

資 料

キャピラリー電気泳動による Cathine 及びその異性体の光学分割検出

古 賀 哲*

Separation of cathine and its stereoisomers by capillary electrophoresis

Satoshi KOGA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

Iwase 531, Matsudo, Chiba 271-0076 JAPAN

A simple separation method for the simultaneous determination of four stereoisomers of phenylpropanolamines ((±)-norephedrine, cathine and (-)-norpseudoephedrine) by capillary electrophoresis was developed. A buffer solution that contained 50 mM-Tris and 40 mM-2, 6-Di-O-methyl- α -cyclodextrin and adjusted to pH 2.4 with phosphoric acid solution was found to be the most suitable for this separation. Identification of cathine controlled by law enforcement could be easily determined.

1. 緒 言

キャピラリー電気泳動による分析技術は、微量の分析試料で且つ高感度に検出できることから幅広い分野で使用されている。特に DNA 関連の研究室や光学異性体分離の必要な薬物分析で応用され、数多くの報告がなされている¹⁾²⁾³⁾。

これら数多くの報告の中から、この技術を取り入れ、特に税関分析で問題となる Cathine (麻薬, 向精神薬取締法別表第三第十一号, 麻薬, 向精神薬及び麻薬向精神薬原料を指定する政令第二条五十四号) の鑑定分析に摘要できるか調査する必要がある。

Cathine とは、上記法令に記載されている「トレオ - ニ - アミノ - - フェニルプロパン - - - オール (左旋性をものを除く) 及びその塩類」であるが、「トレオ」光学異性体として二種類、「エリトロ」光学異性体として二種類の全四種類の立体異性体が存在しており、この四種類中 1 つだけが法律上規制対象となっている (Fig. 1 参照)。

税関分析においては、光学異性体分割能を有するキャピラリーカラムを使用したガスクロマトグラフ分析、同能力を有し且つ検出器を備えた高速液体クロマトグラフ分析など³⁾⁴⁾⁵⁾が考えられるが、標準物質の入手、分析対象成分が微量であること、検出感度等の検討課題の克服が必要で、分析方法及び手段として実用化されるレベルには到達していただきたいのが現状である。

今回、Cathine 及びその立体異性体を用い、極微量で正確な異

性体分割同定が可能となる迅速分析方法を検討したので報告する。

2. 実 験

2. 1 試 料

Cathine HCl: 厚生省から譲渡されたもの
NorephedrineHCl: アルドリッチ社 (ラセミ体混合物)
(1R, 2S)-(-)-NorephedrineHCl; 和光純薬 1 級
(1R, 2S)-(+)-NorephedrineHCl; 和光純薬 1 級
(1R, 2R)-(-)-NorpseudoephedrineHCl; アルドリッチ社

2. 2 試 薬

Tris [Tris (hydroxymethyl)aminomethane]; 和光純薬特級
2, 6-Di-O-methyl- α -cyclodextrin; 和光純薬 生化学用
リン酸: 和光純薬特級 (85%)

2. 3 装置及び測定条件

キャピラリー電気泳動装置: Waters Quanta 4000 E
Millenium™2010 Chromatography manager
使用キャピラリー: 75 μ m I.D. \times 50 cm (全長 65 cm)
電気泳動条件: 25KV (定電圧), 15 (キャピラリー恒温槽
温度)

検 出: UV 214nm

試料注入法: 電気泳動注入 5KV, 3秒又は1秒

試料溶液濃度: 約 0.5 mg / ml \cdot Buffer

*大蔵省関税中央分析所 〒271-0076 千葉県松戸市岩瀬 531

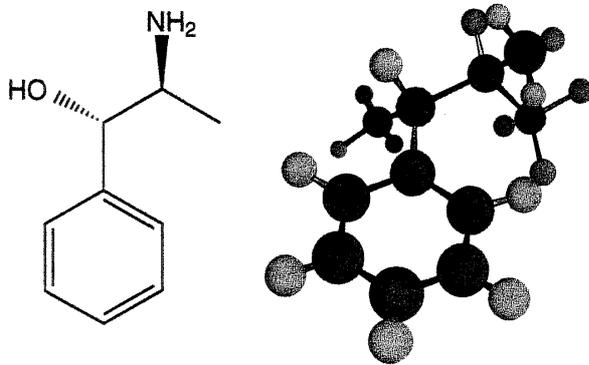
泳動バッファー：50mM-Tris · H₃PO₄ , 40mM-2, 6-Di-O-methyl-
-cyclodextrin (pH = 2.4)
(50mM-Tris 及び 40mM-2, 6-Di-O-methyl-
-cyclodextrin になるように約 80ml の水に溶解し
て水で 100ml とし, 85%リン酸数滴で pH を 2.4

に調整する)
または, Tris 濃度を 25mM にしたもの
泳動バッファーは, 調整後 0.45 μm のフィル
ターを通したあと脱気したものを使用。
赤外分光光度計: Nicolet FT-IR Magna 760

Norpseudoephedrine.

