水中コプロスタノールおよびコレステロールの多重イオン 検出器を備えたガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS-MID) による定量法

立川 涼, 伊藤治郎, 脇本忠明
(愛媛大学農学部環境保全学科)

昭和 51 年 12 月 20 日 受理

Determination Method of Coprostanol and Cholesterol in Water by
Gas Chromatograph-Mass Spectrometer Equipped with Multi-Ion Detector

By Ryo TATSUKAWA, Jiroh ITOH and Tadaaki WAKIMOTO

*Department of Environmental Protection, College of Agriculture, Ehime University,
3-5-7, Tarumi, Matsuyama-shi, Ehime*

Coprostanol (5β -cholestan- 3β -ol) is a characteristic sterol found in the feces of man and higher animals. This compound is available for an indicator of fecal pollution.

Coprostanol and cholesterol in water samples were extracted with *n*-hexane and silylated by N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA). The reaction products were determined by a gas chromatograph-mass spectrometer equipped with multi-ion detector (GC-MS-MID).

In extraction step for polluted waters emulsion was often formed in the lower layer of *n*-hexane. This emulsion resulted in decrease of extraction efficiencies for coprostanol and cholesterol. Washing the hexane layer with 1N potassium hydroxide in 70 per cent ethanol broke this emulsion and recovered these sterols in high efficiencies.

Alkali hydrolysis step was able to omit, when only coprostanol was analysed, because coprostanol was found as free sterol in the aquatic environment.

The determination of these sterols by GC-MS-MID was 5×10^5 times sensitive than that by GC-FID. The detection limits are 1 ng for coprostanol and 3 ng for cholesterol when 1-liter water sample was used.

This method is very sensitive and accurate, and applicable to the determination of trace amounts of coprostanol in the aquatic environment, in particular, sea water for monitoring of fecal pollution.

(Received December 20, 1976)

緒 言

コプロスタノール (5β -cholestan- 3β -ol) は、コレステロールが哺乳動物、特にヒトやブタなどの腸内で細菌によって還元されて生成し、これらの糞便中のみ見出される特異的なステロールである。また、コプロスタノールの前駆体であるコレステロールは糞便中にも見出されるが、主として動物性脂肪に多く含まれており、家庭排水や畜舎排水中に見出すことができる。それゆえ、水中のこれらのステロールを人畜汚染の指標として用い

ることが試みられており、Murtaugh ら⁽¹⁾、Dutka ら⁽²⁾、小椋ら⁽³⁾、金沢⁽⁴⁾、などによって報告されている。

しかし、これらはいずれも水素炎イオン化検出器 (FID) を用いたガスクロマトグラフによる定量法であったので、低濃度の尿尿汚染には対処できなかった。また、松島ら⁽⁵⁾はこれらのステロールを臭素化されたシリル化剤で誘導体化し、エレクトロンキャプチャー検出器 (ECD) を用いたガスクロマトグラフによる定量法をくみだて感度を向上させたが、それでも海洋での尿尿汚染などに応用できるほどの感度は得られなかった。

Fig. 1. Coprostanol (A) and Cholesterol (B).

そこで著者らは、多重イオン検出器 (MID) を備えたガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) を用いたマスフラグメントグラフィーによるこれらのステロールの微量定量法について検討し、感度的にもほぼ満足できる結果を得たので、その概要を報告する。

本法による検出限界は、検水 1 l で、コプロスタノールは 1 ng、コレステロールは 3 ng 程度である。

なお、これらのステロールの構造式を Fig. 1 に示す。

試薬、器具および装置

N,O-bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BS-TFA): Pierce Chemical Company (U. S. A.) 製

Dimethylformamide (DMF): 同上

n-ヘキサン: 試薬 1 級を蒸留して用いる。

エチルアルコール: 同上

n-ヘキサン洗浄水: 蒸留水 4 l に n-ヘキサン 200 ml を加えて振とうした後、下層の水を用いる。

25 ml 容ガラス共栓付試験管: クデルナ・ダニッシュ濃縮器に接続できるもの。

クデルナ・ダニッシュ濃縮器 (KD 濃縮器): 農薬などの分析に常用しているもの。

GC-MS-MID: 島津製作所製、多重イオン検出器 (MID) 付 Shimadzu-LKB 9000 型

分析法の検討

1. 抽出法の検討

検水から n-ヘキサンによってステロールを抽出する際生成したエマルジョンにステロールが吸着し、回収率が低下することがある。これに対し、これまでの定量法では検水に少量の酸と塩を加え、エマルジョンの生成を防ぐ方法で対処してきた。しかし、この方法によってもエマルジョンの生成はさけられず、かなりの量のステロールが吸着される。

