

## Gas-Chromatography/Mass Selective Detector를 사용하여 쥐의 뇨시료 중 benzidine 대사체의 확인 및 *in vitro* 독성

류재천\* · 권오승

한국과학기술연구원 생체대사연구센터 독성연구실

(Received July 11, 2000)

## Identification of Benzidine Metabolites in Rats by Gas Chromatography/Mass Selective Detector and its Toxicity *in vitro*

Jae-Chun Ryu\* and Oh-Seung Kwon

Toxicology Lab., Bioanalysis and Biotransformation Research Center,  
Korea Institute of Science and Technology

**Abstract** — Metabolism study of the dye, benzidine, was performed by gas chromatography-mass selective detector (GC/MSD) in the urine of rats orally administered 100 mg/kg benzidine. Urine samples were collected in metabolic cages for 0-24, 24-48, and 48-72 hrs. Ten ml of the urine was extracted with XAD-2 resin and the XAD-2 column was eluted with methanol. After evaporation, benzidine and its metabolites were extracted with diethyl ether (for non-conjugated fraction). For conjugated metabolites,  $\beta$ -glucuronidase was added to the aqueous layer that was incubated for 1 hr at 50°C and the aqueous layer was extracted as in non-conjugated fraction. Aliquot of trimethylsilylated derivatives was applied to the GC/MSD. The mutagenicity of benzidine and its acetylated metabolites was tested by histidine/reversion assay. Five metabolites observed and confirmed either by electron impact and chemical ionization modes of the GC/MSD, or authentic compounds were monoacetyl-, diacetyl-, hydroxyacetyl-, hydroxydiacetyl-, and hydroxy-benzidine. Monoacetyl-benzidine was more potent than benzidine in histidine/reversion assay. This data indicates that monoacetylation of benzidine may be one of the metabolites produced in metabolic activation process.

**Keywords** □ Benzidine, monoacetylbenzidine, diacetylbenzidine, metabolism, histidine/reversion assay, gas chromatography-mass selective detector

분자구조내에 아미노기를 함유하고 있는 biphenyl구조인 benzidine은 색소로서 여러분야에 다양하게 사용되어 오고 있다. *Salmonella typhimurium* TA98을 사용한 histidine/reversion assay에서 benzidine은 마이토콘드리아 상등액 존재 하에서 활성을 나타내었고, 그것의 congener인 3,3'-dichlorobenzidine은 cytochrome P450 inducer의 전처리에 의하여 현저하게 활성화되었으나 benzidine은 전처리에 의하여 감소하는 것으로

보고되었다.<sup>1)</sup> 또한 benzidine-based azo dye는 사람에서 소장의 미생물총에 의하여 4-aminobiphenyl, monoacetylbenzidine 및 acetylamino-biphenyl로 대사된다고 하였다.<sup>2)</sup> 뿐만 아니라 benzidine은 prostaglandin H synthase에 의하여 quinonediimine으로 cooxidation되고 이 대사체는 다시 glutathione에 의하여 환원되거나 포함(conjugation)되는 것으로 보고되었다.<sup>3)</sup> Benzidine의 대사체 중 acetylation 포함반응에 의한 대사체인 mono- 또는 di-acetyl benzidine의 대사체를 rat의 뇨시료에서 확인하고 이들에 대한 상대적인 독성을 평가하고자 하는 것이 이 실험의 목적

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-958-5070 (팩스) 02-958-5059

이다. 따라서 이 연구목표를 위하여 쥐의 뇨 중의 benzidine의 대사체를 gas chromatography-mass selective detector (GC/MSD)로 분석하고 상대적인 독성을 histidine/reversion assay를 사용하여 평가하였다.

### 실험방법

**시약** - Benzidine, trimethylchlorosilane, trimethyliodosilane,  $\beta$ -nicotineamide adenine dinucleotide phosphate,  $\beta$ -glucuronidase 및 glucose-6-phosphate는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, N-methyl-N-trimethylsilyl-heptafluoro-butylamide는 Macherey & Nagel(Germany)에서 구입하였다. 고순도의 helium은 신양산소(서울, Korea)에서, 2-aminoanthracene은 Aldrich(WI, USA)에서, diacetylbenzidine은 Tokyo Kasei Kogyo Co.(Tokyo, Japan)에서, ambelite XAD-2 resin(particle size, 0.15~0.2 mm)은 Serva(Heidelberg, Germany)에서 구입하였고 그 외 모든 시약들은 특급 및 일급시약을 사용하였다.

