ろ紙電気泳動法の裁判化学領域への応用 (第1報)

Stas-Otto 法で分離困難な合成医薬品およびその関連化合物の分離同定¹⁾

福田照夫, 三上敬二

昭和薬科大学²⁾

Application of Paper Electrophoresis to the Field of Forensic Chemistry. I.
Identification of Synthetic Drugs Difficult to separate by
Stas-Otto Method and the Related Compounds¹⁾

TERUO FUKUDA and KEIJI MIKAMI

Showa College of Pharmaceutical Sciences²⁾

(Received September 25, 1970)

The paper electrophoretic method to identify synthetic drugs difficult to separate by Stas-Otto method (antipyrine salicylate, theobromine and sodium salicylate, caffeine and sodium salicylate, caffeine and sodium benzoate, and pyrabital) and related compounds (barbital, phenobarbital, allobarbital, amobarbital, cyclobarbital, hexobarbital, antipyrine, aminopyrine, acetanilide, phenacetine, acetylsalicylic acid, caffeine, theophylline, and theobromine) was investigated by using $m/30$ Na_2HPO_4 , 5N formic acid, 3 % aqueous ammonia, 1 % borax, and 10-fold diluted solution of Atkins-Pantin buffer (pH 10) as the electrolyte. The mobilities of the compounds were expressed relative to flavianic acid. It was found that synthetic drugs could be identified by using 3 % aqueous ammonia and 5N formic acid as the electrolyte, and all related compounds, except acetanilide, phenacetine, and caffeine, could be separated and identified by selecting the above-mentioned electrolytes.

まえがき

裁判化学における毒物試験には, Stas-Otto 法で分離困難な合成医薬品の処理の項があり, それらは各個別試験になっているが, 一斉分析的に簡易化する目的で, これらを構成している成分について, 従来われわれが衛生化学領域への応用化について種々検討してきているろ紙電気泳動法による分離同定を今回検討した. また同時に, これらの構成成分関連化合物であるバルビツール酸誘導体, 解熱剤およびプリン誘導体の分離同定もあわせて検討した.

実験方法

1. Stas-Otto 法で分離困難な合成医薬品 サリチル酸アンチピリン*, サリチル酸ナトリウムテオブロミン (ジウレチン), サリチル酸ナトリウムカフェイン, 安息香酸ナトリウムカフェイン (アンナカ), ピラビタル*

以上5種類. *印のついた2種の薬品は希塩酸酸性で2-3分間煮沸分解後, 水浴上で蒸発乾固して残渣を少量のエタノールに溶かしたものを試料とする. 他の3種の薬品はそのまま水溶液とする.

2. 上記合成医薬品の構成成分および関連化合物

バルビツール酸誘導体——バルビタル, フェノバルビタル, アロバルビタル, アモバルビタル, ヘキソバルビタル, シクロバルビタル, 以上6種類.

解熱剤——アンチピリン, アミノピリン, アセトアニリド, フェナセチン, アセチルサリチル酸以上5種類.

プリン誘導体——カフェイン, テオフィリン, テオブロミン以上3種類. 合計14種類. テオブロミンおよびテオフィリンは3%アンモニア溶液に溶かし, 他はすべてエタノール溶液とする.

1. および2. に記載の試料濃度は, すべて約0.5%

1) 日本薬学会第90年会, 1970で発表.

2) Location: Tsurumaki, Setagaya-ku, Tokyo (東京都世田谷区弦巻 5-1-8).

とし、スポット量は約5 μ lとする。

3. ろ紙電気泳動操作法³⁻⁸⁾

1) 使用器具³⁻⁸⁾

2) 使用ろ紙の調整⁸⁾

3) 泳動条件——電解液：① M/30 Na₂HPO₄，② 1% ホウ砂，③ 3% アンモニア，④ 5N 硝酸，⑤ Atkins-Pantin 緩衝液 (pH 10) の10倍希釈液。電圧 18.2 V/cm。泳動前放電時間：15分間。泳動時間：フラビアン酸が7cm移動するまで行なう。

