

強者の戦略

研伸館理科講師, 森 上総です。

予定通りなら, 東京オリンピックの最中にこの原稿が公開されているはずですが。無観客となってしまいました。このような情勢の中でさまざまな折り合いを付けながら, 開催の運びになったのは, ただ凄いなと思います。普段はあまりオリンピックをリアルタイムで観ることはしないのですが, 折角ですし, 有機 EL の画面の前で, いくらか感動を共有させてもらっています。

さて今回は, オリンピックでも行われているドーピング検査がテーマ。薄層クロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィーなど, クロマトグラフィーについて深く掘り下げた, 2017 年の東京医科歯科大学の問題です。驚くほど問題文が長く, さながらマラソンのようですが, ぜひチャレンジして金メダルを手にしてください。

【問題】

次の文を読み, 下の問に答えよ。

1. ドーピング

アスリートにとってドーピングは重大な不正行為である。ドーピングは競技の公正性に対する脅威であるだけでなく, アスリートに深刻な健康障害をもたらす。ドーピングを防止するため, 国際機関として世界ドーピング防止機構(WADA: World Anti-Doping Agency)が設立され, 我が国では日本アンチドーピング機構(JADA)による活動が行われている。その一環として, アスリートに対する随時の尿検査が行われている。

ここでは, ドーピング対象薬物として, 興奮剤のエフェドリン, メタンフェタミンをとりあげる。エフェドリンはある一定濃度(尿中 $10\mu\text{g}/\text{mL}$)以上の場合は違反になる薬物である。一方, メタンフェタミンは濃度に関係なく検出されると違反になる薬物である。

これらの薬物を分離, 検出するために, 以下の実験を行った。比較対照薬物として, (1)化学構造の類似したイソブチルベンゼンを用いた。

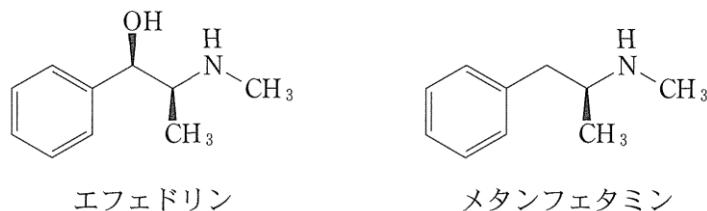


図 3-1 エフェドリンとメタンフェタミンの構造式

強者の戦略

2. 検体の精製(除タンパク)

ドーピング検査の検体試料として、尿を用いる。尿にタンパク質が含まれると検査を妨害する。そのため、尿検体に過塩素酸(HClO₄)を加え、遠心分離し、(2)タンパク質を沈殿させて除去する。

3. クロマトグラフィーの原理

クロマトグラフィーとは試料中の複数の成分を分離する方法である。一般に固定相と移動相に対して各薬物が相互作用し、その際に起こる相互作用の強さが各薬物で異なるため、この差を利用して各薬物を分離する。薄層クロマトグラフィーは、ガラス板の上にシリカを薄く塗ったものを固定相として、溶媒を移動相として用いて試料中の成分を分離する方法である(図 3-2)。

各薬物の特定には図 3-3 に示すように Rf 値を用いる。試料をスポットした位置を原点として、「溶媒が上がった先端」までの距離を B とする。また原点から「スポットの中心までの距離」を A とする。この時、「 $\frac{A}{B}$ 」の値を Rf 値といい、この値は各薬物固有の値となるため薬物を特定することが可能となる。試料中の各薬物は薄層固定相への吸着力が強いほど移動距離は短くなる。

