

最 終 報 告 書

4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) の微生物による分解度試験

(試験番号 : 205172)

2009 年 3 月 16 日

財団法人化学物質評価研究機構

久留米事業所

本文書は正本を正確に電子化したものです。

財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

2009 年 3 月 16 日

試験責任者

最 終 報 告 書

4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) の微生物による分解度試験

(試験番号 : 205172)

2009 年 3 月 16 日

財団法人化学物質評価研究機構

水俣事業部

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 経済産業省

試験の表題 4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) の
微生物による分解度試験

試験番号 205172

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。

2009 年 3 月 16 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 経済産業省

試験の表題 4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) の
微生物による分解度試験

試験番号 205172

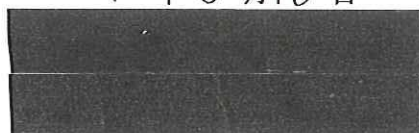
本最終報告書は、試験の方法、手順が正確に記載され、試験結果は生データを正確に反映していることを保証します。

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	2008 年 11 月 21 日	2008 年 11 月 21 日
試験計画書	2008 年 11 月 25 日	2008 年 11 月 25 日
試験計画書の変更	2008 年 12 月 24 日	2008 年 12 月 24 日
培養開始時	2008 年 11 月 26 日	2008 年 11 月 26 日
中間時	2008 年 12 月 10 日	2008 年 12 月 10 日
培養終了時	2008 年 12 月 24 日	2008 年 12 月 24 日
生データ、最終報告書草案	2009 年 3 月 10 日	2009 年 3 月 10 日
最終報告書	2009 年 3 月 16 日	2009 年 3 月 16 日

2009 年 3 月 16 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	8
4. 試験条件の確認	18
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	18
6. 試験結果	18
7. 備 考	25

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 detection of DOC
Table-4	Calculation table for percentage biodegradation of test item
Table-5	Calculation table for percentage production of 4,4'-biphenyldimethanol

Figures

- Fig. 1 Chart of BOD
- Fig. 2-1 Chromatograms of HPLC analysis for calibration curve (test item)
- Fig. 2-2 Calibration curve of test item
- Fig. 3-1 Chromatograms of HPLC analysis for calibration curve
(4,4'-biphenyldimethanol)
- Fig. 3-2 Calibration curve of 4,4'-biphenyldimethanol
- Fig. 4 Chromatograms of HPLC analysis for recovery test (test item)
- Fig. 5 Chromatograms of HPLC analysis for test solution
(test item , HPLC sample -1)
- Fig. 6 Chromatograms of HPLC analysis for test solution
(4,4'-biphenyldimethanol , HPLC sample -2)
- Fig. 7 PDA chromatograms of LC-MS analysis for test solution
(λ =250-340 nm, LC-MS sample -1, qualitative analysis of converted products)
- Fig. 8 Total ion current chromatograms of LC-MS analysis for test solution
(detection ion: positive, LC-MS sample -1, qualitative analysis of converted products)
- Fig. 9 Mass spectrum (mass chromatogram, detection ion: positive, [2] sludge + test item,
LC-MS sample -1, qualitative analysis of converted products)
- Fig. 10 Total ion current chromatograms of LC-MS analysis for test solution
(detection ion : negative, LC-MS sample -1, qualitative analysis of converted products)
- Fig. 11 Mass spectra (mass chromatograms, detection ion: negative, [2] sludge + test item,
LC-MS sample -1, qualitative analysis of converted products)
- Fig. 12 PDA chromatograms of LC-MS analysis for test solution
(λ =250-340 nm, LC-MS sample -2, qualitative analysis of converted products)
- Fig. 13 Total ion current chromatograms of LC-MS analysis for test solution
(detection ion : positive, LC-MS sample -2, qualitative analysis of converted products)
- Fig. 14 Total ion current chromatograms of LC-MS analysis for test solution
(detection ion : negative, LC-MS sample -2, qualitative analysis of converted products)
- Fig. 15 UV spectrum of test item
- Fig. 16 UV spectrum of 4,4'-biphenyldimethanol
- Fig. 17-1 IR spectrum of test item measured before experimental start
- Fig. 17-2 IR spectrum of test item measured after experimental completion
- Fig. 18 Mass spectrum of test item
- Fig. 19 NMR spectrum of test item

表 題	4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) の微生物による分解度試験
試験委託者	経済産業省 (〒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 (〒839-0801) 福岡県久留米市宮ノ陣三丁目 2 番 7 号
試験目的	K-1835 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 Guidelines 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	2008年11月25日
実験開始日	2008年11月26日
実験終了日	2008年12月24日
試験終了日	2009年3月16日

