

1967年

ドーピングの検出法に関する研究

財団法人 日本体育協会

スポーツ科学委員会

ドーピングの検出法に関する研究

ドーピング研究小委員会

競走馬理化学研究所理事

大久保 義夫

尿中の微量薬物の検出方法は薄層クロマトグラフィ（TLC）およびガスクロマトグラフィ（GLC）が最も適している。今回TLCを用いる場合について検討した。

検出の対象となる薬物は次のものを選んだ。

I 中枢神経系興奮薬……アンフェタミン、メタンアンフェタミン、メチルフェニデート、ストリキニーネ、プルシン、ペンテトラゾールニケタミド、テオプロミン、テオフィリン、カフェイン、ピプラドロール。

II 自律神経薬……エフェドリン、ヒヨスチン、アトロピン、ニコチン。

III 鎮痛、麻酔薬……アミノピリン、アンチピリン、4-アミノアンチピリン、フェナセチン、フェニルブタゾン、モルヒネ。

IV 神経安定薬……プロマジン、クロールプロマジン。

V 鎮静催眠薬……バルビツール酸誘導体。

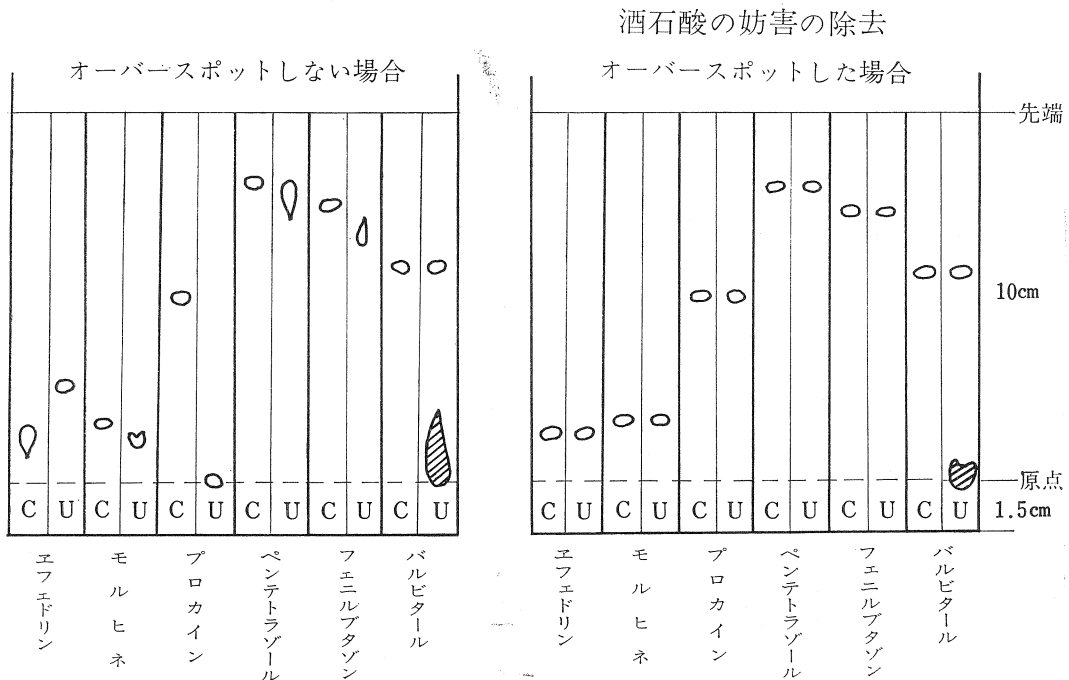
研究方針としては、これらの薬物を含む多数の検体を短時間に処理し、薬物を含むもの（陽性検体）と含まないもの（陰性検体）とを区別する方法を確立することを目的とした。したがってこれら薬物を、できれば一枚の薄層板上で検出し得るための諸種の条件を検討した。

