

第 11 回法医中毒研究会セミナー

ブラインドテスト

(3) ゾルピデムとバルプロ酸

令和 4 年 3 月 15 日 (火曜日)
午後 1 時から午後 3 時半頃



世話人 矢島 大介
国際医療福祉大学医学部法医学教室

第 11 回法医中毒研究会セミナー

ブラインドテスト： (3) ゾルピデムとバルプロ酸

目 次

第 11 回法医中毒研究会セミナー開催にあたって	2
第 11 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)	
バルプロ酸の分析の分析	30
奈女良 昭 (広島大学)	
バリデーション Excel テンプレートの紹介	33
Brian Waters (福岡大学)	

令和4年3月15日

法医中毒研究会会長 久保 真一

第11回法医中毒研究会セミナー開催にあたって

第11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、また、Zoomセミナーの方が参加しやすいとの意見も多かったことから、昨年に引き続き、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3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：(3) ゾルピデムとバルプロ酸」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とともに、精度管理の観点から、バリデーションに有効なExcelテンプレートの紹介する予定です。

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 11 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 : (3) ゾルピデムとバルプロ酸

日 時 : 令和 4 年 3 月 15 日 (火) 13:00~15:30 頃 (Zoom 開催)

開会の挨拶	13:00-13:05
会長 久保 真一 (福岡大学)	
セミナー前半	座長 : 前橋 恭子 (東京慈恵会医科大学)
第 3 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	13:05-13:20
Brian Waters (福岡大学)	
ブラインドテスト結果報告	13:20-13:35
矢島 大介 (国際医療福祉大学)	
質問やご意見(質疑応答含む)	13:35-14:05
休 憩	14:05-14:20
セミナー後半	座長 : 長谷川 弘太郎 (浜松医科大学)
ブラインドテスト対象薬物の分析について	
バルプロ酸の分析	14:20-14:35
奈女良 昭 (広島大学)	
質疑応答	14:35-14:45
バリデーション Excel テンプレートの紹介	14:45-15:00
Brian Waters (福岡大学)	
質疑応答	15:00-15:10
質疑応答及び総括	15:10-15:25
矢島 大介 (国際医療福祉大学)	
閉会の挨拶	15:25-15:30
会長 久保 真一 (福岡大学)	

Department of Forensic Medicine, Fukuoka University

第3回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

ダブルブラインドテストとは？

- ダブル・ブラインド・テストでは、テストを実施している人も結果を知らされていません。
- この場合、テストの結果（正確であるかどうかにかかわらず）は、ラボ自体にのみ知られています。
- これは、結果が正しくない場合にラボが恥ずかしさや愚弄を心配する必要がないようにするために行われます。

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

材料と価格

支出科目	規格(容量・単位)	金額(消費税込)
全血(ウシ)	500 mL	6,710
Zolpidem	5 mg	43,362
バルプロ酸	5 g	3,553
エタノール	500 mL	2,013
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
5mL V底自立型チューブ	1000本	29,920
クラフト封筒(長3)	100枚	440
クラフト封筒(長4)	100枚	418
マシブ リンガパ' 112面角丸	20シート	572
ポリ袋 12号 厚さ 0.03mm	100枚	253
クール宅急便(冷凍)	38ヶ所	57,670
人件費	2人	30,000
雑費		330
合計:		¥180,701

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学


実際のテストサンプルの作成

- 冷凍で受け取った牛の血液を-20℃で保存し、4℃の冷蔵庫で解凍しました。
- メスシリンダーで250mLの解凍血液を測りました。

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学


- 血液を300mLの三角フラスコに注ぎました。
- サンプルからの揮発性化合物の蒸発を防ぐために、フラスコを氷で囲んだ。
- マグネチックスターラーを使用して、血液が凝集するのを防ぎました。



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

- ゾルピデムの1.0mg/mLエタノール溶液125μLを血液に添加しました（最終濃度0.5μg/mL）。
- 27.6 μLのバルプロ酸を血液に添加しました（最終濃度100 μg/mL）。
- 1459.3 μLのエタノールを血液に添加し、ゾルピデム溶液からの125μLと組み合わせて、合計1584.3μLのエタノールにし、最終濃度を5.0mg/mLにしました。



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

- 化合物を添加した後すぐ、フラスコをパラフィルムし、1時間混合した。
- 混和後、サンプル5mLをプラスチックチューブに分けました。



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

- チューブにすぐに蓋をして、パラフィルムで密封した。
- 密封されたチューブはすぐに氷に保管された。
- それぞれ5mLのサンプルを含む40本のチューブが製造されました。



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

- チューブは、2つの保冷剤が入ったチャック付きビニール袋に入れられました。
- チャックを締め、説明紙、解答用紙、および2枚の封筒と一緒にクッション付きの封筒に入れられました。



Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

- 紙は結露や漏れで濡れないようにビニール袋に入れました。
- サンプルの発送には、クロネコヤマト配送サービスを利用しました。

クール宅急便

冷凍タイプ

冷凍タイプ	輸送時の保冷設定温度	手付け時間の目安
	-15℃	-15℃以下で12時間以上

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

テストサンプルの分析とその結果

- サンプルを発送して二日後に凍結したチューブを解凍しました。
- 揮発性物質のスクリーニング/GC-FIDによるエタノールの定量、LC-MS/MSによるゾルピデム、およびGC-MSによるバルプロ酸の定量のために、それぞれサンプル0.2 mLを使用しました。

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

福岡大学

分析結果

スクリーニング検査:

- HS-GC-FIDによる揮発性物質のスクリーニングはエタノールのみ検出された。
- GC-MSによる一般スクリーニングでゾルピデムとバルプロ酸が検出された。
- LC-MS/MSによる一般スクリーニング(島津のRapid Tox Screening)でゾルピデムが検出された。

定量検査:

化合物名	ターゲット濃度	測った濃度
エタノール	5.00 mg/mL	5.07 mg/mL
ゾルピデム	0.50 µg/mL	0.55 µg/mL
バルプロ酸	100 µg/mL	111 µg/mL

- エタノール: 8点の検量線(水で) 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64, 1.28, 2.56, 5.12 mg/mL ($R^2 = 0.999$); 内部標準: t-butanol.
- ゾルピデム: 4点の検量線(牛血で) 0.125, 0.250, 0.500, and 1.000 µg/mL ($R^2 = 0.999$); 内部標準: diazepam-d₅.
- バルプロ酸: 4点の検量線(牛血で) 50, 100, 200, and 400 µg/mL ($R^2 = 0.997$); 内部標準: valproic acid-d₅.

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.

第3回ブラインドテスト結果報告

(2022年3月15日)

法医中毒研究会セミナー

報告事項		
1.	参加機関	p.7
2.	エタノール検査結果	p.8
3.	薬物スクリーニング検査結果	p.12
4.	薬物定量検査結果	p.18
5.	その他(ご意見・ご要望など)	p.25
6.	参考資料	p.28

1. 参加機関

参加機関数	38 機関
回答機関数	38 機関

◆参加 38 機関全てから回答あり。(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)

◆前回(第2回)は 35 機関で 3 機関の増。

検査	参加機関 38 機関中の回答機関数
エタノール検査	36
薬物スクリーニング検査	37
薬物定量検査	30

2. エタノール検査

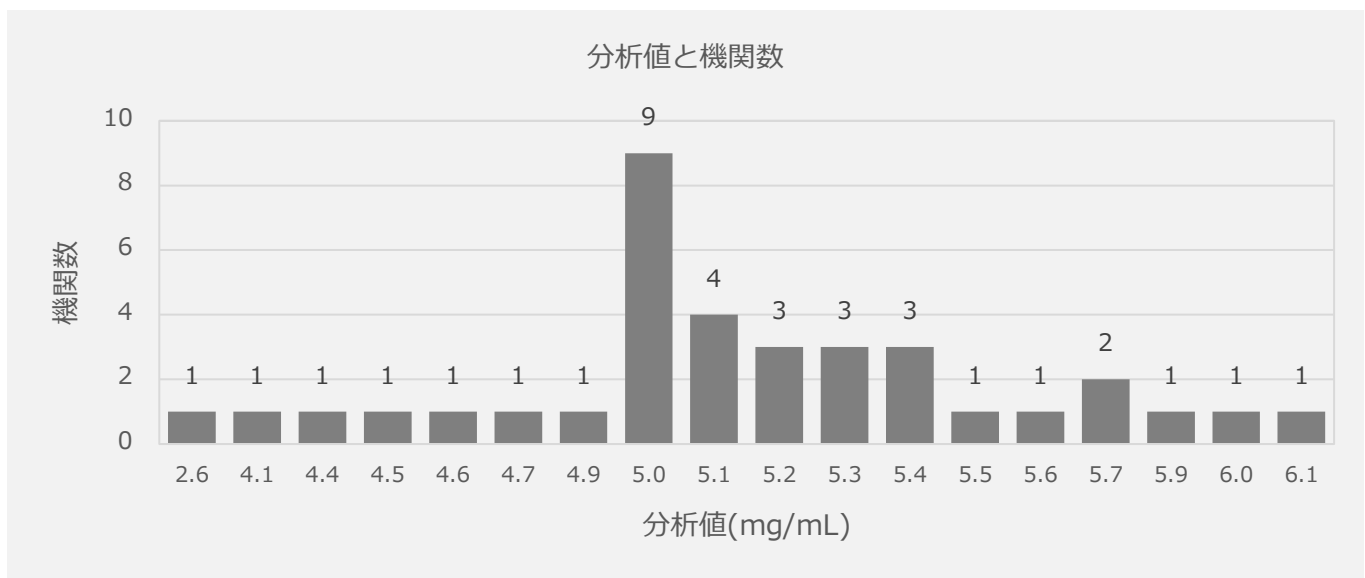
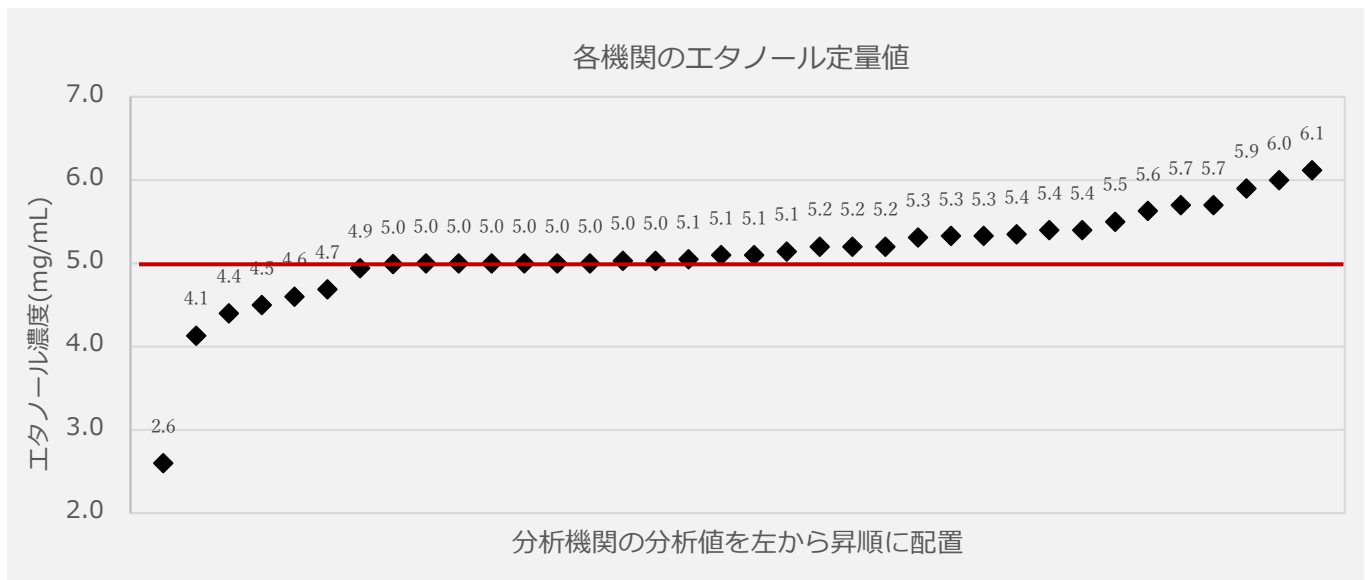
【参加機関】 36 機関

