

120 バイアル Agilent 8697 ヘッドスペース サンプラ-XL トレイおよび デュアル FID Agilent 8890 GC システムに よる血中アルコール濃度の分析

著者

Scott Hoy
Agilent Technologies, Inc.

概要

血中アルコール濃度（BAC）試験は、世界中の法医学ラボにおける重要な手法です。自動車運転者に関する法定エタノール規制値は地域によって異なるうえ、法医学ラボで長年にわたって未処理の試験が存在することが一般的に課題として報告されています。このアプリケーションノートでは、120 バイアル Agilent 8697 ヘッドスペースサンプラ-XL トレイを、デュアルカラムとデュアル水素炎イオン化検出器（FID）を搭載した Agilent 8890 GC システムと組み合わせて使用した BAC 分析について説明します。8697-XL トレイは、8697 の高い精度とインテリジェンスを、大容量の 120 バイアルトレイに組み込んでいます。8697-XL トレイを、デュアルカラムでデュアル FID 構成の 8890 GC と組み合わせることにより、0.025 ~ 0.3 % という優れたエタノールの直線性、さらに濃度 0.05 % でのバイアル間の再現性 2.0 % RSD を実現しており、濃度 0.4 % ではエタノールのキャリーオーバーはありません。

はじめに

BAC 試験は、多くの法医学および診断ラボ向けの十分に確立されたルーチン試験メソッドです。メソッドパラメータは、管轄地域によって異なる場合があります。ただし、ヘッドスペース GC と、法定血中エタノール規制値をまとめて取り扱う線形エタノールキャリブレーションモデルを使用することは、一般的なアプローチです。ヘッドスペースサンプリングは BAC 分析では一般的な手法ですが、これは、標準的な液体注入とは異なり、不揮発性サンプルマトリックスが機器に注入されないためです。その代わりに、サンプルをバイアルに入れて密封してから加熱することにより、エタノールとその代謝物などの揮発性成分を気化させます。この蒸気が GC に注入されても、不揮発性マトリックスはバイアル内に残ったままになり、過剰な無関係のピークやベースラインの乱れが存在しない明確なクロマトグラムが得られます。

サンプル導入に関するこのアプローチでは、注入口ライナやカラムのような機器消耗品が、不揮発性マトリックス中に存在する塩とタンパク質に不必要に曝露されるのを防止することにより、これらの消耗品の寿命を大幅に延ばします。さらに、サンプルでは、複雑なクリーンアップステップや内部標準 (ISTD) の追加以外の特別な前処理ステップが不要になります。その結果、サンプル前処理時間が短縮されると同時に機器の稼働時間が長くなるため、メソッドの性能指数を損なわずに、作業者とラボのスループットを大幅に向上できます。¹ このアプリケーションノートでは、デュアルカラムとデュアル FID を搭載した 8890 GC と 8697-XL トレイを組み合わせて使用した BAC 分析について説明します。

実験方法

Agilent 8890 GC を、スプリット/スプリットレス (SSL) 注入口とデュアル FID で構成しました。SSL 注入口に直接ヒートトレースされたトランスファーラインを使用して、8697-XL トレイを GC に接続しました。短いプレカラムを用いて注入口をパージなしスプリッタに配管し、Agilent J&W DB-BAC1 ウルトライナート (UI) 1 次カラムと Agilent J&W DB-BAC2 UI 確認用カラムの両方に接続しました。これにより、1 回のサンプル注入でデュアルの同時分離が可能になります。表 1 に機器部品と消耗品、表 2 にこのメソッドで使用した標準物質を示します。

ISTD として、0.1 % (v/v) *n*-プロパノールの 1 L 原液を含む水溶液 (Millipore で分注) を調製しました。バイアルごとに、各ヘッドスペースサンプルを 450 μ L の ISTD 溶液と 50 μ L のサンプルで構成し、全容量を 500 μ L にしました。すべての溶液は、4 °C の冷蔵庫に保管しました。表 3 に、GC とヘッドスペースサンブラのメソッドパラメータを示します。

表 1. Agilent 機器部品と消耗品

部品と消耗品	
説明	部品番号
クリンバイアル、20 mL	5190-2286
クリンキャップ/セプタム	5183-4477
注入口ライナ、ウルトライナート、内径 2 mm	5190-6168
プレカラム、0.5 m \times 0.53 mm (不活性フェーズドシリカ)	160-2535-10
カラム 1 : DB-BAC1 ウルトライナート	123-9334UI
カラム 2 : DB-BAC2 ウルトライナート	123-9434UI
CFT パージなし 2 ウェイスプリッタ	G3181-60500

