

環境省殿

試 験 報 告 書

サリチル酸の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号:NMMP/E00/1010)

平成13年12月1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 : 環境省

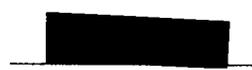
表題 : サリチル酸の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号 : NMMP/E00/1010

上記試験は環境省のGLP規則に従って実施したものである。

平成 13 年 12 月 07 日

運営管理者

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 : 環境省

表題 : サリチル酸の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号 : NMMP/E00/1010

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 13 年 5 月 16 日	平成 13 年 5 月 16 日
試験報告書監査	平成 13 年 11 月 19 日	平成 13 年 11 月 19 日

平成 13 年 12 月 7 日

信頼性保証業務担当者



試験実施概要

1. 表題 : サリチル酸の藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的 : サリチル酸について、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
名称 : 環境省
住所 : (〒100-8975) 東京都千代田区霞が関 1-2-2
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 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 : (〒103-0022) 東京都中央区日本橋室町 3-1-8 都ビル内
7. 試験施設
名称 : 株式会社 東レリサーチセンター 名古屋研究部
所在地 : (〒455-8502) 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			(平成 13 年 12 月 07 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 6 日)
試験担当者			(平成 13 年 12 月 06 日)

9. 試験期間: 試験開始日 平成 12 年 12 月 12 日
 暴露期間 平成 13 年 5 月 14 日 ~ 平成 13 年 5 月 17 日
 試験終了日 平成 13 年 12 月 07 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~~
~~エリサ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。~~ **訂正**

II. 変更項目, 変更時期及び変更理由

頁(行)	変更前	変更後	変更時期	変更理由
P.5 (下から4行)	<p>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。</p>	<p>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あるいは当社研究部の査察・監査のもとに外部保管施設である株式会社ワンビシアーカイブズに保管する。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。</p>	2002年7月	<p>今後、当研究部試資料保管施設の保管容量が不足するため、外部保管施設である株式会社ワンビシアーカイブズを利用する。</p>

目 次

	頁
要 旨.....	7
1 被験物質.....	9
1.1 名称、構造式および物理化学的性状.....	9
1.2 供試試料.....	9
1.3 被験物質の確認、保管方法および保管条件下での安定性.....	9
2 供試生物.....	10
3 試験方法.....	10
3.1 試験条件.....	10
3.2 培地.....	10
3.3 試験容器、藻類培養試験装置および機器.....	10
3.4 試験濃度の設定.....	11
3.5 試験液の調製.....	11
3.6 試験液の分析.....	11
3.7 試験操作.....	11
4 結果の算出.....	12
4.1 藻類生長曲線.....	12
4.2 藻類生長阻害濃度の算出.....	12
4.3 無影響濃度(NOEC)の算出.....	13
4.4 使用した統計手法.....	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 藻類生長曲線.....	14
5.4 生長阻害濃度 (EC50) および無影響濃度 (NOEC).....	14
5.5 温度および pH.....	15
Table 1～7.....	16～22
Figure 1～3.....	23～25
添付資料－1 試験液の分析方法.....	26

要 旨

試験委託者

環境省

表 題サリチル酸の藻類(*Selenastrum capricornutum*)に対する生長阻害試験試験番号

NMMP/E00/1010

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 : サリチル酸
- 2) 培養方式 : 振とう培養 (100rpm)
- 3) 供試生物種 : *Selenastrum capricornutum* (ATCC-22662)
- 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 : 4000 ~ 5000 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、5.31mg/L、9.56mg/L、17.2mg/L、30.9mg/L、55.6mg/L
および100.0mg/L (公比:1.8)
- 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
EbC50(0-72) = 40.8mg/L (95%信頼区間:38.8mg/L~43.0mg/L)
無影響濃度(NOEC(面積法 0-72)) = 17.2mg/L

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度

ErC50(24-48) = 52.5mg/L (95%信頼区間:49.4mg/L~55.9mg/L)

無影響濃度(NOEC(速度法 24-48)) = 30.9mg/L

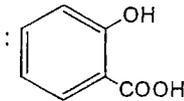
ErC50(24-72) = 67.4mg/L (95%信頼区間:62.7mg/L~73.1mg/L)

無影響濃度(NOEC(速度法 24-72)) = 30.9mg/L

(上記濃度は、全て設定濃度に基づく値)

1 被験物質

1.1 名称、構造式および物理化学的性状

名称	: サリチル酸
	別名 2-ヒドロキシ安息香酸、識別符号: SCA、CAS: 69-72-7
構造式	: 
分子式	: C ₇ H ₆ O ₃
分子量	: 138.12
融点	: 158°C
沸点	: 211°C/ 20mmHg
水への溶解度	: 2240mg/L(25°C)
オクタノール/水 分配係数(logP)	: 2.26
pKa	: 2.97
蒸気圧	: 8.2E-5 mmHg(25°C)

[上記の数値は、次のデータベースから引用した]

TOXNET	: National Library of Medicine (Toxicology Data Network)
ICSC	: International Chemical Safety Cards
SRC	: SRC PhysProp Database (Syracuse Research Corporation)

1.2 供試試料

純度	: 99.8%
ロット番号	: GI01
供給者	: XXXXXXXXXX
供給量	: 25g × 4本
入手日	: 平成12年10月16日
外観	: 白色針状結晶

