

(39) LC/MS/MSによるコンポスト試料中 医薬品の分析法の検討

小野田 優^{1*}・伊藤 竜生²・佐藤 修之¹・伊藤 光明¹・船水 尚行²

¹いであ株式会社 環境創造研究所 (〒425-0057 静岡県志太郡大井川町利右衛門1334-5)

²北海道大学大学院工学研究科 (〒060-8628 北海道札幌市北区北13条西8丁目)

* E-mail: ond20318@ideacon.co.jp

本研究では、持続性の高いサニテーションシステムとして期待されるコンポスト型トイレにおいて、そのコンポスト試料中の医薬品をモニタリングするためにLC/MS/MSを用いた分析法の検討を行った。まずLC/MS/MSによる高感度同時測定法を構築した結果、15医薬品を試料濃度として0.013 ~ 1.1 μ g/kgレベルで安定して検出することが可能となった。また、コンポストからの抽出方法として振とう・超音波抽出-固相抽出法を考案し、標準添加法による添加回収試験を行った結果、10医薬品において回収率が76 ~ 115%となり、本分析法の有効性と実試料への適用が確認された。本分析法を用いてコンポスト試料の医薬品濃度を測定したところ数 μ g/kgレベルであり、ケトプロフェンが35 μ g/kgと最も高濃度で検出された。

Key Words : Pharmaceuticals, Simultaneous analysis, Bio-toilet compost, LC/MS/MS

1. はじめに

コンポスト型トイレでは、ヒトから排泄されるし尿は、おが屑と混合・攪拌することにより好氣的分解及びコンポスト化が行われる。おが屑を用いる利点としては、多孔性に富んでいることや通気性に優れていることなどが挙げられ、処理過程では好氣的微生物活動によってし尿中の有機物が分解される^{1,2)}。さらに、処理過程の最終形態として生成したコンポストは、有機肥料としての再利用が可能であり、持続性の高いサニテーションシステムとして期待されている。

一方、ヒトから排泄されるし尿には、有機物や栄養塩類等の他に微量化学物質が含まれている。この微量化学物質としては、ヒト生体成分であるホルモン類や合成化学物質である医薬品及びこれらの代謝物等が挙げられ、近年では生理活性物質として注目を浴びている³⁾。特に医薬品においては、年間を通じて大量に製造・使用されているものであり、これらは生体内で作用した後、原体もしくは代謝物として排泄され、下水処理場や浄化槽を経て水環境中に放出される。欧米では河川水、湖水、下水処理場処理水、病院排水などから様々な医薬品が検出されているため^{3,4)}、医薬品の製造規制に環境リスク評

価を取り組むことが提案されている。また、日本においても解熱鎮痛剤や抗てんかん薬、抗生物質などが河川水から検出されており、わが国においても水環境中医薬品汚染は顕在化している^{5,6,7)}。これらの報告を受けて近年では環境試料を対象とした分析法の開発及び実態調査が数多く報告されている^{8,9,10)}。また、医薬品は高い生理活性を有することから、これらが水環境中へ放出された場合、水生生物への生態影響が懸念されている¹¹⁾。

コンポスト型トイレを用いたサニテーションシステムでは、医薬品等生理活性物質を含むコンポストを肥料として農地還元することができるため、これらの水環境中への拡散を防ぐことが可能であり、水環境汚染の改善という点で有効なシステムであると考えられる。しかし、コンポスト中に未分解の医薬品がある場合は、それらが雨水等によって農地から水環境中へ放出される危険性が考えられる。また、抗菌剤や抗生物質がし尿中に排出された場合は、コンポスト型トイレ内の分解菌発育阻害によるし尿処理能力の低下や薬剤耐性菌の発生などの問題も考えられる。これらのリスクを管理する上で、コンポスト中の医薬品濃度やトイレ内での分解の挙動を把握することは重要であり、コンポスト中に微量に存在する医薬品類をモニタリングするには高い感度と高い選択性を

有する分析法の開発が必須となる。また、水環境試料を対象とした医薬品の分析法については数多く報告されているが^{9,10}、コンポスト等固体試料を対象に分析した報告は数少ない。

そこで本研究では、高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計 (LC/MS/MS) を用いて、コンポスト試料に含まれる医薬品類の微量分析法開発の検討を行った。まず、作成した測定条件が低濃度の医薬品類に対して安定且つ高感度な測定方法であるか評価するために、低濃度標準溶液を繰り返し測定により得られる装置検出下限値(IDL)を算出した。次に、本研究において考案した前処理法がコンポスト試料からの医薬品類の抽出方法として有効であるかどうか評価するため、添加回収試験を行い、標準添加法により回収率を算出した。また、実際に使用しているコンポスト型トイレのコンポスト試料中医薬品を本研究で開発した分析法を用いて測定し、医薬品の検出濃度レベルについて調査を行った。

