

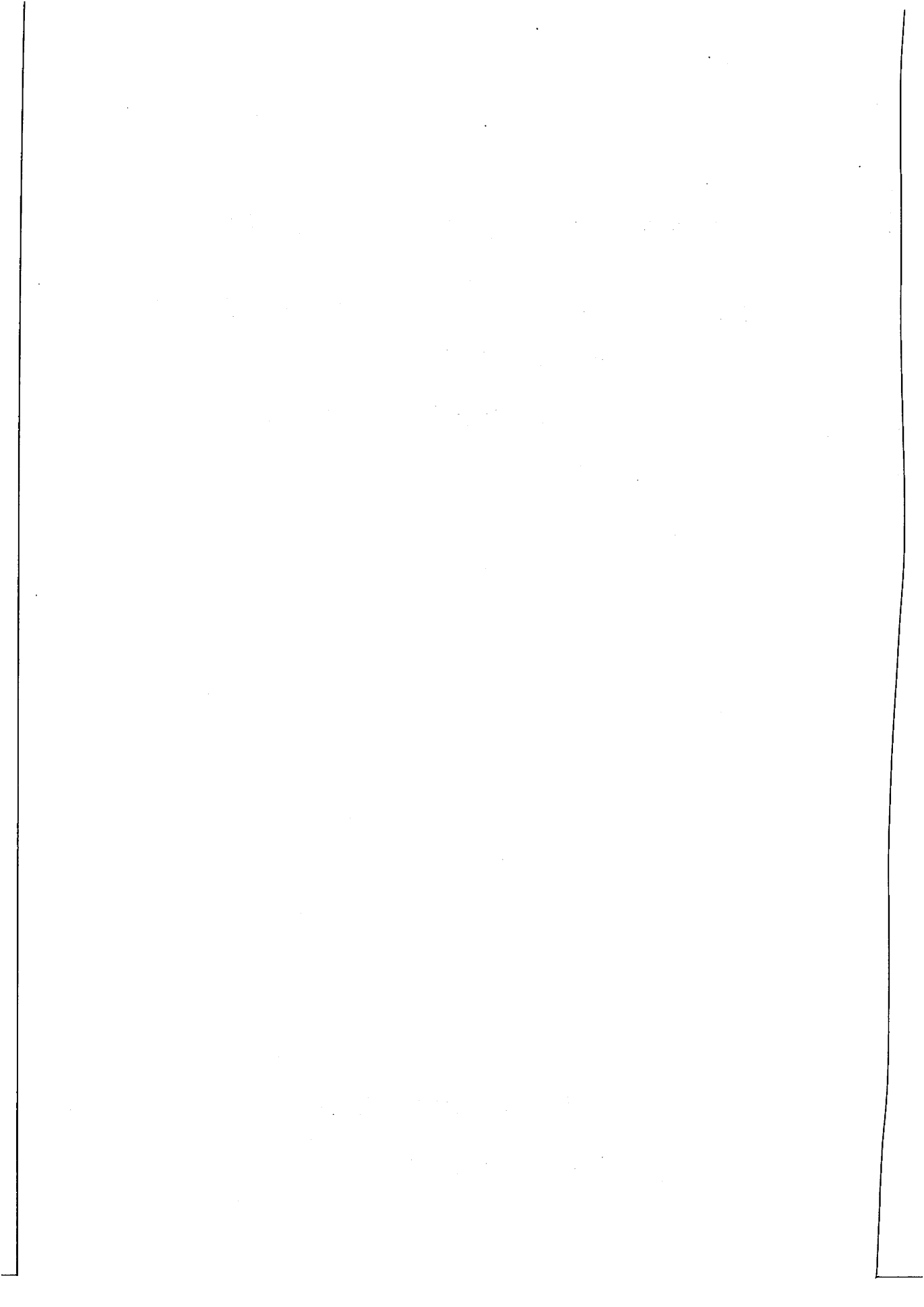
昭和57年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

No. VI スポーツ選手を対象とするドーピング
検査法に関する研究

—カフェインとテストステロン—

財団法人 日本体育協会

スポーツ科学委員会



昭和57年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告
No. VI スポーツ選手を対象とするドーピング検査法に関する研究
—カフェインとテストステロン—