試験資料の保管

(1) 被験物質


供試試料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

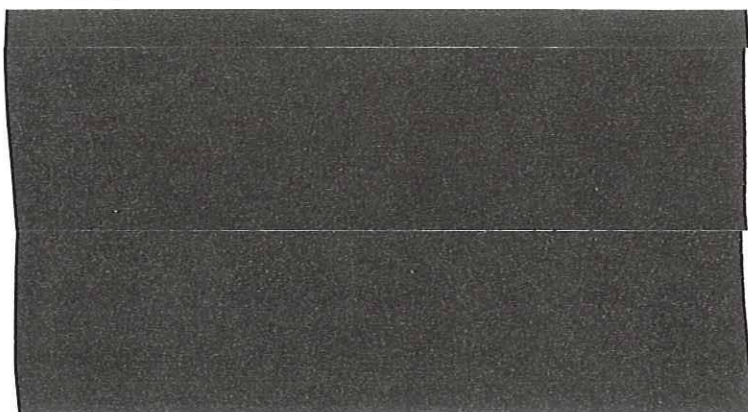
生データ、試験計画書、試験委託書、その他必要な資料等は最終報告書と共に、試験委託者から通知を受けるまでの期間、久留米事業所資料保管室に保管する。

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

2009年3月16日

試験責任者




要 約

試験の表題

4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル (被験物質番号 K-1835) の微生物による分解度試験

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℃
(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

- (1) 全有機炭素分析法 (TOC) による溶存有機炭素 (DOC) の定量分析
- (2) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による 4,4'-ビフェニルジメタノールの定量分析
- (3) 液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) によるその他の変化物の定性分析

試験結果

(1) BOD 分解度	-2%,	-2%,	-1%	平均	0% (-2%) *1
(2) 被験物質分解度 (HPLC)	4%,	7%,	-2%	平均	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。

結 論

本試験条件下において、被験物質の一部は加水分解し、4,4'-ビフェニルジメタノールが生成し、その一部はさらに微生物により酸化され、4'-ヒドロキシメチルビフェニル-4-カルボン酸及び4,4'-ビフェニルジカルボン酸が生成した。生成した4,4'-ビフェニルジメタノール、4'-ヒドロキシメチルビフェニル-4-カルボン酸、4,4'-ビフェニルジカルボン酸及び残りの被験物質は微生物により分解されなかった。

1. 被験物質

本報告書において K-1835 は、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称

4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル

1.2 構造式等

構 造 式



分 子 式 $C_{14}H_{12}Cl_2$

分 子 量 251.15

CAS 番号 1667-10-3

1.3 供給者、商品名及びロット番号^{*2}

供 給 者 [REDACTED]

商 品 名 4,4'-Bis(chloromethyl)biphenyl

ロット番号 [REDACTED]

^{*2} 供給者添付資料による。

1.4 純 度^{*2}

被 験 物 質 95.6% (GC による。)

不 純 物 残り 4.4%は不明

被験物質は純度 100%として取り扱った。

^{*2} 供給者添付資料による。

1.5 被験物質の確認

赤外吸収スペクトル (Fig. 17 参照)、質量スペクトル (Fig. 18 参照) 及び核磁気共鳴スペクトル (Fig. 19 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確認

保 管 条 件 冷暗所保存

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. 17 参照)。

2. 活性汚泥

2.1 活性汚泥の調製

本試験における活性汚泥は、以下のとおり調製したものを使用した。

(1) 採集場所

以下の全国 10 ヶ所から採集した。

伏古川水再生プラザ（北海道札幌市）	深芝処理場（茨城県神栖市）
中浜下水処理場（大阪府大阪市）	落合水再生センター（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) 採集方法

下水処理場	返送汚泥を採集
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を採集

(3) 採集時期

2008 年 9 月

(4) 調製方法

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 5 L と、約 3 ヶ月間培養した活性汚泥^{*3}のろ液 5 L とを混合して 10 L 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 10 L を、次頁 2.2 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。

2.2 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 10 L 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% になるように 50 g/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 50 g/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。

2.3 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、活性汚泥の沈でん性、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 18.5 時間後の活性汚泥を使用した。

2.4 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

2008 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 2008 年 11 月 25 日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は 3970 mg/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 3 mL に精製水（高杉製薬製 日本薬局方）を加えて 1 L 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（和光純薬工業製 試薬特級 ロット番号 ALL1583）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 100 mg/L になるように、試験容器に精製水 300 mL 及び供試試料 30 mg を入れた。供試試料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 100 mg/L になるように、試験容器に基礎培養基 [300 mL から活性汚泥添加液量 (2.27 mL) を差し引いた量] 及び供試試料 30 mg を入れた。供試試料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 100 mg/L になるように、試験容器に基礎培養基 [300 mL から活性汚泥添加液量 (2.27 mL) を差し引いた量] 及びアニリン 29.5 μ L [添加量 30 mg = 29.5 μ L \times 1.022 g/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 [300 mL から活性汚泥添加液量 (2.27 mL) 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 30 mg/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

