

UNIVERSITE DE NEUCHÂTEL
FACULTE DES SCIENCES

Etude expérimentale
sur des sujets humains de l'absorption, du métabolisme
et de l'élimination du styrène,
du m-xylène et du toluène

THÈSE

Présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel
pour obtenir le grade de Docteur ès sciences

par

JOSÉ R. CAPEROS URREA

chimiste diplômé de l'Université de Saragosse (Esp.)

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Etude expérimentale sur des sujets humains de l'absorption,
du métabolisme et de l'élimination du styrène, du m-xylène et du toluène
de M. José R. Caperos Urrea

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL
FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des Sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,
MM. J. Fernandez, A. Jacot-Guillarmod, Ch. Schlatter (EPF Zurich)
et B. Moncelon (Nancy),
autorise l'impression de la présente thèse sans exprimer d'opinion
sur les propositions qui y sont contenues.

Neuchâtel, le 7 août 1978

Le doyen:
J.-P. SCHAEER

Tiré à part des Archives des maladies professionnelles,
de médecine du travail et de sécurité sociale,
1976, 37, pp. 387-391 ; British Journal of Industrial Medicine,
1977, 34, pp. 229-233 et International Archives of Occupational and
Environmental Health, 1977, 40, pp. 1-12 et 1979, 42, pp. 223-230.

Dosage des acides mandélique et phénylglyoxylique dans l'urine par chromatographie en phase gazeuse.

par

J. R. CAPEROS et J. G. FERNÁNDEZ

*Laboratoire d'hygiène industrielle, Université de Neuchâtel,
51, avenue de Bellevaux, 2000 Neuchâtel, Suisse*

Le styrène ou vinylbenzène intervient dans la production d'une grande variété de matières plastiques polymères. Il est largement employé comme produit de remplacement du benzène dans la fabrication des caoutchoucs synthétiques de même que dans la production de résines et de polyesters. Il est fabriqué industriellement par synthèse, mais il existe aussi à l'état naturel dans la sève du styrax.

Lors d'une exposition professionnelle, le styrène pénètre dans l'organisme principalement par voie respiratoire, mais il peut également être absorbé à travers la peau après dissolution des matières grasses du revêtement cutané de l'épiderme. Alors qu'un faible pourcentage du styrène absorbé est éliminé sans modification chimique par voie pulmonaire [1, 2, 3, 4], la plus grande partie est excrétée dans les urines sous forme de métabolites [2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Il se transforme en effet par oxydation en époxyde, ultérieurement hydrolysé en phénylglycol. A son tour, celui-ci s'oxyde en acide mandélique libre et conjugué [7] dont une partie conduit à la formation d'acide phénylglyoxylique.

Différents auteurs ont proposé comme test biologique d'exposition l'analyse du styrène dans l'air expiré pendant les premières heures après la fin de l'exposition, correspondant à la décharge rapide des tissus très vascularisés. D'autres ont par contre adopté la détermination des métabolites urinaires, en particulier l'acide mandélique et l'acide phénylglyoxylique ou encore l'acide hippurique, pour contrôler le degré d'imprégnation chez les personnes exposées professionnellement.

La plupart des méthodes analytiques employées pour la détermination des métabolites du styrène dans l'urine ont été développées ces dernières années. Elles font appel à la spectrophotométrie [6], à la polarographie [5, 12] ou encore à la chromatographie en phase gazeuse [7, 8, 11, 13, 14]. Cependant, certaines de ces méthodes manquent de sensibilité ou ne sont pas très sélectives, d'autres ont été développées pour la détermination d'un seul métabolite; elles demandent en général de longues opérations ou nécessitent l'utilisation de réactifs dangereux tel que le diazométhane, gaz explosif difficile à manipuler.

Dans le cadre d'une étude sur l'absorption, le métabolisme et l'excrétion du styrène, comportant l'exposition contrôlée de volontaires dans une chambre d'exposition [4], nous avons développé différentes techniques analytiques, notamment le dosage urinaire par chromatographie en phase gazeuse des acides mandélique et phényl-

glyoxilique. La méthode que nous avons élaborée et qui fait l'objet du présent travail, permet l'identification spécifique et simultanée des deux métabolites. Elle se caractérise par sa rapidité et sa sensibilité, et peut dès lors être utilisée aussi bien pour des études pharmacocinétiques que pour les contrôles de routine des personnes exposées au styrène. Le procédé est basé sur la méthylation des deux acides urinaires, par le 3-méthyl-p-tolyltriazené, suivie de leur identification sélective par chromatographie en phase gazeuse sous forme de dérivés méthylés.

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Après séparation par extraction de l'urine dans l'acétate d'éthyle, les deux acides sont méthylés simultanément à l'aide du 3-méthyl-p-tolyltriazené en présence de l'acide myristique utilisé comme étalon interne. La solution est ensuite évaporée à sec et le résidu solide obtenu repris dans du chloroforme. L'excès de l'agent de méthylation est séparé sous forme de chlorhydrate dans la phase aqueuse par addition d'une solution d'acide chlorhydrique dilué, et le dosage proprement dit est effectué sur une prise de volume approprié de la fraction organique contenant les dérivés méthylés des acides mandélique, phénylglyoxylique et myristique, après injection dans le chromatographe.

Réactifs utilisés.

L'acétate d'éthyle, le chloroforme et l'acide chlorhydrique de qualité analytique ont été fournis par la Maison Merk, (Darmstadt, RFA). La Maison Fluka, (Buchs, Suisse) nous a procuré les acides mandélique, phénylglyoxylique et myristique de qualité puriss., de même que l'agent de méthylation, le 3-méthyl-p-tolyltriazené purum. Avant d'être employé, ce dernier a été purifié par sublimation à 50 °C sous 1 mm de Hg, puis recristallisé plusieurs fois dans l'hexane [15].

Appareillage.

Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Perkin-Elmer F 11, équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne en verre de 200 cm de longueur et d'un diamètre intérieur de 3 mm. Dans sa première partie (50 cm), la colonne a été remplie avec 3 p. 100 de Carbowax 20 M sur Chromosorb W-NAW (80-100 mesh), et dans la seconde, (150 cm) chargée de 3 p. 100 de OV-17 sur Gas-Chrom Q (100-120 mesh). La température de travail a été fixée à 200 °C et celle du bloc d'injection à 230 °C, alors que l'azote (30 ml/m) était utilisé comme gaz vecteur. Enfin, le détecteur FID a été alimenté par de l'air à une pression de 170 kN/m² et de l'hydrogène à 120 kN/m².

Les produits résultant de la réaction de méthylation ont été identifiés par spectrométrie de masse sur l'appareil Hitachi RMU — 6 L couplé à un chromatographe Perkin-Elmer 990 équipé avec la même colonne que celle utilisée pour les analyses et en gardant scrupuleusement les mêmes conditions opératoires décrites précédemment.

Mode opératoire.

Pour 1 ml d'urine, on introduit dans un tube muni d'un bouchon à vis, 0,1 ml d'acide chlorhydrique concentré et 5 ml d'acétate d'éthyle contenant l'étalon interne (acide myristique 40 mg/l). Le tube est alors agité pendant deux minutes et un aliquot de 3 ml est transféré dans un cristalliseur contenant 1 ml de solution de méthylation (36 g/l de 3-méthyl-p-tolyltriazené dans l'acétate d'éthyle). Après évaporation à sec du solvant, le résidu solide est repris dans 0,2 ml de chloroforme et, la solution est agitée ensuite avec 1,5 ml d'acide chlorhydrique 3 N afin de séparer dans la phase aqueuse le chlorhydrate de l'agent de méthylation. Finalement, 1 µl de la solution chloroformée est injecté dans le chromatographe et la séparation des deux acides est obtenue sur le chromatogramme en sept minutes. Les rapports des pics de chacun des deux métabolites et de l'étalon interne donnent leurs concentrations urinaires.

RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

Les urines des personnes exposées au styrène ont été analysées par comparaison avec deux courbes d'étalonnage obtenues respectivement à partir des solutions aqueuses et urinaires des acides mandéliques et phénylglyoxylique. Comme on peut le constater (fig. 1), les courbes d'étalonnage donnent des droites dans l'intervalle

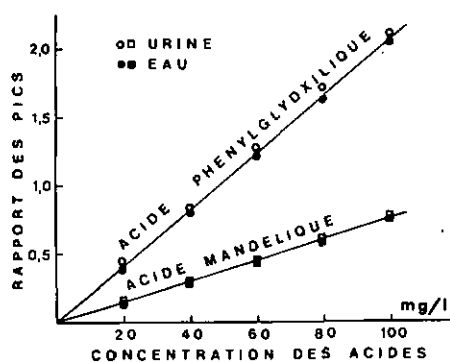


Fig. 1. — Courbe standard des acides mandélique et phénylglxyliques dans l'eau et dans l'urine.

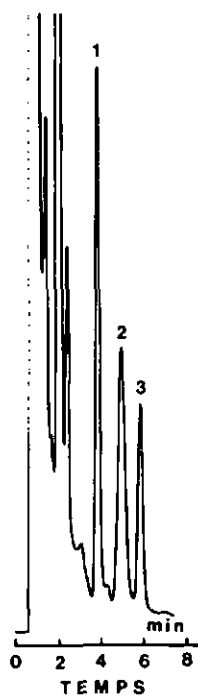


Fig. 2. — Chromatogramme d'un extrait urinaire. Esters méthyliques de l'acide phénylglxylique 1, de l'acide mandélique 2, et de l'acide myristique 3.

des concentrations étudiées, mais les solutions urinaires procurent pour l'acide phénylglxylique des concentrations légèrement inférieures à celles des échantillons témoins préparés dans l'eau. L'acide mandélique donne par contre dans les deux cas pratiquement la même courbe. Dès lors, comme les différences entre les solutions urinaires et aqueuses sont très faibles, même dans les cas les plus défavorables, les solutions étalon peuvent être préparées indifféremment dans l'eau ou dans l'urine, le rapport concentration-surface des pics étant constant dans les deux cas.

La figure 2 montre le chromatogramme obtenu pour l'analyse d'une urine contenant 150 mg/l d'acide phénylglxylique et 125 mg/l d'acide mandélique. Il est intéressant de constater que le temps nécessaire à l'élution des trois esters est de sept minutes environ, alors qu'ils sont séparés dans la colonne sans aucune interférence de la part des substances entrant dans la composition normale de l'urine. Lors de l'analyse des urines de dix personnes non exposées professionnellement, nous n'avons pu détecter d'acide mandélique, alors que l'acide phénylglxylique était présent dans deux échantillons à une concentration inférieure à 4 mg/l.

Nous avons étudié le rendement de l'extraction des deux acides avec l'acétate d'éthyle. On constate qu'elle est pratiquement quantitative lorsqu'on suit le mode opératoire décrit dans ce travail, c'est-à-dire en utilisant un échantillon d'urine de 1 ml, mais diminue rapidement si le volume de l'échantillon utilisé pour l'analyse est plus grand; ainsi, pour 5 ml d'urine, l'extraction n'est que de 85 p. 100.

Le rendement de la réaction de méthylation est supérieur à 90 p. 100 et est par ailleurs constant dans l'intervalle des concentrations étudiés. Ceci peut expliquer, en partie tout au moins, la bonne reproductibilité de la méthode (coefficient de variation inférieur à 3 p. 100) lors de dix analyses répétées d'urines contenant des concentrations identiques des deux métabolites. D'autre part, l'identification des

chromatogrammes par spectrométrie de masse nous permet d'assurer que les conditions opératoires ne produisent ni la décarboxylation des esters analysés, ni leur fragmentation.

De plus, étant donné la sensibilité et la spécificité de la méthode, il est permis de penser qu'elle peut être utilisée aisément pour le contrôle industriel des personnes exposées au styrène, de même que dans la recherche pharmacocinétique de ce composé.

* * *

Les auteurs remercient M. B. Humbert de l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Ils expriment leur gratitude à M. J. Gavin pour le relevé des spectres SM.

Résumé.

