

固相抽出によるハシリドコロ及びヒト血清中の アトロピン、スコポラミンの分析法

多田裕之, 白木康一, 吉田 勲, 中屋謙一, 飯沼宗和

要 旨

ハシリドコロ (*Scopolia japonica*) 植物体及びヒト血清中のアトロピン、スコポラミンを測定するため、強陽イオン交換カラムを用いて抽出し、分離定量する方法について検討した。定量は、ハシリドコロ植物体については高速液体クロマトグラフィーで、血清についてはNPD付きガスクロマトグラフィーで行った。ハシリドコロ植物体の添加回収試験では、葉、茎、根各部位におけるそれぞれの平均回収率は、92.2～99.3%であった。また、検出限界はアトロピンが1.1 $\mu\text{g/g}$ 、スコポラミンが0.68 $\mu\text{g/g}$ であった。血清における添加回収試験では、平均回収率で、アトロピンが104.5%、スコポラミンが99.4%であった。また、検出限界は、アトロピンが30 ng/mL、スコポラミンが15 ng/mLであった。

今回検討した分析法を用いれば、従来の溶媒抽出法に比べて迅速な分析が可能となり、また、食中毒時の血清分析においても有用な方法であると考えられる。

キーワード: ハシリドコロ、アトロピン、スコポラミン、血清、NPD付きガスクロマトグラフィー

1 緒 言

ナス科の植物であるハシリドコロ (*Scopolia japonica*) は、同じナス科のチョウセンアサガオ属と同様にアトロピン、スコポラミン等のトロパン系アルカロイドを含有しており、誤食による食中毒の原因植物の一つとなっている。

ハシリドコロによる食中毒時の原因特定のためハシリドコロ植物体中のアトロピン、スコポラミンを分析する場合、その抽出方法としては、アルカロイド薬物試験¹⁾及び食品中のトロパン系アルカロイド試験²⁾に用いられているスタス・オット法による溶媒抽出が考えられる。しかし、この方法では取り扱いに注意を要するエーテル等の有機溶媒を多量に使用する上、操作も煩雑で長時間を要するため、迅速で精度の良い分析法が望まれるところである。そこで、ミニカラムを使用した固相による抽出を行うことにより、少量の溶媒で迅速にアトロピン、スコポラミンを分析する方法について検討した。

アルカロイド薬物のミニカラムによる固相抽出法を用いた分析報告例は、オクタデシル (C18) カラムを用いた液状食品中のスコポラミン等の分析³⁾、C18 カラムを用いた尿中のアトロピン等の分析⁴⁾、C18 及び

シアノプロピル (CN) カラムを用いた尿中のスコポラミンの分析⁵⁾等があるが、いずれも逆相系カラムを使用しているため選択性に乏しく、アトロピン、スコポラミン両薬物を迅速簡便に精度良く分析するには不十分である。一方選択性が高く共存する夾雑物を効率的に除去可能なカラムとしてはイオン交換カラムが挙げられる。宮武ら⁶⁾は、強陽イオン交換カラムを抽出に使用した胃腸薬中のヒヨスチアミンの定量法を報告している。そこで今回、強陽イオン交換カラムで試料を抽出し、高速液体クロマトグラフ (HPLC) 法で分析する方法を検討した。

また、ヒト血清中のアトロピン、スコポラミンについて、植物体の場合と同様のミニカラムを用いて抽出し、分析定量する方法について検討した。人体内に取り込まれた薬物は体内代謝を受けるため、時間とともに血中濃度は減少する。特にアトロピンの血中濃度は急速に減少するといわれている^{7, 8)}ため、少なくとも血清1 mLあたり数十ng 程度の分析感度が必要と考えられる。そこで、測定は窒素化合物に特異的で夾雑物の影響を受けにくく、しかも比較的感度の高い窒素リン検出器付きガスクロマトグラフ (GC/NPD) で行い、血清中のアトロピン、スコポラミンについて分析

法を検討したので報告する。

2 実験方法

2.1 試料

ハシリドコロは、岐阜県郡上郡山中に自生していたものを採取し、生のまま用いた。血清は、血液採取後、約1時間放置してから2,500 rpmで10分間遠心分離し、その上澄液を使用した。

