

最 終 報 告 書

2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール（被験物質番号 K-1760）の
微生物による分解度試験

（試験番号：205101）

2006 年 2 月 14 日

化学物質環境衛生機構
外務省環境政策課

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 2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール (被験物質番号 K-1760) の
微生物による分解度試験

試験番号 205101

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」 (平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環保企発第031121004号) に規定する「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」
- (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。

2006 年 2 月 14 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 2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール (被験物質番号 K-1760) の
微生物による分解度試験

試験番号 205101

本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

なお、監査又は査察の結果については、下記の通り試験責任者及び運営管理者に報告しました。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (試験責任者及び運営管理者)
試験計画書草案	2005 年 8 月 3 日	2005 年 8 月 3 日
試験計画書	2005 年 8 月 3 日	2005 年 8 月 3 日
試験計画書の変更	2005 年 9 月 1 日	2005 年 9 月 1 日
	2005 年 11 月 15 日	2005 年 11 月 15 日
培養開始時	2005 年 8 月 4 日	2005 年 8 月 4 日
中間時	2005 年 8 月 18 日	2005 年 8 月 22 日
培養終了時	2005 年 9 月 1 日	2005 年 9 月 1 日
	2005 年 9 月 1 日	2005 年 9 月 6 日
	2005 年 9 月 2 日	2005 年 9 月 6 日
	2005 年 11 月 15 日	2005 年 11 月 15 日
生データ、最終報告書草案	2006 年 2 月 11 日	2006 年 2 月 13 日
最終報告書	2006 年 2 月 14 日	2006 年 2 月 14 日

2006 年 2 月 14 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	16
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	16
6. 試験結果	16
7. 備 考	20

Tables

Table-1	Calculation table for percentage biodegradation by BOD
Table-2	Calculation table for recovery rate of test item
Table-3	Calculation table for percentage biodegradation of test item (test solution)
Table-4	Calculation table for percentage detection of test item (soda lime)

Figures

Fig.1	Chart of BOD
Fig.2-1	Chromatograms of HPLC analysis for calibration curve
Fig.2-2	Calibration curve of test item
Fig.3	Chromatograms of HPLC analysis for recovery test
Fig.4	Chromatograms of HPLC analysis for test solution
Fig.5	Chromatograms of HPLC analysis for soda lime
Fig.6	UV chromatograms of LC-MS analysis for test solution
Fig.7	Total ion chromatograms of LC-MS analysis for test solution
Fig.8	Mass spectra (standard solution)
Fig.9	Mass spectra ([1] Water + test item)
Fig.10	Mass spectra ([2] Sludge + test item)
Fig.11	Mass spectra ([5] Control blank)
Fig.12	UV spectrum of test item
Fig.13-1	IR spectrum of test item measured before experimental start
Fig.13-2	IR spectrum of test item measured after experimental completion
Fig.14	Mass spectrum of test item
Fig.15	NMR spectrum of test item

表 題	2,6-ジ- <i>tert</i> -ブチル-4- <i>sec</i> -ブチルフェノール(被験物質番号 K-1760) 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 (〒212-8554) 神奈川県川崎市幸区大宮町1310番
試験施設	財団法人 化学物質評価研究機構 久留米事業所 (〒839-0801) 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目2番7号
試験目的	K-1760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従って行った。</p> <p>(1)「新規化学物質等に係る試験の方法について」(平成15年11月21日、薬食発第1121002号、平成15・11・13製局第2号、環境企発第031121002号)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」(平成15年11月21日、薬食発第1121003号、平成15・11・17製局第3号、環境企発第031121004号)に規定する「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」</p> <p>(2)「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(November 26, 1997)</p>

試験日程

試験開始日	2005年8月3日
実験開始日	2005年8月4日
実験終了日	2005年9月1日
試験終了日	2006年2月14日

試験資料の保管

(1) 被験物質

被験物質を保管用容器に入れ密栓後、品質低下を起こさないで安定に保存する期間、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、試験委託書、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

2006年2月14日

試験責任者

要 約

試験の表題

2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール（被験物質番号 K-1760）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（遮光下）

