

有機溶剤の尿中代謝産物の研究

第 1 報

トルエン、キシレン及びスチレンの尿中代謝産物の 薄層クロマトグラフによる定量

岡山大学医学部公衆衛生学教室

田 口 豊 郁

(昭和58年3月11日受稿)

Key words: 薄層クロマトグラフィー, トルエン, キシレン, スチレン
生物学的暴露指標

緒 言

トルエン及びキシレンは、塗料、溶剤、印刷用インク、接着剤等に広く産業現場で利用されている。また、スチレンも、ポリスチレンゴム、スチレン-ブタジエンゴム等の製造原料の他、不飽和ポリエステル樹脂、塗料として広く利用されている。従って、これらの有機溶剤を取り扱う作業者の有機溶剤暴露の評価のためには、これらの有機溶剤暴露による尿中代謝産物量を定量することが必要である。この点に関して、Pagnottoらは¹⁾、1962年の緒方ら²⁾による研究「トルエン使用プラスチック工場での作業者の尿中馬尿酸の研究」が工場におけるトルエン取扱い作業者の尿中馬尿酸を測定した世界最初の例であると述べている。その後、緒方らは、ペーパークロマトグラフ法^{2,3)}、薄層クロマトグラフ法(TLC)^{3,4)}、高速液体クロマトグラフ法(HPLC)^{5,6)}、直接比色法⁷⁾による定量法を、また、吉良はガスクロマトグラフ法⁸⁾による定量法を報告した。

本研究では、尿を薄層プレートに直接スポット後、前報⁴⁾の2回展開法をさらに改良して、トルエン、o-及びm-又はp-キシレンの尿中代謝産物である馬尿酸(HA)、o-及びm-又はp-メチル馬尿酸(MHA)の各々を、1回展開のみで、同時に確実に分離できる展開液を考案し、分離後、各々の代謝産物を抽出し、比色定量できる方法を開発したので報告する。

なお、本法による展開液を用いると、スチレンの代謝産物であるマンデル酸(MA)及びフェニルグリオキシル酸(PGA)が、HA及びMHAとともに尿中に含まれている場合にも、これらの代謝産物を相互に分離することができた。

実験材料ならびに実験方法

◎材料

1. 正常人尿と、トルエン、キシレン及びスチレンに暴露された工場作業者の作業後尿を-40℃で凍結したものを用いた。

2. TLCプレート

プレート(メルク製、シリカゲル60 F₂₅₄, 20×20cm, 厚さ0.25mm)を使用前に105℃で1時間活性化させた後使用した。

3. 展開液

後述の〔表1〕に示すように、クロロホルム、アセトン、トルエン、メタノール及び酢酸の組成比を変えた展開液を用いて、分離能力及び精度の比較を行った。

◎方法

1. 薄層クロマトグラフ法(TLC)

HAとMHAの分離の際の展開液に、〔クロロホルム-アセトン-酢酸(8:2:1)〕を用いた緒方らの報告⁴⁾があるが、この展開液を用いた場合、HAとo-MHAは、1回展開で分離できたが、HAとm-及びp-MHAは、1回展開では分離が充分ではなかった。本研究では、上述のように展開液に改良を加えて、HAとm-又はp-MHA