Le présent travail décrit une méthode d'analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides mandélique et phénylglyoxylique, métabolites urinaires du styrène chez l'homme.

Après séparation des acides par extraction dans l'acétate d'éthyle en présence de l'acide myristique utilisé comme étalon interne, les trois composés sont méthylés à l'aide du 3-méthyl-p-tolyltriazone. La solution est ensuite évaporée à sec et le résidu solide dissous dans du chloroforme. L'agent de méthylation est séparé sous forme de chlorhydrate par addition d'acide chlorhydrique et la fraction organique est analysée par chromatographie.

La méthode proposée permet un dosage simultané, sûr et précis des deux corps. L'analyse est conduite à l'aide d'un chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne en verre remplie dans sa première partie avec 3 p. 100 de Carbowax 20 M sur Chromosorb-W-NAW (80-100 mesh) et dans la seconde, de 3 p. 100 de OV-17 sur Gas-Chrom Q (100-120 mesh).

Le rendement de l'extraction est tout à fait quantitatif si on suit le mode opératoire, celui de la méthylation est supérieur à 90 p. 100, et le coefficient de variation pour une série de dix analyses inférieur à 3 p. 100.

Bibliographie.

- [1] STEWART, R. D., DODD, H. C., BARETTA, E. D. and SCHAFFER, A. W. : Human exposure to styrene vapors. *Arch. environm. health.*, 1968, **16**, 656-662.
- [2] GÖTEL, P., AXELSON, O. and LINDELOF, B. : Field studies on human styrene exposure. *Work environm. health*, 1972, **9**, 76-83.
- [3] ASTRAND, I., KILDON, A., OVRUM, P., WAHLBERG, I. and VESTENBERG, O. : Exposure to styrene I. Concentration in alveolar air and blood at rest and during exercise and metabolism. *Work environm. health*, 1974, **11**, 69-85.
- [4] FERNANDEZ, J. G. et CAPEROS, J. R. : Etude expérimentale sur des sujets humains de l'absorption et de l'excrétion pulmonaire du styrène. (*En préparation.*)
- [5] BARDODEJ, C. and BARDODEJOVA, E. : Biotransformation of ethylbenzene, styrene and alphas-methylstyrene in man. *Amer. ind. hyg. assoc. J.*, 1970, **31**, 206-209.
- [6] OHTSUJI, H. and IKEDA, M. : A rapid colorimetric method for the determination of phenylglyoxylic and mandelic acids. Its application to urine analysis of workers exposed to styrene vapors. *Brit. J. industr. med.*, 1970, **27**, 150-154.
- [7] SLOB, A. : A new method for determination of mandelic acid excretion at low level styrene exposure. *Brit. J. industr. med.*, 1973, **30**, 390-393.

- [8] BUCHET, J. P., LAUWERYS, R. et ROELS, H. : Evaluation de l'exposition des travailleurs au styrène par le dosage de ses métabolites urinaires : les acides mandélique et phényl-glyoxylique. I. Technique de dosage des métabolites par chromatographie en phase gazeuse. *Arch. mal. prof.*, 1974, **35**, 507-512.
- [9] PHILIPPE, R., LAUWERYS, J. P., BUCHET, J. P. et ROELS, H. : Evaluation de l'exposition des travailleurs au styrène par le dosage de ses métabolites urinaires : les acides mandélique et phényl-glyoxylique. II. Application aux travailleurs fabriquant des polyesters. *Arch. mal. prof.*, 1974, **35**, 631-640.
- [10] IKEDA, M. and IMAMURA, T. : Evaluation of hippuric, phenylglyoxylic and mandelic acids in urine as indices of styrene exposure. *Int. Arch. Arbeitsmed.*, 1974, **32**, 93-101.
- [11] ENGSTRÖM, K. and RANTANEN, J. : A new gas chromatographic method for determination of mandelic acid in urine. *Int. Arch. Arbeitsmed.*, 1974, **33**, 163-167.
- [12] BARDODEJ, C., FISEHOVA-BERGEROVA, V. and LEDRER, E. : Polarographic determination of mandelic acid in the urine. (In Czech). *Pracovní Lékarství*, 1964, **16**, 414-415.
- [13] SEDIVEC, V. und FLEK, J. : Bestimmung toxischer Substanzen und ihrer Metaboliten in biologischen Flüssigkeiten mittels der Gaschromatographie IV. Mandelsäure im Urin. *Collection Czechoslov. Chem. Commun.*, 1970, **35**, 931-937.
- [14] SYBIL, P. J. and WHITE, D. A. : The metabolism of phenethyl bromide, styrene and styrene oxide in the rabbit and rat. *Biochem. J.*, 1967, **104**, 914-921.
- [15] WHITE, E. N., BAUM, A. A. and EITEL, D. E. : 1-methyl-3-p-tolyltriazene and its use in the esterification of acids. *Org. syn.* 1968, **48**, 102-105.

Summary.

Determination of urinary mandelic and phenylglyoxylic acids by gas chromatography.

by J. R. CAPEROS and J. G. FERNANDEZ (Neuchâtel, Suisse)

The present paper describes a method of gas chromatography analysis of mandelic and phenylglyoxylic acids, urinary metabolites of styrene in man.

After separation of the acids by extraction in ethyl acetate, myristic acid being used as an internal standard, the three compounds are methylated with 3-methyl-p-tolyl-triazene. The solution is then evaporated to dryness and the solid residue dissolved in chloroform. The methylation agent is then separated as hydrochloride after addition of hydrochloric acid and the organic fraction is analyzed by chromatography.

The proposed method allows a simultaneous, reliable and precise determination of the two substances. The analysis is performed with a chromatograph equipped with a flame ionisation detector and a glass column filled in its first part with 3 p. 100 Carbowax 20 M on Chromosorb W-NAW (80-100 mesh) and, in its second part, with 3 p. 100 OV-17 on Gas-Chrom Q (100-120 mesh).

The extraction yield is perfectly quantitative if the working method is followed, the yield of methylation is more than 20 p. 100 and the coefficient of variation for a series of ten analyses is less than 3 p. 100.

(*Arch. mal. prof.*, 1976, **37**, n° 1, 387-391.)

Simultaneous determination of toluene and xylene metabolites in urine by gas chromatography

J. R. CAPEROS AND J. G. FERNÁNDEZ

From the Occupational Health and Industrial Hygiene Service, Department of Chemistry, University of Neuchâtel, Bellevaux 51, 2000 Neuchâtel, Switzerland

ABSTRACT A gas chromatographic method for simultaneous determination of hippuric and *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids (metabolites of toluene and xylene) in urine is described. The analytical procedure is based on the extraction of the aromatic metabolites with ethyl acetate containing the internal standard and on a methylation with 3-methyl-1-*p*-tolyltriazeno. With this method, which does not require much time and handling, the different acids can be satisfactorily determined with high sensitivity and specificity. A statistical study shows a good reproducibility for the determination of hippuric and *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids. The coefficient of variation for 10 determinations in all cases was less than 5%.

Toluene and xylene are the principal homologues of benzene and may replace it in many industrial operations. The carbonisation of coal was for a long time the major source of these two solvents, but today they are obtained mainly from petroleum and by petrochemical processes.

Toluene and xylene may be encountered as relatively pure substances or as constituents of solvent mixtures. Occupational exposure may occur from transfer of liquid, spillage or from leaking equipment. There is also a high risk of exposure when toluene or xylene are present as components of paints, thinners, lacquers or as solvents for gums, fats and resins.

In the body, toluene is mainly oxidised into benzoic acid which after conjugation with glycine is eliminated as hippuric acid, in the urine (Quick, 1931). Benzoic acid, which is a normal urinary constituent occurring naturally or derived from food containing benzoate added as a preservative, is also formed from phenylalanine (Meister, 1965) and other alkylbenzenes (El Masry *et al.*, 1956). Quantitative aspects of hippuric acid formation are of interest not only as a test of industrial exposure to toluene but also in the evaluation of liver function (Quick test), in the study of pharmacokinetics of salicylic acid (Amsel and Levy, 1969; Levy *et al.*, 1969) and to observe patients with the Lesch-Nyhan syndrome (Jolley and Scott, 1970; Beardmore and Kelley, 1971).

The commercial product of xylene is a blend of three isomers, the largest proportion consisting of the meta-compound (up to 75-80 %) and the smallest of the para-compound (up to 5 %). After absorption, xylenes are mainly metabolised into toluic acid which, when conjugated with glycine or glucuronic acid give the corresponding ortho-, meta- and para-methylhippuric or toluylglucuronic acids. Only a small percentage is eliminated by pulmonary excretion and by nuclear oxidation with formation of xyleneols.

Until now, different methods, including colorimetry (Gaffney *et al.*, 1954; Ogata *et al.*, 1962; Umberger and Fiorese, 1963), ultraviolet spectrophotometry (Pagnotto and Lieberman, 1967; Ikeda and Ohtsuji, 1969) and gas chromatography (Šedivec and Flek, 1970; Buchet and Lauwerys, 1973; Engström *et al.*, 1976), were used to determine the urinary metabolites of toluene and xylene. Among the various analytical methods proposed, the gas chromatography technique provides the greatest efficiency and easiest determination. Colorimetric and direct UV-spectrophotometric methods are subject to interference from a wide variety of compounds. Removal of this interference is tedious and in many cases incomplete.

The purpose of this paper is to describe a new specific and sensitive gas liquid chromatography procedure for the simultaneous determination of hippuric and *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids for monitoring workers exposed occupationally to toluene and/or xylene. This method is based on the

Received for publication 14 February 1977

Accepted for publication 5 April 1977

formation of methyl esters of hippuric and *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids. For the methylation process of these acids, 3-methyl-1-*p*-tolyltriazeno is used, which reacts directly and instantaneously with carboxylic acids (White *et al.*, 1968; Humbert and Fernández, 1976; Caperos and Fernández, 1976). Furthermore, the use of an internal standard (tridecanoic acid) gives the method a very good reproducibility. During the last few years, this procedure has been regularly used in our laboratory and proved to be satisfactory.

Materials and methods

CHEMICALS

Ethyl acetate, chloroform, methanol, hydrochloric acid and sulphuric acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Hippuric acid, tridecanoic acid, *o*-, and *m*-methylbenzoic acids, *p*-methylbenzoyl chloride, glycine and 3-methyl-1-*p*-tolyltriazeno were furnished by Fluka (Buchs, Switzerland). *O*-, and *m*-methylbenzoyl chloride were synthesised from *o*-, and *m*-methylbenzoic acids respectively, following Vogel's (1967) procedure for aromatic chlorides. *O*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids were prepared from *o*-, *m*-, and *p*-methylbenzoyl chloride and glycine, using Vogel's (1967) method for hippuric acid synthesis. The *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids were converted to the corresponding methyl esters using methanol with concentrated sulphuric acid as catalyst.

For identification of these compounds infrared and nuclear magnetic resonance analyses were conducted and their purity was determined by gas chromatography. 3-methyl-1-*p*-tolyltriazeno was purified by sublimation and recrystallisation in hexane before use (White *et al.*, 1968).

APPARATUS

A Perkin-Elmer model 900 gas chromatograph equipped with glass column (450 cm long, 2 mm internal diameter) packed with Chromosorb G (AW-DMCS, 80-100 mesh) coated with 4% Apiezon M was used. N₂ was the carrier gas (20 ml/min) and a hydrogen flame-ionisation detector unit was employed with a hydrogen flow of 60 ml/min and an air flow of 450 ml/min. The oven was maintained at a temperature of 220°C, the manifold and injector at 250°C. Chromatograms were obtained on a Perkin-Elmer recorder model 56 using a chart speed of 5 mm/min.

The determination of the MS spectra was carried out with a Perkin-Elmer model 990 gas chromatograph coupled with a Hitachi mass spectrometer RMU-6L, under the following conditions: ionisation voltage 68.6 eV, ion source temperature 205°C,

ion accelerative voltage 500 eV, inlet vapour temperature 215°C.

