

環境庁殿

試 験 報 告 書

ホルムアミドの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号：NO1998-生05)

1999年 3月30日作成

株式会社ク  

陳 述 書

株式会社クレハ分析センター

試験委託者： 環境庁

表題： ホルムアミドの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： NO1998-生05

上記試験は環境庁のG L P規則に従って実施したものである。

1999年 3月30日

運営管理者

信 頼 性 保 証 証 明

株式会社クレハ分析センター

試験委託者： 環境庁

表題： ホルムアミドの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： NO1998-生05

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	運営管理者への 報告日	試験責任者への 報告日
試験実施状況査察	1999年1月26日	1999年1月26日	1999年1月26日
	1999年1月29日	1999年1月29日	1999年1月29日
試験報告書監査	1999年3月26日	1999年3月26日	1999年3月26日

1999年3月30日

信頼性保証業務担当者：



試 験 実 施 概 要

1. 表題： ホルムアミドの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的：ホルムアミドについて、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)に準拠して実施する。
4. 適用GLP：本試験は環境庁のGLP規則に準拠した。
5. 試験委託者
名称： 環境庁
住所： 〒100-8975 東京都千代田区霞ヶ関一丁目2-2
委託責任者：環境庁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 XXXXXXXXXX
6. 試験受託者
名称： 株式会社クレハ分析センター
所在地： 〒974-8686 福島県いわき市錦町落合16番地
7. 試験施設：
名称： 株式会社クレハ分析センター
所在地： 〒974-8686 福島県いわき市錦町落合16番地

8. 試験関係者：

試験責任者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 3月30日）
試験責任者（理化学）	■■■■■	■■■■■	（1999年 3月30日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 3月30日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 3月30日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 3月30日）
試験担当者（生物）	■■■■■	■■■■■	（1999年 3月30日）
試験担当者（理化学）	■■■■■	■■■■■	（1999年 3月30日）

9. 試験期間： 試験開始日 1999年 1月 4日
試験終了日 1999年 3月30日
暴露期間 1999年 1月26日～

1999年 1月29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、株式会社クレハ分析センター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上決定する。

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、藻類培養装置および機器等	9
3. 4 試験濃度の設定	9
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	10
4. 1 藻類生長曲線	10
4. 2 藻類生長阻害濃度の算出	10
4. 3 無影響濃度(NOEC)の算出	11
5 結果および考察	12
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	12
5. 2 試験液中の被験物質濃度	12
5. 3 藻類成長曲線	12
5. 4 半数影響濃度	12
5. 5 温度およびpH	12
Table 1～7	13～17
Figure 1～2	18～19
付属資料－1 試験液の分析	

要 旨

試験委託者 環境庁

表 題 ホルムアミドの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号 NO1998-生05

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: ホルムアミド
- 2) 培養方式: 振とう培養 (100rpm)
- 3) 供試生物種: *Selenastrum capricornutum* (ATCC 22662)
- 4) 温度: $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 5) 暴露期間: 72時間
- 6) 試験液量: 100mL (OECD培地)
- 7) 照明: 4000~5000 lux (連続照明)
- 8) 初期細胞濃度: $1 \times 10^4 \text{ cells/mL}$
- 9) 試験濃度: 対照区、1000、320、100、32、10、3.2、1.0 mg/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
EbC50 (0-72 h) : 1000 mg/L 以上
無影響濃度 (NOECb) : 10 mg/L
- 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度
ErC50 (24-48 h) : 1000 mg/L 以上
無影響濃度 (NOECr) : 1000 mg/L

ErC50 (24-72 h) : 1000 mg/L 以上
無影響濃度 (NOECr) : 1000 mg/L

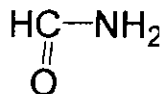
1 被験物質

1. 1 名称、構造式および物理化学的性状

名称：ホルムアミド

(CAS : 75-12-7)

構造式：



分子式： HCONH_2

分子量： 45.04

安定性： 安定

1-オクタノール／水分配係数 (log P) : -1.51

水への溶解度： 水に可溶

蒸気圧： 1 mmHg (21℃)

1. 2 供試試料

購入先：

入手先：

入手日： 1998年11月20日

ロット番号： ACH6014

外観： 無色澄明の液体

純度及び不純物： 99.6 %

1. 3 被験物質の確認および保管条件下での安定性

被験物質は当施設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認められなかったことより被験物質は当施設の冷蔵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、当施設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、0.84 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 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： 振とう培養（100 rpm）
- 2) 温度： 23 ± 2℃
- 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) 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用いた。

[Table 1 (p.13)]

3. 3 試験容器、藻類培養試験装置および機器等

- 試験容器： 300 mL 容ガラス製三角フラスコ
- 藻類培養試験装置： 藻類試験培養器（宮本理研工業 GT-40S）
- 光学顕微鏡： オリンパス倒立培養顕微鏡（IMT413 型）
- 細胞計測器： 血球計算盤
- pH 計： 東亜電波工業（HM-30V）
- 温度計： ガラス水銀温度計
- 照度計： 柴田科学器械工業（ANA-F9 型）

3. 4 試験濃度の設定

予備試験の結果を基に、1000, 320, 100, 32, 10, 3.2, 1.0 mg/L の濃度区および対照区を設定した。

3. 5 試験液の調製

試験培地にホルムアミドを加え10000 mg/Lの原液を作製した。この原液をオートクレーブ滅菌した培地に添加し、各濃度区の試験液を調製した。（原液は濾過滅菌したものをを用いた。）

3. 6 試験液の分析

開始時および72時間後に各試験区の容器より試験水10 mLを採取し、HPLCにより分析した。試験液の分析に際しては、試料測定毎に標準溶液の測定を行い、そのピーク高さから定量した。詳細は付属資料一1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 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、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2.0 mLを採取し、その一部を血球計算盤で顕微鏡下で計測した。

試験液調製時のpHは3連の他に予備1本について測定し、各濃度区の暴露開始時のpHとし、終了時には3連全て測定した。試験期間中、培養装置内の温度、照度を少なくとも1日1回測定した。

4 結果の算出

4. 1 藻類生長曲線

試験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。

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

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。

$$I_A = (A_c - A_t) / A_c \times 100$$

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

生長の阻害百分率 (I_A) を濃度に対してプロットし、試験最高濃度においても阻害百分率が 50 % を越えないので $ErC50(0-72)$ は試験最高濃度以上とした。

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。

$$\mu = (\ln N_n - \ln N_1) / (t_n - t_1)$$

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を次の式により算出した。

$$I_m = (\mu_c - \mu_t) / \mu_c \times 100$$

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

平均生長速度の低下百分率 (I_m) を濃度に対してプロットし、試験最高濃度においても低下百分率が 50 % を越えないので $ErC50(24-48)$ 、 $ErC50(24-72)$ は試験最高濃度以上とした。

4. 3 無影響濃度 (NOEC) の算出

統計的手法 (等分散性検定および平均値の差の検定) 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。

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 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1.2～1050 mg/L（設定値1.0～1000 mg/L）であり、暴露72時間の被験物質濃度は1.2～1020 mg/L（設定値1.0～1000 mg/L）であった。（Table 2）

[Table 2 (p. 13)、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80倍以上に増殖し、試験条件下で正常な生長を示した。設定濃度1000 mg/L区でも生長は認められた。

[Table 3 (p. 14)、Figure 1 (p. 18)]

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（EbC50）

EbC50（0－72 h）は1000 mg/L以上であった。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（NOECb））は10 mg/Lであった。

[Table 4, 5 (p. 15, 16)、Figure 2 (P. 19)]

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度（ErC50）

ErC50（24－48 h）、ErC50（24－72 h）はそれぞれ1000 mg/L以上であった。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（NOECr））も、それぞれ1000 mg/Lであった。

[Table 4, 5 (p. 15, 16)]

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23.1℃であった。試験液のpHは暴露開始時が8.2～8.7であり、試験終了時が8.7～9.8であった。

[Table 6, 7 (p. 17)]

23.1℃

以上

修正あり

Table 1 OECD media

Nutrient salts	concentration (mg/L)
H ₃ BO ₃	0. 1 8 5
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0. 4 1 5
ZnCl ₂	0. 0 0 3
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0. 0 8
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0. 1
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0. 0 0 1 5
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0. 0 0 7
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0. 0 0 0 0 1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 8
NH ₄ Cl	1 5
KH ₂ PO ₄	1. 6
NaHCO ₃	5 0
MgCl ₂ ·6H ₂ O	1 2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 5

Table 2 Measured Concentrations During a 72-Hour Exposure to *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration mg/L	Measured Concentration(mg/L)			
	0 Hour mg/L	Percent of Nominal	72 Hour mg/L	Percent of Nominal
1000	1050	105	1020	102
320	336	105	331	103
100	107	107	103	103
32	33.9	106	33.7	105
10	10.5	106	10.5	105
3.2	3.5	109	3.5	109
1.0	1.2	120	1.2	120
Control	N.D	—	N.D	—

