

昭和53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

第2報 アナボリックステロイドについて

財団法人 日本体育協会

スポーツ科学委員会

昭和53年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

スポーツ選手を対象とするドーピング検査法

第2報 アナボリックステロイドについて

報告者 (株)三菱油化メディカルサイエンス

班員 金井 晃 平井 利生 岡田 高治

管野 健司 宮田 啓一

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は昭和52年度日本体育協会スポーツ科学研究報告「スポーツ選手を対象とするドーピング検査法」(報告者 財団法人競走馬理化学研究所)において行われ、Table 1 に示した IOC 医事委員会指定のドーピングドラッグの中の分類 A) ~D) に関してマスクロマトグラフィーを中

Table 1 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) Narcotic analgesics, e.g.
Fencamfamine	Heroine
Methylamphetamine	Morphine
Norpseudoephedrine	Methadone
Phendimetrazine	Dextromoramide
Phenmetrazine	Dipipanone
Prolintane	pethidine and related compounds
and related compounds	E) Anabolic steroids
B) Sympathomimetic amines, e.g.	Norethandrolone
Ephedrine	Ethylesterenole
Methylephedrine	Methylteslerone
Methoxyphenamine and related compounds	Methandienone
	Esters of 19-nortestosterone and related compounds

心とし TLC, GLC を併せて使用する方法が確立されている¹⁾。

本第2報の目的はTable 1 のドーピングドラッグの中で残された分類E) のアナボリックステロイド(蛋白同化ステロイドホルモン)についてのドーピング検査法を確立することにある。

アナボリックステロイドは男性ホルモンの化学構造上及び生理作用上の類似物質であって、最も顕著な効果の一つは骨格筋肉組織を急速に発達させ、その結果体重の急速な増加をもたらすことである。男性化効果を持たず骨格、筋肉の発達を促進するアナボリックステロイドが種々合成されているが、この二つの効果を完全に切り離すことには成功していない。

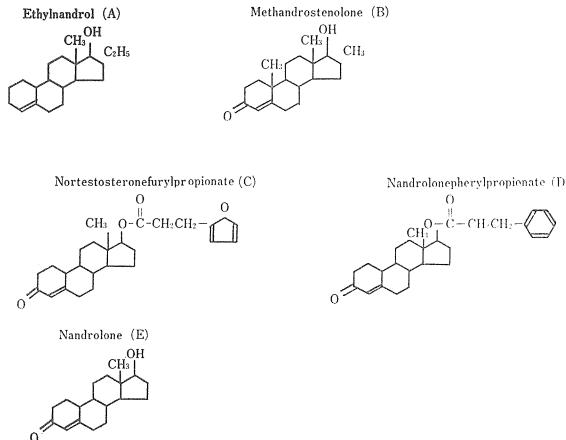
1960年、1970年代の大きなドーピング問題はこのアナボリックステロイドの濫用問題であるが、1974年迄にアナボリックステロイド及びその代謝物の体液中分析法がなかったため IOC の禁止ドラッグのリストに入れることも出来なかった。

ラジオイムノアッセイによる分析法がみられるようになり、IOC はスポーツ競技におけるアナボリックステロイドの使用を禁止した²⁾³⁾⁴⁾。

スポーツ競技会において最初にアナボリックステロイドのコントロールがなされたのは1978年6月のモントリオールオリンピックにおいてであり、その時はラジオイムノアッセイ法によるスクリーニング法と GC/MS 法によるスクリーニング及び同定法が用いられた⁵⁾。

