キラル溶媒和剤を用いた NMR による覚醒剤及び覚醒剤原料の立体識別法の検討

飯田 基 雄, 花尻(木倉)瑠理*

NMR Study of the Discrimination of Enantiomers of Methamphetamine and Its Raw Materials Using Chiral Solvating Agents

Motoo Iida and Ruri Kikura-Hanajiri*

Division of Pharmacognosy, Phytochemistry and Narcotics, National Institute of Health Sciences; 3-25-26 Tonomachi, Kawasaki-ku, Kawasaki 210-9501, Japan.

(Received March 29, 2021; Accepted April 19, 2021)

Some controlled substances, such as stimulants and narcotics, have asymmetric carbons in their molecules. Because the enantiomers do not always show the same pharmacological effects, and there are substances with different controls due to differences in their stereochemistry, a simple and unambiguous method for assessment of the composition of enantiomers is necessary. In this study, to develop a simple and rapid stereoscopic identification method for methamphetamine and its raw materials (ephedrine and pseudoephedrine), the ^1H -NMR method was studied using three commercially available chiral solvating agents (CSAs); 1,1'-bi(2-naphthol) (BINOL), 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl) ethanol (TFAE) and α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetic acid (MTPA). In addition, the accuracy of the optical purity, which was measured using samples mixed with enantiomers in various ratios, was investigated. The NMR peaks of the enantiomers were separated by adding (*R*)- or (*S*)-form of BINOL, TFAE or MTPA to the chloroform-*d* solution of methamphetamine, ephedrine or pseudoephedrine. A sufficient discrimination of enantiomers was obtained by adding about 10 equal amounts of each CSA to the solutions. With regard to the optical purity, it was possible to determine accurately the mixing of small amounts of enantiomers of about 5% even if the NMR peaks did not reach the baseline separation, when impurity peaks do not overlap. This method will be one of the useful techniques for the rapid and simple discrimination of enantiomers of illegal methamphetamine and its raw materials.

Key words—chiral solvating agent; ^1H -NMR; methamphetamine; ephedrine; pseudoephedrine; chiral analysis

緒 言

覚醒剤や麻薬などの規制薬物の多くには、分子内に不斉炭素有することから鏡像異性体が存在する。それらは同じ生理活性を示すとは限らず、また、立体化学の違いにより規制の異なる化合物も存在することから、キラル識別は不可欠である。さらに、絶対配置の決定は試料の異同識別においても有用である。¹⁾

光学純度の測定法として、クロマトグラフィーや NMR がある。ジアステレオマーへ誘導化しての分析は、誘導化試薬の光学純度や反応率の違いが、正確な分析を妨げる可能性がある。そのため、キラル固定相を用いる HPLC²⁾ や、キラルシフト試薬を

用いる NMR 測定法が注目されている。^{3,4)} クロマトグラフィーによるエナンチオ分離は、キラルな固定相と 2 つのエナンチオマーとの吸着作用の差に依存するため、置換基など構造のわずかな差によってキラリティーが生じている化合物では分離が困難な場合がある。一方、NMR によるキラル識別は、キラルシフト試薬と 2 つのエナンチオマーとの結合力の差は必須ではなく、キラルシフト試薬との間で形成される 2 つのジアステレオ複合体の構造の違いに依存する。

NMR によるキラル分析の特徴として、試料にキラルシフト試薬を添加するだけで基質の光学異性体を識別できるという簡便さ、標準試料に依存しないこと、同時に構造情報も得られる可能性があること、複数のプロトンの非等価性を同時に調べることが可能であり結果の信頼性も評価できること、などが挙げられる。キラルシフト試薬として、Eu 錯体

国立医薬品食品衛生研究所生薬部

*e-mail: kikura@nihs.go.jp

Fig. 1. Chemical Structures of Methamphetamine, Ephedrine, Pseudoephedrine and Chiral Solvating Agents

などのキラルランタノイドシフト試薬 (chiral lanthanide shift reagent; CLSR) を用いた識別が行われてきたが, それら錯体は常磁性を有するため高磁場 NMR で測定すると強いブロードニングを起こすという問題がある. この問題を回避した反磁性のキラル溶媒和剤 (chiral solvating agent; CSA) を用いる方法が検討されており, 2,2,2-trifluoro-1-(9-anthryl)ethanol (TFAE) を用いた Methamphetamine,⁵⁾ Methylphenidate,⁶⁾ Prilocaine⁷⁾ のキラル分析や, 1,1'-bi (2-naphthol) (BINOL) を用いた Mephedrone,⁸⁾ Promethazine,⁹⁾ Crispine A¹⁰⁾ のキラル分析, α -methoxy- α -(trifluoromethyl)phenylacetic acid (MTPA) を用いた AM-1220 と AM-1220 azepan-isomer のキラル分析¹¹⁾などが報告されている.