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration mg/L	No.	Cell Density (x10 ⁴ cells/mL)			
		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour
Control	1	1.00	5.50	25.75	86.25
	2	1.00	6.50	22.25	83.00
	3	1.00	6.50	26.50	81.75
	Average	1.00	6.17	24.83	83.67
	S.D.	-	0.58	2.27	2.32
1.0	1	1.00	5.75	27.25	80.75
	2	1.00	6.00	21.50	81.00
	3	1.00	5.00	23.75	86.00
	Average	1.00	5.58	24.17	82.58
	S.D.	-	0.52	2.90	2.96
3.2	1	1.00	6.00	25.50	77.00
	2	1.00	7.00	22.25	78.25
	3	1.00	5.50	25.25	81.75
	Average	1.00	6.17	24.33	79.00
	S.D.	-	0.76	1.81	2.46
10	1	1.00	5.75	20.75	77.25
	2	1.00	5.75	27.25	80.75
	3	1.00	5.25	20.50	78.75
	Average	1.00	5.58	22.83	78.92
	S.D.	-	0.29	3.83	1.76
32	1	1.00	5.75	21.00	74.75
	2	1.00	4.50	21.25	77.25
	3	1.00	5.50	20.00	76.50
	Average	1.00	5.25	20.75	76.17
	S.D.	-	0.66	0.66	1.28
100	1	1.00	5.50	22.75	73.50
	2	1.00	5.25	24.50	73.00
	3	1.00	4.75	21.50	67.50
	Average	1.00	5.17	22.92	71.33
	S.D.	-	0.38	1.51	3.33
320	1	1.00	4.50	22.25	62.25
	2	1.00	5.25	19.75	70.50
	3	1.00	4.75	22.50	69.25
	Average	1.00	4.83	21.50	67.33
	S.D.	-	0.38	1.52	4.45
1000	1	1.00	4.75	15.00	60.50
	2	1.00	4.50	24.50	64.50
	3	1.00	4.75	20.25	60.50
	Average	1.00	4.67	19.92	61.83
	S.D.	-	0.14	4.76	2.31

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Concentration mg/L		Area A(0-72h)	Inhibition (%) $I_A(0-72h)$	Rate $\mu(24-48)$	Inhibition (%) $I_m(24-48)$	Rate $\mu(24-72)$	Inhibition (%) $I_m(24-72)$
Control	1	1725	-2.2	0.0643	-10.8	0.0573	-5.4
	2	1626	3.7	0.0513	11.7	0.0531	2.4
	3	1713	-1.5	0.0586	-0.9	0.0527	3.0
	Average	1688	0.0	0.0580	0.0	0.0544	0.0
1.0	1	1701	-0.8	0.0648	-11.7	0.0550	-1.2
	2	1572	6.9	0.0532	8.4	0.0542	0.3
	3	1662	1.5	0.0649	-11.8	0.0593	-9.0
	Average	1645	2.6	0.0610	-5.0	0.0562	-3.3
3.2	1	1620	4.0	0.0603	-3.9	0.0532	2.2
	2	1581	6.3	0.0482	17.0	0.0503	7.5
	3	1659	1.7	0.0635	-9.4	0.0562	-3.4
	Average	1620	4.0	0.0573	1.3	0.0532	2.1
10	1	1503	11.0	0.0535	8.9	0.0541	0.5
	2	1701	-0.8	0.0648	-11.7	0.0550	-1.2
	3	1503	11.0	0.0568	2.2	0.0564	-3.7
	Average	1569	7.1	0.0584	-0.5	0.0552	-1.5
32	1	1479	12.4	0.0540	7.0	0.0534	1.7
	2	1485	12.0	0.0647	-11.4	0.0592	-8.9
	3	1470	12.9	0.0538	7.3	0.0548	-0.9
	Average	1478	12.4	0.0575	1.0	0.0558	-2.7
100	1	1500	11.1	0.0592	-1.9	0.0540	0.7
	2	1530	10.4	0.0642	-10.6	0.0548	-0.8
	3	1380	18.2	0.0629	-8.4	0.0553	-1.7
	Average	1470	12.9	0.0621	-7.0	0.0547	-0.6
320	1	1329	21.3	0.0666	-14.7	0.0547	-0.6
	2	1386	17.9	0.0552	4.9	0.0541	0.5
	3	1425	15.6	0.0648	-11.6	0.0558	-2.6
	Average	1380	18.3	0.0622	-7.2	0.0549	-0.9
1000	1	1140	32.5	0.0479	-7.2	0.0530	2.5
	2	1410	16.5	0.0706	17.5	0.0555	-2.0
	3	1266	25.0	0.0604	-21.6	0.0530	2.5
	Average	1272	24.6	0.0596	-4.1	0.0538	1.0

Concentration 10
Inhibition 修正あり

Table 5. Calculated EC50 and NOEC

Based on I_A value

	(mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
EbC50 (0-72h)	>1000	—
NOECb (0-72h)	10	—

Based on I_m value

	(mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
ErC50 (24-48h)	>1000	—
NOECr (24-48h)	1000	—
ErC50 (24-72h)	>1000	—
NOECr (24-72h)	1000	—

Table 6. Temperature In Algal Culture Cabinet

Temperature(°C)				
0 h	24 h	48 h	72 h	Average
23.2	23.1	23.2	23.1	23.1

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

Nominal Concentration (mg/L)		pH	
		0 Hour	72 Hour
Control	1	8.4	9.1
	2		8.7
	3		9.0
1.0	1	8.5	9.4
	2		9.1
	3		8.8
3.2	1	8.6	9.4
	2		8.9
	3		8.9
10	1	8.7	8.9
	2		9.8
	3		8.8
32	1	8.4	9.0
	2		8.7
	3		8.8
100	1	8.5	9.1
	2		9.0
	3		8.9
320	1	8.7	8.7
	2		8.8
	3		9.0
1000	1	8.2	9.0
	2		8.8
	3		8.8

Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

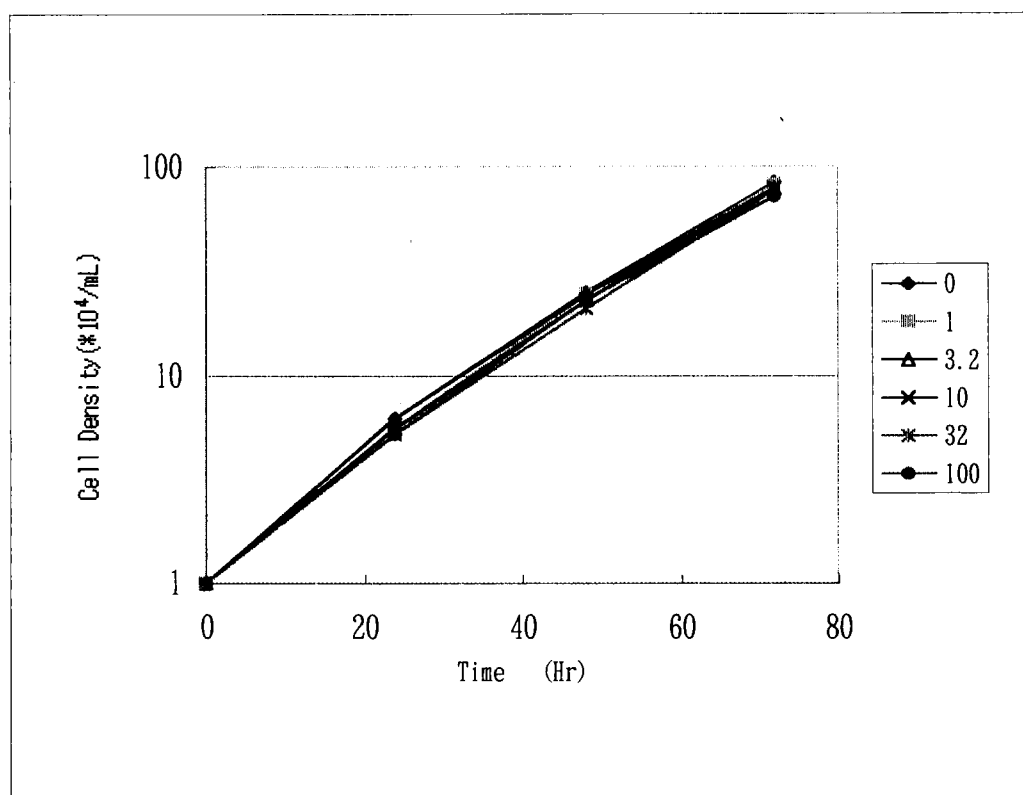
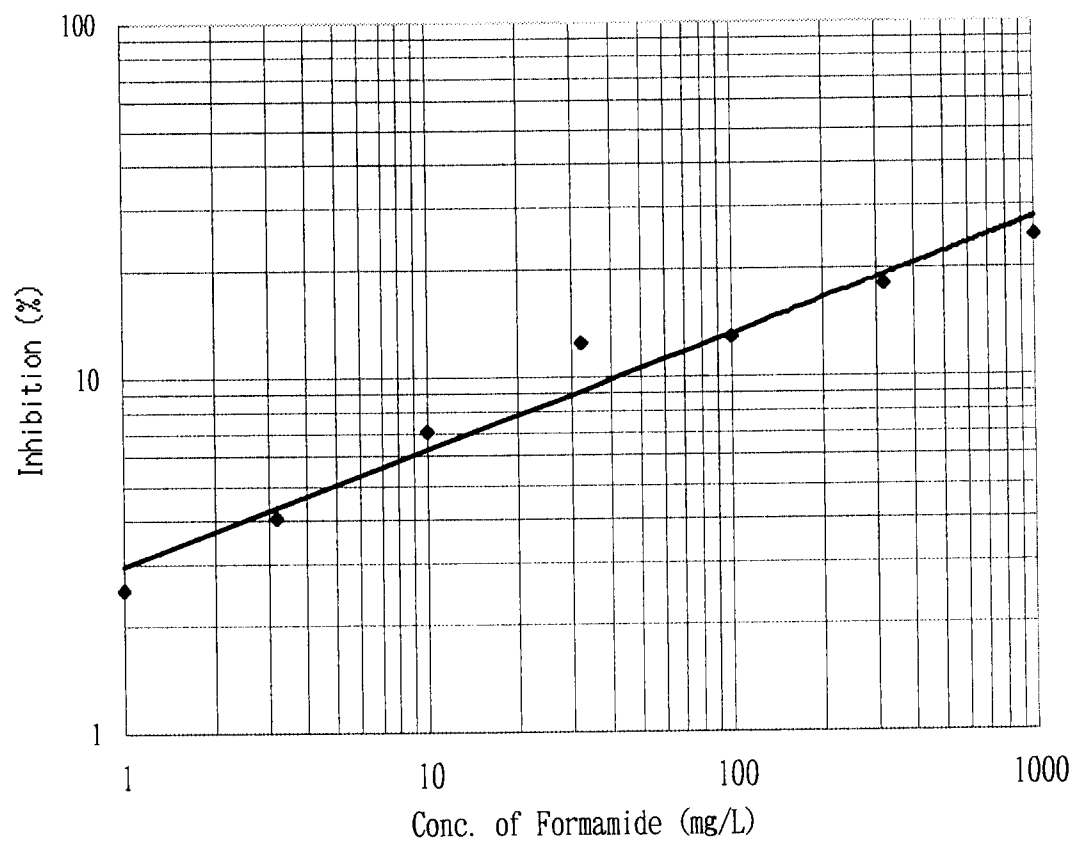


