

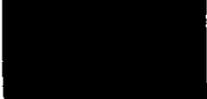
環境庁殿

試 験 報 告 書

D L - メチオニンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する  
生長阻害試験

(試験番号：NO1998-生09)

1999年 7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

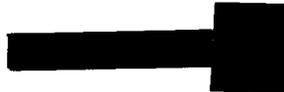
表題： DL-メチオニンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： NO1998-生09

上記試験は環境庁のGLP規則に従って実施したものである。

1999年 7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： DL-メチオニンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する  
生長阻害試験

試験番号： NO1998-生09

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2月16日	1999年2月17日	1999年2月17日
	1999年2月19日	1999年2月22日	1999年2月22日
試験報告書監査	1999年7月26日	1999年7月26日	1999年7月26日

1999年7月30日

信頼性保証業務担当者： 

## 試 験 実 施 概 要

1. 表題： DL-メチオニンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的： DL-メチオニンについて、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  
██████████
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 7月30日）
試験責任者（理化学）	██████████	██████████	（1999年 7月30日）
試験担当者（生物）	██████████	██████████	（1999年 7月30日）
試験担当者（生物）	██████████	██████████	（1999年 7月30日）
試験担当者（生物）	██████████	██████████	（1999年 7月30日）
試験担当者（生物）	██████████	██████████	（1999年 7月30日）
試験担当者（理化学）	██████████	██████████	（1999年 7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 7月30日  
暴露期間 1999年 2月16日～

1999年 2月19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 1～3	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 DL-メチオニンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号 NO1998-生09

### 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: DL-メチオニン
- 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:  $1 \times 10^4$  cells/mL
- 9) 試験濃度: 対照区、1000、320、100、32、10、3.2、1.0、0.32mg/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 (0-72h) : 43.2mg/L (95%信頼区間: 12.1mg/L ~ 154mg/L)  
無影響濃度 (NOECb) : 1.0mg/L
- 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度  
ErC50 (24-48h) : 1000mg/L以上  
無影響濃度 (NOECr) : 3.2mg/L  
  
ErC50 (24-72h) : 1000mg/L以上  
無影響濃度 (NOECr) : 32mg/L

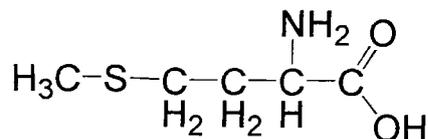
## 1 被験物質

### 1. 1 名称、構造式および物理化学的性状

名称： DL-メチオニン

( CAS : 59-51-8 )

構造式：



分子式：  $\text{CH}_3\text{S}(\text{CH}_2)_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$

分子量： 149.21

安定性： 安定

1-オクタノール/水分配係数 (log P) : 報告されていない

水への溶解度： 33.81 g/L (25℃)

蒸気圧： 報告されていない

### 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： ACH6705

外観： 白色粉末

純度及び不純物： 100.3%

### 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（100rpm）
- 2) 温度： 23±2℃
- 3) 暴露期間： 72時間
- 4) 試験液量： 100mL（OECD培地）
- 5) 照明： 4000～5000 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 (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：     | 300mL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, 0.32 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DL-メチオニンを加え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、そのピーク面積比から定量した。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、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。

$$I_A = (A_c - A_t) / A_c * 100$$

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

ロジット法により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 ( $\mu$ ) 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 ( $\mu$ ) 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。

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

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

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0.32~1060mg/L（設定値0.32~1000mg/L）であり、暴露72時間の被験物質濃度は0.25~1050mg/L（設定値0.32~1000mg/L）であった。

[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1000mg/L区でも20倍以上の生長が認められた。

[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 (0-72h) は43.2mg/Lであり、その95%信頼区間は12.1mg/L~154mg/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 (NOECb)）は1.0mg/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 (24-48h)、ErC50 (24-72h) はそれぞれ1000mg/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)）は、それぞれ3.2mg/L、32mg/Lであった。

[Table 4, 5 (p. 15, 16) Figure 3 (P. 19)]

### 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℃であり、その平均温度は23.0℃であった。試験液のpHは暴露開始時が7.9~9.4であり、試験終了時が8.3~10.4であった。

[Table 6, 7 (p. 17)]

以上

Table 1 OECD media

Nutrient salts	concentration (mg/L)
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0. 1 8 5
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0. 4 1 5
ZnCl <sub>2</sub>	0. 0 0 3
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0. 0 8
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0. 1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0. 0 0 1 5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0. 0 0 7
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0. 0 0 0 0 1
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1 8
NH <sub>4</sub> Cl	1 5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1. 6
NaHCO <sub>3</sub>	5 0
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	1 2
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> 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	1060	106	1050	105
320	337	105	329	103
100	106	106	103	103
32	34.1	107	32.6	102
10	10.2	102	9.63	96
3.2	3.27	102	3.07	96
1.0	1.00	100	0.92	92
0.32	0.32	100	0.25	78
Control	N. D	—	N. D	—

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	5.50	25.25	81.25
	2	1.00	5.00	26.50	79.75
	3	1.00	5.00	24.50	82.25
	Average	1.00	5.17	25.42	81.08
	S.D.	-	0.29	1.01	1.26
0.32	1	1.00	4.50	26.50	81.00
	2	1.00	5.25	24.50	80.25
	3	1.00	5.25	26.00	78.75
	Average	1.00	5.00	25.67	80.00
	S.D.	-	0.43	1.04	1.15
1.0	1	1.00	6.00	22.25	78.25
	2	1.00	5.50	25.50	81.50
	3	1.00	5.25	24.25	85.25
	Average	1.00	5.58	24.00	81.67
	S.D.	-	0.38	1.64	3.50
3.2	1	1.00	5.00	19.75	64.00
	2	1.00	4.50	22.00	71.00
	3	1.00	4.00	21.50	66.75
	Average	1.00	4.50	21.08	67.25
	S.D.	-	0.50	1.18	3.53
10	1	1.00	4.50	12.50	55.50
	2	1.00	4.00	13.75	55.25
	3	1.00	4.50	14.00	52.50
	Average	1.00	4.33	13.42	54.42
	S.D.	-	0.29	0.80	1.66
32	1	1.00	4.00	12.25	42.25
	2	1.00	2.75	11.50	38.75
	3	1.00	2.75	13.25	46.75
	Average	1.00	3.17	12.33	42.58
	S.D.	-	0.72	0.88	4.01
100	1	1.00	4.25	12.25	37.00
	2	1.00	3.25	11.25	33.75
	3	1.00	3.50	13.25	32.25
	Average	1.00	3.67	12.25	34.33
	S.D.	-	0.52	1.00	2.43
320	1	1.00	3.00	8.00	28.50
	2	1.00	3.25	8.00	29.00
	3	1.00	3.25	11.25	28.00
	Average	1.00	3.17	9.08	28.50
	S.D.	-	0.14	1.88	0.50
1000	1	1.00	2.25	6.50	30.25
	2	1.00	2.50	6.00	26.75
	3	1.00	2.75	6.25	30.50
	Average	1.00	2.50	6.25	29.17
	S.D.	-	0.25	0.25	2.10

Table 4. Growth Inhibition of *Selenastrum capricornutum*

Concentration mg/L		Area	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)	Rate	Inhibition (%)
		A(0-72h)	I <sub>A</sub> (0-72h)	$\mu$ (24-48)	I <sub>m</sub> (24-48)	$\mu$ (24-72)	I <sub>m</sub> (24-72)
Control	1	1653	-0.4	0.0635	4.4	0.0561	2.2
	2	1653	-0.4	0.0695	-4.7	0.0577	-0.6
	3	1635	0.7	0.0662	0.3	0.0583	-1.7
	Average	1647	0.0	0.0664	0.0	0.0574	0.0
0.32	1	1656	-0.6	0.0739	-11.3	0.0602	-4.9
	2	1617	1.8	0.0642	3.3	0.0568	1.0
	3	1635	0.7	0.0667	-0.4	0.0564	1.7
	Average	1636	0.7	0.0682	-2.8	0.0578	-0.8
1.0	1	1557	5.5	0.0546	17.8	0.0535	6.7
	2	1662	-0.9	0.0639	3.7	0.0562	2.2
	3	1671	-1.5	0.0638	4.0	0.0581	-1.2
	Average	1630	1.0	0.0608	8.5	0.0559	2.6
3.2	1	1302	20.9	0.0572	13.8	0.0531	7.4
	2	1428	13.3	0.0661	0.4	0.0575	-0.2
	3	1353	17.8	0.0701	-5.5	0.0586	-2.2
	Average	1361	17.4	0.0645	2.9	0.0564	1.7
10	1	1014	38.4	0.0426	35.9	0.0523	8.8
	2	1029	37.5	0.0514	22.5	0.0547	4.7
	3	1014	38.4	0.0473	28.8	0.0512	10.8
	Average	1019	38.1	0.0471	29.1	0.0527	8.1
32	1	837	49.2	0.0466	29.8	0.0491	14.4
	2	747	54.6	0.0596	10.2	0.0551	3.9
	3	885	46.3	0.0655	1.3	0.0590	-2.9
	Average	823	50.0	0.0573	13.8	0.0544	5.2
100	1	780	52.6	0.0441	33.6	0.0451	21.4
	2	693	57.9	0.0517	22.1	0.0488	15.0
	3	729	55.7	0.0555	16.5	0.0463	19.4
	Average	734	55.4	0.0504	24.0	0.0467	18.6
320	1	546	66.8	0.0409	38.4	0.0469	18.3
	2	558	66.1	0.0375	43.5	0.0456	20.5
	3	624	62.1	0.0517	22.1	0.0449	21.8
	Average	576	65.0	0.0434	34.7	0.0458	20.2
1000	1	513	68.8	0.0442	33.4	0.0541	5.6
	2	465	71.8	0.0365	45.1	0.0494	13.9
	3	522	68.3	0.0342	48.5	0.0501	12.6
	Average	500	69.6	0.0383	42.3	0.0512	10.7