【調製濃度と定量値の処理】

調製濃度	5.0 mg/ml
調製機関分析濃度	セミナー当日の報告を参照

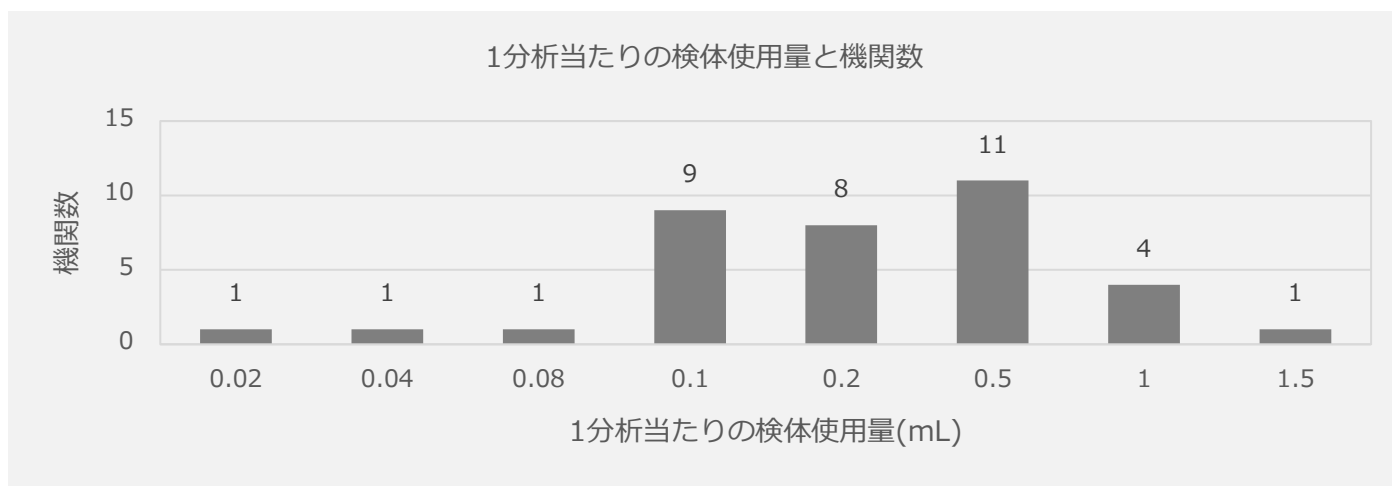
- ◆エタノール濃度は一般の成書や文献では小数点第1位までの数値で症状などを提示している。
- ◆それ以下の細かい数値での症状の違いは明記されていない。
- ◆提出された結果を小数点第1位となるように四捨五入して解析した。

【各機関の定量値の分布】



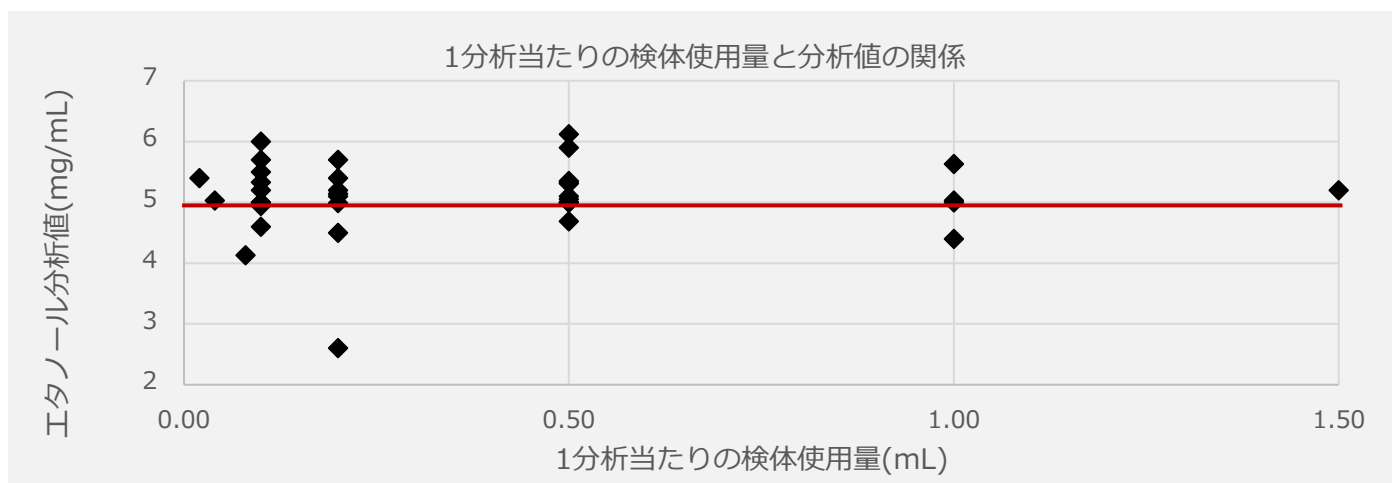
- ◆36 機関中、27 機関(75%)が調整値(5.0 mg/mL)±10%(4.5-5.5 mg/mL)の範囲であった。(注意：10%以内が妥当ということではない)

【1分析当たりの検体使用量】



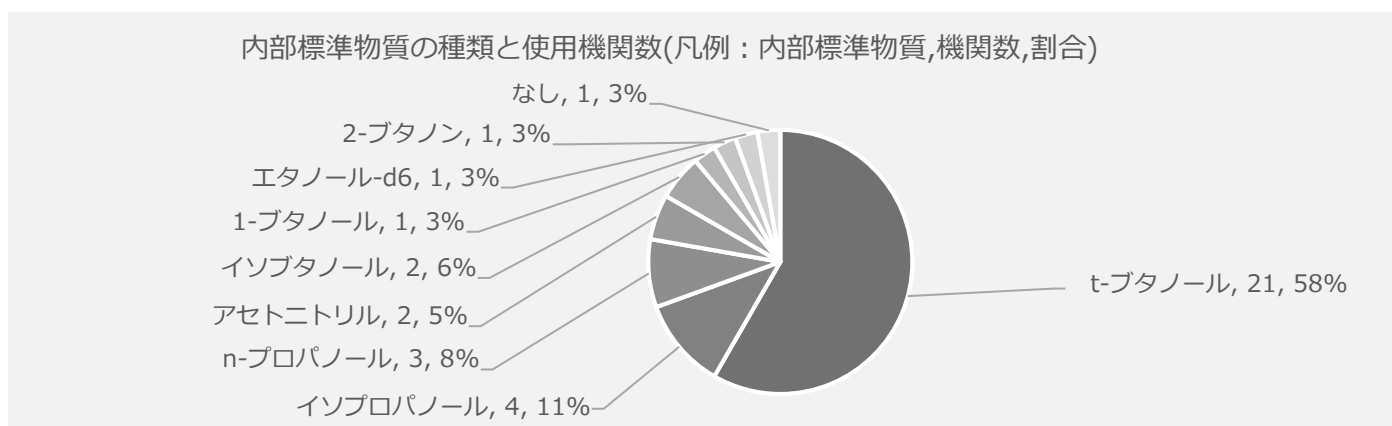
◆ 0.5 ml×2 回や 0.5 mL×2+0.25 ml×2 は、それぞれ 1.0 ml、1.5 ml とした。

◆ 1 分析当たりの検体使用量は 0.1 mL、0.2mL、0.5 mL の機関が多く、最少で 0.02 mL、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。

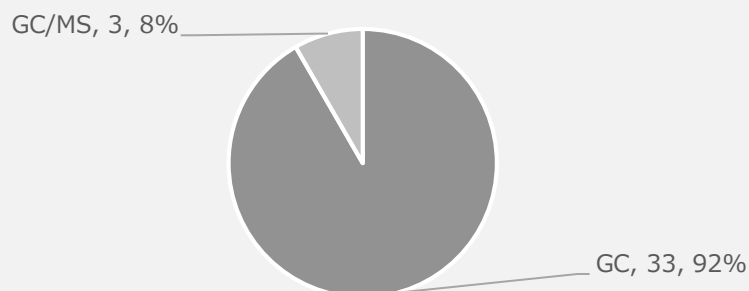
【内部標準物質】



◆ 36 機関中 21 機関(58%)が t-ブタノールを使用していた。

【分析機器及び分析方法】

エタノール分析に使用している分析機器(分析機器、機関数、割合)



- ◆ 36 機関中 33 機関(92%)が GC(ガスクロマトグラフィー)、3 機関(8%)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 36 機関すべてでヘッドスペース法であった。

