

### 3. 低濃度有機溶剤曝露に利用できる曝露指標の開発

#### (1) 低濃度ベンゼン、トルエン、キシレン曝露の指標

ベンゼンは発がん性のある特定化学物質として管理されている。しかし、ベンゼンは多くの化学工業品の合成原料であり、溶剤、洗浄剤、抽出剤に微量成分として含まれ、石油精製、ガソリンの使用に伴い環境中に放出される。環境基準値は1 ppbに設定されているが、一般環境中ではこれを上回ることもある。作業環境では管理濃度が10 ppm、発がんリスクは1 ppmで $10^{-3}$ とされている。ベンゼン曝露の生物学的モニタリングとして、これまでは代謝物である尿中フェノールが測定されてきた。しかし、この物質には食物由来のものもあり、低濃度ベンゼン曝露の指標としては対応出来ない。最近、ppm レベル以下のベンゼン曝露に対応出来る代謝物としてt, t-MA、フェニルメルカプツール酸等が提案されている。今回の仏壇漆器製造業における作業現場では金箔貼りに使用されるホワイトガソリンに少量のベンゼンが含まれていたが、作業場のベンゼン濃度の幾何平均は0.022 ppm程度であった。この様な低濃度ベンゼン曝露状況下でも、尿中t, t-MAはベンゼンの曝露指標として有用( $p < 0.02$ )である事が分かった。

今回の作業所ではトルエン・キシレンは主として塗装現場で使用されていた。塗装現場のトルエン曝露濃度は平均5 ppm程度であり、最高でも9 ppm以下であった。このレベルのトルエン曝露では規則にある馬尿酸の検査は有効でない。本研究では、よ

り低濃度のトルエン曝露にも対応出来る曝露指標として尿中ベンジルメルカプツール酸が優れていることを示した。キシレンも塗装現場で使用されていたが、その曝露濃度の平均は1.5 ppm、最高で7.51 ppmであった。規則ではキシレンの代謝物としてメチル馬尿酸の測定が行われているが、この物質はキシレン以外からは生成しないため、今回の様な低濃度キシレン曝露においても有効な曝露指標となった。

#### (2) 低濃度ヘキサン曝露の指標

今回調査した仏壇漆器製造業ではヘキサンは金箔貼りの工程で使用されるホワイトガソリンに含まれていた。この工程の平均曝露濃度は10 ppm程度であったが、一人(40 ppm)を除いて20 ppm以下であった。1人の作業者ではHDに比べ異常に高い個人曝露濃度が検出され、サンプラーの汚染などの原因が考えられるので今回の検討からは除いた。ヘキサンの管理濃度は50 ppm、許容濃度は40 ppmとされている。ヘキサンの代謝物の検査としては規則では尿を加水分解したtotalの2,5-ヘキサンジオン(tHD)の測定が行われている。この代謝物の分布は2および5 mg/lにより区分される。日本産業衛生学会の2,5-ヘキサンジオンの生物学的許容値は尿を加水分解した場合(tHD)3 mg/gCre、しない場合(fHD)は0.33 mg/gCreとなっている。これらの濃度が許容濃度40 ppmに対応するものとして設定されている。

Fig. 14に示したように、今回の回帰式はいずれもよい相関係数( $r > 0.8$ )を示していた。この回帰式から計算すると、tHD、fHDの許容濃度対応値はそれぞれ2.8、0.9 mg/gCreとなる。前者は日本産業衛生学会

の生物学的許容値に近いが、後者はより高値となった。これは加水分解しない fHD では Cre 補正を行わない方が曝露濃度との相関が良好であったこと、今回の被験者の曝露濃度が許容濃度の半分以下という低濃度曝露であったことによるかも知れない。何れにせよ、許容濃度の半分以下という低濃度ヘキサソール曝露でも tHD および fHD とも生物学的モニタリングとして有効であることが明らかとなった。また、加水分解した場合には Cre 補正が有効であるが、加水分解しない場合には Cre 補正によらない方が曝露指標として良いことが明らかになった。

#### 4. 新築棟病理検査室内の空气中ホルムアルデヒド濃度の検討

事務所、住宅などの建材にはホルムアルデヒド-尿素断熱材が多く使用されており、近年では建材から発散する低濃度のホルムアルデヒドがシックオフィス、シックハウス症候群の原因物質の1つとして注目されている。このため厚生労働省は、過敏症予防のために室内空気汚染の指針値を作成し、ホルムアルデヒドは 80 ppb と定められた。これは日本産業衛生学会の許容濃度である 0.5 ppm よりもはるかに低い濃度である。一方、ホルムアルデヒドには消毒剤、防腐剤などの用途があり、これらに関連する職場ではより高濃度の曝露があり得る。このため、“職域における室内空气中のホルムアルデヒド低減化のためのガイドライン”により、特定作業所における指針値は 250 ppb と定めている。病院の病理検査室もこの特定作業所に含まれる。他に合板製造、ボード製造、プレハブ住宅製造、木製家具製造

なども特定作業所となりうる。

宇佐神ら(2002)は、病院の増改築移転前後で気中のホルムアルデヒド濃度と職員の自覚症状(のどがかかわく、微熱がある、疲れやすい など)の関連を調査し、25箇所での測定で最大値は  $32.64 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (25.63 ppb)、中央値  $19.85 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (15.88 ppb) で、ガイドラインである  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (80ppb) より低濃度であり、特異的な自覚症状は見出せなかったとしている。一方、解剖実習室で個人曝露濃度と自覚症状の調査も行ったところ、実習中の個人曝露濃度(15名)の平均は  $3019.7 \pm 634.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ( $2415.8 \pm 507.6$  ppb) であり、特定作業所のガイドラインをはるかに上回っていた。曝露濃度と自覚症状の変化との関連では、皮膚がかゆい、鼻がむずむずする、のどの痛みの3症状が有意な相関を示した。これらより強制排気設備などの環境改善の必要性を指摘している。

