

岡山県環境保健センター

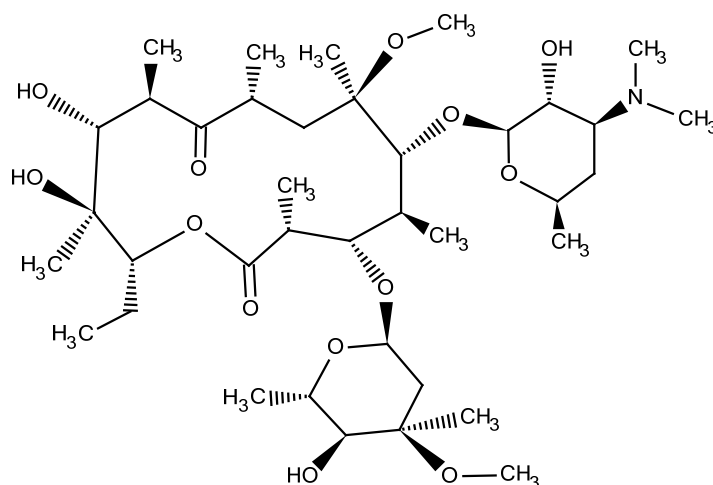
[対象媒体：水質]

クラリスロマイシン

Clarithromycin

IUPAC 名：(3*R*,4*S*,5*S*,6*R*,7*R*,9*R*,11*S*,12*R*,13*S*,14*S*)-6-{[(2*S*,3*R*,4*S*,6*R*)-4-(dimethylamino)-3-hydroxy-6-methyloxan-2-yl]oxy}-14-ethyl-12,13-dihydroxy-4-{[(2*R*,4*S*,5*S*,6*S*)-5-hydroxy-4-methoxy-4,6-dimethyloxan-2-yl]oxy}-7-methoxy-3,5,7,9,11,13-hexamethyl-1-oxacyclotetradecane-2,10-dione

【対象物質の構造】



CAS 番号：81103-11-9

分子式：C₃₈H₆₉NO₁₃

同時分析：オレアンドマイシン、エリスロマイシン A、
エリスロマイシン B、アジスロマイシン、ロキシスロマイシン、
ロイコマイシン A5、ジョサマイシン、チルミコシン、タイロシン、
リンコマイシン、クリンダマイシン、タクロリムス

**Oleandomycin, Erythromycin A, Erythromycin B, Azithromycin,
Roxithromycin, Leucomycin A5, Josamycin, Tilmicosin,
Tylosin, Lincomycin, Clindamycin, Tacrolimus**

【物理化学的性状】（クラリスロマイシン）

〔分子量（平均分子量）〕	747.95
〔分子量（モノイソトピック質量）〕	747.4769
〔融点〕	220-227°C ¹⁾
〔密度〕	1.18 g/cm ³ ²⁾
〔蒸気圧〕	5.06×10 ⁻³⁰ mmHg (25°C) ²⁾
〔溶解性〕	水：0.33 mg/L ³⁾
〔log P _{ow} 〕	3.16 ¹⁾
〔pKa〕	8.48 ⁴⁾

【毒性、用途】（クラリスロマイシン）

〔実験動物に対する急性毒性情報〕

ラット（経口）LD ₅₀	： 1270 mg/kg ⁵⁾
マウス（経口）LD ₅₀	： 1230 mg/kg ⁵⁾
マウス（静脈内注射）LD ₅₀	： 173 mg/kg ⁵⁾
ラット（腹腔内注射）LD ₅₀	： 669 mg/kg ⁵⁾
マウス（腹腔内注射）LD ₅₀	： 850 mg/kg ⁵⁾

〔用途〕

マクロライド系抗生剤 ⁶⁾

- 1) 第十六改正日本薬局方
- 2) Shannxi King Stone Enterprise Company Limited, Product Detail
- 3) Drug Bank
- 4) 医薬品インタビューフォーム ランサップ®400 ランサップ®800
- 5) 和光純薬工業 製品安全データシート (MSDS)
- 6) KEGG DRUG

【同時分析可能な物質の物理化学的性状】

物質名	分子式	CAS 番号	分子量	モライツトビツク質量
オレアンドマイシン	C ₃₅ H ₆₁ NO ₁₂	3922-90-5	687.86	687.4194
エリスロマイシン A	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	114-07-8	733.93	733.4612
エリスロマイシン B	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₂	527-75-3	717.93	717.4663
アジスロマイシン	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	83905-01-5	749.00	748.5085
ロキシスロマイシン	C ₄₁ H ₇₆ N ₂ O ₁₅	80214-83-1	837.05	836.5246
ロイコマイシン A5	C ₃₉ H ₆₅ NO ₁₄	18361-45-0	771.93	771.4405
ジョサマイシン	C ₄₂ H ₆₉ NO ₁₅	16846-24-5	827.99	827.4667
チルミコシン	C ₄₆ H ₈₀ N ₂ O ₁₃	108050-54-0	869.13	868.5660
タイロシン	C ₄₆ H ₇₇ NO ₁₇	1401-69-0	916.10	915.5192
リンコマイシン	C ₁₈ H ₃₄ N ₂ O ₆ S	154-21-2	406.54	406.2138
クリンダマイシン	C ₁₈ H ₃₃ ClN ₂ O ₅ S	18323-44-9	424.98	424.1799
タクロリムス	C ₄₄ H ₆₉ NO ₁₂	104987-11-3	804.02	803.4820

§1 分析法

(1) 分析法の概要

水質試料を固相カートリッジ (HLB) に通水し捕集する。メタノールで溶出し、窒素気流下で濃縮・定容後、LC/MS/MS-SRM で定量する。

【同時分析可能な物質の物理化学的性状】に示すオレアンドマイシン等 12 物質（以下「同時分析物質」という）を同時分析可能である。

(2) 試薬・器具

【試薬】

クラリスロマイシン標準品	：和光純薬工業製 生化学用 純度 95.0%
オレアンドマイシンりん酸塩標準液	：Dr.Ehrenstorfer 100 ng/μL（りん酸塩として）純度 99.9%
エリスロマイシン A 標準品	：和光純薬工業製 HPLC 用 純度 98.0%
エリスロマイシン B 標準品	：United States Pharmacopeial Convention 製 純度 99%
アジスロマイシン二水和物標準品	：Dr.Ehrenstorfer 製 純度 97.0%
ロキシスロマイシン標準品	：Dr.Ehrenstorfer 製 純度 97.0%

ロイコマイシン A5 標準品	: 和光純薬工業製 HPLC用 純度90.0%
ジョサマイシン標準液	: Dr.Ehrenstorfer 製 10 ng/μL 純度 99.9%
チルミコシン標準品 (異性体混合物)	: 和光純薬工業製 HPLC 用 純度 98.0%
タイロシン標準品	: 和光純薬工業製 HPLC 用 純度 97.0%
リンコマイシン塩酸塩一水和物標準品	: 和光純薬工業製 HPLC 用 純度 98.0%
クリンダマイシン塩酸塩標準品	: Dr.Ehrenstorfer 製 純度 98.0%
タクロリムス標準品	: LKT Laboratories 製 純度 96.0%
アセトニトリル、メタノール	: LC/MS 用 和光純薬工業製
精製水	: ミリポア製 Milli-Q Gradientにより調製
固相カートリッジ	: Waters 製 Oasis HLB Plus LP (225 mg)
1mol/L ギ酸アンモニウム溶液	: 和光純薬工業製 HPLC 用

【標準液の調製】

〔標準原液〕

クラリスロマイシン標準品10.0 mgを正確に量り取り、メタノール10.0 mLに溶解し、1000 mg/Lの標準原液を作成する。

〔検量線用標準液〕

標準原液をメタノール/ 精製水(1:1) で順次希釈し、0.100～200 ng/mLの検量線用混合標準液を作成する。

【器具】

試料採取瓶 (1 L、細口瓶)、スピッツ型共栓付試験管 (10 mL)、メスシリンダー、三角フラスコ、パスツールピペット、コンセントレーター、ガラス注射筒、0.45 μm フィルター (親水性、PTFE、13 mm) (Millipore 製)

使用するガラス器具はアセトンで洗浄し、乾燥して用いる。

(3) 分析法

【試料の採取及び保存】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成21年3月)に従う。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料100 mLを固相カートリッジ (Oasis HLB plus) (注1) に10 mL/minの速さで通水し、捕集する。固相カートリッジを精製水15 mLで洗浄後、注射筒で空気を5 mL×3回通気して固相中の水分を除去する。これをメタノール5 mLで溶出し、40℃以下の窒素気流下で約0.2 mLまで濃縮し、メタノール/ 精製水 (1:1)

で1 mLに定容し、0.45 µmフィルターでろ過を行い、試験液とする。

【空試験液の調製】

試料と同じ量の精製水を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従った操作をして得た試験液を空試験液とする。

【測定】

〔LC/MS 測定条件〕（注 2）

LC/MS 機器 : Waters Alliance 2695/ Quattro micro API

LC

LC 機種 : Waters Alliance 2695

カラム : Waters 製 Atlantis T3 2.1 mm × 150 mm, 3 µm

移動相（注 3）（注 4） : A:0.1%ギ酸/10 mmol/L ギ酸アンモニウム水溶液 (99:1)
B:0.1%ギ酸-アセトリル溶液/10 mmol/L ギ酸アンモニウム-アセトリル溶液(99:1)

0～1 min A:97→85 B:3→15 linear gradient

1～10 min A:85→77 B:15→23 linear gradient

10～21 min A:77→25 B:23→75 linear gradient

21～22 min A:25→0 B:75→100 linear gradient

22～35 min A:B=0:100

35～35.1 min A: 0→97 B:100→3 linear gradient

35.1～48 min A:B=97:3

カラム流量 : 0.2 mL/min

カラム温度 : 40°C

試料注入量 : 5 µL

MS

MS 機種 : Waters Quattro micro API

キャピラリー電圧 : 2.5 kV

ソース温度 : 100°C

デゾルベーション温度 : 450°C

コーンガス量 : 60 L/Hr

デゾルベーション流量 : 500 L/Hr

イオン化法 : ESI-Positive

測定モード : SRM

コーン電圧、モニターイオン及びコリジョン電圧：次表参照

〔コーン電圧、モニターイオン及びコリジョン電圧〕（注 5）

物質名	保持時間 (min)	コーン電圧 (V)	モニターイオン（コリジョン電圧）			
			定量		定性	
クラリスロマイシン	20.87	26	748.48>158.0	(27eV)	748.48>116.0	(40eV)
					748.48>590.4	(20eV)
オレアンドマイシン	18.99	18	688.43>158.1	(24eV)	688.43>544.4	(16eV)
エリスロマイシン A	19.48	30	734.47>158.1	(24eV)	734.47>576.3	(21eV)
エリスロマイシン B	20.28	20	718.47>158.1	(27eV)	718.47>560.3	(22eV)
アジスロマイシン	16.14	35	749.52>158.1	(30eV)	749.52>591.3	(25eV)
ロキシスロマイシン	21.01	30	837.53>158.1	(30eV)	837.53>679.4	(25eV)
ロイコマイシン A5	20.48	45	772.45>174.1	(32eV)	772.45>558.1	(25eV)
ジョサマイシン	21.50	35	828.47>174.1	(30eV)	828.47>600.3	(30eV)
チルミコシン	18.16	50	869.57>174.1	(40eV)	869.57>696.5	(40eV)
タイロシン	19.91	50	916.53>174.1	(42eV)	916.53>772.6	(10eV)
リンコマイシン	9.09	32	407.22>126.1	(27eV)	407.22>359.2	(22eV)
クリンダマイシン	17.20	28	425.19>126.1	(20eV)	425.19>377.1	(18eV)
タクロリムス	28.89	28	821.52>768.6	(20eV)	821.52>576.2	(22eV)

（注）タクロリムスは、 $[M+NH_4]^+$

〔検量線〕

検量線用標準液 5.00 μ LをLC/MS/MSに注入して分析する。得られた対象物質の濃度とピーク面積から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液5.00 μ LをLC/MS/MSに注入する。検量線を用いて、得られたピーク面積より試験液中の濃度を求める。