Table 5. Calculated EC50 and NOEC

Based on I<sub>A</sub> value

	(mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
EbC50 (0-72h)	43.2	12.1~154
NOECb (0-72h)	1.0	-

Based on I<sub>m</sub> value

	(mg/L)	95-Percent Confidence Limits (mg/L)
ErC50 (24-48h)	>1000	-
NOECr (24-48h)	3.2	-
ErC50 (24-72h)	>1000	-
NOECr (24-72h)	32	-

Table 6. Temperature In Algal Culture Cabinet

Temperature(°C)				
0 h	24 h	48 h	72 h	Average
23.0	23.0	23.0	23.0	23.0

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

Nominal (mg/L)		pH	
		0 Hour	72 Hour
Control	1		10.2
	2	9.3	10.0
	3		9.7
0.32	1		10.3
	2	9.4	10.3
	3		10.3
1.0	1		10.2
	2	9.3	10.2
	3		10.4
3.2	1		10.0
	2	9.2	9.5
	3		9.8
10	1		9.2
	2	9.3	9.8
	3		9.4
32	1		9.2
	2	9.0	9.1
	3		9.3
100	1		8.9
	2	8.6	8.9
	3		8.9
320	1		8.7
	2	8.3	8.7
	3		8.6
1000	1		8.3
	2	7.9	8.4
	3		8.4

Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

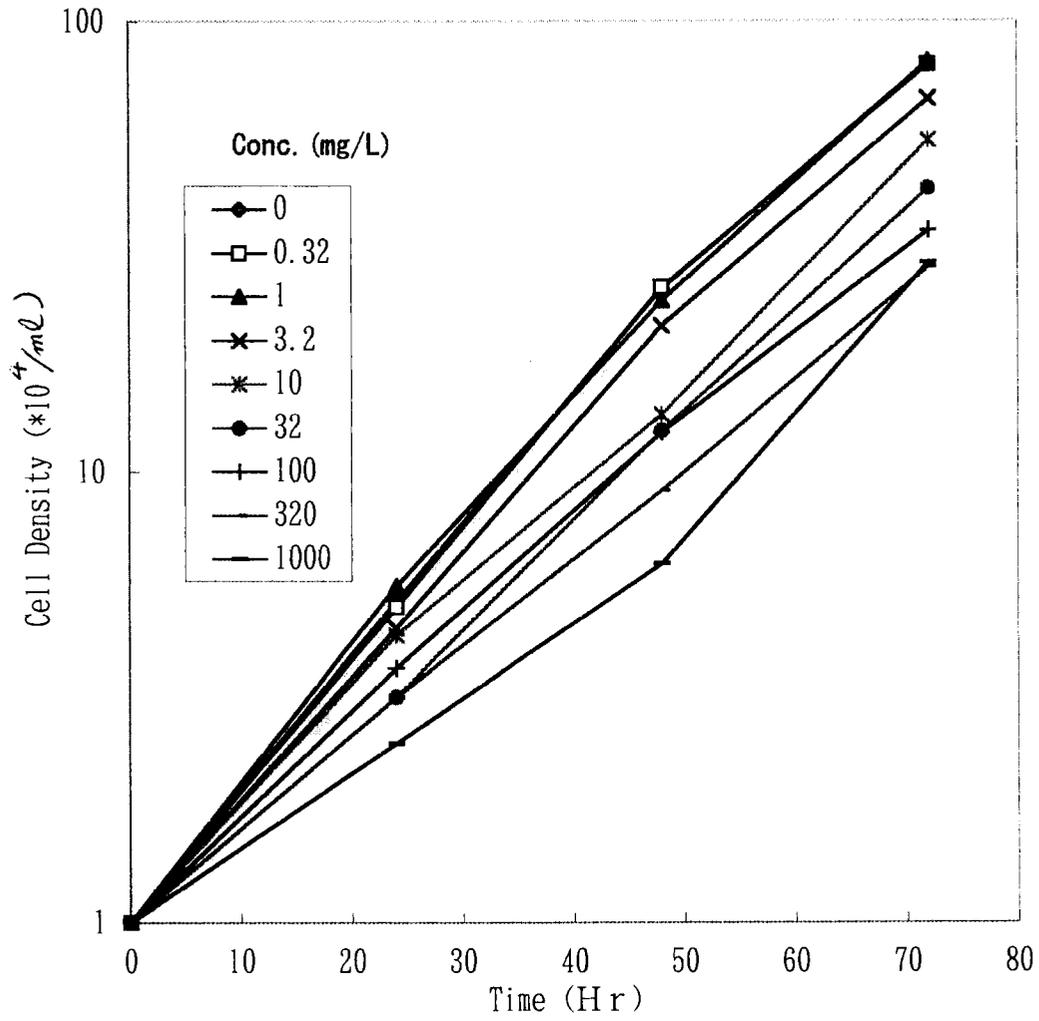


Figure 2 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on  $I_A$  value

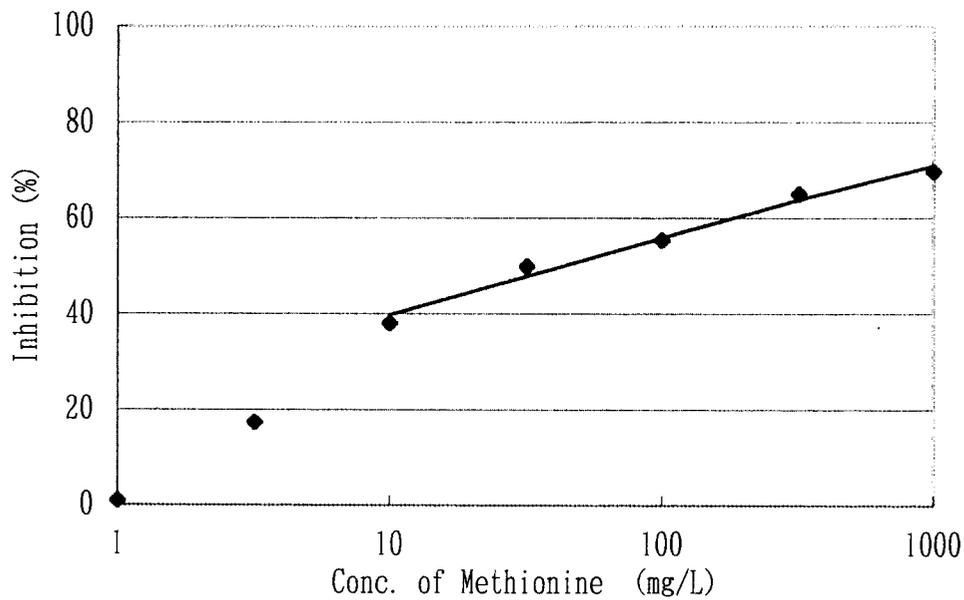
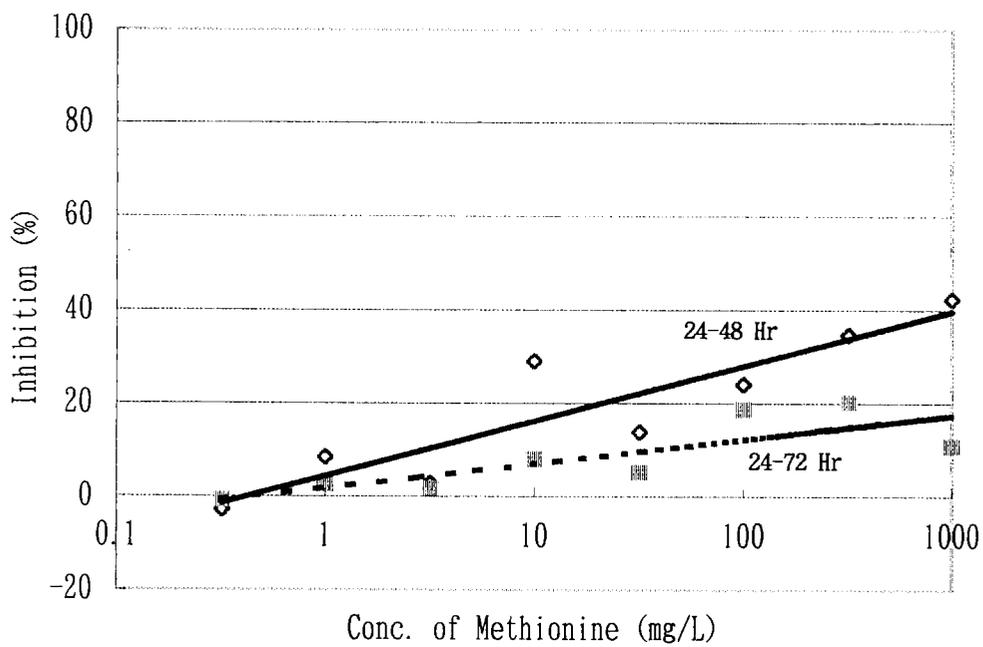


