

試 験 報 告 書

ペンタクロロフェノールの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号：第09011号)

財団法人 日本食品衛生センター

微生物研究部

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
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	5
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	6
4.1 藻類生長曲線	6
4.2 50 %生長阻害濃度の算出	6
4.3 最大無作用濃度（NOEC）の算出	8
5 結果	8
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	8
5.2 試験水中の被験物質濃度	8
5.3 細胞濃度及び藻類生長曲線	8
5.4 EC50及びNOEC	8
5.5 温度及びpH	8
Table 1～7	9～15
Figure 1～3	16～17
付属資料－1	試験水の分析方法

試験概要

1. 表 題

ペンタクロロフェノールの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

2. 試験目的

ペンタクロロ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、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)に準拠して実施する。

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

名 称：環境庁

住 所：東京都千代田区霞が関1丁目2番2号

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

6. 試験受託者

名 称：財団法人 日本食品分析センター

所在地：東京都渋谷区元代々木町52番1号

7. 試験施設：

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所

所在地：東京都多摩市永山6丁目11番10号

名 称：財団法人 日本食品分析センター 多摩研究所別館

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]

(1998年6月1日)

生物担当責任者

[Redacted]

(1998年6月1日)

生物系試験担当者

[Redacted]

(1998年6月1日)

[Redacted]

(1998年6月1日)

分析担当責任者

[Redacted]

(1998年6月1日)

[Redacted] (1998年4月1日異動)

理化学系分析担当者

[Redacted]

(1998年6月1日)

[Redacted]

(1998年6月1日)

[Redacted]

(1998年6月1日)

[Redacted] (1998年4月1日異動)

9. 試験期間

試験開始日：平成 9年12月10日

試験終了日：平成10年 6月1日

曝露期間：平成10年 1月12日～平成10年 1月15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

ペンタクロロフェノールの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号

第 0 9 0 1 1 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：ペンタクロロフェノール
- 2) 培養方式：振とう培養法 (100 rpm)
- 3) 供試生物：*Selenastrum capricornutum* (ATCC22662)
- 4) 温 度：23±2 °C
- 5) 曝露期間：72時間
- 6) 試験水量：100 mL (OECD培地)
- 7) 連 数：3連+分析用試験培養器 (計4本)
- 8) 初期細胞濃度：約 1×10^4 cells/mL
- 9) 照 明：4,000~5,000 lx (連続照明)
- 10) 試験濃度：対照区，助剤対照区，0.046，0.10，0.22，0.46，1.0，2.2，4.6及び
10 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，終了時)

結 果

- 1) 生長曲線下の面積の比較による50%生長阻害濃度
EbC50 (0-72h) = 0.46 mg/L (95 %信頼限界：0.38~0.55 mg/L)
NOEC (面積法0-72h) = 0.22 mg/L
- 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度
ErC50 (24-48h) = 0.71 mg/L (95 %信頼限界：0.59~0.84 mg/L)
NOEC (速度法24-48h) = 0.10 mg/L
ErC50 (24-72h) = 1.0 mg/L (95 %信頼限界：0.92~1.1 mg/L)
NOEC (速度法24-72h) = 0.22 mg/L
(上記濃度は，全て設定濃度に基づく値)

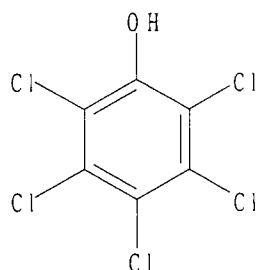
1 被験物質

1.1 名称、構造式及び物理化学的性状

名 称：ペンタクロロフェノール

略 称：PCP (CASNo. 87-86-5)

構 造 式：



分 子 式：C₆Cl₅OH

分 子 量：266.34

安 定 性：－

pKa : 4.71 (Na塩)

LogP_{ow} : 5.01

水への溶解度：80 mg/L (25 °C) , 14 mg/L (20 °C)

蒸 気 圧：14.7 mPa (20 °C)

1.2 供試試料

供給者：[REDACTED]

入手日：1997年12月 5日

ロット番号：MSK9571

外 観：ほとんど白色結晶性粉末

純 度：99.6 %

供給量：2 g

1.3 被験物質の確認及び保管条件下での安定性

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，冷蔵）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

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、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ものである。

基準物質（重クロム酸カリウム，試薬特級）の藻類に対する生長阻害試験の72時間 $EbC50$ 値は、0.76 mg/Lであった。

前 培 養

試験に供する藻類は試験条件と同じ条件で曝露開始前に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い。

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) 温 度：23±2 °C
- 3) 曝露期間：72時間
- 4) 初期細胞濃度：約 1×10^4 cells/mL
- 5) 試験水量：100 mL（OECD培地）
- 6) 連 数：3連＋分析用試験培養器（計4本）
- 7) 照 明：4,000～5,000 lx（連続照明）

3.2 試験培地

前培養及び試験ともにOECD化学品テストガイドラインに示されている滅菌した培地を用いた。

[Table 1(p.9)]

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：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（萱垣医理科工業株式会社）
- 5) 粒子計数装置：コールルターZ1（コールター株式会社）
- 6) 粒子計数装置用電解液：ISOTON II（コールター株式会社）
- 7) pH計：HM-11P及び14P（東亜電波工業株式会社）
- 8) 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、0.1、1.0及び10 mg/Lの濃度区を設定し、予備試験を行い本試験の濃度段階を決定した。

本試験は公比2.2で0.046、0.10、0.22、0.46、1.0、2.2、4.6及び10 mg/Lの濃度区で試験を行った。

3.5 試験水の調製

被験物質を溶解助剤（ジメチルスルホキシド及びポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル）を用いて、試験培地に溶解させた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。なお、各濃度区及び助剤対照区の溶解助剤濃度は一定（100 mg/L）となるように調製した。また対照区は試験培地のみとした。

3.6 試験水の分析

曝露開始時は分析用試験培養器より試験水を100 mL、72時間後は各濃度区の試験培養器より等量混合し、100 mLを分析用試験水とした。

試験水は、速やかに高速液体クロマトグラフを用いて分析した。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 ± 2 °Cの培養試験装置に設置して曝露を開始した。

曝露開始より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。

試験水調製時のpHは4本調製したうちの予備1本について測定して各濃度区の曝露開始時のpHとし、終了時には1本のみを測定した。試験期間中、培養装置内の温度、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 %生長阻害濃度の算出

4.2.1 生長曲線下の面積の比較による50 %生長阻害濃度（EbC50）

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_i : t_i 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百分率 (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) 直線回帰分析法により横軸を濃度 (対数目盛り), 縦軸を生長阻害率 (普通目盛り) とし, $EbC50$ 値を算出した。

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。

$$\mu = \frac{\ln N_n - \ln N_i}{t_n - t_i}$$

N_i : t_i 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_i : 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百分率 (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) 直線回帰分析法により横軸を濃度 (対数目盛り), 縦軸を生長速度の低下百分率 (普通目盛り) とし, $ErC50$ 値を算出した。

4.3 最大無作用濃度（NOEC）の算出

ダネット（Dunnett）の多重比較法により，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最大無作用濃度（NOEC）とした。

5 結果

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 試験水中の被験物質濃度

曝露開始時及び72時間後の試験水中の被験物質の濃度を測定した。

曝露開始時の濃度は0.0454～9.77 mg/L（設定濃度0.046～10 mg/L）であり，曝露終了時の濃度は0.0410～9.96 mg/L（設定濃度0.046～10 mg/L）であった。

設定濃度に対する割合は89～100 %であった。

[Table 2 (p.10) , 付属資料-1]

5.3 細胞濃度及び藻類生長曲線

曝露終了時の細胞濃度は最高試験濃度10 mg/L濃度区（以下設定濃度）で 1.39×10^4 cells/mL，最低試験濃度0.046 mg/L濃度区で 83.80×10^4 cells/mLであった。

