の分析	4
3.7 試 験 操 作	5
3.8 数値の取扱い	5
4 結果の算出	5
4.1 藻類生長曲線	5
4.2 藻類生長阻害率の算出	5
4.3 50%生長阻害濃度(EC50)の算出	6
4.4 最大無作用濃度(NOEC)の算出	6
5 結果及び考察	7
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	7
5.2 試験液中の被験物質濃度	7
5.3 藻類生長曲線	7
5.4 50%生長阻害濃度(EC50)及び最大無作用濃度(NOEC)	7
5.5 暴露終了時における細胞の状態	8
5.6 温度、pH及び照度	8
5.7 試験液の状態	8
Table 1～8	9～16
Figure 1～3	17～18

付属資料－1 試験液の分析方法及び分析チャート

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

6-tert-ブチル-*m*-クレゾールの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試験番号

92041

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： 6-tert-ブチル-*m*-クレゾール
- 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： 4.00、1.60、0.640、0.256、0.102、0.0410 mg/L(公比：2.5)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) 生長曲線下の面積の比較による50%生長阻害濃度(E_bC50)及び最大無作用濃度(NOEC)
 $E_bC50(0-72h) = 0.926 \text{ mg/L}$ (95%信頼限界：0.525～1.63 mg/L)
NOEC=0.256 mg/L
- 2) 生長速度の比較による50%生長阻害濃度(E_rC50)及び最大無作用濃度(NOEC)
 $E_rC50(24-48h) = 1.89 \text{ mg/L}$
NOEC=0.640 mg/L
 $E_rC50(24-72h) = 2.55 \text{ mg/L}$
NOEC=0.640 mg/L
(上記濃度は、全て設定濃度に基づく)

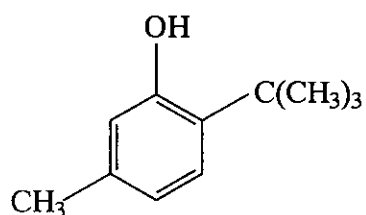
1 被 験 物 質

本最終報告書において6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾールは、次の名称及び品質等を有するものとする。被験物質に関する情報については供給者提供の添付資料等によった。

1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称： 6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール
(CAS番号 88-60-8)

- 2) 構 造 式：



- 3) 分 子 式： $C_{11}H_{16}O$
4) 分 子 量： 164.24
5) 外 観： 赤味の黄色透明液体*1
6) 安 定 性： 不明
7) 1-オクタノール／水分配係数(logP)： 不明
8) pKa： 不明
9) 水への溶解度： 不明
10) 蒸 気 圧： 不明
11) 純 度： 98.3% (GC法)*1
12) ロット番号： FHE01
13) 供 給 者： XXXXXXXXXX

情 報 源

*1： 供給者提供の添付資料

1.2 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

被験物質は当研究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暴露終了時まで安定であったと確認された。

2 試験生物

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 (12301 Parklawn Drive Rockville, Maryland 20852-1776 U.S.A.)より入手したATCC 22662株を、当研究所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、和光純薬工業株式会社)の72時間E₀C50は、0.295 mg/Lであった。

前 培 養

試験に供する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
- 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： 1×10⁴ 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。

[Table 1 (p.9)]

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容ガラス製密閉容器
- 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)を用いた。
- 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 (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 (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4.00 mg/Lを最高濃度として公比2.5で6濃度区(4.00、1.60、0.640、0.256、0.102及び0.0410 mg/L)を設定した。対照には培地のみの対照区を設けた。

3.5 試験液の調製

必要量の被験物質に培地を加え超音波照射しながら100 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、濾過滅菌後の試験原液濃度を測定後、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た。

3.6 被験物質の分析

暴露開始時(0時間)に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HPLCにより分析した。暴露開始後72時間には各試験区の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、その上澄液を分析に供した。試験液中の被験物質の分析に際しては、標準溶液(濃度0.0500 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-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 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 8202-1985 参考 3 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 $\pm 20\%$ 以内であったので、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。

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

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

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%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)と試験濃度の対数値から最小二乗法により回帰直線を求め、その回帰直線よりEC50と可能な限りその95%信頼限界を算出した。その際、面積法により求めたものを $E_bC50(0-72h)$ 、速度法により求めたものを $E_rC50(24-48h)$ もしくは $E_rC50(24-72h)$ と表記した。

4.4 最大無作用濃度(NOEC)の算出

各試験容器毎の生長曲線下面積及び生長速度について、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。

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

暴露開始時及び暴露終了時(暴露開始後72時間)に試験液中の被験物質濃度を測定した。被験物質の測定濃度の設定値に対する割合は、暴露開始時で96.5～102%、暴露終了時で92.1～96.1%であった。

