報 文

LC/MS/MS によるヒト血清・尿中のヒヨスチアミン
およびスコポラミンの分析

(平成 19 年 11 月 19 日受理)

小西 友彦* 赤木 浩一 畑野 和広

Determination of Hyoscyamine and Scopolamine in Serum and Urine of Humans
by Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry

Tomohiko KONISHI*, Kouichi AKAKI and Kazuhiro HATANO

Fukuoka City Institute for Hygiene and the Environment: 2-1-34 Jigyohama,
Chuo-ku, Fukuoka 810-0065, Japan; * Corresponding author

A simple method was developed for the analysis of hyoscyamine and scopolamine in human serum and urine using liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). Hyoscyamine and scopolamine in serum and urine were cleaned up with an Oasis HLB cartridge and a PSA cartridge. The LC separation was carried out on an ODS column, using linear gradient elution with 5 mmol/L IPCC-MS3-methanol as the mobile phase. The mass spectral acquisition was done in the positive ion mode by applying selected reaction monitoring (SRM). The recoveries of hyoscyamine and scopolamine were 86.0–105% from human serum and urine fortified at 0.2 ng/mL and 10 ng/mL. The detection limits of hyoscyamine and scopolamine were 0.02 ng/mL. Four serum and three urine samples of humans poisoned by eating *Datura innoxia* Mill. were analyzed by this method. Hyoscyamine and scopolamine were detected at the levels of 0.45–3.5 ng/mL in all serum samples and 170–670 ng/mL in all urine samples.

(Received November 19, 2007)

Key words: ヒヨスチアミン hyoscyamine; スコポラミン scopolamine; チョウセンアサガオ属 *Datura*; トロパンアルカロイド tropane alkaloid; 血清 serum; 尿 urine; 高速液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置 LC/MS/MS

緒 言

ヒヨスチアミンおよびスコポラミン (Fig. 1) はチョウセンアサガオ属やハシリドコロ属などのナス科植物に含まれるトロパンアルカロイドであり、摂取すると呼吸困難、意識混濁、幻覚などの症状を呈し、大量に摂取すると死亡することもある^{1)~4)}。これらの植物の誤食による食中毒事件は全国で毎年発生しており、有毒植物によるものの中で発生件数が多い^{1), 2)}。

食中毒事件においては食品残物がないこともあり、原因物質を特定するため患者の血清や尿などの生体試料の分析が必要となることが多い。また、患者の治療への臨床応用や中毒の学術的な解明においても、生体試料中のヒヨスチアミンおよびスコポラミンを迅速かつ精度よく分析することが重要といえる。

ヒヨスチアミンおよびスコポラミンの両物質の分析については紫外吸収検出器付高速液体クロマトグラフ

Fig. 1. Structures of hyoscyamine and scopolamine

(HPLC-UV)^{5), 6)}, ガスクロマトグラフ/質量分析計 (GC/MS)⁷⁾ および液体クロマトグラフ/質量分析計 (LC/MS)⁸⁾ を用いた報告があるが、いずれも植物体を対象としたものである。生体試料を対象としたものには窒素リン検出器付ガスクロマトグラフ (GC-NPD) を用いた多田らの報告⁹⁾があるが、血清のみを対象としており尿については検討しておらず検出限界も数十 ng/mL と高い。また、Oertel ら¹⁰⁾ は液体クロマトグラフ/タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) を用いて高感度に分析しているが、薬物動態学の観点からスコポラミンのみについて検討したものであり、対

