

レボフロキサシン

Levofloxacin

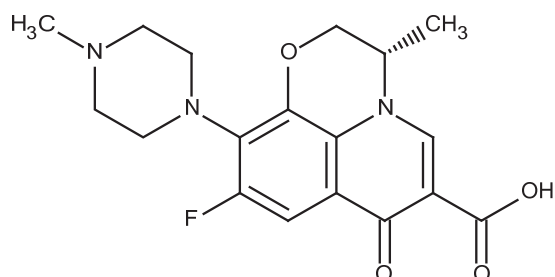
IUPAC 名： (3*S*)-9-フルオロ-3-メチル-10-(4-メチル-1-ピペラジニル)-7-オキシ
-2,3-ジヒドロ-7*H*-[1,4]オキサジノ[2,3,4-*ij*]キノリン-6-カルボン酸
(3*S*)-9-Fluoro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-2,3-dihydro-7*H*
-[1,4]oxazino[2,3,4-*ij*]quinoline-6-carboxylic acid
別名： (*S*)-オフロキサシン、(*S*)-Ofloxacin

(*R*)-オフロキサシン

(*R*)-Ofloxacin

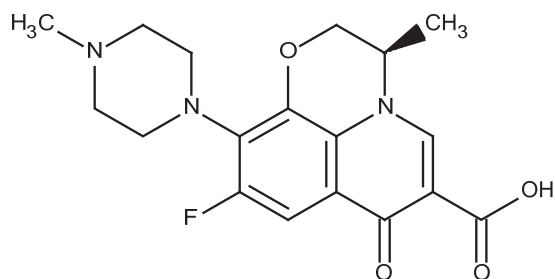
IUPAC 名： (3*R*)-9-フルオロ-3-メチル-10-(4-メチル-1-ピペラジニル)-7-オキシ
-2,3-ジヒドロ-7*H*-[1,4]オキサジノ[2,3,4-*ij*]キノリン-6-カルボン酸
(3*R*)-9-Fluoro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-2,3-dihydro-7*H*
-[1,4]oxazino[2,3,4-*ij*]quinoline-6-carboxylic acid

【対象物質の構造】



Levofloxacin, (*S*)-Ofloxacin

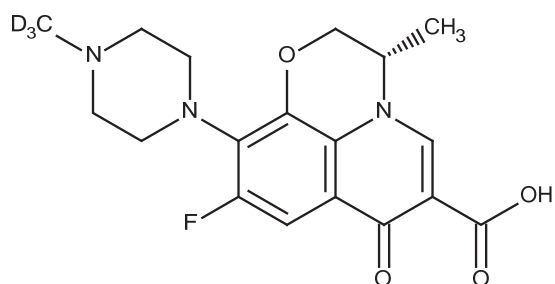
CAS 番号：100986-85-4、分子式：C₁₈H₂₀FN₃O₄



(*R*)-Ofloxacin

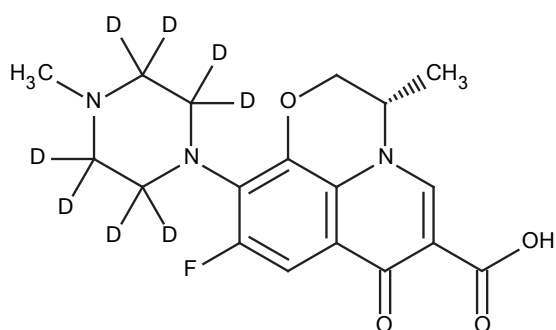
CAS 番号：100986-86-5、分子式：C₁₈H₂₀FN₃O₄

(参考)



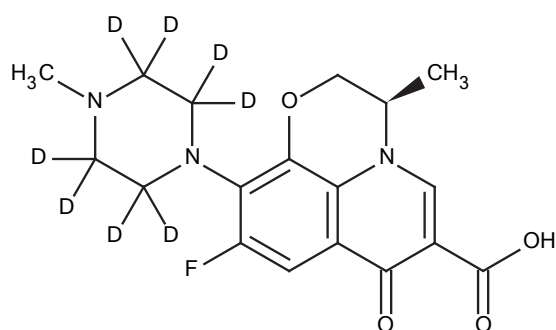
Levofloxacin- d_3

CAS 番号：なし、分子式： $C_{18}H_{17}D_3FN_3O_4$



Ofloxacin- d_8

CAS 番号：1219170-21-4、分子式： $C_{18}H_{12}D_8FN_3O_4$



Levofloxacin- d_8

CAS 番号：1217716-71-6、分子式： $C_{18}H_{12}D_8FN_3O_4$

(*R*)-Ofloxacin- d_3

CAS 番号：1346617-10-4、分子式： $C_{18}H_{17}D_3FN_3O_4$

【物理化学的性状】

物質名	分子量 (モリヤイトビツカ質量)	融点 ($^{\circ}C$)	沸点 ($^{\circ}C$)	水溶解度 (mg/L)	log P_{ow}
レボフロキサシン	361.37 (361.1438)	218-227 ¹⁾ 224 ²⁾	572 ¹⁾	25000 ³⁾ 11200 ⁴⁾	pH 7 : 0.553 ⁵⁾ 水 : 1.022 ⁵⁾
(<i>R</i>)-オフフロキサシン	361.37 (361.1438)	データ無	データ無	データ無	データ無

【毒性、用途等】

〔毒性〕

レボフロキサシン：ラット（経口）LD₅₀：1478 mg/kg^{1), 2)}

〔用途〕

抗菌医薬品（経口製剤、点眼液）^{5), 6)}

レボフロキサシンはオフロキサシン（レボフロキサシンと(R)-オフロキサシンのラセミ体）に比べ、薬効を裏付ける抗菌力試験において MIC（最小発育阻止濃度）がおおよそ 1/2 倍（約 1～1/4 倍程の範囲）と低く、レボフロキサシンと(R)-オフロキサシンは薬効が異なる⁵⁾。

出典：

- 1) APOLLO Scientific Limited MSDS
- 2) 東京化成工業 MSDS
- 3) キッセイ薬品工業 レボフロキサシン点眼液 医薬品インタビューフォーム 改訂第 6 版
- 4) 小林化工 レボフロキサシン錠 250 mg 「MEEK」 医薬品インタビューフォーム 第 5 版
- 5) 第一三共 クラビット錠 医薬品インタビューフォーム 第 13 版
- 6) 参天製薬 タリビット点眼液 医薬品インタビューフォーム 改訂第 10 版

§1 分 析 法

(1) 分析法の概要

水質試料にサロゲート内標準物質を添加した後、pH を調整し、固相カートリッジに通水して抽出する。これを精製水で洗浄した後、十分に乾燥し、イオン交換型固相カートリッジを接続し、メタノールを流して、固相カートリッジからイオン交換型固相カートリッジへ移動させる。イオン交換型固相カートリッジを乾燥後、アンモニア含有メタノールで溶出し、溶出液を乾固した後、メタノールを加えて溶解、定容して LC/MS/MS-SRM (ESI-Positive) で測定する。

(2) 試薬・器具

【試薬】

レボフロキサシン : 東京化成工業製 >98.0%

(R)-オフロキサシン	: Toronto Research Chemicals Inc.製
レボフロキサシン- d_3	: Toronto Research Chemicals Inc.製
オフロキサシン- d_8	: Toronto Research Chemicals Inc.製
レボフロキサシン- d_8	: Toronto Research Chemicals Inc.製
(R)-オフロキサシン- d_3	: Toronto Research Chemicals Inc.製
<i>t</i> -ブチルメチルエーテル	: 富士フイルム和光純薬製 高速液体クロマトグラフ用
エタノール	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
エチレンジアミン	: 富士フイルム和光純薬製 和光特級
酢酸	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
アセトン	: 関東化学製 残留農薬試験用 5000 倍濃縮
メタノール	: 関東化学製 LC/MS 用
<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド	: 富士フイルム和光純薬製 高速液体クロマトグラフ用
2 mol/L アンモニア・メタノール溶液	: 富士フイルム和光純薬製
アセトニトリル	: 関東化学製 LC/MS 用
2-プロパノール	: 関東化学製 LC/MS 用
ギ酸	: 富士フイルム和光純薬製 LC/MS 用
アンモニア水	: 関東化学製 Ultrapur 28.0~30.0%
ギ酸アンモニウム精製水	: 富士フイルム和光純薬製 和光特級 採水口に LC-Pak を接続した超純水製造装置 (Milli-Q、ミリポア製) により精製された水
固相カートリッジ	: Waters 製 Oasis HLB Plus 225 mg
イオン交換カートリッジ	: Waters 製 Oasis MCX Plus 225 mg
イオン交換カートリッジ	: Waters 製 Oasis MAX Plus 225 mg

【試薬の調製】

〔5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液〕

ギ酸アンモニウム 0.315 g を精製水で溶解して全量を 1.0 L とする。または、ギ酸アンモニウム 6.306 g を精製水で溶解して全量を 100 mL として 1.0 mol/L ギ酸アンモニウム溶液を調製し、この 1.0 mol/L ギ酸アンモニウム溶液 5.0 mL を精製水で希釈して全量を 1.0 L とする。

〔5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 10.0) 〕

5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 1.0 L にアンモニア水（あるいは精製水で

適宜希釈したアンモニア水) を添加して pH 10.0 に調整する。調整中に pH が超過した場合はギ酸 (あるいは精製水で適宜希釈したギ酸) を添加して調整する。

【1 mol/L アンモニア・メタノール溶液】

2 mol/L アンモニア・メタノール溶液 50 mL にメタノールを加えて 100 mL とする。

【標準液の調製】

【標準原液】

レボフロキサシン 5.0 mg を正確に量り取り、メタノールに溶解して 50 mL とし、100 µg/mL の標準原液を調製する。

(R)-オフフロキサシン 5.0 mg を正確に量り取り、*N,N*-ジメチルホルムアミドに溶解して 50 mL とし、100 µg/mL の標準原液を調製する。

なお、両物質は有機溶媒中でもガラス壁面や金属壁面に吸着するため、調製にはポリ製器具を使用すること。以下のサロゲート内標準液及び標準液の調製でも同様に行うこと。

【サロゲート内標準液】

レボフロキサシン-*d*₃ 1.0 mg をアセトン 10 mL に溶解し、100 µg/mL のサロゲート内標準原液を調製する。

レボフロキサシン-*d*₃ のサロゲート内標準原液を分取し、メタノールで希釈してレボフロキサシン補正用の 0.50 µg/mL レボフロキサシン-*d*₃ サロゲート内標準液を調製する。

オフフロキサシン-*d*₈ 1.0 mg を *N,N*-ジメチルホルムアミド 10 mL に溶解し、100 µg/mL のサロゲート内標準原液を調製する。

オフフロキサシン-*d*₈ のサロゲート内標準原液を分取し、メタノールで希釈して (R) -オフフロキサシン補正用の 1.0 µg/mL のオフフロキサシン-*d*₈ サロゲート内標準液を調製する。

レボフロキサシン-*d*₃ サロゲート内標準液とオフフロキサシン-*d*₈ サロゲート内標準液は混合して調製してもよい。

なお、レボフロキサシン補正用サロゲート内標準としてレボフロキサシン-*d*₈ を、(R) -オフフロキサシン補正用サロゲート内標準として (R) -オフフロキサシン-*d*₃ を用いてもよい。

【検量線用標準液】

レボフロキサシン標準原液をメタノールで希釈して 1.0 µg/mL とした後、段階

的にメタノールで希釈して 0.10～100 ng/mL の検量線用標準液を調製する。各濃度の検量線用標準液にはレボフロキサシン- d_3 が 5.0 ng/mL の濃度になるようにサロゲート内標準液を添加する。(レボフロキサシン- d_8 の場合も同様とする。)

(*R*)-オフフロキサシン標準原液をメタノールで希釈して 1.0 µg/mL とした後、段階的にメタノールで希釈して 0.10～100 ng/mL の検量線用標準液を調製する。各濃度の検量線用標準液にはオフフロキサシン- d_8 が 10 ng/mL ((*R*)-オフフロキサシン- d_8 として 5.0 ng/mL 相当 (注 1)) の濃度になるようにサロゲート内標準液を添加する。((*R*)-オフフロキサシン- d_3 の場合は 5.0 ng/mL の濃度となるようにする。)

なおレボフロキサシンの標準液と(*R*)-オフフロキサシンの標準液は、混合しない方が測定後の解析を行いやすい。

また、光分解性があるため、保存する場合は褐色ポリ容器に保存すること。

【器具】

〔移動相、5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 10.0) 及び注入口洗浄液調製用〕

ねじロガラスびん、メスシリンダー(ガラス製でよい)をメタノール及びアセトンで洗浄する。

〔レボフロキサシン等と接触するもの〕

レボフロキサシン及び(*R*)-オフフロキサシンはガラスや金属類に吸着するため、ポリ (プラスチック製) のものを用いる。ガラス製ホールピペット、ガラス製パスツールピペット、マイクロシリンジ等ガラス製品、金属製品を用いることはできない。

親水性 PTFE ろ紙 (ADVANTEC 東洋製 : H100A047A 等)、ポリ製減圧ろ過用フィルターホルダー (ADVANTEC 東洋製 : KP-47H 等)、Sep-Pak コンセントレーター (ガラスシリンジの流路前の吸引で使用)、吸引マニホールド (デリバリーチップは PTFE 製等のもの)、試料採取瓶 (ポリ製容器)、メスシリンダー (誤差±2%以内、ナルゲン 3663 シリーズ等)

(3) 分析法

【試料の採取及び保存等】

環境省「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)における「試料の採水及び検体の調製等」に従う。試料はメタノール及びアセトンで洗浄したポリ製容器に採取する。光による分解が確認されたため試料は冷暗所に保存し、7 日以内に分析する。

【試料の前処理及び試験液の調製】

水質試料 200 mL にレボフロキサシン- d_3 サロゲート内標準液(0.50 $\mu\text{g/mL}$)及びオフロキサシン- d_8 サロゲート内標準液(1.0 $\mu\text{g/mL}$)(注 1)を各 40 μL 添加した後、アンモニア水及びギ酸で pH を 10.0 に調整する(注 2)。この溶液を親水性 PTFE ろ紙 (H100A047A) で吸引ろ過する(注 3)。ろ過後、大気開放し、ろ紙残渣上に 5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 10.0) を 2.0 mL 加えて 1 分程度保持した後、再度吸引し、ろ液と合わせる。再度この操作を行い、ろ液とよく混合する。このろ液を、メタノール 10 mL 及び 5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液 (pH 10.0) 10 mL で順次コンディショニングした固相カートリッジ (Oasis HLB) に 8.0 mL/min 程度の速度で吸引式で通水する(注 4)。通水後、精製水 10 mL で洗浄する。間隙液を除去し、固相カートリッジに窒素ガスを通して十分乾燥 (60 分程度) する(注 5)。乾燥後、固相カートリッジに、別途、あらかじめ 1 mol/L アンモニア・メタノール溶液 10 mL 及びメタノール 10 mL で順次コンディショニングしたイオン交換カートリッジ (Oasis MCX) を溶出側(順方向)に接続する。固相カートリッジにメタノール 15 mL を通じて対象物質を溶出し、イオン交換カートリッジに吸着させる。固相カートリッジを除去し、イオン交換カートリッジに窒素ガスを通して乾燥 (15 分程度) する。乾燥後、イオン交換カートリッジに 1 mol/L アンモニア・メタノール溶液 10 mL を通じて対象物質を溶出させる。溶出液 2.5 mL を分取し、窒素気流下で乾固させ(注 6)、メタノール 1.0 mL を加えて溶解し(注 7)、試験液とする(注 8)。

【空試験液の調製】

試料水と同量の 5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液を用い、【試料の前処理及び試験液の調製】の項に従って操作し、得られた試験液を空試験液とする。

【測定】

〔順相 LC/MS/MS 条件〕(注 9)

〔LC 条件〕

LC 機種	: 島津製作所製 Nexera X2
カラム	: phenomenex 製 LUX i-Cellulose-5 (150 mm×2.0 mm, 3 μm)
移動相	: A : エタノール (測定に使用しないが配管内に水系溶媒が残らない様に置換する) B : <i>t</i> -ブチルメチルエーテル/エタノール/ 酢酸/エチレンジアミン (30:70:0.2:0.2,v/v/v/v) 0→15 min A: B = 0: 100 (アイソクラティック)

カラム流量 : 0.3 mL/min (26 MPa 程度)
 カラム温度 : 40°C
 試料注入量 : 10 µL
 注入口洗浄液 : 精製水/メタノール/アセトニトリル/2-プロパノール/ギ酸
 (25:25:25:25:0.1)

〔MS 条件〕

機種 : AB Sciex 製 QTRAP4500
 カーテングス(CUR) : 30 psi
 コリジョンガス(CAD) : 8 (機器の設定値で単位なし)
 イオンスプレー電圧(IS) : 5500 V
 ガス温度(TEM) : 550°C
 ネブライザーガス(GS1) : 40.0 psi
 ターボガス(GS2) : 60.0 psi
 引き込み電圧(DP) : 60.0 V
 入口電圧(EP) : 10.0 V
 出口電圧(CXP) : 12.0 V
 イオン化法 : ESI (+)
 測定モード : SRM

表 1 順相モニターイオン(m/z)と測定条件

物質名		プレカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	Collision Energy (eV)
レボフロキサシン及び	(定量用)	362.1	344.1	30
(<i>R</i>)-オフフロキサシン	(確認用)	362.1	268.1	50
レボフロキサシン- d_3	(定量用)	365.1	347.1	30
	(確認用)	365.1	271.1	50
オフフロキサシン- d_8	(定量用)	370.1	352.1	30
	(確認用)	370.1	272.1	50

〔検量線〕

検量線用標準液 10 µL を LC/MS/MS に注入し、対象物質とサロゲート内標準物質の濃度比及び得られたピーク面積比から検量線を作成する。

〔定量〕

試験液 10 µL を LC/MS/MS に注入して分析する。得られた対象物質とサロゲ

ート内標準のピーク面積比を検量線に照らして定量する。

〔濃度の算出〕

試料水濃度 C は次式により算出する。

$$C = R \cdot Q / V$$

R : 検量線から求めたサロゲート内標準濃度に対する対象物質濃度の比

Q : 試料中に添加したサロゲート内標準の量 (ng)

(= 添加するサロゲート内標準液の濃度 (ng/μL) × 添加するサロゲート内標準液の容量 (μL))

V : 試料水量 (L)

本分析法に従った環境水分析の場合、以下の数値を使用する。

$$Q = 20 \text{ (ng)}$$

(= 添加したサロゲート内標準液の濃度 (0.50 ng/μL) × 添加したサロゲート内標準液の容量 (40 μL))

$$V = 0.20 \text{ (L)}$$

即ち、

$$C = R \times 100 \text{ (ng/L)}$$

である。

〔装置検出下限値(IDL)〕

本分析に用いた LC/MS/MS の IDL を表 2 に示す (注 10)。

表 2 IDL の算出結果

物質名	IDL (pg)	試料量 (L)	最終液量 (mL)	IDL 試料換算値 (μg/L)
レボフロキサシン	0.11	0.20	4.0	0.00022
(R)-オフロキサシン	0.16	0.20	4.0	0.00033

〔分析方法の検出下限値(MDL)及び定量下限値(MQL)〕

本分析法における MDL 及び MQL を表 3 に示す (注 11)。

表3 MDL 及び MQL の算出結果

物質名	試料量 (L)	最終液量* (mL)	MDL ($\mu\text{g/L}$)	MQL ($\mu\text{g/L}$)
レボフロキサシン	0.20	4.0	0.00047	0.0012
(R)-オフロキサシン	0.20	4.0	0.00039	0.0010

*：試料量 0.20 L から得られる計算上の最終液量。

注 解

- (注 1) 添加するオフロキサシン- d_8 は、レボフロキサシン- d_8 と (R)-オフロキサシン- d_8 の混合物であり、このうち (R)-オフロキサシン- d_8 のみを (R)-オフロキサシンのサロゲートとして用いる。正確な混合比は不明であるが 2 つのピーク面積が同等であることからほぼ等量とみなし、(R)-オフロキサシン- d_8 の添加量がレボフロキサシン- d_3 と同程度となるように添加する。そのためオフロキサシン- d_8 の添加量はレボフロキサシン- d_3 の倍濃度としている。
- (注 2) アンモニア水及びギ酸は精製水で適宜希釈して使用する。また海水試料は過度に pH を高く（塩基性に）すると沈殿物を生じることがあるので注意して調整すること。
- pH 電極はガラス面積の小さいプラスチック電極（堀場製作所製 9625-10D）を使用した。通常、ガラス電極（堀場製作所製 9615S-10D）を使用した場合との差は確認していない。
- (注 3) ろ過器にろ紙、カップ（ファンネル）、ベース等を組んだ後にメタノール及び 5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム緩衝液（pH10.0）で洗浄する。浮遊物質によるが、親水性 PTFE ろ紙（H100A047A）1 枚でろ過出来る河川水試料量は 250～300 mL 程度であった。
- (注 4) SepPak コンセントレーターやアクアローダーを利用する場合、ガラスシリンジに通水する前の吸引側に固相カートリッジを設置する。
- Oasis PRiME HLB Plus Short は Oasis HLB Plus に比べて通水性が悪かったため Oasis HLB Plus とした。
- (注 5) 間隙液除去は吸引マニホールド上で吸引する程度でよい。固相カートリッジに残る水分量によっては溶出の程度に差が生じる可能性もあるため、窒素ガス通気によって十分に乾燥させる。水分が残った状態での溶出状況は、この試験方法では確認していない。
- (注 6) 常温では時間がかかるため、ヒートブロック等で 50～60℃（本検討では 55℃ で実施）に加温すると時間を短縮できる。

- (注 7) 十分に溶解させるため 30 分程度静置した後、試験管ミキサー等で攪拌を行う。
- (注 8) フローチャートを図 4～6 に示す。【試料の前処理及び試験液の調製】をまとめたものが図 4 の分析法のフローチャート（通常）であるが、特に清澄な河川水でカラムクリーンアップが不要な場合は、図 5 の分析法のフローチャート（試験液に着色等なくカラムクリーンアップ不要の場合）に従って実施してもよい。しかし検討で行った下水処理水の場合は図 4 に従っても着色が残り、この様な着色成分の多い河川水及び海水の場合は、図 6 の分析法のフローチャート（試験液の着色が強い場合）に従ってイオン交換カートリッジ Oasis MAX Plus を増設して実施するとよい。この図 6 の方法で下水処理水からの試験液をほぼ無色透明にすることが可能であった。
- (注 9) LC/MS の条件は本測定に使用した機種（島津製作所製 Nexera X2 及び AB Sciex 製 QTRAP4500）特有のものである。
- 後述の検討のとおり、レボフロキサシンは逆相条件でも測定できるが、レボフロキサシンと(*R*)-オフロキサシンの異性体分離を行うことはできなかったため順相条件とした。
- 通常は逆相系（移動相 A：水系溶媒、移動相 B：有機溶媒）で使用している機器を、レボフロキサシン分析（順相系）に使用する場合を想定して設定した。エタノール濃度を下げると結晶が析出してポンプやチェックバルブ等が詰まるので規定の移動相濃度で調製すること。