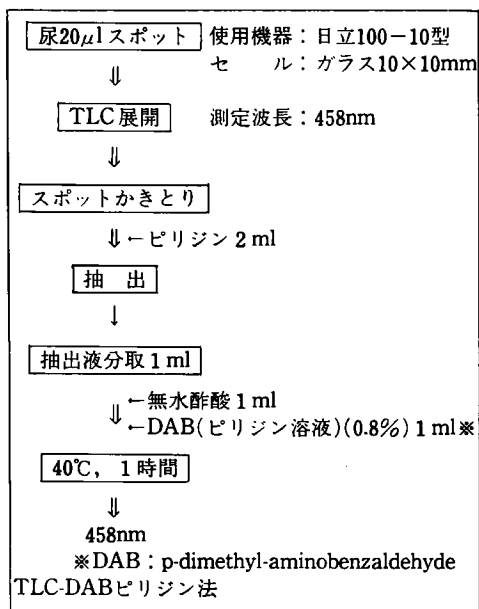


図 1 A

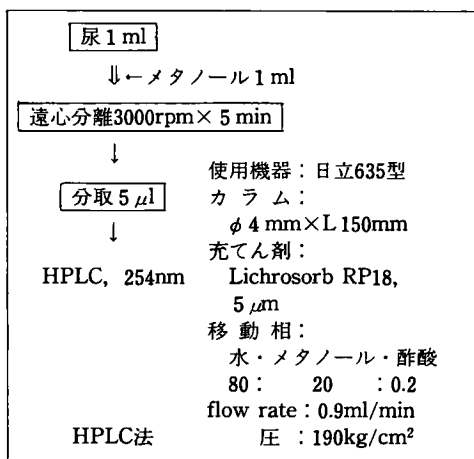


図 1 B

及びo-MHA の分離について検討を行った。

尿20 μ lを TLC にスポットし、〔表1〕の展開液で1回展開(約60分)した。溶媒揮散後、マナスル燈(254nm)を用いて、各々のスポット位置を確認した。HA, MHA については、各々のスポットをかきとり、2 mlのピリジンで抽出後、大森、緒方らの発色法⁹⁾(DAB-ピリジン法)により、比色定量した。すなわち、抽出液 2 ml

から1 mlを分取し、これに0.8w/v %ジメチルアミノベンズアルデヒドのピリジン溶液1 mlを加えさらに無水酢酸1 mlを加えて、40 $^{\circ}$ Cで1時間加熱後、その発色を458nmで定量した(〔図1 A〕)。

2. 高速液体クロマトグラフ法(HPLC法)

尿中代謝産物の定量は、〔図1 B〕に示す条件でHPLCの直接法⁹⁾により行った。

結 果

1. 展開液の検討

緒方らの展開液⁴⁾(クロロホルム-アセトン-酢酸(8 : 2 : 1))に改良を加え、〔クロロホルム-アセトン-トルエン-メタノール-酢酸〕系を新たに開発した。その成績(Rf値)は、〔表1〕のようになった。すなわち、アセトン量を減らし、トルエンを増すと、m-MHAのスポット位置がo-MHAに近づくが、両者の分離は可能であり、HAとm-MHAの分離が相対的によくなる傾向があった。アセトンを除くと、HA, m-MHA 及びo-MHA が等間隔となるが、Rf値は更に小さくなった(表1の展開液A, B, C, D, E)。一方、〔クロロホルム・トルエン・酢酸〕に、メタノールを加えると、Rf値が大きくなることわかった(表1の展開液H, I, J)。これらの結果から、最適な展開液として、〔クロロホルム-トルエン-メタノール-酢酸(8 : 2 : 2 : 1)〕を得た。

2. HA, m-又はp-MHA, o-MHA, MA及びPGAの分離

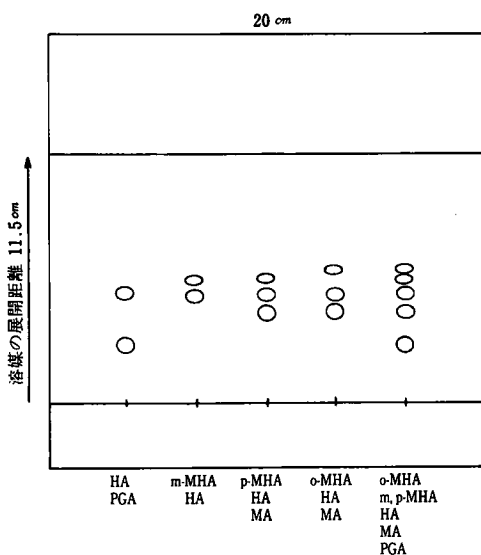
各々の展開液による HA, m-MHA 及びo-MHAのRf値を〔表1〕に示した。展開液(J), すなわち、〔クロロホルム-トルエン-メタノール-酢酸(8 : 2 : 2 : 1)〕のときの分離が最も良好であった。〔図2〕に示したようにこの展開液によるHA, m-, p-MHA, o-MHA, MA 及びPGAのRf値は、各々0.44, 0.49, 0.53, 0.36, 0.24であった。なお、展開液(H)のMA及びPGAのRf値は、0.38, 0.24であったので、分離は(J)に比べて、良好ではなかった。

3. 回収率

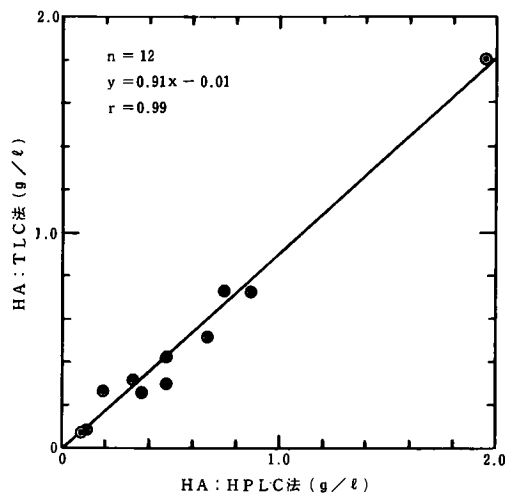
展開液(J)を用いて、尿に既知量の標準物質を添加し、DAB-ピリジン法で分析したところ、

〔表1〕展開液の組成及び展開後のHA, m-MHA, o-MHAのRf値

展開液	組 成 (V/V比)					Rf値		
	クロロホルム	アセトン	トルエン	メタノール	酢酸	HA	m-MHA	o-MHA
(A)	8	2	0	0	1	0.47	0.50	0.60
(B)	8	1.5	0.5	0	1	0.47	0.51	0.60
(C)	8	1	1	0	1	0.37	0.41	0.49
(D)	8	0.5	1.5	0	1	0.15	0.19	0.22
(E)	8	0	2	0	1	0.10	0.12	0.14
(F)	7	0	2	2	1	0.38	0.44	0.48
(G)	7	0	1	2	1	0.60	0.65	0.67
(H)	8	0	1	1	1	0.41	0.46	0.51
(I)	6.5	0	1	2.5	1	0.63	0.69	0.72
(J)	8	0	2	2	1	0.44	0.49	0.53



〔図2〕 薄層クロマトグラム：HA, m, p, o-MHA及びPGAは各々1.0g/l, MAは2.0g/lであり、各々20 μ lスポットとした。



〔図3〕 HPLC法とTLC法の相関(HAについて)

〔表2〕 HA, MHAの回収率 (TLC-DAB・ピリジン法)

濃度 (mg/ml)	HA	m-MHA	o-MHA
0.10	0.92	0.92	0.90
0.20	1.03	1.00	0.88
0.50	1.03	0.96	1.08
1.00	1.00	0.97	0.92
1.50	0.98	1.01	0.97
2.00	0.99	1.01	0.98
平均	0.99	0.98	0.96

回収率は、〔表2〕に示すように、1.0に近い良好な結果を得た。また、濃度の変化による回収率の変動係数 ($\sigma/m \times 100$) は、HA : 3.7%, m-MHA : 3.3%, o-MHA : 6.9%であった。

4. HPLC との相関

某有機溶剤使用工場の作業者のスポット尿中のHAをHPLC及びTLC(展開液(J)で展開)を用いて測定し、結果を比較した。〔図3〕に示すように、HPLC(x), TLC(y)について相関関係を調べた。その結果、HAの相関係数は、 $r = 0.99$ 、直接回帰式は、 $y = 0.91x - 0.01$ であり、

TLCの測定値は、HPLCのそれと良い一致を示した。

考 察

本法は、尿を直接に TLC にスポットすることにより、m-, p-MHA, o-MHA, MAおよびPGAを同時に展開し、分離することが可能であり、HA及びMHAについては、DAB-ピリジン法により、正確に定量できる利点を有する。また、その測定値は、HPLCのそれと良い一致を示した。有機溶剤取扱作業に対する有機特殊健診の二次健診の中で、トルエン及びキシレンについては、尿中のHA及びMHAの測定が採用されている。従って、簡便な本法は、特別な設備、機器を必要とせず、これらの測定が可能であるので有効な一方法であると考え。なお、スチレンの尿中代謝産物であるMA及びPGAも、本法の展開液(J)により、TLC分離が可能であるが、分離後の微量定量方法については、現在、検討中である。

また、トルエン及びスチレンの暴露尿について、HA, MA及びPGAの分離定量に関する、Bieniek Gら¹⁰⁾の報告があるが、この報告では、HA, MA及びPGAが、キシレンの代謝産物であるMHAに対し、相互に分離できるかどうかについてふれられていない。また、展開液に用

いられている light petroleum の純粋なものが入手しにくいと考えられる。そして、この報告では、TLC上でDABにより直接発色させる定量方法を採用しているが、直接発色法は、本法のスポット抽出法と比べて、精度が劣ると考えられる。

そして、本法で測定した成績を緒方らの気中濃度と尿中代謝産物の関係¹¹⁾を用いて換算すれば、トルエン及びキシレンの平均吸入量を求めることができる。

結 論

展開液にクロロホルム・トルエン・メタノール・酢酸(8:2:2:1))を用いて、TLC(シリカゲル)に、尿を直接スポットして展開すると、馬尿酸、m-又はp-メチル馬尿酸、o-メチル馬尿酸、マンデル酸及びフェニルグリオキシル酸を1回の展開で同時に分離することができた。展開、分離した後、スポットをかきとり、DAB-ピリジン法を用いて、馬尿酸、m-又はp-メチル馬尿酸、o-メチル馬尿酸を正確に定量することができた。本法は、特別な設備、機器を必要とせず、どの検査機関でも使用できる利点を有する、簡便、正確、高感度な方法である。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました緒方正名教授に深甚なる謝意を捧げます。

参 考 文 献

1. Pngnotto, L.D. and Liebman, L.M.: Urinary hippuric acid excretion as an index of toluene exposure. *Am. Industr. Hyg. Ass. J.* 28 129-134, 1967.
2. Ogata, M., Sugihara, R. and Moriyasu, H.: Studies on poisoning (IV), Toluene concentration in air and urinary hippuric acid measured by paper chromatography and mass screening examination method. *Acta Med. Okayama* 16 283-292, 1962.
3. Ogata, M., Tomokuni, K. and Takatsuka, Y.: Quantitative determination in urine of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid, metabolites of toluene and m- or p-xylene. *Br. J. Ind. Med.* 26 330-334, 1969.
4. Ogata, M., Shimada, Y., Kamiya, H., Hashimoto, S., Sudo, H. and Meguro, T.: A simplified thin-layer chromatographic determination of hippuric acid and methylhippuric acids. *Ind. Health* 19 155-161, 1981.
5. Ogata, M., Sugihara, R. and Kira, S.: Quantitative determination of urinary hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid as indices of toluene and m- or p-xylene exposure by high performance liquid chromatography. *Int Arch Occup. Environ Health* 39 199-206, 1977.

6. Sugihara, R. and Ogata, M.: Quantitation of urinary m- and p-methylhippuric acids as indices of m- and p-xylene exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **41**, 281–286, 1978.
7. Tomokuni, K. and Ogata, M.: Direct colorimetric determination of hippuric acid in urine. *Chin Chem* **18**, 349–351, 1972.
8. Kira, S.: Measurement by gas chromatography of urinary hippuric acid and methylhippuric acid as indices of toluene and xylene exposure. *Br. J Ind. Med.* **34**, 305–309, 1977.
9. Ohmori, S., Ikeda, M., Kira, S. and Ogata, M.: Colorimetric determination of hippuric acid in urine and liver homogenate. *Anal. Chem.* **49**, 1494–1496, 1977.
10. Bieniek, G., Palys, E. and Wilczok, T.: TLC separation of hippuric, mandelic, and phenylglyoxylic acids from urine after mixed exposure to toluene and styrene. *Br. J. Ind. Med.* **39**, 187–190, 1982.
11. Ogata, M., Tomokuni, K. and Takatsuka, Y.: Excretion of hippuric acid and m- or p-methylhippuric acid in the urine of persons exposed to vapors of toluene and m- or p-xylene in an exposures. *Br. J Ind. Med.* **28**, 382–385, 1971

Urinary metabolites of organic solvents

Report 1 : Quantitative determination on urinary metabolites of toluene, xylene and styrene by thin-layer chromatography.

Toyohiro TAGUCHI

Department of Public Health, Okayama University Medical School,

2-5-1- Shikata-cho, Okayama, Japan

(Director, Prof. M. Ogata)

A simple and specific method for the quantitative determination of hippuric acid and methylhippuric acids is described. Urine samples were applied to silica gel plates (silica gel, 60 F254), and developed with chloroform-toluene-methanol-acetic acid (8:2:2:1). The spots of hippuric acid, m- or p-methylhippuric acids, o-methylhippuric acid, mandelic acid and phenylglyoxylic acid were identified by illuminating the silica gel plates with an ultraviolet lamp. The spots of hippuric acid, m- or p-methylhippuric acids and o-methylhippuric acid were scratched off and extracted with pyridine. The color was then developed with acetic anhydride and p-dimethylaminobezaldehyde (DAB) in pyridine at 40 °C for 60 min. The absorbance at 458 nm was determined against a blank containing pyridine acetic anhydride and DAB.

Key words : Thin-layer chromatography, Toluene, Xylene, Styrene, Biological monitoring