

高速液体クロマトグラフィーによるアンフェタミン系薬物及びフェニルピペラジン系薬物の位置異性体の分析について

片木 聖子*, 杉山 真士*, 松本 啓嗣*, 渡瀬 順司*

Analytical Methods for Regioisomers of Amphetamine-type and Phenylpiperazine-type Drugs by High-performance Liquid Chromatography

Seiko KATAGI*, Masashi SUGIYAMA*, Yoshitsugu MATSUMOTO* and Junji WATASE*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Amphetamine-type and phenylpiperazine-type drugs have regioisomers, which arise by substitution of a halogen atom from a different position of the benzene ring. Not all of these isomers are restricted, because control laws do not cover all of the regioisomers. Therefore, precise identification of the regioisomers is required for accurate analysis. We have been focusing on high-performance liquid chromatography (HPLC), which has many parameters. The purpose of this study was to determine the optimum conditions for analyzing regioisomers of amphetamine-type and phenylpiperazine-type drugs by HPLC. In cases where authentic samples were not commercially available, they were produced by a known procedure. The results suggest that with L-column ODS, 1-heptanesulfonic acid sodium salt is better than sodium dodecyl sulfate as an ion pair agent in the mobile phase. With RP-AQUA, tetrahydrofuran is better than acetonitrile as an organic solvent in the mobile phase. The optimum conditions for HPLC differ depending on the sample. Our data will provide a useful reference for defining the parameters when analyzing regioisomers of amphetamine-type and phenylpiperazine-type drugs by HPLC.

1. 緒 言

2. 実 験

平成21年11月に1-(4-フルオロフェニル)ピペラジン、平成19年4月に1-(4-フルオロフェニル)プロパン-2-アミン(以下、「4-フルオロアンフェタミン」という。)及び1-(4-メトキシフェニル)ピペラジンが薬事法第2条第14項に規定する指定薬物(以下、「指定薬物」という。)として指定された。これらの薬物は、アンフェタミン又はフェニルピペラジンのフェニル基の水素原子をハロゲン等で置換したものであり、それぞれ位置異性体があるがそれらは指定薬物として規制されないことから、これらの位置異性体の明確な識別が求められる。

しかし、これらの位置異性体のマススペクトルは類似していること、また高速液体クロマトグラフィー(以下、「HPLC」という。)による分析では、位置異性体間の分離が困難であった。宇田川ら¹⁾の研究は、ピペラジン系麻薬及びその類似化合物の鑑定分析法についてであるが、本研究では、条件検討にあたり比較的选择性の高いHPLCに着目し、アンフェタミン系薬物及びフェニルピペラジン系薬物のHPLC分析における最適分離条件を検討したので報告する。

2.1 試料及び試薬

2.1.1 標準試薬

N-(2-フルオロフェニル)ピペラジン塩酸塩(和光純薬)
1-(3-フルオロフェニル)ピペラジン二塩酸塩(関税中央分析所所有)
1-(4-フルオロフェニル)ピペラジン二塩酸塩(東京化成)
1-(2-クロロフェニル)ピペラジン(東京化成)
1-(3-クロロフェニル)ピペラジン(和光純薬)
1-(4-クロロフェニル)ピペラジン塩酸塩(東京化成)
1-(2-メトキシフェニル)ピペラジン(和光純薬)
1-(3-メトキシフェニル)ピペラジン(和光純薬)
1-(4-メトキシフェニル)ピペラジン(和光純薬)
4-フルオロアンフェタミン塩酸塩(関税中央分析所所有)
p-メトキシアンフェタミン塩酸塩(関税中央分析所所有)

2.1.2 合成用試薬

2.1.2(1) 出発原料

2-フルオロフェニルアセトン(ACROS ORGANICS)

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

- 3-フルオロフェニルアセトン (ACROS ORGANICS)
- 2-クロロフェニルアセトン (ACROS ORGANICS)
- 3-クロロフェニルアセトン (ACROS ORGANICS)
- 4-クロロフェニルアセトン (和光純薬)
- 2-メトキシフェニルアセトン (東京化成)
- 3-メトキシフェニルアセトン (ACROS ORGANICS)
- 2-メチルフェニルアセトン (和光純薬)
- 3-メチルフェニルアセトン (ACROS ORGANICS)
- 4-メチルフェニルアセトン (和光純薬)

2.1.2(2) その他の試薬

- 酢酸アンモニウム (MP Biomedicals)
- 2-ピコリンボラン (純正化学)
- 20%塩酸 (和光純薬)
- ジクロロメタン (和光純薬)
- 1 mol/L 水酸化ナトリウム液 (和光純薬)
- 硫酸ナトリウム (無水、和光純薬)
- 塩化水素 (Ca. 1 mol/L エチルエーテル溶液、東京化成)

2.1.3 HPLC 用試薬

- 溶離液 (有機溶媒): アセトニトリル (HPLC 用) (和光純薬)
- テトラヒドロフラン (HPLC 用) (和光純薬)
- メタノール (HPLC 用) (和光純薬)
- 溶離液 (水相): リン酸二水素ナトリウム二水和物 (和光純薬)
- りん酸 (HPLC 用) (和光純薬)
- 炭酸水素ナトリウム (和光純薬)
- 0.1 mol/L 水酸化ナトリウム液 (和光純薬)
- イオンペア試薬: ドデシル硫酸ナトリウム-イオンペアクロマトグラフ用 (和光純薬)、
- 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (東京化成)
- 改質剤: トリエチルアミン (和光純薬)
- 内標準: 亜硝酸ナトリウム (和光純薬)

2.2 分析装置及び条件

2.2.1 核磁気共鳴装置 (以下、「NMR」という。)

- 装置 : JNM-ECS400 (日本電子)
- 観測核 : ^1H
- 観測範囲 : 5 ppm ~ 15 ppm
- 溶媒 : 重水
- 測定温度 : 40°C
- 積算回数 : 32 回

2.2.2 高速液体クロマトグラフ装置 (以下、「HPLC」という。)

- 装置: alliance2695、フォトダイオードアレイ検出器 2996 (Waters)
- カラム : L-Column ODS (4.6 mm×150 mm、粒径 5 μm) (化学物質評価研究機構)
- 5NPE4D (4.6 mm×150 mm) (Shodex)
- 5PYE4D (4.6 mm×150 mm) (Shodex)
- Sunniest RP-AQUA (以下、RP-AQUA と略記する。4.6 mm×150 mm、粒径 5 μm) (クロマニックテクノロジーズ)
- Sunniest C18 (4.6 mm×150 mm、粒径 5 μm) (クロマニックテクノロジーズ)

温度 : 40°C (3.2.4(2) を除く)

流量 : 1 mL/min

注入量 : 5 μL

測定波長: フェニルピペラジン系 254 nm、アンフェタミン系 210 nm

2.2.3 ガスクロマトグラフ質量分析装置 (以下、「GC-MS」という。)

装置 : 6890N/5975(Agilent)

カラム : DB-5MS(30 m×0.25 mm×0.25 μm) (Agilent)

オープン温度 : 100°C (1 min) → (20°C/min) → 320°C (6 min)

気化室温度 : 280°C

注入口温度 : 320°C

スプリット比 : 50/1

2.3 合成実験

2.3.1 合成した薬物

- 2-フルオロアンフェタミン塩酸塩
- 3-フルオロアンフェタミン塩酸塩
- 2-クロロアンフェタミン塩酸塩
- 3-クロロアンフェタミン塩酸塩
- 4-クロロアンフェタミン塩酸塩
- 2-メトキシアンフェタミン塩酸塩
- 3-メトキシアンフェタミン塩酸塩
- 2-メチルアンフェタミン塩酸塩
- 3-メチルアンフェタミン塩酸塩
- 4-メチルアンフェタミン塩酸塩

