

(10) 水環境中医薬品のLC-MS/MSによる 一斉分析法の検討

小西 千絵¹・宝輪 勲^{1*}・中田 典秀²
小森 行也²・鈴木 穰²・田中 宏明³

¹ムラタ計測器サービス株式会社 (〒245-0052 神奈川県横浜市戸塚区秋葉町15)

²独立行政法人土木研究所 (〒305-8516 茨城県つくば市南原1-6)

³京都大学大学院工学研究科 (〒520-0811 滋賀県大津市由美浜1-2)

* E-mail: houwa@murata-s.co.jp

近年、新たな環境汚染物質として医薬品が注目を浴び、欧米を中心に環境中からの検出や分析方法が相次いで報告されている。本研究ではできるだけ簡便に、また数多くの医薬品を一斉分析できることを目標とし、環境中の医薬品の固相抽出—LC-MS/MS分析法の開発を試みた。本分析法における抽出効率やイオン化効率を明らかにすることで、分析対象成分の増減を補正する必要性を確認した。その補正法として原試料に標準物質を添加(1点)して定量する方法を提案した。その結果、本法では試料濃縮倍率が200倍で、58の医薬品を0.66~59ng/lで検出することが可能であり、水環境中の医薬品のスクリーニング分析法として有用であることが明らかとなった。

Key Words : Pharmaceuticals, Simultaneous analysis, LC-MS/MS, River water

1. はじめに

医薬品は主に人や家畜の病気治療等のために摂取される。体内で代謝・分解されなかった医薬品は排泄物とともに排出され、下水として排水処理施設に流入すると考えられる。日本で広く採用されている標準活性汚泥法を用いた下水処理場では、難分解性かつ親水性の医薬品の処理が不十分であると報告されており^{1)~3)}、高度な処理技術の開発が急がれる。また環境中に放出された医薬品は本来の利用目的からも察することができるように生理活性を持ち、水生生物への影響が懸念される⁴⁾。

本研究では処理技術開発に伴う確認方法の手段として、また水環境中の実態調査の手段としての医薬品一斉分析方法の開発を試みた。近年、環境試料を対象とした医薬品の分析法の開発および実態調査が報告されている^{5)~9)}が、20種類以上を一斉に分析した報告は数少ない。一方で現在流通している医薬品の種類は数千種類におよぶ。すべてが先に述べたような問題を持つとは考えがたいが、環境中の実態や水生生物への影響が明らかになっていないのも事実である。このため、まずどのような医薬品がどの程度環境中に存在しているのかを広く捉えることが必要である。また分野は異なるが、食品中の799の残留農薬等を規制するポジティブリスト制度が2006年5月に施

行されることをうけ、一斉分析法の検討が行われている¹⁰⁾。本研究においても数多くの医薬品を効率的に検出するために一斉分析法の開発を目標としている。

環境試料の分析において、一般的に前処理は分析対象成分の濃縮や試料中の夾雑物の除去を目的に行う。しかし様々な物性を持った多成分を分析対象とする場合、夾雑物除去のための煩雑な前処理は実用的ではなく、主に濃縮を目的としたより簡便なものが望ましい。その場合、抽出液は夾雑物を多く含有することとなるため、測定には特異性・選択性が要求される。測定にGC-MSを用いた場合には医薬品の多くは極性基を持つため、誘導体化などの複雑な操作を伴ってしまう。そこで本研究では、試料濃縮には固相抽出法を、分離にはHPLCを用い、検出には選択性に優れたMS/MSを用いた。固相抽出—LC-MS/MS分析による夾雑物を含む環境試料の分析において、定量方法に絶対検量線法を用いた場合、正確な定量値を算出することが困難な場合がある。その主な理由として、①前処理における抽出時の分析対象成分の損失、②測定時のイオン化拡大/抑制による分析対象成分の増減が考えられる。②は試料マトリクスによって大きく変化し、この影響を軽減させるための研究が行われている¹¹⁾。他にも③分析対象成分の安定性(分解や夾雑物との反応など)による増減などが

考えられる。これらの問題を解決する最も簡単な方法に内標準法がある。しかし分析対象とした医薬品の安定同位体の多くは市販されていないか、もしくは高価なものがほとんどである。また、ある物質の安定同位体を他の物質にも適用して補正する報告もあるが⁹⁾、必ずしも他の対象とする物質や異なる分析方法にも適用できる保証はなく、その確認試験が必要となる。内標準法の他に夾雑物の影響を補正できる定量法として、標準添加法¹²⁾が挙げられる。標準添加法における検量点は4点以上が理想であるが、分析対象成分が多く、各成分の濃度範囲が広い場合、適切な添加濃度を設定するには膨大な操作量が必要である。特に環境試料の原試料(ろ液等)に標準物質を添加して定量する場合、その操作量は非現実的なものとなる。また、抽出液に標準を添加して定量する場合には、操作量は軽減できるものの前処理時における分析対象成分の増減が補正できない。

そこで本研究では、原試料への標準添加法において操作量を軽減させるために、標準添加試料1点と無添加試料1点の計2点で検量して定量する方法を考案し、この「一点標準添加法」について検討を行った。まず添加回収試験を行い、絶対検量法により算出した回収率と一点標準添加法により算出した回収率を比較することで、本法の優位性を示した。回収率を抽出効率とイオン化効率にわけて算出することで回収率の増減が何に起因するのかを確認した。また検出下限値および定量下限値を算出し、本法を実試料に応用することで、水環境中の医薬品の実態をスクリーニングするための一斉分析法として有用であることを示した。

