

最 終 報 告 書

K-554Aの微生物等による分解度試験

(試験番号B01007)

広栄テクノロジーズ株式会社

信頼性保証報告書

1. 試験の種類

微生物等による化学物質の分解度試験

2. 試験 No. B01007

3. 被験物質の名称

2, 3, 6-トリメチルフェノール (略称: K-554A)

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ついて」(平成12年3月1日:環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号改正)(平成13年1月24日:医薬発第43号、平成13・01・23製局第1号、環保企第13号一部改め)(化学物質GLP)に従って適正に行われており、最終報告書には、試験で使用した方法および手順が正確に記載され、報告結果は、試験の生データを正確に反映していることを保証する。

なお、当施設で定めた信頼性保証業務標準手順書による監査・査察の状況は下記の通りである。

記

対 象	実 施 年 月 日	監 査 ・ 査 察 報 告 年 月 日
試験計画書確認	2001年 5月17日	2001年 5月17日
試験施設査察(試験前査察)	2001年 5月16日	2001年 5月17日
試験の実施状況		
監査及び査察(BOD試験開始日)	2001年 5月22日	2001年 5月22日
[再試験による監査、査察]		
試験施設査察(試験前査察)	2001年 6月26日	2001年 6月26日
試験施設査察(試験前査察)	2001年 7月10日	2001年 7月11日
試験施設査察(試験前査察)	2001年 7月23日	2001年 7月23日
試験の実施状況		
監査及び査察(BOD試験開始日)	2001年 6月27日	2001年 6月27日
監査及び査察(BOD試験開始日)	2001年 7月12日	2001年 7月12日
監査及び査察(BOD試験開始日)	2001年 7月25日	2001年 7月25日
監査及び査察(BOD試験終了日)	2001年 8月22日	2001年 8月22日
最終報告書監査	2001年10月19日	2001年10月19日

2001年10月19日

信頼性保証業務担当者

所属 広栄テクノサービス株式会社
職 品質保証グループマネージャー

氏名



表題:K-554Aの微生物等による分解度試験

試験期間

自: 2001年 5月 17日

至: 2001年 10月 19日

試験委託者の名称と所在地

財団法人化学物質評価研究機構 [REDACTED]
福岡県久留米市中央町19番14号

試験機関の名称と所在地

広栄テクノサービス株式会社
大阪市城東区放出西2丁目12番13号

試験責任者氏名 [REDACTED] 2001年10月19日

試験担当者氏名 [REDACTED] 2001年10月19日
(分解度試験)

[REDACTED] 2001年10月19日

最終報告書作成者名 [REDACTED]

最終報告書作成年月日 2001年10月19日

目次

試験の目的及び試験結果要約	-----	1
緒言	-----	1
試験材料および試験方法	-----	1～6
1. 採用した試験方法	-----	1
2. 被験物質	-----	2
3. 対照物質	-----	2
4. 試薬	-----	3
5. 使用生物	-----	3
6. 試験装置	-----	3
7. 試験条件	-----	3
8. 試験濃度	-----	3
9. 暴露試験期間	-----	4
10. 観察、測定、検査及び分析の種類と頻度	-----	4
11. 被験物質の残留量測定法	-----	4～5
12. 全有機炭素(TOC)測定法	-----	5～6
13. データの解析に使用した統計学的方法等	-----	6
14. 準拠したGLP	-----	6
15. 試資料の保管	-----	6
16. 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	-----	6
試験結果	-----	7～9
1. 試験条件の確認	-----	7
2. 残存率・分解度及び物質収支	-----	7
3. 残留全有機炭素(TOC)量	-----	8
4. 暴露試験中及び暴露試験終了後に実施した観察及び測定	-----	8～9
5. 被験物質の物質確認及び保管条件下に於ける安定性確認	-----	9
考察	-----	9
結論	-----	9
付表	-----	10
付図	-----	10