Figure 2 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_A value



付 属 資 料 - 1

試験液の分析方法

(全20頁)

ホルムアミドの分析法

(株)クレハ分析センター

1. 試料 : 試験液

化学名及び化学式

ホルムアミド

分子式

: H_3CON

化学式

: HCONH_2

分子量

: 45.04

物理的・化学的性質

性状

: 水に可溶

: 無色透明の液体

2. 分析法

1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ

: L-6000

日立製作所

検出器 (UV)

: L-4000又はL-4200

日立製作所

インテグレーター

: D-2000又はD-2500

日立製作所

メスフラスコ

: 100ml

マイクロピペッター

: 250、500、1000 μl

マイクロシリンジ

: 50 μl

2) 試薬

アセトニトリル

: 試薬 高速液体クロマトグラフ用 和光純薬 (株)

水

: 超純水 Milli-RX12 α Millipore

りん酸

: 試薬 特級

ホルムアミド

: 試薬 特級

3) ホルムアミド標準原液 (1000mg/ml)

ホルムアミド標準品の約0.1gを正秤し、容量100mlのメスフラスコに秤りとり、水を標線まで加える。

4) 高速液体クロマトグラフの操作条件

カラム

: Shim pack LCL-ODS

島津製作所

150mm \times 6mmID

溶離液

: アセトニトリル:水 (25:75)

+りん酸 (1lに対して0.7ml添加)

流量

: 1.0ml/min

検出器

: UV (210nm)

注入量

: 50 μl

5) 検量線の作製

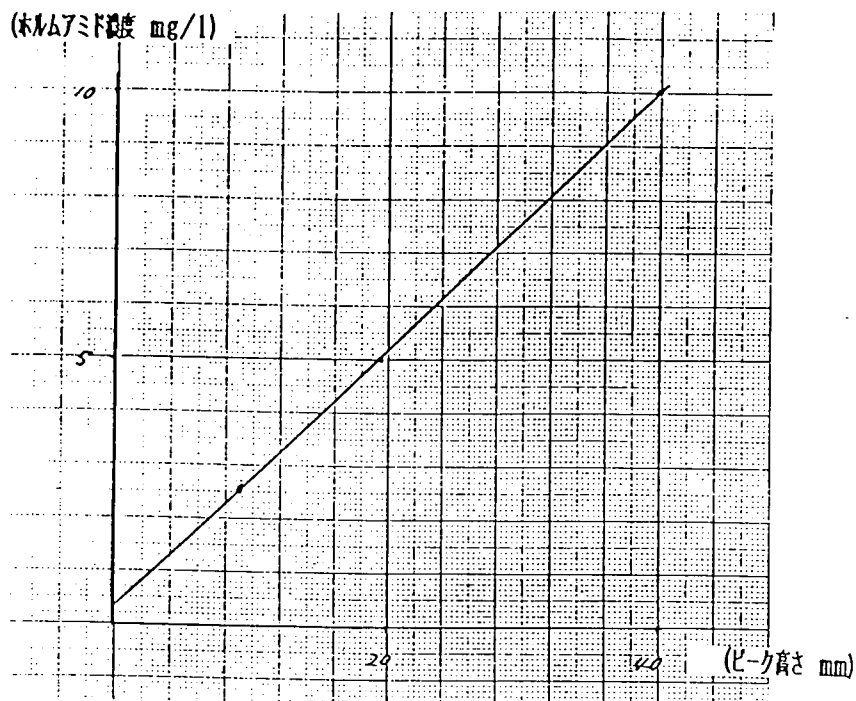
ホルムアミド標準原液に水を加えて希釈し、2.5、5、10mg/lの標準液を調整する。この液50 μl を上記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムをかせ、ピーク高さをノギス (mm) ではかりとる。
濃度を縦軸に、横軸にピークの高さをとり検量線を作成する。

①. 検量線作成

表-1 Input Date

No.	標準溶液濃度 (mg/l)	ピーク高さ (mm)
1	2.515	9.47
2	5.030	19.68
3	10.060	39.94

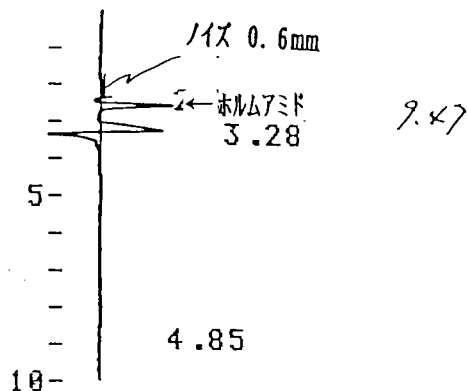
図-1 検量線



②. 検出下限値の計算

図-2 クロマトグラム

CH. 1 C.S 2.515 PPH 5.00 ATT 4 OFFS 0 01/04/99 13:46



- ・ホルムアミド濃度 2.515 mg/l
- ・ホルムアミドのピーク高さ 9.47 mm
- ・ノイズの高さ 0.6 mm

< 計 算 式 >

(S/N=2) としたとき

$$\frac{2 \times 0.6}{9.47} \times 2.515 = 0.3 \text{ (mg/l)}$$

試料液を直接注入できるので
定量下限値は、0.3 (mg/l) となる。

計算により、定量下限値 0.3 mg/l、
よって、定量下限値未満の表示NDは、0.3 mg/l 未満を示す。

- 6) 分析操作 (例 1000mg/l)
 10ml 共栓フラスコに水約5mlをとり、これに、試料溶液の100 μ lをマイクロピペッターではかりとり、水を標線まで加える。
 この液を50 μ lを前記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムをかせ、ホルムアミドの保持時間に相当するピークの高さをノギスではかり、検量線より濃度を求める。
 尚、検量線は測定日毎に調整し、試料溶液濃度は10mg/l前後になるように調整することにした。又、傾向的な日内変動(約1割程度の感度変化)が見られるため、検量線調整時に3回程度同じ試験液を注入し確認すると共に、各依頼件毎に検量線を作成後、測定することにした。

2. 添加回収率試験

ホルムアミドの標準原液に水を加えて希釈し、約1~1000mg/lの試験溶液4種類を下記の様に調整し、繰り返し測定を行った結果、若干ばらつきの大きい時があることがわかったが各試験液共に異常値(設定値 \pm 20%)内であることから、測定は可能と考えられる。(各試験試料はn=2で測定した)

