

農業環境品質整體規劃研討會論文專集

民國八十二年六月十八~十九日

以液相層析法分析辛醇 ／水分佈係數

羅致述

臺灣省農業藥物毒物試驗所

壹、前言

一般用於評估化學物質在環境中蓄積特性的即是使用辛醇／水分佈係數 (Octanal/Water Partition Coefficient)，辛醇／水分佈係數也可用於農藥與醫藥的研發。觀察藥劑是否對環境造成傷害，或藥劑是否易由表皮侵入生物體，或其在生物體內存在的時間是否適當等等。

化學物質在環境中的分佈過程 (Partition processes)，一般可以兩種過程來解釋：

1. 生物蓄積 (Bioaccumulation)：

本過程將化學物質由其原先存在的環境中進入生物體內，並增加其濃度。此過程具有選擇性。

2. 食物鏈增倍 (Biomagnification)：

本過程指化學物質最先進入食物鏈中較低一級的生物中，然後經由食物鏈而在較高級的生物中累積至高的濃度。

由於累積的濃度愈來愈高，而造成毒害的危險 (危險性 = 毒性 × 曝露劑量)。對於具有生物蓄積性，及食物鏈增倍性的化學物，則環境保護的人員要特別謹慎，先評估其利益及危險性之後，才可決定這化學物質是否可以供人類使用，或供人類使用的安全條件。

貳、辛醇／水分佈係數 P

P 的觀念最早是由 Hansch (1969) 引用在生化上的結構活性分析 (Biochemical structure activity relationships)⁽⁵⁾，Neely 等人 (1974) 發現 P 值與有機物質在魚類中的生物濃縮性相關⁽⁶⁾，自此以後 P 值就廣泛地運用在評估水生生物或其他生物之脂肪組織對有機物質的生物濃縮性。其表示方法有三種：P，log P，或 Kow。

$$P = \frac{C_{\text{Octanol}}}{C_{\text{H}_2\text{O}}} = K_{ow}, C < 0.01 \text{ M}, 25 \pm 1^\circ\text{C}$$

其中 C_{Octanol} ：表示溶質在溶劑辛醇 (Octanol) 中之濃度。

$C_{\text{H}_2\text{O}}$ ：表示溶質在溶劑水 (H_2O) 中之濃度。

參、美國環保署對辛醇／水分佈係數之說明

當化學物質進入生物體內，其蓄積 (Accumulation) 及運送 (Transport) 之程度可由物質之極性，水溶性，脂類親和性，及受體鍵結性質來控制。而辛醇／水分佈係數則可提供化學物質在水生生物及其他生物體內脂肪組織之生物濃縮 (Bioconcentration) 的指標。辛醇／水分佈係數的高低亦可提供是否需進行魚之生物濃縮性試驗。由於辛醇／水分佈係數與化學物質之結構有關，因此也可提供毒性評估 (Toxicity assessment) 之資料。

所以美國 EPA 要求當農藥之有效成份為非極性有機化合物，申請廠商需提供該成份純品之辛醇／水分佈係數⁽¹⁾。並建議廠商可依美國環保署公告之方法或歐洲經濟合作開發組織 (OECD) 之方法進行分析^(4, 7)。

Kow 數值大小：美國環保署認為 $Kow < 10$ 並不會造成化學物質在生物體內明顯的蓄積。 $Kow > 10^6$ 則化學物質可造成蓄積，即使該物質在環境中的量低於毒性發生的量，但仍可藉由生物濃縮而造成中毒。

肆、辛醇／水分佈係數之測定

主要分析法有三種：(1) 傳統式搖瓶法 (Traditional shake-flask method)；(2) 液相層析法 (Reverse-phase HPLC method)；(3) 計算法 (Calculating method)。其中第一種為美國環保署所採用，其標準作業如下^(2, 3, 4)：

(a) 目的：

本標準檢驗是針對分析化學物及混合物的辛醇／水分佈係數值所設計。EPA 可利用由此獲得之數值來評估化學物質在環境中的轉化，對生物的健康及影響。

(b) 定義：

“辛醇／水分佈係數” (Kow) 指化學物質在正辛醇及水的溶液中平衡

時的莫耳濃度比值，在一定溫度下此Kow 值是不變的。

(c) 優良實驗操作 (GLP)：

§ 772.110-2 依測試標準進行分析。

(d) 試驗條件：(1) 特殊設備箱。

(I) 加熱槽或箱或一具振盪器及控制溫度的實驗室。

(II) 不鏽鋼或玻璃做的有篩子的離心管，玻璃離心管需可承收12,000轉／分鐘的離心速度，至於不鏽鋼離心管可在更高的離心速度下使用。溫度控制在 25 ± 1 °C。

