

低温オープントラッピングキャピラリーガスクロマトグラフィー (COT-GC) 分析の有用性

著者	渡部 加奈子, 野澤 秀樹, 山岸 格, 南方 かよ子, 鈴木 修, 石井 晃, 鈴木 加奈子
雑誌名	法中毒 = Japanese journal of forensic toxicology
巻	21
号	2
ページ	102-105
発行年	2003-05-31
URL	http://hdl.handle.net/10271/1741

S-1

低温オーブントラッピングキャピラリーガスクロマトグラフィー (COT-GC) 分析の有用性

浜松医大・法医 ○鈴木 (渡部) 加奈子, 野澤秀樹, 山岸 格,
南方かよ子, 鈴木 修
藤田保衛大・法医 石井 晃

UTILITY OF CRYOGENIC OVEN TRAPPING CAPILLARY GAS CHROMATOGRAPHY

Kanako Watanabe-Suzuki¹, Hideki Nozawa¹, Itaru Yamagishi¹,
Kayoko Minakata¹, Osamu Suzuki¹ and Akira Ishii²

¹Department of Legal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

²Department of Legal Medicine, Fujita Health University School
of Medicine

【はじめに】

環境化学領域では、**purge-and-trap** 法とガスクロマトグラフィー (GC) の組み合わせが揮発性有機化合物を測定する方法として最も感度が高いとされていた。しかし、この方法では、分析対象は大容量の水試料や固体試料であり、ヒト試料である血液や組織ホモジェネートは蛋白質を多量に含み、濃縮過程において大量の泡を発生する。そのため、チューブやガラス器具内面を汚染し、流路や捕集管の閉塞を招き測定が困難となる。また **purge-and-trap** 装置は比較的大型かつ高価であり、扱いも煩雑である。

その他よく知られているトラップ・濃縮法としては **cryo-focusing** 法がある (Fig.1)。本法では、GC カラム導入部の一部を液化炭酸ガスや液体窒素で冷却し、揮発性成分をトラップし分析を行う。しかしこの方法で実際に生物試料中から薬毒物分析した報告は殆ど見当たらない。

最近の新しい GC 機器のマイクロコンピュータによる制御部分の発展により、GC のオープン温度を迅速かつ正確に 0°C 以下に設定できるようになった。これは一度昇温したカラム温度を初期温度へ急速冷却する事で分析時間の短縮を図るのが本来の目的であった。我々は本システムを生物試料中の揮発性有機化合物 (volatile organic compound, VOC) のトラップに利用し、これを低温オーブントラッピング (**cryogenic oven trapping, COT**) 法と命名した。この方法では、5 mL という大容量のヘッドスペース (HS) 気体サンプルが、初期温度 0°C 付近もしくはそれ以下に冷却したカラムへ導入され、冷えたカラム入り口の狭い領域にロスなく凝集される (Fig.1)。そのため、ピークは非常にシャープで分離も良好となる。一般的な水素炎イオン化検出器 (FID) を用いるにも拘わらず、COT-GC では従来の HS-GC と比較すると、約 10 倍から 50 倍程度、感度が高い。

我々は、法中毒学上しばしば死亡の原因となるクロロホルム・メチレンジクロリドの高感度分析を試みたところ好結果が得られ、本分析法の詳細を確立した¹⁾。その後、一連の VOCs²⁾ についても、本法を用いた分析法の詳細を確立した。

【分析装置】

本分析では、サイホン管付き液化炭酸ガス(もしくは液体窒素)を使用する (Fig.1)。冷却温度が低い程、液化炭酸ガスの消費は多くなる。液化炭酸ガスポンペは細い金チューブで GC 装置の側面に連結され、電磁駆動のソレノイドバルブにより、液化炭酸ガス (または液体窒素)

を適当な流量で噴射し、オープン全体を目的の温度に冷却する。我々の研究室では COT-GC 装置として HP-6890 シリーズと島津 GC-14A を用いて分析を行っている。いずれの装置も FID と窒素リン検出器 (NPD) の両方を備えている。他社の GC 装置でも、マイクロコンピュータ制御による新しい機器であれば、同様の COT 装置のオプションを簡単に取り付ける事ができる。このオプションの値段は 20 万円程度と安価である。

【分析方法】

分析カラムの選択とカラムの耐性：

分析対象 VOC に適切なカラムを選択する。我々は、熔融シリカキャピラリーカラムを用いて一連の分析を行っている。上記した一連の分析の殆どを、カラム内径 0.32 mm、長さ 30 m のメディアムボアカラムを用いて実験を行った。これらの詳細については文献にまとめている^{6,7)}。カラムの選択で大切なのは、基本的にカラム内面液相の性状であるが、本分析では、分析においてカラムを 0 °C 以下に冷却することが多いので、カラムの使用温度範囲を確認することが大切である。我々の実験では、製造会社にて示された使用可能な最低温度よりさらに数十度冷却しても、数ヶ月の期間ならカラムの劣化は問題とならなかった。キャピラリーカラムは高温には注意すべきであるが、低温には比較的強いのが実感であった。