1.3 被験物質の確認、保管方法および保管条件下での安定性

1) 保管方法

被験物質は試料保管冷蔵庫で光を遮断して保管した。

2) 被験物質の確認および保管条件下での安定性

入手した被験物質について赤外吸収スペクトル、NMRスペクトルの測定および高速液体クロマトグラフ分析を行い、被験物質の構造と矛盾が認められないことおよび純度を確認した。試験終了時にも同様に測定・分析し、試験開始前に測定・分析したスペクトルおよびクロマトグラムと比較した結果、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 ATCC-22662 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。

基準物質(重クロム酸カリウム、試薬特級)による 72 時間の生長阻害濃度 (EbC50)は、0.41 mg/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。培養後、顕微鏡観察を行ない変形や異常な細胞が現れていないことを確認した。

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、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 °C
- 3) 暴露期間 : 72 時間
- 4) 試験液量 : 100 mL (OECD 培地)
- 5) 照明 : 4000~5000 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 カスタニーLAB pHメーター F-22

粒子計数装置	: コールター社 コールターZ1
粒子計数装置用電解液	: アイソトンII
温度計	: アルコール温度計
照度計	: 東京光電(株) デジタル照度計 ANA-F12

3.4 試験濃度の設定

本試験の実施に先立って予備試験を行い、その結果を参考にして、本試験では公比 1.8で、5.31mg/L、9.56mg/L、17.2mg/L、30.9mg/L、55.6mg/L および 100.0mg/L の 6 段階の濃度区を設定した。

3.5 試験液の調製

培地に被験物質を溶解して 100mg/L 溶液とし、これをろ過滅菌して被験物質原液とした。各試験液はろ過滅菌した培地に被験物質原液を加えることにより調製した。濃度区および対照区毎に4個の試験容器を用いた。このうち1個は pH 測定用とし、試験液の分析や細胞数の計数には用いなかった。対照区には培地を用いた。試験液は無色透明で、沈殿等は見られなかった。

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。

暴露開始時(菌体混合直前、0時間)は各濃度区3連の試験容器から試験液を等量ずつ採取し分析した。暴露終了時(72時間)は各濃度区3連の試験容器から試験液を等量ずつ採取し混合後、遠心分離(2000rpm、23℃、15分)により藻体を除去してから分析した。

分析法の詳細は添付資料-1(p.26)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 ± 2 °Cの培養装置に設置して試験を開始し、24、48 および 72 時間後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~1.0mL を採取し、電解液(アイソトン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 連の他に用意した予備1本についてのみ測定し、各濃度区の暴露開始時の pH とした。終了時には各濃度区の 3 連のうち1本(細胞数に2倍以上の差異が認められた濃度区では 3 連全て)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 (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。

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

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 値から Probit 法により EbC50 (0-72) 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 (ErC50)

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低下百分率(I_m)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(24-48)、ErC50(24-72)およびその 95%信頼区間を算出した。

4.3 無影響濃度(NOEC)の算出

Bartlett の等分散検定、一元配置分散分析(ANOVA)および Dunnett の多重比較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。

4.4 使用した統計手法

Probit 法、Bartlett の等分散検定、ANOVA および Dunnett 法はいずれも吉岡義正 大分大学教育学部教授により生態影響試験の EC50,LC50,NOEC を計算するために開発されたプログラム[EcoTox-Statics(Version 1.1)]を用いた。

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

なし。

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 6.33~96.1mg/L であり、暴露 72 時間の被験物質濃度は 5.33~91.0mg/L であった。

設定濃度 (5.31~100.0mg/L) に対する割合は、暴露開始時が 94.2~119.2%、暴露 72 時間が 90.9~102.0% であった。 [Table 2 (p.17)]

暴露開始時の実測濃度が設定濃度の±20%以内であったため、試験結果の算出には設定濃度を用いた。

5.3 藻類生長曲線

1) 対照区における細胞濃度は 72 時間の培養で 229倍に増殖し、試験条件下で正常な生長を示した。

2) 最低濃度区(5.31mg/L)では 72 時間の培養で 228倍に増殖し、対照区と同程度の生長を示した。

3) 最高濃度区(100.0mg/L)では 72 時間の培養で 2.2倍の増殖であった。増殖は僅かであり、大幅な生長阻害が見られた。

4) 上記以外の4濃度区(9.56mg/L、17.2mg/L、30.9mg/L、55.6mg/L)では 72 時間の培養で 31.1~241倍の増殖であった。 [Table 3 (p.18), Figure 1 (p.23)]

5.4 生長阻害濃度 (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(0-72)は 40.8mg/L であり、その 95%信頼区間は 38.8mg/L~43.0mg/L であった。

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、17.2mg/L (NOEC(面積法 0-72)) であった。 [Table 4(p.19), Table 5(p.20), Figure 2(p.24)]

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度 (ErC50)

ErC50(24-48)と ErC50(24-72)は、それぞれ 52.5mg/L、67.4mg/L であり、それらの 95%信頼区間はそれぞれ 49.4mg/L~55.9mg/L、62.7mg/L~73.1mg/L であった。

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、それぞれ 30.9mg/L(NOEC(速度法 24-48))、30.9mg/L(NOEC(速度法 24-72))であった。

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

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 23.5~24.2℃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 4.2~7.4 であり、試験終了時が 4.5~7.7 であった。

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

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. Measured Concentrations of Salicylic acid During a 72-Hour Exposure of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			
	0 Hour	Percent of Nominal	72 Hour	Percent of Nominal
Control	<0.008	—	<0.008	—
5.31	6.33	119.2	5.33	100.4
9.56	10.8	113.0	9.75	102.0
17.2	18.5	107.6	16.4	95.3
30.9	29.1	94.2	28.1	90.9
55.6	54.4	97.8	51.3	92.3
100.0	96.1	96.1	91.0	91.0

