

# ガスクロマトグラフによる Styrene の 尿中代謝産物の定量

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 緒方正名教授)

佐 伯 孝 雄

(昭和50年12月24日受稿)

## 緒 言

styrene monomer (styreneと畧) ポリエステル製の浴槽や、浄化槽の製造工場において、熱硬化性樹脂である不飽和ポリエステル樹脂中の架橋剤として添加され、そのため合成樹脂関係業者の有害性が問題となっている。styrene に暴露されたときの尿中代謝産物としては、図1に示すように、mandelic

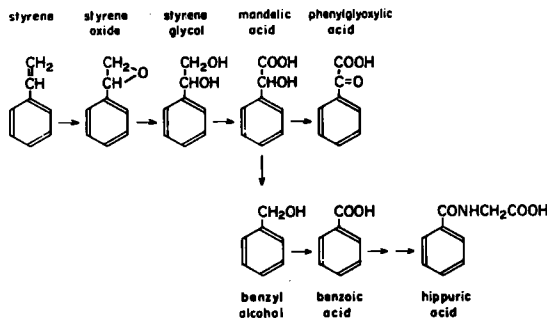


Fig. 1 Metabolism of styrene in the rat.

acid (MA), phenylglyoxylic acid (PGA) および hippuric acid (HA) がある。これらの代謝産物の定量法に関しては、大辻<sup>1)</sup>らの比色による定量法があるが、堀口<sup>2)</sup>らは硫酸ホルマリン法は、尿中の phenolic acid とその類似物質、例えば hydroxyacetic acid, phenylacetic acid, vanilic acid などと反応し、比色法の妨害になることを指摘している。また solb<sup>3)</sup>は styrene 暴露者の尿中より、MA を酢酸エチルで抽出後、抽出液を溜去し、エタノールに溶解しペーパークロマト法で、ブタノール、アンモニアで展開し、MA のスポットをカットし、酢酸エチルで抽出し、クロロホルム溶解後、Bis (trimethylsilyl) acetamide (BSA と畧) を用いて silyl 化し、ガスクロマトグラフ (GLC と畧) をおこなう

方法を報告している。また Piekso<sup>4)</sup> がエタノールアミン遊導体の silyl 化についての報告の中で BSA を用いて silyl 化をおこなっている。著者はこの方法を応用して、ラットに styrene を投与したときの、尿中代謝産物である MA のみならず PGA についても、ペーパークロマトの操作をおこなわず、抽出乾燥し、クロロホルム溶解後、BSA を加えて silyl 化後、GLC によって両者を分離、定量をおこなった結果、極めて定量性のある良い成績が得られた。また HA の定量法については、従来より多くの報告<sup>5) (6) (7)</sup> があるが、Buchet<sup>8)</sup> らの方法により、ジアゾメタンを用いて methyl ester 化をおこない、尿中の HA を GLC によって定量した。さらに著者はこれらの方法を応用して、GLC によりラットに styrene を投与したときの尿中代謝産物の推移を経時的に測定することができた。

## 実験材料並びに方法

### I. 実験材料

Wister 系ラット (5 N), 体重約 250g のものを用い styrene を 59.6 mmole/kg 腹腔内に投与して、6~96 時間の間、計 6 回にわたり経時採尿したものを試料とし、実験に使用するまで、-20℃ に保存した。

試薬は MA および BAS (Merck 製), PGA (Sigma 製) 他はすべて試薬一級を使用した。

### II. 方法

#### 1) 尿中 MA および PGA の GLC による定量法

ラットの尿 0.5 ml を 10 ml の共栓試験管にとり、内部標準物質として、100 mg/ml のミスチン酸 (C. u.) のエタノール溶液 0.1 ml を加え、濃塩酸 1 滴を加え酸性にし、1 ml の酢酸エチル、エーテル (1:1) の混液で 2 回抽出をおこない、無水硫酸カルシウ

ムを用いて脱水後、約5分間静置し、上澄液を完全に取り出して、60℃の水浴上で送風しながら乾固した後、クロロホルム0.8mlを加え、さらにBSA 0.2mlを加えて約1分間電動ミキサーで攪拌、混和する。つぎに60℃の水浴上で約20~30分間、加温してGLCの試料とした。その時のガスクロマトグラムは図2に示す通りである。

GLCは日立K-53型、FiD検出器を用いた。

条件：column 2%OV-25 1mステンレス製

support : chromosorb Q

oven. temp : 150℃

inj. temp : 190℃

carrier gas : N<sub>2</sub> 40ml/min.