(注 10) IDL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)に従って、以下の表 4 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 1 及び図 2 に示す。

表 4 IDL の算出結果

対象物質名	レボフロキサシン	(R)-オフロキサシン
試料量 (L)	0.20	0.20
最終液量 (mL)	4.0	4.0
注入液濃度 (ng/mL)	0.10	0.10
注入量 (pg)	1.0	1.0
装置注入液量 (μL)	10	10
結果 1 (pg)	1.17	1.12
結果 2 (pg)	1.17	1.06
結果 3 (pg)	1.18	1.00
結果 4 (pg)	1.22	1.01
結果 5 (pg)	1.15	1.02
結果 6 (pg)	1.17	1.05
結果 7 (pg)	1.22	1.08
平均値 (pg)	1.184	1.049
標準偏差 (pg)	0.0278	0.0418
IDL (pg)*	0.11	0.16
IDL 試料換算値 (ng/L)	0.22	0.33
S/N 比	13	13
CV (%)	2.4	4.0

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

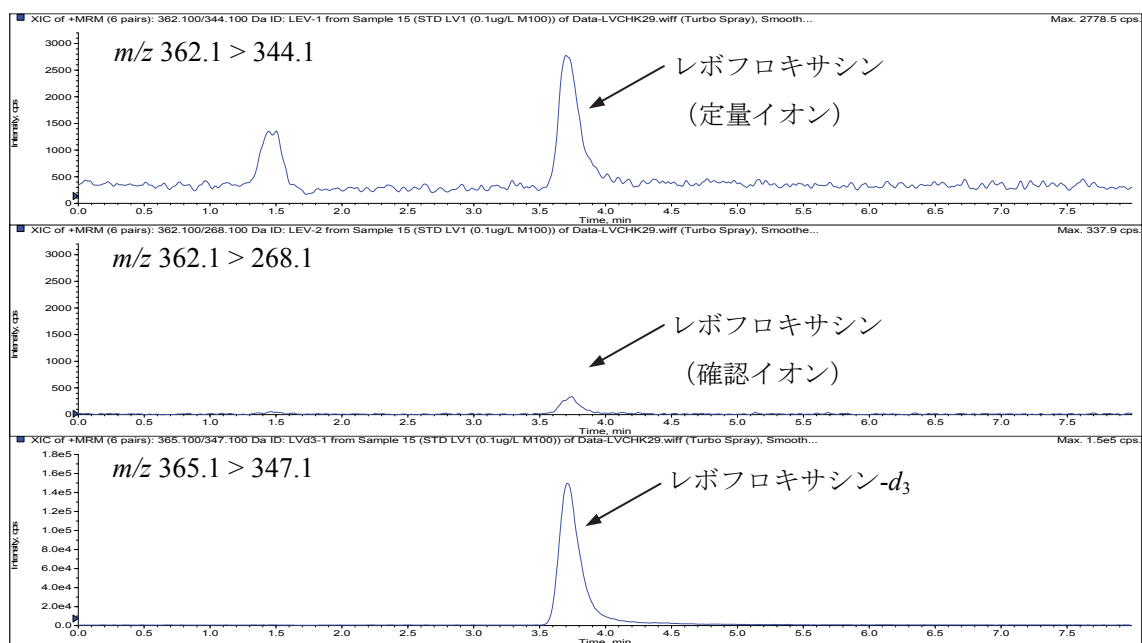


図1 レボフロキサシン(0.10 ng/mL) IDL 測定時のクロマトグラム

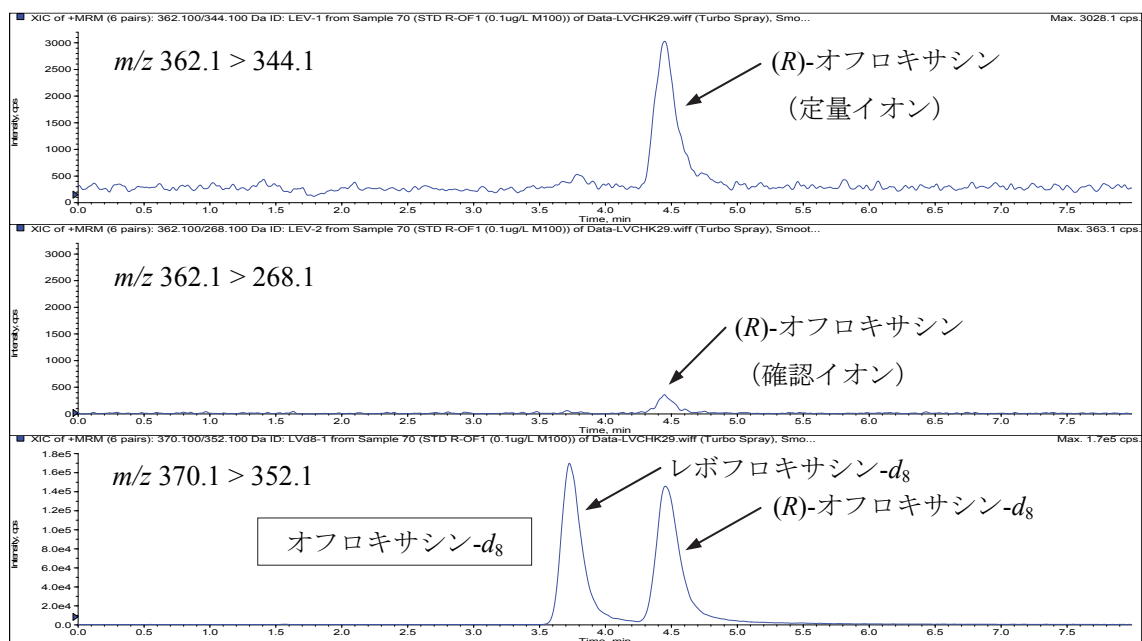


図2 (R)-オフロキサシン(0.10 ng/mL) IDL 測定時のクロマトグラム

(注 11) MDL 及び MQL は、「化学物質環境実態調査実施の手引き」(平成 28 年 3 月)により、結果は表 5 及び表 6 のとおり算出した。また図 3 に MDL 測定時の代表的なクロマトグラムを示す。

表 5 レボフロキサシンの MDL 及び MQL の算出結果

対象物質名	レボフロキサシン	サロゲート回収率(%)
試料	河川水	-
試料量 (L)	0.20	-
標準添加量 (ng)	2.0	-
試料換算濃度 (ng/L)	10	-
最終液量 (mL)	4.0	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.50	-
装置注入液量 (μL)	10	-
操作ブランク平均 (ng/L) ^{*1}	< 0.47	89
無添加平均 (ng/L) ^{*2}	< 0.47	88
結果 1 (ng/L)	11.7	82
結果 2 (ng/L)	11.5	81
結果 3 (ng/L)	11.4	82
結果 4 (ng/L)	11.5	84
結果 5 (ng/L)	11.5	83
結果 6 (ng/L)	11.5	81
結果 7 (ng/L)	11.4	81
平均値 (ng/L)	11.49	82.0
標準偏差 (ng/L)	0.122	
MDL (ng/L) ^{*3}	0.47	
MQL (ng/L) ^{*4}	1.2	
S/N 比	61	
CV (%)	1.1	

*1: 空試験液を測定した値の平均値 (n=4)

*2: MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=3)

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

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

表 6 (R)-オフロキサシンの MDL 及び MQL の算出結果

対象物質名	(R)-オフロキサシン	サロゲート回収率 ^{*1} (%)
試料	河川水	-
試料量 (L)	0.20	-
標準添加量 (ng)	2.0	-
試料換算濃度 (ng/L)	10	-
最終液量 (mL)	4.0	-
注入液濃度 (ng/mL)	0.50	-
装置注入液量 (μL)	10	-
操作ブランク平均 (ng/L) ^{*2}	< 0.39	88
無添加平均 (ng/L) ^{*3}	< 0.39	92
結果 1 (ng/L)	10.6	87
結果 2 (ng/L)	10.7	84
結果 3 (ng/L)	10.6	86
結果 4 (ng/L)	10.7	87
結果 5 (ng/L)	10.6	87
結果 6 (ng/L)	10.5	84
結果 7 (ng/L)	10.4	87
平均値 (ng/L)	10.60	86.1
標準偏差 (ng/L)	0.101	
MDL (ng/L) ^{*4}	0.39	
MQL (ng/L) ^{*5}	1.0	
S/N 比	52	
CV (%)	1.0	

*1: オフロキサシン-*d*₈ 中の (R)-オフロキサシン-*d*₈ の回収率

*2: 空試験液を測定した値の平均値 (n=4)

*3: MDL 算出用試料に標準を添加していない状態で含まれる濃度の平均値 (n=3)

*4: $MDL = t(n-1, 0.05) \times \sigma_{n-1} \times 2$ *5: $MQL = \sigma_{n-1} \times 10$

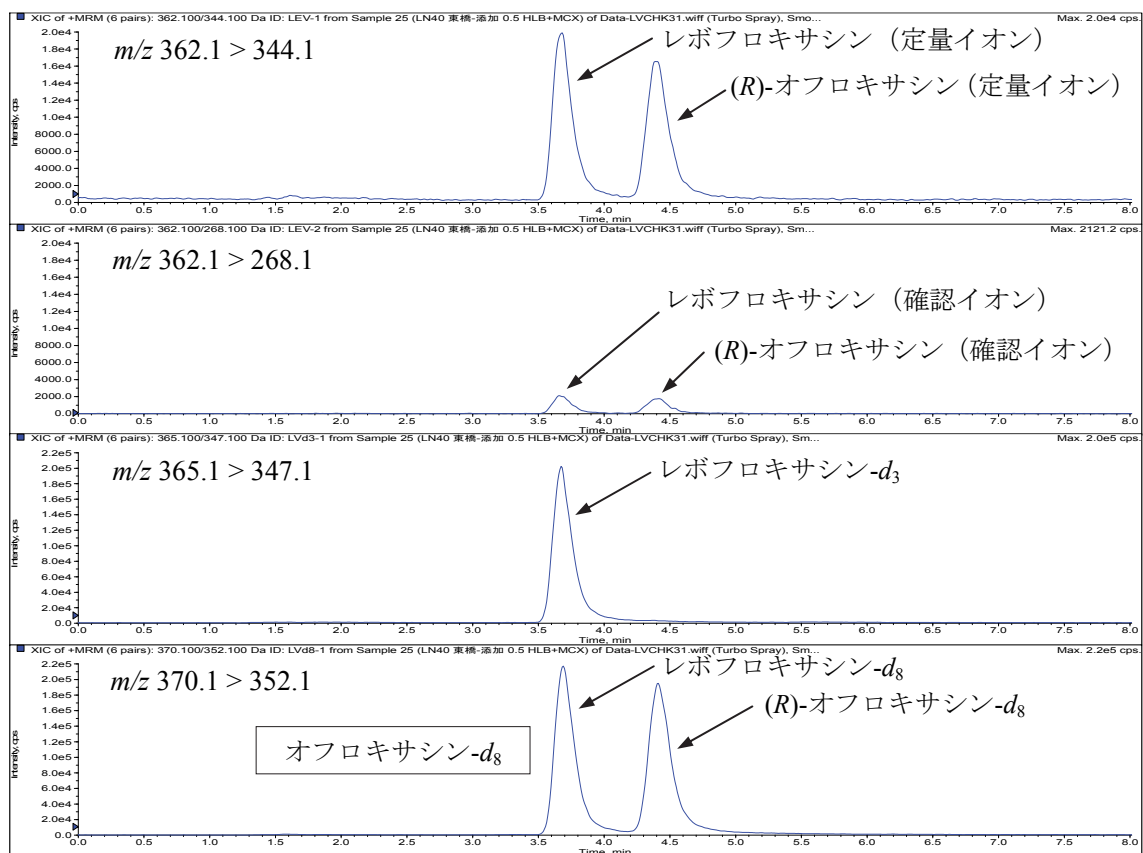


図3 MDL 測定時のクロマトグラム

§2 解 説

【分析法】

〔フローチャート〕

分析法のフローチャートを図 4 に示す。なお、清澄な河川水でカラムクリーンアップを実施しなくても試験液に着色等がない場合は、図 5 のフローチャートに従って実施してもよい。また図 4 のフローチャートに従っても試験液の着色が強い場合は、図 6 のフローチャートに従って実施するとよい。

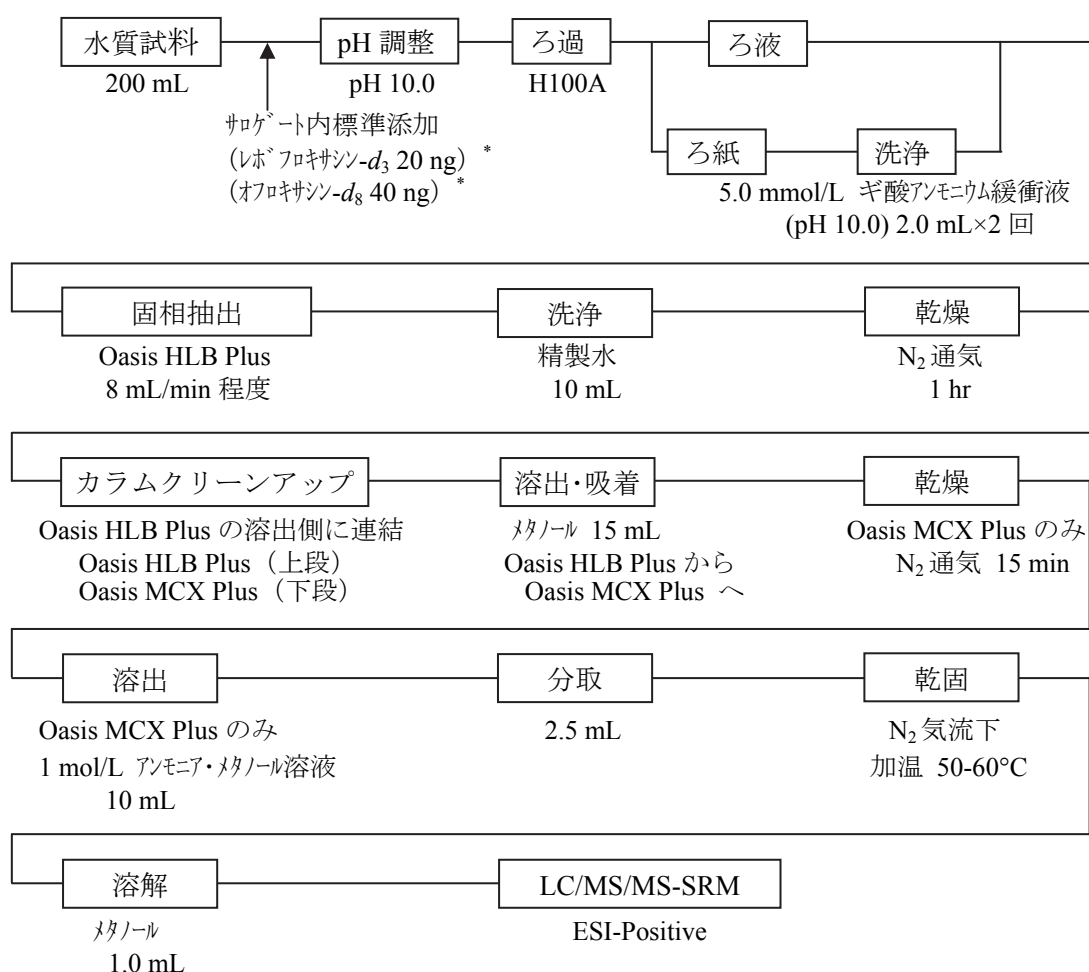


図 4 分析法のフローチャート（通常）

*: レボフロキサシン- d_3 をレボフロキサシン- d_8 に、オフロキサシン- d_8 を (R) -オフロキサシン- d_3 に変更する場合は、レボフロキサシン- d_8 及び (R) -オフロキサシン- d_3 の添加量はどちらも 20 ng とする。レボフロキサシンと (R) -オフロキサシンの d 体は解析を行い易い様に- d_3 体と- d_8 体の両方を別々に用いるとよい。

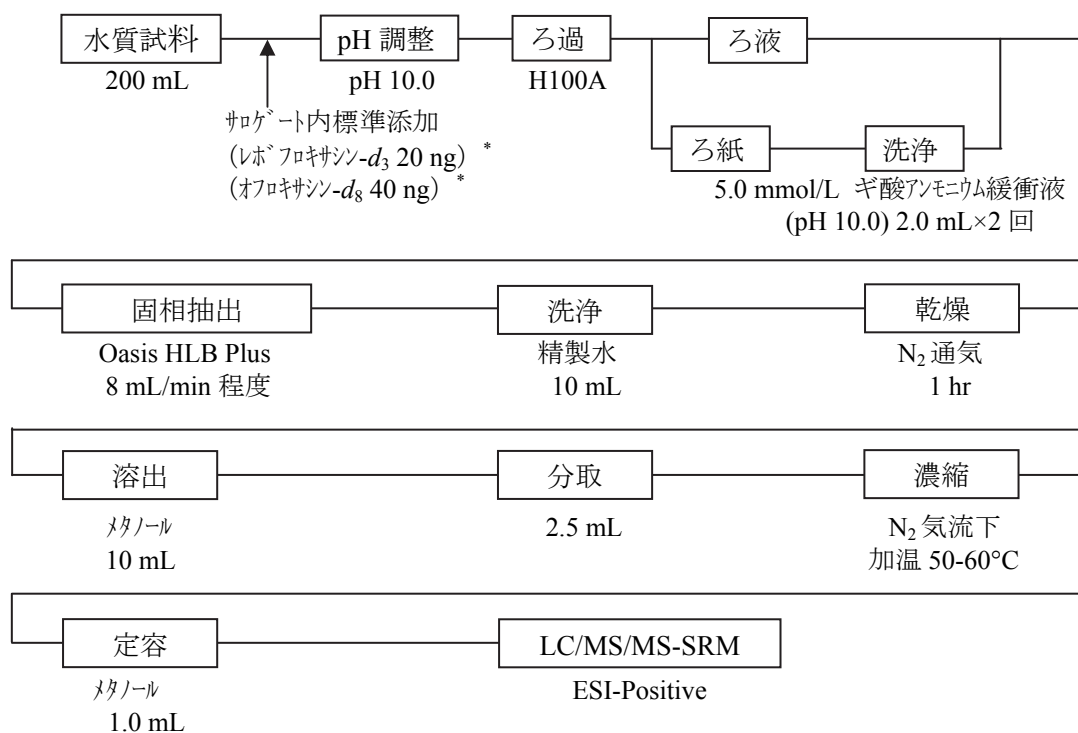


図5 分析法のフローチャート
(試験液に着色等なくカラムクリーンアップ不要の場合)

*: レボフロキサシン- d_3 をレボフロキサシン- d_8 に、オフロキサシン- d_8 を(*R*) -オフロキサシン- d_3 に変更する場合は、レボフロキサシン- d_8 及び(*R*) -オフロキサシン- d_3 の添加量はどちらも 20 ng とする。レボフロキサシンと(*R*) -オフロキサシンの d 体は解析を行い易い様に- d_3 体と- d_8 体の両方を別々に用いるとよい。

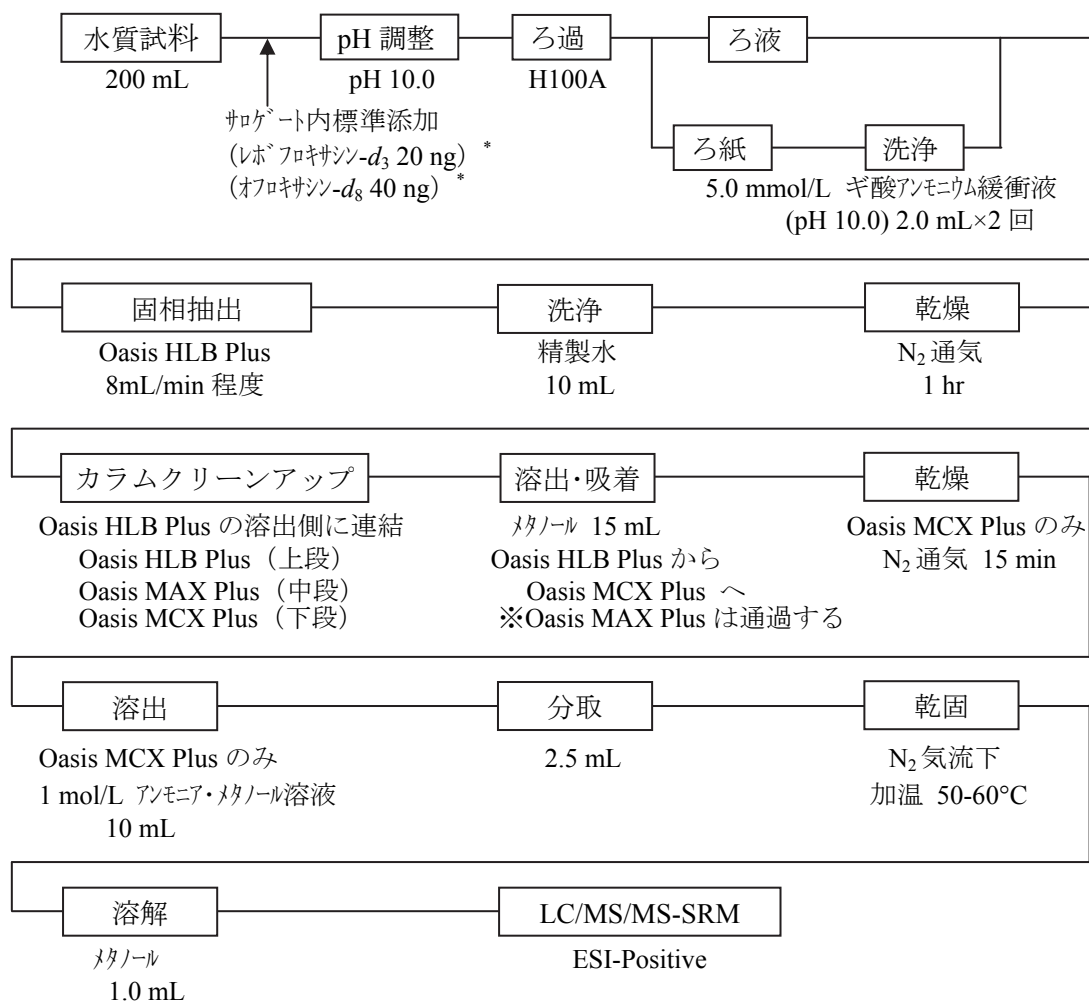


図 6 分析法のフローチャート
(試験液の着色が強い場合)