【コメント・質問など】

コメント	詳細
分析方法に関して	<ul style="list-style-type: none"> • 2 つ測定試料を調整し、平均を求めた。 • 検量線(5mg/ml まで)を外れてしまった。 • 検体使用量 1ml で分析しましたが、検量線範囲から外れたため検体を 10 倍希釈(0.1ml 使用)し、再検査しました。 • 講座内検量線範囲の上限値(4.0mg/ml)を超えたため、×2、×4 希釈して定量値を算出しました。 • 通常業務では 0.1~4.0mg/ml の範囲で検量線を作成して定量を行っているが、今回の分析ではそれ以上の高濃度で検出されたため、検体を 2~4 倍希釈して定量値の確認を行った。 • 検量線は 5mg/ml までしか引いていないので厳密な数値ではありません。(実務的には「5mg/ml 以上」と報告しています) • 4.0、2.0、1.0mg/mL+ブランクで検量線を作成(各点 n=3)⇒これを用いて内部標準法で定量分析を行った(n=2 で平均値を算出)。定量結果が検量線上限を超えてしまったので、結果は参考値とした。ただし、$r>0.99$ なので妥当と推定。 • 最初の測定で検量線の範囲を外れたので、半分の量で再測定しました。

✓ 今回は高濃度とした。

質問	回答
<ul style="list-style-type: none"> • ①内部標準物質を複数使用してらっしゃる機関がありましたら、何を選択されているか教えてください。(当機関では、t-ブタノールをメインで使用していますが、試料由来のピークと被る場合は、イソブタノールを選択しています。) 	<ul style="list-style-type: none"> • ①今回のテストではエタノール検査については内部標準物質を複数使用しているという回答やコメントはありませんでした。セミナー当日に参加者にお伺いいたします。

- ②通常、検量線は 4mg/ml までのものを使用しておりますが、他の機関は定量上限がどれくらいなのか教えて頂きたいです。
- ③希釈方法(ブランク血液あるいはその他(水)で希釈しているのか)をどうしているか知りたいです。
- 検体使用量と定量結果に相関があるのか、また、検体使用量が最低何 ml あれば結果に影響を及ぼさないのかご存知でしたら教えて頂きたいです。
- 内部標準法では 5.3mg/mL を示しましたが、標準添加法では 2.6mg/mL を示しました。なお、ヒト全血にエタノールを添加したところ内部標準法で正確な値が定量できました。前回も高値を報告しましたが、前々回はほぼ正確な値を報告しました。分析手法がウシ血(?)と合致していないと思われます。
- ②上記コメントでは定量上限を 4-5 mg/mL としている機関が多いようです。
- ③検体を希釈して分析でしている機関はいくつかあります。
- セミナー当日に参加者にお伺いいたします。
- 1-3 回のブラインドテストの結果からは、検体使用量と定量結果に相関はありませんでした。
- 検体最低量は分析機器と分析方法によって変わりますので、一概には言えません。一般には許容できる誤差範囲を文献などを参考にご自身で設定し、どこまでその範囲で分析できるかご自身の分析環境で試してみることで判断します。ただし、今回の結果では 0.02 mL、0.04 mL など少量で分析している機関でも、正確な定量値を算出しています。
- 動物種による分析方法への影響は知られておりませんが、その可能性は否定はできません。他方、検量線作成の影響もあるかもしれません。
- セミナー当日に参加者にお伺いします。

3. 薬物スクリーニング検査

【参加機関】 37 機関

【添加化合物】

◆今回は以下の 2 種とした。

添加化合物	①バルプロ酸
	②ゾルピデム

✓ バルプロ酸は検出や分析がうまくいかない場合があるとの意見があったため、その対処方法を研究会の分析者で共有するのがよいとのことで選択した。

✓ ゾルピデムは、いわゆる Z 系薬物と呼ばれるものの代表で、近年臨床で繁用されることから選択した。

【各機関の検出結果】

対象 2 化合物の検出状況	機関数
バルプロ酸、ゾルピデム両物質を検出	33
ゾルピデムは検出したが、バルプロ酸が不検出	4

◆ 37 機関中 33 機関(89%)で対象 2 化合物を検出した。

◆ ゾルピデムは 37 機関全てで検出できていたが、バルプロ酸を検出できなかった機関が 4 機関あった。

【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(35 方法)]

前処理法	機関数	追加処理	機関数
QuEChERS 法	20	特記無し	18
		固相抽出、分散固相(Restek Q-sep)	2
除タンパク法	11	特記無し	9
		QuEChERS AOAC パウダー、リン脂質除去	2
液-液抽出	1	特記無し	1
	1	ギ酸アンモニウム添加アセトニトリルで液液抽出	1
固相抽出	2	特記無し	2

[GC-MS 及び GC-MS/MS 分析における前処理方法(30 方法)]

前処理法	機関数	追加処理	機関数
QuEChERS 法	19	特記無し	14
		リン脂質除去(Captiva、NAGINATA の方法等)	5
液-液抽出法	5	特記無し	3
		珪藻土	2
固相抽出	6	特記無し	6

[PESI-MS/MS 分析における前処理方法(1 方法)]

前処理法	機関数	追加処理	機関数
除タンパク法	1	特記無し	1

◆LC 系分析、GC 分析とも QuEChERS 法を前処理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。
- ✓ 1 分析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 2 ml で集計。

[LC-MS 及び LC-MS/MS、LC-QTOF 分析での検体使用量(35 方法)]

検体使用量(mL)	前処理方法数
0.05	3
0.1	15
0.2	1
0.5	13
1.0	3

[GC-MS 及び GC-MS/MS 分析での検体使用量(30 方法)]

検体使用量(mL)	前処理方法数
0.1	6
0.2	4
0.4	2
0.5	9
1.0	9

[PESI-MS/MS 分析での検体使用量(1 方法)]

検体使用量(mL)	前処理方法数
0.02	1

◆LC 分析系では 1 分析あたり 0.1 mL または 0.5 mL の検体を使用している機関が多く、GC 分析系では 1 分析あたり 0.5 mL または 1.0 mL の検体を使用している機関が多かった。

◆LC 分析系のほうが、検体使用量が少量である傾向があった。また、PESI ではごく少量の検体量使用量(0.02 mL)であった。

【内部標準物質】

- ✓ 分析法(分析機器)により内部標準物質を変えている機関もあったが、機関単位での集計とした(計 37 機関)。
例：LC/MS/MS：ジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5、GC/MS：ジアゼパム-d5 の場合、機関としてはジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5 を使用とした。

内部標準物質	機関数
ジアゼパム-d5	14

ジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5	11
ジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5、ジフェンヒドラミン-d3	1
ジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5、Custom internal standard(RESTEK)	1
ジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5、ナフタレン-d8、ペリレン-d12	1
ジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5、ナフタレン-d8、アセナタレン-d10、3-フェニ ルプロピルアミン	1
ジアゼパム-d5、セコバルビタール-d5	1
ジアゼパム-d5 もしくはフェノバルビタール-d5	1
フェノバルビタール-d5、セコバルビタール-d5	1
エスタゾラム-d5	1
セコバルビタール-d5	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
3-フェニルプロピルアミン	1
記載なし	2

◆ジアゼパム-d5 のみの機関は 37 機関中 14 機関(38%)で、次にジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5 の 2 種が 11 機関(30%)であった。

【分析機器】

分析機器	機関数
GC-MS・LC-MS/MS 併用	17
LC-MS/MS のみ	9
GC-MS のみ	2
GC-MS/MS のみ	2
GC-MS/MS・LC-MS/MS 併用	2
GC-MS・LC-MS 併用	1
GC-MS・LC-MS/MS・LC 併用	1
GC-MS・LC-MS/MS・LC-QTOF 併用	1
LC/MS のみ	1
LC-MS/MS・PESI-MS 併用	1

◆「GC-MS・LC-MS/MS 併用」が 17 機関、「LC-MS/MS のみ」が 9 機関であった。

【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)

- 複数の分析方法を利用することで、取りこぼしを防ぐため。
- LC/MS/MS のみでは不安な時があるので(覚せい剤など)。危険ドラッグや代謝物など NAGINATA でしか確認できないものもあるため。分析値は、LC/MS/MS を優先しているが、化合物によっては GC/MS を優先することもある。
- LC/MS(QTOF)と GC/MS は、スクリーニング対象化合物を広く網羅するために、必ず両方実施します。薬物が検出され、定量する場合は、LC/MS(トリプル四重極)で半定量します。分析結果は、それぞれ別の報告書で出します。
- メインは LC/MS/MS ですが、GC/MS でしか検出されない化合物をみるため、両方行っています。
- PESI-MS/MS は極少量の検体で迅速に分析を行えるが、登録物質が少ない。LC/MS/MS では揮発性(低極性)物質の検出が難しく、GC/MS(濃縮操作を含まない固相抽出法)を併用している。
- ライブラリーの違いによる薬物の検出漏れを防ぐため。異なる分析装置間での検出される薬物の整合性を見るため。
- GC と LC でダブルチェックするため。
- LC/MS での検出が適さない薬物もあるため。

【各機関の検体使用量と前処理方法、分析機器、検出薬物(37 機関)】

✓ 前処理方法、分析機器、検体使用量の 1、2 については、1 機関で複数の方法を実施している場合に記載。

前処理方法 1	分析機器 1	検体量 1 (ml)	前処理方法 2	分析機器 2	検体量 2 (ml)	検出薬物		備考
						バルプロ酸	ゾルピデム	
QuE	GC/MS	0.1	QuE	LC/MS/MS	0.1	○	○	
QuE	GC/MS	1	QuE	LC/MS/MS	0.5	○	○	①
除タン	LC/MS/MS	0.1	QuE	GC/MS	1	○	○	②
除タン	LC/MS/MS	0.1	QuE	GC/MS	0.5	○	○	
固相	LC, GC/MS, LC/MS/MS	1	液液	LC, GC/MS	1	○	○	
QuE	LC/MS/MS	0.1	QuE	GC/MS	0.2	○	○	③
QuE	GC/MS/MS	0.2				○	○	
QuE	GC/MS, LC/MS/MS	0.5				○	○	
固相	LC/MS/MS	1	固相	GC/MS	1	○	○	
QuE	GC/MS, LC/MS/MS	0.1				○	○	
QuE	GC/MS/MS	0.4				○	○	
QuE	GC/MS	0.5	QuE	LC/MS/MS	0.5	○	○	
除タン	LC/MS	0.05	QuE	LC/MS	0.1		○	④
QuE	GC/MS	0.5	QuE	LC/MS/MS	0.5	○	○	
除タン+QuE	GC/MS	0.5	除タン+QuE	LC/MS/MS	0.5	○	○	⑤
QuE	LC/MS/MS	0.5				○	○	
固相	GC/MS	0.1	QuE	LC/MS/MS	0.1	○	○	
除タン	PESI-MS/MS	0.02	QuE	LC/MS/MS	0.5	○	○	⑥

