

原 著

元素選択型キレート樹脂を用いた尿中鉛の高精度簡易測定法

竹内 幸子¹⁾²⁾, 圓藤 陽子¹⁾, 中嶋 義明¹⁾²⁾, 井上 嘉則³⁾
小川 真規¹⁾, 福田 隆広²⁾, 圓藤 吟史³⁾¹⁾東京労災病院産業中毒研究センター, ²⁾同 臨床検査科, ³⁾大阪市立大学大学院医学研究科産業医学

(平成 18 年 9 月 1 日受付)

要旨: [目的]尿中鉛濃度測定は, 作業員への負担が少なく長期曝露の指標として望ましい方法であるが, グラファイト炉原子吸光法(GF-AAS)では, 様々な前処理を必要とし, 測定が困難であった。それ故, 高精度で簡易な測定法を確立するために, 遷移元素を選択的に捕集できるキレート樹脂による固相抽出法を用いた尿中鉛測定を検討した。[方法]尿に同量の 0.2N 酢酸アンモニウムを加え, pH が 4~6 にあることを確認後, カラムに通し, 溶液中の鉛をキレート樹脂に捕捉させた。超純水 20ml を流してカラムを洗浄後, 硝酸溶液 1.0ml により金属を回収した。[結果]尿量は 5~100ml 捕集でき, 溶出液は 1.0N 硝酸溶液 1.0ml により 100% 回収できたので, 100 倍濃縮が可能であった。種々の濃度の鉛を添加した尿において検討した結果, キレート樹脂の固相抽出法によりアルカリ及びアルカリ土類金属はほぼ 100% 除去され, 添加鉛は 95.4~114.5% 回収された。[結論]標準尿, 作業員尿及び腐敗尿による測定においても精度の良い測定結果が得られたので, 本法は尿中鉛測定法として実用的であると考えられた。

(日職災医誌, 55: 15—19, 2007)

—キーワード—

元素選択型キレート樹脂, 尿中鉛, 固相抽出法

はじめに

職業性鉛曝露の指標としては血液中鉛測定が最も有用な生体曝露指標と考えられて, 世界中で測定されている¹⁾。一方, 尿中鉛の測定は作業員への負担が少なく, 試料採取が簡単なことから, 長期曝露の生物学的モニタリング指標として望ましい方法であると考えられるが, 血中鉛濃度との相関が悪いことから, あまり採用されてこなかった¹⁾。しかしながら, 血中鉛の 90~99.8% は赤血球に存在し固定されているので, 血中鉛濃度は生体影響指標との相関があまり良くなく, むしろ 0.2~10% しか存在していないが可動性がある血清中の鉛は生物活性が高く, 標的臓器における濃度を反映するので生体影響との相関が良い²⁾。尿中鉛濃度は血清中に拡散し腎臓から排泄される鉛量を反映していると考えられており, 実際に血清中鉛濃度と良い相関が得られている²⁾。また, キレート療法により尿中に排泄される鉛量は生体中の毒性量を示すとみなされている³⁾。このように, 尿中鉛量は,

鉛による毒性指標となるので, 曝露指標となる血中濃度とともに測定されることが望ましい。

尿中鉛測定には, ICP-AES や ICP-MS, グラファイト炉原子吸光法 (GF-AAS) を用いた測定が実施されているが, 低融点金属である鉛では, 共存する有機物や大量のアルカリ金属・アルカリ土類金属による影響が顕著であり, 湿式灰化や溶媒抽出法等の何らかの前処理により共存元素との分離や目的元素の濃縮が必要とされる⁴⁾⁵⁾。また, 湿式灰化後に DDTC-MIBK 抽出を行った試料を分析に供していたので, 時間がかかるとともに廃棄処理の経費が問題となっていた。

