

Application Data Sheet

No. 140

GC-MS

Gas Chromatograph Mass Spectrometer

ヘッドスペース-GC/MSを用いた血液中揮発性 毒物の分析 (2) ~シアン化物及びアジ化物~

Analysis of volatile toxic substances using headspace GC/MS (2)
~ Cyanide and Azide ~

警察及び法医学分野では、事件、事故や犯罪などの科学捜査のため、さまざまな揮発性物質を測定します。血液中のアルコール(エタノール)は、飲酒による交通事故、飲酒の上での暴行・傷害や急性アルコール中毒などの証明のため測定されます。

トルエン、メタノールおよび酢酸エチルを主成分とするシンナーは、麻酔や興奮作用を有するものもあり、吸引による乱用が社会問題になり、乱用による弊害防止のため法規制がされています。

また、シアン化物やアジ化物は産業分野で利用されており、比較的入手がしやすい化合物であったため、これらの毒物の混入事件が大きな社会問題となりました。それ以降、犯罪や自殺などの原因の究明のため、これらの毒物の検査体制の強化が行われています。

血液中アルコールやシンナーの測定は、ヘッドスペース法を用いることにより、比較的簡単に測定することができ、科学捜査研究所や大学法医学教室では、日常的に行われています。

シアン化物やアジ化物は、過去の報告においてヘッドスペース法での測定例も報告されていますが、PFB誘導体化-溶媒抽出を行い、液体注入でのGC/MSの測定が一般的に行われています。しかし、この方法では、誘導体化や抽出操作などの前処理で手間がかかってしまいます。

本アプリケーションでは、ヘッドスペース-GC/MS法を用いて、シアン化物およびアジ化物の測定を検討するとともに、日常的にヘッドスペースで測定されているアルコールやシンナーと同一のカラムで行える条件の最適化について検討しました。そのうち、シアン化物及びアジ化物の測定結果を紹介します。

試料調製

血液中アルコール分析となるべく同一操作で行えることを目的として、内部標準は1-プロパノールを用いました。標準溶液及び試料調製については、「薬毒物試験法と注解2107 日本薬学会編」を参考にしました。

標準溶液

下記の標準溶液を適宜調製しました。

- 1-プロパノール水溶液 (0.5 mg/mL)
1-プロパノールを5 mg量り取り、超純水に溶解して10mLにメスアップして調製しました。
- アスコルビン酸水溶液 (0.1M)
L-アスコルビン酸1.76gを超純水に溶解して10mLにメスアップして調製しました。
- リン酸水溶液 (50%)
濃リン酸(85%)を超純水で1.7倍に希釈して調製しました。
- シアン化物イオン(CN-)標準溶液 (1 mg/mL)
シアン化カリウム(KCN) 250 mgを0.1 M NaOH水溶液100 mLでメスアップして調製しました。
- アジ化物イオン(N3-)標準溶液 (1 mg/mL)
アジ化ナトリウム(Na₃N) 155 mgを超純水に溶解して100 mLにメスアップして調製しました。

試料調製

シアン化物およびアジ化物用の検量線用標準試料は、馬溶血に0.15, 0.5, 1.5, 5.0, 10.0 µg/mLの濃度になるように添加しました。各濃度に調製した馬溶血0.5 mLを20 mLヘッドスペースバイアルに添加し、次に内部標準の1-プロパノール水溶液 (0.5 mg/mL)を0.5 mL添加しました。その後、0.1Mアスコルビン酸水溶液を0.2 mL添加し、内壁沿いに50%リン酸0.2 mLを加えて、速やかにヘッドスペースのキャップで密栓してかく拌しました。

分析条件

Table 1にヘッドスペースおよびGC/MSの分析条件を示します。アルコール、シアン、アジ化物は同一のヘッドスペースおよびGC/MS条件で測定し、シンナーのみスプリット比と検出器電圧を変更した条件で測定を行いました。HS-20では、ヘッドスペース条件が同一な場合には、GC/MSの分析条件を変更しても、同一のバッチファイルでメソッドを切り替えて測定することが可能です。

本アプリケーションは、GC-MS/MSのGCMS-TQ™8040で採取しておりますが、シングル-GC/MSのGCMS-QP™2020でも同様の結果を得ることができます。