本研究では, 覚醒剤 (Methamphetamine) 及び覚醒剤原料 (Ephedrine, Pseudoephedrine) の簡便な立体識別法の開発を目的として, 市販されている CSA (BINOL, TFAE, MTPA) を用いた ¹H-NMR による測定法を検討した. また, エナンチオマーを様々な比率で混合した試料を用いて, 測定した光学純度の精度を検討した.

研究 方 法

1. 試 料 及 び 試 薬 *d*-Methamphetamine hydrochloride は大日本住友製薬株式会社製 (大阪), *l*-Ephedrine hydrochloride はアルプス薬品工業株式会社製 (岐阜), *d*-Pseudoephedrine hydrochloride

及び *l*-Pseudoephedrine hydrochloride は Sigma-Aldrich 社製 (St. Louis) を使用した. *l*-Methamphetamine hydrochloride 及び *rac*-Ephedrine hydrochloride は過去に合成した化合物¹²⁾を用いた. CSA は (*R*)-BINOL (Sigma-Aldrich 社製), (*S*)-BINOL (株式会社ダイセル社製, 大阪), (*R*)-TFAE (Sigma-Aldrich 社製), (*S*)-TFAE (東京化成工業株式会社製, 東京), (*R*)-MTPA (Sigma-Aldrich 及び東京化成工業株式会社製) 及び (*S*)-MTPA (東京化成工業株式会社製) を用いた. その他の試薬は市販特級品を使用した. NMR 測定溶媒として Chloroform-*d* (Sigma-Aldrich 社製) を用いた. 本研究で分析対象とした化合物及び CSA の構造を Fig. 1 に示した.

2. 試料の調製

2-1. 塩基の調製方法 マイクロチューブに各化合物の塩酸塩をとり, 超純水 0.5 mL を加えて溶解させた. 1 mol/L 水酸化ナトリウム水溶液又はアンモニア水を添加して約 pH 10 に調製し, クロロホルム 300 μ L で 2 回抽出した. クロロホルム層を合わせ, アルゴン気流下で溶媒除去した後, 減圧乾燥した.

2-2. NMR 測定用試料 塩基とした化合物, 及び CSA をそれぞれ Chloroform-*d* に溶解し, 希釈, 混合して NMR 測定用試料を調製した. *d*, *l* 混合比を求める実験では, 塩基調製操作前に濃度調整した *d* 体と *l* 体の水溶液を指定の割合で混合したも

のを使用した。データ解析では、分析対象化合物の濃度を 10 mM とみなし、スペクトルの積分比から CSA の当量、濃度を見積もった。

3. NMR の測定法 NMR は UltraCOOL プローブ付き JNM-ECZ600R / S1 (JEOL RESONANCE, 東京) を使用し、300 K で測定した。化学シフトは溶媒ピーク (CHCl_3) を 7.26 ppm に補正した。定量実験は、観測スペクトル幅 20 ppm, パルス幅 90° , 取り込み時間 4 秒, 遅延時間 60 秒, MPF8 による ^{13}C デカップルの条件で測定した。データ解析には, Delta v5.3.1 (JEOL RESONANCE) 及び ACD/NMR Workbook 2015.2.5 (Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto) を用いた。

研究結果

1. 覚醒剤 Methamphetamine の立体識別法の検討 分析対象として Methamphetamine と, CSA として BINOL, TFAE, MTPA の組み合わせでエナントマーが識別できるか検討した。

d-, *l*-, *rac*-Methamphetamine (10 mM) にそれぞれ (*R*)-BINOL, (*R*)-TFAE, (*R*)-MTPA (20 mM, 2 eq.) を加えて ^1H -NMR を測定した結果, CSA を含まない場合と比べてピークがシフトした。そのシフト幅は *d* 体と *l* 体とで異なることから, 添加した CSA が立体特異的に Methamphetamine と相互作用することが確認できた (Supplementary material Table S1)。また, *d*-体又は *l*-体に (*S*)-CSA を添加して得られる化学シフトは *l*-体又は *d*-体に (*R*)-CSA を添加した場合と同一であった。

