生体試料中のエーテルの微量分析法

星野乙松, 丹沢珪子, 林聖宝^{*1}, 浮田忠之進(東京大学薬学部^{*2})

Microanalysis of Ether in Biological Materials

Otomatsu Hoshino, Keiko Tanzawa, Seiho Hayashi^{*1}

and Tyunosin Ukita

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Tokyo^{*2})

Micro-analysis of ethyl ether in forensic chemistry was investigated.

Gas-liquid chromatography was employed for detection of ethyl ether from biological fluids. As pre-treatment, ethyl ether was extracted with *n*-propyl- or butyl-acetate. Cyclohexane was conveniently used as an internal standard. It was found that the method was available for quantitative analysis of ethyl ether in biological fluids.

Micro diffusion method and Widmark's method were also investigated for quantitative determination of ethyl ether, and it was found that both, especially the later, gave good results.

Several forensic applications of these methods were also described.

(Received October 30, 1965)

エーテル、クロロホルム、トリクロロエチレンなどの揮発性麻酔剤を用いて、全身麻酔を行なう際に関連して生じる事故例はあまり多くはないが、往々にして起ることがある。このような場合には生体試料中の微量の揮発性麻酔剤を裁判化学的に検索し、定性定量することが必要とされる。

従来より血液、尿、組織中の揮発性麻酔剤の微量検出法として蒸留後、マイクロ沸点を測定する法¹⁾、拡散分析法²⁾などが報告されているが、検体量が少ないとき、検索すべき揮発性麻酔剤の量が微量のときは確実な結果を得ることは困難であった。最近はガスクロマトグラフィーによるこれら揮発性物質の定性、半定量法が研究され、2, 3 報告³⁾⁴⁾されているため、比較的短時間で揮発性麻酔剤の種類を定性することは可能となったが、定量法としては未だ十分な結果が得られていない。

著者らは最近4年間(1959~1962)にエーテル麻酔に関連した事故例7例に遭遇し、Widmark法によるエーテルの微量定量法を検討し、十分採用できることを認め

た。ただし、この場合はエーテルをその重クロム酸・硫酸で酸化されたものの揮発性物質として定量しているため、定性的な試験にはならない。

著者らは最近の事故例1例についてエーテルの定性法の一つとしてガスクロマトグラフィーによる微量検出法を検討し、他の揮発性毒物と定性的に分離し、半定量できることを認めた。

このようにエーテル麻酔に関連した事故例の場合のエーテルの微量分析法としては、定性試験および半定量法としてガスクロマトグラフィーを行ない、併せて定量試験としてWidmark法を実施することが望ましいと考えられるので、拡散法との比較を含めてこれらの分析方法、結果、実際例などについての知見を報告する。

実験方法

1. 試料および試薬

1) 標準試料: 標準用の揮発性物質としてはTABLE Iに示す12種類を選んだ。そのうち揮発性麻酔剤は*印を付した6種類であり、いずれも精製して用いた。

2) 生体試料: 血液は東京大学附属病院輸血部より分与された健康人の新鮮なものをを用いた。尿は健康人の新鮮なものをを用い、必要な場合には脳脊髄液、胆汁その他の組織を東京大学医学部法医学教室より供与をうけて用

*1 生化学工業株式会社研究所: 新宿区百人町4丁目513, 蚕研内。

*2 東京都文京区本郷7丁目3-1; 3-1, Hongo 7-chōme, Bunkyo-ku, Tokyo.

TABLE I Gas Chromatography of Volatile Compounds

No.	Compounds	R. T.	R. R. T.	Remarks
1	Ethyl ether	1.2min.	0.38	
2	Fluoromar	1.5	0.47	* $\text{CF}_3\text{CH}_2\text{OCH}=\text{CH}_2$
3	Acetone	1.8	0.56	
4	Methyl alcohol	2.3	0.72	
5	Ethyl alcohol	3.2	1.00	
6	i-Propyl alcohol	3.8	1.19	
7	Cyclohexane	4.1	1.28	
8	Fluothane	5.4	1.69	* CF_3CHClBr
9	Benzene	6.9	2.16	
10	Chloroform	8.5	2.66	*
11	Trichloroethylene	11.2	3.50	* $\text{CHCl}=\text{CCl}_2$
12	Methoxyflurane	19.5	6.09	* $\text{CH}_3\text{OCF}_2\text{CHCl}_2$
13	n-Propyl acetate	9.4	2.94	
14	n-Buthyl acetate	25.2	7.88	

* Anesthetics

いた。

3) 試薬: 分析用には特級品を, 抽出溶媒の酢酸エステル類は1級品を精留して用いた。

2. ガスクロマトグラフィー

1) 装置: 放射線イオン化検出器付 GRT-360 型 (大倉理化学研究所製)

