

<別添> 「測定マニュアル：低速かくはん法による界面活性剤の 1-オクタノール/水分配係数」

NITE 調査研究

「低速かくはん法による界面活性剤の 1-オクタノール/水分配係数測定」報告書別添

測定マニュアル

「低速かくはん法による界面活性剤の 1-オクタノール/水分配係数」

令和 8 年 10 月版

独立行政法人 製品評価技術基盤機構(NITE)

化学物質管理センター

1. はじめに

このマニュアルは、1-オクタノール／水分配係数（ P_{OW} ）の測定方法の 1 つである Organisation for Economic Co-operation and Development Test Guideline（OECD TG）123：Partition Coefficient（1-Octanol/Water）: Slow-Stirring Method（低速かくはん法）をベースに、界面活性作用を有する化学物質（以下、界面活性剤という。）の P_{OW} 測定を行うにあたり推奨される手順を記述した文書である。

2. 構成と定義

2.1. マニュアルの構成

マニュアルは、はじめに（1.）、構成と定義（2.）、方法の原理と適用範囲（3.）、被験物質に関する情報（4.）、試験方法（5.）、データ及び報告書（6.）からなる。試験の流れは、図 1 に示した通りである。



図 1 試験の流れ

2.2. 定義

混ざり合わない溶媒間の被験物質の分配係数は、各溶媒に溶解した物質の分配平衡を特徴づけるものであり、 P_{OW} は、水で飽和した 1-オクタノール相中の被験物質濃度（ C_O ）と 1-オクタノールで飽和した水相中の被験物質濃度（ C_W ）の平衡濃度の比として定義される。

$$P_{OW} = C_O / C_W$$

P_{OW} は上述のとおり各相中の濃度の比であることから無次元であり、多くの場合、常用対数（ $\log P_{OW}$ ）で表される。

なお、 P_{OW} は非解離分子に対する定数であるが、非解離分子及び解離分子の両方の両相への分配を考慮した分配係数として D_{OW} （常用対数の場合は $\log D_{OW}$ あるいは $\log D$ ）が用いられることもある。本書では、 D_{OW} も含めて、 P_{OW} と称する。

3. 方法の原理と適用範囲

3.1. 原理

界面活性剤を対象としてフラスコ振とう法を用いた場合に起こる水中でのエマルションの形成は、低速かくはん法を用いることで抑制が可能である。低速かくはん法は、水相中の 1-オクタノール液

滴の形成を減少させると考えられ、結果として水相に分散した 1-オクタノール液滴に含まれる被験物質分子が水相の分析の際に検出されることによる水中濃度の過大評価を防ぐと考えられている。低速かくはん法では、水、1-オクタノール及び被験物質を一定温度条件下で平衡化する。1-オクタノールと水の間の平衡化はかくはんによって促進されるが、一般的なかくはんよりも低速であることでかくはんによる乱流が制限されるため、エマルション形成が抑制される。平衡化後、二相中の被験物質の濃度を測定し、 $\log P_{OW}$ 値を決定する。

3.2. 適用範囲

アニオン、カチオン、両性、非イオンの界面活性剤の P_{OW} 測定へ適用できる。

$\log P_{OW}$ の値が 0～4.5 の範囲は、本法で測定することができる。

被験物質以外の物質の存在は、分散平衡化に影響を及ぼす可能性があることから、高純度な試薬の使用を推奨する。

被験物質の試薬に他の物質が不純物として含まれる場合、測定された $\log P_{OW}$ 値は、混合物の組成と試験で使用する水相中の電解質の組成に影響を受ける可能性があることに注意が必要である。 P_{OW} の測定には、試験において pH と電解質組成を制御することが必要である。解離物質では、イオン化の状態ごとに P_{OW} が測定できるように、試験目的に応じて適切な pH を試験条件として設定する必要がある。

解離物質の環境動態と生物学的利用能についての情報を得る場合、pH 7（及び pH 5～9 の間）の試験を推奨する。

イオン強度は、バックグラウンド電解質を使用することなどによって、全ての試験で同条件となるように設定する必要がある。

臨界ミセル濃度（以下、CMC という。）が低い、難水溶性又は高 P_{OW} の物質は、水相中濃度が極めて低くなることから、精度の高い分析が困難になる可能性や試験実施の障害となる可能性がある。

