

## ヘッドスペース-GC-MSを用いた血液中 アルコールおよび揮発性毒物の同時分析

坂本 雄紀

### ユーザーベネフィット

- ◆ ヘッドスペース-GC-MSを用いることにより、血中アルコール測定とシアン化物やアジ化物など揮発性毒物の測定を同時に行うことが可能です。
- ◆ HS-20 NXは、サンプル流路を不活性かつ最短経路にデザインしているため、キャリアオーバーを抑制しつつ、血中アルコール測定のような高濃度のエタノール分析と揮発性毒物の微量分析を同時かつ簡便に実施することが可能です。

### ■はじめに

警察科学捜査研究所及び大学の法医学教室では、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、業務に携わる人員であれば比較的入手が容易な化合物であるため、これら毒物を悪用した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、主要な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、液体注入した試料をGC-MSを用いて測定する手法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が課題です。

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を測定するとともに、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の同時測定について検討した結果を紹介します。

### ■ 試料調製

血液はウマ溶血血液を用いました。試料調製は薬毒物試験法と注解 2017<sup>1)</sup>を参考にしています。試料調製は薬毒物試験法と注解 2017<sup>1)</sup>を参考にしています。内部標準は、2-メチル-1-プロパノールおよび2-プロパノール-d8を用いました。内部標準混合溶液は、2-メチル-1-プロパノール 0.2 mg/mL、2-プロパノール-d8 0.005 µg/mLとなるように超純水に溶解して調製しました。

アスコルビン酸溶液(0.1 M)は、L-アスコルビン酸 1.76 gを超純水に溶解後、100 mLにメスアップして調製しました。リン酸水溶液(50%)は市販のリン酸(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<sup>-</sup>)標準溶液 (1 mg/mL)は、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(N<sub>3</sub><sup>-</sup>)標準溶液 (1 mg/mL)は、アジ化ナトリウム(Na<sub>3</sub>N) 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。

シアン化物の検量線用標準試料は、濃度が0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 µg/mLに、アジ化物用の検量線用標準試料は、2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 µg/mLに、またエタノールは、0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 2.0 mg/mLと、各々なるように、測定する直前に血液に添加して調製しました。

20 mLヘッドスペースバイアルに各濃度に調製した血液0.5 mLを添加し、次に内部標準混合溶液を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。

また、シンナーの分析に関しては、20 mLヘッドスペースバイアルに、シンナー原液を5 µL添加し、速やかにヘッドスペースのキャップで密栓しました。



図1 HS-20 NXおよびGCMS-QP™ 2020 NX

### ■ 分析条件

表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 NXでは、ヘッドスペース条件が同一な場合に、GC/MSの分析条件を変更しても同一のバッチファイル内でメソッドを切り替えて測定することが可能です。微量濃度の定量が必要なシアン化物やアジ化物の分析と高濃度のシンナー原液を測定するには、スプリット比を変更して運用することが効果的です。

表1 HS-20 NXおよびGCMS-QP2020 NXの分析条件

HS	: HS-20 NX	[GC]	
GC-MS	: GCMS-QP2020 NX	カラム	: SH-BAC2 (長さ 30 m, 0.32 mm I.D., df=1.2 μm) P/N: 227-36262-01
[HS]		カラムオープン温度	: 40°C (5 min)→(40°C/min)→200°C (1 min)
ヘッドスペースモード	: ループ	キャリアガス	: ヘリウム
オープン温度	: 60°C	キャリアガス制御	: 線速度 (62.5 cm/sec)
サンプルライン温度	: 100°C	注入モード	: スプリット
サンプルライン温度	: 150°C	スプリット比	: 10:1 (アルコール、シアン、アジ化物) 30:1 (シンナー)
バイアル加圧用ガス圧力	: 70 kPa	キャリアガスセーブ	: スプリット比 5 (1 min)
バイアル保温時間	: 10 min	[MS]	
バイアル加圧時間	: 0.5 min	インターフェース温度	: 230°C
加圧平衡化時間	: 0.1 min	イオン源温度	: 200°C
ロード時間	: 0.5 min	溶媒溶出時間	: 0.7 min
ロード平衡化時間	: 0 min	データ採取時間	: 1 - 10 min
注入時間	: 0.5 min	測定モード	: Scan
ニードルフラッシュ時間	: 5 min	質量範囲	: m/z 10 - 300
GCサイクルタイム	: 19 min	イベント時間	: スキャン 0.1 sec SIM 0.2 sec