4) 操作法——泳動法は文献3—8)に同じ。泳動終了後は、ろ紙を乾燥し、紫外線ランプ (マナスライト 2536 Å) で照射し、黒い吸収斑点 (アセチルサリチル酸のみ蛍光) を見出す。これらの斑点の中央と原線との距離をそれぞれの検体の泳動距離とし、これとフラビアン酸の泳動距離との比をフラビアン酸に対する移動比 (RM_F) とする。

$$\text{すなわち, } RM_F = \frac{\text{検体の泳動距離}}{\text{フラビアン酸の泳動距離}}$$

この RM_F を各検体について5つ (n=5) ずつ求め、信頼度95% ($\alpha=0.05$) の信頼限界値を算出し、これによって各検体を分離同定する。

なお本実験における検出法としては、紫外線ランプ照射法によったが、その感度は電解液として1M/30 Na₂HPO₄

を用いた場合、約5 μ l スポットするとして、アセトアニリド、フェナセチン、アミノピリン、アンチピリン、アスピリンの群がもっともよく約0.03%まで、つぎにカフェイン、テオブロミン、テオフィリンの群で約0.1%まで、最後にバルビツール酸誘導体で約0.25%まで検出可能である。今回の検討は、電解液の選択を行なったもので、検出法は最も簡便で全試料が検出可能な紫外線照射法によったが、もちろん、それぞれの化合物に適した検出法を用いれば感度も上り、同定も容易になることは明らかである。しかし本検出法でも通常試験においては感度は十分である。

結果および考察

1. Stas-Otto 法で分離困難な合成医薬品の構成成分およびその関連化合物のフラビアン酸に対する移動比 (RM_F) の信頼度95%の信頼限界

(1) M/30 Na₂HPO₄ を電解液とした場合 Table I にみるように、蛍光を発するアセチルサリチル酸のみ RM_F 値が他に比し、特に大きく分離同定できるが、他のものはAグループ (シクロバルビタール、フェノバルビタール、アロバルビタール)、Bグループ (バルビタール、アモバルビタール、ヘキソバルビタール)、Cグループ (カフェイン、テオフィリン、テオブロミン、アンチピリン、アミノピリン、アセトアニリド、フェナセチン

TABLE I. Confidence Limit of Relative Mobilities of the Compounds, related to the Component of Synthetic Drugs Difficult to separate by Stas-Otto Method, to Flavianic Acid with M/30 Na₂HPO₄ Solution as the Electrolyte

		Confidence limit of RM _F	
Hypnotica	cyclobarbitol	1.05 $\leq$ RM _F $\leq$ 1.15	A group
	phenobarbitol	1.02 $\leq$ RM _F $\leq$ 1.06	
	allobarbitol	0.99 $\leq$ RM _F $\leq$ 1.03	
	barbital	0.93 $\leq$ RM _F $\leq$ 0.97	B group
	amobarbital	0.86 $\leq$ RM _F $\leq$ 0.94	
	hexobarbital	0.85 $\leq$ RM _F $\leq$ 0.93	
Diuretic	caffeine	0.57 $\leq$ RM _F $\leq$ 0.63	C group
	theophylline	0.60 $\leq$ RM _F $\leq$ 0.70	
	theobromine	0.56 $\leq$ RM _F $\leq$ 0.62	
Antifebrile	antipyrine	0.62 $\leq$ RM _F $\leq$ 0.66	C group
	aminopyrine	0.63 $\leq$ RM _F $\leq$ 0.67	
	acetanilide	0.56 $\leq$ RM _F $\leq$ 0.64	
	phenacetine	0.52 $\leq$ RM _F $\leq$ 0.58	
	acetylsalicylic acid	1.31 $\leq$ RM _F $\leq$ 1.33	

- 3) 福田照夫, 小林君江, 呂 清美, 石橋無味雄, 金 景休, 衛生化学, **12**, 25 (1966).
- 4) 福田照夫, 小林君江, 植木民子, 衛生化学, **13**, 342 (1967).
- 5) 福田照夫, 小林君江, 三村和子, 衛生化学, **14**, 271 (1968).
- 6) 福田照夫, 三村和子, 三上敬二, 衛生化学, **15**, 317 (1969).
- 7) 福田照夫, 三村和子, 衛生化学, **16**, 39 (1970).
- 8) 福田照夫, 三村和子, ビタミン, **41**, 260 (1970).

