

SCIENTIFIC INSTRUMENT
NEWS

DECEMBER 1971

Vol.14 No.6

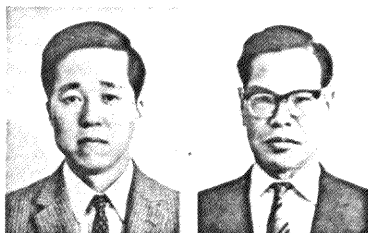


ガスクロマトグラフィによる興奮性薬物の検出

金島弘恭* 森三佐雄*

1. はじめに

尿中の薬物の検出にガスクロマトグラフィ (GLC) を用いる方法は数多く報告されており、微量でかつ特異な分析が可能とされている。今回法律で一般の使用が禁止されているアンフェタミン、メチルアンフェタミンなどの中枢神経興奮薬をとりあげ、その不正使用防止のため、これら薬物の迅速な分析法を確立する目的で、GLCによる検出法を検討した。同時にその類似化合物であるエフェドリン、メチルエフェドリン (鎮咳剤などとして一般に広く使用されている) についても同様に検討したので報告する。



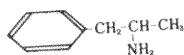
金島 弘恭

森 三佐雄

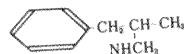
2. 実験方法

使用した薬物:

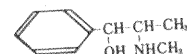
Amphetamine (Am)



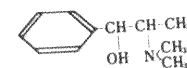
Methylamphetamine (M-Am)



Ephedrine (E)



Methylephedrine (M-E)



これら薬物の市販品は塩酸または硫酸塩なので、GLCに用いる場合はアルカリ性水溶液からエーテル抽出したものを使用した。

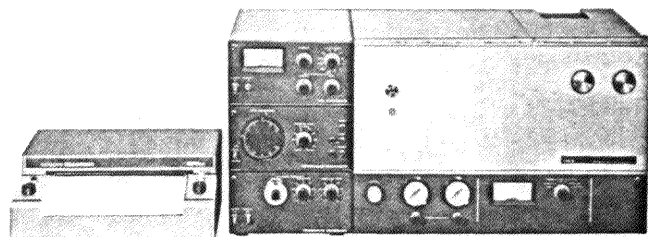
薬物の投与と採尿

4人の被検者(男)にAm 10mg, M-Am 6mg, E 30mg, M-E 50mgをそれぞれ経口投与し、投与6時間後の尿を集めた。これらの尿のpHは5.8~6.6を示し、尿量は270~550mlであった。

尿中より塩基性アミンの抽出

検体尿10mlを共栓遠心管にとり、1N-HCl 0.5mlを加えて酸性(pH<1)とし、これにエーテルを加えてよく振盪する。遠心分離後、エーテル層は捨て、水層に5N-NaOH 0.5mlを加えてアルカリ性(pH>12)とし、再びエーテルを加えて振盪し、遠心分離を行う。エーテル層を他の共栓試験管に移し、Na₂SO₄で脱水する。脱水後、エーテルを40°の水浴中で少量になるまで濃縮した後、2mlの先細試験管に移

*北海道立衛生研究所 薬学部



063形 日立ガスクロマトグラフ

し、さらに約10~15μlにまで濃縮する。

同 定

(1) 標準物添加法

検体尿を2部に分ける。はじめにその一部を用いて試験を行い、そのピークが対象薬物と同じ保持時間(R_t)を示したときは、残りの一部に対象薬物を添加(ガスクロ注入時に2μg/μlの濃度になるように添加する)して同様の試験を行い、初めの検体尿と同一のR_tを示すピークの高さの増加によって同定を行った。試験の結果は、4種の薬物で定量性を検討したところ、0.1~10μgの範囲で直線的な定量性を示した。

(2) TFA誘導体

大久保の方法⁴⁾でTFA誘導体を合成し、これを醋酸エーテルに溶解しGLCに用いた。

GLC

用いた機器と測定条件は次のとおりである。

機種: 063 形 日立ガスクロマトグラフ(FID) 3台
カラム: 表1に示す3種類のカラムを用いた。

試料注入量: 1 μl

キャリアガス: N₂ 30ml/min.

