

## 興奮性薬物の検出 (第2報)

### 薄層クロマトグラフィーによる検出

#### Detection of Stimulants (Part 2)

#### Detection and Identification of Some Central Nervous Stimulants by Thin-layer Chromatography

本 間 正 一 白 崎 節 子

Shoichi Honma and Setsuko Shirasaki

#### はじめに

興奮性薬物を尿中から検出確認する方法は、第1報<sup>1)</sup>で金鳥らが述べたように多くの方法があるが、われわれは薄層クロマトグラフィー (TLC) による検出方法をアンフェタミン (Am)、メチルアンフェタミン (M Am)、エチルアンフェタミン (EAm)、ベンツフェタミン (BP)、フェンメトラジン (Ph)、フェンジメトラジン (Phd)、プロリントラン (Pl)、フェンカンファミン (FC)、ジエチルプロピオン (DP)、ノルブソイドエフェドリン (NPE)、メチルフェニデート (MP)、エフェドリン (E)、メチルエフェドリン (ME)、メトキシフェナミン (MX)、レプタゾール (LP)、ニケタミド (NK)、カフェイン (Ca)、の17種の薬物について検討したので、その結果について報告する。

#### 実験方法

##### I. 抽出

尿中の興奮性薬物の抽出方法は、ベケットら<sup>2)</sup>の方法を基礎としてつぎのように行なった。

試料尿10mlを30ml共栓遠沈管にとり、1 N塩酸を加えてPH1以下 (ユニバーサル試験紙) とする。これに、エーテル10mlを加えて5分間振り混ぜ、10分間遠心分離してエーテル層を捨てる。さらに、5 mlを用いて同様に操作したのち、水層に5 N水酸化ナトリウム液を加えてPH 12以上とする。これに、エーテル10mlを加えて5分間振り混ぜて、10分間遠心分離し、エーテル層を20ml共栓試験管にとる。さらに、エーテル5 mlを用いて2回同様に操作を繰り返し、エーテル層を合せる。無水硫酸ナトリウムを用いて脱水したのち、エーテルを他の試験管に移して、40℃で約3 mlまで濃縮し、さらに先細試験管に移して窒素ガスを用いて極少量のエーテルを残すまで蒸発し、室温で蒸発乾固する。残渣をクロロホルム0.1 mlに溶解して試料溶液とする。

##### II. 検 出

つぎの条件で、試料溶液についてTLCを行なう。

プレートはワコーゲルB-5 U A (混合蛍光体入) を使用し、常法どおり厚さ0.25mmとして製する。105℃で1時間乾燥して活性化したのち、デシケータ中に保存する。

展開溶媒:

I, 28%アンモニア水:メタノール=1.5:10

II, n-ブタノール:ギ酸:水=20:1:2

III, クロロホルム:ジエチルアミン=9:1

呈色試薬:

1) 紫外線ランプ

2) 酸性ヨード白金液:10%ヨウ化カリウム液45 ml, 5%塩化白金酸液5 mlに水を加えて100 mlとし、これに塩酸2 mlを加える。

3) ドラーゲンドルフ液:塩基性炭酸ビスマス1.78 g, ヨウ化カリウム14.3 g, 6 N塩酸3 mlに水を加えて60 mlとする。必要ならろ過する。

4) 塩化第二銅液:塩化第二銅25 gを水75 mlに溶かす。

検出:試料溶液10 $\mu$ lをプレートに点滴して、10cm展開する。展開後風乾して紫外線によって検出を行なったのち、酸性ヨード白金液またはドラーゲンドルフ液を噴霧して検出する。さらに、その上に塩化第二銅液を噴霧して検出する。

#### 実験結果および考察

1) 抽出操作において、試料尿のPH調整に要する1 N塩酸の量は、ほとんどの尿が0.5 mlでPH 1以下となったが、中には0.5 ml以上を要した尿もあった。また、後の抽出における5 N水酸化ナトリウム液の使用量も、通例0.5 mlの使用でPH 12以上となった。今までにわれわれが取扱った尿のPHは4.4~6.8であった。