\*1 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。

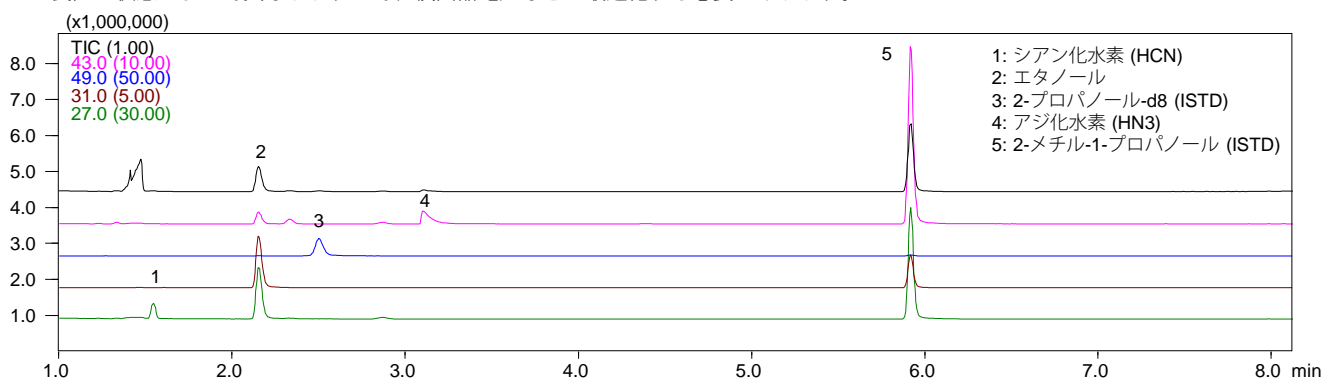


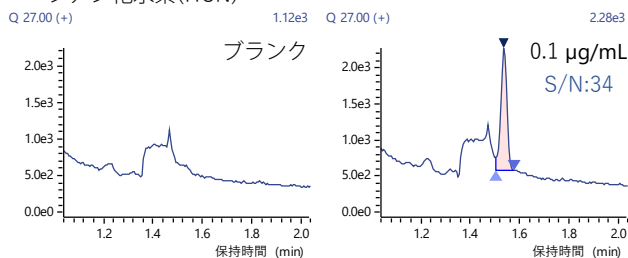
図2 トータルイオンカレントクロマトグラム (シアン化水素: 1 μg/mL, エタノール 0.3 mg/mL, アジ化水素: 10 μg/mL)

## ■ 分析結果

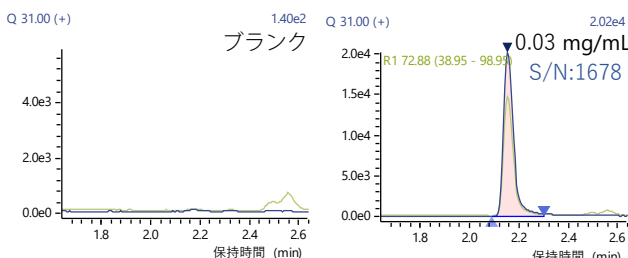
### 1. アルコール、シアン化物およびアジ化物

図2に検量線の中濃度のウマ血標準試料を測定したトータルイオンカレントクロマトグラムを、図3にブランク及び検量線の最低濃度の標準試料を測定したSIMクロマトグラムをそれぞれ示します。検量線の相関係数(R)は0.9992以上であり、良好な直線性を示しました(図4)。

