

高速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PPCPsの分析と水環境中の存在実態

久保田領志[#], 田原麻衣子, 清水久美子, 西村哲治

Determination of Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs) in Environmental Water Samples by LC-MS/MS and Their Occurrence in Aquatic Environment.

Reiji Kubota[#], Maiko Tahara, Kumiko Shimizu, and Tetsuji Nishimura

For the determination of fifteen Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water samples, an analytical method using high performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry was presented in this study. For the extraction of PPCPs from water sample, three different solid phase extraction cartridges (Sep-Pak Plus PS-2, Sep-Pak Plus C18, and Oasis HLB Plus) were tested. For almost all PPCPs except two selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs), good results of recovery were obtained by using Oasis HLB Plus compared with other cartridges. On the other hands, Sep-Pak plus C18 was suitable for extraction of SSRIs, and recovery was more than 90%. Fourteen PPCPs, except chlortetracycline, were detected in all raw sewage water of sewage treatment plant (STP) at high frequency in urban area, Japan. On the other hands, thirteen PPCPs, except fenofibrate and triclosan, were detected in all treated sewage water of STP at high frequency. The highest concentration was observed in bezafibrate and the value was 18.3 $\mu\text{g/L}$. The concentrations of other PPCPs in sewage water were ranged from several tens to several hundreds of ng/L. Because of concentrations of PPCPs in treated sewage water were similar to or higher than those of raw sewage water, further detail study should be focused on removability of PPCPs in STP.

Keywords: pharmaceuticals and personal care products, solid phase extraction, LC-MS/MS, sewage water, river water

1. はじめに

1990年以降の欧米諸国では、医薬品やパーソナルケア製品起源の化学物質 (Pharmaceuticals and Personal Care Products; PPCPs) と総称される、人用の処方薬やOTC医薬品、香水、スキンケア製品、畜水産用の医薬品等由来の化学物質が河川や湖沼等の水環境中から検出され、新たな環境汚染物質として注目されてきた¹⁻³⁾。これらのPPCPsは、製品が廃棄される場合や、ヒトや家畜から排泄されることで、継続的に水環境中へ放出されることが考えられ、直接の排出源として、下水処理場排水、畜水産施設からの排水、病院等の医療機関からの排水等が挙げられる⁴⁾。これらのPPCPsは、広範囲で使用されることや、微量でも生理活性を示す可能性がある

ことから、水圏生態系への影響が懸念される。一方、ヒトへの影響については、PPCPsが存在する水道原水が、浄水工程で十分に除去処理されなかった場合、飲料水を介して摂取する可能性があるため、PPCPsの水環境中での実態把握、影響評価について関心が集まっている。しかしながら、日本国内の水環境中のPPCPsの存在実態に関する知見は限られており^{5,6)}、それら水環境中濃度等の基礎情報の収集、水圏生態系およびヒトへの影響評価、下水および浄水処理工程での挙動および除去性等について解明することが緊急課題となっている。

環境水中のPPCPsの分析法については、環境水中濃度がng/Lレベルと低濃度であるため、固相抽出等の前処理法で対象物質を濃縮し、誘導体化-ガスクロマトグラフィー-質量分析法 (GC-MS)、高速液体クロマトグラフィー-質量分析法 (LC-MS)、高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法 (LC-MS/MS) 等による定量が主に行われているが、前処理法を含めまだ確立

[#] To whom correspondence should be addressed: Reiji Kubota; Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; Tel/Fax.: 03-3700-9346; E-mail: reijik@nihs.go.jp

されていないのが現状である。

そこで本研究では、固相抽出-高速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のPPCPsの一斉分析法の検討を行い、採用した分析法を用いて、水再生センターの流入水および放流水を対象にPPCPsの存在実態を調査した。

2. 試料と方法

2.1 水試料

水再生センターの流入水および放流水は、東京都下水道局のご協力の下、隅田川水系および荒川水系に位置する計8箇所の水再生センターにおいてスポット採水した。水試料は褐色ガラス瓶に満水で採水、冷蔵保存し、できるだけ速やかに固相抽出した。抽出溶液は分析時まで-20℃で保存した。

