

環境庁殿

## 試 験 報 告 書

2-ブタノンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号: EA196005)

平成 9 年 々 月 25 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：EAI96005

修正書番号：1

表題：2-ブタノンの藻類（*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) 8ページ、1.1、被験物質のCAS番号を以下の通り修正した。

修正前：78-96-3

修正後：78-93-3

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

監査日		報告日	
項 目	Q A U	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-ブタノンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： E A I 9 6 0 0 5

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 4 月 25 日

運営管理者

[Redacted]

[Redacted]

## 信頼性保証証明書

試験表題： 2-ブタンの藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験

試験番号： EAI96005

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9年1月9日	平成9年1月13日	平成9年1月30日
	平成9年2月13日	平成9年2月17日	平成9年2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2月24日	平成9年2月26日	平成9年2月26日
	平成9年2月25日		
最終報告書	平成9年3月14日	平成9年3月14日	平成9年4月25日
	平成9年4月25日	平成9年4月25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 4 月 25 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-ブタノンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的： 2-ブタノンについて、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 4 月 25 日)

試験担当者



(平成 9 年 4 月 25 日)

試験担当者



(平成 9 年 4 月 25 日)

9. 試験期間： 試験開始日 平成 9 年 2 月 3 日  
試験終了日 平成 9 年 4 月 25 日  
暴露期間 平成 9 年 2 月 25 日～平成 9 年 2 月 28 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 -----	15～20
Figure 1～3 -----	21～22
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-ブタノンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験試験番号

EA196005

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-ブタノン
- 2) 培養方式 : 振盪培養 (100rpm)
- 3) 供試生物種 : *Selenastrum capricornutum* (ATCC22662)
- 4) 温度 :  $23 \pm 2$  °C
- 5) 暴露期間 : 72時間
- 6) 試験液量 : 100 mL (OECD培地)
- 7) 照明 : 4200 ~ 5000 lux (連続照明)
- 8) 初期細胞濃度 :  $1 \times 10^4$  cells/mL
- 9) 試験濃度 : [設定] 対照区, 100mg/L, 180mg/L, 320mg/L, 560mg/Lおよび 1000mg/L  
[実測値:0hr] 98mg/L, 180mg/L, 330mg/L, 550mg/Lおよび 1300mg/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

$E_bC50$  (0-72h) : 570mg/L (95%信頼区間: 490 ~ 680mg/L)

NOEC(面積法 0-72h) : 98mg/L

- 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

$E_rC50$  (24-48h) : >1300mg/L

NOEC(速度法 24-48h) : 330mg/L

$E_rC50$  (24-72h) : >1300mg/L

NOEC(速度法 24-72h) : 550mg/L

(上記濃度は、全て暴露開始時の実測値に基づく値)



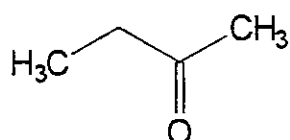
## 1. 被験物質

## 1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名 称： 2-ブタノン

(CAS番号：~~78-96-3~~、略称：MEK、識別番号：96C-1)  
78-93-3

構造式：



分子式：  $C_4H_8O$

分子量： 72.11

1-オクタノール／水分配係数 (logP)： 0.26\*1

水への溶解度：353g/L at 10℃, 190g/L at 90℃\*2

蒸気圧： 71.2mmHg at 20℃\*1

\*1 The Dictionary of Substances and their Effects. Vol.1 (1992)より引用

\*2 Handbook of Environmental Data on Organic Chemicals (1983)より引用

## 1.2 供試試料

購入先： XXXXXXXXXX

入手量： 500mL

入手日： 平成8年12月20日

ロット番号：DLG5830

外観： 無色澄明液体

純度： 99.9%

## 1.3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当社の試薬棚に保管した。

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試薬棚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<sub>50</sub>C50）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4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 ~ 5000 lux (連続照明)
- 6) 初期細胞濃度 : 1×10<sup>4</sup> 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 (密栓)                          |
| 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

