

昭和58年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

No. IV 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 (2) ——

財団法人 日本体育協会

ス ポ ー ツ 科 学 委 員 会



## 昭和58年度 日本体育協会スポーツ科学研究報告

### No.IV 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(2)—

報 告 者 三菱油化メディカルサイエンス

班 長 上館民夫

研究主任 平井利生

研究班員 藤崎誠 近藤仁美 岩間玲子

#### — 目 次 —

##### はじめに

##### 1. 人における尿中カフェイン排泄量の検討

###### 1-1) 分析法

###### 1-2) 正常者の分析データ

###### 1-3) スポーツ選手における運動前後尿の分析

###### 1-4) カフェイン投与による尿中排泄量

##### 2. GC/MS による尿中テストステロンおよびエピ テストステロン分析法の確立

###### 2-1) 分析の確立

###### i ) 試薬

###### ii ) 機器

###### iii) 誘導体化およびGC/SIM 条件

###### iv) 抽出条件

###### 2-2) 精度および定量限界

###### 2-3) RIA 法との相関

###### 2-4) 正常値の検討

##### 3. IOC医事委員会で承認された新規追加薬物 の検討

###### 3-1) 試薬および分析機器

###### 3-2) 分析条件

###### 3-3) 誘導体化

###### i ) TFA化

###### ii ) TMS化-1

###### iii) " - 2

###### iv) " - 3

###### v) " - 4

##### 4. 結果および考察

###### 4-1) カフェイン

###### 4-2) テストステロン

###### 4-3) 新規追加薬物

##### 5. 今後の予定

## はじめに

1980年のモスクワオリンピックで、新たに約30種類のドーピング薬物が追加され、さらに1982年2月、ベケット教授の提案を受けてカフェインとテストステロンが加わるなど、ここ数年の間に数多くの薬物がドーピング規制を受けることになり、1983年末までにIOC医事委員会で承認されたドーピング薬物は実に71品目に上り(Table-1)今後さらに増加していくことが予想される。

我々の研究班では昨年度よりドーピング検査法の研究を再開し、尿中カフェインの定量分析法、及び尿中テストステロン分析法の基礎検討については、すでに昭和57年度、スポーツ科学的研究報告<sup>2)</sup>で報告したので、今年度はさらに内容を進めて  
1) 人における尿中カフェイン排泄量の検討。  
2) GC/MSによる尿中テストステロン、及びエビ

テストステロン分析法の確立。

の2項目について研究を行った。

また、今年度より新たな研究項目としてモスクワオリンピックにおいて新規追加となった約30品目の薬物を中心に、3) IOC医事委員会で承認された新規追加薬物の検討についても研究を開始したので合わせて報告する。

### 1. 人における尿中カフェイン排泄量の検討

#### 1-1) 分析法

尿中カフェイン定量分析法についてはすでに検討を終え、昭和57年度、体協報告において報告した。今回、新たに血中カフェイン分析についても尿の処理法をそのまま適用して検討した結果、試薬量を変えることにより良好な結果が得られ、若干のデータと共に第30回、日本臨床病理学会において発表した<sup>3)</sup>。

#### 1-2) 正常者の分析データ

正常者における尿中カフェイン濃度について把握するため、健常男女（年令20~30才）76人の早晨2番尿を採取し本法に基づいて測定した結果、 $1.13 \pm 0.75 \mu\text{g}/\text{ml}$  であった。これをクレアチニン（C R N）補正しても  $1.87 \pm 2.51 \mu\text{g}/\text{mg C R N}$  と、やはり比較的低値を示した(Fig-1-a, b)。なおクレアチニン測定はヤッフェ法により行なった<sup>4)</sup>。

#### 1-3) スポーツ選手における運動前後尿の分析。

日常生活時においてドーピング陽性とならない程度の尿でも、激しい運動負荷により尿が濃縮されるとカフェイン濃度も高値を示すことが考えられた。そのため運動選手男女12人を対象に運動前尿および緑茶200 mlを服用させての運動負荷直後尿を各々採取し分析を行った。その結果、クレアチニン濃度から判断した限りにおいて運動負荷

Table 1 List of doping drugs, (1983) .

