

財団法人化学物質評価研究機構殿

本写しは原本と相違ありません

(株)三菱化学安全科学研究所  
横浜研究所 運営管理者

## 最 終 報 告 書

K-683Bの分解度試験

(試験番号：A040423)

2005年 3月16日作成

株式会社三菱化学安全科学研究所

# 陳 述 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試験委託者 : 財団法人化学物質評価研究機構

表 題 : K-683Bの分解度試験

試験番号 : A040423

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、本報告書はその結果を正しく記載したものである。

また、本試験は下記のGLPに従って実施したものである。

「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」  
(薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環保企発第031121004号,  
2003)

2005年 3月16日

試験責任者



# 信 頼 性 保 証 書

株式会社三菱化学安全科学研究所

横浜研究所

試験委託者 : 財団法人化学物質評価研究機構

表 題 : K-683Bの分解度試験

試験番号 : A040423

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、下記の査察および監査実施により確認した。

## 記

実 施 事 項	実 施 日	運営管理者および 試験責任者への報告日
試験計画書監査		
試験計画書	2005年 1月19日	2005年 1月19日
変更書(変更番号:01)	2005年 2月21日	2005年 2月28日
変更書(変更番号:02)	2005年 2月23日	2005年 2月28日
試験の査察		
被験物質の添加	2005年 1月24日	2005年 1月24日
培養びんの接続	2005年 1月24日	2005年 1月24日
被験物質残留量の測定	2005年 2月21日	2005年 2月28日
	2005年 2月22日	2005年 2月28日
構造変化物等の分析	2005年 2月22日	2005年 2月28日
	2005年 2月23日	2005年 2月28日
	2005年 2月25日	2005年 2月28日
最終報告書監査	2005年 3月16日	2005年 3月16日

信頼性保証部門担当者 : 2005年 3月16日

2005年 3月16日

2005年 3月16日

## 試験実施概要

1. 表 題 : K-683Bの分解度試験  
(試験番号: A040423)
2. 試験目的 : 被験物質の分解度試験を行い、生分解性を評価する。
3. 適用ガイドライン : 「新規化学物質等に係る試験の方法について<微生物等による化学物質の分解度試験>」(薬食発第 1121002号, 平成15・11・13製局第2号, 環保企発第031121002号, 2003)
4. 適用 G L P : 「新規化学物質等に係る試験を実施する試験施設に関する基準について」(薬食発第1121003号, 平成15・11・17製局第3号, 環保企発第031121004号, 2003)
5. 試験委託者 : 財団法人化学物質評価研究機構  
東京都文京区後楽 1-4-25  
委託責任者 [REDACTED]
6. 試験受託者 : 株式会社三菱化学安全科学研究所  
東京都港区芝二丁目 1 番 30 号
7. 試験施設 : 株式会社三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000 番地
8. 試験責任者 : [REDACTED]  
(環境科学Aグループ)

9. 試験関係者 :

試験担当者 2005年 3月16日

(試験実施)

試験担当者 2005年 3月16日

(試験実施)

標準活性汚泥管理責任者

2005年 3月16日

10. 試験日程

試験開始日	2005年 1月19日
酸素消費量測定開始日	2005年 1月24日
酸素消費量測定終了日	2005年 2月21日
被験物質残留量測定日	2005年 2月21日
	2005年 2月22日
構造変化物等分析日	2005年 2月22日
	2005年 2月23日
	2005年 2月25日
試験終了日	2005年 3月16日

11. 試資料の保管

: 下記の試資料は、(株)三菱化学安全科学研究所 横浜研究所  
の試資料保管施設に保管する。

- 1) 試験計画書
- 2) 最終報告書
- 3) 生データ
- 4) 被験物質
- 5) その他必要なもの

# 目 次

	頁
要 約 .....	7
1 被 験 物 質 .....	9
1.1 名称, 構造式および物理化学的性状 .....	9
1.2 供試試料 .....	9
1.3 被験物質の確認 .....	10
1.4 保管中の安定性の確認 .....	10
2 試 験 方 法 .....	11
2.1 分解度試験条件 .....	11
2.2 BODの測定 .....	12
2.3 BOD測定後の試験液の分析前処理 .....	12
2.4 pHの測定 .....	14
2.5 DOCの測定 .....	14
2.6 被験物質残留量の測定 .....	15
2.7 分解度の算出式 .....	16
2.8 構造変化物生成量の測定 .....	17
2.9 マンガンイオン量の測定 .....	18
2.10 マンガン量の測定 .....	19
2.11 構造変化物の推定 .....	21
3 試 験 結 果 .....	22
3.1 試験成績の信頼性に影響したと思われる環境要因 .....	22
3.2 試験の有効性 .....	22
3.3 BOD測定後の培養びん内容物の観察結果 .....	22
3.4 pH測定結果 .....	22
3.5 BOD分解度 .....	22
3.6 DOC分解度 .....	23
3.7 被験物質残留量からの分解度 .....	23
3.8 構造変化物生成量の測定 .....	23
3.9 マンガンイオン量の測定結果 .....	24
3.10 マンガン量の測定結果 .....	24
3.11 構造変化物の推定 .....	24
4 考 察 .....	25
4.1 被験物質の有機部分について .....	25
4.2 マンガンについて .....	26
表および図 .....	27~39
APPENDIX 1 .....	全 3 頁
APPENDIX 2 .....	全 26 頁

## 要 約

### 表 題

K-683Bの分解度試験（試験番号：A040423）

### 試 験 方 法

「新規化学物質等に係る試験の方法について＜微生物等による化学物質の分解度試験＞」

（薬食発第 1121002号，平成15・11・13製局第2号，環保企発第031121002号，2003）

（試験期間）

2005年 1月19日～2005年 3月16日

（試験の構成）

No.1 : 分解活性確認系 (アニリン+汚泥+基礎培養基)

