

昭和45年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

No. VI ガスクロマトグラフィーによる覚醒アミンの検出

—— II 尿中からの定性，定量法 ——

財団法人 日本体育協会

スポーツ科学委員会

ガスクロマトグラフィーによる 覚醒アミンの検出

II 尿中からの定性, 定量法

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

最近では、多くの国で国際的なスポーツ競技の際、アンチ・ドーピングコントロールとして競技者の尿を用いた薬物検査を行なうようになった。ドーピングの対象となる広範な薬物のなかでも、特にアンフェタミン、メチルアンフェタミン、エフェドリン等の交感神経興奮様作用アミン（ここでは覚醒アミン類と略称）は使用されやすく、今日のドーピング検査では一般にこれらの薬物の検査が主体となっている。

尿中の覚醒アミン類の分析法については、これまでに種々な方法が報告されているが、現段階ではガスクロマトグラフィー（GLC）による分析^{1)~13)}が有効とされ、一般に広く普及している。先に開催されたグルノーブルおよびメキシコのオリンピックでも、主にGLCを用いたドーピング検査が実施された¹⁴⁾。

昭和44年度の本研究¹⁵⁾において、GLCによるアンフェタミン、メチルアンフェタミン、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基礎的な分析法について報告したが、今回は新たに入手した類似薬物のジメチルアンフェタミン、エチルアンフェタミン、フェンフルラミンおよびノルフェンフルラミンを追加し、これらの薬物の尿中からの分析法について検討を加えた。まず、これらの薬物の相互の分離について基礎的の知見を得、つぎに尿中からの定性、確認法を遊離塩基およびその誘導体について検討した。さらに、尿中の薬物の定量法についても検討を加えた。

実験方法

試料

硫酸アンフェタミン、塩酸メタンフェタミン、塩酸エフェドリンおよび dl-塩酸メチルエフェドリンはそれぞれ局方品を使用した。市販品の塩酸メトキシフェナミン（日本新薬）は市販品を、またジメチルアンフェタミン、エチルアンフェタミン

Structural formulae of sympathomimetic amines

Compound	Formula
Amphetamine	
Methylamphetamine	
Dimethylamphetamine	
Ethylamphetamine	
Fenfluramine	
Norfenfluramine	
Methoxyphenamine	
Ephedrine	
Methylephedrine	

ン、フェンフルラミンおよびノルフェンフルラミンの各塩酸塩はロンドン大学の A. H. Beckett 教授の厚意により分与されたものを使用した。

ガスクロマトグラフィ

機種：日立 K-53 型

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：HMDS 処理したガラスカラム

2%PEG20M+5%KOH/Chromosorb G, 2m, 3mmφ (Column A)

2%PEG20M+5%KOH/Chromosorb G, 1m, 3mmφ (Column B)

2%OV-17/Chromosorb W, 2m, 3mmφ (Column C)

他に、10% Apiezon L+10% KOH/Chromosorb G, 2m, 3mmφ；

10% Versamide 940/Neopak 1A, 2m, 3mmφ；3% SE-30/Chromosorb W, 2m, 3mmφ；3% XE-60/Chromosorb W, 2m, 3mmφ などのカラムを使用した。

担体はいずれも酸およびシラン処理をしたものを使用 80~100メッシュ

キャリアガス：N₂, 50ml/min

溶媒：再蒸留した酢酸エチル

内部標準物質 (I. S.)：フェニルエチルアミンおよびジフェニル

定性法

(1) 尿中薬物の抽出法

被検尿 5 ml に 1 N HCl 1 ml を加え酸性下エーテル 20 ml で 3 分間振盪抽出を行ない、その水層をとり 2 N NaOH 1 ml を加え、エーテル 15 ml で 2 度振盪抽出する。抽出中エマルジョンが生じた場合には遠心分離を行なう。エーテル層を試験管に移し、フリーザー中に -10°C で約 15 分間放置して水分を氷結させ分離する。そのエーテル層を底部の尖ったコンベン中にとり、室温下ゆるやかに減圧濃縮を行なう。溶媒が完全に留去される前に濃縮を止め、少量のエーテルで濃縮物をコンベン底部に集め、室温下エーテルを蒸発させる。