HS 抽出と GC への試料注入：

本分析では、ヒト試料中からの揮発性薬毒物の抽出には、従来から行われている HS 法を用いている^{8,9)}。HS 抽出法の各条件も、分析する化合物によって異なるが、とりあえずクロロホルム分析を例にあげる。内部標準物質である 0.5 μg のメチレンジクロリドを含む蒸留水 0.5 mL を、全血 0.5 mL の入った 7.0 mL スクリューキャップバイアルに添加する。素早くシリコンセプタムキャップの蓋を閉め、Vortex にてよく混和する。その後 55°C に設定したヒートブロックにて 20 分加温し、HS 気相の 5 ml を 24 ゲージの注射針の付いたガラスシリンジで抜き取り、素早くオープン温度を -30°C に冷却した GC へ注入する。スプリットレスモードで注入するが、全試料がカラム内に注入完了する 1 分後、スプリット弁を開き、試料がキャリアガスとともに 1~3 ml/min の速度で流れ、オープンを昇温しながら FID 検出する。分析する化合物によっては、HS 抽出において抽出効率を高めるため、塩析効果剤や抗酸化剤 (アルコール類の分析など) を加えるとより感度が上昇する⁸⁾。HS 抽出における加温温度・加温時間・添加物は各分析化合物で異なるため、予備実験の段階でよく検討する必要がある。

初期オープン温度：

本分析を行うには、最初に GC 分析の初期オープン温度を検討する必要がある。初期温度は注入した HS 気体試料をロスなくカラム入り口にトラップする温度であり、分析する化合物の性状に依存する。低温では物質は気体から液体となり、カラム入り口へトラップされる。しかし、あまり低温にすると、血液やプラスチック製品内の不純ピークも出現する。従ってシャープなピークが得られればなるべく高いオープン温度が望ましい。それは液化炭酸ガスの消費量は温度が高い程少ないからである。例えばクロロホルムとジクロロメタンの分析では、0°C から -40°C まで各温度について検討したところ、0°C から -30°C まで温度を下げるにつれて、ピークはシャープになり分離も良好であったが、-40°C では、バックグラウンドに不純ピークが出現し、我々は初期温度を -30°C と設定した。体内に微量に含まれるエタノールの分析では、初期温度を -60°C と設定した。

GC 分析条件：

例えばクロロホルム・メチレンジクロリド分析では、分析カラム、Rtx-Volatiles (30 m x 0.32 mm id, film thickness 1.5 μm, 液相: ジフェニルジメチルポリシロキサン) ; 注入口温度, 250°C ; 検出器温度, 280°C ; ヘリウム流量, 3 ml/min。スプリットレス状態で

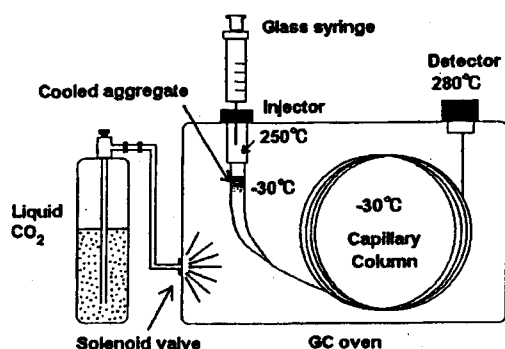
1 分間置いた後、スプリットモードに切り替え昇温分析 ($-30\sim 100^{\circ}\text{C} : 10^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $100\sim 280^{\circ}\text{C} : 20^{\circ}\text{C}/\text{min}$) を行った。

【COT-GC の長所と短所】

従来の HS 抽出では、加熱後スプリットせずに $0.5\sim 1\text{ml}$ 程度の気体をパックドカラムへ注入しているが、ピークはブロードで分離は悪い。ワイドボアキャピラリーカラムを用いても、スプリットレスモードでは、HS 気相を $0.1\sim 0.5\text{ mL}$ しか注入出来ない。メディアムボアキャピラリーカラムを用いる場合にはスプリットモードを採用せざるを得ないため、注入量の約 $1\sim 5\%$ の試料しか GC カラムへ導入出来ないため感度が低い。COT-GC 法では、 5 mL の HS 気相を低温カラム入り口にロス無くトラップする事で、GC カラムへ大容量の試料が導入できるため、同じカラムを用いてスプリット注入した場合に比べて、約 $10\sim 50$ 倍感度が上昇する。また本分析法では、導入された試料は、低温の GC 入り口の狭い範囲に凝集しトラップされるので、ピークはシャープとなり分離も大変優れている。COT-GC 法では、FID 検出器を使用した場合、全血や尿中からの検出限界は約数 ng/mL である。仮に、ECD 検出器を用いれば、飛躍的に感度は上昇するものと思われる。COT システムを設置する費用は安く、最近の GC 機器なら簡単にオプションとして取り付けることが出来る。

