

# 試 験 報 告 書

3, 4-ジクロロベンジルクロライド  
(被験物質No.K-788)の微生物等による分解度試験

昭和60年10月17日

財団法人 化学品検査協会  
化学品安全センター

## 試験実施機関

名 称 : 財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター  
所 在 地 : (〒131) 東京都墨田区東向島四丁目1番1号  
電話番号 : (03) 614-1106  
代 表 者 : 化学品安全センター 所 長 [REDACTED]

### (1) 試験施設

名 称 : 財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター  
九州試験所  
所 在 地 : (〒830) 福岡県久留米市中央町19番14号  
電話番号 : (0942) 34-1500

### (2) 運営管理者など

運 営 管 理 者 九州試験所 所 長 [REDACTED]

試 験 責 任 者 九州試験所 分解試験課 [REDACTED]

試 験 担 当 者 九州試験所 分解試験課 [REDACTED]

微生物管理担当者 九州試験所 分解試験課 [REDACTED]

## 報 告 書 要 旨

1. 試験の内容 : 微生物等による化学物質の分解度試験
2. 被 験 物 質 : 3, 4-ジクロロベンジルクロライド  
(被験物質No.K-788)

### 3. 試験方法及び条件

#### 3.1 試験方法

環 保 業 第 5 号  
薬 発 第 6 1 5 号 } 〈微生物等による化学物質の分解度試験〉による。  
49基局第392号

#### 3.2 試験条件

被 験 物 質 濃 度 : 100 mg/l  
標準活性汚泥濃度 : 30 mg/l (懸濁物質として)  
試 験 液 量 : 300 ml  
培 養 温 度 :  $25 \pm 1$  °C  
培 養 期 間 : 28 日間

#### 3.3 分解度の測定

閉鎖系酸素消費量測定装置による生物化学的酸素要求量(BOD)の測定  
全有機炭素(TOC)分析法による溶存有機炭素量(DOC)の測定  
ガスクロマトグラフ(GC)法による被験物質の分析

### 4. 試験結果

生物化学的酸素要求量による分解度	0%, 0%, 0%
全有機炭素分析法による分解度	0%, 0%, 0%
ガスクロマトグラフ法による分解度	90%, 90%, 91%

被験物質は水中で変化して3, 4-ジクロロベンジルアルコール及び3, 4-ジクロロ安息香酸が生成していた。

## 目 次

	頁
1. 試験の目的	1
2. 試験方法	1
3. 試験期間	1
4. 被験物質	1～2
5. 微生物源	2
6. 試験装置	2
7. 試験条件	3
8. 試験液の調製方法	3
9. 直接定量方法	4～8
10. 分解度の算出	9
11. 試験条件の確認	9
12. 試験結果	10
13. 考 察	11
14. 試資料の保管	12

付 表

付 図

## 1. 試験の目的

既存化学物質の安全性確認の一環として、3,4-ジクロロベンジルクロライド（被験物質No.K-788）の微生物等による分解度試験を実施し、分解性の程度について知見を得る。

## 2. 試験方法

環 保 業 第 5 号  
薬 発 第 6 1 5 号 } 〈微生物等による化学物質の分解度試験〉による。  
49基局第392号

## 3. 試験期間

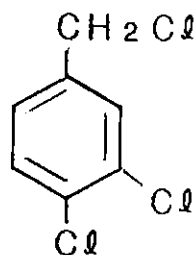
昭和60年2月25日～昭和60年8月20日  
（酸素要求量測定期間 昭和60年7月16日～昭和60年8月13日）

## 4. 被験物質

4.1 名 称 3,4-ジクロロベンジルクロライド  
（被験物質No.K-788）  
純 度\*1 99%以上  
入手源 [REDACTED]（[REDACTED] 試薬）  
ロット番号 AQ01

## 4.2 構造式、分子式、分子量

構造式



分子式  $C_7H_5Cl_3$

分子量 195.48

#### 4.3 スペクトル

紫外吸収スペクトル	(図-10参照)
赤外吸収スペクトル	(図-11参照)
ガスクロマトグラフ-質量スペクトル	(図-12参照)
核磁気共鳴スペクトル	(図-13参照)

