[redacted]

1993年11月22日

ピグメントグリーン7 の
細菌を用いる
復帰突然変異試験

厚生省生活衛生局 委託

財団法人食品薬品[redacted]
秦 野 研

[redacted]

試験委託者　：　厚生省生活衛生局

試験計画番号　：　M－９２－２９３

試験系識別番号　：　GM－０５４

被験物質名　：　ピグメントグリーン７

試験項目　：　細菌を用いる復帰突然変異試験

試験期間　：　１９９２年１０月１９日　～　１９９３年　６月２４日

資料保管場所　：　財団法人食品薬品安全センター秦野研究所資料保管室

資料保管期間　：　試験終了後10年間

試験施設（所在地）　：　財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
（神奈川県秦野市落合７２９－５）

運営管理者　：　財団法人食品薬品安全センター秦野研究所
所長
[redacted]９９３年　６月２５日

[redacted]

試験責任者
（報告書作成者）　：[redacted] 1993 年 6 月 24 日

試験担当主任者　：[redacted] 1993 年 6 月 24 日

試験担当者　：[redacted]

化学分析担当者　：[redacted]（化学分析担当責任者）

[redacted]

陳　述　書

試験の表題　：　ピグメントグリーン７の細菌を用いる復帰突然変異試験

試験計画番号　：　Ｍ－９２－２９３

上記の試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年３月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD化学品試験法ガイドライン：471, 472 に準拠し、化学物質GLP（昭和59年３月31日，環保業第39号，薬発第229号，59基局第85号，改訂昭和63年11月18日，環企研第233号，衛生第38号，63基局第823号）に基づいて実施したものであります。

１９９３年　６月２５日

財団法人食品薬品安全センター
秦野研究所 所長（運営管理者）

氏　　名

[redacted]

信頼性保証証明

財団法人食品薬品安全センター秦野研究所信頼性保証部門は、試験計画番号M－９２－２９３に関する試験の管理状況について次のとおり査察を行った。

査　察　日	査　察　項　目	運営管理者および試験責任者への報告日
1992年10月12日	試験計画書点検査察	1992年10月12日
1993年 2月17日	含量試験・ 試験実施状況（１）査察	1993年 2月17日
1993年 2月19日	試験実施状況（２）査察	1993年 2月19日
1993年 5月27日	報告書案点検査察	1993年 5月27日
1993年 6月24日	最終報告書点検査察	1993年 6月24日

この報告書は、試験に使用された方法および手順を正確に記述し、報告結果は、生データを正確に反映していることを証明する。

1993年 6月24日

財団法人食品薬品安全センター

秦野研究所　信頼性保証責任者 [redacted]

【目　　次】

頁

要　　約 …… 1

緒　　言 …… 2

材料および試験方法 …… 3

試験結果および考察 …… 6

参　考　文　献 …… 7

Tables　1～3

Appendixes　1、2

【要　　約】

ピグメントグリーン７の変異原性の有無について、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施することにより検討した。

検定菌として、*Salmonella typhimurium* TA100, TA1535, TA98, TA1537 および *Escherichia coli* WP2 *uvr*A を用い、直接法および代謝活性化法のいずれも、用量設定試験は 50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ、本試験では 312.5～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量で試験を実施した。

その結果、２回の本試験とも、用いた５種類の検定菌について、いずれの用量でも復帰変異コロニー数の増加が認められなかったことから、ピグメントグリーン７は、用いた試験系において変異原性を有しない（陰性）と判定された。

【緒　　言】

既存化学物質安全性点検に係る毒性調査事業の一環として、難分解性既存化学物質の１つである、ピグメントグリーン７について、細菌を用いる復帰突然変異試験をプレート法により実施した。

この試験は、サルモネラ（ネズミチフス菌）におけるヒスチジン要求性から非要求性への復帰変異[(1)]、ならびに大腸菌におけるトリプトファン要求性から非要求性への復帰変異[(2)]を指標とした変異原の検出系である。

試験は、被験物質をそのまま検定菌に作用させる直接法と、哺乳動物のもつ薬物代謝酵素（S9 混液）によって産生される被験物質の代謝物の変異原性を試験する代謝活性化法とからなっている。