なお，対照区及び助剤対照区における細胞濃度は，対照区が 70.19×10^4 cells/mL，助剤対照区が 76.53×10^4 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.11) , Figure 1 (p.16)]

5.4 EC50及びNOEC

1) 生長曲線下の面積の比較によるEbC50

EbC50（0-72h）は0.46 mg/L，95 %信頼限界：0.38～0.55 mg/L（以下設定濃度）であった。また，NOEC（面積法0-72h）は0.22 mg/Lであった。

[Table 4, 5 (p.12, 13) , Figure 2 (p.17)]

2) 生長速度の比較による生長阻害濃度（ErC50）

ErC50（24-48h）及びErC50（24-72h）は，それぞれ0.71 mg/L（95 %信頼限界：0.59～0.84 mg/L），1.0 mg/L（95 %信頼限界：0.92～1.1 mg/L）であった。また，NOEC（速度法24-48h）及びNOEC（速度法24-72h）は，それぞれ0.10 mg/L，0.22 mg/Lであった。

[Table 4, 5 (p.12, 13) , Figure 3 (p.17)]

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22.7～24.2 °Cであり，その平均温度は 23.7 ± 0.6 °Cであった。試験水のpHは曝露開始時が8.0～8.3であり，曝露終了時が7.9～10.1であった。

[Table 6, 7 (p.14, 15)]

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 Pentachlorophenol ; *Selenastrum capricornutum* was Exposed to Pentachlorophenol for a 72-hour

Nominal Concentration (mg/L)	Measured Concentration (mg/L)			Percent of Nominal
	0 hour	72 hours	Time-weighted Mean	
Control	< 0.0001	< 0.0001	---	---
Solvent Control	< 0.0001	< 0.0001	---	---
0.046	0.0454	0.0410	0.0432	94
0.10	0.0999	0.0912	0.0955	96
0.22	0.221	0.202	0.211	96
0.46	0.453	0.428	0.440	96
1.0	1.00	0.957	0.978	98
2.2	2.17	2.18	2.18*	99
4.6	4.56	4.39	4.47	97
10	9.77	9.96	9.87*	99

* : arithmetic average

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration (mg/L)	No.	Cell Density ($\times 10^4$ cells/mL)			
		0 hour	24 hours	48 hours	72 hours
Control	1	1.0	7.23	33.24	73.26
	2	1.0	6.53	30.96	69.35
	3	1.0	6.54	31.34	67.95
	Average	1.0	6.77	31.85	70.19
	S. D.	0.0	0.40	1.22	2.75
Solvent Control	1	1.0	7.50	33.44	76.70
	2	1.0	5.08	33.16	81.61
	3	1.0	7.35	37.34	71.29
	Average	1.0	6.64	34.65	76.53
	S. D.	0.0	1.36	2.34	5.16
0.046	1	1.0	7.38	36.15	87.13
	2	1.0	7.84	40.19	93.48
	3	1.0	6.21	27.31	70.80
	Average	1.0	7.14	34.55	83.80
	S. D.	0.0	0.84	6.59	11.70
0.10	1	1.0	7.85	41.05	84.59
	2	1.0	6.16	26.81	66.18
	3	1.0	6.08	27.01	70.09
	Average	1.0	6.70	31.62	73.62
	S. D.	0.0	1.00	8.16	9.70
0.22	1	1.0	6.30	25.98	73.43
	2	1.0	7.00	27.31	78.77
	3	1.0	6.00	17.61	52.25
	Average	1.0	6.43	23.63	68.15
	S. D.	0.0	0.51	5.26	14.03
0.46	1	1.0	4.62	10.39	29.97
	2	1.0	5.44	11.30	31.94
	3	1.0	5.00	13.31	43.23
	Average	1.0	5.02	11.67	35.05
	S. D.	0.0	0.41	1.49	7.16
1.0	1	1.0	3.06	6.04	9.54
	2	1.0	2.77	5.58	9.00
	3	1.0	3.04	6.65	12.29
	Average	1.0	2.96	6.09	10.28
	S. D.	0.0	0.16	0.54	1.76
2.2	1	1.0	1.32	1.67	1.81
	2	1.0	1.32	1.82	1.98
	3	1.0	1.31	1.93	2.02
	Average	1.0	1.32	1.81	1.94
	S. D.	0.0	0.01	0.13	0.11
4.6	1	1.0	1.33	1.41	1.30
	2	1.0	1.32	1.32	1.34
	3	1.0	1.30	1.34	1.34
	Average	1.0	1.32	1.36	1.33
	S. D.	0.0	0.02	0.05	0.02
10	1	1.0	1.32	1.30	1.44
	2	1.0	1.36	1.41	1.35
	3	1.0	1.42	1.34	1.39
	Average	1.0	1.37	1.35	1.39
	S. D.	0.0	0.05	0.06	0.05

Each value represents the mean of three sample counts.

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Concentration		Area	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)
mg/L	No.	A (0-72h)	I _A (0-72h)	μ (24-48h)	I _m (24-48h)	μ (24-72h)	I _m (24-72h)
Control	1	17,904,000	-----	0.063563	-----	0.048245	-----
	2	16,719,600	-----	0.064845	-----	0.049224	-----
	3	16,645,200	-----	0.065290	-----	0.048767	-----
	Average	17,089,600	-----	0.064566	-----	0.048745	-----
Solvent Control	1	18,429,600	-7.84	0.062285	3.53	0.048437	0.63
	2	18,370,800	-7.50	0.078168	-21.07	0.057847	-18.67
	3	18,680,400	-9.31	0.067724	-4.89	0.047334	2.89
	Average	18,493,600	-8.22	0.069392	-7.48	0.051206	-5.05
0.046	1	20,302,800	-18.80	0.066204	-2.54	0.051430	-5.51
	2	22,144,800	-29.58	0.068099	-5.47	0.051636	-5.93
	3	15,940,800	6.72	0.061712	4.42	0.050702	-4.01
	Average	19,462,800	-13.89	0.065338	-1.20	0.051256	-5.15
0.10	1	21,286,800	-24.56	0.068928	-6.76	0.049527	-1.60
	2	15,254,400	10.74	0.061279	5.09	0.049465	-1.48
	3	15,752,400	7.82	0.062133	3.77	0.050933	-4.49
	Average	17,431,200	-2.00	0.064113	0.70	0.049975	-2.52
0.22	1	15,958,800	6.62	0.059032	8.57	0.051162	-4.96
	2	17,086,800	0.02	0.056723	12.15	0.050430	-3.46
	3	11,336,400	33.66	0.044863	30.52	0.045089	7.50
	Average	14,794,000	13.43	0.053539	17.08	0.048894	-0.31
0.46	1	6,598,800	61.39	0.033769	47.70	0.038954	20.09
	2	7,250,400	57.57	0.030459	52.83	0.036877	24.35
	3	8,982,000	47.44	0.040795	36.82	0.044940	7.81
	Average	7,610,400	55.47	0.035008	45.78	0.040257	17.42
1.0	1	2,728,800	84.03	0.028333	56.12	0.023689	51.40
	2	2,484,000	85.46	0.029181	54.80	0.024550	49.64
	3	3,200,400	81.27	0.032615	49.49	0.029103	40.30
	Average	2,804,400	83.59	0.030043	53.47	0.025781	47.11
2.2	1	334,800	98.04	0.009800	84.82	0.006577	86.51
	2	391,200	97.71	0.013384	79.27	0.008447	82.67
	3	420,000	97.54	0.016146	74.99	0.009022	81.49
	Average	382,000	97.76	0.013110	79.69	0.008015	83.56
4.6	1	213,600	98.75	0.002434	96.23	-0.000475	100.97
	2	194,400	98.86	0.000000	100.00	0.000313	99.36
	3	194,400	98.86	0.001263	98.04	0.000631	98.71
	Average	200,800	98.82	0.001232	98.09	0.000156	99.68
10	1	201,600	98.82	-0.000636	100.99	0.001813	96.28
	2	226,800	98.67	0.001504	97.67	-0.000154	100.32
	3	229,200	98.66	-0.002416	103.74	-0.000445	100.91
	Average	219,200	98.72	-0.000516	100.80	0.000405	99.17