本報はモントリオールオリンピックの Analy-

Table 2 Reaction Procedure



tical Doping Control の科学レポートを参考に GC/MS 法によるスクリーニング及び同定検査法を検討したものである。

I 実験方法及び結果

1. ガスクロ条件及び誘導体化条件の検討

1—1) 試薬 実験に使用したアナボリックステロイドとその構造式を Table 2 に示した。エチルナンドロール(オルガボリン) A はオルガボリン錠剤よりエチルナンドロールを抽出精製し、そのエタノール溶液を標準溶液として使用した。メタンドロステノロン(アビロール) B はアビロール錠剤から抽出精製し、そのエタノール溶液を標準溶液として使用した。ノルテストステロンフリルプロピオネート(デメロン) C 及びナンドロロンフェニルプロピオネート(デュラボリン) D については、これらの薬剤は生体中で加水分解されて、同一のナンドロロン E として尿中に代謝されると考えられるので C 及び D また精製品の不入手の E については、本報の範囲では未検討である。

試薬類は全て試薬特価を使用し、誘導体化試薬は、ガスクロ工業社製のものをそのまま使用した。

1—2) ガスクロマトグラフィー 使用機種はヒューレットパッカード HP-5840 型で検出器は水素炎イオン化検出器(FID)である。

(1) カラム条件の検討 カラム条件を検討するための誘導体の作成は、エクセルピペットで、標準溶液を適量とり 50°C 窒素吹付でエタノール

を乾固し、脱水ビリジン 500 μl とシリル化剤 MSTFA 20 μl を加え密栓のち 65°C, 30 分間反応させたのち 50°C で窒素吹付によりビリジン及び残存のシリル化剤をとばし、さらに脱水ビリジン 100 μl で再溶解した。

検討用のカラムとしては、3% OV-1/Chromsorb W-HP 100~120 メッシュ、2% OV-105/Chromsorb W-HP 100~120 メッシュ、1.8% DV-17/Chromsorb W-HP 100~120 メッシュの液相及び充填剤でカラムサイズは、いずれもガラスカラム 2 mm (ID) × 6 ft (length) である。いずれのカラムでもエチルナンドロール(A)及びメタンドロステノロン(B)は良い分離を示すが、溶媒ピークとの重なりリテンションタイム等を考えて、ガスクロマイドグラフィー用のカラムとしては 1.8% OV-17/Chromsorb W-HP による昇温プログラム法を選んだ。すなわち 200°C / 3 分間ののち 4°C / 分で昇温し 240°C / 20 分間というプログラムである。

また、マスクロマトグラフィー用のカラムとしては、よりリテンションタイムの速い 3% OV-1/chromsorb W-HP とし 190°C / 4 分間、4°C / 分昇温、240°C / 10 分間の昇温プログラムを選んだ。

(2) 誘導体化条件の検討 誘導体調製試薬としては、

イ. TMCS (trimethylchlorosilane) TMSI (N-trimethylsilylimidazole), BTMSA (N,O-bis-trimethylsilylacetamide) の合剤

- ロ. TMSI-H TMCS に HMDS(hexamethyl disilazane) を加えたもの
 ハ. HFBA(heptafluorobutyric acid anhydride)
 ニ. MSTFA (N-methyl - N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide)
- であるが、イ、ロはシリル化剤の入ったままガスクロに注入する必要があるため、その強い溶媒ビ

ークによりエチルレナンドロールの分離が良くない事、また、メタンドロステノロンの反応性も一定しない事、等不適当であった。

ハのアシル化剤はシリル化剤よりも低沸点のため、また3位のケトンに対する反応性が高いと考え使用したがメタンドロステノロンについては良好な反応性を示したものとのエチルナンドロールに対しては良好ではなかった。

