

逆相高速液体クロマトグラフィー紫外部検出器を用いた タミフル活性代謝物の測定

Study on the determination of oseltamivir carboxylate by using revers phase high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection

山田 建太¹、塚田 康介¹、杉山 千歳²、小川 浩¹

Kenta Yamada, Kosuke Tsukada, Chitose Sugiyama, Hiroshi Ogawa

1. 背景

医薬品類やパーソナルケア製品（pharmaceuticals and personal care products, PPCPs）の有効成分及び含有成分による水環境汚染と、それに起因する飲料水の汚染が、先進国を中心に 2000 年代から注視されている [1-7]。とりわけ、抗インフルエンザ薬の有効成分として使用されている oseltamivir phosphate（OP）と、その活性代謝物である oseltamivir carboxylate（OC）が污水处理施設の放流水中と、その放流水が流れ込む河川水中から、検出されたことが近年注目された [8-13]。OP と OC の分子構造式を図 1 に示す。

OP をヒトが服用した後、経口投与量の約 60 ～ 80% が活性代謝物である OC へと変換され、薬効を果たした後、尿等に含まれ体外に排泄されることが知られている [14]。排水に含まれた OC は主に下水処理場や浄化槽で処理を受けるが、十分に分解・除去されず、河川水中に放流されていると考えられている [15,16]。我が国においても、下水処理場の放流水と、それが流れ込む河川水中から OP と OC が検出されたことが報告されている [8,9,11-13]。

これまでに河川水中から検出された濃度では、野生の動物が OC に暴露されることによって直接影響を受ける可能性は低いと考えられているが、OC に暴露された水鳥等の体内で、タミフルに対する耐性

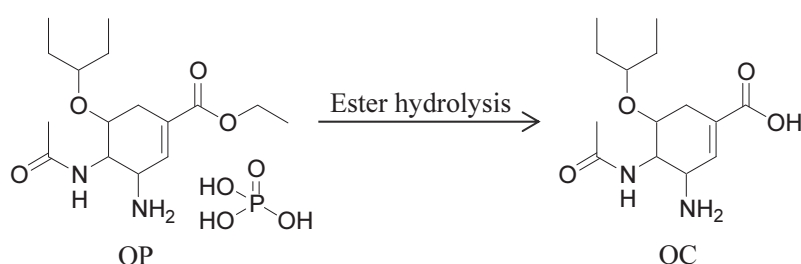


図 1. OP と OC の分子構造

¹ 常葉大学 社会環境学部 社会環境学科

² 常葉大学 健康プロデュース学部 食品栄養学科

を獲得したインフルエンザウィルスの出現が危惧されている。また近年では、PPCPsの有効成分が地下水や水道水中からも、極微量であるが検出されており、それらにヒトが非意図的に暴露される可能性があることが指摘されている [5, 6]。従って、今後も OC については、継続した汚染実態調査が必要であるだけでなく、分解・除去技術に関する知見が必要と言える。

しかしながら、OCによる地域の汚染実態調査や、分解・除去技術の開発に関する情報は、不足しているのが現状である。その要因の一つとして、OCの測定については、液体クロマトグラフィータンデム型質量分析計 (Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS) のような、高額な分析機器が主に用いられていることにある。高額な分析機器の導入が困難な施設では、OCを測定することができず、全国的な汚染実態調査や、分解・除去技術に関する研究開発の進展が遅いと言える。OPとOCは、ともに可視領域に吸収をほとんど有さず、紫外領域の吸光度も低いことが知られている [15,18]。このような吸光度が低く、かつ極性が高い物質については、一般に LC-MS/MS を用いた測定が適していると言える。一方、医薬品であるタミフル製剤中の OP の純度評価や、偽造医薬品の検査に、比較的安価な分析機器である高速液体クロマトグラフィー紫外吸収検出器 (High-performance liquid chromatography-ultraviolet detector, HPLC-UV) を用いた測定方法が近年検討されており、0.05 mg/L 程度まで十分な定量性で測定できることが報告されている [20,21]。OC については、HPLC-UV を用いた測定法を検討した報告はほとんどない。