報告者 三菱油化メディカルサイエンス(株)
班 長 金 井 晃
研究主任 平 井 利 生
研究班員 岡 田 高 治 藤 崎 誠
近 藤 仁 美

1. は じ め に

1982年2月、ベケット教授からの提案により、IOC医事委員会では新たに下記の2項目をドーピングテストに追加することが承認された。

- 1) 尿中カフェイン濃度が15 μ g/ml以上の場合にはドーピングテスト陽性とする。
- 2) 外因性のテストステロンが検出された場合はドーピングテスト陽性とする。

カフェインはコーヒー、緑茶等の嗜好品由来のため今までドーピングテストから除外されていたが、大脳皮質興奮作用を有し精神活動を盛んにしたり運動領の機能を亢進するなどの薬理作用があるため、尿中濃度が15 μ g/mlを越えた場合はドーピングテスト陽性と判断する、と一定の限界値を示したものである。

一方テストステロンは本来内因性(生体由来)のためドーピング薬物から除外されていたが、それ自身男性ホルモン作用の他に蛋白同化作用を有しているため、蛋白同化ステロイドの投与を途中からテストステロンに切替えることにより、薬物の効果を維持しながらドーピングテストで摘発されるのを防ごうとする選手が目立ってきたためテストステロンに対して一定の基準を設けたものである。

我々の研究班では以上の内容を受けて次の2項目について検討を行ったので報告する。

- 1) 尿中カフェイン定量分析法の確立。
- 2) 尿中テストステロン、及びエピテストステロン定量分析法の基礎検討。

1. 尿中カフェイン定量分析法の検討

1-1) 試薬

カフェインは関東化学社製の試薬特級をエタノールに溶解して標準溶液として実験に使用した。また内部標準としてはNMPZ(N-methylphenothiazine)を合成し、そのエタノール溶液を内部標準溶液として使用した。その他の試薬類は全て関東化学社製の試薬特級を用いた。

1-2) ガスクロマトグラフ

使用機種はヒューレットパッカード社製のHP-5840Aで、検出器には窒素、リン検出器(NP)を用いた。

1-3) 分析条件の検討

ガスクロによる分離条件を検討した結果、分析用カラムとしては10%Apiezon L+10%KOH、及び1.8%OV-17が比較的良好であったが、ガスクロの温度条件やドーピングテストの一次スクリーニングで使用しているカラムをそのまま適用できる等の理由により、ガスクロ用カラムとしては1.8%OV-17on chromosorb W-AW DMCS, 100-120 mesh, glass column, 2 mm I.D. \times 6 Ft. Lengthを選択した。またこの時の分析条件は、キャリアガス(N₂)流量30ml/min, カラム温度230 $^{\circ}$ C, 注入口温度260 $^{\circ}$ C, 検出器温度270 $^{\circ}$ Cが良好であった。こうして得られた標準品のガスクロマトグラムをFig-1に示した。

1-4) 尿からの抽出条件の検討

GC/NPによる一次スクリーニングでカフェインを検出した際、再び抽出操作を行わなくても抽出残液からガスクロ条件を変更するだけで定量分析を行えることが理想である。そこで我々は、カ

フェインフリーの正常尿にカフェインを添加して 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度となる様に調製した添加尿 5 ml に内部標準溶液 200 μl (NMPZ, 540 μg 相当) を添加して、当研究室で行っているドーピングテスト

の前処理法をそのまま適用して検討した結果、平均回収率 98.8% と良好な結果が得られ、またこの時の同時再現性は 3.5% (n=4) であった (Fig-2, Table-1)。

Table 1 Recovery and reproducibility of Caffeine analysis (with-in day variation)

	spiked value of caffeine ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	determined value ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	recovery (%)
1		56.9	94.8
2	60.0	58.8	98.0
3		61.9	103.2
4		59.4	99.0
mean \pm SD	98.75 \pm 3.466
CV (%)	3.5

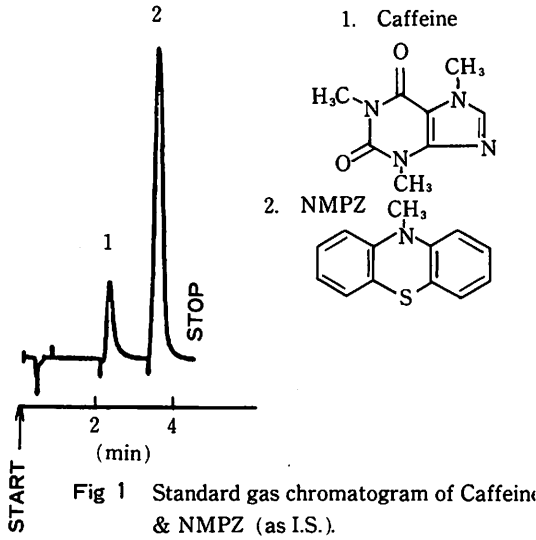


Fig 1 Standard gas chromatogram of Caffeine & NMPZ (as I.S.).