(2) 遊離塩基の検出、確認

濃縮残渣に、内部標準物質のフェニルエチルアミンとジフェニルを適量含む酢酸エチル 50 μl を加えて溶解する。その 1~5 μl を A および B のカラム

で G L C 測定する。

(3) 誘導体による確認

酢酸エチル溶液の残渣にトリフルオル無水酢酸 30 μl を加え、密栓をして水浴中 50°C 下約 5 分間加熱してトリフルオルアセチル (T F A) 誘導体とする。反応液は 40°C 以下で減圧濃縮し、試薬が完全に留去される前に濃縮を止め、酢酸エチル 50 μl を加えて溶解する。その 1~5 μl を C のカラムを用いて G L C 測定を行なう。遊離塩基の分析においては、以下のような方法でトリメチルシリル (TMSi) 誘導体にして再確認を行なう。

酢酸エチル溶液の残渣にビストリメチルシリルアセトアミド (B S A) 試薬 30 μl を加え、水浴中 50°C 下約 10 分間反応する。その反応液を水浴中 40°C 以下で減圧濃縮し、残渣に酢酸エチル 50 μl 加えて溶解する。その 1~5 μl を C のカラムで G L C 測定する。

尿中薬物の定量法

尿 2 ml に薬物を付加し、これに一定量の内部標準物質 (アンフェタミン, メチルアンフェタミン, ジメチルアンフェタミン, エチルアンフェタミン, フェンフルラミンおよびノルフェンフルラミンの場合はフェニルエチルアミンの酢酸エチル溶液を、またメトキシフェナミン, エフェドリン, メチルエフェドリンはジフェニルの酢酸エチル溶液を使用した。ジフェニルは水に不溶なため、酸性抽出後の水層に加えた。) を付加後 1 N HCl 0.5 ml とエーテル 10 ml を加えて 3 分間振盪抽出する。その水層をとり、2 N NaOH 0.5 ml を加えてエーテル 8 ml で 3 分間振盪抽出を 3 度行なう。エーテル層を試験管にとり、フリーザー中 (-10°C) で約 15 分間放置して水分を氷結させ分離する。そのエーテル層をコンベンに移し、1%酢酸/エーテル溶液 (V/V) 1 ml を加えて室温下減圧濃縮する。液量が約 1 ml になるまで濃縮し、それをガラス栓付きの容量約 2 ml のマイクロ試験管に移し、水浴中 40~45°C 下エーテルを蒸発留去する。残渣に 10% NaOH 0.1 ml と酢酸エチル 0.25 ml を加えて良く振り混ぜた後、少量の無水硫酸ナトリウムを加え、酢酸エチル層を別のマイクロ試験管に傾斜してとる。その 5 μl を A または B のカラムを用いて

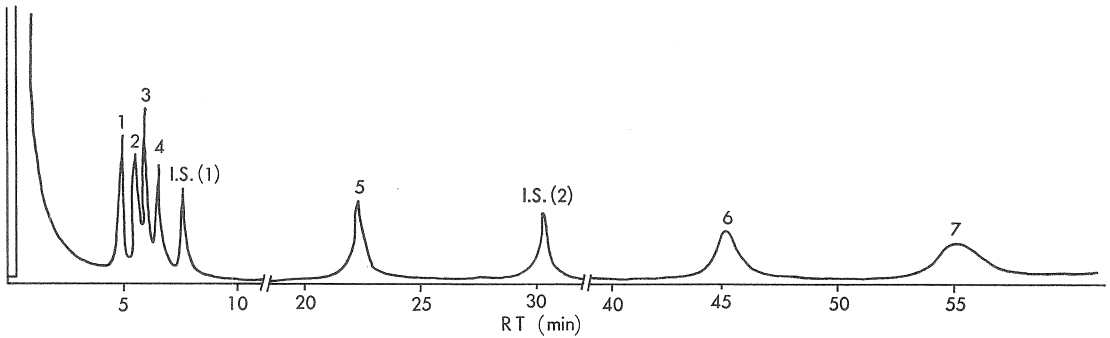


Fig. 1. Gas-chromatogram of Sympathomimetic amines on Column A. (Column temp. 140°C)
 1. Fenfluramine, 2. Norfenfluramine, 3. Methylamphetamine, 4. Amphetamine,
 5. Methoxyphenamine, 6. Mephedrine, 7. Ephedrine
 I. S. (1). Phenylethylamine, I. S. (2). Diphenyl.