2. 実験方法

(1) 分析対象物質の選定

対象には生産量が多く、一般的に用いられていると考えられる医薬品¹³⁾やわが国で今までに検出された報告のある物質^{3), 5), 9)}等から、解熱鎮痛剤、不整脈用剤、抗てんかん剤等様々な用途の医薬品を58種選定した。分析対象とした物質を用途とともに表-1に示した。

(2) 試薬

分析種の標準品として用いた物質は、和光純薬工業、林純薬工業、関東化学のいずれかより生化学用、HPLC用等入手した。また、メタノール、アセトニトリル、超純水およびギ酸は和光純薬製のLC/MS用を使用した。

(3) 標準溶液の調製

各単品標準溶液はメスフラスコに試薬を分取し、メ

タノールに溶解させて1000mg/lになるように調製した。ただしメタノールに対する溶解性の低い物質には、水、アセトン、ジメチルホルムアミドなどの水溶性の高い溶媒を添加するか、もしくは濃度が最低で100mg/lとなるように調製した。この各単品標準溶液を適量分取し、メスフラスコを用いて、すべての分析対象物質が10mg/lとなるように混合標準溶液を調製した。これらの標準溶液は冷蔵保存し、使用時にはこれを適宜希釈した。この際希釈溶媒には、LCの初期移動相と同じ、水/アセトニトリル(0.1%ギ酸含有)=95/5(v/v)を使用した(以下希釈溶媒)。

検量線標準溶液は、10mg/lの混合標準溶液から適量分取し、メスフラスコを用いて0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 μ g/lの濃度を調製した。

(4) 試料

検討に用いた純水は、飲料水として販売されているVolvic(キリンビバレッジ販売)を用いた。

実試料には、2005年11月に宇治川の支川である山科川上流の小栗栖人道橋における河川水、および宇治川に放流している標準活性汚泥処理を行っている下水処理場の処理水(以下放流水)を用いた。これらの試料は、採水時にアスコルビン酸とNa₂EDTAを各約1 g/lとなるように添加し、前処理操作まで冷蔵保存した。

(5) 前処理

試料(200ml)をガラス繊維ろ紙(Whatman社製 GF/F, 孔径0.7 μ m)を用いてろ過し、ろ液は希塩酸でpH 2に調整した後、固相抽出を行った。予めメタノールと希塩酸(pH 2)でコンディショニングした固相カートリッジ(Waters社製Oasis HLB Plus 225mg)にろ液を通水し、希塩酸(pH 2)で洗浄した後、吸引および通気により乾燥させ、メタノールで溶出した。ろ紙上の残渣はメタノールを加えて超音波抽出(10min)し、固相抽出後の溶出液とあわせた。窒素ガスを吹き付けて試料抽出液を濃縮し、希釈溶媒で1mlに定容し、抽出液とした。

(6) 測定

LC-MS/MSの測定条件を表-2に示した。

試料抽出液をHPLCにより分離後、オンラインでMS/MSに導入して測定した。カラムはODSを用い、移動相は水とアセトニトリルにギ酸を添加して用いた。MS/MS測定に必要なプレカーサーイオン、プロダクトイオンおよびコリジョンエネルギーは、予め希釈した各単品標準溶液を用いて決定した。

(7) 定量方法

(a) 絶対検量線法

検量線標準液を表-2の条件を用いて測定し、y軸にピーク面積値、x軸に試料換算濃度をとって検量線を作成した。原試料を2. (5)に従って前処理し、同様に測定して面積値を得た。検量線関係式と得られた面積値から定量値を算出した。

(b) 「一点標準添加法」

「一点標準添加法」で定量するために必要な操作フローを図-1に示した。定量には、ろ過した原試料に標準添加した試料(O_{CS})と無添加試料(O_0)のピーク面積値

の計2点を用いる。しかし実際には添加濃度(CS)が2. 5, 25, 250ng/1となるように標準を添加した標準添加試料($O_{2.5}$, O_{25} , O_{250})と無添加試料(O_0)の計4点を前処理、測定した。ここで得られた各面積値の M_0 と $M_{2.5}$, M_{25} , M_{250} のうちいずれか1点を式(1)に代入し、定量値を算出した。ただし定量計算に用いる1点は、標準添加試料から得られる面積値 M_{CS} が M_0 の2倍から10倍程度であるものを選定した。