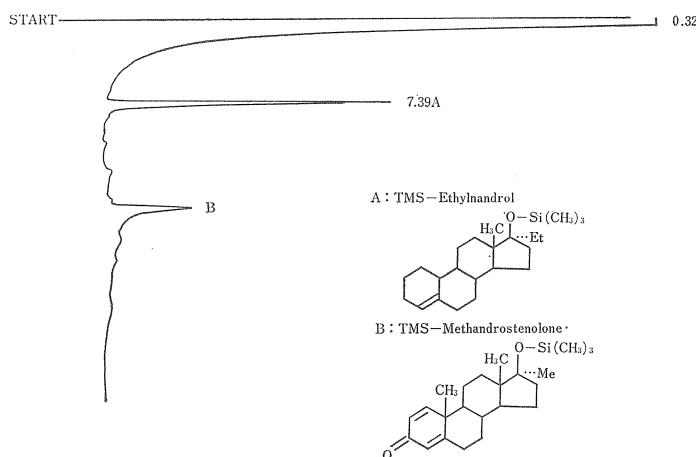


Fig. 1 Gas chromatogram (Standard mixture)

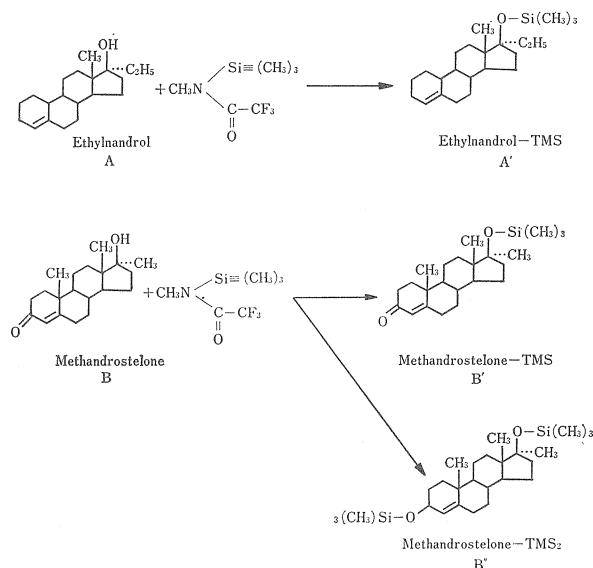


Fig. 2 Anabolic steroids and their chemical structure

それに対し、この MSTFA の場合、反応終了後過剰の試薬をとばすことが出来る利点があるため、結局 MSTFA によるシリル化を検討することにした。

溶媒と MSTFA の量比、反応温度及び反応時間の各組合せについて検討したが、反応温度を 100°C 以上にするとエチルナンドロールのピークがブロードになってくる。溶媒と MSTFA の量比により、メタンドロステノロンは 2 つのピークとして検出される等が判明し種々検討の結果、前述のように MSTFA $20\mu\text{l}$ とピリジン $500\mu\text{l}$ を加え 65°C 30 分間反応させる条件に到達した。

こうして得られたチャートを Fig 1 に示す。こ

の条件下での 2 成分のリテンションタイムはエチルナンドロール 7.5 分、メタンドロステノロン 16.5 分である。またこの反応条件での誘導体の推測構造を Fig 2 に示す。反応条件が厳しすぎるとメタンドロステノロンの 3 位のケト基もシリル化されて 2 つのピークとして検出されることになると推定される。

(3) 検量線の検討 エチルナンドロールの標準溶液を $2.4, 4.7, 9.5, 18.9, 37.8, 75.6\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように、また、メタンドロステノロンの標準溶液を $3.1, 6.3, 12.5, 25.0, 50.0\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように各々調製し前述の方法でガスクロマドグラフィー測定を行ない、ピーク高さによる検量線

