

ノ ー ト

親水性相互作用クロマトグラフィー/質量分析法によるタバコ煙
暴露評価のためのヒト血清中ニコチン及びコチニンの定量岡野 圭太¹, 日の原聖仁志¹, 岩崎 雄介¹, 伊藤 里恵¹,
斉藤 貢一¹, 和泉俊一郎², 牧野 恒久², 中澤 裕之^{®1}

1 緒 言

タバコ煙には, 4000 種類以上の化学物質が存在し, その中にはニコチン, 一酸化炭素, アンモニア, またフェノール類等の 200 種類以上の有害化学物質及びニトロソアミン, ベンゾピレン, また 4-アミノビフェニール等の 40 種類以上の発がん物質が含まれている^{1)~3)}. タバコ煙は主流煙と副流煙に分類されるが, 副流煙はフィルターによる汙過が行われないため, 主流煙と比較して多くの有害物質及び発がん物質を含有しており¹⁾, タバコ煙による環境汚染の大半は副流煙に起因する.

成人の喫煙により肺がん, 食道がん, 心臓血管疾患及び慢性肺疾患等といった生体への悪影響が明らかとなっており^{4)~7)}, 特に, 妊婦の喫煙では, 臍帯の血流量が減少し, 胎児に低酸素状態や低栄養状態をもたらす⁸⁾. その結果, 子宮内胎児発育遅延, 早産, 死産, 先天異常や出生体重低下等が高頻度で発生すると報告^{9)~13)}されている. また, 乳幼児では家庭環境における副流煙の暴露や, タバコの抽出液を誤飲することによるニコチン中毒⁷⁾が報告されている.

ニコチンは喫煙により肺毛細血管を通じて速やかに体内に吸収され, 全身に分布した後, 肝臓でその約 80% がコチニンに代謝され, 約 10% は腎臓で尿中に排泄される. ニコチン依存症は, ニコチンが脳内のドーパミン神経系に影響を及ぼすことで引き起こされ, 必然的に喫煙行為を助長させてしまう⁷⁾. また, 乳幼児において, タバコの副流煙暴露により心臓血管疾患, 呼吸器疾患, 成長抑制等の生体影響が危惧されている¹³⁾. 現在, タバコ煙による暴露実態を評価するために, 喫煙者では, ニコチン及びコチニンを指標とし, 非喫煙者では, ニコチン (血中半減期 1~4 時間) に比べて半減期の長いコチニン (血中半減期 18~20 時間) を指標とする暴露評価が有用とされている^{14)~20)}.

血清中のニコチン及びコチニンの測定法として, 夾雑成

分の影響を避けるため, 液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析法 (LC/MS/MS) を用いた報告²¹⁾があるが, 現在のところ広く普及しているとは言い難い. そこで本研究では, より普及している測定機器を検出器とし, またニコチン及びコチニンを夾雑成分から分離させるため親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)²²⁾を用いた, ヒト血清中ニコチン及びコチニンの高感度な分析法を構築した. 更に主流煙よりも副流煙による暴露が大きいと推測される妊婦について, タバコ煙による暴露実態の評価を行うことを目的とした.

2 実 験

2.1 試 薬

ニコチン (>97%) の標準物質は, 和光純薬製を用いた. コチニン (>98%), ニコチン-d₃ (>98%) 及びコチニン-d₃ (>98%) の標準物質は, Sigma 製を用いた. 構造式を Fig. 1 に示す. また, アセトニトリル {高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用及び残留農薬・ポリクロロビフェニル (PCB) 試験用}, メタノール (残留農薬・PCB 試験用), ギ酸 (特級), 水酸化ナトリウム (特級), トリクロロ酢酸 (特級), リン酸二水素ナトリウム (特級) 及びリン酸水素二ナトリウム (特級) は和光純薬製を用いた. 精製水は EDS ポリッシャーを搭載したミリポア製超

