

## 逆相高速液体クロマトグラフィーによる尿中有機溶剤代謝物の迅速定量

上森仁志<sup>®</sup>, 吉田貴三子, 福本昌巳, 瀧内邦雄, 松浦脩治\*

(1991年7月29日受理)

逆相 HPLC による尿中有機溶剤代謝物 (HAs) の迅速で信頼性の高い定量方法を確立した。高純度シリカゲルを原料として合成された高保持能 C18 充てん剤, Wakosil II-5C18-100 を使用し, 移動相溶媒に炭素数 2 以上の水溶性アルコールを含む酸性緩衝液を使用すれば  $\beta$ -シクロデキストリンを添加しなくともメチル馬尿酸の *m*-, *p*-位置異性体を効率よく分離することが可能となった。標準添加尿を 100 倍に希釈し連続 20 回の測定での RSD は, 保持時間, ピーク面積とも 1% 以下と再現性に優れ, 10~1000 ng/ml 注入範囲の検量線は原点を通る直線となり, 相関係数 0.999 以上と良好な結果であった。この方法を用い, 実際には有機溶剤を取り扱っている作業者の尿中濃度を測定し, 暴露の程度を推定した。

### 1 緒 言

トルエン, キシレン, スチレンなどの有機溶剤取り扱い業務に従事する作業者の健康管理のためには, その有機溶剤の暴露の程度を推定する必要があった。近年, これらの有機溶剤の尿中代謝物濃度が暴露の程度を推定する良好な指標となることが見いだされ, 米国に次いで, 我が国でも, 平成元年度より有機溶剤特殊健康診断として有機溶剤の尿中代謝物濃度の測定が追加された。

体内に吸収されたトルエン, キシレン, スチレンは代謝されて, それぞれ馬尿酸 (HA), *o*-, *m*-, *p*-メチル馬尿酸 (*o*-, *m*-, *p*-MHA), マンデル酸 (MA) となり尿中に排せつされ, これらの濃度の測定が HPLC 法により実施されている。HPLC 法には, 逆相系 C18 充てん剤を使用し, 移動相には MHA の *m*-, *p*-位置異性体を分離するために  $\beta$ -シクロデキストリン ( $\beta$ -CD) を添加した方法<sup>1)</sup>や充てん剤にセラミックカーボンを使用した方法<sup>2)</sup>が報告されている。これらの方法において,  $\beta$ -CD を使用した場合はカラムの耐久性や移動相調製時の溶解度が問題であり, セラミックカーボンを使用した場合は検出感度が低いことやピークの形状が悪いなどの問題がある。今回, 逆相系 C18 充てん剤を用いて移動相に  $\beta$ -CD を添加することなく, 尿中の代謝物とその尿中濃度補正のためのクレアチニン (CR) の 6 成分を迅速に測

定する方法について検討したので報告する。

### 2 実 験

#### 2.1 試 薬

標準品として利用した HA, MA, CR は和光純薬工業製のものを, *o*-, *m*-, *p*-MHA は東京化成工業製のものを使用した。蒸留水, 移動相溶媒は和光純薬工業製の HPLC 用を使用した。本研究に用いたその他の試薬及び溶媒はすべて試薬特級品である。

#### 2.2 装置及び分析条件

本研究には, 島津製作所製 LC-6A 型ポンプ, SPD-6AV 型 UV 検出器, CTO-6A 型カラムオーブン, SIL-6A 型オートサンプラー, C-R4A 型インテグレーターなどから成る HPLC 装置を使用した。

分離カラムは金属イオンとキレート形成能を有する MA のピーク形状をより鋭敏に検出する目的と *m*-, *p*-MHA の分離能を高める目的で, 高純度シリカゲルを原料として合成された高保持能 C18 充てん剤, Wakosil II-5C18-100 (粒子径: 5  $\mu$ m, 細孔径: 100  $\text{\AA}$ , C%: 22%) を内径 4.0 mm, 長さ 200 mm のステンレスカラムに充てんし, 40°C で使用した。移動相は 6 mM オクタンスルホン酸ナトリウムを含む 10 mM リン酸緩衝液 (pH 2.4) 92 部と 2-プロパノール 8 部の混合液を流量 1.0 ml/min で送液し, 検出は UV 210 nm で行った。

\* 和光純薬工業(株)大阪研究所: 661 兵庫県尼崎市高田町 6-1

### 2・3 試料の調製

標準試料は各 1 mg をメタノール水溶液 (20% v/v) 100 ml に溶解し、又尿検体はそのままメタノール水溶液 (20% v/v) で 100 倍に希釈し、それぞれその 10  $\mu$ l を HPLC 装置に注入した。

