

最 終 報 告 書

パーフロアルキル(C=4~12)スルホン酸塩(Na, K, Li) [ペルフルオロオクタン
スルホン酸カリウム(被験物質番号 K-1520)にて試験実施]の微生物による分解度試験

(試験番号: 21520)

化学物質評価研究機構
久留米事業所

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 通商産業省

試験の表題 パーフロロアルキル(C=4~12)スルホン酸塩(Na, K, Li) [ペルフル
オロオクタンスルホン酸カリウム(被験物質番号 K-1520)にて試
験実施]の微生物による分解度試験

試験番号 21520

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)及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)に従って実施したものです。

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。

2000年11月1日

試験責任者

[Redacted Signature]

[Redacted Stamp]

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 通商産業省

試験の表題 パーフロロアルキル(C=4~12)スルホン酸塩(Na, K, Li)〔ペルフル
オロオクタンスルホン酸カリウム(被験物質番号 K-1520)にて試
験実施〕の微生物による分解度試験

試験番号 21520

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及び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	2000年7月31日	2000年7月31日	2000年7月31日
	2000年8月25日	2000年8月29日	2000年8月29日
	2000年11月1日	2000年11月1日	2000年11月1日
試験実施状況	2000年8月7日	2000年8月7日	2000年8月9日
	2000年8月21日	2000年9月7日	2000年9月8日
	2000年9月4日	2000年9月7日	2000年9月8日
	2000年9月5日	2000年9月7日	2000年9月8日
生データ及び最終報告書	2000年11月1日	2000年11月1日	2000年11月1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。

2000年11月1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 G L P	1
試験日程	2
試験資料の保管	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	15
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	15
6. 試験結果	15
7. 備 考	17

表 題	パーフロアルキル(C=4~12)スルホン酸塩(Na, K, Li) [ペルフルオロオクタンスルホン酸カリウム(被験物質番号 K-1520)にて試験実施]の微生物による分解度試験
試験委託者	通商産業省 (〒100-8901) 東京都千代田区霞が関一丁目3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-1520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	「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〉及び「OECD Guideline for Testing of Chemicals」に定める“Ready Biodegradability: Modified MITI Test (I) (Guideline 301C, July 17, 1992)”に準拠した。
適用 G L P	(1) 化学物質GLP 「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」(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)を適用した。 (2) OECD-GLP 「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)を適用した。

試験日程

試験開始日	2000年 7月31日
実験開始日	2000年 8月 7日
実験終了日	2000年 9月 4日
試験終了日	2000年11月 1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、指示書、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

活性汚泥管理責任者

最終報告書の承認

2000 年 / 月 / 日

試験責任者

要 約

試験の表題

パーフロロアルキル(C=4～12)スルホン酸塩(Na, K, Li) [ペルフルオロオクタンスルホン酸カリウム (被験物質番号 K-1520) にて試験実施] 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 |

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) 全有機炭素分析法 (TOC) による溶存有機炭素の分析
- (3) 高速液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) による被験物質の分析

試験結果

- | | | | | | |
|-----------------|-----|-----|----|----|----|
| (1) BODによる分解度 | 0%, | 0%, | 1% | 平均 | 0% |
| (2) TOCによる分解度 | 8%, | 4%, | 4% | 平均 | 6% |
| (3) LC-MSによる分解度 | 8%, | 0%, | 0% | 平均 | 3% |

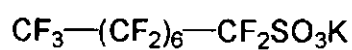
1. 被 験 物 質

本報告書においてK-1520は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 ペルフルオロオクタンスルホン酸カリウム

1.2 構造式等

構造式



分子式 $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{KO}_3\text{S}$

分子量 538.22

1.3 入手先、商品名及びロット番号^{*1}

- (1) 入 手 先 XXXXXXXXXX
(2) 商 品 名 ペルフルオロオクタンスルホン酸カリウム
(3) ロット番号 A37626B

^{*1} 入手先添付資料による。

1.4 純 度^{*1}

被 験 物 質 100.3% (異性体の混合)

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. 4参照) 及び質量スペクトル (Fig. 5参照) 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 冷蔵保存

(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. 4参照)。

2. 活 性 汚 泥

2.1 汚泥の採集場所及び時期

(1) 場 所 以下の全国10ヵ所から採集した。

伏古川処理場（北海道札幌市）	鹿島処理場（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（新潟県西蒲原郡）
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 2000年 6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。

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 2000年 7月17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 2000年 8月 7日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は4500mg/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) 基準物質

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、基準物質としてアニリン（昭和化学製 試薬特級 ロット番号 SL-2927G）を用いた。

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②)

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を正確にはかりとり、添加してpHを測定した。

(b) (汚泥＋被験物質)系 (3個, 試験容器③ ④ ⑤)

試験容器に基礎培養基 [300mLから活性汚泥添加液量 (2.00mL) 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を正確にはかりとり、添加してpHを測定した。

(c) (汚泥＋アニリン)系 (1個, 試験容器①)

試験容器に基礎培養基 [300mLから活性汚泥添加液量 (2.00mL) 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29.5μL [添加量30mg = $29.5\mu\text{L} \times 1.022\text{g}/\text{cm}^3$ (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 (2.00mL) 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

	クーロメーター	大倉電気製
	データ処理装置	旭テクネイオン製
試験容器	300mL用培養瓶	
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±1℃
試験液培養期間	28日間
攪拌方法	マグネチックスターラーによる回転攪拌

