

最終報告書

第三級アルキル（C4～8）過安息香酸エステル〔*tert*-ブチル＝ペルオキシ安息香酸（被験物質番号 K-1317）にて試験実施〕の微生物による分解度試験

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター 本部研究所

陳 述 書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

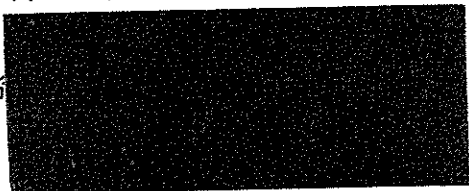
試験の表題 第三級アルキル（C4～8）過安息香酸エステル〔tert-ブチル＝
ペルオキシ安息香酸（被験物質番号 K-1317）にて試験実施〕の
微生物による分解度試験

試験番号 21317

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ついて」（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、昭和63年11月18日改正）に定める「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」及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」（May 12, 1981）に従って実施したものです。

平成10年7月22日

運営管理者



信 頼 性 保 証 書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 第三級アルキル (C4~8) 過安息香酸エステル [tert-ブチル=ペルオキシ安息香酸 (被験物質番号 K-1317) にて試験実施] の微生物による分解度試験

試験番号 21317

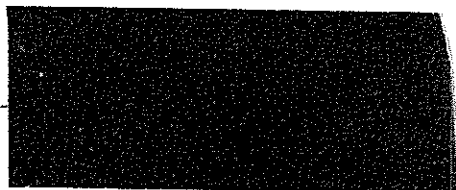
上記試験は財団法人化学品検査協会化学品安全センター久留米研究所の信頼性保証部門が監査及び査察を実施しており、監査又は査察を行った内容、日付並びに運営管理者及び試験責任者に報告を行った日付は以下の通りです。

監査又は査察内容	監査又は査察日	報告日 (運営管理者)	報告日 (試験責任者)
試験計画書	平成10年 2月24日	平成10年 2月24日	平成10年 2月24日
	平成10年 3月10日	平成10年 3月10日	平成10年 3月10日
	平成10年 3月25日	平成10年 3月25日	平成10年 3月25日
	平成10年 4月 1日	平成10年 4月 1日	平成10年 4月 1日
	平成10年 4月 9日	平成10年 4月 9日	平成10年 4月 9日
	平成10年 5月19日	平成10年 5月19日	平成10年 5月19日
	平成10年 6月 5日	平成10年 6月 5日	平成10年 6月 5日
試験実施状況	平成10年 6月 8日	平成10年 6月18日	平成10年 6月16日
	平成10年 6月22日	平成10年 7月 8日	平成10年 7月 8日
	平成10年 7月 6日	平成10年 7月 8日	平成10年 7月 8日
生データ及び最終報告書	平成10年 7月22日	平成10年 7月22日	平成10年 7月22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。

平成10年 7月22日

信頼性保証部門責任者



目 次

	頁
要 約	1
1. 表 題	2
2. 試験委託者	2
3. 試験施設	2
4. 試験目的	2
5. 試験方法	2
6. 適用する優良試験所基準	2
7. 試験期間	3
8. 試験関係者	3
9. 最終報告書の作成	3
10. 被験物質	4
11. 活性汚泥の調製	6
12. 分解度試験の実施	7
13. 試験条件の確認	16
14. 試験結果	16
15. 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	19
16. 試資料の保管	20
17. 備 考	20
18. 表及び図の内容	21

付表及び付図

要 約

1. 試験の表題

第三級アルキル（C 4 ～ 8）過安息香酸エステル [*t e r t* -ブチル = ペルオキシ安息香酸（被験物質番号 K - 1 3 1 7）にて試験実施] の微生物による分解度試験

2. 分解度試験

2.1 試験条件

- (1) 被 験 物 質 濃 度 1 0 0 mg/L
- (2) 活 性 汚 泥 濃 度 3 0 mg/L（懸濁物質濃度として）
- (3) 試 験 液 量 3 0 0 mL
- (4) 試験液培養温度 2 5 ± 1 °C
- (5) 試験液培養期間 2 8 日間

2.2 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（B O D）の測定
- (2) 全有機炭素分析法（T O C）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（H P L C）による被験物質の分析

3. 試験結果

- | | | | |
|--------------------|-------------------------------|----|---------|
| (1) B O D による分解度 | 3 9 %, 3 2 %, 2 5 % | 平均 | 3 2 % |
| (2) T O C による分解度 | 6 2 %, 6 4 %, 6 3 % | 平均 | 6 3 % |
| (3) H P L C による分解度 | 1 0 0 %, 1 0 0 %, 1 0 0 % | 平均 | 1 0 0 % |

