

報 文

覚醒剤のガスクロマトグラフ分析のための
オンカラムキラル誘導体化試薬の開発松下 亨^{®1}, 高津 正久¹, 吉田 雄一², 守安 正恭³

覚醒剤乱用を証明するために尿試料から覚醒剤の光学異性体をガスクロマトグラフ (GC) 法で検出するには, 光学活性カラムを用いて分離する方法とアンフェタミン (AP) 及びメタンフェタミン (MA) をジアステレオマーの形に誘導体化し, 汎用のカラムで分離する方法がある. いずれもルーティンワークである通常の覚醒剤分析に組み込むと, その作業能率を著しく低下させるものである. そこで著者らは, オンカラムで誘導体化反応を完結し, 汎用カラムで光学異性体の分離が可能になる試薬 MTPA-pyrazole を開発した. この試薬は, (+)- α -メトキシ- α -(トリフルオロメチル)フェニルアセチルクロライド (MTPA-Cl) に, ピラゾールを脱離基として結合させることにより合成された. この試薬を GC 用マイクロシリンジで最初に吸入し, 次いで覚醒剤抽出液を吸入し, これをそのまま GC に注入するだけで, インジェクションポート内で両者が反応してジアステレオマーとなり, 光学異性体の分離分析を可能にするものである. 本試薬を用いたオンカラム誘導体化法により, *d*-AP, *l*-AP, *d*-MA 及び *l*-MA それぞれの GC 注入液中濃度が 50 μ M から 2500 μ M の範囲で直線性を示した. また, 添加回収試験では若干ばらつきが認められたものの, 誘導体化反応の再現性は良好であり, 本試薬を用いることにより GC 注入液 1 μ L 中濃度で AP が 25 μ M 以上, MA が 50 μ M 以上であれば AP 及び MA の光学異性体を確認できることが明らかとなった.

1 緒 言

覚醒剤乱用の証明を目的とした尿試料からのアンフェタミン (AP) 及びメタンフェタミン (MA) の検出では, 光学異性体の識別を求められる場合がある. 国内で乱用される覚醒剤は *d*-MA¹⁾ であるが, 服用すると尿中に *l*-MA を排出させる特殊な医薬品が認可²⁾されているためである. *d* 体か *l* 体かを識別することにより, 被疑者が密売された覚醒剤を乱用したのか, 認可された医薬品を服用したのかを判断できる場合がある.

現在, 尿中覚醒剤分析の実務で覚醒剤光学異性体を分析するには, 光学的に活性なキラルカラムを用いて分離する方法と, 前処理で覚醒剤をジアステレオマーの形に誘導体化することにより, 汎用のカラムで分離する方法がある. ガスクロマトグラフィー/質量分析法 (GC/MS) の場合のカラム交換は, 真空解放から交換後の装置全体の安定まで数時間から 1 日が必要である. また, 誘導体化の前処理は, 試料 1 件ごとのインキュベート及び中和操作等が必

要であり, いずれの方法にしても, ルーティンワークに取り入れるには不向きである. なぜなら, 尿中覚醒剤分析では, 試料数が多いうえ試料尿は随時搬入され, その搬入から 2~3 時間以内で結果を求められるケースが多く, それぞれの試料ごとに複雑な前処理を追加することは可能な限り避けるのが望ましいからである.

著者らは, キラルカラム法や誘導体化法に替わる方法として, オンカラムキラル誘導体化法に着目した. オンカラムキラル誘導体化法は, 誘導体化試薬を覚醒剤抽出液と同時に GC に導入するだけでジアステレオマーへの誘導体化を行うことができる方法である. 本法を用いることで, キラルカラムへの交換や前処理が不要になり短時間で光学異性体の分析が可能となる.

キラル誘導体化反応に用いられる既存前処理試薬の大部分は, 酸クロライド基を持ち, 1, 2 級アミン類と結合してジアステレオマーを形成する. この反応の際に生成する塩酸がカラムを始めとする装置の劣化を引き起こすので, これらの試薬をそのままオンカラム誘導体化試薬として用いることは適当ではない. 前処理によるキラル誘導体化反応に用いられる *l*-N-(トリフルオロアセチル)プロリルクロライド (*l*-TPC) について, オンカラムキラル誘導体化と, 前処理による誘導体化を比較した Jürgen らの報告³⁾によると, オンカラム誘導体化は前処理誘導体化に比べて検出

