衛生化学
EISEI KAGAKU
27(2) 116-118 (1981)

高速液体クロマトグラフィーによるトルエン吸入者の尿中馬尿酸の定量

神津 公, 赤沼一弘

長野県警科学捜査研究所

High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Hippuric Acid in Human Urine from a Person inhaled Toluene

TADASHI KOZU and KAZUHIRO AKANUMA

Scientific Investigation Research Laboratory, Nagano Prefectural

Police Headquarters, 1-6-15, Miwa, Nagano

(Received November 26, 1980)

Hippuric acid in the human urine was determined by high-performance liquid chromatography with a UV detector by use of stainless column (4.0 mm×0.15 m) packed with Nucleosil C_{18} . Mobile phase was H_2O -methanol (80:20), adjusted to pH 3.0 with H_3PO_4 . The sample solution was extracted with ethyl acetate after adjusting to pH 1.0 with 6N HCl. Determination was carried out successfully by using vanillic acid as an internal standard and by maintaining the temperature at 40°. The recovery of hippuric acid from aqueous solution (0.5 mg/ml) was $96.0 \pm 1.5\%$. The contents of hippuric acid detected in samples from suspected persons of toluene inhalation were 4.83, 16.01, 2.48 and 6.41 mg/ml, respectively.

Keywords—high-performance liquid chromatography; reserved phase liquid-liquid chromatography; hippuric acid; vanillic acid; toluene

ま え が き

有機溶剤を吸入し、その急性中毒症状を楽しむいわゆるシンナー遊びが依然として流行しているなかで、その行為の裁判化学的証明を目的として特にトルエン吸入者の尿中代謝産物である馬尿酸の定量法について検討を行った。

尿中馬尿酸の定量法としては、薄層クロマトグラフィーによる方法¹⁾、細管式等速電気泳動分析装置による方法²⁾、比色法³⁻⁵⁾ならびにガスクロマトグラフィーによる方法^{4,6)}などが報告されているが、これらの方法は、それぞれすべて、鋭敏性、迅速性、特異性ならびに誘導体作製の煩雑化などのいずれかに問題があり、必ずしも良い方法とはいえない。一方、これらの方法に比較して単純、迅速、特異性などの特徴を有する高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による方法⁷⁻¹¹⁾が報告されている。

今回、著者らは、緒方らによる方法⁹⁾に準じて尿中馬尿酸のみについて再検討を行い実例についても良い結果が得られたので報告する。

実 験 の 部

液体クロマトグラフィー条件 装置—島津高速液体クロマトグラフ LC-3A 型; カラム—Nucleosil C_{18} 4.0 mm×0.15 m; カラム温度—40°; 移動相— H_2O 80/メタノール 20 (リン酸で pH=3.0 に調整); 移動相流量—1.0 ml/min; カラム内圧—120 kg/cm²; 検出器—UV 検出器 SPD-1 型 (254 nm); 感度 (range)— 64×10^{-2} ; 定量装置—クロマトパック R-1A。

検量線作成のための標準液の調整 馬尿酸標準液—馬尿酸 (純度 100.4%) 50 mg をメスフラスコにとり、メタノールを加えて溶解し、全量を 50 ml とした。この溶液、2, 4, 6, 8, 10 ml をそれぞれメスフラスコにとり、メタノールを加えて全量を 10 ml とした。

バニリン酸溶液 (内部標準)—バニリン酸 10 mg をメスフラスコにとり、メタノールを加えて溶解し、全量を 25 ml とした。

試料の分析法 尿 1 ml を共栓付 10 ml 遠心管に採取し、6N HCl 2 滴を加えて酸性 (pH=1) にし、酢酸エチル 2 ml を加えて 5 分間振とうしてから、3000 rpm

で5分間遠心分離して酢酸エチル層をナシ型フラスコに採取した。この抽出をさらに2回行い、抽出液を合した後、エバポレーターで蒸発乾固してから内部標準溶液1 mlを加えて溶解し、その10 μ lをHPLCに注入した。

ガスクロマトグラフィー化学イオン化質量分析 (GC-MS) の測定条件 装置—Finnigan 3300型；カラム—1.5% SE-30/Chromosorb W (AW-DMCS) 80—100メッシュ, 2.0 mm $\times$ 1.5 m ガスカラム；カラム温度—150°；試料注入口温度—190°；反応ガス—メタン (1 Torr)；電子衝撃エネルギー—110 eV；イオン化電流—500 μ A。