URINE TREATMENT

0.5 ml of urine were transferred into a glass stoppered tube and acidified with 0.1 ml of 10 mol/l. HCl. After introduction of 5 ml of internal standard solution (tridecanoic acid, 25 mg/l, in ethyl acetate), the tube was shaken for 5 minutes, 3 ml of the ethyl acetate extract (containing *o*-, *m*-, *p*-methylhippuric, hippuric acid and tridecanoic acids) were added to 2 ml of the methylating solution (3-methyl-1-*p*-tolyltriazeno in ethyl acetate, 36 g/l) in a crystallising dish and this mixture was evaporated slowly to dryness at a temperature lower than 50°C. After cooling the methylated sample was dissolved in 0.2 ml of chloroform. The excess of methylating reagent was removed by shaking the chloroform solution with 1 ml of 3 mol/l HCl which produced the water-soluble chlorohydrate. Finally, 2 μl of the organic phase were injected into the gas chromatograph for analysis.

DEGREE OF METHYLATION

To investigate the efficiency of methylation, known concentrations of hippuric, *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acid methyl esters were prepared by diluting these esters in ethyl acetate. 1 ml of ethyl acetate containing 100 mg/l of tridecanoic acid methyl ester (internal standard) was added to 3 ml of the standard solution. The mixture was evaporated to dryness at a temperature not higher than 50°C. The residue was dissolved in chloroform and 2 μl were then analysed by gas liquid chromatography. Calibration curves were calculated (Figures 1 and 2). These data were then compared to results obtained from standard solutions of hippuric acid and *o*-, *m*-, and

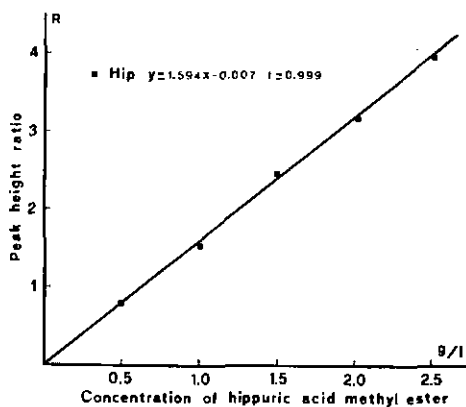


Fig. 1 Standard curve of hippuric acid methyl ester in ethyl acetate.

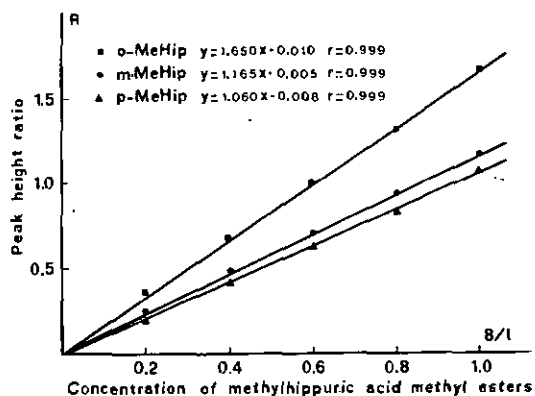


Fig. 2 Standard curves of *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acid methyl esters in ethyl acetate.

p-methylhippuric acid in ethyl acetate and methylated with 3-methyl-1-*p*-tolyltriazene (Table 1).

DEGREE OF METHYLATION AND EXTRACTION
The total degree of both methylation and extraction

processes was studied as follows. Known concentrations of hippuric *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids were prepared by diluting these acids in water or in urine. 5 ml of each solution were treated as described under 'urine treatment' with these variations: the solvent of extraction did not contain the internal standard (tridecanoic acid), but its methyl ester was added to the ethyl acetate extract later. The ratio of the peak heights of the hippuric, and *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acids to the internal standard was calculated (Tables 2 and 3) and compared with the peak height ratios between hippuric, and *o*-, *m*-, and *p*-methylhippuric acid methyl esters and the internal standard shown in Figures 1 and 2.

Results

Figure 3 shows a characteristic gas chromatogram of the treated urine from a worker exposed to vapours of toluene and xylene in a printing office. The five acid methyl esters were well separated and eluted within 20 minutes. All the aromatic acids studied

Table 1 Study of methylation. Reproducibility and recovery of the analyses of metabolites in ethyl acetate

Metabolites	Concentration of acids (g/l)	No. of analyses	Mean of peak height ratios	Coefficient of variation (%)	R (%)
Hippuric acid	2.5	10	3.95	4.0	99.6
Hippuric acid	1.5	10	2.47	2.8	96.8
Hippuric acid	1.0	10	1.52	3.4	95.8
<i>o</i> -methylhippuric acid	1.0	10	1.69	1.4	98.1
<i>o</i> -methylhippuric acid	0.6	10	0.99	3.1	98.3
<i>o</i> -methylhippuric acid	0.4	10	0.67	3.1	97.3
<i>m</i> -methylhippuric acid	1.0	10	1.16	3.5	100.0
<i>m</i> -methylhippuric acid	0.6	10	0.70	2.2	98.3
<i>m</i> -methylhippuric acid	0.4	10	0.47	2.4	100.0
<i>p</i> -methylhippuric acid	1.0	10	1.05	6.0	100.0
<i>p</i> -methylhippuric acid	0.6	10	0.63	3.5	100.0
<i>p</i> -methylhippuric acid	0.4	10	0.41	2.5	100.0

where R is equal to $\frac{(\text{mean of peak height ratios})}{\mu_0} \times 100$ and μ_0 is the ideal value of the peak height ratio derived from standard curves of Figures 1 and 2.

Table 2 Study of methylation and extraction. Reproducibility and recovery of the analyses of metabolites in water

Metabolites	Concentration of acids (g/l)	No. of analyses	Mean of peak height ratios	Coefficient of variation (%)	R (%)
Hippuric acid	2.5	10	3.35	2.1	81.3
Hippuric acid	1.5	10	2.08	2.2	75.5
Hippuric acid	0.5	10	0.67	1.5	81.9
<i>o</i> -methylhippuric acid	1.0	10	1.42	2.5	82.4
<i>o</i> -methylhippuric acid	0.6	10	0.84	4.2	80.0
<i>o</i> -methylhippuric acid	0.4	10	0.56	1.8	79.8
<i>m</i> -methylhippuric acid	1.0	10	0.99	2.3	82.4
<i>m</i> -methylhippuric acid	0.6	10	0.60	2.1	82.4
<i>m</i> -methylhippuric acid	0.4	10	0.41	4.3	82.4
<i>p</i> -methylhippuric acid	1.0	10	0.90	1.7	83.7
<i>p</i> -methylhippuric acid	0.6	10	0.52	4.8	80.0
<i>p</i> -methylhippuric acid	0.4	10	0.36	3.5	82.4

where R is equal to $\frac{(\text{mean of peak height ratios})}{\mu_0} \times 100$ and μ_0 is the ideal value of the peak height ratio derived from standard curves of Figures 1 and 2.

Table 3 Study of methylation and extraction. Reproducibility and recovery of the analyses of metabolites in urine

Metabolites	Concentration of acids (g/l)	No. of analyses	Mean of peak height ratios	Coefficient of variation (%)	R (%)
Hippuric acid	2.5	10	4.50	2.4	—
Hippuric acid	2.0	10	3.81	1.5	—
Hippuric acid	1.0	10	2.46	2.2	—
o-methylhippuric acid	1.0	10	1.40	1.8	82.4
o-methylhippuric acid	0.6	10	0.85	1.8	82.4
o-methylhippuric acid	0.4	10	0.55	2.8	79.8
m-methylhippuric acid	1.0	10	1.00	1.5	81.0
m-methylhippuric acid	0.6	10	0.60	2.5	80.0
m-methylhippuric acid	0.4	10	0.42	3.6	85.7
p-methylhippuric acid	1.0	10	0.94	2.7	86.4
p-methylhippuric acid	0.6	10	0.55	1.8	82.4
p-methylhippuric acid	0.4	10	0.37	2.3	85.6

where R is equal to $\frac{(\text{mean of peak height ratios})}{\mu_0} \times 100$ and μ_0 is the ideal value of the peak height ratio derived from standard curves of Figures 1 and 2.

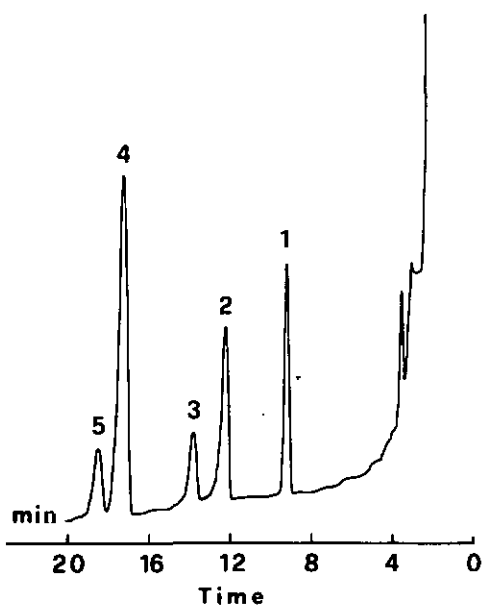


Fig. 3 Chromatogram obtained by analysing the urine of a worker exposed to xylene vapours in a printing office. Methyl esters of tridecanoic acid (1), of hippuric acid (2) and *o*-, *m*-, *p*-methylhippuric acids (3, 4, 5).

were identified by comparing their retention behaviour and their mass spectra with reference compounds.

An analytical curve was obtained by subjecting the reference compounds to all steps of analysis and by plotting the peak height ratio between each acid studied and the internal standard versus concentrations. Standard solutions of hippuric acid from 0.5 to 2.5 g/l and *o*-, *m*- and *p*-methylhippuric acids

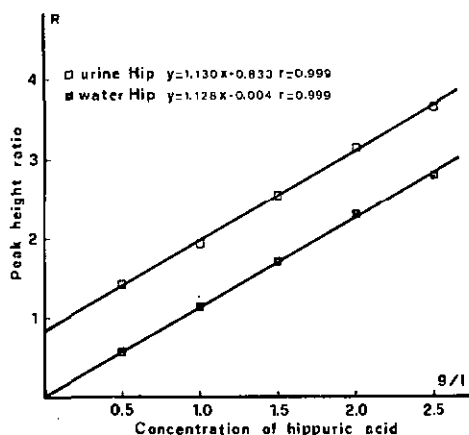


Fig. 4 Standard curves of hippuric acid methyl ester in water and in urine.

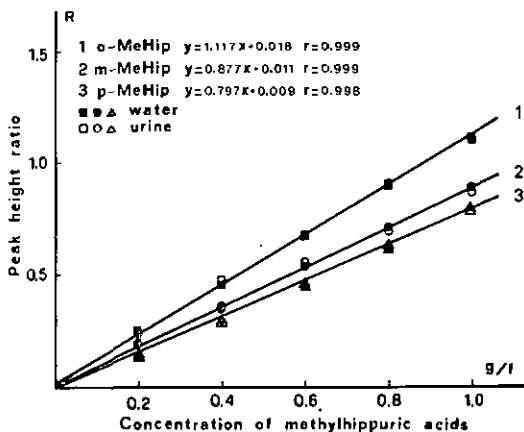


Fig. 5 Standard curves of *o*-, *m*- and *p*-methylhippuric acids in water and in urine.

from 0.2 to 1.0 g/l were prepared both in water and in urine. Calibration curves obtained from these solutions are shown in Figures 4 and 5. As urine already contains some hippuric acid, the calibration curve is separated from the water calibration curve, resulting in two parallel lines.

The esterification of hippuric, o-, m-, and p-methylhippuric acids is rapidly carried out and the yield of this reaction is constant (mean $98.7 \pm 1.5\%$) as shown in Table 1. The total yield of both methylation and extraction procedures must be constant to ensure good reproducibility of this method: our results, shown in Tables 2 and 3, confirm that both processes give constant yields (mean $81.2 \pm 2.2\%$ in water, $82.9 \pm 2.5\%$ in urine). The yield of extraction depends on solubility of the hippuric, o-, m-, and p-methylhippuric acids in water, urine or ethyl acetate, and is modified when the volume of two phases (organic or aqueous) is changed. Like Buchet and Lauwerys (1973), we found that the degree of extraction of the four methyl derivatives from the urine with ethyl acetate was constant over HCl concentrations ranging between 0.05 mol/l and 10 mol/l.

