〔衛生化学〕
EISEI KAGAKU
33 (5) 342-348 (1987)

裁判化学における薬毒物の系統的分析法に関する研究 (第2報) Retention Index による同定のためのキャピラリーカラムガスクロマトグラフィーの利用

大山信行,^a 佐野敏幸,^a 庄山正敏,^a 前田憲志^b

愛知県警察本部科学捜査研究所^a

名古屋大学医学部付属病院分院^b

Studies on Systematic Analysis of Poisonous Compounds in Forensic Chemistry. II. Application of Capillary Column Gas Chromatography to Substance Identification by Means of Retention Indices

NOBUYUKI OYAMA,^a TOSHIYUKI SANO,^a MASATOSHI SYOYAMA^a
and KENJI MAEDA^b

*Criminal Science Laboratory, Aichi Prefectural Police H.Q.,^a 2-1-1, Sanno-maru,
Naka-ku, Nagoya 460, Japan and Department of Internal Medicine,
Nagoya University Branch Hospital,^b 1-1-4, Daiko-cho,
Higashi-ku, Nagoya 461 Japan*

(Received April 15, 1987)

The simultaneous determination of 110 compounds including pesticides, hypnotics, local anesthetics, psychotropics, narcotics, etc., was examined by means of retention index on gas chromatography (GC). Temperature programmed GC using fused-silica capillary column CBP-1 (0.53 mm i.d. × 12 m) was very effective in this study as compared with CBP-10 (0.33 mm i.d. × 25 m) and some packed columns. All of the compounds except benzoximate, cloxazolam and oxazepam could be detected as good symmetrical peaks less than 100 minutes under the conditions of 120–250°C/(6°C/min) as oven temperature, 270°C as injection temperature, 0.2 kg/cm² as carrier gas (N₂) pressure (velocity, 90.9 cm/s) on CBP-1. A search window of these retention indices could be estimated about 20, then the discriminating powers of a combination of this data and TLC screening system mentioned earlier (Ref. 1), were 0.995, 1.00, 1.00, 0.996 and 1.00 in I, II, II', III and IV division, respectively.

Keywords—retention index; GC; fused-silica capillary column; forensic chemistry; poisonous compound; simultaneous determination

緒 論

裁判化学における薬物分析には事例の状況から、特定の薬物に限定できる場合と全く未知な場合とがある。後者のケースでは現在、農薬、催眠剤、精神安定剤等グループ別に分析するのが通例であるが、混在していた場合、あるいは予想外の薬物が存在していた場合見落とす恐れが十分考えられる。

最近、殺人を予測させた服毒事例で胃内容物から、フェノチアジン、プロメタジン、ジアゼパム、クロルプロマジン、フルニトラゼパム、ニメタゼパム、ブロムワレリル尿素及びニトラゼパムが同時に検出された例があ

る。医薬品の過度とも思える多種類、多量の投与あるいは農薬にもみられる多くの複合製剤の普及等を考慮すると、裁判化学上問題の多い薬物の総括的な分析法の設定が急務と思われる。

我々はこの観点から100種の薬物について薄層クロマトグラフィー (TLC) による分族法を報告したが、¹⁾ ガスクロマトグラフィー (GC) による保持指標 (RI) の利用が薬物分析に至適なものと提唱され²⁻⁴⁾ 最近、角田は充填カラムを用いて有機リン剤を、⁵⁾ 土橋らはヒューズドシリカキャピラリーカラム (FC) により、125種の薬物を分析している。⁶⁾ しかし、実用化するには更にデー