本試験は、「新規化学物質に係る試験の方法について」（昭和62年３月31日、環保業第237号、薬発第306号、62基局第303号）およびOECD化学品試験法ガイドライン：471，472に準拠し、化学物質GLP（昭和59年３月31日，環保業第39号，薬発第229号，59基局第85号，改訂昭和63年11月18日，環企研第233号，衛生第38号，63基局第823号）に基づいて実施した。

【材料および試験方法】

〔検　定　菌〕

Salmonella typhimurium TA100
Salmonella typhimurium TA1535
Escherichia coli WP2 *uvr*A
Salmonella typhimurium TA98
Salmonella typhimurium TA1537

S. typhimurium の４菌株は1975年10月31日にアメリカ合衆国、カリフォルニア大学の[redacted]博士から分与を受けた。

E. coli WP2 *uvr*A 株は1979年５月９日に国立遺伝学研究所の[redacted]博士から分与を受けた。

検定菌は、－80℃以下で凍結保存した。

試験に際して、ニュートリエントブロスNo.２（OXOID, ロット番号：B-1674/1 および B-1674/2）を入れたＬ字型試験管に種菌を接種し、37℃、約10～12時間往復振とう培養したものを検定菌液とした。

〔被験物質〕

ピグメントグリーン７（CAS No. 1328-53-6、以下ＰＧ７と略）は、分子量 1092～1127 の緑色の粉末である。純度 99.04%のもの（不純物として塩素化フタル酸誘導体等を含む, ロット番号：[redacted]）を[redacted]から供与された。被験物質は、使用時まで室温に遮光して保管した。被験物質は、この状態で安定あることが製造者によって確認されている。

ＰＧ７は、ジメチルスルホキシド（以下DMSOと略：ロット番号：TWP 5445 および APQ 5928 、和光純薬工業㈱）を用いて 50 mg/mℓ になるように調製した後、同溶媒で更に公比２ないし３で希釈したものを、速やかに試験に用いた。なお、調製にあたって、純度換算は行わなかった。

秦野研究所においてＰＧ７の DMSO 溶液中での安定性試験を、本試験における最高濃度（50 mg/mℓ）および最低濃度（３mg/mℓ）の２濃度について、室温遮光条件下で実施した。その結果、調製後４時間における各３サンプルの平均含量は、それぞれ初期値（０時間）の平均に対して、99.8%および 100%であった。これらの値は、当研究所の基準を満たしていた（Appendix 1）。

また、本試験に用いた調製検体について、含量測定試験を行った結果、50 mg/mℓ 溶液の含量は既定濃度に対し、95.1～100%、3.125 mg/mℓ 溶液は、95.9～97.4%であった。これらの値も当研究所の基準を満たしていた（Appendix 2）。

以上の結果から、ＰＧ７は DMSO 溶液中では安定であり、また調製液中の被験物質の含量は所定の値の範囲内にあることが確認された。

〔陽性対照物質〕

用いた陽性対照物質およびその溶媒は以下のとおりである。

AF-2 : ﾌﾘﾙﾌﾗﾏｲﾄﾞ	（上野製薬㈱	ﾛｯﾄ番号 46,	純度99.9%）
SA : ｱｼﾞ化ﾅﾄﾘｳﾑ	（和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 TWR3330,	純度>90%）
9-AA : 9-ｱﾐﾉｱｸﾘｼﾞﾝ	（Sigma Chem. Co.	ﾛｯﾄ番号 96F05641,	純度>98%）
2-AA : 2-ｱﾐﾉｱﾝﾄﾗｾﾝ	（和光純薬工業㈱	ﾛｯﾄ番号 DSF2950,	純度>90%）

AF-2, 2-AA は DMSO（和光純薬工業㈱）に溶解したものを、－20℃で凍結保存し、用時解凍した。9-AA は DMSO に、SA は蒸留水に溶解して速やかに試験に用いた。

〔培地および S9 混液の組成〕

1）トップアガー（TA菌株用）

下記の水溶液（A）および（B）を容量比 10:1 の割合で混合した。

(A) ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ（Difco）	0.6%	(B) L-ﾋｽﾁｼﾞﾝ*	0.5 mM
塩化ﾅﾄﾘｳﾑ	0.5%	ﾋﾞｵﾁﾝ	0.5 mM