#### 4.4 物理化学的性状

外 観	無色透明液体
比 重 <sup>*1</sup>	$d_{20}^{20}$ 1.415
溶解性	水 <sup>20</sup> : 約20mg/ℓ(TOC計による)
	クロロホルム : 10g/ℓ以上
	メタノール : 10g/ℓ以上

\*1 [REDACTED] 提示資料による。

### 5. 微生物源

#### 標準活性汚泥

昭和60年3月に下記の全国10ヶ所から採取した汚泥を混合した後、pH等の調整をし、活性汚泥の調製の方法により培養

伏古川処理場（北海道札幌市）	深芝処理場（茨城県鹿島郡）
中浜処理場（大阪府大阪市）	落合処理場（東京都新宿区）
北上川（宮城県石巻市）	信濃川（新潟県西蒲原郡）
吉野川（徳島県徳島市）	琵琶湖（滋賀県大津市）
広島湾（広島県広島市）	洞海湾（福岡県北九州市）

### 6. 試験装置

大倉電気株式会社製 閉鎖系酸素消費量測定装置（クーロメーター）  
揮発性物質用改良型

## 7. 試験条件

被 験 物 質 濃 度	100	mg/l	
標準活性汚泥濃度	30	mg/l	(懸濁物質として)
試 験 液 量	300	ml	
培 養 温 度	25±1	℃	
培 養 期 間	28	日間	

## 8. 試験液の調製方法

### 1) (水+被験物質)系

精製水 300mlに被験物質 21.5 $\mu$ l (30.4mg相当<sup>\*2</sup>)を添加した。  
(n=1)

### 2) (汚泥+被験物質)系

基礎培養基<sup>\*3</sup> 300mlに被験物質 21.5 $\mu$ l及び標準活性汚泥<sup>\*4</sup> 1.55 ml  
(懸濁物質として 9.1mgに相当)を添加した。(n=3)

### 3) (汚泥+アニリン)系

基礎培養基 300mlにアニリン<sup>\*5</sup> 29.5 $\mu$ l (30.0mgに相当)及び標準活性  
汚泥 1.55 mlを添加した。(n=1)

### 4) 汚泥ブランク系

基礎培養基 300mlに標準活性汚泥 1.55 mlを添加した。(n=1)

