

超臨界流体クロマトグラフによるメトルファンの光学異性体の分離

小林 俊哉*, 石崎 哲章*, 佐々木 良祐*, 安藤 利典*, 樋野 千寿*

Separation of methorphan enantiomers by supercritical fluid chromatography

Toshiya KOBAYASHI*, Noriaki ISHIZAKI*, Ryosuke SASAKI*, Toshinori ANDO* and Chitoshi HINO*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

Methorphan has two optical isomers whose physiological functions are different. Levomethorphan is regulated as an illegal drug, while dextromethorphan is not regulated. Therefore, discriminating between them is very important. In this study, we examined a rapid analysis for separating the enantiomers of methorphan using supercritical fluid chromatography (SFC). When amine additives were dissolved in the co-solvent, levo- and dextro-methorphans were separated from racemmethorphan by SFC and detected with both a photodiode array detector and a mass spectrometer.

1. 緒 言

有機化合物には、平面上でその鏡像と重ね合わせることができない光学異性体を有するものがある。光学異性体は物理的及び化学的性質はほとんど同じであるが、立体的な構造が異なるため生理活性が異なるものが存在している。光学異性体を有する物質の一例として3-メトキシ-N-メチルモルヒナン（以下、メトルファンと略記する）があり（Fig.1），左旋性のもの（以下、レボメトルファンと略記する）は鎮痛作用を有しており、麻薬及び向精神薬取締法別表第一第六十九号に規定する麻薬に該当する。一方、右旋性のもの（以下、デキストロメトルファンと略記する）は鎮咳作用を有するため一般の風邪薬等の医薬品に配合されており、規制はされていない。このようにメトルファンは旋光性の違いにより規制の有無が異なるため、鑑定分析を行う際は、その光学異性体を正確に区別する必要がある。

メトルファンの光学異性体分析については、高速液体クロマトグラフィー（以下、HPLCと略記する）¹⁾、キャピラリー電気泳動法²⁾及び超臨界流体クロマトグラフィー（以下、SFCと略記する）³⁾が報告されている。当所ではキラルカラムを使用したHPLCを用いて分析しているが、分析に時間を要し、また別の手法であるキャピラリー電気泳動も同様に分析に時間を要する。

SFCは光学異性体分析に優れた分析装置として知られており、特に医薬品の分野ではHPLCに代わる光学異性体分離手法として注目されている⁴⁾。SFCでは、移動相に超臨界状態の二酸化炭素を用いており、超臨界状態の二酸化炭素は、液体よりも低い粘性及び高い拡散性を有している。そのため当該手法はHPLCに比べ、高流量においても高い分離能が得られ、分析時間を短縮でき、かつ有機溶媒の消費量を削減することが見込まれる。

そこで、本研究ではメトルファンの右旋性及び左旋性の混合物（以下、ラセメトルファンと略記する）を合成し、SFCによる同合成物の分離条件を検討した。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 標準試料

デキストロメトルファン臭化水素酸塩一水和物
(純度99%以上, Aldrich)

2.1.2 ラセメトルファン合成試薬

5,6,7,8-テトラヒドロイソキノリン（純度98%以上, 東京化成）
臭化メチル（特級, 東京化成）
0.25 M p-メトキシベンジルマグネシウムクロライド THF 溶液
(Aldrich)

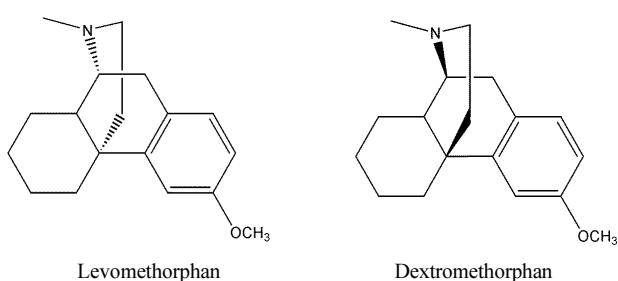


Fig. 1 Chemical structures of methorphan

超高純度水素ガス (エア・リキッド)
 パラジウム-炭素 (一級, 和光純薬)
 リン酸 (特級, 和光純薬)
 フェニルトリメチルアンモニウムクロリド (特級, 和光純薬)
 ナトリウムメトキシド (一級, 和光純薬)
 メタノール (特級, 和光純薬)