エーテルを加えて振り混ぜた後の遠心分離は、毎分2000回転で行なったが、エマルジョンができて遠心分離後もエーテル層が分離されない場合もあった。その時は、極少量のメタノールを静かに滴加してエマルジョンを破壊したのち、エーテル層を採取した。

2) 17種の薬物の遊離塩基から得られたスポットのRf値は、Table 1に示したとおりである。このRf

値は、1~10%の間で再現性が認められた。人尿に各薬物の塩が、1ml当り20 $\mu$ g含有するように調製した試料尿についても行ったが、そのRf値は遊離塩基から得られたRf値とよく一致した。また、Am, MAm, E, NK, MXを服用したときの3時間尿、6時間尿についても同様に試みた。このときの薬物の服用量および尿量は、Table 2に示したとおりであるが、その結果はFig1に示したとおりで、人により尿成分に差異がある

Table 1. Rf in TLC of Stimulants

Solvent System Drugs	I	II	III
Amphetamine	0.49	0.55	0.55
Methylamphetamine	0.40	0.38	0.60
Ethylamphetamine	-*	-*	0.74
Benzphetamine	0.79	0.50	0.73
Phenmetrazine	0.62	0.42	0.57
Phendimetrazine	0.69	0.23	0.70
Prolintane	0.59	0.37	0.72
Fencamfamine	0.65	0.54	0.72
Diethylpropion	0.77	0.22	0.75
Norpseudoephedrine	0.53	0.55	t**
Methylphenidate	0.72	0.40	0.71
Ephedrine	0.42	0.42	0.28
Methylephedrine	0.48	0.32	0.53
Methoxyphenamine	0.35	0.41	0.60
Leptazol	0.72	0.64	0.65
Nikethamide	0.72	0.51	0.67
Caffeine	0.68	0.39	

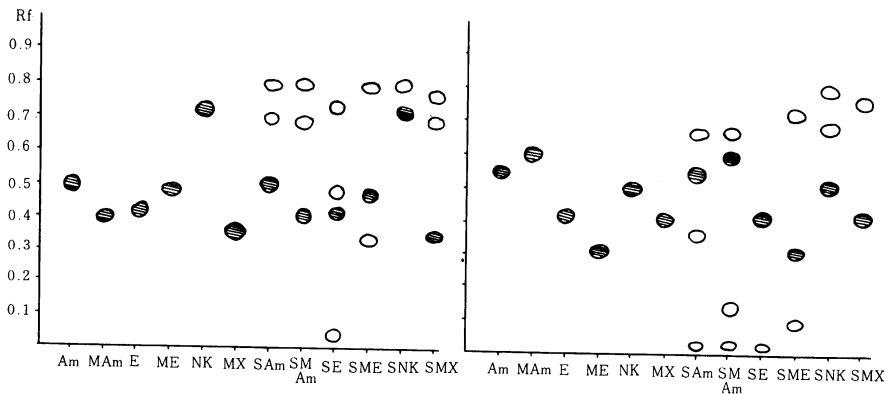
\*- : Did not give color by color reagents.  
\*\*t : Tailing

Table 2. Dose of stimulants and volume of urine

Drugs	Dose (mg)	Urine	
		Time of Sampling (hour)	Volume of Urine (ml)
Amphetamine	8	-	-
Methylamphetamine	6	3	120
		6	125
Ephedrine	30	3	110
		6	370
Methylephedrine	50	3	170
		6	230
Nikethamide	250	3	340
		6	370
Methoxyphenamine	50	-	-

Fig 1. Thin-layer Chromatograms of Stimulants Solvent I,

Solvent II,



Am : Amphetamine  
MAm : Methylamphetamine  
E : Ephedrine  
ME : Methylephedrine  
NK : Nikethamide  
MX : Methoxyphenamine  
⊙ : Showed spots of stimulants