2) 標準用試験溶液: TABLE I に示す標準試料を酢酸 n-プロピルおよび酢酸 n-ブチルに 0.5% の濃度に溶かし標準用試験溶液とする。

3) 生体試料より試験溶液の調製: 生体試料 1 ml を小形共栓遠沈管 (5 ml 容) にとり, 氷冷しながら酢酸エステル 1 ml および塩類 (K_2CO_3 または NaCl) 適量を加えて振盪後, 遠心分離して上清を試験溶液とする。

4) ガスクロマトグラフィーの条件

カラム: $100 \times 0.5 \text{ cm}$

充填剤: Diasolid L に 1% Carbowax および 5% DOS をコーティングしたもの。

カラム温度: 40° , 注入口温度: 120°

キャリアーガス (アルゴン) の流速: 30 ml/min.

5) 内部標準物質: RT よりの定性および半定量のためには Cyclohexane を 0.5% の濃度に加えて用いた。

6) 試料注入量: $0.5 \sim 1.0 \mu\text{l}$

3. 拡散法²⁾

1) 器具: 標準型ユニット, No.1

2) 試薬 ①Conway 比色用 $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4$ 試液: $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ (特) 3.70 g を水 150 ml に溶かし, これに硫

酸 280 ml を加え冷後さらに水を加えて 650 ml とする。

②飽和炭酸カリウム溶液

3) 測定法: ユニット内室に $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4$ 試液 1 ml, 外室に試料 0.8 ml をいれ, さらに必要な場合は飽和炭酸カリウム 1 ml 溶液を加える。これを 40° で 3 時間放置後, 内室の $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7\text{-H}_2\text{SO}_4$ 液をとりだし, 水にて 5 ml に希釈し $450 \text{ m}\mu$ の吸光度を測定する。

4. 滴定法 (Widmark 法)

1) 器具: Widmark 用フラスコ

2) 試薬: 塚元, 奥井のエタノール定量法の項⁵⁾ にしたがって調製する。

3) 測定法: Widmark 法⁵⁾ に準じて重クロム酸カリウム消費物質としてエーテルを定量する。ただしエーテル算出のための係数は, 0.0926 で, 対照の 0.01N チオ硫酸ナトリウム溶液の消費量を a, 試料の消費量を b とすれば, 試料 1 ml 中のエーテル含量 X (mg) は次の式から算出される。

$$X(\text{mg/ml}) = (a-b) \times 0.0926 \times 5$$

実験結果および考察

1. ガスクロマトグラフィー (GC)

1) 標準試料の GC

主な揮発性毒物および揮発性麻酔剤の保留時間および相対保留時間を TABLE I に示す。

また Fig. 1-a) に酢酸 n-プロピルを溶媒としてエーテル, メタノール, エタノール, シクロヘキサンをそれぞれ 0.5% に溶かした試験溶液のガスクロマトグラムを示し, Fig. 1-b) に a) の試料のほかにベンゼン, クロ

Fig. 1 Gas Chromatograms of Volatile Compounds

Samples a) 0.5 μ l of 0.5 % Mixture of A~D in n-Propyl Acetateb) 0.5 μ l of 0.5 % Mixture of A~G in n-Buthyl Acetate

A...Ethyl ether

B...Methyl alcohol

C...Ethyl alcohol

D...Cyclohexane

E...Benzene

F...Chloroform

G...Trichloroethylene

S...Solvent

S.I. ...Solvent impurity

ロホルム, トリクロロエチレンを酢酸 n-ブチル 0.5% の割に加えた場合のガスクロマトグラムを示す。

Fig. 1-a) からわかるように酢酸 n-プロピルを抽出溶媒とすると, 分析時間が短縮されるため, エーテル, メタノール, エタノールなどの検出には適している。Fig. 1-b) のように酢酸 n-ブチルを用いると, 一回の分析時間は長くなるが, 広範囲に揮発性物質の検索を行なうことができる。

2) 溶媒抽出時の塩類添加の影響

Cadman ら⁴⁾は血液などの試料よりエタノールを酢酸 n-プロピルで抽出後, GC を実施して定性, 定量を行なっている。この際, 試料に K_2CO_3 , $NaNO_3$, $NaCl$ などの塩類を添加するとエタノールの回収率が増大し, 試

料として水 1 ml をとり, K_2CO_3 を 0.8 g ~ 1 g 加えて抽出した場合に最もよい結果を与え, 回収率は 90 ~ 92% くらいにまで上昇 (無添加の場合は約 30%) することを報告している。エーテルの場合は Fig. 2 に示すように塩類の影響はそれ程大きくない。すなわち, 試料として水にエタノールまたはエーテルを 0.05% の割に加え, その 1 ml に K_2CO_3 または $NaCl$ を Fig. 2 に示す割合で添加したのち, 内部標準物質として 0.1% のシクロヘキサンを含ませた酢酸 n-プロピルで振盪, 抽出後, GC

