

試 験 報 告 書

o-sec.-ブチルフェノールの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

(試験番号：第 1 0 0 1 1 号)

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

目 次

	頁
試験概要 -----	1
要 旨 -----	3
1 被験物質 -----	4
1.1 名称, 構造式及び物理化学的性状 -----	4
1.2 供試試料 -----	4
1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性 -----	4
2 供試生物 -----	5
2.1 供試生物 -----	5
2.2 前培養 -----	5
3 試験方法 -----	5
3.1 試験条件 -----	5
3.2 試験培地 -----	5
3.3 試験培養器, 藻類培養試験装置及び機器 -----	5
3.4 試験濃度の設定 -----	6
3.5 試験水の調製 -----	6
3.6 試験水の分析 -----	6
3.7 試験操作 -----	6
4 結果の算出 -----	7
4.1 藻類生長曲線 -----	7
4.2 50 %生長阻害濃度 (EC ₅₀) -----	7
4.3 最大無作用濃度 (NOEC) -----	8
5 結果 -----	9
5.1 試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因 -----	9
5.2 試験水中の被験物質濃度 -----	9
5.3 細胞濃度及び藻類生長曲線 -----	9
5.4 EC ₅₀ 及びNOEC -----	9
5.5 温度及びpH -----	9
Table 1～8 -----	10～16
Figure 1～3 -----	17, 18
付属資料-1 -----	試験水の分析方法

陳述書

試験委託者： 環境庁

試験の表題： o-sec.-ブチルフェノールの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験

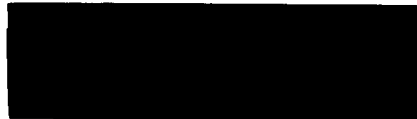
試験番号： 第10011号

上記試験は、環境庁GLP規則「生態影響試験実施に関する基準」を遵守して実施したものである。

1999 年 7 月 30 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

運営管理者



信頼性保証証明書

試験委託者： 環境庁

試験の表題： o-sec.-ブチルフェノールの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験

試験番号： 第10011号

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、本報告書には試験に用いた方法、手順が正確に記載されており、試験結果は試験の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	試験責任者及び 運営管理者への報告日
査察実施期間	1999年 1月20日 ～1999年 7月30日	1999年 1月20日 ～1999年 7月30日
試験報告書監査	1999年 7月30日	1999年 7月30日

1999 年 7 月 30 日

財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

信頼性保証責任者



試験概要

1 表題

o-sec.-ブチルフェノールの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

2 試験目的

o-sec.-ブチルフェノールについて、藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験を行い、72時間後の50 %生長阻害濃度(EC₅₀)及び最大無作用濃度(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 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GLP規則「生態影響試験実施に関する基準」に従い実施した。

5 試験委託者

- 1) 名 称：環境庁
- 2) 住 所：東京都千代田区霞が関 1丁目 2番 2号
- 3) 委託責任者：企画調整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

- 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター
- 2) 所 在 地：東京都渋谷区元代々木町52番 1号
- 3) 代 表 者：[REDACTED]

7 試験施設

- 1) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所
- 2) 所 在 地：東京都多摩市永山 6丁目11番10号
- 3) 名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所別館
- 4) 所 在 地：東京都多摩市永山 6丁目21番 6号

8 試験関係者

試験責任者

[Redacted]

(1999年7月30日)

生物担当責任者

[Redacted]

(1999年7月30日)

生物系試験担当者

[Redacted]

(1999年7月30日)

分析担当責任者

[Redacted]

(1999年7月30日)

[Redacted]

(1999年7月30日)

理化学系分析担当者

[Redacted]

(1999年7月30日)

[Redacted]

(1999年7月30日)

[Redacted]

(1999年7月30日)

9 試験期間

試験開始日：平成11年 1月20日

試験終了日：平成11年 7月30日

曝露期間：平成11年 5月10日～平成11年 5月13日

10 保管

試験計画書，生データ，記録文書及び試験報告書は，試験報告書作成後10年間，財団法人日本食品分析センター多摩研究所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。

要 旨

試験委託者

環境庁

表 題

o-sec.-ブチルフェノールの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試験番号

第10011号

試験方法

本試験はOECD化学品テストガイドライン 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：o-sec.-ブチルフェノール
- 2) 培養方式：振とう培養法(100 rpm)
- 3) 曝露期間：72時間
- 4) 連 数：1濃度区 3連+分析用試験培養器(計4本)
- 5) 供試生物：*Selenastrum capricornutum* (ATCC22662株)
- 6) 初期細胞濃度：約 1×10^4 cells/ml
- 7) 試験水量：100 ml/1連(OECD培地)
- 8) 試験温度： $23 \pm 2^\circ\text{C}$
- 9) 照 明：連続照明(フラスコ液面付近で4,000~5,000 lx)
- 10) 試験濃度：対照区, 1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18及び32 mg/l
- 11) 試験水中の被験物質の分析：高速液体クロマトグラフ法(曝露開始時及び終了時)

