

昭和52年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

No. VII スポーツ選手を対象とするドーピング検査法

財団法人 日本体育協会

スポーツ科学委員会

昭和52年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

No. VIII スポーツ選手を対象とするドーピング検査法

報 告 者 (財)競走馬理化学研究所

研 究 員 行 方 正 也 百瀬 篤 田 中 恒 夫
亀 井 克 利 村 田 政 康

最近、我国においても、国際的なスポーツ競技の際、ドーピングコントロールとして競技者の尿を用いたドーピング検査が行なわれるようになつた。ドーピング検査についてはこれまでに、アンフェタミン、メチルアンフェタミン、エフェドリンなどの覚せいアミン類について、薄層クロマトグラフィー (TLC)¹⁾、およびガスクロマトグラフィー (GLC) による検出²⁾³⁾、定性定量法⁴⁾が報告されており、1972年には札幌冬期オリンピック大会において我国で初めて TLC、GLC によるドーピング検査が行なわれた。その後、分析方法の発達はめざましく、同じく1972年のミュンヘン大会では、ドーピングドラッグスなどに特異的に感度の高い N-FID 付 GLC を検査の主体として、確認方法にガスクロマトグラフ・質量分析計 (GC・MS) をとりいれ⁵⁾、1976年モントリオール大会ではコンピューターでコントロールされたN-FID 付 GLC および GC・MS により検査が行なわれた⁶⁾。

我国において、スポーツ国際競技が多く開催されるにともない、一貫したドーピング検査法を早急に確立する必要があり、そのため我々は IOC 医事委員会によって示されたドーピングドラッグス (Table I) を対象としたドーピング検査法の検討を行なった。検査法をつくるための基本的な考え方として、1. 少量の尿を使用すること。2. 国際的なスポーツ大会におけるドーピング検査という観点から、従来のオリンピック大会で使用された方法を参考とする。3. 現在考えられる最も正確で確実な分析方法を使用する。の 3 点を骨子

Table I List of Doping Drugs

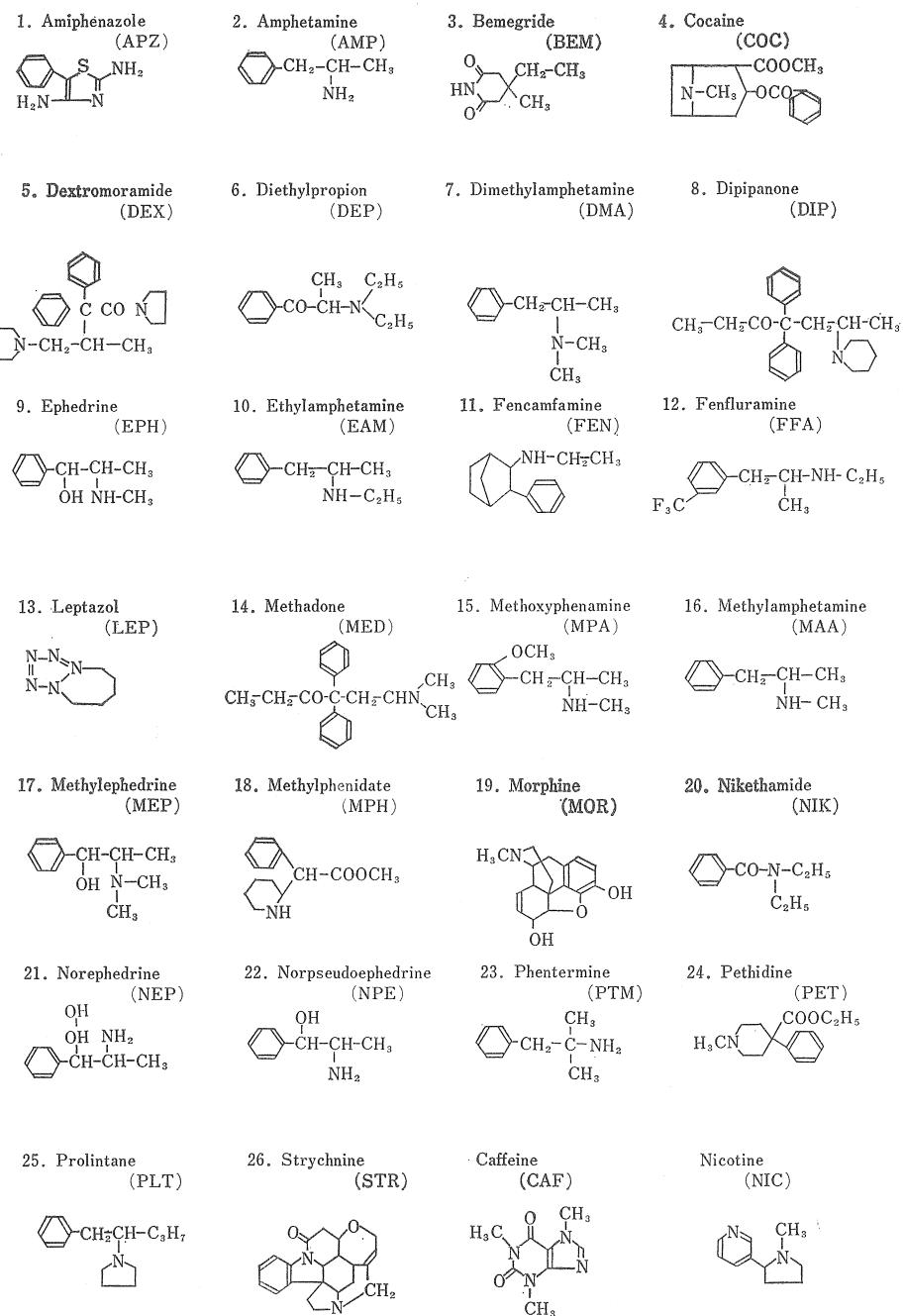
A)	Psychomotor Stimulant drugs, e.g.	C)	Miscellaneous central nervous system stimulants, e.g.
	Amphetamine		Amiphenazole
	Benzphetamine		Bemegride
	Cocaine		Leptazol
	Diethylpropion		Nikethamide
	Dimethylamphetamine		Strychnine and related compounds
	Ethylamphetamine		D)
	Fencamfamine		Narcotic analgesics, e.g.
	Methylamphetamine		Heroin
	Norpseudoephedrine		Morphine
	Phendimetrazine		Methadone
	Phenmetrazine		Dextromoramide
	Prolintane		Dipipanone
	and related compounds		Pethidine and related compounds
B)	Sympathomimetic amines, e.g.	E)	Anabolic steroids
	Ephedrine		Norethandrolone
	Methylephedrine		Ethylesterenol
	Methoxyphenamine		Methyltestosterone
	and related compounds		Methandienone
			Esters of 19-nortestosterone and related compounds

として検討した結果、マスクロマトグラフィー (MC) をスクリーニングテストに使用することが最も効果的であるとの結論をえた。そこで MC を中心として TLC、GLC を補助的に使用するドーピング検査法を検討し、さらに薬物をスポーツ選手に投与して採取した尿についても検討を加えた。

実 験 の 部

使用薬物 実験に使用した薬物とその構造式

Table II Doping Drugs and their Structural Formulae



Letters in parentheses show an abbreviation of the drug name

を Table II に示した。硫酸アンフェタミン、塩酸コカイン、塩酸エフェドリン、塩酸メタンフェタミン、塩酸メチルエフェドリン、塩酸モルヒネ、ニケタミド、塩酸ペチジン、硝酸ストリキニーネ、およびカフェインは局方品を使用した。ベメグリド(アンチパルビ注:田辺製薬)、レプタゾール(Sigma Chemical Company, U.S.A.), 塩酸メトキシフェナミン(日本新薬), 塩酸メチルフェニデート(リタリン散:日本チバガイギー), 塩酸ノルエフェドリン(Aldrich Chemical Company, U.S.A.), およびニコチン(東京化成)は市販品を使用した。アミフェナゾール(Aldrich), デキストロモラマイド(Janssen Pharmaceutica, Belgia), ジエチルプロピオン(Siegfried Zofingen, Switzerland), ジピバノン(Burroughs Wellcome & Co., England), フェンカソファミン(Aldrich), メサドン(Burroughs

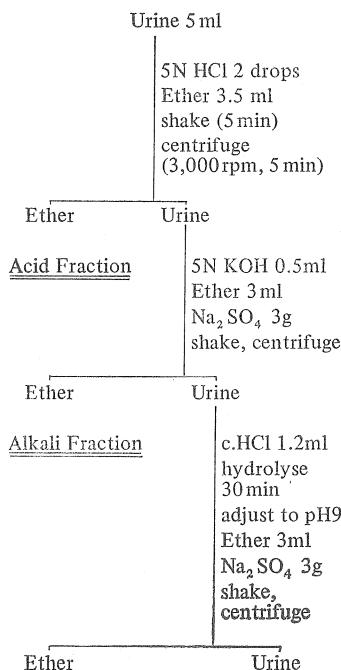
Wellcome & Co.,), ノルプソイドエフェドリン(Aldrich), フェンテルミン(Alfred Bader Library of Rare Chemicals, U.S.A.), およびブロリンタン(Industrie Chimiche Farmaceutiche Italiana, S.P.A.; Italia)は日本体育協会、黒田善雄博士の厚意により入手した。ジメチルアンフェタミン、エチルアンフェタミン、およびフェンフルラミンの各塩酸塩は、ロンドン大学の A.H. Beckett 教授の厚意により分与されたものを使用した。

試薬類はすべて試薬特級を使用し、活性炭は Norit A(中性, Amend Drug & Chemical Co., U.S.A.) XAD-2 はアンバーライト XAD-2(Rohm & Haas Co., U.S.A.)を使用した。

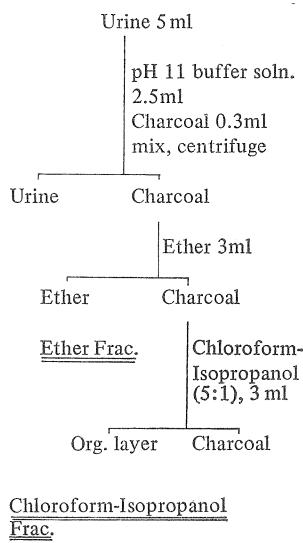
使用尿 当研究所に勤務する健康人尿、練習後に採取したスポーツ選手尿、および、1977年我国において開催されたアイスホッケー、フィギュ

