

第 10 回法医中毒研究会セミナー

ブラインドテスト

(2)フェノバルビタールとレボメプロマジン

令和 3 年 3 月 17 日 (水曜日)
午後 1 時半から午後 4 時頃



世話人 Brian Waters
福岡大学医学部法医学教室

第 10 回法医中毒研究会セミナー

ブラインドテスト： (2)フェノバルビタールとレボメプロマジン

目 次

第 10 回法医中毒研究会セミナー開催にあたって	2
第 10 回法医中毒研究会セミナープログラム	3
抄録	
ブラインドテストの準備及び実施の実際	4
Brian Waters (福岡大学)	
ブラインドテスト結果報告	7
矢島 大介 (国際医療福祉大学)	
フェノバルビタールの分析	32
長谷川 弘太郎 (浜松医科大学)	
レボメプロマジンの分析	36
坂 幹樹 (東京大学)	

令和3年3月17日

法医中毒研究会会長 久保 真一

第10回法医中毒研究会セミナー開催にあたって

第10回法医中毒研究会セミナー（以下、セミナー）は、新型コロナウイルス感染症の流行の状況を考慮し、Zoomで開催いたします。

法医中毒研究会セミナーでは、法医鑑定における薬毒物分析を、薬毒物分析マニュアルに即して、薬毒物分析業務全般から各物質の分析方法に至るまでより実践的、専門的に学ぶことを目的としております。

今回のセミナーでは、昨年12月に実施した第2回ブラインドテストの結果を共有し、今後の薬物分析の精度の向上に繋がたいと考えており「ブラインドテスト：（2）フェノバルビタールとレボメプロマジン」というテーマで、ブラインドテストの実施要領、ブラインドテストの結果の報告、対象薬物についての分析における留意点を扱う予定です。

本セミナーにおいて薬毒物定量法について理解を深め、業務の発展、改善等に役立てていただければと思います。

第 10 回法医中毒研究会セミナープログラム

ブラインドテスト：(2)フェノバルビタールとレボメプロマジン

日 時：令和 3 年 3 月 17 日（水）13:30～16:00 頃（Zoom 開催）

開会の挨拶	13:30-13:35
会長 久保 真一 先生（福岡大学）	
セミナー前半	座長：久保 真一 先生（福岡大学）
第 2 回ブラインドテストについて	
ブラインドテストの準備及び実施の実際	13:35-13:50
Brian Waters 先生（福岡大学）	
ブラインドテスト結果報告	13:50-14:05
矢島 大介 先生（国際医療福祉大学）	
ブラインドテストの今後とあり方(質疑応答含む)	14:05-14:35
休憩	14:35-14:50
セミナー後半	座長：福家 千昭 先生（横浜市立大学）
ブラインドテスト対象薬物の分析について	
フェノバルビタールの分析	14:50-15:05
長谷川 弘太郎 先生（浜松医科大学）	
質疑応答	15:05-15:15
レボメプロマジンの分析	15:15-15:30
坂 幹樹 先生（東京大学）	
質疑応答	15:30-15:40
質疑応答及び総括	15:40-15:55
閉会の挨拶	15:55
世話人 Brian Waters 先生（福岡大学）	

Department of Forensic Medicine, Fukuoka University

ブラインドテストの 準備及び実施の実際

Brian Waters,
徳安智子, 枝光依津子, 久保真一
福岡大学医学部法医学教室

福岡大学
FUKUOKA UNIVERSITY

What is a 'Blind Test'?

- In a 'blind test', information that could influence the participants is withheld until after the experiment is complete.
- In this case, the participants of the test are unaware of what compounds they are expected to find and in what concentrations.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

'Double-Blind' Meaning

- In a double-blind experiment, those who are conducting the test are also blind to the results.
- In other words, the result of the test (whether it is accurate or not) is only known to the laboratory itself.
- This is done so the laboratories need not fear embarrassment or condemnation if their results are incorrect.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Materials / Preparation /Expenses

支出科目	規格 (容量・単位)	金額 (消費税込)
全血 (ウシ)	500 mL	6,710
Levomopromazine HCl	5 g	19,107
Phenobarbital Sodium Salt	25 g	2,244
Ethanol	500 mL	1,830
クッション封筒	50枚	2,090
保冷剤	600個	2,310
チャック付きポリ袋	200枚	1,060
5-mLチューブ	1000本	11,200
封筒 (長3)	100枚	400
封筒 (長4)	100枚	350
75分リリガバ 112面角丸	20シート	520
ポリ袋 (12号)	100枚	230
クール宅急便 (冷蔵)	35ヶ所	52,790
人件費	2人	30,000
雑費		550
合計:		¥ 131,391

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Production of the Test Sample

- The cow's blood, which was received frozen and stored at -20°C, was thawed overnight at 4°C.
- The following morning, the thawed blood was poured into a 200-mL graduated cylinder to accurately measure the volume.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Production of the Test Sample (2)

- The blood was then poured into a 300-mL Erlenmeyer flask.
- The flask was surrounded by ice to prevent the evaporation of volatile compounds from the sample.
- A magnetic stirrer was used to prevent from the blood from clumping.



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Production of the Test Sample (3)

- 100 μL of a 1.0 mg/mL ethanolic solution of Levomepromazine was added to the blood (final concentration 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- 8.76 mg of Phenobarbital Sodium salt was added to the blood (final concentration 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$).
- 533.7 μL of Ethanol was added to the blood, combined with the 100 μL



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

Production of the Test Sample (4)

- The flask was Parafilm and mixed 1 hr.
- After stirring, 5 mL aliquots of the spiked blood were added to 5 mL plastic tubes.



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

Production of the Test Sample (5)

- The tubes were immediately capped and sealed with Parafilm.
- The sealed tubes were immediately stored on ice.
- 40 tubes were produced, each containing 5 mL of spiked blood sample.



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

Production of the Test Sample (6)

- The tubes were placed in sealable plastic bags with 2 frozen ice packs.
- Each bag was sealed and placed into a cushioned envelope along with an instruction sheet, an answer form, and 2 envelopes.



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

Production of the Test Sample (7)

- The paper items were placed into a plastic bag to keep them from getting wet due to condensation or leakage.
- Kuroneko-Yamato shipping service was used to ship the samples.



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

Analysis of the Test Sample

- A frozen tube was thawed out for analysis in our laboratory.
- 0.2 mL aliquots were sampled for screening by GC/MS and LC-MS/MS, screening of volatiles/quantitation of Ethanol by GC-FID, and quantitation of Levomepromazine and Phenobarbital by LC-MS/MS.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

Test Sample Analysis Results

Screening:

- Volatiles screening by GC-FID was positive for ethanol.
- General screening by GC/MS was positive for phenobarbital and levomepromazine.
- General screening by LC-MS/MS (Shimadzu Forensic Database) was positive for phenobarbital and levomepromazine.

Quantitation:

Compound	Expected Result	Analyzed Result
Ethanol	2.50 mg/mL	2.40 mg/mL
Levomepromazine	0.50 µg/mL	0.55 µg/mL
Phenobarbital	40 µg/mL	37 µg/mL

- Ethanol: 3-pt calibration in cow's blood at 1.0, 2.5, and 5.0 mg/mL ($R^2 = 0.995$); IS: *t*-butanol.
- Levomepromazine: 3-pt calibration in cow's blood at 0.125, 0.25, and 0.50 µg/mL ($R^2 = 0.999$); IS: diazepam-*d*₅.
- Phenobarbital: 3-pt calibration in cow's blood at 20, 40, and 80 µg/mL ($R^2 = 0.997$); IS: phenobarbital-*d*₅.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

First year vs. Second year (1)

- Not enough sample (first year = 2 mL)
 - Increased the sample from 2 to 5 mL.
 - Changed from human blood to cow's blood, to increase blood volume (human blank blood = ¥1万/20 mL; cow's blood = ¥6千/500 mL).
 - Since it was changed to cow's blood, caffeine and other substances were eliminated.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

First year vs. Second year (2)

- The sample arrived unfrozen, or appeared to have melted and refrozen
 - We increased the volume of the sample from 2 to 5 mL, added 2 frozen ice packs to the bag, and pre-packed all the samples so we just needed to hand them to the courier.
 - The implementation time was changed from November to December.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

さいごに

- 今後も、より多くの方にブラインドテストに参加頂くために、実施本部では、正確な試料の作成と配布に努力します。
- ブラインドテストの改良のための、皆様のご意見をお待ちしております。

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

第2回ブラインドテスト結果報告

(2021年3月17日)

法医中毒研究会セミナー

報告事項		
1.	参加機関	p.1
2.	エタノール検査結果	p.2
3.	薬物スクリーニング検査結果	p.6
4.	薬物定量検査結果	p.12
5.	その他(ご意見・ご要望など)	p.22
6.	参考資料	p.24

1. 参加機関

参加機関数	35 機関
回答機関数	35 機関

- ◆ 参加 35 機関全てから回答があり。ただし、エタノール検査のみ、スクリーニング検査のみ参加の機関を含む。

検査	参加機関 35 機関中の回答機関数
エタノール検査	31
薬物スクリーニング検査	34
薬物定量検査	21

2. エタノール検査

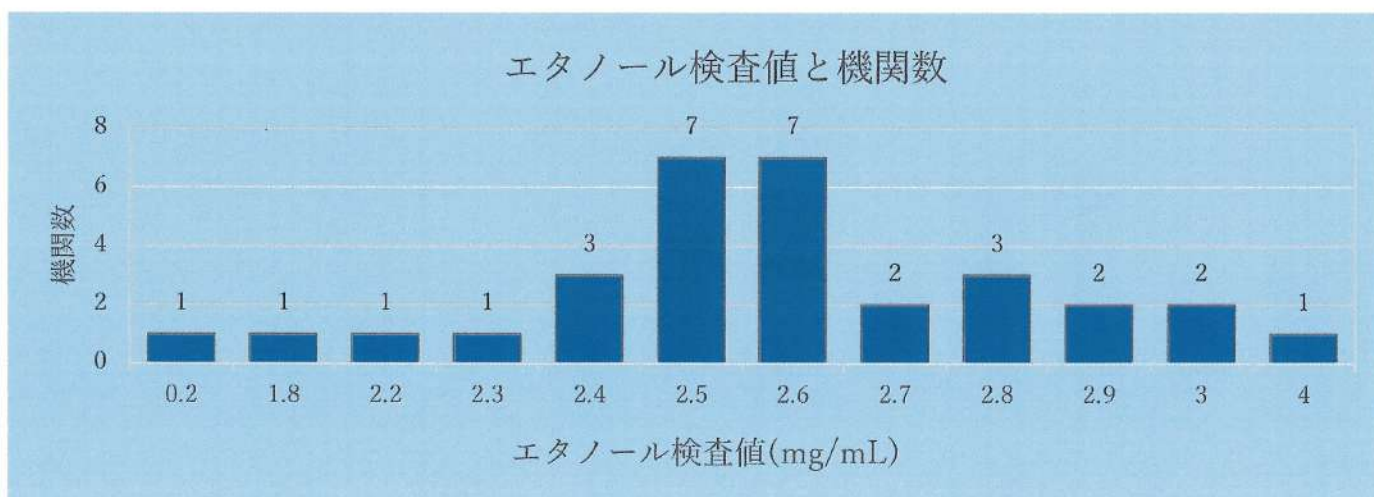
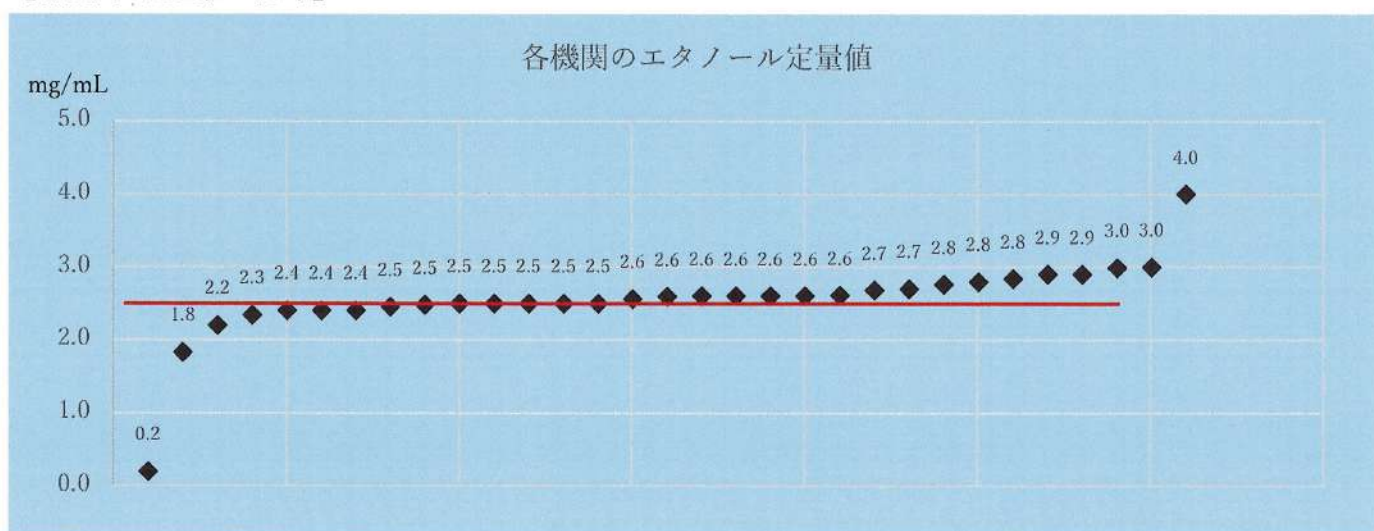
【参加機関】 31 機関