結 果

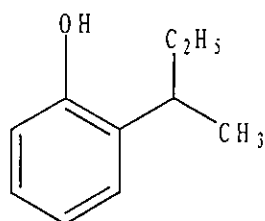
下記の結果は設定濃度より算出した。

- 1) 生長曲線下の面積の比較による50 %生長阻害濃度(EbC_{50})及び最大無作用濃度(NOEC)
 EbC_{50} (0-72hr) : 3.6 mg/l, 95 %信頼限界 : 3.3~3.9 mg/l (直線回帰分析法)
NOEC(面積法 0-72hr) : 1.8 mg/l (Dunnettの多重比較法)
- 2) 生長速度の比較による50 %生長阻害濃度(ErC_{50})及び最大無作用濃度(NOEC)
 ErC_{50} (24-48hr) : 6.8 mg/l, 95 %信頼限界 : 6.5~7.2 mg/l (直線回帰分析法)
NOEC(速度法 24-48hr) : 算出せず
 ErC_{50} (24-72hr) : 8.2 mg/l, 95 %信頼限界 : 7.7~8.7 mg/l (直線回帰分析法)
NOEC(速度法 24-72hr) : 1.0 mg/l (Dunnettの多重比較法)

1 被験物質

1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

- 1) 名 称：o-sec.-ブチルフェノール（別名：2-sec.-ブチルフェノール）
- 2) 英 名：o-sec.-Butylphenol（CAS No. 89-72-5）
- 3) 構造式：



- 4) 化学式： $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$
- 5) 分子量：150.22
- 6) 安定性：安定
- 7) pKa：－
- 8) logP_{ow}：－
- 9) 水への溶解度：不溶
- 10) 蒸気圧：－

1.2 供試試料

- 1) 供給者：[REDACTED]
- 2) 入手日：1998年12月14日
- 3) ロット番号：DLJ5725
- 4) 外 観：無色透明液体
- 5) 純 度：98.4 %
- 6) 供給量：100 g

1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質は財団法人日本食品分析センター多摩研究所の被験物質保管庫（遮光，室温）に保管した。

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。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。よって，被験物質は多摩研究所の被験物質保管庫に保管中は安定であったと判断された。

2 供試生物

2.1 供試生物

試験に供した単細胞緑藻類(*Selenastrum capricornutum*)を下記に示した。供試藻類は3日間の前培養を行ったものを用いた。

供試藻類の基準物質(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, 72時間 EC_{50} 値は0.90 mg/l(平成10年11月9日実施)及び0.82 mg/l(平成11年6月7日実施)であった。

- 1) 和 名：ムレミカズキモ
- 2) 学 名：*Selenastrum capricornutum* (ATCC22662株)
- 3) 入手先：American Type Culture Collectionより入手(平成9年5月22日)し, 財団法人日本食品分析センターにおいて無菌的に継代培養している種である。

2.2 前培養

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

なお, 変形や異常な細胞の出現が認められた場合は使用しなかった。

3 試験方法

3.1 試験条件

- 1) 培養方式：振とう培養法(100 rpm)
- 2) 曝露期間：72時間
- 3) 連 数：1濃度区 3連+分析用試験培養器(計4本)
- 4) 初期細胞濃度：約 1×10^4 cells/ml
- 5) 試験水量：100 ml/1連(OECD培地)
- 6) 試験温度： $23 \pm 2^\circ\text{C}$
- 7) 照 明：連続照明(フラスコ液面付近で4,000~5,000 lx)

3.2 試験培地

前培養及び試験は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。試験培地は滅菌したものを使用した。

[Table 1(p.10)]

3.3 試験培養器, 藻類培養試験装置及び機器

- 1) 試験培養器：ガラス栓付500 ml容ガラス製三角フラスコ
- 2) 藻類培養試験装置：光照射式恒温振とう機 TA-60RL[高崎科学器械株式会社]
- 3) 光学顕微鏡：位相差顕微鏡 CK2[オリンパス光学工業株式会社]
- 4) 血球計算盤：THOMA[荳垣医理工業株式会社]
- 5) 粒子計数装置：コールターZ1[コールター株式会社]
- 6) pH計：HM-14P[東亜電波工業株式会社]
- 7) 照度計：NT-1332[N. T. コーポレーション]

3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立ち、公比10で1.0から100 mg/lの濃度区を設定し、予備試験を行った。本試験は32 mg/l以下の濃度を公比1.8で7段階設定した。各濃度区は以下の通りであった。

対照区, 1.0, 1.8, 3.2, 5.6, 10, 18及び32 mg/l

3.5 試験水の調製

被験物質を試験培地に溶解させて被験物質原液及び溶液を調製し、試験培地に添加して試験水を調製した。また、試験培地のみの対照区を設定した。

3.6 試験水の分析

全濃度区について、曝露開始時及び終了時(72時間後)に試験水を採取した。

試験水の採取方法は、曝露開始時では分析用試験培養器から100 ml, 終了時は各濃度区の試験培養器(3連/濃度区)より適量採取し、等量混合して100 mlを分析用試験水とした。

分析用試験水は速やかに遠心分離等の方法により藻体を除去し、高速液体クロマトグラフを用いて分析を行った。試験水の分析に際しては、標準溶液のピーク高さを用いて検量線を作成し、試験水より得られたピーク高さから試験水中の被験物質濃度を算出した。なお、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濃度を測定し、試験水中の細胞濃度が約 1×10^4 cells/mlとなるように、前培養液の一定量を試験水の入った試験培養器に添加した。

各濃度区の分析用試験培養器のpHを測定し、各試験培養器を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ の培養試験装置に設置した(試験条件は3.1参照)。

曝露開始時より24, 48及び72時間後に細胞濃度を測定した。細胞濃度の測定は各試験培養器より試験水5 mlを採取し、電解液(ISOTON-II)5 mlと混合した後、粒子計数装置により計測した。また、曝露終了時に試験水のpHを測定した。

pHの測定は、開始時は各濃度区の分析用試験培養器について、終了時は各濃度区の試験培養器(各1容器)について行った(但し、72時間後の細胞濃度の差が2倍以上の場合は3容器全てを測定し平均した。)