* : WP2 用には、0.5 mM L-トリプトファン水溶液を用いた。

2）合成培地

培地は、日清製粉株式会社製の最少寒天培地（用量設定試験においてはロット番号：DJ040IH, 1992年９月４日製造および DJ060KH, 1992年11月10日製造、本試験においては、ロット番号：DJ050JH, 1992年10月12日製造および DJ060KH, 1992年11月10日製造）を用いた。なお、培地１ℓあたりの組成は下記のとおりである。

硫酸ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ・7水和物	0.2 g	ﾘﾝ酸水素ｱﾝﾓﾆｳﾑﾅﾄﾘｳﾑ・4水和物	3.5 g
ｸｴﾝ酸・1水和物	2 g	ｸﾞﾙｺｰｽ	20 g
ﾘﾝ酸水素二ｶﾘｳﾑ	10 g	ﾊﾞｸﾄｱｶﾞｰ（Difco）	15 g

径 90 mm のシャーレ１枚あたり 30 mℓ を流して固めてある。

3） S9 混液（1 mℓ中下記の成分を含む）

S9**	0.1 mℓ	NADH	4 μmol
塩化ﾏｸﾞﾈｼｳﾑ	8 μmol	NADPH	4 μmol
塩化ｶﾘｳﾑ	33 μmol	0.2M リン酸緩衝液 (pH 7.4)	0.5 mℓ
ｸﾞﾙｺｰｽ・6ﾘﾝ酸	5 μmol		

** ：7週齢の Sprague-Dawley 系雄ラットをフェノバルビタール(PB)および5、6-ベンゾフラボン(BF)の併用投与で酵素誘導して作製した S9（キッコーマン㈱、ロット番号 RAA-280、1992年7月24日製造 RAA-285、1992年11月20日製造および RAA-291, 1993年4月1日製造）を－80℃で凍結保存し、用時に解凍した。PBおよびBFの投与量は1日目 PB 30 mg/kg、2日目 PB 60 mg/kg、3日目 PB 60 mg/kg および BF 80 mg/kg、4日目 PB 60 mg/kgであり、いずれも腹腔内投与したものである。

〔試 験 方 法〕

プレート法を用いて、直接法および代謝活性化法によって試験を行った。

小試験管中にトップアガー2 mℓ、被験物質調製液 0.1 mℓ、リン酸緩衝液 0.5 mℓ(代謝活性化試験においては S9 混液 0.5 mℓ）、検定菌液 0.1 mℓ を混合したのち合成培地平板上に流して固めた。また、対照群として被験物質調製液の代わりに DMSO、または数種の陽性対照物質溶液を用いた。各検定菌ごとの陽性対照物質の名称および用量は表中に示した。培養は37℃で48時間行い、生じた変異コロニー数を算定した。抗菌性の有無については、肉眼的あるいは実体顕微鏡下で、寒天表面の菌膜の状態から判断した。用いた平板は用量設定試験においては、陰性および陽性対照群では3枚ずつ、各用量については1枚ずつとした。また、本試験においては両対照群および各用量につき、3枚ずつを用い、それぞれその平均値と標準偏差を求めた。用量設定試験は1回、本試験は同一用量について2回実施し、再現性の確認を行った。

〔判 定 基 準〕

用いた5種の検定菌のうち、1種以上の検定菌の直接法あるいは代謝活性化法において、被験物質を含有する平板上における復帰変異コロニー数が、陰性対照のそれに比べて2倍以上に増加し、かつ、その増加に再現性あるいは用量依存性が認められた場合に、当該被験物質は本試験系において変異原性を有する（陽性）と判定することとした。

【試験結果および考察】

試験の全過程を通して、信頼性に悪影響を及ぼすおそれのある予期し得なかった事態および試験計画書からの逸脱はなかった。

〔用量設定試験〕

結果を Table 1 に示した。ＰＧ７について、50～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の範囲で、公比を約３とし、試験を実施したところ、すべての検定菌の直接法あるいは代謝活性化法のいずれにおいても、抗菌性は認められなかった。また、被験物質に由来する寒天平板上の沈殿物は、直接法および代謝活性化法ともに、500 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ 以上の用量で認められた。