¹ 兵庫県警察本部刑事部科学捜査研究所: 650-8510 兵庫県神戸市中央区下山手通 5-4-1

² 和光純薬工業株式会社試薬研究所: 350-1101 埼玉県川越市大字の場 1633

³ 神戸薬科大学生薬化学研究室: 658-8558 兵庫県神戸市東灘区本山北町 4-19-1

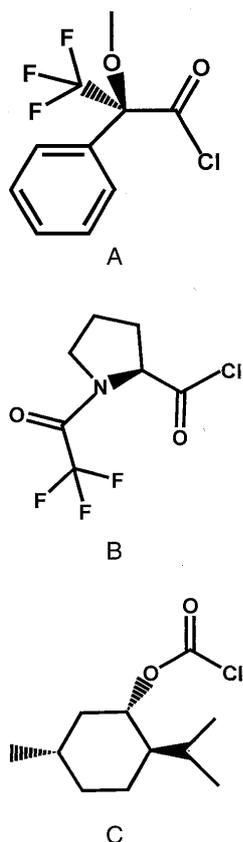


Fig. 1 Structures of conventional reagents

A: α -Methoxy- α -trifluoromethyl-phenylacetylchloride, B: N-(trifluoroacetyl)prolyl chloride, C: Menthyl chloroformate

下限値が約 20 倍 (AP) 及び 40 倍 (MA) 低感度であった。Jürgen らはその原因を、オンカラム法では AP 及び MA のごく一部しか *l*-TPC と反応しなかったためと推測している。そこで、本報告ではオンカラムで誘導体化反応が円滑に進み、GC 中で塩酸等の妨害物を発生しない新規なキラル誘導体化試薬の開発を試み、良好な結果を得たので報告する。

新規誘導体化試薬については、酸クロライドである既存誘導体化試薬のクロライドを他の化合物に置換することにより合成することとした。

2 実験

2.1 試薬

大日本住友製薬製の *d*-MA 塩酸塩 (ヒロポン[®])、厚生労働省より譲受した *l*-MA 塩酸塩、*d*-AP 硫酸塩及び *l*-AP 硫酸塩を用いた。

既存誘導体化試薬として、アルドリッチ製 (-)-メンチルクロロホルメート (MCF, 99%)、東京化成製 (+)- α -メトキシ- α -(トリフルオロメチル)フェニルアセチルクロライド (MTPA-Cl, 98% 以上)、Regis 製 *l*-N-(トリフルオロ

アセチル)プロリルクロライド 0.1 M クロロホルム溶液 (*l*-TPC, 0.1% *d*-isomer 含有) を用いた (Fig. 1)。

その他の試薬として、和光純薬製テトラヒドロフラン (安定剤不含; 脱水; 有機合成用)、クロロホルム (脱水; 有機合成用)、アルドリッチ製ピリジン (脱水; 99.8%)、和光純薬製テトラデカン (特級) 及び東京化成製オクタコサン (特級) を用いた。

2.2 GC/MS 分析条件

分析条件 1; Agilent technology 製 6890N ガスクロマトグラフ装置 + 5973N MSD 質量分析装置, カラム; HP-5MS (膜厚 0.25 μ m, 内径 0.25 mm, 長さ 30 m), キャリヤーガス; He (1 mL/min), カラム温度; 70°C で 1 分間保持した後, 毎分 20°C で 280°C まで昇温, 注入方法; スプリット (5:1), 注入口温度; 250°C, イオン化法 (電圧)・温度; 電子イオン化法 (70 eV)・230°C, 四重極温度; 150°C.

分析条件 2; 島津製 GC17A ガスクロマトグラフ装置 + QP5050A 質量分析装置, カラム; DB-5 MS (膜厚 0.25 μ m, 内径 0.25 mm, 長さ 30 m), キャリヤーガス; He (1 mL/min), カラム温度; 70°C で 1 分間保持した後, 毎分 20°C で 280°C まで昇温, 注入方法; スプリット (5:1), 注入口温度; 250°C, イオン化法 (電圧)・温度; 電子イオン化法 (70 eV)・250°C, 四重極温度; 100°C.

