

原 著

# 有機溶剤代謝産物を人工尿に添加した 精度管理用試料の調製と保存

嶋田義弘<sup>1)</sup> 藤井俊子<sup>2)</sup> 田口豊郁<sup>3)</sup> 緒方正名<sup>3)</sup>

中国短期大学 生活学科<sup>1)</sup>

川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科<sup>2)</sup>

川崎医療福祉大学 医療福祉学部 医療福祉学科<sup>3)</sup>

(平成6年10月19日受理)

## Preparation and Preservation on Solvent Metabolites Spiked in Artificially Prepared Urines for Quality Controls

**Yoshihiro SHIMADA<sup>1)</sup>, Toshiko FUJII<sup>2)</sup>, Toyohiro TAGUCHI<sup>3)</sup>  
and Masana OGATA<sup>3)</sup>**

*Department of Home Economics*

*Chugoku Junior College<sup>1)</sup>*

*83 Niwase, Okayama, 701-01, Japan*

*Department of Clinical Nutrition, Faculty of Medical Professions*

*Kawasaki University of Medical Welfare<sup>2)</sup>*

*Kurashiki, 701-01, Japan*

*Department of Medical Social Work, Faculty of Medical Welfare*

*Kawasaki University of Medical Welfare<sup>3)</sup>*

*Kurashiki, 701-01, Japan*

*(Accepted Oct. 19, 1994)*

**Key words :** solvent metabolites, artificially prepared urine, quality control,  
preservation

### Abstract

Artificial urines containing major components of human urine, as ingredients, were prepared as specimens for the survey of quality control. The hippuric acid, m-methylhippuric acid and mandelic acid of various concentrations were spiked into the artificial urines. Thereafter, the specimens were kept at 30°C, 1°C and -20°C for 1, 2 and 4 weeks, and change in concentrations during storage was examined by high performance liquid chromatography. The ratio of the concentrations of the three acids after storage to those before storage was about 99 per cent or above under the storage condition at 1°C

for 2 weeks and  $-20^{\circ}\text{C}$  for 4 weeks. Creatinine was more unstable than the three acids under these storing condioion at  $30^{\circ}\text{C}$  and  $1^{\circ}\text{C}$ . The metebolites were more stable when they were kept in lower temperatures and the mandelic acid was most stable among three metabolites.

## 要 約

外部精度管理用の試料として人の自然尿の主成分を含む人工尿を作製し、各種の濃度の溶剤代謝産物として、馬尿酸、*m*-メチル馬尿酸、マンデル酸を添加して試料とした。次いで、この試料を $30^{\circ}\text{C}$ 、 $1^{\circ}\text{C}$ 及び $-20^{\circ}\text{C}$ に、1, 2, 4週間保存して、保存前後におけるこれらの代謝産物濃度の変動を高速液体クロマトグラフで調べた。

その結果、これらの代謝産物は、 $1^{\circ}\text{C}$ で2週間、 $-20^{\circ}\text{C}$ で4週間の保存では、保存前のほぼ99%以上の濃度を保つことができた。クレアチニンは、 $30^{\circ}\text{C}$ 、 $1^{\circ}\text{C}$ の保存に対して、尿中代謝産物より不安定である事が認められた。低濃度の保存条件で比較すると、保存温度が低い程、代謝産物は安定であり、かつマンデル酸が最も安定であった。

## 緒 言

有機溶剤中毒予防規則の改正により、溶剤の尿中代謝産物による生物学的モニタリングが平成元年以来、我が国で約50万人の暴露作業者を対象として行なわれ<sup>1)</sup>、また世界でもその実施の検討がなされている。これらの現状から、生物学的モニタリングについての生体試料の検査を実施している機関において、その精度をチェックし向上させるために、外部精度管理を行なう必要を生じ、そのための試料の作製が急務となりつつある。しかしながら、尿中代謝産物の試料作製の研究は少なく、作製のための基礎的研究が必要とされるに至った。

また、世界保健機関(WHO)においても、環境保健に関する生物学的モニタリングのために、各国の検査機関を対象とする外部精度管理の検討を行っている。近年、ドイツでは、人の尿に溶剤の代謝物質を加えた試料を用いた内部精度管理<sup>2)</sup>更に外部精度管理<sup>3)</sup>を行なっている。

わが国では、原田<sup>4)</sup>によって、人工尿に溶剤の代謝物質を加えた試料が作製され、これによる外部精度管理の実施によって成果をあげてきた。しかしながら、現在の4種の尿成分のみで、かつ強酸性の人工尿は、測定法の特異性の検定は充分でないので、成分として新たに尿酸、クレアチニンを添加し、従来の硫酸酸性(pH 4.0付