そこで著者らは、検水に酸や塩を添加せずに n-ヘキサン抽出を行ない、生成したエマルジョンを 1 N 水酸化

Table I. Extraction Rates from River Water into 100 ml of n-Hexane

Method	Coprostanol		Cholesterol	
	found (μg/l)	recovery (%)	found (μg/l)	recovery (%)
Reflux with 100 ml of 1 N KOH-70% EtOH	14.6	100	24.0	100
Shaking with 100 ml of 1 N KOH-70% EtOH	14.9	102	19.6	82
Shaking with 50 ml of 70% EtOH	15.6	107	20.1	84
Shaking with 50 ml of 70% EtOH	8.8	60	15.3	64
	10.2	70	15.9	65

カリウム 70% エチルアルコール溶液で消去し、遊離したステロールを n-ヘキサン層に抽出することを試み、満足できる結果を得た。

著しく汚染されエマルジョンを多量に生成するような河川水を 500 ml ずつ 3 つにわけ、それぞれ n-ヘキサン 100 ml で抽出し、下層の水をすてた後、次の i) ~ iii) の 3 種の操作を行なった。

i) n-ヘキサン層とエマルジョンを 500 ml 容共栓付三角フラスコに移し、1 N 水酸化カリウム 70% エチルアルコール溶液 100 ml を加え、水浴上で 1 時間還流し、エマルジョンを分解し、遊離したステロールを n-ヘキサンで抽出する。

ii) 1 N 水酸化カリウム 70% エチルアルコール溶液 100 ml を加え、10 分間激しく振とうし、エマルジョンを消去し、遊離したステロールを n-ヘキサンで抽出する。

iii) 70% エチルアルコール 50 ml で n-ヘキサン層を洗い、エマルジョンを消去し、遊離したステロールを n-ヘキサンで抽出する。

これらの処理による抽出効率の比較を Table I に示す。

i) の処理によれば、エマルジョンはほぼ完全に分解される。i) による抽出効率を 100% とすると、70% アルコールで洗っただけでは、両ステロールとも約 65% しか抽出されず、かなりの量のステロールがエマルジョンに吸着されていることが明らかとなった。これに対し、1 N 水酸化カリウム 70% エチルアルコール溶液を加えて振とうしたものでは、コプロスタノールはほぼ 100%、コレステロールは約 80% が抽出された。コレステロールの抽出率がやや悪いが、ほぼ満足できる値が得られた。

1 N 水酸化カリウム 70% エチルアルコール溶液処理によるエマルジョンの消去後、しばらく静置することに

より、直ちに *n*-ヘキサン層を分析に供することができる。

2. シリル化の検討

遊離ステロールのガスクロマトグラフィーを行なうと、ピークがはなはだしくテーリングし、また検出限界も満足できるものではなかった。ステロールの3位の水酸基をトリメチルシリルエーテル化 (シリル化) し、極性を下げ揮発性を高めることを試みた。この結果、ピークが著しくシャープになり、検出感度を約 10 倍向上させることができた。

シリル化剤としては BSTFA を用い、Butts ら⁽⁶⁾が無機化合物のシリル化に用いた方法を追試し、ステロールのシリル化にも十分用いることを確認した。

シリル化操作: 十分乾燥したガラス共栓付試験管に試料溶液をとり、溶媒を留去し完全に乾燥させる。残渣を DMF 200 μ l に溶解し、次に BSTFA 200 μ l を加えてゆるやかに混合する。ガラス栓をしてデシケーター中に1夜 (15~18 時間) 放置し、デシケーターからとり出して、DMF と過剰の BSTFA を窒素気流下で加熱し留去する。残渣を直ちに *n*-ヘキサン 1ml に溶解し、GC-MS 試料とする。

3. 検量線

コプロスタノール、コレステロール各 0.01 mg/l の標準液を調製し、それぞれ 1ml, 2ml, 3ml, 4ml をとり、シリル化後 GC-MS-MID により検量線を作成し、Fig. 2 に示すように、ピーク高との間に満足すべき直線

