

超臨界流体クロマトグラフィー質量分析法による メタンフェタミンの光学異性体の分離（第 2 報）

野澤 和也*, 丹 佑太*, 安藤 利典*, 儘田 博志*, 三輪 洋一*

Separation of methamphetamine enantiomers using Supercritical Fluid Chromatography / Mass Spectrometry (Second Report)

NOZAWA Kazuya*, TAN Yuta*, ANDO Toshinori*, MAMADA Hiroshi* and MIWA Yoichi*

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

It is important to find the ratio of methamphetamine enantiomers by chiral analysis because it is deeply related to its raw materials and degree of purification. In previous study, we found the good condition to separate methamphetamine enantiomers using supercritical fluid chromatography / mass spectrometry (SFC/MS). However, the detection sensitivity under these conditions was found to be lower than that of the conventional method (HPLC/PDA). In this study, we reconsidered analytical conditions to improve detection sensitivity. Good peak intensities and peak separations were achieved using a column with Amylose tris (3-chloro-5-methylphenylcarbamate) as the chiral selector, and the co-solvent comprised of ethanol and cyclohexylamine with the ratio of 500:1. Other analytical conditions were also considered, and it was confirmed that the detection sensitivity of this method is superior to that of the conventional method.

1. 緒 言

関税中央分析所（以下、「当所」という。）では、2007 年から覚醒剤プロファイル分析を行っている。覚醒剤プロファイル分析は、税関が押収した覚醒剤の科学的特徴の分析を行い、過去に分析した覚醒剤の分析結果と比較・照合することにより、密輸ルート の 解明や他の事件との関連性の有無等、犯則事件の調査に資する情報を得ることを目的としており、現在、当所では、安定同位体比質量分析、純度分析、光学異性体分析及び不純物分析の 4 つの分析を行っている。

覚醒剤の 1 種であるメタンフェタミンには、右旋性（d 体）及び左旋性（l 体）の 2 つの光学異性体がある。麻黄から抽出して得られたエフェドリン類（エフェドリン及びブソイドエフェドリン）や糖蜜発酵で得られたエフェドリン類から合成されたメタンフェタミンは右旋性のみであり、化学合成により得られたエフェドリン類やフェニルアセトンから合成されたメタンフェタミンは通常ラセミ体（dl 体）となる。一般に、左旋性のメタンフェタミンは右旋性の 10 分の 1 ほどの効力しかもたないと言われている¹⁾ため、ラセミ体のメタンフェタミンはその効力を高めるために通常

は光学分割を行って右旋性のものを選択的に得ており、左旋性はその残渣であると考えられる。このようなことから、メタンフェタミンの光学異性体の割合は、原料や精製度に密接に関係しているため、光学異性体分析により d 体及び l 体の存在割合を明らかにすることは重要である。

当所ではこれまで、キラルカラムを用いた高速液体クロマトグラフフォトダイオードアレイ検出器を用いた分析法（HPLC/PDA）（以下、「従来法」という。）によりメタンフェタミンの光学異性体分析を行ってきた。しかし、この分析法は強力な酸化剤である過塩素酸ナトリウムを多量に用いる必要があり、カラムの安定化や測定後のカラムの洗浄にかなりの時間を要するなどの問題がある。この解決策として第 1 報²⁾では、カラムの安定化や測定後のカラムの洗浄が短時間でできる超臨界流体クロマトグラフィー質量分析法（SFC/MS）（以下、「新法」という。）に着目した。超臨界流体クロマトグラフィーは、移動相に共溶媒として各種有機溶媒を混合した超臨界流体二酸化炭素を使用することが一般的であるため、第 1 報ではこの共溶媒の検討を行い、右旋性と左旋性メタンフェタミンのピークの分離に成功した。しかし、第 1 報の条件は従来法と比較して検出感度が低いことが判明した。検出感度が低いと、試料中に僅かに含有される左旋性メタンフェタミンを検出できない可能性があり、メタンフェタミンの原料を正しく推定できないおそれがある。