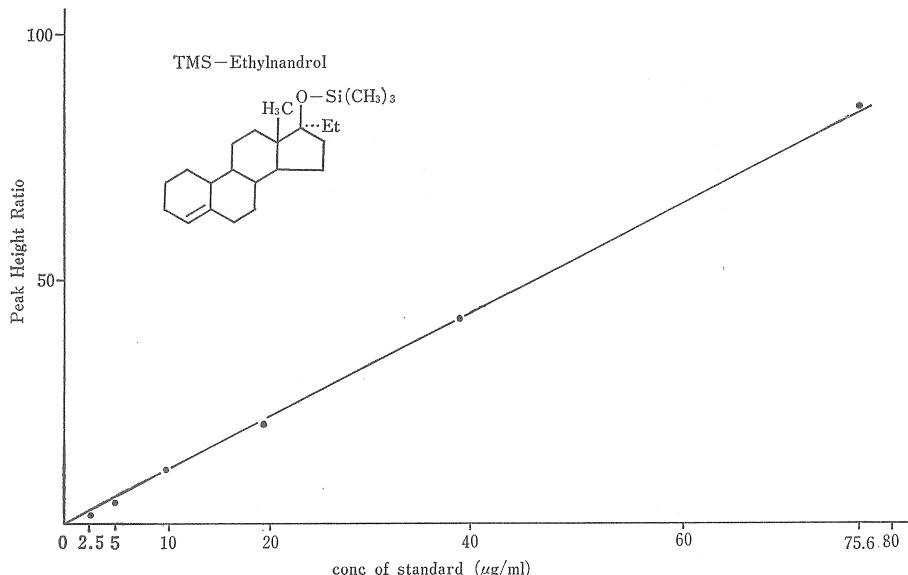


Fig. 3 Standard Curve (Ethynodiol)

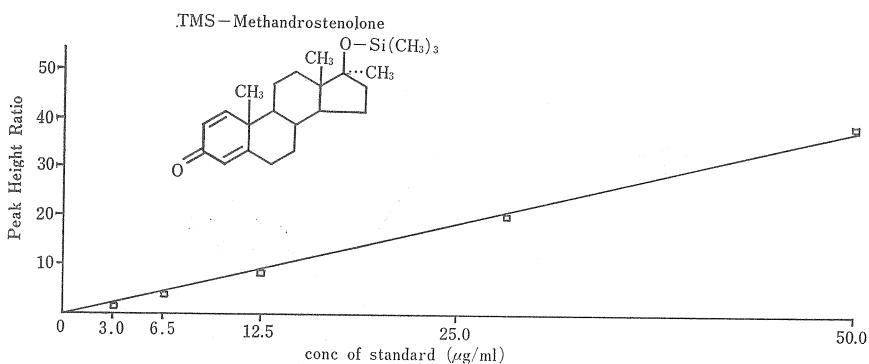


Fig. 4 Standard Curve (Methandrostenolone)

を作成した。Fig 3 及びFig 4 に示すように2ないし3 µg/ml から50ないし75 µg/ml の範囲で良好な直線性が得られた。

2. 尿からの溶出条件の検討

尿からの溶出法は、前述のモントリオールオリンピックの科学レポートを基本に、若干の改良を加えFig 5 のように設定した。

2-1) 水添加薬剤の回収率の検討 エチルナンドロール、メタンドロステノロンの標準液を蒸留水で希釈して適当な濃度とし Fig 5 の溶出法と前述の誘導体化ガスクロ条件により分析した。

Table 3 に薬剤水溶液の濃度及び分析濃度、回収率(%)を示した。

エチルナンドロールについて、2.4~75.6 µg/5 ml 濃度の水溶液を分析したところ、平均回収率

Urine 5ml
PH 8.5~9.0 buffer soln
NaCl 6.0g
dichloromethane/isopropyl alcohol(1% v/v) 25ml
shake (10min)
centrifuge (3,000rpm, 10min)

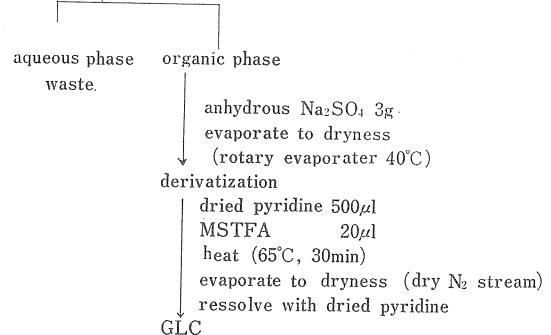


Fig 5 Extracion Prcedure (free fraction)