*: レボフロキサシン- d_3 をレボフロキサシン- d_8 に、オフロキサシン- d_8 を (R) -オフロキサシン- d_3 に変更する場合は、レボフロキサシン- d_8 及び (R) -オフロキサシン- d_3 の添加量はどちらも 20 ng とする。レボフロキサシンと (R) -オフロキサシンの d 体は解析を行い易い様に- d_3 体と- d_8 体の両方を別々に用いるとよい。

〔検量線〕

レボフロキサシンの検量線を図7に、検量線作成データを表7に示す。また(R)-
オフロキサシンの検量線を図8に、検量線作成データを表8に示す。

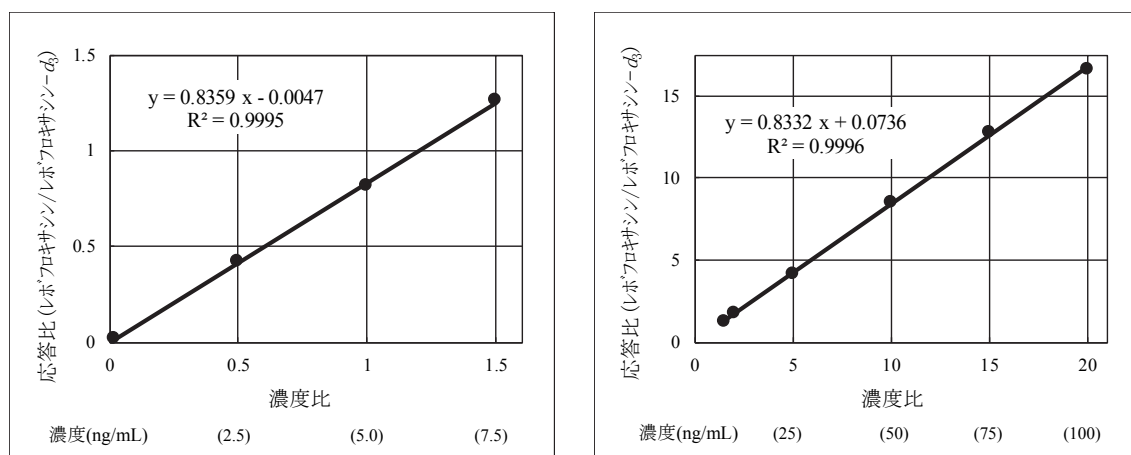


図7 レボフロキサシンの検量線

(対象物質濃度範囲：0.10～7.5 ng/mL (左図)；7.5～100 ng/mL (右図))

表7 検量線作成用データ

濃度比	標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	応答値 (平均値)		応答比 (A _s /A _{is})
		レボフロキサシン(A _s) (m/z 362.1>344.1)	レボフロキサシン-d ₃ (A _{is})* (m/z 365.1>347.1)	
0.020	0.10	25950.1	1750462.1	0.01483
0.50	2.5	697922.2	1670258.1	0.4178
1.0	5.0	1392992.3	1712659.7	0.8133
1.5	7.5	2107982.9	1673986.6	1.259
2.0	10	2904559.6	1649507.6	1.761
5.0	25	6843351.6	1636808.3	4.182
10	50	13519016.5	1594841.0	8.477
15	75	20194518.2	1581882.6	12.77
20	100	25760825.5	1554287.6	16.57

*：サロゲート内標準濃度：5.0 ng/mL

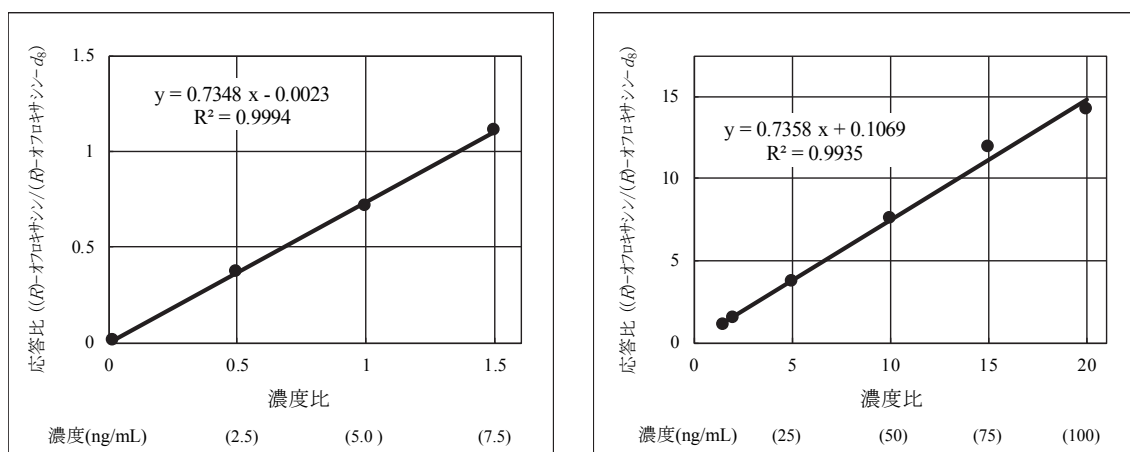


図 8 (R)-オフロキサシンの検量線
(対象物質濃度範囲：0.10～7.5 ng/mL (左図)；7.5～100 ng/mL (右図))

表8 検量線作成用データ

濃度比	標準液濃度 (ng/mL) (C _s)	応答値 (平均値)		応答比 (A _s /A _{is})
		(R) -オフロキサシン (A _s) (m/z 362.1>344.1)	(R) -オフロキサシン-d ₈ (A _{is}) [*] (m/z 370.1>352.1)	
0.020	0.10	28715.2	2088776.7	0.01376
0.50	2.5	730525.0	1967788.0	0.3712
1.0	5.0	1511793.8	2110550.8	0.7163
1.5	7.5	2199768.9	1984228.8	1.109
2.0	10	3070032.3	2056808.9	1.493
5.0	25	7321037.0	1976359.0	3.705
10	50	14452712.9	1917040.7	7.539
15	75	22393882.9	1878303.5	11.92
20	100	27549338.3	1934999.6	14.24

*： オフロキサシン-d₈（濃度 10 ng/mL）のうち (R) -オフロキサシン-d₈ のみの
応答値を用いてサロゲート内標準濃度 5.0 ng/mL として取扱う。

〔クロマトグラム〕

レボフロキサシン (5.0 ng/mL) 及び(R)-オフロキサシン (5.0 ng/mL) のクロマトグラムを図9に示す。

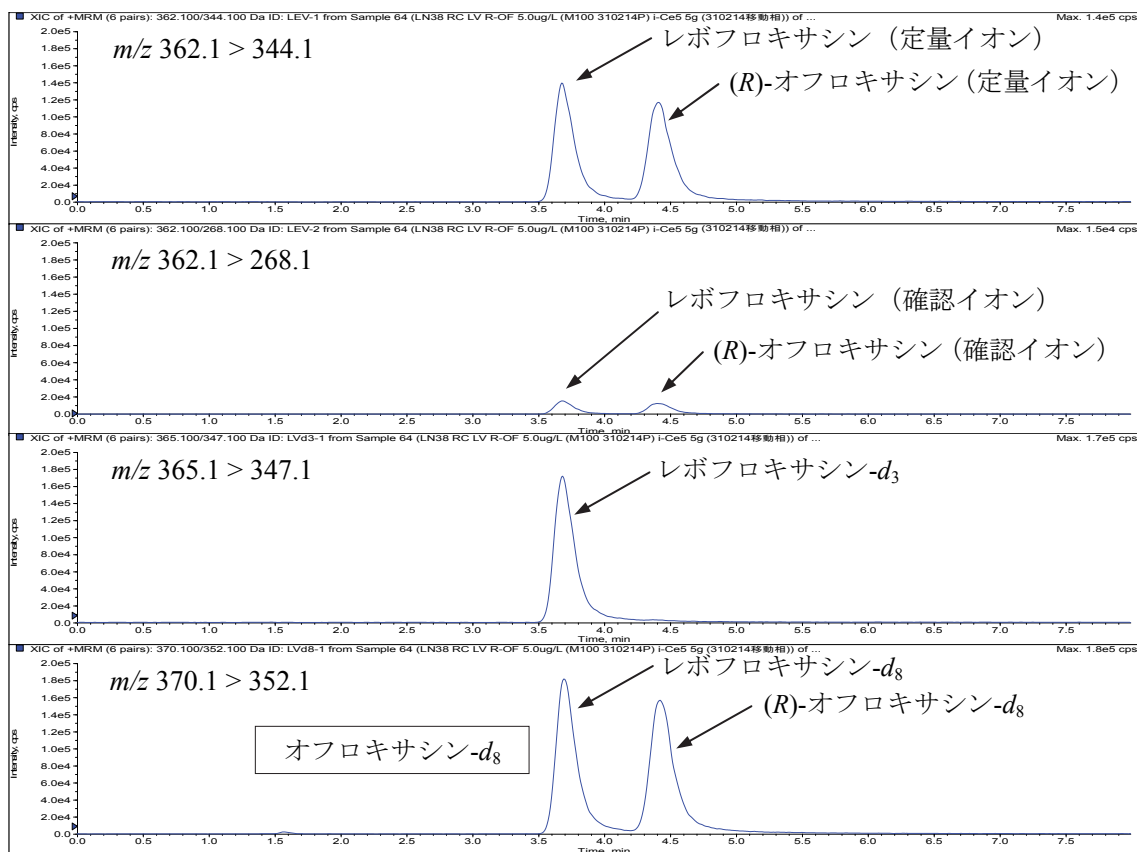


図9 標準液 (5.0 ng/mL)のクロマトグラム

〔マススペクトル〕

順相でのレボフロキサシンのマススペクトルを図 10 に示す。

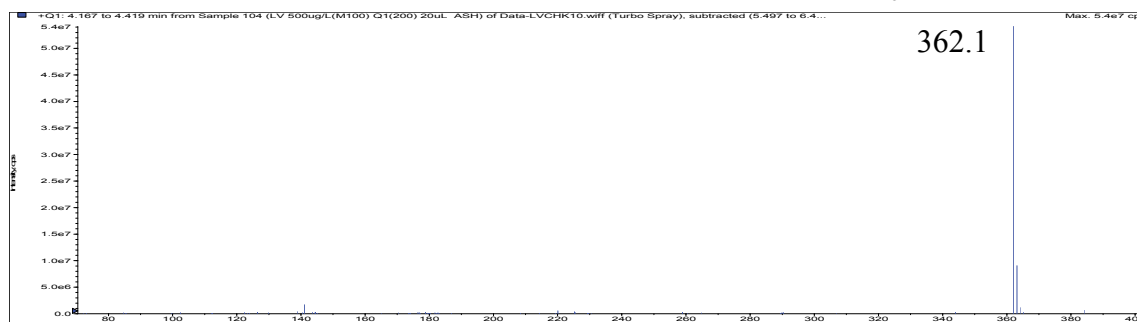


図 10 順相でのレボフロキサシンのマススペクトル

順相におけるレボフロキサシンのプレカーサーイオン m/z 362.1 に対するプロダクトイオンマススペクトルを図 11 に示す。

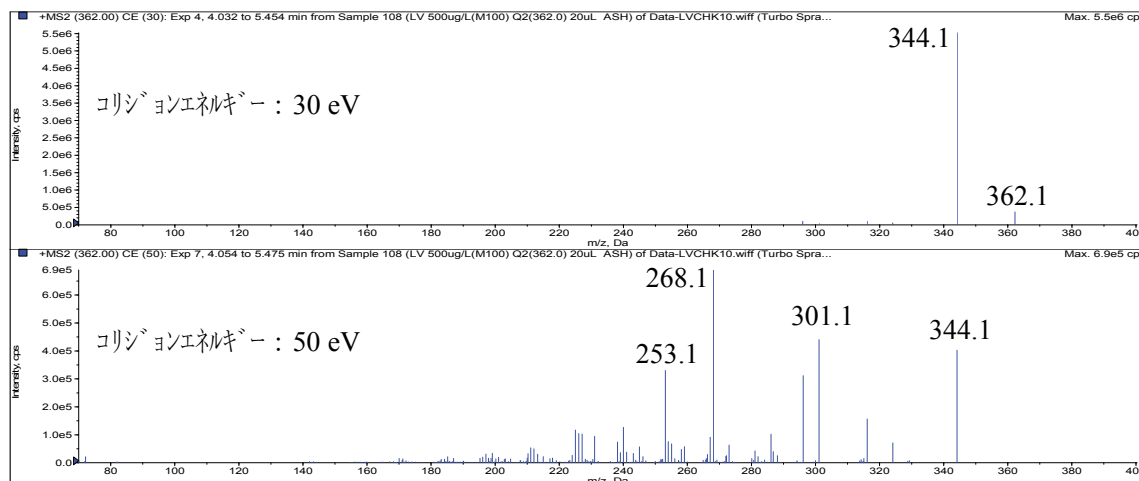


図 11 順相プレカーサーイオン m/z 362.1 に対するプロダクトイオンマススペクトル

順相でのレボフロキサシン- d_3 のマススペクトルを図 12 に示す。

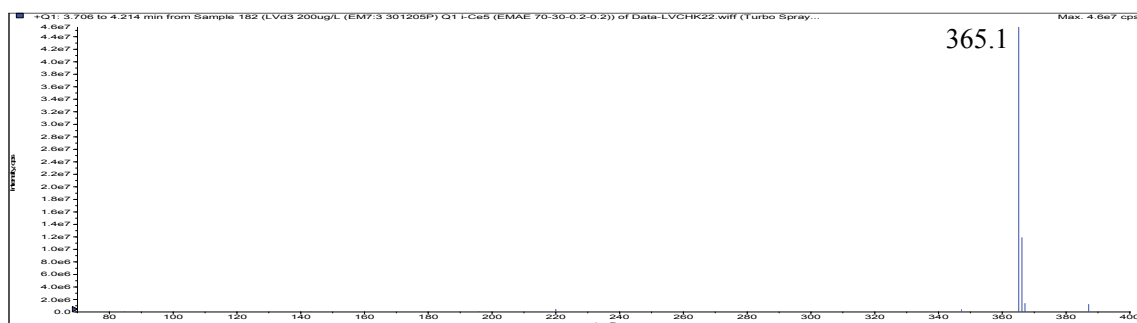


図 12 順相でのレボフロキサシン- d_3 のマススペクトル

順相でのレボフロキサシン- d_3 のプレカーサーイオン m/z 365.1 に対するプロダクトイオンマスペクトルを図 13 に示す。

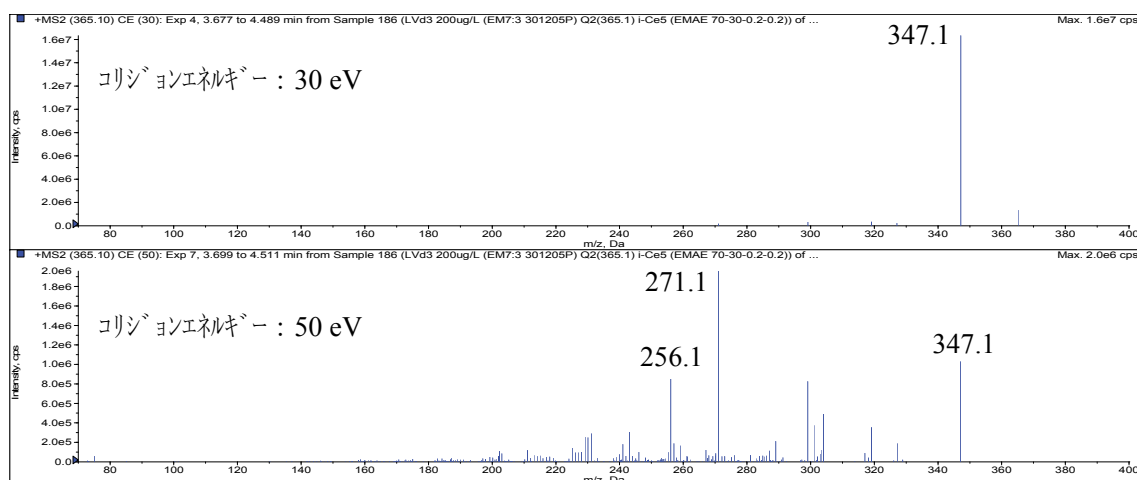


図 13 順相プレカーサーイオン m/z 365.1 に対するプロダクトイオンマスペクトル

順相でのレボフロキサシン- d_8 のマスペクトルを図 14 に示す。

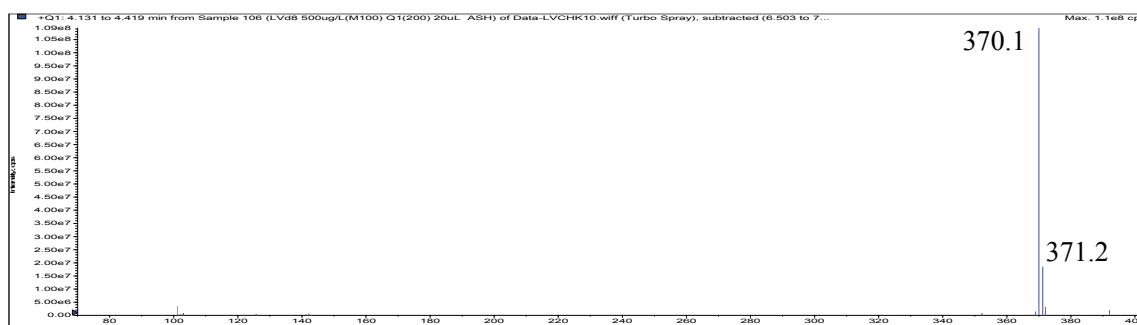


図 14 順相でのレボフロキサシン- d_8 のマスペクトル

順相でのレボフロキサシン- d_8 のプレカーサーイオン m/z 370.1 に対するプロダクトイオンマスペクトルを図 15 に示す。

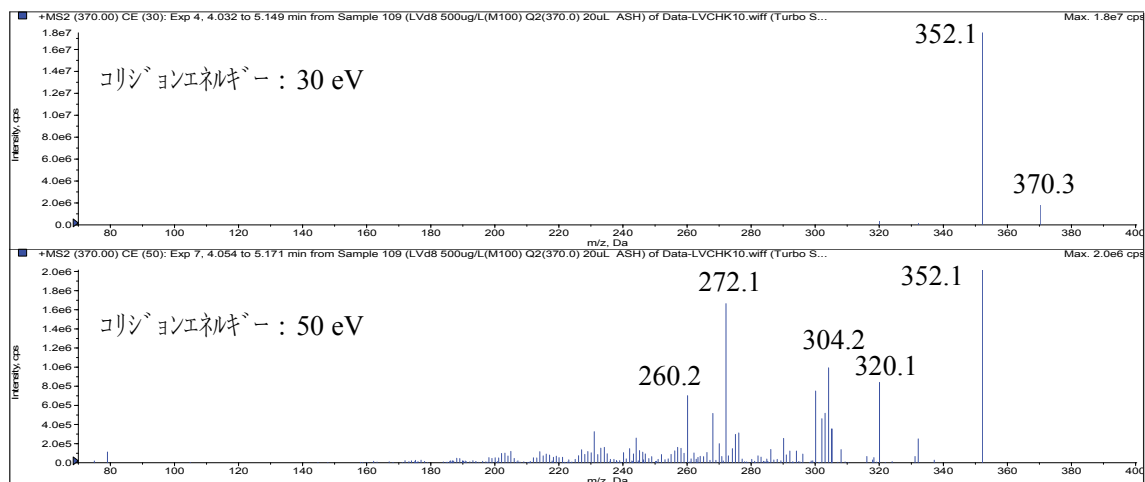


図 15 順相プレカーサーイオン m/z 370.1 に対するプロダクトイオンマススペクトル

〔操作ブランク〕

操作ブランク測定時のクロマトグラムを図 16 に示す。対象物質は MDL 未満であった。

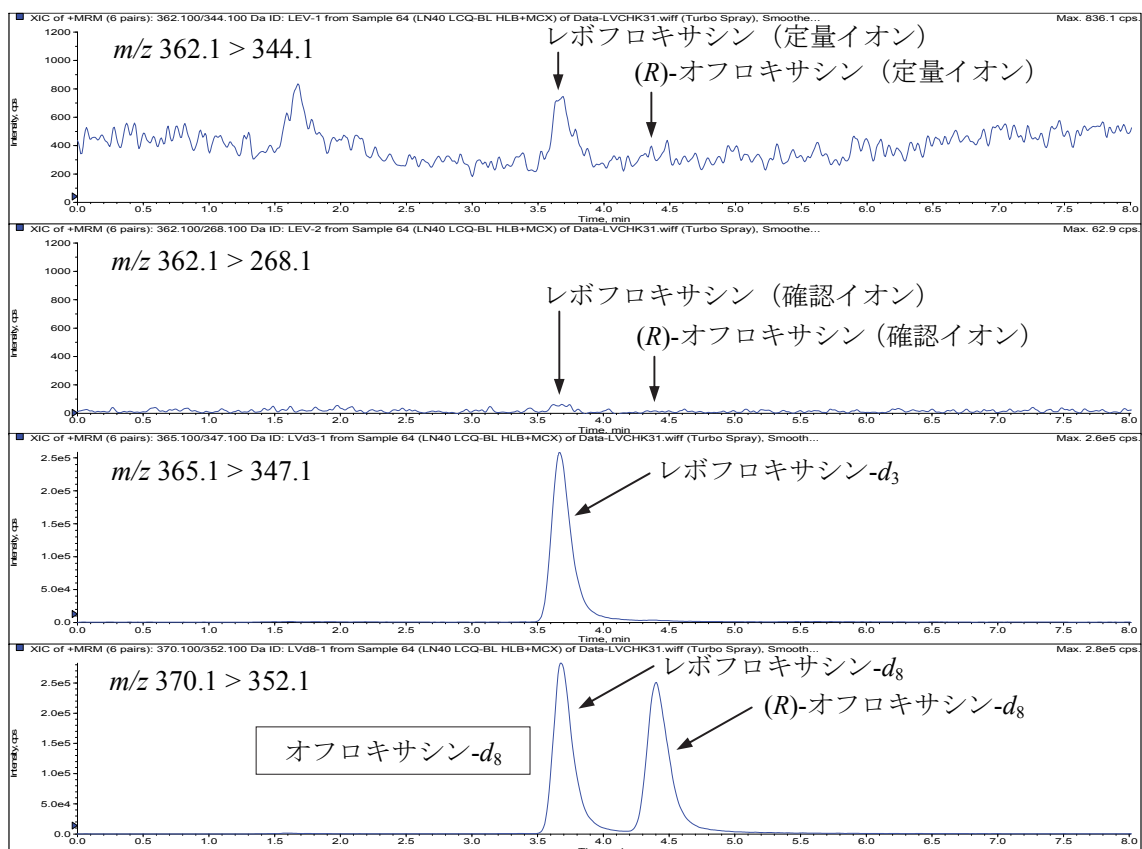


図 16 操作ブランク測定時のクロマトグラム

〔添加回収試験〕

精製水、河川水及び海水への添加回収試験結果を表 9 に、クロマトグラムを図 17～図 20 に示す。

精製水は緩衝能が無く、pH 調整が安定しないため、5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液で実施した。河川水および海水ともにサロゲート補正後の回収率は100%前後と良好であった。海水でのサロゲート回収率がやや低く、固相カートリッジへの吸着が塩分により多少阻害されている可能性があるが、50～120%の範囲内に収まっており、海水の分析も可能であった。

