

水環境中の抗インフルエンザウイルス剤の分析法

鈴木 俊也, 小杉 有希, 保坂 三継, 矢口 久美子, 中江 大, 西村 哲治, 小縣 昭夫

Analytical Method for Anti-influenza Virus Drug in Aquatic Environments

Toshinari SUZUKI Yuki KOSUGI, Mitsugu HOSAKA, Kumiko YAGUCHI,
Dai NAKAE, Tetsuji NISHIMURA and Akio OGATA

[研究年報 第 62 号 (2011) 正誤表 Errata]

東京健安研七年報 *Ann. Rep. Tokyo Metr. Inst. Pub. Health*, **62**, 233-236, 2011

水環境中の抗インフルエンザウイルス剤の分析法

Analytical Method for Anti-influenza Virus Drug in Aquatic Environments

page 236

[誤 Error]

Toshinari SUZUKI^a, Yuki KOSUGI^a,

[正 Correct]

Toshinari SUZUKI^a, Yuki KOSUGI^a,

水環境中の抗インフルエンザウイルス剤の分析法

鈴木 俊也^a, 小杉 有希^a, 保坂 三継^a, 矢口 久美子^b, 中江 大^c, 西村 哲治^d, 小縣 昭夫^a

水環境中の抗インフルエンザウイルス剤オセルタミビル (OT) 及びその活性代謝物オセルタミビルカルボキシレート (OC) の存在実態を把握するための分析法について検討した. 水試料中のOT及びOCを酸性下, タンデム型に接続した2種類の固相で抽出し, アセトニトリルで溶出後, 濃縮し液体クロマトグラフ-質量分析計 (LC/MS) またはタンデム型質量分析計で分離定量した. 本法によるOT及びOCの定量下限値はそれぞれ2及び4 ng/L (水試料換算値), OT及びOCの添加回収率はそれぞれ89及び61%であった. 本法は水道水, 水道原水及び河川水等の水試料に適用可能であった. OCを正確に定量するためには, サロゲート法や標準添加法が必要であった.

キーワード: 水環境, オセルタミビル, オセルタミビルカルボキシレート, 固相抽出, LC/MS, 分析法

はじめに

オセルタミビル (タミフル, 以下OTと略す) はインフルエンザの治療やその大流行の防御にとって重要な抗インフルエンザウイルス剤の一つであり^{1,2)}, 特に, 日本では大量に使用されている³⁾. また, 日本を始め世界各国では大流行に備えOTの備蓄を進めている. OTはヒトにおいて経口投与後速やかに主として肝臓で加水分解されて活性体オセルタミビルカルボキシレート (以下OCと略す, Fig. 1) となり, OT及びOCのほとんどは尿中に排泄される⁴⁾. インフルエンザの流行時, 都市部の河川水では下水処理場を介してOCが水環境中に混入することが既に報告されている^{5,6)}. その原因として, OCが下水処理場における沈殿や活性汚泥処理ではほとんど除去されないこと⁷⁾, また, 河川水を用いた分解実験でもOTの半減期は十日以上であること^{8,9)}が考えられている. また, 都市河川水中のOCの検出濃度がノイラミニダーゼ活性50%阻害濃度 (IC50) に近いことから, OT及びOCを含む水を野鳥が飲むことにより, 野鳥体内に存在するインフルエンザウイルスが薬剤耐性を獲得することも懸念されている¹⁰⁾.

東京都においても, インフルエンザの流行時にはOTが

服用されており, 都内河川の流域には多くの野鳥が生息していることから, 河川水中のOT及びOCの存在実態を把握する必要があると考えられる. そこで, 水環境中のOT及びOCを固相抽出により抽出・濃縮後, 液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS/(MS)) で分離定量する方法について検討したので, その結果を報告する.

実験方法

1. 試薬

OT標準溶液 (1000 mg/L) はタミフル製剤 (タミフルカプセル75) 1カプセルの中身を取り出し, 精製水75 mLに溶解して調製した. OC標準溶液 (100 mg/L) はOT標準溶液1 mLに0.1 N水酸化カリウム-エタノール溶液1 mLを加え80°C20分間加熱し, 室温に冷却後, 0.01 N塩酸で10 mLとした. 固相カートリッジはSep-Pak PS-2 plus (以下PS-2と略す, 日本ウォーターズ) 及びOASIS HLB Plus (以下HLBと略す, 日本ウォーターズ) を用いた.

