

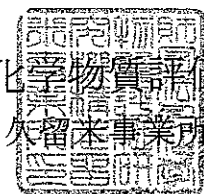
受付番号	632-06-S-4792
試験番号	14792

最終報告書

13F-OLEの微生物による分解度試験

2007年3月15日

財団法人化学物質評価研究機構



本文書は正本を正確に転写したものです。

財団法人化学物質評価研究機構 久留米事業所

2007年3月15日

試験責任者

小山 一 彦

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 ダイキン工業株式会社

試験の表題 13F-OLEの微生物による分解度試験

試験番号 14792

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。

2007 年 3 月 15 日

試験責任者

小山 一 祐

小山 一 祐

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 ダイキン工業株式会社

試験の表題 13F-OLEの微生物による分解度試験

試験番号 14792

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	2007年1月25日	2007年1月25日
試験計画書	2007年1月25日	2007年1月25日
培養開始時	2007年2月1日	2007年2月1日
中間時	2007年2月15日	2007年2月15日
培養終了時	2007年3月1日	2007年3月2日
	2007年3月2日	2007年3月2日
生データ、最終報告書草案	2007年3月14日	2007年3月14日
最終報告書	2007年3月15日	2007年3月15日

2007年3月15日

信頼性保証部門責任者

白石圭二

白石圭二

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. 供試試料	5
3. 活性汚泥	6
4. 分解度試験の実施	8
5. 試験条件の確認	15
6. 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
7. 試験結果	15
8. 備 考	17

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
Reference 1	Calculation table for percentage detection of test item (test solution [1], test solution after pretreatment)
Reference 2	Calculation table for percentage detection of test item (test solution [1], soda lime)

Figures

Fig.1	Chart of BOD
Fig.2-1	Chromatograms of GC analysis for calibration curve
Fig.2-2	Calibration curve of test item
Fig.3	Chromatograms of GC analysis for recovery test
Fig.4	Chromatograms of GC analysis for test solution
Fig.5-1	IR spectrum of test item measured before experimental start
Fig.5-2	IR spectrum of test item measured after experimental completion
Reference 3	IR spectrum supplied by sponsor
Reference 4	Chromatograms of GC analysis for test solution after pretreatment and soda lime (test solution [1])

表 題	13F-OLEの微生物による分解度試験
試験委託者	ダイキン工業株式会社 (〒566-8585) 大阪府摂津市西一津屋 1-1
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	13F-OLE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	本試験は以下の試験法に従って行った。 (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、環保企発第031121002号) に規定する (微生物等による化学物質の分解度試験) (2) 「OECD Guidelines for Testing of Chemicals」 に定める "Ready Biodegradability: Modified MITI Test (I) (Guideline 301C, July 17, 1992)"
適用 GLP	本試験は以下の基準を適用した。 (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)

試験日程

試験開始日	2007年1月25日
実験開始日	2007年2月1日
実験終了日	2007年3月1日
試験終了日	2007年3月15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、化学物質の審査及び製造等の規制に関する法律（以下「化審法」と記す）第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、又は品質低下をおこさないで安定に保管しうる期間のいずれか短い方の期間、久留米事業所試料保管室に保管する。保管期間経過後の処置又は廃棄に際しては試験委託者と協議の上決定する。

(2) 生データ、資料等

生データ、試験計画書、試験委託書、被験物質調査票、その他必要な資料等は最終報告書と共に、化審法第4条第1項若しくは第2項、第4条の2第2項、第3項若しくは第8項、第5条の4第2項、第24条第2項又は第25条の3第2項の規定による通知を受けた後10年間、久留米事業所資料保管室に保管する。保管期間経過後の処置は試験委託者と協議の上決定する。

試験関係者

試験責任者

小山一祐所属 試験第一課試験担当者
(分解度試験の実施)小宮華菜下川裕子樽木正範廣松康一山下裕美吉田智彦兼武優子田中貴美子辻村真里宮浦紀子柚木雅子永田茜

活性汚泥管理責任者

片桐和臣

最終報告書の承認

2007年3月15日

試験責任者

小山一祐

小山一祐

要 約

試験の表題

13F-OLE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学的酸素消費量 (BOD) の測定
- (2) ガスクロマトグラフィー (GC) による被験物質の定量分析

試験結果

(1) BOD分解度	-4%,	-1%,	0%	平均	0%	(-2%) ^{*1}
(2) 被験物質分解度 (GC)	-11%,	-11%,	-12%	平均	0%	(-11%) ^{*1}

*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

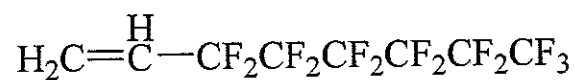
本報告書において13F-OLEは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名称^{*2}

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8-トリデカフルオロ-オクタ-1-エン

1.2 構造式等^{*2}

構造式



分子式 C₈H₃F₁₃

分子量 346.09

CAS番号 25291-17-2

*2 試験委託者提供資料による。

2. 供試試料

2.1 供給者及びロット番号^{*2}

供給者	ダイキン工業株式会社
ロット番号	061122HM

2.2 純度^{*2}

被験物質	99.8%
不純物	不明成分 0.2%

被験物質は純度100%として取り扱った。

2.3 被験物質の確認

試験委託者提供の赤外吸収スペクトルと久留米事業所の当該測定スペクトルが一致することを確認した (Fig.5、Reference 3参照)。

2.4 物理化学的性状^{*2}

常温における性状	無色透明液体	
沸点	106°C (760mmHg)	
密度	1.560g/cm ³ (20°C)	
溶解度	水	不溶
	ジメチルスルホキシド	不溶
	アセトン	可溶(任意に混合)

*2 試験委託者提供資料による。

2.5 保管条件及び保管条件下での安定性確認

保管条件	室温暗所保存
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.5参照)。

3. 活性汚泥

3.1 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

2006年12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、次頁3.2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。

3.2 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10Lにして再びばっ気し（30分以上）、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。

3.3 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。

3.4 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

2007年 1月16日

4. 分解度試験の実施

4.1 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 2007年 1月29日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は3460mg/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（和光純薬工業製 試薬特級 ロット番号 DPJ7363）を用いた。

4.2 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、4.3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及び供試試料19.5 μ L [添加量30.4mg=19.5 μ L \times 1.560g/cm³ (密度)]を入れた。供試試料はマイクロシリンジで分取して添加した。

(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 (2.60mL) を差し引いた量] 及び供試試料19.5 μ L [添加量30.4mg=19.5 μ L \times 1.560g/cm³ (密度)]を入れた。供試試料はマイクロシリンジで分取して添加した。

(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 (2.60mL) 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 (2.60mL) 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3.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。

4.3 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	以下の300mL用培養瓶を用いた。	
	4.2 試験液の調製における	
	(a)、(b)及び(d)	: 揮発性物質用改良型培養瓶
	(c)	: 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)	

4.2 試験液の調製における(a)、(b)及び(d)の試験容器と測定ユニットの接続にはコック付きのチューブを使用した。

(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

4.4 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。

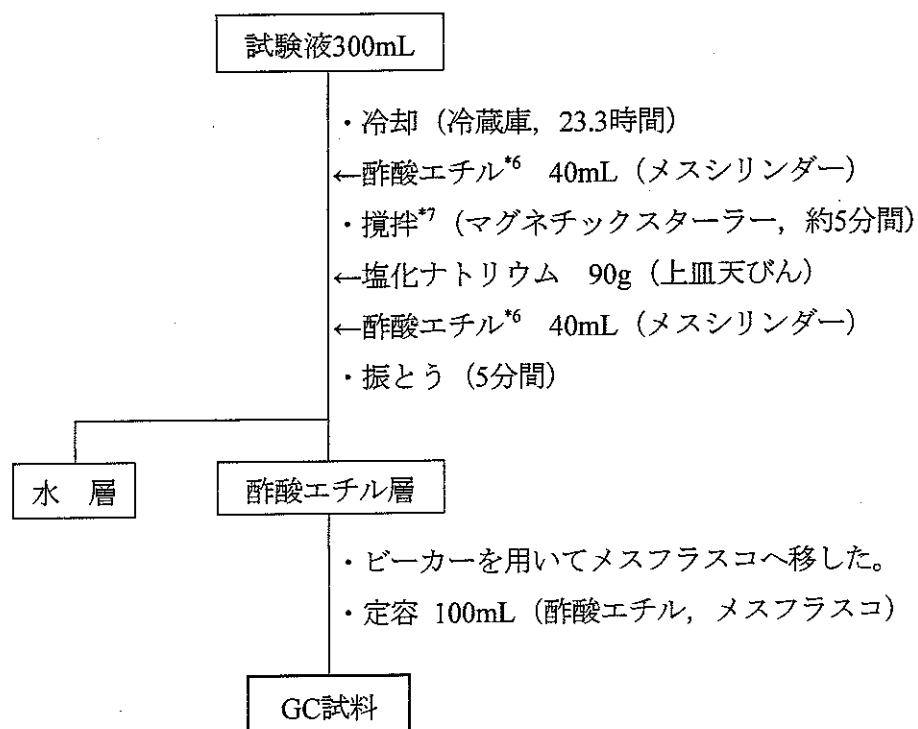
4.5 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中の被験物質について分析した。なお、被験物質は揮発性を有するため、試験液のpHは測定しなかった。

4.5.1 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、被験物質を分析するためのガスクロマトグラフィー (GC) 試料を調製した。

フロースキーム



*6 予め冷蔵庫で冷却したもの。

*7 酢酸エチル*6 10mL (メスシリンダー) で蓋をシールし、攪拌した。

4.5.2 ガス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GC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。GC試料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304mg/Lのピーク面積とGC試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた (Table-3、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780 μ V \cdot sec (被験物質濃度3.0mg/L) とした。