No.2 : 汚泥基礎呼吸系 (汚泥+基礎培養基)

No.3-5 : 被験物質の分解系- 1, 2, 3 (被験物質+汚泥+基礎培養基)

No.6 : 水中安定性系 (被験物質+精製水)

(被験物質濃度：100 mg/L，汚泥濃度：30 mg/L)

（測定項目）

閉鎖系酸素消費量測定装置による生物化学的酸素消費量(BOD)の測定 (28日間)

全有機炭素計による溶存有機炭素(DOC)の測定 (28日後)

高速液体クロマトグラフによる被験物質残留量の測定 (28日後)

### 測 定 結 果 (28日後の値)

測 定 項 目	被験物質の分解系			水中安 定性系	仕込み 理論値
	1	2	3		
BOD, mg <sup>*1</sup>	0.3	0.4	0.0	3.2	41.6
DOC, mg <sup>*1</sup>	5.0	5.2	4.9	5.1	5.7
被験物質, mg	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	30.0

\*1) 被験物質の分解系の値は汚泥基礎呼吸系の値を差し引いて表示する

### 28日後の分解度

分 解 度	被験物質の分解系			平均値	水中安 定性系
	1	2	3		
BOD分解度, %	1	1	0	1	---
DOC分解度, %	水に難溶のため算出せず				---
被験物質の消失率*2, %	>99	>99	>99	>99	>99

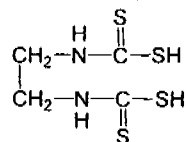
\*2) 水中安定性系で仕込み量の90%以下となったため，被験物質残留量から分解度は算出せず，消失率を示した。

被験物質の消失率 = (仕込み量 - 被験物質残留量) ÷ 仕込み量 × 100

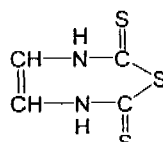
### 考 察

- ・ 28日後のBOD分解度は平均 1%，被験物質の消失率はすべて 99%以上であったことから，被験物質は分解性不良と判断される。
- ・ BOD分解度が平均 1%であるにもかかわらず，被験物質はすべて消失したことから，被験物質は構造変化したものと推測された。

- ・ 構造変化物等の分析の結果、2-イミダゾリジンチオンの生成率が 64～68%と算出され、1,2-ジチオシアン酸エチレンは検出されなかった。その他の構造変化物として分子量 212および 176の化合物が生成していることが推測され、生成率は被験物質換算で分子量 212の化合物が 2～3%、分子量 176の化合物が 15～21%と推定された。被験物質残留量、2-イミダゾリジンチオン、1,2-ジチオシアン酸エチレン、分子量212および 176の化合物のトータルバランスは<89～<90%と算出された。



分子量 212の推定構造式



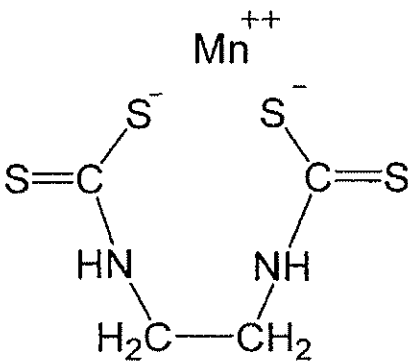
分子量 176の推定構造式

- ・ マンガンは試験液に約 10%がマンガニオンとして存在し、残りは水酸化マンガニオンとして沈殿していると推定された。
- ・ 水中安定性系ではマンガンは 85%がマンガニオンとして存在し、残りはほとんどが水和二酸化マンガニオンとして沈殿していると推定された。



# 1 被 験 物 質

## 1.1 名称, 構造式および物理化学的性状

被験物質の名称	{[エチレンビス(カルバモジチオアト)](2-)}マンガン		
別 名	K-683B		
構造式又は示性式 (いずれも不明の場合は、その製法の概要)	<div></div>		
試験に供した新規化学物質の純度	90.2%	試験に供した新規化学物質の Lot No.	
不純物の名称及び濃度	—		
C A S 番号	12427-38-2	蒸 気 圧	<0.00001 Pa(20℃)
分 子 量	265.30	分配係数	—
融 点	約 135℃で分解	常温における性状	灰黄色粉末
沸 点	—		
安 定 性	安定		

上記内容は委託者提供資料による

## 1.2 供試試料

1) 供給者 : 財団法人化学物質評価研究機構

2) 元素組成 : C 17.2%, H 1.3%, N 9.9%, S 44.0%,  
Mn 18.0% [当社測定値]

### 1.3 被験物質の確認

委託者から供給された被験物質の赤外吸収スペクトル、質量スペクトルおよび核磁気共鳴スペクトルを測定した。なお、核磁気共鳴スペクトルの測定は、株式会社三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 に依頼した。赤外吸収スペクトルおよび質量スペクトルにおいて提示された構造を有する化合物の特性吸収が認められたことから、被験物質を確認した。核磁気共鳴スペクトルは被験物質が金属含有化合物であるため、ピークがブロードになり帰属はできなかった。

- 1) 装 置：フーリエ変換赤外分光分析装置，Nicolet製 AVATAR 320型
- 2) 装 置：高速液体クロマトグラフ質量分析計，  
島津製作所製 LCMS-2010A型
- 3) 装 置：超伝導NMR装置，Bruker製 AVANCE500型

[ Figure 1 (p30) および APPENDIX 1 Figure 1,2 (p2,3) ]

### 1.4 保管法および安定性の確認

生物化学的酸素消費量（BOD）測定終了後、試験物質保管用冷蔵庫で保管した被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した。得られたスペクトルは試験開始前に測定したスペクトルと一致したことから、被験物質は保管中は安定であったと判断した。

[ Figure 1 (p30) ]

