

B-13 活性汚泥からの多種医薬品 抽出方法について

○奥田 隆^{1*}・小林 義和¹・八十島 誠²・山下 尚之¹・田中 宏明¹

¹京都大学大学院工学研究科流域圏総合環境質研究センター（〒520-0811 滋賀県大津市由美浜1-2）

²東和科学株式会社（〒730-0841 広島市中区舟入町6番5号）

* E-mail: t-okuda@biwa.eqc.kyoto-u.ac.jp

1. はじめに

近年、水環境中に存在する医薬品が問題となっている。医薬品は服用後、一部は代謝されるが、残りは尿とともに体外から排泄され、下水処理場を経由して水環境へと流出していると考えられており、河川中においても医薬品が検出されている^{1,2)}。医薬品はその特性上、生物に対して何らかの作用を有するため、水環境中に出た医薬品は生態影響を与えることが懸念されている。そこで、医薬品のリスク管理を行うため下水処理場、水環境中などでの挙動の把握や生態影響に関する研究が行われている³⁾。

しかし、報告されている調査結果の多くは溶解態医薬品のみを対象としており、これだけでは下水処理場などでの医薬品の挙動の把握は困難である³⁾。そのため溶解態以外にも懸濁態医薬品の分析を行う必要があるが、

その抽出・分析方法についてはほとんど研究事例がないのが実情である。

そこで本研究では27種類の医薬品の下水処理場での挙動を把握を行うため、下水処理場における活性汚泥からの医薬品抽出条件について検討した。活性汚泥から医薬品を抽出するにあたり、抽出方法及び抽出溶媒が大きな要素となると考えられるため、本研究ではこの2つの条件に着目した。

活性汚泥からの主な抽出方法としてはソックスレー抽出法、超音波抽出及び高速溶媒抽出の3つがある。ソックスレー抽出法とは、ソックスレー抽出器を用いて同じ溶媒を何度も試料に通すことにより抽出を行う方法であり、ダイオキシンやPAHsなどの抽出によく用いられているが、抽出時間が1溶媒当たり20時間程度と非常に長い時間がかかる上、抽出溶媒量も400ml程度と多くなってしまふ欠点がある⁴⁾。超音波抽出は試料に溶媒を加

表1 対象物質一覧

No.	物質名	分類	cas number	化学式	分子量	mp融点 (°C)	水溶解度 (mg/L)	pKa	Log Kow
1	clarithromycin	クラリスロマイシン	81103-11-9	C38H69NO13	747.95	220~227	0.342	8.48, 8.99	3.16
2	levofloxacin	レボフロキサシン	100986-85-4	C18H20FN3O4	370.38	220~230(分解)	25000	5.5, 8.0	-0.257
3	azithromycin	アジスロマイシン	83908-01-5	C38H72N2O12	785.03	114	7.09	8.74	4.02
4	sulfamethoxazole	スルファメトキサゾール	723-48-6	C10H11N3O3S	253.28	166	610		0.89
5	sulfamonomethoxine	スルファモノメキシジン	1220-83-3	C11H12N4O3S	298.32	204~206	4030		0.7
6	sulfadimethoxine	スルファジメキシジン	122-11-2	C12H14N4O4S	318.33	203.5	343		1.63
7	sulfadiazine	スルファジアジン	57-88-1	C12H14N4O2S	278.32	198.5	1500	7.59	0.89
8	carbamazepine	カルバマゼピン	298-46-4	C15H12N2O	236.27	189~193	17.7		2.45
9	2-quinolinecarboxylic acid	2-キノリンカルボン酸	879-65-2	C9H6N2O2	174.15	208			
10	ifenprodil	イフェンプロジル	66157-43-5	(C21H27NO2)2·C4H6O6	800.99	148(分解)		9.05, 9.69	3.9
11	cyclophosphamide	シクロフォスファミド	50-18-0	C7H15ClN2O2P	261.08	45~53	4.00E+04		0.63
12	N,N-diethyl-m-tolamide	N,N-ジエチル-m-トルアミド	134-62-3	C12H17NO	191.27	-45	912		2.18
13	disopyramide	ジソピラミド	3737-91-5	C21H29N3O	339.47	85~87	44.9		2.58
14	metoprolol	メトプロロール	37350-58-6	C15H25NO3	342.41		1.69E+04	9.6	1.88
15	propranolol	プロプラノロール	318-98-9	C16H21NO2·HCl	285.81	163-165	3010	9.45	0.74
16	indomethacin	インドメタシン	53-86-1	C19H16ClNO4	357.79	214	0.937	4.5	4.27
17	ketoprofen	ケトプロフェン	22071-15-4	C16H14O3	254.29	94~97	51	4.45	3.12
18	mefenamic acid	メフェナム酸	61-68-7	C15H13NO2	241.29	225(分解)	20	4.2	5.12
19	diclofenac	シクロフェナク	15307-79-6	C15H11ClNNaO2	318.13	280	2430	4	0.7
20	antipyrine	アンチピリン	60-80-0	C11H12N2O	188.23	111~113	5.19E+04	1.4	0.38
21	ethenzamide	エテンザミド	938-73-8	C9H11NO2	165.19	129-134			0.77
22	fenoprofen	フェンプロフェン	31879-05-7	C15H14O3	242.28	< 25		7.3	3.9
23	isopropylantipyrine	イソプロピルアンチピリン	479-92-5	C14H18N2O	230.31	103	3.00E+06		1.94
24	naproxen	ナプロキセン	22204-53-1	CH3COCH(CH3)CH2COOH	230.26	154~158	15.9	4.15	3.18
25	crotamiton	クロタミトン	483-63-6	C13H17NO	203.28	< 25			2.73
26	clenbuterol	クレンブテロール	37148-27-9	C12H18Cl2N2O	277.22	約170(分解)		9.33	2
27	teophylline	テオフィリン	58-55-9	C7H8N4O2	180.16	271~275(分解)	7360	8.81	-0.02

