

最 終 報 告 書

オレイン酸（被験物質番号 K-1113）の微生物による分解度試験

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所

陳 述 書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 オレイン酸（被験物質番号 K-1113）の微生物による分解度試験

試験番号 21113

上記試験は、「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」（環保業第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、昭和63年11月18日改正）に定める「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設に関する基準」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に従って実施したものです。

平成 5 年 4 月 9 日

運営管理者



信頼性保証書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 オレイン酸（被験物質番号 K-1113）の微生物による
分解度試験

試験番号 21113

上記試験は財団法人化学品検査協会化学品安全センター久留米研究所の
信頼性保証部門が監査及び査察を実施しており、監査又は査察を行った日付
並びに運営管理者及び試験責任者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察日	報告日（運営管理者）	報告日（試験責任者）
平成 4 年 11 月 4 日	平成 4 年 11 月 4 日	平成 4 年 11 月 4 日
平成 5 年 1 月 18 日	平成 5 年 1 月 19 日	平成 5 年 1 月 19 日
平成 5 年 2 月 1 日	平成 5 年 2 月 17 日	平成 5 年 2 月 18 日
平成 5 年 2 月 15 日	平成 5 年 2 月 17 日	平成 5 年 2 月 18 日
平成 5 年 2 月 16 日	平成 5 年 2 月 17 日	平成 5 年 2 月 18 日
平成 5 年 4 月 9 日	平成 5 年 4 月 9 日	平成 5 年 4 月 9 日

本最終報告書は、試験の方法が正確に記載されており、内容が試験計画及び
標準操作手順に従い、かつ、生データを正確に反映していることを保証します。

平成 5 年 4 月 9 日
信頼性保証業務担当者

平成 5 年 4 月 9 日
信頼性保証業務担当者

平成 5 年 4 月 9 日
信頼性保証部門責任者

目 次

	頁
要 約	1
1. 表 題	2
2. 試験委託者	2
3. 試験施設	2
4. 試験目的	2
5. 試験方法	2
6. 優良試験所基準への適合	2
7. 試験期間	3
8. 試験関係者	3
9. 最終報告書作成日	3
10. 最終報告書の承認	3
11. 被 験 物 質	4
12. 活性汚泥の調製	5
13. 分解度試験の実施	7
14. 試験条件の確認	12
15. 試験結果	13
16. 試資料の保管	14
17. 備 考	15
18. 表及び図の内容	16
付 表	
付 図	

要 約

1. 試験の表題

オレイン酸（被験物質番号 K-1113）の微生物による分解度試験

2. 分解度試験

2.1 試験条件

- (1) 被験物質濃度 100 mg/l
- (2) 活性汚泥濃度 30 mg/l（懸濁物質濃度として）
- (3) 試験液量 300 ml
- (4) 試験液培養温度 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- (5) 試験液培養期間 28日間

2.2 測定及び分析

- (1) 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
- (2) ガスクロマトグラフィー（GC）による被験物質の分析

3. 試験結果

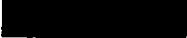
- (1) BODによる分解度 90%, 72%, 72%
- (2) GCによる分解度 100%, 100%, 100%

4. 被験物質の安定性

被験物質は保管条件下で安定であることを確認した。

最 終 報 告 書

試験番号 2 1 1 1 3

1. 表 題 オレイン酸（被験物質番号 K-1113）の微生物による
 分解度試験
2. 試験委託者 名 称 通商産業省
- 住 所 （〒100）東京都千代田区霞が関一丁目3番1号
3. 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久留米研究所
- 住 所 （〒830）福岡県久留米市中央町19-14
 TEL （0942）34-1500
- 運営管理者 
4. 試験目的 被験物質K-1113の微生物による分解性の程度について知見
 を得る。
5. 試験方法 「新規化学物質に係る試験の方法について」（環保業第5号、
 薬発第 615号、49基局第 392号、昭和49年 7月13日）に規定
 する「微生物等による化学物質の分解度試験」及び「OECD
 Guidelines for Testing of Chemicals」(May 12, 1981)
 に定める「301C, Ready Biodegradability : Modified MITI
 Test (I)」に準拠した。
6. 優良試験所 「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査
 基準への適合 の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」
 （環保業第39号、薬発第 229号、59基局第85号、昭和59年
 3月31日、昭和63年11月18日改正）に定める「新規化学物質に
 係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を
 定める命令第4条に規定する試験施設に関する基準」及び「OECD
 Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に
 適合して行った。