近年, 遷移金属を選択的に保持するキレート樹脂が開発されて河川水や海水中の金属分析に使われている^{6)~8)}。その中でも, ポリアミノポリカルボン酸(PAPC)型官能基を持つキレート樹脂固相抽出剤である NO-BIAS Chelate PA-1 は, 酸性領域においては, Na, K, Ca などのアルカリおよびアルカリ土類をほとんど捕捉しないが, Pb, Bi, V, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Al, Ga, In, Cd, Ag, W, Zr, Th, Sn, Ti, U など多くの金属元素を捕捉でき, アルカリ金属・アルカリ土類金属と遷移金属の分離に優れていることから, 海水中の重金属の濃縮分析に使用されている⁹⁾。それによると

An accurate and rapid analysis for lead in urine using solid phase extraction column packed with a functional chelating resin

PbはpH3~7の範囲でほぼ100%捕捉され、Na, K, CaはpH7以下では殆ど捕捉されないことが明らかにされている。

今回、このNOBIAS Chelate PA-1を用いた固相抽出法によって、前処理を簡単にし、かつ偏光ゼーマンGF-AAS、紫外部吸収GF-AASのいずれにおいても尿中鉛を精度良く測定することが可能となったので報告する。

方 法

1) 試薬

0.1% 硝酸溶液：ICP-MS用硝酸（TAMA PURE-AA-10, タマケミカル, 東京）は水道水をMilli-Q-ICP-MS（Millipore Japan, 東京）により精製した超純水で希釈して用いた。

0.1M 酢酸アンモニウム緩衝液：鉄試験用酢酸アンモニウム緩衝液（関東化学, 東京）を本報告で使用したキレート樹脂（NOBIAS Chelate PA-1）で精製した後に使用した。

標準液：ICP-MS分析には多元素混合標準溶液（10 mg/l）（CertiPrep, SPEX, USA）、および内標準溶液として原子吸光分析用Ge標準溶液（1,000mg/l）（和光純薬, 大阪）を0.1%硝酸溶液で希釈して用いた。AAS分析には原子吸光分析用Pb標準溶液（1,000mg/l）（和光純薬, 大阪）を用いた。

尿標準試料としてSeronom Trace Elements Urine & Urine Blank（SERO AS, Norway）を用いた。

2) 固相抽出

固相抽出カラムとして、多孔質ポリヒドロキシメタクリレートにイミノ二酢酸・エチレンジアミン三酢酸を導入したキレート樹脂固相充填カラムNOBIAS Chelate PA-1（日立ハイテクノロジー, 東京）を用いた。樹脂粒子径は45~90 μ m、充填量は240mgであった。

固相抽出カラムは1N硝酸による洗浄および0.1M酢酸アンモニウムによるコンディショニング⁹⁾を行った。標準液または尿に同量の0.2M酢酸アンモニウムを加え、pHが4~6にあることを確認後、カラムに通し、溶液中の鉛をキレート樹脂に捕捉させた。超純水20mlを流してカラムを洗浄した後、硝酸溶液1.0mlにより鉛を回収した。

3) 分析装置とその測定条件

1) ICP-MSはHP4500（Agilent, USA）を用いた。検出質量数（m/z）は、Pb=208を用い、内標準としてY=89を用いた。尿試料を固相抽出しない場合は、超純水により尿を10倍希釈して導入した。

2) 偏光ゼーマン補正グラファイト炉原子吸光光度法（Zeeman GF-AAS）はZ-2000 AAS（Hitachi High-Technologies, Japan）を用いた。波長283.3nmの分析線を用い、試料量は10 μ l、温度プログラムは、60 $^{\circ}$ C~110 $^{\circ}$ Cで40 sec乾燥、500 $^{\circ}$ Cで20 sec灰化、2,000 $^{\circ}$ Cで3 sec

原子化した後2,800 $^{\circ}$ Cで4 sec洗浄した。尿試料を固相抽出しない場合は、化学修飾剤としてパラジウム/マグネシウム（Pd/Mg）溶液（Pd 1,000ppm + Mg 100ppm）10 μ lを添加して分析した。