(1) 定量条件

機 器	ガスクロマトグラフ
自動試料導入装置	Hewlett Packard製 HP6890 Series
検 出 器	水素炎イオン化検出器 (FID)
カ ラ ム	PONA 膜厚 0.5 μ m (Agilent technologies製) 50m \times 0.2mmI.D. フェーズドシリカ製
カラム温度	50 $^{\circ}$ C (2min) \rightarrow 150 $^{\circ}$ C (3min)
昇温速度	10 $^{\circ}$ C/min
試料導入部温度	200 $^{\circ}$ C
キャリアガス	ヘリウム
カラム流量	1.3mL/min (定流量モード)
水 素	40mL/min
空 気	400mL/min
注 入 量	1 μ L
導 入 モード	スプリット
スプリット比	5:1
検 出 器	
温 度	200 $^{\circ}$ C
感 度	レンジ 2 ⁰

(2) 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19.5 μ L [被験物質30.4mg=19.5 μ L \times 1.560g/cm³ (密度)] を分取し、酢酸エチルに溶解して1010mg/Lの被験物質溶液を調製した。これを酢酸エチルで希釈して304mg/Lの標準溶液とした。

(3) 検量線の作成

(2)の標準溶液の調製と同様にして76.1、152及び304mg/Lの標準溶液を調製した。これらを(1)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)。

4.5.3 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、4.2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4.5.1及び4.5.2に従い、回収試験を行った。また、4.2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	96.6%, 94.8%	平均	95.7%
(汚泥+被験物質) 系回収率	97.7%, 97.5%	平均	97.6%

4.6 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

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}^{*8}} \times 100$$

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^{*8} : 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)

*8 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)

4.7 数値の取扱い

数値の丸め方は、JIS Z 8401 : 1999 規則Bに従った。

5. 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	4%	20%未満	7.3項分解度
	被験物質分解度	1%		
アニリンのBOD分解度	7日後	69%	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	10.2mg	18mg未満 (60mg/L未満)	Table-1 Fig.1

6. 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。

7. 試験結果

7.1 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。	*9
	(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。	*9

*9 被験物質は揮発性を有するため、培養終了後の(水 + 被験物質)系及び(汚泥 + 被験物質)系の試験液のpH測定は行わなかった。

7.2 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 ^{*10}	mg	6.1	-0.9	-0.3	0.1	24.6	1	1	
被験物質残留量 及び残留率 (GC)	mg	27.4	30.4	30.4	30.6	30.4	3	4	
	%	90	100	100	101	-			

*10 (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。

7.3 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	%	-4	-1	0	0 (-2) ^{*1}	1
被験物質分解度 (GC)	%	-11	-11	-12	0 (-11) ^{*1}	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。

7.4 考 察

被験物質分析の結果、(水+被験物質)系において被験物質残留率(90%)が低かった。GCクロマトグラム上に変化物ピークが検出されなかったことから、収支不足の原因として、被験物質の抽出率の低下及び試験容器内に装着した炭酸ガス吸収剤(ソーダライム)への被験物質の移行が考えられたため、試験液[1]の前処理後の試験液及びソーダライムについて抽出操作を行い分析した(8.1参照)。その結果、被験物質は前者で1%検出、後者で不検出であり、変化物ピークはどちらからも検出されなかった。その他の原因として、試験液調製または前処理操作における被験物質の揮発による損失が考えられるが、収支不足の原因の特定には至らなかった。なお、(汚泥+被験物質)系から理論量の被験物質が検出されたことから、被験物質は微生物により分解されなかったと判断される。

7.5 結 論

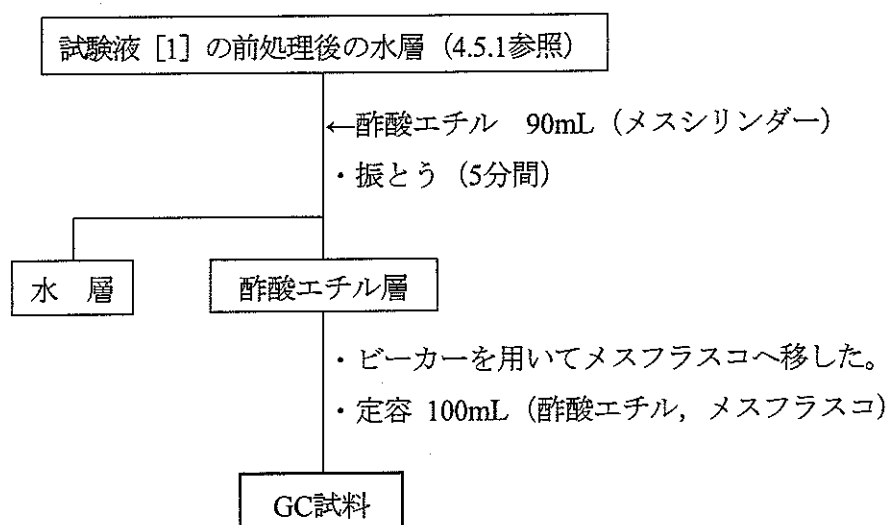
本試験条件下において、被験物質は微生物により分解されなかった。

8. 備 考

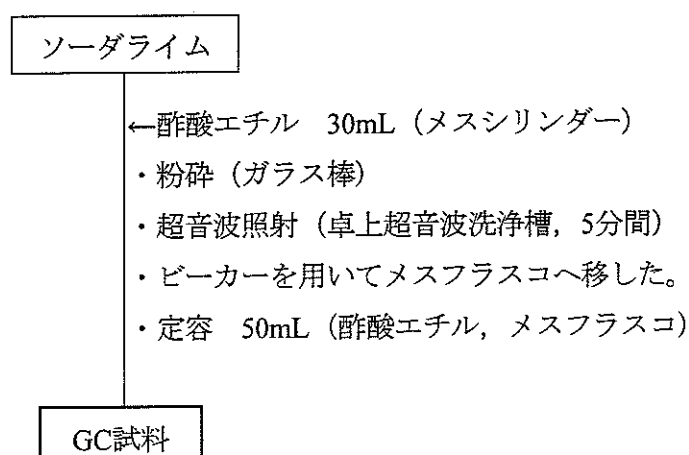
- 8.1 試験液 [1] の前処理後の試験液及び炭酸ガス吸収剤（ソーダライム）中の被験物質分析（水＋被験物質）系における被験物質残留率の低下の原因を調査するために、試験液 [1] の前処理後の試験液及びソーダライムについて前処理操作を行い分析に供した。

(1) 分析試料の調製

①前処理後の試験液



②ソーダライム



(2) 分析条件

4.5.2(1)参照。

(3) 分析結果

試験液 [1] の前処理後の試験液及びソーダライムの分析結果は下記のとおりであった。

		試験液 [1]		理論量	Reference
		前処理後の試験液	ソーダライム		
被験物質検出量 及び検出率 (GC)	mg	0.4	0	30.4	1,2
	%	1	0	-	

8.2 試験に使用した主要な装置・機器

フーリエ変換赤外分光光度計	:	島津製作所製	IRPrestige-21
閉鎖系酸素消費量測定装置	:	10頁参照	
ガスクロマトグラフ	:	12頁参照	
振とう機	:	タイテック製	SR-2w

8.3 分析に使用した試薬

酢酸エチル	:	関東化学製	試薬一級
塩化ナトリウム	:	マナック製	試薬一級

Table-1 Calculation table for percentage biodegradation by BOD

Study No. 14792		Duration of cultivation: 28 days							
Vessel No.	7th day		14th day		21st day		28th day		Mean Deg. (%)
	BOD (mg)	Deg. (%)	BOD (mg)	Deg. (%)	BOD (mg)	Deg. (%)	BOD (mg)	Deg. (%)	
[6]	63.3	69	66.5	68	68.3	68	70.6	67	
[5]	1.1	-	5.0	-	7.3	-	10.2	-	
[2]	0.9	-1	4.3	-3	6.4	-4	9.3	-4	-2
[3]	0.8	-1	4.9	0	7.4	0	9.9	-1	
[4]	0.7	-2	4.5	-2	6.9	-2	10.3	0	
[1]	0.9	-	3.1	-	4.7	-	6.1	-	

Deg. : Percentage biodegradation

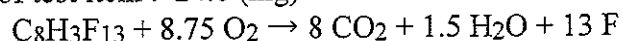
Vessel No. [6] : Sludge + aniline
 Vessel No. [5] : Control blank [B]
 Vessel No. [2] [3] [4] : Sludge + test item
 Vessel No. [1] : Water + test item

Test item of 30.4 mg was added.

Chart of BOD : Fig. 1

$$\text{Deg.} = [\text{BOD} - \text{B}] / [\text{TOD}] \times 100 (\%)$$

TOD of test item : 24.6 (mg)



$$8.75 \text{ O}_2 / \text{C}_8\text{H}_3\text{F}_{13} = 279.99 / 346.09 = 0.81$$

$$\text{TOD} = 30.4 \times 0.81 = 24.6 (\text{mg})$$

TOD of aniline : 90.3 (mg)



$$8.75 \text{ O}_2 / \text{C}_6\text{H}_7\text{N} = 279.99 / 93.13 = 3.01$$

$$\text{TOD} = 30 \times 3.01 = 90.3 (\text{mg})$$

Mar.1,2007 Name Kana Komiya

Table-2 Calculation table for recovery rate of test item

Study No. 14792

Sample description	A	D	E	F
Standard solution 304mg/L	81739			
Water + test item -1	78986	29.4	96.6	95.7
Water + test item -2	77523	28.8	94.8	
Sludge + test item -1	79883	29.7	97.7	97.6
Sludge + test item -2	79655	29.6	97.5	
Control blank	n.d.			

Amount of test item added : 30.4 (mg)

A : Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)

B : Final volume : 100 (mL)

C : Ratio of portion used for analysis : 300/300

D : Recovery amount (mg)

$$D_w = G \times (A(\text{Water + test item}) / A(\text{Standard})) \times (B / C) / 1000$$

$$D_s = G \times \{ (A(\text{Sludge + test item}) - A(\text{Control blank})) / A(\text{Standard}) \} \times (B / C) / 1000$$

E : Recovery rate (%)

$$E = D / 30.4 \text{ (mg)} \times 100$$

F : Average recovery rate (%)

G : Concentration of standard solution : 304 (mg/L)

See Fig. 3

January 18, 2007

Name

Kana Komiya

Table-3 Calculation table for percentage biodegradation of test item

Study No. 14792

Sample description	A	E	F	G	H
Standard solution 304mg/L	78721				
[1] Water + test item	67832	27.4	90		
[2] Sludge + test item	76849	30.4	100	-11	
[3] Sludge + test item	76794	30.4	100	-11	-11
[4] Sludge + test item	77316	30.6	101	-12	
[5] Control blank	n.d.				