- 1) 装 置：フーリエ変換赤外分光分析装置，Nicolet製 AVATAR 320型

## 2 試 験 方 法

本試験は、「新規化学物質等に係る試験の方法について<微生物等による化学物質の分解度試験>」（薬食発第 1121002号，平成15・11・13製局第2号，環保企発第031121002号，2003）に準拠して実施した。

活性汚泥存在下における被験物質の分解に伴う生物化学的酸素消費量（BOD）を閉鎖系酸素消費量測定装置により 28 日間に亘り経時的に測定した。さらに，BOD測定終了後，溶存有機炭素（DOC）および被験物質残留量を測定し，これらの測定結果から被験物質の生分解性を評価した。

### 2.1 分解度試験条件

下記の条件により，分解度試験を行った。

（標準活性汚泥）

- 1) MLSS : 4100mg/L
- 2) 入 手 源 : (財) 化学物質評価研究機構
- 3) 入手年月日 : 2005年 1月20日

（条 件）

- 1) 温 度 :  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$
- 2) 期 間 : 28 日間（BOD測定）
- 3) 液 量 : 300 mL
- 4) 濃 度 : 被験物質およびアニリン\*（対照物質） : 100 mg/L  
標準活性汚泥 : 30 mg/L  
\* : 関東化学製 試薬特級 Lot No. 604F1224

（試験の構成および試験物質の添加）

- No.1 : 分解活性確認系（アニリン＋汚泥＋基礎培養基）  
基礎培養基\*<sup>1</sup>を培養びんに入れ，アニリンを29 $\mu\text{L}$ （30mg）マイクロシリンジで添加し混合後，汚泥を添加した。
- No.2 : 汚泥基礎呼吸系（汚泥＋基礎培養基）  
基礎培養基\*<sup>1</sup>を培養びんに入れ，汚泥を添加した。
- No.3-5 : 被験物質の分解系-1-3（被験物質＋汚泥＋基礎培養基）  
基礎培養基\*<sup>1</sup>を培養びんに入れ，ガラスカップに秤量した被験物質を30mg\*<sup>2</sup>添加し，各培養びんに汚泥を添加した。
- No.6 : 水中安定性系（被験物質＋精製水）  
300mLの精製水\*<sup>3</sup>に，ガラスカップに秤量した被験物質を30mg添加した。

\*<sup>1</sup> : 基礎培養基量は300mLから汚泥懸濁液添加量2.2mLを差し引いた量である。

\*<sup>2</sup> : 被験物質の純度 90.2%で補正し，供試試料として33.3mg添加した。

\*<sup>3</sup> : JIS K0557 A4 グレードの水。

## 2.2 BODの測定

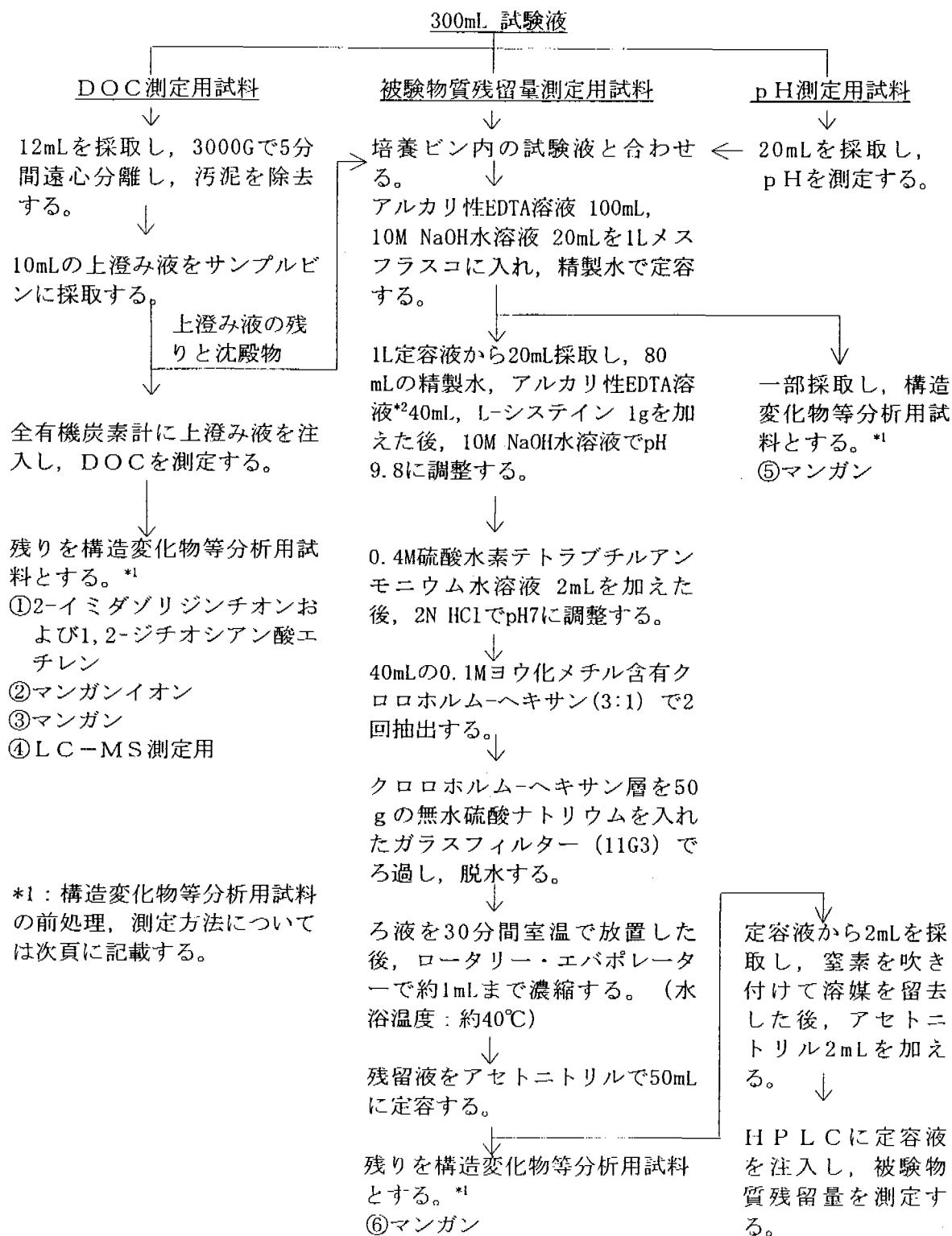
下記の装置によりBODを測定するとともに、測定期間中培養びん内容物の観察を行った。

