

最 終 報 告 書

N-メチルカルバミン酸-2-sec-ブチルフェニル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九州試験所

保 証 書

財団法人 化学品検査協会
化学品安全センター九州試験所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 N-メチルカルバミン酸-2-sec-オプチルフェニルの微生物による分解度
試験

試験番号 20716

上記試験は、昭和59年3月31日付、環保業第39号、薬発第229号及び59基局
第85号による「新規化学物質に係る試験の項目等を定める命令第3条に規定する試験施
設に関する基準」に従って実施したものです。

昭和61年3月28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九州試験所

試験委託者 通商産業省

試験の表題 N-メチルカルバミン酸-2-sec-ブチルフェニルの
微生物による分解度試験

試験番号 20716

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九州試験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。

| 監査又は査察日 | 報告日(運営管理者) | 報告日(試験責任者) |
|-------------|-------------|-------------|
| 昭和61年 2月 5日 | 昭和61年 2月 5日 | 昭和61年 2月 5日 |
| 昭和61年 2月12日 | 昭和61年 2月13日 | 昭和61年 2月13日 |
| 昭和61年 3月 7日 | 昭和61年 3月13日 | 昭和61年 3月12日 |
| 昭和61年 3月12日 | 昭和61年 3月13日 | 昭和61年 3月12日 |
| 昭和61年 3月28日 | 昭和61年 3月28日 | 昭和61年 3月28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。

昭和 61 年 3 月 28 日
信頼性保証業務担当者

昭和 61 年 3 月 28 日
信頼性保証責任者

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. 試験期間 | 2 |
| 7. 試験関係者 | 3 |
| 8. 最終報告書の承認 | 3 |
| 9. 被験物質 | 4 |
| 10. 活性汚泥の調製 | 6 |
| 11. 分解度試験の実施 | 7 |
| 12. 試験結果 | 13 |
| 13. 考 察 | 14 |
| 14. 試資料の保管 | 15 |
| 15. 備 考 | 16 |
| 16. 表及び図の内容 | 17 |
| 付 表 | |
| 付 図 | |

要 約

1. 試験の表題

N-メチルカルバミン酸-2-sec-ブチルフェニル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 100 mg/l
- (2) 活性汚泥濃度 30 mg/l (懸濁物質濃度として)
- (3) 試験液量 300 ml
- (4) 試験液培養温度 25 ± 1 °C
- (5) 試験液培養期間 28 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 (BOD) の測定
- (2) 全有機炭素計 (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 (HPLC) による被験物質の分析

3. 試験結果

| | | | |
|------------------|-----|-----|-----|
| (1) BOD による分解度 | 1 % | 0 % | 0 % |
| (2) TOC 法による分解度 | 1 % | 1 % | 0 % |
| (3) HPLC 法による分解度 | 2 % | 3 % | 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 20716

1. 表 題 N-メチルカルバミン酸-2-sec-ブチルフェニル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) 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九州試験所
住 所 (〒830) 福岡県久留米市中央町19-14
TEL (0942) 34-1500
運営管理者 XXXXXXXXXX
4. 試験目的 N-メチルカルバミン酸-2-sec-ブチルフェニル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〉による。
6. 試験期間
 - (1) 試験開始日 昭和61年 2月10日
 - (2) 試験実施期間
活性汚泥使用開始日 昭和60年11月18日
試験液培養開始日 昭和61年 2月12日
試験液培養終了日 昭和61年 3月12日
 - (3) 試験終了日 昭和61年 3月28日

7. 試験関係者

試験責任者

[REDACTED]

試験担当者

[REDACTED]

活性汚泥管理責任者

[REDACTED]

試資料管理責任者

[REDACTED]

最終報告書作成者

昭和61年 3月17日

[REDACTED]

8. 最終報告書の承認

試験責任者

昭和61年 3月28日

氏名

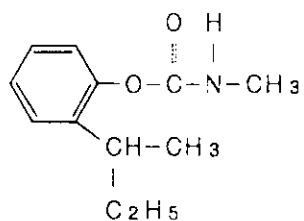
[REDACTED]

9. 被験物質

9.1 名 称 N-メチルカルバミン酸-2-sec-ブチルフェニル
(被験物質番号 K-716)

9.2 構造式等

構造式



分子式 C₁₂H₁₇NO₂

分子量 207.27

9.3 純 度*¹ 97.4%
不純物 2-sec-ブチルフェノール 0.90%, N-メチルカルバミン酸
-4-sec-ブチルフェニル 0.83%, トルエン 0.29%

