

# Application News

## Brevis GC-2050を用いた 血中アルコール類のデュアルカラム分析

宮林 花道、小林 永佑、真保 恵美子

### ユーザーベネフィット

- ◆ 分離特性の異なる2本のカラムを用いることで、高精度かつハイスループットな血中アルコール分析が可能です。
- ◆ コンパクトな設計であるBrevis GC-2050を使用することで、実験室の省スペース化ができます。
- ◆ ヘリウムの代替ガスとしてキャリアガスに水素を用いることができます。これにより分析時間の短縮も可能です。

### ■はじめに

エタノールを主体とする血中のアルコール類および揮発性有機化合物の測定は、法医学の分野で飲酒による酩酊度の判定や犯罪性の評価などに活用されています。

この分析には一般的にヘッドスペースサンブラおよびFIDを搭載したガスクロマトグラフを使用します。正確性が求められる血中アルコール分析では、クロスチェックのために、分離特性の異なる2本のカラムを用いた分析を実施する必要があります。正確性と同時に迅速性も求められますが、1台のHS-GCシステムに2種類のカラムと2台のFIDを繋ぐ構成にすることで、1回の分析でもクロスチェックが可能です。

ガスクロマトグラフには当社ハイエンドモデルのNexis™ GC-2030だけでなく、コンパクトな設計のBrevis GC-2050を使用可能です。GC-2050は既存GCと比較してシステム幅を約35%削減可能です。さらに、コンパクトながら2本のカラムを取り付けることができ、ラボの生産性向上にも貢献します。本稿では、ガスクロマトグラフBrevis GC-2050およびヘッドスペースサンブラHS-20 NX (図1)を使用した血中アルコール分析例をご紹介します。血中アルコール分析専用高分離カラムSH-BAC PLUSシリーズを使用し、エタノール標準試料の検量線直線性、繰り返し再現性、および血中揮発性有機化合物7種類の分離を確認しました。また本分析は昨今のヘリウム不足に対応し、キャリアガスに水素を用いた高速分析例です。

※本分析例では市販の羊無菌血液を使用しました。



図1 Brevis™ GC-2050とHS-20 NX  
(GC-2050用省スペーストランスファーライン)

表1 カラム接続時の必要部品一覧

図2,3中の番号	部品名	P/N	備考
①	2-hole Ferrule	225-19056	10個入り
②	Twin MS Kit	225-20201-91	10個入り
③	SMI Union Kit	227-35024-02	0.4 mm - 0.5 mm
④	不活性化処理チューブ	227-35023-02	2 mチューブを 100 mm × 2にカット

### ■装置の準備

本分析では図2のように、ヘッドスペースサンブラに分離特性の異なる2本のカラムを接続し、2つのFIDを使用しました。2つのラインで同時分析することにより、定性能力および生産性を向上させることができます。カラムには、血中アルコール分析に適したSH-BAC PLUS1 (30 m × 0.32 mm I.D., 1.8 μm) およびSH-BAC PLUS2 (30 m × 0.32 mm I.D., 0.6 μm) を用いました。

2本のカラムの同時分析に必要な部品一覧を表1に示し、HS側に接続するカラムへの各部品の取付け方法を図3に示します。2本の分析カラムはそれぞれSMI Union Ferrule (0.4 mm - 0.5 mm) で不活性化処理チューブ (0.22 mm I.D., 100 mm) に繋ぎました。HS接続ナット部分には、2-hole Ferruleとtwin MS kitを使用しました。また、HS-20 NXのサンプルループには0.5 mLループ (P/N: 225-21889-85) を使用しました。キャリアガスにはヘリウムの代替ガスとして水素を、HS-20 NXのバイアル加圧ガスには窒素を使用しました。