結果と考察

I HPLCの分離条件について

HPLCによる馬尿酸の分析法については、Ogata らにより、カラムに Li Chrosorb RP18 を用い、メタノール・水・酢酸 (20/80/0.2) 混液で溶出させる方法⁷⁾ Li Chrosorb SI 100 を用い、*n*-ヘキサン・クロロホルム (25/75) 混液で溶出させる方法⁸⁾ および Nucleosil C_{18} を用い、アセトニトリル・水・酢酸 (5/95/0.02) で溶出させる方法⁹⁾ が報告されている。また、Matsui ら¹⁰⁾ は、Bondapak C_{18} を用い、メタノール・0.01M K_2HPO_4 ・酢酸 (20/80/0.5) 混液で溶出させる方法を報告している。さらに、Astier ら¹¹⁾ は、Partisil ODS-2 を用い、1%酢酸溶液・アセトニトリル (4/1) で分離する方法を報告している。

今回、われわれは、Ogata らの方法⁹⁾ に準じて、Nucleosil C_{18} を用いて尿の妨害成分と馬尿酸の完全分離を目的として実験を行った。

まず、移動相溶媒については、その経済性を考慮して水とメタノールの混液について検討を行った。最初に、馬尿酸の溶出時間とピークの形状を考慮して水とメタノール混液の混合比率について10, 20, 30% (v/v) メタノール溶液で検討を行った結果、20% (v/v) が適当であった。

溶出液の液性については、リン酸を用いて pH を 2.2, 3.0, 5.0 に調整して検討を行ったところ、pH=3.0 が適当であった。

カラム温度については、30, 40, 50° で検討を行った結果、いずれの温度においても分離は良好であったが、馬尿酸の t_R を考慮して 40° を適当と認めた。

内部標準物質については、benzoic acid, β -indole acetic acid, β -indole propionic acid, β -phenylethylamine-HCl, ascorbic acid, vanillin, vanillic acid, *p*-nitroaniline, *p*-nitrophenol の範囲内で検討した結果、馬尿酸と完全に分離し、ピークの形状が良好な vanillic

acid を選定した。

以上のとおり、馬尿酸と他の尿中妨害成分が完全に分離する条件を選定したが、この場合の馬尿酸の理論段数は 2890, バニリン酸のそれは 4230 で両者の分離度 (R_s) は 6.62 と良好であった。

II 検量線

各馬尿酸標準液 1 ml を 10 ml のナシ型フラスコにとり、エバポレーターを用い蒸発乾固した後、内部標準溶液 1 ml を加えて溶解し、この 10 μ l を HPLC に注入してクロマトパックより得られたクロマトグラムの積分値から、両者の面積比を算出して検量線を作成したところ、0.2—0.8 mg/ml の範囲内で原点を通り直線性を示した。

III pH 変化による回収率の検討

尿中馬尿酸の分析法としては、尿を直接注入する方法⁷⁾ 溶媒抽出法⁸⁻¹⁰⁾ 1N 酢酸溶液で希釈して直接注入する方法¹¹⁾ などが行われているが、今回の実験においては、カラムの汚染と劣化防止のため溶媒抽出法を用いた。

回収実験においては、水 1 ml に馬尿酸を 0.3, 0.5, 0.7 mg 添加した試料について、それぞれ 6N HCl で pH を 1 および 3 に調整した後、前述の分析法に従ってその回収率を求めたところ、いずれも 6 回の平均値で良好な成績が得られ、両者の間に有意差は認められなかったが、本実験では pH=1 に調整して抽出を行った (Table I)。

TABLE I. Recovery of Hippuric acid from aqueous Solution at pH 1 or 3

Added hippuric acid (mg)	pH	Found (mg)	Recovery (%)
0.3	1	0.292 $\pm$ 0.005	97.2 $\pm$ 1.6
0.3	3	0.285 $\pm$ 0.008	95.1 $\pm$ 2.7
0.5	1	0.480 $\pm$ 0.007	96.0 $\pm$ 1.5
0.5	3	0.484 $\pm$ 0.006	96.7 $\pm$ 1.2
0.7	1	0.682 $\pm$ 0.008	97.4 $\pm$ 1.1
0.7	3	0.688 $\pm$ 0.015	98.3 $\pm$ 2.2