標準添加試料を3点としたにもかかわらず、その中から上の条件を満たす1点を選定する理由は、分析対象成分が高濃度の場合に、検量線の傾きが小さくなり直線

表-1 対象物質とその用途

No. Component	用途	No. Component	用途
1 carbamazepine	抗てんかん剤	30 dipyridamole	血管拡張剤
2 primidone	抗てんかん剤	31 verapamil	血管拡張剤
3 prednisolone	眼科用剤/副腎ホルモン剤	32 diltiazem	血管拡張剤
	/鎮痛、鎮痒、収斂、消炎剤	33 gemfibrozil	高脂血症用剤
4 antipyrine	解熱鎮痛剤	34 ifenprodil	その他の循環器官用薬
5 isopropylantipyrine	解熱鎮痛剤	35 pentoxifylline	その他の循環器官用薬
6 acetaminophen	解熱鎮痛消炎剤	36 dextromethorphan	鎮咳剤
7 diclofenac	解熱鎮痛消炎剤	37 salbutamol	気管支拡張剤
8 mepirizole	解熱鎮痛消炎剤	38 terbutaline	気管支拡張剤
9 ethenzamide	解熱鎮痛消炎剤	39 clenbuterol	気管支拡張剤
	解熱鎮痛消炎剤	40 tolbutamide	糖尿病用剤
10 indomethacin	/鎮痛、鎮痒、収斂、消炎剤	41 promethazine	抗ヒスタミン剤
	解熱鎮痛消炎剤	42 cyclophosphamide	抗腫瘍剤
11 ketoprofen	/鎮痛、鎮痒、収斂、消炎剤	43 nalidixic acid	合成抗菌剤
12 crotamiton	鎮痛、鎮痒、収れん、消炎剤	44 thiamphenicol	合成抗菌剤
13 N,N-diethyl-m-tolamide	昆虫忌避剤	45 danofloxacin	合成抗菌剤 (動物用医薬品)
14 chlorpromazine	精神神経用剤	46 norfloxacin	合成抗菌剤 (動物用医薬品)
15 amitriptyline	精神神経用剤		合成抗菌剤 (動物用医薬品)
16 imipramine	精神神経用剤	47 2-quinoxalinecarboxylic acid	の代謝物
17 haloperidol	精神神経用剤	48 trimethoprim	その他の化学療法剤
	精神神経用剤	49 sulfamethoxazole	その他の化学療法剤
18 sulpiride	/消化性潰瘍用剤	50 sulfadimazine	サルファ剤
19 pirenzepine	消化性潰瘍用剤	51 sulfadimethoxine	サルファ剤
20 metoclopramide	その他の消化器官用薬	52 sulfanomonemethoxine	サルファ剤 (動物用医薬品)
21 tolperisone	鎮けい剤		主としてカビに作用する
22 scopolamine	鎮けい剤	53 griseofulvin	抗生物質製剤
23 diphenidol	鎮暈剤	54 tetracycline	抗生物質 (動物用医薬品)
24 caffeine	強心剤	55 oxytetracycline	抗生物質製剤
25 disopyramide	不整脈用剤	56 tilimicosin	抗生物質 (動物用医薬品)
26 propranolol	不整脈用剤		主としてグラム陽性・陰性菌に
27 sotalol	不整脈用剤	57 amoxicillin	作用する抗生物質製剤
28 atenolol	不整脈用剤		
29 metoprolol	血圧降下剤	58 benzylpenicillin	抗生物質 (動物用医薬品)

表-2 LC-MS/MS の測定条件

HPLC	: Agilent 1100	
移動相 A	超純水 (0.1% ぎ酸含有)	
移動相 B	アセトニトリル (0.1% ぎ酸含有)	
グラジエント	時間 / min	B, %
	initial	5
	11	40
	14	100
	20	100
カラム	Sun Fire C18	2.1×150mm, 5um (Waters 社製)
カラム温度	40℃	
注入量	5ul	

MSMS	: Thermo Quantum Discovery MAX	
Mode	ESI-Positive	
Spray Voltage	4500 V	
Sheath gas	35	
Aux gas	5	
Capillary temperature	320 °C	

性が失われるため、直線範囲の上限が試料換算濃度で100ng/l程度までしかない物質について、2点の検量点を直線範囲内に収めるためである。また、実試料中の濃度範囲が広範囲におよぶことが予想されるため、標準添加濃度の公比を10と高い値に設定したためである。

本試験においては添加濃度を2.5, 25, 250ng/lとしたが、一般の実試料を対象として定量する場合には、原試料に標準添加する試料数や濃度は試料中の分析対象成分の含有量に応じて適宜調整する必要がある。

$$\text{「1点標準添加法」による試料 } O_0 \text{ の定量値} = \frac{CS \cdot M_0}{M_{CS} - M_0} \quad (1)$$

ただし、CS：添加濃度

M_0 ：無添加試料から得られるピーク面積値

M_{CS} ：添加濃度 CS の標準添加試料から得られるピーク面積値

(8) 分析法評価のための各パラメータの算出方法

(a) 回収率

原試料には、純水、河川水、放流水の三種類のマトリクスを用意した。原試料は、分析対象成分の標準物質添加濃度(RS)が25ng/lとなるように標準物質を添加した標準添加試料(O_a)と、無添加の試料(O_u)を用いて添加回収試験を行い、各定量法の回収率を確認した。絶対検量線法により算出する回収率は、2. (7) (a) の定量方法に従って O_a 及び O_u をそれぞれ定量し、式(2)を用

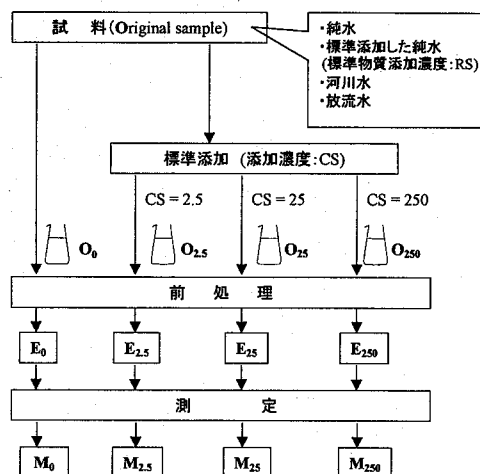


図-1 一点標準添加法による定量に必要な操作

いてその定量値の差を標準物質添加濃度RSで除して算出した。一点標準添加法による回収率についても同様に、2. (7) (b)に従って算出した O_u と O_a の各定量値の差を標準物質添加濃度RSで除して算出した。ここで一点標準添加法により算出される回収率は、抽出時やイオン化時の分析対象成分の増減を補正しているため、誤解を生じる可能性があるが、その算出方法¹⁴⁾から「一点標準添加法により算出される回収率」と呼ぶこととする。これにより算出される回収率は必ずしも100%とはならず、標準添加試料(O_a)と無添加試料(O_u)間の操作のばらつきや検量線の非直線性等によって生じることになる。

