薄層クロマトグラフィーによるバルビツール酸系睡眠薬の分析

丹 羽 口 徹 吉 (科学警察研究所*)

Thin-Layer Chromatography of Hypnotics of Barbituric Acid Derivatives.

Tetsukichi Niwaguchi

(Scientific Police Research Institute*)

Separation and identification of several kinds of barbituric acid derivatives by thin-layer chromatography were investigated. The thin-layer was made of a mixture of silicic acid, potato starch and sodium carbonate. The most suitable solvent system among those tested was ethylene dichloride-acetone (85 : 15). Spectroscopic characterization of the compounds submitted to the chromatography was performed by eluting the spots with 0.5 N ethanolic sodium hydroxide.

(Received June 29, 1962)

ま え が き

近時、睡眠薬は裁判化学上の問題となることが多く、しかもバルビツール酸系睡眠薬、非バルビツール酸系睡眠薬は単独で用いられることは少なく、他の薬剤と混合して使用される傾向を示している。従来、これら製剤中より、あるいは生物体中より微量のバルビツール酸系睡眠薬を抽出し、同定する有力な方法の1つとして、ペーパークロマトグラフィーが行なわれているが、これら相互の分離にやや難点がみられることおよび発色剤に鋭敏なものが見あたらないことなどの点から、容易に目的を達することができなかったようである。

薄層クロマトグラフィーは最初 Kirchner¹⁾ などが吸着剤としてケイ酸を固着剤としてデンプンを用いてクロマトストリップを作り、これによってテルペン類の分離を行ない実用化されたもので、そのうち Reitsema²⁾ などは同様にクロマトプレートを用いてテルペン類の確認に成功し、また Fiori³⁾ らは尿中のメプロバメートの定量に応用している。さらに古河⁴⁾ は固着剤に石膏を用いてプレートを作り、種々の有機窒素化合物の分離に成功している。最近本法はいちじるしい発展をみせ、ケイ酸の他にアルミナなどを吸着剤とし、特別の装置を用いてプレートを作製し、食用色素⁵⁾、スルファミン剤⁶⁾、アルカロイド⁷⁾ などの分離同定を行なっている。

著者らはさきに、ケイ酸とデンプンとによりプレートを作製し、農薬の分析を行ない好結果を得た⁸⁾。この方法

は、展開時間が短かくて分離がよく、スポットの確認に際してある程度、強酸、高熱に耐え、しかも再現性が良好で、溶媒を選択すればスポットはきわめてひきしまった鮮明なものが得られ、定量するため目的物を抽出する操作も簡単にできるなどの特徴がある。そこで著者は、本法を数種のバルビツール酸系睡眠薬の分離同定に応用し、検討した結果、二、三の知見を得たので報告する。ここではバルビツール酸系睡眠薬がアルカリにより紫外線照射下でけい光を発することから、あらかじめアルカリを混合してプレートを作製し、上昇法により展開を行なった。展開溶媒は数種のものについて検討を加え、スポットは紫外線に照射して観察するとともに、硝酸銀溶液を噴霧して確認した。また各スポットから目的物を抽出し、アルカリ性における紫外部の吸収を測定した。

実 験 の 部

1. 試 料

A. バルビツール酸系睡眠薬

Barbital (diethylbarbituric acid, B)

Phenobarbital (phenylethylbarbituric acid, P)

Amobarbital (isoamylethylbarbituric acid, Am)

Allobarbital (diallylbarbituric acid, Al)

Methylhexabital (N-methylcyclohexenyl-methylbarbituric acid, Mh)

Ethylhexabital (cyclohexenylethylbarbituric acid, Eh)

Sandoptal (allylisobutylbarbituric acid, S)

* 東京都千代田区三番町 6 ; Sanbancho, Chiyoda-ku, Tokyo.

B. 製 剤

Bellerger (錠剤) (三共)

1 錠中	belifoline	0.1 mg
	ergotamine tartarate	0.3 mg
	phenobarbital	20.0 mg

Hydantol-F (錠剤) (藤永)

1 錠中	diphenylhydantoin	25 mg
	caffeine sod. benzoate	17 mg
	phenobarbital	8 mg

Neo Ricketropine (注射薬) (理研)

1 ml 中	procaine hydrochloride	10.0 mg
	scopolamine hydrobromide	0.1 mg
	atropine hydrosulfate	0.18 mg
	allobarbitol	30.0 mg
	pyrabitol	150.0 mg

2. クロマトプレートの作製

ケイ酸 (Mallinckrodt, $\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, 100 mesh) 28 g および バレイショデン プン (日本薬局方) 2 g の混合物に, 水 54 ml を加え, おだやかに煮沸して濃厚なペーストとし, さらに 4% 炭酸ナトリウム水溶液 25 ml を加えて再び数分間徐々に加熱し煮沸し始めてから火を去り, 冷却したのちその 25 g を 13×13 cm のガラス板の中央部に注ぎ, これを板上に均等に行きわたるように水平方向に揺動しつつ全面に平滑にひろげる。そののち $100 \sim 105^\circ$ の恒温器中で 30 ~ 60 分間加熱, 乾燥し, デシケーター中に保存する。層の厚さは $0.95 \text{ mm} \pm 0.05 \text{ mm}$ である。

3. 展開溶媒

溶媒 A: 15 N- NH_4OH 飽和ブタノール

溶媒 B: 15 N- NH_4OH 飽和アミルアルコール, ブタノール (50, 50)

