

昭和44年度日本体育協会スポーツ
科学研究報告 No. X

ガスクロマトグラフィーによる覚醒
アミンの検出

財団法人 日本体育協会
スポーツ科学委員会

昭和44年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告 No. X・ガスクロマトグラフィーによる覚醒アミンの検出

報告者
スポーツ科学委員会
ドーピング研究小委員会
大久保義夫

尿中の覚醒アミン類の検出法に関しては、これまでにペーパーおよび薄層クロマトグラフィー¹⁻⁵⁾、紫外吸収測定⁶⁾、比色分析⁷⁾⁸⁾、ガスクロマトグラフィー⁹⁻¹⁴⁾ (GLC) 等による方法が知られているが、ドーピングのルーチン検査に適用する場合は、GLC法が最も特異性があり、かつ微量分析が可能と思われる。

昭和42年度の研究において、ドーピングに使用される広範な薬物の薄層クロマトグラフィーによるスクリーニング法を確立したが、今回は覚醒アミンおよびその関連薬物の GLC による確認法について検討した。

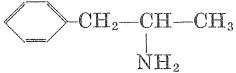
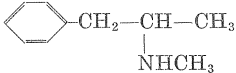
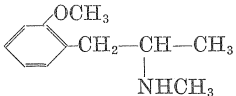
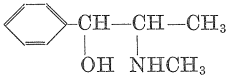
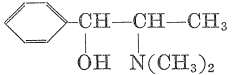
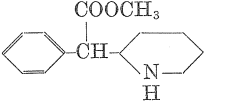
今日の日本において覚醒アミン取締り法で一般の使用が禁止されているアンフェタミン、メチルアンフェタミン (ヒロポン) とその類似化合物であるメトキシフェナミン、エフェドリン、メチルエフェドリンおよびメチルフェニデートの6種の薬物を用い、種々のカラム充てん剤による各薬物の純品による分離能、検出感度等の GLC 条件の比較検討を行なった。また検出感度を上げるとともに、薬物の確認をより確実にするために容易に合成できる比較的安定な各薬物のパーフロアシル誘導体についても検討した。さらに、正常人の尿を用いた尿付加実験を行ない、各薬物の尿中からの分離、確認法を検討した。

実験の部

1. 実験方法

ガスクロマトグラフィー

使用した薬物の構造式

薬物名(略記号)	構造式
Amphetamine (A)	
Methylamphetamine (M)	
Methoxyphenamine (Mn)	
Ephedrine (Ep)	
Methylephedrine (Me)	
Methylphenidate (Mp)	

機種：日立K-53型

検出器：FID

カラム：HMDS処理したガラスカラム 1 m, または 2 m, 3 mmφ

充てん剤

- 2% PEG20M + 5% KOH, Chromosorb G
- 5% PEG20M + 5% KOH, Chromosorb G
- 10% Apiezone L + 10% KOH, Chromosorb G
- 10% Versamide 940, Neopak IA
- 2% OV-17, Chromosorb W
- 3% XE-60, Chromosorb W 等

各充てん剤の担体はいずれも AW, DMCS 処

理したものをを用いた。80~100メッシュ。

キャリアーガス：N₂， 50ml/min

Attenuation：50

溶 媒：蒸留により精製した醋酸エチル

パーフロアシル誘導体の合成

各薬物の遊離塩基を含む醋酸エチル溶液に同量のトリフロロ無水醋酸またはヘプタフロロ無水ラク酸を加え、水浴中50°C下約5分間加熱し、その反応液を水浴中40~50°C下、減圧濃縮し、過剰の試薬を留去し、デシケータ中で減圧乾燥を行なう。生成した各薬物のトリフロロアセチル (TFA) またはヘプタフロロブチリル (HFB) 誘導体は醋酸エチルに溶解し、GLC 分析の試料とした。

