

LC/MS/MSによる環境水中の向精神薬の分析法と公共用水域の実態

ーフェノバルビタール，カルバマゼピンー

吉澤 正，仁平雅子，清水 明，宇野健一

1.はじめに

医薬品を規制する薬事法では環境に対する影響評価が行われておらず，生態への影響が懸念されている。そのため，水環境中の医薬品の実態や環境に与える影響に関心が集まり，調査・研究が行われ始めている¹⁾。

向精神薬のフェノバルビタールは化学物質排出把握管理促進法の第二種指定化学物質に指定されており，昨年度はLC/MSを用いた水質の分析法を開発し，報告した²⁾。分析法検討中に種々の環境水を試みに測定したところ，そのほとんどにおいて対象物質の保持時間(R.T.)にピークが認められ，フェノバルビタールが環境水中に広範に存在している可能性が示唆された。しかし，近接して多くのピークが出現し，他物質の妨害を受ける可能性があるため，さらに分析法を改善した上での実態調査が必要であると考えられた。

改善の方向性としては選択性のより高いLC/MS/MSの使用もしくは前処理でのクリーンアップの検討であると考えたが，ここではLC/MS/MSを用いた検討結果とそれを用いた県内公共用水域の実態調査の結果について報告する。なお，分析方法は基本的に前報のLC/MSを用いた方法を踏襲している。

2.分析方法の検討条件および実態調査

2.1 分析方法の概要

LC/MS/MSを採用するにあたっての問題点はフェノバルビタールのドーナーイオンの強度が弱く，感度が悪いことであった。水試料を大幅に増やすことは出来ないために，最終液量を減らすことが現実的

と考えた。そこで，サロゲートを添加した水試料 0.5 L から固相カートリッジ(Sep-Pak Plus PS-2)により抽出後，メタノールで溶出し，最終液量を 0.2mL として，LC/MS/MS-SRM法で定量する方向で検討した。分析フローを図1に示した。標準品はSIGMA-ALDRICH社製 1000 μ g/mLメタノール溶液を，サロゲートはCambridge Iso社の $^{13}C_3$ 体を用いた。メタノールで適宜希釈したのち，検量線用標準液は50%メタノール水溶液で10 ng/mLから1000 ng/mLの範囲を作成した。試料添加用のサロゲート溶液には50 ng/mLメタノール溶液を作成した。サロゲート以外の試薬・器具等は前報と同じである。

2.2 LC/MS条件

変更可能なMS条件について最適化を行い，デゾルベーション温度及びガス量を昨年度と変更した。機器及び条件は表1のとおりとした。

2.3 従来法(LC/MS法)との比較

これまでに報告されている方法は仁平らと鎌田らの方法³⁾があり，前者がLCの移動相にメタノールを使用したグラディエント分析(以後，LC条件1という)であるのに対し，後者はアセトニトリルを用いたアイソクラティック分析(以後，LC条件2という)である。同時に採水した試料を用い，内標法によるLC/MS/MS法以外に，鎌田らの方法で前処理を行った試料を2種類のLC条件(絶対検量線法，条件1及び条件2)でLC/MS分析を実施し，比較を行った。条件2で測定した場合に異常値が現れたので，試料と試料の間に99%のアセトニトリルでカラムからの洗い出しを行うLC条件(条件3)についても試みた。条件は表2に示した。

2.4 実態調査

調査地点は県内公共用水域の河川 31 地点及び東京湾内湾 4 地点、計 35 地点とした。採水は河川については 2007 年 1 月、海域については 2007 年 3 月に実施した。また、フェノバルビタールと同時測定ができることが報告されている向精神薬であるカルバマゼピン及びフェニトインについても LC/MS/MS 分析を行った⁴⁾。条件を表 3 に示した。

3.結果

3.1 機器の装置検出下限値(IDL), 測定方法の検出下限値(MDL), 定量下限値(MQL)

