

# 健常者および疾患患者の尿中EtG/EtSおよび バルビツール酸塩の高速LC-MS/MS分析

Jared Burkhart

Jared.Burkhart@restek.com

**MATT**  
Midwest Association for Toxicology  
and Therapeutic Drug Monitoring

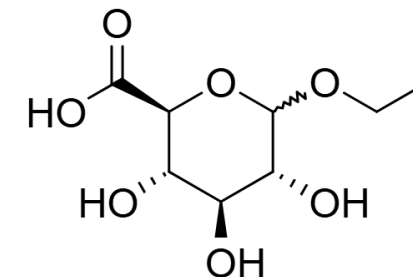
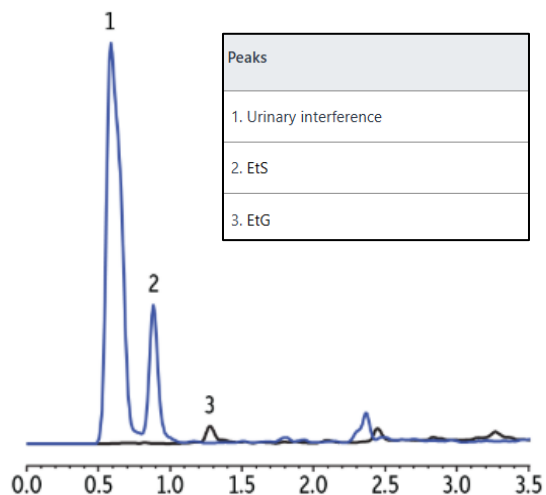
# 発表の目的

- 背景と現在の課題
- 逆相クロマトグラフィーおよび充填剤選択の利点
- メソッド開発
- ネガティブモード薬物（バルビツール酸塩）との統合
- まとめ

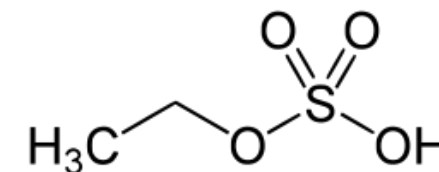


# 分析上の課題（留意点）

- 逆相による低分子・高極性化合物の保持の難しさ
- EtSと同重体の尿マトリックス由来干渉成分
- クロマトグラフィーによる分離の必要性
- ボイドボリューム付近のマトリックス効果（イオンサプレッション・エンハンスメント）を防ぐため、十分な保持を確保
- サンプルごとに生体マトリックスの組成が異なる
- イオン交換（IEX）法では、安定した性能を得るための様々なカラムのプレコンディショニングが必要



エチルグルクロニド  
(EtG)



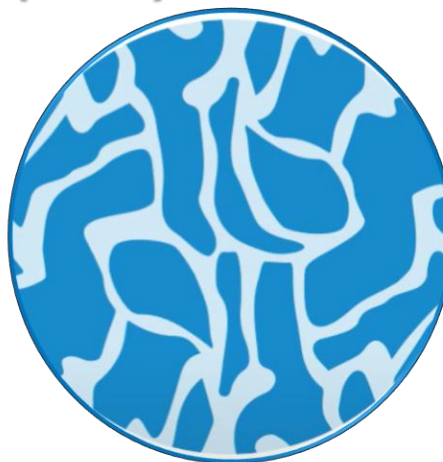
エチル硫酸塩  
(EtS)

# 逆相メソッドの利点

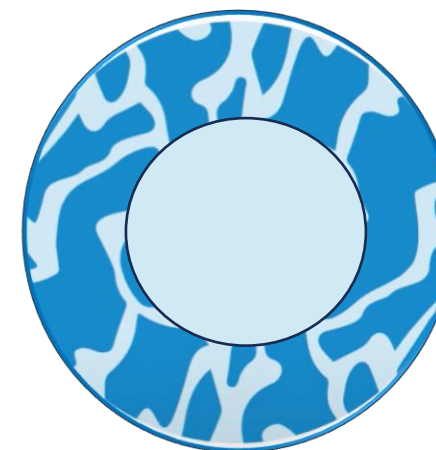
- 全多孔性充填剤 (FPP) は大きな表面積を持ち、高い保持力を実現
- 分析対象物の高い保持力
- 同一カラムでの複数パネル分析が可能
- 同一メソッドへの追加化合物の組み込みが可能...