固相	GC/MS	1	QuE	LC/MS/MS、LC-QTOF	0.5		○	
除タン	LC/MS/MS	0.1				○	○	
除タン	LC/MS/MS	0.1	QuE	GC/MS/MS	0.1	○	○	
QuE	LC/MS/MS	0.1					○	
除タン	LC/MS/MS	0.1				○	○	⑦
除タン	LC/MS/MS	0.1	液液	GC/MS	0.1	○	○	
除タン	LC/MS/MS	0.2				○	○	
QuE、固相	LC/MS/MS	0.5	QuE	GC/MS	1	○	○	⑧
除タン	LC/MS/MS	0.1				○	○	
QuE	LC/MS/MS	0.5					○	
QuE	GC/MS	0.5				○	○	⑨
QuE+分散固相	LC/MS/MS	0.05	液液	GC/MS	0.2	○	○	⑩
QuE	LC/MS/MS	0.5				○	○	
QuE	GC/MS	0.5	QuE	LC/MS/MS	0.5	○	○	
QuE	LC/MS	0.5	QuE	GC/MS	0.5	○	○	⑪
液液抽出	LC/MS/MS	0.1				○	○	⑫
除タン	LC/MS/MS	0.05	QuE	GC/MS	0.5	○	○	⑬
固相	GC/MS	1.0				○	○	
QuE	LC/MS/MS	0.1	QuE	GC/MS/MS	0.1	○	○	

前処理方法略語：除タンパクのみ：除タン、QuEChERS：QuE、固相抽出：固相、液液抽出：液液
[備考]

①検体使用量 1mL (フリーとアセチル化で各 0.5mL 使用)

②前処理方法 2：QuEChERS Captiva(NAGINATA の方法)、検体使用量 2：0.5 mL×2 (AC 用, Free 用)

③下記コメント①。

④分析方法 3：液液抽出、GC/MS、検体使用量 0.2x2(酸性、塩基性各 0.2mL)、内部標準物質なし。下記コメント②。

⑤前処理方法 1 及び 2：アセトニトリル除タン+QuE AOAC パウダー(NAGINATA の方法)

⑥分析方法 3：前処理: 固相(濃縮なし), 分析機器: GC/MS, 検体量: 1.0, 内部標準物質: なし

⑦前処理方法 1：除タン→リン脂質除去

⑧前処理方法 2：QuE、Captiva リン脂質除去

⑨前処理方法 1：スクリーニングには NAGINATA 法を用いた。

⑩下記コメント④。前処理方法 1：QuE+分散固相(Restek Q-sep)、前処理方法 2：珪藻土-液液分配。分析方法 3：前処理: 珪藻土-液液分配+無水酢酸 TFA, 分析機器: GC/MS, 検体量: 0.2, 内部標準物質: 3-フェニルプロピルアミン

⑪前処理方法 2：QuE+NDLipidsCaptiva

⑫前処理方法 1：ギ酸アンモニウム添加アセトニトリルで液液抽出

⑬前処理方法 2：QuE+NDLipidsCaptiva

【コメント】

- ①LC/MS/MS ではバルプロ酸検出されず(pos, neg 共に検出されない)、GC/MS でバルプロ酸検出。
- ②2 化合物含まれているとのことでしたが、3 種類の定性分析で、いずれもゾルピデムしか検出できませんでした。
- ③スクリーニングには NAGINATA 法を用いた。
- ④普段は LC/MS/MS と無水酢酸 TFA-GC/MS でスクリーニングを行っていますが、これらではバルプロ酸が微妙でした。2 化合物含まれているという情報があったので LC/MS/MS で微妙なピークを認知でき、さらに誘導化なしの GC/MS で確認できました。事前情報がなかったらバルプロ酸を見逃していたかもしれません。
- ◆ バルプロ酸が検出できていない 4 機関の分析機器は LC-MS/MS のみが 2 機関、GC-MS と LC-MS 併用が 1 機関、GC-MS と LC-MS/MS、LC-QTOF 併用が 1 機関であった。

ブラインドテスト参加者からの質問

質問	回答
・ よく偽陽性で検出される化合物がある場合、偽陽性であることを確認する方法として、他の機関ではどのような手法を用いているのでしょうか?(当機関では模索中です。)	・ 標品との比較と他の分析方法で確認することが基本です。具体的には、キャリーオーバーを含むコンタミではないことを同分析方法で確認し、次に標品との RT とスペクトルの整合性を検討。それでも解決できない時は異なった分析機器で測定して判断します。不安が残る時は、知り合いの先生に分析をお願いするのはいかがでしょうか。事務局へのご相談も可能です。
・ 定性に使用する検体は何を使っているのか、教えてください。大腿静脈血、尿を基本に、ない時は心血を使っています。基本は何を使っているのか、十分量取れない場合は代わりに何を使うのか、最初、末梢血というくくりで検査をするようになりましたが、それで良いのか、外注検査にどの程度出しているのか、科捜研に分析を頼んでいるのか等、よろしくお願いします。	・ 尿と血液を基本として、血液に心血を使うか大腿静脈血を使うかは、機関や分析者の判断であり、どちらが良いということはありません。例えば、基本が大腿静脈血でも十分量がない時は心血を使用したり、その他の血液を使用したりしても問題ありません。大腿静脈血以外の末梢血を採取することは少ないとは思いますが、鎖骨下静脈や内頸静脈などからの採血でも末梢血としてよいと思います。分析した血液の採血部位を記録しておくことが大切です。外注や科捜研の依頼については、機関によると思います。すべて機関内で分析する（または分析を試みる）ところから、機材や人員の関係でほぼ全て外注している機関まで様々です。ただし、本研究会では、外注よりも本研究会を通じての他大学への分析依頼を推奨しています。ご相談ください。

4. 薬物定量検査

【参加機関】 30 機関 ただし 1 機関は機器故障のため定量分析結果はなし。

【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)
バルプロ酸	100	セミナー当日の報告を参照
ゾルピデム	0.5	セミナー当日の報告を参照

✓ 今回はバルプロ酸は治療域に、ゾルピデムは中毒域に設定した(下表参照)。

化合物	治療域(μg/mL)	中毒域(μg/mL)	致死域(μg/mL)
バルプロ酸	40-150	150-200	556-
ゾルピデム	0.008-0.2	0.5	1.0-

薬毒物情報インデックスより

【分析機器】 30 機関

分析機器	機関数
LC-MS/MS	17
LC-MS/MS と GC-MS 併用	10
LC-MS	1
LC-MS と GC-MS 併用	1
LC-Orbitrap-MS	1