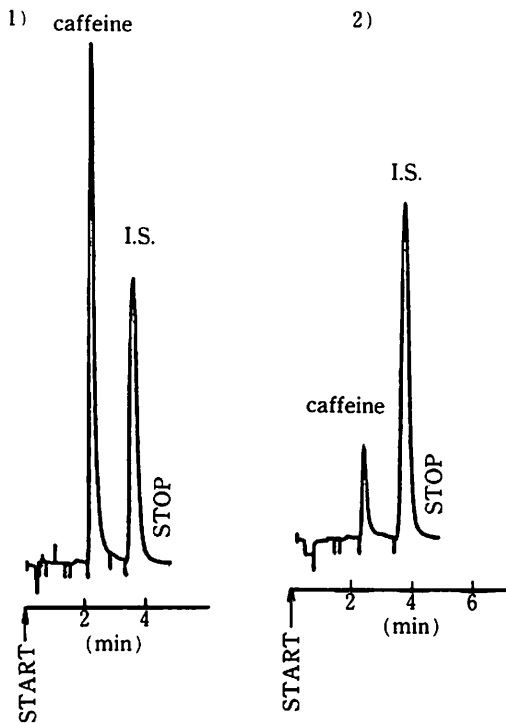


Fig 3 Gas chromatogram obtained in the analysis of 5 ml of urine extract 1) containing 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of caffeine, and 2) from coffee habitual drinker.

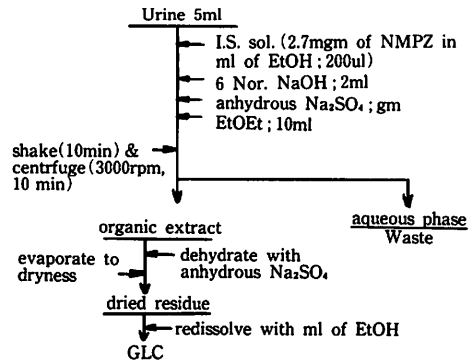


Fig 2 Extraction procedure of Caffeine analysis (urine).

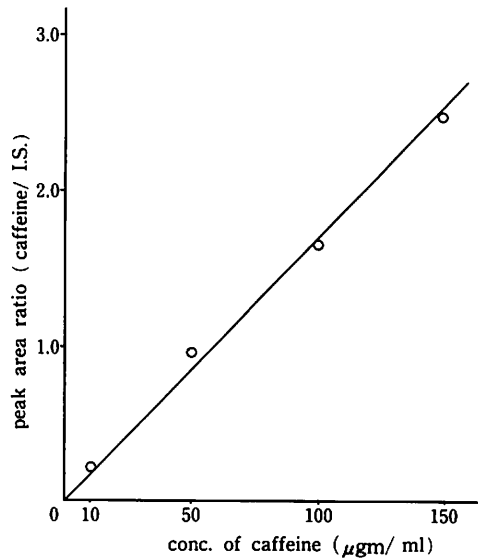


Fig 4 Standard calibration curve of caffeine.

以上の結果より、被検尿にカフェイン定量用の内部標準物質を添加しておけば、カフェイン定量分析用として別途抽出操作を行わなくても定量分析が可能であることが分かった。

Fig-3 にカフェイン添加尿とコーヒー常飲者尿より得られたガスクロマトグラムを示した。

(検量線の作成)

カフェインフリーの正常尿 5 ml にカフェインを 0~150 $\mu\text{g/ml}$ の濃度となる様に添加し、本法に沿って分析を行い濃度とピーク面積比との関係を調べたところ Fig-4 に示す様にこの濃度範囲において原点を通る直線性が得られた。

2. 尿中テストステロン, 及びエピテストステロン定量分析法の基礎検討

2-1) 試薬

実験に使用した Testosterone (17β -Hydroxy-3-oxo-androstene), Epitestosterone (17α -Hydroxy-3-oxo-androstene), 及び Testosterone- β -D-glucuronide (Free acid) は Sigma Chemical Co., (St. Lois, U.S.A.) から入手し、また β -グルクロニダーゼ (13,000 unit/ml) は富士臓器社製のものを使用した。