CSA を添加した場合の化学シフトは, 溶液中で平衡状態にあるフリー体と複合体それぞれの化学シフトの加重平均で観測される。添加する CSA の当量を増やすと, 複合体存在率が高まることで化学シフト値の移動が大きくなると考えられる。³⁾ そこで, より適した分析条件を探索するため, CSA の当量を変化させてピークシフト幅, *d* 体と *l* 体とのシフト差を調べた (Supplementary material Tables S2–S4, Figs. S1–S3)。BINOL 及び TFAE を用いた場合, 添加当量を増やす程ピークのシフト幅も大きくなる傾向があるが, *d* 体と *l* 体とのシフト差は 10 当量程度で飽和しつつあった (Figs. 2 and 3)。一方, MTPA を用いた場合では, 4 当量程度の添加

Fig. 2. Selected Expansion of the ^1H Spectra of Methamphetamine (10 mM) with/without (*R*)-BINOL (600 MHz, CDCl_3 , 300 K)

a) *d*-methamphetamine, *rac*-methamphetamine with (*R*)-BINOL; b) 1.1 eq., c) 2.05 eq., d) 3.05 eq., e) 4.25 eq., f) 5.4 eq., g) 6.6 eq., h) 8 eq., i) 9.4 eq., j) 10.2 eq., k) 11.4 eq.

からシフト幅が一定になる傾向があった。当量を増やすとシフト差が小さくなるプロトン (H-3 , H-1'') やピークがブロードになるプロトン (H-1'') はあったが, シフト差の大きい H-1a では, BINOL 及び TFAE と同様, シフト差は 10 当量程度で飽和しつつあった。

以上の結果を踏まえて, CSA の添加量をシフト差がほぼ飽和する 10 当量に設定し, *d*, *l* 混合比を変化させた場合に光学純度がどの程度の精度で測定できるかを検討した。塩基調製操作前に *d* 体と *l* 体を指定の割合で混合し, NMR 測定は定量条件 (スピンなし/あり) を用いた (Fig. 4, Supplementary material Figs. S4–S6)。積分値は, シグナル分離のよいプロトン (BINOL: H-1'' , TFAE: H-2',6' , MTPA: H-1a) について, 垂直分割, 接線補間及び波形分離の 3 通りの方法で求めて比較した (Table 1, Supplementary material Tables S5 and S6)。NMR

Fig. 3. Influence of (*R*)-BINOL Equivalents on Chemical Shifts of Methamphetamine
a) Induced shift, $\Delta\delta$ of *d*- and *l*-methamphetamine, b) chemical shift difference, $\Delta\delta_{(d-l)}$ of *rac*-methamphetamine.

Fig. 4. Selected Expansion of the ^1H Spectra of Mixtures of *d*- and *l*-Methamphetamine (10 mM) with (*R*)-BINOL (600 MHz, CDCl_3 , 300 K, spin off)

a) $d/l = 5/95$ with 11.5 eq. of (*R*)-BINOL, b) $d/l = 10/90$ with 11 eq. of (*R*)-BINOL, c) $d/l = 25/75$ with 10.6 eq. of (*R*)-BINOL, d) $d/l = 50/50$ with 10.7 eq. of (*R*)-BINOL, e) $d/l = 75/25$ with 10.6 eq. of (*R*)-BINOL, f) $d/l = 90/10$ with 11.1 eq. of (*R*)-BINOL, g) $d/l = 95/5$ with 11.1 eq. of (*R*)-BINOL.

ピークは裾野が広いローレンツ曲線として観測されるため、本実験条件では、一見ピークが離れているようでもベースラインに至るほどの分離とはならなかった。そのため、垂直分割により積分値を求めた場合に、割合の小さいピークの積分値が過大に見積もられる傾向が、また接線補間による場合には、過少に見積もられる傾向があった。一方、波形分離を用いた場合では、広い範囲で、実際の調製割合との差が数%以内と比較的精度のよい結果が得られた。測定時のスピンの有無に関して、定量測定では一般にスピニングサイドバンド (spinning side band; SSB) による誤差要因を避けるためにスピンさせないで測定するが、本実験ではスピンさせた方がやや良好な結果が得られた。これは、SSB による悪影響よりも、スピンによるシム改善、ピーク形状の改善が精度向上に寄与したと考えられる。

2. 覚醒剤原料への適用 Ephedrine 及び Pseudoephedrine に対しても、(*R*)-, (*S*)-CSA (BINOL, TFAE, MTPA) を 10 当量添加する条件で立体異性体が識別できるか検討した。本実験のすべての組み合わせにおいて、立体異性体を識別できるだけの化学シフト差が観測され、特に BINOL を用いた場合に *N*-メチルプロトン (H-1'') の化学シフト差が大きかった (Figs. 5 and 6, Supplementary material Tables S7 and S8)。