2.3.2 合成方法

アンフェタミン系薬物の合成は、フェニルアセトン置換体を出発原料として、還元的アミノ化反応により行った。例として、2-フルオロアンフェタミンの合成経路を Fig.1 に示した。

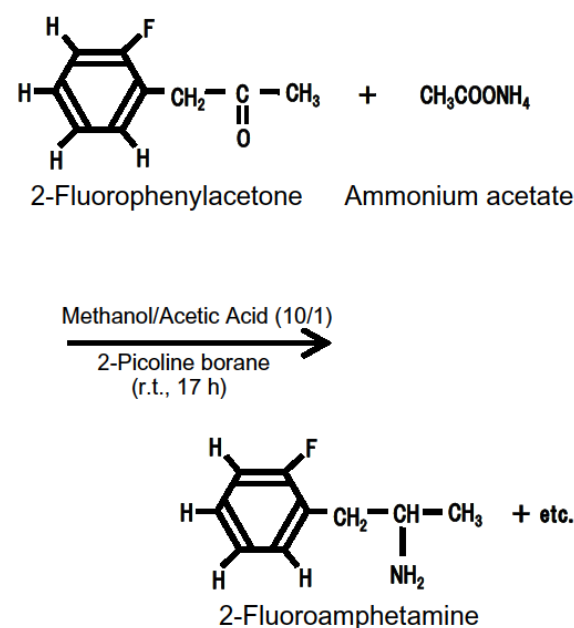


Fig.1 Reaction route of synthesis of 2-fluoroamphetamine

それぞれの出発原料、酢酸アンモニウム及び2-ピコリンボランをメタノール-酢酸溶液（メタノール/酢酸=10/1）に溶解し、室温下17時間攪拌した。20%塩酸により酸性とし、ジクロロメタンで洗浄した。1 mol/L 水酸化ナトリウム溶液により塩基性とし、ジクロロメタンで抽出した。回収したジクロロメタン層を硫酸ナトリウム（無水）で脱水後、塩化水素（エチルエーテル溶液）を加え塩酸塩とした。触媒及び溶媒を100–120℃で減圧留去し、目的物を得た。合成の確認はGC-MS及びNMRを用いて行った。

2.4 分析試料の調製

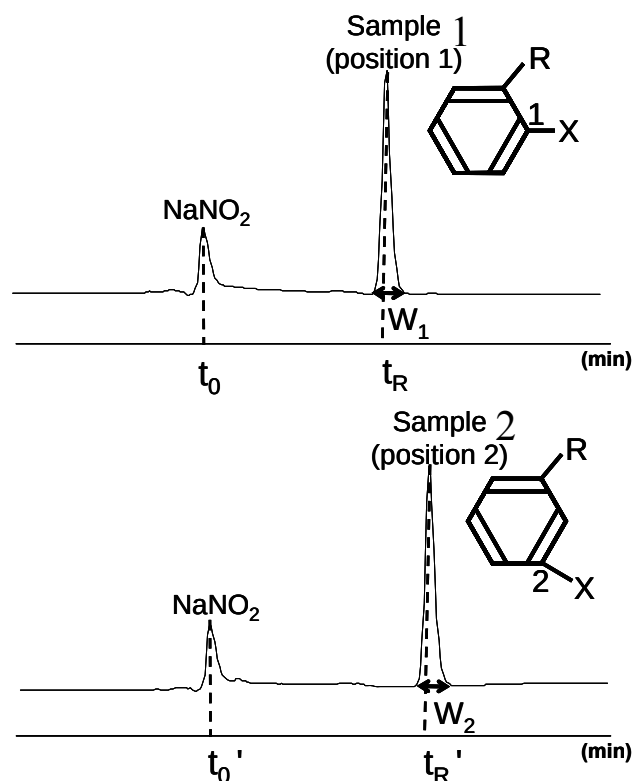
標準試薬及び合成した薬物各 9.5–16.9 mg をメタノール/水（=50/50）に溶かして10 mLにしたものと、内標準として亜硝酸ナトリウム 11.2 mg をメタノール/水（=50/50）に溶かして10 mLにしたものを各 0.10 mL ずつ混合後、メタノール/水（=50/50）で1.0 mL に希釈してHPLCに導入した。

2.5 分離能の比較

位置異性体の分離能は、分離係数 α 及び分離度 R で比較した^{2)–5)}。本研究では、同じ分子式を持つ各3種類の位置異性体間の分離条件を検討した。すなわち、1位置換と2位置換、1位置換と3位置換、2位置換と3位置換、の3種類の分離係数及び分離度を算出した。

α はカラムの選択性を示す尺度として用いられる⁶⁾。 R の値は1以上が望ましいとされ、 $R=1$ のとき2つのピークの重なりは2%、 $R=1.5$ では約0.1%で定量的に2成分が分離できる⁶⁾。

例として、位置異性体 sample 1、sample 2 の分離係数 α 及び分離度 R の定義を Fig.2 に示した。



$$\text{Separation factor: } \alpha = (t_R - t_0) / t_0 \div (t_R' - t_0') / t_0' \\ [t_R' \leq t_R]$$

$$\text{Resolution: } R = 2|t_R - t_R'| / (W_1 + W_2)$$

Fig.2 Determination of separation factor (α) and resolution (R)

t_0 (t_0'): retention time of standard

t_R (t_R'): retention time of samples

W_1 (W_2): width of peaks

3. 結果及び考察

3.1 合成した薬物の確認

合成した薬物を GC-MS で分析し、そのマススペクトルから、目的物の分子式であることを確認した。

またそれらの¹H-NMR スペクトルを測定して化学構造を確認するとともに、副生成物等の不純物の有無についても検討した (Fig.3–12)。精製が不十分な段階では、2.5 ppm、7.0 ppm、7.5 ppm 及び 8.5 ppm 付近に2-ピコリンボランに由来するシグナルが観測されたが、精製後には観測されなかった。またシグナルの積分値の比は、目的物の構造上同じ環境にある水素原子数の比に一致した。

3.2 HPLC 分析条件の検討

3.2.1 従来から使用されているカラム (L-Column ODS) の分離条件の検討

3.2.1(1) 溶離液のイオンペア試薬の検討

薬物分析において一般的に使用される ODS カラムである L-Column ODS について、最適なイオンペア試薬を検討した。溶離液としてアセトニトリル及びりん酸緩衝液 (50 mM、pH 2.8) を使用した。アセトニトリル濃度は、カラムへの保持挙動に応じ

て分析試料ごとに20–50%の範囲で調整し、同じ分子式をもつ3種類の位置異性体は全て同じアセトニトリル濃度で分析した。

溶離液のイオンペア試薬としてドデシル硫酸ナトリウム (5.0 mM) を用いた結果と、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (5.0 mM) を用いた結果を比較した (Fig.13)。その結果、イオンペア試薬として通常用いられているドデシル硫酸ナトリウムよりも、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを使用の方が、全ての結果において分離係数及び分離度が高くなることが分かった。

Table 1 に、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを使用した場合の、分析試料ごとのアセトニトリル濃度と保持時間の結果を示した。

3.2.1(2) 溶離液の有機溶媒の検討

L-Column ODS について、溶離液の有機溶媒としてアセトニトリルを用いた結果と、テトラヒドロフランを用いた結果を比較した (Fig.14)。いずれも、溶離液の水相としてりん酸緩衝液 (50 mM、pH 2.8) を使用し、イオンペア試薬として1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (5.0 mM) を加えた。Table 2 に、テトラヒドロフランを使用した場合の、分析試料ごとのテトラヒドロフラン濃度と保持時間の結果を示した。