表 9 添加回収試験結果

物質名	試料名	試料量 (L)	添加量 (ng)	溶出 液量 (mL)	分取 液量 (mL)	最終 液量 (mL)	試 験 数	検出 濃度 ^{*1} (ng/L)	回収 率 ^{*1} (%)	変動 係数 (%)	サロゲート 回収率 (%)
レボフロ キサシン	精製水 ^{*2, *3}	0.20	0	10	2.5	1.0	4	<0.47	—	—	89
		0.20	2.0	10	2.5	1.0	4	11.0	110	1.2	88
	河川水 ^{*3} (豊平川)	0.20	0	10	2.5	1.0	3	<0.47	—	—	88
		0.20	2.0	10	2.5	1.0	7	11.5	115	1.1	82
		0.20	20	10	2.5	1.0	2	99.2	99.2	0.15	84
	海水 ^{*3} (小樽)	0.20	0	10	2.5	1.0	1	<0.47	—	—	77
		0.20	20	10	2.5	1.0	2	102	102	0.14	72
	精製水 ^{*2, *3}	0.20	0	10	2.5	1.0	4	<0.39	—	—	88
		0.20	2.0	10	2.5	1.0	4	10.6	106	1.2	87
	(R)-オフロ キサシン	0.20	0	10	2.5	1.0	3	<0.39	—	—	92
(R)-オフロ キサシン	河川水 ^{*3} (豊平川)	0.20	2.0	10	2.5	1.0	7	10.6	106	1.0	86
		0.20	20	10	2.5	1.0	2	98.7	98.7	2.3	85
		0.20	20	10	2.5	1.0	2	97.6	97.6	2.7	74
	海水 ^{*3} (小樽)	0.20	0	10	2.5	1.0	1	<0.39	—	—	77
		0.20	20	10	2.5	1.0	2	97.6	97.6	2.7	74

*1：検出濃度及び回収率はサロゲート補正後の値

*2：5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液にて実施

*3：精製水は試験液に着色等なく、分析ブローではカラムクリーンアップ不要な場合（図 5 のフローチャート）に相当するが、河川水及び海水も含め、この検討ではすべて図 4 の分析法のフローチャート（通常）によって実施した。

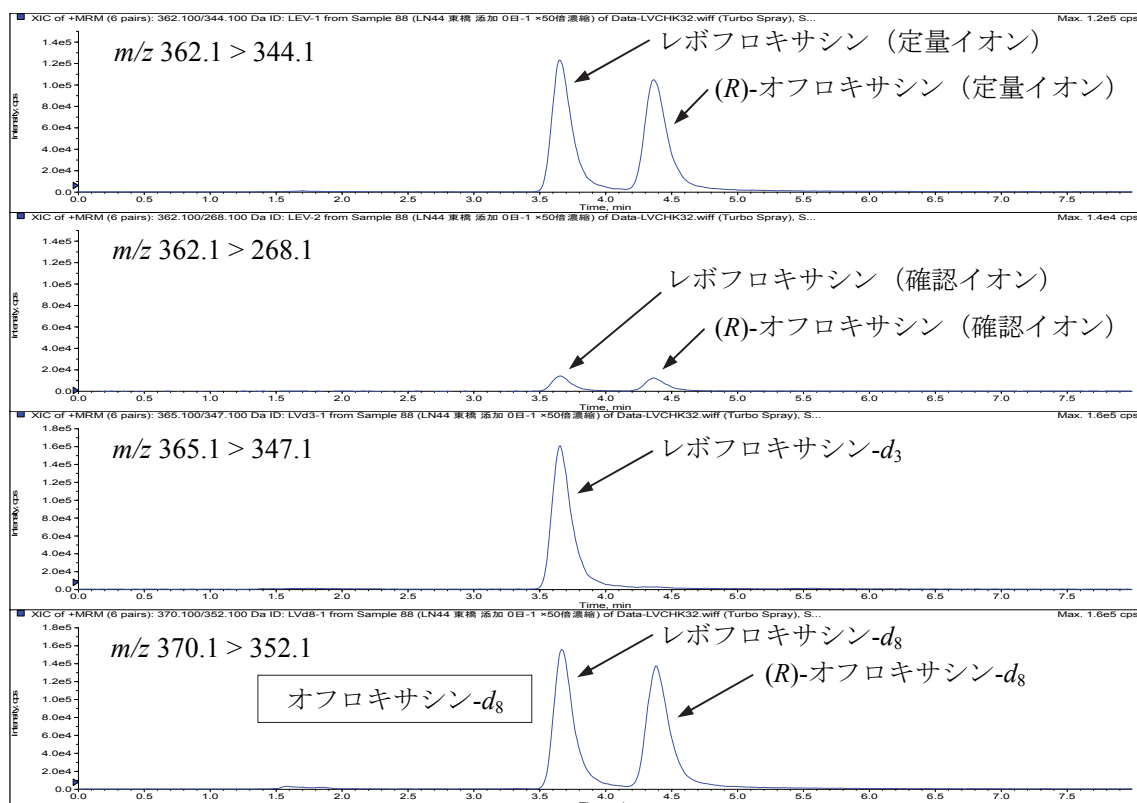


図 17 添加回収試験（河川水）のクロマトグラム（20 ng/ 200 mL 添加試料）

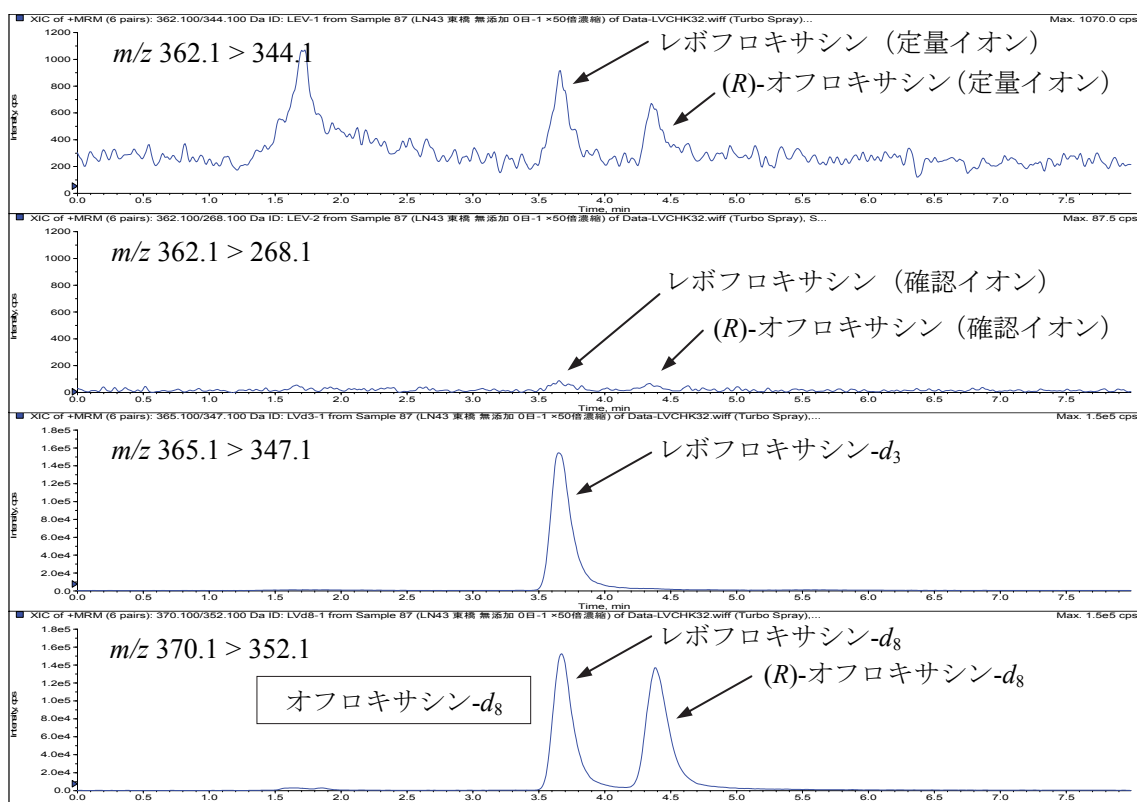


図 18 添加回収試験（河川水）のクロマトグラム（無添加試料）

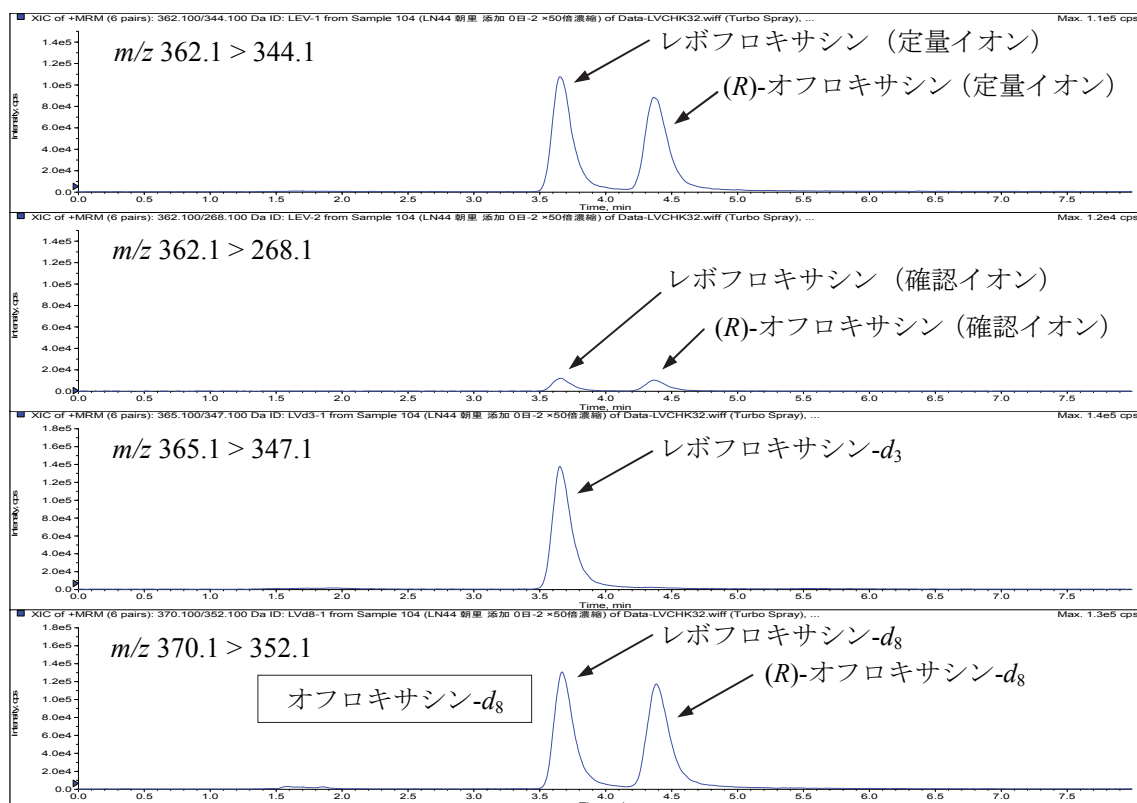


図 19 添加回収試験（海水）のクロマトグラム（20 ng/ 200 mL 添加試料）

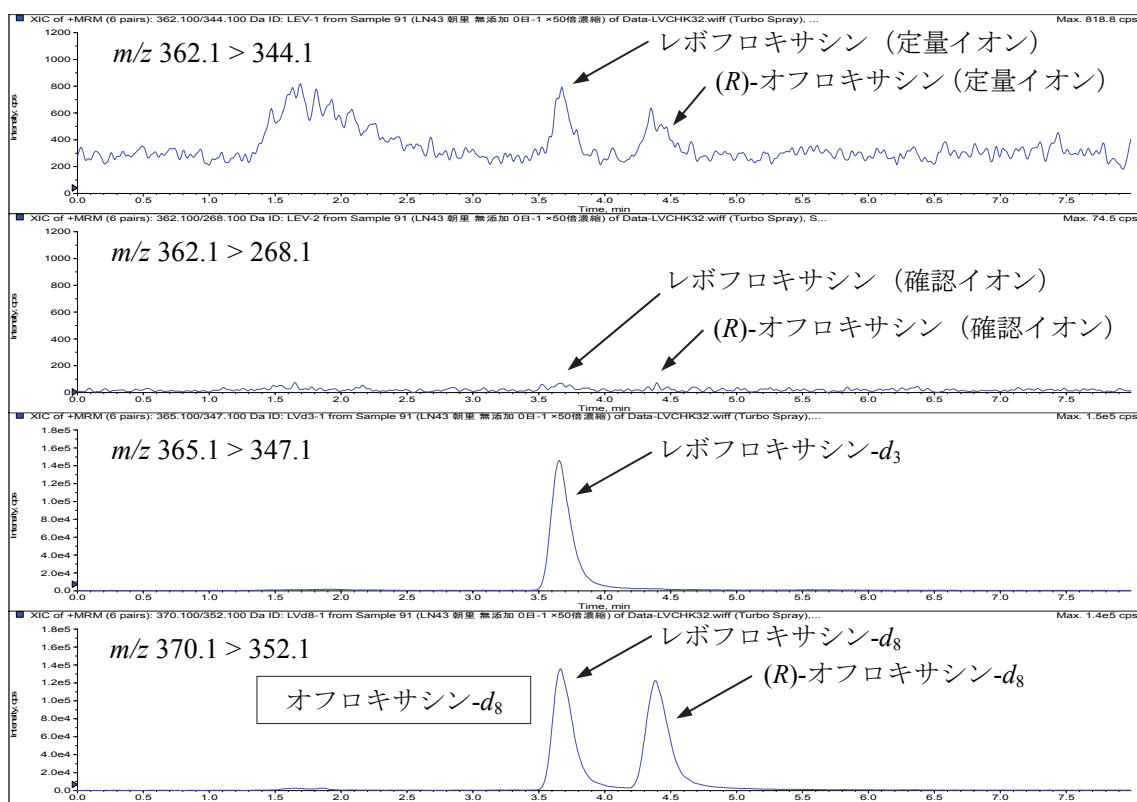


図 20 添加回収試験（海水）のクロマトグラム（無添加試料）

〔分解性スクリーニング試験〕

分解性スクリーニング試験の結果を表 10 に示す。保存容器はメタノール及びアセトンで洗浄した 500 mL のポリプロピレンボトル（アイボーイ）を用いた。冷暗所（5℃）であれば pH 5.0～9.0 の範囲で分解性は認められなかったが、明所では残存率が低下しており、暗所に保存する必要性が認められた。

表 10 分解性スクリーニング試験結果

物質名	pH ^{*1, *2}	試験数	調製濃度 (ng/L)	検出濃度(ng/L) ^{*3} (残存率(%)) ^{*4}		
				1 時間 放置後	7 日間放置後	
					冷暗所 ^{*5}	明所 ^{*6}
レボフロ キサシン	5	2	100	99.2 (99)	96.1 (96)	—
	7	2	100	95.0 (95)	97.8 (98)	67.6 (68)
	9	2	100	97.1 (97)	95.5 (95)	—
(R)-オフロ キサシン	5	2	100	103 (103)	95.1 (95)	—
	7	2	100	98.6 (99)	96.2 (96)	68.5 (68)
	9	2	100	98.7 (99)	96.0 (96)	—

*1：pH 保持は以下の緩衝液にて行った。

pH 5、pH 7、pH 9：5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液をギ酸（適宜精製水で希釈）及びアンモニア水（適宜精製水で希釈）で pH 5.0、pH 7.0、pH 9.0 に調整。

*2：7 日間設定 pH で保持後、図 4 の分析法のフローチャート（通常）に従い、pH を 10.0 に調整した後に固相抽出を実施した。この検討の試料は pH の調整した精製水であるが Oasis MCX Plus によるカラムクリーンアップも実施した。

*3：サロゲート補正後の値

*4：調製濃度に対する検出濃度の割合

*5：5℃保管

*6：室温（約 20～25℃）保管

〔保存性試験〕

〔水質試料の保存性〕

各水質試料をポリプロピレンボトルに入れ、1 時間後と暗所 5℃ で保存した 7 日後のレボフロキサシン濃度を測定した結果を表 11 に、(R) -オフロキサシンの結果を表 12 に示す。保存処理無しでも保存性は良好であったため、保存処理は実施しないこととした。

表 11 水質試料のレボフロキサシン保存性試験結果

物質名	試料名	保存条件	調製濃度 (ng/L)	保存処理*1	検出濃度(ng/L)*2 (残存率(%)*3)		
					添加前	1 時間後	7 日間
レボフロキサシン	河川水 (豊平川)	—	0	—	<0.47	—	—
		—	100	—	—	99.2 (99)	—
		暗所 5℃	100	無し	—	—	97.5 (97)
				pH 10	—	—	99.4 (99)
				硫酸銅	—	—	80.7 (81)
		—	0	—	<0.47	—	—
	海水 (小樽)	—	100	—	—	102 (102)	—
		暗所 5℃	100	無し	—	—	101 (101)
				pH 10	—	—	96.7 (97)
				硫酸銅 (pH 3.0)	—	—	101 (101)
		—	0	—	416	—	—
	下水処理水 (参考) *4	暗所 5℃	0	無し	—	—	397 (95)
				pH 10	—	—	398 (96)
				硫酸銅	—	—	406 (98)

*1：保存処理について

pH 10: アンモニア水 (超過した場合はギ酸で調整) を加えて pH 10 とした。

硫酸銅：試料 100 mL につき硫酸銅(II)五水和物 0.1 g を加えて溶解させた。

なお海水試料では沈殿物が生じたため pH 3.0 に調整して沈殿物を溶解させ保存し、この pH のまま抽出操作 (5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH3.0) 使用) を行った。

*2：サロゲート補正後の値

*3：調製濃度に対する検出濃度の割合

*4：試験に用いた下水処理水は次亜塩素酸ナトリウム溶液添加等の消毒はされていない。また試験液が着色するため図 6 の分析法のフローチャートによりカラムクリーンアップに Oasis MAX Plus を追加接続して実施した。なお表 11 中の測定した試料は融雪時期 (3 月採水) のため、図 23～図 26 の結果 (2 月採水) と比較して濃度が低いと考えられる。

表 12 水質試料(R)-オフロキサシン保存性試験結果

物質名	試料名	保存 条件	調製濃度 (ng/L)	保存処理*1	検出濃度(ng/L)*2 (残存率(%)*3)		
					添加前	1 時間後	7 日間
(R)-オフロキサシン	河川水 (豊平川)	—	0	—	<0.39	—	—
			100	—	—	98.7 (99)	—
		暗所 5℃	100	無し	—	—	99.2 (99)
				pH 10	—	—	95.6 (96)
				硫酸銅	—	—	76.3 (76)
		—	0	—	<0.39	—	—
	100			—	—	97.6 (98)	—
	海水 (小樽)	暗所 5℃	100	無し	—	—	97.3 (97)
				pH 10	—	—	99.2 (99)
				硫酸銅	—	—	96.3 (96)
				硫酸銅 (pH 3.0)	—	—	96.3 (96)
	下水処理水 (参考) *4	—	0	—	1.70	—	—
				無し	—	—	1.64 (96)
暗所 5℃			0	pH 10	—	—	1.43 (84)
				硫酸銅	—	—	1.47 (87)

*1：保存処理について

pH 10: アンモニア水 (超過した場合はギ酸で調整) を加えて pH 10 とした。

硫酸銅：試料 100 mL につき硫酸銅(II)五水和物 0.1 g を加えて溶解させた。

なお海水試料では沈殿物が生じたため pH 3.0 に調整して沈殿物を溶解させ保存し、この pH のまま抽出操作 (5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液 (pH3.0) 使用) を行った。

*2：サロゲート補正後の値

*3：調製濃度に対する検出濃度の割合

*4：試験に用いた下水処理水は次亜塩素酸ナトリウム溶液添加等の消毒はされていない。また試験液が着色するため図 6 の分析法のフローチャートによりカラムクリーンアップに Oasis MAX Plus を追加接続して実施した。なお表 11 中の測定した試料は融雪時期 (3 月採水) のため、図 23～図 26 の結果 (2 月採水) と比較して濃度が低いと考えられる。

〔試験液及び標準液の保存性〕

試験液及び標準液の保存性試験結果を表 13 に示す。試験液は添加回収試験時に Oasis MCX Plus からの 1 mol/L アンモニア・メタノール溶出液を暗所 5°C で保存し、14 日後に 2.5 mL 分取、乾固、溶解して測定した。

標準液については検量線用標準液を褐色ポリプロピレンチューブに入れ、暗所 5°C で保存し、1 ヶ月後に測定した。

どちらも保存性は良好であった。

表 13 試験液及び標準液保存性試験結果

物質名	液種	試料名	調製濃度 (ng/mL)	検出濃度(ng/mL ^{*1}) (残存率(%) ^{*2})	
				14 日間	1 ヶ月
レボフロキサシン	試験液	河川水 (豊平川)	5.0	4.97 (99)	—
		海水 (小樽)	5.0	5.06 (101)	—
	標準液	検量線最低濃度	0.10	—	0.100 (100)
		検量線最高濃度	100	—	102 (102)
(R)-オフロキサシン	試験液	河川水 (豊平川)	5.0	4.62 (92)	—
		海水 (小樽)	5.0	4.59 (92)	—
	標準液	検量線中間濃度	0.10	—	0.106 (106)
		検量線最高濃度	100	—	93.6 (94)

*1：サロゲート補正後の値

*2：調製濃度に対する検出濃度の割合

〔標準物質の溶解性〕

(R)-オフロキサシン及びオフロキサシン (レボフロキサシン及び(R)-オフロキサシンの混合物、東京化成工業製) の標準液調製のために溶媒に溶解しようとするすると溶け残る場合があった。

レボフロキサシン及びオフロキサシン各標準物質を約 2 mg 分取し、各溶媒 1 mL に対する溶解性を調べた結果を表 14 に示す。

レボフロキサシンは溶解する溶媒種類は多いが、オフロキサシンをすべて溶解できる溶媒は限られていた。溶媒量を増やせば溶解できる場合もあると思われるが、標準原液調製のためには少ない溶媒量で溶解させる必要がある。この検討の条件でオフロキサシンを溶解できる溶媒はジクロロメタンと *N,N*-ジメチルホルムアミドであった。ただしジクロロメタンに溶解させたものは数日後に析出物が発生したため、(R)-オフロキサシン及びオフロキサシンの標準原液調製には *N,N*-ジメチルホルムアミドを用いることとした。