300 mL 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（遮光下）

撹拌方法 マグネチックスターラーによる回転撹拌

(3) 実施場所

機器室 1A

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。

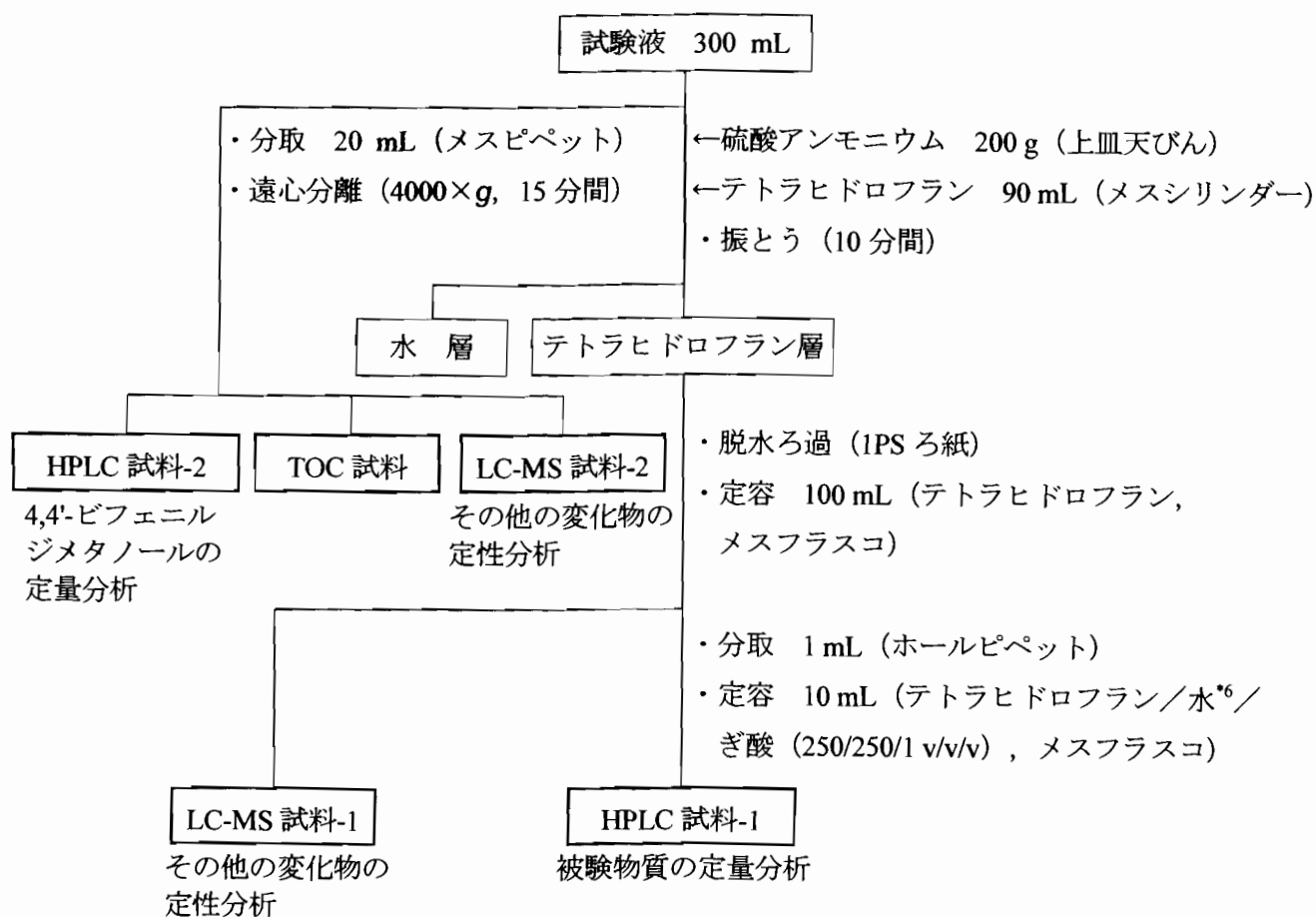
3.5 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中の被験物質及び予備試験の結果から生成が予想された変化物のうち定量可能な変化物である 4,4'-ビフェニルジメタノールについて分析し、塩化物イオンについては、生じる塩化物イオン量は少量であり、検出が困難であると予想されたため、分析は行わなかった。4,4'-ビフェニルジメタノール及び塩化物イオン以外の定量困難なその他の変化物（以後、その他の変化物と記す）について定性分析を行った。また、本試験に先立って実施した予備試験の結果より、被験物質は試験液に溶解しないことが明らかであるが、水溶性変化物の生成の有無を確認するために、試験液中の溶存有機炭素について分析した。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