タの積み重ねが必要と考えられ、今回我々は110種の薬物について、系統的分析法の一環として至適カラムの選択及びそのRIについて検討を加えたので報告する。

実験方法

試薬及び分析機器 使用した薬物は既報¹⁾に従いI族としたピリミホスメチル、プロチオホス、クロルプロピレート及びBPMC, III族としたブロムペリドール、フルジアゼパム、ニメタゼパム、フルラゼパム、フルニトラゼパム、プロメタジン及びプロクロルペラジンを追加しI—IV族、計110種とした(Table II)。いずれも試薬、試薬原体及び市販製品より抽出、精製したものを酢酸エチル、アセトン又はメタノールに溶解し、約2mg/mlとして用いた。*n*-アルカンはC₁₁—C₃₆(東京化成、及びSigma Co.)各々約2mgを混合し、ベンゼン1mlに溶解した。

GCは柳本製作所製G-180型(充填カラム用、水素炎イオン化検出器(FID)、インテグレータ・システム1000付)及び島津製作所製GC-9A(FC用、FID、クロマトパックC-R3A付)を使用した。カラム及び測定条件をTable Iに示す。

分析方法 各カラムについて*n*-アルカン混合溶液を用いRI最多領域と思われる²⁾C₁₈—C₂₈間の保持指標の直線性がよい分析条件を選定し、3回測定した保持時間の平均値から作図法により、各薬物溶液も同様に操作し、RIを算出した。

結果及び考察

充填カラムによる検討

まず第I族ではカラム3及び5を使用した場合、有機リン剤であるピリダフェンチオン、ジメトエート、テトラクロルビンホス及び医薬品であるメダゼパム、ベンゾ

カイン、エチナメート、クロチアゼパム、ジアゼパムに著しいテーリングが見られた。これはカラム4では解消したが、同族のカーバメート系及びジクロロジフェニール系はいずれのカラムでも誘導体化(トリフルオロアセチル化)を必要とした。またII族のバルビタール系はすべて良好なピークを示さず、III族、IV族の塩基性医薬品では保持時間が長く、かつ、強いテーリングを示すものがみられた。

充填カラムによるRIは既に多くの化合物について測定され、その有用性が指摘されているが、多くの化学種を含む薬物を一定条件で一斉分析する目的には、なお種々の測定条件を検討する必要がある、実用的には不利と考えられたので、以後の検討を中止した。

FCによるRIの測定

無極性ワイドボアークラムとしてCBP-1(SE-30又はOV-1相当、0.53mm i.d.×12m)、微極性セミワイドボアークラムとしてCBP-10(OV-17相当、0.33mm i.d.×25m)を選択し、分析方法に従い各薬物のRIを測定した。

まずCBP-10では多くの薬物において良好なピークを示したが、100分を実用的な保持時間限界と仮定した場合、検出されないものが12種あり、更に一部分解のみられるもの(カーバメート系)、又はそれを予測させる多峰ピーク(プロバリン、ジブロム、トリクロルホン)及びブロードなピーク等計15種がみられた(Table II)。この現象は注入口温度を下げてでも発生することから、分子間相互作用の強さとカラム長(25m)からくる保持時間の長さ起因するものと予測される。

一方、CBP-1ではベンゾキシメート(未検出)、クロキサゾラム(ブロードなピーク)及びオキサゼパム(同)

TABLE I. Operating Conditions for Gas Chromatography

Item	Columns				
	1 CBP-1 ^{a)}	2 CBP-10 ^{a)}	3 1.5%-OV-1	4 3%-OV-17	5 3%-SE-30
Solid support	...	...	Chromosorb W (AW-DMCS), 60 —80 mesh	the same	the same
i.d.×length (mm, m)	0.53×12	0.33×25	3×2	3×2	3×2
Column temp.(°C)	120—250(6°C/min)	140—250(8°C/min)	80—220(2°C/min)	130—240(2°C/min)	210
Injec. temp.(°C)	270	270	230	230	230
Carri. gas (N ₂) (kg/cm ²)	0.2	1.3	1	1.25	1.8
Split ratio	1/7	1/30	...	...	...
Maked up gas (N ₂)	50 ml/min	50 ml/min	...	...	...

a) Fused-silica capillary column (Shimadzu Co.).