〔濃度の算出〕

水質試料中の濃度(ng/L) は次式により算出する。

$$\text{水質試料中の濃度(ng/L)} = \text{検出濃度(ng/mL)} \times \text{最終液量(mL)} / \text{試料量(L)}$$

〔装置検出下限(IDL)〕

本分析に用いたLC/MSのIDLを下表に示す（注6）。

表1 IDL算出の結果

物質名	IDL ($\mu\text{g/L}$)	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 ($\mu\text{g/L}$)
クラリスロマイシン	0.056	100	1.00	0.00056

〔測定方法の検出下限(MDL)及び定量下限(MQL)〕

本測定方法におけるMDL及びMQLを下表に示す（注7）。

表2 MDL及びMQLの算出結果

物質名	試料量 (mL)	最終液量 (mL)	MDL ($\mu\text{g/L}$)	MQL ($\mu\text{g/L}$)
クラリスロマイシン	100	1.00	0.00080	0.0021

注解

- (注1) 固相カートリッジは、メタノール10 mL、精製水20 mLでコンディショニングしたものを使用する。
- (注2) LC/MSの条件は、本測定に使用した機種（Waters Alliance2695+Quattro micro API）固有のものである。
- (注3) タクロリムスのモニターイオン（プレカーサーイオン）が $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$ であるため移動相にアンモニウムイオンを添加している。タクロリムスを測定しない場合は、A:0.1%ギ酸、B:0.1%ギ酸アセトニトリルで良い。
- (注4) 移動相の初期条件をA:B=97:3としているのは、同時に開発したサルファ剤のうち親水性が高い物質を保持するためであり、クラリスロマイシンのみ又はマクロライド系・リンコマイシン系抗生物質のみを分析する場合は、初期条件をA:B=85:15として、0～10 min A:85→77 B:15→23 linear gradient（以下変更なし）としても良い。
- (注5) 多成分を同時分析する時は、定量イオンのみの測定でも良い。その場合、検出された際には確認イオンも測定する。

(注6) IDLは、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成21年3月)に従って表3のとおり算出した。図1にIDL測定時のクロマトグラムを示す。

表3 IDL の算出結果

物質名	クラリスロマイシン
試料量 (mL)	100
最終液量 (mL)	1
注入液濃度 (ng/mL)	0.200
注入量 (μL)	5.0
結果 1 (ng/mL)	0.198
結果 2 (ng/mL)	0.201
結果 3 (ng/mL)	0.202
結果 4 (ng/mL)	0.202
結果 5 (ng/mL)	0.239
結果 6 (ng/mL)	0.201
結果 7 (ng/mL)	0.204
平均値(ng/mL)	0.2067
標準偏差(ng/mL)	0.0143
IDL (ng/mL)*	0.056
IDL 試料換算値 (ng/L)	0.56
S/N	12
CV (%)	6.9

*: $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

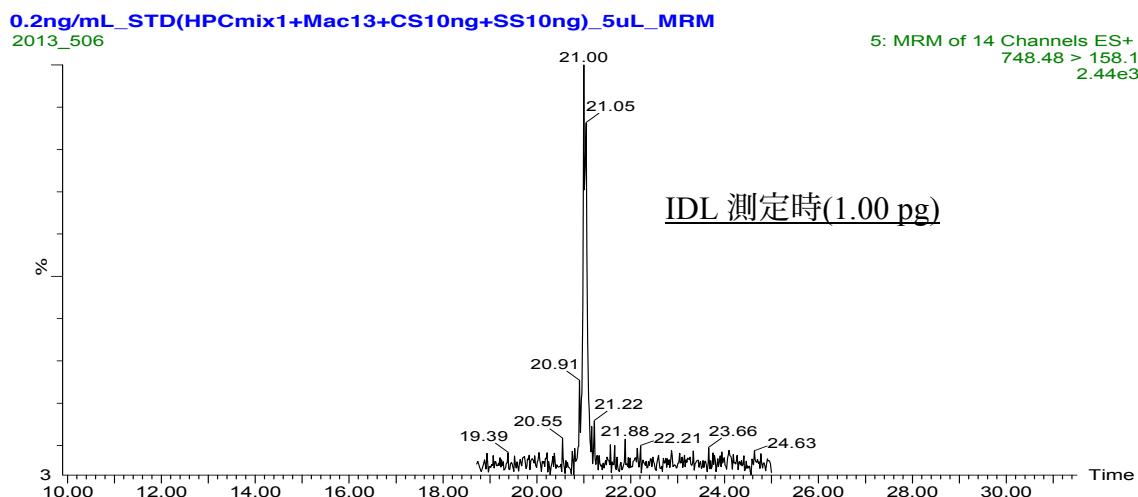


図1 IDL 測定時(0.200 ng/mL)のクロマトグラム

〔同時分析物質のIDLの算出結果〕

同時分析物質のIDLの算出結果を以下に示す。

表4 同時分析物質のIDLの算出結果

物質名	試料 量 (mL)	最終 液量 (mL)	注入液 濃度 (ng/mL)	注入 量 (μL)	平均値 (ng/mL)	標準 偏差 (ng/mL)	IDL (ng/ mL)*	IDL 試料 換算値 (ng/L)	S/N	CV (%)
oleandomycin	100	1	1.75	5.0	1.71	0.187	0.73	7.3	11	11
erythromycinA	100	1	1.00	5.0	0.953	0.0648	0.25	2.5	11	6.8
erythromycinB	100	1	1.00	5.0	1.11	0.0974	0.38	3.8	9.9	8.8
Azithromycin	100	1	10.0	5.0	9.97	0.541	2.1	21	8.8	5.4
Roxithromycin	100	1	2.00	5.0	2.04	0.164	0.64	6.4	13	8.0
LeucomycinA5	100	1	1.00	5.0	1.00	0.114	0.44	4.4	8.0	11
Josamycin	100	1	1.00	5.0	1.08	0.118	0.46	4.6	9.3	11
Tilmicosin	100	1	5.00	5.0	4.97	0.396	1.5	15	13	8.0
Tylosin	100	1	1.00	5.0	1.08	0.0731	0.28	2.8	9.1	6.8
Lincomycin	100	1	0.500	5.0	0.511	0.0418	0.16	1.6	8.8	8.2
Clindamycin	100	1	1.00	5.0	1.10	0.102	0.40	4.0	12	9.3
Tacrolimus	100	1	0.200	5.0	0.198	0.0116	0.045	0.45	13	5.9

*: $IDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

(注7) MDL及びMQLは、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成21年3月)により、表5のとおり算出した。測定時の代表的なクロマトグラムを図2に示す。

表5 MDL及びMQLの算出結果

物質名	クラリスロマイシン
試料	海水
試料量 (mL)	100
標準添加量 (ng)	0.300
試料換算濃度 (ng/L)	3.00
最終液量 (mL)	1.00
注入液濃度 (ng/mL)	0.300
装置注入量 (μL)	5.0
操作ブランク (ng/L) ^{*1}	ND
無添加平均 (ng/L) ^{*2}	0.93
結果 1 (ng/L)	3.71
結果 2 (ng/L)	3.71
結果 3 (ng/L)	4.16
結果 4 (ng/L)	3.96
結果 5 (ng/L)	3.55
結果 6 (ng/L)	3.78
結果 7 (ng/L)	3.97
平均値 (ng/L)	3.834
標準偏差 (ng/L)	0.206
MDL (ng/L) ^{*3}	0.80
MQL (ng/L) ^{*4}	2.1
S/N 比	23
CV (%)	5.4

*1 試料マトリクスのみがない状態で水質試料と同様の操作を行い測定した値 (n = 1)

*2 無添加平均：MDL 算出用試料に標準物質を添加しない状態で含まれる濃度の平均値(n = 2)

*3 $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$

*4 $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

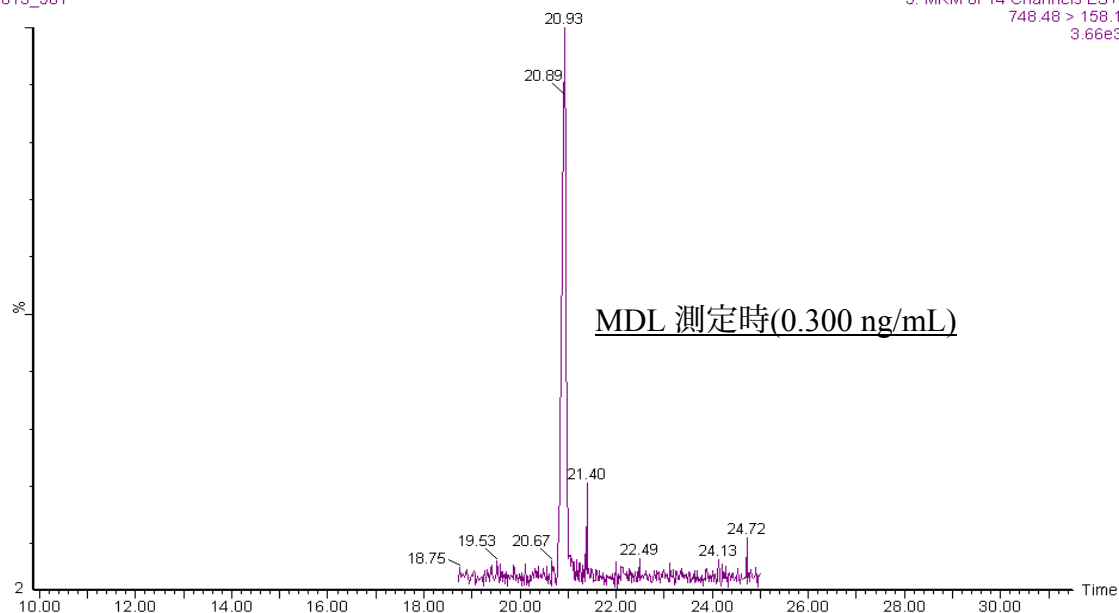


図2 MDL 測定時の代表的なクロマトグラム

〔同時分析物質の MDL 及び MQL の算出結果〕

同時分析物質の MDL 及び MQL の算出結果を以下に示す。アジスロマイシンとチルミコシンは夾雑物質の影響により正のマトリックス効果が生じる傾向があり、定量性に問題があった。

表6 同時分析物質のMDL及びMQLの算出結果

対象物質	試料	標準 添加量 (ng)	試料換 算濃度 (ng/L)	操作ブ ランク 平均 (ng/L)	無添加 平均 (ng/L)	平均値 (ng/L)	標準 偏差 (ng/L)	MDL (ng/L)	MQL (ng/L)	S/N	CV (%)
oleandomycin	海水	1.75	17.5	ND	ND	14.9	1.74	6.8	17	10	12
erythromycinA	海水	2.00	20.0	ND	ND	18.1	1.26	4.9	13	13	7.0
erythromycinB	海水	2.00	20.0	ND	ND	18.1	1.79	6.9	18	15	9.8
Azithromycin	海水	2.00	20.0	ND	ND	31.5	4.14	16	41	9.0	13
Roxithromycin	海水	2.00	20.0	ND	ND	16.9	1.66	6.5	17	11	9.9
LeucomycinA5	海水	2.00	20.0	ND	ND	16.5	1.50	5.8	15	15	9.1
Josamycin	海水	2.00	20.0	ND	ND	15.8	1.42	5.5	14	11	9.0
Tilmicosin	海水	2.00	20.0	ND	ND	45.8	2.93	11	29	6.9	6.4
Tylosin	海水	2.00	20.0	ND	ND	16.9	1.43	5.6	14	7.1	8.4
Lincomycin	海水	2.00	20.0	ND	ND	19.0	1.28	5.0	13	29	6.7
Clindamycin	海水	2.00	20.0	ND	ND	20.4	1.59	6.2	16	13	7.8
Tacrolimus	海水	0.300	3.00	ND	ND	1.61	0.306	1.2	3.1	11	19