(+)-Norpseudoephedrine

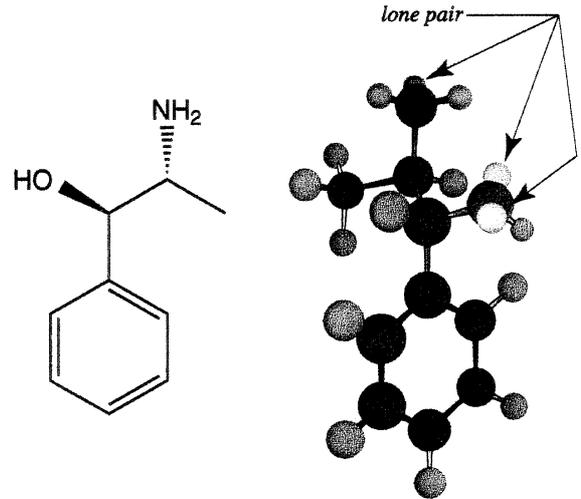
threo-(+)-2-amino-1-hydroxy-1-phenylpropane.
...Cathine.



(S,S) - form

(-)-Norpseudoephedrine

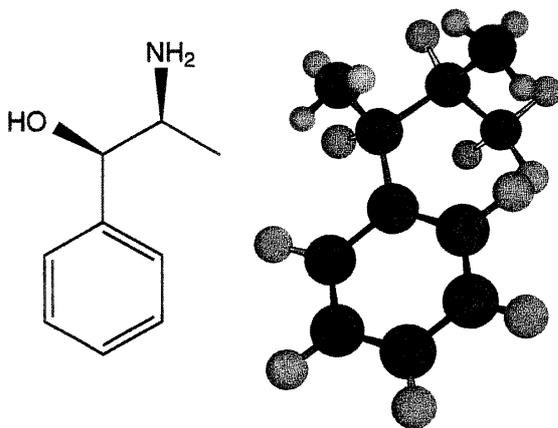
threo-(*-*)-2-amino-1-hydroxy-1-phenylpropane.



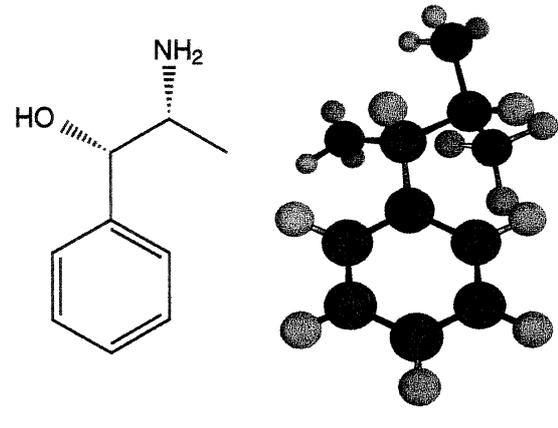
(R,R) - form

Norephedrine.

(R*, S*)-(±)-α-(1-aminoethyl)benzenemethanol.
erythro-2-amino-1-phenyl-1-propanol.



(1S,2R)-(+)-Norephedrine



(1R,2S)-(-)-Norephedrine

Fig.1 Structures of phenylpropanolamines^{1) 2) 3)}

高速液体クロマトグラフ : HP1100 (施光度検出器 ShodexOR-
2 使用)

3. 使用及び考察

3.1 鑑定用麻薬 Cathine HCl の評価

3.1.1 赤外吸収スペクトル

Cathine HCl について、まずこの鑑定用麻薬が妥当であるかを評価するために、税関分析として有効な分析項目を予備実験として行った。試料は精製等を行わず直接分析に使用した。

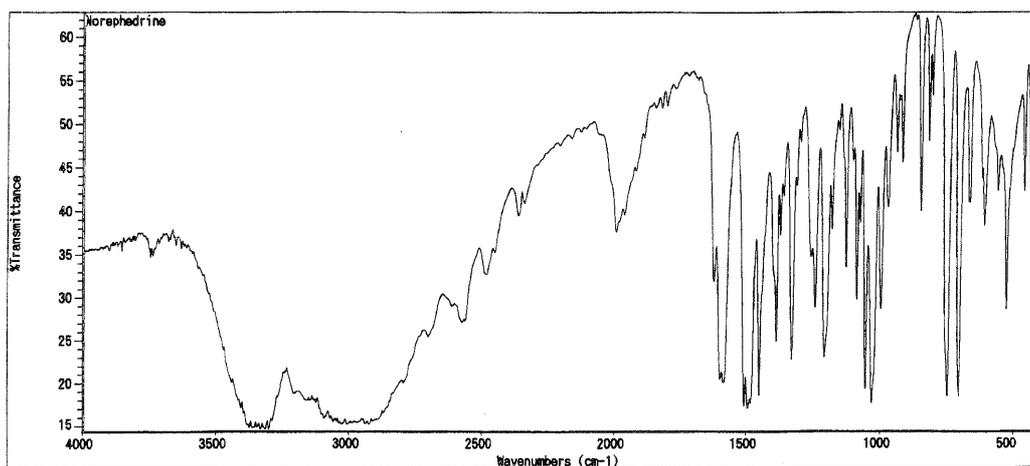


Fig.2 Infra-red spectrum of "DL-Norephedrine HCl"

