

第 7 回法医中毒研究会セミナー

剖検試料（血液、尿）の GC/MS、LC/MS/MS を用いた 定量法の実際

目次

第 7 回法医中毒研究会セミナー開催にあたって	2
プログラム	3
セミナー 1. 内部標準法による定量法	5
佐々木 千寿子 先生 (北里大学医学部法医学)	
セミナー 2. 標準添加法による定量法 -剖検試料での測定と評価-	24
長谷川 弘太郎 先生 (浜松医科大学法医学講座)	

平成 30 年 3 月 16 日

法医中毒研究会会長 久保 真一

第 7 回法医中毒研究会セミナー開催にあたって

法医中毒研究会では、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、セミナーを定期的に開催しております。

第 7 回法医中毒研究会セミナーは、世話を岩手医大の新津先生にお願いし、テーマを「剖検試料（血液、尿）の GC/MS、LC/MS/MS を用いた定量法の実際」として具体例を交えて講演していただきます。

具体的な定量法についてどのように行われているか、やられている先生には常識のことでも、経験のない先生にもわかりやすいように具体的に紹介していただきます。鑑定を始めて間もない先生の中には定量をしているが、このやり方でよいのか、上手くいかない場合の改善点、他の大学ではどのように定量を行っているのか等々、知りたいことも多いでしょう。標準添加法については経験のない先生もおられますし、経験豊富な先生方には、それらに関して後進の先生にも共有してもらいたいと思っておられることと思います。

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。また、今後は分析精度管理を推進していきたいと考えております。休憩時間もあり余裕を持たせましたので、この機会に、会員相互の交流、情報交換もしていただければと思います。

第7回法医中毒研究会セミナープログラム

「剖検試料（血液、尿）のGC/MS、LC/MS/MSを用いた定量法の実際」

日 時： 平成30年3月16日（金）

13:30～16:30頃

会 場：アジレント・テクノロジー株式会社

東京芝浦オフィス 8階セミナールーム

東京都港区芝浦4-16-36 住友芝浦ビル

開会の挨拶 (13:30～13:40)

法医中毒研究会会长 久保 真一 先生（福岡大学）

セミナー

座長 斎藤 剛 先生（東海大学）

1. 内部標準法による定量法 (13:40～14:40)

佐々木 千寿子 先生（北里大学）

質疑応答 (14:40～14:55)

休憩 14:55～15:15

2. 標準添加法による定量法 (15:15～16:15)

長谷川 弘太郎 先生（浜松医科大学）

質疑応答 (16:15～16:30)

お知らせ、その他 16:30~

情報交換会 (17:30~)

おやつとさあ 田町店

東京都 港区 芝浦 3-7-9 サニープレイス田町ビルディング 1F

TEL 03-5765-6270

セミナー会場から徒歩 10 分程度、JR 田町駅から徒歩 3 分

矢印付近です。



第7回法医中毒研究会セミナー

内部標準法による定量法

北里大学医学部法医学
佐々木 千寿子

第7回法医中毒研究会セミナー

GC-MSにおける内部標準法について

- 内部標準法とは
- 定量検査の手順
- 定量検査の注意点
- 法医学検体と内部標準法



当教室における薬物分析の現状

検案・解剖時

- トライエージ · インスタントビュー
- アルコール(GC-FID, GC-2014, SHIMADZU)
- CO-Hb(分光光度計, UVmini1240, SHIMADZU)
- その他簡易検査

スクリーニング

- GC-MS(NAGINATA) (7890A GC, 5975C MSD, Agilent)
- LC-MSMS(1290Infinity, 6460Triple Quad LC/MS, Agilent)

確認検査

- GC-MS (Scan)
- LC-MSMS (Product ion scan)



定量検査

- GC-MS (SIM)
- LC-MSMS (MRM)



薬毒物分析の流れ

GC-MS or LC-MSスクリーニング

➢ 化合物名および半定量値

確 認 検 査

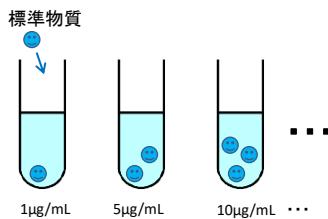
➢ 標準物質を用いて保持時間とマススペクトルを確認
➢ スクリーニングと別な方法で行うのが望ましい

定 量 検 査

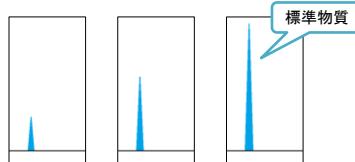
- 絶対検量線法
- 内部標準法
- 標準添加法



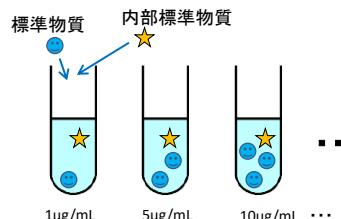
絶対検量線法



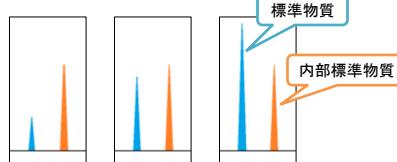
抽出・測定



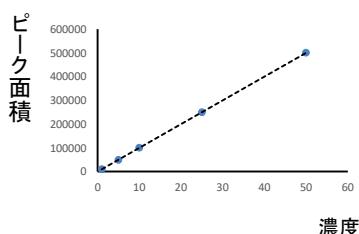
内部標準法



抽出・測定

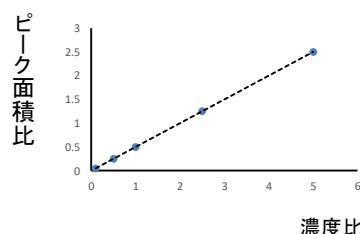


絶対検量線法



目的化合物のピーケ面積を用いて定量する

内部標準法



目的化合物と内部標準物質のピーケ面積比を用いて定量する



GC-MSで誤差が出やすい箇所

- ・前処理中のロス
- ・注入量の変化(溶媒の揮発など)
- ・装置の感度変化

絶対検量線法

全ての過程を厳密に一定条件に
保たなければならぬ

内部標準法

内部標準物質で補正できる



薬毒物検査例

【症 例】

70歳男性.

自宅の布団上で仰向けで倒れているのを発見された.

病歴:高血圧, 糖尿病, うつ病

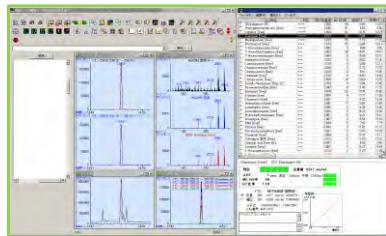
トライエージ BZO陽性

血液中からアルコールは検出されない

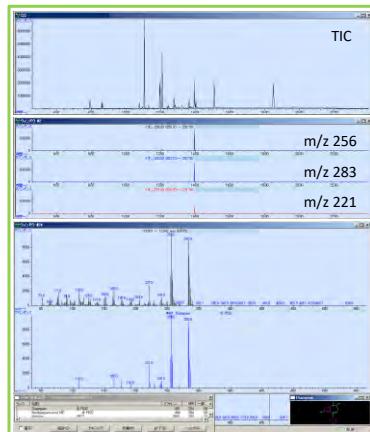


薬毒物検査例

GC-MS および LC-MSスクリーニング



NAGINATAスクリーニングにて
ジアゼパム陽性
(相対定量値: 3.517μg/mL)

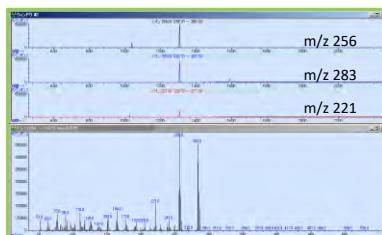


薬毒物検査例

確認検査



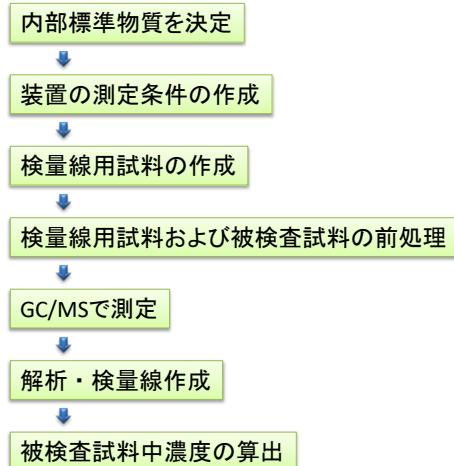
ジアゼパム標準溶液



被検査試料



定量分析の手順



内部標準物質 (I.S.)