[Table 2 (p.10), 付属資料-1]

5.3 藻類生長曲線

対照区における細胞濃度は暴露終了時まで65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。4.00 mg/L区では暴露開始後24時間から顕著な阻害がみられ、暴露終了時まで生長は僅かにしか認められなかった。1.60及び0.640 mg/L区でも阻害がみられ、生長量も少なかったが、対照区の生長過程と類似したものであった。0.256、0.102及び0.0410 mg/L区では対照区とほぼ同じ生長を示した。

[Table 3 (p.11), Figure 1 (p.17)]

5.4 50%生長阻害濃度(EC50)及び最大無作用濃度(NOEC)

1) 生長曲線下面積の比較による生長阻害濃度

6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾールの設定濃度に基づくE_bC50(0-72h)は0.926 mg/Lであり、その95%信頼限界は0.525～1.63 mg/Lであった。NOECは0.256 mg/Lであった。

[Table 4,5 (p.12,13), Figure 2(p.18)]

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾールのE_tC50(24-48h)、E_tC50(24-72h)は、それぞれ1.89 mg/L、2.55 mg/Lであり、それらの95%信頼限界はともに本試験の結果からは得られなかった。NOECは、ともに0.640 mg/Lであった。

[Table 4,5 (p.12,13), Figure 3 (p.18)]

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全濃度区では正常な細胞が観察された。

5.6 温度、pH及び照度

暴露期間中の藻類培養装置内の温度は22.9～24.9℃であった。試験液のpHは暴露開始時が全試験区とも7.9であり、暴露終了時が8.3～10.5であった。暴露期間中の藻類培養装置内の照度は4,300～4,400 luxであった。

[Table 6,7,8 (p.14～16)]

5.7 試験液の状態

調製時の試験液は全濃度区とも無色透明であった。暴露終了時では4.00 mg/L区で無色透明であり、それ以外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. 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. Concentrations of 6-*tert*-butyl-*m*-cresol in growth inhibition test using *Selenastrum capricornutum*

Nominal concentration (mg/L)	Measured concentration (mg/L) (Percentage of nominal)		
	0-hour ^{a)}	72-hour ^{b)}	Mean ^{c)}
Control	n.d.	n.d.	n.d.
0.0410	0.0396 (96.5)	0.0378 (92.1)	0.0387 (94.3)
0.102	0.102 (100)	0.0980 (96.1)	0.100 (98.1)
0.256	0.260 (102)	0.236 (92.3)	0.248 (96.9)
0.640	0.649 (101)	0.596 (93.2)	0.622 (97.2)
1.60	1.63 (102)	1.50 (93.6)	1.56 (97.6)
4.00	4.06 (101)	3.75 (93.8)	3.90 (97.5)

n.d. : < 0.00500 mg/L

a) initial

b) final

c) 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 3. Cell density of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

Nominal concentration (mg/L)	Cell density ($\times 10^4$ cells/mL)				
	No.	0-hour	24-hour	48-hour	72-hour
Control	1	1.0	5.4	27.8	86.2
	2	1.0	5.8	36.4	85.7
	3	1.0	5.1	24.5	65.4
	Average	1.0	5.5	29.6	79.1
	S.D.	0.0	0.4	6.1	11.8
0.0410	1	1.0	5.3	29.7	70.0
	2	1.0	5.1	22.6	60.4
	3	1.0	5.4	30.2	80.4
	Average	1.0	5.3	27.5	70.2
	S.D.	0.0	0.1	4.2	10.0
0.102	1	1.0	5.9	31.1	90.2
	2	1.0	5.9	28.9	85.0
	3	1.0	5.2	26.5	80.1
	Average	1.0	5.7	28.8	85.1
	S.D.	0.0	0.4	2.3	5.1
0.256	1	1.0	5.3	30.6	63.1
	2	1.0	5.1	26.7	71.8
	3	1.0	5.1	34.4	85.7
	Average	1.0	5.2	30.5	73.5
	S.D.	0.0	0.1	3.8	11.4
0.640	1	1.0	4.0	17.6	53.8
	2	1.0	4.3	21.9	54.4
	3	1.0	3.8	20.5	62.8
	Average	1.0	4.0	20.0	57.0
	S.D.	0.0	0.3	2.2	5.0
1.60	1	1.0	1.7	6.0	19.2
	2	1.0	1.6	5.2	16.0
	3	1.0	1.7	5.1	18.5
	Average	1.0	1.7	5.4	17.9
	S.D.	0.0	0.1	0.5	1.7
4.00	1	1.0	1.4	1.6	1.8
	2	1.0	1.3	1.5	1.8
	3	1.0	1.2	1.4	1.8
	Average	1.0	1.3	1.5	1.8
	S.D.	0.0	0.1	0.1	0.0