*¹ 添付資料による。

9.4 提供者及びロット番号

(1) 提 供 者 [REDACTED] (商品名 [REDACTED])
(2) ロット番号 B-5601

9.5 同 定

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により構造を確認した。

9.6 物理化学的性状

| | | |
|-------------------|------------------------------|-----------|
| 外 観 | 無色透明粘稠液体 | |
| 融 点 ^{*1} | 26.5~31℃ | |
| 沸 点 ^{*1} | 112~113℃/0.2mmHg | |
| 密 度 ^{*1} | 1.050g/cm ³ (20℃) | |
| 溶解性 | 水 | 約 600mg/l |
| | ヘキサン | 100g/l以上 |
| | クロロホルム | 100g/l以上 |
| | 酢酸エチル | 100g/l以上 |
| | メタノール | 100g/l以上 |

赤外吸収スペクトル (図-8.9参照)

質量スペクトル (図-11参照)

核磁気共鳴スペクトル (図-13参照)

紫外吸収スペクトル (図-14参照)

*1 添付資料による。

9.7 保管条件及び保管条件下での安定性

- (1) 保 管 条 件 冷蔵所
- (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(図-9参照)、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。

10. 活性汚泥の調製

10.1 汚泥の採集場所及び時期

(1) 場 所 下記の全国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（新潟県西蒲原郡） |
| 古野川（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 昭和60年 9月

10.2 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

10.3 新旧汚泥の混合

上記で採集してきた各地の汚泥のろ液をそれぞれ 500ml と、それまで試験に供していた旧活性汚泥のろ液 5ℓ とを混合して 10ℓ とし、pH を 7 ± 1 に調整して培養槽でばっ気^{*2}した。

*2 ばっ気

屋外空気をプレフィルターに通し、ばっ気に用いた。

10.4 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、これと等量の 0.1% 合成下水^{*3}を加えて再びばっ気した。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。

*3 0.1% 合成下水

グルコース、ペプトン、りん酸一カリウムそれぞれ 0.1(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 ± 1 に調整したものをを用いた。

10.5 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. 分解度試験の実施

11.1 試験の準備

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

測定方法 JIS K 0102-1985 の14.1に準じて行った。

測定実施日 昭和61年 2月10日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は6500mg/lであった。

(2) 基礎培養基の調製

JIS K 0102-1985 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）を用いた。

11.2 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、11.3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)

試験容器に精製水 300mlを入れ、被験物質を 100mg/lになるように添加した。

(b) (汚泥+被験物質)系(3個)

試験容器に基礎培養基 300mlを入れ、被験物質を 100mg/lになるように添加した。

(c) (汚泥+アニリン)系(1個)

試験容器に基礎培養基 300mlを入れ、アニリンを 100mg/lになるように添加した。

(2) 活性汚泥の接種

(b), (c) 及び汚泥ブランク系(試験容器に基礎培養基のみ 300mlを入れたもの1個)の試験容器に10. 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。

11.3 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(大倉電気製 クーロメーター)

試験容器 300ml用培養ビン

炭酸ガス吸収剤 ソーダライム, No.1 (和光純薬工業製 試薬一級)

攪拌方法 マグネチックスターラーによる回転攪拌

(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 第6機器室

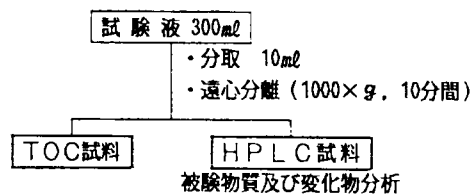
11.4 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中に残留している溶存有機炭素、被験物質及び変化物を分析した。

(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下記のフロースキームに従って前処理操作を行い、溶存有機炭素を分析するための全有機炭素計（TOC）試料とし、被験物質及び変化物を分析するための高速液体クロマトグラフ（HPLC）試料とした。

フロースキーム



(2) 全有機炭素計による溶存有機炭素の分析

前処理を行って得られたTOC試料について下記定量条件に基づき溶存有機炭素を分析した。

試験液の溶存有機炭素は記録紙上から得られたTOC標準溶液80.0mgC/lのピーク高さとしてTOC試料のピーク高さとを比較し、比例計算して求めた(表-2、図-2参照)。なお、TOC標準溶液はフタル酸水素カリウムを精製水に溶解して調製した。

ピーク高さの測定限界はノイズレベルを考慮して2mm(溶存有機炭素濃度1mgC/l)とした。

定量条件

| | | |
|-----------|--------|---------|
| 機 器 | 島津製作所製 | TOC-10B |
| T C 炉 温 度 | 900 | ℃ |
| 流 量 | 200 | ml/分 |