Figure 1 Extraction Procedure

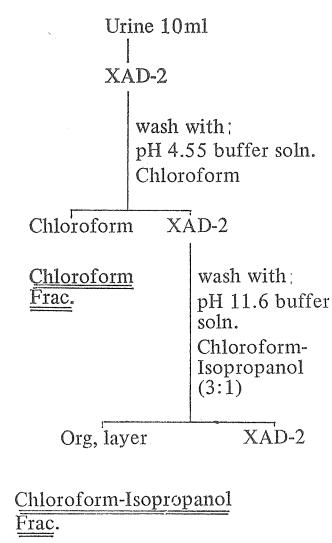
1. Extraction by Ether



2. Extraction using Charcoal



3. Extraction using XAD-2



Hydrolysed Fraction

アスケート、バレーボールの各国際試合において採取した尿を使用した。

抽出法

1. 有機溶媒による方法 Fig. 1 に示すごとく、尿 5 ml を 16.5×115 mm 共栓遠沈管にとり、5 N・HCl 0.1 ml を加えて酸性とする。これにエーテル 3.5 ml を加え 5 分間ふりませたのち冷却下 3,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上層のエーテルを無水硫酸ナトリウムを入れたガラスロートを通じて試験管にとる。エーテル 1 ml で遠沈管の内壁を洗い、このエーテルを同様にして試験管に加えたのち、新鮮なエーテル少量で 2 度ロートの硫酸ナトリウムを洗い抽出液と合せる。(酸性分画) 酸性で抽出したあとの尿にエーテル 3 ml、5 N・HCl 0.5 ml とあらかじめ水で飽和したエーテルにひたし、室温でエーテルを除去した硫酸ナトリウム(抽出用硫酸ナトリウム) 3 g を加え、酸性抽出と同様にふりませ、遠心分離してエーテル層をとり、この抽出液に 5 % 酢酸・酢酸エチル液 2 滴を加える。(アルカリ分画) アルカリ抽出後の尿を別の遠沈管に移し、濃 HCl 1.2 ml を加えて沸騰水浴中で 30 分加水分解を行なったのち流水で冷却し、20 % NaOH およびアンモニア水を用いて pH 9 とし、エーテル 3 ml、抽出用硫酸ナトリウム 3 g を加え、同様にふりませ、遠心分離してエーテル層をとり、この抽出液に 5 % 酢酸・酢酸エチル液 2 滴を加える。(加水分解分画)

各々の抽出液を約 30° の水浴中 N₂ 気流下でエーテルを留去し残留物を得る。

2. 活性炭法 Meola の方法⁷⁾ に従い、尿 5 ml を 16.5×115 mm 共栓遠沈管にとり pH 11 炭酸塩緩衝液 2.5 ml と活性炭泥 0.3 ml を加え、フランクミキサーでよく混合したのち数分間静置する。ついで 3,000 rpm で 5 分間遠心分離して上部の液をとる。この遠沈管にエーテル 3 ml を加え、よくふりませて抽出を行ない、しばらく静置したのち、硫酸ナトリウムを入れたガラスロートを通じて、エーテル液を試験管にとる。(エーテル分画) 活性炭の残っている遠沈管にクロロホルム・イソプロパノール液(50:10) 3 ml を加えてよくふりませたのち、東洋汎紙 No. 5 を通じて

抽出液を試験管にとる。さらにもう一度抽出をくり返し、合せた抽出液に 5 % 酢酸・酢酸エチル液 2 滴を加える。(クロロホルム・イソプロパノール分画) 各々の抽出液を約 40° の水浴中 N₂ 気流下で溶媒を留去し残留物を得る。

3. レジン法 Pranitis らの方法⁸⁾ に従い、尿 10 ml を XAD-2 カラムを通過させ pH 4.55 の 0.05 M 酢酸ソーダ緩衝液で洗ったのちクロロホルムで溶出する。(酸・中性分画) ついで pH 11.6 の 0.01 M 炭酸カリ緩衝液で洗ったのち、クロロホルム・イソプロパノール液(3:1) で溶出し 5 % 酢酸・酢酸エチル液 2 滴を加える。(アルカリ分画) 各々の抽出液を約 40° の水浴中 N₂ 気流下で溶媒を留去し残留物を得る。

薄層クロマトグラフィー

シリカゲルプレート ワコーゲル B 5 FM (混合蛍光体入り) を常法通り 20×20 cm, 厚さ 0.25 mm として製し 105° で 1 時間活性化したのち、デシケーター中に保存する。

スポット 抽出して得られた残留物にエタノール 0.2 ml を加えて溶し、シリカゲルプレートに塗布する。

展開溶媒 1. クロロホルム・メタノール(9:1)

2. n-ブタノール・5 % クエン酸液(95:5)

発色試薬 1. 紫外線照射 混合蛍光体入りシリカゲルを使用のため、全帯域紫外線照射とした。

2. ニンヒドリン試薬 ニンヒドリン 0.5 g を n-ブタノール 100 ml に溶解する。

3. 硫酸液 5 N・硫酸

4. 塩化白金酸試薬 NaI 1.8 g を水 6 ml にとかし、これに 5 % 塩化白金酸液 (H₂PtCl₆・6 H₂O) 10 ml を混和する。用時、水で 10 倍に希釈する。

5. ドラーゲンドルフ試薬 塩基性炭酸ビスマス ((BiO)₂CO₃・1/2 H₂O) 0.5 g に HCl, 1.5 ml を加えてとかし、これに KI 3 g を加え、水を加えて 50 ml とする。

6. 銅ピリジン試薬 硫酸銅 (CuSO₄・5 H₂O) 10 g を水 90 ml にとかし、この溶液 4 ml にピリジン 1 ml、水 4 ml を加える。

7. 硝酸水銀試薬 硝酸第一水銀 ($HgNO_3 \cdot H_2O$) 1 g を 1 % 硝酸 100 ml に溶解する。

検出 薄層板を展開したのち風乾する。検出は紫外線照射下で観察ののち、アルカリ分画の薄層板には、ニンヒドリン試薬を噴霧し 105° で 5 分加熱する。ついで、硫酸液、塩化白金酸試薬、およびドーラーゲンドルフ試薬を順次噴霧する。加水分解分画の薄層板には、硫酸液、塩化白金酸試薬、およびドーラーゲンドルフ試薬を噴霧する。酸性分画の薄層板には、銅ピリジン試薬および硝酸水銀試薬をつづけて噴霧する。

ガスクロマトグラフィー

機種：島津 GC—4 CMF

検出器：水素炎イオン化検出器

カラム：DMCS 処理したガラスカラム 1.5 m × 3 mm ID

(カラム A) 12.5 %, Apiezon grease L + 2 % Igepal CO 880 / Chromosorb W, AW, KOH 処理, 60~80 メッシュ

(カラム B) 1 %, SE-30 / Anakrom ABS 100~120 メッシュ

(カラム C) 2.5 %, SE-30 / Chromosorb W, AW, HMDS, 80~100 メッシュ

(カラム D) 1.5 %, OV-17 / Shimalite W, DMCS, 80~100 メッシュ

キャリヤーガス : N_2 30 ml/min

トリメチルシリル (TMS) 誘導体の合成：抽出して得られた残留物に酢酸エチル 20 μl およびビストリメチルシリルアセタミド (BSA) 試薬 20 μl を加え、密栓をして、水浴中 50° で約 15 分反応させる。その反応液をそのまま 2 μl ガスクロマトグラフに注入する。

マスクロマトグラフィー

機種：日本電子製 ガスクロマトグラフ・質量分析計 (ガスクロマトグラフ : JGC 20K, 質量分析計 : JMS-D300, データ処理機 : JMA 2000)

カラム : (カラム E) 3 % OV-17 / Gaschrom Q, 100~120 メッシュ, 2 m × 2 mm ID ガラスカラム, カラム温度 140°~240° (8°/min 升温)

(カラム F) 1.5 %, OV-1 Gaschrom Q, 80~100 メッシュ, 1 m × 2 mm ID ガラスカラム, カラム温度 160°~280° (12°/min 升温)

質量分析計 : イオン化電圧 70 eV, 加速電圧 3.0 kV, H. V. 1.3 kV

トリフロロアセチル (TFA) 誘導体の合成：抽出して得られた残留物に酢酸エチル 20 μl およびトリフロロ無水酢酸 20 μl を加え密栓をして、水浴中 50° で 5 分反応させる。その反応液を減圧濃縮し、生成した TFA 誘導体に酢酸エチル 50 μl を加えて溶解する。その 2 μl を MC 測定する。

栄養剤の投与実験 実験に使用した栄養剤と服

Table III Soft Drinks, Treatments, and Tonics

Drug	Maker	Ingredients	Dose
Aspara C	Tanabe	K & Mg aspartate, Vitamins	2 bottles/day
Coca Cola	Coca Cola Bottling	Soft drink	2 cans/day
Gin-gin-ton	Korea	Extract of ginseng	1 bottle/day
Guromsan Drink strong	Chugai	Glucuronolactone, Vitamins	2 bottles/day
Hicee A	Takeda	Vitamin C (500 mg/a tab)	3 tabs/day
Lipovitan D super	Taisho	Taurine, Arginine hydrochloride, Vitamins	2 bottles/day
New Guromont	Chugai	Glucuronolactone, Vitamins	2 bottles/day
Oronamin C drink	Ohtsuka	Vitamins	2 bottles/day
Tathion	Yamanouchi	Glutathione (50 mg/a tab)	6 tabs/day
Tioctan	Fujisawa	Thioctic acid (2.5 mg/a tab), Vitamins	6 tabs/day
Tiovita Drink	Taiho	Thiocticamide, Vitamins	2 bottles/day
Samon Royal Jelly	Taisho	Royal Jelly, Vitamins, Herb extracts	2 bottles/day

用量を Table III に示す。被験者は当研究所員、男女をえらび、服用は一剤あたり2~4名とした。採尿は服用前日の勤務時間(9:00~17:00)および服用日勤務直後に栄養剤を服用し、服用後8時間(9:00~17:00)に行なった。なお、人参精以外は服用前日の夕食後服用し、さらに、服用日の午前9時に服用した。