2.2 実験方法

2.2.1 LC-MS/MSの試料溶液の調整法

試料溶液の調整法については下記のように行った。水試料500mLにギ酸を添加してpH2.8に調整し、ガラス繊維ろ紙(孔径0.7 μ m)でろ過後、メタノール、0.04Mクエン酸(pH4.7)それぞれ2mLでコンディショニングした固相カートリッジに5mL/minの流速で通水した。その後、固相カートリッジに0.04Mクエン酸(pH4.7)、0.1M酢酸カリウムそれぞれ2mLを通水し、通気脱水の後メタノール10mLで溶出した。溶出液は窒素気流下で0.1mLに濃縮し、0.1%ギ酸を0.9mL添加し全量を1mLに定容した。

2.2.2 分析条件

PPCPsの定量には液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法(LC-MS/MS)を用いた。高速液体クロマトグラフはWaters製のWaters Alliance 2695を使用した。分離カラムはWaters製SunFire C18(2.1 \times 150mm, 3.5 μ m)を用いた。カラムオープンの温度は40℃とした。移動相には0.1%ギ酸(v/v)およびメタノールを用い、流速0.2mL/minでメタノール10%から90%の濃度勾配をつけて行った。移動相の濃度勾配の条件をTable 1に示す。タンデム質量分析装置はWaters製のWaters Micromass QuattroMicro APIを使用した。イオン化法は、エレクトロスプレーイオン化法(ESI)のポジティブ、ネガティブイオンモードの、高感度測定に適したMultiple Reaction Monitoring(MRM)モードで測定を行った。

Table 1 Gradient condition of mobile phase

Time (min)	0	5	10	20	25	30
Mobile PhaseA (%)	90	20	10	10	90	90
Mobile PhaseB (%)	10	80	90	90	10	10

A : 0.1% Formic acid (v/v) ; B : MeOH

3. 結果と考察

3.1 分析条件の検討

本研究において、テトラサイクリン系抗生物質のテトラサイクリン、オキシテトラサイクリン、クロロテトラサイクリン、マクロライド系抗生物質のエリスロマイシン、ロキシスロマイシン、高脂質血症用剤のベザフィブラート、フェノフィブラート、高脂質血症用剤の代謝物のクロフィブリック酸、殺菌剤のトリクロサン、解熱鎮痛消炎剤のジクロフェナック、メフェナム酸、エテンザミド、抗てんかん剤のカルバマゼピン、抗うつ剤のパロキセチン、フルボキサミンの計15種のPPCPsを測定対象物質として分析条件を検討した。これらの15種のPPCPsは、生産量が多く広範囲の地域で使用されているもの、海外での検出の報告が多いものを選択した。LC-MS/MSを用いた分析条件の検討において、C18系逆相カラムのWaters社製Atlantis dC18(2.1 \times 150mm, 3 μ m)およびWaters社製SunFire C18(2.1 \times 150mm, 3.5 μ m)の2種を用いて分離状況を検討した。測定溶液として、測定対象のPPCPsをそれぞれ100 μ g/Lになるように混合した標準メタノール溶液を用いてMRMクロマトグラムを比較した結果、Atlantis dC18を用いた場合で、テトラサイクリン系抗生物質3種でテーリングが認められた(Fig. 1)。一方、SunFire C18を

