

昭和59年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

No.III 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

——I O Cスクリーニング法による
ドーピング薬物の検査方法——

財団法人 日本体育協会

スポーツ科学委員会

昭和59年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

No.III 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

—— I O Cスクリーニング法による
ドーピング薬物の検査方法——

報 告 者 (株)三菱油化メディカルサイエンス
班 長 上 館 民 夫
研究主任 植 木 眞 琴
研究班員 藤 崎 誠 岩 淵 仁 美 岩 間 玲 子

——目 次——

- | | |
|---------------------------|----------------------------------|
| 1. はじめに | 2.6. 試薬 |
| 2. 方法 | 2.6.1 薬物標品 |
| 2.1 スクリーニング方法 | 2.6.2 その他の試薬 |
| 2.1.1 揮発性画分 | 2.6.3 誘導体化試薬の略号表 |
| 2.1.2 難揮発性画分 | 2.7 投与実験 |
| 2.1.3 熱不安定性物質 | 3. 結果 |
| 2.1.4 蛋白同化ステロイド | 3.1 スクリーニングI |
| 2.2 カフェインの定量方法 | 3.2 スクリーニングII |
| 2.3 外因性テストステロンの検出方法 | 3.3 スクリーニングIIIおよびカフェインの確認
分析 |
| 2.4 ドーピング薬物の判定方法 | 3.4 スクリーニングIVおよびテストステロンの
確認分析 |
| 2.5 装置及び測定条件 | 4. 結言 |
| 2.5.1 ガスクロマトグラフ | 5. 注釈 |
| 2.5.2 高速液体クロマトグラフ | 6. 文献 |
| 2.5.3 二重収束型ガスクロマトグラフ質量分析計 | |
| 2.5.4 四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 | |

1. はじめに

国際的なスポーツ大会においてドーピング検査の果たす役割は増々重要になってきている。近年、アナボリックステロイド（蛋白同化ステロイド）の乱用例がたびたび報告されているが、一方でアナボリックステロイド長期使用選手が多数死亡しているとの報告もある。この種の薬物の使用は、生体内ホルモンの恒常性を人為的に変えるため、深刻な後遺症が残ることが指摘されている。

1980年のモスクワオリンピックにおいて多くのテストステロン乱用者が見出されて以来、IOC医事委員会では内因性物質をもドーピング検査の対象とすることを決定し、既に、第1回ヘルシンキ国際陸上選手権、サラエボ冬期五輪、ロスアンゼルス五輪の各ドーピング検査にて、外因性テストステロンおよびカフェインの定量が公式に実施されている。

この様な背景から、IOCおよびIAAFの認定ド

ーピング機関は、従来の定性試験に加え外因性テストステロンのスクリーニングとカフェインの定量とが新たに義務付けられるようになった。IOCではドーピングに使用する装置および方法を詳細に規定し、認定機関間のドーピング検査の標準化に務めている。

今回、我々の研究班では、これまでの研究成果に加え、過去2回の「ドーピングに関するワークショップ」に参加して得られた資料をもとに、IOC法によるドーピングテストの検討を実施したので報告する。

2. 方法

IOC法による尿ドーピングテストの概要を Fig. 2-1に示した。

尿中の薬物のスクリーニングは次の4スクリーニングを5画分に分けて実施する。

I) 揮発性画分（スクリーニング I）

尿中に遊離の状態では排泄される含窒素化合物群。

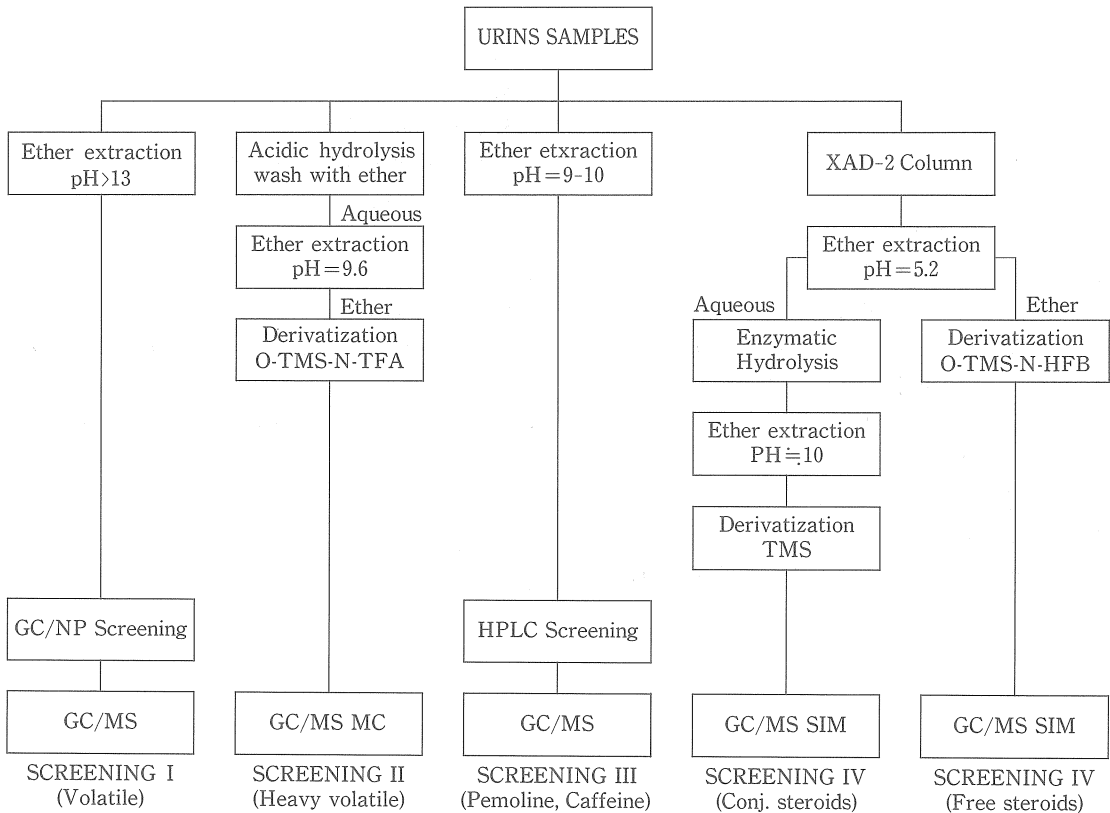


Fig 2 -1 SCHEME OF URINE ANALYSIS BY IOC-SCREENING PROCEDURE

II) 難揮発性画分 (スクリーニングII)

尿中に抱合体として排泄される含窒素化合物群。

III) 熱不安定性物質 (スクリーニングIII)

ガスクロマトグラフィーでの検出が困難な薬物。

IV) アナボリックステロイド (スクリーニングIV)

① 尿中に遊離の型で排泄されるステロイドの代謝物群。

② 尿中に抱合体として排泄されるアナボリックステロイドの代謝物群。

スクリーニングIは、遊離の含窒素化合物を窒素ーリン選択的検出器を使用したキャピラリーガスクロマトグラフ (GC/NP) で迅速かつ高感度で検出する方法である。

スクリーニングIIおよびIVでは検出器に質量分析計を使用するため、ほとんどの場合において、スクリーニングと同時に薬物の同定が完了し、確認分析が大幅に簡略化された。

従来、その不安定性から検出が困難であるとされてきた薬物 (たとえばペモリン) のスクリーニング方法として、新たに高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を使用した。

HPLCは、誘導体化が不要で、しかも室温で測定できるため、スクリーニング効率と操作性を大幅に向上させることができた。

スクリーニングIからIVの前処理、誘導体化法、測定条件は、主として Donike らの方法^{x1)}を参考にした。

2.1. スクリーニング方法

2.1.1. 揮発性画分

尿5mlに対し、5N-KOH 0.5mlと20 μ gの内部標準物質 (ジフェニルアミンとN-メチルフェノチアジン: NMPZ) および用時蒸留したジエチルエーテル2.0mlを加えたのち、水層を無水硫酸ナトリウムで飽和し、20分間振とう抽出した。