(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。

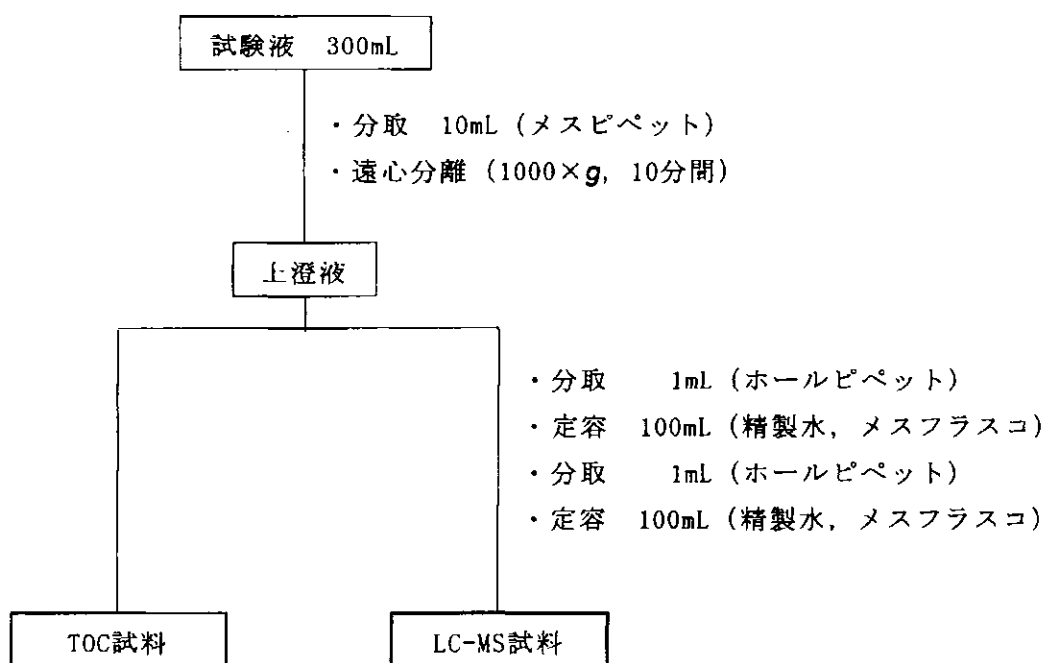
3.5 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中に残留している溶存有機炭素及び被験物質について分析した。なお、（水＋被験物質）系及び（汚泥＋被験物質）系の試験液のpHを測定した。

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、溶存有機炭素（DOC）を分析するための全有機炭素分析法（TOC）試料とし、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質量分析法（LC-MS）試料とした。

フロースキーム



3.5.2 定量分析

(1) 全有機炭素分析法による溶存有機炭素の分析

前処理を行って得られたTOC試料について、下記の定量条件に基づきDOCを分析した。

試験液のDOC濃度は、全有機炭素計内のデータ処理装置により、TOC標準溶液 20.0mgC/Lのピーク面積を測定して検量線を設定し、TOC試料のDOCを測定して求めた（Table-2参照）。なお、TOC標準溶液はフタル酸水素カリウム（和光純薬工業製 等級 試薬特級）を精製水に溶解して調製した。

定量下限濃度はDOC濃度1.0mgC/Lとした。

定量条件

機	器	全有機炭素計
		島津製作所製 TOC-5000A
T C 炉 温 度		680℃
流	量	150mL/min
注 入 量		33μL
感	度	レンジ 5

(2) 高速液体クロマトグラフィー質量分析法による被験物質の分析

前処理を行って得られたLC-MS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。LC-MS試料中の被験物質の濃度は、被験物質が異性体混合物であるため、マスキロマトグラム上で得られた標準溶液10.0 μ g/Lのピークの総面積とLC-MS試料のピークの総面積とを比較し、比例計算して求めた (Table-3、Fig. 3参照)。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して1000 (被験物質濃度0.29 μ g/L) とした。

(a) 定量条件

機	器	高速液体クロマトグラフ質量分析計
	高速液体クロマトグラフ	
		ウォーターズ社製 2690
	質量分析計	ウォーターズ社製 ZMD

高速液体クロマトグラフ条件

カ	ラ	ム	L-column ODS
			15cm \times 1.5mm I. D. ステンレス製
	カラム温度		40 $^{\circ}$ C
溶	離	液	A(60%) : アセトニトリル
			B(40%) : 5mmol/L酢酸ジ- <i>n</i> -ブチルアミン
流		量	0.15mL/min
注	入	量	10 μ L

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレー
検出イオン	負イオン
コーン電圧	47V
イオン源温度	120 $^{\circ}$ C
脱溶媒システム温度	300 $^{\circ}$ C
脱溶媒ガス流量	350L/hr
測定イオン	m/z 499

(b) 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、メタノールに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを精製水で希釈して10.0 μ g/Lの標準溶液とした。

(c) 検量線の作成

(b)の標準溶液の調製と同様にして2.50、5.00及び10.0 μ g/Lの標準溶液を調製した。これらを(a)の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのマスキ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)。

3.6 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

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}^{*5}} \times 100$$

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 純度100%として計算した。

(2) TOCによる分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{DOC}_w - \text{DOC}_s}{\text{DOC}_w} \times 100$$

DOC_s : (汚泥+被験物質)系における溶存有機炭素の残留量
(測定値) (mgC)