そこで、本研究では LC-MS/MS よりも安価な分析装置である HPLC-UV を用いて、OC を測定するための方法を検討することを目的とする。さらに、水溶液中の微量な OC を濃縮して測定するために、固相抽出法を用いた前処理方法による添加回収実験を行い、環境試料やモデル分解・除去実験試料中の OC の測定に、本測定法が適応可能であるか検討することも目的とする。

2. 実験方法

2-1. 試薬

OC の標準品 (purity : >95%) は、ChemScene 社から購入したものを用いた。また OC の物性データを表 1 に示す。メタノールは関東化学社製の HPLC 用を用いた。アセトニトリルは、Sigma-Aldrich 社製の HPLC 用を用いた。蒸留水は関東化学社製の HPLC 用を用いた。

表 1. OC の物性データ

IUPAC name	(3R,4R,5S)-4-acetamido-5-amino-3-pentan-3-yloxy-cyclohexene-1-carboxylic acid
CAS No.	187227-45-8
組成式	C ₁₄ H ₂₄ N ₂ O ₄
分子量 ^{a)}	284.35 g/mol
沸点 ^{a)}	508.7°C at 760 mmHg
密度 ^{a)}	1.15g/cm ³
水溶解度 ^{b)}	>500 mg/L
pKa ^{b)}	3.6
Log D (pH 7.4) ^{b)}	-1.5

a) 文献番号 [22]

b) 文献番号 [23]

2-2. 試料の調製

OC 標準溶液は、濃度が 100 mg/L になるよう OC をメタノールに溶解し調製した。この標準溶液を希釈して、OC の濃度が 0.1、0.3、0.5、1.0、1.5、2.0 mg/L の試料を調製し、HPLC-UV で測定した。

2-3. 器具

本研究で用いた全てのガラス器具は、500 °C で 2 時間加熱するか、またはメタノールで洗浄してから実験に使用した。

2-4. 装置

本実験では、OC の可視紫外吸収スペクトルを測定する為に、日立ハイテクノロジーズ社製の可視紫外分光光度計（型式：UH5300）を用いた。メタノールを 20% 含んだアセトニトリル：水（70:30, v/v）の混合溶媒に OC の濃度が 20 mg/L となるよう溶解し、光路長 1 cm の石英セルに溶液を移し、分光光度計で測定した。測定波長領域は 200 から 400 nm とし、スキャン速度は 400 nm/min、データ間隔は 2.0 nm に設定した。

本実験では OC の測定に HPLC（ポンプ：LC-10AD；検出器：SPD-10A VP；レコーダー：C-R6A；島津製作所製，オートサンプラー：851-As；日本分光社製）を用いた。本測定では分離カラムとして、逆相 ODS カラム（inertsil C18, 150 × 4.6 mm I.D., P.S. 5 μm, ジーエルサイエンス社製）を用いた。移動相は、アセトニトリル：水（30:70, v/v）の混合溶媒とし、移動相組成を変えずに測定した。流速は 0.8 ml/min、試料注入量は 10 μL とし、検出波長は 220 nm に設定した。

2-5. 添加回収実験

本実験では、水溶液中の OC の抽出・濃縮に、固相カートリッジ Oasis-Plus HLB（225 mg, Waters 社製）を用いた。また固相カートリッジへの試料の通水と乾燥に、固相抽出用マニホールド（ジーエルサイエンス社製）を用いた。固相カートリッジは、メタノール 5 mL を通液してから使用した。添加回収実験用試料は、OC 濃度が 0.01 mg/L の 100 mL 水溶液とした。この試料は塩酸水溶液（1+100）を用いて、pH を 3 以下に調製した後、マニホールドを用いて、通水速度約 5 mL/min で固相カートリッジに通水した。試料を通水した後、約 30 分間固相カートリッジを乾燥し、メタノール 5 mL で抽出した。抽出試料を窒素気流下で約 0.1 mL まで濃縮し、アセトニトリル：水（30:70, v/v）の混合溶媒で、1 mL に体積を調製したものを HPLC-UV で測定した。回収率は、3 回の繰り返し実験から得られた平均値から算出した。