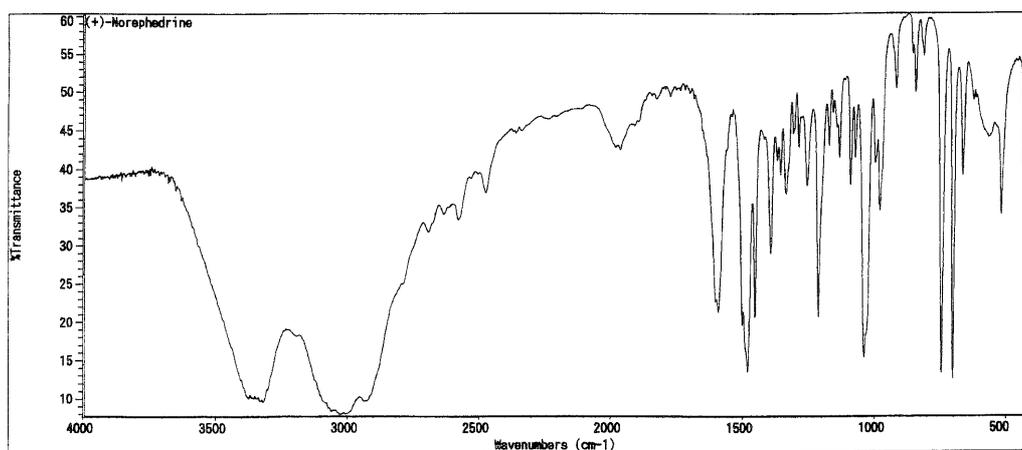


Fig.3 Infra-red spectrum of "(1S, 2R)-(+)-Norephedrine HCl"

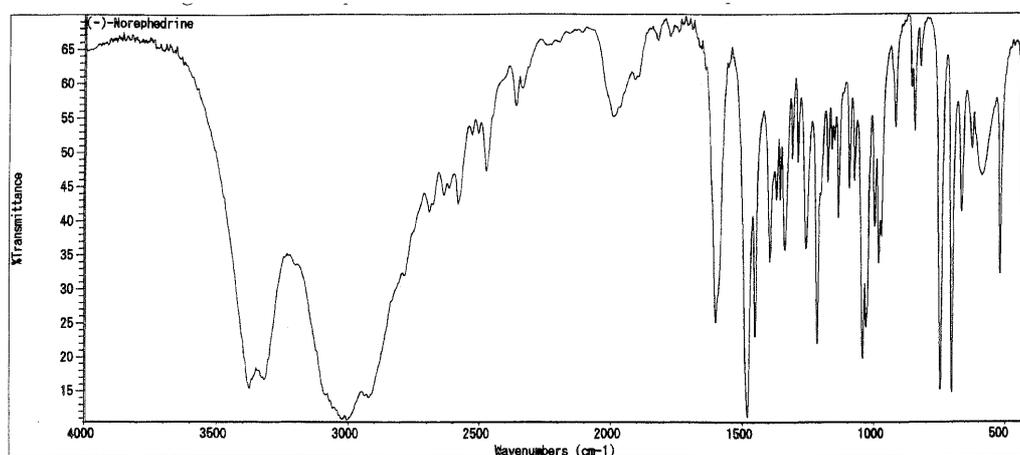


Fig.4 Infra-red spectrum of "(1R, 2S)-(-)-Norephedrine HCl"