(III) 機械式的振盪器。

(IV) 酸鹼測量計解析度需小於或等於0.1個pH值。

(2) 溫度控制箱：

加熱槽或箱或實驗室及離心機的溫度須控制在 (25 ± 1) °C。

(3) 溶劑純度：

正辛醇純化如[g](1)(I)段所述，水則需為蒸餾水或反應級水，如ASTM第二型或同級品。

(4) 溶質濃度：

所有實驗溶質在辛醇或水中之濃度需低於0.01M，且遠低於個別溶質在辛醇或水的溶解度。

(5) 平衡時間：

一般而言，一小時溫和的攪拌足以達到平衡。對於表面活性劑則至少需16小時才可達到平衡。

(6) 辛醇／水體積比：

這兩種溶劑的體積比須依測試化學物在辛醇和水的相對溶解度調整。透過體積比調整，可以使濃度所造成的誤差降到最低(由於分析的誤差)。

(7) 辛醇相及水相的化學分析：

分析溶質的Kow 值時，必須分析辛醇相與水相。對一特定的化學物質，我們必須選定一個適當的分析方法。層析法一般較適合，因對化合物較具專一性，且無不純物的干擾，但不論什麼方法，其精確度須在 $\pm 5\%$ 內。

(8) 乳化及離心：

溫和的振盪以降低乳化，離心可使乳化分層以得到辛醇相和水相。在 25°C 條件下離心20分鐘。使用的G 值大小則以嚐試錯誤的方式來決定，其依據的是需使水

相與辛醇相完全分離。

(9) 平衡容器：

(I) 如可能，平衡可在有蓋的離心管(不鏽鋼或玻璃)中進行，離心管必須幾乎全裝滿，如此進行分佈試驗時，可降低空氣的干擾，使混合完全，特別是揮發性化學物質更需如此。

(II) 疏水性強的化學物質(Kow 值約在 10^4 - 10^6 之間)需要大量的水相。因此這些化學物的平衡必須在大的有蓋的圓底燒瓶中進行。

(10) 化學物種效應：Kow 之數學等式：

$$\text{等式 (1)- } Kow = \frac{C_{\text{辛醇}}}{C_{\text{水}}}$$

其中 C 指的是定溫下在辛醇和水之溶質的莫耳濃度

(I) 假使化學物質於辛醇及水中時不會發生鍵合(Associate) 或解離(Dissociate)，則使用等式 1，且 Kow 之計算必須在莫耳濃度 $C < 0.01M$ 及 $C_1 = 0.01C$ 狀況內進行。

(II) 假如化學物質可於水或辛醇或兩者液體中進行鍵合，此時仍用等式 1，但計算 Kow 值需在莫耳濃度 $C < 0.01M$ ， $C_1 = 0.1C$ ， $C_2 = 0.01C$ ， $C_3 = 0.001C \dots$ 的情況下進行。當兩個莫耳濃度相差 10 倍而 Kow 仍不變時，這時鍵合的影響已降到最低或消除。

(III) 假使化學分子在辛醇及水中發生解離或鍵合，則等式 1 須修改，以考慮離子化、聚合、水合反應等物種形成效應。化學物在辛醇相中無鍵合，而只在水中發生解離，這時等式 1 變成等式 2：

$$Kow = \frac{C_{\text{octanol}}}{(1 - \alpha_{\text{water}}) (C_{\text{water}})}$$