ン) の3グループに別けることができたが、グループ内の各構成メンバー個々については分離同定できなかった。

(2) **Atkins-Pantin 緩衝液 (pH 10) の10倍希釈液を電解液とした場合** Table II にみるように、Aグループ中のアロバルビタール、フェノバルビタールおよびシクロバルビタールの3者は相互に分離同定できたが、Bグループではバルビタールのみが分離同定でき、アモバルビタールとヘキソバルビタール間の分離ができなかった。この両者間の分離は(4)に述べるように、電解液として1%ホウ砂を用いることにより分離されることになる。

TABLE II. Confidence Limit of Relative Mobilities of A Group and B Group Drugs to Flavianic Acid with Tenfold diluted Solution of Atkins-Pantin Buffer (pH 10) as the Electrolyte

Confidence limit of RM _F		
A group	allobarbitol	$0.96 \leq \text{RM}_F \leq 1.02$
	phenobarbital	$0.91 \leq \text{RM}_F \leq 0.95$
	cyclobarbitol	$0.79 \leq \text{RM}_F \leq 0.83$
B group	barbital	$0.94 \leq \text{RM}_F \leq 1.02$
	amobarbital	$0.84 \leq \text{RM}_F \leq 0.92$
	hexobarbital	$0.84 \leq \text{RM}_F \leq 0.91$

(3) **5N 酢酸を電解液とした場合** Table III にみるように、Cグループ中のアンチピリンとアミノピリンの2者のみが分離同定できた。

TABLE III. Confidence Limit of Relative Mobilities of C Group Drugs to Flavianic Acid with 5N Formic Acid as the Electrolyte

Confidence limit of RM _F	
Aminopyrine	$0.18 \leq \text{RM}_F \leq 0.28$
Antipyrine	$0.35 \leq \text{RM}_F \leq 0.41$
Acetanilide	$0.62 \leq \text{RM}_F \leq 0.68$
Phenacetine	$0.62 \leq \text{RM}_F \leq 0.70$
Caffeine	$0.59 \leq \text{RM}_F \leq 0.65$
Theophylline	$0.58 \leq \text{RM}_F \leq 0.62$
Theobromine	$0.56 \leq \text{RM}_F \leq 0.62$

(4) **1%ホウ砂を電解液とした場合** Table IV にみるように、テオフィリンがよく分離同定できた。テオブロミンも分離同定不能ではないが、RM_F 値がカフェインと接近しているので、やや困難である。テオブロミンに関しては、つぎの3%アンモニアを電解液とすることにより分離同定がより容易となる。またさきの(2)で分離不能であったアモバルビタールとヘキソバルビタールの分離同定がここで可能であることがわかる。

TABLE IV. Confidence Limit of Relative Mobilities of Some Drugs belong to B and C Group Drugs to Flavianic Acid with 1% Borax as the Electrolyte

Confidence limit of RM _F		
B group	amobarbital	$0.79 \leq \text{RM}_F \leq 0.81$
	hexobarbital	$0.74 \leq \text{RM}_F \leq 0.77$
C group	theophylline	$0.69 \leq \text{RM}_F \leq 0.75$
	theobromine	$0.41 \leq \text{RM}_F \leq 0.51$
	caffeine	$0.37 \leq \text{RM}_F \leq 0.41$
	acetanilide	$0.36 \leq \text{RM}_F \leq 0.40$
	phenacetine	$0.34 \leq \text{RM}_F \leq 0.38$

(5) **3%アンモニアを電解液とした場合** Table V にみるように、さきの(4)で分離のやや困難であったテオブロミンとカフェイン間の分離がきわめて良好である。しかし、今度はテオフィリンとテオブロミンとの間が不可能ではないが、分離困難となる。従って、プリン誘導体3者間の分離同定には、電解液として1%ホウ砂と3%アンモニアの両者を用いると容易である。