## 2) 尿中のHAのGLCによる定量法。

ラットの尿0.5mlを試験管にとり、内部標準物質として、ヘプタデカン酸(H.D) 1mg/mlのメタノール溶液0.1mlを加え、濃塩酸1滴を加え酸性とし、酢酸エチル2mlを用いて2回抽出をおこなう、これに無水硫酸カルシウムを加えて脱水し、5分間静置後、上澄液を完全に取り出し、70℃の水浴上で送風しながら乾固した。残渣にエタノール0.2mlを加えて溶解する、ついで予め調製したジアゾメタンのエーテル溶液0.2~0.5mlを黄色が消失しなくなるまで加えて、methyl ester化した後、溶媒を溜去し、残渣にメタノール0.1mlを加えてGLCの試料とした。このときのガスクロマトグラムは図3に示す通りである。

GLCは日立K-53型、FiD検出器を用いた。

条件：column : 3%SE-30, 1mステンレス製

support : chromosorb W (AW)

oven. temp : 200℃

inj. temp : 230℃

carrier gas : N<sub>2</sub>, 40ml/min

## 結 果

MAおよびPGAを酢酸エチル、エーテルの混液で抽出後、溶媒を溜去し、残渣をクロロホルムに溶解して、BSAを用いてsilyl化後、GLCをおこない再現性の極めて良い結果が得られた。

### 1. MAおよびPGAの濃度とピーク高との関係。

尿中にMAおよびPGAの純品各々125~1.000μgの範囲で加え、更に内部標準物質として、ミリスチン酸を加える、ついで、酢酸エチル、エーテルの混液で抽出し、silyl化して、GLCをおこなって得られたピーク高について、内部標準物質との

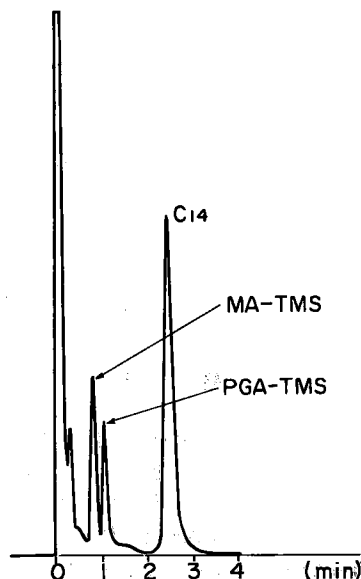


Fig. 2 Gas chromatograms of mandelic acid trimethylsilyl (MA-TMS) and phenylglyoxylic acid trimethylsilyl (PGA-TMS) from rat urine after styrene administration.

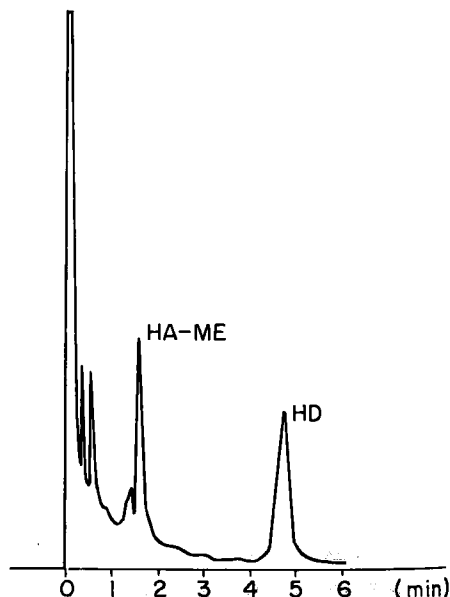


Fig. 3 Gas chromatograms of hippuric acid methyl ester (HA-ME) from rat urine after styrene administration.

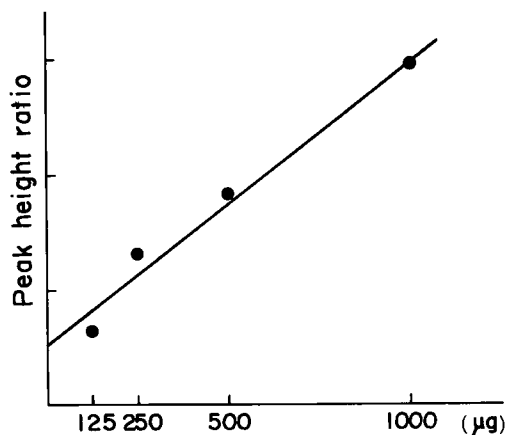


Fig. 4 Calibration curve of mandelic acid in urine.

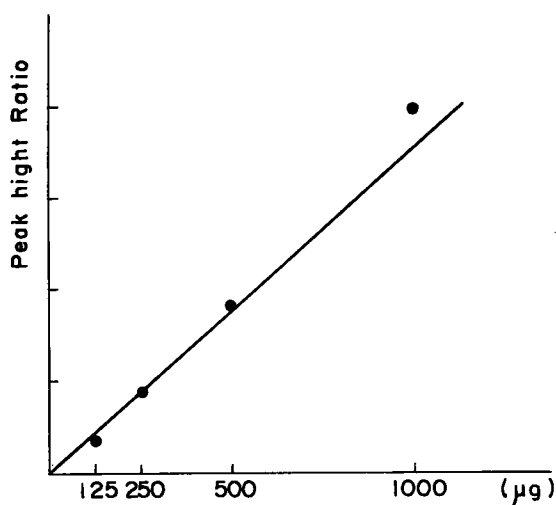


Fig. 5 Calibration curve of phenylglyoxylic acid in urine.