100 および 1000mg/L で予備試験を実施したところ、100mg/L 区は対照区と同等の生長が見られたが、1000mg/L 区では約 68%の増殖阻害が認められた。以上の結果を基に最低濃度を 100mg/L とし、公比 1.8 で 180, 320, 560 および 1000mg/L の 5 濃度を本試験の設定濃度とした。

### 3.5 試験液の調製

各設定濃度に必要な量の被験物質を比重 (0.806g/mL) で容量換算して、直接マイクロシリンジを用いて量り取り、培地に添加して各濃度の試験液を調製した。添加後は直ちに栓をして攪拌した。

対照区には培地だけのものを用いた。

### 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 (0 時間) および暴露終了時 (72 時間) に、栓付ガラス製遠沈管に満水 (約 15mL) となるように各濃度区 3 連の試験容器からほぼ均等に試験液を採取し、フィルター濾過後 HPLC により分析した。ただし、暴露終了時には 0.45 $\mu$ m メンブレンフィルター濾過により藻体を除去した。試験液の分析に際しては、試料のピーク高さ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)住化分析センターで実施した。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  $1 \times 10^4$  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 (72 時間のみ 1.0mL) を採取し、電解液 (ISOTON-II) を 18mL (72 時間のみ 19mL) 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 pH 測定用に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

各濃度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 ( $E_bC50$ )

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  $I_A$  値を用いてロジット法により  $E_bC50$  (0-72h) およびその 95%信頼区間を算出した。

###### 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 ( $E_rC50$ )

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 ( $\mu$ ) 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 ( $\mu$ ) 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、

$\mu_c$  : 対照区の平均生長速度

$\mu_t$  : 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 1000mg/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、Kruskal-Wallis の順位検定、多重比較検定 (Dunnett) および 2 群の平均値の差の検定 (t 検定)) 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 98, 180, 330, 550 および 1300mg/L (設定値 100, 180, 320, 560 および 1000mg/L) であり、試験最高濃度の 1000mg/L 区を除いてほぼ設定どおりであった。暴露 72 時間の被験物質濃度は、88, 85, 310, 520 および 1100mg/L (設定値 100, 180, 320, 560 および 1000mg/L) であり、暴露開始時の濃度に比べて 180mg/L 区のみ設定の 47%(85mg/L)に減少したが、他の濃度区の減少は僅かであり、いずれも設定の 20%以内であった。なお、180mg/L 区の顕著な減少は特異的なものであり、原因として栓部分からの洩れによるものと推測された。

これらの結果から、暴露開始時の分析において 1000mg/L 区の試験液の濃度が設定値の  $\pm 20\%$  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

対照区における細胞濃度は 72 時間の培養で 61 倍に増殖し、試験条件下で正常な生長を示した。

98mg/L 区においては 56 倍の増殖となり、対照区とほぼ同等の生長が見られたが、他の区においては増殖倍率が濃度依存的に低下し、試験最高濃度の 1300mg/L 区で 18 倍となった。

[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 ( $E_bC50$ )

$E_bC50(0-72h)$  は 570mg/L であり、その 95%信頼区間は 490~680mg/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、ノンパラメトリック手法による多重比較検定 (Dunnett) においては 330mg/L となったが、 $I_A$  値から考えて不適切な値と判断し、パラメトリックな多重比較検定 (Dunnett) を採用し 98mg/L とした。

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

## 2) 生長速度の比較による生長障害濃度 ( $E_rC50$ )

試験最高濃度の 1300mg/L 区における  $I_m$  値が 40%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 >1300mg/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、前者(24-48h)で 330mg/L であった。しかし、後者(24-72h)では Kruskal-Wallis の順位検定で有意差が認められず 1300mg/L となったが、 $I_m$  値から考えて不適切と判断し、NOEC を 550mg/L とした。なお、この値は多重比較検定 (Dunnett) や平均値の差の検定 (t 検定) で調べたところ、550mg/L が NOEC に相当することから妥当な値と判断した。