尿付加実験

正常人の尿 5 ml にアンフェタミン10 μ g，メチルアンフェタミン10 μ g，メトキシフェナミン15 μ g，エフェドリン 30 μ g，メチルエフェドリン20 μ g およびメチルフェニデート20 μ g を含む水溶液 1 ml を付加し、それに 1N-HCl 1 ml を加え、酸性下エーテル 30ml で3分間振盪抽出する。そのエーテル層を除去後、水層に 2 N-Na OH 1 ml を加え、エーテル 15ml で二度振盪抽出を行なう。そのエーテル層を分離し、無水硫酸ナトリウム 1g で脱水後、汙過、少量のエーテルで洗滌し、汙液および洗液を合せ室温下減圧濃縮する。濃縮残渣はデシケータの中で良く乾燥し、20 μ lの醋酸エチルを加え、溶解し、その 1~2 μ l を (a) のカラムを用いて分析する。つぎにその残液にヘプタフロロ無水ラク酸 20 μ l を加え、前記方法で各薬物の

HFB 誘導体にし、GLC で各薬物を再確認する。今回の GLC の注入量は 20 μ l の醋酸エチルに溶解し、その 1 μ l を用いて分析した。また、メチルフェニデートと、各 HFB 誘導体の GLC は (e) のカラム (2 m) を使用した。

2. 実験結果

遊離塩基のガスクロマトグラフィー

各薬物について比較的良好な分離能、検出感度を示したカラム充てん剤による保持データを表-I に、またそのクロマトグラムを図-1に示した。

6種の薬物のうち、メチルフェニデートはいずれのカラムでも保持時間が大で、同一温度下における他の5種の薬物との連続分析は適当でない。また、他の薬物の分離能が良いアルカリ性カラムでは GLC 中分解ピークを生じ易く、検出感度も極めて悪い。しかし、OV-17, XE-60等のシリコン系カラムでは比較的シャープなクロマトグラムを示し、感度も良い結果を示した。

表および図中、6種の薬物以外にニコチンを加えたが、これは被検者が喫煙者の場合に尿中に排出されるニコチンが或る種の覚醒アミンのクロマトグラムと重なる恐れがあるためである。

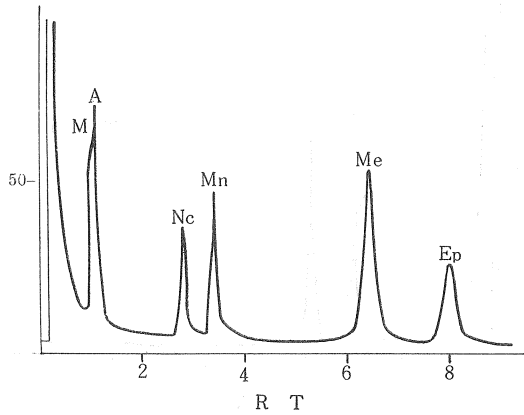
これらの薬物の GLC に最も有効であった 2% PFG 20M + 5% KOH カラム (1 m) を用いて得られた各薬物の検出限界量を表-I に示す。ただし、メチルフェニデートは 2% OV-17カラム 1 m で測定した。

表-I 各種カラムにおける薬物の保持時間

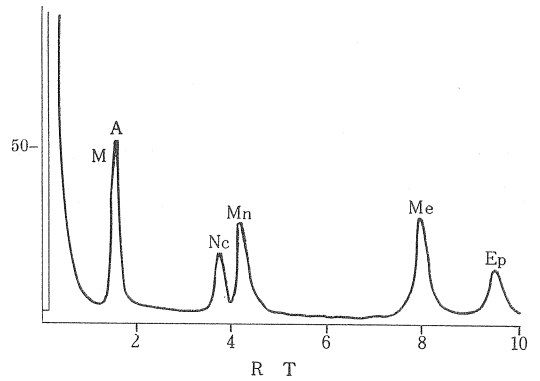
薬物	カラム		2%PEG 20M + 5% KOH	5% PEG6000 + 5% KOH	10%ApiezonL + 10% KOH	10%Versa- mide 940	2% OV-17
	カラム	温度*1	150	170	160	160	170
アンフェタミン	*2	1.1	1.5	2.2	1.5	—	
メチルアンフェタミン		1.0	1.3	3.0	1.6	—	
メトキシフェナミン		3.3	4.2	7.1	4.4	—	
エフェドリン		8.0	9.6	9.1	9.0	—	
メチルエフェドリン		6.5	7.9	9.7	7.7	—	
メチルフェニデート		—	—	—	—	3.2	
ニコチン		2.8	3.7	6.4	4.2	—	