Table 4. Growth inhibition of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

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 μ (24-48h)	μ (24-72h)	I μ (24-72h)
Control	1	1770	-	0.0680	-	0.0575	-
	2	1980	-	0.0762	-	0.0559	-
	3	1440	-	0.0651	-	0.0530	-
	Average	1730		0.0698		0.0555	
0.0410	1	1620	6.34	0.0714	-2.40	0.0536	3.46
	2	1330	23.1	0.0619	11.2	0.0514	7.36
	3	1760	-1.60	0.0720	-3.26	0.0564	-1.62
	Average	1570	9.28	0.0685	1.86	0.0538	3.07
0.102	1	1910	-10.4	0.0694	0.497	0.0569	-2.53
	2	1800	-3.80	0.0664	4.80	0.0556	-0.256
	3	1660	3.92	0.0675	3.23	0.0568	-2.40
	Average	1790	-3.43	0.0678	2.84	0.0565	-1.73
0.256	1	1560	9.89	0.0730	-4.59	0.0516	7.07
	2	1560	9.58	0.0688	1.41	0.0550	0.859
	3	1920	-10.8	0.0791	-13.4	0.0586	-5.56
	Average	1680	2.90	0.0736	-5.53	0.0551	0.790
0.640	1	1100	36.2	0.0619	11.2	0.0543	2.22
	2	1220	29.3	0.0679	2.66	0.0529	4.74
	3	1280	26.2	0.0703	-0.752	0.0585	-5.32
	Average	1200	30.6	0.0667	4.38	0.0552	0.545
1.60	1	356	79.4	0.0512	26.5	0.0499	10.1
	2	296	82.9	0.0487	30.2	0.0476	14.1
	3	324	81.3	0.0464	33.5	0.0501	9.67
	Average	325	81.2	0.0488	30.1	0.0492	11.3
4.00	1	32.6	98.1	0.00644	90.8	0.00512	90.8
	2	28.9	98.3	0.00431	93.8	0.00637	88.5
	3	23.3	98.7	0.00672	90.4	0.00918	83.5
	Average	28.2	98.4	0.00582	91.7	0.00689	87.6

Table 5. Calculated EC50 and NOEC of 6-*tert*-butyl-*m*-cresol in *Selenastrum capricornutum*

Based on I_A value		
	6- <i>tert</i> -butyl- <i>m</i> -cresol (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)
EbC50(0-72h)	0.926	0.525 – 1.63
NOECb(0-72h)	0.256	-

Based on I_{μ} value		
	6- <i>tert</i> -butyl- <i>m</i> -cresol (mg/L)	95-Percent confidence limits (mg/L)
ErC50(24-48h)	1.89	-
NOECr(24-48h)	0.640	-
ErC50(24-72h)	2.55	-
NOECr(24-72h)	0.640	-

Table 6. Temperature in the incubation chamber during 72-hour exposure to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

Exposure time (hour)	Temperature (°C)
0	22.9
24	24.1
48	24.9
72	24.1
Average	24.0

Table 7. pH values of test solutions at 0-hour and 72-hour exposure to 6-*tert* -butyl-*m* -cresol

Nominal concentration (mg/L)	pH	
	0-hour	72-hour
Control	7.9	10.2
0.0410	7.9	10.4
0.102	7.9	10.5
0.256	7.9	10.5
0.640	7.9	9.9
1.60	7.9	9.0
4.00	7.9	8.3

Table 8. Light intensity in the incubation chamber during 72-hour exposure to 6-*tert*-butyl-*m*-cresol

Exposure time (hour)	Light intensity (lux)
0	4,300
24	4,400
48	4,400
72	4,300
Average	4,400

