液体クロマトグラフィーによる (−)-Deprenyl 服用パーキンソン病患者及び 覚せい剤乱用者の尿中アンフェタミン類の光学異性体分析

牧野由紀子,^a 鈴木康男^b

厚生省関東信越地区麻薬取締官事務所,^a 東北大学薬学部^b

Enantiomeric Separation of Amphetamines in Human Urine by High-Performance Liquid Chromatography to Differentiate the Intake of (−)-Deprenyl in Parkinsonian from Abuse of Methamphetamine

YUKIKO MAKINO^a and YASUO SUZUKI^b

Kanto-Shin'etsu Regional Narcotic Control Office, Ministry of Health & Welfare,^a 2-4-14
Nakameguro, Meguro-ku, Tokyo 153, Japan and Faculty of Pharmaceutical
Sciences, Tohoku University,^b Aza-Aoba, Aramaki, Aoba-ku, Sendai,
Miyagi 980, Japan

(Received June 5, 1996)

The optical isomers of amphetamine and methamphetamine in the human urine were clearly separated by direct HPLC analysis using a chiral stationary phase. This direct HPLC was applied to the enantiomeric resolution of amphetamines in the methamphetamine abusers' urine and in the Parkinsonian urine after (R)-(−)-deprenyl administration. (S)-(+)-Amphetamine and (S)-(+)-methamphetamine were only detected in the urine from several methamphetamine abusers. On the contrary, (R)-(−)-amphetamine and (R)-(−)-methamphetamine were only detected as metabolites in the Parkinsonian urine treated with (−)-deprenyl. Enantiomer analysis may provide valuable information about the original substrate in the metabolic pathway. This simple and convenient method is suitable for the enantiomeric analysis for forensic purposes.

Key words — amphetamines; HPLC; (−)-deprenyl; enantiomeric separation; methamphetamine abuse

緒 言

Deprenyl (別名 Selegiline) は現在欧米で使用されているパーキンソン病治療薬の一つで, monoamine oxidase の B 型を選択的に阻害する薬物であると報告¹⁾されている。日本では, 1996 年 3 月 22 日より覚せい剤原料に指定された。

Deprenyl は Fig. 1 に示す構造を有しており, (R)-(−) 体であり, Fig. 2 に示した代謝経路を経て速やかに尿中に (R)-(−) 体のメタンフェタミンとアンフェタミンが排泄されてくると推定されている。実際に, イギリス,²⁾ ドイツ³⁾ 及び U.S.A.⁴⁾ でこの薬物を服用したヒトの尿からこれらを確認している。日本での報告は動物実験での報告のみで, 日本

人パーキンソン病患者についての報告は本報告が初めてである。

現在, deprenyl は日本でもパーキンソン病治療薬として臨床試験が進められている。この薬物が治療に用いられるようになった場合, 尿中覚せい剤の鑑定分析において, 覚せい剤取締法で規制されているメタンフェタミンを乱用した場合と区別しなければならない。日本で覚せい剤として乱用されているメタンフェタミンは中枢興奮作用の強い (S)-(+)-体がほとんどであり, 尿中覚せい剤の光学異性体分析を行うことで区別が可能となる。そこで, 迅速簡便な分析の要求される尿中覚せい剤の光学異性体の直接分離を光学活性カラムを用いて検討した。

Fig. 1. (R)-(-)-Deprenyl (Selegiline, Eldepryl)

Fig. 2. Proposed Metabolic Pathways of Deprenyl

実 験

1. 試薬 (S)-(+)-体及び(R)-(-)体の硫酸アンフェタミン及び塩酸メタンフェタミンは大日本製薬製, deprenylは藤本製薬製で(R)-(-)体を用いた。

2. 尿 覚せい剤乱用者尿は当地区事務所で検挙し, 鑑定嘱託された尿16検体であり, 塩酸メタンフェタミンの使用量は不明である。Deprenyl服用者尿は順天堂大学で5mgを1日2回連用している治療中の患者2名の尿8検体の提供を受けた。

3. 抽出 尿の液性をpH10.0とし, *n*-hexaneで抽出し, ガスクロマトグラフィー(GLC), TLC及びGC-MSの試料とした。HPLC用試料は*n*-hexane抽出液の一部を1N HClで逆抽出した溶液を用いた。

4. 装置及び測定条件 GLC, TLC, GC-MS及びHPLCの各分析条件は下記のとおりである。

1) GLC——装置: 島津社製GC-14A, カラム: J & W社製DB-5メガボアカラム(長さ30m, 内径0.52mm, 膜厚1.5 μ m), 検出器: 熱イオン化検出器, カラム温度: 60–250 $^{\circ}$ C (10 $^{\circ}$ C/min)。

2) TLC——プレート: メルク社製シリカゲル

60 F-254, 展開溶媒: 1.5%アンモニア性イソプロパノール, 呈色試薬: シモン試液。

3) GC-MS——装置: 日本電子製JMS-505W, カラム: Hewlett-Packard社製HP-5キャピラリーカラム(長さ30m, 内径0.25mm, 膜厚0.25 μ m), カラム温度: 60–150 $^{\circ}$ C (10 $^{\circ}$ C/min), イオン化エネルギー: 70 eV (EI mode)。