3) D₂補正グラファイト炉原子吸光光度法（UV GF-AAS）は、AA6800 AAS（Shimadzu, Japan）を用いた。波長283.3nmの分析線を用い、試料量は10 μ l、温度プログラムは、70~130 $^{\circ}$ C/50 sec乾燥、500 $^{\circ}$ Cで20 sec灰化、2,000 $^{\circ}$ Cで3 sec原子化した。尿試料を固相抽出しない場合は、尿20mlを硝酸/硫酸/過塩素酸による湿式灰化後、DDTC-MIBK抽出した溶液10 μ lを分析に供した。固相抽出した場合は、溶出液を超純水により5倍希釈して分析した。

4) 試料中のナトリウム（Na）およびカリウム（K）は電極法（7600型 臨床検査自動分析装置, 日立製作所）により測定し、カルシウム（Ca）はICP-MSにて測定し、m/zはCa=43、内標準としてY=89を用いた。

結 果

pH4~6における鉛濃度10 μ g/lの標準液50mlをNOBIAS Chelate PA-1による固相抽出後、溶出液を50mlとしICP-MSで測定したところ、繰り返し精度はN=5で、10.41 \pm 0.25 μ g/l、CV=2.4%であった。

尿負荷時における固相抽出カラムからの鉛の溶出を確認するために、硝酸の濃度と溶出液量を変えて検討した。健康人によるプール尿に40 μ g/l濃度の鉛を添加し、その5mlをカラムに通し、1, 2, 3mlの1.0Nまたは3.0N硝酸により溶出させ、ICP-MSにて測定した。その結果、表1に示すように回収率は、ほぼ同一の102~107%の範囲にあったことから、1.0N硝酸1mlによる溶出で十分であった。

固相抽出カラムの鉛保持量を確認するために、負荷尿量を20倍まで増加させて検討した。健康人によるプール尿に40 μ g/lの濃度に鉛を添加し、その5, 10, 20, 50, 100mlを同量の0.2M酢酸アンモニウムで2倍に希釈して固相抽出し、ICP-MSにて測定した結果、回収率は図1に示すように97~105%と一定であった。

非曝露者尿に鉛を14.5, 29.0, 72.7 μ g/l添加し、その

表1 溶出液としての硝酸の濃度及び量による尿中添加鉛の回収率

硝酸濃度	項目	硝酸の液量		
		1mL	2mL	3mL
1N	無添加尿 (μ g/L)	0.4	0.4	0.5
	添加尿 (μ g/L)	42.6	41.9	41.2
	回収率 (%)	105.5	103.8	101.8
3N	無添加尿 (μ g/L)	0.3	0.3	0.3
	添加尿 (μ g/L)	43.0	42.6	42.5
	回収率 (%)	106.8	105.8	105.5