尿への薬物添加実験 尿に薬物を添加し有機溶媒で抽出する方法で抽出し TLC および GLC による検出限界濃度を求めた。GLC のカラムは、カラムDを使用した。

禁止薬物の投与実験 アミフェナゾール、ペメグリド、ジエチルプロピオン、エフェドリン、フェンカンファミン、レプタゾール、メトキシフェナミン、メチルエフェドリン、メチルフェニデート、ニケタミド、ノルプソイドエフェドリン、およびプロリンタンの12薬物を使用した。方法は健康なスポーツ選手2名に薬物を投与し、投与前、投与後1, 3, 6, 12, 24時間目、以後24時間毎に120時間まで採尿した。これらの尿を前記有機溶媒による抽出法に従って抽出し、TLC, GLC、およびMCにより測定し、尿への排泄を検討した。

実験結果および考察

尿からの薬物の抽出 有機溶媒で直接抽出する方法、および、活性炭に吸着させたのち有機溶媒で抽出する方法 XAD-2 レジンで抽出し有機溶媒で抽出する固相抽出法の3法について比較した。いずれの方法も薬物を抽出する方法として、すでにひろく使用されている方法であるため、尿から抽出されてくる常在成分がどの程度であるかを TLC により判断し、選択の基準とした。

活性炭を用いる方法は、使用した薬物のほとんどが抽出されるクロロホルム・イソプロパノール分画で尿成分が多く検出され、薬物の存在を推定することは非常に困難であった。

また、XAD-2による方法も、酸・中性分画、アルカリ分画ともに尿成分が多く、薬物の検出を妨害した。これらの尿成分を除去するため、クロロホルム・イソプロパノール抽出液を1N・HCl 3ml で2回よくふりまぜ、このHCl 液を含せて

5N・KOH 1.5ml を加えて強アルカリ性として、再びクロロホルム、またはクロロホルム・イソプロパノールで抽出したが、いずれによっても、尿成分は殆んど除去されなかった。

有機溶媒で抽出する方法では、抽出溶媒として、クロロホルムおよびエーテルを比較したところ、クロロホルムでは尿成分が多く認められるのに対し、エーテルでは薬物検出に妨害となるような尿成分のスポットは殆んど認められず、健康人尿ではカフェインおよびニコチン相当のスポット以外、顕著なものはなかった。また抽出の際加える塩として、塩化ナトリウムおよび硫酸ナトリウムを比較したとき、抽出される尿成分に差を認めないが冷却遠沈機で分離後エーテルを分取するとき、硫酸ナトリウムを加えた検体は一時的に水相が固まっているものが多く、エーテル層の分離が容易であった。しかし、硫酸ナトリウム添加の欠点は、無水物を加えたとき抽出のためふりませる前に、吸水して固化することであった。これは硫酸ナトリウムをあらかじめ水で飽和したエーテルで充分温らせてから、室温でエーテルを揮散したものを使用することにより、固化を防ぐことができた。

エフェドリンおよびアンフェタミンの40 µg/ml 水溶液をアルカリ性でエーテルを用いて抽出し、GLC で回収率を測定した結果、回収率はエフェドリンが93.1% (内標: ジフェニル) アンフェタミンが95.1% (内標: ウンデカン) であった。抽出の際、塩を加えることにより、この方法では1回の抽出で90%以上の薬物がエーテルに抽出される。これは塩を加えない場合の回収率(81.2% エフェドリン)⁹⁾ よりすぐれ、また活性炭を用いた回収率¹⁰⁾¹¹⁾ および XAD-2 を用いた回収率¹²⁾ よりもすぐれていることから、この実験における抽出は、エーテルによるふりませ抽出を行なうこととした。

薄層クロマトグラフィー TLC では薬物の検出を妨げる尿成分のスポットがほとんど認められないで、尿中に検出されるカフェインおよびニコチンを常在成分と想定して、対象薬物とカフェインおよびニコチンの分離を試みた。展開溶媒は我々がウマのドーピング検査に使用しているもの

を含め11種について検討したが、すべての薬物をカフェインおよびニコチンと分離できる展開溶媒をみつけることはできなかった。これら用いた溶媒のうち比較的良好な分離を示したのは、クロロホルム・メタノール（9:1, I液）およびn-ブタノール・5%クエン酸（95:5, II液）である

った。この成績をTable IVに示した。TLCをスクリーニング法として用いる場合に一種類の展開溶媒を使用するとすれば、I液が2~3回の反覆使用に耐えること、および展開時間が短いことなどから適当であった。I液による展開でカフェインと近似したRf値をもつレバタゾール、メチル

Table IV Rf Value and Their Characteristics on TLC

Alkali Drugs

Drug	Rf. value		Location			
	Solvent I*	Solvent II**	UV	Ninhydrin	PtCl ₄ ・NaI	Dragendorff
Amiphenazole	0.46	1.00	+			orange
Amphetamine	0.19	0.21		+	violet	orange
Cocaine	0.66	0.17			violet	orange
Dextromoramide	0.73	0.60			violet	orange
Diethylpropion	0.68	0.19	+	+	violet	orange
Dimethylamphetamine	0.31	0.07			blue	orange
Dipipanone	0.38	0.25	+		violet	orange
Ephedrine	0.14	0.12	+	+	violet	orange
Ethylamphetamine	0.21	0.12		+	violet	orange
Fencamfamine	0.48	0.16	+		violet	orange
Fenfluramine	0.37	0.11	+	+	violet	orange
Leptazol	0.63	0.44				orange
Methadone	0.26	0.11	+		violet	orange
Methoxyphenamine	0.19	0.09	+	+	violet	orange
Methylamphetamine	0.23	0.12	+	+	violet	orange
Methylephedrine	0.21	0.11		+	blue	orange
Methylphenidate	0.58	0.12		+	violet	orange
Morphine	0.17	0.05	+		blue	orange
Nikethamide	0.62	0.38	+			orange
Norephedrine	0.15	0.13	+	+	violet	orange
Norpseudoephedrine	0.15	0.14		+	violet	orange
Phentermine	0.36	0.16	+	+	violet	orange
Pethidine	0.55	0.13	+		violet	orange
Prolintane	0.43	0.12		+	violet	orange
Strychnine	0.36	0.03	+		violet	orange
Caffeine	0.60	0.27	+		blue	orange
Nicotine	0.45	0.05	+		blue	orange

Acidic Drugs

Drug	Rf. value		UV	Location	
	Solvent I*	Solvent II**		Cu-pyridine + 1% HgNO ₃	
Bemegride	0.71	0.65			black
Barbital	0.60				black

* Solvent I Chloroform: Methanol (9:1)

** Solvent II n-Butanol:5% Citric acid (95:5)

フェニデート、およびニケタミド、またニコチンと近似した Rf 値をもつアミフェナゾール、フェンカンファミン、およびプロリンタンは、いずれも II 液で展開することによりカフェインおよびニコチンと分離することができた。

展開のとき薬物は抽出溶媒留去のとき加えた蒸散防止剤により酢酸塩となっているので、展開直前にアンモニアをオーバースポットして遊離塩基としたもの、および酢酸塩のままのものについて比較した。その結果、遊離塩基のほうが薬物相互の分離および尿成分との分離がよいため、展開は遊離塩基として行なうこととした。酸性分画に検出されるペメグリドは、尿成分より大きな Rf 値

を示し、また検出試薬により黒色のスポットを与える。一方尿成分はほとんど発色しないで、明瞭に判別でき、抽出物をそのままスポットし展開できる。

発色試薬に対する呈色を Table IV に示した。使用した薬物のうちアルカリ性および中性の薬物は、すべてドライゲンドルフ試薬に陽性であり、カフェインおよびニコチンと色調の差は認められないが、塩化白金酸試薬に対してカフェイン (Rf : 0.60)、ニコチン (Rf : 0.45) は青色を呈する。一方、これらの薬物に近似の Rf 値をもつフェンカンファミン (Rf : 0.48)、プロリンタン (Rf : 0.43)、メチルフェニデート (Rf : 0.58)

Table V Relative Retention Time on each Temperature using 1.5% OV-17 Column

	Column Temperature				
	120°	140°	180°	235°	290°
Amiphenazole-TMS				0.82	
Amphetamine-TMS	1.00(2.08)*				
Bemegride		1.22			
Cocaine				1.00(5.33)	0.20
Dextromoramide					1.00(6.93)
Diethylpropion		2.44	0.39		
Dimethylamphetamine	1.50				
Dipipanone				1.78	
Ephedrine-TMS	4.03	1.00(4.30)		1.78	
Ethylamphetamine-TMS	1.40				
Fencamfamine-TMS			0.72		
Fenfluramine-TMS	1.18				
Leptazol			1.00(5.12)	0.24	
Methadone				0.69	
Methoxyphenamine-TMS	3.88	0.88			
Methylamphetamine-TMS	1.20				
Methylephedrine-TMS	4.17	1.06			
Methylphenidate			1.12		
Morphine-TMS				2.32	
Nikethamide			0.53		
Norephedrine-TMS	3.31	0.97			
Norpseudoephedrine-TMS	3.31	0.88			
Phentermine-TMS	1.11				
Pethidine			0.96		
Prolintane			0.45		
Strychnine					2.25
Caffeine			2.70	0.43	
Nicotine					

* A figure in parenthesis shows retention time minute.