【調製濃度と定量値の処理】

調製濃度	2.5 mg/ml
調製機関分析濃度	セミナー当日の報告を参照

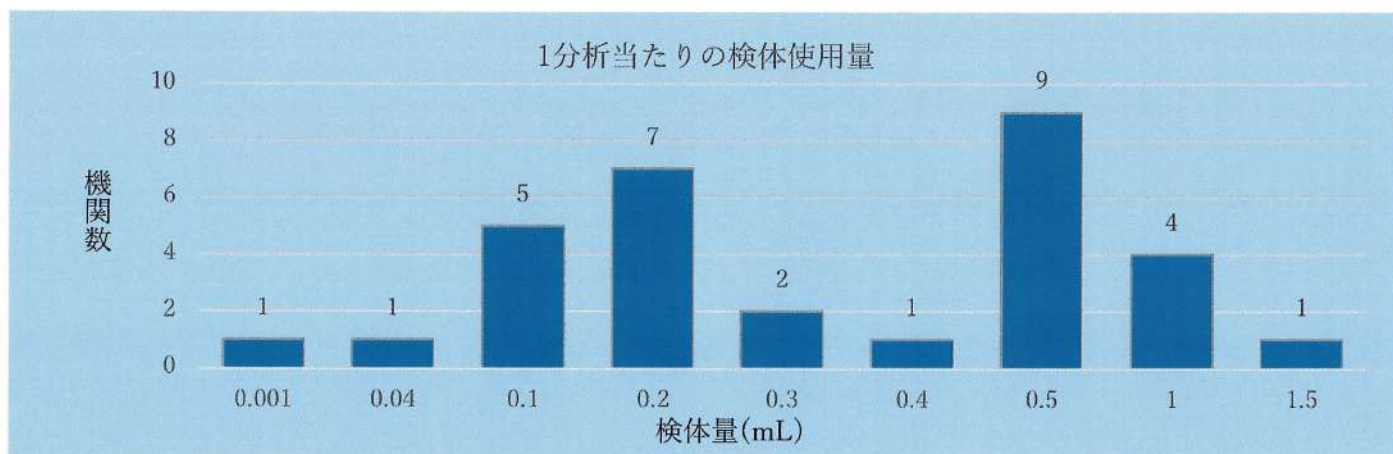
- ◆ エタノール濃度は一般の成書や文献では小数点第 1 位までの数値で症状などを提示している。
- ◆ それ以下の細かい数値での症状の違いは明記されていない。
- ◆ 提出された結果を小数点第 1 位となるように四捨五入して解析した。

【各機関の定量値の分布】

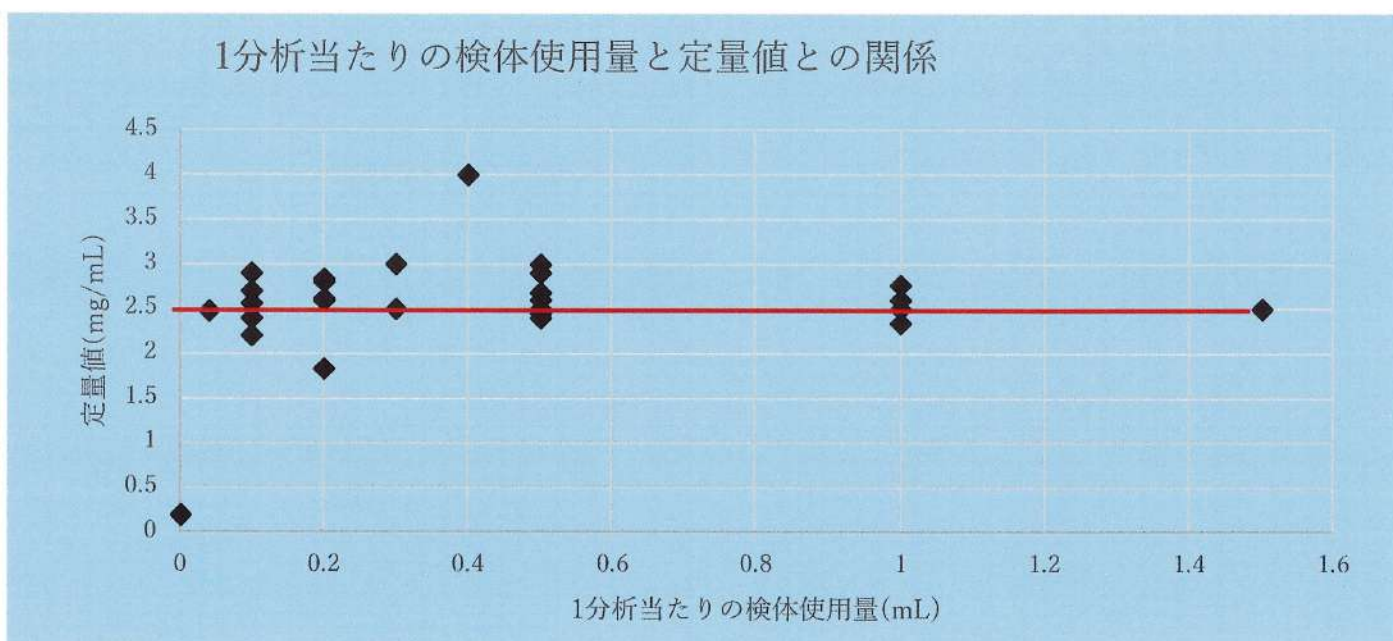


- ◆ 31 機関中、23 機関(74%)が調整値(2.5 mg/mL)±10%(2.3-2.8 mg/mL)の範囲であった。(注意：10%以内が妥当ということではない)

【検体 1 回使用量】

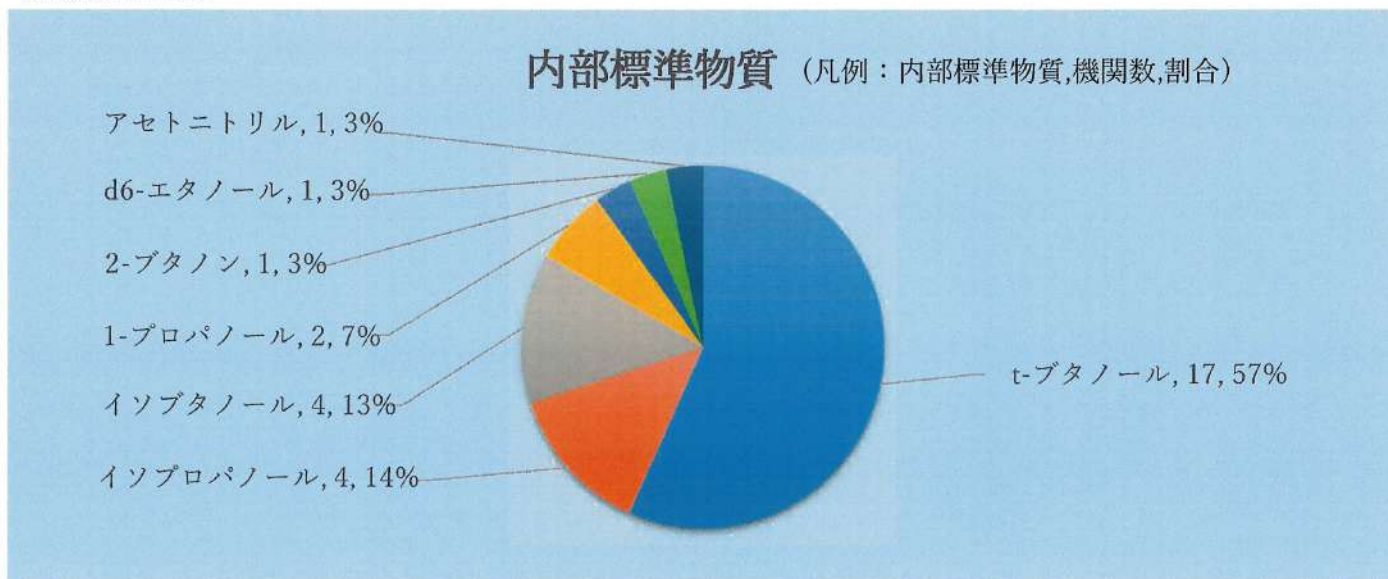


- ◆ 0.1 ml×3 回や 0.5 ml×2 回は、それぞれ 0.3 ml、1.0 ml とした。
- ◆ 1 分析当たりの検体使用量は 0.5mL か 0.2mL の機関が多く、最少で 0.001mL、最大で 1.5mL であった。