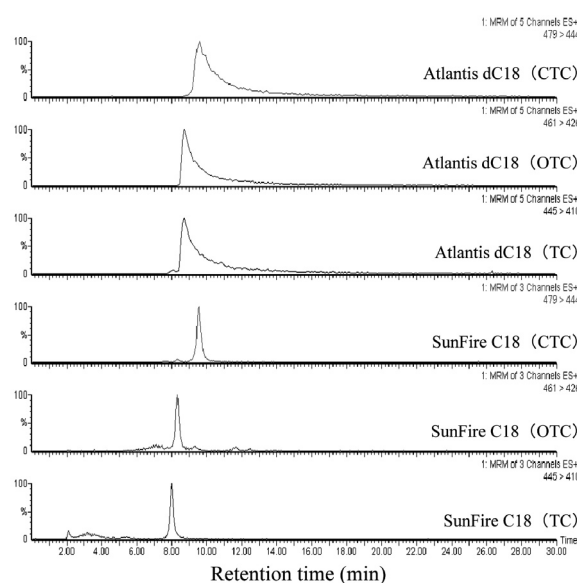


Fig. 1 Comparison of separation of tetracyclines by using two types of separation columns, CTC: chlortetracycline; OTC: oxytetracycline; TC: tetracycline

用いた場合には、Atlantis dC18で認められたテーリングが改善され、その他の物質についてもテーリング等は認められなかった。このことから、HPLC用分離カラムにはSunFire C18を用いることとした。

本研究で対象とする水試料は水再生センター流入水、放流水であり、水試料中の共存物質によりLC-MS/MSのイオン化等の条件が変動する恐れがある。環境水および下水処理場排水中のPPCPsを対象とした研究の中には、水試料中のマトリックスによる影響を補正するため、対象物質の重水素化体を内部標準物質として用いる内部標準法が採用されているものもある^{7,8)}。本研究で対象とするPPCPsについては、カルバマゼピン等の重水素化体が市販されているものと、テトラサイクリン等

の重水素化体が入手できないものが含まれているため、対象とした全てのPPCPs濃度の計算は標準添加法で行うこととした。また、測定中の検出器感度の変化をモニターするための内部標準物質としてフェノプロップを用いた。Table 2に検討の結果採用した測定対象のPPCPsの保持時間、プレカーサイオン、プロダクトイオン、コーン電圧、コリジョンエネルギー、定量下限値(水試料換算値)を示す。これらの条件で15種のPPCPsは30分以内で良好なピーク形状で溶出できた (Fig. 2)。

3.2 固相抽出法の検討

Oasis HLB Plusカートリッジを用いて、固相抽出法の検討を行った。固相カートリッジのコンディショニング

Table 2 Analytical parameters of target PPCPs

Compound	Retention time (min)	Precursorion/Product ion	Cone (V)	Collision energy (eV)	ESI Polarity	LOQ (ng/L)
Bezafibrate	12.47	360.2/273.7	30	20	Negative	3
Fenofibrate	15.74	361.1/233.1	30	20	Positive	0.2
Clofibric acid	12.79	213.0/127.0	20	20	Negative	1
Triclosan	15.24	287.0/ 35.0	20	20	Negative	60
Tetracycline	7.46	445.0/410.0	30	20	Positive	2
Oxytetracycline	7.78	461.0/426.0	30	20	Positive	2
Chlortetracycline	8.41	479.0/444.0	30	20	Positive	5
Erythromycin	9.05	734.6/158.1	30	30	Positive	10
Roxithromycin	9.53	837.7/158.1	30	30	Positive	2
Diclofenac	13.83	295.7/213.8	20	30	Positive	2.5
Mefenamic acid	15.11	242.2/223.9	30	20	Positive	2
Ethenzamide	9.85	165.9/120.7	20	20	Positive	1
Carbamazepine	10.96	236.9/193.9	30	20	Positive	0.2
Paroxetine	9.05	330.2/192.2	30	30	Positive	8
Fluvoxamine	9.37	319.2/200.2	20	20	Positive	6