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消費量（BOD）の測定
- (2) 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による被験物質の定量分析

その他の分析

液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）による変化物の定性分析

試験結果

(1) BOD分解度	-1%,	-1%,	-1%	平均	0%（-1%） ^{*1}
(2) 被験物質分解度（HPLC）	3%,	2%,	1%	平均	2%

*1 分解度の平均値が負の値に算出されたため、平均値を0としカッコ内にその計算値を示した。

結 論

本試験条件下において、被験物質の一部は構造不明な変化物に変化し、残留したが、大部分は被験物質として試験液中に残留した。また、被験物質の一部は揮発し、試験液から炭酸ガス吸収剤であるソーダライムに移行した。

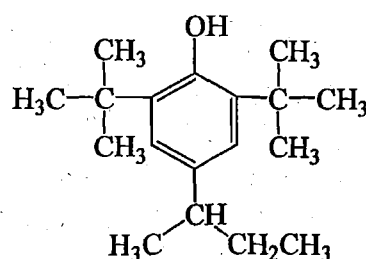
1. 被験物質

本報告書においてK-1760は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称 2,6-ジ-*tert*-ブチル-4-*sec*-ブチルフェノール

1.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{18}H_{30}O$

分子量 262.43

CAS番号 17540-75-9

1.3 入手先、商品名及びロット番号*2

(1) 入手先

(2) 商品名

(3) ロット番号

1.4 純 度*2

(1) 被験物質 96.4% (GAS LIQUID CHROMATOGRAPHY)

(2) 不純物 残り3.6%は不明

被験物質は純度100%として取り扱った。

*2 入手先添付資料による。

1.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル、質量スペクトル及び核磁気共鳴スペクトルは独立行政法人産業技術総合研究所の有機化合物スペクトルデータベースに記載のスペクトルと一致することを確認した (Fig.13, 14, 15参照)。

1.6 保管条件及び保管条件下での安定性確認

- | | |
|-----------|--|
| (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.13参照)。 |

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）	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 2005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^{*3}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^{*4}した。

*3 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。

*4 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。これに脱塩素水道水を加え全量を10Lにして再びばっ気し（30分間以上）、添加した脱塩素水道水中での合成下水濃度が0.1%(w/w)になるように50g/L合成下水^{*5}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。

*5 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、活性汚泥の沈殿性、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。また、合成下水を添加してから19.5時間後の活性汚泥を使用した。

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 2005年 7月12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 2005年 8月 1日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は3650mg/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.）に定められた組成の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 SP-3442Z）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 [1])

被験物質濃度が100mg/Lになるように、試験容器に精製水300mL及び被験物質30mgを入れた。被験物質は電子分析天びんで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])

被験物質濃度が100mg/Lになるように、試験容器に基礎培養基 [300mLから活性汚泥添加液量 (2.47mL) を差し引いた量] 及び被験物質30mgを入れた。被験物質は電子分析天びんで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 [6])

アニリンの濃度が100mg/Lになるように、試験容器に基礎培養基 [300mLから活性汚泥添加液量 (2.47mL) を差し引いた量] 及びアニリン29.5 μ L [添加量30mg = 29.5 μ L \times 1.022g/cm³ (密度)] を入れた。アニリンはマイクロシリンジで分取して添加した。

(d) 汚泥ブランク系 (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 (2.47mL) 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	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（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±1℃
試験液培養期間	28日間（遮光下）
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

クーロ室A

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) 生物化学的酸素消費量（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 試験液及びソーダライムの分析