え、超音波を与えることにより抽出する方法であり、少量の溶媒で、しかも短時間で容易に抽出が行えるが、抽出効率や危険な溶媒で抽出を行う場合の安全性に問題が残る懸念もある。高速溶媒抽出は耐圧性金属容器に試料を封入し、これに溶媒を加え高温高圧条件にすることにより抽出を行う方法であり、少量の溶媒、短時間で自動的に抽出を行うことができるが医薬品のように不安定な物質物質は高温高圧下において変性する可能性がある。しかしソックスレー法は環境面での問題、長時間かつ手間がかかることから、本研究では超音波抽出及び高速溶媒抽出法の2つの方法に着目し、抽出方法の検討を行った。

2. 方法

(1) 対象物質

本研究では使用量・検出報告・分析可否などの観点から27種類の医薬品を選定した。表1にこれらの医薬品の名前・化学式・物性などを示した。27種類の医薬品には抗生物質や解熱鎮痛剤といった人用医薬品の他にも動物用医薬品も含まれている。

(2) 抽出方法及び測定方法

超音波抽出及び高速溶媒抽出法の抽出方法の検討を行った。高速溶媒抽出法の抽出溶媒としてはメタノール、アセトン、ジクロロメタン、水、酢酸エチルの5種類を用いた。なお、超音波抽出ではメタノール、アセトン、水の3種類で検討した。

超音波抽出では卓上型超音波洗浄機(UT-205S, SHARP製)を用い、残渣の付いたろ紙を10mlの溶媒に入れ、5分間抽出した後溶媒を入れ替えるという操作を3回行った。メタノール、アセトンによる抽出液のみ超純水で1Lに希釈し、EDTA、アスコルビン酸を1g/Lとなるように添加した後、固相抽出を行った。一方、高速溶媒抽出ではASE200 (DIONEX製)を用い、八十島らの方法⁵⁾を参考に、抽出時間5分を3サイクル、100度、2000psiで抽出を行った。水以外の抽出液は1%ギ酸を2ml添加した後、ロータリーエバポレーターを用いて35℃の温浴下で濃縮し、超純水で希釈後、EDTA、アスコルビン酸を同様に添加して固相抽出を行った。固相抽出はOasis HLB カートリッジ(waters製)を用いて精製・濃縮を行い、その後溶媒を0.1%ギ酸：メタノール=8：2溶液に転換してLC-MS/MSで分析を行った。なお、HPLCはalliance waters2695セパレーションモジュール(waters製)、MS/MSはQuattro micro API (waters製)を用いた。