1,000 \times Gで5分間遠心して得たエーテル層1 μ lをGC/NPにて分析した。

2.1.2. 難揮発性画分

尿5mlに対し、システイン100mgと12N-HCl 1.0mlとを加え、105 $^{\circ}$ C、30分間加熱した。

この水解尿に5mlのジエチルエーテルを加えて20分間振とう洗浄したのち、エーテル層を廃棄し、第3ブタノール0.5mlと10N-ホウ酸カリウムバッ

ファー2.0mlとを加え、pHを9.6 \pm 0.1とした。

さらに用時蒸留した過酸化水素フリーのジエチルエーテル5.0mlと無水硫酸ナトリウム3gを加え、15分間振とうしたのち、エーテル層を遠心分取した。

このエーテル抽出液を乾固し誘導体化をおこなったのち、GC/MS分析に供した。

(選択的誘導体化法)

乾固物を、200ppmのメチルオレンジを含むアセトニトリル/トリフルオロ酢酸 (60/40) 溶液50 μ lに溶解後、メチルオレンジが赤から黄色に変色する迄MSTFAを加え、80 $^{\circ}$ C 5分間加熱した (第1段階: O-トリメチルシリル化)。

次に、MBTFA 10 μ lを加え、さらに80 $^{\circ}$ C、10分間加熱した (第2段階: N-トリフルオロアセチル化)。

このようにして得たO-TMS-N-TFA化物をそのままGC/MSに注入した。

誘導体化物の液色が黄色を示している間は数週間安定に分析できた。

検索は、各薬物に特徴的なイオンにて、マスプロットグラムを作成しておこなった。

2.1.3. 熱不安定性物質

尿1.0mlに内部標準としてエチルテオフィリン15 μ gと、0.1gの固型バッファー (Na₂CO₃:NaHCO₃ = 2:1)を加え、pH=9.6としたのち、無水硫酸ナトリウム0.5gで水層を飽和し、次いでジエチルエーテル5.0mlにて1分間振とう抽出した。

エーテル層を乾固後、400 μ lのメタノールに溶解し、その20 μ lをHPLCに注入した。

ペモリンおよびカフェインのスクリーニングは波長216nmでの紫外吸収にてモニターし、またカフェインの定量は波長274nmの紫外吸収にて実施した。

ペモリンのGC/MSによる確認分析はOrisaらの方法によった^{x2)}。

2.1.4. アナボリックステロイド

(ミニカラムによる精製)

アセトン、メタノールおよび蒸留水で充分洗浄した吸着剤XAD-2を、ガラス小球をカラム栓に用いたパストゥールピペットカラム (内径5mm)に

25mmの樹脂長で充填し、2 mlの蒸留水で洗浄した。

このカラムに、あらかじめ遠心しておいた尿上清5～10mlを添加後、同容積の蒸留水でカラムを洗浄した。

次いで0.5mlのメタノール5回で遊離型、抱合型のアナボリックステロイドを溶出し、その溶出液を乾固後、0.2M-酢酸ナトリウムバッファーpH=5.2, 1 mlに再溶解した。

この溶液に用時蒸留した過酸化水素フリーのジエチルエーテル5.0mlを加え、5分間振とう抽出し、エーテル層と水層とを各々遠心分取した。エーテル層は遊離型、また水層は抱合型のアナボリックステロイド画分として以下に示す処理を実施した。

(遊離型ステロイドの前処理)

遊離型ステロイドのエーテル抽出液は、乾固後五酸化リンとKOHとを乾燥剤として用いた真空デシケーター内でさらに30分以上充分乾燥し、誘導体化に供した。

(抱合型ステロイドの前処理)

抱合型ステロイドを含む水層は、2 mlのエーテルで洗浄後、痕跡のエーテルを加温除去した。次いで内標として1,2-重水素化テストステロンおよび50 μ lの加水分解酵素液を加えたのち、55 $^{\circ}$ C 3時間または37 $^{\circ}$ C, 16時間加水分解した。この水解液に炭酸カリウム100mgとエーテル5 mlを加えて5分間振とう抽出し、1 gの硫酸ナトリウムを加えて10分間室温に放置した。

エーテル層は遠心分取後、遊離ステロイドと同様に充分乾燥したのち、誘導体化をおこなった。

(遊離型ステロイドの誘導体化)

遊離型ステロイド画分の乾固物を混合誘導体化剤MSHFB/TMSC l /TMSIm (100/5/2) 50 μ lに溶解し、60 $^{\circ}$ C 1分間加温した(第一ステップ:O-トリメチルシリル化)。

次いで、7 μ lのMBHFBAを加え、80 $^{\circ}$ C 1時間反応させた(第二ステップ:N-ヘプタフルオロブチル化)。

この反応混合物をそのままGC/MSに注入し、SIM検出(選択的イオン検出)を実施した。

(抱合型ステロイド画分の誘導体化)

抱合型ステロイド画分の乾固物を、0.2%ジチオエリスリトールを含むMSTFA/TMS-iodo(1000

/2) 50 μ lに溶解し、60 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。

この反応液をそのままGC/MSに注入しSIM検出をおこなった。

2.2. カフェインの定量方法

カフェインはスクリーニングI, II, IIIのいずれでも検出できるが、その定量値はスクリーニングIまたはIIIによって得た。

定量値が15 μ g/mlを越える検体については、エチルテオフィリンを内部標準物質として、スクリーニングIIIの方法で再抽出をおこない、GC/NPD, HPLCの両方で定量し、再度15 μ g/mlを越えた場合には陽性と判断した^{文3), 文4)}。

2.3. 外因性テストステロンの検出方法

外因性テストステロンの検出は、テストステロン/エピテストステロン比(T/ET比)を指標としてスクリーニングIVの抱合体画分で測定した。テストステロンおよびエピテストステロンは、3-エノール-O-TMS-17-O-TMSエーテル誘導体とし、分子イオン432m/zにおけるSIM検出により測定した。

T/ET比は1980年以後に実施された主要な国際スポーツ大会の際に採尿した検体、計4683検体の分析結果から得られたデータを基にした^{文5)}。

正常比は危険率5%, 1%および0.1%のときそれぞれ3.48以下, 4.53以下および5.27以下であり、T/ET比が6を越えたものを陽性とした。

T/ET比が6を越えた検体については、スクリーニングIVの方法に基づき、遊離型ステロイドの抽出を省略し、総テストステロン量(遊離型+抱合型)として再現性を確認した。

その際、内部標準物質1,2-D₂テストステロンは検体分注直後に添加し、全行程の回収率補正ができる方式とした。また、次に示した計9種の内因性ステロイドを同時に測定し、判定の参考とした。

- ① 5 β -Androstandione
- ② cis-Androsterone
- ③ Ethiocholanolone
- ④ 5 α -Androstandione
- ⑤ Epitestosterone
- ⑥ Androstendione
- ⑦ Testosterone

- ⑧ 11 β -Hydroxyandrosterone
 ⑨ 11 β -Hydroxyethiocholanolone

2.4. ドーピング薬物の判定方法

外因性薬物の判定は、最終的に質量分析計を用いて実施され、次の手順に従って行なわれた。

- ①同一抽出物を再分析し、再現性を確認する。
 - ②推定薬物に、より適した方法で再抽出をおこない、再度確認する。
 - ③標品または投与尿から抽出した代謝物との比較により、保持時間、スペクトル (SIM の場合には各イオンの比率) が等しいことを確認する。
 - ④必要に応じ複数のイオン化方法 (電子イオン化、化学イオン化) または複数の誘導体化法によって同じ判定結果が得られることを確認する。
- 以上の方法によって外因性薬物が同定されたものを陽性と判定した。

2.5. 装置および測定条件

分析に使用した装置はガスクロマトグラフ 2 台、高速液体クロマトグラフ 1 台、二重収束型ガスクロマトグラフ質量分析計 3 台および四重極型ガスクロマトグラフ質量分析計 1 台である。すべてのガスクロマトグラフは化学結合型固定相を有する溶融シリカキャピラリーカラムを用いた。

各装置のデータ処理は付属のコンピュータまたはインテグレータによって行なった。

測定条件を 2.5.1 から 2.5.4 に示した。

2.5.1. GAS CHROMATOGRAPHS

(Equipments)

- i) HP5794A GC with Nitrogen/Phosphorus Detector (NPD)
- ii) HP5890A GC with NPD: Hewlett-Packard (HP)

Two GC were connected to HP7672A autosampler and to HP3390A or C-R2A (Shimadzu) Reporting integrator.