7. 試験期間

- (1) 試験開始日 平成 4 年 1 1 月 4 日
- (2) 試験液培養開始日 平成 5 年 1 月 1 8 日
- (3) 試験液培養終了日 平成 5 年 2 月 1 5 日
- (4) 試験終了日 平成 5 年 3 月 2 4 日

8. 試験関係者

試験責任者

試験担当者

活性汚泥管理責任者

試験資料管理部門責任者

9. 最終報告書作成日

平成 5 年 3 月 2 4 日
作成者 _____

10. 最終報告書の承認

試験責任者

平成 5 年 3 月 2 4 日
氏名 _____

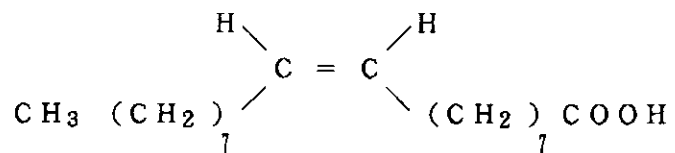
11. 被 験 物 質

本報告書において被験物質K-1113は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

11.1 名 称 オレイン酸

11.2 構造式等

構造式



分子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{34}\text{O}_2$

分子量 282.47

11.3 純 度^{*1} 99.0%以上

*1 [REDACTED] 添付資料による。

11.4 入手先、等級及びロット番号

- (1) 入 手 先 [REDACTED]
- (2) 等 級 [REDACTED]
- (3) ロット番号 GA01

11.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル（図－5参照）、質量スペクトル（図－6参照）及び核磁気共鳴スペクトル（図－7参照）により構造を確認した。

11.6 保管条件及び保管条件下での安定性

(1) 保管条件 冷暗所

(2) 安定性確認 試験液培養開始前及び培養終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定し、両スペクトルが一致することから、保管条件下で安定であることを確認した（図－5参照）。

12. 活性汚泥の調製

12.1 汚泥の採集場所及び時期

(1) 場 所 以下の10ヵ所から採集した。

伏古川処理場（北海道札幌市）

中浜処理場（大阪府大阪市）

北上川（宮城県石巻市）

吉野川（徳島県徳島市）

広島湾（広島県広島市）

深芝処理場（茨城県鹿島郡）

落合処理場（東京都新宿区）

信濃川（新潟県西蒲原郡）

琵琶湖（滋賀県大津市）

洞海湾（福岡県北九州市）

(2) 時 期 平成 4 年 9 月

12.2 採集方法

- (1) 都 市 下 水 下水処理場の返送汚泥
- (2) 河川、湖沼及び海 表層水及び大気と接触している波打際の表土

12.3 新旧汚泥の混合

上記で採集してきた各地の汚泥のろ液をそれぞれ 500ml と、それまで試験に供していた旧活性汚泥のろ液 5ℓ とを混合して 10ℓ とし、pH を 7.0 ± 1.0 に調整して培養槽でばっ気^{*2}した。

*2 ばっ気

屋外空気をプレフィルターに通し、ばっ気に用いた。

12.4 培 養

培養槽へのばっ気を約 30 分間止めた後、全量の約 1/3 量の上澄液を除去した。

これと等量の脱塩素水を加えて再びばっ気し、上澄交換液部の濃度が 0.1% になるように合成下水^{*3}を加えた。この操作を毎日 1 回繰り返し、培養して活性汚泥とした。培養温度は $25 \pm 2^\circ\text{C}$ とした。

*3 合成下水

グルコース、ペプトン、りん酸一カリウムをそれぞれ 5 (W/V) % になるように脱塩素水に溶解し、水酸化ナトリウムで pH を 7.0 ± 1.0 に調整したものをを用いた。

12.5 管理及び使用

培養中、上澄液の外観及び活性汚泥の生成状態を観察するとともに、活性汚泥の沈でん性、pH、温度及び溶存酸素濃度を測定し記録した。活性汚泥の生物相は適宜光学顕微鏡を用いて観察し、異常のないことを確認した上で試験に供した。