## 3 結果及び考察

### 3・1 分析条件の検討

分析時間は 15 分以内とし、かつ、*p*-, *m*-MHA の分離能 ( $R_s$ ) を 1.2 以上とすることを目的に最適分析条件の検討を行った。移動相に使用される有機溶媒の種類を通常用いられるアセトニトリルやメタノールから水溶性で低波長領域に UV 吸収が少ない溶媒へと代えて検討した結果、炭素数 2 以上の水溶性アルコール系溶媒を使用するとき、 $\beta$ -CD を用いなくても *p*-, *m*-MHA の分離が達成されることが分かった。2-プロパノール (IPA) や *t*-ブチルアルコールが効果的であったが、ベースラインの安定性や臭気の問題から IPA を使用した。そのときの結果を Table 1 に示した。

リン酸緩衝液の pH の変化は HA, MA の溶出位置に見られる尿からの妨害ピークの影響を回避するために重要な要素となり pH 2.4 が最適となった。そのときの保持時間の変化を Fig. 1 に示した。

CR を別法で測定する場合はイオン対試薬の添加を必要としないが、CR をも含めた同時分析の場合には添加が必要となり、保持時間の安定性を考慮にいれオクタンスルホン酸ナトリウムを使用することにした。

### 3・2 再現性と直線性

標準品を添加した正常尿を 100 倍に希釈し連続 20 回の測定 (100 ng/10  $\mu$ l 注入時) での RSD は、保持時間、ピーク面積とも 1% 以下と再現性に優れていた。その結果を Table 2 に、又、そのクロマトグラムを

Table 1 Resolution ( $R_s$ ) and retention time of *p*- and *m*-methylhippuric acids

Organic solvent	$R_s$	Retention time/min	
		<i>p</i> -MHA	<i>m</i> -MHA
15% Acetonitrile	0.6	13.1	13.5
30% Methanol	0.8	10.0	10.4
15% Ethanol	1.1	12.8	13.4
8% 1-Propanol	1.2	10.0	10.5
10% 2-Propanol	1.4	10.2	10.7
4% <i>t</i> -Butyl alcohol	1.6	13.8	14.6

Column size: 4.6 mm  $\times$  150 mm; Buffer: 20 mM phosphate buffer (pH 2.4); Flow rate: 1.0 ml/min at 40°C

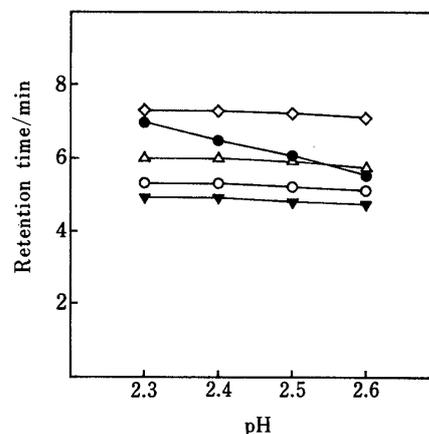


Fig. 1 The effect of pH on the retention times of HAs in urine

○: HA, △: MA, ◇: *o*-MHA, ▼: unknown 1, ●: unknown 2; HPLC conditions: column, Wakosil II-5C18-100 (4.0 mm  $\times$  200 mm); mobile phase, 8% 2-propanol/10 mM-phosphate buffer containing 6 mM-1-octanesulfonic acid sodium salt; flow rate, 1.0 ml/min; column temperature, 40°C; detector, UV (210 nm)

Table 2 Reproducibilities of retention time and peak area/each 100 ng injection ( $n=20$ )

	HA	MA	<i>o</i> -MHA	CR	<i>p</i> -MHA	<i>m</i> -MHA
Retention time/min						
$\bar{X}$	5.09	5.73	7.10	8.44	11.83	12.39
SD	0.005	0.006	0.007	0.01	0.014	0.012
RSD	0.09	0.10	0.10	0.12	0.12	0.10
Peak area (100 ng injection)						
$\bar{X}$	76665	79188	99656	101262	103941	128666
SD	576	714	735	930	814	846
RSD	0.75	0.90	0.74	0.92	0.78	0.66

Table 3 Results of the determination of HAs in urine on volunteers and BEI value

Urine	HA (g/gCR)	MA (g/l)	MHA (g/gCR)				CR (g/l)
			<i>o</i> -	<i>p</i> -	<i>m</i> -	Total	
No. 1	0.28	—	0.01	—	—	0.01	1.29
2	0.04	0.04	0.01	—	0.01	0.02	2.00
3	0.03	—	0.02	0.01	—	0.03	1.86
4	0.22	0.02	—	—	—	—	0.61
5	0.24	0.04	0.02	—	—	0.02	1.61
6	0.04	0.35	0.02	—	0.01	0.03	1.74
7	0.15	—	0.01	0.01	—	0.02	2.35
8	0.23	0.03	—	0.01	—	0.01	1.36
9	0.30	—	—	—	—	—	0.43
10	0.06	0.03	0.02	—	0.01	0.03	1.45
BEI	2.5	1.0				1.5	

