

同位体希釈-LC/MS/MS 法による水中の

抗インフルエンザウイルス薬および数種の PPCPs の分析法検討

木口倫¹, 渡邊拓馬¹, 今野祿朗², 松渕亜希子², 小林貴司²

¹ 秋田県立大学生物資源科学部生物環境科学科

² 秋田県健康環境センター

生活排水を通じて水環境中に流入する医薬品類やパーソナルケア製品類に由来する生活関連化学物質 (PPCPs) の実態と挙動を効率よく明らかにするため, 抗インフルエンザウイルス薬 (タミフルとその代謝物およびリレンザ) と数種の PPCPs (カフェイン, カルバマゼピン, トリクロサン, トリクロカルバン) の同位体希釈-LC/MS/MS 法による分析法の基礎検討を行った. 本研究では, (1) LC/MS/MS 法での分析精度, (2) 固相抽出法での溶出条件 (溶媒の種類) および (3) 添加回収試験について検討し, リレンザを除く 6 種の PPCPs の分析に適した条件を見出した. また, 実試料水中のマトリックス効果の影響を低減するには, 同位体希釈法の適用が有効であった.

キーワード: タミフル, PPCPs, LC/MS/MS, マトリックス効果, 同位体希釈法

水環境中に流入する医薬品類やパーソナルケア製品類に由来する生活関連化学物質 (PPCPs: Pharmaceuticals and Personal Care Products) は, 水環境を汚染する新たな化学物質として国際的に関心が高まっている (USEPA). これらは ppb 以下と微量でもヒトや生態系への悪影響や薬剤耐性菌の出現等が懸念されており, 水環境中における PPCPs の実態と挙動の把握が不可欠であると考えられる.

国内ではこれまで主要都市域の河川 (Nakada *et al.*, 2008) や首都圏の都市小河川 (小森ら, 2009) における PPCPs の研究が行われてきた. 我々は誘導体化-GC/MS 法によるカフェイン (CAF), カルバマゼピン (CBZ) およびトリクロサン (TCS) の 3 種の PPCPs の同時分析法を開発し, 秋田県内の都市部および農村部の小河川や流域規模の大きい主要河川におけるこれらの PPCPs の濃度レベルと季節変化の特徴を明らかにしてきた (例えば, 木口, 2013).

一方, 近年, 国内の主要河川水中から抗インフル

エンザウイルス薬 (タミフル) の検出が報告されており (Ghosh *et al.*, 2010), 鳥インフルエンザウイルスの宿主の水鳥が河川水中でこれらに曝露された場合, タミフル耐性インフルエンザウイルスの発生が懸念されている (上村ら, 2010). このため, 既存の PPCPs だけでなく, 抗インフルエンザウイルス薬を含む河川水中での PPCPs の実態と挙動を把握することが重要である. しかしながら, これまで数種の抗インフルエンザウイルス薬のみを対象とした分析法開発は報告されているものの (Ghosh *et al.*, 2010, Prasse *et al.*, 2010), これらとその他の PPCPs を効率よく評価できる分析法開発は遅れている.

本研究では, 抗インフルエンザウイルス薬のタミフル (OP) とその代謝物 (OC) およびリレンザ (Za) と我々の先行研究 (木口, 2013) で対象とした 3 種の PPCPs にトリクロカルバン (TCC) を加えた 7 種の PPCPs を対象に, 同位体希釈-LC/MS/MS 法による分析法の基礎検討を行った. ここではその検討結

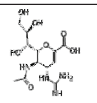






果を報告する.

材料と方法

検討対象化合物と試薬

表 1 に検討対象化合物とその主な物性を示す. これらの標準溶液は, 標準試薬または標準原液 (和光純薬製, Toronto Research Chemicals 製, Sigma-Aldrich 製) を溶媒で適宜希釈して用いた. Za を除くクリーンアップ内標準は, OP-*d*₃, OC-*d*₃ (Toronto Research Chemicals 製), ¹³C₃-CAF, ¹³C₁₂-TCS, ¹³C₁₂-TCC (Cambridge Isotope Laboratories 製), CBZ-*d*₁₀ (C/D/N ISOTOPES 製) をそれぞれ溶媒で適宜希釈して用いた. 7 種の PPCPs と Za を除く 6 種の安定同位体標識化合物の混合標準液は, 標準溶液を段階的に溶媒で適宜希釈後, 既定濃度に調製したものをを用いた. LC/MS/MS 注入用内標準は, アセフェート (ACP) -*d*₆ と 4-クロロフェノキシ酸 (CPA) -*d*₆ (和光純薬製) を用いた. 検討溶媒は, 残留農薬・PCB 分析用 (5000 倍濃縮品, 和光純薬製) を用いた. 超純水はアリウム UV611 で製造したものをを用いた.