Table 1 Ratio of acetonitrile (CH₃CN) and retention time, *t_R* (column: L-column ODS, temperature: 40°C, mobile phase: CH₃CN/50 mM NaH₂PO₄-H₃PO₄ (pH 2.8) with 1-heptanesulfonic acid sodium salt)

	CH ₃ CN/ NaH ₂ PO ₄ -H ₃ PO ₄	<i>t_R</i> [m]
1- (2-Fluorophenyl) piperazine	20/80	8.374
1- (3-Fluorophenyl) piperazine	20/80	10.489
1- (4-Fluorophenyl) piperazine	20/80	8.856
1- (2-Chlorophenyl) piperazine	25/75	4.914
1- (3-Chlorophenyl) piperazine	25/75	6.444
1- (4-Chlorophenyl) piperazine	25/75	6.549
1- (2-Methoxyphenyl) piperazine	20/80	6.674
1- (3-Methoxyphenyl) piperazine	20/80	7.575
1- (4-Methoxyphenyl) piperazine	20/80	5.429
2-Fluoroamphetamine	20/80	6.937
3-Fluoroamphetamine	20/80	8.542
4-Fluoroamphetamine	20/80	8.734
2-Chloroamphetamine	25/75	3.969
3-Chloroamphetamine	25/75	5.569
4-Chloroamphetamine	25/75	6.128
2-Methoxyamphetamine	20/80	9.768
3-Methoxyamphetamine	20/80	7.959
4-Methoxyamphetamine	20/80	7.258
2-Methylamphetamine	25/75	3.972
3-Methylamphetamine	25/75	4.671
4-Methylamphetamine	25/75	4.820

クロロフェニルピペラジン、フルオロアンフェタミン及びクロロアンフェタミンの位置異性体の分析では、テトラヒドロフラン使用時の分離度がアセトニトリル使用時の分離度を上回った。逆に、メトキシアンフェタミンの位置異性体の分析では、アセトニトリル使用時の分離度がテトラヒドロフラン使用時の分離度を上回った。

3.2.2 5NPE4D 及び 5PYE4D (カラム) を用いた分離条件の検討

ニトロフェニルエチル基が導入されたカラム 5NPE4D 及びビレニルエチル基が導入されたカラム 5PYE4D の分離能を、L-Column ODS の分離能と比較した (Fig.15)。L-Column ODS による分析は、溶離液としてテトラヒドロフラン及びりん酸緩衝液 (50 mM、pH 2.8) を使用し、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (5.0 mM) を加えた。5NPE4D 及び 5PYE4D 用の溶離液はメタノール及びりん酸緩衝液 (50 mM、pH 2.8) を使用し、改質剤としてトリエチルアミン (10 mM) を加えた。トリエチルアミンを添加すると、カラムの残存シラノール基のマスティング剤として機能し、ピーク形状を改善できる⁷⁾。

フルオロフェニルピペラジン及びメトキシフェニルピペラジンの位置異性体の分析において L-Column ODS を使用した場合、分離度が 1 以下で分離困難なものがあった。しかし、5PYE4D を使用すると、それら全ての分離度が 1 を超え分離可能となった。

Table 2 Ratio of tetrahydrofuran (THF) and retention time, *t_R* (column: L-column ODS, temperature: 40°C, mobile phase: THF/50 mM NaH₂PO₄-H₃PO₄ (pH 2.8) with 1-heptanesulfonic acid sodium salt)

	THF/ NaH ₂ PO ₄ -H ₃ PO ₄	<i>t_R</i> [m]
1- (2-Fluorophenyl) piperazine	15/85	5.534
1- (3-Fluorophenyl) piperazine	15/85	8.700
1- (4-Fluorophenyl) piperazine	15/85	8.078
1- (2-Chlorophenyl) piperazine	20/80	4.561
1- (3-Chlorophenyl) piperazine	20/80	7.128
1- (4-Chlorophenyl) piperazine	20/80	7.847
1- (2-Methoxyphenyl) piperazine	10/90	8.812
1- (3-Methoxyphenyl) piperazine	10/90	11.705
1- (4-Methoxyphenyl) piperazine	10/90	8.714
2-Fluoroamphetamine	15/85	5.458
3-Fluoroamphetamine	15/85	7.731
4-Fluoroamphetamine	15/85	8.471
2-Chloroamphetamine	20/80	4.342
3-Chloroamphetamine	20/80	6.638
4-Chloroamphetamine	20/80	7.658
2-Methoxyamphetamine	10/90	13.094
3-Methoxyamphetamine	10/90	13.449
4-Methoxyamphetamine	10/90	12.080
2-Methylamphetamine	15/85	8.018
3-Methylamphetamine	15/85	8.989
4-Methylamphetamine	15/85	9.134

3.2.3 Sunniest C18 (カラム) を用いた分離条件の検討

残存シラノール基の影響を減らし、耐アルカリ性に優れたカラム Sunniest C18 について、溶離液の有機溶媒としてアセトニトリルを使用した場合とメタノールを使用した場合を検討した (Fig.16)。溶離液の水相として炭酸水素ナトリウム緩衝液 (10 mM、pH 10.5) を使用し、イオンペア試薬あるいは改質剤は加えなかった。その結果、アセトニトリル又はメタノール使用時の分離能に大差はなかった。

また、Sunniest C18 の分離能を、L-Column ODS の分離能と比較した (Fig.16)。L-Column ODS による分析では、溶離液としてテトラヒドロフラン及びりん酸緩衝液 (50 mM、pH 2.8) を使用し、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (5.0 mM) を加えた。その結果、メチルアンフェタミンの位置異性体の分析において、Sunniest C18 の分離係数及び分離度が L-Column ODS の分離係数及び分離度を上回った。

3.2.4 RP-AQUA (カラム) を用いた分離条件の検討

3.2.4(1) 溶離液の有機溶媒の検討

オクタコシル基が導入されたカラム RP-AQUA を検討した。溶離液の水相としてりん酸緩衝液 (50 mM、pH 2.8) を使用し、イオンペア試薬あるいは改質剤を加えず実験を行った。溶離液の有機溶媒としてアセトニトリルを用いた結果と、テトラヒドロフランを用いた結果を比較した (Fig. 17)。その結果、全ての結果にお

いて、アセトニトリル使用時よりもテトラヒドロフラン使用時の分離度の方が大きかった。

また、RP-AQUA の分離能を、L-Column ODS の分離能と比較した (Fig.17)。L-Column ODS による分析では、溶離液としてテトラヒドロフラン及びりん酸緩衝液 (50 mM、pH 2.8) を使用し、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム (5.0 mM) を加えた。Table 3 に、RP-AQUA を使用し溶離液の有機溶媒としてテトラヒドロフランを用いた場合の、分析試料ごとのテトラヒドロフラン濃度と保持時間の結果を示した。

Table 3 Ratio of tetrahydrofuran (THF) and retention time, t_R (column: RP-AQUA, temperature: 40°C, mobile phase: THF/50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ (pH 2.8))