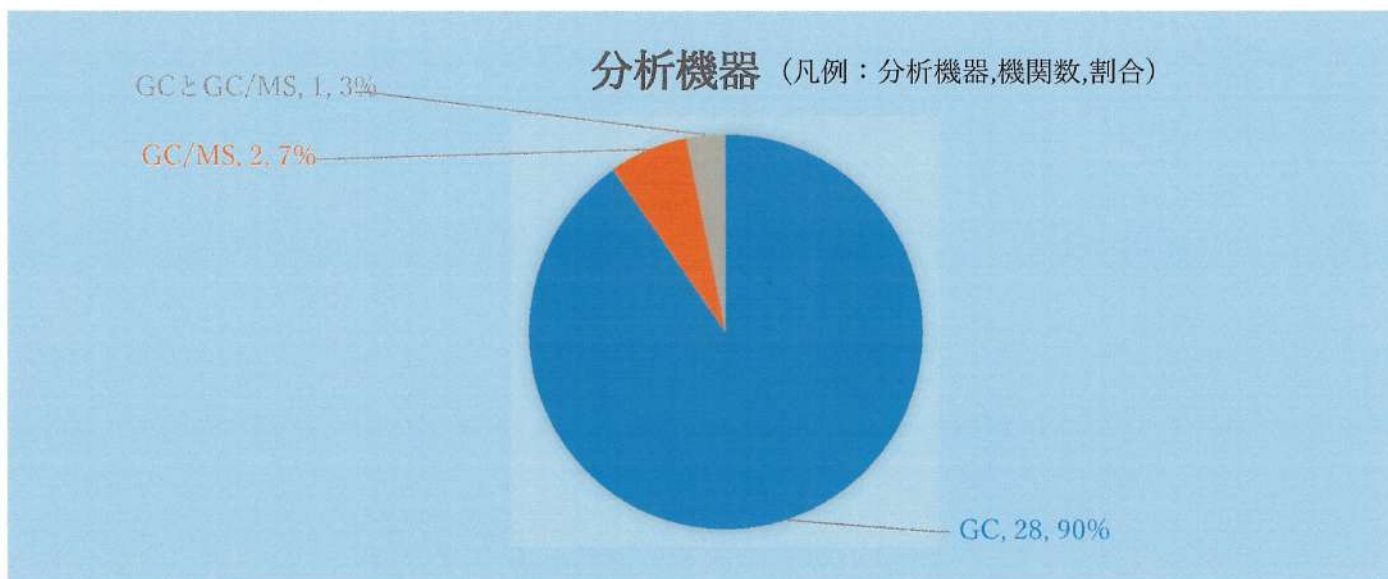
- ◆ 検体使用量と分析結果に相関は認められなかった。

【内部標準物質】



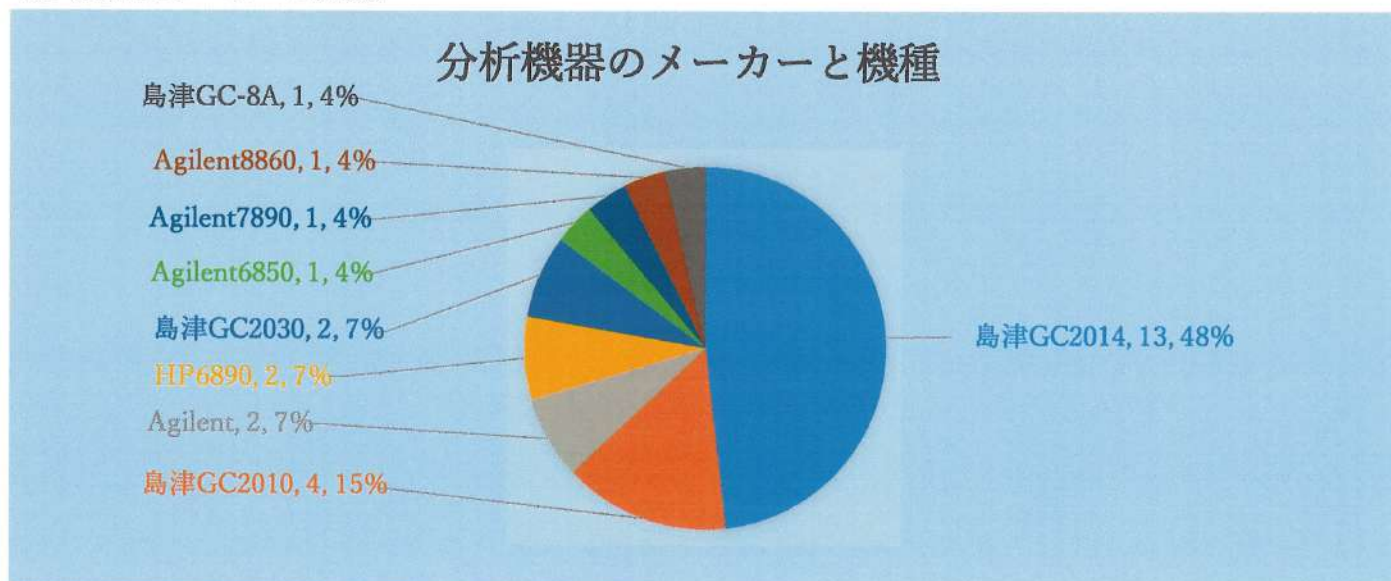
- ◆ 30 機関中 17 機関(57%)が t-ブタノールを使用していた。

【分析機器及び分析方法】



- ◆ 31 機関中 28 機関(90%)が GC(ガスクロマトグラフィー)、3 機関(10%)が GC-MS(ガスクロマトグラフィー・質量分析計)を使用していた。
- ◆ 分析方法は 1 機関でダイレクト注入法を採用していた以外は、すべてヘッドスペース法であった。

【分析機器のメーカーと機種】



- ◆ 約半数の機関が島津 GC2014 であった。
- ◆ 機種の詳細は省略した。例：A、Plus、AF など。

【コメント・質問】

内容	詳細
分析方法に関すること	0.5mL を使用した分析を 2 回行っています。 - ヒトブランク血液を用いて内部標準法で分析した。3 点(1.0、2.0、4.0)+ブランクで検量線を作成した(n=3)。定量分析は 2 回施行し、平均値を算出した。 - 検量線を用いて算出。
検出物質に関すること	- アセトン、アセトアルデヒドも検出された。 - メタノールも検出されました。

- ✓ 今回は試料調整時にメタノールは使用していない。
- ✓ 調整機関での購入したウシ血清の事前スクリーニングでは添加薬物以外は検出されていない。

質問	回答
- エタノールを測定する前に血液を数回溶解したので、値が低くなっている可能性あり。 - 本大学ではダイレクト注入法により測定を行っているが、ヘッドスペース法と比較してデメリットや問題点がありましたら、是非教えていただきたいと思います。	- 分析値は調整濃度±10%に入っており、溶解による影響は許容範囲内と思われます。 - セミナー当日に参加者のご意見を伺います。

3. 薬物スクリーニング検査

【参加機関】34 機関

- ✓ 1 機関はスクリーニング分析に記載なく、定量分析のみに記載があったが、スクリーニング分析にも含めた。

【添加化合物】

- ◆ 今回は以下の 2 種とした。

添加化合物	①フェノバルビタール ②レボメプロマジン
-------	-------------------------

- ✓ 酸性、塩基性薬物を各 1 種ずつとし、代表的な薬物を選択した。
- ✓ フェノバルビタールは酸性薬物の代表的なもので、臨床でも汎用されている。
- ✓ レボメプロマジンは代表的な向精神薬で、塩基性薬物に分類される。

【各機関の検出結果】

対象 2 化合物の検出状況	機関数
フェノバルビタール、レボメプロマジン両物質を検出	34

- ◆ 34 機関のすべてで対象 2 化合物を検出した。

【対象 2 化合物以外で報告された化合物】

化合物	報告機関数
メチルフェノバルビタール(メホバルビタール)	2
レボメプロマジンスルホキシド	1
クロナゼパム	1

- ◆ 試料調整機関で確認した化合物以外にもいくつかの化合物が検出されていた。
- ✓ 購入したウシ血清の事前スクリーニングでは添加薬物以外は検出されていない。
- ✓ GC-MS でフェノバルビタールを分析すると分析条件にもよりますが、注入口でメチル化されてメホバルビタールが検出されることがある。LC-MS で確認すると検出されない。

【前処理方法】

[LC-MS 及び LC-MS/MS、LC-QTOF 分析における前処理方法(27 方法)]

前処理法	機関数	追加処理	機関数	備考
除タンパク法	12	特記無し	11	
		リン脂質除去	1	
QuEChERS 法	4	特記無し	3	
		リン脂質除去	1	酸性・塩基性薬物同時抽出法
分散固相抽出法	4	特記無し	4	
液-液抽出	1	特記無し	1	ギ酸アンモニウムを添加してアセトニトリルで液液抽出。
その他	3	特記無し	3	1 機関は下記詳細*)、2 機関は詳細記載なし。
記載なし	3	特記無し	3	

*) 固相抽出と分散固相抽出の 2 方法でそれぞれ処理した検体を分析。分散固相抽出後 HPLC にて 254nm のピークデータを取り、LC-MS/MS でのデータ採取後、濃縮し、GC-MS でデータを取り解析する。また、液-液抽出は酢酸エチルを用いて蒸発乾固後、アセトニトリルで再溶解し、HPLC(200nm)でデータ採取する。濃縮後 GC-MS でデータ採取し、ピークを同定。

✓ 「QuEChERS 法」との記載がある場合は別に分類した。

✓ Captiva 類はリン脂質除去とした。

[GC-MS 及び GC-MS/MS 分析における前処理方法(21 方法)6+15]

前処理法	機関数	追加処理	機関数
分散固相抽出法	5	特記無し	5
QuEChERS 法	6	リン脂質除去カラムによる酸性・塩基性薬物同時抽出法	2
		特記無し	4
液-液抽出法	3	特記無し	3
除タンパクのみ	2	特記無し	2
固相抽出	3	特記無し	3
その他	2	上記*)	1
		記載なし	1

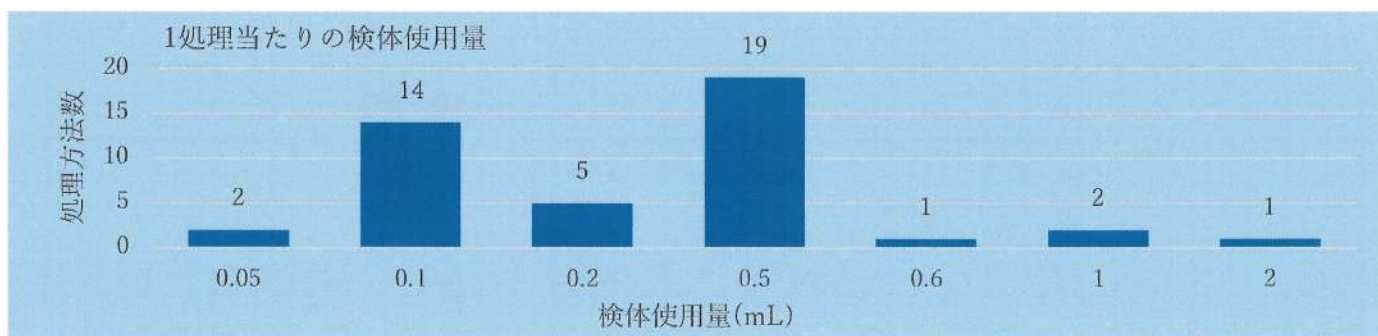
✓ Captiva 類はリン脂質除去とした。

◆ LC 系分析では除タンパク法が、GC 系の分析では QuEChERS 法と分散固相抽出法を前処理法として採用している機関が多かった。

【検体使用量】

- ✓ 1 機関内でも分析機器等により 2 種以上の前処理方法を採用している場合があり、それらは各 1 方法として集計した。
- ✓ 計 43 方法(前処理方法①34 機関、前処理方法②10 機関)として集計した。
- ✓ 前処理方法と分析機器に関係なく 1 処理当たりの検体使用量として集計した。例：1 分析当たり合計 2 mL(0.5 ml×4 回)使用の場合は 0.5 ml で集計。

検体使用量(mL)	前処理方法数
0.05	2
0.1	14
0.2	5
0.5	19
0.6	1
1.0	2
2.0	1



- ◆ 1 処理あたり 0.5mL 用いている場合が最多であった。

【内部標準物質】

内部標準物質	機関数
d5-ジアゼパム	12
d5-ジアゼパム、d5-フェノバルビタール	8
d5-ジアゼパム、d6-ベサフィブラート	1
d5-フェノバルビタール、d5-セコバルビタール	1
d5-エスタゾラム	1
カルビノキサミン	1
ペルフェナジン(GC-MS 固相抽出)、フェナセチン(LC-MS 除タンパク)	1
Custom internal standard	1
用いない	1
記載なし	7

- ✓ 記載のあった 27 機関で集計
- ◆ d5-ジアゼパムは 27 機関中 21 機関(78%)で採用されており、最多であった。

【分析機器】

分析機器	機関数
GC-MS のみ	6
GC-MS・LC-MS/MS 併用	11
GC-MS・LC-MS/MS・LC 併用	1
GC-MS と LC-QTOF 併用	1
GC-MS/MS のみ	1
GC-MS/MS・LC-MS/MS 併用	2
LC-MS/MS のみ	11
LC-QTOF のみ	1