TABLE II. Retention Indices of 110 Compounds on Fused-silica Capillary and Packed Columns

Division & compounds	CBP-1	CBP-10	1.5 % OV-1	3 % OV-17	3 % SE-30
I					
Ethinamate	1328	1610	1419 ^{c)}	1622	1254 ^{c)}
MTMC	1392	1687 ^{a)}	1399 ^{b)}	1651 ^{b)}	1392 ^{b)}
Isoprocarb	1481	1761 ^{a)}	1473 ^{b)}	1717 ^{b)}	1466 ^{b)}
XMC	1500	1791 ^{a)}	1493 ^{b)}	1652 ^{b)}	1478 ^{b)}
Benzocaine	1516	1852	1563 ^{c)}	1802	1578 ^{c)}
MPMC	1536	1740 ^{a)}	1526 ^{b)}	1722 ^{b)}	1519 ^{b)}
Propoxur	1550	1860 ^{a)}	1558 ^{b)}	1734 ^{b)}	1546 ^{b)}
BPMC	1570	1832 ^{a)}	...	...	...
Salithion	1600	1932	1609	1707	1645
Dimethoate	1646	2090	1809 ^{c)}	2054	1774 ^{c)}
Thiometon	1655	1918	1655	1954	1689
Cyanophos	1700	2067	1733	2062	1700
Diazinon	1756	1957	1774	2018	1776
Carbaryl	1812	2232 ^{a)}	1770 ^{b)}	2022 ^{b)}	1717 ^{b)}
Dichlofenthion	1820	2059	1822	2085	1852
Chlorfenethol	1853	2085	1850 ^{b)}	2122 ^{b)}	1898 ^{b)}
Fenitrothion	1870	2227	1885	2229	1904
Pirimiphosmethyl	1897	2143	1909	2203	1914
Malathion	1902	2082	1946	2253	1926
Palathion	1917	2264	1928	2254	1952
Fenthion	1918	2216	1919	2279	1941
Chlorpyrifos	1920	2180	1926	2230	1956
Phenthoate	1996	2313	1984	2384	2038
Mecarbam	2010	2340	2044	2373	2052
Methidathion	2010	2207	2027	2441	2064
Tetrachlorvinphos	2032	2398	2114 ^{c)}	2420	2095 ^{c)}
Vamidothion	2036	2544	...	...	...
Methaqualone	2094	2492	2158	2527	2144
Prothiofos	2095	2370	2093	2400	2129
Isoxathion	2133	2516	2155	2538	2168
Proclonol	2182	2554	2187 ^{b)}	2515 ^{b)}	2195 ^{b)}
Chlorpropylate	2183	2500	...	...	...
Medazepam	2185	2522	2200 ^{c)}	2587	2280 ^{c)}
Chlorbenzilate	2204	2514	2011 ^{b)}	2506 ^{b)}	2020 ^{b)}
Cyanofenphos	2236	2690	2252	2671	2268
EPBP	2237	2562	2234	2609	2258
EPN	2313	2788	2365	2807	2388
Pyridaphenthion	2352	2803	2360 ^{c)}	2840	2386 ^{c)}
Diazepam	2377	2830	2486 ^{c)}	2857	2438 ^{c)}
Phosalone	2426	2890	2440	2897	2461
Clothiazepam	2448	2875	2497 ^{c)}	2918	2519 ^{c)}
Leptophos	2486	2897	...	...	...
Oxazolam	2507	3006	N.D.	N.D.	N.D.
Dialifor	2553	2967	...	...	...
Benzoximate	N.D.	N.D.	...	...	...
II					
Barbital	1457	1832	...	...	...
Methomyl	1500	1898 ^{a)}	...	...	...
Allylisobutylbarbital	1634	2008	...	...	...
Amobarbital	1682	2050	...	...	...
Pentobarbital	1711	2073	...	...	...