近)の溶液に代わり、Na-Kリン酸緩衝液を加え、水素イオン濃度をほぼ中性に調整して、ある程度特異性の検定も可能で、より自然尿に近い人工尿に改良する事とした。更に作製した試料を運搬後、測定までに時間を要する事から、その保存中の溶剤の代謝物質の変動についての検討を行った。

## 材料と方法

### 1. 試 薬

試薬は何れも試薬特級を用いた。

### 2. 人 工 尿

今回作製した人工尿の組成は、表1に示すごとくである。Na-Kリン酸緩衝液(pH 7.4)に尿酸を溶解後、他の成分を加え、脱イオン水で

表1 人工尿の組成

塩化ナトリウム	11.6	g
リン酸水素二アンモニウム	2.0	g
尿素	18.0	g
食用色素(タートラジン)	100	mg
アジ化ナトリウム	1.0	g
クレアチニン	1.0	g
尿酸	0.25	g
リン酸一カリウム	0.7	g
リン酸二ナトリウム	5.3	g
全 量	1	ℓ

全量を1ℓとした。これは従来の人工尿に対し、人尿には近い濃度の尿酸、クレアチニンを追加し、濃硫酸2ml/ℓに代えて、Na-Kリン酸緩衝液を添加したものである。

### 3. 代謝産物添加濃度

馬尿酸, m-メチル馬尿酸およびマンデル酸を人工尿に添加することにより、高濃度液、中濃度液、低濃度液の3種を作成した。高濃度液は労働省による分布2-3の境界濃度であり、生物学的暴露指標に相当する濃度である。低濃度液は労働省による分布1-2の境界濃度であり、生物学的暴露指標の約1/2~1/3の濃度に相当する濃度である。中濃度液は高濃度液と低濃度液との算術平均値を採用した。

### 4. 保存の為の条件

温度は、30℃(電気重湯煎)、1℃(冷蔵庫)、-20℃(冷凍庫)で1, 2, 4週間保存した。

### 5. 代謝物測定のための高速液体クロマトグラフ条件<sup>5)</sup>

カラム：ステンレス製  $\phi$  4.6mm  $\times$  L 150mm.

充填剤：TSKgel ODS 80 Tm.

移動相：[20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.3) + 2 mM 1-デカンスルホン酸ナトリウム] 液：アセトニトリル液=85：15.

検出：UV 225 nm.

## 結 果

人工尿を各種の温度の下で、一定期間保存した後、その中に含まれる馬尿酸, m-メチル馬尿酸, マンデル酸の濃度の変動を表2 A, B, Cに示す。

### 1. その結果を保存温度を中心として、濃度変化を検討すれば、以下の様になる。

#### 1) 30℃, 1週間の保存下の3種の代謝産物の濃度。

① 高濃度液, 中濃度液：ほぼ、添加時の約98%以上の濃度を示した

② 低濃度液：測定値はやや低いが、1週間保存下の濃度は、添加時の約97%の値を示した。

③ 高～低濃度の溶液については、97%を基準とすれば、1週間までは保存可能であった。

④ クレアチニン(0.94~0.98 g/ℓ)は、代謝産物より不安定であり、1週間の間に83~92%

まで減少した。

#### 2) 1℃, 2週間の保存下の3種の代謝産物の濃度。

① 高濃度液：ほぼ、添加時の99%以上の値を示した。

② 中濃度液, 低濃度液：測定値は添加時の99%以上の値を示した。

③ 高～低濃度の溶液については、99%を基準とすれば、2週間までは保存可能と推定された。

④ クレアチニンはやや不安定であり、2週間で添加時の96%まで減少した。

#### 3) -20℃(凍結) 4週間保存下の3種の代謝産物濃度。

① 高～低濃度液：いずれの濃度も添加時のほぼ99%以上(1例は98%)の値を示した。

② クレアチニンは、比較的、安定で4週間でその濃度は、添加時の97%以上の値を示した。

### 2. 2週間の保存時における、人工尿中の低濃度馬尿酸, m-メチル馬尿酸, マンデル酸濃度の変動

保存温度の影響をみるために、代表例として、上述の条件の試料を選んだ。図1に示すように、代謝産物は、低温ほど安定であり、構造が単純で加水分解し難いマンデル酸が最も安定である事が分かった。

## 考 察

今回の研究では、アジ化ナトリウムを添加した人工尿において、検討した総ての温度については、

① 30℃では1週間まで、1℃では2週間までは、保存可能であるが、クレアチニンよりみた安全度からいえば、1℃保存の方が安全と思われる。

② -20℃の冷凍保存は、冷凍、解凍の経過をより注意深く行なえば、約4週間までは、保存可能と考える。

③ クレアチニンは、3種類の代謝産物より不安定であり、その濃度の減少の程度はより大きい。よって保存後の尿に代謝産物のクレアチニン補正を行なうと値が、高くなりすぎ、いわゆる over estimation となるので、この補正法は、-20℃の冷凍保存尿には可能であるが、30℃, 1℃