Conclusion

This work describes a gas chromatographic method which allows the determination in the urine of hippuric, and o-, m-, and p-methylhippuric acids, metabolites of toluene and xylene. The use of tridecanoic acid as internal standard and that of a rapid and efficient methylation with 3-methyl-1-p-tolyltriazene make this analysis simple, accurate and reproducible.

The best resolution of methyl ester derivatives is obtained by using a 4% Apiezon M filled column while a FID detector allows high sensitivity.

The smallest amount of these acids in urine distinguishable by our procedure was 5 mg/l, but with larger quantities of sample a considerably higher sensitivity may be achieved.

By means of this method it is possible to determine from the same urinary sample the different aromatic acids, metabolites of toluene and xylene, with high specificity in a relatively short time. The method can therefore be used for the occupational monitoring of exposure to toluene and xylene, as well as for studies in industrial toxicology.

We are grateful to the Fonds National Suisse pour la Recherche Scientifique for financial support. Thanks are due to B. E. Humbert for skilful technical assistance.

References

- Amsel, L. P., and Levy, G. (1969). Drug biotransformation interactions in man. II. A pharmacokinetic study of the simultaneous conjugation of benzoic and salicylic acids with glycine. *Journal of Pharmaceutical Science*, **58**, 321-326.
- Beardmore, T. D., and Kelley, W. N. (1971). Ultraviolet-absorbing compounds in urine from patients with hereditary disorders of purine and pyrimidine metabolism. *Clinical Chemistry*, **17**, 795-801.
- Buchet, J. P., and Lauwerys, R. R. (1973). Measurement of urinary hippuric and m-methylhippuric acids by gas chromatography. *British Journal of Industrial Medicine* **30**, 125-128.
- Caperos, J. R., and Fernández, J. G. (1976). Dosage des acides mandélique et phénylglyoxylique dans l'urine par chromatographie en phase gazeuse. *Archives des maladies professionnelles de Médecine du Travail et de Sécurité Sociale*, **37**, 387-391.
- El Masry, A. M., Smith, J. N., and Williams, R. T. (1956). Detoxication. LXIX. The metabolism of alkylbenzenes: n-propylbenzene and n-butylbenzene with further observations on ethylbenzene. *Biochemistry Journal*, **64**, 50-56.
- Engström, K., Husman, K., and Rantanen, J. (1976). Measurement of toluene and xylene metabolites by gas chromatography. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **36**, 153-160.
- Gaffney, G. W., Schreier, K., DiFerrante, N., and Altman, K. I. (1954). The quantitative determination of hippuric acid. *Journal of Biological Chemistry*, **206**, 695-698.
- Humbert, B. E., and Fernández, J. G. (1976). Simultaneous determination of trichloroacetic acid and trichloroethanol by gas chromatography. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **36**, 235-241.
- Ikeda, M., and Ohtsuji, H. (1969). Significance of urinary hippuric acid determination as an index of toluene exposure. *British Journal of Industrial Medicine*, **26**, 244-246.
- Jolley, R. L., and Scott, C. D. (1970). Preliminary results from high-resolution analyses of ultraviolet-absorbing and carbohydrate constituents in several pathologic body fluids. *Clinical Chemistry*, **16**, 687-696.
- Levy, G., Amsel, L. P., and Elliot, H. C. (1969). Kinetics of salicylic acid elimination in man. *Journal of Pharmaceutical Science*, **58**, 827-829.
- Meister, A. (1965). *Biochemistry of the amino acids*, 2nd edition. Academic Press: New York.
- Ogata, M., Sugiyama, K., and Moriyasu, H. (1962). Studies on poisoning. IV. Toluene concentration in air and urinary hippuric acid measured by paperchromatography and mass screening examination method. *Acta Medicinæ Okayama*, **16**, 283-292.
- Pagnotto, L. D., and Lieberman, L. M. (1967). Urinary hippuric acid excretion as an index of toluene exposure. *American Industrial Hygiene Association Journal*, **28**, 129-134.
- Quick, A. J. (1931). The conjugation of benzoic acid in man. *Journal of Biological Chemistry*, **92**, 65-85.
- Šedivec, V., and Flek, J. (1970). Bestimmung toxischer Substanzen und ihrer Metaboliten in Biologischen Flüssigkeiten mittels der Gaschromatographie. V. Hippursäure in Urin. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **35**, 3265-3273.
- Umberger, J. C., and Fiorese, F. F. (1963). Colorimetric method for hippuric acid. *Clinical Chemistry*, **1**, 91-96.
- Vogel, A. L. (1967). *A Textbook of Practical Organic Chemistry*, 3rd edition. Longmans: London.
- White, E. H., Baum, A. A., and Eitel, D. E. (1968). 1-methyl-3-p-tolyltriazene and its use in the esterification of acids. *Organic Syntheses*, **48**, 102-105.

Exposition au Styrene. I. Etude expérimentale de l'absorption et de l'excrétion pulmonaires sur des sujets humains

J. G. Fernández et J. R. Caperos

Laboratoire d'Hygiène Industrielle, Université de Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel, Suisse

Styrene Exposure. An Experimental Study of Pulmonary Absorption and Excretion

Summary. Volunteers were exposed in a controlled environment chamber at different concentrations of styrene in order to determine the quantity and percentage of the solvent absorbed and eliminated by the lungs. As a result of these experiments, it was found that the absorption rate of styrene is constant during the exposure at a level representing $88,7 \pm 3,4$ % of the inspired concentration. The proportion of solvent eliminated by the lungs was only of $2,62 \pm 0,85$ % of the absorbed dose, while the rate of decay of alveolar concentration curves with respect to time is independent of the steady inspired concentration during exposure. Accordingly, breath decay curves can be used as a method to monitor time weighted average exposure.

Key words: Exposition – Styrene – Alveolar air – Uptake – Excretion

Le styrène monomère ou vinylbenzène est fabriqué industriellement par déshydrogénation catalytique de l'éthylbenzène, mais il existe aussi à l'état naturel dans la sève du styrax. Il est utilisé comme produit de remplacement du benzène en tant que solvant du caoutchouc synthétique et des résines, comme matière première dans la fabrication des agents émulsifiants, ou encore comme produit intermédiaire pour la synthèse organique. Il s'agit d'un produit inflammable qui polymérise rapidement à une température élevée. Comme cette réaction est exothermique, elle augmente la vitesse de polymérisation. Les produits commerciaux contiennent un inhibiteur de polymérisation pour éviter ce phénomène.

Sur le plan toxicologique, le styrène a fait l'objet de très nombreux travaux [5, 15, 21, 25, 28, 33, 34]. En milieu industriel, il est absorbé dans l'organisme principalement par voie pulmonaire. Il pénètre également par les petites érosions de la peau des mains et par dissolution des matières grasses du revêtement cutané de l'épiderme. Une fois parvenu dans le courant circulatoire, il subit une transformation rapide produisant les acides mandélique et phénylglyoxylique, métabolites éliminés par voie urinaire [2, 3, 4, 10, 16, 17, 18, 24, 26]. Seul un faible pourcentage de styrène se fixe dans les tissus [7], principalement dans les graisses et dans les muscles, et s'élimine

en partie inchangé par voie pulmonaire [2, 7, 9, 16, 21, 23, 27]. Sa transformation en CO_2 , de même que la formation de dérivés glucuroniques, de 2-phényléthanol, de 4-vinylphénol, d'acide hydroxyphénéthylmercapturique, ou encore la décarboxylation de l'acide mandélique en alcool benzylique, ont été décrites lors de l'expérimentation animale [7, 9, 19, 20, 22, 32]. Chez l'homme, ces transformations n'ont pas encore été démontrées.

L'absorption pulmonaire a été étudiée principalement par Bardoděj [3, 4], Vrba et al. [31], Stewart et al. [27], Fiserova et al. [14] et Åstrand et al. [2], en pratiquant des expériences sur des volontaires. Toutefois, il est intéressant de constater que ces auteurs trouvent des rétentions très différentes, entre 45 et 70 % de la concentration de styrène dans l'air inspiré pendant l'exposition. Par ailleurs, comme ils n'ont pas contrôlé la ventilation pulmonaire lors des expériences, il est difficile de comparer leurs résultats, car celle-ci détermine la quantité de styrène absorbée et influence la rétention.

L'excrétion pulmonaire a été étudiée notamment par Stewart et al. [27], Götell et al. [16], Åstrand et al. [2] et Oltramar et al. [23] qui ont établi des courbes d'élimination dans l'air alvéolaire et discuté la possibilité de leur utilisation pour développer des tests biologiques d'exposition. Par contre, Fiserova et al. [14], de même que Bardoděj [3, 4], n'ont pas retrouvé de styrène dans l'air exhalé dès la fin de l'inhalation, probablement parce que leurs méthodes analytiques n'avaient pas une sensibilité suffisante. Alors que Stewart et al. arrivent à la conclusion qu'une corrélation existe entre les concentrations alvéolaires et le degré d'exposition, les recherches de Åstrand et al. ne confirment pas ces résultats. Il en est de même pour les expériences de Oltramar et al. qui observent d'importantes différences individuelles dans la vitesse d'élimination du styrène dans l'air alvéolaire.

Bien que de nombreux travaux aient été publiés ces dernières années, il n'en demeure pas moins que les connaissances concernant l'absorption et l'excrétion pulmonaires du styrène, de même que celles ayant trait au comportement des métabolites, sont encore trop fragmentaires et, selon les auteurs, sujettes à des controverses. C'est pourquoi il nous a paru intéressant d'effectuer une série d'expériences afin d'apporter une contribution à l'étude des relations qui déterminent le destin de ce solvant dans l'organisme.

Ce travail présente les résultats de cinq expériences rigoureusement contrôlées sur des volontaires à des durées variables, dans une cabine d'expérimentation toxicologique. Dans cette publication, seuls les phénomènes d'absorption et d'excrétion pulmonaires seront discutés. En effet, les résultats concernant l'élimination urinaire des métabolites seront présentés ultérieurement [6].

Partie expérimentale

Onze expositions contrôlées ont été effectuées par groupes de 2 ou 3 personnes, sur 6 volontaires de sexe masculin et d'âges compris entre 18 et 49 ans. Tous étaient étudiants ou employés dans notre Institut. Les expositions, d'une durée de 4 ou 8 heu-

res, ont été réalisées dans une chambre d'expérimentation toxicologique à des concentrations de vapeurs de styrène de 70, 103, 115, 200 et 206 ppm. Le tableau 1 présente l'ensemble des expériences réalisées dans le cadre de ces recherches. Au cours de celles-ci, les sujets, tous en bonne santé et non exposés professionnellement aux solvants, étaient assis au centre de la cabine et ont changé périodiquement de place. Avant l'expérience, chacun d'entre eux a subi un examen clinique complété par des analyses de sang et d'urine. En outre, les volontaires se sont abstenus de consommer de l'alcool 48 heures avant l'exposition et pendant toute la durée des prélèvements d'échantillons d'air alvéolaire et d'urine.

Dans la chambre, les volontaires étaient surveillés en permanence depuis l'extérieur et les ventilations pulmonaires, de même que les fréquences respiratoires, ont été mesurées périodiquement à l'aide d'un pneumotachographe Godart et d'une tête de Fleisch Type 18515/2. Les ventilations alvéolaires individuelles ont été calculées en tenant compte de l'espace mort physiologique, de celui du masque différent pour chaque sujet, et de celui de l'appareil de mesure.