その他の試薬類は全て関東化学又は和光純薬の試薬特級を使用し、誘導体調製試薬, 及びガスク

ロのカラム用担体, 液相等はガスクロ工業社製のものを用いた。

2-2) 分析機器

ガスクロマトグラフはヒューレットパッカード社製の HP-5840A を使用し、検出器としては水素炎イオン化検出器 (FID) を用いた。

GC/MS はヒューレットパッカード社製のガスクロマトグラフ, HP-5710A に日本電子社製の JMS-D300 型マスペクトロメトリーを接続し、コンピュータ, 及びディスクドライブは同じく日本電子社製の JMA-2000S, 及び MS-DK400 を使用した。

2-3) 誘導体化条件の検討

検討用カラムとして 3%OV-1, 2mm I.D. \times 6 Ft. を使用し誘導体化条件の検討を行った。

始めに当研究所で行っているアナボリックステロイドの誘導体化法をそのまま適用してテストステロンの分析を行った。即ち 100 μg のテストステロンを 500 μl の脱水ピリジンと 50 μl の BSTFA (N, O-bis-trimethylsilyltrifluoroacetamide) の混液に溶解し室温で 30 分間反応を行い窒素吹付けにより溶媒及び過剰の試薬を乾固させた後、100 μl の脱水ピリジンに再溶解して GC/EI-MS 法によりマスペクトルを測定したところ、 $M/Z=360$ $[M]^+$, 及び $M/Z=270$ $[M-TMSOH]^+$ が検出され

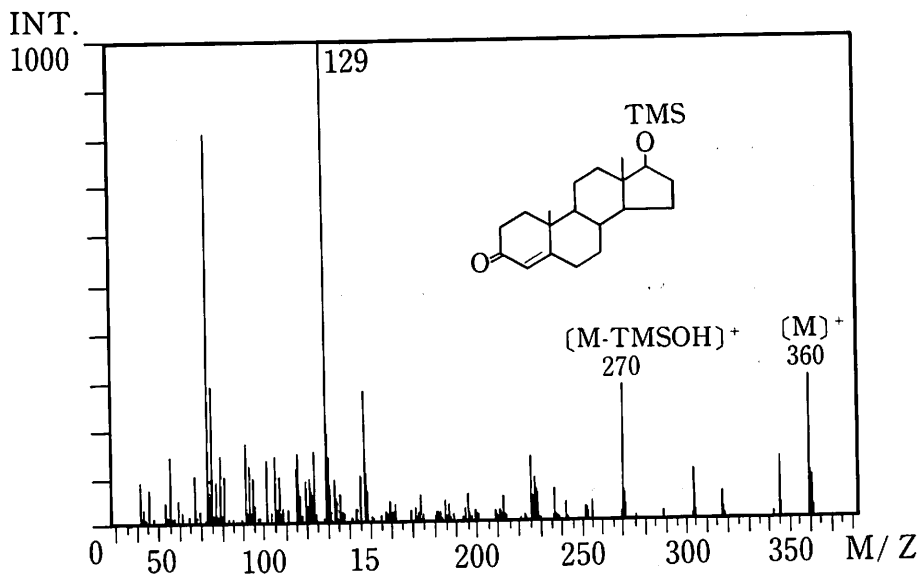


Fig 5 EI-Mass spectrum of Testosterone-TMS.

INT.
1000

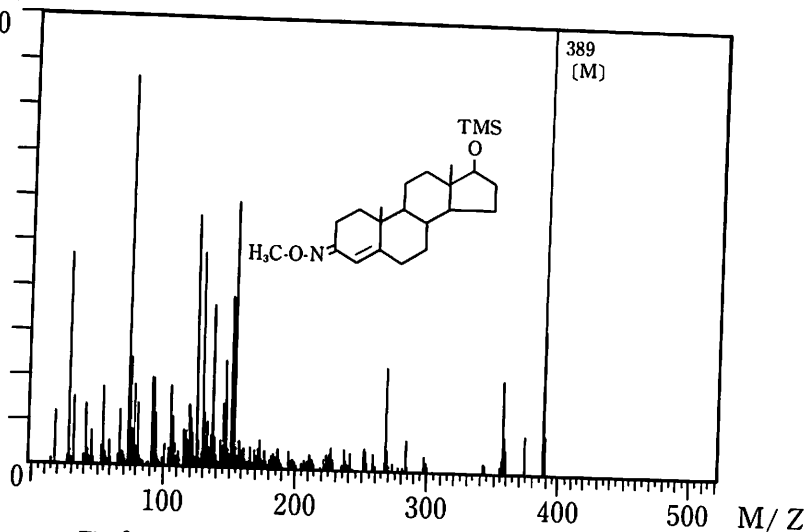


Fig 6 EI-Mass spectrum of Testosterone-MO-TMS.