TABLE II. (continued)

Division & compounds	CBP-1	CBP-10	1.5 % OV-1	3 % OV-17	3 % SE-30
Hexobarbital	1817	2177	...	...	...
Allobarbitol	1868	2050	...	...	...
Phenobarbital	1910	2391	...	...	...
Cyclobarbitol	1936	2350	...	...	...
Cloxacolam	2569 ^{d)}	2647 ^{d)}	...	...	...
Nitrazepam	2688	N.D.	...	...	...
II'					
Dichlorvos	1200	1418	...	...	...
Trichlorfon	1402	N.D. ^{e)}	...	...	...
Bromvalerylurea	1438	N.D. ^{e)}	...	...	...
Dibrom	1590	N.D. ^{e)}	...	...	...
III					
Nicotine	1301	1467	...	...	...
Caffeine	1769	2152	...	...	...
Antipyrine	1796	2267	...	...	...
Glutethimide	1797	2045	...	...	...
Ketamine	1805	2112	...	...	...
Lidocaine	1838	2164	...	...	...
Diphenhydramine	1846	2037	...	...	...
Aminopyrine	1877	2224	...	...	...
Pilocarpine	1946	2588	...	...	...
Chlorpheniramine	1970	2198	...	...	...
Procaine	1984	2340	...	...	...
Benactyzine	2249	2523	...	...	...
Promethazine	2260	2540	...	...	...
Bupibacaine	2278	2593	...	...	...
Oxazepam	2291 ^{d)}	2677 ^{d)}	...	...	...
Codeine	2324	2718	...	...	...
Fludiazepam	2363	2770	...	...	...
Perlapine	2421	2746	...	...	...
Chlorpromazine	2443	2774	...	...	...
Chlorprothixene	2452	2750	...	...	...
Levomepromazine	2512	2806	...	...	...
Flunitrazepam	2594	3110	...	...	...
Haloxazolam	2646	2663 ^{d)}	...	...	...
Nimetazepam	2662	3192	...	...	...
Dibucaine	2677	3048	...	...	...
Flurazepam	2758	3130	...	...	...
Chlordiazepoxide	2764	2900 ^{d)}	...	...	...
Opipramol	2774	N.D.	...	...	...
Perazine	2780	3093	...	...	...
Hydroxyzine	2820	N.D.	...	...	...
Estazolam	2828	3450	...	...	...
Haloperidol	2897	3364	...	...	...
Prochlorperazine	2937	3262	...	...	...
Bromperidol	3023	N.D.	...	...	...
Strychnine	3074	3469	...	...	...
Thioridazine	3094	3414	...	...	...
Propericiazine	3227	N.D.	...	...	...
Perphenazine	3243	3500	...	...	...
Spiperone	3316	N.D.	...	...	...
Brucine	3437	N.D.	...	...	...

TABLE II. (continued)

Division & compounds	CBP-1	CBP-10	1.5% OV-1	3% OV-17	3% SE-30
Thiothixene	3523	N.D.	...	...	...
Thiopropazine	3528	N.D.	...	...	...
Carpipramine	3722	N.D.	...	...	...
IV					
Methamphetamine	1150	1270	...	...	...
Ephedrine	1330	1552	...	...	...
Methylephedrine	1363	1572	...	...	...
Theophylline	1900	2517	...	...	...
Atropine	2145	2517	...	...	...
Morphine	2366	2443	...	...	...
Sulpiride	3074	N.D.	...	...	...

a) : partly decomposed., b) : TFA-derivatization., c) : tailing., d) : broad., N.D. e) : multiple peaks., N.D. : not detected
Retention times (min) of standard *n*-alkanes (CBP-1, CBP-10, respectively) : C₁₅=4.57, 2.94., C₂₀=12.50, 7.79., C₂₅=19.80, 12.63., C₃₀=28.50, 25.10., C₃₅=56.18, 69.80.

Fig. 1. Gas Chromatograms of II, II' and IV Divisions on CBP-1

Division II : 1: barbital, 2: methomyl, 3: allylisobutylbarbital, 4: amobarbital, 5: pentobarbital, 6: hexobarbital, 7: allobarbital, 8: phenobarbital, 9: cyclobarbital, 10: cloxazolam, 11: nitrazepam.