4. 被験物質の安定性

被験物質は保管条件下で安定であることを確認した。

最 終 報 告 書

試験番号 21317

1. 表 題 第三級アルキル (C4~8) 過安息香酸エステル [tert-ブチル=ペルオキシ安息香酸 (被験物質番号 K-1317) にて試験実施] の微生物による分解度試験
2. 試験委託者 名 称 通商産業省
住 所 (〒100-8901) 東京都千代田区霞が関一丁目3番1号
3. 試験施設 名 称 財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター久留米研究所
住 所 (〒830-0023) 福岡県久留米市中央町19-14
TEL (0942) 34-1500
運営管理者 [REDACTED]
4. 試験目的 K-1317の微生物による分解性の程度について知見を得る。
5. 試験方法 「新規化学物質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 Guidelines for Testing of Chemicals」(July 17, 1992)に定める "Ready Biodegradability : 301C, Modified MITI Test (I)" に準拠した。
6. 適用する優良試験所基準 「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ついて」(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、昭和63年11月18日改正)に定める「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」(以下「GLP基準」という。)及び「OECD Principles of Good Laboratory Practice」(May 12, 1981)に適合して行った。

7. 試験期間

- (1) 試験開始日 平成10年 2月24日
- (2) 試験液培養開始日 平成10年 6月 8日
- (3) 試験液培養終了日 平成10年 7月 6日
- (4) 試験終了日 平成10年 7月16日

8. 試験関係者

試験責任者

試験担当者

活性污泥管理責任者

試資料管理部門責任者

9. 最終報告書の作成

平成10年 7月16日

試験責任者

氏名

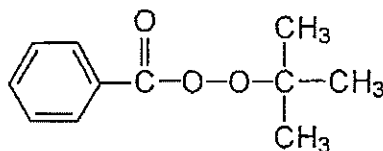
10. 被 験 物 質

本報告書においてK-1317は、次の名称及び構造式等を有するものとする。

10.1 名 称 *t e r t*-ブチル＝ペルオキシ安息香酸

10.2 構造式等

構造式



分子式 $C_{11}H_{14}O_3$

分子量 194.23

10.3 純 度^{*1}

被 験 物 質 98%

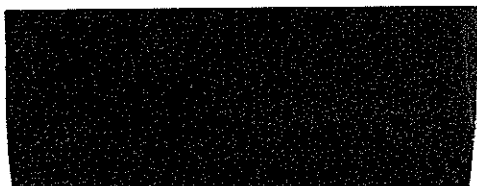
被験物質濃度は不純物の含量を補正せずに表示した。

10.4 入手先、商品名及びロット番号^{*1}

(1) 入 手 先

(2) 商 品 名

(3) ロット番号



*1 入手先添付資料による。

10.5 被験物質の確認

ALDRICH LIBRARY に記載の赤外吸収スペクトルと当研究所において測定したスペクトルが一致することを確認した (Fig. 8 参照)。また、質量スペクトル (Fig. 9 参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Reference 1 参照) についても測定を行い、構造を確認した。

10.6 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 試験液培養開始前及び培養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. 8 参照)。

11. 活性汚泥の調製

11.1 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 平成10年 3月

11.2 採集方法

(1) 都 市 下 水 下水処理場の返送汚泥

(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

11.3 新旧汚泥の混合

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 上記で採集した各地の汚泥混合液のろ液10Lを、下記11.4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。

11.4 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。

これと等量の脱塩素水を加えて再びばっ気し、上澄交換液部の濃度が0.1%になるように合成下水^{*4}を加えた。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5(W/V)%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 に調整したものを用いた。

11.5 管理及び使用

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、活性汚泥の沈でん性、pH、温度及び溶存酸素濃度を測定し記録した。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。

11.6 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。また、旧活性汚泥との関連性に留意した。

(2) 活性汚泥使用開始日 平成10年 4月21日

12. 分解度試験の実施

12.1 試験の準備

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

測定方法 「工場排水試験方法、懸濁物質」(JIS K 0102-1993 の 14.1) に準じて行った。

測定実施日 平成10年 6月 8日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は3600mg/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 0102-1993 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

アニリン(昭和化学製 試薬特級 ロット番号 SH-2842Y)を用いた。

12.2 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、12.3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⑥)

