

# B-53 環境水中のリレンザおよびタミフル・タミフル代謝物の同時分析法の検討

○高浪 龍平<sup>1\*</sup>・尾崎 博明<sup>2</sup>・林 新太郎<sup>2</sup>・谷口 省吾<sup>1</sup>

<sup>1</sup>大阪産業大学新産業研究開発センター (〒574-8530 大阪府大東市中垣内3-1-1)

<sup>2</sup>大阪産業大学工学部 (〒574-8530 大阪府大東市中垣内3-1-1)

\* E-mail: r-nami@cnt.osaka-sandai.ac.jp

## 1. はじめに

新型インフルエンザの流行に伴って使用量が増加している抗インフルエンザウイルス薬による環境汚染が懸念され、それらの環境動態が注目されている。しかし、これら抗インフルエンザウイルス薬に関する調査報告は少なく、その要因のひとつとして分析法開発の遅れが挙げられる。

本研究では抗インフルエンザウイルス薬としてタミフルおよびタミフル代謝物に加え、リレンザを対象とした同時分析法について検討を行った。

## 2. 実験方法

### (1) 対象物質

抗インフルエンザウイルス薬としてタミフル (Oseltamivir phosphate, 以下 OP) およびタミフル代謝物 (Oseltamivir carboxylate, 以下 OC)、リレンザ (Zanamivir hydrate, 以下 ZH) を対象物質とし、同時分析を試みた。それぞれの物質の性質を表 1 に示す。

リレンザは両性化合物であり、前処理が困難であることが予想された。

### (2) LC/MS/MSの測定条件

測定は LC/MS/MS を用いた。LC は Waters 製 ACQUITY UPLC を用い、表 2 に示す測定条件にて分離を行った。リレンザが両性の極性物質であることから、極性物質の保持に有利な HILIC カラムを使用した。MS/MS は Waters 製 ACQUITY TQD を用い、表 3 に示す測定条件にて測定した。

### (3) 分析方法

添加回収実験にて同時分析法を検討した。精製水およびガラス繊維ろ紙にてろ過した河川水に OP、OC、ZH をそれぞれ 50 μg 添加し、固相抽出にて濃縮を行った。

固相抽出の方法は固相によってそれぞれ異なるが、Oasis 2×4 メソッド<sup>3)</sup>を基本的な方法とし、メタノールおよび精製水にてコンディショニングを行った後、試料を 1ml/min の流速にて通水した。通水後、精製水およびメタノールにて固相を洗浄し、酸またはアルカリ含有メタノール溶液にて溶出した。溶出液は窒素気流下にて 0.5ml まで濃縮し、メタノールにて 1ml に定容した。

表 1 対象物質の性質

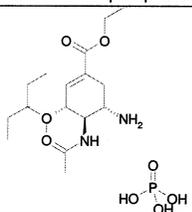
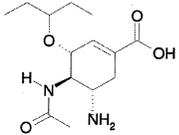
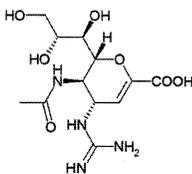
化合物名	Oseltamivir phosphate	Oseltamivir carboxylate	Zanamivir hydrate
構造式			
分子式	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> · H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> · xH <sub>2</sub> O
分子量	410.41	284.35	332.31
解離定数 (pKa)	7.8 <sup>1)</sup>	—	2.4 および 13.0 <sup>2)</sup>
logP	0.42 (pH1)、0.27 (pH7)、1.18 (pH9) <sup>1)</sup>	—	—

表2 LCの測定条件

注入量	1.0μl			
カラム	Waters製 ACQUITY UPLC BEH HILIC 2.1×100mm, 1.7μm			
カラム温度	30°C			
移動相	(A) 10mM 酢酸アンモニウム +5%アセトニトリル水溶液 (B) 10mM 酢酸アンモニウム +95%アセトニトリル水溶液			
移動相条件	Time (min)	Flow Rate (ml/min)	A (%)	B (%)
	0	0.7	0	100
	0.5	0.7	0	100
	4.5	0.7	20	80
	5.5	0.7	50	50