(3) 試料と評価方法

活性汚泥は凝集剤添加標準活性汚泥法の下水処理場の

曝気槽中間付近で採水したものをを用いた。この試料20mlをGF/Bろ紙でろ過を行い、ろ紙上の残渣中の医薬品を懸濁態医薬品と定義した。採水は各抽出実験の数時間前に行ったため、採水試料中の医薬品濃度が実験ごとに変化する可能性があることから、以下のような添加回収試験の回収率により抽出効率の評価を行った。まず、同じ試料をろ過した残渣に対し、医薬品の標準物質各50ngを添加しない系BLと添加する系ADDを作成し、同様の抽出方法、前処理方法を施したのちそれぞれの濃度を分析した(これを X_{BL} 、 X_{ADD} とする)。そして

$$\text{回収率} = \frac{(X_{ADD} - X_{BL})}{50} \times 100$$

から回収率を求めた($n=3$)。なお、添加量 50ng は実際の濃度の推定量の数倍程度となるように設定した。

3. 結果及び考察

(1) 高速溶媒抽出

高速溶媒抽出法での5種類の溶媒検討結果を図1に示した。水で抽出を行った場合、全体として回収率が高く、21物質が回収率50～120%の範囲に収まった。また、メタノールやジクロロメタンも一部の溶媒に対しては回収率が低いものの、およそ50%程度の回収率を得た。一方、酢酸エチルやアセetonは一部の溶媒に対しては抽出効率が低い、平均回収率は38%、37%と全体的に低く、一斉抽出は困難と考えられる。以上のことから、高速溶媒抽出法では、抽出溶媒としては水を用いることが平均的

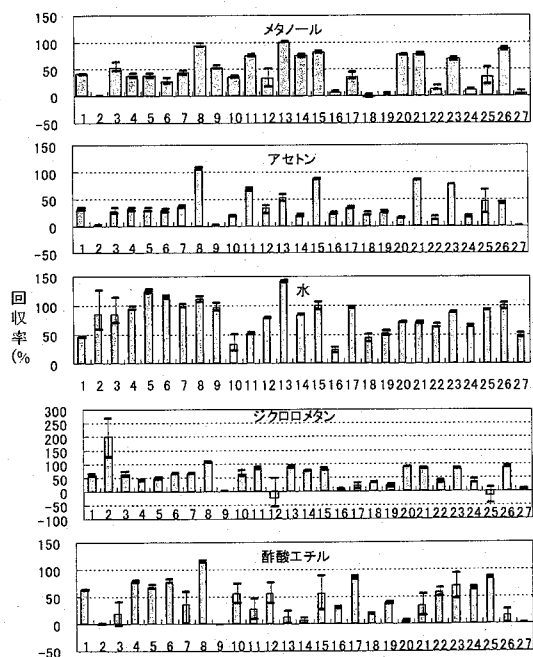


図1 高速溶媒抽出法による医薬品回収率

には抽出効率が低いと考えられ、必要に応じて適宜メタノールやジクロロメタンで回収率の低い物質を抽出する方法が良いと考えられる。

(2) 超音波抽出

超音波抽出による抽出結果を図2に示す。ここでも、抽出溶媒として水やメタノールを用いた方がアセトンを用いた場合よりも回収率が高いという結果となった。しかし、高速溶媒抽出の場合と比較して、No.1～3の抗生物質などでの回収率が低くなっていることや、13～15の不整脈用剤で水やアセトンの回収率が低い結果が得られたことから、これらの抽出には高速溶媒抽出の方が適していると考えられる。一方、メタノールを用いた抽出の場合、高速溶媒抽出と超音波抽出では回収率の値がほぼ同程度であった。高速溶媒抽出と超音波抽出の回収率を散布図にプロットした結果を図3に示した。これから、メタノールの抽出は高温や高圧によるものよりも汚泥にメタノールが浸透したことによる抽出が比較的大きな要素なのではないかと推察される。