\*2  $21.5\mu\text{l} \times 1.415 (\text{比重}) = 30.4\text{mg}$

\*3 JIS K 0102の21. で定められたA液、B液、C液及びD液それぞれ 6mlに  
精製水を加えて 2l とし、pH 7.0に調整したもの。

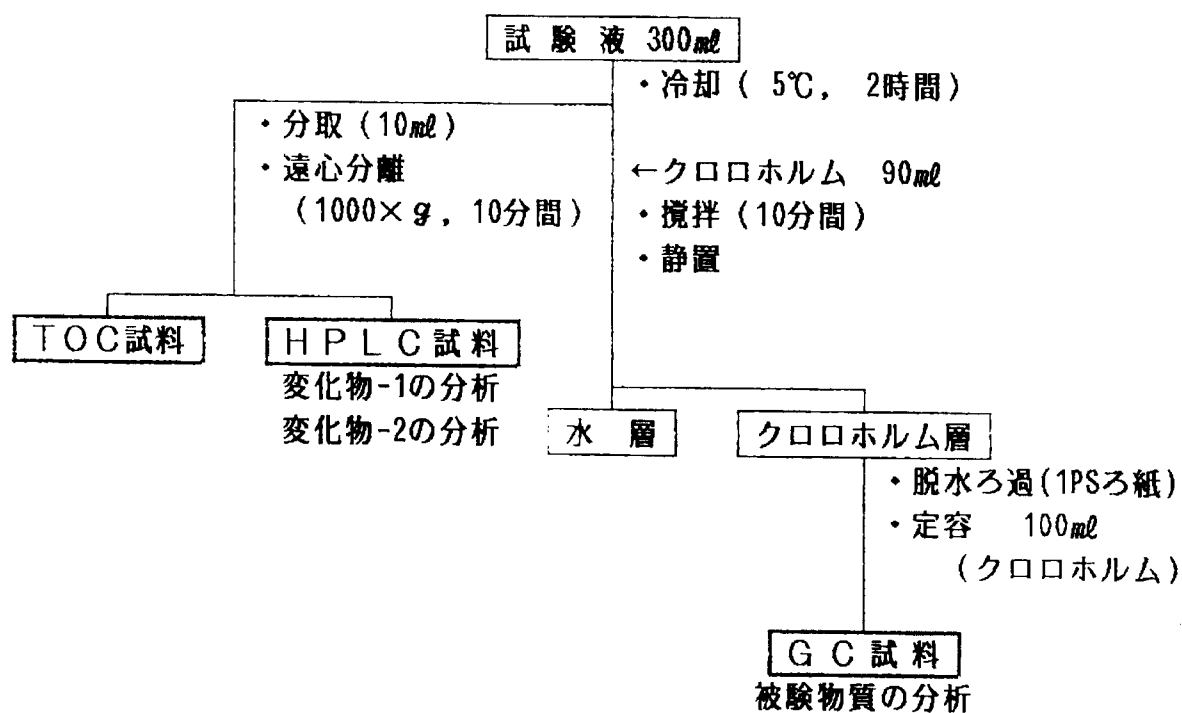
\*4 標準活性汚泥中の懸濁物質濃度は 5900mg/lであった。

\*5 昭和化学株式会社製 試薬特級

## 9. 直接定量方法

### 9.1 試験液の前処理

培養期間終了後、（水＋被験物質）系、（汚泥＋被験物質）系及び汚泥ブランク系の試験液について下記のフローチャートに従って前処理操作を行い、TOC試料、HPLC試料及びGC試料とした。



変化物-1 : 3, 4-ジクロロベンジルアルコール  
変化物-2 : 3, 4-ジクロロ安息香酸



## 9.2 全有機炭素（TOC）分析法による測定

前処理を行って得られたTOC試料について下記条件により溶存有機炭素量（DOC）を測定した。

被験物質のDOCは記録紙上の被験物質のピーク高さでフタル酸水素カリウムを精製水に溶解して調製したTOC標準溶液 80.0mgC/lのピーク高さと比較し、比例計算により求めた。（表-2、図-2参照）

ピーク高さの測定限界は2mmとした。

### 〔定量条件〕

装置 : 島津 TOC-10B  
TC炉温度 : 900℃  
流量 : 200 ml/分  
検出濃度 : 1 mgC/l

## 9.3 ガスクロマトグラフ（GC）法による被験物質の定量分析

前処理を行って得られたGC試料について下記条件により直接定量分析を行った。被験物質の濃度はデータ処理装置で得られた被験物質のピーク面積と標準溶液 300mg/lのピーク面積とを比較し、比例計算により求めた。（表-3、図-3参照）

ピーク面積の測定限界は500μV・secとした。

### 〔定量条件〕

装置 : 島津 GC-9A  
検出器 : 水素炎イオン化検出器（FID）  
カラム : 1m×3mmφ, ガラス製  
液相 : 10% OV-17  
担体 : クロモソルブW（HP）  
カラム温度 : 180℃  
キャリアガス : 窒素  
検出濃度 : 3mg/l

#### [ 定量性の確認 ]

被験物質 150.0mg をクロロホルムに溶解し、100ml に定容して 1500mg/ℓ の標準原液を調製した。これをクロロホルムで希釈して 300mg/ℓ、150mg/ℓ、75.0mg/ℓ の標準溶液とした。この標準溶液を前記の [ 定量条件 ] に従って GC 分析を行い、それぞれのピーク面積と濃度とにより検量線を作成した。検量線は原点を通る直線であることから定量性が良好であることを確認した。( 図 - 7 参照 )

#### [ 回収率 ]

抽出回収試験を行うために 8. に従って被験物質を添加した ( 水 + 被験物質 ) 系及び ( 汚泥 + 被験物質 ) 系の試験液を 9.1 の操作で前処理し回収率を求めた。回収率は下記のとおりであり、試験液中の被験物質濃度を求める場合の補正值とした。( 表 - 6、図 - 6 参照 )