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	6.3	66.3	222.1
	2	1.00	5.9	63.1	234.6
	3	1.00	6.0	67.9	231.6
	Average	1.00	6.1	65.7	229.4
	S.D.	0.00	0.23	2.45	6.53
5.31	1	1.00	5.9	67.6	230.0
	2	1.00	6.2	67.7	230.2
	3	1.00	6.7	62.9	222.6
	Average	1.00	6.3	66.1	227.6
	S.D.	0.00	0.41	2.72	4.33
9.56	1	1.00	6.0	64.2	210.0
	2	1.00	6.1	73.0	216.3
	3	1.00	5.7	65.9	239.7
	Average	1.00	5.9	67.7	222.0
	S.D.	0.00	0.22	4.69	15.64
17.2	1	1.00	5.2	69.2	239.5
	2	1.00	6.0	69.4	233.7
	3	1.00	5.5	67.2	248.5
	Average	1.00	5.6	68.6	240.6
	S.D.	0.00	0.41	1.22	7.47
30.9	1	1.00	4.8	63.3	216.5
	2	1.00	4.7	57.9	204.4
	3	1.00	4.5	58.8	206.5
	Average	1.00	4.7	60.0	209.1
	S.D.	0.00	0.16	2.88	6.49
55.6	1	1.00	4.2	9.4	33.7
	2	1.00	4.2	13.3	34.8
	3	1.00	4.2	10.2	24.7
	Average	1.00	4.2	11.0	31.1
	S.D.	0.00	0.01	2.09	5.52
100.0	1	1.00	1.0	1.3	1.8
	2	1.00	0.9	1.2	2.7
	3	1.00	0.9	0.9	2.2
	Average	1.00	0.9	1.1	2.2
	S.D.	0.00	0.06	0.19	0.45

Each value represents the mean of three sample counts.

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)	Im(24-48h)	μ (24-72h)	Im(24-72h)
Control	1	4347	-	0.0980	-	0.0742	-
	2	4409		0.0991		0.0769	
	3	4493		0.1010		0.0761	
	Average	4416		0.0994		0.0757	
5.31	1	4464	0.21	0.1017	1.13	0.0764	1.07
	2	4475		0.0997		0.0753	
	3	4282		0.0934		0.0730	
	Average	4407		0.0982		0.0749	
9.56	1	4145	1.02	0.0985	-1.96	0.0740	0.44
	2	4435		0.1034		0.0743	
	3	4535		0.1020		0.0779	
	Average	4372		0.1013		0.0754	
17.2	1	4599	-4.29	0.1082	-5.50	0.0800	-3.74
	2	4552		0.1022		0.0764	
	3	4667		0.1040		0.0793	
	Average	4606		0.1048		0.0786	
30.9	1	4173	9.38	0.1072	-6.94	0.0792	-4.52
	2	3895		0.1045		0.0785	
	3	3938		0.1070		0.0797	
	Average	4002		0.1063		0.0791	
55.6	1	669	84.67	0.0334	60.18	0.0434	45.24
	2	778		0.0482		0.0441	
	3	584		0.0370		0.0369	
	Average	677		0.0396		0.0415	
100.0	1	15	99.67	0.0110	91.77	0.0131	75.13
	2	20		0.0126		0.0241	
	3	9		0.0009		0.0193	
	Average	15		0.0082		0.0188	

Table 5. Calculated EC50 and NOEC

Based on IA value

	Calculated Value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
EbC50(0-72)	40.8	38.8 ~ 43.0
NOECb(0-72)	17.2	----

Based on Im value

	Calculated Value (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
ErC50(24-48)	52.5	49.4 ~ 55.9
NOECr(24-48)	30.9	----
ErC50(24-72)	67.4	62.7 ~ 73.1
NOECr(24-72)	30.9	----

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

Exposure Period (Hours)	Temperature (°C)
0	23.5
24	24.2
48	24.0
72	23.9
Average	23.9

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

Nominal Concentration (mg/L)	pH	
	0 Hour	72 Hour
Control	7.4	7.7
5.31	7.4	7.7
9.56	7.3	7.7
17.2	7.3	7.7
30.9	7.3	7.7
55.6	7.1	7.6
100.0	4.2	4.5

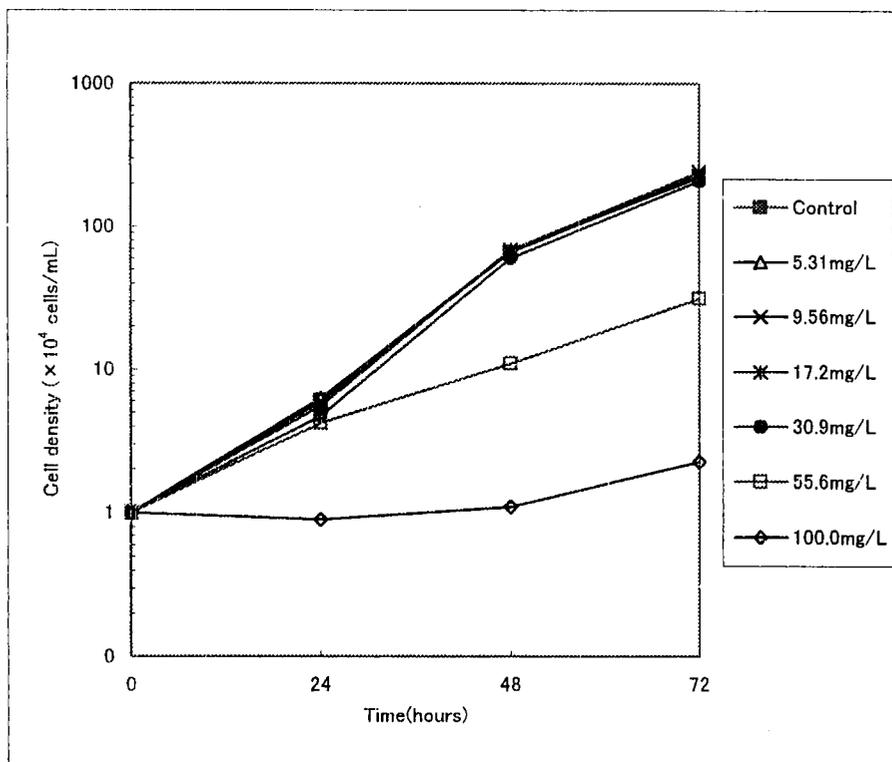
Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