いずれの装置も注入口ライナーにグラスウールを適量充填したものを装着した。

2.3 合成方法

窒素雰囲気中でピラゾール 25 mg (0.5 mmol) をテトラヒドロフラン 0.5 mL (ピリジン 0.5 mmole 含有) に溶解し, 室温下で攪拌しながら MTPA-Cl 142 mg (0.5 mmol) を徐々に滴下した。析出したピリジン塩酸塩を濾別後, テトラヒドロフランを減圧留去, 得られた無色透明半固形物をクロロホルムに再溶解した。溶液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え激しく攪拌洗浄した後, 3000 回転で 10 分間遠心分離後, クロロホルム層を分取した。得られたクロロホルム溶液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後, クロロホルムを減圧留去, 1 夜減圧乾燥して無色結晶約 93.6 mg (収率: 66%) を得た。

Varian 製 VXR-500 を用いて ¹H NMR, ¹³C NMR 及び各種 2 次元 NMR 測定を行い, 日立製 M-4100 を用いて質量分析を行った。これらにより同定された構造式を Fig. 2 に示した。

¹H-NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 3.64 (3H, q, J = 1.5 Hz, -OCH₃), 6.33 (1H, dd, J = 3.0, 1.5 Hz, 4-H), 7.38 (3H, m, 3', 4', 5'-H), 7.53 (2H, m, 2', 6'-H), 7.66 (1H, d, J = 1.5 Hz, 3-H), 8.13 (1H, d, J = 3.0 Hz, 5-H).

質量分析理論値 (C₁₃H₁₁F₃N₂O₂); 284.0772, 実測値;

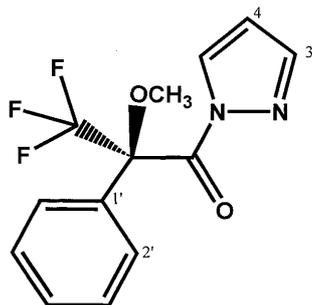


Fig. 2 Structure of the MTPA-pyrazole

284.0775.

2.4 オンカラム誘導体化

合成した誘導体化試薬の酢酸エチル又はクロロホルム溶液 1 μ L を GC 用マイクロシリンジに吸入し, 空気 3 μ L を吸入した後覚醒剤 (フリー) のヘキサン溶液 1 μ L を吸入し, これらを GC インジェクションに素早く注入した。

2.5 尿からの抽出方法

マイクロピペットを用いて試料尿 4 mL をマグネット攪拌子入りの平底試験管に採取し, 酢酸エチル 5 mL 及びリン酸緩衝液 (pH 10.0) 0.85 mL を加えて 90 秒間マグネチックスターラーで攪拌した。静置後, 酢酸エチル層 3.5 mL を新しい平底試験管に分取し, 塩酸 + メタノール (1 + 40) を 0.15 mL 添加後, ブロックヒーター上で 8 分間 70°C に加温しながら窒素を吹き付け溶媒留去した。以上の操作は島津製アトラスミニアーム K 型自動抽出装置を用いて行った。得られた乾固物を超純水 0.2 mL に溶解してスピッツ管に分取し, 28% アンモニア水 1 滴及びヘキサン 0.2 mL を加えボルテックスミキサーで 30 秒間攪拌後, 遠心分離 (750 回転, 3 分間) し, ヘキサン層を抽出液として得た。

3 結果と考察

3.1 最適な光学活性残基の検討

GC 用のキラル誘導体化試薬として報告されている MCF⁴⁾, *l*-TPC⁵⁾ 及び MTPA-Cl⁶⁾ について前処理誘導体化と GC/MS によりそれら試薬の分離性能を検討した。MCF については Hughes らの方法⁴⁾ で誘導体化した。*l*-TPC については雨宮らの方法⁵⁾ に準じたが, トリエチルアミン添加量を原液で 5 μ L に, *l*-TPC 添加量を 200 μ L に変更して誘導体化した。MTPA-Cl については Fallon らの方法⁶⁾ で誘導体化した。それぞれの誘導体を分析条件 1 で GC/MS を行うことにより分離性能を検討した。

MCF で誘導体化されたものについては, AP 及び MA 共に *d* 体, *l* 体が分離されなかった。GC の昇温速度を

3°C/min まで遅くすると, MA の *d* 体, *l* 体は分離されたものの AP は分離されなかった。*l*-TPC で誘導体化されたものについては, *d*-AP と *l*-AP 及び *d*-MA と *l*-MA のピーク分離度が 2.1 及び 1.8 と良好な分離を示した。しかし, 試薬に不純物として *d*-TPC が少量混入しているため, *l*-TPC で *l*-MA を誘導体化すると *l*-MA の *d*-TPC 誘導体化物のピークが出現する。このピークは *d*-MA の *l*-TPC 誘導体と保持時間が同じであるうえ, 両者のマススペクトルは区別できず, 光学純度 100% の *l*-MA を分析しても *d*-MA が混入した誤った結果を導くおそれがあり, 尿中覚醒剤分析を行うには不適當であった。MTPA-Cl で誘導体化されたものについては, *d*-AP と *l*-AP のピーク分離度は 2.1 と良好であり, *d*-MA と *l*-MA のピーク分離度も 1.4 と比較的良好であった。両者共に光学異性体の識別は十分可能であり, 不純物アイソマー由来のピークも出現せず, 尿中覚醒剤分析に適當であると考えられた。