DOC_w : (水+被験物質)系における溶存有機炭素の残留量
(測定値) (mgC)

(3) LC-MS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74%及び85%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	pH
培養開始時	(水 + 被験物質) 系	被験物質は溶解した。	② 6.4
	(汚泥 + 被験物質) 系	被験物質は溶解した。	③ 7.0
			④ 7.0
			⑤ 7.0
培養終了時	(水 + 被験物質) 系	不溶物は認められなかった。	② 8.2
	(汚泥 + 被験物質) 系	汚泥以外の不溶物は認められなかった。 汚泥の増殖は認められなかった。	③ 7.3
			④ 7.3
			⑤ 7.3

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
		②	③	④	⑤				
BOD* ⁶	mg	0	0	0	0.1	13.8		1	1
DOC残留量及び残留率* ⁶	mgC	5.2	4.8	5.0	5.0	5.4	2	—	—
	%	97	89	93	93	—			
被験物質残留量及び残留率(LC-MS)	mg	29.3	27.0	29.4	29.5	30	3	3	3
	%	98	90	98	98	—			

*6 (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
	③	④	⑤	平 均	
BODによる結果	0	0	1	0	1
TOCによる結果	8	4	4	6	2
LC-MSによる結果	8	0	0	3	3

7. 備 考

7.1 試験に使用した主要な装置・機器

閉鎖系酸素消費量測定装置	:	9頁参照	
全有機炭素計	:	11頁参照	
高速液体クロマトグラフー質量分析計	:	12頁参照	
フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所製	FTIR-8200PC
天びん	:	ザルトリウス社製	BP301S
		ザルトリウス社製	BP210S
pH計	:	東亜電波工業製	HM-50G
遠心分離機	:	島津製作所製	CST-060LF

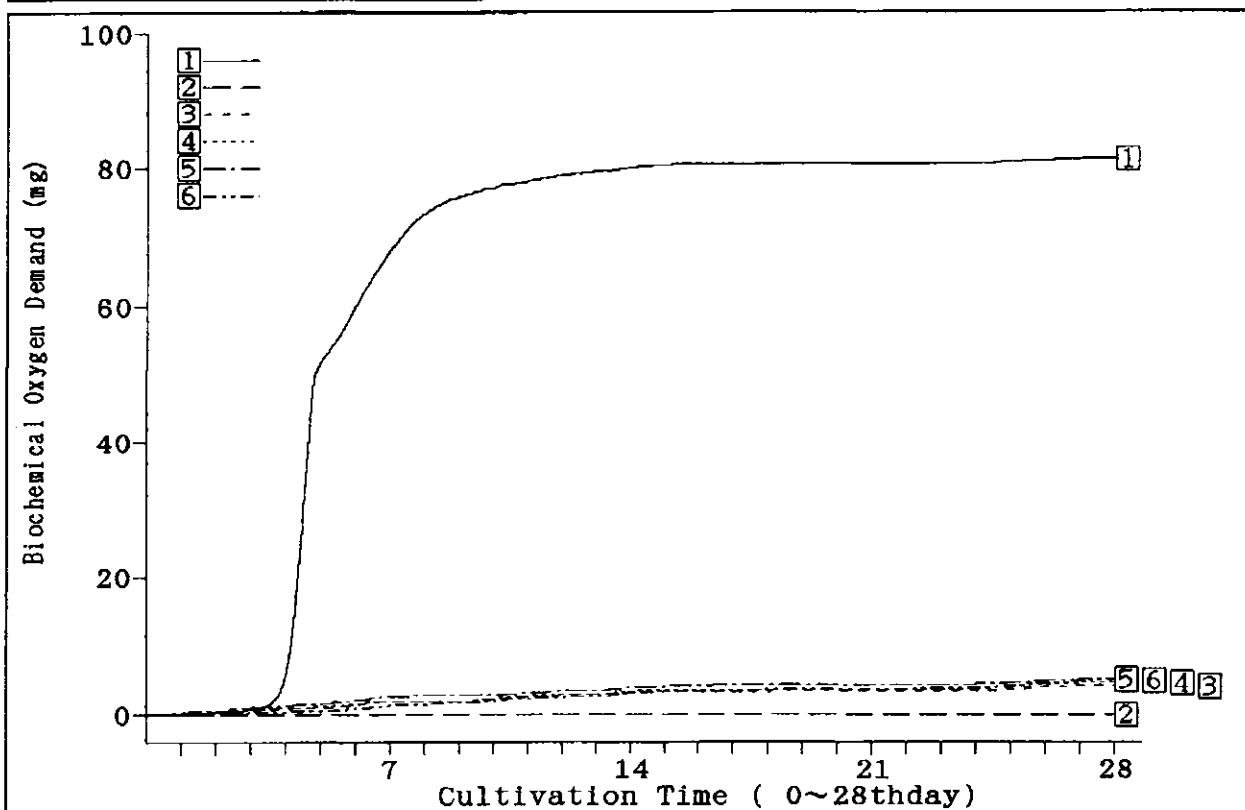
7.2 分析に使用した試薬

メタノール	:	和光純薬工業製	HPLC用
アセトニトリル	:	和光純薬工業製	HPLC用
0.5mol/L酢酸ジ- <i>n</i> -ブチルアミン	:		
	:	東京化成工業製	LC-MS用イオンペア試薬
精製水	:	高杉製薬製	日本薬局方