Internal Standard

- ① 目的化合物と化学的・物理的性質が類似し、同じ挙動を示す。
- ② 目的化合物や夾雜物とピークが分離される。
- ③ 被検査試料に含まれていない。
- ④ 化学的に安定である。
- ⑤ 安定供給される、入手しやすい価格である。



内部標準物質(I.S.)

① 目的化合物と化学的・物理的性質が類似し、同じ挙動を示す

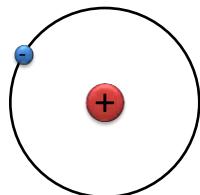
- 抽出時のロスの仕方が同じ
- 保持時間が近い

構造が類似している → **重水素体(D体)がベスト**

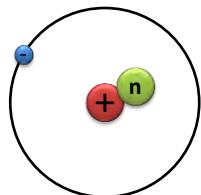


重水素体(D体)

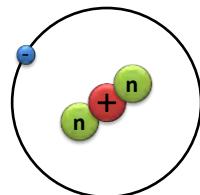
水素(H)



重水素(D)



三重水素(T)



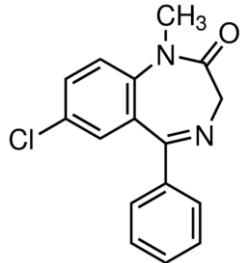
陽子

電子

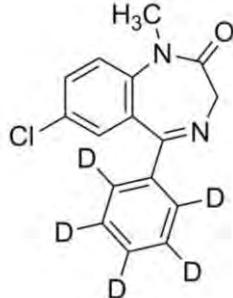
中性子



重水素体(D体)



ジアゼパム
 $C_{16}H_{13}ClN_2O$
分子量 284.74



ジアゼパム-d₅
 $C_{16}D_5H_8ClN_2O$
 分子量 289.77

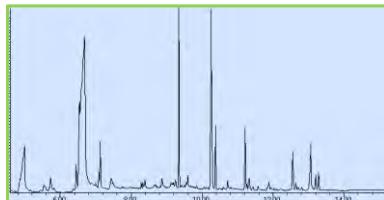
内部標準物質の使用例

- ・ ベンゾジアゼピン系 → ジアゼパム-d₅
フルニトラゼパム-d₇
アルプラゾラム-d₅
 - ・ バルビツール酸系 → フェノバルビタール-d₅(環上)
 - ・ メタンフェタミン → メタンフェタミン-d₄
3-フェニルプロピルアミン

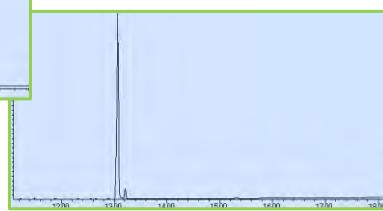
ScanとSIM

装置の測定条件の作成

法医学検体は夾雑物を多く含む → **SIM**の使用



Scan

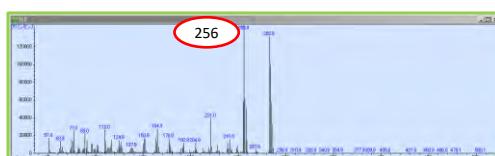


質量数を選択して測定
➤ 高選択性
➤ 高感度



薬毒物検査例

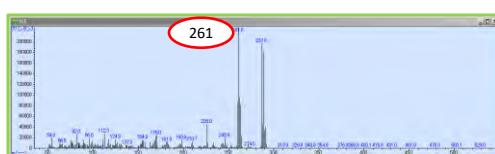
装置の測定条件の作成



ジアゼパム

イオンの選び方

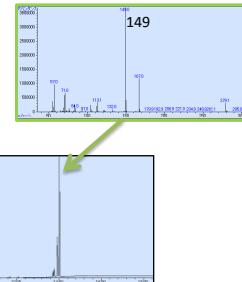
- 強度が大きい
- 化合物に特徴的
- 高質量側

ジアゼパム-d₅

SIMで用いないほうがよいイオン

(m/z)

- 57 (アルカン)
- 73 (TMS誘導体)
- 74 (脂肪酸エステル)
- 91 (アルキルベンゼン)
- 105 (ベンゼンカルボン酸)
- 149 (フタル酸エステル)
- 207, 281 (シリコン／シロキサン)
- 169 (フォアラインポンプオイル)



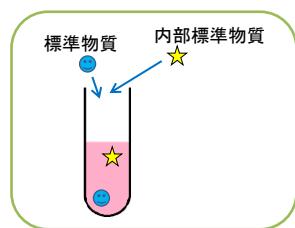
7890GC/5975MSDオペレーション基礎トレーニングテキスト(Agilent Technologies)より



薬毒物検査例

検量線用試料の作成

- ・ 標準品を各濃度に調製し、ブランクマトリックスに添加する
- ・ レベルは6点以上、n=2
- ・ 検量線範囲：予想される濃度をはさむ（相対定量値を参考に）
- ・ 被検体濃度が高値と予想されるとき
→装置の得意な濃度範囲で検量線を作成し、被検体を希釈する



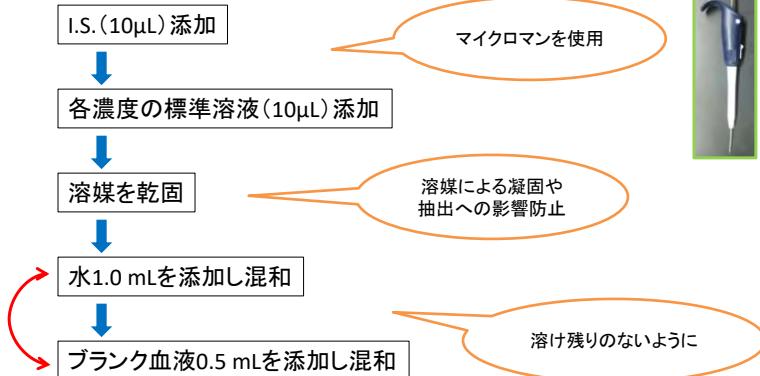
L.S/I.R	血液中濃度 $\mu\text{g}/\text{mL} \approx \mu\text{g}/\text{dL}$	標準液濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						I.S. $\mu\text{g}/\text{mL}$
		0.5	0.25	0.05	0.025	0.0125		
1	0.05 $\mu\text{g}/\text{mL} \approx 0.05 \mu\text{g}/\text{dL}$						10 μL	10 μL
2	0.1 $\mu\text{g}/\text{mL} \approx 0.1 \mu\text{g}/\text{dL}$						10 μL	10 μL
3	0.5 $\mu\text{g}/\text{mL} \approx 0.5 \mu\text{g}/\text{dL}$						10 μL	10 μL
4	1.0 $\mu\text{g}/\text{mL} \approx 1.0 \mu\text{g}/\text{dL}$						10 μL	10 μL
5	5.0 $\mu\text{g}/\text{mL} \approx 5.0 \mu\text{g}/\text{dL}$						10 μL	10 μL
6	10.0 $\mu\text{g}/\text{mL} \approx 10.0 \mu\text{g}/\text{dL}$						10 μL	10 μL



