

Sensitive determination of ethylene glycol, propylene glycol and diethylene glycol in human whole blood by isotope dilution gas chromatography mass spectrometry, and the presence of appreciable amounts of the glycols in blood of healthy subjects

著者	阿民 勿日他
発行年	2014-03-17
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10271/2723">http://hdl.handle.net/10271/2723</a>

doi: 10.1007/s11419-013-0188-3

博士(医学) 阿民 勿日他

論文題目

Sensitive determination of ethylene glycol, propylene glycol and diethylene glycol in human whole blood by isotope dilution gas chromatography–mass spectrometry, and the presence of appreciable amounts of the glycols in blood of healthy subjects

(ヒト全血中エチレングリコール、プロピレングリコール並びにジエチレングリコールの同位体希釈 GC-MS による高感度検出法と、健常人血中におけるグリコール類の存在について)

論文の内容の要旨

[はじめに]

エチレングリコール(EG)、プロピレングリコール(PG) 並びにジエチレングリコール(DEG) などのグリコール類は自動車の不凍液、潤滑油並びに溶媒などに広く使われている。3 種のグリコール類の中では、DEG が最も毒性が強く次に EG と続き、PG がもっとも毒性が低い。法医学実務では、EG を多量に服用し自殺するケースが時々経験される。さらに 1937 年から 2006 年までの統計によると世界中で 600 名以上の人々が DEG 急性中毒で死亡しているとされる。PG も毒性は低いものの、多量に服用すると昏迷から昏睡へと進んだとする報告がある。

今回の研究では、従来のグリコール類の GC-MS よりもはるかに高感度の検出・定量法を開発した。その方法を用いて、健常人血液をブランク試料として用いたところ、EG、PG、DEG いずれのピークも検出された。この結果について、当初の頃は何らかの carry-over や汚染によるものと自ら疑い、カラムを新しいものに変え、GC のインジェクタや MS のイオン源の洗浄まで行ったが、結果は同様であった。それらの GC-MS マススペクトルがグリコール類の標準品のマススペクトルと一致したことから、健常人血液中にグリコールが存在するという結論に至った。本研究ではその結果も合わせ報告する。

[材料ならびに方法]

EG、PG、DEG、並びにEG- $d_6$ 、PG- $d_8$ 、DEG- $d_8$ の純品を各製造会社より購入した。ヘプタフルオロ酪酸(HFB)無水物はThermo Fisher Scientific社より購入した。当初固相抽出法と用いることを考えたため、Sep-Pak AC2、ENVI-Carb Plusを各メーカーより購入した。健常人10名のボランティアから各10 mlの採血を行った。本研究は浜松医科大学倫理委員会の承認を得ている。

全血0.25 mlに内部標準(IS<sub>S</sub>)としてそれぞれ100 ngのEG- $d_6$ 、PG- $d_8$ 、DEG- $d_8$ を混合した。この混合物に0.75 mlのアセトニトリルを加え振盪し、5分間超音波処理後遠心分離した。上清をバイアルに移し、室温で窒素気流下で蒸発乾固した。各バイアルにアセトニトリル100  $\mu$ l、HFB無水物50  $\mu$ lを添加し、各バイアルを密栓後、穏やかに振盪し、60°Cで30分間加熱した。冷却後、ミリQ水及びn-ヘキサン各0.5 mlを添加し、1分間よく振盪した。n-ヘキサン層を分離し、無水硫酸ナトリウム0.2 gを加え、振盪脱水した。n-ヘキサン層を別のバイアルに移し、再度無水硫酸ナトリウム層にn-ヘキサン0.5 ml を加えて軽く振盪し、得られたn-ヘキサン抽出液と先の抽出液とを混合した。n-ヘキサン層の1  $\mu$ lをGC-MS装置に注入した。

GC-MS装置として、GC-2010/GCMS-Q2010 Plus(島津製作所製)を用い、オートサンプリングとオー

トインジェクタをオンラインで連動させた。カラムはDB-1 (30 m x 0.25 mm i.d., 厚膜 0.25  $\mu$ m、アジレント社製)を用い、GC-MS装置への注入はスプリットレスモード(1分間)を用いた。オープン温度は40°C(1分間)から開始し、10°C/分で昇温し、130°Cに達した時点で、30°C/分で急速に昇温し、325°Cまで上昇させ、カラム内の不純物を除去し、次の測定に備えた。MS条件として、定性にはスキャンモード、定量には選択的イオン検出(SIM)法を用いた。

#### [結果及び考察]

EG、PG、DEGの全血試料からの抽出法として、当初アルコール類に適すると考えられた2種類の固相抽出法を試みたが、両者共満足できる回収率を得ることができなかった。従って、前述の様に、水酸基を修飾した上で、液-液抽出法で水から有機層に抽出する方法を採用した。HFB誘導体は水が存在しても安定であった。グリコール類濃度の低いMilli-Q水を試料として得られた結果から、検出限界は1ng/ml前後と極めて高感度であった。

健常人血液抽出物のEG、DEGに相当するマススペクトルは、各標準物質によるそれらとよく一致し、PG標準物に相当するマススペクトルでも $m/z$  197以上のマススペクトルパターンは、PG標準物質のそれにほぼ一致したため、血液抽出物中にEG、PG、DEGを同定することができた。EG、PG、DEGの定量にはいずれも $m/z$  241のピーク、IS<sub>S</sub>には $m/z$  245のピークを使用した。各ピークはSIMクロマトグラム上で十分に分離し、同時分析が容易であった。

本分析法においては、グリコール類が全く存在しないブランク血液を入手することが不可能なため、いわゆる「標準添加法」を用いた。標準添加検量線はy軸とx軸の両方に交叉するが、x軸とはマイナス部分で交叉し、その濃度がその血液のグリコール濃度を表示する。いずれの検量線も相関係数0.99以上と良好であった。日内・日間変動もいずれも12.2%以内と良好であった。回収率も61.6-80.9%と概ね良好であった。

本法を用いて10人の健常人血中EG、PG、DEG濃度を測定した結果、EG は $64.0 \pm 20.3$  ng/ml、PG は $181 \pm 203$  ng/ml並びにDEG は $11.1 \pm 4.56$  ng/mlという結果を得た。

#### [結論]

本研究ではヒト全血中 EG、PG、DEG の高感度 GC-MS 検出法を開発した。本法は今までに発表されたグリコール GC-MS 検出法のいずれよりも感度が優れていた。これらのグリコール類は内因性物質とは認識されておらず、専らこれらの物質による中毒例において分析されてきた。上記結果の様に、EG、PG はかなりの濃度が健常人血中に存在することが判明した。この様な結果は本論文が最初の報告である。各グリコール中毒が疑われる事例の分析結果解釈において、健常人に存在し得るグリコール濃度を知っておく事は大変重要で、カットオフレベル設定の重要な根拠となるものである。