Fig.1 Chart of BOD

Test No. 21520 (Test substance K-1520)
 Apparatus No. CM-19
 Cultivating conditions: **Regular condition**
 Concentration
 Test substance 100 (mg/ℓ)
 Reference substance(aniline) .. 100 (mg/ℓ)
 Activated sludge 30 (mg/ℓ)
 Temperature 25 ± 1° C
 Duration 28days(Aug.7~Sep.4,2000)
 Note: **Regular test**

Vessel no.	Sample description	B O D (mg)			
		7thday	14thday	21stday	28thday
①	Sludge + Aniline	68.5	80.1	80.8	81.5
②	Water + Test substance	0.0	0.0	0.0	0.0
③	Sludge + Test substance	2.0	3.3	3.6	4.3
④	Sludge + Test substance	2.2	3.4	3.8	4.8
⑤	Sludge + Test substance	2.7	4.0	4.4	5.3
⑥	Control blank [B]	1.5	3.2	3.7	5.2



2000.09.04 Name _____

FINAL REPORT

Biodegradation test of Salt (Na,K,Li) of perfluoroalkyl (C=4-12) sulfonic acid
[This test was performed using Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt
(Test substance number K-1520)] by microorganisms
(Test number 21520)

Kurume Laboratory
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

STATEMENT

Kurume Laboratory
Chemicals Evaluation and
Research Institute, Japan

Sponsor Ministry of International Trade and Industry

Title Biodegradation test of Salt (Na,K,Li) of perfluoroalkyl (C=4-12) sulfonic acid [This test was performed using Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt (Test substance number K-1520)] by microorganisms

Test number 21520

I, the undersigned, hereby declare that this report provides a correct English translation of the Final Report (Test No.21520, issued on November 1, 2000).

Date

July 8, 2002

Study director



CONTENTS

	page
Title	1
Sponsor	1
Testing facility	1
Objective	1
Test method	1
Applied GLP	2
Test schedule	2
Storage of test substance, raw data, etc.	2
Personnel	3
Preparation of final report	3
SUMMARY	4
1. Test substance	5
2. Activated sludge	6
3. Performance of biodegradation test	8
4. Validity of test conditions	15
5. Factors possibly affecting accuracy	15
6. Results	15
7. Remarks	17

Title

Biodegradation test of Salt (Na,K,Li) of perfluoroalkyl (C=4-12) sulfonic acid [This test was performed using Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt(Test substance number K-1520)] by microorganism

Sponsor

Ministry of International Trade and IndustryI
1-3-1 Kasunigaseki,Chiyoda-ku,Tokyo 100-8901,Japan

Testing facility

Kurume Laboratory
Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan
19-14 Chuomachi, Kurume, Fukuoka 830-0023, Japan

Objective

This test was performed to evaluate the biodegradability of K-1520 by microorganisms.

Test method

This test was conducted according to the "Method for Testing the Biodegradability of Chemical Substances by Microorganisms" stipulated in the "Testing Methods for New Chemical Substances" (July 13, 1974, Kanpogyo No.5, Planning and Coordination Bureau, Environment Agency, Yakuhatu No.615, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare, and 49 Kikyoku No.392, Basic Industries Bureau, Ministry of International Trade and Industry, Japan). This test method is essentially the same as that in the OECD Guideline for Testing of Chemicals "Ready Biodegradability: Modified MITI Test (I) (Guideline 301C, July 17, 1992)".

Applied GLP

(1) Chemical GLP

This test complied with "Basic standards to be observed by testing facilities in conducting tests stipulated in article 4 of the Order Prescribing Those Items of the Test Relating to the New Chemical Substances and Study on Harmful Effects of Designated Chemical Substances (hereafter referred to as "GLP standards")" (March 31, 1984, Revised November 18, 1988, Kanpogyo No.39, Planning and Coordination Bureau, Environment Agency, Yakuhatu No.229, Pharmaceutical Affairs Bureau, Ministry of Health and Welfare, and 59 Kikyoku No.85, Basic Industries Bureau, Ministry of International Trade and Industry, Japan).

(2) OECD-GLP

This test complied with "OECD Principles of Good Laboratory Practice" (November 26, 1997).

Test schedule

Start of test	July 31, 2000
Start of cultivation with activated sludge	August 7, 2000
Termination of cultivation with activated sludge	September 4, 2000
End of test	November 1, 2000

Storage of test substance, raw data, etc.

(1) Test substance

About 5 g of the substance is sealed in a store vessel and stored in a storage room in this laboratory while it is kept stable.

(2) Raw data and materials, etc.

Raw data, the protocol, the direction by the sponsor, necessary materials and the copy of the final report are stored in a storage room in this laboratory until it receives a notice from a sponsor after the end of the test.

Personnel

Study director



Test operators





Staff for cultivation of activated sludge



Preparation of final report

Study director

Date

November 1, 2000

Signature

Signed in original



SUMMARY

Title

Biodegradation test of Salt (Na,K,Li) of perfluoroalkyl (C=4-12) sulfonic acid
[This test was performed using Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt (Test substance number K-1520)] by microorganism

Conditions of cultivation

(1) Concentration of test substance	100 mg/L
(2) Concentration of activated sludge (as the concentration of suspended solid)	30 mg/L
(3) Volume of test solution	300 mL
(4) Cultivation temperature	25±1℃
(5) Cultivation duration	28 days

Measurement and analysis

- (1) Measurement of biochemical oxygen demand (BOD) by means of a closed system oxygen consumption measuring apparatus
- (2) Determination of dissolved organic carbon by means of a total organic carbon analysis (TOC)
- (3) Determination of test substance by means of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

Results

(1) Percentage biodegradation by BOD	0 %,	0 %,	1 %	average	0 %
(2) Percentage biodegradation by TOC	8%,	4 %,	4 %	average	6 %
(3) Percentage biodegradation by LC-MS	8 %,	0 %,	0 %	average	3 %

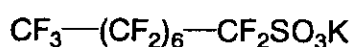
1. Test substance

In this report, K-1520 has the following chemical name, etc.

