

## 最終報告書修正書

試験名： 塩化コリンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： 1998-生13

該当するページ： p-7

① p-7

修正する項目等：

訂正または追加前の内容 (\_\_\_\_部分の修正)

結 果

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) : 1000mg/L

ErC50 (24-72h) : 1000mg/L以上

無影響濃度 (NOECr) : 1000mg/L

訂正または追加後の内容

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) : 1000mg/L

ErC50 (24-72h) : 1000mg/L以上

無影響濃度 (NOECr) : 10mg/L

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

環境庁殿

試 験 報 告 書

塩化コリンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

(試験番号：NO1998-生13)

1999年 8月20日作成

株式会社クレスティア

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： 塩化コリンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号： NO1998-生13

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 8月20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： 塩化コリンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する  
生長阻害試験

試験番号： NO1998-生13

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23日	1999年2月23日	1999年2月23日
	1999年2月26日	1999年2月26日	1999年2月26日
試験報告書監査	1999年8月17日	1999年8月17日	1999年8月17日

1999年8月20日  
信頼性保証業務担当者：



## 試 験 実 施 概 要

1. 表題： 塩化コリンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験
2. 試験目的： 塩化コリンについて、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化学製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  
[REDACTED]
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 8月20日）
試験責任者（理化学）	██████████	██████████	（1999年 8月20日）
試験担当者（生物）	██████████	██████████	（1999年 8月20日）
試験担当者（生物）	██████████	██████████	（1999年 8月20日）
試験担当者（生物）	██████████	██████████	（1999年 8月20日）
試験担当者（生物）	██████████	██████████	（1999年 8月20日）
試験担当者（理化学）	██████████	██████████	（1999年 8月20日）

9. 試験期間：

試験開始日	1999年	1月	4日
試験終了日	1999年	8月	20日
暴露期間	1999年	2月	23日～

1999年 2月26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 塩化コリンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験

試験番号 NO1998-生13

### 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: 塩化コリン
- 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 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 (0-72h) : 1000 mg/L以上  
無影響濃度 (NOECb) : 32 mg/L
- 2) 生長速度の比較による生長阻害濃度  
ErC50 (24-48h) : 1000 mg/L以上  
無影響濃度 (NOECr) : 1000 mg/L

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

↑ ErC50(24-72h)  
1000 mg/L  
修正あり

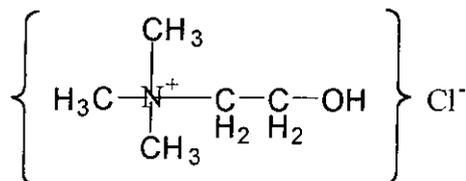
## 1 被験物質

### 1. 1 名称、構造式および物理化学的性状

名称： 塩化コリン

( CAS : 67-48-1 )

構造式：



分子式：  $[(\text{CH}_3)_3\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{OH}]^+\text{Cl}^-$

分子量： 139.63

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： 水に可溶

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： PAR1681

外観： 白色結晶性粉末

純度及び不純物： 100.2%

### 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 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

試験培地に塩化コリンを加え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10mL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-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2.0mL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。

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

ここで、

A<sub>c</sub> : 対照区の生長曲線下の面積

A<sub>t</sub> : 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<sub>A</sub>) 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EbC50(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 ( $\mu$ ) 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<sub>1</sub> : t<sub>1</sub>時の実測細胞濃度 (cells/mL)

N<sub>n</sub> : t<sub>n</sub>時の実測細胞濃度 (cells/mL)

t<sub>1</sub> : 暴露開始後最初に細胞濃度を測定した時間

t<sub>n</sub> : 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<sub>m</sub>) 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0.8~1070mg/L（設定値1.0~1000mg/L）であり、暴露72時間の被験物質濃度は1.0~1070mg/L（設定値1.0~1000mg/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 (0-72h) は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 (NOECb)) は32mg/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1000mg/L、10mg/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8.4~8.6であり、試験終了時が9.2~10.4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>	0.185
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.415
ZnCl <sub>2</sub>	0.003
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.08
Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	0.1
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0015
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.007
CuCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.00001
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	18
NH <sub>4</sub> Cl	15
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6
NaHCO <sub>3</sub>	50
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	12
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15

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	1070	107	1070	107
320	328	103	345	108
100	103	103	108	108
32	31.3	98	32.1	100
10	10.0	100	10.1	101
3.2	3.0	94	3.1	97
1.0	0.8	80	1.0	100
Control	N. D	—	N. D	—

Table 3. Cell Density of *Selenastrum capricornutum*

Nominal Concentration mg/L	No.	Cell Density (x10 <sup>4</sup> cells/mL)			
		0 Hour	24 Hour	48 Hour	72 Hour
Control	1	1.00	4.00	23.75	81.75
	2	1.00	4.50	24.50	84.75
	3	1.00	4.50	22.50	85.25
	Average	1.00	4.33	23.58	83.92
	S. D.	-	0.29	1.01	1.89
1.0	1	1.00	4.00	23.75	79.00
	2	1.00	4.00	23.75	83.75
	3	1.00	4.00	22.25	83.75
	Average	1.00	4.00	23.25	82.17
	S. D.	-	0.00	0.87	2.74
3.2	1	1.00	4.25	21.25	79.00
	2	1.00	4.00	23.50	81.50
	3	1.00	5.00	22.25	82.25
	Average	1.00	4.42	22.33	80.92
	S. D.	-	0.52	1.13	1.70
10	1	1.00	5.00	22.75	81.50
	2	1.00	4.00	19.25	78.50
	3	1.00	5.00	22.75	80.00
	Average	1.00	4.67	21.58	80.00
	S. D.	-	0.58	2.02	1.50
32	1	1.00	5.00	20.50	77.75
	2	1.00	4.75	25.50	78.75
	3	1.00	4.75	19.25	77.25
	Average	1.00	4.83	21.75	77.92
	S. D.	-	0.14	3.31	0.76
100	1	1.00	4.25	20.25	71.25
	2	1.00	4.50	19.50	67.50
	3	1.00	4.50	18.75	72.25
	Average	1.00	4.42	19.50	70.33
	S. D.	-	0.14	0.75	2.50
320	1	1.00	4.75	21.75	71.25
	2	1.00	4.50	24.75	66.50
	3	1.00	4.75	19.75	65.50
	Average	1.00	4.67	22.08	67.75
	S. D.	-	0.14	2.52	3.07
1000	1	1.00	4.50	21.75	69.25
	2	1.00	4.00	21.25	60.75
	3	1.00	3.50	17.75	61.50
	Average	1.00	4.00	20.25	63.83
	S. D.	-	0.50	2.18	4.71

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)	Im(24-48)	$\mu$ (24-72)	I <sub>m</sub> (24-72)
Control	1	1587	1.9	0.0742	-5.1	0.0629	-1.8
	2	1653	-2.2	0.0706	0.0	0.0612	1.0
	3	1611	0.4	0.0671	5.1	0.0613	0.8
	Average	1617	0.0	0.0706	0.0	0.0618	0.0
1.0	1	1554	3.9	0.0742	-5.1	0.0621	-0.6
	2	1611	0.4	0.0742	-5.1	0.0634	-2.6
	3	1575	2.6	0.0715	-1.2	0.0634	-2.6
	Average	1580	2.3	0.0733	-3.8	0.0630	-1.9
3.2	1	1500	7.2	0.0671	5.1	0.0609	1.4
	2	1578	2.4	0.0738	-4.5	0.0628	-1.7
	3	1581	2.2	0.0622	11.9	0.0583	5.5
	Average	1553	4.0	0.0677	4.2	0.0607	1.8
10	1	1584	2.0	0.0631	10.6	0.0581	5.9
	2	1440	10.9	0.0655	7.3	0.0620	-0.4
	3	1566	3.2	0.0631	10.6	0.0578	6.5
	Average	1530	5.4	0.0639	9.5	0.0593	4.0
32	1	1485	8.2	0.0588	16.8	0.0572	7.4
	2	1611	0.4	0.0700	0.9	0.0585	5.3
	3	1443	10.8	0.0583	17.4	0.0581	5.9
	Average	1513	6.4	0.0624	11.7	0.0579	6.2
100	1	1383	14.5	0.0651	7.9	0.0587	4.9
	2	1326	18.0	0.0611	13.5	0.0564	8.7
	3	1365	15.6	0.0595	15.8	0.0578	6.4
	Average	1358	16.0	0.0619	12.4	0.0577	6.6
320	1	1431	11.5	0.0634	10.2	0.0564	8.7
	2	1440	10.9	0.0710	-0.6	0.0561	9.2
	3	1314	18.7	0.0594	15.9	0.0547	11.5
	Average	1395	13.7	0.0646	8.5	0.0557	9.8
1000	1	1401	13.4	0.0656	7.1	0.0570	7.8
	2	1275	21.2	0.0696	1.5	0.0567	8.2
	3	1188	26.5	0.0677	4.2	0.0597	3.3
	Average	1288	20.3	0.0676	4.2	0.0578	6.5

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)	32	-

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)	10	-

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 Concentration (mg/L)		pH	
		0 Hour	72 Hour
Control	1	8.6	10.1
	2		10.0
	3		10.1
1.0	1	8.5	9.9
	2		9.8
	3		10.0
3.2	1	8.5	9.9
	2		10.0
	3		10.4
10	1	8.6	10.0
	2		9.7
	3		9.9
32	1	8.4	9.7
	2		10.1
	3		10.4
100	1	8.5	9.8
	2		9.2
	3		9.4
320	1	8.5	10.0
	2		9.7
	3		9.6
1000	1	8.6	9.4
	2		9.6
	3		9.5