§2 解 説

【分析法】 〔フローチャート〕

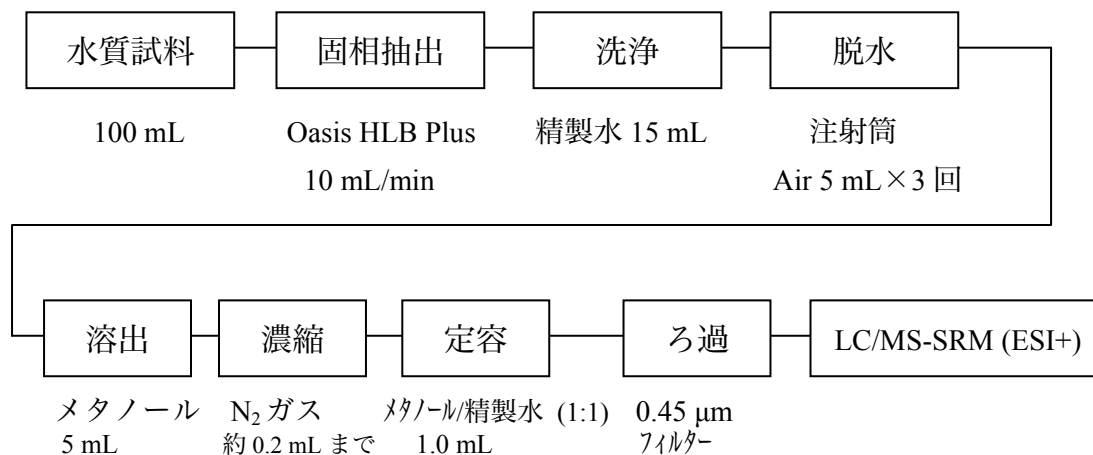


図3 分析法のフローチャート

〔検量線〕

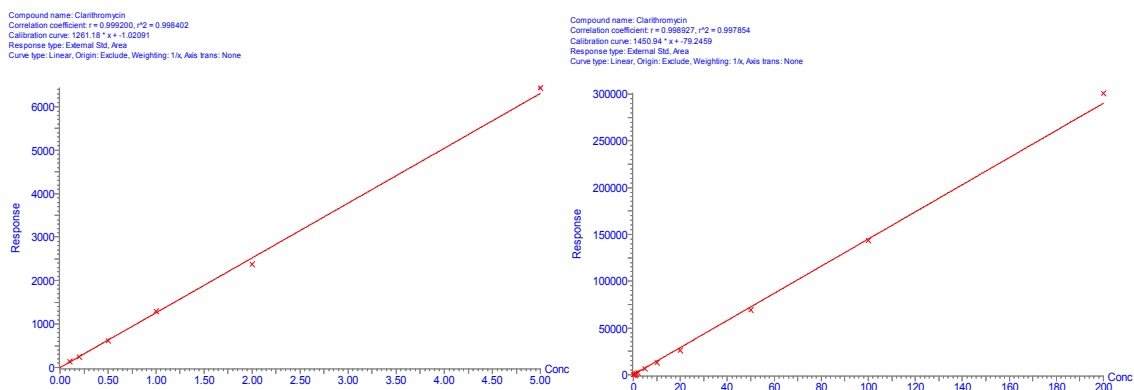


図4 検量線

(対象物質濃度範囲 0.100～5.00 ng/mL (図左)、0.100～200 ng/mL (図右))

表 7 検量線作成用データ

標準液濃度 (ng/mL) (Cs)	応答値
	クラリスロマイシン(As) (m/z 748.48>158)
0.1	136
0.2	239
0.5	609
1	1296
2	2379
5	6433
10	12930
20	26125
50	68898
100	143502
200	300707

〔クロマトグラム〕

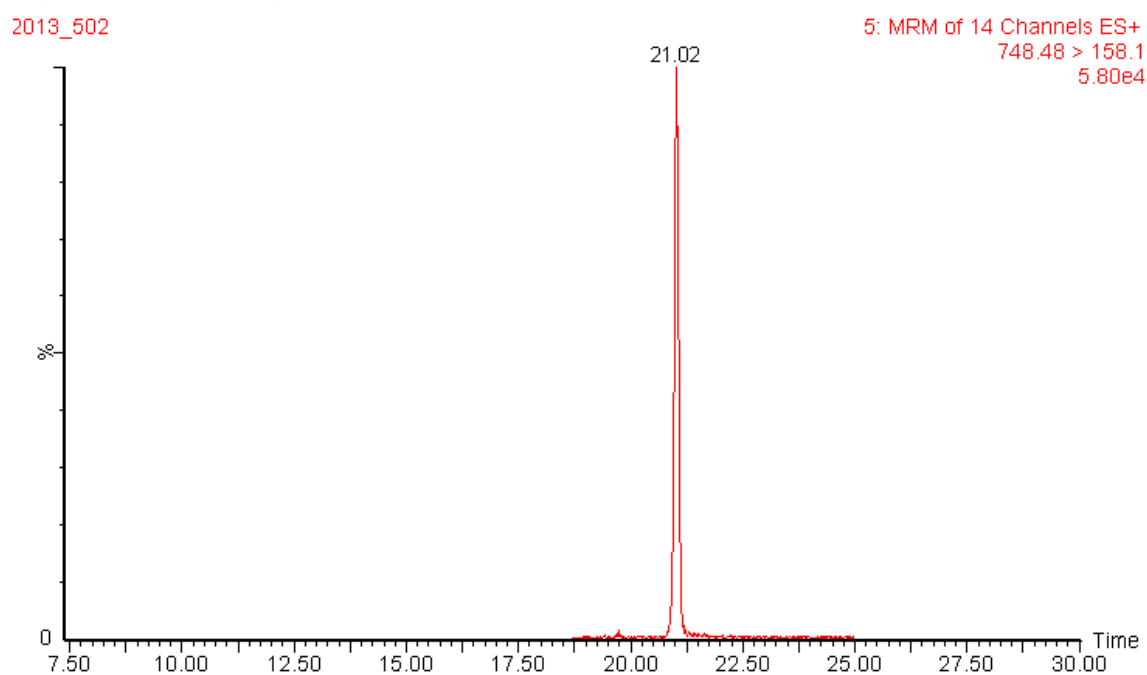


図 5 クラリスロマイシン (5.00 ng/mL) のクロマトグラム

〔マススペクトル〕

クラリスロマイシンのマススペクトル及びプレカーサーイオン m/z 748.48 に対するプロダクトイオンをそれぞれ下図に示す。

1ppm SMZ+CAM 100uL 3-43-98(1-17-22)ACN_D3_MRM

2013_173 272 (20.487) Cm (265:279)

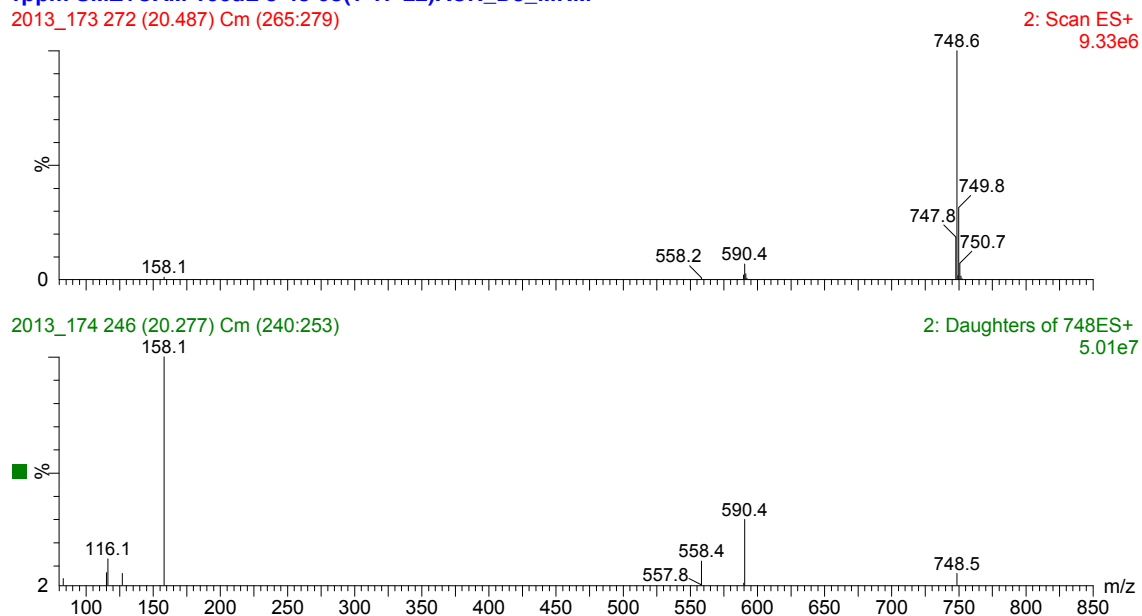


図6 クラリスロマイシンのマススペクトル（上図）及び
プレカーサーイオン m/z 748.48 に対するプロダクトイオン（下図）

〔操作ブランク試験〕

操作ブランクのクロマトグラムを図7に示す。操作ブランクからピークは検出されなかった。

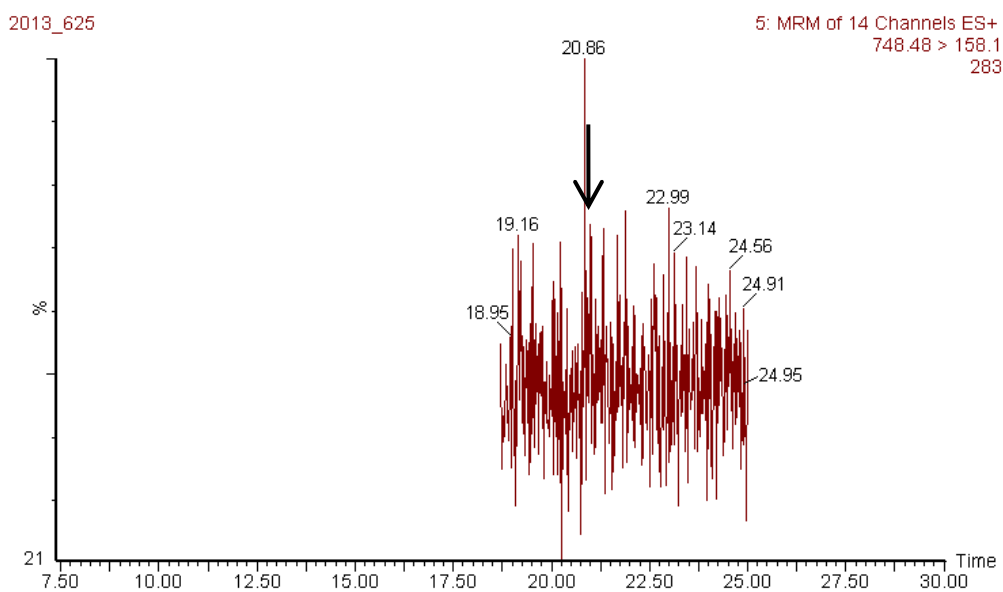


図7 操作ブランクのクロマトグラム

〔添加回収試験〕

添加回収試験結果を表 8 に示す。添加回収試験に用いた試料は、河川水は笹ヶ瀬川笹ヶ瀬橋、海水は岡山県倉敷市水島沖で採取した。

表8 添加回収試験結果

物質名	試料名	試料量 (mL)	添加量 (ng)	試験数	検出 濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動 係数 (%)
クラリスロ マイシン	河川水	100	無添加	2	37	—	4.6
		100	30.0	5	350	102	3.8
	海水	100	無添加	2	0.93	—	5.1
		100	0.300	7	3.8	97	5.4
		100	2.00	7	19.4	92	4.8

