

## 最終報告書

微生物等による K-1551 の分解度試験

JCL018052

2001 年 7 月 18 日

試験委託者：財団法人 化学物質評価研究機構

試験受託者：株式会社日本医学臨床検査研究所

バイオアッセイ事業部

## 複 写 証 明 書

株式会社日本医学臨床検査研究所

バイオアッセイ事業部 西脇ラボ

試験表題 : 微生物等による K-1551 の分解度試験

試験番号 : JCL018052

試験責任者 :

試験委託者 : 財団法人 化学物質評価研究機構

〒 112-0004 東京都文京区後染 1 丁目 4 番 25 号

これは、上記試験の最終報告書(正本)から正確に  
複写されたものであることを証明します。

2001 年 7 月 18 日

運営管理者 :

## 信頼性保証証明書

(最終報告書)

本試験結果が、本試験計画書及び標準操作手順書に従って実施された  
試験の生データを正確に反映していることを保証致します。

試験の種類：分解度試験

試験委託者：財団法人 化学物質評価研究機構

試験施設：株式会社日本医学臨床検査研究所 バイオアッセイ事業部 西脇ラボ

試験表題：微生物等による K-1551 の分解度試験

試験番号：JCL018052

試験責任者：[REDACTED]

試験期間：2001年 5月24日 ～ 2001年 7月18日

監査及び査察対象	監査及び査察日	報告日 運営管理者	試験責任者
試験計画書	: 2001年 5月24日	2001年 5月24日	2001年 5月24日
実験開始	: 2001年 5月31日	2001年 5月31日	2001年 5月31日
実験終了	: 2001年 6月28日	2001年 6月28日	2001年 6月28日
瓶内容物の分析	: 2001年 6月28,29日	2001年 6月29日	2001年 6月29日
最終報告書草案	: 2001年 7月12日	2001年 7月12日	2001年 7月12日
最終報告書	: 2001年 7月18日	2001年 7月18日	2001年 7月18日

株式会社日本医学臨床検査研究所  
バイオアッセイ事業部

2001年 7月18日 信頼性保証部門責任者

[REDACTED]

## 目 次

要約	1
1 表題	2
2 試験番号	2
3 試験目的	2
4 試験法	2
5 試験委託者	2
6 試験施設	2
7 試験関係者の氏名及び所属	2
8 試験期間	2
9 被験物質	3
10 対照物質	5
11 活性汚泥の調製	5
12 主な試薬	6
13 主な機器・装置	6
14 分解度試験の実施	7
15 分解度の算出方法	10
16 数値の取扱い	11
17 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	11
18 試験結果	11
19 試資料の保管	12
20 最終報告書の変更	12
21 GLP 基準への適合	13
22 最終報告書の承認	13
添付資料（測定結果、図・表・チャート類等）	14～28

## 要 約

## 1 表題

微生物等による K-1551 の分解度試験

## 2 試験結果

方 法	分 解 度 ( % )			
	培養瓶 No.2	培養瓶 No.3	培養瓶 No.4	平均値
酸素消費量による結果	0.0	0.0	0.0	0.0
高速液体クロマトグラフによる結果	1.3	0.0	0.0	0.4

## 3 結論

酸素消費量から求めた分解度の平均値が 0.0 %、直接定量法から求めた分解度の平均値が 0.4 %であることより、本被験物質は難分解性物質と考えられた。

## 1 表題

微生物等による K-1551 の分解度試験

## 2 試験番号

JCL018052

## 3 試験目的

「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省令」(昭和 49 年総理府・厚生省・通商産業省令第 1 号、昭和 61 年改正)第 2 条 1 項に基づき微生物等による K-1551 の分解度試験を行い、K-1551 の生分解性の知見を得ることを目的とした。

## 4 試験法

「新規化学物質に係る試験の方法について」(昭和 49 年環保業第 5 号・薬発第 615 号・49 基局第 392 号、昭和 62 年改正)の微生物等による化学物質の分解度試験、また、「OECD Test Guideline 301C・修正 MITI 試験(I)」において規定されている生分解性試験法によった。

