短 報

高速液体クロマトグラフィーによる
尿中馬尿酸・メチル馬尿酸の定量High-speed Liquid Chromatographic
Determination of Hippuric and
Methylhippuric Acids in Urine

有機溶剤の暴露指標として尿中に排泄された溶剤の代謝物の量が用いられており, toluene や xylene についても, それらの尿中代謝物である馬尿酸およびメチル馬尿酸の定量が行なわれている。

定量法として benzenesulfonyl chloride (BSC) を用いての比色定量法 (BSC 法)^{1,2)} が簡便な方法として用いられているが, この方法では尿中に存在して同様に発色する物質を考慮する必要がある, また, 馬尿酸とメチル馬尿酸が同時に存在するときには分別定量は困難である。

一方, これらの物質の特異的定量法としてペーパークロマトグラフ³⁾ やガスクロマトグラフ⁴⁾ による方法が用いられているが, 測定のための前処理にはかなり複雑な操作を必要とする。そこで, 比較的簡単な前処理での尿中馬尿酸およびメチル馬尿酸の特異的定量法を目的として高速液体クロマトグラフを用いて検討を行なった。

方 法

高速液体クロマトグラフは Waters 社 ALC 204 型を用い, カラムは逆相カラムの μ Bondapak C₁₈ で, 移動相として methanol/0.01 M KH₂PO₄ (20/80) を使用した。検出は紫外部 254 nm で行なった。尿のクロマトグラフへの注入試料は 0.22 μ m の Millipore filter でろ過 (ろ過法) したものと酢酸エチルで抽出 (抽出法) したものをを用いた。酢酸エチルによる抽出は緒方ら³⁾ の方法に従って行ない, 得られた溶媒層の 0.2 ml を温浴上で蒸発乾固させ, 注入直前に乾固物を蒸留水に溶かした。

BSC を用いての比色法は, あらかじめ酢酸エチルで抽出したものを Umberger ら¹⁾ の方法で測定した。

結 果

1. 馬尿酸およびメチル馬尿酸と, BSC 法で同様に発色するニコチン酸・サリチル酸の標準物質について液体クロマトグラフでの分離状態を Fig. 1 に示す。

ここで *p*-メチル馬尿酸と *m*-メチル馬尿酸は同じ保持時間を有し分離されなかったが, その他の物質は互いによく分離している。

2. 馬尿酸および *m*-メチル馬尿酸の標準液 1 容に尿

Fig. 1. Separation of standard glycine conjugates.

Fig. 2. Liquid chromatograms of urine extracts.
— : control urine, --- : urine with added acids

9 容を加え最終濃度をそれぞれ 0.2~1.0 mg/ml とする試料を作り, それらをろ過法および抽出法で前処理して測定した結果, いずれの前処理でも, 両物質共に加えた量とピークの高さの間には直線関係があり, 更に標準水溶液における同様な処理での検量線と平行にあり, 標準水溶液での検量線で定量が可能であった。これらの前処理を行なった際の両物質の回収率はいずれの方法でもほぼ 100% であった。Fig. 2 は馬尿酸および *m*-メチル馬尿酸を添加した尿の抽出法でのクロマトグラムであり, ここで尿中の馬尿酸および *m*-メチル馬尿酸の保持時間は Fig. 1 に示した水溶液中での値と一致している。

3. 尿の酢酸エチル抽出部分と Millipore filter でろ過した尿のクロマトグラムを比較すると抽出尿ではろ過尿にみられる保持時間の短い成分だけでなく馬尿酸に近

Fig. 3. Comparison of liquid chromatographic results for hippuric acid in urine: extracted vs. filtered urine.

Fig. 4. Comparison of the liquid chromatographic method with the BSC method for hippuric acid in urine.

いピークもかなり除去され、ほぼベースライン分離が可能であった。ろ過法および抽出法でそれぞれ得られた尿中馬尿酸測定値を比較した結果、Fig. 3 に示すごとく、抽出法での値はろ過法での値に比べてやや低値を与えた。

4. 有機溶剤に暴露していない健康者尿について馬尿酸の定量を酢酸エチルで抽出した後、液体クロマトグラフ法および BSC 法で行ない、両者での値を比較した。その結果、Fig. 4 にみられるように、液体クロマトグラフ法では BSC 法にくらべてかなり低い値を示した。

考察および結論

高速液体クロマトグラフィーにより比較的簡単な前処理で尿中の馬尿酸とメチル馬尿酸の分別定量が可能であった。しかし、メチル馬尿酸のパラ位とメタ位の異性体が同時に存在する場合には、今回の条件ではこの二つの異性体を互いに分離することができなかった。本法での馬尿酸測定に際してろ過を前処理として用いた場合の測

定値は抽出して測定した値にくらべていくぶん高いが、これは、ほぼ完全にベースライン分離が可能である抽出尿にくらべてろ過尿では馬尿酸のベースライン分離は困難で尿中の他の成分のピークが加わっていることによると思われる。したがって抽出尿を用いて測定したほうがより特異的な尿中馬尿酸の定量が可能である。しかし、トルエン暴露者の尿では非暴露者にくらべて高い馬尿酸測定値を与え、ろ過尿での定量妨害成分の影響は相対的に小さくなり、トルエン暴露評価には實際上簡単な前処理であるろ過法でも十分であると思われる。

BSC 法での馬尿酸測定値は液体クロマトグラフ法での値にくらべて高い値を与えたが、これは尿中に存在して馬尿酸と同様に発色する成分によると思われる。一方、ニコチヌール酸やサリチルル酸は BSC によって呈色することが知られているが、ニコチヌール酸は酢酸エチルで抽出されず、サリチルル酸は今回の健康者尿におけるクロマトグラムで検出されなかったことから、BSC 法での定量妨害はこれらの glycine 抱合物以外の物質によると考えられる。

本論文の要旨は、昭和51年4月、第49回日本産業衛生学会(岡山)において発表した。

文 献

- 1) Umberger, C. J. and Fiorese, F. F.: Colorimetric method for hippuric acid, Clin. Chem., 9: 91-96, 1963.
- 2) Tomokuni, K. and Ogata, M.: Direct colorimetric determination of hippuric acid in urine, Clin. Chem., 18: 349-351, 1972.
- 3) 緒方正名, 長尾逸子: Toluene, Xylene 吸入時, 尿中に排泄される馬尿酸, メチル馬尿酸の新定量法について, 産業医学, 9: 434-442, 1967.
- 4) Buchet, J. P. and Lauwerys, R. R.: Measurement of urinary hippuric and m-methylhippuric acids by gas chromatography, Br. J. Ind. Med. 30: 125-128, 1973.

松井寿夫, 今村 晋*, 笠尾真由美

群馬大学医学部衛生学教室

* 現在: 東京医科歯科大学医学部衛生学教室

Hisao MATSUI, Susumu IMAMURA† and Mayumi KASAO

Department of Hygiene, Gunma University School of Medicine, Maebashi, 371 Japan

† Present address: Department of Hygiene, Tokyo Medical and Dental University School of Medicine
昭和52年3月2日受付

通信先: 松井あて, Reprint requests to H. Matsui