TABLE V. Confidence Limit of Relative Mobilities of C Group Drugs to Flavianic Acid with 3% Aqueous Ammonia as the Electrolyte

Confidence limit of RM _F	
Theophylline	$0.71 \leq \text{RM}_F \leq 0.79$
Theobromine	$0.61 \leq \text{RM}_F \leq 0.71$
Caffeine	$0.09 \leq \text{RM}_F \leq 0.23$
Acetanilide	$0.11 \leq \text{RM}_F \leq 0.23$
Phenacetine	$0.09 \leq \text{RM}_F \leq 0.23$

なお今回のこれまでの電解液の検討では、アセトアニリド、フェナセチンそれにカフェインの3者は最後まで分離できなかった。

以上にみるように、Stas-Otto 法で分離困難な合成医薬品の構成成分およびその関連化合物は、まず 1M/30 Na₂HPO₄ を電解液としてA, B, C の3グループに分け、各グループについては、それぞれに適したさきに記した電解液を用いることにより、アセトアニリド、フェナセチンおよびカフェインの3者を除き、すべて分離同定できた。

2. Stas-Otto 法で分離困難な合成医薬品の同定法

上記 1. の結果を本法に応用するに、Fig. 1 にみるように、電解液として、まず3%アンモニアを用いると、サリチル酸ナトリウムテオブロミンがテオブロミンの特異的な位置およびサリチル酸の螢光で同定できる。安息香酸ナトリウムカフェインもカフェインの位置は特異的

Fig. 1. Identification of Synthetic Drugs, Difficult to separate by Stas-Otto Method, by using 3% Aqueous Ammonia and 5N Formic Acid as the Electrolyte
□: fluorescence ■: absorption

ではないが、安息香酸が黒い吸収を示すので同定できる。つぎに5Nギ酸を用いると、サリチル酸、安息香酸、カフェインおよびテオブロミンは4者ともRMF値がほぼ同じで斑点が重なるので、サリチル酸アンチピリンとピラビタールの2者のみが2つの斑点が現われ、またサリチル酸の蛍光および他の成分のRMF値の差により同定できる。また、サリチル酸ナトリウムカフェインは3%アンモニアを電解液とした場合、サリチル酸アンチピリンとの区別ができず同定不能であったが、5Nギ酸の場合にサリチル酸アンチピリンは2つの斑点が現われるのに反し、サリチル酸ナトリウムカフェインは1つの斑点しか現われないので両者の区別がつく。

以上にみるように、電解液として3%アンモニアと5Nギ酸の2種類を用いることにより、Stas-Otto法で分離困難な合成医薬品5種類がすべて同定できた。なお、この際、サリチル酸アンチピリンおよびピラビタールの2者は希塩酸酸性で煮沸分解の前処理を必要とするが、他のサリチル酸ナトリウムカフェイン、サリチル酸ナトリウムテオブロミンおよび安息香酸ナトリウムカフェイ

ンの3者は分解操作の前処理を必要とせず、そのまま試料として用いることができわめて容易な試験法である。

結 論

1. Stas-Otto法で分離困難な合成医薬品であるサリチル酸アンチピリン、サリチル酸ナトリウムカフェイン、サリチル酸ナトリウムテオブロミンおよびピラビタールは、電解液として3%アンモニアおよび5Nギ酸を用いることにより相互の同定が可能である。

2. 上記合成医薬品構成成分関連化合物として検討した、バルビタール、フェノバルビタール、アロバルビタール、アモバルビタール、シクロバルビタール、ヘキソバルビタール、アンチピリン、アミノピリン、アセトアニリド、フェナセチン、アセチルサリチル酸、カフェイン、テオブロミン、テオフィリンは、電解液として1M/30 Na_2HPO_4 、1%ホウ砂、3%アンモニア、5Nギ酸およびAtkins-Pantin緩衝液(pH 10)の10倍希釈液をそれぞれ使い分けることにより、フェナセチン、アセトアニリド、カフェインの3者を除き、すべて分離同定できた。