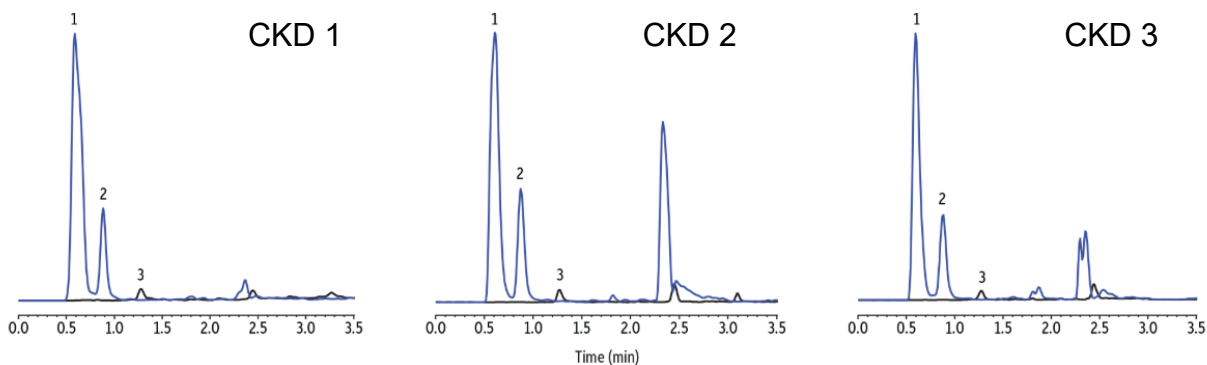
**全多孔性充填剤  
(FPP)**



**表面多孔性充填剤  
(SPP)**



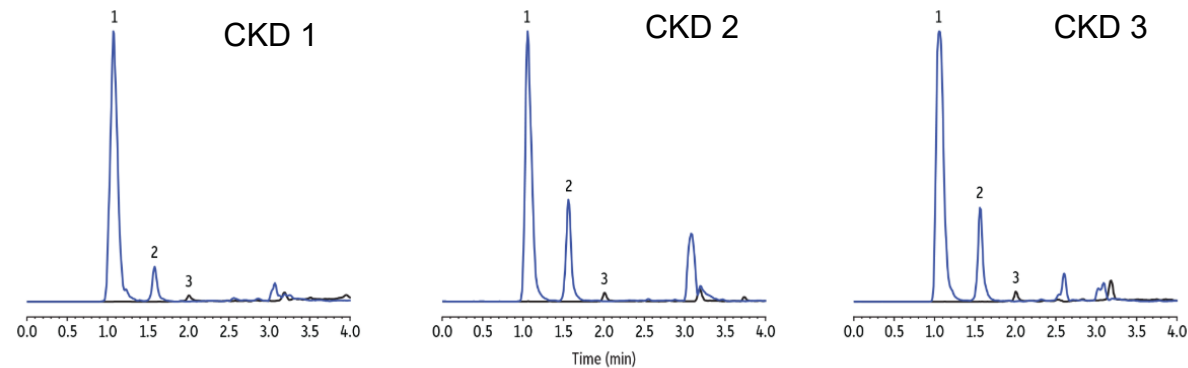
# メソッド開発：カラム選択



LC\_CF0844

| Peaks                   | $t_R$ (min) | Precursor | Product 1 | Product 2 |
|-------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| 1. Urinary interference | 0.60        | 125.0     | 80.1      | -         |
| 2. EtS                  | 0.88        | 125.0     | 96.8      | 80.1      |
| 3. EtG                  | 1.28        | 221.1     | 75.1      | 85.2      |

