

糞便汚染指標としてのコプロスタノールに関する研究

その1. コプロスタノールの水溶解度

高橋 基之

要 旨

糞便性ステロールとして環境中に存在するコプロスタノールの水溶解度を、フラスコ法を応用して求めた。さらに、溶液のイオン強度、溶解性フミン酸濃度、pHに対する依存度から、河川水中への溶解量を推定した。

コプロスタノールの溶解度は、蒸留水中において $12\mu\text{g}/\text{l}$ であった。イオン強度の強い溶液として、pH7の水道水では、溶解度は $5\mu\text{g}/\text{l}$ に減少したが、この水に溶解性フミン酸が $0.2\text{mgC}/\text{l}$ 溶存すると、 $15\mu\text{g}/\text{l}$ に増加した。また、フミン酸溶液がアルカリ性側では溶解度は変化しないのに対し、pH4の酸性側ではさらに増加して $68\mu\text{g}/\text{l}$ になった。

これより、平均的な河川水に溶解可能なコプロスタノール量は、約 $15\mu\text{g}/\text{l}$ と推定できた。

1 はじめに

コプロスタノール ($5\beta\text{-Cholestan-3}\beta\text{-ol}$) は、人畜の糞便が唯一の発生源であることから、糞便汚染の指標物質として利用される飽和ステロールである。その生成には哺乳動物の腸内細菌が関与し、コレステロール ($\text{Cholest-5-en-3}\beta\text{-ol}$) の二重結合への水素付加反応により生成されることが知られている¹⁾ (図1)。

環境中のコプロスタノールの性質として、下水や湖

沼水の好氣的条件では比較的容易に生分解を受け、一週間程度ではば分解すること、また、水試料を遠心分離やろ過することで分離できることから、コプロスタノールは水中の粒子部に多く存在することが知られている²⁾。しかし、凝集や沈殿などの処理が適切に行われている排水や清澄な水域では、水に溶解しているコプロスタノールから糞便汚染を評価する必要がある。そこで、これまで報告のないコプロスタノールの水溶解度を求め、一般的な河川水へ溶解可能な量を推定した。

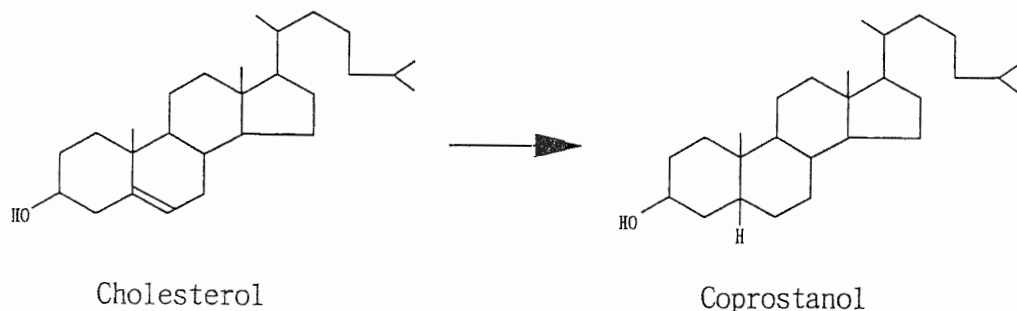


図1 コプロスタノールの生成

2 試薬、器具および装置

コプロスタノール、コレステロール、内部標準用の5 α -コレスタン、GLサイエンス社から入手したものをn-ヘキサンで溶解して標準試薬とした。フミン酸ナトリウム塩はAldrich社製、n-ヘキサン、エチルアルコール、無水硫酸ナトリウムは残留農薬試験用、他の試薬は試薬特級を使用した。

濃縮装置はロータリーエバポレーターを使用した。四重極型GC/MSはHP-5971で測定した。

3 方法

3・1 ステロール類の分析

分析操作はMurtaughら³⁾、Dutkaら⁴⁾、およびMatusikら⁵⁾の方法を参考にして行った。その操作フローを図2に示す。測定は、高感度で選択性に優れたGC/MSで行い、以下の条件で分析した。なお、この際の定量下限は0.1 $\mu\text{g}/\text{l}$ であった。