（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、被験物質及び 4,4'-ビフェニルジメタノールを分析するための高速液体クロマトグラフィー（HPLC）試料並びにその他の変化物を定性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で処理した水。

3.5.2 定量分析及定性分析

(1) 全有機炭素分析法による溶存有機炭素の定量分析

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溶存有機炭素 (DOC) を分析した。

TOC 試料中の DOC 濃度は、TOC 標準溶液 80.0 mgC/L の二酸化炭素濃度と TOC 試料の二酸化炭素濃度とを比較し比例計算して求めた (Table-3 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。

定量下限濃度は DOC 濃度 1.0 mgC/L とした。

定 量 条 件

機	器	全有機炭素測定装置
		平沼産業製 TOC-2000
反	応	液
注	入	酸化チタン懸濁液 ^{*7}
	量	400 μ L

*7 酸化チタン粉末、70%過塩素酸溶液及び水^{*6}を用いて調製したもの。

(2) 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 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 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 30.0 mg/L のピーク面積と HPLC 試料-1 のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた (Table-4、Fig. 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 15000 $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (被験物質濃度 0.27 mg/L) とした。

(a) 定量条件

機 器	高速液体クロマトグラフ
	島津製作所製 LC-2010A (紫外可視分光検出器内蔵)
カ ラ ム	L-column ODS
	(15 cm×2.1 mm I.D., 化学物質評価研究機構製)
カ ラ ム 温 度	40°C
溶 離 液	A: テトラヒドロフラン/ギ酸 (500/1 v/v)
	B: 水 [※] /ギ酸 (500/1 v/v)
	グラジエント条件
	時間 (min) A (%) B (%)
	0.0 5 95
	2.0 5 95
	12.0 65 35
	25.0 65 35
流 量	0.2 mL/min
測 定 波 長	265 nm (Figs. 15, 16 参照)
注 入 量	2 μL
検 出 器 出 力	2 V/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。

供試試料 100 mg を正確にはかりとり、テトラヒドロフランに溶解して 1000 mg/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 300 mg/L の被験物質溶液を調製し、さらにテトラヒドロフラン/水[※]/ギ酸 (250/250/1 v/v/v) で希釈して 30.0 mg/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 30.0 mg/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)。

(3) 高速液体クロマトグラフィーによる 4,4'-ビフェニルジメタノールの定量分析

前処理を行って得られた HPLC 試料-2 について、下記の定量条件に基づき 4,4'-ビフェニルジメタノールを分析した。HPLC 試料-2 中の 4,4'-ビフェニルジメタノールの濃度は、クロマトグラム上で得られた標準溶液 30.0 mg/L のピーク面積と HPLC 試料-2 のピーク面積とを比較し、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 15000 $\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (4,4'-ビフェニルジメタノール濃度 0.31 mg/L) とした。

(a) 定 量 条 件

3.5.2(2)(a)参照。

(b) 標準溶液の調製

分析試料中の 4,4'-ビフェニルジメ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。

4,4'-ビフェニルジメタノール標品 (和光純薬工業製) ^{*8}100 mg を正確にはかりとり、テトラヒドロフランに溶解して 1000 mg/L の 4,4'-ビフェニルジメタノール溶液を調製する。これをテトラヒドロフランで希釈して 300 mg/L の 4,4'-ビフェニルジメタノール溶液を調製し、さらにテトラヒドロフラン/水^{*6}/ギ酸 (250/250/1 v/v/v) で希釈して 30.0 mg/L の標準溶液とした。

^{*8} ロット番号 KLL0228

純 度 98.1%

4,4'-ビフェニルジメタノールは純度 100%として取り扱った。

(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 30.0 mg/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)。

(4) 液体クロマトグラフィー質量分析法によるその他の変化物の定性分析

前処理を行って得られた LC-MS 試料-1 及び LC-MS 試料-2 について、下記の分析条件に基づきその他の変化物の定性分析を行った (Figs. 7~14 参照)。また、比較のため LC-MS 試料-1 の分析時に被験物質溶液及び 4,4'-ビフェニルジメタノール溶液についても同様に分析を行った。

(a) 分析条件

機 器	液体クロマトグラフィー質量分析計	
液体クロマトグラフ	Waters 製	Alliance 2695
質量分析計	Waters 製	ZQ2000
多波長検出器	Waters 製	2996PDA

液体クロマトグラフ条件

カラム	L-column ODS (15 cm×2.1 mm I.D., 化学物質評価研究機構製)		
カラム温度	40℃		
溶離液	A: テトラヒドロフラン／ぎ酸 (500/1 v/v) B: 水*6／ぎ酸 (500/1 v/v)		
	グラジエント条件		
	時間 (min)	A (%)	B (%)
	0.0	5	95
	2.0	5	95
	12.0	65	35
	25.0	65	35
流量	0.2 mL/min		
注 入 量	LC-MS 試料-1	5 μL	
	LC-MS 試料-2	10 μL	
測定波長	250～340 nm		