式中 α 代表化學物在水中的解離度

如化學物進行可逆的離子化或質子化(例如羧酸、酚類或苯胺)，在使用等式 2 時，水之酸鹼度需

以緩衝液調整為pH在5, 7, 及9[(g)(I)(II)]。

(11)預先洗淨所有移轉容器。所有移轉容器在使用前需以預先平衡之水相清洗。

(e) 步驟：

測試的條件如本部份[d]段所述。

(f) 報告：

本測試方法可測辛醇／水分佈係數從 10 到 10^6 的範圍。至於不在此範圍之 Kow 值，其報告表示為 $Kow > 10^6$ 或 $Kow < 10$ 。

(1)特殊分析及回收率：

(I)對使用的分析方法提供一詳盡的描述或參考資料，其中包括計算及準確度。

(II)假如使用萃取方法從辛醇與水中萃取溶質，則需提供萃取流程及回收率。

(III)說明可破壞乳化並使辛醇及水完全分離的 G 值。

(2)測試數據：

對每一 Kow 的分析，報告使用的濃度，以及在辛醇及水中之莫耳濃度，並且報告 Kow 的平均值及標準機差。

(g) 測試步驟：

(1)反應劑及溶液

(I)正辛醇及水：

以 $0.1N$ 硫酸和 $0.1N$ 氫氧化鈉依序洗純辛醇(純度最少須98%以上)，然後用蒸餾水洗至中性為止。用硫酸鎂乾燥處理後，再以減壓蒸餾[沸點約 $80^{\circ}C$ ， $0.27kPa(2torr)$]蒸餾兩次，所得到之正辛醇純度至少需99.9%，品質相當於Fisher Scientific公司編號A-402之"Certified Octanol-1"，水需以蒸餾水或反應級的水(ASTM II型)。

(II)緩衝溶液：使用蒸餾過或反應級水與反應級的化學物來製備緩衝溶液。製備方法如下：

pH值=5 250ml $0.1M$ Potassium hydrogenphthalate(酞酸氫鉀)；113 ml $0.1M$ NaOH (氫氧化鈉)；加反應級水定量到500ml。pH值=7.0 250ml $0.1M$ Potassium dihydrogen phosphate(磷酸氫鉀)；145 ml $0.1M$ 氫氧化鈉；加反應級水定量到500ml。pH值=9 250 ml $0.075M$ Borax(硼砂)；69ml的 $0.1M$ HCl(鹽酸)；加反應級的水定量到500ml。

以pH儀器檢查 $25^{\circ}C$ 時每一緩衝溶液的pH值，並視需要調整到pH值為5, 7或9。

(III) 預飽和溶劑：

在進行實驗之先，製備飽和辛醇的水及製備飽和水的辛醇。先將已純化的正辛醇放入大瓶中，再加足夠量的蒸餾水飽和辛醇；機械振盪24小時，靜置至分層；重覆上述步驟，只是將水與辛醇調換過。

(IV) 測試溶液的製備：

製備含有測試物質的溶液(以辛醇為溶劑)其濃度在 $10^{-3}M \sim 10^{-2}M$ 間。

(2) 步驟：

(I) 先取前項製備之測試溶液小量(約1-5ml)到有蓋的離心管。

(II) 水量的需求則隨測試物質而異，一般而言20-40ml的水就足夠了。再依(d)(6)所敘加水至離心管，使近於全滿。

(III) 在一恆溫 $25^{\circ}C$ 的溫控槽或室平衡樣品，溫和振盪離心瓶約1小時。避免強力振盪以免發生乳化。如測試物質為界面活性劑，則至少需振盪16小時以上，如同(d)(5)段所說明。

(IV) 混合後之樣品在 $25^{\circ}C$ 下離心20分鐘，以破壞其乳化及造成分層。離心使用的G值，則由實驗中的分層經驗來決定。

(V) 自辛醇和水相中取樣：

(A) 先以吸管吸取辛醇相(至多 $1/2$ 總辛醇相體積)；並移轉至分析容器上或稀釋溶劑中。

(B) 以吸管將殘留之辛醇相及接觸面部份移棄。

(C) 另取乾淨之吸管插入離心管之底部，小心地吸取水相，用吸水紙擦拭吸管底端外緣，再將水溶液注入到分析容器上或萃取溶劑中。不要讓吸管觸及萃取溶劑。

(VI) 如(d)(7)所述選擇適當的分析法，然後分析溶質在辛醇和水相中的濃度(M)。

(VII) 分析測試物質的 K_{ow} 值。需在兩種濃度 $C < 0.01M$ 及 $C_1 = 0.1C$ (如(d)(10)(I)所述)下進行，三重覆。如在 C 及 C_1 濃度下 K_{ow} 值不是定數時，則可能是因鍵合效應所致。因此重覆步驟(I)至步驟(VII)。以更低的濃度進行 K_{ow} 分析，直到 K_{ow} 值為一定數止(濃度每次降低10倍)。

(VIII) 非常疏水性的化學物(其 K_{ow} 值在 $10^4 - 10^6$ 間)須要相當大量的水相，如(d)(6)及(9)(II)所述。所以對於疏水物質，辛醇與水相需如步驟(III)所述，要在附蓋的大型圓底燒瓶中進行，平衡後將溶液移轉到離心管中，離心管已先用水預先潤濕，再依步驟(VI)離心。依步驟(V)取量進行分析。注意：須先以水相將所有移轉的離