試験期間中は培養装置内の温度及び照度を1日1回測定した。

4 結果の算出

4.1 藻類生長曲線

濃度区及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 50 %生長阻害濃度 (EC_{50})

4.2.1 生長曲線下の面積の比較による50 %生長阻害濃度 (EbC_{50})

1) 生長曲線下の面積は次の式により算出した。

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

A : 生長曲線下の面積

N_0 : 曝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 : 曝露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 曝露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

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

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

A_c : 対照区の生長曲線下の面積

A_i : 各濃度区における生長曲線下の面積

3) 横軸を濃度 (対数目盛り), 縦軸を I_A (普通目盛り) とし, 直線回帰分析法により EbC_{50} 値を算出した。

なお, 統計解析にはユックムス統計ライブラリーを用いた。

4.2.2 生長速度の比較による50 %生長阻害濃度(ErC₅₀)

- 1) 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)を次の式により算出した。

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

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 : 曝露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t_n : 曝露開始後n回目に細胞濃度を測定した時間

- 2) 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率(I_m)を次の式により算出した。

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

μ_c : 対照区の平均生長速度

μ_i : 各濃度区における平均生長速度

- 3) 横軸を濃度(対数目盛り), 縦軸を I_m (普通目盛り)とし, 直線回帰分析法によりErC₅₀値を算出した。

なお, 統計解析にはユックムス統計ライブラリーを用いた。

4.3 最大無作用濃度(NOEC)

ダネット(Dunnett)の多重比較法により, 対照区と各濃度区の I_a 及び I_m を比較して有意差(5 %または1 %水準)が認められない最高濃度区の濃度をNOECとした。

なお, 統計解析にはユックムス統計ライブラリーを用いた。

5 結果

5.1 試験結果の信頼性に影響を及ぼしたと思われる環境要因なし。

5.2 試験水中の被験物質濃度

曝露開始時及び終了時(72時間後)における試験水中の被験物質濃度は、それぞれ1.00～31.2 mg/l及び0.957～30.6 mg/l(設定濃度:1.0～32 mg/l)であり、設定濃度に対する割合は93～102 %であった。よって、実測濃度は設定濃度の±20 %を維持できた。

[Table 2 (p.11), 付属資料-1]

5.3 細胞濃度及び藻類生長曲線

各濃度区における72時間後の平均細胞濃度の最小値は32 mg/l濃度区の 1.02×10^4 cells/ml, 最大値は1.0 mg/l濃度区の 67.42×10^4 cells/mlであった。

対照区の72時間後の平均細胞濃度は 70.39×10^4 cells/mlであり、試験成立条件である16倍以上の増殖の基準を満たした。

[Table 3 (p.12), Figure 1 (p.17)]

5.4 EC₅₀値及びNOEC

1) 生長曲線下の面積の比較によるEbC₅₀値及びNOEC

被験物質の設定濃度に基づくEbC₅₀(0-72hr)値は3.6 mg/l, 95 %信頼限界は3.3～3.9 mg/l(直線回帰分析法)であった。また、NOEC(面積法0-72hr)は1.8 mg/lであった。

[Table 4, 5, 6 (p.13, 14), Figure 2 (p.18)]

2) 生長速度の比較によるErC₅₀値及びNOEC

被験物質の設定濃度に基づくErC₅₀(24-48hr)値は6.8 mg/l, 95 %信頼限界は6.5～7.2 mg/l(直線回帰分析法)であった。

同様にErC₅₀(24-72hr)値は8.2 mg/l, 95 %信頼限界は7.7～8.7 mg/l(直線回帰分析法)であった。

NOEC(速度法24-72hr)は、1.0 mg/lであったが、NOEC(速度法24-48hr)は算出されなかった。

[Table 4, 5, 6 (p.13, 14), Figure 3 (p.18)]

5.5 温度及びpH

72時間の曝露期間中の藻類培養試験装置内の温度は23.9～24.0℃であり、その平均温度は 23.9 ± 0.1 ℃であった。試験水のpHは曝露開始時が8.0であり、曝露終了時が8.0～10.3であった。

[Table 7, 8 (p.15, 16)]

以 上

Table 1. OECD medium

Nutrient salts	Concentration (mg/l)
H_3BO_3	0.185
$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	0.415
$ZnCl_2$	0.003
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.08
$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	0.1
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.0015
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.007
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.00001
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	18
NH_4Cl	15
KH_2PO_4	1.6
$NaHCO_3$	50
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	15

Table 2. Measured concentrations of the test solutions of o-sec.-Butylphenol
in the 72-hour growth inhibition test on *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration (mg/l)	Measured concentration(mg/l)		Time-weighted Mean (mg/l)	Percentage of nominal	
	0 hour Fresh	72 hours Old		0 hour Fresh	72 hours Old
Control	< 0.01	< 0.01	---	---	---
1.0	1.00	0.957	0.978	100	96
1.8	1.84	1.72	1.78	102	96
3.2	3.23	2.96	3.09	101	93
5.6	5.45	5.41	5.43	97	97
10	10.2	9.63	9.91	102	96
18	17.5	17.4	17.4	97	97
32	31.2	30.6	30.9	98	96