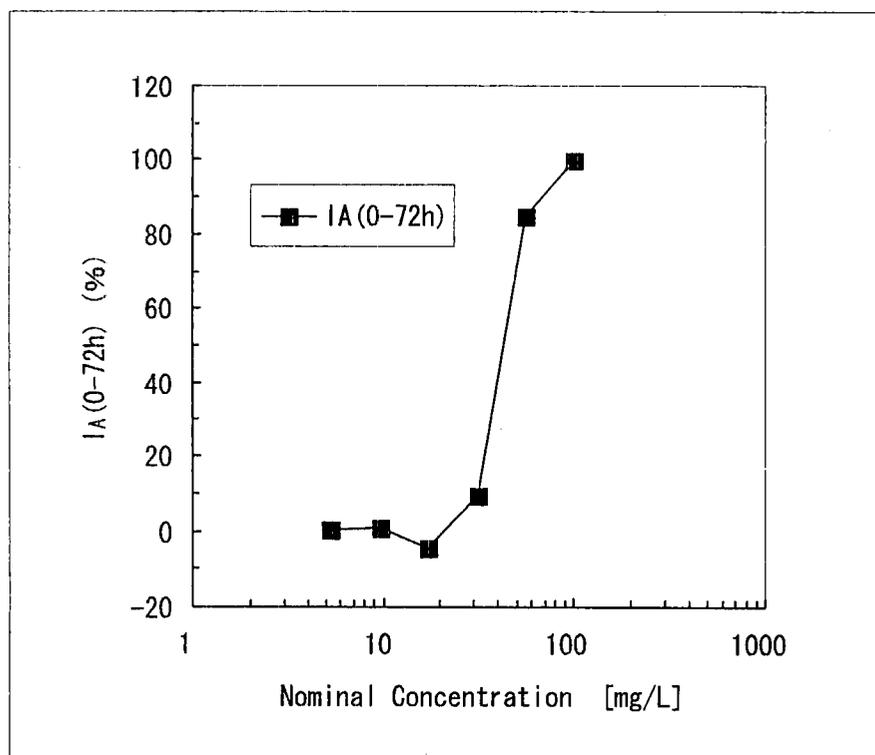
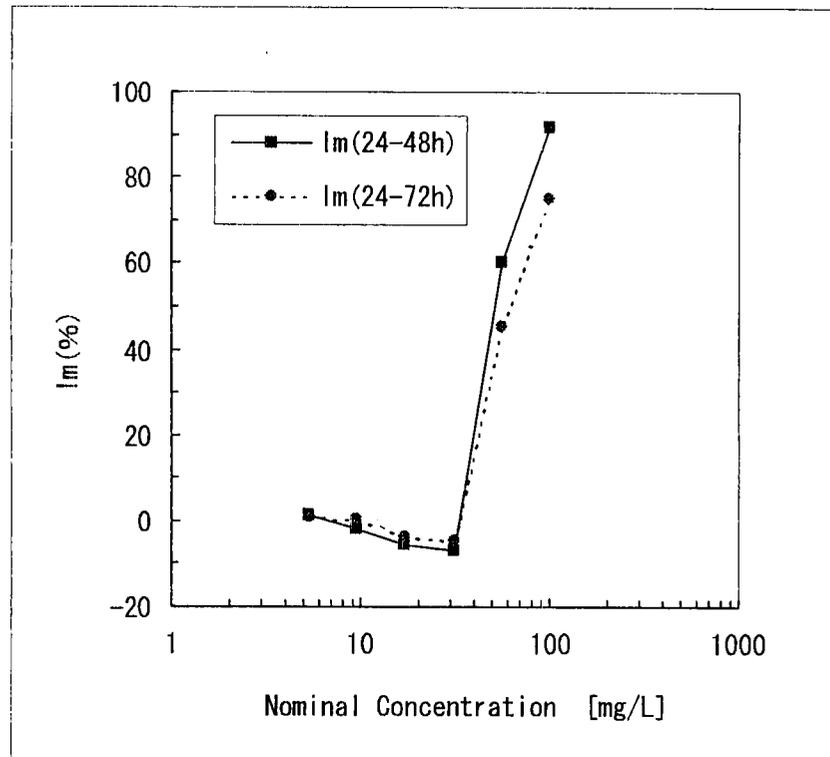
Figure 2 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_A value