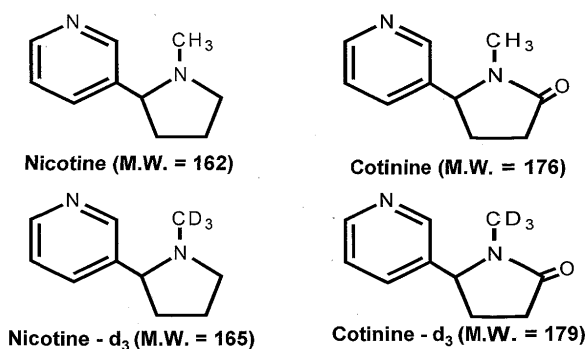


Fig. 1 Structures of nicotine, cotinine, nicotine-d₃ and cotinine-d₃

¹ 星薬科大学薬品分析化学教室: 142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41

² 東海大学医学部産婦人科: 259-1193 神奈川県伊勢原市望星台

純水装置 (Milli-Q gradient A 10) を用いて調製した。固相抽出のカートリッジに Waters 製 Oasis HLB (1 cc, 30 mg) を用いた。

2.2 標準溶液の調製

各標準溶液をアセトニトリルに溶解させて、100 µg/mL の溶液を調製し、0.5~2.0 µg/mL の範囲で標準溶液をアセトニトリルで適宜希釈して測定用試料を調製した。また、ニコチン-d₃ 及びコチニン-d₃ を用いて内標準法により検量線を作成した。

2.3 LC/MS 装置及び測定条件

高速液体クロマトグラフ/質量分析 (MS) 計には Agilent 製 Agilent 1100 series LC/MSD を用いた。分離カラムには Waters 製 Atlantis HILIC シリカ (150 mm × 2.1 mm, 3.0 µm) を用いた。移動相は 0.01% ギ酸を添加した水/アセトニトリルの混液を、アセトニトリル含量が 90% (0 min) ~ 50% (15 min) ~ 50% (20 min) ~ 90% (23 min) となるようリニアグラジエントで送液 (流量 0.2 mL/min) した。カラム温度は 40°C, 試料注入量は 5 µL とした。MS のイオン化には、エレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法を用い、キャピラリー電圧は 3000 V, フラグメンター電圧は 110 V を採用し、ポジティブイオンモードで測定した。測定には選択イオン検出 (SIM) モードを用い、モニタリングイオンにはニコチン (m/z 163), コチニン (m/z 177), ニコチン-d₃ (m/z 166) 及びコチニン-d₃ (m/z 180) とした。

2.4 ヒト血清試料

東海大学医学部産婦人科で分娩を行った女性ボランティアから、母体血清 51 検体及び臍帯血清 11 検体 (同一個人における母体血清-臍帯血清のペアは 10 検体) を採取した。採取した血清は分析に供するまで、遮光、-80°C で保存した。なお、母体血清及び臍帯血清の採取と分析に関しては、いずれもインフォームドコンセントを十分に行い、理解が得られたボランティアから採取するなど、倫理面への配慮を行った。

2.5 試料の前処理

アシストチューブに血清 500 µL とサロゲート物質 (ニコチン-d₃; 5 µg/mL, ; コチニン-d₃; 10 µg/mL) 10 µL を加えかくはんした。除タンパクのため 25% トリクロロ酢酸 160 µL を加えた後、かくはん・遠心分離 (10000 g, 5 分) を行った。固相抽出カートリッジにおけるニコチン及びコチニンの保持の向上を目的とし、1 M の水酸化ナトリウム水溶液 330 µL を加え試料を塩基性にし、再び遠心分離 (10000 g, 5 分) を行った後、得られた上澄み 750 µL

を固相抽出に適用し、試料の濃縮・精製を行った。溶出液をエバポレーターで濃縮乾固後、アセトニトリル 75 µL に再溶解させ、測定に供した。

添加回収試験には、一般人から採取したプール血清に、ニコチン及びコチニンが 100 ng/mL 又は 200 ng/mL となるように標準溶液を加えて、同様の前処理操作を行い、HILIC/MS にて測定した。