2. 試験溶液の調製

固相カートリッジHLB単独, または2つの固相カートリッジPS-2及びHLBを直列に接続し, 始めにアセトニトリル

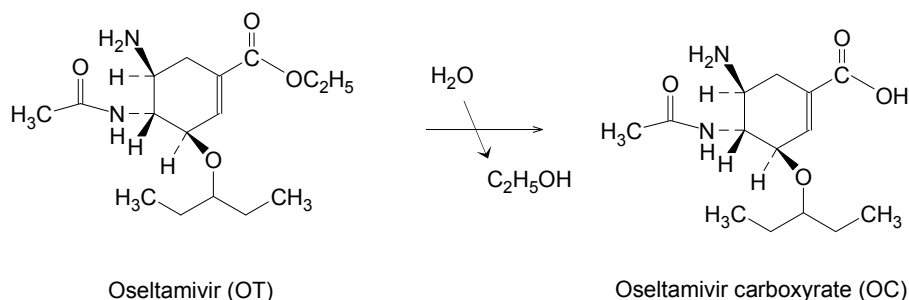


Fig. 1. Major metabolic pathway of oseltamivir in human liver

^a 東京都健康安全研究センター環境保健部環境衛生研究科

169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター精度管理室

^c 東京都健康安全研究センター医薬品部

^d 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部

158-0098 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

10 mL, 精製水5 mLの順でコンディショニングした。固相抽出はつぎのA及びB法により行った。A法: 水試料500 mLをHLBに流速20 mL/minで通水し, 30分間の通気乾燥後, メタノール5 mLで抽出物を溶出させた。B法: 水試料500 mLにギ酸0.5 mLを加えて酸性 (pH約3) にした後, PS-2, HLBの順で流速20 mL/minで通水し, 30分間の通気乾燥後, 通水方向とは逆方向からアセトニトリル5 mLで抽出物を溶出させた。各溶出液を窒素気流下で0.5 mLに濃縮し, 内部標準としてカルバマゼピン-*d*₁₀ (10 mg/Lアセトン溶液) を5 µL加え, これを試験溶液とした。

3. LC/MSの分析条件

LC: 2690 (日本ウォーターズ), 注入量: 10 µL, カラム: XTerra MSC18 (2.1×150 mm, 5 µm, 日本ウォーターズ), カラム温度: 40°C, 移動相: 0.1% ギ酸含有10% アセトニトリル (5分間保持) - 0.1% ギ酸含有90% アセトニトリル (45分, リニアグラジエント), 流速: 0.2 mL/min, MS: ZMD (日本ウォーターズ), キャピラリー電圧: 3 kV, コーン電圧: 10 V, モード: エレクトロスプレーイオン化法ポジティブ (ESI⁺), ソースブロック温度: 120°C, デソルベーション温度: 350°C, モニターイオン: OT *m/z* 313, OC *m/z* 285

4. LC/MS/MSの分析条件

LC: 2695 (日本ウォーターズ), 注入量: 10 µL, カラム: XBridge C18 (2.1×150 mm, 5 µm, 日本ウォーターズ), カラム温度: 40°C, 移動相: 10 mM酢酸アンモニウム30% アセトニトリル (5分間保持) - 10 mM酢酸アンモニウム含有90% アセトニトリル (25分, リニアグラジエント), 流速: 0.2 mL/min, MS: Ultima PT (マイクロマス), キャピラリー電圧: 1 kV, コーン電圧: 40~50 V, コリジョンエネルギー: 10 eV, モード: エレクトロスプレーイオン化法ポジティブ (ESI⁺), ソースブロック温度: 120°C, デソルベーション温度: 400°C, モニターイオン: OT *m/z* 313 > 225及びOC *m/z* 285 > 197

結果及び考察

1. LC/MS/MSの分析条件

逆相系のODSカラムではギ酸-アセトニトリル系または酢酸アンモニウム-アセトニトリル系の移動相を用いたグラジエント分析により, OT及びOCの良好な分離が行えることがわかった。MS (ZMD) の条件について, OT及

Table 1. Recovery of oseltamivir (OT) and oseltamivir carboxyrate (OC) from water

compound	method A		method B	
	recovery (%) average ± SD	CV (%)	recovery (%) average ± SD	CV (%)
OC	< 4	-	61 ± 4	7
OT	85 ± 6	7	89 ± 6	7

water sample: 500mL

fortified concentration: 100 ng/L (n=3)