*1：検出器および注入口温度は、カラム温度+約40°

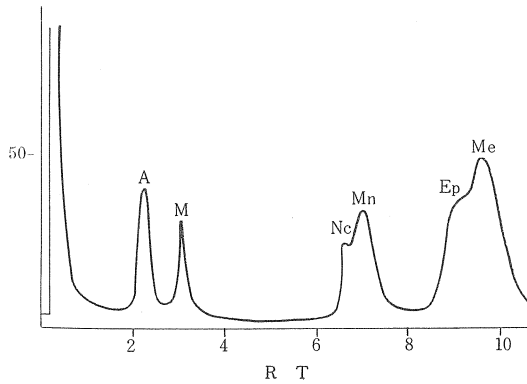
*2：保持時間 (min)



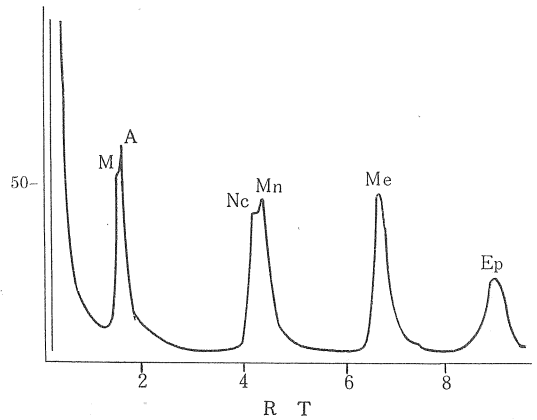
(i) 2% PEG 20M+5% KOH カラム
(Te 150)



(ii) 5% PEG 6000+5% KOH カラム
(Te 170)



(iii) 10% Apiezon L+10% KOH カラム
(Te 160)



(iv) 10% Versamide 940 カラム
(Te 160)

図-1 各種カラムによる混合物のクロマトグラム
NC: ニコチン, RT: 保持時間 (min), Te: カラム温度 (°C)

表-II 各薬物純品の検出限界量

薬物	GC条件 カラム	* カラム温度 (°C)	保持時間 (min)	検出限界 量 (μg)
アンフェタミン	2% PEG20M +5% KOH	140	1.3	0.15
メチルアンフェタミン	"	"	1.2	0.15
メトキシフェナミン	"	"	4.5	0.45
エフェドリン	"	"	11.3	1.00
メチルエフェドリン	"	"	9.1	0.60
メチルフェニデート	2% OV-17	210	3.1	0.50

*: 2% PEG20M+5% KOH カラムは 1m を用い, 2% OV-17 カラムは 2m を使用した。

パーフロアシル誘導体による確認

各薬物の純品の混合試料を用いて調整した TFA および HFB 誘導体の 2%OV-17カラム 2m による保持データを表-III に、そのクロマトグラムを図-2 および図-3 に示した。また同じカラムによるメチルフェニデートの遊離塩基と HFB 誘導体の混合物のクロマトグラムを図-4 に示した。

表-III 2%OV-17 (2m) カラムによるTFA および HFB 誘導体の保持データ

薬物	カラム温度	保持時間 (min)	
		TFA 誘導体	HFB 誘導体
アンフェタミン	140	2.6	2.3
メチルアンフェタミン	〃	4.5	4.0
メトキシフェナミン	〃	11.3	9.2
エフェドリン	〃	3.2	2.8
メチルエフェドリン	〃	1.9	1.9
メチルフェニデート	210	3.7	3.9
	220		

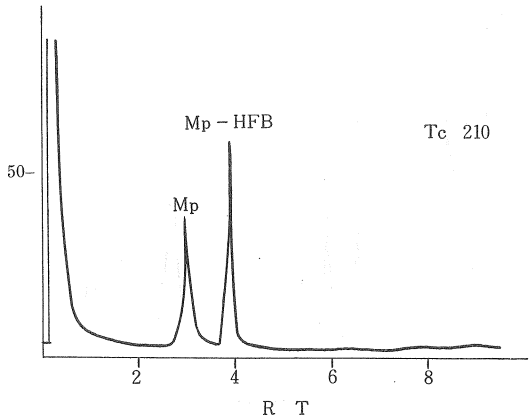


図-4 メチルフェニデートとその HFB 誘導体のクロマトグラム

メチルエフェドリンの TFA 誘導体は他の薬物の TFA 誘導体に比較し、不安定な誘導体で醋酸エチル溶液を調整後、直ちに GLC を行なっても一部、分解ピークを生じ、数分後では TFA 体のピークは完全に消失し、数種の分解ピークを生じた。しかしこのものは反応液のままで使用すれば、TFA 誘導体の確認はできる。また、メチルエフェドリンの HFB 誘導体も比較的安定であるが、TFA 誘導体よりは安定性が高く、醋酸エチル溶液で数時間室温放置しても、HFB 誘導体として充分確認できた。