Table 1 分析条件

HS	: HS-20				
GC-MS	: GCMS-TQ8040				
[HS]		[GC]			
ヘッドスペースモード	: ループ	カラム	: Rtx™-BAC2 (長さ 30 m, 0.32 mm I.D., df=1.2 μm, レステック社)		
オープン温度	: 60°C	カラムオープン温度	: 40°C (5分)→(40°C/分)→200°C (1分)		
サンプルライン温度	: 100°C	キャリアガス	: ヘリウム		
トランスファーライン温度	: 150°C	キャリアガス制御	: 線速度 (62.5 cm/秒)		
バイアル加圧用ガス圧力	: 70 kPa	注入モード	: スプリット		
バイアル保温時間	: 10 分	スプリット比	: 10:1 (アルコール、シアン、アジ化物)		
バイアル加圧時間	: 0.5 分		: 30:1 (シンナー)		
ロード時間	: 0.5 分	[MS]			
ロード平衡化時間	: 0 分	インターフェース温度	: 230°C	イオン源温度	: 200°C
注入時間	: 0.5 分	溶媒溶出時間	: 0.7 分	データ採取時間	: 1 - 10 分
ニードルフラッシュ時間	: 5 分	測定モード	: Scan	質量範囲	: m/z 10-300
GCサイクルタイム	: 18 分	イベント時間	: 0.2 秒	エミッション電流	: 60 μA (標準)

※ 装置の状態によって異なりますので、検出器電圧などは最適化する必要があります。

血液中シアン化物分析結果

ブランク及び0.15 μg/mL標準試料を測定して得られたマスクロマトグラムをFig. 1に、マススペクトルをFig. 2にそれぞれ示します。定量するためのイオンはHCNイオンを示すm/z 27を用いました。内部標準補正によって得られた検量線(0.15, 0.5, 1.5, 5, 10 μg/mL)をFig. 3に示します。検量線の相関係数(R)は0.9999以上であり、良好な直線性を示しました。