IDL 及び MDL, MQL は 1.1, 1.2, 3.3ng/L であった⁵⁾。多くの実試料を実施したところ、サロゲートのピーク面積がかなり小さい場合があり、イオン化抑制と考えられる現象が認められ、試料によっては MDL や MQL は 2~3 倍大きくなると推察された。なお、標準液でも感度低下が起き、イオン源の洗浄を行っても改善されなかったため、カラムをエタノールにより一晩洗ったところ

表 1 LC/MS/MS 条件(フェノバルビタール)

[LC/MS条件]
LC : Waters alliance 2695 カラム : waters社製 SunFire C ₁₈ (2.1 mm×150 mm×3µm) 移動相 : A : 水, B:メタノール, C : 100 mM酢酸アンモニウム水溶液 0-0.5min A : B : C=69 : 30 : 1 0.5→5min A : 69 % →29 % linear gradient C:1%一定 5→12min A : 29 % →99 % linear gradient C:1%一定 12→32min A : B=0 : 99 C:1%一定 流量 : 0.2 mL/min : カラム温度 : 40°C : 注入量 : 25µL
MS : Waters Quattro micro API キャピラリー電圧 : 3 kV コーン電圧 : 25 V コリジョン電圧 : 12V デゾルベーションガス流量 : N ₂ 800 L/Hr コーンガス流量 : N ₂ 50 L/Hr ソース温度 : 120°C デゾルベーション温度 : 450°C イオン化法 : ESI(-)-SRM モニターイオン : m/z 230.9>188.0(native), m/z 234.1>190.1(サロゲート)

表 3 LC/MS/MS 条件(カルバマゼピン等)

[LC/MS条件]
LC : Waters alliance 2695 カラム : waters社製 SunFire C ₁₈ (2.1 mm×150 mm×3µm) 移動相 : A : 2mM酢酸アンモニウム水溶液, B:フェニトリン A : B=70 : 30 流量 : 0.2 mL/min : カラム温度 : 40°C : 注入量 : 5µL
MS : Waters Quattro micro API キャピラリー電圧 : 3.5 kV コーン電圧 : 25 V(カルバマゼピン), 25V(フェニトリン) コリジョン電圧 : 20V(カルバマゼピン), 15V(フェニトリン) デゾルベーションガス流量 : N ₂ 600 L/Hr コーンガス流量 : N ₂ 50 L/Hr ソース温度 : 120°C デゾルベーション温度 : 450°C イオン化法 : ESI-SRM モニターイオン : m/z(+) 237.1>194.1(カルバマゼピン) : m/z(+)253>182.1, m/z(-)251.1>101.9(フェニトリン)

回復した。カラムの洗い出し不足であったと考えられ、メタノールでの洗い出しの時間を長く取ることとした。

3.3 LC/MS(絶対検量線法)との比較

図 2 に LC 条件 1~3 で SIM 法により測定した分析結果と LC 条件 1 で SRM 法により測定した分析結果の関係を示した。条件 1 の SIM 法では明らかに 3 地点で異常値(図中の円内)を示していた。これらのうちの 1 地点のクロマトグラムを図 3 に示した。条件 2 ではフェノバルビタールの R.T.の位置に条件 3 ではその R.T.より早く溶出するピークが遅れて出てくる形になっており、ピークの誤認を起こしていた。このような誤認と考えられる場合が条件 2 では低濃度地点であった。

図 4 は異常値を除いた場合の関係を示した。

条件 3 は条件 1 に比べて、誤認による影響がなくなったために低濃度域での一致が良くなっている。しかし、条件 3 では回帰式の傾きが 0.82, 条件 1 では 0.55 といずれも 1 よりも小さな値となった。確認のために、固相抽出後にサロゲートを加えてみたが、試料においてはピーク面積の減少があらわれた。このため、イオン化抑制が起きており、現状ではサロゲートの使用が望ましいと推察された。