(GC Conditions for screening I)

Column : SE 54 Cross-linked fused silica capillary 0.2mm ϕ X16m (HP)
 Temp 1 : 100 $^{\circ}$ C
 Temp 2 : 300 $^{\circ}$ C (3min. hold)
 Rate : 20 $^{\circ}$ C/min.
 Injector : 280 $^{\circ}$ C (Split ratio 10 : 1)

Detector : 330 $^{\circ}$ C
 Carrier Gas : 1.9kg He/cm² at 100 $^{\circ}$ C
 Auxiliary gas : 20ml He/min.
 H₂ flow : 3.0ml/min.

2.5.2. HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPH

(Equipments)

TRI-ROTAR III HPLC : Japan Spectroscopic Co. (JASCO)

The HPLC was connected to UVIDEC 100-V (JASCO) UV-detector and to 710B (Waters) Autosampler.

(HPLC conditions for Screening III)

Column : RP-18 (7m μ Particle ODS-silica: Merck)
 Temp : 40 $^{\circ}$ C
 Flow rate : 2.0ml/min.

Wave length : 216nm

Solvent : 10%CH₃CN in Water

(HPLC conditions for Xanthine derivatives)

Solvent 1 : 10%CH₃CN in Water

Solvent 2 : 30%CH₃CN in Water

Rate : Solvent 1 to Solvent 2 within 15min.

Wave length : 274nm

Other conditions : see conditions for Screening III

2.5.3. DOUBLE FOCUSSING TYPE GC/MS

(Equipments)

JMS-DX303 GC/MS with JMA-DA5000 CPU; Japan Electric Optics Lab. (JEOL) Three GC/MS were connected to HP7672A autosampler. GC-column was coupled directly to the ion source. All devices were fully controlled by PASCAL program on RSX-11M Operating System.

(JMA-DA5000 : based on DEC PDP-11/23 CPU)

(GC/MS Conditions for screening II)

i) GC : MS-GCGO6 (JEOL)

Column : Dimethyl silicone cross-linked fused silica capil-

Temp 1 : 100°C (1 min. hold)
Temp 2 : 300°C (5 min. hold)
Rate : 16°C/min.
Injector : 300°C (Split ratio 10 : 1)
Carrier gas : 1.5kg He/cm² at 100°C

ii) MS

Ion source : 200°C
Transfer line : 300°C
Ionization current : 300 μA
Ionization voltage : 70 eV
Mass range : 50-500 m/z
Scan rate : 0.7 sec./scan

(GC/MS-SIM Conditions for Testosterone analysis)

i) GC

Temp 1 : 180°C (1 min. hold)
Temp 2 : 250°C
Temp 3 : 290°C (10 min. hold)
Rate 1 : 4°C/min.
Rate 2 : 16°C/min.
Injector : 300°C (Split ratio 10 : 1)

ii) MS : Magnetic field switching SIM

Dwell time : 100m sec./ion
Monitoring ion : 432, 434, 430, 522, 417, 419 (m/z)

Other conditions : see conditions for Screening II

2.5.4. QUADRUPOLE TYPE GC/MS (Equipments)

HP5995B GC/MS with HP9825B CPU and two floppy disk units (HP9885).

(GC/QMS Conditions for free steroids)

i) GC

Column : Dimethyl silicone cross-linked fused silica capillary. 0.2mm φ X 12.5m (HP)
Temp 1 : 180°C (1 min. hold)
Temp 2 : 290°C (10min. hold)
Rate : 15°C/min
Injector : 300°C (Split ratio 10 : 1)
Carrier gas : 1.2ml He/min. at 180°C

ii) QMS

Ion source : 200°C
Transfer line : 300°C
Analyzer : 250°C
Dwell time : 50m sec.

(GC/QMS Conditions for conjugated steroids)

i) GC

Temp 1 : 180°C
Temp 2 : 290°C (5 min. hold)
Rate : 3°C/min
Other conditions : see conditions for free steroids

2.6. 試薬

2.6.1. 薬物標品

内因性ステロイド標品および外因性薬物標品で市販されているものは主としてシグマ社から入手した。それ以外のものについては局方品などから抽出精製し、再結晶して用いた。また、一部の薬物については、西ドイツ体育大学のM. Donike教授、東京大学教授の黒田善雄博士、(財)競走馬理化学研究所の百瀬篤博士、科学警察研究所の故丹羽口徹吉博士らの御好意により分与されたものを使用した。

2.6.2. その他の試薬

(内部標準物質)

ジフェニルアミンおよび1,2-D₂テストステロンはそれぞれ和光純薬およびMSD ISOTOPE社より入手した。

N-メチルフェノチアジンおよびエチルテオフィリン (1,3-N,N-ジメチル-7-N-エチルキサンチン) はそれぞれフェノチアジン、テオフィリンから合成して使用した。

(誘導体化試薬)

誘導体化試薬の略号表を2.6.3に示した。MSTFA, MBTFA, MSHFB, TMS Cl, TSM ImはMacherey-Nagel社より、また TMS-iodoはAldrich社より入手した。

(前処理用試薬)

アンバーライト XAD-2はRohm & Hass社、メチルオレンジは和光純薬から入手したものを脱塩後熱水から再結晶して使用した。抽出に使用したジエチルエーテルは、使用の一週間以内に水素

化カルシウム処理し、蒸留した過酸化フリーのものを使用した。

2.6.3. 誘導体化試薬の略号

MSTFA : N-methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide

MBTFA : N-methyl-bis-trifluoroacetamide

MSHFB : N-methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorobuthylamide

TMSCl : trimethylsilyl-chloro-silane

TMSIm : trimethylsilyl-imidazole

TMS-iodo : trimethylsilyl-iodo-silane

抱合型ステロイドの加水分解は、Helix Pomatia由来の酵素液(β -Glucuronidase : Arylsulfatase 活性=5U/ml : 2.5U/ml)をベーリンガーマンハイム社より入手して使用した。

2.7. 投与実験

IOC薬物リスト記載のすべてのアナボリックステロイドについて投与実験をおこない、それら薬物の代謝物のスペクトルを得た。

投与対象者は健康人男子とし、ブランク尿を採尿後ただちに服用し、72時間以内の尿を別々にすべて採取した。

これらの尿を用い、投与薬物または代謝物の検索をおこなった。投与量を以下に示した。

クロステボル (Megagrisevit®) 50mg, デヒドロクロロメチルテストステロン (Oral-Turinabol®) 20mg, フルオキシメステロン (Halotestin®) 20mg, メステロン (Proviron®) 25mg, メテノロンアセテート (Primobolan®) 20mg, メタンジエノン (Abilol®) 20mg; 17 α -メチルテストステロン (Enalmon®) 50mg, オキシメステロン (Oranabol®) 20mg, オキシメトロン (Anadorol®) 25mg, スタノゾロール (Winstrol®) 20mg, エチルナンドロール (Orgabolin®) 20mg, ナンドロロン (Nortestosterone) 20mg, テストステロン (Testosterone acetate) 40mg

3. 結果および考察

実際のドーピング作業を実施する上で最も問題となるのが、分析時間と疑陽性の頻度である。判定を効率的に実施するためには分析カラムの分離能の向上、前処理の簡略化、検出の選択性が必須条件となる。