2.2 試薬及び精製用ミニカラム

アトロピンは、L-ヒヨスチアミンが抽出過程でラセミ化したものであり、また、分析データもL-ヒヨスチアミンと差がなかったため、東京化成工業製L-ヒヨスチアミンの特級品を標準品として用いた。臭化水素酸スコポラミンは、東京化成工業製の特級品を標準品として用いた。ブルシン、リン酸二水素カリウム、トリエチルアミンはキシダ化学、リン酸は和光純薬工業、アンモニア水(28%)はナカライテスク製の特級品を用いた。メタノールはキシダ化学製のHPLC用を用いた。HPLC用アセトニトリルは和光純薬工業製を用いた。

精製カラムは、ボンドエルート LRC SCX 100 mg (バリアン製)を用いた。

2.3 装置

2.3.1 HPLC 及び分析条件

島津製作所のシステムコントローラー SCL-10A, ポンプ LC-10AD, 検出器 SPD-10A, デガッサー DG U-3A, カラム恒温槽 CTO-10A, データ処理装置 C-R7A plusを用いた。

分析条件は、以下の方法(日本薬局方ロートコンの定量法に準ずる)で行った。

カラム: TSKgel ODS-80T_M (3.9φ×150 mm, 5 μm, 東ソー)

検出器: UV 210 nm

カラムオープン温度: 40℃

移動相: 1%トリエチルアミン-50mM リン酸水素一カリウム(pH 3.5): アセトニトリル (9:1)

流速: 1.0 mL/min.

注入量: 20 μL

2.3.2 GC/NPD

ヒューレットパッカー HP5890 series II (オートインジェクター ヒューレットパッカー 7673 付き)

分析条件

カラム: HP-1 (0.25mm I.D.×30m, 0.25 μm film, アジレント)

カラム温度: 160℃で2分間保持, その後毎分30℃で

290℃まで昇温し, 290℃で3分間保持する。

注入口温度: 250℃

検出器温度: 290℃

キャリアーガス: ヘリウム

流速: 1.5mL/min.

注入量: 1 μL (スプリットレス)

2.3.3 ホモジナイザー

マイクロテック・ニチオン社ヒスコトロン NS50 を用いた。

2.4 試料溶液及び標準溶液の調製

2.4.1 ハシリドコロ植物体

図1に示すように、試料を細切してその1gを遠心管に秤取し、メタノール15mLを加え高速ホモジナイザーにより15,000~20,000 rpmで5分間ホモジナイズした。ホモジナイザーは水5mLで洗浄し洗液は試料液に合わせ、4,500 rpmで5分間遠心分離を行い、上澄液を50mLメスフラスコに分取した。更に残渣にpH 5.5の100mM リン酸水素一カリウム溶液(以下リン酸緩衝液と言う)15mL加え、15,000~20,000 rpmで3分間ホモジナイズした。4,500 rpmで5分間遠心分離後、上澄液を先の50mLメスフラスコに取り、リン酸緩衝液を加えて50mLとした。30分静置し、上澄液1mLをあらかじめメタノール5mL、リン酸緩衝液2mLで洗浄したBOND ELUT LRC SCX 100 mgに毎分2mL以下の速度で通した。次にカラムを水2mL、メタノール5mLで洗浄した後、2%アンモニア水含有アセトン2mLにより、流速を毎分約0.5mLでアトロピン、スコポラミンを溶出させた。溶出液を40℃以下で減圧乾固し、ブルシン(内標準)を20mg/L含む移動相1mLに溶解し、3,000 rpmで5分間遠心分離し、その上澄液を試料溶液とした。

標準溶液は、アトロピン、スコポラミンが各1,000 μg/mLになるようメタノールで溶解し、各溶液を等量混合し混合標準原液とした。混合標準原液を移動相で希釈し、また内標準物質であるブルシンを20mg/Lになるよう混入し、標準溶液を調製した。

2.4.2 血清

血清2mLに対しリン酸緩衝液4mLを加え混和した溶液を、あらかじめメタノール5mL、リン酸緩衝液2mLで洗浄したボンドエルート LRC SCX 100 mgに通し、以下ハシリドコロ植物体と同様に操作した。ただし、減圧乾固後の溶解液は、メタノール0.5mLとした。