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

添付資料－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

暴露開始時は3連の試験容器より試験液各 0.04~2.0mL をバイアル瓶に採取する。
暴露終了時は3連の試験容器より試験液各 1.0~2.0mL を採取し、合わせて遠心分離する。
その上澄み液 1.0~2.0mL 程度をバイアル瓶に採取する。
試験液の濃度が高い場合は蒸留水で希釈する。
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	: Mightysil RP-18、2.0mm φ × 100mm
カラム温度	: 40°C
検出波長	: 306nm
注入量	: 20 μL
移動相	: 10%酢酸/アセトニトリル = 75/25
流量	: 0.2mL/min

3. 検量線

定量限界付近から予想測定濃度が含まれる5ポイントの標準液を測定し、直線性を確認した。

[Figure 1(p.28)]

測定日毎に 2.0mg/L の標準溶液を測定して、その面積値を用いて検量線を作成した。

4. 添加回収率

試験培地に標準液の一定量を添加して、回収率を求めた。

サリチル酸 1.0mg/L の回収率は101.8%であった。

5. クロマトグラム

代表的ないくつかのクロマトグラムを示した。

[Figure 2(p.29~p.33)]

Figure 1 Calibration Curve of Salicylic acid by HPLC Analysis

Input Data

No.	Concentration (mg/L)	Peak Area (mAU*sec.)
1	0.01	1.6455
2	0.05	5.7001
3	0.1	11.3196
4	1.0	120.5165
5	2.0	240.0043

$$X(\text{Concentration}) = Y(\text{Peak Area}) / 120.089$$

$$r^2 = 1.0000$$

r^2 : coefficient of correlation

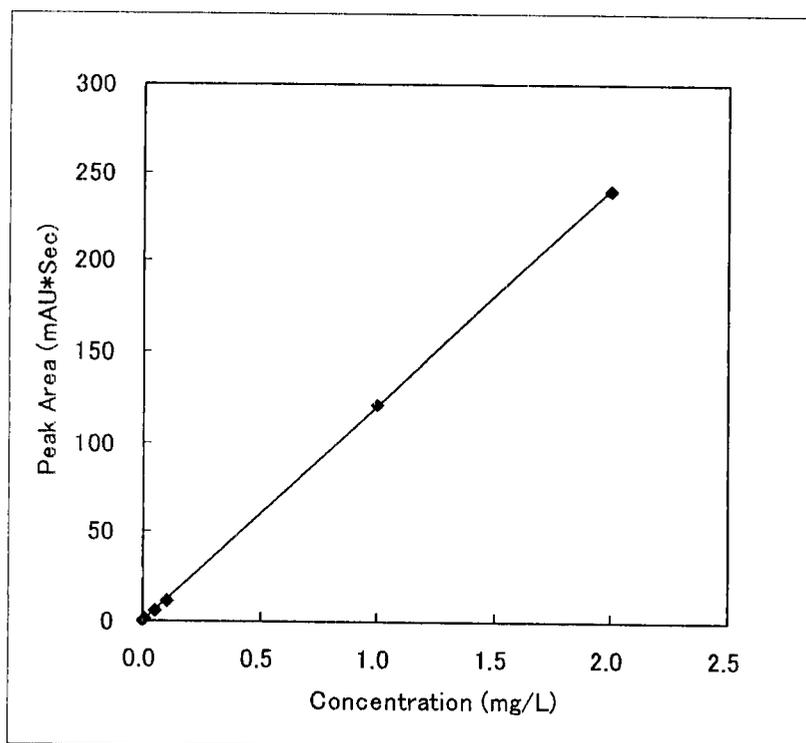
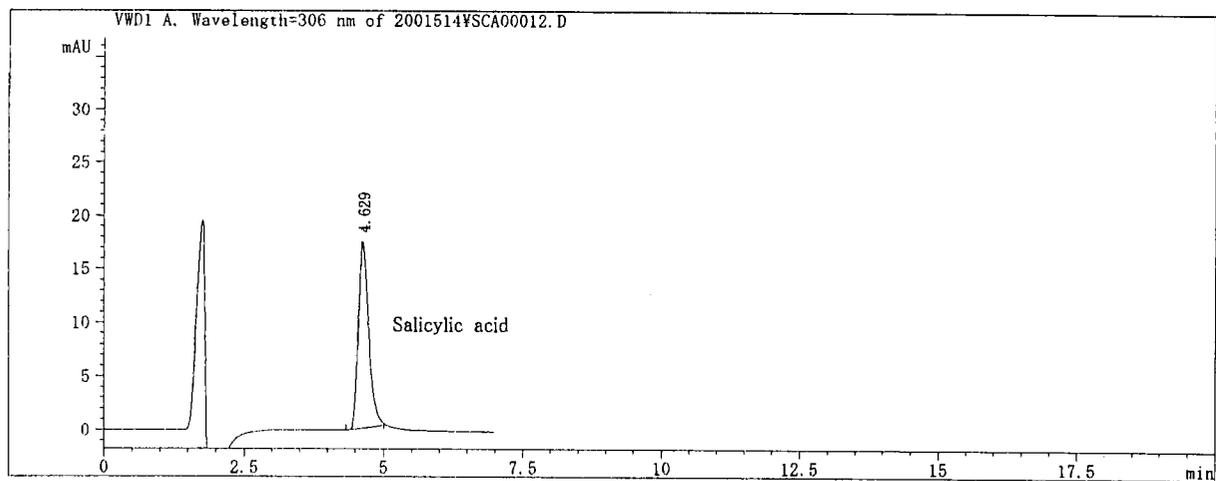