比で求めた結果、濃度とピーク高との間には図4および図5に示すように直線関係が成立した。

2. 回収率

尿中に MA および PGA を加えて、酢酸エチル、エーテルの混液で抽出し、silyl 化後のガスクロマトグラムによる回収率は表1に示す如く、MAでは95.6~101.2%、PGAでは73.0~91.2%の極めて良好な成績が得られた。

3. ラットに styrene を投与したときの尿中代謝産物の経時変化。

ラットに styrene を投与したときの尿中代謝産物である MA, PGA および HA について、MA と PGA は silyl 化し、HA は methyl ester 化後、GLC によって、これらの排泄量の経時変化を観察した結果は、表2に示すように MA では24時間後に最高排泄量2.23mmole の値を示し、PGA も同じく24時間後で、1.06mmole の排泄量であった。そして、いずれも4日後には排泄を終了した。一方 HA の排泄量は前2者に比し、逆に投与後には急激に上昇して、6時間後に最高1.91 mmole の排泄量であり、4日後には投与前の値に回復した。Danishefsky<sup>13)</sup>らの  $\beta^{14}\text{C}$ -styrene を用いた実験では、24時間後には呼気中に Carbon dioxide として12%、尿中には71%が排泄されると報告している。著者の実験では、styrene 投与時に尿中における MA, PGA および HA の24時間後の排泄量は各々26.1%、18.7%、16.0%であり総排泄量は60.8%の値を示した。また4日後における累積総排泄量は87.9%であった。

謝 辞

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導と御高関を給った、緒方正名教授に深謝いたします。また終始愛わらぬ御援助、御協力を戴いた、吉良尚平助手に謝意を表します。

Table. 1 Recovery of added mandelic acid and phenylglyoxylic acid from normal urine.

MA added (mg)	Recovery (%)	PGA added (mg)	Recovery (%)
0.25	97.4	0.1	73.0
0.5	95.6	0.25	82.3
1.0	98.6	0.5	76.5
1.5	101.2	1.0	91.2
2.0	98.7	1.5	88.2

Table. 2 Ratio (mmole urinary metabolites/mmole styrene with rat) of MA, PGA and HA after styrene administration.

hours	MA (mmole)	PGA (mmole)	HA (mmole)
6	0.57	0.77	1.91
12	1.00	0.87	0.39
24	2.23	1.06	0.12
0-24	26.1%	18.7%	16.0%
48	1.95	0.61	0.12
72	0.86	0.20	0.11
96	0.30	0.11	0.11
25-96	19.8%	5.2%	2.1%
total	45.9%	23.9%	18.1%

#### 文 献

- 1) Ohtuji, H. and Ikeda, M.: Brit. J. industr. Med., 27, 150-154, 1957.
- 2) Horiguchi, T. and Teramoto, K.: Japan. J. ind. Health., 14, 26-27, 1972.
- 3) Solb, A.: Brit. J. industr. Med., 30, 390-393, 1973.
- 4) Piekos, R. Kobyczyk, K. and Crzybowski, J.: Anal. Chem., 47, 1157-1159, 1975.
- 5) Umberger, c.J. and Fioresi, F.F. : Cli. Chem., 9, 91-96, 1963.
- 6) Tomokuni, K. and Ogata, M.: Clin. Chem., 18, 349-351, 1972.
- 7) Ogata, M. Tomokuni, k. and takatuka, Y.: Brit. J. industr. Med., 26, 330-335, 1969.
- 8) Buchet, J.P. and Lauwerys, : Brit. J. industr. Med., 30, 125-128, 1973.
- 9) Danishefsky, A.M. and willhite, M.: J. biol. chem., 211, 549-552, 1954.

**Quantitative determination of urinary styrene metabolites  
by means of Gas chromatography**

**Takao SAEKI**

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director: Prof. Masana Ogata)

**ABSTRACT**

Quantitative determination of urinary mandelic acid (MA) phenylglyoxylic acid (PGA) and hippuric acid (HA) (metabolites of styrene monomer.) was conducted.

For the determination of urinary MA and PGA, a known amount of myristic acid (internal standard) is added to the urine, before its extraction with mixture of ethyl acetate and ethyl ether. After evaporation of the solvents, the acids are silylated with bis (trimethylsilyl) acetamide. For the determination of urinary HA, HA in ethyl acetate extract from urine, is methylated with diazomethane.

Thereafter they were injected into gas chromatograph. Rats were administrated styrene intraperitoneally, and their urins were collected as time lapses. Maximum excretion of MA and PGA reached after 24 hours from styrene injection and that of HA did after 6 hours.

Total excretion of MA was calculated to be 45.9% of styrene administrated that of PGA 23.9%, that of 18.1% and that of all metabolites 87.9%, respectively.

Discussion was made between amount of styrene exposed with people and amount of their urinary metabolites.