以上の結果から、本試験における最高用量を直接法、代謝活性化法ともに、すべての検定菌において、5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ とし、公比２で５用量を設定することとした。

〔本試験〕

結果を Tables 2、3 に示した。ＰＧ７について 312.5～5000 μg/ﾌﾟﾚｰﾄ の用量範囲で試験を実施した。２回の試験を通して、用いた５種類の検定菌の直接法、代謝活性化法のいずれにおいても、陰性対照の２倍以上となる変異コロニー数の増加は認められなかった。

なお、直接法および代謝活性化法ともに、すべての用量で被験物質に由来する沈殿物が寒天平板上に認められた。

ＰＧ７について実施した試験において、陽性対照群では、いずれの検定菌においても変異コロニー数の増加が認められ、陰性対照群とともに、計測された変異コロニー数はヒストリカルコントロール値の範囲内であったことから、本試験に用いた各検定菌の感受性および各陽性対照物質の変異原活性についての安定性が確認された。

以上の結果に基づき、ＰＧ７は、用いた試験系において変異原性を有しないもの（陰性）と判定した。

【参 考 文 献】

(1) Maron, D.M. and Ames, B.N.: Mutation Research. 113: 173-215 (1983)

(2) Green, M.H.L.: in "Handbook of Mutagenicity Test Procedures." Kilbey, B.J., Legator, M., Nichols, W. and Ramel, C. (eds.) Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford. (1984) pp. 161-187.

Table 1. Results of preliminary cytotoxicity test in bacterial reverse mutation assay with pigment green 7

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg / plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	135 135 143 (138 ± 4.6)	10 12 9 (10 ± 1.5)	11 9 21 (14 ± 6.4)	16 23 21 (20 ± 3.6)	4 7 7 (6 ± 1.7)	
	50	125	26	12	25	9	
	150	137	11	17	13	6	
	500 #	104	13	12	12	9	
	1500 #	146	13	15	14	5	
	5000 #	122	16	11	8	8	
S9Mix (+)	0	133 123 135 (130 ± 6.4)	13 14 16 (14 ± 1.5)	11 12 13 (12 ± 1.0)	31 30 35 (32 ± 2.6)	17 17 12 (15 ± 2.9)	
	50	149	16	12	35	18	
	150	155	15	21	27	13	
	500 #	135	26	13	31	10	
	1500 #	150	10	22	25	10	
	5000 #	127	20	18	28	9	
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg / plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	563 548 568 (560 ± 10.4)	228 222 207 (219 ± 10.8)	143 141 158 (147 ± 9.3)	611 656 629 (632 ± 22.6)	2197 2105 2191 (2164 ± 51.5)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg / plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	705 764 802 (757 ± 48.9)	180 193 174 (182 ± 9.7)	471 406 447 (441 ± 32.9)	283 314 301 (299 ± 15.6)	190 173 156 (173 ± 17.0)	

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 2. Results of bacterial reverse mutation assay (I) with pigment green 7