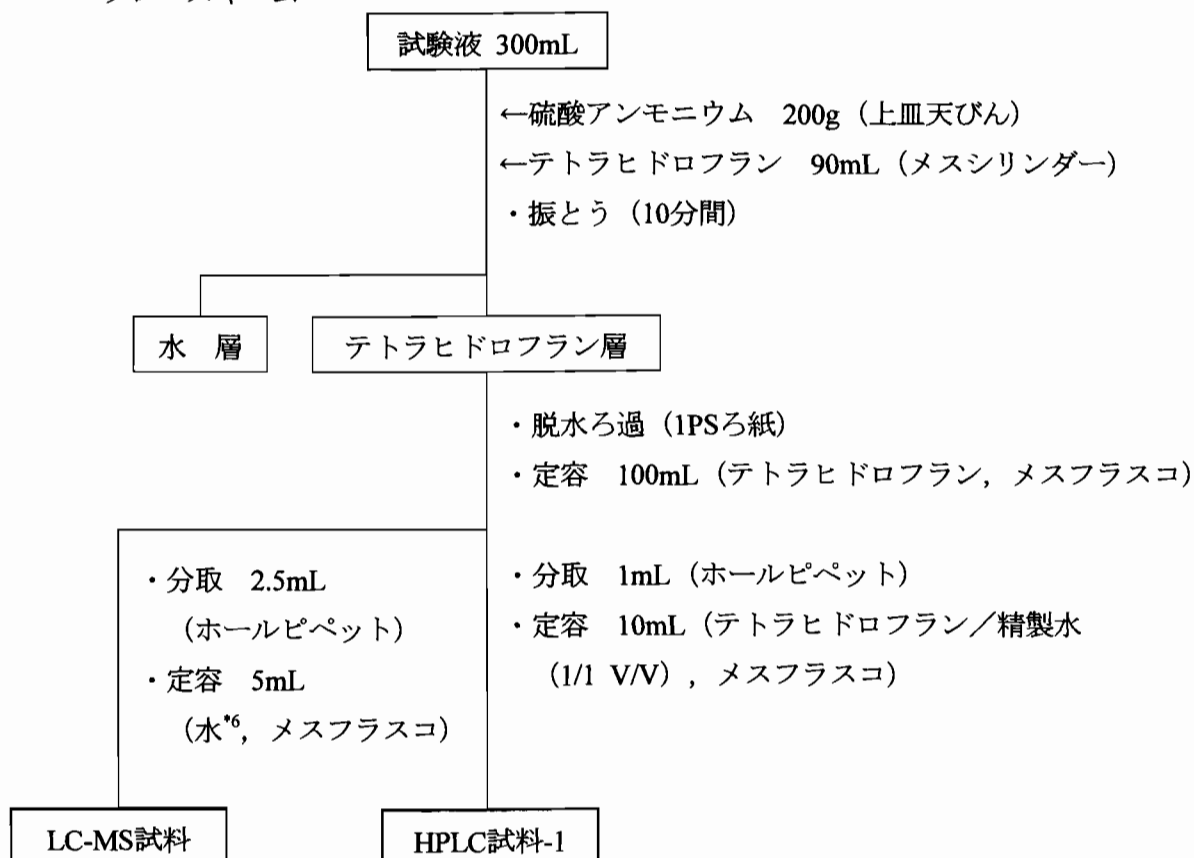
培養期間終了後、試験液中に残留している被験物質について分析した。また、被験物質は試験容器内に装着する炭酸ガス吸収剤のソーダライムに吸着する可能性が考えられたため、ソーダライムについても被験物質分析を行った。さらに、変化物が生成したため定性分析を行った。なお、（水＋被験物質）系及び（汚泥＋被験物質）系の試験液のpHを測定した。

3.5.1 試験液及びソーダライムの前処理

(1) 試験液

（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-1並びに変化物を分析するための液体クロマトグラフィー質量分析法（LC-MS）試料を調製した。