Fresh: Start of the test

Old: End of the test

Table 3. Cell concentrations in the test cultures and controls

Nominal Concentration (mg/l)	Vessel No.	Cell concentration ($\times 10^4$ cells/ml)			
		0 hour	24 hours	48 hours	72 hours
Control	1	1.0	4.03	22.33	74.01
	2	1.0	2.86	19.61	68.46
	3	1.0	3.56	22.07	68.71
	Average	1.0	3.48	21.34	70.39
	S. D.	0.0	0.59	1.50	3.13
1.0	1	1.0	4.09	19.62	66.18
	2	1.0	3.84	21.12	66.25
	3	1.0	3.77	21.22	69.84
	Average	1.0	3.90	20.65	67.42
	S. D.	0.0	0.17	0.90	2.09
1.8	1	1.0	3.64	19.56	64.77
	2	1.0	4.21	19.76	59.82
	3	1.0	4.12	19.71	61.64
	Average	1.0	3.99	19.68	62.08
	S. D.	0.0	0.31	0.10	2.50
3.2	1	1.0	2.32	9.75	34.34
	2	1.0	3.31	15.49	47.20
	3	1.0	2.61	10.57	37.50
	Average	1.0	2.75	11.94	39.68
	S. D.	0.0	0.51	3.10	6.70
5.6	1	1.0	1.50	4.73	15.92
	2	1.0	1.77	5.04	15.92
	3	1.0	2.16	6.79	19.62
	Average	1.0	1.81	5.52	17.15
	S. D.	0.0	0.33	1.11	2.14
10	1	1.0	1.37	2.66	4.10
	2	1.0	1.35	3.37	3.68
	3	1.0	1.37	2.48	3.45
	Average	1.0	1.36	2.50	3.74
	S. D.	0.0	0.01	0.15	0.33
18	1	1.0	1.11	1.34	1.42
	2	1.0	1.13	1.30	1.43
	3	1.0	1.07	1.23	1.24
	Average	1.0	1.10	1.29	1.36
	S. D.	0.0	0.03	0.06	0.11
32	1	1.0	0.96	1.11	1.01
	2	1.0	0.87	0.98	1.03
	3	1.0	0.90	1.02	1.01
	Average	1.0	0.91	1.04	1.02
	S. D.	0.0	0.05	0.07	0.01

Each value represents the mean of three sample counts.

Table 4. The percentage inhibition of the cell growth(I_A) and the average specific growth rate(I_m) in the 72-hour growth inhibition test on *Selenastrum capricornutum*

Nominal Conc. (mg/l)	Vessel No.	Area A (0-72hr)	Inhibition I _A (%) (0-72hr)	Rate μ (24-48hr)	Inhibition I _m (%) (24-48hr)	Rate μ (24-72h)	Inhibition I _m (%) (24-72hr)
Control	1	14,607,600	-----	0.071340	-----	0.060634	-----
	2	13,008,000	-----	0.080217	-----	0.066155	-----
	3	13,796,400	-----	0.076019	-----	0.061669	-----
	Ave.	13,804,000	-----	0.075859	-----	0.062819	-----
1.0	1	13,032,000	5.59	0.065334	13.87	0.057997	7.68
	2	13,340,400	3.36	0.071031	6.36	0.059333	5.55
	3	13,778,400	0.19	0.071995	5.09	0.060815	3.19
	Ave.	13,383,600	3.05	0.069453	8.44	0.059382	5.47
1.8	1	12,740,400	7.71	0.070063	7.64	0.059976	4.53
	2	12,331,200	10.67	0.064425	15.07	0.055289	11.99
	3	12,516,000	9.33	0.065220	14.02	0.056364	10.28
	Ave.	12,529,200	9.24	0.066569	12.24	0.057210	8.93
3.2	1	6,417,600	53.51	0.059821	21.14	0.056140	10.63
	2	9,576,000	30.63	0.064302	15.23	0.055363	11.87
	3	7,063,200	48.83	0.058278	23.18	0.055521	11.62
	Ave.	7,685,600	44.32	0.060800	19.85	0.055675	11.37
5.6	1	2,805,600	79.68	0.047853	36.92	0.049211	21.66
	2	2,944,800	78.67	0.043601	42.52	0.045762	27.15
	3	3,902,400	71.73	0.047723	37.09	0.045968	26.82
	Ave.	3,217,600	76.69	0.046392	38.84	0.046980	25.21
10	1	859,200	93.78	0.027646	63.56	0.022837	63.65
	2	734,400	94.68	0.023449	69.09	0.020892	66.74
	3	738,000	94.65	0.024727	67.40	0.019241	69.37
	Ave.	777,200	94.37	0.025274	66.68	0.020990	66.59
18	1	158,400	98.85	0.007846	89.66	0.005131	91.83
	2	154,800	98.88	0.005839	92.30	0.004905	92.19
	3	100,800	99.27	0.005806	92.35	0.003072	95.11
	Ave.	138,000	99.00	0.006497	91.44	0.004369	93.04
32	1	18,000	99.87	0.006049	92.03	0.001058	98.32
	2	-32,400	100.23	0.004961	93.46	0.003517	94.40
	3	-18,000	100.13	0.005215	93.13	0.002402	96.18
	Ave.	-10,800	100.08	0.005408	92.87	0.002326	96.30

Table 5. Calculated EC₅₀ values (based on nominal concentration)

	EC ₅₀ value (mg/l)	95 % Confidence limits (mg/l)	Statistical Method	Ordinate
EbC ₅₀ (0-72hr)	3.6	3.3~3.9	Simple regression	I _A
ErC ₅₀ (24-48hr)	6.8	6.5~7.2	Simple regression	I _m
ErC ₅₀ (24-72hr)	8.2	7.7~8.7	Simple regression	I _m

Table 6. Calculated NOEC (based on nominal concentration)