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)					
		Base - pair substitution type			Frameshift type		
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537	
S9Mix (-)	0	122 99 110 (110 ± 11.5)	9 19 11 (13 ± 5.3)	21 19 26 (22 ± 3.6)	33 44 39 (39 ± 5.5)	11 9 8 (9 ± 1.5)	
	312.5 #	98 114 120 (111 ± 11.4)	17 15 18 (17 ± 1.5)	22 15 21 (19 ± 3.8)	25 31 33 (30 ± 4.2)	8 8 7 (8 ± 0.6)	
	625 #	101 118 110 (110 ± 8.5)	18 11 19 (16 ± 4.4)	15 19 19 (18 ± 2.3)	31 29 36 (32 ± 3.6)	13 7 5 (8 ± 4.2)	
	1250 #	108 86 92 (95 ± 11.4)	12 14 13 (13 ± 1.0)	22 14 26 (21 ± 6.1)	19 27 22 (23 ± 4.0)	5 5 10 (7 ± 2.9)	
	2500 #	116 120 103 (113 ± 8.9)	16 9 7 (11 ± 4.7)	18 25 25 (23 ± 4.0)	24 27 22 (24 ± 2.5)	11 12 6 (10 ± 3.2)	
	5000 #	122 90 98 (103 ± 16.7)	9 17 14 (13 ± 4.0)	17 12 23 (17 ± 5.5)	35 28 22 (28 ± 6.5)	9 6 5 (7 ± 2.1)	
S9Mix (+)	0	116 136 138 (130 ± 12.2)	12 12 22 (15 ± 5.8)	25 29 22 (25 ± 3.5)	53 36 45 (45 ± 8.5)	13 13 14 (13 ± 0.6)	
	312.5 #	132 133 116 (127 ± 9.5)	13 15 20 (16 ± 3.6)	26 21 15 (21 ± 5.5)	58 49 38 (48 ± 10.0)	13 19 18 (17 ± 3.2)	
	625 #	119 108 108 (112 ± 6.4)	20 16 19 (18 ± 2.1)	27 26 24 (26 ± 1.5)	43 39 37 (40 ± 3.1)	13 24 22 (20 ± 5.9)	
	1250 #	103 115 110 (109 ± 6.0)	15 21 14 (17 ± 3.8)	35 17 22 (25 ± 9.3)	43 40 48 (44 ± 4.0)	18 17 9 (15 ± 4.9)	
	2500 #	123 129 120 (124 ± 4.6)	15 13 13 (14 ± 1.2)	32 23 25 (27 ± 4.7)	42 34 36 (37 ± 4.2)	13 15 13 (14 ± 1.2)	
	5000 #	130 112 115 (119 ± 9.6)	14 18 11 (14 ± 3.5)	23 30 24 (26 ± 3.8)	31 26 35 (31 ± 4.5)	12 16 9 (12 ± 3.5)	
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA	
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80	
	Number of colonies / plate	410 373 394 (392 ± 18.6)	122 126 106 (118 ± 10.6)	168 134 154 (152 ± 17.1)	545 502 555 (534 ± 28.2)	1818 1698 1982 (1833 ± 142.6)	
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA	
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2	
	Number of colonies / plate	439 599 620 (553 ± 99.0)	211 181 192 (195 ± 15.2)	860 829 726 (805 ± 70.1)	235 277 222 (245 ± 28.7)	171 175 155 (167 ± 10.6)	

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Table 3. Results of bacterial reverse mutation assay (II) with pigment green 7