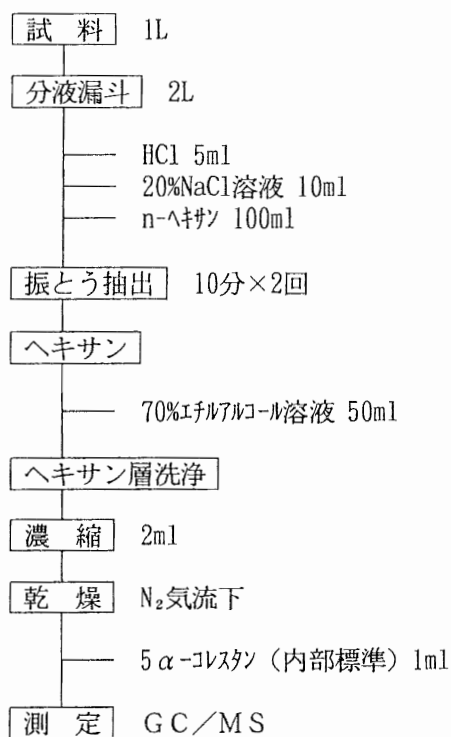


図2 ステロール類分析の操作フローシート

分析カラム：HP-1 (12m×0.2mm 膜厚 0.33 μm)

昇温条件：100 $^{\circ}\text{C}$ (2 min.)-10 $^{\circ}\text{C}/\text{min.}$ -300 $^{\circ}\text{C}$ (5 min.)

注入口温度：260 $^{\circ}\text{C}$

試料注入量：1 μl (スプリットレスモード)

キャリアーガス：He, 1 ml/min.

SIM測定条件

	保持時間 (min.)	モニターイオン(M/Z)	
		Target	Qualifier
Coprostanol	20.17	215	233
Cholesterol	20.40	275	301

3・2 水溶解度測定

コプロスタノールおよびコレステロールの水溶解度は非常に小さく、ろ紙等への吸着も予想されるため、フラスコ法を応用して行った。

1 L試料瓶を蒸留水で洗浄乾燥し、さらにヘキサン洗浄後乾燥したものをフラスコの代替として使用した。まず試料瓶の内側壁に、ヘキサンで溶解した標準試薬 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 2 mlを均一に塗り覆う。N₂気流で溶媒を完全に揮発させた後、試料水を静かに加え、20 $^{\circ}\text{C}$ で48時間マグネチックスターラーをゆっくり攪拌し、平衡に達したステロール類の濃度を測定した。

溶解度は以下の試料水について求めた。

1) 水道水および蒸留水

水道水は残留塩素と粒子状物質を除去するため、活性炭、さらに0.45 μm メンブレンフィルターでろ過したものを。

2) フミン酸含有水道水

フミン酸ナトリウム塩粉末を蒸留水に溶解し、0.45 μm メンブレンフィルターでろ過、希釈してTOC濃度40mgC/lとした原水を、1)の水道水に加え、TOC濃度0.2, 1, 5 mgC/lに調製したものを。

3) pH 4, 7, 10フミン酸含有水道水

0.2mgC/lフミン酸含有水道水を塩酸 (1+100)、および水酸化ナトリウム溶液 (0.2%) でpH調整したものを。

4 結果及び考察

化学物質の水への溶解度は、河川水など環境水中での当該物質の運命予測や挙動を解析する上で非常に重要な要素となる。これまでステロール類の溶解度は、コレステロールやコプロスタノールについて若干の報告^{1,6)}はあるが、コプロスタノールについてはされていない。これは、コプロスタノールがその分子構造から溶解度が小さく、ろ過などの際に吸着をしてしまうため、測定が困難であったことによると考えられる。そこで、従来のフラスコ法を応用し、ろ過を省いた方法でコプロスタノールの水溶解度を求めた。

蒸留水中における溶解度は、コプロスタノールが $12\mu\text{g}/\ell$ 、コレステロールは先の文献値 (19ppb) と比べ少し小さく $11\mu\text{g}/\ell$ であった。また両物質の溶解度は、ほぼ同じ値を示した。