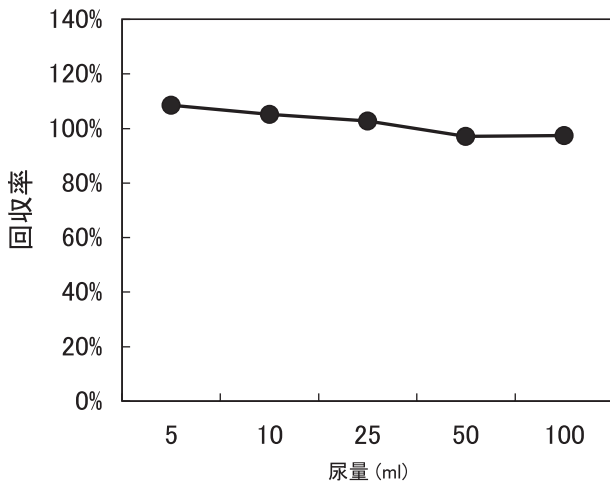


図1 負荷尿量を増加させた場合の回収率の変化。

尿中の鉛濃度を ICP-MS, 灰化-DDTC-MIBK 抽出 GF-AAS, Zeeman GF-AAS で分析した。次に, 添加尿を固相抽出後, ICP-MS, Zeeman GF-AAS, UV GF-AAS で測定した (表2)。その結果, 固相抽出なしの灰化-DDTC-MIBK 抽出 UV GF-AAS, Zeeman GF-AAS は良好な回収率が得られなかったが, 固相抽出した場合はすべての方法において, ほぼ 100% の回収率が得られた。この被検査尿の固相抽出前の Na, K, Ca 濃度はそれぞれ 5,700, 2,300, 142mg/l であったが, 固相抽出した後の溶出液中の Na, K, Ca 濃度は, それぞれ 1mg/l 未満, 1mg/l 未満, 1.3mg/l となった。

次に, 鉛作業員等の尿試料に 40µg/l の濃度に鉛を添加して, その回収率を検討した結果を表3に示した。また, 固相抽出前後における Ca, Na, 及び K の濃度を比較すると, 固相抽出により, これらの元素はほぼ完全に除去されていた (表4)。いずれの鉛作業員尿においても, ま

表2 固相抽出法と各種分析法との組み合わせによる鉛添加尿の測定結果

Added Pb	ICP-MS				UV-NF AAS				Zeeman NF AAS			
	生尿 10 倍希釈		固相抽出		湿式灰化-DDTC-MIBK 抽出		固相抽出		Pd/Mg 補正		固相抽出	
µg/L	µg/L	%	µg/L	%	µg/L	%	µg/L	%	µg/L	%	µg/L	%
0.0	1.6		1.6		3.2		2.2		0.7		1.8	
14.5	15.2	93.8	15.4	95.4	28.3	173.1	18.8	114.5	10.8	69.9	18.3	113.6
29.0	29.4	95.9	29.5	96.5	19.6	56.6	33.6	108.5	20.8	69.4	31.8	103.4
72.7	71.9	96.7	73.5	99.0	63.0	82.3	80.0	107.1	55.5	75.4	73.7	98.9

表3 鉛作業員尿における固相抽出法の応用

作業員	尿の混濁	クレアチニン濃度 (g/L)	鉛濃度 (µg/L)	添加後鉛濃度 (µg/L)	回収率 (%)
作業員 1	-	0.61	26.9	69.5	106.4
作業員 2	+	1.26	65.4	108.8	108.8
作業員 3	++	3.37	77.7	114.8	92.5
腐敗尿	+++	-	2.1	21.9	98.7

表4 作業員尿中からのアルカリおよびアルカリ土類の除去率

元素	項目	ナトリウム (mEq/L)	カリウム (mEq/L)	カルシウム (mg/L)
作業員 1	生尿	151	47	41
	抽出溶液	< 4	< 0.2	0.002
	除去率 (%)	> 97.4	> 99.6	> 99.9
作業員 2	生尿	248	38.9	142
	抽出溶液	< 4	< 0.2	0.004
	除去率 (%)	> 98.4	> 99.5	> 99.9
作業員 3	生尿	82	54.4	103
	抽出溶液	< 4	< 0.2	0.009
	除去率 (%)	> 95.1	> 99.6	> 99.9
腐敗尿	生尿	160	58.4	107
	抽出溶液	< 4	< 0.2	0.013
	除去率 (%)	> 97.5	> 99.7	> 99.9

表5 標準尿 (Seronom Trace Elements Urine) における分析結果 (N = 5)

試料	分析結果 (µg/L)	認証値 (µg/L)
Urine Lot No.2525	89.7 ± 1.2	91.1 ± 7.0
Urine Blank Lot No.2524	0.65 ± 0.02	0.65 ± 0.12

た腐敗尿においても、灰化操作なしに添加鉛量のほぼ100%の回収率が得られたことから、保存された作業尿の分析においても、十分分析可能と考えられた。

尿標準試料 (Seronorm Trace Elements Urine) 5ml を固相抽出し、溶出液を5mlとしてICP-MSにて分析した分析値と認証値を表5に示した。標準ブランク尿および標準尿のいずれも認証値と良く一致し、しかも標準偏差は、認証値よりも小さく、精度よく測定されていた。

