短 報

尿中馬尿酸・*m*-メチル馬尿酸の高速液体クロマトグラフィーによる定量Quantitative Determination of Urinary Hippuric Acid and *m*-Methylhippuric Acid by High Performance Liquid Chromatography

尿中の馬尿酸 (HA), *m*-メチル馬尿酸 (*m*-MHA) の定量により, toluene, *m*-xylene の平均吸入量を推定する試みが広く行なわれてきた。

直接比色定量法¹⁾はきわめて簡便であるが, 同様な反応を呈する尿中物質の影響を考慮する必要があり, とくに HA と *m*-MHA が混在する尿はこの方法では分別定量できない。そこで, 各種のクロマトグラフィーを用いて, 尿中 glycine 抱合物の分離定量をする試み²⁾がなされている。

今回, 高速液体クロマトグラフィー (HLC) を用いて, 尿中 HA, *m*-MHA の分離定量を検討した結果, 尿に特別な前処理を行なうことなく, 両者を分離定量できた。

方 法

1. 試料: HA は Merck, *m*-MHA, *p*-MHA は東京化成, isonicotinic acid (INA), salicylic acid (SA) は日本感光色素研究所の製品を用いた。被験尿には, 健康人 (正常尿), および toluene, *m*-xylene 混合気体 (toluene 67 ppm, *m*-xylene 83 ppm) に 3 時間暴露後 2.5 時間後に採取した尿 (暴露尿) を用いた。

2. 方法: 各 glycine 抱合物を移動相の液に溶かし標準液とした。尿は遠心分離 (1,500 rpm, 5 min) した後の上澄液をそのまま HLC に注入した。分析装置: 高速液体クロマトグラフィー 633 型 (日立), 充填剤: Li Chrosorb RP 18, 10 μ (Merck), カラム: 4.0mm ϕ $\times$ 150 mm, カラム温度: 室温 (約 25°C), 移動相: methanol/水/酢酸 (20/80/0.2), 流量: 1.2 ml/min, 圧力: 50 kg/cm², 検出器: UV 254 nm, 感度: 0.08 AU FS。

結果と考察

1. HA, *m*-HHA の分離: 種々の glycine 抱合物溶液を混合した液のクロマトグラムを Fig. 1 に示す。HA, *o*-MHA, *m*-MHA あるいは *p*-MHA は, 他の glycine 抱合物から完全に分離できたが, 今回の分析条

件では, *m*-MHA と *p*-MHA の分離は完全ではなかった。

2. 尿のクロマトグラム: 正常尿, 暴露尿のクロマトグラムを Fig. 2, 3 に示す。

3. 検量線: HA, *m*-MHA の標準液を水および正常尿に 1/1 の割合で添加したときの HA (*m*-MHA) 濃度と peak 高とは, Fig. 4 に示すごとくともに直線関係にあり, かつ二つの検量線は平行となり, その peak 高の差は常に正常尿中の HA 量に等しかった。また, 感度については, 10 μ g/ml 以上であれば検出でき, かつ高濃度の場合には水または methanol で希釈しても直線性が認められた。

以上の結果から, 本法は尿中 HA, *m*-MHA の分離定量に十分適用できると考えられる。

4. 正常値: HLC で測定した正常尿中の HA 量 (比重補正後) は, はば対数正規分布を示し, 濃度を μ g/ml で表示し対数化した平均値は 2.347 (222 μ g/ml), 標準偏差 0.256, 5% 棄却限界を上限値とすれば 2.874 (748 μ g/ml) となった ($n=36$)。また, 本法で測定した尿中 HA 量と直接比色定量法 (重層法)³⁾による定量値との間には, 相関係数 $r=0.98$ ($n=21$) で, 高い相関が認められた。

なお, HA より前に溶出する物質 (たとえば INA) の定量を目的とする場合, およびカラムの汚染の危険を避ける意味からは, 内部標準物質を添加した抽出法が適当と考えられるが, これについては次報で述べる。

結 論

固定相に octadecyl silane を化学結合させた silica gel を, 移動相に methanol/水/酢酸の混液を用いる逆相クロマトグラフィーにより, 短時間でかつ精度よく, 尿中 HA, *m*-MHA の分離定量および比色法では発色して定量の妨害となる INA, *o*-MHA, SA の混在する尿にも適用が可能となった。このとき, 尿に対する抽出等の特別な前処理は不要であった。

本研究にあたり, ご協力いただいた 藤原沢美さんに厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Tomokuni, K. and Ogata, M.: Direct colorimetric determination of hippuric acid in urine, Clin. Chem., 18: 349—351, 1972.
- 2) Ogata, M., Tomokuni, K. and Takatsuka, Y.: Quantitative determination in urine of hippuric acid and *m*- or *p*-methylhippuric acid, metabolites of toluene and *m*- or *p*-xylene, Br. J. Ind. Med., 26: 330—334, 1969.

Fig. 1. High performance liquid chromatographic separation of standard INA, HA, *o*-MHA, SA and *m*-MHA.

Fig. 2. Chromatogram of a normal urine specimen.

Fig. 3. Chromatogram of a urine specimen exposed to the mixed vapour of toluene and *m*-xylene.

Fig. 4. Calibration lines of HA (A) and *m*-MHA (B) in water and in urine.

3) 緒方正名, 杉原黎子: 尿中馬尿酸直接比色定量法の改良について, 産業医学, 18: 40-41, 1976.

緒方正名, 杉原黎子, 吉良尚平

岡山大学医学部公衆衛生学教室

Masana OGATA, Reiko SUGIHARA and Shohei KIRA

Department of Public Health, Okayama University Medical School, Okayama, 700 Japan

昭和51年11月22日受付

通信先: 杉原あて, Reprint requests to R. Sugihara