50 x 3 mm, 3  $\mu$ m



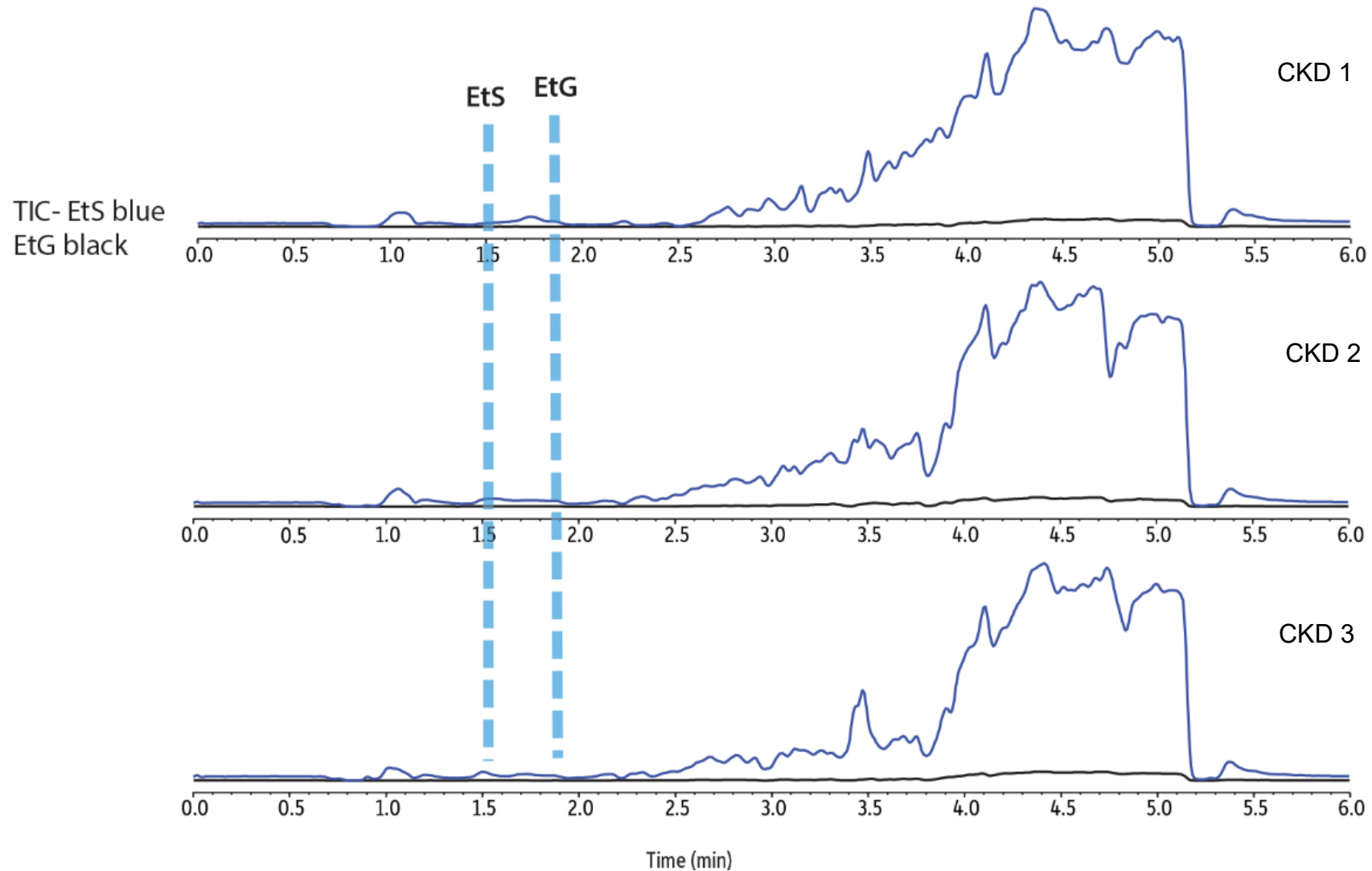
LC\_CF0845

| Peaks                   | $t_R$ (min) | Precursor | Product 1 | Product 2 |
|-------------------------|-------------|-----------|-----------|-----------|
| 1. Urinary interference | 1.06        | 125.0     | 80.1      | -         |
| 2. EtS                  | 1.56        | 125.0     | 96.8      | 80.1      |
| 3. EtG                  | 2.01        | 221.1     | 75.1      | 85.2      |

100 x 3 mm, 3  $\mu$ m

**Force Biphenyl**  
**125.0>80.1尿マトリックス干渉**

# メソッド開発：イオンサプレッション・イオンエンハンスメント



溶媒中1 ng/mL EtG・EtSをポストカラムインフュージョン、CKD尿の同時注入

# サンプル前処理

尿(50  $\mu$ L)を2 mL遠心チューブに分取し、  
同位体標識された内部標準を添加

氷冷アセトニトリル (150  $\mu$ L) を添加し  
30秒間ボルテックス後、  
4,200 rpmで10分間遠心分離

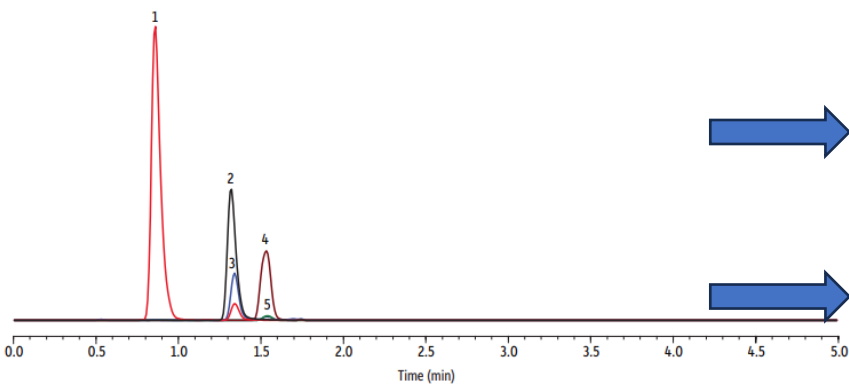
上清(100  $\mu$ L)をオートサンプラーバイアルに  
移し、水(900  $\mu$ L)を加える

キャップをして30秒間ボルテックス後、  
10  $\mu$ LをLC-MS/MSに注入



# クロマトグラフィー性能

| Peaks                   | Retention Time (min) | Conc. (ng/mL) | Precursor | Product 1 | Product 2 |
|-------------------------|----------------------|---------------|-----------|-----------|-----------|
| 1. Urinary interference | 0.89                 | -             | 125.0     | 80.1      | -         |
| 2. EtS-d5               | 1.34                 | 1000          | 130.0     | 97.9      | -         |
| 3. EtS                  | 1.34                 | 100           | 125.0     | 96.8      | 80.1      |
| 4. EtG-d5               | 1.54                 | 2000          | 226.0     | 75.0      | -         |
| 5. EtG                  | 1.54                 | 100           | 221.1     | 75.1      | 85.2      |