試験の目的及び試験結果要約

K-554Aの安全性評価の一環として、微生物分解性を調べるために環保業第5号、薬発第615号、49基局第392号<微生物等による化学物質の分解度試験>に基づいた方法で分解度試験を行った。

その結果、本試験条件下における28日後の酸素消費量による分解度は、平均1%であった。

直接定量によるK-554Aの残存率は、被験物質分解区;平均86%、被験物質-水区;93%であった。

全有機炭素残存率は、被験物質分解区;平均86%、被験物質-水区;92%であり、分解度は平均6%であった。

被験物質分解区の直接定量によるK-554Aの残存率、全有機炭素残存率ともに平均86%と低く、被験物質-水区においても直接定量によるK-554Aの残存率は93%及び全有機炭素残存率も92%と低かった。被験物質が暴露期間中に揮発したと考えられるため、被験物質分解区及び被験物質-水区のソーダライムをメタノール中で超音波照射した洗液を液体クロマトグラフィー(LC)にて分析した結果、洗浄液中のK-554Aの残留量と、試験終了液中の残留量と合わせた物質収支は被験物質分解区;平均90%、被験物質-水区;94%となり分解度は平均5%であった。

以上の結果より、K-554Aは本条件下において微生物等により分解され難いと考えられる。

なお、アニリンの分解度は、暴露試験開始7日後で75%であったので本試験は有効である。

緒言

K-554Aの安全性評価の一環として微生物分解性を調べるために分解度試験を実施した。

試験材料および試験方法

1. 採用した試験方法

環保業第5号、薬発第615号、49基局第392号<微生物等による化学物質の分解度試験>に基づいた方法で分解度試験を実施した。

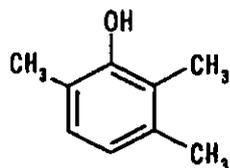
2. 被験物質

名称 : 2, 3, 6-トリメチルフェノール

別名 : K-554A

Cas No.: 2416-94-6

構造式 :



分子式 : $C_9H_{12}O$

分子量 : 136. 19

Lot No.: ACH6754

純度 : 99. 9%

外観・形状: 黄橙色結晶状固体

溶解度: 水; 1580mg/L (25℃)

保管条件: 暗所

同定: [redacted] スペクトル(付図4)と試験施設測定IRスペクトル(付図5)の比較及び試験施設測定NMRスペクトル(付図9)、MSスペクトル(付図10)によって確認。

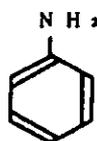
安定性: 保管条件下; 暴露試験開始日測定IRスペクトル(付図6)と暴露試験終了日測定IRスペクトル(付図7)の比較によって安定であることを確認。

試験条件下; 分解度試験のため不要

3. 対照物質

名称 : アニリン

構造式 :



分子式 : C_6H_7N

分子量 : 93. 13

Lot No. : DI817X

メーカー : [redacted] 純度: 99%

4. 試薬

りん酸水素二カリウム	石津製薬製	試薬特級
りん酸二水素カリウム	石津製薬製	試薬特級
りん酸水素二ナトリウム 12水塩	石津製薬製	試薬特級
塩化アンモニウム	石津製薬製	試薬特級
硫酸マグネシウム 7水塩	石津製薬製	試薬特級
塩化カルシウム	石津製薬製	試薬特級
塩化第二鉄 6水塩	石津製薬製	試薬特級
ソーダライム	石津製薬製	二酸化炭素吸収用
フタル酸水素カリウム	石津製薬製	試薬特級
炭酸ナトリウム	石津製薬製	試薬特級
炭酸水素ナトリウム	石津製薬製	試薬特級
アセトニトリル	キシダ化学製	液体クロマトグラフ用
メタノール	石津製薬製	試薬特級

5. 使用生物

活性汚泥:財団法人化学物質評価研究機構化学物質安全センターより2001年7月19日に入手した標準活性汚泥を当試験室で温度 $25 \pm 2^\circ\text{C}$ 、溶存酸素 5mg/L 以上、 $\text{pH}7.0 \pm 1.0$ で培養管理した汚泥。(汚泥No. 130719)