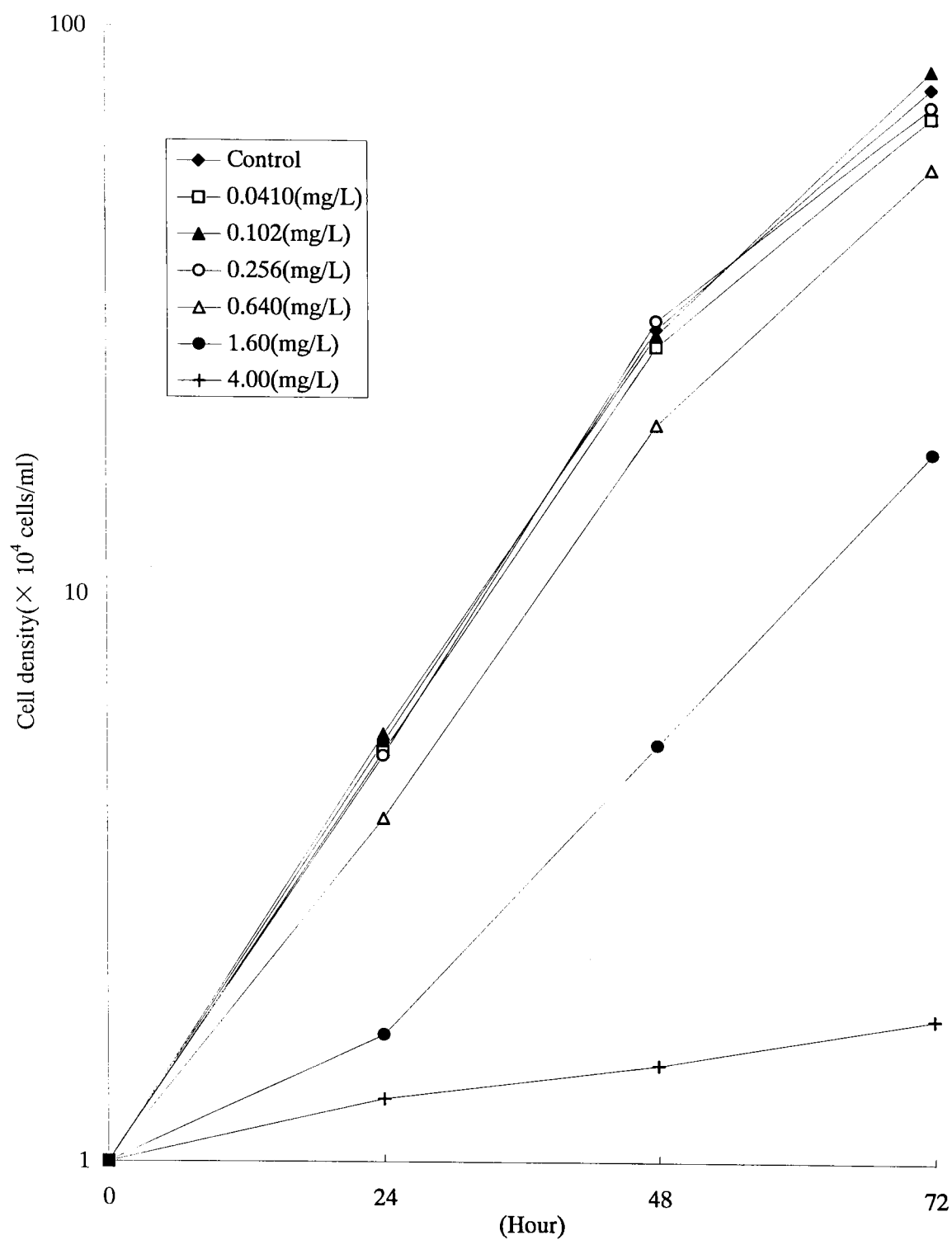


Figure 1. Growth curve of *Selenastrum capricornutum* during 72-hour exposure to 6-tert-butyl-m-cresol.

