

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の法中毒的応用

メタデータ	言語: jpn 出版者: 日本法医学会 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 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/1865

学術奨励賞受賞講演

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の法中毒的応用

渡部加奈子 (浜松医大)

【はじめに】

環境化学領域では、purge-and-trap法とGCの組み合わせが揮発性有機化合物(VOCs)を測定する方法として最も感度が高いとされてきた。しかしこの方法では、分析対象物が大容量の水試料や固体試料では問題はないが、法医学で扱うヒト全血や尿、組織ホモジネートでは蛋白質を多量に含むため、濃縮過程で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や汚染を招き測定が困難となる。装置は比較的大型で高価であり、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cryofocusing法がある。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。特別な装置を必要とし、価格もやや高価である。実際に生物試料中から薬毒物分析した報告も殆ど見当たらない。

最近の新しいGC機器のマイクロPC制御部分の発展により、GCオープン温度を迅速かつ正確に0℃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。我々はこのシステムをそのままヒト全血や尿などの生物試料中のVOCsを大量にトラップするのに利用し、低温オーブントラッピングガスクロマトグラフィー(cryogenic oven trapping gas chromatography: COT-GC)と命名した。本法では、5 mlやそれ以上という大容量のヘッドスペース(HS)気体試料が、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、冷えたカラム入り口の狭い領域にロスなく凝集される。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100倍程度、感度が高い。

筆者は、法中毒学上しばしば中毒死の原因となるクロロホルム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。その後、一連のVOCsについても本法を用いた研究を展開した。

【分析装置】

分析機器は、既存のGCにサイホン管付き液化炭酸ガスポンペをオプションとして装着しただけの単純な装置である。本分析では液化炭酸ガスを使用して冷却するが、冷却温度が低い程、液化炭酸ガスの消費は多くなる。ポンペ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、適量の液化炭酸ガスをGC内部へ噴射し、オープン全体を目的の温度に急速冷却する。このオプション装着費は15万円程度と安価であり、マイクロPC制御が備わっている最近の機器であれば、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。

【分析方法】

分析カラムの選択とカラムの耐性：

溶融シリカキャピラリーカラム(殆どが、カラム内径0.32 mm,長さ30 mのメディウムポアカラム)を用いてVOCsの一連の分析を行った。本法ではカラムを0℃以下に冷却する事が多いので、カラムの使用温度範囲を確認する事が大切である。一連の実験で、メーカーが提示する最低温度より更に数十度冷却しても、数ヶ月の期間、カラムの劣化は認めなかった。

HS抽出とGCへの試料注入：

本法では、ヒト試料中からのVOCsの抽出には、簡便なHS法を用いる。HS抽出条件も分析化合物により異なるが、ここではクロロホルム分析を例に挙げる。0.5 mlの全血と同量の蒸留水を入れた7 mlスクリーキャップバイアルに、クロロホルムと内部標準物質であるメチレンジクロリド各々0.5 μgを含む蒸留水10 μlを添加する。素早く蓋を閉め良く混和する。その後55℃のヒートブロックで20分加熱し、HS気相の5 mlをガスタイトシリンジにて抜き取り、素早く-30℃に冷却したGCへ注入する。スプリットレスモードで注入した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3 ml/minの速度で流れ、オープンを昇温しながらFID検出器を用いて検出する。分析化合物によっては、抽出効率を高めるため塩析効果剤や抗酸化剤を加えると、感度は上昇する。

初期オープン温度：

本法では、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し、液化炭酸ガスの消費量も増加する。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に設定するのが望ましい。クロロホルムの分析では、0から-40℃までの各温度について検討した結果、0から-30℃まで温度を下げるにつれ、ピークはシャープとなり分離も良好であったが、

40℃では不純ピークが出現したため、初期温度を-30℃と設定した。内因性エタノールの分析では、初期温度を-60℃に設定した。

GC分析条件 (クロロホルムの分析例) :

分析カラム, Rtx-Volatiles (長さ30 m, 内径0.32 mm, 膜厚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℃, 検出器温度, 280℃; He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 (-30~100℃: 10℃/min; 100~280℃: 20℃/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0.5~1 ml程度の気体をパックドカラムへ注入するが、ピークはブロードで分離は悪い。ワイドポ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0.1~0.5 mlしか注入できない。メディアムポアキャピラリーカラムを用いる場合、スプリットモードでせざるを得ないため、注入量の約1~5%の試料しかGCカラムへ導入できず感度が低い。COT-GCでは、5 mLのHS気相を冷えた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10~50倍感度が上昇する。本法では、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では、FID検出器を使用した場合でも、全血や尿からの検出限界は約数ng/mlと高感度である。仮にECD, NPD, MS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。

【結論】

筆者は、生物試料中のVOCsの新しい高感度分析法として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。その結果、大変シャープなピークが得られ、不純物からの分離も優れている。ヒト全血や尿などの生物試料がごく微量しか得られない場合には特に本法は適する。COT装置設置価格は安く、機器の扱いや維持も簡便である。以上の理由から、COT-GC法は、法医学の分野で非常に有用性が高い分析法であると思われる。