他の医療機関の病理検査室では切り出し室の8箇所の測定点のうち6箇所のホルムアルデヒド濃度が 0.22~0.27 ppm であり、他は 0.45 ppm、最高の1箇所では 1.56 ppm であったという報告がある(呉羽ら、2003)。ホルマリン固定された組織の切り出し場付近の濃度は換気によりある程度抑えられていたが、切り出した組織の真空パックを保存する棚の濃度は最高であった。これによりパックからのホルムアルデヒドの漏洩の可能性を指摘している。

本研究においては新築棟の病理検査室内のホルムアルデヒドの調査を行った。今回の測定結果では、切り出し場の1ヵ所で 282 ppb と指針値を上回ったが、他の場所ではいずれも指針値以下であった。業務時間中

の個人曝露濃度でも最高値は切り出し作業を行った技師1名の147.5 ppbで指針値内であり、他の技師1名は22 ppb、病理医は21 ppbと非常に低かった。これは検査室の換気システムの改善と(10回/時間)、ホルムアルデヒドの発生源である切り出し場に近接して換気口を設置したため室内濃度を低く抑えられたと考えられる。このように、近年のホルムアルデヒド対策のとられた換気良好な作業場では指針値以下の濃度に保つことができることが明らかになった。一方、本研究での旧棟の病理解剖室での作業時の個人曝露濃度は、技師2名が413 ppbと711 ppbであり指針値を上回る結果であったが、解剖室は今後新築される予定であり、換気回数・換気口の数・位置などについては従事者の健康管理の面からも十分な配慮が必要であると考えられる。

#### 5. LC-MSによる尿中2,4-TDIおよび2,4-TDAの代謝物の検索

初年度の研究ではTDI作業者の尿中代謝物を加水分解して生じるTDAを測定する方法を確立したが、この方法は加水分解時間が長く、誘導体化反応が必要であるなど複雑な面がある。加水分解してTDAを生じる代謝物の本体についてはこれまで明らかでないが、生体内でのTDIの代謝とその排泄に関しては2,4-TDIを例にとるとFig. 20の様な経路が考えられる。体内に吸収されるTDIはグロビンなど生体高分子と付加体を生ずる一方、その分解やTDIの直接的加水分解によりTDAを生ずる。このTDAがN-acetylation、 $\text{CH}_3$ -oxidation、ring C-hydroxylation、グルクロン酸抱合、硫酸

抱合などを受けて尿中に排泄されると考えられる。これ以外にTDIに特異な代謝によって生ずる代謝物も除外出来ない。これらの物質の例をFig. 21に示すが、この一部には加水分解されるとTDAを生ずるものがある。本研究は加水分解によりTDAを生ずる元の尿中代謝物を検索、確定し、それを加水分解なしにLC-MSなどにより簡便に測定して生物学的モニタリングに役立てようとするものである。

LC-MSまたはLC-MS<sup>n</sup>は複雑な混合物中の未知の化合物を同定するための有効な方法として最近利用出来るようになった。LC-MSでは様々な割合に含まれる多種類の化合物を同時分析可能であり、各化合物について特異性の高い質量スペクトルおよびその構造情報を得ることができる。生物学的試料中の生体異物の分析は、一般的に分析対象をマトリックスから分離するため、クリーンアップの手法が含まれる。マトリックスはHPLCカラムやMS検出器に過剰な負荷を与える。本研究では、試験的にラット尿中のTDI/TDA代謝物のプロフィールを得るため、アルカリ性、酸性、様々な極性をもった物質、または非イオン性などの広範な性状の化合物を回収するために非選択的クリーンアップ手法を開発しなくてはならなかった。この目的のためには水と混和しない溶剤との液/液抽出や、固層抽出は適さないで、二段階の比較的水溶性の物質を回収するクリーンアップ手法、即ち、AN抽出と分取逆相クロマトグラフを採用した。

最初にTDI/TDA投与ラット尿をANと混和した。サンプルは2層の液層を形成し、大部分の無機塩や尿素高極性の化合物(重量で60%に達する)は水層に残り、TDI/TDA

代謝物は上層の AN 層に回収された。AN は水と混和する液体であるため、層の分離は ml あたり 50~200 mg の塩を含むラット尿のような高濃度のサンプルのときのみ起こり、ヒト尿では起こらない。また、いくつかの極性代謝物は抽出されず水相にとどまる。それにもかかわらず、全 2,4-TDA の AN 層での回収率は 90%以上である。AN 抽出の有効性に加え、分取 HPLC は優れたクリーンアップ手法により TDI/TDA 代謝物を極性マトリックスから非常に効果的に分離できた。

上記のクリーンアップ（前処理）の後、尿の LC-MS 分析によって多くの TDI/TDA 代謝物を明らかにした。そのうちいくつかは合成標準品によって同定された。APCI 検出では特異的な ion である  $[M-OH]^+$ 、 $[M+H]^+$ 、 $[M+H_2O]^+$ 、 $[2M+H]^+$  を生成した (Table 5, 6, Fig. 18, 19)。このようなイオンパターン ( $MS^2$  を含む) は未知の化合物の分子量の推定において単独イオンによるよりも効果的である。もし単独イオンのみが検出されるならば、それは  $[M+H]^+$  と推定される (Table 5, 6) が、いくつかの既知の化合物中の最も豊富なイオンは  $[M-OH]^+$  または  $[M+H_2O]^+$  である。推定分子量が 2,4-TDA の既知の代謝反応によって生成する推定化合物と対応