各回収率の算出は、純水、河川水、放流水の各試料マトリクスについて前処理(標準添加)時から回収率算出までの一連の操作を5回繰り返して行い、結果には平均値を用いた。

$$\text{回収率}(\%) = \left[\frac{Ma - A}{B} - \frac{Mu - A}{B} \right] \cdot \frac{1}{RS} \cdot 100 \quad (2)$$

ただし、RS：標準物質添加濃度(添加回収試験のために添加した標準の濃度)

Ma：添加濃度 RS の標準添加試料から得られるピーク面積値

Mu：無添加試料から得られるピーク面積値

A：絶対検量線関係式の y 切片

B：絶対検量線関係式の傾き

(b) 抽出効率およびイオン化効率

また絶対検量線法により算出した回収率が100%とわずに増減する主な原因として①前処理(抽出)時におけるものと②測定(イオン化)時におけるものが考えられる。絶対検量線法において、これら2つが回収率に

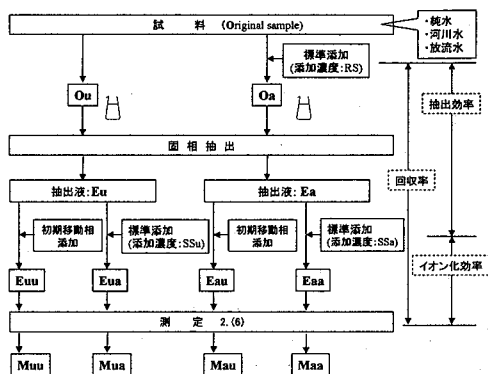


図-2 抽出効率算出のための操作フロー

どの程度寄与しているのかをそれぞれ確認するため、①を抽出効率、②をイオン化効率として算出した。

抽出効率を算出するために必要な操作フローを図-2に示した。試料200mlを2点用意し、一方には分析対象物質を添加 (Oa) し、もう一方は無添加 (Ou) として回収率同様に添加回収試験を行い、定量値の差を標準物質添加濃度RSで除して算出した。ただし、この際用いる定量値は「抽出時の損失を補正していない定量値」を用いなければならない。ここでは回収率への寄与が抽出とイオン化における分析対象成分の増減から成り立っていると考えると、「抽出時の損失を補正していない定量値」を「イオン化時の増減を補正した定量値」と言い換えることができる。イオン化時の増減を補正した定量値を算出するための定量方法として「抽出液への一点標準添加法」を用いた。これに必要な操作はまず、試料に標準物質添加濃度 (RS) が250ng/lとなるように添加した試料 (Oa) と無添加の試料 (Ou) の2点を2. (5)にしたがって前処理を行い、抽出液Ea及びEuとした。抽出液Euに標準溶液を加えて添加濃度がSSuとなるように抽出液Euaを調製し、Euに標準溶液の添加量と同量の希釈溶媒を添加した抽出液Euuを調製した。Eaについても同様にして抽出液Eau及び添加濃度がSSaとなるようにEaaを調製した。これら4種類の抽出液を表-2の条件を用いて測定し、各ピーク面積値Muu, Mua, Mau, Maaを得た。得られた面積値Muu, Muaとその標準添加濃度 (SSu) から、式(3)を用いて試料Ouの濃度を算出することにより、測定時における分析対象成分の増減を補正した定量値を算出した。同様にしてMau, MaaおよびSSaから試料Oaを定量した。これらの定量値と標準物質RSから式(4)を用いて、抽出効率を算出した。この一連の操作を純水、河川水、放流水の3種類の試料マトリクスについて5回繰り返して行い、結果には平均値を用いた。

イオン化効率については抽出液中の分析対象成分がどれだけイオン化できたかを示すものと定義し、抽

出液中の分析対象成分の量を抽出効率で、抽出しイオン化できた分析対象成分の量を回収率で置き換えて、式(5)を用いてイオン化効率を算出した。

$$\begin{aligned} & \text{イオン化時の分析種増減分を補正した試料Ouの定量値} \\ &= \frac{SSu \cdot Muu}{Mua - Muu} \end{aligned} \quad (3)$$

$$\begin{aligned} & \text{抽出効率(\%)} \\ &= \left(\frac{SSa \cdot Mau}{Maa - Mau} - \frac{SSu \cdot Muu}{Mua - Muu} \right) \cdot \frac{1}{RS} \cdot 100 \end{aligned} \quad (4)$$

$$\text{イオン化効率(\%)} = \frac{\text{回収率}}{\text{抽出効率}} \cdot 100 \quad (5)$$

3. 結果と考察

(1) 絶対検量線法と一点標準添加法との比較

(a) 回収率

絶対検量線法により算出した回収率を図-3に、一点標準添加法により算出した回収率を図-4に示した。ただし用いた実試料には分析対象成分が含有されている物質があった。そのうち含有濃度が25ng/l以上の物質については正確な回収率の算出が困難であったので、これらの物質の結果については図中に「*」と示した。