Fig. 2 Effect of Salts on Extraction of Ethyl Ether from Water

Fig. 3 Calibration Curves for Determination of Ethyl Ether by Gas Chromatography

HE: Peak height of 0.1 % ether

Hc: Peak height of 0.1 % cyclohexane

(1) In n-AcOPr (○—○)

(2) From water: 0.2 Gm K_2CO_3 (●—●)

(3) From urine: " (△—△)

(4) From blood: " (×—×)

Fig. 4 Calibration Curves for Determination of Ethyl Ether by Diffusion Method

(1) Water (●—●) (2) Urine (▲—▲)
(3) Blood (○—○)

を行なうと、エタノールについては Cadman らの報告とほぼ同様の結果を得た。エーテルについては無添加でも 86% の回収率を示し、 K_2CO_3 0.7~1.0 g を加えた場合には 96~98% の回収率を得たが、 K_2CO_3 の添加量が多くなると溶媒と振盪、分離する操作が困難になるので、以後の実験では K_2CO_3 は 0.2 g を添加することにした。

3) 検量線

シクロヘキサンを内部標準物質とし、種々の濃度のエーテルを水、尿、血液などに加えて溶媒抽出後 GC を行ない、エーテルとシクロヘキサンとのピークの高さの比を縦軸として検量線を作成すると Fig. 3 に示すようにエーテル濃度 0.01~0.10% の間ではほぼ直線的となり拡散法、Widmark 法に比べて精度はやや劣るが、定量

Fig. 5 Calibration Curves for Determination of Ethyl Ether by Titration Method

(1) Water (●—●) (2) Urine (▲—▲)
(3) Blood (○—○)

可能なことを認めた。ただし、酢酸n-プロピルにエーテルを直接添加した場合 (Fig. 3 の 1) に比し、水 (2)、尿 (3)、血液 (4) の順に回収量が低下するので、検量線は検体と同一の対照試料を用いて作成しなければならない。

2. 拡散法

種々の濃度のエーテルを水、尿、血液に加え、これらを試料として拡散法により比色定量を行なうと、Fig. 4 に示すように 0.1~1.5 mg/ml の範囲ではほぼ定量可能と認められる。この拡散法の場合も水、尿、血液の順にエーテルの回収量は低下している。なお、実験 2. の 3) に記した測定法は一般的には血中エタノールの比色法または滴定法として用いられている方法である。したがって、エタノールの定量を目的とする場合は Conway 拡散器の外室にいたした試料中のエタノールを充分に放出させ、内室の $K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$ 試液に吸収させるために飽和炭酸カリウム溶液 1 ml を必ず外室に加えている。エーテ

TABLE II Several Examples of Analysis of Ethyl Ether by Widmark Method

No.	Sex	Age	Blood (mg/ml)	Urine (mg/ml)	Cerebrospinal- fluid (mg/ml)	Bile (mg/ml)	Liver (mg/g)	Brain (mg/g)	Muscle (mg/g)	Adipose tissue (mg/g)
1	♀	5 month	0.14	—	—	—	0.048	0.067	—	—
2	♂	4 year	0.32	—	—	—	0.060	—	—	—
3	♂	73 year	0.189	—	0.178	—	0.173	0.145	—	—
4	♂	1.7 year	0.446	—	0.415	—	0.395	0.531	—	—
5	♂	7 year	0.152	—	0.248	—	—	—	0.132	0.421
6	♀	22 year	0.019	—	—	—	—	—	—	—
7	♂	1.5 year	0.762	1.046	0.792	1.165	—	—	—	—

ルの場合には無添加の場合と添加した場合と測定値はほとんど変わらず、放出用の塩類溶液の添加の必要をとくに認めなかった。これは GC の場合と同様、エーテルとエタノールとの沸点の差、水に対する溶解度の差、塩析効果の違いなどによるものと考えられる。

3. 滴定法

種々の濃度にエーテルを水、尿、血液に加え、これらを試料として実験方法 3. の 3) 測定法によりエーテルを定量すると、Fig. 5 に示すように 0.1~2.0mg/ml の範囲で測定値はいずれの場合にも直線的な比例関係を示し、定量可能であることを認めた。この場合も、GC 法、拡散法と同様、水、尿、血液の順にエーテルの回収量は低下しており、Widmark 法の場合は試料血液中の揮発性物質はほとんど $K_2Cr_2O_7-H_2SO_4$ 試液の方に吸収されるため、尿、血液中では添加したエーテルの一部が尿、血液の構成成分と結合して不揮発性になるものと推定される。