キャピラリーカラムの採用により、容易に高分

離能が得られ、選択的検出方法と組合せることによって、より多くの薬物を容易に同定できる様になった。

また、今回用いた誘導体化試薬はアミド系のTMS化剤およびTFA化剤であり、塩型薬物の誘導体化が可能で、しかも良好な溶媒としても使えるため、過剰試薬を除去しないで装置に注入できた。また、その際のイオン源の汚染度はほとんど問題とならなかった。

この様な特長により、O-TSM-N-TFA等の平衡反応においてもほとんど副産物なく安定な誘導体が得られ、操作時間も短縮できた。

3.1. スクリーニング I

アンフェタミンを初めとするフェニルアルキル

Table 3-1 List of absolute and relative retention time for volatile dope agents on SE 54 fused silica capillary column. (Conditions. see 2.5.1)

	Retention time (minutes)	Relative retention time	
Heptaminol	1.44	0.280	0.176
Amphetamine	1.56	0.309	0.194
Phentermine	1.74	0.352	0.221
Methamphetamine	1.84	0.375	0.236
Ethylamphetamine	2.12	0.442	0.278
Fenfluramine	2.13	0.443	0.279
Norpseudoephedrine	2.65	0.568	0.357
Nicotine	2.79	0.601	0.378
Chlorphentermine	2.88	0.623	0.385
Ephedrine	2.96	0.641	0.404
Methoxyphenamine	3.05	0.663	0.417
Methylephedrine	3.22	0.703	0.442
Phenmetrazine	3.44	0.743	0.468
Phendimetrazine	3.56	0.784	0.493
Etafedrine	3.68	0.812	0.511
Diethylpropione	3.77	0.834	0.525
Nikethamide	4.00	0.888	0.559
Leptazole	4.18	0.931	0.586
Diphenylamine (IS1)	4.47	1.000	...
Prolintane	4.54	1.017	0.640
Fencamfamine	4.88	1.107	0.697
Methylphenidate	5.24	1.183	0.744
Pethidine	5.33	1.204	0.758
Caffeine	5.77	1.309	0.824
Benzphetamine	5.84	1.325	0.834
Amiphenazole	6.80	1.553	0.978
N-Methylphenothiazine (IS2)	6.95	...	1.000
Methadone	7.48	1.715	1.067
Pipradrol	7.54	1.229	1.088
Dipipanone	9.04	2.086	1.312
Dextromoramide	11.09	2.572	1.619
Strychnine	12.64	2.941	1.851

アミン系の中樞興奮薬の多くは遊離のまま尿中に排泄され、本画分で検出された。

ストリキニーネ、デキストラモラミドおよびジピパノン等の麻薬系薬物は、高沸点なためGCカラムの温度を300℃付近迄上げる必要があり、従来のパックドカラムを用いた分析では液相の溶出による検出器の汚染が問題となったが、化学結合型固定相では液相の溶出がないため、NPDと組合せた場合100℃から300℃迄昇温してもベースラインの変動はごくわずかであった。

また、キャピラリーカラムの採用により、分離能が向上し、本スクリーニングで検出可能な薬物の種類は飛躍的に増加した。

Table3-1に本スクリーニングで検出される薬物と、その内標に対する相対保持時間を示した。

Table3-1に示した薬物のうち、メチルフェニデート、ノルシュードエフェドリン、ストリキニー

ネ以外の成分については2～20ppmの範囲で定量的に尿から回収され、良好な直線性を示した。ノルシュードエフェドリン、ストリキニーネはスクリーニングIIでも検出できた。

Fig3-1にニケタミドの陽性例を示した。クロマトグラム上に3種の非常在ピークが検出され、ピーク3の溶出時間からニケタミドが疑われたがGC/MSによる確認分析により、ピーク1、2がニケタミドの代謝物(脱エチル化体)、ピーク3がニケタミドであることがそれぞれ証明された(Fig3-2, Fig3-2-2)。

キャピラリーカラムを用いた場合、カラムに導入される試料量は $\frac{1}{10}$ 以下(スプリット比15:1)であるが、非常にシャープなピークとして溶出されるため、パックドカラムよりも高感度で検出できた。

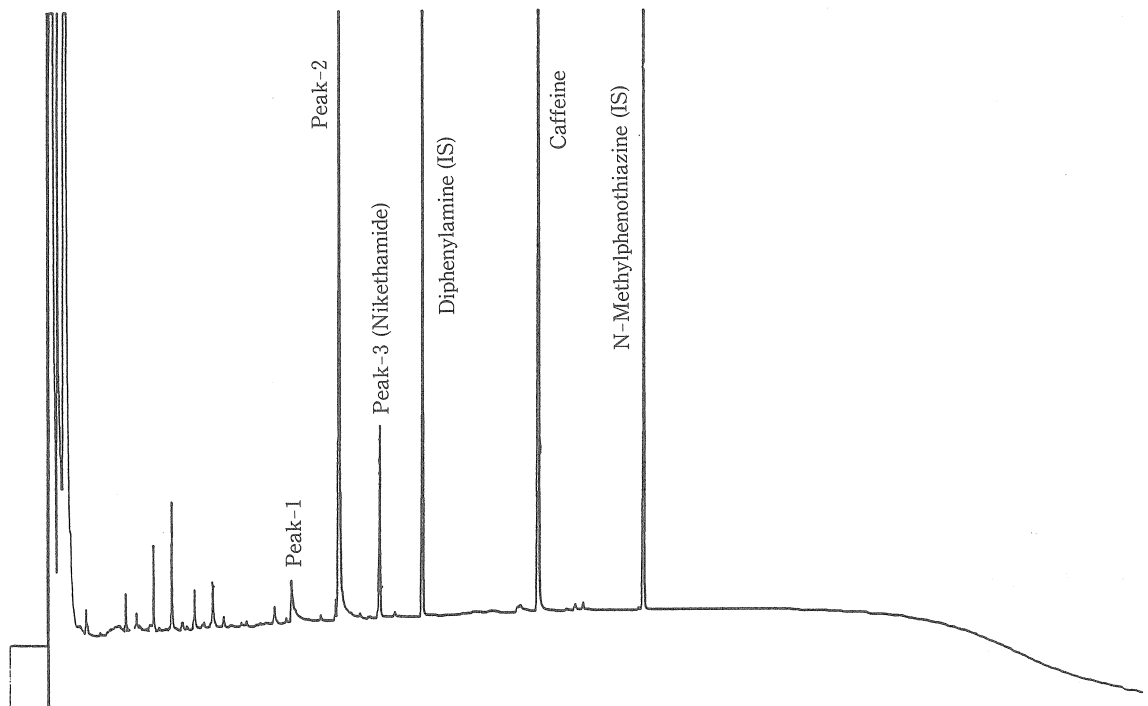


Fig 3-1 GC/NP-chromatogram of the urinary extracts (positive case of Nikethamide)