標準溶液は、混合標準原液をメタノールで希釈して調製した。

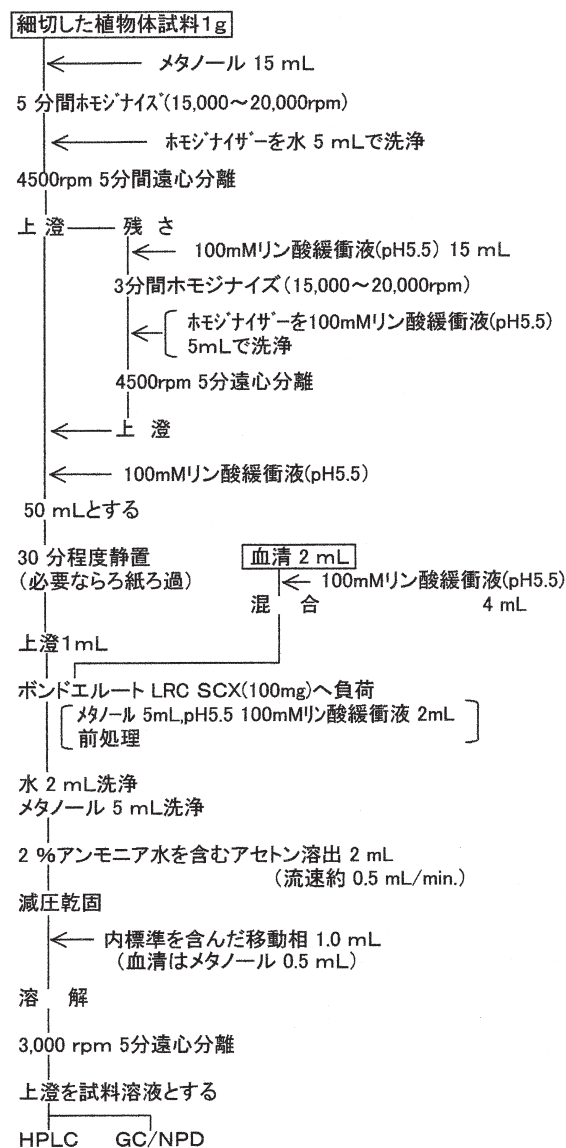


図1 抽出フロー

2.5 精製カラムに対するメタノールの吸着限度

植物体の抽出溶液はメタノールを30%含有する。このため5~40%のメタノールを含有するリン酸緩衝液を用いて、アトロピン、スコポラミン各20 mg/Lの試料を調製し、その1 mLを精製カラムに通しメタノールによる精製カラムへの吸着阻害について検討した。

2.6 精製カラムからの溶出液の検討

精製カラムからの溶出液にはアンモニア水を含むアセトンを用いたが、アンモニア水の濃度及び溶出容量について、アトロピン、スコポラミン各500 ng/mLを含むリン酸緩衝液2 mLを試料とし検討した。アンモニア水の濃度は1%及び2%とし、測定はHPLC法

で行った。ただし、内部標準物質であるブルシンの濃度は1 mg/Lとした。

2.7 添加回収試験及び検出限界

植物体の場合は、葉、茎、根それぞれ1 gにアトロピン、スコポラミンを各0.5 mg添加し、各試料について3回のくりかえし添加回収試験を行いその平均値を算出した。検出限界は、日本薬局方参考情報の分析法バリデーションの項に示す方法(スロープ法)⁹⁾により算出した。

血清の場合は、血清2 mLにアトロピン、スコポラミンをそれぞれ100 ng添加し、3回のくりかえし添加回収試験を行った。検出限界はS/N比3として算出した。

3 結果及び考察

3.1 抽出操作

ホモジナイズに用いる溶媒は、リン酸緩衝液のみで行った場合、葉が十分に破碎されず、抽出効率が低下することが懸念されたため、1回目のホモジナイズはメタノールで行った。

陽イオン交換カラムには、弱イオン交換と強イオン交換のタイプがあるが、アトロピンはイオン強度が比較的高く、スコポラミンのそれは低い方であるため、両物質を吸着させるためには強イオン交換タイプを用いる必要がある。よってベンゼンスルホン酸をイオン交換基に持つカラムを選択した。また、アトロピンは強イオン性であるため、溶出溶媒のpHをかなり高く設定しなければならないが、水酸化ナトリウム等の強アルカリを使用するとエステル結合が分解する恐れがあり、また除去の容易性を考え、溶出溶媒のpH調製にはアンモニア水を用いた。