|                    |   |                    |     |
|--------------------|---|--------------------|-----|
| Column             | Force Biphenyl 100 mm, 3.0 mm ID, 3 μm (cat.# 962931E)  |                    |     |
| Guard Column       | Force Biphenyl EXP guard cartridge 5 x 3.0 mm ID (cat.# 962950253); an UltraShield UHPLC precolumn filter 0.2 μm frit (cat.# 25811) was installed before the guard cartridge. |                    |     |
| Column Temperature | 30 °C   |                    |     |
| Injection Volume   | 10 μL   |                    |     |
| Mobile Phase A     | Water, 0.1% formic acid   |                    |     |
| Mobile Phase B     | Methanol, 0.1% formic acid  |                    |     |
| Detector           | ESI (-) MS/MS   |                    |     |
| Valve Position     | Time (min)  | Flow Rate (mL/min) | %B  |
| Waste              | 0.00  | 0.8                | 0   |
| MS                 | 0.50  | 0.8                | -   |
| MS                 | 1.74  | 0.8                | 100 |
| Waste              | 1.75  | 1.0                | -   |
| Waste              | 3.50  | 1.0                | 100 |
| Waste              | 3.51  | 0.8                | 0   |
| Waste              | 5.00  | 0.8                | 0   |

# 精度と再現性

- 校正用標準溶液は合成尿 (UTAK)で調製
- 直線性 : 30-2,000 ng/mL
- QCサンプルは3日間にわたり調製し、3回繰り返し分析
- 日内回収率 : 85.1-114.6%, %RSD<9.6
- 日間回収率 : 91.9-111.9%, %RSD<10.1

|      |           | 日間              |      |                 |      |                  |      |
|------|-----------|-----------------|------|-----------------|------|------------------|------|
|      |           | LQC (100 ng/mL) |      | MQC (400 ng/mL) |      | HQC (1600 ng/mL) |      |
| 分析対象 | 尿サンプル #   | % Recovery      | %RSD | % Recovery      | %RSD | % Recovery       | %RSD |
| EtS  | CKD 1     | 111.9           | 1.5  | 100.1           | 6.7  | 106.9            | 4.0  |
|      | CKD 2     | 111.8           | 2.2  | 102.0           | 3.8  | 104.4            | 5.4  |
|      | 3         | 109.8           | 2.3  | 106.2           | 8.2  | 107.6            | 5.3  |
|      | 4         | 101.3           | 4.4  | 95.9            | 5.2  | 101.0            | 9.4  |
|      | 5         | 105.1           | 2.6  | 103.6           | 7.5  | 106.8            | 4.9  |
|      | 6         | 110.7           | 3.8  | 106.4           | 4.3  | 106.7            | 3.7  |
|      | synthetic | 98.3            | 3.6  | 91.9            | 2.0  | 95.3             | 5.2  |
| EtG  | CKD 1     | 104.6           | 3.6  | 93.8            | 9.5  | 94.4             | 3.6  |
|      | CKD 2     | 96.5            | 6.7  | 94.1            | 0.9  | 100.2            | 2.5  |
|      | 3         | 107.4           | 6.8  | 100.1           | 6.8  | 104.1            | 5.7  |
|      | 4         | 92.9            | 6.4  | 93.5            | 7.5  | 100.1            | 3.2  |
|      | 5         | 93.3            | 1.8  | 97.4            | 5.1  | 95.3             | 2.1  |
|      | 6         | 103.5           | 10.1 | 96.6            | 7.5  | 95.1             | 3.2  |
|      | synthetic | 103.1           | 4.1  | 100.2           | 4.2  | 100.0            | 9.3  |