(3) 高速液体クロマトグラフによる被験物質及び変化物の分析

前処理を行って得られたHPLC試料について下記定量条件に基づき被験物質及び変化物を分析した。HPLC試料中の被験物質及び変化物の濃度はクロマトグラム上で得られた標準溶液100mg/l及び80.0mg/lのピーク高さとしてHPLC試料のピーク高さとを比較し、比例計算して求めた(表-3、4、図-3、4参照)。

ピーク高さの測定限界はノイズレベルを考慮して2mm(被験物質濃度2mg/l及び変化物濃度1mg/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 | ウォーターズ製 6000A |
| 検 出 器 | 日本分光工業製 UVIDEC-100-III |
| カ ラ ム | ERC-ODS-1151 5cm×6mmφ、ステンレス製 |
| 溶 離 液 | メタノール/水(65/35 V/V) |
| 測 定 波 長 | 被験物質 261nm (図-14参照) 変 化 物 275nm (図-15参照) |

(b) 検量線の作成

・被験物質

被験物質 100.0mgをメタノールに溶解し、100mlに定容して1000mg/lの標準原液を調製した。これを精製水で希釈して25.0、50.0及び100mg/lの標準溶液とした。この標準溶液を前記の定量条件に従ってHPLC分析を行い、それぞれのピーク高さと濃度とに基づき検量線を作成した（図-5参照）。

・変化物

市販試薬2-sec-ブチルフェノール 100.0mgをメタノールに溶解し、100mlに定容して1000mg/lの標準原液を調製した。これを精製水で希釈して20.0、40.0、80.0mg/lの標準溶液及び12.5、25.0、50.0mg/lの標準溶液とした。この標準溶液を前記の定量条件に従ってHPLC分析を行い、それぞれのピーク高さと濃度とに基づき検量線その1及びその2を作成した（図-6、7参照）。

11.5 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^{*4} : 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)

*4 純度100%として計算した。

(2) TOC法による分解度

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

DOC_A : (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_B : (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法による分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{S_B - S_A}{S_B} \times 100$$

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

S_B^{*5} : 被験物質の添加量 (mg)

*5 被験物質が水中で変化したため添加量とした。

11.6 数値の取扱い

数値を平均する場合、平均は算術平均とした。数値の丸め方は JIS Z 8401-1961に従った。

12. 試験結果

12.1 試験液の状況

培養期間中の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 | 約2時間攪拌後、溶解した。 | 6.1 |
| | (汚泥+被験物質)系 | 同 上 | 6.9 |
| 培養終了時 | (水+被験物質)系 | 培養開始時と変化は見られなかった。 | 9.3 |
| | (汚泥+被験物質)系 | 同 上 汚泥の増殖は見られなかった。 | 7.1 |

12.2 分解度

28日後の分解度は下記のとおりであった。

| | 分 解 度 (%) | | | 付 表 |
|------------|-----------|---|---|-----|
| | ③ | ④ | ⑤ | |
| BODによる結果 | 1 | 0 | 0 | 表-1 |
| TOC法による結果 | 1 | 1 | 0 | 表-2 |
| HPLC法による結果 | 2 | 3 | 0 | 表-3 |

12.3 試験条件の確認

BODから求めたアニリンの7、14日後の分解度はそれぞれ61及び77%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。

13. 考 察

予備検討の結果、培養終了時の（水+被験物質）系試験液のHPLC分析において、被験物質ピーク以外のピークが検出された。その試験液からクロロホルム抽出した試料について質量スペクトルを測定した結果、変化物として2-sec-ブチルフェノール（官報公示整理番号 3-503）の生成が確認された（図-12-2参照）。そこで、本試験においては市販試薬を用いてHPLC分析により変化物を定量し、その生成率を調べた。本試験の分析結果は表-8のとおりであった（表-2、3、4、図-2、3、4参照）。

TOC分析の結果、（水+被験物質）系及び（汚泥+被験物質）系ともにDOCは残留していた。しかし、HPLC分析の結果pHが著しく上昇した（水+被験物質）系ではK-716本体が減少して変化物が生成し、（汚泥+被験物質）系では本体が残留して変化物は生成していなかった。