Table 3 Determination of anabolic steroid in standard aqueous solution

	Conc. of standard aqueous soln. (µg/5ml)		determined value (µg/5 ml)		recovery (%)	
	ETN *1	MEA *2	ETN	MEA	ETN	MEA
1	75.6	50.0	82.7	52.3	109.4	104.6
2	37.8	25.0	38.3	20.9	101.3	83.6
3	18.9	12.5	16.7	7.6	88.4	60.8
4	9.5	6.3	*3 —	4.9	—	77.8
5	4.7	3.1	5.2	2.5	110.6	80.6
6	2.4	1.6	3.3	1.4	137.5	87.5
average					109.4	82.5

*1 ETN=Ethynandrol

*2 MEA=Methandrostenolone

*3 lost.

Table 4 Determination of analolic steroid in spiked urine

	Spiked value of Standard (µg/5 mg)		determined value (µg/5 ml)		recovery (%)	
	ETN *1	MEA *2	ETN	MEA	ETN	MEA
0	0.0	0.0	0.0	0.0	—	—
1	75.6	50.0	75.5	60.4	99.9	120.8
2	37.8	25.0	30.9	23.6	81.7	94.4
3	18.9	12.5	17.2	14.7	91.0	117.6
4	9.5	6.3	7.7	9.2	81.1	146.0
5	4.7	—	4.2	—	89.4	—
avarage					88.6	119.7

*1 ETN=Ethynandrol

*2 MEA=Methandrostenolone

109.4% (88.4~137.5) であり、メタンドロステノロンについては $1.6\sim 50\mu\text{g}/5\text{ml}$ 濃度の水溶液について分析したところ、平均回収率 82.5% (60.8~104.6) であり、いずれも若干のバラツキはあるものの大略 80% 台の回収率であり、溶出法としてはほぼ満足できるものと考えられる。

2-2) 尿添加薬剤の回収率の検討 エチルナンドロール、メタンドロステノロンの標準溶液を薬物投与のない正常者尿に添加し、適当な濃度とし **Fig 5** の溶出法により尿からの溶出実験を検討した。**Table 4** にその結果を示す。

エチルナンドロールについて標準液を尿に添加して $4.7\sim 75.6\mu\text{g}/5\text{ml}$ の濃度とした尿について平均回収率 88.6% (81.1~99.9)% であり、同じくメタンドロステノロンの $6.3\sim 50.0\mu\text{g}/5\text{ml}$ の

濃度範囲の尿については平均 119.7 (94.4~146.0)% の回収率を得た。

薬物投与のない正常者尿からの分析チャートを **Fig 6** にエチルナンドロール及びメタンドロステノロンを添加した尿からの分析チャートを **Fig 7** に示した。チャートの途中で分析感度を 2×10^6 から 2×10^4 と上げているためベースラインが移動している。

Fig 6 から明らかなように、本法の溶出法を用いた場合、生体に由来する各種ステロイドホルモン代謝物 (17-ケトステロイド、プレグナンジオール、プレグナントリオール、テストステロン等々) は殆んど溶出されず分析チャート上には検出されないことがわかる。

但し、今回の検討は **Fig 5** の工程で遊離の薬物

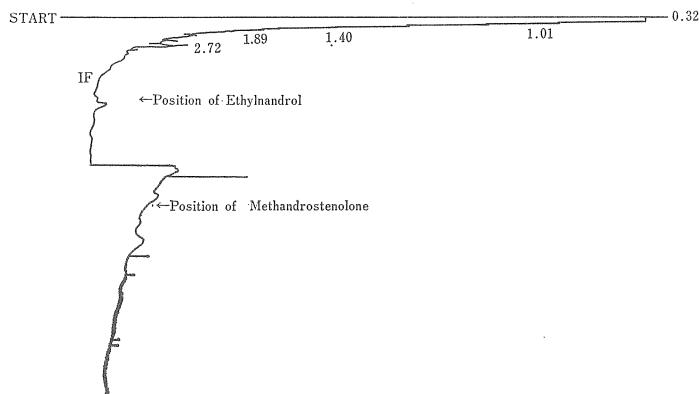


Fig 6 Gas chromatogram (Drug free Urine Extract-TMS)