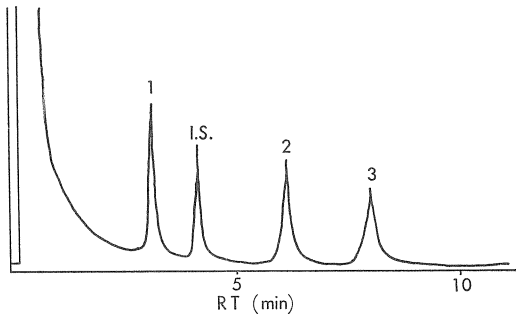


Fig. 2. Gas-chromatogram of Sympathomimetic amines on Column B. (Column temp. 150°C)
 1. Methoxyphenamine, 2. Mephedrine,
 3. Ephedrine I. S. Diphenyl

G L C 測定する。

実験結果および考察

遊離塩基およびその誘導体のガスクロマトグラフィ

前報でアンフェタミン、メチルアンフェタミン、エフェドリン等の遊離塩基の分析には担体をアルカリ (KOH) 処理し、PEG20MまたはPEG6000あるいはApiezon Lの液相をコーティングしたカラムが比較的分離能、検出感度の良いクロマトグラムを示すことを報告した¹⁵⁾。今回、新たに追加した薬物についても種々の液相を用いて検討したが、前報と同様にこれらの塩基性カラムが分離、検出感度とも良い結果を示した。特に分離能のよいPEG20Mではカラム長さ2m(A)と1m(B)の両方を用いて検討した。

カラムAおよびBによる各薬物の保持データをTable Iに、またそのクロマトグラムをFig. 1および

Table I. Retention data of Sympathomimetic amines on Column A and B.

Compound	*1 A		B	
	*2 140		150	
	*3 RT	RRT	RT	RRT
Fenfluramine	5.00	0.67	0.80	0.19
Norfenfluramine	5.65	0.75	0.85	0.20
Methylamphetamine	5.95	0.79	0.94	0.22
Dimethylamphetamine	6.10	0.81	0.98	0.23
Ethylamphetamine	6.20	0.83	1.00	0.24
Amphetamine	6.45	0.86	1.02	0.24
Methoxyphenamine	22.10	2.95	2.10	0.74
Mephedrine	44.90	5.99	6.15	1.46
Ephedrine	55.30	7.37	7.50	1.79
*4 Phenylethylamine	7.50	1.00	1.10	
Diphenyl	30.40		4.20	1.00

*1 A: 2% PEG 20M+5%KOH (2m, 3mmφ)
 B: 2% PEG 20M+5%KOH (1m, 3mmφ)

*2 Column temp. (°C)

*3 RT: retention time (min)
 RRT: relative retention time

*4 internal standard

Fig. 2 に示した。アンフェタミン、メチルアンフェタミン、ジメチルアンフェタミン、エチルアンフェタミン、フェンフルラミンおよびノルフェンフルラミンの測定にはAのカラムが、メトキシフェナミン、エフェドリンおよびメチルエフェドリンの測定にはBのカラムがそれぞれ有効なクロマトグラムを示した。

前報¹⁵⁾と同じように再確認にはパーフルオールアシル誘導体とする方法について検討を加えた。各薬物のトリフルオロアセチル (TFA), ペンタ

Table II. Relative retention times of Sympathomimetic amines and those perfluoroacyl derivatives on Column C.*1

