

受付番号	632-06-S-4739
試験番号	14739

最 終 報 告 書

13F-SFMAの微生物による分解度試験

2007 年 2 月 1 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 2 月 / 日

試験責任者

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-SFMAの微生物による分解度試験

試験番号 14739

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 2 月 / 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 ダイキン工業株式会社

試験の表題 13F-SFMAの微生物による分解度試験

試験番号 14739

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	2006 年 11 月 17 日	2006 年 11 月 17 日
試験計画書	2006 年 11 月 20 日	2006 年 11 月 20 日
試験計画書の変更	2006 年 12 月 6 日	2006 年 12 月 6 日
	2006 年 12 月 13 日	2006 年 12 月 13 日
	2007 年 1 月 15 日	2007 年 1 月 15 日
培養開始時	2006 年 12 月 13 日	2006 年 12 月 13 日
中間時	2006 年 12 月 28 日	2006 年 12 月 28 日
培養終了時	2007 年 1 月 10 日	2007 年 1 月 11 日
	2007 年 1 月 11 日	2007 年 1 月 11 日
	2007 年 1 月 15 日	2007 年 1 月 17 日
生データ、最終報告書草案	2007 年 1 月 31 日	2007 年 1 月 31 日
最終報告書	2007 年 2 月 1 日	2007 年 2 月 1 日

2007 年 2 月 1 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. 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	20
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	20
7. 試験結果	20
8. 備 考	24

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 recovery rate of 13F-EtOH
Table-4	Calculation table for recovery rate of 13F-AcOH
Table-5	Calculation table for percentage biodegradation of test item
Table-6	Calculation table for percentage production of 13F-EtOH
Table-7	Calculation table for percentage production of 13F-AcOH
Table-8	Calculation table for percentage production of methacrylic acid (test solution for analysis of methacrylic acid)
Reference 1	Calculation table for percentage detection of methacrylic acid (CO ₂ absorbent, test solution for analysis of methacrylic acid)
Reference 2	Calculation table for percentage detection of methacrylic acid (CO ₂ absorbent)

Figures

- | | |
|-------------|--|
| Fig.1 | Chart of BOD |
| Fig.2-1 | Chromatograms of GC analysis for calibration curve (test item) |
| Fig.2-2 | Calibration curve of test item |
| Fig.3-1 | Chromatograms of GC analysis for calibration curve (13F-EtOH) |
| Fig.3-2 | Calibration curve of 13F-EtOH |
| Fig.4-1 | Total ion chromatograms of LC-MS analysis for calibration curve (13F-AcOH) |
| Fig.4-2 | Calibration curve of 13F-AcOH |
| Fig.5-1 | Chromatograms of HPLC analysis for calibration curve (methacrylic acid) |
| Fig.5-2 | Calibration curve of methacrylic acid |
| Fig.6 | Chromatograms of GC analysis for recovery test (test item) |
| Fig.7 | Chromatograms of GC analysis for recovery test (13F-EtOH) |
| Fig.8 | Total ion chromatograms of LC-MS analysis for recovery test
(13F-AcOH) |
| Fig.9 | Chromatograms of GC analysis for test solution (test item and 13F-EtOH) |
| Fig.10 | Total ion chromatograms of LC-MS analysis for test solution (13F-AcOH) |
| Fig.11 | Chromatograms of HPLC analysis for test solution for analysis of
methacrylic acid (methacrylic acid) |
| Fig.12 | UV spectrum of methacrylic acid |
| Fig.13 | Mass spectrum of 13F-AcOH |
| Fig.14-1 | IR spectrum of test item measured before experimental start |
| Fig.14-2 | IR spectrum of test item measured after experimental completion |
| Reference 3 | IR spectrum supplied by sponsor |
| Reference 4 | Chromatograms of HPLC analysis for CO ₂ absorbent (methacrylic acid,
test solution for analysis of methacrylic acid) |
| Reference 5 | Chromatograms of HPLC analysis for CO ₂ absorbent (methacrylic acid) |

表 題	13F-SFMA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-SFMA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	2006年11月20日
実験開始日	2006年12月13日
実験終了日	2007年1月10日
試験終了日	2007年2月1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

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

2007年2月 / 日

試験責任者

要 約

試験の表題

13F-SFMA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) ガスクロマトグラフィー (GC) による被験物質の定量分析

その他の分析

- (1) ガスクロマトグラフィー (GC) による2-(ペルフルオロヘキシル)エタノールの定量分析
- (2) 液体クロマトグラフィー質量分析法 (LC-MS) による3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクタン酸の定量分析
- (3) 高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によるメタクリル酸の定量分析

試験結果

(1) BOD分解度	16%,	11%,	14%	平均	14%
(2) 被験物質分解度 (GC)	5%,	15%,	4%	平均	8%

結 論

本試験条件下において、一部の被験物質が変化し、メタクリル酸、2-(ペルフルオロヘキシル)エタノール及び3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクタン酸が生成した。生成したメタクリル酸の一部は炭酸ガス吸収剤に移行し、残りは微生物により分解されたと考えられる。また、被験物質、2-(ペルフルオロヘキシル)エタノール及び3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクタン酸は分解されずに残留した。

1. 被験物質

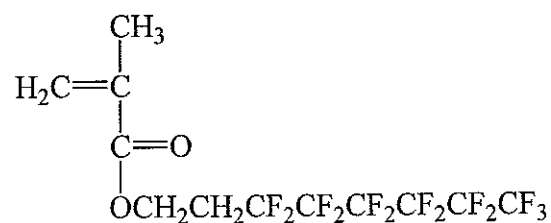
本報告書において13F-SFMAは、次の名称等を有するものとする。

1.1 名 称^{*1}

3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクチル=メタクリレート

1.2 構造式等^{*1}

構 造 式



分 子 式 $\text{C}_{12}\text{H}_9\text{F}_{13}\text{O}_2$

分 子 量 432.18

CAS番号 2144-53-8

^{*1} 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^{*1}

供 給 者	ダイキン工業株式会社
ロット番号	6Y002

2.2 純 度^{*1}

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.14、Reference 3参照)。

2.4 物理化学的性状^{*1}

常温における性状	無色透明液体	
沸 点	92°C (8mmHg)	
密 度	1.496g/cm ³ (25°C)	
溶 解 度	水	不溶
	ジメチルスルホキシド	可溶 (任意に混合)
	アセトン	可溶 (任意に混合)

*1 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.14参照)。

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 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。

*3 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50g/L合成下水^{*4}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。

*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21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

2006年10月17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 2006年12月11日

測定結果 活性汚泥の懸濁物質濃度は3210mg/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 SR-2626U）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20.5 μ L [添加量30.7mg=20.5 μ L $\times$ 1.496g/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 (2.80mL) を差し引いた量] 及び供試試料20.5 μ L [添加量30.7mg=20.5 μ L $\times$ 1.496g/cm³ (密度)] 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 [5])

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 (2.80mL) 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 [6])

試験容器に基礎培養基 [300mLから活性汚泥添加液量 (2.80mL) 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 大倉電気製
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 $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$

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

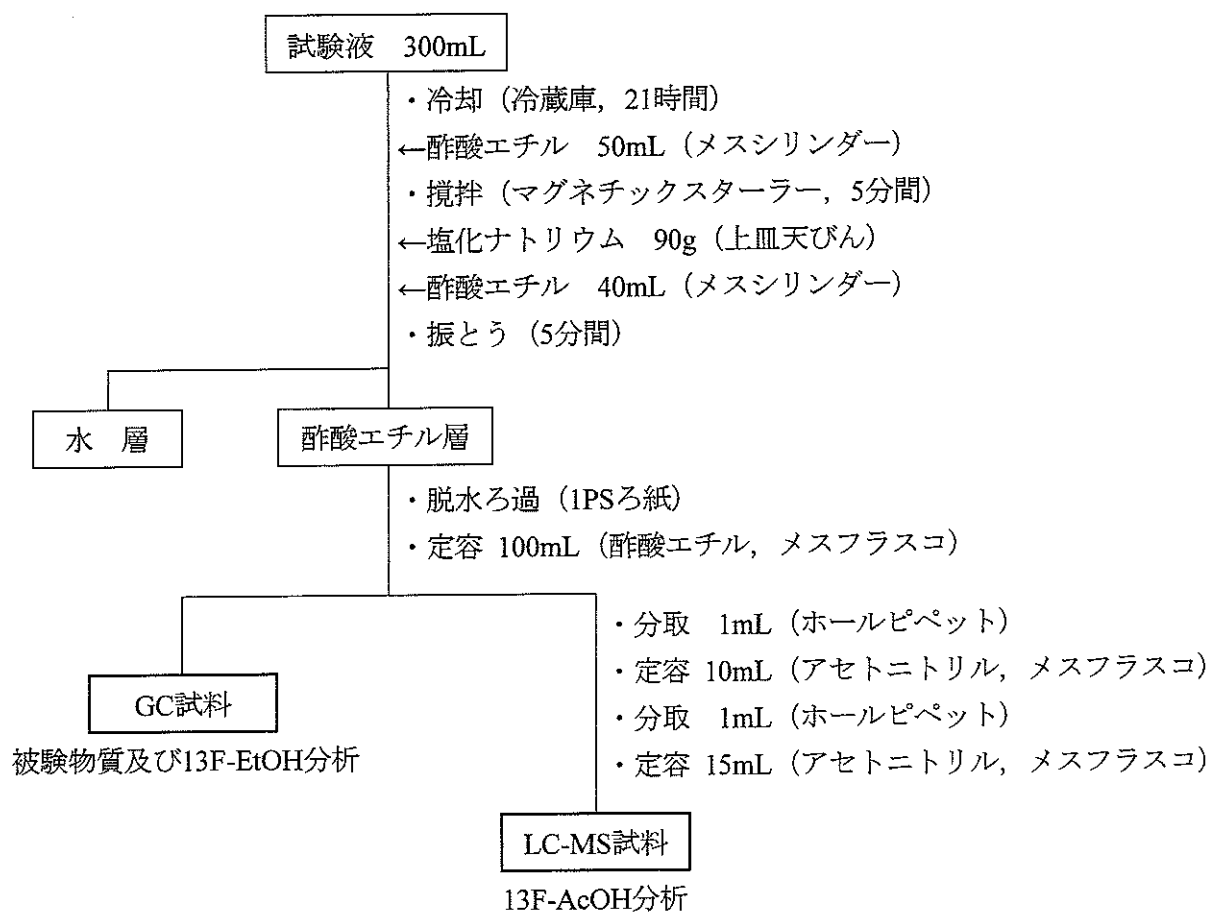
培養期間終了後、試験液中の被験物質及び予備試験の結果生成が予想される変化物2-(ペルフルオロヘキシル)エタノール（以下、13F-EtOHと略記）について分析した。さらに、生成の可能性がある3,3,4,5,5,6,6,7,7,8,8-トリデカフルオロオクタン酸（以下、13F-AcOHと略記）についても分析した。なお、被験物質は揮発性を有するため、試験液のpHは測定しなかった。

13F-EtOHの生成に伴って生成が予想されたメタクリル酸〔官報公示整理番号(2)-1025、良分解〕については、その分析試料を調製するための前処理操作において被験物質及び13F-EtOHの揮発による損失が考えられたため、別途、試験液を調製してメタクリル酸の分析に供した（4.6参照）。

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、被験物質及び13F-EtOHを分析するためのガスクロマトグラフィー（GC）試料、並びに13F-AcOH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



4.5.2 定量分析

(1) ガスクロマトグラフィーによる被験物質及び13F-EtOH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及び13F-EtOH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307mg/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-5、Fig.9参照)。また、13F-EtOHの濃度は、クロマトグラム上で得られた標準溶液252mg/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-6、Fig.9参照)。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して $1800\mu\text{V} \cdot \text{sec}$ (被験物質濃度3.0mg/L、13F-EtOH濃度4.3mg/L) とした。

(a) 定量条件

機 器	ガスクロマトグラフ
	Hewlett Packard製 HP6890 Series
検 出 器	水素炎イオン化検出器 (FID)
カ ラ ム	DB-17 膜厚 0.25 μm (Agilent Technologies製)
	30m $\times$ 0.25mmI.D. フューズドシリカ製
カ ラ ム 温 度	40 $^{\circ}\text{C}$ (3min) $\rightarrow$ 140 $^{\circ}\text{C}$ (0min)
昇 温 速 度	15 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$
試料導入部温度	200 $^{\circ}\text{C}$
キャリアガス	ヘリウム
カラム流量	1.0mL/min
水 素	40 mL/min
空 気	400 mL/min
注 入 量	1 μL
導 入 モ ー ド	スプリット
スプリット比	5:1
検 出 器	
温 度	200 $^{\circ}\text{C}$
感 度	レンジ 2 $^{\circ}$

(b) 標準溶液の調製

分析試料中の被験物質及び13F-EtOH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

供試試料20.5 μ L [被験物質30.7mg=20.5 μ L $\times$ 1.496g/cm³ (密度)] を分取し、酢酸エチルに溶解して1020mg/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307mg/Lの標準溶液とした。

② 13F-EtOH

13F-EtOH (試験委託者提供品) *5 15.0 μ L [13F-EtOH 25.2mg=15.0 μ L $\times$ 1.678g/cm³ (密度)] を分取し、酢酸エチルに溶解して839mg/Lの13F-EtOH溶液を調製した。これを酢酸エチルで希釈して252mg/Lの標準溶液とした。

*5 純 度 99.8%
ロット番号 180804
純度100%として取り扱った。

(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76.7、153及び307mg/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)。

② 13F-EtOH

(b)②の標準溶液の調製と同様にして62.9、126及び252mg/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.3参照)。

(2) 液体クロマトグラフィー質量分析法による13F-AcOHの定量分析

前処理を行って得られたLC-MS試料について、下記の定量条件に基づき13F-AcOHを分析した。13F-AcOHをLC-MSで分析したところ、質量数376.9及び754.8の負イオンが検出されたため、これらを分析に使用した。LC-MS試料中の13F-AcOHの濃度は、トータルイオンクロマトグラム上で得られた標準溶液2.00mg/Lのピーク面積とLC-MS試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた(Table-7、Fig.10参照)。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して800 (13F-AcOH濃度0.019mg/L) とした。

(a) 定量条件

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	Alliance2690
質量分析計	Waters製	ZMD

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 (80%) : アセトニトリル/ぎ酸 (500/0.25 V/V) B (20%) : 水 ^{*6} /ぎ酸 (500/0.25 V/V)
流量	0.2mL/min
注入量	1μL

*6 水道水を超純水装置システムで処理した水。

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	負イオン
検出法	選択イオンモニタリング (SIM)
測定イオン(m/z)	376.9, 754.8 (Fig.13参照)
イオン源温度	120℃
脱溶媒システム温度	350℃
コーン電圧	20V

(b) 標準溶液の調製

分析試料中の13F-AcOH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。

13F-AcOH（試験委託者提供品）^{*7}100mgを正確にはかりとり、アセトニトリルに溶解して1000mg/Lの13F-AcOH溶液を調製した。これをアセトニトリルで希釈して2.00mg/Lの標準溶液とした。

*7 純 度 99.4%

ロット番号 S6X01

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0.500、1.00及び2.00mg/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トータルイオン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.4参照）。

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、13F-EtOH及び13F-AcOH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、（水＋13F-EtOH）系及び（汚泥＋13F-EtOH）系、（水＋13F-AcOH）系及び（汚泥＋13F-AcOH）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、13F-EtOH及び13F-AcOH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、13F-EtOH及び13F-AcOH濃度を求める場合の補正值とした。

(1) 被 験 物 質 (Table-2、Fig.6参照)

回収試験は被験物質 30.7mgを添加して行った。

（水＋被験物質）系回収率	94.8%, 94.5%	平均	94.7%
（汚泥＋被験物質）系回収率	94.0%, 95.0%	平均	94.5%

(2) 13F-EtOH (Table-3、Fig.7参照)

回収試験は13F-EtOH 25.2mgを添加して行った。

（水＋13F-EtOH）系回収率	96.2%, 96.1%	平均	96.2%
（汚泥＋13F-EtOH）系回収率	96.5%, 97.5%	平均	97.0%

(3) 13F-AcOH (Table-4、Fig.8参照)

回収試験は13F-AcOH 30mgを添加して行った。

（水＋13F-AcOH）系回収率	96.0%, 96.7%	平均	96.4%
（汚泥＋13F-AcOH）系回収率	96.7%, 96.4%	平均	96.6%

4.6 メタクリル酸分析用試験液の調製及び分析

生成が予想されたメタクリル酸の分析を行うために、4.2に示す試験液とは別に（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を4.2に従って1点ずつ調製し、培養した。培養期間中、4.4(1)に従って観察を行った。培養期間終了後、試験液中のメタクリル酸を分析した。

(1) 培養条件

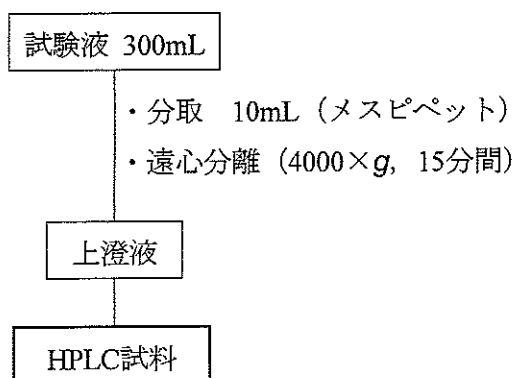
培養方法	300mL用培養瓶(揮発性物質用改良型培養瓶)を用い、試験容器にエアタンクを取り付け閉鎖系で培養した。また、4.3(1)の炭酸ガス吸収剤を使用した。
試験液培養温度	約25℃
試験液培養期間	28日間（遮光下） ^{*8}
撈拌方法	マグネチックスターラーによる回転撈拌
実施場所	環境調節室

^{*8} 培養は実験開始日から実験終了日まで行った。

(2) 試験液の前処理

メタクリル酸分析用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、メタクリル酸を分析するための高速液体クロマトグラフィー（HPLC）試料を調製した。

フロースキーム



(3) 高速液体クロマトグラフィーによるメタクリル酸の定量分析

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メタクリル酸を分析した。HPLC試料中のメタクリル酸の濃度は、クロマトグラム上で得られた標準溶液20.0mg/Lのピーク面積とHPLC試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた（Table-8、Fig.11参照）。

ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して15000 μ V・sec（メタクリル酸濃度0.20mg/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}
システムコントローラー	島津製作所製 SCL-10A _{VP}
デガッサー	島津製作所製 DGU-14AM
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	35℃
溶離液	A (30%) :アセトニトリル／りん酸 (1000/1 V/V) B (70%) :水 ^{*6} ／りん酸 (1000/1 V/V)
流量	0.2mL/min
測定波長	205nm (Fig.12参照)
注入量	5 μ L
検出器出力	1V/AU

(b) 標準溶液の調製

分析試料中のメタクリル酸の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。

メタクリル酸（和光純薬工業製 試薬特級）^{*9} 100mgを正確にはかりとり、精製水に溶解して1000mg/Lのメタクリル酸溶液を調製した。これを精製水で希釈して20.0mg/Lの標準溶液とした。

^{*9} 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5.00、10.0及び20.0mg/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）。

4.7 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

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}^{*10}} \times 100$$

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^{*10} : 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)

*10 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)

4.8 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	5%	20%未満	7.3項 分解度
	被 験 物 質 分 解 度	11%		
アニリンのBOD 分解度	7日後	62%	40%以上	Table-1 Fig.1
	14日後	72%	65%以上	
汚泥ブランク系 のBOD値	28日後	7.7mg	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。	*11
	(汚泥 + 被験物質) 系	汚泥以外の不溶物が認められた。 汚泥の増殖は確認できなかった。 試験液は無色であった。	*11

*11 被験物質は揮発性物質と考えられたため、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 ^{*12}	mg	0	4.8	3.4	4.2	30.1		1	1
被験物質残留量 及び残留率 (GC)	mg	30.0	28.6	25.6	28.8	30.7	5	9	
	%①	98	93	83	94	-			
13F-EtOH生成量 及び生成率 (GC)	mg	0.6	2.6	4.2	1.3	25.9	6	9	
	%②	3	10	16	5	-			
13F-AcOH生成 量及び生成率 (LC-MS)	mg	0	0.6	0.6	1.4	26.9	7	10	
	%③	0	2	2	5	-			
メタクリル酸生成	-	分析用試料を調製するための前処理 操作において被験物質及び13F-EtOH の揮発による損失が考えられたため、 分析は行わなかった。				-	-	-	-
アルキル鎖部分 の物質収支 (①+②+③)	%	101	105	101	104	-	-	-	-

*12 (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。

28日後のメタクリル酸分析用試験液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.
メタクリル酸生 成量及び生成率 (HPLC)	mg	0	0	6.1	8	11
	%	0	0	-		

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	%	16	11	14	14	1
被験物質分解度 (GC)	%	5	15	4	8	5

7.4 考 察

(1) 本試験結果について

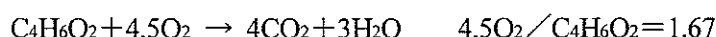
被験物質分析の結果、被験物質の残留率が（水＋被験物質）系で98%、（汚泥＋被験物質）系で83～94%と低下したため、予備試験結果より生成が予想された2-(ペルフルオロヘキシル)エタノール（以下、13F-EtOHと記載）の分析を行った。その結果、（水＋被験物質）系及び（汚泥＋被験物質）系から13F-EtOHが検出された（Fig.9参照）。被験物質の残留率及び13F-EtOHの生成率より算出した被験物質のアルキル鎖部分（次頁参照）の物質収支（7.2の①＋②に相当）は、（水＋被験物質）系で101%、（汚泥＋被験物質）系で99～103%と良好であった。しかしながら、生成の可能性が考えられた3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクタン酸（以下、13F-AcOHと略記）について分析を行ったところ、（汚泥＋被験物質）系から理論量に対して2～5%の13F-AcOHが検出された（Fig.10参照）。以上の結果より、（汚泥＋被験物質）系におけるアルキル鎖部分の物質収支がほぼ100%になることから、アルキル鎖部分を含む残留物は被験物質、13F-EtOH及び13F-AcOHの3成分と考えられる。

一方、被験物質のメタクリル酸部分（次頁参照）に関しては、メタクリル酸〔官報公示整理番号(2)-1025、良分解〕の分析試料を調製するための前処理操作において被験物質の揮発による損失が考えられたため、別途、試験液を調製してメタクリル酸を分析した。その結果、メタクリル酸分析用試験液からメタクリル酸は検出されなかった（Fig.11参照）。そこで、メタクリル酸の移行が考えられたメタクリル酸分析用試験液の炭酸ガス吸収剤について分析を試みたところ、メタクリル酸が検出され、被験物質の加水分解に伴うメタクリル酸の生成が確認された（8.1参照）。

次いで、分解度試験液の炭酸ガス吸収剤について同様の分析を行ったところ、（水＋被験物質）系では理論量に対して3%のメタクリル酸が検出され、試験液から検出された13F-EtOHの生成率（3%）と一致した（7.2、8.1参照）。このことから、炭酸ガス吸収剤へ移行したメタクリル酸のほぼ全量を回収できたと考えられる。一方、（汚泥＋被験物質）系ではメタクリル酸の検出率（1%、2%、1%、平均1%）が試験液から検出された13F-EtOH及び13F-AcOHの生成率の合計（12%、18%、10%、平均13%）より小さいことから、生成したメタクリル酸の一部が試験液中で分解された可能性が高いと考えられる（7.2、8.1参照）。なお、メタクリル酸の不足分（12%）に相当するBOD分解度は4%^{*13}と小さいため、BOD分解度からメタクリル酸の分解は判断できなかった。

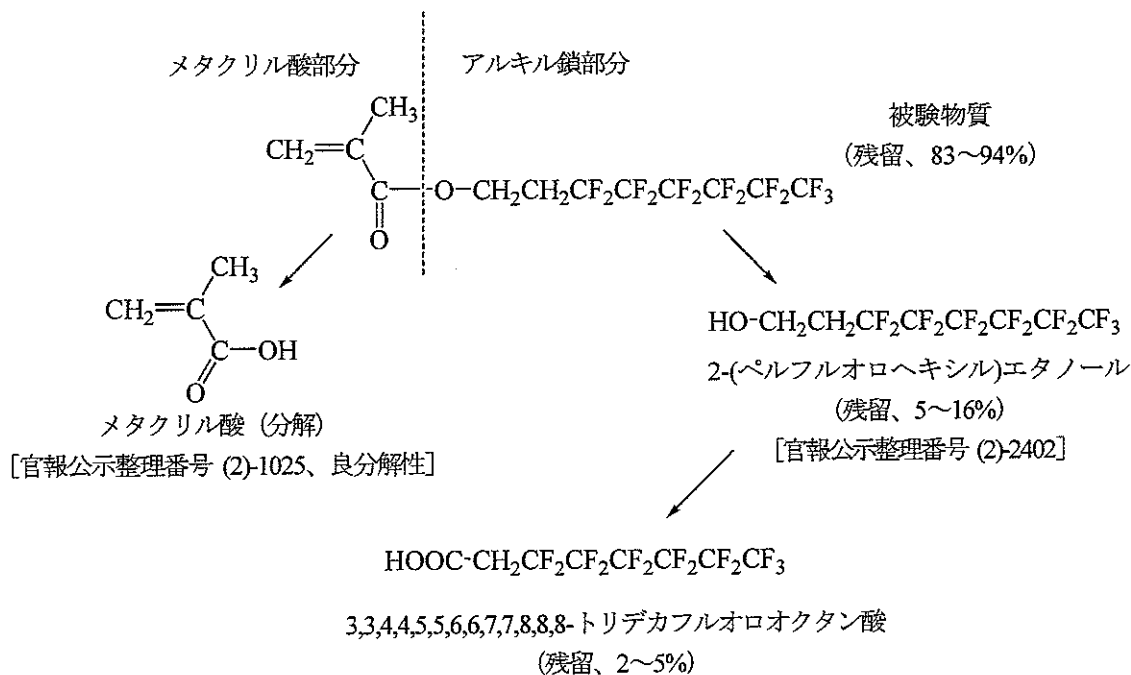
以上の結果より、本試験条件下で一部の被験物質が変化してメタクリル酸、13F-EtOH及び13F-AcOHが生成し、試験液には被験物質、13F-EtOH及び13F-AcOHの3成分が残留したと考えられる。

*13 理論量の12%に相当するメタクリル酸（C₄H₆O₂）が分解した場合のBOD分解度



$$\text{BOD分解度} = \{30.7 \times \text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2 / \text{C}_{12}\text{H}_9\text{F}_{13}\text{O}_2 \times 12 / 100 \times 1.67\} / 30.1 \times 100 = 4 \text{ (\%)}$$

(汚泥+被験物質)系における被験物質の変化(推定)



(2) BOD分解度について

(1)に記載したように分解したと考えられるメタクリル酸量に相当するBOD分解度は4%と小さいため、本試験においてBOD分解度が16%、11%、14%と算出された主な原因として、各試験液における活性汚泥の基礎呼吸量のばらつきの寄与が考えられる。

7.5 結 論

本試験条件下において、一部の被験物質が変化し、メタクリル酸、2-(ペルフルオロヘキシル)エタノール及び3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクタン酸が生成した。生成したメタクリル酸の一部は炭酸ガス吸収剤に移行し、残りは微生物により分解されたと考えられる。また、被験物質、2-(ペルフルオロヘキシル)エタノール及び3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクタン酸は分解されずに残留した。

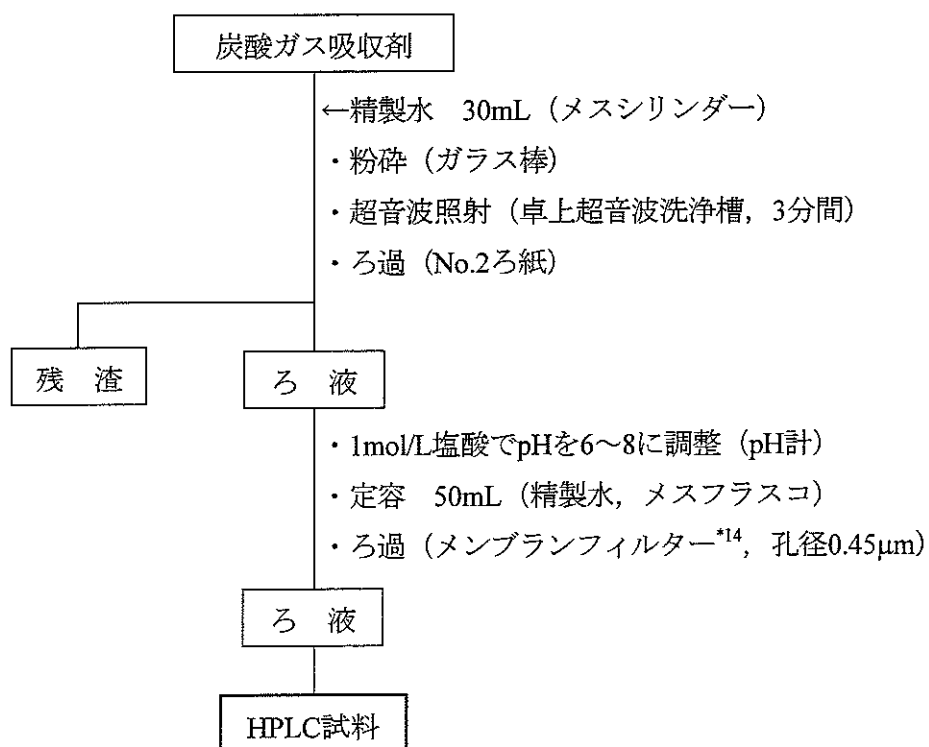
8. 備 考

8.1 炭酸ガス吸収剤中のメタクリル酸分析

メタクリル酸分析用試験液からメタクリル酸が検出されなかったことから、生成したメタクリル酸が炭酸ガス吸収剤へ移行した可能性が考えられた。そこで、メタクリル酸分析用試験液の炭酸ガス吸収剤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、メタクリル酸を分析した。その結果、メタクリル酸が検出されたため、分解度試験液の炭酸ガス吸収剤についても同様の分析を行った。

(1) 炭酸ガス吸収剤の前処理

フロースキーム



*14 Nuclepore製 Syrifil-MF

(2) 分析条件

4.6 (3) 参照。

(3) 分析結果

メタクリル酸分析用試験液の炭酸ガス吸収剤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	Reference
メタクリル酸検出量及び検出率 (HPLC)	mg	0.1	0.1	6.1	1, 4
	%	2	2	-	

分解度試験液の炭酸ガス吸収剤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	Reference
		[1]	[2]	[3]	[4]			
メタクリル酸検出量及び検出率 (HPLC)	mg	0.2	0.1	0.1	0.1	6.1	2, 5	
	%	3	1	2	1	-		

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	
液体クロマトグラフー質量分析計	:	14頁参照	
高速液体クロマトグラフ	:	18頁参照	
天びん	:	ザルトリウス製	BP210S
紫外可視分光光度計	:	日本分光製	V-660
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
pH計	:	東亜電波工業製	HM-50G
卓上超音波洗浄槽	:	ヤマト科学製	B-32H

8.3 分析に使用した試薬

アセトニトリル	:	和光純薬工業製	HPLC用
精製水	:	高杉製薬製	日本薬局方
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
りん酸	:	和光純薬工業製	試薬特級
ぎ酸	:	和光純薬工業製	試薬特級
メタクリル酸	:	和光純薬工業製	試薬特級
1mol/L塩酸	:	和光純薬工業製	容量分析用
2-(ペルフルオロヘキシル)エタノール	:	試験委託者提供品	
3,3,4,4,5,5,6,6,7,7,8,8,8-トリデカフルオロオクタン酸	:	試験委託者提供品	

Table-1 Calculation table for percentage biodegradation by BOD

Study No. 14739		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. (%)	
[5]	57.8	62	70.3	72	71.1	71	71.4	71	
[6]	1.7	-	5.3	-	7.1	-	7.7	-	
[2]	1.7	0	6.8	5	10.5	11	12.5	16	14
[3]	1.4	-1	5.9	2	9.2	7	11.1	11	
[4]	1.7	0	6.8	5	10.0	10	11.9	14	
[1]	0.0	-	0.0	-	0.0	-	0.0	-	

Deg. : Percentage biodegradation

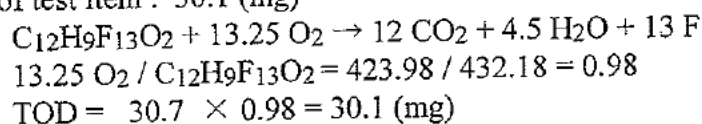
Vessel No. [5] : Sludge + aniline
Vessel No. [6] : Control blank [B]
Vessel No. [2] [3] [4] : Sludge + test item
Vessel No. [1] : Water + test item

Test item of 30.7 mg was added.

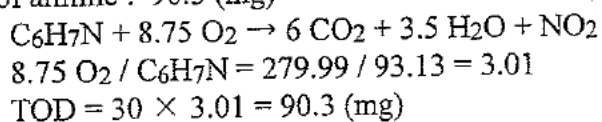
Chart of BOD : Fig. 1

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

TOD of test item : 30.1 (mg)



TOD of aniline : 90.3 (mg)



Jan.10,2007 Name _____

Table-2 Calculation table for recovery rate of test item

Study No. 14739

Sample description	A	D	E	F
Standard solution 307mg/L	174335			
Water + test item -1	165284	29.1	94.8	94.7
Water + test item -2	164751	29.0	94.5	
Sludge + test item -1	163925	28.9	94.0	94.5
Sludge + test item -2	165554	29.2	95.0	
Control blank	n.d.			

Amount of test item added : 30.7 (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 (%)

$$E = D / 30.7 (\text{mg}) \times 100$$

F : Average recovery rate (%)

G : Concentration of standard solution : 307 (mg/L)

See Fig. 6

January 18, 2007

Name _____

Table-3 Calculation table for recovery rate of 13F-EtOH

Study No. 14739

Sample description	A	D	E	F
Standard solution 252mg/L	102048			
Water + 13F-EtOH -1	98210	24.3	96.2	96.2
Water + 13F-EtOH -2	98099	24.2	96.1	
Sludge + 13F-EtOH -1	98467	24.3	96.5	97.0
Sludge + 13F-EtOH -2	99470	24.6	97.5	
Control blank	n.d.			
Amount of 13F-EtOH added : 25.2 (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) $D_w = G \times (A(\text{Water} + 13\text{F-EtOH}) / A(\text{Standard})) \times (B / C) / 1000$ $D_s = G \times \{ (A(\text{Sludge} + 13\text{F-EtOH}) - A(\text{Control blank})) / A(\text{Standard}) \} \times (B / C) / 1000$ E : Recovery rate (%) $E = D / 25.2 (\text{mg}) \times 100$ F : Average recovery rate (%) G : Concentration of standard solution : 252 (mg/L) See Fig. 7				

January 18, 2007

Name _____

Table-4 Calculation table for recovery rate of 13F-AcOH

Study No. 14739

Sample description	A	D	E	F
Standard solution 2.00mg/L	91022			
Water + 13F-AcOH -1	87401	28.8	96.0	96.4
Water + 13F-AcOH -2	88009	29.0	96.7	
Sludge + 13F-AcOH -1	87989	29.0	96.7	96.6
Sludge + 13F-AcOH -2	87784	28.9	96.4	
Control blank	n.d.			

Amount of 13F-AcOH added : 30 (mg)

A : Peak area (-)

B : Final volume : 15 (mL)

C : Ratio of portion used for analysis : 1/10×1/100×300/300

D : Recovery amount (mg)

$$D_w = G \times (A(\text{Water} + 13\text{F-AcOH}) / A(\text{Standard})) \times (B / C) / 1000$$

$$D_s = G \times \{ (A(\text{Sludge} + 13\text{F-AcOH}) - A(\text{Control blank})) / A(\text{Standard}) \} \times (B / C) / 1000$$

E : Recovery rate (%)

$$E = D / 30 \text{ (mg)} \times 100$$

F : Average recovery rate (%)

G : Concentration of standard solution : 2.00 (mg/L)

See Fig. 8

January 18, 2007

Name: _____

Table-5 Calculation table for percentage biodegradation of test item

Study No. 14739

Sample description	A	E	F	G	H
Standard solution 307mg/L	186406				
[1] Water + test item	172719	30.0	98		
[2] Sludge + test item	164291	28.6	93	5	
[3] Sludge + test item	147005	25.6	83	15	8
[4] Sludge + test item	165122	28.8	94	4	
[6] Control blank	n.d.				