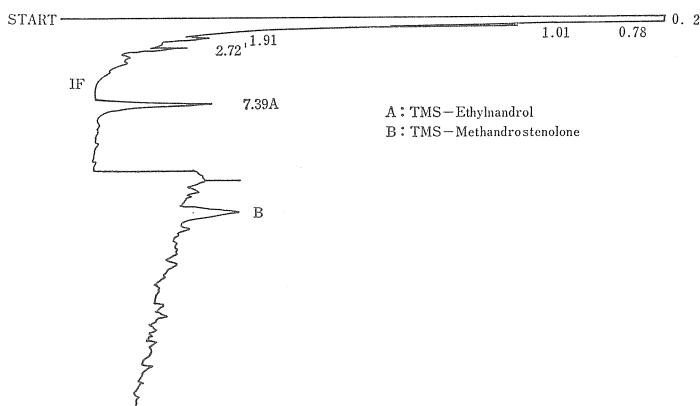


Fig 7 Gas chromatogram (Spiked Urine Extract-TMS)

のみを溶出したものであり、今後薬物投与者の尿を加水分解しての溶出検討が必要であり、この点の詳細な検討が必要となろう。

なおFig 6のエチルナンドロールの位置に小さなピークがみられるがこれは水からの溶出実験のときにも見られるピークであり、尿から由来するものでなく溶媒、誘導化試薬等に起用するものと考えられる。

この点に関しては反応条件の改良、マスクロマドグラムによる分離定性等今後の検討に待ちたい。

3. マススペクトルの測定

前述の誘導体化法により分析したエチルナンドロール及びメタンドロステノロンのマススペクトルを測定した。

ガスクロマドグラフの条件は、

機種 ヒューレットパッカードHP-5710型
カラム 3% OV-1 Chrom sorb W-HP
100-120 mesh, 2 mm (ID) × 3 ft
(length)