試験容器に精製水300mLを入れ、被験物質濃度が100mg/Lになるようにマイクロシリンジで29.0 μ L [添加量30.1mg = 29.0 μ L \times 1.038g/cm³ (密度)] 分取して添加した。

(b) (汚泥+被験物質)系(3個, 試験容器③④⑤)

試験容器に基礎培養基(300mL-活性汚泥添加液量(mL))を入れ、被験物質濃度が100mg/Lになるようにマイクロシリンジで29.0 μ L [添加量30.1mg = 29.0 μ L \times 1.038g/cm³ (密度)] 分取して添加した。

(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-活性汚泥添加液量(mL))を入れ、アニリン濃度が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②)

試験容器に基礎培養基(300mL-活性汚泥添加液量(mL))を入れた。

(2) 活性汚泥の接種

(b), (c)及び(d)の試験液に11. 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。

12.3 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（旭テクネイオン製 クーロメーター）

（旭テクネイオン製 データ処理装置）

試験容器 300 mL用培養瓶（揮発性物質用改良型）

炭酸ガス吸収剤 ソーダライム, Na1

（和光純薬工業製 二酸化炭素吸収用）

撈拌方法 マグネチックスターラーによる回転撈拌

(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

実施場所 511クーロ室

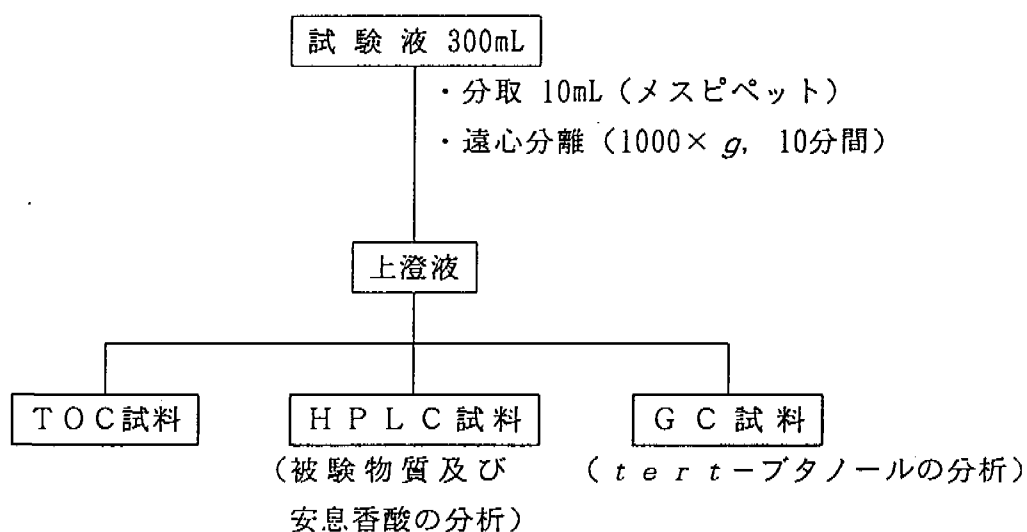
12.4 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中に残留している溶存有機炭素、被験物質、安息香酸及び *tert*-ブタノールについて分析した。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。

12.4.1 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、被験物質及び安息香酸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、*tert*-ブタノールを分析するためのガスクロマトグラフィー（GC）試料とした。

フロースキーム



12.4.2 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T O C試料について、下記の定量条件に基づきD O Cを分析した。

試験液のD O C濃度は、全有機炭素計内のデータ処理装置により、全炭素（T C）標準溶液80.0mgC/L及び無機炭素（I C）標準溶液80.0mgC/Lのピーク面積を測定してそれぞれの検量線を設定し、T O C試料のD O Cを測定して求めた（Table-2 参照）。なお、T C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、I C標準溶液は炭酸水素ナトリウム（和光純薬工業製 等級 試薬特級）及び炭酸ナトリウム（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D O C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 T O C - 5 0 0 0
T C	炉 温 度	6 8 0 °C
流	量	1 5 0 mL/min
注 入	量	3 3 μL
感	度	レンジ 5