La chambre d'exposition, de même que le système de dilution permettant la préparation de l'atmosphère préalablement choisie, ont été décrits en détail dans de précédents travaux [12, 13]. La concentration de styrène a été contrôlée périodiquement par chromatographie en phase gazeuse, à l'aide d'un Perkin Elmer F 11 équipé d'une colonne de 1,5 m (diamètre intérieur 3 mm) remplie de 3 % d'OV 17 sur Gas-Chrom Q (100–120 mesh), alors que la température du four a été fixée à 150° C et le débit d'azote à 45 ml/min. Pour les cinq expériences, la stabilité de la concentration de solvant dans la chambre a été de ± 5 %. Le styrène utilisé était de qualité Fluka puriss et sa pureté était supérieure à 99,5 %. Pour éviter sa polymérisation, 0,2 % de *tert*-butyl-catéchol ont été utilisés comme stabilisant.

L'absorption et l'excrétion du styrène ont été étudiées par analyse du solvant dans l'air alvéolaire, respectivement pendant et après l'exposition. La technique de prélèvement a été décrite en détail lors de précédents travaux [11, 12]. Ces analyses ont été effectuées à l'aide d'un chromatographe Perkin Elmer 900, équipé d'un détecteur FID, d'une vanne à gaz de 1 ml et d'une colonne de 4 m (diamètre intérieur 2 mm) chauffée à 100° C et remplie de 4 % d'Apiezon M sur Chromosorb G (80–100 mesh). La température de l'injecteur, de même que celle de l'interface, a été fixée à 120° C et le débit de gaz vecteur (azote) s'élevait à 25 ml/min. Ces conditions ont permis un dosage de styrène jusqu'à une limite inférieure à 0.01 ppm. Pour s'assurer de la reproductibilité du prélèvement des échantillons, les teneurs en CO₂ et en O₂ ont été déterminées simultanément. A cet effet, la vanne à gaz du chromatographe décrit ci-dessus a été connectée à celle d'un Hitachi 063 (colonne de 2 m, diamètre intérieur 2 mm, chauffée à 53° C, remplie de Porapak Q (100–120 mesh), température d'injection 70° C, température du détecteur 55° C, gaz porteur hélium 40 ml/min) équipé d'un katharomètre (courant de 96 mA) et d'un détecteur de susceptibilité paramagnétique (cellule Munday, Taylor Servomex, Oxygen Analyzer type OA 272). Après injection de 25 ml d'échantillon d'air alvéolaire dans les deux vannes, le premier chromatographe a permis la détermination de la concentration de styrène, alors que le second a servi à déterminer le CO₂ et le O₂. La figure 1 illustre un prélèvement d'air et montre les différents instruments de mesure.



Fig. 1. Prélèvement de l'air alvéolaire et instruments de mesure

Résultats et discussion

Absorption pulmonaire

Les résultats obtenus lors des analyses de l'air alvéolaire pendant la période correspondant à l'absorption sont rassemblés dans les figures 2 et 3 où les valeurs indiquées correspondent à la différence entre les concentrations de styrène dans l'air inspiré et dans l'air alvéolaire, c'est-à-dire aux concentrations de solvant retenu. Elles montrent respectivement trois et deux séries d'expositions avec la participation de deux sujets pour quatre d'entre elles et trois pour celles effectuées à 206 ppm.

Comme on peut le constater dès le début de l'exposition, la concentration de styrène dans l'air alvéolaire s'élève rapidement, après quoi elle reste pratiquement constante pendant toute la durée de l'expérience, à un niveau représentant en moyenne le 10 % de la concentration inspirée. Aussi, toute augmentation ou diminution de la concentration de styrène dans l'air de la chambre provoque une modification du niveau de styrène dans l'air alvéolaire, de sorte que la rétention reste constante (voir tableau 2). Néanmoins, une variation de la ventilation pulmonaire, du débit cardiaque ou de la vitesse de métabolisation chez un sujet peut entraîner une modification de la rétention, d'où une modification des doses absorbées.

La rétention se déduit de la différence entre les concentrations de styrène dans l'air inspiré et dans l'air alvéolaire, alors que la quantité de styrène absorbée peut être déterminée à l'aide de la surface délimitée par la droite calculée à partir des concentrations alvéolaires et celle représentant les concentrations inspirées. Cette dernière varie en fonction de la ventilation et du temps d'exposition et peut être calculée pour chaque sujet à partir de l'équation:

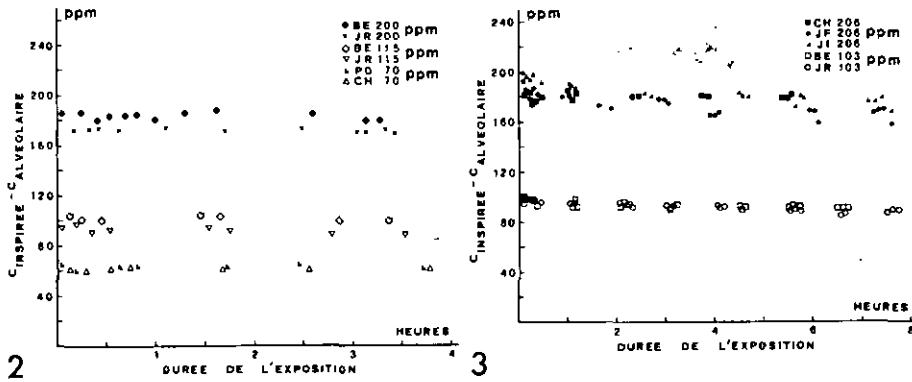


Fig. 2. Différence entre la concentration de styrène dans l'air inspiré et dans l'air alvéolaire au cours d'une série d'expositions à 70, 115 et 200 ppm pendant 4 h

Fig. 3. Différence entre la concentration de styrène dans l'air inspiré et dans l'air alvéolaire au cours d'une série d'expositions à 103 et 206 ppm pendant 8 h

Tableau 1. Caractéristiques des sujets exposés et expériences réalisées

Sujet	Age (ans)	Poids (kg)	Concentration d'exposition (ppm)	Durée d'exposition (heures)
CH	48	81	206 et 70	8 et 4
JI	27	75	206	8
JF	19	66	206	8
JR	28	73	103, 200 et 115	8, 4 et 4
BE	31	76	103, 200 et 115	8, 4 et 4
PO	26	81	70	4

Tableau 2. Absorption pulmonaire du styrène

Sujet et durée de l'exposition	Ventilation alvéolaire (l/mn) (B T P S)	Concentration d'exposition (ppm)	Concentration moyenne dans l'air alvéolaire (ppm)	Styrène absorbé (mg)	Rétention (%)
CH (8H)	6,4	206	25,8 ± 3,1	2120	87,5
JI (8H)	5,8	206	22,6 ± 8,7	1956	89,0
JF (8H)	8,0	206	33,2 ± 9,2	2541	83,9
JR (8H)	5,8	103	10,6 ± 3,8	985	92,7
BE (8H)	5,7	103	10,3 ± 2,3	971	90,0
PO (4H)	5,8	70	6,1 ± 1,5	341	91,3
CH (4H)	6,7	70	7,3 ± 1,0	386	89,6
JR (4H)	6,5	200	26,8 ± 1,7	1035	87,0
BE (4H)	5,9	200	15,5 ± 3,2	1001	92,3
JR (4H)	5,1	115	20,9 ± 3,1	441	81,8
BE (4H)	5,8	115	11,4 ± 2,5	552	90,1

$$W = (C_{\text{insp}} - C_{\text{alv}}) V_a \cdot t \cdot 3,83 \cdot 10^{-3} \quad \text{où}$$

W : quantité absorbée en mg
 C_{insp} : concentration inspirée en ppm
 C_{alv} : concentration alvéolaire en ppm
 V_a : ventilation alvéolaire en l/min (B T P S)
 t : durée de l'exposition en min
 $3,83 \cdot 10^{-3}$: facteur de conversion de ppm en mg/l
 (B T P S)

Le tableau 2 donne respectivement pour chaque sujet la ventilation alvéolaire, la concentration moyenne d'exposition, la concentration moyenne dans l'air alvéolaire, le pourcentage de rétention individuelle et la quantité de styrène absorbée. Ainsi, pour l'ensemble des expériences la rétention moyenne est de $88,7 \pm 3,4 \%$. Elle ne semble pas être influencée de façon significative, tout au moins dans l'intervalle des expositions étudiées, ni par la durée, ni par la concentration d'exposition. Par ailleurs, il apparaît que lors d'une même expérience, chaque sujet absorbe une dose différente de styrène. Il en résulte que la concentration et la durée d'exposition ne représentent qu'une donnée de plus à prendre en considération, car la quantité de corps chimique absorbée dépend également d'autres facteurs, tels que par exemple, la ventilation pulmonaire. Par conséquent, si l'on veut connaître les relations existant entre le degré d'exposition et l'excrétion du styrène ou de ses métabolites, il importe de s'attacher beaucoup plus résolument que par le passé à déterminer les doses réelles absorbées. Seule une telle démarche permettra d'établir de véritables tests d'exposition professionnelle.

Par ailleurs, il est intéressant de constater le taux de rétention particulièrement élevé pour les styrène. Sa forte solubilité dans le sang et dans les tissus adipeux [1, 8, 29, 30], de même que son haut coefficient de biotransformation jouent certainement un rôle capital dans la dynamique d'absorption. En outre, il n'est pas exclu que les concentrations alvéolaires déterminées soient légèrement supérieures à celles qui correspondent à l'équilibre d'échange air alvéolaire — sang. En effet, quand la rétention est élevée, à chaque expiration l'air alvéolaire peut se charger de styrène en se mélangeant avec l'air de l'espace mort physiologique ou par décharge des tissus lors de son passage à travers les bronchioles et les bronches. Dès lors, les quantités effectivement absorbées seraient légèrement différentes de celles déterminées expérimentalement. Pendant la période de décharge, ce phénomène est par contre négligeable, car l'air inspiré ne contient pas de solvant.

Élimination pulmonaire

La période d'élimination pulmonaire se caractérise par une brusque diminution de la concentration de styrène dans l'air alvéolaire suivie d'une lente décroissance (fig. 4, 5); celle-ci dure environ une semaine après une exposition de 8 h à 100 ppm. L'équation représentant la décharge peut être obtenue à l'aide de trois exponentielles interdépendantes englobant des équilibres différents dans l'organisme. Ainsi, les excrétions individuelles déterminées par analyse graphique peuvent être représentées par les fonctions mathématiques suivantes:

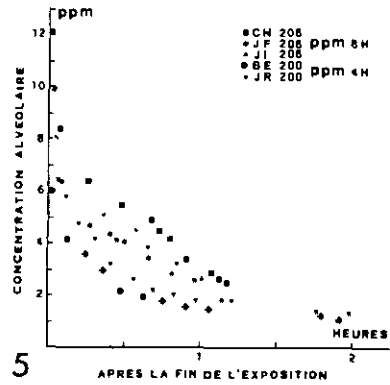
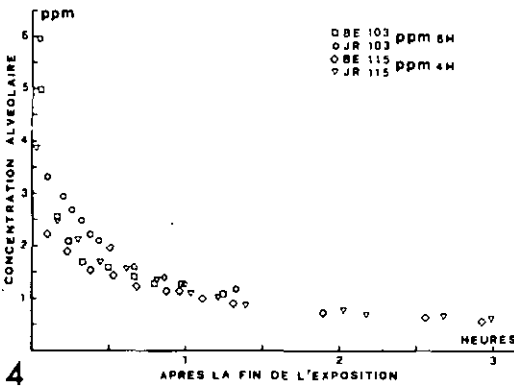


Fig. 4. Concentration de styrène dans l'air alvéolaire après exposition à 103 ppm pendant 8 h et à 115 ppm pendant 4 h

Fig. 5. Concentration de styrène dans l'air alvéolaire après exposition à 206 ppm pendant 8 h et à 200 ppm pendant 4 h

8 heures d'exposition à 206 ppm

$$CH \ C_{alv} = 1,33 e^{-0,028t} + 3,11 e^{-0,686t} + 5,61 e^{-1,972t}$$

$$JI \ C_{alv} = 0,64 e^{-0,039t} + 4,92 e^{-0,250t} + 4,95 e^{-3,707t}$$

$$JF \ C_{alv} = 0,47 e^{-0,052t} + 2,55 e^{-0,185t} + 5,71 e^{-3,230t}$$

8 heures d'exposition à 103 ppm

$$JR \ C_{alv} = 0,54 e^{-0,044t} + 1,09 e^{-0,343t} + 2,52 e^{-3,070t}$$

$$BE \ C_{alv} = 0,68 e^{-0,054t} + 1,13 e^{-0,579t} + 6,52 e^{-11,727t}$$

4 heures d'exposition à 200 ppm

$$BE \ C_{alv} = 0,54 e^{-0,044t} + 1,36 e^{-0,439t} + 2,24 e^{-1,397t}$$

$$JR \ C_{alv} = 0,29 e^{-0,033t} + 1,36 e^{-0,251t} + 3,60 e^{-1,501t}$$

4 heures d'exposition à 115 ppm

$$JR \ C_{alv} = 0,20 e^{-0,032t} + 0,94 e^{-0,249t} + 2,37 e^{-2,324t}$$

$$BE \ C_{alv} = 0,22 e^{-0,037t} + 0,93 e^{-0,295t} + 1,38 e^{-2,156t}$$

4 heures d'exposition à 70 ppm

$$PO \ C_{alv} = 0,18 e^{-0,069t} + 0,28 e^{-0,623t} + 0,83 e^{-1,140t}$$

$$CH \ C_{alv} = 0,21 e^{-0,058t} + 0,14 e^{-0,401t} + 1,23 e^{-3,133t}$$

où t indique temps exprimé en heures après l'exposition.