2.1.3 SFC 用試薬

トリフルオロ酢酸 (以下, TFA と略記する) (特級, 和光純薬)
 酢酸アンモニウム (以下, AmAc と略記する) (特級, 和光純薬)
 トリエチルアミン (以下, TEA と略記する) (特級, 和光純薬)
 以下の試薬のグレードは全て高速液体クロマトグラフ用を用いた。
 メタノール (以下, MeOH と略記する) (和光純薬)
 エタノール (以下, EtOH と略記する) (和光純薬)
 2-プロパノール (以下, 2-PrOH と略記する) (和光純薬)
 アセトニトリル (以下, ACN と略記する) (和光純薬)

2.2 分析装置及び分析条件の検討

2.2.1 ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS)

装置 : GCMS-QP2020 (島津製作所社製)
 カラム : DB-5MS (30 m × 0.25 mm i.d., 膜厚 0.25 μm)
 (Agilent 社製)
 カラム温度 : 100 °C (1 min) - [20 °C/min] - 320 °C (5 min)
 注入口 : スプリットレス
 注入量 : 1 μL
 注入口温度 : 320 °C
 インターフェース温度 : 320 °C
 イオン源温度 : 200 °C
 キャリアガス : ヘリウム (1 mL/min)
 イオン化法 : EI 法

2.2.2 超臨界流体クロマトグラフ質量分析計/多波長検出器 (SFC-MS/DAD)

装置 : ACQUITY UPC-2 (Waters 社製)
 カラム : 下記の光学異性体分離カラム 3 種をそれぞれ用いて検討した。
 Trefoil AMY1 (以下, AMY1 と略記する)
 Trefoil CEL1 (以下, CEL1 と略記する)
 Trefoil CEL2 (以下, CEL2 と略記する)
 (いずれも 3.0 × 150 mm i.d., 粒子径 2.5 μm, Waters 社製)

検出器 1 : 質量分析計 SYNAPT G2-Si (Waters 社製)

イオン源温度 : 150 °C
 脱溶媒ヒータ温度 : 500 °C
 キャビラリー電圧 : 1.2 kV
 サンプルコーン電圧 : 20 V

検出器 2 : フォトダイオードアレイ検出器

測定波長 : 210~450 nm

2.2.2 (1) 移動相に添加剤を用いない分離条件の検討

移動相に添加剤を加えて測定した場合, 流路が汚染される可能性があるため, 初めに添加剤を加えずに 3 種類の光学異性体分析

用カラムを用いて, 二酸化炭素と有機溶媒のみの組合せからなる移動相で分離することができないか検討することとした。カラム, 流速, 移動相(B)の種類及び比率を変更した以下の測定条件で合成したラセメトルファンの分離を検討した。

カラム温度 : 40 °C

移動相(A) : 二酸化炭素

その他のパラメーターに関しては Table 1 に記載 (psi = 6894.76 Pa, 以下同様に定義する)。

Table 1 Measurement parameters of SFC (not containing additives)

| Method No. | Mobile phase (B) | (A):(B) | Column | Flow rate (ml/min) | Back pressure (psi) |
|------------|--------------------------|---------|--------|--------------------|---------------------|
| 1 | | 80:20 | CEL1 | 2.0 | 2,000 |
| 2 | | 90:10 | CEL1 | 2.0 | 2,000 |
| 3 | | 60:40 | CEL2 | 1.5 | 2,000 |
| 4 | MeOH | 65:35 | CEL2 | 1.5 | 2,000 |
| 5 | | 70:30 | CEL2 | 1.5 | 2,000 |
| 6 | | 80:20 | CEL2 | 3.0 | 2,000 |
| 7 | | 60:40 | AMY1 | 1.5 | 2,000 |
| 8 | | 60:40 | CEL2 | 1.5 | 2,000 |
| 9 | MeOH : ACN = 1 : 1 | 70:30 | CEL2 | 2.0 | 2,000 |
| 10 | | 80:20 | CEL2 | 2.0 | 2,000 |
| 11 | MeOH : 2-PrOH = 1 : 1 | 92:18 | CEL1 | 2.0 | 2,000 |
| 12 | | 70:30 | CEL2 | 2.0 | 2,000 |
| 13 | | 90:10 | CEL1 | 3.0 | 2,000 |
| 14 | EtOH | 60:40 | CEL2 | 1.5 | 2,000 |
| 15 | | 90:10 | CEL2 | 2.0 | 2,000 |

2.2.2 (2) 移動相に添加剤を用いた分離条件の検討

移動相に添加剤として TFA, AmAc 又は TEA のいずれかを用い, 添加剤の添加濃度, カラム, 流速, 移動相(B)の種類及び比率を変更した条件で検討した。