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on  $I_m$  value



付属試料－ 1

試験液の分析方法

(全 1 4 頁)

## DL-メチオニン の分析法

(株)クレハ分析センター

試料 : 試験液

## 化学名及び化学式

DL-Methionine

分子式 :  $C_6H_{11}NO_2S$   
 化学式 :  $CH_3SCH_2CH_2CH(NH_2)COOH$   
 分子量 : m. w 149.21

## 物理的・化学的性質

液体、融点 : 281℃  
 性状 : 水に可溶  
 : 白色の薄片状結晶か結晶性粉末

## ① 分析法

## 1) 装置及び器具

高速液体クロマトグラフ : LC-10AD 島津製作所  
 検出器 (UV) : SPD-10A 島津製作所  
 オートインジェクタ : SIL-6B 島津製作所  
 インテグレーター : C-R5A (CHROMATOPAC) 島津製作所  
 メスフラスコ : 容量 100 mL 褐色  
 ホールピペット : 容量 1 mL、10 mL、20 mL  
 マイクロシリンジ : 容量 100  $\mu$ L

## 2) 試薬

アセトニトリル : 試薬 高速液体クロマトグラフィ用 和光純薬 (株)  
 水 : 超純水 Milli-RX 12 $\alpha$  Millipore  
 DL-メチオニン : 試薬 特級

## 3) DL-メチオニン標準原液 (1000 mg/L)

DL-メチオニン標準品の 0.100 g を容量 100 mL のメスフラスコに量りとり、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

分離管 : Shim-pack CLC-ODS 150 mm  $\times$  6 mm ID 島津製作所  
 検出波長 : UV 210 nm  
 溶離液 : 0.7 mL + (アセトニトリル 3.5 : 水 6.5 V/V) 100 mL  
 流量 : 1.05 mL/min  
 感度 : 0.128 AFUS  
 記録紙速度 : 5 mm/min  
 保持時間 : 2.3 min  
 試料量 : 20  $\mu$ L

## 5) 検量線の作成

DL-メチオニンの標準原液に水を加えて希釈し、200、100、10、1 mg/L の標準溶液を調整する。この液 20  $\mu$ L を上記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを画かせ、ピーク面積を記録させる。濃度を縦軸に、横軸にピークの面積をとり検量線を作成する。

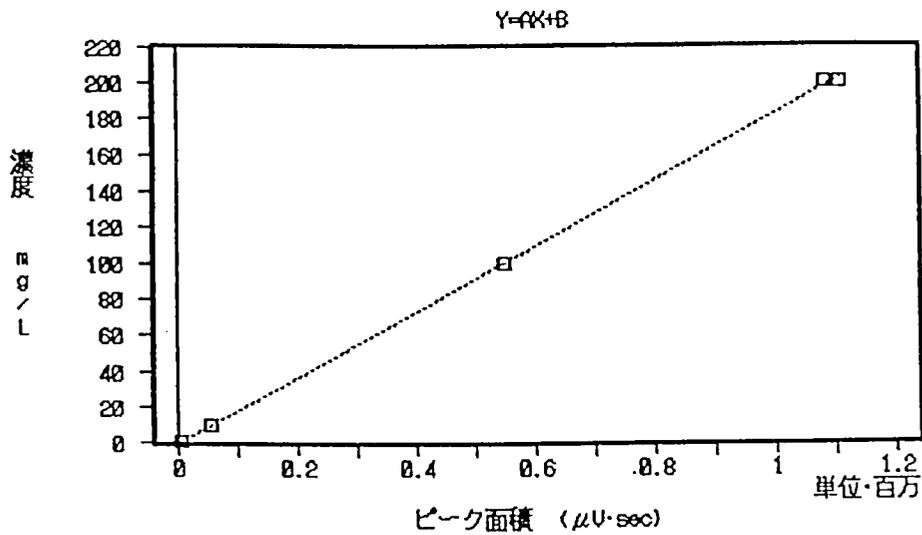
(注-1) (注-2)

1. 検量線作成

表-1 Input Date

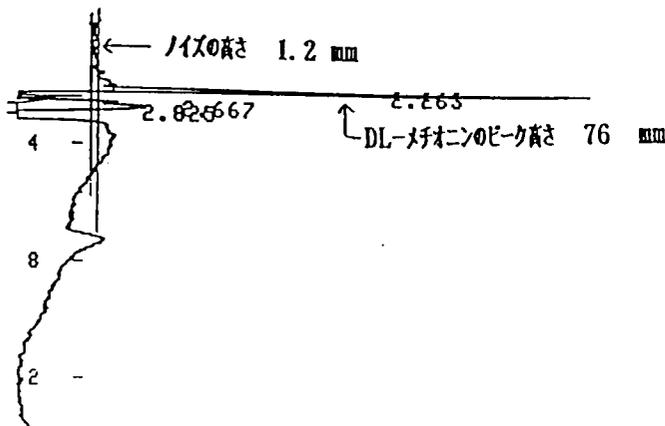
No	標準溶液濃度 (mg/L)	ピーク面積 ( $\mu V \cdot sec$ )
	1	1.0
2	10.0	54618
3	100.0	548022
4	200.0	1107339

図-1 検量線



2. 検出限界及び定量下限値の計算

図-2 クロマトグラム



ATTEN 0

- ・ DL-メチオン濃度 0.5 mg/L
- ・ DL-メチオンのピーク高さ 76 mm
- ・ ノイズの高さ 1.2 mm

< 計算式 >

$$\frac{3 \times \frac{1.2}{2}}{76.0} \times 0.5 = 0.01 \text{ (mg/L)}$$

検出限界  
↓  
(mg/L)

検出限界の 5 倍とすると、  
定量下限値は 0.05 mg/L となる。

計算により、  
 検出限界 0.01 mg/L  
 定量下限値 0.05 mg/L

6) 分析操作 (例 1000 mg/L 試料溶液)

50 mLのメスフラスコに水約 10 mLをとり、これに、試料溶液の 5 mLをホールピペットにて量りとり、水を標線まで加える。

この液 20  $\mu$ Lを前記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムを画かせ、DL-メチオニンの保持時間に相当するピークの面積を記録させ、検量線より濃度を求める。

(注-3) (注-4)

② 添加回収率試験

DL-メチオニンの標準原液に水を加えて希釈し、100 と 10 mg/Lの試験溶液を調整し、繰り返し測定により回収率を求めた結果、良好な回収率を得た。

Table 1. 添加回収率の測定結果

試料濃度 (mg/L)	測定値 (mg/L)	回収率 (%)	平均回収率 (%)	変動係数 (%)
1	10.05	101	101.0	0.09
	10.07	101		
	10.07	101		
100.0	100.2	100	100.7	0.17
	100.5	101		
	100.6	101		

③ 保存安定性試験

DL-メチオニンの標準原液に水を加えて希釈し、1000、100、10、1 mg/Lの試験溶液を調整した。この試験溶液を 4  $^{\circ}$ Cの冷暗所に保存した時の 3日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。

設定濃度 (mg/L)	3日後の経時濃度 (mg/L)		
	1回目	2回目	平均
0	ND	ND	ND
1.00	0.97	0.97	0.97
10.0	10.1	10.1	10.1
100.0	100.1	100.4	100.3
1000	1002	1002	1002

(注-5)

(注-1) 連日に測定を行なう場合は、2濃度以上の標準溶液にて検量線をチェックし、変動の無いことを確認し測定すること。

(注-2) 定量下限値：0.05 mg/L ND：定量下限値未満

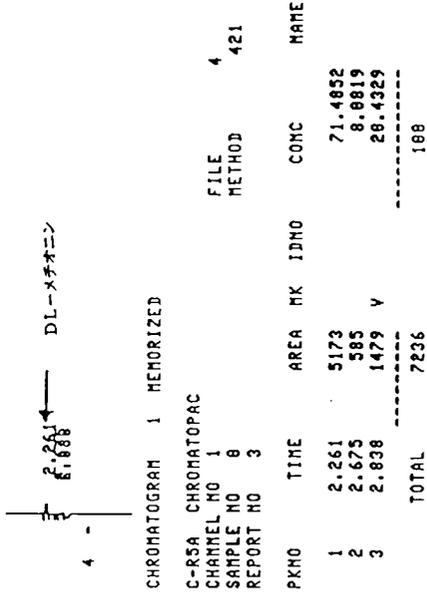
(注-3) 試料溶液の濃度は 100 mg/L~1 mg/L に調整し測定すること。