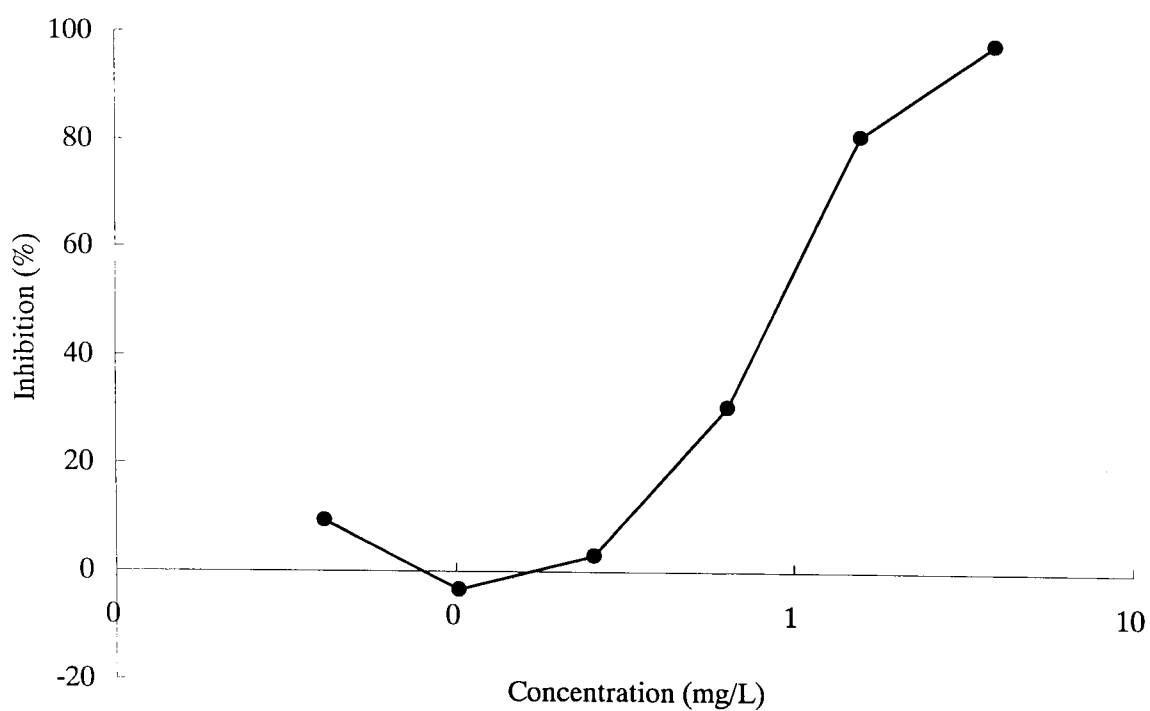


Figure 2. Concentration-Inhibition curve of 6-*tert*-butyl-*m*-cresol in *Selenastrum capricornutum* based on I_A value.

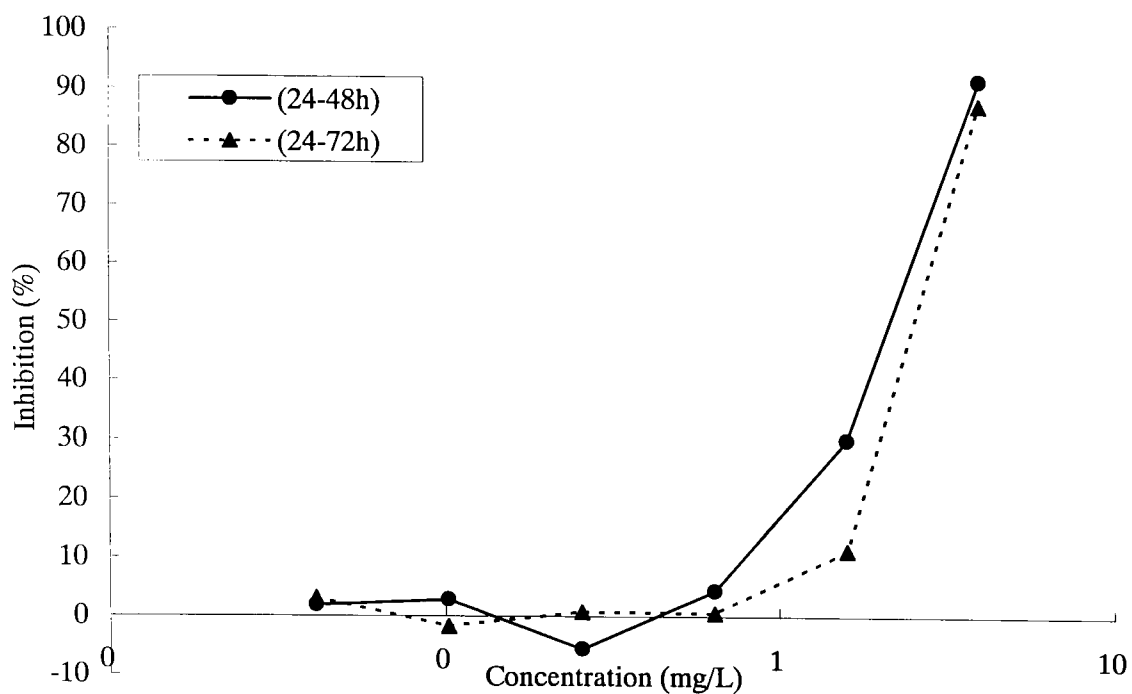


Figure 3. Concentration-Inhibition curve of 6-*tert*-butyl-*m*-cresol in *Selenastrum capricornutum* based on I_μ value.

