

LC/MS/MSによる尿中のアトロピン，スコポラミンの迅速定量

Rapid Determination of Atropine and Scopolamine in Urine using LC/MS/MS

山辺真一，肥塚加奈江，山本 淳，石井 学，今中雅章（衛生化学科）

Shinichi Yamabe, Kanae Koeduka, Jun Yamamoto, Manabu Ishii, Masaaki Imanaka

【資 料】

LC/MS/MSによる尿中のアトロピン、スコポラミンの迅速定量

Rapid Determination of Atropine and Scopolamine in Urine using LC/MS/MS

山辺真一, 肥塚加奈江, 山本 淳, 石井 学, 今中雅章 (衛生化学科)

Shinichi Yamabe, Kanae Koeduka, Jun Yamamoto, Manabu Ishii, Masaaki Imanaka

要 旨

チョウセンアサガオの誤食による食中毒の原因究明のため、迅速かつ高精度な尿中アトロピン、スコポラミンの同時分析法を開発した。添加回収実験を行ったところ回収率、相対標準偏差ともに良好であった。

[キーワード：チョウセンアサガオ, 尿, アトロピン, スコポラミン, LC/MS/MS]

[Key words : *Datura metel* , urine , atropine , scopolamine , LC/MS/MS]

1. はじめに

アトロピン、スコポラミンはチョウセンアサガオ、ハシリドコロ、ヒヨス、ベラドンナなどのナス科植物に含まれるトロパンアルカロイドの一種であり、両者ともに微量の場合は医薬品成分として使用されるが、一定量以上の摂取で頻脈、呼吸困難、幻覚などの中毒症状を示す¹⁾。上記植物のうち、チョウセンアサガオについては、根茎がゴボウと酷似していることから、全国的には毎年中毒事例が報告²⁾されている。キンピラゴボウ等の食品中のアトロピン、スコポラミンの迅速定量法については前報³⁾で報告したが、これらの物質を摂取した場合速やかに尿中に排泄されるので、尿中濃度の測定は食中毒の原因究明のための重要な情報となる。今回、尿中の分析法について検討を加え良好な結果を得たので報告する。

2. 実験方法

2.1 試料

新鮮尿をそのまま用いた。

2.2 試薬及び標準液

硫酸アトロピン、臭化水素酸スコポラミン標準品：

和光純薬(株)製特級試薬

その他の試薬：残留農薬分析用、LC/MS用試薬を用いた

固相カラム : Waters製 オアシスMCX 60mg/6cc,
同オアシスHLB 200mg/6cc, バリアン
製ボンドエルトPSA 500mg/10cc,

同ボンドエルト DEA 500mg/10cc,
スペルコ製 ディスカバリー DSC-
NH2 500mg/6cc

標準原液 (1000mg/L)：硫酸アトロピン12.0mg (アトロピンとして10.0mg), 臭化水素酸スコポラミン13.3mg (スコポラミンとして10.0mg) を正しく秤量し、個別にメタノールに溶解して10mLとする。

混合標準液 (1mg/L)：標準原液各1mLを100mLメスフラスコに採りメタノールで定容したのち、その10mLを100mLメスフラスコに採りメタノールで定容する。

2.3 装置及び測定条件

2.3.1 HPLC条件

(装置) 島津製 LC-20A 高圧グラジエントシステム
(分析カラム) Supelco製 Discovery HS F5, 3 μ m, 150
x 2.1 mm

(移動相流量) 0.2 mL/min (注入量) 5 μ L

(カラム温度) 40 $^{\circ}$ C

(移動相)

