

尿中馬尿酸，メチル馬尿酸およびマンデル酸の クロスチェック結果報告

労働衛生検査精度向上研究会

木戸 誠二郎（株式会社ビー・エム・エル）

1. はじめに

労働衛生検査精度向上研究会は、鉛・有機溶剤健康診断における生物学的モニタリングの精度向上および測定法の標準化等を目的とし、登録衛生検査所6社を含めた11機関で構成されている。本研究会では事業計画の一環として定期的な施設間クロスチェックを実施しているが、今回は2008年度に実施した尿中馬尿酸（HA）・メチル馬尿酸（MHA）およびマンデル酸（MA）の結果について報告する。

2. 試料及び方法

（1）試料

クロスチェック用試料は、各項目とも分布区分に合わせたばく露尿3濃度、標準水溶液3濃度とし、各試料はポリプロピレン製チューブに分注後、冷蔵状態にて各測定機関に送付した。標準水溶液の濃度は表1に示したとおりである。

表1 標準水溶液濃度

標準水溶液 (g/L)	試料 No.	HA	MHA	MA
	試料④	0.30	0.90	0.30
	試料⑤	1.00	3.00	1.00
	試料⑥	3.00	9.00	3.00

る。

（2）測定方法

研究会11施設中今回のクロスチェック参加は8施設であった。分析機器は、全施設高速液体クロマトグラフィ（HPLC）であり、測定に関する諸条件を表2、表3に示した。またそれぞれの測定フローを図1に示した。

HA, MHA, MA 共に7施設が前処理として希釈処理を行い、残り1施設はダイレクト注入を行っていた。また、充填剤の粒径が1.7～2μmのカラムを用いた超高速型HPLCが、HA, MHA 2施設, MA 1施設で使用されており、1サンプルの分析時間はHA, MHAにおいては2分～20分、MAにおいては6分～40分と施設間で大きな差があった。

3. 結果および考察

測定結果を表4～表6に示した。

HAにおいて施設間の変動係数（C.V.%）はばく露尿で3.3～4.1%、標準水溶液で1.6～3.0%であった。MHAの変動係数（C.V.%）はばく露尿で3.3～17.6%、標準水溶液で1.9～3.4%であった。2005年に行った本研究会のクロスチェック（参加HA 13施設、

表2 馬尿酸・メチル馬尿酸 分析条件表

測定諸条件	A	B
カラムメーカー	東ソー	資生堂
カラム品名	TSK-GEL ODS-80TM	CAPCELL PAK C18
カラムサイズ (mm)	4.6 × 150	2.0 × 75
粒径 (μm)	5	3
機器メーカー	島津	資生堂
ポンプ	LC-9A	SHISEIDO NANOSPACE3101
サンプラー	SIL-6B	SHISEIDO NANOSPACE3023
検出器	SPD-6AV	SHISEIDO NANOSPACE3002
移動相組成	アセトニトリル：リン酸緩衝液 = 15 : 85 1-デカンスルホン酸ナトリウムを添加	3g 臭化テトラ n-ブチルアンモニウム + 3g リン酸 二水素カリウム / 3L 超純水：メタノール = 9 : 3
流速 (mL/min)	0.6	0.3
測定波長 (nm)	225	225
試料注入量 (μL)	10	2
前処理法	希釈法	超純水で希釈
試料 (μL) / 希釈液 (μL)	10/990	50/1950
標準液メーカー	和光純薬	東京化成
計算法 (AREA, HEIGHT)	AREA	AREA
検量線ポイント数	4	3
各ポイントの濃度 (成分表記のないものは同一)	0.20, 0.50, 1.00, 2.00 g/L	0.5/1.0/2.0 g/L
報告下限 (g/L)	0.01	0.02
分析時間 (測定サイクル)	7.5 分 (30 分)	16 分