3 結果及び考察

3.1 LC/MS 測定条件の検討

コチニンは高極性物質であるため通常のオクタデシルシリカ (ODS) カラムでは保持が困難であるといわれているため、ODS と HILIC を比較検討した。ODS カラムにおいては移動相の組成を変更してもコチニンの保持時間に大きな変化はなかったことから、カラムにほとんど保持されていないと考えられた (Fig. 2)。そこで、ニコチン及びコチニンの分離を改善し、また移動相の有機溶媒の割合を多くして MS でのイオン化向上を目的として、カラムには HILIC カラムを使用した。分離条件として、移動相に添加するギ酸の濃度を検討したところ、0.01% ギ酸及び 0.01% ギ酸含有アセトニトリルの混液をグラジエント送液することで、目的物質の良好な相互分離を達成した。MS でのイオン化には ESI 法のポジティブイオンモードを用い、フラグメンター電圧を検討した結果、110 V が最適であった。

3.2 固相抽出法の条件検討

HILIC カラムは陽イオン交換能を有するため、高極性物質の除去を目的に固相抽出カートリッジには逆相系の Oasis HLB (Waters 製) を採用した。固相抽出法において試料の負荷後にカートリッジを洗浄し、夾雑成分の除去を行う洗浄溶液の pH, メタノールの含有率及び洗浄回数の検討をした。また、保持された目的物質を選択的に抽出するため、抽出の回数を検討した。Fig. 3 に示すように、洗浄溶液に 10 mM リン酸塩緩衝液 (pH 9): メタノール = 90:10 を採用し、1 mL で 2 回の洗浄が最適条件であった。また、抽出工程において 1% ギ酸含有メタノールを用い、1 mL で抽出することにより、試料のクリーンアップを行った。最適化した固相抽出の手順を Fig. 4 に示す。

3.3 検出下限値及び定量下限値

標準溶液を用いて検出下限値及び定量下限値を求めた結果、ニコチン及びコチニンの検出下限値 ($S/N=3$) は 0.2 ng/mL 及び 0.1 ng/mL となった。また、定量下限値 ($S/N>10$) は 1 ng/mL 及び 0.4 ng/mL となり、高感度な分析法が構築できた。LC/MS/MS を用いた従来法²¹⁾では試料量は 1000 µL, 定量下限値は 2 ng/mL である。本

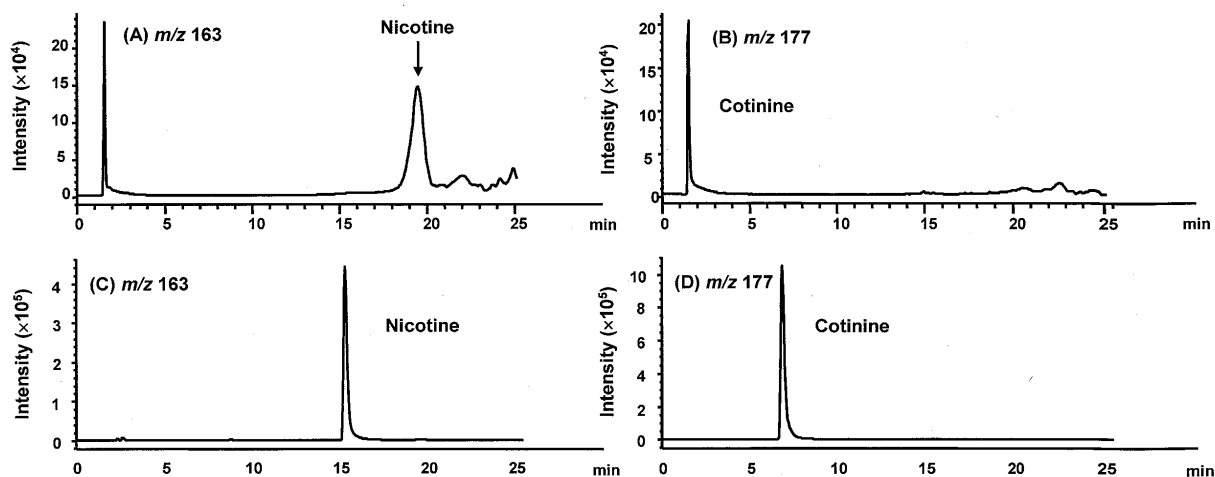


Fig. 2 Comparison of chromatograms using ODS and HILIC column

(A) chromatogram of nicotine obtained with ODS column; (B) chromatogram of cotinine obtained with ODS column; (C) chromatogram of nicotine obtained with HILIC column; (D) chromatogram of cotinine obtained with HILIC column; Gradient profile of mobile phase for ODS column separation: Acetonitrile/water = 10/90 (0~5 min) $\rightarrow$ 90/10 (20~25 min)