また、高速溶媒抽出では安定性や融点の低い物質などは高温高圧下では構造が変化したり、抽出作業時に揮発する可能性が懸念される。しかし、高速溶媒抽出で抽出を行った場合は、どの溶媒を用いても回収率が悪いという物質が見当たらないことから、対象物質ではこのような高速溶媒抽出による問題は見出せなかった。

以上のことから、本研究で選定した27物質を活性汚泥

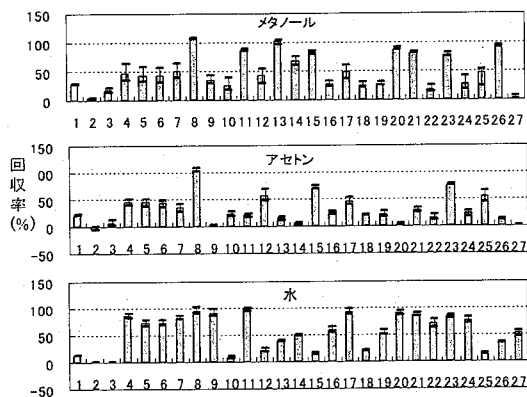


図2 超音波抽出法による医薬品回収率

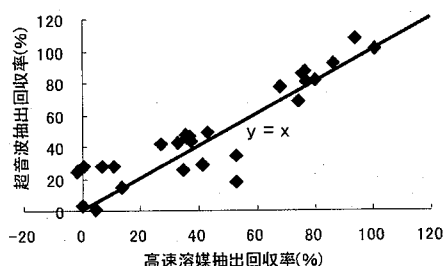


図3 メタノールを抽出溶媒とした場合の高速溶媒抽出と超音波抽出の回収率の比較

から一斉抽出するには、水を抽出溶媒として高速溶媒抽出法を用いることが最も効率が良いと考えられた。また、水では抽出できない物質に関してはメタノールやジクロロメタンを用いて高速溶媒抽出法を用いることが有効であると考えられた。また、メタノールを抽出溶媒とする超音波抽出法も一部の医薬品に対しては良好な回収率を得たが、メタノールを用いた高速溶媒抽出法の結果と同程度であったことから、高速溶媒抽出法による一斉抽出を行う方法が簡便と考えられる。

今後は、これらの結果をもとに高速溶媒抽出法における抽出回数や抽出時間などに関して詳細な検討を行う必要がある。

4. まとめ

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

- 1) 活性汚泥から医薬品を一斉抽出するには、高速溶媒抽出法を用いて水で抽出する方法が有効と考えられ、27物質中21物質が回収率50～120%の範囲に収まった。
- 2) 水やアセトンを用いた超音波抽出では抗生物質など、一部の物質に対して高速溶媒抽出よりも抽出効率が悪くなった。
- 3) メタノールによる抽出は、超音波抽出と高速溶媒抽出とでは抽出効率の差はほとんど無かった。

謝辞

本研究を行うにあたりましてご協力を頂きました関係者の方々には深くお礼申し上げます。なお、本研究は日本学術振興会科学研究費補助金の助成を受けました。

参考文献

- 1) 長尾亮治, 田中宏明, 田中周平, 藤井滋穂: 淀川水系における抗生物質およびエストロゲンの検出; 第8回日本水環境学会シンポジウム講演集, pp.67-68, 2005
- 2) 清野敦子, 古庄早苗, 益永茂樹: 環境試料における医薬品の分析法, 用水と廃水, Vol.47, pp.39-46, 2005
- 3) 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, No.11, pp.707-714, 2004
- 4) 奥田隆, 小林義和, 山下尚之, 田中宏明, 田中周平, 藤井滋穂, 小西千絵, 宝輪勲: 下水の高度処理施設における医薬品の除去特性; 環境衛生工学研究 Vol.20 No.3, pp.67-70, 2006
- 5) 天野冴子, 星純也, 佐々木裕子: 粒子状物質に含まれる多環芳香族炭化水素類 (PAHs) の抽出法の検討と高速溶媒抽出装置 (ASE) の適用の可能性, 東京都環境科学研究所年報, pp.161-168, 2003
- 6) 八十島誠, 小森行也, 鈴木穰: 下水試料を対象とした人用抗生物質の分析法, 第43回下水道研究発表会講演集, pp.70-72, 2006