びOCの感度はエレクトロスプレーイオン化法ではネガティブモードよりもポジティブモードの方が高く, 至適コロン電圧は10 V, 測定質量数はそれぞれ[M+H]⁺の313及び285に設定することとした (Fig. 2)。MS/MS (Ultima PT) の場合には, OT及びOCの至適コロン電圧は40~50 V, 親イオン>娘イオンはそれぞれ313 > 225及び285 > 197であった。検量線の直線性はOT及びOCともに0-100 µg/Lの範囲で0.99以上であった。定量下限値は1000倍濃縮時の水試料換算値でOTが2 ng/L, OCが4 ng/Lであった。OCのノイラミニダーゼに対するIC50は80~230 ng/Lであること³⁾から, 河川水中のOT及びOCを測定するために必要な感度を十分に満たしていると考えられる。

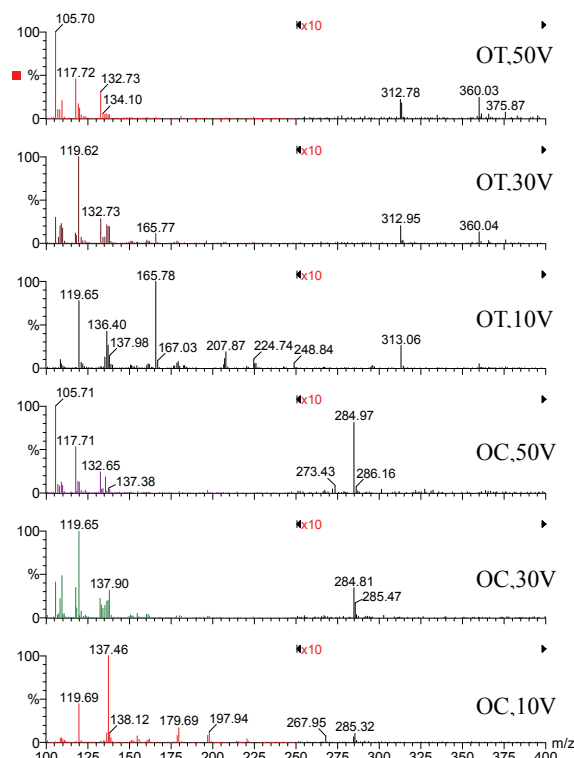


Fig. 2. LC/MS spectra (ESI⁺) of oseltamivir (OT) and oseltamivir carboxyrate (OC) at several collision energies.

2. 固相抽出条件の検討

HLBを用い, 中性下で抽出後, メタノール溶出する方法 (A法) 及びPS-2とHLBをタンデムに接続し, ギ酸酸性下で抽出後, アセトニトリル溶出する方法 (B法) の2法について検討した。なお, A法は, 水試料中のペルフルオロオクタノ酸やペルフルオロオクタンスルホン酸等の有機フッ素化合物を効率良く抽出濃縮できる方法である¹¹⁾。一方, B法は水試料中の医薬品類を効率良く抽出濃縮できる方法である¹²⁾。精製水を用いた場合の添加回収率をTable 1に示す。A法ではOTが85%, OCが4%未満, B法ではOTが89%, OCが61%であった。A法のOCを除き, 変動係数はいずれも10%未満と低く, A法に比べB法の方が分析精度が優れていることがわかった。A法でOCの回収率が低い原因は, 中性条件下ではOCのカルボキシル基が解離しているため

と考えられ、逆相系の固相で抽出するためにはカルボン酸の解離を抑える必要があることが分かった。

河川水試料を分析した場合、妨害ピークは認められなかった (Fig. 3)。また、水道原水や水道水の場合にも同様な結果が得られ、B法は実試料への適用が可能であると考えられる。

しかし、B法によるOCの回収率が61%と低かったことから、定量に際し、標準添加法やサロゲート法などによる補正の必要性が示唆された。Fickら⁷⁾は、OCの重水素体をサロゲートとして用いて定量する方法により、水試料からの回収率91~107%と良好な結果が得られることを報告している。しかし、OCのサロゲートは現在市販されておらず、またメーカーからの提供も困難であることから、実用性に乏しい。したがって、現状では、OC及びOTの標準添加法が望ましいと考えられる。