絶対検量線法により算出した回収率について、No. 28, 37, 38は純水、河川水、放流水のいずれの試料マトリクスにおいても10%以下であった。これらの物質は親水性が高いため、抽出時に損失があると考えられる。一方、一点標準添加法による算出した回収率は純水においては良好な結果が得られたが、No. 37の河川水、放流水やNo. 38の放流水においては100%を大幅に越えた。No. 37, 38はHPLCにおける保持時間が比較的短く、MS測定におけるイオン化時に移動相は気化しにくい。このため、分析対象成分が高濃度の場合にイオン化エネルギーが不十分となりやすく、検量線の線形性が失われ、その傾きが小さくなる傾向にある。純水から河川水、放流水へと夾雑物が増えるとイオン化エネルギー不足の程度が大きくなる。その結果純水の場合よりも、河川水や放流水では標準添加を行うことで検量線の傾きが小さくなるため、一点標準添加法により算出した定量値が一層大きくなってしまったのではないかと考えられる。従ってこれらの物質についてより正確な定量を行うには、測定液の希釈等の工夫が必要となる可能性がある。またNo. 14, 41, 42, 50, 51, 52の物質において、絶対検量線法により算出した回収率は純水から河川水、放流水へと夾雑物が増えるにつれて減少する傾向にあったが、一点標準添加法では放流水におけるNo. 52の回収率以外で良好な結果を得ることができた。No. 5, 15, 16, 17等の物質においては、絶対検量

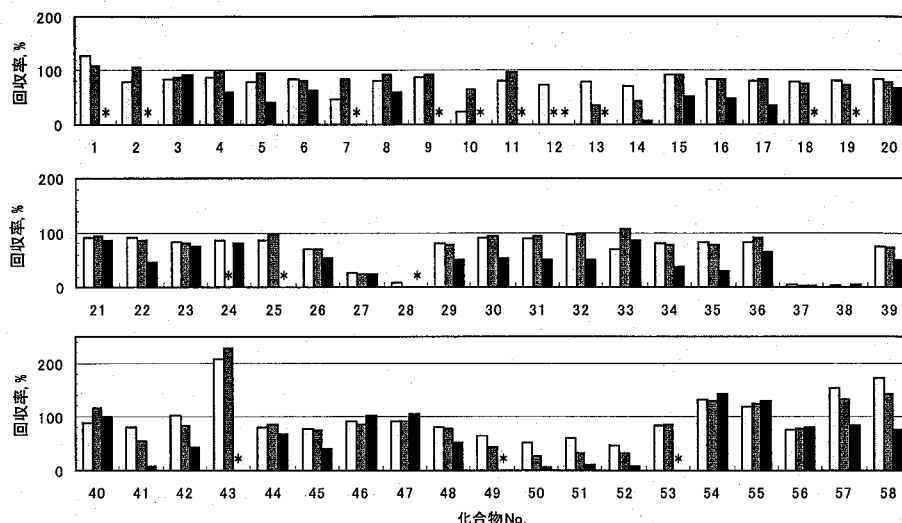


図-3 絶対検量線法により算出した回収率, %
 純水; 河川水; 放流水
 * は算出不能

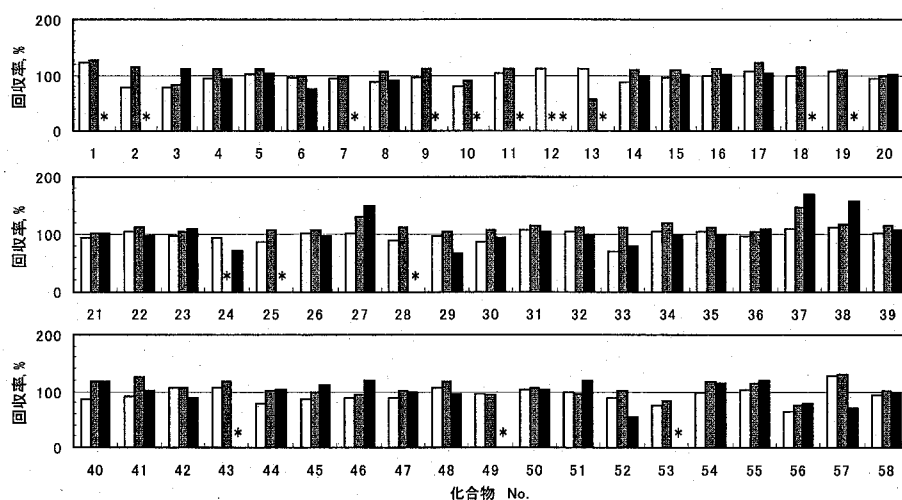


図-4 一点標準添加法により算出した回収率, %
 純水; 河川水; 放流水
 * は算出不能

線法により算出した回収率は放流水において減少する傾向が見られたが、一点標準添加法では良好な結果が得られた。

全体的な傾向として、絶対検量線法により算出した回収率は、No. 27, 28, 37, 38, 43等以外で純水においては概ね良好であるにも関わらず、試料マトリクスが河川水、放流水と夾雑物が増えるにつれ回収率が減少する傾向にあった。その程度は物質によってまた試料マトリクスによって異なるものであった。一方、一点

標準添加法により算出した回収率は、一部の物質で低い回収率を示したが、全体的に100%に近い成分が多く、試料マトリクスによる違いはほとんどの化合物で見られなかった。