河川水には、自然負荷や各種排水によりさまざまなイオン類が含まれる。そこで、イオン強度が蒸留水よりも強く河川水に比較的近い水道水について溶解度を

求めた。pH 7 に調整した水道水中では、コプロスタノールとコレステロールの溶解度はともに約 $5\mu\text{g}/\ell$ と、蒸留水の半分以下に減少した。コプロスタノールのように、分子構造の中に親水基をあまり持たず、疎水的な性質の物質は、溶解度が非常に小さく、河川水など多くのイオンを含む水では溶解度がより小さくなると言える。

実際の河川水中における溶解度を評価するには、溶存している有機物質や懸濁粒子状物質との相互作用を考慮する必要がある。特に、一般的な河川水中において、溶存有機物質の半分以上を占めるフミン類は、コプロスタノールのように溶解度の小さな物質と粒子状物質間の平衡相互作用に関与する重要な物質である。そこで、モデル河川水として溶解性フミン酸を含む水道水中の溶解度を求めることとした。図3に各フミン酸濃度におけるコプロスタノール溶解度を示す。フミン酸が $0.2\text{mgC}/\ell$ 溶存しているだけで、約3倍の $15\mu\text{g}/\ell$ に溶解度は増加した。これは、水溶液に溶存しているフミン酸分子の疎水基とコプロスタノール分子