Table 5. Calculated EC50 and NOEC (Based on Nominal Concentrations)

Based on I_h value

	Concentration (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
EbC50 (0-72h)	0.46	0.38~0.55
NOECb (0-72h)	0.22	----

Based on I_m value

	Concentration (mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
ErC50 (24-48h)	0.71	0.59~0.84
NOECr (24-48h)	0.10	----
ErC50 (24-72h)	1.0	0.92~1.1
NOECr (24-72h)	0.22	----

Table 6. Daily Temperature in the Incubation Chamber ; *Selenastrum capricornutum* was Exposed to Pentachlorophenol for a 72-hour

Exposure Period (hours)	Temperature (°C)
0	24.0
24	24.2
48	23.9
72	22.7
Average	23.7

Table 7. pH Values ; *Selenastrum capricornutum* was Exposed to Pentachlorophenol for a 72-hour at 0-hour and 72-hour Exposure

Nominal Concentration (mg/L)	pH	
	0 hour	72 hours
Control	8.2	8.2
Solvent Control	8.1	8.3
0.046	8.1	10.1
0.10	8.1	10.0
0.22	8.3	9.9
0.46	8.1	8.8
1.0	8.1	8.1
2.2	8.1	7.9
4.6	8.1	7.9
10	8.0	7.9

Figure 1. Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

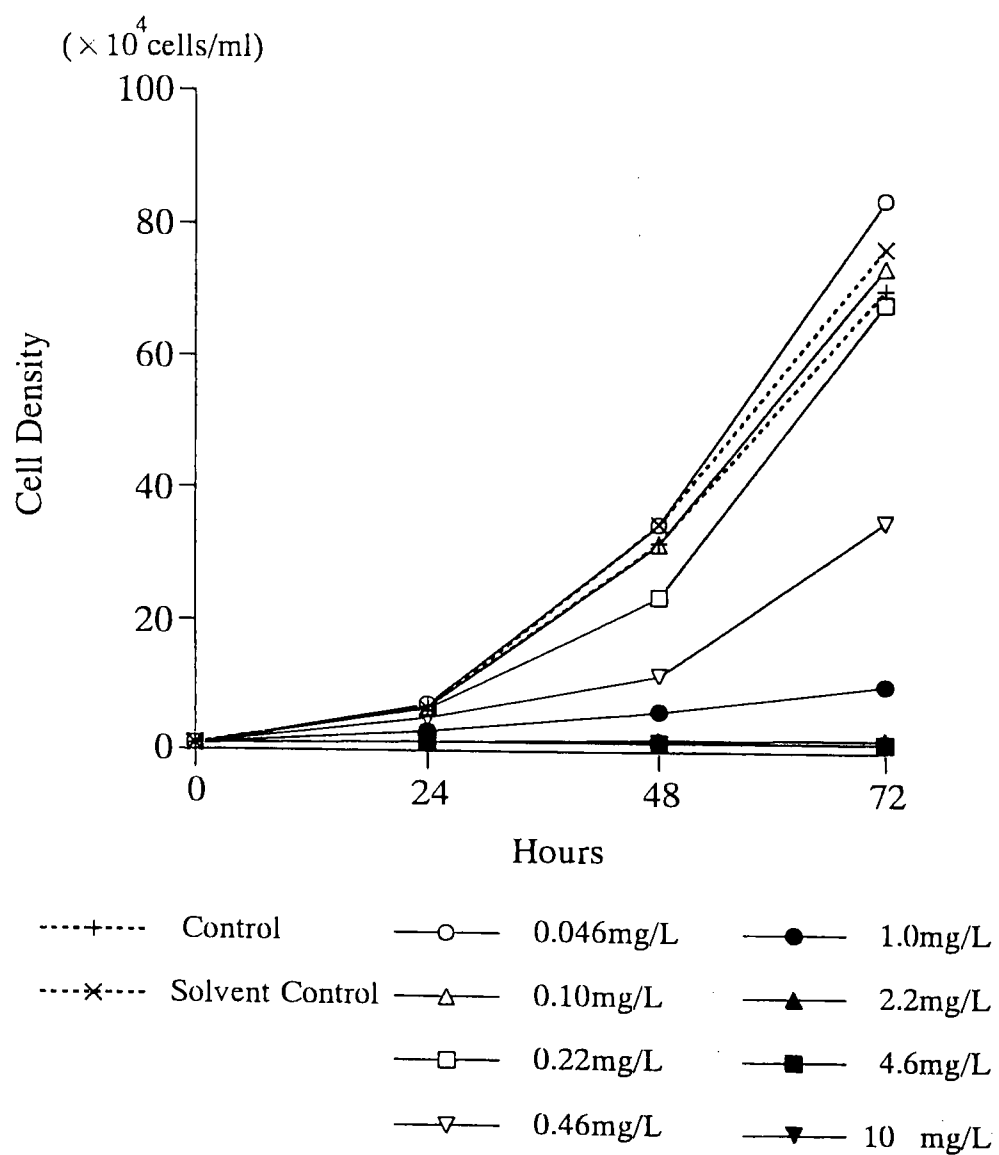


Figure 2. Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_A value

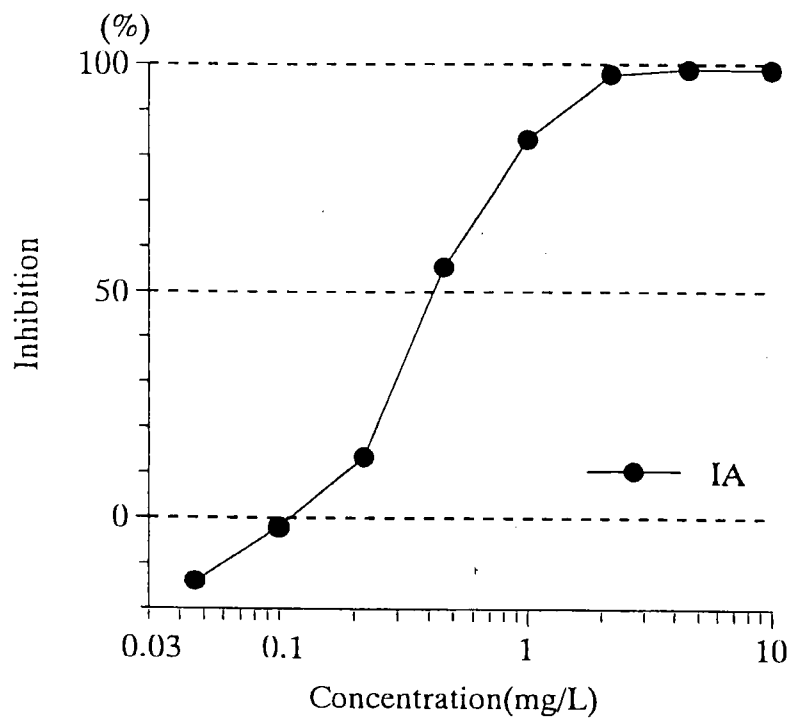
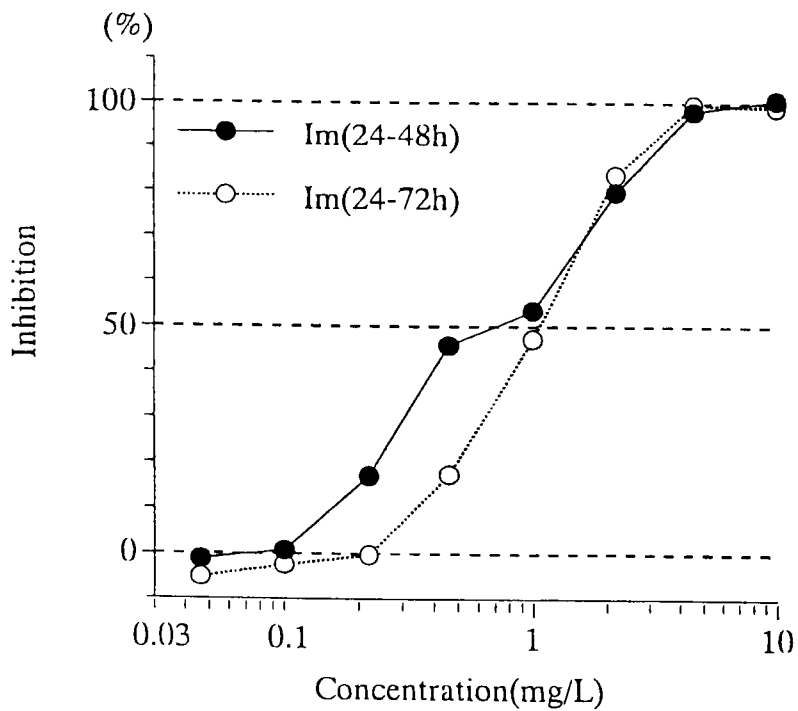