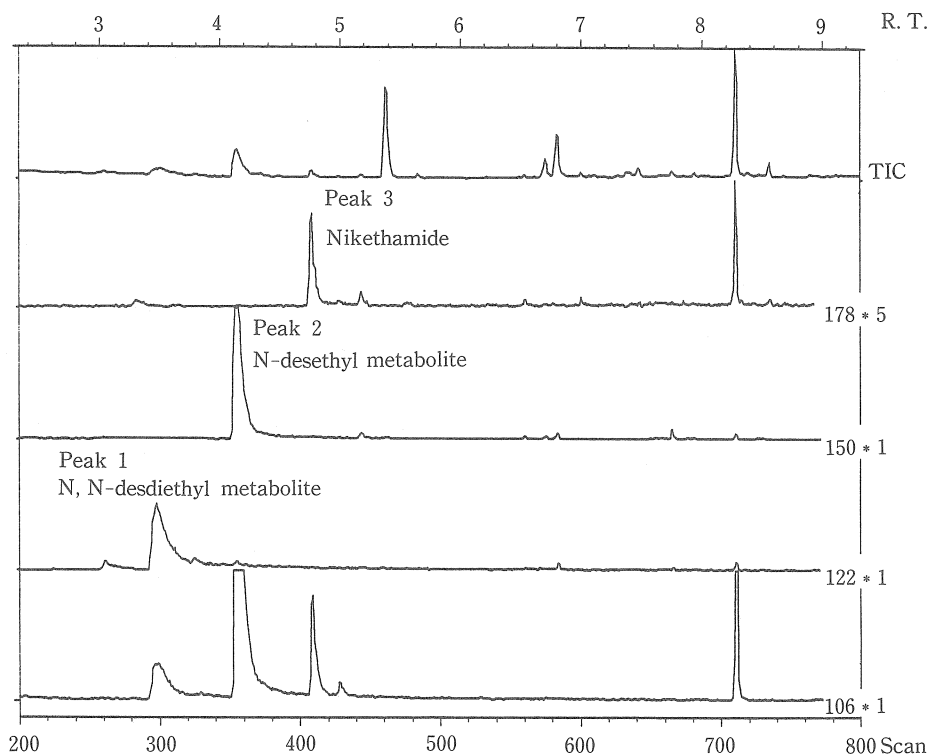


Fig. 3-2 Mass chromatogram of the urinary extracts (Positive case of Nikethamide)

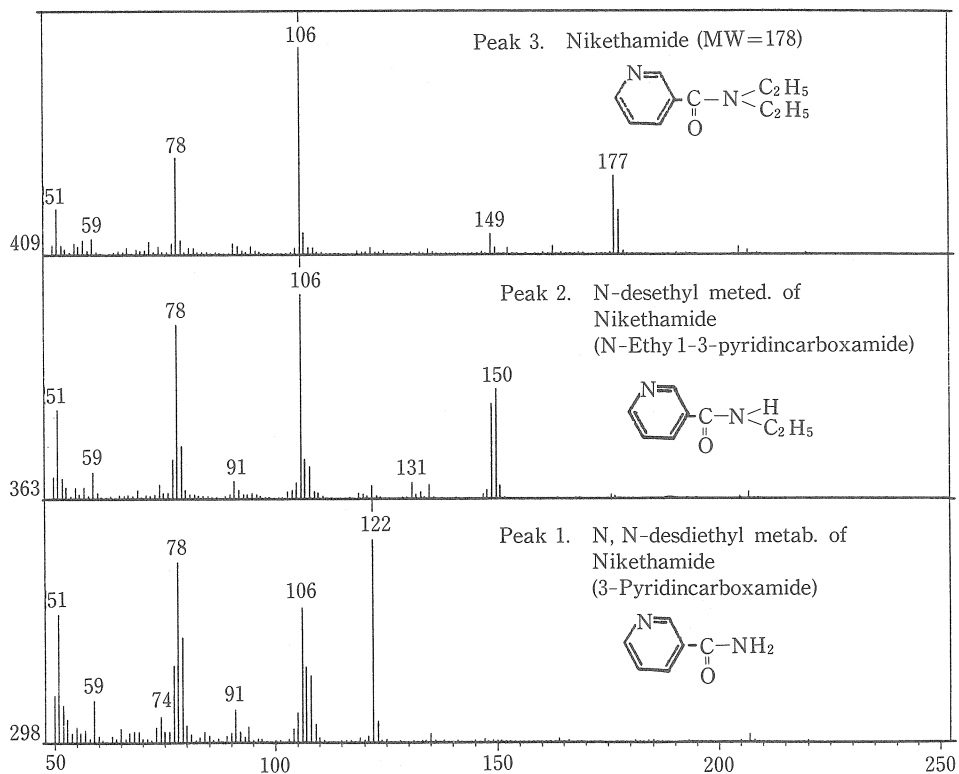


Fig 3-2-2 Mass Spectra of Peak1, Peak2 and Peak3

3.2. スクリーニング II

スクリーニングIIでは主として尿中にグルクロン酸あるいは硫酸抱合型として排泄される薬物およびその代謝物が検出された。

この画分の抽出は第3ブタノール存在下、弱アルカリ条件でおこなわれるため、ベメグリドなどの酸性薬物においても1 µg/ml以下の濃度で検出できた。

O-TMS-N-TFA 誘導体化は、パラハイドロキシアンフェタミン等のフェノールアルキルアミンあるいはカテコールアルキルアミンに対して特に有効であり、各化合物に特徴的なベンジルフラグメントイオン（たとえば $m/z=179$ ）を用いることにより、ngレベルの検出感度を得られた。

Fig 3-3にスクリーニングIIで検出される代表的薬物のマスプロファイル例を示した。

また、各薬物の略号とその誘導体化物のモニタリングイオンを Table 3-2-1, にそれぞれ示した。

また Fig 3-4 にスクリーニングIIで同定されたメタンフェタミン陽性患者例のマスプロファイルと、この尿から得られた代謝物パラハイドロキシメタンフェタミンの誘導体化物のマスプロファイルを示した。

フェノールアルキルアミンのO-TMS-N-TFA 化物は、この例に示した様に、その代謝物に特徴的な骨格を反映したベンジルフラグメントイオンを強い強度で与えるので、塩基性基を失わない様な代謝物については未変化体と同時に検出することができた。