Figure 2 Representative chromatograms

(1) Standard 2.0 mg/L ; 0h



(2) Standard 2.0 mg/L ; 72h

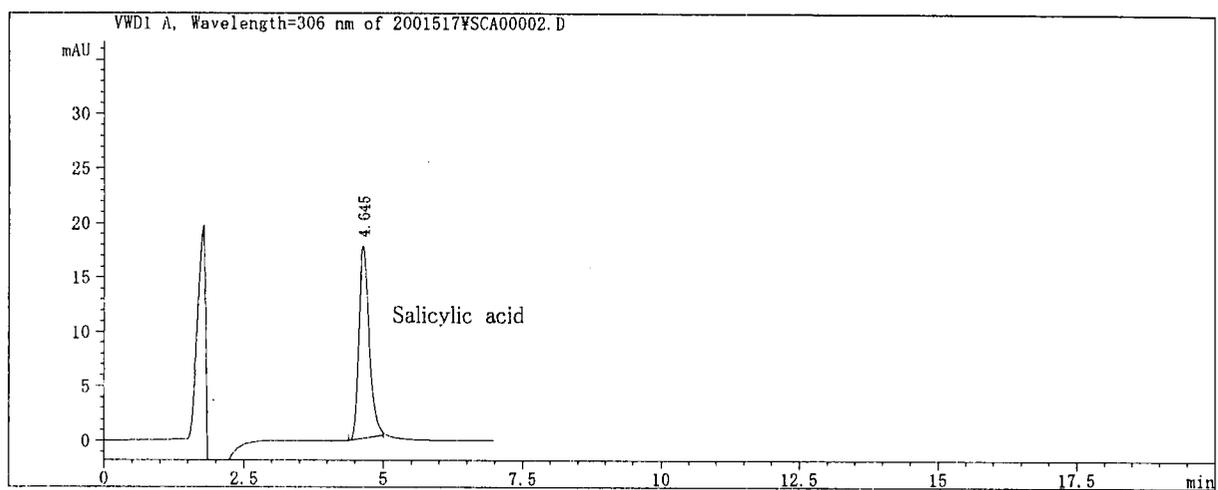
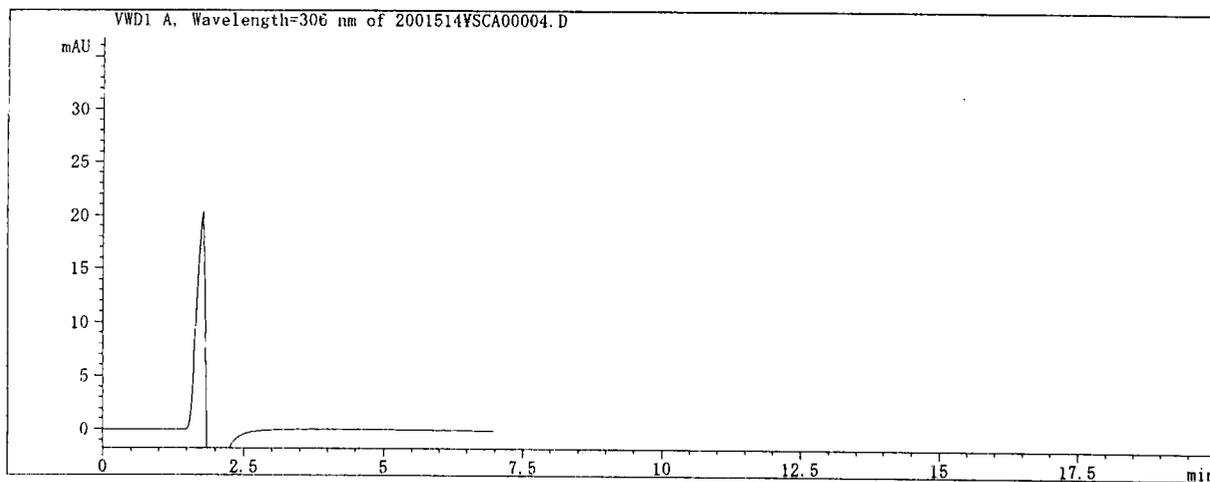