2. 実験方法

(1) 分析対象物質

分析対象物質としては、一般的に用いられており且つ生産量が多いと考えられる医薬品やわが国で今まで水環境中で検出されたとの報告がある医薬品を選定した⁹。選定した医薬品は解熱鎮痛剤や抗てんかん薬、抗不整脈薬、抗生物質等計15物質とした。分析対象とした物質を用途と共に表-1に示した。

表-1 分析対象物質とその用途

化合物名	用途
アスピリン	解熱鎮痛薬
イブプロフェン	解熱鎮痛薬
アセトアミノフェン	解熱鎮痛薬
ケトプロフェン	消炎鎮痛剤
インドメタシン	消炎鎮痛剤
メフェナム酸	消炎鎮痛剤
カルバマゼピン	抗てんかん薬
プロプラノロール	抗不整脈薬
アテノロール	抗不整脈薬
ジピラミド	抗不整脈薬
酒石酸イフェンプロジル	脳循環代謝改善薬
プラバスタチンナトリウム	抗高脂血症薬
テトラサイクリン	抗生物質
オキシテトラサイクリン	抗生物質
クロルテトラサイクリン	抗生物質

(2) 測定条件

(a) 測定条件の最適化

医薬品類は極性が高く、難揮発性の性質を持つものが多い。これらの性質を持つ微量化学物質を高感度且つ高選択的に測定するためには LC/MS/MS が有効であり、マトリックス成分が多く、分析対象物質が幅広い物性を有する環境分析においてその有効性が期待されている¹²。

本研究の分析対象媒体であるコンポスト試料中においても、様々なマトリックス成分が夾雑物として含まれているため、それらを含む抽出液中医薬品を LC/MS/MS によって測定することは有効であり、前処理過程だけでなく測定過程においても対象物質と夾雑物とを分離し、且つ高感度で検出する条件を検討することは重要であると考えられる。

LC/MS/MSの測定条件を最適化するためには、①カラムや移動相、グラジエント等のLC条件の最適化と②対象物質のプリカーサーイオンやプロダクトイオンを決定するためのコーン電圧、コリジョンエネルギー等 MS/MS条件の最適化が必要となる。本研究では、まず①について、ODSカラムと0.1%ぎ酸水溶液/メタノールを用いたグラジエント分析を適用し、各対象物質の分離性やピーク形状等を確認した。LC部における測定条件を表-2に示す。次に、②について、高濃度(1~5mg/L)の各単品標準溶液を持続的にMS/MS部に注入し、最も感度良くプリカーサーイオン及びプロダクトイオンを生成するようにイオン化に関するパラメーターを調整した。MS/MS部における測定条件を表-2~4に示す。なお、表-2~4に示す値は本研究で用いた機種に依存するものである。

表-2 LC部の測定条件

機種	Agilent 1100 series
分析カラム	SunFire (3.0mm×150mm, 5μm), Waters
移動相	A: 0.1%ぎ酸水溶液 B: メタノール
グラジエント	B: 5%(0min)→80%(5min)→90%(10-20min)
カラム温度	40℃
注入量	5μL

表-3 MS/MS部の測定条件

機種	Quattro Ultima, Micromass
イオン化法	ESI-negative 及び positive
キャピラリー電圧	ESI-negative ; -2.5kV ESI-positive ; 3.0kV
イオン源温度	120℃
Desolvation 温度	300℃
コーンガス流量	70L/hr
Desolvation ガス流量	600L/hr

表4 分析対象物質のプリカーサーイオン及びプロダクトイオン

化合物名	イオン化 モード	コーン電圧 (V)	コリジョン エネルギー(eV)	プリカーサー イオン(m/z)	プロダクト イオン(m/z)
アスピリン	ESI-negative	-50	15	137	93
イブプロフェン	ESI-negative	-40	7	205	161
プラバスタチンナトリウム	ESI-negative	-90	15	423	321
アセトアミノフェン	ESI-positive	50	18	152	110
ケトプロフェン	ESI-positive	50	15	255	209
インドメタシン	ESI-positive	50	15	358	139
メフェナム酸	ESI-positive	40	15	242	224
プロプラノロール	ESI-positive	55	18	260	116
ジソピラミド	ESI-positive	50	18	340	239
カルバマゼピン	ESI-positive	70	17	237	194
アテノロール	ESI-positive	50	19	267	190
酒石酸イフェンプロジル	ESI-positive	50	19	326	308
テトラサイクリン	ESI-positive	30	20	445	410
オキシテトラサイクリン	ESI-positive	30	20	461	426
クロルテトラサイクリン	ESI-positive	30	20	479	444