活性汚泥の懸濁物質濃度測定結果(2001年7月24日): 4771mg/L

6. 試験装置

クーロメータ :大倉電気製 OM-2001A型
データサンプラー :旭テクネイオン製 DS-3

7. 試験条件

試験温度: 25.0°C

試験液量:300mL

試験水:日本ミリボア製超純水製造装置による自製

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:無

8. 試験濃度

汚泥懸濁物質濃度 : 30mg/L

被験物質濃度 : 100mg/L

9. 暴露試験期間

28日間(2001年7月25日～2001年8月22日)

10. 観察、測定、検査及び分析の種類と頻度

温度, 被験物質の溶解状態, 試験液の色, 汚泥の増殖状況観察: 1日1回観察

(但し、休日合計12日間を除く)

酸素消費量の測定: クーロメータによる28日間連続自動測定

試験液のpH測定: 試験終了後、クーロメータより取り出した直後に測定

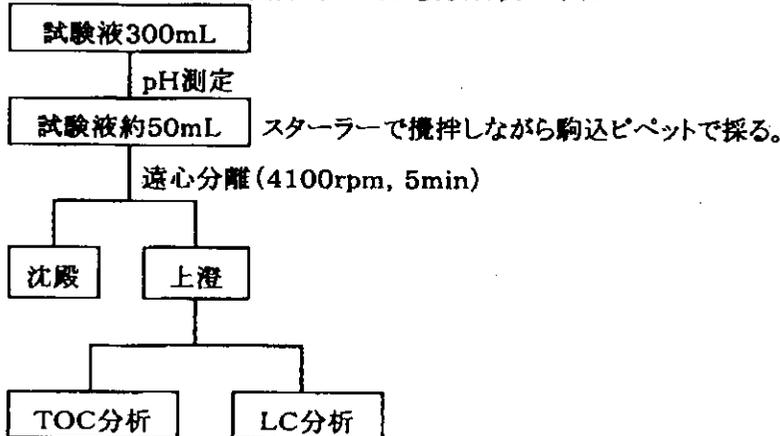
被験物質の残留量測定: 試験終了後、試験液を前処理してLCにより分析

全有機炭素(TOC)量の測定: 試験終了後、試験液を前処理してTOC分析装置により分析

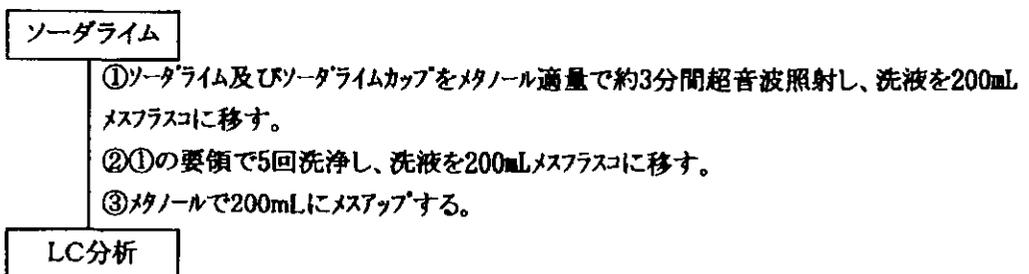
11. 被験物質の残留量測定法

11.1 直接定量の前処理

基礎呼吸区、被験物質分解区及び被験物質一水区



基礎呼吸区、被験物質分解区及び被験物質一水区



11.2 液体クロマトグラフ分析条件

装置 : 日立製作所製 L-7000システム
 検出器 : 日立製作所製 UV検出器 D-7420
 データ処理装置: 日立製作所製 D-7000
 カラム : L-column ODS 5 μ m 4.6mm ϕ ×150mm
 カラム温度 : 30℃
 移動相 : アセトニトリル:水=45:55(v/v)
 流量 : 1.0mL/min
 波長 : 270nm
 感度 : 1AUFS
 注入量 : 20.0 μ L