質量分析計条件

イオン化法	エレクトロスプレーイオン化法 (ESI)
検出イオン	正イオン及び負イオン
検出法	スキャン
走査質量範囲 (m/z)	150~600
イオン源温度	120°C
脱溶媒システム温度	400°C
コーン電圧	30 V

(b) 被験物質溶液及び 4,4'-ビフェニルジメタノール溶液の調製

LC-MS 分析に用いた被験物質溶液及び 4,4'-ビフェニルジメタノール溶液の調製は次のように行った。

① 被験物質溶液

3.5.2(2)(b)で調製した 300 mg/L の被験物質溶液を使用した。

② 4,4'-ビフェニルジメタノール溶液

3.5.2(3)(b)で調製した 300 mg/L の 4,4'-ビフェニルジメタノール溶液を使用した。

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 及び 3.5.2(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. 4 参照）。

（水＋被験物質）系回収率	95.8%, 96.3%	平均	96.1%
（汚泥＋被験物質）系回収率	95.8%, 96.9%	平均	96.3%

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

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

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 : 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)

(2) 被験物質分解度

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

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	1%	20%未満	6.3 項 分解度
	被 験 物 質 分 解 度	9%		
アニリンの BOD 分解度	7 日後	55%	40%以上	Table-1 Fig. 1
	14 日後	68%	65%以上	
汚泥ブランク系の BOD 値	28 日後	10.2 mg	18 mg 未満 (60 mg/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] 4.2
	(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] 7.0 [3] 7.0 [4] 6.9

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 ^{*9}	mg	1.9	-1.1	-1.2	-0.8	65.1	1	1
DOC 検出量及び 検出率 ^{*9}	mgC	2.5	2.4	3.2	2.0	20.1	3	-
	%①	12	12	16	10	-		
被験物質残留量 及び残留率 (HPLC)	mg	27.7	26.6	25.7	28.2	30.0	4	5
	%②	92	89	86	94	-		
4,4'-ビフェニル ジメタノール生 成量及び生成率 (HPLC)	mg	2.2	0.8	0.8	0.4	25.6	5	6
	%③	9	3	3	2	-		
塩化物イオン	mg	(汚泥+被験物質)系において、 有意な量としての検出が困難と 判断されたため、分析は実施しな かった (6.5(6)参照)。				8.5	-	-
	%					-		
物質収支 (①+②)	%	104	101	102	104	-	-	-
物質収支 (②+③)	%	101	92	89	96	-	-	-
その他の変化物 の検出・不検出 ^{*10} (LC-MS)	-	不検出	その他の変化物と考え られるピークが3本検出 された。			-	-	7~14

*9 (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。

*10 被験物質分析において、(汚泥+被験物質)系でその他の変化物ピークが検出されたが (Figs. 5, 6 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。

なお、被験物質は試験濃度（100 mg/L）以上水に溶解しないため、DOC 分解度は算出しなかった。

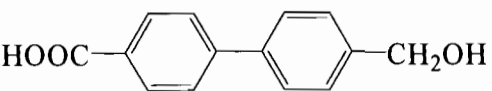
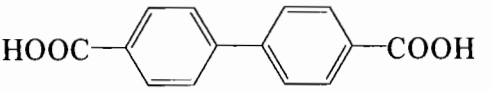
		(汚泥+被験物質) 系				Table
		[2]	[3]	[4]	平 均	
BOD 分解度	%	-2	-2	-1	0 (-2) ^{*1}	1
被験物質分解度 (HPLC)	%	4	7	-2	3	4

*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 その他の変化物の定性分析結果

被験物質分析において、（汚泥+被験物質）系の全ての試験液の HPLC クロマトグラム上に、4,4'-ビフェニルジメタノール以外の変化物由来と考えられるピークが 3 本検出された（Fig. 5 参照。以後、各々のピークに該当する成分を溶出順に変化物 A、B 及び C と記す）。そこで、LC-MS によりこれらの変化物について定性分析を行った。分析の結果、変化物 A 及び B の質量スペクトルを測定したところ、各変化物は下表に示す構造式及び分子量であると推定された（Figs. 7～14 参照）。変化物 C については、質量スペクトルを測定したが、構造式及び分子量は推定できなかった。また、（汚泥+被験物質）系の全ての試験液において、LC-MS 試料-1、LC-MS 試料-2 共に、変化物 A、B 及び C が検出されたことから、これらの変化物は水溶性であり、テトラヒドロフランに抽出される化合物であることが確認された（前処理フロースキーム 3.5.1 参照）。