薬毒物検査例

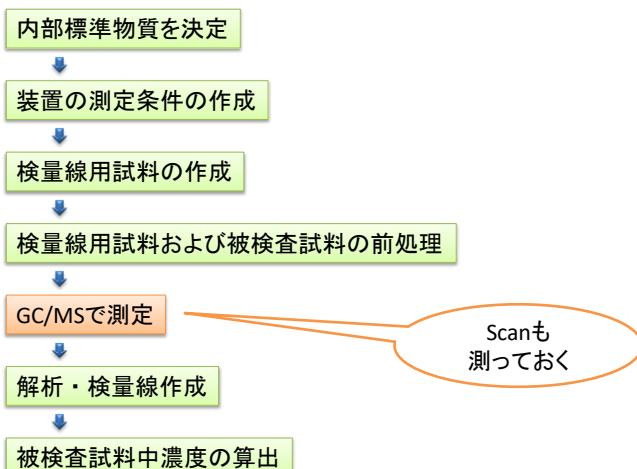
検量線用試料の作成 実際に行った手順は……

[全血0.5 mL + 水1.0 mL] を用いる場合



北里大学
KITA-SEI UNIVERSITY

定量分析の手順

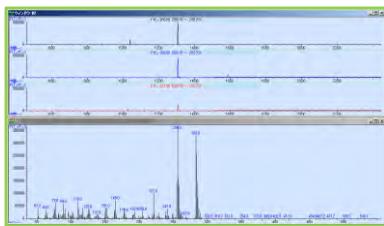


北里大学
KITA-SEI UNIVERSITY

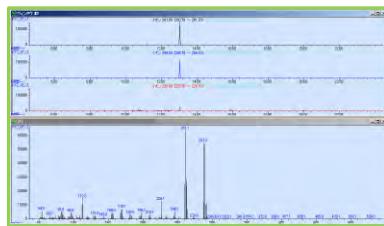
薬毒物検査例

解析・検量線作成

Scan測定データであらためて保持時間とマススペクトルを確認



ジアゼパム

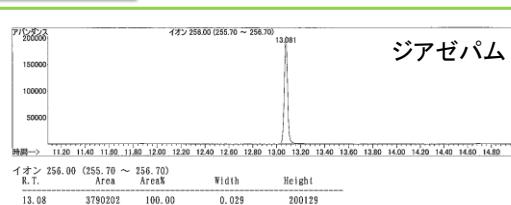


I.S.

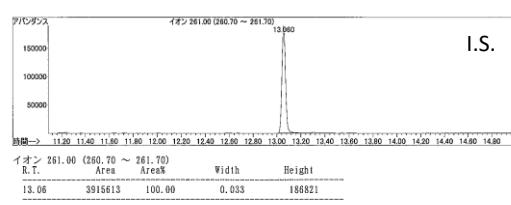


薬毒物検査例

解析・検量線作成



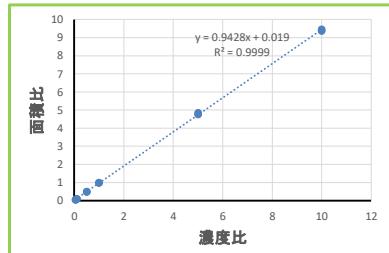
ジアゼパム



薬毒物検査例

解析・検量線作成

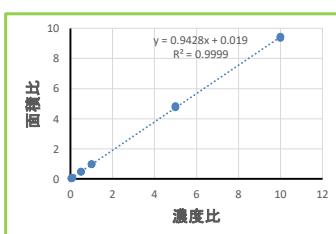
血液中濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	ピーク面積		面積比 Diazepam / IS
	Diazepam (m/z 256)	IS (m/z 261)	
0.05	178901	3573036	0.050349619
0.05	185108	3872206	0.047804275
0.1	315303	3495940	0.090191193
0.1	337196	3828952	0.088064828
0.5	1814661	3792454	0.478492554
0.5	1710104	3480828	0.491292302
1	3790202	3915613	0.987971554
1	4122345	4163108	0.990208517
5	21148434	4452856	4.749408919
5	22839999	4719738	4.839251458
10	44692791	4768112	9.373267868
10	45036203	4761868	9.457673657



薬毒物検査例

被検査試料中濃度の算出

	ピーク面積		面積比 Diazepam / IS	検量線計算値 $y=0.9428x + 0.019$	平均
	Diazepam (m/z 256)	IS (m/z 261)			
被検体-1	10473987	3545631	2.954054441	3.113125202	3.09750656
被検体-2	11272880	3854498	2.92460393	3.081887919	

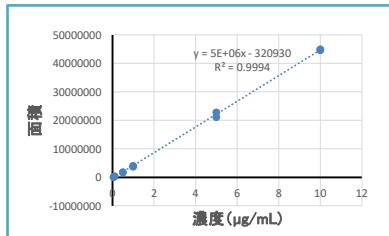


死亡者の血液中ジアゼパム濃度は
3.1 $\mu\text{g/mL}$ であった。



I.S.補正なしで計算してみると……

血液中濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	ピーク面積 Diazepam (m/z 258)
0.05	179901
0.05	185108
0.1	315303
0.1	337196
0.5	1814661
0.5	1710104
1	3790202
1	4122345
5	21148434
5	22839999
10	44692791
10	45036203



	ピーク面積 Diazepam (m/z 258)	検量線計算値 $y=5E+06x - 320930$	平均
被検体-1	10473987	2.1589834	2.2388727
被検体-2	11272880	2.318762	

→ 2.2 $\mu\text{g/mL}$



定量検査の注意点

試料作製

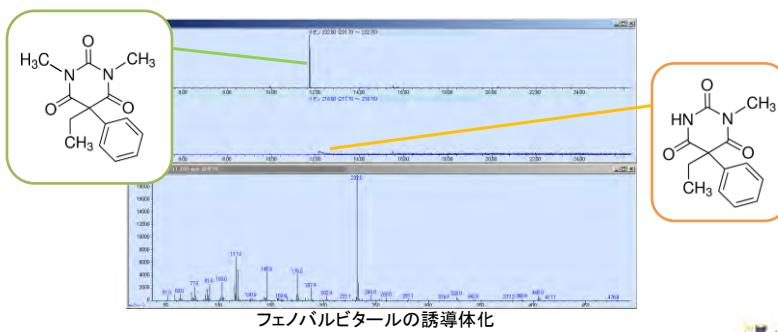
- 正しい量を採取できているか？



定量検査の注意点

前処理

- GC-MSの抽出操作課程はLC-MSと比べて多い
= 誤差が出やすい
- 誘導体化は完全にされているか？

北里大学
KITA-SEI UNIVERSITY

定量検査の注意点

注入順	ピーク面積		内部標準のピーク面積 (m/z 261)
	血液中濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	Diazepam (m/z 256)	
0.05	179901	3573036	小
0.05	185108	3872206	
0.1	315303	3495940	
0.1	337196	3828952	
0.5	1814661	3792454	
0.5	1710104	3480828	
1	3790202	3915613	
1	4122345	4163108	
5	21148434	4452856	
5	22839999	4719738	
10	44692791	4768112	
10	45036203	4761869	大

キャリーオーバー？？
化合物によるマトリックス効果？？
溶媒揮発？？

ブランク血液で
確認を

北里大学
KITA-SEI UNIVERSITY

定量検査の注意点

最終溶媒の揮発

I.S.で補正できる

- GC/MSに注入するためには、

最終溶媒は揮発性が高いものでなければならない



溶媒揮発による誤差

- メタノール
- 酢酸エチル
- アセトン
- など....

後々検証するために、注入順をノートに書いておく



定量検査の注意点

注入量の誤差

I.S.で補正できる・
気づける

注入量は正しいか？

- サンプルの粘性
▶ プランジャー速度の検討
- マイクロシリンジの固着
- 採取時のニードルの深さ



(大抵、人為的ミス)



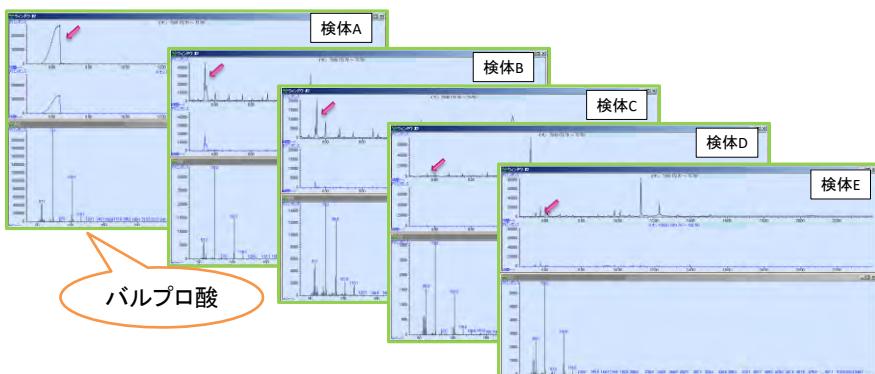
定量検査の注意点

装置の状態

- ・汚れによる感度低下
- ・キャリーオーバー



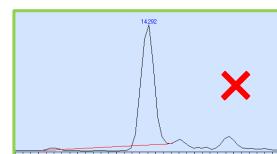
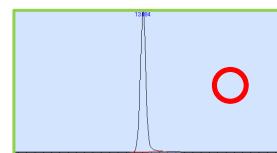
例) 注入口ライナーの汚れ