**Benzidine의 투여** - Sprague-Dawley 웅성 rat (300±10 g)에 100 mg/kg 용량의 benzidine을 경구 투여 하였다. 대사 cage를 사용하여 0-24, 24-48, 및 48~72 hr 간격으로 뇨를 채취하여 분석하기 전까지 4°C에 보관하였다. 실험동물은 사용하기 전 적어도 1주간 실험실 환경에 적응시켰고 실험기간동안 사료(삼양사, Korea)와 물은 자유로이 섭취하게 하였다.

**Monoacetylbenzidine의 합성** - Benzidine 에탄올 용액(100 mM) 1 ml에 acetic anhydride/chloroform 용액(100 mM) 1 ml를 혼합하고 pyridine 1 ml를 가하고 vortex mixer로 잘 혼합한 후, 50°C에서 5분간 반응시킨다. Silica gel 칼럼(100~200 mesh, 200 g)에서 chloroform으로 elution(유속 3.6 ml/min)하여, chloroform과 n-hexane으로 결정화시켜 GC/MS로 확인한 후 표준물질로 사용하였다.

### 분석기기 및 조건

**Gas chromatography-mass selective detector/electron impact (GC/MSD/EI)** - Hewlett Packard사의 GC/MSD/EI(5890A/5970B)와 mass spectrometry chemstation(HP 59970C) 및 auto liquid sampler(HP 7673A)를 사용하였다. Cross-linked 5% phenyl-

methylsilicone fused silica capillary 칼럼(16 m, length×0.2 mm, internal diameter×0.33  $\mu$ m, film thickness)을 사용하였다. GC의 주입구의 온도는 280°C, transfer line의 온도는 300°C이었고 칼럼의 온도는 180°C에서 시작하여 분당 15°C씩 300°C까지 증가시켰다. 이동상 기체로는 helium을 사용하였고 유속은 0.8 ml/min으로 하였다. 주입방식은 split이고 그 비율은 1:10으로 하였다.

**Gas chromatography-mass selective detector/chemical ionization (GC/MSD/CI)** - Hewlett Packard사의 GC/MSD/CI(5890A/5988A)와 mass spectrometry chemstation(HP 59970C) 및 auto liquid sampler(HP 7673A)를 사용하였다. Cross-linked 5% phenylmethylsilicone fused silica capillary 칼럼(16 m, length×0.2 mm, internal diameter×0.33  $\mu$ m, film thickness)을 사용하였다. GC의 주입구의 온도는 290°C, transfer line의 온도는 300°C이었고 칼럼의 온도는 180°C에서 시작하여 분당 15°C씩 300°C까지 증가시켰다. 이동상 기체로는 helium을 사용하였고 유속은 0.8 ml/min으로 하였다. 주입방식은 split이고 그 비율은 1:10으로 하였다. Ion source의 온도는 200°C이고 ion source의 압력은 0.9 torr이고, reagent gas로서 methane을 사용하였다.

### Benzidine 및 그 대사체의 추출 방법

뇨 10 ml를 미리 준비한 XAD-2 resin column에 loading하고 증류수 10 ml로 세척한 다음, methanol 1 ml로 3회 용출하여 evaporator(Buchi, Swit.)로 증발시킨 잔사에 1 ml의 0.2 M potassium phosphate (pH 7.0)를 가하였다. Diethyl ether 5 ml를 가하고 mechanical shaker(Buchler, Germany)로 5 분동안 shaking하고, 원심분리(2500 rpm, 10 min)하여, -30°C의 freezer(Lauda, Germany)에서 수층을 얼려 층분리를 하였다. Ether 층을 증발시켜 P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>/KOH를 넣은 desiccator에서 건조시킨 후 N-methyl-N-trimethylsilyl-heptafluorobutylamide/trimethylchlorosilane/trimethyliodosilane(100:5:2, v/v/v), 50  $\mu$ l의 혼합물을 넣고 50°C에서 20 분 동안 가열하여 trimethylsilyl 유도체를 만들고 이 용액 1~2  $\mu$ l를 GC/MSD에 주입하였다(Unconjugated fraction). 또한 수층은 남아있는 소량의 diethyl ether를 증발시키고 potassium phosphate buffer(pH 7.0) 1 ml와  $\beta$ -glu-

curonidase(100 U/ml) 25  $\mu$ l를 가하고 50°C에서 1 hr 배양하여 실온에서 식힌 후, 5 ml의 diethyl ether로 추출 및 원심분리하여 증발시킨 잔사를 unconjugated fraction에서 언급한 것과 같은 방법으로 전처리하여 GC/MSD에 주입하였다(Conjugated fraction).