（汚泥+被験物質）系で検出された変化物一覧表（Fig. 10 参照）

変化物 (溶出順)	推定構造式	推定分子量
A		228
B		242
C	不明	不明

6.5 考 察

(1) BOD 分解度

BOD 分解度は-1~-2%であり、汚泥の増殖も認められなかったことから、微生物による分解は生じなかったと考えられた。

(2) TOC 分析結果

(水+被験物質)系、(汚泥+被験物質)系共に、DOC 検出率は理論量の 10~16%であった。被験物質の対水溶解度は 20.1 µg/L (20℃) ^{*11}であることを考慮すると、水溶性変化物が生成したため、有意な DOC が検出されたと考えられた。

*11 「4,4'-ビス(クロロメチル)ビフェニル(被験物質番号 K-1835)のコイにおける濃縮度試験(試験番号 505171)」の最終報告書による。

(3) 被験物質分析結果

被験物質分析の結果、被験物質の残留率は(水+被験物質)系で 92%、(汚泥+被験物質)系で 86~94%であった。また、HPLC クロマトグラム上において、被験物質のピークの他に(水+被験物質)系で 1 本、(汚泥+被験物質)系で 4 本の変化物のピークが検出された(Fig. 5 参照)。従って一部の被験物質は変化していることが確認された。

(4) 4,4'-ビフェニルジメタノール分析の結果

予想変化物である 4,4'-ビフェニルジメタノールについて分析を行った。分析の結果、4,4'-ビフェニルジメタノールの生成率は(水+被験物質)系で 9%、(汚泥+被験物質)系で 2~3%であった。生成率は(水+被験物質)系よりも(汚泥+被験物質)系の方が低い値であった。

また、4,4'-ビフェニルジメタノールは試験液に 30 mg/L 以上溶解することから、(2)で述べた水溶性変化物は 4,4'-ビフェニルジメタノール由来であることが考えられた。なお、(水+被験物質)系における 4,4'-ビフェニルジメタノール生成量は 2.2 mg であり、DOC 量に換算すると 1.7 mgC^{*12}と算出される。一方、(水+被験物質)系の DOC 検出量は 2.5 mgC であり、0.8 mgC 高い値であったが、1 mgC 未満であり、有意差はないと考えられる。従って、(水+被験物質)系において水溶性変化物は全て 4,4'-ビフェニルジメタノールである可能性が高いと考えられた。一方(汚泥+被験物質)系の 4,4'-ビフェニルジメタノールの生成率は(水+被験物質)系よりも低い値であったが、(水+被験物質)系と同程度の 4,4'-ビフェニルジメタノールが生成したと考えられるが、微生物の影響でさらに変化した可能性があることが示唆された。

*12 $1.7 \text{ mgC} = 2.2 \text{ mg} \times 14\text{C} / \text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_2$

(4,4'-ビフェニルジメタノールの分子式: $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_2$)

(5) その他の変化物の定性分析の結果

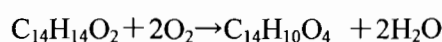
予想変化物の4,4'-ビフェニルジメタノール以外のその他の変化物ピークについて、LC-MSによる定性分析を行った。その結果、4,4'-ビフェニルジメタノール以外の変化物と考えられる変化物 A 及び B は被験物質の加水分解物である 4,4'-ビフェニルジメタノールの末端が微生物により酸化されて生成した 4'-ヒドロキシメチルビフェニル-4-カルボン酸及び 4,4'-ビフェニルジカルボン酸であると推定された。従って、(4)で述べた 4,4'-ビフェニルジメタノールの生成率が（水＋被験物質）系よりも（汚泥＋被験物質）系の方が低かった原因は、生成した 4,4'-ビフェニルジメタノールの一部が微生物により酸化され、さらに変化したためと考えられる。また、これらの酸化による変化は、4,4'-ビフェニルジメタノールの生成量が微量（0.3～0.8 mgO）^{*13}であるため、BOD の上昇は検出されなかったと考えられる。また、変化物 C に関しては構造式及び分子量を推定することはできなかった。

- *13 （汚泥＋被験物質）系試験液の被験物質減少率^{*14}分が全て 4,4'-ビフェニルジメタノールに変化し、さらに 4,4'-ビフェニルジメタノールの一部が 4,4'-ビフェニルジカルボン酸へ酸化されたと仮定した場合、酸化に必要な酸素量は以下のとおり。

	(汚泥＋被験物質) 系		
	[2]	[3]	[4]
被験物質減少率 (%) ①	11	14	6
4,4'-ビフェニルジメタノール生成率 (%) ②	3	3	2
4,4'-ビフェニルジカルボン酸生成率 (%) (①－②)	8	11	4
酸化に必要な酸素量 (mgO)	0.6	0.8	0.3

酸化に必要な酸素量 (mgO) =

$$30 \text{ (mg)} \times \frac{C_{14}H_{14}O_2}{C_{14}H_{12}Cl_2} \times \frac{4O}{C_{14}H_{14}O_2} \times (4,4'\text{-ビフェニルジカルボン酸生成率}) / 100$$