表3 MS/MSの測定条件

イオン化法	ESI positive	
測定方法	MRM	
注入量	1μL	
OP モニターイオン	313.14	> 225.14
OC モニターイオン	285.10	> 197.10
ZH モニターイオン	332.96	> 59.96
検出・定量限界		
検出限界 (ng/ml)	OP	0.75
	OC および ZH	7.5
定量限界 (ng/ml)	OP	2.5
	OC および ZH	25.0

### 3. 実験結果および考察

#### (1) 固相抽出における固相の検討

5種の固相 (Ossis HLB, MCX, WCX, MAX, WAX) について、2%酢酸または5%アンモニア水を加えた精製水 (pH2.8またはpH10.0) 120mlにOP, OC, ZHをそれぞれ50μg添加した添加回収実験を行った。それぞれの回収率を図1に示す。

OPはすべての固相にて保持されており、80%以上回収されていた。一方、OCはWCXおよびWAXには全く保持されていなかった。HLBでは22%と非常に低い回収率となり、MAXでの回収率は74%であった。最も高い保持を示したのがMCXで回収率は93%であった。ZHはMCXのみで保持され、回収率は54%であった。

これよりOP, OC, ZH すべてが保持され回収できた固相はOssis MCXであり、Ossis MCXを前処理における固相に採用した。

#### (2) 試料液pHの検討

対象物質の解離、非解離の状態が固相への保持に大きく影響することから固相抽出前の試料液pHについて検討を行った。2%リン酸 (pH1.8)、2%ギ酸 (pH2.3)、2%酢

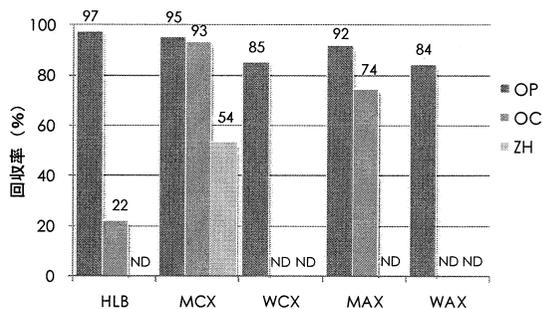


図1 固相別の回収率 (n=3)

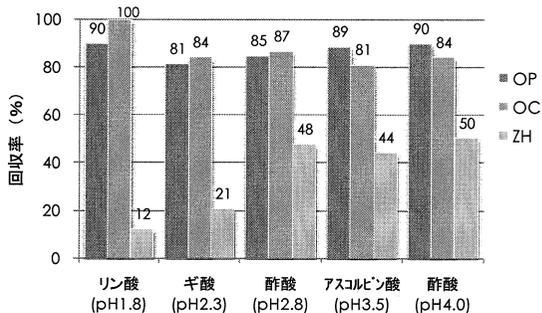


図2 試料液pH別の回収率 (n=2)

酸 (pH2.8)、1g/lアスコルビン酸 (pH3.5) を添加した試料液および酢酸にてpH4に調整した試料液を用いた。添加回収実験の方法は固相にOasis MCXを用い、試料液のpH調整を除き (1) と同様に行った。それぞれの回収率を図2に示す。

最もpHが低い2%リン酸試料液においてOPおよびOCの回収率が高くなった。これはOPおよびOCが非解離の状態であると考えられる。しかし、ZHは両性化合物のため2%リン酸試料液において解離していると考えられ回収率は低く、pHが高くなるにつれて回収率が増加した。これよりZHはイオン交換にて保持されていると考えられ、pH4の酢酸試料液において最も回収率が高く50%であった。

試料液pHの検討にあたっては、河川水のみならず下水処理水試料の分析も考慮し、酸化防止として用いられている1g/lアスコルビン酸によるpH調整を採用することとした。

#### (3) 固相のクリーンアップおよび脱離液の検討

夾雑物質を多く含む環境試料では固相に様々な物質が保持されるため、通水後のクリーンアップおよび脱離液を検討する必要がある。

Oasis MCX はイオン交換と逆相のミックスモードで保持されるため、メタノールによるクリーンアップが可能である。これにより、LC/MS/MS 測定におけるイオン化抑

制物質の除去が期待できる。100%メタノールによるクリーンアップを検討した結果、100%メタノールによる対象物質の溶出は見られなかったため、100%メタノールによるクリーンアップを採用した。