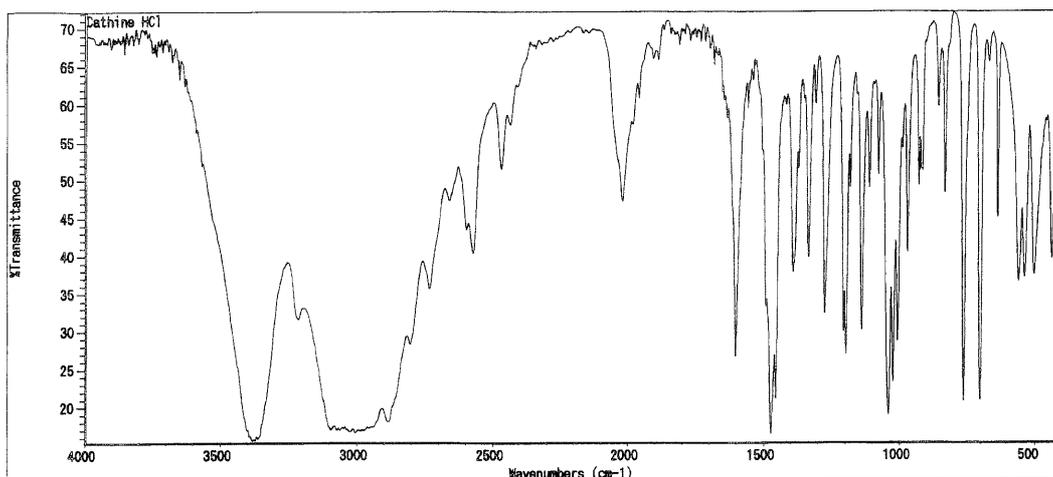


Fig.5 Infra-red spectrum of "Cathine HCl"

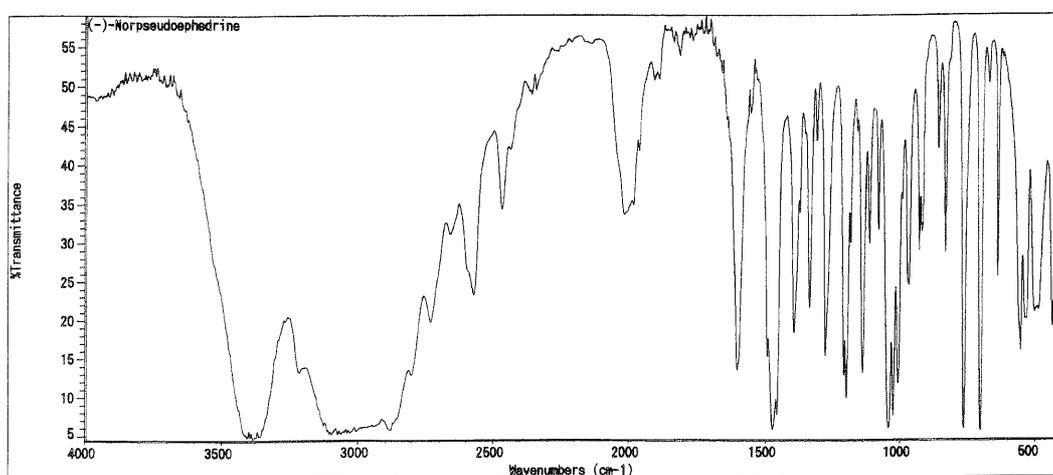


Fig.6 Infra-red spectrum of "(1R, 2R)-(-)-Norpseudoephedrine HCl"

これらの物性など（溶解性試験，融点，呈色試験等）は省略し，赤外吸収スペクトル測定の結果を次に示す。

Norephedrine HCl（ラセミ体混合物），(1R,2S)-(-)-Norephedrine HCl 及び(1R,2S)-(+)-Norephedrine HCl が Fig. 2 ~ 4，(1R,2S)-(-)-Norpseudoephedrine HCl のものが Fig. 5 及び 6 である。

赤外吸収スペクトルの結果からは，Norephedrine 類と Norpseudoephedrine 類の区別鑑定（Fig. 2 ~ 4 のものと Fig. 5 及び 6）はこの手段で可能であり，Cathine HCl と(1R,2S)-(-)-Norpseudoephedrine HCl は同一の吸収が得られることから別の方法で鑑定が必要である。

3.1.2 高速液体クロマトグラフィー

3.1.1 で鑑定が難しい Cathine HCl と(1R,2S)-(-)-Norpseudoephedrine HCl について，旋光度検出器を用いた高速液体クロマトグラフ分析を行った Cathine は右旋性，(1R,2S)-(-)-Norpseudoephedrine は左旋性を示すクロマトグラムが得られた。

赤外吸収スペクトルの結果と併せると，今回入手した Cathine HCl は鑑定用麻薬として妥当であると認められる。

3.2 キャピラリー電気泳動

光学分割に使用されるキャピラリー電気泳動用バッファー添加剤として，シクロデキストリン（特に タイプ）が一般的になっている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。しかし，シクロデキストリンは水に溶けにくく，この他に尿素やアルコールを添加して溶解性を上げたバッファーの使用例が多く，これら添加量の要素をすべて満足させる方法を探し出すのは容易ではない。また，バッファー調製の個人差等を考慮すると，できるだけ簡単な組成の方法¹⁰⁾を調査するのが近道と考え，水によく溶けるシクロデキストリン誘導体を使用することでバッファー調製を行った。2・3に示す条件で電気泳動を行った結果は次の通りである。

Norephedrine (DL-) のエレクトロフェログラムを Fig. 7 に，Cathine 及び(1R,2S)-(-)-Norpseudoephedrine 混合物のそれを Fig. 8 に，Norephedrine 及び(1R,2S)-(-)-Norpseudoephedrine 混合物のそれを Fig. 9 に，Norephedrine，Cathine 及び(1R,2S)-(-)-Norpseudoephedrine 混合物のそれを Fig. 10 及び 11 に示す。