(b) 標準溶液の調製

各対象物質の標準溶液はメスフラスコ内でメタノールにより溶解させ、1000mg/Lとなるように調製した。また、酒石酸イフェンプロジルについては超音波をかけることによりメタノールに可溶となった。これらの各単品標準溶液を100 μ Lずつ分取し、10mLメスフラスコ内でメタノールにより10mg/Lの混合標準溶液を調製した。各単品標準溶液及び混合標準溶液は常時-20℃で低温保存とし、使用時にはこれを適宜希釈した。この時の希釈溶媒としては、メタノールもしくは0.1%ギ酸水溶液/0.1%ギ酸メタノール=90/10を使用した。

検量線に用いる標準溶液は、10mLメスフラスコを用いて10mg/Lの混合標準溶液を0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 μ g/Lとなるよう調製した。

(3) 試料の前処理

コンポスト試料の前処理法においては、まず、対象物質をコンポスト試料から抽出する必要がある。下水試験方法における汚泥試験では汚泥中のビスフェノールAを最初にアセトンを用いて超音波により抽出を行っている¹³⁾。また、本山らは下水汚泥から製造したコンポスト中に含まれるエストロゲン類をメタノールにより抽出しており、その回収率も71～83%と良好な結果を示している¹⁴⁾。本研究では、これらの抽出方法を参考とし、コンポスト試料からの抽出方法としてメタノールによる振とう抽出及び超音波抽出を採用した。

また、コンポスト試料からのメタノールによる粗抽出液には対象物質以外に多くのマトリックス成分が存在すると考えられる。コンポスト試料と同様に多くの

マトリックス成分を含む下水処理放流水や下水中医薬品の分析法として、カートリッジ型の固相を用いた抽出方法が数多く報告されている^{9), 10), 11)}。この固相抽出法は、目的物質の濃縮だけでなくクリーンアップの役目も有しており、本研究においてもその有用性が期待できた。そのため、コンポスト試料からのメタノール抽出液を濃縮後、純水に転溶し、これを固相抽出することにより夾雑物からのクリーンアップ操作とした。

以上の事項より考案した本研究におけるコンポスト試料の前処理方法を以下に示す。

コンポスト試料5g（水分率：30.4%）を100mLの遠沈管に分取し、メタノール30mLで振とう抽出及び超音波抽出をそれぞれ10分間行った。抽出後、遠心分離（1500rpm, 5分間）を行い上澄みを回収した。この操作を2回繰り返して、粗抽出液をエバポレーターにより約2～5mLまで濃縮した。

濃縮した粗抽出液中には沈殿物が生じ、これらは純水に容易に溶解した。従って、粗抽出液を純水に転溶後、ギ酸によりpHを約3.0に調製し、この水溶液を予めメタノール10mLと0.1%ギ酸水溶液10mLでコンディショニングした固相カートリッジ（Oasis HLB）に10mL/minで通水し、固相抽出を行った。固相カートリッジを純水20mLで洗浄後、遠心分離（3000rpm, 5分間）により脱水し、メタノール10mLで対象物質を溶出させた。溶出液はメスフラスコを用いて正確に10mLとした。

メタノールによる溶出液の一部を分取し、これをESI-negativeモードによる測定用試料とした。また、メタノール溶出液を正確に0.5mL分取後、窒素ガスにより乾固寸前まで濃縮し、これに0.1%ギ酸水溶液/メタノール

(90/10)水溶液を0.5mLを加え、超音波により溶解したものをESI-positiveモードによる測定用試料とした。

(4) 試薬

本研究において標準品として用いた物質は、和光純薬工業より購入した標準物質もしくは生化学用のものであった。また、前処理及び測定時に使用したメタノールは関東化学のHPLC用を、ギ酸については和光純薬工業の試薬特級を用いた。また、純水については純水製造装置(MILLIPORE社製:Milli-Q A10)より精製した水を使用した。

(5) 定量方法

(a) 絶対検量線法

検量線標準溶液を表-2~4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。続いて実試料を2. (3)に従って前処理し、標準溶液と同様に測定して得られた面積値を前述の検量線の関係式に代入し、定量値の算出を行った。