Figure 3. Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on I_m value



付属資料－1

試験水の分析方法
(全 10 頁)

試験水の分析方法

1 試験方法

①試料溶液の調製

a) 対照区，助剤対照区の試験水

試験水 50ml を 100ml の分液漏斗に正確に量り，塩化ナトリウム 2.5g，5mol/L 硫酸 1ml，ジクロロメタン 25ml を加えて 5 分間振とうした。静置後，ジクロロメタン層を分取し，水層にはさらにジクロロメタン 25ml を加えて同様な操作を繰り返した。ジクロロメタン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，減圧濃縮乾固した。得られた残留物をメタノール 0.5ml に溶解し，これを試料溶液とした。

b) 0.046mg/L 濃度区の試験水

試験水 50ml を 100ml の分液漏斗に正確に量り，塩化ナトリウム 2.5g，5mol/L 硫酸 1ml，ジクロロメタン 25ml を加えて 5 分間振とうした。静置後，ジクロロメタン層を分取し，水層にはさらにジクロロメタン 25ml を加えて同様な操作を繰り返した。ジクロロメタン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，減圧濃縮乾固した。得られた残留物をメタノール 2.5ml に溶解し，これを試料溶液とした。

c) 0.1mg/L 濃度区の試験水

試験水 50ml を 100ml の分液漏斗に正確に量り，塩化ナトリウム 2.5g，5mol/L 硫酸 1ml，ジクロロメタン 25ml を加えて 5 分間振とうした。静置後，ジクロロメタン層を分取し，水層にはさらにジクロロメタン 25ml を加えて同様な操作を繰り返した。ジクロロメタン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，減圧濃縮乾固した。得られた残留物をメタノール 10ml に溶解し，これを試料溶液とした。

d) 0.22mg/L 濃度区の試験水

試験水 50ml を 100ml の分液漏斗に正確に量り，塩化ナトリウム 2.5g，5mol/L 硫酸 1ml，ジクロロメタン 25ml を加えて 5 分間振とうした。静置後，ジクロロメタン層を分取し，水層にはさらにジクロロメタン 25ml を加えて同様な操作を繰り返した。ジクロロメタン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，減圧濃縮乾固した。得られた残留物をメタノール 15ml に溶解し，これを試料溶液とした。

e) 0.46mg/L 濃度区の試験水

試験水 50ml を 100ml の分液漏斗に正確に量り，塩化ナトリウム 2.5g，5mol/L 硫酸 1ml，ジクロロメタン 25ml を加えて 5 分間振とうした。静置後，ジクロロメタン層を分取し，水層にはさらにジクロロメタン 25ml を加えて同様な操作を繰り返した。ジクロロメタン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，減圧濃縮乾固した。得られた残留物をメタノール 25ml に溶解し，これを試料溶液とした。

f) 1.0mg/L 濃度区の試験水

試験水 50ml を 100ml の分液漏斗に正確に量り，塩化ナトリウム 2.5g，5mol/L 硫酸 1ml，ジクロロメタン 25ml を加えて 5 分間振とうした。静置後，ジクロロメタン層を分取し，水層にはさらにジクロロメタン 25ml を加えて同様な操作を繰り返した。ジクロロメタン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，減圧濃縮乾固した。得られた残留物をメタノール 5ml に溶解し，メタノールで 20 倍に希釈し，これを試料溶液とした。

g) 2.2mg/L 濃度区の試験水

試験水 50ml を 100ml の分液漏斗に正確に量り，塩化ナトリウム 2.5g，5mol/L 硫酸 1ml，ジクロロメタン 25ml を加えて 5 分間振とうした。静置後，ジクロロメタン層を分取し，水層にはさらにジクロロメタン 25ml を加えて同様な操作を繰り返した。ジクロロメタン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，減圧濃縮乾固した。得られた残留物をメタノール 5ml に溶解し，メタノールで 25 倍に希釈し，これを試料溶液とした。

h) 4.6mg/L 濃度区の試験水

試験水 50ml を 100ml の分液漏斗に正確に量り，塩化ナトリウム 2.5g，5mol/L 硫酸 1ml，ジクロロメタン 25ml を加えて 5 分間振とうした。静置後，ジクロロメタン層を分取し，水層にはさらにジクロロメタン 25ml を加えて同様な操作を繰り返した。ジクロロメタン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，減圧濃縮乾固した。得られた残留物をメタノール 10ml に溶解し，メタノールで 25 倍に希釈し，これを試料溶液とした。

i) 10mg/L 濃度区の試験水

試験水 50ml を 100ml の分液漏斗に正確に量り，塩化ナトリウム 2.5g，5mol/L 硫酸 1ml，ジクロロメタン 25ml を加えて 5 分間振とうした。静置後，ジクロロメタン層を分取し，水層にはさらにジクロロメタン 25ml を加えて同様な操作を繰り返した。ジクロロメタン層を合わせ，無水硫酸ナトリウムで脱水後，減圧濃縮乾固した。得られた残留物をメタノール 25ml に溶解し，メタノールで 25 倍に希釈し，これを試料溶液とした。

②標準溶液の調製

標準品 0.025g を正確に量りとり、メタノールに溶解して 50ml に溶解し、これを標準原液とした。この標準原液からメタノールを用いて適宜希釈し、0.01, 0.05, 0.5, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の標準溶液を調製した。

③定量

試料溶液 20 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 PCP 濃度を求め、試験水中の PCP 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：島津製作所 LC-10AD

検 出 器：UV

カ ラ ム：CAPCELL PAK C18 SG120Å $\phi 4.6\text{mm} \times 15\text{cm}$, 孔径 5 μm

移 動 相：0.02mol/L 酢酸－メタノール(1:9 V/V)

測定波長：215nm

流 速：1.0ml/分

温 度：40℃

注 入 量：20 μl

データ処理装置：島津製作所 LC ワークステーション

3 検量線

1-②で調製した標準溶液 20 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

①低濃度添加

飼育水に濃度が 0.04mg/L になるように PCP 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 95.8%, 102.5%, 94.5 % (平均 97.6%) であった。

②高濃度添加

飼育水に濃度が 10mg/L になるように PCP 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 95.7%, 94.5%, 96.7% (平均 95.6%) であった。