この事は、得られた結果を操作上のコンタミネーションと区別する上でも有用であった。

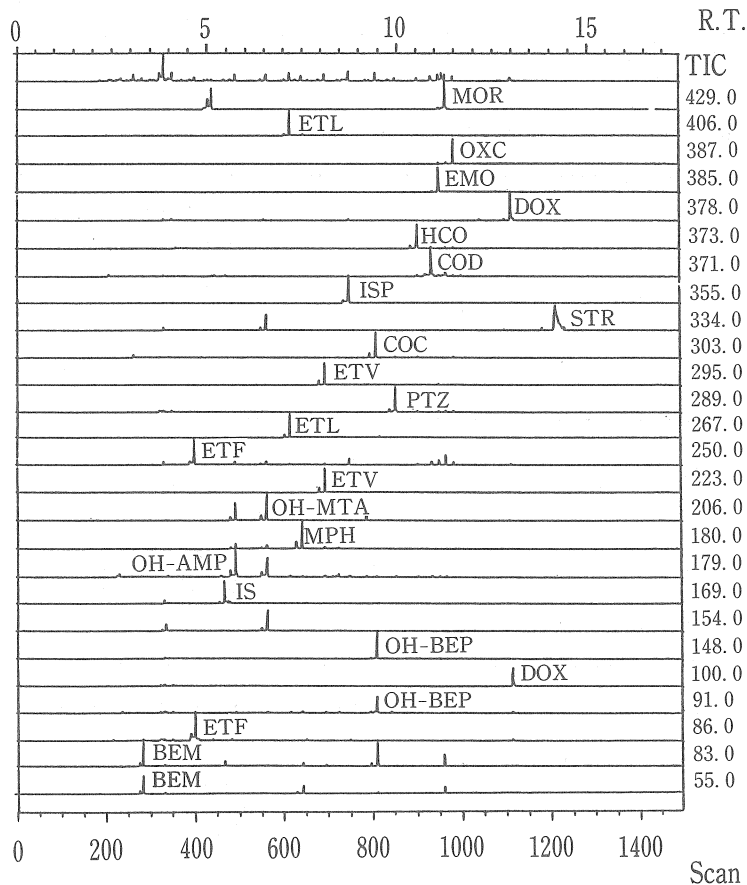


Fig 3-3 Typical mass chromatogram of drug mixture

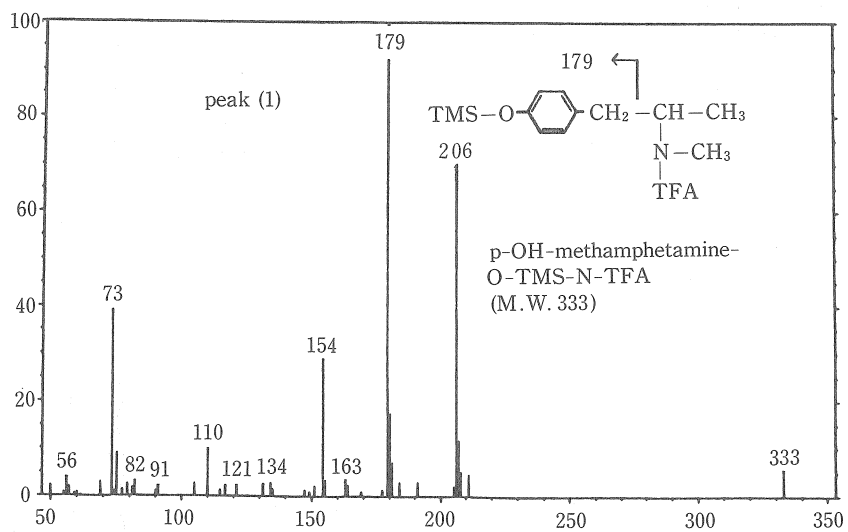
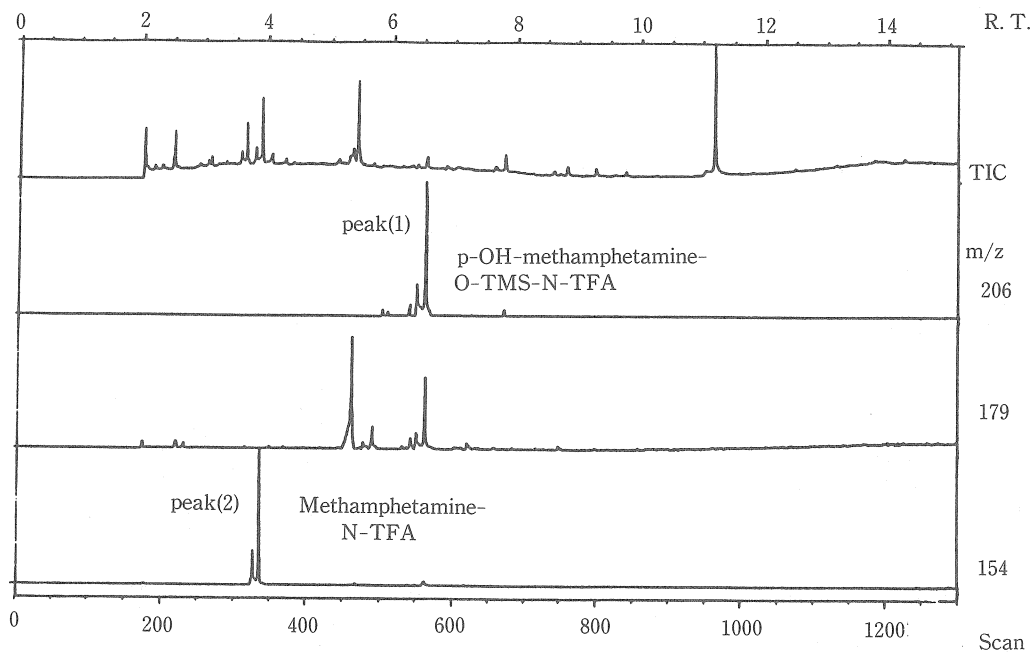


Fig 3-4 Chromatogram of methamphetamine and p-OH-methamphetamine measured in a patient's urine and mass spectrum of p-OH-methamphetamine-O-TMS-N-TFA (peak 1)

Table 3-2-1 The Abbreviation of Drugs

No.	DRUG NAME (O-TMS-N-TFA)	MONITORING IONS (m/z)
1.	Amphetamine (AMP)	118, 140
2.	Bemegride (BEM)	55, 83
3.	Benzphetamine (BEP)	91, 148
4.	Caffeine (CAF)	109, 194
5.	Chlorphentermine (CLP)	154
6.	Cocaine (COC)	91, 148, 182, 303
7.	Codeine (COD)	371
8.	Dextromoramide (DEM)	100, 265
9.	Diethylpropione (DEP)	100
10.	Dihydrocodeine (HCO)	373
11.	Dimethylxanthine (DMX)	180
12.	Diphenylamine (IS)	169
13.	Dipipanone (DIP)	112, 334
14.	Doxapram (DOX)	100, 378
15.	Ephedrine (EPD)	179
16.	Etafedrine (ETF)	86, 250
17.	Etamivane (ETV)	223, 295
18.	Etilefrine (ETL)	267
19.	Ethylamphetamine (EAM)	140, 168
20.	Ethylmorphine (EMO)	385
21.	Fencamfamine (FCA)	142, 170
22.	Fenfluramine (FEF)	140, 168
23.	Heptaminol (HEP)	131, 298
24.	Isoprenaline (ISO)	355
25.	Leptazol (LEP)	82, 109, 138
26.	Methadone (MED)	223, 294
27.	Methamphetamine (MAA)	118, 154
28.	Methoxyphenamine (MPA)	148, 154
29.	Methylephedrine (MEP)	105, 179
30.	Methylphenidate (MPH)	180
31.	Morphine (MOR)	429
32.	Nikethamide (NIK)	106, 177
33.	Norpseudophedrine (NPE)	179
34.	Oxycodone (OXC)	387
35.	p-hydroxyamphetamine(OH-AMP)	179, 206
36.	p-hydroxybenzphetamine(OH-BEP)	91, 148
37.	p- hydroxymethamphetamine (OH-MAA)	154, 179, 206
38.	Pentazocine (PTZ)	289
39.	Pethidine (PET)	247
40.	Phendimetrazine (PHD)	85, 191
41.	Phenmetrazine (PMD)	167
42.	Phentermine (PHT)	154
43.	Prolintane (PLT)	126
44.	Strychnine (STR)	334

3.3. スクリーニングⅢおよびカフェインの確 認分析

構造上の特徴や、化学的な性質の違いから他の成分と同時に検出することが困難な物質のスクリーニング方法として、新たに HPLC を採用した。

これにより、従来検出が困難だったペモリンが

きわめて容易に検出できるようになった他、カフェインの定量とその代謝物の同時スクリーニングが可能となった。ペモリン、カフェインの尿からの抽出率はいずれも約80%であったが、定量的に回収されるため、内標法で精度良く定量でき、その検出限界下限は100ng/mlであった。

Fig 3-5 にペモリン Fig 3-6 にカフェインの陽性例を示した。

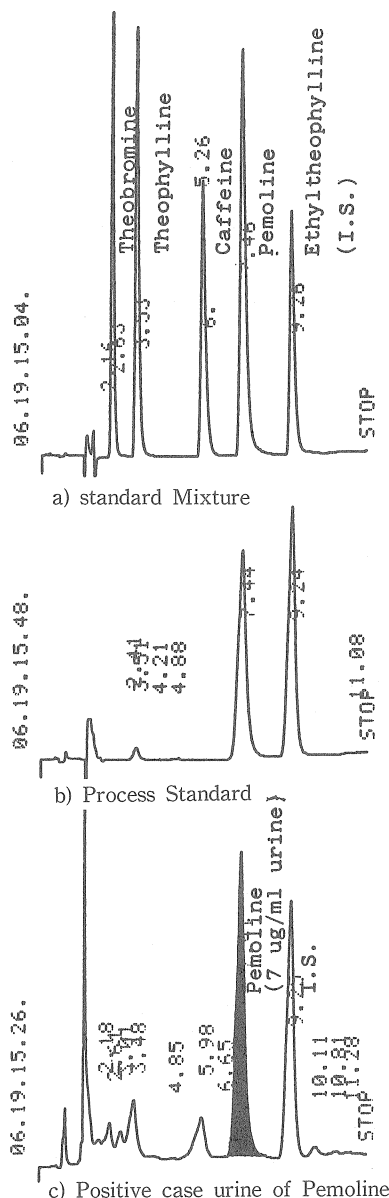


Fig 3-5 Chromatogram from HPLC run.
(Screening Procedure III)

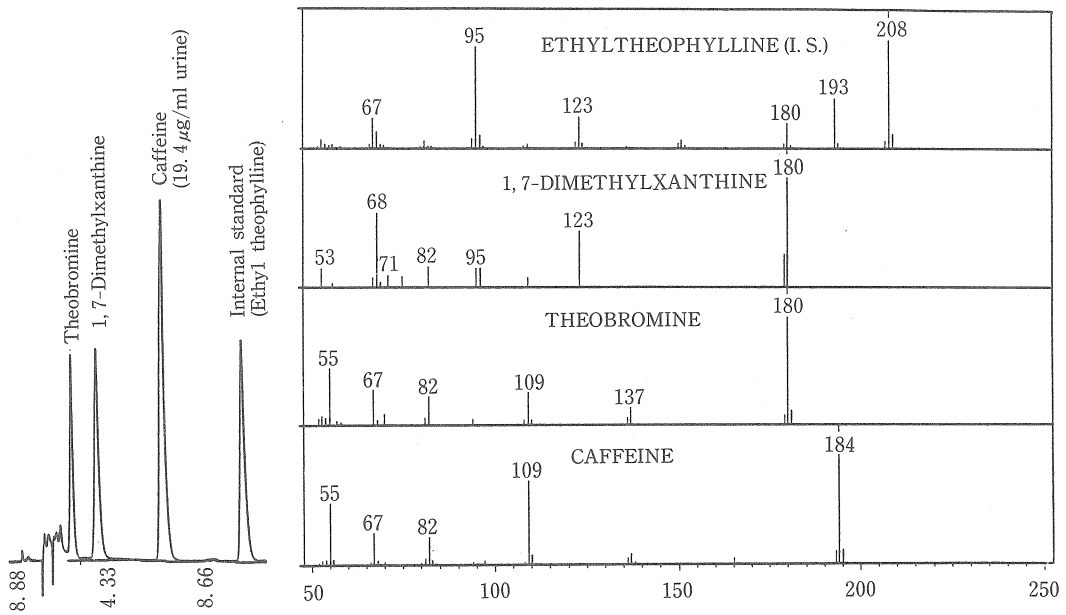


Fig 3-6 SCREENING RESULTS FOR CAFFEINE AND XANTHINE DERIVATIVES (Positive case of Caffeine) Identification of Caffeine and its metabolite by GC/MS (LEFT; HPLC Chromatogram/RIGHT; Mass spectra from GC/MS confirmation analysis)

Fig 3-6 ではカフェインとその脱メチル化した代謝物、テオブロミンと1,7-ジメチルキサンチンも同時に検出された。代謝物は脱メチル化により水溶性が増す結果、回収率が20%程度に下がるので定量の対象にはしなかった。

3.4. スクリーニングⅣおよびテストステロン

アナボリックステロイドは最も検出が困難な薬物の一群である。その原因として

①スタノゾール以外のアナボリックステロイドはすべて代謝物の形で検出する必要がある。

②標準品が市販されていない。

③構造の類似する内因性物質が数多く存在する。

④前処理が複雑であり、濃度が低い。

等が挙げられる。

今回我々は、入手し得たすべてのアナボリックステロイドについて投与実験を行ない、Table 3-3-1, 3-3-2にその結果を要約した。

遊離ステロイド画分で検出された代謝物は主として17-アルキルステロイドの6β-水酸化物であった。

Table 3-3-1 Monitoring ions and relative retention time for the screening of main metabolites of anabolic steroids

Free fraction

Applied steroids	Metabolite	Derivative	Relative retention time*	Monitoring ions (m/z)
Methandienone	6β, 17β-diOH-17α-CH ₃ -androst-1, 4-dien-3-one	6, 17-bis-O-TMS	1.047	460/370/281/143
Fluoxymesterone	9α-fluoro-6β, 11β, 17β-triOH-17α-CH ₃ -5α-androstan-3-one	6, 11, 17-tris-O-TMS-3-enol-TMS	1.044	642/627/552/143
Dehydrochlormethyltestosterone	17α-CH ₃ -4-chloro-6β, 17β-diOH-androst-1, 4-dien-3-one	6, 17-bis-O-TMS	1.168	494/479/315/143
Stanozolol	17β-OH-17α-CH ₃ -5α-androstan-(3,2C)pyrazole	N-HFB-O-TMS	1.157	596/581/491/143

* ; Methandienone-TMS-ether = 1.000

Table 3-3-2 Monitoring ions and relative retention time for the screening of main metabolites of anabolic steroids

Conjugated fraction				
Applied fraction	Metabolite	Derivative	Relative retention time*	Monitoring ions (m/z)
Clostebol	4-chloro-3 α -OH-5 α -androstan-17-one	3-O-TMS-17-enol-TMS	1.219	468/453
Mesterolone	1 α -CH ₃ -3 α -OH-5 α -androstan-17-one	3-O-TMS-17-enol-TMS	0.932	448/343
Metenolone	1-methylene-3 α -OH-5 α -androstan-17-one	3-O-TMS-17-enol-TMS	0.898	446/431
Oxymetholone	17 α -CH ₃ -2-hydroxymethyl-3 α , 6 β , 17 β -triOH-5 α -androstane	O ⁽²⁾ , 3, 6, 17-tetre-O-TMS	1.499	640/550/143
Oxymesterone	17 α -CH ₃ -3 α , 4, 17 β -triOH-androst-4-ene	3, 4, 17-tris-O-TMS	0.922	536/521/143
Methyltestosterone	17 α -CH ₃ -3 α , 17 β -diOH-5 α -androstan-17-one	3, 17-bis-O-TMS	0.943	450/435/143
Ethynandrol**	19-nor-3 α , 17 β , 21-triOH-5 α -pregnane	3, 17, 21-tris-O-TMS	1.274	421/245
Nandrolone	3 α -OH-5 α -estran-17-one	3-O-TMS-17-enol-TMS	0.707	420/405

*; 1, 2,-D₂-Testosterone-17-O-TMS-enol-TMS=1.000

*; Metabolite is the same as norethandrolone

一方、抱合型ステロイド画分で検出された代謝物の主なものは、 Δ^4 -3-ケトン型および5 α -アンドロスタン-3-オン型のアナボリックステロイド由来のものであり、これらはテストステロンの代謝経路によって還元されて排泄されたものと考えられる。アナボリックステロイドのスクリーニングに際しては、その対照物質として、投与尿から抽出誘導体化して得た各ステロイドのスペクトルを用い、これを被検検体のそれと比較して同定した。Fig 3-7-1 にフルオキシメステロンの陽性例を、また Fig 3-7-2 に対照として用いたフルオキシメステロン投与後のボランティア尿のSIMクロマトグラムを示した。

フルオキシメステロンの代謝物(Table 3-3-1)は

スクリーニングⅣの遊離ステロイド画分で検出することができた。

抱合体ステロイド画分の検出例としてエチルナンドロールの例を Fig 3-8-1, 3-8-2 に示した。それぞれ選手の陽性例及び投与後のボランティアの例である。陽性例ではT/ET比が高く、外因性テストステロンの使用も疑われたため、さらに確認分析を実施したところ、Fig 3-9 に示した様に、T/ET比が7.4であり、エピテストステロンに対してテストステロンが異常に高いことが確認された。T/ET比の異常がエチルナンドロールの使用によるものか、または競技時にエチルナンドロールからテストステロンにスイッチした事によるものかは不明である。