Norephedrine の(1R,2S)-(-)-及び(1R,2S)-(+)-光学異性分割，Cathine である(+)-Norpseudoephedrine 及

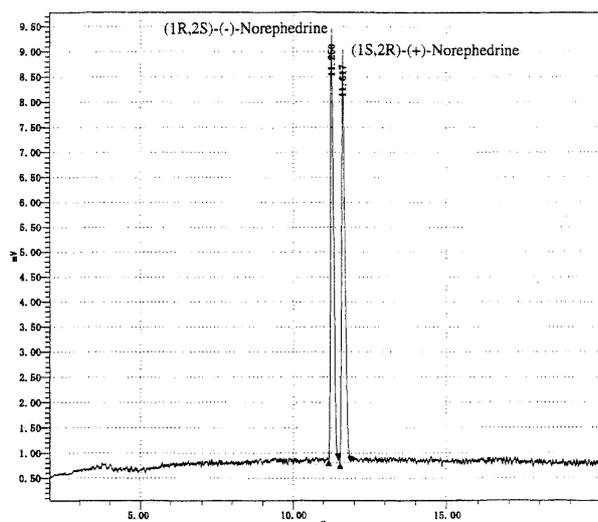


Fig.7 Chiral separation at 214nm of DL-Norephedrine with 40mM-2, 6 Di-O-methyl- β -CD in 50 mM Tris \cdot HO₃PO₄ buffer (pH 2.4) in a 65 cm (50 cm length to detector) \times 75 μ m capillary at 15 with avoltage of 25 KV. Electromigration inject method ; 5 KV, 3 sec.

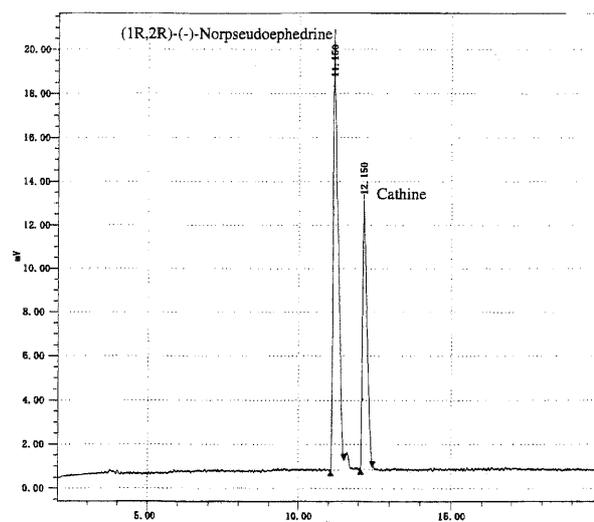


Fig.8 Chiral separation of Cathine and (-)-Norpseudoephedrine. Conditions as Fig.7

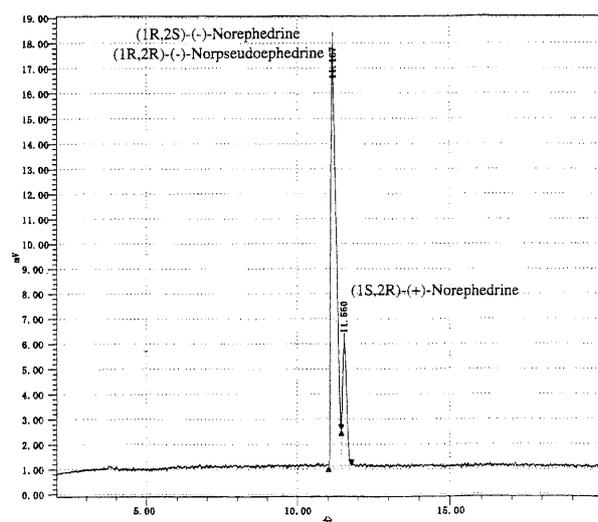


Fig.9 Separation of a mixture of DL-Norephedrine and (-)-Norpseudo-ephedrine. Conditions as Fig.7

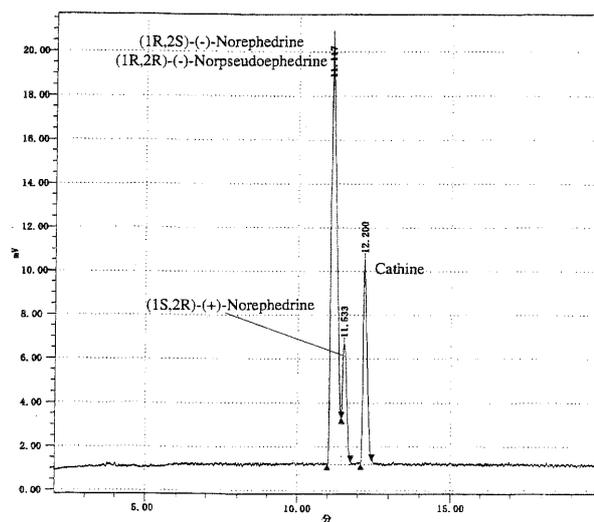


Fig.10 Separation of 4 stereoisomers of Phenylpropanolamines. Conditions as Fig.7