### *Salmonella typhimurium*을 사용한 histidine/reversion assay

대사활성화를 위한 S-9 fraction 존재 하에서 Ames *et al.*<sup>4)</sup>의 방법에 따라서 실험하였으며, 균주로는 *Salmonella typhimurium* TA98과 TA100을 사용하였다. 음성대조군은 benzidine의 용매로 사용된 dimethyl sulfoxide, 양성대조군으로는 2-aminoanthracene을 사용하여 *Salmonella typhimurium*에서 benzidine과 그것의 acetylation된 대사체의 mutation capacity를 측정하였다.

### 실험결과

Gas chromatography-mass selective detector에 의한 benzidine 및 그 대사체의 분석 및 정량 - Benzidine 100 mg/kg을 경구 투여 후 24 hr에서 얻어진 뇨 시료로부터 위의 실험방법 하에서 언급한 방

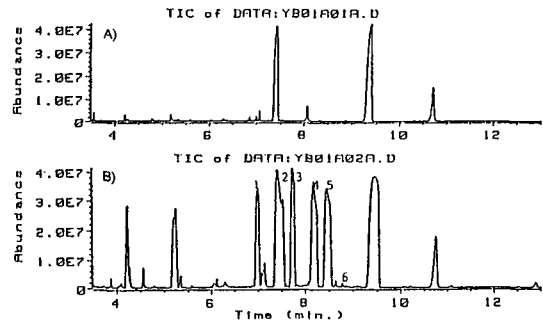


Fig. 1 - Total ion chromatograms for benzidine-negative blank urine (A) and urine sample 24 hr after oral administration of 100 mg/kg benzidine to rats (B). Peak 1, Benzidine-bis-TMS; Peak 2, Monoacetylbenzidine-bis-TMS; Peak 3, Diacetylbenzidine-bis-TMS; Peak 4, Hydroxyacetylbenzidine-tris-TMS; Peak 5, Hydroxydiacetylbenzidine-bis-TMS; Peak 6, Hydroxybenzidine-tris-TMS.

법에 따라 처리하여 얻어진 total ion chromatogram을 benzidine-negative인 blank 뇨시료와 비교하였다 (Fig. 1). 이 두 개의 chromatograms의 비교로부터 benzidine의 대사체로 추정되는 5개의 peak를 관찰하였다. 이들 중 monoacetyl-, diacetyl 및 hydroxybenzidine은 합성하거나 구입한 표준물질과 비교하여 확인하였고, hydroxyacetyl- 및 hydroxydiacetyl-ben-