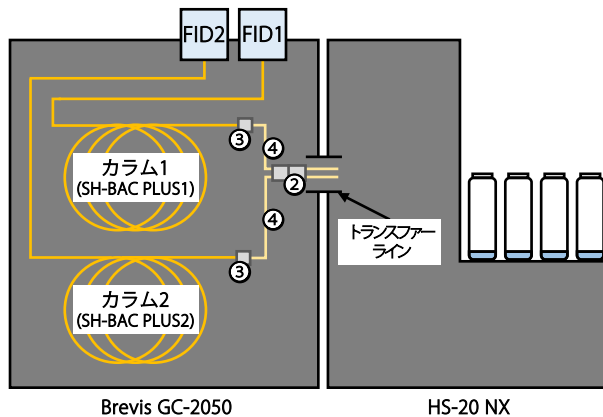


図2 HS-GCデュアルカラム分析の模式図

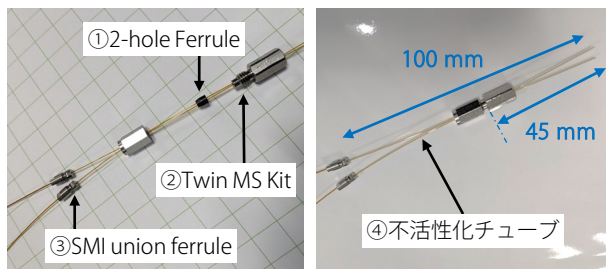


図3 HS側カラムへの各部品の取付け方法

## ■ 分析条件

分析条件を表2に示します。

表2 分析条件

GC Model	: Brevis GC-2050
Headspace Sampler	: HS-20 NX
[HS-20 NX]	
Oven Temp.	: 65°C (20 min)
Sample Line Temp.	: 90°C
Transfer Line Temp.	: 100°C
Vial Stirring	: 3
Vial Pressurization Time	: 0.5 min
Pressure Equilib. Time	: 0.1 min
Loading Time	: 0.5 min
Load Equilib. Time	: 0.1 min
Injection Time	: 0.5 min
Needle Flush Time	: 3 min
GC cycle Time	: 4 min
Vial Pressure	: 80 kPa, Nitrogen
Sampling Volume	: 0.5 mL
[GC-2050]	
Carrier Gas	: Hydrogen
Carrier Gas Control	: Constant Linear Velocity (60 cm/sec)
Purge Flow	: 0 mL/min
Injection Mode	: Split 1:13
Column	: SH-BAC PLUS1 (P/N : 227-36260-01) (30 m × 0.32 mm I.D., 1.8 μm) SH-BAC PLUS2 (P/N : 227-36263-01) (30 m × 0.32 mm I.D., 0.6 μm)
Column Temp.	: 40°C (3 min)
FID Temp.	: 250 °C
FID H2 Flow Rate	: 32 mL/min
FID Make up Flow Rate	: 24 mL/min, Nitrogen
FID Air Flow Rate	: 200 mL/min

## ■ サンプルの準備

図4の手順でHSバイアルに試料を封入しました。20 mL容量のHSバイアルに、水または血液を480 μL添加した後、検量線用標準試料を20 μL、続けて内部標準試料を100 μL添加し、密栓しました。実際の血液（未知試料）を分析する際には、血液500 μLと内部標準試料100 μLを封入する想定です。表3に各標準試料の濃度を示します。



図4 サンプル作製手順

表3 試料調製濃度一覧

試料・化合物	標準試料濃度	バイアル内 (内部標準試料を除く) 最終濃度
検量線用標準試料 (エタノール水溶液)	6 mg/mL	0.2 mg/mL
	30 mg/mL	1 mg/mL
	60 mg/mL	2 mg/mL
	120 mg/mL	4 mg/mL
内部標準試料 (tert-ブタノール水溶液)	6 mg/mL	1 mg/mL

## ■ 分析フロー

血液試料の分析を実施する際の推奨分析フローを図5に示します。

再現性を向上させるために、はじめにプレコンディショニングとして高濃度サンプル分析を実施しました。エタノールやメタノールなどの極性成分はサンプルラインへ吸着しやすい性質があり、分析開始直後は面積値が低く検出され、分析を繰り返すうちに面積値が増加する場合があります。

そこで、高濃度サンプル分析により吸着活性点をあらかじめマスクングしてから連続分析を始めることで、面積値変動を抑制する効果が期待できます。

高濃度サンプルとして、エタノールとtert-ブタノールの各10 mg/mL混合水溶液を使用しました。高濃度サンプル分析後は、ブランクとして水を2回分析しました。水ブランク分析時のクロマトグラムを確認し、キャリアオーバーがないことを確かめました。

プレコンディショニング実施後、検量線作成のための標準試料5点を分析しました。次に、血液試料を分析しました。分析時間の経過に伴う面積値変化を確認するため、血液試料5回分析ごとにバイアル内最終濃度1 mg/mLのエタノール水溶液標準試料を分析しました。その後も、血液試料5回分析ごとに1 mg/mLエタノール水溶液標準試料の分析を実施しました。