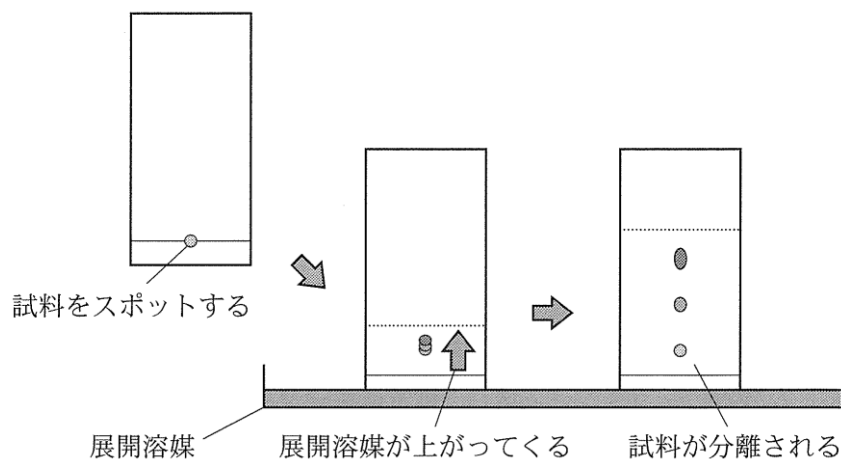


図 3-2 薄層クロマトグラフィーによる薬物の分離

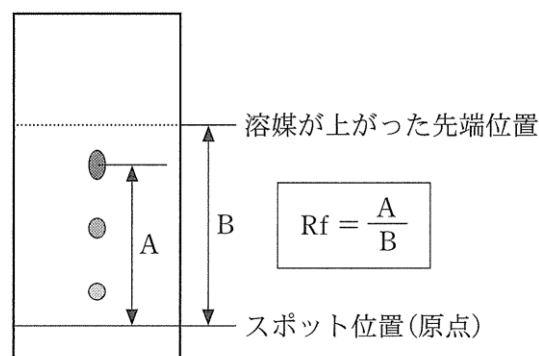


図 3-3 薄層クロマトグラフィーによる薬物の特定

強者の戦略

4. 薄層クロマトグラフィーの実験

エフェドリン,メタンフェタミン,イソブチルベンゼンの3つの薬物成分を含む混合物の分離を試みた。薄層の下端から1.0cmの部位に混合物をスポットし,クロロホルム-アセトン-アンモニア混合溶媒を用いて展開した。薄層固定相に対する官能基の吸着力は $\text{NH} > \text{—COOH} > \text{—OH} > \text{—CH}_3$ の順番とする。

③各薬物の検出に以下の3つの方法を用いた。

方法1:ヨウ素粉末

すべての対象薬物と反応し,紫色を呈する。

方法2:ドラーゲンドルフ試薬(ヨウ化ビスマズ-ヨウ化カリウム液)

メタンフェタミンと反応し,橙黄色を呈する。

方法3:ニンヒドリン試薬

エフェドリンと反応し,紫赤色を呈する。

5. 高速液体クロマトグラフィーと内部標準を用いた検量線

薄層クロマトグラフィーと同じ原理で薬物を分離する方法として,高速液体クロマトグラフィーがある。シリカを充填したカラム(固定相)に試料を入れ,カラムに高圧の液体(移動相となる展開溶媒)を加え,カラムを通過する薬物を検出器で連続的に測定する。固定相に対する官能基の吸着力は薄層クロマトグラフィーと同じである。測定結果は,時間(x軸)に対する薬物の量(y軸)とするグラフ(クロマトグラム)として得られる。各薬物のピークの高さは試料中の薬物濃度に比例する。エフェドリン,メタンフェタミン,イソブチルベンゼンの3つの薬物を含む試料の場合,図3-4のようなクロマトグラムが得られた。

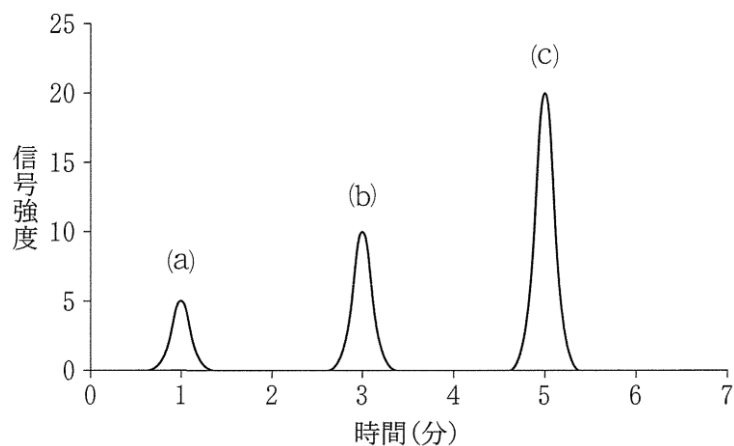


図3-4 試料のクロマトグラム

強者の戦略

高速クロマトグラフィーの信号強度は測定毎に変わるので、試料中の薬物濃度を求めるために、基準となる薬物(内部標準物質)を用いて、対象薬物についての検量線を作成する必要がある。検量線は試料中の内部標準物質を一定濃度にしたまま、複数の濃度の異なる対象薬物のピークの高さの比を横軸(x 軸), 対象薬物濃度を縦軸(y 軸)として、グラフにプロットすることによって求めた。その後、検量線をもとに試料中の対象とする薬物の濃度を計算した。