I. Psychomotor stimulant drugs.	III. Miscellaneous central nervous system stimulants	V. Anabolic steroids
1. Amphetamine	2. Benzphetamine	1. Clostebol
3. *Caffeine	4. Chlorphentermine	2. Dehydrochlormethyl-testosterone (4-Chloro-methandienone; Turinabol) <sup>ii</sup>
5. Cocaine	6. Diethylpropione (Amfepramone)	3. Fluoxymesterone
7. Dimethylamphetamine	8. N-Methylamphetamine (Pentylenetetrazol)	4. Mesterolone
9. Fencamfamine	10. Meclophenoxate (Centrophenoxine)	5. Metenolone
11. N-Ethylamphetamine	12. Methylphenidate	6. Methandienone (Methandrostenolone)
13. Norpseudoephedrine	14. Pemoline	7. 17 $\alpha$ -Methyltestosterone (19-Nortestosterone)
15. Phendimetrazine	16. Phenmetrazine	8. Nandrolone
17. Phentermine	18. Pirtradol	9. Norethandrolone
19. Prolintane	20. Fenfluramine	10. Oxymesterone
II. Sympathomimetic Amines	IV. Narcotic analgesics	11. Oxymetholone
1. Chlorprenaline	2. Ephedrine	12. Stanazolol (Stanolol)
3. Etafedrine	4. Isoetharine	13. *Testosterone
5. Isoprenaline	6. Methoxyphenamine	14. Ethynodiol (Ethylestrenol)
7. N-Methylephedrine		* Definition of positive depends on the following; For caffeine:..... up to $15 \mu\text{g}/\text{ml}$ For Testosteron:.....
		1) A ratio of testosterone to epites-testosterone more than 6. 2) A ratio of total testosterone (n mol/l) to LH ( $\text{IU}/\text{l}$ ) more than 400.

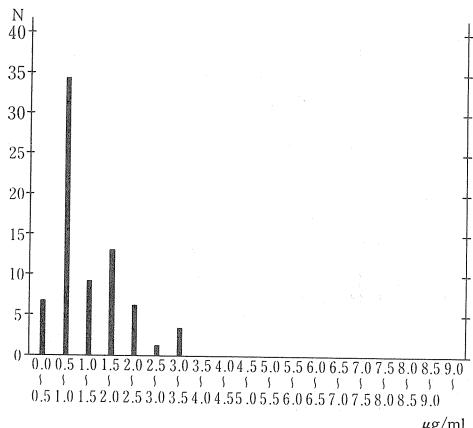


Fig. 1-a. Urinary caffeine value of normal adults.

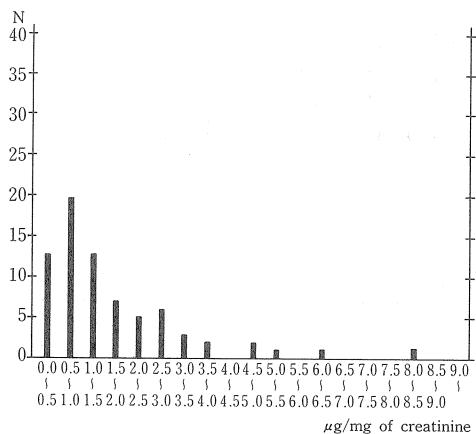


Fig. 1-b. Urinary caffeine of normal adults

により尿が濃縮されたと思われる様な例はほとんどなく、逆にうすまっている例や、運動中に排尿する例も生じた。この理由としては運動直前に服用した緑茶中カフェインの利尿効果が大きく影響したことが考えられた。次に、一流スポーツ選手（レスリング、陸上、水泳 etc.）男女41人を対象に運動負荷前および運動負荷後尿を各々採取し分析を行った。その結果、緑茶服用時の様な利尿効果の大きな影響はなかったが、運動前から比較的高値を示す者でも運動後の尿中カフェイン濃度の大幅な上昇はみられなかったばかりでなく、逆に運動前より低値を示す例も生じた（Table-2）。

#### 1-4) カフェイン投与による尿中排泄量

血中濃度の推移、および投与後24時間の尿中排泄パターンについて知見を得るために、健常者数名

Tabl. 2.