3. 結果と考察

3-1. OC の可視紫外外部吸収スペクトル

OC を紫外外部検出器で検出するための波長を検討する為に、OC の可視紫外外部の吸収スペクトルを分光光度計で測定した。その結果を、図 2 に示す。これより、OC は 250 nm より長波長領域に吸収をほとんど

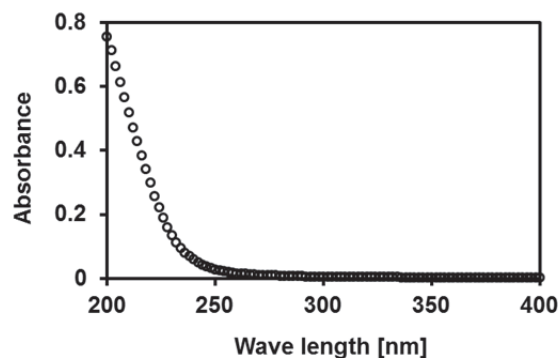


図 2. OC 標準液（濃度 2.0 mg/L）の紫外吸収スペクトル

ど有さず、250 nm から 200 nm の間において波長が短くなると吸光度が高くなることが確認された。この結果から、HPLC-UV で OC を測定する際に、より検出感度を高くするためには、検出器の波長を可能な限り短波長に設定する必要があることから、本研究では HPLC-UV の検出波長は 220 nm に設定し、OC を測定した。

3-2. HPLC-UV による OC 標準液の測定

検出波長を 220 nm に設定した HPLC-UV を用いて、OC 濃度 0.5 mg/L 標準液とブランク試料を測定した。その結果得られたクロマトグラムを図3に示す。これより、OC と考えられるピークは保持時間 2.1 min に検出された。保持時間約 1.3 min に確認されるピークは、ブランク試料からも検出されていることから、完全に除去することが困難な不純物と考えられる。この不純物と考えられるピークは、保持時間 2.1 min のピークと十分分離されていることから、測定値に影響しないと判断した。また、このピークが、OC であることを確認する為に、このピークを分取し、可視紫外吸収スペクトルを測定した。その結果を図4に示す。これより、図2に示した OC 標準液の測定から観測されたスペクトルと一致したことから、HPLC-UV によって分取された保持時間 2.1 min のピークは、OC であることが確認された。