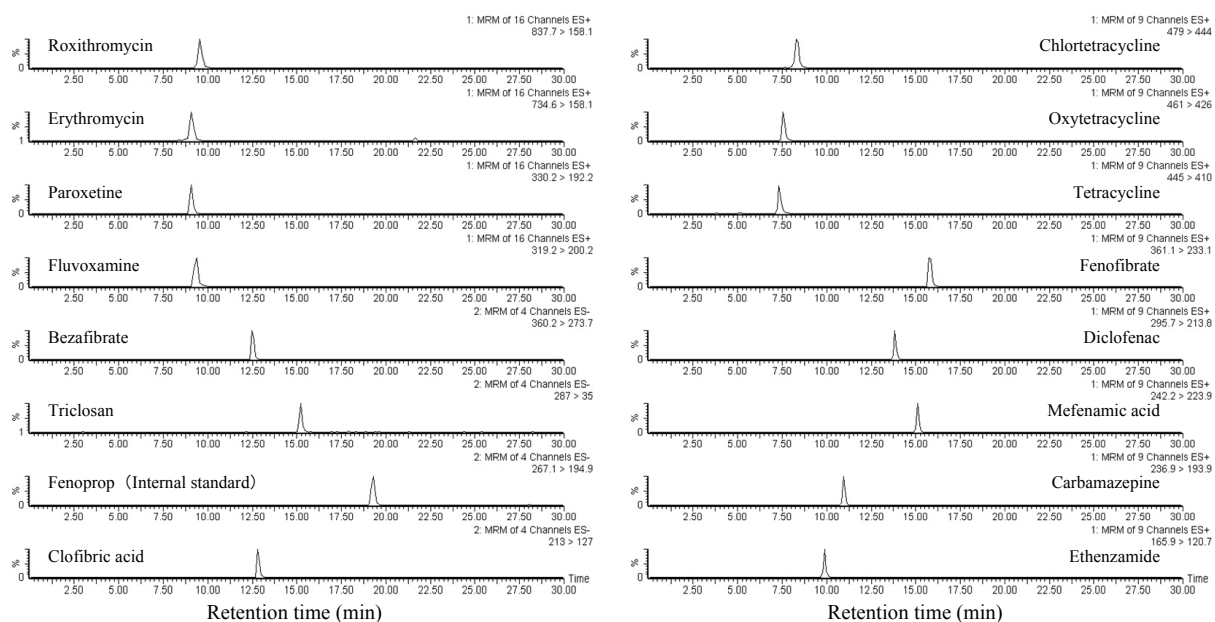


Fig. 2 MRM chromatograms of 15 PPCPs and 1 internal standard

グおよび処理法は、メタノール5mL, 0.1%ギ酸5mLでコンディショニングし、試料通水の後に通気脱水するA法と、メタノール, 0.04Mクエン酸 (pH4.7) それぞれ2mLでコンディショニングし、試料通水の後0.04Mクエン酸 (pH4.7), 0.1M酢酸カリウムそれぞれ2mLを通水し通気脱水するB法で添加回収試験を行い、回収率で比較した。A法ではテトラサイクリン, オキシテトラサイクリン, クロロテトラサイクリンのテトラサイクリン系抗生物質3種の回収率が23~28%であったのに対し, B法では101~108%と, B法を用いた場合に良好な回収率が得られたことから, 固相カートリッジのコンディショニングおよび操作にはB法を採用した。次にB法を用いて3種類の異なる固相カートリッジ (Sep-Pak Plus C18, Oasis HLB Plus, Sep-Pak Plus PS-2) で添加回収試験を行い, それぞれの固相カートリッジによる回収率をテトラサイクリン系抗生物質3種, クロフィブリック酸, トリクロサンについて比較した。その結果, Oasis HLB Plusを用いた場合に最も高い回収率が得られた。さらに, Oasis HLB Plusを用いてその他のPPCPsについても回収率を検討した。10種中8種についてもOasis HLB Plusでの回収率が高く, それぞれの回収率は54~128%であった。一方, パロキセチンおよびフルボキサミンはそれぞれ50.6%, 28.4%とOasis HLB Plusでの回収率は低値を示した (Fig. 3)。