1) 装置：閉鎖系酸素消費量測定装置：大倉電気製 OM-3100A型（識別符号 I）

## 2.3 BOD測定後の試験液の分析前処理

次頁のフロー・シートに従って、試験液中のpH、DOC、被験物質残留量および構造変化物生成量等の測定のための前処理を行った。

# BOD測定終了後の分析前処理フロー・シート



\*2: アルカリ性EDTA溶液: 0.4M エチレンジアミン四酢酸ナトリウム+ 0.8M NaOH 水溶液

#### 構造変化物生成量測定用試料

##### ①2-イミダゾリジンチオンおよび1,2-ジチオシアン酸エチレン

上澄液をHPLCに注入し、上記化合物濃度を測定した。

##### ②マンガンイオン

上澄液をHPLCに注入し、マンガンイオン濃度を測定した。

##### ③マンガ

汚泥基礎呼吸系 (No.2), 被験物質の分解系-1, 2, 3 (No.3, 4, 5) は上澄液を1% 硝酸水溶液で1000倍に希釈した後、希釈液をファーネスAASに注入し、マンガンを測定した。水中安定性系 (No.6) は上澄液を1% 硝酸水溶液で5000倍に希釈した後、希釈液をファーネスAASに注入し、マンガンを測定した。

##### ④構造変化物の推定 (LC-MS)

上澄液をLC-MSに注入し、構造変化物を分析した。

##### ⑤マンガ

定容液を一部採取し、精製水で10倍希釈した後、希釈液を1% 硝酸水溶液で200倍に希釈し、希釈液をファーネスAASに注入し、マンガンを測定した。

##### ⑥マンガ

定容液を10mL 採取し、窒素を吹き付けて溶媒を乾固した後、1% 硝酸水溶液で100mLに定容したものをファーネスAASに注入し、マンガンを測定した。

#### 2.4 pHの測定

BOD測定期間中にpHが変化したかどうかを確認するため、pHを測定した。

1) 装置 : 卓上pH/イオン計, オリオン製 720A型

#### 2.5 DOCの測定

下記の装置および条件でDOCを測定した。

1) 装置 : 全有機炭素計 : 島津製作所製 TOC-5000A型

2) 条件 : 炉温度 : TC 680℃  
空気流量 : 150 mL/min  
感度 : × 5  
注入量 : 50 μL  
繰返し回数 : n=3 (平均値を採用)

### 3) 検量線

下記の標準溶液を全有機炭素計に注入しピーク面積を得て、全有機炭素計内のデータ処理装置により 2 点検量線を設定した。

- 全炭素(TC)測定用 : フタル酸水素カリウム水溶液 ( 20 および 50 mgC/L)  
無機炭素(IC)測定用 : 炭酸水素ナトリウムおよび炭酸ナトリウム水溶液 ( 10 mgC/L)  
および精製水 ( 0 mgC/L)

### 4) 試験液の測定

2.3に従って前処理後、DOCを測定した。

## 2.6 被験物質残留量の測定

被験物質は金属錯体のままで分析することは困難であることから、金属をはずし誘導体化した形で分析した。ただし、被験物質残留量は金属を含めた被験物質そのものの濃度で表示した。被験物質残留量は下記の装置および条件により定量した。

### 1) 装 置 : 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

LC-10AVP-1型 ( No. 2 )

- 送液ポンプ : 島津製作所製 LC-10ADvp型 ( 2 台使用)  
オートインジェクター : 島津製作所製 SIL-10ADvp型  
紫外可視分光検出器 : 島津製作所製 SPD-10AVvp型  
コミュニケーションバスモジュール : 島津製作所製 CBM-10A型  
カラムオーブン : 島津製作所製 CTO-10ACvp型  
ワークステーション : 島津製作所製 CLASS-LC10型  
デガッサー : 島津製作所製 DGU-14A型

- 2) 条 件 : カ ラ ム : ジーエルイェンス製 Inertsil ODS-3V, 4.6mm i. d. ×150 mm  
溶 離 液 : アセトニトリル : 水 = 55:45  
流 速 : 1 mL/min  
検出波長 : 272 nm  
カラム温度 : 40 °C  
注 入 量 : 10 μL

### 3) 検量線

被験物質の標準液は供試試料 33.3mg (被験物質として 30.0mg 相当) に精製水 300mL を加えた後、2.3に示した被験物質残留量測定用試料のアルカリ性 EDTA 溶液添加の項目以降に準じて前処理することにより、12 mg/L アセトニトリル溶液を調製した。12 mg/L アセトニトリル溶液をアセトニトリルで希釈し 0, 3, および 6 mg/Lアセトニトリル溶液を調製し、これら 4 濃度の標準液をHPLCに注入してピーク面積を得、横軸に被験物質濃度を、縦軸にピーク面積をとり検量線を作成した。

最小二乗法により、直線回帰式の相関係数を求めた。相関係数は 1.00 と直線性

は良好であり、原点を通過すると見なせた。そこで、試験液中の被験物質の定量は 12 mg/L アセトニトリル溶液で得られるピーク面積との比較で行った。

[ Figure 2 (p31) および Figure 3 (p32-33) ]