カラム温度 : 40 °C

移動相(A) : 二酸化炭素

その他のパラメーターに関しては Table 2 に記載。

Table 2 Measurement parameters of SFC (containing additives)

| Method No. | Mobile phase (B) | (A):(B) | Column | Flow rate (mL/min) | Back pressure (psi) |
|------------|---|--------------------------|--------|--------------------|---------------------|
| 16 | (EtOH : 2-PrOH : ACN = 1 : 1 : 1) + 20 mM AmAc | gradient 97:3 ~ 40:60 | AMY1 | 1.2 | 3,200 |
| 17 | (MeOH : 2-PrOH = 1 : 1) + 0.2 % TFA | gradient 97:3 ~ 40:60 | CEL1 | 1.2 | 3,200 |
| 18 | (EtOH : ACN = 1 : 1) + 0.2 % TFA | gradient 97:3 ~ 40:60 | CEL2 | 1.2 | 3,200 |
| 19 | (EtOH : 2-PrOH = 1 : 1) + 0.2 % TFA | gradient 97:3 ~ 40:60 | AMY1 | 1.2 | 3,200 |
| 20 | | 90 : 10 | AMY1 | 2.5 | 2,000 |
| 21 | | 94 : 6 | AMY1 | 2.5 | 2,000 |
| 22 | MeOH + 0.01 % TEA | 90 : 10 | CEL1 | 2.5 | 2,000 |
| 23 | | 96 : 4 | CEL1 | 2.5 | 2,000 |
| 24 | | 75 : 25 | CEL2 | 2.2 | 2,000 |
| 25 | | 81 : 19 | CEL2 | 2.4 | 2,000 |
| 26 | | 90 : 10 | AMY1 | 2.5 | 2,000 |
| 27 | | 94 : 6 | AMY1 | 2.5 | 2,000 |
| 28 | MeOH + 0.1 % TEA | 90 : 10 | CEL1 | 2.5 | 2,000 |
| 29 | | 96 : 4 | CEL1 | 2.5 | 2,000 |
| 30 | | 81 : 19 | CEL2 | 2.4 | 2,000 |
| 31 | | 90 : 10 | AMY1 | 2.5 | 2,000 |
| 32 | | 94 : 6 | AMY1 | 2.5 | 2,000 |
| 33 | MeOH + 0.2 % TEA | 90 : 10 | CEL1 | 2.5 | 2,000 |
| 34 | | 96 : 4 | CEL1 | 2.5 | 2,000 |
| 35 | | 75 : 25 | CEL2 | 2.2 | 2,000 |
| 36 | | 81 : 19 | CEL2 | 2.4 | 2,000 |
| 37 | | 90 : 10 | AMY1 | 2.5 | 2,000 |
| 38 | | 94 : 6 | AMY1 | 2.5 | 2,000 |
| 39 | MeOH + 0.3 % TEA | 90 : 10 | CEL1 | 2.5 | 2,000 |
| 40 | | 96 : 4 | CEL1 | 2.5 | 2,000 |
| 41 | | 81 : 19 | CEL2 | 2.4 | 2,000 |
| 42 | | 90 : 10 | AMY1 | 2.2 | 2,000 |
| 43 | (MeOH : ACN = 1 : 1) + 0.2 % TEA | 90 : 10 | CEL1 | 2.4 | 2,000 |
| 44 | | 75 : 25 | CEL2 | 2.2 | 2,000 |
| 45 | | 65 : 35 | CEL2 | 2.0 | 2,000 |

2.3 ラセメトルファンの合成

ラセメトルファンの合成は、河嶋ら⁵⁾の方法を参考にして行った。合成物の確認は、2.2.1の条件でGC/MSにより行った。

2.4 SFCを用いたメトルファンの光学異性体の分離条件の検討

合成したラセメトルファンを用いてSFCにより、光学異性体であるデキストロメトルファンとレボメトルファンの分離条件をSFCの移動相への添加剤の添加の有無やその種類、カラム、流速、移動相(B)の種類及び比率を変えて検討した。

3. 結果及び考察

3.1 合成したラセメトルファンの確認

合成物の確認をGC/MSを用いて行った。得られたトータルイオンクロマトグラム及びマススペクトルをFig.2及びFig.3にそれぞれ示す。ピークの保持時間及びマススペクトルが標準のデキストロメトルファンのものと一致したことから、メトルファンが合成されていることを確認した。