1.1 Chemical name^{*1} Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt

1.2 Chemical structure, etc.^{*1}

Structural formula



Molecular formula $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{KO}_3\text{S}$

Molecular weight 538.22

*1 Information supplied by [REDACTED]

1.3 Manufacturer and lot number^{*1}

(1) Manufacturer [REDACTED]

(2) Name

Perfluorooctane sulfonic acid, potassium salt

(3) Lot number

A37626B

1.4 Purity^{*1}

Test substance 100.3 % (Mixture of isomers)

The test substance was treated as 100 % in purity.

1.5 Confirmation of test substance

Infrared and mass spectra of the test substance were confirmed to be identical (see Fig.4 and Fig.5).

1.6 Storage and stability

(1) Storage condition

Cold storage place.

(2) Stability

The test substance was stable under the storage conditions, as shown by the finding that IR spectra of the test substance before the start and after the termination of the cultivation were identical (see Fig.4).

2. Activated sludge

2.1 Sludge sampling sites and date

(1) Sampling sites

On-site sludge sampling was carried out at the following 10 locations in Japan.

Fushikogawa city sewage plant (Sapporo-shi, Hokkaido)
 Kashima industrial sewage plant (Kashima-gun, Ibaragi)
 Nakahama city sewage plant (Osaka-shi, Osaka)
 Ochiai city sewage plant (Shinjuku-ku, Tokyo)
 Kitakami River (Ishinomaki-shi, Miyagi)
 Shinano River (Nishikanbara-gun, Niigata)
 Yoshino River (Tokushima-shi, Tokushima)
 Lake Biwa (Otsu-shi, Shiga)
 Hiroshima Bay (Hiroshima-shi, Hiroshima)
 Dookai Bay (Kitakyushu-shi, Fukuoka)

(2) Date June, 2000

2.2 Sludge sampling

(1) City sewage

Return sludge from sewage plants were collected.

(2) Rivers, lake and sea

Surface water and surface soil which was in contact with the atmosphere were collected.

2.3 Preparation of activated sludge

Activated sludge was prepared as follows to maintain its uniformity.

The filtrate (5 L) of the supernatant of the activated sludge^{*2} cultivated about for 3 months was mixed with the mixed filtrate (5 L) of the supernatant of a sludge collected newly at each location. The mixed filtrate (10 L) was aerated^{*3} after the pH value of the mixture was adjusted to 7.0 ± 1.0 .

*2 The activated sludge cultivated the mixed filtrate (10 L) of the supernatant of sludge collected at the ten locations.

*3 Prefiltered open air was used.

2.4 Cultivation

Roughly 30 minutes after ceasing aeration of the sludge mixture, supernatant corresponding to about 1/3 of the whole volume was removed. Dechlorinated water was added to the remaining portion so that the total volume reached 10 L. This mixture was aerated, and then a predetermined amount of synthetic sewage^{*4} was added to the mixture so that the concentration of the synthetic sewage was 0.1 wt% in the volume of dechlorinated water added. This procedure was repeated once every day. Cultivation was carried out at $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

*4 Synthetic sewage

Glucose, peptone and potassium dihydrogenphosphate were dissolved in dechlorinated water to obtain 50 g/L of the solution for each component. The pH of the solution was adjusted to 7.0 ± 1.0 with sodium hydroxide.

2.5 Control and use

During cultivation, the appearance of the supernatant, sedimentation of the sludge, formation of flock, pH, dissolved oxygen concentration in the solution and temperature were checked to maintain a normal state of sludge. It was confirmed that these were within the scope of the control standard stipulated in the "Testing Methods for New Chemical Substances". Microflora in the activated sludge was microscopically observed and sludge with no abnormal symptoms is used for the test.

2.6 Inspection of activity and date of initiation of use of activated sludge

(1) Inspection of activity

Activity of the sludge was assessed using a reference substance.

(2) Date of initiation of use

July 17, 2000

3. Performance of biodegradation test

3.1 Preparations for test

(1) Measurement of concentration of suspended solid

The concentration of suspended solid was measured to determine the amount of activated sludge to add.

Method	In accordance with Japanese Industrial Standards (JIS) K 0102-1998-14.1
Date	August 7, 2000
Result	Concentration of suspended solid in the activated sludge was 4500 mg/L.

(2) Preparation of basal culture medium

Each 3 mL of solutions A, B, C and D, which are prescribed in JIS K 0102-1998-21, were made up to 1000 mL with purified water (Takasugi Seiyaku Co., Ltd.), and then the pH of this solution was adjusted to 7.0.

(3) Reference substance

Aniline (reagent grade, Showa Chemicals Inc. Lot No. SL-2927G) was used as a reference substance to confirm that the sludge is sufficiently active.

The pass level was that the percentage biodegradation of aniline calculated from the BOD value after 7 and 14 days were 40 % or over and 65 % or over, respectively.