表 14 溶媒 1 mL に対する標準物質約 2 mg の溶解性

溶媒種	標準物質	
	レボフロキサシン	オフロキサシン
精製水	可溶	溶残有 (溶媒透明)
メタノール	可溶	溶残少有 (溶媒透明)
エタノール	可溶	不溶 (溶媒白濁)
2-プロパノール	溶残有 (溶媒透明)	不溶 (溶媒白濁)
アセトニトリル	可溶	溶残有 (溶媒透明)
アセトン	可溶	溶残有 (溶媒透明)
<i>N,N</i> -ジメチルホルムアミド	可溶	可溶 (遅)
ジクロロメタン	可溶	可溶 (早) (後日析出)
MTBE	不溶 (溶媒白濁)	不溶 (溶媒白濁)
<i>n</i> -ヘキサン	—	不溶 (溶媒白濁)

〔抽出用固相カートリッジの検討〕

水質試料から抽出するための固相カートリッジについて、イオン交換型（ポリマーベース、逆相ミックス型含む）及びポリマー型充填剤のものに標準物質を負荷し、メタノール系溶出溶媒での溶出状況を調べた。

負荷する試料水は pH を調整して行った。レボフロキサシン 1.0 µg/mL 標準液を pH : 3.0、7.2、10.0 に調整（pKa₁:6.11、pKa₂:8.18 の酸性側、中間、塩基性側で設定）した精製水（5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液）またはろ過済み海水で希釈し、10 ng/mL の固相カートリッジ負荷用試料水とした。

この負荷用試料水を各固相カートリッジに 10 mL 負荷し、固相カートリッジを窒素ガスで乾燥した後、陽イオン交換型は 1 mol/L アンモニア・メタノール溶液 10 mL で溶出、陰イオン交換型はギ酸/メタノール (2:98,v/v) 10 mL で溶出、ポリマー型はメタノール 10 mL で溶出させた。なおレボフロキサシン-*d*₃ は固相カートリッジには負荷せず、溶出液に内標準として添加した。

検討した固相カートリッジと回収率を表 15 に示す。

表 15 固相カートリッジ種類別の回収試験結果

固相カートリッジ 種類	充填材種類	調整 pH	回収率 (%)	
			精製水 調製負荷	ろ過海水 調製負荷
Oasis MCX Plus	イオン交換＋逆相	3.0	97.6	0.2
InertSep SlimJ MC-1 ^{*1}	イオン交換	3.0	100	13.0
SepPak PS-2 Plus	ポリマー（逆相）	3.0	— ^{*2}	92.6
Oasis HLB Plus	ポリマー（逆相）	3.0	— ^{*2}	105
InertSep SlimJ PLS-3	ポリマー（逆相）	3.0	— ^{*2}	106
SepPak PS-2 Plus	ポリマー（逆相）	7.2	— ^{*2}	98.0
Oasis HLB Plus	ポリマー（逆相）	7.2	— ^{*2}	102
InertSep SlimJ PLS-3	ポリマー（逆相）	7.2	— ^{*2}	101
Oasis MAX Plus	イオン交換＋逆相	10.0	96.4	102
InertSep SlimJ MA-1 ^{*1}	イオン交換	10.0	103	11.7
SepPak PS-2 Plus	ポリマー（逆相）	10.0	— ^{*2}	94.1
Oasis HLB Plus	ポリマー（逆相）	10.0	— ^{*2}	102
InertSep SlimJ PLS-3	ポリマー（逆相）	10.0	— ^{*2}	99.1

*1：SlimJ 形状、充填量 500 mg の特注品

*2：未実施

イオン交換型の 3 種(Oasis MCX Plus、InertSep SlimJ MC-1、InertSep SlimJ MA-1) は、海水試料で回収率が悪く抽出用の固相カートリッジとしては不適といえる。一方、Oasis MAX Plus は精製水、海水においても回収率が良好であったが、後述の表 17 の結果のとおり、メタノールを通すと溶出してきてしまい、イオン交換カートリッジで捕集後のメタノール洗浄を行うことができない。

ポリマー型は海水試料のどの pH においても回収率は良好であり、抽出用固相カートリッジとしての性能を確認できた。

レボフロキサシンを SepPak コンセントレーターやアクアローダーを用いて固相抽出する場合、ガラスへの吸着を避けるため、試料水と固相カートリッジの間にガラス製器具を使用することはできない。固相抽出装置のガラスシリンジに試料水が流れる前に固相カートリッジを設置し、吸引で試料水から抽出する必要がある。

吸引での通水状況について表 15 のポリマー型固相カートリッジ 3 種と Oasis HLB Plus の類似品である Oasis PRiME HLB Plus Short の合計 4 種を調べたところ、8 mL/min で通水できたのは Oasis HLB Plus のみであり、他の固相カートリッジは通水速度がかなり遅くなった。このため抽出用固相カートリッジには Oasis HLB Plus を用いることとした。

〔固相カートリッジ溶出溶媒量の検討〕

表 15 の検討では様々な固相を検討するため、溶出溶媒量を 10 mL に限って実施した。採用した Oasis HLB Plus について溶出溶媒量を減らせるか、溶出溶媒量を区切って検討した結果を表 16 に示す。溶出溶媒はメタノールで行った。

なお、レボフロキサシン- d_3 は固相カートリッジには負荷せず、溶出液に内標準として添加した。

表 16 の結果から、溶出溶媒量を減らすことはできず 10 mL は必要であった。

表 16 固相カートリッジ溶出溶媒量の検討結果

溶出溶媒	溶出量 (mL)	回収率 (%)
		Oasis HLB Plus
メタノール	0-5	64.8
	5-7	21.1
	7-10	12.9
	10-15	5.0
	合計	103.8

〔カラムクリーンアップの検討〕

固相カートリッジからの溶出液（メタノール溶液）をイオン交換カートリッジ（Oasis MCX Plus 及び Oasis MAX Plus）によりクリーンアップ可能か検討（対象物質がイオン交換カートリッジで捕集されるか、捕集されず通過するか確認）を行った。

対象物質がメタノール中でイオン形態でない場合は、イオン交換カートリッジに捕集されず通過するが、夾雑物が捕集されればクリーンアップ効果は得られると考えた。

また対象物質がイオン形態であった場合は、陽・陰どちらかのイオン交換カートリッジに捕集され、捕集されない夾雑物を除くことができる。

負荷する試料はレボフロキサシン 10 ng/mL のメタノール溶液をイオン交換カートリッジ負荷用試料とした。この負荷用試料を各イオン交換カートリッジに 10 mL 負荷し、通過液の濃度を測定した。なおレボフロキサシン- d_3 は固相カートリッジには負荷せず、通過液に内標準として添加した。

検討したイオン交換カートリッジと通過率を表 17 に示す。

検討の結果、メタノール溶媒中の対象物質は Oasis MCX Plus を通過できず、Oasis MAX Plus は通過することが分かった。

表 17 カラムクリーンアップ検討試験結果

負荷試料濃度 (溶媒)	負荷量 (mL)	イオン交換カートリッジ通過率 (%)	
		Oasis MCX Plus	Oasis MAX Plus
レボフロキサシン (10 ng/mL、メタノール溶液)	10	0.2	100

以上よりクリーンアップ用のイオン交換カートリッジは Oasis MCX Plus とし、固相カートリッジ Oasis HLB Plus からの溶出液をそのまま通して対象物質を捕集させ、捕集後、アンモニア含有のメタノールで溶出させることとした。

なお、溶出溶媒を「アンモニア水」含有メタノール（アンモニア水とメタノールの混合溶媒）ではなく、1 mol/L アンモニア・メタノール溶媒としたのは、溶出溶媒を乾固させる時に水分があると乾固に時間を要するためである。

〔固相抽出時の pH 設定について〕

Oasis HLB Plus は pH 3.0～10.0 の間で回収率が良好であったことから、特に pH を調整しないで何回か固相抽出を検討したところ、回収率が安定しなかったため、pH を決めて（調整して）固相抽出（添加回収）の検討を実施した。

pH の設定は、pH 3.0、pH 7.2 及び pH 10.0 の 3 通りで 5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液に対して行った。pH 設定以外は図 4 のフローチャートのとおり実施した。

pH を変えて固相抽出を行った場合の回収率の結果を表 18 に示す。サロゲート補正後は、レボフロキサシン及び(R)-オフロキサシンの回収率について特に問題はなかったが、サロゲート回収率については pH 10.0 の場合が他の pH 設定よりも良好であった。またクリーンアップ用のイオン交換カートリッジを取り付けると回収率は下がる傾向であった。

表 18 各 pH での固相抽出検討の添加^{*1}回収率検討結果

試料	抽出用 固相	溶出時 イオン 交換	調整 pH	回収率(%)					
				サロゲート		レボフロキサシン		(R)-オフロキサシン	
				レボフロ キサシン- <i>d</i> ₃	(R)-オフロ キサシン- <i>d</i> ₈	絶対	サロゲート 補正	絶対	サロゲート 補正
精製水 ^{*2}	Oasis HLB Plus	なし	3.0	80.4	74.2	80.8	100.4	81.6	110.1
			7.2	85.0	75.7	83.6	98.4	82.6	109.2
			10.0	95.7	89.8	94.2	98.4	92.8	103.4
	Oasis MCX Plus	Oasis	3.0	73.3	66.6	74.3	101.4	74.9	112.4
			7.2	72.5	62.0	71.3	98.4	69.3	111.8
			10.0	79.0	74.0	79.7	100.8	78.8	106.4

*1：精製水 200 mL に対し、レボフロキサシン、(R)-オフロキサシンを各々 20 ng 添加
レボフロキサシン-*d*₃を 20 ng、オフロキサシン-*d*₈を 40 ng 添加

*2：5.0 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液にて実施

〔下水処理水の測定について〕

河川水へのレボフロキサシン供給源として下水処理水が考えられ、下水処理水には様々な物質が含まれていることから、下水処理水を用いて前処理の検討を行った。

pH を 3.0、7.2 及び 10.0 に調整した下水処理水を Oasis HLB Plus のみで抽出・溶出させた場合、並びに、同様に Oasis HLB Plus で抽出を行った後、溶出時に Oasis MAX Plus+Oasis MCX Plus を接続して溶出させた場合の各々で、着色や夾雑物の影響（クロマトグラム）を確認することとした。

- ① pH 3.0 下水処理水 HLB 抽出・溶出
- ② pH 7.2 下水処理水 HLB 抽出・溶出
- ③ pH 10.0 下水処理水 HLB 抽出・溶出
- ④ H 3.0 下水処理水 HLB 抽出・HLB+MAX+MCX 溶出
- ⑤ pH 7.2 下水処理水 HLB 抽出・HLB+MAX+MCX 溶出
- ⑥ pH 10.0 下水処理水 HLB 抽出・HLB+MAX+MCX 溶出

以上の 6 通りで検討を行った。

この検討でのサロゲート回収率は表 19 の結果であった。

表 19 各 pH での下水処理水サロゲート添加回収率結果*

試料	抽出用 固相	溶出時 イオン交換	調整 pH	サロゲート回収率(%)		検討
				レボフロキサシン- d_3	(R)-オフロキサシン- d_8	
下水 処理水	Oasis HLB Plus	なし	3.0	113.5	107.6	①
			7.2	60.1	56.4	②
			10.0	75.6	74.0	③
		Oasis MAX+MCX Plus	3.0	84.1	83.3	④
			7.2	67.6	64.8	⑤
			10.0	75.4	74.2	⑥

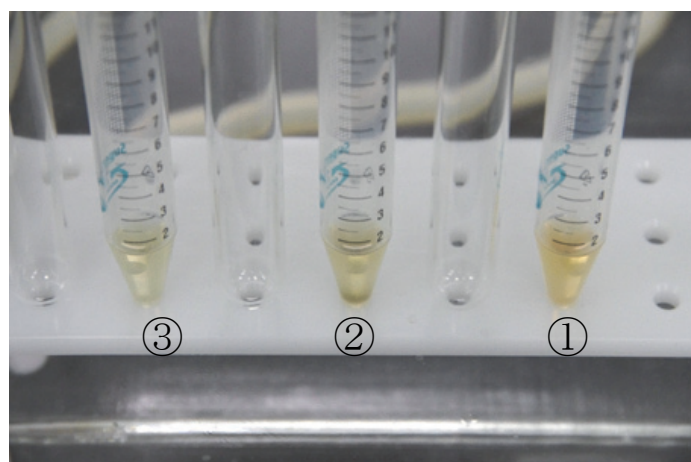
* : 200 mL に対しレボフロキサシン- d_3 を 20 ng、オフロキサシン- d_8 を 40 ng 添加

表 19 の結果では pH 3.0 で回収率が高いが、本当に回収率が高いのか他に要因があるのかは不明である。pH 7.2 及び pH 10.0 の結果は表 18 の結果と比較しても妥当な値と思われる。

検討①～⑥の溶出液の最初の約 1 mL 溶出させた時点での着色状況を図 21 及び図 22 に示す。

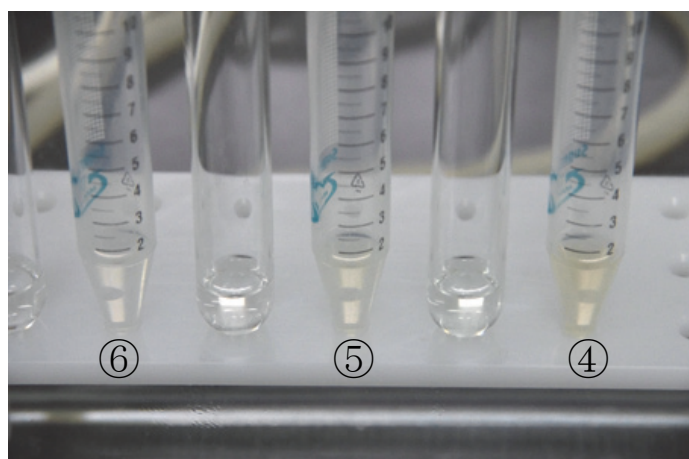
図 21 のイオン交換カートリッジを接続しない検討①～③の場合、③の pH 10.0 の場合が着色が少なく、また図 22 のイオン交換カートリッジを接続した検討④～⑥の場合でも同様に、⑥の pH 10.0 の場合が着色は少なかった。

これらの結果から夾雑物（着色）の影響を減らすためには pH 10.0 が良く、表 18 の結果も含め、pH 10.0 で抽出を行うこととした。



- ① : 濃い黄色（やや橙色）
- ② : 黄色
- ③ : 薄黄色

図 21 Oasis HLB Plus からの溶出液の着色状況



- ④：淡黄色
- ⑤：微黄色
- ⑥：ほぼ無色透明

色の濃さの比較（目視）
濃①>②>③>④>⑤>⑥薄

図 22 Oasis MCX Plus からの溶出液の着色状況

なお、この検討では溶出液の着色が強かったため、クリーンアップ用イオン交換カートリッジに Oasis MCX Plus のみではなく Oasis MAX Plus も接続して実施した。（Oasis HLB Plus + Oasis MAX Plus + Oasis MCX Plus の順で接続）

検討①と検討⑥のクロマトグラムを図 23 及び図 24 に示す。

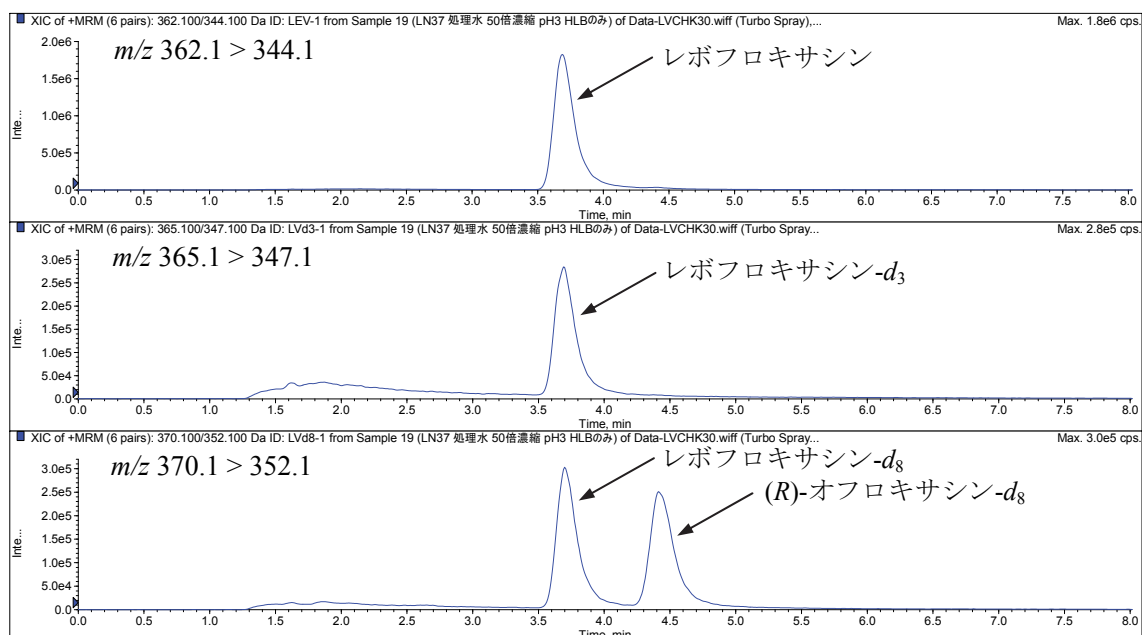


図 23 検討①下水処理水 Oasis HLB での抽出のクロマトグラム

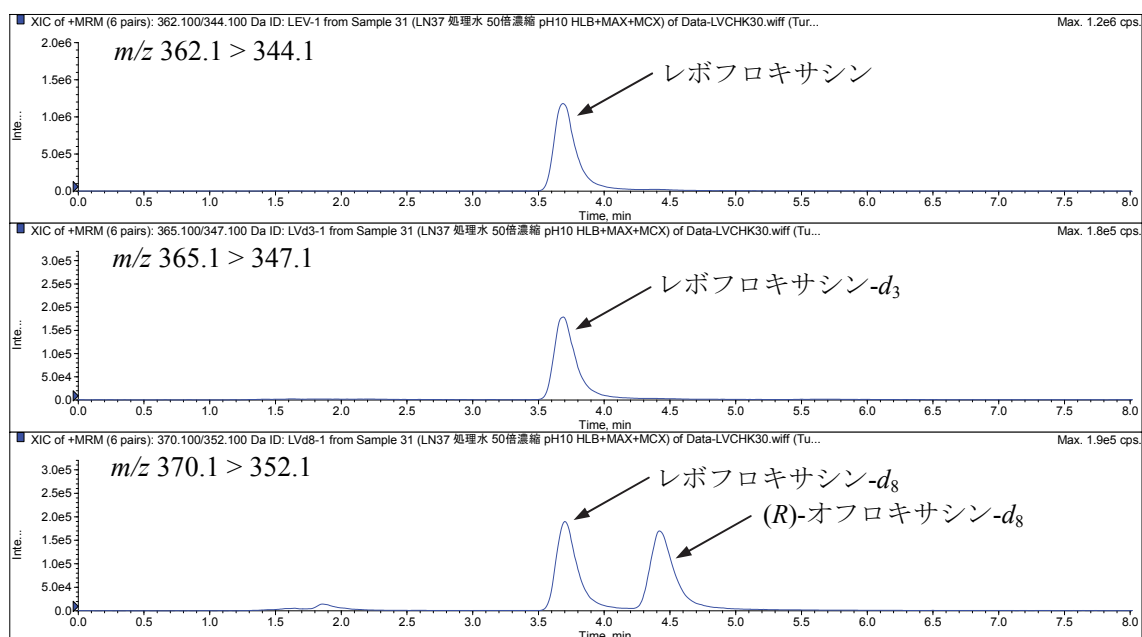


図 24 検討⑥下水処理水 Oasis HLB+MAX+MCX での抽出のクロマトグラム

固相カートリッジからの溶出時に MAX+MCX を取り付けることにより、クロマトグラムのベースラインが低くなり効果はあるが、MAX+MCX を取り付けるとピークは小さくなった。また図 23 のとおり取り付けなくても定量に影響するような夾雑ピークは見られなかった。

図 23 及び図 24 を拡大したクロマトグラムを図 25 及び図 26 に示す。

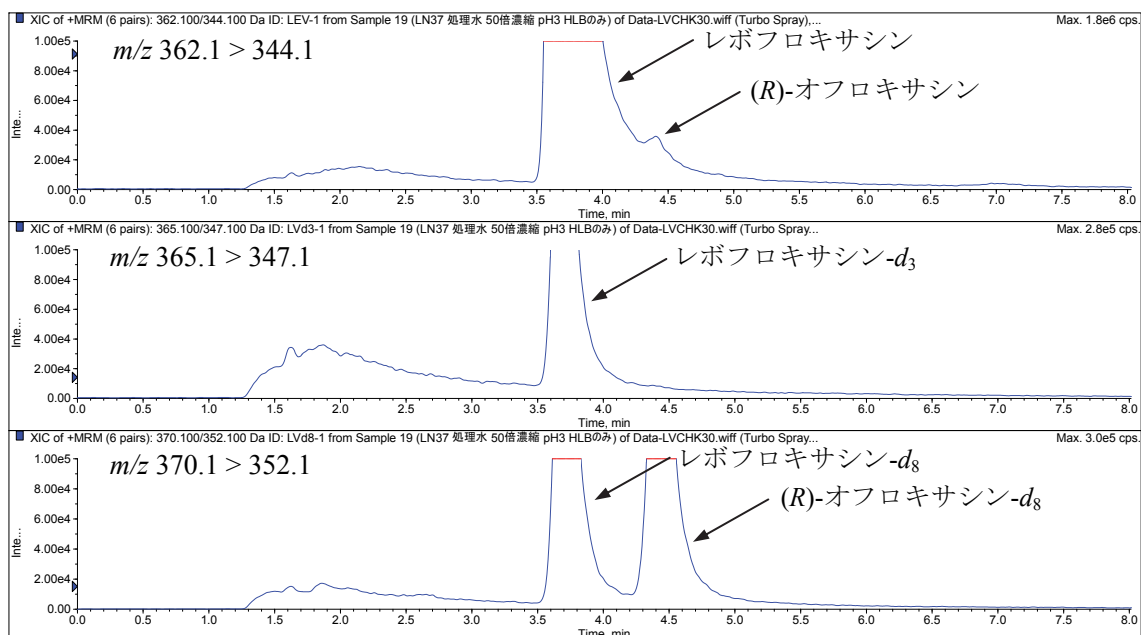


図 25 検討①図 23 を拡大したクロマトグラム (Oasis HLB)