表2 人工尿中の各種濃度の馬尿酸 (HA), m-メチル馬尿酸 (m-MHA), マンデル酸 (MA) の保存温度別の濃度変動

## A. 30℃保存

## 高濃度

Days	HA (g/l)	m-MHA (g/l)	MA (g/l)	Creatinine (g/l)
0	2.50 (1.00)	1.50 (1.00)	1.00 (1.00)	0.94 (1.00)
7	2.45±0.04(0.98)	1.47±0.03(0.98)	0.98±0.02(0.98)	0.78±0.01(0.83)
14	2.44±0.01(0.98)	1.47±0.01(0.98)	0.98±0.01(0.98)	0.71±0.01(0.76)
28	2.47±0.04(0.99)	1.47±0.02(0.98)	0.96±0.02(0.96)	0.65±0.09(0.69)

## 中濃度

Days	HA (g/l)	m-MHA (g/l)	MA (g/l)	Creatinine (g/l)
0	1.73 (1.00)	0.95 (1.00)	0.64 (1.00)	0.98 (1.00)
7	1.70±0.05(0.98)	0.93±0.03(0.98)	0.63±0.01(0.98)	0.89±0.02(0.91)
14	1.68±0.04(0.97)	0.92±0.02(0.97)	0.62±0.01(0.97)	0.81±0.02(0.83)
28	1.70±0.02(0.98)	0.95±0.01(1.00)	0.62±0.01(0.97)	0.71±0.01(0.73)

## 低濃度

Days	HA (g/l)	m-MHA (g/l)	MA (g/l)	Creatinine (g/l)
0	0.96 (1.00)	0.48 (1.00)	0.29 (1.00)	0.97 (1.00)
7	0.93±0.03(0.97)	0.46±0.01(0.97)	0.28±0.01(0.97)	0.90±0.02(0.92)
14	0.91±0.05(0.94)	0.45±0.03(0.94)	0.28±0.02(0.97)	0.80±0.04(0.83)
28	0.92±0.02(0.96)	0.46±0.01(0.97)	0.28±0.01(0.97)	0.73±0.02(0.75)

## B. 1℃保存

## 高濃度

Days	HA (g/l)	m-MHA (g/l)	MA (g/l)	Creatinine (g/l)
0	2.50 (1.00)	1.50 (1.00)	1.00 (1.00)	0.94 (1.00)
7	2.48±0.06(0.99)	1.49±0.04(0.99)	0.99±0.03(0.99)	0.91±0.02(0.97)
14	2.50±0.05(1.00)	1.50±0.03(1.00)	1.00±0.02(1.00)	0.90±0.02(0.96)
28	2.50±0.08(1.00)	1.49±0.05(0.99)	0.97±0.03(0.97)	0.87±0.03(0.93)

## 中濃度

Days	HA (g/l)	m-MHA (g/l)	MA (g/l)	Creatinine (g/l)
0	1.73 (1.00)	0.95 (1.00)	0.64 (1.00)	0.98 (1.00)
7	1.71±0.03(0.99)	0.94±0.02(0.99)	0.63±0.01(0.99)	0.94±0.02(0.96)
14	1.71±0.06(0.99)	0.94±0.03(0.99)	0.63±0.02(0.99)	0.96±0.04(0.98)
28	1.71±0.03(0.99)	0.95±0.02(1.00)	0.63±0.01(0.99)	0.97±0.01(0.99)

## 低濃度

Days	HA (g/l)	m-MHA (g/l)	MA (g/l)	Creatinine (g/l)
0	0.96 (1.00)	0.48 (1.00)	0.29 (1.00)	0.97 (1.00)
7	0.95±0.04(0.99)	0.47±0.02(0.99)	0.29±0.01(1.00)	0.95±0.04(0.98)
14	0.95±0.06(0.99)	0.47±0.03(0.99)	0.29±0.02(1.00)	0.96±0.07(0.99)
28	0.94±0.04(0.98)	0.47±0.02(0.99)	0.29±0.01(1.00)	0.96±0.04(0.99)

## C. -20℃保存

## 高濃度

Days	HA (g/l)	m-MHA (g/l)	MA (g/l)	Creatinine (g/l)
0	2.50 (1.00)	1.50 (1.00)	1.00 (1.00)	0.94 (1.00)
7	2.48±0.15(0.99)	1.49±0.09(0.99)	1.01±0.06(1.01)	0.92±0.06(0.98)
14	2.48±0.07(0.99)	1.49±0.04(0.99)	1.00±0.03(1.00)	0.92±0.02(0.98)
28	2.48±0.05(0.99)	1.49±0.02(0.99)	0.98±0.02(0.98)	0.91±0.02(0.97)