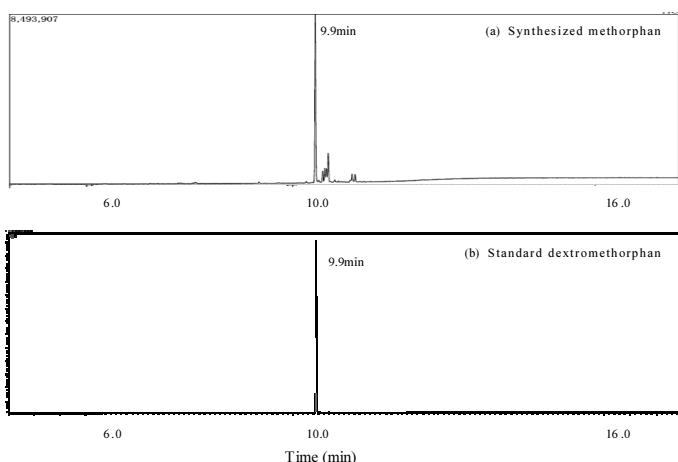


Fig. 2 Total ion chromatogram of methorphan (a) synthesized methorphan (b) standard dextromethorphan

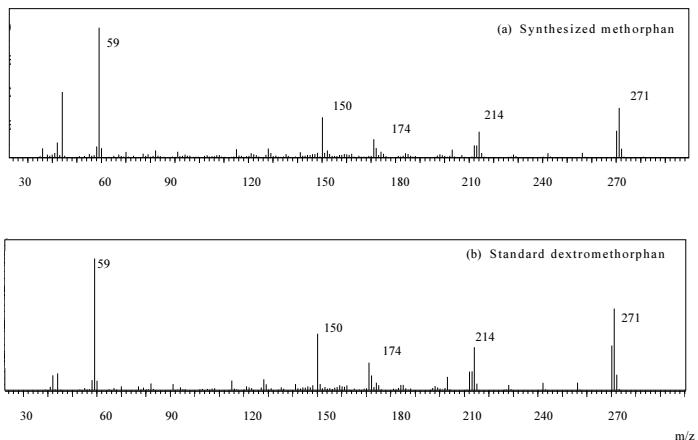


Fig. 3 EI/MS spectrum of methorphan at 9.9 min. (a) synthesized methorphan (b) standard dextromethorphan

3.2 メトルファンの光学異性体の分離条件の検討

3.2.1 移動相に添加剤を用いない分離条件の検討

予備実験の段階で標準のデキストロメトルファンを分析しそのピーク形状を確認したところ、カラムCEL1及びAMY1はCEL2に比べピークがテーリングする場合が多かった。そこで、CEL2を主に用いて、2.2.2(1)の測定条件で合成したラセメトルファンの分離を試みたが、いずれの測定条件においてもラセメトルファンを分離できなかった。今回用いた3種類のカラムに関しては、移

動相に添加剤を用いない分離条件でのラセメトルファンの分離は困難と考えられる。

3.2.2 移動相に添加剤を用いた分離条件の検討

次に 2.2.2 (2)の条件で分離を試みた。Table 2 の Method No. 16～19 の分離条件は、カラムの製造元である Waters 社が推奨している TreFoil™ SFC キラル分析法開発に基づく分離条件であるが、いずれの条件でもラセメトルファンの光学異性体を分離できなかつた。De Klerck ら⁶によると、多くの医薬品に用いられる化合物は、酸性基及び塩基性基の両方又はいずれか一方を有するため、固定相のシリカ基材と強すぎる相互作用を示すことがあり、その結果、溶出しないか、又は歪んだピーク形状で溶出することがあるとし、塩基性物質の分析には、アミン系の添加剤を使用することでこのような相互作用を抑制することができる。メトルファンはアミン系の塩基性化合物であることから、この報告に基づき移動相にアミン系添加剤である TEA を移動相(B)である MeOH に加えた条件で分析を行い、得られた質量電荷比 m/z 272 (メトルファンのプロトン付加体) のマスクロマトグラムの一例を Fig.4 に、検出された主要な 2 本のピークの UV スペクトルを Fig.5 にそれぞれ示す。

マスクロマトグラムの主要な 2 本のピークは同程度の大きさであり、2 本のピークの UV スペクトルは一致していた。また、保持時間 3.0 分のピークは標準のデキストロメトルファンと保持時間が一致していることから、これら 2 本のピークはラセメトルファンが光学異性体分離したものであり、保持時間 3.0 分のピークがデキストロメトルファン、保持時間 3.3 分のピークがレボメトルファンであると考えられる。