(4,4'-ビフェニルジメタノールの分子式 : $C_{14}H_{14}O_2$)

(4,4'-ビフェニルジカルボン酸の分子式 : $C_{14}H_{10}O_4$)

- *14 被験物質減少率 (%) = 100－被験物質残留率 (%)

(6) 塩化物イオンについて

塩化物イオンの理論生成量は 8.5 mg であるが、培養終了時の被験物質の残留率は 86%～94%と大部分が試験液中に残留していたことが確認され、塩化物イオンの生成量はわずかと考えられた。さらに（汚泥＋被験物質）系は基礎培養基由来として 16.9 mg の塩化物イオンが含まれている。以上より、汚泥ブランクと試験液との間で有意な差を検出することができないと判断し、塩化物イオンの分析については実施しなかった。なお、培養終了時の（汚泥＋被験物質）系試験液中の塩化物イオンの生成量について、被験物質の減少率^{*14} から算出（被験物質減少分全てが加水分解したと仮定）したところ、試験液 [2]、[3] 及び [4] についてそれぞれ 0.9、1.2 及び 0.5 mg と算出された^{*15}。

$$*15 \text{ 塩化物イオン生成量 (mg)} = 30 \text{ (mg)} \times \frac{2\text{Cl}}{\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{Cl}_2} \times \frac{\text{被験物質の減少率}^{*14} (\%)}{100}$$

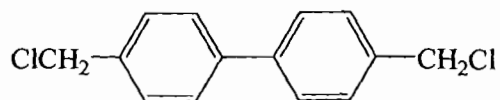
(7) 物質収支

被験物質、4,4'-ビフェニルジメタノールを合わせた物質収支は（水＋被験物質）系で 101%、（汚泥＋被験物質）系で 92%、89%及び 96%となった。（汚泥＋被験物質）系で 100%より若干低くなったが、これは 4,4'-ビフェニルジメタノール以外の変化物 A 及び B が生成したためであると考えられる。また、被験物質残留率と DOC 検出率の和による物質収支は（水＋被験物質）系で 104%、（汚泥＋被験物質）系で 101～104%と 100%より若干大きくなったが、物質収支は良好であった。

(8) ま と め

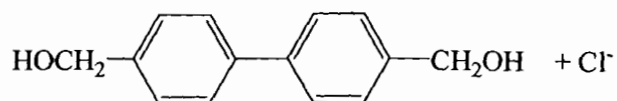
(1)～(7)から、本試験条件下において、被験物質の一部は加水分解し、4,4'-ビフェニルジメタノールが生成した。4,4'-ビフェニルジメタノールの一部は微生物により酸化され、4'-ヒドロキシメチルビフェニル-4-カルボン酸及び 4,4'-ビフェニルジカルボン酸が生成した。4,4'-ビフェニルジメタノール、4'-ヒドロキシメチルビフェニル-4-カルボン酸及び 4,4'-ビフェニルジカルボン酸及び残りの被験物質は微生物により分解されなかったと考えられる（次頁参照）。

本試験における（汚泥＋被験物質）系での変化（推定）



被験物質（残留率：86～94%）

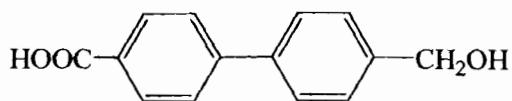
↓ 一部加水分解



4,4'-ビフェニルジメタノール（生成率：2～9%）

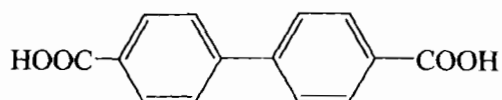
塩化物イオン（生成率：不明）

↓ 微生物による変化



4'-ヒドロキシメチルビフェニル-4-カルボン酸（生成率：不明）

↓ 微生物による変化



4,4'-ビフェニルジカルボン酸（生成率：不明）

6.6 結 論

本試験条件下において、被験物質の一部は加水分解し、4,4'-ビフェニルジメタノールが生成し、その一部はさらに微生物により酸化され、4'-ヒドロキシメチルビフェニル-4-カルボン酸及び4,4'-ビフェニルジカルボン酸が生成した。生成した4,4'-ビフェニルジメタノール、4'-ヒドロキシメチルビフェニル-4-カルボン酸、4,4'-ビフェニルジカルボン酸及び残りの被験物質は微生物により分解されなかった。

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	:	10 頁参照	
全有機炭素測定装置	:	12 頁参照	
高速液体クロマトグラフ	:	13 頁参照	
液体クロマトグラフー質量分析計	:	15 頁参照	
紫外可視分光光度計	:	日本分光製	V-660
フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所製	IRPrestige-21
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	ME235P
pH 計	:	東亜電波工業製	HM-50G
遠心分離機	:	久保田製作所製	5922
振とう機	:	タイテック製	SR-2w

