短 報

高速液体クロマトグラフィーによる尿中フェニルグリオキシル酸の簡易定量法

A Simple Method for the Determination of Phenylglyoxylic Acid in Urine by High-speed Liquid Chromatography

有機溶剤の暴露状況を評価するうえで、尿中代謝産物は重要な指標となることが知られており、スチレンについても、その尿中代謝産物であるフェニルグリオキシル酸 (PGA)、マンデル酸 (MA) が暴露指標として用いられている。

定量法としてホルマリン-硫酸試薬を用いた比色定量法¹⁾やガスクロマトグラフによる方法²⁾などがある。しかし、前者では尿中に排泄される正常代謝産物によっても発色することが指摘されており³⁾、後者は特異的な測定法であるが前処理として揮発性の誘導体にする必要がある。

先に、われわれは高速液体クロマトグラフを用いてトルエン、キシレンの尿中代謝産物である馬尿酸、メチル馬尿酸を比較的簡単な前処理で、特異的に定量できることを報告したが⁴⁻⁶⁾、今回、スチレンの尿中代謝産物についても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、移動相としてアセトニトリル/水/酢酸 (10/90/0.1) を使用した。検出は 254 nm で行なった。尿は正常者 (有機溶剤非暴露者, 15例) およびスチレン暴露作業 (ガラス線強化プラスチック製品の製造) から得た。クロマトグラフへの注入前に被験尿を 0.22 μ m のメンブランフィルターでろ過、あるいは等量のメタノールで混和、遠心 (10,000 g, 10 min) し微粒子除去を行なった。

結 果

1. 尿中の PGA の分離: 正常者尿および PGA 添加尿 (60 mg/l) のクロマトグラムを Fig. 1 A, B に示す。正常者尿中には PGA と同様の保持時間を有する紫外外部吸収物質があるが、そのピークはすべて PGA として 10 mg/l 以下に相当していた。スチレン暴露者尿では Fig. 1 C に示すごとく高い PGA のピークがみられた。

2. 定量妨害物質の検討: PGA, MA と馬尿酸, *o*-, *m*-, *p*-メチル馬尿酸, グリシン抱合物のニコリチール

Table 1. Relative retention time of various compounds related to phenylglyoxylic acid.

Compound	Relative Retention Time*
Nicotinuric acid	0.9
Phenylglyoxylic acid	1.0
Mandelic acid	2.2
Hippuric acid	2.6
p-Hydroxyphenylacetic acid	3.4
o-Methylhippuric acid	3.7
Salicyluric acid	5.9
m-Methylhippuric acid	7.1
p-Methylhippuric acid	7.1
Ferulic acid	14.1

*Relative to phenylglyoxylic acid

Table 2. Determination of phenylglyoxylic acid in urine of workers exposed to styrene.

Subject No.	Styrene Concentration in Air (ppm)	Phenylglyoxylic Acid in Urine	
		Concentration (mg/l)	Excretion (mg/hour)
1	50	520	20.8
2	50	250	14.6
3	20	690	7.3
4	20	540	9.1
5	20	480	3.7
6	20	250	9.5
7	20	540	6.5

酸, サリチヌール酸, およびホルマリン-硫酸試薬で発色する α -ヒドロキシフェニル酢酸, フェルル酸³⁾ の分離状態を Table 1 に示す。PGA, MA は共に他の物質と完全に分離した。しかし、MA の検出感度は PGA に比較してほぼ 1/100 で低く、今回用いた条件での尿中 MA の定量は困難であった。

3. 定量性: PGA の標準液 1 容に水または正常者尿 9 容を加えて作った試料の測定結果から、PGA 量とピークの高さは Fig. 2 に示すように直線関係があった。また尿中および水中 PGA の検量線は互いに平行であり、標準水溶液での検量線で定量が可能であった (3 例の正常尿について行なったが、すべて尿による PGA の定量妨害はみられなかった)。

4. スチレン暴露作業尿: ほぼ一定した気中濃度に暴露されている作業者の時間尿 (午後 3 時に採尿) を用いて PGA の測定を行なった。結果は Table 2 に示すように、気中濃度が 20~50 ppm の時、尿中 PGA は 250~690 mg/l であった。これを時間当たりの排泄量で示すと、例数は少ないが 20 ppm 暴露尿にくらべて 50 ppm 暴露尿では平均値で約 2.5 倍高く、排泄率は気中濃度と対応していた。

Fig. 1. Chromatograms of (A) normal urine (B) normal urine supplemented with 60 mg/l of phenylglyoxylic acid (C) urine from a worker exposed to styrene.

Fig. 2. Standard curves of phenylglyoxylic acid in water (●) and in urine (▲).

考察および結論

高速液体クロマトグラフィーにより複雑な抽出操作をすることなく直接、尿中 PGA の定量が可能であった。正常者尿中には今回の条件で PGA と同様の保持時間をもつ物質がみられるが、このピークの高さは PGA の 10 mg/l 以下に相当するのに対し、PGA は強い紫外部吸収があり検出感度が高く暴露者尿の分析では尿を希釈するか感度を下げて測定すること、暴露者尿では高い PGA 量 (スチレンの気中濃度 20 ppm で 200 mg/l 以上) を示すことから、この正常者尿中の物質の影響は小さく、スチレン暴露評価に際しての定量には實際上この方法で十分である。

馬尿酸、メチル馬尿酸は PGA とは完全に分離し、トルエン、キシレン、スチレンの混合暴露の際にも本法での測定が可能である。

スチレン暴露作業者の PGA 量は Ohtsuji ら¹⁾の報告した値とはほぼ一致している。

一方、MA については検出感度が PGA にくらべて著しく低く、今回の条件では定量困難であった。

文 献

- 1) Ohtsuji, H. and Ikeda, M.: A rapid colorimetric method for the determination of phenylglyoxylic and mandelic acids, *Br. J. Ind. Med.*, 27: 150—

154, 1970.

- 2) Guillemin, M. and Bauer, D.: Human exposure to styrene II. Quantitative and specific gaschromatographic analysis of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids as an index of styrene exposure, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 37: 57—64, 1976.
- 3) 堀口俊一, 寺本敦子: スチレン暴露の指標としての尿中マンデル酸およびフェニルグリオキシル酸の生理値の検討, *産業医学*, 14: 288—289, 1972.
- 4) 松井寿夫, 今村 晋: 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, 第49回日本産業衛生学会講演集, 86—87, 1976.
- 5) 松井寿夫, 今村 晋, 笠尾真由美: 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, *産業医学*, 19: 138—139, 1977.
- 6) Matsui, H., Kasao, M. and Imamura, S.: Quantitative determination of hippuric and *m*-methylhippuric acids in urine by high-speed liquid chromatography, *Br. J. Ind. Med.*, 34: 310—313, 1977.

松井寿夫, 小野 哲, 笠尾真由美, 和田 攻, 今村 晋*
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, Tetsu ONO, Mayumi KASAO, Osamu WADA and Susumu IMAMURA†

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11月25日受付

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