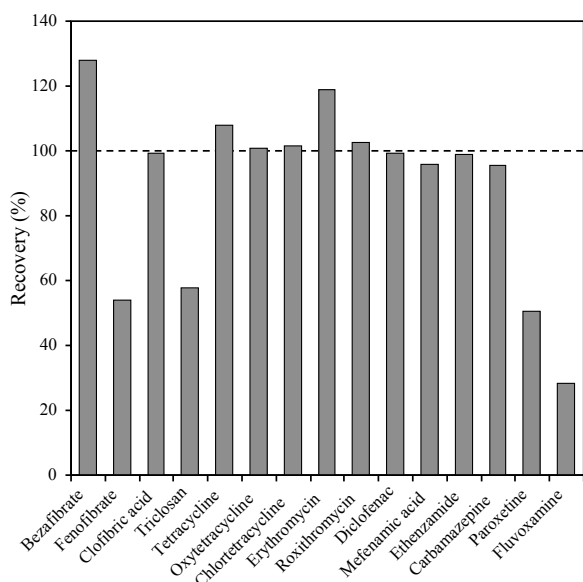


Fig. 3 Recovery of 15 PPCPs by using Oasis HLB Plus

フルボキサミンおよびパロキセチンについては, Oasis HLB Plusを用いた場合の回収率は低く, 十分ではなかったため, 上記のB法の固相カートリッジのコンディショニングおよび処理法で, 固相抽出操作の確認のためにマクロライド系抗生物質2種を加えた計4種のPPCPs

について, 3種の固相カートリッジ, タンデム固相抽出, バックフラッシュ溶出を組み合わせることで回収率を評価した (Fig. 4 A). 通常の溶出法の場合, Sep-Pak Plus PS-2で抽出したSample 2は, Oasis HLB Plusで抽出したSample 1に比べ4物質全てにおいて回収率が低かった。また, Oasis HLB PlusとSep-Pak Plus PS-2を連結させてタンデム固相抽出したSample 3の場合もSample 1より良好な回収率は得られなかった (Fig. 4 A)。一方, Oasis HLB PlusおよびSep-Pak Plus PS-2を用いメタノール10mlで溶出した後のカートリッジからバックフラッシュ溶出した溶出液からは, Oasis HLB Plusではパ