実験方法

I 抽出法

尿または対象薬物を添加した尿 10ml をアンモニア水 9 で PH にし、クロロホルム 30ml を

第1図 アンモニアオーバースポットの効果



U:尿抽出物
C:標品

用いて抽出，5 ml の硼酸緩衝液(PH 9.0)で洗い，5%酒石酸アルコール液1滴を加え減圧濃縮して抽出残渣(以後尿試料と記す)を得た。

II 尿試料を溶解する溶媒とその量

N/100 塩酸，N/100 塩酸メタノール混液およびメタノールについて，その量およびスポットの広がり，乾固状態などの点から検討したところ，メタノールが各薬物について共通に良好であった。使用量は試料の溶解に必要な最低量 $10\mu l$ にした。すなわち $10\mu l$ の全量をスポットした場合尿試料中の薬物の R_f 値は標品とよく一致した。

III 試料中に加えられている酒石酸の影響

溶媒溜去時に薬物の損失を防ぐ目的で酒石酸を加えているので，これのTLCに対する被害が考えられる。検討した結果中性溶媒(塩基の添加量の少ない塩基性溶媒も同様)では R_f 値の上昇又は低下，テーリング等種々の影響があることがわかった。塩基性の強い溶媒では問題はないが，中性溶媒でも試料スポット上に濃アンモニア水を重ねて塗布した後展開するとよいことが判明した。(第1図)

IV 展開溶媒について

アルカロイドの展開溶媒を含む溶媒系20種について検討した。まず標品を用いての実験では，

1. クロロホルム，メタノール (9:1)
2. メタノール，アンモニア (99:1)
3. アセトン，アンモニア (99:1)

等が良い分離能を示した。尿試料についての結果，尿成分との分離に関して1が良い成績を示した。(第2図)

V 薄層上のスポットの検出法

尿試料中の薬物を十分な感度で尿成分に妨害されることがなく検出し得ることを目的とし，できれば一枚の薄層板で行い得ることを目的とした。紫外線照射，Lüdy-Tenger, $PtCl_4 \cdot KI$ 等のアルカロイド試薬， $KMnO_4$ ， I_2 等の万能試薬15種を用いた。これらのうち最も検出感度が高く又範囲の広いものは Lüdy-Tenger に更に 25% $CuCl_2$ を重ねて噴霧する方法であり， I_2-FeCl_3 試薬がこれに次いだ。これらはいずれもバルビツール酸誘導体とフェニルブタゾンは検出できないので，これらに特徴的な硝酸銀溶液とマンデリン試薬を用いる必要がある。以上の点を考慮して一枚の薄層板上で適用可能な組合せを検討した結果 1) 紫外線下の観察 2) 硝酸銀試薬 3) マンデリン試薬 4) Lüdy-Tenger 試薬の順に行うのが最も良いことがわかった。

VI 薄層板について

薄層は中性シリカゲル，アルカリ性シリカ

第2図 T.L.C. 法による薬物のスクリーニング
検査対象薬物の検出とその R_f

検体中に見出されることのある検査対象以外のスポット。

スポットの検出	$\left\{ \begin{matrix} U.V. + \\ Hg + \\ Man + \\ L.T. + \end{matrix} \right\}$	$\left\{ \begin{matrix} U.V. + \\ Man + \\ L.T. + \end{matrix} \right\}$	$\left\{ \begin{matrix} U.V. + \\ Hg + \\ L.T. + \end{matrix} \right\}$	$\left\{ \begin{matrix} U.V. + \\ L.T. + \end{matrix} \right\}$	L.T. +	U.V. +	$\left\{ \begin{matrix} U.V. + \\ Man + \end{matrix} \right\}$	$\left\{ \begin{matrix} U.V. + \\ Hg + \end{matrix} \right\}$	
R_f									
0.80					コカイン				
0.60					ニコタミド カフェイン アンチピリン	ベンテトラゾール メチルフェニデート			U.V. L.T. 黄 Hg 黒 Man 褐
0.40	クロールプロマジン プロマジン	メサピレン	4-アミノ アンチピリン		ニコチン テオフィリン テオプロミン アロカイニン モノフィリン ストリキニーネ				フェノバルビタール バルビタール
0.20		ブルシシン			アンフェタミン モルヒネ				フェニルブタゾン
					メタンフェタミン アトロピン エフェドリン				
									Man-ピンク U.V. L.T. 対 U.V. L.T. 対 U.V. L.T. 対となつて現われることが多い L.T.
	←-----塩基性薬物-----			*中性薬物*		-----酸性薬物-----			