4) HPLC——装置: 島津社製LC-10A, カラム: 信和加工社製ULTRON ES-CD(長さ15cm, 内径0.6cm), カラム温度: 9 $^{\circ}$ C, 移動相: 20mM-KH₂PO₄-CH₃CN (94:6, v/v), 検出波長: 200nm, 流速: 1.0 ml/min。

結 果 及 び 考 察

Deprenyl服用患者と覚せい剤乱用者の尿を日常の鑑定法に準じた方法で分析したところ, Table Iに示すような結果が得られた。Deprenyl服用患者尿から検出されたアンフェタミン及びメタンフェタミンの濃度は, 約0.3–0.6 μ g/mlと0.8–1.2 μ g/mlであった。この濃度範囲は覚せい剤乱用者尿中で通常検出される濃度範囲⁹⁾と近似していた。

次に, アンフェタミン及びメタンフェタミンの光学異性体の一斉分析を β -シクロデキストリンを球状シリカゲルに化学結合したカラムで検討し, 一級及び二級アミンの光学異性体を同時に分析することが可能となった。本実験で標準品を用いた実際の検出限界はアンフェタミン及びメタンフェタミンのいずれにおいても30 ng/inj.であった。本法の応用として, パーキンソン病治療薬deprenylを使用した患者及び覚せい剤乱用者の尿中に排泄されてくるアンフェタミン及びメタンフェタミンの光学異性体分析を行った。その結果, 覚せい剤乱用者尿中のアンフェタミンとメタンフェタミンはいずれも(S)-(+)-体のみであった。一方, 本実験におけるdeprenyl服用パーキンソン病患者尿から検出されたものはいずれ

TABLE I. Analytical Results of Amphetamines in Urine

	Parkinsonian urine after (-)-deprenyl administration		Methamphetamine abusers' urine	
	Amphetamine	Methamphetamine	Amphetamine	Methamphetamine
GC	+	+	+	+
TLC	—	+	—	+
GC-MS	+	+	+	+
HPLC	+	+	+	+

+, detected.

Fig. 3. HPLC Chromatograms of Extract from Urine Sample of (A) Methamphetamine Abuser, (B) Parkinsonian Treated with (R)-(-)-Deprenyl and (C) Authentic Sample Mixture

も (R)-(-)-体のみであった。それぞれのクロマトグラムの一例を Fig. 3 に示す。(A) 及び (B) のクロマトグラムにおけるアンフェタミンとメタンフェタミンのピーク比からも推測されるが、deprenyl 服用パーキンソン病患者尿中のアンフェタミン濃度がメタンフェタミン乱用者尿の場合より多い傾向にあった。

現実問題として、鑑定囑託された尿から覚せい剤が検出された場合には、今後その光学異性体分析を行い、アンフェタミンまたはメタンフェタミンの光学異性体が (R)-(-)-体か (S)-(+)-体のいずれであるかを迅速に確認することが必要になる。光学異性体の分析法としてはキラル誘導化試薬で誘導体とし GC または HPLC で分析する方法は幾つか報告されているが、ルーチン分析で行うには煩雑で抵抗がある。ここで検討した方法は、誘導化を行わずに、

HPLC 用のキラルカラムを用いる迅速簡便な方法⁶⁾の一つであり、上記の目的を十分に達成できた。

覚せい剤が検出され、(S)-(+)-体のみでなかった場合には、deprenyl の異性体である (S)-(+)-deprenyl との混合体を使用したか、Vicks Inhaler を使用したことも考えられるので、微量の代謝物である desmethyldeprenyl か未変化体 deprenyl をヒトの尿でとらえることが必要になる。そのための迅速で簡便な高感度分析法の検討を標準品を準備し、早急に行う必要がある。

謝辞 この分析を行うにあたり、deprenyl 服用患者尿の採取に協力いただいた順天堂大学脳神経内科の近藤先生並びに各種液体クロマトグラフィー用キラルカラムを貸与して下さった信和化工の担当者に感謝いたします。

引用文献

- 1) J. Knoll, "Monoamine Oxidase and Its Inhibition," ed. by G.E.W. Wolstenholme, J. Knight, Elsevier, Amsterdam, 1976, pp.135-161.
- 2) G.P. Reynolds, J.D. Elsworth, K. Blau, M. Sandler, A.J. Lees, G.M. Stern, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **6**, 542 (1978).
- 3) H.H. Maurer, T. Kraemer, *Arch. Toxicol.*, **66**, 675 (1992).

-
- 4) R.W. Romberg, S.B. Needleman, J.J. Snyder, A. Greedan, *J. Forensic Sci.*, **40**, 1100 (1995).
 - 5) K. Kira, M. Shimizu, C. Maseda, T. Okamoto, T. Sakata, H. Oda, K. Yamamoto, K. Sakai, H. Ikeda, H. Inoue, Y. Fukui, *Rep. Nat. Res. Ins. Police Sci.*, **33**, 237 (1980).
 - 6) Y. Makino, S. Ohta, M. Hirobe, *Forensic Sci. Int.*, **78**, 65 (1996).