Figure 1 Calibration Curve of PCP by HPLC Analysis

Amount (ng)	Peak Height (μ Abs)
20	36086
10	17997
1	1810

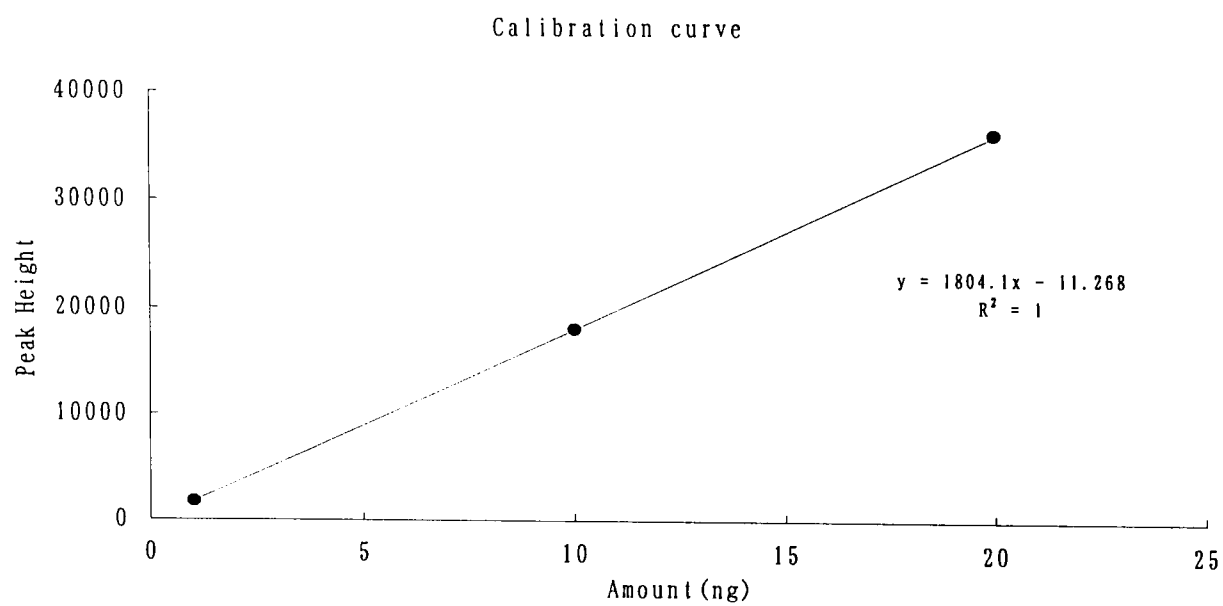
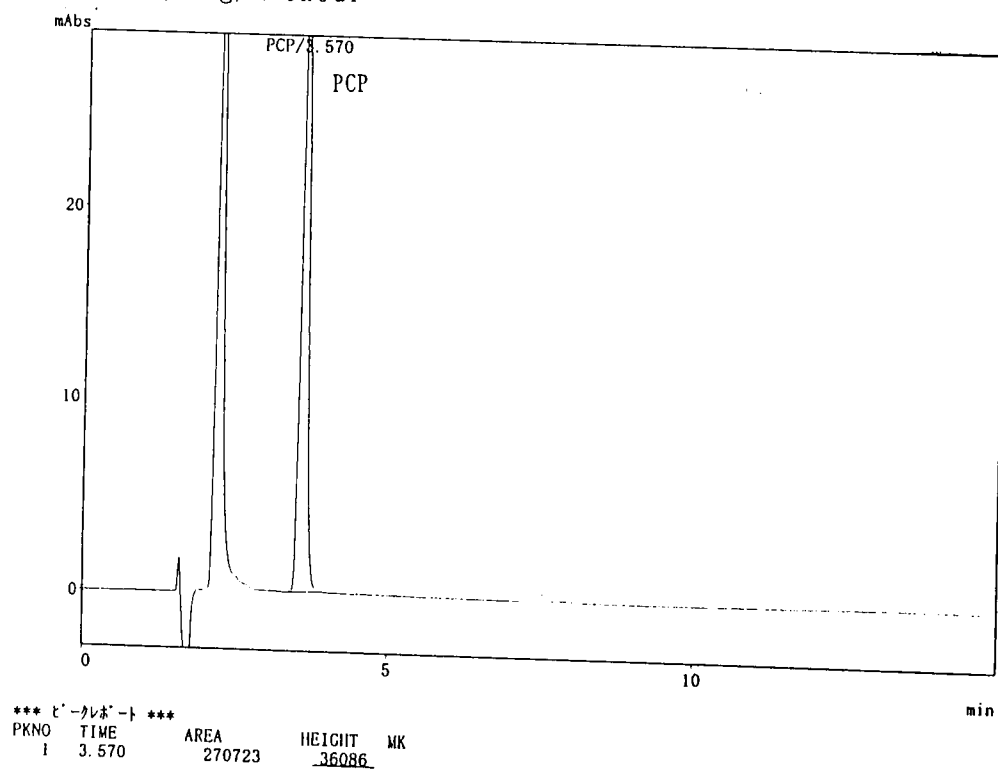
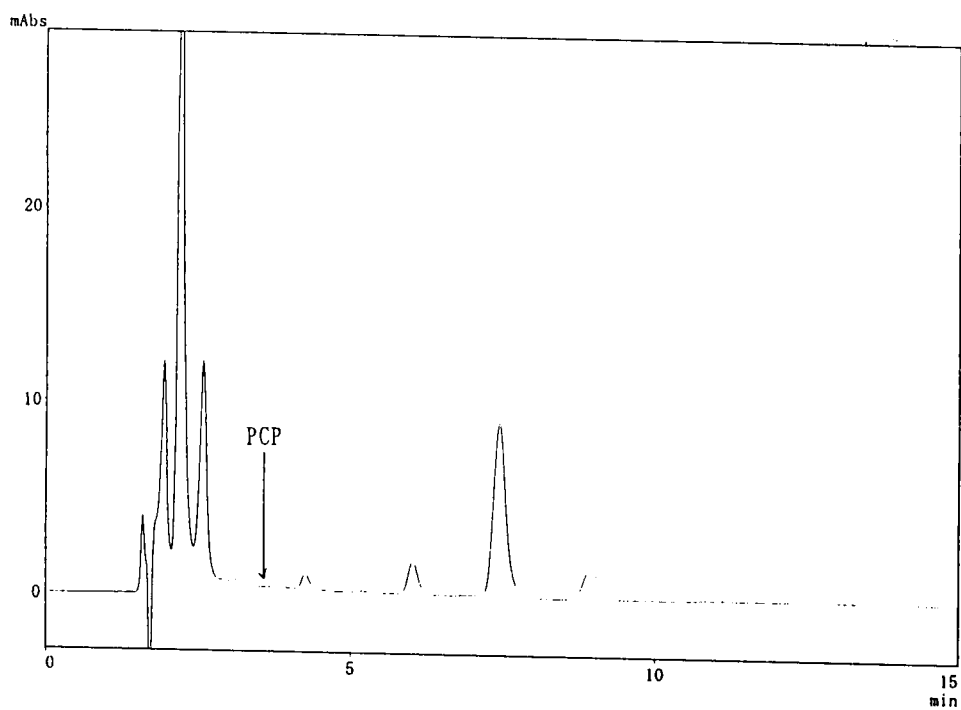