Compound	Relative Retention Time			
	Free Base	TFA	PFP	HFB
Methylephedrine	3.28	0.60	0.64	0.71
Dimethylamphetamine	1.09	*2 T	T	T
Norfenfluramine	1.08	0.88	0.88	0.88
Amphetamine	0.91	0.89	0.89	0.89
Ephedrine	3.09	1.17	1.12	1.21
Fenfluramine	0.89	1.51	1.51	1.51
Methylamphetamine	0.66	1.64	1.67	1.64
Ethylamphetamine	1.03	1.85	1.82	1.77
Methoxyphenamine	2.84	4.85	4.59	4.39
*3 Phenylethylamine	1.00	1.00	1.00	1.00
	*4 (3.20)	(5.80)	(4.90)	(5.20)

*1 C: 2% OV-17 (2m, 3mmφ), Column temp. 120°C

*2 T: tertiary amine

*3 Internal Standard

*4 retention time (min.)

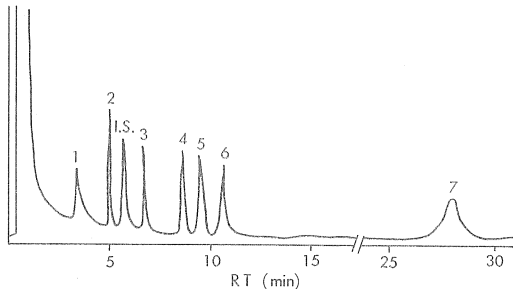


Fig. 3. Gas-chromatogram of trifluoroacetyl derivatives of Methylephedrine (1), Amphetamine (2), Ephedrine (3), Fenfluramine (4), Methylamphetamine (5), Ethylamphetamine (6) and Methoxyphenamine (7) on Column C. (Column temp. 120°C)
I. S. Phenylethylamine-TFA

フルオルプロピニル (PFP) およびヘプタフルオルブチリル (HFB) 誘導体の分析にはOV-17, XE-60, SE-30等のシリコン系液相のカラムがいずれも分離, 検出感度の良いクロマトグラムを示した。それらのうちで最も良い分離が得られた2%OV-17カラムによる保持データをTable IIに示した。TFA, PFPおよびHFBの3種の誘導体において分離能, 検出感度, 安定性等の比較ではほとんど優位差が認められなかったので尿中からの分析には最も一般的なTFA誘導体

を用いることにした。各薬物のTFA誘導体のクロマトグラムをFig. 3に示した。

メチルエフェドリンのパーフルオールアシル誘導体は他の薬物より著しく安定性に欠け, 誘導体を調整後, 直にGLC測定してもブロードなピークとなり検出感度も悪い。また酢酸エチル溶液で数分間放置すると分解ピークを一部生じる。しかし, トリメチルシリル (TMSi) 誘導体は安定性, 検出感度とも良好なクロマトグラムを示した。したがってメチルエフェドリンが検出された場合には, TMSi誘導体として再確認する方が良いと考えられる。カラムCによるメチルエフェドリンのTMSi誘導体のクロマトグラムをFig. 4に示した。

分子内に活性アミンを有する他の薬物のTMSi誘導体はいずれも不安定で, 分解ピークをとまなう。しかし, 活性アミンと水酸基の両者を有するエフェドリンはTMSiおよびTFAの両誘導体とも比較的安定であった。

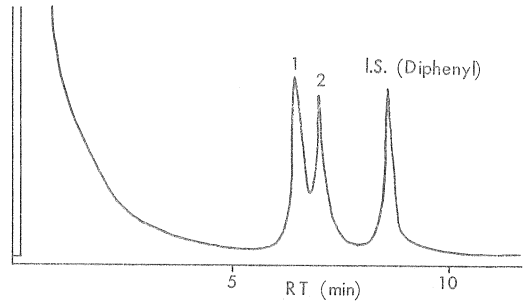


Fig. 4 Gas-chromatogram of trimethylsilyl derivatives of Ephedrine (1) and Methylephedrine (2) on Column C. (Column temp. 120°C)

