ヘッドスペース・ガスクロマトグラフィーによる臓器中クロロホルム
の定量——均質な試料の調製法

篠原利明, 瀬戸康雄

科学警察研究所, 化学第二研究室

Preparation of Homogeneous Sample Solution for the Determination
of Chloroform in Tissue by Headspace Gas Chromatography

TOSHIAKI SHINOHARA and YASUO SETO

Second Chemistry Sec., National Research Institute of Police Science,
Sanban-cho, 6, Chiyoda-ku, Tokyo 102, Japan

(Received November 17, 1987)

The present study was focused on the preparation of a homogeneous sample solution for the determination of chloroform in the tissue of brain or lung of a rabbit. Into a pair of vial (7 ml) both of 200 mg of brain sample and 0.4 ml of 10% (v/v) Triton X-100 in water were taken, and adjusted to a total volume of 0.8 ml with water. Each vial was sealed with a screw-cap with a septum lid. The sample mixture was irradiated by ultrasonic wave (20 KC, 100 W) for 5 min under cooling on running water. Into the resulting duplicate tissue homogenate samples was injected 200 μ l of either one of standard sample solutions, (a) or (b) through the septum lid: (a), 20% methanol solution (200 μ l) containing 30 μ g of CHCl_3 and 20 μ g of CH_2Cl_2 (internal standard); (b), the same solution containing 15 μ g of CHCl_3 and 20 μ g of CH_2Cl_2 . The both vials were allowed to stand for 15 min at 65°C on a heating block. A portion (400 μ l) of the headspace gas was analyzed by GC with a flame ionization detector. GC conditions used were as follows: Glass column (1.6 m $\times$ 3 mm i.d.) packed with Chromosorb 102 (80–100 mesh); Column oven, 170°C; Detector and injector temperatures, 220°C; Carrier gas, N_2 50 ml/min. In the case of lung tissue sample, the mixture was incubated at 35°C for 2 h in the presence of collagenase in the sealed vial prior to the sonication. The successive experimental mannuals were mostly the same as those of the brain. The present headspace GC was found to be reliable for the determination of CHCl_3 in a range of 2 to 40 μ g/ml in the homogeneous sample solution.

Keywords——sonication; tissue homogenate; collagenase digestion; chloroform determination

はじめに

クロロホルム (CHCl_3) の吸引による中毒死事故に際して、裁判化学上、血液及び臓器中の CHCl_3 濃度を明らかにする必要があることが多い。血液中から CHCl_3 を含めて代表的揮発性有機溶剤について、気化平衡法・ガスクロマトグラフィー (GC) で分離定量を行う方法が、最近 J.D. Ramsey ら¹⁾ によって報告されたが、我が国でも以前から血中トルエンの定量法として気化平衡 GC 法は広く採用されている。²⁻⁴⁾ 一般に、血液中の有機溶剤は脂肪成分と吸着性を有することから、定量に際し

ては特に、検査対象とする有機溶剤の回収率についての注意が必要であり、そのために検査溶剤と物理化学的性状の近似する溶剤を内部標準物質に選ぶなどの手段が取られている。正常血液のような均質な液状の生物試料と比較して、凝固血液や臓器等の固形試料の場合には、 CHCl_3 のような有機塩素系溶剤は組織や細胞質内に深く浸透していると考えられ、これらを正常血液試料と同様の操作で気化平衡 GC 法を用いて分析した際には、信頼性の低い定量値が得られる可能性がある。本報では固形の生物試料中の CHCl_3 を、気化平衡 GC 法により

正確に定量することを目的として、均質な試料の調製法について検討を試みた。

実験材料及び方法

1. 装置及び分析条件 1) 超音波発生装置 (W-375 型, カップホーン冷却ジャケット付, Heat System Ultrasonic, Inc.)—波長, 20 KC; 最大出力, 150 W.