Tableau 3. Elimination pulmonaire du styrène

Sujet et durée de l'exposition	Ventilation alvéolaire (l/mn) (B.T. P.S.)	Concentration d'exposition (ppm)	Quantité éliminée (mg)	Elimination pulmonaire (%)
CH (8H)	7,4	206	93	4,4
JI (8H)	7,1	206	61	3,1
JF (8H)	6,9	206	39	1,5
JR (8H)	6,5	103	24	2,4
BE (8H)	6,7	103	23	2,4
PO (4H)	6,8	70	6	1,8
CH (4H)	7,4	70	7	1,8
JR (4H)	6,5	200	25	2,4
BE (4H)	6,7	200	26	2,6
JR (4H)	6,5	115	16	3,6
BE (4H)	6,7	115	15	2,7

Par intégration de ces fonctions entre le début de l'excrétion et l'infini (élimination complète du solvant) et à l'aide de la ventilation alvéolaire, il est possible de déterminer la quantité de styrène éliminée par chaque sujet:

$$W_{\text{él}} = V_a \cdot 3,83 \cdot 10^{-3} \int_0^{\infty} \bar{C}_{\text{alv}}(t) dt$$

où

$W_{\text{él}}$: quantité de styrène éliminée en mg

V_a : ventilation alvéolaire en l/h (B T P S)

$3,83 \cdot 10^{-3}$: facteur de conversion de ppm en mg/l (B T P S)

Les ventilations alvéolaires ont été estimées à partir des dépenses énergétiques individuelles en tenant compte des différentes périodes de travail et de repos. Le tableau 3 donne la quantité et le pourcentage de styrène excrété pour chaque sujet.

La plus grande partie de styrène éliminé par les poumons est excrété durant les premières heures de post-exposition, période qui correspond principalement à la décharge du sang et des tissus très vascularisés. Par la suite, l'élimination est beaucoup plus lente et tributaire du mouvement de sortie du styrène des tissus adipeux qui se poursuit pendant plusieurs jours. Ainsi, pour une exposition de 8 h, (fig. 6) le rapport $C_{\text{alv}} / C_{\text{insp}}$, respectivement après 1 jour ou 2 jours, est de $17 \cdot 10^{-4}$ et $5,3 \cdot 10^{-4}$. Il n'est que de $7,4 \cdot 10^{-4}$ et $2,5 \cdot 10^{-4}$, c'est-à-dire d'environ la moitié lorsque l'exposition dure 4 h (fig. 7). Ceci veut dire tout simplement que la quantité de styrène stockée dans les tissus adipeux double approximativement avec le temps d'exposition.

D'autre part, ces résultats montrent que l'excrétion pulmonaire du styrène est faible, indépendamment de la concentration et de la durée de l'exposition. en effet, seul le $2,62 \% \pm 0,85 \%$ de la quantité absorbée est excrété par les poumons sans modification chimique. Par conséquent, le 97 % subit une transformation dans l'organisme et s'élimine sous forme de métabolites dans l'urine. En outre, si l'on considère certains facteurs pouvant influencer l'excrétion pulmonaire, tels que la ventilation, le volume des graisses ou encore les différences individuelles de métabolisme, on constate une assez bonne concordance entre les taux d'excrétion.

Aussi, les courbes d'élimination du styrène dans l'air alvéolaire peuvent donner une bonne indication sur la concentration de solvant fixé dans les tissus de l'organisme

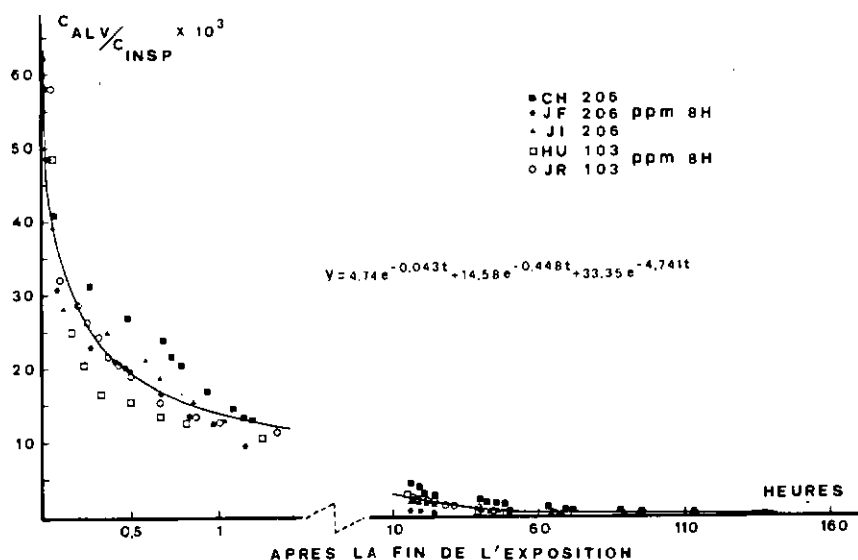


Fig. 6. Variation du rapport de la concentration de styrène dans l'air alvéolaire (C_{alv}) sur la concentration d'exposition (C_{insp}) en fonction du temps après la fin des gazages de 8 h

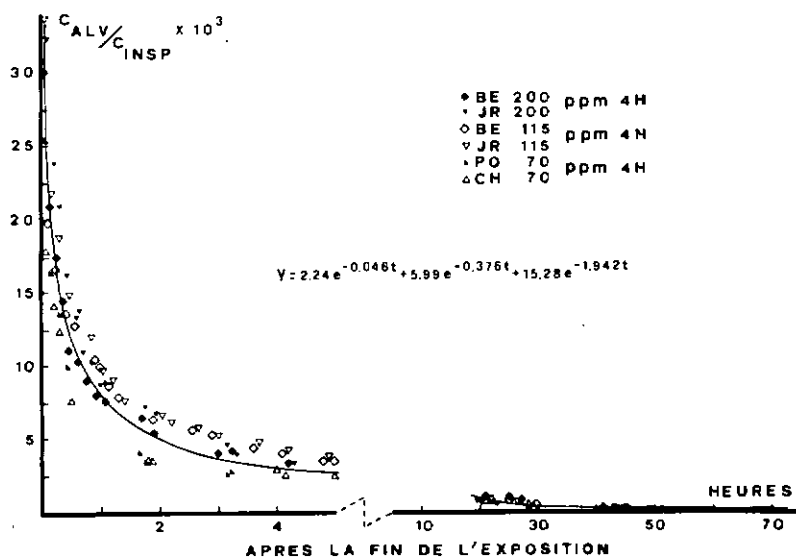


Fig. 7. Variation du rapport de la concentration de styrène dans l'air alvéolaire (C_{alv}) sur la concentration d'exposition (C_{insp}) en fonction du temps après la fin des gazages de 4 h

et par là même, du degré d'exposition. Ceci est clairement illustré dans les figures 6 et 7 où l'ensemble des résultats est comparé en fonction du rapport C_{alv} / C_{insp} . Comme on peut le constater, pour une durée d'exposition de 4 h et de 8 h, les courbes représentant la décharge pulmonaire pour différentes concentrations sont presque identiques, ce qui signifie qu'il existe une relation entre les concentrations alvéolaires et la quantité de styrène absorbée durant la période de gazage.

En milieu industriel, l'absorption peut se répéter journellement et les solvants s'accumulent dans les tissus adipeux provoquant une augmentation de la concentration alvéolaire d'un jour à l'autre. On distingue alors deux périodes dans l'élimination. L'une pendant les premières heures de post-exposition, représentative d'un demi-gazage, l'autre au cours des heures suivantes, influencée essentiellement par le stockage successif du styrène. Dans de telles conditions, il apparaît que le moment du prélèvement de l'air alvéolaire détermine l'interprétation biologique de l'analyse, car il peut s'agir d'équilibres différents.

Conclusions

Cette étude montre que lors de l'exposition le taux de styrène dans l'air alvéolaire est directement proportionnel à la concentration inspirée, alors que la rétention est en moyenne de $88,7 \pm 3,4$ % et ne semble pas être influencée par la durée du gazage.

Dès que l'exposition cesse, la chute de la concentration sanguine se fait d'une manière exponentielle, les premières heures rapidement, puis lentement. La proportion de solvant éliminée par les poumons est faible puisqu'elle ne représente que $2,62 \pm 0,85$ % de la dose absorbée, indépendamment de la durée et de la concentration d'exposition. Aussi, la plus grande partie du styrène subit dans l'organisme des réactions métaboliques qui le transforment en composés plus aisément excrétés dans l'urine.

Il apparaît d'autre part que les courbes d'élimination pulmonaire du styrène représentent le degré d'exposition et peuvent, par conséquent, être utilisées pour le contrôle des personnes professionnellement exposées. Cependant, il faut tenir compte de l'augmentation de la courbe de la concentration dans l'air alvéolaire lorsque le styrène stocké dans les tissus adipeux ne s'élimine pas complètement d'une exposition à l'autre.

Les auteurs remercient MM. P. O. Droz et B. E. Humbert de l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail. Ils expriment leur gratitude au Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique pour son soutien financier.