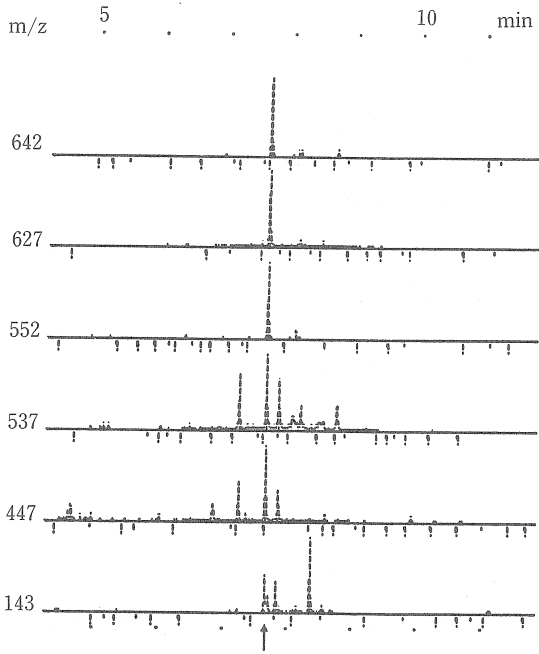


Fig 3-7-1 The result of GC/MS-SIM screening for anabolic steroids from the free fraction of athlete's urine

↑; A peak of SIM chromatogram with the same retention time and the same ion-signal as main metabolite of fluoxymesterone (see Fig 3-7-2)

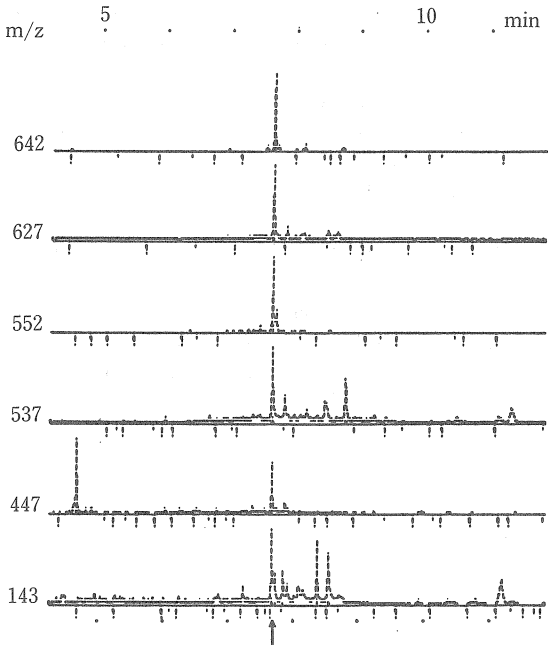


Fig 3-7-2 SIM chromatogram of volunteer's urine after ingestion of fluoxymesterone

↑; Main metabolite of fluoxymesterone

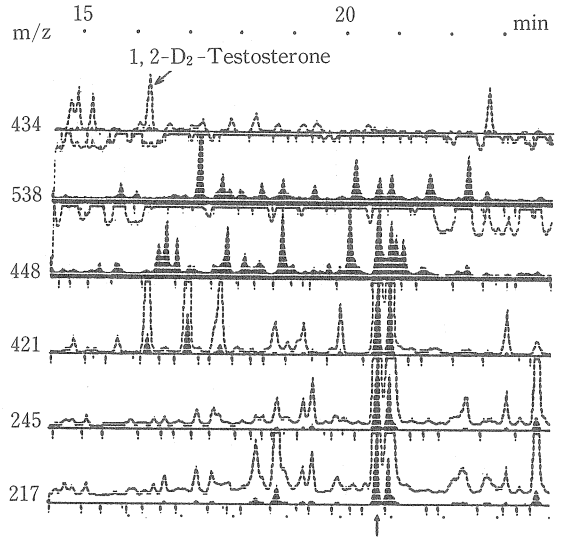


Fig 3-8-1 The result of GC/MS-SIM screening for anabolic steroids from the conjugated fraction

↑; A peak of SIM chromatogram with the same retention time and the same ion-signal as main metabolite of ethynandrol (see Fig 3-8-2)

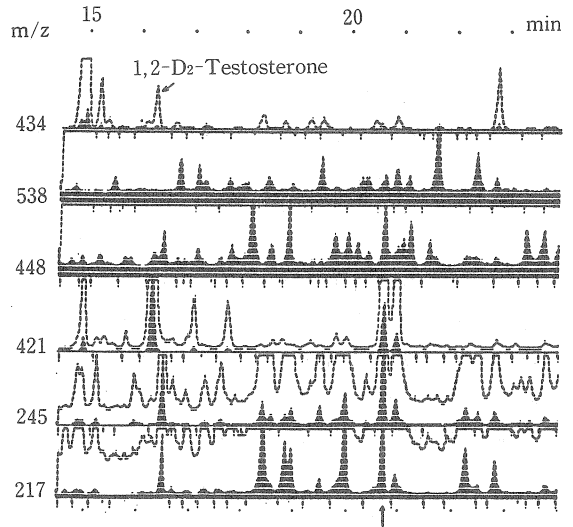


Fig 3-8-2 SIM chromatogram of volunteer's urine after ingestion of ethynandrol

↑; Main metabolite of ethynandrol

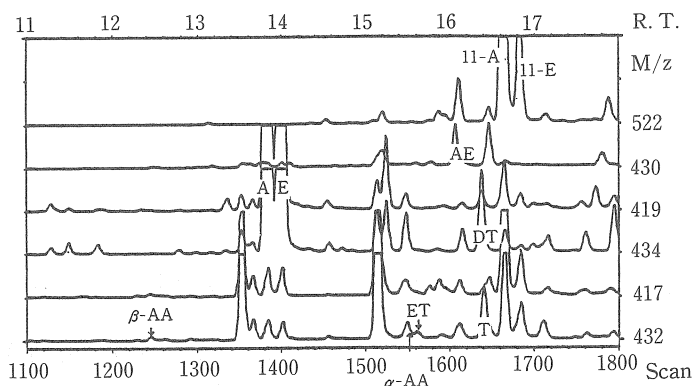


Fig 3-9 SIM chromatogram from positive case urine of the testosterone (T/ET=7.4)

β -AA ; 5 β -Androstandione
 A ; cis-Androsterone
 E ; Ethiocholanolone
 α -AA ; 5 α -Androstandione
 ET ; Epitestosterone

AE ; Androstendione
 T ; Testosterone
 11-A ; 11 β -Hydroxy androsterone
 11-E ; 11 β -Hydroxy ethiocholanolone
 DT ; 1,2-Deutero testosterone

4. 結語

本年度の研究テーマとしてIOC法によるスクリーニング方法について検討し、IOC規定に沿ったドーピング検査が実施できるようになった。

対象薬物もロスアンゼルスオリンピックの際に使用された薬物リスト記載のほとんどすべてと今後は、ドーピング検査のなかでもアナボリックステロイドに話題が集中していることから、内因性ステロイドの代謝に関する基礎データの蓄積が必要と考える。

また、近代五種競技、特に射撃における β -ブロッカーの乱用が問題となっており、今後、薬物リストに加わることが予想されることから、標品を入手し、順次ライブラリーに追加していく予定である。

最後に、本報告書で例示したスポーツ選手陽性尿のほとんどは西ドイツケルン体育大学生化学研究室 Manfred Donike 教授より分与され、当研究室にて分析したものであり、分析に際して数多くの御助言を頂き、感謝申し上げます。

5. 注釈

- 1) 2nd. Cologne Workshop in Dope Analysis
1984年1月、西ドイツ体育大学。
- 2) 3rd. Cologne Workshop in Dope Analysis
1985年2月、西ドイツ体育大学。

6. 文献

- 1) M. Donike et al., Screening Procedure in Dope Control; Sportsmedical Congress in Caracas, May 15th. (1983).
- 2) Orisa et al., GLC Analysis of Pemoline in Biological Fluids Using Electron Capture Detection; J. Chromatogr. Sci., 19 (1981)
- 3) 金井他, 昭和57年度日本体育協会スポーツ科学研究報告
- 4) 上館他, 昭和58年度日本体育協会スポーツ科学研究報告
- 5) M. Donike et al., The Determination of "Normal Values" for Monitoring Exogenous Testosterone Application.; 3rd. Cologne Workshop in Dope Analysis. Feb. 10th. -16th. (1985).