#### シアン化水素(HCN)



#### エタノール



#### アジ化水素 (HN3)

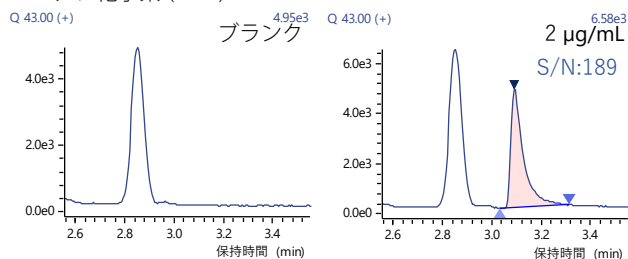
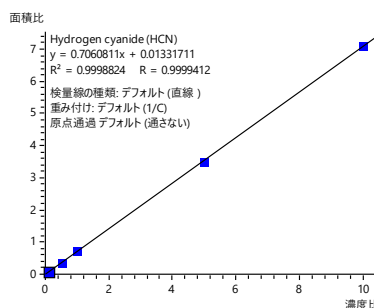
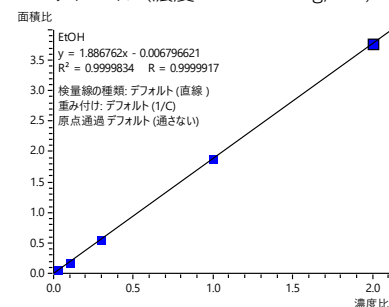


図3 各対象化合物のSIMクロマトグラム

#### シアン化水素 (濃度: 0.1 ~ 10 μg/mL)



#### エタノール (濃度: 0.03 ~ 2 mg/mL)



#### アジ化水素 (濃度: 2 ~ 50 μg/mL)

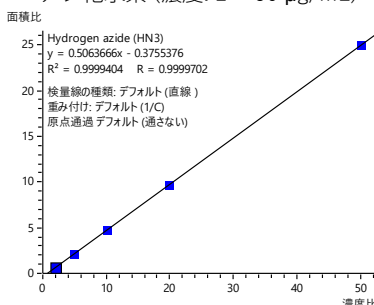


図4 各対象化合物の検量線

表2 検量線のLV1濃度の日内再現性 (n=7)

	シアン化水素		EtOH		アジ化水素	
	濃度 (µg/mL)	真度 (%)	濃度 (mg/mL)	真度 (%)	濃度 (µg/mL)	真度 (%)
1st	0.105	104.8	0.032	106.6	1.819	91.0
2nd	0.099	99.0	0.032	107.5	1.820	91.0
3rd	0.105	105.1	0.033	108.7	1.658	82.9
4th	0.103	103.5	0.033	109.8	1.618	80.9
5th	0.103	103.3	0.032	106.1	1.469	73.5
6th	0.107	107.5	0.033	109.0	1.573	78.6
7th	0.104	103.7	0.032	107.5	1.541	77.1
平均	0.104	103.8	0.032	107.9	1.643	82.1
標準偏差 (SD)	0.003	2.567	0.000	1.347	0.135	6.729
%RSD	2.472	2.472	1.249	1.249	8.192	8.192

表3 検量線のLV1濃度の日間再現性 (5日間)

	シアン化水素		EtOH		アジ化水素	
	濃度 (µg/mL)	真度 (%)	濃度 (mg/mL)	真度 (%)	濃度 (µg/mL)	真度 (%)
Day1	0.094	94.5	0.033	108.7	1.910	95.5
Day2	0.105	105.2	0.033	110.2	1.999	99.9
Day3	0.103	103.1	0.033	110.9	1.851	92.5
Day4	0.100	100.2	0.033	109.1	2.140	107.0
Day5	0.099	99.2	0.033	111.0	2.132	106.6
平均	0.100	100.4	0.033	110.0	2.006	100.3
標準偏差 (SD)	0.004	4.080	0.000	1.032	0.130	6.490
%RSD	4.063	4.063	0.939	0.939	6.470	6.470

検量線におけるLV1濃度の標準試料(ウマ溶血血液)を1日あたり7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を表2に、5日間における日間再現性を表3にそれぞれ示します。

7回繰り返し測定における日内再現性の真度はシアン化水素 99.0 ~ 107.5% (平均103.8%)、エタノール 106.1 ~ 109.8% (平均107.9%)、アジ化水素 73.5 ~ 91.0% (平均82.1%)でした。アジ化水素は真度が低くなるのは、ピークのテーリングから吸着性が高いためと考えられます。いずれの化合物においても併行精度は10%以内でした。

5日間における日間再現性の真度および併行精度は、シアン化水素 94.5 ~ 105.2% (平均100.4%, %RSD: 4.063)、エタノール 108.7 ~ 111.0% (平均110.0%, %RSD: 0.939)、アジ化水素 95.5 ~ 106.6% (平均100.3%, %RSD: 6.470)と日間再現性においても良好な結果が得られました。