	Concentration (mg/l)	Statistical Method	Parameter
NOEC (0-72hr)	1.8	Dunnett (p<0.05)	I _A
NOEC (24-48hr)	not calculated	---	I _m
NOEC (24-72hr)	1.0	Dunnett (p<0.05)	I _m

NOEC: no observed effective concentration

Table 7. Daily temperature values in the incubation chamber

Exposure Period (hours)	Temperature (°C)
0	23.9
24	23.9
48	23.9
72	24.0
Average	23.9
S. D.	0.1

Table 8. The pH values of the test solutions in the 72-hour growth inhibition test on *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration (mg/l)	pH	
	0 hour	72 hours
Control	8.0	10.2
1.0	8.0	10.3
1.8	8.0	10.0
3.2	8.0	9.2
5.6	8.0	8.6
10	8.0	8.2
18	8.0	8.1
32	8.0	8.0

Figure 1. Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

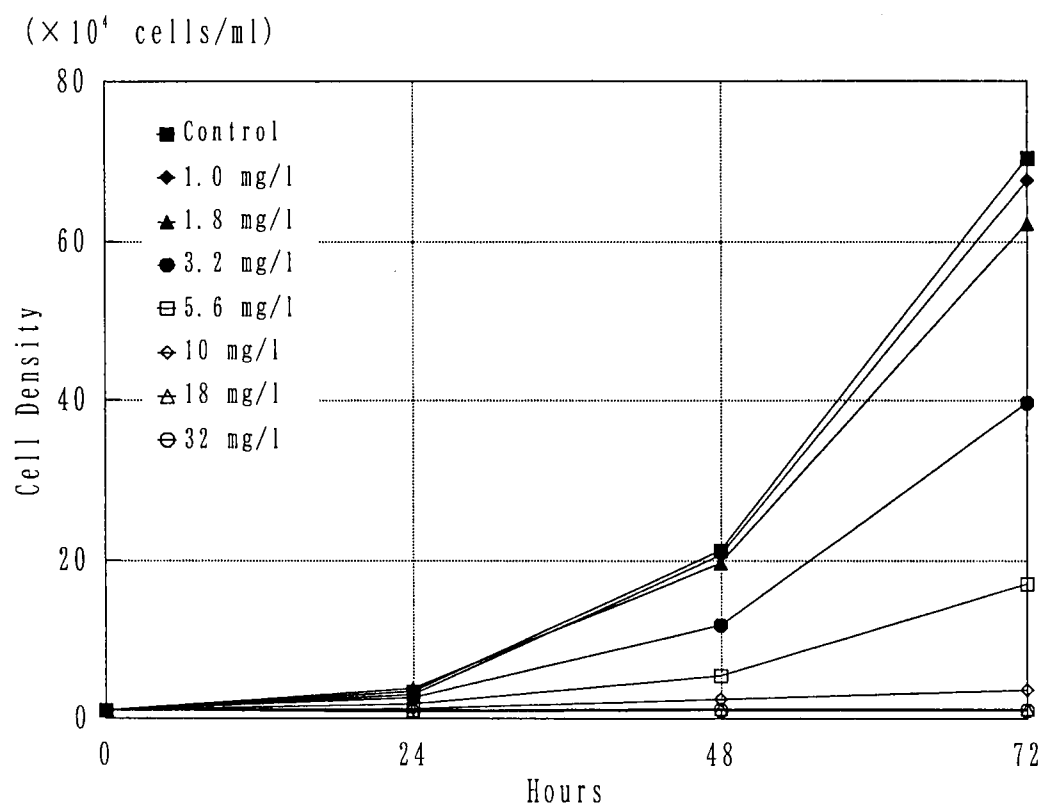


Figure 2. Concentration-Inhibition curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_A value