[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 23.0~23.2℃であり、その平均温度は  $23.1 \pm 0.1$ ℃であった。試験液の pH は暴露開始時が 7.7~7.9 であり、暴露終了時が 8.6~10.3 であった。

[Table 6, 7 (p. 20)]

以 上

Table 1. OECD medium

Nutrient Salts	Concentration (mg/L)
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.185
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.415
$\text{ZnCl}_2$	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
$\text{NH}_4\text{Cl}$	15
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1.6
$\text{NaHCO}_3$	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-Butanone 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	<5	—	<5	—
100	98	98	88	88
180	180	100	85	47
320	330	100	310	97
560	550	99	520	92
1000	1300	130	1100	110

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum* to 2-Butanone.

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	4.88	27.9	61.7
	2	1.00	4.80	28.7	60.5
	3	1.00	4.99	28.4	61.8
	Mean	1.00	4.89	28.3	61.3
	SD	0	0.10	0.4	0.7
98	1	1.00	4.96	27.6	55.4
	2	1.00	5.06	26.7	55.8
	3	1.00	5.60	30.1	57.0
	Mean	1.00	5.21	28.1	56.0
	SD	0	0.34	1.7	0.8
180	1	1.00	4.92	26.4	54.2
	2	1.00	4.69	24.7	48.5
	3	1.00	3.92	14.5	44.6
	Mean	1.00	4.51	21.9	49.1
	SD	0	0.52	6.4	4.8
330	1	1.00	4.24	23.1	44.9
	2	1.00	3.43	17.6	44.6
	3	1.00	3.54	17.0	42.1
	Mean	1.00	3.74	19.2	43.9
	SD	0	0.44	3.3	1.5
550	1	1.00	3.25	13.4	40.4
	2	1.00	3.08	10.7	25.0
	3	1.00	3.79	14.9	38.9
	Mean	1.00	3.37	13.0	34.8
	SD	0	0.37	2.1	8.5
1300	1	1.00	2.36	7.58	19.5
	2	1.00	2.32	6.11	18.2
	3	1.00	2.23	6.38	16.1
	Mean	1.00	2.30	6.69	17.9
	SD	0	0.07	0.78	1.7

Each value represents the mean of three sample counts.

SD: Standard Deviation

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum* to 2-Butanone.

Initial Measured Concentration		Area	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)
mg/L	No.	A(0-72h)	I <sub>A</sub> (0-72h)	μ(24-48h)	I <sub>m</sub> (24-48h)	μ(24-72h)	I <sub>m</sub> (24-72h)
Control	1	14678880		0.0727		0.0528	
	2	14691840		0.0745		0.0528	
	3	14832000		0.0725		0.0524	
	Mean	14734240	0.0	0.0732	0.0	0.0527	0.0
98	1	13863360		0.0715		0.0503	
	2	13717440		0.0694		0.0500	
	3	14796000		0.0700		0.0483	
	Mean	14125600	4.1	0.0703	4.0	0.0495	6.0
180	1	13416480		0.0700		0.0500	
	2	12267840		0.0692		0.0487	
	3	9180960		0.0546		0.0506	
	Mean	11621760	21.1	0.0646	11.8	0.0498	5.6
330	1	11338560		0.0705		0.0491	
	2	9791520		0.0681		0.0534	
	3	9384000		0.0654		0.0516	
	Mean	10171360	31.0	0.0680	7.1	0.0514	2.5
550	1	8231520		0.0590		0.0525	
	2	5715840		0.0520		0.0437	
	3	8562720		0.0572		0.0485	
	Mean	7503360	49.1	0.0561	23.4	0.0482	8.5
1300	1	4125120		0.0487		0.0440	
	2	3604800		0.0403		0.0429	
	3	3397920		0.0438		0.0412	
	Mean	3709280	74.8	0.0443	39.5	0.0427	19.0

Table 5. Calculated EC50 and NOEC Values for 2-Butanone.