滴定法の場合は 1 回の試料の採取量は 0.2ml できわめて少量ですみ、器具、試薬、操作も血中エタノールの定量の場合と全く同様でよく、計算式の係数が異なるのみであり、GC 法、拡散法よりも定量精度も優れている。

4. 実際例について

1) 滴定法による測定例

1959 年から 1962 年の 4 年間に当教室で取扱ったエーテル麻酔に関連した事故例 7 例について滴定法により血液、尿、その他の組織中のエーテル量を測定した結果を

TABLE II に示す。これらの例は骨折、ヘルニア、軟口蓋または腹部疾患などのため手術を必要とした患者にエーテルによる全身麻酔を行ない、そのうち 3 例は抗生物質または局所麻酔剤の注射を併用しているが、いずれも 1 時間ないし数時間後に何らかの原因により死亡した例である。

エーテルは揮散し易いため事故後の時間的経過、季節などにより麻酔時（平均して 1mg/ml くらいの血中濃度とされている）には全身に麻酔に十分な量のエーテルが分布していたとしても、No.1, No.2, No.6 のように測定時にはエーテルがほとんど検出されない場合もあり、No.3, No.5 のように微量が、また No.4 のように麻酔時の約半量が検出されたり、No.7 のようにほぼ麻酔時に近い測定値を得る場合もある。これらの結果より滴定法は実際例に応用しても十分定量の目的を達することができるものと考えられる。

2) GC 法による測定例

TABLE II の No.7 の事故例の場合にはすでに GC 法による測定法が検討されていたので、同一検体について GC 法による定性ならびに定量を試みた。そのガスクロマトグラムは Fig. 6 に示すようにエーテルと同一 RT に相当量のピークを認めた。また GC 法によるこれらの検体中のエーテル量の定量結果を TABLE III に示す。

TABLE III の値を TABLE II の No.7 の値と比較するとやや低目であるが、その傾向は大体一致しており、GC 法はエーテルを定性すると同時に内部標準にシクロ

Fig. 6 Analysis of Ethyl Ether in Blood and Bile (No.7) by Gas Chromatography
A...Ethyl Ether B...0.1% Cyclohexane C, D...Solvent impurity E...Solvent

Table III An Example of Analysis of Ethyl Ether by Gas Chromatographic Method

No.	Sex	Age	Blood (mg/ml)	Urine (mg/ml)	Cerebrospinal- fluid (mg/ml)	Bile (mg/ml)	Liver (mg/g)	Brain (mg/g)	Muscle (mg/g)
7'	♂	1.5 year*	0.71	0.96	0.75	1.03	-	-	-

* The same patient with No. 7 in TABLE II.

ヘキサンを用いて概量を定量することができるものと考えられる。

総 括

1) エーテル麻酔の際の事故例に対処するため、エーテルの微量分析法について検討を加えた。

2) 生体試料中のエーテルの定性法として溶媒抽出によるガスクロマトグラフィーを実施し、揮発性毒物および揮発性麻酔剤の検索に応用できることを認めた。

3) エーテル、メタノール、エタノールなどの抽出溶媒としては酢酸 n-プロピルが、広範囲に揮発性物質を検索する場合には酢酸 n-ブチルが良好であり、エーテルなどの内部標準物質としてはシクロヘキサンがよいことを認めた。

4) エーテルの定量法としてガスクロマトグラフ法、拡散法および滴定法 (Widmark 法) について検討を加え、いずれも微量定量可能であり、とくに滴定法は精度が良好なことを認めた。

5) 実際の事故例についてガスクロマトグラフ法および滴定法を行ない良好な結果を得た。この研究の一部は

昭和38年度文部省各個研究費によって行なったので感謝する。

終りに試料を入手するに当たり、種々便宜をはかって頂いた東京大学医学部法医学教室、同附属病院輸血部に感謝致します。また標準用揮発性麻酔剤を分与して頂いた同附属病院麻酔科大熊佳晴氏に感謝致します。

文 献

- 1) A.O. Gettler, A. Tiber: Arch. Path., 3, 75 (1927).
- 2) C.P. Stewart, A. Stolman: Toxicology, Vol. 1, p. 648 (1960).
- 3) K.D. Parker, C. R. Fontan, J. L. Yee, R. L. Kirk: Anal. Chem., 34, 1234 (1962).
- 4) W. J. Cadman, T. Johns: Unpublished data, 9th Annual Pittsburgh Conference on Annual Chem. & Applied Spectroscopy (1958).
- 5) 塚元久雄, 奥井誠一: 裁判化学, p. 42 (南山堂).