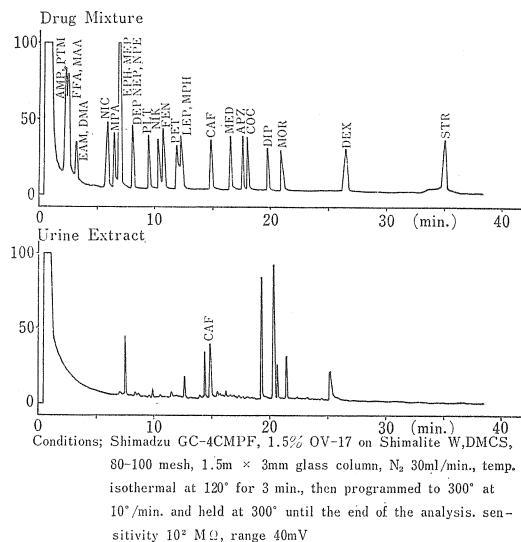


Figure 2 Gas Chromatogram by Programmed GLC

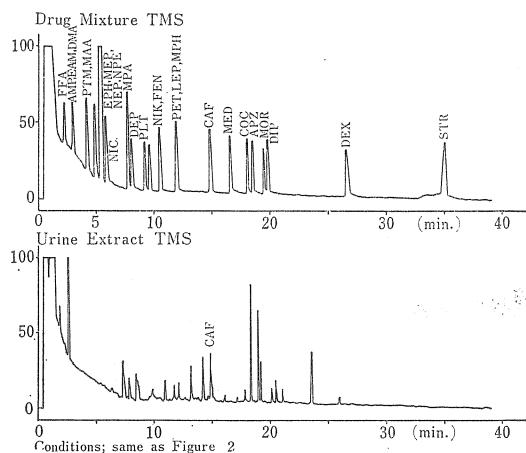


Figure 3 Gas Chromatogram by Programmed GLC

は紫色を呈し、色調により区別できる。塩化白金酸に発色しないレブタゾール (R_f : 0.63) およびニケタミド (R_f : 0.62) は、微量のときカフェインとの判別はむずかしいが、ニケタミドは代謝物である N-エチルニコチナミド (R_f : 0.51)、ニコチナミド (R_f : 0.35) なども同時にドラーゲンドルフ試薬に発色するので、これら代謝物のスポットにも注意することにより判別が可能である。また、アルカリ性・中性薬物の検出は、硫酸液を噴霧して強酸性とすることにより、塩化白金酸試

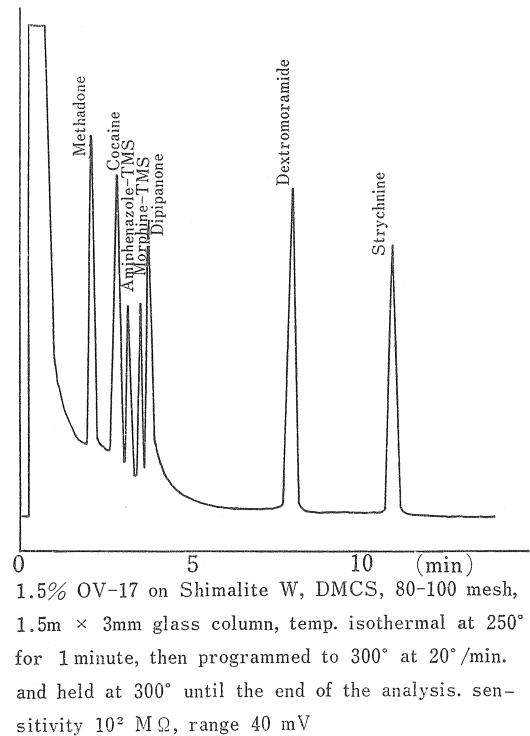


Figure 4 Gas Chromatogram of Drug Mixture TMS detected in high temperature

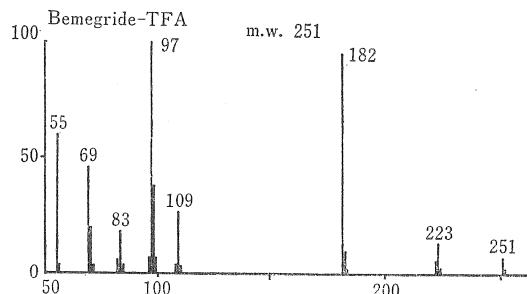


Figure 5 Mass Spectrum of Acidic Drug

薬およびドラーゲンドルフ試薬による発色を高め、検出感度が上昇した。酸性薬物のベメグリドは硝酸第一水銀で黒色に発色するが、検出感度は非常に悪い。しかし、銅ピリジン試薬を噴霧し、つづいて硝酸水銀試薬を噴霧することにより、検出感度を $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ 尿と大きく上昇させることができた。

ガスクロマトグラフィー いずれの カラムにおいても、薬物の遊離塩基および酢酸塩は同じ保持時間を持った。遊離塩基を試料としたとき、カラ

ムAは薬物の分離は非常に良好であるが、最高使用温度が200°であるため、カラム温度190°で10分以内に検出される薬物は11種にすぎず、全薬物を測定するには2種以上のカラムを必要とする。Donike⁵⁾はカラムAを使用し130°～270°の昇温分析を行なっているが200°以上では液相の流出がおこり測定には不適当であった。カラムBおよびCはすべての薬物を測定できるが、吸着がはげしく、微量ではピークの出現をみないことがあった。カラムDは薬物の分離がよく、すべての薬物を測定できる。また、吸着もほとんど認められなかつた。Table VにカラムDによる保持時間を示した。同一カラム、同一温度で10分以内に薬物を検出するには、5段階の温度設定が必要とした。したがつて、一斉分析を行なうには、昇温分析が必要である。

遊離塩基およびTMS誘導体とした薬物のカラムDを使用した昇温分析ガスクロマトグラムをFig. 2およびFig. 3に示した。カラム温度は120°で3分間保持したのち10°/minで300°まで昇温した、遊離塩基のガスクロマトグラムでは、アンフェタミン、フェンテルミン、フェンフルラミン、およびメチルアンフェタミンがほとんど分離せず、また、ノルエフェドリン、ノルプソイドエフェドリン、エフェドリン、およびメチルエフェドリンが同一ピークとなり分離しなかつた。TMS誘導体でも同様に重なるピークを示す薬物がみられるが、スクリーニングの目的には使用可能である。尿抽出物のガスクロマトグラムは尿の違いによる差異ではなく、いずれも同一パターンを示し、薬物の検出を妨害するピークは殆んど認められず、薬物含量が微量である場合を除いて、薬物と尿成分の判別は容易であった。しかし、この分析方法では測定に約40分を要し、スクリーニング検査法として不適当である。そのため、後述するMCとの関連からGLCでは高温で検出されるメサドン、アミフェナゾール、コカイン、ジビバノン、モルヒネ、デキストロモラマイド、およびストリキニーネをスクリーニングすることとした。Fig. 4に高温部でのガスクロマトグラムを示した。カラム温度は250°で1分間保持したのち20°/minで300°まで昇温した。モルヒネは遊離

塩基では吸着が大きく、検出が困難であるがTM S誘導体とすることにより検出が容易となる。

マスクロマトグライマー MC測定の指標となる質量(m/e)を選択するため、薬物およびそれらの誘導体のマススペクトルを測定した。マススペクトルをFig. 5, Fig. 6, およびFig. 7に示した。これらのフラグメントイオンから、親イオンまたは比較的強度の強いイオンをえらびm/eと保持時間を考慮のうえ、薬物相互を判別するイオンとして、アルカリ分画にはm/e 72, 78, 82, 100, 106, 109, 110, 112, 118, 126, 140, 142, 148, 154, 159, 168, 170, 180, および247の19のイオンを選択した。加水分解分画にはm/e 124, 176, 182, 196, 207, 236, 289, 302, 303, 334, 355, 357, 371, および429の14のイオンを選択した。選択したイオンと検出される薬物をTable VIおよびTable VIIに示した。酸性分画は対象とする薬物がペメグリドのみであるため、アルカリ分画のm/e 247をm/e 182に変更することにより検出できる。

アルカリ分画に抽出される薬物の混合物のTF A誘導体のMCをFig. 8に、スポーツ選手尿のアルカリ分画のTFA誘導体のMCをFig. 9に示した。アルカリ分画の薬物のマススペクトルでは、分子イオン(M⁺)がほとんど出現せず、数種の薬物に共通したイオンが多く出現している。Table VIにみられるごとくm/e 154に最強強度を有する薬物は、エフェドリン、メトキシフェナミン、メチルアンフェタミン、フェンテルミン、および内部標準物質(IS)として使用した2-monoethylamino-N-methyl-2',6'-dimethyacetoanilide-TFAの5薬物であるが、これらはFig. 8より明らかなごとく、保持時間により判別できる。また、ほぼ同じ保持時間を有するアンフェタミン、ノルエフェドリン、ノルプソイドエフェドリン、およびフェンテルミンは、アンフェタミンがm/e 118および140、ノルエフェドリンおよびノルプソイドエフェドリンがm/e 140のみ、フェンテルミンはm/e 154を指標として判別可能である。しかし、ノルエフェドリンおよびノルプソイドエフェドリンは立体配位が異なるだけの化合物であり、TLC, GLC、およびMCのいずれの方

