

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシ-2'-ニトロアゾベンゼン（被験物質番号 K-1692）の微生物による分解度試験

試験番号 205021

本最終報告書（電子媒体上のPDFファイル）は、上記試験の最終報告書を正確にコピーしたものです。

2003年12月17日

運営管理者



最 終 報 告 書

3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシ-2'-ニトロアゾベンゼン（被験物質番号 K-1692）の
微生物による分解度試験

（試験番号：205021）

財団法人
化学物質評価研究機構
公営事業所

陳 述 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシ-2'-ニトロアゾベンゼン（被験物質番号 K-1692）の微生物による分解度試験

試験番号 205021

上記試験は以下のGLPに従って実施したものです。

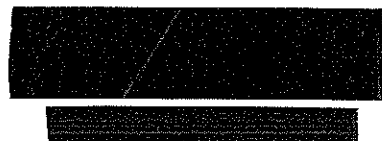
(1) 「新規化学物質に係る試験及び指定化学物質に係る有害性の調査の項目等を定める省令第4条に規定する試験施設に関する基準」（環境省令第39号、薬発第229号、59基局第85号、昭和59年3月31日、平成12年3月1日改正）

(2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)

また、本最終報告書は生データを正確に反映しており、試験データが有効であることを確認しています。

2003年12月15日

試験責任者



信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学物質評価研究機構
久留米事業所

試験委託者 独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構

試験の表題 3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシ-2'-ニトロアゾベンゼン（被験物質番号 K-1692）の微生物による分解度試験

試験番号 205021

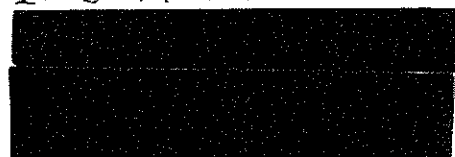
上記試験は財団法人化学物質評価研究機構久留米事業所の信頼性保証部門が監査又は査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに試験責任者及び運営管理者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日（試験責任者）	報告日（運営管理者）
試験計画書	2003 年 9 月 29 日	2003 年 9 月 29 日	2003 年 9 月 29 日
	2003 年 10 月 14 日	2003 年 10 月 14 日	2003 年 10 月 14 日
	2003 年 11 月 13 日	2003 年 11 月 13 日	2003 年 11 月 13 日
試験実施状況	2003 年 10 月 16 日	2003 年 10 月 16 日	2003 年 10 月 16 日
	2003 年 10 月 30 日	2003 年 11 月 13 日	2003 年 11 月 13 日
	2003 年 11 月 13 日	2003 年 11 月 13 日	2003 年 11 月 13 日
生データ及び最終報告書	2003 年 12 月 15 日	2003 年 12 月 15 日	2003 年 12 月 15 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。

2003 年 12 月 15 日

信頼性保証部門責任者



目 次

	頁
表 題	1
試験委託者	1
試験施設	1
試験目的	1
試験法	1
適用 GLP	1
試験日程	2
試資料の保管	2
試験関係者	2
最終報告書の承認	2
要 約	3
1. 被 験 物 質	4
2. 活 性 汚 泥	6
3. 分解度試験の実施	7
4. 試験条件の確認	13
5. 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	14
6. 試験結果	14
7. 備 考	16

表 題	3,5-ジ- <i>tert</i> -ブチル-2-ヒドロキシ-2'-ニトロアゾベンゼン（被験物質番号 K-1692）の微生物による分解度試験
試験委託者	独立行政法人 新エネルギー・産業技術総合開発機構 （〒170-6028）東京都豊島区東池袋三丁目1番1号
試験施設	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 19-14
試験目的	K-1692の微生物による分解性の程度について知見を得る。
試験法	<p>本試験は以下の試験法に準拠した。</p> <p>(1) 「新規化学物質等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〉</p> <p>(2) 「OECD Guideline for Testing of Chemicals」に定める“Ready Biodegradability: Modified MITI Test (I) (Guideline 301C, July 17, 1992)”</p>
適用GLP	<p>本試験は以下の基準を適用した。</p> <p>(1) 「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」（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、平成12年3月1日改正）</p> <p>(2) 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（November 26, 1997）</p>

試験日程

試験開始日	2003年 9月 29日
実験開始日	2003年10月16日
実験終了日	2003年11月13日
試験終了日	2003年12月15日

試験資料の保管

(1) 被験物質


被験物質約5gを保管用容器に入れ密栓後、安定に保存しうる期間、久留米事業所試料保管室に保管する。

(2) 生データ、資料等


生データ、試験計画書、試験依頼書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、試験委託者から通知を受けるまでの期間、久留米事業所資料保管室に保管する。