# 精度と再現性

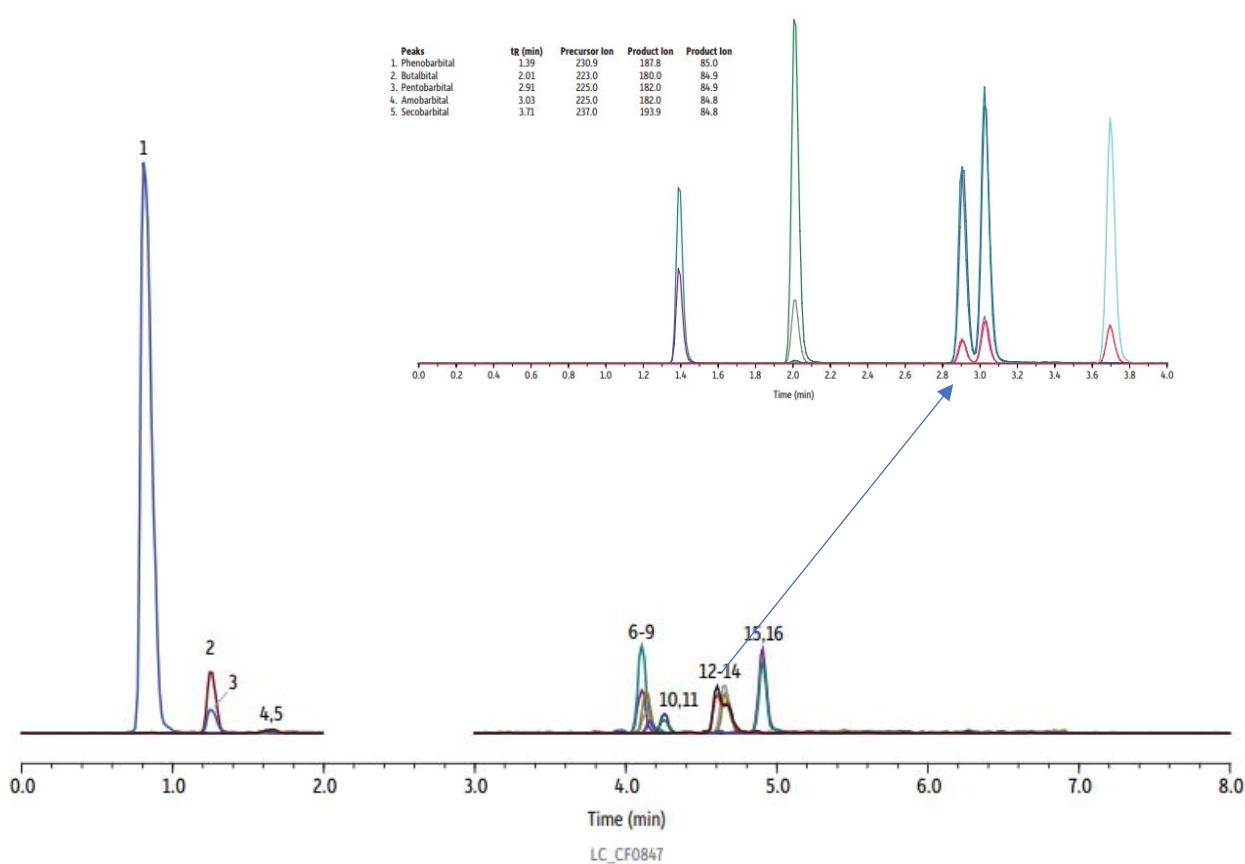
|             |                    | UTAK EtG Plusレベル1 尿コントロール |              | UTAK EtG Plusレベル2 尿コントロール |              |
|-------------|--------------------|---------------------------|--------------|---------------------------|--------------|
|             | 分析対象               | EtG                       | EtS          | EtG                       | EtS          |
|             | <b>確認値 (ng/mL)</b> | <b>510</b>                | <b>240</b>   | <b>1800</b>               | <b>800</b>   |
| Day 1 (n=6) | % Recovery         | 98.3                      | 97.5         | 106.2                     | 106.6        |
|             | %RSD               | 7.84                      | 3.50         | 5.68                      | 4.80         |
|             | 算出濃度 (ng/mL)       | 502                       | 234          | 1912                      | 853          |
| Day 2 (n=6) | % Recovery         | 103.0                     | 101.7        | 104.0                     | 105.7        |
|             | %RSD               | 8.63                      | 7.29         | 4.85                      | 2.82         |
|             | 算出濃度 (ng/mL)       | 523                       | 245          | 1823                      | 831          |
| Day 3 (n=6) | % Recovery         | 103.3                     | 100.0        | 101.9                     | 101.2        |
|             | %RSD               | 10.91                     | 8.50         | 4.57                      | 3.62         |
|             | 算出濃度 (ng/mL)       | 524                       | 240          | 1784                      | 795          |
| 日間 (n=18)   | % Recovery         | <b>101.6</b>              | <b>100.0</b> | <b>104.1</b>              | <b>104.5</b> |
|             | %RSD               | <b>2.75</b>               | <b>2.13</b>  | <b>2.07</b>               | <b>2.78</b>  |
|             | 算出濃度 (ng/mL)       | 516                       | 240          | 1840                      | 826          |