Add-1_Sasagase-2_CS10ng,SS10ng_5uL_MRM
2013_616

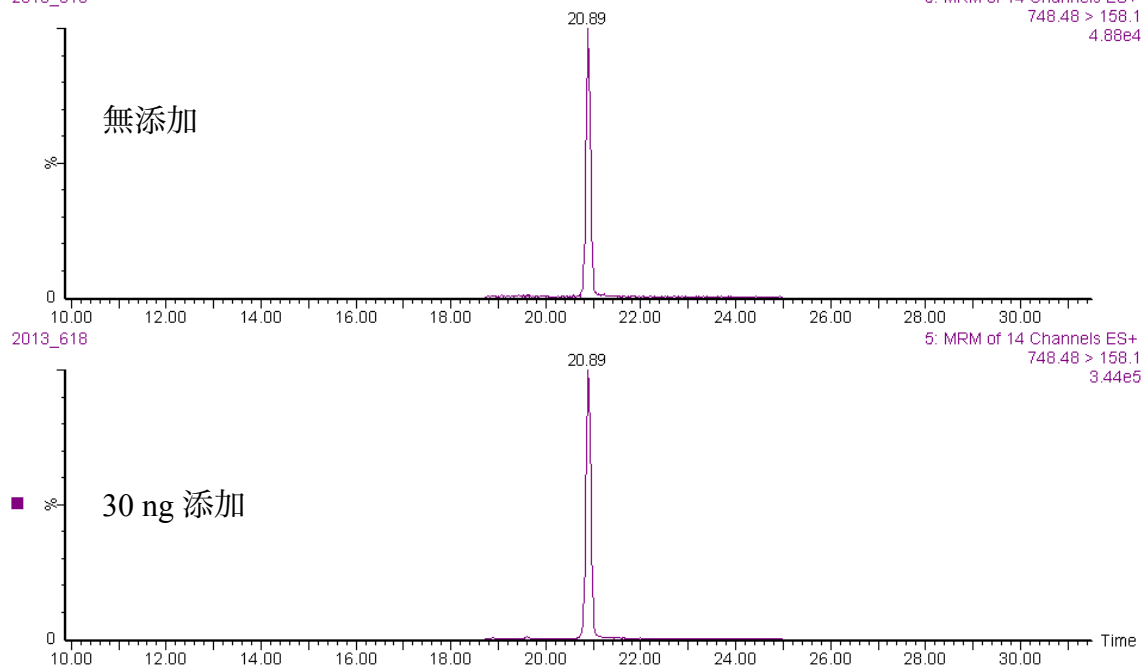


図 8-1 無添加試料及び添加試料（河川水）のクロマトグラム

NonAdd_Tamashima_MDL_5uL_MRM
2013_557

5: MRM of 14 Channels ES+
748.48 > 158.1
793

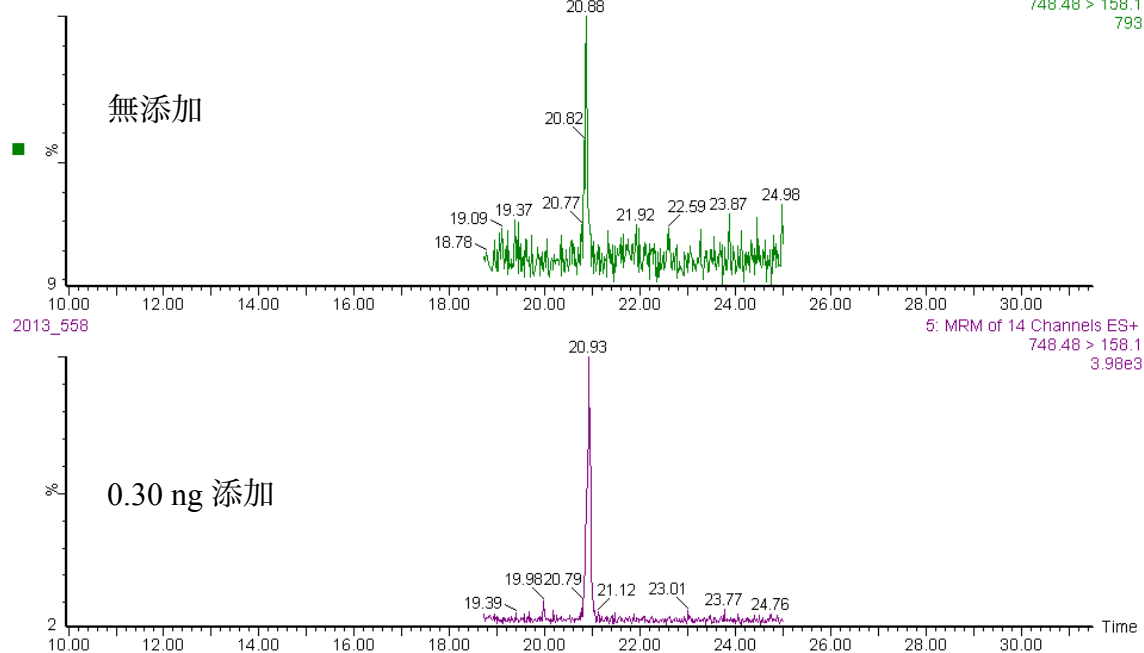


図 8-2 無添加試料及び添加試料（海水）のクロマトグラム

〔同時分析物質の添加回収試験結果〕

河川水への 30 ng 添加では、アジスロマイシンとチルミコシンを除き、70～120%の良好な回収率であった。

表 9 同時分析物質の添加回収試験結果（河川水）

対象物質	試料名	試料量 (mL)	無添加		30 ng 添加			
			試験 数	検出 濃度 (ng/L)	試験 数	検出 濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動 係数 (%)
oleandomycin	河川水	100	2	ND	5	301	100	5.0
erythromycinA	河川水	100	2	1.9	5	255	84	3.8
erythromycinB	河川水	100	2	ND	5	285	95	4.8
Azithromycin	河川水	100	2	ND	5	382	127	6.8
Roxithromycin	河川水	100	2	2.5	5	309	102	3.1
LeucomycinA5	河川水	100	2	ND	5	297	99	2.1
Josamycin	河川水	100	2	ND	5	302	101	3.5
Tilmicosin	河川水	100	2	ND	5	473	158	4.6
Tylosin	河川水	100	2	ND	5	306	102	2.1
Lincomycin	河川水	100	2	ND	5	275	92	3.1
Clindamycin	河川水	100	2	ND	5	296	99	4.3
Tacrolimus	河川水	100	2	ND	5	322	107	2.9

(注) オレアンドマイシンは、りん酸塩として 30 ng 添加。

海水への 2 ng 添加では、アジスロマイシンとチルミコシンが 100%を大きく超えたほか、タクロリムスが、70%未満の回収率となった。

表 10 同時分析物質の添加回収試験結果（海水）

対象物質	試料名	試料量 (mL)	無添加		添加 (2 ng)			
			試験 数	検出 濃度 (ng/L)	試験 数	検出 濃度 (ng/L)	回収率 (%)	変動 係数 (%)
oleandomycin	海水	100	2	ND	7	17.0	85	12
erythromycinA	海水	100	2	ND	7	18.1	91	7.0
erythromycinB	海水	100	2	ND	7	18.1	91	9.8
Azithromycin	海水	100	2	ND	7	31.5	157	13
Roxithromycin	海水	100	2	ND	7	16.9	84	9.9
LeucomycinA5	海水	100	2	ND	7	16.5	82	9.1
Josamycin	海水	100	2	ND	7	15.8	79	9.0
Tilmicosin	海水	100	2	ND	7	45.8	229	6.4
Tylosin	海水	100	2	ND	7	16.9	85	8.4
Lincomycin	海水	100	2	ND	7	19.0	95	6.7
Clindamycin	海水	100	2	ND	7	20.4	102	7.8
Tacrolimus	海水	100	2	ND	7	11.6	58	9.6

(注) オレアンドマイシンは、りん酸塩として 2 ng 添加。

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験結果を表 11 に示す。暗所ではいずれの pH でも分解性は確認されなかったが、明所でわずかに分解性が確認された。

表 11 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH	試験数	初期濃度 (ng/L)	1 時間後の 残存率(%)	7 日後の残存率(%)	
					暗所	明所
クラリスロマイシン	5	2	100	88	88	—
	7	2	100	71	71	65
	9	2	100	78	86	—

同時分析物質の分解性スクリーニング試験結果を表 12 に示す。

pH9 で特に分解性が確認されたのは、オレアンドマイシン、アジスロマイシン、チルミコシン、タクロリムスであった。明所ではいずれの物質も分解性が認められたが、特にタイロシン、タクロリムスで分解性が大きかった。エリスロマイシン A は、pH5 の 1 時間後でも分解性が確認され、後述の〔通水時の pH の検討〕で pH3 及び pH4 での回収率が低かったのは、分解性の影響もあると考えられた。

タクロリムスは、いずれの条件でも分解性が確認されたが、pH5 かつ暗所で分解が抑えられることが確認された。

表 12 同時分析物質の分解性スクリーニング試験結果

対象物質	試験数	初期濃度 (ng/L)	1 時間後の 残存率(%)			7 日後の残存率(%)			
						暗所		明所	
			pH 5	pH 7	pH 9	pH 5	pH 7	pH 9	pH 7
oleandomycin	2	87.5	93	76	83	90	76	81	57
erythromycinA	2	100	8	72	71	2	63	81	46
erythromycinB	2	100	73	72	65	78	68	70	52
Azithromycin	2	100	133	-	19	130	-	4	-
Roxithromycin	2	100	79	72	67	78	67	71	51
LeucomycinA5	2	100	82	71	76	85	76	78	64
Josamycin	2	100	81	68	69	84	70	75	55
Tilmicosin	2	100	139	-	17	152	-	5	-
Tylosin	2	100	82	73	77	84	79	81	22
Lincomycin	2	100	90	81	77	97	83	82	79
Clindamycin	2	100	90	75	83	98	75	86	71
Tacrolimus	2	100	85	73	66	65	48	3	20

(注) アジスロマイシン及びチルミコシンは、pH7では1h後も回収されなかった。

〔保存性試験〕

保存性試験結果を表13に示す。保存性は良好であった。

表13 保存性試験結果

物質名	試験対象	試料名	試験数	初期濃度 (ng/L) 又は (ng/mL)	残存率(%)		
					7日後	14日後	1月後
クラリ	試料	河川水	2	47* ¹	106	—	—
スロマ	粗抽出液	河川水	2	4.74	—	105	—
イシン	標準液	標準液	2	1.00	—	—	102

*1：環境試料より 37 ng/L 検出＋標準品を 10 ng/L 相当添加

同時分析物質の保存性試験結果を表 14 に示す。

表14 同時分析物質の保存性試験結果

対象物質	試料名	試験数	試験対象	初期濃度 (ng/L)	7日後 残存率 (%)	試験対象	初期濃度 (ng/mL)	14日後 残存率 (%)
oleandomycin	河川水	2	試料	8.75	98	粗抽出液	1.00	101
erythromycinA	河川水	2	試料	11.9* ¹	99	粗抽出液	1.19	103
erythromycinB	河川水	2	試料	10	100	粗抽出液	1.00	94
Azithromycin	河川水	2	試料	10	107	粗抽出液	1.00	101
Roxithromycin	河川水	2	試料	12.5* ²	96	粗抽出液	1.25	92
LeucomycinA5	河川水	2	試料	10	101	粗抽出液	1.00	100
Josamycin	河川水	2	試料	10	102	粗抽出液	1.00	99
Tilmicosin	河川水	2	試料	10	109	粗抽出液	1.00	106
Tylosin	河川水	2	試料	10	101	粗抽出液	1.00	107
Lincomycin	河川水	2	試料	10	106	粗抽出液	1.00	102
Clindamycin	河川水	2	試料	10	96	粗抽出液	1.00	100
Tacrolimus	河川水	2	試料	10	101	粗抽出液	1.00	103

*1：環境試料より 1.9 ng/L 検出＋標準品を 10 ng/L 添加

*2：環境試料より 2.5 ng/L 検出＋標準品を 10 ng/L 添加

H26年度調査において、試料を通水した固相カートリッジ (HLB)を冷凍して96～131日間保存した後、溶出・測定した事例があった。本分析の前処理はスルファメトキサゾール等(26物質)(H25白本p794)と同時に実施しており、他方の分析における7種のサロゲート添加回収率に問題はなく(スルファクロロピリダジンの4検体(68-79%/全12検体)を除き80%以上)、保存性に支障なしと判断された。(2015年度精査等検討会コメント)