(b) 抽出効率およびイオン化効率

前処理時における抽出効率及び測定時におけるイオン化効率を算出した結果をそれぞれ図-5および6に示した。

抽出効率について、多くの物質で100%に近い良好な

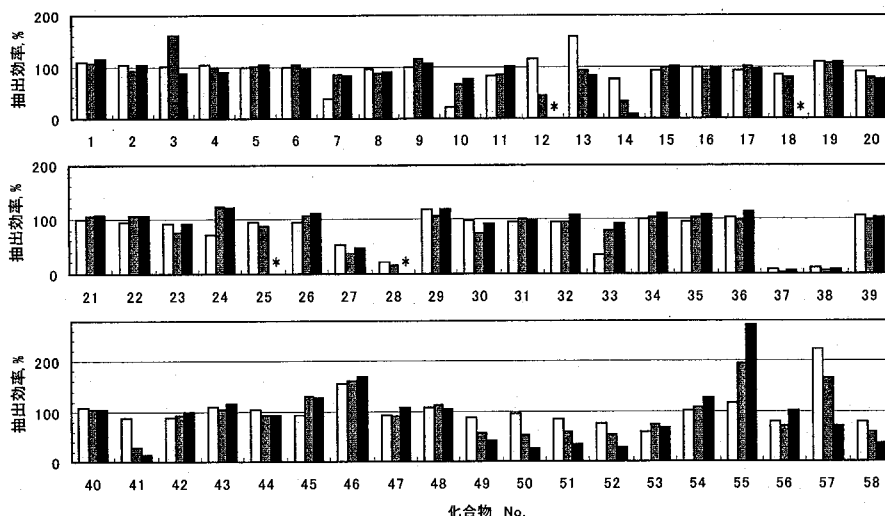


図-5 前処理操作時における抽出効率, %

純水; 河川水; 放流水
*は抽出効率算出不能

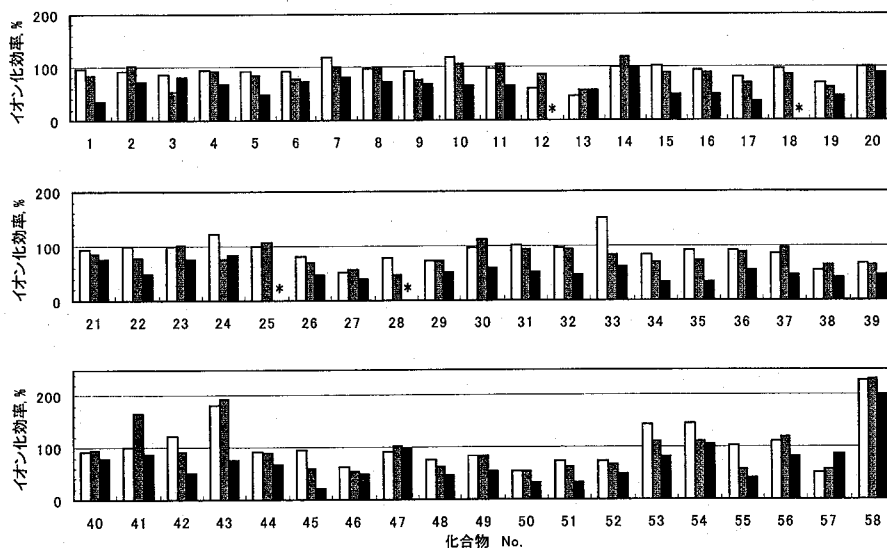


図-6 MS/MS 測定時におけるイオン化効率, %

純水; 河川水; 放流水
*はイオン化効率算出不能

結果が得られ、各試料マトリクスの違いによる有意な差は見られなかった。しかし、No. 27, 28, 37, 38は回収率と同様にすべての試料マトリクスにおいて抽出効率が低かった。これは親水性(オクタノール/水分配係数がそれぞれ0.24, 0.16, 0.64, 0.90¹⁵⁾)が高いうえ、塩基性化合物(pKaがそれぞれ8.14/9.83, 9.75, -, 8.8/10.1¹⁶⁾)であるため、酸性条件下での逆相系の固相カートリッジには吸着しにくいのではないかと考えら

れる。一方、No. 7, 10, 33 (オクタノール/水分配係数がそれぞれ4.51, 4.27, 4.77¹⁵⁾)は純水から河川水、放流水へと夾雑物が増えるにつれ抽出効率が増加した。逆にNo. 14, 41, 49-52, 58では減少した。また、No. 13, 46, 55, 57では、試料マトリクスによる傾向はそれぞれ異なるが、100%を大幅に越えた。抽出効率が100%以上になることは理論上考えられず、これは分析対象成分の安定性の問題ではないかと推測される。

一方イオン化効率ではほとんどの物質で有意な差が見られた。No. 1, 4, 5等では純水から河川水、放流水へと徐々にイオン化が抑制される度合いが大きくなり、特に放流水におけるイオン化効率への影響が明白である。この理由は、単純に本来分析対象成分に与えられるはずのイオン化エネルギーが、LCにおいて分析対象成分と分離しきれなかった夾雑物やブロープ付近にメモリーされた夾雑物に奪われてしまうためであると考えられる。また、No. 43, 58は純水においても100%よりも大幅に大きくなった。

以上の結果から、分析対象成分によってはNo. 47のように特異的に分析できる物質もあった。その他の物質については全体的に純水から河川水、放流水と夾雑物が増えるほどその影響が大きくなる傾向がイオン化効率には見られたが、抽出効率においては試料マトリクスの違いによる影響が見られない物質のほうが多かった。しかし、抽出効率においてもNo. 49-52(サルファ剤)のように試料マトリクスの影響を受けている物質もあった。従って回収率の増減の原因は前処理時におけるものと測定時におけるものと様々であり、その程度は物質によって異なるものであった。特に抽出効率が100%を超えたNo. 55, 57(抗生物質)は、分析対象成分の安定性に依存していると考えられるなどの特有の傾向を示した。これらのことから補正は前処理時から、また物質ごとに行う必要があると考えられる。

(c) 変動係数

絶対検量線法による定量値のバラツキと一点標準添加法による定量値のバラツキの度合いを比較するため、各定量方法による定量値の変動係数を求めた。操作は純水に標準添加(RS=25ng/l)した試料について前処理から定量値算出まで5回併行して行い、定量値には、各定量法2. (7) (a) および(b)に従って算出した。絶対検量線法における変動係数と一点標準添加法における変動