3.4 実態調査結果

図 5 にフェノバルビタールとカルバマゼピンの調査結果を示した。いずれも県北西部の都市部を流域に含む印旛沼・手賀沼流入河川で高い濃度を示す傾向にあった。フェノバルビタールの最大値は 97ng/L, カルバマゼピンの最大値は 38ng/L であり、フェノバルビタールで MDL(1.2 ng/L)以下の地点は 35 点中 2 地点であった。また、東京湾内湾の 4 地点でも図のようにいずれも数 ng/L で検出された。このように、人の体外に排泄されたフェノバルビタールやカルバマゼピンは河川を通じて海域(内湾)にまで拡散していることがわかった。フェニトインに関しては 31 地点の測定を開始して、約 20 検体を測定終了後に、急速に感度が低下した。その後、感度の回復が得られていない。

表 2 LC比較条件

方法	条件1	条件2	条件3
条件	0min A : B=70 : 30 0→15min A : 70 % → 5 % linear 15→20min A : B=5 : 95 20→40min A : B=70 : 30	A : B=70 : 30	0→8min A : B : C=68.5 : 30 : 1.5 8→15min A : B=0 : 98.5 C:一定 流量2倍 15→20min A : B=98.5 : 0 C:一定 流量2倍 20→32min A : 98.5% →68.5% linear gradient C:一定 流量2倍
移動相	A:10 mM酢酸アンモニウム水溶液 B:メタノール	A:2mM酢酸アンモニウム水溶液 B:アセトニトリル	A:水 B:アセトニトリル C:100mM酢酸アンモニウム水溶液

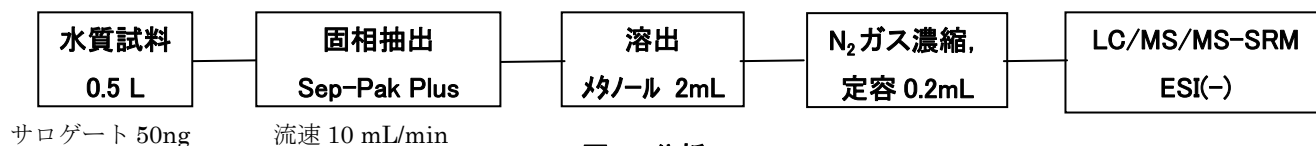


図 1. 分析フロー

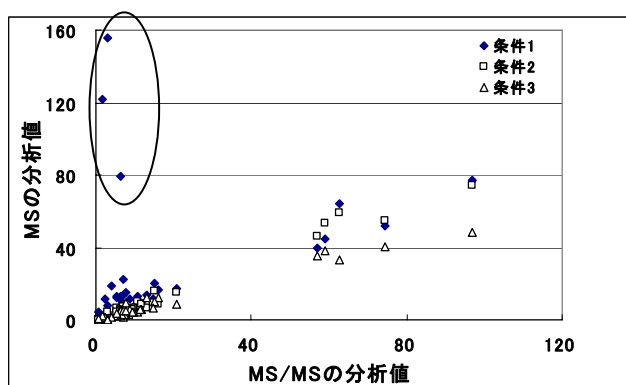


図 2 3条件のMS(絶対検量線法)とMS/MS(内標法)