(b) 標準添加法

コンポスト試料のような夾雑物が多く含まれている試料については、MS/MS部において夾雑物により目的物質のイオン化が抑制される現象が起りやすく、絶対検量線法で定量した場合、実際の濃度よりも低い測定値となる場合がある。この問題を解決するためには、内標準法が有効であり、これは対象物質の構成元素を同位体置換した化合物を同時に測定することにより、測定時の感度補正を行うものである。しかし、対象物質とした医薬品類の安定同位体はほとんど市販されていないのが現状である。本研究では、コンポスト試料のマトリックスによる測定時感度低下を補正するため、2. (3)によって得られた抽出液に標準物質を濃度段階的に添加し、2. (5). (a)と同様に作成した検量線により各対象物質の定量を行った。

標準添加法による検量線作成では、添加濃度が5, 10, 20, 50, 100, 200ng/mLとなるように各対象物質の混合標準溶液を抽出液に添加した。この検量線作成用の抽出液は、実試料の抽出液より分取したものであり、本研究では、検討で用いた実試料それぞれに対して検量線を作成し、これを用いて定量を行った。検量線作成時には、無添加試料のピーク面積値及び検量線の直線性が確保できる濃度範囲を考慮して、無添加試料を含めて4~7点とり、得られた検量線により各対象物質の定量を行った。

(c) アスピリンの定量方法について

本研究の分析対象物質の一つであるアスピリンにおいて、前処理操作以降の過程で脱アセチル化をうけ、サリチル酸が生成する可能性が考えられる。サリチル酸のプリカーサーイオン及びプロダクトイオンをモニターした結果、両物質のそれらは同一である結果が得られた。そのため、アスピリンのみを測定する場合は両物質をLC部において分離する必要があったが、本研究で作成した測定方法では分離するまでに至らなかった。

しかし、アスピリンとサリチル酸のピーク強度及びピーク形状は同様であったため、本研究では表-2及び3に示す測定条件で試料を分析した場合に、アスピリンと同一保持時間に検出されたピークをアスピリンの検量線によって定量し、これをアスピリンとサリチル酸の合計値(半定量値)として扱うこととした。なお、アスピリンとサリチル酸とを分離する条件の検討については今後の研究課題として取り組む予定である。

3. 結果と考察

(1) 高感度多成分同時分析法の検討

(a) 本測定条件における検出感度及びピーク形状

本研究で検討した測定条件により得られた各対象物質の低濃度標準溶液のクロマトグラムを図.1に示す。

本研究で用いたLC条件は、分析カラムとしてODSを、移動相として0.1%ギ酸水溶液及びメタノールを用いた一般的な逆相系のグラジエント分析である。図.1のクロマトグラムより、カラムによる対象物質の分離や検出されたピークの形状については全化合物において良好な結果が得られた。また、テトラサイクリンとクロロテトラサイクリンには目的物質のピークの前に小さいピークが確認された。テトラサイクリン系の抗生物質はエピ異性体が存在することが知られており⁹⁾、この小さなピークがエピ異性体由来のものであることが推測された。本研究では本ピークのみを分析対象とし、定量を行った。

一方、本研究で設定したMS/MS条件では、全化合物の最低標準溶液濃度は0.05~5ng/mLの範囲となり、その濃度レベルでの高感度な検出が可能となった(図.1)。さらに、ある化合物のモニター質量数が他の化合物の質量数に干渉するということなく、各対象物質を感度良く1ピークで検出することが可能となった(テトラサイクリン、クロロテトラサイクリンは除く)。

その中で、アスピリン、イブプロフェン、プラバスタチンナトリウムの最低標準溶液濃度は5ng/mLであり、

他の化合物と比較すると高い結果となった。本研究では、①分析対象物質の多くが酸性物質であったために分析カラム内での保持を高め、各化合物の分離を良くするため、②測定条件の最適化の結果、ESI-positive法によってイオン化される化合物が多く、これらを感度良く検出するためには酸性移動相が適してい

る場合が多いという2点が挙げられる。しかし、アスピリン等のようにESI-negative法によって検出される化合物については、今回のように酸性移動相を用いた場合にそれらのイオン化が抑制されてしまい、感度低下が起こる傾向がある。従って、これらについてはLC条件の改善が課題であるが、多成分同時分析や測定時間の短縮化を考慮し、表-2～4に示す測定条件を用いた。