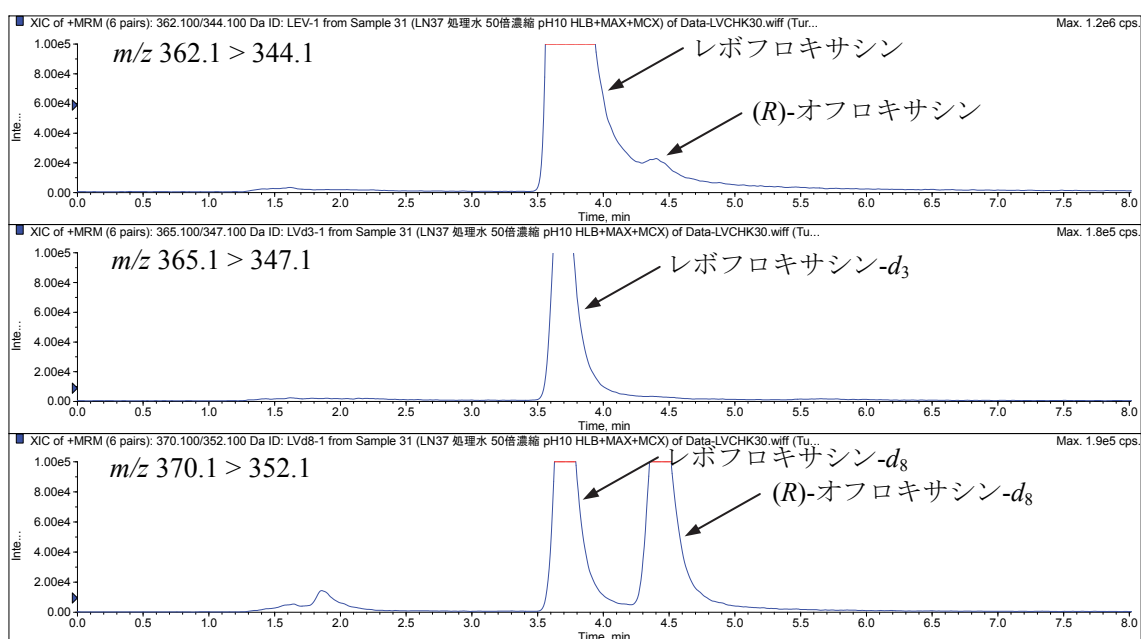


図 26 検討⑥図 24 を拡大したクロマトグラム(Oasis HLB+MAX+MCX)

なお下水処理水中の濃度は試料換算値で、レボフロキサシンが約 0.8 $\mu\text{g/L}$ 、(R)-オフロキサシンが約 0.004 $\mu\text{g/L}$ であった。(検討①でも⑥でも、サロゲート補正されるため、ほぼ同じ結果であった。)

〔順相における分離カラムと移動相条件の検討〕

最初、分離カラムにはダイセル製 CHIRALPAK AS-H (250 mm×2.1mm, 5 μ m)を用いて、異性体分離の移動相条件を検討した。

CHIRALPAK AS-H で移動相組成、*t*-ブチルメチルエーテル (MTBE)/エタノール/酢酸/エチレンジアミン (EDA) を (50:50:0.1:0.1, v/v/v/v (以下 v/v/v/v 略)) とし、オフロキサシン (レボフロキサシンと(*R*)-オフロキサシンの混合物) を測定したときのクロマトグラムを図 27 に示す。

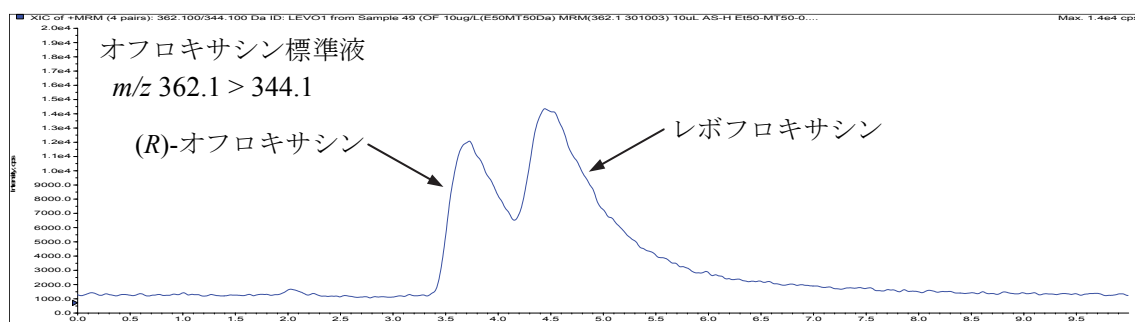


図 27 標準液 10 ng/mL の MTBE/EtOH/酢酸/EDA(50:50:0.1:0.1)のクロマトグラム

異性体分離はしているがピーク形状は悪いため、移動相の MTBE/エタノール比率を変えて改善されないか確認することとした。

MTBE/エタノール/酢酸/EDA (20:80:0.1:0.1) の移動相組成での測定では大きな違いは得られず、(80:20:0.1:0.1) の組成としたとき移動相内に白色の針状結晶が析出した。

そのため MTBE/エタノールの比率を変え、酢酸/EDA は各々混合比 0.1 で調製したときの針状結晶の析出状況を調べた結果は表 20 のとおりであった。

表 20 溶媒組成と結晶発生の有無*

溶媒種	溶媒体積混合比 (v/v/v/v)								
MTBE	90	85	80	75	70	65	60	55	50
エタノール	10	15	20	25	30	35	40	45	50
酢酸	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
EDA	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
結晶発生の有無*	有	有	有	有	有 (翌日)	有 (翌日)	無	無	無

*：約 30℃ の室温で実施

MTBE/エタノール (50:50) では結晶が生じやすいと考えられ、MTBE/エタノール/酢酸/EDA (50:50:1.0:1.0) で検討した際には LC のポンプ詰まりが発生したことから、MTBE/エタノール比率を (30:70) として、酢酸及び EDA の混合比を

変えて針状結晶の析出状況を調べた結果を表 21 に示す。

表 21 溶媒組成と結晶発生の有無

溶媒種	溶媒体積混合比 (v/v/v/v)								
MTBE	30	30	30	30	30	30	30	30	30
エタノール	70	70	70	70	70	70	70	70	70
酢酸	0.1	～ ^{*1}	1.0	～ ^{*2}	2.0	～ ^{*3}	5.0	5.5	6.0
EDA	0.1	～ ^{*1}	1.0	～ ^{*2}	2.0	～ ^{*3}	5.0	5.5	6.0
結晶発生の有無 ^{*4}	無	無	無	無	無	無	無	無	有

*1 : 0.3、0.5、0.7 で実施

*2 : 1.2、1.4、1.5、1.8 で実施

*3 : 3.0、4.0 で実施

*4 : 約 25°C の室温で実施

表 21 から酢酸及び EDA の混合比は 5.0 まで高めても問題ないと言える。

そこで MTBE/エタノール比 30:70 とし酢酸及び EDA の混合比を 0.1、0.5、1.0、2.0 とした時のオフロキサシン 20 ng/mL のクロマトグラムを図 28～31 に示す。また試験室室温は 25°C 設定で実施した。

この検討試験中、MTBE/エタノール/酢酸/EDA (30:70:2.0:2.0) 液を LC でラインページ中 (8.0mL/min 設定) に、ポンプ詰まりが発生してしまい、以後 2.0 以上の混合比での検討は実施していない。ページによって圧力がかかり析出した可能性がある。

なお析出した白色針状結晶を、ろ過し乾燥させたものは、精製水、メタノール、エタノールに溶解したがアセトニトリルには溶解しなかった。

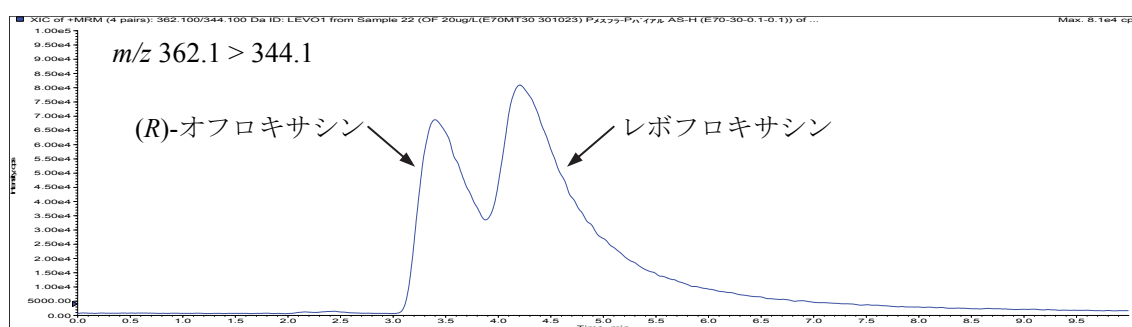


図 28 オフロキサシン 20 ng/mL の酢酸/EDA 混合比 0.1 のクロマトグラム

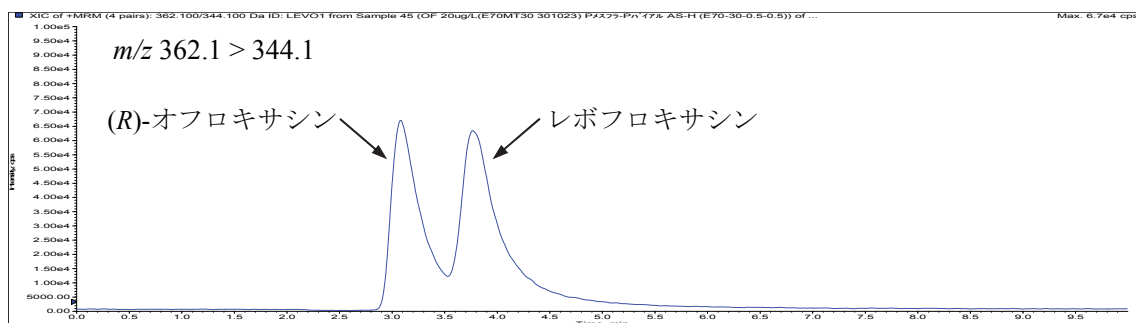


図 29 オフロキサシン 20 ng/mL の酢酸/EDA 混合比 0.5 のクロマトグラム

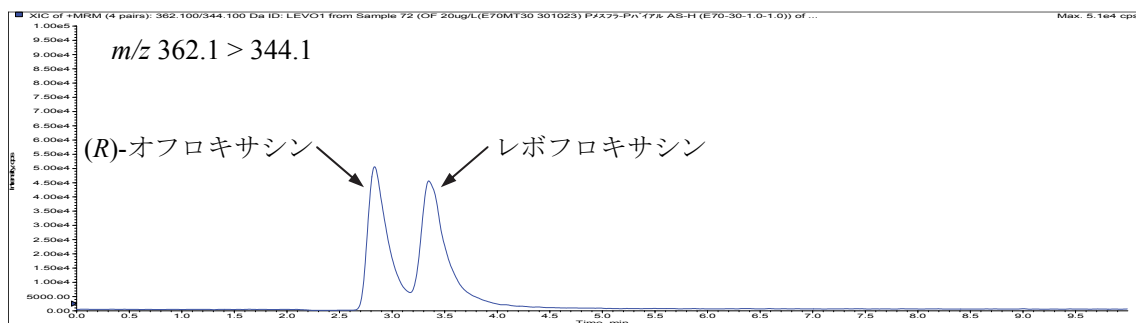


図 30 オフロキサシン 20 ng/mL の酢酸/EDA 混合比 1.0 のクロマトグラム

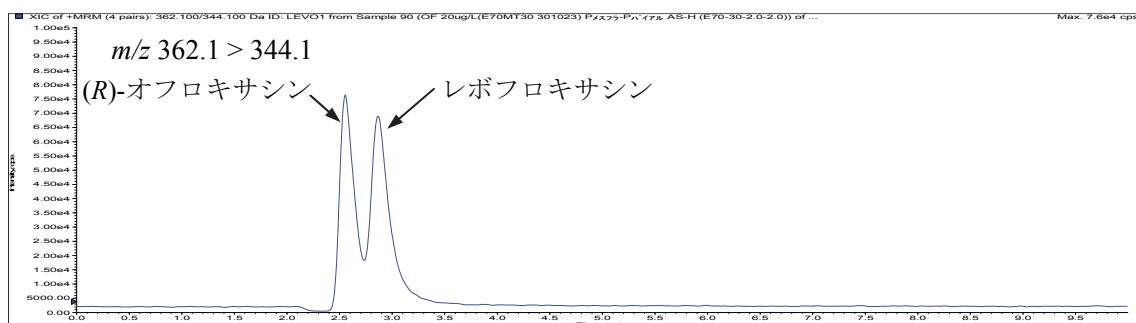


図 31 オフロキサシン 20 ng/mL の酢酸/EDA 混合比 2.0 のクロマトグラム

図 28～31 は時間軸（横軸）と強度軸（縦軸）を揃えてある。酢酸/EDA 混合比を高くすることによりピーク形状は改善されたと言えるがピーク面積値は小さくなっており、イオン化抑制の可能性はある。

酢酸/EDA 混合比を高めにししないとピーク形状が改善されないことから、追加で 2 種類のキラルカラムについて分離状況を確認した。

1. ダイセル製 CHIRALPAK IA-3 (150 mm×2.1 mm, 3 μm)
2. phenomenex 製 LUX i-Cellulose-5 (150 mm×2.0 mm, 3 μm)

CHIRALPAK IA-3 ではレボフロキサシンの異性体分離はできなかったが、LUX i-Cellulose-5 では分離可能であった。

移動相条件、MTBE/エタノール/酢酸/EDA (30:70:1.0:1.0)、LUX i-Cellulose-5 で

測定したクロマトグラムを図 32 に示す。

また同じ移動相条件で CHIRALPAK AS-H で測定したクロマトグラムを図 33 に示す。

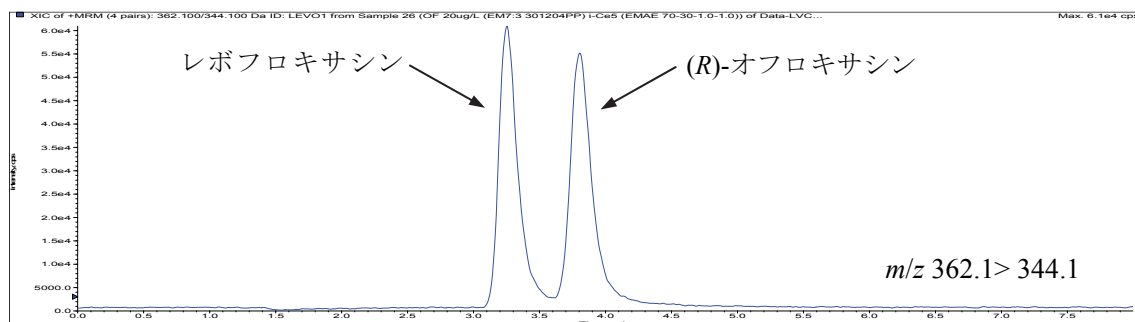


図 32 カラム i-Cellulose-5 でのオフロキサシン 20 ng/mL の分離状況

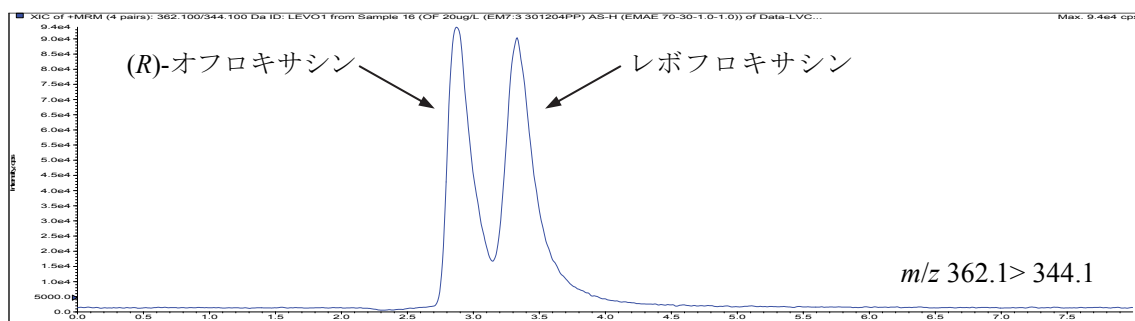


図 33 カラム CHIRALPAK AS-H でのオフロキサシン 20 ng/mL の分離状況

i-Cellulose-5 の方が 2 つのピークの分離が良好であった。CHIRALPAK AS-H は移動相中の酢酸/EDA 混合比を 1.0 に高めないと図 33 の様な分離が得られなく、この場合 MS のエキゾーストが詰まりやすいため、i-Cellulose-5 を用いて移動相中の酢酸/EDA の混合比を減らせないか検討を行った。

移動相の MTBE/エタノール (30:70) とし、酢酸/EDA を各々 MTBE/エタノールに対し混合比 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、1.0 としてオフロキサシンの測定を行った。その時のクロマトグラムを図 34～39 に示す。各図の縦軸・横軸のスケールは揃えて表示した。なお酢酸/EDA 無添加ではピークを確認できなかった

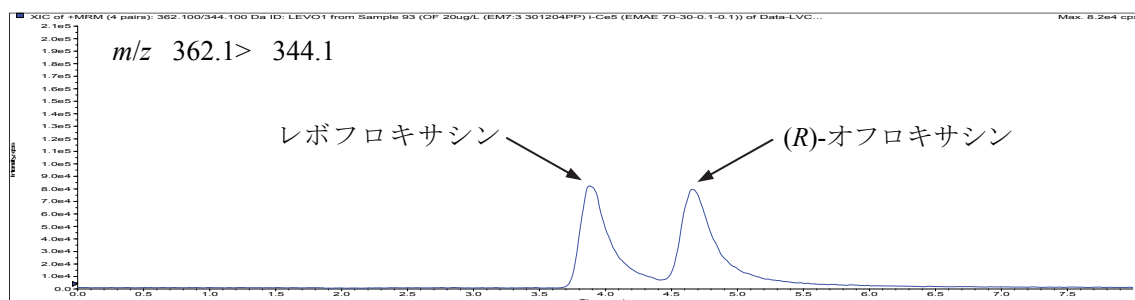


図 34 酢酸/EDA 混合比 0.1 でのオフロキサシン 20 ng/mL のクロマトグラム

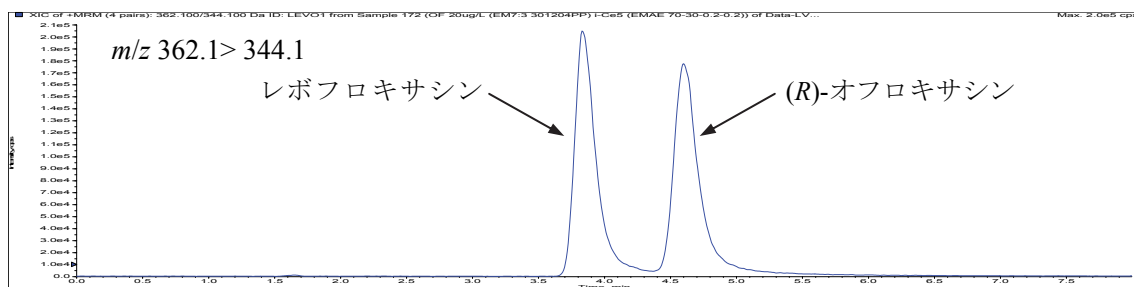


図 35 酢酸/EDA 混合比 0.2 でのオフロキサシン 20 ng/mL のクロマトグラム

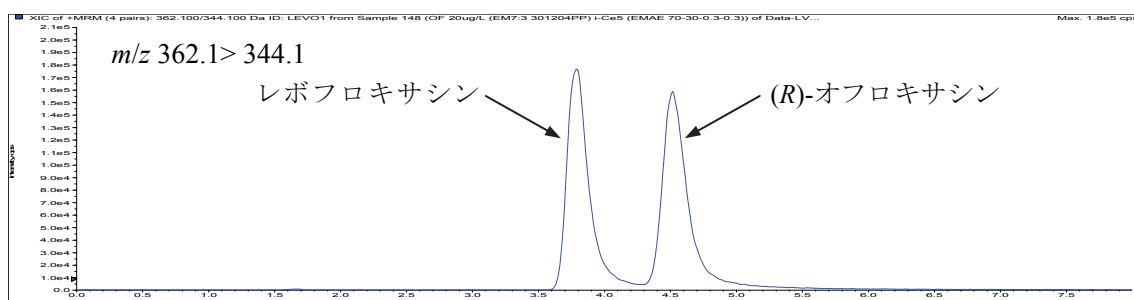


図 36 酢酸/EDA 混合比 0.3 でのオフロキサシン 20 ng/mL のクロマトグラム

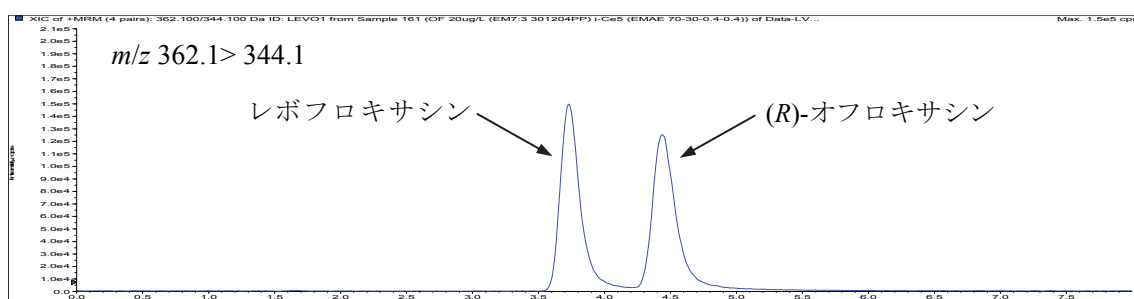


図 37 酢酸/EDA 混合比 0.4 でのオフロキサシン 20 ng/mL のクロマトグラム

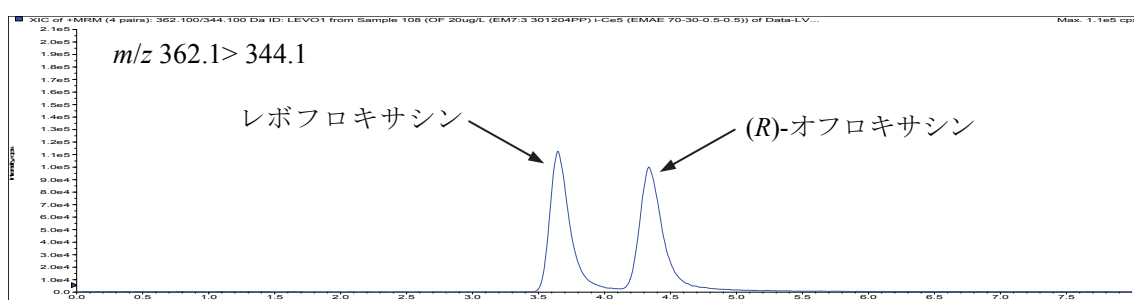


図 38 酢酸/EDA 混合比 0.5 でのオフロキサシン 20 ng/mL のクロマトグラム

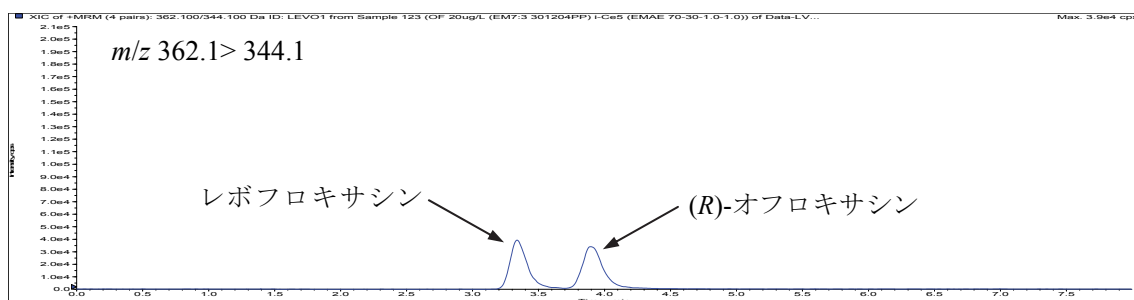


図 39 酢酸/EDA 混合比 1.0 でのオフロキサシン 20 ng/mL のクロマトグラム

図 34～39 のオフロキサシン中のレボフロキサシンピーク高さと酢酸/EDA 添加混合比の関係は表 22 のとおりであった。これを図で示すと図 40 の様になり、添加混合比 0.2 近傍でピーク高さが最高となると考えられることから、カラム LUX i-Cellulose-5 使用時の移動相中の酢酸/EDA 混合比は 0.2 とした。