〔試験液の溶媒組成の検討〕

アセトニトリル 100%で調製してもピークがリーディングすることはなかったが、スルファメトキサゾールとの同時分析のため 50%メタノールで調製することとした。

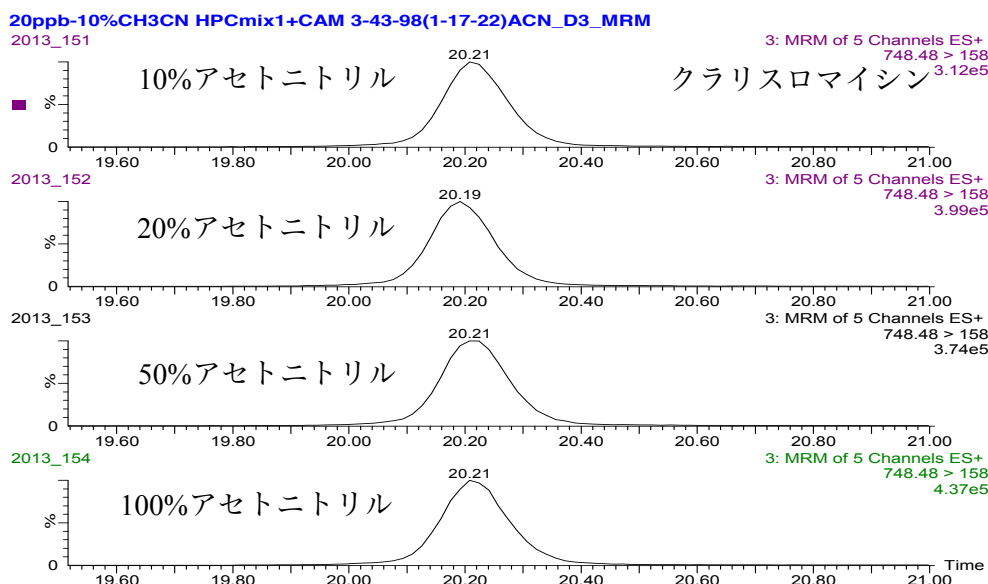


図 9-1 試験液の溶媒組成を変えた場合のクロマトグラム
(クラリスロマイシン、10 μ L 注入)

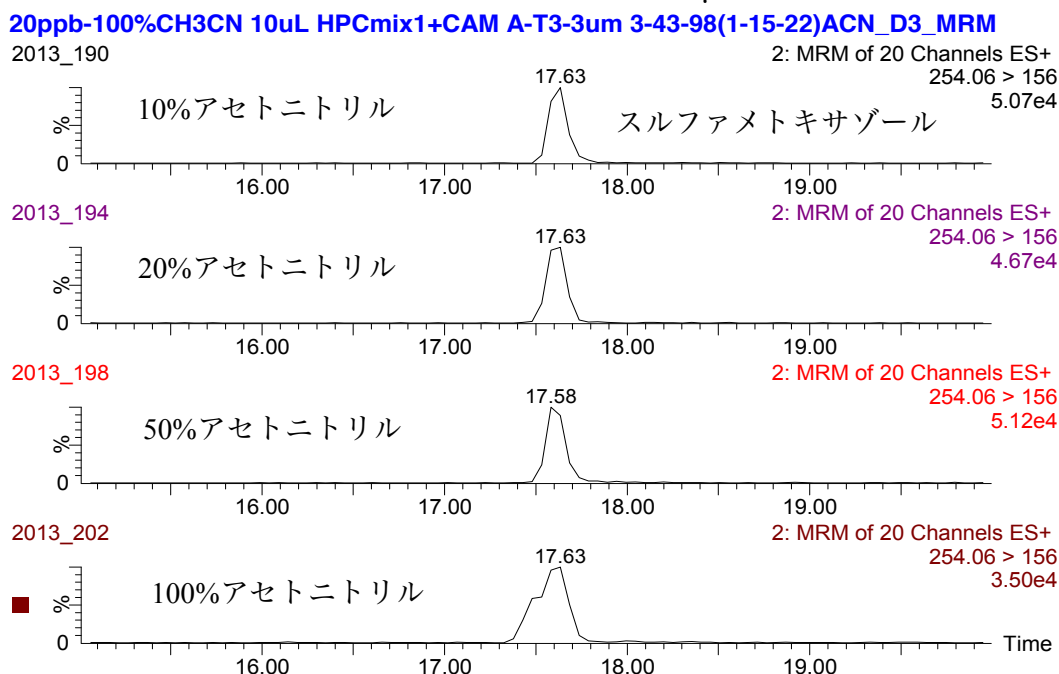


図 9-2 試験液の溶媒組成を変えた場合のクロマトグラム【参考】
(スルファメトキサゾール、10 μ L 注入〔LC/MS 測定条件〕
はクラリスロマイシンと同じ)

〔移動相及びカラムの検討〕

移動相をギ酸／アセトニトリル系からギ酸／メタノール系に変更したところ、むしろテーリングしてピーク幅が広がり気味となった。

カラムを XTerra から Xbridge 及び Atlantis T3 に変更したところ、いずれもピークがシャープとなり良好であったが、Atlantis T3 の方がよりシャープであったので、Atlantis T3 を採用することとした。

20ppb-10%CH3CN 10uL HPCmix1+CAM XTerra 3-43-98(1-13-22)MeOH_D3_MRM

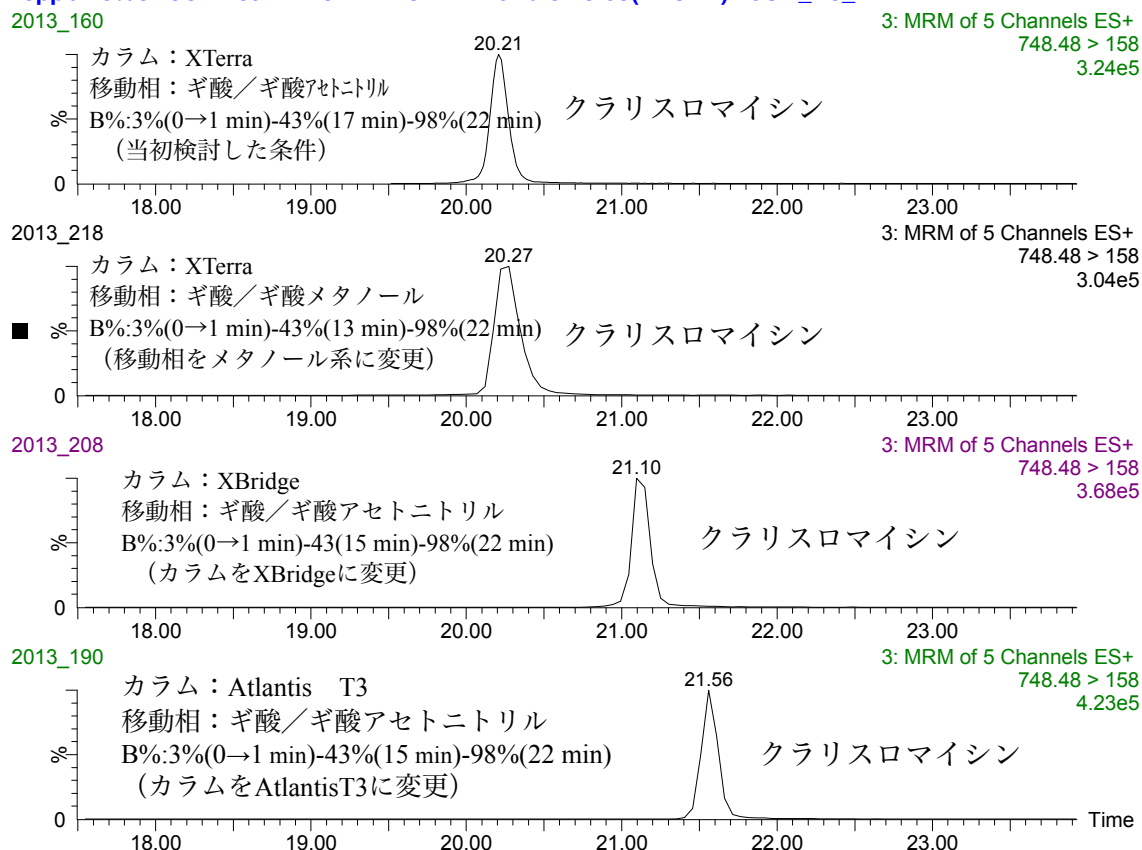
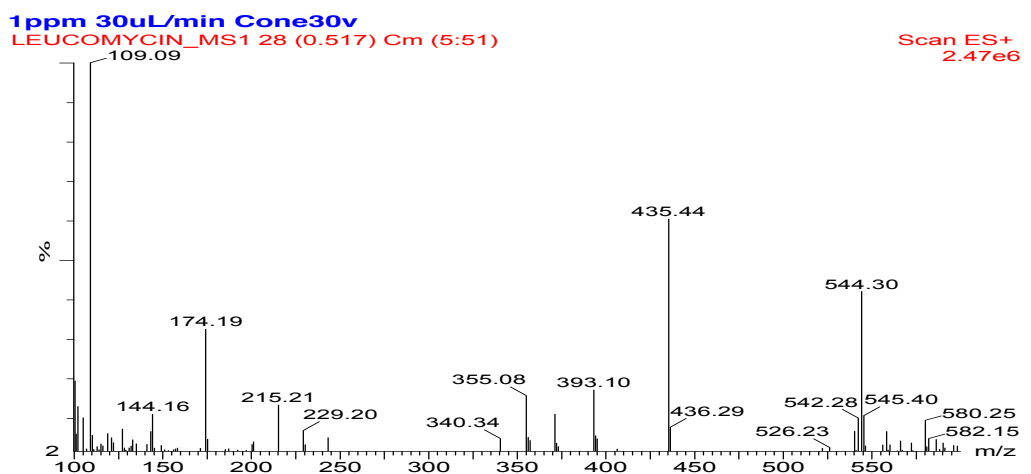


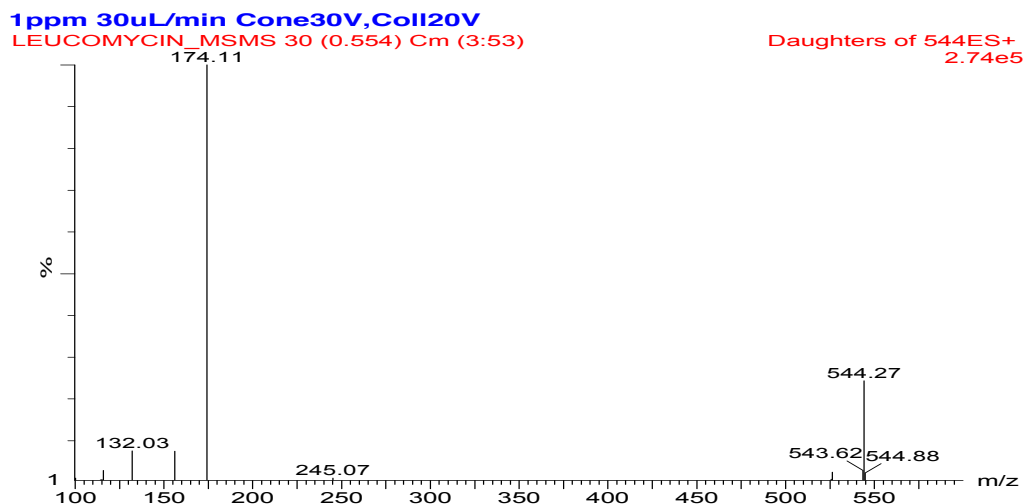
図 10 移動相及びカラムを変更して測定したクロマトグラム

〔同時分析物質（ロイコマイシン）の測定イオンの検討〕

標準試薬（Dr.Ehrenstorfer 製）の添付書には、水和物で分子量 558.7 とあり、水（分子量 18.0）を除いた分子量は 540.7 となるが、インフュージョンのスペクトルでは m/z 541.3 ではなく m/z 544.3 が観測された。 m/z 544.3 のプロダクトイオンスペクトルを測定したところ、マクロライド系に特徴的なプロダクトイオンの 1 つの m/z 174.1 が観測されるため、 m/z 544.3 はロイコマイシン関連のイオンと考えられた。



ロイコマイシンのスペクトル (m/z 100-600)



プロダクトイオンスペクトル (m/z 544.3)

図 11-1 ロイコマイシンのマススペクトル-1

次に、範囲を広げてスペクトルを取ったところ、最も大きいイオンは m/z 804.6 で、そのプロダクトイオンに m/z 174.1 があり、こちらもロイコマイシン関連のイオンのようであった。