カラム充てん剤としては 2%OV-17 以外に、2%OV-1, 2%OV-25, 3%XE-60, 2%XF-1105 等のシリコン系ポリマーを用いて各誘導体の分離能、検出感度を比較検討したが、2%OV-17 カラムが最も良好な結果を示した。

2%OV-17カラム (2m) を用いて測定した各 HFB 誘導体の検出限界量を表-IV に示す。

表-IV 2%OV-17カラム (2m) による HFB 誘導体の検出限界量

HFB 誘導体	GC 条件 カラム温度 (°C)	保持時間 (min)	検出限界量 (μg) *
アンフェタミン	140	2.3	0.10
メチルアンフェタミン	〃	4.0	0.15
メトキシフェナミン	〃	9.2	0.60
エフェドリン	〃	2.8	0.20
メチルエフェドリン	〃	1.9	0.50
メチルフェニデート	210	3.9	0.20

*: 遊離塩基としての μg 量

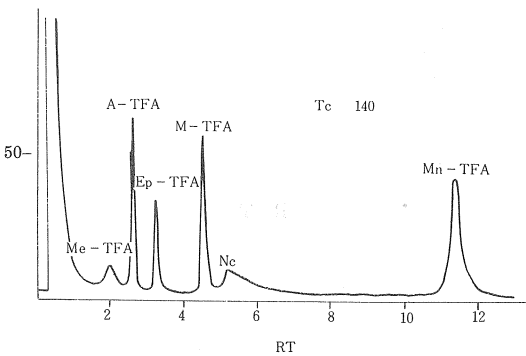


図-2 TFA 誘導体混合物のガスクロマトグラム

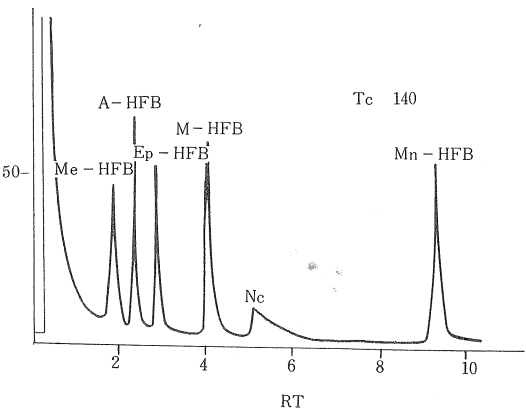


図-3 HFB 誘導体混合物のガスクロマトグラム

付加尿からの検出確認

2% PEG20M+5% KOHカラム 1mを用いた時の正常人尿のバックグラウンドを図-5に、各薬物の純品混合試料を付加した場合を図-6に示した。また2% OV-17カラム (2m)を用いてメチルフェニデートを検出した場合の尿のバックグラウンド