12.6 活性汚泥の活性度の点検及び使用開始日

(1) 活性汚泥の活性度の点検

標準物質を用いて活性汚泥使用開始前に活性度を点検した。また、旧活性汚泥との関連性に留意した。

(2) 活性汚泥使用開始日 平成 4年10月20日

13. 分解度試験の実施

13.1 試験の準備

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

測定方法 「工場排水試験方法」の懸濁物質（JIS K 0102-1986 の 14.1）に準じて行った。

測定実施日 平成 5年 1月18日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は5700mg/lであった。

(2) 基礎培養基の調製

「工場排水試験方法」の生物化学的酸素消費量（JIS K 0102-1986 の 21.）で定められたA液、B液、C液及びD液それぞれ3mlに精製水を加えて1ℓとする割合で混合し、pHを7.0に調整した。

(3) 基準物質

アニリンを用いた。

13.2 試験液の調製

試験容器を6個用意し、試験液を下記の方法で調製した。

これらの試験液について、13.3の条件で培養を行った。

(1) 被験物質及びアニリンの添加

(a) (水+被験物質)系(1個)

試験容器に精製水 300mlを入れ、被験物質を 100mg/lになるようにマイクロシリンジで33.5μl [添加量29.8mg = 33.5μl × 0.890 g/cm³ (密度)] 分取して添加した。

(b) (汚泥+被験物質)系(3個)

試験容器に基礎培養基 300mlを入れ、被験物質を 100mg/lになるようにマイクロシリンジで33.5μl [添加量29.8mg = 33.5μl × 0.890 g/cm³ (密度)] 分取して添加した。

(c) (汚泥+アニリン)系(1個)

試験容器に基礎培養基 300mlを入れ、アニリンを 100mg/lになるようにマイクロシリンジで29.5μl (添加量30mg) 分取して添加した。

(d) 汚泥ブランク系(1個)

試験容器に基礎培養基 300mlを入れた。

(2) 活性汚泥の接種

(b), (c) 及び (d) の試験液に12. の条件で調製した活性汚泥を懸濁物質濃度として30mg/lになるように接種した。

13.3 試験液培養装置及び環境条件

(1) 試験液培養装置

閉鎖系酸素消費量測定装置 (クーロメーター, データ処理装置)

試験容器 300ml用培養ビン

炭酸ガス吸収剤 ソーダライム, NaOH

攪拌方法 マグネチックスターラーによる回転攪拌

(2) 環境条件

試験液培養温度 25 ± 1℃

試験液培養期間 28日間

実施場所 511クーロ室

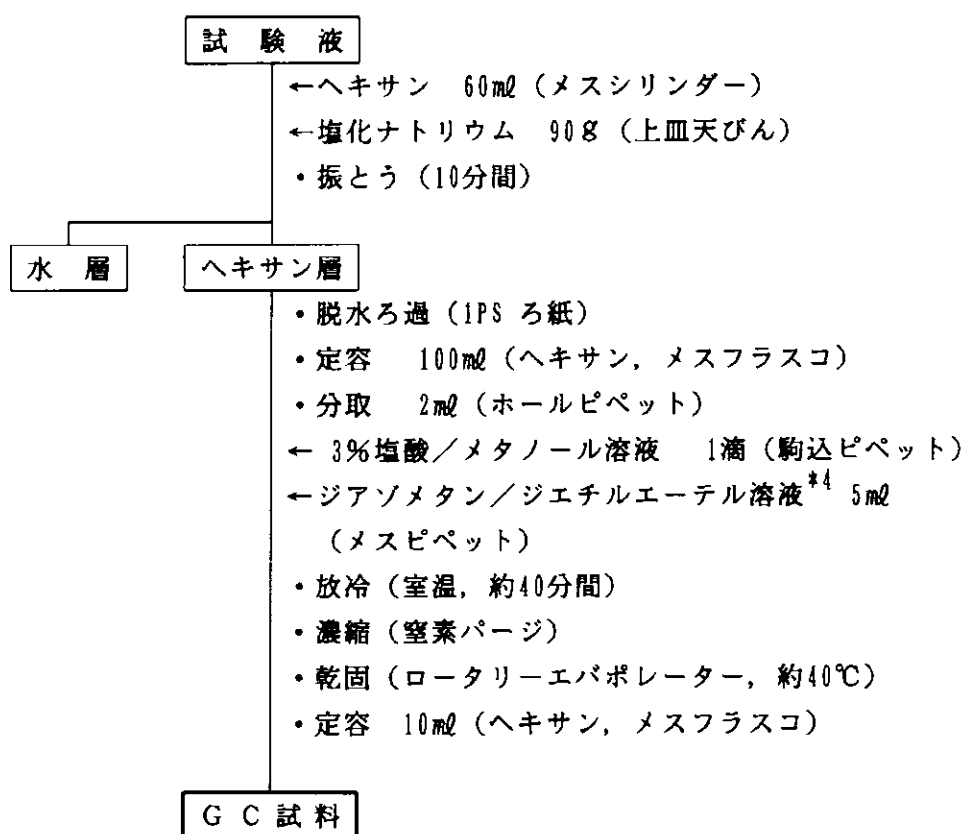
13.4 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中に残留している被験物質を分析した。

