

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2019

課題番号：16K09146

研究課題名（和文）毛髪・爪中ニコチンおよびコチニンを用いた受動喫煙暴露の長期的評価法の開発

研究課題名（英文）Development of long-term evaluation method for secondhand smoke exposure using nicotine and cotinine in hair and nails

研究代表者

安田 誠（YASUDA, MAKOTO）

帝京大学・薬学部・講師

研究者番号：00361965

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、受動喫煙暴露を長期的に評価するため、非侵襲的な試料である毛髪・爪中のニコチンおよびコチニン分析法の開発を目指した。毛髪・爪を溶解した試料中のニコチンおよびコチニンを前処理して抽出し、「HPLCポストカラム光照射蛍光検出法」において分析した。前処理で除けない夾雑成分とニコチンおよびコチニンの分離改善を目指して「逆相（イオンペア法）」、「逆相+陽イオン交換」、「HILIC」などの分離モードを検討し、保持の調節幅が広い「HILIC」モードに決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

毛髪および爪を溶解した試料中には夾雑成分が大量に存在しているため、前処理として行う液液抽出では夾雑成分の混入が問題となった。そこで、液相の比重を調節して常に上層からピペットで吸引する方法を開発し、操作手順による混入を防止することに成功した。

また、HPLC条件のpHではニコチンは一価または二価の陽イオン、コチニンは一価の陽イオンまたは分子形であり、pHが光誘導体化反応の効率にも大きく影響していることが明らかとなった。光誘導体化反応については未解明の部分も多く、高感度検出のための条件検討において重要な知見が得られたものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a long-term evaluation method for secondhand smoke exposure. Non-invasive hair and nail samples were used for nicotine and cotinine analysis. Nicotine and cotinine in hair or nail dissolved samples were extracted by pretreatment. The analysis was performed by HPLC with fluorometric detection and postcolumn UV-photoirradiation system.

Since some contaminants could not be removed by pretreatment, separation modes were investigated to improve separation from nicotine and cotinine, and HILIC mode with broad retention was selected.

研究分野：分析化学

キーワード：前処理 分離調節 ニコチン コチニン HPLC HILIC

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

喫煙による健康被害は世界規模での問題であり、日本でも喫煙者に対する禁煙指導や禁煙補助薬（ニコチンパッチおよびバレニクリン）が保険適用となった。一方の非喫煙者における受動喫煙についても健康被害が明らかになっていることから、より深刻な影響を受ける乳幼児、未成年者、妊産婦を環境たばこ煙から守るための社会全体の対策として健康増進法や受動喫煙防止条例などが制定されて、禁煙指導、喫煙場所の制限や分煙が行われてきた。

受動喫煙量の評価は尿中に排泄されたニコチンの主要代謝物であるコチニンを ELISA 法で測定して行われている。尿中コチニンの半減期は 30 時間程度と長いため、受動喫煙が成立してから数日から一週間程度は測定可能である。しかし、暴露状況を長期的に把握するためには尿試料の継続的な採取が必要とされるため、調査対象者への負担が増加することが予想される。

そこで、長期的な暴露状況を把握できる試料として、法医学分野で広く用いられている毛髪および爪に着目した。どちらの場合もニコチンおよびその代謝物が移行することが既に報告されており、毛髪は1ヶ月に約 1 cm、爪は1ヶ月に約 0.3 cm (手指) または約 0.1 cm (足趾) 伸びるとされることから、長期的な評価に適していると考えられる。

当研究室では、「HPLC ポストカラム光照射蛍光検出法」を用いた喫煙者の体内ニコチンおよびコチニン濃度を測定する独自の方法を開発・報告してきたことから (Yasuda 他, *J. Chromatogr. B* 2013, 934: 41-45.)、本研究で目的とする『毛髪・爪中ニコチンおよびコチニンをを用いた受動喫煙暴露の長期的評価法の開発』を達成することが、従来法の改良と毛髪および爪試料への適用によって可能になると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究では、毛髪および爪に移行したニコチンおよびコチニンを測定対象とすることで、受動喫煙暴露の長期的評価を指向した高感度分析法の確立を目的としている。当研究室では独自の「HPLC ポストカラム光照射蛍光検出法」を開発・報告しており、さらなる高感度化と毛髪および爪試料への適用によって、受動喫煙量を評価できると期待される。また、受動喫煙の実態が明らかになれば、健康への意識を高めることになるため、非常に意義深いものである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試薬・試料の前処理