Amount of test item added : 30.4 (mg)

A : Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)

B : Final volume : 100 (mL)

C : Ratio of portion used for analysis : 300/300

D : Recovery rate : 95.7 (%) (Water + test item)
97.6 (%) (Sludge + test item)

E : Residual amount of test item (mg)

$$E_w = I \times (A(\text{Water + test item}) / A(\text{Standard})) \times (B / C) / (D / 100) / 1000$$

$$E_s = I \times \{ (A(\text{Sludge + test item}) - A(\text{Control blank})) / A(\text{Standard}) \} \times (B / C) / (D / 100) / 1000$$

F : Percentage residue (%)

$$F = E / 30.4 \text{ (mg)} \times 100$$

G : Percentage biodegradation (%)

$$G = \{ (E(\text{Water + test item}) - E(\text{Sludge + test item})) / E(\text{Water + test item}) \} \times 100$$

H : Average percentage biodegradation (%)

I : Concentration of standard solution : 304 (mg/L)

See Fig. 4

March 2, 2007

Name

Kana Komiya

Reference 1 Calculation table for percentage detection of test item
(test solution [1], test solution after pretreatment)

Study No. 14792

Sample description	A	E	F
Standard solution 304mg/L	78721		
[1] Water + test item (after pretreatment)	927	0.4	1

Amount of test item added : 30.4 (mg)

A : Peak area ($\mu V \cdot sec$)

B : Final volume : 100 (mL)

C : Ratio of portion used for analysis : 300/300

D : Recovery rate : 95.7 (%) (Water + test item)

E : Residual amount of test item (mg)

$$E = H \times (A / A(\text{Standard})) \times (B / C) / (D / 100) / 1000$$

F : Percentage residue (%)

$$F = E / 30.4 \text{ (mg)} \times 100$$

H : Concentration of standard solution : 304 (mg/L)

See Reference 4

March 7, 2007

Name

Kana Komiya

Reference 2 Calculation table for percentage detection of test item
(test solution [1], soda lime)

Study No. 14792

Sample description	A	D	E
Standard solution 304mg/L	78721		
[1] Water + test item (soda lime)	n.d.	0	0

Amount of test item added : 30.4 (mg)

A : Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)

B : Final volume : 50 (mL)

C : Ratio of portion used for analysis : 1

D : Amount of test item (mg)

$$D = G \times (A / A(\text{Standard})) \times (B / C) / 1000$$

E : Percentage detection (%)

$$E = D / 30.4 \text{ (mg)} \times 100$$

G : Concentration of standard solution : 304 (mg/L)

See Reference 4

March 7, 2007

Name

Kana Komiya

Study No. 14792 (Test item 13F-OLE)

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 (Feb.1,2007 - Mar.1,2007)

Note: -

Vessel No.	Sample Description	BOD (mg)			
		7th day	14th day	21st day	28th day
[1]	Water + test item	0.9	3.1	4.7	6.1
[2]	Sludge + test item	0.9	4.3	6.4	9.3
[3]	Sludge + test item	0.8	4.9	7.4	9.9
[4]	Sludge + test item	0.7	4.5	6.9	10.3
[5]	Control blank [B]	1.1	5.0	7.3	10.2
[6]	Sludge + aniline	63.3	66.5	68.3	70.6

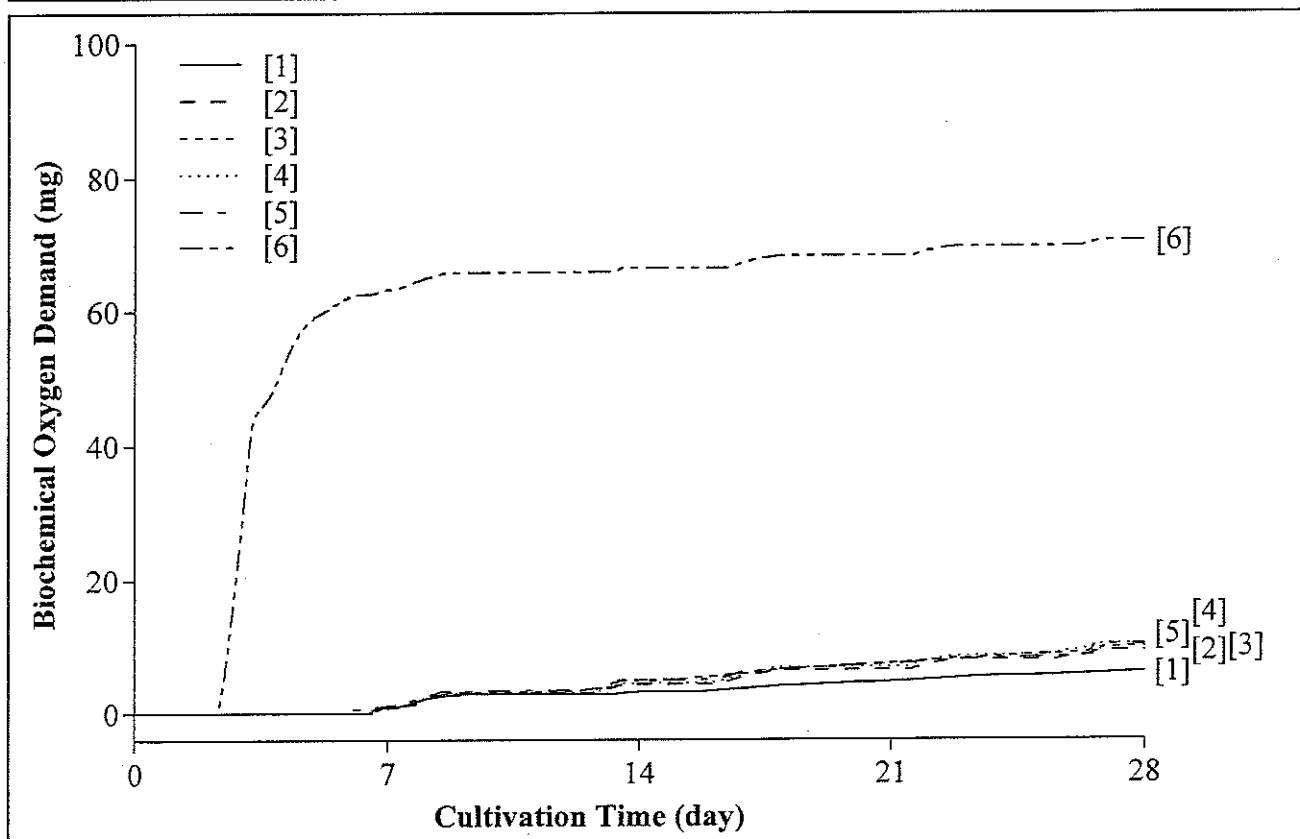


Fig. 1 Chart of BOD.