- ◆ 「GC-MS・LC-MS/MS 併用」と「GC-MS/MS・LC-MS/MS 併用」がそれぞれ 11 機関と最多であった。

【併用の理由】

- ◆ 主要な理由は以下であった。
- ① それぞれに長短があり、それを相互に補完するため。
 - ② 複数の分析方法で確認するため。

併用の理由(詳細)
・ 各分析法の向き、不向きの特徴から、結果を統合的に判断するため。 ・ GC と LC でダブルチェック。 ・ 固相分散抽出後 HPLC にて 254nm のピークデータを取り、LC-MS/MS でのデータ採取後、濃縮し、GC-MS でデータを取り解析する。また、液-液抽出は酢酸エチルを用いて蒸発乾固後、アセトニトリルで再溶解し、HPLC(200nm)でデータ採取する。濃縮後 GC-MS でデータ採取し、ピークを同定。 ・ 各分析法で結果報告書を作成。 ・ LC-MS/MS 及び GC-MS(NAGINATA)の 2 種の結果をまとめて報告している。 ・ 情報を補うために使用。 ・ それぞれ個別に報告書を作成している。メインは LC-MS/MS であるが、NAGINATA で検出されるものもあるため、併用している。

【検体使用量と前処理方法、分析機器】

検体使用量(mL)	前処理方法数	前処理方法	内訳	分析機器	内訳
0.05	2	除タンパクのみ	2	LC-MS/MS	1
				LC-QTOF	1
0.1	14	除タンパク	9	LC-MS/MS	7
				LC-QTOF	1
				GC-MS/MS	1
		固相抽出	1	GC-MS	1
		液-液抽出	2	LC-MS/MS	1
				GC-MS	1
		分散固相抽出	2	LC-MS/MS	2
0.2	5	QuEChERS	2	GC-MS/MS	1
				GC-MS	1
		除タンパクのみ	1	LC-MS/MS	1
		液-液抽出	1	GC-MS	1
		固相抽出	1	GC-MS	1
		0.5	18	分散固相抽出	6
GC-MS	4				
QuEChERS	3			LC-MS/MS	3
QuEChERS+ CaptivaNDLipids カラムによる酸性・塩基性薬物同時抽出法	2			GC-MS	2
除タンパク	2			GC-MS	1
				LC-MS/MS	1
固相抽出	1			GC-MS	1
液-液抽出	1			GC-MS	1
その他(記載なし)	3			LC-MS/MS	3
		GC-MS			
0.6	1	QuEChERS	1	GC-MS/MS	1
1.0	3	QuEChERS	1	GC-MS	1
		固相抽出	1	GC-MS	1
		分散固相抽出	1	GC-MS	1
2.0	1	前述*)の方法	1	前述*)の方法	1

- ◆ 検体使用量が少量の場合は LC 系の分析方法である傾向がみられる。
- ◆ 1 分析当たり検体を 0.5mL 使用している分析が最多であったが、0.5mL 使用している 18 分析中、固相分散抽出法が最多の 6 分析で、そのうち分析機器は 2 分析が LC-MS/MS、4 分析が GC-MS であった。

- ◆ 2 番目に多かった検体使用量は 0.1mL であり(14 分析)、そのうち除タンパク法が最多の 9 分析で、分析機器は LC-MS/MS 7 分析、LC-QTOF1 分析、GC-MS1 分析であった。

【コメント】

自機関の分析方法について

- ・ スクリーニングは NAGANATA method を用いた。
- ・ 薬物の精密質量データベースとスペクトルライブラリを用いたスクリーニングを実施。検出されたピークのモノアイソトピック質量及び MS/MS スペクトルで定性(標品は使用していません)。スタンダードレスのスクリーニング方法です。

検出化合物に関する事項

- ・ 途中 N₂ 乾固しない GC 用抽出と乾固する LC 用抽出でレボメプロマジンの半定量値に差が出た(半定量は標準液 1 点から算出)。
- ◆ レボメプロマジンを LC-MS で分析する場合、前処理法にもよるが、濃度が比較的高いためにスペースチャージしている可能性があり、そのためにピーク面積が小さくなり半定量値が低くなっている可能性があると思われる。

4. 薬物定量検査

【参加機関】 21 機関（フェノバルビタール 19 機関、レボメプロマジン 21 機関）

【添加濃度】

添加化合物	調製濃度(μg/mL)	調製機関分析濃度(μg/mL)
フェノバルビタール	40	セミナー当日の報告を参照
レボメプロマジン	0.5	セミナー当日の報告を参照

✓ 今回は中毒域から致死域程度に設定した(下表参照)。

化合物	治療域(μg/mL)	中毒域(μg/mL)	致死域(μg/mL)
フェノバルビタール	10-40	30-40	50-
レボメプロマジン	0.005-0.2	0.4	0.5

薬毒物情報インデックスより

【分析機器】 21 機関

分析機器	機関数
LC-MS/MS	17
GC-MS	1
LC-MS/MS と GC-MS 併用	1
LC-QTOF	1
LC で定量、GC-MS で確認	1

◆ 記載のあった 21 機関中 20 機関(95%)が LC 系を用いていた。

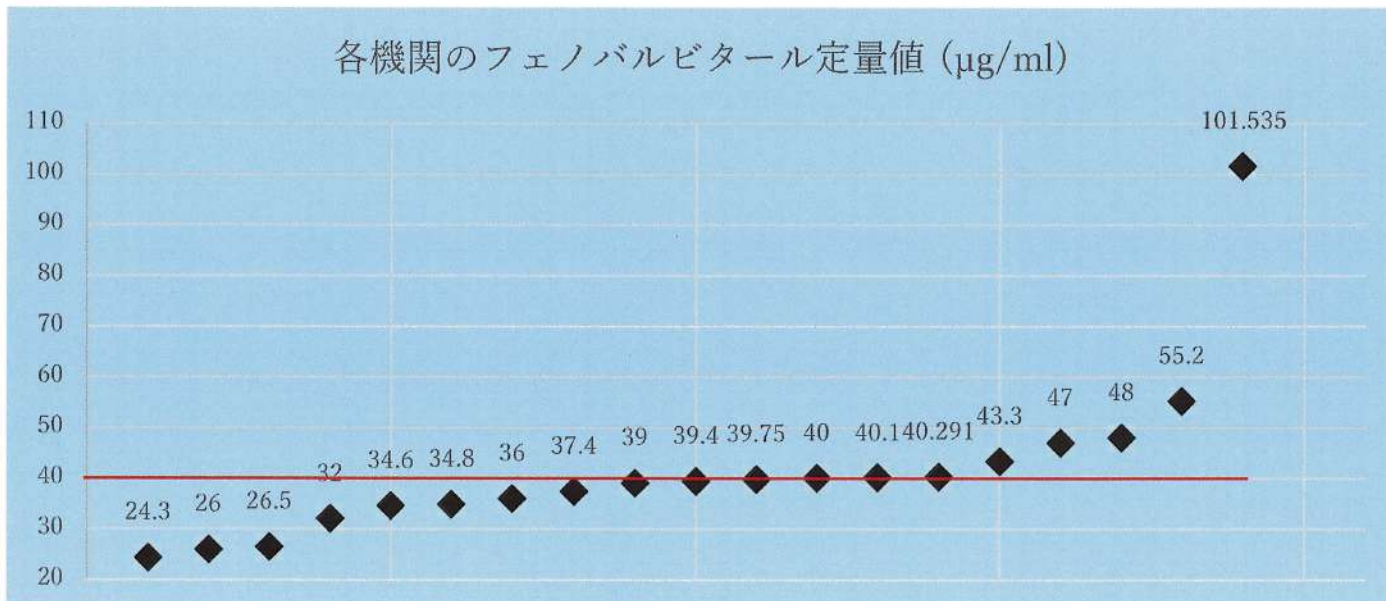
【分析方法】 21 機関

定量分析方法	機関数
内部標準法	15
標準添加法	4
内部標準法と標準添加法	1
記載なし	1

◆ 記載のあった 20 機関中 16 機関(80%)で内部標準法を用いていた。

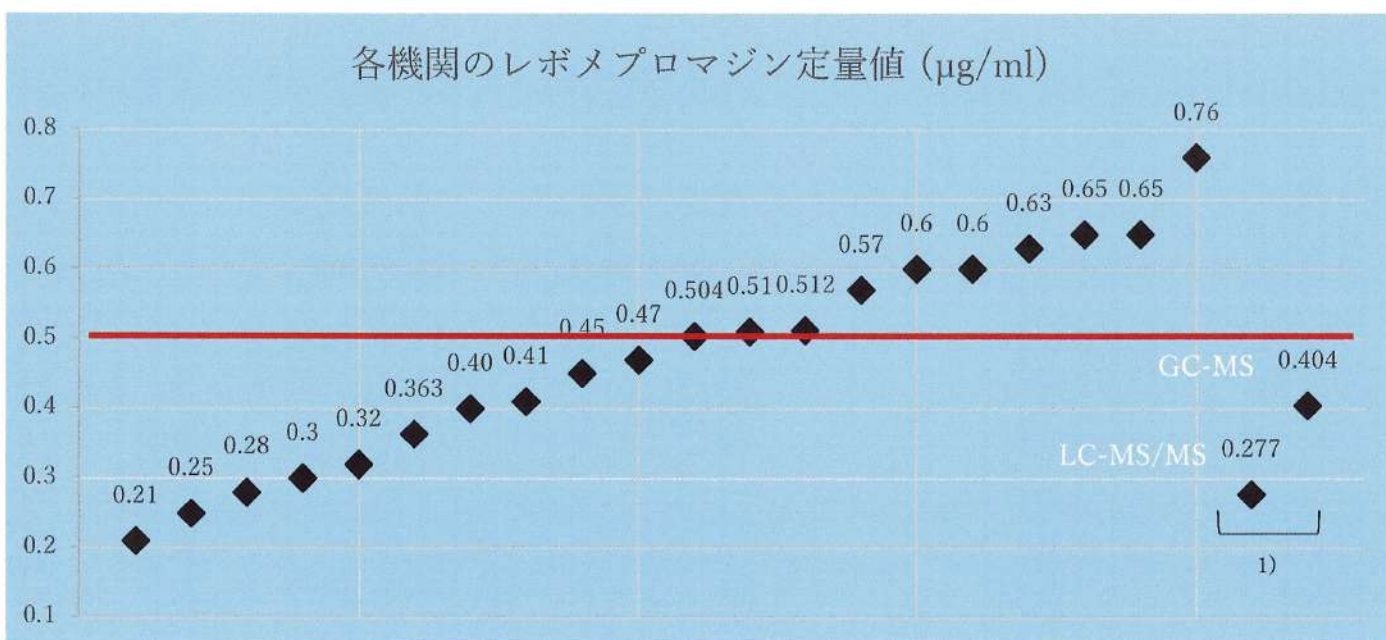
【各機関の定量値】

[フェノバルビタール] 19 機関で定量値を算出。



✓ 調製値±10% (36-44) とすると 19 機関中 9 機関(47%)がその範囲に入った。

[レボメプロマジン] 21 機関で定量値を算出。



- ✓ 1)LC-MS/MS、GC-MS と分析機器が示されているものは 1 機関内でそれぞれの機器で分析した値を示した。
- ✓ 調製値を中心にはほぼ均等にばらついている。
- ✓ レボメプロマジンの定量値バラツキの原因の一つに、人血液とウシ血液の違いによるマトリックスの違いによる影響が考えられる。一方、フェノバルビタールは D 体を使っている機関が多いので、ばらつきが少なかった可能性がある。