本研究では、検出感度の向上を目的に新法の分析条件の再検討を行い、決定した分析条件における新法の分析能力を確認したので報告する。

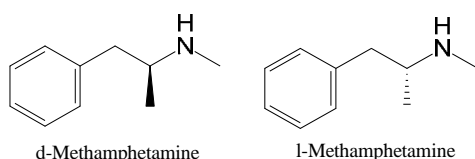


Fig.1 Methamphetamine enantiomers

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

ヒロポン (メタンフェタミン塩酸塩, 右旋性) (大日本製薬株式会社製)

メタンフェタミン塩酸塩 (右旋性, 当所保有)

メタンフェタミン塩酸塩 (左旋性, 当所保有)

2.1.2 試薬

メタノール, エタノール, 2-プロパノール, ギ酸 (いずれも富士フィルム和光純薬株式会社製, 高速液体クロマトグラフ用)

シクロヘキシルアミン (富士フィルム和光純薬株式会社製, 和光特級)

過塩素酸ナトリウム一水和物 (富士フィルム和光純薬株式会社製, 試薬特級)

2.2 分析装置及び測定条件

2.2.1 HPLC-PDA

装置 : Prominence UFLC (株式会社島津製作所製)

カラム : Chiral CD-Ph (150 mm×2.0 mm I.D., 粒子径 5 µm, 株式会社資生堂製)

カラム温度 : 30 °C

移動相 : 0.5 M 過塩素酸ナトリウム水溶液:エタノール=1:2

移動相流速 : 0.2 mL/min

注入量 : 1 µL

検出器 : フォトダイオードアレイ検出器

検出波長 : 210 nm

2.2.2 SFC-MS

2.2.2 (1) キラルカラムの検討

装置 : 超臨界流体クロマトグラフ ACQUITY UPC² (Waters Corporation 製)

カラム : ① CHIRALPAK[®] IA-3/SFC (以下, 「IA-3」という.)

② CHIRALPAK[®] IC-3/SFC (以下, 「IC-3」という.)

③ CHIRALPAK[®] IE-3/SFC (以下, 「IE-3」という.)

④ CHIRALPAK[®] IG-3/SFC (以下, 「IG-3」という.)

(いずれも 150 mm×3.0 mm I.D., 粒子径 3 µm, 株式会社ダイセル製)

カラム温度 : 40 °C

移動相 : (A) 超臨界流体二酸化炭素

(B) ① エタノール:シクロヘキシルアミン=200:1

② 2-プロパノール:シクロヘキシルアミン=200:1

(A): (B) =95:5

移動相流速 : 2.0 mL/min

ABPR 圧力 : 2000 psi (1 psi≒6894.76 Pa)

メイクアップ溶媒 : メタノール:ギ酸=100:1

メイクアップ溶媒流速 : 0.5 mL/min

注入量 : 1 µL

検出器 : 四重極飛行時間型質量分析計 Xevo G2-XS QTof (Waters Corporation 製)

検出器条件

イオン化法 : ESI 法 (ポジティブモード)

キャピラリー電圧 : 2.5 kV

ソース温度 : 120 °C

脱溶媒ガス : N₂ ガス (800 L/h, 400 °C)

測定モード : MSMS モード

ブリカーサーイオン : *m/z* 150

コリジョン電圧 : 6 V

2.2.2 (2) 共溶媒の検討

移動相 : (A) 超臨界流体二酸化炭素

(B) ① エタノール:シクロヘキシルアミン=100:1

② エタノール:シクロヘキシルアミン=200:1

③ エタノール:シクロヘキシルアミン=500:1

④ 2-プロパノール:シクロヘキシルアミン=100:1

⑤ 2-プロパノール:シクロヘキシルアミン=200:1

⑥ 2-プロパノール:シクロヘキシルアミン=500:1

(A): (B) =95:5

カラム : IG-3

その他の条件については 2.2.2 (1) と同様.

2.2.2 (3) カラム温度の検討

カラム温度 : 40 °C, 30 °C 又は 20 °C

カラム : IG-3

移動相 : (A) 超臨界流体二酸化炭素

(B) エタノール:シクロヘキシルアミン=500:1

(A): (B) =95:5

その他の条件については 2.2.2 (1) と同様.