(2) 高速液体クロマトグラフィーによる被験物質及び安息香酸の分析

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分析した。HPLC試料中の被験物質の濃度は標準溶液104mg/L及びHPLC試料のクロマトグラム上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた(Table-3、Fig. 4参照)。また、安息香酸の濃度は標準溶液50.0mg/L及びHPLC試料のクロマトグラフ上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた(Table-4、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2000 μ V \cdot sec(被験物質濃度1.3mg/L、安息香酸濃度0.96mg/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		日本分光製 BIP-1
検出器		日本分光製 UVIDEC 100-V
カラム		L-column ODS 15cm \times 4.6mm I.D. ステンレス製
溶離液		アセトニトリル/0.3%りん酸(7/3 V/V)
流量		1.0 mL/min
測定波長		273 nm (Fig. 7 参照)
注入量		20 μ L
検出器		
記録計出力		10 mV
レンジ		0.04

(b) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質及び安息香酸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。

①被験物質

被験物質 $50.0\mu\text{L}$ [$51.9\text{mg}=50.0\mu\text{L}\times 1.038\text{g}/\text{cm}^3$ (密度)] 分取し、アセトニトリルに溶解して $1038\text{mg}/\text{L}$ の被験物質溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して $104\text{mg}/\text{L}$ の標準溶液とした。

②安息香酸

安息香酸（和光純薬工業製 等級 試薬特級） 50mg を正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して $1000\text{mg}/\text{L}$ の安息香酸溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して $50.0\text{mg}/\text{L}$ の標準溶液とした。

(c) 検量線の作成

①被験物質

(b)①の標準溶液の調製と同様にして 26.0 、 51.9 及び $104\text{mg}/\text{L}$ 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安息香酸

(b)②の標準溶液の調製と同様にして 12.5 、 25.0 及び $50.0\text{mg}/\text{L}$ 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. 3 参照)。

(3) ガスクロマトグラフィーによる *tert*-ブタノールの分析

前処理を行って得られたGC試料について、下記の定量条件に基づき分析した。GC試料中の *tert*-ブタノールの濃度は標準溶液40.0mg/L及びGC試料のクロマトグラム上で得られたピーク面積を比較し、比例計算して求めた (Table-5、Fig. 6 参照)。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して $350 \mu V \cdot sec$ (*tert*-ブタノール濃度0.62mg/L) とした。

(a) 定量条件

機	器	ガスクロマトグラフ
		島津製作所製 GC-9A
検	出	器
カ	ラ	ム
液	相	40m×1.2mm I.D. ガラス製
カ	ラ	ム
温	度	G-300 膜厚 2.0 μm
試	料	導
入	部	温
度		100℃
キ	ャ	リ
ヤ	ー	ガ
ス		ス
ヘ	リ	ウ
ム		20 mL/min
水		素
0.	6	kg/cm ²
空		気
0.	5	kg/cm ²
注	入	量
1		μL
感		度
検	出	器
レ	ン	ジ
1	0	

(b) 標準溶液の調製

分析試料中の *tert*-ブタノール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。

tert-ブタノール (東京化成工業製 等級 TCI-EP) 100mgを正確にはかりとり、精製水に溶解して1000mg/Lの *tert*-ブタノール溶液を調製した。これを精製水で希釈して40.0mg/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10.0、20.0及び40.0mg/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. 5 参照)。

12.5 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

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

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) HPLCによる分解度^{*6}

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{S_w - S_s}{S_w} \times 100$$

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)

*6 HPLCによる分解度の算出は、12.4.2での分析においてピーク面積が定量下限を越えなかったため、残留量を0として計算した。

12.6 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8202-1985 参考3規則Bに従った。

13. 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70%及び93%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）。

14. 試験結果

14.1 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	p H
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	不溶物は認められなかった。	⑥ 4.2
	（汚泥 + 被験物質）系	汚泥の増殖が認められた。	③ 5.9
		汚泥以外の不溶物は認められなかった。	④ 5.9 ⑤ 5.9

14.2 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.
		[6]	[3]	[4]	[5]			
B O D ^{*7}	mg	1.1	25.1	20.6	15.9	64.4	1	1
DOC残留量 及び残留率	mgC	20.0	7.7	7.2	7.3	20.5	2	—
	%	97	38	35	36	—		
被験物質残留 量及び残留率 (HPLC)	mg	22.2	0	0	0	30.1	3	4
	%	74	0	0	0	—		
安息香酸生成 量及び生成率 (HPLC)	mg	4.4	0	0	0	18.9	4	4
	%	23	0	0	0	—		
tert-7'タノール 生成量及び 生成率 (GC)	mg	0.8	10.5	11.0	11.1	11.5	5	6
	%	7	91	96	96	—		