Mar.1,2007

Name

Kana Komiya

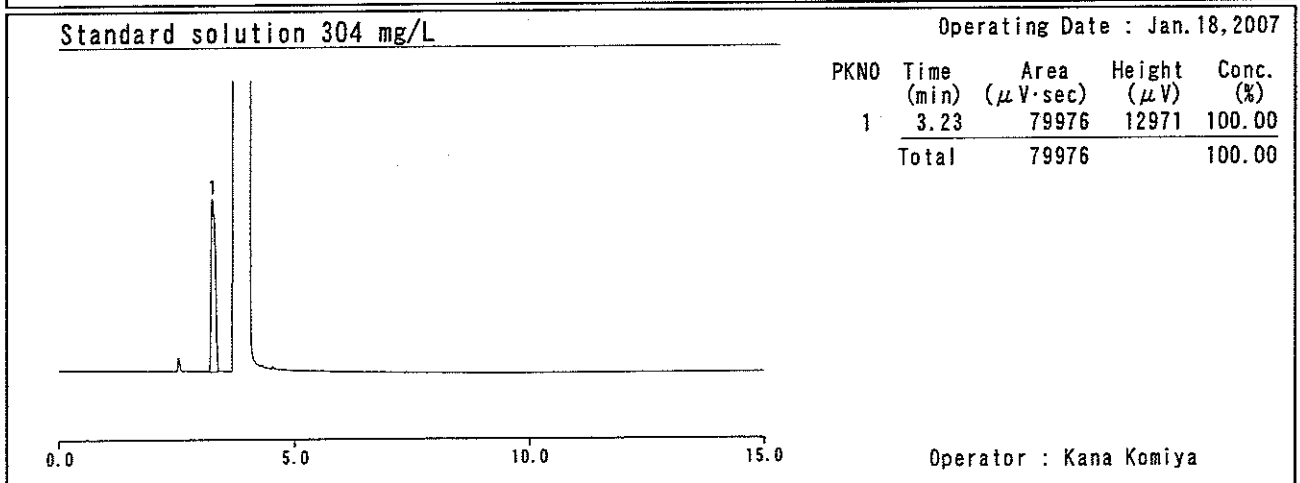
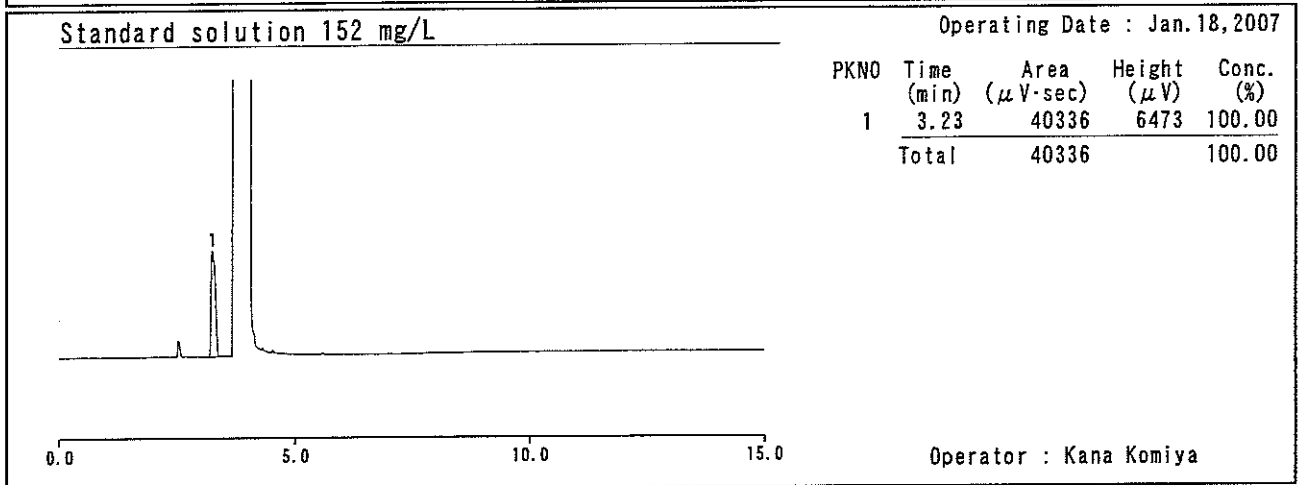
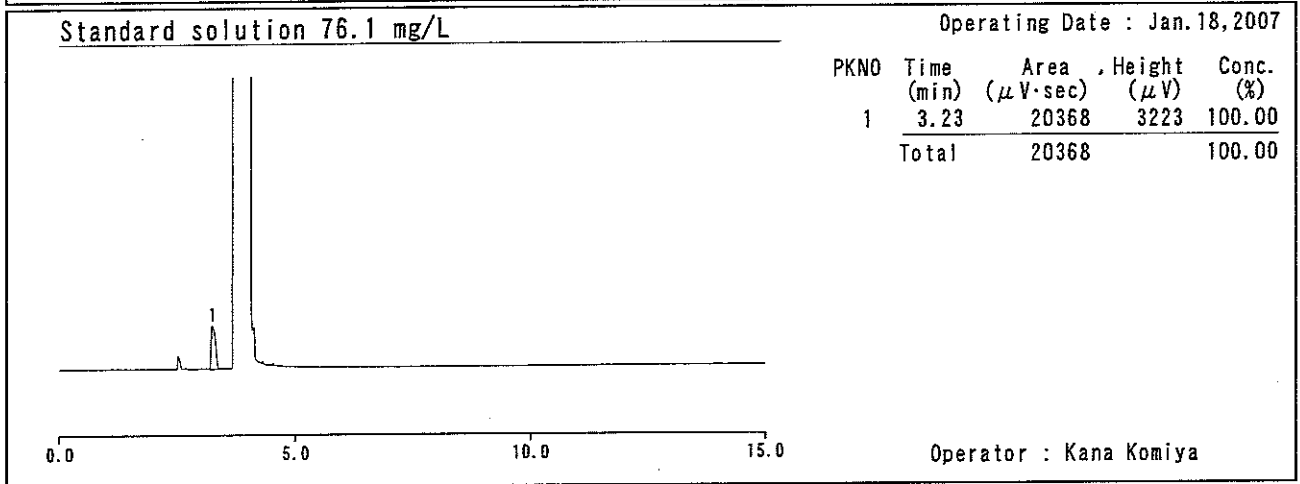
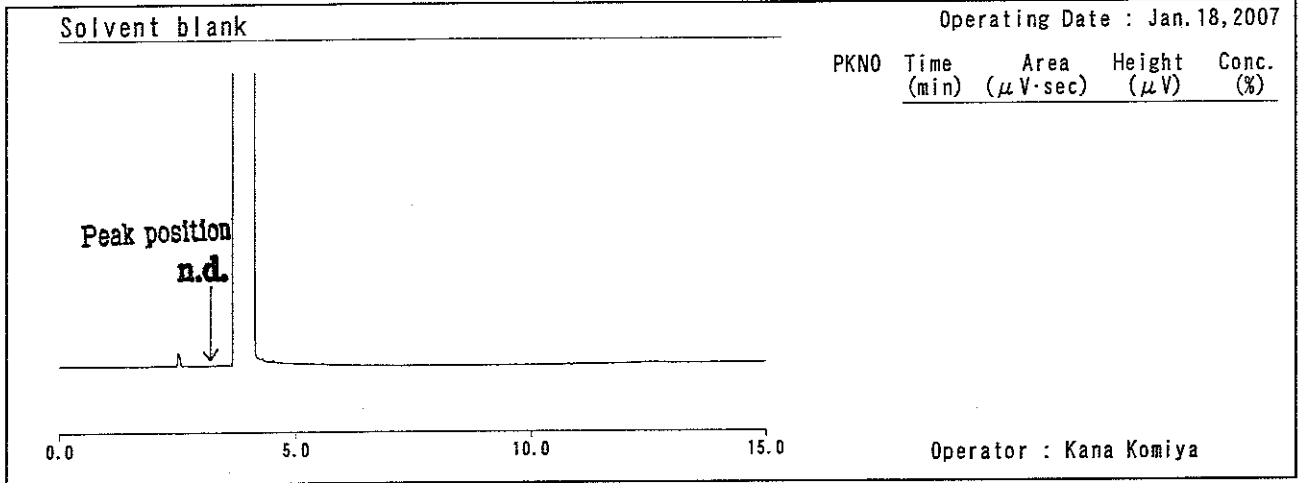
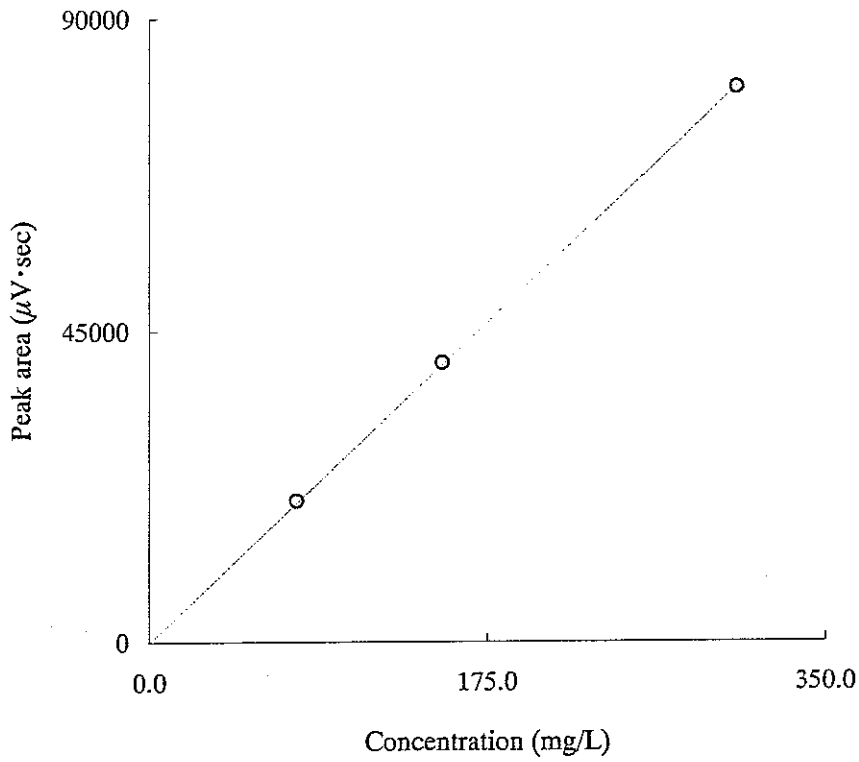


Fig. 2 - 1 Chromatograms of GC analysis for calibration curve.

Date : Jan.18,2007 Name : Kana Komiya



$y = 264x$
 $r = 1.00$

Concentration (mg/L)	Peak area (μV·sec)
76.1	20368
152	40336
304	79976

Fig. 2 - 2 Calibration curve of test item.