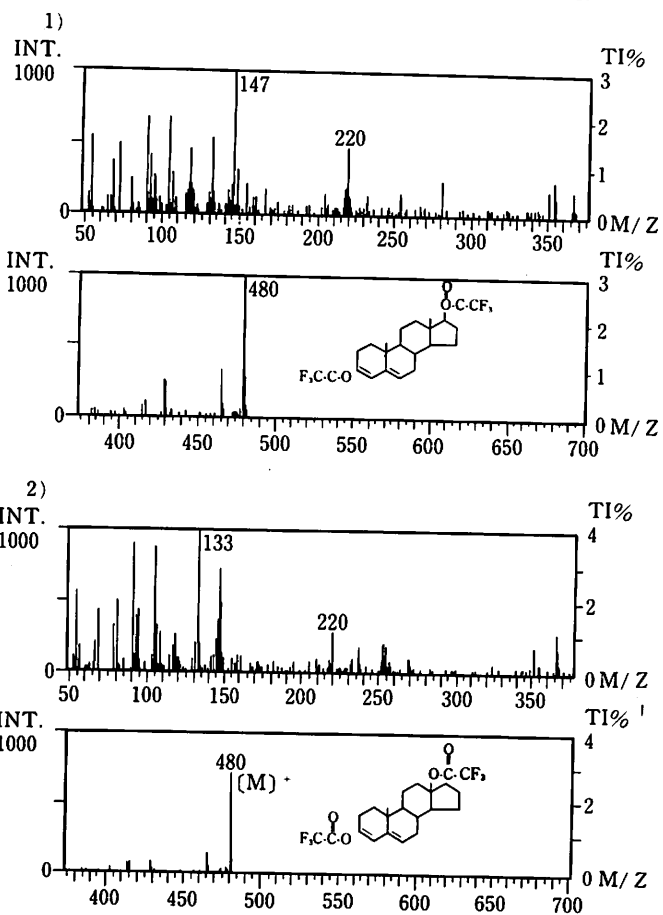


Fig 7 EI-Mass spectrum of the di-TFA derivatives of 1) Testosterone and 2) Epitestosterone.

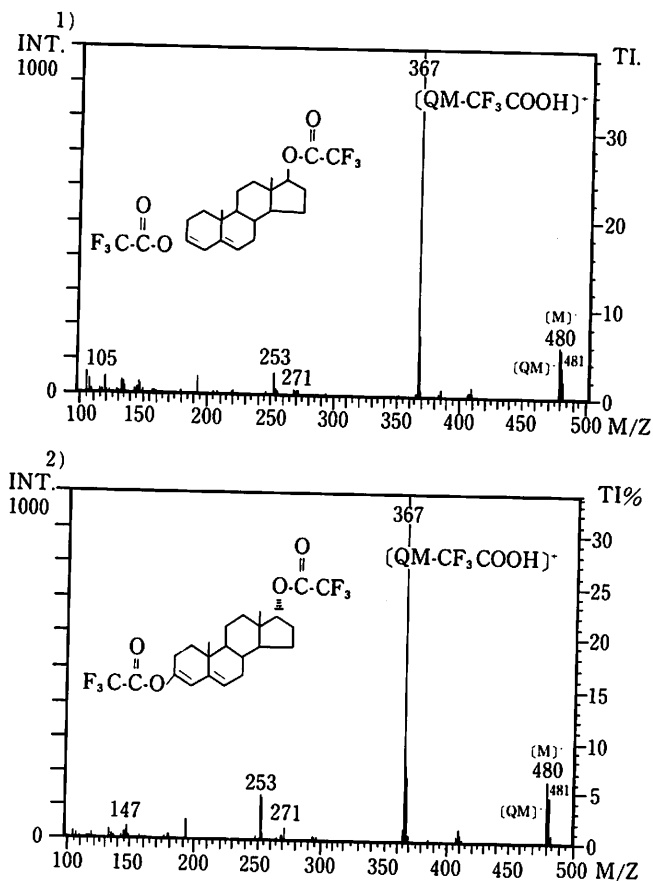


Fig 8 CI-Mass spectrum of the di-TFA derivatives of 1) Testosterone and 2) Epitestosterone. (CI gas using isobutane)

