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による揮発性有機化合物の分析

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 日本法中毒学会 公開日: 2013-08-27 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 渡部, 加奈子, 石井, 晃, 李, 暁鵬, 鈴木, 修, 鈴木, 加奈子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1726

法中毒 第18巻 第3号 平成12年(2000)

綜　説

低温オーブントラッピングガスクロマトグラフィーによる揮発性有機化合物の分析

鈴木(渡部)加奈子[a]*, 石井　晃[b], 李　暁鵬[c], 鈴木　修[a]
[a]浜松医科大学法医学教室　〒431－3192 浜松市半田町3600番地
[b]名古屋大学医学部法医学教室　〒466－8550 名古屋市昭和区鶴舞町65
[c]昭和大学医学部法医学教室　〒142－8555 東京都品川区旗の台1－5－8

Analysis of volatile organic compounds by cryogenic oven trapping gas chromatography

Kanako WATANABE-SUZUKI[a]*, Akira ISHII[b], Xiao-Pen LEE[c] and Osamu SUZUKI[a]
[a]*Department of Legal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine, 3600 Handa-cho, Hamamatsu 431－3192, Japan*
[b]*Department of Legal Medicine and Bioethics, Nagoya University Post Graduate School of Medicine, 65 Tsuruma-cho, Nagoya 466－8550, Japan*
[c]*Department of Legal Medicine, Showa University School of Medicine, 1－5－8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo 142－8555, Japan*

Summary

Recently, a microcomputer-controlled device for lowering oven temperature below 0℃ 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 review, some successful data obtained by the present capillary GC with cryogenic oven trapping are presented for analyses of

*To whom all correspondence should be addressed.
©2000 Japanese Association of Forensic Toxicology. All right reserved. 0915－9606/00/$14.00

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.

Key words: Cryogenic oven trapping; Gas chromatography; Cryo-focusing; Volatile organic compounds (VOCs); Headspace method; Chloroform; Ethanol

1．はじめに

環境化学や食品化学領域において，揮発性有機化合物（VOCs）を測定するためには，purge-and-trap 法とガスクロマトグラフィー（GC）の組合せが，大容量の水試料[1]や固体試料[2,3]から VOCs を捕捉・濃縮して分析できるため，感度的に最も優れた方法とされていた。しかし，この方法では，目的化合物を揮発させる過程において泡を発生させる。そのため，蛋白含量の多いヒト血液や組織ホモジェネートでは，発生する多量の泡沫がチューブやガラス器具内面を汚染し，さらに流路や補集管の閉塞等の重篤なトラブルを招来する。また，purge-and-trap 法の装置は機器が比較的大型なうえ，扱いもやや複雑といえる。

その他の捕捉・濃縮法としては cryo-focusing 法[4,5]と呼ばれるものがある。これは 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たガスで低温にさせ，揮発成分を補捉し，分析を行う方法である。しかしながら，我々の知るところでは，この方法により生体試料中から薬毒物を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 のオーブンの温度を 0 ℃以下に迅速かつ正確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体試料中の VOCs の補捉に利用し，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[6]。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 ℃付近もしくはそれ以下に冷却したカラムへ導入される。すなわち高温の気化室に注入された気体サンプルは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。最も一般的な水素炎イオン化検出器（FID）を用いるのにもかかわらず，COT-GC では従来の HS-GC と比較すると，約10から50倍の感度を得ることが出来る。我々は，まず手始めに本法を用いて，法中毒学上しばしば問題となるクロロホルム，メチレンジクロリドの高感度分析法の詳細を確立した[6]。その後，一連の VOCs についても好結果を得ている[7−12]。本綜説では，本 COT-GC について簡単に紹介し，その利点，問題点なども述べる。

2．分析装置

COT-GC 分析では，Fig. 1 に示す様に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。液化炭酸ガスボンベは細い金属チューブで 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，オーブン全体を目的の温度に冷却する。我々の研究室においては，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付ける事ができる。このオプションの値段は数十万円程度と安価である。