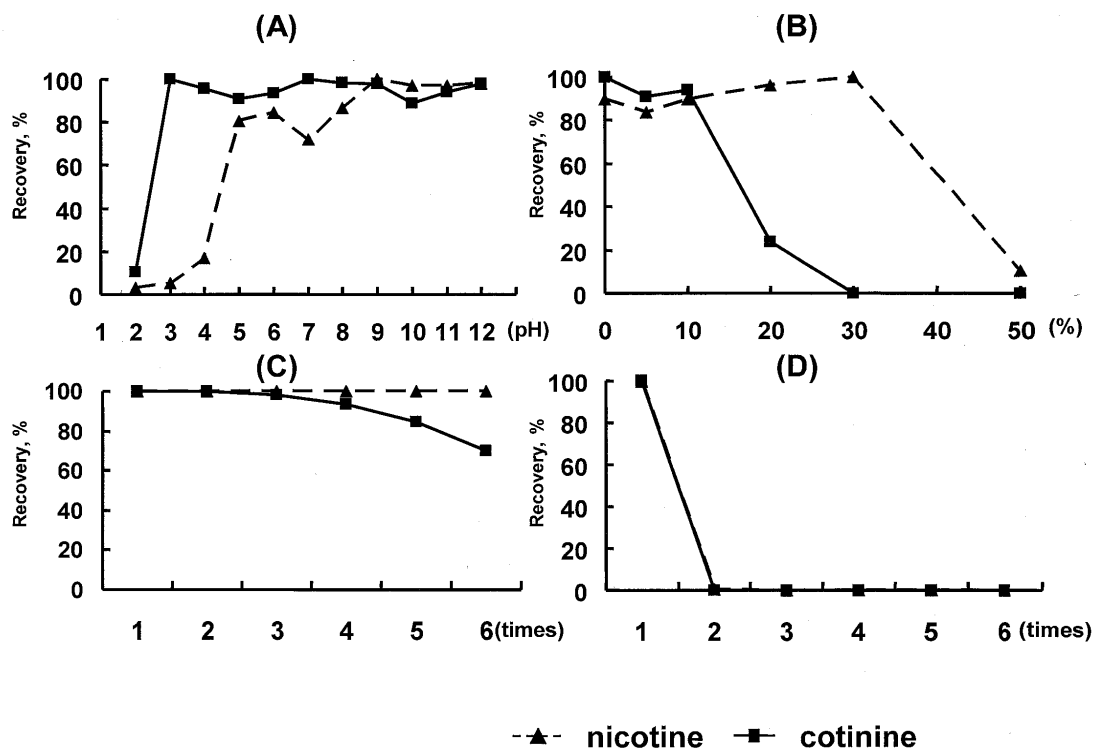


Fig. 3 Optimization of conditions for solid phase extraction

(A) pH of wash solution; (B) methanol concentration in wash solution; (C) times of wash; (D) times of elution

法は従来法と比較し、試料量は少量 (500 μ L) であり、感度の面からも良好な分析法である。検量線を作成した結果、ニコチンは 5.0~2000 ng/mL, コチニンは 2.0~2000 ng/mL の濃度範囲で相関係数 0.999 以上と良好な結果が得られた。ニコチン及びコチニンの標準溶液のクロマ