2) 島津 GC-7 A (水素炎イオン化検出器付)—カラム充填剤, Chromosorb 102, 80—100 メッシュ; ガラスカラム, 1.6 m×3 mm i.d.; カラム温度, 170°C; 検出器及び注入口温度, 220°C; 検出器感度, 2×10^2 ; キャリヤガス, 窒素 50 ml/分; 記録計, 島津クロマトパック (C-R 2 A 型).

3) 気化平衡用器具—スクリュウキャップ付バイアル, 容量 7 ml, 硬質ガラス製, 日本クロマト工業製; シリコンラバーパッキング (タフボンド・ディスク®), 同工業製.]

2. 試料の調製法 実験動物としてウサギ (雌, 体重 4 kg) を用い, 脳及び肺臓を摘出したのち直ちに凍結保存 (-80°C) した. 実験直前に保存臓器を解凍し, その一部を切りとり使用した.

1) 脳組織—脳組織の一部 (約 200 mg) を解剖用の小型はさみで切り取り, 2 本のバイアルに同量ずつ入れ, 各々に 10% (v/v) Triton X-100 水溶液 0.4 ml を添加した後, 水を加えて全量を約 0.8 ml とした. バイアルをシリコンラバー付スクリュウキャップで密栓し, 内容物を軽く振り混ぜ超音波発生装置に固定した. 装置に水を通してバイアルを冷却しながら 5 分間, 超音波を試料に照射 (set 6, 100 W) し, 脳のホモジネート試料を調製した. 一方, 2 種類の標準溶液, すなわち, 20% (v/v) メタノール水溶液 200 μ l 中に 30 μ g の CHCl_3 と 20 μ g の 1,1,1-トリクロロエタン (CH_2Cl_2) を含む溶液 (a) 及び 15 μ g の CHCl_3 と 20 μ g の CH_2Cl_2 を含む溶液 (b) を調製し, 各々 200 μ l を GC 用マイクロシリンジを用いて先の 2 検体のバイアルに, シリコンラバーパッキング上から別々に注入し, 十分に混合させた. つづいてバイアルをヒーティングブロック (三田村工業製) 中で 65°C, 15 分間加温し, 有機溶剤を気化平衡させた. 気化平衡後, バイアル中の気相 400 μ l をガスタイトシリンジでとり, GC で分析した.

2) 肺組織—脳組織と同様の操作で肺組織の一部 (約 200 mg) を 2 本のバイアルに等量ずつ採取し, 各々に 1 mg のコラゲナーゼ (125 U/mg, Worthington Biochemical Inc., type III) を含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.7) を 0.2 ml, 10% Triton X-100 水溶液を 0.2 ml, 更に水を加えて全量を約 0.8 ml とした. ついで,

バイアルをスクリュウキャップで密栓したのち, 35°C, 2 時間以上振盪させながらインキュベートした. インキュベート後バイアルを超音波発生装置に固定し, 超音波照射 (set 6, 100 W, 15 min) により試料を完全に可溶化させた. 得られた 2 検体のホモジネートに対して前項 a 及び b の標準溶液各 200 μ l をパッキング上からそれぞれ注入し, ブレンダーを用いて振り混ぜ, 更に数分間室温に静置したのち, 気化平衡 (65°C, 15 min) させた. 気化平衡後, 直ちに気相 400 μ l を GC で分析した.

3. 検量線の作成 脳又は肺組織のホモジネート試料につき得られた GC チャート上から, CH_2Cl_2 に対する CHCl_3 のピーク面積比を縦軸にとり, また CH_2Cl_2 に対する CHCl_3 の添加量比を横軸にとって検量線を作成した. 対照試験としてバイアル中に, 水 0.8 ml 及び前項 1) の a, b 両標準溶液各 200 μ l のみ加え, 同様に気化平衡させ (65°C, 15 min) GC 分析を行いブランク値とした.