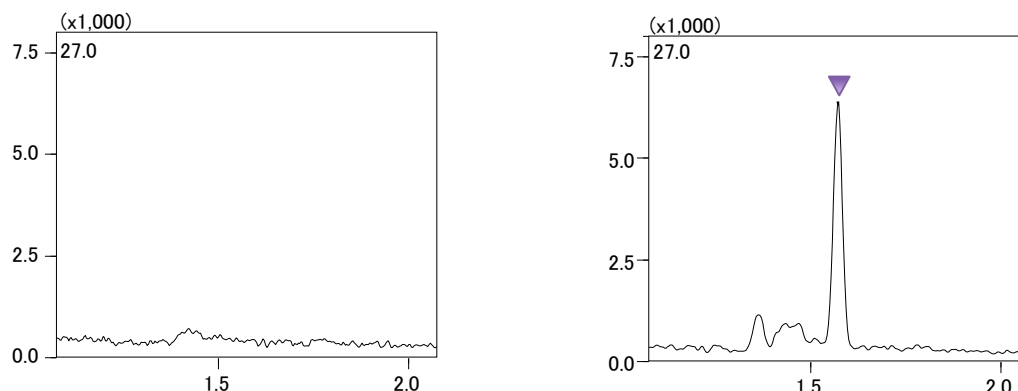


Fig. 1 ブランクおよび0.15 μg/mL標準試料を測定したシアン化物のマスクロマトグラム
左: ブランク、右: 0.15 μg/mL標準試料

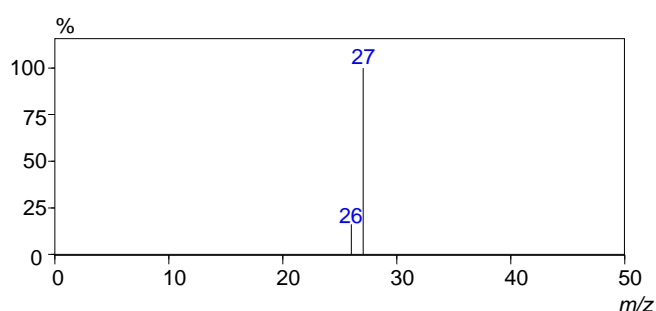


Fig. 2 シアン化物のマススペクトル

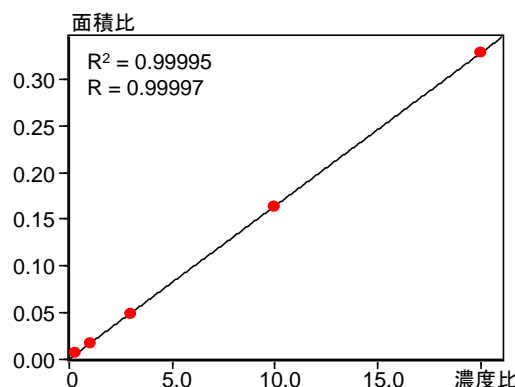


Fig. 3 シアン化物の検量線 (濃度: 0.15 ~ 10 μg/mL)

1.5 µg/mLの標準試料(馬溶血)を1日あたり8回の繰り返し測定を5日間行い、日内再現性および日間再現性について評価を行いました。初日における日内再現性(n=8)をTable 2に、5日間における日間再現性をTable 3にそれぞれ示します。8回繰り返しにおける日間再現性の真度は97.2 ~ 103.6% (平均100.5%)であり、繰り返し再現性(%RSD)は約2%でした。5日間における定量濃度における日間再現性は、5%以内であり良好な定量性を示しています。

Table 2 面積比および濃度の日内再現性 (n=8, 初日)

	面積比	濃度 (µg/mL)	真度 (%)
1st	0.053	1.546	103.0
2nd	0.054	1.555	103.6
3rd	0.053	1.519	101.2
4th	0.052	1.503	100.2
5th	0.051	1.476	98.4
6th	0.051	1.457	97.2
7th	0.053	1.520	101.3
8th	0.052	1.486	99.1
平均	0.052	1.508	100.5
標準偏差(SD)	0.001	0.034	2.251
%RSD	2.101	2.240	2.240

Table 3 5日間における定量値の日間再現性

	平均面積比	平均濃度 (µg/mL)	濃度%RSD (日内再現性)
1st Day	0.052	1.508	2.240
2nd Day	0.051	1.463	1.577
3rd Day	0.056	1.610	1.126
4th Day	0.055	1.603	2.287
5th Day	0.057	1.645	1.359
日間再現性(%RSD)	4.614	4.907	

血液中アジ化物分析結果

ブランク及び1.5 µg/mL標準試料を測定して得られたマスクロマトグラムをFig. 4に、マススペクトルをFig. 5にそれぞれ示します。定量するためのイオンはHN₃イオンを示すm/z 43を用いました。アジ化物のピークは少しテーリングを起し、そのため他の揮発性毒物よりも感度が低くなりますが、死亡例における血中濃度は約5 µg/mL以上と報告されているため、感度的に充分であると判断することができます。内部標準補正によって得られた検量線(1.5, 5, 10 µg/mL)をFig. 6に示します。原点は通りませんが、検量線の相関係数(R)は0.999以上であり、良好な直線性を示しました。

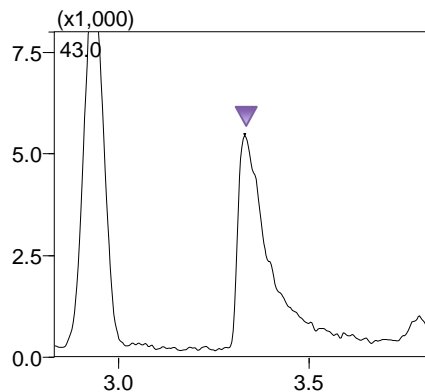
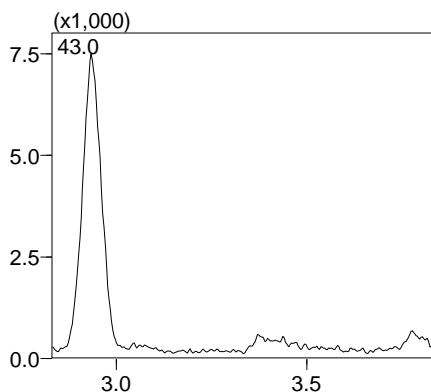