* 連絡先

福岡市保健環境研究所: 〒810-0065 福岡市中央区地行浜
2-1-34

Table 1. LC/MS/MS conditions for determination of hyoscyamine and scopolamine

Column	YMC-Pack Pro C18, 50 mm×2.0 mm i.d., 5 μm
Column temperature	40°C
Flow rate	0.2 mL/min
Mobile phase	Solvent A: 5 mmol/L IPCC-MS3, Solvent B: methanol
Gradient profile	A : B=80 : 20 (0 min)→(linear gradient)→40 : 60 (12 min)→10 : 90 (12–25 min)→80 : 20 (25–40 min)
Injection volume	20 μL
Ionization	ESI
Mass spectral acquisition	Positive ion mode by selected reaction monitoring
Ion-spray voltage	5,500 V
Turbo gas temperature	650°C
Declustering potential	Hyoscyamine: 86 V, Scopolamine: 61 V
Collision energy	Hyoscyamine: 35 eV, Scopolamine: 25 eV
Nebulizer gas	Pure air, 20 psi
Precursor ion	Hyoscyamine: <i>m/z</i> 290, Scopolamine: <i>m/z</i> 304
Product ion	Hyoscyamine: <i>m/z</i> 124, Scopolamine: <i>m/z</i> 156

象も血清と微小透析試料のみで尿については検討していない。このような例はあるが、実際にチョウセンアサガオなどの喫食による中毒患者の血清・尿から両物質を検出した報告はほとんどない。

そこで、LC/MS/MSを用いてヒト血清・尿中のヒヨスチアミンおよびスコポラミンの分析法について検討し、実際の食中毒事例において患者の血清・尿を分析したので報告する。

実験方法

1. 試料

中毒患者の血清・尿：平成17年に福岡市内で発生したチョウセンアサガオの喫食による中毒患者6名（男3名，女3名）から採取した血清4検体（男3名，女1名）および尿3検体（男2名，女1名）を用いた。

健常者の血清・尿：福岡市保健環境研究所職員13名（男8名，女5名）の血清13検体および尿13検体を用いた。

2. 試薬等

IPCC-MS3：ジーエルサイエンス(株)製陽イオン分析用イオンペア試薬（C3の炭素鎖を持つフッ素化有機酸，M.W. 214）を使用した。

5 mmol/L IPCC-MS3：IPCC-MS3 1.07 gを蒸留水に溶解し1 Lとした。

標準品：ヒヨスチアミンは東京化成工業(株)製，臭化水素酸スコポラミンはSIGMA社製を使用した。

標準原液：標準品20 mg（臭化水素酸スコポラミンはスコポラミンとして20 mg）を精秤しメタノールに溶解し20 mLとした。なお，標準原液は4°C以下で保存した。

標準溶液：標準原液を5 mmol/L IPCC-MS3で適宜希釈し使用した。ただし，添加回収試験用標準溶液は蒸留水で希釈し使用した。

HLBカートリッジ：Waters社製Oasis HLB (60 mg, 3 cc)をあらかじめメタノール5 mLおよび蒸留水5 mLでコンディショニングして使用した。

PSAカートリッジ：ジーエルサイエンス(株)製Inert-Sep SlimJ PSA (500 mg)をあらかじめ蒸留水10 mLおよびメタノール10 mLでコンディショニングして使用した。

SAXカートリッジ：ジーエルサイエンス(株)製Inert-Sep SlimJ SAX (500 mg)をあらかじめ蒸留水10 mLおよびメタノール10 mLでコンディショニングして使用した。

その他の試薬：いずれも特級品あるいはHPLC用を使用した。

3. 装置

高速液体クロマトグラフ：Agilent社製Agilent1100シリーズを使用した。

質量分析装置：Applied Biosystems社製API4000を使用した。

4. 測定条件

LC/MS/MSの測定条件はTable 1に示した。

5. 試験溶液の調製

5.1 血清

試料0.5 mLをHLBカートリッジに負荷し，蒸留水10 mL，10%メタノール5 mLで洗浄した。真空ポンプでHLBカートリッジを通気乾燥(5 min)した後，メタノール2 mLで溶出した。窒素を吹き付けて40°Cで溶媒留去後，5 mmol/L IPCC-MS3 1 mLに溶解し，試験溶液とした。

5.2 尿

試料0.5 mLをHLBカートリッジに負荷し，蒸留水10 mL，10%メタノール5 mLで洗浄した。真空ポンプでHLBカートリッジを通気乾燥(5 min)した後，HLBカートリッジの下にPSAカートリッジを連結し，メタノール2 mLで溶出した。HLBカートリッジを取り外し，PSAカートリッジからさらにメタノール1 mLで溶出した。溶出液を合わせ，窒素を吹き付けて40°Cで溶媒留去後，5 mmol/L IPCC-MS3 1 mLに溶解し，試験溶液とした。なお，中毒患者の尿については，得られたピーク面積が検