係数を図-7に比較して示した。

結果はNo. 28, 37以外の物質で絶対検量線法の方が優位なものであった。No. 28, 37が大きく逆転したのは抽出効率が低いためであると考えられる。また、No. 7, 10, 33, 38, 46, 54では他の物質と比較して変動係数が大きくなったが、絶対検量線法による定量においても変動係数が大きいことから、2点検量によるばらつきだけではなく、抽出時やイオン化時のばらつきも大きいと考えられる。

(2) 一点標準添加法の検出下限値及び定量下限値

試料には予めRSが2.5ng/lもしくは25ng/lとなるように分析対象成分を添加した純水を用い、図-1の操作と式(1)を用いて定量値を算出した。添加濃度が2.5と25ng/lの両者で変動係数が20%未満となった場合は2.5ng/lの定量値から3 σ (n=5)を算出し、これを検出下限値とし、10 σ を定量下限値とした。それ以外の場合には25ng/lの定量値から3 σ および10 σ を算出してそれぞれ検出下限値および定量下限値とした。算出した値を表-3に示した。41物質で50ng/l以上の定量が可能であり、17物質で10ng/l以上の定量が可能である。32物質で10ng/l以上で検出可能である。

(3) 実試料への応用

本法を河川水と放流水に応用した。各試料を2. (7) (b)に従って前処理、測定、一点標準添加法により定量した結果を表-3に示した。なお今回は試料中の分析対象成分の予想濃度範囲の上限を250ng/lとしたため、250ng/l以上の定量は行っていない。従って定量値が250ng/lを超える場合には、表中に「>250」と示した。また不検出の場合は「ND」、下限値未満の場合は「<LOD」と示し、検出下限値以上であった物質はすべて算出した定量値を記載した。分析対象物質58成分中、河川水では6物質、放流水では25物質が検出された。

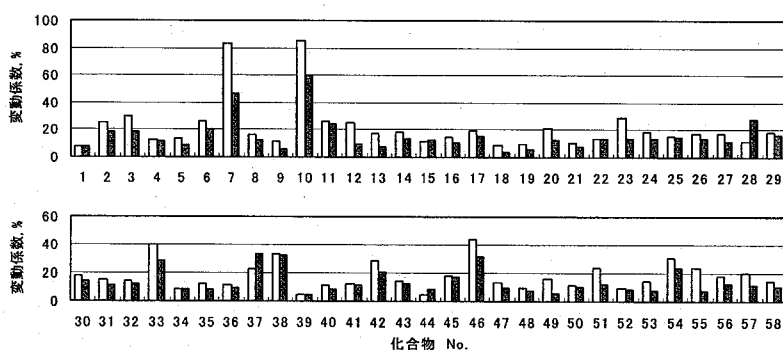


図-7 絶対検量線法と一点標準添加法による定量値の変動係数の比較

濃度: 25ng/l

□ 一点標準添加法; ■ 絶対検量線法

表-3 本法の検出下限値(3 σ), 定量下限値(10 σ)および実試料への応用 / ng/L

No.	検出下限値	定量下限値	河川水	放流水	No.	検出下限値	定量下限値	河川水	放流水
1	0.92	3.1	5.1	90	30	12	39	ND	<LOD
2	15	51	<LOD	110	31	1.3	4.3	ND	1.9
3	18	59	ND	ND	32	0.66	2.2	<LOD	21
4	1.3	4.4	<LOD	4.8	33	21	69	ND	ND
5	1.3	4.2	<LOD	ND	34	1.0	3.3	ND	8.4
6	19	62	<LOD	<LOD	35	9.4	31	ND	ND
7	59	200	<LOD	66	36	8.3	28	<LOD	10
8	1.4	4.6	ND	ND	37	19	64	ND	ND
9	8.6	29	ND	36	38	28	92	ND	ND
10	51	150	<LOD	<LOD	39	1.0	3.4	ND	ND
11	20	68	ND	110	40	7.2	24	ND	ND
12	2.0	6.5	120	>250	41	8.5	28	ND	ND
13	3.7	12	40	110	42	23	76	ND	<LOD
14	12	40	ND	ND	43	0.69	2.3	<LOD	43
15	0.98	3.3	ND	8.2	44	3.0	10	ND	ND
16	1.7	5.6	ND	<LOD	45	12	39	ND	ND
17	1.3	4.4	<LOD	3.8	46	29	97	ND	ND
18	1.1	3.5	11	>250	47	8.7	29	<LOD	24
19	8.0	27	<LOD	35	48	7.7	26	<LOD	17
20	15	49	ND	<LOD	49	12	39	<LOD	50
21	0.73	2.4	<LOD	<LOD	50	9.2	31	ND	ND
22	11	35	ND	ND	51	17	58	ND	ND
23	21	69	ND	<LOD	52	6.1	20	ND	ND
24	16	53	140	24	53	8.1	27	ND	31
25	0.41	1.4	2.5	>250	54	22	75	ND	ND
26	13	45	ND	<LOD	55	18	61	ND	ND
27	13	44	ND	ND	56	8.9	30	ND	ND
28	7.8	26	ND	>250	57	19	63	ND	ND
29	13	45	ND	20	58	10	33	ND	ND

4. まとめ

絶対検量線法で算出される回収率を、①抽出時と②イオン化時にわけて、定量値に与える影響を確認した。抽出効率やイオン化効率の増減は、純水から河川水、放流水へと夾雑物が増えるにつれ大きくなる等の傾向はあったものの、その原因や程度は物質によって異なることから、各物質に対して前処理時から補正することが必要であると確認した。

