

モノクロロベンゼン中毒に関する研究

第 1 編

モノクロロベンゼンの尿中代謝産物 (p-クロロフェニルメルカプツール酸及び4-クロロカテコールの抱合物) の高速液体クロマトグラフィーによる定量法について

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 緒方正名教授)

嶋 田 義 弘

(昭和56年4月17日受稿)

Key words: モノクロロベンゼン
p-クロロフェニルメルカプツール酸
4-クロロカテコール体
高速液体クロマトグラフィー

緒 言

モノクロロベンゼンは、主にアニリン、フェノール、クロロニトロベンゼンなど主要な染料中間体として、またエチルセルロース、ラッカーナなどの溶剤、混合溶剤として、年間2万3370トン(1973年度)程度使用されており¹⁾、その主要代謝産物として尿中にメルカプツール酸抱合体、4-クロロカテコールのグルクロン酸抱合体及びエーテル硫酸抱合体が排泄される²⁾³⁾⁴⁾。また微量代謝産物としてo-, m-, p-クロロフェノール⁵⁾、2-クロロキノール⁵⁾、4-クロロカテコールメチルエーテル⁶⁾などと、これら水酸化物以外にも微量のSH、SCH₃体などの含硫代謝産物も認められている⁷⁾⁸⁾。一方、作業現場において、作業者への暴露量と生体内への吸収量との間に、作業者による呼吸量の変動、マスクの装着等により、差異が生じる。そして吸収量が中毒の発生と最も深い関係を有するので、実際には吸収量が問題となる。そこで著者は、尿中代謝産物量の測定より、生体内への吸収量を求め得ると考え、主要尿中代謝産物である、メルカプツール酸抱合体は、直接p-クロロフェニルメルカプツール酸として尿から抽出し、4-クロロカテコールのグルクロン酸抱合体及びエーテル硫酸抱合体(4-クロロカテコール体)は、加水分

解した後の4-クロロカテコールとして尿から抽出し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)に導入し定量する簡便なHPLC定量法について検討した。

実験方法

1. 標準品

p-クロロフェニルメルカプツール酸はdu Vigneaudらの方法⁹⁾に準じて合成した。4-クロロカテコールは特級試薬(東京化成)を用いた。

2. 試料尿

モノクロロベンゼン2mmoles/kgをラット(体重200g、雌)に皮下注射し、24時間毎に採尿したものを用いた。

3. 抽出

p-クロロフェニルメルカプツール酸の測定には、試料尿1mlから、塩化ナトリウム飽和後、塩酸酸性下エーテル2mlで3回抽出した。エーテル層を集め濃縮乾固し、抽出物をエタノールに溶解してHPLC分析に導入した。4-クロロカテコールの測定には、Smithらの方法¹⁰⁾を応用した。つまり尿1mlに塩酸0.3mlを加え、沸とう水浴中で3時間加熱した。その後塩化ナトリウムを飽和させ、エーテル2mlで3回抽出した。エーテル層を集め濃縮乾固し、抽出物をエ

タノールに溶解して HPLC 分析に導入した。

4. 4-クロロカテコールの吸収スペクトルの測定

標準品のエタノール溶液を日立100-50型ダブルビーム連続波長で測定した。

5. HPLC 条件

p-クロロフェニルメルカプツール酸の場合は、日立633型、カラム $4\text{ mm}\phi \times 150\text{ mm}$ 、充てん剤 Nucleosil 5 C₁₈、移動相エタノール：水：リン酸=50：50：0.26、流量 1 mL/min. 、圧力 80 kg/cm^2 、検出 UV254nm で行なった。4-クロロカテコールの場合は、日立635型、カラム $4\text{ mm}\phi \times 150\text{ mm}$ 、充てん剤 Nucleosil 5 C₁₈、移動相メタノール：水=50：50、流量 0.7 mL/min. 、圧力 105 kg/cm^2 、検出 UV285nm で行なった。

結 果

1. p-クロロフェニルメルカプツール酸の分離及び定量性

a. HPLCによる分離：Fig. 1 に示すように、HPLCチャート上で p-クロロフェニルメルカプツール酸の標準品は、本 HPLC 条件では保持時間 5 分にピークを有していた (1-A)。モノクロロベンゼン投与後ラット尿でも同じ保持時間の位置にピークが認められ (1-B)，それは投与前尿中の他の抽出成分 (1-C) とは重ならない位置であった。

b. HPLCによる定量性：Fig. 2 に示すように、p-クロロフェニルメルカプツール酸の注入量 (ng) と、254nmでの吸収におけるピーク高 (cm) との間に直線関係が認められ、5 ng程度までの定量分析が可能となった。なお本抽出法における尿中よりの p-クロロフェニルメルカプツール酸の回収率は 1 mg/mL 添加尿で $98.7 \pm 2.5\%$ (mean $\pm \sigma n$) であった。

2. 4-クロロカテコールの分離及び定量性

a. HPLCによる分離：4-クロロカテコールのグルクロン酸抱合体とエーテル硫酸抱合体を加水分解した後の4-クロロカテコールは285nm 付近に極大吸収があるので、HPLCで分離後の検出には285nmでの紫外外部吸収を用いた。HPLCチャートでは、Fig. 3 に示すように、標準品 (3-A) と同じ保持時間約 8 分の位置にモ

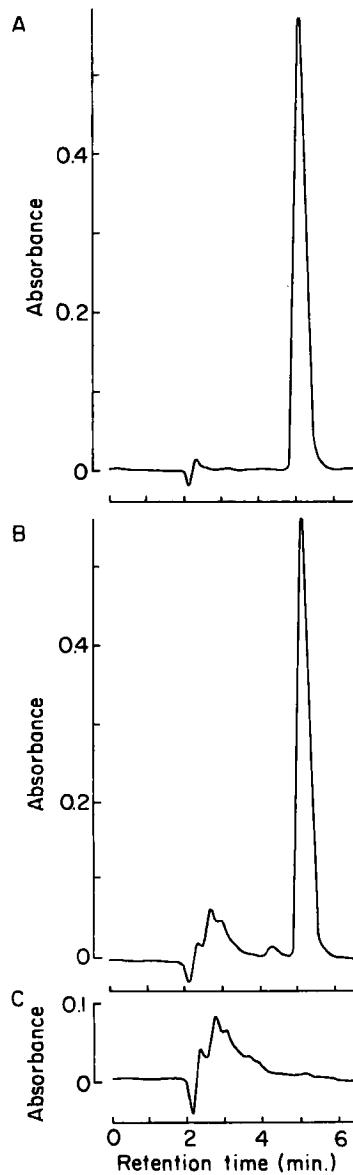


Fig. 1. High-performance liquid chromatogram of p-chlorophenylmercapturic acid.
A : authentic sample.

B : extract from urine of rat received monochlorobenzene.

C : normal urine of rat.

ノクロロベンゼン投与後ラット尿中成分が認められ (3-B)，それは投与前尿中の他の成分 (3-C) とは重ならない位置であった。なお本抽出法による 1 mg/mL 添加尿からの4-クロロカテコールの回収率は、 $98.91 \pm 0.39\%$ (mean $\pm \sigma n$) で

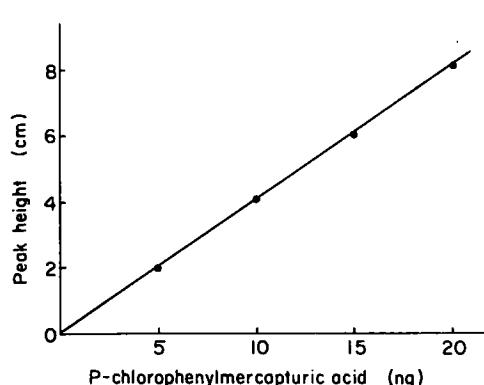


Fig. 2 Calibration curve of p-chlorophenylmercapturic acid.

あった。

b. HPLCによる定量性: Fig. 4に示すように、4-クロロカテコールの注入量(μg)と285 nmでの吸収におけるピーク高(cm)との間に直線関係が認められ、0.3 μg 程度までの定量分析が可能となった。

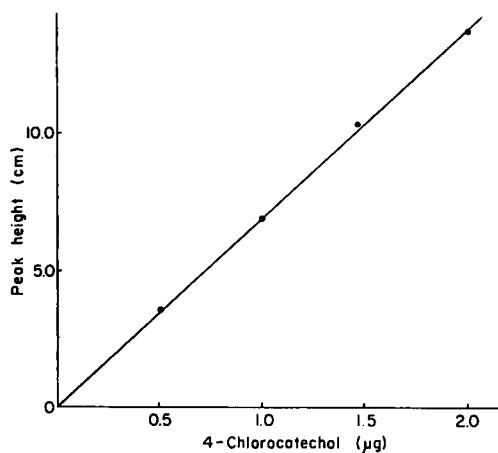


Fig. 4 Calibration curve of 4-chlorocatechol.

考 素

モノクロロベンゼンの代謝経路をFig. 5に示すが、このうち主要尿中代謝産物は、p-クロロフェニルメルカプツール酸と、4-クロロカテコール体であり、その投与量に対する排泄率はウサギ経口投与の場合で、それぞれ25%、27%である¹¹⁾。これらの代謝産物について、前者は直接尿から抽出し、また後者は加水分解した後の4-クロロカテコールとして、HPLCにて簡便

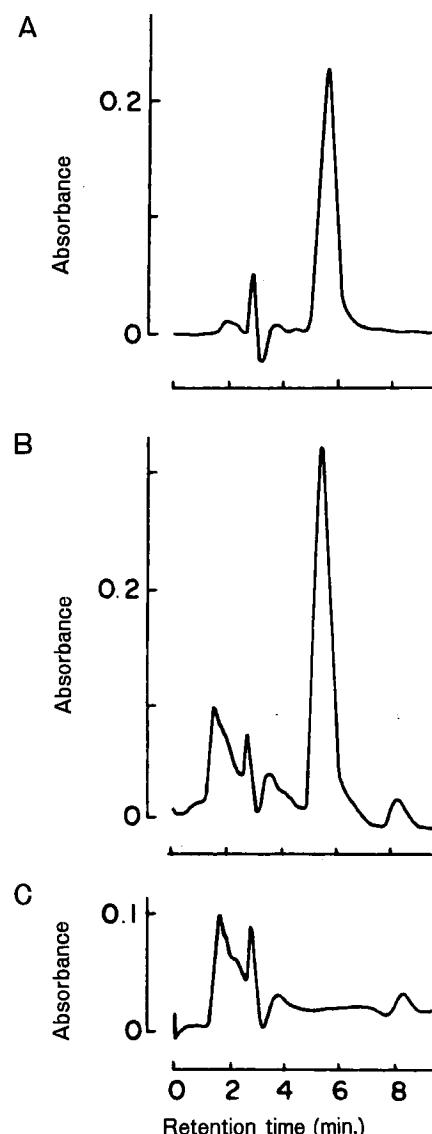


Fig. 3 High-performance liquid chromatogram of 4-chlorocatechol.

A : authentic sample

B : extract from hydrolyzate of urine of rat received monochlorobenzene

C : normal urine of rat

な定量分析が可能となった。定量感度も良く、特にp-クロロフェニルメルカプツール酸は5 ng程度までの定量が可能であり、モノクロロベンゼンの尿中代謝産物の定量にHPLC法はたいへん有効であると思われる。また本定量法を利用してモノクロロベンゼン投与量と、尿中代謝

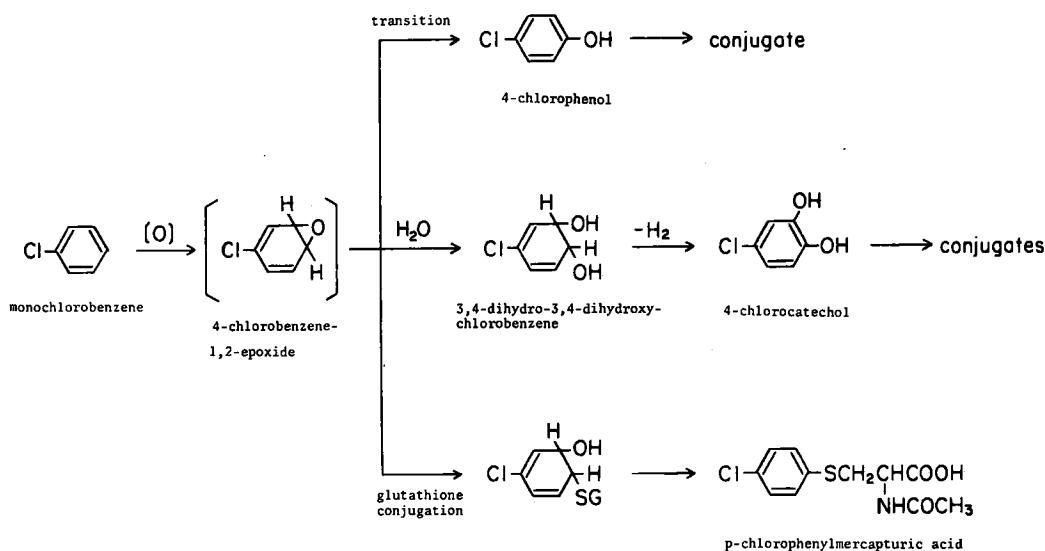


Fig. 5 Scheme of metabolism of monochlorobenzene.