Figure 2 Representative Chromatogram

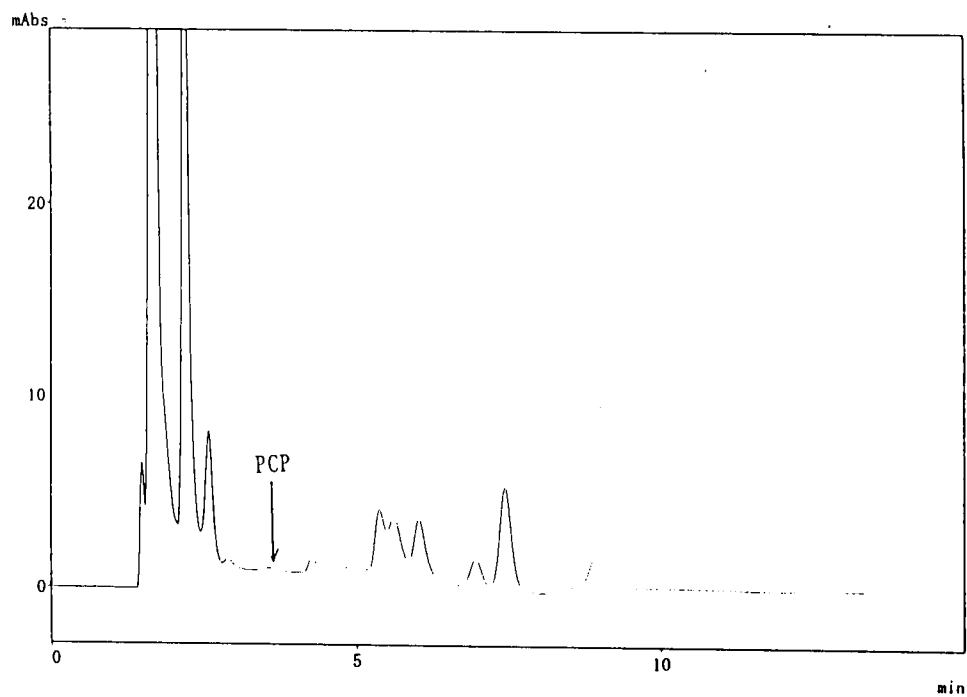
Standard(20ng) : 0hour



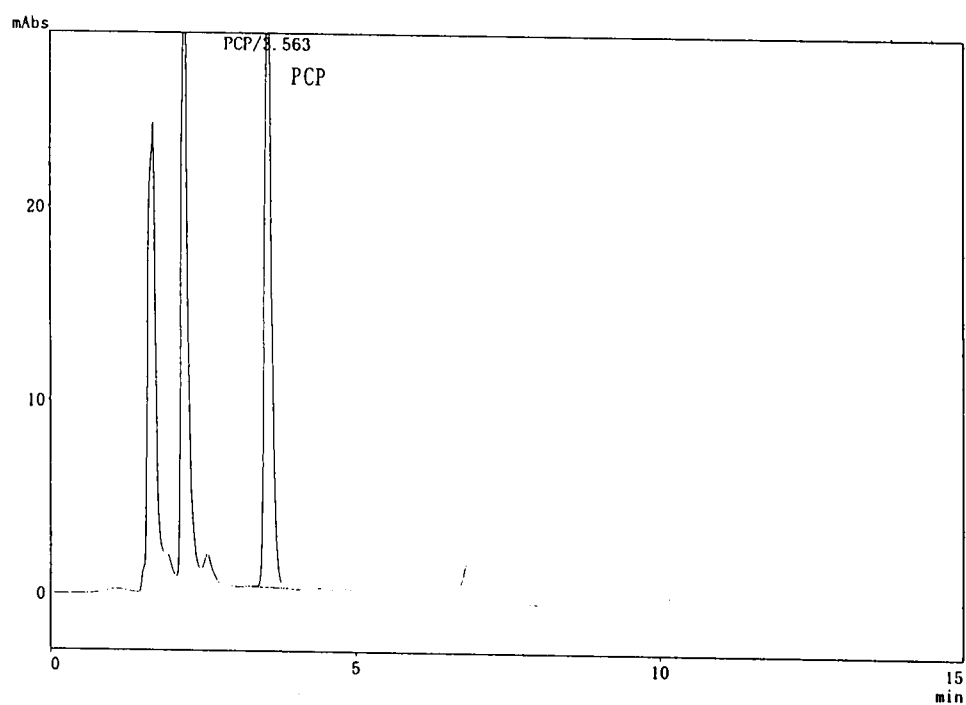
Control : 0hour



Solvent control : 0hour

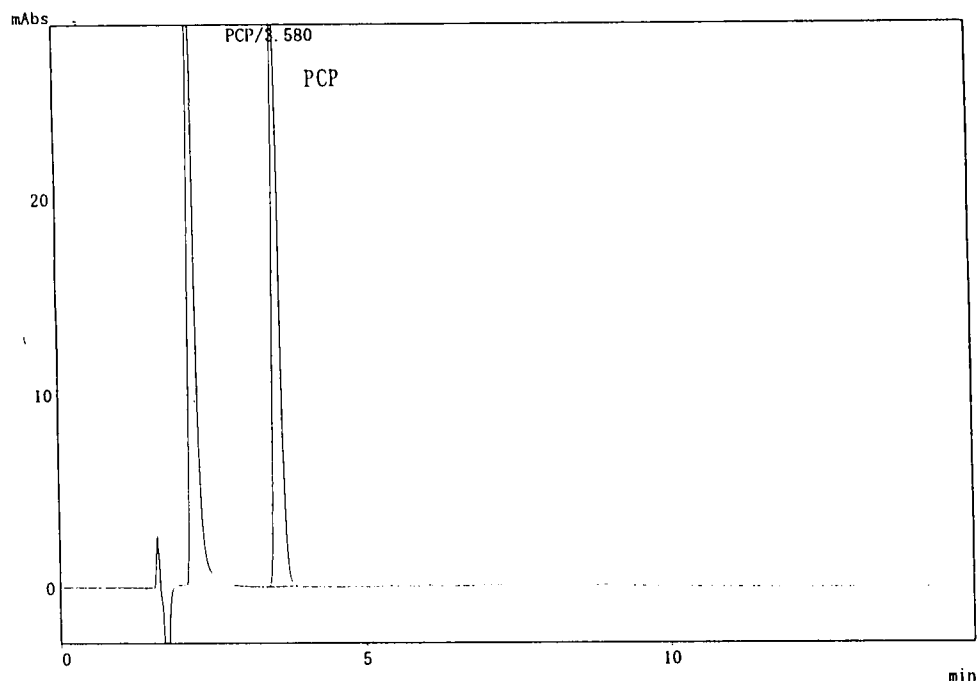


Test solution (0.046 mg/L) : 0hour



*** ヒートアップ ***
 PKNO TIME AREA HEIGHT MK
 [] 3.563 251862 32741

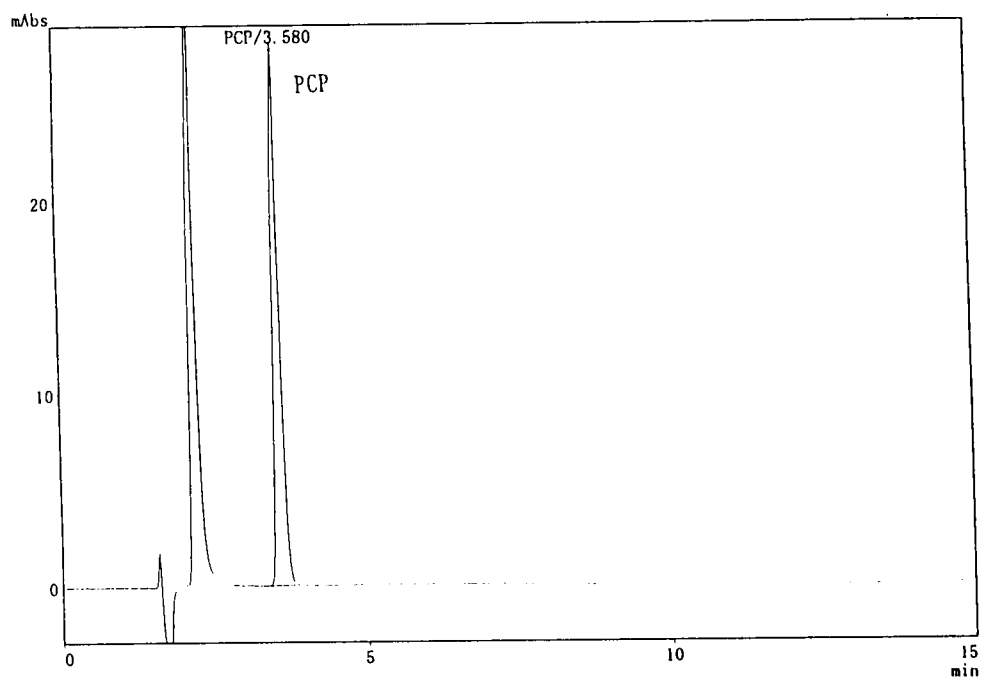
Test solution (0.46mg/L) : 0hour



*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	WK
1	3.580	245882	<u>32647</u>	