Urinary caffeine values of A-class athletes; Group-I were obtained in the elevated levels from after training following in the range of up to 0.5 μg/ml from before training, Group-II were also obtained in the elevated levels from after training following in the range of less than 0.5 μg/ml from before training and Group-III were obtained in the range of lower levels from after training.

Group	N	Urinary caffeine (μg/ml)	
		before training	after training
I	14	** (0.57~2.65)	2.11±1.13 (0.58~4.85)
II	15	0.28±0.15 (0.06~0.47)	0.55±0.46 (0.17~1.90)
III	12	1.37±1.29 (0.05~4.38)	0.86±1.00 (0.05~3.45)

\*\* X±SD  
(min~max)

を対象にコーヒーおよびカフェイン錠剤（カフェイン含有 186 mg、コーヒー 2 杯に相当）の経口投与実験を行った。その結果最高血中濃度に達するまでに 0.5~2 時間と比較的速やかに体内吸収されることがわかった（Fig-2）。また、尿中代謝速度については24時間後までの尿中排泄量を 1.00 として計算したため明らかとは言えないが、生体内半減期  $T_{1/2}$  は 3 ~ 5 時間であり代謝速度も比較的速いことがわかった（Fig-3）。

#### 2. GC/MS による尿中テストステロンおよびエピテストステロン分析法の確立

##### 2-1) 分析法の確立

###### i) 試薬

実験に使用した Testosterone, Epitestosterone, Testosterone  $\beta$ -D-glucuronide (Free acid),  $\beta$ -glucuronidase (Type H-1) 及び 1-Dehy-

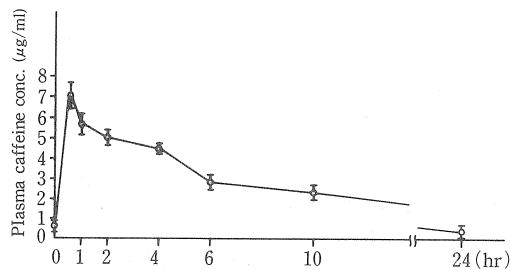


Fig. 2. Change in plasma concentration after p.o. administration of 186 mg of caffeine.

drotestosterone は Sigma Chemical Co., (St. Lois U. S. A.) から入手した。その他の試薬類は、全て関東化学また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。

### ii) 分析機器

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 を日本電子社製の JMS-D300 型マススペクトロメーターに接続し、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。

### iii) 誘導体化および GC/SIM 条件

誘導体化試薬の選択については前回の基礎検討すでに報告済であるが、今回、反応温度について検討を加え一部変更した。即ち、標品を TFAA に溶解し、40°Cで30分間おだやかに反応させたのち過剰試薬を N<sub>2</sub>吹付により乾固しベンゼンに再溶解した。標品のマススペクトルは、分子イオンピーク M/Z480 が強く検出された (Fig-4)。またアナボリックステロイドの 1 つである 1-Dehydrotestosterone を標品と同様に誘導体化したところマススペクトルは分子イオンピーク M/Z478 が強く検出された (Fig-5)。両者のマススペクト