<標準液の調製>

被験物質濃度として1.2~120.0mg/Lの間で5点となるように水で希釈したものを標準液とした。

11.3 定量限界

定量限界(確認済): 1.0mg/L

11.4 添加回収率

被験物質分解区: 101%

被験物質一水区: 98%

添加回収試験の結果より、試験終了液の直接定量による残存率及び分解度は回収率100%として算出した。

12. 全有機炭素(TOC)測定法

12.1 分析試料の前処理

11.1に示した前処理液を使用した。

12.2 TOC分析条件

装置 : 島津製作所製 TOC-5000A
 range : AUTO
 注入量 : AUTO
 触媒 : TC触媒
 キャリアーガス : 空気
 流量 : 150mL/min

<標準液の調製>

- ①TC用標準液:フタル酸水素カリウム 0.21253gを正確にはかり、水で100mLにメスアップした。
これを、更に水で10倍希釈したものを標準液とした。(100.0mg/L TC溶液)
- ②IC用標準液:炭酸水素ナトリウム 0.34912g、炭酸ナトリウム 0.44254gを正確にはかり、
水で100mLにメスアップした。これを、更に水で10倍希釈したものを標準液とした。
(100.1mg/L IC溶液)

13. データの解析に使用した統計学的方法等

- ・LC分析検量線の回帰式ならびに回帰係数は、最小二乗法により算出した。
- ・TOCのデータ処理は、分析計に付属するデータ処理装置で行った。
- ・被験物質残留量、TOC残留量(質量=mg, 濃度=mg/L)及び酸素消費量(質量=mg)は、小数点以下一桁に丸め、残存率、分解度及び物質収支(%)は、整数に丸めて表示した。
- ・数値を平均する場合は、算術平均とした。
- ・数値の丸め方は、四捨五入とした。

14. 準拠したGLP

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ついて」(平成12年3月1日:環保安第41号、生衛発第268号、平成12・02・14基局第1号改正)(平成13年1月24日:医薬発第43号、平成13・01・23製局第1号、環保企第13号一部改め)(化学物質GLP)に基づき標準操作手順書に従って実施した。

15. 試資料の保管

当該試験に関する記録及び試資料は広栄テクノサービス㈱のGLP施設が保有する試資料保管室に保管する。

16. 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

無

試験結果

1. 試験条件の確認

付表1に示すように、酸素消費量より算出されるアニリンの分解度が暴露試験開始7日後で75%であったので、本試験は有効である。

2. 残存率・分解度及び物質収支

暴露試験開始28日後の酸素消費量による分解度は、平均1%であった。(表1-1)

直接定量による結果は、被験物質に揮発性があったため残存率は被験物質分解区平均86%、被験物質一水区93%であった。(表1-2)そこで、試験終了液中残留量とソーダライム洗液中残留量を合算したところ、物質収支は被験物質分解区平均90%、被験物質一水区94%であり、分解度は平均5%であった。

(表1-3)

表 1-1

	No.	試験区	分解度(%)		付表	付図
				平均値		
酸素消費量 による結果	3	被験物質分解区	2	1	付表1	付図1
	4	被験物質分解区	0			
	5	被験物質分解区	0			

表 1-2

	No.	試験区	残存率(%)		付表	付図
				平均値		
直接定量 による結果	3	被験物質分解区	86	86	付表2	付図2-1 ~2-7
	4	被験物質分解区	87			
	5	被験物質分解区	86			
	6	被験物質一水区	93			

表 1-3

	No.	試験区	物質収支(%)		分解度(%)		付表	付図
				平均値		平均値		
直接定量 による結果	3	被験物質分解区 +(ソーダライムメタノール洗液)	89	90	6	5	付表2 参考データ	付図 2-1~ 2-10
	4	被験物質分解区 +(ソーダライムメタノール洗液)	90		5			
	5	被験物質分解区 +(ソーダライムメタノール洗液)	90		5			
	6	被験物質一水区 +(ソーダライムメタノール洗液)	94	-				