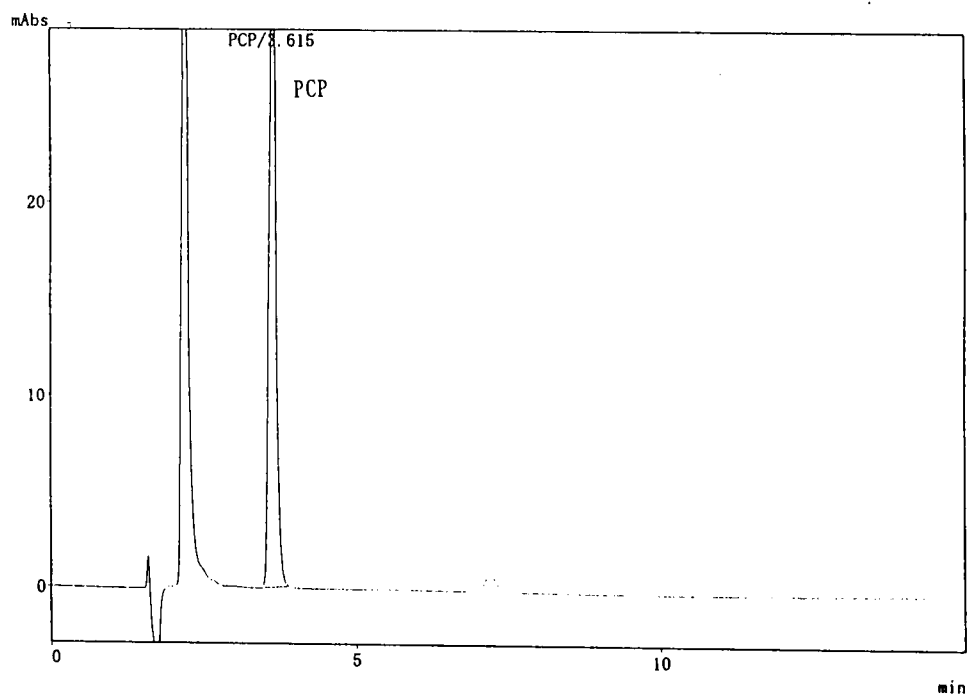
Test solution (10mg/L) : 0hour



*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	WK
1	3.580	211662	<u>28199</u>	

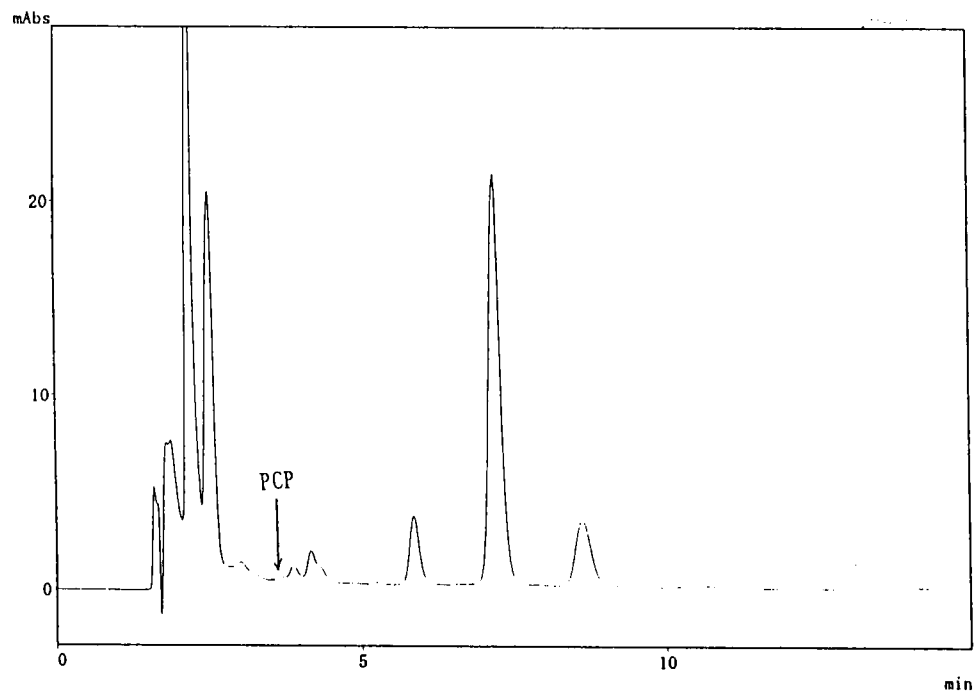
Standard (20ng) : 72hours



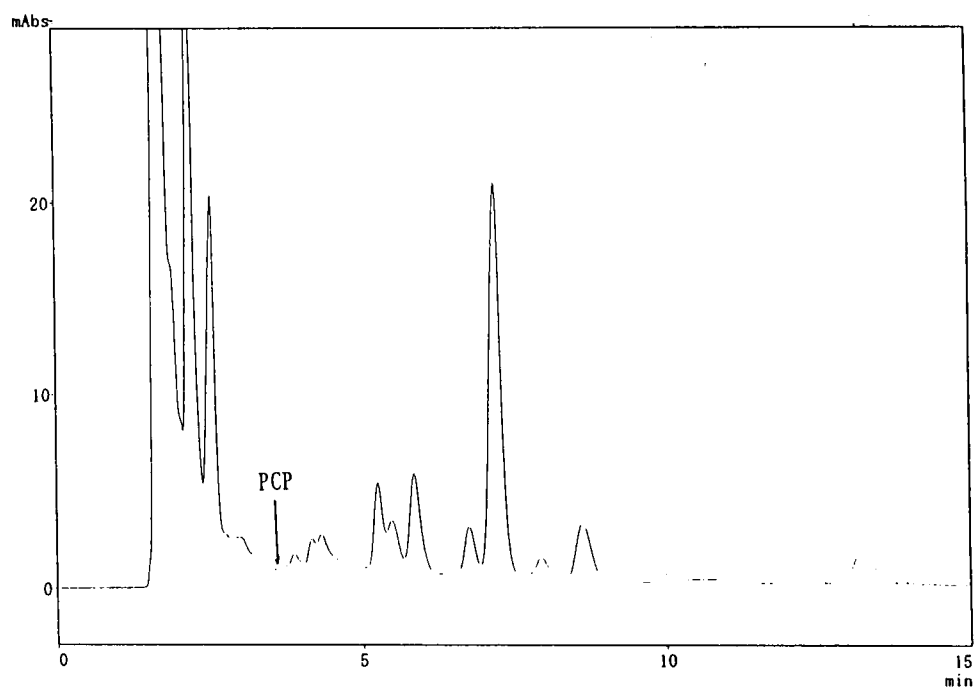
*** ピークレポート ***

PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	WK
1	3.615	271416	<u>36736</u>	