2.2.2 (4) ABPR 圧力の検討

ABPR 圧力 : 2000 psi 又は 2500 psi

カラム : IG-3

移動相 : (A) 超臨界流体二酸化炭素

(B) エタノール:シクロヘキシルアミン=500:1

(A): (B) =95:5

その他の条件については 2.2.2 (1) と同様.

2.2.2 (5) コリジョン電圧及び解析条件の検討

コリジョン電圧 : 6 V, 8 V, 10 V, 12 V, 14 V, 16 V 又は 18 V

カラム : IG-3

移動相 : (A) 超臨界流体二酸化炭素

(B) エタノール:シクロヘキシルアミン=500:1

(A): (B) =95:5

ABPR 圧力 : 2500 psi

その他の条件については 2.2.2 (1) と同様.

2.2.2 (6) 定量性、検出限界及び定量下限並びに右旋性と左旋性の混合割合に係る分析精度の確認

カラム : IG-3
 移動相 : (A) 超臨界流体二酸化炭素
 (B) エタノール:シクロヘキシルアミン=
 500:1
 (A): (B) =95:5

ABPR 圧力 : 2500 psi

コリジョン電圧 : 16 V

その他の条件については 2.2.2 (1) と同様.

なお、測定データの解析は m/z 91.055 \pm 0.025 の抽出イオンクロマトグラムにより行った.

2.3 実験方法

2.3.1 測定条件の検討

右旋性メタンフェタミン塩酸塩及び左旋性メタンフェタミン塩酸塩約 10 mg をそれぞれ超純水 20 mL に溶解した. 調製した両水溶液 50 μ L を混合し, エタノール 900 μ L を加えたものを分析試料とし, 2.2.2 (1) ~ 2.2.2 (5) の各条件で測定を行った.

2.3.2 定量性の確認

ヒロポン及び左旋性メタンフェタミン塩酸塩 50 mg をそれぞれ 50 mL メスフラスコに精秤し, 超純水:エタノール=1:19 溶液 (以下, 「SFC 用希釈液」という.) で定容した. 調製した両溶液をそれぞれ SFC 用希釈液で希釈し, 濃度が 20 μ g/mL, 40 μ g/mL, 60 μ g/mL, 80 μ g/mL 及び 100 μ g/mL となるよう調製したものを検量線作成用試料溶液とした. これらを 2.2.2 (6) の条件でそれぞれ 5 回測定し, メタンフェタミン塩酸塩の濃度及びピーク面積の平均値から検量線を作成した.

2.3.3 検出限界及び定量下限の確認

2.3.3 (1) 従来法の検出限界及び定量下限の確認

ヒロポン及び左旋性メタンフェタミン塩酸塩 5 mg をそれぞれ 100 mL メスフラスコに精秤し, 超純水で定容した. 調製した両水溶液をそれぞれ超純水で希釈し, 濃度が 0.5 μ g/mL となるよう調製したものを従来法の検出限界及び定量下限確認用試料とした. これらを 2.2.1 の条件でそれぞれ 10 回測定し, ピーク面積の標準偏差から農林水産省のガイドライン³⁾を参考に検出限界及び定量下限を求めた.

2.3.3 (2) 新法の検出限界及び定量下限の確認

2.3.2 で調製したヒロポン及び左旋性メタンフェタミン塩酸塩の 1 mg/mL 溶液をそれぞれ SFC 用希釈液で希釈し, 濃度が 0.4 μ g/mL となるよう調製したものを新法の検出限界及び定量下限確認用試料とした. これらを 2.2.2 (6) の条件でそれぞれ 10 回測定し, 2.3.3 (1) と同様に検出限界及び定量下限を求めた.