フロースキーム

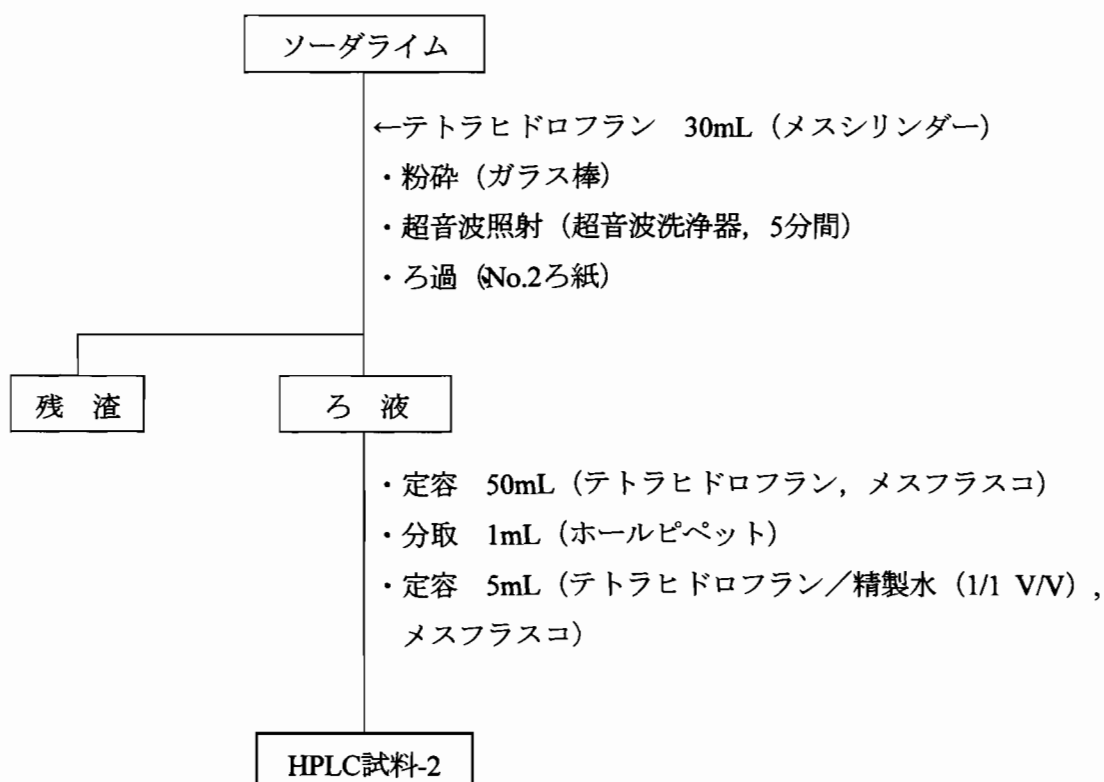


*6 水道水を超純水装置システムを用いて処理した水。

(2) ソーダライム

(水+被験物質)系、(汚泥+被験物質)系及び汚泥ブランク系のソーダライム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-2を調製した。

フロースキーム



3.5.2 定量及び定性分析

(1) 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-1及び-2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-1及び-2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-1及び-2のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた（Table-3, 4、Fig.4, 5参照）。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して2870 μ V・sec（被験物質濃度0.30mg/L）とした。

(a) 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-10AD _{VP}
検出器	島津製作所製 SPD-10AV _{VP}
カラムオープン	島津製作所製 CTO-10AC _{VP}
オートインジェクター	島津製作所製 SIL-10AD _{VP}
デガッサー	島津製作所製 DGU-14AM
システムコントローラー	島津製作所製 SCL-10A _{VP}
カラム	L-column ODS（化学物質評価研究機構製） 15cm×2.1mmI.D.
カラム温度	40℃
溶離液	テトラヒドロフラン／水 ^{*6} （62/38 V/V）
流量	0.2mL/min
測定波長	277nm（Fig.12参照）
注入量	5 μ L
検出器出力	2V/AU

(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、テトラヒドロフランに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをテトラヒドロフランで希釈して300mg/Lの被験物質溶液とした。さらに、これをテトラヒドロフラン／精製水（1/1 V/V）で希釈して30.0mg/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7.50、15.0及び30.0mg/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）。

(2) 液体クロマトグラフィー質量分析法による変化物の定性分析

前処理を行って得られたLC-MS試料について、下記の分析条件に基づき検出された変化物の定性分析を行った（Fig.6, 7, 8, 9, 10, 11参照）。また、同条件において被験物質溶液を分析し、被験物質ピーク及び不純物ピークを確認した。

(a) 分析条件

機 器	液体クロマトグラフィー質量分析計	
高速液体クロマトグラフ	Waters製	Alliance2690
質量分析計	Waters製	ZMD
多波長検出器	Waters製	996PDA