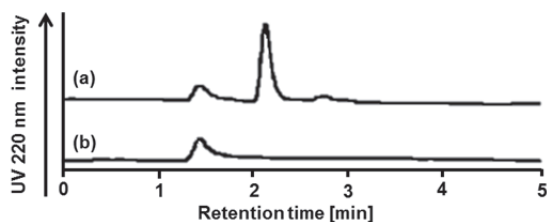


図3. HPLC-UV を用いた測定から得られたクロマトグラム

- (a) OC 濃度 0.5 mg/L 標準液
- (b) ブランク

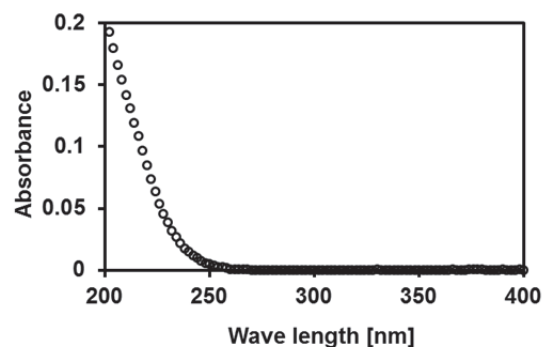


図4. HPLC によって分取した保持時間 2.1 min のピークの紫外吸収スペクトル

次に本測定条件によって、OC 濃度 0.1 ~ 2.0 mg/L の標準液を 6 回繰り返し測定し、得られたデータから検量線を作成した。OC の検量線を図5に示す。これより、検量線の相関係数は 0.999 と高い直線性を示し、かつ 0.1 mg/L 標準液の 6 回の繰り返し測定から算出された変動係数(CV%)も 5% 以下であったことから、ばらつきも小さく検量線作成濃度範囲において、OC の定量に本測定条件を用いることが十分可能と言える。本測定条件による OC の定量性をさらに評価する為に、Eurachem の指針 [21] を参考に、OC の定量下限値 (LOQ : limit of quantification, $10\sigma/\text{slope}$) 及び、検出下限値 (LOD : limit of detection, $3.3\sigma/\text{slope}$) を算出した。その結果、本測定条件における OC の LOQ と LOD はそれぞれ 0.1、0.03 mg/L であった。LC-MS/MS を用いて OC を測定した既報では、OC の LOQ と LOD はそれぞれ 3.6 と 1.2 ng/L であり、本測定と比較すると約 104 倍検出感度が高い [8,9,11]。LC-MS/MS による対象物質の検出方法は、LC によって分離した物質を質量分析部でイオン化して検出するため、OC のような吸光度が低く、極性の高い物質の検出に適していると言える。一方、本測定で用いた

HPLC-UVによる検出感度は、対象物質の吸光度に大きく依存する。OCの紫外部の吸収スペクトルを測定した結果、その吸光度は比較的良かったことから、HPLC-UVにおける検出感度が、LC-MS/MSと比較して低い要因と言える。

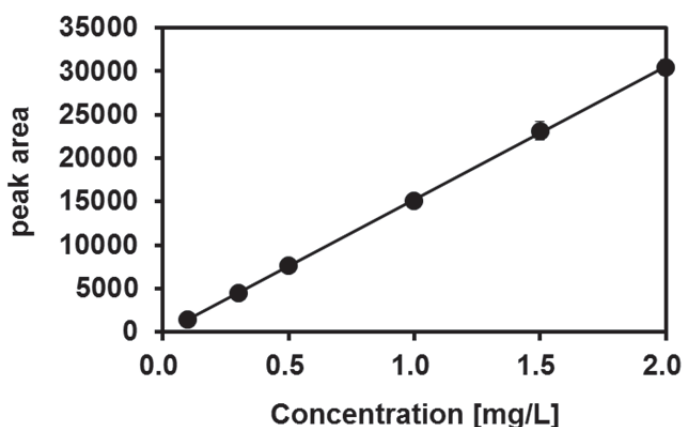


図 5. HPLC-UV 測定より得られた OC の検量線
 濃度範囲：0.1-2.0 mg/L
 傾き：15298
 切片：-52
 相関係数 (r)：0.999
 LOD：0.03 mg/L
 LOQ：0.10 mg/L

3-3. 添加回収実験

水溶液中の OC を抽出・濃縮した後、HPLC-UV で測定し検量線を用いて定量することで、水溶液中からの OC の回収率を評価した。その結果、回収率は $96.1 \pm 8.0\%$ であり、高い回収率が得られ、ばらつきも小さかった。これより、本前処理法と HPLC-UV 測定を用いることで、OC の濃度が 0.01 mg/L の水試料においては、高い定量性で OC を測定・定量することが可能だと考えられる。

Azuma らは、インフルエンザ罹患者が増加した 2011 年 1 月から 4 月の間に、京都市内の下水処理場放流水中と河川水中の OC を測定した結果、最も高濃度で 827 ng/L 検出されたことを報告している [11]。この濃度であれば、本試験法でも固相抽出法によって 1.2 L 程度の水試料を濃縮することで、OC を検出できると考えられる。しかし、下水処理場放流水中には夾雑物も多く含まれていることから、これが妨害ピークとなり OC ピークの検出と同定が困難になることが予想される。また、河川水では、インフルエンザ罹患者が最も多い時期でも、OC の検出濃度は約 288 ng/L であったことが報告されている [11]。この濃度の OC を本測定条件で検出するためには、3.5 L 程度の水試料を濃縮する必要があり、前処理に時間を要する。さらに、インフルエンザ罹患者数の少ない時期の試料、つまり OC の濃度が極微量の試料については、10 L 以上の水試料を濃縮しなければ、ピークを検出することは困難だと考えられることから、本試験法を環境試料中の OC の測定に適用することは難しいと言える。一方、本測定条件では、0.1 mg/L の濃度であれば、十分ピークを検出でき、定量性も確認されていることから、実験室内での OC の分解・除去モデル実験を行う時に、OC の濃度変化を観測することを目的とした利用は十分可能と言える。