更に、溶出溶媒に用いる有機溶媒としては、酢酸エチル、アセトン、メタノール等の溶媒が考えられたが、酢酸エチルでは、アトロピンの溶出が不完全であり、また、メタノールでは夾雑物の溶出が多かった。アセトンでは、アトロピン、スコポラミンの溶出も良好で、夾雑物の溶出も比較的少なかったため、この溶媒を使用した。

3.2 精製カラムに対するメタノールの影響

メタノール等の有機溶媒が存在するとイオン化が抑制されるため、イオン交換カラムへの吸着が阻害される可能性がある。そこで、リン酸緩衝液中に含まれるメタノールの影響について検討したところ、精製カラムへの吸着阻害は、メタノール濃度40%まで認められなかった(図2)。更に、リン酸緩衝液のpHは5.5

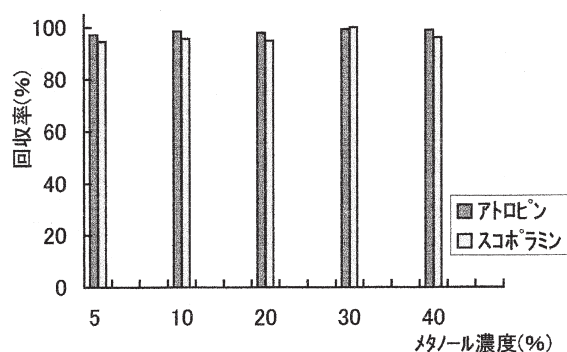


図2 メタノール濃度による回収率への影響

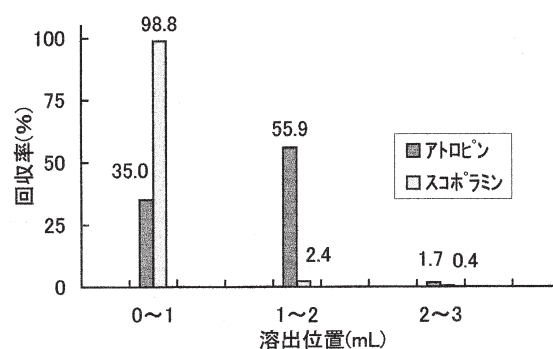


図3 精製カラムからの溶出 (アンモニア水1%-アセトン)

に設定したが、これはアトロピン、スコポラミンのpKa値がそれぞれ9.9, 7.6であることから、両物質を理論上ほぼ100%解離させ得るpH値を選定したためである。メタノールを混入しないで使用する血清の場合は、夾雑物の解離を出来る限り抑制するために、pH値をさらにアルカリ側に移動できる可能性がある。しかし、今回の分析法では、迅速簡便に行えることに重きを置いているため、血清用に新たな緩衝液を検討することは行わなかった。

3.3 溶出溶媒のアンモニア水濃度及び溶出容量

アンモニア水濃度1%の場合、スコポラミンは1 mLまでの溶出容量に99.8%が溶出され、2 mLまでにほぼ100%溶出された。アトロピンについては2 mLまでに90.9%が溶出されたが、3 mLにおいても1.7%溶出した(図3)。一方、アンモニア水濃度2%では、スコポラミン、アトロピン双方共1 mLまでに各々100.8%, 96.3%溶出され、2 mLでほぼ100%溶出された(図4)。この結果から、溶出溶媒のアンモニア水濃度は2%とし、溶出容量は2 mLとした。

3.4 GC/NPD条件

アトロピンはイオン性が強く吸着を起こしやすい物質であるため、カラムは無極性のジメチルポリシロキサンを100%液相に用いたHP-1を用い、また、昇温

条件は初期温度160℃と比較的高く設定し、温度上昇率も毎分30℃と高くした。50~400 ng/mLにおける、各濃度3回の平均値による検量線(図5)では、Y切片が負の値となっており、カラムへの吸着が起こっているものと推察されるが、相関係数はアトロピン、スコポラミン共に0.999であり直線性は良好であった。

3.5 添加回収試験及び検出限界

3.5.1 ハシリドコロ植物体

茎での添加回収率は、アトロピンが92.2%, スコポラミンが92.6%であり若干低い値となったが、他の部位での回収率については、96%以上であり、良好な結果であった(表1)。茎については、ホモジナイズ後の遠心分離において、葉、根に比べて多少沈澱物と溶媒との分離が悪かったため、上澄液の採取が完全に行えなかった可能性がある。遠心分離時間の延長