溶媒 C: イソプロパノール, クロロホルム, 15 N- NH_4OH (45, 45, 10)

溶媒 D: 二塩化エチレン, アセトン (90, 10)

溶媒 E: 二塩化エチレン, アセトン (85, 15)

溶媒 F: 二塩化エチレン, アセトン (80, 20)

4. 展開方法

各バルビツール酸系睡眠薬のエタノール溶液をクロマトプレート上に点状にスポットして上昇法により展開する。原点は下端より 1.5 cm, 原点より 10 cm 展開する。各試料は $50 \mu\text{g}$ を使用し, 展開時間は $25 \sim 30^\circ$ で溶媒 A, B, C の場合は 60 分, D, E, F では 30 分である。

製剤の場合は, 錠剤を粉碎し, エタノールで 30 分間温浸し, 浸出液を検液とする。また注射薬はそのままエ

タノールで希釈して用いる。

5. 検出方法

展開後, プレートを手乾し紫外線照射下でスポットを観察する。さらに 0.05 M エタノール性硝酸銀試液を噴霧し数分間殺菌灯を照射すると, 褐色地に白色のスポットとして検出される。

6. スポットからバルビツール酸系睡眠薬の抽出ならびに紫外部の吸収測定

展開後, 乾燥し, スポットの位置を削りとり, エタノールで 30 分間温浸しエタノールを留去する。残渣を 0.5 N-エタノール性水酸化ナトリウムに溶かし, ただちに紫外部の吸収を測定する。

7. 実験結果ならびに考察

各溶媒に対するバルビツール酸系睡眠薬の Rf 値を Table I に示す。

Table I Rf values of Barbituric Acid Derivatives

Barbituric Acid Derivatives Solvents	B	P	Am	All	S	Mh	Eh
A	0.50	0.50	0.70	0.64	0.65	0.68	—
B	0.38	0.45	0.70	0.56	0.67	0.65	0.60
C	0.80	0.80	0.76	0.86	0.82	0.86	0.79
D	0.20	0.29	0.51	0.34	0.48	0.74	0.42
E	0.27	0.33	0.50	0.37	0.46	0.68	0.40
F	0.45	0.68	0.61	0.69	0.47	0.67	0.77

以上の結果からみると, 溶媒として B, D または E を用いた場合, 相互の分離が比較的良好である。しかしながら, 溶媒 B の場合はスポットのひろがりやや大きいため, Rf 値の変動をきたすことがあり, また展開時間も前述のように溶媒 D, E の場合の 2 倍の 60 分を要する。これに反し, 溶媒 D, E の場合はスポットのひろがり小さく, Rf 値の変動は各睡眠薬について ± 0.02 以内で再現性も良好である。

また各睡眠薬の確認限度は, 紫外線照射による場合は $25 \mu\text{g}$ であり, 硝酸銀試液を用いた場合は $10 \mu\text{g}$ である。

つぎに製剤について溶媒 E を用いて展開し, 硝酸銀試液により発色させて得たクロマトグラムを Fig. 1 に示す。

展開後, スポットの位置から各バルビツール系睡眠薬を抽出し, 0.5 N-エタノール性水酸化ナトリウムに溶かして得た紫外部吸収の最大波長は Table II に示すとおりである。

この値は展開の操作を行わない純品のものと全く同一の値を示し, 相互の同定に資することができる。

Fig. 1 Plate Chromatograms of Hypnotics
Containing Barbituric Acid Derivatives

Table II The Absorption Maxima of Barbituric Acid Derivatives in Ethanolic Sodium hydroxide Solution

Barbituric Acid Derivatives	B	P	Am	All	S	Mh	Eh
$\lambda_{\max} (m\mu)$	254	258	254	255	243	245	256

むすび

薄層クロマトグラフィーにより数種のバルビツール酸系睡眠薬の分離同定を行なった。この結果、炭酸ナトリウム添加のプレートを用い、二塩化エチレン、アセトン (85 : 15) を展開溶媒として用いたものが最も適していることが明らかになった。また展開後、スポットより目的物を抽出し、アルカリ性溶液として紫外部の吸収を測定することにより、相互の同定をさらに確実にすることができた。

本研究にあたり、種々御助言を戴いた山村室長に深謝し、また実験に協力された吉田技官に謝意を表す。

文 献

- 1) J. G. Kirchner, J. M. Miller : Ind. Eng. Chem., **44**, 318 (1952) ; J. Agr. Food Chem., **1**, 512 (1953) ; *Ibid.*, **2**, 1031 (1954) ; *Ibid.*, **5**, 283 (1957) ; Anal. Chem., **23**, 420 (1951).
- 2) R. H. Reitsema : *Ibid.*, **26**, (1954).
- 3) A. Fiori, M. Marigo : Nature, **182**, 943 (1958).
- 4) 古河 : 日化誌, **78**, 1185 (1957).
- 5) M. Mottier : Mitt. Lebensm. u. Hyg., **47**, 372 (1956) ; Chem. Abst., **51**, 7723 (1959).
- 6) E. Wollish, M. Schmall : Anal. Chem., **33**, 1138 (1961).
- 7) G. Machata : Mikrochim. Acta, **1960**, 79.
- 8) 山村, 丹羽口 : 科警研報, **13**, 450 (1960) ; 木村, 丹羽口 : *Ibid.*, **14**, 77 (1961) ; 丹羽口 : *Ibid.*, **14**, 423 (1961) ; J. Yamamura, T. Niwaguchi : Proc. Japan Acad., **38**, 129 (1962).