たが (Fig 5), ピーク強度が小さいため SIM (Selected Ion Monitoring) 法による定量分析には適さないことが分かった。

次に Claes Lindberg 等の方法に従って MO-TMS 化を検討した。EI-マススペクトルを測定したところ $M/Z=389 [M]^+$ がベースピークとなり良好であった (Fig 6) が, ガスクロマトグラム上で2つのピーク, つまり syn と anti の異性体が検出され, 誘導体化条件を種々検討しても単一ピーク²⁾とすることができなかった。さらに清水等の方法を応用して HFBA (Heptafluorobutyric acid anhydride) によるアシル化を検討したところ, やはり2つの異性体の生成が見られた。

それに対して100 μ gのテストステロンを100 μ lの TFAA (Trifluoroacetic acid anhydride) に溶解して65 $^{\circ}$ Cで30分間アシル化を行い窒素吹付けに

より過剰の試薬を乾固した後, 100 μ lのベンゼンに再溶解してガスクロで分析したところ単一ピークが得られた。またエピテストステロンについても同様に処理して検討したところ良好な結果が得られた。両者のEI-マススペクトルを測定した結果 $M/Z=480 [M]^+$ が強く検出されたため (Fig 7), SIM 法による定量分析に使用できることが分かった。しかし, テストステロンとエピテストステロンのマススペクトルによる差異がはっきりしなかったためイソブタンを使用してのCI-マススペクトルを測定したところ, やはりテストステロンとエピテストステロンは類似のパターンを示しマススペクトルで両者を区別することはできなかった (Fig 8)。この場合, $M/Z=481 [QM]^+$ よりもそこからCF₃COOH が脱離した $M/Z=367$ がベースピークとして³⁾ 検出された。

2-4) カラム条件の検討

3%OV-1ではTFA化したテストステロンとエピテストステロンの分離が悪かったためガスクロによりOV-17,及びSE-30を検討したところ, 3%SE-30を使用することにより良好な分離を行うことができた。次にこのカラムをGC/MSに接続して分子イオンM/Z=480を用いて下記の条件によりGC/SIMを検討したところ, Fig 9に示した様に良好なマスフラグメントグラムが得られた。

(GC条件)

カラム: 3%SE-30 on chromosorb W-AW
DMCS 80- 100mesh, 2 mm ID×6
FT

キャリアガス: He 30ml/min

注入口温度: 250°C

カラム温度: 240°C

(MASS条件)

モード: EI

エンリッチャー温度: 260°C

チャンバー温度: 230°C

イオン化電圧: 70eV

イオン化電流: 300 μ A

加速電圧: 3KV

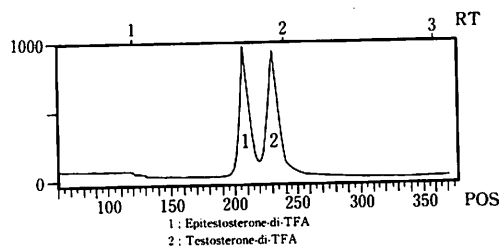


Fig 9 Standard mass fragmentogram of di-TFA derivatives of Testosterone and Epitestosterone (M/Z using 480).

2-5) 尿からの抽出条件の検討

始めに5mlの正常男子尿を用いて当研究所で行っている尿中遊離型蛋白同化ステロイド分析法³⁾に従って前処理を行い, TFA化した後GC/SIM (M/Z=480)により測定を行った。この時テストステロン, 及びエピテストステロン各1 μ gを添加した正常男子尿についても同様に検討を行った。抽出, 洗浄, アシル化だけでは目的成分に隣接した2つの妨害ピークが検出されたので, この

妨害ピークを除去するためにLH-20, アンバーライト XAD-2等の吸着クロマトグラフィ, 及びTLCを検討したところ, 抽出, 洗浄後の残渣を下記の操作によりTLC処理することで問題の妨害ピークを原点に止めてテストステロンとエピテストステロンを含む画分を分離, 精製することができた (Fig 10, 11)。

この結果, GC/SIMにより添加尿からテストステロン, 及びエピテストステロンが良好に測定されたが, 検体量5mlでは内因性の遊離型テストステロン, 及びエピテストステロンは検出されなかった。