標準品としてニコチンおよびコチニン、内標準物質として *N*-エチルノルコチニン (NENC) を用いた。毛髪および爪 (手指、足趾) は非喫煙者より得た。標準品、試料、標準添加試料についての前処理は強塩基性条件で溶解し、有機溶媒への抽出と水相への逆抽出を利用した液液抽出により行った。また、珪藻土カラムを利用した液液抽出法も検討した。

#### (2) HPLC 装置

HPLC ポストカラム光照射蛍光検出に用いた装置構成は、送液ポンプ-オートサンプラー-カラム-光反応器-蛍光検出器-データ処理装置である (図 1)。島津製作所製の LC-20A システムを基本とし、紫外線照射用の光反応器はカラムからの配管 (ETFE チューブ、内径 0.1 mm、長さ 10 m) を殺菌灯 2 本に巻きつけて作製した。蛍光検出器は高感度化に対応するためセミマイクロフローセルを採用した。

カラムは、「逆相 (イオンペア法)」、「逆相+陽イオン交換」、「HILIC」などの分離モードに対応したものを検討し、移動相はカラムの特性に合わせて調製した。

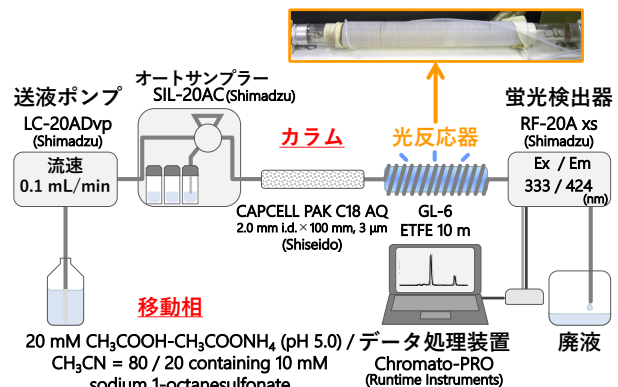


図 1 HPLC ポストカラム光照射蛍光検出装置

### 4. 研究成果

#### (1) 検出感度に対する pH の影響

HPLC の移動相 pH が検出感度に影響するか検討した結果、ニコチンは pH 5 から 7 で感度が高く、pH 5 以下および pH 7 以上では感度が低下した。一方、コチニンおよび NENC は pH 低下とともに感度が増加する結果となった (図 2)。ニコチンとの違いは、酸化による構造変化のため解離基が 1 つ失われて  $pK_a$  が 1 つになっていることが原因ではないかと推察された。

このため、ニコチンとコチニンの pH による解離状態の変化を、構造式描画プログラム (MarvinSketch) にて作図して比較した (図 3)。その結果、どちらも一価の陽イオンとなる pH 条件において検出感度が増加していることが明らかとなった。光誘導体化反応については未解明の部分も多く、高感度検出のための条件検討において重要な知見が得られたものと考えられる。