考 察

生体試料中の金属測定には、高感度で微量試料でも分析が可能であることから、GF-AASが広く使われているが、尿中鉛の測定は低融点の金属であること、大量のアルカリ及びアルカリ土類金属が共存しており、そのマトリックスの個人差が大きいことから、各種補正方法を加えても正確な数値を得るのが困難であることが報告されている¹⁰⁾。近年、海水中の微量金属の測定にキレート樹脂固相抽出剤による前処理を用いることにより、アルカリ及びアルカリ土類金属を除去して鉛やカドミウム等の多くの遷移類金属を濃縮できることが報告された⁹⁾。今回用いたNobias PA-1では、図1に示すように尿においても100mlの尿中の鉛をほぼ100%捕集でき、またその捕集した鉛の溶出には、硝酸濃度は1.0N、溶液量は1mlで十分であった(表1)。GF-AAS分析においては、試料と標準液の硝酸濃度を一致させれば、定量値に影響はない¹¹⁾ので、超純水1mlによる溶出を加えた場合でも尿中の鉛を50倍まで濃縮できる。キレート抽出を行った場合は、表2で明らかのようにゼーマン補正法及び紫外外部吸収補正法のいずれにおいても尿に添加した鉛は100%回収されている。しかしながら、最も有効な補正法として知られる偏光ゼーマン補正法においても生尿の分析はPd/Mg補正法のみでは70%の回収率しか得られず、湿式灰化-DDTC-MIBK抽出-GF AAS測定では数値は大きくずれた。ICP-MSにおいては、尿の希釈だけで十分な測定ができるとされており³⁾、今回の結果でも生尿の10倍希釈において平均95.5%の回収率が得られたが、キレート抽出により97.0%とさらに良くなった。このことは、尿は試料によってアルカリ塩類などのマトリックスが大きく異なるので、GF AAS法のみならずICP-MS法においてもこれらによるマトリックス効果を減じることができるキレート樹脂による前処理は有効だと考えられた。

また、尿の混濁の程度やクレアチン濃度の異なる3名の作業尿と腐敗尿における検討においてもほぼ100%の添加鉛が回収され、アルカリ・アルカリ土類元素が除去されていた(表3、表4)。さらに、標準尿による測定においても、認証値よりも精度良く測定されており、キレート抽出法による測定の正確性と再現性が良いことが示された(表4)。

以上の結果から、生尿をキレート抽出することにより、ICP-MS分析およびGF-AAS分析において、尿中鉛を精度良く測定することが可能となった。本法は、生尿をキレート樹脂による固相抽出をすることにより簡単に精度良くかつ濃縮することが可能なので、尿中鉛測定法として実用的であると考えられた。

謝辞：本研究は独立法人 労働者健康福祉機構「労災疾病12分野研究開発事業」および文部科学省科学研究費補助金(萌芽研究)17659178によるものである。

(株)日立ハイテクノロジーズ ナノテクノロジー製品事業部 那珂事業所那珂アプリケーションセンター 山本和子氏よりキレート抽出法および原子吸光法に関する技術情報の提供とアドバイスを戴き、深謝致します。