ラセミ体の覚醒剤等に対して *R* 体の CSA を 10 当量添加した場合に想定される化学シフト差 ($\Delta\delta_{(d-l)}$) を Fig. 7 にまとめた [*d*-体又は *l*-体に (*R*)-CSA を添加して得られる化学シフトは *l*-体又は

Table 1. Analytical Results of Mixtures of *d*- and *l*-Methamphetamine in Various Ratios by ¹H-NMR Using (*R*)-BINOL^{a,b}

<i>d_p</i>	Spin off ^c						Spin (15 Hz) ^c					
	Vertical partition		Tangent interpolation		Curve fitting		Vertical partition		Tangent interpolation		Curve fitting	
	<i>d_m</i>	Δd	<i>d_m</i>	Δd	<i>d_m</i>	Δd	<i>d_m</i>	Δd	<i>d_m</i>	Δd	<i>d_m</i>	Δd
5	11.3	6.3	3.2	−1.8	4.2	−0.8	10.1	5.1	4.0	−1.0	5.9	0.9
10	13.9	3.9	7.4	−2.6	9.5	−0.5	13.9	3.9	7.9	−2.1	10.6	0.6
25	27.0	2.0	20.5	−4.5	24.8	−0.2	27.9	2.9	20.7	−4.3	25.7	0.7
50	51.3	1.3	51.4	1.4	50.3	0.3	50.7	0.7	51.0	1.0	50.1	0.1
75	73.8	−1.2	80.0	5.0	76.3	1.3	74.9	−0.1	79.3	4.3	75.1	0.1
90	87.8	−2.2	92.6	2.6	92.3	2.3	88.0	−2.0	92.2	2.2	90.4	0.4
95	91.9	−3.1	96.4	1.4	95.4	0.4	92.4	−2.6	96.2	1.2	95.2	0.2

The H-1'' peaks were chosen for integration. *d_p*: Ratios (%) of *d*-methamphetamine expected after preparation, *d_m*: Ratios (%) of *d*-methamphetamine measured experimentally by three integration methods (vertical partition, tangent interpolation or curve fitting), Δd : Different values between *d_m* (%) and *d_p* (%).

^a Total concentration of methamphetamine was 10 mM; the concentration of (*R*)-BINOL was *ca.* 100 mM. ^b Recorded at 600 MHz in CDCl₃ at 300 K. ^c NMR data was collected without spinning the tube or with spinning at 15 Hz.

Fig. 5. ¹H Spectra of Ephedrine (10 mM) with/without (*R*)-BINOL (600 MHz, CDCl₃, 300 K)

a) *rac*-ephedrine, b) *l*-ephedrine with 11 eq. of (*R*)-BINOL, c) *rac*-ephedrine with 11.2 eq. of (*R*)-BINOL.

d-体に (*S*)-CSA を添加した場合と同一であり, (*S*)-CSA を用いた実験データも計算に用いた]. これは, *d* 体の覚醒剤等に対して *R* 体若しくは *S* 体の CSA を添加した場合に想定される化学シフト差 ($\Delta\delta_{(R-S)}$) と言い換えることもできる.

考 察

CSA を添加した際のピーク位置 (絶対値) は, 濃度や添加した CSA の当量, 残留水分や塩などの夾雑物により影響を受けるため, ピークのシフト値だけで立体化学を帰属することは避けたい方が望ましい. 一方, *d* 体と *l* 体のシフト差の符号 (相対位置)

Fig. 6. ^1H Spectra of Pseudoephedrine (10 mM) with/without (*R*)-BINOL (600 MHz, CDCl_3 , 300 K)

a) *l*-pseudoephedrine, b) *d*-pseudoephedrine with 10.4 eq. of (*R*)-BINOL, c) *l*-pseudoephedrine with 9.5 eq. of (*R*)-BINOL, d) *rac*-pseudoephedrine with 10.2 eq. of (*R*)-BINOL.

$\Delta\delta_{(d-l)}$ [ppb]	Methamphetamine	Ephedrine	Pseudoephedrine
(<i>R</i>)-BINOL

(<i>R</i>)-TFAE

(<i>R</i>)-MTPA

Fig. 7. Chemical Shift Differences between *d*- and *l*-Compounds (10 mM) with (*R*)-CSA (*ca.* 10 eq.) (600 MHz, CDCl_3 , 300 K)