(4)薬物を含まない尿について、内部標準物質イソブチルベンゼンの濃度を $1\mu\text{g/mL}$, エフェドリン濃度を $5\mu\text{g/mL}$, $20\mu\text{g/mL}$ になるように添加した場合のクロマトグラムを示す(図 3-5, 図 3-6)。

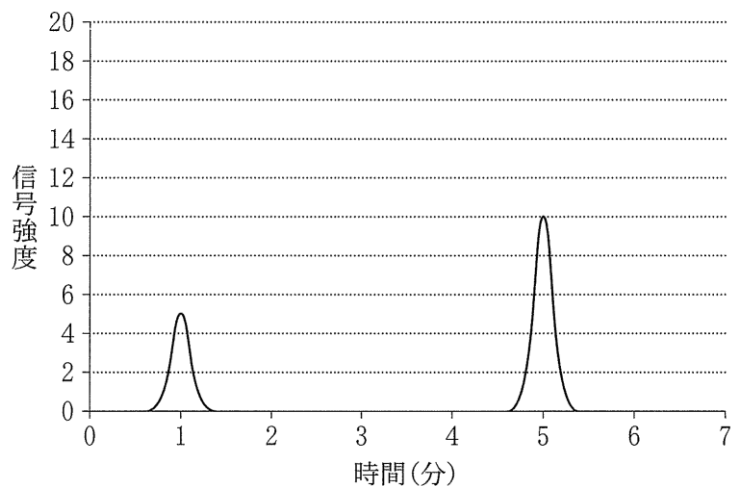


図 3-5 クロマトグラム
(イソブチルベンゼン濃度 $1\mu\text{g/mL}$, エフェドリン濃度 $5\mu\text{g/mL}$)

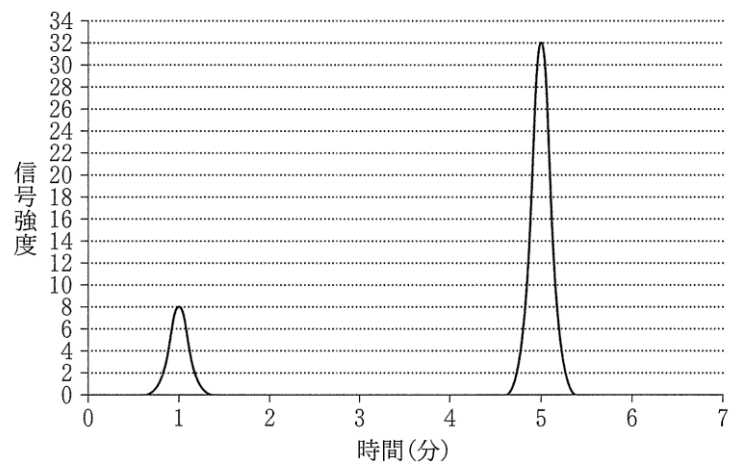


図 3-6 クロマトグラム
(イソブチルベンゼン濃度 $1\mu\text{g/mL}$, エフェドリン濃度 $20\mu\text{g/mL}$)

強者の戦略

6. 高速液体クロマトグラフィーによる検体試料の定量

次に、尿検体試料に内部標準物質イソブチルベンゼンの濃度を $1\mu\text{g/mL}$ になるように添加して、高速液体クロマトグラフィーの測定を行った。そのクロマトグラムを図 3-7 に示した。

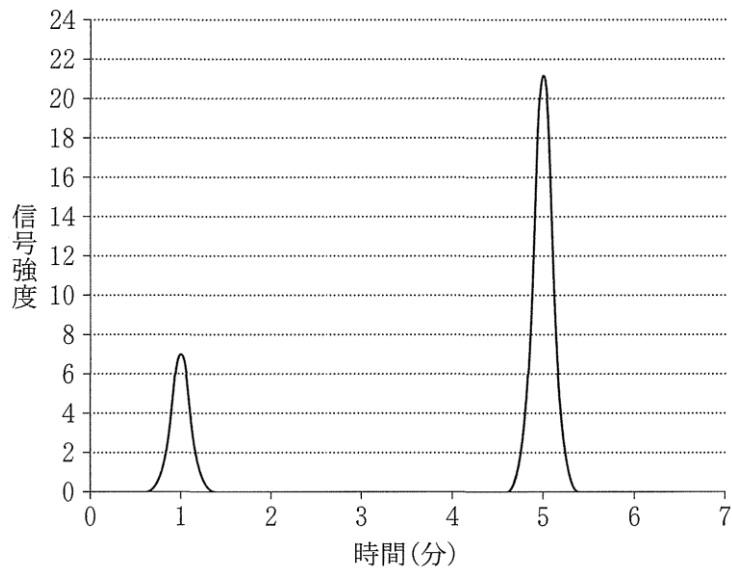


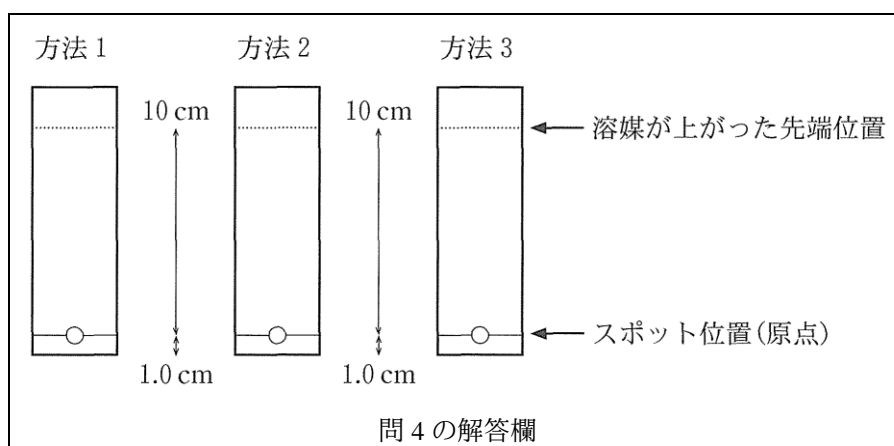
図 3-7 尿検体試料のクロマトグラム

問 1 下線部(1)について、イソブチルベンゼンの構造式を書け。

問 2 下線部(2)について、タンパク質が過塩素酸で沈殿する理由を書け。

問 3 下線部(3)について、本文中の展開溶媒でエフェドリンの R_f 値は 0.5 であった。溶媒が上がった先端までの距離が 10cm のとき、エフェドリンの薄層固定相の下端からの距離を計算せよ。

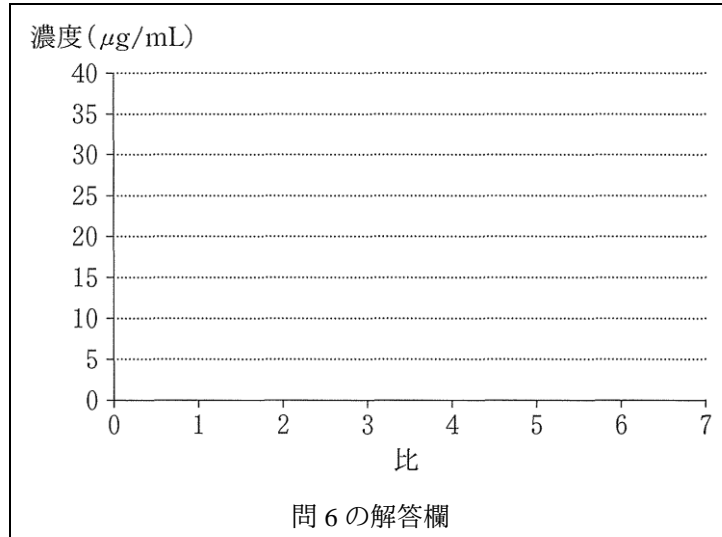
問 4 下線部(3)について、各方法で展開して検出した後のスポットを○で記入せよ。エフェドリン以外の 2 つの薬物について、 R_f 値は一方は 0.7 で、もう一方は 0.9 であった。



強者の戦略

問5 図3-4の(a),(b),(c)はそれぞれどの薬物に相当するか。

問6 下線部(4)について,エフェドリンの検量線を求めるため,解答欄のグラフ上に,イソブチルベンゼン濃度に対するエフェドリン濃度の比を横軸,エフェドリンの濃度を縦軸に黒丸でプロットしなさい。プロットした2点を結ぶ直線を検量線と仮定し,その1次関数の式を求めよ。途中の計算過程は不要である。



問7 図3-7について,問6で得た検量線に基づいて,尿中のエフェドリンの濃度を整数で求め,この尿検体について,ドーピング検査が陽性か陰性か判定せよ。