ただし図 40 のとおり添加混合比が少し変わっただけで感度が大きく変化し、移動相は酢酸/EDA を添加した状態では日持ちせず、分析の都度、毎日調製する必要があった。エタノール/MTBE の混合溶媒は確認した 1 週間の作り置きで特に問題はなかった。

表 22 酢酸/EDA 添加濃度とレボフロキサシンピーク高さ

酢酸/EDA 混合比	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	1.0
ピーク高さ	82,376	204,888	176,697	149,717	112,719	39,262

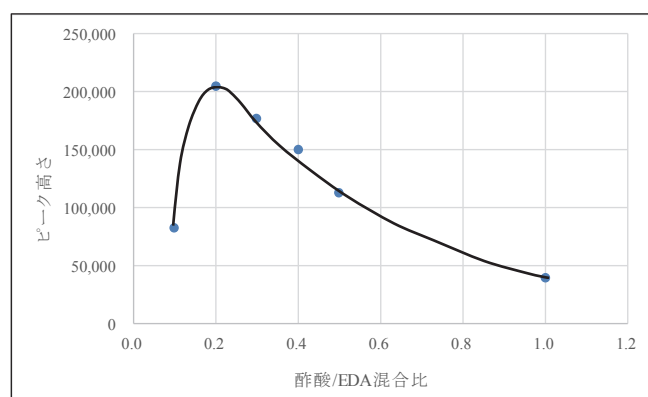


図 40 酢酸/EDA 添加濃度とピーク高さの関係

〔移動相の保存性（応答値ピーク強度の経時変化）〕

調製した移動相については、調製後の時間経過と共にピーク強度が減少していく傾向が見られたため、基本的に測定毎に調製をし直していたが、どの程度減少するか把握するため、同じレボフロキサシン標準液 (5.0 ng/mL) を約 15 分毎に連続で 36 時間測定し、65 時間経過後までのピーク面積値の変化を調べた。また 65 時間経過後に新しく調製した移動相で測定も行った。測定は標準液をバイアルに小分けし、1 バイアルからは連続 4 回分 (1 時間分) の測定を行った。

この時のピーク面積値の変化を図 41 に、レボフロキサシンとサロゲート（内標準）のレボフロキサシン- d_3 との応答比の変化を図 42 に示す。

MTBE/エタノール (30:70) に酢酸と EDA を添加した時を 0:00 とし、機器の配管・カラムの移動相置換に多少の時間を要しているため、0:00 からのプロット開始とはなっていない。

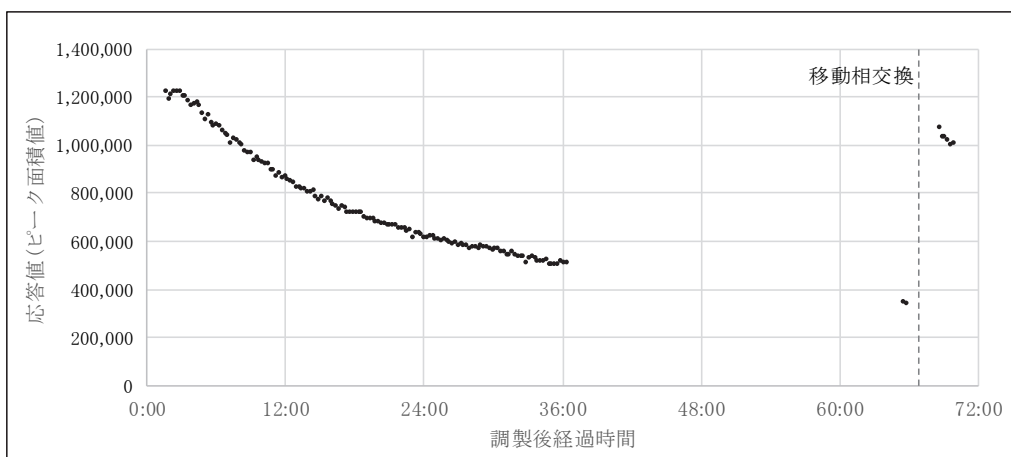


図 41 レボフロキサシン標準液応答値の経時変化

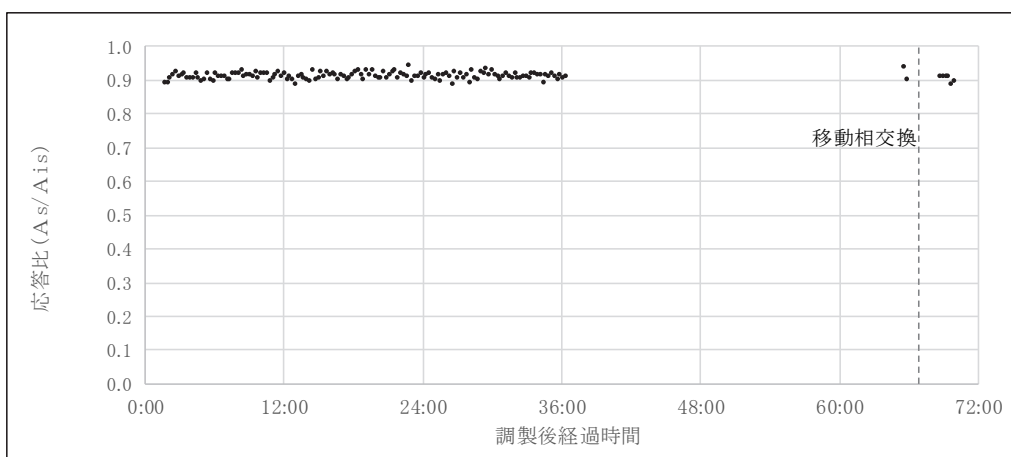


図 42 レボフロキサシン標準液応答比の経時変化

図 41 のとおり、時間経過と共にピーク強度は減少しており、24 時間経過でおよそ半減していた。しかし図 42 のとおりサロゲート（内標準）との応答比は、ほぼ一定であった。

レボフロキサシンの測定については、今回の順相においては絶対検量線法を用いることはできないが、サロゲート（内標準）法であれば定量は可能である。

移動相に添加した酢酸と EDA の変化が起きていると思われるが、ステンレス配管、ステンレスカラムを使用する機器では、これら添加剤を加えないとピークは現れないため、現時点で異性体分離を行う測定方法としては、この MTBE/エタノール/酢酸/EDA の移動相を用いることとした。ただし 24 時間でピーク強度が半減してしまうため、毎日移動相を調製交換した方が望ましい。

なお、後述の逆相における測定では異性体分離は行えないが、この様なピーク強度の減少は見られなかった。

〔溶出溶媒の乾固について〕

Oasis MCX Plus イオン交換カートリッジからの溶出にはアンモニアを含有した溶媒を使用しており、最終試験液にアンモニアが残っていると LC/MS/MS の測定時に影響が出るため、溶出液の乾固が可能な検討を行った。

標準原液を 20 ng/mL となるように 1 mol/L アンモニア・メタノール溶液で希釈し、この 10 mL をポリ試験管中で窒素ガスを吹きつけて乾固（55℃ にヒートブロックを加温して実施）させた後、内標準液レボフロキサシン-*d*₃ 5.0 ng/mL（メタノール溶液）を 2.0 mL 加え溶解し、測定した結果を表 23 に示す。乾固させても回収率に大きな影響は無かった。

表 23 溶媒を乾固/濃縮させた場合の回収率

標準液溶媒	調製濃度 (ng/mL)	濃縮倍率 (倍)	条件	試験 回数	回収率 (%)
1 mol/L アンモニア・ メタノール	20	5	乾固	2	91.8

〔標準液の保存容器と保存性について〕

レボフロキサシン検量線用標準液及び (*R*)-オフロキサシン検量線用標準液をガラス製容器に入れておくと、測定されるピーク強度が減少していった。試しにこのガラス容器に酢酸及び EDA を添加するとピーク強度が回復することから、ガラス製容器に吸着していると考えられた。（酢酸、EDA は徐々に反応すると思われることから、これら添加剤を加えて標準液等を保存するのは適当ではないと考えられる。）

そのため保存等する容器をポリ製品とした場合に、保存性に問題がないか確認を行った。使用したポリ容器は 3 種類で、メタノール溶液のレボフロキサシン標準液を明所・室温で 1 ヶ月保管し、1 ヶ月後に内標準を加えて強度を測定した。その結果を表 24 に示す。褐色系の方が保存性は良かった。

表 24 ポリ容器での標準液の保存性

物質名	調製濃度 (ng/mL)	ポリ保存容器	1ヶ月後 残存率(%)
レボフロ キサシン	5.0	Labcon 遠沈管 15 mL 無色 透明	90.5
		Labcon 遠沈管 15 mL 褐色 不透明	99.0
		Eppendorf コニカルチューブ [®] 15 mL 褐色 透明	105
(R)-オフロ キサシン	5.0	Labcon 遠沈管 15 mL 無色 透明	84.7
		Labcon 遠沈管 15 mL 褐色 不透明	95.2
		Eppendorf コニカルチューブ [®] 15 mL 褐色 透明	97.6

〔レボフロキサシン- d_8 と (R)-オフロキサシン- d_3 の利用について〕

本法の検討時に (R)-オフロキサシン単独の- d 体は在庫切れで入手できなかったため、(R)-オフロキサシンの- d 体として、オフロキサシン- d_8 に含まれる (R)-オフロキサシン- d_8 を用いて検討を行った。

その後、(R)-オフロキサシン- d_3 が再生産され、入手できたため、これを(R)-オフロキサシンのサロゲート内標準として検討を行ってみた。なお、(R)-オフロキサシン- d_8 は単独での製品は無く、- d_3 体のみ入手可能である。

(R)-オフロキサシンのサロゲート内標準として- d_3 を使用するため、レボフロキサシンのサロゲートには質量数の異なる- d_8 を使用した。

これらサロゲート物質を用いて検量線作成や添加回収試験を行ったが、特に問題もなく測定が可能であった。(R)-オフロキサシン- d 体のクロマトグラム解析については、オフロキサシン- d_8 を用いるとレボフロキサシン- d_8 と(R)-オフロキサシン- d_8 のピーク分割処理を行わなければならないが、(R)-オフロキサシン- d_3 を用いればサロゲートのピークは1つであり、簡便であった。

図 43 にレボフロキサシン標準液測定時のクロマトグラムを、図 44 に (R)-オフロキサシン標準液測定時のクロマトグラムを示す。

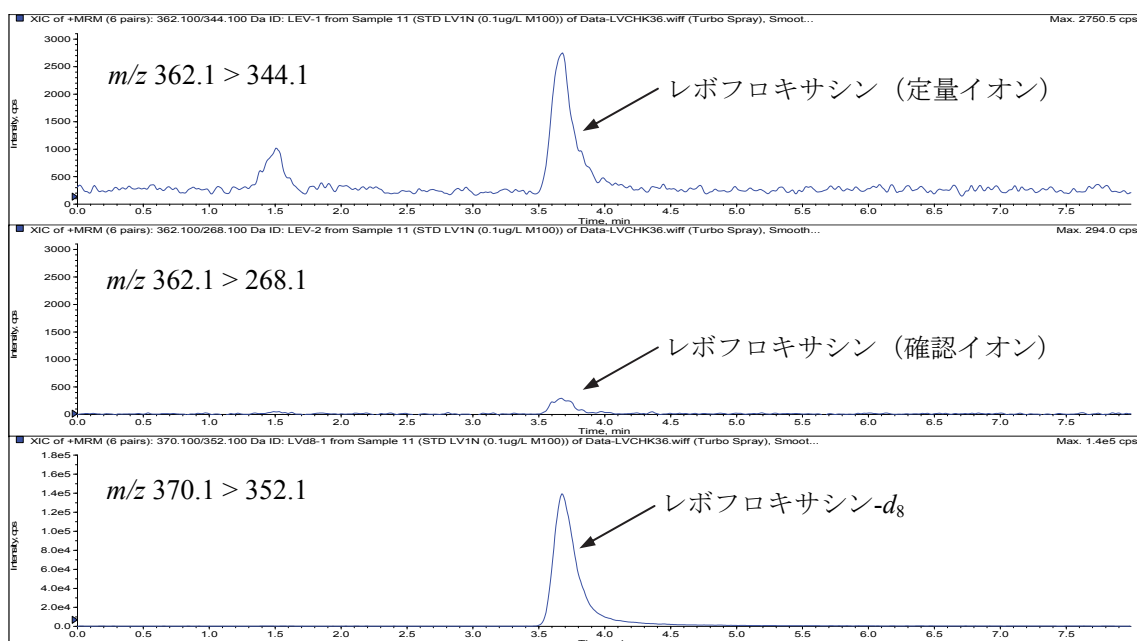


図 43 レボフロキサシン(0.10 ng/mL)測定時のクロマトグラム

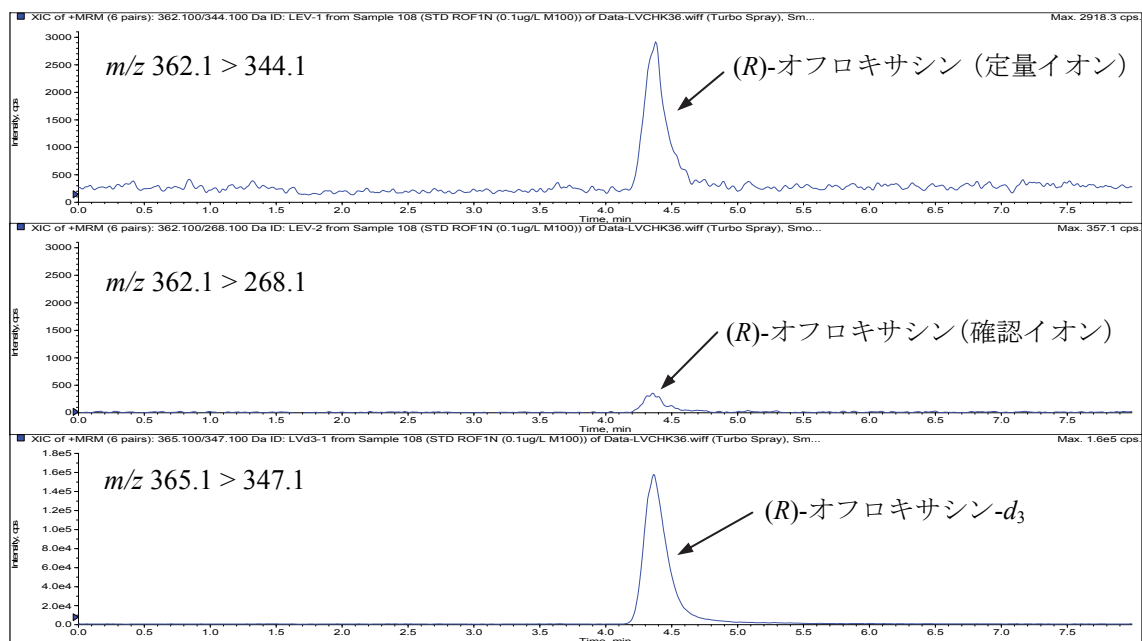


図 44 (R)-オフロキサシン(0.10 ng/mL)測定時のクロマトグラム

〔逆相での分析法について〕

レボフロキサシンは逆相条件でも測定できるが、レボフロキサシンと(R)-オフロキサシンの異性体分離を行うことはできなかった。

逆相での検討結果を以下に示す。表 25 のとおり、順相の場合とはモニターイオンの質量数が異なっている。

〔検量線用標準液〕

標準原液をメタノール/精製水 (1:1,v/v) で希釈して検量線用標準液を調製する。各濃度の検量線用標準液にはサロゲート内標準液を添加する。

〔逆相 LC/MS/MS 条件〕

〔LC 条件〕

LC 機種	: 島津製作所製 Nexera X2
カラム	: Agilent 製 Poroshell 120 EC-C18 (150 mm×2.1 mm, 4 μm)
移動相	: A: ギ酸/精製水 (0.1:100,v/v) B: ギ酸/メタノール (0.1:100,v/v)
	0→1 min A: B = 90: 10
	1→9 min A: 90→10, B: 10→90 linear gradient
	9→11 min A: B = 10: 90
	11→13 min A: 10→70, B: 90→30 linear gradient
	13→15 min A: 70→90, B: 30→10 linear gradient
	15→20 min A: B = 90: 10
カラム流量	: 0.3 mL/min
カラム温度	: 40°C
試料注入量	: 5 μL

〔MS 条件〕

機種	: AB Sciex 製 QTRAP4500
カーテングス (CUR)	: 30 psi
コリジョンガス (CAD)	: 8 (機器の設定値で単位なし)
イオンスプレー電圧 (IS)	: 5500 V
ガス温度 (TEM)	: 550°C
ネブライザーガス (GS1)	: 40.0 psi
ターボガス (GS2)	: 60.0 psi
引き込み電圧 (DP)	: 60.0 V
入口電圧 (EP)	: 10.0 V
出口電圧 (CXP)	: 12.0 V
イオン化法	: ESI (+)

測定モード : SRM

表 25 逆相モニターイオン(m/z)と測定条件

物質名		プレカーサー イオン (m/z)	プロダクト イオン (m/z)	Collision Energy (eV)
レボフロキサシン及び (<i>R</i>)-オフロキサシン	(定量用)	362.1	318.2	25
	(確認用)	362.1	261.2	35
レボフロキサシン- d_3	(定量用)	365.1	321.1	25
	(確認用)	365.1	260.9	35
オフロキサシン- d_8	(定量用)	370.1	326.1	30
	(確認用)	370.1	265.2	40

[クロマトグラム]

レボフロキサシン (5.0 ng/mL)、(サロゲート内標準としてレボフロキサシン- d_3 及びレボフロキサシン- d_8 を 5.0 ng/mL の濃度で含む) のクロマトグラムを図 45 に示す。

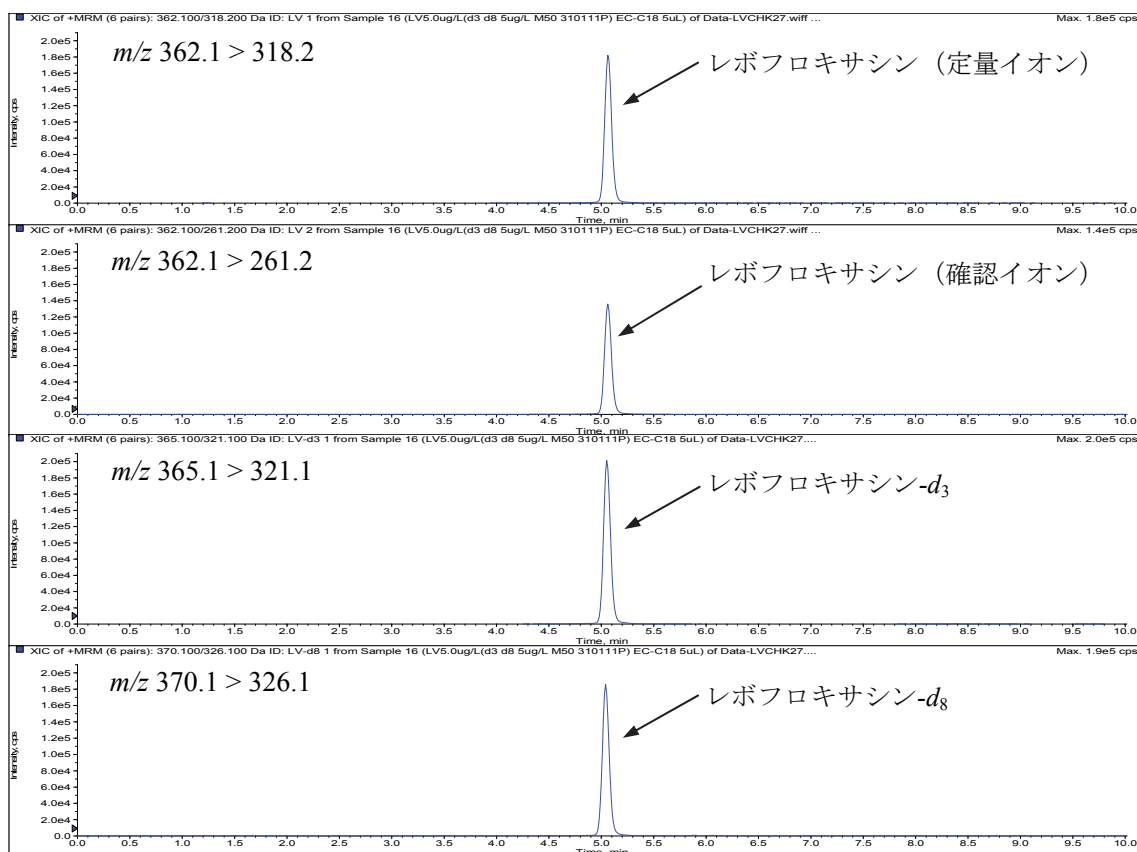


図 45 逆相でのレボフロキサシン標準液(5.0 ng/mL)のクロマトグラム

[マスペクトル]