北里大学
KITA-SEI UNIVERSITY

定量検査の注意点

自動積分

- ・目的化合物のピークであるか?
➤保持時間の確認
- ・自動積分の面積値は正しいか?
- ・クロマトグラムの形状は?
➤全データのクロマトグラムを確認

北里大学
KITA-SEI UNIVERSITY

定量検査の注意点

マトリックス効果

- ・ 被検査試料にあわせたマトリックスを使用する
- ・ 被検査試料が高濃度の際は
水で希釈か？
ブランクマトリックスで希釈か？



法医学検体と内部標準法

内部標準法の
短所

- ・ 法医学検体は様々……
- ・ 適切なブランクマトリックスが得られなければ、内部標準法は使えない
 - 実質、適応可能なのは血液と尿
 - 血液の性状も様々(粘性の違い、軟凝血、腐敗)
- ・ 腐敗検体、臓器などは標準添加法の検討を



内部標準物質添加の意義

誤差が出る箇所

- 検量線用試料調製
- 抽出時
- 最終溶媒の揮発
- 注入量
- イオン化
など……

I.S.添加により、

- 補正できる
- 不具合に気付くことが出来る

標準添加法による定量法

-剖検試料での測定と評価-

浜松医科大学 法医学講座
長谷川 弘太郎

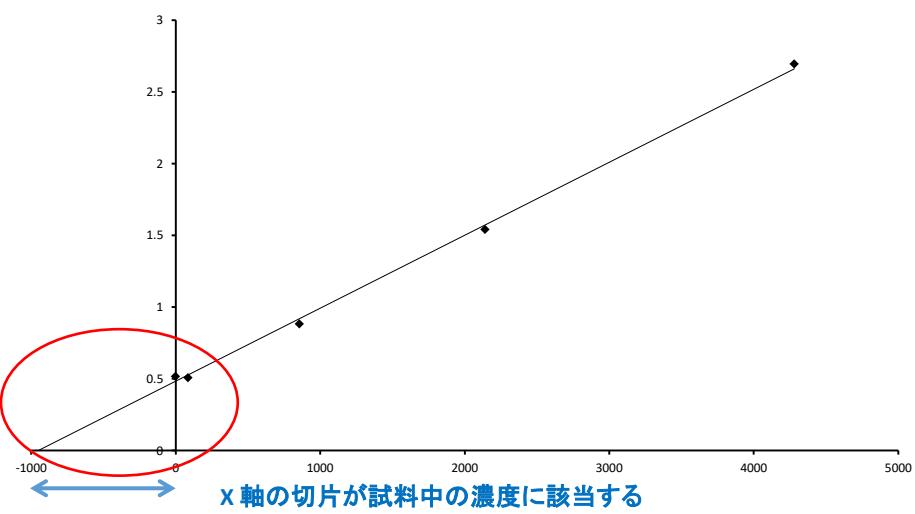
本日の紹介内容

- ・当講座での標準添加検量線の作成方法**
- ・マトリックス効果と回収率の評価方法**
- ・論文報告を目指したバリデーションの評価**

試料中の物質の主な定量方法

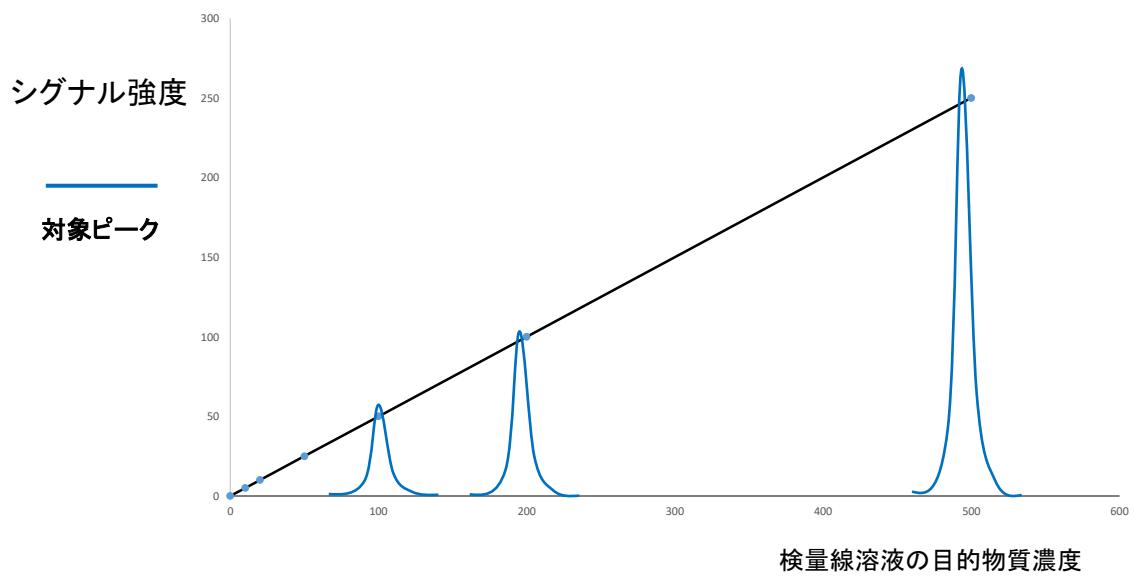
- ・外部標準法(検量線法)
- ・内部標準法
- ・標準添加法

標準添加法での典型的な検量線



各定量方法の特徴と、標準添加法の利点

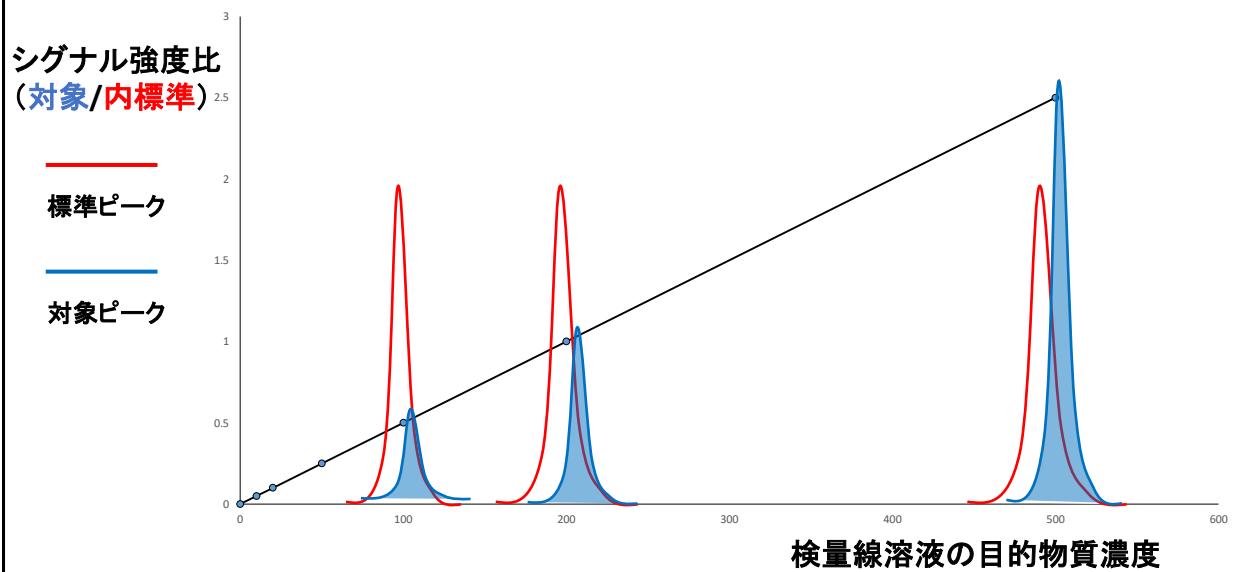
・外部標準法(検量線法)



・外部標準法(検量線法)