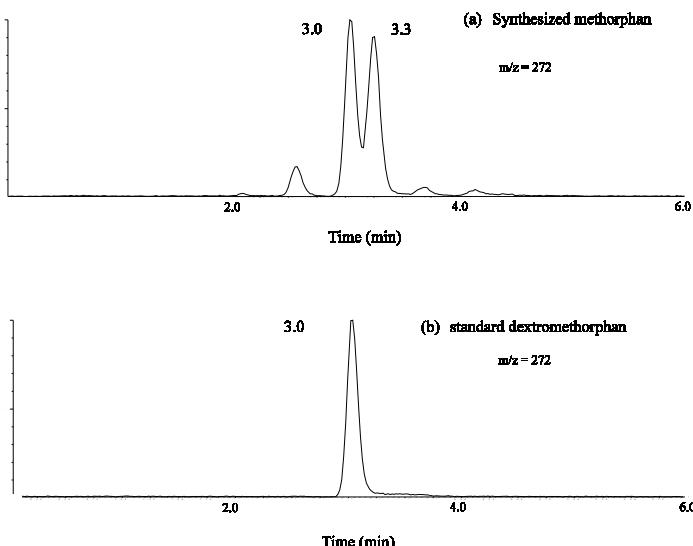


Fig. 4 SFC-MS chromatograms (m/z = 272) of (a) Synthesized methorphan and (b) standard dextromethorphan under the conditions of, column CEL2; column temperature 40 °C; back pressure 2000 psi; mobile phase: CO₂: 0.2% TEA in MeOH (75%: 25%).

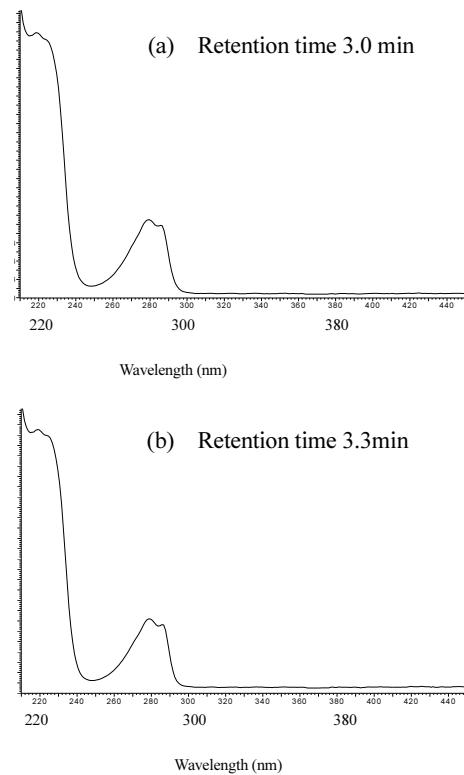


Fig. 5 UV spectra of synthesized methorphan. (a) Retention time 3.0 min and (b) Retention time 3.3 min.

3.2.3 移動相に TEA を用いた分離の最適条件の検討

TEA を用いることによってラセメトルファンの光学異性体分離できたが、より良好な分離を実現するために移動相(B)中の TEA の添加濃度、カラムの種類及び移動相(B)に用いる有機溶媒の種類及び比率を Table 2 の Method No. 20～45 に示すように変えて検討した。

TEA の添加濃度を 0.01%から 0.1%まで濃くした場合、保持時間は短くなり、ピーク形状がシャープになったが、更に 0.3%まで濃くしても、保持時間及びピーク形状にさほど大きな影響はみられなかった。従って今回用いたカラムでは 0.2%を最適な TEA の添加濃度とした。

移動相(B)の比率を低くした場合、光学異性体の分離は改善されるが、保持時間は長くなり、ピークがプロードになる傾向があつた。

カラムについては、AMY1 を用いると分離・ピーク形状が最も良好であった。

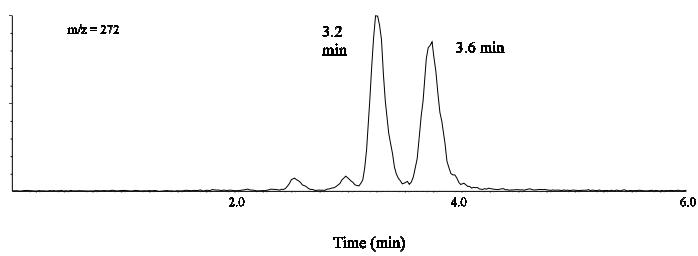
移動相(B)に MeOH と ACN の混合溶媒を用いた場合が、分離・ピーク形状が良好となった。Table 2 Method No.20～45 に示した条件は全てメトルファンの光学異性体分離が可能であり、これらの条件で検出されたレボメトルファン及びデキストロメトルファンの保持時間を Table 3 に示す。今回検討した条件の中で、最も分離が良好な条件は Table 4 に示す条件であり、その条件で得られるマスクロマトグラムを Fig.6 に示す。

