

バリア放電イオン化検出器付ガスクロマトグラフィー (BID-GC) による血中 ethanol 定量法の開発

柴田 大輔 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 本田 克也 (筑波大学 医学医療系)

【背景・目的】

血中 ethanol 濃度測定は、酔酩度を知るために法医学では最も重要な項目の一つである。アルコール中毒死はもちろんであるが、飲酒に起因した事件、事故、飲酒運転等、飲酒が日常生活に大きく関与しているからである。司法解剖における血中 ethanol 分析法として、一般的に気化平衡ガスクロマトグラフィー (気化平衡法) が用いられている。これは血液をバイアルに入れて加熱・気化させ、そのヘッドスペース (HS) を分析する方法である。このためにはヒーター等の加熱機器が必要であり、最近では加熱・直接導入が可能な HS サンプラーも発売されているが、高価である。そこで我々は GC 分析の前処理としての加熱を必要としない血中 ethanol の高感度分析法である NeedlEx[®]法を開発した。この方法は気化平衡法と異なり、加熱機器を使用せず、NeedlEx[®]に ethanol を吸着・濃縮し、GC で簡便かつ高感度に分析するというものである。しかし、NeedlEx[®]法を用いても ethanol の吸着・濃縮に 10 分程度かかり迅速な検査が求められる司法解剖においては改善の余地がある。また、NeedlEx[®]は消耗品であり、繰り返し使用可能ではあるが、その推奨回数は 25-30 回とされており、定期的な交換を必要とする。一方、近年開発されたバリア放電イオン化検出器は安定的な He プラズマを生成し、励起した He から放出されたエネルギーを用いて化合物をイオン化し、これをコレクタで捕集する。He から放出されるエネルギーは非常に大きいため、従来の使用機器である FID-GC に比べ、検出感度の高さと広い汎用性が期待できる。そこで BID-GC による濃縮機器を必要としない血中 ethanol の定量方法を検討した。

【方法】

バイアルに ethanol 水溶液および t-butanol 水溶液 (内部標準) を入れて密栓し、その HS をシリンジで採取し、そのまま BID-GC のインジェクションに注入して分析した。この方法 (BID-GC 法) をヘッドスペース法 (HS-GC 法)、気化平衡法、NeedlEx[®]法と比較した。次に、BID-GC による ethanol 定量条件の最適化のため、バイアル容量、平衡時間、サンプル量、HS 採取量について検討し、決定された定量条件を用いて検量線および検出限界の検討を行った。さらに、ウマ全血を用いて添加回収試験を行い、BID-GC による血中 ethanol の回収率を検討した。最後に、剖検試料について BID-GC および NeedlEx[®]法により血中 ethanol を定量し、分析結果を比較した。

GC (BID-GC) の条件は以下のように行った。

装置: Shimadzu Nexis GC-2030

カラム: Rtx-BAC plus2 (内径 0.50 mm, 長さ 250.0 m, 膜厚 10.0 μm)

カラム温度: 40°C (3 min) - 25°C/min - 240°C (1 min)

注入口および検出器温度: 250°C

キャリアガス: He

キャリアガス流量: 1.37 mL/min

スプリット比: 10:1

【結果・考察】

同じ水溶液について HS-GC 法、気化平衡法、NeedlEx[®]法および BID-GC 法で分析した結果、ethanol の感度は、NeedlEx[®]法が最も高く、次いで BID-GC 法、気化平衡法、HS-GC 法の順であった。装置が異なるため一概には言えないが、BID-GC 法は、NeedlEx[®]法ほど感度は高くないものの (80%程度)、気化平衡法の 5 倍の感度を持っていた。感度が高いと、前処理を簡単にでき、かつサンプル量も少なく抑えられることから、本法は ethanol の検出に優れた方法であると考えられた。

BID-GC が ethanol の簡便かつ高感度な測定法として使用できる可能性が示唆されたので、定量のための各種条件について検討した。得られた最適な定量条件は以下のとおりであり、以後の実験ではこの条件で行った。

バイアル容量: 5 mL

バイアル内での静置時間: 5 min

サンプル量: 100 μL

内部標準 (0.5 μL/mL t-butanol) : 100 μL

HS 採取量: 500 μL

本法の定量性を検証するため各種濃度の標準水溶液について分析し、検量線を作成した。検量線は高い直線性を示し ($R^2 > 0.99$)、本法による ethanol 定量が可能であることが示唆された。また、検出下限は 0.005 μL/mL であった。これは、酔酩度を測るうえで十分な感度であり、BID-GC は血中 ethanol 測定に十分利用できることが示された。そこで、実際に血液に ethanol をスパイクして定量を試みた。異なる濃度の ethanol をスパイクした 2 つのサンプルについてそれぞれ分析した結果、回収率はそれぞれ 64%、72%であり、十分な回収率を得ることができなかった。理由として、血液が ethanol の気液平衡に干渉することで、HS 中に ethanol が十分に揮発できなかったことが考えられた。そこで、塩析により血中の ethanol を血液から分離し、ethanol を HS に揮発させることを試みた。上の 2 つのサンプルに塩化ナトリウムを飽和量添加して同様に分析した結果、回収率はそれぞれ 100%、104%となり、高い回収率を得ることができた。以上の結果から、BID-GC による血中 ethanol 測定は、血液 100 μL、t-butanol 水溶液 (内部標準) 100 μL、塩化ナトリウム 50 mg を 5 mL バイアルに加えて密栓し、5 分間静置した後 HS を 500 μL 採取して BID-GC の注入口に注入し分析するという方法により、高い精度で定量できることが示された。

最後に、本法が法医学の実務に利用できることを検証するため、当研究室で得られた剖検試料について本法と NeedlEx[®]法で分析を行い、2 つの方法による分析結果を比較した。BID-GC および NeedlEx[®]法による定量結果は高い相関が示されたため、高い精度で定量可能であると考えられた。

以上のように、本法は濃縮機器を必要とせず、簡便な操作で血中 ethanol が迅速に定量できるため、法医学の実務に役立つと期待される。