するかを検討した。これらの反応による主な mass の増大は Table 4, 5, 6 に示す。たとえば、180 と 222 amu の値は以前に同定された 2,4-TDAce(4)-OH, 2,4-TDAce<sub>2</sub> である。同様に、251 と 325 の amu はそれぞれアセチル-2,4-ジアミノ馬尿酸と、ジヒドロキシ-2,4-ジアセチル馬尿酸に対応する。比較的高濃度の反応性ジイソシアネートやジアミンの投与が生体内物質の代謝に重要な影響をおよぼす可能性もある。

LC-MS による 2,4-TDA 投与ラット尿の分析はこれまで幾つか報告されているが、今回の検討でもその代謝物の大部分を確認できた。いくつかのピークで本研究とこれまでの研究との相違はラットの系統と投与量の違いによるかもしれない。今回の前処理では強極性代謝物、すなわちグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体は大部分除かれている。本研究により 2,4-TDI と 2,4-TDA 摂取による未知の代謝物群が発見されたが、これらの構造を明らかにし、代謝起源を説明することは今後の課題となる。今回、ラットにおいて推定した尿中代謝物のイオンを TDI 作業者の尿についても検索して、生物学的曝露モニタリングとしての有効性を評価するための研究を次年度の計画としたい。

## E. 結論

除草剤メコプロップ (MCP) 中毒患者の血清と尿の HPLC 分析では、MCP 以外にそれぞれ 4 本、2 本の未知ピークが検出された。このうち 6.8 分に溶出するピーク a は比較的高いピークであった。MCP とピーク

a の UV スペクトルは殆ど同一で、230 および 280 nm に吸収極大を示した。MCP の LC-MS 分析では  $m/z$  213 ( $[M-H]^-$ ) が検出され、ピーク a については  $[M+16]^-$  の質量を示し、MCP に酸素の付加したものと示唆される。入院時の尿中および血清中 MCP はそれぞれ 1050、522 mg/l であったが、両者とも

に2相性の減衰を示した。

Hg 暴露作業者の尿中ポルフィリンのクロマトグラフでは8C (ウロポルフィリン:UP) ~4C (コプロポルフィリン:CP、I と III) が分離溶出されるが、これら以外に未知ポルフィリンのピーク (Unknown:UK) が5C とCPI の間に観察された。このUK濃度はCPIIIを標準物質として計算した。UPとUKでは暴露群は非暴露群に較べて有意に高値であった。血中プロトポルフィリン濃度および尿中ALA濃度は暴露群と非暴露群の間で有意差はみられなかった。UKのみが血中・尿中水銀と有意な正の相関を示した。Mnを投与した3群のラットでは用量に応じて血中Mn濃度の上昇が認められた。HPLC (ゲルろ過)-ICP-MSにより分画したクロマトグラフでは、溶出順にA~Eの5本のピークが出現した。このうちピークDに検出されるMn量が全血Mn(Mn-B)と非常によく相関し、溶出位置から低分子の蛋白質に結合したMnの可能性が高い。これが投与したMnを反映する血液中のMnの化学型の可能性が示唆された。

低濃度有機溶剤を使用する仏壇漆器製造工場における、ベンゼン曝露の幾何平均は0.022ppm、幾何標準偏差は5.690であった。トルエン、キシレンも幾何平均で1ppm以下であった。ベンゼン曝露濃度とt, t-MAとの相関係数は0.307~0.490の範囲にあった(p<0.02)。回帰および相関分析により、本調査の様な低濃度混合曝露下でも、トルエンの曝露指標として尿中ベンジルメルカプツール酸が、キシレンでは尿中の総メチル馬尿酸が優れていることが示唆された。ヘキサンは許容濃度(40ppm)の半分以下の低濃度曝露であったが、遊離およびtotal

2,5-ヘキサジオンとも個人曝露濃度との間に良好な相関が認められ、何れも生物学的曝露指標として有効であった。

新築棟の病理検査室における空气中ホルムアルデヒド濃度の検討では、気中ホルムアルデヒドのパッシブサンプリング(yppb)とアクティブサンプリング(xppb)は非常によく相関した。病理検査室内の10カ所のパッシブサンプリングの結果では、切り出し場の1カ所で282ppbと指針値を上回ったが、他の場所ではいずれも指針値以下であった。検査室内の業務時間中の個人曝露濃度では切り出し作業を行った技師1名が147.5ppbとやや高値であったが特定作業場の指針値内であった。旧棟の病理解剖室における作業時の個人曝露濃度は、技師2名が413ppbと711ppbであり指針値を上回っていた。

2,4-TDI投与ラット尿のLC-MS分析では、2,4-TDAce(4)と2,4-TDAce<sub>2</sub>が代謝物として同定できた。後者のマススペクトルではm/z 207のピークが2,4-TDAce<sub>2</sub>に由来するイオンで、m/z 224はその水付加イオンと帰属した。この他に、monoacetylated TDAおよびその水酸化体、カルボキシル体の尿中排泄が推定された。これらの結果より、生体内でのTDIの代謝にはN-acetylationの他、CH<sub>3</sub>-oxidation、ring-hydroxylationが関与していることが推定できた。これらの尿中代謝物はLC-MSで容易に直接検出可能であることから、作業員での生物学的モニタリングとして利用可能である。