Based on  $I_A$  Value

Item	Value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
$E_bC_{50}$ (0-72h)	570	490 ~ 680
NOEC <sub>b</sub> (0-72h)	98	—

Based on  $I_m$  Value

Item	Value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
$E_rC_{50}$ (24-48h)	>1300	—
NOEC <sub>r</sub> (24-48h)	330	—
$E_rC_{50}$ (24-72h)	>1300	—
NOEC <sub>r</sub> (24-72h)	550	—

Table 6. Daily Temperature in the Incubation Chamber during a 72-Hour Exposure of *Selenastrum capricornutum* to 2-Butanone.

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	23.2
24	23.0
48	23.2
72	23.1
Mean $\pm$ SD	23.1 $\pm$ 0.1

Table 7. pH Values at 0-Hour and 72-Hour Exposure of *Selenastrum capricornutum* to 2-Butanone.

Initial Measured Concentration (mg/L)	pH	
	0 Hour	72 Hour
Control	7.7	10.3
98	7.8	10.2
180	7.8	10.0
330	7.9	9.6
550	7.9	9.0
1300	7.9	8.6

Figure 1. Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum* Exposed to 2-Butanone.

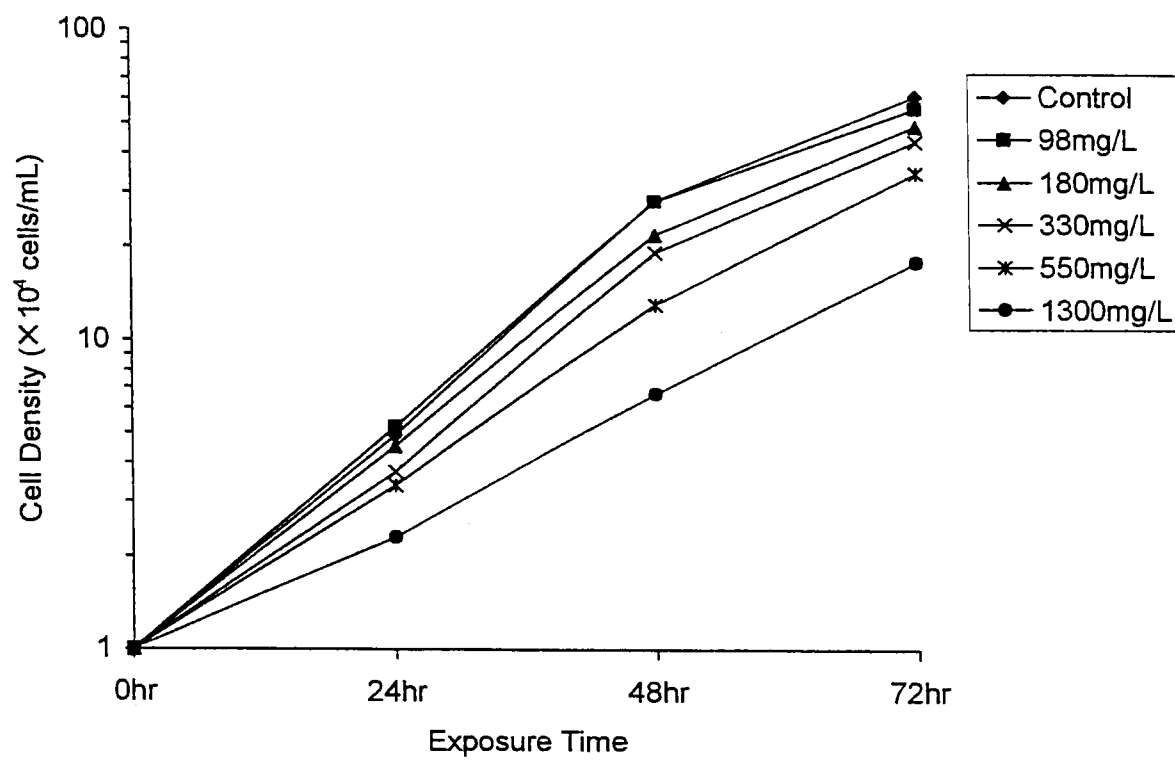


Figure 2. Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* Based on  $I_A$  (0-72h) Value to 2-Butanone.