◆ 定量分析では LC-MS/MS が最多で、LC-MS/MS と GC-MS の併用が次に多かった。

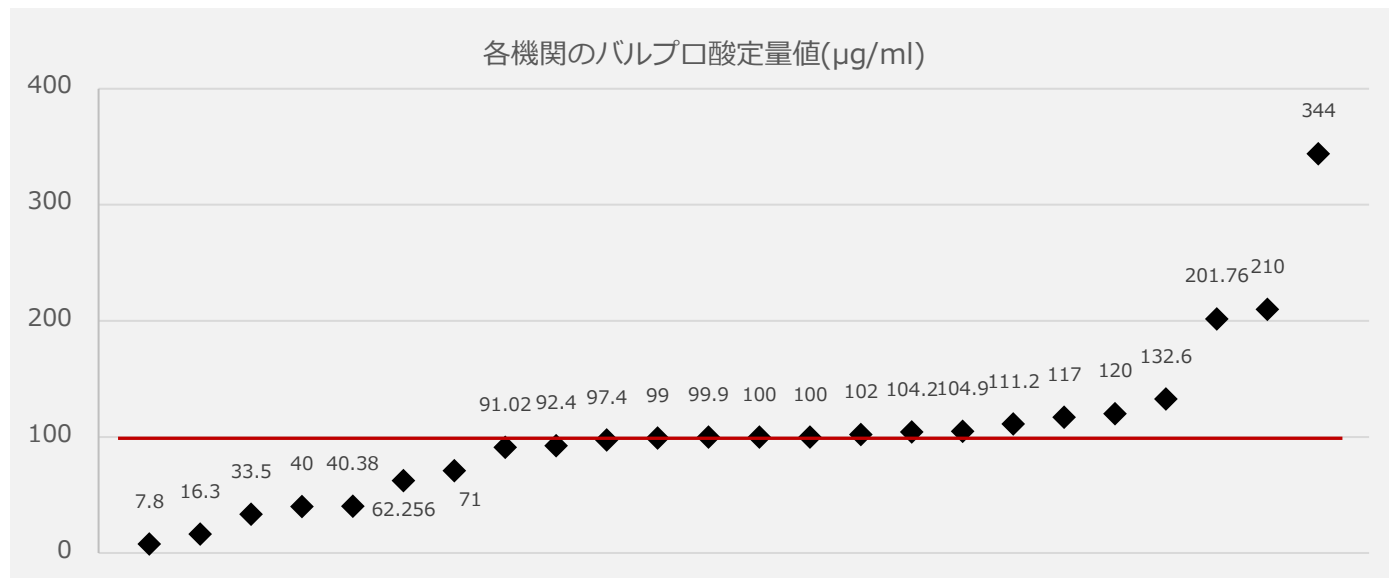
【分析方法】 30 機関

定量分析方法	機関数
内部標準法	22
標準添加法	5
内部標準法と標準添加法	2
絶対検量線法	1

◆ 記載のあった 30 機関中 24 機関(80%)で内部標準法を用いていた。

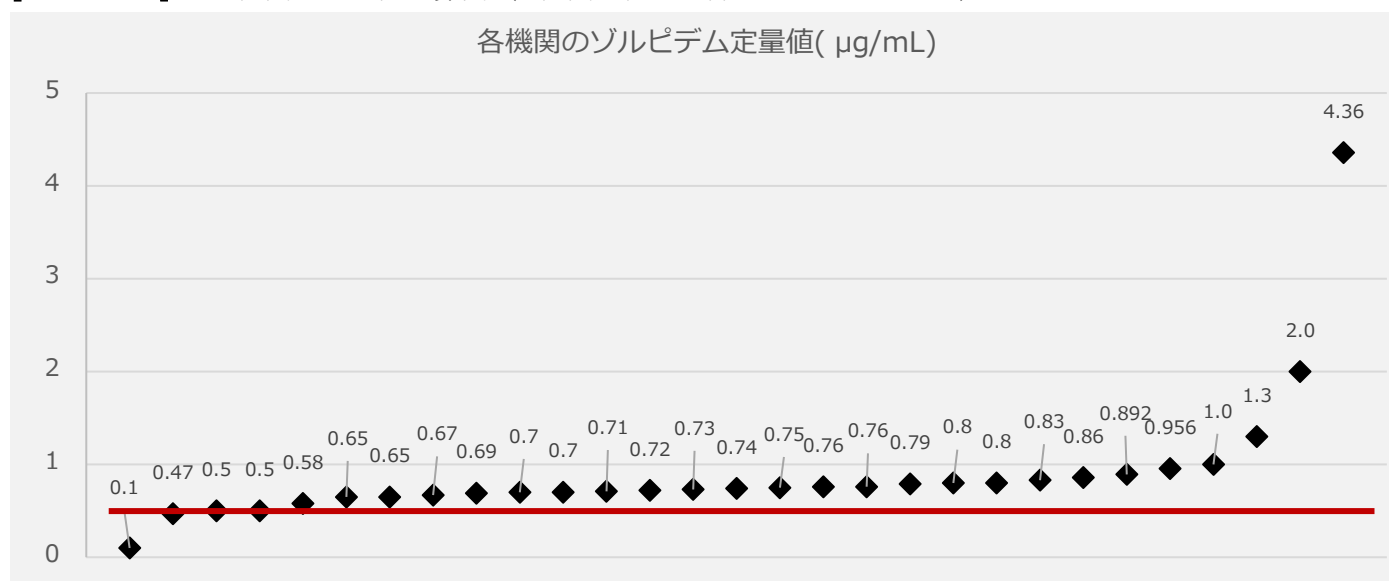
【各機関の定量値】

【バルプロ酸】 24 機関で定量値を算出。29 機関中 3 機関はバルプロ酸が不検出であり、2 機関は定量せず、1 機関は機器故障により定量できず。



✓ 調製値±10% (90-110) とすると 24 機関中 10 機関(42%)がその範囲に入った。

【ゾルピデム】 29 機関で定量値を算出 (1 機関は機器故障により定量できず)。



✓ 調製予定値±10% (0.45-0.55) とすると 24 機関中 4 機関(17%)がその範囲に入った。(注意：±10%が正しいということではない)

✓ 1 機関を除いては、全ての機関で中毒域以上で検出できていた。

✓ 調製値より約 10%高い値の分析値が多い。

【内部標準物質】 30 機関

内部標準物質	機関数
ジアゼパム-d5	6

ジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5	5
ジアゼパム-d5、2-エチルヘキサン酸	2
ジアゼパム-d5、2-エチルブタン酸	1
ジアゼパム-d5、p-t-ブチル安息香酸	1
ジアゼパム-d5、tert-ブチル安息香酸	1
エスタゾラム-d5、2-エチルヘキサン酸	1
ジアゼパム	1
ジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5、ナフタレン-d8	1
ジアゼパム-d5、安息香酸(検討)	1
ジアゼパム-d5 もしくはフェノバルビタール-d5	1
ゾルピデム-d6	1
ゾルピデム-d6、バルプロ酸-d6	1
ゾルピデム-d6、4-メチルオクタン酸	1
ゾルピデム-d7、フェノバルビタール-d5	1
ベサフィブラート-d6	1
ペルフェナジン	1
なし	1
記載なし	1

◆内部標準物質はジアゼパム-d5 の 1 種が 6 機関、ジアゼパム-d5、フェノバルビタール-d5 の 2 種が 5 機関と最多であった。

◆d5-ジアゼパムは 30 機関中 19 機関(63%)で採用されていた。

◆定量物質に合わせた内部標準物質(ゾルピデム-d6、バルプロ酸-d6)を採用している機関も認められた。

【定量分析における各機関の前処理方法、分析機器、検体使用量、定量値一覧】 30 機関

✓ 前処理方法 1 の検体使用量が少ない順に掲載。

✓ 前処理方法、分析機器、検体使用量の 1、2 については、1 機関で複数の方法を実施している場合に記載。

前処理方法 1	分析機器 1	定量法 1	検体量 1 (ml)	前処理 方法 2	分析機器 2	定量法 2	検体量 2 (ml)	定量値 (µg/mL)		備 考
								バルプロ酸	ゾルピデム	
除タン	LC/MS/MS	内	0.02						0.86	
除タン	LC/MS/MS	内	0.04					16.3	0.47	
QuE	LC/MS	内	0.05	液液 ⁴⁾	GC/MS	内	0.1	104.9	0.83	①
QuE	GC/MS	内	0.1	QuE	LC/MS/MS	内	0.1	40.38	0.1	
除タン	LC/MS/MS	標	0.1					97.4	0.7	②
除タン	LC/MS/MS	内	0.1						0.65	③
固相	LC/MS/MS	内	0.1						2.0	④
QuE	LC/MS/MS	内	0.1	QuE	GC/MS	内	0.1	120	0.71	
QuE	LC/MS	内	0.1						0.5	
固相	GC/MS	標	0.1	QuE	LC/MS/MS	内	0.05	7.8	0.8	
除タン	LC/MS/MS	内	0.1	液液	GC/MS	内	0.1	102	0.76	

除タン	LC-Orbitrap-MS	内	0.1					132.6	1.0	
QuE	LC/MS/MS	内	0.1							⑤
QuE (Micro)	LC/MS/MS	内	0.1					99	0.69	
QuE	LC/MS/MS	内	0.1	QuE	GC/MS/MS	内	0.1	99.9	0.892	
固相	LC/MS/MS	内 ¹⁾	0.2	固相	LC/MS/MS	内	1	40	0.5	
除タン	LC/MS/MS	標	0.2					111.2	0.74	⑥
QuE	LC/MS/MS	内	0.3					100	1.3	⑦
QuE	LC/MS/MS	内	0.5					62.256	0.956	
固相	LC/MS/MS	外 ²⁾	0.5	除タン	LC/MS/MS	外 ²⁾	0.1	71	0.58	
QuE	GC/MS	内	0.5	QuE	LC/MS/MS	内	0.5	201.76	0.72	
QuE、固相	LC/MS/MS	内	0.5	QuE ⁵⁾	GC/MS	内	0.025	104.2	0.73	
QuE	LC/MS/MS	内	0.5	固相	GC/MS		0.5		4.36	
液液 ³⁾	LC/MS/MS	標	0.002x2 本 x5 点	液液 ³⁾	LC/MS/MS	標	0.1x2 本 x5 点	100	0.7	
QuE ⁷⁾	LC/MS/MS	内	0.05×2 (反復)					210	0.8	
除タン	LC/MS/MS	標	0.05x6	QuE ⁶⁾	GC/MS	標	0.5x4	33.5	0.76	
除タン	LC/MS/MS	内	0.1×2	除タン ⁹⁾	GC/MS	内	0.1×2	91.02	0.67	⑧
その他 ⁸⁾	GC/MS	内	0.1×3=0.3	QuE	LC/MS/MS	内	0.5×2=1.0	344	0.75	⑨
除タン	LC/MS/MS	標	0.1×4	除タン	LC/MS/MS	標	0.1×4	117	0.79	⑩
除タン	LC/MS/MS	標、内	0.4(0.1x4)	除タン	LC/MS/MS	標、内	0.4(0.1x4)	92.4	0.65	

前処理方法略語、除タンパクのみ：除タン、QuEChERS：QuE、固相抽出：固相、液液抽出：液液
 定量法略語、内：内部標準法、標：標準添加法、外：外部標準法

- 1)①内部標準法 ②誘導体化法
- 2)外部標準法(絶対検量線法)、マトリックス検量線
- 3)ギ酸アンモニウム添加アセトニトリルで液液抽出
- 4)液液抽出後誘導体化
- 5)QuEChERS、Captiva リン脂質除去
- 6)QuEChERS+NDLipidsCaptiva TMS 化処理
- 7) QuEChERS+分散固相(Restek Q-sep)
- 8)その他(奈女良先生の方法)
- 9)アセトニトリル除タン+QuEChERS AOAC パウダー

[備考]

- ①今回検出されたバルプロ酸は以前 QuEChERS で抽出した際、バラツキが大きかったため、液液抽出で実施した。
- ②簡易定量値は、GCMS で算出された値を記入しています。定量値は、3 回測定した平均値です。
- ③バルプロ酸は定量していない。
- ④バルプロ酸はルーチンで外部委託検査を実施しているため、定性のみの結果です。
- ⑤ExionLC+Sciex6500 で定量分析を試みたものの、機器の故障による分析不可であった。
- ⑥バルプロ酸の定量値はフリーとして。

- ⑦ゾルピデムの検量線の直線性がある範囲(~1.0)を超えたため、2 倍希釈したサンプルで定量値を算出しました。
- ⑧ゾルピデムを LC/MS/MS, バルプロ酸を GC/MS で定量しました。
- ⑨バルプロ酸は、血液 0.1ml に内部標準(2-エチルヘキサノイック酸)と塩酸を加え、t-ブチルメチルエーテルで抽出後にトリメチルシリルジアゾメタンでメチル化して測定した。
- ⑩バルプロ酸分析は N2 乾固しない抽出法を使っている。

【分析機器と前処理方法】

[LC-MS、LC-MS/MS、LC-Orbitrap-MS 分析における前処理方法]30 機関、35 組み合わせ(1 機関が複数の機器を使用)

前処理法	採用数	追加処理	内訳
QuEChERS	15	特記無し	12
		Micro 法	1
		分散固相(Restek Q-sep)	1
		固相抽出	1
除タンパク	14	特記なし	14
固相抽出	4	特記なし	4
液液抽出	2	特記なし	2

[GC-MS、GC-MS/MS 分析における前処理方法]30 機関、12 組み合わせ

✓ Captiva 類はリン脂質除去とした。

前処理法	採用数	追加処理	内訳
QuEChERS	6	特記無し	4
		リン脂質除去	2
液液抽出	2	特記なし	1
		液液抽出後誘導体化	1
固相抽出	2	特記なし	2
除タンパク	1	QuEChERS AOAC パウダー	1
その他	1	奈女良先生の方法	1

◆ LC 分析系、GC 分析系ともに前処理方法として QuEChERS を採用している機関が多かった。LC 分析系では除タンパクのみの前処理も QuEChERS とほぼ同じが多かった。

【コメント】

✓ 質問については最後にまとめてお答えします。

複数の分析法を採用した理由	①定性分析と同様に高極性と低極性の物質に対応するため、適合する複数の分析法を用いた。本件は特に有機酸に有効な誘導体化法を用いた。
---------------	--