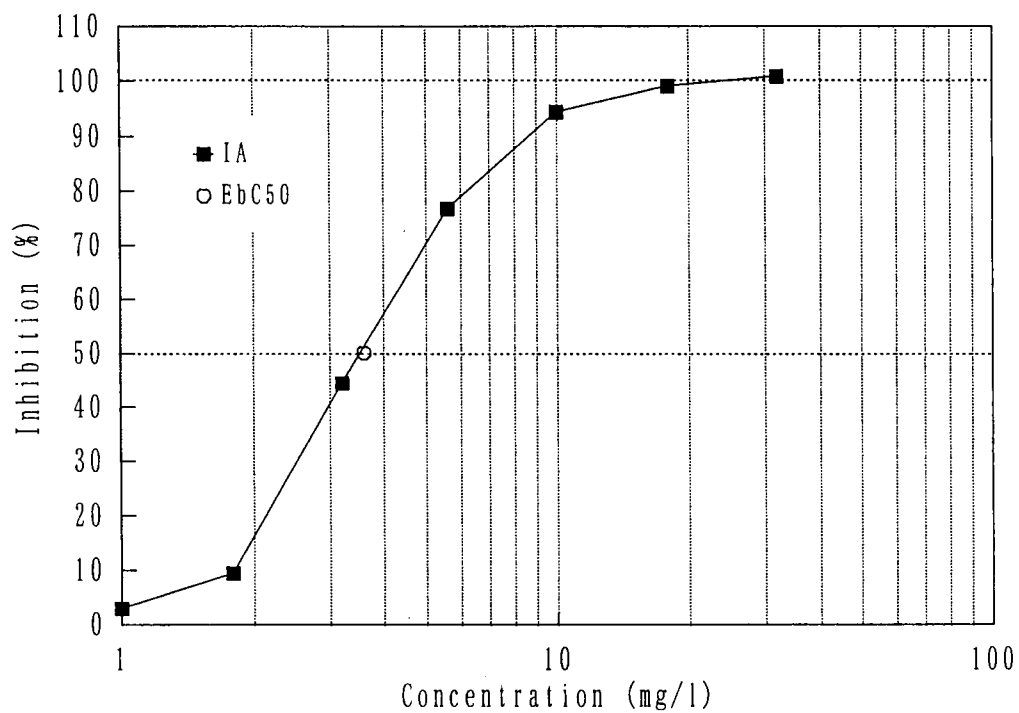
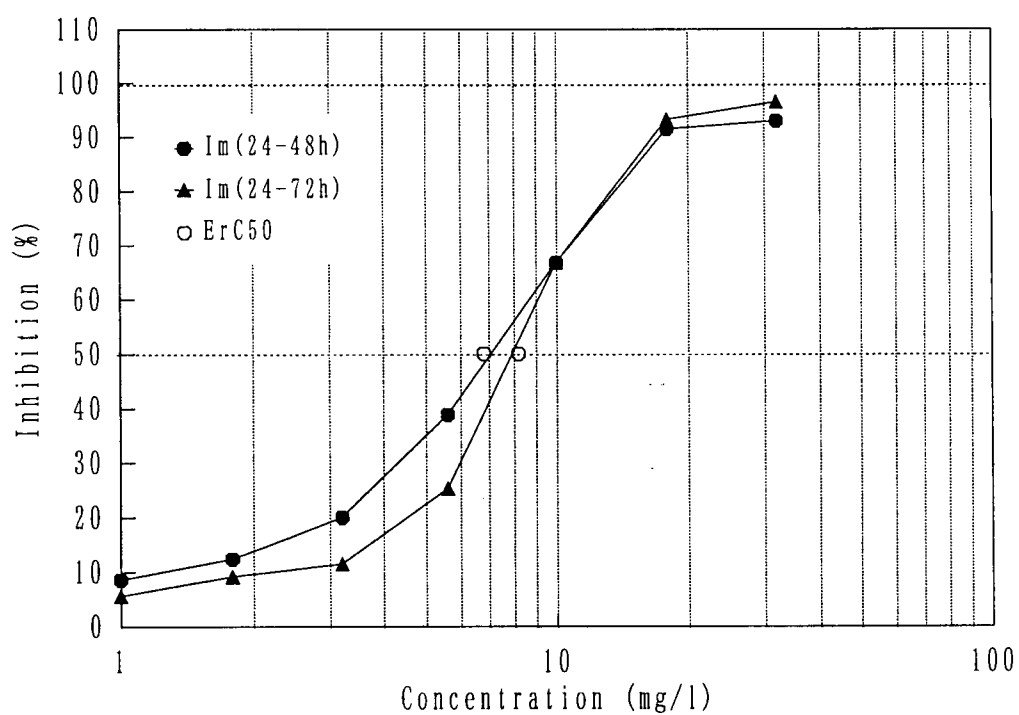


Figure 3. Concentration-Inhibition curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_m value



付属資料一 1

試験水の分析方法
(全9頁)

試験水の分析方法

1 試験方法

1-1 試料溶液の調製

1) 対照区の試験水

試験水10 mlを200 mlの分液漏斗に正確に量り、ヘキサン20 mlを加えて5分間振とうした。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にはさらにヘキサン20 mlを加えて同様な操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、2 %ジエチレングリコール-アセトン溶液0.5 mlを添加した後減圧濃縮乾固した。得られた残留物をアセトニトリル-水(7:3 V/V)2 mlに溶解し、これを試料溶液とした。

2) 1.0 mg/l濃度区の試験水

試験水10 mlを200 mlの分液漏斗に正確に量り、ヘキサン20 mlを加えて5分間振とうした。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にはさらにヘキサン20 mlを加えて同様な操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、2 %ジエチレングリコール-アセトン溶液0.5 mlを添加した後減圧濃縮乾固した。得られた残留物をアセトニトリル-水(7:3 V/V)10 mlに溶解し、これを試料溶液とした。

3) 1.8 mg/l濃度区及び3.2 mg/l濃度区の試験水

試験水10 mlを200 mlの分液漏斗に正確に量り、ヘキサン20 mlを加えて5分間振とうした。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にはさらにヘキサン20 mlを加えて同様な操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、2 %ジエチレングリコール-アセトン溶液0.5 mlを添加した後減圧濃縮乾固した。得られた残留物をアセトニトリル-水(7:3 V/V)20 mlに溶解し、これを試料溶液とした。

4) 5.6 mg/l濃度区及び10 mg/l濃度区の試験水

試験水の2 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容する。この10 mlを200 mlの分液漏斗に正確に量り、ヘキサン20 mlを加えて5分間振とうした。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にはさらにヘキサン20 mlを加えて同様な操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、2 %ジエチレングリコール-アセトン溶液0.5 mlを添加した後減圧濃縮乾固した。得られた残留物をアセトニトリル-水(7:3 V/V)10 mlに溶解し、これを試料溶液とした。

5) 18 mg/l濃度区及び32 mg/l濃度区の試験水

試験水の2 mlを20 mlのメスフラスコに正確に量り取り、水で定容する。この10 mlを200 mlの分液漏斗に正確に量り、ヘキサン20 mlを加えて5分間振とうした。静置後、ヘキサン層を分取し、水層にはさらにヘキサン20 mlを加えて同様な操作を繰り返した。ヘキサン層を合わせ、無水硫酸ナトリウムで脱水後、2 %ジエチレングリコール-アセトン溶液0.5 mlを添加した後減圧濃縮乾固した。得られた残留物をアセトニトリル-水(7:3 V/V)20 mlに溶解し、これを試料溶液とした。