2.3.4 右旋性と左旋性の混合割合に係る分析精度の確認

ヒロポン及び左旋性メタンフェタミン塩酸塩 50 mg をそれぞれ 25 mL メスフラスコに精秤し, 超純水で定容した. 調製した両水溶液 5 mL をそれぞれ 100 mL メスフラスコに採り, エタノールで定容して濃度が 100 μ g/mL となるよう調製した. この両溶液をそれぞれ Table 1 に示す割合で混合し, 各混合割合につき 3 検体ずつ

調製したものを右旋性と左旋性の混合割合に係る分析精度の確認用試料とした. これらについて 2.2.2 (6) の条件で各検体につき 3 回測定し, 右旋性と左旋性のピーク面積比が試料の混合割合と一致するか確認を行った.

Table 1 Preparation of solutions with various ratios of methamphetamine enantiomers

Proportion of d- and l-Methamphetamine in the prepared solution (%)		Amount of 100 μ g/mL Methamphetamine solution (μ L)	
d-form	l-form	d-form	l-form
0.5	99.5	5	995
1	99	10	990
5	95	50	950
10	90	100	900
25	75	250	750
50	50	500	500
75	25	750	250
90	10	900	100
95	5	950	50
99	1	990	10
99.5	0.5	995	5

3. 結果及び考察

3.1 測定条件の検討

3.1.1 キラルカラムの検討

第 1 報では, 不斉識別剤としてアミロース誘導体を用いられているキラルカラムを用い, 共溶媒をエタノール:シクロヘキシルアミン=200:1 とした場合に, 右旋性と左旋性のピークの分離に成功した. また, Segawa らは, 同じく不斉識別剤としてアミロース誘導体を用いられているキラルカラム (第 1 報のカラムとは異なるカラム) を用い, 共溶媒をシクロヘキシルアミン含有 2-プロパノールとした場合に良好な分離が得られたと報告している⁴⁾.

以上より, メタンフェタミンの光学異性体の分離にアミロース誘導体のキラルカラムを用いる場合は, 共溶媒としてエタノール又は 2-プロパノール, 共溶媒に添加する塩基としてシクロヘキシルアミンを用いると, 分離が達成される可能性が高いと考えられる. したがって, 本研究で 3 種類のアミロース誘導体キラルカラム (IA-3, IE-3 及び IG-3) の検討を行う際の共溶媒は, シクロヘキシルアミンを添加したエタノール又は 2-プロパノールを用いることとした. また本研究では, 不斉識別剤としてセルロース誘導体を用いられているキラルカラム (IC-3) についても同時に検討を行った.

なお, 本研究で用いた 4 種類のキラルカラムは不斉識別剤が以下のように異なる.

IA-3: アミロース トリス (3,5-ジメチルフェニルカルバメート)

IC-3: セルロース トリス (3,5-ジクロロフェニルカルバメート)

IE-3: アミロース トリス (3,5-ジクロロフェニルカルバメート)

IG-3: アミロース トリス (3-クロロ-5-メチルフェニルカルバメート)

2.2.2 (1)の条件で測定を行った結果, カラム IA-3 及び IE-3 を使用した場合はいずれも, 右旋性と左旋性のピークは分離しなかった。

カラム IC-3 を使用した場合, 共溶媒がエタノール:シクロヘキシルアミン=200:1 のときは右旋性と左旋性のピークが分離しなかったが, 共溶媒が2-プロパノール:シクロヘキシルアミン=200:1 のときは Fig.2 (a)に示すようにピークが分離した。

カラム IG-3 を使用した場合は, 共溶媒がエタノール:シクロヘキシルアミン=200:1 及び 2-プロパノール:シクロヘキシルアミン=200:1 のいずれの場合においても Fig.2 (b)及び(c)に示すようにピークが分離した。

カラム IG-3 を使用した場合はいずれも, カラム IC-3 を使用し共溶媒が 2-プロパノール:シクロヘキシルアミン=200:1 の場合と比べてピークの分離が良好であることから, 使用するカラムは IG-3 を選定した。