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column ODS (15cm×2.1mmI.D., 化学物質評価研究機構製)
カラム温度	40℃
溶離液	A(62%): テトラヒドロフラン B(38%): 水 ^{*6}
流量	0.2mL/min
注入量	20μL
測定波長	276～278nm

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレー (ESI)
検出イオン	負イオン
検出法	スキャン
走査質量範囲(m/z)	100～400
イオン源温度	120℃
脱溶媒システム温度	350℃
コーン電圧	20V

(b) 被験物質溶液の調製

LC-MS分析に用いる被験物質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、テトラヒドロフランに溶解して1000mg/Lの被験物質溶液を調製した。これをテトラヒドロフラン／水^{*6} (1/1 V/V) で希釈して150mg/Lの被験物質溶液とした。

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(1)及び3.5.2(1)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	95.0%, 95.3%	平均	95.1%
（汚泥＋被験物質）系回収率	96.0%, 95.5%	平均	95.8%

3.6 分解度の算出法

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分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}^{*7}} \times 100$$

BOD : (汚泥+被験物質)系の生物化学的酸素消費量
(測定値) (mg)

B : 汚泥ブランク系の生物化学的酸素消費量
(測定値) (mg)

TOD^{*7} : 被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる
理論的酸素消費量(計算値) (mg)

*7 純度100%として計算した。

(2) 被験物質分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{Sw} - \text{Ss}}{\text{Sw}} \times 100$$

Ss : (汚泥+被験物質)系における被験物質の残留量
(測定値) (mg)

Sw : (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

試験の有効性の基準値と本試験における値を下表に示す。本試験における値はいずれも基準値を満たしたことから、本試験は有効であった。

		本試験における値	基準値	参 照
分解度の最大値 と最小値の差	BOD分解度	0%	20%未満	6.3項 分解度
	被 験 物 質 分 解 度	2%		
アニリンのBOD 分解度	7日後	57%	40%以上	Table-1 Fig.1
	14日後	65%	65%以上	
汚泥ブランク系 のBOD値	28日後	6.6mg	18mg未満 (60mg/L未満)	Table-1 Fig.1

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	被験物質は溶解しなかった。 試験液は無色であった。	-
	(汚泥 + 被験物質) 系	被験物質は溶解しなかった。 試験液は無色であった。	-
培養終了時	(水 + 被験物質) 系	不溶物が認められた。 試験液は無色であった。	[1] 6.4
	(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。 試験液は無色であった。	[2] 7.1 [3] 7.1 [4] 7.2

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* ⁸	mg	0	-1.3	-1.3	-1.1	91.5	1	1	
被験物質残留量及び残留率 (試験液, HPLC)	mg	27.1	26.4	26.7	26.8	30.0	3	4	
	%①	90	88	89	89	-			
被験物質検出量及び検出率* ⁹ (ソーダ石灰, HPLC)	mg	0.1	0.1	0.2	0.1	30.0	4	5	
	%②	0	0	1	0	-			
変化物の生成* ¹⁰ (試験液, LC-MS)	-	検出					-	-	6~11
物質収支①+②	%	90	88	90	89	-	-	-	

*8 (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。

*9 被験物質の揮発によるソーダ石灰への移行を厳密に再現できないため、被験物質のソーダ石灰からの回収試験は実施しなかった。よって、回収率補正は行わず、検出量を算出した。

*10 LC-MSによる変化物の定性分析において全ての試験液で検出されたが(6.4参照)、標品が入手不可能なため定量分析を実施することはできなかった。

6.3 分 解 度

28日後の分解度は下記のとおりであった。

		(汚泥+被験物質) 系				Table
		[2]	[3]	[4]	平 均	
BOD分解度	%	-1	-1	-1	0 (-1) ^{*1}	1
被験物質分解度 (HPLC)	%	3	2	1	2	3

*1 分解度の平均値が負の値に算出されたため、平均値を0としカッコ内にその計算値を示した。

6.4 変化物の定性分析結果 (Fig.6, 7, 8, 9, 10, 11参照)