3．分析方法

1）分析対象物質とカラムの選択

VOCs のキャピラリー GC 分析にあたって，

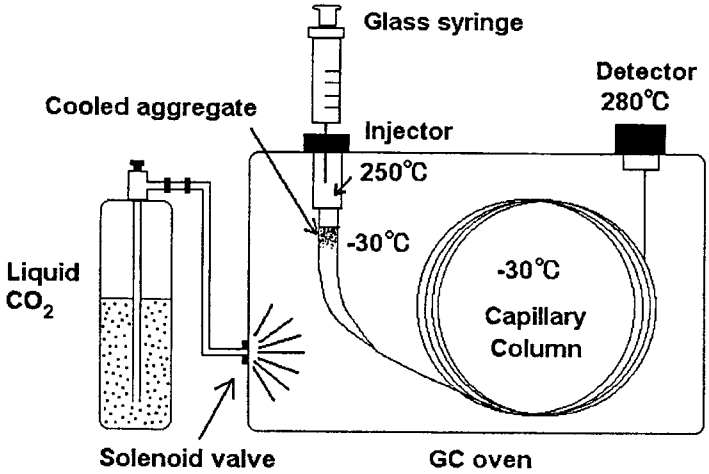

Fig. 1. Instrumental schema of cryogenic oven trapping (COT) capillary GC. The whole GC oven is cooled by computer-controlled direct jet of liquid carbon dixide sprayed from a solenoid valve. A-5 ml HS sample introduced into the injector port is trapped in the narrow area at the front part of the capillary column without any loss.

Table 1. Summary of capillary columns selected for cryogenic oven trapping GC analyses in our laboratories

Chemical(s) to be analyzed	Column	Length (m)	ID (mm)	Film thickness (μm)	Temp.range[a] (℃)	Stationary phase material	Ref.
Chloroform	Rtx-Volatile	30	0.32	1.5	0 to 280	Diphenyldimethylpolysiloxane	6)
Methylene chloride	Rtx-Volatile	30	0.32	1.5	0 to 280	Diphenyldimethypolysiloxane	6)
Trichloroethylene	Rtx-Volatile	30	0.32	1.5	0 to 280	Diphenyldimethylpolysiloxane	7)
Ethyl ether	Rtx-Volatile	30	0.32	1.5	0 to 280	Diphenyldimethylpolysiloxane	8)
Thinner components	DB-624	30	0.32	1.8	-20 to 260	Cyanopropylphenylmethylpolysiloxane	9)
Xylene isomers	AT-WAX	30	0.32	0.5	40 to 280	Polyethylene glycol	10)
Cyanide	Supel-Q PLOT	30	0.32		—[b] to250	Divinylbenzene polymer	11)
Ethanol	Rtx-BAC2	30	0.53	2.0	-20 to 240	Not open[c]	12)

[a]Temperature range recommended by the manufacturer.
[b]The lowest temperature not specified.
[c]The manufacturer gives no information on the material.

各物質に最適なカラムの選択が重要となる。いずれの物質についても，VOCs に適するとされている3～4種類のキャピラリーカラムを試し，最良の結果を得たものを採用している。我々が今迄に報告した8種類（系統）の VOCs の COT-GC 分析に採用したキャピラリーカラムを Table 1 にまとめて示す。殆どのカラムが内径0.32 ㎜のいわゆるミドルボアキャピラリーカラムであるが，エタノールの分析には，Rtx-BAC2 という内径0.53 ㎜のワイドボアキャピラリーカラムを用いている。これは，BAC2 ではミドルボアキャピラリーカラムが市販されていないため，

Table 2. Summary of conditions for cryogenic oven trapping capillary GC for VOCs established in our laboratories

Chemical(s) to be analyzed	Matrix [a]	Additive	Extraction efficiency in blood (%)	Oven Temp. (°C)	Detector [b]	LOD[c] (ng/ml)	Ref.
Chloroform	WB	Water	11.5	-30 to 280	FID	4	6)
Methylene chloride	WB	Water	20.0	-30 to 280	FID	4	6)
Trichloroethylene	WB,U	None	75.0	0 to 270	FID	3	7)
Ethyl Ether	WB	None	53.9	0 to 260	FID	10	8)
Thinner components[d]	WB,U	Water	3.58-55.1	5 to 110	FID	1-10	9)
Xylene isomers	WB	Water	41.0-46.3	5 to 180	FID	20	10)
Cyanide	WB	$Na_2SO_4+H_3PO_4$	2.89-3.22	-30 to 160	NPD	2	11)
Ethanol	WB	$Na_2S_2O_4+Na_2SO_4$	3.06	-60 to 240	FID	10	12)

[a]WB=whole blood; U=urine.