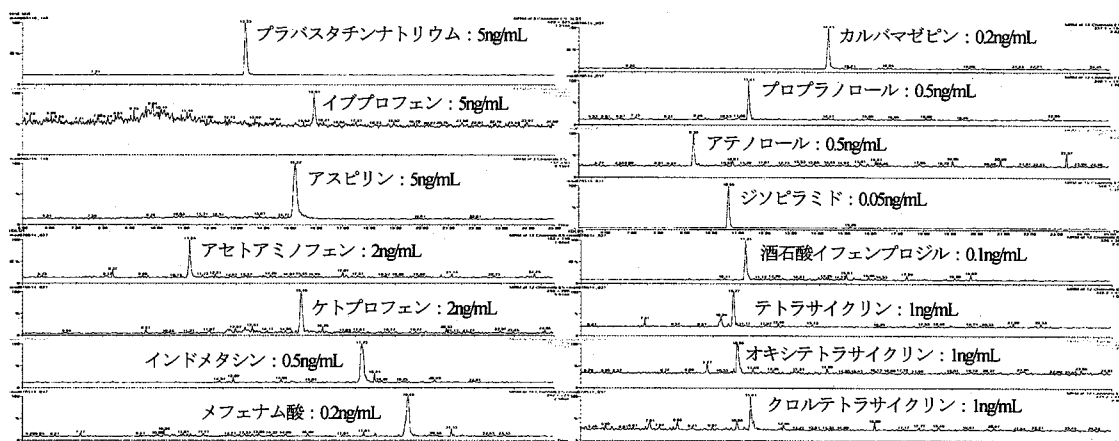


図.1 対象物質の低濃度標準溶液のクロマトグラム

(b) 装置検出下限値 (IDL)

各分析対象物質の装置検出下限値(IDL)を表-5に示した。IDLは各対象物質のピークがSN比10～20程度になるような混合標準溶液を調製し、その繰り返し測定より得られた定量値から求めた標準偏差(sd)と自由度n-1の危険率5% (片側) のt値 ($t(n-1, 0.05)$) を用いて式(1)によって算出した。

本研究では各化合物が表-5に示す濃度になるように混合標準溶液を調製し、それを7回繰り返し測定することによりIDLを求めた。n=7時における $t(n-1, 0.05)$ の値は1.943である。

$$\text{IDL}(\text{ng/mL}) = \text{sd} \times t(n-1, 0.05) \quad (1)$$

また、2(3)で示した前処理法による試料量、最終液量、装置注入量等を勘案し、式(1)で示すIDLを試料濃度に換算したものをIDL試料換算値とし、本研究ではこの値を検出下限値として用いた。

表-5より、本測定条件における各化合物の検出下限値 (IDL試料換算値) は0.013～1.1 $\mu\text{g/kg}$ であり、このレベルでの検出が可能であることが確認された。また、検

出下限値算出時の変動係数は全対象物質で3.3～9.6%と10%以内の値を示し、ばらつくことなく安定して検出することが可能となった。

以上の結果より、本研究の測定条件では対象物質15種を同時に試料濃度0.013～1.1 $\mu\text{g/kg}$ レベルで検出することが可能となり、高感度多成分同時分析法としての有効性が確認された。

(2) 回収率

コンポスト試料に各対象物質を200ng添加し、2(3)で示す前処理法によって得られた回収率を表-6に示す。ここでは、標準添加法によって得られた回収率 (回収率A) と絶対検量線法によって得られた回収率 (回収率B) をそれぞれ示した。また、純水に各対象物質を200ng添加し、2(3)で示す操作において、ぎ酸によるpH調製以降の操作を行って得られた回収率 (回収率C) も表-6に併記した。回収率はn=3で前処理を行い、その平均値で算出したものである。

表-5 対象物質のIDL

化合物名	標準溶液濃度 (ng/mL)	IDL (ng/mL)	IDL(試料換算値) (μg/kg)	変動係数 (%)
アスピリン	5	0.35	0.70	3.3
イブプロフェン	5	0.52	1.1	5.7
プラバスタチンナトリウム	5	0.36	0.72	3.9
アセトアミノフェン	2	0.33	0.66	7.7
ケトプロフェン	2	0.19	0.38	4.6
インドメタシン	0.5	0.088	0.18	8.2
メフェナム酸	0.2	0.048	0.096	9.4
カルバマゼピン	0.2	0.030	0.060	7.1
プロプラノロール	0.5	0.060	0.12	6.7
アテノロール	0.5	0.11	0.22	9.6
ジソピラミド	0.05	0.0063	0.013	4.9
酒石酸イフェンプロジル	0.1	0.015	0.029	7.5
テトラサイクリン	1	0.22	0.44	9.5
オキシテトラサイクリン	1	0.20	0.40	9.7
クロルテトラサイクリン	1	0.18	0.36	7.6