【内部標準物質】 21 機関

内部標準物質	機関数	備考
d5-ジアゼパム、d5-フェノバルビタール	8	
d5-ジアゼパム	3	
d5-フェノバルビタール、d3-クロルプロマジン	2	
d5-フェノバルビタール、クロルプロマジン	2	
d5-ジアゼパム、アモバルビタール	1	
d6-ベサフィブラート	1	
フェナセチン	1	LC にて定量
なし	2	1 機関は LC-QTOF
記載なし	1	

◆ 内部標準物質は 1 物質が 5 機関、2 物質が 13 機関であった。

◆ d5-ジアゼパムは 21 機関中 12 機関(57%)で採用されていた。

【前処理方法】 21 機関 (1 機関は GC-MS と LC-MS/MS 併用)

[LC 及び LC-MS/MS、LC-QTOF 分析における前処理方法(20 機関)]

前処理法	機関数	追加処理	内訳	備考
除タンパク法	10	特記無し	9	
		リン脂質除去	1	
QuEChERS 法	3	特記無し	1	
		リン脂質除去	1	
		Micro 法	1	
分散固相抽出法	5	特記無し	5	
液-液抽出法	1	特記無し	1	ギ酸アンモニウム/アセトニトリル
その他	1		1	前記スクリーニング*)時に除タンパク用 アセトニトリルに IS 含有

✓ 「QuEChERS 法」との記載がある場合は、分けて分類した。

✓ Captiva 類はリン脂質除去とした。

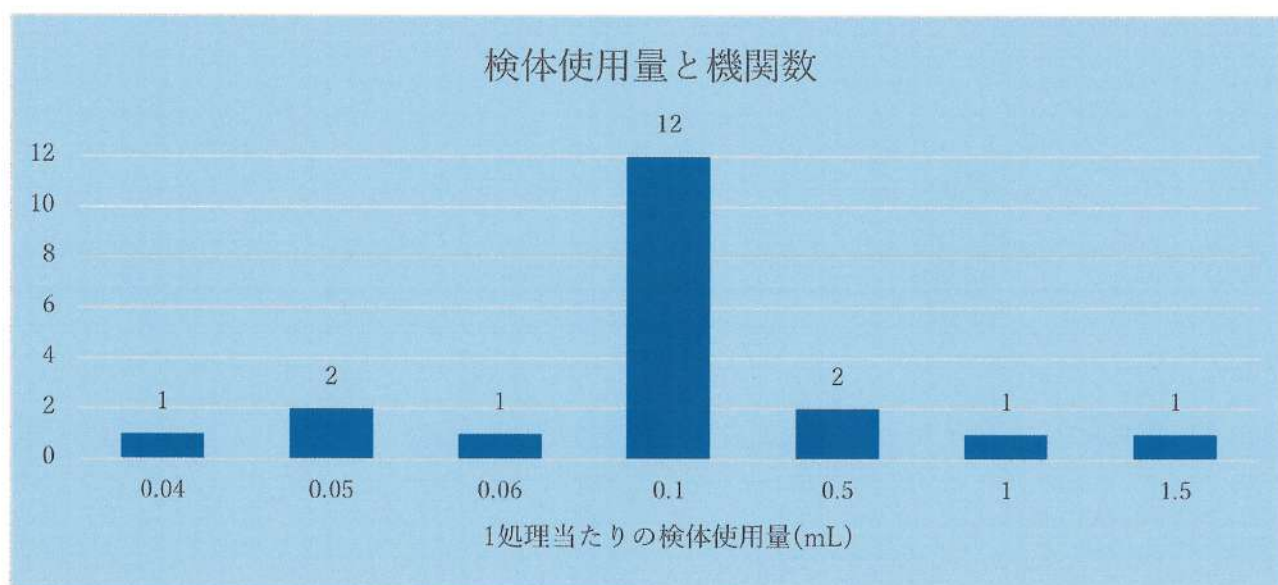
[GC-MS 分析における前処理方法(2 機関)]

前処理法	機関数	追加処理	内訳
QuEChERS 法	2	特記無し	1
		リン脂質除去	1

【検体使用量】 21 機関

検体使用量(mL)	機関数	備考
0.04	1	
0.05	2	1 機関は 0.05×2
0.06	1	
0.1	12	0.1×4 が 2 機関、0.1×2、0.1×5、0.1×10 が 1 機関
0.5	2	
1.0	1	
1.5	1	
記載なし	1	

◆ 1 処理当たり 0.1 mL 使用する機関が最多であったが、複数回分析する機関もあった。



◆ 記載のある 21 機関中、12 機関(57%)は 1 処理当たり 0.1mL の検体を使用していた。

【検体使用量と前処理方法、分析機器】記載のあった 21 機関

検体使用量(mL)	機関数	前処理方法	内訳	分析方法	内訳	分析機器	内訳
0.04	1	除タンパク	1	内部標準法	1	LC-MS/MS	1
0.05	2	分散固相抽出	1	内部標準法	1	LC-MS/MS	1
		除タンパク	1	内部標準法	1	LC-MS/MS	1
0.06	1	分散固相抽出	1	内部標準法	1	LC-MS/MS	1
0.1	12	除タンパク	7	内部標準法	3	LC-MS/MS	3
				標準添加法	3	LC-MS/MS	3
				内部標準法と標準添加法	1	LC-MS/MS	1
		分散固相抽出	2	内部標準法	2	LC-MS/MS	2
		QuEChERS	2	内部標準法	2	LC-MS/MS	2
		液-液抽出	1	標準添加法	1	LC-MS/MS	1
0.5	2	QuEChERS	1	内部標準法	1	LC-MS/MS と GC-MS	1
		分散固相抽出	1	内部標準法	1	LC-MS/MS	1
1.0	1	前記＊)	1	内部標準法	1	LC と LC-MS/MS	1
1.5	1	QuEChERS	1	内部標準法	1	GC-MS	1
記載なし	1	除タンパク	1	記載なし	1	LC-QTOF	1

✓ 2 方法の定量法を記載した機関が 1 機関あり。2 方法目：前処理はケイソウカラム、検体使用量 0.1mL、内部標準法、内部標準物質セコバルピタール、分析機器 GC-MS。

【定量に用いた機種】21 機関中 20 機関（1 機関は記載なし）

- ◆ 20 機関中 18 機関は定性と同様の機種を用いていた。
- ◆ 2 機関は定性とちがう機種を用いており、1 機関は定性は GC-MS、定量は LC-MS/MS を用い、1 機関は定性は GC-MS と LC-QTOF を、定量は LC-MS/MS を用いていた。

【コメント】

自機関の分析方法について

- ・ 定性(GC-MS)でメフオバルビタールが検出されましたが、標準品を持っていなかったため、確認分析、定量は行いませんでした。
- ・ プレガバリンとフェノバルビタールは標品がなかったため定性のみ。レボメプロマジン[®]は標品による絶対検量線^①で実施。但し標品は10年程度保存(-20℃)ひた10ppm溶液なので分解している可能性あり。
- ・ ヒトブラunk血液を用いて内部標準法で分析した。定量分析は2回施行し、平均値を算出した。
- ・ 解析ソフトの簡易定量値(購入時)はフェノバルビタール 84µg/mL、レボメプロマジン 2.1µg/mL でした。(傾きを更新しました。)
- ・ レボメプロマジンについて、検量線は 0.25、0.5、1.0(n=2)で作成した。IS は d5-ジアゼパム。フェノバルビタールについて、検量線は 20、40、50(n=2)で作成した。IS はバルビタール。
- ・ 定量については他の研究で使用していたため、期限内で行えなかったのではありませんでした。レボメプロマジンの標準品も期限内に入手困難でした。
- ・ レボメプロマジン、フェノバルビタールは GC-MS、LC-MS/MS とともに検出。クロナゼパムは LC-MS/MS のみ検出、メホバルビタールは GC-MS のみ検出。メホバルビタールはフェノバルビタールがメチル化したものとおもわれました(どの時点でメチル化されたのかは確認できていません)。*)
- ・ フェノバルビタールの簡易定量値が GC-MS と LC-MS/MS とで 100 倍近い差が出たが、標品を測定することで GC-MS の値を採用。レボメプロマジンは標品を持ち合わせていないので、どちらが真の値に近い判断できなかった(島津の検量線は高く算出されるイメージ)。

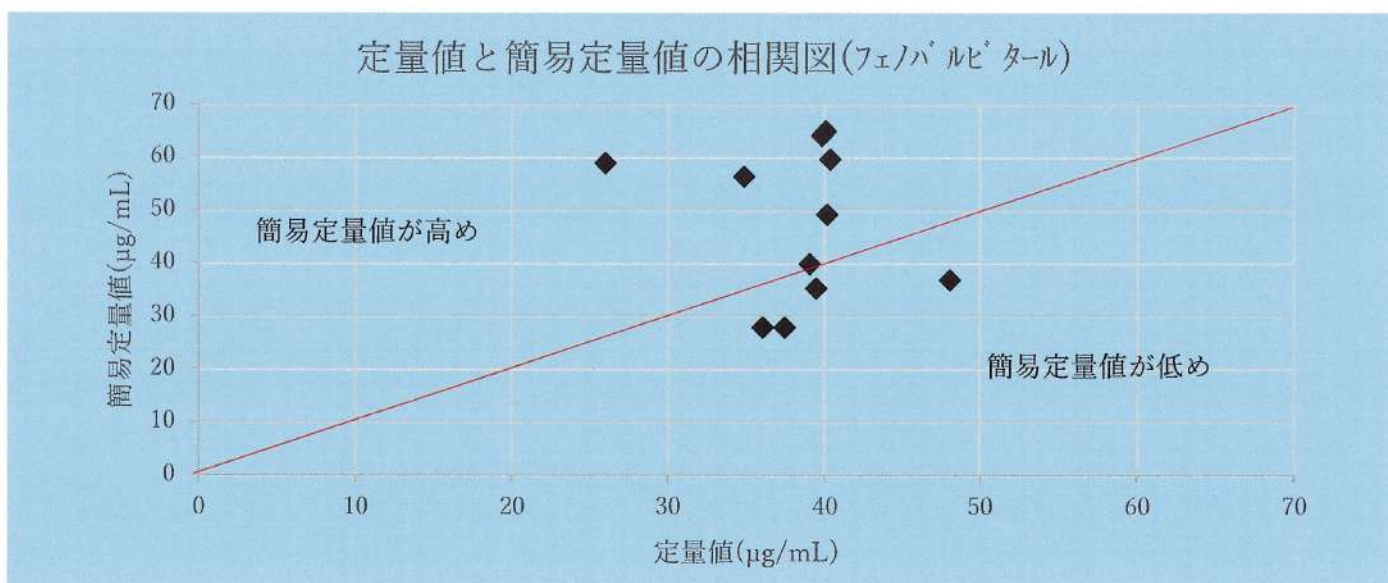
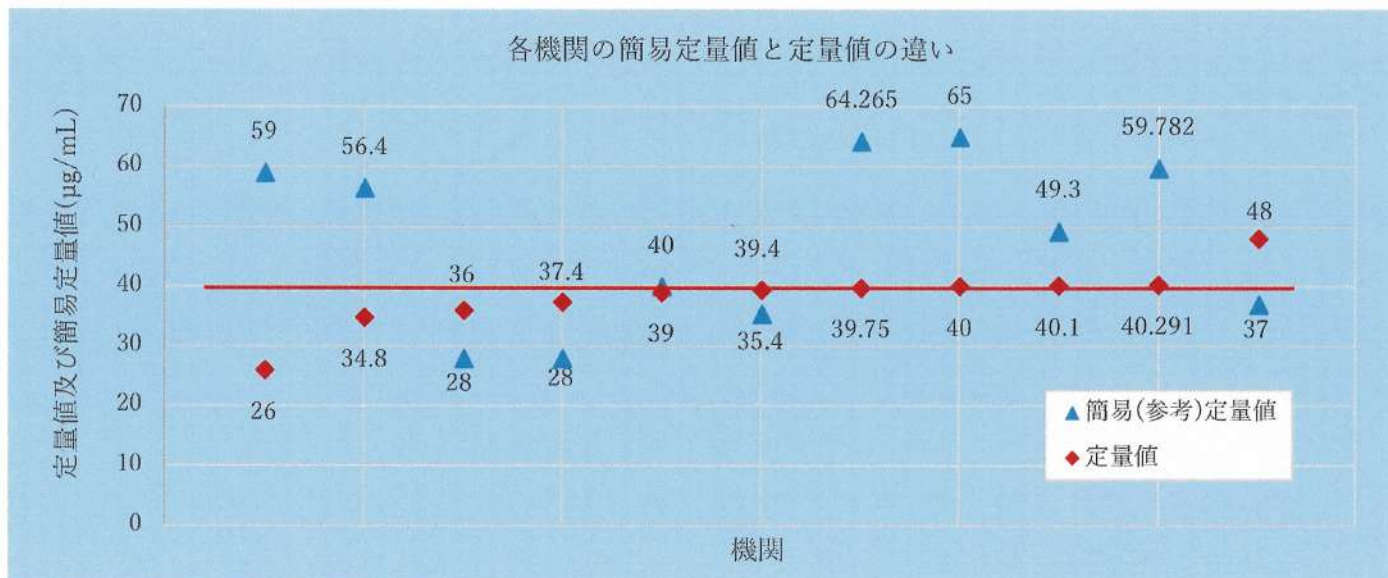
*) GC-MS でフェノバルビタールを分析すると分析条件によっては、注入口でメチル化されてメホバルビタールが検出されることがある。LC-MS で確認すると検出されない。当該機関では GC-MS でも分析しているので、それが原因の可能性もある。