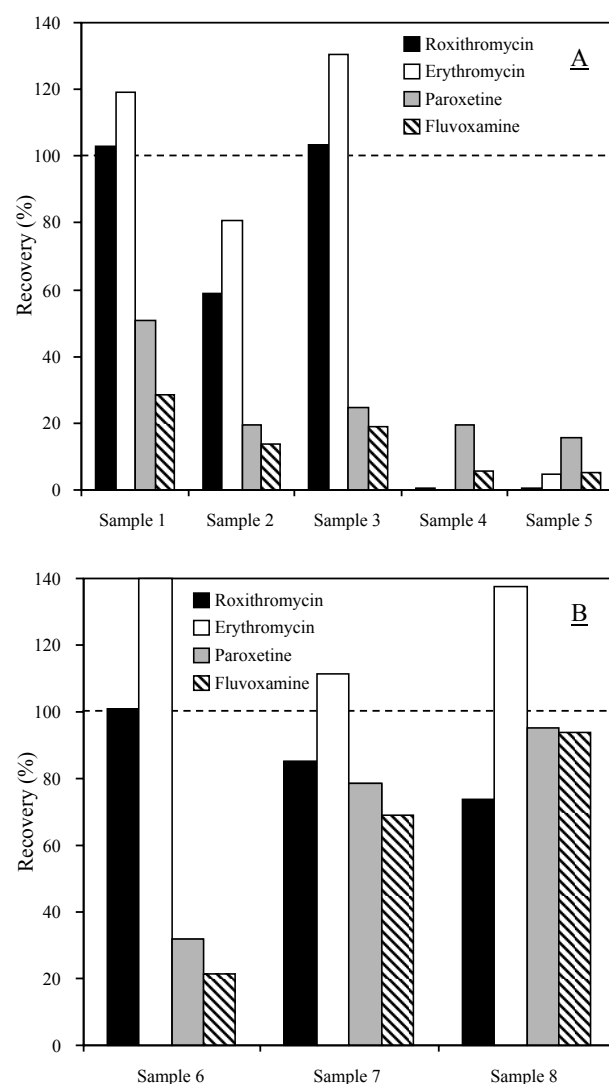


Fig. 4 Comparison of recovery of two macrolides and two SSRIs by several types of solid phase extraction, Sample 1: Oasis (Elution with 10mL); Sample 2: PS-2 (Elution with 10mL); Sample 3: Tandem (Oasis + PS-2) (Elution with 5mL from each column); Sample 4: Oasis (Backflushing of Sample 1 (elution with 5mL)); Sample 5: PS-2 (Backflushing of Sample 2 (elution with 5mL)); Sample 6: Oasis (Elution with 10mL) + Backflushing (Elution with 5mL); Sample 7: PS-2 (Elution with 10mL) + Backflushing (Elution with 5mL); Sample 8: C18 (elution with 10mL)

ロキセチンが19.5%, フルボキサミンが5.8%回収され, Sep-Pak Plus PS-2ではパロキセチンが15.8%, フルボキサミンが5.4%回収され, 固相カートリッジ中に残存していることが予想された (Fig. 4 A, Samples 4および5).

そこで, Oasis HLB Plusで通常溶出液とバックフラッシュ溶出液を加えたSample 6, Sep-Pak Plus C18で通常溶出液とバックフラッシュ溶出液を加えたSample 7, およびSep-Pak Plus C18で固相抽出したSample 8を作製し, 回収率を比較した (Fig. 4 B). 全ての試料において, エリスロマイシンの回収率は100%を大きく超え, 測定に妨害を及ぼす物質が溶出していることが認められた. ロキシスロマイシンの回収率は, Oasis HLB Plusでバックフラッシュ溶出液を加えたSample 6では100.9%であったのに対し, Sep-Pak Plus C18でバックフラッシュ溶出液を加えたSample 7は85.3%, Sep-Pak Plus C18で通常の抽出したSample 8でも73.9%と, それぞれSample 6に比べやや低値を示した. Sample 6ではパロキセチンが31.7%, フルボキサミンが21.6%と回収率の改善は認められなかった (Fig. 4 B). 一方, Sample 7では, フルボキサミンが73.3%, パロキセチンが80.2%, さらにSample 8では両者とも90%以上と良好な回収率が得られた (Fig. 4 B). 以上の結果から, 本研究では, バックフラッシュ溶出液を加えても大きな回収率の改善が認められなかったため, 回収率が良好であった固相カートリッジとして, SSRI系抗うつ剤2種についてはSep-Pak Plus C18を, その他13種についてはOasis HLB Plusを用い, 通常の順方向からの溶出を行うこととした.

3.3 水再生センター試料水中PPCPs検出への適用

前述の検討の結果採用した一斉分析法を用いて水環境中PPCPsの存在実態を調査するため, 平成17年1月に東京都下水道局のご協力の下, 東京都内に位置する隅田川水系, 荒川水系の計8箇所の水再生センターの流入水および放流水をスポット採水し, 11種のPPCPs (テトラサイクリン, オキシテトラサイクリン, クロロテトラサイクリン, ベザフィブラート, フェノフィブラート, クロフィブリック酸, トリクロサン, ジクロフェナック, メフェナム酸, エテンザミド, カルバマゼピン) について調査した. 流入水および放流水において最も検出率が高かったのは高脂質血症用剤のベザフィブラートであり, 流入水, 放流水ともに88% (8検体中7検体で検出)であった. その他のPPCPsについては, 放流水で解熱鎮痛消炎剤のジクロフェナックで88% (8検体中7検体で検出)と高い検出率で, それ以外のPPCPsの検出率も50~75%であり, 東京都内の水再生センターの流入水お