測定諸条件	C	D
カラムメーカー	東ソー	和光純薬
カラム品名	TSKgel ODS-80TM	WAKOSIL II
カラムサイズ (mm)	4.6 × 100	4.6 × 150
粒径 (μm)	5	5
機器メーカー	東ソー	下記参照
ポンプ	DP-8020	L-6000 (日立製作所)
サンプラー	AS-8020	AS-1550 (日本分光)
検出器	UV-8020	SPD-10A (島津製作所)
移動相組成	20mMKH ₂ PO ₄ (pH3.3) + 1-デカンスルホン酸 Na : アセトニトリル = 85 : 15	メタノール 750mL + 水 3000mL + リン酸二水素カリウム 4.09g + リン酸 1mL + β-シクロデキストリン 30.6g + n-カプリル酸 0.3mL
流速 (mL/min)	0.8	0.8
測定波長 (nm)	223	230
試料注入量 (μL)	20	2
前処理法	50%メタノール希釈後, 遠心 3000rpm * 5min.	前処理なし
試料 (μL) / 希釈液 (μL)	50/5000	
標準液メーカー	和光純薬, 東京化成	TCl
計算法 (AREA, HEIGHT)	AREA	HEIGHT
検量線ポイント数	1	1
各ポイントの濃度 (成分表記のないものは同一)	1.0g/L	0.5g/L
報告下限 (g/L)	HA 0.10 MHA 0.10	0.01
分析時間 (測定サイクル)	9.5 分 (10 分)	20 分前後 (21 分前後)

(つづく)

(つづき)

測定諸条件	E	F
カラムメーカー	東ソー	Waters
カラム品名	TSK-GEL	ACQUITY UPLC BEH C18
カラムサイズ (mm)	4.6 × 150	2.1 × 50
粒径 (μm)	5	1.7
機器メーカー	東ソー	Waters
ポンプ	CCPM-II	Waters UPLC
サンプラー	AS-8020	Waters UPLC
検出器	UV-8200	Waters UPLC
移動相組成	アセトニトリル+リン酸	β-CD45g + 酢酸 45ml + アセトニトリル 240ml + 精製水 2700ml
流速 (mL/min)	0.8	0.7
測定波長 (nm)	225	230
試料注入量 (μL)	15	2
前処理法	50%メタノールで 101 倍希釈	希釈法 (精製水)
試料 (μL) / 希釈液 (μL)	50/5000	47/893
標準液メーカー	和光純薬	関東化学, 東京化成
計算法 (AREA, HEIGHT)	AREA	HEIGHT
検量線ポイント数	1	1
各ポイントの濃度 (成分表記のないものは同一)	HA 2.00g/L MHA 0.5g/L (o-, m- と同)	0.5g/L
報告下限 (g/L)	HA 0.01 MHA 0.05	0.01
分析時間 (測定サイクル)	HA 7 分 MHA 9.5 分	2 分 (2.2 分)

測定諸条件	G	H
カラムメーカー	資生堂	日本分光
カラム品名	CAPCELL PAC MG C18	X-PressPak V-C18
カラムサイズ (mm)	3.0 × 75	2.0 × 50
粒径 (μm)	3	2
機器メーカー	日立	日本分光
ポンプ	L7000	3185PU
サンプラー	L7200	3059AS
検出器	L7400	3075UV
移動相組成	50mM リン酸 BUFFUR : アセトニトリル = 90 : 10	リン酸-カリ 6.94g/2520mL + アセトニトリル 180mL リン酸添加 Ph3.3 に調製
流速 (mL/min)	0.75	0.6
測定波長 (nm)	210	220
試料注入量 (μL)	10	1
前処理法	サンプルを 10%CH ₃ CN で 50 倍希釈	希釈法 (精製水)
試料 (μL) / 希釈液 (μL)	20/980	50/450
標準液メーカー	東京化成	東京化成
計算法 (AREA, HEIGHT)	AREA	AREA
検量線ポイント数	1	1
各ポイントの濃度 (成分表記のないものは同一)	HA 3.00g/L MHA : O-MHA 1.50g/L m + p として 3.00	HA : 0.5g/L 総 MHA : 0.3g/L
報告下限 (g/L)	0.01	0.01
分析時間 (測定サイクル)	7 分	6 分 (6.5 分)