CR: creatinine

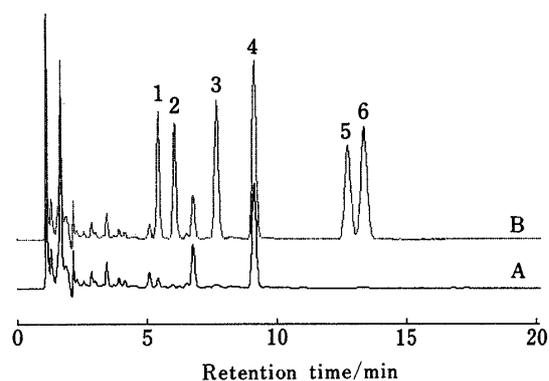


Fig. 2 Chromatograms of a urine sample(A) and a urine containing standard sample(B)

HPLC conditions are as shown in Fig. 1. The elution buffer is pH 2.4. Peaks: (1) HA, (2) MA, (3) *o*-MHA, (4) CR, (5) *p*-MHA, (6) *m*-MHA

Fig. 2 に示した. 10~1000 ng/注入範囲でピーク面積と濃度の間には直線関係が存在し, 相関係数は 0.999 以上と良好な結果を示した.

### 3.3 添加回収

1.0 ml の健常人尿に各 1.0 mg の標準品を添加して回収率を測定した結果 ( $n=5$ ), HA は  $99.3 \pm 0.5\%$ , MA

は  $103.0 \pm 1.4\%$ , *o*-MHA は  $97.7 \pm 0.7\%$ , CR は  $98.2 \pm 0.8\%$ , *p*-MHA は  $99.9 \pm 1.0\%$ , *m*-MHA は  $100.3 \pm 0.5\%$  と良好な回収率を示した.

### 3.4 有機溶剤取扱作業者の尿中濃度測定

有機溶剤取扱作業に従事している試験・研究者 10 名の尿中濃度の測定に適用した結果と, 米国で規定されている限界濃度 Biological Exposure Indices (BEI 値) を Table 3 に示した. これらの結果から有機溶剤の暴露は極めて低く, 作業環境, 取り扱いには十分な配慮がなされていることが分かる. 又現在, MHA 濃度は総量で規定されているが, *o*-, *m*-, *p*-MHA への代謝率は個人個人により異なっており, この代謝率の違いと病態との間に相関関係があるならば, 個別定量の重要性は更に増してくるものと考えられる. 以上本法は簡易に有機溶剤代謝物の尿中濃度を測定することができ, 臨床のスクリーニング検査として十分適用できる測定法と言える.

(1991 年 5 月, 第 8 回液体クロマトグラフィ春季討論会において一部発表)

## 文 献

- 1) 高田智子, 徳田俊夫: 第 34 回液体クロマトグラフィ研究会講演要旨集, p. 131 (1991).
- 2) 小沢真樹子, 大林 隆, 石川利弘: クロマトグラフィ学会講演要旨集, p. 76 (1990).



**Rapid determination of organic solvent metabolites in urine by reversed phase HPLC.** Hitoshi UEMORI, Kimiko YOSHIDA, Masami FUKUMOTO, Kunio TAKIUTI and Shuji MATUURA(Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka Research Laboratory, 6-1,

Takada-cho, Amagasaki-shi, Hyogo 661)

We have developed an improved method for the determination of organic solvent metabolites (HAs), hippuric acid (HA), mandelic acid (MA), *o*-methylhippuric acid (*o*-MHA), *m*-methylhippuric acid (*m*-MHA), *p*-methylhippuric acid (*p*-MHA) and creatinine (CR), in urine by reversed phase HPLC. The separation was carried out with a stainless-steel column (4.0 mm×200 mm) packed with Wakosil II-5C18-100 and 8% 2-propanol/10 mM phosphate buffer (pH 2.4) containing 6 mM 1-octanesulfonic acid sodium salt as a mobile phase (1.0 ml/min). A UV monitor (210 nm) was used for monitoring. Reproducibility of this method was excellent. Calibration plots between 10 and 1000 ng/injection were linear and passed through the origin of the coordinate system. This method was used for the determination of HAs in urine on volunteers.

(Received July 29, 1991)

***Keyword phrases***

organic solvent metabolites; hippuric acid; mandelic acid; methylhippuric acids; reversed phase HPLC.

---