表 2. 標準物質

標準溶液		
説明	部品番号	試験
Agilent 血中アルコールチェックアウト混合物	5190-9765	再現性/分解能
Agilent エタノールキャリブレーションキット	G3440-85035	エタノール検量線
Agilent 多成分アルコールキャリブレーションキット	G3440-85036	キャリーオーバーチェック
1-プロパノール	34871 (Millipore Sigma)	ISTD

GC サイクル時間

GC サイクル時間は、ヘッドスペースサンブラの自動化を最適化して最大のスループットを実現する際の重要なパラメータです。簡単にいえば、GC サイクル時間は、サンプルを注入してからシステムが次の「準備完了」状態になるまでの時間です。具体的には、GC 取り込み時間、オープン冷却時間（非等温メソッドの場合）、各制御ゾーンの温度と圧力の平衡化時間、およびコンピューター/ソフトウェアの処理時間を合計した時間です。ラボの環境の変化（例えば、ドアを開けたときの圧力変化や、冷却時のすぐ近くの GC のベントなど）が原因で、平衡化時間にばらつきが生じる場合があるため、一般的には約 1 分のバッファ時間を追加することを推奨します。このアプリケーションノートでは、分析時間を 5 分、GC サイクル時間を 6 分に設定しています。

設定した GC サイクル時間が短すぎる場合は、シーケンスを「Abort (中断)」、サンプルを「Skip (スキップ)」、または GC の準備完了を「Wait (待機)」するようにシステムをプログラムできます。図 1 に示すように、このオプションは、8697-XL トレイのメソッド設定の [Sequence Actions (シーケンスアクション)] で設定できます。最適な GC サイクル時間の設定を支援するために、OpenLab CDS のアクティビティログにより、このメソッドを使用した際のサンプル分析の実際の GC サイクル時間が計算されます。図 2 に、アクティビティログから報告された GC サイクル時間の画面を示します。

Sequence Actions

What should the sequence do if it encounters the following:

Vial Missing	Skip
Wrong Vial Size	Pause
Leak Detected	Skip
System Not Ready	Abort
	Skip
	Abort
	Wait

The system always logs detected issues

図 1.ヘッドスペースサンブラで問題が発生した際にシーケンスの動作を制御するために使用する、Agilent 8697 ヘッドスペースサンブラ-XL トレイの Agilent OpenLab CDS メソッドパラメータの設定

表 3. Agilent 8697 ヘッドスペースサンブラ-XL トレイと 8890 GC システムのメソッドパラメータ

Agilent 8697 ヘッドスペースサンブラ-XL トレイの使用条件	
オープン温度	70 °C
ループ温度	80 °C
トランスファライン温度	90 °C
バイアル平衡化時間	7 分
注入時間	1 分
GC サイクル時間	6 分
バイアルのサイズ	20 mL
バイアル攪拌	250 回/分 (設定 9)
バイアル充填モード	圧力
充填圧力	15 psi
加圧ガス	窒素
圧力平衡化時間	0.05 分
ループ充填モード	カスタム
ループ昇圧速度	40 psi/min
最終ループ圧力	1.5 psi
ループの平衡化	0.05 分
抽出モード	1 回
抽出後のベントバイアル圧力	オン
注入後パージ	カスタム
パージ流量	200 mL/min
パージ時間	3 分

Agilent 8890 GC システムの使用条件	
注入口温度	150 °C
キャリアガス	ヘリウム
スプリット比	10:1
コントロールモード	一定圧力
注入口圧力	21 psi
セプタムパージ	3 mL/min
ガスセーバ	2 分後に 20 mL/min
オープンプログラム	40 °C で 5 分間保持
FID A/B 温度	250 °C
FID A/B 空気流量	400 mL/min
FID A/B 水素流量	30 mL/min
FID A/B メークアップ流量 (N ₂)	25 mL/min

Date and Time (yyyy-MM-dd)	User	Description	Details
2023-03-13 17:13:24-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:23	
2023-03-13 17:07:07-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:23	
2023-03-13 17:00:54-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:23	
2023-03-13 16:54:35-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:22	
2023-03-13 16:48:20-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:23	
2023-03-13 16:42:01-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:21	
2023-03-13 16:35:51-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:22	
2023-03-13 16:29:35-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:26	
2023-03-13 16:23:20-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:23	
2023-03-13 16:17:03-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:28	
2023-03-13 16:10:49-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:23	
2023-03-13 16:04:31-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:27	
2023-03-13 15:58:17-04:00	SIDAPPAIC1	Calculated GC Cycle Time: 0:05:23	