3.2 Preparation of test solutions

The following test solutions were prepared and cultured under the conditions described in 3.3.

(1) Addition of test substance or aniline

(a) Test solution (water + test substance) (n=1, Vessel No.2)

In one test vessel, 30 mg of test substance was accurately weighed and added to 300 mL of purified water, so that the concentration of the test substance reached 100 mg/L.

(b) Test solution (sludge + test substance) (n=3, Vessel No.3, 4 and 5)

In each test vessel, 30 mg of test substance was accurately weighed and added to the basal culture medium [the volume was less than 300 mL by the volume of activated sludge (2.00 mL) inoculated] so that the concentration of the test substance reached 100 mg/L.

(c) Test solution (sludge + aniline) (n=1, Vessel No.1)

In one test vessel, 29.5 μL [$30.0 \text{ mg} = 29.5 \mu\text{L} \times 1.022 \text{ g/cm}^3$ (density)] of aniline was added into the basal culture medium [the volume was less than 300 mL by the volume of activated sludge (2.00 mL) inoculated], so that the concentration reached 100 mg/L.

(d) Test solution (control blank) (n=1, Vessel No.6)

In one test vessel, nothing was added to the basal culture medium [the volume was less than 300 mL by the volume of activated sludge (2.00 mL) inoculated].

(2) Inoculation of activated sludge

The activated sludge cultivated under the conditions described in 3 was added to each test vessel, (b), (c) and (d), so that the concentration of the suspended solid reached 30 mg/L.

3.3 Instruments and conditions of cultivation

(1) Instruments for cultivation

Closed system oxygen consumption measuring apparatus

(Coulometer : Ohkura Electric Co., Ltd.)

(Data sampler : Asahi Technicon Co., Ltd.)

Vessel 300 mL in volume

Absorbent for carbon dioxide

Soda lime No.1 (for absorption of carbon dioxide,

Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)

(2) Conditions of cultivation

Cultivation temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$

Cultivation duration 28 days

Stirring method Each test solution is stirred by a magnetic stirrer.

(3) Room Apparatus room No.511

3.4 Observation and measurement of test conditions

(1) Observation of test solution

The appearance of the test solution was observed periodically and conditions of the instruments were checked properly.

(2) Measurement of biochemical oxygen demand (BOD)

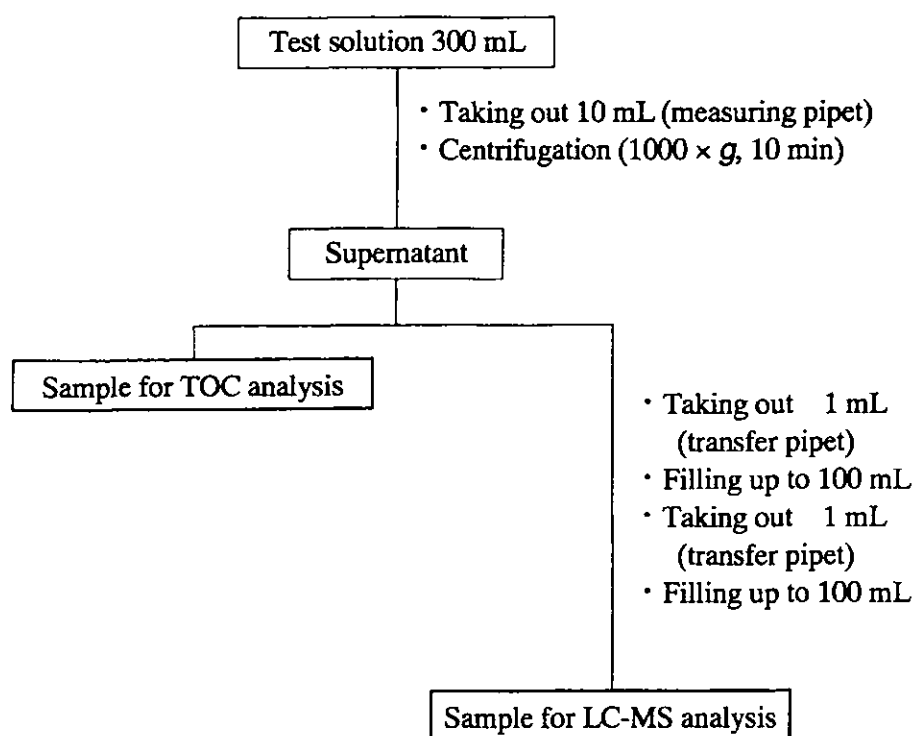
During the test period, the change in BOD of the test solutions was measured by autorecording using a data sampler. Cultivation temperature was measured and recorded once a day.

3.5 Analysis of test solution

After the termination of the cultivation, dissolved organic carbon and the test substance in the test solutions were determined. The pH of the test solution (water + test substance) and the test solutions (sludge + test substance) was measured.

3.5.1 Pretreatment of test solutions for analysis

After the termination of the cultivation, the test solution (water + test substance), the test solutions (sludge + test substance) and the test solution (control blank) were pretreated for total organic carbon (TOC) analysis and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) analysis as follows.



3.5.2 Quantitative analysis

(1) Determination of dissolved organic carbon

The samples for TOC analysis were analyzed under the following conditions. The concentration of the dissolved organic carbon in the test solutions was calculated proportionally from the peak area of the test solutions by comparison with that of 20.0 mgC/L standard solution (see Table-2). The standard solution for TOC analysis was prepared by dissolving potassium hydrogenphthalate in purified water.