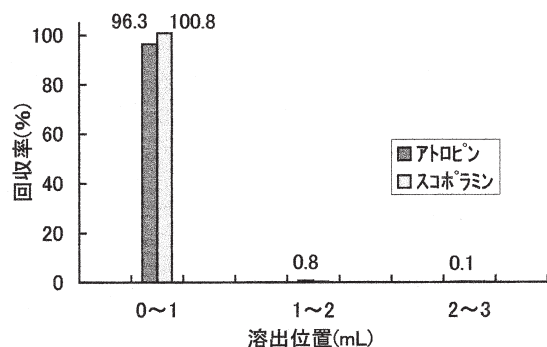


図4 精製カラムからの溶出 (アンモニア水2%-アセトン)

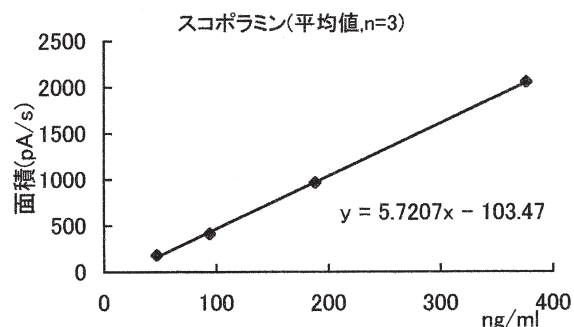
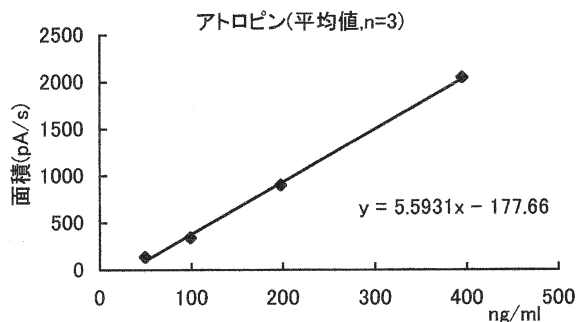


図5 検量線 (GC/NPD)

表1 植物体添加回収率

		アトロピン (0.49mg添加)			スコポラミン (0.47mg添加)		
		回収率 (%)	平均 (%)	C.V. (%)	回収率 (%)	平均 (%)	C.V. (%)
葉	1	97.75	98.5	0.8	99.08	99.6	0.6
	2	98.46			99.48		
	3	99.34			100.34		
茎	1	98.35	92.2	6.2	90.41	92.6	3.6
	2	91.11			96.39		
	3	87.08			90.89		
根	1	94.02	96.6	2.5	99.08	99.3	0.2
	2	98.64			99.46		
	3	97.23			99.22		

表2 血清添加回収率

No	アトロピン 98.7ng/2mL血清		スコポラミン 100.0ng/2mL血清	
	ng/2mL血清	回収率 (%)	ng/2mL血清	回収率 (%)
1	97.88	99.17	94.15	94.15
2	100.50	101.82	95.70	95.70
3	110.91	112.37	108.41	108.41
平均値	103.09	104.5	99.42	99.4
CV (%)	—	6.68	—	7.87

等今後検討する必要がある。検出限界は、アトロピンが $1.1 \mu\text{g/g}$ 、スコポラミンが $0.68 \mu\text{g/g}$ であった。

3.5.2 血清

血清におけるアトロピン、スコポラミンの平均回収率はそれぞれ 104.5 %、99.4 % であり、良好な結果であった (表2)。検出限界は、血清 1 mL あたりアトロピンが 30 ng、スコポラミンが 15 ng であった。Hayden P. W. ら⁷⁾ 及び Berghen L. ら⁸⁾ は、アトロピンの治療目的の静脈注射投与における血漿中濃度は、数 ng/mL へと急速に減少し、その後緩やかに減少すると報告している。また、アトロピンの中毒量は成人において 10~60 mg であると報告されている¹⁾ ことから、中毒時の摂取量を 10 mg と仮定したとき、アトロピンの血清中濃度はおおよそ数十 ng/mL 程度になると概算される。このため中毒時を想定した場合、この程度の分析感度は必要と考えられるが、今回の血清分析法を用いた場合、十分ではないが食中毒時の原因物質特定に用いることは可能であると考えられる。