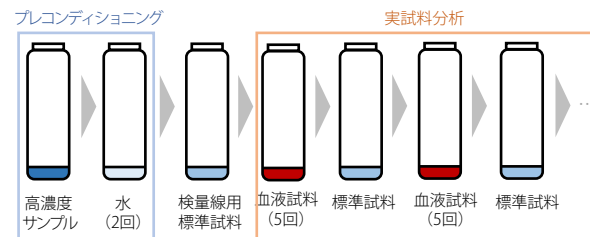


図5 推奨分析フローイメージ

## ■ 検量線の直線性確認

検量線用標準試料を用いて作製したサンプルについて、各濃度6回連続分析の平均面積値から作成した検量線を図6に示します。溶媒に水および血液を用いて、その誤差を確認しました。水溶液中標準試料に比べて、血液中標準試料ではエタノールおよびtert-ブタノールの面積値が大きく検出され、検量線の傾きにもわずかな差が見られました。これは、血液に含まれる塩などのマトリクスの影響により対象化合物の気液平衡が気相側に偏るため、またその変化の度合いが化合物ごとに異なるためと考えられます。

水溶液、血液のいずれを使用した場合も、検量線の相関係数は0.999を越えており良好な直線性が得られました。

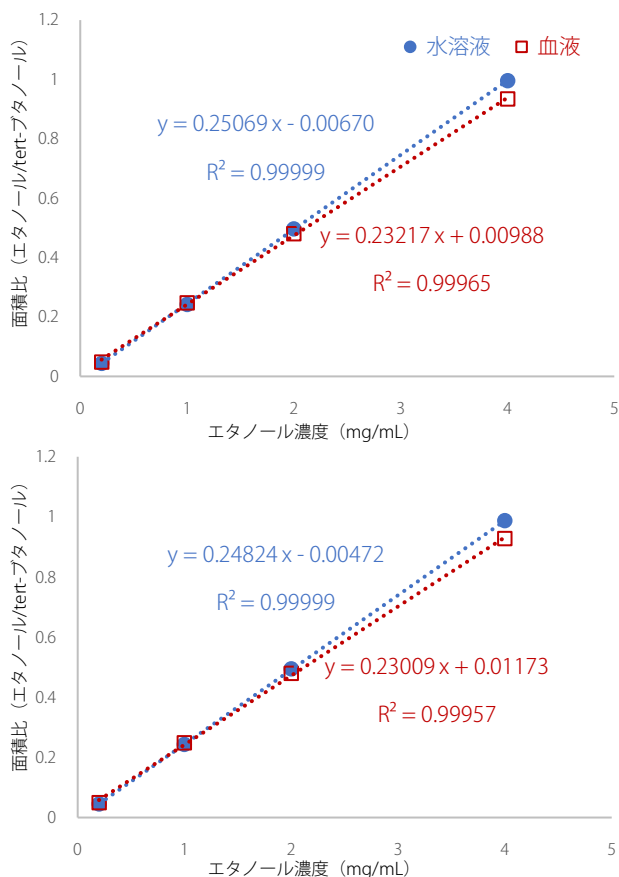


図6 エタノール標準試料の検量線  
(上：SH-BAC PLUS1、下：PLUS2)

## ■ 血液試料の分析

模擬試料として溶媒に血液を使用し、表3の検量線用標準試料と内部標準試料を添加して、濃度既知（内部標準試料を除くバイアル内最終濃度0~4 mg/mL）のサンプルを作製しました。上記試料分析時の重ね書きクロマトグラムを図7に示します。また、各濃度の模擬試料について、上述の検量線を用いてエタノールを定量した結果を表4に示します。水溶液および血液検量線の傾きの違いから、水溶液検量線使用時は定量値が低くなる傾向にありましたが、いずれの検量線使用時も、理論値と定量値の誤差は10%以内でした。分析運用時には血液を使用した検量線作成が好ましいですが、難しい場合には上記のような差に留意したうえで、水溶液検量線を使用することを推奨します。

また、血液試料5回分析ごとに測定した1 mg/mL標準試料の面積比再現性は%RSD=1.29(n=6)となり、良好な再現性が得られました。

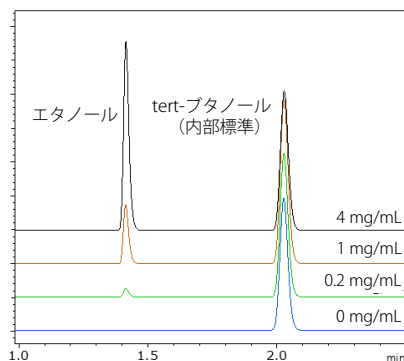


図7 検量線用標準試料および内部標準試料を含む血液の重ね書きクロマトグラム

表4 模擬試料の定量値および理論値との誤差 (n=5)