Amount of test item added : 30.7 (mg)

A : Peak area (μ V-sec)

B : Final volume : 100 (mL)

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

D : Recovery rate : 94.7 (%) (Water + test item)
94.5 (%) (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 (%)

$$F = E / 30.7 \text{ (mg)} \times 100$$

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 : 307 (mg/L)

See Fig. 9

January 31, 2007 Name _____

Table-6 Calculation table for percentage production of 13F-EtOH

Study No. 14739

Sample description	A	E	F	G
Standard solution 252mg/L	106133			
[1] Water + test item	2630	0.6	3	3
[2] Sludge + test item	10448	2.6	10	
[3] Sludge + test item	17160	4.2	16	10
[4] Sludge + test item	5355	1.3	5	
[6] Control blank	n.d.			

Amount of test item added : 30.7 (mg)
Theoretical amount of 13F-EtOH : 25.9 (mg)
 $(30.7) \times (C_8H_5F_{13}O / C_{12}H_9F_{13}O_2)$

A : Peak area ($\mu V \cdot sec$)
B : Final volume : 100 (mL)
C : Ratio of portion used for analysis : 300/300
D : Recovery rate : 96.2 (%) (Water + test item)
97.0 (%) (Sludge + test item)
E : Amount of 13F-EtOH (mg)
 $E_w = H \times (A(\text{Water + test item}) / A(\text{Standard})) \times (B / C) / (D / 100) / 1000$
 $E_s = H \times \{ (A(\text{Sludge + test item}) - A(\text{Control blank})) / A(\text{Standard}) \}$
 $\times (B / C) / (D / 100) / 1000$
F : Percentage production (%)
 $F = E / 25.9 \text{ (mg)} \times 100$
G : Average percentage production (%)
H : Concentration of standard solution : 252 (mg/L)
See Fig. 9

January 22, 2007

Name _____

Table-7 Calculation table for percentage production of 13F-AcOH

Study No. 14739

Sample description	A	E	F	G
Standard solution 2.00mg/L	83124			
[1] Water + test item	n.d.	0	0	0
[2] Sludge + test item	1728	0.6	2	
[3] Sludge + test item	1714	0.6	2	3
[4] Sludge + test item	3715	1.4	5	
[6] Control blank	n.d.			

Amount of test item added : 30.7 (mg)
Theoretical amount of 13F-AcOH : 26.9 (mg)
 $(30.7) \times (C_8H_3F_{13}O_2 / C_{12}H_9F_{13}O_2)$

A : Peak area (-)
B : Final volume : 15 (mL)
C : Ratio of portion used for analysis : 1/10×1/100×300/300
D : Recovery rate : 96.4 (%) (Water + test item)
96.6 (%) (Sludge + test item)
E : Amount of 13F-AcOH (mg)
 $E_w = H \times (A(\text{Water + test item}) / A(\text{Standard})) \times (B / C) / (D / 100) / 1000$
 $E_s = H \times \{ (A(\text{Sludge + test item}) - A(\text{Control blank})) / A(\text{Standard}) \}$
 $\times (B / C) / (D / 100) / 1000$
F : Percentage production (%)
 $F = E / 26.9 \text{ (mg)} \times 100$
G : Average percentage production (%)
H : Concentration of standard solution : 2.00 (mg/L)
See Fig. 10

January 22, 2007

Name _____

Table-8 Calculation table for percentage production of methacrylic acid
(test solution for analysis of methacrylic acid)

Study No. 14739

Sample description	A	D	E
Standard solution 20.0mg/L	1521555		
Water + test item	n.d.	0	0
Sludge + test item	n.d.	0	0
Control blank	n.d.		

Amount of test item added : 30.7 (mg)
Theoretical amount of methacrylic acid : 6.1 (mg)
 $(30.7) \times (C_4H_6O_2 / C_{12}H_9F_{13}O_2)$

A : Peak area ($\mu V \cdot sec$)
B : Final volume : 10 (mL)
C : Ratio of portion used for analysis : 10/300
D : Amount of methacrylic acid (mg)
 $D_w = F \times (A(\text{Water + test item}) / A(\text{Standard})) \times (B / C) / 1000$
 $D_s = F \times \{ (A(\text{Sludge + test item}) - A(\text{Control blank})) / A(\text{Standard}) \} \times (B / C) / 1000$
E : Percentage production (%)
 $E = D / 6.1 \text{ (mg)} \times 100$
F : Concentration of standard solution : 20.0 (mg/L)

See Fig. 11

January 31, 2007

Name _____

Reference 1 Calculation table for percentage detection of methacrylic acid
(CO₂ absorbent, test solution for analysis of methacrylic acid)

Study No. 14739

Sample description	A	D	E
Standard solution 20.0mg/L	1518705		
Water + test item	225650	0.1	2
Sludge + test item	140937	0.1	2
Control blank	n.d.		

Amount of test item added : 30.7 (mg)
Theoretical amount of methacrylic acid : 6.1 (mg)
 $(30.7) \times (C_4H_6O_2 / C_{12}H_9F_{13}O_2)$

A : Peak area ($\mu V \cdot sec$)
B : Final volume : 50 (mL)
C : Ratio of portion used for analysis : 1
D : Amount of methacrylic acid (mg)
 $D_w = F \times (A(\text{Water} + \text{test item}) / A(\text{Standard})) \times (B / C) / 1000$
 $D_s = F \times \{ (A(\text{Sludge} + \text{test item}) - A(\text{Control blank})) / A(\text{Standard}) \} \times (B / C) / 1000$
E : Percentage detection (%)
 $E = D / 6.1 \text{ (mg)} \times 100$
F : Concentration of standard solution : 20.0 (mg/L)

See Reference 4

January 31, 2007

Name _____

Reference 2 Calculation table for percentage detection of methacrylic acid
(CO₂ absorbent)

Study No. 14739

Sample description	A	D	E	F
Standard solution 20.0mg/L	1523373			
[1] Water + test item	275549	0.2	3	3
[2] Sludge + test item	103843	0.1	1	
[3] Sludge + test item	165511	0.1	2	1
[4] Sludge + test item	108086	0.1	1	
[6] Control blank	n.d.			

Amount of test item added : 30.7 (mg)
Theoretical amount of methacrylic acid : 6.1 (mg)
 $(30.7) \times (C_4H_6O_2 / C_{12}H_9F_{13}O_2)$

A : Peak area ($\mu V \cdot sec$)
B : Final volume : 50 (mL)
C : Ratio of portion used for analysis : 1
D : Amount of methacrylic acid (mg)
 $D_w = G \times (A(\text{Water} + \text{test item}) / A(\text{Standard})) \times (B / C) / 1000$
 $D_s = G \times \{ (A(\text{Sludge} + \text{test item}) - A(\text{Control blank})) / A(\text{Standard}) \} \times (B / C) / 1000$
E : Percentage detection (%)
 $E = D / 6.1 \text{ (mg)} \times 100$
F : Average percentage detection (%)
G : Concentration of standard solution : 20.0 (mg/L)
See Reference 5

January 31, 2007

Name _____

Study No. 14739 (Test item 13F-SFMA)

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 (Dec.13,2006 - Jan.10,2007)

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	1.7	6.8	10.5	12.5
[3]	Sludge + test item	1.4	5.9	9.2	11.1
[4]	Sludge + test item	1.7	6.8	10.0	11.9
[5]	Sludge + aniline	57.8	70.3	71.1	71.4
[6]	Control blank [B]	1.7	5.3	7.1	7.7

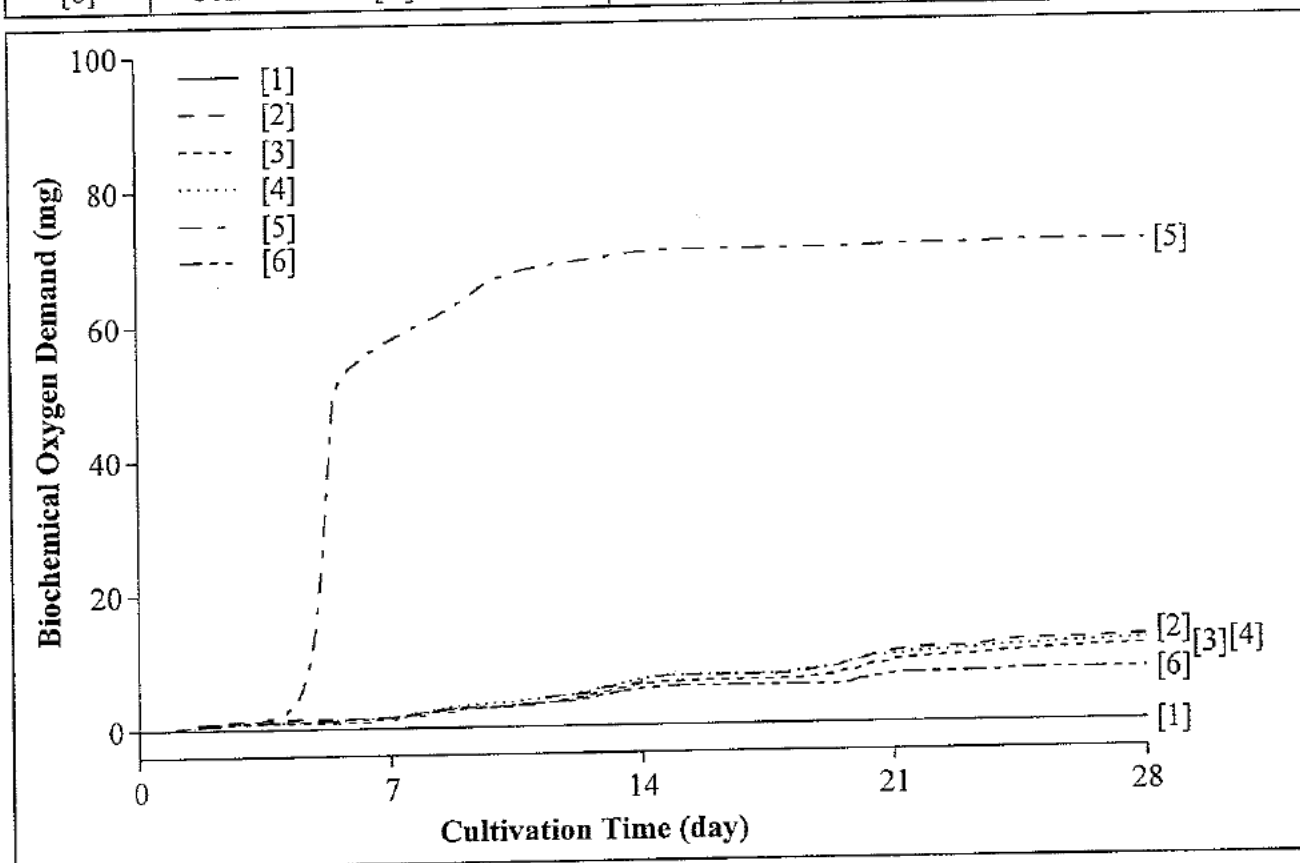


Fig. 1 Chart of BOD.

Jan.10,2007 Name _____

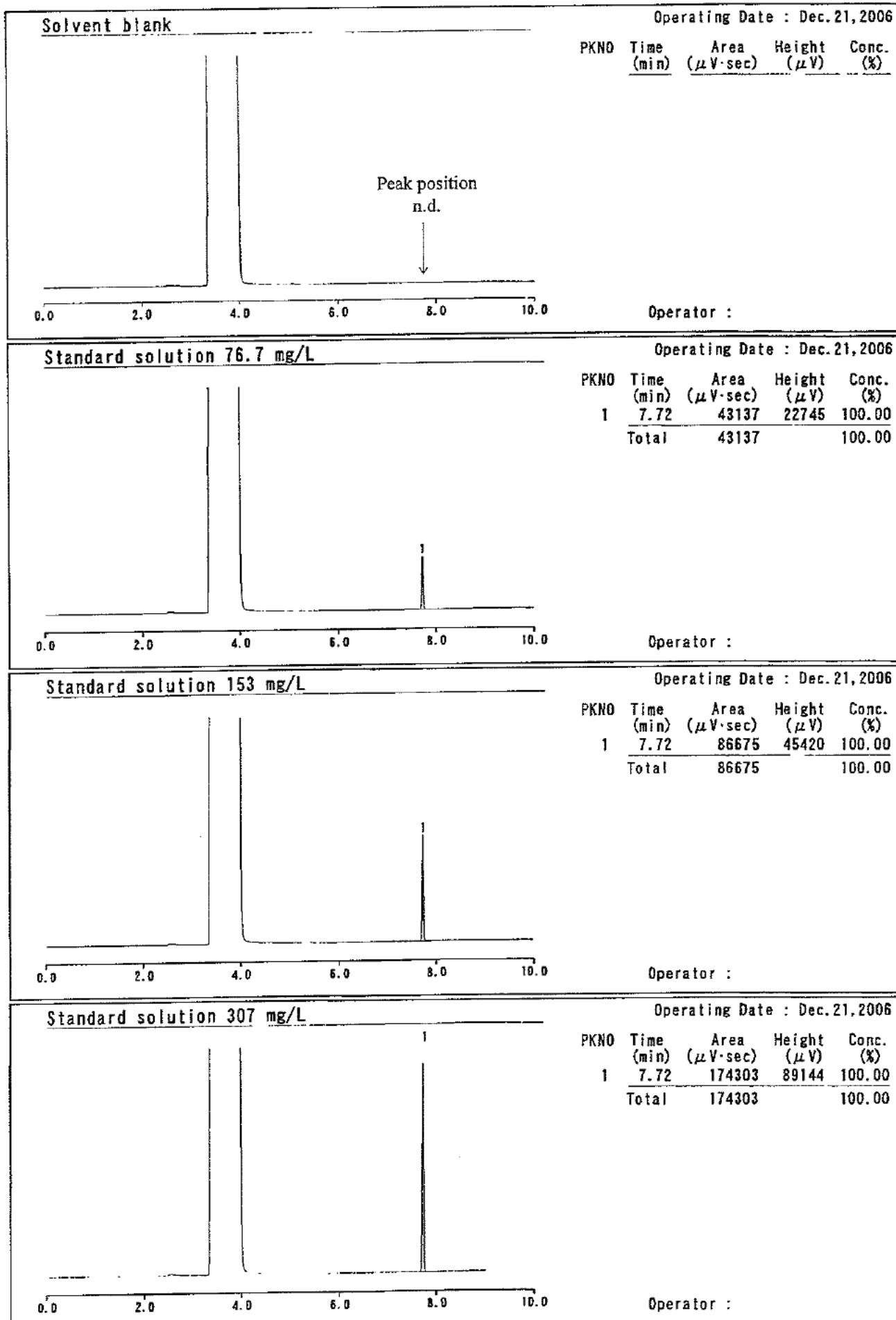
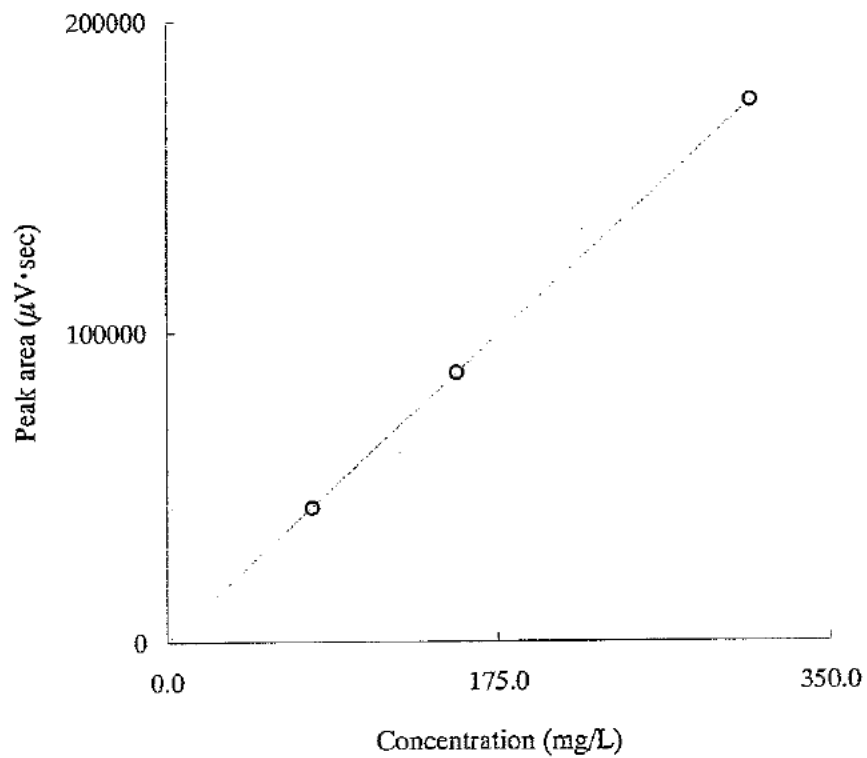


Fig. 2 - 1 Chromatograms of GC analysis for calibration curve (test item).

Date : Dec.21,2006 Name : _____



Concentration (mg/L)	Peak area ($\mu\text{V}\cdot\text{sec}$)
76.7	43137
153	86675
307	174303

Fig. 2 - 2 Calibration curve of test item.