表 1 検討対象化合物と物性

Compound	CAS RN.	Chemical structure	Water solubility (mg/L) ¹⁾	LogKow ^{1,2)}	pKa ^{1,2)}
Zanamivir (Za)	139110-80-8		18,000	-4.66	-
Oseltamivir (OP)	204255-11-8		1,600	0.95	7.7
Oseltamivir carboxylate (OC)	187227-45-8		-	-2.1	3.6
Caffeine (CAF)	58-08-2		21600	-0.07	10.4
Carbamazepine (CBZ)	298-46-4		18	13.9	2.45
Triclosan (TCS)	3380-34-5		10	4.76	7.9
Triclocarban (TCC)	101-20-2		0.00237	4.90	-

1) PubChem: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>, 2) 文献 Prasse *et al.*, 2010.

LC/MS/MS 測定条件

測定には LC/MS/MS システム (API4000, AB SCIEX 製) を用いた. 使用カラムは Atlantis T3 (Waters 製), 移動相は A 液: 0.01%ギ酸+0.5 mM 酢酸アンモニウム溶液と B 液: 0.01%ギ酸+0.5 mM 酢酸アンモニウム含有メタノールのグラジエントとした. カラム流量は 200 μL/min, カラム温度は 40°C, 注入量は 10 μL とした. Za, OP, OC, CAF および CBZ は ESI ポジティブ法 (ESI+), TCS および TCC は ESI ネガティブ法 (ESI-) を用いた. MS/MS 測定イオンは, 標準溶液を用いて FIA およびインフュージョン法により検討した条件を用いた (表 2).

LC/MS/MS 測定精度の検討

7 種の PPCPs と Za を除く 6 種の安定同位体標識化合物の混合標準液を用いて, 装置検出下限 (IDL), 直線範囲, RF 値および繰返し測定 of the 再現性を検討した (*n*=5).

固相抽出法での溶出溶媒の検討

固相抽出法での溶出溶媒は, アセトン (Ac), 酢酸エチル (EA), メタノール (Me) とこれらの混合溶媒 (各 1/1, 1/4, 4/1, v/v) とした. 固相カートリッジは HLB 6 cc Vac Cartridge (Waters 製, 200mg) を用いた. pH 3.5 に調製した超純水 10 mL に混合標準液を規定濃度添加した試料を固相カートリッジに減圧通水後, 脱水, 溶出させた. 溶出液を濃縮・乾固し, メタノールに再溶解させた試料液と超純水とを等量混合後, 注入用内標準を添加し, 測定試料とした (*n*=1). 溶出率は, 溶出溶媒に混合標準液を規定量添加後, 検討試料と同じ手順で調製した基準試料を用い, 注入用内標準に対するそれぞれの PPCPs の面積比を元に算出した.

添加回収試験

予め pH3.0 に調製した超純水および河川水試料 (200mL) に, PPCPs の試料水中濃度がそれぞれ 12.5, 62.5, 200 ng/L となるように混合標準液を添加した試料 (以下, 低, 中, 高濃度試料) を用いて回収試験を行った (*n*=3). 前処理および回収率の算出は溶出溶媒検討と同じ手順で行った.

結果・考察

LC/MS/MS 測定精度の検討結果

IDL は 0.004~0.58 µg/L, 直線範囲は 10²~10³であった。RF 値 (平均) は 0.025~1.06 の範囲で, そのバラツキ (RSD: 相対標準偏差) は 4.6~12% で良好な結果であった (表 2)。

表 2 MS/MS 測定イオンと測定精度の検討結果 (n=5)