## 2. シンナー成分

同一条件を用いてシンナーの主要成分であるメタノール、酢酸エチル、トルエンを測定して得られたトータルイオンカレントクロマトグラムを図5に示します。今回検討した分析条件によって、シンナー中の主要3成分を10分で分離することができました。

図6に血液にシンナーの主要成分を0.1 µg/mLの濃度で添加して測定したSIMクロマトグラムを示します。主要成分の検出下限(LOD、Peak-to-PeakにおけるS/N=3の濃度)は、メタノール: 0.03 µg/mL、酢酸エチル: 0.01 µg/mL、トルエン: 0.003 µg/mLでした。

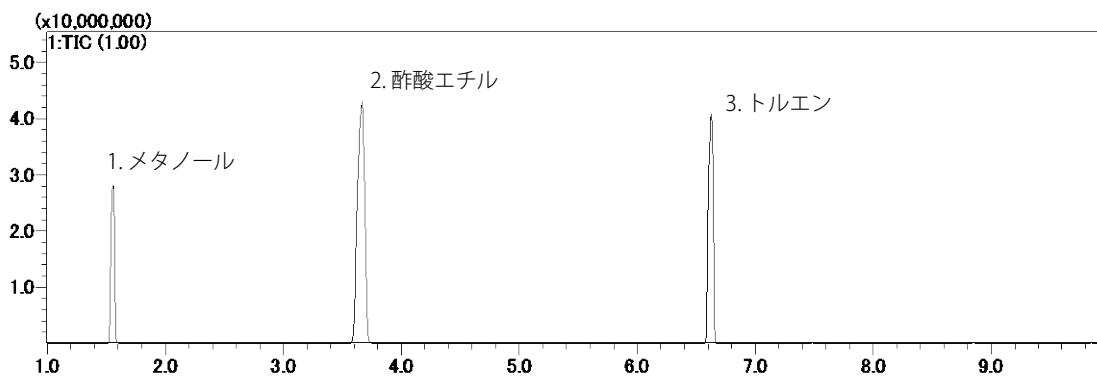


図5 シンナー成分のトータルカレントクロマトグラム

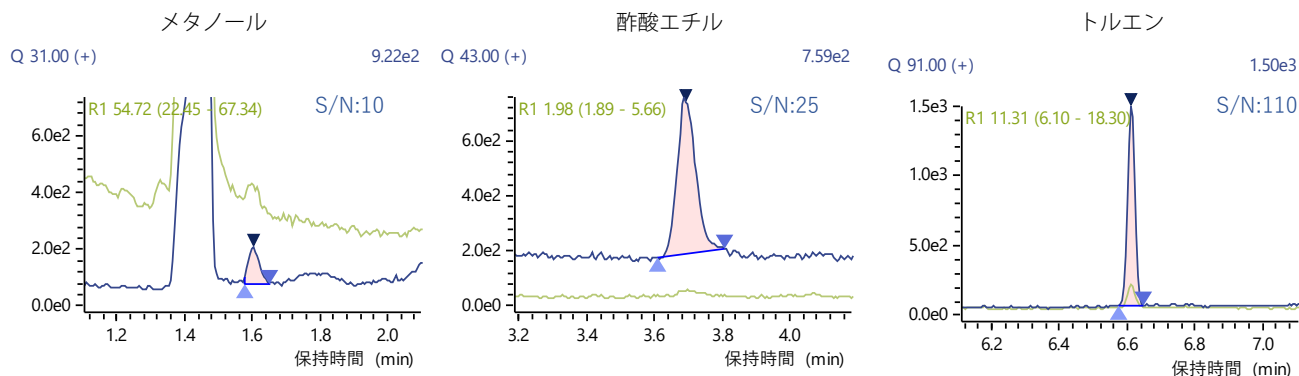


図6 血液に添加したシンナー成分のSIMクロマトグラム (濃度: 0.1 µg/mL)

## ■まとめ

血液中のアルコール(エタノール)と同一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することができました。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 NX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流路を不活性かつ最短経路に抑えているため、キャリーオーバーが起こりにくく、血中アルコール測定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分析を簡単に行えます。

### <参考文献>

- 1) 日本薬学会編：薬毒物試験法と注解 2017 (東京化学同人)

GCMS-QP1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/>

01-00677-JP 初版発行：2024年 1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。