表3 マンデル酸 分析条件表

測定諸条件	A	B
カラムメーカー	東ソー	資生堂
カラム品名	TSK-GEL ODS-80TM	CAPCELL PAK C18
カラムサイズ (mm)	4.6 × 250	2.0 × 75
粒径 (μm)	5	3
機器メーカー	島津	資生堂
ポンプ	LC-9A	SHISEIDO NANOSPACE3101
サンプラー	SIL-6B	SHISEIDO NANOSPACE3023
検出器	SPD-6AV	SHISEIDO NANOSPACE3002
移動相組成	アセトニトリル：リン酸緩衝液 = 15 : 85 1-デカンスルホン酸ナトリウムを添加	3g 臭化テトラn-ブチルアンモニウム + 3g リン酸二水素カリウム / 3L 超純水 : メ タノール = 9 : 3
流速 (mL/min)	0.6	0.3
測定波長 (nm)	210	225
試料注入量 (μL)	10	2
前処理法	希釈法	超純水で希釈
試料 (μL) / 希釈液 (μL)	10/990	50/1950
標準液メーカー	和光純薬	東京化成
計算法 (AREA, HEIGHT)	AREA	AREA
検量線ポイント数	4	3
各ポイントの濃度	0.20, 0.50, 1.00, 2.00 g/L	0.5 / 1.0 / 2.0 g/L
報告下限 (g/L)	0.01	0.02
分析時間 (測定サイクル)	11.3 分 (40 分)	16 分

測定諸条件	C	D
カラムメーカー	東ソー	東ソー
カラム品名	TSKgel ODS-80TM	TSK-GEL ODS-120A
カラムサイズ (mm)	4.6 × 100	4.6 × 250
粒径 (μm)	5	5
機器メーカー	東ソー	下記参照
ポンプ	DP-8020	L-6000 (日立製作所)
サンプラー	AS-8020	AS-1550 (日本分光)
検出器	UV-8020	SPD-10A (島津製作所)
移動相組成	20mMKH ₂ PO ₄ (pH3.3) + 1-デカン スルホン酸 Na : アセトニトリル = 85 : 15	MP-A : メタノール 180mL + リン酸緩衝 液 2820mL (リン酸二水素カリウム 8.16g / 精製水 3000mL + リン酸 1.8mL) MP-B : メタノール 2100mL + リン酸緩衝 液 900mL
流速 (mL/min)	0.8	1
測定波長 (nm)	223	205
試料注入量 (μL)	20	5
前処理法	50%メタノール希釈後、遠心 3000rpm * 5min.	前処理なし
試料 (μL) / 希釈液 (μL)	50/5000	
標準液メーカー	和光純薬	和光純薬
計算法 (AREA, HEIGHT)	AREA	HEIGHT
検量線ポイント数	1	1
各ポイントの濃度	1.0g/L	0.5g/L
報告下限 (g/L)	0.10	0.01
分析時間 (測定サイクル)	9.5 分 (10 分)	40 分前後 (41 分前後)

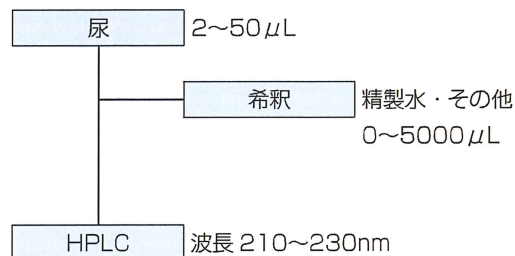
(つづく)

(つづき)