以上の分離性能の検討から, 覚醒剤分離に最適と判断された MTPA-Cl を用い, これと適当な脱離基を組み合わせることにより新規誘導体化試薬の開発を試みた。

3.2 脱離基の検討

脱離基としては以下の化合物を検討した。

N-methyl-2-pyrrolidone, *N*-methylpyrrolidine, indole, 2,4-dinitrophenylhydrazine, *p*-nitrosophenol, α -nitroso- β -naphthol, dimethylglyoxime, 2-methyl-4(5)nitroimidazole, 2,2,2-trifluoroacetamide, pyrrole, acetamide, methylaminoacetonitrile, 3-pyrroline, 3-(trifluoromethyl)pyrazole, piperazine, 4-nitroimidazole, piperidine, pyrrolidine, hexamethyleneimine, *o*-toluidine, benzylamine, di-*n*-butylamine, *n*-propylamine, pyrazole, *N*-methylacetamide。

MTPA-Cl と脱離基を反応させ合成したもののうち, MTPA の imidazole 誘導体と *N*-methylacetamide 誘導体については, AP のみオンカラム誘導体化が可能であったが, MA とは反応しなかった。pyrazole 誘導体 (MTPA-pyrazole) は, AP の *d, l* 体及び MA の *d, l* 体とオンカラムで容易に誘導体を形成し, 良好な分離ピークを与えた。

分析条件 2 のオンカラム誘導体化で得られたトータルイオンクロマトグラムを Fig. 3 に示す。

3.3 試薬濃度の検討

オンカラム誘導体化を行うためには, AP 及び MA に対して過剰の誘導体化試薬を注入する必要がある。一方で, GC/MS への負担や分離性能の低下を軽減するためには, 試薬注入量はできるだけ少ないほうが望ましい。そこで, 十分な誘導体化率が得られる最適な試薬量について検討した。

MTPA-pyrazole 濃度を 0 ~ 20 (w/v)% (酢酸エチル溶液)

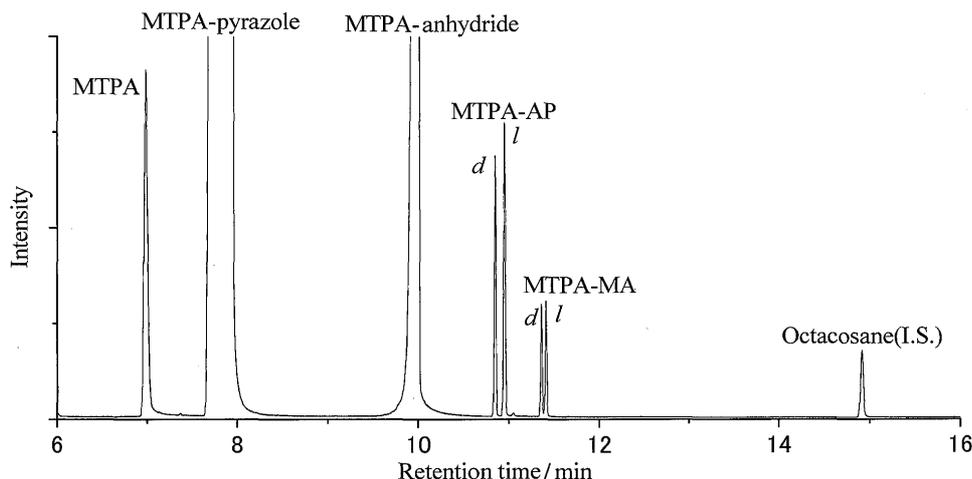


Fig. 3 Typical total ion chromatogram of *d,l*-AP and *d,l*-MA after on-column derivatization with MTPA-pyrazole