## 5 試験委託者

名 称 : 財団法人 化学物質評価研究機構

所在地 : 〒 112-0004 東京都文京区後楽 1 丁目 4 番 25 号

## 6 試験施設

名 称 : 株式会社日本医学臨床検査研究所 バイオアッセイ事業部 西脇ラボ

所在地 : 〒 677-0032 兵庫県西脇市中畑町 17-18

## 7 試験関係者の氏名及び所属

試 験 責 任 者 : (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

試験担当者(物理・化学系) : (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

試験担当者(生物系) : (バイオアッセイ事業部 西脇ラボ)

## 8 試験期間

試験開始日 2001 年 5 月 24 日

分解度試験実験期間 自 2001 年 5 月 31 日

至 2001 年 6 月 28 日

試験終了日 2001 年 7 月 18 日

## 試験日程表

信頼性保証部門担当者  
による監査及び査察

2001. 5.24	被験物質の測定 ・被験物質の同定 ・被験物質の保管条件下での安定性確認(実験開始前) ・高速液体クロマトグラフによる分析法検討	
2001. 5.30	閉鎖系酸素消費量測定装置作動	
2001. 5.31	実験開始	監査、査察
2001. 6.28	実験終了 ・閉鎖系酸素消費量測定装置停止 ・試験液の分析 ・被験物質の保管条件下での安定性確認(実験終了後)	監査、査察 監査、査察
2001. 7. 2	最終報告書草案作成開始	
2001. 7.13	最終報告書作成開始	監査
2001. 7.18	最終報告書作成 試験終了	監査

## 9 被験物質(被験物質調査書による)

## 9-1 名 称

名 称 : 4-(フェニルアゾ)アニリン

略 称 : K-1551

CAS No. : 60-09-3

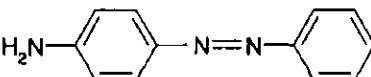
## 9-2 提供者及びロット番号

提 供 者 : 財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所

〒 830-0023 福岡県久留米市中央町 19 番 14 号

ロット番号 : SEF0192

## 9-3 構造式、分子式及び分子量

構 造 式 : 分 子 式 : C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>N<sub>3</sub>

分 子 量 : 197.24

## 9-4 純度及び含有率等

純 度 : 99.5 %<sup>1)</sup>

不純物の名称及び含量 : 不明物 ; 0.5 %<sup>1)</sup>

## 9-5 物理化学的性状

外 観 : だいたい色粉末<sup>2)</sup>

沸 点 : 225 °C (160 hPa)<sup>3)</sup>

融 点 : 124 ~ 128 °C<sup>3)</sup>

溶 解 性 : 対水 ; 難溶 [ $<0.1 \text{ g}/100 \text{ mL}$  (19 °C)]<sup>4)</sup>

: 対メタノール ; 可溶<sup>4)</sup>

<sup>1)</sup>: 株式会社日本医学臨床検査研究所西脇ラボにおける測定結果より引用

<sup>2)</sup>: (提供者による被験物質の購入元)の当該ロット検査成績表より引用

<sup>3)</sup>: 提供の製品安全データシートより引用

<sup>4)</sup>: より引用

## 9-6 同 定

実験開始前に赤外分光光度計により、被験物質の同定を行った[チャートをFig. 1 (p.15)に示す]。

提示資料による赤外吸収スペクトル及び当該試験施設測定 of 赤外吸収スペクトルを比較したところ、各吸収帯は一致しており、アゾ基の-N=N-逆対称伸縮振動による  $1620 \text{ cm}^{-1}$  付近の吸収、ベンゼン環の C=C 伸縮振動を含む環振動による  $1600$ ,  $1500$  及び  $1450 \text{ cm}^{-1}$  付近の吸収、第1級アミンの C-N 伸縮振動による  $1300 \text{ cm}^{-1}$  付近の吸収、ベンゼン p-置換体による=C-H 面外変角振動による  $830 \sim 690 \text{ cm}^{-1}$  付近の吸収等が見られた。