	THF/ $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$	t_R [m]
1- (2-Fluorophenyl) piperazine	2/98	9.787
1- (3-Fluorophenyl) piperazine	2/98	12.842
1- (4-Fluorophenyl) piperazine	2/98	10.973
1- (2-Chlorophenyl) piperazine	5/95	11.230
1- (3-Chlorophenyl) piperazine	5/95	18.148
1- (4-Chlorophenyl) piperazine	5/95	19.218
1- (2-Methoxyphenyl) piperazine	2/98	9.303
1- (3-Methoxyphenyl) piperazine	2/98	10.673
1- (4-Methoxyphenyl) piperazine	2/98	7.232
2-Fluoroamphetamine	2/98	7.907
3-Fluoroamphetamine	2/98	9.181
4-Fluoroamphetamine	2/98	11.413
2-Chloroamphetamine	5/95	8.862
3-Chloroamphetamine	5/95	14.565
4-Chloroamphetamine	5/95	17.482
2-Methoxyamphetamine	2/98	14.688
3-Methoxyamphetamine	2/98	12.614
4-Methoxyamphetamine	2/98	11.075
2-Methylamphetamine	2/98	18.899
3-Methylamphetamine	2/98	21.945
4-Methylamphetamine	2/98	21.699

クロロフェニルピペラジン、クロロアンフェタミン、メトキシアンフェタミン及びメチルアンフェタミンの位置異性体の分析において、テトラヒドロフランを使用した RP-AQUA の分離度は L-Column ODS の分離度を上回った。

3.2.4(2) カラム温度の検討

RP-AQUA について、カラムの温度変化 (25°C、40°C、60°C) による分離能への影響を検討した (Fig.18)。溶離液は 3.2.4(1) の検討結果をもとに、テトラヒドロフラン及びりん酸緩衝液 (50 mM、pH 2.8) を使用し、イオンペア試薬あるいは改質剤を加えず分析を行った。

その結果、フルオロフェニルピペラジン及びクロロフェニルピペラジンの位置異性体の分析では、温度が低いほど分離係数及び分離度は大きくなる傾向があった。これは、40°C では分析試料のカラムへの保持がほぼ同じで分離が難しい場合でも、より低温にすると試料の分配係数が変わり、試料の保持力に差が出たためと考えられる⁸⁾。

4. 要 約

本研究では、HPLC によるアンフェタミン系薬物及びフェニルピペラジン系薬物の位置異性体の分離条件について検討した。分析に当たり、入手できなかった薬物については合成したものを使用した。

これらの薬物の分析の結果、L-Column ODS カラム使用時の溶離液のイオンペア試薬は、ドデシル硫酸ナトリウムよりも 1-ヘプタンスルホン酸ナトリウムを用いると分離能が向上することが分かった。

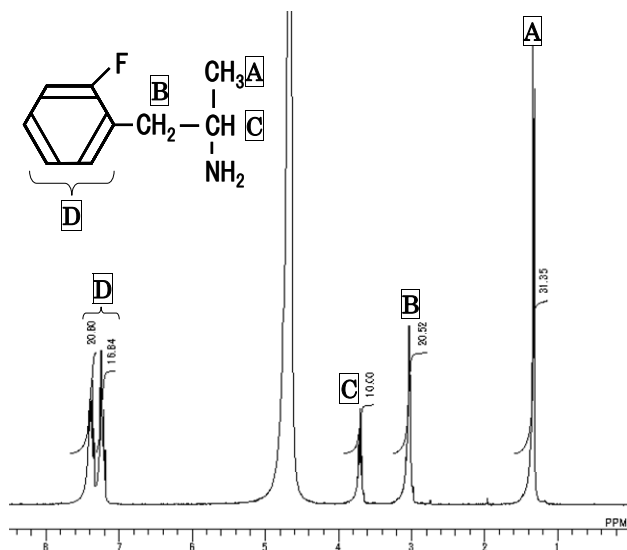
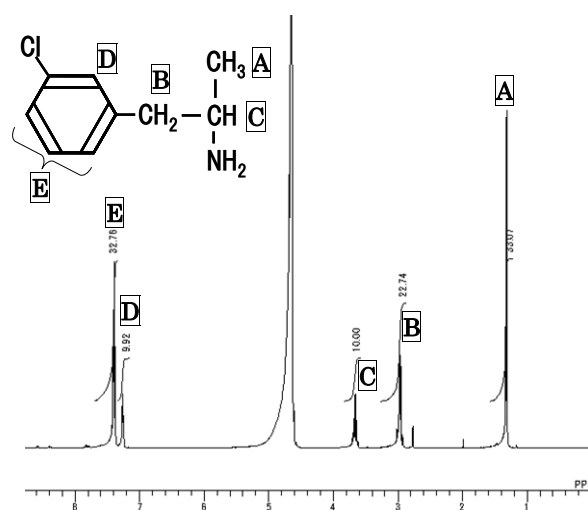
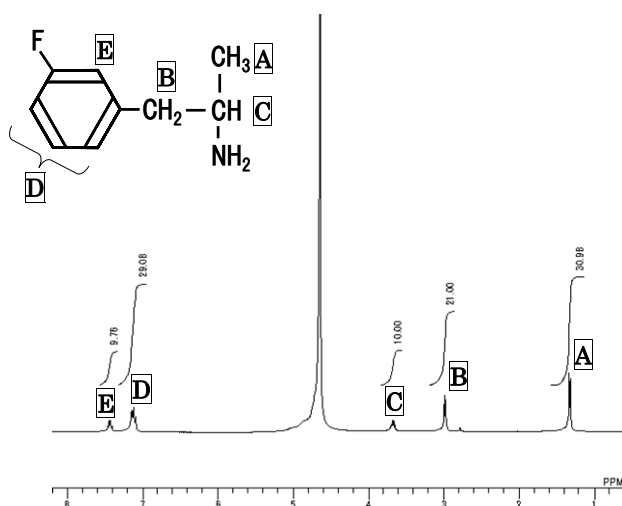
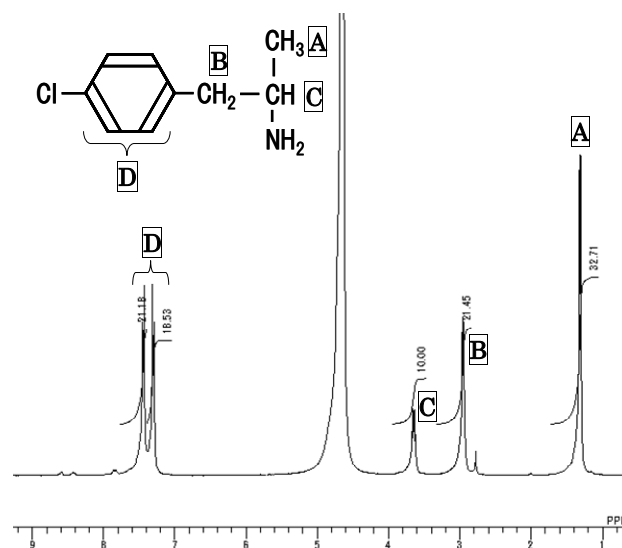
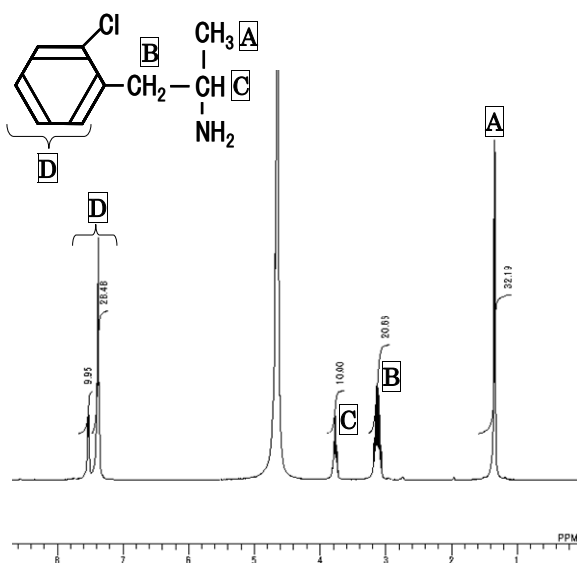
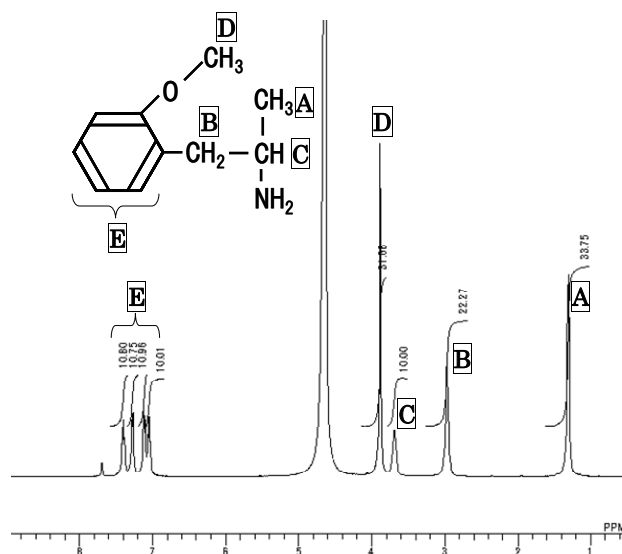
また、RP-AQUA カラム使用時の溶離液の有機溶媒は、アセトニトリルよりもテトラヒドロフランを使用した場合の方が分離能がよかった。