December 21, 2006

Name _____

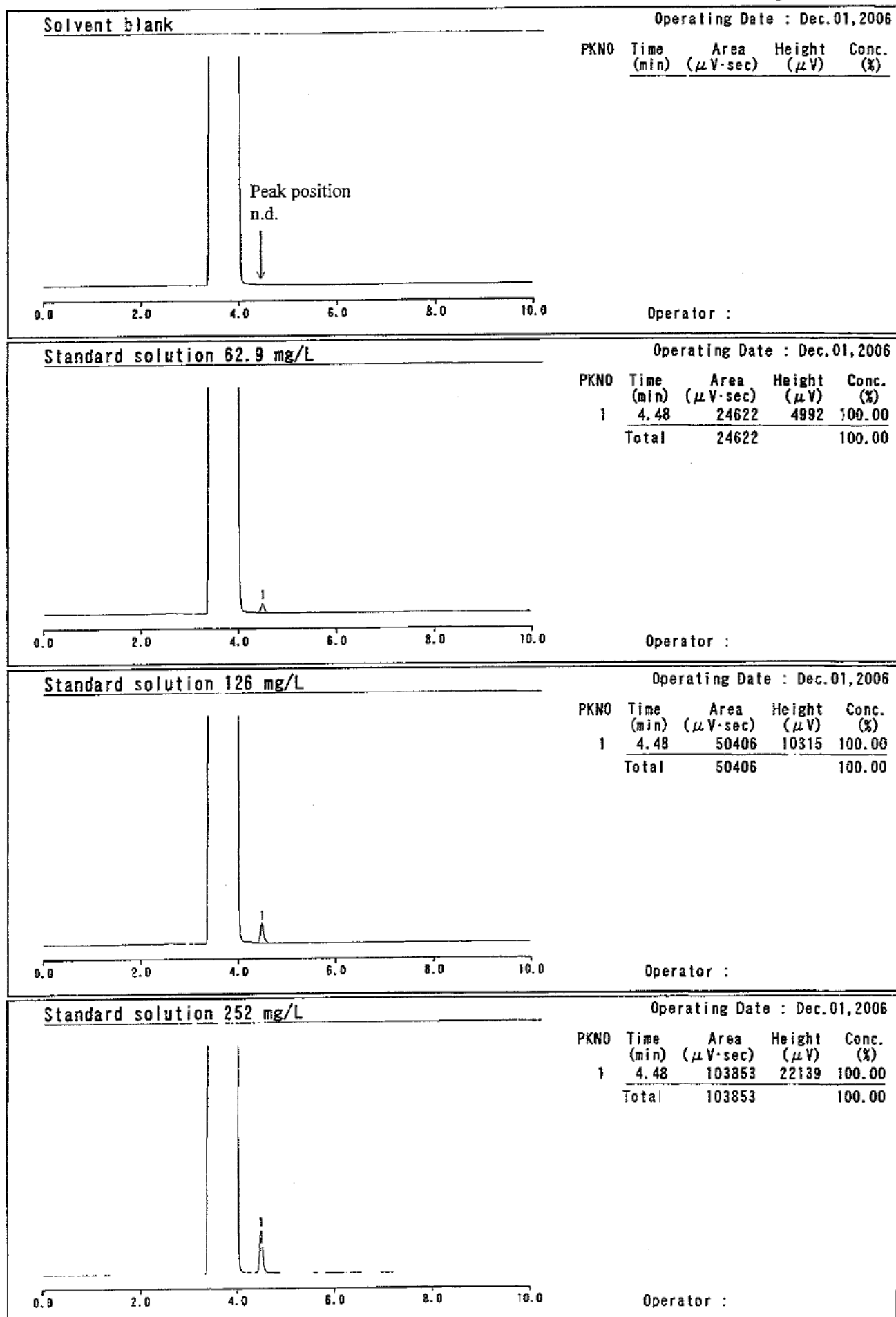
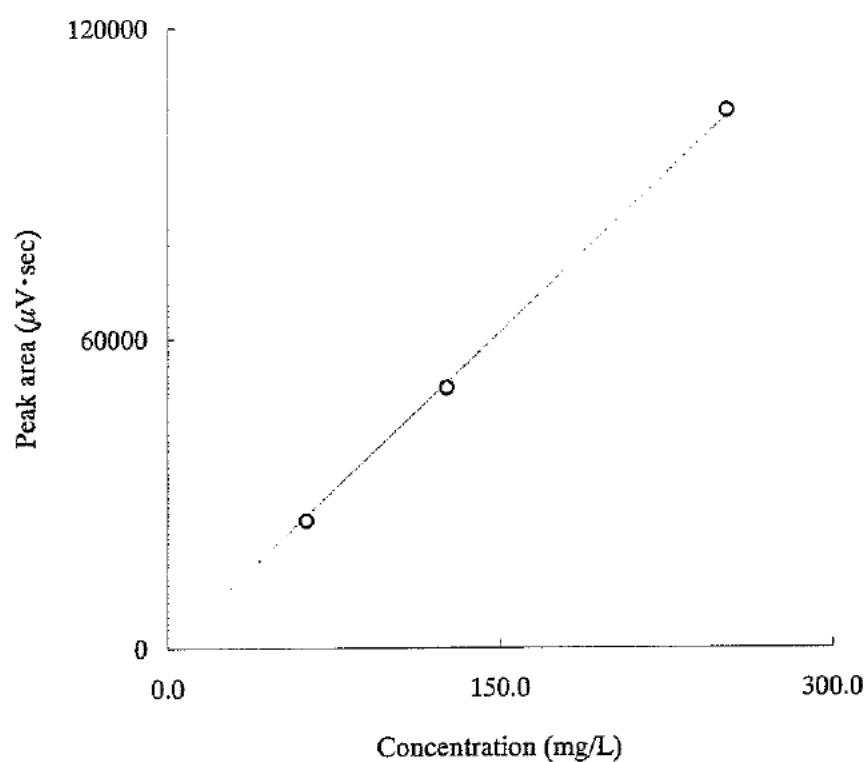


Fig 3 - 1 Chromatograms of GC analysis for calibration curve (13F-EtOH).

Date : Dec.1,2006 Name : _____



$$y = 409x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area (μV·sec)
62.9	24622
126	50406
252	103853

Fig. 3 - 2 Calibration curve of 13F-EtOH.

December 1, 2006

Name

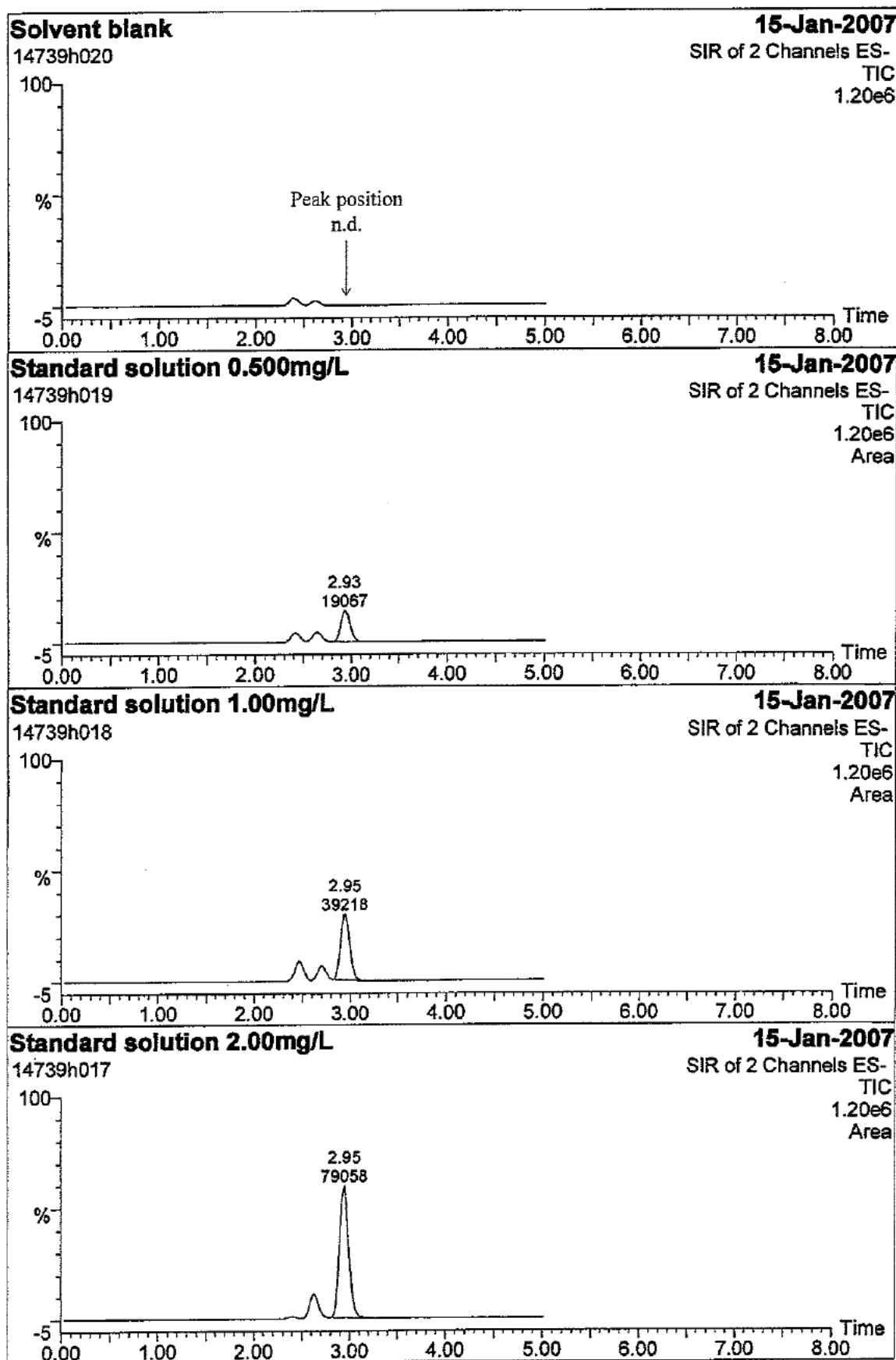
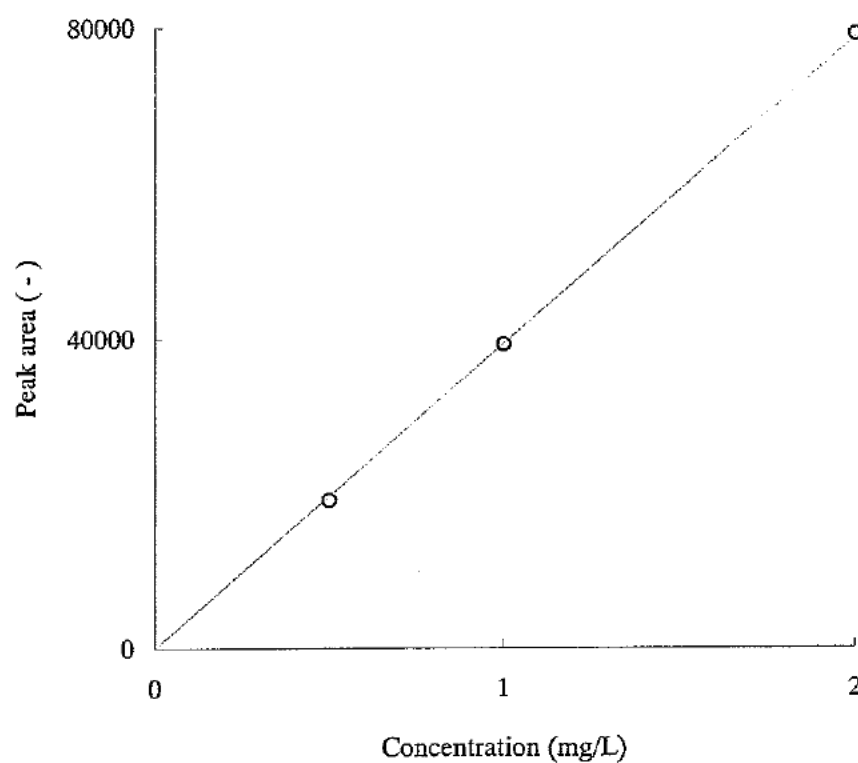


Fig. 4 - 1 Total ion chromatograms of LC-MS analysis for calibration curve (13F-AcOH).



Concentration (mg/L)	Peak area (-)
0.500	19067
1.00	39218
2.00	79058

Fig. 4 - 2 Calibration curve of 13F-AcOH.

January 15, 2007

Name _____

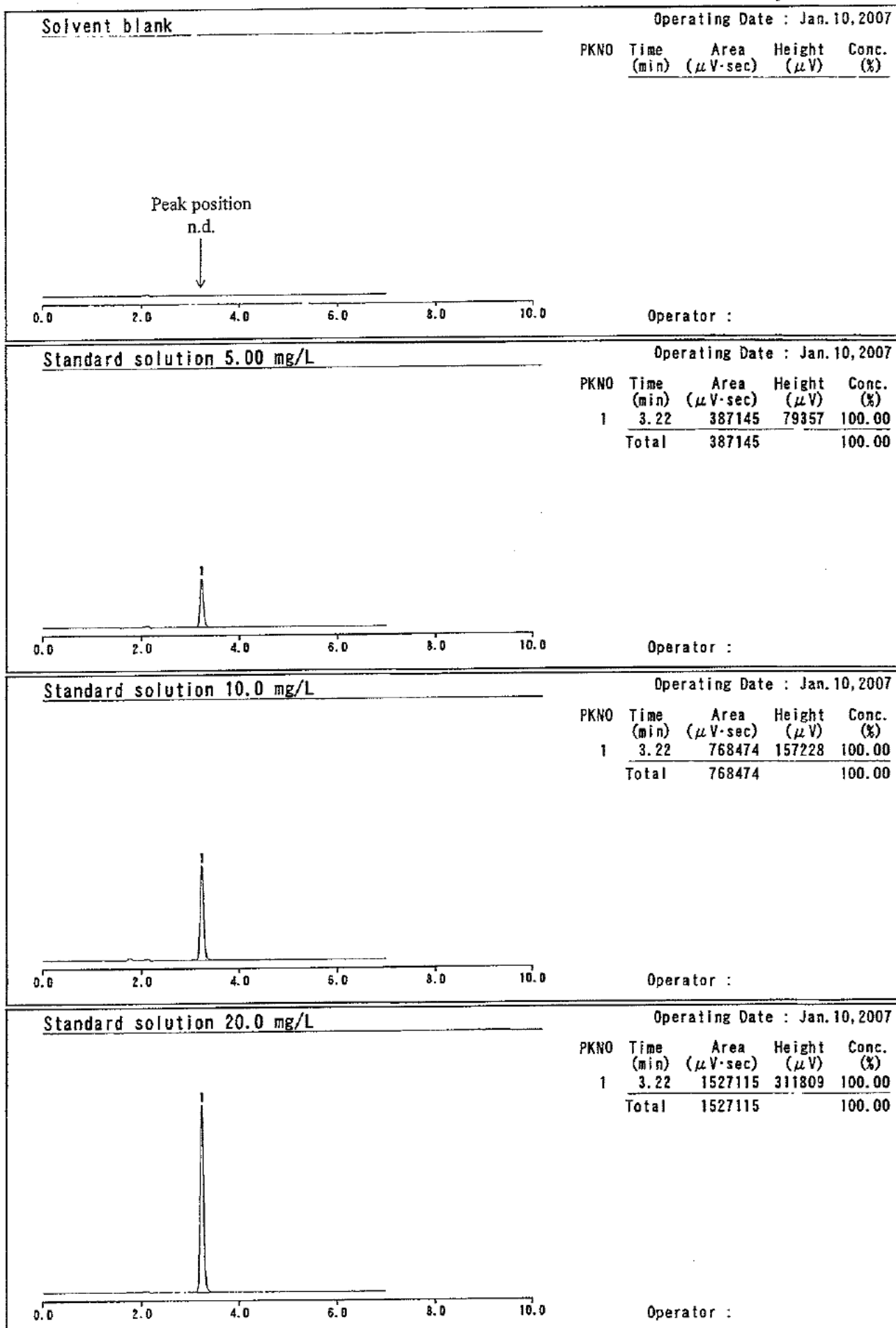
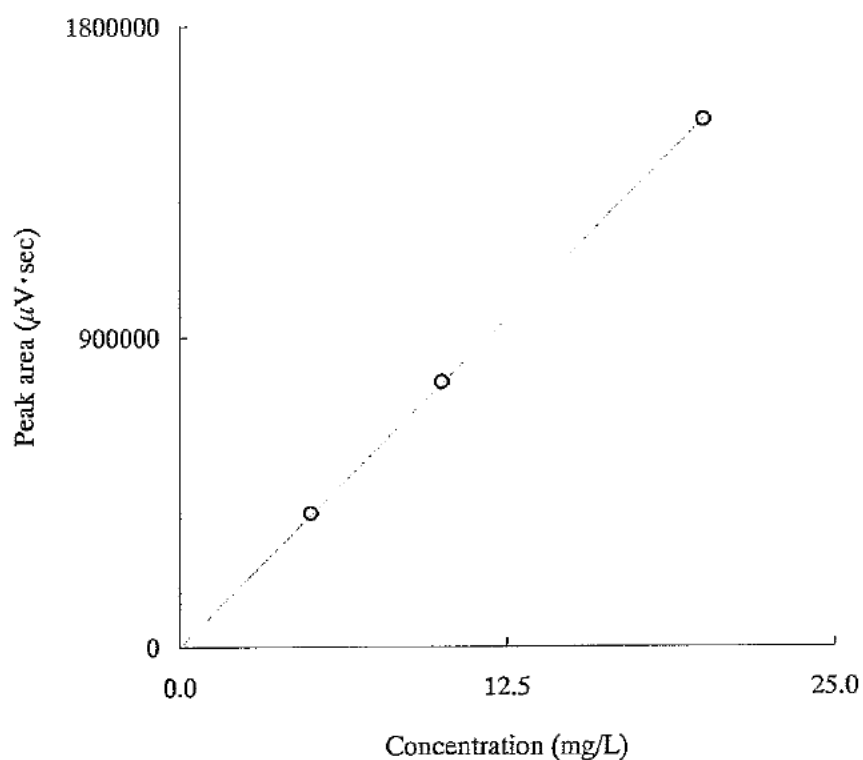


Fig.5 - 1 Chromatograms of HPLC analysis for calibration curve (methacrylic acid).

Date : Jan.10,2007 Name : _____



$$y = 76501x$$

$$r = 1.00$$

Concentration (mg/L)	Peak area (μV·sec)
5.00	387145
10.0	768474
20.0	1527115

Fig. 5 - 2 Calibration curve of methacrylic acid.