*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。

14.3 分 解 度

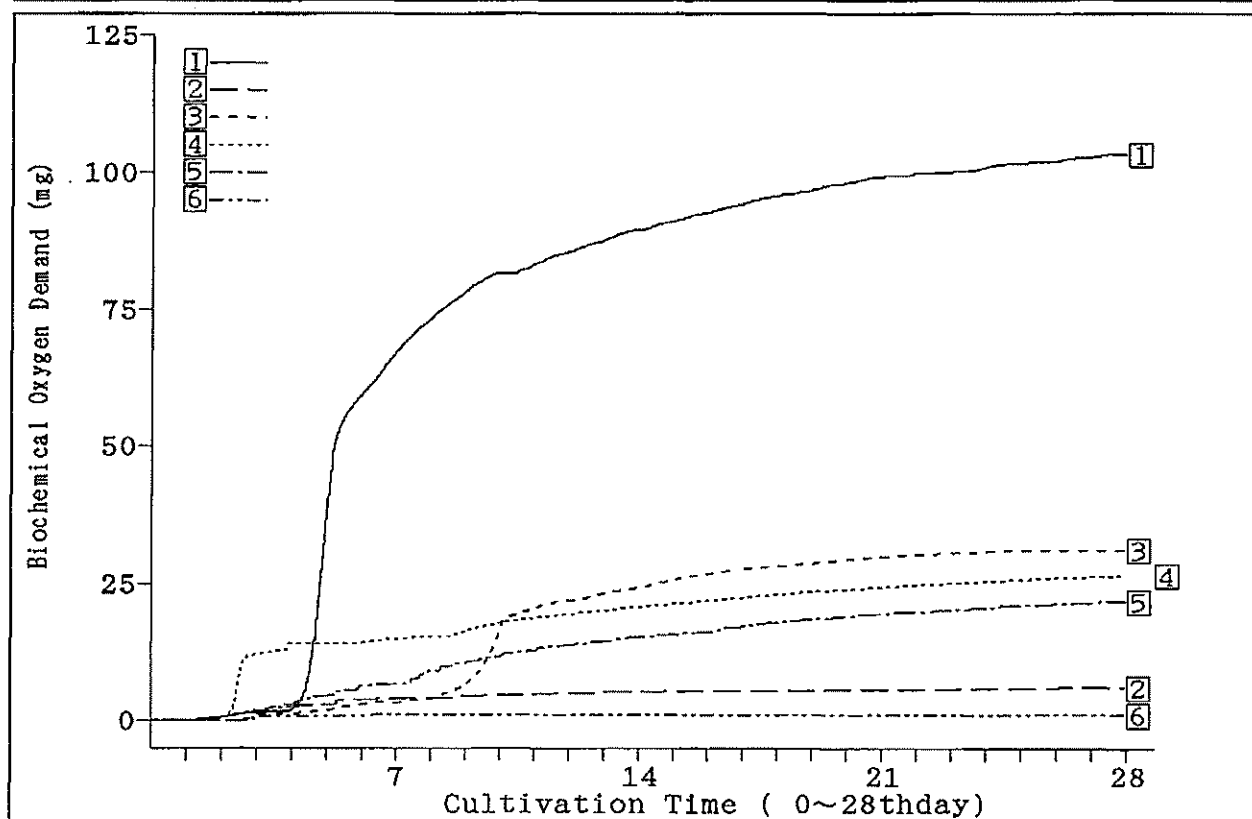
28日後の分解度は下記のとおりであった。

	分 解 度 (%)				Table
	③	④	⑤	平 均	
B O D による結果	3 9	3 2	2 5	3 2	1
T O C による結果	6 2	6 4	6 3	6 3	2
H P L C による結果	1 0 0	1 0 0	1 0 0	1 0 0	3

Fig.1 Chart of BOD

Test No. 21317-2 (Test substance K-13/7)
 Apparatus AT 32 7/6 H2A No. CM-35
 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(Jun.8~Jul.6,1998)
 Note: Regular test

Vessel no.	Sample description	B O D (mg)			
		7thday	14thday	21stday	28thday
①	Sludge + Aniline	67.5	89.6	99.3	103.5
②	Control blank [B]	4.1	5.4	5.8	6.2
③	Sludge + Test substance	3.5	24.4	30.1	31.3
④	Sludge + Test substance	15.0	21.0	24.6	26.8
⑤	Sludge + Test substance	6.8	15.4	19.7	22.1
⑥	Water + Test substance	1.1	1.1	1.1	1.1



1998.07.06 Name XXXXXXXXXX