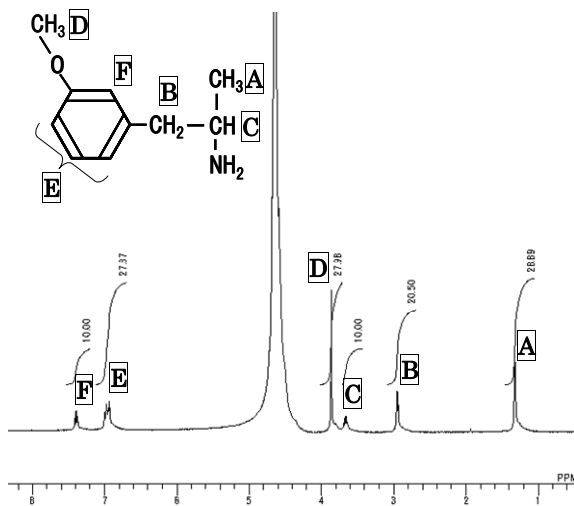
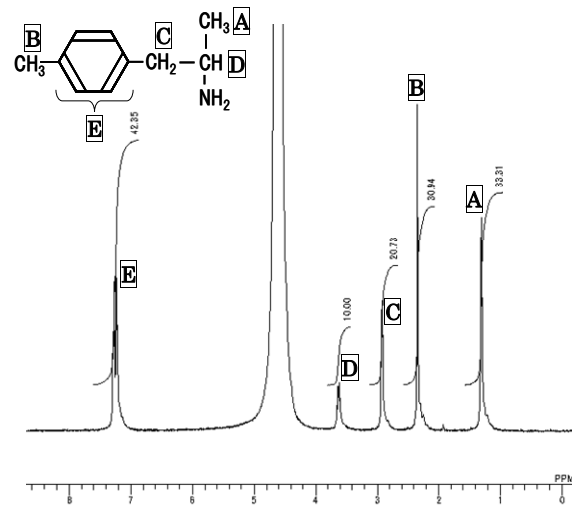
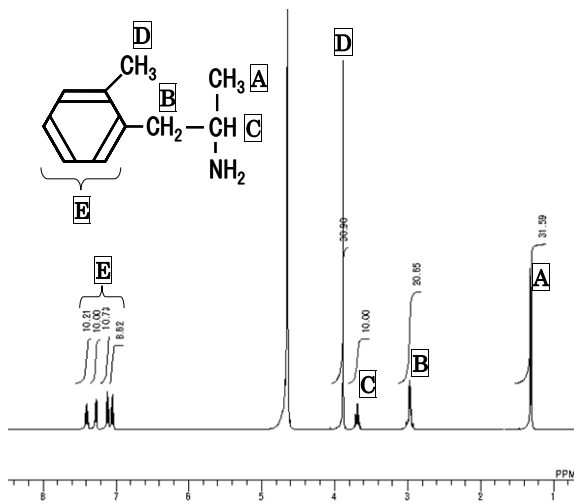
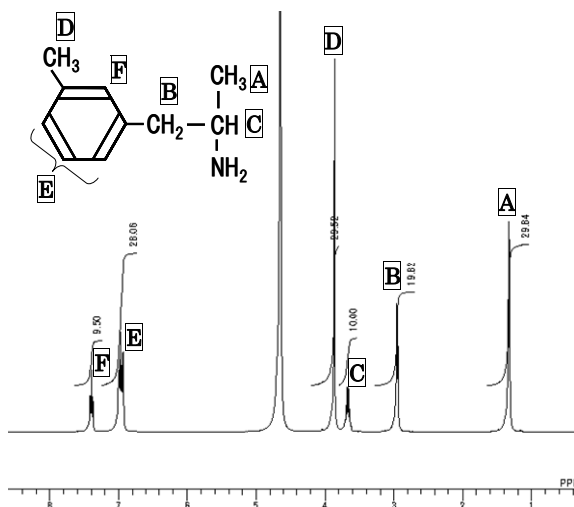
さらに、RP-AQUA カラム使用時、カラム温度を低温にすることで分離能が向上するものも認められた。

以上のことから、目的の薬物に応じて HPLC のカラム、溶離液の有機溶媒又はカラム温度等の条件を適切に設定することで、アンフェタミン系薬物及びフェニルピペラジン系薬物の位置異性体を良好に分離できるものと考えられる。

文 献

- 1) 宇田川晃：関税中央分析所報，**49**，51 (2009)。
- 2) 大木道則：“化学大辞典”，P.2221 (1989)，(東京化学同人)。
- 3) 大木道則：“化学大辞典”，P.2426 (1989)，(東京化学同人)。
- 4) 大木道則：“化学大辞典”，P.2110 (1989)，(東京化学同人)。
- 5) 大木道則：“化学大辞典”，P.2222 (1989)，(東京化学同人)。
- 6) (社)日本分析化学会：“分離分析”，P.101 (1998)，(朝倉書店)。
- 7) 中村洋：“ちょっと詳しい液クロのコツ分離編”，P.42 (2007)，(丸善株式会社)。
- 8) 中村洋：“液クロ虎の巻”，P.49 (2001)，(筑波出版会)。

Fig.3 ^1H -NMR spectra of 2-fluoroamphetamineFig.6 ^1H -NMR spectra of 3-chloroamphetamineFig.4 ^1H -NMR spectra of 3-fluoroamphetamineFig.7 ^1H -NMR spectra of 4-chloroamphetamineFig.5 ^1H -NMR spectra of 2-chloroamphetamineFig.8 ^1H -NMR spectra of 2-methoxyamphetamine

Fig.9 ¹H-NMR spectra of 3-methoxyamphetamineFig.12 ¹H-NMR spectra of 4-methylamphetamineFig.10 ¹H-NMR spectra of 2-methylamphetamineFig.11 ¹H-NMR spectra of 3-methylamphetamine