Compound	m/z		IDL (µg/L)	Range (µg/L)	RF (-)	RSD (%)
	Q1	Q3				
ESI+						
Za	333.0	→ 59.9	0.03	1.0 - 200	0.025	12
OP	313.1	→ 166.0	0.004	1.0 - 200	1.06	8.5
OP-d ₃	316.1	→ 211.0	-	-	-	-
OC	285.1	→ 197.2	0.03	1.0 - 500	0.672	8.5
OC-d ₃	288.1	→ 200.0	-	-	-	-
CAF	195.0	→ 137.9	0.58	5.0 - 200	0.756	4.6
CAF- ¹³ C ₃	198.0	→ 139.9	-	-	-	-
CBZ	236.9	→ 193.0	0.005	0.1 - 100	0.150	7.9
CBZ-d ₁₀	247.0	→ 204.0	-	-	-	-
ACP-d ₆	189.9	→ 148.8	-	-	-	-
ESI-						
TCS	286.8	→ 35.0	0.06	1.0 - 200	0.695	11
TCS- ¹³ C ₆	299.0	→ 35.1	-	-	-	-
TCC	312.9	→ 159.8	0.03	0.5 - 500	0.731	6.8
TCC- ¹³ C ₆	318.8	→ 159.7	-	-	-	-
4-CPA-d ₆	190.8	→ 130.8	-	-	-	-

IDL: Instrumental detection limit, RF: Response factor, RSD: Relative standard deviation (%)

固相抽出法での溶出溶媒の検討結果

検討溶媒のうち, 単一溶媒の Me と混合溶媒の Me/EA=1/4 の溶出率は, Za を除いて 100±30% 以内と良好な結果であった。Za の溶出率は, 検討溶媒の全てで 10%未満であった。このため, 以後の検討では Za を検討対象から除外した。

次に, 溶出率の結果が良好な Me と Me/EA=1/4 について再現性の確認を行った (n=3)。その結果, Me/EA=1/4 での溶出率は 71~116%, RSD は 0.4~14% と満足できる結果であった (図 1)。これらの結果から, 以後の検討では Me/EA=1/4 を溶出溶媒として用いた。

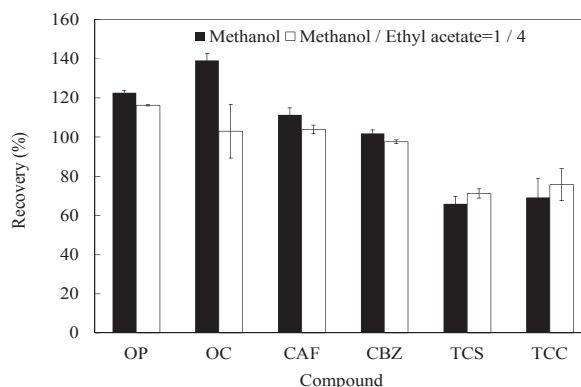


図 1 溶出率の再現性の結果 (n=3)

添加回収試験の検討結果

表 3 に添加回収試験の結果を示す。超純水試料の場合, 低・中濃度試料では CAF を除いて回収率は 67~114%, RSD は 0.7~17% であった。OP と OC でややバラツキが大きいものの, 満足できる結果であった。CAF の回収率は低・中濃度試料では 141~154% と高く, ブランクの影響が示唆された。高濃度試料では, 回収率は 69~99%, RSD は TCS と TCC が 17~19% とややバラツキが大きいものの, その他は 10%以下であった。

河川水試料の場合, 低・中濃度試料では OP, OC および CAF を除いて回収率は 87~125%, RSD は 2.4~15% で満足できる結果であった。高濃度試料では OP を除いて 88~127%, RSD は 2.6~15% で満足できる結果であった。低・中濃度試料の CAF では, 超純水試料と同じくブランクの影響を受けていた。一方, OP および OC はマトリックスの影響が示唆された (Prasse et al., 2010)。このため, それぞれの

表 3 添加回収試験結果 (単位%, n=3)

Compound	Ultra-purified water						River water					
	Low		Middle		High		Low		Middle		High	
	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD
OP	67	1.3	103	15	69	4.1	136	11	183	11	162	6.1
OC	109	3.0	114	17	88	2.4	150	8.5	138	7.8	127	7.2
CAF	154	16	141	12	79	3.4	251	7.8	162	17	116	2.6
CBZ	93	2.8	96	8.1	77	2.0	87	7.1	87	5.0	88	6.6
TCS	85	4.6	105	13	99	17	112	3.0	124	15	111	10
TCC	78	0.7	104	13	97	19	99	2.4	125	9.0	120	15