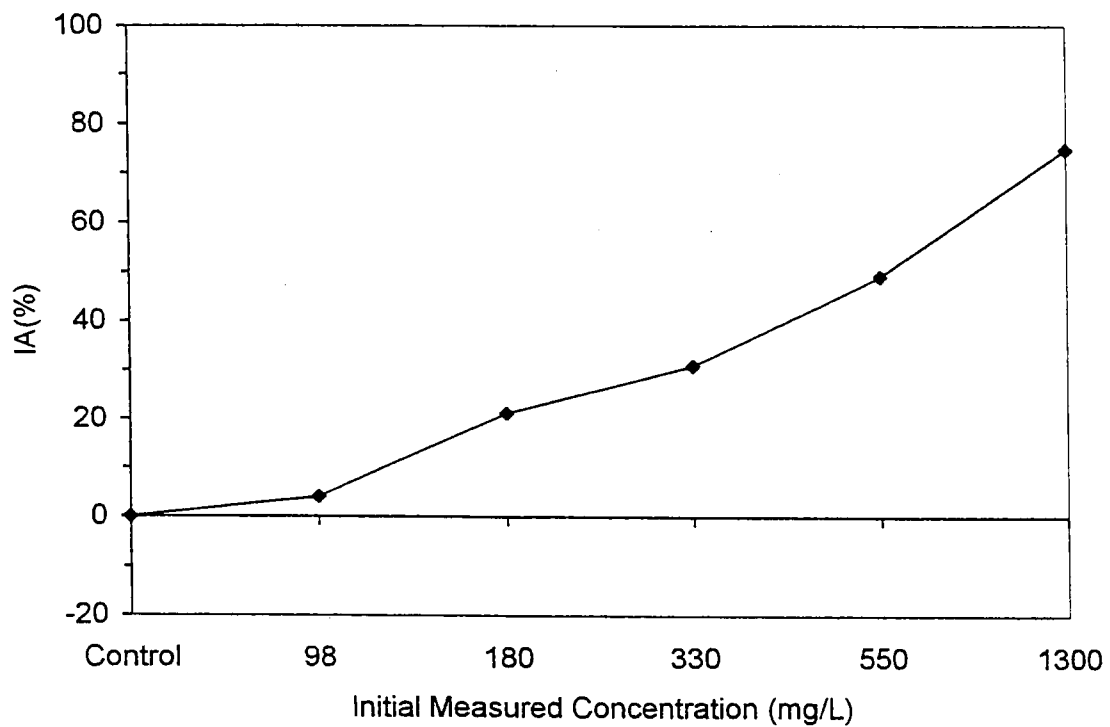
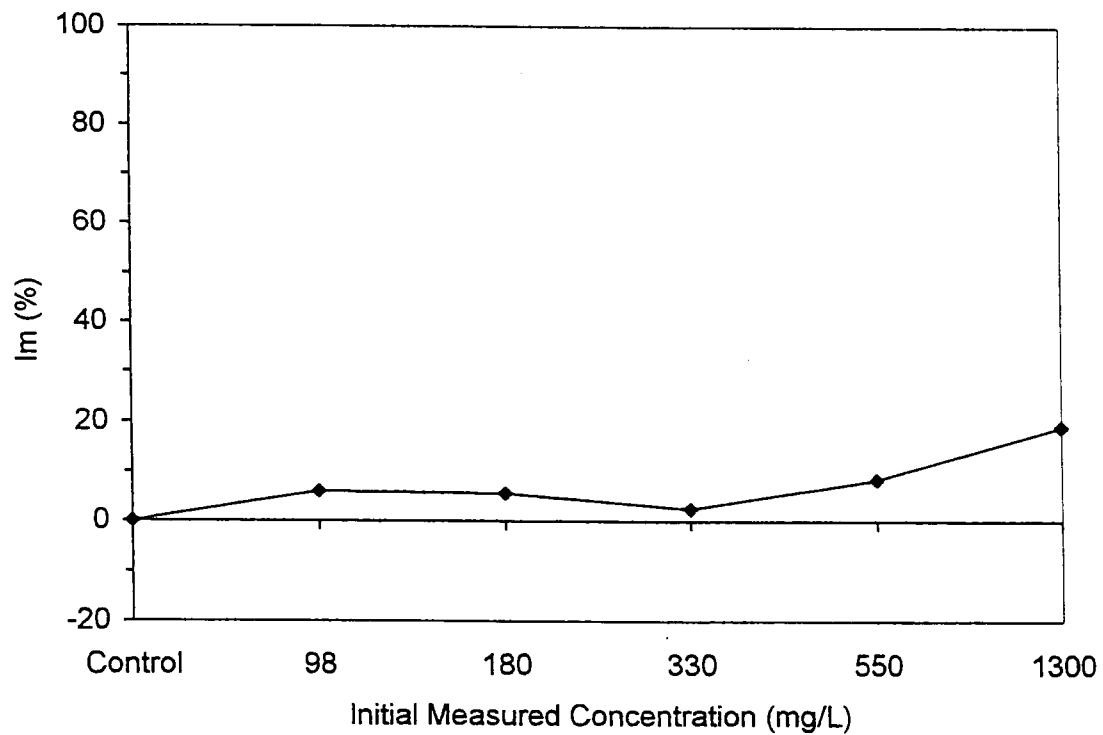