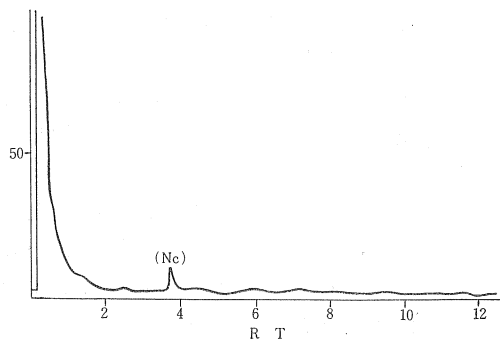


図-5 尿抽出物のクロマトグラム
2% PEG20M+5% KOHカラム (1m), Tc140

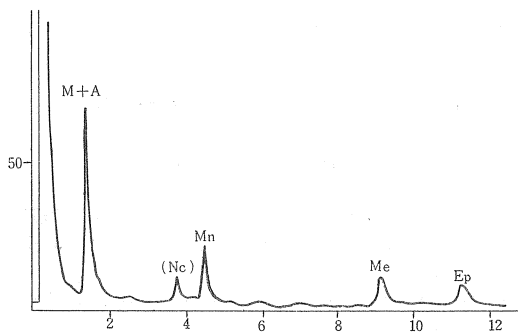


図-6 尿中から得た各薬物のクロマトグラム
2% PEG20M+5% KOHカラム (1m), Tc140

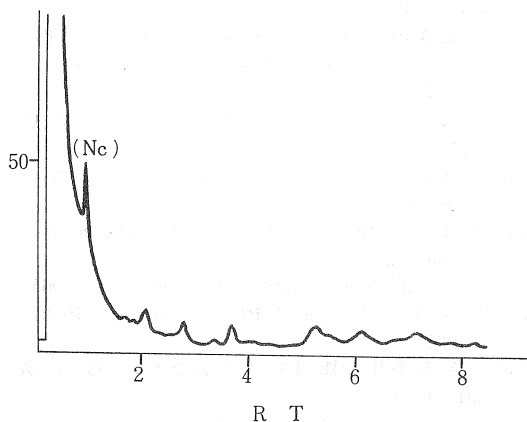


図-7 尿抽出物のクロマトグラム
2% OV-17カラム (2m) Tc210

を図-7に、付加した場合を図-8に示した。

各薬物とも尿成分の妨害をほとんど受けず確認された。図中における (Nc) は被検者の喫煙によ

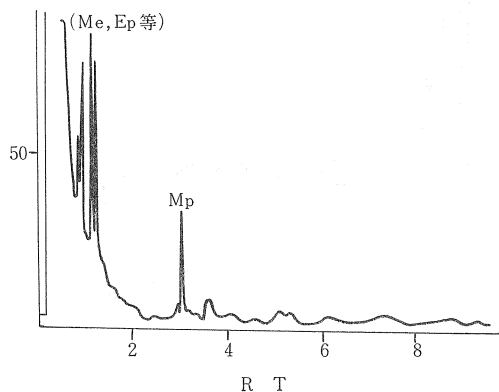


図-8 尿中から得たメチルフェニデートのクロマトグラム
2% OV-17カラム (2m), Tc210

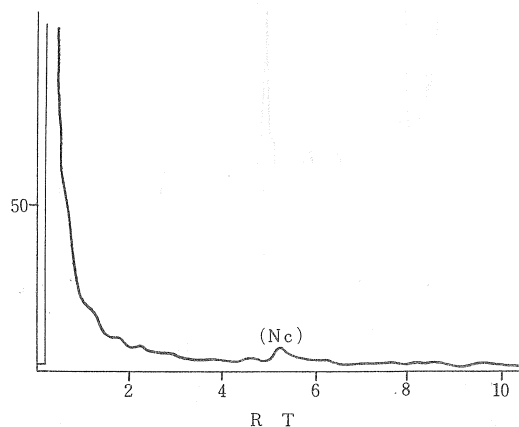


図-9 HFB化した尿抽出物のクロマトグラム
2% OV-17 (2m), Tc140

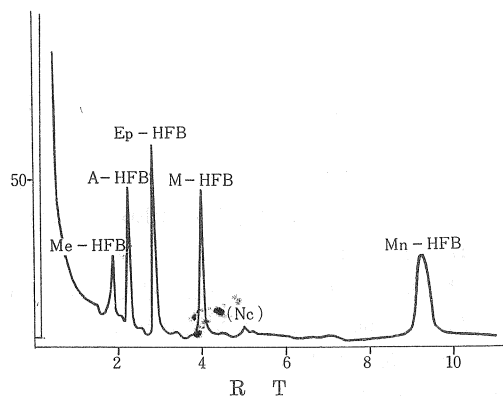


図-10 尿中より得た各薬物のHFB誘導体のクロマトグラム
2% OV-17 (2m), Tc140

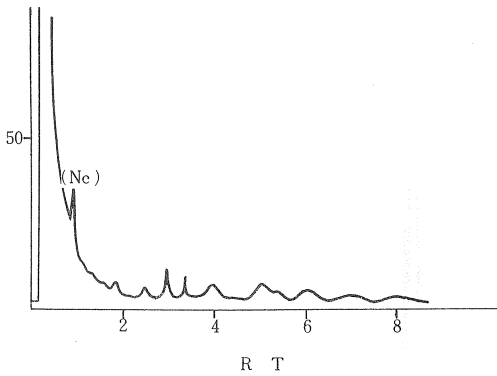


図-11 HFB 化した尿成分のクロマトグラム
2% OV-17カラム (2m), Tc210

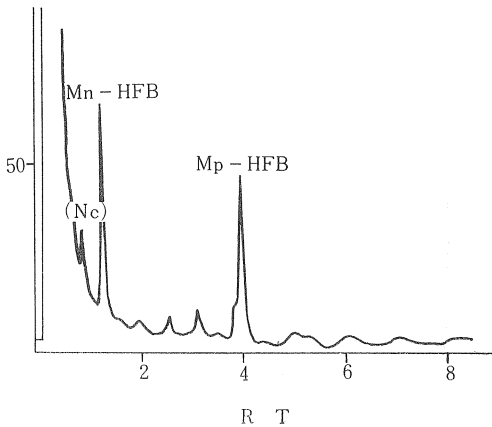


図-12 尿中より得たメチルフェニデートの HFB 誘導体のクロマトグラム
2% OV-17カラム (2m), Tc210

る尿中のニコチンと考えられる。

各薬物の遊離塩基を検出後、HFB 誘導体として再確認したクロマトグラムとその時の尿のバックグラウンドを図-9～12に示した。

考 察

以上の実験結果からつぎのようなことが明らかとなった。

- 1) 遊離塩基の確認にはメチルフェニデートを除いて、アルカリ処理をした PEG や Apiezon L カラムが有効である。メチルフェニデートはアルカリカラムでは分解を生じるが、OV-17, XE-60等のシリコン系カラムを用いると容易に検出できる。
- 2) 各薬物ともパーフロアシル誘導体にすればさらに高感度で確認できる。特に薬物の再確認に有力である。

- 3) パーフロアシル誘導体の分析には、OV-17カラムが特に優れている。
- 4) 相対的にメチルエフェドリンのパーフロアシル誘導体は不安定だが、HFB 誘導体は安定であり、確認に充分使用できる。