January 16, 2007

Name _____

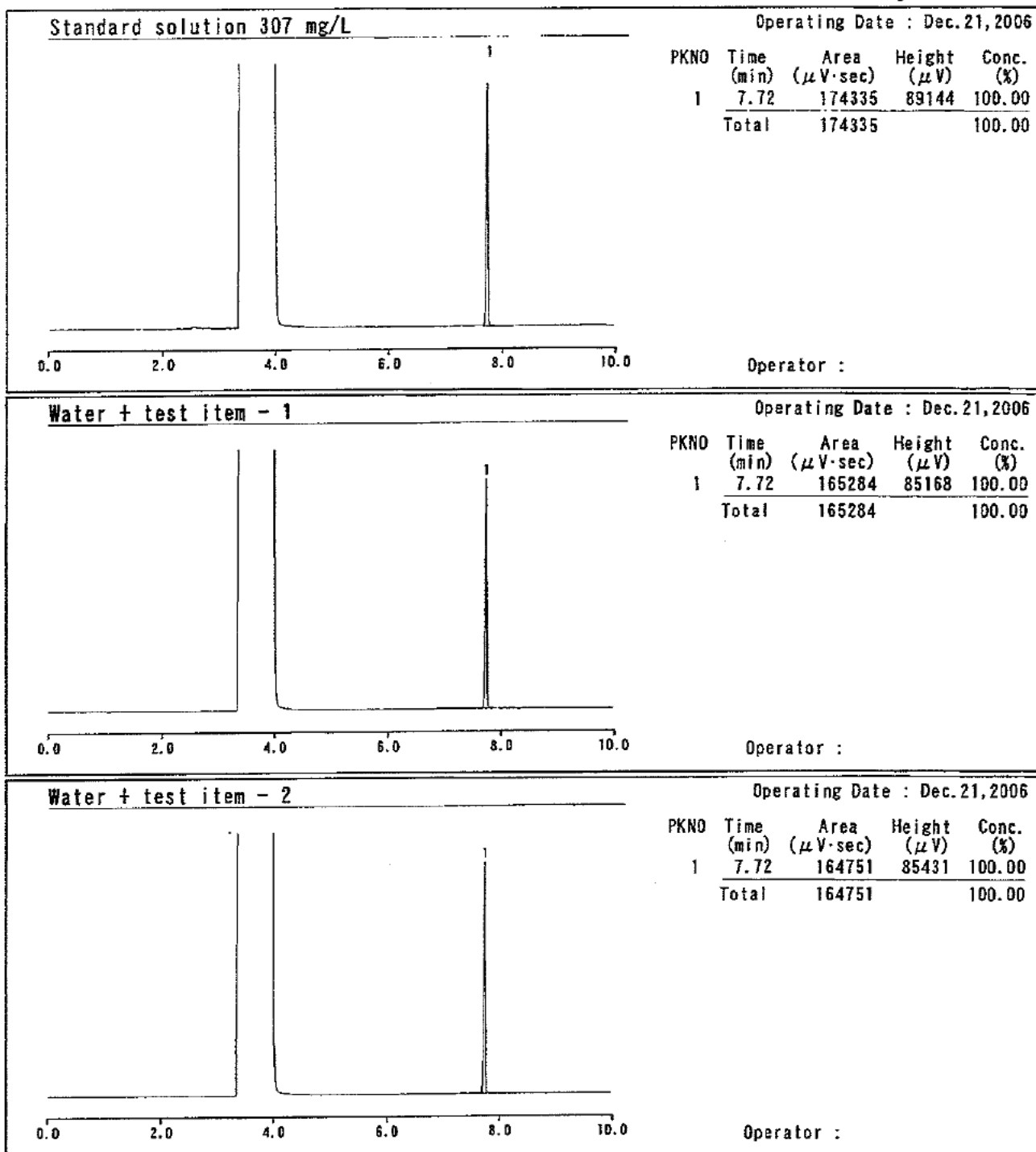


Fig.6 - 1

Chromatograms of GC analysis for recovery test (test item).

Date : Dec.21,2006 Name : _____

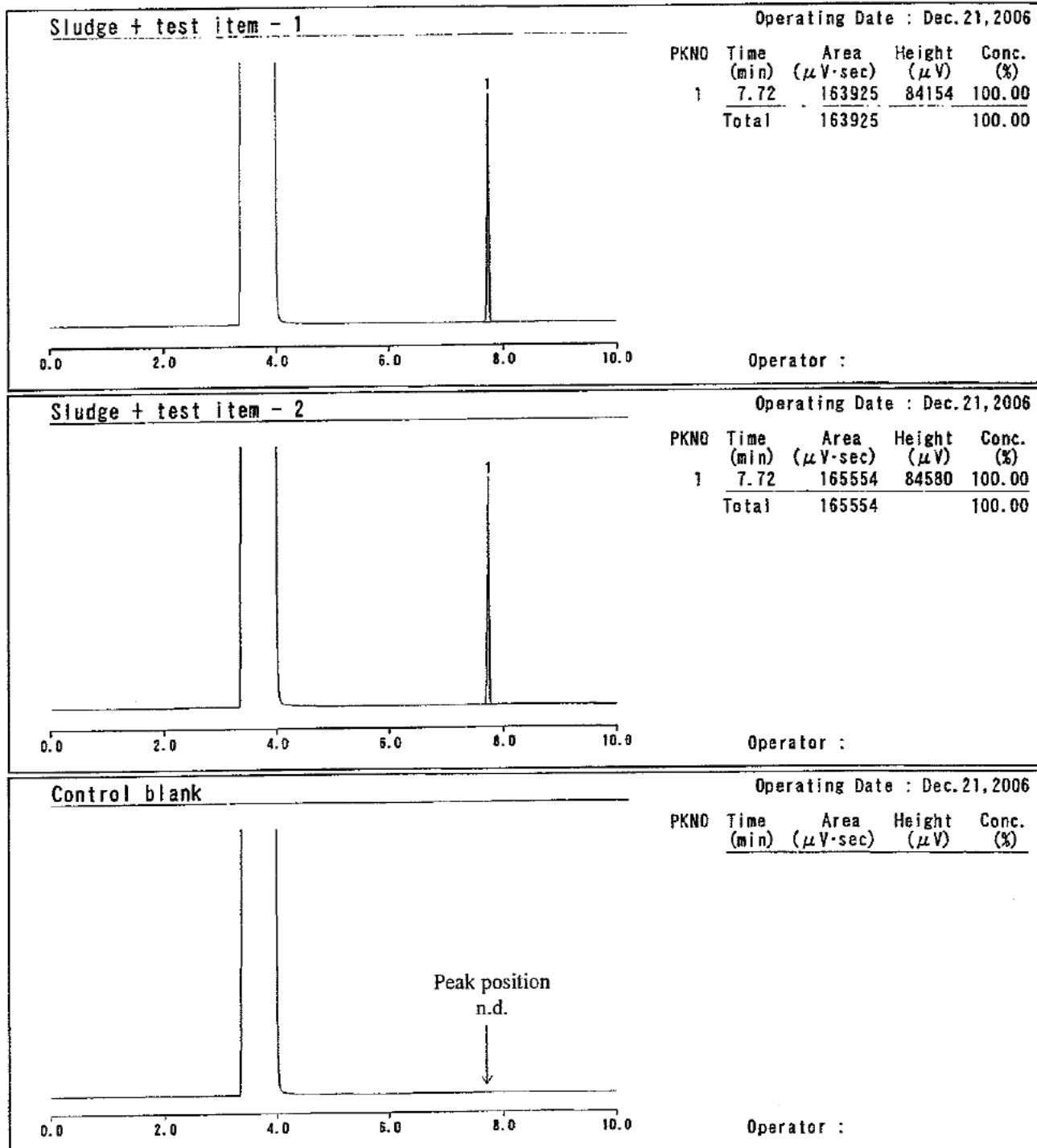


Fig.6 - 2 Chromatograms of GC analysis for recovery test (test item).

Date : Dec.21,2006 Name : _____

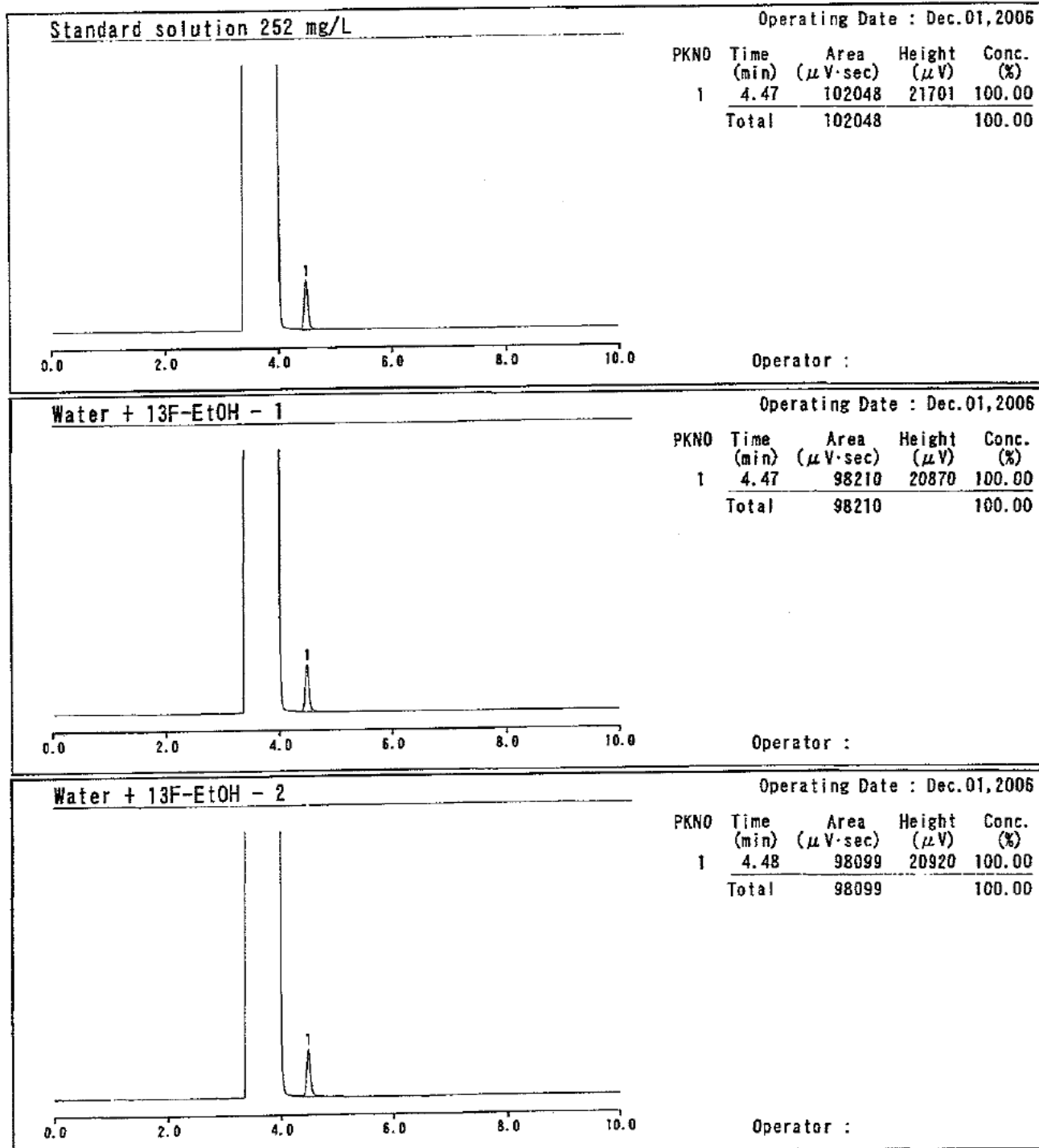


Fig.7 - 1

Chromatograms of GC analysis for recovery test (13F-EtOH).

Date : Dec.5,2006 Name : _____

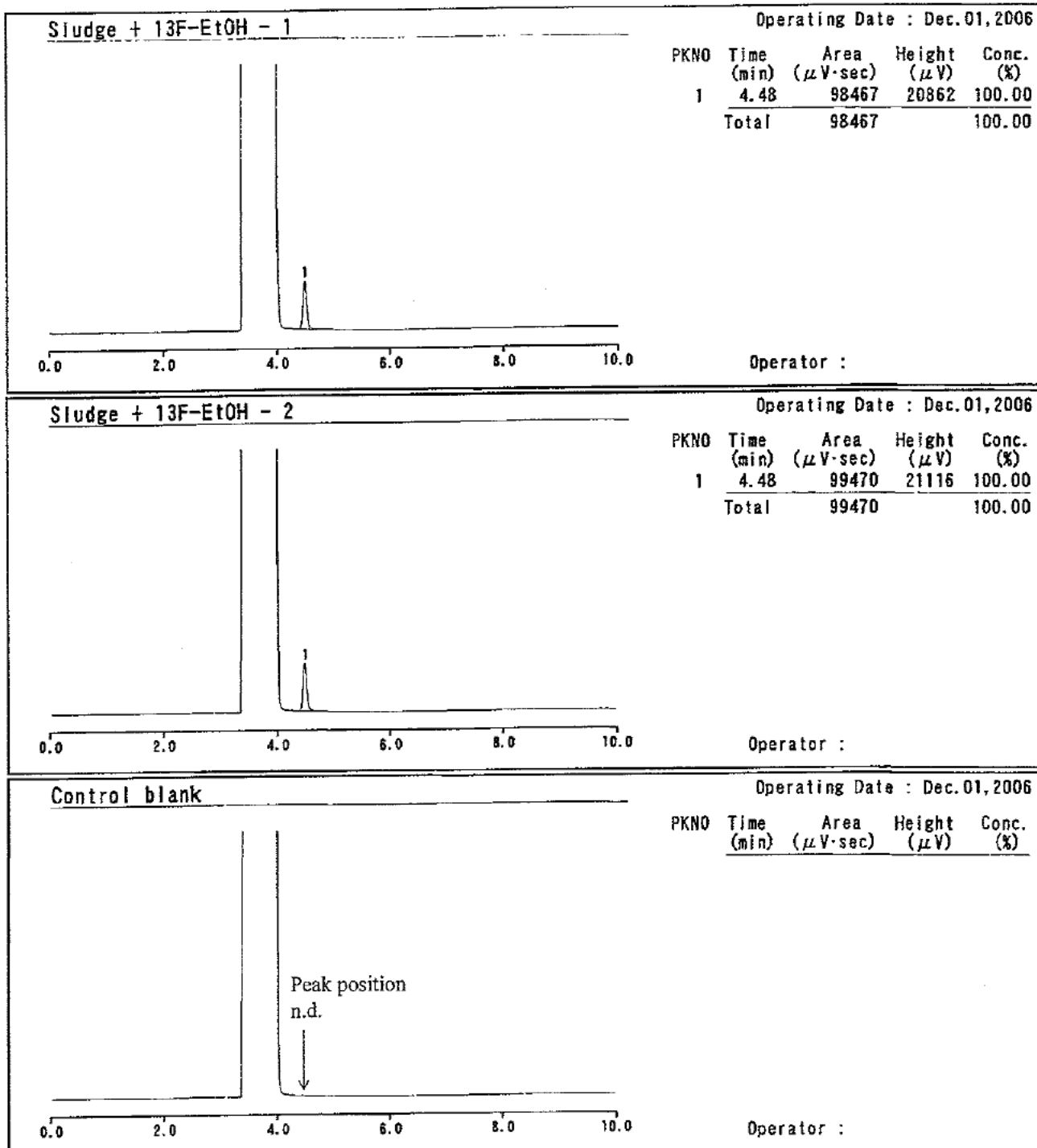


Fig.7 - 2

Chromatograms of GC analysis for recovery test (13F-EtOH).

Date : Dec.5,2006 Name : _____

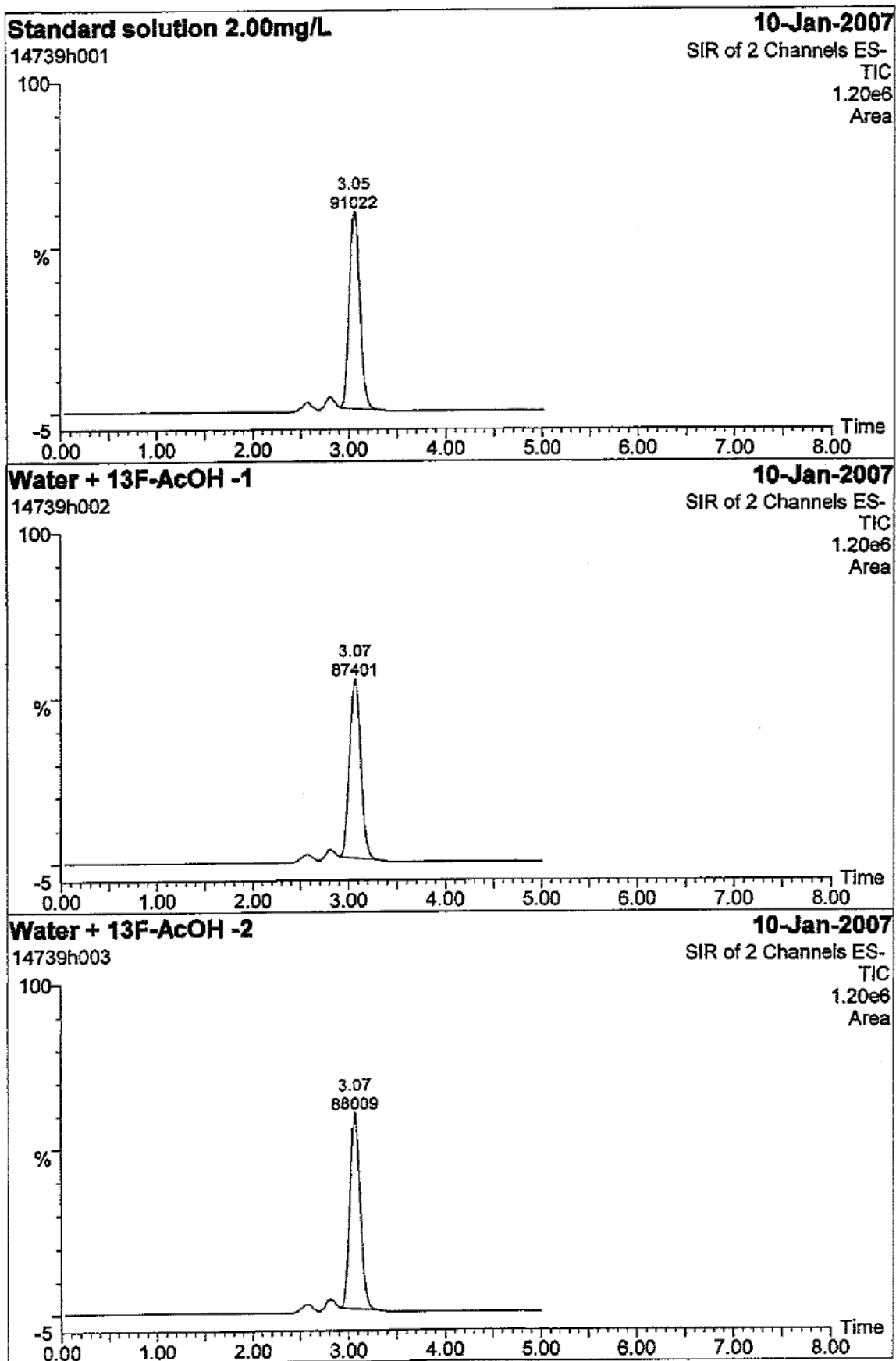


Fig. 8 - 1 Total ion chromatograms of LC-MS analysis for recovery test (13F-AcOH).

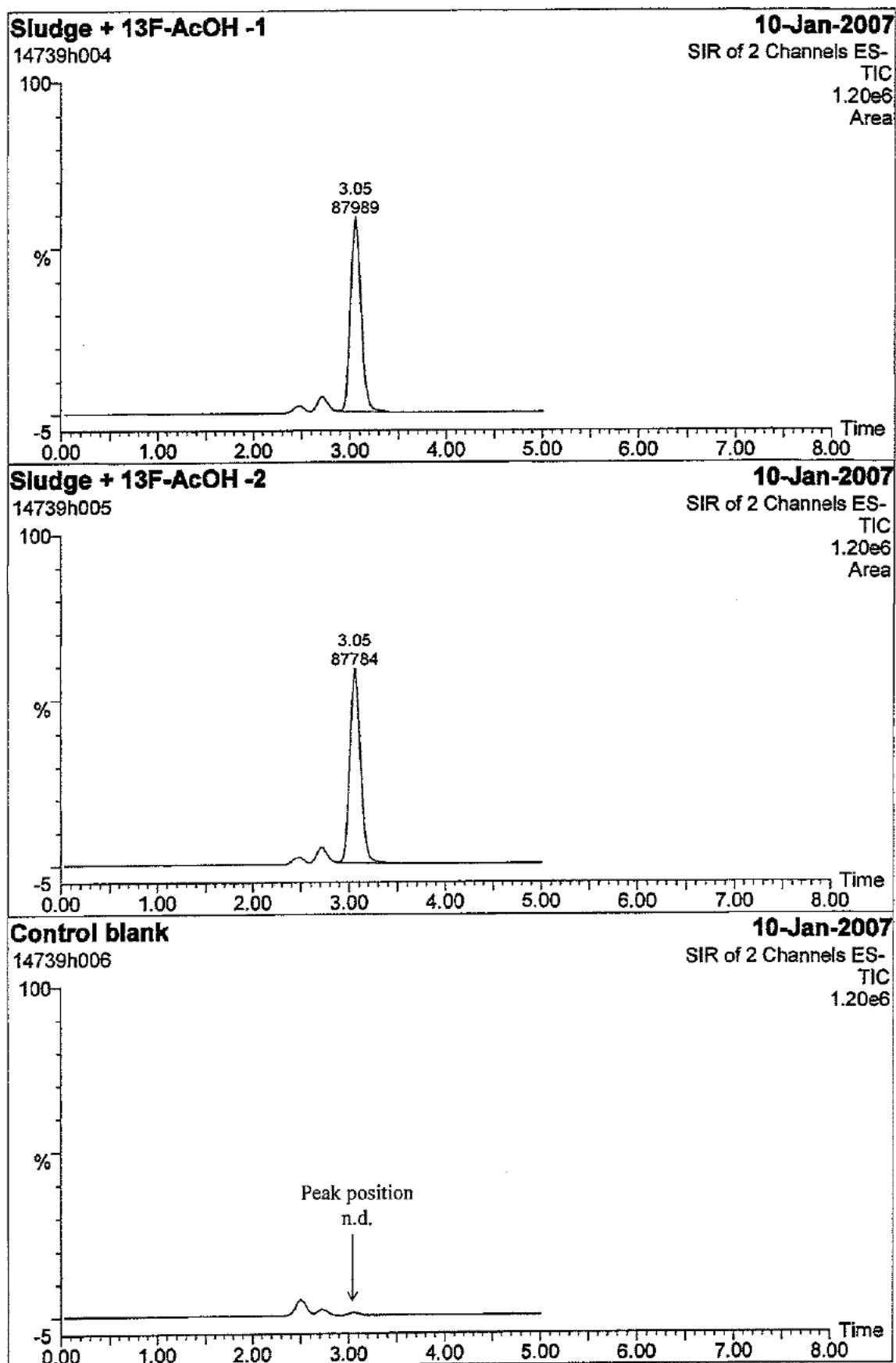


Fig. 8 - 2 Total ion chromatograms of LC-MS analysis for recovery test (13F-AcOH).

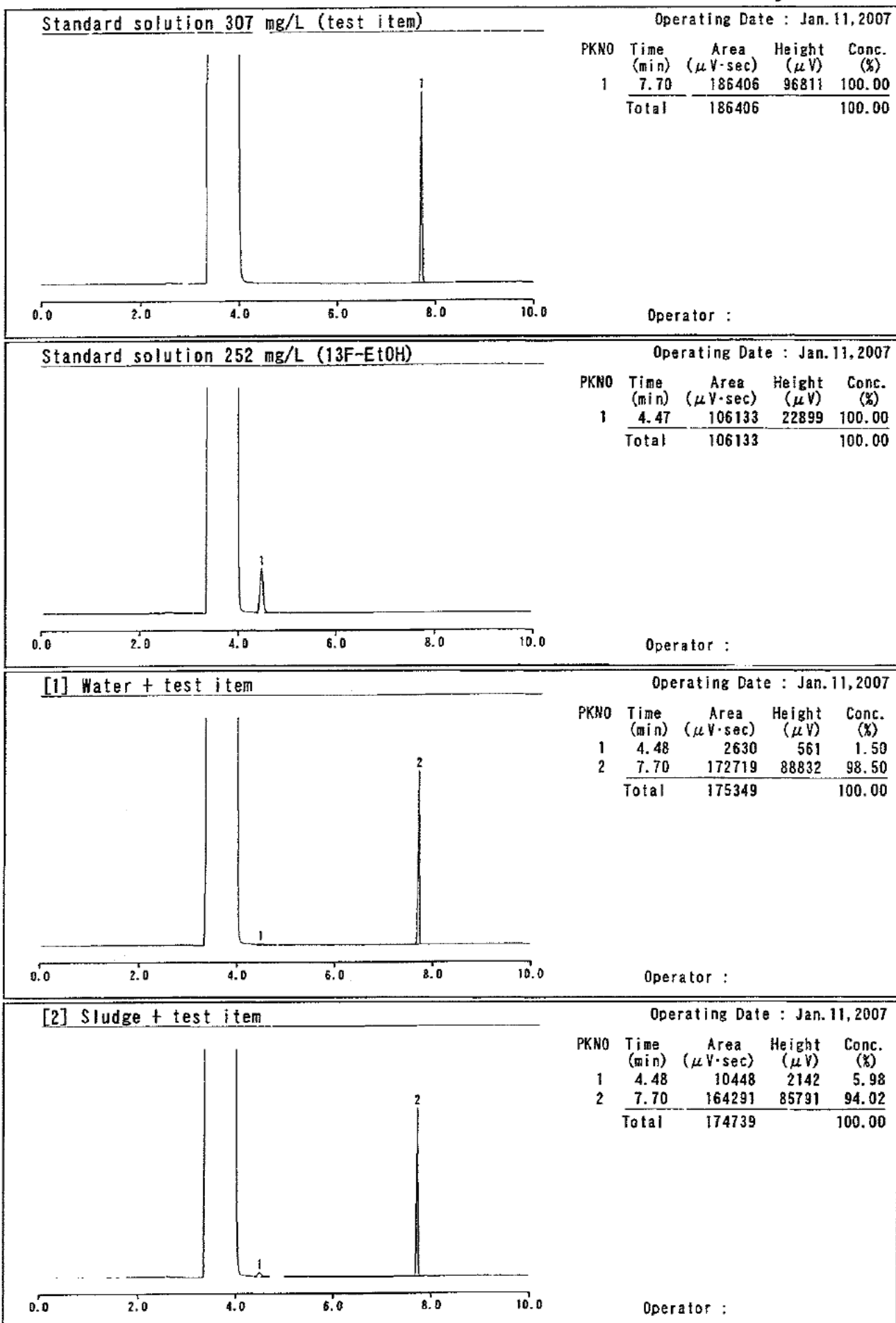


Fig.9 - 1

Chromatograms of GC analysis for test solution (test item and 13F-EtOH).

Date : Jan.11,2007 Name : _____

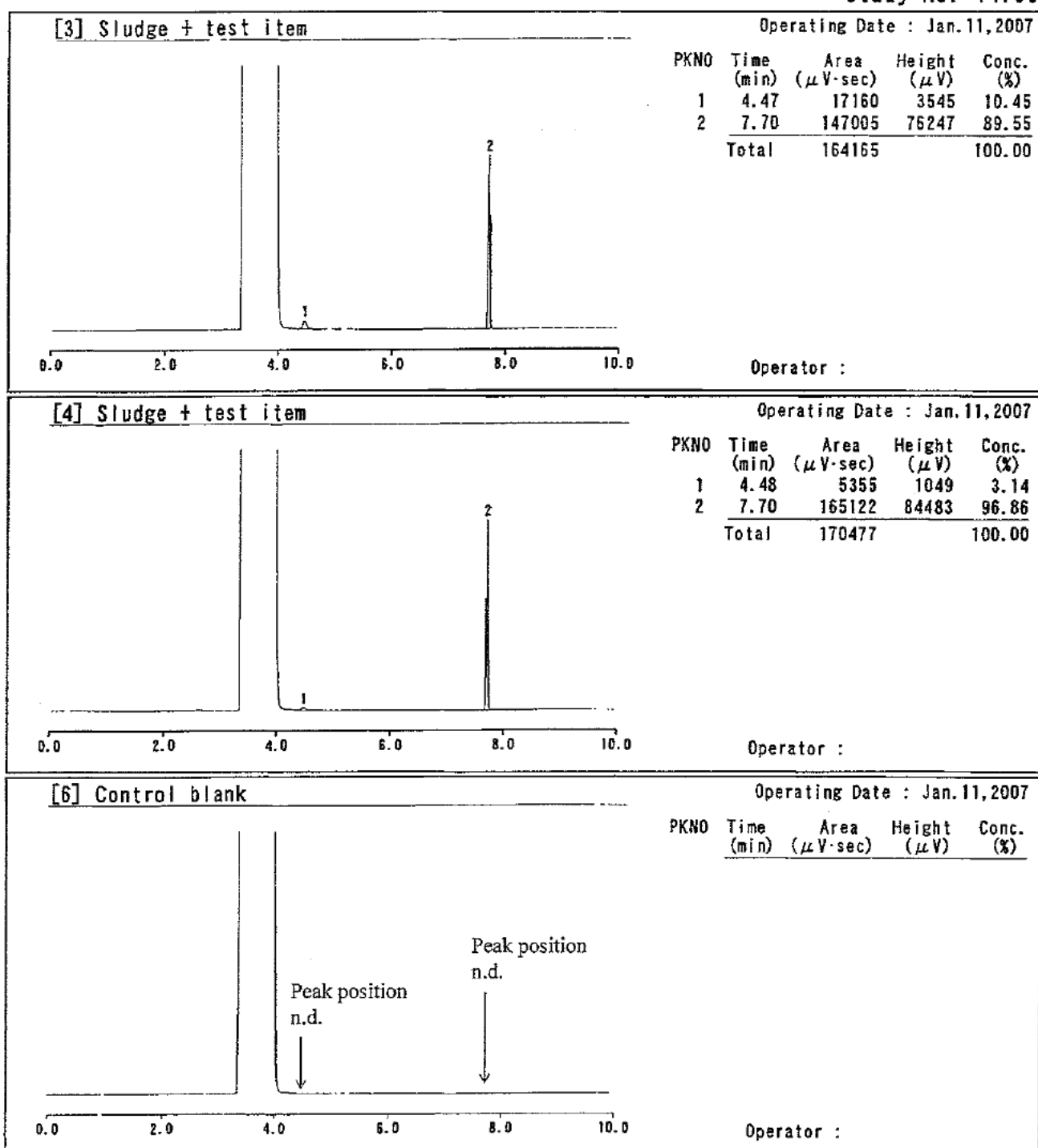


Fig.9 - 2

Chromatograms of GC analysis for test solution
(test item and 13F-EtOH).

Date : Jan.11,2007 Name : _____

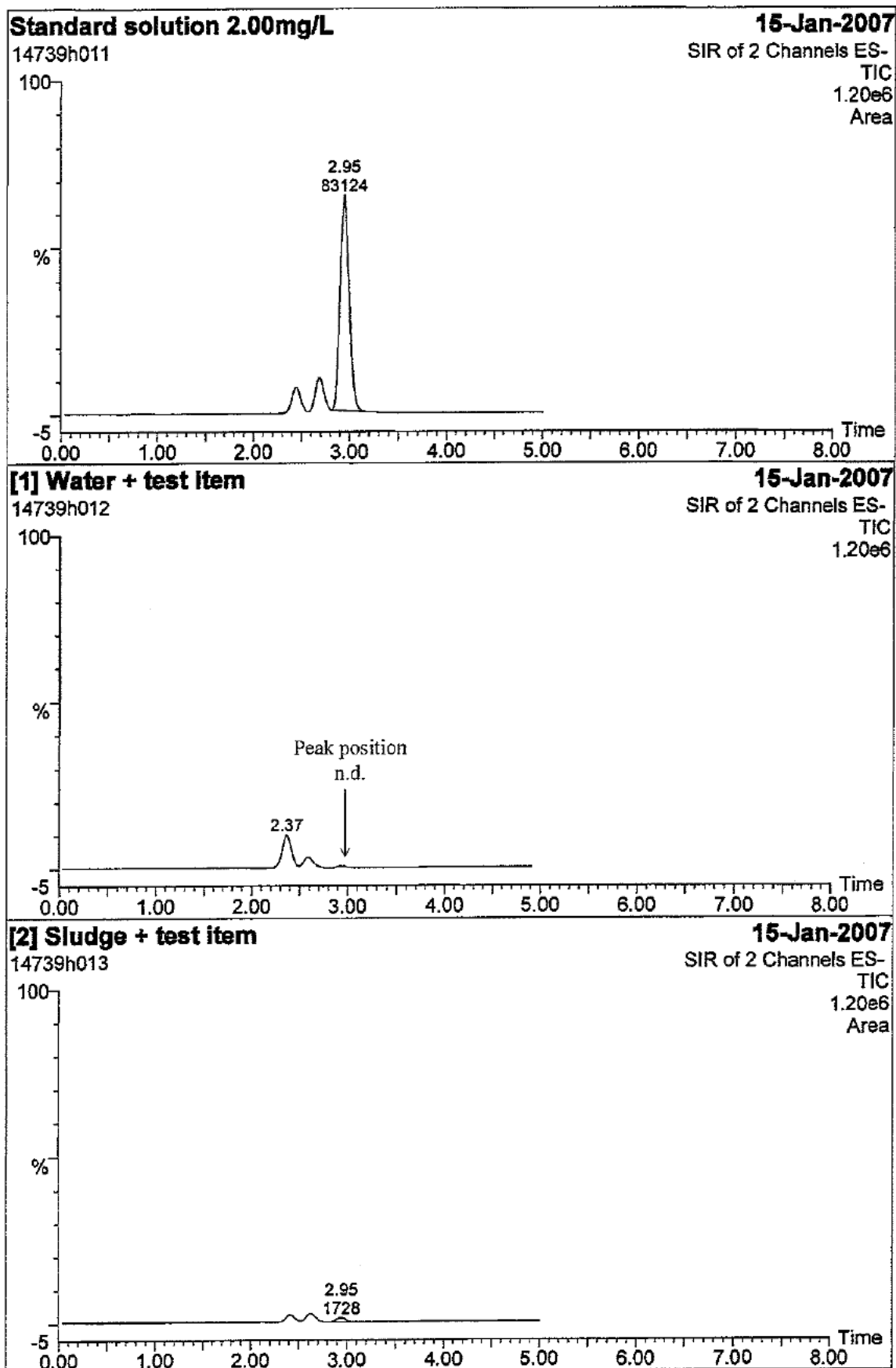


Fig. 10 - 1 Total ion chromatograms of LC-MS analysis for test solution (13F-AcOH).

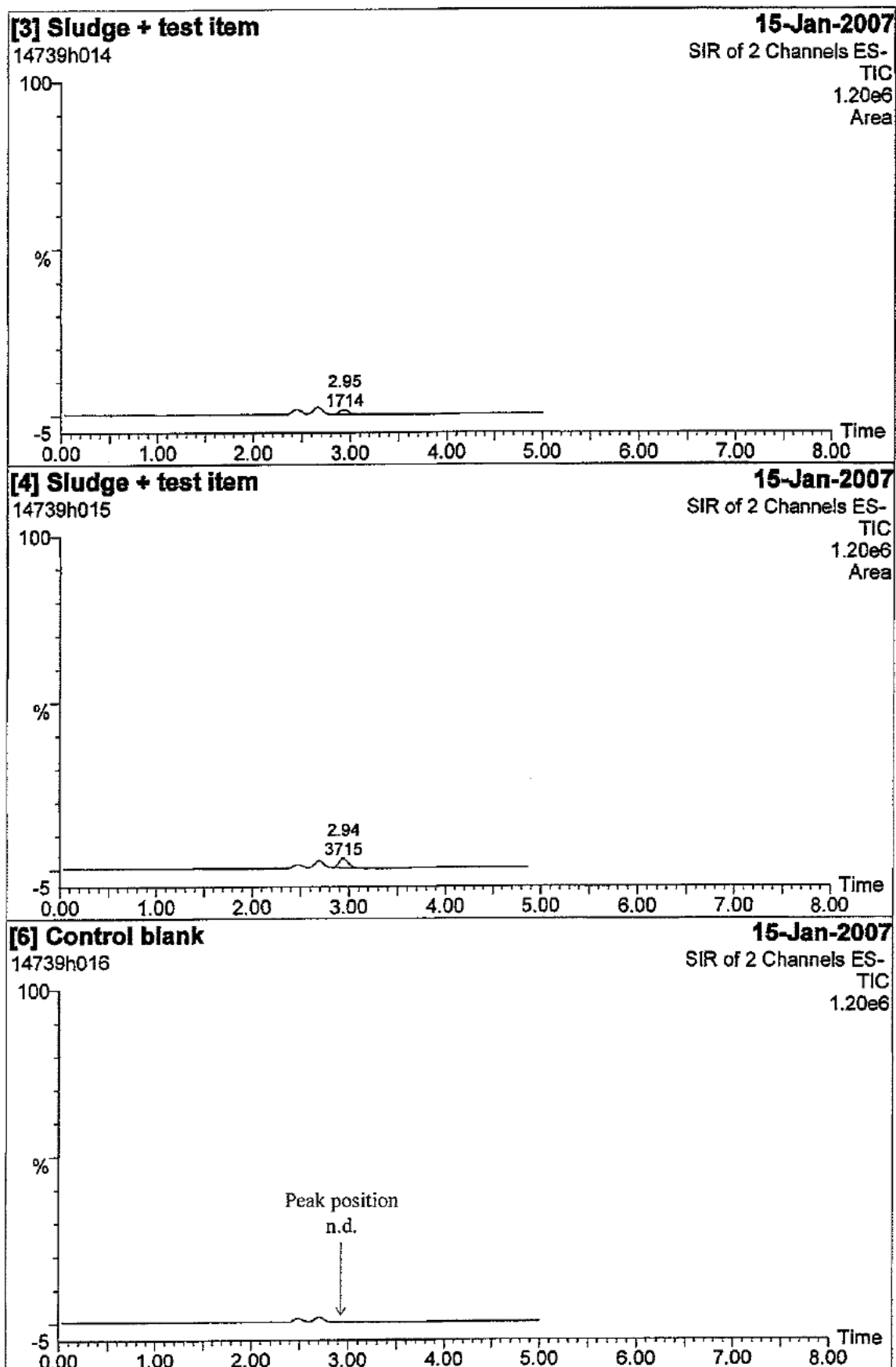


Fig. 10 - 2 Total ion chromatograms of LC-MS analysis for test solution (13F-AcOH).

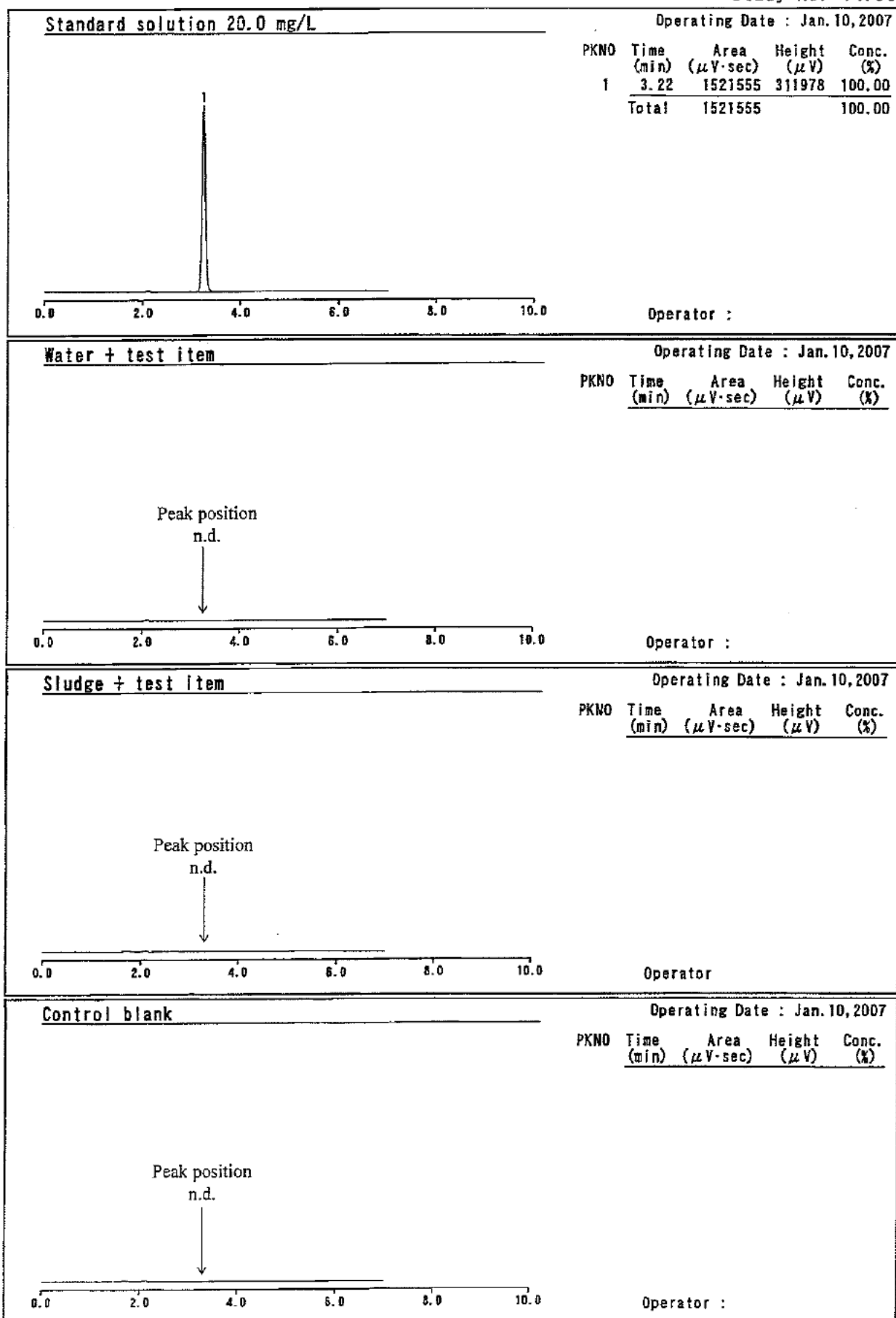


Fig. 11 Chromatograms of HPLC analysis for test solution for analysis of methacrylic acid (methacrylic acid).

Date : Jan. 31, 2007 Name : _____

StudyNo.	14739	Wavelength	190.00 - 340.00
Date	Nov. 21, 2006	Scale Limit	1.000 - -0.1000
Sample	Methacrylic acid	Slit Width	(UV) 2.0nm
Solvent	Purified water	Scan Speed	200nm/min
Reference	-	Sampling Pitch	0.200000
Cell	10mm x 10mm, quartz	Analyst	
Instrument	JASCO	Note	10.0 mg/L
Photometric Mode	Abs		

Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan Kurume Laboratory

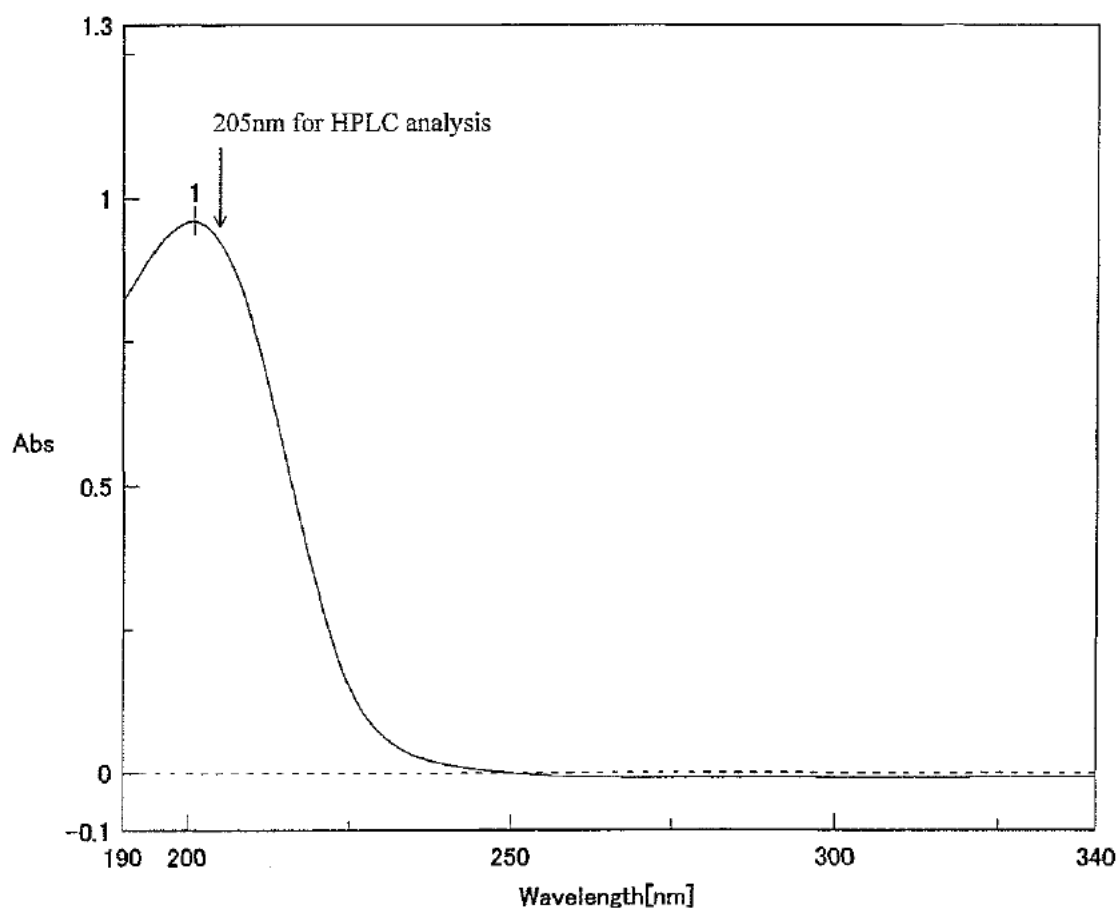


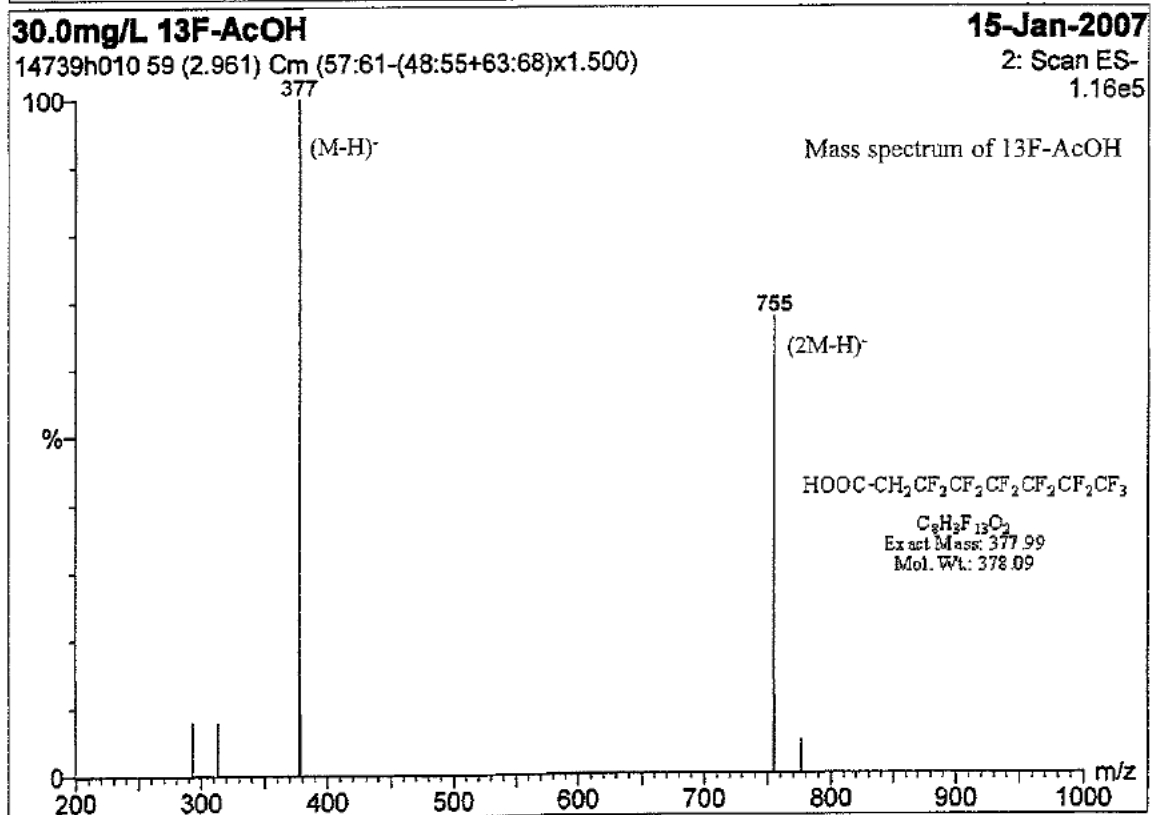
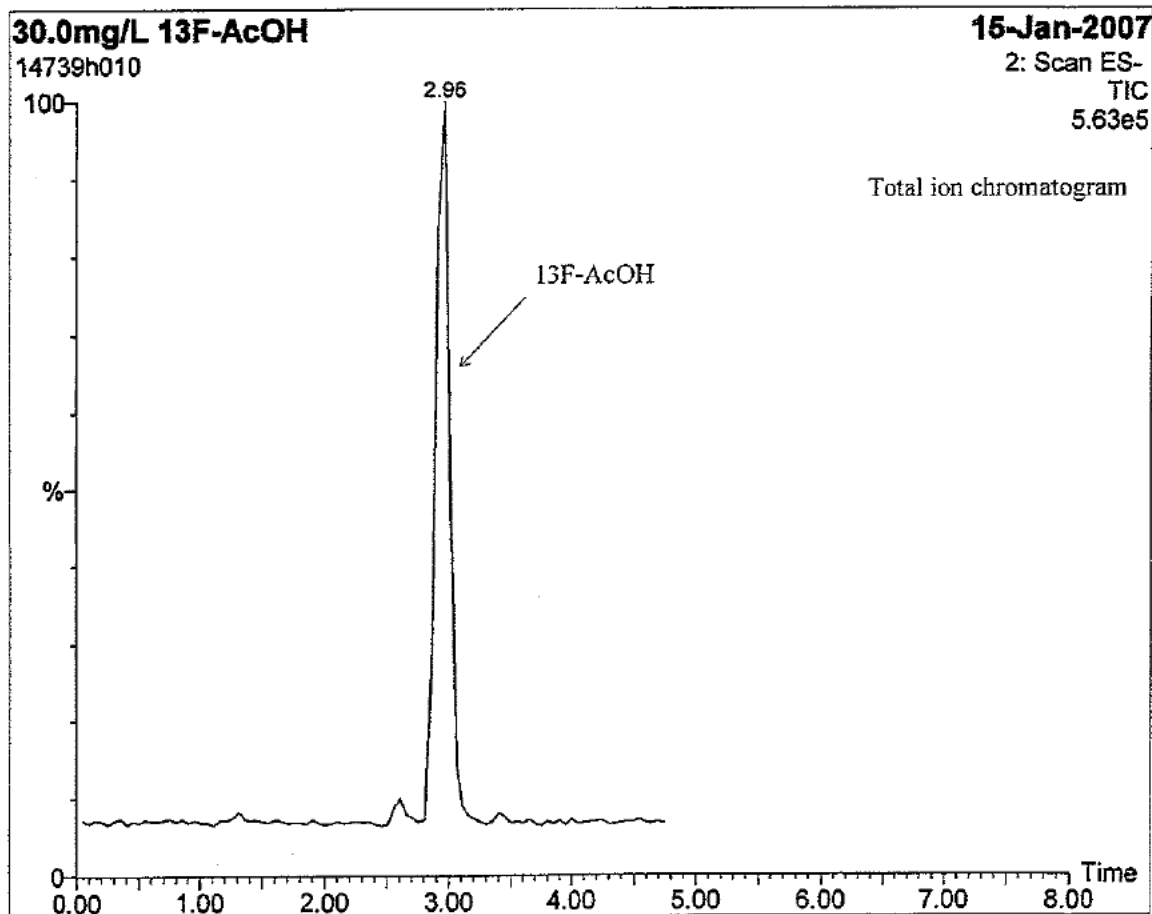
Fig. 12 UV spectrum of methacrylic acid.

Analytical conditionsInstrument MS : Waters ZMD, LC : Waters Alliance2690Sample 30.0mg/L 13F-AcOH solutionLC ConditionsInlet system ColumnColumn L-column ODS Column size 15 cm x 2.1 mm I.D.Column temp. 40°CEluent A (80%) : Acetonitrile / formic acid (500/0.25 V/V)B (20%) : Water / formic acid (500/0.25 V/V)Flow rate 0.2 mL/minSample size 2 μ L (Solvent Acetonitrile)MS ConditionsIonization mode ESI Detection mode NegativeFunction SCANMass range (m/z) 200 - 1000Probe Capillary 3.0 kV Desolvation temp. 350 °C Desolvation gas 400 L/hrSource Cone 20 V, Extractor 2 V, RF Lens 0.2 VSource block temp. 120 °C

Operator _____

Kurume Laboratory, Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

Fig. 13 - 1 Mass spectrum of 13F-AcOH.



14739
2007.1.15

Fig. 13 - 2 Mass spectrum of 13F-AcOH.

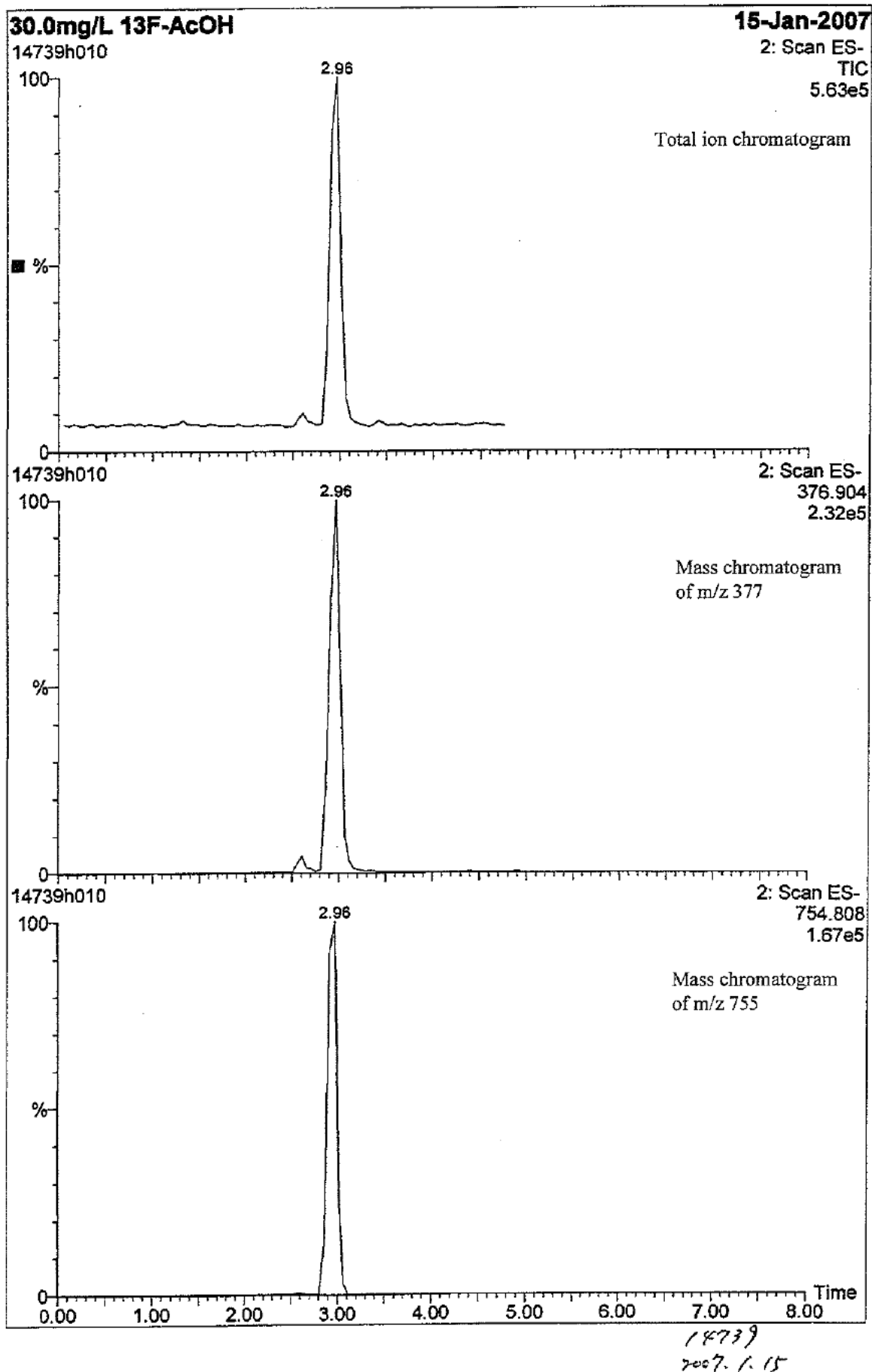
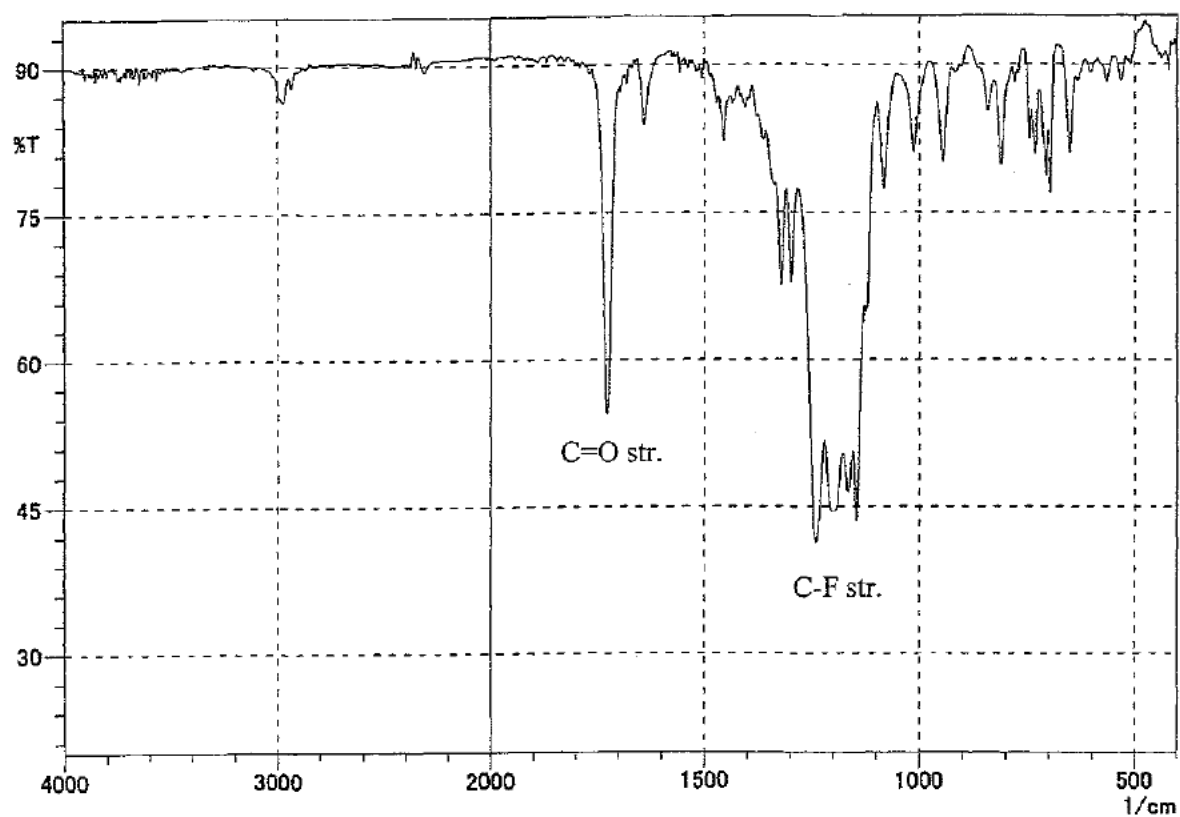
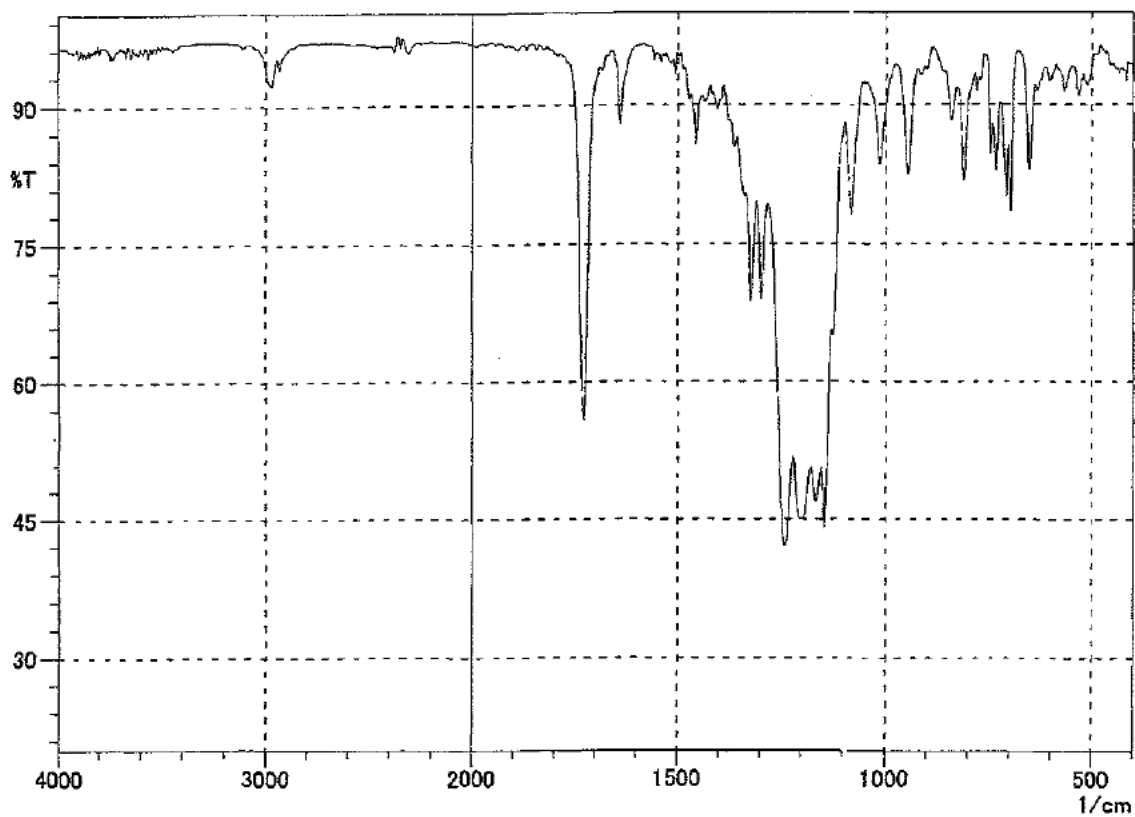


Fig. 13 - 3 Mass spectrum of 13F-AcOH.



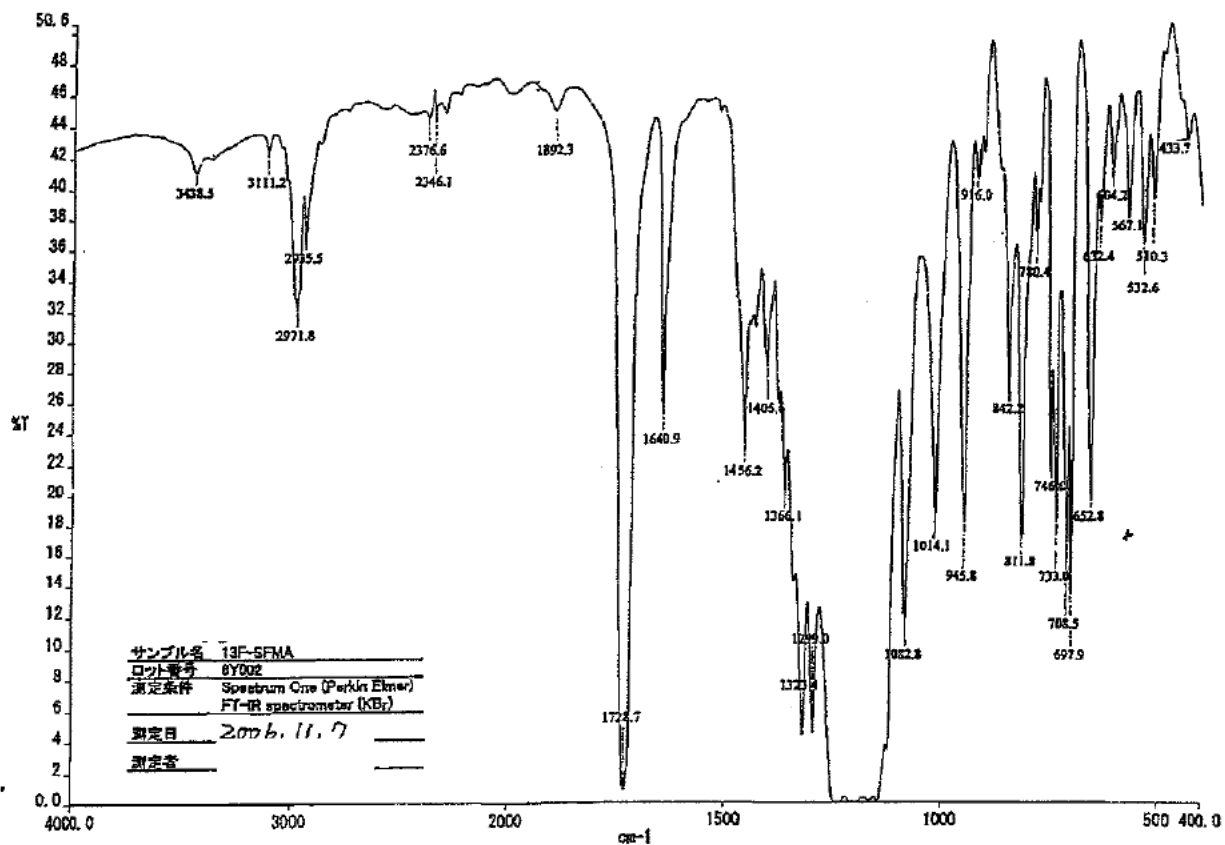
Instrument : Shimadzu IRPrestige-21
Study No. : 14739
Sample : Test item
Method : Neat
Date : November 15, 2006
Name :

Fig.14 - 1 IR spectrum of test item measured before experimental start.



Instrument : Shimadzu IRPrestige-21
Study No. : 14739
Sample : Test item
Method : Neat
Date : January 18, 2007
Name :

Fig.14 - 2 IR spectrum of test item measured after experimental completion.



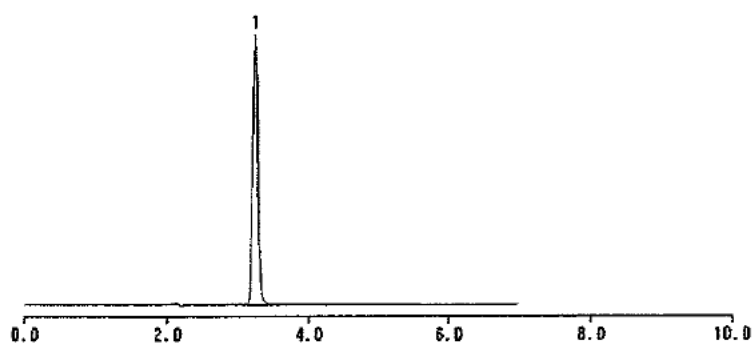
c:\pel_data\spectra\jk5545.sp - 13F-SFMA (Lot. 6Y002)

別紙②

Reference 3 IR spectrum supplied by sponsor.

Standard solution 20.0 mg/L

Operating Date : Jan.15,2007



PKNO	Time (min)	Area (μV·sec)	Height (μV)	Conc. (%)
1	3.22	1518705	311896	100.00
Total		1518705		100.00

Operator :

Water + test item

Operating Date : Jan.15,2007



PKNO	Time (min)	Area (μV·sec)	Height (μV)	Conc. (%)
1	3.22	225650	46522	100.00
Total		225650		100.00

Operator

Sludge + test item

Operating Date : Jan.15,2007

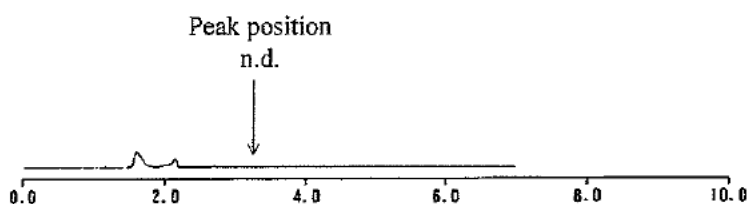


PKNO	Time (min)	Area (μV·sec)	Height (μV)	Conc. (%)
1	3.22	140937	28964	100.00
Total		140937		100.00

Operator :

Control blank

Operating Date : Jan.15,2007



PKNO	Time (min)	Area (μV·sec)	Height (μV)	Conc. (%)
------	------------	---------------	-------------	-----------

Operator :

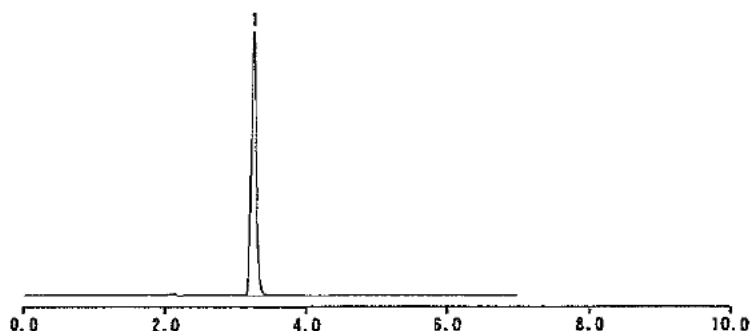
Reference 4 Chromatograms of HPLC analysis for CO₂ absorbent (methacrylic acid, test solution for analysis of methacrylic acid).

Date : Jan.15,2007 Name : _____

Standard solution 20.0 mg/L

Operating Date : Jan.15,2007

PKNO	Time (min)	Area (μ V-sec)	Height (μ V)	Conc. (%)
1	3.23	1523373	305754	100.00
Total		1523373		100.00

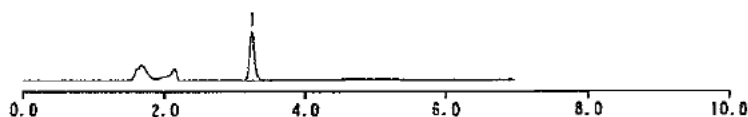


Operator :

[1] Water + test item

Operating Date : Jan.15,2007

PKNO	Time (min)	Area (μ V-sec)	Height (μ V)	Conc. (%)
1	3.22	275549	56614	100.00
Total		275549		100.00

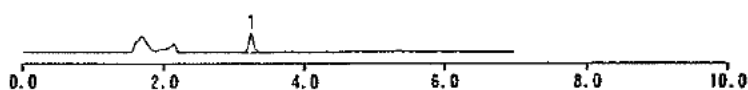


Operator :

[2] Sludge + test item

Operating Date : Jan.15,2007

PKNO	Time (min)	Area (μ V-sec)	Height (μ V)	Conc. (%)
1	3.22	103843	21345	100.00
Total		103843		100.00



Operator :

Reference 5 - 1

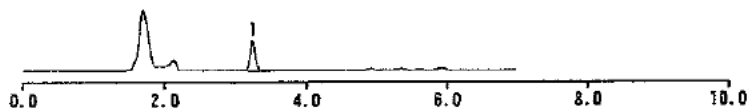
Chromatograms of HPLC analysis for CO2 absorbent
(methacrylic acid).

Date : Jan.15,2007 Name _____

[3] Sludge + test item

Operating Date : Jan.15,2007

PKNO	Time (min)	Area (μ V-sec)	Height (μ V)	Conc. (%)
1	3.22	165511	34079	100.00
Total		165511		100.00

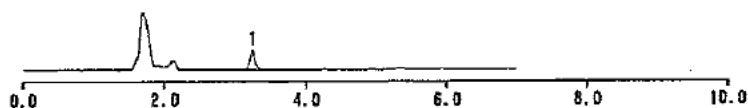


Operator :

[4] Sludge + test item

Operating Date : Jan.15,2007

PKNO	Time (min)	Area (μ V-sec)	Height (μ V)	Conc. (%)
1	3.22	108086	22162	100.00
Total		108086		100.00

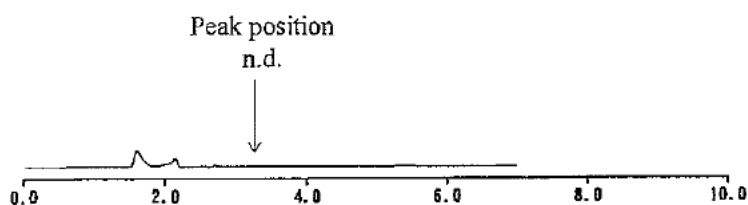


Operator :

[6] Control blank

Operating Date : Jan.15,2007

PKNO	Time (min)	Area (μ V-sec)	Height (μ V)	Conc. (%)
------	---------------	------------------------	----------------------	--------------



Operator :

Reference 5 - 2

Chromatograms of HPLC analysis for CO2 absorbent
(methacrylic acid).

Date : Jan.15,2007 Name : _____