Figure 3. Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* Based on  $I_m$  (24-72h) Value to 2-Butanone.



## 付属資料－1

試験液の分析方法

(全 15 頁)



## 試験結果報告書

表題： 2-ブタノンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験  
(物理・化学系)

(試験番号： EAI96005)

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-ブタノンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する  
生長阻害試験 (物理・化学系)

試験番号 : EAI96005


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-ブタリノの藻類(*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験 (物理・化学系)試験番号: EA196005

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 2月17日	1997年 2月17日	試験計画書
1997年 2月24日	1997年 2月24日	試験操作
1997年 2月25日	1997年 2月25日	試験操作
1997年 3月20日	1997年 3月20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：EAI96005

表題： 2-ブタノンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験  
(物理・化学系)

## 試験委託者










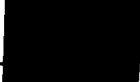
名 称 住化テクノス株式会社  
住 所 兵庫県宝塚市高司4丁目2番1号

## 試験期間

自： 1997年 2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) 添加回収試験結果
  - (2) 試験液測定結果
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-ブタノンの藻類に対する生長阻害試験（試験番号：EAI96005）」  
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測定した。

## 3. 試験物質、試薬および装置

2-ブタノン標準品： XXXXXXXXXX より提供された純度既知の被験物質

Lot. No. : DLG5830

純 度 : 99.9%

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
フィルター:	DISMIC-13HP (PTFE 0.45 $\mu$ m)	ADVANTEC
高速液体クロマトグラフ用ポンプ:	LC-5A	榊島津製作所製
紫外分光光度計検出器:	SPD-6A	榊島津製作所製
自動注入装置:	KMT-60A-II型	榊協和精密製作所製
データ処理装置:	C-R4A	榊島津製作所製
天秤:	AT-250	メトラー社製

## 4. 試験の実施

## (1) 用いた試験方法

試験液をフィルターに通し、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  $\mu$ 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 4.5 分  
測定波長: 262 nm  
注入量: 50  $\mu$ L