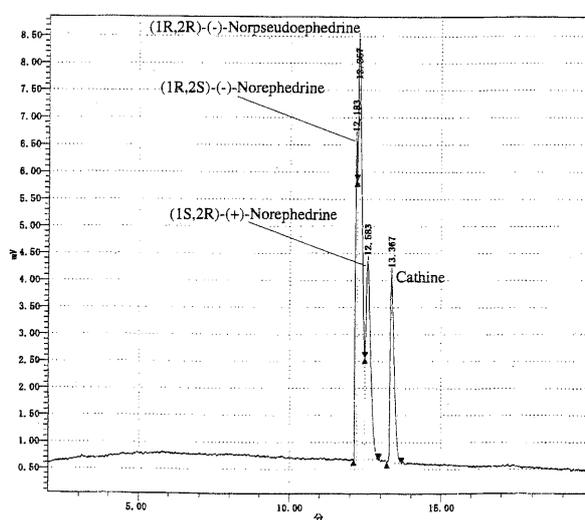


Fig.11 Separation of 4 stereoisomers of phenylpropanolamines. Conditions as Fig.7 except for injection time ; 1sec.

び(1R, 2R)-(-)-Norpseudoephedrine 光学異性分割は 100%達成され、簡単なバッファー組成で分離が可能であった。

Fig. 9 及び Fig10 の結果からは、(1R, 2R)-(-)-Norephedrine と(1R, 2R)-(-)-Norpseudoephedrine の分離が完全ではなかったが、唯一の向精神薬該当成分である Cathine の分離・同定に問題はなく、薬物鑑定に充分適用でき、四種類の光学分割については、Fig.11 に示すように、試料注入量の検討（または、注入溶液中の試料濃度）を行うことで分割できることが判明した。

バッファーの組成に際し、シクロデキストリン誘導体の濃度については、40mM 程度でほぼ光学分割の影響が 100%に達し、これ以上濃度を高くしても分離の改善はなかったことから、この濃度を採用した。併せてヨビーク形状を調査しながら、泳動条件及びキャピラリー槽温度の最適化も行い、泳動電圧 25KV、15 が分析時間及び再現性等を満足できる条件であった。

Tris 濃度は 50mM、25mM 及び 10mM について検討した

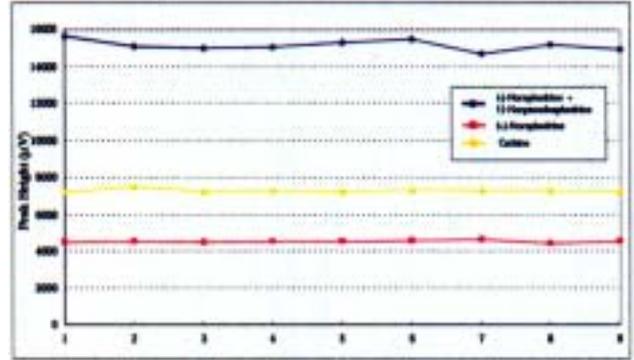


Fig.14 Variation of peak height of norephedrine alkaloids using a buffer solution of 50mM-Tris·H₃PO₄, 40mM-2, 6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin (pH 2.4) Injection mode; Electromigration injection at 5KV for 3 sec. The x-axis gives the number of replicate injections.

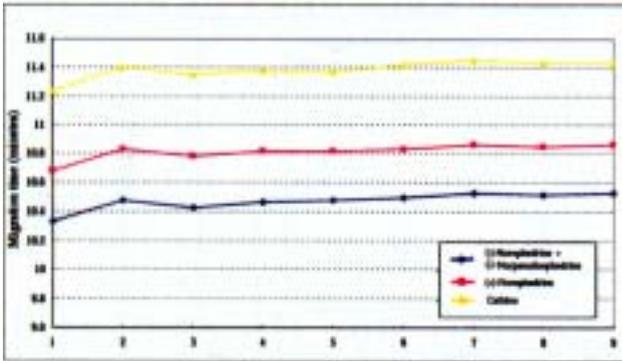


Fig.12 Variation of migration times of norephedrine alkaloids using a buffer solution of 50 mM-Tris·H₃PO₄, 40mM-2, 6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin(pH2.4).Injection mode; Electromigration injection at 5 KV for 3 sec. The x-axis gives the number of replicate injections.