- ・標準試料で検量線を作成し、未知試料を定量する方法である
- ・検量線が直線であり、原点を通るのが前提である
- ・分析試料の組成が比較的よくわかっている場合に用いられる
- ・操作手技や溶媒の揮発等による影響を受けやすい

・内部標準法

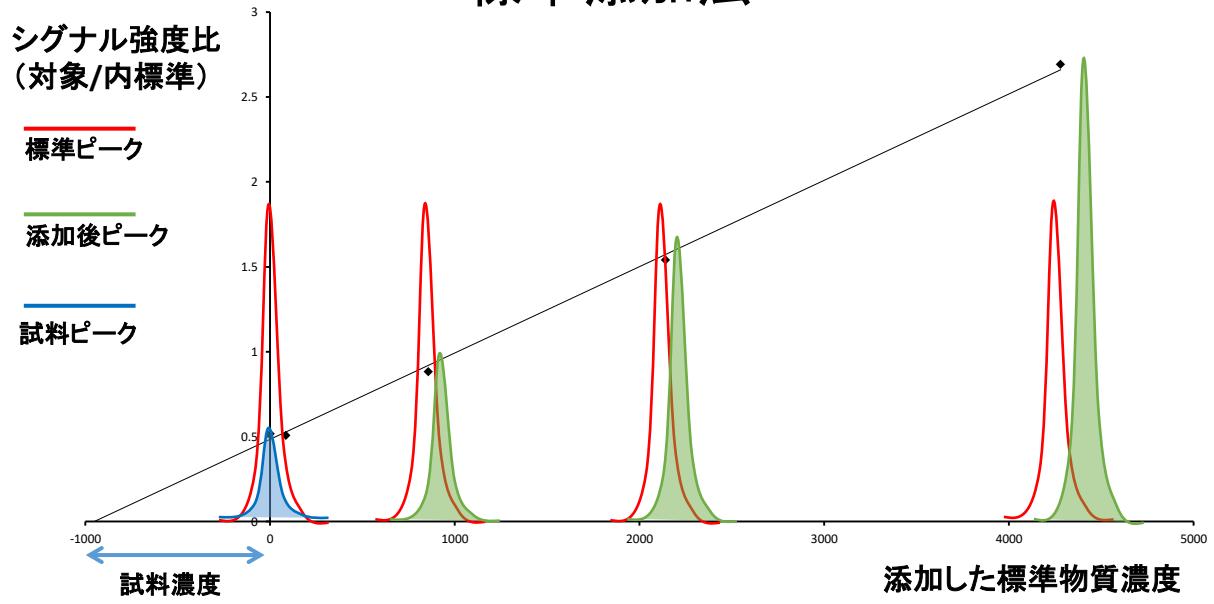


・内部標準法

- ・標準試料での検量線作成の際に内部標準物質を一定量添加し、(濃度vsピーク面積比)で検量線を作成する方法である
- ・測定値のばらつきが相殺されやすい
- ・適切な条件を選べば再現性がよく、測定精度が高くなる

→ 法中毒学領域でも頻用される定量法である。

・標準添加法



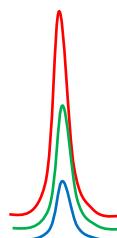
・標準添加法

- ・試料溶液に異なる既知量の標準物質を添加して系列を作り、検量線を作成する方法である
- ・**共存成分が複雑な場合に、その影響を除くことができる**
- ・**試料溶液の作成にあたり、ブランク試料を必要としない**

→法医学領域での物質定量に適している

・法医学領域での標準添加法の利点

- ・法医学領域では、試料中の共存成分が特に多様・複雑である
 - …採取臓器や試料採取部位の違い、腐敗の影響など
- 共存成分による影響(マトリックス効果)を除く事ができる**
- ・**Matrix effect**
signal enhancement
 - ・**signal suppression**



例) Matrix effects and Recovery rates in α -PBP poisoning case

Specimen	Matrix effect (%)	Recovery (%)
Right heart blood	92.5 ± 3.62	96.7 ± 4.02
Left heart blood	87.6 ± 6.24	92.2 ± 6.84
Femoral vein blood	93.6 ± 4.89	97.4 ± 5.76
Cerebrospinal fluid	96.4 ± 8.82	91.2 ± 7.46
Urine	98.2 ± 3.28	99.3 ± 6.48
Stomach contents	84.2 ± 7.86	93.8 ± 6.24
Lung	47.9 ± 5.74	85.4 ± 14.2
Liver	103 ± 5.29	97.2 ± 3.11
Kidney	39.7 ± 3.97	89.6 ± 10.2
Pancreas	49.9 ± 4.86	83.0 ± 7.64
Spleen	63.8 ± 7.87	97.8 ± 10.2

A. Wurita et al. Leg Med 16 (2014) 241-246

→ 臓器により、マトリックス効果は大きく異なる

・法医学領域での標準添加法の利点

・検量線作成のためのブランク試料の入手は、ときに困難である

…特に人体試料では、目的外使用での倫理審査、承諾など

…ブランク試料の用意が極めて困難な場合 (ex. ethylene glycol)

→標準添加法では分析対象試料のみがあればよい

…試料の目的外使用に当たらない(鑑定資料の分析として)、と理解

例) グリコール類の健康成人血中・純水中濃度

Subject no.	Concentration (ng/ml)		
	Ethylene glycol	Propylene glycol	Diethylene glycol
3	97.0	360	8.36
4	89.0	151	11.3
5	45.6	689	8.08
6	64.4	147	22.9
7	86.9	60.8	10.8
8	39.1	49.1	8.40
9	59.9	49.3	9.08
10	45.6	49.1	8.48
11	59.2	70.7	13.0
12	52.3	182	10.2
Mean ± SD	64.0 ± 20.3	181 ± 203	11.1 ± 4.56
Tap water	107	26.1	46.0
Milli-Q water	42.5	13.0	21.6
Evian water	53.4	19.0	41.8

A. Wurita et al. Forensic Toxicol 31(2013) 272-280

・標準添加法のデメリット(所感)

- ・試料毎に異なる既知量の標準物質を添加して系列を作り、検量線を作成する必要がある
- ・1個の定量値を得るために、複数回の測定が必要である
- ・測定回数が多くなるため、用いる試料の量が多くなる

→ 手間・時間・多量の試料を要するため、スクリーニングに不向き

当講座での標準添加法の紹介

標準添加法を用いる際の前提

- ・検量線が比例直線となる(定量対象範囲で)
- ・標準溶液の検量線は原点を通る

・当講座での標準添加法の紹介

- ・検量線の作成方法
- ・マトリックス効果と回収率の評価方法
- ・論文投稿を目指したバリデーションの評価

・当講座での標準添加法の紹介

- ・検量線の作成方法
- ・マトリックス効果と回収率の評価方法
- ・論文投稿を目指したバリデーションの評価方法

当講座での標準添加法での検量線作成

- ・5～6点検量線を作成する(無添加サンプル含む)
 - 内部標準物質(internal standard)を用いて検量線を作成する
 - coefficient correlation value; $r > 0.99$ を目指す

5～6点検量線を作成する(無添加サンプル含む)

- ・まずは、測定対象物質の濃度を大まかに測定する
 - … スクリーニング定量結果の利用(NAGINATAなど)
 - … 既知濃度の標準溶液とのシグナル強度の比較

5~6点検量線を作成する(無添加サンプル含む)

- ・測定対象の濃度を挟み込むように、4~5種類の異なった濃度の標準物質の溶液系列を作成する

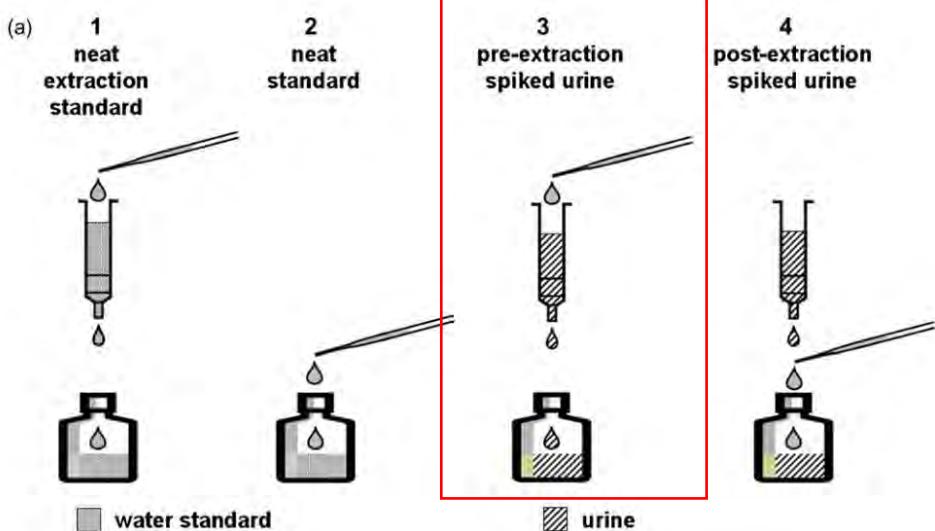
(ex. 10, 50, 100, 500, 1000, 2000. 1, 2, 5, 10, 20, 50.)