	Ion pair agent	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3-, or 4-Fluoroamphetamine (FMP)	SDS	40		
	SHS	20		
2-, 3-, or 4-Chloroamphetamine (CMP)	SDS	50		
	SHS	25		
2-, 3-, or 4-Methoxyamphetamine (MA)	SDS	40		
	SHS	20		
2-, 3-, or 4-Methylamphetamine (MMP)	SDS	50		
	SHS	25		

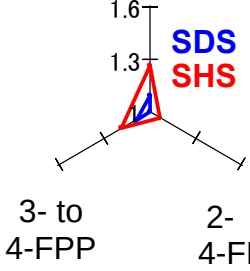
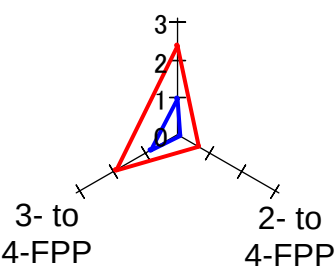
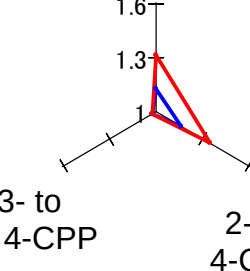
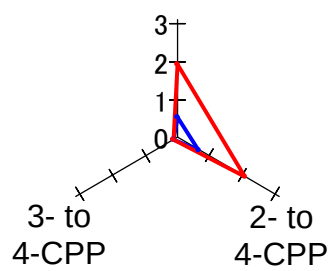
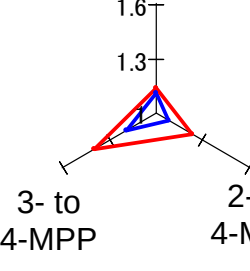
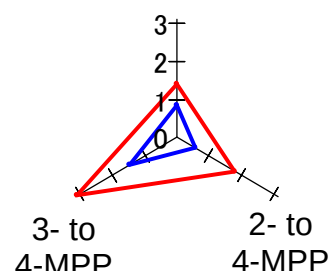
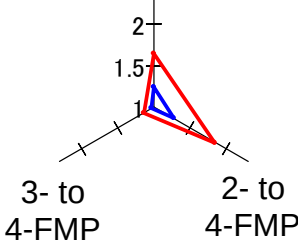
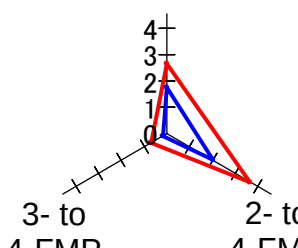
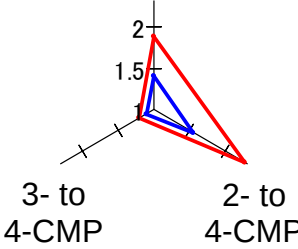
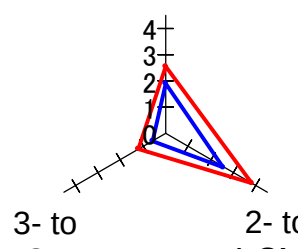
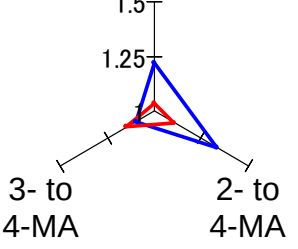
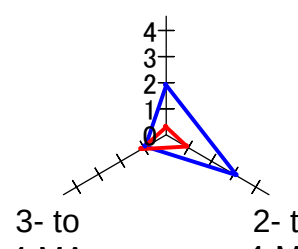
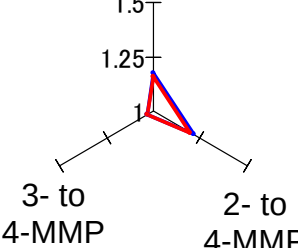
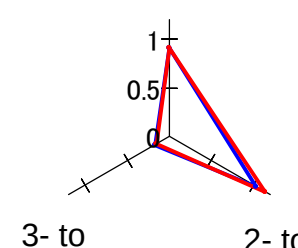
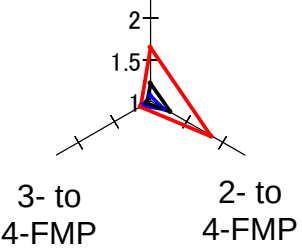
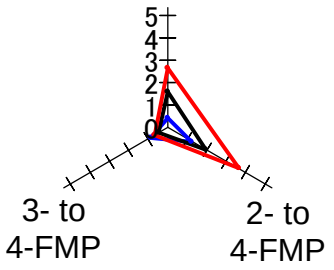
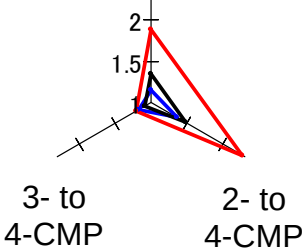
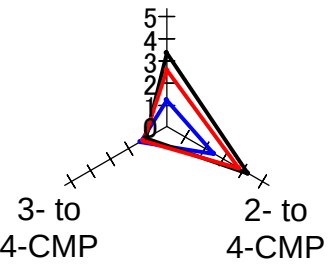
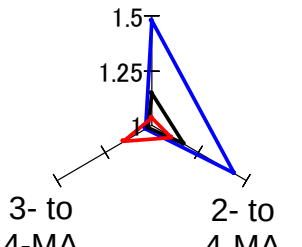
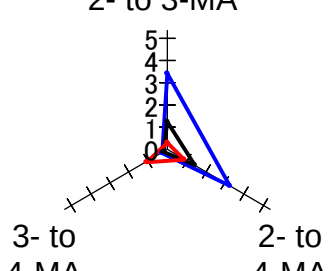
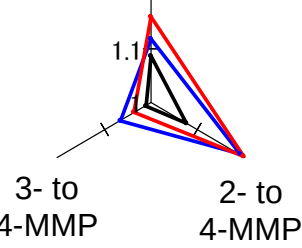
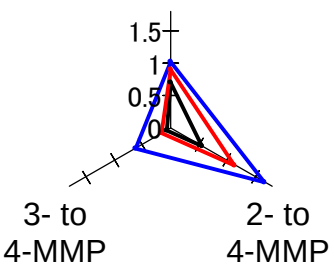
	Ion pair agent	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3- or 4-Fluorophenyl piperazine (FPP)	SDS	40	Comparison of 2- to 3-FPP 	2- to 3-FPP 
	SHS	20		
2-, 3-, or 4-Chlorophenyl piperazine (CPP)	SDS	50	2- to 3-CPP 	2- to 3-CPP 
	SHS	25		
2-, 3-, or 4-Methoxyphenyl piperazine (MPP)	SDS	40	2- to 3-MPP 	2- to 3-MPP 
	SHS	20		

Fig.13 Influence of ion pair agent in the mobile phase on separation factor and resolution (column: L-column ODS, mobile phase: acetonitrile/50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ (pH 2.8), ion pair agent: — sodium dodecyl sulfate (SDS), — 1-heptanesulfonic acid sodium salt (SHS))

	Organic solvent	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3-, or 4-Fluoroamphetamine (FMP)	CH ₃ CN	20	2- to 3-FMP 	2- to 3-FMP 
	THF	15		
2-, 3-, or 4-Chloroamphetamine (CMP)	CH ₃ CN	25	2- to 3-CMP 	2- to 3-CMP 
	THF	20		
2-, 3-, or 4-Methoxyamphetamine (MA)	CH ₃ CN	20	2- to 3-MA 	2- to 3-MA 
	THF	10		
2-, 3-, or 4-Methylamphetamine (MMP)	CH ₃ CN	25	2- to 3-MMP 	2- to 3-MMP 
	THF	15		