質問	回答
GC-MS で定量する際、レボメプロマジンのマスはどれを選ぶのが良いのでしょうか。レボメプロマジンの定量で、内標はどのようなものを使うと良いのでしょうか。D 体以外での内標の選び方も知りたいです。	- レボメプロマジンのマスの選択は m/z58,328 のどちらかが適切だと思われます。328 は小さいので定量は 58 を使うのはいかがでしょうか。 - 検体に含有されている恐れが無い場合は、手持ちの標準品で構造が似ていて保持時間が近い物質を使用するという方法もあります。
皆さんの普段使っている抽出法やスキンの手法 (GC,LC,その他の機器で) など、多数派から少数派までどんなものがあるか知りたいです。	報告書を参照してください。
分析対象物に近い D 体を選択するようにしていますが、使用した D 体により定量値が異なるケースに遭遇した場合、どのように判断するのが望ましいですか。	- 可能であれば「そのものの D 体」がベストです。 - ない場合をどうするかは意見が分かれると思います。
レボメプロマジンスルホキシドは標品の不純物、または試料作製後の酸化生成物と考えています。	セミナー当日に参加者からご意見を伺います。

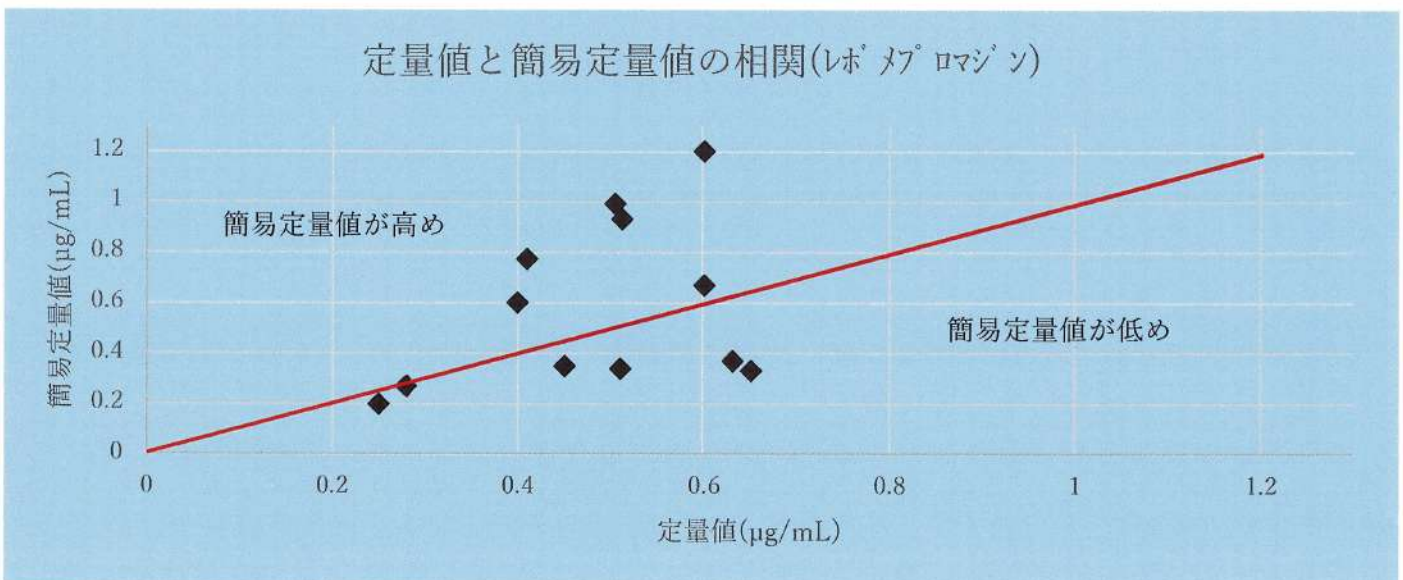
【簡易定量値と本定量値の違い】

- ✓ 定量値の記載のある機関で簡易定量値も記載があった機関について、その両者の値の違いを示した。

[フェノバルビタール 11 機関]



[レボメプロマジン 12 機関]



【分析機器】

✓ 記入のあった各機関の分析機器一覧

LC-MS/MS
Agilent
Agilent
Agilent 1290 UHPLC/6460 TQ
Agilent 6420 Triple Quad LC/MS
Agilent 6420 Triple Quad LC/MS
SCIEX 3200 QTRAP
SCIEX 3200 QTRAP
SCIEX 4000 QTRAP
SCIEX 4000 QTRAP
SCIEX 4500 QTRAP
SCIEX 4500 QTRAP
SCIEX 4500 QTRAP
SCIEX 5500 QTRAP
SCIEX 5500 QTRAP
島津 LCMS TM -8030
島津 LCMS TM -8040
島津 LCMS TM -8040
島津 LCMS TM -8040
島津 LCMS TM -8040
島津 LCMS TM -8040
島津 LCMS TM -8040
島津 LCMS TM -8045
島津 LCMS TM -8050
島津 LCMS TM -8050

LC-QTOF
Waters AcquityUPLC/XevoG2-XS QTof

LC
島津 LC-20
島津 Nexera-i

GC-MS
Agilent
Agilent 5975C GC/MSD
Agilent 5977A GC/MSD
Agilent 6850 GC/5975C GC/MSD
Agilent 6850 GC/5975C GC/MSD
Agilent 7890A GC/5975C GC/MSD
Agilent 7890A GC/5975C GC/MSD
Agilent 7890 GC/5977 GC/MSD
Agilent 7890B GC System
Agilent 7890B GC/5977A GC/MSD
Agilent 7894A GC/5975C GC/MSD
Agilent 7894A GC/5975C GC/MSD
Agilent 9870B GC/5977A GC/MSD
島津 GCMS-QP2010SE
島津 GCMS-QP2010Ultra
島津 GCMS-QP2010Ultra
島津 GCMS-QP2010Ultra
島津 GCMS-QP2020NX

GC-MS/MS
島津 GCMS-TQ8040
島津 GCMS-TQ8040
島津 GCMS-TQ8040NX

5. その他(ご意見・ご要望など)

ご意見・ご要望	回答
・ 今回、検体量を増やしていただき、ありがとうございました。 ・ 血液量が5mLと十分量送って頂いたので、安心して分析できました。	・ 今後も十分な検査ができるように配慮いたします。具体的なご意見をいただけましたらと思います。
・ 記入の仕方がよく分からなかったです。間違っていたら申し訳ございません。	・ 回答用紙の改善を行います。
・ 検体が届いた時、チューブのフタ側に凍結していました。回答用紙封筒は長形6号にしてほしいです。A4用紙3つ折りで長形3号に入ります。	・ 貴機関の結果からは解凍の影響は許容範囲内と思われます。 ・ 回答用紙封筒を長形6号とすることを検討いたします。

質問	回答
・ ほぼ毎回の定量で内部標準を d5-ジアゼパム、d5-フェノバルビタールを使用していますが、他大学では測定するものによって変えているのでしょうか。	・ 厳密には分析対象物質の重水素置換体を用いることが推奨されますが、現実的には難しいため、各機関で入手が容易、比較的安価など条件を考慮して1-2物質を固定して使用しているのが現状だと思われます。
・ 今回のブラインドテストとは直接関係ないのですが、1つ質問させてください。法医領域では検査試料としては全血を用いることが多いと聞きますが、死体血は粘稠なことも多くハンドリングに困ることが多々あります。このため、全血を遠心分離して得られる上清を用いて薬物分析を行うことは問題ないものなのでしょうか。	・ 用いても問題ないと思います。ただし、以下のことは知っておくべきだと思われます。新鮮な血液であれば全血と血清または血漿の分離は比較的容易であり、区別して分析することは可能です。成書には薬物濃度の全血/血漿比などの換算比率が記載されているものがあり、それを参考に全血中濃度や血漿中濃度を換算することも可能です。死体血では遠心した上清が何に当たるのか、死後経過時間や死後凝血の多少、腐敗の状態も関係し非常に難しいです。解剖時に採取された血液に多量の豚脂様凝血や軟凝血の形成があった場合は上清は溶血したヘモグロビンを含んだ「血清のようなもの」、流動性血液であった場合には上清はヘモグロビンを含んだ「血漿のようなもの」と考えられます。しかし、凝血が少量の場合や死後経過が長く凝血があったか否か不明の場合もあり、その場合は一概には決めら

	れません。検体採取時の凝血形成の程度や全血または上清を用いたか等血液の状態を記録しておくことが重要だと考えられます。
・ LC-MS/MS の解析ソフトでの簡易定量値では、フェノバルビタール 84ug/mL、レボメプロマジン 2.1ug/mL でした。標品がありましたので、ブタ血に薬物を添加した試料（4-5 点）を使って検量線を作成し定量したところ、フェノバルビタール 35ug/mL、レボメプロマジン 0.47ug/mL となり、これで報告しました。解析ソフトで簡易定量値が出るのは「おおよそ」を知る意味ではありがたいのですが、自作の検量線で算出した値と大きく違う場合、これで大丈夫だろうかと不安に感じます。これまでも、簡易定量値で問題になった薬物については、検量線を作成して傾き等の更新をしています。今回のように定量値が大きくズレていない事を確認する手段があると心強いなと思います。	・ LC-MS/MS 分析時にいくつかの標品のミクスチャーを測定し、大きくずれていないか確認するという方法もあります。
・ エタノールの検量線は当講座では分析の度に作成する事はせず、試薬等を再調整で変更になった折にのみ更新しています。今回の当講座の結果から、誤差の大きさが気になりましたので、改善策を考える予定です。ほかの講座がどのような方法で分析（検量線の更新、標品の購入等）しているか、などは知りたいです。	・ エタノールの場合は検量線作成で利用したある 1 濃度を再度分析し、定量値が大きく変わらなければ、毎回検量線を作成する必要はないと考えます。 ・ 一般に検量線は機器の状態や調整した標品に劣化がない限り、変わらないはずですが、少しの環境変化が影響する高性能な機器を用いる場合、溶媒中で分解・揮発が進む標品の場合は、面倒でも分析毎に感度の確認や標品の再調整をする必要があります。標準品自体が劣化しやすいものでは、劣化に気が付かないと誤った濃度を算出する結果となります。各化合物の特徴を知っておくことが大切です。
・ 報告定量値が調製値に近かった機関の分析方法や検体使用量を知りたいです。	・ いくつかご紹介いたします。
・ 参加機関の結果等情報を一覧で見ることが可能でしょうか。	・ ブラインドテスト参加者の賛同が得られればよろしいと思います。