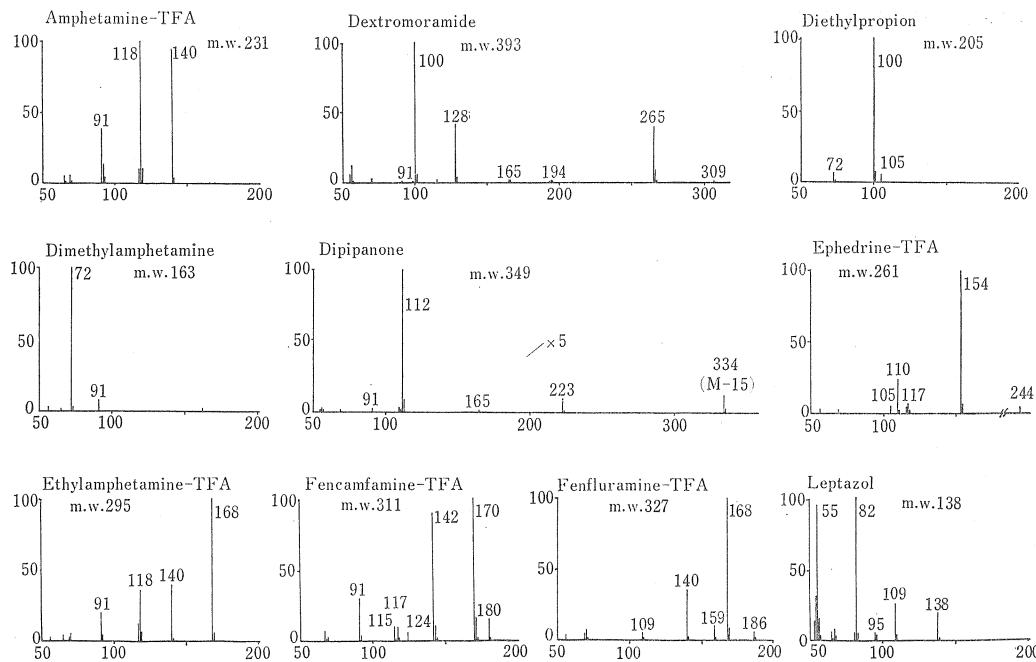


Figure 6-1 Mass Spectra of Alkali Fraction Drugs

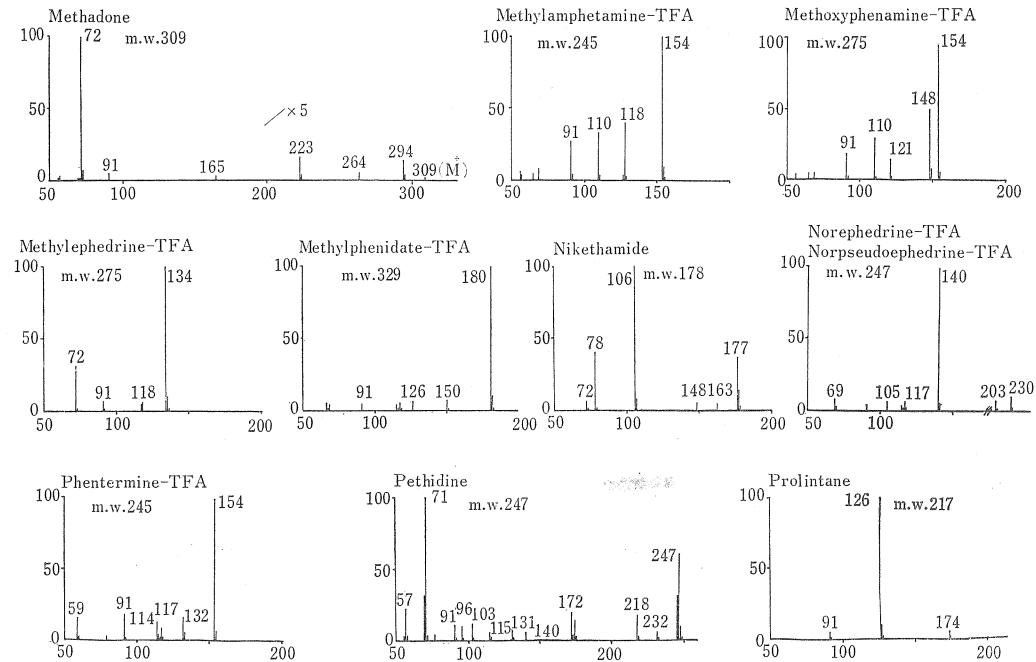
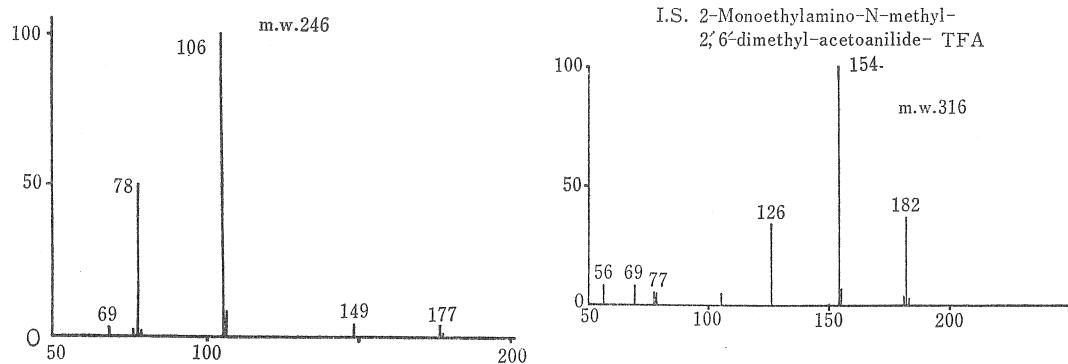
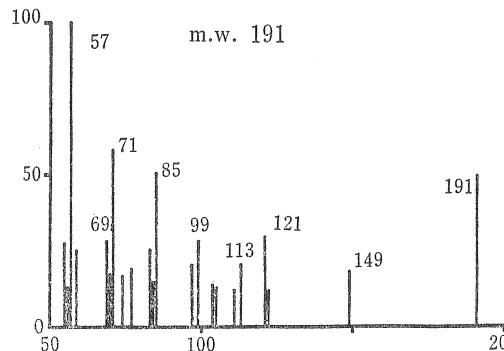


Figure 6-2 Mass Spectra of Alkali Fraction Drugs

N-Ethylnicotinamide-TFA



Amiphenazole



Amiphenazole-TFA

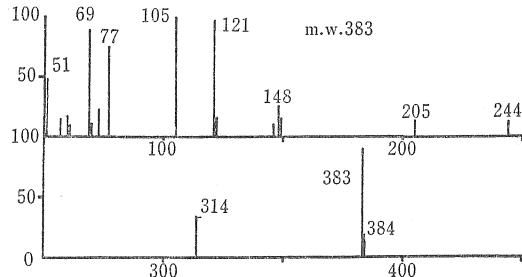
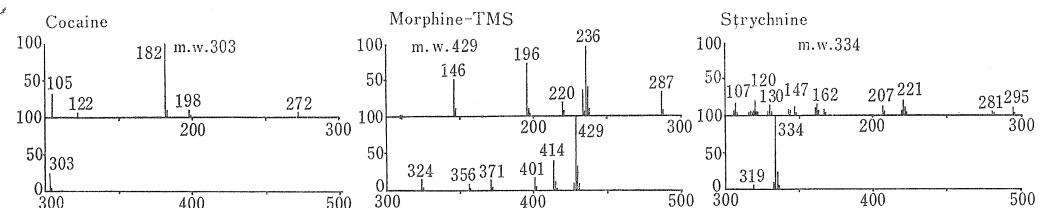
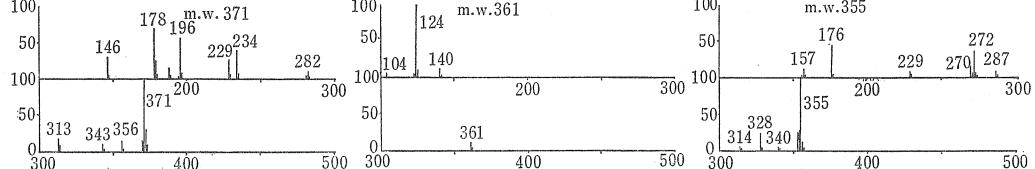


Figure 6-3 Mass Spectra of Alkali Fraction Drugs



Codeine-TMS



Pentazocine-TMS

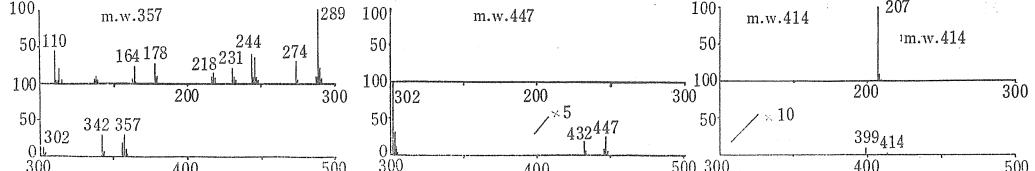


Figure 7 Mass Spectra of Hydrolysed Fraction Drugs

Table VI Relationship between Alkali Fraction Drugs and diagnostic m/e selected

Drug	m/e	72	78	82	100	106	109	110	112	118	126	140	142	148	154	159	168	170	180	247
Amphetamine-TFA										●		○								
Dextromoramide		○				●														
Diethylpropion						●														
Dimethylamphetamine																				
Dipipanone										●										
Ephedrine-TFA																				
Ethylamphetamine-TFA																				
Fencamfamine-TFA																				
Fenfluramine-TFA																				
Leptazol																				
Methadone																				
Methoxyphenamine-TFA																				
Methylamphetamine-TFA																				
Methylephedrine-TFA																				
Methylphenidate-TFA																				
Nikethamide		○	○					○												
Norephedrine-TFA																				
Norpseudoephedrine-TFA																				
Phentermine-TFA																				
Pethidine																				
Prolintane																				
N-Ethylnicotinamide-TFA		○						●												
I.S.																				

○ m/e which the drug gives

● m/e which is the highest intensity for the drug in the selected numbers

Table VII Relationship between Hydrolysed Fraction Drugs and diagnostic m/e selected

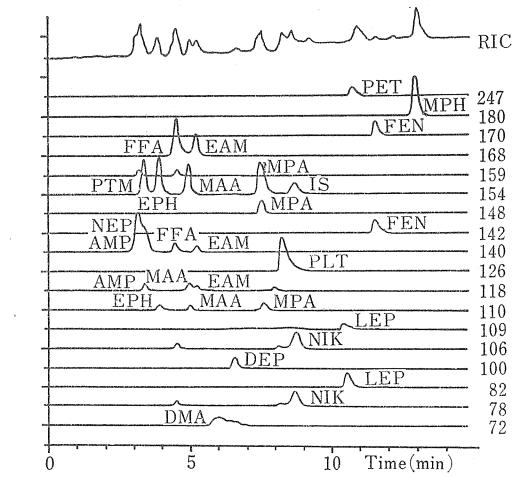
	124	176	182	196	236	289	302	303	334	355	357	371	429	207
Cocaine														
Morphine-TMS			●		○	○		○				○	●	
Strychnine									●					
Codeine-TMS				○										
Atropine-TMS	●													
Levallorphan-TMS		○												
Pentazocine-TMS							●							
Pentazocine (H_2O)-TMS								●			○			
I.S. (Hexesterol-TMS)														●

○ m/e which the drug gives.

● m/e which is the highest intensity for the drug in the selected numbers.