トグラムを Fig. 5 に示す。

3.4 添加回収試験

ヒト血清中で 100 ng/mL 又は 200 ng/mL となるようにニコチン及びコチニンを添加し、本法に従い添加回収試験

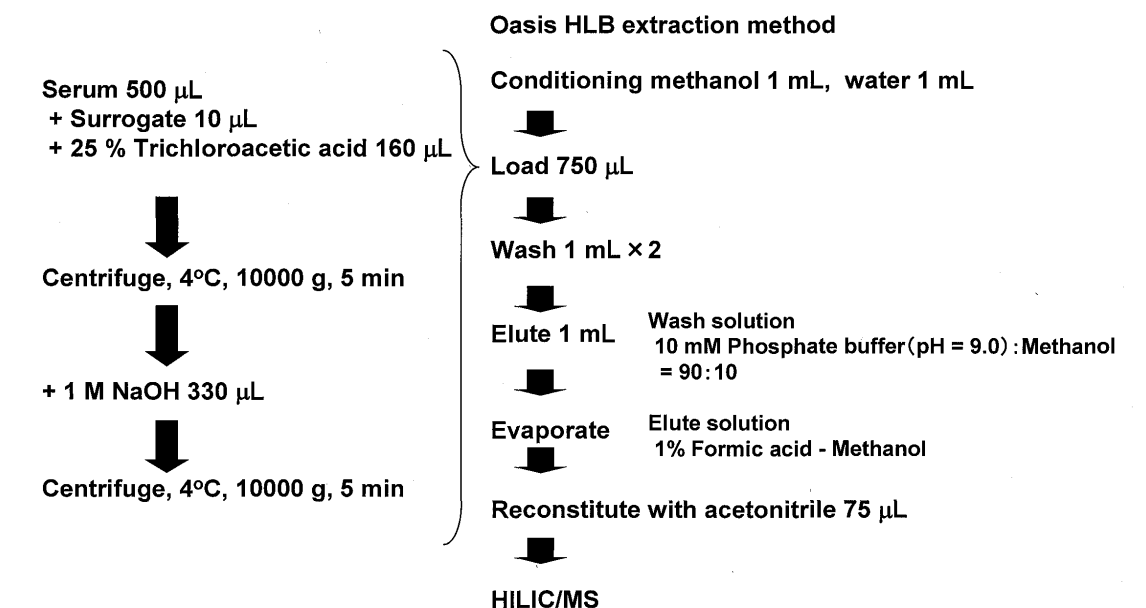
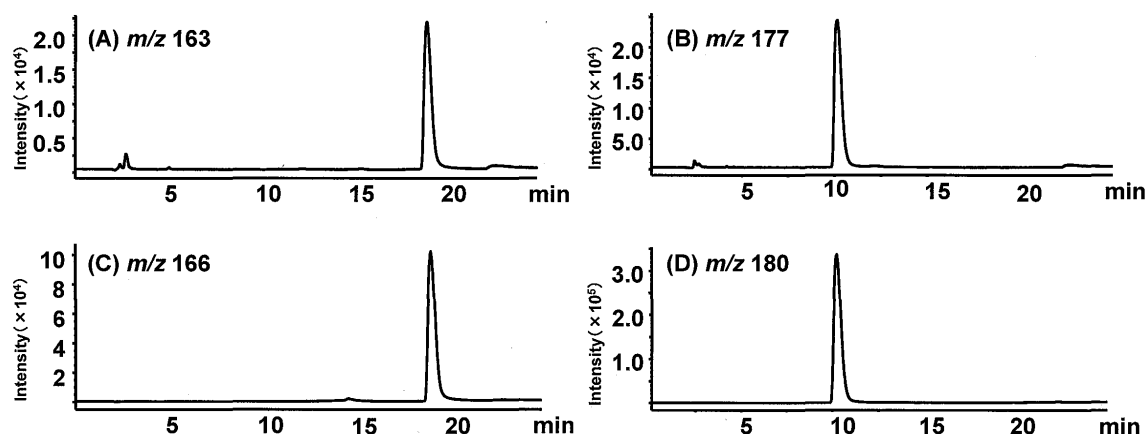


Fig. 4 Procedure of sample preparation

Fig. 5 SIM chromatograms of standard for (A) nicotine, (B) cotinine, (C) nicotine- d_3 and (D) cotinine- d_3

を行った。プール血清におけるクロマトグラムを Fig. 6 に示す。ニコチン及びコチニン共に平均回収率 ($n = 6$) は 90.0% 以上, 相対標準偏差 (RSD) は 6.0% 未満と良好な結果が得られた (Table 1)。

3・5 実試料の分析結果

本分析法を母体血清 51 検体及び臍帯血清 11 検体 (同一個人における母体血清-臍帯血清のペアは 10 検体) の分析に適用した。Table 2 に示すとおり, 母体血清では 51 検体中 14 検体 (検出率 = 検出された検体数/総検体数 $\times 100 = 27.5\%$) から, N.D.~177.2 ng/mL の濃度範囲でコチニンが検出された。母体血清からコチニンが検出された検体では, ニコチンも同様に検出され, 採血した直前