表-2 添加回収率試験の測定結果

No	試料濃度 (mg/l)	測定値 (mg/l)	回収率 (%)	平均回収率 (%)
1	1006	1012.7 1099.4	100.7 109.3	105.0
2	100.6	104.6 98.8	104.0 98.2	101.1
3	10.06	10.7 10.2	106.3 101.4	103.9
4	1.006	1.1 1.1	109.3 109.3	109.3

3. 保存安定性試験

ホルムアミドの標準原液に水を加えて希釈し、約1~1000mg/lの試験溶液4種類を下記の様に調整した。この試験溶液を4℃の冷暗所に保存した時の3日間後の経時測定により保存安定性を求めた結果、いずれの濃度においても顕著な濃度変化は見られなかった。(各試験試料はn=2で測定した)

表-3 保存安定性試験の測定結果

No	試料濃度 (mg/l)	3日後の経時変化濃度 (mg/l)				
		調整時	1日目	2日目	3日目	平均
1	1006	1012.7 1099.4	1021.9 1002.3	1035.4 1031.6	935.0 966.7	1013.2
2	100.6	104.6 98.8	100.4 97.0	103.3 110.1	98.0 100.0	101.5
3	10.06	10.7 10.2	10.2 10.1	10.2 10.4	9.43 9.72	10.2
4	1.006	1.1 1.1	0.83 0.96	0.94 0.88	1.1 1.2	1.03

しかし、ばらつきが若干大きいことがわかったので分析はn=2の平均値を用いることにした。それで、上記データがすべてばらつきと考え、n=2の平均値を用いて算出した場合(表-4)、この方法でのばらつきは、10mg/l以上は CV=5%以内で問題ないと

思われるが1mg/lは CV=14%程度でばらちが大きいため異常値（設定値±20%）となった場合はnの数を増やす又は、検量線を再確認することにした。

表-4 保存安定性試験の測定結果（n=2の平均値とそのばらつき）

No	試料濃度 (mg/l)	3日後の経時変化濃度 (mg/l)				
		調整時	1日目	2日目	3日目	平均
1	1006	1056.1	1012.1	1033.5	950.8	1013.2 δ_{n-1} 45.3 CV % 4.5
2	100.6	101.7	98.7	106.7	99.0	101.5 δ_{n-1} 3.7 CV % 3.6
3	10.06	10.5	10.2	10.3	9.72	10.2 δ_{n-1} 0.33 CV % 3.3
4	1.006	1.1	0.90	0.92	1.2	1.03 δ_{n-1} 0.14 CV % 14

図-3 標準溶液の液体クロマトグラム (検量線作成用)

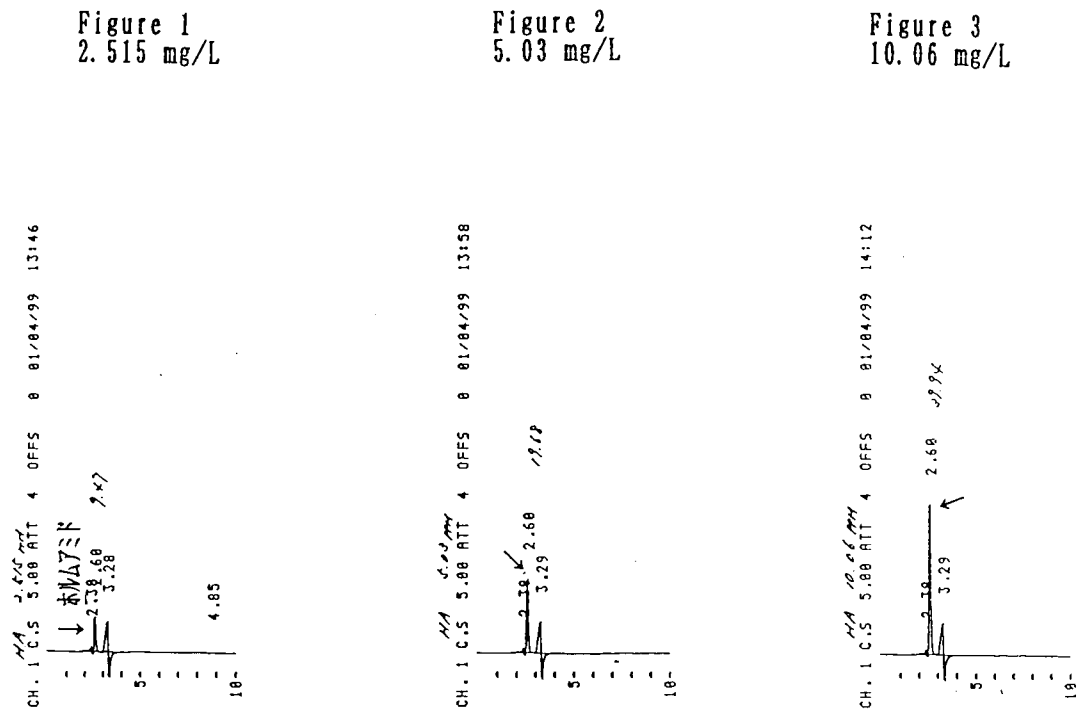


図-4 添加回収率試験の液体クロマトグラム

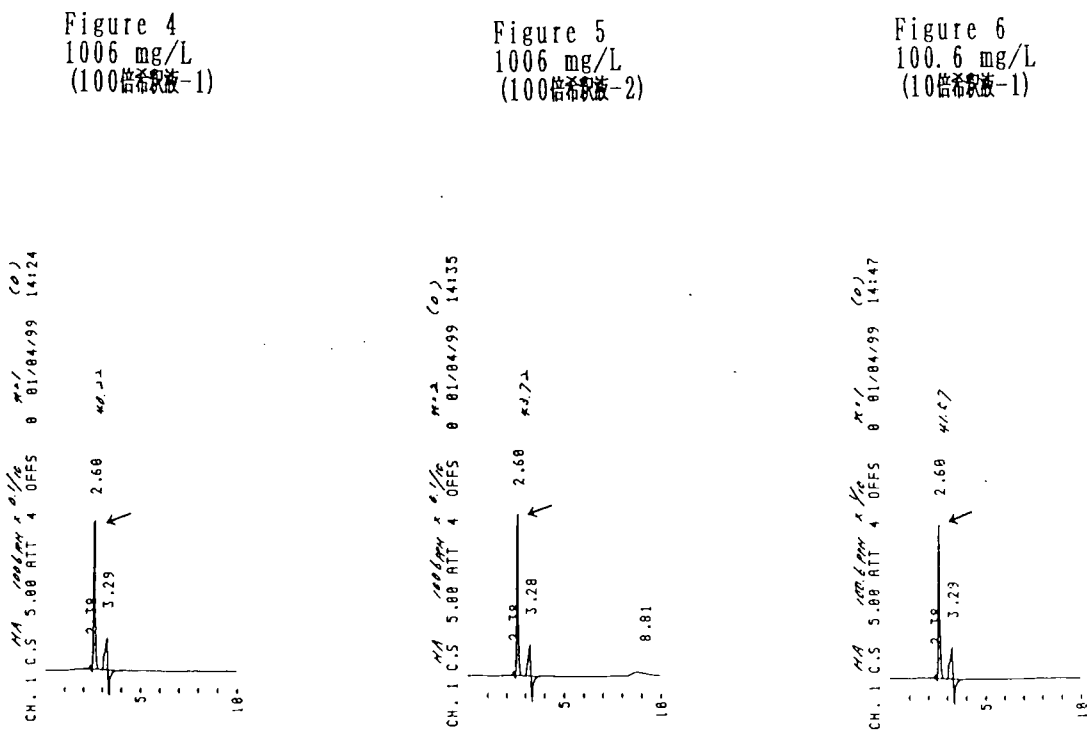


Figure 7
100.6 mg/L
(10倍稀释液-2)

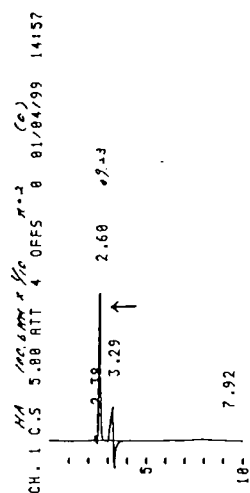


Figure 8
10.06 mg/L
(n-1)

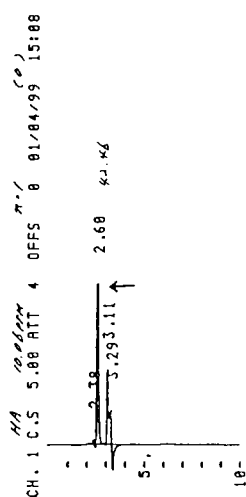


Figure 9
10.06 mg/L
(n-2)

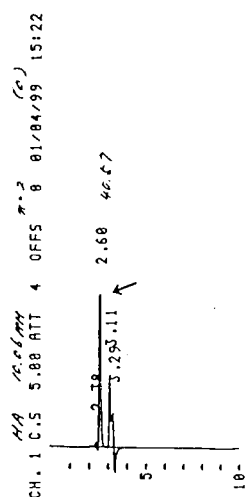


Figure 10
1.006 mg/L
(n-1)

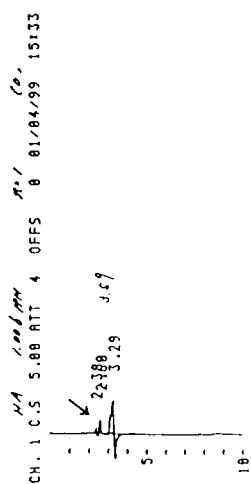


Figure 11
1.006 mg/L
(n-2)

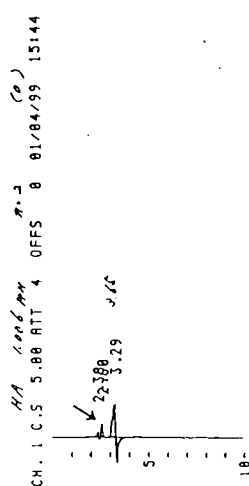


図-5 保存安定性試験の液体クロマトグラム

Figure 12
標準溶液
2.905 mg/L

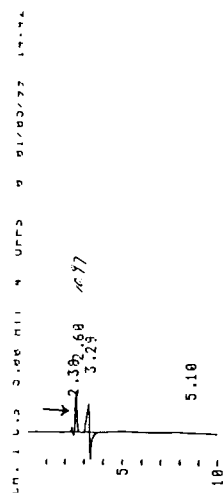


Figure 13
標準溶液
5.81 mg/L

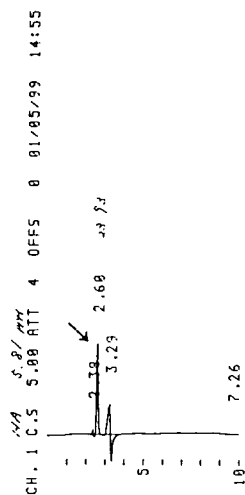


Figure 14
標準溶液
11.62 mg/L

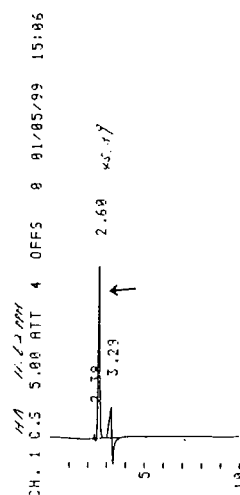


Figure 15
1006 mg/L (1日後)
(100倍希釈液-1)

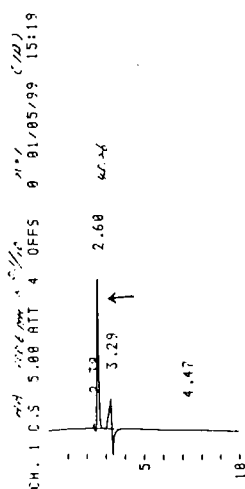


Figure 16
1006 mg/L (1日後)
(100倍希釈液-2)

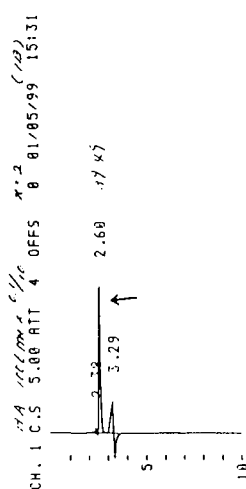


Figure 17
100.6 mg/L (1日後)
(10倍希釈液-1)

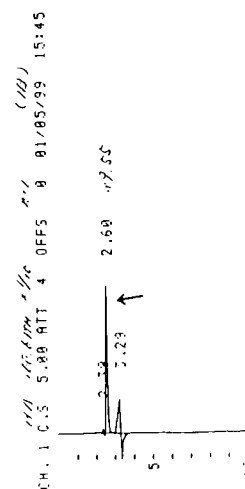


Figure 18
100.6 mg/L (1日後)
(10倍希釈液-2)

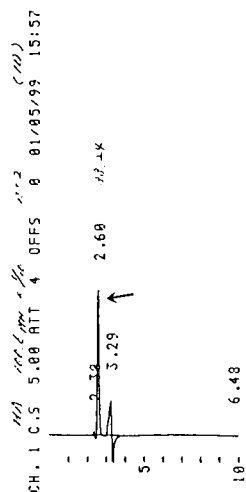


Figure 19
10.06 mg/L (1日後)
(n-1)

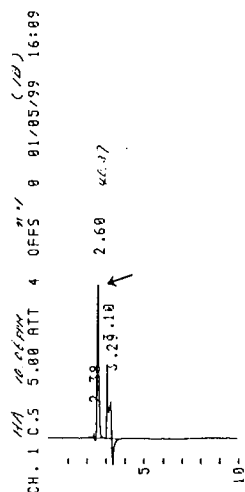


Figure 20
10.06 mg/L (1日後)
(n-2)

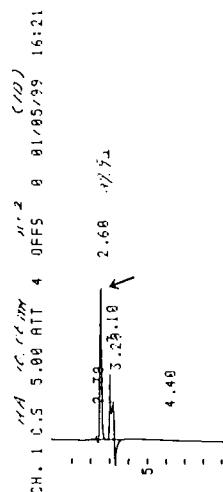


Figure 21
1.006 mg/L (1日後)
(n-1)

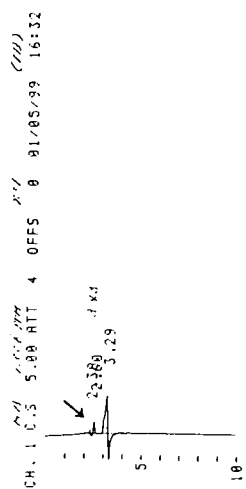


Figure 22
1.006 mg/L (1日後)
(n-2)

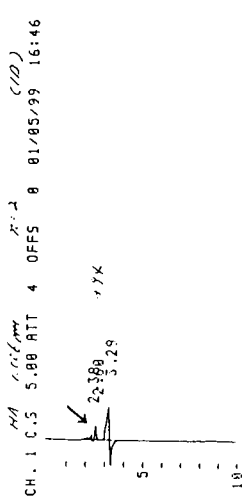


Figure 23
標準溶液
2.955 mg/L

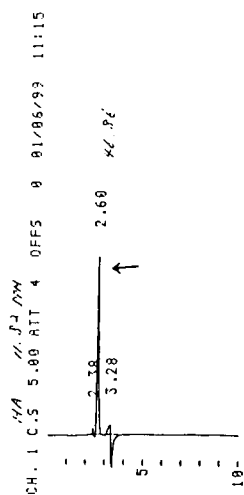


Figure 24
標準溶液
5.91 mg/L

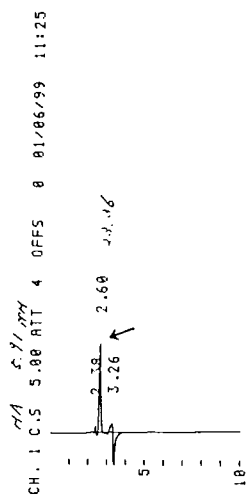


Figure 25
標準溶液
11.82 mg/L

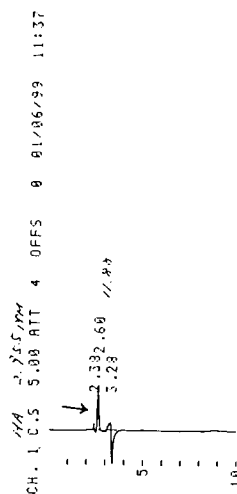


Figure 26
1006 mg/L (2日後)
(100倍希釈液-1)

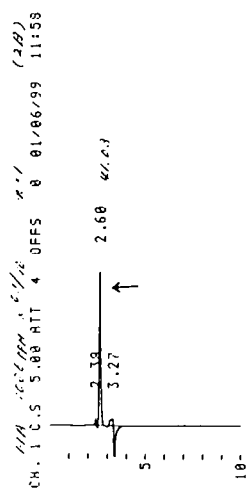


Figure 27
1006 mg/L (2日後)
(100倍希釈液-2)

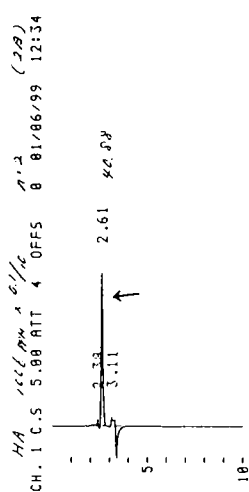


Figure 28
100.6 mg/L (2日後)
(10倍希釈液-1)

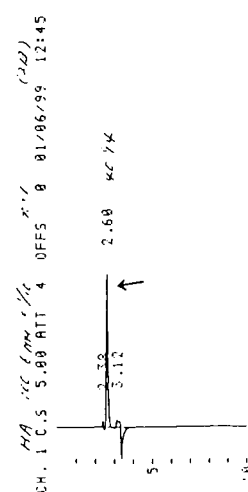


Figure 29
100.6 mg/L (2日後)
(10倍希釈法-2)