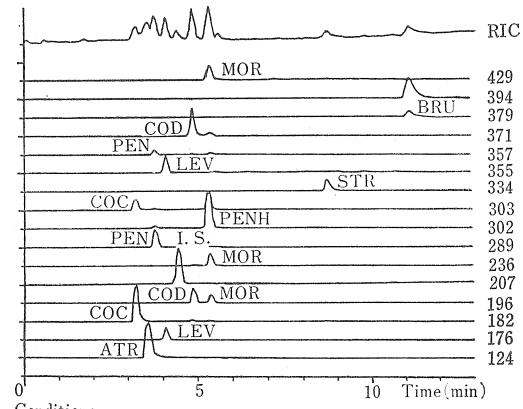
法によっても分離できなかった。メチルエフェドリンの TFA 誘導体は、不安定で短時間に分解するため MC による検出はできないが、尿中には代謝物のエフェドリンおよびノルエフェドリンが同時に検出されるため、スクリーニング検査では、

これら代謝物を検出し、さらに TMS 誘導体を測定することにより、メチルエフェドリンの存在を確認できる。アミフェナゾールの TFA 誘導体は不安定で、生成後直ちに分解し検出はできないが TMS 誘導体とすることにより測定が可能であ



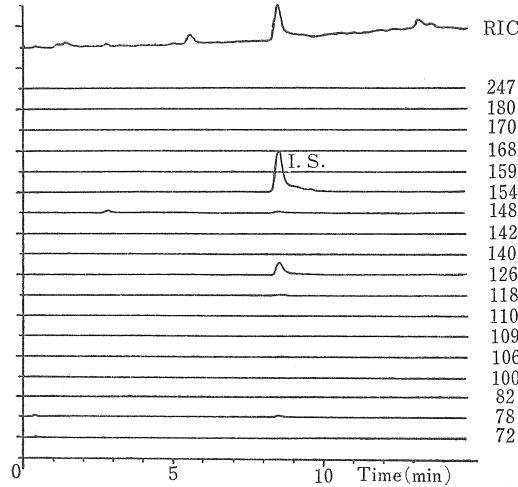
Conditions :
 GLC : JGC-20K, 3% OV-17 on Gaschrom Q, 100-120 mesh, 2m × 2mm glass column, temp. 140°→240°(8°/min)
 MC : JMS-300, ion energy 70eV, acer.V. 3kV, scan each 5sec.
 Computer : JMA 2000
 I.S. 2-Monoethylamino-N-methyl-2',6'-dimethylacetanilide-TFA

Figure 8 MassChromatogram of Alkali Fraction Drug Mixture TFA



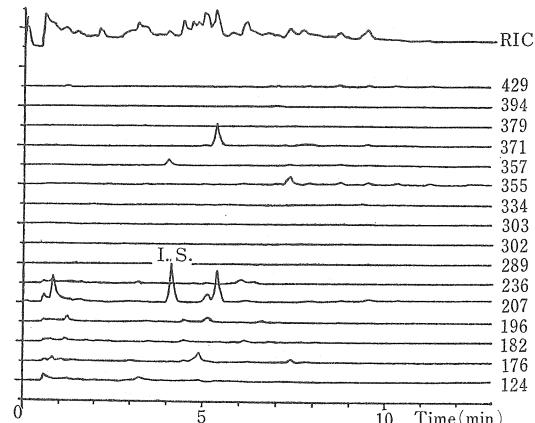
Conditions :
 GLC : JGC 20K, 1.5% OV-1 on Gaschrom Q, 80-100 mesh, 1m × 2mm glass column, temp. 160°→280°(12°/min)
 MC : JMS-D300, ion energy 70eV, acer. V. 3kV, scan each 5 sec.
 Computer : JMA 2000
 Abbreviation ; ATR Atropine, BRU Brucine, COD Codeine-TMS, LEV Levallorphan-TMS, PEN Pentazocine-TMS, PENH Pentazocine(H₂O)-TMS, I. S. Hexestrol-TMS

Figure 10 Mass Chromatogram of Hydrolysed Fraction Drug Mixture TMS



Conditions : same as Fig. 8

Figure 9 Mass Chromatogram of Alkali Fraction TFA from Urine



Conditions : same as Fig. 10

Figure 11 Mass Chromatogram of Hydrolysed Fraction TMS from Urine

る。メサドン、ジピパノン、およびデキストロモラマイドは分析温度が高く、カラム液相の流出などにより測定は困難で、かつ、測定に長時間を要するため、他の薬物と同条件で測定することはむずかしく、上記アミフェナゾールを含め GLC でスクリーニングすることとした。

加水分解分画に検出される薬物の混合物の TMS 誘導体の MC を Fig. 10 に、スポーツ選手尿の加水分解分画の TMS 誘導体の MC を Fig. 11 に示した。この分画には、対象薬物としてコカイン、モルヒネ、ストリキニーネなどを含むが、通常、製剤中に同時に含まれるもの、また類似構造を有し使用頻度が高い薬物として、コデイン、レバロルファン、アトロピン、ペントゾシン、および酸性加水分解により生成するペントゾシン水和物 [$2'$ -hydroxy- 2 -(3-methyl-3-hydroxybutyl)- $5,9$ -dimethyl-6,7-benzomorphan (ペントゾシン・ H_2O)] を参考のため、同時に測定した。Table VII, Fig. 7, および Fig. 10 から明らかなるごとく、この分画の薬物は M^+ の強度が強く、またすべての薬物が異なる m/e を検出の指標としており、判別は容易である。

MC における尿成分の影響は、アルカリ分画では Fig. 9 にみられるごとく、ほとんど尿成分の影響をうけることはない。加水分解分画では Fig. 11 のごとく m/e 207, 355, 357, および 371 などに若干認められるが、いずれも薬物と保持時間が異なるため検出を妨害しない。

栄養剤の投与実験 栄養剤の摂取が薬物の検出を妨害するかを検討するため、ハイシー A, ローヤルゼリー、人参精など Table III に示す12種の投与実験を行なった。TLC および GLC による測定の結果では、薬物の検出を妨害するスポットまたはピークの出現は認められず、これら栄養剤の摂取は薬物の検出に妨害を与えないことを確認できた。

尿への薬物添加実験 尿 1 ml あたり薬物を 0.1, 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, および 6.0 μg (遊離塩基として算出) を添加し、有機溶媒による抽出法で抽出した。TLC に尿 5 ml 相当分を GLC には尿 0.25 ml 相当分 (抽出物の 1/20) を使用し検出限界を求めた。その成績を Table VIII に

Table VIII Detectable Limit by TLC, GLC, and MC

Drug	Detectable Limit		
	TLC*	GLC*	MC**
Amiphenazole	3.0	1.0	
Amphetamine	1.0	0.4	0.003
Bemegride	1.0	0.2	0.025
Cocaine	0.4	0.2	
Dextromoramide	0.4	0.2	
Diethylpropion	0.2	0.1	0.009
Dimethylamphetamine	0.2	0.2	
Dipipanone	0.4	0.1	
Ephedrine	0.4	0.1	0.006
Ethylamphetamine	1.0	2.0	0.003
Fencamfamine	1.0	0.1	0.003
Fenfluramine	0.2	0.2	0.003
Leptazol	1.0	0.2	0.003
Methadone	0.4	0.1	
Methoxyphenamine	0.2	2.0	0.003
Methylamphetamine	1.0	0.4	0.003
Methylephedrine	0.4	0.4	
Methylphenidate	1.0	0.4	0.003
Morphine	0.4	0.2	
Nikethamide	1.0	0.1	0.006
Norephedrine	1.0	0.1	0.003
Norpseudoephedrine	1.0	0.1	
Phentermine	1.0	0.2	0.003
Pethidine	0.4	0.1	
Prolintane	0.2	0.1	0.01
Strychnine	0.2	0.2	0.015

* On TLC and GLC, each drug was added to 5 ml of urine. ($\mu g/ml$ urine)

** On MC, authentic drug was used. (μg / an injection)

示した。TLC ではアミフェナゾールの検出限界濃度が 3 $\mu g/ml$ であったが、その他の薬物はすべて 1.0 $\mu g/ml$ 以下の濃度で検出できた。アミフェナゾールはニコチンと Rf 値が近接しているため、微量では検出されにくい。またニコチンと同様、尿中に通常検出されるカフェインは Rf の近接する薬物の検出に影響をおよぼすことがある。すなわち、通常の量では酸性分画に抽出されて、アルカリ分画では残量も僅かで影響は少ないが、大量に含まれている場合、レプタゾール、メチルフェニデートなどの検出を困難とする。

GLC は抽出物を TMS 誘導体として測定した。その結果 MC によるスクリーニングを補うため高温で測定するメサドン、コカインなど 7 種の薬物は、いずれも尿成分の影響をうけず感度よく検出

された。使用した薬物中、エチルアンフェタミンおよびメトキシフェナミンの検出限界 TLC がの成績を下回った。これは検出限界付近ではピーク高が低く、尿成分との判別が困難なためである。

MC の成績はマススペクトルで薬物を確認するに必要な注入量で示した。スクリーニング検査で MC に供する抽出物の量は、尿 0.1 ml に相当する。GLC 供試料は尿 0.25 ml に相当するので、抽出による損失を無視して比較すれば、ジエチルプロピオノンおよびプロリンタンはほぼ同じ限界濃度、他の薬物は約 1/7～1/10 の濃度で MC により

検出確認が可能である。

禁止薬物の投与実験 投与実験に使用した12薬物、およびメチルアンフェタミン患者尿および治療のためオピアト、ペチロルファンを投与した患者尿の検出の結果を Table IX に示した。

これらの結果はスクリーニング検査の成績であり TLC および GLC は対照となる投与前の尿との比較で異常と判定したものであるため、正確には排泄パターンと一致しない場合も考えられる。一方 MC の成績は薬物の存在が疑われたとき、マススペクトルをとり、標品と対比のうえ判定し

Table IX Detectable Hours by the Drug Administration Experiment

(The detectable hours on TLC and GLC show the result of the screening test, and the hours on MC represent the result of the identification test).