LC-MSによる定性分析の結果、UV検出 (276~278nm) のクロマトグラム上に被験物質以外に1本ピークが検出された (Fig.6参照)。このピークは被験物質の標準溶液と試験液の質量スペクトルの比較から、入手試料中に含まれる不純物と試験液において生成した変化物が重なって検出されていると考えられたが、変化物の構造推定には至らなかった。各ピーク成分の質量スペクトルから推定した分子量及び構造式を下表に示す。

LC-MS分析で検出された成分一覧表

成 分 (溶出順)	保持時間 ^{*11} (分)	分子量	構 造 式
不純物	4.9	206	
変化物	5.1	294	不明
被験物質	7.1	262	

*11 LC-MS分析におけるUVクロマトグラム上の保持時間 (Fig.6参照)

6.5 考 察

試験液分析の結果、(水+被験物質)系における被験物質の残留率は90%、(汚泥+被験物質)系における試験液中の被験物質の残留率は88%、89%及び89%であり、各試験液において物質収支が不足した。各試験液のHPLCクロマトグラム上で入手試料に含まれている不純物のピーク形状に変化が確認されたため、不純物と保持時間が同程度である変化物の生成が示唆された(Fig.4参照)。この変化物について、構造推定を目的としてLC-MSによる定性分析を行った。被験物質の標準溶液を分析した結果、不純物は被験物質よりもブチル基が1つ少ない構造式であると推定された(Fig.8参照)。また、分子量294の変化物が検出されたが、この変化物については構造推定には至らなかった(Fig.9, 10, 11参照)。なお、UVクロマトグラム及びトータルイオンクロマトグラム(TIC)上に被験物質、入手試料中に含まれる不純物及び分子量294の変化物以外のピークは検出されなかったため、分子量294以外の変化物は生成していないと考えられる(Fig.6, 7参照)。

また、その他の物質収支不足の原因として、被験物質が一部揮発し、試験容器内に装着していた炭酸ガス吸収剤であるソーダライムに移行した可能性が考えられたため、培養期間終了後のソーダライムについて、被験物質を分析した。(水+被験物質)系において1%未満であるが若干量検出され、(汚泥+被験物質)系においては0%、1%及び0%検出された(Table-4、Fig.5参照)。この結果から被験物質がソーダライムに移行したことが確認された。また、(水+被験物質)系から試験液において生成した変化物とは異なる変化物が検出されたが、その検出量は微量であり、被験物質添加量に対し1%未満であった。(水+被験物質)系及び(汚泥+被験物質)系共にソーダライムからの検出量をあわせても物質収支が不足した。この原因として、ソーダライムは多孔質の粒子であり、吸着した被験物質を完全に回収するのは困難であったと考えられる。

以上より、試験液中で被験物質の一部は変化し、構造式が不明な変化物を生成したと考えられる。しかしながら、BOD分解度は平均0% (-1%)^{*1}であることから被験物質及び変化物は微生物により分解されなかったと考えられる。

6.6 結 論

本試験条件下において、被験物質の一部は構造不明な変化物に変化し、残留したが、大部分は被験物質として試験液中に残留した。また、被験物質の一部は揮発し、試験液から炭酸ガス吸収剤であるソーダライムに移行した。

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	
高速液体クロマトグラフ	:	12頁参照	
液体クロマトグラフー質量分析計	:	13頁参照	
フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所製	IRPrestige-21
ガスクロマトグラフー質量分析計	:	日本電子製	JMS-700QQ
フーリエ変換核磁気共鳴装置	:	日本電子製	JNM-MY60FT
天びん	:	ザルトリウス製	BP210S
		メトラー製	AE-163
pH計	:	東亜電波工業製	HM-50G
紫外可視分光光度計	:	日本分光製	V-560
振とう機	:	タイテック製	SR-2w
超音波洗浄器	:	柴田科学器械工業製	SU-9TH

7.2 分析に使用した試薬

テトラヒドロフラン	:	関東化学製	HPLC用
精製水	:	高杉製薬製	日本薬局方
硫酸アンモニウム	:	関東化学製	試薬一級

Study No. 205101 (Test item K-1760)

Cultivating conditions:

Concentration

Test item 100 (mg/L)

Reference item (aniline) 100 (mg/L)