もタバコ煙に暴露されていたことが推察された。母体血清中のニコチン検出率は, 64.7% であり, 検出濃度範囲は ND~12.4 ng/mL であった。また, 臍帯血清では 11 検体中 1 検体からコチニンが検出された。同一個人における母体血清-臍帯血清のペアとなる検体において, 母体血清でコチニンが検出された検体からは, 臍帯血清でもコチニンが検出された (母体血清; 3.0 ng/mL, 臍帯血清; 8.7 ng/mL)。

母体血清及び臍帯血清ペア検体から共にコチニンが検出されたことから, 臍帯を介して胎児がタバコ煙に暴露されることが危惧される。また, 本分析法はヒト血清中のニコチン及びコチニンの測定に有用であることが示唆された。今後, 本分析法を用いたタバコ暴露評価が望まれる。

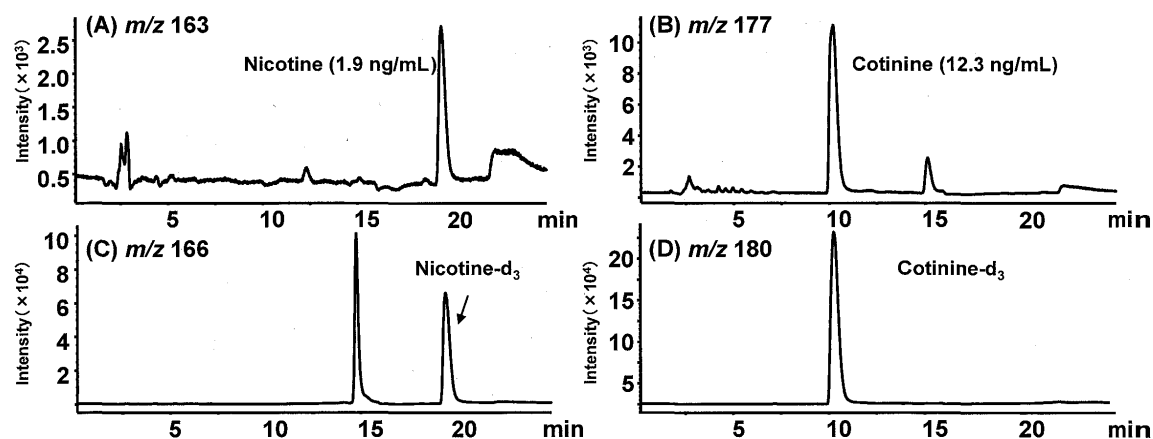


Fig. 6 SIM chromatograms of pool of human serum for (A) nicotine, (B) cotinine, (C) nicotine-d₃ and (D) cotinine-d₃

Table 1 Average recoveries of nicotine and cotinine from human serum

	Blank/ ng mL ⁻¹	Spiked amount/ ng mL ⁻¹	Recovery, %	RSD, %
Nicotine	1.9	100	90.3	3.9
		200	98.7	3.8
Cotinine	12.3	100	95.1	5.2
		200	96.9	4.1

(n = 6)

Table 2 Concentration of nicotine and cotinine in human serum

	n	Analyte	Detection range/ ng mL ⁻¹	Detection rate, %
Pregnant woman serum	51	Nicotine	N.D. ~ 12.4	64.7
		Cotinine	N.D. ~ 177.2	27.5
Umbilical cord serum	11	Nicotine	N.D. ~ 1.7	18.0
		Cotinine	N.D. ~ 8.7	9.0

(Nicotine: N.D. < 1.0 ng/mL, Cotinine: N.D. < 0.4 ng/mL)