チャートスピード: 10mm/min.

目 次

■ ガスクロマトグラフィによる興奮性薬物の検出	金島 弘恭, 森 三佐雄	1
■ アミンのガスクロマトグラフィ(補遺)...	富田 功一	4
■ "2波長・2光束法"による濁った生体試料の微小吸収の測定		
— 356形 日立2波長/自記分光光度計の新しい応用例 —	村岡 三郎, 高橋 建次, 岡田 雅文	6
■ 2波長分光測光法によるソルビン酸カリとパラベン		
の同時定量	北村 正孝, 小森 律夫	10
■ 072形 日立偏光干渉フーリエ変換分光システムと		
その化学計測への応用(その2)	間宮 真佐人	14

表1 各種カラムと測定温度

カラム名	カラム管	液相	担体	カラム温度(°C)	試料注入温度(°C)	アッテネーション
A	3m×3mm (ステンレス製)	5% Carbowax 6000 5% KOH	Chromosorb G A/W DMCS treated 80-100mesh	155	190-200	10×2
B	1m×3mm (ステンレス製)	2% Carbowax 20M 2% KOH		140	180	10×8
C	2m×3mm (ガラス製)	2.5% SE-30	Chromosorb G A/W DMCS treated 80-100mesh	130	180	10×8

表2 各種カラムにおける薬物のR_t

薬物	カラム名	A	B	C
Am		8.0	—	2.9
M-Am		10.9	—	3.4
E		—	5.9	6.9
M-E		—	4.8	7.5

3. 実験結果

(1) 各種カラムにおける市販薬物のR_tとTFA誘導体

薬物1μgを注入して各種カラムにおけるR_tを求め、その結果を表2に示した。どの薬物も良好なピークを示したが、CカラムにおけるM-Eのピークは図1に見られるとおり長いテーリングを示した。

次にM-EのTFA誘導体のCカラムにおけるクロマトグラムを図2に示した。先述したとおり、遊離塩基としてのM-EはCカラムであまり良好なピークを示さなかったが、M-EのTFA誘導体は図に見られるような良好なピークを示した。

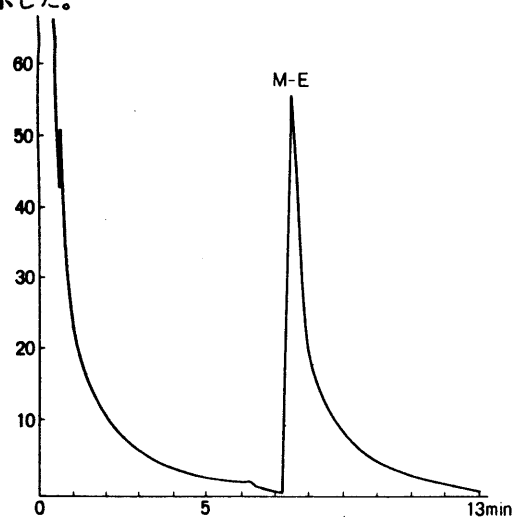


図1 M-Eのクロマトグラム(C Column)

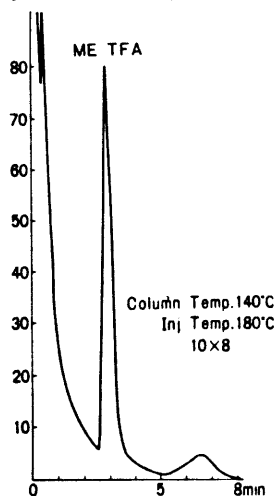
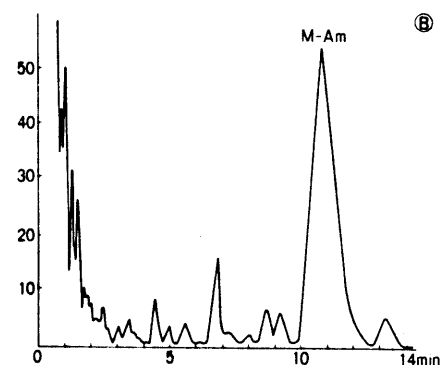
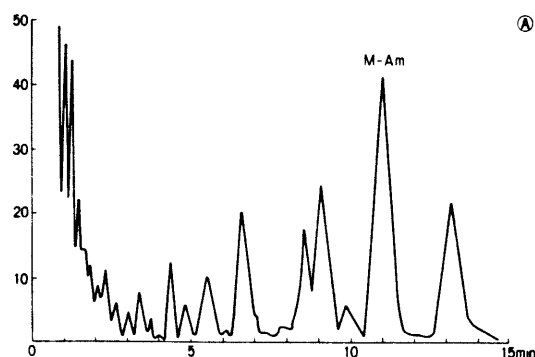
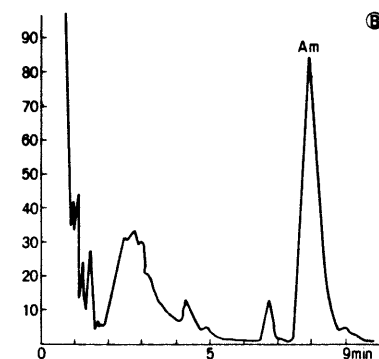
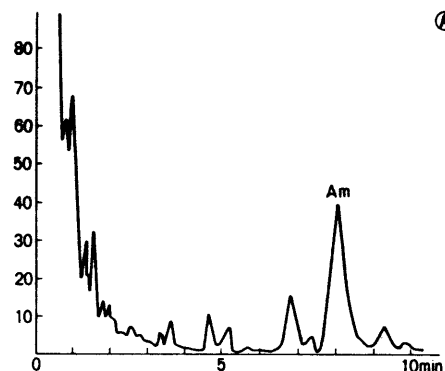


図2 M-E TFA誘導体のクロマトグラム(C Column)

(2) 尿抽出物のクロマトグラムと同定

尿抽出物の各種カラムにおけるクロマトグラムとこれら薬物を同定するために添加試験を行った結果を図3に示した。同図(左)はいずれも尿中から得た各薬物のクロマトグラムであり、同図(右)は尿に対象薬物を添加して得られた各薬物のクロマトグラムである。いずれのカラムにおいても、同定しようとする薬物の添加により対象と同一のR_tにおけるピーク高の増加が認められ、それぞれの薬物の同定ができた。



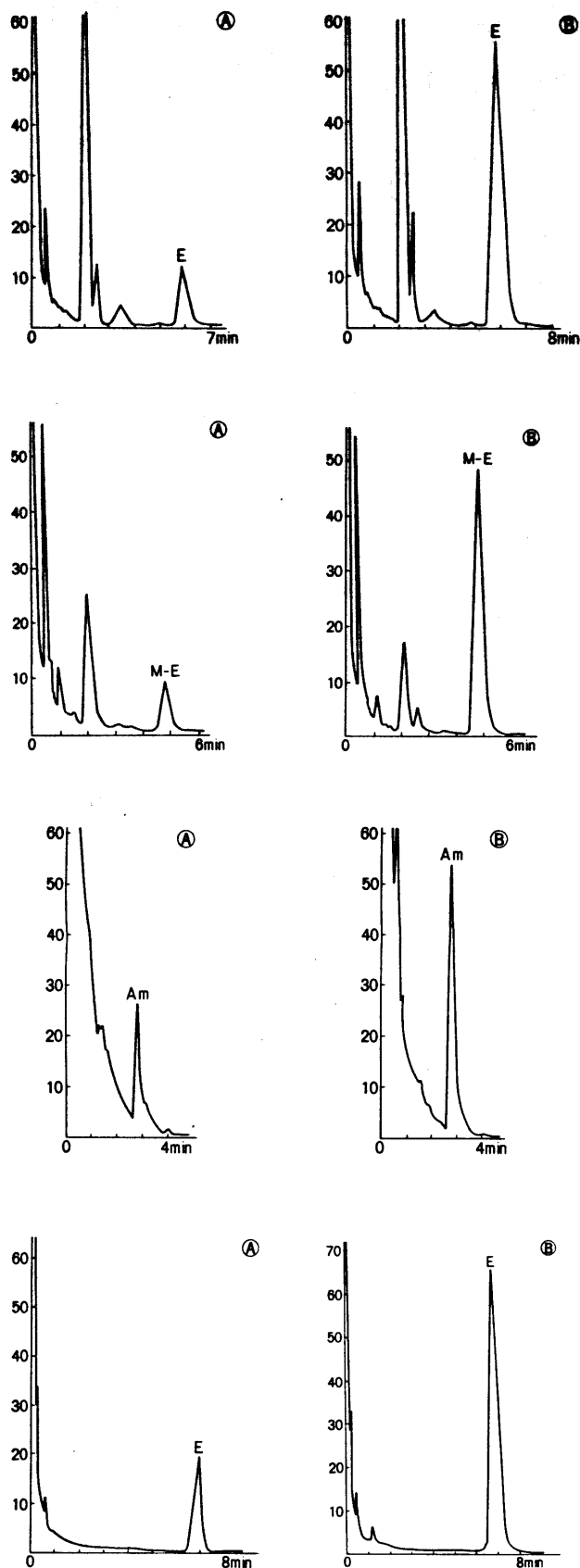


図3 尿中から得た各薬物のクロマトグラム(A)と尿に対象薬物を添加して得られた各薬物のクロマトグラム(B)

4. 考 察

今回は4種の薬物についてGLCによる分析を試みたが、いずれも迅速な検出が可能であった。M-EはCカラムよりBカラムにおいて良好なピークを示したが、将来さらに多くの薬物の検出にあたっては、少なくとも2種類の極性の異ったカラムの使用が望ましいと考えられる。また、ガスクロマトグラフの台数に余裕があれば、GLCをむしろスクリーニングの手段として用い、同定にはこれと薄層クロマトグラフィやマススペクトロメータを併用したほうがより効果的であると考えられる。なお、薬物の同定の方法として、今回は標準物添加法を用いたが、現在尿抽出物からTFA誘導体を合成しそれらをクロマト的に同定する方法ならびに内部標準法(内部標準物質としてジメチルアニリンなど)についても検討中である。

参考文献

- 1) Brooks, C.J.W. Horning, E.C.: *Anal. Chem.*, 36, No. 8, 1540(1964)
- 2) Beckett, A.H. Rowland, M.: *J. Pharm., Pharmacol.*, 17, 59(1965)
- 3) Beckett, A.H. *et al*: *ibid* 19, 273(1967)
- 4) 大久保義夫: 日本体育協会スポーツ科学研究報告, No. X, 1(1969)

アミンのガスクロマトグラフィ(補遺)

富田功一*

1. 緒言

著者はすでに2回にわたり本誌にアミンのガスクロマトグラフィについて発表したが、その後検討を加え、特に動物死体についてのアミンを定性のみでなく定量的に扱う場合に若干の問題点が生ずることを知り、より正確な定量と得られた数値の評価について若干の知見を得た。また、この技術は単に法医学や他の関連医学への応用にとどまらず、食品衛生学特に動物性食品変質の過程追及に應用できるものと思うので、ここに補遺として発表することにした。

2. 装置

前報告の場合にはKGL-2B形日立ガスクロマトグラフ装置を使用した。今回報告では新形のK53形を使用し、検出器は水素炎イオン化検出器を用いた。記録計はQPD33形(1mVフルスケール)である。

3. カラム充てん剤および注入試料

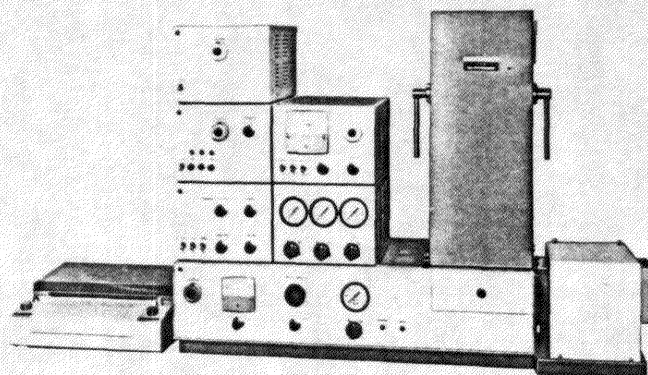
カラム充てん剤は前回と同じTEA (HMDS処理Chromosorb Wに25%の割合に塗布)およびシリコンSE30 (同じくHMDS処理した80~100メッシュの担体に5%の割合に塗布)を用いた。カラムの長さは前者が4m、後者が2mで、ステンレススチール内径3mmのカラムである。注入試料は、前報¹⁾のように、TEAカラムの場合は、18°Cにおける通気により-70°Cに冷却したU字管内に集めて、注入直前に液化したものを用いた。また、シリコンSE30カラムの場合も、前回と同じく、スピッツ管底においた0.5ccのベンツアルデヒドに発生した気体状のアミンを通気反応させたものを注入試料として用いた。同時に、アミン含有液を2ccのベンツアルデヒドで抽出して得られたSchiff塩基のベンツアルデヒドおよびエーテル混合溶液をも注入試料として用いた。今回は遊離形のアミンのみでなく塩などを形成している結合形のアミンについても、次に述べるように遊離アミンとして取出し注入試料とした点が前回と大きく異なる点である。

4. 脂肪族アミン分析についての検討

著者が水中死体の研究をしている過程で、対照として用いた空中腐敗の死体や水中から空中へ移して長時間経過した死体には通気法で採取しうる遊離のアミン類がきわめて少なくなる(ただし、トリメチルアミンは例外)のに、悪臭それ自体はそれほど低下をしておらず、たまたま低級脂肪酸分析のためKOHアルカリ性にしたものから猛烈なアミン臭を発した。この事実から、これらの場合は、生じたアミン類が脂肪酸、一部分は炭酸やリン酸のような酸と結合して塩、場合によってはさらにアミド結合をした化合物にまでなっているのではないかと考えられた。

そこで基礎的な実験として、試薬のn酸にトリメチルアミン、ジメチルアミンおよび各種低級第一モノアミンを反応させて生成した塩(この場合は常温で液体)や、実験動物体の脂肪中の高級脂肪酸組成に似せて配合した試薬高級脂肪酸混合物に同上のアミン類混合物を少量混じり反応させて生成した塩(この場合は常温で石鹼状に固化)について先ず実験してみた。それらの塩について水分と未反応のアミンをほとんど蒸発させた後、それぞれ10%溶液を作製し、その10ccを通気管に入れて、前報¹⁾の

*広島大学 医学部 法医学教室, 医博



K53形日立ガスクロマトグラフ

ように通気して遊離アミンをそのまま冷却採取したり、またはベンツアルデヒドと反応させてSchiffの塩基としてから、GLC分析を試みた。アミンのまま分析した場合はTEAカラム、Schiff塩基にした場合はシリコンSE30カラムを使用した。

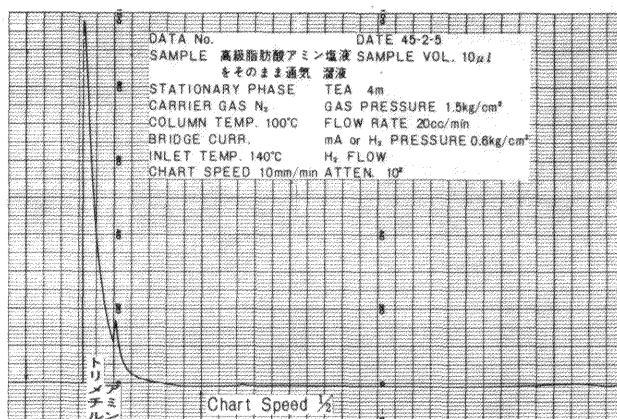


図1

この場合、図1のように水溶液とした場合は、TEAカラムでトリメチルアミンが少量検出されるにすぎず、Schiff塩基としてのアミンの感度のよい検出法によっても、低級第一モノアミン類は全く検出されなかった。

低級脂肪酸アミン塩液をそのまま通気した場合を図2にした。この場合は、10%溶液10ccにKOHを加えてpHを9.0より大にすると、今まで全く検出されなかった低級第一モノアミンが図3、4のように検出されるようになった。もちろん、トリメチルアミン、ジメチルアミンについてもTEAカラムで検出され、前者はKOHを加えてアルカリ性にしない前の10倍もの量を捕捉することができた。

そこで、マウス水中死体について、その圧搾汁液をそのまま、またはKOHアルカリ性にして通気し、各種揮発性アミンのSchiff塩基がどのように検出されるかを測定したが、ある条件下の水中死体では、図5のように遊離のまま存在するアミンは検出されず、圧搾汁液をKOHアルカリ性にしてはじめて図6のように放出される結合形のアミンがかなり多く認められた。著者はこの揮発性アミンの定性のみでなく、前報¹⁾の図8にその一部を掲げているが、面積法により、定量も同時に行っており、それらの結果は別の報告²⁾に載せてある。

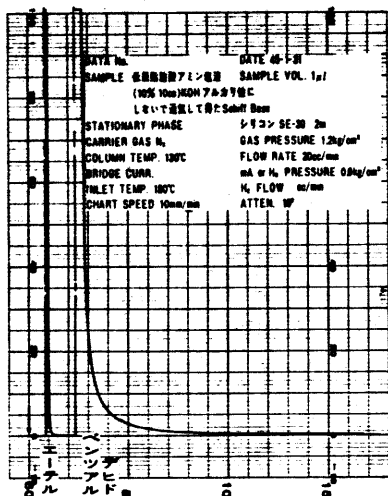


図 2

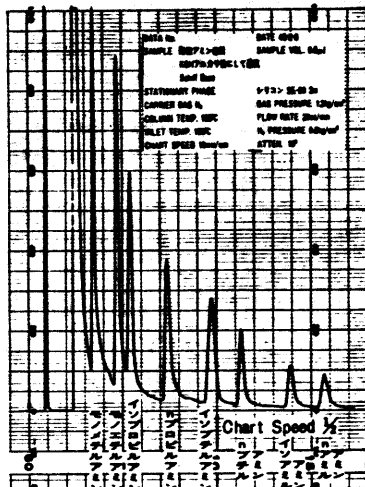


図 3

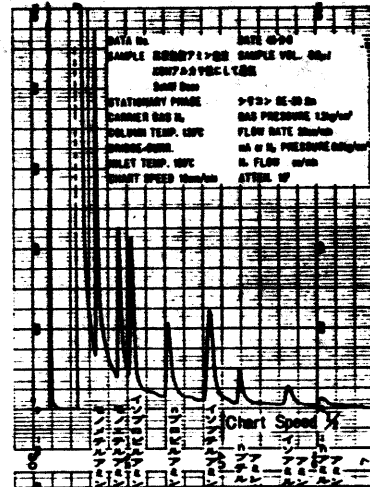


図 4

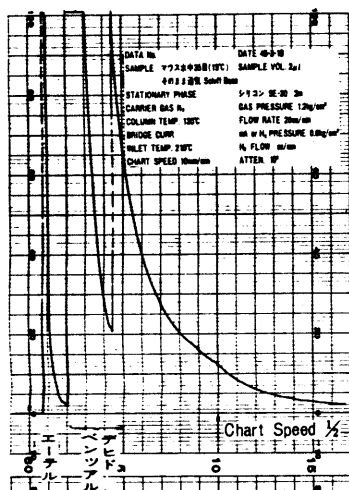


図 5

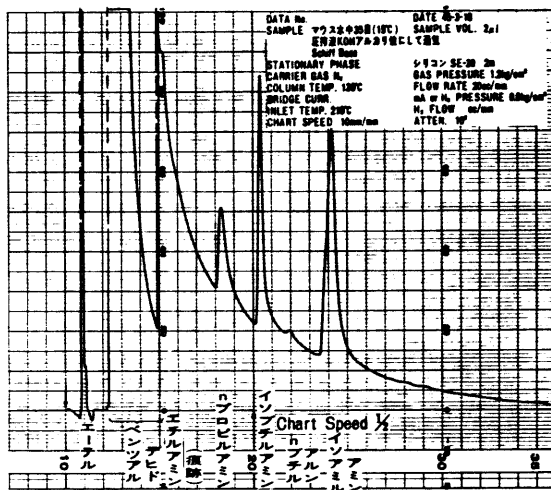


図 6

この現象はジアミンのSchiff塩基についてもいえることで、死体についての実際例は図7および図8に示してある。しかし、このような揮発性の弱いアミン類は通気によって検出することは不可能で、等量のベンツアルデヒドを用いての抽出および反応を同時に行う抽出法によった。もし、抽出法による場合には、KOHアルカリ性になくとも、一部の結合形のアミンが反応してSchiffの塩基

を形成することがその後の実験により知れたので、注意する必要がある。すなわち、揮発性モノアミン類のKOHアルカリ性としなない場合の通気法による場合と抽出法による場合の捕捉値には大きな差異があり、場合によっては、KOHアルカリ性としなくとも抽出に際してこれらの結合形のアミン類が少量近くSchiffの塩基になってしまう場合のあることがわかった。

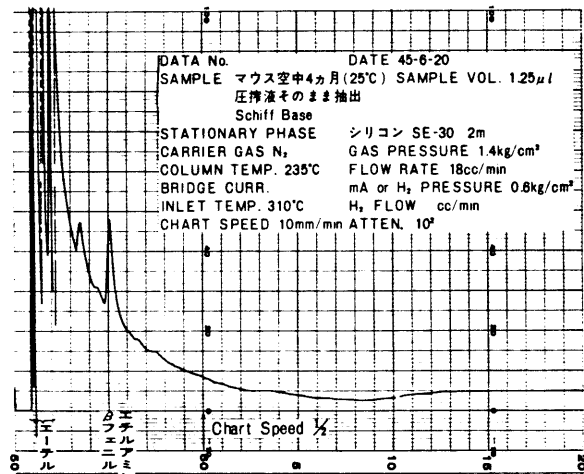


図 7

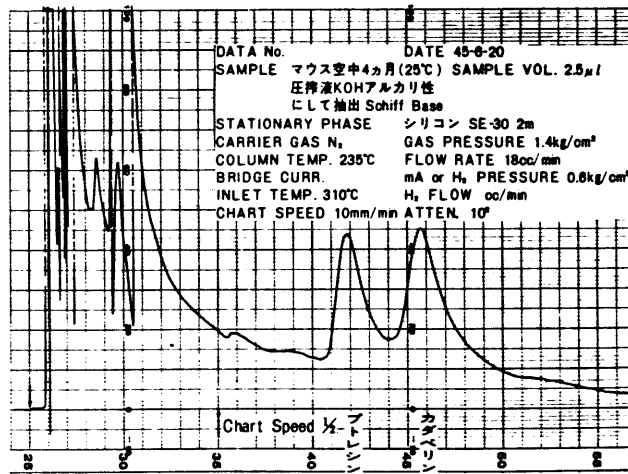


図 8

5. 水酸基を有するアミンの分析

エタノールアミンやイソプロパノールアミンのようなアミノアルコール、またチラミンのようなPhenolic amineは、それらの有するOH基のために、たとえSchiff塩基を作製してもRetention timeは著しく長くなり、定量に際して不利となる。エタノールアミンのような比較的沸点の低いものはまだしも、チラミンのごときはそのままのSchiff塩基では235°Cで20分ものRetention timeをもち、OH基のないβフェニルエチルアミンのそれに比べて数倍の時間を要し、感度も悪い。そこで、著者がオキシ脂肪酸のGLC分析³⁾に関して用いた方法⁴⁾で行ったところ好成績を得た。このメトキシ化により、チラミンの場合ではRetention timeを半分に縮め、感度も10倍近くあげること成功した。このメトキシ化は酸化銀の代りに金属ナトリウムまたはカリウムとメタノールを用いても⁵⁾可能である。

6. 考察および他分野への応用

従来、アミンの分離、定性、定量はペーパークロマトグラフィやイオン交換樹脂法に頼っていたが、揮発性の強いアミンについては定量に際して不利で、より揮発性の小さい誘導体とせざるを得なかった。宮本ほか⁶⁾の綜説には特殊なペーパークロマトグラフィなどの方法が述べられているが、著者のガスクロマトグラフィによる方法は、第一モノアミンでも特に揮発性の強い低級アミン

(Schiff塩基としシリコンSE30のカラム使用)に、また第三アミン(誘導体とせずTEAのカラム使用)の分析に有利であるといえる。しかし、ヒスタミンやアグマチンのような複雑な構造の揮発性に乏しいアミンの定量には向かないと考えられる。また、例えば、動物性食品の鮮度判定に従来用いられていたトリメチルアミンの定性定量法や総塩基性窒素の定量があるが、これに加えて、低級揮発性アミンのGLCによるこのような定性定量をも行えば、変質の程度が正確につかめるものと考え。特に、動物性乾物の場合は、半ば腐敗しかけたものを強力に乾燥したものは生じたアミンの一部が脂肪酸その他

酸と結合してアミン臭を発しなくなっているため、余程すぐれた嗅覚のもち主でないと判別が困難であるが、著者の方法を用いれば、潜在しているアミンもたちどころに知ることができるから、この方法は食品衛生特に塩乾物の鮮度判定ばかりでなく、悪臭公害の分野への応用も可能と考えている。

7. むすび

以上アミンのガスクロマトグラフィの補遺編として、各種モノおよびジアミンのうち脂肪酸その他の酸と結合している潜在アミンのGLC分析やOHを有するアミンのメトキシ化によるGLC分析について述べた。

参考文献

- 1) 富田功一: Hitachi Scientific Instrument News, 10(6), 526(昭42)
- 2) 小林宏志・富田功一: 日本法医学雑誌, 24(3), (昭45)
- 3) 富田功一: 島津科学機器ニュース(クロマトグラフィ特集号No.6) 11(12), 1, (昭44)
- 4) Kishimoto, Y. Radin, N.S.: J. #Lipid Res. 1, 72, (1959)
- 5) 日本化学会編: 実験化学講座第19巻(有機化合物の合成1), 丸善, 176, (昭32)
- 6) 宮木高明, 林誠, 安藤宗八: 腐敗研究所報告, 9, 135, (昭31)
- 7) 川崎近太郎: 衛生化学I, 食品化学及び衛生試験法, 南山堂, 31, (昭32)

おわび

Hitachi Scientific Instrument News Vol.10, No.6の参考文献(1)の論著については、付図(ガスクロマトグラム)に分析条件がすべて脱落していました(特に図8は0.05%各種アミン水溶液からSchiff塩基とした場合)ので、遅ればせながらおわびをいたします。必要な方は著者宛お問合せください。

“2波長・2光束法”による濁った生体試料の微小吸収の測定

———356形 日立2波長/自記分光光度計の新しい応用例———

村岡三郎* 高橋建次* 岡田雅文*



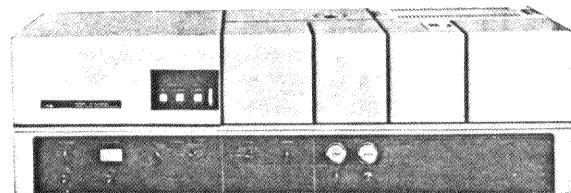
村岡 三郎



高橋 建次



岡田 和文



356形 日立2波長/自記分光光度計

1. まえがき

一般に生細胞の懸濁液、細胞内顆粒、筋肉組織を用いて生体色素を分光学方法で測定するには、何らかの方法で試料の“濁り”による光散乱の影響を打消さなければならない。例えば、細胞分画法で簡単に分離できるミトコンドリアはNADH(ニコチンアミド・ジヌクレオチド)、フラビン・蛋白、ユビキノンおよびチトクロムb, c₁, c, a, a₃などの呼吸色素を含んでいるが、これらの光学的吸収はそれよりはるかに大きい光散乱による吸収の影響

* 徳島大学 薬学部

響下に測定しなければならない。

また、呼吸成分の酸化還元に基づく吸収の変化は非常に小さく、例えばネズミの肝臓ミトコンドリアでよく用いる実験条件を想定して計算してみると、表1に示すように、チトクロムc + c₁では“完全還元”-“完全酸化”で550nmの吸光度の変化ΔA=0.011となる。生理的条件下での吸収の変化はさらに小さく、ミトコンドリアの機能からみて最も重要な高エネルギー状態(State 4)と低エ