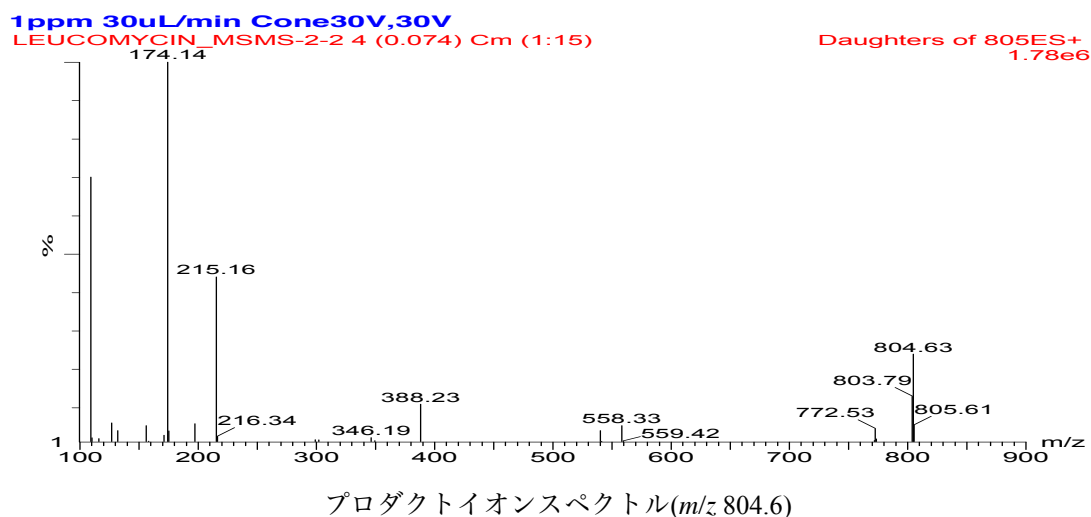
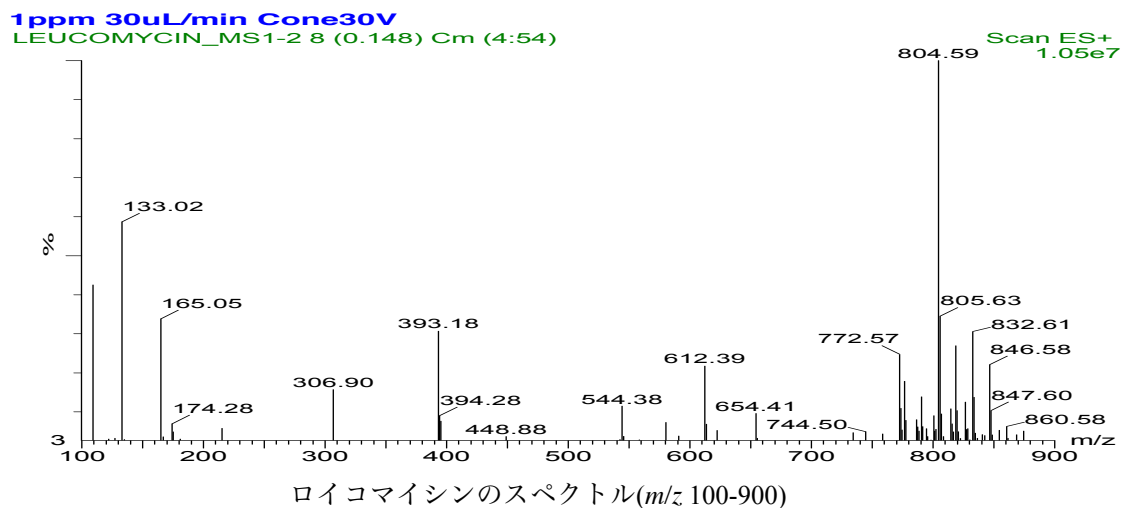


図 11-2 ロイコマイシンのマススペクトル-2

ロイコマイシンについて、詳しく調べたところ、A1,A3~A9 (A3=ジョサマイシン) の混合物で、A5(m.w 771.9)が有効成分のようである。 m/z 804.6 のプロダクトイオンに m/z 772.5 が生成することから、 m/z 804.6 は A5 の $[M+H+32]^+$ と推測された (32=CH₃OH と推測)。

そこで、有効成分であるロイコマイシン A5 の標準品を入手し、スペクトルを調べたところ、 $[M+H]^+$ に該当する m/z 772 と、それより強い強度で m/z 804 ($[M+H+CH_3OH]^+$ と推測) が検出された (メタノール溶液をインフュージョン測定)。

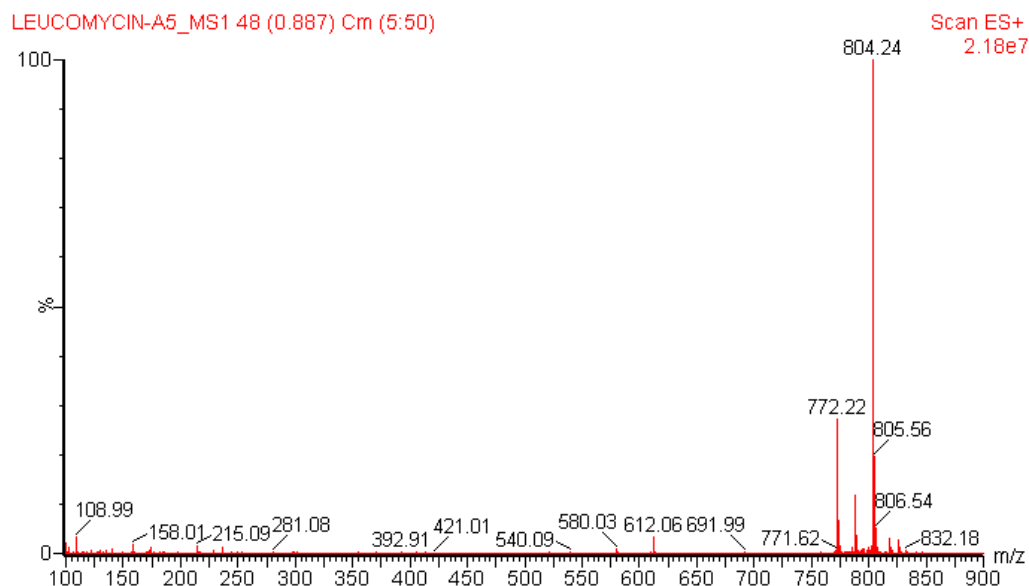
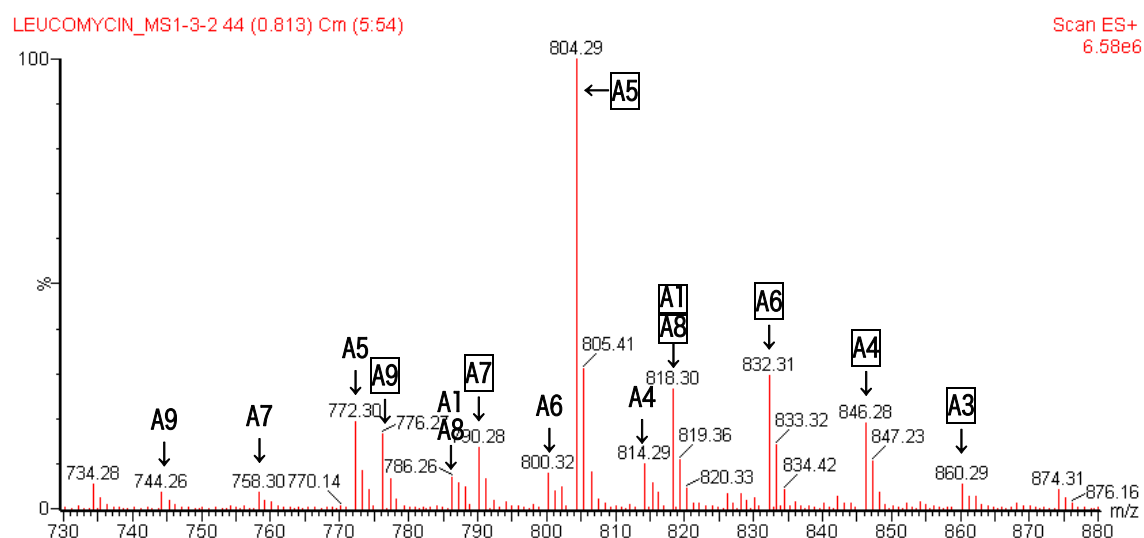


図 11-3 ロイコマイシン A5 標準品のマスペクトル

このことから、Dr.Ehrenstorfer 製の試薬は、有効成分のロイコマイシン A5(m.w. 771.9)を主成分とする A1,A3~A9 等の混合物と判断された。

なお、分析法は、有効成分のロイコマイシン A5 を検討物質とした。



無印は $[M+H]^+$ 、□囲みは $[M+H+CH_3OH]^+$ と考えられる 32amu 大きいイオンを表す。

図 11-4 Dr.Ehrenstorfer 製ロイコマイシン標準品のマスペクトル

〔抽出用固相カートリッジの検討〕

精製水 100 mL に標準物質 1.0 μg を添加し、3 種類の固相に 10 mL/min で通水、メタノール 5 mL で溶出した後、アセトニトリル 5 mL で溶出した。

Oasis HLB がメタノール 5 mL 溶出での回収率が高く、アセトニトリル画分への残留も少なかったため、Oasis HLB を採用することとした。

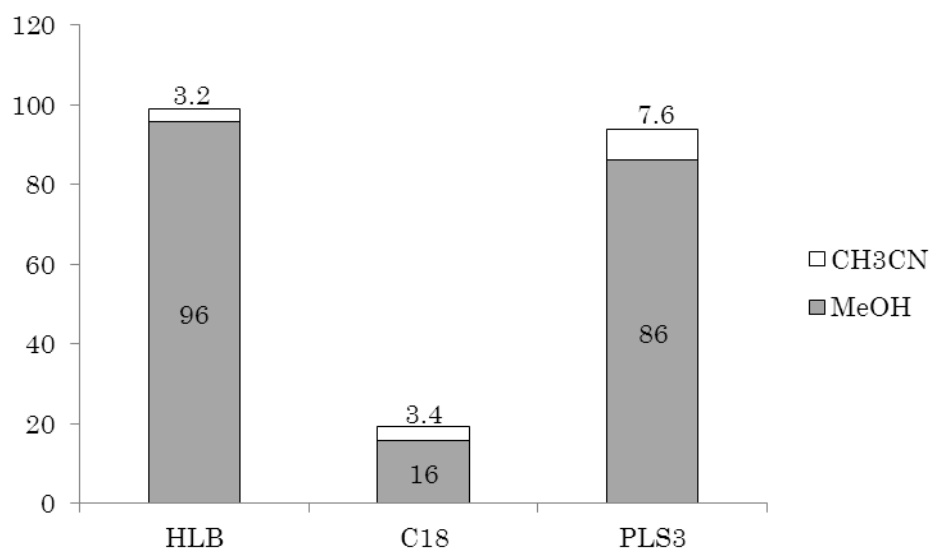


図 12 抽出用固相カートリッジの検討結果（クラリスロマイシン）

〔溶出溶媒の検討〕

抽出用固相カートリッジの検討において、メタノール 5 mL で溶出しきれずアセトニトリル画分への残留が確認されたので、溶出溶媒の種類及び量について検討を行った。

精製水 100 mL に標準物質各 100 ng を添加し、10 mL/min で通水、メタノール 5 mL で溶出後、更にメタノール 5 mL で溶出したもの及びアセトニトリル 5 mL で溶出後、更にアセトニトリル 5 mL で溶出したものを比較した。

クラリスロマイシンを含め、アセトニトリルでは回収率が低くなる物質が多かったため、メタノールでの溶出とした。溶媒量については、チルミコシンを除き、メタノール 5～10 mL への残留が 0.5%未満であったため、メタノール 5 mL での溶出とした。

表15 溶出溶媒の検討試験結果 (n=2) (Oasis HLB)