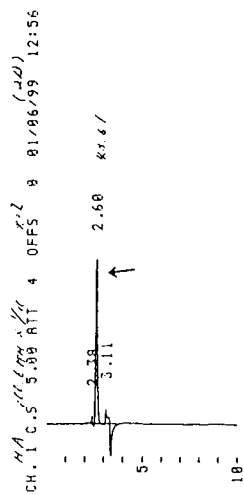


Figure 30
10.06 mg/L (2日後)
(n-1)

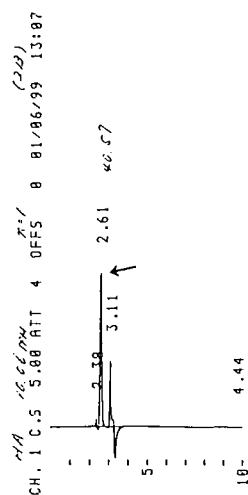


Figure 31
10.06 mg/L (2日後)
(n-2)

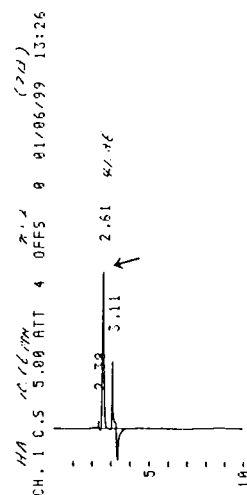


Figure 32
1.006 mg/L (2日後)
(n-1)

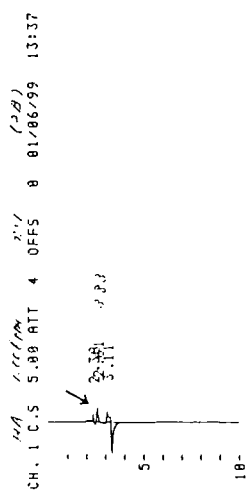


Figure 33
1.006 mg/L (2日後)
(n-2)

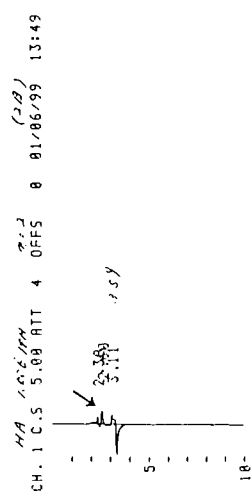


Figure 34
標準溶液
2.725 mg/L

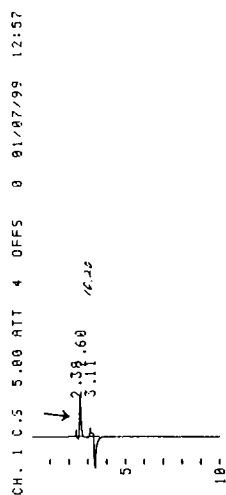


Figure 35
標準溶液
5.46 mg/L

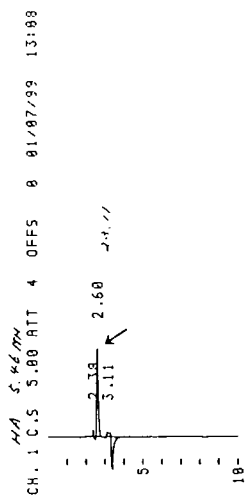


Figure 36
標準溶液
10.92 mg/L

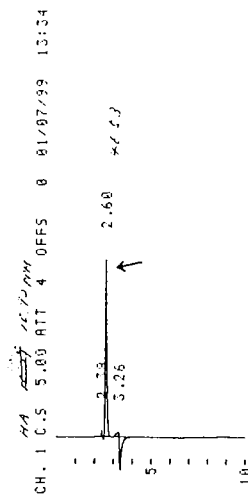


Figure 37
1006 mg/L (3日後)
(100倍希釈液-1)

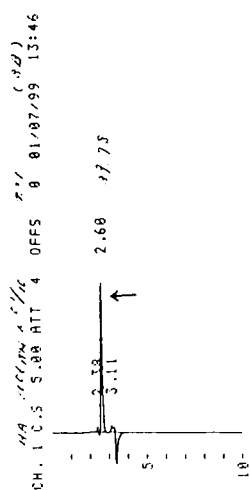


Figure 38
1006 mg/L (3日後)
(100倍希釈液-2)

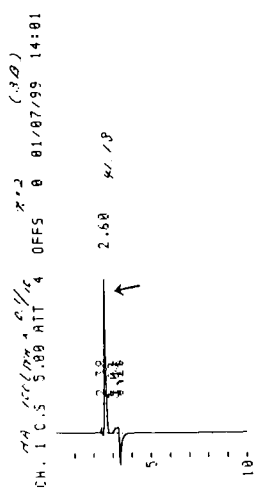


Figure 39
100.6 mg/L (3日後)
(10倍希釈液-1)

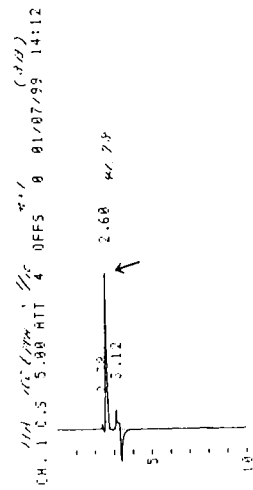


Figure 40
100.6 mg/L (3日後)
(10倍希釈液-2)

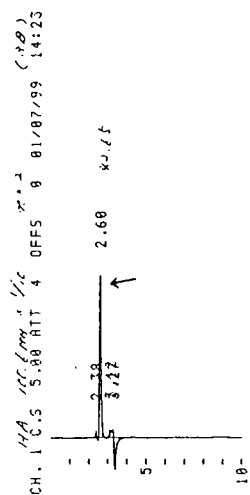


Figure 41
10.06 mg/L (3日後)
(n-1)

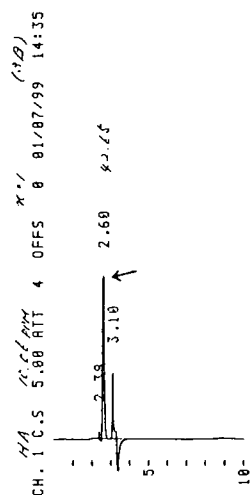


Figure 42
10.06 mg/L (3日後)
(n-2)

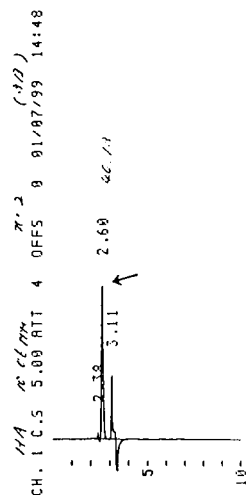


Figure 43
1.006 mg/L (3日後)
(n-1)

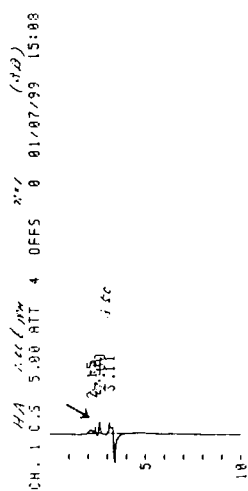
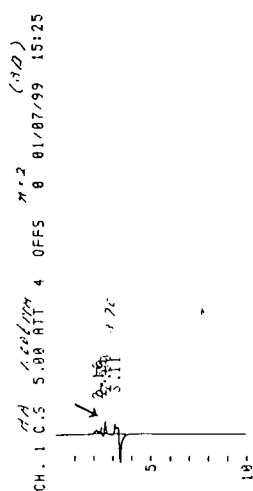


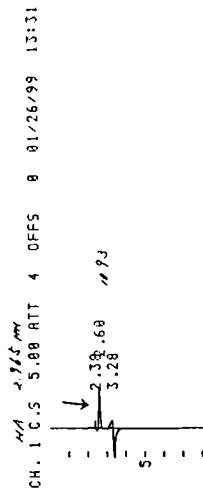
Figure 44
1.006 mg/L (3日後)
(n-2)



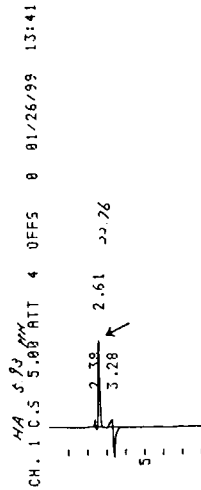
試験結果の液体クロマトグラム

試料名：ホルムアミドの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
(試験番号：NO1998生-05)