January 18, 2007

Name Kana Komiya

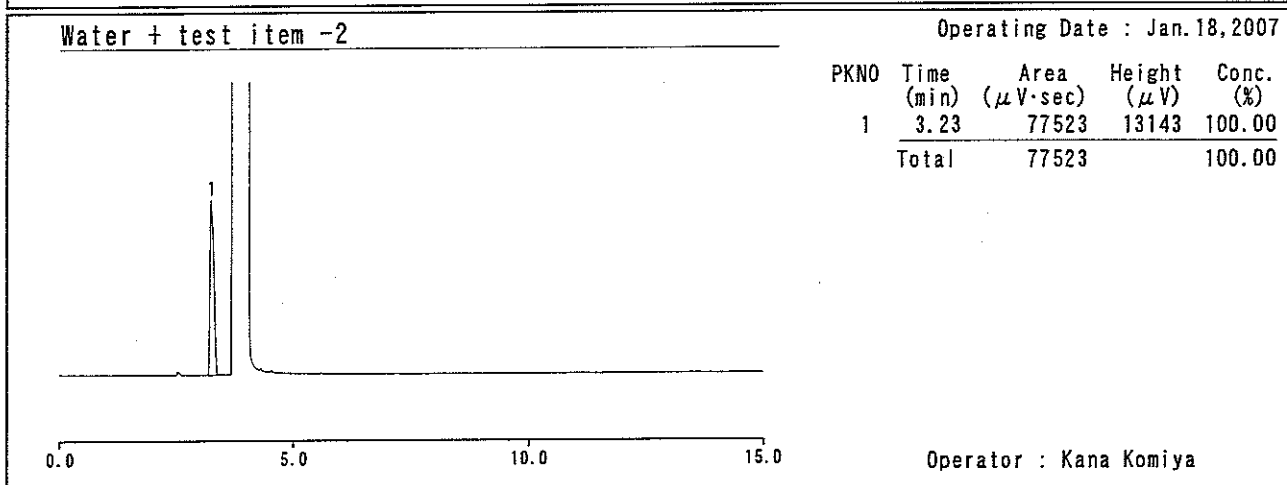
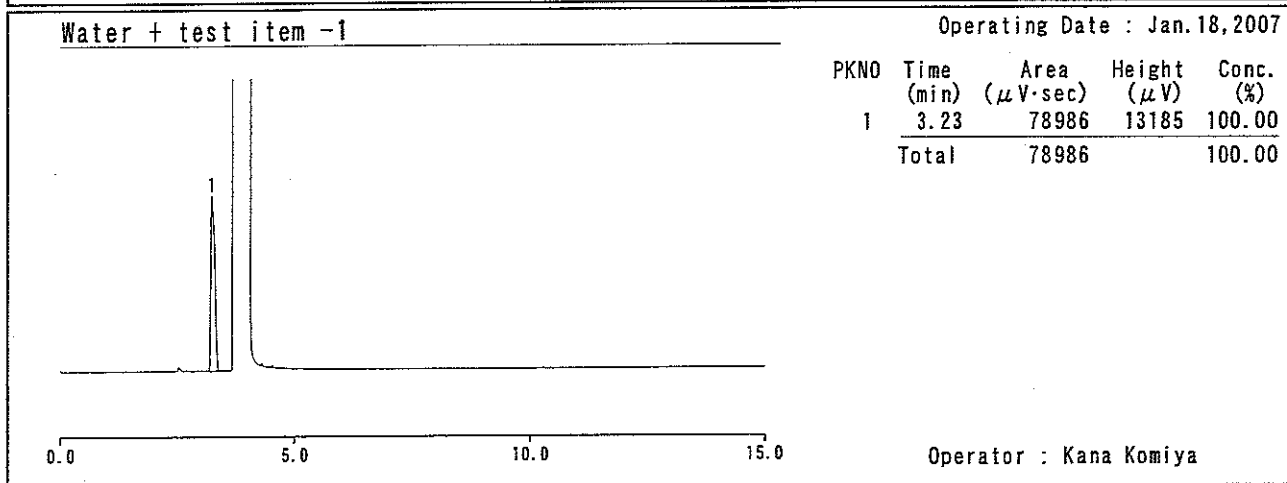
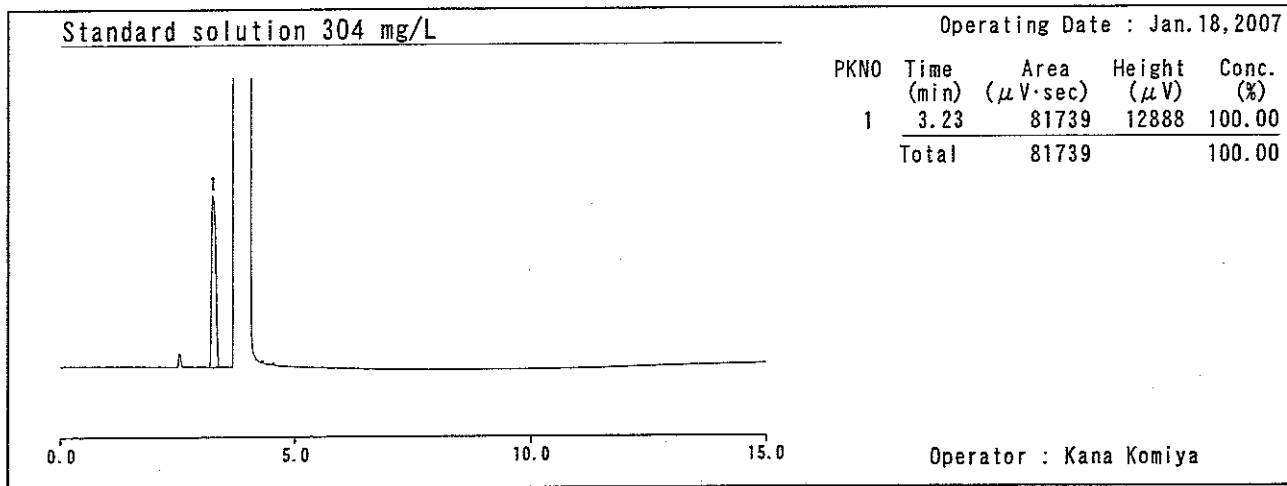


Fig. 3 - 1 Chromatograms of GC analysis for recovery test.

Date : Jan. 18, 2007 Name : Kana Komiya

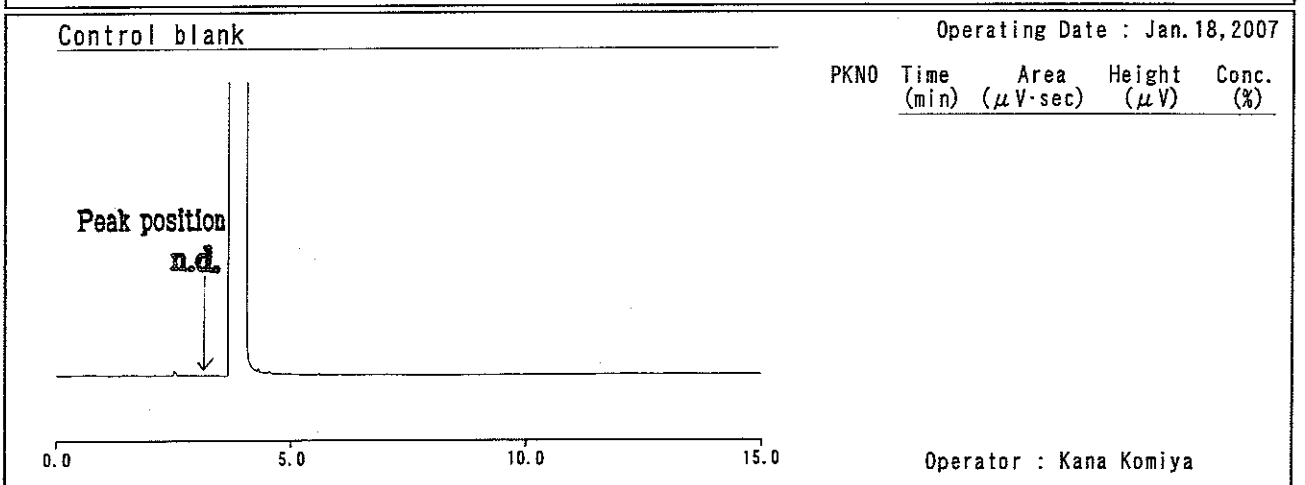
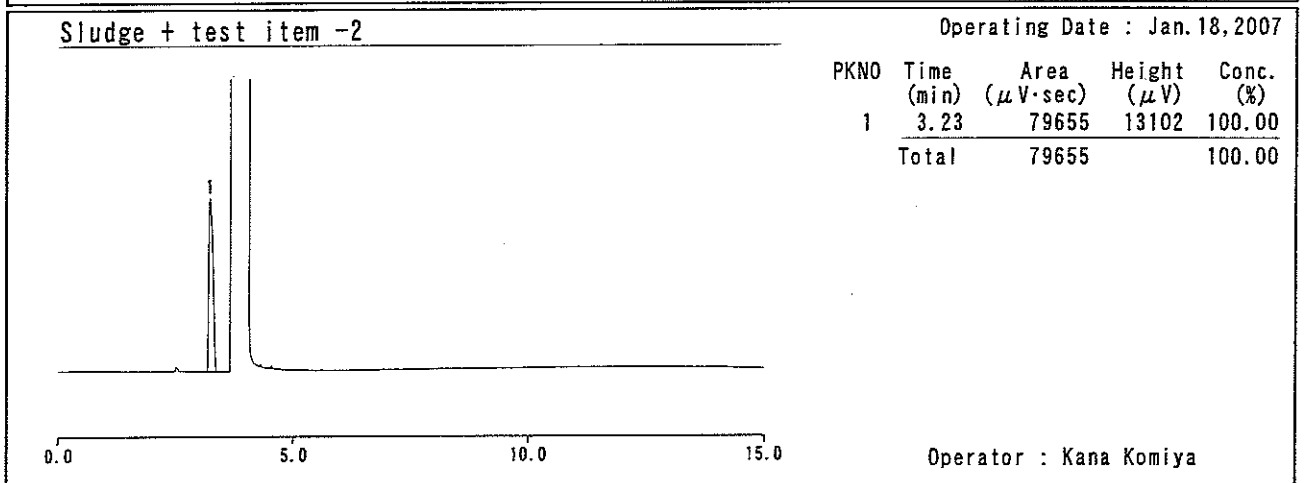
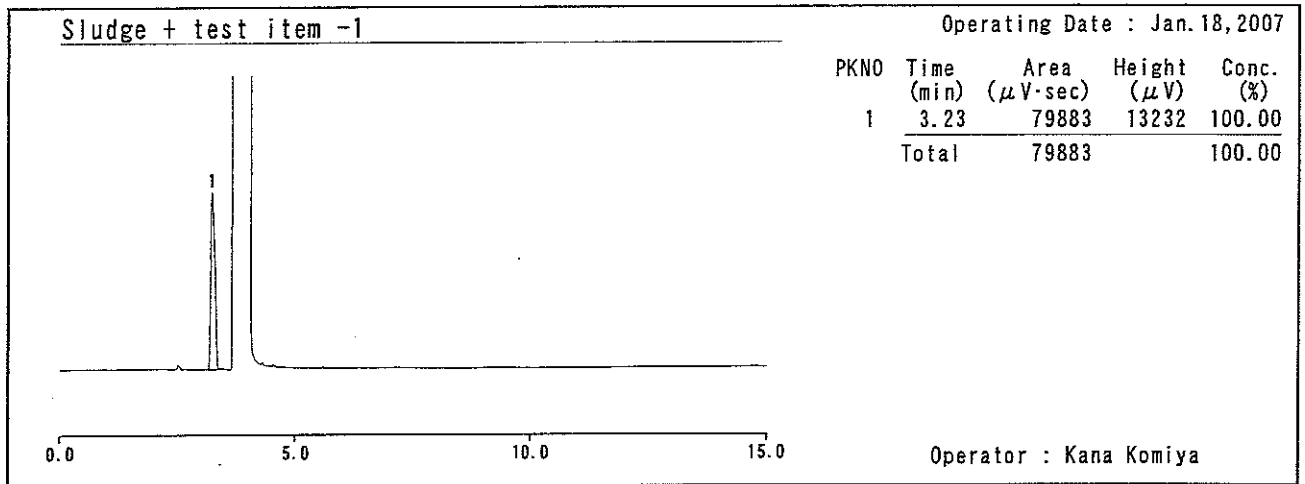


Fig. 3 - 2 Chromatograms of GC analysis for recovery test.