Activated sludge 30 (mg/L)

Temperature $25 \pm 1^\circ\text{C}$

Duration 28 days (Aug.4,2005 - Sep.1,2005)

Note: —

Vessel No.	Sample Description	BOD (mg)			
		7th day	14th day	21st day	28th day
[1]	Water + test item	0.0	0.0	0.0	0.0
[2]	Sludge + test item	1.6	3.2	4.5	5.3
[3]	Sludge + test item	1.7	3.3	4.6	5.3
[4]	Sludge + test item	1.6	3.2	4.6	5.5
[5]	Control blank [B]	0.8	2.7	5.5	6.6
[6]	Sludge + aniline	52.1	61.8	66.7	68.9

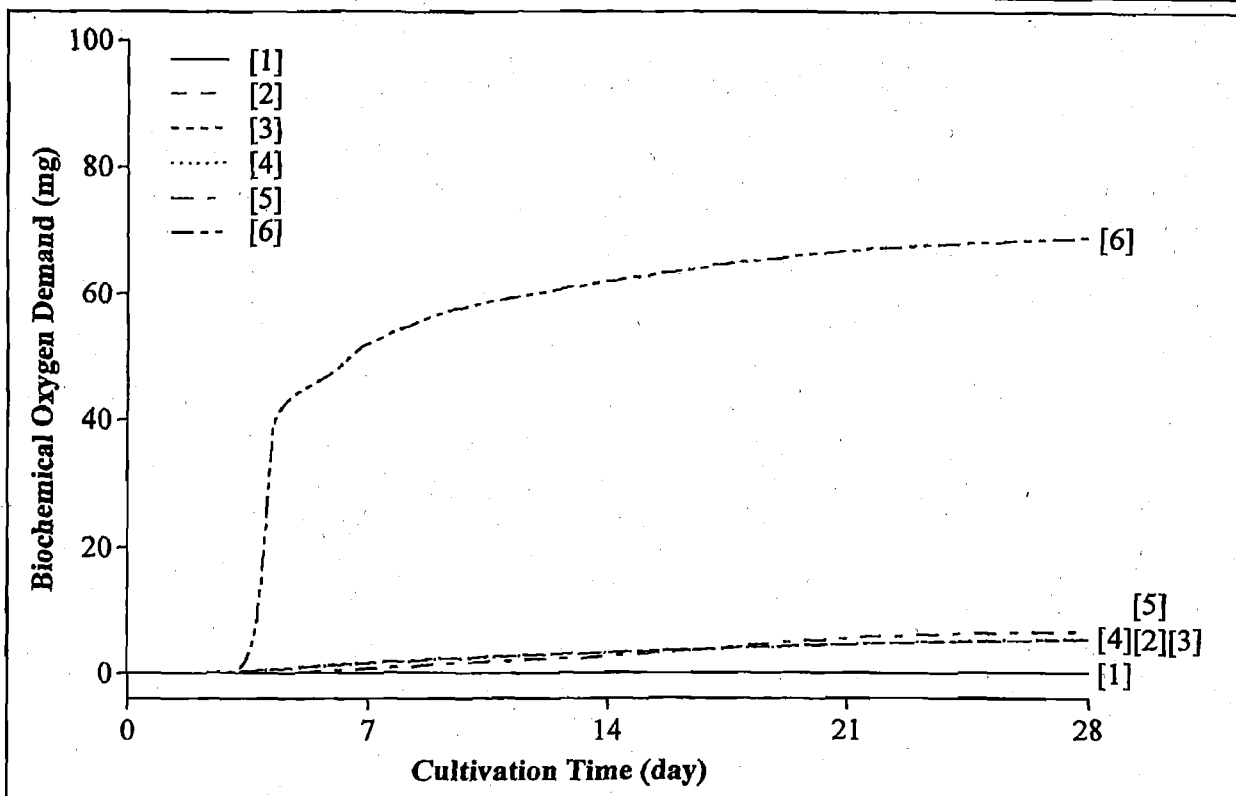


Fig. 1 Chart of BOD.

Sep.1,2005 Name XXXXXXXXXX