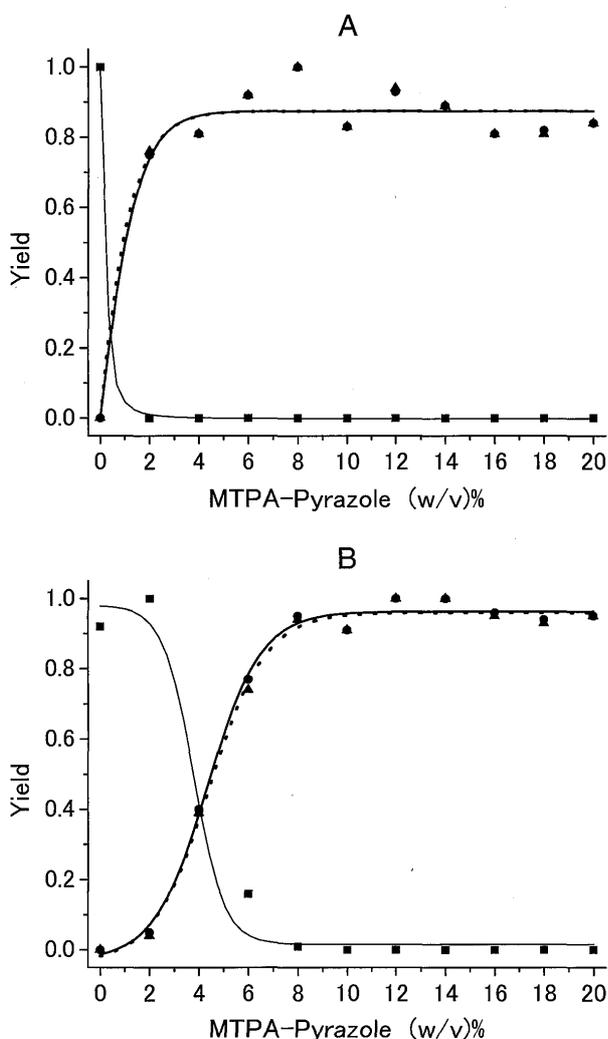


Fig. 4 Effect of concentration of MTPA-pyrazole on on-column derivatization yield

(A): AP, (B): MA; ●: MTPA derivatives of *d*-stimulants, ▲: MTPA derivatives of *l*-stimulants, ■: not derivatized stimulants

の範囲で変化させ、AP及びMAの誘導体化率の変化を求めた。*d*-AP、*l*-AP、*d*-MA、*l*-MA及び内部標準物質オクタコサン(C28)を各 $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ ずつ含有するヘキサン溶液を調製し、分析条件2でオンカラム誘導体化GC/MSを行い、得られたトータルイオンクロマトグラム中のMTPA-*d,l*-AP及びMTPA-*d,l*-MAの各光学異性体ピークとC28ピークとの面積比を求めた。同時に未反応のAP及びMAのピークとC28ピークとのピーク面積比も求めた。Fig. 4 (A)に示すように、*d,l*-APに対してはMTPA-pyrazole濃度が2(w/v)%以上で十分なAPの誘導体化率が得られ、未反応のAPピークも観察されなかった。また、Fig. 4 (B)に示すように、*d,l*-MAに対しては2(w/v)%ではわずかなMTPA-*d,l*-MAのピークが観察されるのみで、未反応のMAのピークも観察された。しかし、10(w/v)%以上で十分な誘導体化効率が得られ、未反応のMAのピークは観察されなくなった。未反応のAP及びMAのピークが観察されなくなったのに伴ってMTPA-*d,l*-AP及びMTPA-*d,l*-MAのピーク面積比の増加が止まり、副生物のピークも観察されなかったことより、AP及びMAはMTPA-pyrazole濃度2(w/v)%以上及び10(w/v)%以上で大部分が反応したと判断された。このことからAP及びMA混合物を誘導体化するためのMTPA-pyrazole濃度は10(w/v)%近傍が最適であることが分かった。

3.4 再現性の検討

d-AP、*l*-AP、*d*-MA及び*l*-MAのそれぞれの濃度が $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ のヘキサン溶液、覚醒剤乱用者3名の尿からの酢酸エチル抽出液及び $0.5\ \mu\text{g mL}^{-1}$ の*d*-MA水溶液から尿と同様に抽出された酢酸エチル抽出液を試料溶液として、分析条件2でオンカラムキラル誘導体化GC/MSを5回繰り返して行い、ピーク面積及びピーク高さの再現性を求め