尿中からの検出について

前報で一部の薬物の尿付加実験について記載¹⁵⁾したが, 今回は新たに追加した4種の薬物を尿に付加し検出, 確認を行なった。すなわち, 正常人尿5mlにジメチルアンフェタミン, エチルアンフェタミン, フェンフルラミンおよびノルフェンフルラミンの各塩酸塩の混合水溶液1ml (遊離塩基とし各5.0μg含有)を加え, 実験の部で述べた方法により抽出分離し, 遊離塩基およびTFA誘導体として検出, 確認した。GLCの測定は50μlの酢酸エチル溶液の5μl量を注入した。得られたクロマトグラムをFig. 5およびFig. 6に示した。

あらかじめ酸性抽出を行なうことにより, 尿成

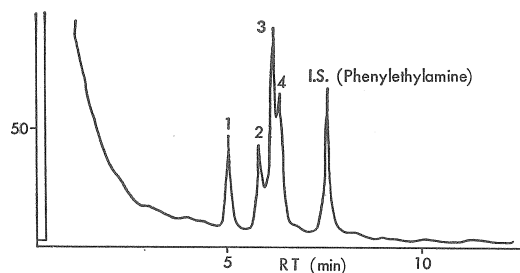


Fig. 5. Gas-chromatogram of an ether extract of 5 ml of urine containing 1 µg each of Fenfluramine (1), Norfenfluramine (2), Dimethylamphetamine (3) and Ethylamphetamine (4) per ml of urine on Column A. (Column temp. 140°C) Residue was dissolved in 50 µl of ethylacetate ; 5 µl of this Solution was injected.

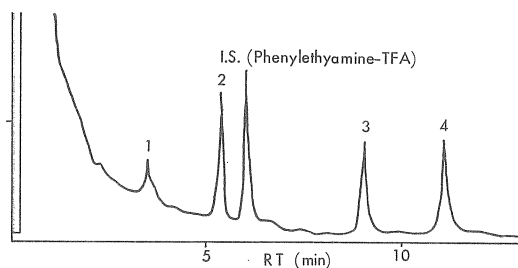


Fig. 6. Gas-chromatogram after trifluoroacetylation of the extract of 5 ml urine containing 1 µg each of Fenfluramine, Norfenfluramine, Dimethylamphetamine and Ethylamphetamine per ml of urine on Column C. (Column temp. 120°C) 1. Dimethylamphetamine, 2. Norfenfluramine-TFA, 3. Fenfluramine-TFA, 4. Ethylamphetamine-TFA.

分の妨害はほとんど受けず、微量の薬物が十分に検出、確認できた。この方法で尿中0.5~1 µg/mlの薬物が明確に検出、確認された。

定量について

アンフェタミン、メチルアンフェタミン、エフェドリンおよびメチルエフェドリンの一定量をそれぞれ尿 2 ml に付加し、実験の部で述べた方法で測定して得た各薬物の回収率を Table III に示した。回収率はあらかじめ作成した検量線から求め、それぞれ 5 例行なった。

一般に覚醒アミン類の遊離塩基は揮発性が極めて大きいため、そのままの状態では抽出溶媒の濃縮を行なうと薬物の損失を生じ、回収率が低く再現性も悪い。したがって今回の実験では濃縮の前に少量の酢酸を加えて薬物を酢酸塩としてから、抽出溶媒の濃縮を行なった。

アンフェタミンとメチルアンフェタミンの尿中

Table III. Recovery of some sympathomimetic amines added to urine

Compound	added (µg/ml)	recovery ± s. d.* (%)
Amphetamine	10.0	92.1 ± 2.59
Methylamphetamine	10.0	98.6 ± 1.52
Ephedrine	25.0	90.1 ± 4.25
Methylephedrine	12.5	93.8 ± 1.30