5 mM 酢酸アンモニウム水溶液：5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液 30:70

Total run time : 15 min

2.3.2 LC/MS/MS条件

(装置) Applied Biosystems 製 API3200 QTrap

LC/MS/MS system

(インターフェース) Turbo V source

(イオン化モード) ESI positive mode
 (イオン源パラメーター) 前報³⁾と同様
 (測定モード) : MRM法 詳細は前報³⁾と同様

2.4 添加回収試験

図1に示す方法により精製方法を検討した。まず、新鮮尿2mlを試験管へ取り2 MIX混合標準液を0.2 mL添加し、0.1N HCl 2 mLを加えた後、固相抽出を行った。最終溶出液をロータリーエバポレーターで蒸発乾燥後、メタノールに溶解し2mLとした。

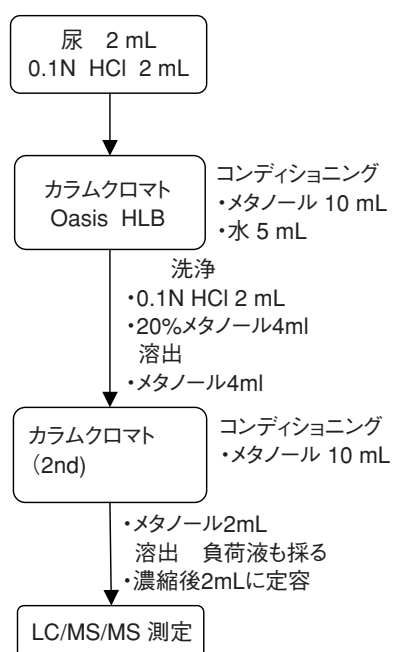


図1 精製、測定フロー

3. 結果及び考察

3.1 固相カラムの検討

クリーンアップに使用する固相カラムはまず、前報³⁾で使用したOasis MCX固相を用いた。尿2mLに0.1 N HCl 2 mLを加え、メタノール1mL、水1mLでコンディショニングしたOasis MCX 60 mgカラムに負荷し、0.1 N HCl 2 mL、メタノール1mL、水1mL で洗浄した後、5 % NH₄OH メタノール1.5 mLで溶出した。溶出液をメタノールで2 mLに定容し測定した。さらに、これとは別にMCX固相溶出時にPSA, NH₂, DEAカートリッジをそれぞれMCX固相の下に連結し溶出後に分離しメタノール2mLで更に溶出し溶出液を併せて濃縮し2mLに定容し測定した。その結果を図2に示したが、MCX単独の場合も、PSA, NH₂, DEAと連結

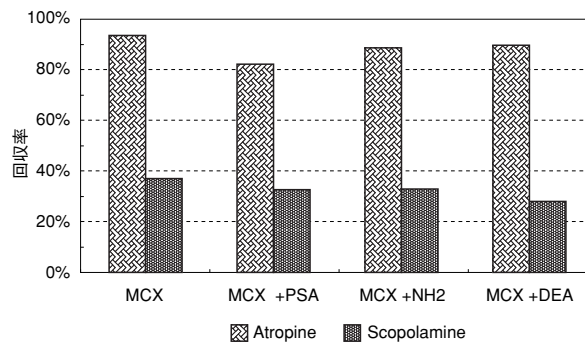


図2 固相別の回収率 1

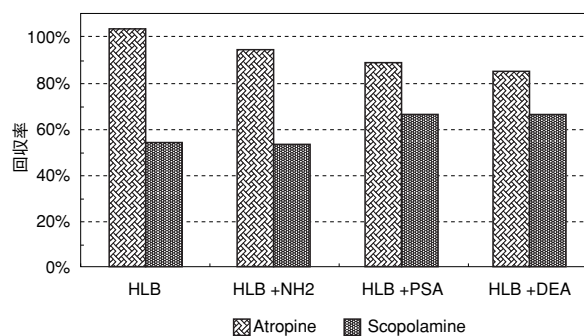


図3 固相別の回収率 2

した場合も共にアトロピンでは回収率が80%を超えたが、スコポラミンでは全て40%未満であった。標準品単独及びキンピラゴボウへの添加の場合は回収率に問題がなかった³⁾ことから、これは夾雑物によるイオン化抑制と考えられた。このイオン化抑制を回避するため、小西らの報告⁴⁾を参考に別の固相カートリッジを検討した。すなわち、Oasis HLB 200 mgをメインに2段目にPSA, NH₂, DEAと連結したものを検討した。その結果を図3に示したが、HLB単独の場合でアトロピン、スコポラミンの回収率がそれぞれ104%, 54%になり、2段目にPSAを追加した場合には89%, 67%になりスコポラミンで改善が見られた。