Figure 2 Continued

(3) Control ; 0 h



(4) Control; 72 h

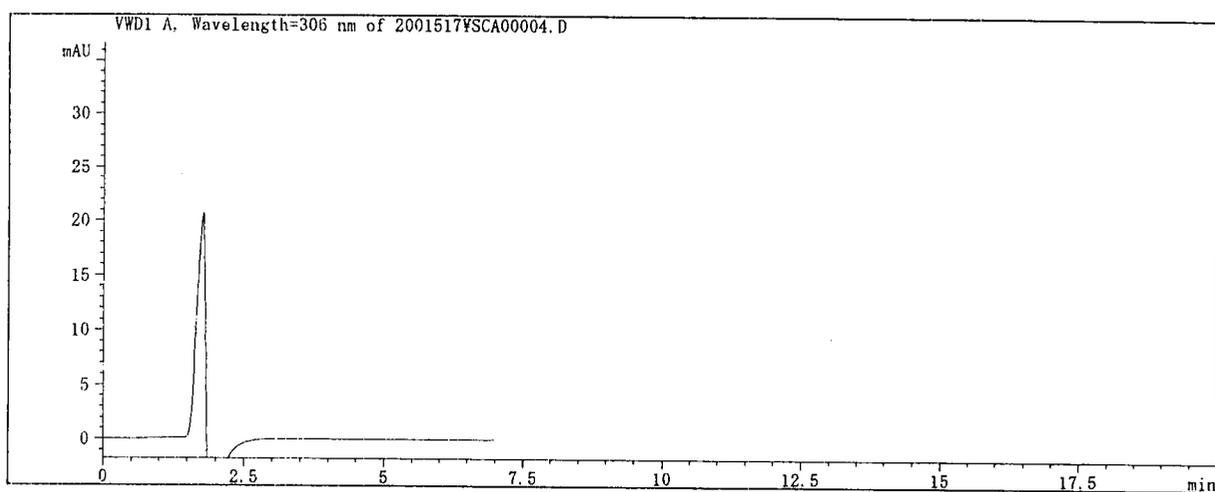
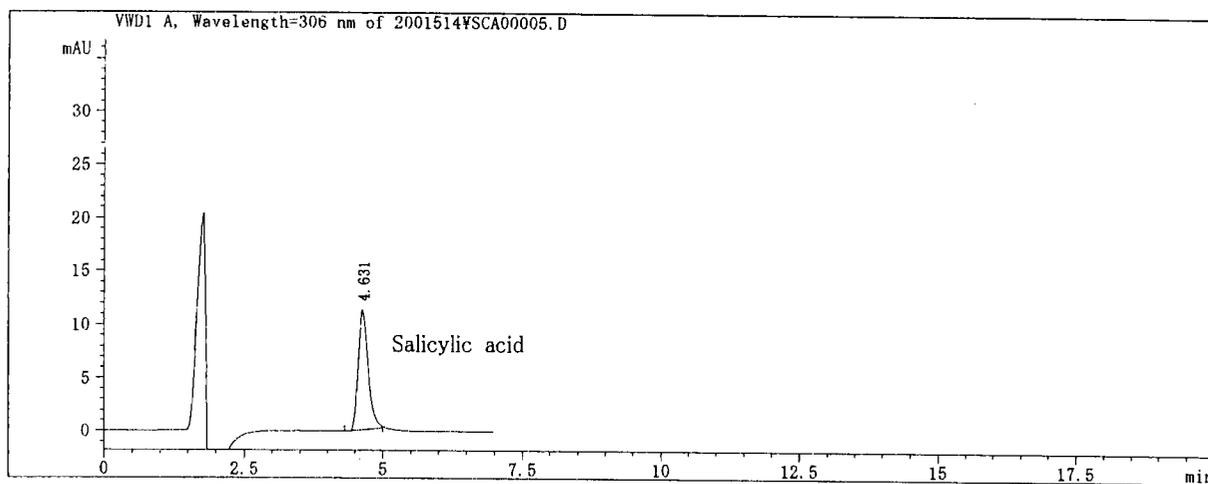


Figure 2 Continued

(5) 5.31 mg/L nominal; 0 h (diluted to 1.06 mg/L)



(6) 5.31 mg/L nominal; 72 h (diluted to 1.06 mg/L)

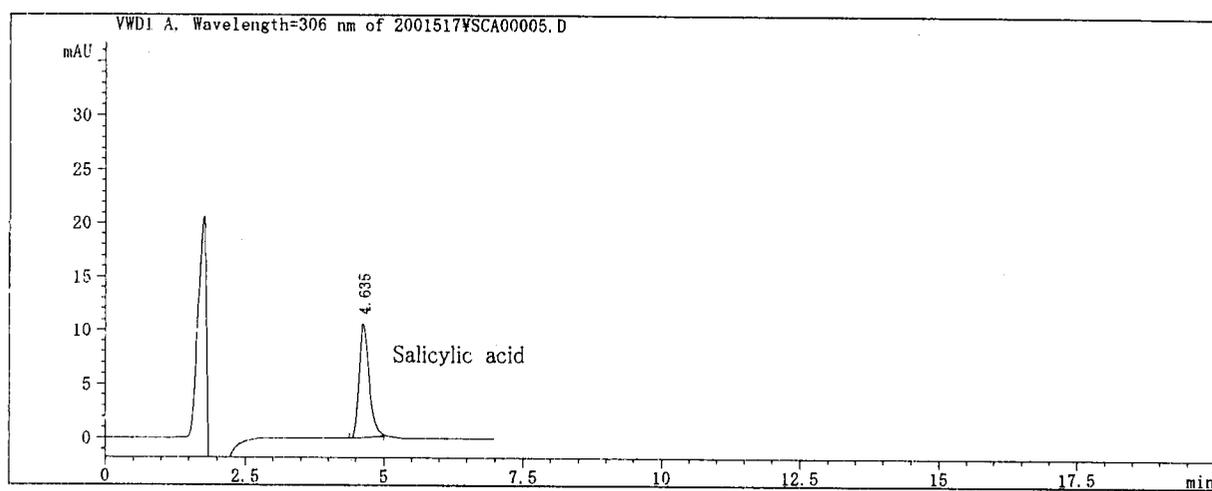
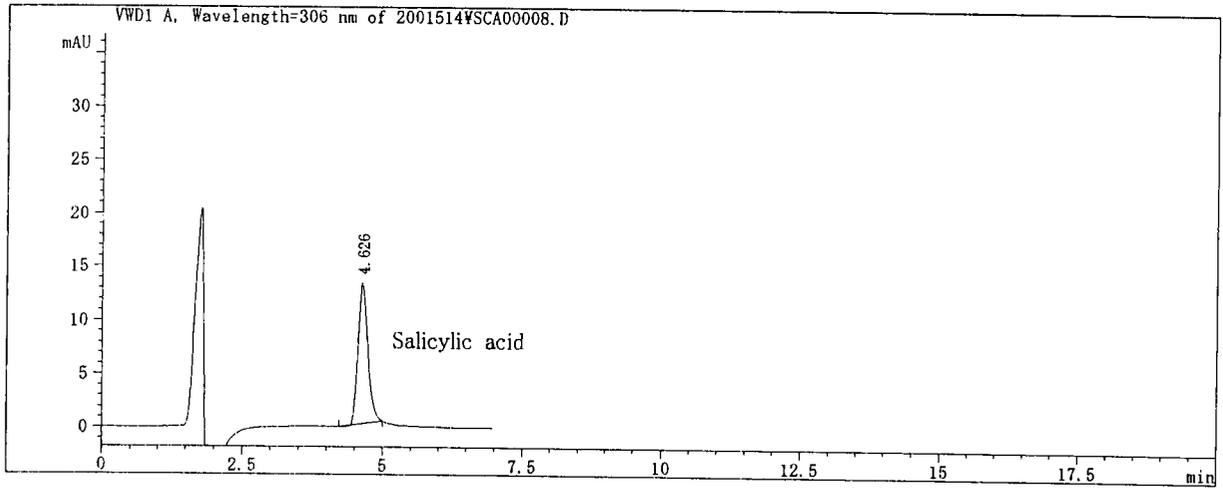