* s. d. : standard deviation

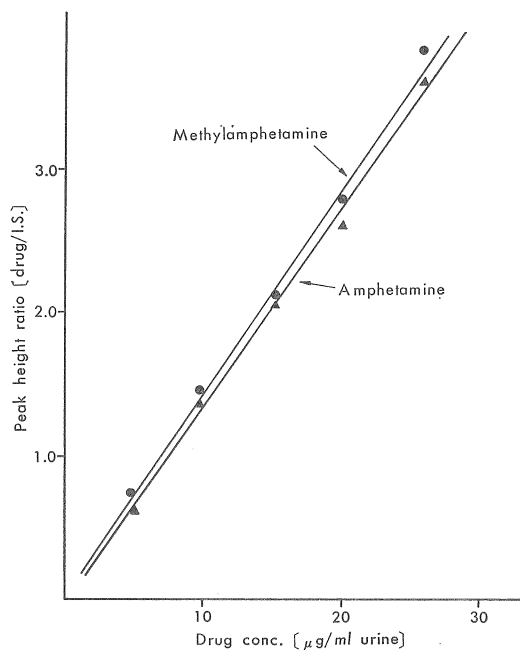


Fig. 7. Standard calibration curves for urine relating peak height ratios of Amphetamine, Methylamphetamine and Phenylethylamine (I. S.).

からの定量曲線を Fig. 7 に示した。縦軸に内部標準物質 (フェニルエチルアミン) とのピーク高さ比を、横軸に尿中への薬物の付加量を示した。両薬物とも尿中、数 µg/ml 量まで定量可能な直線関係が得られた。

結 論

尿中の覚醒アミン類の微量分析にはガスクロマトグラフィーによる方法が有効とされ、すでにドーピングの検査でも用いられているが、本報では主にそれらの分析法の簡易、迅速化の目的で種々な改良を試みた。

すなわち、尿中分離した薬物をまず、従来からよく用いられている塩基性カラムで検出、確認

し、さらに T F A, P F P, H F B 等のパーフルオルアシル誘導体としてシリコン系カラムで再確認する方法をとった。覚醒アミン類のパーフルオルアシル誘導体は分離能、検出感度とも極めて良好なクロマトグラムを示し、メチルエフェドリンを除いては誘導体の安定性も良い。特に、従来使用されているアセチル、シッフの塩、イソシアネート体等の個々の薬物に適合した誘導体に比べ、パーフルオルアシル誘導体はほとんどの覚醒アミン類の一連分析が可能である。また、ここで使用した 2 種の内部標準物質は遊離塩基と誘導体の両方の分析に適用できるので、ルーチン検査としては極めて便利である。本法により尿中およそ 0.5 ~ 1 $\mu\text{g/ml}$ 量の薬物が確実に検出、確認できた。

アンフェタミンとメチルアンフェタミンの尿中からの定量では、両薬物ともおよそ 2.5 $\mu\text{g/ml}$ 尿まで十分に定量することができた。

おわりにジメチルアンフェタミン、エチルアンフェタミン、フェンフルラミンおよびノルフェンフルラミンを分与されたロンドン大学の A. H. Beckett 教授に深く感謝します。

参 考 文 献

- 1) C. R. Hall et al., *Pharmacologist*, **7**, 148 (1965)
- 2) A. H. Beckett, M. Rowland, *J. Pharm. Pharmac.*, **17**, 59 (1965)
- 3) P. Capella, E. C. Horning, *Anal. Chem.*, **38**, 316 (1966)
- 4) D. E. Van Zwol, *J. Chromatog.*, **24**, 26 (1966)
- 5) A. H. Beckett et al., *J. Pharm. Pharmac.*, **19**, 273 (1967)
- 6) H. Brandenberger, E. Hellback, *Helv. Chim. Acta.*, **50**, 958 (1967)
- 7) H. V. Street, *J. Chromatog.*, **29**, 68 (1967)
- 8) A. Noirefalise, M. H. Grosjean, *J. Chromatog.*, **37**, 197 (1968)
- 9) G. P. Cartoni, A. Cavell, *J. Chromatog.*, **37**, 158 (1968)
- 10) P. A. Toseland, P. H. Scott, *Clin. Chim. Acta.*, **25**, 75 (1969)
- 11) J. Bäumler et al., *Pharm. Acta. Helv.*, **44**, 85 (1969)
- 12) 高市憲一, 科警研報告, **23**, 6 (1970)
- 13) A. Liberti, G. P. Cartoni, *Medicina Dello Sport*,

23, 352 (1970)

- 14) "Medical Commission of the International Olympic Committee" Reports 1. Grenoble, 2. Mexico
- 15) 大久保義夫, 昭和44年度日体協スポーツ科学研究報告 No. X