[b]FID=flame ionization detection; NPD=nitrogen-phosphorus detection.

[c]LOD=limit of detection.

[d]Ethyl acetate, benzene, *n*-butanol, toluene, butyl acetate and isoamyl acetate.

あえてこのカラムに数ml/分の流量でキャリアガスを流して使用したものである。

2）HS抽出とGCへの注入

COT-GC分析における抽出は従来のHS法で行っている。一例として，クロロホルム分析の抽出操作を簡単に記すと，VOCs を含有する血液0.5 mlを7 mlのスクリューキャップバイアル瓶に入れ，既知濃度の内部標準物質が含まれている蒸留水を0.5 ml添加し，全量を1 mlにした後，直ちにテフロンセプタム付きの蓋を閉める。その後 Vortex で十分に撹拌し，ヒートブロックにて55℃で15分間加熱する。バイアル瓶中の5 mlの気相を24G針のガラスシリンジで抜き取り，GC オーブン温度−30℃に冷却した GC の注入口に挿入し，スプリットレスの条件下にて余り圧力をかけないでゆっくりと5 mlのガスを注入していく。終了後，スプリットレスモードで1分間そのままおいた後，スプリットモードに切り替え昇温分析を行う。HS の抽出操作自体は従来のそれと同様で簡便であるが，分析対象物質によっては，バイアル瓶中気相での濃度を上げるため，塩析効果物質，さらに分解をさけるために抗酸化物質等を添加する必要がある（Table 2)。また，ヘッドスペース抽出において平衡状態となる至適条件（温度，時間）は物質によって異なるので，予備実験を繰り返し，十分検討する必要がある。

3）GC の初期温度

COT-GC分析ではシアンの分析（NPD）を除き，最も一般的な FID 検出器を用いている（Table 2)。GC 分析条件を決定する際に，最初に VOCs を補捉するためのカラム（オーブン）の至適低温初期温度について検討する必要がある。クロロホルム分析の結果を例に挙げると，初期温度が0℃の時は，ピークはブロードで，感度，分離とも優れなかった。初期温度を−10℃，−20℃，−30℃，−40℃と下げていくと，低温になるにつれ，ピークはシャープになり，感度，分離とも大幅に改善された（Fig. 2)。ただし，−40℃になると，不純ピークが増加し，検出器のノイズも出現したので，初期温度を−30℃に設定した[6]。同様にヒト血中の内因性エタノール分析において初期温度を検討した結果を Fig. 3 に示した。この場合，さらに低温（−60℃）の初期温度で分析し，好結果を得ている[12]。