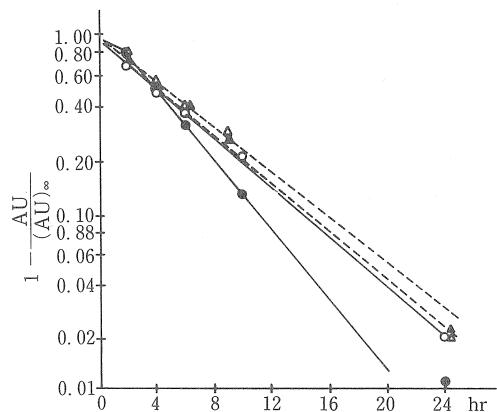
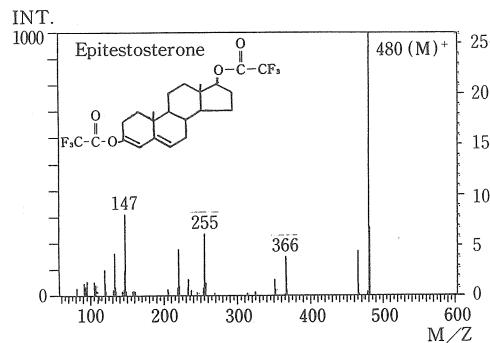
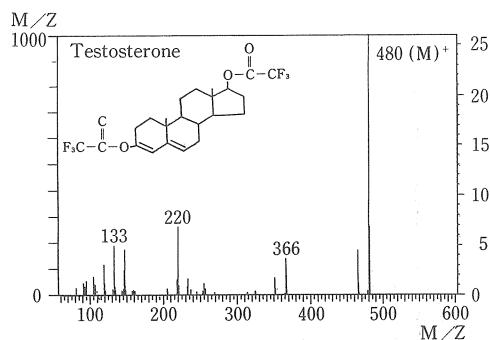
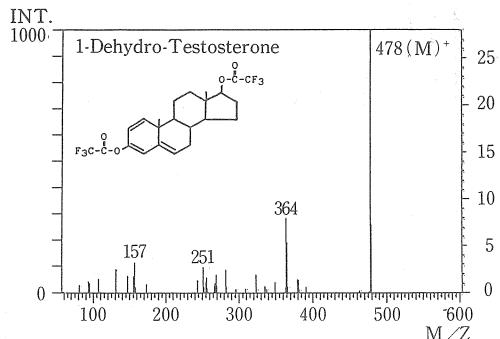


Fig. 3.

Urinary excretion pattern during 24 hr after administration of caffeine tablet (—○—:  $Ke = 0.164 \text{ (hr}^{-1}\text{)}$ ,  $t_{0.5} = 4.23\text{(hr)}$ )—●—:  $Ke = 0.233 \text{ (hr}^{-1}\text{)}$ ,  $t_{0.5} = 2.98 \text{ (hr)}$ ) or coffee (—△—:  $Ke = 0.142 \text{ (hr}^{-1}\text{)}$ ,  $t_{0.5} = 4.89 \text{ (hr)}$ ) —▲—:  $Ke = 0.147 \text{ (hr}^{-1}\text{)}$ ,  $t_{0.5} = 4.70 \text{ (hr)}$ ) containing 186 mg of caffeine, respectively.



F.g. 4.



F.g. 5.

ルはイオン化電圧を 70eV から 20eV に下げるこことにより、フラグメンテーションをおさえ分子イオンピーク強度の大幅な増加がみられ、M/Z480, 478 を用いた SIM 分析が可能となった (Fig-6)。

### iv) 抽出条件

尿中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、当研究所で行っているアナボリック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、前回の体協報告においてすでに報告済である。しかし、抱合型テストステロンおよびエビ

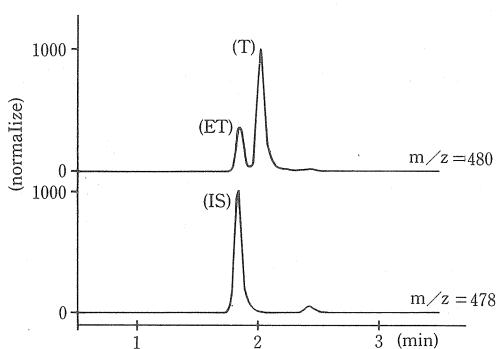


Fig. 6.

Standard mass fragmentogram of di-TFA derivatives of Testosterone(T), Epitestosterone(ET) and Internal standard (IS).