SAm : Amphetamine administered urine  
SMAm : Methylamphetamine administered urine  
SE : Ephedrine administered urine  
SME : Methylephedrine administered urine  
SNK : Nikethamide administered urine  
SMX : Methoxyphenamine administered urine

ことからスポットの数および位置に違いはあるが、投与薬物のスポットはいずれもその薬物の遊離塩基の場合と一致する位置に得られた。

3) 呈色の色調は、Table 3に示したとおりである。紫外線ランプでは、EAmおよびLPは発色しなかった。紫外線ランプおよびドラーゲンドルフ液による呈色の色調は、いずれの薬物も同じ色調を示した。酸性ヨード白金液では、時間の経過にともなって色調の変化するものもあり、かなり特徴が認められた。酸性ヨード白金液またはドラーゲンドルフ液を噴霧したのち、さらに塩化第二銅液を噴霧したときの色調は、すべて黒かっ色であった。

4) Am, MAm, E, MEの4種の薬物について、酸性ヨード白金液を用いて呈色感度を調べたところ、E, MEは1 $\mu$ g, MAm 2 $\mu$ g, Amで10 $\mu$ gであった。しかし、酸性ヨード白金液を噴霧したのち、さらに塩化第二銅液を噴霧すると、酸性ヨード白金液中のヨウ化カリウムと塩化第二銅が反応してヨウ素を遊離するため、スポットの色調が黒かっ色に変わるものと考えられるが、これによって呈色感度を上げることができた。その時の呈色感度は、EおよびMEは0.5 $\mu$ g, MAm 1 $\mu$ g, Amで5 $\mu$ gを示した。

他の薬物の呈色感度も、ほぼ酸性ヨード白金液噴霧で1~10 $\mu$ g, 酸性ヨード白金液および塩化第二銅液

で噴霧0.5~5 $\mu$ gであった。

ドラーゲンドルフ液による呈色は、褪色が割合早く、薬物の含量が少ないとスポットの位置を見落す場合もあったが、さらに塩化第二銅を噴霧すると、酸性ヨード白金液の場合と同様の反応によって安定性のある黒かっ色のスポットが得られ、酸性ヨード白金液および塩化第二銅液の噴霧の場合と同程度の感度で検出することができた。

紫外線ランプについては、前述の呈色試薬に比較してやや呈色感度が落ちるようであった。

5) 展開溶媒については、溶媒Iは展開時間が約50分で、展開後の乾燥も早く、またRf値0.70附近に2, 3のスポットが集るが、使用した3種の溶媒中では最もよい分離能を示した。溶媒IIは展開時間に約2.5時間を要し、展開後の乾燥時間も割合長く、所要時間にや、難があった。また、分離能ではRf値0.40附近に集る薬物がや、多かった。溶媒IIIは展開時間は約1時間であったが、展開後の乾燥がかなり早く、フロントのチェックにやや困難性があり、分離能も悪くRf値0.60~0.75にほとんどの薬物が集中した。

1, 2の薬物の検索の場合はよいとしても、多くの薬物を対象とした場合は、1種の展開溶媒のみで確認することは困難で、少なくとも2種の展開溶媒を用いて確認しなければならないことは当然である。それで、

Table 3. Colors in TLC

Color Reagents Drugs	UV Light	Acidify Iodo- platinate Sol.	Dragendorff Sol.
Amphetamine	Red violet	White	Orange
Methylamphetamine	Red violet	*Violet-White	Orange
Ethylamphetamine	—	Brown	Orange
Benzphetamine	Red violet	Violet	Orange
Phenmetrazine	Red violet	Blue violet	Orange
Phendimetrazine	Red violet	Blue violet	Orange
Prolintane	Red violet	Violet	Orange
Fencamfamine	Red violet	*Violet-White	Orange
Diethylpropion	Red violet	Blue violet	Orange
Norpseudoephedrine	Red violet	*Violet-White	Orange
Methylphenidate	Red violet	Violet	Orange
Ephedrine	Red violet	*Blue violet-White	Orange
Methylephedrine	Red violet	*Violet-White	Orange
Methoxyphenamine	Red violet	*Blue violet-Gray	Orange
Leptazol	—	Red brown	Orange
Nikethamide	Red violet	Blue violet	Orange
Caffeine	Red violet	Violet	Orange

\* Showed change of colors.