Oasis MCXにおける固相抽出の脱離液はアンモニア水を含むメタノール溶液にて溶出するのが一般的であり、アンモニア水の含有濃度による対象物質の脱離について、25%アンモニア含有アンモニア水を4%、8%、12%、16%、20%添加したメタノール溶液にて検討を行った。それぞれの回収率を図3に示す。

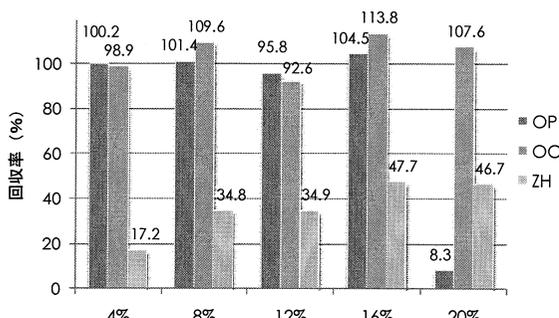


図3 アンモニア水含有率別の回収率 (n=3)

OP はアンモニア水 20%含有メタノールにおいて回収率が著しく低下した。これは OP が逆相に保持されているため脱離液中の水分が増加したことにより固相から脱離できなくなったためであると考えられる。一方 OC はすべての濃度において良好な回収が可能であった。ZH はアンモニア水含有率が高くなるにつれて回収率が増加した。これは ZH の脱離にはある程度の水分が必要であることが考えられる。OP および ZH の回収率よりアンモニア水 16%含有メタノールを最適な脱離液として採用した。

#### (4) 河川水による添加回収実験

Oasis MCX (充てん量 500mg) に最も夾雑物質が含まれていた河川水試料 100ml を通水し、図 4 に示す最適化条件にて添加回収実験を行った。それぞれの回収率、変動係数を表 4 に示す。

OP および OC は回収率、変動係数ともに良好であった。ZH は回収率がやや低いものの安定した回収が可能であった。

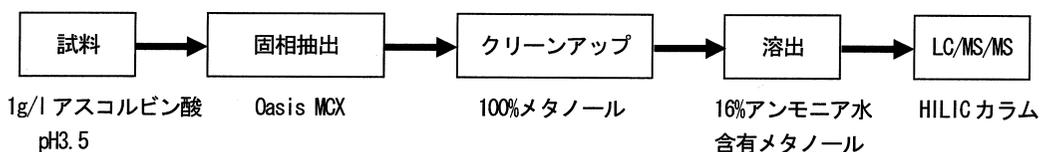


図4 タミフル、タミフル代謝体およびリレンザ同時分析の最適化条件

表 4 最適化条件における添加回収実験 (n=10)

	OP	OC	ZH
回収率 (%)	94.3	103.8	74.0
変動係数 (%)	8.5	4.8	11.4

#### 4. まとめ

抗インフルエンザウイルス薬であるタミフル、タミフル代謝物質およびリレンザを対象とした同時分析法について以下の結果を得た。

固相抽出による濃縮のため各固相を検討した結果、Oasis MCX が最適であった。それ以外の固相からは ZH を回収できなかった。

Oasis MCX を使用する場合における試料液の pH を検討した結果、1g/l アスコルビン酸による pH3.5 試料液において OP、OC、ZH が同時に固相に保持されることがわかった。

対象物質の固相からの脱離はアンモニア水16%含有メタノールが最適であった。また、固相のクリーンアップは100%メタノールにて可能であり、100%メタノールによる対象物質の溶出は見られなかった。

最適化した条件において河川水を用いた添加回収実験を行った結果、OP、OC、ZHともに高い回収率、低い変動係数となり、最適化条件は同時分析法として利用可能であるといえる。

なお、本研究の一部は文部科学省私立大学学術研究高度化推進事業「社会連携推進事業」(平成19年度～平成23年度)の一環として行ったものである。

#### 【参考文献】

- 1) 中外製薬株式会社: 医薬品インタビューフォーム「タミフル」, 2005
- 2) グライソ・スミスクライン株式会社: 医薬品インタビューフォーム「リレンザ」, 2009
- 3) 日本ウォーターズ株式会社: カラム・サンプル前処理、オーダーインフォメーション, p8, 2008