・参考

検量線法では、検量線範囲は測定対象濃度が検量線の中央部付近に来るのが理想的(不確かさが同程度の場合)

→ 試料に添加後、抽出を行う (pre-extraction spiked sample)

例)



Neat extraction standard, neat standard, pre- and post- extraction spiked standard の概念図 (SPE)

Ivano Marchi et al. J Pharm Biomed Anal 49 (2009) 459–467 より抜粋

α -PBP concentrations in various specimens

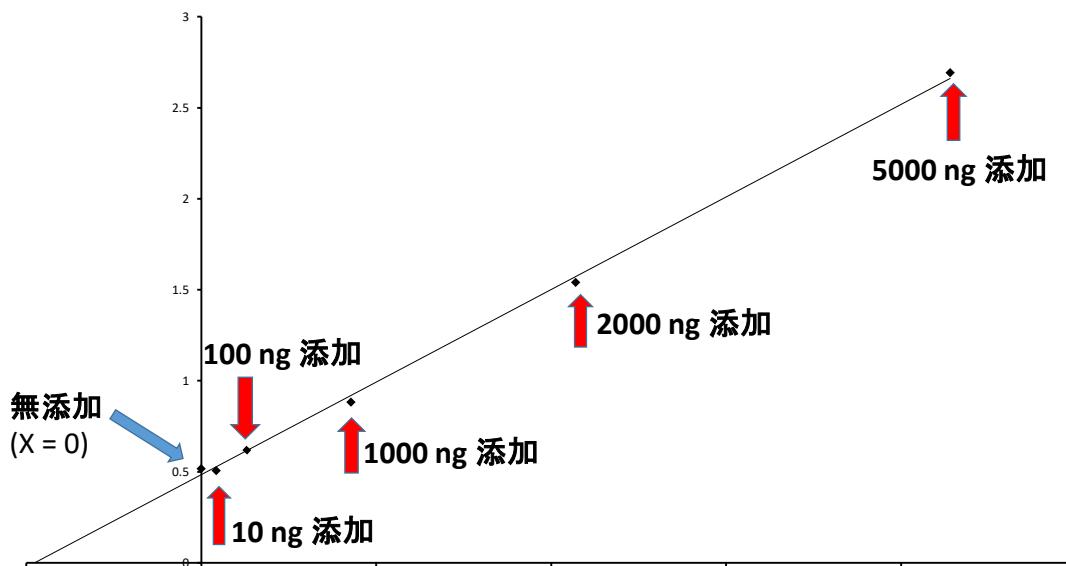
A. Wurita et al. Leg Med 16 (2014) 241-

246

Specimen	Concentration (ng/ml or g)
Right heart blood	51.7 ± 2.71
Left heart blood	68.3 ± 3.21
Femoral vein blood	55.2 ± 2.93
Cerebrospinal fluid	41.4 ± 2.03
Urine	906 ± 40.6
Stomach contents	725 ± 34.7
Lung	125 ± 20.9
Liver	82.6 ± 5.20
Kidney	140 ± 16.0
Pancreas	106 ± 8.90
Spleen	121 ± 7.10

→ 標準溶液系列は10, 100, 1000, 2000, 5000 ng/mL で作成

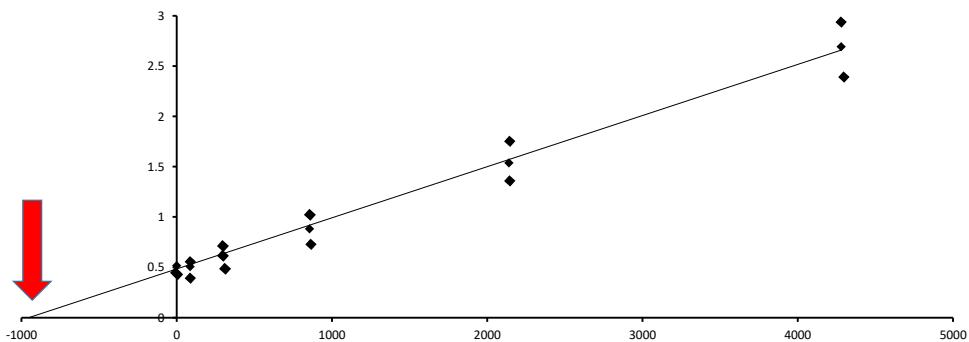
5~6点検量線を作成する(無添加サンプル含む)



5~6点検量線を作成する(無添加サンプル含む)

・各点について $n = 3 \sim 5$ が理想的であるが…

→一つの定量値を得るのに、15~18回以上測定はあまりにも大変



5~6点検量線を作成する(無添加サンプル含む)

各点1点検量線でも、直線性が保たれていれば許容できるものとした

そこで、

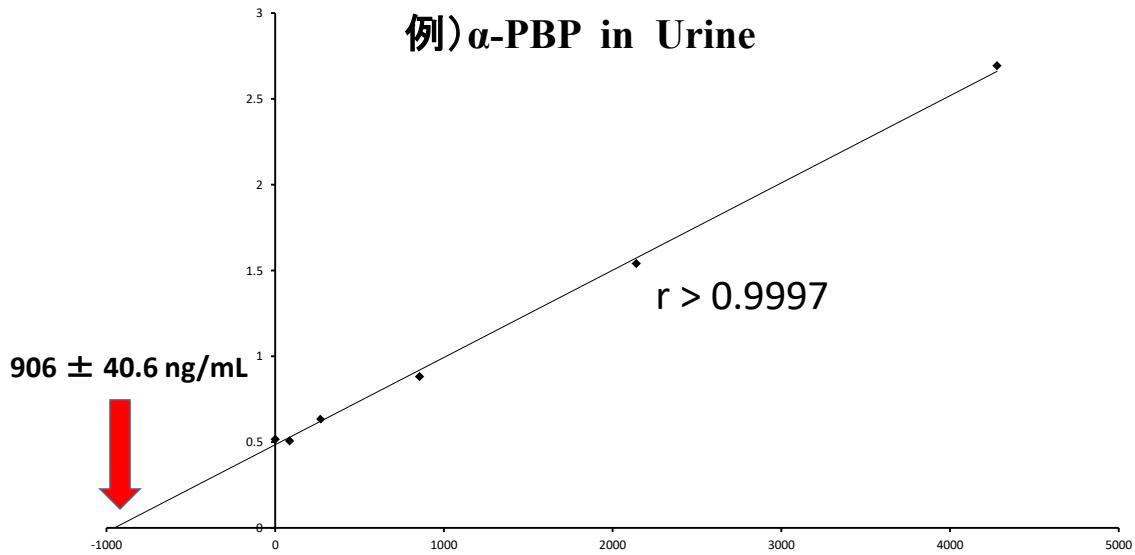
各測定間でのばらつきを抑えるため、

→ 内部標準物質(internal standard)を用いる(→内部標準法)

直線性の評価のためには、

→ coefficient correlation value; $r > 0.99$ を目指す

標準添加検量線から濃度を読み取る(マイナス値として現れる)



ここで…

添加検量線が評価範囲内で直線であるということは、すなわち

・添加後溶液の各濃度で、Process Efficiency はほぼ一定とみなせる

※ Process Efficiency = (Matrix Effect) * (Recovery Rate)