4. 被験物質に関する情報

試薬は分析グレード又は高純度（>99%）の使用を推奨する。

試験実施に先立ち、被験物質に関する以下の情報が有用である。

- ・ 構造式
- ・ 純度（不純物の情報を含む）
- ・ 試験温度での CMC（試験温度がクラフト点以下の場合、試験温度での水溶解度）
- ・ クラフト点
- ・ 1-オクタノール溶解度
- ・ 加水分解性
- ・ pKa
- ・ 被験物質に対して選択性の高い分析方法
- ・ $\log P_{OW}$ 推定値

CMC は試験時の被験物質濃度の設定に重要な役割を示すことから、試験時と同一の緩衝液における値の取得を推奨する。

log P_{OW} の推定には、両相への溶解度の比を使用することもできるが、不確実性が大きいことに留意する必要がある。

5. 試験方法

5.1. 装置及び器具

標準的な装置や器具に加え、特に以下のものが必要である。

- ・ 相互飽和用容器：材質が適切で試験に必要な溶媒量に見合う容量を有するもの
- ・ マグネティックスターラー：低速時に安定なかくはんが可能な性能を持つもの
- ・ スターラーバー：テフロン等でコーティングされ、かくはん時に泡が生じない形状のもの
- ・ 恒温槽又は恒温室：スターラーを使用できる環境が整っているもの
- ・ 平衡化容器：ふた付きで、コックが底にあるかくはん容器。表面材質が不活性であることが望ましい。容器は透明で、かくはんにより生じる渦の形状を外部から確認できること、また容器底部においてスターラーバーが長時間安定して回転できる形状であるもの。
- ・ pH 計：試験目的に応じて適切な測定精度を有するもの

5.2. 試験溶液の調製

5.2.1. 溶媒

水は、蒸留水、再蒸留水、純水製造システムから入手した純水、HPLC 用グレード以上の試薬の使用を推奨する。

1-オクタノールは、分配係数測定用あるいは分析用グレード以上の試薬の使用を推奨する。

解離物質を対象とした測定では、試験目的に応じて適切な pH を試験条件として設定する必要がある。

pH 7.0 での試験の場合、リン酸緩衝液などの使用を推奨する。

- ・ リン酸緩衝液の組成例 : 5 mM Na_2HPO_4 、5 mM NaH_2PO_4 、1 mM NaN_3

5.2.2. 溶媒の相互飽和

水と 1-オクタノールは、測定前に両溶媒相を試験温度で平衡化させ、相互に飽和させる必要がある。

十分に大きな容器を 2 つ用意し、一方には 1-オクタノールと飽和に十分な量、例えば 1-オクタノールの 1/10 倍量の水を入れ、もう一方には水と飽和に十分な量、例えば水の 1/10 倍量の 1-オクタノールを入れ、穏やかに 24 時間以上の振とう又はかくはんを実施する。

振とう又はかくはん後、それぞれの容器の二相が分離するまで試験温度で静置する（数日）。分相後は、比重差により上相となる 1-オクタノール相を別の容器に採取する。次に、下相の水相を別の容器に採取する。なお、相境界付近は混合が生じやすいため、採取を避ける。なお、試験において緩衝液を用いない場合は、水相の pH を測定し、試験前の pH として記録する。

5.2.3. 被験物質添加液の調製及び初期濃度の設定

被験物質を添加する相互飽和溶媒（以下、添加相という。）は水相、1-オクタノール相のどちらでも良い。

被験物質添加液は添加相と同じ飽和溶媒（1-オクタノール飽和水又は水飽和 1-オクタノール）で調製する。

被験物質添加液を添加した直後の、完全混合を仮定した添加相全体における理論的濃度（以下、初期濃度という。）は、被験物質添加液の濃度、添加量および添加相量から算出する。また、添加相が水相の場合は CMC（試験温度がクラフト点以下の場合、試験温度での水溶解度）、1-オクタノール相の場合は 1-オクタノール溶解度を超えない範囲で、完全に溶解するように調製する必要がある。

初期濃度は CMC、 $\log P_{OW}$ 推定値及び被験物質の分析感度を考慮して設定する。

$\log P_{OW}$ の算出に当たっては希薄溶液で測定する必要がある、被験物質の濃度がいずれの相でも 0.1 M 以下であることが望ましい。

初期濃度は、 $\log P_{OW}$ 値に影響を及ぼすことがあることから、少なくとも CMC よりも低い、すなわち、初期濃度/CMC（以下、CMC 比という。）が 1 以下である必要がある、CMC 比 0.1~0.3 以下を推奨する。