Table 1 Reproducibility of on-column derivatization

Sample	Peak	Peak area ^{a)}		Peak height ^{a)}	
		Average	CV, %	Average	CV, %
<i>d</i> -AP, <i>l</i> -AP, <i>d</i> -MA, <i>l</i> -MA 100 µg mL ⁻¹ each hexan solution	MTPA- <i>d</i> -AP	2094018	2.90	1678605	2.67
	MTPA- <i>l</i> -AP	2133444	3.51	1665232	2.53
	MTPA- <i>d</i> -MA	1372230	1.09	1097863	1.20
	MTPA- <i>l</i> -MA	1375276	1.60	1045267	2.73
Ethyl acetate extract of 0.5 µg mL ⁻¹ <i>d</i> -MA aqueous solution	MTPA- <i>d</i> -MA	233778	4.35	190207	4.57
Ethyl acetate extract of urine A	MTPA- <i>d</i> -AP	295982	3.80	204256	4.44
	MTPA- <i>d</i> -MA	1502188	2.78	1177863	5.21
Ethyl acetate extract of urine B	MTPA- <i>d</i> -AP	297045	5.08	219127	3.96
	MTPA- <i>d</i> -MA	5088590	1.59	3991552	2.16
Ethyl acetate extract of urine C	MTPA- <i>d</i> -AP	8552074	6.52	6536729	5.94
	MTPA- <i>d</i> -MA	43604525	5.96	15243233	3.43
<i>d</i> -AP, <i>l</i> -AP, <i>d</i> -MA, <i>l</i> -MA 100 µg mL ⁻¹ each hexan solution (Achiral analysis)	AP(free)	1794264	5.66	641055	5.34
	MA(free)	1718049	6.90	670756	8.90

a) All statistics are based on data from five replicate injections ($N = 5$).

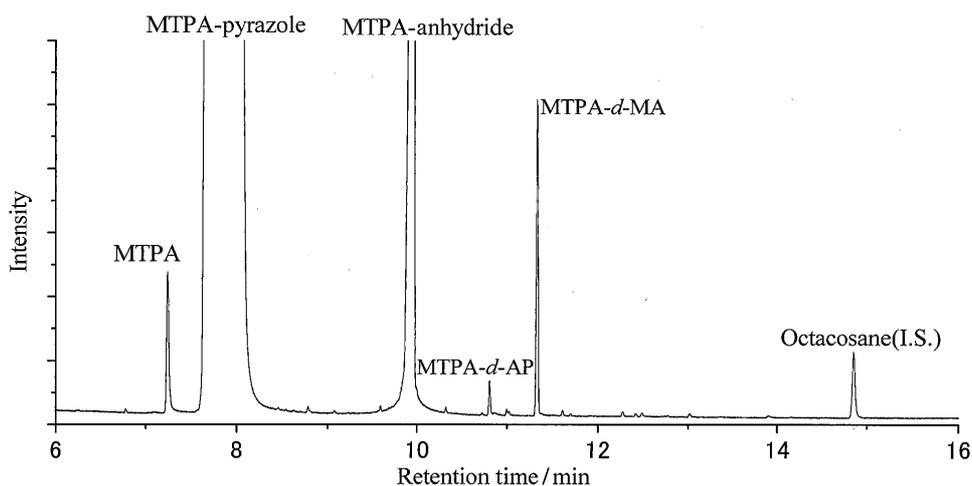


Fig. 5 Total ion chromatogram of ethyl acetate extract of abuser's urine by use of on-column derivatization with MTPA-pyrazole

た. なお, 手動注入による誤差を排除するため注入には島津製 AOC20s 型オートインジェクターを用い, 10(w/v)% MTPA-pyrazole 酢酸エチル溶液 1 µL, 空気 0.5 µL, 試料溶液 1 µL を吸入して高速で GC に注入するソルベントフラッシュ法によりオンカラム誘導体化を行った. 再現性を比較するため, *d*-AP, *l*-AP, *d*-MA 及び *l*-MA のそれぞれの濃度が 100 µg mL⁻¹ のヘキサン溶液を, 誘導体化試薬を用いない通常の注入により 5 回繰り返して GC/MS し, 同様に再現性を求めた. Table 1 に示すように, オンカラム誘導体化法により得られた MTPA-*d,l*-AP のピーク面積の変動係数 (CV) 値が 2.90~6.52, ピーク高さの CV 値が 2.53~5.94 であり, 同じく MTPA-*d,l*-MA のピーク面積の CV 値が 1.09~5.96, ピーク高さの CV 値が 1.20~5.21 であった. これらは誘導体化試薬を用いない分析により得

られた AP のピーク面積の CV 値 5.66% とピーク高さの CV 値 5.34%, MA のピーク面積の CV 値 6.90% とピーク高さの CV 値 8.90% と比較して同程度の再現性であった. また, Fig. 5 に一例を示すように, 乱用者尿抽出液より得られたトータルイオンクロマトグラムに, MTPA-*d,l*-AP, 及び MTPA-*d,l*-MA の各ピークと重なり妨害するピークは認められなかった.