Fig. 4 ブランクおよび1.5 µg/mL標準試料を測定したアジ化物のマスクロマトグラム
左: ブランク、右: 1.5 µg/mL標準試料

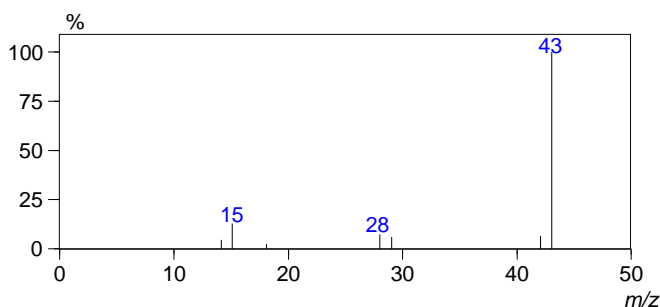


Fig. 5 アジ化物のマススペクトル

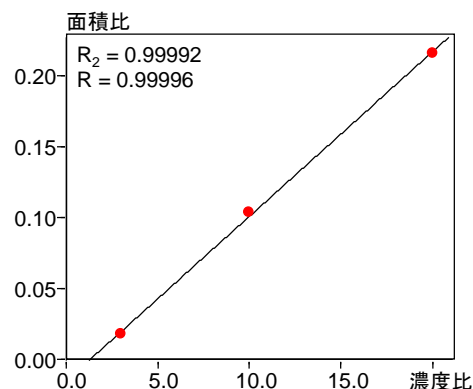


Fig. 6 アジ化物の検量線 (濃度: 1.5 ~ 10 µg/mL)

1.5 µg/mLの標準試料(馬溶血)を1日あたり8回の繰り返し測定を5日間行い、日内再現性および日間再現性について評価を行いました。初日における日内再現性(n=8)をTable 4に、5日間における日間再現性をTable 5にそれぞれ示します。8回繰り返しにおける日間再現性の真度は94.3 ~ 114.5% (平均101.6%)であり、繰り返し再現性(%RSD)は約7%でした。5日間における定量濃度における日間再現性は、2%以内であり良好な定量性を示しています。

Table 4 面積比および濃度の日内再現性 (n=8, 初日)

	面積比	濃度 (µg/mL)	真度 (%)
1st	0.018	1.420	94.7
2nd	0.018	1.449	96.6
3rd	0.020	1.513	100.9
4th	0.022	1.593	106.2
5th	0.023	1.623	108.2
6th	0.025	1.718	114.5
7th	0.019	1.464	97.6
8th	0.018	1.415	94.3
平均	0.020	1.524	101.6
標準偏差(SD)	0.003	0.110	7.307
%RSD	12.594	7.190	7.190

Table 5 5日間における定量値の日間再現性

	平均面積比	平均濃度 (µg/mL)	濃度%RSD (日内再現性)
1st Day	0.020	1.524	7.190
2nd Day	0.019	1.489	6.258
3rd Day	0.019	1.460	6.618
4th Day	0.019	1.463	7.077
5th Day	0.019	1.465	4.552
日間再現性(%RSD)	3.295	1.839	

まとめ

血液中のアルコール(エタノール)と同じカラムおよび分析条件で、揮発性毒物のシアン化物およびアジ化物を測定できるかについて検討しました。検査試料にアスコルビン酸水溶液とリン酸水溶液を添加するだけで、血中アルコール検査と同一の分析条件でシアン化物とアジ化物を測定することが可能でした。

HS-20ヘッドスペースサンブラは、高いバイアル保温性能とサンプルループを不活性かつ最短に抑えているので、キャリアオーバーが起こりにくいいため、血中アルコールのような高濃度のエタノール分析とシアン化物やアジ化物の微量の分析を切り替えて測定することが簡単に行えます。

参考資料

[1] 日本薬学会編: 薬毒物試験法と注解 2017 (東京化学同人)

GCMS-QPおよびGCMS-TQは、株式会社島津製作所の商標です。

Rtxは、Restek Corporationの商標です。

その他、本書に掲載されている会社名/サービス名およびロゴは、各社の商標および登録商標です。

なお、本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

株式会社 島津製作所

分析計測事業部 <http://www.an.shimadzu.co.jp/>

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。

初版発行: 2018年3月
© Shimadzu Corporation, 2018