表-8 本試験分析結果（28日後）

| 試 験 液 | pH | | HPLC分析 | | | TOC分析 |
|-------------|-------|-------|-----------------|-------------|---------|-----------|
| | 培養開始時 | 培養終了時 | K-716 本体残留率 (%) | 変化物 生成率 (%) | 収 支 (%) | 残 留 率 (%) |
| ⑥ 水 + 被験物質 | 6.1 | 9.3 | 3 | 105 | 108 | 101 |
| ③ 汚泥 + 被験物質 | 6.9 | 7.1 | 98 | 0 | 98 | 100 |
| ④ 汚泥 + 被験物質 | 6.9 | 7.1 | 97 | 0 | 97 | 100 |
| ⑤ 汚泥 + 被験物質 | 6.9 | 7.1 | 101 | 6 | 107 | 105 |
| 付 表 | | | 表 - 3 | 表 - 4 | | 表 - 2 |

別途実施した開放系試験における（水+被験物質）系の分析結果は、表-9のとおりである（表-5、6、7、図-16、17、18参照）。変化物が生成したのはソーダライム有の系のみで、その系は試験液のpHが著しく上昇した。この結果から、変化物の生成はソーダライムに起因するものと考えられる。また、（汚泥+被験物質）系では基礎培養液の緩衝作用の為に、変化物が生成しなかったものと考えられる。

表-9 開放系試験分析結果

| 試験液 (ソーダライム) | pH | | | | HPLC分析 変化物生成率(%) | | |
|--------------|-----|-----|------|------|---------------------|------|------|
| | 溶解時 | 7日後 | 14日後 | 28日後 | 7日後 | 14日後 | 28日後 |
| 水+被験物質-1(有) | 5.4 | 7.6 | 8.1 | 8.6 | 7 | 37 | 76 |
| 水+被験物質-2(有) | 5.6 | 7.9 | 8.1 | 8.6 | 8 | 43 | 87 |
| 水+被験物質-3(無) | 5.4 | 5.4 | 4.9 | 5.7 | 2 | 1 | 2 |
| 水+被験物質-4(無) | 4.9 | 5.7 | 5.0 | 5.0 | 1 | 1 | 1 |
| 付 表 | | | | | 表-5 | 表-6 | 表-7 |

以上より、本被験物質は(水+被験物質)系でソーダライムの影響により加水分解し、2-sec-ブチルフェノールを生ずるが、(汚泥+被験物質)系では残留しており、活性汚泥による生分解性は無いものと考えられる。

14. 試資料の保管

14.1 被験物質

保管用被験物質約5gを保管用容器に入れ密栓後、「新規化学物質に係る試験の項目等を定める命令第3条に規定する試験施設に関する基準」(以下「試験施設基準」という。)第32条に定める期間、当試験所試料保管室に保管する。

14.2 生データ、資料等

試験により得られた分析結果、測定結果、観察結果、その他試験ノート等最終報告書の作成に用いた生データ、試験計画書、調査表、資料等は最終報告書と共に、「試験施設基準」第32条に定める期間、当試験所資料保管室に保管する。

15. 備 考

15.1 試験に使用した機器及び装置

| | | |
|-------------|---|----------------------|
| クーロメーター | : | 8頁参照 |
| 全有機炭素計 | : | 10頁参照 |
| 高速液体クロマトグラフ | : | 10頁参照 |
| 天 び ん | : | Sartorius社製 2007 MP6 |
| p H 計 | : | 東亜電波工業製 HM-20E |
| 紫外可視分光光度計 | : | 日立製作所製 200-20 |

15.2 分析に使用した試薬

| | | |
|----------------|---|---------------|
| フタル酸水素カリウム | : | 和光純薬工業製 試薬特級 |
| メタノール | : | 和光純薬工業製 HPLC用 |
| 精製水 | : | 高杉製薬製 日本薬局方 |
| 2-sec-ブチルフェノール | : | 東京化成工業製 試薬特級 |

図-1

クーロメーター 書記録図

Test substance K-716

Apparatus Coulometer No 210
range 250mg/l x 1

Cultivation condition
concentration
test substance mg/l
reference substance (Aniline) 100mg/l
activated sludge 30 mg/l
temperature 25 ± 1°C
period 2/12 ~ 3/12 (28 days) 1986