Division II' : 1: dichlorvos, 2: trichlorfon, 3: bromvalerylurea, 4: dibrom.

Division IV : 1: methamphetamine, 2: ephedrine, 3: methylephedrine, 4: theophylline, 5: atropine, 6: morphine, 7: sulpiride.

を除くすべての薬物が良好なピークとして検出され、特に II, II' 及び IV 族では完全に識別可能であった (Fig.

Fig. 2. Histogram of Retention Index of 110 Compounds

— : CBP-1, --- : CBP-10.

1). 全 RI は 1150—3722 の間に広く分布し (Fig. 2), 最も保持時間の長いカルピプラミンで約 98 分であった。

土橋ら⁶⁾ はより極性の高い CBP-20 は多くの薬物が検出されず不向きであると指摘しており、以上の結果を併せ考慮すると幅広い化学種を含む薬物の一斉分析には無極性キャピラリーがより適当であると考えられた。

そこで CBP-1 による測定値を充填カラム (OV-1) で測定した有機リン剤の値と比較したところ、最も大きな差を示す EPN (差 58) を除き、6—42 の間 (平均 22.4, $n=22$) で、充填カラムの search window 50²⁾ の範囲内にあった。また既存データのうち、有機リン剤については角田,⁵⁾ 医薬品等については Robert E. Ardrey²⁾ の値と比較したところ、前者ではジメトエートの差 64 を除き、差 2—48 の間 (平均 22.5, $n=21$) にあったが、後者ではチオプロペラジン (未検出), チオチキセン (差 463), スルピリド (差 242) 等極端な差を示すものが見られ、データのある 40 種類のうち、差が 50 以内のものは 32 種類 (平均 31.9) で、やや開きが大きいと考えられ

た。充填カラムの既存データがワイドボアークラムでは利用できるとする報告⁷⁾があるものの、前述のようにテーリングの大きい医薬品等では大差を生じる可能性があり、キャピラリーカラムのデータの有用性はより高いものと判断される。

Search Window の検討

RI は分析条件による差が極めて少なく⁹⁾ 表面的には各液相に対する固有の値と考えることができ、対照薬物との比較操作を省いてもかなりの確度で予測できる有利さをもっている。しかし充填カラムの RI の search window は50とされ、²⁾ 毒物検索にはかなりの支障があると思われる。そこで今回用いた CBP-1 の分離能について検討を加えた。すなわち、RI の接近する2つの成分を混合し、分析したところ RI 差18以上の例では明確に分離 (Fig. 3) することが判明した。また、*n*-アルカン C₂₈ について測定した理論段数は充填カラム (OV-1) で約 5600, CBP-1 で約 30000 となった。このことは同じ保持時間ならピーク幅が 1/2 以下になることを意味し、search window もほぼ 1/2 にできることを期待させた。一方カフェイン (RI, 1769), ジフェンヒドラミン (同, 1846), アトロピン (同, 2145), ベナクチジン (同, 2249), クロルプロマジン (同, 2443), ジブカイン (同, 2677), エスタゾラム (同, 2828), 及びスルピリド (同,

3074) の8種類の薬物で測定した RI の変動幅は、最大値12.2 (クロルプロマジン) 最小値3.3 (スルピリド), 平均 7.3 で近接する2成分が両方向にずれたとしても、RI 値に20以上の差があれば2成分を識別できるものと考えられた。以上の結果を総合すれば、CBP-1 を用いた場合の 'search window' は20とみなすことが可能と思われる。この値から識別能力 discriminating power (DP) を計算した結果 0.953 と高い値を示したが、更に既報¹⁾ の TLC による相対保持値 (RRf) と RI データの組合わせによる DP を求めたところ、全薬物では0.998で、族別にみれば II, II', IV 族は1.00で完全に分離され、I 族は0.995, III族は0.996となり、既報¹⁾ と本データの組合わせが薬物スクリーニングに有効と判断された。