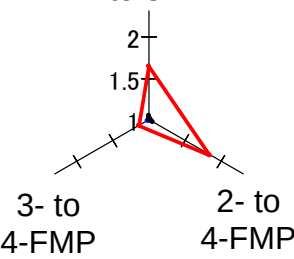
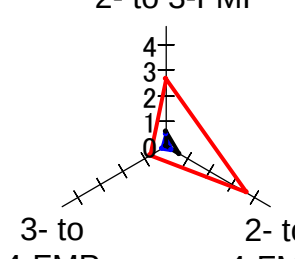
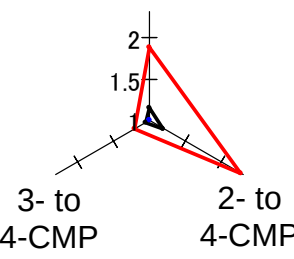
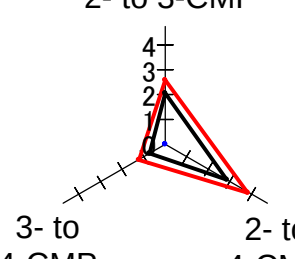
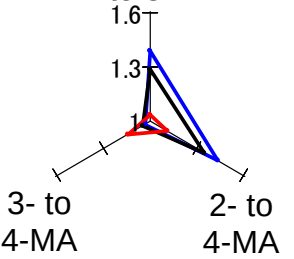
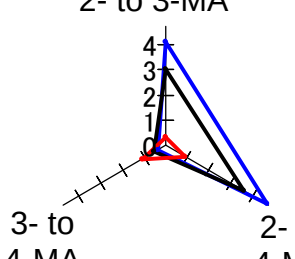
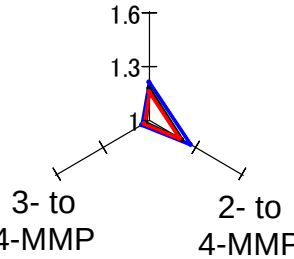
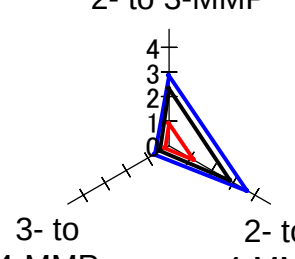
	Organic solvent	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3- or 4-Fluorophenyl piperazine (FPP)	CH ₃ CN	20	Comparison of 2- to 3-FPP 	2- to 3-FPP
	THF	15		
2-, 3-, or 4-Chlorophenyl piperazine (CPP)	CH ₃ CN	25	2- to 3-CPP 	2- to 3-CPP
	THF	20		
2-, 3-, or 4-Methoxyphenyl piperazine (MPP)	CH ₃ CN	20	2- to 3-MPP 	2- to 3-MPP
	THF	10		

Fig.14 Influence of organic solvent as the mobile phase on separation factor and resolution (column: L-column ODS, ion pair agent: 1-heptanesulfonic acid sodium salt, mobile phase: — acetoneitrile/50 mM NaH₂PO₄-H₃PO₄ (pH 2.8), — tetrahydrofuran/50 mM NaH₂PO₄-H₃PO₄)

	Column	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3-, or 4-Fluoroamphetamine (FMP)	ODS	15	2- to 3-FMP  3- to 4-FMP 2- to 4-FMP	2- to 3-FMP  3- to 4-FMP 2- to 4-FMP
	5NPE	40		
	5PYE	30		
2-, 3-, or 4-Chloroamphetamine (CMP)	ODS	20	2- to 3-CMP  3- to 4-CMP 2- to 4-CMP	2- to 3-CMP  3- to 4-CMP 2- to 4-CMP
	5NPE	40		
	5PYE	40		
2-, 3-, or 4-Methoxyamphetamine (MA)	ODS	10	2- to 3-MA  3- to 4-MA 2- to 4-MA	2- to 3-MA  3- to 4-MA 2- to 4-MA
	5NPE	40		
	5PYE	30		
2-, 3-, or 4-Methylamphetamine (MMP)	ODS	15	2- to 3-MMP  3- to 4-MMP 2- to 4-MMP	2- to 3-MMP  3- to 4-MMP 2- to 4-MMP
	5NPE	40		
	5PYE	30		

	Column	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3- or 4-Fluorophenyl piperazine (FPP)	ODS	15	Comparison of 2- to 3-FPP 	2- to 3-FPP
	5NPE	40		
	5PYE	30		
2-, 3-, or 4-Chlorophenyl piperazine (CPP)	ODS	20	2- to 3-CPP 	2- to 3-CPP
	5NPE	50		
	5PYE	65		
2-, 3-, or 4-Methoxyphenyl piperazine (MPP)	ODS	10	2- to 3-MPP 	2- to 3-MPP
	5NPE	40		
	5PYE	30		

Fig.15 Separation factor and resolution of 5NPE4D (—), 5PYE4D (—) (mobile phase: methanol/50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ (pH 2.8) with triethylamine) and L-column ODS (—) (mobile phase: tetrahydrofuran/50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-H}_3\text{PO}_4$ (pH 2.8) with heptanesulfonic acid sodium salt)

	Column/ Organic solvent	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3-, or 4- Fluoro amphetamine (FMP)	ODS/ THF	15	2- to 3-FMP  3- to 4-FMP 2- to 4-FMP	2- to 3-FMP  3- to 4-FMP 2- to 4-FMP
	C18/ CH ₃ CN	30		
	C18/ CH ₃ OH	43		
2-, 3-, or 4- Chloro amphetamine (CMP)	ODS/ THF	20	2- to 3-CMP  3- to 4-CMP 2- to 4-CMP	2- to 3-CMP  3- to 4-CMP 2- to 4-CMP
	C18/ CH ₃ CN	30		
	C18/ CH ₃ OH	45		
2-, 3-, or 4- Methoxy amphetamine (MA)	ODS/ THF	10	2- to 3-MA  3- to 4-MA 2- to 4-MA	2- to 3-MA  3- to 4-MA 2- to 4-MA
	C18/ CH ₃ CN	30		
	C18/ CH ₃ OH	43		
2-, 3-, or 4- Methyl amphetamine (MMP)	ODS/ THF	15	2- to 3-MMP  3- to 4-MMP 2- to 4-MMP	2- to 3-MMP  3- to 4-MMP 2- to 4-MMP
	C18/ CH ₃ CN	30		
	C18/ CH ₃ OH	43		