(TLCによる分離, 精製)

a) プレート

メルク社製のプラスチックプレート Silicagel 60F₂₅₄ 20×20cmをそのまま使用した。

b) スポット

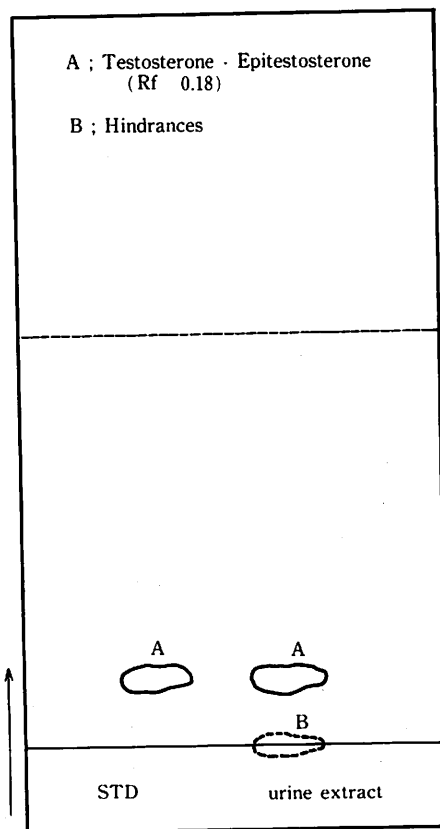


Fig 10 Single dimensional thin layer chromatogram of a standard and spiked urine extract.

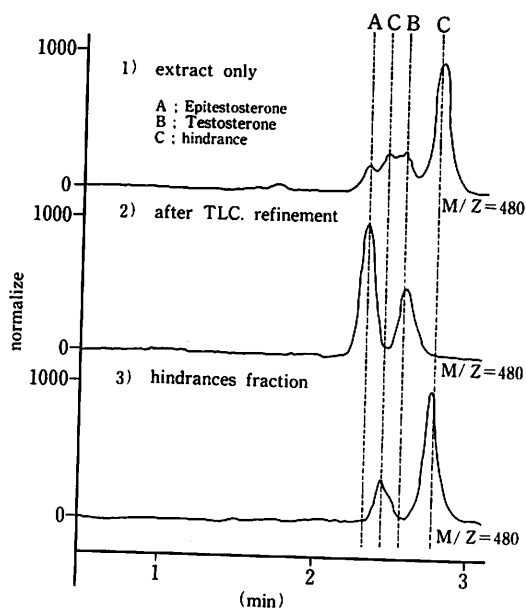


Fig 11 Mass fragmentogram obtained in the analysis of 5 ml of spiked urine extract.

残渣を少量のアセトンに再溶解し、プレート下端から 2 cm のところを原点としてそこにスポットした。

c) 展開溶媒

ベンゼン：酢酸エチル = 2 : 1 (V/V)

d) 展開

プレートを展開槽中で飽和したのち原点から 10 cm 展開した。

e) 抽出、精製

風乾後 UV-ランプ (254nm) でスポットを確認しプレートごと切り取ってエタノール 2 ml 中にしばらく漬けた後軽く振盪抽出を行った。エタノール抽出液を窒素吹付けにより蒸発乾固し分析まで -20°C 以下で凍結保存した。

2-6) 内因性の遊離型テストステロン、及びエピテストステロンの確認

正常男子尿 100 ml を使用して 2-5) に従って前処理を行い TFA 化して GC/SIM 法によりテストステロン及びエピテストステロンの検索を行ったところ、Fig 12 に示す様に多量のエピテストステロン、及び少量のテストステロンらしきピークが検出されたが、マススペクトルを測定できる程の量が得られなかったため明確な確認には至らな

った。

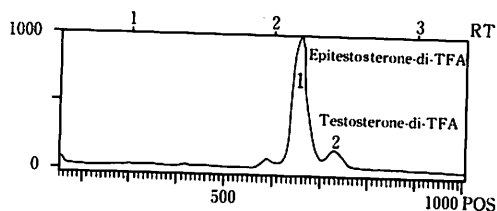


Fig 12 Mass fragmentogram obtained in the analysis of 100 ml of non-hydrolyzed urine extract from normal adult.