(注-4) 1 mg/L 試料溶液の場合は、1 mg/L と 10 mg/L の標準溶液で作成した検量線を用いて濃度を求める。

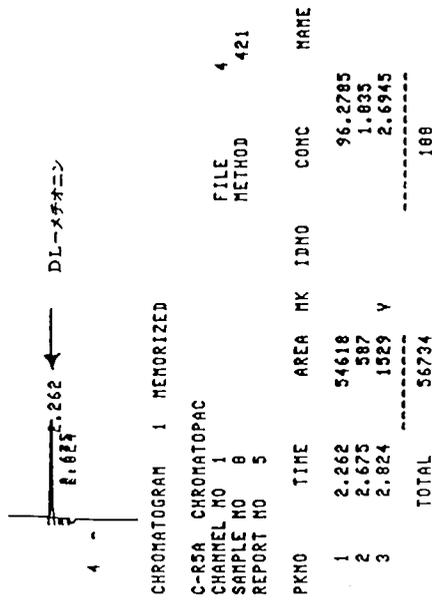
(注-5) 試料溶液の保管は、4  $^{\circ}$ Cの冷暗所に保管すること。

④ 標準溶液の液体クロマトグラム (検量線作成用)

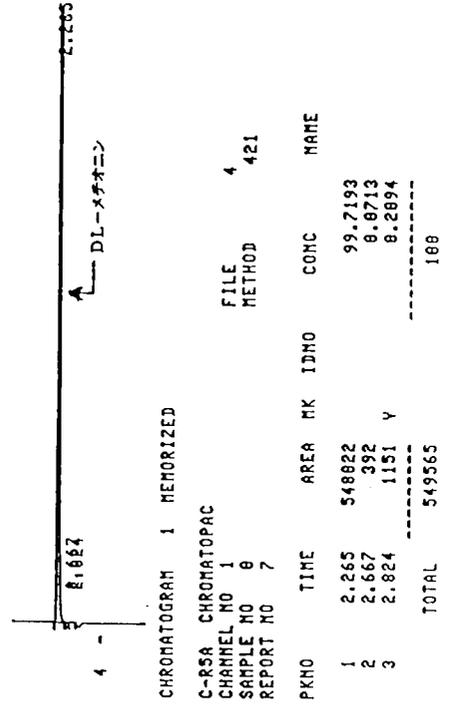
☒-3  
1.0 mg/L



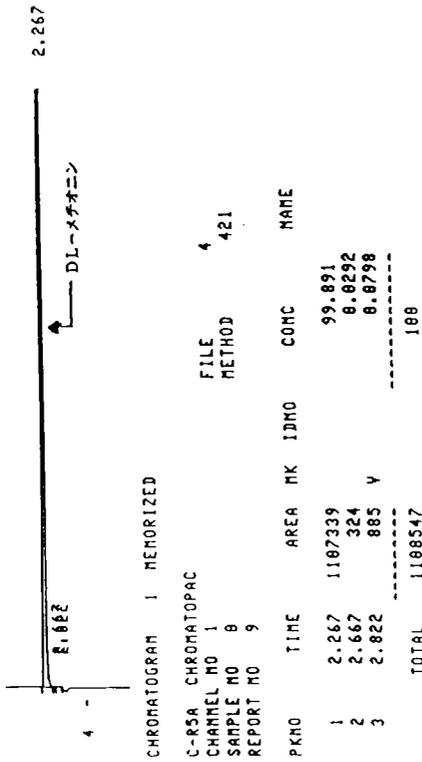
☒-4  
10.0 mg/L



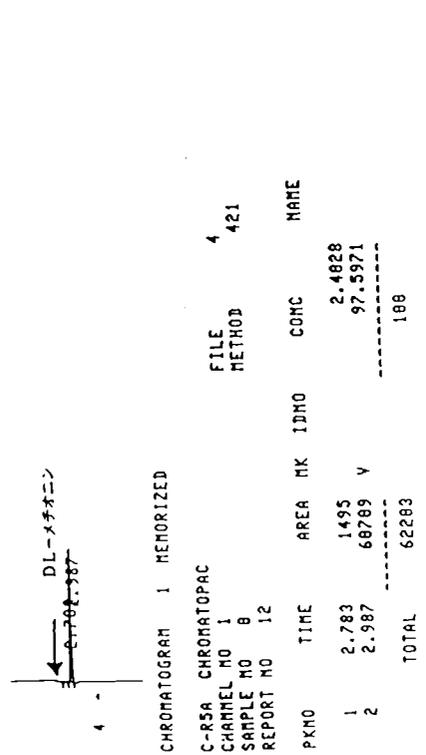
☒-5  
100.0 mg/L



☒-6  
200.0 mg/L

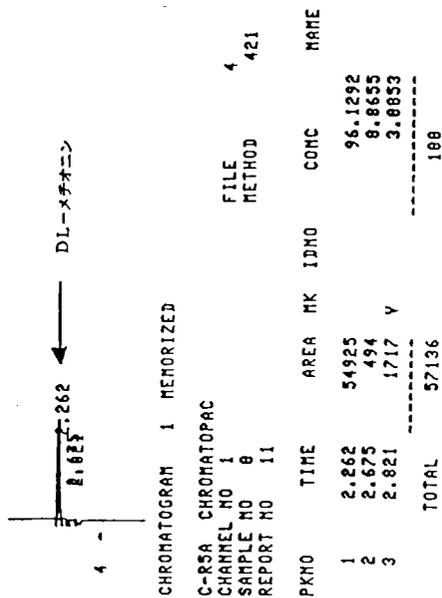


☒-7  
対照区 (無添加区)