## F 研究発表

1. 論文発表
  - (a) 学術誌など
    - 1) 森田陽子、坂井 公、Y Kim. GC-MSによるトルエンジイソシアネート尿中代謝物の測定. 日本職業・災害医学会会誌 51: 154-157, 2003.
    - 2) 森田陽子、坂井 公、中嶋義明、河口友香、横沢册子、西中川秀太、吉田友彦、永田直一. 新築医療施設でのVOC濃度とその推移. 日本職業・災害医学会会誌 51: 437-441, 2003.
    - 3) 嶽石美和子、小野崎幾之助、坂井 公、森田陽子、岩田豊人、村田勝敬. 仏壇製造に従事する女性労働者における有機溶剤暴露による自律神経機能への影響. 産衛誌 45: 194-196, 2003.
    - 4) K Murata, T Sakai, Y Morita, T Iwata, M Dakeishi. Critical dose of lead affecting  $\delta$ -aminolevulinic acid levels. *J Occup Health* 45: 209-214, 2003.
    - 5) M Onuki, K Yokoyama, K Kimura, H Sato, R Hordin, L Naing, Y Morita, T Sakai, Y Kobayashi, S Araki. Assessment of urinary cotinine as a marker of nicotine absorption from tobacco leaves: A study on tobacco farmers in malaysia. *J Occup Health* 45: 140-145, 2003.
    - 6) J Ahn, C Yoo, C Lee, J Lee, H Lee, C Kim, J Park, T Sakai, C Yoon, Y Kim. Calcification mimicking manganese-induced increased signal intensities in T1-weighted MR images in a patient talking herbal medicine: case report. *Neuro Toxicol* 24: 835-838, 2003.
  - (b) 一般・啓蒙誌
    - 1) 坂井 公. 職場の環境汚染について教えてください. 産業医業務のコツ. 治療 86: 181-183, 2003.
    - 2) 坂井 公. 相談事例に学ぶ化学物質中毒. 18 ニッケル. 安全スタッフ, 4.5号, p.36-37, 2003.
    - 3) 坂井 公. 同上. 19 セロソルブ. 安全スタッフ, 5.5号, p.34-35, 2003.
    - 4) 坂井 公. 同上. 20 一酸化炭素. 安全スタッフ, 6.5号, p.34-35, 2003.
    - 5) 坂井 公. 同上. 21 ホルムアルデヒド. 安全スタッフ, 7.5号, p.34-35, 2003.
    - 6) 坂井 公. 同上. 22 硫化水素. 安全スタッフ, 8.5/15号, p.50-51, 2003.
    - 7) 坂井 公. 同上. 23 フッ化水素. 安全スタッフ, 9.5号, p.38-39, 2003.
    - 8) 坂井 公. 同上. 24 イソシアネート類. 安全スタッフ, 10.5号, p.28-29, 2003.
    - 9) 坂井 公. 同上. 25 エチレンオキシド. 安全スタッフ, 11.5号, p.38-39, 2003.
    - 10) 坂井 公. 同上. 26 塩素. 安全スタッフ, 12.15号, p.40-41, 2003.
2. 学会発表および講演
  - 1) 坂井 公、森田陽子、中嶋義明、Jaroslav Mraz. トルエンジイソシアネート(TDI)のヘモグロビン付加体の測定銀の測定. 第76回日本産業衛生学会、山口、2003.4
  - 2) 森田陽子、坂井 公、朴 喜燦、荒木俊一. 金属水銀暴露と血中および尿中ポルフィリン濃度との関連. 第76回日本産業衛生学会、山口、2003.4
  - 3) 河口友香、横沢册子、吉田友彦、永田直

- 一、坂井 公. 当院における一般室内の空気質調査 (第一報). 第 12 回日本臨床環境医学会、東京、2003. 6
- 4) 坂井 公、森田陽子、三井 浩. 除草剤メコプロップ (MCPP) 中毒患者の血清および尿中濃度の測定. 第 25 回日本中毒学会、福島、2003.7
- 5) 坂井 公、森田陽子、Jaroslav Mraz. 2,4-トルエンジイソシアネート投与ラットの代謝物の検索と同定. 第 51 回日本職業・災害医学会、横浜、2003.11
- 6) 森田陽子、坂井 公、北村文彦. 有機リン農薬尿中代謝物の測定. 第 51 回日本職業・災害医学会、横浜、2003.11
- 7) 中嶋義明、坂井 公、森田陽子、井上 修、村田勝敬、小野崎幾之助. 低濃度ヘキサン暴露の生物学的モニタリング. 第 51 回日本職業・災害医学会、横浜、2003.11
- 8) 井上 修、葛西清美、中嶋義明、森田陽子、坂井 公、村田勝敬、小野崎幾之助. 低濃度ベンゼン暴露指標としての尿中 t,t-ムコン酸の有用性. 第 51 回日本職業・災害医学会、横浜、2003.11
- 9) 西中川秀太、横沢册子、河口友香、吉田友彦、永田直一、中嶋義明、森田陽子、坂井 公、徳留隆博. 当院における病理検査室内の空気質ホルムアルデヒド濃度の検討. 第 51 回日本職業・災害医学会、横浜、2003.11
- 10) 坂井 公、森田陽子. ラット尿中のトルエンジイソシアネート代謝物の検索. 第 74 回日本衛生学会、東京、2004.3
- 11) 坂井 公. 化学物質による健康問題. 化学物質汚染研究懇談会、コスモス青山、東京、2003.10.11.
- 12) 坂井 公. 生体試料中の有害物質の検査—とくに有機リン代謝物を中心として. 第 3 回シックハウス研究会特別講演. 北里学園白金キャンパス、東京、2004.3

## G. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

該当するものなし.