With (+) or without (-) S9 Mix	Test substance dose (μg /plate)	Number of revertants (number of colonies / plate , Mean ± S.D.)				
		Base - pair substitution type			Frameshift type	
		TA100	TA1535	WP2uvrA	TA98	TA1537
S9Mix (-)	0	117 122 123 (121 ± 3.2)	10 15 14 (13 ± 2.6)	31 24 25 (27 ± 3.8)	21 29 22 (24 ± 4.4)	8 9 9 (9 ± 0.6)
	312.5 #	112 110 102 (108 ± 5.3)	15 17 13 (15 ± 2.0)	30 20 15 (22 ± 7.6)	24 28 21 (24 ± 3.5)	7 4 12 (8 ± 4.0)
	625 #	122 113 118 (118 ± 4.5)	9 9 14 (11 ± 2.9)	19 18 35 (24 ± 9.5)	21 29 23 (24 ± 4.2)	7 5 7 (6 ± 1.2)
	1250 #	106 101 104 (104 ± 2.5)	19 16 9 (15 ± 5.1)	19 22 25 (22 ± 3.0)	21 30 18 (23 ± 6.2)	5 7 4 (5 ± 1.5)
	2500 #	96 106 101 (101 ± 5.0)	9 12 23 (15 ± 7.4)	11 29 21 (20 ± 9.0)	18 25 19 (21 ± 3.8)	4 4 6 (5 ± 1.2)
	5000 #	127 90 102 (106 ± 18.9)	24 14 12 (17 ± 6.4)	18 25 19 (21 ± 3.8)	25 25 24 (25 ± 0.6)	5 5 5 (5 ± 0.0)
S9Mix (+)	0	124 111 135 (123 ± 12.0)	17 9 18 (15 ± 4.9)	23 22 24 (23 ± 1.0)	37 48 40 (42 ± 5.7)	7 12 12 (10 ± 2.9)
	312.5 #	119 135 141 (132 ± 11.4)	18 13 11 (14 ± 3.6)	26 25 21 (24 ± 2.6)	40 38 40 (39 ± 1.2)	10 14 7 (10 ± 3.5)
	625 #	134 122 124 (127 ± 6.4)	14 26 10 (17 ± 8.3)	34 26 28 (29 ± 4.2)	26 37 32 (32 ± 5.5)	15 12 9 (12 ± 3.0)
	1250 #	133 128 122 (128 ± 5.5)	15 19 9 (14 ± 5.0)	15 12 22 (16 ± 5.1)	43 33 35 (37 ± 5.3)	4 10 4 (6 ± 3.5)
	2500 #	93 151 132 (125 ± 29.6)	14 11 17 (14 ± 3.0)	26 31 21 (26 ± 5.0)	36 27 33 (32 ± 4.6)	8 7 5 (7 ± 1.5)
	5000 #	129 122 128 (126 ± 3.8)	14 6 16 (12 ± 5.3)	37 24 20 (27 ± 8.9)	23 30 20 (24 ± 5.1)	5 4 2 (4 ± 1.5)
Positive control S9 Mix (-)	Chemical	AF2	SA	AF2	AF2	9AA
	Dose (μg /plate)	0.01	0.5	0.01	0.1	80
	Number of colonies / plate	441 413 419 (424 ± 14.7)	127 147 161 (145 ± 17.1)	122 128 144 (131 ± 11.4)	495 500 501 (499 ± 3.2)	2499 2225 2310 (2345 ± 140.3)
Positive control S9 Mix (+)	Chemical	2AA	2AA	2AA	2AA	2AA
	Dose (μg /plate)	1	2	10	0.5	2
	Number of colonies / plate	724 674 713 (704 ± 26.3)	217 226 229 (224 ± 6.2)	864 856 888 (869 ± 16.7)	286 253 282 (274 ± 18.0)	241 240 260 (247 ± 11.3)

AF2: 2-(2-Furyl)-3-(5-nitro-2-furyl)acrylamide , SA: Sodium azide, 9AA: 9-Aminoacridine, 2AA: 2-Aminoanthracene

#: Precipitant was observed on the surface of agar plates.

Stability of the test article in the preparation

Date of preparation: Feb. 16, 1993
Date of determination
A : Feb. 16, 1993
B : Feb. 16, 1993
Condition for storage :
ambient temp., shading

Test article : pigment green 7
[redacted]
Carrier : DMSO

Indicated formulation (mg/mℓ)	A (0 hr)			B (4 hr)		
	Sample No.	Found-1 (mg/mℓ)	Content (%)[a]	Sample No.	Found-2 (mg/mℓ)	Content (%)[b]
3	1	2.975	99.2	4	3.071	103
〃	2	2.993	99.8	5	2.959	98.8
〃	3	3.021	101	6	2.948	98.4
	mean	2.996	100	mean		100
50	7	49.96	99.9	10	50.71	101
〃	8	49.82	99.6	11	50.94	102
〃	9	50.49	101	12	48.28	96.4
	mean	50.09	100	mean		99.8

[a] : Found-1/Indicated Formulation × 100

[b] : Found-2/mean Found-1 × 100

Investigator [redacted]

Director, Chemistry Dept. [redacted]

Appendix 2.

Content of the test article in the preparation

Test article : pigment green 7 Date of preparation : Feb. 17, 1993

[redacted] Date of determination : Feb. 17, 1993

Carrier : DMSO

Sample No.	Indicated Formulation (A) (mg/mℓ)	Found (B) (mg/mℓ)	B/A×100 (%)	Mean (%)
1	3.125	3.045	97.4	96.6
2	〃	2.997	95.9	
3	〃	3.011	96.4	
4	50	47.72	95.4	96.8
5	〃	50.02	100	
6	〃	47.53	95.1	

Investigator [redacted]

Director, Chemistry Dept. [redacted]