付属資料－1

試験液の分析方法及び分析チャート

(全 6 頁)

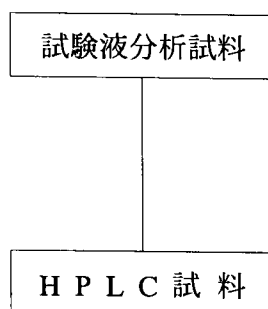
試 験 名 : 藻類生長阻害試験
被 験 物 質 名 : 6-*tert*-ブチル-*m*-クレゾール

1) 試験液の分析方法

(1) 試験液の前処理操作

混合した溶液はそのまま若しくは培地で希釈して、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、アセトニトリルに溶解して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1.00 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。1.00 mg/Lの被験物質溶液を培地で希釈して0.0500 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-10A
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10A
カラム	L-column ODS (化学品検査協会製) 15 cm×4.6 mmφ ステンレス製
カラム温度	40℃
溶離液	アセトニトリル/蒸留水 7/3 (v/v)
流量	1.0 mL/min
測定波長	275 nm
注入量	400 μ L
感度	
検出器	1 AU/1 V
記録計	ATTEN 2 ²

3) 検量線の作成

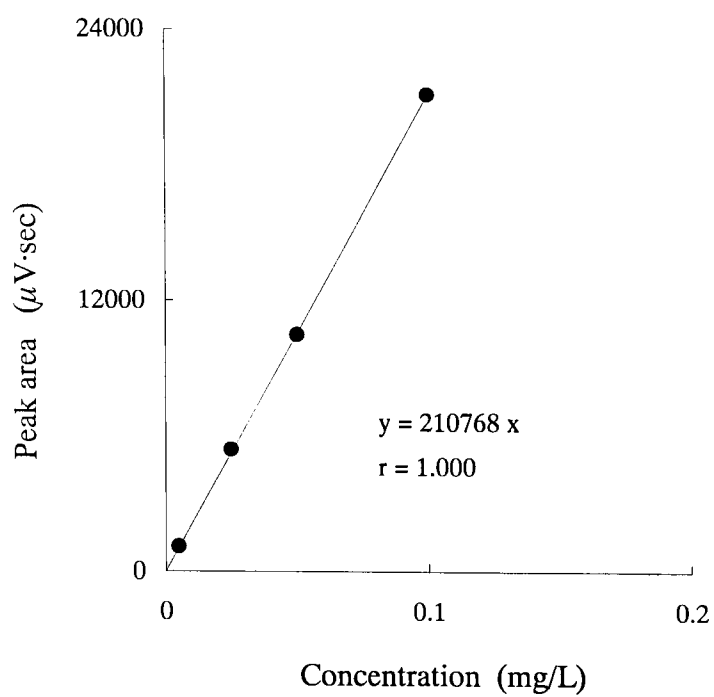
1)(3)の標準溶液の調製と同様にして0.00500、0.0250、0.0500及び0.100 mg/Lの標準溶液を調製した。これらを2)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により、検量線を作成した。

Table of Attached Figures

Figure 1.	Calibration curve of 6- <i>tert</i> -butyl- <i>m</i> -cresol by HPLC analysis.
Figure 2-1.	Example of chromatogram. (standard solution of 0.0500 mg/L, 0-hour)
Figure 2-2.	Example of chromatogram. (fresh test solution of 0.640 mg/L as nominal concentration, 0-hour)
Figure 2-3.	Example of chromatogram. (fresh test solution of control, 0-hour)
Figure 2-4.	Example of chromatogram. (standard solution of 0.0500 mg/L, 72-hour)
Figure 2-5.	Example of chromatogram. (expired test solution of 0.640 mg/L as nominal concentration, 72-hour)
Figure 2-6.	Example of chromatogram. (expired test solution of control, 72-hour)

Input data

Run	Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
1	0.00500	1080
2	0.0250	5390
3	0.0500	10477
4	0.100	21076

Figure 1. Calibration curve of 6-*tert*-butyl-*m*-cresol by HPLC analysis.