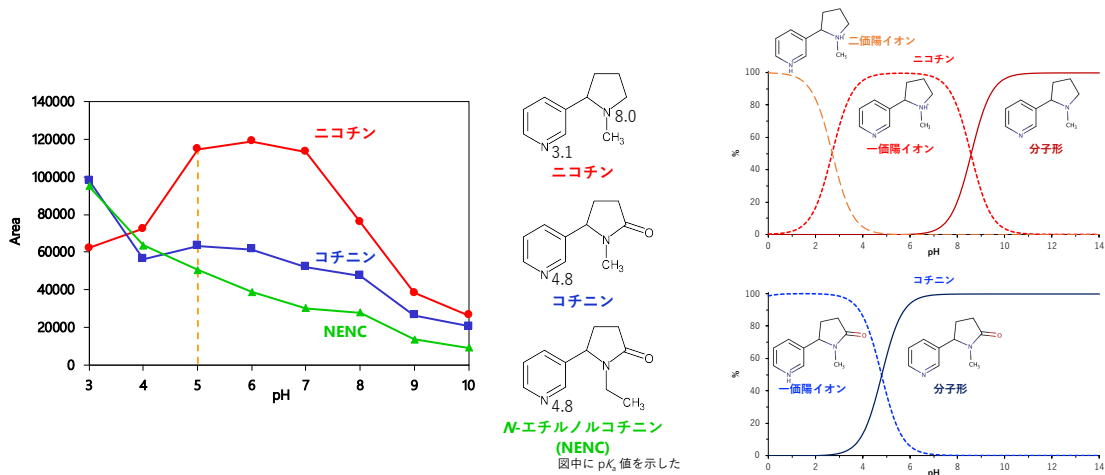


図2 検出感度に対する pH の影響 (左)、構造式と  $pK_a$  (右) 図3 pH による解離状態の変化  
ニコチン (上)、コチニン (下)

### (2) 前処理 (液液抽出) による夾雑成分の除去

ニコチンは揮発性のため乾固を伴うような前処理法は利用できない。すなわち、濃縮のために溶媒を揮発させようとするニコチンも揮発して失われるために測定できなくなる。本研究では塩基性で分子形としたニコチンおよびコチニンを有機溶媒に抽出する液液抽出を採用した (図3参照)。一旦有機溶媒に抽出することで、水溶性化合物、酸性化合物、両性化合物を水相に留めて除去できると考えられる。その後、分け取った有機溶媒相に塩酸を加えると、ニコチンおよびコチニンはイオン形となって水相に移行させることができる。このとき用いる水相の量を調整することで濃縮が可能となった。

毛髪および爪を水酸化ナトリウム水溶液で溶解した試料を用いたところ、分析を妨害する成分 (夾雑成分) が大量に存在するため、有機溶媒相の分注操作に用いるピペットチップへのわずかな水相の付着ですら分析に影響する結果となった。そこで、初期の水相の液量を増加して夾雑成分を希釈して除去するとともに、有機溶媒相の比重を変化させて上層とすることで、分注操作中に夾雑成分に触れることなく操作できるように改良を重ねた (図4)。この方法は夾雑成分が除去できる反面、操作が煩雑となるため、同じく液液抽出を原理とする珪藻土カラムを利用する方法へと応用し、効率化を行った。

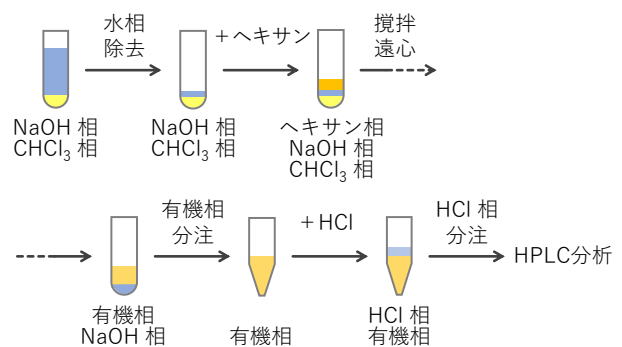


図4 前処理 (液液抽出) による  
夾雑成分の除去

### (3) 新たな分離モードの検討

前処理によって多くの夾雑成分を除くことに成功したが、性質の類似した化合物は前処理では除去できないため、移動相組成を調節して分離できるか検討した。しかし、ニコチンやコチニンの挙動に合わせるように夾雑成分も移動したため、移動相の調節だけでは分離できないと結論した。そこで新たな分離モードとして、「逆相+陽イオン交換」を検討した結果、各種官能基について、イオン形のニコチンの保持が弱いか、あるいは強すぎて溶出に時間を要す結果となり、分析に適した保持時間に調節することは不可能であった。保持機構の異なる逆相カラムではピークのテーリングが解消できなかった。ここまでは逆相分配モードを基本として検討したが、親水性相互作用による保持を利用した HILIC モードを検討した。HILIC モードでは、NENC、コチニン、ニコチンの順に溶出し、これは親水性のものほど保持する結果となった。この場合、移動相組成の水相と有機溶媒相の比率を調節することで全体的な保持時間を変化させることが可能であった。また、pH の調節によってもそれぞれの化合物のイオン形の比率が変化することで保持時間が変化した。ただし、単一の移動相組成では同時分析を行うためには保持時間が長くなりすぎるため、送液ポンプを1台増設し、2種類の移動相を用いたグラジエント溶出に対応することにした。これによって、保持時間の調節と感度に影響する pH の調節の両立が可能となったことで、同時分析法の確立に向けて前進したと考える。