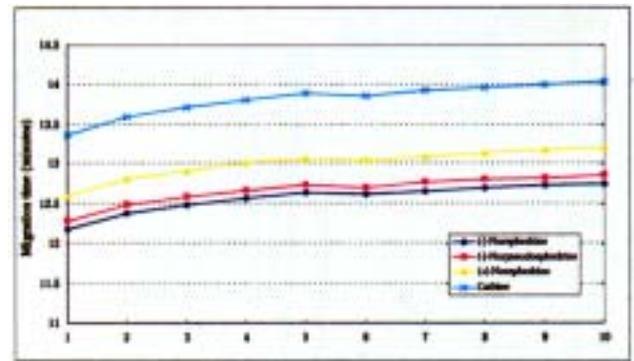


Fig.15 Variation of migration times of norephedrine alkaloids using a buffer solution of 50 mM-Tris·H₃PO₄, 40mM-2, 6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin (pH 2.4).Injection mode; Electromigration injection at 5 KV for 1 sec. The x-axis gives the number of replicate injections.

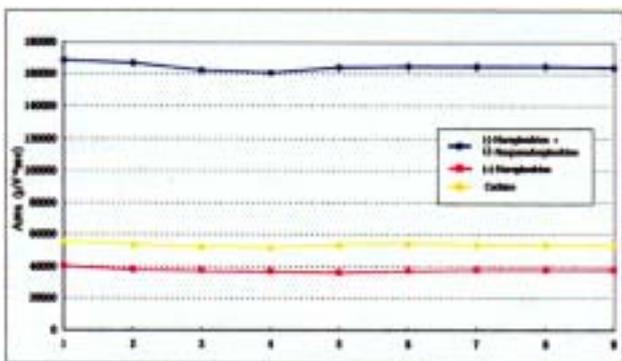


Fig.13 Variation of areas of norephedrine alkaloids using a buffer solution of 50mM-Tris·H₃PO₄, 40mM-2, 6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin (pH2.4) Injection mode; Electromigration injection at 5KV for 3 sec. The x-axis gives the number of replicate injections.

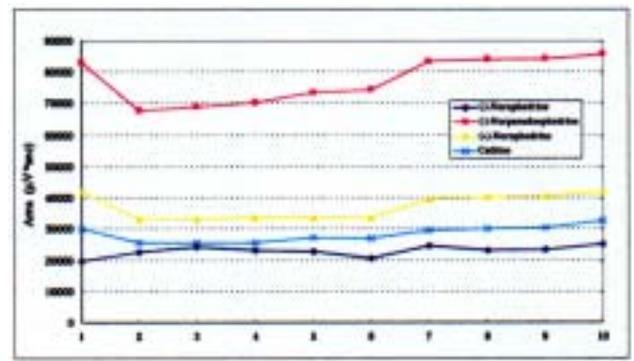


Fig.16 Variation of areas of norephedrine alkaloids using a buffer solution of 50mM-Tris·H₃PO₄, 40mM-2, 6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin (pH 2.4) Injection mode; Electromigration injection at 5KV for 1 sec. The x-axis gives the number of replicate injections.

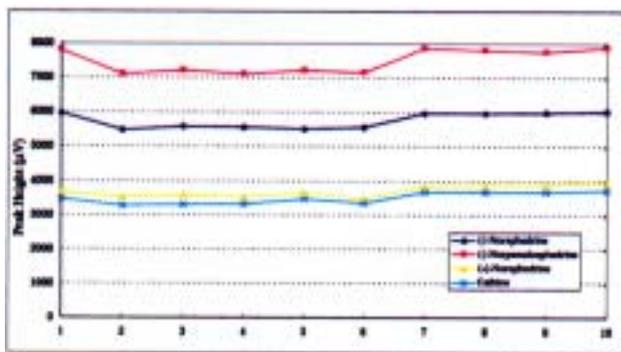


Fig.17 Variation of peak heights of norephedrine alkaloids using a buffer solution of 50mM-Tris·H₃PO₄, 40mM-2, 6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin (pH2.4)
Injection mode ; Electromigration injection at 5KV for 1 sec.
The x-axis gives the number of replicate injections.

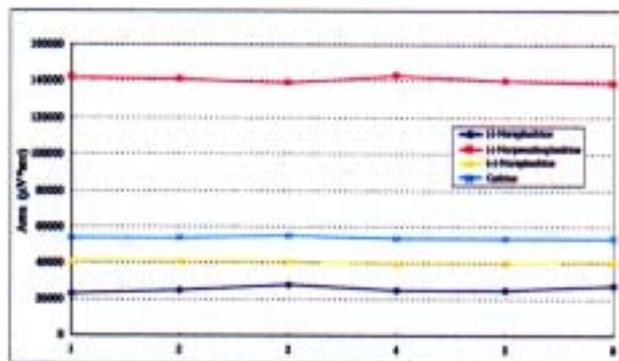


Fig.19 Variation of area of norephedrine alkaloids using a buffer solution of 25mM-Tris·H₃PO₄, 40mM-2, 6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin (pH 2.4)
Injection mode ; Electromigration injection at 5 KV for 1 sec.
The x-axis gives the number of replicate injections.