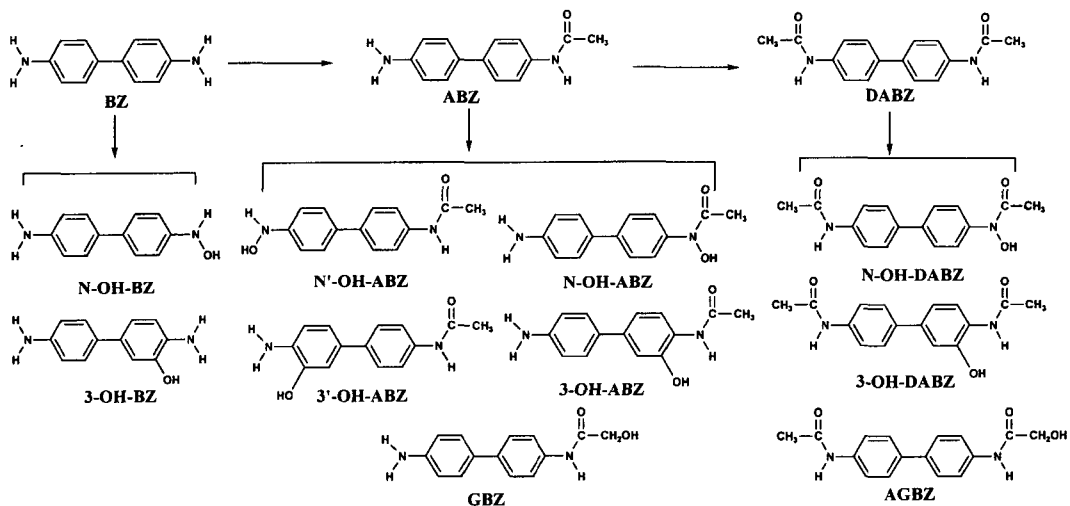


Fig. 2 - The chemical structure of possible acetylated and/or hydroxylated metabolites of benzidine. BZ, benzidine; ABZ, N-acetylbenzidine; DABZ, diacetylbenzidine; N-OH-BZ, N-hydroxybenzidine; 3-OH-BZ, 3-hydroxybenzidine; N'-OH-ABZ, N'-hydroxyacetylbenzidine; N-OH-ABZ, N-hydroxyacetylbenzidine; 3'-OH-ABZ, 3'-hydroxyacetylbenzidine; 3-OH-ABZ, 3-hydroxyacetylbenzidine; GBZ, N-glycolylbenzidine; N-OH-DABZ, N-hydroxydiacetylbenzidine; 3-OH-DABZ, 3-hydroxydiacetylbenzidine; AGBZ, N-acetyl-N-glycolylbenzidine.

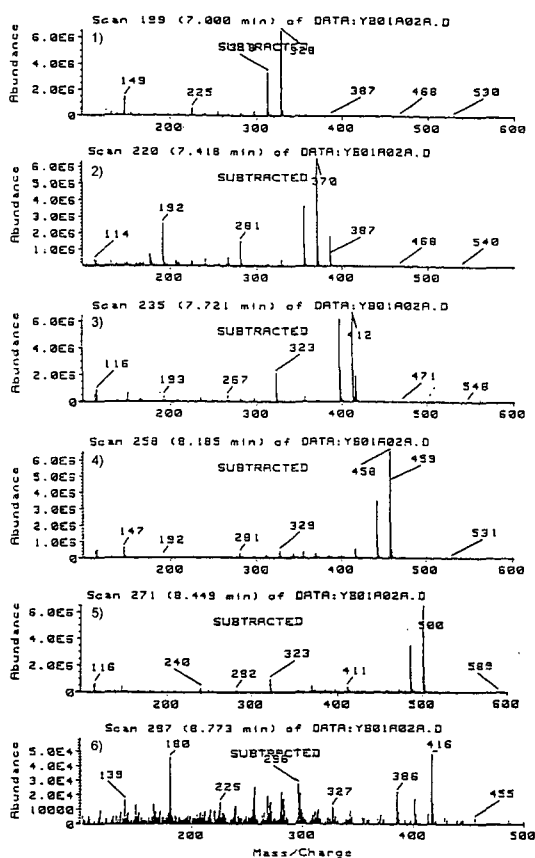


Fig. 3 – Gas chromatography-mass selective detector/electron impact mass spectra of benzidine metabolites. Spectrum 1, Benzidine-bis-TMS; Spectrum 2, Monoacetyl-benzidine-bis-TMS; Spectrum 3, Diacetyl-benzidine-bis-TMS; Spectrum 4, Hydroxyacetyl-benzidine-tris-TMS; Spectrum 5, Hydroxydiacetyl-benzidine-tris-TMS; Spectrum 6, Hydroxy-benzidine-tris-TMS.

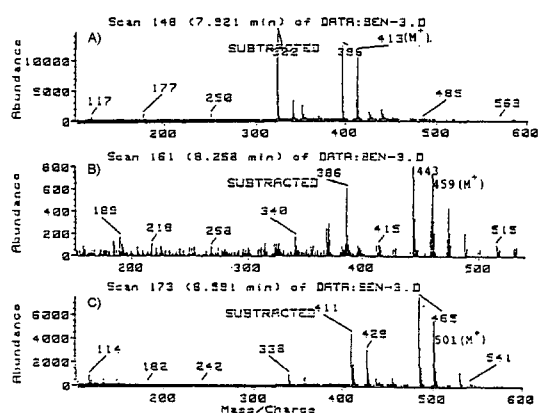


Fig. 4 – Gas chromatography-mass selective detector/chemical ionization mass spectra of benzidine metabolites. A) Diacetylbenzidine-bis-TMS; B) Hydroxyacetylbenzidine-tris-TMS; C) Hydroxy-diacetylbenzidine-tris-TMS.