Drug	Dose (mg)	Excreted form	Detectable Hours after Administration					
			TLC		GLC		MC	
			A*	B*	A*	B*	A*	B*
Amiphenazole	100 oral	unchanged	12	12	6	6		
Bemegride	50 oral	unchanged metabolite	120	120	120	120	48 120	24 120
Diethylpropion	25 oral	unchanged metabolite	ND** 24	ND 24	ND 24	ND 96	ND 24	ND 48
Ephedrine	25 oral	unchanged	48	24	72	72	96	120
Fencamfamine	10 oral	unchanged metabolite	72	24	72 120	72 24	96 120	120 96
Leptazol	50 oral	unchanged	24	48	12	12	24	6
Methoxyphenamine	300 oral	unchanged	48	24	12	24	72	96
Methylephedrine	50 oral	unchanged metabolite	24 24	24 24	48 48	48 48	72 72	72 72
Methylphenidate	10 oral	unchanged	ND	ND	12	6	12	12
Nikethamide	250 i.m.	unchanged metabolite	6	48	6	3	3 24	12 24
Norpseudoephedrine	20 oral	unchanged	12	12	12	12	24	24
Prolintane	10 oral	unchanged	ND	ND	12	12	24	24
Methylamphetamine***		unchanged	detected		detected		detected	
Morphine****		unchanged	detected		detected		detected	
Pethidine*****		unchanged	detected		detected		detected	

* athletes (♂) ingested drugs

** not detected

*** detected from the urine of an addict

**** detected from the patient urine administered "Opiato"

***** detected from the patient urine administered "Pethilorphan"

た。

投与実験被験者中 1 名に 1 日 300 カロリーの運動負荷を与え、運動負荷が排泄時間に及ぼす効果を検討したが、その影響は認められなかった。

投与実験の 12 薬物および患者尿の 3 薬物、計 15 薬物中、未変化体が尿中に検出されなかつたものは、ジエチルプロピオノンのみで、他の薬物はすべて未変化体を検出した。ジエチルプロピオノンは Schreider¹³⁾ によれば 7.8%、Mikhailova¹⁴⁾ は 2 % が未変化体として尿中に排泄されると報告しているが、MC、GLC による結果から、未変化体と思われる微小なピークを認めたが同定するにいたらず、脱エチルして生成した N-エチルアミノプロピオフェノン、アミノプロピオフェノン、およびノルエフェドリンが検出された。メチルエフェドリン投与尿では、メチルエフェドリンの TFA 誘導体が不安定で分解し易いため MC では未変化体を検出できず、代謝物であるエフェドリンおよびノルエフェドリンが検出された。そこで新たに尿抽出物を TMS 誘導体として測定した結果、投与後 72 時間まで未変化体であるメチルエフェドリンを検出した。

TFA 誘導体の MC スクリーニング検査で、エフェドリンまたはノルエフェドリンを検出したと

き、存在が疑われる薬物は、ジメチルアンフェタミン、エチルアンフェタミン、メチルアンフェタミン、アンフェタミン、メチルエフェドリン、エフェドリン、ノルエフェドリン、ノルプソイドエフェドリン、およびジエチルプロピオノンの 9 種で、これらの薬物は Table X に示した未変化体または代謝物を検出することによって判別する必要がある。

文献に示された尿に排泄される未変化体の量を Table XI に示した。投与実験で未変化体を確認した薬物を含め、殆どの薬物が未変化体を排泄するため、ドーピングドラッグスの検出は未変化体を検出、同定すればよいと考えられるが、今回検討から除外したヘロインは Way ら¹⁵⁾ によれば、未変化体を認めず 50~57% がモルヒネとして尿中へ排泄されることから、モルヒネを検出したときの原薬物の判定には配慮が必要である。

投与実験の検出成績はいずれも良好な結果を得たが TLC でジエチルプロピオノン、メチルフェニデート、およびプロリンタンを検出できなかつた。しかし、ジエチルプロピオノン投与尿には Rf 0.56 および 0.51 に代謝物のスポットを認めた。Rf 値がカフェインまたはニコチンと近接しているメチルフェニデートおよびプロリンタンは、通

Table X Some drugs and their metabolites

	AMP	DMA	EPH	EAM	MAA	MEP	NEP	MET
Amphetamine	○						○	
Diethylpropion							○	
Dimethylamphetamine	○	○			○		?	
Ephedrine			○				○	
Ethylamphetamine	?			○			?	
Methylamphetamine	○				○		○	
Methylephedrine			○			○	○	
Norephedrine							○	
Norpseudoephedrine							○	

? metabolite assumed from the metabolic pathway of another drugs

AMP; Amphetamine

DMA; Dimethylamphetamine

EPH; Ephedrine

EAM; Ethylamphetamine

MAA; Methylamphetamine

MEP; Methylephedrine

NEP; Norephedrine (or Norpseudoephedrine)

MET; Another metabolites

Table XI Unchanged % Dose excreted of Doping Drugs in Urine

Drug	unchanged % dose	reference	unchanged (our study)
Amiphenazole			detected
Amphetamine	54-70	16, 17, 18, 19	
Bemegride	partly	20	detected
Cocaine	1-12	21, 22, 23	
Dextromoramide	not detected	24	
Diethylpropion	2-7.8, little	13, 14, 25	not detected
Dimethylamphetamine	40	26, 27, 18	
Ephedrine	61-80	28, 29	detected
Ethylamphetamine	17-45	18, 30, 31	
Fencamfamine			detected
Fenfluramine	20	31, 32	
Leptazol	9.9	33	detected
Methadone	4	15, 34	
Methoxyphenamine	detected	35, 36	detected
Methylamphetamine	23-major	17, 30, 37	detected
Methylephedrine	32	28, 29	detected
Methylphenidate	0.8-11	38, 39	detected
Morphine	1-14	15, 40	detected
Nikethamide			detected
Norephedrine	91	15, 41	
Norpseudoephedrine	40	42	detected
Phentermine	less than 5	43, 44, 45	
Pethidine	2-10	15, 46, 47	detected
Prolintane	not detected	48	detected
Strychnine	small	49	

常、塩化白金酸試薬で判別できるが、カフェインおよびニコチンの含量が多いため、検査が妨害されたものと考えられる。アミフェナゾールは TLC および GLC で未変化体を確認した。

パッチ方式による MC スクリーニングの主体とした MC は、微量の薬物が存在すれば、その薬物名をスクリーニング検査の段階で、ほぼ正確に知ることができる。しかし、この分析には一検体当たり約25分を要する。ドーピング検査は限られた短時間に多数の検体を処理する必要がある。そこでスポーツ競技大会におけるドーピング検査では、薬物使用が非常に低率であると推定されるため、数検体をまとめて一緒にスクリーニングするパッチ方式を検討した。すなわち投与尿からの抽出物および薬物を含まない尿抽出物数検体を、各

々等量づつ混合して MC を行なった。その結果、4 検体をまとめて測定しても Table IX に示した検出成績と同じ成績を得た。このことより 4 検体をまとめてパッチ方式でスクリーニング検査を行なっても、充分な検出感度を維持できるという結論を得た。さらに投与実験尿を使ってブラインド方式で、TLC, GLC, パッチ方式 MC によるスクリーニング検査法の有効性を検討した結果、満足する成績を得た。

結論

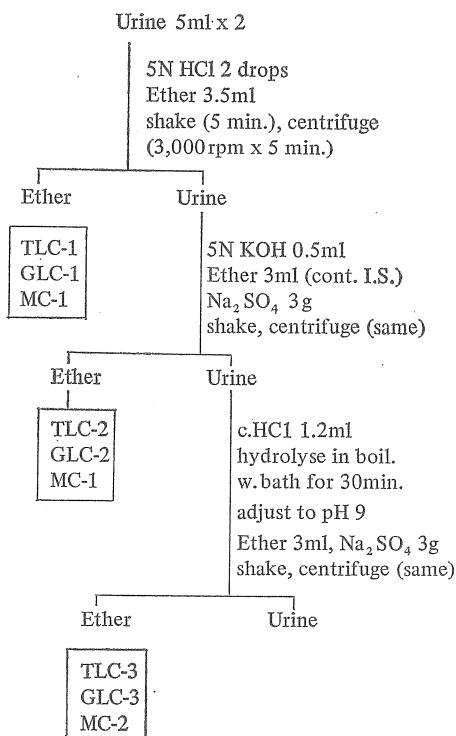
スポーツ選手のドーピング検査法について検討した結果、次の如き検査法が適当であるとの結論を得た。

すなわち、スクリーニング検査は検体をまとめ

DOPING ANALYSIS

CONDITIONS

SCREENING PROCEDURE



IDENTIFICATION TEST

GC-MS

TLC: dev. soln., chloroform: methanol (9:1)
color reagents,

TLC-1 1. UV

2. Cu-pyridine reagent

3. 1% HgNO₃

TLC-2 1. UV

2. Ninhydrin reagent

3. H₂SO₄

4. PtCl₄ · NaI reagent

5. Dragendorff's reagent

TLC-3 1. UV

2. H₂SO₄

3. PtCl₄ · NaI reagent

4. Dragendorff's reagent

GLC: 1.5% OV-17 on Shimalite W, AW, DMCS, 80–100 mesh 1.5m x 3mm glass column, N₂ 30ml/min

column temperature

GLC-1 150°

GLC-2 250°(1 min), 250°→300°(20°/min)

GLC-3 250°

MC: ion energy 70eV, acer. V. 3kV, HV 1.3kV

MC-1 3% OV-17 on Gaschrom Q, 100–120 mesh, 2m x 2mm glass, 140°→240° (8°/min.)

MC-2 1.5% OV-1 on Gaschrom Q, 80–100 mesh, 1m x 2mm glass, 160°→280° (12°/min.)

Identification GC-MS

isothermal, conditions of MS are same as the above.