図 2. BAC サンプルのシーケンスにおいて計算された GC サイクル時間を示す、Agilent OpenLab CDS ソフトウェアのアクティビティログの画面

結果と考察

キャリブレーション

50、80、100、200、300 mg/dL のエタノール水溶液を含む標準溶液を 3 回分析しました。また、25 μ L の 50 mg/dL 標準と 25 μ L の水をヘッドスペースバイアルに添加して 25 mg/dL の標準を調製し（他の標準に合わせて、最終容量を 0.5 mL にするため）、同じく 3 回分析しました。

n-プロパノールに対するエタノールの相対レスポンス (Y 軸) を、*n*-プロパノールに対するエタノールの相対量 (X 軸) に対してプロットし、OpenLab CDS で重み付けなしの線形モデルを作成しました。このモデルは、原点を無視し、キャリブレーション濃度ごとに平均値を用いて計算するように設定しました。R² 値は、FID A では 0.99994、FID B では 0.99993 でした。図 3 と 4 はそれぞれ、FID A と B のキャリブレーションモデルを示しています。

検量線

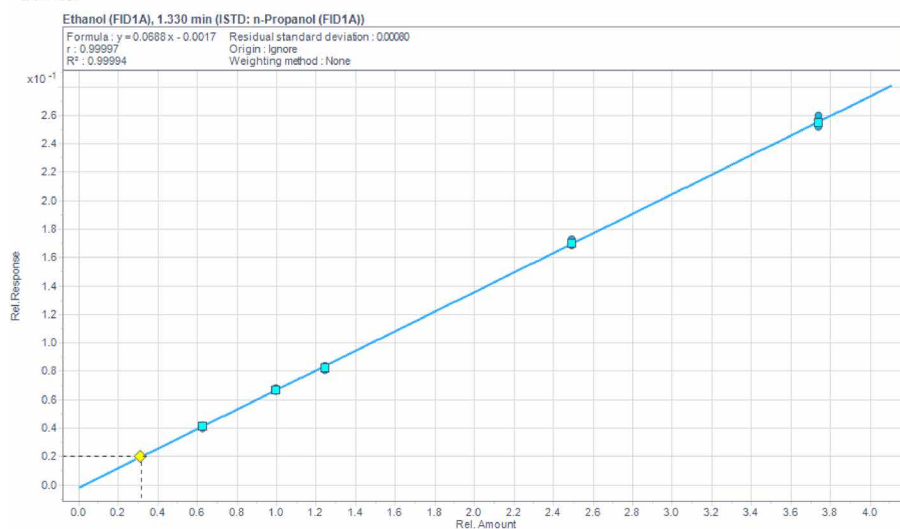


図 3. FID A でのエタノールのキャリブレーションモデル (Agilent J&W DB-BAC1 ウルトラライナート 1 次カラム)

検量線

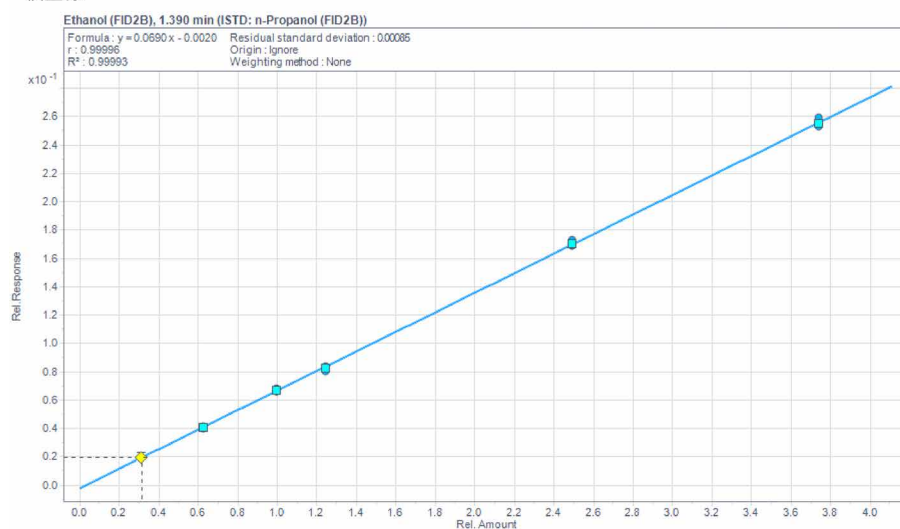


図 4. FID B でのエタノールのキャリブレーションモデル (Agilent J&W DB-BAC2 ウルトラライナート確認用カラム)

再現性

Agilent 血中アルコールチェックアウト混合物 (部品番号 5190-9765) は、システムのクロマトグラフィー性能が適切であることを確認するために 12 種類の化合物を混合したものです。各化合物は 50 mg/dL で存在しており、この混合物はメソッドの精度を解析する際の優れた標準となります。図 5 と 6 に、DB-BAC1 UI および DB-BAC2 UI カラムそれぞれにおける、血中アルコールチェックアウト混合物の分離結果を示します。また、表 4 に、ピークの同定結果とリテンションタイムを示します。このメソッドの再現性を実証するために、チェックアウト混合物を 12 回連続して注入し、分析しました。その結果を表 5 に示します。

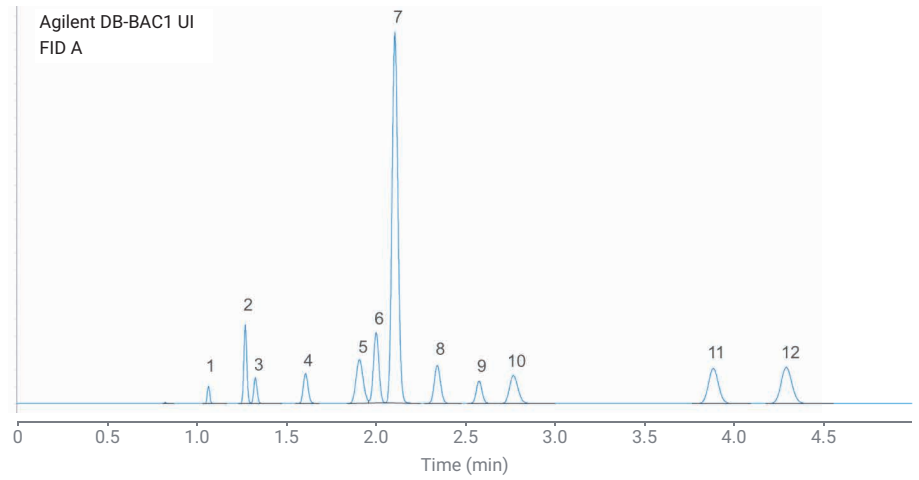


図 5. Agilent J&W DB-BAC1 ウルトライナートカラムでの Agilent 血中アルコールチェックアウト混合物の FID A クロマトグラム

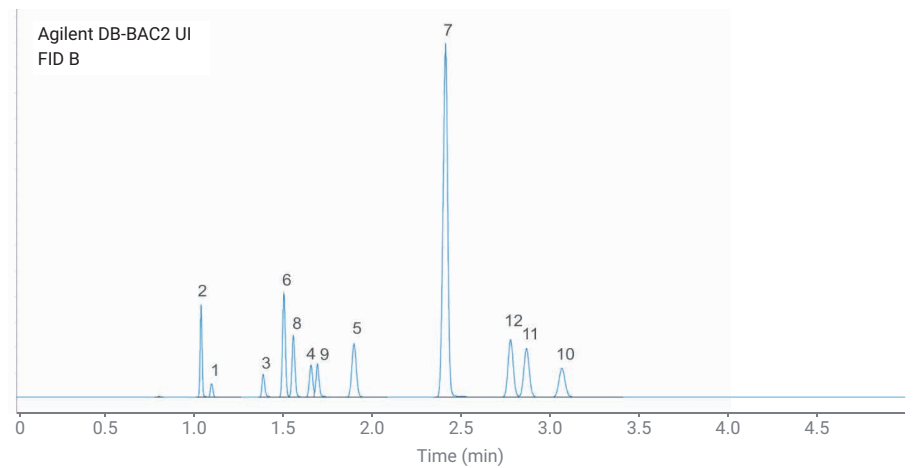


図 6. Agilent J&W DB-BAC2 ウルトライナートカラムでの Agilent 血中アルコールチェックアウト混合物の FID B クロマトグラム

表 4. 図 5 と 6 で示されている、Agilent 血中アルコールチェックアウト混合物のピーク同定結果とリテンションタイム (RT)