3.5 定量性と確認限界の検討

MTPA-pyrazole によるオンカラム誘導体化法の定量性を検討するため, 検量線を作成した.

d-AP, *l*-AP, *d*-MA 及び *l*-MA のそれぞれの濃度が 50~2500 µM のヘキサン溶液 (C28, 100 µM 含有) を調製し, 分析条件 1 でオンカラム誘導体化 GC/MS を行い, 得られ

Table 2 Recoveries of *d,l*-AP and *d,l*-MA from human urine determined by on-column derivatization with MTPA-pyrazole and GC/MS analysis

Amount added/ $\mu\text{g mL}^{-1}$	Recovery, % ^{a)}							
	<i>d</i> -AP		<i>l</i> -AP		<i>d</i> -MA		<i>l</i> -MA	
0.2	106.5	8.00	103.1	5.40	124.8	0.60	95.3	7.50
0.5	114.5	4.70	113.9	4.90	130.1	5.00	111.1	2.80
10.0	107.9	2.80	105.6	2.40	80.5	1.90	82.0	2.30

a) Values are average CV ($N = 3$)

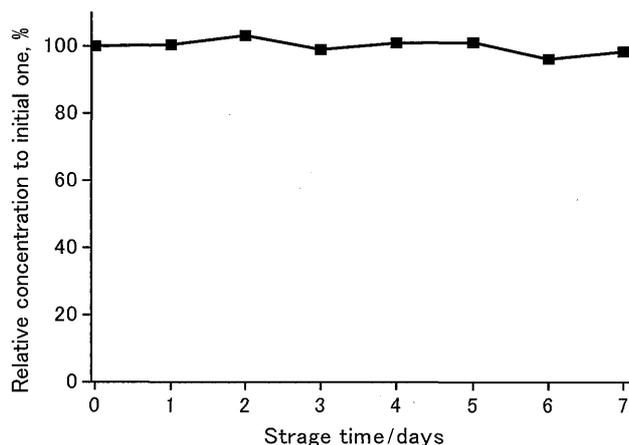


Fig. 6 Stability of MTPA-pyrazole 10(w/v)% ethyl acetate solution ($N = 3$)

たトータルイオンクロマトグラム中の MTPA-*d,l*-AP 及び MTPA-*d,l*-MA の各光学異性体ピークと C28 ピークとの面積比をもとに検量線を作成した。その結果、相関係数 0.99 以上の直線性が認められた。

また、分析条件 1 でオンカラム誘導体化反応を行い、MTPA-*d,l*-AP 及び MTPA-*d,l*-MA のスキャンモードにおける確認下限濃度を検討した。確認の判断基準は、マススペクトルのベースイオンピーク ($m/z = 189$) の 5% 以上の強度を持つイオンピークの種類と相対強度が、MTPA-AP 及び MTPA-MA の標準マススペクトルに一致することとした。その結果、GC 注入液 1 μL 中、AP が 25 μM 以上、MA が 50 μM 以上でそれらのマススペクトルを確認できることが明らかとなった。

3.6 添加回収試験

d-AP, *l*-AP, *d*-MA 及び *l*-MA を、フリー換算濃度で 0.2, 0.5 及び 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ となるよう添加した尿について、先の実験方法に準じ酢酸エチル抽出を 3 回、ヘキサンによる逆抽出を 3 回繰り返し行った。定量用の内部標準としてはサロゲート物質を用いることが望ましいが、本誘導体化試薬は新規物質であることから、現在のところサロゲート物質が確定されていない。そこで、オクタコサン 20 μg を内部標準として添加した。各濃度の尿について 3 回ず

つ繰り返し試験を行った。その結果は Table 2 に示したように、マススペクトルによる確認限界付近の 0.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の尿では、*d*-MA の回収率が 124.8% 及び 130.1% と高い値を示した。これは、低濃度の抽出液ではリテンションタイムが遅い MA のピーク形状がブロードなため積分計算が不正確になるなどが原因と考えられる。一方、10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ の尿では、*d,l*-AP の回収率は 107.9 及び 105.6%, *d,l*-MA の回収率は 80.5 及び 82.0% で、実際の検査で多いこの濃度領域の尿では効率よく検出できることが確認された。

3.7 試薬の安定性

日常的分析を行う上で試薬の安定性は非常に重要である。

MTPA-pyrazole の 10(w/v)% 酢酸エチル溶液にテトラデカンを内部標準物質として 5(w/v)% 添加し、GC オートサンプラー用のバイアルビンに入れ室温で保存した。これを 7 日間にわたって約 24 時間おきに分析条件 1 で GC/MS を行い、内部標準物質と試薬の面積比の変化を求めることにより試薬濃度減少の程度を求めた ($N = 3$)。なお、マイクロシリンジに溶液を吸入する際は、バイアルビンキャップのセプタムを突き破らず、キャップを外して吸入した。その結果、Fig. 6 に示すとおり、7 日間にわたって試薬濃度の減少はほとんど認められず、十分実務に使用可能であることが分かった。