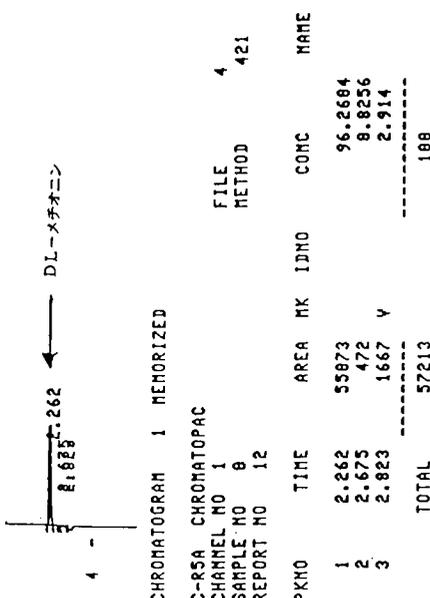


⑤ 添加回収率試験の液体クロマトグラム

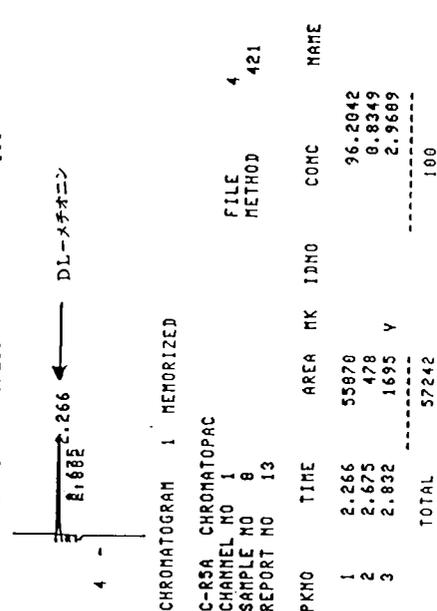
☑-8  
10.0 mg/L  
n-1



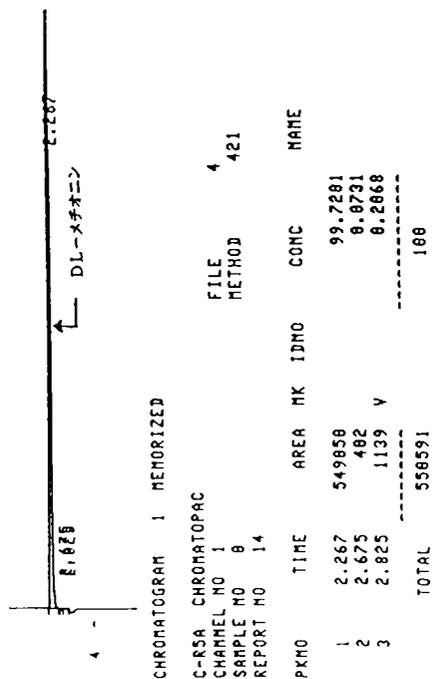
☑-9  
10.0 mg/L  
n-2



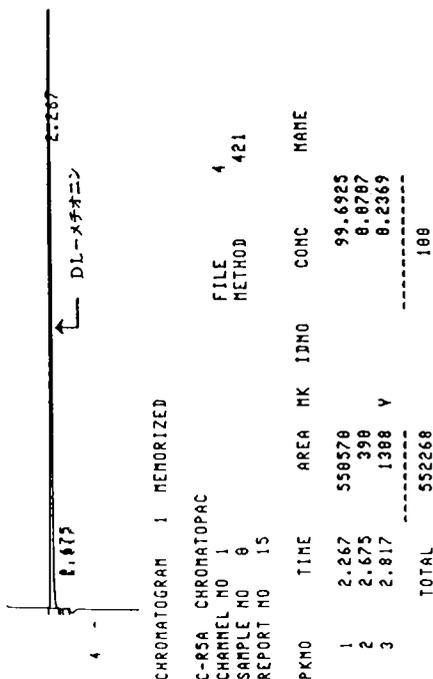
☑-10  
10.0 mg/L  
n-3



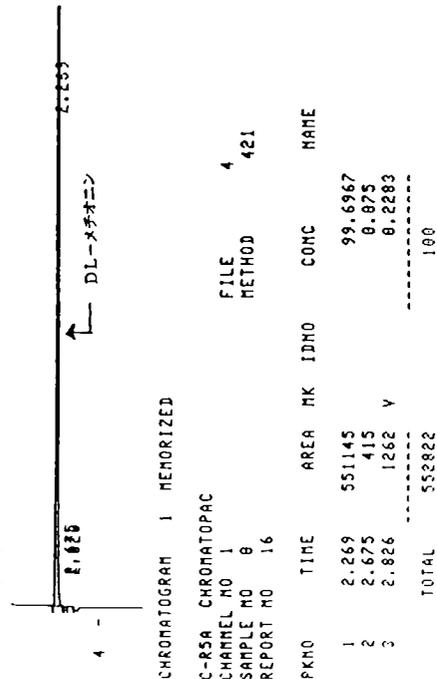
☑-11  
100.0 mg/L  
n-1



☑-12  
100.0 mg/L  
n-2

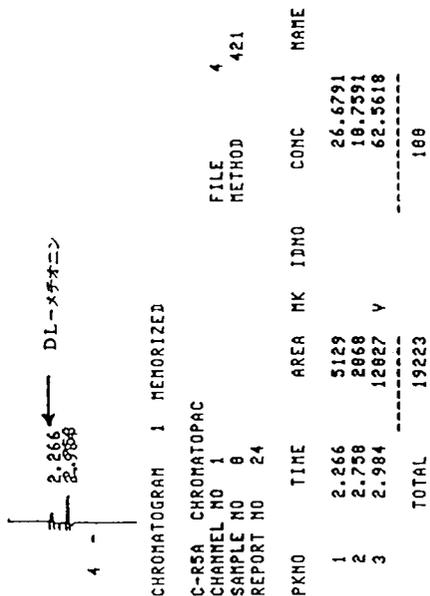


☑-13  
100.0 mg/L  
n-3

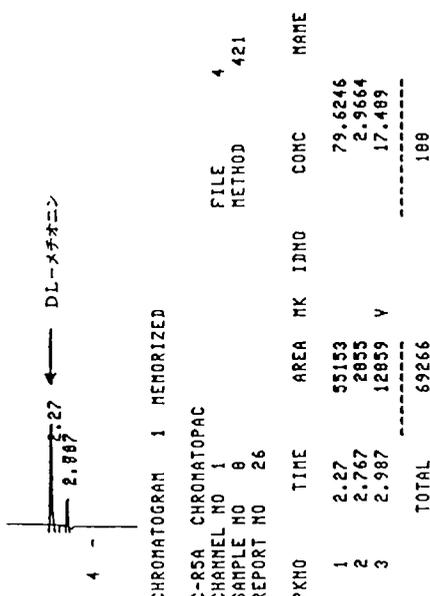


⑥ 保存安定性試験の液体クロマトグラム

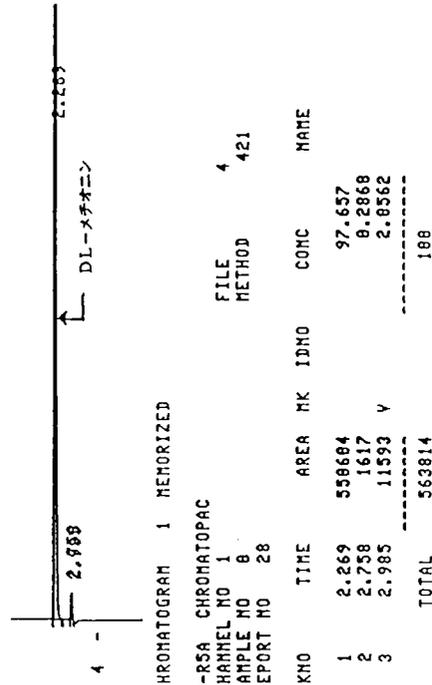
☒-14  
1.0 mg/L  
3日後



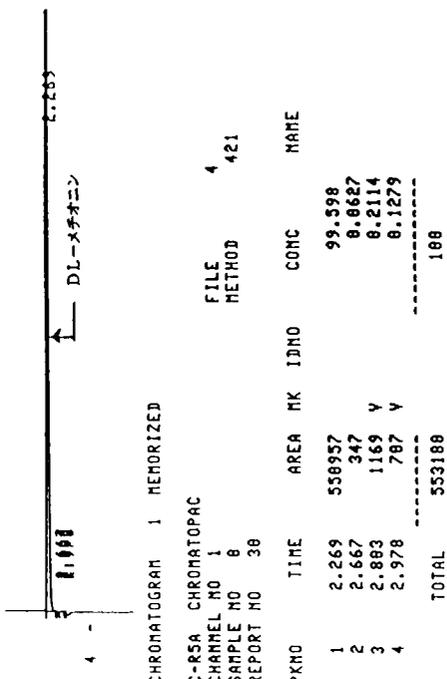
☒-15  
10.0 mg/L  
3日後



☒-16  
100.0 mg/L  
3日後



☒-17  
1000 mg/L  
3日後



試験結果の液体クロマトグラム

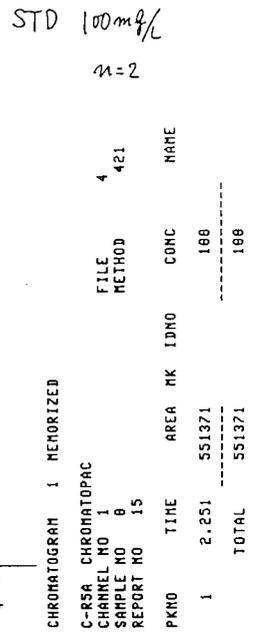
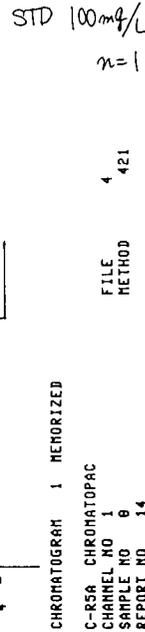
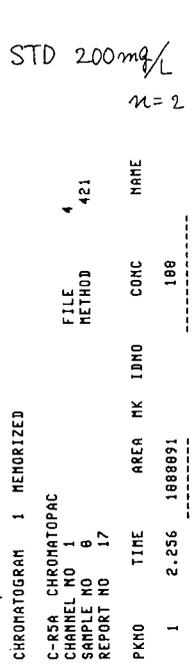
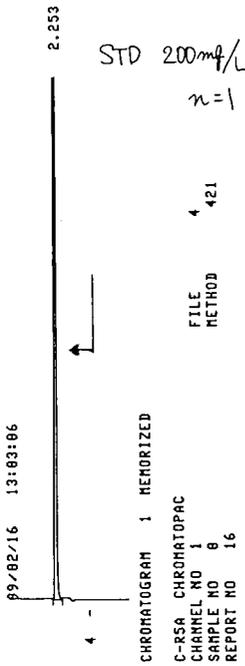
試験名 : DL-メチオニンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する  
成長阻害試験 (試験番号: NO1998生-09)

暴露開始時  
図-18  
標準溶液  
200 mg/L n-1

暴露開始時  
図-19  
標準溶液  
200 mg/L n-2

暴露開始時  
図-20  
標準溶液  
100 mg/L n-1

暴露開始時  
図-21  
標準溶液  
100 mg/L n-2



暴露開始時  
図-22  
標準溶液  
10 mg/L n-1

暴露開始時  
図-23  
標準溶液  
10 mg/L n-2

暴露開始時  
図-24  
標準溶液  
1 mg/L n-1

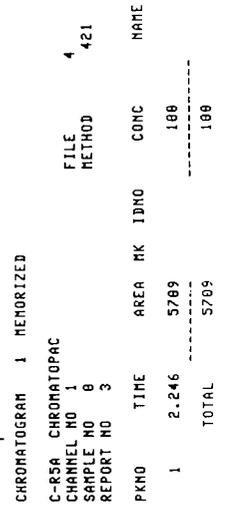
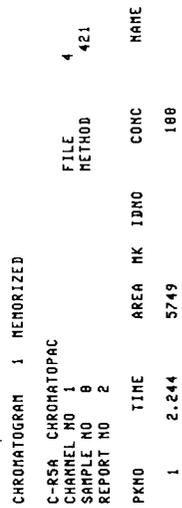
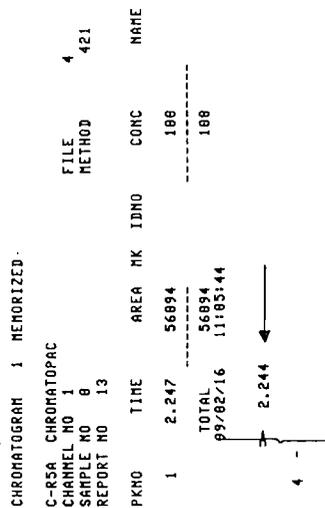
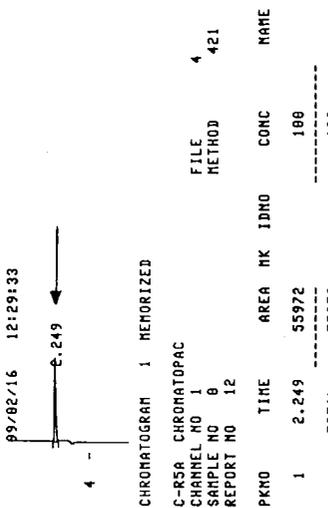
暴露開始時  
図-25  
標準溶液  
1 mg/L n-2