心管潤濕，完成步驟(VI)及(VII)後計算Kow值。

(IX)如測試物質具可逆性的離子化、質子化特性者，可依(d)(10)(II)的步驟分析，依(g)(I)(II)配製的緩衝液中不同酸鹼度pH=3, 7, 9下分析Kow值。利用酸解離常數及在水相中的溶質濃度 $[C_{water}]$ ，求得解離度 α ，再以 α 及 C_{water} 來計算未解離的溶質濃度。

在歐洲則使用的方法近似於美國(7,8)，其辛醇/水分佈係數之分析用的也是傳統式搖瓶法(Flask-shaking method)。但是與USEPA不同的是：

- (1)辛醇/水分佈係數以log P值表示。
- (2)水需為蒸餾水，不可使用去離子水。
- (3)平衡溫度20-25°C(±1°C)。
- (4)可使用無溫控之離心機，但離心後靜置1小時才可進行分析。
- (5)對易解離之有機物質需使用緩衝液(但緩衝液之pH未說明)。

ASTM之辛醇/水分佈係數之分析則使用液相層析法(C₈或C₁₈管柱)。溶劑系統MeOH/H₂O。溶質分析：LC偵檢器，或氣相層析儀偵檢器等。辛醇/水分佈係數以Kow表示，以線性迴歸計算：

$$Kow = a \log(tr - to) + b.$$

a 斜率，b 交點。

tr：測試溶質之滯留時間或標準物(已知Kow值，5-10種)之滯留時間。

to：內標準物滯留時間。

內標準物則依測試物質的溶解度使用Dipotassium salt of 2,5-dihydroxy p-benzene disulfonic acid(低Kow值)或使用Acetanilide(高Kow值)。

伍、搖瓶法與層析法之比較

傳統搖瓶式分析法：

1.搖瓶法：如溶質水解度很低，或相分層無法完全，均可造成Kow明顯的差異。所有測試物質純度需求極高，不純物極易干擾，過程多，耗時。

- (1)溶質：純度>99%，<0.01M(水或辛醇)。
- (2)水：試藥級蒸餾水，預飽和辛醇，20-40ml。
- (3)辛醇：純度99.9%，(0.1N H₂SO₄, NaOH, H₂O)，預飽和水，1-5ml。
- (4)平衡時間：1小時。
- (5)溶質分析：層析法。
- (6)液-液分層：離心法(25°C, 20 min × 12000G)或自選。
- (7)平衡容器：離心管(玻璃或不鏽鋼)，需裝滿，如Kow值在10⁴-10⁶則液相使用量大，可改用大的圓底瓶。

(8) 緩衝液：如溶質在溶劑中易發生解離(Dissociation)，則需調整水之酸鹼度(pH 5.0, 7.0, 及9.0)。並改用等式2

$$Kow = \frac{C_{\text{octanol}}}{(1 - \alpha_{\text{water}}) (C_{\text{water}})}$$

α = 解離度

(9) Kow 數值：使用二種劑量(相差10倍)三重覆，例如， $C_1=0.1C$ ， $C_2=0.01C$ ，所測得的Kow 數值不同，則降低濃度直至Kow 為一定值。

如溶質易解離，則需先以緩衝液來進行Kow 之測定。

2. 層析法：則不受以上之限制，但層析法不適用於強酸、強鹼、金屬錯化物或界面活性劑，而搖瓶法則可測界面活性劑的Kow 值。至於層析法所得之log P 值與計算法接近(表一)⁽³⁾，顯示簡易的層析法是可以用來取代複雜的搖瓶法。