#### 4) 添加回収試験

被験物質の分解系の試験液を 2.1 に示した試験液調製方法に従って調製し、30 分間閉鎖系酸素消費量測定装置内で攪拌した後、2.3 の操作に準じて前処理し、被験物質残留量を測定した。2回測定した結果、回収率は 84 および 83%であった。被験物質残留量の測定結果は、平均回収率 84%で補正した。

[ Table 3 (p29) および Figure 4 (p34-35) ]

#### 5) 検出限界

最小検出ピーク面積を 1000mAbs・secに設定し、これに相当する培養びん中の被験物質質量から 0.1mgを被験物質の検出限界とした。

[ Table 3 (p29) および Figure 4 (p34-35) ]

#### 6) 試験液の測定

2.3に従って前処理した後、被験物質残留量を測定した。

### 2.7 分解度の算出式

BOD、DOCおよび被験物質残留量の測定値からの分解度の算出式を下記に示す。

#### 1) BOD分解度

$$\text{分解度 (\%)} = (\text{BOD}_s - \text{BOD}_b) / \text{ThOD} \times 100$$

BOD<sub>s</sub> : 分解活性確認系または被験物質の分解系における酸素消費量 (mg)

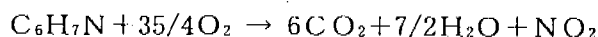
BOD<sub>b</sub> : 汚泥基礎呼吸系における酸素消費量 (mg)

ThOD : アニリンまたは被験物質の理論的酸素要求量 (mg)

理論的酸素要求量 (ThOD) の計算

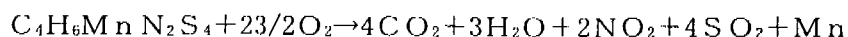
アニリン : 90.2 mgO<sub>2</sub> / 30 mg

アニリンが下記のように無機化されるとして算出した。



被験物質 : 41.6 mg-O<sub>2</sub> / 30 mg

被験物質が下記のように無機化されるとして算出した。



#### 2) DOC分解度

$$\text{分解度 (\%)} = [ 1 - (\text{DOC}_s - \text{DOC}_b) / \text{DOC}_c ] \times 100$$

DOC<sub>s</sub> : 被験物質の分解系中のDOC (mg)

DOC<sub>b</sub> : 汚泥基礎呼吸系中のDOC (mg)

DOC<sub>c</sub> : 水中安定性系中のDOC (mg)



### 3) 被験物質残留量からの分解度

$$\text{分解度 (\%)} = (1 - C_s / C_c) \times 100$$

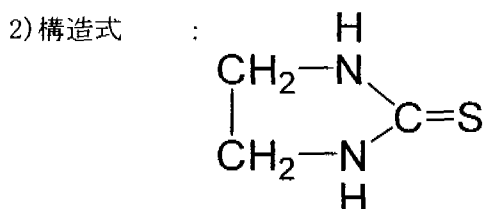
$C_s$  : 被験物質の分解系中の被験物質残留量 (mg)

$C_c$  : 水中安定性系中の被験物質残留量 (mg)

## 2.8 構造変化物生成量の測定

### 2.8.1 構造変化物標品 (2-イミダゾリジンチオン)

1) 名称 : 2-イミダゾリジンチオン

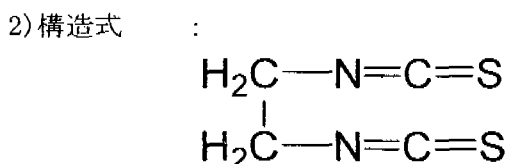


3) 分子量 : 102.16

4) 入手先 : 和光純薬工業製 化学用 ロット番号 : DWE1719

### 2.8.2 構造変化物標品 (1,2-ジチオシアン酸エチレン)

1) 名称 : 1,2-ジチオシアン酸エチレン



3) 分子量 : 144.22

4) 入手先 : 関東化学製 試薬特級 ロット番号 : G7159A

### 2.8.3 試験液中の2-イミダゾリジンチオンおよび1,2-ジチオシアン酸エチレンの生成量の測定

試験液中の2-イミダゾリジンチオンおよび1,2-ジチオシアン酸エチレンの生成量を下記の装置および条件により定量した。

1) 装置 : 高速液体クロマトグラフ (HPLC)

LC-10AWS-3型 (No. 1)

送液ポンプ : 島津製作所製 LC-10AD型 (2台使用)

オートインジェクター : 島津製作所製 SIL-10AXI型

紫外可視検出器 : 島津製作所製 SPD-M10AVP型

コミュニケーションバスモジュール : 島津製作所製 CBM-10A型

カラムオーブン : 島津製作所製 CTO-10AC型  
ワークステーション : 島津製作所製 CLASS-LC10型  
デガッサー : 島津製作所製 DGU-14A型

2) 条件 : カラム : ジーエルサイエンス製 Inertsil ODS-3V, 4.6mm i.d. × 150 mm

溶離液 : A液 アセトニトリル

B液 水

グラジエント条件 :	Time	A	B
	0.0 min	3%	97%
	5.0 min	25%	75%
	15.0 min	25%	75%
	16.0 min	3%	97%
	31.0 min	3%	97%

流速 : 1 mL/min

検出波長 : 210 nm

カラム温度 : 40 °C

注入量 : 20 µL

### 3) 検量線

2-イミダゾリジンチオンの 0, 10, 20 および 40 mg/L水溶液および1,2-ジチオシアン酸エチレンの 0, 5, 10 および 20 mg/L水溶液を調製し, これらをHPLCに注入してピーク面積を得, 横軸に2-イミダゾリジンチオンおよび1,2-ジチオシアン酸エチレン濃度を, 縦軸にピーク面積をとり検量線を作成した。

最小二乗法により, 直線回帰式の相関係数を求めた。相関係数はいずれも 1.00と直線性は良好であり, 原点を通過すると見なせた。そこで, 試験液中の2-イミダゾリジンチオンおよび1,2-ジチオシアン酸エチレンの定量は, 2-イミダゾリジンチオンの 40mg/L水溶液および1,2-ジチオシアン酸エチレンの 20 mg/L水溶液で得られるピーク面積との比較で行った。

[ APPENDIX 2 Figure 1-1, 1-2 (p7-8) および Figure 2-1, 2-2 (p11-14) ]

### 4) 試験液の測定

2.3に従って, 2-イミダゾリジンチオンおよび1,2-ジチオシアン酸エチレンの生成量を測定した。

## 2.9 マンガンイオン量の測定

### 2.9.1 標品 (マンガンイオン)

1) 名称 : マンガンイオン

2) 分子式 :  $Mn^{2+}$

3) 分子量 : 54.94

4) 入手先 : 関東化学製 マンガン標準液 (化学分析用)

ロット番号 : 508F9196

### 2.9.2 試験液中のマンガンイオン量の測定

試験液中のマンガンイオン量を下記の装置および条件により定量した。

#### 1) 装 置：高速液体クロマトグラフ (HPLC)

LC-10AWS-2型 (No. 1)

送液ポンプ	: 島津製作所製	LC-10AD型
オートインジェクター	: 島津製作所製	SIL-10A <sub>XL</sub> 型
コミュニケーションバスモジュール	: 島津製作所製	CBM-10A型
カラムオーブン	: 島津製作所製	CTO-10AC型
リクステーション	: 島津製作所製	CLASS-LC10型
デガッサー	: 島津製作所製	DGU-12A型
電気伝導度検出器	: 島津製作所製	CDD-6A型 (SOP/INS/105)

#### 2) 条 件：カ ラ ム：横河アナリティカルシステムズ製 ISC-C15/C1G

溶 離 液：1mM エチレンジアミン, 10mM クエン酸水溶液

流 速：1 mL/min

カラム温度：35 °C

感 度：検出器：GAIN 10  $\mu$ S/cm

: RANGE 1

ポラリティ：－

注 入 量：50  $\mu$ L

#### 3) 検量線

マンガンイオンの 0, 5, 10 および 20 mg/L水溶液を調製し、これらをHPLCに注入してピーク面積を得、横軸にマンガンイオン濃度を、縦軸にピーク面積をとり検量線を作成した。

最小二乗法により、直線回帰式の相関係数を求めた。相関係数は 1.00 と直線性は良好であり、原点を通過すると見なせた。そこで、試験液中のマンガンイオンの定量は 20 mg/L水溶液で得られるピーク面積との比較で行った。

[ APPENDIX 2 Figure 1-3 (p9) , Figure 2-3 (p15-16) ]

#### 4) 試験液の測定

2.3に従って、マンガンイオン量を測定した。

### 2.10 マンガン量の測定

#### 2.10.1 標品 (マンガン)

1) 名 称：マンガン

2) 分子式：Mn

3) 分子量：54.94

4) 入手先：関東化学製 マンガン標準液 (化学分析用)

ロット番号：508F9196

## 2.10.2 マンガンの物質収支の確認

前処理フロー・シートにおける各画分中のマンガン量を下記の装置および条件により定量した。

### 1) 装 置：ゼーマン型ファーンズ原子吸光分光光度計（ファーンズAAS）

バリアン テクノロジーズ ジャパン リミテッド 製 Spectr AA-880Z型(No.1)

ワークステーション : SpectrAA(Windows 98)

### 2) 条 件：測定モード : ピーク高さ

波長 : 279.5 nm

スリット幅 : 0.2 nm

バックグラウンド補正 : BCオン

試料量 : 20  $\mu$ L

バルク濃度 : 0.0050 mg/L

標準溶液 : 0.0010 mg/L

0.0025 mg/L

0.0050 mg/L

ファーンズ条件：

ステップ	度 (℃)	時間 (秒)	流量 (L/min)	ガスタイプ	読み込み	シグナル保存
1	85	5.0	3	アルゴン	いいえ	いいえ
2	95	40.0	3	アルゴン	いいえ	いいえ
3	120	10.0	3	アルゴン	いいえ	いいえ
4	700	5.0	3	アルゴン	いいえ	いいえ
5	700	1.0	3	アルゴン	いいえ	いいえ
6	700	2.0	0	アルゴン	いいえ	はい
7	2400	1.1	0	アルゴン	はい	はい
8	2400	2.0	0	アルゴン	はい	はい
9	2400	2.0	3	アルゴン	いいえ	はい

### 3) 検量線

マンガンの 0.0050 mg/L水溶液（含む 1%  $\text{HNO}_3$ ）を調製し、これを検量線標準溶液の原液としファーンズAASで自動希釈して測定した。横軸にマンガン濃度を、縦軸にピーク高さを取り検量線を作成した。

最小二乗法により、2次回帰式の相関係数を求めた。相関係数は 1.00 と良好であり、各画分中のマンガンの定量は検量線より算出した。

[ APPENDIX 2 Figure 1-4 (p10) ]

### 4) 試験液の測定

2.3に従って、マンガン量を測定した。

## 2.11 構造変化物の推定

構造変化物を下記の装置および条件により分析した。

### 1) 装 置 : 高速液体クロマトグラフ質量分析計

島津製作所製 LCMS-2010A型 (No. 1)

送液ポンプ	: 島津製作所製 LC10ADVP型 (2台使用)
オートインジェクター	: 島津製作所製 SIL-10ADVP型
紫外可視検出器	: 島津製作所製 SPD-M10AVP型
システムコントローラー	: 島津製作所製 SCL-10AVP型
カラムオーブン	: 島津製作所製 CTO-10ACVP型
デガッサー	: 島津製作所製 DGU-14AM型
切替バルブ	: 島津製作所製 FCV-12AH型
質量分析計	: 島津製作所製 LCMS-2010A型
ワークステーション	: LCMS solution

### 2) 条 件 : 【LC条件】

カラム	: ジーエルサイエンス製 Inertsil ODS-3 2.1mm i.d. × 150 mm
溶離液	: アセトニトリル:0.05%酢酸水溶液 = 40:60
流速	: 0.2 mL/min
注入量	: 5 µL
カラム温度	: 40 °C
検出波長	: 210 nm

#### 【MS】

インターフェイス	: ESI
検出モード	: SCAN 走査範囲 70-300 m/z ポジティブ/ネガティブ
ネブライザーガス流量	: 1.50 L/min
検出器電圧	: 1.5 kV
インターフェイス電圧	: +4.50 / -3.50 kV
CDL 電圧	: -30.0 / +30.0 V
Q-array 電圧	: DC +0.0 V, RF +150.0 V
ヒートブロック温度	: 200 °C
CDL 温度	: 250 °C

### 3) 試験液の測定

2.3に従って、構造変化物を分析した。

### 3 試験結果

#### 3.1 試験成績の信頼性に影響したと思われる環境要因

該当する事象はなかった。

#### 3.2 試験の有効性

1) 14日後のアニリンのBOD分解度は 60%以上 (74%) であった。

2) 28日後の分解度の最大値と最小値の差は 20%以内 (BOD分解度で 1%) であった。なお被験物質の分解度は算出しなかったが、被験物質の消失率の最大値と最小値の差は 0%であった。

3) 28日後の汚泥基礎呼吸系のBODは 18mgO<sub>2</sub>以内 (5.0mgO<sub>2</sub>) であった。

以上のことから試験は有効であると判断される。

[ Table 1 (p27) および Figure 5 (p36) ]

#### 3.3 BOD測定後の培養びん内容物の観察結果

分解活性確認系 (No.1) 内の液はやや白濁しており、被験物質の分解系-1, 2, 3 (No.3, 4, 5) 内の液は白濁しており、汚泥基礎呼吸系 (No.2) 内の液は無色透明で、水中安定性系 (No.6) 内の液は薄茶色であった。

分解活性確認系で、汚泥基礎呼吸系に比べて汚泥の増殖が認められたが、被験物質の分解系では増殖は認められなかった。

#### 3.4 pH測定結果

BOD測定終了後の試験液のpHは、被験物質の分解系で 7.4, 7.4, 7.4 (No.3, 4, 5の順, 以下同順) であり、水中安定性系で 6.4であった。

[ Table 1 (p27) ]

#### 3.5 BOD分解度

28日後のBODは理論値 41.6mgに対して、被験物質の分解系で 0.3, 0.4, 0.0mg (汚泥基礎呼吸系のBOD値で補正後の値), 水中安定性系で 3.2mgであった。28日後のBOD分解度は 1, 1, 0%と算出された。

[ Table 1 (p27) および Figure 5 (p36) ]

### 3.6 DOC分解度

28日後のDOCは仕込み量 5.7mgに対して、被験物質の分解系で 5.0, 5.2, 4.9 mg（汚泥基礎呼吸系のDOC値で補正後の値），水中安定性系で 5.1mg検出された。被験物質は水に難溶であるためDOC分解度は算出しなかった。

[ Table 1 (p27) および Table 2 (p28) ]

### 3.7 被験物質残留量からの分解度

被験物質は仕込み量 30.0mgに対し、被験物質の分解系ですべて 0.1mg以下、水中安定性系で 0.1mg以下であった。水中安定性系で仕込み理論値の 90%以下に減少したため、被験物質残留量からの分解度は算出しなかった。

被験物質の消失率は、被験物質の分解系ですべて 99%以上、水中安定性系で 99%以上と算出された。

$$\text{消失率 (\%)} = (\text{仕込み量} - \text{被験物質残留量}) \div \text{仕込み量} \times 100$$

[ Table 1 (p27) , Table 4 (p29) および Figure 6 (p37-39) ]

### 3.8 構造変化物生成量の測定

被験物質の分解系-1, 2, 3および水中安定性系で保持時間約 3.2分にピークが検出された。このピークは2-イミダゾリジンチオンの標準液の保持時間と一致したことから、2-イミダゾリジンチオンであることを確認した。

試験液中の2-イミダゾリジンチオンの生成量は、被験物質の分解系で 7.8, 7.4, 7.9mg, 水中安定性系で 8.5mg検出された。被験物質から2-イミダゾリジンチオンへの変換率は、被験物質の分解系で 68, 64, 68%, 水中安定性系で 74%と算出された。

また被験物質の分解系-1, 2, 3および水中安定性系で1,2-ジチオシアン酸エチレンの標準液の保持時間と一致するピークは検出されなかったことから、1,2-ジチオシアン酸エチレンは生成していないことを確認した。被験物質から1,2-ジチオシアン酸エチレンへの変換率は、被験物質の分解系ですべて 2%未満、水中安定性系で 2%未満と算出された。

なお最小検出ピーク面積は 5000mAbs・secに設定し、これに相当する培養びん中の分析対象物質質量から 0.1mgを2-イミダゾリジンチオンおよび1,2-ジチオシアン酸

エチレンの検出限界とした。

[ APPENDIX 2 Table 1-1 (p2) , Table 2 (p6) および Figure 3-1 (p17-20) ]

### 3.9 マンガンイオン量の測定結果

被験物質の分解系-1, 2, 3および水中安定性系で保持時間約 5.3~5.4分にピークが検出された。このピークはマンガンイオンの標準液の保持時間とほぼ一致したことから、マンガンイオンであることを確認した。

試験液中のマンガンイオンの生成量は、被験物質の分解系で 0.6, 0.6, 0.6mg, 水中安定性系で 5.1mg検出された。マンガンイオンの理論値に対する検出率は、被験物質の分解系で 10, 10, 10%, 水中安定性系で 85%と算出された。なお最小検出ピーク面積は 300mV・secに設定し、これに相当する培養びん中のマンガンイオン量から 0.3mgをマンガンイオンの検出限界とした。