### 2. 実用新案登録

該当するものなし.

### 3. その他

該当するものなし.

Table 1. Porphyrin levels in urine and blood from workers exposed to Hg and control subjects (mean±SD)

Porphyrins*	Control subjects (n=35)	Hg workers (n=42)	
<b>Urine</b>			
ALA	0.9±0.23	0.9±0.4	
UP	8.4±2.6	9.7±2.9	#
Hepta P	4.7±1.3	4.7±1.8	
Hexa P	0.2±0.4	0.2±0.3	
Penta P	0.9±0.9	1.3±1.0	
UK	3.4±1.7	5.1±2.3	##
CP I	21.1±9.4	23.6±8.8	
CP III	16.0±20.8	27.4±31.5	
<b>Blood</b>			
ZP	29.7±13.1	29.5±12.6	
PP	5.7±3.4	4.9±3.8	

Urinary porphyrins (ALA and UP~CP III) :  $\mu$  g/gCre

Blood porphyrins (ZP and PP) :  $\mu$  g/dl RBC

\*: See text

#: p<0.05, ##: p<0.001 by Welch's test



Table 2. Correlation coefficients of various porphyrins vs Hg-B or Hg-U

Porphyrins *		Hg-B	Hg-U (Cre. correct)
Urine porphyrins (Cre. correction)	ALA	0.017	0.086
	UP	0.045	0.111
	Hepta P	-0.150	-0.081
	Hexa P	-0.089	-0.038
	Penta P	0.084	0.109
	UK	0.407 #	0.451 #
	CP I	0.074	0.116
	CP III	0.086	0.170
Blood porphyrin	ZP	-0.066	-0.022
	PP	-0.132	-0.131

\*: See text.

#: P<0.001

**Table 3 Mn-B and Mn in each fraction**

Sample #	Mn-B ug/l	Mn-fr A ug/l	Mn-fr B ug/l	Mn-fr C ug/l	Mn-fr D ug/l	total ug/l
<b>Saline group</b>						
S1	6.7	0.0	16.9	18.1	0.0	35.1
S2	6.5	26.8	28.3	23.9	0.0	79.0
S3	6.0	9.2	16.7	12.5	0.0	38.4
S4	8.0	0.0	12.0	10.0	0.0	22.0
S5	5.6	0.9	20.3	14.1	0.0	35.2
<b>Low exposed group</b>						
LM1	61.8	28.0	15.6	15.5	0.0	59.0
LM2	32.8	84.6	6.6	9.8	0.0	101.0
LM3	51.1	13.7	12.9	10.5	29.4	66.4
LM4	67.8	97.7	0.0	18.5	46.0	162.2
LM5	76.8	41.9	17.9	12.2	33.2	105.2
<b>High exposed group</b>						
HM1	216.5	34.5	9.1	13.0	130.9	187.5
HM2	251.2	36.6	10.0	9.0	139.0	194.5
HM3	392.6	17.3	13.2	9.6	213.9	254.1
HM4	97.1	18.3	12.2	15.6	51.5	97.6
HM5	103.5	14.0	20.7	10.3	62.0	107.1

**Table 4 LCMS analysis of the synthetic standards**

Compound	M <sub>r</sub>	MS (m/z) <sup>1)</sup>	MS <sup>2</sup> (parent ion: daughter ions) (m/z) <sup>1)</sup>	Reten tion time (min)
2,4-TDA	122	<u>123</u> , 164	123: <u>106</u> , 108	2.45
2,4-TDA-Ac(2)	164	<u>165</u> , 206, 329	165: 106, <u>124</u> , 147	2.97
2,4-TDA-Ac(4)	164	<u>165</u> , 206, <u>329</u>	165: 106, 123, <u>124</u> , 147	3.52
2,4-TDA-Ac <sub>2</sub>	206	165, 207, <u>224</u> , 329, 371	207: 165, <u>177</u>	5.15
2,4-DABA	152	109, <u>153</u>	153: 135	3.57
2,4-DABA-Ac(2)	194	151, <u>177</u> , 195, 234	195: 151, <u>177</u>	6.05
2,4-DABA-Ac(4)	194	151, 177, <u>195</u>	195: 151, <u>177</u>	5.21
2,4-DABA-Ac <sub>2</sub>	236	219, 237, <u>254</u>	237: <u>177</u> , 195, 219	6.23

**Table 5** Characteristic compounds detected by LCMS analysis of rat urine after administration of 2,4-TDI.

Retention time (min)	m/z <sup>1)</sup>	M <sub>r</sub> assessed	Structure <sup>2)</sup>
6:47	165	164	<b>2,4-TDA-Ac(4)</b>
6:83	240	222	<b>2,4-TDA-Ac<sub>2</sub>-OH</b>
7:08	297	296	
7:55	326	325	
7:69	252	251	
8:09	207, <u>224</u>	206	<b>2,4-TDA-Ac<sub>2</sub></b>
8:16	321	320	
8:83	361, <u>379</u> , 396	378	
9:07	237	236	<b>2,4-DABA-Ac<sub>2</sub></b>
9:41	<u>308</u> , 325	307	
9:55	<u>317</u> , 318, 334, 335	316	
9:87	<u>304</u> , 322	321	
10:39	165, <u>308</u> , 325	307	

<sup>1)</sup> the most abundant ion is underlined

<sup>2)</sup> structure of compounds printed in bold was confirmed using the synthetic standards

**Table 6** Characteristic compounds detected by LCMS analysis of rat urine after administration of 2,4-TDA

Retention time (min)	m/z <sup>1)</sup>	M <sub>r</sub> assessed	Structure <sup>2)</sup>
2.22	137	136	
2.58	182	181	
2.79 *	151, 163, <u>181</u>	180	<b>2,4-TDA-Ac(4)-OH</b>
2.96	<u>155</u> , 196, 309	154	
3.48	403	402	
3.52 *	<u>165</u> , 182, 206, 329	164	<b>2,4-TDA-Ac(4)</b>
3.66 *	<u>205</u> , 223, 240	222	<b>2,4-TDA-Ac<sub>2</sub>-OH</b>
3.70	281	280	
4.05	297	296	
4.18 *	205, 223, <u>240</u>	222	<b>2,4-TDA-Ac<sub>2</sub>-OH</b>
4.40 *	151, 163, 206, <u>326</u> , 651	325	
4.46	321	320	
5.15 *	165, 207, <u>224</u> , 371, 430	206	<b>2,4-TDA-Ac<sub>2</sub></b>
5.21 *	151, 177, <u>195</u>	194	<b>2,4-DABA-Ac(4)</b>
6.23 *	219, 237, <u>254</u>	236	<b>2,4-DABA-Ac<sub>2</sub></b>

<sup>1)</sup> the most abundant ion is underlined

<sup>2)</sup> structure of compounds printed in bold was confirmed using the synthetic standards

\* peak visible in the TIC chromatogram (see Figure 19)

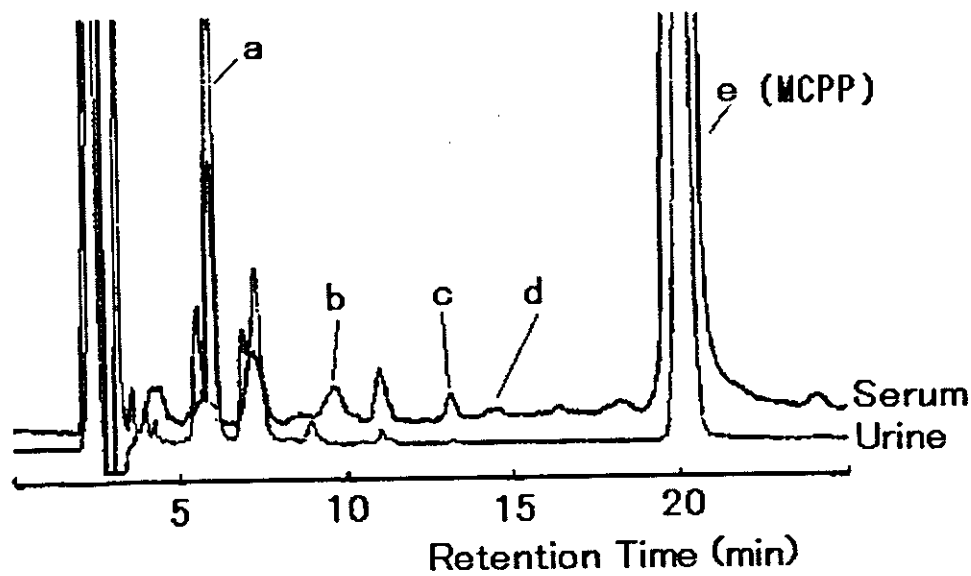
Table 6 (continued)

Retention time (min)	m/z 1)	Mr assessed	Structure 2)
6.67 *	431, <u>448</u>	430	
7.88 *	447, <u>464</u>	446	
8.13	220	219	
8.20 *	<u>421</u> , 438	420	
8.33	<u>321</u> , 338	320	
8.79	300	299	

1) the most abundant ion is underlined

2) structure of compounds printed in bold was confirmed using the synthetic standards

\* peak visible in the TIC chromatogram (see Figure 19)