カラム温度 190°C / 4分, 升温 4°C/分,
240°C / 10分

キャリヤーガス ヘリウム 50ml/分

マススペクトロメーターの主な条件は、

機種 日本電子製 JEOL-D 300型

セパレーター温度 280°C

イオン化電圧 20eV

加速電圧 1.6kV

H.V. 3.0kV

である。

Fig 8は上の条件でのTIMクロマトグラムでエチルナンドロールは約2.8分、メタンドロステノロンは約8.0分に各々リテンションタイムを持つ。

Fig 9はエチルナンドロールのマススペクトル、Fig 10はメタンドロステノロンのマススペクトルを各々示した。

上述のイオン化電圧条件では、比較的解裂の少ない条件を選んでいるためM⁺及びM⁺-18のピークが比較的強く現われている（いずれもTMS基ははずれている）。

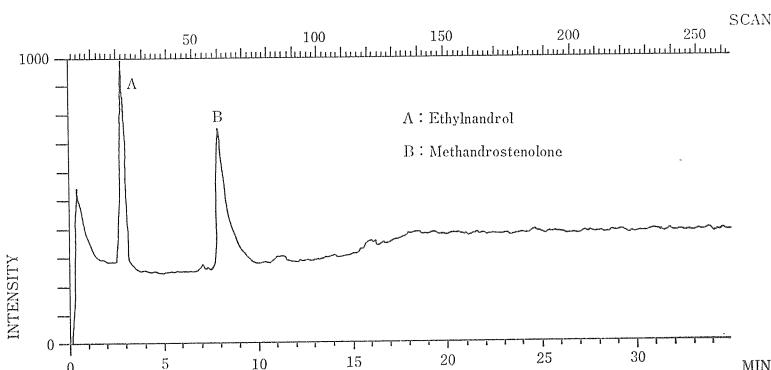


Fig 8 TIM Spectrum

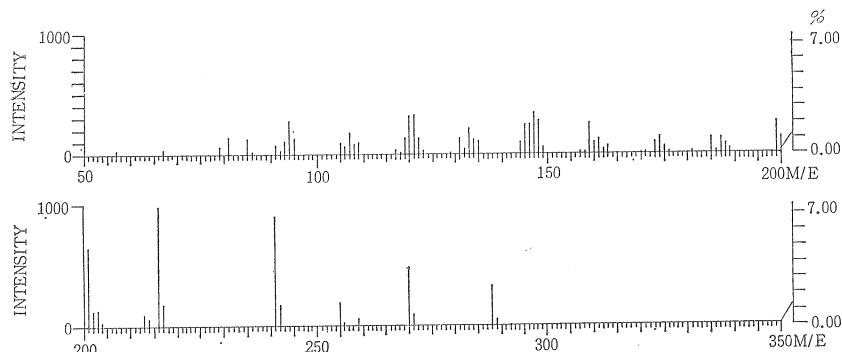


Fig 9 Mass Spectrum of ethynodiol

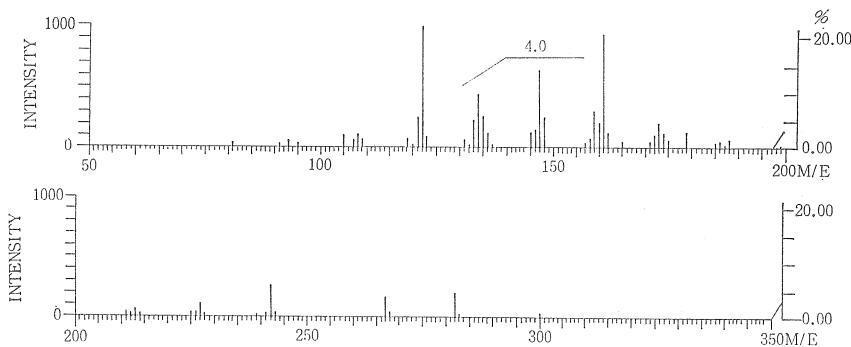


Fig. 10 Mass Spectrum of methandrostenolone

マススペクトロメーター諸条件とスペクトラルについての関係は今後、薬物の原末による分析を含めて詳細に検討する予定である。

II 結論及び今後の予定

本報は中間報告のため分析法確立という意味での結論は出せないが、

- 1) 遊離の薬剤の尿からの溶出に関して内因性のステロイドホルモン及びその代謝物と干渉しない溶出条件
 - 2) 誘導体化の試薬及び反応条件
 - 3) ガスクロマトグラフィー、マススペクトロメトリーの各分析条件
- をほぼ確立できた。
- 今後は以上の条件を用いて、
- 1) 薬物投与者尿の分析（代謝物分析を含む）

- 2) エチルナンドロール、メタンドロステノロン以外のアナボリックステロイドに関する分析
- 3) 各アナボリックステロイドのマススペクトルの正確な測定

等を行ない、アナボリックステロイドに関するドーピング検査法を確立することとしたい。

参考文献

- 1) (財)競走馬理化学研究所, 1977年度日本体育協会スポーツ科学研究報告書 No.VII
- 2) Sumner, N.A., J. Steroid Biochem., 5, 307(1974)
- 3) Brooks, R. V., Firth, G. R. and Sumner, N. A., Brit. J. Sports Med., 9, 89—92 (1975)
- 4) Ward, R. J., Shackleton, C. H. L. and Lawson, A. M., Brit. J. Sports Med., 9, 93—97 (1975)
- 5) Games of the XXIst Olympiad Analytical Doping Control Scientific Report