Date : Jan. 18, 2007 Name : Kana Komiya

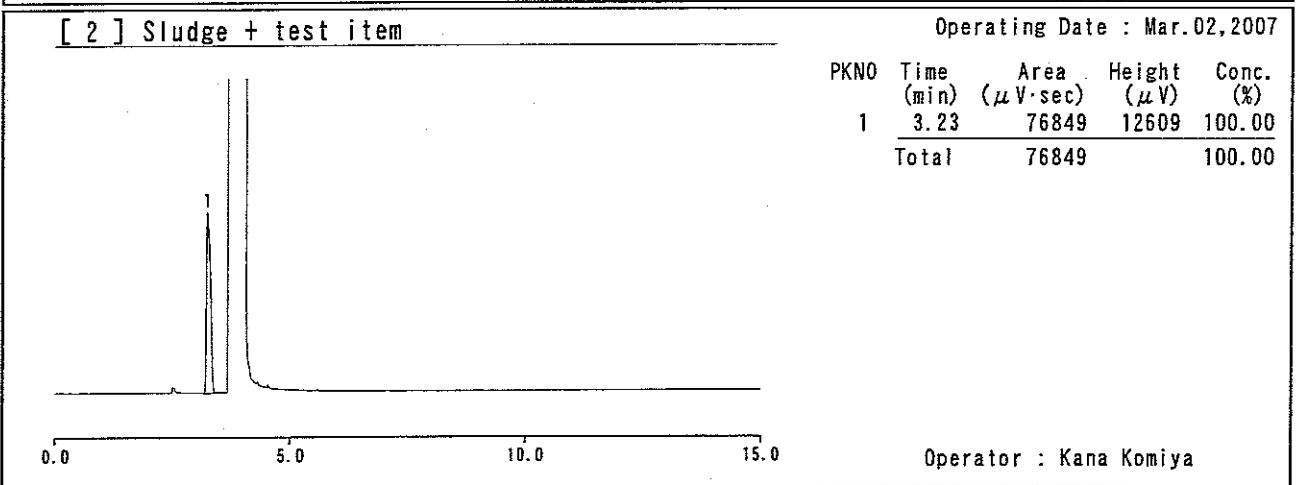
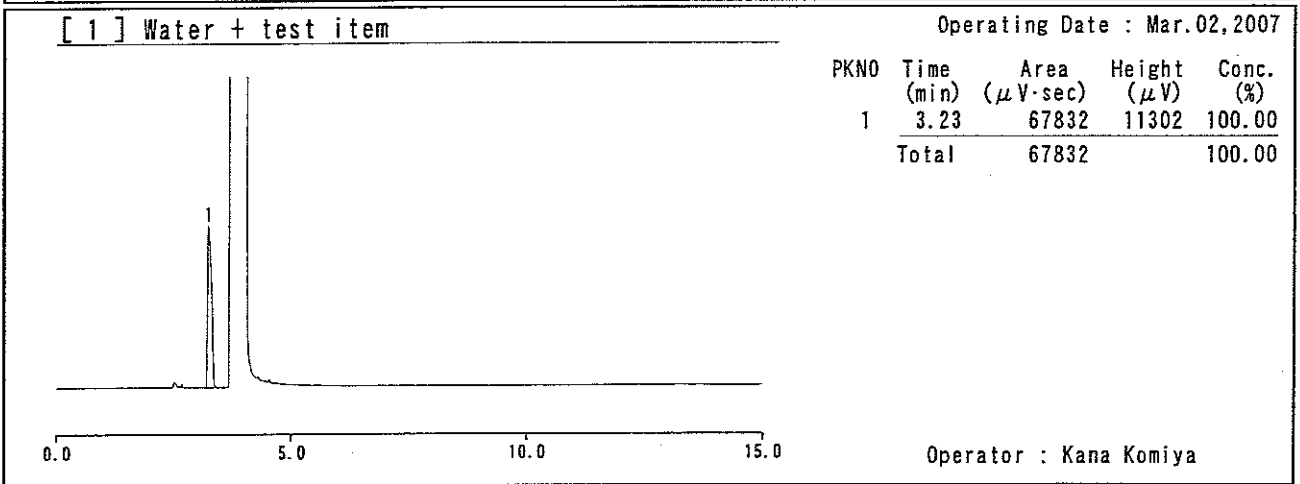
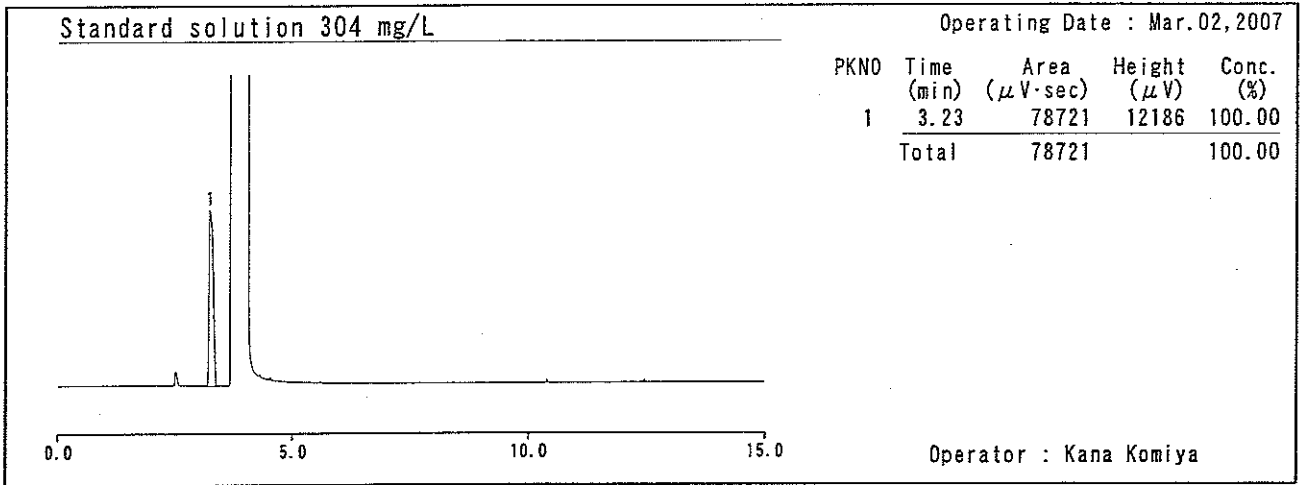


Fig. 4 - 1 Chromatograms of GC analysis for test solution.