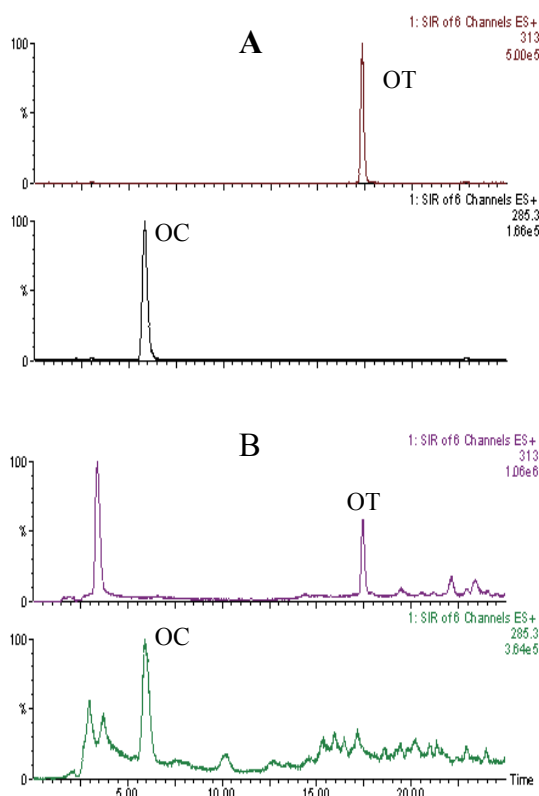


Fig. 3. LC/MS chromatograms of oseltamivir (OT) and oseltamivir carboxyrate (OC) in standard solution and river water extract. A: standard solution 100 µg/L, B: river water extract of concentration factor 1000.

本研究の一部は平成 22 年度厚生労働科学研究費補助金、医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業、「医薬品の環境影響評価ガイドラインに関する研究」の助成を受けて実施された。

文 献

- 1) WHO (2006), Influenza antiviral medicinal products for potential use during a pandemic, *WHO Drug Information*, **19**, 273-285.
- 2) 山下 誠: *ファルマシア*, **47**(8), 713-718, 2011.
- 3) Monto, A.S., McKimm-Breschkin, J.L., Macken, C., *et al.*: *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**(7), 2006, 2395-2402.
- 4) タミフル添付文書, 中外製薬
- 5) Soderstrom, H., Jarhult, J.D., Olsen, B., *et al.*: *PloS ONE*, 2009, **4**(6), e6064
- 6) Ghosh, G., Nakada, N., Yamashita, N., *et al.*: *Environ. Health Perspect.*, **118**(1), 2010, 103-107.
- 7) Fick, J., Lindberg, R.H., Tysklind, M., *et al.*: *PloS ONE*, **10**, 2007, e986.
- 8) Bartels, P. and von Tumpling Jr., W.: *Sci. Total Environ.*, **405**, 215-225, 2008
- 9) Sacca, M.L., Accinelli, C., Fick, J., *et al.*: *Chemosphere*, **75**, 2009, 28-33.
- 10) Singer, A.C., Nunn, M.A., Gould, E.A., *et al.*: *Environ. Health Perspect.*, **115**(1), 2007, 102-106.
- 11) 鈴木俊也, 宇佐美美穂子, 保坂三継, 他: 第17回環境化学討論会講演集, 552-553, 2008.
- 12) 鈴木俊也, 小杉有希, 保坂三継, 他: 河川水中の医薬品の分析法, *東京健安研七 年 報*, **60**, 253-258, 2009.

Analytical Method for Anti-influenza Virus Drug in Aquatic Environments

Toshinari SUZUKI^a, Yuki KOSUGI^a, Mitsugu HOSAKA^a, Kumiko YAGUCHI^b,
Dai NAKAE^c, Tetsuji NISHIMURA^d and Akio OGATA^a

The analytical method for the antiviral drug oseltamivir (OT) and its major active metabolite oseltamivir carboxylate (OC) in the aquatic environment was investigated. OT and OC in the water sample were extracted by tandem solid-phase extraction cartridges and were eluted by acetonitrile. The extract was concentrated and analyzed by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS(/MS)) with reverse-phase octadecylsilyl-silica (ODS) analytical column.

The detection limits and recovery rates of OT and OC were 2 and 4 ng/L, and 89% and 61%, respectively. This method could be applied to analysis of drinking water, raw water for water supply, and river water. As for accurate determination of OC, correction by surrogate or standard addition method was necessary.

Keywords: aquatic environment, oseltamivir, oseltamivir carboxylate, solid-phase extraction, LC/MS, analytical method

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Environmental Health and Toxicology,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan

^b Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Quality Assurance

^c Tokyo Metropolitan Institute of Public Health, Pharmaceutical Sciences

^d National Institute of Health Science, Division of Environmental Chemistry,
1-18-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501 Japan