( 水 + 被験物質 ) 系	平均値	94.0%
( 汚泥 + 被験物質 ) 系	平均値	94.0%

#### 9.4 高速液体クロマトグラフ ( HPLC ) 法による 3, 4 - ジクロロベンジルアルコール ( 変化物 - 1 ) の定量分析

前処理を行って得られた HPLC 試料について下記条件により直接定量分析を行った。変化物 - 1 の濃度はクロマトグラムから変化物 - 1 のピーク高さと標準溶液 80.0mg/ℓ のピーク高さとを比較し、比例計算により求めた。( 表 - 4、図 - 4 参照 )

ピーク高さの測定限界は 2 mm とした。

[ 定量条件 ]

装 置 : CBC型 高速液体クロマトグラフ  
ポンプ : ウォータース社製 6000A  
検出器 : 日本分光工業製 UVIDE C-100-II

カ ラ ム : ERC-ODS-1151  
5 cm×6 mmφ, ステンレス製

溶 離 液 : メタノール/水(60/40 V/V)

測 定 波 長 : 230nm (図-14参照)

検 出 濃 度 : 1.3 mg/ℓ

[ 定量性の確認 ]

市販試薬3, 4-ジクロロベンジルアルコール 100.0mgをメタノールに溶解し、50mlに定容して2000mg/ℓの標準原液を調製した。これをメタノールで希釈して 400mg/ℓの標準原液を調製し、さらに精製水で希釈して80.0mg/ℓ、40.0mg/ℓ、20.0mg/ℓの標準溶液とした。この標準溶液を前記の[ 定量条件 ]に従ってHPLC分析を行い、それぞれのピーク高さと濃度とにより検量線を作成した。検量線は原点を通る直線であることから定量性が良好であることを確認した。(図-8参照)

9.5 高速液体クロマトグラフ(HPLC)法による3, 4-ジクロロ安息香酸  
(変化物-2)の定量分析

前処理を行って得られたHPLC試料について下記条件により直接定量分析を行った。変化物-2の濃度はクロマトグラムから変化物-2のピーク高さと標準溶液 40.0mg/ℓのピーク高さとを比較し、比例計算により求めた。(表-5、図-5参照)

ピーク高さの測定限界は2mmとした。

[定量条件]

装 置 : CBC型 高速液体クロマトグラフ  
ポンプ : ウォータース社製 6000A  
検出器 : 日本分光工業製 UVIDEC-100-II

カラム : Unisil 3F-50A  
5cm×6mmφ, ステンレス製

溶 離 液 : メタノール/水(75/25 V/V) (リン酸でpH3)

測 定 波 長 : 240nm (図-15参照)

検 出 濃 度 : 0.6mg/l

[定量性の確認]

市販試薬3, 4-ジクロロ安息香酸 100.0mgをメタノールに溶解し、50mlに定容して2000mg/lの標準原液を調製した。これをメタノールで希釈して200mg/lの標準原液を調製し、さらに精製水で希釈して40.0mg/l、20.0mg/l、10.0mg/lの標準溶液とした。この標準溶液を前記の[定量条件]に従ってHPLC分析を行い、それぞれのピーク高さと濃度とにより検量線を作成した。検量線は原点を通る直線であることから定量性が良好であることを確認した。(図-9参照)

なお、9. で使用した試薬は次のとおりである。

フタル酸水素カリウム : 和光純薬工業株式会社 試薬特級  
メタノール : 和光純薬工業株式会社  
液体クロマトグラフ用

3, 4-ジクロロベンジルアルコール

: 半井化学薬品株式会社 試薬一級

3, 4-ジクロロ安息香酸 : 東京化成工業株式会社 試薬一級

## 10. 分解度の算出

分解度は下記の式により算出した。

### 10.1 酸素要求量による分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}} \times 100$$

BOD : (汚泥+被験物質)系の生物化学的酸素要求量  
(測定値) (mg)

B : 汚泥ブランク系の生物化学的酸素要求量  
(測定値) (mg)

TOD<sup>\*5</sup> : 被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる理論的  
酸素要求量 (計算値) (mg)

\*5 純度100%として計算した。

### 10.2 直接定量による分解度

被験物質が水中で変化していたため、分解度は次式により算出した。

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{SB} - \text{SA}}{\text{SB}} \times 100$$

SA : (汚泥+被験物質)系における被験物質の残留量  
(測定値) (mg)

SB : 被験物質の添加量 (mg)