## 中濃度

Days	HA (g/l)	m-MHA (g/l)	MA (g/l)	Creatinine (g/l)
0	1.73 (1.00)	0.95 (1.00)	0.64 (1.00)	0.98 (1.00)
7	1.71±0.05(0.99)	0.94±0.03(0.99)	0.63±0.02(0.99)	0.95±0.03(0.97)
14	1.71±0.06(0.99)	0.94±0.03(0.99)	0.63±0.02(0.99)	0.97±0.03(0.99)
28	1.73±0.03(1.00)	0.96±0.02(1.01)	0.63±0.01(0.99)	0.98±0.02(1.00)

## 低濃度

Days	HA (g/l)	m-MHA (g/l)	MA (g/l)	Creatinine (g/l)
0	0.96 (1.00)	0.48 (1.00)	0.29 (1.00)	0.97 (1.00)
7	0.95±0.04(0.99)	0.47±0.02(0.99)	0.29±0.01(1.00)	0.96±0.04(0.99)
14	0.95±0.01(0.99)	0.47±0.01(0.99)	0.29±0.01(1.00)	0.95±0.01(0.98)
28	0.95±0.07(0.99)	0.47±0.04(0.99)	0.29±0.02(1.00)	0.97±0.07(1.00)

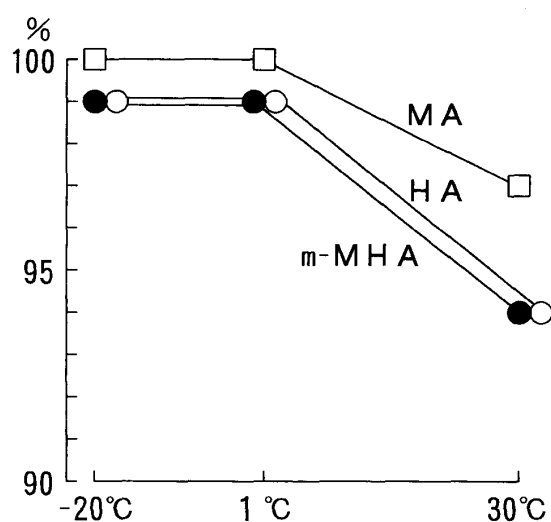


図1 各種温度で2週間保存時における人工尿中の低濃度馬尿酸 (HA), m-メチル馬尿酸 (m-MHA), マンデル酸 (MA) の濃度変動

の保存尿には、行なわない方が良く考える。

人工尿中の代謝産物が、30℃でも1週間は、比較的安定なのは、殺菌剤アジ化ナトリウム添加の影響の他に、人工尿では、腐敗源となる有

機物が少ないためと思われる。

人工尿を使用する長所は、① 有機溶剤の代謝産物を計量して添加するので、真値が得やすい。また② 細菌の栄養となる成分が人尿より少ないので腐敗による変性が少なく保存が容易な事である。一方その短所として、人尿に比べて尿成分が少ないために、測定法の確度の検定に不十分な点である。本研究では、従来の人工尿より、自然尿により近いものとなった。なお、人工尿中の代謝産物濃度がやや減少傾向にあるのは、代謝産物の溶解度が関係し、リン酸緩衝液の濃度を高くすればより良い結果が得られると推定した。

今後は、人工尿の凍結乾燥物の保存に関して研究を行なうと共に、更に人尿に代謝産物を添加した試料を用いて、液性状態、凍結乾燥状態の比較を行なう事も予定している。

本研究の一部は、文部省科学研究費試験研究Bの補助を受けた。

## 文 献

- 1) 労働省 (1989) 有機溶剤中毒予防規則の一部改正, 労働省令第23号.
- 2) Schaller KH, Angerer J and Lehnert G (1990) Many years of experiences in internal quality control in the toxicological analysis of biological material in the field of occupational medicine. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **338**, 547—550.
- 3) Schaller KH, Angerer J and Lehnert G (1991) Internal and external quality control in the toxicological analysis of blood and urine samples in the Federal Republic of Germany. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **62**, 537—542.
- 4) Harada A (1990) Quality control of analytical procedures used in biological monitoring in Japan. In : Fiserova-Bergerova V, Ogata M, eds. Biological monitoring of exposure to industrial chemicals. ACGIH, Cincinnati, pp 199—202.
- 5) Ogata M and Taguchi T (1988) Simultaneous determination of urinary creatinine and metabolites of toluene, xylene, styrene, ethylbenzene and phenol by automated high performance liquid chromatography. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **61**, 131—140.