ピークラベル	化合物	RT DB-BAC1 UI (分)	RT DB-BAC2 UI (分)
1	メタノール	1.066	1.095
2	アセトアルデヒド	1.271	1.036
3	エタノール	1.327	1.385
4	イソプロパノール	1.606	1.653
5	t-ブタノール	1.906	1.895
6	プロパナール	1.999	1.501
7	n-プロパノール (ISTD)	2.103	2.409
8	アセトン	2.339	1.555
9	アセトニトリル	2.571	1.689
10	2-ブタノール	2.762	3.062
11	酢酸エチル	3.873	2.864
12	2-ブタノン	4.279	2.774

キャリアオーバー

サンプルがヘッドスペースオープンから GC に完全に移されていることを実証するために、メタノール、エタノール、イソプロパノール、アセトン、*n*-プロパノール (ISTD) を含む 400 mg/dL の標準を 10 回連続して分析し、

その後にはブランク分析も実施しました。図 7 と 8 に、DB-BAC1 UI および DB-BAC2 UI カラムそれぞれの 10 回繰り返し分析のクロマトグラムを重ね表示と、その繰り返し分析直後のブランク分析結果を拡大したものを示します。これらの図からわかるように、標準中のす

べての化合物において、両方のカラムのブランクシグナルでは、測定できるほどのキャリアオーバーは観察されていません。

表 5. Agilent 血中アルコールチェックアウト混合物中の各化合物のリテンションタイム、面積レスポンス、ピーク高さの再現性 (%RSD)

名前	シグナル名	%RSD			名前	シグナル名	%RSD		
		RT	面積	高さ			RT	面積	高さ
2-ブタノール	FID1A	0.022	1.342	1.441	酢酸エチル	FID1A	0.008	2.747	2.777
	FID2B	0.010	1.363	1.406		FID2B	0.016	2.759	2.834
2-ブタノン	FID1A	0.012	1.810	1.838	イソプロパノール	FID1A	0.025	1.455	1.513
	FID2B	0.000	1.804	1.767		FID2B	0.028	1.454	1.435
アセトアルデヒド	FID1A	0.000	2.036	1.998	メタノール	FID1A	0.047	2.454	2.443
	FID2B	0.000	2.048	1.911		FID2B	0.000	2.706	2.224
アセトン	FID1A	0.017	1.544	1.511	<i>n</i> -プロパノール	FID1A	0.022	1.378	1.455
	FID2B	0.026	1.536	1.493		FID2B	0.022	1.424	1.530
アセトニトリル	FID1A	0.000	1.497	1.444	プロパナール	FID1A	0.000	2.442	2.321
	FID2B	0.000	1.534	1.362		FID2B	0.000	2.258	2.259
エタノール	FID1A	0.000	2.018	2.034	t-ブタノール	FID1A	0.021	1.310	1.319
	FID2B	0.034	1.995	2.021		FID2B	0.027	1.341	1.297