量線の上限を超えたため、5 mmol/L IPCC-MS3 で適宜希釈して試験溶液とした。

6. 定 量

試験溶液 20 μ L を LC/MS/MS に注入し、得られたクロマトグラムのピーク面積から絶対検量線法によりヒヨスチアミンおよびスコポラミンの濃度を求め、試料中の含量を算出した。

結果および考察

1. LC/MS/MS 条件の検討

カラムおよび移動相は、LC/MS に一般に汎用されている ODS カラムおよび酢酸アンモニウムまたはギ酸を使用し検討を行った。移動相に酢酸アンモニウムを用いた場合はピークがテーリングを示した。これは、ヒヨスチアミンおよびスコポラミンが塩基性化合物であるため移動相中で正電荷を帯び、カラムに残存する解離したシラノール基と電気的に作用した結果と考える。ギ酸を用いた場合は、移動相が酸性になるためカラムのシラノール基の解離が抑制され、ピークのテーリングは解消されたが、ヒヨスチアミンおよびスコポラミンのプロトン化が進み、カラムへの保持が弱まる結果となった。このため、ピークのテーリングを解消するとともに、カラムへの保持を強めるために、移動相に酸性のイオンペア試薬を使用することについて検討した。塩基性化合物に対するイオンペア試薬としては揮発性を有するフッ素化有機酸が一般に用いられていることから、イオンペア試薬としてこの性質を持つ IPCC-MS3 を使用することとした。また、できるだけ短時間で分析できるよう、IPCC-MS3 を移動相に 5 mmol/L 添加し、水-メタノール系でグラジエント分析を試みたところ、カラムへの保持およびピーク形状が良好なクロマトグラムが得られた。また、次の検体を分析するときの影響をできるだけ少なくするため、測定終了後は LC の移動相を B 液 90% で 13 分間、20% で 15 分間保持して機器を安定化させた。さらに、注入開始後 (4 min) と測定終了後はスイッチングバルブを用いて移動相の MS/MS への導入を遮断した。

イオン化はエレクトロスプレー (ESI) によるポジティブモードで行い、選択反応検出法 (SRM) を用いて定量を行った。各物質の条件についてはインフュージョンポンプを用いて感度が最大となるよう求めた。ヒヨスチアミンおよびスコポラミンいずれについても $[M+H]^+$ をプレカーサーイオンとして、最も感度が高く得られたプロダクトイオンを定量用イオンとした。イオンスプレー電圧およびイオンソース温度などの条件については、フローインジェクションを用いて両物質の感度が高く得られるように求めた。

以上の LC/MS/MS 条件での検量線はヒヨスチアミンおよびスコポラミンとも 0.02~10 ng/mL の範囲で相関係数 0.999 以上であった。

2. 前処理方法の検討

試料の前処理は Oertel らの報告¹⁰⁾を参考にして HLB カートリッジを用いた精製方法について検討した。まず、HLB カートリッジにヒヨスチアミンおよびスコポラミンを 10 ng 負荷し、メタノール濃度を変えて洗浄条件を検討した。蒸留水で負荷した場合は、メタノール濃度が 0、10 および 20% では 5 mL でいずれも溶出されなかったが、30% では 5 mL でそれぞれ 8.3 および 44% 溶出された。一方、尿で負荷した場合は、0 および 10% では 5 mL でいずれも溶出されなかったが、20% では 5 mL でスコポラミンのみ 20% 溶出され、共存物質の存在により溶出条件が変化した。次に、メタノール濃度 100% で溶出条件を検討した結果、2 mL でそれぞれ 100 および 101% 溶出された。したがって、精製方法は試料 0.5 mL を HLB カートリッジに負荷した後、蒸留水 10 mL および 10% メタノール 5 mL で洗浄し、メタノール 2 mL で溶出することとした。