本研究成果では、目標とする受動喫煙暴露の長期的評価法の開発には至らなかったが、研究期間中、多くの困難な課題を解決し新たな知見を得ており、応用に向けて発展させる必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 安田 誠, 佐藤 優, 馬渡 健一, 福内 友子, 山岡 法子, 金子 希代子, 中込 和哉, 奥 直人
2. 発表標題 ニコチンおよびコチニンの各種カラムによる分離検討
3. 学会等名 日本薬学会 第139年会（千葉）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田誠、桐生茉穂、梅田夕佳、佐藤優、永村尚吾、馬渡健一、福内友子、山岡法子、金子希代子、中込和哉、奥直人
2. 発表標題 HPLC 蛍光検出法による非侵襲試料中ニコチンおよびコチニンの同時分析法の開発
3. 学会等名 第31回 バイオメディカル分析科学シンポジウム（BMAS2018）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Yasuda, Maho Kiryu, Yuuka Umeda, Yu Sato, Shogo Nagamura, Tomoko Fukuuchi, Noriko Yamaoka, Ken-ichi Mawatari, Kiyoko Kaneko, Kazuya Nakagomi, and Naoto Oku
2. 発表標題 DEVELOPMENT OF ANALYTICAL METHOD FOR NICOTINE AND COTININE IN NAIL SAMPLES BY HPLC
3. 学会等名 国際トリプトファン研究会（ISTRY2018）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 桐生 茉穂、高橋 さやか、安田 誠、馬渡 健一、福内 友子、山岡 法子、金子 希代子、中込 和哉
2. 発表標題 爪試料中ニコチン及びコチニンの光誘導体化HPLC 蛍光検出法による分離検討
3. 学会等名 第30回バイオメディカル分析科学シンポジウム（BMAS 2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 梅田 夕佳、桐生 茉穂、高橋 さやか、安田 誠、馬渡 健一、福内 友子、山岡 法子、金子 希代子、中込 和哉
2. 発表標題 爪試料中ニコチン及びコチニンのHPLC蛍光検出における前処理条件の検討
3. 学会等名 新アミノ酸分析研究会第7回学術講演会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安田 誠、梅田 夕佳、桐生 茉穂、高橋 さやか、馬渡 健一、福内 友子、山岡 法子、金子 希代子、中込 和哉
2. 発表標題 爪試料中ニコチン及びコチニンの光誘導体化HPLC蛍光検出法による分析
3. 学会等名 第38回日本トリプトファン研究会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 安田 誠、梅田 夕佳、桐生 茉穂、高橋 さやか、馬渡 健一、福内 友子、山岡 法子、金子 希代子、中込 和哉
2. 発表標題 蛍光検出HPLC による非侵襲試料中ニコチンおよびコチニンの同時分析法の開発
3. 学会等名 日本薬学会第138年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋さやか、高橋秀明、安田誠、馬渡健一、福内友子、山岡法子、金子希代子、中込和哉
2. 発表標題 毛髪中ニコチン及びコチニン分析における前処理法の検討
3. 学会等名 第22回 LCテクノプラザ
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	高橋 さやか  (TAKAHASHI Sayaka)		
研究協力者	梅田 夕佳  (UMEDA Yuuka)		
研究協力者	桐生 茉穂  (KIRYU Maho)		
研究協力者	佐藤 優  (SATO Yu)		
研究協力者	八束 香奈江  (YATSUZUKA Kanae)		
研究協力者	藤岡 裕香  (Fujioka Yuka)		