## (3) 試験液の分析

## 1) 検量線の作成

2-ブタノン標準品約 30 mg を精密に秤り取り 30 mL 容メスフラスコに入れ、蒸留水を加えて溶かし、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 5, 25, 50, 100 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高さと標準品の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、15 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. a. を被験物質の濃度が 5~100 mg/L になるように蒸留水で希釈し、フィルターに通したのち、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、感度変化のないことを確認した。

## 3) 検出限界

検出限界 = 5 mg/L

## 6. 試験結果

## (1) 添加回収試験結果

検出限界の 10 倍濃度 (50 mg/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 %
50.40	99.19	96.93
	97.80	
	93.81	

## (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	<5	<5
100	98.34	87.55
180	179.7	84.63
320	325.7	309.9
560	552.4	538.4
1000	1259	960.1

## 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-Butanone by HPLC Analysis

Input Data		
No.	Weight (n g)	Peak Height ( $\mu$ v · s e c)
1	254.5	232
2	1273	1177
3	2545	2365
4	5090	4695

$$Y(\text{Peak Height}) = 3.122 + 0.9229 X (\text{Weight})$$

$$r = 1.000$$

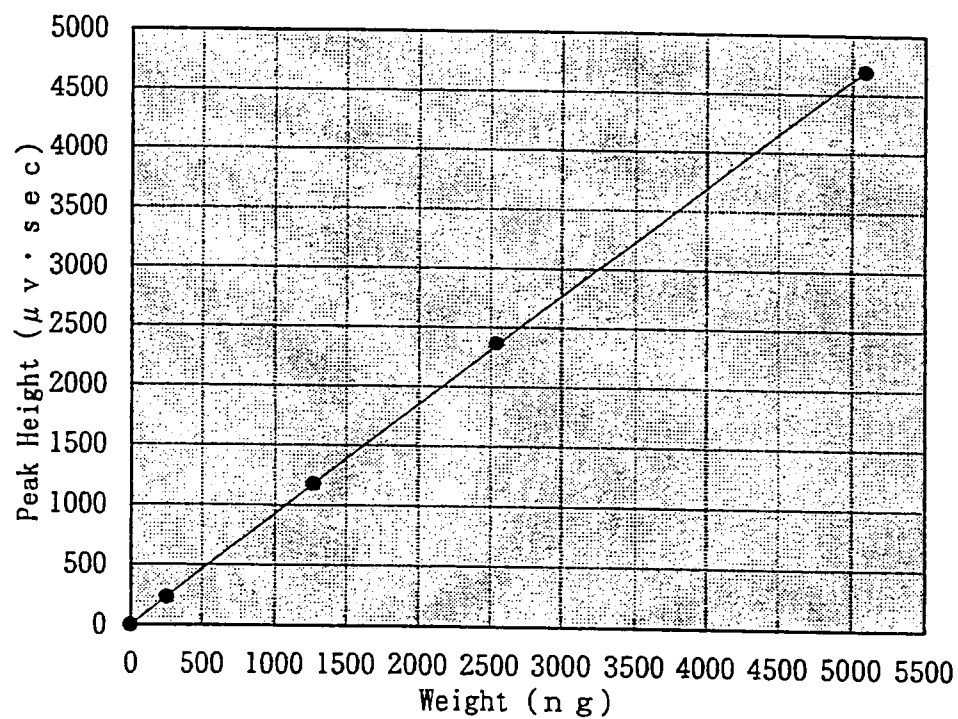


Figure 2 Representative Chromatograms

(1) Standard 50.90 mg/L

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=62 クロマト=1:970225.C12 97/02/25 15:57:05

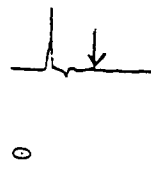


\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.286	13300	2365			100	
TOTAL			13300	2365			100	