→各濃度でMatrix Effect と Recovery Rateはほぼ一定とみなせる

Matrix Effect と Recovery Rate の 値を評価する際に重要な

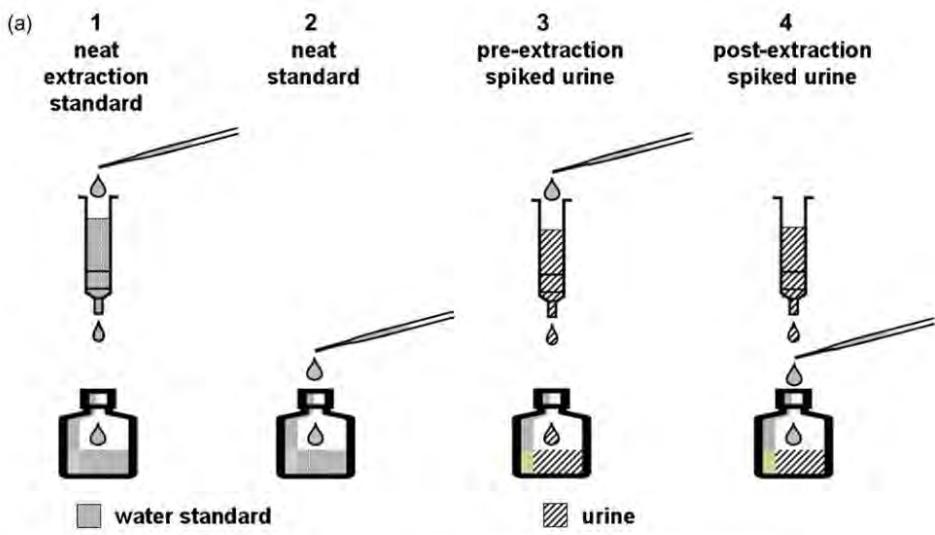
・当講座での標準添加法の紹介

- ・検量線の作成方法
- ・マトリックス効果と回収率の評価方法
- ・論文投稿を目指したバリデーションの評価方法

各指標の定義

- ・ Neat Extraction Standard = A
- ・ Neat Standard (STD solvent) = B
- ・ Pre-Extraction Spiked Standard = C
- ・ Post-Extraction Spiked Standard = D

- | | |
|---------------------------------|-------|
| ・ Process Efficiency | = C/B |
| ・ Matrix Effect (on system) | = D/B |
| ・ Recovery Rate (on extraction) | = C/D |
| ・ Extraction Yield | = A/B |



Neat extraction standard, neat standard, pre- and post- extraction spiked standard の概念図 (SPE)

Ivano Marchi et al. J Pharm Biomed Anal 49 (2009) 459–467 より抜粋

- Neat Extraction Standard = A
- Neat Standard (STD solvent) = B
- Pre-Extraction Spiked Standard = C
- Post-Extraction Spiked Standard = D } ブランク試料溶液が準備できない！

- Process Efficiency = C/B } 評価できない？
- Matrix Effect (on system) = D/B } → 工夫する必要がある
- Recovery Rate (on extraction) = C/D

- Extraction Yield = A/B

先程のスライドで触れた、検量線の直線性が重要になってくる

添加検量線が評価範囲内で直線であること

すなわち

添加後溶液の各濃度で、Process Efficiency はほぼ一定とみなせる

※ Process Efficiency = (Matrix Effect) * (Recovery Rate)

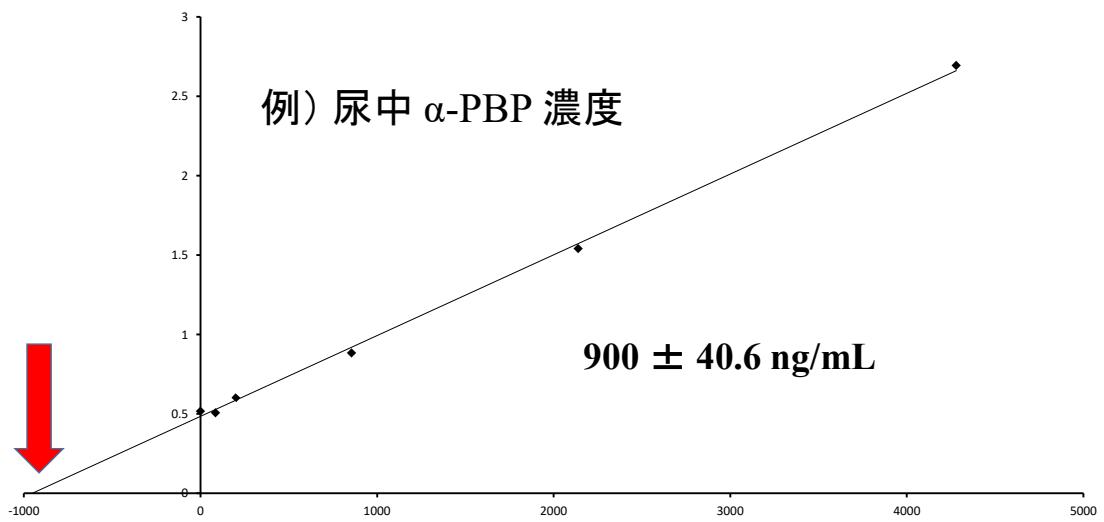
→各濃度でMatrix Effect と Recovery Rateはほぼ一定とみなせる

当講座でのMatrix Effect と Recovery Rateの評価方法 (標準添加法)

- Extracted Sample = ① (評価対象の試料)
 - Post-Extraction Spiked Sample = ② (①の2倍濃度になるよう添加)
 - Reference Standard(neat standard) = ③ (① と同濃度の溶液)
-
- Recovery Rate = ① / (②-①)
 - Matrix Effect = (②-①) / ③
 - Process Efficiency = ① / ③

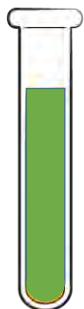
具体例

試料中の対象物質の定量分析を行い、濃度を算出する



同じ試料に対して、1セット(2検体)抽出を行う

例) 尿試料 1 mL × 2 を抽出



900 ng/mL相当

Extracted Sample = ①



900 ng/mL相当

Extracted Sample = ①

一方の検体に、対象物質を添加して測定試料の2倍濃度相当とする
(標準添加法で求めた試料濃度相当量を添加する)

例) 尿試料 1 mL × 2 を抽出の場合



900 ng/mL相当

Extracted Sample = ①



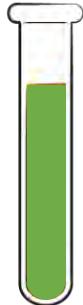
900 ng(絶対量)添加

900 ng/mL相当+900 ng (①の2倍相当)

Post-Extraction Spiked Sample = ②

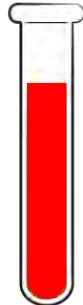
標準添加法で求めた対象試料濃度の標準溶液を用意する(計3本)

例) α -PBP in ACN



900 ng/mL相当
Extracted Sample

①



900 ng/mL相当+900 ng
Post-Extraction Spiked Sample

②



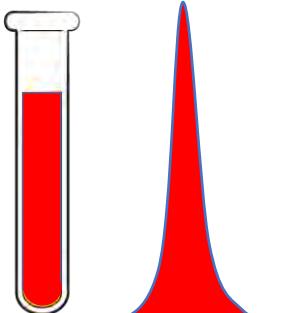
900 ng/mL
Reference Standard Solution = ③