性があることを確認した。

なお、これらのトリメチルシリル誘導体 (以下、TMS 誘導体と略す) は保存できず、分析時に毎回一定量のステロールをシリル化し、標準液とする。

4. GC-MS-MID 条件

MID の指定フラグメントを決定するため、コプロスタノールおよびコレステロールの TMS 誘導体のマススペクトルを測定した。これらを Fig. 3 に示す。

コプロスタノール TMS 誘導体 (M. W. 460) のベースピークは、*m/e* 370 である。これは、トリメチルシリノールの脱離によるものと考えられる。ついで顕著なのは、*m/e* 355 および *m/e* 215 である。前者は *m/e* 370 のフラグメントからのメチル基1個の脱離に、

Fig. 2. Calibration Curve of Silylated Coprostanol and Cholesterol.

○—○ coprostanol, x---x cholesterol.

Fig. 3. Mass Spectra of Silylated Coprostanol and Cholesterol.

後者は側鎖と D 環の炭素 3 個の脱離によるものと考えられる。

コレステロール TMS 誘導体 (M. W. 458) のベースピークは m/e 329 であり, これとイオン強度のほぼ等しいピークが m/e 129 にある。これらは両者とも, トリメチルシタノールの A 環の炭素 3 個をともなった脱離に由来し, m/e 329 はそのステロイド骨格側, m/e 129 はシタノール側であると考えられる。これらについて顕著なのは, トリメチルシタノールの脱離による m/e 368 のピークである。

以上の結果から, イオン強度が強く, しかも MID によって同時分析が可能な質量数範囲にあるものとして, それぞれベースピークである m/e 370 と m/e 329 を指定フラグメントとした。

また, イオン化エネルギーについて, 20 eV と 25 eV の場合について比較検討したところ, 20 eV でイオン化させた方がフラグメンテーションが少なく, 従ってベースピークのイオン強度が強くなり, かつベースラインが低くなることが確認された。従って, イオン化エネルギーは 20 eV に設定した。

その他, GC-MS-MID 条件を Table II に示す。

この条件下で, 保持時間はコプロスタノールは 2.8 分, コレステロールは 3.6 分。また検出限界はコプロスタノールは 10 pg, コレステロールは 30 pg であった。

この条件下でのマスフラグメントグラムを Fig. 4 に示す。

ただし, コプロスタノールは m/e 329 に, コレステ

ロールは m/e 370 にそれぞれ微少なフラグメントを持つため, 試料中のコプロスタノールとコレステロールの存在量が著しく異なるときは, これらの微少なフラグメントによるフラグメントグラム上のピークが, 定量に際して妨害となることがある。このような妨害を取り除くことは, 両者の保持時間差をより広げるように条件を設定することによって可能である。著者らは, ガスクロマトグラフのカラム恒温槽温度を 225°C に下げ, この条件を実現させている。この条件下で, 保持時間は, コプロスタノールは 4.8 分, コレステロールは 6.5 分である。

定 量 法

以上の検討をもとに, 以下のような定量法をくみたてた。

1. 操 作

1) 抽出: 検水 1 l を分液漏斗にとり, n -ヘキサン 100 ml を加えて 10 分間激しく振とうする。しばらく静置後, 下層の水をすて, エマルジョンの生成がみられたときは, 1 N 水酸化カリウム 70% エチルアルコール溶液 100 ml を加え, さらに 10 分間激しく振とうし, エマルジョンを消去する。

2) エステルの加水分解: n -ヘキサン層を 25 ml 容ガラス栓付試験管を受器とした KD 濃縮器にうつし, 数 ml に濃縮する。以後の加水分解, 転溶, シリル化等の操作は, すべて KD 濃縮器からとりはずしたこの試験管内で行なう。濃縮液は窒素気流下で加熱しながら, n -ヘキサンを留去する。

ついで, 1 N 水酸化カリウム 70% エチルアルコール溶液 1 ml を加え, ガラス栓をして 70°C のオイルバス中で 3 時間加水分解を行なう。

分解後, n -ヘキサン洗浄水 10 ml, 濃塩酸数滴, n -ヘキサン 10 ml を加え, ガラス栓をして 2 分間激しく振と

Fig. 4. Typical Mass Fragmentgram of Silylated Coprostanol and Cholesterol.