- 5) 尿中からの検査の場合は、あらかじめ酸性抽出を行ない、一部尿成分や他の混在物を除去することにより尿成分の妨害をほとんど受けずに微量の薬物を確認できる。

以上のように今回の実験の範囲内では、比較的良好な結果が得られたと思うが、今後の課題として、次のような大きな問題が残されている。

- 1) 欧米諸国で商品化されていて、構造的に覚醒アミンに類似した薬物の入手と検出法の確立。
- 2) 投与実験による未変化体および代謝産物の検出、回収率の測定。
- 3) 或る種のビタミン剤やポリエチレングリコール等の薬物の検出を困難にすると考えられるようなものの影響。
- 4) 現在、最も確実な分析法とされている、ガスクロマトグラフ-マススペクトロメーターの連結法 (GC-MS法) による薬物の検出、確認。

参 考 文 献

- 1) E. G. C. Clarke, J. Forens. Sci. Soc., 7, 31 (1967)
- 2) V. J. Baumler et al., Pharm. Acta. Helv., 44, 85 (1969)
- 3) G. P. Cartoni, A. Cavall, J. Chromatog., 37, 158 (1968)
- 4) P. E. Haywood, M. S. Moss, Analyst., 93, 737 (1968)
- 5) A. M. Heaton, A. G. Blumberg, J. Chromatog., 41, 367 (1969)
- 6) J. E. Wallace et al., Anal. Chem., 40, 2207 (1968)
- 7) M. S. Karawya et al., J. Pharm. Sci., 56, 1005 (1967)
- 8) M. S. Karawya et al., J. Pharm. Pharmac., 20, 650 (1968)
- 9) A. H. Beckett, M. Rowland, J. Pharm. Pharmac., 17, 59 (1965)
- 10) H. Brandenberger, E. Hellback, Helv. Chim. Acta., 50, 958 (1967)
- 11) C. R. Hall et al., Pharmacologist, 7, 148 (1965)
- 12) A. H. Beckett et al., J. Pharm. Pharmac., 19, 273 (1967)
- 13) A. Noirefalise, M. H. Grosjean, J. Chromatog., 37, 197 (1968)
- 14) P. A. Toseland, P. H. Scott, Clin. Chim. Acta., 25, 75 (1969)