Figure 2 Continued

(7) 30.9 mg/L nominal; 0 h (diluted to 1.55 mg/L)



(8) 30.9 mg/L nominal; 72 h (diluted to 1.55 mg/L)

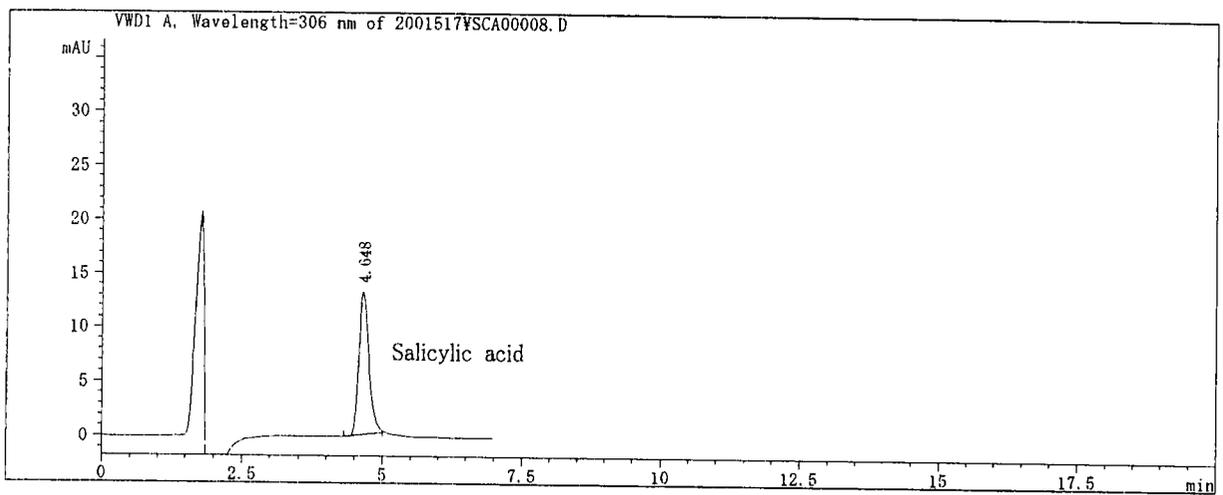
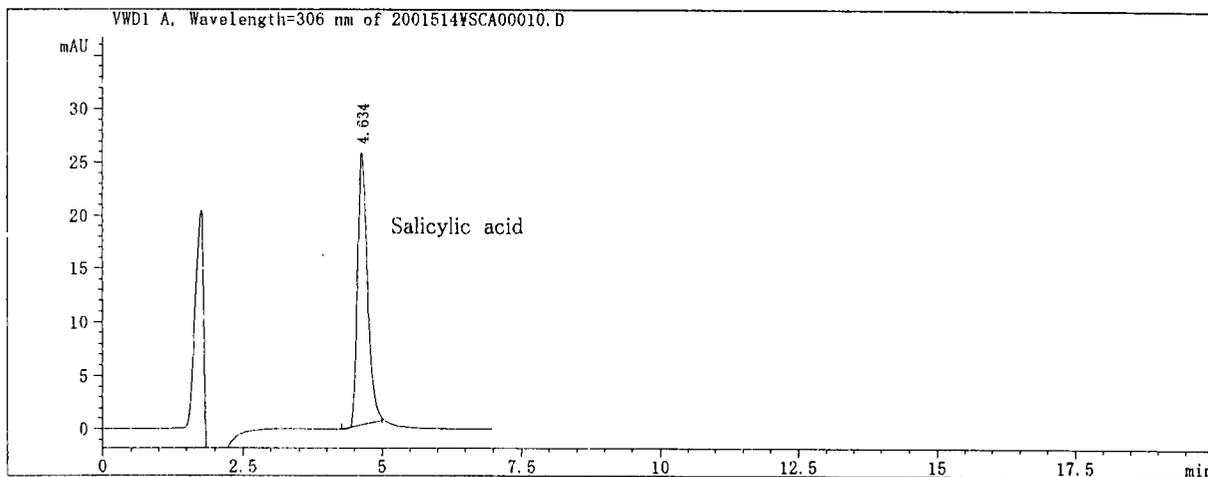


Figure 2 Continued

(9) 100.0 mg/L nominal; 0 h (diluted to 3.00 mg/L)



(10) 100.0 mg/L nominal; 72 h (diluted to 3.00 mg/L)