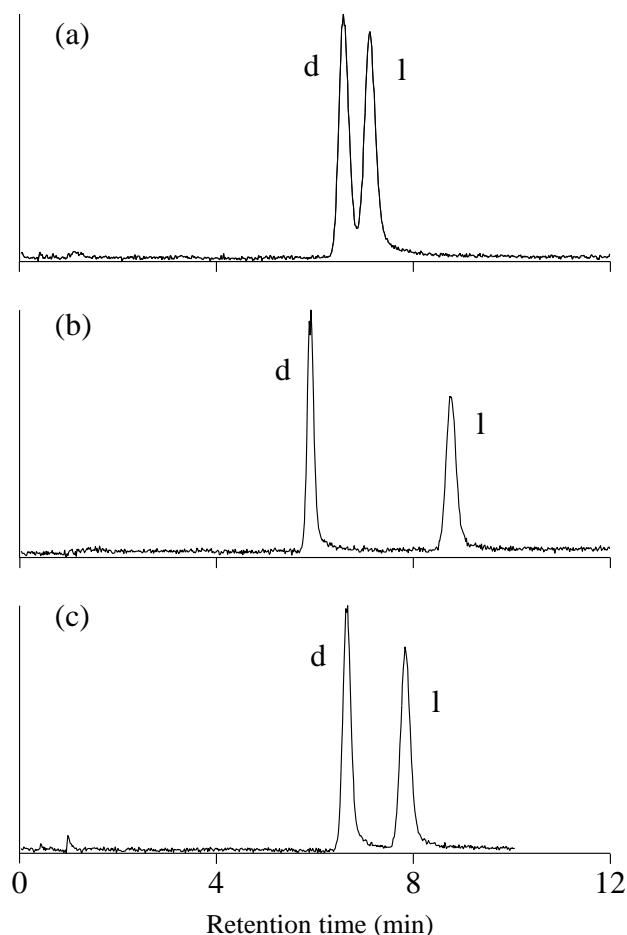


Fig.2 Chromatograms of mixed solution with d- and l-Methamphetamine.

- (a) column: IC-3; co-solvent: 2-propanol/cyclohexylamine (200/1),
 (b) column: IG-3; co-solvent: ethanol/cyclohexylamine (200/1) and
 (c) column: IG-3; co-solvent: 2-propanol/cyclohexylamine (200/1).

3.1.2 共溶媒の検討

2.2.2 (2)の条件で測定を行った結果を Fig.3 に示す. 共溶媒にエタノール:シクロヘキシルアミン=500:1 を用いた場合, ピーク強度, ピーク分離がともに良好であったことから, 使用する共溶媒はエタノール:シクロヘキシルアミン=500:1 に決定した. なお, エタノール及び 2-プロパノールいずれを用いた場合においても, シクロヘキシルアミンの割合が大きいほどピーク強度が小さい傾向が見られた. 本条件では ESI のポジティブモードで試料をイオン化しており, 塩基であるシクロヘキシルアミンの割合が大きくなることで, イオン化が抑制されたためであると考えられる。