Bibliographie

1. Åstrand, I.: Uptag or lösningsmedel i blod och vävnader hos människa. *Arbete och Hälsa* 6, 1-31 (1975)
2. Åstrand, I., Kilbom, Å., Övrum, P., Wahlberg, I., Vestergerg, O.: Exposure to styrene. I. Concentration in alveolar air and blood at rest and during exercise and metabolism. *Work Environm. Hlth.* 11, 69-85 (1974)
3. Bardoděj, Z.: Styrene metabolism. *Cs. Hyg.* 4, 223-239 (1964)
4. Bardoděj, Z., Bardodejova, E.: Biotransformation of ethylbenzene, styrene and alpha-methylstyrene in man. *Amer. Industr. Hyg. Ass.* 31, 206-209 (1970)
5. Browning, E.: Toxicity and metabolism of industrial solvents. p. 98. Amsterdam: Elsevier 1965
6. Caperos, J.R., Fernández, J.G.: Exposition au styrène II. Contribution à l'excrétion des acides mandélique et phénylglyoxylique sur des sujets humains. (En préparation)
7. Danishefsky, I., Willhite, M.: The metabolism of styrene in the rat. *J. Biol. Chem.* 211, 549-553 (1954)
8. Droz, P.O., Fernández, J.G.: Solubility of organic solvents. I. Gas chromatographic determination of olive oil-gas partition coefficients. *Helv. Chim. Acta* 60, 454-458 (1977)

9. El Masry, A.M., Smith, J.N., Williams, R.T.: The metabolism of alkylbenzenes: phenylethylene and phenylacetylene. *Biochem. J.* 68, 199–204 (1958)
10. Engström, K., Härkönen, H., Kalliokoski, P., Rantanen, J.: Urinary mandelic acid concentration after occupational exposure to styrene and its use as a biological exposure test. *Scand. J. Work Environ. Hlth.* 2, 21–26 (1976)
11. Fernández, J.G., Droz, P.O.: Absorption et élimination pulmonaires de l'acétate d'éthyle. Etude expérimentale sur des sujets humains. *Arch. Mal. Prof.* 35, 953–961 (1974)
12. Fernández, J.G., Guberan, E., Caperos, J.R.: Experimental human exposures to tetrachloroethylene vapor and elimination in breath after inhalation. *Amer. Industr. Hyg. Assoc. J.* 37, 143–150 (1976)
13. Fernández, J.G., Humbert, B.E., Droz, P.O., Caperos, J.R.: Exposition au trichloréthylène. Bilan de l'absorption, de l'excrétion et du métabolisme sur des sujets humains. *Arch. Mal. Prof.* 36, 397–407 (1975)
14. Fiserova-Bergerova, V., Teisinger, J.: Pulmonary styrene vapor retention. *Industr. Med. and Surg.* 34, 620–622 (1965)
15. Gerarde, H.W.: *Toxicology and biochemistry of aromatic hydrocarbons.* p. 133. Amsterdam: Elsevier 1960
16. Götell, P.A., Axelson, O., Lindlöf, B.: Field studies on human styrene exposure. *Work Environm. Hlth.* 9, 76–83 (1972)
17. Härkönen, H., Kalliokoski, P., Hietola, S., Hernberg, S.: Concentrations of mandelic and phenylglyoxylic acid in urine as indicators of styrene exposure. *Work Environm. Hlth.* 11, 162–169 (1974)
18. Ikeda, M., Imanura, T.: Evaluation of hippuric, phenylglyoxylic and mandelic acids in urine as indices of styrene exposure. *Int. Arch. Arbeitsmed.* 32, 93–101 (1974)
19. James, S.P., White, D.A.: The metabolism of phenethyl bromide, styrene and styrene oxide in the rabbit and rat. *Biochem. J.* 104, 914–921 (1967)
20. Leibman, K.C., Ortiz, E.: Oxidation of styrene in liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* 18, 552–554 (1969)
21. Leibman, K.C.: Metabolism and toxicity of styrene. *Environ. Health Perspectives.* 11, 115–119 (1975)
22. Ohtsuji, H., Ikeda, M.: The metabolism of styrene in the rat and the stimulatory effect of phenobarbital. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18, 321–328 (1971)
23. Oltramare, M., Desbaumes, E., Imhoff, C., Michiels, W.: *Toxicologie du styrène monomère.* Genève: Editions Médecine et Hygiène 1974
24. Philippe, R., Lauwerys, R., Buchet, J.P., Roels, H.: Evaluation de l'exposition des travailleurs au styrène par le dosage de ses métabolites urinaires: les acides mandélique et phényl-glyoxylique II. Application aux travailleurs fabriquant des polyesters. *Arch. Mál. Prof.* 35, 631–640 (1971)
25. Pokrovski, V.A.: La toxicologie du styrène. *Toxicology of styrene. Gig. Truda i Prof. Zabol.* 5, 3–7 (1961)
26. Slob, A.: A new method for determination of mandelic acid excretion at low level styrene exposure. *Brit. J. Industr. Med.* 30, 390–393 (1973)
27. Steward, R.D., Dodd, H.C., Baretta E.D., Schaffer, A.W.: Human exposure to styrene vapor. *Arch. Environ. Health* 16, 656–662 (1968)
28. Styrene monomer. *Amer. Industr. Hyg. Assoc. J.* 29, 526–529 (1968)
29. Ulfarson, V., Övrum, P.: Bestämning av fördelningskoefficienten mellan blod och luft för några lättflyktiga lösningsmedel. *Arbete och Hälsa* 7, 1–10 (1976)
30. Van Rees, H.: The partition coefficients of styrene between blood and air and between oil and blood. *Int. Arch. Arbeitsmed.* 33, 39–47 (1974)
31. Vrba, J., Mádl, Z., Ledrer, E.: Lecture delivered at a seminary in Prague of the society of occupational medicine the 9.10.63
32. Vrba, J., Mádl, Z., Kovár, V.: A study on styrene metabolism in the rat by means of gas chromatography. *Cs. Hyg.* 12, 477–478 (1967)
33. Wolf, M.A., Rowe, V.K., McCollister, D.D., Hollings Worth, R.L., Oyen, F.: Toxicological studies of certain alkylated benzenes and benzene. *AMA Arch. Industr. Health,* 14, 387–398 (1956)

34. Zielhuis, R.L.: Systemic toxicity from exposure to epoxy resins, hardeners and styrene. *J. Occup. Med.* 3, 25–29 (1961)

Recu 14 Juin 1977 / Accepté 12 Juillet 1977

Exposition au styrène

II. Bilan de l'absorption, de l'excrétion et du métabolisme sur des sujets Humains

J. R. Caperos¹, B. Humbert² et P. O. Droz³

¹ Laboratoire d'Hygiène Industrielle, Université de Neuchâtel Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel, Suisse

² Interfood SA, Ch-2000 Neuchâtel, Suisse

³ Institut universitaire de médecine sociale et préventive, rte de la Clochette, CH-1052 Le Mont, Suisse

Styrene Exposure. II. Percentage Studies of Absorption, Excretion, and Metabolism by Human Subjects

Summary. In order to determine the quantities and percentages of styrene metabolites excreted in urine, five male subjects were given five controlled exposures to styrene, each of 8 h, at 206 and 103 ppm. The experiment showed that about 92 o/o of styrene is metabolized in the body. Of the amount absorbed, 54 o/o is eliminated in the urine as phenylglyoxylic acid and 37 o/o as mandelic acid. Neither differences between the individual subjects nor the exposure concentration seem greatly to influence elimination of the solvent. These urinary metabolites may therefore be used as biological indicators of exposure to styrene.

Key words: Styrene, exposure to – Metabolites, excretion of – Percentage studies – Biological monitoring – Half-life

Dans une publication antérieure [7], nous avons présenté les résultats de l'absorption et de l'excrétion pulmonaires de cinq expériences sur des volontaires dans une cabine d'expérimentation toxicologique.

Le présent travail complète le précédent dans le but d'établir un bilan complet de l'absorption et de l'excrétion pulmonaires du styrène, de même que de déterminer les pourcentages d'excrétion urinaire des métabolites, fréquemment utilisés comme test d'exposition, c'est-à-dire les acides mandélique et phénylglyoxylique. La technique de dosage de ces deux acides, le contrôle de la chambre d'exposition et l'analyse des solvants dans l'air alvéolaire ont été décrits antérieurement [3, 7, 8, 9, 10].

Tableau 1. Excrétion urinaire des acides mandélique et phénylglyoxylique

Sujet	Concentration d'exposition (ppm)	Temps d'exposition (mn)	Quantité d'acide mandélique éliminé (mg)	Quantité d'acide phénylglyoxylique éliminé (mg)
CH	206	480	1132	714
JI	206	480	1006	704
JF	206	480	1408	865
JR	103	480	544	446
BE	103	480	512	388

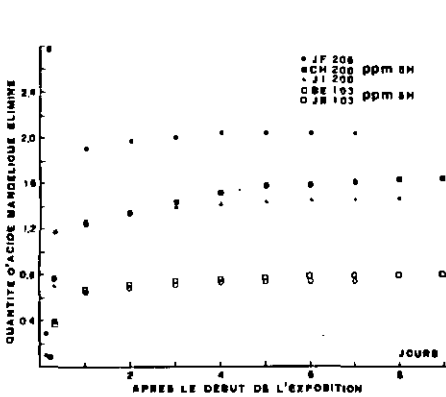


Fig. 3. Quantité totale d'acide mandélique éliminé après 8 h à 103 et 206 ppm

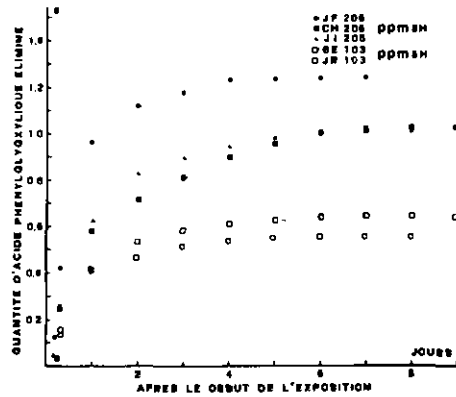


Fig. 4. Quantité totale d'acide phénylglyoxylique éliminé après 8 h à 103 et 206 ppm

Alors que le phényléthylène glycol était absent des urines de tous les sujets ainsi que de leurs hydrolysats, tous les acides hippurique, mandélique et phénylglyoxylique ont été trouvés à l'état libre. Cependant, l'acide benzoïque était aussi présent sous forme conjuguée.

L'évolution de la quantité d'acide hippurique éliminé journalièrement après une exposition de 8 h à 103 et 206 ppm est représentée dans la Fig. 2. Le trait continu représente l'élimination moyenne chez les adultes à régime alimentaire mixte (0,7 g/24 h) et les traits discontinus indiquent les valeurs limites (0,1 et 1 g/24 h) [16].

Comme on peut le constater, l'absorption du styrène ne modifie pas les taux normaux d'acide hippurique, tout au moins pour les doses absorbées lors de ces expériences. Par ailleurs, l'acide benzoïque libre ne représente qu'un faible pourcentage de la totalité de cet acide présent dans les urines, alors que la concentration de celui-ci correspond à celle provenant de l'acide hippurique. C'est pourquoi on peut affirmer que l'acide benzoïque se conjugue essentiellement avec la glycine pour former de l'acide hippurique qui s'élimine dans les urines.

Les Figs. 3 et 4 présentent en fonction du temps dès le début de l'exposition les cumuls des quantités de métabolites éliminés par les cinq sujets.

Il ressort de ces résultats que l'élimination des acides mandélique et phénylglyoxylique est rapide. Ainsi, la moitié de l'acide mandélique formé est éliminée pendant l'exposition et l'excrétion est pratiquement terminée 4 ou 5 jours après. En ce qui concerne l'acide phénylglyoxylique, un quart est éliminé durant le gavage et le reste

pendant les trois ou quatre jours suivants. En outre, il est intéressant de constater que le sujet JF, qui avait une ventilation alvéolaire anormalement élevée pendant l'exposition, éliminé une quantité plus forte de métabolites. Par ailleurs, il apparaît que la quantité d'acide mandélique excrété est systématiquement plus grande que celle correspondant à l'acide phénylglyoxylique. Leur rapport est de $2,7 \pm 0,19$ ou $1,4 \pm 0,17$ selon qu'on tient compte de l'excrétion durant l'exposition ou de l'élimination totale. Par conséquent, leurs vitesses de formation sont différentes, ce qui pourrait expliquer l'hypothèse selon laquelle l'acide phénylglyoxylique proviendrait exclusivement de l'oxydation de l'acide mandélique, hypothèse démontrée chez l'animal par Ohtsuiji et Ikeda [15].

Dans le tableau 1, on a reporté les quantités des deux métabolites transformées en poids de styrène, de même que leurs pourcentages individuels d'excrétion.

Le taux d'élimination urinaire pour l'acide mandélique est en moyenne de $53,6 \pm 1,7$ et celui de l'acide phénylglyoxylique de $37,8 \pm 4,9$. Dès lors, il apparaît que les différences individuelles sont relativement faibles pour le premier acide et un peu plus importantes pour le second.

Afin d'utiliser l'excrétion des acides mandélique et phénylglyoxylique comme test biologique d'exposition, l'élimination de ces deux métabolites a été comparée avec le degré d'exposition exprimé par:

1. la concentration moyenne inspirée,
2. le produit de celle-ci par le temps de gazage,
3. la dose de solvant absorbé.

Les résultats de l'excrétion urinaire des acides ont été exprimés:

1. en g/l,
2. en concentration par rapport à une densité de 1,024 g/ml, ou par rapport à l'excrétion d'un gramme de créatinine,
3. par la quantité (mg).