文 献

- 喫煙と健康—喫煙と健康問題に関する検討会報告書, 新版, p. 39 (2002), (保健同人).
- E. L. Wynder, D. Hoffmann: *N. Engl. J. Med.*, **300**, 894 (1979).
- S. L. Stock: *Lancet*, **2**, 1082 (1980).
- M. Rebagliato: *Am. J. Epidemiol.*, **142**, 525 (1995).
- S. Kono, M. Ikeda, S. Tokudome, M. Nishizumi, M. Kuratsune: *Jpn. J. Cancer Res.*, **78**, 1323 (1987).
- J. L. Labandeira-Garcia: *Biochem. Pharmacol.*, **64**, 125 (2002).
- I. B. Karaconji: *Arh. Hig. Rada Toksikol.*, **56**, 363 (Review), (2005).
- J. Kalinka, W. Hanke, W. Sobala: *Am. J. Perinatol.*, **22**, 41 (2005).
- P. H. Shiono, M. A. Klebanoff, G. G. Rhoads: *JAMA*, **255**, 82 (1986).
- J. L. Peacock, J. M. Bland, H. R. Anderson: *BMJ*, **311**, 531 (1995).
- J. Andrews, J. M. McGarry: *J. Obstet. Gynaecol. Br. Commonw.*, **79**, 1057 (1972).
- C. V. Ananth, R. W. Platt: *BMC Pregnancy Childbirth*, **4**, 22 (2004).
- A. Bouckaert: *Stat. Med.*, **19**, 239 (2000).
- P. Tutka, J. Mosiewicz, M. Wielosz: *Pharmacol. Rep.*, **57**, 143 (Review), (2005).
- N. L. Benowitz, Jacob P. 3rd, I. Fong, S. Gupta: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **268**, 296 (1994).
- P. Dhar: *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **35**, 155 (2004).
- S. Pichini, X. B. Basagana, R. Pacifici, O. Garcia, C. Puig, O. Vall, J. Harris, P. Zuccaro, J. Segura, Sunyer: *Environ. Health Perspect.*, **108**, 1079 (2000).
- Y. Akiyama, K. Arashidani, W. Kawano, N. Kunugita: *J. UOEH*, **28**, 245 (2006).
- A. Thaqi, K. Franke, G. Merkel, H. E. Wichmann, J. Heinrich: *Indoor Air*, **15**, 302 (2005).
- G. Bazylak, H. Brozik, W. Sabanty: *J. Pharm. Biomed.*

- Anal.*, **24**, 113 (2000).
21) T. P. Moyer, J. R. Charlson, R. J. Enger, L. C. Dale, J. O. Ebbert, D. R. Schroeder, R. D. Hurt: *Clin. Chem.*, **48**, 1460 (2002).
22) B. Y. Zhu, C. T. Mant, R. S. Hodges: *J. Chromatogr.*, **548**, 13 (1991).

Determination of Nicotine and Cotinine in Human Serum for
Evaluation of Tobacco Smoke Exposure by
Hydrophilic Interaction Chromatography/Mass Spectrometry

Keita OKANO¹, Masatoshi HINOHARA¹, Yusuke IWASAKI¹, Rie ITO¹,
Koichi SAITO¹, Shun-ichiro IZUMI², Tsunehisa MAKINO² and Hiroyuki NAKAZAWA¹

¹ Department of Analytical Chemistry, Hoshi University, 2-4-41, Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501

² Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Tokai University, Bouseidai, Isehara-shi, Kanagawa 259-1193

(Received 13 April 2007, Accepted 9 June 2007)

Tobacco smoke contains more than 200 harmful compounds and 40 carcinogenic compounds. Tobacco smoke exposure is a significant risk of growth suppression for fetuses and infants. A highly sensitive and selective method for the determination of nicotine and cotinine in human serum samples, to evaluate the exposure amount of tobacco smoke, was developed. Solid-phase extraction was employed for sample preparation, and a measurement was performed by hydrophilic interaction chromatography with mass spectrometry (HILIC/MS). The limits of detection of nicotine and cotinine were 0.2 and 0.1 ng/mL, respectively. Moreover, the limits of quantification of nicotine and cotinine were 1.0 and 0.4 ng/mL, respectively. The average recoveries of nicotine and cotinine were over 90% (RSD < 6%, $n = 6$). The proposed method was applied to measure the serum and umbilical cord serum of a pregnant woman. The detection rate of cotinine in the pregnant woman serum and umbilical cord serum were 51 to 14 and 11 to 1.

Keywords : tobacco; nicotine; cotinine; solid phase extraction; HILIC/MS; pregnant woman serum; umbilical cord serum.