以上の結果から、本被験物質は“被験物質及び対照物質調査書”記載の物質と同一物質であると推定された。

## 9-7 保管条件及び保管条件下での安定性確認

## (1) 保管条件

室温(デシケーター内)・遮光

## (2) 保管条件下での安定性確認

実験開始前及び実験終了後に赤外吸収スペクトルを測定し、被験物質の保管

条件下での安定性を確認した。

赤外吸収スペクトルについて比較したところ、1620, 1600, 1500, 1450, 1300 及び 830 ~ 690  $\text{cm}^{-1}$  付近の強い吸収及び吸収帯を特徴として全般的にほぼ同様の吸収スペクトルが得られた[チャートを Fig. 2(p.16)に示す]。

以上の結果より被験物質は実験期間中保管条件下で安定であった。

## 10 対照物質

### 10-1 名 称

IUPAC 名 : Benzenamine

慣用名 : アニリン (Aniline) 点試験用

### 10-2 購入先及びロット番号

購 入 先 : XXXXXXXXXX

ロット番号 : ELM8993

## 11 活性汚泥の調製

### 11-1 標準活性汚泥の入手

2001 年 4 月 19 日に財団法人 化学物質評価研究機構より標準活性汚泥を購入した。

### 11-2 培 養

11-1 の標準活性汚泥を活性汚泥自動定量培養装置により 23.5 時間曝気した。曝気を 30 分間止めたのち、全量の約 3 分の 1 の量(約 330mL)の上澄液を除去し、これと等量の 0.1 % 合成下水(注 1)を加えて再び曝気した。

この操作を原則として毎日 1 回繰り返した。培養温度は、 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ とした。

(注 1) 0.1 % 合成下水

グルコース、ペプトン、りん酸二水素カリウム各々 1 g を純水 1.0 L に溶解し、水酸化ナトリウムで pH を  $7.0 \pm 1.0$  に調整したもの。

### 11-3 管 理

培養段階での管理は次の項目を点検し、所要の調整を行った。

分解度試験実験開始日(2001 年 5 月 31 日)の測定結果を以下に示す。

(1) 温度 :  $25.0^\circ\text{C}$

(2) 溶存酸素濃度 :  $7.3 \text{ mg/L}$

- (3) 活性汚泥の沈殿率 : 13 %
- (4) pH : 7.8
- (5) 上澄液の外観 : やや混濁
- (6) 懸濁物質濃度 : 2957 mg/L
- (7) 活性汚泥の生物相 : フロックは厚みがあり凝集は進んでいた。原生動物は繊毛虫類が主にみられ、糸状菌が存在した。

## 12 主な試薬

試薬名	等級	メーカー
グルコース	JIS S	和光純薬工業
ペプトン	—	DIFCO LABORATORIES
りん酸二水素カリウム	JIS S	和光純薬工業
水酸化ナトリウム	JIS S	和光純薬工業
りん酸水素二カリウム	JIS S	和光純薬工業
りん酸水素二ナトリウム	JIS S	和光純薬工業
塩化アンモニウム	JIS S	和光純薬工業
硫酸マグネシウム	JIS S	和光純薬工業
塩化カルシウム	JIS S	和光純薬工業
塩化第二鉄	特 級	和光純薬工業
アセトニトリル	液体クロマトグラフ	和光純薬工業
酢酸エチル	残農用	和光純薬工業
塩化ナトリウム	特 級	和光純薬工業
超純水(以下「純水」と記す)	—	純水製造装置により製造

## 13 主な機器・装置

機器・装置名	型 式	メーカー	(SOP 番号)
高速液体クロマトグラフ (以下「HPLC」と略す)	LC-6A システム-II (8 号機)	島津製作所	(SOP/OME/040)
赤外分光光度計	IR-460	島津製作所	(SOP/OME/192)
活性汚泥自動定量培養装置	ASI-1	宮本製作所	(SOP/OME/520)
閉鎖系酸素消費量測定装置	OM-2001(3 号機)	大倉電気	(SOP/OME/530)

pH メーター	F-14 (1, 2 号機)	堀場製作所	(SOP/OME/120)
電子分析天秤	BP 110S	ザルトリウス	(SOP/OME/094)
純水製造装置	MILLI-QSP システム	ミリポア	(SOP/OME/220)

## 14 分解度試験の実施

### 14-1 試験の準備

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度を測定し、標準活性汚泥入手時の濃度の  $\pm 1000 \text{ mg/L}$  以内であることを確認した。

#### (2) 基礎培養基の調製

JIS K0102 の 21 で定められた A 液、B 液、C 液及び D 液それぞれ 6 mL に純水を加え 2.0 L とした。

### 14-2 試験液の調製

次の培養瓶を準備し、これらを試験温度に調整した。

(1) 純水 300 mL に被験物質 30 mg を添加して 100 mg/L としたものを入れた培養瓶－培養瓶 No.1 (純水＋被験物質)

(2) 基礎培養基 300 mL に被験物質 30 mg を添加して 100 mg/L としたものを入れた培養瓶－培養瓶 No.2, 3 及び 4 (汚泥＋被験物質)

(3) 基礎培養基 300 mL にアニリン 30 mg を添加して 100 mg/L としたものを入れた培養瓶－培養瓶 No.5 (汚泥＋対照物質)

(4) 基礎培養基 300 mL のみの対照空試験用の培養瓶－培養瓶 No.6 (汚泥)

### 14-3 活性汚泥の接種

培養瓶 No.2, 3, 4, 5 及び 6 の試験容器に、JIS K0102 の 14.1 で定められた懸濁物質濃度が 30 mg/L になるように活性汚泥 3.044 mL を接種した。

### 14-4 試験条件等

閉鎖系酸素消費量測定装置を用い  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  で十分攪拌しながら、28 日間培養し、酸素消費量の変化を経時的に測定した。実験終了後、残留する被験物質を分析に供し、その量を測定した。

### 14-5 観察・測定等

閉鎖系酸素消費量測定装置の作動状態、培養瓶内の色の変化、恒温槽内の温度を原則として毎日チェックし、7 日目のアニリンの分解度を酸素消費量から

算出した。また、実験開始前及び実験終了時に培養瓶内容物の pH を測定した。

分解度試験実験期間中における閉鎖系酸素消費量測定装置の恒温槽内の温度は 24.9 ~ 25.1 °C と 25.0 ± 1.0 °C の範囲内に保たれており、装置は正常に作動していた。

対照物質を添加した培養瓶 No.5 において、実験開始後 5 日目頃より微生物の増殖による濁りを確認した。

pH の測定結果を Table 1 (p.17) に示す。

#### 14-6 試験液の分析(直接定量)

実験終了後、HPLC により被験物質の分析を行った。

##### (1) 機器の分析条件

###### ・使用分析機器

高速液体クロマトグラフ	: LC-6A システム-II
ポンプ	: LC-6A
システムコントローラー	: SCL-6A
オートサンプラー	: SIL-6A
カラムオープン	: CTO-6A
検出器 (UV-VIS)	: SPD-10A
データ処理装置	: C-R4A

###### ・測定条件

カラム	: Inertsil ODS-3 (4.6 mm I.D. × 150 mm) (GL サイエンス)
移動相	: アセトニトリル/純水 = 60 : 40 (v/v)
流速	: 1.0 mL/min
カラム温度	: 40 °C
検出波長 (VIS)	: 380 nm [参考データとして、予備検討で得られた紫外可視吸収スペクトルを Fig. 3 (p.17) に示す。]
チャートスピード	: 2 mm/min
試料注入量	: 10 µL

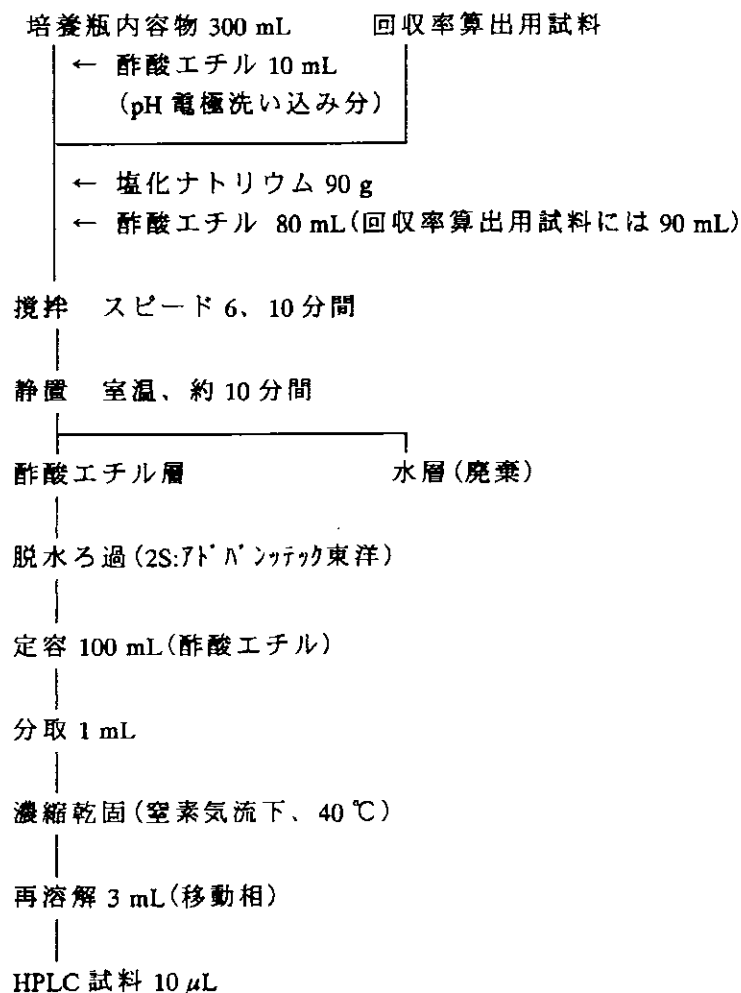
##### (2) K-1551 標準溶液の調製

被験物質 25.0 mg を精秤しアセトニトリルで溶解させた後、100 mL に定容し、250 mg/L 標準溶液を調製した。この溶液を移動相で希釈し、125, 100, 75, 50, 25 及び 10 mg/L の標準溶液を調製した。

## (3) 試験液の前処理

実験終了時に培養瓶内容物の pH を測定し、pH 電極に付着した被験物質を酢酸エチル 10 mL で培養瓶内に洗い込んだ。閉鎖系酸素消費量測定装置内の培養瓶 No.1, 2, 3, 4 及び 6 の内容物 300 mL 及び酢酸エチル 10 mL (pH 電極洗い込み分) に塩化ナトリウム 90 g を加え溶解させた。酢酸エチル 80 mL を加え、マグネチックスターラー(スピード 6)で 10 分間攪拌した。室温で約 10 分間静置した後、分液ろ紙(2S:アドバンテック東洋)を用いて上層の酢酸エチル層を 100 mL 容量メスフラスコに移し入れ、酢酸エチルにて 100 mL に定容した。この溶液 1 mL を分取し、窒素気流下(40℃)で濃縮乾固させた残渣に移動相 3 mL を加えて再溶解させた。これを HPLC 試料として 10  $\mu$ L を注入した。

フローチャートを下記に示す。



## (4) 定量方法(濃度算出)

- ①ピークの同定は保持時間により行い、定量は被験物質のピーク面積による直接定量法によって行った。すなわち、標準溶液のピーク面積値(y)と標準溶液濃度(x)との関係を用いて最小二乗法により検量線式を求めた。

$$y = ax + b$$

x : 標準溶液濃度  
y : ピーク面積値  
a : 検量線の傾き  
b : y 軸切片

検量線式から濃度を算出する式：濃度(mg/L) =  $1/a \times$  ピーク面積値 -  $b/a$  を作成し、前処理後の被験物質濃度を求めた。

- ②回収率を求めるために、純水及び基礎培養基(汚泥添加)各 300 mL に被験物質 30.0 mg を添加し回収率算出試料を調製した。この試料を 14-6(3)の方法により前処理操作を行った。標準溶液を用いて作成した検量線からその濃度を求めて、添加濃度に対する百分率を回収率(%)とした。

培養瓶中の被験物質濃度は次式を用いて算出した。

$$\text{培養瓶中の濃度 (mg/L)} = \text{HPLC 試料中の濃度 (mg/L)} \times 100 / \text{回収率}$$

- ③各分析試料について 1 回測定とし、それより分解度を算出した。
- ④ K-1551 標準溶液の濃度範囲 10 ~ 125 mg/L において、同時再現性(CV)は 0.2 ~ 1.5 % と良好であり、ピーク面積値の平均値から求めた検量線式の直線性は  $r = 0.99988$  で良好な結果が得られた[Table 2(p.18), Fig. 4(p.18)]。また、純水及び基礎培養基による回収率の平均値( $n = 3$ )はそれぞれ 97.8 % (CV = 0.9 %), 97.1 % (CV = 1.3 %) で良好な結果が得られた[Table 3(p.19)]。

以上の結果から、本分析条件は K-1551 濃度の測定方法として十分信頼できるものであると考えられた。

## 15 分解度の算出方法

## 15-1 酸素消費量から分解度(%)を算出する方法

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

BOD : 被験物質の生物学的酸素要求量(測定値 : mg)

B : 基礎培養基に活性汚泥を接種したものの酸素消費量(測定値 : mg)

TOD : 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)

## 15-2 HPLC 分析から分解度(%)を算出する方法

$$\text{分解度}(\%) = \frac{S_b - S_a}{S_b} \times 100$$

Sa : 実験終了後の被験物質の残留量(測定値: mg)

Sb : 純水に被験物質のみを添加した空試験における被験物質の残留量  
(測定値: mg)

## 16 数値の取扱い

## 16-1 数値の記載

小数点以下2桁目を丸めて1桁まで記載した。

## 16-2 数値の丸め方

JIS Z8401 で定められた方法に準じた。

## 17 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

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はなかった。

## 18 試験結果

## 18-1 結果の要約

方 法	分 解 度 ( % )			
	培養瓶 No.2	培養瓶 No.3	培養瓶 No.4	平均値
酸素消費量による結果	0.0	0.0	0.0	0.0
高速液体クロマトグラフによる結果	1.3	0.0	0.0	0.4

## 18-2 試験条件の確認

酸素消費量から求めた培養瓶 No.5 のアニリンの分解度が 7 日後に 60.0 %、  
14 日後に 65.4 %であったことから本試験の試験条件を満たしていることが確  
認できた。

## 18-3 考察及び結論

酸素消費量(BOD)から求めた分解度は 0.0 %、高速液体クロマトグラフ(HPLC)  
による残留被験物質質量から求めた分解度は 0.4 %であった(それぞれ平均値)。

また、実験終了時の HPLC 分析チャートには K-1551 以外のピークは検出され  
ていなかった[Fig. 7-1, 7-2(p.27, 28)]。

以上のことから、本被験物質は難分解性物質であると考えられた。

#### 18-4 測定結果

(1) BOD による測定結果を Table 4 (1~5), (p.20~22) 及び Fig.5-1, 5-2 (p.23, 24) に示す。

(2) HPLC による残留被験物質 (K-1551) 測定結果を Table 5 (p.26) 及び Fig. 6 (p.25) に示す。また、その分析チャートを Fig. 7-1, 7-2 (p.27, 28) に示す。

#### 19 試資料の保管

記録及び試資料の保管は、「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省令第4条に規定する試験施設に関する基準」第11章に準じ、当該試験施設の試資料保管施設にて、次に掲げる期間保管するものとする。

但し、当該試験施設が業務を停止し、かつ、法的な継承者を持たない場合は、その試資料は当該試験の委託者である財団法人 化学物質評価研究機構の保管施設に移管されるものとする。

##### 19-1 生データ、資料等

生データ、資料等について「化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律」(昭和48年法律第117号。以下「化審法」という。)第4条第1項第1号又は第2号又は第3号に該当する旨の通知を受けた後10年間とする。

- ・主計画表
- ・試験計画書
- ・生データ及び最終報告書
- ・信頼性保証部門による査察等の記録
- ・職員の資格、訓練、経験等の記録
- ・全標準操作手順書の経時的ファイル
- ・機器等の保守点検、校正の記録、報告書
- ・環境モニター記録

##### 19-2 被験物質、対照物質その他の試料

被験物質、対照物質その他の試料について「化審法」第4条第1項第1号又は第2号又は第3号に該当する旨の通知を受けた後10年間又は安定に保存しうる期間のいずれか短い方の期間とする。

#### 20 最終報告書の変更

最終報告書を訂正又は追加等する場合には、試験責任者は訂正、追加等の内容及び

理由を「最終報告書(変更・訂正・追加)の件」(様式.16)に明記し、試験委託者等に提出する。また、その写しを信頼性保証部門担当者に提出する。「最終報告書(変更・訂正・追加)の件」(様式.16)は当該試験施設及び試験委託者等において最終報告書とともに保管される。

## 21 GLP 基準への適合

本試験は「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省令第4条に規定する試験施設に関する基準」(平成12年改正)に基づいて実施されたものである。

## 22 最終報告書の承認

2007年 7 月 18 日

試験責任者

:

Study No. : JCL018052
-----------------------

Study Title : Biodegradability study of K-1551
--

Date : 2001. 5.31 - 2001. 6.28

Test Temperature :  $25.0 \pm 1.0$  °C

Test Substance : K-1551

Range : 250 ppm  $\times$  1

Chart Speed : 2 mm/h

Test Bottle No.	Contents	Conc.	Sludge conc.
(1)	Pure water + Test substance	(100 mg/L)	( ----- )
(2)	Sludge + Test substance	(100 mg/L)	( 30 mg/L)
(3)	Sludge + Test substance	(100 mg/L)	( 30 mg/L)
(4)	Sludge + Test substance	(100 mg/L)	( 30 mg/L)
(5)	Sludge + Reference substance	(100 mg/L)	( 30 mg/L)
(6)	Control blank	( ----- )	( 30 mg/L)

Rem. Chart is shown in Fig. 5-2.

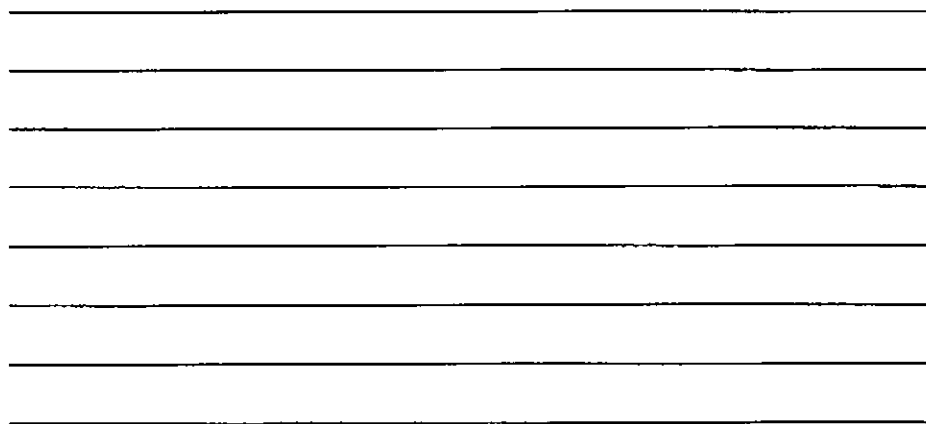


Fig. 5-1 BOD Chart

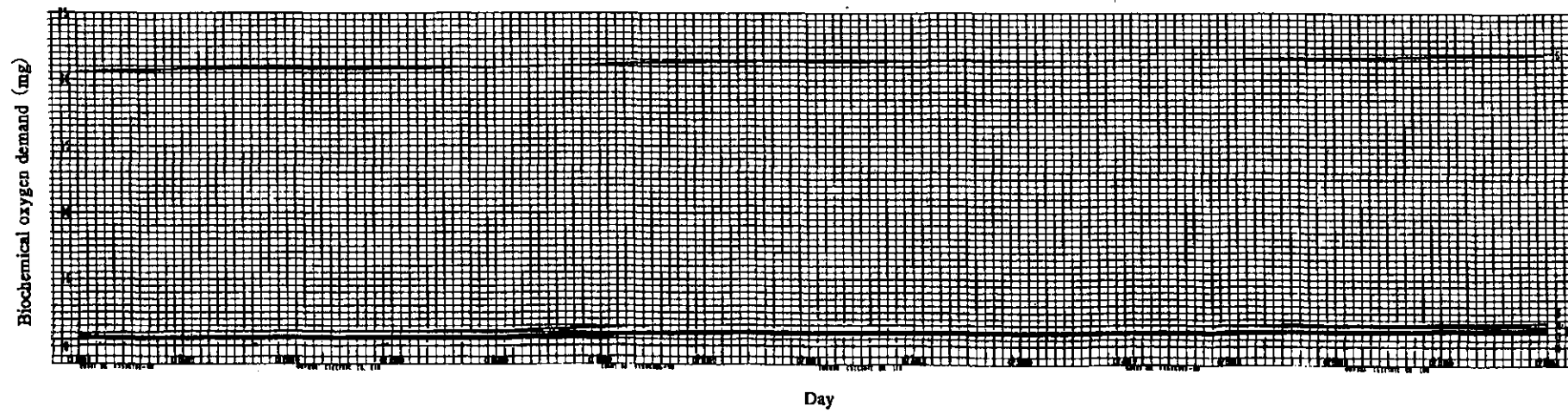
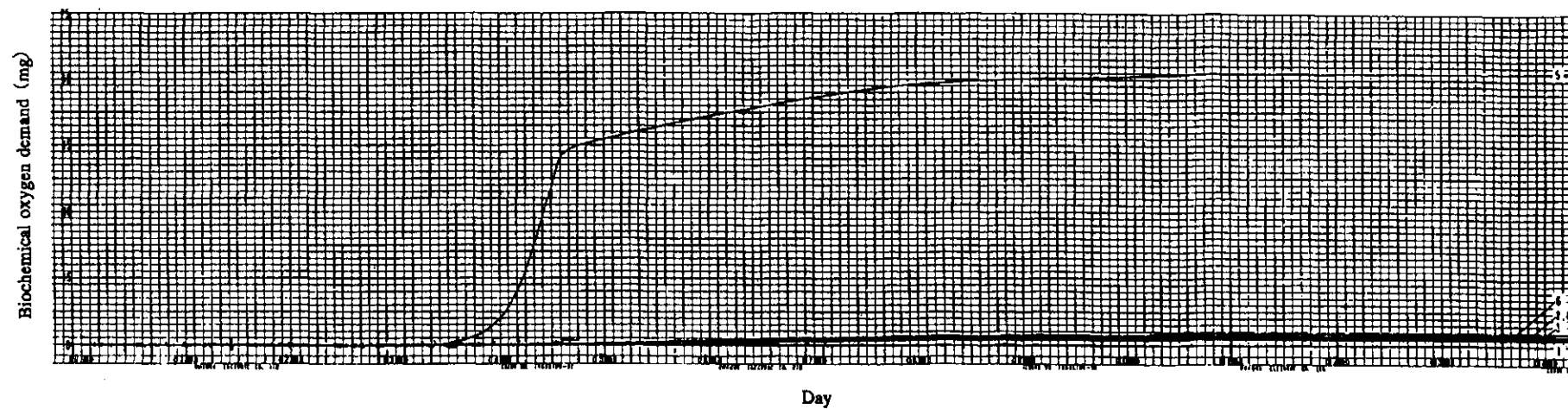


Fig. 5-2 BOD Chart