文 献

- 1) Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, et al: A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect* 113: 1669—1674, 2005.
- 2) Hirata M, Yoshida T, Miyajima K, et al: Correlation between lead in plasma and other indicators of lead exposure among lead-exposed workers. *Int Arch Occup Environ Health* 68: 58—63, 1995.
- 3) Sakai T: Biomarkers of lead exposure. *Ind Health* 38: 127—142, 2000.
- 4) Delon H: Metals in urine. In: Kneip TJ, Crable JV (eds.) *Methods for biological monitoring*, Washington, DC, American Public Health Association, 1988, 229—235.
- 5) Schramel P, Begerow J, Emons H: The use of ICP-MS for human biomonitoring. In: Angerer J, Schaller, KH (eds.) *Analysis of Hazardous Substances in Biological Materials Volume 6*, Weinheim, Wiley-VCH, 1999, 1—45.
- 6) Bashir W, Paull B: Sensitive and selective ion chromatographic method for the determination of trace beryllium in water samples. *J Chromatogr A* 910: 301—309, 2001.
- 7) Gao Y, Oshita K, Lee KH, et al: Development of column-pretreatment chelating resins for matrix elimination/multi-element determination by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analyst* 127: 1713—1719, 2002.
- 8) Juang RS, Wang YC: Use of complexing agents for effective ion-exchange separation of Co (II)/Ni (II) from aqueous solutions. *Water Res* 37: 845—852, 2003.
- 9) 坂本秀之, 山本和子, 白崎俊浩, 井上嘉則: ポリアミノポリカルボン酸型キレート樹脂固相抽出カラムを用いる海水中微量金属の前処理方法. *分析化学* 55: 133—139, 2006.
- 10) 道辻広美, 大原昭男, 兼高明生, 藤木幸雄: 金属間化合物及びNaClの効果を応用した尿中鉛の直接定量法. *松仁会医誌* 23: 175—183, 1984.
- 11) 広川吉之助: 分析特性と定量例, 高純度技術体系: 保母敏行監修. 東京, フジ・テクノシステム, 1997, Vol 1, 分析技術, pp 471—482.

(原稿受付 平成 18.9.1)

別刷請求先 〒143-0013 東京都大田区大森南 4-13-21
独立行政法人勤労者健康福祉機構・東京労災病
院・産業中毒研究センター
圓藤 陽子

Reprint request :

Yoko Endo
Research Center for Occupational Poisoning, Tokyo Rosai
Hospital, 4-13-21, Omoriminami, Ohta-ku, Tokyo, 143-0013, Ja-
pan

AN ACCURATE AND RAPID ANALYSIS FOR LEAD IN URINE USING SOLID PHASE EXTRACTION
COLUMN PACKED WITH A FUNCTIONAL CHELATING RESIN

Sachiko TAKEUCHI^{1,2)}, Yoko ENDO¹⁾, Yoshiaki NAKAJIMA¹⁾²⁾, Yoshinori INOUE³⁾,
Takahiro FUKUDA²⁾, Masanori OGAWA¹⁾ and Ginji ENDO³⁾

¹⁾Research Center for Occupational Poisoning, Tokyo Rosai Hospital, Japan Labour Health and Welfare Organization,

²⁾Clinical Laboratory, Tokyo Rosai Hospital, Japan Labour Health and Welfare Organization,

³⁾Industrial Medicine, Graduate School of Medicine, Osaka City University

[Purpose] Since measurement of urinary lead is easy to perform, it is desirable as an index of long-term exposure. However, measurement was difficult by graphite furnace atomic absorption spectrometry because various pretreatment steps were required. In order to establish an accurate and rapid method of analysis of lead in urine, we examined the solid-phase extraction method (SPE) using a functional chelate resin column which could sample transitional elements selectively. [Methods] Urine and the same amount of 0.2N ammonium acetate were mixed, checked for pH 4–6, and loaded onto the extraction column. Lead in the urine was captured by the chelating resin, the column was washed with 20ml of super-pure water, and lead was eluted with 1.0ml of nitric acid solution. [Results] Five to 100 ml urine could be loaded onto the column and 100% recovery was obtained with 1.0 ml of 1N HNO₃, yielding a 100-fold range of concentration. The results of recovery testing using urine with various concentrations of lead added indicated that added lead was recovered at 95.4 to 114.5% and alkali and alkaline earth metals were removed at approximately 100% by SPE using the chelating resin column. Certified urine, lead workers' urine and corrupted urine were analyzed, and good accuracy was obtained. This method is practical for urinary lead measurement.