1-2 標準溶液の調製

標準品0.025 gを精密に量りとり、アセトニトリルに溶解して50 mlとし、これを標準原液とした。この標準原液からアセトニトリル-水(7:3 V/V)を用いて適宜希釈し、0.05, 0.25, 1.0及び2.0 µg/mlの標準溶液を調製した。

1-3 定量

試料溶液40 µlを高速液体クロマトグラフに注入し、得られたピーク高さと検量線から試料溶液中のo-sec.-ブチルフェノール濃度を求め、試験水中のo-sec.-ブチルフェノール濃度を算出した。

2 高速液体クロマトグラフ操作条件

機 種 : LC-10AD[株式会社 島津製作所]

検 出 器 : SPD-10A[株式会社 島津製作所]

カ ラ ム : LUNA 5 µ C18(2), φ4.6 mm×25 cm

移 動 相 : アセトニトリル-水-リン酸 (700:300:2 V/V/V)

測定波長 : 270 nm

流 速 : 0.8 ml/min

温 度 : 40℃

注 入 量 : 40 µl

データ処理装置 : C-R4A[株式会社 島津製作所]

3 検量線

1-2で調製した標準溶液40 µlを高速液体クロマトグラフに注入し、注入量(ng)と得られたピーク高さから検量線を作成した。

4 添加回収試験

4-1 低濃度添加

飼育水に濃度が1.0 mg/lになるようにo-sec.-ブチルフェノールを添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は100.3 %, 100.6 %, 100.4 %(平均100.4%)であった。

4-2 高濃度添加

飼育水に濃度が40 mg/lになるようにo-sec.-ブチルフェノールを添加し、この溶液を用いて添加回収試験を行った。試験は平行測定3回で実施し、回収率は98.2 %, 98.2 %, 98.0 % (平均98.1 %)であった。

Figure 1. Calibration curve of o-sec.-Butylphenol by HPLC analysis

Amount (ng)	Peak height (μV)
80	15,754
40	7,975
10	1,828
2	391

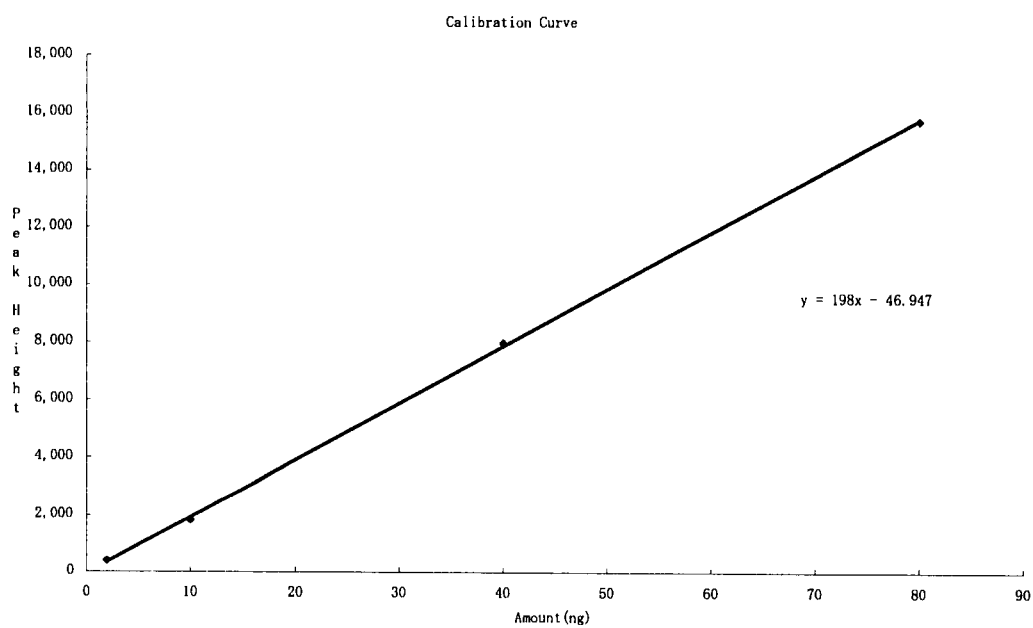


Figure 2. Representative chromatogram

Standard (80 µg/ml): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=2 クロマト=1:BUP002.C01 99/05/10 17:51:38



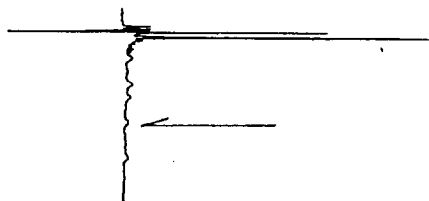
**** 定量計算結果 ****

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.857	143881	15754			100	
TOTAL			143881	15754			100	

Control: 0 hour

波形処理/計算エラー* Ch=1, 1: 生ピークがありません。

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=3 クロマト=1:BUP002.C05 99/05/10 18:43:47



**** 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	

Test solution (1.0 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=4 クロマト=1:BUP002.C06 99/05/10 18:55:19

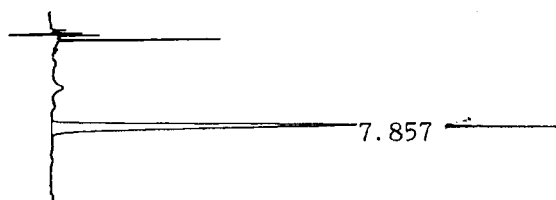


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.857	71428	7911			100	
TOTAL			71428	7911			100	