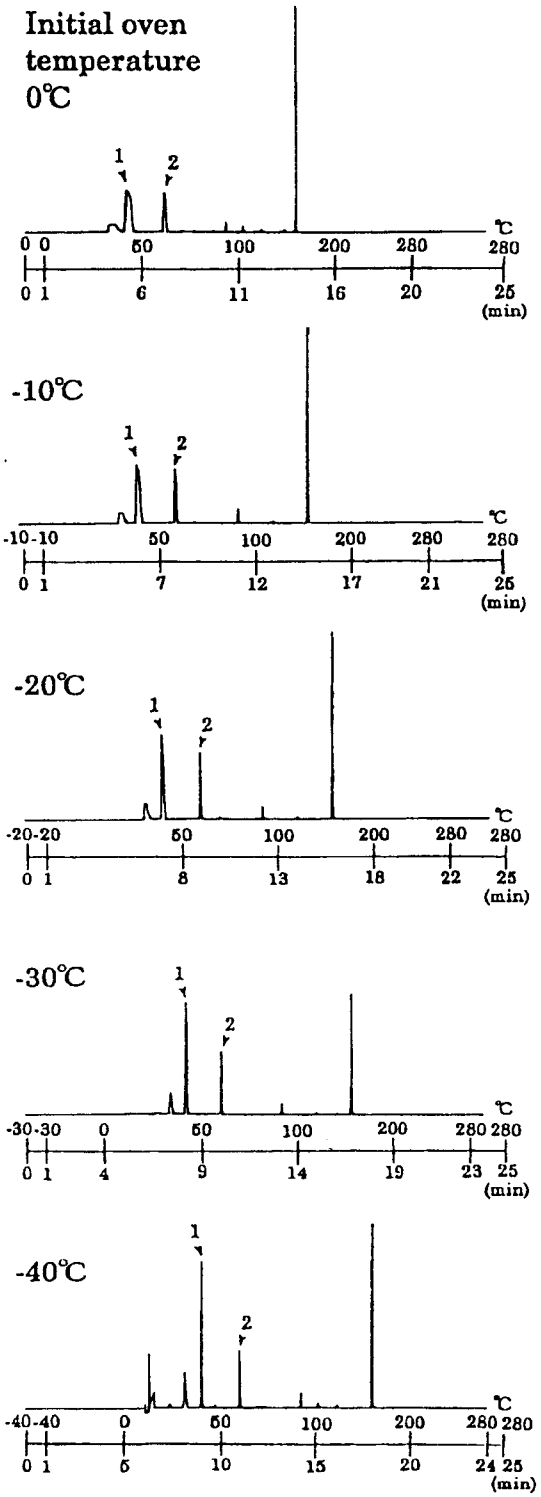

Fig. 2. Cryogenic oven trapping (COT) capillary GC for chroloform (2) and methylene chloride (1) as a function of various initial oven temperatures. Five micrograms of each compound was added to 0.5 ml of human whole blood for headspace extraction. The scales of the Y-axes are the same for each panel.

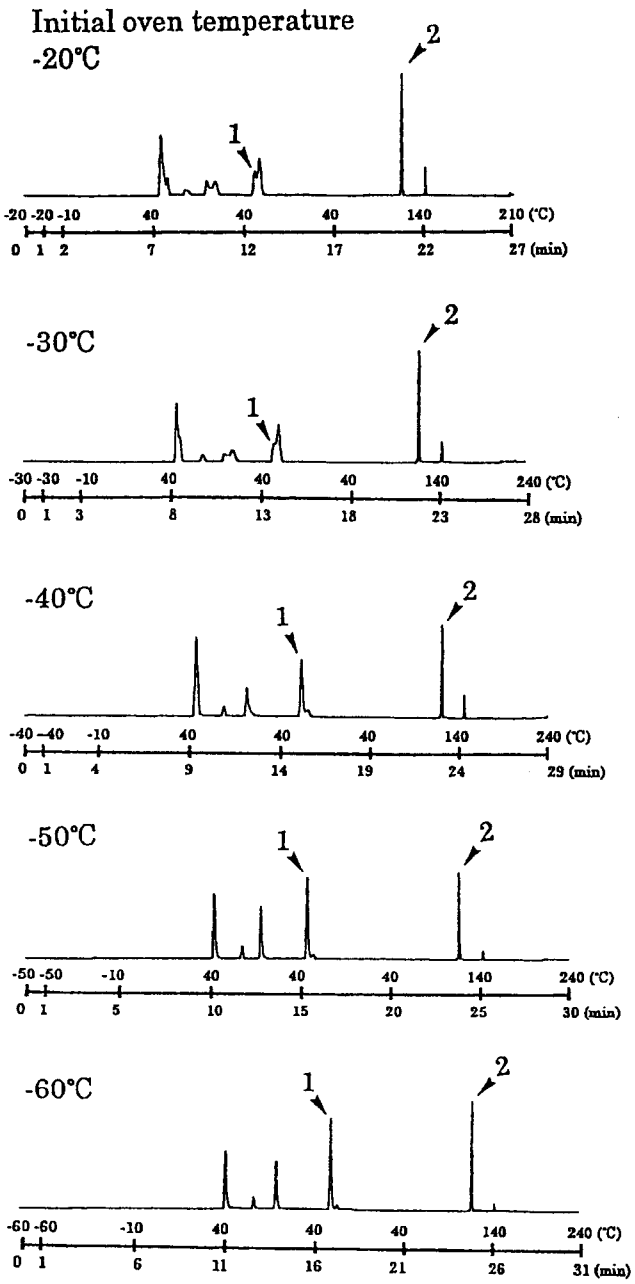

Fig. 3. Cryogenic oven trapping (COT) capillary GC for ethanol (1) and isobutyl alcohol: IS (2) as a function of various initial oven temperatures. Ethanol (5 μg) and IS (0.5 μg) were added to 1 ml human whole blood for headspace extraction. The scales of the Y-axes are the same for each panel.