4. まとめ

本研究では、近年新たな水環境汚染物質として注視されている、抗インフルエンザ薬の有効成分である OP の活性代謝物である OC を対象とし、比較的安価な分析装置である HPLC-UV を用いた測定条件を検討した。その結果、本測定条件を用いることで、OC を分離しそのピークを検出することができた。本測定条件における OC の LOD と LOQ を算出した結果、それぞれ 0.03、0.1 mg/L であり、十分 OC の濃度を定量することが可能であることが確認された。さらに、固相抽出法による水溶液中の OC の前処理条件を検討した結果、本前処理法における OC の添加回収率は $96.1 \pm 8.0\%$ であり、高い回収率で OC を抽出することができた。

しかし、環境試料中の OC 濃度を LC-MS/MS で定量した文献値を参考に、本測定法を用いた OC の定量が可能であるか検討した結果、環境試料中の微量な OC を定量するためには、HPLC-UV の感度は十分ではなく、本測定条件を用いても OC の検出は困難であると判断された。一方、0.1 mg/L の濃度までであれば十分な定量性が確認されたことから、室内実験モデルにおける OC の分解速度や分解・変換生成物の生成速度評価に、本測定方法は十分適応可能だと考えられる。今後は、活性汚泥法や塩素消毒等の水処理過程における OC の挙動評価に関する研究や、紫外線や過酸化水素などを用いた促進酸化法による OC の物理化学的な分解除去方法の開発に関する研究を進める為に、本測定法を用いることを計画している。

【謝辞】

本研究は平成 25 年度常葉大学共同研究の一環として進められました。

【引用文献】

- [1] Kümmerer K. (2001) "Drugs in the environment: emission of drugs, diagnostic aids and disinfectants into wastewater by hospitals in relation to other sources--a review" *Chemosphere*, Vol. 45, pp. 957-969
- [2] Kolpin DW., Furlong ET., Meyer MT., Thurman EM., Zaugg SD., Barber LB., Buxton HT. (2002) "Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: a national reconnaissance" *Environmental Sciences and Technology*, Vol. 36(6), pp. 1202-1211
- [3] Nakada N., Tanishima T., Shinohara H., Kiri K., Takada H. (2006) "Pharmaceutical chemicals and endocrine disrupters in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment" *Water Research*, Vol. 40, pp. 3297-3303
- [4] Benotti MJ., Trenholm RA., Vanderford BJ., Holady JC., Stanford BD., Snyder SA. (2009) "Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in U.S. drinking water" *Environmental Sciences and Technology*, Vol. 43(3), pp. 597-603
- [5] World Health Organization (2012) "Pharmaceuticals in drinking-water" (http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/pharmaceuticals/en/, 2014 年 9 月 5 日閲覧)
- [6] Kuroda K., Murakami M., Oguma K., Muramatsu Y., Takada H., Takizawa S.. (2012)