テストステロンの分析に関しては酵素水解により新たに類似の未知成分が多く認められ、SIM分析で十分な感度を得るには無理があり、クリーンアップに工夫を加える必要性が生じた。そこで我々はSep Pak カートリッジ(日本ウォーターズ社製)およびTLCを応用し検討を加えた。サンプルは24時間尿の一部(10ml)とし、酵素水解に先立ってSep Pak C18 カートリッジにより尿中ステロイド類を分離した。 $\beta$ -glucuronidaseによる酵素水解ののち、アナボリックステロイド分析の前処理法<sup>5)</sup>に従って抽出し、その残渣を得た。次にこれをSep Pak Silica カートリッジに吸着させジクロルメタン/メタノール溶媒で溶出される目的成分分画を分取した。さらに、TLCプレート(Kieselgel 60F254, Merck)にスポットし、ベンゼン/酢酸エチル、ジクロルメタン/ジエチルエーテルで順次展開し、内標と共にエタノール抽出を行

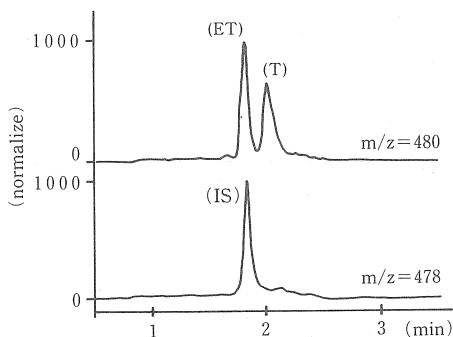


Fig. 7. Mass Fragmentogram of a urine extract.

った。溶媒をN<sub>2</sub>吹付により乾固し、di-TFA化したのちGC/MS分析に用いたところ良好なマスフラグメントグラムが得られた(Fig.7,8)。

## 2-2) 精度および定量限界

標品添加生食液(0~120ng/ml)を調製し、本法に沿って分析したところピーク高比(M/Z480/M/Z478)と添加濃度は良好な直線性を示した(Fig.9)。

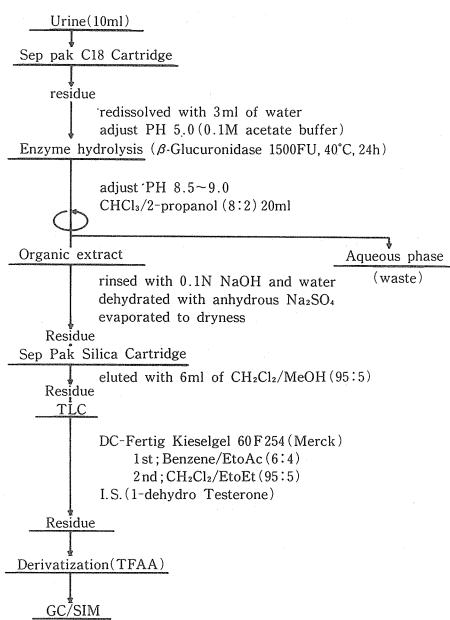


Fig. 8. Schematic flow diagram of the extraction procedure

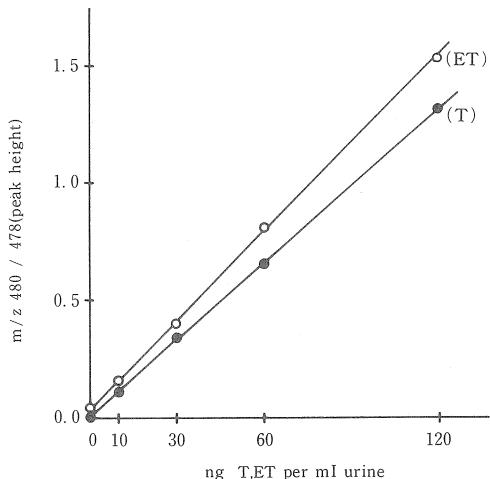


Fig. 9. Calibration curve of determination of urinary Testosterone (T) and Epitestosterone (ET).

この際、再現性は10%以内であった。また、定量限界は尿中テストステロン、エピテストステロン共に1 ng/ml (S/N=10) と満足しうるものであった。

### 2-3) RIA法との相関

健常男子の尿中テストステロン値についているRIA法による値との比較を試みた。RIA法による尿中テストステロン測定は、Sep Pak C18カートリッジ、酵素水解、抽出、洗浄処理のち、市販のテストステロン用栄研RIAキットによる二抗体法で行なった。その結果、GC/MS法をyとすると $y = 0.57x + 2.83$ ,  $r = 0.928$ となりRIA法が比較的高値を示したが相関は良好であった(Fig-10)。