zidine은 GC/MSD/CI를 사용한 분자량 확인방법에 따라 동정하였다. 이들 각각의 mass spectrum을 Fig. 3과 Fig. 4에 나타내었고, 이 결과를 Table I에 요약하여 보여 주었다. Benzidine의 hydroxylation이나 acetylation과 관련된 대사체의 화학적 구조를 Fig. 2에 나타내었다. Rat의 뇨 중에 확인된 benzidine 대사체의 량을 free 및 conjugate fraction 별로 정량한 결과를 Table IIa와 Table IIb에 나타내었다. Conjugate fraction에서는 hydroxydiacetyl-(tris-TMS;  $m/z$  500) 및 monoacetyl-benzidine(bis-TMS;  $m/z$  300)대사체가 주로 배설되었고, hydroxybenzidine (tris-TMS;  $m/z$  416)은 관찰되지 않았다. 이는 Lakshmi 등이 보고한 바에 따르면 3-hydroxybenzidine은 담즙에서 주 대사체이지만 뇨에서는 아니라고 한 점과 잘 일치하고 있다.<sup>5)</sup> 이 fraction에서

Table I – GC/MS/EI and GC/MS/CI mass spectra of benzidine metabolites

Benzidine metabolites	RT (min)	M+ (m/z)	CI		EI	
			M <sup>+</sup> +H	BP	BP	BP
BZ-bis-TMS	6.980	328	NC	328	313	255
Monoacetyl-BZ-bis-TMS	7.418	370	NC	370	355	281
Diacetyl-BZ-bis-TMS	7.701	412	413	412	397	370
Hydroxyacetyl-BZ-tris-TMS	8.140	458	459	458	443	417
Hydroxydiacetyl-BZ-tris-TMS	8.491	500	501	500	485	323
Hydroxy-BZ-tris-TMS	8.773	416	NC	180	296	256

GC/MS/EI, gas chromatography/mass selective detector/electron impact; GC/MS/CI, gas chromatography/mass selective detector/chemical ionization; BZ, benzidine; M<sup>+</sup>, molecular ion; TMS, trimethylsilyl; RT, retention time; BP, base peak; NC, not confirmed.

**Table IIa** – Relative percentage of benzidine metabolites in urine of rats administered orally 100 mg/kg benzidine (Conjugated fraction)

Benzidine metabolites	0-24 hr	24-48 hr	48-72 hr
BZ-bis-TMS (m/z 328)	20.7 ± 6.6	8.2 ± 2.4	1.2 ± 1.2
Monoacetyl BZ-bis-TMS (m/z 370)	24.1 ± 3.0	26.2 ± 5.0	4.9 ± 4.2
Diacetyl BZ-bis-TMS (m/z 412)	9.7 ± 5.7	0.9 ± 0.5	3.4 ± 2.5
Hydroxyacetyl BZ-tris-TMS (m/z 458)	15.6 ± 1.0	10.7 ± 2.3	3.5 ± 3.4
Hydroxydiacetyl BZ-tris-TMS (m/z 500)	30.0 ± 5.1	54.0 ± 8.2	87.0 ± 5.2
Hydroxy BZ-tris-TMS (m/z 416)	ND	ND	ND

Each value represents mean ± S.D. of 3 rats.

BZ, benzidine; TMS, trimethylsilyl; ND, not detected.

**Table IIb** – Relative percentage of benzidine metabolites in urine of rats administered orally 100 mg/kg benzidine (Unconjugated (free) fraction)

Benzidine metabolites	0-24 hr	24-48 hr	48-72 hr
BZ-bis-TMS (m/z 328)	44.1 ± 8.6	15.5 ± 7.6	1.23 ± 0.3
Monoacetyl BZ-bis-TMS (m/z 370)	18.3 ± 10.0	18.5 ± 7.0	17.9 ± 16.8
Diacetyl BZ-bis-TMS (m/z 412)	ND	18.2 ± 4.3	18.8 ± 3.5
Hydroxyacetyl BZ-tris-TMS (m/z 458)	11.2 ± 0.6	12.4 ± 4.5	7.1 ± 5.0
Hydroxydiacetyl BZ-tris-TMS (m/z 500)	23.8 ± 1.4	34.4 ± 11.6	66.9 ± 11.2
Hydroxy BZ-tris-TMS (m/z 416)	0.6 ± 0.2	1.0 ± 0.1	ND

Each value represents mean ± S.D. of 3 rats.

BZ, benzidine; TMS, trimethylsilyl; ND, not detected.