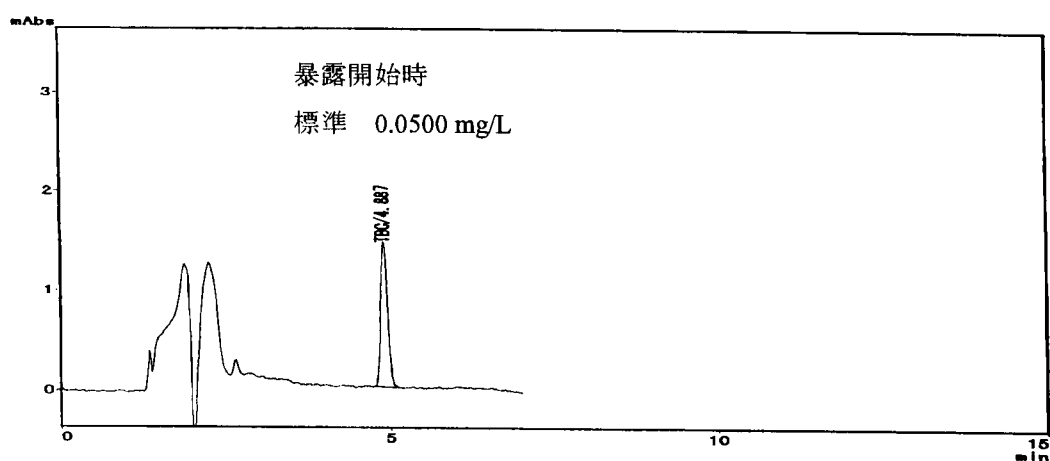


Figure 2-1. Example of chromatogram.
(standard solution of 0.0500 mg/L, 0-hour)

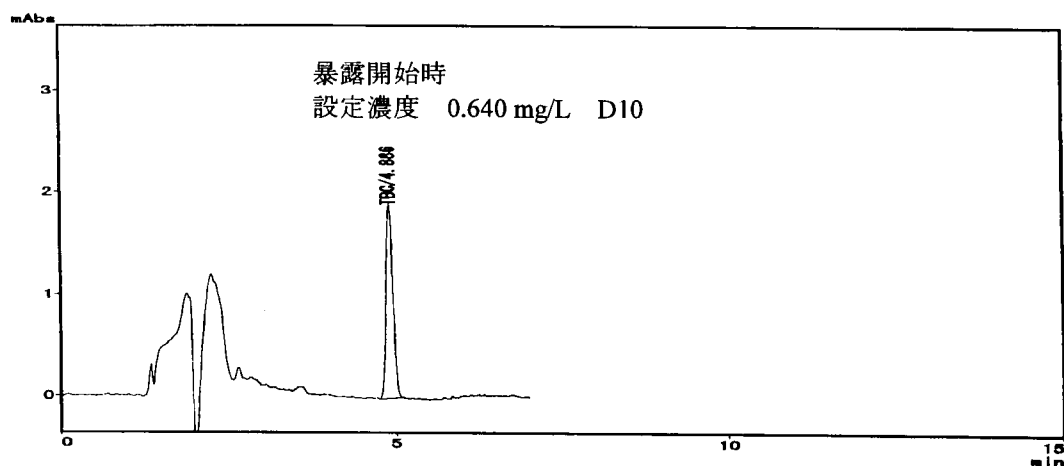


Figure 2-2. Example of chromatogram.
(fresh test solution of 0.640 mg/L as nominal concentration, 0-hour)

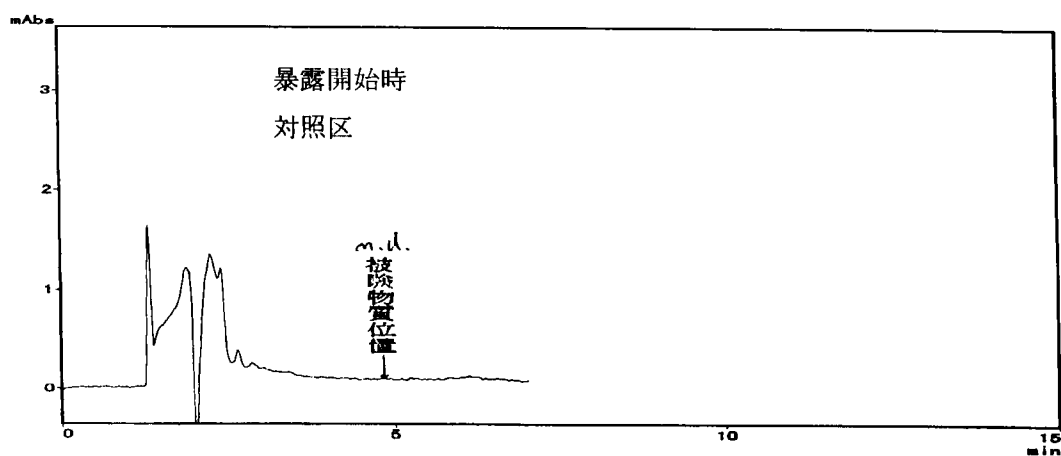


Figure 2-3. Example of chromatogram.
(fresh test solution of control, 0-hour)