次に、標品添加サンプルを調製し本キットのエピテストステロンに対する交叉試験を行ったところ数%の交叉反応が認められた(Fig-11)。GC/MS法との比較においてRIA法が高値を示した原因としてエピテストステロンおよび他の尿中ステロイドとの交叉反応が推測された。

### 2-4) 正常値の検討

20~30才の健常男女各10人について、24時間尿を採取し正常値を測定した。その結果Table-3に見られる様に女子に比べ男子の方が排泄量は比較的大く、各々のテストステロンおよびエピテストステロンは、ほぼ同程度の排泄量( $T/ET \approx 1$ )を示した。

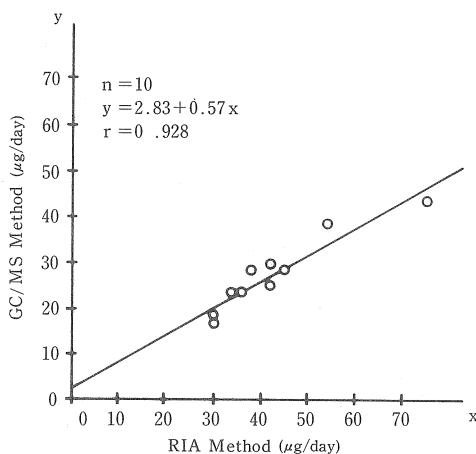


Fig. 10. Correlation of results for urinary T in healthy men by GC/MS and by RIA.

以上の研究の一部については第23回、臨床化学会年会で発表した<sup>6)</sup>。

### 3. I O C 医事委員会で承認された新規追加薬物の検討

今年度、新たに入手したドーピング薬物、17品目(精神興奮薬6品目、中枢興奮薬3品目、鎮静、鎮痛薬4品目、たん白同化ステロイド4品目)についてGC/MS分析を行いマススペクトルデータをJMA2000Sデータ処理システムのライブライリーに収録した。

#### 3-1) 試薬および分析機器

誘導体調製試薬およ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。またガスクロマトグラフ、質量分析計データ処理システムについてはテストステロン分析と同じ機器を使用した。

#### 3-2) 分析条件

ガスクロ用カラムには1.8% OV-17 or 3% SE-30 on chromosorb W-AW DMCS, 2mm I.D. × 6Ft を用いた。また、質量分析計の条件はイオン化電圧70eV、イオン化電流300μA、加速電圧3.0KVに設定し、EI (Electron Impact) 法による分析を行った。

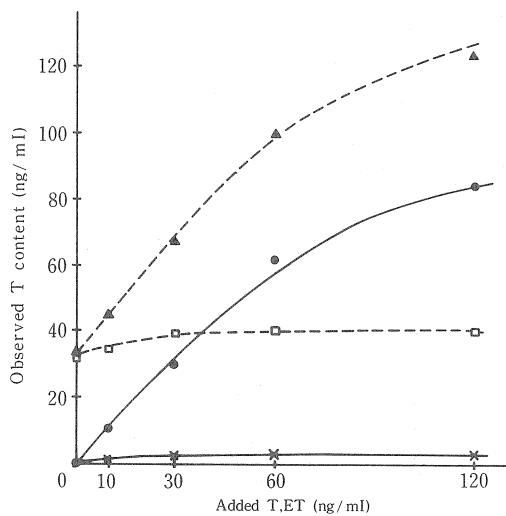


Fig. 11. Specificity of RIA (Double antibody method) —●—: added testosterone (T) into physiological saline solution, —×—: added epitestosterone (ET) into physiological saline solution, —▲—: added T into pooled urine, —□—: added ET into

### 3-3) 誘導体化

興奮薬および鎮痛薬の中で3級アミン化合物については適当な溶媒に溶解してそのままGCに注入したが、1級、2級アミンもしくはOH基を有する化合物についてはTFAおよびTMS誘導体にしてGC/MS分析を行った。また、たん白同化ステロイドについては凡てTMS化を採用した。各化合物の誘導体化は以下の条件で行った。

i) TFA化 (AMP, EAM, PHT, FEF, HCO, EMO, COD, PTZ), 5~10 $\mu$ g の標品を 100 $\mu$ l のアシリル化剤 (酢酸エチル: TFAA = 1 : 1 by vol) に溶解し 60°Cで10分間反応させた後、過剰の試薬を窒素吹付により留去した。

Table. 3.