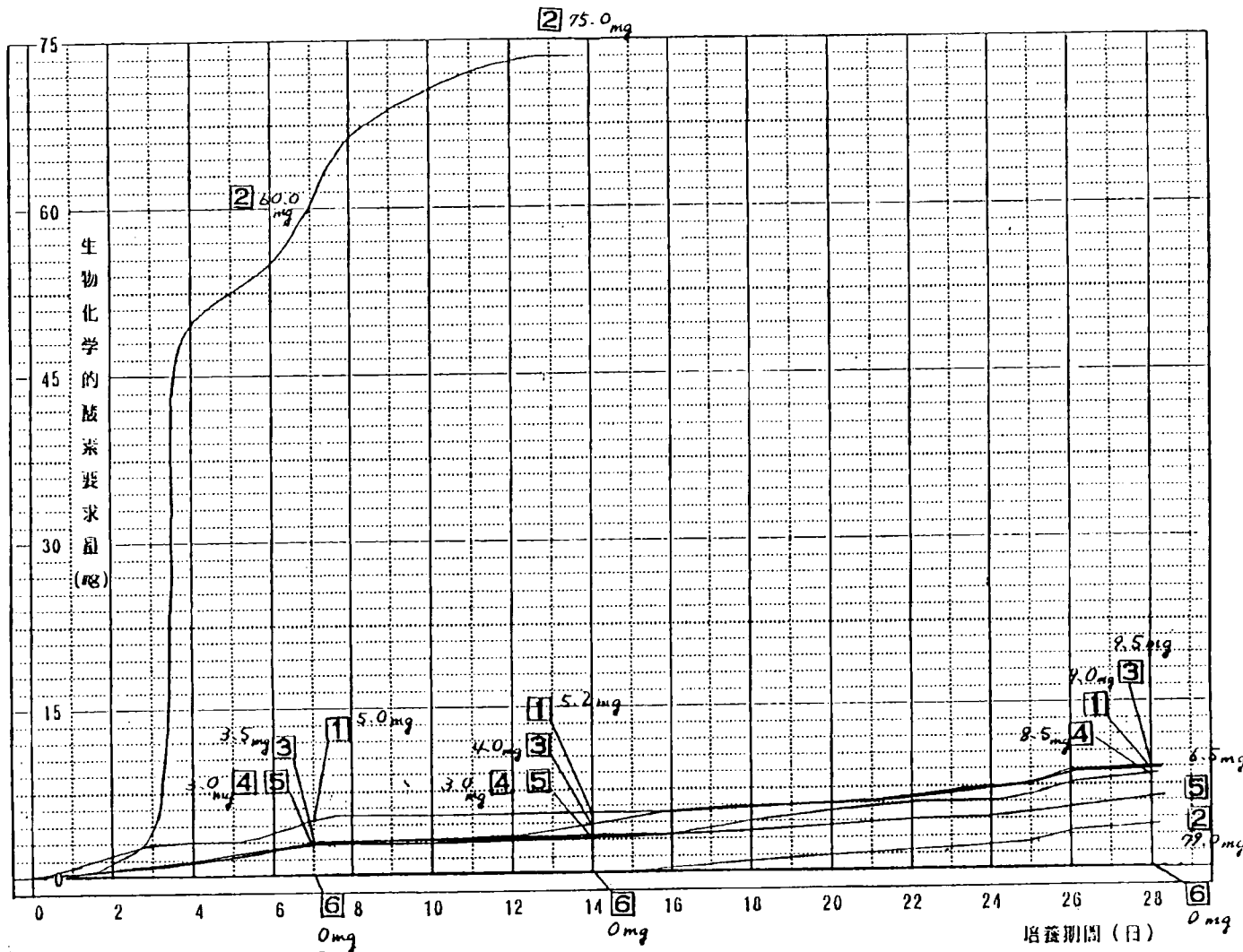
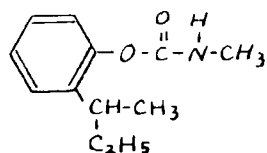
| Bottle No. | Contents |
|------------|----------|
| ① | 基礎呼吸 |
| ② | 汚泥+アニリン |
| ③ | 汚泥+被験物質 |
| ④ | 汚泥+被験物質 |
| ⑤ | 汚泥+被験物質 |
| ⑥ | 水+被験物質 |

Note : 本試験 標準条件

Operator

財団法人 化学品検査協会 化学品安全センター九州試験所

構造式



K-716 の分解度

$$\text{分解度} = (\text{BOD}-\text{B}) / \text{TOD} \times 100 = 1 \%$$

$$\text{分解度} = (\text{BOD}-\text{B}) / \text{TOD} \times 100 = 0 \%$$

$$\text{分解度} = (\text{BOD}-\text{B}) / \text{TOD} \times 100 = 0 \%$$

$$\text{TOD} = 30.0 \text{ mg} \times 0.80 = 24.0 \text{ mg}$$

$$7 \text{ 日目のアニリンの分解度} = (\text{BOD}-\text{B}) / \text{TOD} \times 100 = 61 \%$$

$$\text{アニリンのTOD} = 30.0 \times 3.01 = 90.3 \text{ mg}$$