STD 10mg/L  
n=1

STD 10mg/L  
n=2

STD 1mg/L  
n=1

STD 1mg/L  
n=2



暴露開始時  
 図-26  
 对照区  
 生-09-19-1

暴露開始時  
 図-27  
 对照区  
 生-09-19-2

暴露開始時  
 図-28  
 0.32 mg/L  
 生-09-18-1

暴露開始時  
 図-29  
 0.32 mg/L  
 生-09-18-2

生09-19 对照区

生09-19 对照区

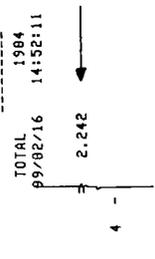
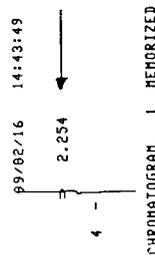
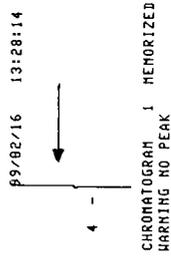
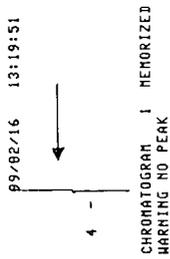
生09-18 0.32mg/L

生09-18 0.32mg/L  
 n=2

n=1

n=2

n=1



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.254	1984		188		
TOTAL 1984						

PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.242	1910		188		
TOTAL 1910						

暴露開始時  
 図-30  
 1.0 mg/L  
 生-09-17-1

暴露開始時  
 図-31  
 1.0 mg/L  
 生-09-17-2

暴露開始時  
 図-32  
 3.2 mg/L  
 生-09-16-1

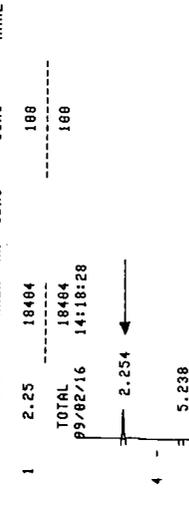
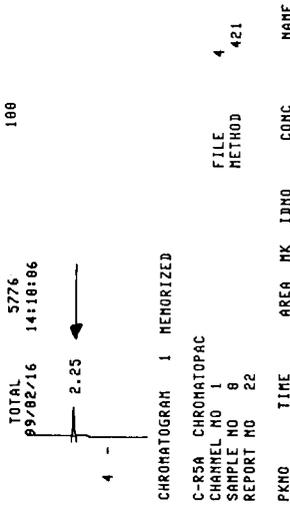
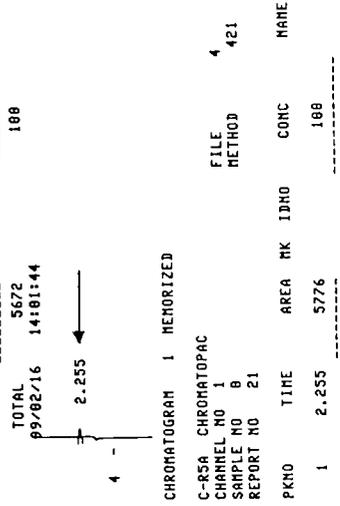
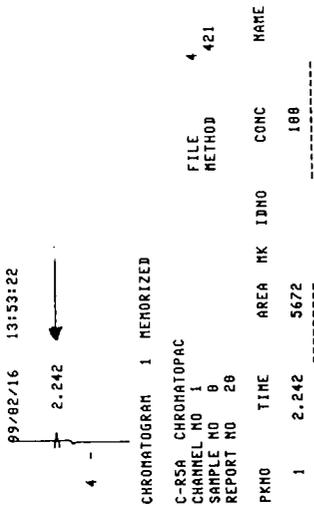
暴露開始時  
 図-33  
 3.2 mg/L  
 生-09-16-2

生09-17 1mg/L  
 n=1

生09-17 1mg/L  
 n=2

生09-16 3.2mg/L  
 n=1

生09-16 3.2mg/L  
 n=2



PKNO	TIME	AREA	MK	IDNO	CONC	NAME
1	2.254	18355		96.6674		
2	5.238	633		3.9326		
TOTAL 18988						

暴露開始時  
 ☒-34  
 10mg/L  
 生-09-15-1

暴露開始時  
 ☒-35  
 10mg/L  
 生-09-15-2

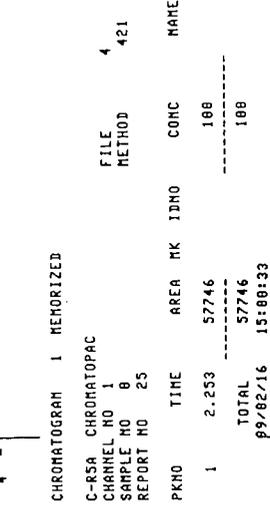
暴露開始時  
 ☒-36  
 32mg/L  
 生-09-14-1

暴露開始時  
 ☒-37  
 32mg/L  
 生-09-14-2

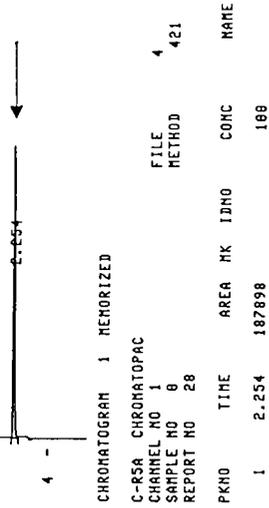
生09-15 10mg/L  
 n=1



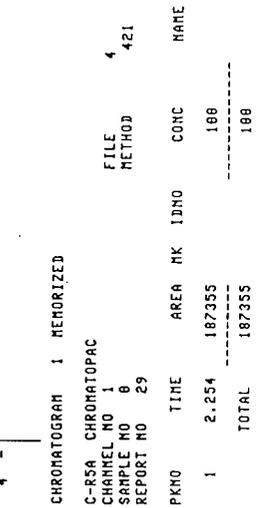
生09-15 10mg/L  
 n=2



生09-14 32mg/L  
 n=1



生09-14 32mg/L  
 n=2



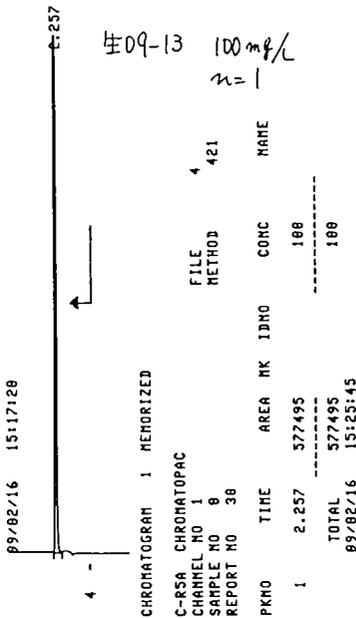
暴露開始時  
 ☒-38  
 100mg/L  
 生-09-13-1

暴露開始時  
 ☒-39  
 100mg/L  
 生-09-13-2

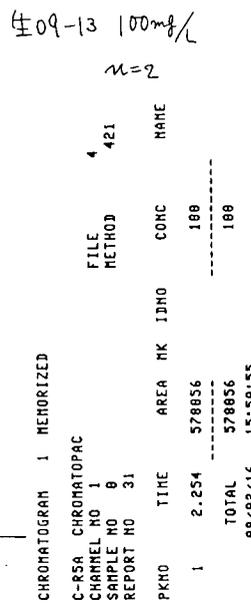
暴露開始時  
 ☒-40  
 320mg/L  
 生-09-12-1

暴露開始時  
 ☒-41  
 320mg/L  
 生-09-12-2

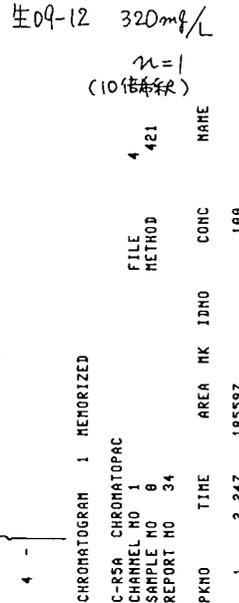
生09-13 100mg/L  
 n=1



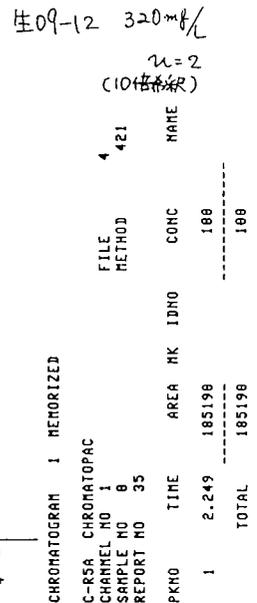
生09-13 100mg/L  
 n=2



生09-12 320mg/L  
 n=1  
 (10時後)