ご協力頂きましてありがとうございました。

皆様のご意見を伺いつつ、より良い制度へ発展できますように検討を重ねていきたいと思っています。忌憚のないご意見、ご感想を頂けましたらと思います。

6. 参考資料

【対象 2 物質とも定量値が調製値に近かった機関の分析方法】

- ✓ 対象 2 物質の定量値がフェノバルビタール 39-41 µg/mL、レボメプロマジン 0.45-0.54 µg/mL の範囲であった機関は以下の 3 機関であった。

	分析機関		
	A	B*)	C
分析物質	フェノバルビタール	40.1	40.291
値	レボメプロマジン (エタノール)	0.51 (2.6)	0.504 (2.7)
検体使用量	0.1	0.1	0.1×4
前処理法	Micro QuEChERS	分散固相抽出	除タンパクのみ
定量方法	内部標準法	内部標準法	内部標準法と標準添加法
分析機器	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
内部標準物質	クロルプロマジン d5-フェノバルビタール	d5-ジアゼパム バルビタール	d5-ジアゼパム d5-フェノバルビタール

* 機関 B のコメント：ヒトブランク血液を用いて内部標準法で分析した。定量分析は 2 回施行し、平均値を算出した。レボメプロマジンについて、検量線は 0.25、0.5、1.0(n=2)で作成した。IS は d5-ジアゼパム。フェノバルビタールについて、検量線は 20、40、50(n=2)で作成した。IS はバルビタール。

【定量値の解釈について】

◆ 調製値±何%以内が妥当な分析結果か？

⇒目的により異なる。

(前提)調製が正しくなされ、分析時まで劣化がないとする。

① 調製時の精度はどうか。

例：0.1 µg/mL で調整、0.100 µg/mL で調整で異なる

② 自機関の分析の精度（分析手技や分析機器）はどうか。

⇒再現性のある桁はどこか。

③ 薬物血中濃度から症状を推測する場合

⇒例えばエタノールは成書では少数点以下 1 桁目までしか掲載されていない。それより細かい数値の違いによる症状の違いは明らかにされていない。薬物ごとに同様に調べる。

◆ 各機関が提出した値には様々な要素が影響している。（考慮すべき事項）

①調整時の不均一性の可能性(調製方法の検証)

②搬送時の変化の可能性(事前の検証)

⇒第2回目も、結果を見る限り問題なさそうである。

③機関受け取り後の保管による影響の可能性(各機関自身で検証)

④各機関で調製した標準溶液の影響(各機関自身で検証)

⑤分析方法の影響 (各機関自身で検証)

フェノバルビタールの分析 -LC-MS/MSによる定量分析の手技について-

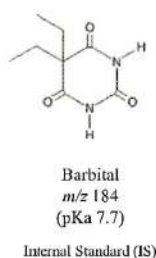
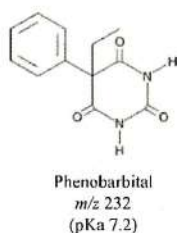
浜松医科大学法医学講座
長谷川 弘太郎

第10回法医中毒研究会セミナー

概要

- LCの移動相条件とクロマトグラムへの影響
- 定量分析での代替マトリックス(ヒト全血)使用の評価
- Surrogate analyte approach (SAA) methodについて

測定対象と内部標準物質



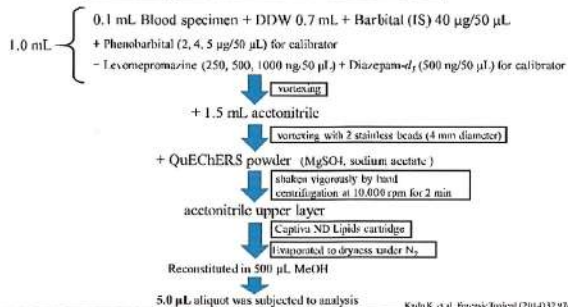
GC-MSスクリーニング結果(簡易定量値)

Phenobarbital 49.3 $\mu\text{g/mL}$ ($n = 2$ 平均)

- GC-MS instruments;
Agilent 6850 GC system + 5975 MSD
- 内部標準物質;
Diazepam- d_5
- 抽出・分析メソッド;
QuEChERS法 + NAGINATAスクリーニング

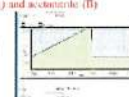
Kudo K, et al. Forensic Toxicol (2014) 32:97–104, DOI 10.1007/s11419-013-0215-4

Extraction procedure for LC-MS/MS analysis

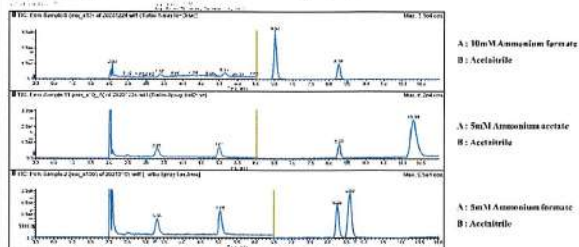


LC-MS/MS conditions

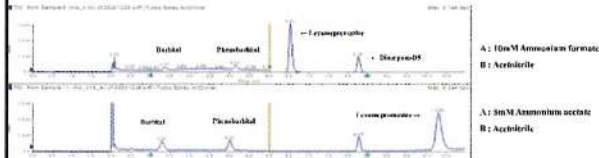
- LC-MS/MS instruments
Sciex Exion LC system connected to a 6500+ Triple Quad LC/MS tandem MS
- LC condition
 - Column: *TSX gel ODS-1000* column (2.0 $\times$ 150 mm i.d., particle size 3.0 μm , *TSX*)
 - flow rate: 0.2 mL/min
 - elution mode: gradient with 5 mM ammonium formate/0.1% formic acid in distilled water (A) and acetonitrile (B)
 - 70% A/30% B → 100% B during 9 min → run 1 min with 100% B
- Total analysis time: 17 min (elution 10 min – post-run 7 min with 70% A/30% B)
- Injection volume: 5.0 μL
- Column Temp: 40°C
- MS/MS condition
 - interface: ESI mode, polarity: *negative ion mode* (switching from negative to positive at 6.5 min)
 - Ion source temp: 600°C; ion spray voltage: -4500 V
 - Quantitation: selected reaction monitoring (SRM)
 - m/z 230.8 → 42.0, 230.8 → 185.0 for Phenobarbital (quantifier and qualifier transitions, respectively)
 - m/z 182.8 → 42.1, 182.8 → 139.7 for Barbitol (IS) (quantifier and qualifier transitions, respectively)
 - Collision energies: -56 and -14 V for quantifier and qualifier transitions of Phenobarbital
 - 46 and -16 V for quantifier and qualifier transitions of Barbitol (IS)



LCの移動相条件とクロマトグラムの変化

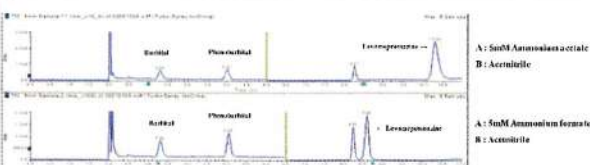


10 mM Ammonium formate → 5 mM Ammonium acetate (pH ↑)



- BarbitolとPhenobarbitalのピーク強度が改善した
- しかし、Levomepromazineピークがブロードに、かつRTが伸びた(> 10 min)

5 mM Ammonium acetate → 5 mM Ammonium formate (pH ↓)



- Levomepromazineピークがsharpになり、かつRTが短縮された
→
5 mM Ammonium formate をLCの移動相として使用することにした

LC移動相に関する所感・考察

移動相のpH↑により、フェノバルのピーク形状が改善(sharpかつ、S/N比が向上)した。
→
フェノバルとバルビタールはいずれも酸性物質であり、pH↑によりイオン化が促進された。
移動相のpH↑により、レボメプロマジン(塩基性)のピークがブロードに、かつRTが延長してしまった。
→
レボメプロマジン(塩基性)との同時分析には、さらなる移動相の調整が必要となった。

LCでの塩基性物質と酸性物質の同時分離には工夫が必要

定量分析での代替マトリックス使用と影響

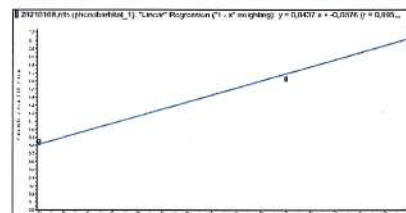
ヒト・ブタ 血液成分比較表

	各動物の血中タンパク質濃度 (g/dL)			
	血漿タンパク	アルブミン	グロブリン	フィブリノーゲン
ヒト	7.37	4.50	2.50	0.37
ブタ	6.30	2.03	3.27	-
参考:				
ウシ	8.32	3.63	3.97	0.72
ウマ	6.84	3.25	3.25	0.34

参考文献:「血液」 農林スライドより一部改訂。
<https://www.kyokyo-u.ac.jp/faculty/akagawa/akagawa.pdf>

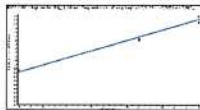
残余検体であるヒト全血を用いて検量線を作成

残余検体であるヒト全血を用いて検量線を作成



フェノバルビタール20.0, 40.0, 50.0 µg/mLの系列とした
※正確な定量を目指し、検量線範囲の上限を定量目的濃度の2倍程度までとした。
直線性や重み付け(分散 or 偏差が比例?)の議論もシンプルになる(はず)。

検量線 (20.0, 40.0, 50.0 µg/mL, each n = 2)



Matrix; **human whole blood**
Calibration range; 20.0 – 50.0 µg/mL
y axis; area ratio (phenobarbital to IS)
Linearity; $r > 0.995$ (weight; 1/x)

定量結果:
Phenobarbital 40.1 µg/mL (n = 2 平均)

定量結果と考察

Phenobarbital 40.1 µg/mL (参考; GC-MSスクリーニング結果 49.3 µg/mL)

→
検量線はヒト全血を用いて作成し、良好な定量結果が得られた。
ヒトマウスで血液成分が類似していることによると考えられた。

→
ブタ・ヒト血液試料の使用により、Matrix matched calibration method (MMCM) となった。
→
厳密な定量分析のためには、標準添加法による定量が望ましい。

Surrogate analyte approach (SAA) methodについて

目的物質の安定同位体標識薬(stable isotope labeled reagent)を用いて、検量線を作成する。

内部標準 (IS) は別の安定同位体標識薬(C^{13} 体など)、あるいはアナログ物質を用いる。

生化学分野で、Endogenous compoundsを分析するために提案された方法である。

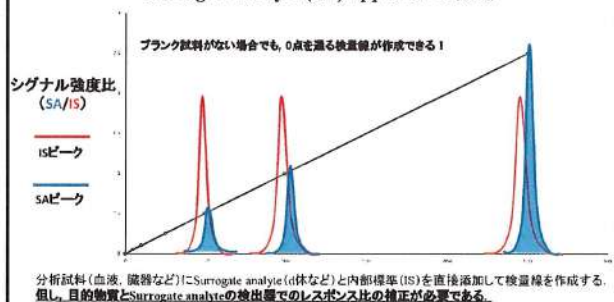
Li W, Cohen LH (2003) Quantitation of endogenous analytes in biofluid without a true blank matrix. *Anal Chem*, 75(21):5854-9, doi:10.1021/ac034505u.