(2) Control: Hour 0

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=64 クロマト=1:970225.C14 97/02/25 16:18:00



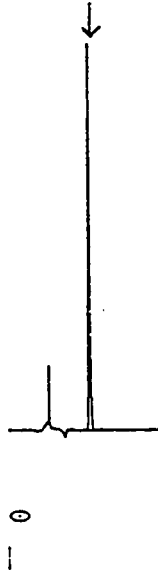
\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.137	444	244			100	
TOTAL			444	244			100	

Figure 2 Continued

(3) 100 mg/L nominal; Hour 0

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=65 クロマト=1:970225.C15 97/02/25 16:28:27

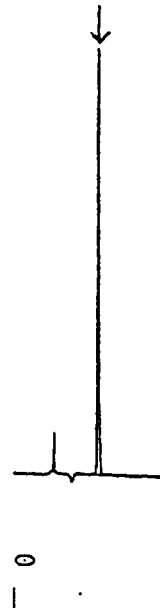


\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.089	781	335			5.7666	
	2	4.285	12767	2272			94.2333	
TOTAL			13549	2607			100	

(4) 320 mg/L nominal; Hour 0

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=67 クロマト=1:970225.C17 97/02/25 16:49:22



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	4.281	14134	2508			100	
TOTAL			14134	2508			100	

Figure 2 Continued

(5) 1000mg/L nominal; Hour 0

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=69 クロマト=1:970225.C19 97/02/25 17:10:17



\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2	4.283	16470	2907			100	
TOTAL			16470	2907			100	

Figure 2 Continued

(6) Standard 50.90 mg/L

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=14 クロマト=1:970228.C04 97/02/28 14:49:12

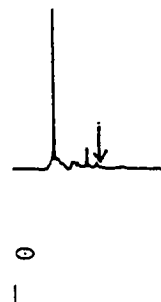


\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	3.042	436	22			3.1767	
	3	4.292	13277	2321			96.8233	
TOTAL			13713	2343			100	

(7) Control: Hour 72

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=16 クロマト=1:970228.C06 97/02/28 15:10:06



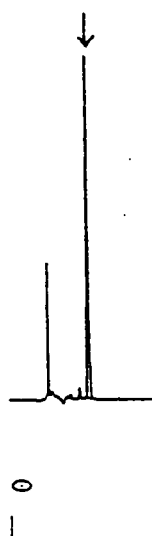
\*\* 定量計算結果 \*\*

CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK	IDNO	CONC	NAME
1	1	2.118	2306	881			81.3097	
	2	3.808	530	110			18.6903	
TOTAL			2836	991			100	

Figure 2 Continued

(8) 100 mg/L nominal; Hour 72

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=17 クロマト=1:970228.C07 97/02/28 15:20:34



** 定量計算結果 **				
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	1	2.072	1807	767
	3	4.291	11366	2005
TOTAL			13173	2772
			CONC	NAME
			13.7195	
			86.2805	
			100	

(9) 320mg/L nominal; Hour 72

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=19 クロマト=1:970228.C09 97/02/28 15:41:30

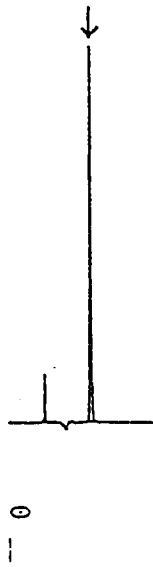


** 定量計算結果 **				
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	1	4.292	13462	2366
TOTAL			13462	2366
			CONC	NAME
			100	
			100	

Figure 2 Continued

(10) 1000mg/L nominal; Hour 72

CHROMATOPAC C-R4A CH=1 REPORT No.=21 97/02/28 16:02:23



** 定量計算結果 **				
CH	PKNO	TIME	AREA	HEIGHT
1	1	4.291	12450	2199
TOTAL			12450	2199
			CONC	NAME
			100	
			100	