## 11. 試験条件の確認

酸素要求量から求めたアニリンの7日後、14日後の分解度はそれぞれ、  
68%、73%であった。

よってこの試験は有効である。

## 12. 試験結果

### 12.1 試験液の状況

	試 験 液	状 況	pH
仕込時	(水+被験物質)系	被験物質は溶解せず、培養ビンの底に沈降した。	—
	(汚泥+被験物質)系	被験物質は溶解せず、培養ビンの底に沈降した。	—
終了時 (28日後)	(水+被験物質)系	試験液は透明で不溶物質の残留は目視確認されなかった。	④ 3.4
	(汚泥+被験物質)系	試験液は透明で不溶物質の残留は目視確認されなかった。 汚泥の増殖は見られなかった。	① 6.0 ② 6.0 ③ 5.4

### 12.2 28日後の分解度

	分 解 度 (%)			付 表
	①	②	③	
酸素要求量による結果	0	0	0	表-1
TOC法による結果	0	0	0	表-2
GC法による結果	90	90	91	表-3

### 13. 考 察

培養終了時、試験液のGC分析では（水＋被験物質）系、（汚泥＋被験物質）系ともに、被験物質ピーク以外のピークが検出された。そこで、（汚泥＋被験物質）系試験液のTOC試料をメチルエステル化して、GC-MSスペクトルを測定した結果、3, 4-ジクロロベンジルアルコール（変化物-1）と3, 4-ジクロロ安息香酸（変化物-2、官報公示整理番号 3-1424）の2種類の変化物の生成が確認された（図-16参照）。変化物については、市販試薬を用いてHPLC分析により定量し、各々の生成率を調べた。その結果は次表のとおりであった。

培養終了時（28日後）の分析結果

試 験 液	被験物質 残留率(%)	変化物-1 生成率(%)	変化物-2 生成率(%)	被験物質の残留率及び 変化物-1と変化物-2の 生成率の合計(%)
④ 水＋被験物質	8	86	2	96
① 汚泥＋被験物質	10	68	15	93
② 汚泥＋被験物質	10	62	29	101
③ 汚泥＋被験物質	9	60	28	97
付 表	表-3	表-4	表-5	

被験物質の残留率及び変化物-1と変化物-2の生成率の合計は、（水＋被験物質）系で96%、（汚泥＋被験物質）系で平均97%となっており、いずれの系においても変化物は、生成後安定に残留していたことが確認された。

## 14. 試資料の保管

### 14.1 被験物質

保管用被験物質約5gを保管用容器に入れ密栓後、「新規化学物質に係る試験の項目等を定める命令第3条に規定する試験施設に関する基準」（以下「試験施設基準」という。）第32条に定める期間、当試験所試料保管室に保管する。

### 14.2 生データ、資料等

試験計画書及び試験により得られた分析結果、測定結果、観察結果、その他試験ノート等最終報告書の作成に用いた生データ並びに調査表、資料等は最終報告書と共に、「試験施設基準」第32条に定める期間、当試験所資料保管室に保管する。