4）カラムの耐性

VOCs の種類により，カラムへ補捉するための最適初期温度は異なる（Table 2)。トリクロロエチレンや，シンナー成分，キシレン異性体はクロロホルムより沸点，融点が高く，カラム温度が0－5℃で完全に補捉される。液化炭酸ガスはオーブンが低温であるほど多量消費するので，経済的な点を考慮すると，初期温度は高い方が良い。しかしながら，血中の内因性エタノールの分析には，－60℃という初期温度が必要である（Fig. 3)。それぞれのキャピラリー GC カラムには各メーカーによって許容温度範囲が示されている（Table 1)。Table 1 と Table 2 の各温度範囲を比較して明らかな様に，クロロホルム，エチルエーテル，エタノール分析において，我々は各メーカーが指定した許容下限温度を無視し，さらに大幅に下方冷却して実際に使用している。それにもかかわらず，一連の実験を行う数ヶ月の間，劣化は認められず，再現性にも問題は見られなかった。

4．低温オーブントラッピング法の長所と短所

生体試料中から VOCs を GC で測定するには，通常 HS-GC 法が用いられる[13,14]。これには従来のパックドカラムが用いられるが，分離面，感度面とも優れない。ワイドボアキャピラリーカラムを用いても，0.1－0.5 mlの気相しか注入出来ず[15]，ミドルボアキャピラリーカラムを用いる場合には，スプリット方式を用いざるを得ない。従って，全注入量中のほんの1－5％のガスがカラムに導入され，効率が低くなり，その分感度が低下する。我々の方法では，オーブンを低温にする事によって，5 ml の HS 気体サンプル全量をロスなくカラム入り口付近に補捉出来る。そのため，従来の方法と比較すると，はるかに高い感度を得ることが出来る。それに加え，ピークもシャープになり，不純物からの分離も良い。そのため FID 検出器を用いているにも拘わらず，検出限界が数ng/ml血液あるいは尿，という結果を得た。これは従来のパックドカラム GC を用いて電子捕獲検出器（ECD）や質量分析計（MS）で検出した場合の感度に匹敵する。従って，COT-GC-ECD や COT-GC/MS の組み合わせにより，さらに高感度を得る事が期待される。

COT オプションの価格は安く，しかも GC 操作は，従来と同じく簡単であることも本法の長所である。

短所としては，液化炭酸ガスは冷却時直接 GC 内部へ噴射されるため，実験室内空気中の炭酸ガス濃度は増加する。空気中の炭酸ガス濃度は3％以上になると人体に影響を及ぼし，6－10％では危険となるので，本法を使用する際には室内の空気の換気に特に注意すべきである。また，液化炭酸ガスは比較的消費が早いので，その分若干の費用を要する。

5．COT 法と cryo-focusing 法との相違点

今回提示した COT 法は，低温で VOCs を補捉するという点において以前より知られている cryo-focusing 法[4,5]と類似している。しかしながら，cryo-focusing 法はオーブン全体を冷却するのではなく，カラム導入部の一部だけが冷却される（Fig.4)。cryo-focusing 法では，気化室の底部に冷却/加熱チェンバーというものがとりつけられている。その中心に，ステンレス製の細いチューブが通っており，その下方には GC のキャピラリーカラムの前端がはまっている。ステンレス製の細いチューブには急速昇温のため，電熱コイルが巻かれている。冷却時には，チェンバーに液化炭酸ガスあるいは液体窒素で冷却されたガスが導入される。前者を用いた場合，チェンバー内部は－70℃に冷却され，後者の場合は，－180℃にまで冷却される。この様にして捕捉された VOCs を今度は揮発させるため，上述した電熱コイルにより加熱する。最近の cryo-focusing 装置では，冷却/加熱チェンバー内の温度は室温から－70℃以下まで，自由に設定出来る様になっている。cryo-focusing 装置のオプションは GC 機器自体と同じくらい高価であり，機器の扱いも比較的複雑である。COT と cryo-focusing 法につい