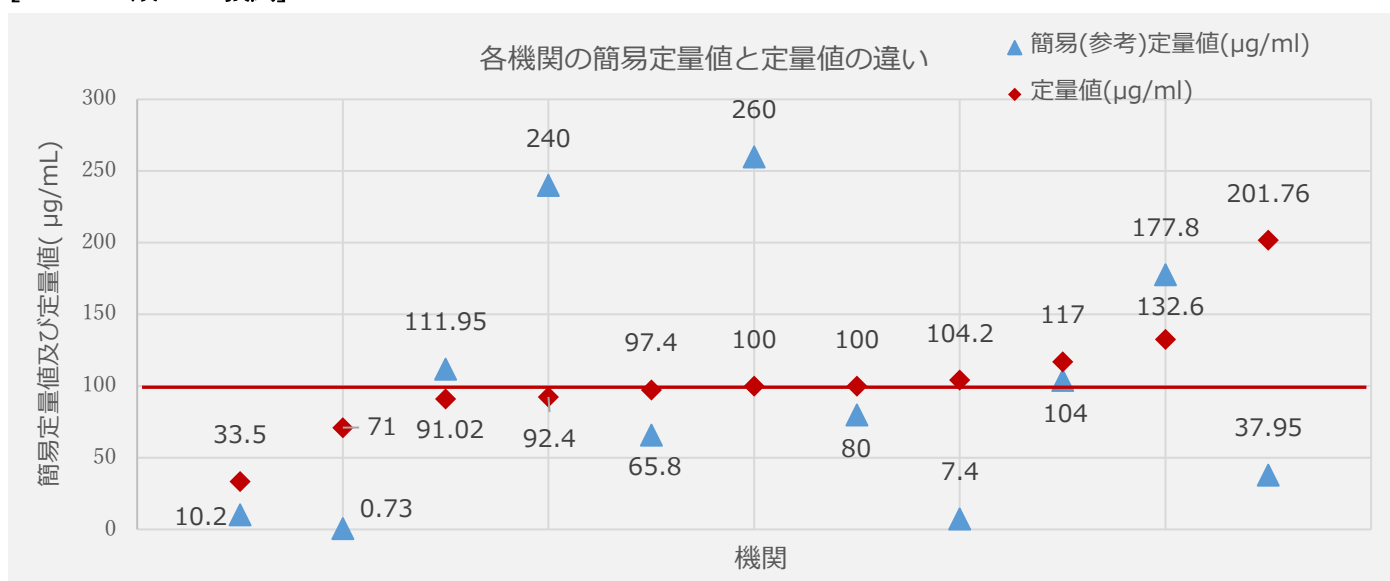
分析方法について

- ②今回検出されたバルプロ酸は以前 QuEChERS で抽出した際、バラツキが大きかったため、液液抽出で実施した。
- ③ゾルピデムを LC/MS/MS, バルプロ酸を GC/MS で定量しました。
- ④バルプロ酸分析は N₂ 乾固しない抽出法を使っている。
- ⑤バルプロ酸は、血液 0.1ml に内部標準(2-エチルヘキサノイック酸)と塩酸を加え、t-ブチルメチルエーテルで抽出後にトリメチルシリルジメタンのメチル化して測定した。
- ⑥ExionLC+Sciex6500 で定量分析を試みたものの、機器の故障による分析不可であった。
- ⑦NAGINATA 法でのバルプロ酸はテーリングが大きく簡易定量値はあてにならないので使用しなかった。
- ⑧簡易定量値は、GCMS で算出された値を記入しています。定量値は、3 回測定した平均値です。
- ⑨バルプロ酸はルーチンで外部委託検査を実施しているため、定性のみの結果です。
- ⑩前述の通り機器の故障により定量分析は不可であった。簡易定量値は NAGINATA 法の分析レポートによる。*検出薬物はいずれも GC/MS スクリーニングでの確認のみ。LC/MS/MS での同定未実施。
- ⑪アルコールの分析と同様に、検体を任意の倍率で希釈して定量値を確認しているが、値が一致しない時もあるので、分析は難しい(奥が深い)と感じた。
- ⑫ゾルピデムの検量線の直線性がある範囲(~1.0)を超えたため、2 倍希釈したサンプルで定量値を算出しました。

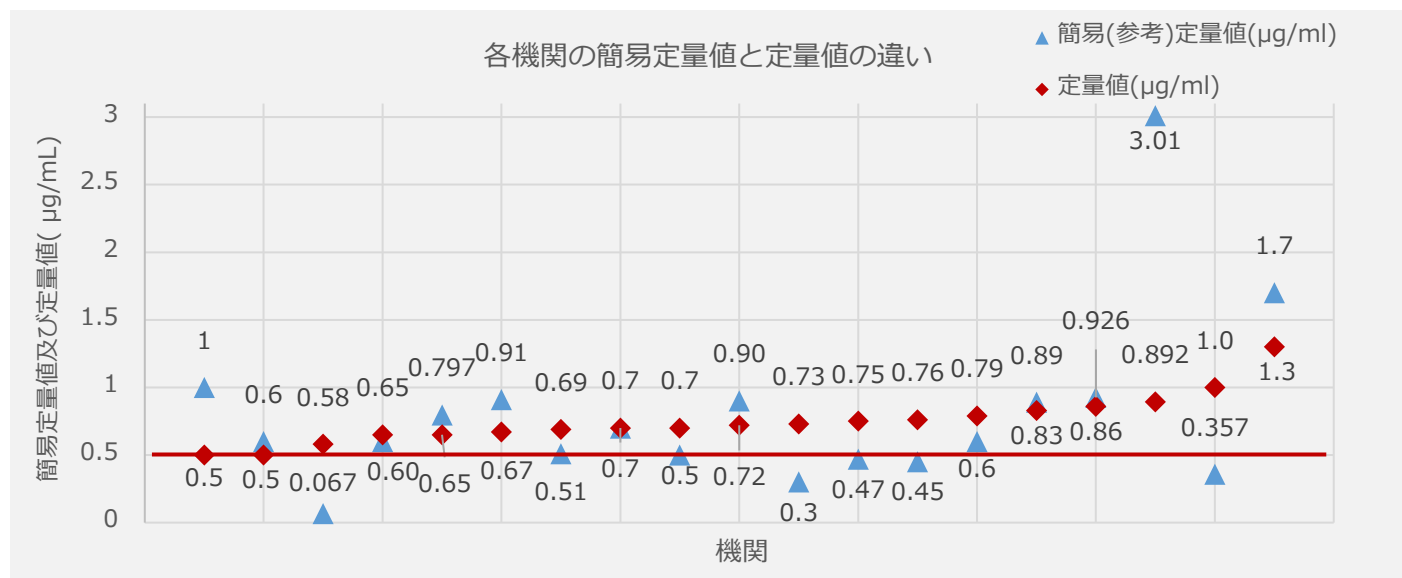
【簡易定量値と本定量値の違い】

✓ 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。

[バルプロ酸 11 機関]



[ゾルピデム 19 機関]



◆ 本定量値が調製予定濃度の近い機関でも、簡易定量値が大きく異なっている機関もある。簡易定量値の扱いを各機関で定めておく必要がある。

5. その他(ご意見・ご要望など)

ご意見・ご要望	回答
<ul style="list-style-type: none"> ・ 3回ブラインドテストに参加しておりますが、実際の値とこちらで測った値との間で違いが生じた場合、何が原因なのかわからないまま、結局次のブラインドテストに参加しております。地方で一人で分析していると、中々他機関から教えてもらえる情報などが少なく、また自分のやり方が正しいのか、誤っているのか教えてくれる人がおらず、次につなげられていない気がします。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ お忙しい中、難しいとは思いますが、まずはセミナーでの助言を参考に相違点を見つけて、ご自身で何度か再分析しなおす必要があります。しかし、ご自身の分析方法の改善すべき点を探し出すことは、そう簡単ではありません。解決できない時は、遠慮なく個別に事務局に相談頂けたらと思います。 ・ 先生と同様の1人分析者としての悩みは多くの先生がお持ちです。本研究会は、そのような先生方との連絡を密にして、問題を解決するためのものでもあります。遠慮なく事務局にご相談ください。
<ul style="list-style-type: none"> ・ 保有する機器の関係上、シアン(NPD)と界面活性剤(イオンクロマト)は測定できない。また、重金属系分析に用いていた蛍光X線分析装置も経年劣化のため処分した。使用頻度の低い分析装置にかかる維持費はバカにならず、教室としても処分していく方向だが、5年~10年に1度しか遭遇しない薬物のために高額機器を購入するのか否かは日々苦慮している。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ シアンや界面活性剤などをルーチン分析している機関は多くは無いと思います。 ・ ブラインドテストは現時点では一般医薬品を対象にしております。特殊な薬毒物を対象とする場合は、ブラインドテストという形式ではなく、物質を明示して「難しいが重要な薬毒物を分析する試み」として提供したいと思います。 ・ 使用頻度が低い高額機器の購入・維持については、皆さん同様の悩みをお持ちだと思います。今後は学会や研究会などで特定の機関に補助金などを出して、維持してもらうなど方策が必要だと思います。
<ul style="list-style-type: none"> ・ 大変貴重な機会を設けて頂きありがとうございました。 ・ 定量値(分析値)がどれくらい正解と離れているかドキドキします。今後もこのような企画には参加したいと思います。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ ご自身の研鑽や機関のクオリティーコントロール、また新人育成に役立てて頂けたら幸いです。

質問	回答
<ul style="list-style-type: none"> ・ 有効数字を何桁くらいまでみていますか。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 「有効数字」というものを、「安定的に算出できる桁数」と考えてよろしいでしょうか。 ・ 前処理、分析機器などにより異なり、基本的にはご自身の分析系で実際に評価する必要があります。

ます。例えば、自機関の分析機器で同じ試料を複数回分析して安定して 0.01 まで算出できる (0.001 の桁は不安定) 場合は、機器としての有効数字は 0.01 の桁と考えてよいと思います。しかし、複数の試料を同じ前処理で行って同様の機器で分析した場合、0.01 の桁が不安定となる場合は、それ以上の桁 0.1 や 1 など、安定した桁が有効数字となるでしょう。他方、たとえ複数の検体を同じ前処理、同じ機器で分析して 0.00001 が安定的に算出できたとしても、当該薬毒物の生理変化が文献的に治療域 0.1-1、中毒域 5-10 などとなっていた場合は、正確な定量値もあまり意味がありません(分析者としてのプライドを示したいのであれば、0.58931 と報告してもよろしいと思います)。このように、各薬物で自身の分析方法の有効数字をおよそ知り、その都度適切に処理、対処することが必要です。

- ・ アルコール分析における検体使用量について質問があります。現在、検体使用量 1ml でアルコール分析をしています。血液や尿の検体状態により、加温による気化平衡がうまくいかず、内部標準物質の面積値がコントロールに比べ極端に低くなり、正しく分析値が出ないという事を経験しました。やはり検体使用量は 0.5ml または 0.2ml の方がよいのでしょうか？
- ・ 非常に難しい問題です。ヘッドスペース法では検体と対照検体が同じ物質を含んでおり、含まれる物質の気化率が一定濃度範囲では一定、すなわち各物質はその他同時に含まれる物質の気化率には一定濃度内では影響を与えないという前提で成り立つ分析法です。基本的には検体と同様の状態の対照検体(検体と対照検体が全く同じ物質を含んでいる前提)であれば、検体量に関わらず、内部標準物質の面積値が大きく異なることはないと考えられます。しかし、分析対象としていない気化率の高い物質が腐敗などで発生し、その高い気化率のため内部標準物質を含むその他の物質の気化が抑制されて同等の面積値が得られないということは可能性としてはあると思われます。その場合は検体使用量を増減させて、内部標準物質を含むその他の物質のより十分な気化が得られる条件を模索することになります。
- ・ セミナー当日に参加者にお伺いいたします。