試験関係者

試験責任者


 所属 試験第一課

 試験担当者
 (分解度試験の実施)

 活性汚泥管理責任者


最終報告書の承認

2003年12月15日

 試験責任者


要 約

試験の表題

3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシ-2'-ニトロアゾベンゼン（被験物質番号 K-1692）
の微生物による分解度試験

試験条件

- | | |
|-------------|-------------------|
| (1) 被験物質濃度 | 100mg/L |
| (2) 活性汚泥濃度 | 30mg/L（懸濁物質濃度として） |
| (3) 試験液量 | 300mL |
| (4) 試験液培養温度 | 25±1℃ |
| (5) 試験液培養期間 | 28日間 |

分解度算出のための測定及び分析

- (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) 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による被験物質の分析

試験結果

- | | | | | | |
|----------------|-----|-----|----|----|----|
| (1) BODによる分解度 | 0%, | 2%, | 0% | 平均 | 1% |
| (2) HPLCによる分解度 | 0%, | 0%, | 0% | 平均 | 0% |

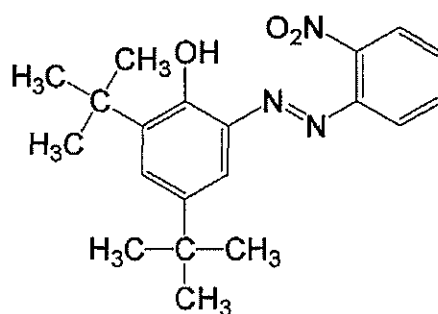
1. 被 験 物 質

本報告書においてK-1692は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 3,5-ジ-*tert*-ブチル-2-ヒドロキシ-2'-ニトロアゾベンゼン

1.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{20}H_{25}N_3O_3$

分子量 355.43

CAS No. 52184-14-2

1.3 提供者、商品名及びロット番号^{*1}

(1) 提 供 者

(2) 商 品 名

(3) ロット番号

^{*1} 提供者添付資料による。

1.4 純 度*1

- (1) 被 験 物 質 99.8%
- (2) 不 純 物 不明成分 0.2%

被験物質は純度100%として取り扱った。

1.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル (Fig. 6参照)、質量スペクトル (Fig. 7参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 8参照) により構造を確認した。

1.6 保管条件及び保管条件下での安定性

- (1) 保 管 条 件 冷暗所保存
- (2) 安定性確認 実験開始前及び終了後に被験物質の赤外吸収スペクトルを測定した結果、両スペクトルは一致し、保管条件下で安定であることを確認した (Fig. 6参照)。

2. 活 性 汚 泥

2.1 汚泥の採集場所及び時期

(1) 場 所 以下の10ヵ所から採集

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（新潟県新潟市）
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）

(2) 時 期 2003年09月

2.2 採集汚泥

- (1) 下水処理場 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

2.3 活性汚泥の調製

活性汚泥の均一性を保つため、上記で採集してきた各地の汚泥混合液のろ液5Lと、約3ヶ月間培養した活性汚泥^{*2}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^{*3}した。

*2 上記で採集してきた各地の汚泥混合液のろ液10Lを、下記2.4に従って培養した活性汚泥。

*3 屋外空気をプレフィルターに通し、ばっ気に用いた。

2.4 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。これに脱塩素水を加え全量を10Lにして再びばっ気し（30分間以上）、添加した脱塩素水中での合成下水濃度が0.1wt%になるように50g/L合成下水^{*4}を添加した。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。

*4 グルコース、ペプトン、りん酸二水素カリウムをそれぞれ50g/Lになるように精製水に溶解し、水酸化ナトリウムでpHを 7.0 ± 1.0 に調整した。

2.5 管理及び使用

活性汚泥の正常な状態を維持するため、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、沈でん性が優れていること、pH、温度及び溶存酸素濃度を測定し、管理基準（「新規化学物質等に係る試験の方法について」参照）の範囲内であることを確認した。この結果を生データとして保管した。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。

2.6 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。

(2) 活性汚泥使用開始日 2003年10月14日

3. 分解度試験の実施

3.1 試験の準備

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

活性汚泥の添加量を決定するために、懸濁物質濃度を測定した。

測定方法 「工場排水試験方法，懸濁物質」（JIS K 0102-1998 の 14.1）に準じて行った。

測定実施日 2003年10月14日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は3000mg/Lであった。