The concentration of dissolved organic carbon corresponding to the minimum determination limit was regarded as 1.0 mgC/L.

Analytical conditions

Instrument	Total organic carbon analyzer Shimadzu Corporation type TOC-5000A
Temperature of furnace	680°C
Flow rate	150 mL/min
Injection volume	33 μ L
Sensitivity	Range 5

(2) Determination of test substance

The samples for LC-MS analysis were analyzed under the following conditions. The concentration of the test substance in the sample for LC-MS analysis was proportionally calculated by comparing the total peak area (mixture of isomers) on the mass chromatogram of the sample for LC-MS analysis with that on the mass chromatogram of 10.0 $\mu\text{g/L}$ standard solution (see Table-3 and Fig.3).

The lowest detectable peak area of the test substance was regarded as 1000 considering the noise level, which corresponded to the test substance concentration of 0.29 $\mu\text{g/L}$.

(a) Analytical conditions

Instrument	Liquid chromatograph-mass spectrometer
High-performance liquid chromatograph	Waters 2690
Mass spectrometer	Waters ZMD
<u>Conditions of HPLC</u>	
Column	L-column ODS 15 cm \times 1.5 mm I.D. stainless steel
Column temp.	40°C
Eluent	A(60%): Acetonitrile B(40%): 5 mmol/L Di-n-butylammonium acetate
Flow rate	0.15 mL/min
Sample size	10 μL
<u>Conditions of MS</u>	
Ionization mode	Electrospray
Detection mode	Negative
Cone Voltage	47 V
Ion source temp.	120°C
Desolvation temp.	300°C
Gas flow rate	350L/hr
Monitoring ion	m/z 499

(b) Preparation of standard solution

The standard solution to determine the concentration of the test substance in the sample for LC-MS was prepared as follows.

100 mg of test substance was accurately weighed and dissolved in methanol to obtain 1000 mg/L solution of the test substance. The 10.0 $\mu\text{g/L}$ standard solution was then prepared from this solution by dilution with purified water.

(c) Calibration curve

2.50, 5.00 and 10.0 $\mu\text{g/L}$ standard solutions were prepared by the same method as described in (b). These solutions were analyzed according to the analytical conditions described in (a). A calibration curve was drawn based on the relation between the peak area on the chromatograms and the respective concentrations (see Fig.2).

3.6 Calculation of percentage biodegradation

The percentage biodegradation was calculated by the following equations and expressed in whole numbers.

(1) Percentage biodegradation by BOD

$$\text{Percentage biodegradation (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}^{*5}} \times 100$$

- BOD : Biochemical oxygen demand in the test solution (sludge + test substance) (experimental) (mg)
- B : Biochemical oxygen demand in the control blank (experimental) (mg)
- TOD^{*5} : Theoretical oxygen demand required when the test substance was completely oxidized (theoretical) (mg)

*5 The purity was regarded as 100 % and TOD was calculated.

(2) Percentage biodegradation by TOC

$$\text{Percentage biodegradation (\%)} = \frac{\text{DOCw} - \text{DOCs}}{\text{DOCw}} \times 100$$

- DOCs : Residual amount of the dissolved organic carbon in the test solution (sludge + test item) (experimental) (mgC)
- DOCw : Residual amount of the dissolved organic carbon in the test solution (water + test item) (experimental) (mgC)

(3) Percentage biodegradation by LC-MS

$$\text{Percentage biodegradation (\%)} = \frac{\text{Sw} - \text{Ss}}{\text{Sw}} \times 100$$

- Ss : Residual amount of the test substance in the test solution (sludge + test substance) (experimental) (mg)
- Sw : Residual amount of the test substance in the test solution (water + test substance) (experimental) (mg)

3.7 Treatment of numerical values

Values were rounded off in accordance with JIS Z 8401:1999 rule B.

4. Validity of test conditions

Percentage biodegradations of aniline calculated by the BOD values were 74 % and 85 % after 7 and 14 days, respectively. It was concluded that this test conditions were valid (see Table-1 and Fig.1).

5. Factors possibly affecting accuracy

No adverse effects on the reliability of this test were noted.

6. Results

6.1 Appearances of test solutions

Appearances of test media in cultivation vessels were as follows.

	Test solution	Appearance	pH
At the start of cultivation	Water + test substance	The test substance was dissolved.	6.4
	Sludge + test substance	The test substance was dissolved.	7.0 7.0 7.0
At the termination of cultivation	Water + test substance	Insoluble compound was not observed.	8.2
	Sludge + test substance	Insoluble compound was not observed except for the sludge. Growth of the sludge was not observed.	7.3 7.3 7.3

6.2 Analytic results of test solutions

Analytic results of the test solution after 28 days were as follows.

		(Water + test Substance)	(Sludge + test substance)				Theoretical amount	Table	Fig.
		Vessel-2	Vessel-3	Vessel-4	Vessel-5				
BOD*6	mg	0	0	0	0.1	13.8	1	1	
Residual amount *6 of DOC	mgC	5.2	4.8	5.0	5.0	5.4	2	-	
	%	97	89	93	93	—			
Residual amount and percentage residue of test substance (LC-MS)	mg	29.3	27.0	29.4	29.5	30	3	3	
	%	98	90	98	98	—			

^{*6} The value of control blank was subtracted from the values of the test solutions (sludge + test substance).