2-7) 抱合型テストステロンの確認

テストステロン-β-D-グルクロナイドを含む水溶液を PH5.0 ± 0.05 に調製し β-グルコニダーゼを添加して 37°C で 48 時間インキュベートした後抽出、精製、TFA 化を行って GC/SIM 法により分析したところ、Fig 13 に示した様にグルクロン酸抱合体が β-G 水解により遊離型になることは確認されたが、エピテストステロンと Rt を同じくするピークもかなり検出された。このピークがエピテストステロンであることはほぼ間違いないと考えられるが、これがテストステロン-β-D-グルクロナイドの水解によって生じたものなのか、あるいは標品に起因した現象であるのかについては今のところ不明である。

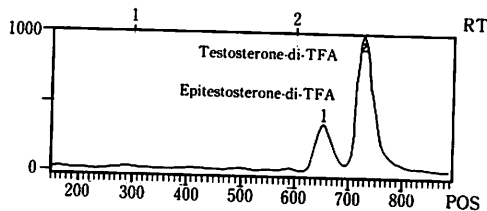


Fig 13 Mass fragmentogram obtained in the enzymatic hydrolysis of Testosterone-β-D-glucuronide.

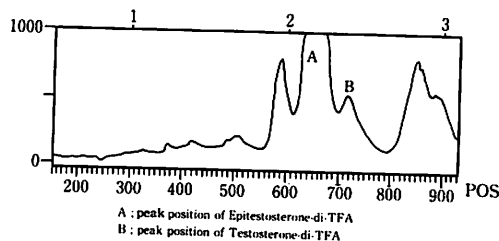


Fig 14 Mass fragmentogram obtained in the analysis of 100 ml of hydrolyzed urine extract from normal adult.

2-6)と同じ正常男子尿100mlをPH5.0±0.05に調製しβ-Gを4 ml (2,600unit/ml of urineの割合)に加え37°Cで48時間インキュベートした後2-6)に従って分析を行い遊離型と抱合型の比較を検討した。しかしサンプルクリーンアップに無理があったためか尿中妨害物質が多量に検出されたため比較検討することができなかった (Fig 14)

3. 結論及び今後の予定

GC/NPによる尿中カフェインの定量分析法についてはほぼ確立することができた。IOCの医事委員会ではドーピング陽性となる尿中カフェイン濃度の基準を15μg/ml以上と規定しているが、例えば日本の様にコーヒー以外に緑茶を多く愛飲している国では、尿中カフェインの排泄量も増加するため、15μg/mlという基準をそのまま適用するには問題がある様に考えられる。事実、若干名のコーヒーと緑茶の愛飲者尿について尿中カフェイン濃度を測定したところ10~13μg/mlとかなりの高値が得られたため、今後種々のケースについて尿中カフェイン濃度を測定し検討を重ねていく必要があると考えられる。

一方尿中テストステロン分析法の検討からは

- 1) 遊離型テストステロン、及びエピテストステロンのサンプルクリーンアップについては、当研究室で行っている蛋白同化ステロイド分析の前処理法にTLCを追加することで良好な結果が得られた。
- 2) 分析条件については、TFA誘導体にしてGC/EI-MSを行うことにより、単一ピークでしかも分子イオンを感度良く検出することができた。
- 3) 内因性の遊離型テストステロン、及びエピテストステロンの検索については、GC/SIMでは

検出されたが、マススペクトルを測定する程の量が得られず明確な確認には至らなかった。

- 4) 抱合体の分析に関しては、テストステロン-β-D-グルクロナイドの酵素水解によってエピテストステロンらしきピークが検出され、またサンプルクリーンアップにも検討の余地を残した。という結果が得られた。1), 2)よりGC/SIM法による尿中遊離型テストステロン、及びエピテストステロン定量分析法の基本的な操作についての検討はほぼ確立することができた。

今後さらに検討を進めて

- 1) 尿中エピテストステロンの同定
 - 2) 抱合体分析法の確立
 - 3) 内部標準物質の選択
- 等の基礎検討からGC/SIM法によるテストステロン分析法を確立した後、
- 4) RIAによる尿中黄体形成ホルモン(LH)の定量法
 - 5) 正常値の検討
 - 6) テストステロン投与者尿の分析について研究を進め、外因性テストステロンに関するドーピング検査法を確立していきたいと考えている。

参考文献

- 1) Claes Lindberg, Sven Jönsson, Pavo Hedner, and Åsa Gustafsson; Clin. Chem., 28,174-177, 1982
- 2) 清水久太郎, 山崎弘子, 原 照子, 医用マス研究会講演集, 第5巻, 217-220, 1980
- 3) (株)三菱油化メディカルサイエンス; 1978年度日本体育協会スポーツ科学研究報告 報告書 No VI