5.3. 予備検討

5.3.1. かくはん速度の設定

エマルション形成を抑制するため、試験前に 1-オクタノールと水の界面に 0.5~1.5 cm の深さの渦ができるスターラーバーの種類及びかくはん速度について、試験前に検討することを推奨する。

5.3.2. 平衡化時間の設定

5.4 項に示した試験手順を用いて、1-オクタノール相と水相を定期的に試料採取する平衡化時間検討試験（A）を実施する。経時的に 4 回以上測定した $\log P_{OW}$ の回帰直線の傾きが有意水準を 0.05 としてゼロと有意な差が認められないとき分配平衡が達成されたと判定する。

又は 1-オクタノール相に被験物質を添加する平衡化時間検討試験（B）及び水相に被験物質を添加する平衡化時間検討試験（C）から得た同一かくはん時間における $\log P_{OW}$ に有意水準 0.05 で有意な差が認められないとき、分配平衡が達成されたと判定する。なお、この条件を満たす場合には、平衡化時間検討はかくはん時間を 1 条件とした測定でも十分であるものとするが、再現性を確保するため、各条件において繰り返し測定（ $n=3$ 以上）を行うこと。

5.4. 試験の実施

5.4.1. 二相の体積比

1-オクタノール飽和水と水飽和 1-オクタノールの体積比は 1:1 を推奨する。

5.4.2. 試験条件

本マニュアルでは、試験温度の基準条件を $25 \pm 1^\circ\text{C}$ とする。ただし、試験目的に応じて適切な温度で試験することも可能である。

かくはん速度は 5.3.1.項で設定した 1-オクタノールと水の界面に 0.5～1.5 cm の深さの渦ができる値に調整する。

平衡化時間は 5.3.2.項で設定した時間とする。

静置時間（かくはん停止から試料採取までの時間）は 1 時間を目安とする。

被験物質の特性を考慮して、必要に応じて、平衡化容器をアルミホイルで遮光するなど暗所で実施する。

同一条件で 3 試料以上の試験を行う。

5.4.3. 試験の開始

平衡化容器に設定した容量の 1-オクタノール飽和水を入れる。

水相に被験物質を添加する場合は、ここで所定量の被験物質（1-オクタノール飽和水に溶解したもの）を泡立たないように添加する。

水相との混合を避けるため、水飽和 1-オクタノールを壁面に沿って、極めてゆっくり添加する。水飽和 1-オクタノールの滴が直接水相に落ちることがあってはならない。

1-オクタノール相に被験物質を添加する場合は、所定量の被験物質（水飽和 1-オクタノールに溶解したもの）を注意深く壁面に沿って、極めてゆっくり添加する。

揺らさないよう平衡化容器のフタを閉め、平衡化容器をスターラーの上にゆっくりと置く。

スターラーのかくはん速度を徐々に上げ、5.3.1.項で設定した 1-オクタノールと水の界面に 0.5～1.5 cm の深さの渦ができる値に調整する。エマルション形成を抑制するため、渦の深さの制御は重要である。

5.3.2.項で設定した平衡化時間が経過したら、スターラーの回転を止め、かくはんを停止する。

水相又は 1-オクタノール相、あるいは両相が白濁した場合、白濁が $\log P_{OW}$ 値に影響しないことを確認する必要がある。白濁は、CMC 比を下げる、あるいは平衡化時間を延長すると改善する場合がある。

白濁の有無は、動的光散乱法等によって確認することができる。

5.4.4. 試料採取

かくはん停止から 1 時間後に、1-オクタノール相の中央部に例えばピペットの先端を挿入し、適切な量の 1-オクタノールを採取する。

平衡化容器にあるコックから水相の試料採取を行う。コック内にある水はかくはんされていないため平衡状態にないことから、デッドボリュームとして 1-オクタノールと水の界面がかく乱されないようにゆっくりと排出し、廃棄する。続いて水相を静かに採取する。なお、緩衝液を用いない場合は、水相の pH を測定し、試験後の pH として記録する。

上記で採取した 1-オクタノール相及び水相試料はそのまま、あるいは希釈、濃縮などの前処理を行って分析する。分析は被験物質に対して選択的な方法が望ましい。なお、物質収支計算では、廃棄した水に含まれる被験物質質量も考慮すること。

5.5. 試料調製と分析

log P_{OW} 値の算出には、水で飽和した 1-オクタノール相中の被験物質濃度 (C_O) と 1-オクタノールで飽和した水相中の被験物質濃度 (C_W) を、検証された分析方法を用いて測定することが必要である。