表-6より、各化合物の回収率Aと回収率Bとを比較すると、アセトアミノフェン、アテノロール、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリンを除く10化合物において回収率Bが回収率Aを下回る結果となった。絶対検量線法において回収率が100%とならずに増減する主な原因としては①前処理時における対象物質の損失によるものと②測定時のイオン化抑制による感度低下によるものが挙げられる。本研究では、その二つの原因うち②の原因を補正するために標準添加法を用いている。従って、回収率Bが回収率Aを下回る主な原因は、LC部で対象成分と分離できなかったコンポスト試料由来の夾雑物によるMS/MS部での対象物質に対するイオン化抑制であると考えられる。特に、インドメタシン、メフェナム酸については絶対検量線法による回収率が他の化合物に比べて著しく低く、標準添加法によって感度低下を補正し、定量することが絶対条件であると確認された。

また、イオン化抑制による影響を補正した回収率Aの値は前処理時における対象物質の抽出効率を示していると考えられる。表-6より前述の10化合物の回収率Aは76～115%の範囲内と良好な結果が得られ、これらの前処理時における損失は小さいことが明らかとなった。

また、アセトアミノフェン、アテノロール、テトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クロルテトラサイクリンについてはイオン化抑制を補正した場合でも、それぞれ29、3.0、5.4、5.4、8.7%と低い回収率であり、この原因としては前処理時における損失であると考えられた。

本研究で用いた前処理法は、大きく二つに分けると(a)メタノールによるコンポスト試料からの抽出部分と(b)コンポスト抽出液を純水を用いて水溶液とし、水質試料として固相抽出を行う部分とから構成されている。アテノロールについては純水からの回収率Cにおいても25%と低く、(b)の操作における損失が大きいたことが推測された。この原因としては化合物の親水性が高いこと(オクタノール/水分配係数:0.16)や塩基性化合物であるため、酸性条件下での固相抽出においてカートリッジ内にトラップできていない可能性が考えられた。従って、アテノロールについては(b)の操作においてpHを塩基性側に調整することや、より強い保持を示す活性炭系のカートリッジを使用することより回収率の向上が期待でき、今後の課題として挙げられる。

また、アセトアミノフェンについては、回収率Cでは良好な結果が得られているものの回収率Aではその値が低くなり、これは前述の(a)の操作による損失が大きいた影響しているものと考えられる。この原因としては、抽出溶媒としてメタノールが適していない可能性や超音波抽出による抽出力不足の可能性が考えられるが特定するまでには至らなかった。

テトラサイクリン系抗生物質3種においては、回収率Cで120%を上回る回収率となり、その変動係数も他の化合物と比較して大きい結果となった。本検討ではn=3で回収率を算出しているため、より試行回数を増やすことにより純水からの回収率及び変動係数を確認する必要があるが、概ね(b)の操作においては損失は少ないと考えられる。従って、回収率Aが低い原因としてはア

表-6 本分析法における対象物質の各回収率の比較 (n=3)

化合物名	回収率 A ^{注2)}	回収率 B ^{注3)}	回収率 C ^{注4)}
	(%)	(%)	(%)
アスピリン ^{注1)}	94 ± 2.6	64 ± 3.0	90 ± 5.4
イブプロフェン	95 ± 2.6	75 ± 2.3	93 ± 2.0
プラバスタチンナトリウム	96 ± 2.6	63 ± 2.4	85 ± 3.5
アセトアミノフェン	29 ± 2.9	32 ± 2.8	92 ± 1.1
ケトプロフェン	115 ± 8.7	77 ± 5.9	84 ± 4.0
インドメタシン	94 ± 10	23 ± 5.6	88 ± 6.3
メフェナム酸	107 ± 15	33 ± 3.6	86 ± 5.2
カルバマゼピン	82 ± 2.7	61 ± 2.0	81 ± 1.8
プロプラノロール	76 ± 11	48 ± 6.7	86 ± 3.3
アテノロール	3.0 ± 0.45	3.1 ± 0.47	25 ± 5.7
ジソピラミド	88 ± 7.2	71 ± 5.9	83 ± 2.6
酒石酸イフェンプロジル	78 ± 12	46 ± 7.2	73 ± 3.9
テトラサイクリン	5.4 ± 1.7	7.8 ± 2.5	125 ± 16
オキシテトラサイクリン	5.4 ± 1.4	10.4 ± 4.4	135 ± 13
クロルテトラサイクリン	8.7 ± 6.7	10.0 ± 7.6	123 ± 15