(2) 基礎培養基の調製

「工場排水試験方法，生物化学的酸素消費量」（JIS K 0102-1998 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（高杉製薬製 日本薬局方）を加えて1Lとする割合で混合し、pHを7.0に調整した。

(3) 対照物質

試験の実施には汚泥が十分な活性度を有することを確認するため、対照物質としてアニリン（昭和化学製 試薬特級 ロット番号 H0-3028D）を用いた。化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律に定められた試験法及びOECDテストガイドラインの規定に従って、BODから求めたアニリンの7日後及び14日後の分解度がそれぞれ40%及び65%を越えた時、本試験が有効となることとする。

3.2 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、3.3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 ①)

試験容器に精製水300mLを入れ、被験物質濃度が100mg/Lになるように被験物質を電子分析天びんで30mg正確にはかりとり添加した。

(b) (汚泥＋被験物質)系 (3個, 試験容器 ② ③ ④)

試験容器に基礎培養基 [300mLから活性汚泥添加液量 (3.00mL) を差し引いた量] を入れ、被験物質濃度が100mg/Lになるように被験物質を電子分析天びんで30mg正確にはかりとり、添加した。

(c) (汚泥＋アニリン)系 (1個, 試験容器 ⑤)

試験容器に基礎培養基 [300mLから活性汚泥添加液量 (3.00mL) を差し引いた量] 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29.5 μ L [添加量30mg = 29.5 μ L \times 1.022g/cm³ (密度)] 分取して添加した。

(d) 汚泥ブランク系 (1個, 試験容器 ⑥)

試験容器に基礎培養基 [300mLから活性汚泥添加液量 (3.00mL) を差し引いた量] を入れた。

(2) 活性汚泥の接種

(b)、(c)及び(d)の試験液に2.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。

3.3 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

恒温槽及び測定ユニット 旭テクネイオン製

データ処理装置 旭テクネイオン製

試験容器 300mL用培養瓶（改良型培養瓶）

炭酸ガス吸収剤 ソーダライム，No.1
（和光純薬工業製 二酸化炭素吸収用）

(2) 環境条件

試験液培養温度 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$

試験液培養期間 28日間

撈拌方法 マグネチックスターラーによる回転撈拌

(3) 実施場所 511クーロ室

3.4 観察、測定等

(1) 観察

培養期間中、試験液の状況を毎日目視観察した。また、装置の作動状況を適宜点検した。

(2) 生物化学的酸素要求量（BOD）の測定

培養期間中、試験液のBODの変化を連続的にデータ処理装置で自動記録して測定した。また、槽内温度は毎日測定記録した。

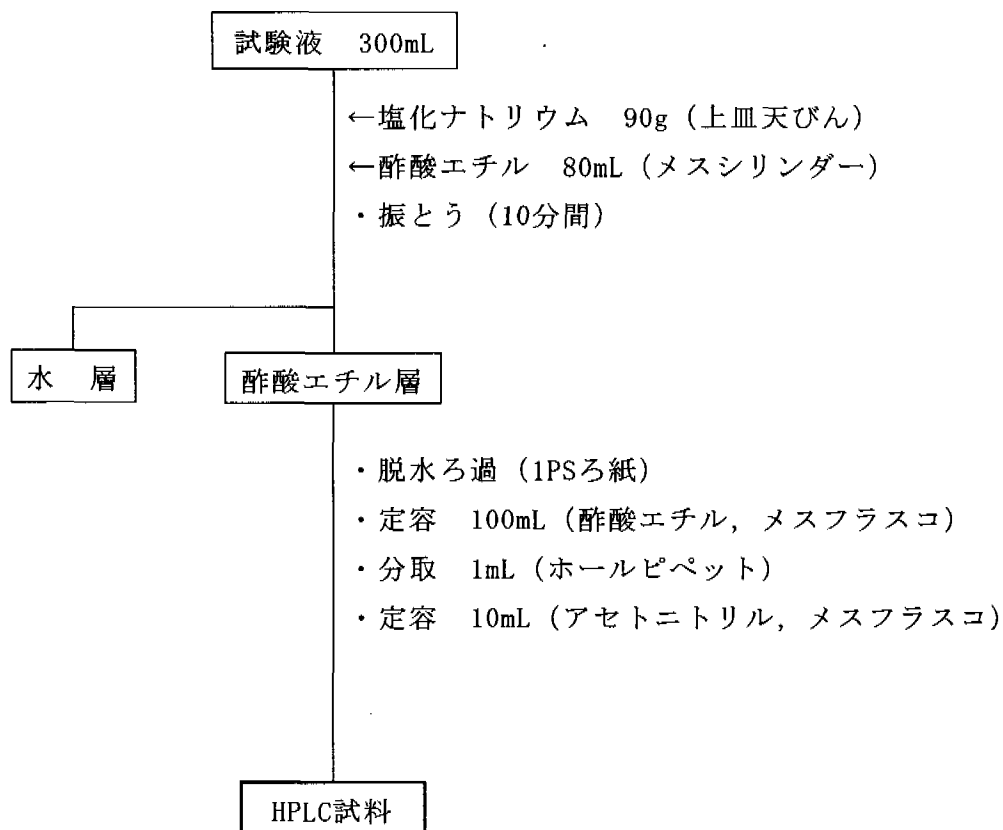
3.5 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中に残留している被験物質について分析した。

3.5.1 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高速液体クロマトグラフィー（HPLC）試料とした。

フロースキーム



3.5.2 定量分析

高速液体クロマトグラフィーによる被験物質の定量分析

前処理を行って得られたHPLC試料について、下記の定量条件に基づき被験物質を分析した。HPLC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30.0mg/Lのピーク面積とHPLC試料のピーク面積を比較し、比例計算して求めた（Table-3、Fig.4参照）。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して22000 μ V・sec（被験物質濃度0.61mg/L）とした。

(1) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
ポンプ	島津製作所製 LC-10ADvp
検出器	島津製作所製 SPD-10AVvp
カラムオープン	島津製作所製 CTO-10ACvp
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10ADvp
カラム	L-column ODS（化学物質評価研究機構製） 15cm \times 2.1mm I.D.
カラム温度	30 $^{\circ}$ C
溶 離 液	アセトニトリル／水*5（99/1 V/V）
流 量	0.2mL/min
測定波長	340nm（Fig.5参照）
注 入 量	5 μ L
検出器出力	1V/AU

*5 水道水を超純水装置システムで処理した水。

(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100mgを正確にはかりとり、アセトニトリル／酢酸エチル（9/1 V/V）に溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリル／酢酸エチル（9/1 V/V）で希釈して30.0mg/Lの標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

(2)の標準溶液の調製と同様にして7.50、15.0及び30.0mg/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(Fig.2参照)。

3.5.3 回収試験及びブランク試験

前述した前処理における試験液からの被験物質の回収率を求めるため、3.2に準じて調製した(水+被験物質)系及び(汚泥+被験物質)系の試験液について3.5.1及び3.5.2に従い、回収試験を行った。また、3.2に準じて調製した汚泥ブランク系の試験液について回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。回収試験については各2点、ブランク試験については1点測定した。この結果、ブランク試験においてクロマトグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。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(Table-2、Fig.3参照)。

(水 + 被験物質) 系回収率	101%,	100%	平均	101%
(汚泥 + 被験物質) 系回収率	98.9%,	101%	平均	99.8%

3.6 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位で表示した。

(1) BODによる分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}^{*6}} \times 100$$

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^{*6} : 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)

*6 純度100%として計算した。

(2) HPLC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)

3.7 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則Bに従った。

4. 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53%及び74%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 (Table-1、Fig.1参照)。

5. 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

当該要因はなかった。

6. 試験結果

6.1 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	不溶物が認められた。
	(汚泥 + 被験物質) 系	汚泥以外の不溶物が認められた。 汚泥の増殖は認められなかった。

6.2 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	Table	Fig.
		①	②	③	④				
BOD*7	mg	2.6	0	1.5	0	75.0		1	1
被験物質残留量及び残留率 (HPLC)	mg	29.1	29.0	29.2	29.5	30		3	4
	%	97	97	97	98	-			

*7 (汚泥+被験物質)系は、汚泥ブランク系の値を差し引いて表示した。

6.3 分解度

28日後の分解度は下記のとおりであった。

	分解度 (%)				Table
	②	③	④	平均	
BODによる結果	0	2	0	1	1
HPLCによる結果	0	0	0	0	3

6.4 考察

本試験において、BOD及びHPLCによる平均分解度はそれぞれ1%及び0%であったことから、被験物質は微生物により分解されなかった。

また、HPLCによる(水+被験物質)系の残留率及び(汚泥+被験物質)系の平均残留率が、それぞれ97%及び97%であることから、被験物質は変化していないと考えられる。