(A) coprostanol, (B) cholesterol, GC-MS-MID condition, see Table II.

Table II. GC-MS-MID Condition

GC condition	
Column: 2% OV-225 on Chromosorb-W	
AW HMDS [(80~100) mesh]	
I. D. 3 mm×1 m glass column	
Temperature, column :	240°C
injection :	300°C
separator :	280°C
Carrier gas : He 30 ml/min	
MS-MID condition	
Accelerating voltage : 3.5 kV	
Trap current :	60 μ A
Ionization energy : 20 eV	
Ion source temp. : 310°C	
Selected fragment,	
coprostanol :	m/e 370
cholesterol :	m/e 329

Table III. Recovery Test for Coprostanol and Cholesterol Added to Water

	Coprostanol			Cholesterol		
	added (μg)	found (μg)	recovery (%)	added (μg)	found (μg)	recovery (%)
1	1.00	1.00	100	1.00	0.96	96
2	1.00	1.05	105	1.00	0.94	94
3	1.00	1.08	108	1.00	0.99	99
Ave.	1.00	1.04	104	1.00	0.96	96

うする。しばらく静置後、下層の水を先の細い駒込ビレットを用いて、できるだけ除去する。

3) シリル化: *n*-ヘキサン層を窒素気流下で加熱して *n*-ヘキサンを留去し、完全に乾燥させる。残渣を DMF 200 μl に溶解し、さらに BSTFA 200 μl を加えて、ガラス栓をしてデシケーター中に 1 夜放置する。

4) GC-MS-MID による定量: 1 夜放置後、窒素気流下で加熱して DMF と過剰の BSTFA を留去し、残渣を直ちに *n*-ヘキサン 1 ml に溶解する。

GC-MS-MID を Table II の条件に設定し、この *n*-ヘキサン溶液を注入して定量する。定量は同時に調製した標準液を用い、絶対検量線法で行なう。

2. 回収率

本法による *n*-ヘキサン洗浄水からの添加回収試験の結果を Table III に示す。*n*-ヘキサン洗浄水は 1 l、試料添加量は、コプロスタノール、コレステロールそれぞれ 1 μg である。

コプロスタノール、コレステロールとも高い回収率を示し、十分満足できる結果であった。

結果および考察

抽出法について、Murtaugh ら⁽¹⁾の方法を追試したところ、検水の状態によってはエマルジョンが生成し、これにステロールが吸着することによる回収率の低下がみられた。そこで、生成したエマルジョンをアルカリアルコール溶液によって消去することを試み、著しく大量のエマルジョンを生成するような検水からも高効率でステロールを抽出することを可能にした。また、この操作は、*n*-ヘキサン層のクリーンアップにもなっている。

また、BSTFA によるシリル化は、操作が簡便で、室温で反応が進行するため分解生成物などがみられないという利点がある。その反面、反応時間が長いという欠点があるが、これは分析操作の時間配分を考えることにより容易に克服できる。

Table IV. Free and Combined Sterols in River Water Samples

	Coprostanol			Cholesterol		
	total (A) ($\mu\text{g/l}$)	free (B) ($\mu\text{g/l}$)	B/A (%)	total (A) ($\mu\text{g/l}$)	free (B) ($\mu\text{g/l}$)	B/A (%)
1	0.029	0.029	100	3.0	1.9	63
2	0.59	0.60	102	3.5	2.6	74
3	4.9	4.6	94	10.0	7.8	78
Ave.			98			72

シリル化を行なうことにより、立体障害の大きなトリメチルシラノールあるいはこれを含む部分の脱離が優先し、ベースピークのイオン強度が増大するため、揮発性が高まったこととあいまって、同一条件で遊離ステロールを分析したときに比べ、約 10 倍の感度の向上がみられた。

コレステロールの感度がコプロスタノールに比べて悪いのは、Fig. 4 に示したように、ベースピーク (*m/e* 329) とほぼ強度の等しい *m/e* 129 のピークが存在するためであろう。

Dutka ら⁽²⁾は、水環境中でこれらのステロールのうちエステルとして存在するのは 8~15% 程度であり、遊離ステロールだけでも十分尿汚染指標として用い得るとして、加水分解操作を省略したことを報告している。著者が道後平野の河川水について、遊離ステロールの存在率を検討したところ、Table IV に示す結果を得た。コレステロールは 30% 程度がエステルとして存在しているのに対し、コプロスタノールはほぼ 100% が遊離状態で存在していた。従って、コレステロールをも同時定量するには、加水分解操作は必要であるが、コプロスタノールのみを定量する際には、この操作を省略できる。この操作を省略すれば、1 行程あたり約 3 時間の短縮となる。