3.7 カラムへの影響

分析条件 1, 分析条件 2 の装置で約 3 年間にわたり、おのおの 300 回以上分析を行ったが、現在のところカラムブリードなどの現象は観察されていない。また、初回分析時と最終回分析時における *d*-MA と *l*-MA のピーク分離度を比較すると、分析条件 1 の装置では初回 1.4 と最終回 1.4, 分析条件 2 の装置では初回 1.3 と最終回 1.4 であり、カラム分離能の低下は認められなかった。

4 結 言

覚醒剤光学異性体の迅速な分離分析を行うための新規な GC/MS 用オンカラムキラル誘導体化試薬として MTPA-pyrazole を開発した。

この試薬は, オンカラム法で AP 及び MA と反応してジアステレオマーを容易に形成するため, 尿中覚醒剤光学異性体の簡便な分離分析を可能にするものである. 本試薬を用いることで, 汎用のカラムで, 誘導体化前処理の必要もなく, 通常分析とほぼ同等の時間で光学異性体分析を行うことができ, ルーティンワークとして通常分析をしている合間に必要に応じて簡単に光学異性体分析を割り込ませることも可能となる. また, 本試薬は, 扱いやすい粉末であることから, 尿抽出液からの覚醒剤光学異性体の実務的な分離検出に有用と思われる.

本研究の一部は, 日本学術振興会科学研究費補助金 (奨励研究 No. 16915039) により行われた.

(本研究は, 2004 年 11 月, 日本鑑識科学技術学会第 10 回学術集会において一部発表した)

文 献

- 1) T. Nagai, S. Kamiyama: *J. Anal. Toxicol.*, **15**, 299 (1991).
- 2) H. S. Shin: *Drug Metab. Dispos.*, **25**, 657 (1997).
- 3) H. Jürgen, P. Sievert: *Chirality*, **6**, 295 (1994).
- 4) R. O. Hughes, W. E. Bronner, M. L. Smith: *J. Anal. Toxicol.*, **15**, 256 (1991).
- 5) 雨宮正欣, 頼 建伸, 長井辰男: *法中毒*, **18**, 21 (2000).
- 6) J. K. Fallon, A. T. Kicman, J. A. Henry, P. J. Milligan, D. A. Cowan, A. J. Hutt: *Clin. Chem.*, **45**, 1058 (1999).

Development of New On-Column Chiral Derivatization Reagent for Gas Chromatographic Separation of Optical Isomeric Amphetamine and Methamphetamine

Toru MATSUSHITA¹, Masahisa TAKATSU¹, Yuichi YOSHIDA² and Masataka MORIYASU³

¹ Forensic Science Laboratory of Hyogo Prefectural Police H.Q., 5-4-1, Shimoyamate-dori, Chuo-ku, Kobe-shi, Hyogo 650-8510

² Wako Pure Chemical Industries, Ltd., 1633, Oazamatoba, Kawagoe-shi, Saitama 350-1101

³ Kobe Pharmaceutical University Natural Medicinal Chemistry, 4-19-1, Motoyamakitamachi, Higashinada-ku, Kobe-shi, Hyogo 658-8558

(Received 20 July 2007, Accepted 24 October 2007)

A new derivatization reagent, which facilitated on-column chiral separation for gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) detection of amphetamine (AP) and methamphetamine (MA), was developed. In general, there are two methods to detect enantiomers using gas chromatography: one method uses a chiral stationary phase column; the other is pretreatment consisting of a reaction with a chiral derivatization reagent to form a diastereomer. Handling both of them is rather complicated. The reagent, (+)- α -Methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl pyrazole (MTPA-pyrazole), was synthesized from (+)- α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl chloride and pyrazole. AP and MA were injected with the reagent in the GC/MS system, and were separated as α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetyl derivatives. Ethyl acetate solution {10(w/v)%} of the reagent was reasonably stable, and could be used for the routine analysis of AP and MA from urine samples. The calibration curves of AP and MA in 1 μ L AP and MA hexane extract showed linearity in the range of 50 ~ 2500 μ M. This method gave good reproducibility from urine, and could be adapted to detect 25 μ M of AP extract and 50 μ M of MA extract in the scan mode.

Keywords : amphetamine; methamphetamine; MTPA; on-column derivatization; GC; chiral.