Tous ces paramètres ont été déterminés durant la période d'exposition, les 15 premières h de post-exposition, puis par périodes de 24 h pendant plusieurs jours.

Aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre l'exposition et la concentration urinaire mes métabolites. Ceci est dû au fait que le volume des urines est très différent entre les sujets et varie même d'un jour à l'autre.

Il en va de même si on compare le degré d'exposition exprimé en concentration moyenne, ou le produit de celle-ci par la durée du gazage, avec la quantité des acides éliminés ou la somme de ceux-ci transformés en poids de styrène. Il faut noter que dans ces cas, on ne tient pas compte des facteurs individuels tels que la ventilation alvéolaire. En effet, ce paramètre détermine la dose de solvant absorbé lors de l'exposition, et par conséquent la quantité de métabolites éliminés. Par contre, une bonne corrélation a été trouvée entre la quantité de styrène absorbé (déterminée en tenant compte des ventilations individuelles) et les quantités excrétées d'acides mandélique et phénylglyoxylique ou la somme de ceux-ci transformée en poids de styrène. Cet aspect est clairement illustré par les Figs. 5, 6, et 7 présentant les résultats en fonction de l'excrétion correspondant aux périodes de 8 h d'exposition, 15 h de post-exposition et 23 h depuis le début du gazage.

Les meilleurs corrélations sont obtenues si on compare la quantité totale des métabolites. Il apparaît aussi que le taux d'excrétion urinaire des acides varie peu

Fig. 5. Quantité d'acide mandélique éliminé durant différentes périodes, en fonction de la quantité de styrène absorbé (W_{AB}), après 8 h d'exposition à 103 et 206 ppm

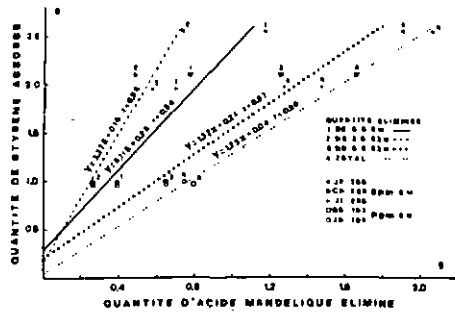


Fig. 6. Quantité d'acide phénylglyoxylique éliminé durant différentes périodes, en fonction de la quantité de styrène absorbé (W_{AB}), après 8 h d'exposition à 103 et 206 ppm

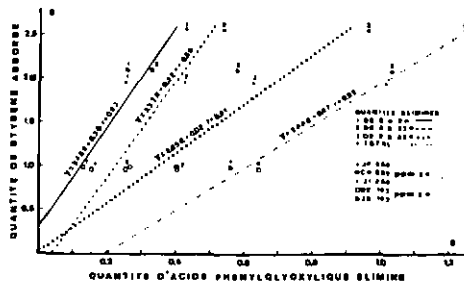
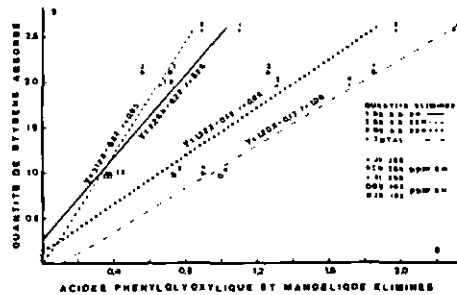


Fig. 7. Quantités d'acides mandélique et phénylglyoxylique transformés en poids de styrène, éliminés pendant différentes périodes, en fonction de la quantité de styrène absorbé (W_{AB}), après 8 h d'exposition à 103 et 206 ppm



d'un individu à l'autre et que celui-ci n'est pas influencé par la concentration du gazage (voir Tableau 1). Ainsi, la détermination de la quantité des métabolites urinaires permet de contrôler l'exposition. Cependant, si l'absorption se répète avant que la totalité du styrène ou de ses métabolites soit éliminée complètement on peut s'attendre à une modification du rapport entre l'élimination urinaire et la dose absorbée.

Le Tableau 2 présente un bilan complet de l'absorption et de l'excrétion. Il permet de comparer la quantité de styrène absorbée avec celle éliminée sous forme de métabolites ou excrétée par voie pulmonaire. En outre, il met en évidence l'existence d'un bilan excédentaire pour un volontaire et déficitaire pour le reste. Ces résultats peuvent être expliqués par l'imprécision des mesures de ventilation alvéolaires, paramètre qui influence directement le calcul de la dose absorbée et le taux d'élimination pulmonaire. Par ailleurs, la possibilité d'excrétion d'autres métabolites, comme cela a été montré chez l'animal, ne doit pas être écartée.

Tableau 2. Bilan de l'absorption et de l'excrétion

Sujet	Concentration d'exposition (ppm)	Temps d'exposition (mn)	Elimination pulmonaire du styrène (%)	Elimination d'acide mandélique (%)	Elimination d'acide phényl-glyoxylique (%)	Total éliminé (%)
CH	206	480	4,4	53,4	33,7	91,5
JI	206	480	3,1	51,4	36,0	90,5
JF	206	480	1,5	55,4	34,0	90,9
JR	103	480	2,4	55,1	45,3	102,8
BE	103	480	2,4	55,1	45,3	95,1

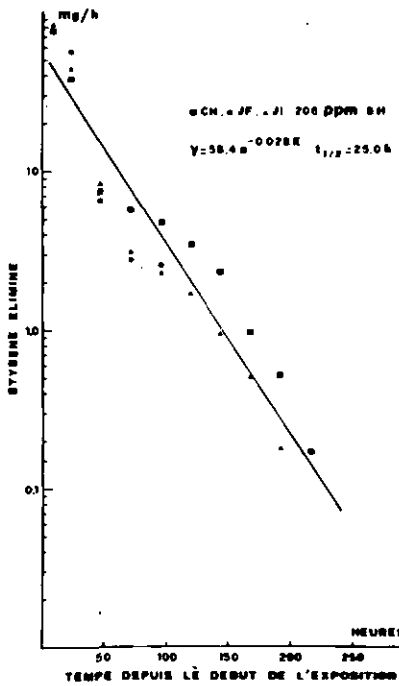


Fig. 8. Styrène éliminé (mg/h) en fonction du temps, dès le début de l'exposition à 103 ppm pendant 8 h

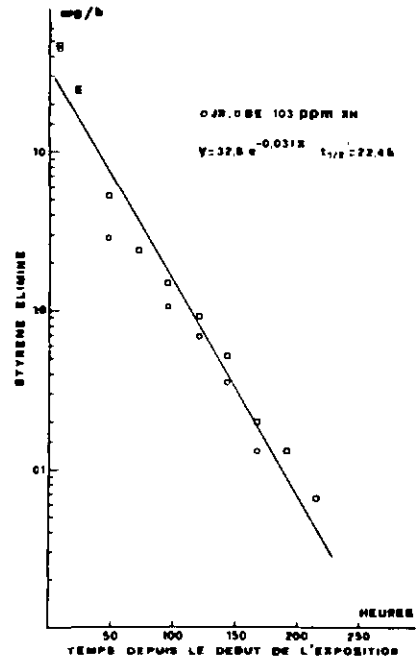


Fig. 9. Styrène éliminé (mg/h) en fonction du temps, dès le début de l'exposition à 206 ppm pendant 8 h

Afin de déterminer la demi-vie du styrène (temps nécessaire pour éliminer la moitié de la dose absorbée), il a été considéré que les différentes parties de l'organisme forment une seule unité. Dès lors, son comportement est entre autre déterminé par un seul volume de distribution, un seul coefficient de partage, etc.. Cette approximation permet de représenter l'élimination du styrène par une seule équation exponentielle. La représentation logarithmique du styrène éliminé (sous la forme de vapeurs dans le poumons et de métabolites dans l'urine) en fonction du temps permet de déterminer la demi-vie de ce solvant, Figs. 8 et 9.

Conclusions

Cette étude montre que la plus grande partie du styrène subit des réactions métaboliques dans l'organisme, lesquelles le transforment en composés plus aisément excrétés dans l'urine. En effet l'élimination urinaire des acides mandélique et phénylglyoxylique, représente respectivement le 54 et le 38 % de la quantité de solvant absorbé. Elle varie peu d'un individu à l'autre et n'est pas influencée par le degré d'exposition. En outre, de bonnes corrélations ont été trouvées entre la quantité de styrène absorbé et celle des deux métabolites excrétés. Aussi, leur contrôle peut servir comme test biologique d'exposition.

Nous remercions sincèrement M. le professeur A. Jacot-Guillarmod, directeur de l'Institut de chimie à l'Université de Neuchâtel et M. C. Maneff pour leur appui moral durant ces derniers mois. Nous exprimons notre gratitude au Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique pour son soutien financier.

Bibliographie

1. Bakke, O. M., Scheline, R. R.: Hydroxylation of aromatic hydrocarbons in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **16**, 691–700 (1970)
2. Bardoděj, Z.: Metabolismus styrene. *Čs. Hyg.* **IX**, 223–239 (1964)
3. Caperos, J. R., Fernandez, J. G.: Dosage des acides mandélique et phénylglyoxylique dans l'urine par chromatographie en phase gazeuse. *Arch. Mal. Prof.* **37**, 387–391 (1976)
4. Caperos, J. R.: Étude expérimentale sur des sujets humains de l'absorption, du métabolisme, et de l'élimination du styrène, du m-xylène et du toluène. Thèse, p. 79–98. Université de Neuchâtel 1978
5. Danishefsky, I., Willhite, M.: The metabolism of styrene in the rat. *J. Biol. Chem.* **211**, 549–553 (1954)
6. El Masry, A. M., Smith, J. N., Willians, R. T.: The metabolism of phenylethylene and phenylacetylene. *Proceedings of the Biochemical Society* 19–20 (1957)
7. Fernandez, J. G., Caperos, J. R.: Exposition au styrène. I. Étude de l'absorption et de l'excrétion pulmonaires sur des sujets humains. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **40**, 1–12 (1977)
8. Fernandez, J. G., Droz, P. O.: Absorption et élimination pulmonaires de l'acétate d'éthyle. Étude expérimentale sur des sujets humains. *Arch. Mal. Prof.* **35**, 953–961 (1974)
9. Fernandez, J. G., Guberan, E., Caperos, J. R.: Experimental human exposures to tetrachloroethylene vapor and elimination in breath after inhalation. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **37**, 143–150 (1976)
10. Fernandez, J. G., Humbert, B. E., Droz, P. O., Caperos, J. R.: Exposition au trichloréthylène. Bilan de l'absorption, de l'excrétion et du métabolisme sur des sujets humains. *Arch. Mal. Prof.* **36**, 397–407 (1975)
11. James, M. O., Fouts, J. R., Bend, J. P.: Hepatic and extrahepatic metabolism in vitro, of an epoxide (8-¹⁴C-styrene oxide) in the rabbit. *Biochem. Pharmacol.* **25**, 187–193 (1976)
12. James, S. P., White, D. A.: The metabolism of phenethyl bromide, styrene and styrene oxide in the rabbit and rat. *Biochem. J.* **104**, 914–921 (1967)
13. Leibman, K. C., Ortiz, E.: Oxidation of styrene on liver microsomes. *Biochem. Pharmacol.* **18**, 551–554 (1969)
14. Milvy, P., Garro, A. J.: Mutagenic activity of styrene oxide (1,2-epoxyethylbenzene) a presumed styrene metabolite. *Mutat. Res.* **40**, 15–18 (1976)

16. Documenta Geigy.: Tables scientifiques, 6th ed., p. 544, Bâle 1963
15. Ohtsuji, H., Ikeda, M.: The metabolism of styrene in the rat and the stimulatory effect of phenobarbital. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **18**, 321–328 (1971)
16. Tables scientifiques: 7th ed., Bâle: Ciba-Geigy
17. Vrba, J., Madlo, Z., Kovar, V.: A study on styrene metabolism in the rat by means of gas chromatography. *Čs. Hyg.* **12**, 477–478 (1967)

Reçu le Août 2, 1978 / Accepté Septembre 18, 1978