Date : Mar.2,2007 Name : Kana Komiya

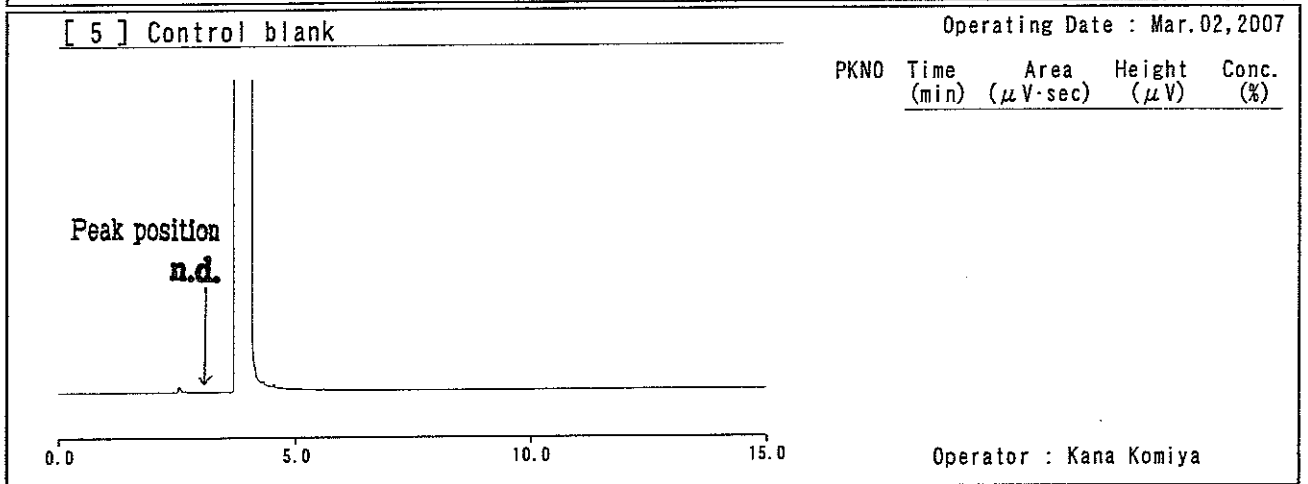
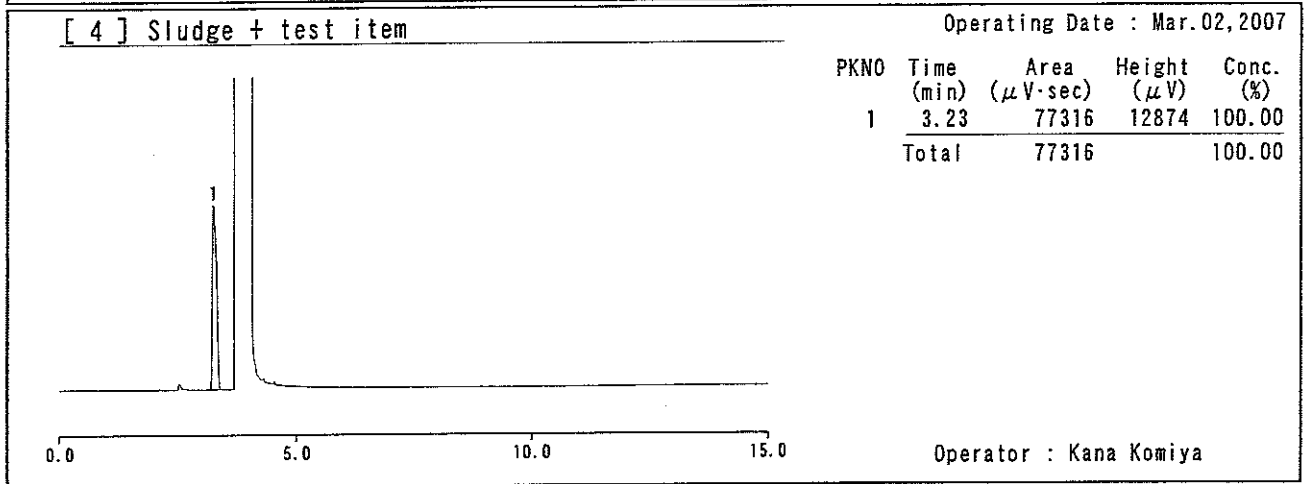
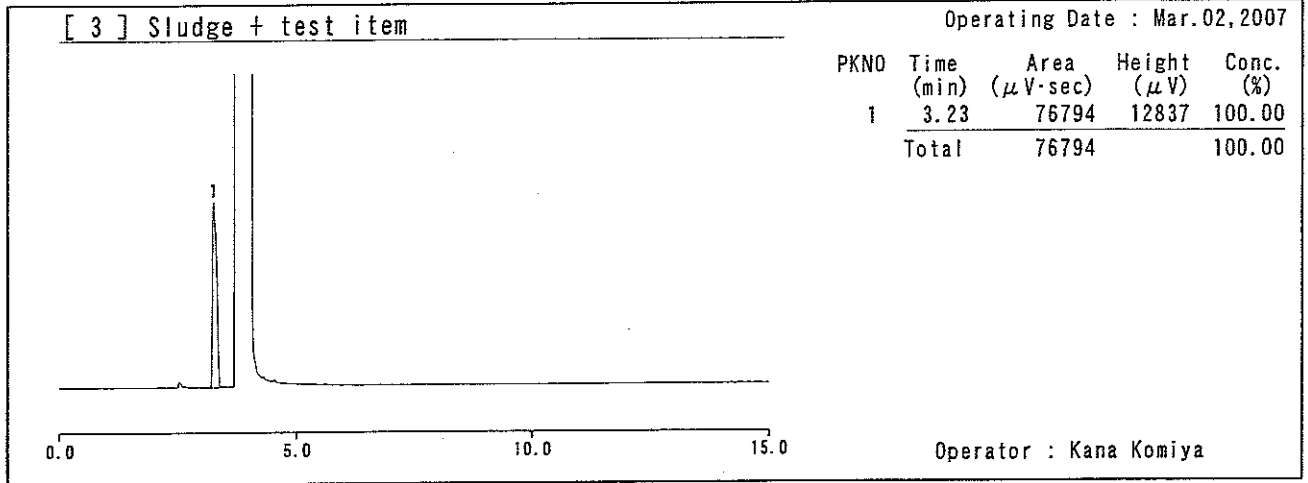
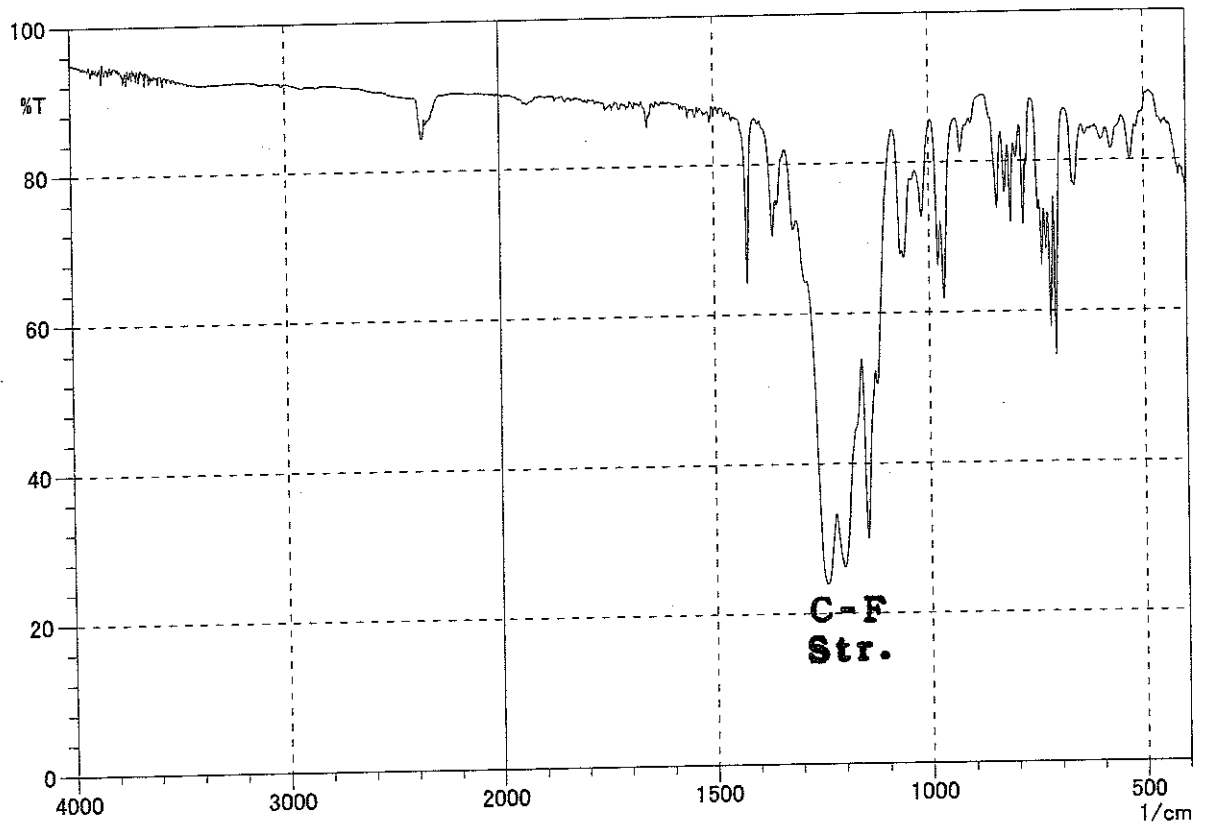


Fig. 4 - 2 Chromatograms of GC analysis for test solution.