<ul style="list-style-type: none"> ・ アルコール以外にルーチンで定量している化合物があれば教えてください。(揮発性化合物に限定して、今回は質問させて頂きたいです。) 	<ul style="list-style-type: none"> ・ セミナー当日に参加者に伺います。 ・ 一般にはエタノール以外では腐敗で発生するメタノール、アセトン、n-プロパノールなどを同時に分析している機関があります。 ・ その他の揮発性化合物については、疑われた場合や、ルーチン分析中に通常とは違うピークに気がついた場合に、個別に分析することになると思います。
<ul style="list-style-type: none"> ・ 血液試料調整時の標準品を頂けないでしょうか。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ 標準品を希望に応じて配布できるような制度を検討中ですが、実現できていません。 ・ ブラインドテストで使用した薬物については標準品を提供できるように、今後検討いたします。
<ul style="list-style-type: none"> ・ バルプロ酸定量の再現性を向上させる工夫はありますでしょうか。バルプロ酸の定量は GC/MS と LC/MS/MS のどちらが適しているでしょうか。LC/MS/MS でうまくピークを検出することが出来ませんでした。 	<ul style="list-style-type: none"> ・ セミナー当日に参加者にお伺いいたします。

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

【全ての機関のエタノール、バルプロ酸、ゾルピデムの定量値一覧】全 38 機関

✓ エタノール定量値の昇順に提示した。

エタノール定量値 (mg/ml)	バルプロ酸定量値 (μg/ml)	ゾルピデム定量値 (μg/ml)
2.6		
4.13		
4.4		2
4.5	7.8	0.8
4.6	92.4	0.65
4.689		
4.94		
4.99	40.38	0.1
5	40	0.5
5	71	0.58
5	91.02	0.67
5	99	0.69
5	344	0.75
5		0.5
5.03		0.86
5.03		
5.05		
5.1	104.2	0.73
5.1	120	0.71
5.14	16.3	0.47
5.2	100	0.7
5.2	100	1.3
5.2		
5.3115		0.65
5.33	62.256	0.956
5.33	99.9	0.892
5.35	201.76	0.72
5.4	104.9	0.83
5.4	117	0.79
5.5	102	0.76
5.63		
5.7	97.4	0.7

5.7	210	0.8
5.9		
6	33.5	0.76
6.12		4.36
	111.2	0.74
	132.6	1

✓ 青は定量値が調整予定濃度±10%であったもの。

バルプロ酸の分析

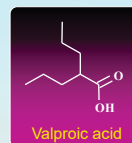
奈女良 昭

広島大学大学院医系科学研究科法医学

第11回法医中毒研究会セミナー(2022.3.15)

はじめに

- バルプロ酸は、てんかんおよびてんかんに伴う性格行動障害の治療に使用されている。
- 血中からの消失半減期が比較的短く、またタンパク結合率が高く、併用薬や剤型などの要因によっても血中濃度に変化するため、血中濃度のモニタリング(TDM)の対象となっている。



薬物名	半減期	有効血中濃度
フェニトイン	20~70時間	7~20µg/ml
カルバマゼピン	10~26時間	4~12µg/ml
フェノバルビタール	70~130時間	15~40µg/ml
エトスクシמיד	40~60時間	40~100µg/ml
バルプロ酸	11~20時間	50~100µg/ml

・てんかん診療ガイドライン2018(日本神経学会)

はじめに

- モニタリングは主に蛍光偏光免疫測定法やHPLC法を利用しているが、法医学上、確実な同定と定量が不可欠である。
- 抗原抗体反応を利用した検出キットは販売されていない。

分析機器を使用して見つけない

LCMSの得手不得手

今やLCMSがスクリーニングを行う上でのファーストチョイスになりつつある

- 使用する分析装置によって得手不得手がある
- 化合物の性質(極性・分子量・溶解度など)や目的を加味する

GC-MS: 気化し易く熱で分解しにくい化学物質
LC-MS: 気化し難い、あるいは熱で分解してしまう化学物質
LC-MS: バルプロ酸はフラグメンテーションを起こし辛いいため、MRMの設定ができない。

如何にして分析装置を運用するか

分析機器の運用法

LCMSとGCMSの併用

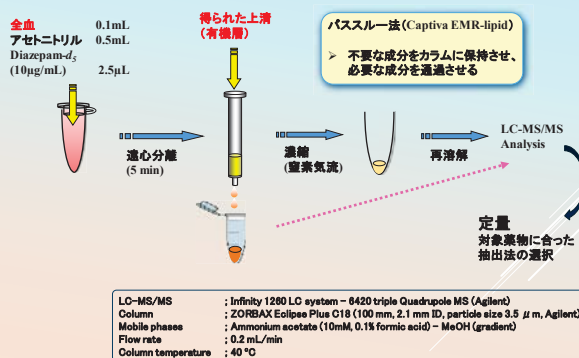
両方の機器を所有・稼働する必要がある。
⇒ 維持管理費が嵩む。

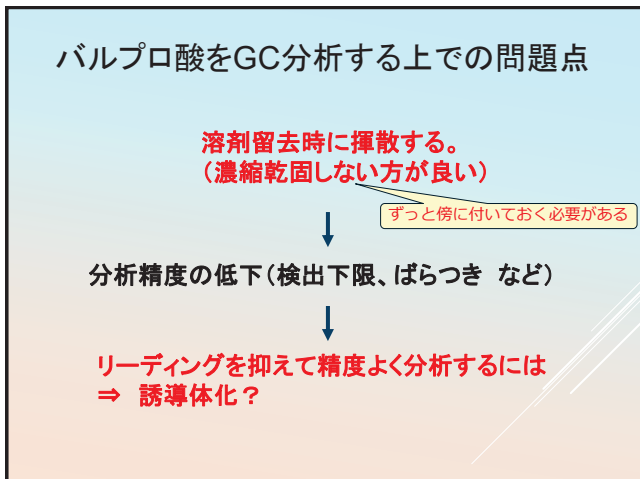
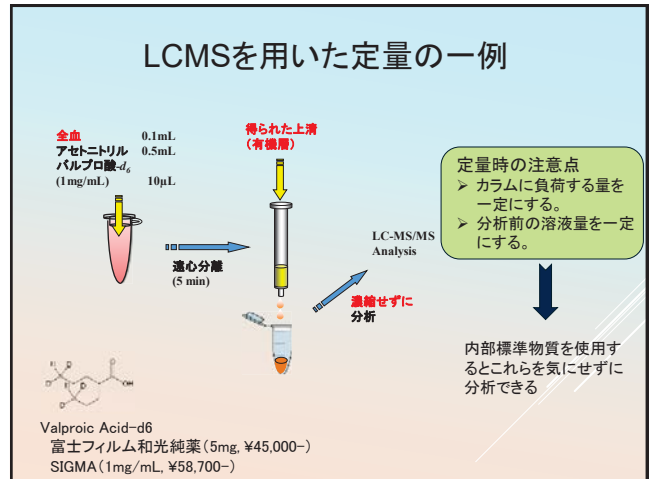
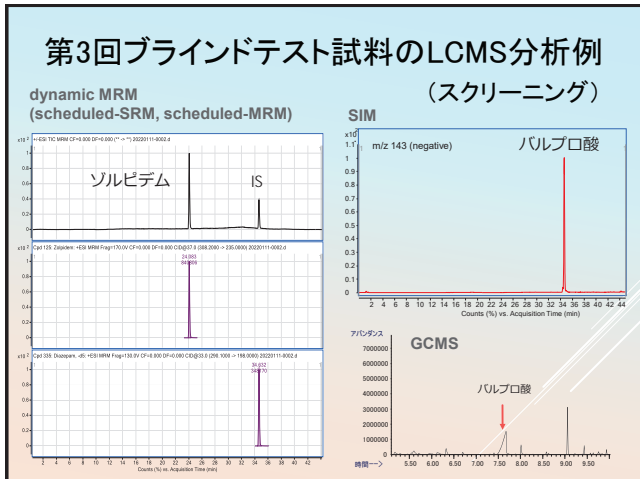
LCMSのみに固執

フラグメントを起こさないでcollision energyを”0”にして素通りさせる。
⇒ SIMと同じ(妨害成分を加味する必要がある)

どちらを選択するかはガイドラインなどで明記されない限り、各施設の判断に委ねられる。

LCMSを用いたスクリーニングの一例





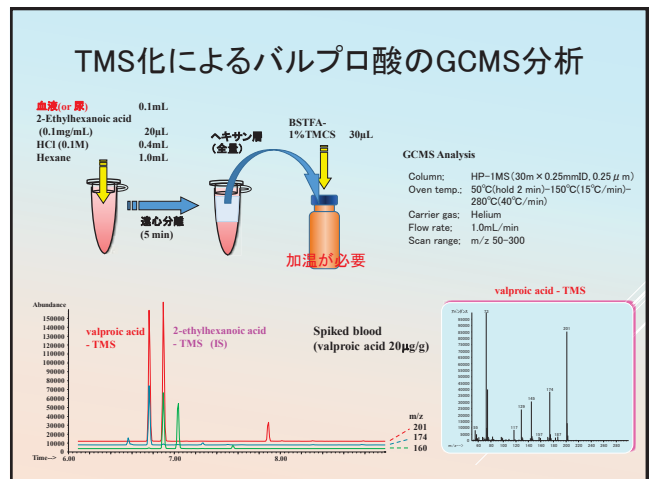
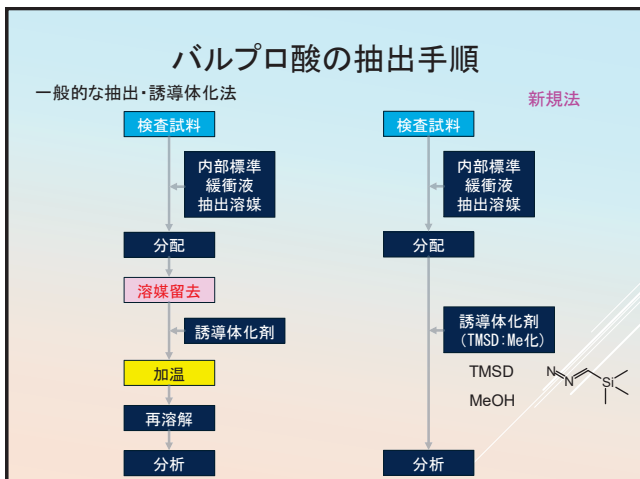
カルボン酸の誘導体化

シリル化	トリメチルシリル化剤	
エステル化	酸・アルコール N,N-ジメチルホルムアミド ジメチルアセタール ジアゾメタン オンカラムメチル化剤	HCl-MeOHまたはBF ₃ -MeOH Tetramethylammonium (TMAH)

https://www.tcichemicals.com/assets/brochure-pdfs/Brochure_A1104_J.pdf

シリル化: 水分や加温が反応に大きく影響する。

ジアゾメタンは最も一般的なメチルエステル化剤として古くから知られている。ジアゾメタンは、黄色の非常に有毒な爆発性のガス体である。従ってその取扱いにはドラフト中または通風の良い場所で細心の注意を要する。製造の際、先端がとがっていたり、表面の粗いガラス面に接触させると爆発の恐れがある。その為、通常のスリ合せジョイントは使用できない。



TMS化でのバリデーション

Recovery and Intra-day Precision for Analysis of Valproic Acid

Blood (μg/mL)	recovery(%)	CV(%)	Urine (μg/mL)	recovery(%)	CV(%)
5	99	5.8	5	86	3.9
50	98	3.8	50	101	3.4

Quantitation Limit and Linearity of the Method

Sample	detection limit (μg/mL)	range of linearity (μg/mL)	Corrlation Coefficient
Blood	1.0	10-150	0.999
Urine	1.0	10-150	0.999

メチル化によるバルプロ酸のGCMS分析

血液(or 尿) 0.1mL
2-Ethylhexanoic acid (1mg/mL) 10μL
HCl (0.05M) 0.9mL
Methyl *tert*-butyl ether (MTBE) 0.5mL

MeOH TMSDM 50μL 10μL

MTBE 0.4mL

Centrifugation (13,400 rpm, 5 min)

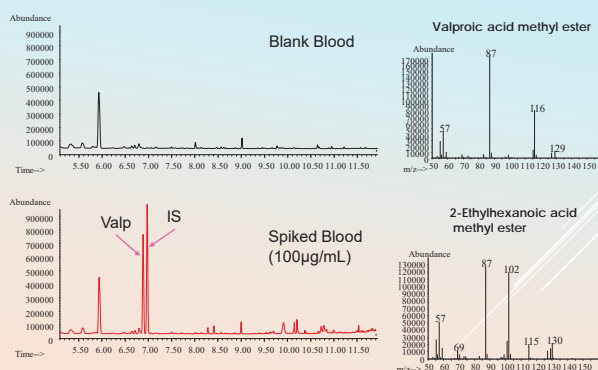
バルプロ酸

2-エチルヘキサン酸

GCMS Analysis

Column: HP-1MS (30m × 0.25mmID, 0.25 μm)
Oven temp.: 50°C (hold 2 min) ~ 150°C (15°C/min) ~ 280°C (40°C/min)
Carrier gas: Helium
Flow rate: 1.0mL/min
Scan range: m/z 50-300

メチル化GCMS分析で得られたクロマトグラム



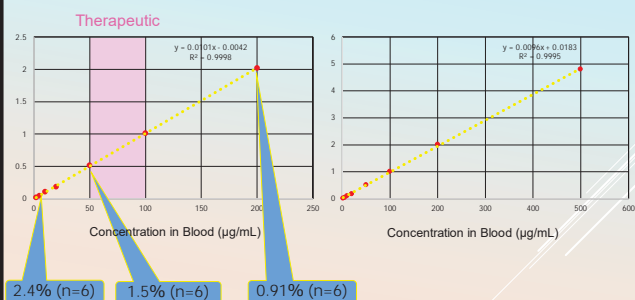
メチル化でのバリデーション

	Intra-day assay*				Inter-day assay†		
	Recovery	Accuracy	RSD	RSD(d6)	Recovery	Accuracy	RSD
Whole Blood (μg/mL)							
2.0	87.8	104.9	4.7	2.9	91.2	110.5	5.9
20	88.9	102.3	1.8	0.9	88.2	102.6	1.5
200	86.7	104.8	0.9	1.5	91.6	103.3	1.6
Urine (μg/mL)							
2.0	89.8	102.2	2.6	1.5	86.2	104.7	2.9
20	98.0	101.1	1.9	0.5	91.4	101.3	1.2
200	96.7	104.1	2.1	3.1	87.7	104.9	1.4

* Intra-day precision analysis was performed on a single day (n = 5).

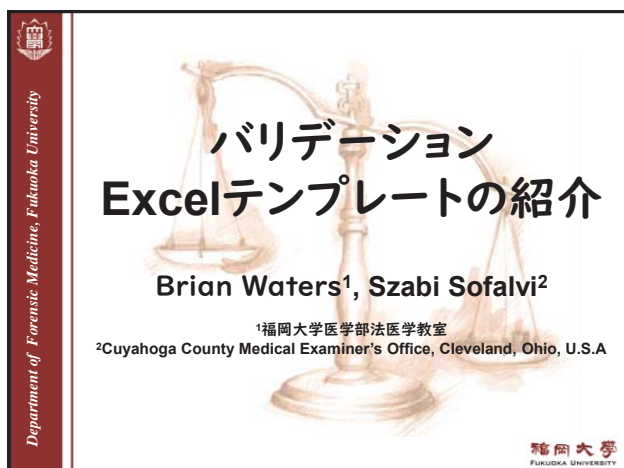
† Inter-day precision analysis was performed over three consecutive days in duplicate (n = 9).

メチル化法での検量範囲とばらつき



まとめ

- 分析に使用可能な(所有する)機器を確認する。
- 使用可能な機器で分析できる抽出法を選択する。
- バルプロ酸は揮散する恐れがあるので、濃縮乾固は避ける。
- 安価な内部標準物質を選択する。
- 研究会のメーリングリストを有効に活用する。(一人で経験できる薬物の数は限られているので、経験者のアドバイスを参考にできる)



Background

- Last year, I submitted a paper to be published in the **Journal of Chromatography B**
- The initial decision on the submission was, “... **reconsideration** of your manuscript following **major revision**.”

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Some Reviewer's Comments

- “... the method cannot be considered as **fully validated**.”
- “... it is important to note that **coefficients of determination** (r^2) are **not sufficient** to prove **linearity**.”
- “... was the calibration data **heteroscedastic**?”
- “What about the use of **weighting factors**?”
- “Was **ANOVA** used for precision calculation?”

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Selection of Calibration Model

Journal of Analytical Toxicology, 2021, 45, 772-779
doi:https://doi.org/10.1093/jat/tkab047
Advance Access Publication Date: 25 June 2021
Special Issue

Article

Procedure for the Selection and Validation of a Calibration Model I—Description and Application

Brigitte Desharmes^{1,2,*}, Félix Camirand-Lemyre³, Pascal Mireault¹, and Cameron D. Skinner²

Article

Procedure for the Selection and Validation of a Calibration Model II—Theoretical Basis

Brigitte Desharmes^{1,2,*}, Félix Camirand-Lemyre³, Pascal Mireault¹, and Cameron D. Skinner²

Introduction

Every toxicologist performing quantitative method development eventually faces the challenge of choosing a calibration model for the analyte. Most data acquisition and processing software (e.g., Agilent's ChemStation or Mass Hunter, AB Sciex's Analyst®) offer options with regards to **forcing the calibration equation through the origin**, applying a **weight** and model order (e.g., **quadratic or linear**). When only the most common weighting (**none, 1/x, 1/x²**) and model order (linear, quadratic) options are taken into account, there are six possible calibration models per analyte.

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Weighted Regression

Shimadzu GCMS Solutions

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

EZSTATSG1 (Version 1)

Journal of Analytical Toxicology, 2021, 45, 772-779
doi:https://doi.org/10.1093/jat/tkab047
Advance Access Publication Date: 25 June 2021
Special Issue

- weighted linear calibration models
- bias and precision data for the lower limit of quantitation
- quality controls
- dilution integrity and ion suppression

Special Issue

Assessment of Bioanalytical Method Validation Data Utilizing Heteroscedastic Seven-Point Linear Calibration Curves by EZSTATSG1 Customized Microsoft Excel Template

Szabolcs Sofalvi^{1,*} and Harold E. Schueler²

¹Toxicology Department, Cuyahoga County Medical Examiner's Office (CCMEO), 11001 Cedar Avenue, Cleveland, OH 44106, USA and ²School of Science, Technology, and Mathematics, Ohio Northern University, 525 South Main Street, Ada, OH 45810, USA

*Author to whom correspondence should be addressed. Email: ssosalvi@cuyahogacounty.us

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Journal of Chromatography B 1186 (2022) 123074

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jchromb

A validated method for the separation of ethyl glucoside isomers by gas chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation in human whole blood and urine

Brian Waters^{a,1,*}, Ryoko Nakano^{a,b,1}, Kenji Hara^a, Aya Matsusue^a, Masayuki Kashiwagi^a, Shin-ichi Kubo^a

^a Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan
^b Department of Anesthesiology, Faculty of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka, Japan

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Updated Version (EZSTATSG2)

A Quantum Leap in the Development of Quadratic External Calibration Models by EZSTATSG2, an Innovative Tool for ANSI/ASB Standard 036 Method Validation Using Microsoft Excel

Szabolcs Sofalvi^{1,*}, Harold E. Schueler² and Jocelyn V. Abonamah³

¹Cuyahoga County Medical Examiner's Office (CCMEO), Toxicology Department, 11001 Cedar Avenue, Cleveland, Ohio 44106, USA. ²The School of Science, Technology, and Mathematics, Ohio Northern University, 525 South Main Street, Ada, Ohio 45810, USA. ³Office of the Chief Medical Examiner, District of Columbia, 401 E St SW, Washington, DC 20024, USA

*Author to whom correspondence should be addressed. Email: ssofalvi@cuyahogacounty.us

EZSTATSG2 (Version 2)

Special Issue

- flexible five-, six- or seven-point calibration
- six weighted quadratic calibration models
- a processed sample stability function
- implementation of Visual Basic for Applications (VBA) in Excel UserForms for easier data entry

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University

EZSTATSG2

Will be available for download from the
 法医中毒研究会 home page:

- The EZSTATSG2 Excel template
- A PDF version of the preprint article
- An Excel file of an example sequence used for validation analysis

Department of Forensic Medicine, Faculty of Medicine, Fukuoka University