産物量との間の関係を調べ、これらの代謝産物がモノクロロベンゼン暴露量の指標になりうるかについて、またこれら代謝における種属差について、現在検討中である。

結 論

モノクロロベンゼンの主要尿中代謝産物であるp-クロロフェニルメルカプツール酸と、グルクロン酸、エーテル硫酸抱合体を加小分解した後の4-クロロカテコールのHPLCによる定量法について検討し、以下の成績を得た。

1. p-クロロフェニルメルカプツール酸

a. モノクロロベンゼン投与ラット尿中のp-クロロフェニルメルカプツール酸は、他の尿中成分とは異なる保持時間のピークとして認められた。

b. p-クロロフェニルメルカプツール酸

量とピーク高の間に直接関係が認められ、5 ng程度までの定量が可能となった。

2. 4-クロロカテコール

a. モノクロロベンゼン投与ラット尿の加水分解後の4-クロロカテコールは他の尿中成分とは異なる保持時間のピークとして認められた。

b. 4-クロロカテコール量とピーク高の間に直線関係が認められ、0.3 μg程度までの定量が可能となった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲いただいた緒方正名教授、およびp-クロロフェニルメルカプツール酸合成の援助をいただいた安井茂夫博士に深く感謝の意を表します。本論の要旨は第53、54回日本産業衛生学会で発表した。

文 献

1. 藤原元典、渡辺敬一編：総合衛生学、南江堂、東京、p.450, 1978.
2. Spencer, B. and Williams, R.T.: Studies in Detoxication. 33. The metabolism of halogenobenzenes. A comparison of the glucuronic acid, ethereal sulphate and mercapturic acid conjugations of chloro-, bromo- and iodo-benzenes and of the o-, m- and p-chlorophenols. Biosynthesis of o-, m- and p-chlorophenylglucuronides. *Biochem. J.* 47, 279-284, 1950.
3. Smith, J.N., Spencer, B. and Williams, R.T.: Studies in Detoxication. 34. The metabolism of chloro-

- benzene in the rabbit. Isolation of dihydronide and p-chlorophenylmercapturic acid. *Biochem. J.* **47**, 284—293, 1950.
4. Azouz, W.M., Parke, D.V. and Williams, R.T.: Studies in Detoxication. 42. Fluorobenzene. Spectro-photometric determination of the elimination of unchanged halogenobenzenes by rabbits. A comparison of the oxidation *in vivo* of fluorobenzene and of benzene. *Biochem. J.* **50**, 702—706, 1952.
5. Gessner, T. and Smith, J.N.: Comparative Detoxication. 8. The metabolism of chlorobenzene in locusts: Phenolic metabolites, a comparison with some vertebrate species. *Biochem. J.* **75**, 172—179, 1960.
6. Jerina, D.M., Daly, J.W. and Witkop, B.: Deuterium migration during the acid-catalyzed dehydration of 6-deutero-5, 6-dihydroxy-3-chloro-1, 3-cyclohexadiene, a nonenzymic model for the NIH shift. *J. Am. Chem. Soc.* **89**, 5488—5489, 1967.
7. 喜田村正次, 住野公昭, 三尾隆彌: クロルベンゼン類の新含硫代謝物. 日衛誌 **32**, 200, 1977.
8. 喜田村正次, 住野公昭, 三尾隆彌: クロルベンゼン—メチルスルホン系代謝物の前駆体. 日衛誌 **33**, 215, 1978.
9. du Vigneaud, V., Wood, J. L. and Binkley, F.: Acetylation *in vivo* of p-bromophenyl-d-cysteine. *J. Biol. Chem.* **138**, 369—374, 1941.
10. Smith, J.R.L., Shaw, B.A.J. and Foulkes, D.M.: Mechanisms of Mammalian Hydroxylation: Some Novel Metabolites of Chlorobenzene. *Xenobiotica* **2**, 215—226, 1972.
11. Williams, R.T.: *Detoxication Mechanisms*, Chapman & Hall, London, p.251, 1959.

Studies on monochlorobenzene poisoning

Part I: Quantitative determination of urinary metabolites (p-chlorophenylmercapturic acid and conjugates of 4-chlorocatechol) of monochlorobenzene by high-performance liquid chromatography.

Yoshihiro SHIMADA

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director: Prof. M. Ogata)

The quantitative determination of major urinary metabolites of monochlorobenzene by high-performance liquid chromatography(HPLC) was studied. Urinary p-chlorophenylmercapturic acid was assayed directly and urinary monoglucuronide and ethereal sulphate conjugates of 4-chlorocatechol were assayed as 4-chlorocatechol after being hydrolyzed. The results obtained were as follows.

- 1. Para-chlorophenylmercapturic acid.**
 - a. Urinary p-chlorophenylmercapturic acid of rats given monochlorobenzene by subcutaneous injection was recognized as a separate peak on the HPLchromatogram against the other peaks in normal rat urine.
 - b. A linear relationship was obtained between the quantity of p-chlorophenylmercapturic acid and its peak height on HPLchromatogram up to 5ng.
- 2. 4-Chlorocatechol.**
 - a. 4-Chlorocatechol in the hydrolyzate of the urine of rats given monochlorobenzene by subcutaneous injection was recognized as a separate peak on the HPLchromatogram against the other peaks of normal rat urine.
 - b. A linear relationship was obtained between the quantity of 4-chlorocatechol and its peak height on the HPLchromatogram up to $0.3\mu\text{g}$.