注)No.:クーロメータ検出部のNo.を示す。

3. 残留全有機炭素(TOC)量

表2に示すように、理論TOC量23.8mgに対し、全有機炭素残存率は被験物質分解区;平均86%、被験物質一水区;92%であり、分解度は平均6%であった。

表 2

No.	試験区	TOC量*1		残存率(%)		分解度(%)		付表	付図
		(mg)	平均値		平均値		平均値		
3	被験物質分解区	20.8	20.5	87	86	5	6	付表3	付図3
4	被験物質分解区	20.4		86		7			
5	被験物質分解区	20.3		85		7			
6	被験物質一水区	21.9	92	—					

注) No. : クーロメータ検出部のNo. を示す。

*1: 被験物質分解区は基礎呼吸区を、被験物質一水区は試験使用超純水ブランクを差し引いた値。

4. 暴露試験中及び暴露試験終了後に実施した観察及び測定

暴露試験期間(2001年7月25日～2001年8月22日)を通じて実施した1日1回の観察(但し、休日合計12日を除く)は、表3に示した。

表 3

クーロメータ恒温槽温度	期間を通じ25.0℃であった。
被験物質の溶解状態	被験物質分解区:0～28日後 ;溶解 被験物質一水区:0～28日後 ;溶解
試験液の色	アニリン分解区:0～7日後 ;やや白濁 8～28日後 ;やや淡黄色～淡黄色 被験物質分解区:0～28日後 ;やや白濁 被験物質一水区:0～28日後 ;無色
汚泥の増殖状態	アニリン分解区:0～2日後 ;増殖なし 3,4日後 ;観察せず(休日) 5日後 ;増殖が認められた 被験物質分解区:0～28日後 ;増殖なし
その他	暴露開始12日後以降、被験物質分解区、被験物質一水区のソーダライムに淡いピンク色の着色が認められた。

表4に試験終了液の観察及び測定結果を示した。

表 4

	被験物質分解区			被験物質一水区
	3	4	5	6
クローメータ検出部 No.				
試験終了液の被験物質溶解状態	溶解	溶解	溶解	溶解
試験終了液の試験液の色	やや白濁	やや白濁	やや白濁	無色
試験終了液の汚泥増殖状態	無	無	無	—
試験終了液のpH	7.20	7.18	7.19	6.99

5. 被験物質の物質確認及び保管条件下に於ける安定性確認

物質確認;同定用(Aldrich社データ)(付図4)と物質確認及び同定用(試験施設取得データ)(付図5)と比較して、被験物質に相違ないことを確認した。

安定性確認;暴露試験開始日(付図6)及び暴露試験終了日(付図7)にIR分析を行い、付図4, 5とも比較して試験期間を通じて安定であることを確認した。

考察

K-554Aの本試験条件下における28日後の酸素消費量による分解度は、平均1%であった。直接定量によるK-554Aの残存率は、被験物質分解区;平均86%、被験物質一水区;93%であった。全有機炭素残存率は、被験物質分解区;平均86%、被験物質一水区;92%であり、分解度は平均6%であった。

被験物質分解区の直接定量によるK-554Aの残存率、全有機炭素残存率ともに平均86%と低く、被験物質一水区においても直接定量によるK-554Aの残存率は93%及び全有機炭素残存率も92%と低かった。被験物質が暴露期間中に揮発したと考えられるため、被験物質分解区及び被験物質一水区のソーダライムをメタノール中で超音波照射した洗液を液体クロマトグラフィー(LC)にて分析した結果、洗浄液中のK-554Aの残留量と、試験終了液中の残留量と合わせた物質収支は被験物質分解区;平均90%、被験物質一水区;94%となり分解度は平均5%であった。