LC/MS 分析を行う場合、イオン源や機器の調整の状態はいうまでもなく、試料由来の塩などの共存成分の影響によりイオン化が促進または抑制され、検出感度が変化することが知られている^{11), 12)}。このため、HLB カートリッジによる精製物を最終的にどの程度の量の溶液に溶解すればその影響を緩和できるかについて検討した。血清・尿 0.5 mL を前述の方法により HLB カートリッジで精製し、溶出液を溶媒留去した後、1 ng/mL の標準溶液 0.1, 0.25, 0.5, 1, 2.5, 5 mL に溶解したものを LC/MS/MS に注入し、ピーク面積を標準溶液のそれと比較した。Fig. 2 に示すとおり、血清についてはヒヨスチアミンおよびスコポラミンの標準溶液に対するピーク面積が 0.1, 0.25, 0.5 mL でそれぞれ 60, 78, 83 および 93, 104, 107% と、ヒヨス

Fig. 2. Effect of test solution volume on response of hyoscyamine and scopolamine

The relative peak area was calculated by using the following equation: relative peak area (%) = {peak area of hyoscyamine and scopolamine (1 ng/mL) in test solution prepared from serum and urine / peak area of hyoscyamine and scopolamine (1 ng/mL) in standard solution} $\times$ 100.

チアミンでイオン化の変化に伴う感度変化が大きく見られたが、1 mL 以上ではそれぞれ 90～92 および 100～108%と 100±10%の範囲内で安定した結果が得られた。一方、尿についてはヒヨスチアミンでは 0.1 mL で 37%、5 mL で 130%と安定した結果が得られなかった。また、スコポラミンも 0.1 mL で 57%、5 mL で 82%と安定しなかった。これは、尿には高濃度で多くの種類の塩や色素などが含まれており、HLB カートリッジによる精製のみでは十分除去できなかったためと考える。尿の前処理には、目的物質を無極性固相に保持して水系溶媒による洗浄で大部分の塩や色素を除去した後、イオン交換相でさらに精製する方法¹³⁾があることから、これを応用して HLB カートリッジに加えてさらにイオン交換樹脂により精製する方法について検討した。イオン交換樹脂には陽イオン交換樹脂と陰イオン交換樹脂があるが、ヒヨスチアミンおよびスコポラミンは塩基性化合物であり、陽イオン交換樹脂により精製する場合、両物質はいったん固相に保持されるので、酸・アルカリによる pH 調整や高濃度の塩による溶出が必要となる。しかし、溶出液をそのまま濃縮して LC/MS/MS に注入した場合、塩などの影響による感度変化が危惧される。そこで今回は、中毒時の分析を想定し、できるだけ迅速に前処理を行えるよう、陰イオン交換樹脂により目的物質を固相に保持させずに通過させ、試料由来の塩や色素のうち陰イオン性物質のみを除去する方法を試みた。尿 0.5 mL を HLB カートリッジで精製した溶出液について、弱陰イオン交換の PSA カートリッジおよび強陰イオン交換の SAX カートリッジを通過させ、通過液を溶媒留去した後、前述と同様にピーク面積を標準溶液のそれと比較した。Fig. 2 に示すとおり、PSA カートリッジおよび SAX カートリッジとも 1 mL 以上でヒヨスチアミンおよびスコポラミンがそれぞれ 91～110 および 90～101%と 100±10%の範囲内に安定させることができた。両カートリッジとも HLB カートリッジのみでは除去しきれなかった色素もほとんど除去できたが、PSA カートリッジのほうが SAX カートリッジに比べてきょう雑ピークが若干少ないクロマトグラムを得ることができた。また、血清・尿とも HLB カートリッジを蒸留水および 10%メタノールで洗浄後、そのままメタノールで溶出すると回収率が 100%を大きく超過し、相対標準偏差 (R.S.