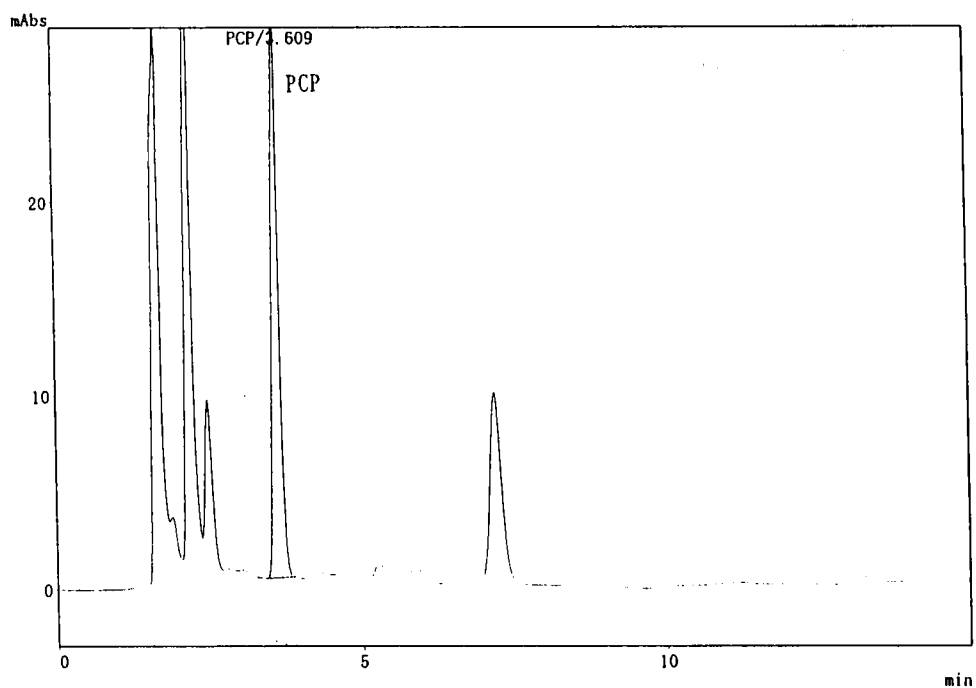
Control : 72hours



Solvent control : 72hours



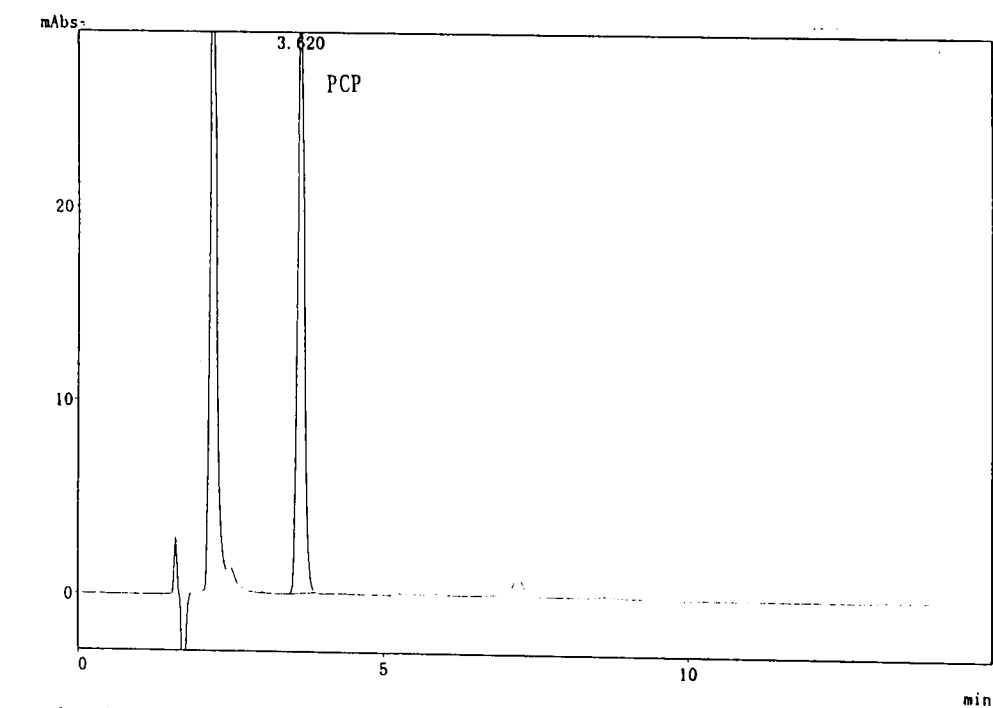
Test solution (0.046mg/L) : 72hours



*** ピークレポート ***

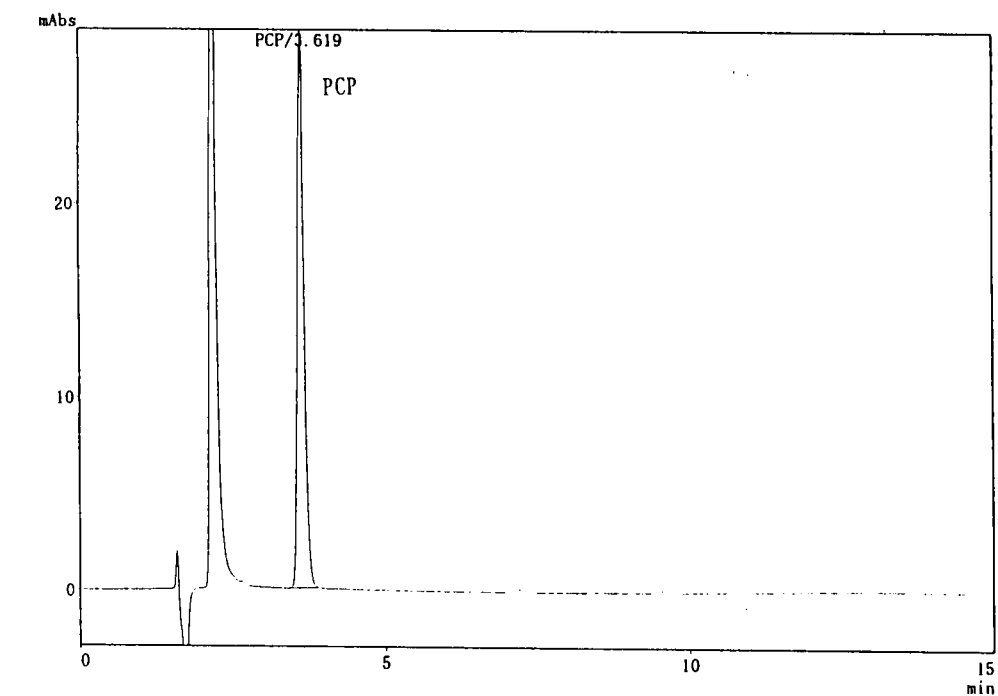
PKNO	TIME	AREA	HEIGHT	MK
1	3.609	230274	30070	

Test solution (0.46mg/L) : 72hours



*** レポート ***
 PKNO TIME AREA HEIGHT MK
 1 3.620 234578 31344

Test solution (10mg/L) : 72hours



*** レポート ***
 PKNO TIME AREA HEIGHT MK
 1 3.619 217237 29194

陳述書

試験委託者： 環境庁

試験の表題： ペンタクロロフェノールの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験

試験番号： 第09011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。

1998 年 6 月 1 日

(財) 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： ペンタクロロフェノールの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する
生長阻害試験

試験番号： 第 0 9 0 1 1 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	1997年12月10日 ～1998年 6月 1日	1997年12月10日 ～1998年 6月 1日
試験報告書監査	1998年 6月 1日	1998年 6月 1日

1998 年 6 月 1 日

(財) 日本食品分析センター 多摩研究所

信頼性保証責任者