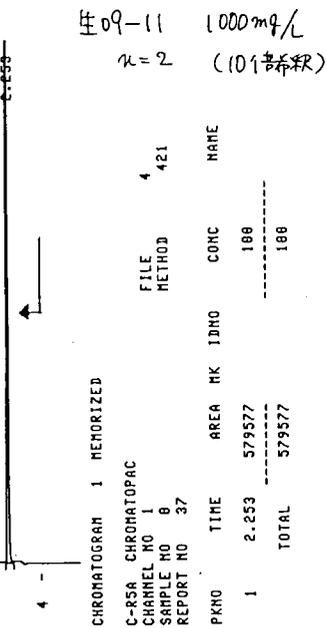
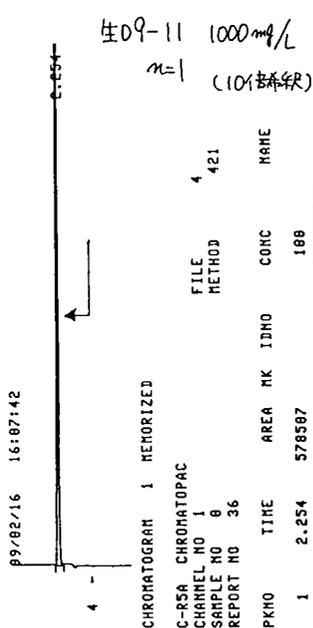


生09-12 320mg/L  
 n=2  
 (10時後)



暴露開始時  
 図-42  
 1000 mg/L  
 生-09-11-1

暴露開始時  
 図-43  
 1000 mg/L  
 生-09-11-2

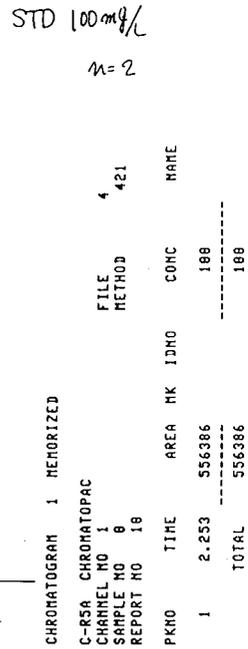
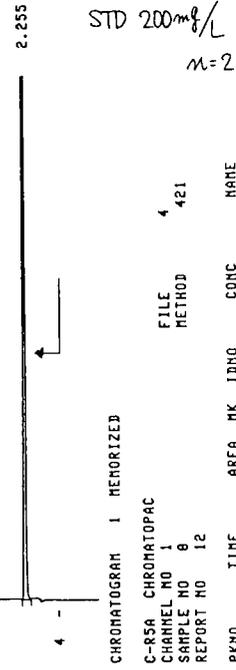
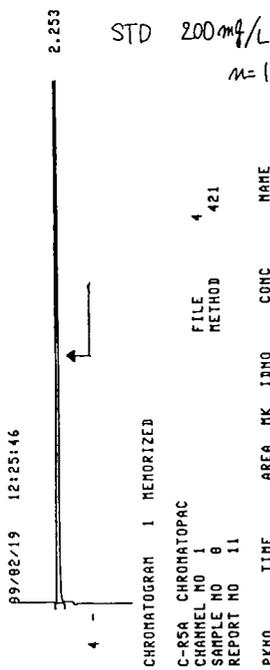


暴露終了時 (72時間)  
 ☒-44  
 標準溶液  
 200 mg/L n-1

暴露終了時 (72時間)  
 ☒-45  
 標準溶液  
 200 mg/L n-2

暴露終了時 (72時間)  
 ☒-46  
 標準溶液  
 100 mg/L n-1

暴露終了時 (72時間)  
 ☒-47  
 標準溶液  
 100 mg/L n-2



暴露終了時 (72時間)  
 ☒-48  
 標準溶液  
 10 mg/L n-1

暴露終了時 (72時間)  
 ☒-49  
 標準溶液  
 10 mg/L n-2

暴露終了時 (72時間)  
 ☒-50  
 標準溶液  
 1 mg/L n-1

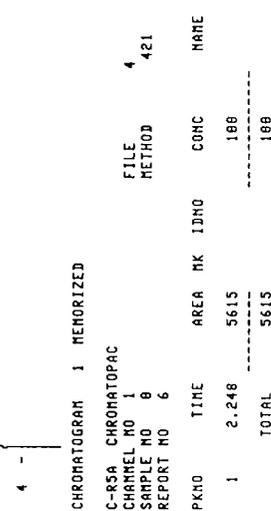
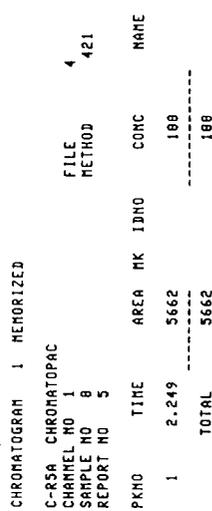
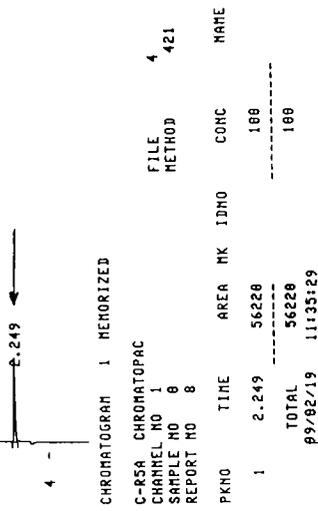
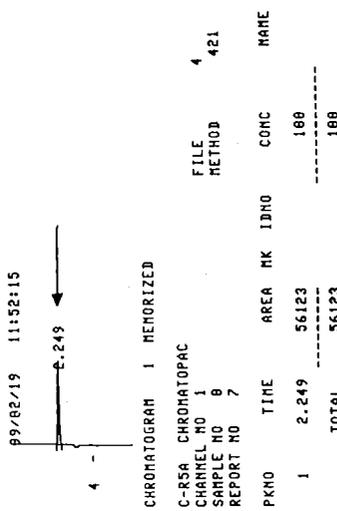
暴露終了時 (72時間)  
 ☒-51  
 標準溶液  
 1 mg/L n-2

STD 10mg/L  
 n=1

STD 10mg/L  
 n=2

STD 1mg/L  
 n=1

STD 1mg/L  
 n=2



暴露終了時 (72時間)  
 図-52  
 対照区  
 生-09-28-1

暴露終了時 (72時間)  
 図-53  
 対照区  
 生-09-28-2

暴露終了時 (72時間)  
 図-54  
 0.32 mg/L  
 生-09-27-1

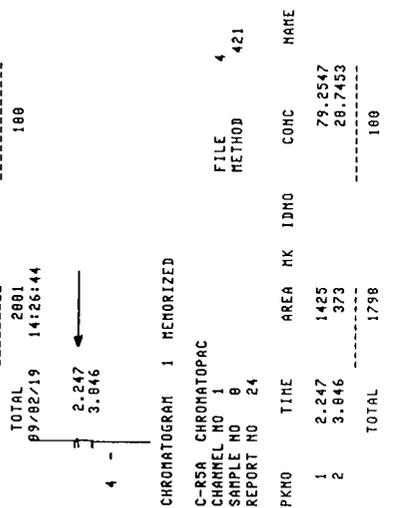
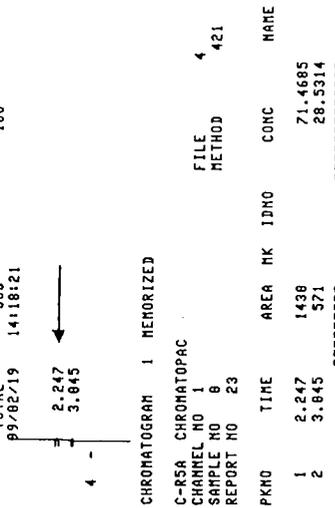
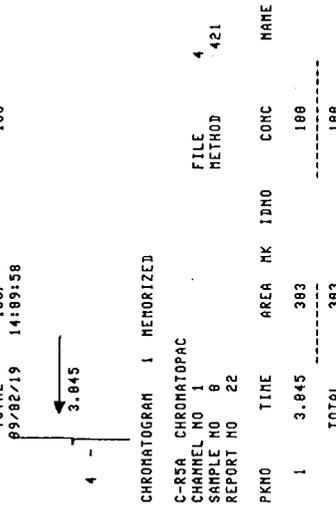
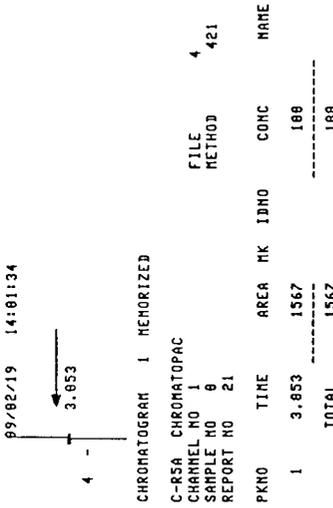
暴露終了時 (72時間)  
 図-55  
 0.32 mg/L  
 生-09-27-2

生09-28 対照区  
 n=1

生09-28 対照区  
 n=2

生09-27 0.32mg/L  
 n=1

生09-27 0.32mg/L  
 n=2



暴露終了時 (72時間)  
 図-56  
 1.0 mg/L  
 生-09-26-1

暴露終了時 (72時間)  
 図-57  
 1.0 mg/L  
 生-09-26-2

暴露終了時 (72時間)  
 図-58  
 3.2 mg/L  
 生-09-25-1

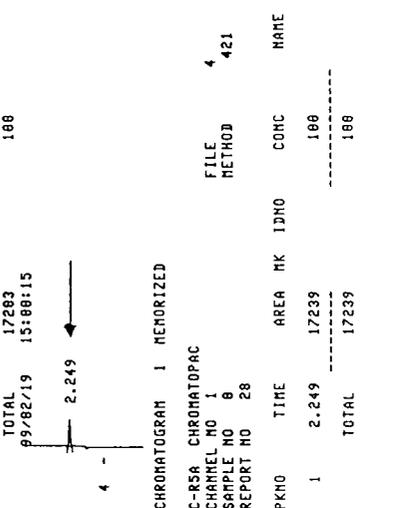
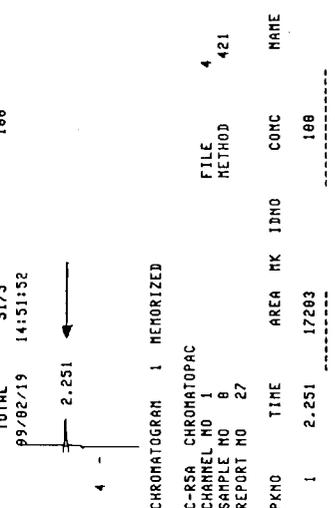
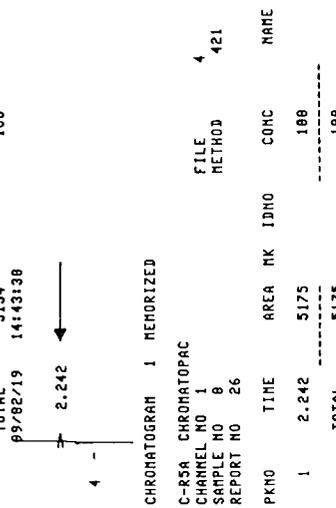
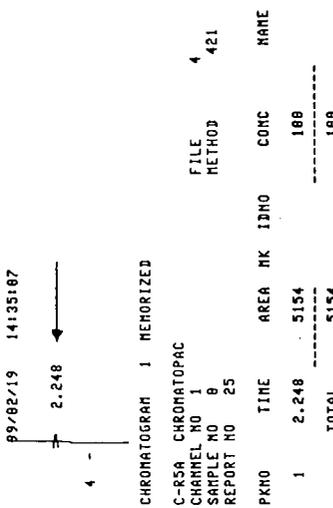
暴露終了時 (72時間)  
 図-59  
 3.2 mg/L  
 生-09-25-2

生09-26 1mg/L  
 n=1

生09-26 1mg/L  
 n=2

生09-25 3.2mg/L  
 n=1

生09-25 3.2mg/L  
 n=2

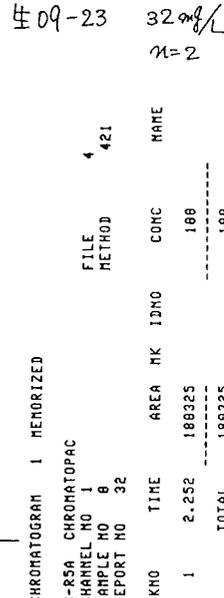
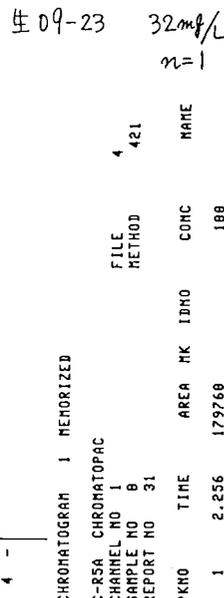
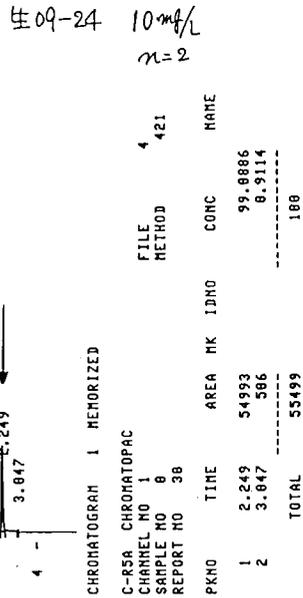
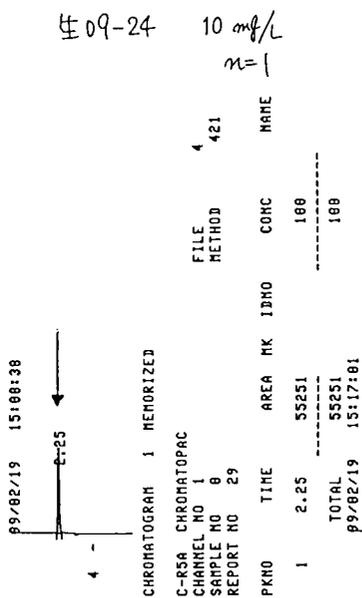


暴露終了時 (72時間)  
 ☒-60  
 10mg/L  
 生-09-24-1

暴露終了時 (72時間)  
 ☒-61  
 10mg/L  
 生-09-24-2

暴露終了時 (72時間)  
 ☒-62  
 32mg/L  
 生-09-23-1

暴露終了時 (72時間)  
 ☒-63  
 32mg/L  
 生-09-23-2

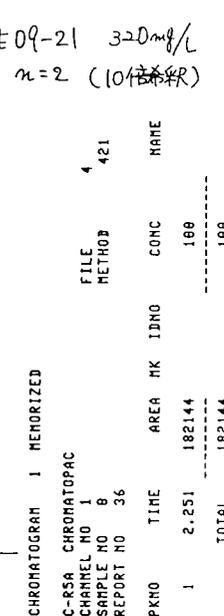
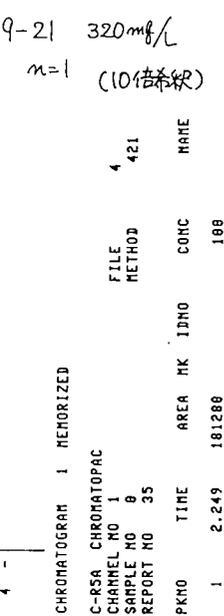
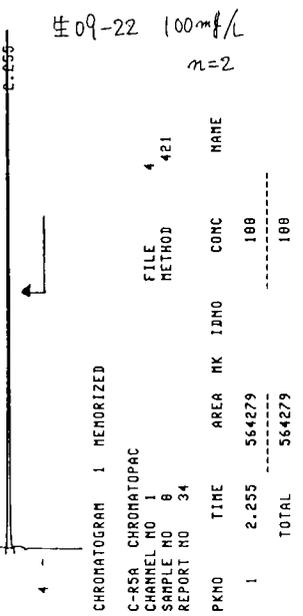
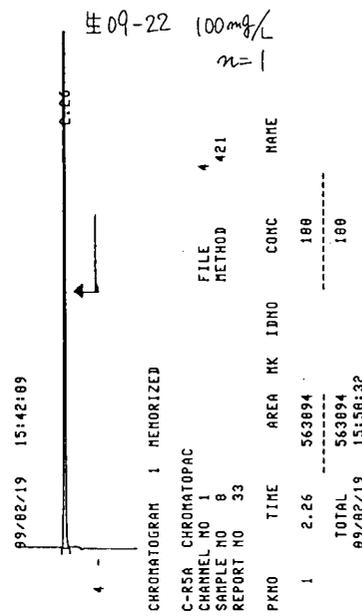


暴露終了時 (72時間)  
 ☒-64  
 100mg/L  
 生-09-22-1

暴露終了時 (72時間)  
 ☒-65  
 100mg/L  
 生-09-22-2

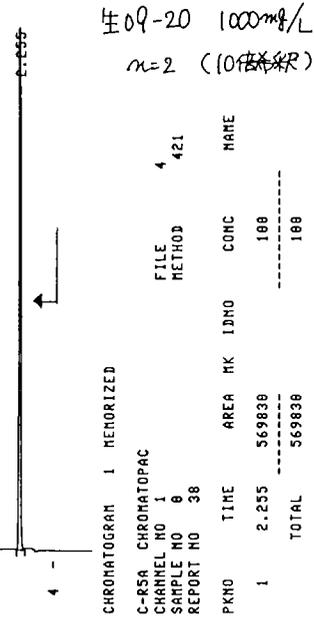
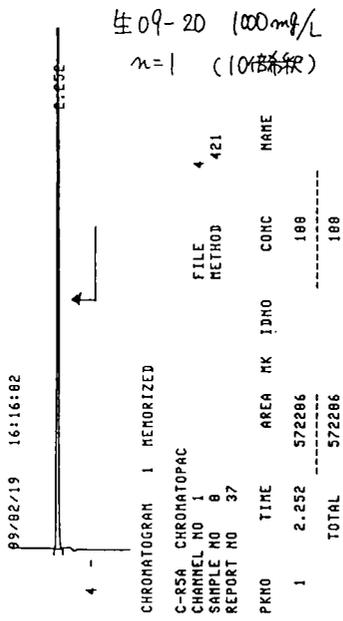
暴露終了時 (72時間)  
 ☒-66  
 320mg/L  
 生-09-21-1

暴露終了時 (72時間)  
 ☒-67  
 320mg/L  
 生-09-21-2



暴露終了時 (72時間)  
 図-68  
 1000 mg/L  
 生-09-20-1

暴露終了時 (72時間)  
 図-69  
 1000 mg/L  
 生-09-20-2



以上