対象物質	回収率(%)					
	メタノール			アセトニトリル		
	0-5 mL	5-10 mL	計	0-5 mL	5-10 mL	計
Clarithromycin	95	0	95	64	11	75
oleandomycin	105	0	105	81	8	89
erythromycinA	94	0	94	58	14	72
erythromycinB	90	0	90	61	11	72
Azithromycin	93	0	93	64	12	76
Roxithromycin	94	0	94	62	11	73
LeucomycinA5	91	0	91	89	0	90
Josamycin	89	0	89	87	0	87
Tilmicosin	82	68	150	3	16	19
Tylosin	91	0	91	89	0	90
Lincomycin	119	0	119	80	1	82
Clindamycin	89	0	89	96	1	97
Tacrolimus	120	0	121	117	1	117

(注) オレアンドマイシンは、りん酸塩として 100 ng 添加。

〔環境試料の添加回収試験〕

河川水（旭川・乙井手堰）、海水（水島沖）100 mL に標準物質各 100 ng を添加し、10 mL/min で通水、メタノール 5 mL で溶出した（測定溶媒はメタノール）。

河川水では、いずれの物質も回収率 70～120% の良好な結果であったが、海水ではロイコマイシン A5、ジョサマイシン、タイロシン、タクロリムスが 70% 未満、チルミコシンが 120% 超となった。

表16 環境試料の添加回収試験結果 (n=2)(Oasis HLB)

対象物質	回収率(%)			
	河川水		海水	
	無添加	添加	無添加	添加
Clarithromycin	ND	82	ND	82
oleandomycin	ND	90	ND	92
erythromycinA	ND	86	ND	85
erythromycinB	ND	75	ND	74
Azithromycin	ND	82	ND	85
Roxithromycin	ND	76	ND	78
LeucomycinA5	ND	81	ND	66
Josamycin	ND	82	ND	68
Tilmicosin	ND	100	ND	148
Tylosin	ND	81	ND	69
Lincomycin	ND	91	ND	91
Clindamycin	ND	94	ND	90
Tacrolimus	ND	85	ND	60

(注) 1. ND は、ピークが確認されないことを表す。

2. オレアンドマイシンは、りん酸塩として 100 ng 添加。

〔通水時の pH の検討〕

海水（水島沖）100 mL に標準物質各 100 ng を添加し、pH をそれぞれ 3、4、5、7 及び 9 に調整した後、10 mL/min で通水、メタノール 5 mL で溶出した（測定溶媒はメタノール、pH8 は pH 未調整で、環境試料の添加回収試験での検討結果を再掲した）。

クラリスロマイシンを含む多くの物質で、pH3 で回収率が高い傾向が確認されたが、エリスロマイシン A が pH3 で極端に回収率が低くなるため、pH を調整する分析法にはしなかった。なお、試料の pH や対象物質によって、pH 調整の必要の有無を確認することが望ましい。

表17 通水時のpHの検討試験結果 (n=2)(Oasis HLB)

対象物質	回収率 (%)					
	pH3	pH4	pH5	pH7	pH8	pH9
Clarithromycin	100	91	88	88	80	83
oleandomycin	101	89	96	93	90	78
erythromycinA	9	60	86	91	86	81
erythromycinB	97	89	85	85	75	78
Azithromycin	99	91	88	91	82	82
Roxithromycin	87	94	85	88	76	84
LeucomycinA5	100	89	97	80	81	67
Josamycin	95	86	97	78	82	64
Tilmicosin	164	116	47	152	100	139
Tylosin	93	89	93	84	81	69
Lincomycin	98	96	103	87	91	88
Clindamycin	115	104	109	101	94	89
Tacrolimus	105	95	100	78	85	57

(注) オレアンドマイシンは、りん酸塩として 100 ng 添加。

〔逆相-イオン交換ミックスモード固相の検討〕

河川水（旭川・乙井手堰）、海水（水島沖）100 mL に標準物質各 100 ng を添加し、10 mL/min で通水、MAX は濃アンモニア水 / 精製水（5:95）、精製水で洗浄後、メタノール 5 mL で溶出し、更にギ酸/メタノール（2:98）5 mL で溶出、MCX は、2%ギ酸水溶液、精製水で洗浄後、メタノール 5 mL で溶出し、更に濃アンモニア水 / メタノール(5:95)で溶出した（測定溶媒はメタノール）。

MAX では、全ての物質でメタノールの画分に溶出、つまり陰イオン交換ではなく逆相で保持していた。MCX では、回収できない物質が多かった。

よって、いずれも採用しないこととした。

表18 逆相-イオン交換ミックスモード固相の検討試験結果(n=2)

対象物質	回収率 (%)											
	海水						河川水					
	MAX			MCX			MAX			MCX		
	MeOH	ギ酸/ MeOH	計	MeOH	NH3/ MeOH	計	MeOH	ギ酸/ MeOH	計	MeOH	NH3/ MeOH	計
Clarithromycin	84	0	84	0	0	0	90	0	90	0	0	0
oleandomycin	62	10	73	0	33	33	83	5	89	0	26	26
erythromycinA	85	0	85	0	0	0	87	0	87	0	0	0
erythromycinB	84	0	84	0	1	1	94	0	94	0	1	1
Azithromycin	83	0	83	0	0	0	90	0	90	0	0	0
Roxithromycin	83	0	83	0	0	0	87	0	87	0	0	0
LeucomycinA5	63	3	66	0	0	0	78	2	80	0	2	2
Josamycin	60	1	61	0	0	0	80	1	80	0	0	0
Tilmicosin	164	1	165	1	161	162	126	12	138	0	183	183
Tylosin	66	3	69	0	0	0	78	2	80	0	0	0
Lincomycin	83	0	84	0	79	79	64	0	65	0	78	78
Clindamycin	79	0	79	0	80	80	78	0	79	0	82	82
Tacrolimus	40	0	41	75	0	75	76	0	77	101	0	101

(注) オレアンドマイシンは、りん酸塩として 100 ng 添加。

使用固相：

MAX：Waters 製 Oasis MAX Plus (225 mg)

MCX：Waters 製 Oasis MCX Plus (225 mg)

〔試験液の溶媒組成の検討〕

河川水（旭川・乙井手堰）、海水（水島沖）100 mL に標準物質各 100 ng を添加し、10 mL/min で通水、メタノール 5 mL で溶出したものを用い、試験液の溶媒をメタノール / 精製水(1:4)、メタノール / 精製水(1:1)、メタノールと変更し、同じ溶媒組成の標準品との面積値の比較を行った。

有機溶媒の割合を減らすほど回収率が低くなる傾向が確認され、特に保持時間が最も長いタクロリムスで顕著であったが、大きな差ではないのでピーク形状を重視して、試験液の溶媒をメタノール / 精製水(1:1)とした。

表19 試験液の溶媒組成の検討試験結果(n=2)

対象物質	回収率 (%)								
	メタノール/精製水(1:4)			メタノール/精製水(1:1)			メタノール		
	川	海	平均	川	海	平均	川	海	平均
Clarithromycin	78	80	79	88	82	85	89	87	88
oleandomycin	89	89	89	91	68	79	90	75	83
erythromycinA	85	85	85	89	85	87	83	86	84
erythromycinB	80	81	80	83	81	82	83	82	82
Azithromycin	78	84	81	92	87	90	91	89	90
Roxithromycin	83	82	83	93	89	91	92	97	95
LeucomycinA5	86	66	76	90	63	76	89	61	75
Josamycin	82	63	73	91	62	77	90	59	75
Tilmicosin	93	165	129	92	116	104	100	104	102
Tylosin	88	73	81	92	65	78	89	66	78
Lincomycin	84	89	87	90	89	90	86	87	87
Clindamycin	89	90	89	100	92	96	96	93	95
Tacrolimus	56	26	41	84	31	58	104	40	72

(注) オレアンドマイシンは、りん酸塩として 100 ng 添加。

〔移動相条件の検討〕

クラリスロマイシンを含む同時分析物質 13 物質のうち、リンコマイシン (9.09 分) とタクロリムス (28.89 分) を除く 11 物質の保持時間が近接していたため、21 分に B : 75%となるよう緩やかにグラジエントさせるよう変更した。また、タクロリムスの保持時間が長いため、最終を B : 100%とし、洗いの時間をタクロリムスの溶出から 5 分後の 35 分まで延長した。最終条件における分離状況を以下に示す。

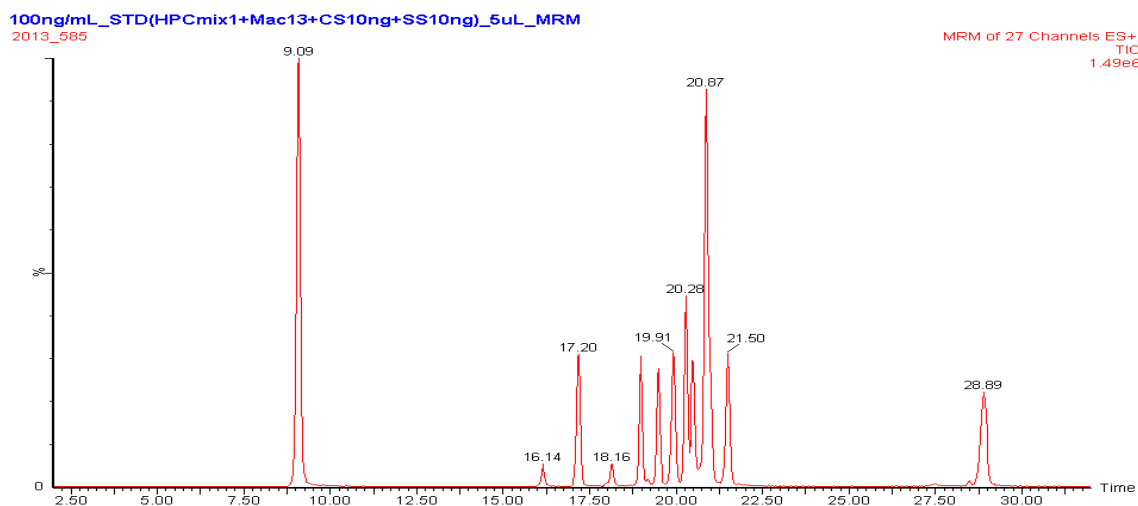


図 13 最終条件で測定したクロマトグラム

(参考) 保持時間一覧

物質名	保持時間(min)	物質名	保持時間(min)
リンコマイシン	9.09	エリスロマイシン B	20.28
アジスロマイシン	16.14	ロイコマイシン A5	20.48
クリンダマイシン	17.20	クラリスロマイシン	20.87
チルミコシン	18.16	ロキシスロマイシン	21.01
オレアンドマイシン	18.99	ジョサマイシン	21.50
エリスロマイシン A	19.48	タクロリムス	28.89
タイロシン	19.91		

〔サロゲート物質の検討〕

クラリスロマイシンのサロゲート物質の市販は確認できなかったが、ロキシスロマイシンのサロゲート物質 (- d_9) が市販されていたため、使用を検討した。

サロゲート物質 1 $\mu\text{g/mL}$ を装置に注入し、ネイティブ物質の含有量を確認したところ、クラリスロマイシン及びオレアンドマイシンと同一の質量数に夾雑ピークが確認されたため、使用しないこととした。