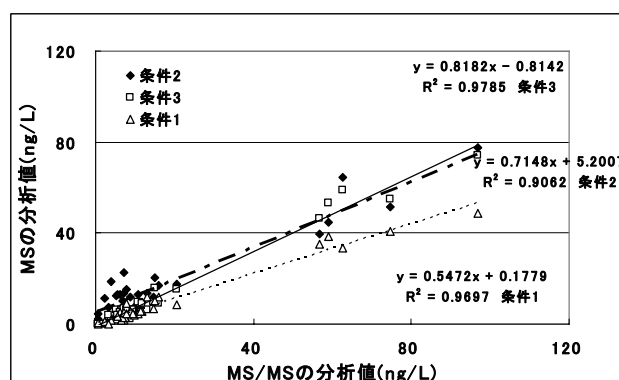
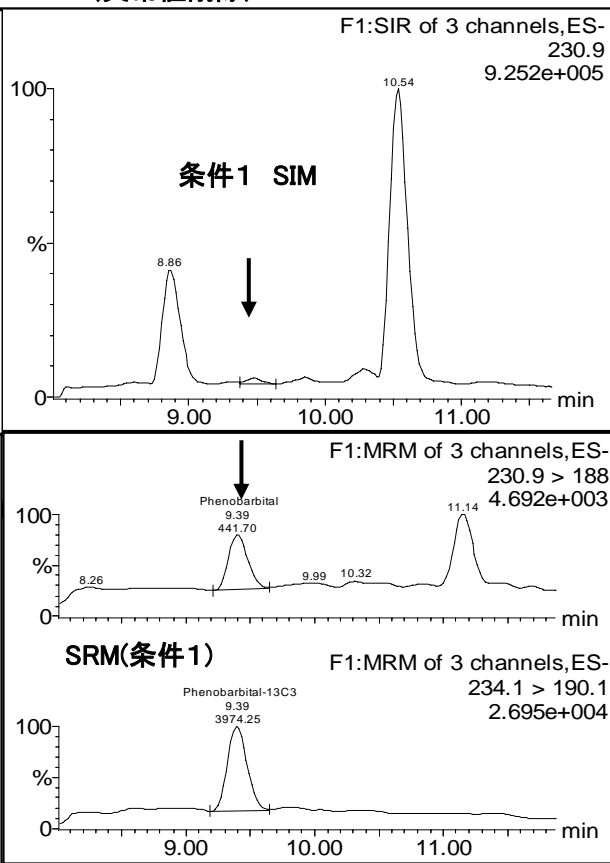
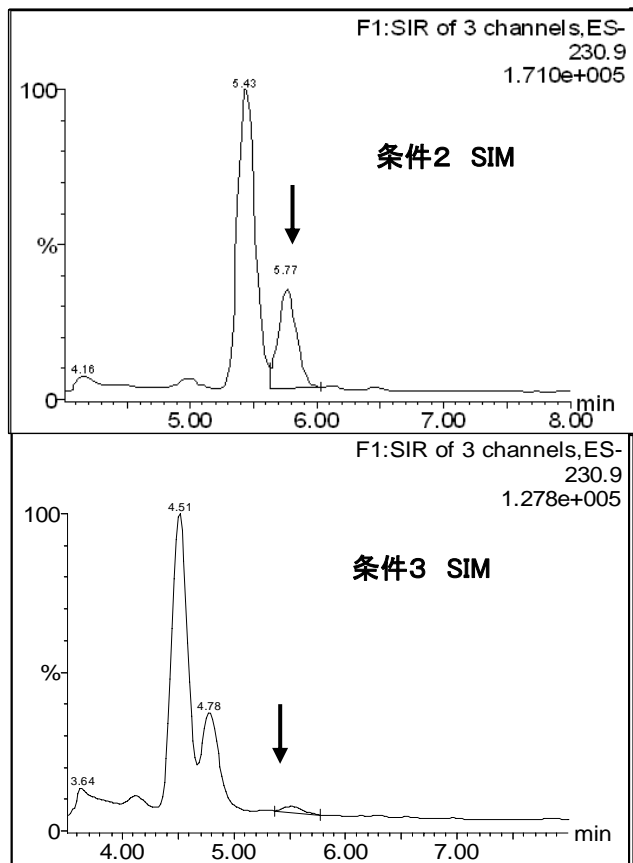


図 4 3条件のMS(絶対検量線法)とMS/MS(内標法) (異常値削除)