Test solution (5.6 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=5 クロマト=1:BUP002.C09 99/05/10 19:29:57

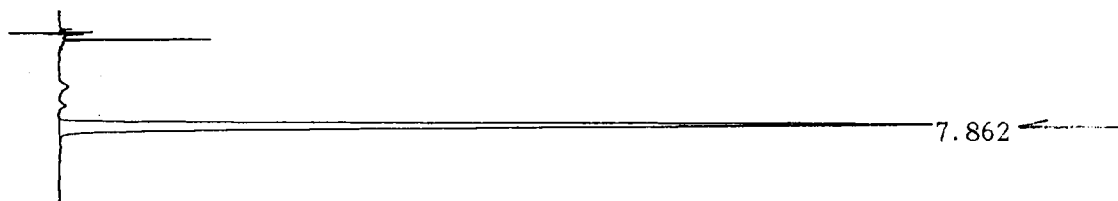


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.857	38601	4273			100	
TOTAL			38601	4273			100	

Test solution (32 mg/l): 0 hour

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=6 クロマト=1:BUP002.C12 99/05/10 20:04:33

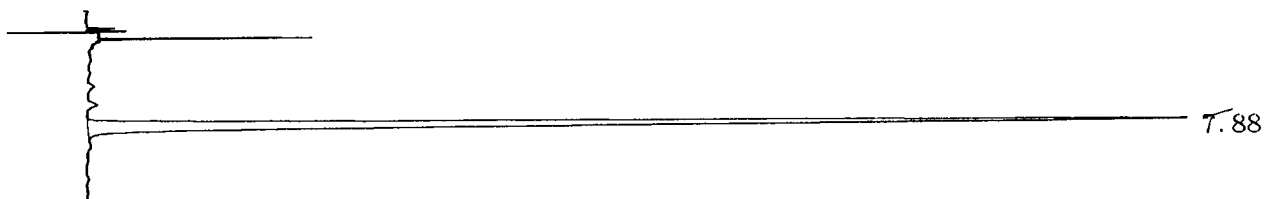


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.862	110579	12306			100	
TOTAL			110579	12306			100	

Standard (80 µg/ml): 72 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=7 クロマト=1:BUP005.C11 99/05/13 20:55:25



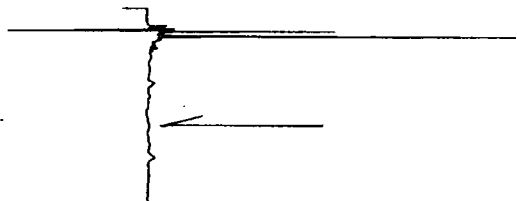
** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.882	140534	15481			100	
TOTAL			140534	15481			100	

Control: 72 hours

波形処理/計算エラー Ch=1, 1: 生ピークがありません。

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=8 クロマト=1:BUP005.C15 99/05/13 21:43:32

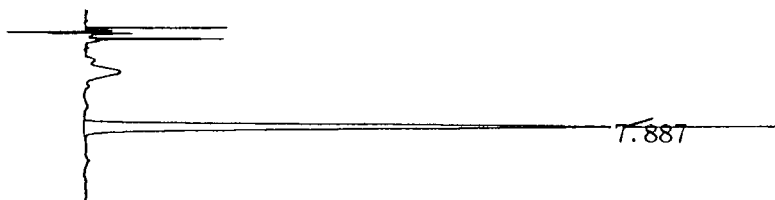


** 定量計算結果 ** 注意 エラー有 CALERROR: 1

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

Test solution (1.0 mg/l): 72 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=9 クロマト=1:BUP005.C16 99/05/13 21:55:33

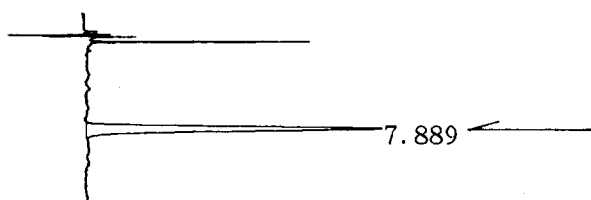


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.887	66334	7405			100	
		TOTAL	66334	7405			100	

Test solution (5.6 mg/l): 72 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=10 クロマト=1:BUP005.C18 99/05/13 22:19:36

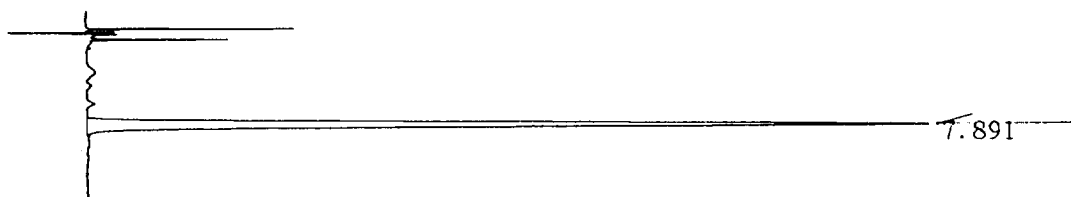


** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.889	37120	4151			100	
TOTAL			37120	4151			100	

Test solution (32 mg/l): 72 hours

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=11 クロマト=1:BUP005.C22 99/05/13 23:07:43



** 定量計算結果 **

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	7.891	106858	11875			100	
TOTAL			106858	11875			100	