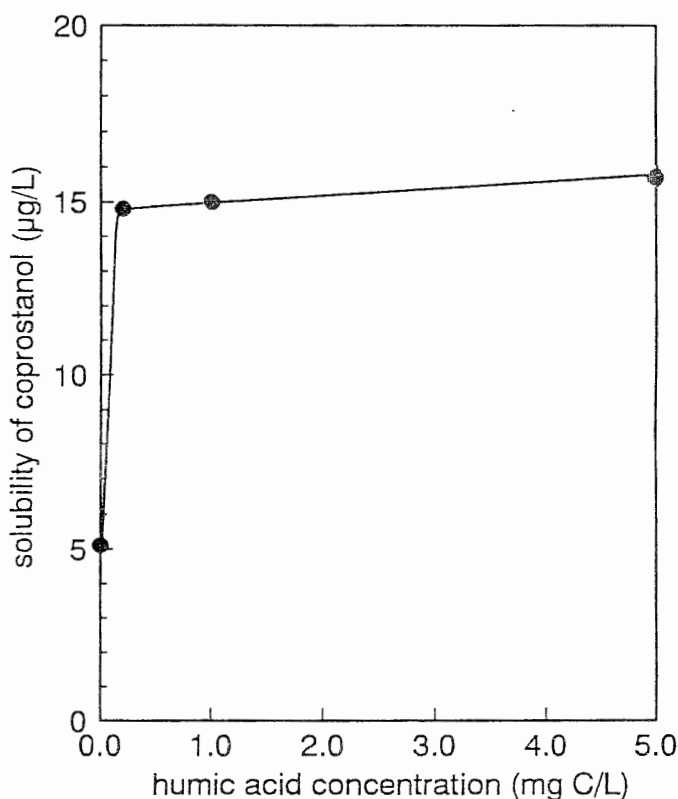


図3 各フミン酸濃度溶液におけるコプロスタノール溶解度

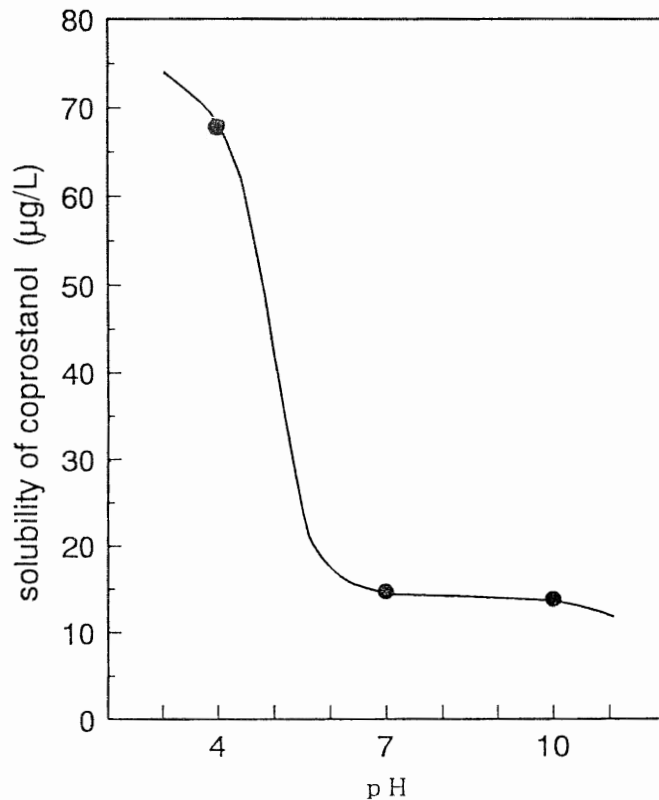


図4 コプロスタノール溶解度のpHによる変化
(0.2mgC/l フミン酸溶液)

の吸着によるためと考えられる。またフミン酸濃度がこれ以上増加しても、溶解度は大きく変化しなかった。この理由として、フミン酸濃度の増加に伴い会合が生じるため、実質的にコプロスタノールとの吸着に係わる疎水基数の変化が小さかったと予想できる。

pHによる溶解度の変化を図4に示す。この場合も河川水と近似する目的で、フミン酸を0.2mg/l含む水道水において試験した。その結果、pH 7および10で溶解度はそれぞれ15、14µg/lとほとんど変化しなかったが、pH 4の酸性側になると68µg/lと大きく増加した。フミン酸はpHが低くなると負の帯電が小さくなり、結果として親水の性質が減少する。このため、疎水の性質の強い溶質であるコプロスタノールのフミン酸への吸着量が増加したためと考えられる。

5 まとめ

河川水におけるコプロスタノールの溶解度は、水

のイオン強度、溶解性フミン類の存在、pHに依存することがわかった。実際の河川水は、導伝率などから判断すると、水道水と同程度のイオン強度を持っている。また溶解性有機炭素量(DOC)から見て、自然由来の溶解性フミン類を1mgC/l前後含むと考えられ、pHはほぼ中性から弱アルカリ性である。これらの点を考慮すると、河川水には15µg/l程度のコプロスタノールが溶解すると推定できる。よって、排泄された糞便そのものでなくとも、それに汚染された水は溶解しているコプロスタノールから判断可能となる。

コプロスタノールのように溶解度の非常に小さな化学物質は、ただ単に純水における溶解度の値から環境中の挙動を判断することは危険である。特に、河川水中に普遍的に存在するフミン類は、農薬などの化学物質の環境中への流出を考える上で非常に重要な物質といえる。今後は共存する土壌、粘土、砂などのコロイド粒子との相互作用を含め、その特性を十分に把握する必要がある。

文 献

- 1) R. W. Walker et al. : Coprostanol as an indicator of fecal pollution, CRC Critical Review in Env. Cont., Apr., 91-112, 1982
- 2) K. D. Switzer-Howse and B. J. Dutka : Fecal sterol studies ; samples processing and microbial degradation, National Water Research Institute, Burlington, Ont., Scientific Series No. 89, 1978
- 3) J. J. Murtaugh and R. L. Bunch : Sterols as a measure of fecal pollution, J. Water Pollut. Cont. Fed., 39, 404-409, 1967
- 4) B. J. Dutka et al. : Relationship between bacterial indicators of water pollution and fecal sterols, Water Res., 8, 1047-1055, 1974
- 5) J. E. Matusik et al. : Gas chromatographic /mass spectrometric Confirmation of Identity of Coprostanol in *Mercenaria mercenaria* (bivalvia) taken from Sewage-polluted water, J. Assoc. Off. Anal. Chem., 71, 994-999, 1989
- 6) H. Y. Saad and W. I. Higuchi : Water solubility of cholesterol, J. Pharm. sci., 54, 1205-1206, 1965