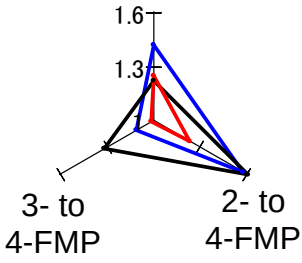
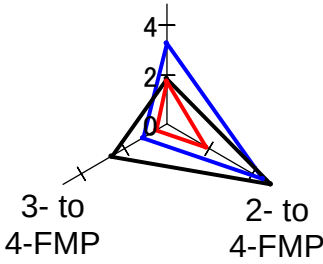
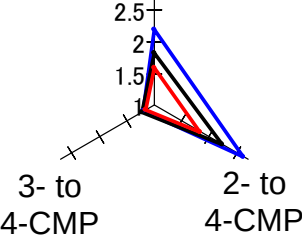
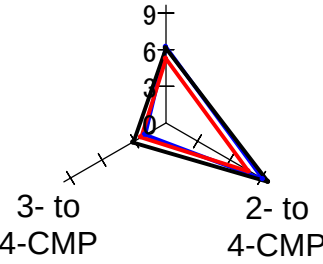
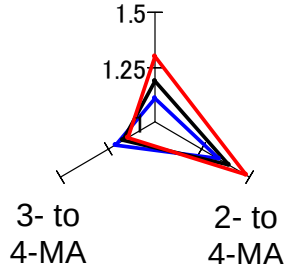
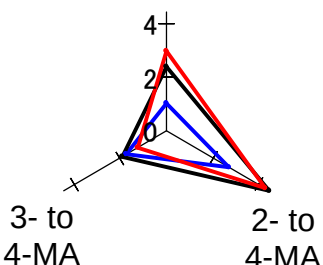
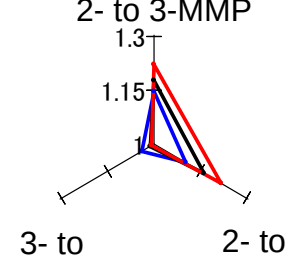
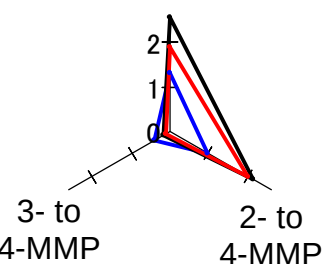
	Column/ Organic solvent	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3- or 4- Fluorophenyl piperazine (FPP)	ODS/ THF	15	Comparison of 2- to 3-FPP 	2- to 3-FPP
	C18/ CH ₃ CN	30		
	C18/ CH ₃ OH	40		
2-, 3-, or 4- Chlorophenyl piperazine (CPP)	ODS/ THF	20	2- to 3-CPP 	2- to 3-CPP
	C18/ CH ₃ CN	30		
	C18/ CH ₃ OH	43		
2-, 3-, or 4- Methoxyphenyl piperazine (MPP)	ODS/ THF	10	2- to 3-MPP 	2- to 3-MPP
	C18/ CH ₃ CN	30		
	C18/ CH ₃ OH	40		

Fig.16 Separation factor and resolution of Sunniest C18 (mobile phase: —, acetonitrile/10 mM NaHCO₃-NaOH (pH 10.5), — methanol/10 mM NaHCO₃-NaOH (pH 10.5)) and L-column ODS (mobile phase: (— tetrahydrofuran/50 mM NaH₂PO₄-H₃PO₄ (pH 2.8) with 1-heptanesulfonic acid sodium salt))

	Column/ Organic solvent	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3-, or 4- Fluoro amphetamine (FMP)	ODS/ THF	15	2- to 3-FMP	2- to 3-FMP
	RP/ CH ₃ CN	10		
	RP/ THF	2		
2-, 3-, or 4- Chloro amphetamine (CMP)	ODS/ THF	15	2- to 3-CMP	2- to 3-CMP
	RP/ CH ₃ CN	15		
	RP/ THF	5		
2-, 3-, or 4- Methoxy amphetamine (MA)	ODS/ THF	15	2- to 3-MA	2- to 3-MA
	RP/ CH ₃ CN	10		
	RP/ THF	2		
2-, 3-, or 4- Methyl amphetamine (MMP)	ODS/ THF	15	2- to 3-MMP	2- to 3-MMP
	RP/ CH ₃ CN	15		
	RP/ THF	2		

	Column/ Organic solvent	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3- or 4- Fluorophenyl piperazine (FPP)	ODS/ THF	15	Comparison of 2- to 3-FPP 	2- to 3-FPP
	RP/ CH ₃ CN	10		
	RP/ THF	2		
2-, 3-, or 4- Chlorophenyl piperazine (CPP)	ODS/ THF	15	2- to 3-CPP 	2- to 3-CPP
	RP/ CH ₃ CN	15		
	RP/ THF	5		
2-, 3-, or 4- Methoxyphenyl piperazine (MPP)	ODS/ THF	15	2- to 3-MPP 	2- to 3-MPP
	RP/ CH ₃ CN	10		
	RP/ THF	2		

Fig.17 Separation factor and resolution of RP-AQUA (mobile phase: — acetonitrile/50 mM NaH₂PO₄-H₃PO₄ (pH 2.8), — tetrahydrofuran/50 mM NaH₂PO₄-H₃PO₄ (pH 2.8)) and L-column ODS (mobile phase: (— tetrahydrofuran/50 mM NaH₂PO₄-H₃PO₄ (pH 2.8) with 1-heptanesulfonic acid sodium salt))

	Temp. [°C]	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3-, or 4- Fluoro amphetamine (FMP)	25	3	2- to 3-FMP 	2- to 3-FMP 
	40	2		
	60	1		
2-, 3-, or 4- Chloro amphetamine (CMP)	25	10	2- to 3-CMP 	2- to 3-CMP 
	40	5		
	60	3		
2-, 3-, or 4- Methoxy amphetamine (MA)	25	3	2- to 3-MA 	2- to 3-MA 
	40	2		
	60	1		
2-, 3-, or 4- Methyl amphetamine (MMP)	25	3	2- to 3-MMP 	2- to 3-MMP 
	40	2		
	60	2		

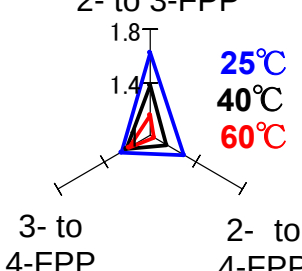
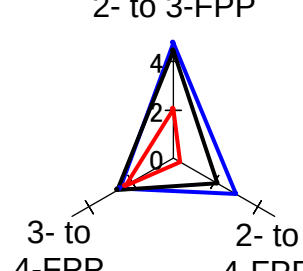
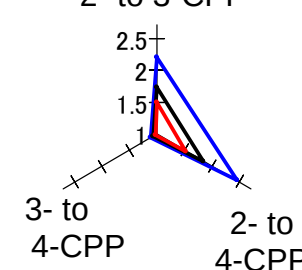
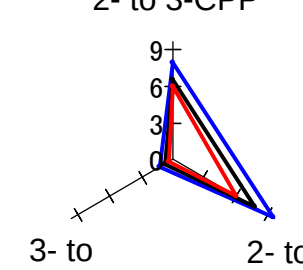
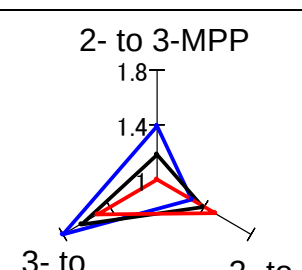
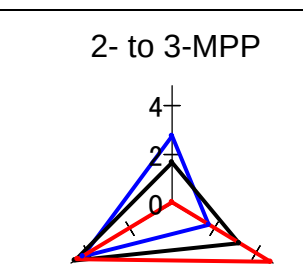
	Temp. [°C]	Organic solvent ratio	Separation factor	Resolution
2-, 3- or 4- Fluorophenyl piperazine (FPP)	25	3	Comparison of 2- to 3-FPP 	2- to 3-FPP 
	40	2		
	60	1		
2-, 3-, or 4- Chlorophenyl piperazine (CPP)	25	10	2- to 3-CPP 	2- to 3-CPP 
	40	5		
	60	3		
2-, 3-, or 4- Methoxyphenyl piperazine (MPP)	25	3	2- to 3-MPP 	2- to 3-MPP 
	40	2		
	60	1		

Fig.18 Influence of temperature on separation factor and resolution (column: RP-AQUA, temperature: — 25°C, — 40°C, — 60°C, mobile phase: tetrahydrofuran/50 mM NaH₂PO₄-H₃PO₄ (pH 2.8))