Table 2. Recoveries of hyoscyamine and scopolamine from human serum and urine

Sample	Fortification level (ng/mL)	Recovery ^{a)} (%)	
		Hyoscyamine	Scopolamine
Serum	0.2	86.0±3.9	90.1±3.6
	10	91.3±2.5	105±2.5
Urine	0.2	98.2±2.7	99.7±1.9
	10	90.0±1.5	97.6±1.7

^{a)} Values are mean ±S.D. (n=5)

D.) が 30%以上になることがあった。蒸留水 10 mL および 10%メタノール 5 mL による洗浄では試料由来の塩などの除去が十分ではないと考え、洗浄後メタノールで溶出する前にカートリッジに残留する溶媒中の塩などを吸引除去あるいは析出させることによりこれらの影響を抑えた結果、R.S.D. を 5%以内にすることができた。

以上の結果から、血清については試料 0.5 mL を HLB カートリッジに負荷し、蒸留水 10 mL および 10%メタノール 5 mL で洗浄し、HLB カートリッジを通気乾燥後メタノール 2 mL で溶出し、溶出液を留去した後、5 mmol/L IPCC-MS3 1 mL に溶解し試験溶液とすることとした。尿については HLB カートリッジに用いて精製した溶出液を、さらに PSA カートリッジを通過させ、通過液を留去した後、5 mmol/L IPCC-MS3 1 mL に溶解し試験溶液とすることとした。

3. 添加回収試験

本法を用いて、血清・尿にヒヨスチアミンおよびスコポラミンを試料中濃度として 0.2 および 10 ng/mL となるように添加して回収試験を行った。Table 2 に示したとおり、回収率は 86.0～105%、標準偏差は 1.5～3.9%と良好な結果が得られた。

また、本法による検出限界 (S/N=3) はいずれも 0.02 ng/mL、定量限界 (S/N=10) はいずれも 0.04 ng/mL であった。

4. チョウセンアサガオの喫食による中毒患者の分析結果

本法を用いて、チョウセンアサガオの喫食による中毒患者の血清 4 検体および尿 3 検体を分析した。分析結果および患者の主な症状を Table 3 に示した。

Table 3. Analysis results of hyoscyamine and scopolamine in serum and urine of humans poisoned by eating *Datura innoxia* Mill.

Patient	Age	Sex	Detected level (ng/mL)				Main symptoms
			Serum		Urine		
			Hyoscyamine	Scopolamine	Hyoscyamine	Scopolamine	
1	74	Male	0.48	2.0	270	170	Drunkenness, clouding of consciousness
2	70	Male	1.5	3.1	350	300	Drunkenness, clouding of consciousness
3	69	Female	0.45	3.5	270	670	Drunkenness, clouding of consciousness
4	93	Male	1.5	3.2	— ^{a)}	—	Drunkenness, clouding of consciousness, dyspnea

^{a)} No sample

Fig. 3. SRM chromatograms of hyoscyamine and scopolamine in sample extracts

- (A): Standard solution (1.0 ng/mL of each)
 (B): Serum sample of healthy human
 (C): Urine sample of healthy human
 (D): Serum sample (containing 0.48 ng/mL of hyoscyamine and 2.0 ng/mL of scopolamine) of human poisoned by eating *Datura innoxia* Mill.

検出範囲は、血清からヒヨスチアミンおよびスコポラミンが 0.45～3.5 ng/mL、尿から 170～670 ng/mL ですべての検体から検出された。患者の主な症状は酩酊感や意識混濁であり、なかには呼吸困難を示す重篤なものもあったが、血清・尿中のヒヨスチアミンおよびスコポラミンの濃度との関係は見られなかった。

また、参考のため健常者の血清・尿各 13 検体について同様に分析したが、いずれの検体からもヒヨスチアミンおよびスコポラミンは検出されなかった。

Fig. 3 に標準溶液（各 1.0 ng/mL）、健常者の血清・尿およびチョウセンアサガオの喫食による中毒患者の血清から得られたヒヨスチアミンおよびスコポラミンの SRM によるクロマトグラムを示した。定量に支障を与える試料由来のきょう雑ピークは見られず、良好なクロマトグラムを得た。