環境試料中には、さまざまな物質が含まれており、分析の最終段階にまでこれらが混入すると、クロマトグラム上に妨害ピークとしてあらわれることがあり、また、目的物質の同定もピークの保持時間によるだけでは危険性がある。本法では GC-MS-MID の使用により、保持時間だけではなく、目的物質に特有の *m/e* をも情報として得られるので、同定の確実さが高まり、またフラグメントグラム上に妨害ピークがあらわれることがほとんどない。

また、GC-MS-MID の使用により、コプロスタノールおよびコレステロールのきわめて高感度の検出が可能と

なり, GC-ECD⁽⁶⁾ の約 500 倍, GC-FID⁽¹⁻⁴⁾ の 5×10^5 倍前後に感度が向上した。これによって, 本法は海洋などの低濃度の尿尿汚染から, 都市河川などの著しい尿尿汚染まで, 広範囲にわたっての尿尿汚染のモニタリングに使用が可能である。

ただし, 本法はきわめて高感度なため, 分析操作過程での 2 次汚染が深刻な問題となる。コレステロールは高等動物にとって最も一般的なステロールであり, 分析者自身が汚染源となり得るため, 微量のステロールの分析には, 入念なブランクチェックを行ない, ガラス器具の試料溶液が接触する可能性のある部位, あるいはその周辺部 (たとえば, 分液漏斗のコック部分, 25ml 容試験管のスリ外縁部など) には直接素手で触れないようにするなど, 2 次汚染を防止するために厳重な注意を払う必要がある。

要 約

コプロスタノールは, 高等動物の糞便中のみ見出される特異的なステロールであり, 尿尿汚染指標として用いることができる。このコプロスタノールとコレステロールを広範な水環境における尿尿汚染指標として用いるために, GC-MS-MID による微量定量法を検討した。

検水中のステロールは *n*-ヘキサンにより抽出し, 必要に応じ, エマルジョン消去処理, アルカリ加水分解を行ない, シリル化後, GC-MS-MID により定量する。

n-ヘキサンによって検水からステロールを抽出する際, しばしばエマルジョンの生成がみられ, これにステロールが吸着し, 回収率が低下する。本法では 1N 水酸化カリウム 70% エチルアルコール溶液でエマルジョンを消去し, エマルジョンに吸着されたステロールを高効

率で回収することを可能にした。

水環境中では, コプロスタノールはほぼ 100% が遊離状態で存在していることが確認できたので, コプロスタノールのみを定量する際には, 加水分解を省略できる。ただし, コレステロールは 30% 程度がエステルとして存在しているため, 加水分解は必要である。

抽出したステロールは BSTFA によるシリル化を行ない, 遊離ステロールよりも約 10 倍感度を向上させることができた。BSTFA によるシリル化は簡便で, 分解生成物などがみられない。

GC-MS-MID によって, 感度を従来の GC-FID による定量法の 5×10^5 倍前後に向上させることができた。検出限界は検水 1l で, コプロスタノールは 1 ng, コレステロールは 3 ng 程度である。本法によれば, これまで困難であった沿岸海域での尿尿汚染のモニタリングも容易に行なえる。

また, GC-MS-MID の使用は, 試料中の共存物質の妨害を防ぎ, ピークの同定をより確実なものとする。

- (1) J. J. Murtaugh and R. L. Bunch: *J. Water Pollution Control Federation*, **39**, 404 (1967).
- (2) B. J. Dutka, A. S. Y. Chau and J. Coburn: *Water Research*, **8**, 1047 (1974).
- (3) 小椋和子, 半谷高久: 用水と廃水, **12**, 84 (1970).
- (4) 金沢昭夫: 文部省特定研究「人間の生存にかかわる自然環境に関する基礎的研究」, 水圏部門, 有明海班研究成果概要報告集, p. 121 (1974).
- (5) 松島 肇, 脇本忠明, 立川 涼: 分析化学, **24**, 342 (1975).
- (6) W. C. Butts and W. T. Rainey Jr.: *Anal. Chem.*, **43**, 538 (1971).