逆相でのレボフロキサシンのマスペクトルを図 46 に示す。

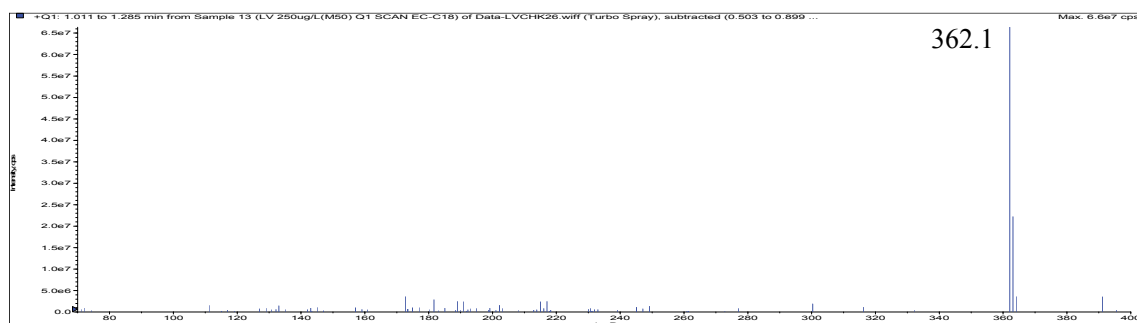


図 46 逆相でのレボフロキサシンのマスペクトル

逆相におけるレボフロキサシンのプレカーサーイオン m/z 362.1 に対するプロダクトイオンマスペクトルを図 47 に示す。

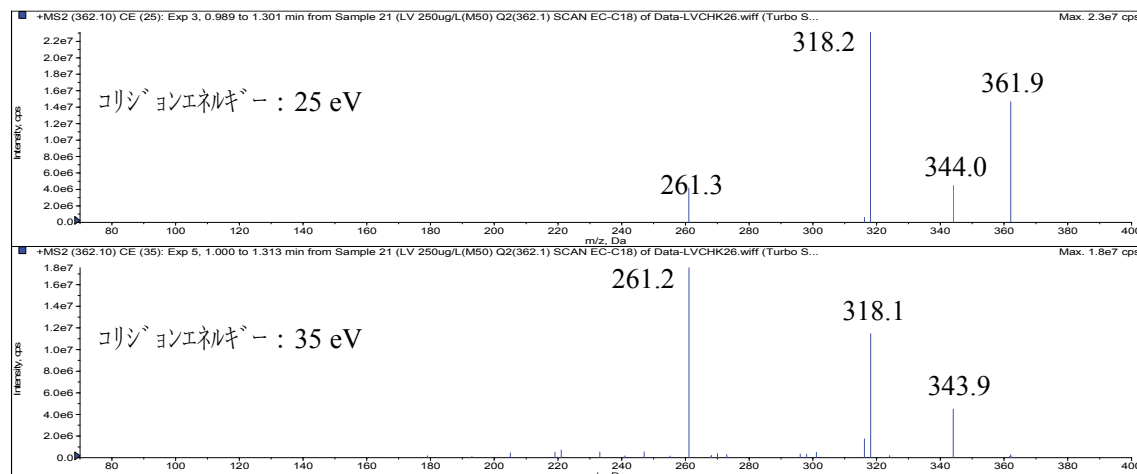


図 47 逆相プレカーサーイオン m/z 362.1 に対するプロダクトイオンマスペクトル

逆相でのレボフロキサシン- d_3 のマスペクトルを図 48 に示す。

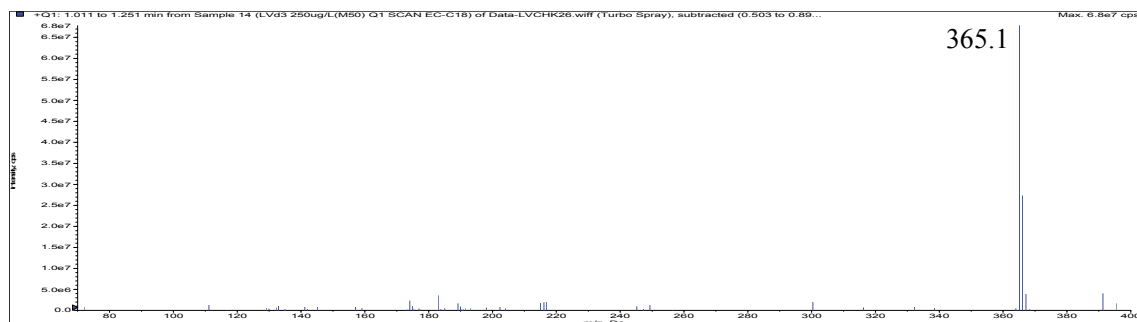


図 48 逆相でのレボフロキサシン- d_3 のマスペクトル

逆相でのレボフロキサシン- d_3 のプレカーサーイオン m/z 365.1 に対するプロダクトイオンマスペクトルを図 49 に示す。

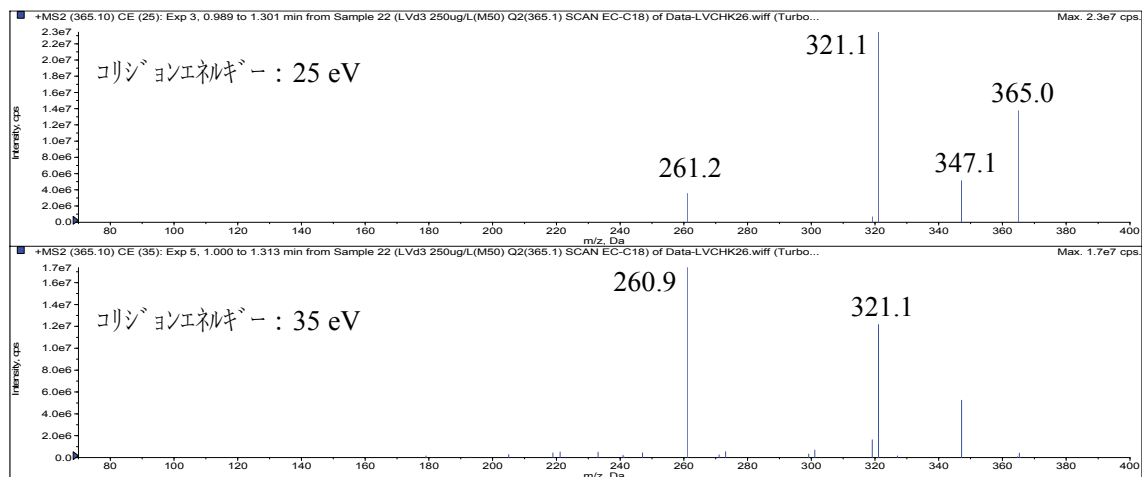


図 49 逆相プレカーサーイオン m/z 365.1 に対するプロダクトイオンマスペクトル

逆相でのレボフロキサシン- d_8 のマスペクトルを図 50 に示す。

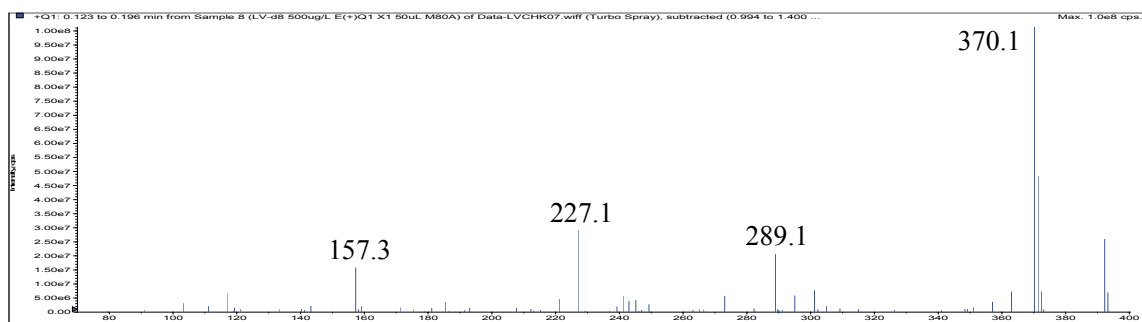


図 50 逆相でのレボフロキサシン- d_8 のマスペクトル

逆相でのレボフロキサシン- d_8 のプレカーサーイオン m/z 370.1 に対するプロダクトイオンマスペクトルを図 51 に示す。

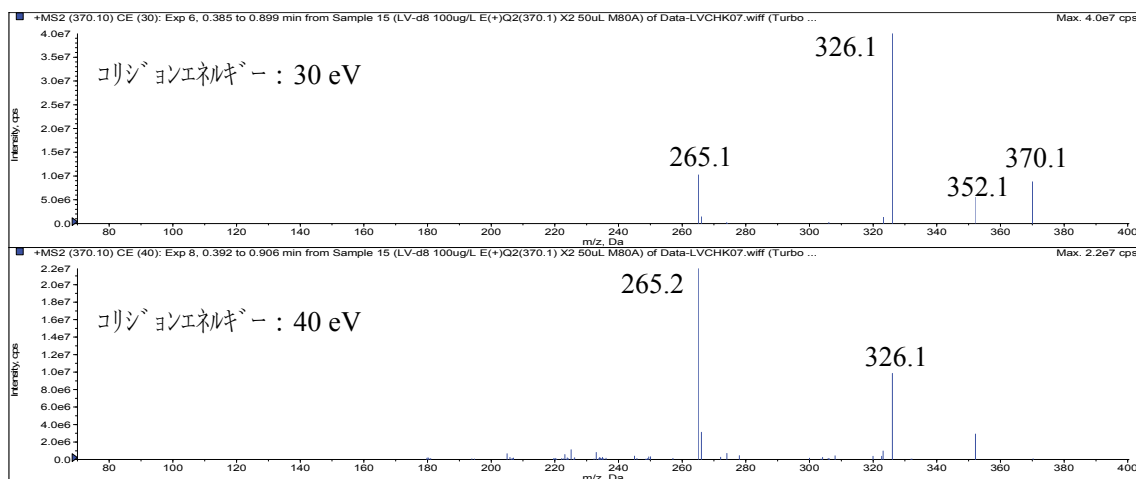


図 51 逆相プレカーサーイオン m/z 370.1 に対するプロダクトイオンマスペクトル

[カラム分離状況]

カラム (Agilent 製 Poroshell 120 EC-C18 (150 mm×2.1 mm, 4 μ m)) でのレボフロキサシン、(R) -オフロキサシン及びオフロキサシンのクロマトグラムを図 52～54 に示す。このカラム・条件では分離できなかった。

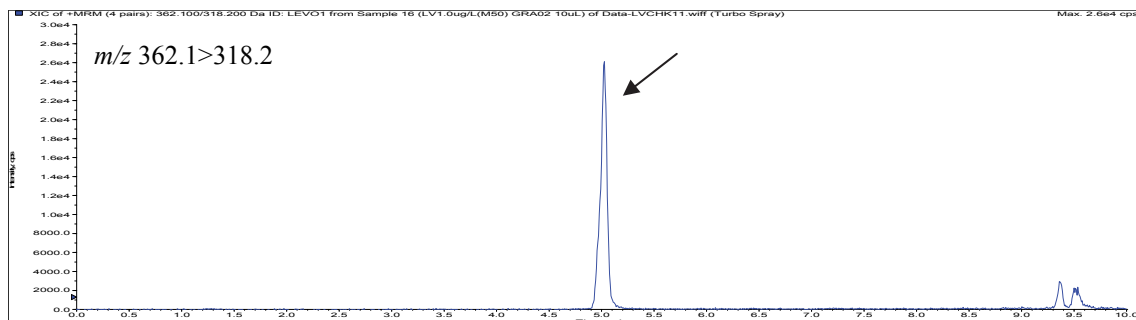


図 52 レボフロキサシン 1.0 ng/mL のクロマトグラム

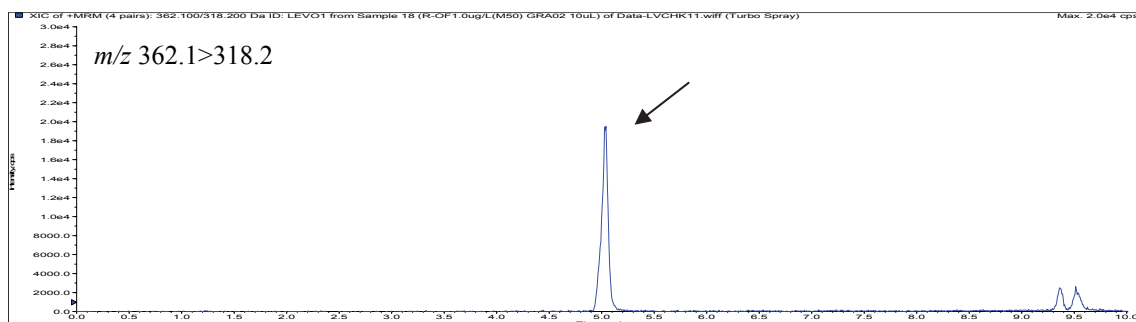


図 53 (R)-オフロキサシン 1.0 ng/mL のクロマトグラム

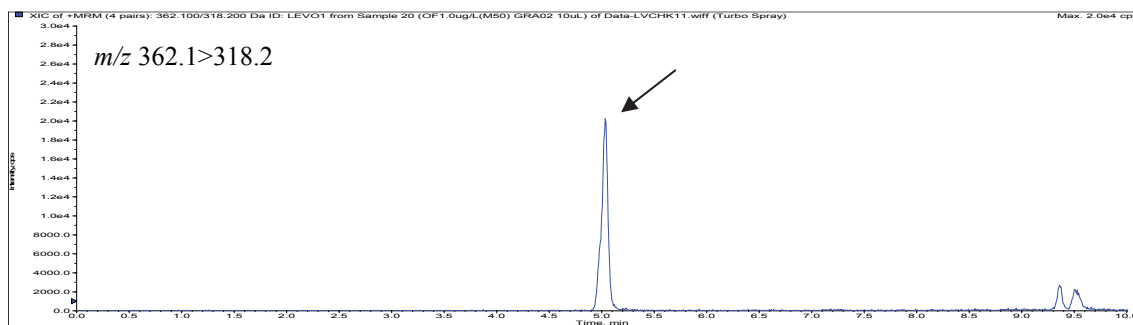


図 54 オフロキサシン 1.0 ng/mL のクロマトグラム

カラムはこの他、次の 6 種類のカラムでも検討を行った。

1. Agilent 製 ZORBAX Eclipse XDB-C18 (100 mm×2.1 mm, 1.8 μm)
2. Agilent 製 Poroshell 120 Chiral-V (150 mm×2.1 mm, 2.7 μm)
3. ダイセル製 CHIRALPAK AS-RH (250 mm×2.1 mm, 5 μm)
4. SUPELCO 製 Ascentis Express C18 (150 mm×2.1 mm, 2.7 μm)
5. SUPELCO 製 Ascentis RP-Amide (150 mm×2.1 mm, 3 μm)
6. Waters 製 XSELECT CSH Phenyl-Hexyl (150 mm×2.1 mm, 3.5 μm)

これらについても検討を行ったが、異性体分離させることはできなかった。

異性体分離させる必要がなければ逆相条件の測定方法でもよく、S/N 比も逆相条件の方が良好であるが、レボフロキサシンと (R)-オフロキサシンは薬効が異なるため、本検討では順相で異性体分離させる分析方法とした。

〔環境試料の分析例〕

本法を用いて河川水（豊平川、下水処理水の影響は非常に小さい）及び海水（小樽）を測定した。レボフロキサシン、(R)-オフロキサシンの両物質共、MDL 未満であった。河川水のクロマトグラムを図 18 に、海水のクロマトグラムを図 20 に示す。

【評価】

本法で用いた LC/MS/MS では、レボフロキサシンの MDL は 0.47 ng/L、MQL は 1.2 ng/L、(R)-オフロキサシンの MDL は 0.39 ng/L、MQL は 1.0 ng/L であった。2 物質ともに、0.10～7.5 ng/mL 及び 7.5～100 ng/mL の濃度範囲で検量線の直線性 ($r^2 > 0.99$) が確認された。河川水及び海水 200 mL に対し、各々 20 ng 添加した時の回収率はレボフロキサシンが河川水 99%、海水 102%、(R)-オフロキサシ

ンが河川水 99%、海水 98%であった。本法により札幌市内の河川水を測定したところ、下水処理水の流入がほとんど無い地点では MDL 未満であったが、下水処理水からはレボフロキサシンが 420 ng/L、(R) -オフロキサシンは 1.7 ng/L で検出された。

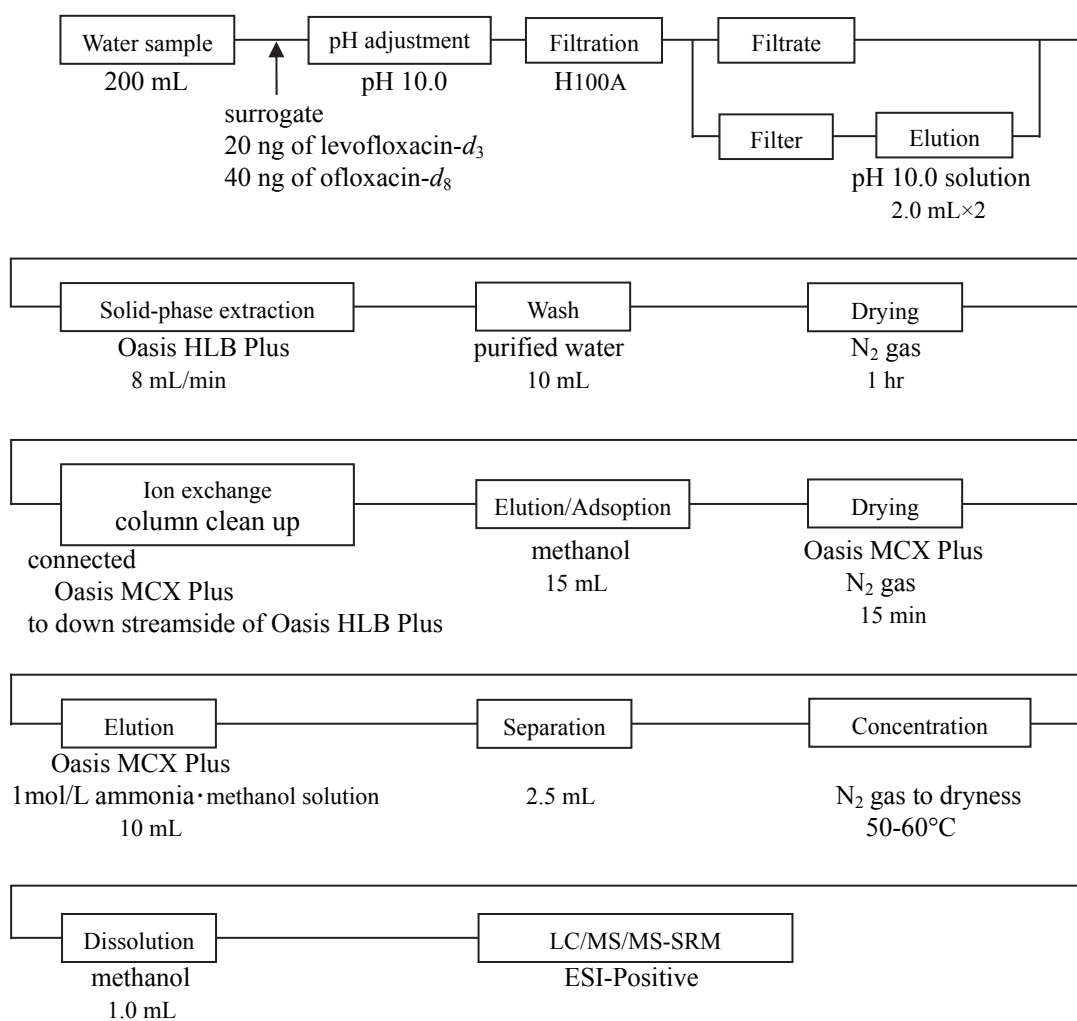
以上の結果から、本法は環境水中に含まれる、1.0 ng/L オーダーのレボフロキサシン及び (R) -オフロキサシンの定量に適用できると判断される。

【担当者連絡先】

所属先名称 : 札幌市衛生研究所
所属先住所 : 〒003-8505 札幌市白石区菊水 9 条 1 丁目 5-22
TEL : 011-841-9596 FAX : 011-841-7073
担当者名 : 折原 智明
E-mail : tomoaki.orihara@city.sapporo.jp

Levofloxacin, (*R*)-Ofloxacin

This method provides a procedure for the determination of levofloxacin and (*R*)-ofloxacin in water samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). A water sample (200 mL) is spiked with two surrogates (20 ng of levofloxacin-*d*₃ and 40 ng of ofloxacin-*d*₈ or 20 ng of levofloxacin-*d*₈ and 20 ng of (*R*)-ofloxacin-*d*₃). The sample is adjusted to pH 10.0 with ammonia solution and formic acid, and then the sample is filtered with a hydrophilic PTFE membrane filter (H100A:1 µm effective pore size), which is subsequently extracted with 2.0 mL of pH 10.0 solution (5.0 mmol/L ammonium formate solution is adjusted to pH 10.0 with ammonia solution and formic acid) twice. The filtrate is passed through a preconditioned solid-phase extraction cartridge (Oasis HLB Plus) at a flow rate of 8 mL/min. After the cartridge is washed with 10 mL of purified water, the cartridge is dried with nitrogen gas for 1 hr. The cartridge is subsequently connected to preconditioned ion-exchange cartridge (Oasis MCX Plus). The analytes are eluted from Oasis HLB Plus with 15 mL of methanol, which are subsequently adsorbed to Oasis MCX Plus. Oasis MCX Plus is dried with nitrogen gas for 15 min, which is subsequently eluted with 10 mL of 1 mol/L ammonia methanol solution. The 2.5 mL separated from 10 mL of eluate is completely dried under a nitrogen gas stream, and then dissolved with 1.0 mL of methanol. The concentration of analytes are determined by LC/MS/MS-SRM (ESI positive). The method detection limits (MDL) of levofloxacin and (*R*)-ofloxacin are 0.47 ng/L and 0.39 ng/L, respectively. The recovery rates were both 99% when 20 ng of levofloxacin and (*R*)-ofloxacin were added to river water sample (200 mL). The recovery rates were 102% and 98% when 20 ng of levofloxacin and (*R*)-ofloxacin were added to sea water sample (200 mL), respectively. Using this method, levofloxacin and (*R*)-ofloxacin were detected from sewage treated water sample in Sapporo area. The concentrations of levofloxacin and (*R*)-ofloxacin were 420 ng/L and 1.7 ng/L, respectively.



物質名	分析法フローチャート	備考
[1] レボフロキサシン 別名：(S)-オフロキサシン [2] (R)-オフロキサシン	【水質】	分析原理： LC/MS/MS-SRM ESI-Positive 検出下限値： 【水質】(μg/L) [1] 0.00047 [2] 0.00039 分析条件： 機器 LC: 島津製作所 製 Nexera X2 MS: AB Sciex 製 QTRAP4500 カラム phenomenex 製 LUX i-Cellulose-5 EC-C18 (150 mm × 2.0 mm, 3 μm)