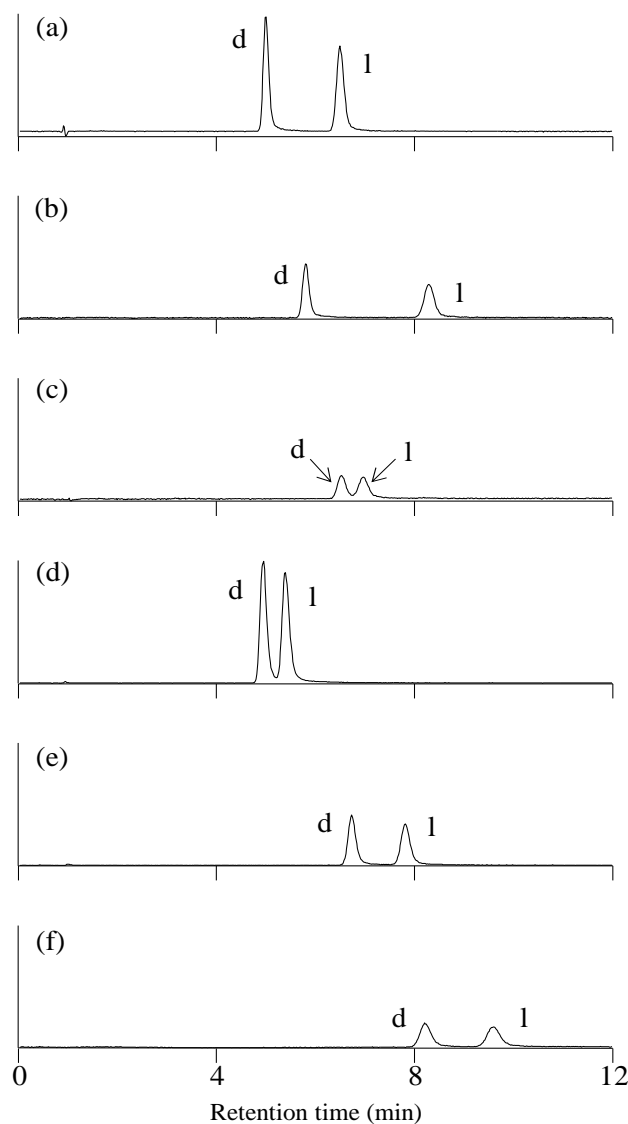


Fig.3 Chromatograms of mixed solution with d- and l-Methamphetamine. Co-solvent: (a) ethanol /cyclohexylamine (500/1), (b) ethanol /cyclohexylamine (200/1), (c) ethanol /cyclohexylamine (100/1), (d) 2-propanol /cyclohexylamine (500/1), (e) 2-propanol /cyclohexylamine (200/1) and (f) 2-propanol /cyclohexylamine (100/1).

3.1.3 カラム温度の検討

2.2.2 (3)の条件で測定を行った結果を Fig.4 に示す。カラム温度が 30℃ の場合に最もピークの分離が良好であったが、40℃ の場合と比べてピーク強度の低下が見られた。カラム温度 40℃ の場合においてもピークは十分に分離されていることから、カラム温度は、検出感度を優先してピーク強度が最も大きい 40℃ に決定した。

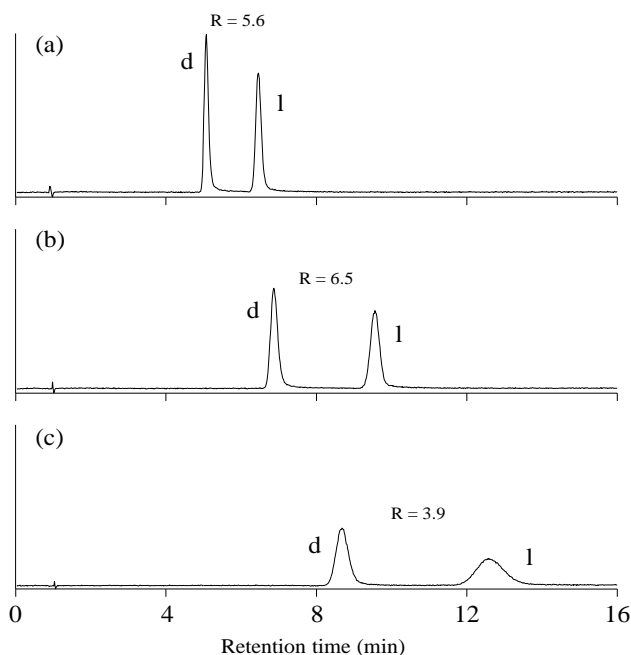


Fig.4 Chromatograms of mixed solution with d- and l-Methamphetamine (R: resolution). Column temperature: (a) 40℃, (b) 30℃ and (c) 20℃.