以上のことから、本法はヒヨスチアミンおよびスコポラミンの中毒事例において、原因を特定する分析法として十分適用できるものと考ええる。

結 論

LC/MS/MS によるヒト血清・尿中のヒヨスチアミンおよびスコポラミンの分析法について検討した。

LC 用カラムに ODS を用いて、移動相に陽イオン分析用イオンペア試薬である IPCC-MS3 を添加し、水-メタノール系でグラジエント分析した結果、ピーク形状が良好なクロマトグラムを得た。血清・尿は HLB カートリッジおよび PSA カートリッジで精製した。

ヒト血清・尿の検出限界は 0.02 ng/mL、添加回収試験による回収率は 86.0～105%、標準偏差は 1.5～3.9% と良好な結果が得られ、定量に支障を与える試料由来のきょう雑ピークも見られなかった。

本法を用いて、チョウセンアサガオの喫食による中毒患者の血清 4 検体および尿 3 検体について分析した結果、血清からヒヨスチアミンおよびスコポラミンが 0.45～3.5 ng/mL、尿から 170～670 ng/mL の範囲ですべての検体から検出された。

本法は前処理も比較的簡易であり、緊急を要するヒヨスチアミンおよびスコポラミンによる中毒事例の分析に十分適用できるものと考ええる。

なお、本研究の一部は日本食品衛生学会第 94 回学術講演会（2007 年 10 月、静岡）において発表した。

文 献

- 1) 食品衛生研究会監修. 食品衛生指導員ハンドブック. 東京, 日本食品衛生協会, 2004, p. 198-205.
- 2) Hosogai, Y., Matsumoto, M. Shin Shokuhin Eiseigaku Yosetsu, 4th ed. Tokyo, Ishiyaku Shuppan Kabushiki-gaisha, 2003, p. 74-75. (ISBN 4-263-70429-0)
- 3) Yamanaka, H., Fujii, T., Shiomi, K. Shokuhin Eiseigaku. Tokyo, Koseisha Koseikaku, 1999, p. 76-85. (ISBN 4-7699-0898-9)
- 4) Fujiwara, K., Aibara, K. Shokuhin Eisei Handobukku. Tokyo, Nankodo, 1992, p. 190. (ISBN 4-524-22271-5)
- 5) He, L., Zhang, G., Tong, Y., Oshima, T., Sagawa, K. Determination of hyoscyamine, scopolamine, anisodamine and anisodine in solanaceous plants by high performance liquid chromatography. Shoyakugaku Zasshi, **44** (3), 162-166 (1990).
- 6) Fliniaux, M., Manceau, F., Jacquin-Dubreuil, A. Simultaneous analysis of *l*-hyoscyamine, *l*-scopolamine and *dl*-tropic acid in plant material by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J. Chromatog., **644**, 193-197 (1993).
- 7) Ishiharajima, E., Nakamura, H., Moriyama, K., Seshuyama, M. Kechosenasagao shokuchudoku jiken ni okeru genin arukaroido no bunsekiho ni tsuite (About the analysis method of the cause alkaloid in *Datura meteloides* food poisoning case). Tochigiken Hokenkan-kyo Senta Nenpo (Annual Report of Tochigi Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science), **3**, 80-82 (1998).
- 8) Aurioa, S., Martinsen, A. Analysis of tropane alkaloids with thermospray high-performance liquid chromatog-

- raphy-mass spectrometry. J. Chromatog., **562**, 737-744 (1991).
- 9) Tada, H., Shiraki, K., Yoshida, I., Nakaya, K., Iinuma, M. Analysis of atropine and scopolamine in *Scopolia japonica* and human serum using solid phase extraction. Gifuken Hokenkankyokenkyusho Ho (Annual Report of Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences), **9**, 29-34 (2001).
- 10) Oertel, R., Richter, K., Ebert, U., Kirch, W. Determination of scopolamine in human serum and microdialysis samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. Chromatog. B, **750**, 121-128 (2001).
- 11) Blanchflower, W. J., Hewitt, S. A., Kennedy, D. G. Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. Analyst, **119**, 2595-2601 (1994).
- 12) Riediker, S., Stadler, R. H. Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. Anal. Chem., **73**, 1614-1621 (2001).
- 13) ジーエルサイエンス(株)監修. 最新固相抽出法ガイドブック. 東京, ジーエルサイエンス(株), 1996, p. 130-131.