よび放流水中からはPPCPsが常的に検出される可能性が示唆された. 一方, 抗生物質のクロロテトラサイクリンは流入水中で, 高脂質血症用剤のフェノフィブラートおよび殺菌剤のトリクロサンは放流水中では未検出であった. 放流水中で未検出であったフェノフィブラートやトリクロサンは, 水再生センターの処理工程で除去されたことが考えられるが, 放流水のみで検出されたクロロテトラサイクリンは, 下水処理場の処理工程での物理的処理, 生物的処理, 化学的処理の過程で, PPCPsの抱合体等の代謝物に何らかの変化が起こった結果である可能性が考えられた. 流入水に比べ放流水中でPPCPsの濃度が高くなる傾向は, Nakadaらもカルバマゼピン等において同様の傾向を報告しており⁹⁾, 各処理工程での各PPCPsの挙動を詳細に評価するなど, 今後の検討課題である.

隅田川水系および荒川水系の水再生センター流入水および放流水中の11種のPPCPs濃度をFig. 5 AおよびFig. 5 Bに示す. 流入水では, 流入水中のベザフィブラートが本研究の測定対象のPPCPs中で最も高濃度 (18.3 $\mu\text{g/L}$)であった (Fig. 5 A). 流入水中のベザフィブラートの濃度範囲は244ng/Lから2.78 $\mu\text{g/L}$ と他のPPCPsに比べ高く, 家庭および医療施設等からの排水中にベザフィブラートが高濃度に含まれている可能性が示された. 流入水中の他のPPCPsの濃度についてはベザフィブラートに比べ低く, 数十から数百ng/Lのオーダーで検出された. その中でも殺菌剤のトリクロサンは定量下限値未満 (<60ng/L) から805ng/Lと比較的高濃度の試料水が確認され, 解熱鎮痛消炎剤のエテンザミドは定量下限値未満 (<1ng/L) から17.8ng/Lと低値を示した.

放流水中については, 流入水中と同様ベザフィブラートが最も高濃度で, その濃度範囲は128ng/L~5.95 $\mu\text{g/L}$ と流入水中とほぼ同程度であった. 一方, メフェナム酸については, 放流水中の最大値で4.92 $\mu\text{g/L}$ と高濃度であり, 濃度範囲もベザフィブラートと同程度であった. その他のPPCPsについては, 流入水中の濃度に比べ, 同程度もしくは低値を示し, 水再生センターの浄水過程でトリクロサンなどは良好に除去されているが, ジクロフェナックやカルバマゼピン等の除去率については十分なものではないといえる.

隅田川水系と荒川水系における流入水, 放流水中PPCPsの検出パターンを比較した. その結果, 流入水, 放流水において, 両水系ともベザフィブラートが最高値を示し, 濃度範囲も同程度であった. また, その他のPPCPsについても同程度の濃度範囲を示した. 両水系とも都市部を流下しており, また, 各水再生センターの処理区域には人口密集地がある. さらに, 両水系の