**EtG Plus Level 1 & Level 2 (UTAK) prepared 6x**

# 同時測定メソッド

(EtG・EtSとバルビツール酸塩の同時測定)

- バルビツール酸塩は多くの場合、ネガティブモードによる別パネルが必要
- バルビツール酸塩をアルコール代謝物と統合し、ネガティブモードパネルとして分析
- アモバルビタールおよびペントバルビタールは必要に応じて、セカンダリーメソッドで同定可能

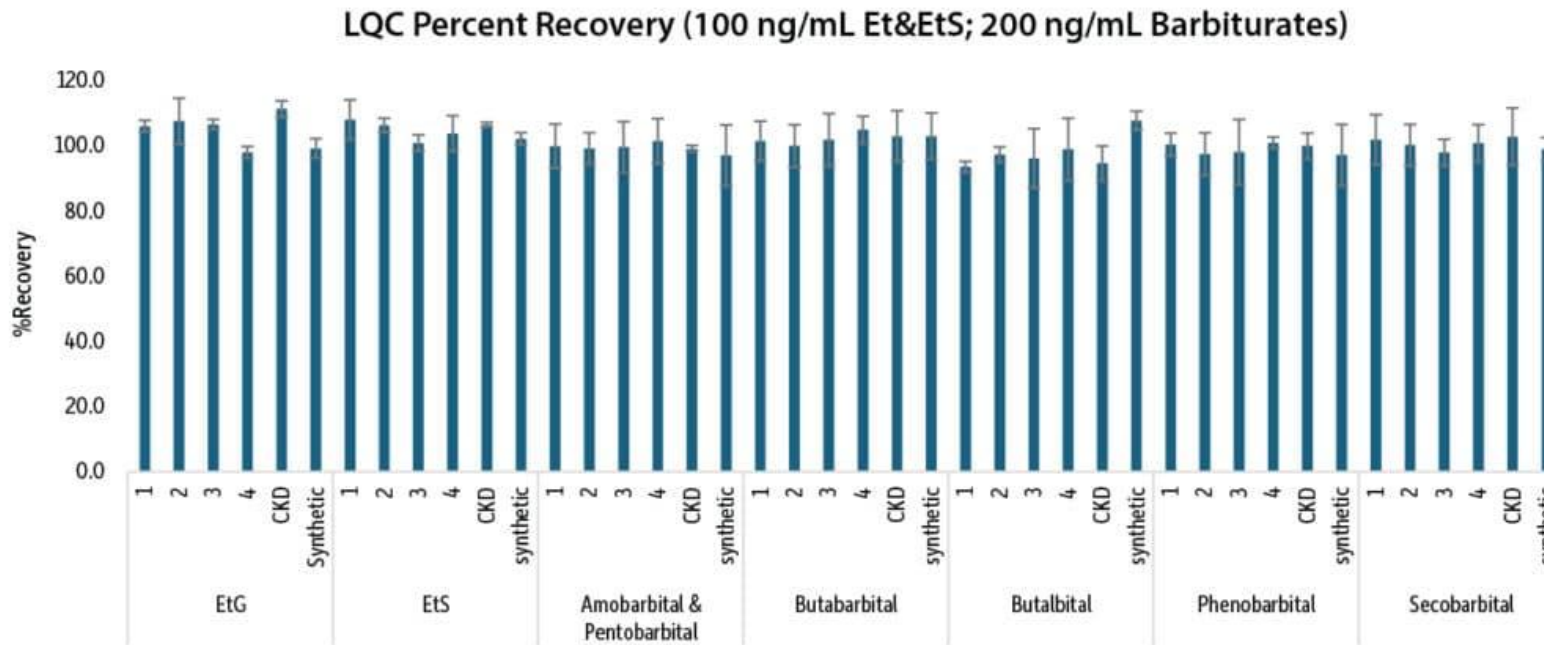


| Peaks                   | tr (min) | Conc. (ng/mL) | Precursor | Product 1 | Product 2 | Peaks               | tr (min) | Conc. (ng/mL) | Precursor | Product 1 | Product 2 |
|-------------------------|----------|---------------|-----------|-----------|-----------|---------------------|----------|---------------|-----------|-----------|-----------|
| 1. Urinary interference | 0.89     | -             | 125.0     | 80.1      | -         | 9. Butabarbitol     | 4.19     | 200           | 211.0     | 168.3     | 42.0      |
| 2. EtS                  | 1.22     | 100           | 125.0     | 96.8      | 80.1      | 10. Butalbital-d5   | 4.23     | 4000          | 228.0     | 185.3     | -         |
| 3. EtS-d5               | 1.21     | 1000          | 130.0     | 97.9      | -         | 11. Butalbital      | 4.27     | 200           | 223.0     | 42.1      | 180.3     |
| 4. EtG                  | 1.65     | 100           | 221.1     | 75.1      | 85.2      | 12. Amobarbital     | 4.63     | 200           | 225.0     | 182.3     | 42.1      |