ゲル, アルミナ, アビセルセルローズについて検討したが, 今回の目的には中性シリカゲルが最も適当であった。蛍光剤入りシリカゲル, ギブス 5% 入りを 20×20cm のガラス板上に厚さ 250 μ にし, 100~105°C で 60 分活性化する。10mm ごとに縦の切込線を入れて用いる。

実験結果

尿試料はメタノールに溶解後中性シリカゲルプレートに塗布し同時に標品溶液(少くとも対象薬物 5 種を含む)も所定の位置に塗布した後原点上に濃アンモニア水を重ねて塗布する。クロロホルム・メタノールの溶媒で展開する。風乾燥後以下の検出操作を行う。

1) 2537Å の紫外線照射下で観察

- 2) 1% AgNO₃ 試薬
- 3) Mandelin 試薬
- 4) Lüdy-Tenger 試薬

等を順次噴霧しスポットの観察を行う。尿試料に薬物を加えての検出限界テストの結果は第 1 表に示す。いずれも良好な結果を得た。

考察

尿中から薬物を TLC 法により検出する方法について検討を行なったが, 今回は薬物の標品を用いての実験である。したがって代謝産物に対する考慮は行なっていない。これは今後検討する必要がある。また薬物の確認方法についての検討もガスクロマトグラフィー, 質量分析法等を加え行う必要がある。

第 1 表 尿抽出物中薬物の検出感度

	1) U.V. light	2) Hg NO ₃	3) Mandelin's	4) Lüdy-Tenger	備 考
	$\mu\text{g}/\text{spot}$	$\mu\text{g}/\text{spot}$	$\mu\text{g}/\text{spot}$	$\mu\text{g}/\text{spot}$	
カ フェ イン	0.63	—	—	0.31	
テ オ フィ リ ン	1.25	—	—	0.63	
テ オ ブ ロ ミ ン	0.63	—	—	0.63	
ア ト ロ ピ ン	—	—	—	0.16	
ヒ ヨ ス チ ン	—	—	—	2.5	
エ フ ェ ド リ ン	5	—	—	5	
メ タ ン フ ェ タ ミ ン	5	—	—	1.25	
メ チ ル フ ェ ニ デ イ ト	—	—	—	2.5	
ブ ロ カ イ ン	0.63	—	—	0.63	
ア ミ ノ 安 息 香 酸 エ チ ル	1.25	5	—	—	
ア ミ ノ ピ リ ン	0.63	—	—	2.5	
ア ン チ ピ リ ン	0.63	5	—	0.63	
4-アミノアンチピリン	0.63	5	20	2.5	
ク ロ ル プ ロ マ ジ ン	0.63	0.63	0.63	0.63	
ブ ロ マ ジ ン	0.63	0.63	5	5	
パ ル ビ タ ー ル	5	0.63	—	—	
フェノバルビタール	5	1.25	—	—	
ニ コ チ ン	0.63	—	—	0.63	
フ ェ ナ セ チ ン	0.63	—	—	5	
ス ト リ キ ニ ー ネ	0.63	—	—	1.25	
ペ ン テ ト ラ ズ ー ル	—	—	—	1.25	
ニ ケ タ ミ ド	0.63	—	—	0.63	
コ カ イ ン	5	—	—	0.63	ジアゾ化バラニト
モ ル ヒ ネ	0.31	—	—	0.31	ロアニリン試薬 0.63 $\mu\text{g}/\text{spot}$
メ サ ビ リ レ ン	1.25	—	—	1.25	
ブ ル シ ン	0.63	—	0.63	0.16	
フェニルプタゾン	2.5	—	5	—	ジアゾ化バラニト
アンフェタミン	—	—	—	20	ロアニリン試薬 0.31 $\mu\text{g}/\text{spot}$