Urinary excretion of Testosterone (T) and Epitestosterone (ET).

#### Healthy men

Sample	Excretion ( $\mu$ g/day)		T/ET ratio
	T	ET	
A	17.6	38.6	0.5
B	27.6	34.3	0.8
C	23.8	31.0	0.8
D	16.3	11.8	1.4
E	18.3	11.0	1.7
F	40.8	37.5	1.1
G	24.3	23.1	1.1
H	22.7	18.8	1.2
I	38.5	45.4	0.8
J	30.11	43.7	0.7
Mean $\pm$ SD	25.9 $\pm$ 7.80	29.5 $\pm$ 12.64	1.0 $\pm$ 0.36
Range	16.3~40.8	11.0~45.4	0.5~1.7

#### Healthy women

K	5.8	5.8	0.9
L	4.1	7.8	0.5
M	14.6	9.5	1.6
N	8.9	17.2	0.5
O	16.9	19.7	0.9
P	28.0	18.8	1.5
Q	18.7	12.3	1.5
R	12.4	8.0	1.5
S	9.7	15.5	0.6
T	8.1	4.5	1.8
Mean $\pm$ SD	12.7 $\pm$ 7.17	11.9 $\pm$ 5.58	1.1 $\pm$ 0.49
Range	4.1~28.0	4.5~19.7	0.5~1.8

乾固残渣を 100 $\mu$ l の酢酸エチルに再溶解してその 1 $\mu$ l をガスクロに注入した。

#### ii) TMS化-1 (EAM, PHT, FEF, HCO, EMO)

5~10 $\mu$ g の標品を 100 $\mu$ l のTMS化剤(酢酸エチル: BSA (N,O-bis-trimethylsilylacetamide) = 1 : 1 by vol)に溶解し、その 1 $\mu$ l を直接ガスクロに注入した。

#### iii) TMS化-2 (COD, PTZ)

5~10 $\mu$ g の標品を 100 $\mu$ l の BSTFA (N,O-bis-trimethylsilyltrifluoroacetamide) に溶解し、60°Cで10分間反応させた後、過剰の試薬を窒素吹付により留去した。乾固残渣を 100 $\mu$ l の Pyridine に再溶解してその 1 $\mu$ l をガスクロに注入した。

#### iv) TMS化-3 (OMT, STN, FLM)

5~10 $\mu$ g の標品を 100 $\mu$ l の TMS化剤 (BSA : Pyridine : TMCS (Trimethylchlorosilane) = 7 : 4 : 1 by vol) に溶解し 80°Cで1時間反応させた後、その 1 $\mu$ l を直接ガスクロに注入した。

#### v) TMS化-4 (NAN)

5~10 $\mu$ g の標品を 100 $\mu$ l の TMSI-H に溶解し、室温で20分間TMS化を行った後、過剰の試薬を窒素吹付により留去した。反応残渣を 100 $\mu$ l の n-Hexane に再溶解してその 1 $\mu$ l をガスクロに注入した。

### 4. 結果および考查

#### 4-1) カフェイン

IOC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 15 $\mu$ g/ml 以上と規定している。今回、我々は健常男女やスポーツ選手を対象として尿中カフェイン濃度を測定し検討を重ねた結果、通常の状態、あるいは激しい運動をした直後の濃縮された尿においても、この基準値を上回ったケースは一例もなかった。186mg のカフェイン投与実験の結果より、経口投与により速やかに吸収されたカフェインは代謝速度も比較的速く、未変化体(カフェイン)の生体内半減期( $T_{1/2}$ )は 3~5 時間であり投与後 4 時間目の尿中濃度が 8  $\mu$ g/ml を越えるケースも見られた。また今回の実験ではカフェイン錠剤を投与しても、あるいはコーヒーを服用しても同様の代謝パターン