3.1.4 ABPR 圧力の検討

2.2.2 (4)の条件で測定を行った結果、ABPR 圧力（二酸化炭素の超臨界状態を保つために負荷する背圧）が 2500 psi の場合は 2000 psi の場合と比較してピークが強く検出されたため、ABPR 圧力は 2500 psi に決定した。

3.1.5 コリジョン電圧及び解析条件の検討

第 1 報では、TIC クロマトグラムを用いて解析を行っていた。TIC クロマトグラムは、検出器から得られたすべての m/z 値の信号の合計を時間に対してプロットしたもので、定性分析に適しているが、クロマトグラムのノイズが大きいという欠点がある。そこで、特定の m/z 値の信号を各マススペクトルから抽出し、時間に対してプロットする抽出イオンクロマトグラム (EIC) を用いることを検討した。その際、メタンフェタミン分子に不活性ガスを衝突させて分子を壊し、生成されたフラグメントイオンのうち特定のフラグメントイオンを選択して抽出イオンクロマトグラムを描くことで、より夾雑成分の影響を受けにくく、クロマトグラムのノイズを抑えた分析が可能となる。2.2.2 (5)の条件で測定を行うことで適切なコリジョン電圧及び抽出するフラグメントイオンの m/z 値の検討を行った。

コリジョン電圧を 6 V から 2 V ずつ上げていくと、メタンフェ

タミンの水素付加体のピークである m/z 150 のピーク強度が小さくなり、代わりに m/z 91 のピーク強度が大きくなっていったため、抽出するフラグメントイオンの m/z 値は 91 を選択することとした。また、 m/z 91 のピーク強度はコリジョン電圧 16 V の時に最大となったため、コリジョン電圧は 16 V に決定した。コリジョン電圧が 6 V 及び 16 V の場合のマススペクトルを Fig.5 に示す。

m/z 91 のピークは $[C_6H_5CH_2]^+$ である⁵⁾ことから、 m/z 値の理論値は 91.055 である。抽出するフラグメントイオンの m/z 値の範囲を狭くすることにより、クロマトグラムのノイズをより抑えることができるため、 m/z 値の範囲は 91.055 ± 0.025 と決定した。決定した分析条件における測定結果を Fig.6 に示す。

以上の検討結果より、以降の分析には 2.2.2 (6)の条件を用いることとした。

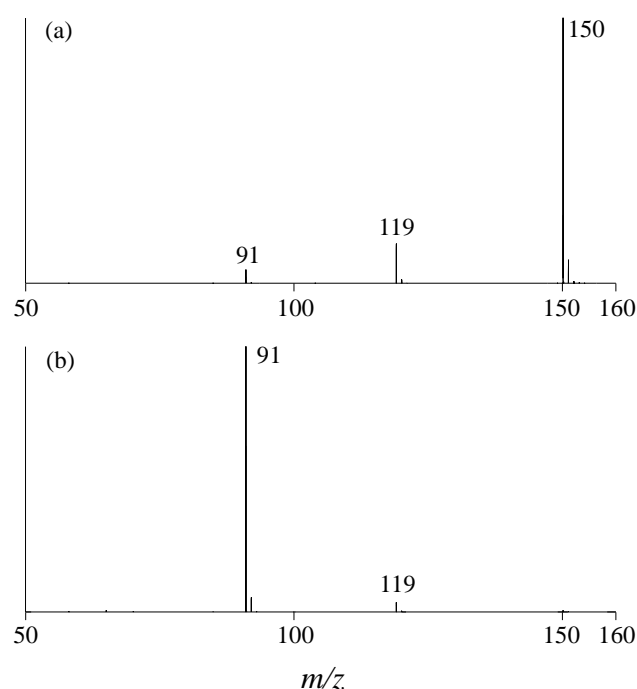


Fig.5 Mass spectra of Methamphetamine at a collision energy of (a) 6 V and (b) 16 V.

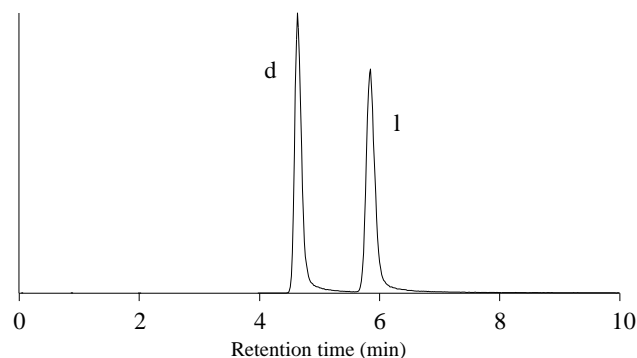


Fig.6 Chromatograms of mixed solution with d- and l-Methamphetamine at the determined analytical conditions.