Study No. 205021		(Test item <u>K-1692</u>)	
Cultivating conditions:			
Concentration		Regular condition	
Test item	100 (mg/L)		
Reference item (Aniline)	100 (mg/L)		
Activated sludge	30 (mg/L)		
Temperature	25 ± 1 °C		
Duration	28 days (Oct.16,2003 - Nov.13,2003)		
Note:		Regular test	

Vessel No.	Sample Description	BOD (mg)			
		7th day	14th day	21st day	28th day
[1]	Water + test item	0.0	0.0	2.2	2.6
[2]	Sludge + test item	2.9	4.3	7.7	8.8
[3]	Sludge + test item	2.9	4.0	11.1	12.7
[4]	Sludge + test item	3.2	4.3	8.0	9.3
[5]	Sludge + aniline	52.7	72.8	79.7	80.7
[6]	Control blank [B]	4.5	5.7	9.6	11.2

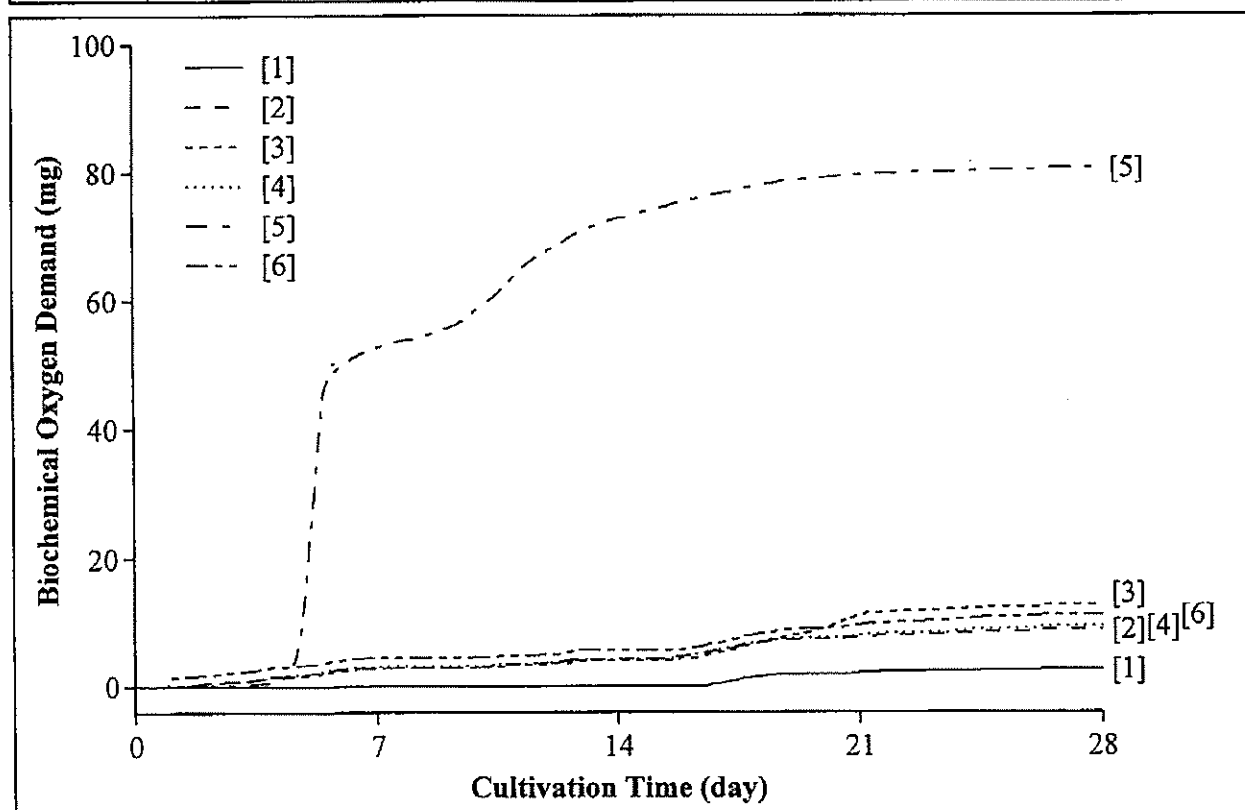


Fig. 1 Chart of BOD.

Nov.13,2003 Name