- “Assessment of groundwater pollution in Tokyo using PPCPs as sewage markers” *Environmental Sciences and Technology*, Vol. 46(3), pp. 1455-1464
- [7] Liu JL. and Wong MH. (2013) “Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs): a review on environmental contamination in China” *Environment International*, Vol. 59, pp. 208-224
- [8] Ghosh GC., Nakada N., Yamashita N., Tanaka H. “Oseltamivir carboxylate, the active metabolite of oseltamivir phosphate (Tamiflu), detected in sewage discharge and river water in Japan” *Environmental Health Perspective*, Vol. 118, No. 1, pp 103-107
- [9] Ghosh GC., Nakada N., Yamashita N., Tanaka H. (2010) “Occurrence and fate of oseltamivir carboxylate (Tamiflu) and amantadine in sewage treatment plants” *Chemosphere*, Vol. 81(1), pp. 13-7
- [10] Leknes H., Sturtzel IE., Dye C. (2012) “Environmental release of oseltamivir from a Norwegian sewage treatment plant during the 2009 influenza A (H1N1) pandemic” *Science of The Total Environment*, Vol. 414, pp. 632-638
- [11] Azuma T., Nakada N., Yamashita N., Tanaka H. (2012) “Synchronous dynamics of observed and predicted values of anti-influenza drugs in environmental waters during a seasonal influenza outbreak” *Environmental Sciences and Technology*, Vol. 46(23), pp. 12873-12881
- [12] 上村 仁, 仲野 富美, 近内 美乃里, 三宅 裕子, 長谷川 一夫, (2010) “タミフルの相模川水系河川水中における分布” *環境化学*, Vol. 20(3), pp. 269-272
- [13] 小原浩史, 宗かよこ, 平野真悟, 中牟田啓子 (2011) “福岡市内河川におけるタミフルおよびその代謝物の実態調査” 平成 23 年度福岡市保健環境研究所報, Vol. 37, pp. 41-44
- [14] He G, Massarella J, Ward P. (1999) “Clinical pharmacokinetics of the prodrug oseltamivir and its active metabolite Ro 64-0802.” *Clinical Pharmacokinetics*, Vol. 37(6), pp. 471-484
- [15] Fick J, Lindberg RH, Tysklind M, Haemig PD, Waldenström J, Wallensten A. (2007) “Antiviral oseltamivir is not removed or degraded in normal sewage water treatment: implications for development of resistance by influenza A virus” *PLoS ONE*, Vol. 2(10), e986
- [16] Okuda T., Kobayashi Y., Nagao R., Yamashita N., Tanaka H., Tanaka S., Fujii S., Konishi C. and Houwa I. (2008) “Removal efficiency of 66 pharmaceuticals during wastewater treatment process in Japan” *Water Science & Technology*, Vol. 57(1), pp. 65-71
- [17] Bartels P. and von Tümpling W Jr. (2008) “The environmental fate of the antiviral drug oseltamivir carboxylate in different waters” *Science of The Total Environment*, Vol. 405, pp. 215-225
- [18] Gonçalves C, Pérez S, Osorio V, Petrovic M, Alpendurada MF, Barceló D. (2011) “Photofate of oseltamivir (Tamiflu) and oseltamivir carboxylate under natural and simulated solar irradiation: kinetics, identification of the transformation products, and environmental occurrence” *Environmental Science and Technology*, Vol. 45(10), pp. 4307-4314
- [19] Malipatil S.M. Jahan Kishwar, Patil S.K. (2011) Development and validation of RP-HPLC method for the determination of oseltamivir phosphate in bulk drug and in dose, *Indo-Global Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol.1(1), pp. 57-62
- [20] Agim A., Jasmina S., Katerina S., Zorica AS. (2012) “ A simple isocratic RP-HPLC method for

quality control of oseltamivir capsules” *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, Vol. 31(2), pp. 205-215

- [21] Ellison SLR. and Williams A. (2012) “Eurachem/CITAC guide quantifying uncertainty in analytical measurement” Third Edition, EURACHEM/CITAC Measurement Uncertainty Working Group (http://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/QUAM2012_P1.pdf, 2014年9月5日閲覧)
- [22] ChemNet (<http://www.chemnet.com/cas/en/187227-45-8/Oseltamivir-Acid.html>, 2014年9月5日閲覧)
- [23] Straub JO. (2009) “An environmental risk assessment for oseltamivir (Tamiflu) for sewage works and surface waters under seasonal-influenza- and pandemic-use conditions” *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 72, pp. 1625-1634