測定諸条件	E	F
カラムメーカー	東ソー	和光純薬
カラム品名	TSK-GEL	Wakosil 5C18 RS
カラムサイズ (mm)	4.6 × 150	4.6X150
粒径 (μm)	5	5
機器メーカー	東ソー	日立
ポンプ	CCPM-II	L7100
サンプラー	AS-8020	L7250
検出器	UV-8200	L7400
移動相組成	アセトニトリル+リン酸	アセトニトリル 180ml + 酢酸 30ml + 超純水 2700ml
流速 (mL/min)	0.8	1.0
測定波長 (nm)	225	225
試料注入量 (μL)	15	20
前処理法	50%メタノールで 101 倍希釈	希釈法 (精製水)
試料 (μL) / 希釈液 (μL)	50/5000	95/855
標準液メーカー	和光純薬	シグマ
計算法 (AREA, HEIGHT)	AREA	HEIGHT
検量線ポイント数	1	1
各ポイントの濃度	0.1008 g/L	1.0g/L
報告下限 (g/L)	0.03	0.10
分析時間 (測定サイクル)	11 分	18 分 (30 分)

測定諸条件	G	H
カラムメーカー	GL サイエンス	日本分光
カラム品名	Inertsil ODS3V	X-PressPak V-C18
カラムサイズ (mm)	4.6X250	2.0 × 50
粒径 (μm)	5	2
機器メーカー	日立	日本分光
ポンプ	L7000	3185PU
サンプラー	L7200	3059AS
検出器	L7400	3075UV
移動相組成	50mM リン酸 BUFFUR : アセトニトリル = 90 : 10	リン酸一カリ 6.94g/2520mL + アセトニトリル 180mL リン酸添加 Ph3.3 に調製
流速 (mL/min)	1	0.6
測定波長 (nm)	210	220
試料注入量 (μL)	10	1
前処理法	サンプルを 10%CH ₃ CN で 50 倍希釈	希釈法 (精製水)
試料 (μL) / 希釈液 (μL)	20/980	50/450
標準液メーカー	東京化成	和光純薬
計算法 (AREA, HEIGHT)	AREA	AREA
検量線ポイント数	1	1
各ポイントの濃度	3.00g/L	0.3g/L
報告下限 (g/L)	0.01	0.01
分析時間 (測定サイクル)	20 分	6 分 (6.5 分)

・馬尿酸・メチル馬尿酸



・マンデル酸

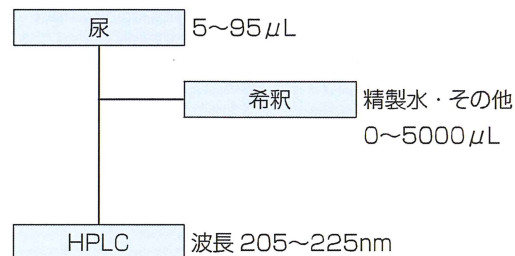


図1 測定フロー

表4 馬尿酸 クロスチェック測定結果

施設		A	B	C	D	E	F	G	H	Mean (g/L)	S.D. (g/L)	C.V. (%)
ばく露尿	試料①	0.30	0.34	0.32	0.32	0.30	0.32	0.31	0.32	0.32	0.013	4.1
	試料②	1.55	1.61	1.59	1.56	1.68	1.61	1.60	1.73	1.62	0.060	3.7
	試料③	4.70	4.86	4.77	4.83	4.99	4.53	4.79	5.02	4.81	0.157	3.3
水溶液	試料④	0.32	0.30	0.30	0.31	0.32	0.31	0.30	0.32	0.31	0.009	3.0
	試料⑤	1.04	1.03	0.99	1.02	1.03	1.01	1.01	1.04	1.02	0.017	1.6
	試料⑥	3.09	3.11	2.96	3.06	3.10	2.94	3.02	3.08	3.04	0.065	2.1

表5 メチル馬尿酸 クロスチェック測定結果

施設		A	B	C	D	E	F	G	H	Mean (g/L)	S.D. (g/L)	C.V. (%)
ばく露尿	試料①	0.30	0.25	0.32	0.23	0.19	0.23	0.21	0.26	0.25	0.044	17.6
	試料②	0.86	0.83	0.70	0.84	0.79	0.81	0.82	0.85	0.81	0.051	6.2
	試料③	1.94	1.88	2.06	1.88	1.91	1.88	1.88	1.95	1.92	0.063	3.3
水溶液	試料④	0.96	0.90	0.89	0.94	0.89	0.91	0.89	0.96	0.92	0.031	3.4
	試料⑤	3.12	3.06	2.96	3.10	3.02	3.02	2.99	3.13	3.05	0.063	2.1
	試料⑥	9.32	9.30	8.95	9.22	9.21	8.92	9.15	9.40	9.18	0.172	1.9

表6 マンデル酸 クロスチェック測定結果

施設		A	B	C	D	E	F	G	H	Mean (g/L)	S.D. (g/L)	C.V. (%)
ばく露尿	試料①	0.15	0.15	0.18	0.15	0.18	0.17	0.19	0.23	0.18	0.027	15.6
	試料②	0.73	0.74	0.68	0.60	0.60	0.60	0.61	0.69	0.66	0.060	9.2
	試料③	1.36	1.31	1.38	1.30	1.30	1.39	1.35	1.48	1.36	0.060	4.4
水溶液	試料④	0.32	0.29	0.29	0.30	0.32	0.30	0.30	0.33	0.31	0.015	4.8
	試料⑤	1.05	1.02	0.99	1.00	1.06	0.99	1.01	1.05	1.02	0.029	2.8
	試料⑥	3.13	3.11	2.95	3.00	3.09	2.95	3.02	3.14	3.05	0.078	2.6

MHA 12 施設) での変動係数 (C.V.%) は HA 6.6~19.7%, MHA 4.6~33.2% であり、今回はそれと比較して測定値の収束が認められた。

また、MA では施設間の変動係数 (C.V.%) はばく露尿で 4.4~15.6%, 標準水溶液で 2.6~4.8% であり、2000 年に行った本研究会のクロスチェック (参加 12 施設) での変動係数 (C.V.%) 5.6~18.2% と同様な結果が得られた。

MHA および MA においてばく露尿の低濃度試料 (試料①) は、変動係数 (C.V.%) が 15% 以上であったが、標準水溶液や中・高濃度ばく露尿の集計結果が良好であることから、低濃度のばく露尿ではクロマトグラム上の小さな夾雑物質やノイズの影響を受けている可能性が示唆された。

2005 年の HA・MHA クロスチェックでは、充填剤の粒径が 3 μ m 以下のカラムを使用していた施設は 13 施設中 1 施設、2000 年の MA クロスチェックにおいては 12 施設中 0 施設であった。今回、参加 8 施設中 HA・MHA において 4 施設、MA において 2 施設が粒径 3 μ m 以下のカラムを使用していたが、その充填剤の粒径の違いを含め、分析条件の違いによる測定値への影響は各項目とも認められなかった。

3. まとめ

近年液体クロマト分析では、技術の進歩に伴

い充填剤の粒径を小さくすることが可能となり、分析時間の短縮が可能となってきた。今回のクロスチェックでも粒径 3 μ m 以下のカラムを処している施設が増加し、粒径 1.7~2 μ m のカラムを用いた超高速型 HPLC を使用している施設もあった。今回のクロスチェックは、そのような新技術が導入された中で実施したものであったが、結果は概ね良好であった。

尚、低濃度ばく露尿での変動係数 (C.V.%) は依然高く、今後も分析条件等の検討を継続し、さらなる精度向上が必要であることが示された。

〈参考文献〉

- 1) 労働衛生検査精度向上研究会活動報告：尿中馬尿酸およびメチル馬尿酸のクロスチェック結果報告 労働衛生管理 vol.17 No.1 通巻第 63 号 (2006)
- 2) 労働衛生検査精度向上研究会活動報告：尿中馬尿酸、メチル馬尿酸、マンデル酸の施設間誤差について 労働衛生管理 vol.12 No.3 通巻第 47 号 (2001)

* 労働衛生検査精度向上研究会会員：佐賀大学医学部 市場 正良、(財)神奈川県予防医学協会、(財)近畿健康管理センター、中央労働災害防止協会労働衛生調査分析センター、東京労災病院産業中毒研究センター、パナソニック産業衛生科学センター、(株)エスアールエル、(株)江東微生物研究所、(株)ビー・エム・エル、(株)保健科学研究所、三菱化学メディエンス(株)、(株)メデカジャパン・ラボラトリー