Jones HR, Schultz G A, Feketeich J A, Ackermann HJ. (2012) Surrogate matrix and surrogate analyte approaches for definitive quantitation of endogenous biomolecules. *Bioanalysis* 4(19):2343-56, doi:10.4155/bia.12.200.

法医学分野への応用はまだ少ない。

Huckbols L, Karlsen M, Ramsey J, Miazec H (2017) Single injection quantification of cocaine using multiple isotopically labeled internal standards. *Forensic Toxicol* 35:153-161, doi.org/10.1007/s11419-016-0328-7

Surrogate analyte (SA) approachの概略



イオン化効率やisotope effectの補正と濃度計算

response factor (RF) $RF = \text{Area}_{\text{surrogate analyte}} / \text{Area}_{\text{analyte}}$ ※ neat solution で測定する

Calibration equation; $y = ax - b$

$(\text{Area}_{\text{surrogate analyte}} / \text{Area}_{\text{IS}}) = a * \text{Conc}_{\text{surrogate analyte}} + b$

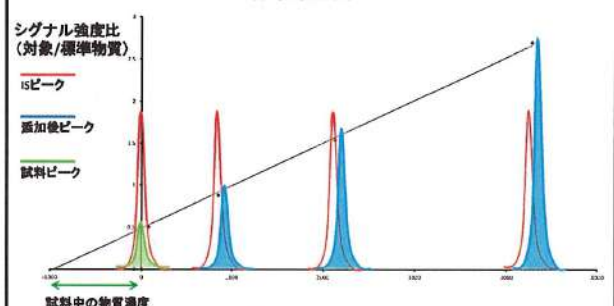
$\text{Conc}_{\text{surrogate analyte}} = \{(\text{Area}_{\text{surrogate analyte}} / \text{Area}_{\text{IS}}) - b\} / a$

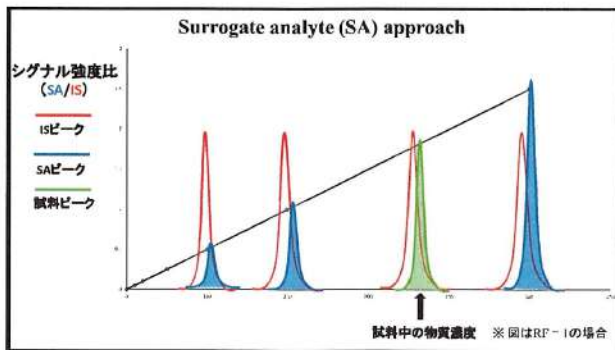
上記RFを用いて

$\text{Conc}_{\text{analyte}} = \{(\text{Area}_{\text{analyte}} / \text{Area}_{\text{IS}}) * RF - b\} / a$

Li W, Cohen LH (2003) *Anal Chem*, 75(21):5854-9.

標準添加法





・法医学領域でのSAA法の利点

- ・検量線の作成にあたり、ブランク試料が必要ない
- ・共存成分の影響を除くことができる(標準添加法と同じ利点)
- ・内部標準法のバリデーション評価の手法がそのまま使える
- ・同一試料で目的物質濃度が異なる場合でも、検量線の範囲内なら測定可能である

但し...

- ・安定同位体は一般的に高価である
- ・目的物質の安定同位体標識薬が必ずしも入手できるとは限らない

ご清聴ありがとうございました。

状況に応じた定量分析 ーレボメプロマジンー

東京大学大学院医学系研究科法医学教室

坂 幹樹



概要

- Levomepromazine (LEV) の光分解について
- 内部標準物質 (IS) の選択法
 - ー Stable Isotope Labeled (SIL)-ISがない場合
- 正確かつ迅速な定量分析

Levomepromazineの光分解について

フェノチアジン系薬物の光分解

1. 光によって徐々に着色する。
(ヒルナミン筋注、インタビューフォーム)
2. Levomepromazine as well as other phenothiazines are very liable to oxidation reaction. The process occurs under the influence of chemical agents as well as under UV-vis radiation. (Spectrochim Acta A 2008; 71: 1562-1564)
3. Photolysis of some chlorine-containing drugs and photodegradation of phenothiazines are well-known phenomena. (J Pharm Biomed Anal 1993; 11: 451-457)

Table 3
Relative peak areas (%) of various neuroleptics in 0.1 N HCl after 1 h exposure to indirect sunlight compared with those at time 0 h

Phenothiazines	
Chlorpromazine	70
Fluphenazine	3
Levomepromazine	51
Perphenazine	79
Prochlorperazine	45
Prochlorperazine	59
Thioridazine	52
Trifluoperazine	62
Thiopropazine	49
Thioriperazine	20
Troloperazine	71
Trifluoperazine	58
Thioxanthenes	
Chlorpromazine	57
Fluphenazine	98
Zuclopentixol	98
Other drugs	
Cocaine	100
Fluparazine	100
Haloperidol	99

The results are the means of two experiments.

J Pharm Biomed Anal. 1993; 11: 451-457

Levomepromazineの光分解について

標準溶液の不安定さ (1)

LEV定量時に経験したこと

- LEV添加血 (calibrator) → LEVのレスポンスがばらつく
- LEVを含む採血 → LEVの再現性が良い

当時, calibrator作成時には, LEVメタノール溶液を試験管に滴下採取し, 空素気流でメタノールを留去してから血液を混和するというステップを採っていたが, 血液を試験管に採取後, LEV水溶液を血液に混和するという方法に変えてから LEVのレスポンスが安定した。

余計なことをせず, LEV標品をすぐに血液と混ぜれば安定のようである。

Levomepromazineの光分解について

標準溶液の不安定さ (2)

実験

- Group A: LEVメタノール溶液を窒素気流にて溶媒留去後, 再溶解
- Group B: Aと同濃度のLEVメタノール溶液をすぐに測定

No.	Group A	Group B
1	942816	790938
2	943136	786235
3	601677	638693
4	616511	752633
5	628188	753355
平均値	589466	744371

- この結果より, 標準品単独で何らかの作業をしていると光分解する可能性がある。
- フェノチアジン系薬物に対しては, stock solutionはメタノールに溶解し-20°C保存, working solutionは用事調整, 水溶液として褐色瓶で作成し, 使用期間中は+4°C保存している。

概要

- Levomepromazine (LEV) の光分解について
- 内部標準物質 (IS) の選択法
 - ー Stable Isotope Labeled (SIL)-ISがない場合
- 正確かつ迅速な定量分析

ISの選択法 (3)

	SimCoeff	NHD	LogP	LogD (pH 3.3)
Levomepromazine	1	0	4.92	1.82
Chlorpromazine	0.9636	0	5.42	2.26
Promazine	0.9587	0	4.65	1.55
Thioridazine	0.8939	0	6.08	3
Properidazine	0.8934	1	3.74	0.64
Diazepam	0.8199	0	2.92	2.57

*SimCoeff: Similarity Coefficient (類似度)

✓ 選択されたISが試料中に存在しないことを必ず確認する。

12

無料の構造式検索ツール

- 富士フイルム和光純薬 (株)
<https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/search/structure.html>
- 東京化成工業 (株)
<https://www.tcichemicals.com/JP/ja/structure-search>
- SciFinder®
構造式を書いて (またはimport) search→Similarityをクリック
(pKa, 沸点, 比重も計算してくれる)

13

概要

- Levomepromazine (LEV) の光分解について
- 内部標準物質 (IS) の選択法
 - Stable Isotope Labeled (SIL)-ISがない場合
- 正確かつ迅速な定量分析

14

スクリーニングから定量へのメソッド移行

スクリーニングでは多数の薬物を対象にしているため、メソッドに多くの制約があるが、定量ではこれらの条件をより有利に設定する。

メソッド変更の一例 (島津LC-MS/MS 8030)

	スクリーニング	定量
Total Run Time	15 min	10 min
移動相流速	0.3 mL/min	0.4 mL/min
Dwell Time	1 msec	100 msec前後 (母物質に対する共洗脱により変動、 データポイントが15以上/1ピークとなるように設定)

15

日本と海外における状況の違い

- 海外では分析センターなどに試料を集約し、validationされた濃度範囲の広い検量線を準備することにより、能率的な定量分析が行われている。
- 日本の法医学ではどうでしょうか？
例えば、LEVの定量は年に何度依頼されるでしょうか？
半年に1度程度もしくはそれ以下であれば、その検量線は1度しか使用しないのではないのでしょうか？
- このような日本の現状に基づいて、下記ガイドラインにある記載は必ず順守すべきなのか検討する。
 - The chosen IS must never be a therapeutic drug.
 - Calibrator concentrations must cover the whole calibration range. Most guidelines require a minimum of five to eight concentration levels.
 (Forensic Sci Int 2007, 165: 216-224)

16

1) The chosen IS must never be a therapeutic drug.

前提条件

- 半年に1度程度しか定量依頼のない薬物のため、検量線はその都度作成する。
- d値が劣っていない、もしくは高い、納期が遅いなどの理由で使えない。



この状況の場合、治療薬を依頼して良いと思われず。

理由

- ✓ その定例に、IS候補の消滅量が入っていないことはスクリーニング結果で既にわかっている。
- ✓ LEV定量の例では、ISとしてdiazepam-d₅よりchlorpromazineの方が定量性が良いのは明らか。

*注意: 論文や国際学会では、治療薬をISにするのは避けて下さい。

17

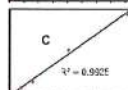
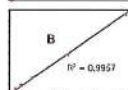
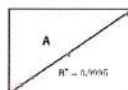
2) Calibrator concentrations must cover the whole calibration range. Most guidelines require a minimum of five to eight concentration levels.

前提条件

- 半年に1度程度しか定量依頼のない薬物のため、検量線はその都度作成する。
- つまり、定量する濃度は1点もしくはその近辺の点しかない。(大臍血と心臍血を測定する場合など)
- 定量に多くの時間を割けない。

10

検量線範囲の検討



濃度 (ng/mL)	検出値 (ng/mL)	誤差 (%)
0.009	0.05	14.3
0.05	0.1	10.0
0.25	0.25	114.3
0.554	0.5	110.8
1.029	1	102.9
2.456	2.5	98.6
5.005	5	100.1

濃度 (ng/mL)	検出値 (ng/mL)	誤差 (%)
0.04	0.05	80.9
0.181	0.1	80.8
0.311	0.25	124.2
0.573	0.5	114.5
1.137	1	103.7
2.44	2.5	97.6
4.919	5	98.4

結果・考察

- 最小 本法の原理から濃度側に遠き方が誤差のため、広範囲の検量線は、R²が低くても、低濃度のaccuracyが悪い。
- 低濃度の定量では、高濃度の検量線は悪いほうが良い。
- 高濃度側しか定量しない場合でも、低濃度の検量線の存在はあまり意味を持たない。
- 測定濃度が1点もしくはその近辺の点しかない場合、検量線の範囲は狭くてよい。
- 定量値が検量線の中央付近に来るように、検量点を調整するとよい。

11

Method Validation参考文献

論文や国際学会では、下記のようなガイドラインを順守することをお勧めします。

- ✓Validation of new methods. Forensic Sci Int 2007; 165: 216-224
- ✓Bioanalytical Method Validation, Guidance for Industry. Food and Drug Administration 2018

12

まとめ

- フェノチアジン系薬物は光に不安定なので、抽出時に配慮する必要がある。特に、working solutionが光にあたる時間は短くすべきである。
- ISはd体（定量対象薬物の同位体）がファーストチョイスであるが、それが無い場合でも可能な限り物理化学的性質の近い物質を選択すべきである。Similarity searchはISを選択する際の有用な手段の1つである。
- 正確な定量値を限られた時間で得るためには、分析者はその置かれた状況に応じて最善の方法を検討すべきである。

13