**Fig. 1** Chromatographic separation of MCPP and related compounds (a-d) in serum and urine from the patient.

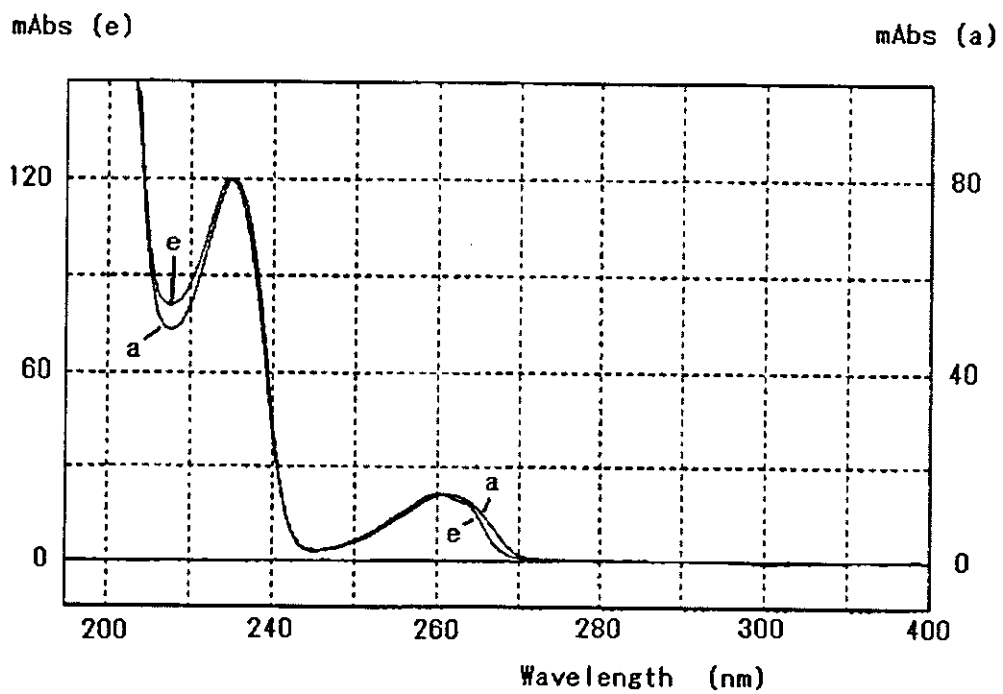


Fig.2 UV spectra of peak a and e



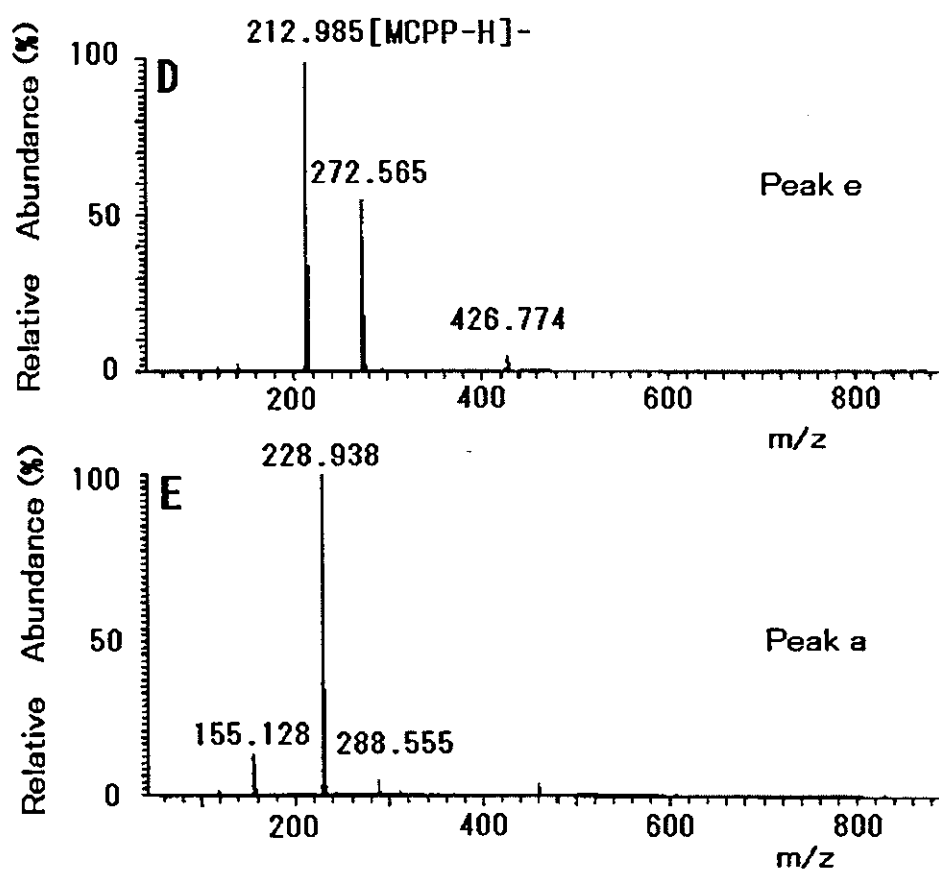
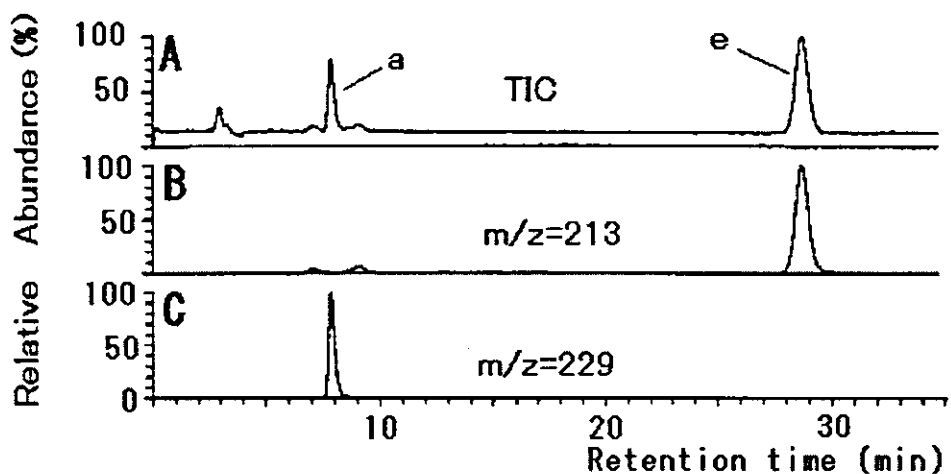


Fig. 3 Chromatographic separation of MCPP and its related compound, and their mass spectra.