3.2 HPLC条件の検討

最初はHPLC条件を前報³⁾の条件で行ったが、3.1固相カラムの検討のところで述べたように固相カラムの追加等を行ってもスコポラミンの回収率が70%未満で、更に改善が必要なので、HPLC条件を再検討することとした。そこで、移動相(5 mM 酢酸アンモニウム水溶液) : (5 mM 酢酸アンモニウムメタノール溶液) = 20:80 の比率を変化させたところ、30:70の場合にアトロピン、スコポラミンのリテンションタイムが(6.3, 3.0) から (7.5, 3.8) へ1分前後遅くなった

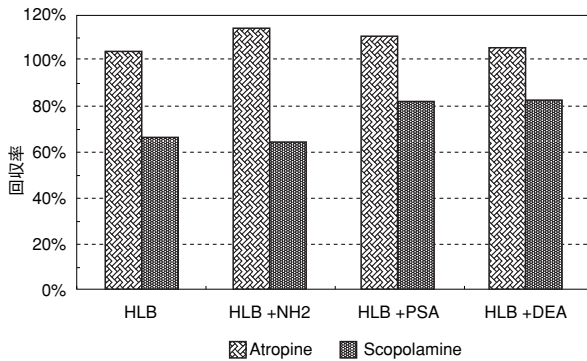


図4 固相別の回収率 3

たが、回収率は図4に示すようにHLB単独の場合でアトロピン、スコポラミンでそれぞれ105%、67%となり、2段目にDEAを追加した場合には106%、83%となり、良好な結果となった。

3.3 添加回収実験

新鮮尿にアトロピンおよびスコポラミンを添加して添加回収実験を行ったところ、表1のとおりとなった。アトロピン、スコポラミンの回収率が106.0%、82.8%、相対標準偏差 (RSD)は3.2%、4.0%と良好であった。

表1 添加回収率

試料	アトロピン		スコポラミン	
	回収率	RSD	回収率	RSD
尿	106.0%	3.2%	82.8%	4.0%

n = 5

4 まとめ

- 1) クリーンアップ用固相カラムはジビニルベンゼン-N-ビニルピロリドン共重合体 ミニカラムを1段目に用い、その溶出液を弱塩基性陰イオン交換体ミニカラムでさらに 精製するのが最も適切であった。
- 2) 尿試料の場合は食品試料よりもイオン化抑制を強く受けたので、イオン化抑制を回避するため、HPLC条件を細かく検討する必要がある。
- 3) 添加回収実験ではアトロピン、スコポラミン共に良好な回収率、RSDを示した。

文 献

- 1) 刈米達夫, 木村康一監修: 廣川薬用植物大事典, 221-222, 281-282, 324-325, 株式会社廣川書店, 東京, 1993
- 2) 過去の食中毒事件一覧: 厚生労働省食品安全部監視安全課 <http://www.mhlw.go.jp/topics/syokuchu/04.html>
- 3) 山辺真一, 肥塚加奈江, 田邊英子, 北村雅美, 今中雅章: LC/MS/MSによる食品中のアトロピン, スコポラミンの迅速定量, 岡山県環境保健センター年報, 31, 127-132, 2007
- 4) 小西友彦, 赤木浩一, 畑野和広: チョウセンアサガオによる食中毒事例における患者血清・尿中のヒオスチアミンおよびスコポラミンの分析, 第2回全国自然毒中毒研究会抄録集, 24-25, 2008