3.2 定量性の確認

2.3.2の実験を行い検量線を作成した結果、検量線の決定係数は右旋性、左旋性いずれも $R^2 > 0.9998$ となり、良好な直線性を示した。

3.3 検出限界及び定量下限の確認

2.3.3の実験を行った結果を Table 2 に示す。この結果、新法における検出限界及び定量下限は従来法より小さい値となったことから、検出感度の向上が確認された。

Table 2 Comparison of LOD and LOQ between conventional method and new method

		d-Methamphetamine	l-Methamphetamine
LOD † (µg/mL)	Conventional method		
	(HPLC/PDA)	0.073	0.119
	New method		
	(SFC/MS)	0.058	0.071
LOQ ‡ (µg/mL)	Conventional method		
	(HPLC/PDA)	0.221	0.360
	New method		
	(SFC/MS)	0.176	0.217

† LOD: Limit of Detection

‡ LOQ: Limit of Quantitation

3.4 右旋性と左旋性の混合割合に係る分析精度の確認

2.3.4の実験を行った結果を Table 3 に示す。この結果、右旋性と左旋性のピーク面積比から、右旋性と左旋性の混合割合を±0.5%の精度で求めることが可能であった。

Table 3 Confirmation of analytical accuracy for mixing ratio of d- and l-Methamphetamine by SFC/MS (n=9)

Proportion of d- and l-Methamphetamine in the prepared solution (%)		Calculated proportion of d- and l-Methamphetamine by SFC/MS (%)		Absolute error
d-form	l-form	d-form	l-form	
0.5	99.5	0.6	99.4	0.1
1	99	1.1	98.9	0.1
5	95	5.2	94.8	0.2
10	90	10.5	89.5	0.5
25	75	24.6	75.4	0.4
50	50	50.0	50.0	< 0.05
75	25	75.2	24.8	0.2
90	10	89.6	10.4	0.4
95	5	95.0	5.0	< 0.05
99	1	99.1	0.9	0.1
99.5	0.5	99.6	0.4	0.1

4. 要 約

本研究では、第1報からの検出感度向上を目的に、超臨界流体クロマトグラフィー質量分析法 (SFC/MS) の分析条件を再検討した。不斉識別剤としてアミロース トリス (3-クロロ-5-メチルフェニルカルバメート) が用いられているカラムを用い、共溶媒をエタノール:シクロヘキシルアミン=500:1 とした場合に、ピーク強度及び右旋性と左旋性のピークの分離が良好となった。そのほか詳細な条件の検討、解析条件の検討を行い、決定した分析条件における新法の検出限界及び定量下限を求めたところ従来法より小さい値となり、検出感度の向上が確認できた。定量性においても良好な結果が得られ、右旋性と左旋性のピーク面積比から、右旋性と左旋性の混合割合を±0.5%の精度で求めることが可能であった。

文 献

- 1) 依存性薬物情報研究班: “覚せい剤 (AMPHETAMINES)”, P.6 (1988), (厚生省薬務局麻薬課)
- 2) 佐々木良祐, 松下孝也, 柴田正志: 関税中央分析所報, **59**, 57 (2019)
- 3) 農林水産省, 分析法の妥当性確認に関するガイドライン (2019.10)
- 4) Hiroki Segawa, Yuko T. Iwata, Tadashi Yamamuro, Kenji Kuwayama, Kenji Tsujikawa, Tatsuyuki Kanamori, Hiroyuki Inoue: *Forensic Toxicology*, **37**, 145 (2019)
- 5) Munehiro Katagi, Michiaki Tatsuno, Akihiro Miki, Mayumi Nishikawa, Hitoshi Tsuchihashi: *Journal of Analytical Toxicology*, **24**, 354 (2000)