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
ぎ酸	:	和光純薬工業製	試薬特級
酸化チタン粉末	:	平沼産業製	
70%過塩素酸溶液	:	関東化学製	試薬特級
フタル酸水素カリウム	:	和光純薬工業製	試薬特級
4,4'-ビフェニルジメタノール	:	和光純薬工業製	

Study No. 205172 (Test item K-1835)

Cultivating conditions:

Concentration

Test item 100 (mg/L)

Reference item (aniline) 100 (mg/L)

Activated sludge 30 (mg/L)

Temperature 25 ± 1 °C

Duration 28 days (Nov.26,2008 - Dec.24,2008)

Note: —

Vessel No.	Sample Description	BOD (mg)			
		7th day	14th day	21st day	28th day
[1]	Water + test item	0.0	0.2	0.7	1.9
[2]	Sludge + test item	1.5	5.2	7.2	9.1
[3]	Sludge + test item	1.6	5.1	6.8	9.0
[4]	Sludge + test item	1.5	4.5	7.3	9.4
[5]	Control blank [B]	1.8	5.5	7.8	10.2
[6]	Sludge + aniline	51.1	66.7	69.4	72.8

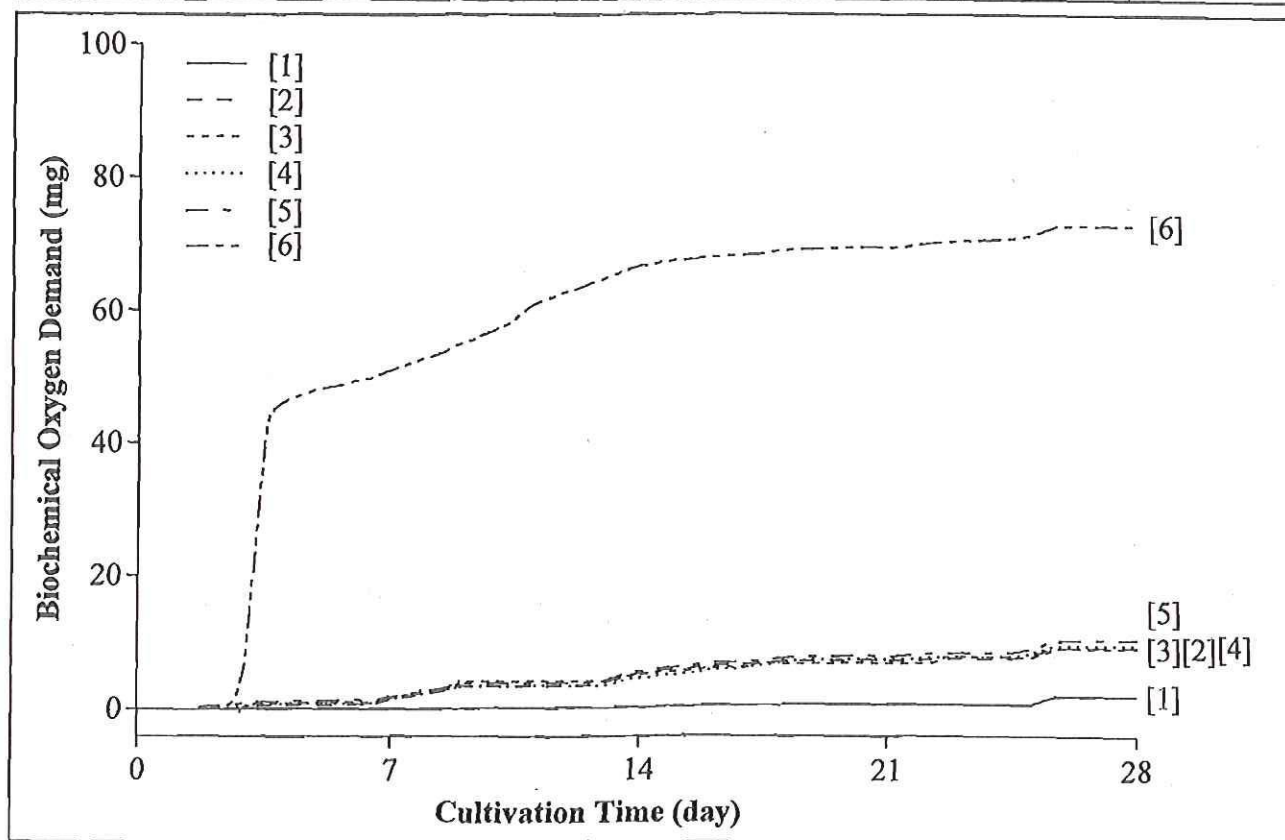


Fig. 1 Chart of BOD.

Dec.24,2008 Name _____