また、尿の場合の検量線は水のそれと平行となり、その回収率は pH=1 において、その 6 回の測定値より、0.3 mg で 95.7 $\pm$ 3.3%, 0.5 mg で 95.9 $\pm$ 2.6%, 0.7 mg で 94.9 $\pm$ 1.8% であった。

IV 鑑定例

本年、長野県下でトルエンを溶媒として用いているゴム糊を袋に入れて吸入したヒトの尿について馬尿酸の含有量を測定したところ、Fig. 1 のようなクロマトグラム (Table II の 1) が得られた。また、同様の種類の試

Fig. 1. Chromatogram of the Extract of Urine from a Suspected Person of Toluene Inhalation

1: hippuric acid, 2: vanillic acid.

Operating conditions: column, Nucleosil $5C_{18}$ (4.0 mm $\times$ 0.15 m): mobile phase, methanol 20/H₂O 80: column temp. 40°: flow rate, 1.0 ml/min. (pressure, 120 kg/cm²): detector, UV photometer (254 nm).

料につき分析したところ、その含有量は Table II に示す結果が得られた (Fig. 1, Table II).

なお、含有量の多い試料については希釈して実施した。

また、正常尿中の馬尿酸量は 0.30 ± 0.15 mg/ml と報告⁶⁾されており、著者らの一人の尿中含有量は 0.376 mg/ml、他のそれは 0.215 mg/ml であった。

V GC-MS による馬尿酸の同定

鑑定例中 Sample 1 の HPLC の馬尿酸相当フラクションを分取し、塩酸酸性として酢酸エチルで抽出後ジアゾメタンによりメチルエステル化し、GC-MS を行ったところ、標品のメチル馬尿酸のスペクトルと一致し、メチル馬尿酸であることが認められた (Fig. 2).

TABLE II. Contents of Hippuric acid in Urines from Suspected Persons of Toluene Inhalation

Sample	Name	Hippuric acid (mg/ml)
1	K. T.	4.83
2	T. W.	16.01
3	T. S.	2.48
4	K. T.	6.41

Fig. 2. GC-MS Spectrum of a HPLC Fraction corresponding to Methyl-hippurate

結 び

HPLC によるトルエン吸入者の尿中馬尿酸の定量法について検討を行った。その結果、試料を 6N HCl で pH=1 に調整して酢酸エチルで抽出後、内部標準物質にバニリン酸を選択して水 80:メタノール 20(v/v) の組成比の移動相を用い、40°で Nucleosil $5C_{18}$ カラムにより、クリーンアップすることなく容易に馬尿酸の定量が可能であった。

謝辞 本研究にあたり、御指導、御校閲をいただいた岐阜薬科大学河合 聡助教授ならびに GC-MS をお願いした科学警察研究所附属鑑定所富山次雄所長と大津留修氏に深謝いたします。

引用文献および注

- 1) J. Gartzke, H.J. Weigmann, *J. Chromatogr.*, **162**, 234 (1979).
- 2) J. Sollenberg, A. Baldesten, *J. Chromatogr.*, **132**, 469 (1977).
- 3) C.J. Umberger, F.F. Fiores, *Clin. Chem.*, **9**, 91 (1963).
- 4) 友国勝磨, 緒方正名, 産業医学, **14**, 103 (1972).
- 5) K. Tomokuni, M. Ogata, *Clin. Chem.*, **18**, 349 (1972).
- 6) 高橋節典, 日法医誌, **30**, 427 (1976).
- 7) M. Ogata, R. Sugihara, S. Kira, *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.*, **39**, 199 (1977).
- 8) R. Sugihara, M. Ogata, *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.*, **41**, 281 (1978).
- 9) M. Ogata, R. Sugihara, *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.*, **42**, 11 (1978).
- 10) H. Matsui, M. Kasao, S. Imamura, *J. Chromatogr.*, **145**, 231 (1978).
- 11) A. Astier, A.M. Deutsch, *J. Chromatogr.*, **182**, 88 (1980).