Figure 1 Algal Growth Curve of *Selenastrum capricornutum*

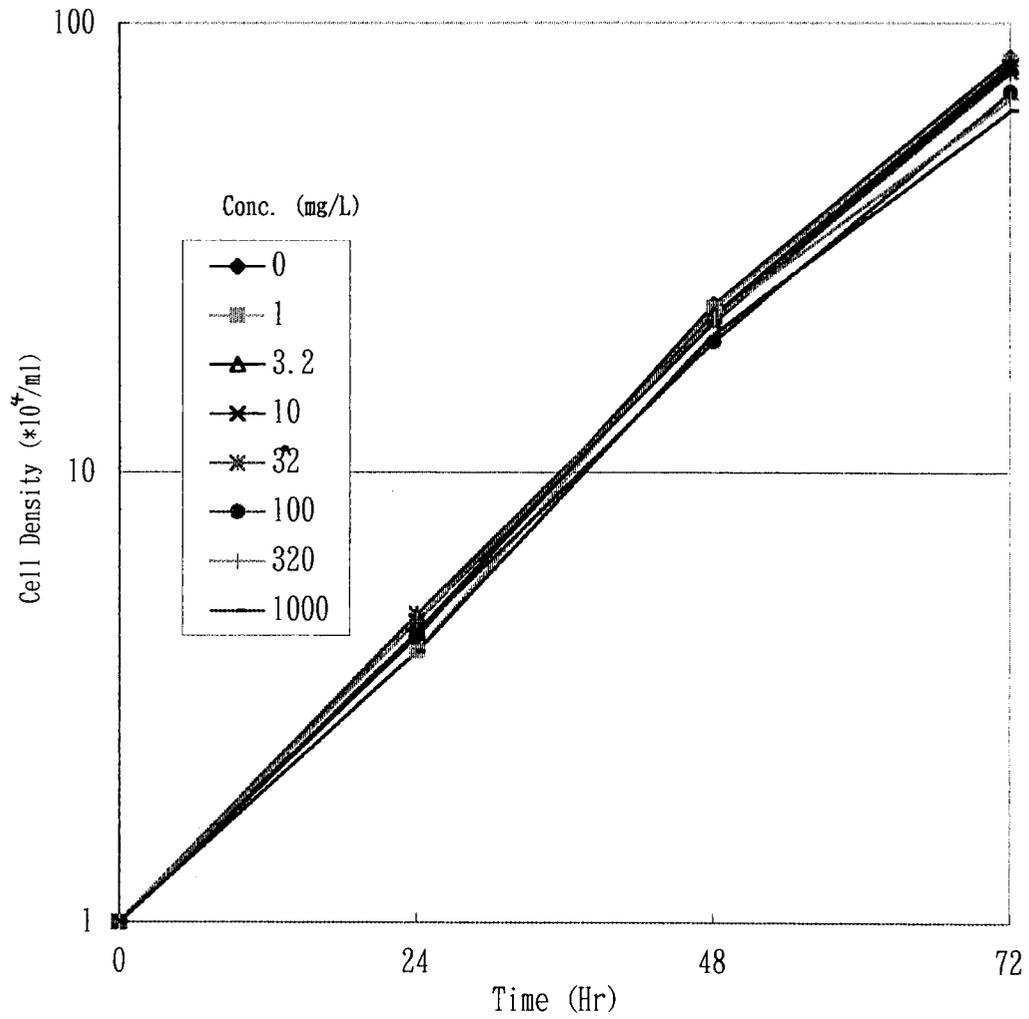


Figure 2 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on  $I_A$  value

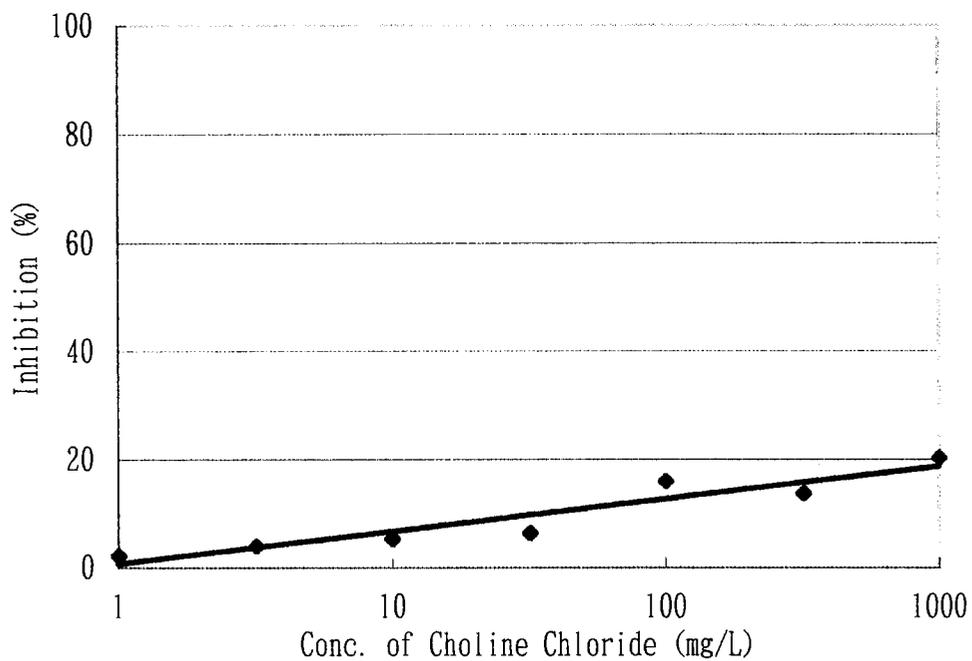
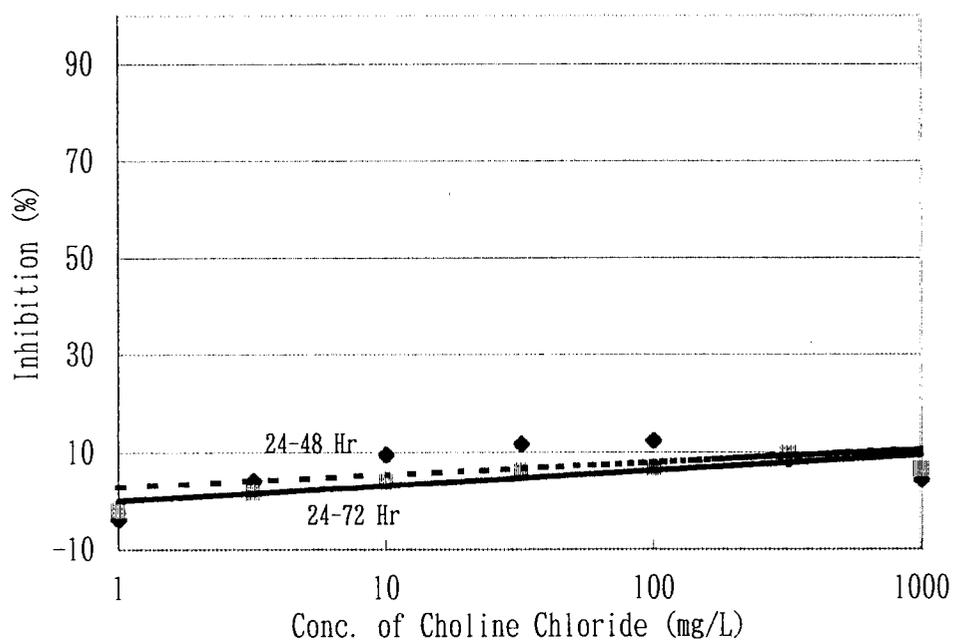


Figure 3 Concentration-Inhibition Curve of *Selenastrum capricornutum* based on  $I_m$  value



# 付 属 資 料 - 1

試験液の分析方法

(全17頁)

## 塩化コリンの分析法

(株)クレハ分析センター

## 1. 試料 : 試験液

## 化学名及び化学式

塩化コリン

分子式

:  $C_5H_{14}ONCl$ 

化学式

:  $HOCH_2CH_2(CH_3)_3N^+Cl^-$ 

分子量

: 139.63

## 物理的・化学的性質

性状

: 水に可溶

: 白色の固体

## 2. 分析法

## 1) 装置及び器具

イオンクロマトグラフ

: ノンプレッサー型IC

日立製作所

検出器 (電気伝導度)

: L-3720

日立製作所

インテグレーター

: D-7500

日立製作所

メスフラスコ

: 100ml

マイクロピペッター

: 250、500、1000 $\mu$ l

マイクロシリンジ

: 50 $\mu$ l

## 2) 試薬

メタノール

: 試薬 特級

水

: 超純水 Milli-RX12 $\alpha$  Millipore

りん酸

: 試薬 特級 (85%)

塩化コリン

: 試薬 1級

## 3) 塩化コリン標準原液 (1200mg/ml)

塩化コリン標準品の約0.12g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) イオンクロマトグラフの操作条件

カラム

: Shodex IC Y-521 昭和電工製

: 150mm $\times$ 4mmID

溶離液

: 7mM-りん酸溶液+メタノール (15%になる様に添加)

流量

: 1.5ml/min

検出器

: 電気伝導検出器

注入量

: 50 $\mu$ l

## 5) 検量線の作製

塩化コリン標準原液に水を加えて希釈し、3、6、12mg/lの標準液を調整する。この液50 $\mu$ lを上記条件の高速液体クロマトグラフに注入し、クロマトグラムをかかせ、ピーク高さをノギス (mm) ではかりとる。

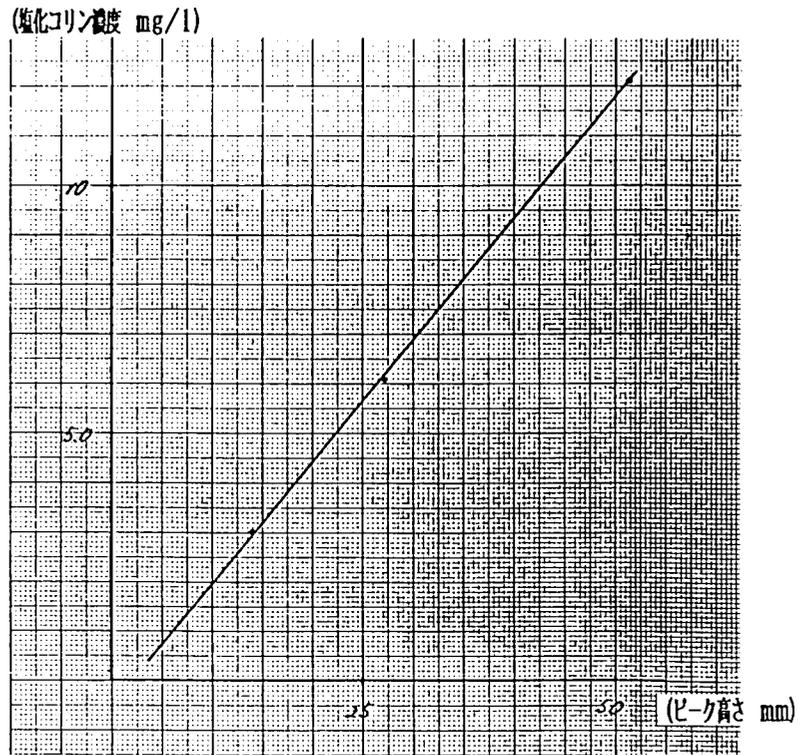
濃度を縦軸に、横軸にピークの高さをとり検量線を作成する。

## 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	3.020	13.92
2	6.050	27.18
3	12.100	51.40

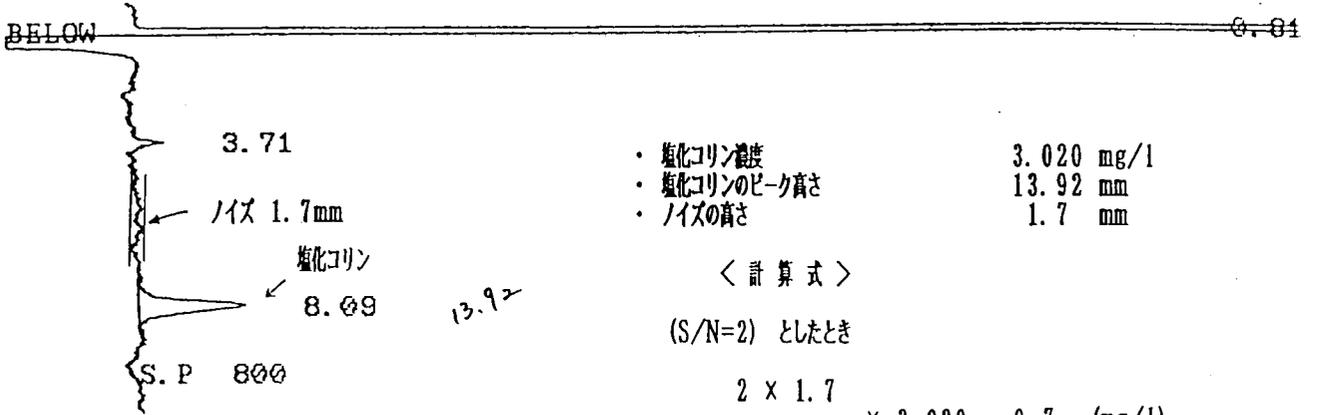
図-1 検量線



②. 検出下限値の計算

図-2 クロマトグラム

FILE 4      SYS 1      SEQ      9  
 CH. 1<A>    C. S 5.00    ATT 5    OFFS    0    01/25/99 13:04



- 塩化コリン濃度                    3.020 mg/l
- 塩化コリンのピーク高さ        13.92 mm
- ノイズの高さ                      1.7 mm

< 計 算 式 >

(S/N=2) としたとき

$$\frac{2 \times 1.7}{13.92} \times 3.020 = 0.7 \text{ (mg/l)}$$

試料液を直接注入できるので  
 定量下限値は、0.7 (mg/l) となる。

計算により、定量下限値 0.7 mg/l、  
 よって、定量下限値未満の表示NDは、0.7 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 $\mu$ 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 $\mu$ lを前記条件のイオンクロマトグラフに注入し、クロマトグラムをかかせ、塩化コリン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。

## 2. 添加回収率試験

塩化コリン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、良好な回収率を得た。(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	1008	1023.9 1038.5	101.6 103.0	102.3
2	100.8	103.7 104.7	102.9 103.9	103.4
3	10.08	10.6 10.3	105.2 102.2	103.7
4	1.008	0.9 0.8	89.3 79.4	84.4

## 3. 保存安定性試験

塩化コリン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 $^{\circ}$ C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)

しかし、低濃度の値が低くなることがあるので、設定値より20%低くなった場合は、nの数を増やすか、検量線の感度変化等を確認する必要がある。

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	3日目	平均
1	1008	1023.9 1038.5	987.8 1019.9	985.7 1003.5	1010.0
2	100.8	103.7 104.7	103.0 101.9	99.2 96.1	101.4
3	10.08	10.6 10.3	10.2 10.5	10.2 10.2	10.3
4	1.008	0.9 0.8	0.9 1.0	0.9 1.0	0.9

図-3 標準溶液の液体クロマトグラム (検量線作成用)

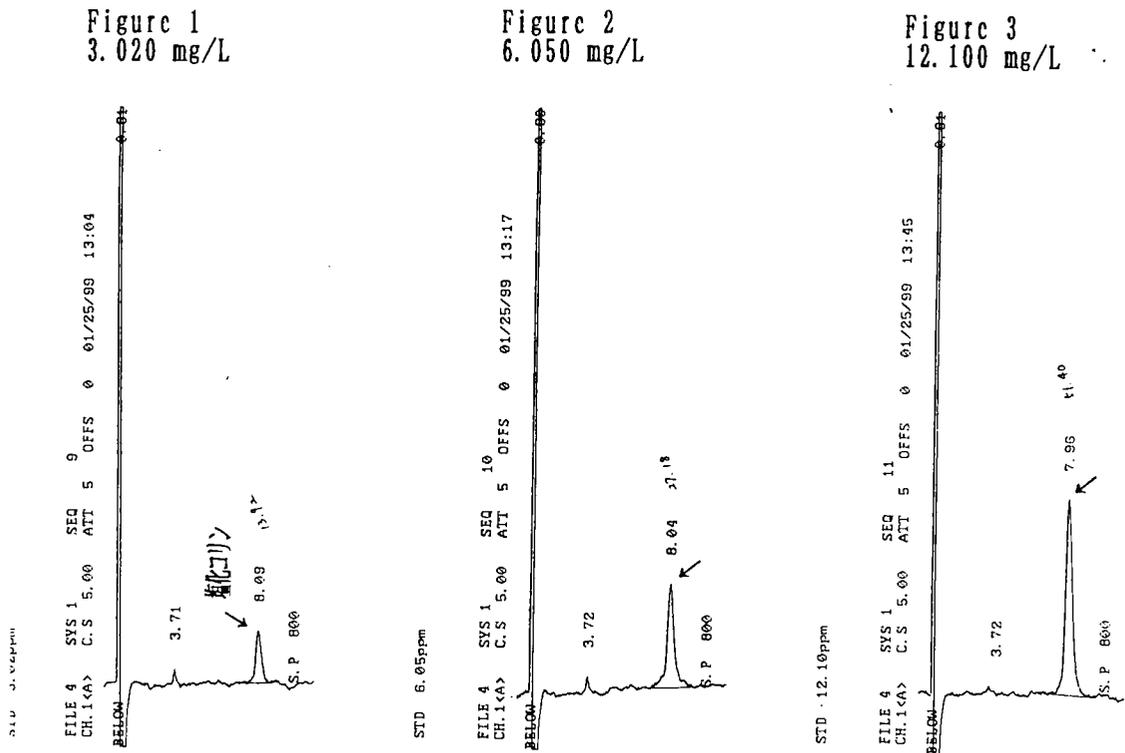


図-4 添加回収率試験の液体クロマトグラム

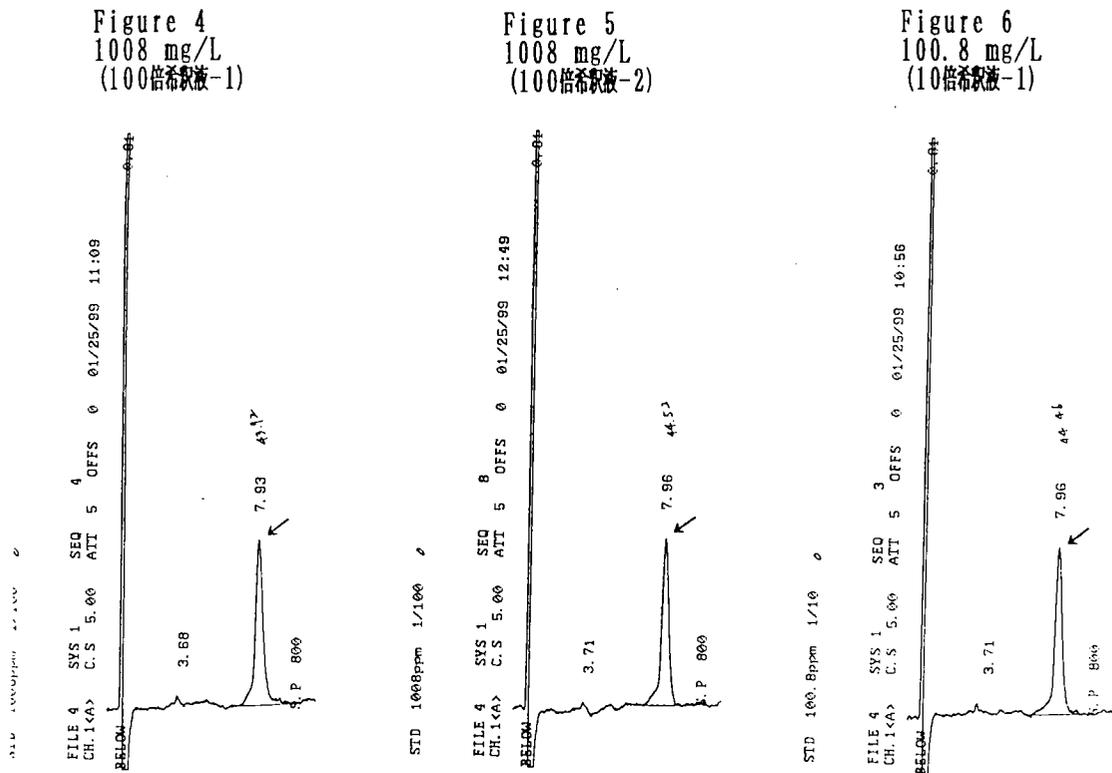


Figure 7  
100.8 mg/L  
(10倍稀释-2)

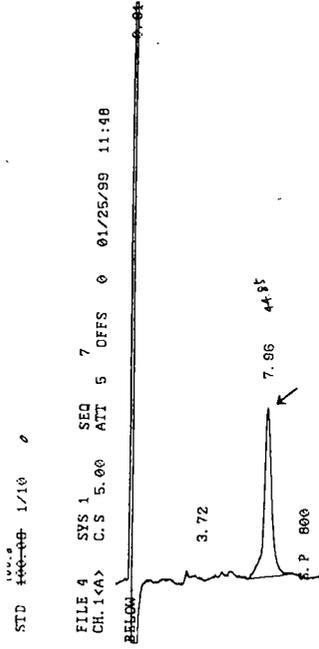


Figure 8  
10.08 mg/L  
(n-1)

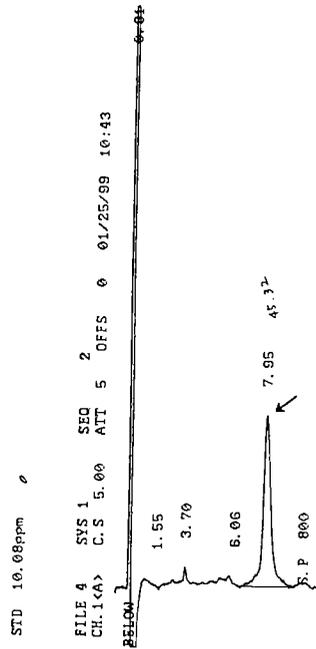


Figure 9  
10.08 mg/L  
(n-2)

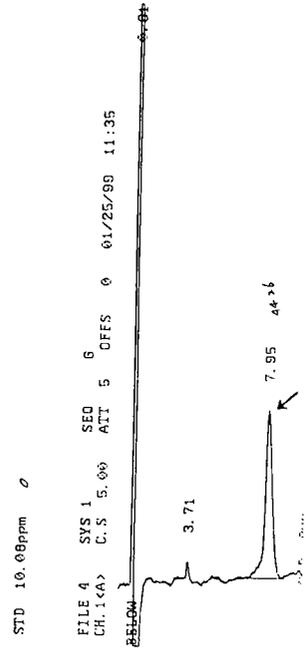


Figure 10  
1.008 mg/L  
(n-1)

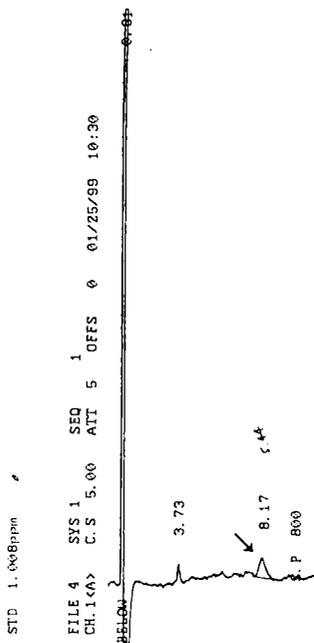


Figure 11  
1.008 mg/L  
(n-2)

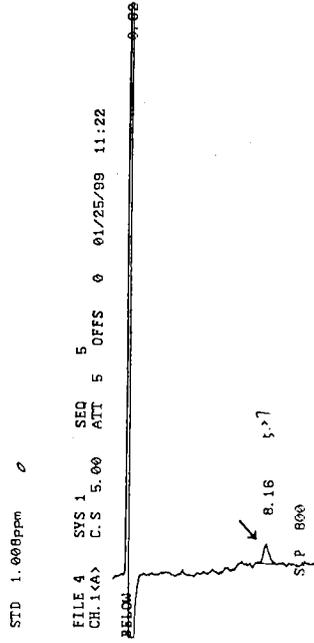


図-5 保存安定性試験の液体クロマトグラム

Figure 12  
標準溶液  
3.000 mg/L

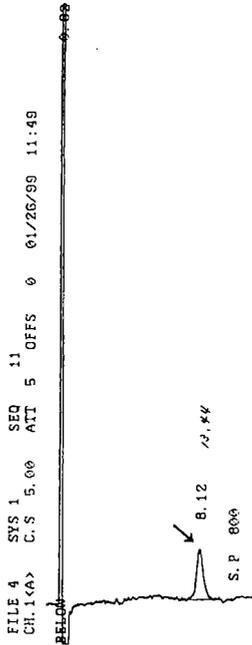


Figure 13  
標準溶液  
6.000 mg/L

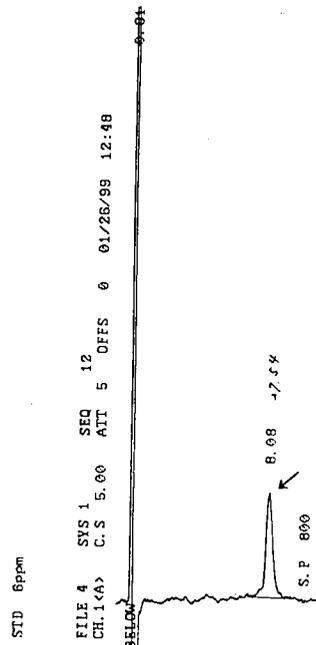


Figure 14  
標準溶液  
12.000 mg/L

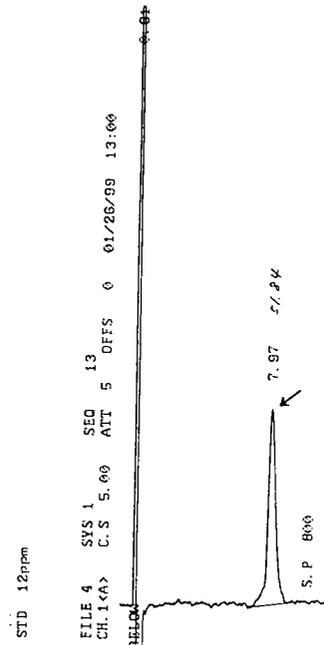


Figure 15  
1008 mg/L (1日後)  
(100倍希釈液-1)

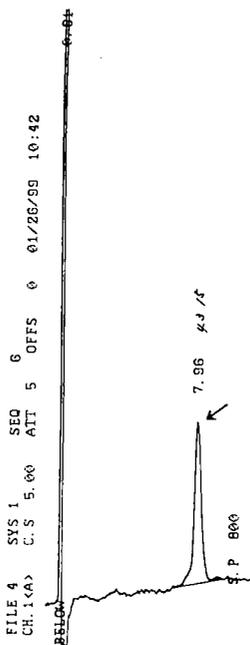


Figure 16  
1008 mg/L (1日後)  
(100倍希釈液-2)

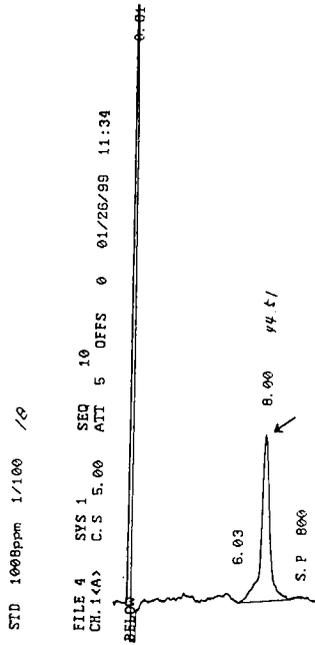


Figure 17  
100.8 mg/L (1日後)  
(10倍希釈液-1)

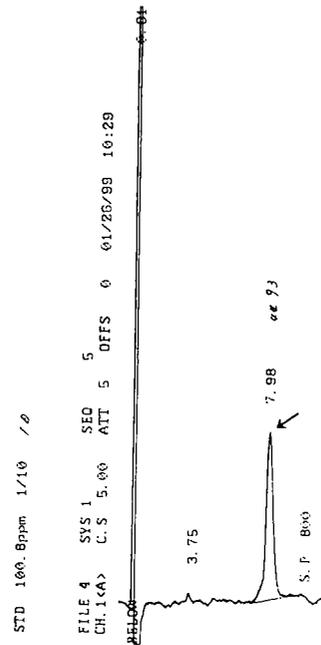


Figure 18  
100.8 mg/L (1日後)  
(10倍希釈液-2)

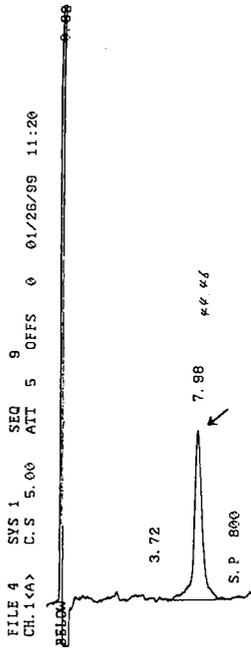


Figure 19  
10.08 mg/L (1日後)  
(n-1)

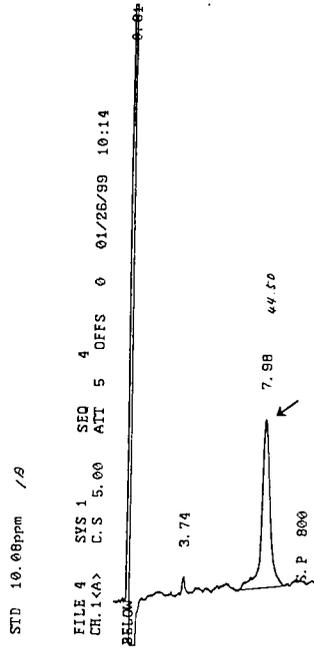


Figure 20  
10.08 mg/L (1日後)  
(n-2)

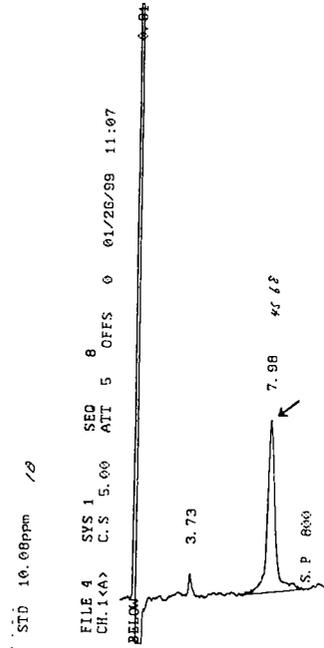


Figure 21  
1.008 mg/L (1日後)  
(n-1)

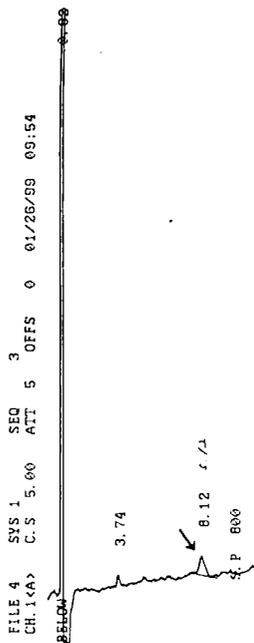


Figure 22  
1.008 mg/L (1日後)  
(n-2)

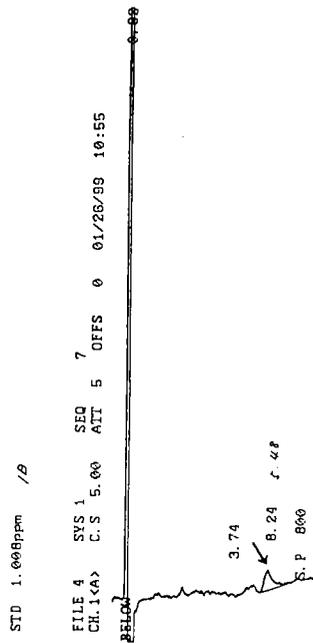


Figure 23  
標準溶液  
3.036 mg/L

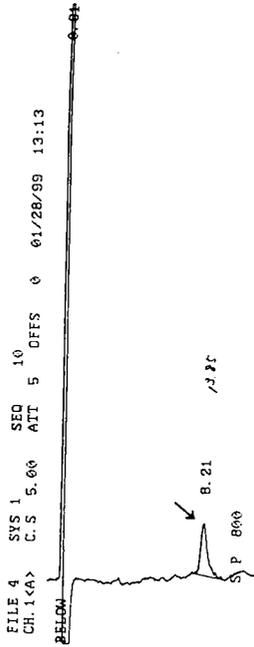


Figure 24  
標準溶液  
6.072 mg/L

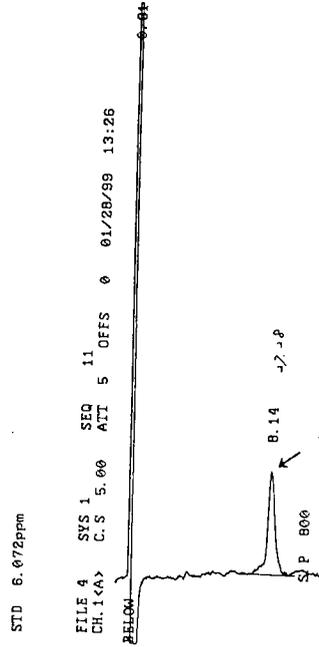


Figure 25  
標準溶液  
12.144 mg/L

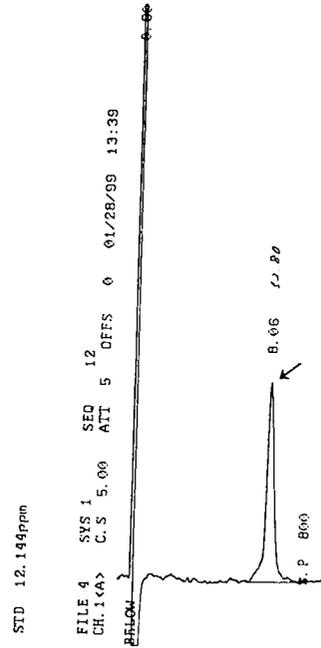


Figure 26  
1008 mg/L (3日後)  
(100倍希釈液-1)

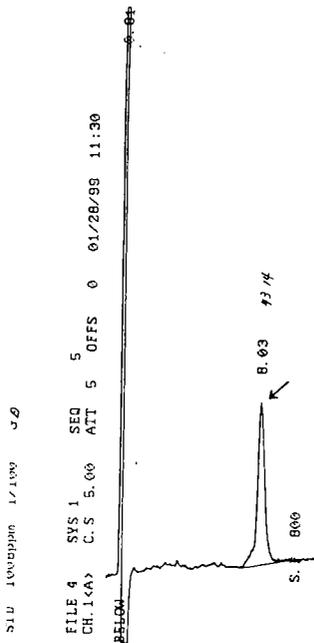


Figure 27  
1008 mg/L (3日後)  
(100倍希釈液-2)

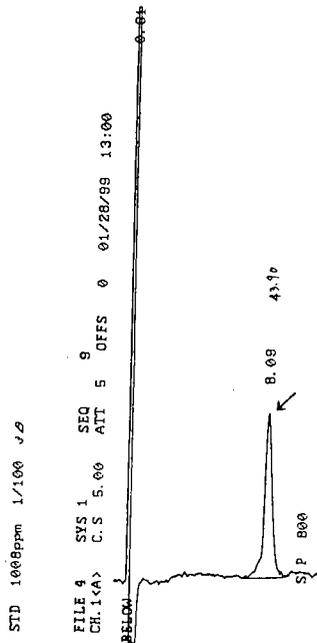


Figure 28  
100.8 mg/L (3日後)  
(10倍希釈液-1)

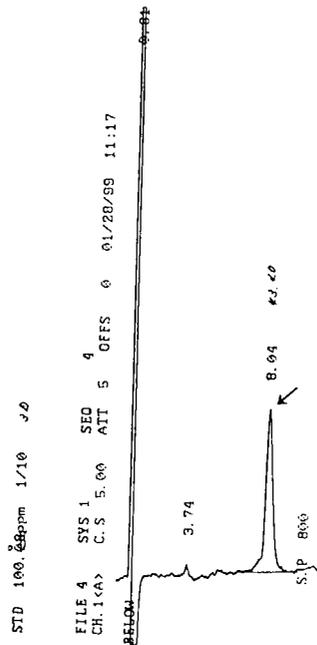


Figure 29  
100.8 mg/L (3日後)  
(10倍希釈後-2)

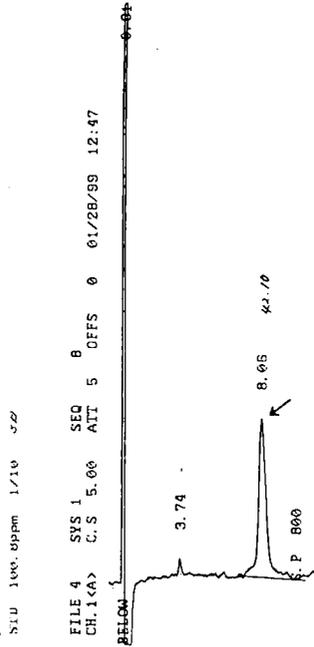


Figure 30  
10.08 mg/L (3日後)  
(n-1)

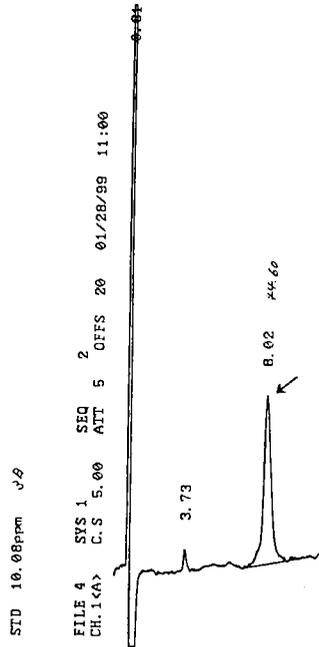


Figure 31  
10.08 mg/L (3日後)  
(n-2)

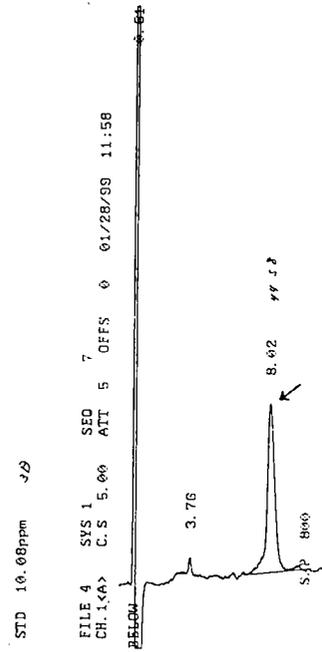


Figure 32  
1.008 mg/L (3日後)  
(n-1)

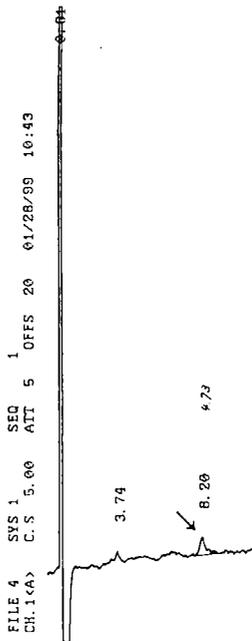
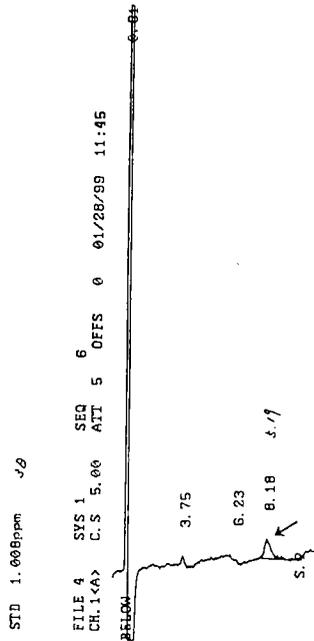
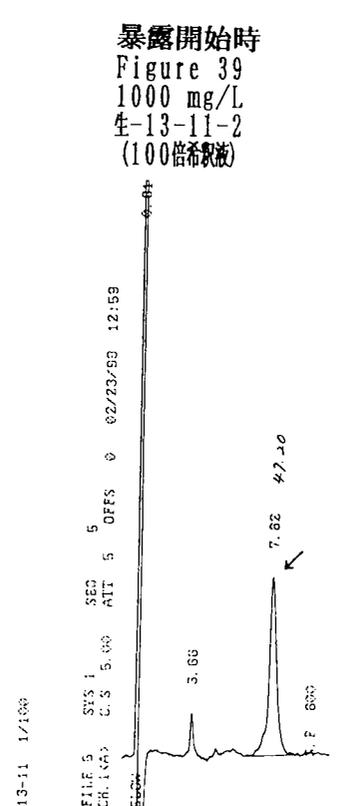
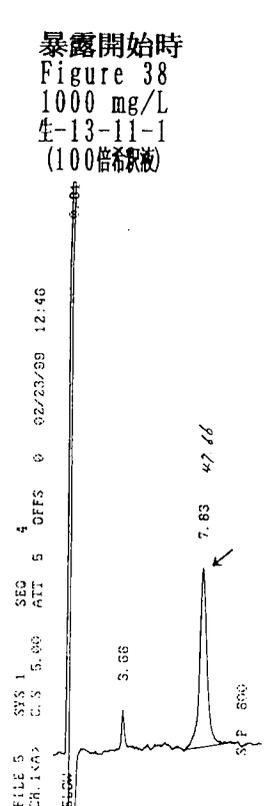
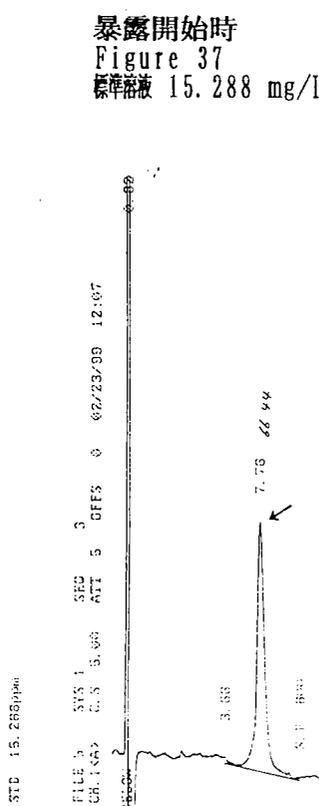
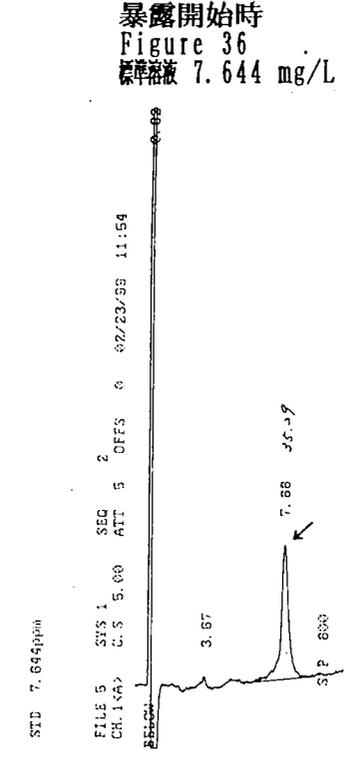
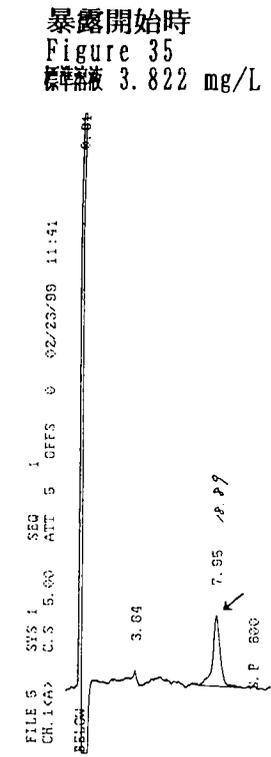
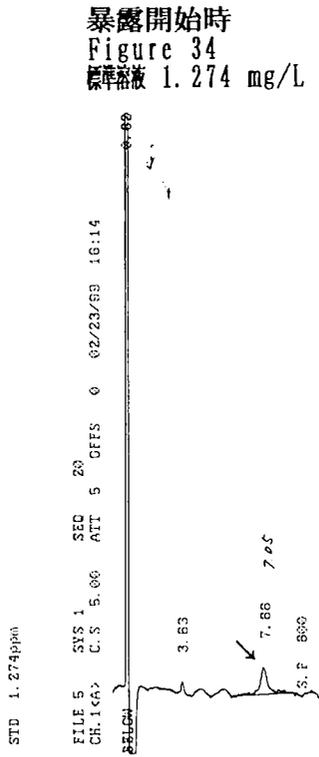


Figure 33  
1.008 mg/L (3日後)  
(n-2)

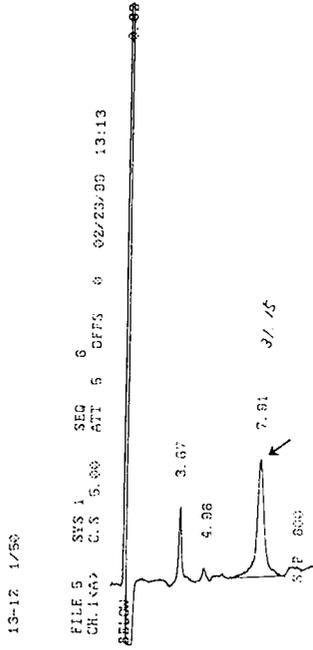


試験結果の液体クロマトグラム

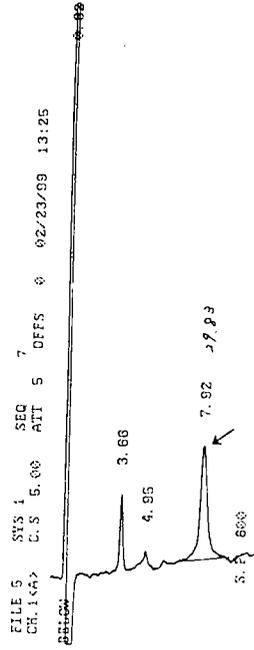
試料名：塩化コリンの藻類 (*Selenastrum capricornutum*) に対する生長阻害試験  
(試験番号：NO1998生-13)



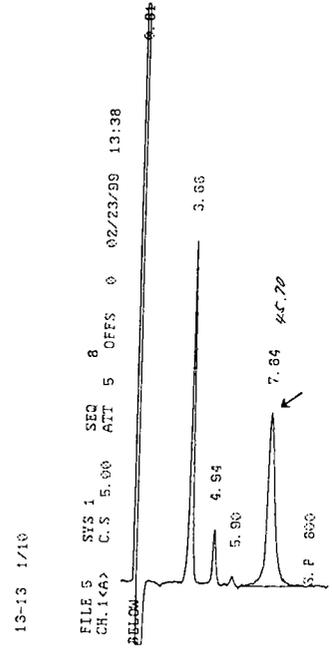
暴露開始時  
Figure 40  
320 mg/L  
生-13-12-1  
(50倍希釈液)



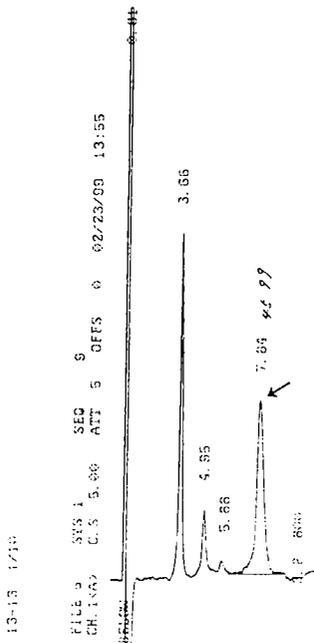
暴露開始時  
Figure 41  
320 mg/L  
生-13-12-2  
(50倍希釈液)



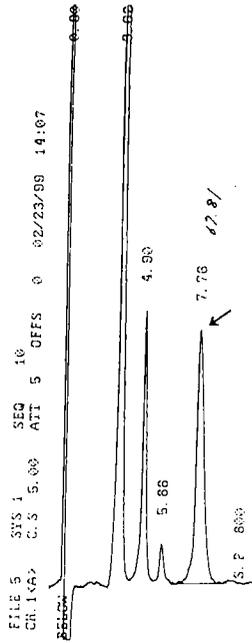
暴露開始時  
Figure 42  
100 mg/L  
生-13-13-1  
(10倍希釈液)



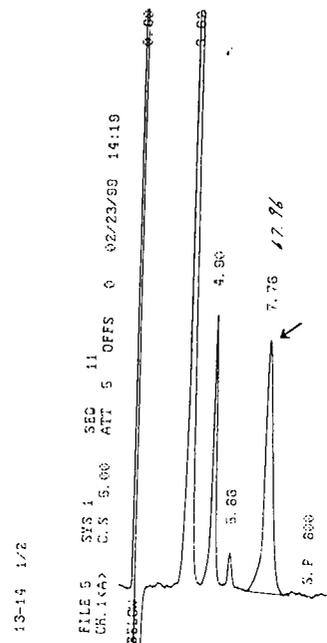
暴露開始時  
Figure 43  
100 mg/L  
生-13-13-2  
(10倍希釈液)



暴露開始時  
Figure 44  
32 mg/L  
生-13-14-1  
(2倍希釈液)

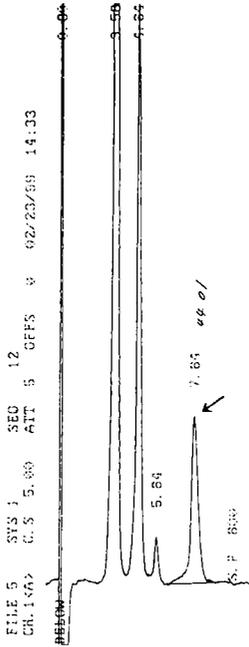


暴露開始時  
Figure 45  
32 mg/L  
生-13-14-2  
(2倍希釈液)



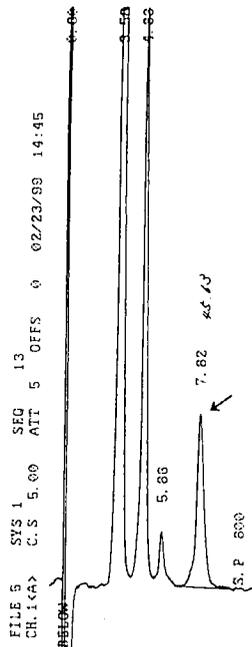
暴露開始時  
Figure 46  
10 mg/L  
4-13-15-1

13-15



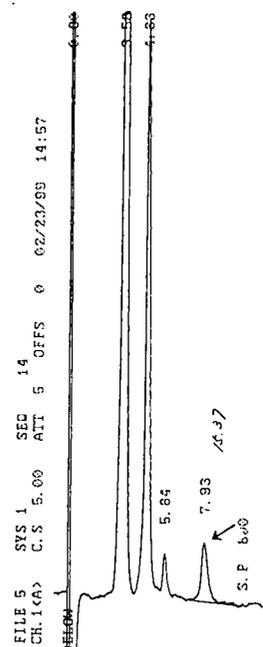
暴露開始時  
Figure 47  
10 mg/L  
4-13-15-2

13-15



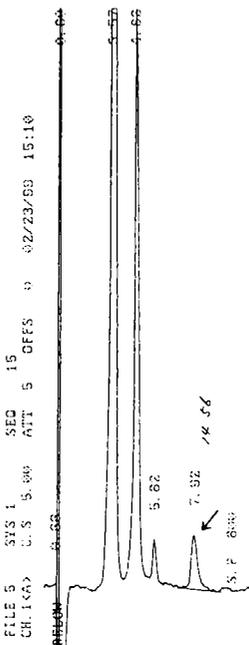
暴露開始時  
Figure 48  
3.2 mg/L  
4-13-16-1

13-16



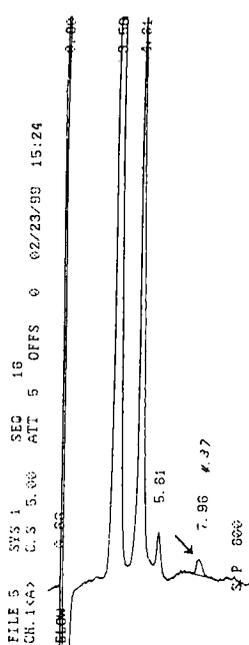
暴露開始時  
Figure 49  
3.2 mg/L  
4-13-16-2

13-16



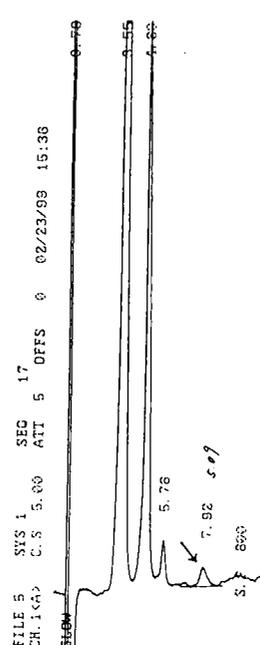
暴露開始時  
Figure 50  
1 mg/L  
4-13-17-1

13-17

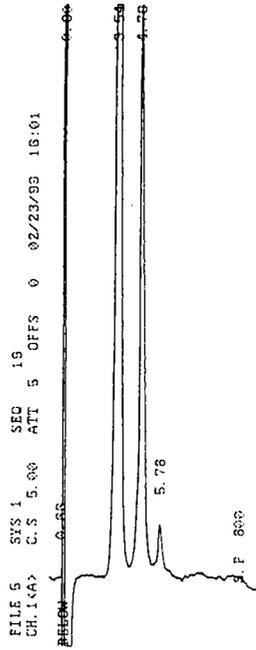


暴露開始時  
Figure 51  
1 mg/L  
4-13-17-2

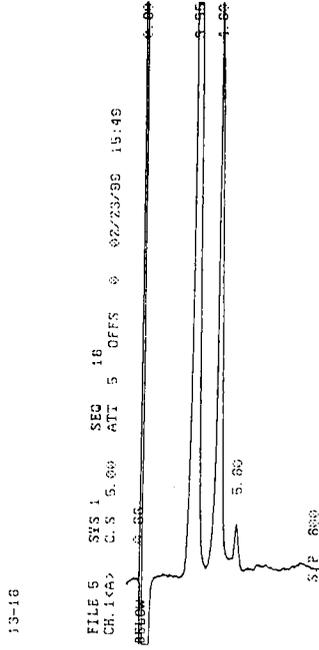
13-17



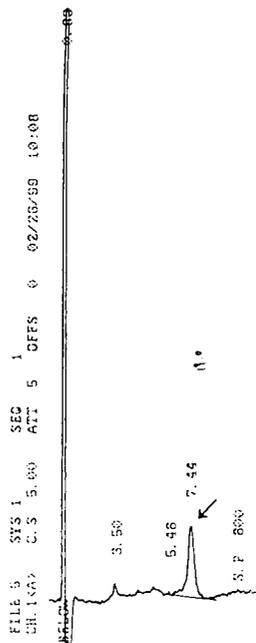
暴露開始時  
Figure 52  
Control  
4-13-18-1



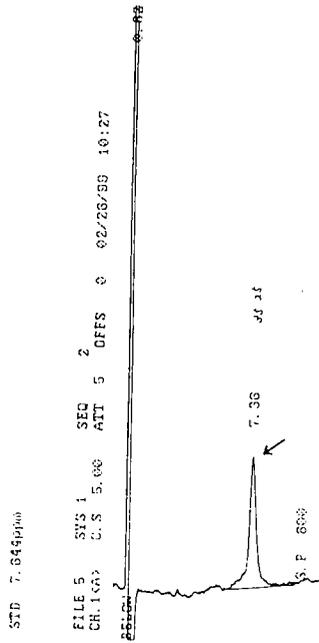
暴露開始時  
Figure 53  
Control  
4-13-18-2



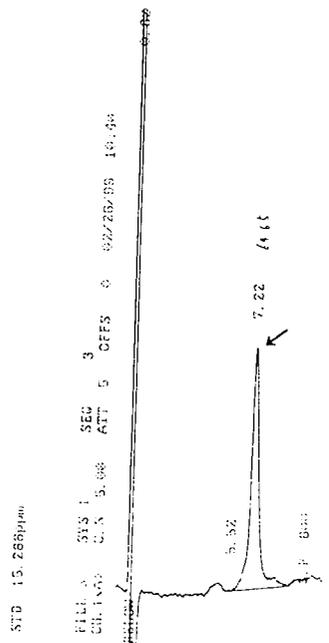
暴露終了時 (72時間)  
Figure 54  
標準溶液 3.822 mg/L



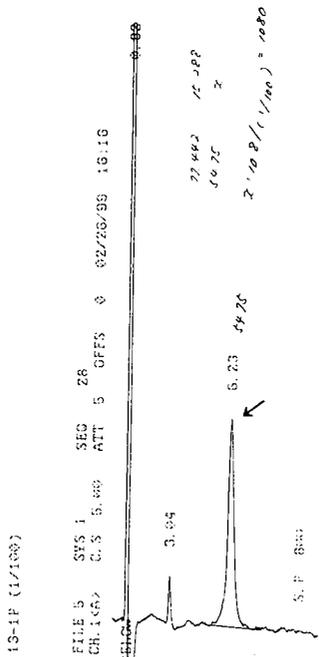
暴露終了時 (72時間)  
Figure 55  
標準溶液 7.644 mg/L



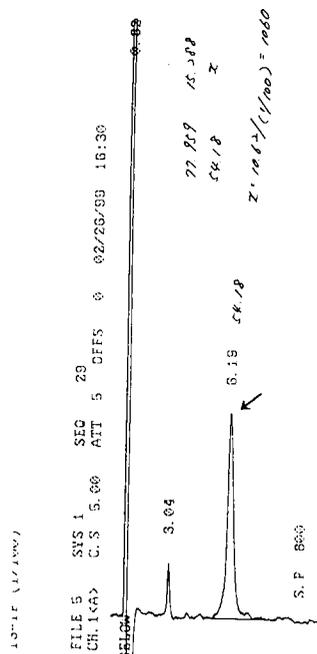
暴露終了時 (72時間)  
Figure 56  
標準溶液 15.288 mg/L



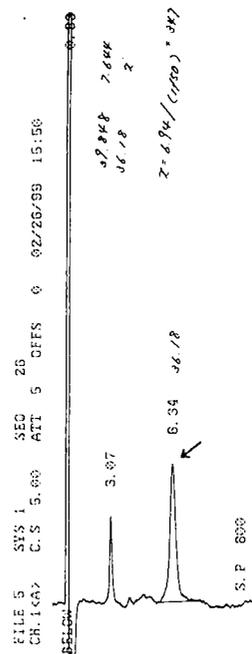
暴露終了時(72時間)  
Figure 57  
1000 mg/L  
生-13-19-1  
(100倍希釈液)



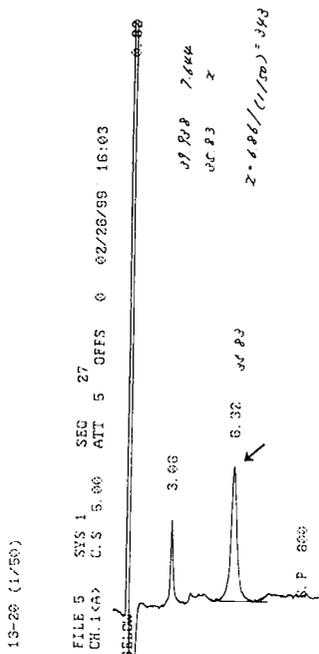
暴露終了時(72時間)  
Figure 58  
1000 mg/L  
生-13-19-2  
(100倍希釈液)



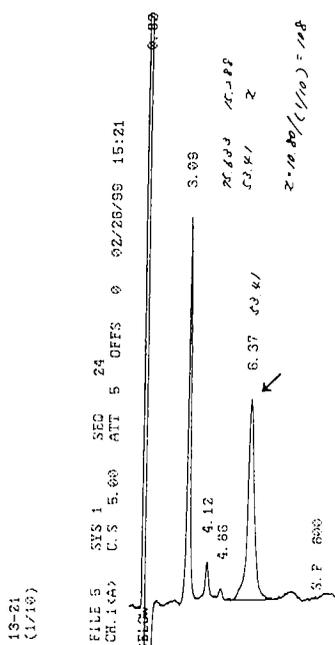
暴露終了時(72時間)  
Figure 59  
320 mg/L  
生-13-20-1  
(50倍希釈液)



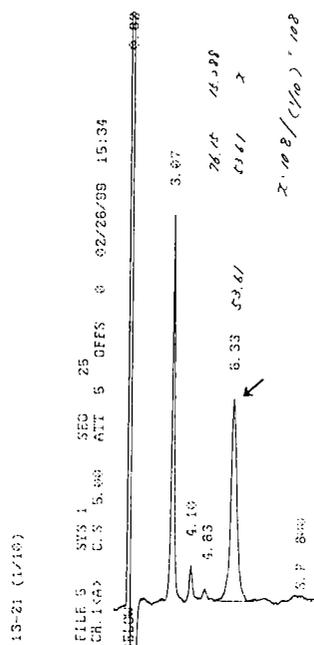
暴露終了時(72時間)  
Figure 60  
320 mg/L  
生-13-20-2  
(50倍希釈液)



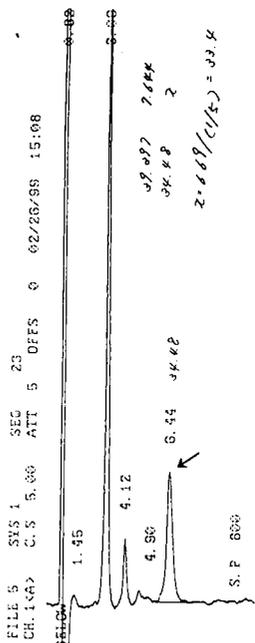
暴露終了時(72時間)  
Figure 61  
100 mg/L  
生-13-21-1  
(10倍希釈液)



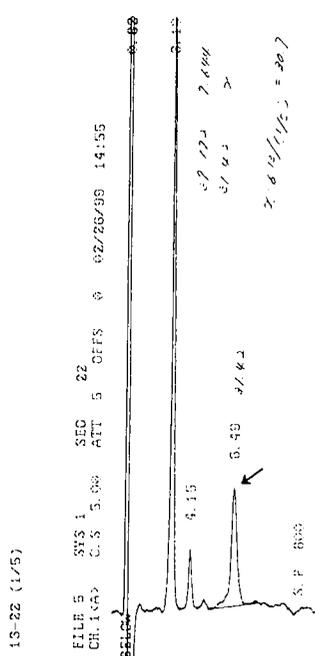
暴露終了時(72時間)  
Figure 62  
100 mg/L  
生-13-21-2  
(10倍希釈液)