本研究では抽出効率やイオン化効率を物質ごとに補正できる一点標準添加法の評価を行った。純水、河川水、放流水の3種類の試料マトリクスを用いて添加回収試験を行い、絶対検量線法により算出した回収率と本法による回収率を比較することで、本法の優位性を確認した。絶対検量線法では、試料マトリクスに関係なく安定した回収率が得られる物質もあったが、特に

放流水においては回収率が80~120%であった物質は、算出可能な43物質中9物質と少なく、試料マトリクスによって回収率が異なった。一方、本法により算出した回収率は概ね実試料においても試料マトリクスの影響を受けずに良好な結果を得ることができた。しかし一部回収率の低い物質もあり、今後は測定における試料マトリクスのイオン化効率への影響等、回収率不良の具体的な原因を把握し分析法を改善する必要がある。また変動係数については2点検量であるために、絶対検量法と比較すると劣位であった。しかし、試料濃縮倍率が200倍で41物質で定量下限値が50ng/L未満であり、17物質で10ng/L未満であった。また32物質で検出下限値が10ng/L未満であった。本法を実試料に応用し、放流水中では対象とした58物質のうち25物質が検出された。このことから本法は水環境中の医薬品を一斉にスクリーニングできる有用な分析法であると考えられる。

標準添加法の代替法として内標準法が挙げられるが、医薬品に関しては入手可能な安定同位体は限られており、また分析対象物質とは異なる同位体を用いて定量するにはその代表性を確認する必要がある。しかし内標準法はより簡易な分析法として有効であることから、様々な実試料を元に本法との比較を行い、サロゲート物質の代表性を確認することも今後の課題となる。

謝辞：本研究は、環境省環境技術開発等推進費「水環境に見出される医薬品の排出段階における物理化学処理」のプロジェクトの一環で行われた。

参考文献

- 1) 浦瀬太郎, 田中俊至: 異なる活性汚泥による女性ホルモン類・医薬品等の除去特性, 環境工学研究論文集, Vol. 42, pp. 347-356, 2005.
- 2) 八十島誠, 小林義和, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明: 下水処理場における人用抗生物質の挙動, 環境工学研究論文集, Vol. 42, pp. 357-368, 2005.
- 3) 谷島利勝, 高田秀重: 医薬品起源化学物質の下水処理過程における挙動, 水環境学会年会講演集, pp. 343, 2003.
- 4) 八十島誠, 山下尚之, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明: 下水処理水中に含まれるレボフロキサシン, クラリスロマイシンの分析と藻類生長への影響, 水環境学会誌, vol. 27, pp. 707-714, 2004.
- 5) 清野敦子, 古荘早苗, 益永秀樹: わが国の水環境中における人用・動物用医薬品の存在, 水環境学会誌, vol. 27, pp. 685-691, 2004.
- 6) 石井善昭, 王寧, 尹順子: 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法による環境水中医薬品の分析, 環境化学, vol. 14, pp. 127-134, 2004.
- 7) 長尾亮治, 田中宏明, 田中周平, 藤井滋穂, 小西千絵, 宝輪勲: 淀川水系における医薬品の検出, 環境工学研究フォーラム講演集, pp. 42-44, 2005.
- 8) M. J. Hilton and K. V. Thomas: Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high - performance liquid chromatography - electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1015, pp. 129-141, 2003.
- 9) T. A. Ternes: Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples, *trends in analytical chem.*, 20, pp. 419-434, 2001.
- 10) 谷澤春奈, 島三記絵, 池原千枝子, 小畑雅一, 佐藤元昭: LC/MS/MS による農作物中残留農薬の多成分一斉スクリーニング分析, 食品衛生学雑誌, vol. 46, No. 5, 2005.
- 11) T. Benijts, R. Dams, W. Lambert and A. D. Leenheer: Countering matrix effects in environmental liquid chromatography - electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals, *J. Chromatogr. A*, 1029, pp. 153-159, 2004.
- 12) JIS: 高速液体クロマトグラフィー質量分析通則, 11.2 c), K0136: 2004.
- 13) 厚生労働省医政局編集: 薬事工業生産動態統計年報 平成 15 年, じほう, 2004.
- 14) JIS: 分析化学用語, 3.1, K0211: 2006.
- 15) Syracuse Research Corporation: SRC Phys Prop Database, <http://www.syrres.com/esc/physdemo.htm>
- 16) 医療薬学研究会: 常用医薬品情報集, 廣川書店, 2006.

(2006.5.26 受付)

Development of Simultaneous Analysis of Pharmaceuticals in Aqueous Samples Using LC-MS/MS

Chie KONISHI¹, Isao HOWA¹, Norihide NAKADA²,
Koya KOMORI², Yutaka SUZUKI² and Hiroaki TANAKA³

¹Murata Keisokuki Service Co., Ltd.

²Public Works Research Institute

³Research Center for Environmental Quality Management, Kyoto University

In recent years, pharmaceuticals have attracted attention as new environmental contaminants. Their detections in the aqueous environment thanks to innovative analytical methods have been extensively reported in Europe and North America. The purpose of this study is to develop an innovative and timesaving method to analyze many pharmaceuticals in water samples by solid phase extraction and LC-MS/MS. In this study, the recoveries and the efficiencies of both extraction and ionization were evaluated in comparison with between an absolute calibration curve method and a "standard addition method at a single concentration." The results showed that the standard addition method can correct more appropriately measurement values biased due to the extraction and ionization processes. Detection limits of 58 pharmaceuticals are between 0.66 to 59 ng/l for a concentration factor of 200. Therefore, this method is useful for simultaneous analysis of pharmaceuticals in the aqueous environment.