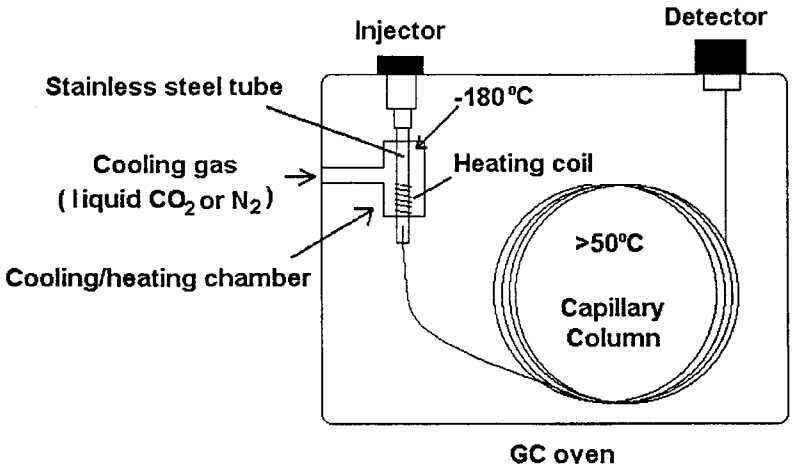

Fig. 4. Instrumental schema of cryo-focusing capillary GC. Only the introduction part attached to the capillary column is cooled by a gas passing through liquid nitrogen or liquid carbon dioxide. A small heating/cooling chamber is located just below the bottom of GC injection port just inside the GC oven. Around the stainless steel tube, a heating coil is wound for rapid heating of the tube.

て，データを直接比較検討すべきであるが，残念ながら我々の手元には，cryo-focusing 法を用いた実験データを持ち合わせていないし，文献データも殆どないのが現状である。

6．おわりに

我々は，COT 法によって，生体試料中の VOCs を高感度に GC 分析する方法の詳細を確立した。この方法では，シャープなピークが得られ，不純物からの分離は非常に良好である。装置も単純で，特別な GC 機器を必要とせず，オプションも安価である。また，分析操作は至って簡便である。水試料，固体試料に加えて，生体試料にも最適である。本法は法中毒学や環境化学の分野において有益な分析法であると結論される。

文　献

1) Otson, R. and Chan, C.: Int J Environ Anal Chem, **30**, 275−287 (1987).
2) Saferstein, R. and Park, S.A.: J Forensic Sci, **27**, 484−494 (1982).
3) Wampler, T. P., Bowe, W. A. and Levy, E. J.: J Chromagr Sci, **23**, 64−67 (1985).
4) Keil, E. M., Kolb, B. and Auer, M.: CLB Chemie in Labor und Biotechnik, **48**, 56−58 (1997).
5) Drury, J. A., Nycyk, J. A. and Cooke, R. W. I.: Free Radical Biol Med, **22**, 895−900 (1997).
6) Watanabe, K., Seno, H., Ishii, A., Suzuki, O and Kumazawa, T.: Anal Chem, **69**, 5178−5181 (1997).
7) Watanabe, K., Seno, H., Ishii, A., Kumazawa, T., Hattori, H. and Suzuki, O.: Jpn J Forensic Toxicol, **15**, 211−216 (1997).
8) Watanabe, K., Seno, H., Ishii, A., Kumazawa, T., Hattori, H. and Suzuki, O.: Jpn J Forensic Toxicol, **16**, 69−74 (1998).
9) Lee, X.-P., Kumazawa, T., Sato, K., Watanabe, K.,Seno, H. and Suzuki, O.: Analyst, **123**, 147−150 (1988).
10) Hattori, H., Iwai, M., Kurono, S., Yamada, T., Watanabe-Suzuki, K., Ishii,

A., Seno, H. and Suzuki, O.: J Chromatogr B, **718**, 285−289 (1998).
11) Ishii, A., Seno, H., Watanabe-Suzuki, K., Suzuki, O. and Kumazawa, T.: Anal Chem, **70**, 4873−4876 (2000).
12) Watanabe-Suzuki, K., Seno, H., Ishii, A., Kumazawa, T. and Suzuki, O.: J Chromatogr B, **727**, 89−94 (1999).
13) Seto, Y.: J Chromatogr A, **674**, 25−62 (1994).
14) Seto, Y.: Jpn J Forensic Toxicol, **12**, 175−191 (1994).
15) Hara, K., Kageura, M., Hieda, Y., Harada Y, Fujiwara, Y., Takamoto, M. and Kashimura, S.: Jpn J Forensic Toxicol, **9**, 94−95 (1991).