LOW: 低濃度試料, Middle: 中濃度試料, High: 高濃度試料, RSD: 相対標準偏差

PPCPs と対応する安定同位体標識化合物の面積比を基準にした回収率を検討した。その結果、検討した全ての試料で OP および OC の回収率は 100±10%、RSD は 5%未満と良好な結果であった(表 4)。なお、CAF を除いて、その他の PPCPs も同様な結果であった。このことから、実試料中でのマトリックスの影響を低減するには、安定同位体標識化合物による補正が有効である (Prasse *et al.*, 2010) と考えられる。

表 4 安定同位体標識化合物を用いた添加回収試験結果 (単位%, n=3)

Compound	Ultra-purified water						River water					
	Low		Middle		High		Low		Middle		High	
	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD	Average	RSD
OP	97	2.9	104	2.1	89	1.4	93	2.5	100	3.0	97	4.8
OC	95	2.0	98	0.7	94	2.6	96	2.6	97	0.4	97	3.6
CAF	155	11	136	7.7	100	4.6	238	13	154	8.6	120	8.5
CBZ	103	2.1	106	2.0	93	3.4	99	3.0	105	1.2	104	4.5
TCS	103	6.7	104	5.0	100	1.4	106	2.6	103	7.2	102	1.8
TCC	98	4.0	102	3.0	94	6.2	99	4.0	103	2.0	98	8.5

LOW: 低濃度試料, Middle: 中濃度試料, High: 高濃度試料, RSD: 相対標準偏差

謝辞

本研究は、秋田県立大学平成 26 年度 産学連携・共同研究推進事業の支援を受けて行った。ここに記して謝意を表します。

文献

- C. Prasse, M. P. Schlusener, R. Schulz, T. A. Ternes (2010). Antiviral drugs in wastewater and surface waters: a new pharmaceutical class of environmental relevance?. *Environ. Sci. Technol.*, 44, 1728–1735.
- G. C. Ghosh, N. Nakada, N. Yamashita, and H. Tanaka (2010). Oseltamivir Carboxylate, the Active Metabolite of Oseltamivir Phosphate (Tamiflu), Detected in Sewage Discharge and River Water in Japan. *Environmental Health Perspectives*, 118,

103–107.

- N. Nakada, K. Kiri, H. Shinohara, A. Harada, K. Kuroda, S. Takizawa, H. Takada (2008). Evaluation of Pharmaceuticals and Personal Care Products as Water-soluble Molecular Markers of Sewage. *Environ. Sci. Technol.*, 42, 6347–6353.

USEPA: Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs), <http://www.epa.gov/ppcp/>.

- 上村仁, 仲野富美, 近内美乃里, 三宅裕子, 長谷川一夫 (2010). 「タミフルの相模川水系河川水中における分布」『環境化学』, 20, 269-272.

木口倫:「渇水期の農山村部の河川環境中に残留する生活関連化学物質の汚染実態に関する研究」, (平成 26 年 3 月). 平成 25 年度河川整備基金助成事業報告書 (助成番号: 25-1211-001).

- 小森行也, 鈴木穰 (2009). 「生活排水の処理状況が異なる都市域小河川における医薬品の存在実態と生態リスク初期評価」『水環境学会誌』 32, 133–138.

〔平成 28 年 7 月 20 日受付〕
〔平成 28 年 7 月 31 日受理〕

Analysis of Anti-Influenza Drugs and Several PPCPs in Water Using High-Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry and Isotope Dilution

Osamu Kiguchi¹, Takuma Watanabe¹, Rokuro Konno², Akiko Matsubuchi², and Takashi Kobayashi²

¹ *Department of Biological Environment, Faculty of Bioresource, Akita Prefectural University*

² *Akita Research Center for Public Health and Environment*

To efficiently assess the condition and behavior of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in aquatic environments released from domestic wastewaters, we analyzed anti-influenza drugs (tamiflu and its metabolite and zanamivir) and several PPCPs (caffeine, carbamazepine, triclosan, and triclocarban) in water using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry and isotope dilution. In this study, the analytical conditions for LC/MS/MS, solid-phase extraction (extraction solvent types), and recovery of target compounds in water samples were studied. The optimized conditions were then successfully applied in the analysis of target compounds of tested samples. Recovery results for target compounds revealed that the isotope dilution method was necessary to reduce matrix effects from real samples.

Keywords: Tamiflu, PPCPs, High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry, Matrix effects, Isotope dilution method