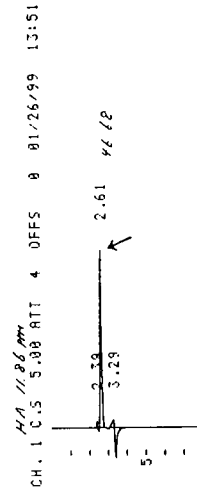
暴露開始時
Figure 45
標準溶液 2.965 mg/L



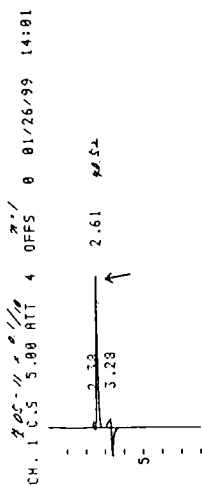
暴露開始時
Figure 46
標準溶液 5.93 mg/L



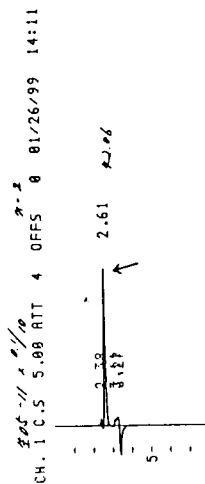
暴露開始時
Figure 47
標準溶液 11.86 mg/L



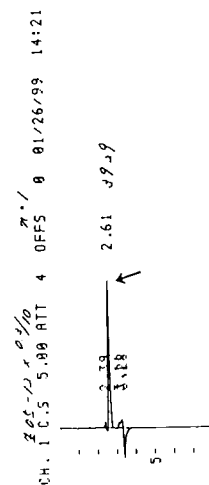
暴露開始時
Figure 48
1000 mg/L
生-05-11-1
(100倍希釈液)



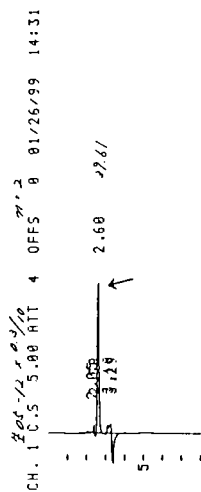
暴露開始時
Figure 49
1000 mg/L
生-05-11-2
(100倍希釈液)



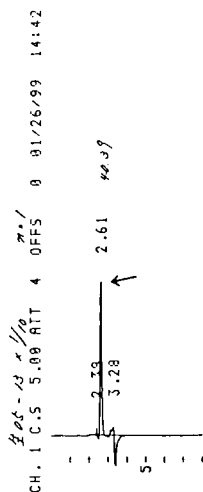
暴露開始時
Figure 50
320 mg/L
生-05-12-1
(33.3倍希釈液)



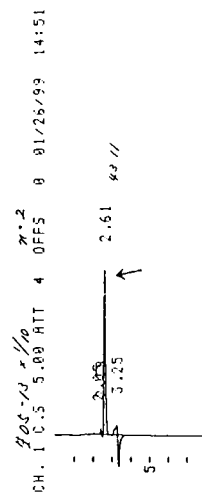
暴露開始時
Figure 51
320 mg/L
生-05-12-2
(33.3倍希釈液)



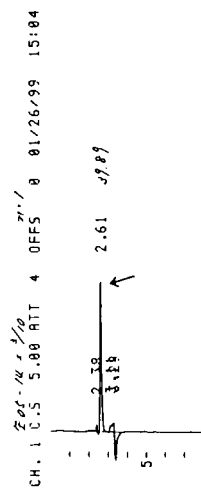
暴露開始時
Figure 52
100 mg/L
生-05-13-1
(10倍希釈液)



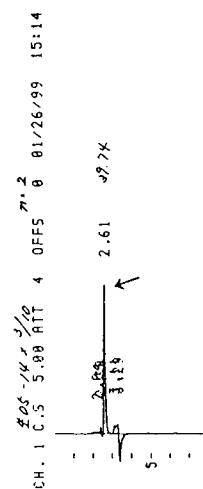
暴露開始時
Figure 53
100 mg/L
生-05-13-2
(10倍希釈液)



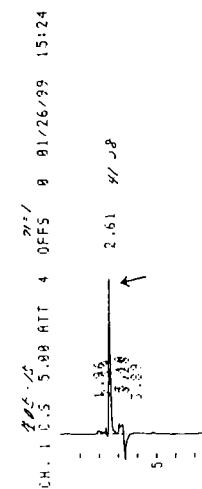
暴露開始時
Figure 54
32 mg/L
生-05-14-1
(3.33倍希釈液)



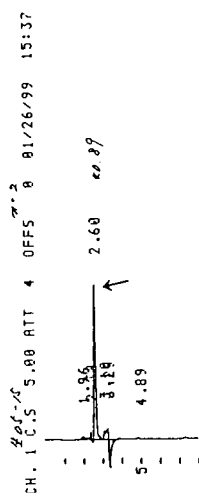
暴露開始時
Figure 55
32 mg/L
生-05-14-2
(3.33倍希釈液)



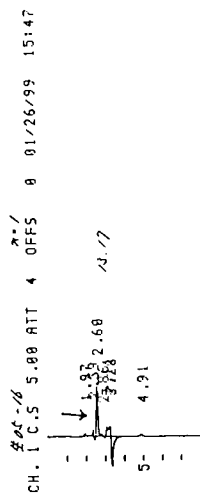
暴露開始時
Figure 56
10 mg/L
生-05-15-1



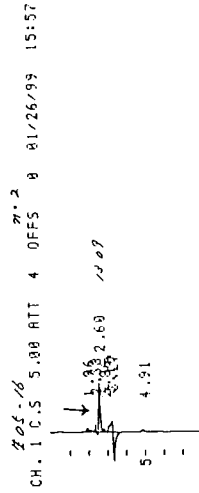
暴露開始時
Figure 57
10 mg/L
4-05-15-2



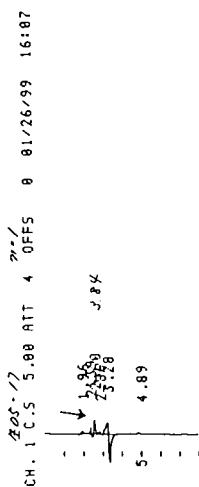
暴露開始時
Figure 58
3.2 mg/L
4-05-16-1



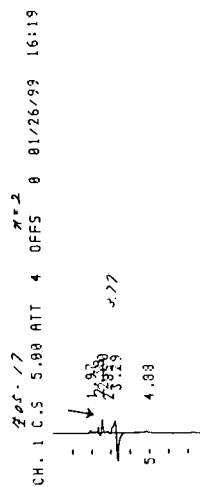
暴露開始時
Figure 59
3.2 mg/L
4-05-16-2



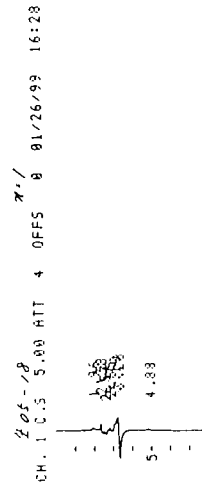
暴露開始時
Figure 60
1 mg/L
4-05-17-1



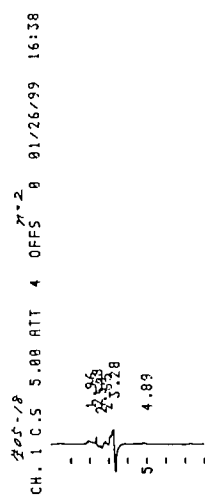
暴露開始時
Figure 61
1 mg/L
4-05-17-2



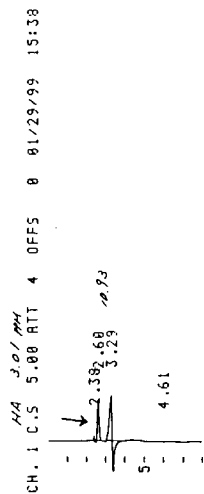
暴露開始時
Figure 62
Control
4-05-18-1



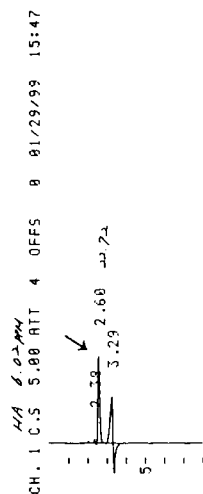
暴露開始時
Figure 63
Control
生-05-18-2



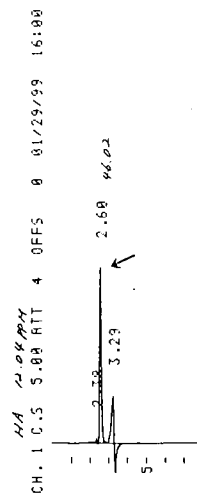
暴露終了時 (72時間)
Figure 64
標準溶液 3.01 mg/L



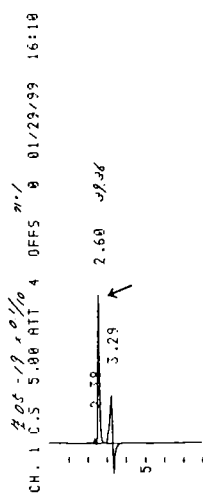
暴露終了時 (72時間)
Figure 65
標準溶液 6.02 mg/L



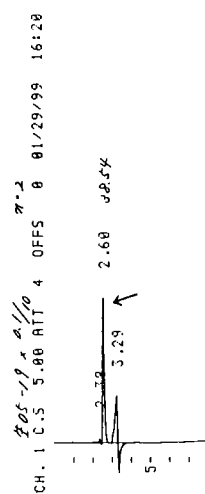
暴露終了時 (72時間)
Figure 66
標準溶液 12.04 mg/L



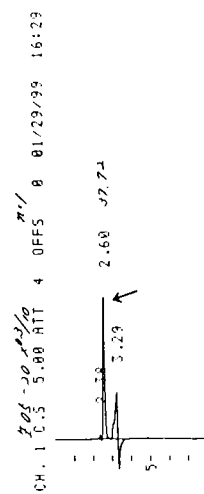
暴露終了時 (72時間)
Figure 67
1000 mg/L
生-05-19-1
(100倍希釈液)



