

〈研究発表〉

簡易な log P 測定法による高疎水性有機化合物の log P 値の評価

木曾祥秋¹⁾, 平野智己¹⁾, Yong-Jun Jung²⁾

豊橋技術科学大学エコロジー工学系 (441-8580 豊橋市天伯町雲雀ヶ丘 1-1, E-mail: kiso@eco.tut.ac.jp)¹⁾
Catholic University of Pusan (9, Bugok 3-dong, Keumjeong-gu, Pusan, 609-757, Korea)²⁾

概要

log P は、有機化合物の環境中での動態を支配する重要な因子の一つであるが、疎水性の高い(log P>4)物質については、その値は HPLC における保持比から推定する間接法か、またはフラグメント法に基づく計算によらざるを得なかった。いずれの方法も、基準物資のデータとその精度が log P 値の信頼性を支配する。本来の測定法である分配法によって、疎水性の高い物質の log P 値を精度の高い方法で測定できれば、間接法や計算法の精度も向上する。本研究では、微量有機化合物を抽出・濃縮せずに $\mu\text{g L}^{-1}$ レベルで定量可能な HPLC—直接注入法を用いることにより、分配法による log P の測定を行った。その結果、log P>5 の物質についても、高い繰り返し精度で測定が可能であることを明らかにした。

キーワード: 微量有機汚染物質, log P, 測定法, HPLC

1. はじめに

環境に排出された難分解性の微量有害有機汚染物質は、様々な経路を経て水、土壌、大気、生物などに移行する。さらに、それぞれの媒体中で分解・代謝されるとともに蓄積される。これら化合物の移動および蓄積には、蒸気圧、溶解度、拡散係数な物理化学的因子が重要な影響を及ぼす。しかしながら、高沸点で難溶解性物質については、精度の高いこれらの物性値は得られておらず、疎水性指標が代わりに用いられてきた。疎水性指標としては、Hanschらに開発したオクタノール/水分配係数(log P)が広く用いられており、環境中での動態¹⁾、中でも生物濃縮係数(BCF)等と相関が高いことが知られている²⁻⁴⁾。また、毒性など生理活性作用との構造活性相関(QSAR)の検討においても log P は、重要な説明変数の一つである^{5,6)}。

分配法による log P の測定法は、OEDのガイドライン⁷⁾に示されているが、疎水性の高い(log P>4)化合物の測定は困難であり、HPLC を用いた間接的な測定法⁸⁻⁹⁾や分子構造から計算する方法¹⁰⁾などが用いられている。これらの方法で用いるデータベースの精度が予測値の精度の強く影響を及ぼすため、本来の分配法での測定が望まれる。本研究では、少量の水試料で $\mu\text{g L}^{-1}$ レベルの定量が可能な HPLC 直接注入法¹¹⁾を用いることにより、log P>5 の化合物についても高い精度で log P を測定できることを確認した。ここでは、アルキルフェノール類(APs)、多環芳香族炭化水素(PAHs)、フタル酸エステル類(APhs)、農薬について測定した結果を報告する。

2. 測定方法

2.1 溶液の調整

蒸留イオン交換水と *n*-octanol (log P 測定用) はあらかじめ相互の溶媒を加えて飽和させ、*n*-octanol 飽和水と水飽和 *n*-octanol を使用した。水飽和 *n*-octanol

に溶質を溶解し、 $1000\sim 3000\ \mu\text{g mL}^{-1}$ の標準原液を調整した。標準原液とそれを 2 段階に希釈 (1/2, 1/4) したものを測定に供した。

2.2 分配方法

容量 15 mL のガラス製の共栓付き遠心管に、*n*-octanol 飽和水を 10 mL 入れ、そこに測定対象化合物を溶解した *n*-octanol 溶液 1 mL を加えた。この溶液はチューブミキサーを用いて 5 分間激しく攪拌した。その後、20°C の恒温槽内に置いた。この溶液は 3 日以上恒温槽内に置き、その間時々チューブミキサーで攪拌を行い、最終的には 1 日以上静置して 2 相に分離させた。

2.3 濃度測定

まず *n*-octanol の一部をピペットで採取し、ethanol で適当な濃度に希釈した。この溶液濃度は ODS カラム (ULTRON VX -ODS: 4.6 mm i.d.×250 long, 親和加工) を装着した HPLC によって測定した。次いで、ガラスシリンジを遠心管に挿入して水相を採取した。この溶液を HPLC に直接注入して測定を行った。なお、*n*-octanol 溶液の場合の注入量は 20 μL とし、水溶液の場合には 2 mL~5 mL とした。水溶液を多量注入することにより、数 $\mu\text{g/L}$ 程度まで検出が可能であった。なお、HPLC の移動相には CH₃CN と H₂O の混合溶媒を用い、対象化合物によって組成比を変化させた。カラム温度は室温として、検出器には UV 検出器を用いた。

2.4 測定対象物質

これまで実測値が報告されていない化合物を対象とし、5 種類のアルキルフェノール、2 種類のフタル酸エステル、7 種類の多環芳香族炭化水素、23 種類の農薬を用いた。アルキルフェノールについては、3 段階の濃度のそれぞれについて 5 回の測定を行い、測定精度の検討を行った。それ以外の化合物は、3 段階のそれぞれの濃度において 1 回の測定とした。

3. log P 測定結果

3.1 繰り返し精度

アルキルフェノール類については同一濃度で、5 回の測定を行った。測定精度については、分配係数 (P) と回収率 (R) を用いて検討を行った。

Table 1 に結果を示す。平均回収率は 97.76~99.89% であり、回収率から見た測定精度は高いといえる。しかし、分配係数 (P) は 1000 であるため、回収率 (R) は水相の平衡濃度の影響は小さく、*n*-octanol 相の初濃度と平衡濃度の測定精度によって支配されるためといえる。分配係数 (P) の相対標準偏差は、概ね 5%未満で、例外は 4-*n*-butylphenol の最も低い濃度の場合の 6.49%であった。

4-*n*-octylphenol と 4-*n*-nonylphenol は $P > 1E+5$ であり、従来は分配法による測定が不可能と考えられていたが、本法では高い繰り返し精度で測定できることが示された。その要因は、水相の濃度測定の精度が高いことによるといえる。本法では、水相の濃度測定を行う場合、抽出・濃縮等の前処理を行っていないため、分析段階での対象物質の損失がなかったことが指摘できる。

3.2 log P 測定結果

本研究で対象とした化合物の log P の測定結果を **Table 2** にまとめて示す。なお、アルキルフェノール類については、15 個 (濃度 3 段階 × 5 回測定) のデータの平均値を示している。log P は分配係数の (P) の対数であるため、当然のこととして **Table 2** に示す相対標準偏差 (RSD) は **Table 1** の値よりも小さかった。Imidacloprid は例外的に高い RSD を示したが、それでも 3.43% であり、他の化合物の log P の RSD はすべて 1%未満であった。最も高い測定値は、*m*-terphenyl の 5.63 であったが、この場合でも測定値の変動はわずかであることが示された。

4. 考察

4.1 既往の測定結果との対応性

疎水性の高い化合物は分配法での測定が困難であり、間接法による測定が行われているが、Biphenyl については、分配法と間接法の測定結果を比較することができる。**Table 3** に既往の測定結果と測定法を示す。Method-I は分配法、II は HPLC の保持時間からの外挿値、III は ODS カラムを *n*-octanol で修飾したカラムによる測定である。**Table 3** の分配法の結果は、本法の結果と良い一致 (偏差: 0.03~0.06) が得られているが、間接法 (method-II, -III) の結果は、低い値となる傾向が見られる。

4.2 計算法との比較

log P 値を推定する方法として、フラグメントの log P 値を加算する方法が広く用いられているが、基本となるフラグメントのデータベースの精度が重要であること、また、計算のアルゴリズムによる影響も考えられる。化学計算ソフトの ChemDrow (CambridgeSoft Co.) で使用できる 3 種類の計算方法を用いて計算した多環芳香族炭化水素の結果を **Table 4** に示す。計算方法による差は比較的大きく、方法 (C) は計算値が低い傾向がある。また、これら化合物は、かさ高い構造をしていることが特徴であり、その影響を評価するデータベースの精度も課題と考えられる。

5. おわりに

本研究で示した log P 測定法は、本来の分配法であるが、水相の分析方法として HPLC に多量の水溶液を直接注入する方法を用いることにより、簡易な測定が可能となり、その特長は以下のようにまとめられる。

- (1) 少量の試料 (水相: 10 mL; *n*-octanol 相: 1 mL) で測定が可能である。
- (2) 分析操作に誤差要因が少な、log P 測定精度も高い。
- (3) 従来間接法によらなければならなかった高疎水性化合物の測定が可能である。

[参考文献]

- 1) J. Y. Ding and S. C. Wu: Partition coefficients of organochlorine pesticides on soil and on the dissolved organic matter in water, *Chemosphere*, Vol.30, pp.2259 (1995).
- 2) J. Devillers, S. Bintein, and D. Domine: Comparison of BCF models based on log P, *Chemosphere*, Vol.33, pp.1047 (1996).
- 3) H.J. Geygr, A. Kaune, K.-W. Schrammt, G. Rimkus, I. Scheunert, R. Brüggemann, J. Altschuh, C.E. Steinberg, W. Vetter, A. Kettrup and D.C.G. Muir: Predicting bioconcentration factors (BCFs) of polychlorinated bornane (toxaphene) congeners in fish and comparison with bioaccumulation factors (BAFs) in biota from the aquatic environment, *Chemosphere*, Vol.39, pp.655 (1999).
- 4) T. Tsuda, M. Kojima, H. Harada, A. Nakajima and S. Aoki: Acute toxicity, accumulation and excretion of isoprothiolane and its degradation products in killifish, *Water Res.*, Vol.31, pp.323 (1997).
- 5) C. Hansh and A. Leo: Exploring QSAR Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology, American Chemical Society, Washington DC (1995).
- 6) J.H. Canton and R.C.C. Wegman: Studies on the toxicity of tribromoethene, cyclohexene and bromocyclohexane to different freshwater organisms, *Water Res.*, Vol.17, pp.743 (1983).
- 7) OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS:
<http://www.oecd.org/dataoecd/17/35/1948169.pdf>
- 8) Alan Noble: Partition coefficients (*n*-octanol -water) for pesticides, *J. Chromatogr. A*, Vol.642, pp.3-14 (1993).
- 9) S.A. Tittlemier, E.Braekevelt, T.r Halldorson, C.M. Reddy and R. J.Norstrom: Vapour pressures, aqueous solubilities, Henry's Law constants, and octanol/water partition coefficients of a series of mixed halogenated dimethyl bipyrroles, *Chemosphere*, Vol.57, pp.1373 (2004).
- 10) E. Benfenati, G. Gini, N. Piclin, A. Roncaglionni and M. R. Vari: Predicting logP of pesticides using different software, *Chemosphere*, Vol.53, pp.1155 (2003).
- 11) Y.Kiso, H.Li, K.Shigetoh, T.Kitao, and K.Jinno: Pesticide Analysis by high-performance liquid chromatography using the direct injection method, *J. Chromatogr. A*, Vol.733, pp.259 (1996)

Table 1 Repeatability of the method (N=5)

Compound	Initial conc. (mg/L)	Av. recovery (%)	Partition coefficient (P)	
			Av.	RSD (%)
4- <i>tert</i> -butylphenol	786	99.63	2.103E+03	3.57
	401	99.42	2.131E+03	3.40
	206	97.76	2.216E+03	2.56
4- <i>n</i> -butylphenol	376	99.56	3.655E+03	1.40
	189	98.95	3.567E+03	1.53
	92	99.59	2.821E+03	6.49
4- <i>tert</i> -octylphenol	1068	99.40	2.561E+04	4.76
	503	99.33	2.393E+04	3.42
	281	97.17	2.517E+04	3.81
4- <i>n</i> -octylphenol	1133	99.30	1.417E+05	3.63
	555	99.00	1.415E+05	2.13
	287	97.80	1.418E+05	1.73
4- <i>n</i> -nonylphenol	2824	98.30	2.619E+05	0.80
	1550	99.77	2.645E+05	3.35
	785	99.89	2.741E+05	4.09

Table 2 Summary of log P values measured by the proposed method

compound	Recovery (%)	log P		N	compound	Recovery (%)	log P		N
		Av.	RSD(%)				Av.	RSD(%)	
alkylphenol					methyldymron	98.1	2.56	0.12	3
4-ethyphenol		2.40	0.60	3	pyridaphenthion	96.2	3.14	0.35	3
4- <i>tert</i> -butylphenol	98.9	3.33	0.50	15	chlorneb	97.4	3.09	0.66	3
4- <i>n</i> -butylphenol	99.4	3.52	0.53	15	tolclophos-methyl	98.8	4.70	0.53	3
4- <i>tert</i> -octylphenol	98.6	4.40	0.47	15	butamifos	93.9	4.45	0.40	3
4- <i>n</i> -octylphenol	98.7	5.15	0.21	15	terbucarb	101.5	3.97	0.17	3
4- <i>n</i> -nonylphenol	99.3	5.43	0.28	15	thiuram	101.9	1.64	0.11	3
alkylphthalate					buprofezin	100.9	4.89	0.25	3
dicyclohexy phtha-	98.3	5.00	0.67	3	esprocarb	97.5	4.52	0.17	3
<i>p</i> -diethyl phthalate	99.7	3.24	0.12	3	edifenfos	96.8	3.75	0.62	3
Polycyclic aromatic hydrocarbons					propiconazole	96.3	4.58	0.16	3
biphenyl	100.1	4.07	0.83	3	imidacloprid	100	0.61	3.43	3
2,2'-dimetyldiphenyl	98.2	5.05	0.01	3	molinate	102.8	2.64	0.92	3
4,4'-dimetyldiphenyl	100.7	5.23	0.99	3	thionbencarb	100.6	4.15	0.66	3
<i>o</i> -terphenyl	100.1	5.12	0.45	3	chlorothalonil	97.7	3.71	0.07	3
<i>m</i> -terphenyl	100.6	5.63	0.30	3	isoprothiolane	99.8	3.07	0.10	3
triphenylmetane	101.5	5.46	0.26	3	chlorpyrifos	99.7	4.98	0.84	3
pesticide					fenobucarb(BPMC)	98.7	2.65	0.38	3
propyzamide	102.3	3.17	0.14	3	pendimethalin	100.4	5.01	0.22	3
iprobenfos(IBP)	101.6	3.31	0.07	3	ethofenprox	101.4	5.18	0.18	3
isoxathion	99.4	4.77	0.38	3					

Table 3 Reported log P values

method	log P	Ref
I	4.01	12
I	4.04	13
II	3.79	14
II	3.77	15
III	3.89	16
unknown	4.04	17
unknown	3.76	18
unknown	3.16	19
av.	3.81	
RSD	7.55%	

I: standard method

II: HPLC

III: generator column-HPLC

Table 4 Comparison of calculated values

Solute	method			Av.	This work
	A	B	C		
biphenyl	3.71	3.73	3.30	3.58	4.07
4,4'-dimethyldiphenyl	4.63	4.67	4.13	4.48	5.23
2,2'-dimethyldiphenyl	4.63	4.67	4.13	4.48	5.05
<i>m</i> -terphenyl	5.38	5.42	4.73	5.18	5.63
<i>o</i> -terphenyl	5.38	5.42	4.73	5.18	5.12
Triphenylmethane	5.64	5.68	4.98	5.43	5.46

C: Crippen's method; (B) Viswanadhan's method, (C) Broto's method