分子量から RI の予測

RI は *n*-アルカンの炭素数を基準数値とすることから、RI を分子量に対しプロットすれば直線となる。薬物を同様に操作すれば類似した構成元素と化学種を持つものはグループとして捉えることが期待される。今、x 軸に RI を、y 軸に分子量をとり、CBP-1 による測定値をプロットしたところ、*n*-アルカンの直線を挟みダ円状に分散し、薬物をグループとして捉えることは困難であった。

分子量が異なり、RI が同じ薬物についてみた場合、RI と分子量の差を分子量に対してプロットすれば、分子量の違いから x 軸マイナス方向へのずれの差が生じ異なった分散像を与えることとなる。この操作を行った結果、ハロゲンやリン、イオウ等重い元素を含む有機リン剤は *n*-アルカンより上部、カラムとの分子間相互作用が大きいと思われる医薬品は下部に位置し、グループ分け

Fig. 3. Separation of Closed Pairs on CBP-1

Mixture of A: XMC and benzocaine (disparity of retention index=16), B: amobarbital and cyanophos (the same, 18), C: isoprocab and XMC (the same, 19).

Fig. 4. Relation between Molecular Weight (MW) and Value of (Retention Index-MW)

A: organophosphorous pesticides, B: carbamates, C: barbiturates, D: benzodiazepines, E: phenothiazines, F: *n*-alkanes.

が明確となった (Fig. 4).

化学種からみればカーバメート系, バルビタール系, ベンゾジアゼピン系, フェノチアジン系をグループとして捉えることも可能であった. この結果から, 化学種と分子量が分かておれば薬物を分析するにあたり, また新たな薬物のデータをとるにあたり, 条件設定の参考になるものと思われた.

一方分析時間からみれば分子量506の *n*-アルカン C₃₆ が69分であり, x軸プラス方向にずれている保持時間の長いカルビプラミン (分子量447) で98分であることから見れば分子量500以下のものは本分析条件でほぼ100分以内に分析できるものと推測された.

結 語

農薬, 催眠剤, 精神安定剤, 局所麻酔剤及び麻薬等を含む110種の薬物の系統的分析法の一貫として GC による RI を測定した. 分離条件を検討した結果, 無極性ヒューズドシリカキャピラリー (ワイドボアー) の CBP-1 を用いることによりベンゾキシメート, クロキサゾラム及びオキサゼパムを除き, 誘導体化等前処理の必要なく RI 1150—3722で100分以内に分析可能であった. この場合の search window は20と推算でき, この結果を, 既報¹⁾ TLC の RRf 値と組み合わせれば, 薬物検索に極めて有効なものと判断された.

なお, この研究は日本薬学会第107年会, 京都 (1987) において一部発表した.

引 用 文 献

- 1) 庄山正敏, 佐野敏幸, 衛生化学, **31**, 348 (1985).
- 2) Robert E. Ardrey, Anthony C. Moffat, *J. Chromatogr.*, **220**, 195 (1981).
- 3) B.J. Perrigo, H.W. Peel, *J. Chromatogr. Sci.*, **19**, 219 (1981).
- 4) E. Marozzi, V. Ganbaro, E. Saligari, R. Mariani, F. Lodi, *J. Anal. Toxicol.*, **6**, 185 (1982).
- 5) 角田紀子, 衛生化学, **32**, 91 (1986).
- 6) 土橋 均, 小野広孝, 辰野道昭, 科学警察研究所昭和61年度鑑識科学研究発表会 (化学部会) 講演要旨集, p.21.
- 7) M. Bogusz, J. Bialka, J. Giels, *J. Anal. Toxicol.*, **10**, 135 (1986).
- 8) 正田芳郎, 小島次郎, “高分解能ガスクロマトグラフィー,” 化学同人, 京都, 1983, pp.131—171.