は、添加した CSA の当量によって変わらなかった。したがって、CSA を添加したスペクトルにおいて、ピークが 2 つに分離すれば、その相対位置を Fig. 7 の値と比較して立体化学を帰属することが可能である [Fig. 8(a)]. 単一ピークの場合は、できるだけ濃度・当量などの条件をそろえて両エナンチオマーの CSA 添加試料を測定し、測定試料間でピーク位置を比較することで立体化学を帰属することができる [Fig. 8(b)]. また、両エナンチオマーを添加してもピーク位置に差が出なかった場合は、この実験が適応できないという判断ができ、自己チェック機能も備わった手法と言える。

近年、CSA 添加試料の NMR によるキラル識別は、危険ドラッグに含まれる主成分の立体化学を検討する上でも使用されている。危険ドラッグは、次々と構造類似化合物が市場に出現し、分析用標品の入手が困難である場合がある。また、違法に流通する危険ドラッグの立体化学については明らかになっていないことが多い。Stolarska らは、Mephedrone 等の合成カチノン類について、CSA として (R)-BINOL を使用した NMR によるキラル識別法の検討を行っている。⁸⁾ また、Langer らは、危険ドラッグ製品（乾燥植物細片製品）から、数種類のカンナビノイド受容体に作用する合成化合物（合成カンナビノイド）を検出・同定している。そして、同定した化合物のうち、構造中に不斉炭素有する合成カンナビノイド AM-1220 及び AM-1220 azepan-isomer について、CSA として 1 当量の (R)-MTPA を添加した試料の NMR 測定を行い、両化合物の市場流通品がラセミ体であることを示している。¹¹⁾ このように、CSA 添加試料の NMR によるキラル識別法は、市場に流通する危険ドラッグに含まれる構造既知である主成分の立体化学を簡便かつ迅速に推測する上でも有用な手法になり得ると考えられる。

結 論

覚醒剤（Methamphetamine）及び覚醒剤原料（Ephedrine, Pseudoephedrine）に CSA（BINOL, TFAE, MTPA）を添加することで、立体異性体の NMR ピークが分離することを確認した。CSA 添加量を変化させて調べた結果、シフト差は 10 当量でほぼ飽和し、十分な立体識別能が得られることが分かった。また、光学純度に関して、不純物ピーク

Fig. 8. Conceptual Diagram of the Discrimination of Enantiomers by NMR Using a Chiral Solvating Agent

a) For a mixture of *d*- and *l*-compounds, b) for an enantiopure compound.

が重ならない場合は、ベースライン分離まで達していなくても裾野が少し重なる程度のピーク分離であれば、波形分離処理にて積分をとることで、5%程度の少量エナンチオマーの混在を精度よく求めることが可能であった。本手法は、違法に流通する覚醒剤や覚醒剤原料の立体化学を迅速かつ簡便に検討する上で、有用な手法の 1 つと考えられる。また、他のアミン系薬物の立体識別にも適用できる可能性があり、更なる検証が望まれる。

謝辞 本研究は厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス政策研究事業）で行われたものであり、関係各位に深謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

Supplementary materials この論文のオンラインに Supplementary materials（電子付録）を含んでいる。

REFERENCES

- 1) Iwata Y. T., Kuwayama K., Tsujikawa K., Kanamori T., Inoue H., *Bunseki Kagaku*, **63**,

- 221–231 (2014).
- 2) Castrignanò E., Lubben A., Kasprzyk-Hordern B., *J. Chromatogr. A*, **1438**, 84–99 (2016).
 - 3) Uccello-Barretta G., Balzano F., *Top. Curr. Chem.*, **341**, 69–131 (2013).
 - 4) Yang L., Wenzel T., Williamson R. T., Christensen M., Schafer W., Welch C. J., *ACS Cent. Sci.*, **2**, 332–340 (2016).
 - 5) Hanna G. M., *Pharmazie*, **61**, 188–193 (2006).
 - 6) Hanna G. M., Lau-Cam C. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **11**, 665–670 (1993).
 - 7) Hanna G. M., *Enantiomer*, **5**, 303–312 (2000).
 - 8) Stolarska M., Bocian W., Sitkowski J., Naumczuk B., Bednarek E., Popławska M., Błażewicz A., Kozerski L., *J. Mol. Struct.*, **1219**, 128575 (2020).
 - 9) Borowiecki P., *Tetrahedron: Asymmetry*, **26**, 16–23 (2015).
 - 10) Yuste F., Sánchez-Obregón R., Díaz E., García-Carrillo M. A., *Tetrahedron: Asymmetry*, **25**, 224–228 (2014).
 - 11) Langer N., Lindigkeit R., Schiebel H. M., Ernst L., Beuerle T., *Drug Test. Analysis*, **6**, 59–71 (2014).
 - 12) Kikura R., Ishigami A., Nakahara Y., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **38**, 136–141 (1992).