**Table III** – Histidine/reversion assay of benzidine and its metabolites in *Salmonella typhimurium* strains in the presence of S-9 fraction

Chemicals	Concentrations (µg/plate)	Histidine revertants/plate		Mutagenicity <sup>a)</sup>
		TA98	TA100	
Dimethyl sulfoxide		35, 31	13, 17	
Benzidine	5	47, 45	11, 13	-
	100	115, 130	51, 63	+
	500	309, 264	178, 144	+
Monoacetyl-benzidine	5	112, 147	127, 152	+
	100	1884, 1660	1624, 1748	+
	500	2436, 2780	2362, 2310	+
Diacetyl-benzidine	5	37, 42	19, 25	-
	100	90, 76	65, 74	+
	500	119, 131	105, 99	+
2-Aminoanthracene	2.5	1182, 1550	1352, 1038	+

<sup>a)</sup> Positive mutagenicity was based on the presence of a positive dose response and a yield of at least three times revertant colonies of the spontaneous mutation rate.

hydroxydiacetyl-benzidine은 점차적으로 증가되는 경향을 보여 주었다. Free fraction에서도 주 대사체는 hydroxydiacetyl- 및 monoacetyl benzidine(m/z 370, bis-TMS)이었다.

*Salmonella typhimurium*을 사용한 histidine/reversion assay – 5~500 µg/plate의 농도에서 benzidine, monoacetyl- 및 diacetylbenzidine을 박테리아를 사용한 histidine/reversion assay의 결과는 5 µg/

plate의 benzidine 및 diacetylbenzidine을 제외하고 사용된 모든 농도에서 변이원성을 보여주었다(Table III). 생성된 revertant의 수에 바탕을 두고 상대적으로 독성을 평가해 보면 monoacetylbenzidine의 변이원성이 가장 크고, 그 다음이 benzidine 및 diacetylbenzidine 순이어서 benzidine은 생체내에서 acetylation되어 metabolic activation을 거치는 것으로 사료된다. Lynn *et al.*<sup>12)</sup>의 보고에서는 25~75 µg/plate 사이에서는 변이원성의 크기는 diacetylbenzidine>monoacetylbenzidine>benzidine의 순서였고, 100 µg/plate에서는 monoacetylbenzidine>diacetylbenzidine>benzidine의 순서로 나타났다. 본 실험에서는 benzidine과 diacetylbenzidine의 변이원성에 큰 차이가 없었으며, monoacetylbenzidine>benzidine ≥ diacetylbenzidine 순으로 나타났다.

### 고찰 및 결론

Benzidine에 장기간 노출된 노동자에서 방광암(bladder cancer)을 유발하는 것으로 잘 알려져 있다.<sup>6,8)</sup> 이는 뇨방광의 상피세포는 cytochrome P450의 함량이 낮은 반면에 prostaglandin H synthase는 비교적 높게 존재하고 있으므로 뇨방광 상피세포에서의 prostaglandin H synthase의 작용에 의하여 benzidine과 같은 방향족 아민을 대사활성화시켜 DNA에 반응성이 큰 대사체를 생성하기 때문인 것으로 알려져 있다.<sup>9)</sup>

N-acetylation에 의한 대사는 N-acetyltransferase에 의하여 일어나는데, 이 반응은 조효소인 acetyl coenzyme A를 필요로 한다.<sup>10)</sup> 방향족 아민은 이러한 N-acetyltransferase에 의하여 활성화 또는 무독화 될 수 있다.<sup>11)</sup> 방향족 아미이드는 방향족 아민보다 DNA에 대한 반응성이 적기 때문에 보통은 N-acetyltransferase에 의한 방향족 아미이드의 생성은 무독화 반응이다. 그러나 먼저 아민의 N-hydroxylation이 cytochrome P450 등의 효소에 의하여 일어나게 되면 N-acetyltransferase에 의하여 acetyl 기가 N에서 O로 옮겨지므로 인해 보다 반응성이 큰 nitrenium 이온을 형성하게 된다.

이 실험에서 rat의 뇨시료로부터 관찰된 대사체는 크게 acetylation에 의한 mono-와 di-acetyl benzidine의 생성과, hydroxylation에 의한 hydroxybenzidine,

그리고 이의 acetylation form인 hydroxymono- 와 hydroxydi-acetylbenzidine이 관찰되었다. TMS 유도체화 반응에 의하여 benzidine, acetyl benzidine 및 diacetyl benzidine은 두 개의 TMS기가 도입되는 반면에 이들의 hydroxylated form은 3개의 TMS기가 도입되는 것이 지배적으로 관찰되었다. 이는 아미노기와 hydroxyl기에 TMS기가 도입되는 TMS 유도체화 반응의 특성 때문이다. Hydroxylated form의 benzidine 대사체의 구조는 mass spectrum의 해석 만으로 구조를 확인할 수가 없었다. 따라서 Fig. 2에 제시된 구조의 어느 것에 해당하는 지에 대한 규명은 이들에 대한 표준물질을 합성하여 비교하여야만 가능할 것으로 사료된다. 이들 중 monoacetyl-benzidine은 histidine/reversion assay에서 benzidine보다 변이원성이 더 강하게 나타났다. 그러나 diacetyl-benzidine은 benzidine과 비슷한 정도의 변이원성을 나타내는 것으로 관찰되었다. 위에서 언급한 것처럼 일반적인 acetylation 포함반응은 무독화 반응인 점과는 다르게, benzidine의 경우는 acetylation에 의한 monoacetyl-benzidine의 생성은 metabolic activation인 것으로 사료된다. 따라서 benzidine은 대사활성화에 의하여 생성된 monoacetylbenzidine과 같은 반응성이 큰 대사체가 benzidine의 carcinogenesis에 영향을 미칠 수 있는 여러가지 요소들 중의 하나라고 사료된다.

### 문헌

- 1) Iba, M. M. : Comparative activation of 3,3'-dichlorobenzidine and related benzidines to mutagens in the Salmonella typhimurium assay by hepatic S9 and microsomes from rats pretreated with different inducers of cytochrome P450. *Mutat. Res.* **182** (5), 231 (1987).
- 2) Manning, B. W., Cerniglia C, E., and Federle, T. W. : Metabolism of the benzidine-based azo dye Direct Black 38 by human intestinal microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**(1), 10 (1985).
- 3) Wise, R. W., Zenser, T. V., and Davis, B. B. : Prostaglandin H synthase oxidation of benzidine and o-dianisidine: reduction and conjugation of activated amines by thiols. *Carcinogenesis*, **6**(4), 579 (1985).
- 4) Ames, B., McCann, J., and Yamasaki, E. : Methods for detecting carcinogens and mutagens with

- Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, **31**, 347 (1975).
- 5) Lakshmi, V. M., Mattammal, M. B., Spry, L. A., Kadlubar, F. F., Zenser, T. V., and Davis, B. B. : Metabolism and disposition of benzidine in dog. *Carcinogenesis*, **11**(1), 139 (1992).
  - 6) Zenser, T. V., Lakshmi, V. M., and Davis, B. B. : N-glucuronidation of benzidine and its metabolites. Role in bladder cancer. *Drug Metab. Dispos.* **26**(9), 856 (1998).
  - 7) Babu, S. R., Lakshmi, V. M., Hsu, F. F., Zenser, T. V., and Davis, B. B. : Role of N-glucuronidation in benzidine-induced bladder cancer in dog. *Carcinogenesis*, **13**(7), 1235 (1992).
  - 8) Hayes, R. B., Bi, W., Rithman, N., Broley, F., Caporaso, N., Feng, P., You, X., Yin, S., Woosley, R. L., and Meyer, U. A.: N-Acetylation phenotype and genotype and risk of bladder cancer in benzidine-exposed workers. *Carcinogenesis*, **14**, 675, (1993).
  - 9) Eling, T. E., Thompson, D. C., Foureman, G. L., Curtis, J. F., and Hughes, M. F. : Prostaglandin H synthase and xenobiotic oxidation. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 1 (1990).
  - 10) Hein, D. W. : Acetylator genotype and arylamine-induced carcinogens. *Biochem. Biophys. Act.*, **948**, 37 (1988).
  - 11) Kato, R., and Yamazoe, Y. : Metabolic activation of N-hydroxylated metabolites of carcinogenic and mutagenic arylamines and arylamides by esterification. *Drug Metab. Rev.*, **26**, 413 (1994).
  - 12) Lynn, R. K., Gravie-Gould, C. T., Milam, D. F., Scott, K. F., Eastman, C. L., Ilias, A. M., and Rodgers, R. M. : Disposition of the aromatic amine, benzidine, in the rat: Characterization of mutagenic urinary and biliary metabolites. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **72**, 1 (1984).