13.4.1 試験液の前処理

試験液培養期間終了後、（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以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、被験物質を分析するためのガスクロマトグラフィー（GC）試料とした。

フロースキーム



*4 水酸化カリウム 2.4g、イオン交換水 4ml、ジエチルエーテル 4ml及びジエチレングリコールモノエチルエーテル 3mlにp-トルエンスルホン酸-N-メチル-N-ニトロソアミド10gを加えて発生したジアゾメタンをジエチルエーテルに溶解して調製した。

13.4.2 定量分析

ガスクロマトグラフィーによる被験物質の分析

被験物質は直接分析することが困難であったため、ジアソメタンによる誘導体化物（オレイン酸メチル）を分析することにより、被験物質の分析に代えた。なお、標準溶液の濃度は被験物質濃度で表示した。

前処理を行って得られたGC試料について下記定量分析条件に基づき誘導体化物を分析した。GC試料中の被験物質の濃度はクロマトグラム上で得られた標準溶液79.7mg/lのピーク面積とGC試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた（表-2、図-2参照）。

被験物質の検出下限は、クロマトグラムのノイズレベルを $100 \mu V \cdot sec$ （ピーク面積）とし、 $0.9 mg/l$ とした。

(1) 分析機器の定量条件

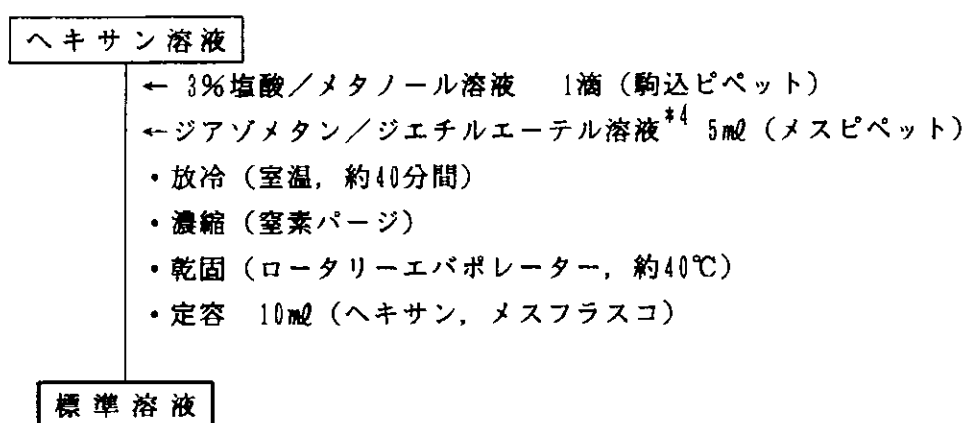
機 器	ガスクロマトグラフ
検 出 器	水素炎イオン化検出器 (FID)
カ ラ ム	30 ml × 1.2 mm φ ガラス製
液 相	G-230 膜厚 0.5 μm
カ ラ ム 温 度	230℃
試料導入部温度	350℃
キャリアーガス	ヘリウム
流 量	0.5 Kg/cm ²
注 入 量	2 μl
感 度	
検 出 器	レンジ 10 ²
記 録 計	ATTEN 2 ¹

(2) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。

被験物質56μl [$49.8\text{mg} = 56\mu\text{l} \times 0.890\text{g}/\text{cm}^3$ (密度)] をマイクロシリンジで分取し、ヘキサンに溶解して997mg/lの標準原液を調製した。これをヘキサンで希釈して399mg/lのヘキサン溶液とし、2ml分取した後、以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、79.7mg/lの標準溶液とした。

フロースキーム



(3) 検量線の作成

(2) の標準原液をヘキサンで希釈して99.7、199 及び 399mg/lのヘキサン溶液とし、各2ml分取した後、(2) のフロースキームに従って前処理操作を行い、19.9、39.9及び79.7mg/lの標準溶液を調製した。これらを (1) の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により検量線を作成した (図-4 参照)。

13.4.3 回収試験

回収試験は13.2に準じ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13.4.1に従って前処理操作し、前記の定量条件に従ってGCにより分析を行った。分析操作における各2点の回収率及び平均回収率は下記のとおりであり、平均回収率を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-3、図-3 参照)。

(水 + 被験物質) 系回収率	99.0 %	96.0 %	平均 97.5 %
(汚泥 + 被験物質) 系回収率	94.1 %	93.8 %	平均 94.0 %

13.5 分解度の算出

被験物質の分解度は下記の式に基づき算出し、小数点以下1ケタ目を丸めて整数で表示した。

(1) BOD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^{*5} : 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 TODの算出は純度100%として計算した。

(2) GCによる分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{S_W - S_S}{S_W} \times 100$$

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

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

13.6 数値の取扱い

数値を平均する場合、平均は算術平均とした。数値の丸め方は JIS Z 8401-1961に従った。

14. 試験条件の確認

BODから求めたアニリンの7日及び14日後の分解度はそれぞれ56%及び71%であることから、本試験の試験条件が有効であることを確認した(表-1、図-1参照)。

15. 試験結果

15.1 試験液の状況

試験液の状況は下記のとおりであった。

	試 験 液	状 況
培養開始時	(水 + 被験物質) 系	被験物質は溶解しなかった。
	(汚泥 + 被験物質) 系	被験物質は溶解しなかった。
培養終了時	(水 + 被験物質) 系	試験液は白濁していた。
	(汚泥 + 被験物質) 系	汚泥の増殖が認められた。

15.2 試験液の分析結果

28日後の分析結果は下記のとおりであった。

		(水 + 被験物質) 系	(汚泥 + 被験物質) 系			理論量 (mg)	付 表	付 図
		②	③	④	⑤			
B O D	(mg)	0.0	77.6	62.2	61.9	86.1	表 - 1	図 - 1
被験物質残留 (G C)	(mg)	28.6	0.0	0.0	0.0	29.8	表 - 2	図 - 2
	*6 (%)	96	0	0	0			

*6 残留率 (%) は以下の式に基づき算出し、小数点以下1ケタを丸めて整数で表示した。

$$\text{残留率 (\%)} = \frac{\text{残留量 (mg)}}{\text{理論量 (mg)}} \times 100$$

15.3 分解度試験結果

28日後の分解度は下記のとおりであった。

	分 解 度 (%)			付 表
	③	④	⑤	
B O D による 結 果	9 0	7 2	7 2	表-1
G C による 結 果	1 0 0	1 0 0	1 0 0	表-2

16. 試資料の保管

16.1 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及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設について」に定める「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める命令第4条に規定する試験施設に関する基準」（以下「GLP基準」という。）第32条に定める期間、当研究所試料保管室に保管する。

16.2 生データ、資料等

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、試験計画書、調査表、資料等は最終報告書と共に、「GLP基準」第32条に定める期間、当研究所資料保管室に保管する。

17. 備 考

17.1 試験に使用した機器及び装置

クーロメーター（装置No CM-19） : 大倉電気製
ガスクロマトグラフ（機器No GC-39） : 島津製作所製 GC-14A
天 び ん : Sartorius社製 2007 MP6
p H 計 : 東亜電波工業製 HM-50S

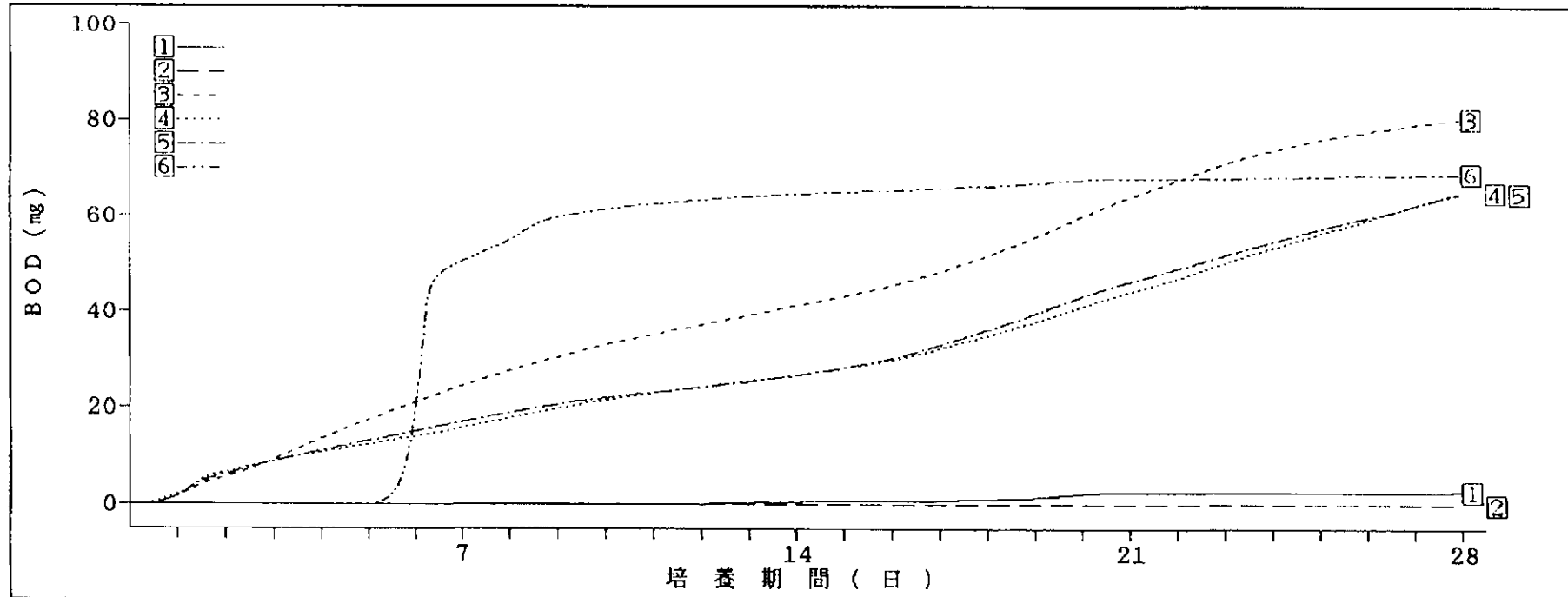
17.2 試験に使用した試薬

ヘキサン : 和光純薬工業製 試薬一級
塩化ナトリウム : マナック製 日本工業規格試薬特級
3%塩酸/メタノール溶液
: 関東化学製
ジエチルエーテル : ナカライテスク製 試薬特級
水酸化カリウム : 和光純薬工業製 試薬一級
ジエチレングリコールモノエチルエーテル
: 和光純薬工業製 試薬一級
p-トルエンスルホンル-N-メチル-N-ニトロソアミド
: 東京化成工業製 TCI-GR
ソーダライム, No.1 : 和光純薬工業製 試薬一級
アニリン : 昭和化学製 試薬特級
ロット番号 SC-2726
精製水 : 高杉製薬製 日本薬局方

図-1 BODチャート

試験番号: 21113 (被験物質: K-1113)
 装置番号: CM-19
 試験条件: 標準条件
 被験物質濃度: 100 (mg/l)
 活性汚泥濃度: 30 (mg/l)
 培養温度: 25 ± 1°C
 培養期間: 28日 (1/18~2/15, 1993)
 備考:

試料名	BOD (mg)			
	7日	14日	21日	28日
① 基礎呼吸	0.0	0.6	2.5	2.9
② 水 + 被験物質	0.0	0.0	0.0	0.0
③ 汚泥 + 被験物質	24.5	41.3	63.9	80.5
④ 汚泥 + 被験物質	15.9	26.8	44.2	65.1
⑤ 汚泥 + 被験物質	17.1	26.7	46.3	64.8
⑥ 汚泥 + アニリン	50.6	64.7	68.0	69.0



平成5年2月5日

氏名