注1) 半定量値

注2) 回収率A: 標準添加法によって得られた回収率 注3) 回収率B: 絶対検量線報によって得られた回収率

注4) 回収率C: 純水を用いた添加回収試験より得られた回収率

セトアミノフェン同様コンポスト試料からの抽出効率の低さが原因であると考えられ、その原因解明と前処理法の改善が今後の課題として考えられる。

以上の結果より、本分析条件では、コンポスト試料中に含まれるアスピリン（半定量）、イブプロフェン、プラバスタチンナトリウム、ケトプロフェン、インドメタシン、メフェナム酸、カルバマゼピン、プロプラノロール、ジソピラミド、酒石酸イフェンプロジルの計10物質を高回収率で分析することができ、実試料分析への適用が可能であると確認された。

(3) 実試料への適用

本法を用いて実際に使用しているコンポスト型トイレのコンポスト試料を標準添加法によって分析し、その中に含まれる医薬品濃度レベルを調査した。分析結果を表-7に示す。

分析対象物質は3.(2)において高回収率での分析が可能となった10物質とした。また、本調査で用いたコンポスト試料の主媒体はおが屑であり、コンポスト型トイレに新しく投入後約1年間が経過したものである。その間のコンポスト型トイレの使用回数は月平均で67回であった。なお、水分率は45.8%であった。

表-7 コンポスト試料中の医薬品濃度

化合物名	試料濃度 (μg/kg)
アスピリン	6.4 ^{注)}
イブプロフェン	<1.1
プラバスタチンナトリウム	<0.72
ケトプロフェン	35
インドメタシン	1.8
メフェナム酸	1.4
カルバマゼピン	2.1
プロプラノロール	7.0
ジソピラミド	2.5
酒石酸イフェンプロジル	3.0

注) 半定量値のため参考値とする

表-7の結果より、イブプロフェン、プラバスタチンナトリウムを除く8物質が実試料より検出された。その中でも、アスピリン、ケトプロフェン、プロプラノロールの濃度が比較的高く、最も高い濃度でケトプロフェンの35μg/kgであった。

4. まとめ

本研究では、コンポスト試料中医薬品の分析方法を開発するために、解熱鎮痛剤等15物質を対象に以下に示す検討を行った。

- ① LC/MS/MSを用いた対象物質の高感度同時分析法の検討
- ② 振とう・超音波抽出及び固相抽出法を用いたコンポスト試料の前処理及び標準添加法を用いた定量方法の検討
- ③ ①及び②で得られた結果より考案した分析法によるコンポスト実試料の分析

まず①において、ODSカラムと0.1%ギ酸水溶液及びメタノールを用いた逆相系のグラジエント分析によるLC条件と各対象物質のモニタリーオンを決定するためのMS/MSの機器条件の最適化を行った。その結果、全対象物質をピーク形状を損なうことなく高感度且つ高選択的に測定することが可能となった。また、本検討より作成した測定方法を用いて各化合物の検出最低濃度の標準溶液を繰り返し測定した結果、それより得られた検出下限値は0.013 ~ 1.1 μ g/kgであり、その時の変動係数は3.3 ~ 9.6%と安定していたことから、本測定法は高感度多成分同時分析法として有効であると確認された。

また②においては、メタノールによるコンポスト試料からの抽出と固相カートリッジを用いたクリーンアップにより、15対象物質のうちアスピリン（半定量）、イブプロフェン、プラバスタチンナトリウム、ケトプロフェン、インドメタシン、メフェナム酸、カルバマゼピン、プロプラノロール、ジソピラミド、酒石酸イフェンプロジルの計10物質が分析可能となった。この時の定量方法は標準添加法を用い、これによりコンポスト試料由来の夾雑物による対象物質のイオン化抑制を補正することができた。添加回収試験を行った結果、前述の10物質の回収率は76 ~ 115%の範囲内と良好な結果が得られ、本前処理法の実試料分析への有効性が示唆された。一方、アセトアミノフェン、アテノロール、テトラサイクリン系抗生物質については、本法を用いた結果、良好な回収率が得られなかったことから、その原因解明と前処理法の改善が今後の課題として考えられた。

③においては、①と②で考案した分析法を用い、実際に運行しているコンポスト型トイレのコンポスト試料中医薬品濃度レベルを調査した。その結果、8物質が数 μ g/kgレベルで検出され、その中でも特に