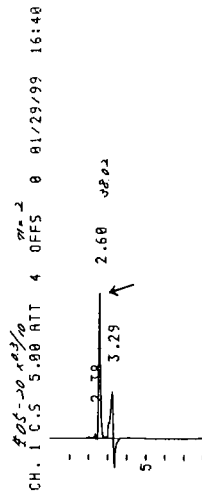
暴露終了時 (72時間)
Figure 68
1000 mg/L
生-05-19-2
(100倍希釈液)



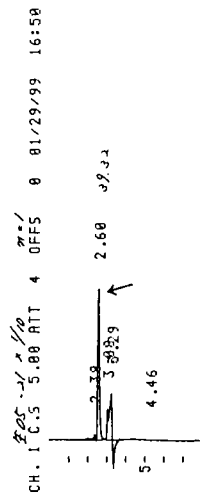
暴露終了時 (72時間)
Figure 69
320 mg/L
生-05-20-1
(33.3倍希釈液)



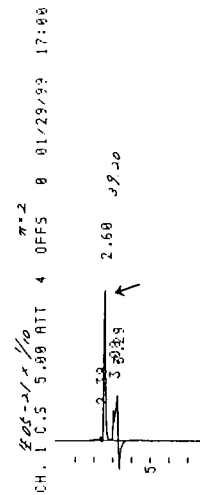
暴露終了時 (72時間)
Figure 70
320 mg/L
生-05-20-2
(33.3倍希釈液)



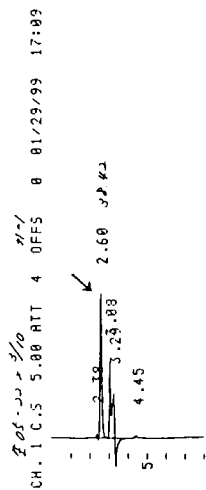
暴露終了時 (72時間)
Figure 71
100 mg/L
生-05-21-1
(10倍希釈液)



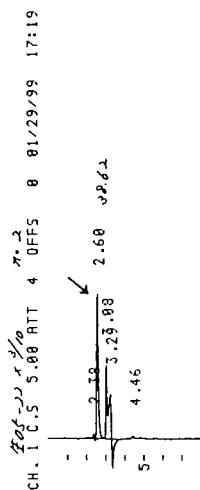
暴露終了時 (72時間)
Figure 72
100 mg/L
生-05-21-2
(10倍希釈液)



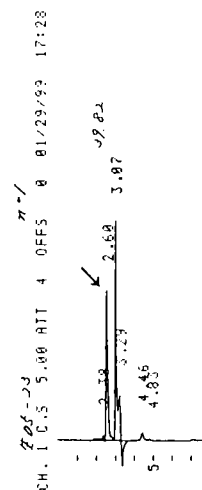
暴露終了時 (72時間)
Figure 73
32 mg/L
生-05-22-1
(3.33倍希釈液)



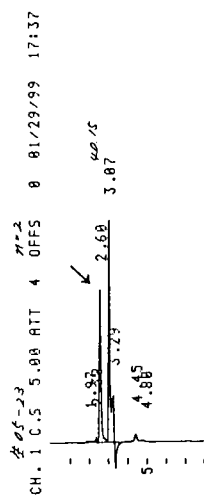
暴露終了時 (72時間)
Figure 74
32 mg/L
生-05-22-2
(3.33倍希釈液)



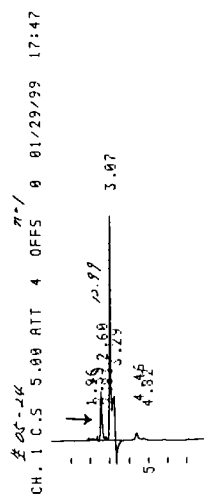
暴露終了時 (72時間)
Figure 75
10 mg/L
生-05-23-1



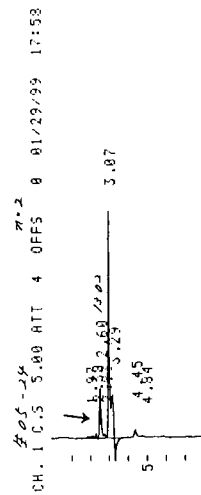
暴露終了時 (72時間)
Figure 76
10 mg/L
生-05-23-2



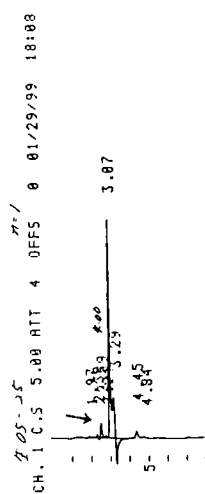
暴露終了時 (72時間)
Figure 77
3.2 mg/L
生-05-24-1



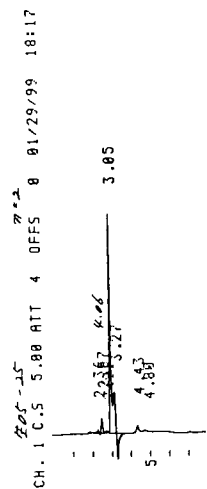
暴露終了時 (72時間)
Figure 78
3.2 mg/L
生-05-24-2



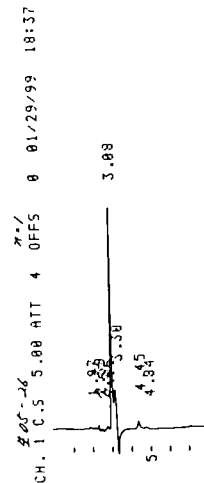
暴露終了時 (72時間)
Figure 79
1 mg/L
生-05-25-1



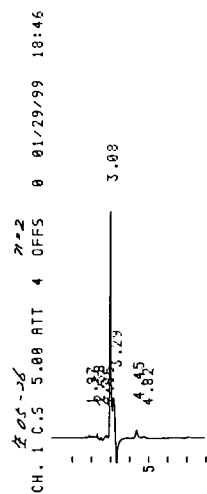
暴露終了時 (72時間)
Figure 80
1 mg/L
生-05-25-2



暴露終了時 (72時間)
Figure 81
Control
生-05-26-1



暴露終了時 (72時間)
 Figure 82
 Control
 生-05-26-2



最終報告書修正書

試験名： ホルムアミドの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： NO1998-生05

該当するページ： p-12, p-15

① p-12

修正する項目等：

訂正または追加前の内容 (____部分の修正)

5 結果および考察

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23.1℃であった。試験液のpHは暴露開始時が8.2～8.7であり、試験終了時が8.7～9.8であった。

[Table 6,7 (p.17)]

訂正または追加後の内容

5 結果および考察

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23.1～23.2℃であった。試験液のpHは暴露開始時が8.2～8.7であり、試験終了時が8.7～9.8であった。

[Table 6,7 (p.17)]

訂正または追加の理由： 記載ミス

② p-15

修正する項目等：

訂正または追加前の内容（____部分の修正）


Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Concentration mg/L		Area A (0-72h)	Inhibition (%) I_A (0-72h)	Rate μ (24-48)	Inhibition (%) I_m (24-48)	Rate μ (24-72)	Inhibition (%) I_m (24-72)
1000	1	1140	32.5	0.0479	<u>-7.2</u>	0.0530	2.5
	2	1410	16.5	0.0706	<u>17.5</u>	0.0555	-2.0
	3	1266	25.0	0.0604	<u>-21.6</u>	0.0530	2.5
	Average	1272	24.6	0.0596	<u>-4.1</u>	0.0538	1.0

訂正または追加後の内容

Concentration mg/L		Area A (0-72h)	Inhibition (%) I_A (0-72h)	Rate μ (24-48)	Inhibition (%) I_m (24-48)	Rate μ (24-72)	Inhibition (%) I_m (24-72)
1000	1	1140	32.5	0.0479	<u>17.5</u>	0.0530	2.5
	2	1410	16.5	0.0706	<u>-21.6</u>	0.0555	-2.0
	3	1266	25.0	0.0604	<u>-4.1</u>	0.0530	2.5
	Average	1272	24.6	0.0596	<u>-2.8</u>	0.0538	1.0

訂正または追加の理由： 記載ミス

試験責任者氏名：  承認月日 2002 年 3 月 29 日