以 上



☒ - 1

Date 7/16 ~ 8/13 1985

Test Temp. 25 ± 1°C

Model Coulometer No 207

Range 250 mg/l x 1

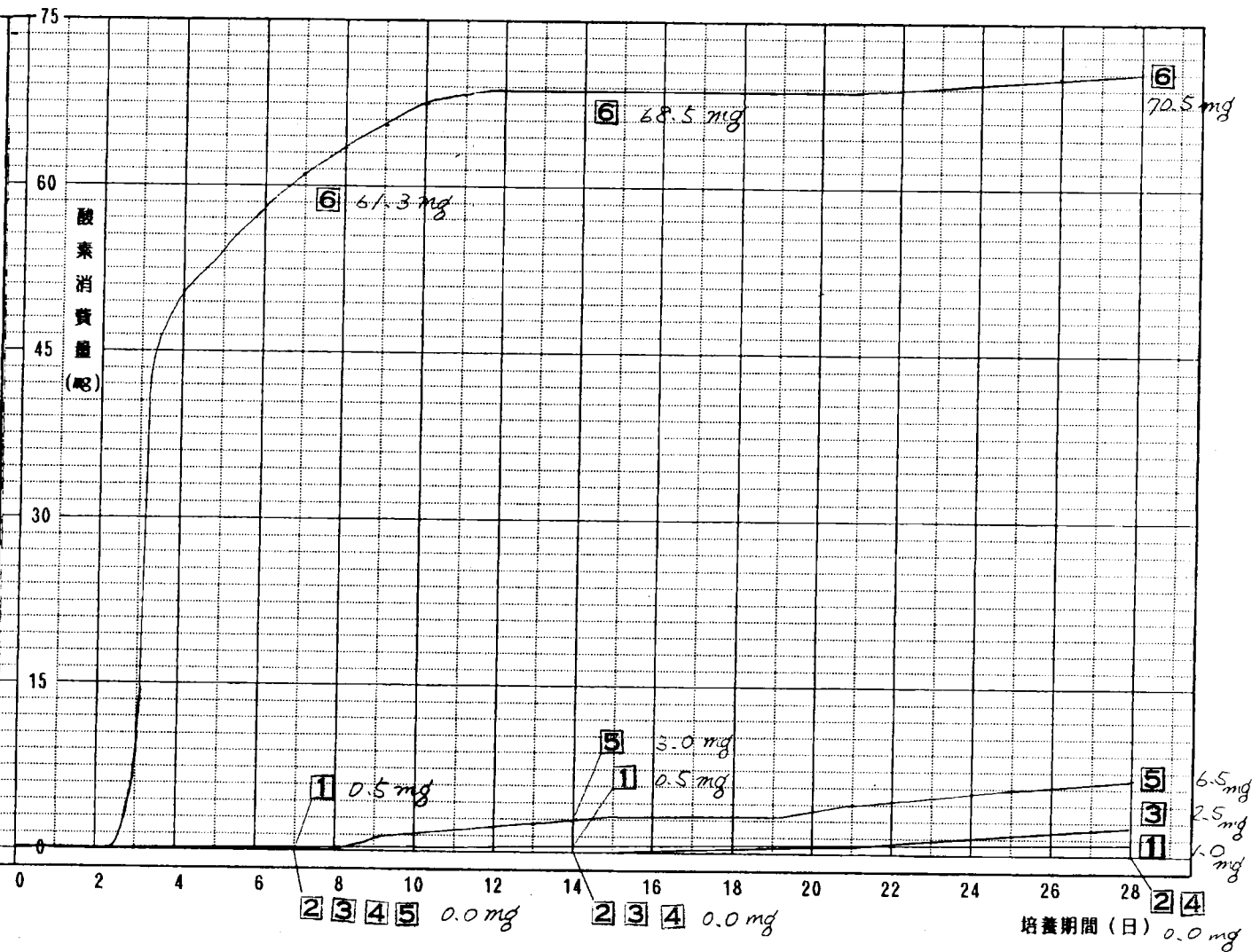
Chart Speed 2 mm/h

Sample (mg/l)	Sludge (mg/l)
① 汚泥+被験物質 (100)	30
② 汚泥+被験物質 (100)	30
③ 汚泥+被験物質 (100)	30
④ 水+被験物質 (100)	—
⑤ 基礎呼吸 (—)	30
⑥ 汚泥+アニリン (100)	30

Note: K788

本試験 標準条件

Operator XXXXXXXXXX



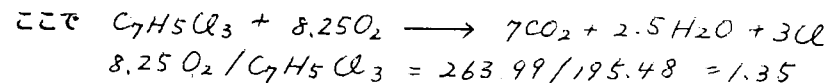
K-788 分解度

① 分解度 = (BOD-B)/TODX100 = 0 %

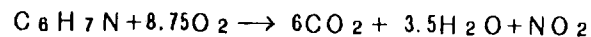
② 分解度 = (BOD-B)/TODX100 = 0 %

③ 分解度 = (BOD-B)/TODX100 = 0 %

TOD = 30.4 mg x 1.35 = 41.0 mg



7日目のアニリンの分解度 = (BOD-B)/TODX100 = 68 %



$8.75\text{O}_2 / \text{C}_6\text{H}_7\text{N} = 280.0 / 93.1 = 3.01$

TOD = 30.0 x 3.01 = 90.3 (mg)