1-オクタノール相及び水相の被験物質濃度が定量下限を超えている必要がある。

試料の濃度や分析感度によっては試料の濃縮が必要な場合がある。1-オクタノール相及び水相からの被験物質の添加回収試験を行い、回収率等を明らかにするなど、試験前に濃縮・抽出手法を確立する必要がある。添加回収試験で回収率の大きな変動が見られた場合、サロゲート物質の使用を推奨する。

必要に応じて適当な溶媒で希釈して分析することも可能である。試料採取や濃縮、希釈の操作において、吸着性の高い界面活性剤の場合には、十分に共洗いを行うなどして、吸着による損失に注意する。

界面活性剤の分析では、装置等からのコンタミネーションの影響を受けやすい。そのため、コンタミネーションの影響を受けない手順で分析を実施する必要がある。界面活性剤分析でよく用いられる液体クロマトグラフィー質量分析法（以下、LC/MS という。）であれば、ディレイカラム（リテンションギャップ）法等の利用が可能である。

検量線の作成は JIS K 0050「化学分析方法通則」、JIS K 0124「高速液体クロマトグラフィー通則」、JIS K 0136「高速液体クロマトグラフィー質量分析通則」等を参考に、適切に実施する。

検出下限値は、JIS K 0124「高速液体クロマトグラフィー通則」、JIS K 0136「高速液体クロマトグラフィー質量分析通則」等を参考に決定する。

6. データ及び報告書

log P_{OW} 値は、同一条件の試験を 3 回以上実施することで決定する。

6.1. log P_{OW} の計算方法

log P_{OW} の値は以下の式によって求める。ここで、C_O は 1-オクタノール相中の被験物質濃度と C_W は水相中の被験物質濃度とする。

$$\log P_{OW} = \log_{10} (C_O / C_W)$$

log P_{OW} の平均値、標準偏差及び相対標準偏差（変動係数）を求める。

試験開始時に添加した被験物質の量と試験後のそれぞれの相の被験物質の合計量を比較し、物質収支の確認を行う。物質収支は、原則として 70-120%程度を目安とする。

6.2. 試験の有効性

同一条件の低速かくはん法を 3 回以上実施する。得られた値が平均値±0.3 以内であることが望ましい。

6.3. 試験報告書

試験報告書には、次の情報を含める必要がある。

- ・ 被験物質

＜別添＞ 「測定マニュアル：低速かくはん法による界面活性剤の 1-オクタノール/水分配係数」

- ✓ 同定情報（例えば、物質名、CAS 登録番号、構造式等）
- ✓ 物理化学的情報（例えば、CMC、水溶解度、1-オクタノール溶解度等）
- ✓ 純度（不純物の情報を含む）
- ✓ $\log P_{ow}$ 推定値
- ・ 試験条件
 - ✓ 試験実施日
 - ✓ 試験温度
 - ✓ 平衡化容器、スターラーバーの形状・仕様
 - ✓ 被験物質の添加量及び添加相
 - ✓ 試験開始時の水及び 1-オクタノールの量
 - ✓ 試験 pH（試験前後）
 - ✓ 緩衝液の組成、濃度
 - ✓ 試験数
 - ✓ かくはん条件（スターラー回転速度、渦の深さ、かくはん時間）
 - ✓ 静置時間（かくはん停止から試料採取までの時間）
- ・ 試験結果
 - ✓ 分析方法
 - ✓ 検量線、定量下限値
 - ✓ 平衡化時間検討試験結果
 - ✓ 試験液の白濁の有無
 - ✓ $\log P_{ow}$ 平均値、標準偏差及び相対標準偏差
 - ✓ 物質収支の確認結果

7. 参考文献

JIS K 0050 : 2019. 化学分析方法通則.

JIS K 0124 : 2011. 高速液体クロマトグラフィー通則.

JIS K 0136 : 2015. 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則.

JIS Z 7260-107 : 2000. 分配係数（1-オクタノール／水）の測定－フラスコ振とう法－

JIS Z 7260-117 : 2006. 分配係数（1-オクタノール／水）の測定－高速液体クロマトグラフィー－

OECD (1995). Test No. 107: Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 1.

OECD (2022). Test No. 117: Partition Coefficient (n-octanol/water), HPLC Method. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 1.

OECD (2022). Test No. 123: Partition Coefficient (1-Octanol/Water): Slow-Stirring Method. OECD Guideline for the Testing of Chemicals, Section 1.