以上の結果より、K-554Aは本条件下において微生物等により分解され難いと考えられる。

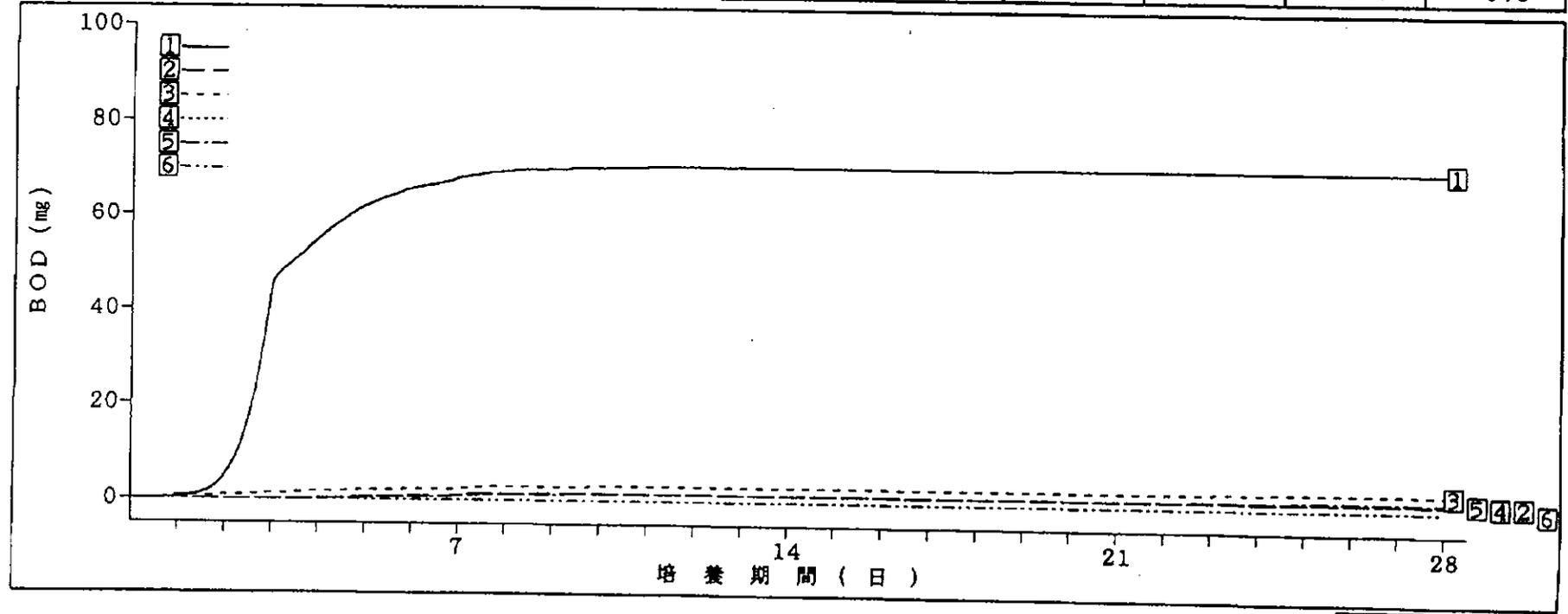
結論

K-554Aは本試験条件において、微生物等により分解され難いと判断された。

図-1 BODチャート

試験番号: B01007 (被験物質: K-554A)
 装置番号: A-2 試験責任者: XXXXXXXXXX
 試験条件: 010822
 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 (7/25~8/22, 2001)
 備考:

試料名	BOD (mg)			
	7日	14日	21日	28日
① 汚泥+アニリン	68.3	70.9	71.1	71.2
② 基礎呼吸	1.1	1.7	1.7	1.7
③ 汚泥+被験物質	2.6	3.2	3.2	3.7
④ 汚泥+被験物質	1.0	1.6	1.6	1.6
⑤ 汚泥+被験物質	1.2	1.6	1.6	1.9
⑥ 水+被験物質	0.0	0.0	0.0	0.0



14

平成13年8月22日 氏名 XXXXXXXXXX

付図 1 酸素消費量曲線