Figure 12

てバッチ方式で測定する MC を主体として行ない、そのほかに個々の検体について TLC を、高温で検出されるメサドン、アミフェナゾール、コカイン、ジピバノン、デキストロモラマイド、モルヒネ、およびストリキニーネについては GLC で情報を補うこととする。

次に検査法を詳述し、その概略を Figure 12 に示した。

スクリーニング検査法

試料の調製 共栓遠沈管 (16.5×115 mm) に尿 5 mL づつ 2 本とり 5N · HCl 2 滴、エーテル 3.5 mL を加えて 5 分間ふりまぜる。0°, 3,000 rpm, 5 分間遠心分離したのち、エーテル層を綿栓し少量の硫酸ナトリウムを入れたガラスロートを通じ

て試験管 (18×100mm) にとる。遠沈管にエーテル 1 mL を新たにとり、壁面を洗ったのち抽出液に合せる。(酸性分画) 酸性抽出した尿に 5 N · KOH, 0.5 mL, エーテル 3 mL, 硫酸ナトリウム 3 g を加え、さらに同一検体 2 本のうち 1 本に内部標準物質 (2-momoethylamino-N-methyl-2' 6'-dimethylacetamide) を加えて、前と同様に抽出・分離し、エーテル層を試験管にとる。この抽出液に蒸散防止剤として 5 % 酢酸・酢酸エチル液 2 滴を加える。(アルカリ分画) アルカリ抽出後の尿を別の遠沈管に移し、濃 HCl 1.2 mL を加え、沸騰水浴中で 30 分加水分解する。これを流水でひやし 20% NaOH およびアンモニア水で pH 9 とする。エーテル 3 mL, 硫酸ナトリウム 3 g を加

え、前と同様に抽出・分離し、エーテル層をとり
5% 酢酸・酢酸エチル液 2滴を加える。(加水分
解分画) 抽出液の入った試験管を約30°の水浴に
入れ N₂ 気流下で溶媒を留去して残留物を得る。
各分画 2本づつ得られた残留物は、1本を TLC に
他方を GLC および MC に使用する。

TLC 試料は残留物を 0.2ml のエタノールに溶
解し、全量をシリカゲルプレートに塗布する。

GLC および MC に供する試料は、酸性分画、
内部標準物質を含むアルカリ分画、および加水分
解分画の残留物を少量の酢酸エチルに溶解し、2
分したのち N₂ 気流下で溶媒を留去する。2分し
た残留物をそれぞれ GLC および MC に使用する。

GLC 試料はアルカリ分画および加水分解分画
を TMS 誘導体とし、試料の 1/10 (尿 0.25ml 相当
分) をガスクロマトグラフに注入する。酸性分画
は酢酸エチル 10 μl に溶解し 1 μl (尿 0.25ml 相當
分) をガスクロマトグラフに注入する。

MC 用試料は残留物を酢酸エチル 50 μl に溶解
し、その 25 μl をとり、4 検体分をミクロ試験管中
で混合する。この混合液を N₂ 気流下で溶媒を留
去したのち、酸性およびアルカリ分画は TFA 誘
導体、加水分解分画は TMS 誘導体とし、試料の
4/50 (尿 0.1 ml 相当分) を MC 測定に使用する。
バッチ方式による MC スクリーニングで薬物が検
出されたとき、確認のためそれぞれの検体の残
っている 25 μl を使用する。

次に薬物検出のため、下記の条件で検査する。

TLC：ワコーゲル、B5 FM、20×20 cm,
0.25 mm 厚

展開溶媒：クロロホルム・メタノール (9 :
1) アルカリ分画、加水分解分画のプレートは、
アンモニア水をオーバースポットして展開する。

発色：酸性分画 1. UV ライト

2. 銅ピリジン試薬

3. 硝酸水銀試薬

アルカリ性分画 1. UV ライト

2. ニンヒドリン試薬 (105°, 5 分)

3. 硫酸液

4. 塩化白金酸試薬

5. ドラーゲンドルフ試薬

加水分解分画 1. UV ライト

2. 硫酸液

3. 塩化白金酸試薬

4. ドラーゲンドルフ試薬

GLC：1.5% OV-17/Shimalite W, DMCS,
80~100 メッシュ、1.5 m × 3 mm ID ガラスカラ
ム、カラム温度：酸性分画 150°、アルカリ分画
250° で 1 分保持したのち 300° に昇温 (20°/min),
加水分解分画 250°

MC：イオン化電圧 70 eV, 加速電圧 3.0 kV,
H. V. 1.3 kV, 酸性・アルカリ性分画：3% OV-
17/Gaschrom Q, 100~120 メッシュ、2 m × 2
mm I D ガラスカラム 140° から 240° まで 8°/min
昇温、加水分解分画：1.5% OV 1/Gaschrom Q,
80~100 メッシュ、1 m × 2 mm I D ガラスカラ
ム、160° から 280° まで 12°/min 昇温

確認検査法

スクリーニング検査で陽性となった検体の尿 5
ml をあらたにとり、スクリーニングの場合と同
じく抽出し、必要な分画について定温で GC・MS
を行ない、マススペクトルを標品と比較する。

文 献

- 1) 本間正一、白崎節子、北海道立衛生研究所報、22
38 (1972)
- 2) 金森弘恭、森三佐雄、同誌、22, 32 (1972)
- 3) 大久保義夫、日体協スポーツ科研報告。No. X,
1 (1969)
- 4) 大久保義夫、同誌、No. VI, 1 (1970)
- 5) M. Donike, Dope Analysis, Games of the XXth
Olympiade, 1972, München
- 6) R. Dugal and M. Bertrand, Canad. Res., May-June, 17 (1976)
- 7) J. M. Meola and M. Vanko, Clin. Chem., 20,
184 (1974)
- 8) P. A. F. Pranitis and A. Stolman, J. Forensic
Sci., 20, 726 (1975)
- 9) 渡辺壯一、科警研報告、19, 88 (1966)
- 10) R. F. Adams, Clin. Chem. Newsletter, 4, 15
(1972)
- 11) R. F. Adams, ibid., 4, 22 (1972)
- 12) D. J. Berry and J. Grove, J. Chromatog., 61, 111
(1971)
- 13) E. C. Schreiber, B. H. Min, A. V. Zeiger, and

- J.F. Lang, J. Pharmacol. Exptl. Therap., **159**, 372 (1968)
- 14) D. Mikhailova, A. Rosen, B. Testa, and A. H. Beckett, J. Pharm. Pharmacol., **26**, 711 (1974)
- 15) E. L. Way and T. K. Adler, Pharmacol. Rev., **12**, 383 (1960)
- 16) L. G. Dring, R. L. Smith, and R. T. Williams, Biochem. J., **116**, 425 (1970)
- 17) J. Caldwell, L. G. Dring, and R. T. Williams, ibid., **129**, 23 (1972)
- 18) T. B. Vree, J. P. M. C. Gorgels, A. Th. J. M. Muskens, and J. M. Van Rossum, Clin. Chim. Acta, **34**, 333 (1971)
- 19) A. H. Beckett, M. Rowland, and P. Turner, Lancet, **1**, 303 (1965)
- 20) N. E. W. McCallum, J. Pharm. Pharmacol., **7**, 276 (1955)
- 21) H. E. Hamilton, J. E. Wallace, E.L. Shimek. Jr., Pam Land, S.C. Harris, and J. G. Christensen, J. Forensic Sci., **22**, 697 (1977)
- 22) H. A. Oelkers and E. Vinke, Arch. exp. Path. Pharmak., **179**, 341 (1935)
- 23) F. Fish and W. D. C. Wilson, J. Pharm. Pharmacol., **21**, Suppl. 135s (1969)
- 24) A. Vidic, Arch. Toxikol., **19**, 254 (1961)
- 25) F. Banci, G. P. Cartoni, A. Cavalli, and A. Morai, Arzneim. Forsch., **21**, 1616 (1971)
- 26) T. B. Vree, A. Th. J. M. Muskens, and J.M.Van Rossum, Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., **199**, 311 (1972)
- 27) A. H. Beckett, L. G. Brooks, and E. V. B. Schenoy, J. Pharm. Pharmacol., **21**, 151s (1969)
- 28) A. H. Beckett and G. R. Wilkinson, ibid., **17**, Suppl. 104s & 107s (1965)
- 29) P. S. Sever, L. G. Dring, and R. T. Williams, Eur. J. Clin. Pharmacol., **9**, 193 (1975)
- 30) A. H. Beckett and E. V. B. Shenog, J. Pharm. pharmacol., **25**, 793 (1973)
- 31) A. H. Beckett and L. G. Brooks, ibid., **19**, Suppl. 42s (1967)
- 32) R. Bruce and W. R. Maynard, J. Pharm. Sci., **57**, 1173 (1968)
- 33) S. G. Rowles, G. S. Born, S. Gordon, H. T. Russel, T. Henry, W. B. Kessler, and J. E. Christian, ibid., **60**, 725 (1971)
- 34) A. H. Beckett, J. F. Taylor, A. F. Casy, and M. M. A. Hassan, J. pharm. Pharmacol., **20**, 754 (1967)
- 35) 大鳥居健, 小嶋哲夫, 新潟医学会雑誌, **79**, 625 (1965)
- 36) K. K. Midha, J. K. Cooper, I. J. McGilveray, R. T. Coutts, and R. T. Dawe, Drug Metab. Disposit., **4**, 568 (1976)
- 37) A. H. Beckett and M. Rowland, J. Pharm. Pharmacol., **17**, Suppl. 109s (1965)
- 38) R. Wells, K. B. Hammond, and D. O. Rodger-son, Clin.Chem., **20**, 440 (1974)
- 39) B. A. Faraj, Z. H. Israilli, J. M. Perel, M. L. Jenkins, S. G. Holzman, S. A. Cucinell, and P. G. Dayton, J. Pharmacol. Exptl. Therap., **191**, 535 (1974)
- 40) T. Oka and E. Hosoya, Keio J. Med., **16**, 23 (1967)
- 41) J. E. Sinsheimer, L. G. Dring, and R. T. Williams, Biochm. J., **136**, 763 (1973)
- 42) C. K. Maitai and G. M. Mugera, J. Pharm. Sci., **64**, 702 (1975)
- 43) A. H. Beckett and P. M. Bélanger, J. Pharm. Pharmacol., **26**, 205 (1974)
- 44) A. H. Beckett and L.G.Brooks, ibid., **23**, 288 (1971)
- 45) V. K. Walkenstein, N. Chumakov, and S. Seifter, J. Pharmacol. Exptl. Therap., **115**, 16 (1955)
- 46) A. M. Asatoor, D. R. London, M. D. Milne, and M. L. Simenhoff, Br. J. Pharmacol., **20**, 285 (1963)
- 47) J. J. Burns, J. Pharmacol. Exptl. Therap., **114**, 289 (1955)
- 48) A. H. Beckett, G. T. Tucker, and A. C. Moffat, J. Pharm. Pharmacol., **19**, 273 (1967)
- 49) R. A. Hatcher and C. Eggleston, J. Pharmacol. Exptl. Therap., **10**, 281 (1917)