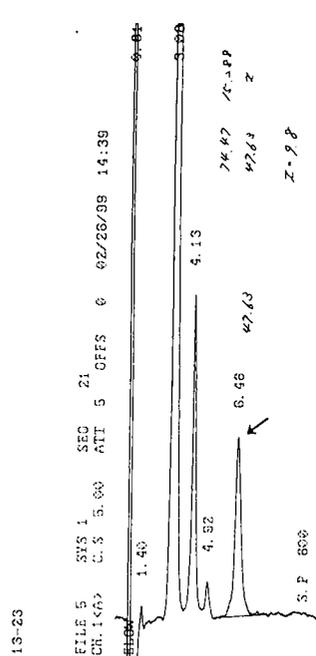
暴露終了時 (72時間)  
Figure 63  
32 mg/L  
生-13-22-1  
(5倍希釈液)



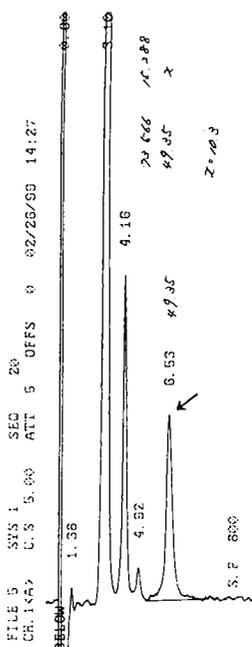
暴露終了時 (72時間)  
Figure 64  
32 mg/L  
生-13-22-2  
(5倍希釈液)



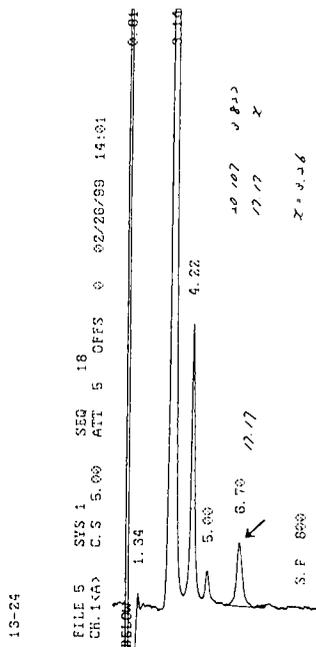
暴露終了時 (72時間)  
Figure 65  
10 mg/L  
生-13-23-1



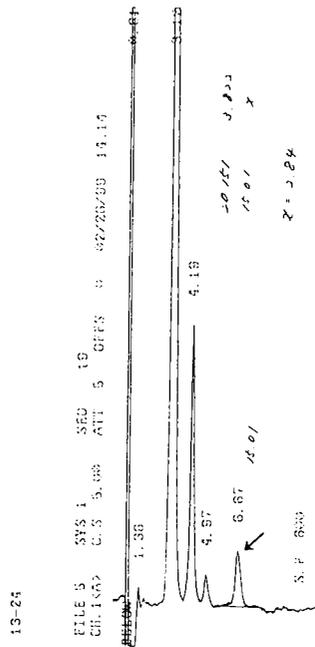
暴露終了時 (72時間)  
Figure 66  
10 mg/L  
生-13-23-2



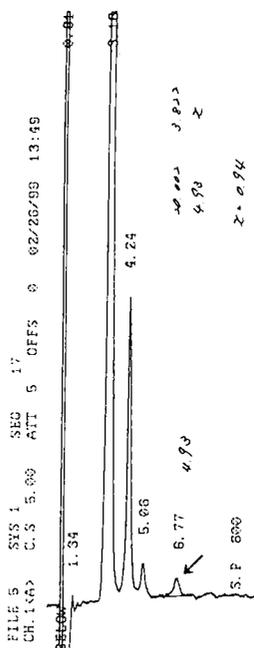
暴露終了時 (72時間)  
Figure 67  
3.2 mg/L  
生-13-24-1



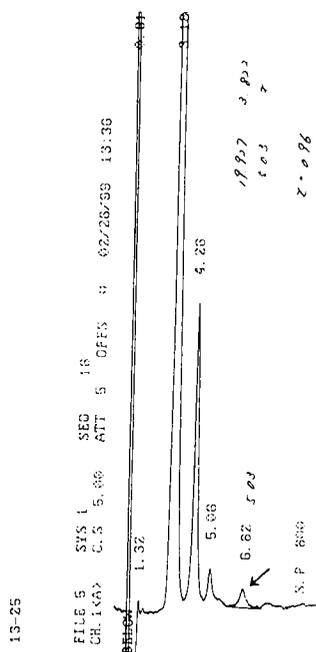
暴露終了時 (72時間)  
Figure 68  
3.2 mg/L  
生-13-24-2



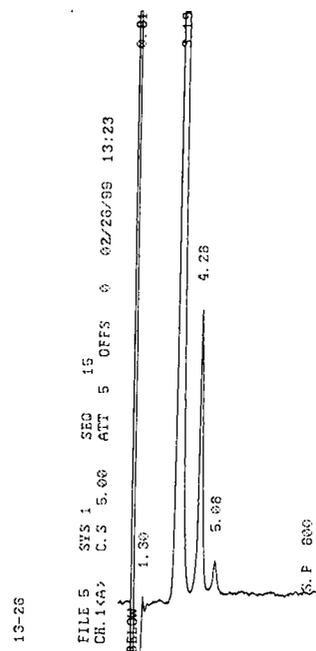
暴露終了時 (72時間)  
Figure 69  
1 mg/L  
#-13-25-1



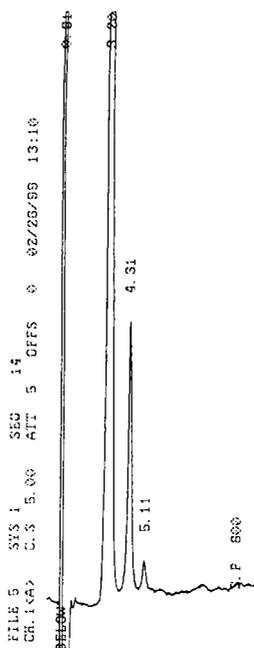
暴露終了時 (72時間)  
Figure 70  
1 mg/L  
#-13-25-2



暴露終了時 (72時間)  
Figure 71  
Control  
#-13-26-1



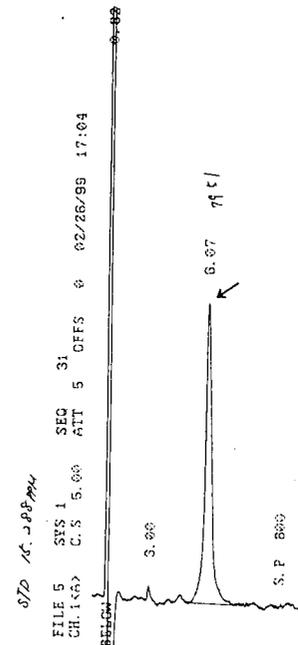
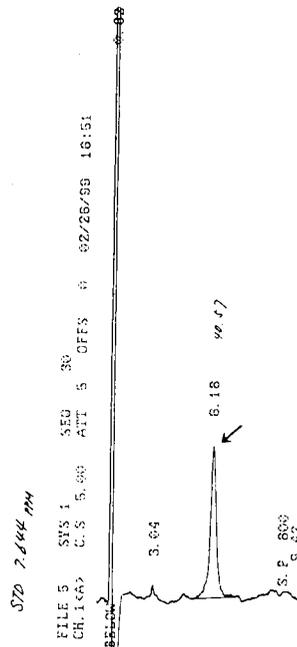
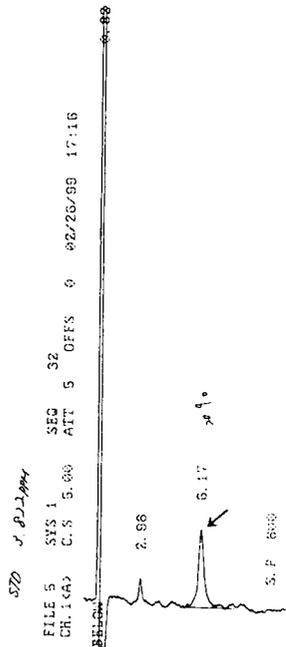
暴露終了時 (72時間)  
Figure 72  
Control  
#-13-26-2



暴露終了時 (72時間)  
Figure 73  
標準溶液 3.822 mg/L

暴露終了時 (72時間)  
Figure 74  
標準溶液 7.644 mg/L

暴露終了時 (72時間)  
Figure 75  
標準溶液 15.288 mg/L



注) 暴露終了時 (72時間) の測定に於いて、塩化コリンのリテンションタイムが測定時間と共に早く検出されることがわかった。それで、標準溶液を試料測定終了後に再分析して、ピーク高さとし、リテンションタイムの関係を求めて、下記の関係式を用いて1点検量線法で補正した。

- (1) 標準溶液 15.288 ppm の補正  
試料対象: 13-25、13-21、13-19  
使用データ  
測定開始: リテンションタイム 7.22 分でピーク高さ 64.65 mm  
測定終了: リテンションタイム 6.07 分でピーク高さ 79.51 mm

上記について、ピーク高さを Y とし、リテンションタイムを X とすると次の関係式が得られる。

$$Y = -12.9217 \times (\text{試料測定時の塩化コリンリテンションタイム}) + 157.94$$

- (2) 標準溶液 7.644 ppm の補正  
試料対象: 13-22、13-20  
使用データ  
測定開始: リテンションタイム 7.36 分でピーク高さ 35.25 mm  
測定終了: リテンションタイム 6.18 分でピーク高さ 40.57 mm

上記について、ピーク高さを Y とし、リテンションタイムを X とすると次の関係式が得られる。

$$Y = -4.50847 \times (\text{試料測定時の塩化コリンリテンションタイム}) + 68.432$$

- (3) 標準溶液 3.822 ppm の補正  
試料対象: 13-25、13-24  
使用データ  
測定開始: リテンションタイム 7.44 分でピーク高さ 19.00 mm  
測定終了: リテンションタイム 6.17 分でピーク高さ 20.90 mm

上記について、ピーク高さを Y とし、リテンションタイムを X とすると次の関係式が得られる。

$$Y = -1.49606 \times (\text{試料測定時の塩化コリンリテンションタイム}) + 30.130$$