本所則依層析法進行log P 的分析，其結果如圖1，顯示線性關係良好⁽²⁾。

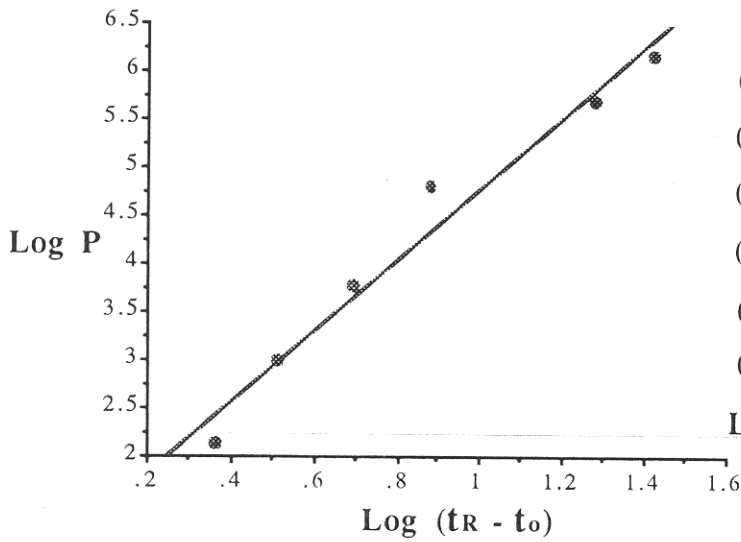
陸、結語

辛醇/水分佈係數的分析由於主要係針對極疏水性的物質，因此往往水層中之溶質萃取不易，增加誤差。去年我們曾嘗試分析一系列的三環化物的log P 值，但由於水溶性低，以致測得的log P 值變異很大，但改用HPLC層析法，即可得到一具再現性的log P 值。因此對於農藥或醫藥的開發及環境安全評估，使用層析法是可考慮的(表二)。

表一、搖瓶法，液相層析法與計算法之log P 比較

化學物質	搖瓶法	層析法	計算法*	差異	
	(a)	(b)	(c)	(a-b)	(a-c)
Biphenyl	3.63	4.01	3.81	-0.38	-0.18
p,p'-DDT	6.19	6.21	6.91	-0.02	-0.72
HCB	6.18	6.41	6.42	-0.23	-0.24
Chlorfenvinphos	3.80	3.84	3.67	-0.04	0.13
Aniline	0.94	0.81	0.91	0.13	0.03
r-BHC	3.72	3.67	3.89	0.05	-0.17
平均差異				-0.08	-0.19

*計算法：LOG P Programme, MEDCHEM software.



化合物	Log (tr - to)	Log P
(1) Benzene	0.36	2.13
(2) Bromobenzene	0.51	2.99
(3) Biphenyl	0.69	3.76
(4) Bibenzyl	0.88	4.81
(5) pp'-DDE	1.28	5.69
(6) HCB	1.42	6.18

$$\text{Log P} = 3.666 \text{ Log (tr - to)} + 1.114$$

圖 1. 辛醇/水分佈係數與常態化滯留時間的線性圖

表二、辛醇/水分佈係數不同分析法之比較

分析方法	搖瓶法	層析法	計算法
過程	多	少	不詳
材料	多	少	不詳
再現性	優或劣	優	不詳
意義	直接或間接	間接	推算
接受性			
USEPA	++	+/-	參考值
OECD	++	+	參考值
ASTM		++	參考值
實用性			
農藥	++/+	++	++
醫藥	++/+	++	++

柒、參考文獻

1. 羅致述, 1991. 美國環保署對農藥申請理化性測試條件說明, 藥試所專題報導, 第三十期 16頁。
2. 謝再添, 羅致述, 1993. Diclomezine 之辛醇/水分佈係數分析委託試驗報告
3. Eadsforth, C. V., 1986, Application of reverse-phase h.p.l.c. for the determination of partition coefficients. *Pest Sci*, 17: 311-325.
4. 45 Fed Reg, 77350 (Nov, 21, 1980).
5. Hansch, C, 1969. A quantitation approach to biochemical structure-activity relationships. *Accounts Chem. Res.* 2:232-239.
6. Neely, W. B., Branson, D. R. and Blau, G. E., 1974. Partition coefficient to measure bioconcentration potential of organic chemicals in fish. *Environ. Sci. and Tech* 8:1113.
7. OECD Guidelines for Testing Chemicals, May, 1981, Section 1, Number 107, Partition coefficient (n-Octanol/Water).

APPLICATION OF HPLC FOR THE DETERMINATION
OF PARTITION COEFFICIENTS

Chi-Chu Lo

Taiwan Agricultural Chemicals and Toxic
Substances Research Institute,
Wufeng, Taiwan, ROC

Abstract

The octanol/water partition coefficient (K_{ow} or P_{ow}) has been used as the indicator to predict the structure-activity relationship and to provide the ecotoxicological properties of any new pesticide or drug. Thus, the registration of each manufacturing-use product and end-use product should provide the octanol/water partition coefficient value of the active ingredient for the assessment of the potential environmental hazards in Taiwan. The details of the determination methods of the USEPA, OECD, and ASTM are discussed.