Table 3 Comparison of retention time of dextromethorphan and levomethorphan (compatible with Table 2 Method No.)

| Method | retention time (min) | |
|--------|----------------------|----------------|
| No. | dextromethorphan | levomethorphan |
| 20 | 2.1 | 2.3 |
| 21 | 5.0 | 5.6 |
| 22 | 1.4 | 1.6 |
| 23 | 5.3 | 5.9 |
| 24 | 3.4 | 3.9 |
| 25 | 5.2 | 5.7 |
| 26 | 1.9 | 2.1 |
| 27 | 4.5 | 5.0 |
| 28 | 1.3 | 1.5 |
| 29 | 4.5 | 5.0 |
| 30 | 4.8 | 5.2 |
| 31 | 1.8 | 2.3 |
| 32 | 4.2 | 4.8 |
| 33 | 1.2 | 1.4 |
| 34 | 4.2 | 4.6 |
| 35 | 3.0 | 3.3 |
| 36 | 4.5 | 4.8 |
| 37 | 1.9 | 2.0 |
| 38 | 4.3 | 4.8 |
| 39 | 1.3 | 1.4 |
| 40 | 4.3 | 4.8 |
| 41 | 4.7 | 5.0 |
| 42 | 3.2 | 3.6 |
| 43 | 1.7 | 1.8 |
| 44 | 4.7 | 4.4 |
| 45 | 2.4 | 2.3 |

Table 4 The measurement method of the best separation of levomethorphan and dextromethorphan in this research

| Mobile phase (B) | (A):(B) | Column | Column temperature (°C) | Flow rate (ml/min) | Back pressure (psi) |
|-------------------------------------|---------|--------|-------------------------|--------------------|---------------------|
| (MeOH : ACN = 1 : 1 + 0.2 % TEA) | 90 : 10 | AMY1 | 40 | 2.2 | 2,000 |

Fig. 6 SFC-MS chromatograms ($m/z = 272$) of synthesized methorphan under the conditions of, column AMY1, mobile phase: CO_2 : 0.2% TEA in MeOH/ACN (50/50, v/v) (90% : 10%).

3.3 今後の課題

今回は SFC によるメトルファンの光学異性体の分離に着目し検討を行ったが、実際の鑑定分析では、複数成分からなる風邪薬または薬物の一成分としてメトルファンが含有されている場合が多く、純粋なメトルファンを分析することはほとんどない。したがって、実際の鑑定分析ではメトルファンと共存成分を分離する必要があるが、SFC による分析は HPLC に比べ測定時間も短いため複数の成分が同一の保持時間に検出されてしまう可能性がある。今後は共存成分の影響を含めてメトルファンの光学異性体の分離を検討する必要がある。

4. 要 約

本研究では、SFC で移動相に TEA を添加した移動相を使用することでデキストロメトルファンとレボメトルファンの分離を短時間で行うことができた。

今回検討した中で最もデキストロメトルファンとレボメトルファンの分離が良好であったのはカラムに AMY1 を用いて、移動相に MeOH と ACN の混合溶媒を使用した Table 4 に示した条件であった。

また、添加剤を用いない場合についても条件検討を行ったがラセメトルファンの光学異性体分離できなかった。

文 献

- 1) Lulia Demian: *Chirality*, **5**, 238 (1993).
- 2) Anthony A., Robert J. W.: *J Chromatogr Sci.*, **31**, 502 (1993).
- 3) Li L. : *Forensic Chemistry*, **2**, 82 (2016)
- 4) 宮澤 賢一郎 : 生物工学会誌 第88巻 P513 (2010)
- 5) 河嶋優美, 倉嶋直樹, 渥美貴博, 池田勝, 笹谷隆 : 関税中央分析所報, **46**, 35 (2006).
- 6) De Klerck K., Mangelings D., Vander Heyden Y. : *J Pharm Biomed Anal*, **69**, 77 (2012)