各溶液のシグナル強度(エリア面積)を測定する



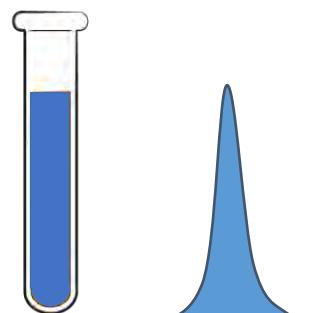
900 ng/mL相当
Extracted Sample

①



900 ng/mL相当+900 ng
Post-Extraction Spiked Sample

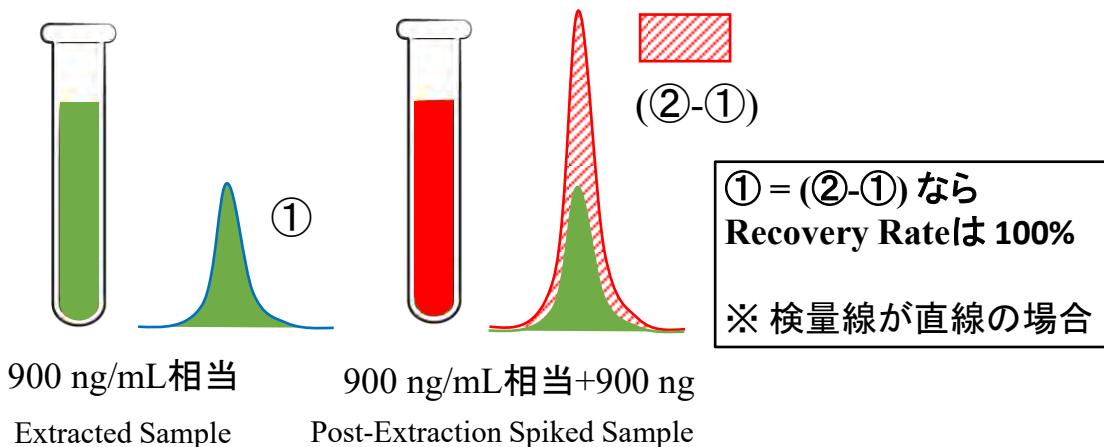
②



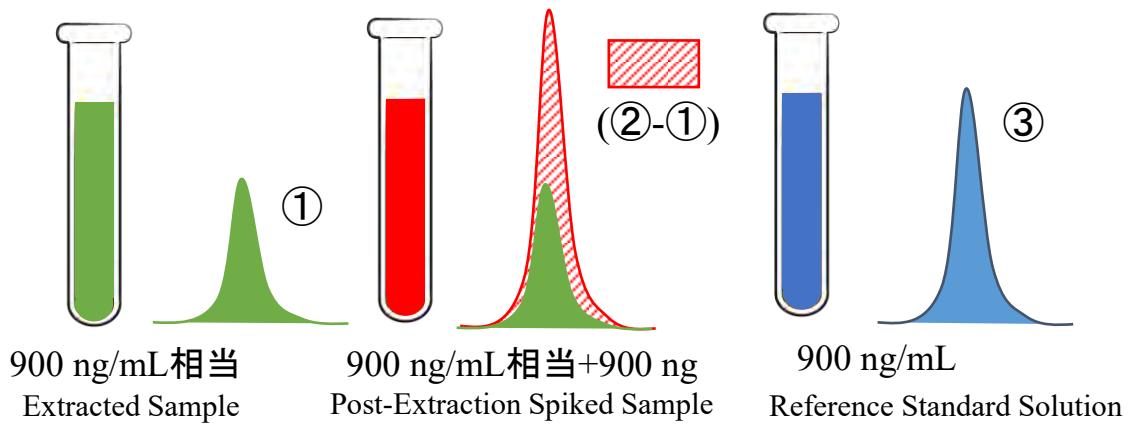
900 ng/mL
Reference Standard Solution

③

$$\text{Recovery Rate} = \frac{\textcircled{1}}{\textcircled{2}-\textcircled{1}}$$



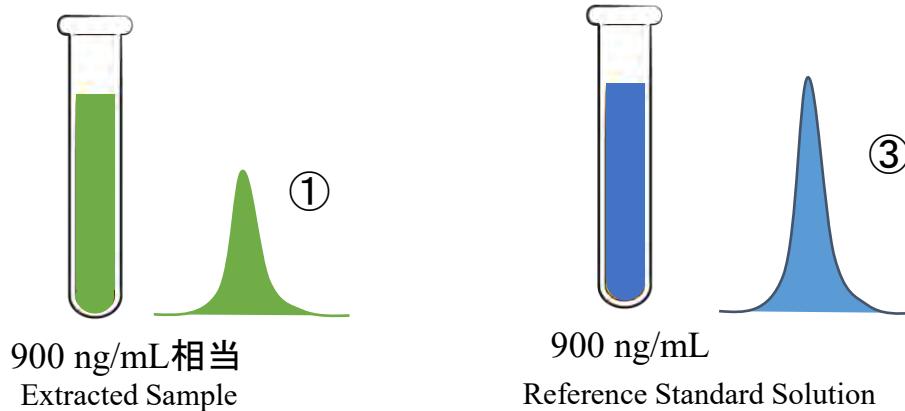
$$\text{Matrix Effect} = \frac{\textcircled{2}-\textcircled{1}}{\textcircled{3}}$$



$(\textcircled{2}-\textcircled{1})=\textcircled{3}$ なら
Matrix Effectによる suppression や enhancement は 0%

※ 検量線が直線の場合

$$\text{Process Efficiency} = \textcircled{1} / \textcircled{3}$$



① = ③ なら Process Efficiency は 100%

例) ZolpidemとZolpidem metaboliteでの評価例

	Specimen	Matrix effect (%)	Recovery (%)	Concentration ($\mu\text{g/ml or }\mu\text{g/g}$)
Zolpidem				
	femoral vein blood	98.6±1.34	93.8±3.06	9.55±0.146
	bile	64.2±1.66	82.7±2.92	44.0±1.03
	brain	85.7±3.13	108±5.29	21.9±0.563
	liver	82.7±1.84	84.6±5.39	60.6±1.66
Zolpidem phenyl-4-carboxylic acid				
	femoral vein blood	88.9±4.70	108±3.26	2.70±0.343
	bile	91.2±0.921	107±3.19	149±1.80
	brain	58.4±1.89	110±2.62	28.4±2.39
	liver	92.7±7.04	104±2.39	68.0±1.85

各々の2倍濃度になるよう
添加後に抽出、評価した

・当講座での標準添加法の紹介

- ・検量線の作成方法
- ・マトリックス効果と回収率の評価方法
- ・論文投稿を目指したバリデーションの評価方法

通常、評価されるvalidation項目

- ・Accuracy, Precision (inter-day, intra-day)
- ・Matrix Effect, Recovery Rate
- ・Limit of detection(LOD), Lower limit of quantitation(LLOQ)
- ・Stability

- Accuracy, Precision (inter-days, intra-day)
- Matrix Effect, Recovery Rate → 評価可能
- Limit of detection(LOD), Lower limit of quantitation(LLOQ)
- Stability → 評価可能

→ ブランク試料がないため、任意の濃度のものは用意できない

- Accuracy, Precision (inter-days, intra-day)
- ブランク試料がないため、通常の添加回収試験ができない
- 代わりに、
同一試料の定量分析を複数回($n = 3 \sim 5$)日内と日間で行い、
定量値のRelative Standard Deviation (%RSD) を算出する

Inter-days %RSD
Intra-day %RSD

→ Accuracy, Precision と同様、15%以内で許容できるものとする

例) ZolpidemとZolpidem metaboliteでの評価例

	Specimen	Intraday (n=5)		Interday (n=5)	
		Concentration found (ug/g)	Repeatability (%RSD)	Concentration found (ug/g)	Repeatability (%RSD)
Zolpidem	femoral vein blood	9.55±0.146	1.53	9.41±0.352	3.74
	bile	44±1.03	2.34	47.6±3.84	8.07
	brain	21.9±0.563	2.57	20.1±1.32	6.57
	liver	60.6±1.66	2.74	63.8±3.34	5.24
Zolpidem carboxylic acid					
	femoral vein blood	2.7±0.343	12.7	2.83±0.232	8.19
	bile	149±1.8	1.21	143±3.26	2.28
	brain	28.4±2.39	8.42	26.1±1.86	7.13
	liver	68±1.85	2.72	70.4±3.78	5.37

Limit of detection(LOD), Lower limit of quantitation(LLOQ)の評価

→ 対象試料を適当に希釈(蒸留水など)をした後、抽出・検出を行う

対象の検出シグナルについて

- Signal to Noise ratio = 3 の濃度で LOD
- Signal to Noise ratio = 10 の濃度で LLOQ

…通常の評価通り

当講座では、これまで紹介した方法で測定・評価を行ってきた

- Forensic Toxicology (11報)
- Legal Medicine (2報)

...
合成カンナビノイド類
カチノン類
薬毒物(覚せい剤、ベンゾジアゼピン類)
環境物質(グリコール類)

更に、ドクササコ中のclitidine、zolpidem中毒例についても準備中