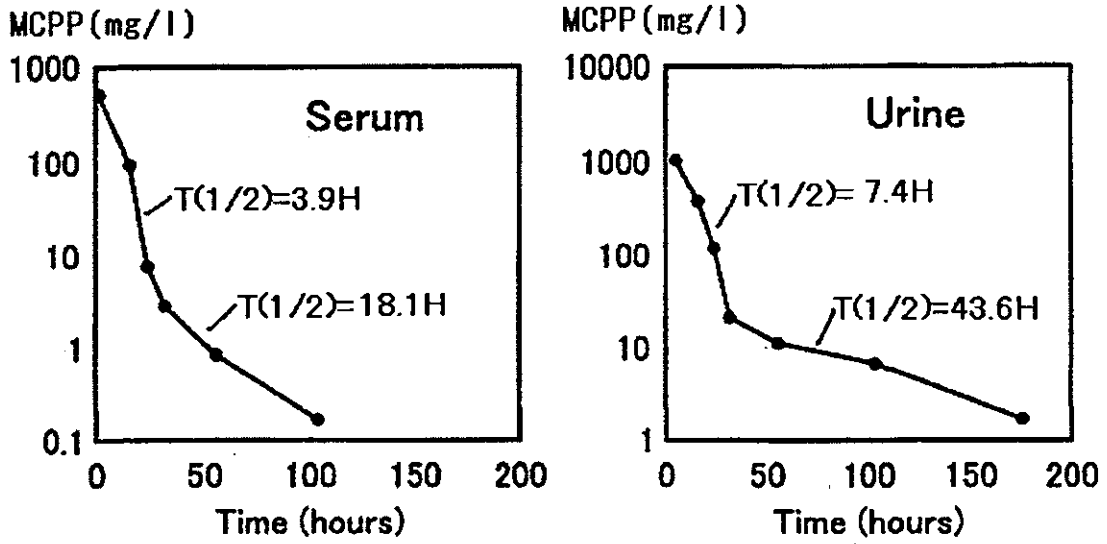


Fig. 4 Decay curves of serum and urine MCPP during the patient's hospitalization

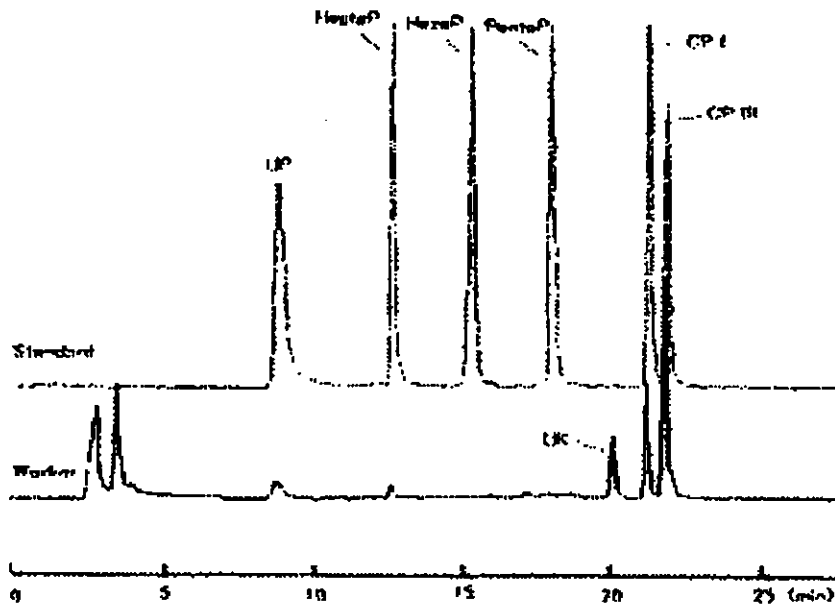


Fig. 5 Chromatographic separation of porphyrins in urine from a Hg worker and a standard solution

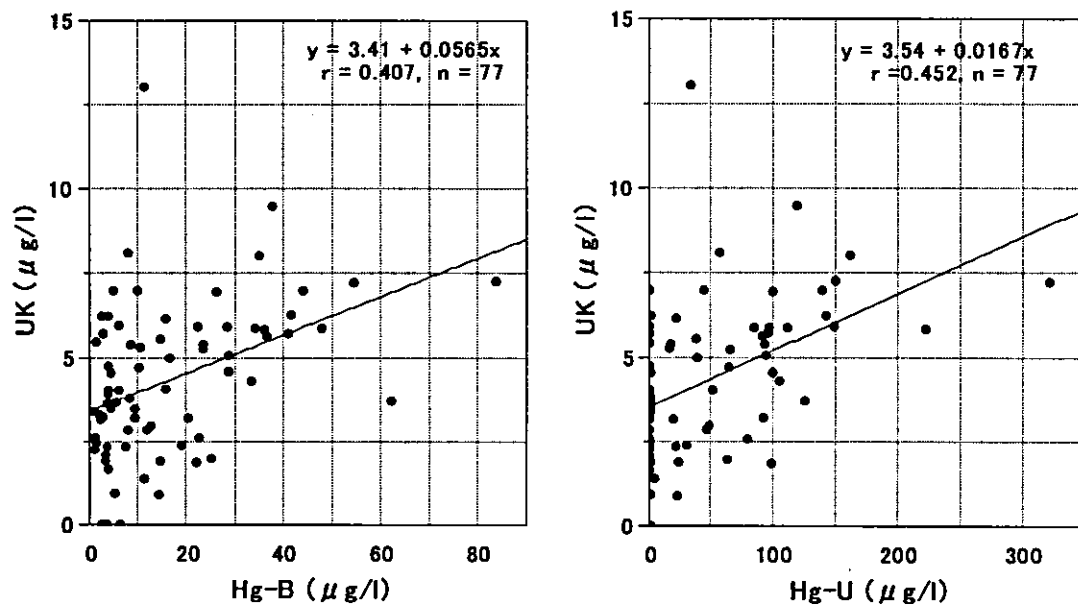


Fig. 6 Relationship between UK and Hg-B or Hg-U