[ APPENDIX 2 Table 1-2 (p3) および Figure 3-2 (p21-23) ]

### 3.10 マンガン量の測定結果

2.3 前処理フローシートにおける各分画(③, ⑤, ⑥)マンガン量は、分画③の被験物質分解系で 0.7, 0.7, 0.8mg, 水中安定性系で 5.2mg検出された。分画⑤の被験物質分解系で 6.0, 6.2, 6.8mg, 水中安定性系で 6.9mg検出された。分画⑥の被験物質分解系ですべて 0.1mg以下, 水中安定性系で 0.1mg以下であった。

なお最小検出ピーク面積は 0.02ABSに設定し、これに相当する培養びん中のマンガン量からマンガンの検出限界は、分画③では 0.1mg, 分画⑤では 0.3mg, 分画⑥では 0.1mgとした。

[ APPENDIX 2 Table 1-3 (p4) ]

### 3.11 構造変化物の推定

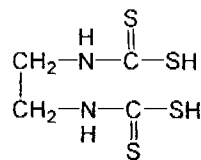
被験物質の分解系および水中安定性系のクロマトグラム上に保持時間約 2.4, 3.6, 5.4分に構造変化物由来のピークが検出された。

これらのピークのマススペクトルを調べたところ、保持時間約 2.4分のピークはポジティブモードで分子イオンピーク  $m/z$  103が検出されたことから、分子量 102の2-イミダゾリジンチオンと推定された。

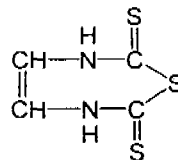
保持時間約 3.6分のピークはポジティブモードで分子イオンピーク  $m/z$  213が検出されたことから、分子量 212の化合物であることが確認され、次のような構造を



有すると推定された。



保持時間約 5.4分のピークはポジティブモードで分子イオンピーク  $m/z$  177が検出されたことから、分子量 176の化合物であることが確認され、次のような構造を有すると推定された。



構造変化物と推定されたピークが検出されたため、UV 210nmにより検出されるピーク面積から被験物質換算で生成量および変換量を推定した。

分子量 212の化合物の生成量は、被験物質の分解系で 0.6, 0.5, 0.6mg, 水中安定性系で0.4mgと推定された。被験物質から分子量 212の化合物への変換率は、被験物質の分解系で 3, 2, 3%, 水中安定性系で 2%と推定された。

分子量 176の化合物の生成量は、被験物質の分解系で 2.9, 4.2, 3.0mg, 水中安定性系で2.0mgと推定された。被験物質から分子量 176の化合物への変換率は、被験物質の分解系で 15, 21, 15%, 水中安定性系で 10%と推定された。

なお、分子量 102の化合物は2-イミダゾリジンチオンであり、3.8ですでに定量している。

[ APPENDIX 2 Table 1-4 (p5) , Table 2 (p6) および Figure 4 (p24-26) ]

## 4 考 察

### 4.1 被験物質の有機部分について

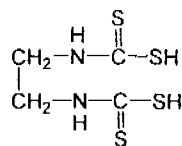
28日後のBOD分解度は平均 1%, 被験物質の消失率はすべて 99%以上であったことから、被験物質は分解性不良と判断される。

BOD分解度は平均 1%であるにもかかわらず、被験物質はすべて消失したことから、被験物質は構造変化したものと推測された。

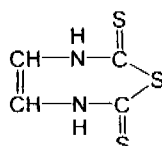
そこで構造変化物として予想される2-イミダゾリジンチオンおよび1,2-ジチオシアン酸エチレン生成量の測定を行った結果、被験物質の分解系で2-イミダゾリジンチオンの生成率は 64~68%, 1,2-ジチオシアン酸エチレンは検出されなかった。

また試験液をLC-MSで測定したところ、新たに分子量 212および 176の化合物と推定されるピークを検出した。被験物質換算で算出した生成率は被験物質の分解系で分子量 212の化合物は 2~3%, 分子量 176の化合物は 15~21%と算出され

た。



分子量 212の推定構造式



分子量 176の推定構造式

被験物質残留量、2-イミダゾリジンチオン、1,2-ジチオシアン酸エチレン、分子量 212の化合物および分子量 176の化合物のトータルバランスは <89~<90%と算出された。

#### 4.2 マンガンについて

被験物質から遊離したマンガンイオンは、被験物質の分解系ですべて 0.6mg検出しており、マンガンの理論量に対して 10%検出されていることが確認された。

マンガンの物質収支の確認において、水溶性マンガンの定量を目的とした分画③では 0.7~0.8mg (検出率 12~13%) 検出された。マンガンイオンが 0.6mg検出されていることから、水溶性のマンガンはすべてマンガンイオンとして存在していると推測された。

分画⑤は試験液のすべてをアルカリ性EDTA液およびNaOHで溶解させた溶液であり、マンガンは被験物質の分解系で6.0~6.8mg (検出率 100~113%) 検出されていることから、難水溶性マンガンもすべてこの分画に存在していると推測された。難水溶性マンガンの酸化形態については、内容物の観察において被験物質の分解系で試験液が白濁していることが確認されていることから、水酸化マンガであると推定された。

分画⑥は分画⑤の抽出層であるが、マンガンはすべて 0.1mg以下 (検出率 2%以下) であり、マンガンは存在していないことが確認された。

水中安定性系はマンガンイオンで 5.1mg (検出率 85%)、分画③で 5.2mg (検出率 87%)、分画⑤で 6.9mg (検出率115%)、分画⑥で <0.1mg (検出率 2%以下) であったことから、ほとんどがマンガンイオンとして試験液中に存在し、残りは沈殿したと推定した。沈殿物の酸化形態については、内容物の観察で薄茶色であったことから、水和二酸化マンガになったと推定した。

以 上