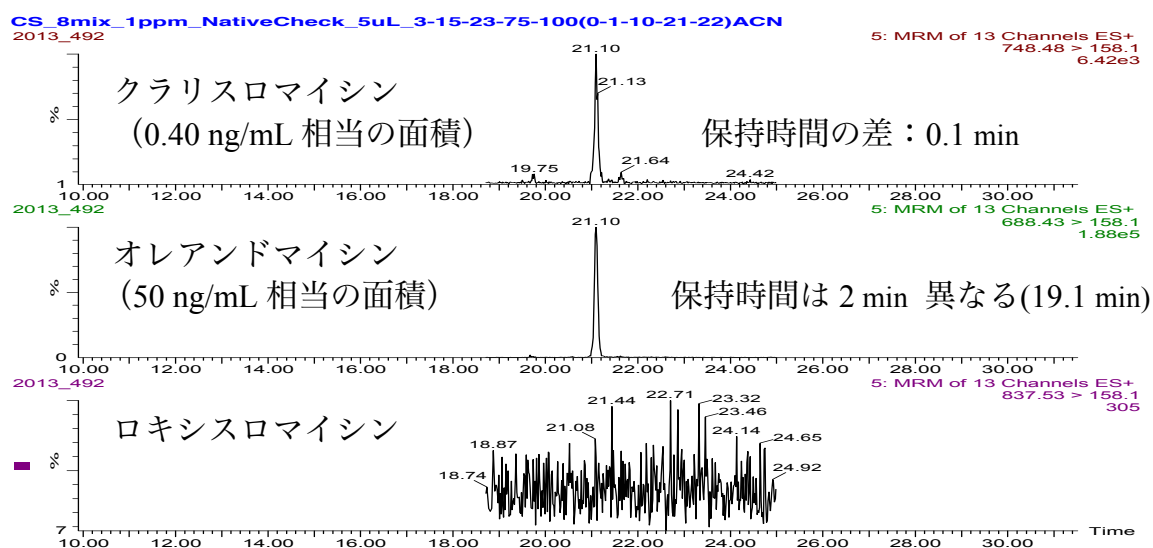


図 14 ロキシスロマイシン- d_9 標準品のクロマトグラム

〔MS 分離の確認〕

クラリスロマイシンの同位体イオンが、アジスロマイシンのモニターイオン (m/z 749.52>591.3 及び 749.52>158.1) に被ることが確認されたが、保持時間が異なるため区別可能であり定量値にも影響しない。

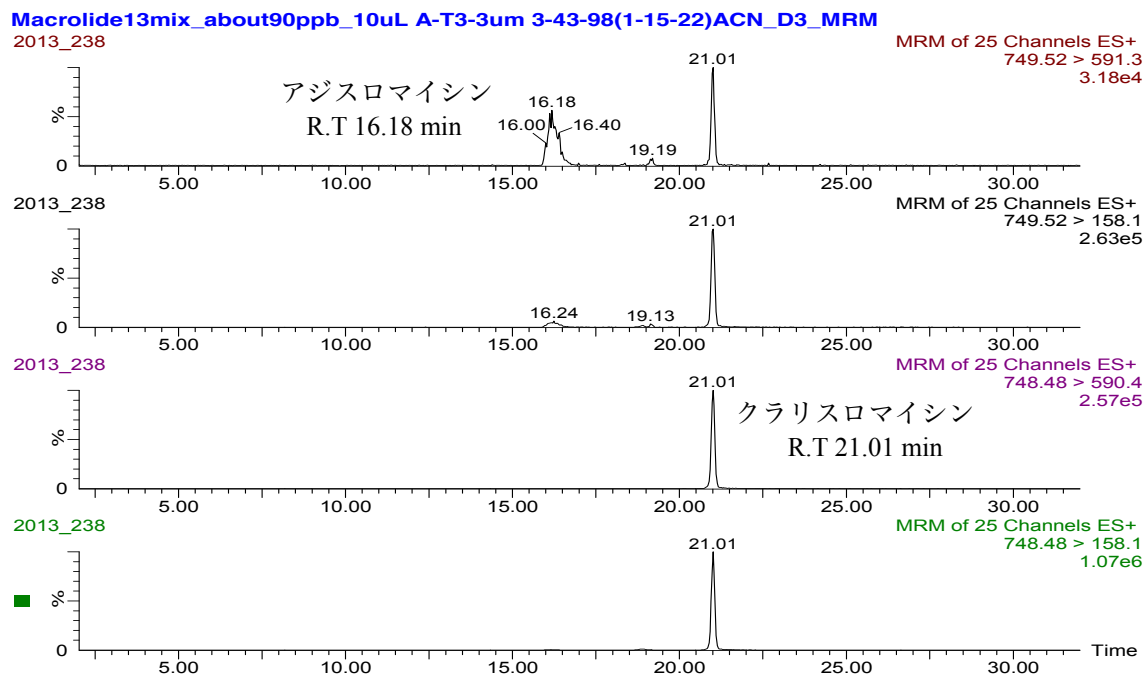


図15 アジスロマイシンとクラリスロマイシンのクロマトグラム

クラリスロマイシンとロキシスロマイシンの保持時間が近接しているため、MSの分離状況を確認した。夾雑ピークが確認されたが、わずかであった。

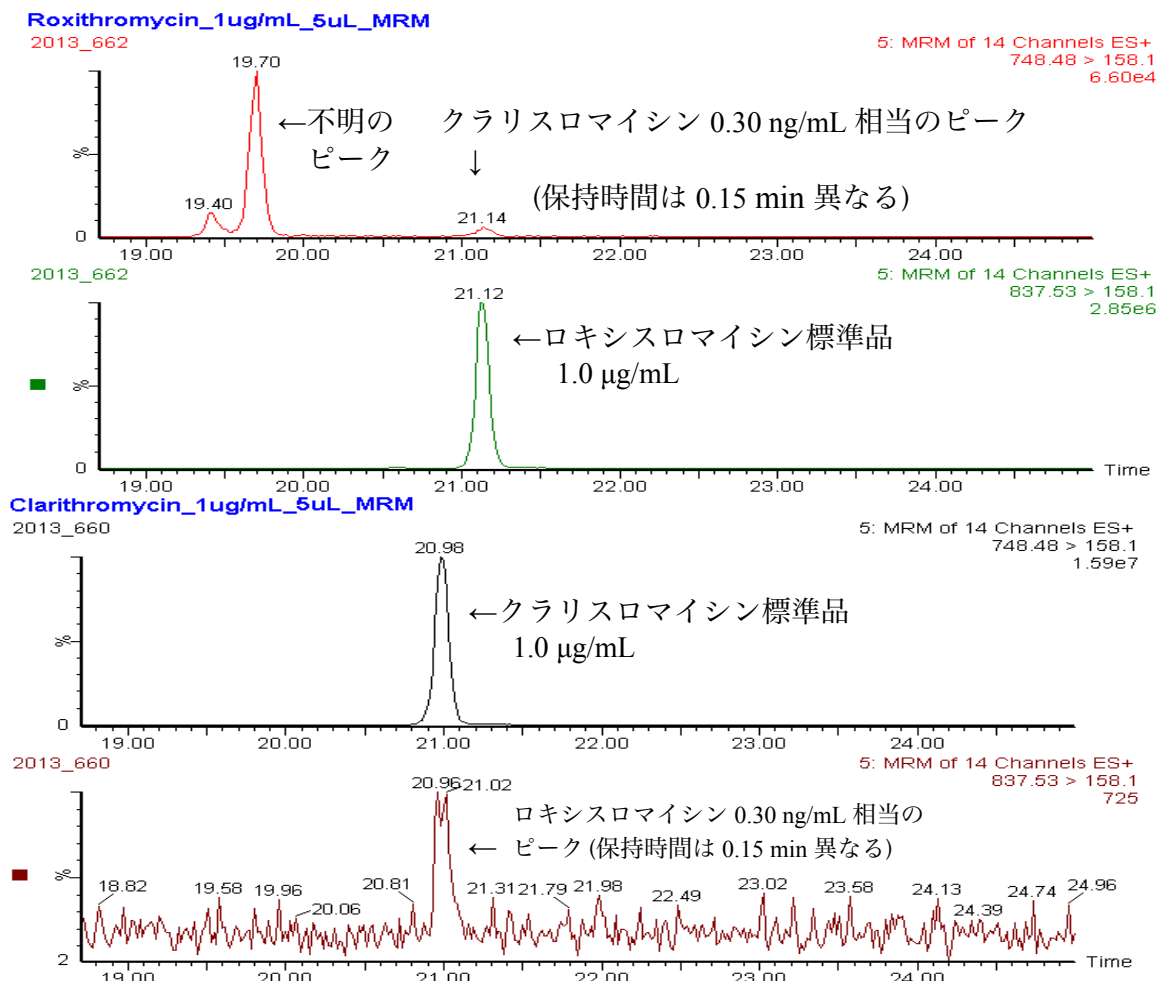


図16 クラリスロマイシンとロキシスロマイシンのクロマトグラム

【評価】

本法は、水質試料中のクラリスロマイシンの分析に適用でき、MDLは0.00080 µg/L、MQLは0.0021 µg/Lであった。

なお、操作ブランクは不検出であり、河川水の環境試料から0.037 µg/L、海水の環境試料から検出下限以上 (0.00093 µg/L) 検出された。

また、河川水及び海水を用いた添加回収試験(河川水は0.30 µg/L、海水は0.0030 µg/L添加)の回収率は、それぞれ100% (変動係数3.8%)、97% (変動係数5.4%) であった。

また、この分析法は対象物質を含む11種類の抗生物質を同時分析することが可能である。

【担当者連絡先】

所属先名称：岡山県環境保健センター

所属先住所：〒701-0298 岡山市南区内尾739-1

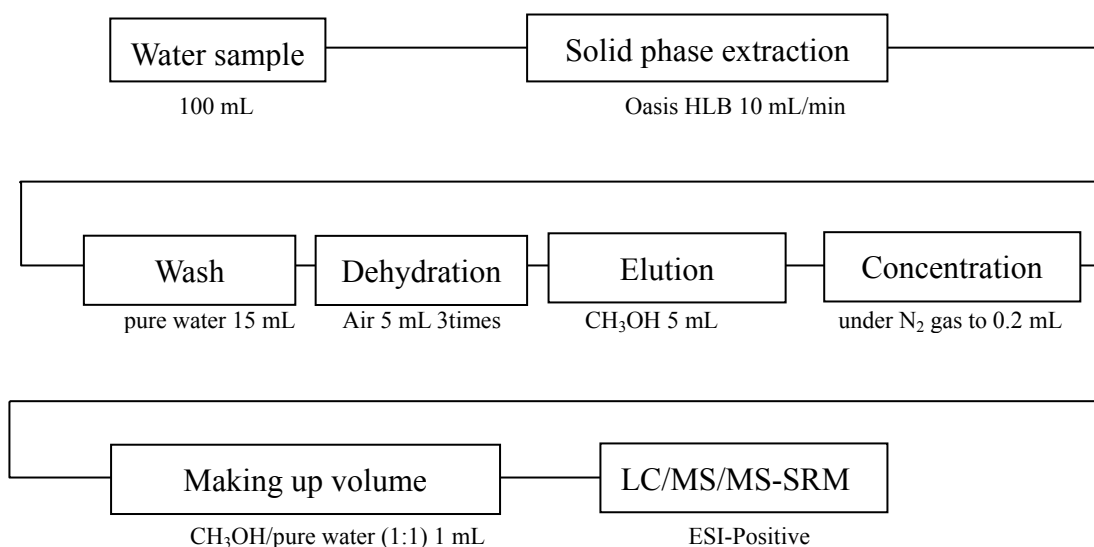
TEL：086-298-2684 FAX：086-298-2088

担当者名：新 和大、浦山豊弘

E-mail：kanpo@pref.okayama.lg.jp

Clarithromycin

This method is suitable for the determination of Clarithromycin in water sample by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). A water sample (100 mL) is passed through a preconditioned solid phase extraction cartridge (Oasis HLB plus) at a flow rate of 10 mL/min. The cartridge is washed with 15 mL of pure water, and then the extract is eluted with 5 mL of methanol. The eluate is concentrated under gentle stream of ultra-pure grade nitrogen gas to about 0.2 mL and made up to 1 mL with methanol/ pure water (1:1), and analyzed by LC/MS/MS. The method detection limit (MDL) of Clarithromycin is 0.00080 µg/L. The recovery of Clarithromycin in river surface water was 100%. That in sea surface water was 97%. Using this method, Clarithromycin was detected in river surface water and sea surface water.



物質名	分析法フローチャート	備 考
クラリスロマイシン	【水質】 <pre> graph LR A[水質試料 100 mL] --> B[固相抽出 Oasis HLB 10 mL/min] B --> C[洗浄 精製水 15 mL] C --> D[脱水 Air 5 mL × 3 回] D --> E[溶出 CH₃OH 5 mL] E --> F[濃縮 N₂ 気流下 0.2 mL まで] F --> G[定容 CH₃OH/水 (1:1) 1mL] G --> H[ろ過 0.45 μm フィルター] H --> I[LC/MS/MS-SRM ESI-Positive] </pre>	分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI Positive カラム： Atlantis T3 150 mm×2.1 mm, 3 μm 検出下限値： 【水質】(μg/L) クラリスロマイシン： 0.00080