

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生体試料中アルキルナイトライト分解産物の高感度分析

メタデータ	言語: jpn 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, 野澤, 秀樹, 南方, かよ子, 鈴木, 修, 石井, 晃, 鈴木, 加奈子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1735

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生体試料中アルキルナイトライト分解産物の高感度分析

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

Sensitive determination of decomposition products of alkyl nitrites in body fluids by headspace capillary gas chromatography with cryogenic oven trapping

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

¹Department of Legal Medicine, Hamamatsu University School of Medicine

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

【目的】

最近, 法的規制のないいわゆる“合法ドラッグ”アルキルナイトライト(亜硝酸エステル)類が注目されている。アルキルナイトライトガスを吸入中に死亡する例や, 自殺目的で多量に経口摂取する例が時々経験され, 死因の究明上, 高感度かつ正確な分析法の開発・改良が必要である。アルキルナイトライトは, 吸入直後アルキルアルコールと亜硝酸に分解されるため, 分解産物である両者を定量するのが一番確実である。

今回我々は, n-ブチルナイトライト, イソブチルナイトライト, イソアミルナイトライトの3種類の分解産物であるn-ブチルアルコール, イソブチルアルコール, イソアミルアルコールをヘッドスペース抽出法(HS)と低温オーブントラッピングガスクロマトグラフィー(COT-GC)を組み合わせて高感度検出を試みた。

また, 血中亜硝酸は血球中ヘモグロビンを酸化してメトヘモグロビンを生成する。今回我々は, 実際に合法ドラッグに多く含まれるイソブチルナイトライトガスを吸入して, 採血後直ちにCOT-GCで分解産物であるイソブチルアルコールを定量すると同時に, 血中メトヘモグロビン濃度を吸光光度計を用いて定量した。

【実験方法】

試料の調製: 3種類のアルキルナイトライトの分解産物であるn-ブチルアルコール, イソブチルアルコール, イソアミルアルコールと内部標準物質(IS)であるt-ブチルアルコールの標準溶液は, 各々 $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ になるようメタノールに溶解調製した(a溶液)。全血や尿などのヒト試料への添加実験に使用するため, 各々 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ になるようメタノールで調製した(b溶液)。

HS抽出: 7mlセプタム付きスクリューキャップバイアルに, Na_2SO_4 0.5 g, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 0.1 g, ヒト全血あるいは尿 1.0 ml (上記調製したb溶液 $10\mu\text{l}$ を添加: オンバイアルで各化合物 $1\mu\text{g}$)を加え, よく混和する。ヒートブロックにて, 55°C , 15分加熱したのち, HS気相サンプル 5 mlを抜き取り, 素早くオープン温度 0°C に冷却したGCへ注入する。

GC条件: 分析カラム, Rtx-BAC2 (30 m x 0.32 mm id, 膜厚 $1.2\mu\text{m}$) ; 注入口温度, 240°C ; 検出口温度, 240°C ; ヘリウム流量, 3 ml/min ; オープン昇温プログラム, 0°C (1 min) $\rightarrow 10^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 120^\circ\text{C} \rightarrow 20^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 240^\circ\text{C}$ で分析を行った。

吸入実験：健康な成人男性 3 名（本研究従事者）が吸入実験を行った。すなわち、チャック付きビニール袋（大きさ 28 x 20 cm，容積 2.24 l）内にイソブチルナイトライト原液 5 ml をしみ込ませたガーゼ 1 枚を容れ，ビニール袋開口部からイソブチルナイトライトガスを 2 分間吸入する。吸入前，直後，10 分後に採取した全血につき，COT-GC を用いて，血中イソブチルアルコール濃度を測定する。同時に，吸光光度計を用いて，血中メトヘモグロビン濃度を測定する。

【結果】

まず始めに，ヒト全血に n-ブチルナイトライト，イソブチルナイトライト，イソアミルナイトライトを添加して分析を行ったところ，血中では直ち（数分以内）にアルキルナイトライト類はすべて分解され，アルコール類に変化することが判明した。分解産物である n-ブチルアルコール，イソブチルアルコール，イソアミルアルコールの HS-GC 分析のための初期オープン温度について，-60℃から 30℃の範囲で検討したところ，0℃でピークがもっともシャープとなり，不純物からの分離も良好なため，初期オープン温度を 0℃に設定した。全血あるいは尿（各 n=10）につき，0.2，1，10 μg/ml の 3 点の濃度で，上記 3 種のアルコールの抽出効率，日内変動率，日替わり変動率を測定したところ，抽出効率は，全血で 0.469-5.43%，尿で 1.41-8.14%であった。日内変動率と日替わり変動率は，全血で 13.8%以下，尿で 12.9%以下とほぼ良好であった。検量線は，IS 濃度 1 μg/ml を使用して，0.2-10 μg/ml の範囲でにおいて 11 点の濃度をとって作成したところ，いずれの化合物でも良好な直線性を示した。検出限界は全血では 10 ng/ml，尿では 5 ng/ml であった。

実際にイソブチルナイトライトガスを吸入したヒト血中イソブチルアルコールやメトヘモグロビン濃度も簡便に定量することができた。

【考察】

アルキルナイトライト類は光によって分解し，水溶液中でも容易に加水分解し，各アルコールと亜硝酸を生じる。血液の中では瞬時に分解が始まることが知られている。今回我々は，HS 法と COT-GC を組み合わせて，アルキルナイトライト分解産物であるアルキルアルコール類の検出法を設定した。Rtx-BAC2 ミドルボアキャピラリーカラムを用いて，0℃の低温で微量のアルコール類の検出を行った結果，簡便かつ高感度で分析することができた。全血・尿とも定量性・再現性は良好で，実際試料の測定も可能であった。本法はアルキルナイトライト類による中毒例や亡例の死因究明に有益な方法であると思われる。

【Summary】

A simple and sensitive method is presented for determination of n-butyl alcohol, isobutyl alcohol and isoamyl alcohol, which are decomposition products of alkyl nitrites in body fluids, using capillary gas chromatography (GC) with cryogenic oven trapping. After heating a blood or urine sample containing each alkyl alcohol and *t*-butyl alcohol (IS) in a 7-ml vial at 55 °C for 15 min, 5 ml of the headspace vapor was drawn into a gas tight syringe and injected into a GC port. All vapor was introduced into an Rtx-BAC2 middle-bore capillary column in the splitless mode at 0 °C of oven temperature to trap entire analytes, and then the oven temperature was programmed up to 240 °C for GC measurements by flame ionization detection. The present conditions gave sharp peaks of each compound and IS, and low background noises for whole blood or urine samples. Isobutyl alcohol and methemoglobin in human whole blood, after inhalation of isobutyl nitrite gas for 2 min, could be actually determined.