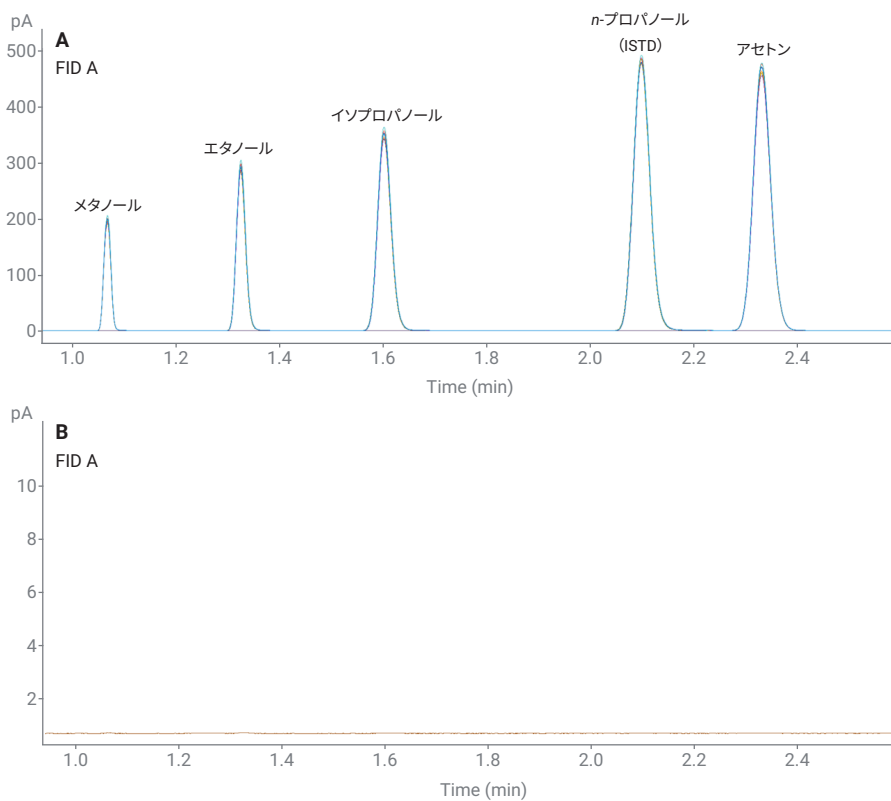


図 7. Agilent J&W DB-BAC1 ウルトライナート 1 次カラム (FID A) での 400 mg/dL の混合物 (A) の 10 回繰り返し分析の重ね表示および直後のブランク分析 (B)

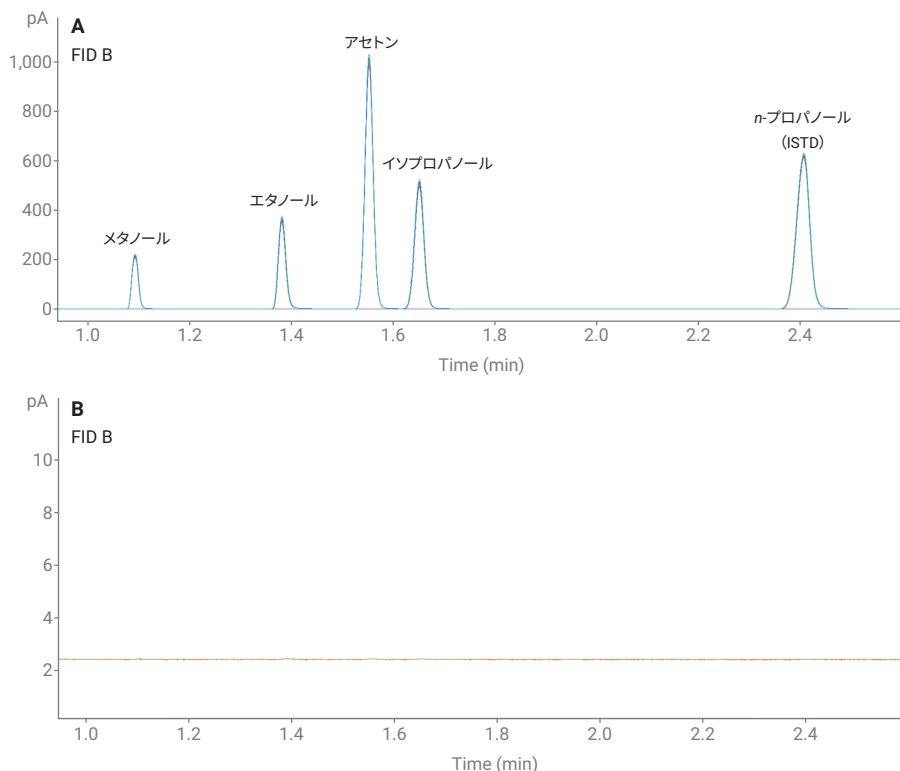


図 8. Agilent J&W DB-BAC2 ウルトラライナート確認用カラム (FID B) での 400 mg/dL の混合物 (A) の 10 回繰り返し分析の重ね表示および直後のブランク分析 (B)

結論

今回の 8697-XL トレイは、同製品で以前に確立されている精度、堅牢性、インテリジェンスをベースにして、トレイ容量を 120 バイアルまで拡大した製品です。このような特長を Agilent 8890 GC と組み合わせることにより、BAC 試験において最終的に未処理のサンプルをなくすのに必要なゼロキャリアオーバー、優れた直線性と機能を実現できます。

参考文献

1. Agilent 8697 ヘッドスペースサンプリングと 8890 GC デュアル FID システムによる血中アルコール分析. *Agilent Technologies application note*, publication number 5994-3126JAJP, **2022**.

ホームページ

www.agilent.com/chem/jp

カスタムコンタクトセンター

0120-477-111

email_japan@agilent.com

本製品は一般的な実験用途での使用を想定しており、医薬品医療機器等法に基づく登録を行っておりません。本文書に記載の情報、説明、製品仕様等は予告なしに変更されることがあります。

RA45056.5805902778

アジレント・テクノロジー株式会社
© Agilent Technologies, Inc. 2023
Printed in Japan, May 18, 2023
5994-6090JAJP