6.3 Percentage biodegradation

Percentage biodegradations after 28 days were as follows.

	Percentage biodegradation (%)				Table
	Vessel-3	Vessel-4	Vessel-5	Average	
BOD	0	0	1	0	1
TOC	8	4	4	6	2
LC-MS	8	0	0	3	3

7. Remarks

7.1 Instruments used for test

Closed system oxygen consumption measuring apparatus :
see page 11
Total organic carbon analyzer : see page 13
Liquid chromatograph-mass spectrometer :
see page 14
Fourier transform infrared spectrophotometer :
Shimadzu Corporation type FTIR-8200PC

Electronic analytical balance : Sartorius type BP301S
Sartorius type BP210S
pH meter : Toa Electronics Ltd. type HM-50G

Refrigerated centrifuge : Shimadzu Corporation type CST-060LF

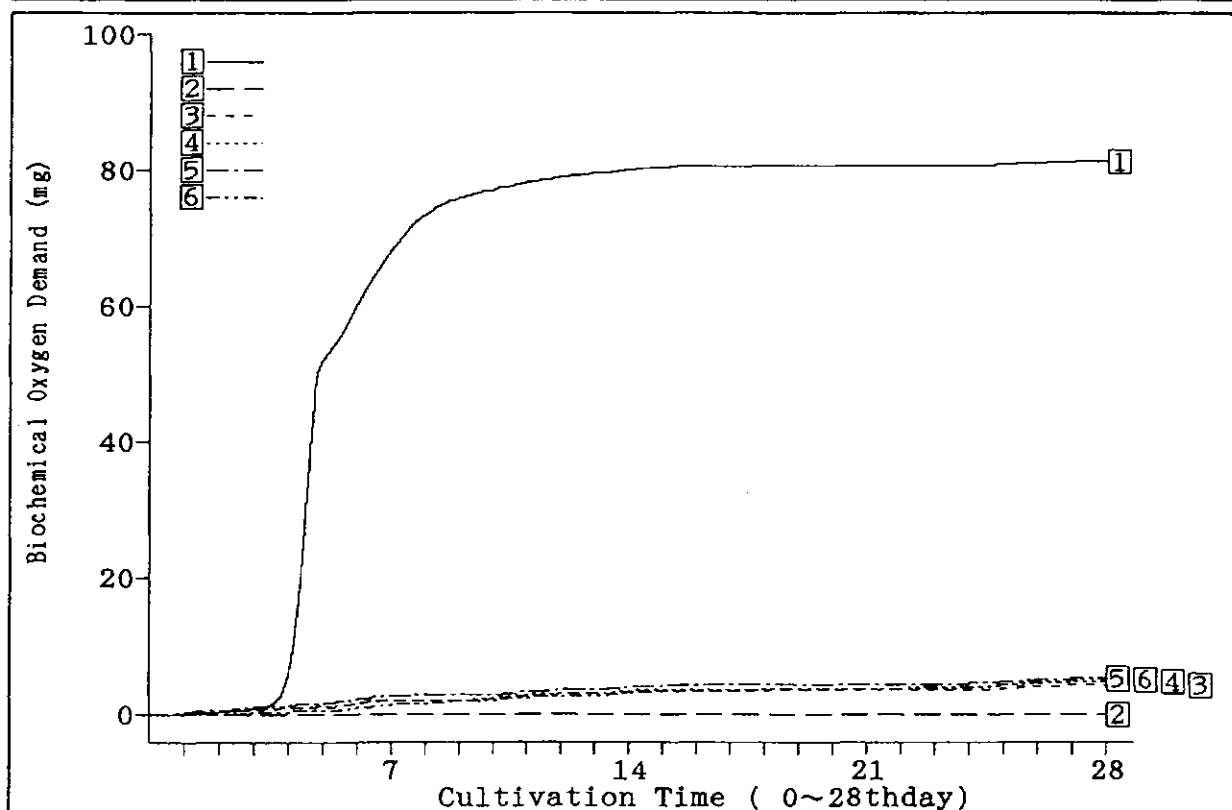
7.2 Reagents used for analysis

Purified water : Takasugi Seiyaku Co., Ltd.
0.5 mol/L Di-n-butylammonium acetate :
Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.
Methanol (HPLC grade) : Wako Pure Chemical Industries, Ltd..
Acetonitrile (HPLC grade) : Wako Pure Chemical Industries, Ltd..

Fig.1 Chart of BOD

Test No.	21520	(Test substance	<u>K-1520</u>)
Apparatus		No.	CM-19
Cultivating conditions: Regular condition				
Concentration				
Test substance	100	(mg/ℓ)	
Reference substance(aniline)	100	(mg/ℓ)	
Activated sludge	30	(mg/ℓ)	
Temperature	25 ± 1	°C	
Duration	28days	(Aug.7~Sep.4,2000)	
Note: Regular test				

Vessel no.	Sample description	B O D (mg)			
		7thday	14thday	21stday	28thday
①	Sludge + Aniline	68.5	80.1	80.8	81.5
②	Water + Test substance	0.0	0.0	0.0	0.0
③	Sludge + Test substance	2.0	3.3	3.6	4.3
④	Sludge + Test substance	2.2	3.4	3.8	4.8
⑤	Sludge + Test substance	2.7	4.0	4.4	5.3
⑥	Control blank [B]	1.5	3.2	3.7	5.2



2000.09.04 Name