ケトプロフェンの濃度が35 μ g/kgと最も高い結果となった。

謝辞

本研究は、戦略的創造研究推進事業「水の循環系モデリングと利用システム 持続可能なサニテーションシステムの開発と水循環系への導入に関する研究」のプロジェクトの一環で行われたものであり、試料提供等協力してくださった方々に感謝いたします。

参考文献

- 1) Horisawa S., Tamai Y., Sakuma Y., Doi S., Terazawa M. : Effect of moisture content of a wood matrix on small-scale biodegradation system for organic solid waste, *Journal of Wood Science*, 46, 317-321, 2000
- 2) 堀田真也, 寺沢実, 船水尚行 : コンポスト型トイレにおけるアンモニアガスの揮発特性に関する基本的研究, *環境工学研究論文集*, Vol. 41, pp. 79-86, 2004
- 3) Dana W. Kolpin, Edward T. Furlong, Michael T. Meyer, E. Michael Thurman, Steven D. Zaugg, Larry B. Barber, Herbert T. Buxton : Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000 : A national reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.*, 36, 1202-1211, 2002
- 4) Roman Hirsch, Thomas A. Ternes, Klaus Haberer, Armin Mehlich, Frank Ballwanz, Karl-Ludwig Kratz : Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 815, 213-223, 1998
- 5) 清野敦子, 古荘早苗, 益永秀樹 : わが国の水環境における人用・動物用医薬品の存在, *水環境学会誌*, Vol.27, pp. 685-691, 2004
- 6) 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, *環境工学フォーラム講演集*, pp.41-44, 2005
- 7) 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
- 8) 鈴木俊也, 宇佐美美穂子, 安田和男 : 河川水中の解熱鎮痛消炎剤のモニタリング, 第38回日本水環境学会年会講演集, 288, 2004
- 9) 篠塚達雄 : 医薬品の一斉分析法の開発—LC/MS法による解熱鎮痛剤、抗うつ薬の分析—, *The Chemical Times*, No.2 (通巻192号), pp.6-10, 2004

- 10) 小西千絵, 宝輪勲, 中田典秀, 小森行也, 鈴木穰, 田中宏明: 水環境中医薬品の LC/MS/MS による一斉分析法の検討, 環境工学研究論文集, Vol. 43, pp. 73-82, 2006
- 11) 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菌類成長への影響, 水環境学会誌, Vol.27, pp.707-714, 2004
- 12) 環境省環境保健部環境安全課: 化学物質環境実態調査における LC/MS を用いた化学物質の分析法とその解説, 2006
- 13) 社団法人日本水道下水協会: 下水試験方法 (追補暫定版) - 内分泌攪乱化学物質編及びクリプトスポリジウム編一, 107, 2002
- 14) 本山充希, 古閑豊和, 野見山桂, 中川修平, 松尾秀樹, 篠原亮太: 下水汚泥または畜産廃棄物から製造したコンポスト中に含まれるエストロゲン及びアンドロゲンの残留と内分泌攪乱性評価, 環境化学, Vol.16, No.4, pp.615-626, 2006

(2007.5.25受付)

Analytical Development of Pharmaceuticals in Bio-Toilet Compost Using Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry (LC/MS/MS)

Yu ONODA¹, Ryusei ITO², Nobuyuki SATO¹, Mitsuaki ITO¹
and Naoyuki FUNAMIZU²

¹Institute of Environmental Ecology, IDEA Consultants, Inc.

²Graduate School of Engineering, Hokkaido University

In this study, we have developed a trace analytical method for pharmaceuticals measurement in bio-toilet compost samples by LC/MS/MS system. Firstly, we tried to create a high-sensitive and simultaneous analytical method with LC/MS/MS for 15 pharmaceuticals. As a result, we have successfully detected all target compounds at 0.013 ~ 1.1 µg/kg level in compost sample. Secondly, we have examined a method of pretreatment including extraction by shaking, supersonication and cleanup by solid phase cartridge for target compounds in compost sample. As a result of recovery test using standard addition method, the good recovery rates, 76-115%, were obtained for 10 out of 15 compounds, except for acetaminophen, atenolol and tetracyclines. From the above-mentioned results, analyzing 10 pharmaceuticals in compost sample became possible. We have analyzed target compounds in compost samples, concentrations of target compounds detected by this method was a few µg/kg level and especially, it detected at 35 µg/kg of ketoprofen, which was the highest among target compounds.