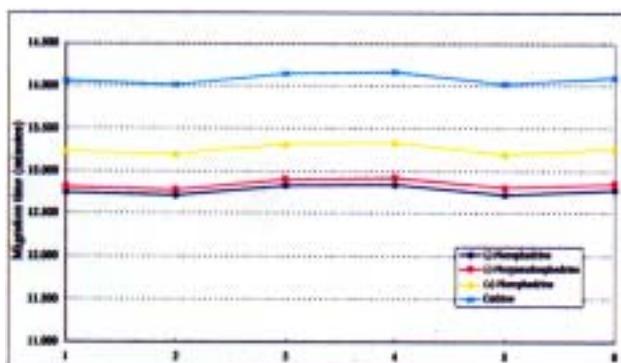


Fig.18 Variation of migration times of norephedrine alkaloids using a buffer solution of 25mM-Tris·H₃PO₄, 40mM-2, 6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin (pH 2.4).
Injection mode ; Electromigration injection at 5 KV for 1 sec.
The x-axis gives the number of replicate injections.

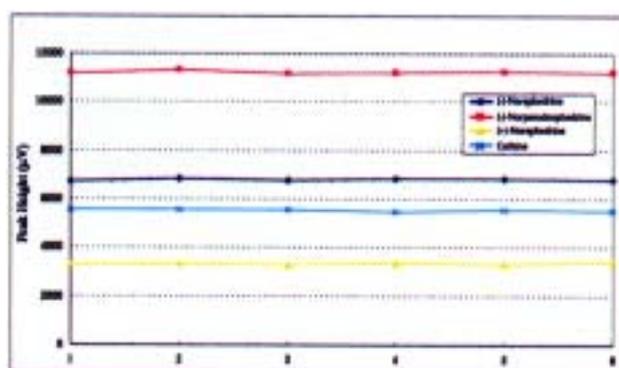


Fig.20 Variation of peak heights of norephedrine alkaloids using a buffer solution of 25mM-Tris·H₃PO₄, 40mM-2, 6-Di-O-methyl-β-cyclodextrin (pH 2.4)
Injection mode ; Electromigration injection at 5 KV for 1 sec.
The x-axis gives the number of replicate injections.

が、10mM では分離が良好でなく採用できない。50mM 及び 25mM の結果についてはほぼ同様となった。これらの結果について、注入回数に対するマイグレーションタイムの変化、計算面積変化、検出ピーク高さ変化の関係を Fig.12 ~ Fig.20 に示す。

これらの分析条件から、キャピラリー電気泳動装置を使用した場合、定性分析においては、試料注入量（成分の絶対量）をできるだけ少なくし、繰り返し分析を行ってマイグレーションタイムの変動が小さくなった時点を見極める必要がある。定量分析においては、繰り返し分析による目的成分の検出精度が良好な注入量を検討することが必要である。

今回の分析においては、定性分析的には良好な結果が得られ、Cathine の成分鑑定が可能であることが判明したしかし、定量分析においては、Cathine のみならずあらゆる目的成分において、試料溶液濃度や注入量などの検討が必要であることも示唆される。

キャピラリー電気泳動装置は、分析に供する試料溶液調製な

どの項目にも配慮しなければならない点を除けば、定性分析に関しては、極微量の分析対象試料に対し精度の良い結果を得ることができる。

4. 要 約

シクロデキストリン誘導体を用いたキャピラリー電気泳動法により、Cathine 及びその立体異性体 3 種類の分離・定性分析が可能である。分析に供する試料濃度やキャピラリー電気泳動に用いる注入量などの検討を行えば、定量分析にも適用できることが示唆される。

5. 謝 辞

高速液体クロマトグラフ測定に協力いただきました、長崎税関業務部分析部門樋野技官に感謝致します。

文 献

- 1) ELKS and GANELLIN : Dictionary of organic compounds ; chapman and Hall A-02547
- 2) Merck Index 11th Ed. 6634. 7279
- 3) Ira S. Lurie : J. Chromatogr. 605 269-275 (1992)
- 4) 朝長 洋祐, 廣瀬 達也, 葉山 良子, 氏原 覚 : 本誌, 31 141-147 (1992)
- 5) 小曾根 一欽, 松崎 隆一, 佐藤 重剛, 山崎 光廣, 古川 広 : 本誌, 36 27-35 (1997)
- 6) 柴庄 正志, 松本 啓嗣, 野口 大, 山崎 光廣, 印出 進 : 本誌, 37 13-31 (1998)
- 7) Ira SLurie : J. Chromatogr. 605 269-275 (1992)
- 8) Ying-Mei Liu and Shuenn-Jyi Sheu : J. Chromatogr. 600 370-372 (1992)
- 9) Changyu Quang and Morteza G. Khaledi : Anai Chem. 65 3354-3358 (1993)
- 10) 第2回キャピラリー電気泳動セミナー・テキスト (横河アナリティカルシステムズ株)