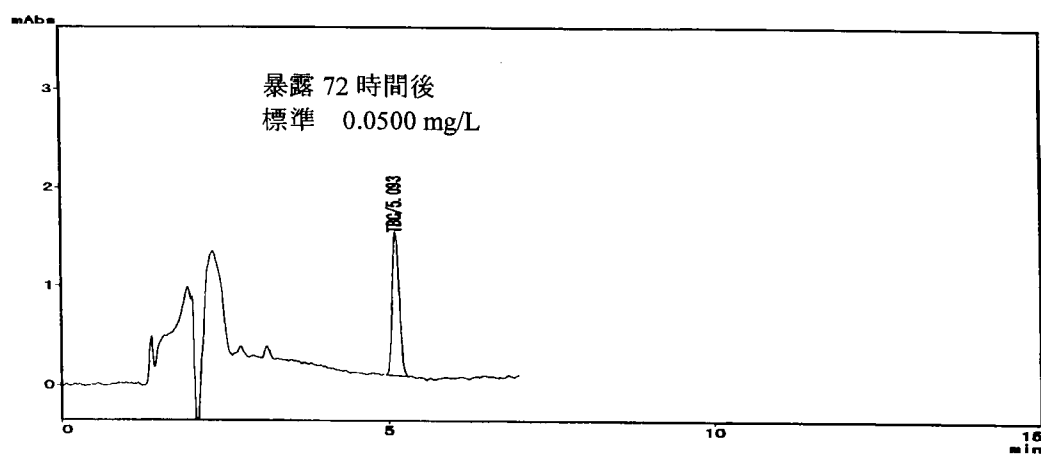


Figure 2-4. Example of chromatogram.
(standard solution of 0.0500 mg/L, 72-hour)

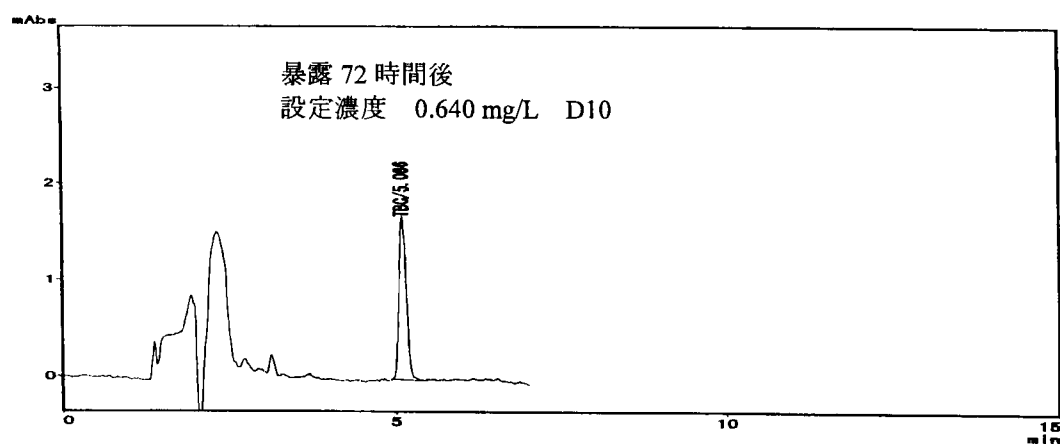


Figure 2-5. Example of chromatogram.
(expired test solution of 0.640 mg/L as nominal concentration, 72-hour)

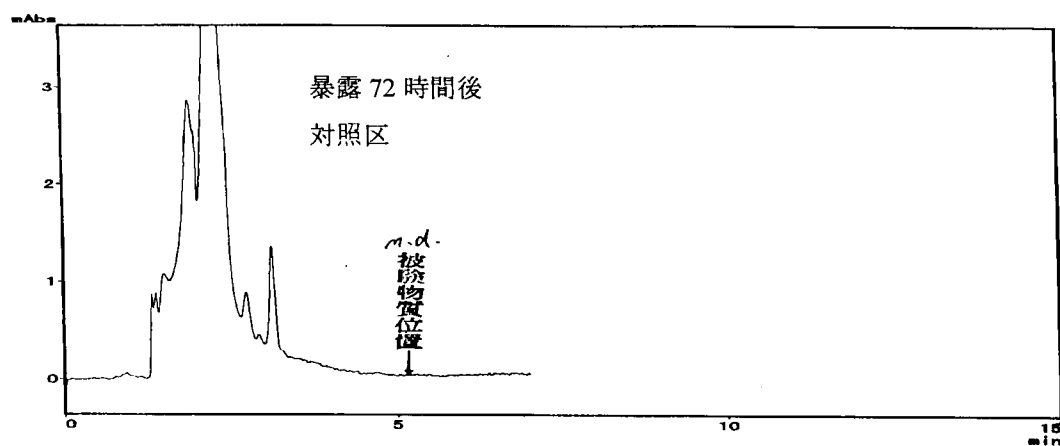


Figure 2-6. Example of chromatogram.
(expired test solution of control, 72-hour)