ンを示した。投与されたカフェインが激しい運動後の尿中濃度に反映されるまでの過程には、カフェインの吸収と排泄速度、および尿の濃縮に対する利尿効果が重要な因子として働いている。従ってカップ1杯のコーヒーは50~100mgのカフェインを含み、一方カフェインの有効治療投与量が200mgであることを考えると、これらの条件がかみ合えばコーヒーを飲用しても、あるいはカフェインを投与した場合についても尿中濃度が15μg/mlを越える場合があることが十分予想される。

#### 4-2) テストステロン

GC/SIM法による尿中テストステロン及びエピテストステロンの分離定量法については今回の検討ではほぼ確立することができた。また、テストステロンについてはRIA法との相関も良好であった。IOC医事委員会ではドーピング陽性となる尿中テストステロンの分析基準の一つとしてT/ET>6を規定しているが、20~30才の健常男女各10名についてT/ETを検討したところ、男子ではmean±SD=1.00±0.36、また女子ではmean±SD=1.14±0.49であり、6を越えるケースは1例もなかった。

#### 4-3) 新規追加薬物

収録したライブラリーデータのリストをTable 4に示した。たん白同化ステロイドはケトーエノール平衡や立体障害のため多数の化合物に共通なシリル化条件を確立するには困難が予想される。例えば今回検討したNANは17α-OHのみをシリル化することを考えれば比較的弱い条件下で17α-OTMS体を得ることができるが、FLMの11β-OHをシリル化するにはかなり強い条件が必要となる。またGC/MS分析を行うに際しシリル化剤のままガスクロに注入することは、カラムの劣化やセパレータ、および質量分析計のイオン源の汚染を考えると良好な手段とは言えず、何らかのクリーンアップ操作が必要と考えられる。

#### 5. 今後の予定

昨年度より継続してきたカフェインおよびテストステロンについては、尿中黃体形成ホルモン(LH)分析法の検討を残してほぼ終了することができた。一方、IOC医事委員会では1983年度末までにTable-1に示した様に71品目のドーピング薬

Table 4. List of inserted new library data

Doping drugs	Abbre-viation	EI mass spectra		
		nonderiv	TFA-deriv	TMS-deriv
1. Amphetamine	AMP		○	
2. Benzphetamine	BEP	○		
3. N-Ethylamphetamine	EAM		○	○
4. Fenfluramine	FEF		○	○
5. Meclophenoxate	MEC	○		
6. Phentermine	PHT		○	○
7. Doxapram	DOX	○		
8. Picrotoxinin	PIC	○		
9. Strychnine	STR	○		
10. Codeine	COD		○	○
11. Dihydrocodeine	HCO	○	○	○
12. Ethylmorphine	EMO	○	○	○
13. Pentazocine	PTZ		○	○
14. Fluoxymesterone	FLM			○
15. Nandrolone	NAN			○
16. Oxymetholone	OMT			○
17. Stanozolol	STN			○

物を認定しているが、その内我々の研究室で現在検査できる薬物はその約3割に過ぎず、また未入手の薬物も3割を残している。従って、我々の研究班における今後の予定は、

- 1) 未入手薬物の入手を急ぐと共に、1985年の夏、神戸で行われるユニバーシアード大会を目標に、
- 2) 検査項目の拡大を行い、さらに、
- 3) 多検体分析に耐え得る合理化システムを基礎としたドーピング検査法の確立

について研究を重ねていきたいと考えている。

#### 参考文献

- 1) H. W. Dürbeck, I. Büker, B. Scheulen and B. Telin : J. Chromatogr. Sci., 21, 405-410, (1983).
- 2) 三菱油化メディカルサイエンス：1982年度、日本体育協会スポーツ科学研究報告、報告書、No. VI
- 3) 平井利生、近藤仁美、上館民夫：臨床病理、31(補冊), 281, (1983).
- 4) S. Natelson : Techniques of Clinical chemistry, Third edition, Charles C Thomas Publisher, Springfield, Illinois, U.S.A., 286, (1971).
- 5) 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
- 6) 近藤仁美、平井利生、上館民夫：日本臨床化学会年会記録、第23集、1983。(印刷中)