Ethylamphetamine and Leptazol did not give color by ultraviolet light.

The all stimulants had been developed a black brown color when initially acidify iodoplatinate solution or dragendorff solution was sprayed to the plates and then 25% CuCl<sub>2</sub> Solution sprayed to the same plates.

前記の溶媒以外にも数種の展開溶媒についても検討したがそれぞれ短所があったので、われわれは対象薬物数が多い場合は溶媒IIはやや時間的に難があるが、溶媒IとIIを用いることとした。ただ、外人の尿では薬物を服用しない場合でも、Caが検出される例が多いが、溶媒IとIIを併用した場合のCaのRf値はいずれの溶媒においてもPhおよびMPに近接しているので、3者の分離確認にはさらに他の展開溶媒を用いるか、ガスクロマトグラフィーなど他の機器に頼らざるを得ないと思える。

### 結 語

TLCによる尿中の興奮性薬物の検出を検討した結果、呈色試薬の酸性ヨード白金液、ドラージェンドルフ液を用いて1~10 $\mu$ gの検出限界が得られたが、これらの呈色試薬を噴霧したあとにさらに塩化第二銅液を噴霧することにより0.5~5 $\mu$ gまで検出限界を上げることができた。また、溶媒IとIIを併用することにより、多くの薬物を一度に確認検出することができた。

以上の結果から、今回検討した方法で充分興奮性薬物のスクリーニングの目的を達することができるものと思える。

今回は、尿中の薬物の未変化体の検出確認のみの検討に終わったが、さらには代謝産物のTLCによる迅速な検出法についても検討すべきものと思われる。

終りに臨み、種々ご鞭達並びにご校閲を頂いた当衛生研究所橋高 毅薬学部長に深謝いたします。

### 文 献

- 1) 金島 他：本誌, 22, 32-37 (1972)
- 2) A.H.Beckett, et, al. : J. Pharmac., 19, 273-294 (1967).

## Detection of Stimulants (Part 2) Detection and Identification of Some Central Nervous Stimulants by Thin-layer Chromatography

Shoichi Honma and Setsuko Shirasaki  
(Hokkaido Institute of Public Health)

The detection and identification of 17 kinds of central nervous system stimulants were investigated by thin-layer chromatography.

Extaction method of drugs from urines was the same as described in previous report.

The condition of TLC used is as follows:

Plate : Wako Gel B-5UA(0.25mm in thickness, activated at 105° for 1 hour).

Solvent system : I. 28% NH<sub>4</sub>OH : Methanol = 1.5 : 10

II. n-Butanol : Formic acid : Water = 20 : 1 : 2

III. Chloroform : Diethylamine = 9 : 1

Color reagents : 1) Aciditify iodoplatinate solution. 2) Dragendorff solution. 3) 25% CuCl<sub>2</sub> solution.

Detection of spots : Initially spots were located by ultraviolet ray (254 $\mu$ ), and then color reagent 1) or 2) used separately in different plate. Further, color development of each spot was made using color reagent 3).

As the results, the range of Rf values of all the drugs was 0.20 to 0.80 in solvent I or II system, but 0.60 to 0.65 in III systm.

Detection limit was obtained 1 to 10 $\mu$ g by the spray of Aciditify iodoplatinate solution or Dragendorff solution and increased the sensitivity by using 25% CuCl<sub>2</sub> solution. Color reagent used showed the higher sensitivity than UV ray in detection of spots.