結果及び考察

1. 試料の調製

超音波処理前のウサギ脳組織片浮遊物と処理後のホモジネートの状態を Figs. 1 A, B に示す. 脳組織のホモジネートは Triton X の存在下, 短時間の超音波処理のみで得られたが (Figs. 1 B), 肺組織は結合組織を多く含むためこれらの処理のみでは不十分で, あらかじめコラゲナーゼ処理を行うと良い結果が得られた (Figs. 2 B, C). Ramsey ら¹⁾ は死体臓器中の揮発性有機溶剤の分析に際して, 蛋白分解酵素 Subtilisin A, Novo を用いて成功したと述べているが, 著者らは Subtilisin (ICN Pharm., Inc.) を用いて追試したが良い結果が得られず, その原因は酵素源の相違による基質選択性の根本的な差異によるものか, あるいは単なる酵素活性の強弱によるものかは明らかではなかった. 用いたコラゲナーゼはラット肝細胞間結合性蛋白を可溶化²⁾ させ, 細胞分離に使用されるものと同種で本実験においても強い組織分解能を示した. 他の臓器及び凝固血液についても可溶化剤と超音波処理又はコラゲナーゼ処理との組み合わせで均一なホモジネート試料が得られるものと考えられる. 藤井ら³⁾ は血液, 脳, 肝臓, 及び腎臓中のアルコール定量法に超音波処理を利用し, 臓器破碎のための条件を詳細に検討しているが, 肺組織のような強靱な結合組織を有する臓器については超音波処理のみでは試料を可溶化することは困難であった.

2. 検量線

実験方法で述べた測定条件で作成した検量線を Fig. 3

Fig. 1. View of Sample Solutions from a Rabbit Brain

- (A) A piece of brain tissue (200 mg) was suspended in a medium of 0.4 ml of 10% (v/v) Triton X-100 in water and 0.2 ml of water without sonication.
 (B) Homogeneous suspension of the mixture (A) obtained by the sonication (20 kc, 100 W for 5 min).

Fig. 2. View of Sample Solutions from a Rabbit Lung

- (A) A piece of lung tissue (200 mg) was suspended in a medium of 0.2 ml of 10% (v/v) Triton X-100 in water, 0.2 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.7) containing 1 mg of collagenase, and 0.2 ml of water without incubation and sonication.
 (B) The mixture (A) was incubated with collagenase at 35°C for 2 h.
 (C) The mixture (B) was further treated by sonication (20 kc, 100 W, 15 min).

に示す。まず、水試料を用いた対照試験で得られた検量線 (Fig. 3 A) では、 CH_3CCl_3 (内部標準物質, bp 74.1°C) に対する CHCl_3 (bp 61.2°C) のピーク面積比で表わした2点は原点を通る直線上にあり、物理化学的性状が近似するこれら2成分は水試料からの気化に際し

でも類似した挙動をしていることが判明した。この平衡状態では試料 200 mg (試料溶液, 1 ml) 中に存在する CHCl_3 は 2—40 μg の範囲で定量することが可能と考えられる。Fig. 3 B, Fig. 3 C にそれぞれ、脳及び肺組織の存在下における検量線を示す。直線性は Fig. 3 A

Fig. 3. Calibration Curves of CHCl_3 by Headspace Gas Chromatography (GC)

(A) The mixture of 0.8 ml of water and 200 μl of standard solution (a) or (b) in a sealed vial (7 ml each) was allowed to stand at 65°C for 15 min, and then a portion (400 μl) of each headspace was analyzed by GC; (a), 20% methanol solution (200 μl) containing 30 μg of CHCl_3 and 20 μg of CH_3CCl_3 as an internal standard; (b), the same solution (200 μl) containing 15 μg of CHCl_3 and 20 μg of CH_3CCl_3 .

(B) The mixture of 200 mg of a rabbit brain, 0.4 ml of 10% Triton X-100, and 0.2 ml of water was well homogenized in the sealed vial by sonication (20 KC, 100 W, 5 min). Into the vial was injected 200 μl of the standard solution of (a) or (b), and after sonication a portion (400 μl) of each headspace was analyzed by GC.

(C) The mixture of 200 mg of a rabbit lung, 0.2 ml of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.7) containing 1 mg of collagenase, 0.2 ml of 10% Triton X-100, and 0.2 ml of water was well homogenized by incubation (35°C , 2 h) and sonication under conditions described in methods. After the addition of (a) or (b), a portion (400 μl) of each headspace was analyzed. A/A_s , The ratio of peak area of CHCl_3 to that of CH_3CCl_3 on GC; M/M_s , The ratio of the amount (μg) of CHCl_3 to that of CH_3CCl_3 .

と比較して若干失われるが、これは組織ホモジネートに対する有機溶剤の吸着性の微小な差異に原因するものと思われる。両塩素化合物は、特に脂肪組織に対し吸着性が大きいことがよく知られているが、これらの検量線からみて、両者間には吸着程度に大きな差は認められなかった。なお、両有機塩素化合物の対照試験の GC チャート上のピーク面積を 100% とし、脳又は肺組織ホモジネートの存在下でのピーク面積を比較すると、いずれも 50—55% となり、かなりの比率で有機塩素化合物はホモジネート中に吸着されることが観察された。臓器中の CHCl_3 がこのような前処理によって気化平衡ガスとして十分に回収されるか否かは不明であるが、 65°C で 15 分以上 1 時間内で検量線に変化が認められなかったもので、Figs. 3 B, C の検量線は実際の試料の気化平衡状態のものに近いと思われ、実務に応用できると考えられる。内部標準物質として加えた CH_3CCl_3 の意義もまた

大きいと思われる。以上の実験操作で若干の補足をする、市販のガスタイトシリンジは高価で、また注射針も太く、パッキングの穴からガス漏れの恐れがあるので、著者らは細い注射針 (Terumo, 25 G 又は 26 G) を通常の硬質硝子注射筒 (0.5 ml) に取り付け、内壁にシリコングリスを薄く塗布し気密性を高くしたものを用いている。Triton X の濃度については終濃度 1—4% の範囲で検討したが、脳組織の可溶化は 4% が最も効果的であり、肺組織では濃度の影響は脳組織と比較して小さかったので、終濃度 2% で気化平衡を行った。

一般に、 CHCl_3 を吸入すると大部分は肺より未変化のまま呼気中へ排出され、一部は体内で代謝されることが知られている。 CHCl_3 による中毒症状は麻酔、アシドーシス、チアノーゼ、循環系障害、心筋障害及び腎障害が主なものである。イヌを用いた暴露実験では 15000 ppm の濃度で CHCl_3 は急速に体内に浸透し、約 1 時

間で臓器中の CHCl_3 含有量は平衡に達し、肝臓で 256 $\mu\text{g/g}$, 脳では 480 $\mu\text{g/g}$, 血液中には 490 $\mu\text{g/g}$ に達すると報告されている。⁷⁾ 本 CHCl_3 定量法はある致死事件に

関連して、鑑定資料として送付された血液、脳及び肺臓組織中の CHCl_3 の定量に応用し、GC-MS による化合物の確認と併せて有用な成果が得られた。

引用文献

- 1) J.D. Ramsey, R.J. Flanagan. *J. Chromatogr.*, **240**, 423 (1982).
- 2) 宮浦修一, 三河礼子, 磯野秀夫, 衛生化学, **29**, 83 (1983).
- 3) 小嶋 亨, 小林宏志, 日法医誌, **27**, 255 (1973).
- 4) 日本薬学会(編), “薬毒物化学試験法注解,” 第3版, 南山堂, 東京, 1985.
- 5) D.C. Hixson, M.D. Ponce, J.P. Allison, E.F. Walborg, *Exp. Cell Res.*, **152**, 402, (1984).
- 6) 藤井孝子, 白水英治, 日法医誌, **26**, 11 (1972).
- 7) “Industrial Hygiene and Toxicology,” Vol. 2, ed. by D.W. Fassett and D.D. Irish, John Wiley & Sons, New York, 1962, p.1261.