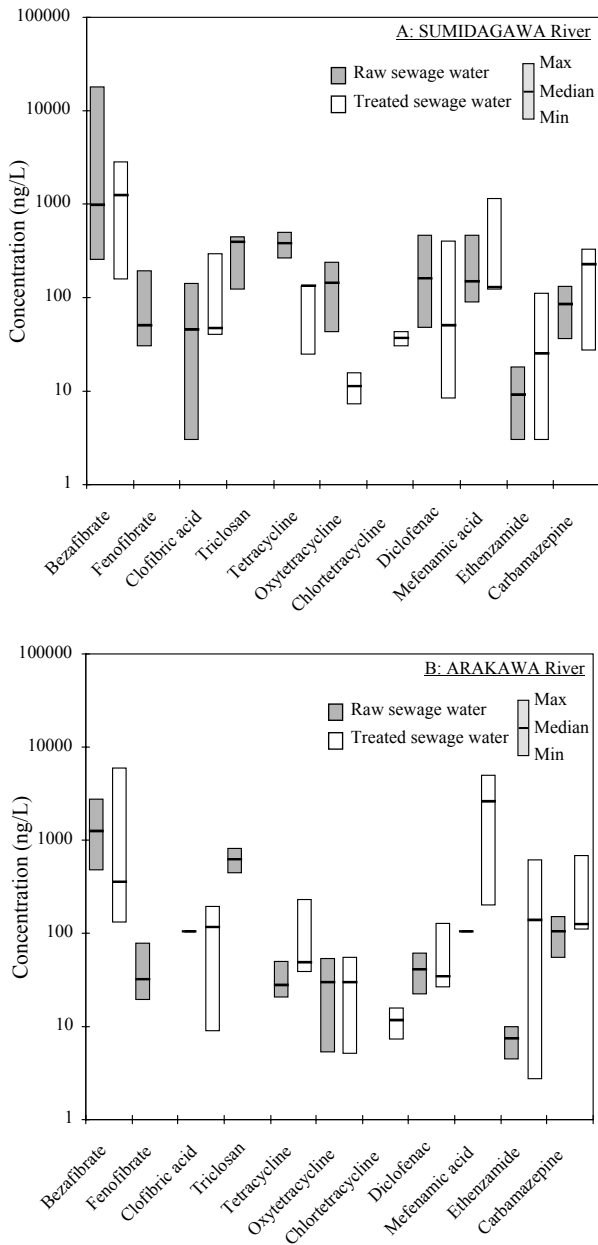


Fig. 5 Concentrations of PPCPs in raw and treated sewage water from STP located in SUMIDAGAWA River and ARAKAWA River basin.

水再生センターの処理工程は基本的に同様であることから、流入水、放流水中のPPCPsの濃度レベルや検出されたPPCPsの組成等の傾向は同様であることが考えられた。今後は、水再生センターでのPPCPsの除去性、処理方法を含め、環境水への負荷を低減することを検討していかなければならない。

4. おわりに

水環境中のPPCPsを評価するために、固相抽出-LC-MS/MSによる環境水中のPPCPsの一斉分析法を確立した。この方法により0.2ng/Lから60ng/Lの定量下限値という高感度分析が可能になり、今後の実態把握に有用な

方法であることが示された。この一斉分析法を用いて、水再生センターの流入水および放流水を対象に実態調査を行った結果、多くのPPCPsはng/Lオーダーと低濃度であったが検出された。一方、ベザフィブラートやメフェナム酸のような一部のPPCPsは放流水中でもμg/Lの濃度レベルと他のPPCPsがng/Lの濃度レベルなのに比べて高濃度で検出された。今後、さらなる詳細な水環境中PPCPsの実態調査、水再生センターや浄水場の各処理工程でのPPCPsの除去性、挙動評価、検出された濃度におけるヒトや水圏生態系の影響評価等を行う必要がある。

参考文献

- 1) Daughton, C.G. and Ternes, T.A.: *Environ. Health Perspect.*, 107 (suppl. 6), 907-938 (1999)
- 2) Kümmerer, K.: *Chemosphere*, 45, 957-969 (2001)
- 3) Kolpin, D.W., Furlong, E. T., Meyer, M.T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L.B., Buxton, H.T.: *Environ. Sci. Technol.*, 36, 1202-1211 (2002)
- 4) U.S. Environmental Protection Agency Homepage (Origins and Fate of PPCPs in the Environment) <http://www.epa.gov/ppcp/pdf/drawing.pdf>
- 5) Seino, A., Furusho, S., Masunaga, S.: *J. Jpn. Soc. Wat. Environ.*, 27 (11), 685-691 (2004)
- 6) Nakada, N., Komori, K., Suzuki, Y., Konishi, C., Houwa, I., Tanaka, H.: *Wat. Sci. Technol.*, 56 (12), 133-140 (2007)
- 7) Ternes, T.A., Bonerz, M., Herrmann, N., Löffler, D., Keller, E., Bagó Lacida, B., Alder, A.C.: *J. Chromatogr. A.*, 1067, 213-223 (2005)
- 8) Boyd, G.R., Reemtsma, H., Grimm, D.A., Mitra, S.: *Sci. Total Environ.*, 311, 135-149 (2003)