| 5. EtG-d5               | 1.64     | 2000          | 226.0     | 75.0      | -         | 13. Amobarbital-d5  | 4.69     | 4000          | 230.0     | 42.0      | -         |
| 6. Phenobarbital-d5     | 4.15     | 4000          | 236.0     | 42.0      | -         | 14. Pentobarbital   | 4.71     | 200           | 225.0     | 182.3     | 42.1      |
| 7. Phenobarbital        | 4.18     | 200           | 231.2     | 42.1      | 188.1     | 15. Secobarbital-d5 | 4.92     | 4000          | 242.0     | 199.3     | -         |
| 8. Butabarbitol-d5      | 4.18     | 4000          | 216       | 41.9      | -         | 16. Secobarbital    | 4.94     | 200           | 237.0     | 42.1      | 194.2     |

**Column** Force Biphenyl (cat.# 962931E)  
 Dimensions: 100 mm x 3 mm ID  
 Particle Size: 3 µm  
 Pore Size: 100 Å  
 Guard Column: Force Biphenyl EXP guard cartridge 5 mm, 3 mm ID, 3 µm (cat.# 962950253)  
 Temp.: 30 °C

# 同時測定メソッドの精度と再現性

- 校正用標準溶液は合成尿(UTAK)で調製
- 直線性：アルコール代謝物 30–2,000 ng/mL、バルビツール酸塩 60–4,000 ng/mL
- QCサンプルは3日間にわたり調製し、3回繰り返し分析
- 日内回収率：87.3-114.8%, RSD<10.7%
- 日間回収率：92.7-112.9%, RSD<11.9%



# まとめ

- EtG・EtS分析に逆相クロマトグラフィーを採用
- マトリックス干渉を解消し、カラムのプレコンディショニングも不要
- CKDを含む各種尿タイプを用いてメソッド開発を行い、合成尿による検量線を作成
- アルコール代謝物専用メソッドと、アルコール代謝物・バルビツール酸塩の統合メソッドを構築
- Force Biphenylカラムにより他のパネル（薬物乱用検査など）への応用が可能で、カラム切り替えの必要性を低減