短所として、本法では液化炭酸ガスを使用するので、 CO_2 中毒に気を付ける必要がある。空气中の CO_2 濃度が 3% 以上になれば人体に影響を及ぼすという報告がある。実験室の換気に注意を払い、近年の地球温暖化現象防止のためにも CO_2 の消費は最低限に押さえるべきである。

(A) Cryogenic oven trapping : COT



(B) Cryo-focusing

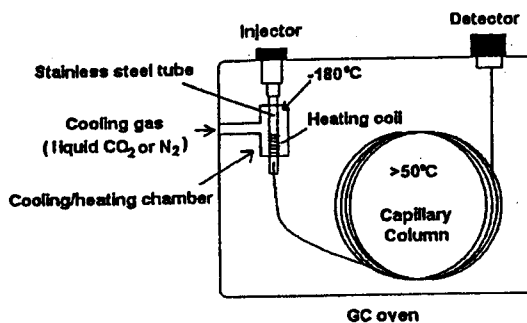


Fig.1 Schematic diagram of the instrumentation used for cryogenic oven-trapping (COT)-capillary GC (A) and for cryo-focusing (B). The COT conditions for analysis of chloroform or dichloromethane are shown. For cryo-focusing the chamber can be cooled to -180°C (minimum) with gas from liquid N_2 and down to -90°C with gas from liquid CO_2

【結論】

我々は、生物試料中の VOCs の新しい分析法として COT-GC 法を確立した。本分析法では、5 mL かそれ以上の HS 気体をロスなく GC へ注入できる。大変シャープなピークが得られ、高感度が得られるのと同時に不純物からの分離も優れている。COT 装置設置価格は安く、機器の扱いもシンプルである。この様な理由から、法医学・環境化学の分野で非常に有用性の高い分析法であると思われる。もはや *purge-and-trap* 法や *cryo-focusing* 法は設備の高価さと扱いの煩雑さから、殆ど COT 法にとって替わられるべきものと考えている。

現在、実験を発展させるべく、COT-GC とマススペクトロメトリーを組み合わせた分析法を試みている。これにより、感度や特異性は飛躍的に上昇するものと思われる。

【SUMMARY】

Recently, a microcomputer-controlled device for lowering oven temperature below 0 °C has become available for new types of gas chromatography (GC) instruments. This device was originally designed for rapid cooling of an oven to reduce the time for analysis. In our laboratories, we are using it for trapping volatile organic compounds (VOCs) inside a capillary column at cryogenic oven temperatures; as much as 5 mL of headspace vapor can be injected into a medium-bore capillary column without any loss, giving sensitivity 10-50 times higher than that by the conventional headspace GC method. In addition to the above high sensitivity, much better resolution (separation) of compounds can be also achieved, probably because VOCs are trapped at a cryogenic oven temperature in a quite narrow zone of the front part of a capillary column. The method is recommendable for wide use in forensic and environmental toxicology, because it is simple and requires no special GC operations in addition to the above high sensitivity and high resolution. In this lecture, some successful data obtained by the present capillary GC with cryogenic oven trapping are presented for analysis of chloroform, methylene chloride, trichloroethylene, ethyl ether, solvent thinner components, xylene isomers, cyanide and ethanol in human body fluids. The difference between the cryogenic oven trapping method and the *cryo-focusing* method is also explained.

【References】

- 1) Watanabe, K., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O. and Kumazawa, T.: *Anal Chem*; **69**, 5178-5181(1997).
- 2) Watanabe, K., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O., Kumazawa, T., Hattori, H., and Suzuki O.: *Jpn J Forensic Toxicol*, **15**, 211-216 (1997).
- 3) Watanabe, K., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O. and Kumazawa, T.: *Jpn J Forensic Toxicol*, **16**, 69-74 (1998).
- 4) Watanabe-Suzuki, K., Seno, H., Ishii, A., Kumazawa T and Suzuki, O.: *Chromatogr B*, **727**, 89-94 (1999).
- 5) Watanabe-Suzuki, K., Hideki, N., Suzuki, O. and Ishii, A.: *J Chromatogr Sci*, **41**: in press (2003)
- 6) Watanabe-Suzuki, K., Ishii, A., Xiao-Pen, Lee. and Suzuki, O.: *Jpn J Forensic Toxicol*, **18**, 201-209 (2002).
- 7) Watanabe-Suzuki, K., Ishii, A. and Suzuki, O.: *Anal Biomed Chem*, **373**, 75-80 (2002).
- 8) Seto Y.: *J Chromatogr A*, **674**, 25-62 (1994).
- 9) Seto, Y.: *Jpn J Forensic Toxicol*, **12**, 175-191 (1994).