バイアル内最終濃度 (内部標準試料を除く)	水溶液検量線 使用時		血液検量線 使用時		
	定量値 (mg/mL)	誤差 (%)	定量値 (mg/mL)	誤差 (%)	
0.2 mg/mL	SH-BAC PLUS1	0.192	-4.0	0.185	-7.5
	SH-BAC PLUS2	0.187	-6.5	0.183	-8.5
1 mg/mL	PLUS1	0.989	-1.1	1.050	+5.0
	PLUS2	0.982	-1.8	1.047	+4.7
2 mg/mL	PLUS1	1.922	-3.9	2.064	-3.2
	PLUS2	1.907	-4.7	2.052	+2.6
4 mg/mL	PLUS1	3.736	-6.6	4.036	+0.9
	PLUS2	3.700	-7.5	4.001	+0.0

## ■ 血中揮発性有機化合物7種の分離確認

分離確認のため、血中揮発性有機化合物7種（メタノール、エタノール、1-プロパノール、2-プロパノール、アセトン、tert-ブタノール、アセトアルデヒド）の各0.2 mg/mL（バイアル内最終濃度）混合水溶液を分析しました。得られたクロマトグラムを図8に示します。全ピークが2.4分以内に検出され、分離も良好でした。また、それぞれのカラムで異なる分離パターンが得られ、正しく定性できることを確認しました。表5に各成分の保持時間再現性と、内部標準であるtert-ブタノールに対する面積比の再現性（n=20）を示します。

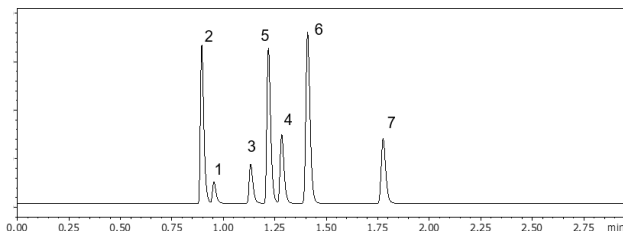
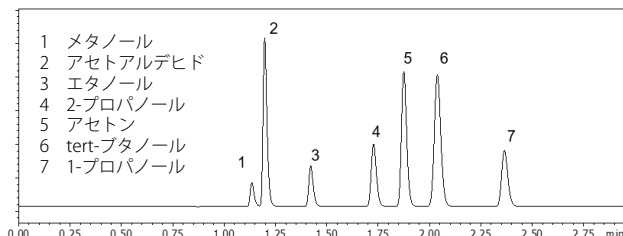


図8 血中揮発性有機化合物7種混合水溶液のクロマトグラム  
(上：SH-BAC PLUS1、下：SH-BAC PLUS2)

表5 各成分の保持時間再現性と面積比再現性%RSD (n=20)

ID	化合物名	SH-BAC PLUS1		SH-BAC PLUS2	
		保持時間	内部標準に対する面積比	保持時間	内部標準に対する面積比
1	メタノール	0.0066	0.63	0.0165	0.57
2	アセトアルデヒド	0.0077	1.24	0.0082	0.95
3	エタノール	0.0067	0.48	0.0121	0.46
4	2-プロパノール	0.0069	0.38	0.0080	0.47
5	アセトン	0.0060	0.70	0.0101	0.36
6	tert-ブタノール	0.0062	-	0.0104	-
7	1-プロパノール	0.0066	0.38	0.0010	0.36

## ■ まとめ

Brevis GC-2050およびHS-20 NXを用いて、血中アルコール類の分析を実施しました。プレコンディショニングを実施することで、データの信頼性が高まり、その後の連続分析について良好な再現性が得られました。実際の未知試料を模した血液を分析した場合も、同様に良好な再現性および直線性を得ることができました。

また本分析では、ヘリウムの代替として水素をキャリアガスに用いました。本分析システムにより、高速かつ省スペースで信頼性の高い結果が得られました。

BrevisおよびNexisは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行：2023年 9月  
 A改訂版発行：2024年 9月

島津コールセンター ☎ 0120-131691

本文書に記載されている製品は、医薬品医療機器法に基づく医療機器、体外診断用医薬品として承認・認証を受けておりません。本文書に記載されている分析手法を治療診断目的およびその手続き上で使用することはできません。

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。本文中に記載されている会社名、製品名、サービスマークおよびロゴは、各社の商標および登録商標です。本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。

▶ アンケート

**関連製品** 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。



▶ Brevis™ GC-2050  
ガスクロマトグラフ

## 関連分野

▶ Clinical Research

▶ Forensics

▶ Blood

▶ 価格お問い合わせ

▶ 製品お問い合わせ

▶ 技術お問い合わせ

▶ その他お問い合わせ