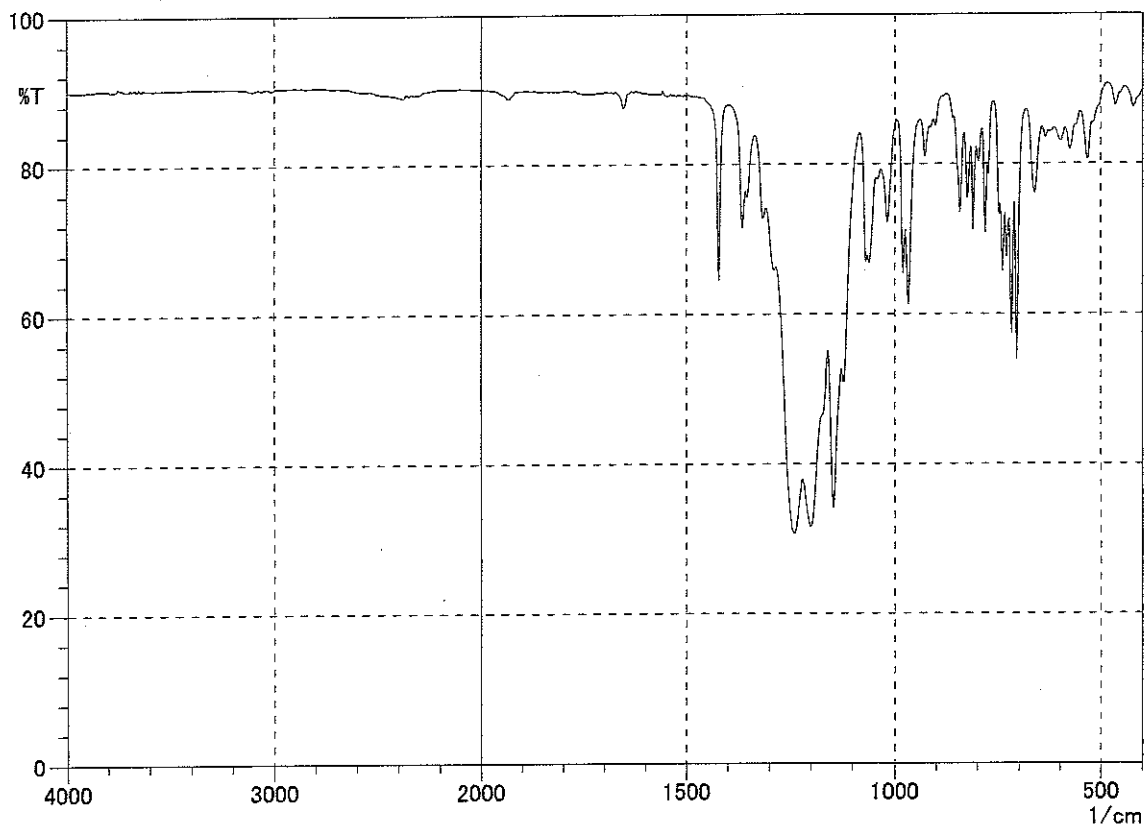
Date : Mar.2,2007

Name : Kana Komiya



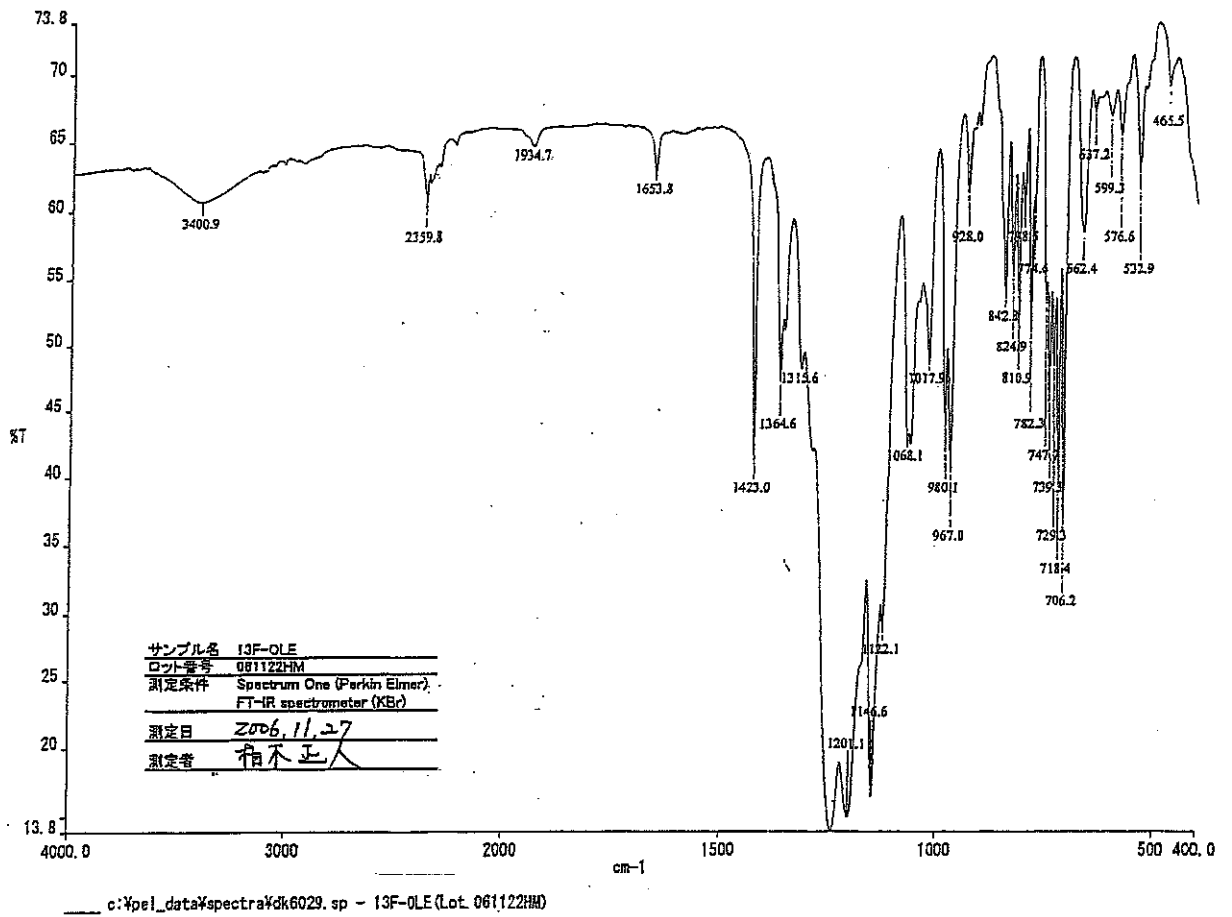
Instrument : Shimadzu IRPrestige-21
Study No. : 14792
Sample : Test item
Method : Neat
Date : November 29, 2006
Name : A. Nagata

Fig. 5 - 1 IR spectrum of test item measured before experimental start.

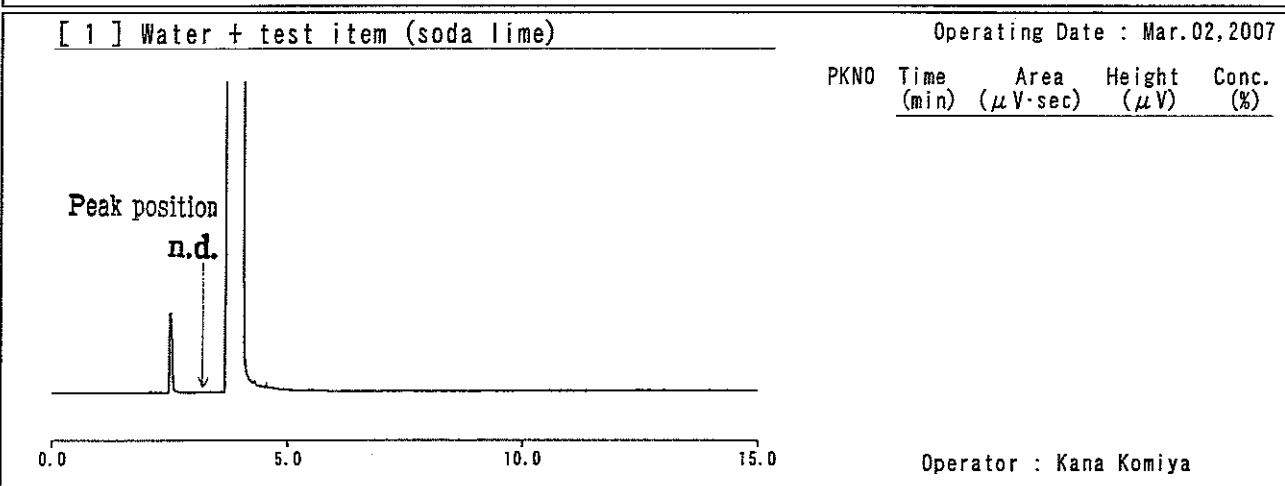
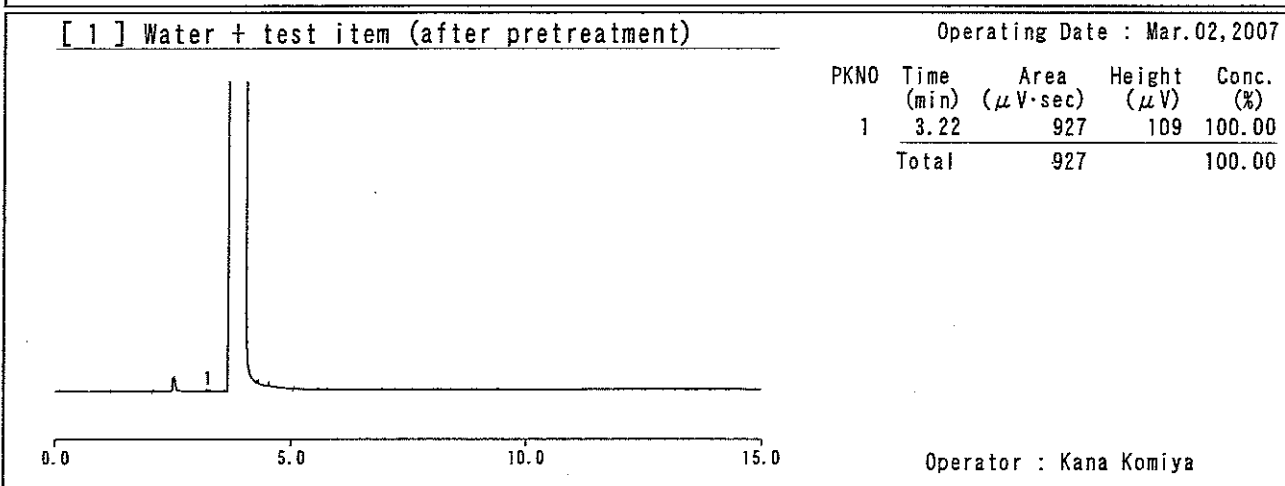
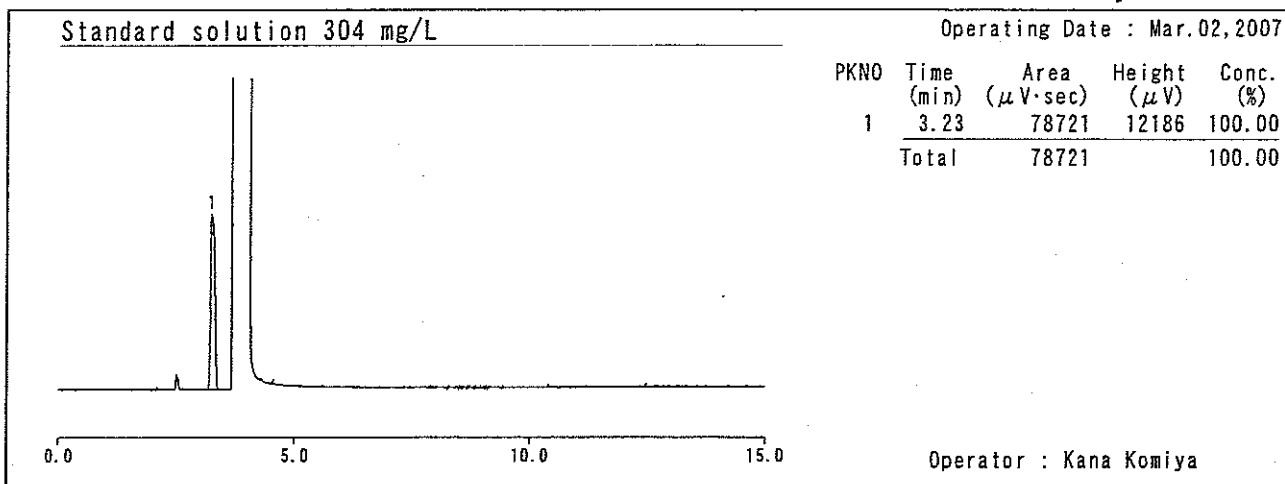


Instrument : Shimadzu IRPrestige-21
Study No. : 14792
Sample : Test item
Method : Neat
Date : March 6, 2007
Name : *A. Nagata*

Fig. 5 - 2 IR spectrum of test item measured after experimental completion.



Reference3 IR spectrum supplied by sponsor.



Reference 4

Chromatograms of GC analysis for test solution after pretreatment and soda lime (test solution [1])

Date : Mar.2,2007 Name : Kana Komiya