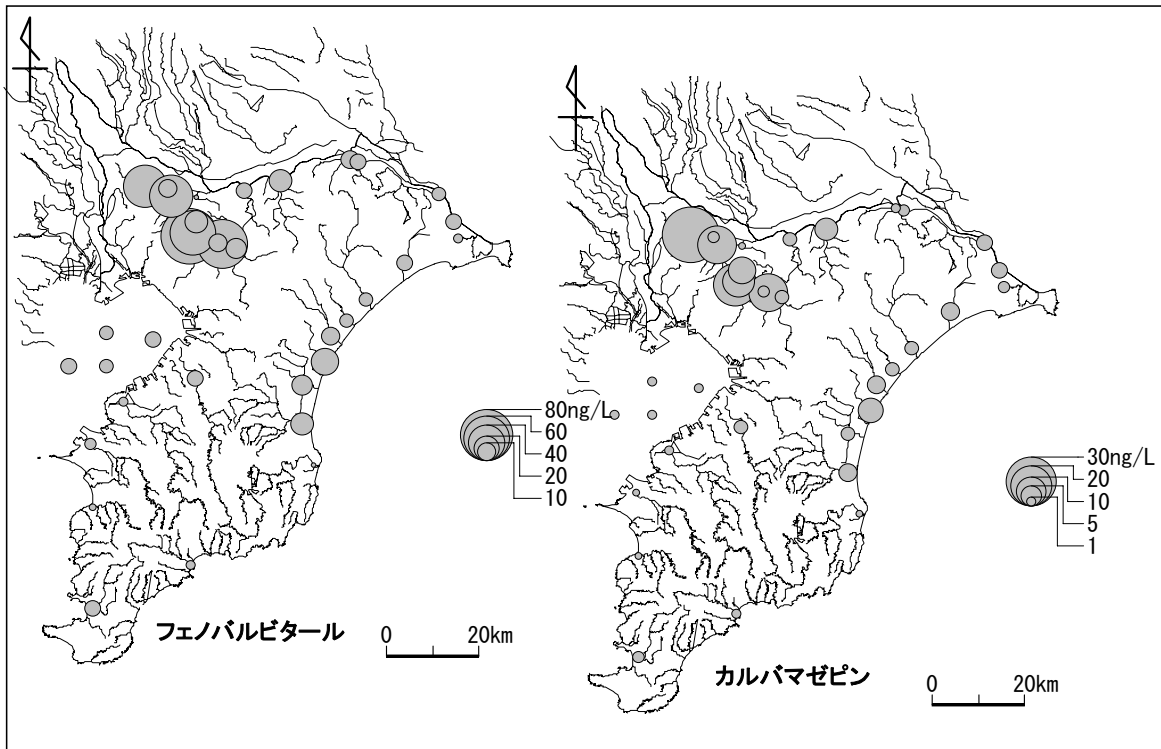


図5 調査結果(左:フェノバルビタール, 右:カルバマゼピン)

4.まとめ

昨年度に開発した LC/MS による分析法よりも選択性の高い LC/MS/MS による分析法を検討した結果、水試料中に数 ng/L レベルで存在するフェノバルビタールの定量が可能となった。フェノバルビタールは県内公共用水域 35 地点の水試料を測定したところ、検出下限値以下の地点は 2 地点しかなく、県内公共用水域では微量ではあるが、広範囲から検出された。また、県北西部の都市部を流域に含む印旛沼・手賀沼流入河川で高い濃度を示す傾向にあった。カルバマゼピンもフェノバルビタールと同様な検出傾向であった。

謝辞

試料採取にあたり協力していただいた(財)千葉県環境財団、(財)千葉県薬剤師会検査センター及び当センター水環境研究室の方々に感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 「水環境中の医薬品類の挙動」、第 9 回水環境制御研究センターシンポジウム(2006)
- 2) 平成 17 年度 化学物質分析法開発調査報告書(平成 18 年 7 月) 環境省環境保健部環境安全課
- 3) 仁平雅子ら: LC/MS を用いた分析法開発(1)ーフェノバルビタールー, 千葉県環境研究センター年報第 5 号, 96-97(2005)
- 4) 鎌田憲光ら: 環境水中の抗てんかん薬の分析, 49-50, 第 40 回日本水環境学会(2006)
- 5) 環境省: 化学物質環境実態調査の手引き(平成 18 年 3 月)