今回検討した分析方法より高感度な血液分析法としては、Xu A. らによる LC/MS/MS 法¹⁰⁾ (L-ヒヨスチアミン)、Koprda V. らによる GC/MS 法¹¹⁾ (アトロピン、スコポラミン) 等があり、これらの分析法での検出限界は、血漿 1 mL あたり数 pg~数 ng と報告

されている。しかし、操作が複雑であり簡便な方法とはいえない。また、GC/NPD を用いた方法としては、Holstege D. M. らによるアルカロイドのスクリーニング法 (アトロピン等)¹²⁾ があるが、アトロピンの検出限界が血清 1 mL あたり 100 ng であり、血清分析には感度不足であると考えられる。今後更に検出感度の向上等の課題を残すものの、今回検討した試験方法を用いれば、食中毒時の血清中アトロピン、スコポラミンの分析の迅速簡便法として有用であると考えられる。

4 総 括

ハシリドコロ植物体あるいは、中毒患者血清中のアトロピン、スコポラミンの定量法について検討した。精製カラムとしてボンデルエルト LRC SCX を用いることにより、従来の溶媒抽出法に比べて迅速な分析が可能となり、回収率も良好であった。また、血清分析における検出限界は、アトロピン、スコポラミンで各々 30 ng、15 ng (血清 1 mL あたり) であり、食中毒時における原因究明のため有用であると考えられる。

謝 辞

植物体採取に協力いただいた岐阜地域保健所本巣山

県センター衛生課に、また血液採取に協力いただいた
岐阜地域保健所健康増進課に感謝いたします。

文 献

- 1) 日本薬学会編, 薬毒物化学試験法と注解, 205-210, 南山堂, 1992.
- 2) 日本薬学会編, 衛生試験法・注解 2000, 247-249, 金原出版, 2000.
- 3) Lin L. A. : Detection of alkaloids in foods with a multi-detector high-performance liquid chromatographic system. *J. Chromatogr.*, **632**, 69-78, 1993.
- 4) 矢部薫, 遠藤敦史, 飴野清, 福家千昭, 飴野節子, 霧生孝弘, 篠原豊彦, 井尻巖 : 尿中薬物量からの投与量推定, 法医学の実際と研究, **34**, 161-165, 1991.
- 5) Whelpton R., Hurst P. R., Metcalfe R. F., Saunders S. A. : Liquid chromatographic determination of hyoscine (scopolamine) in urine using solid phase extraction, *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 198-204, 1992.
- 6) 宮武ノリエ, 重岡捨身, 寺島潔, 長島真知子, 上原真一, 秋山和幸 : 高速液体クロマトグラフィーによる胃腸薬中のヒヨスチアミンの定量, 東京衛研年報, **41**, 47-50, 1990.
- 7) Hayden P. W., Larson S. M., and Lakshminarayanan S. : Atropine clearance from human plasma, *J. Nucl. Med.*, **20**, 366-367, 1979.
- 8) Berghem L., Bergman U., Schildta B., Sorbo B. : Plasma atropine concentrations determined by radioimmunoassay after single i.v. and i.m. administration, *Br. J. Anaesth.*, **52**, 597-601, 1980.
- 9) 厚生労働省第十四改正日本薬局方参考情報 14 分析法バリデーション, 1249
- 10) Xu A., Havel J., Linderholm K., Hulse J. : Development and validation of an LC/MS/MS method for the determination of L-hyoscyamine in human plasma, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **14**, 33-42, 1995.
- 11) Koprda V., Bohov P., Smisterova J., Bohacik L. : Methods of assessment of atropine and scopolamine levels in transdermal permeation. *J. Radioanal. Nucl. Chem.*, **188**, 439-451, 1994.
- 12) Holstege D. M., Seiber J. N., Galey F. D. : Rapid multiresidue screen for alkaloids in plant material and biological samples, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 691-699, 1995.

Analysis of Atropine and Scopolamine in *Scopolia japonica* and Human Serum Using Solid Phase Extraction

Hiroyuki TADA, Kouichi SHIRAKI, Isao YOSHIDA, Ken-ichi NAKAYA, Munekazu IINUMA

*Gifu Prefectural Institute of Health and Environmental Sciences : 1-1, Naka-fudogaoka,
Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan*