

原 著

## アブラナ科野菜中 2-チオチアゾリジン-4-カルボン酸 (TTCA) のキャピラリー電気泳動法による測定

楊井理恵\*<sup>1</sup> 河辺聡子\*<sup>2</sup> 藤井俊子\*<sup>3</sup>

### 要 約

キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE) とミセル動電クロマトグラフ法 (MEKC) を用いて、アブラナ科野菜のキャベツとブロッコリー中の 2-チオチアゾリジン-4-カルボン酸 (TTCA) を簡便、かつ、迅速に分析する方法について記述した。CZE 用泳動溶液は 15 mM  $\beta$ -シクロデキストリン入りの 20 mM 四ほう酸ナトリウム溶液を、MEKC 用は CZE 用泳動溶液に界面活性剤として 50 mM のドデシル硫酸ナトリウムを加えた泳動溶液を用いた。

分析条件は、以下の通りである。キャピラリーは溶融シリカ製、内径 75  $\mu\text{m}$  × 長さ 50 cm のものを用い、25、15 kV の定電圧で測定した。試料注入量は約 24 nL である。測定波長は 273 nm を用いた。

TTCA は、CZE では 6.1 分、MEKC では 7.1 分に移行した。TTCA の検出限界は CZE と MEKC のいずれも約 4  $\mu\text{g/L}$  で、検量線は 0.25~10 mg/L の濃度範囲で良好な直線性を示した。

本研究をアブラナ科野菜のキャベツとブロッコリー中の TTCA 分析に応用した結果、CZE はキャベツとブロッコリー中の TTCA の定性法として有用であるが、MEKC ではキャベツとブロッコリー中の TTCA 濃度の測定値と HPLC による測定値とがよく一致することが認められた。アブラナ科野菜中の TTCA 測定法について比較すると、MEKC は、HPLC に比べて分析時間が短いこと、また、野菜から TTCA を水抽出後に適宜水で希釈した試料においても定量できるので、エーテル抽出に要する前処理が省けるなどの利点が認められた。

### 緒 言

有機溶剤中毒のうち、我が国で最初に社会問題を引き起こしたのは二硫化炭素 ( $\text{CS}_2$ ) 中毒である。 $\text{CS}_2$  は主としてレーヨンや木材パルプの産業で用いられ、硫黄を含む有機化合物の合成用試薬として、また、種々の工業用溶剤として広範囲に使用されている。 $\text{CS}_2$  は経気道および経皮経由で吸収されたのち、その 10~30% は未変化のまま呼気に排泄されるが、残りは未変化体のまま、あるいは、2-チオチアゾリジン-4-カルボン酸 (TTCA)、チオカルバミド、2-メルカプト-2-チアゾリノン-5 等の代謝産物になって尿中に排泄される<sup>1)</sup>。これらの代謝産物のうち、TTCA 濃度は  $\text{CS}_2$  曝露量との相関が高いことが認められており<sup>1)</sup>、 $\text{CS}_2$  取扱い作業者の特殊健康診断では、検査項目として尿中 TTCA 濃度の測定が定められている<sup>2)</sup>。

これまで TTCA は  $\text{CS}_2$  曝露者尿以外からは検出されないと考えられていたが、最近になって農

業<sup>3-5)</sup>、アルコール<sup>6)</sup>、タバコ<sup>7)</sup>、アブラナ科野菜の摂取<sup>8-10)</sup> 等による尿中への TTCA の排泄などが報告されるようになった。これらの要因のうち、アブラナ科野菜のキャベツやブロッコリーなどは日常比較的多量に摂取する食品であるために、尿中 TTCA 濃度のバックグラウンド値への寄与率が高いと考えられる。したがって、アブラナ科野菜中の TTCA 濃度を調査する必要がある。

TTCA 濃度は、高速液体クロマトグラフ法 (HPLC)<sup>2-21)</sup> により測定されることが多いが、HPLC では分析試料をエーテル抽出する必要があり、試料調製の前処理操作が煩雑であること、分析に長時間を要することなどの短所がある。

本研究では、アブラナ科野菜中の微量の TTCA を簡便に、かつ、精度高く短時間に分析できる方法としてキャピラリー電気泳動法 (HPCE) による方法を検討した。HPCE は高分離能、短時間分析、試料負荷量や使用試薬量少量、操作簡便などの特徴を

\*1 山口県立大学 生活科学部 栄養学科 \*2 川崎医療短期大学 介護福祉科 \*3 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科 (連絡先) 楊井理恵 〒753-8502 山口県山口市桜島3丁目2-1 山口県立大学

もつ微量分析法として発展してきている<sup>22)</sup>。今回は HPCE の分離モードのうち、キャピラリーゾーン電気泳動法(電荷をもつ試料の分離に適用。以下 CZE)とミセル動電クロマトグラフ法(電荷をもたない試料の分離に適用。CZE の泳動溶液にイオン性界面活性剤を添加して分析。以下 MEKC)を用いた。TTCA 分析は、CZE、MEKC および CS<sub>2</sub> 曝露者尿の TTCA 濃度測定に使用されている HPLC<sup>20)</sup> の計 3 つの分析法を用いて、分析試料を水抽出とエーテル抽出試料に分けて、先ず TTCA 標準溶液の分析法バリデーション<sup>23)</sup> を実施し、次にキャベツとブロッコリー中の TTCA の定性および定量分析を行って比較検討した。その結果、HPCE を用いて、アブラナ科野菜中の TTCA を簡便、かつ、精度高く、短時間に分析できることが認められたので報告する。

## 方 法

### 1. 分析装置と分析条件

#### 1) HPCE

分析装置：フォトダイオードアレイ検出器付キャピラリー電気泳動装置(CAPI-3300, 大塚電子株式会社製); キャピラリー, 溶融シリカ製(内径, 75  $\mu\text{m}$ ; 長さ, 50 cm; 検出器までの長さ, 37.5 cm)。

分析条件：印加電圧, 15 kV; 測定温度, 25 ; 測定波長, 273 nm; 注入量, 約 24 nL (落差方式, 25 mm  $\times$  60 sec)。

#### 2) HPLC

分析装置：島津製作所製 CLASS-LC-10/M10A; 送液ユニット(ポンプ), LC-10A; 脱気装置, DGU-4A; カラムオープン, CTO-10A; オートインジェクター, SIL-6 B; システムコントローラー, SLC-6 B; コミュニケーションバスモジュール, CBM-10A; フォトダイオードアレイ紫外可視検出器, SPD-M10Avp; カラム, LiChrosorb RP-18 (内径, 4.0 mm; 長さ, 25 cm; Merck 社製)。

分析条件：測定温度, 40 ; 測定波長, 273 nm; 注入量, 10  $\mu\text{L}$ ; 流速, 1 mL/min; 移動相, A (0.1 M 酢酸溶液) B (アセトニトリル)。

### 2. 試薬および試薬調製法

TTCA は Aldrich Chem. Co. 製を用いた。塩化ナトリウム(試薬特級, NaCl と略す), 高速液体クロマトグラフ用蒸留水, ジエチルエーテル(過酸化水素フリー), アセトニトリル, メタノールはナカライテスク株式会社製を用いた。1 M 塩酸, 酢酸, 四ほう酸ナトリウム(試薬特級),  $\beta$ -シクロデキストリン( $\beta$ -CD と略す), ドデシル硫酸ナトリウム

(SDS と略す) は和光純薬工業株式会社製を用いた。

### 3. HPCE 泳動溶液および HPLC 移動相の調製法

#### 1) HPCE 用泳動溶液の調製法

(1) CZE 用溶液(15 mM  $\beta$ -CD, 20 mM 四ほう酸ナトリウム溶液): 四ほう酸ナトリウム 0.763 g に少量の蒸留水を加えてスターラーを用いて溶解し, 100 mL に定容した(pH 9.5)。この溶液に  $\beta$ -CD 1.703 g を添加し, スターラーを用いて溶解後, メンブランフィルター(DISMIC-25, 0.20  $\mu\text{m}$ , 東洋濾紙株式会社製, HPCE では以後同じ)を用いて濾過し, 超音波洗浄器で 30 分間脱気した。

(2) MEKC 用溶液(50 mM SDS, 15 mM  $\beta$ -CD, 20 mM 四ほう酸ナトリウム溶液): CZE 用溶液 100 mL に SDS 1.442 g を添加し, スターラーを用いて溶解後, メンブランフィルターを用いて濾過し, 超音波洗浄器で 30 分間脱気した。

#### 2) HPLC 用移動相

下記の溶液 A と B を用いて送液は表 1 のタイムプログラムにしたがってグラジエント法で行った。

表1 送液プログラム

Time(min)	A (v/v %)	B (v/v %)
2.0	99	1
10.0	65	35
20.0	65	35
26.0	99	1
39.0	99	1
39.5	STOP (Initial condition)	

A: 酢酸 6 mL を蒸留水で 1 L に定容し, 超音波洗浄器で 30 分間脱気したもの(0.1 M 酢酸)。

B: アセトニトリル。

### 4. 標準溶液の調製法

TTCA 10 mg を 50 mM NaCl 溶液で 10 mL に定容して標準原液(1,000 mg/L)を調製した。この TTCA 標準原液を用いて HPCE 用と HPLC 用の標準溶液を以下のように調製した。

#### 1) HPCE 用標準溶液

希釈標準溶液: 目的の濃度に合わせて, 標準原液を 50 mM NaCl 溶液で適宜希釈し, メンブランフィルターを用いて濾過し, 超音波洗浄器で 10 分間脱気した。

エーテル抽出標準溶液: 希釈標準溶液を試験管に 1.0 mL 取り, 1 M 塩酸 0.3 mL とジエチルエーテル 3.0 mL を加えて遠心分離(3,000 r.p.m., 10 分間, 以後同じ)後, 上清を 2.0 mL 分取した。試験管の残りの液に, 再び 1 M 塩酸 0.3 mL とジエチルエーテル 3.0 mL を加えて, 遠心分離後, 上清を 2.0 mL 分取し,

先に分取した上清と合わせて4.0 mLとし、窒素ガスを用いてエーテル層を除去した。残存する乾固物に50 mM NaCl溶液を1.0 mL加え、メンブランフィルターを用いて濾過し、超音波洗浄器で10分間脱気した。

## 2) HPLC用標準溶液

希釈標準溶液を上述のようにエーテル抽出し、残存する乾固物に50%メタノール溶液1.0 mLを加え、メンブランフィルター(DISMIC-25HP, 0.20 μm, 東洋濾紙株式会社製, HPLCでは以後同じ)を用いて濾過し、超音波洗浄器で10分間脱気した。

## 5. 標準溶液の調製法

分析法バリデーションのうち、併行精度、室内再現精度、検出限界および直線性を調べた。

併行精度(Repeatability or Within-series precision)は、短時間の間に同一条件下で測定する場合の精度を、室内再現精度(Intermediate precision or Between-series precision)は、同一施設内において、試験日、試験実施者、器具、機器等を変えて測定する場合の精度をいう。検出限界(Limits of detection or Detection limits; 以下LOD)は、試料中に存在する分析対象物の検出可能な最小濃度または量をいう。直線性(Linearity)は、一定の濃度範囲内で試料中の分析対象物の濃度(量)と直線関係にある測定値を与える能力のことで、本研究では回帰直線と相関係数で示した。

併行精度と室内再現精度は、HPCE, HPLCともにTTCA 1 mg/Lのエーテル抽出標準溶液を用いて求めた。併行精度は同一日に続けて10回TTCA 1 mg/Lの標準溶液の分析を行い、室内再現精度は6日間1日1回(n=3)TTCA 1 mg/Lの標準溶液の分析を行った。各精度は、移行時間、ピーク面積、ピーク高の相対変動係数(標準偏差/平均値×100, 以下R.S.D., %) で表した。

LODは、分析対象物を既知の低濃度で含有する試料のシグナルをベースラインノイズと比較して求めた。検出限界の設定には、シグナル対ノイズ比を3~2:1とするのが一般的であるため、本研究ではベースラインにおけるノイズ面積の平均値の3倍値を用いた。

回帰直線と相関係数をTTCAのエーテル抽出標準溶液の5つの濃度(0.25, 0.5, 1.0, 5.0および10.0 mg/L)についてピーク面積の測定値から求め、直線性を調べた。

## 6. 野菜試料の調製

岡山県内で無農薬栽培されたキャベツとスティックブロッコリー(以後ブロッコリーと略す)から、以下の野菜試料を調製した。各野菜試料は遠心分離

後の上清をメンブランフィルターで濾過し、超音波洗浄器で10分間脱気した。

### 1) キャベツ

(1) 生キャベツ溶出液; 生キャベツ50 gを千切りにし、蒸留水100 mLとともに均質化した後24時間攪拌した。液相部分を採取し野菜試料とした。

(2) 茹でキャベツ; 生キャベツ50 gを千切りにし、蒸留水100 mLで10分間茹でた。茹で汁と茹でキャベツに分け、茹で汁はそのままを野菜試料とした。茹でキャベツは蒸留水100 mLとともに均質化した後24時間攪拌し、液相部分を野菜試料とした。

(3) キャベツジュース; 生キャベツ100 gを千切りにしてジューサー(Juicer mixer, MITSUBISHI ELECTRIC製, 以後同じ)にかけた。濾過後液相部分を野菜試料とした。

### 2) ブロッコリー

(1) 生ブロッコリー溶出液; 生ブロッコリー200 gを一口大にきざみ、蒸留水300 mLとともに均質化した後24時間攪拌した。液相部分を採取し野菜試料とした。

(2) 茹でブロッコリー; 生ブロッコリー200 gを一口大にきざみ、蒸留水300 mLで10分間茹でた。茹で汁と茹でブロッコリーに分け、茹で汁はそのままを野菜試料とした。茹でブロッコリーは蒸留水300 mLとともに均質化した後24時間攪拌し、液相部分を野菜試料とした。

(3) ブロッコリージュース; 生ブロッコリー200 gを一口大にきざみ、ジューサーにかけた。濾過後液相部分を野菜試料とした。

以上の野菜試料を遠心分離し、上清をメンブランフィルターで濾過後、濾液を超音波洗浄器で10分間脱気した。

## 7. 分析試料の調製法

HPCEでは、下記の水抽出試料とエーテル抽出試料を分析試料とした。HPLCでは、水抽出試料では分析が出来ないのでエーテル抽出試料だけを分析した。

### 1) 水抽出試料

上記の野菜試料をそのまま、または適宜希釈して分析に供した。

### 2) エーテル抽出試料

野菜試料1.0 mLを標準溶液のエーテル抽出法に準じてエーテル抽出して分析試料とした。

## 結果および考察

### 1. TTCA 標準溶液の分析

TTCA 標準溶液(1 mg/L)の紫外外部吸収スペク

トルをダブルビーム分光光度計 (U-2000形 日立製作所製) で測定した結果, 極大吸収波長は273 nmであった<sup>24)</sup>. そこで, HPCE, HPLCともに測定波長を273 nmに設定した.

図1にHPCEエレクトロフェログラムとTTCAの吸収曲線を示す. 本条件下では, 分離モード別に見るとTTCAはCZEでは平均6.1分, MEKCでは平均7.1分に移行した. 希釈標準溶液とエーテル抽出標準溶液とでは移行時間はほぼ同じであった.

図2にHPLCクロマトグラムとTTCAの吸収曲線を示す. TTCAピークの保持時間は平均5.6分であった.

## 2. 分析法バリデーション

エーテル抽出標準溶液の併行精度を表2に, 室内再現精度を表3に示す. 併行精度は3分析法のいずれにおいても移行時間, ピーク面積, ピーク高のR.S.D.が5%以内できわめて高かった. 室内再現精度は移行時間ではR.S.D.が5%以内で精度がきわめて高かったが, ピーク面積, ピーク高はCZEで10%以上を示し, MEKCやHPLCでも5%以上となった. これらのことから, ピーク面積やピーク高を用いてTTCA定量する場合には, 測定日毎に標準溶液の測定により補正をする必要があることが示唆された.

表2 併行精度

Method	R. S. D. ( % )		
	Migration time	Peak area	Peak height
CZE	1.38	2.20	1.44
MEKC	0.36	3.01	3.02
HPLC	0.29	3.91	3.74

Standard solutions of TTCA, 1 mg/L; n=10.

表3 室内再現精度

Method	R. S. D. ( % )		
	Migration time	Peak area	Peak height
CZE	3.25	10.79	11.14
MEKC	4.57	6.74	9.56
HPLC	1.19	7.29	6.65

LODを表4に示す. 本HPLCでは, 検出限界濃度が4 µg/Lであったが, これまでに0.5 mg/L<sup>15)</sup>, 0.02 mg/L<sup>17)</sup>, 0.1 mg/L<sup>10)</sup>などの報告が見られ, 本LODはこれらより低い. 検出限界量は本成績では40 pgであるが, 250 pg<sup>18)</sup>や8 pg<sup>7)</sup>とする報告も見られる. HPCEのLODについての報告はこれまでに見られない.

表4 検出限界

Method	Concentrations (µg/L)	Amounts (pg)
CZE	4	0.096
MEKC	5	0.120
HPLC	4	40

回帰直線と相関係数は表5に示すように, TTCA濃度が0.25~10 mg/Lの範囲において, 本HPCE, HPLCともに回帰直線は良好な直線性を示し, 相関係数もきわめて高いことが認められ( $r = 0.999$ ), TTCAの定量が可能であることが認められた.

表5 TTCA標準溶液の回帰直線と相関関数

Method	Regression line	r
CZE	y=4.68x-0.38	0.9998
MEKC	y=3.67x-0.18	0.9995
HPLC	y=17.41x-2.91	0.9997

r, correlation coefficient;

y, peak area (mAU×sec);

x, concentration (mg/L);

concentration range, 0.25 - 10 mg/L.

## 3. アブラナ科野菜試料のHPCEエレクトロフェログラム

生キャベツと生ブロッコリーの水抽出試料のエレクトロフェログラムを図3(CZE)と図4(MEKC)に, エーテル抽出試料のエレクトロフェログラムを図5(CZE)と図6(MEKC)に示す. 野菜試料中のTTCAはCZE, MEKCのいずれでも他の成分と分離したピークとして認められた.

## 4. アブラナ科野菜試料のHPLCクロマトグラム

生キャベツと生ブロッコリーのエーテル抽出試料のHPLCクロマトグラムを図7(a: 生キャベツ, b: 生ブロッコリー)に示す. HPLCにおいてもTTCAは他の成分と分離したピークとして認められた.

## 5. アブラナ科野菜中TTCA濃度の測定

アブラナ科野菜中TTCA濃度の測定をMEKCとHPLCで行った. 水抽出試料でMEKC分析したものをMEKC\*<sup>1</sup>, エーテル抽出試料でMEKC分析したものをMEKC\*<sup>2</sup>で表し, HPLCはエーテル抽出試料を分析した. 分析法別のTTCA濃度を表6に示す. キャベツ, ブロッコリーともに生, 茹でたもの, ジュースの3種類についてみると, 同一の試料のTTCA濃度は水抽出試料を分析したMEKC\*<sup>1</sup>, エーテル抽出試料を分析したMEKC\*<sup>2</sup>およびエー

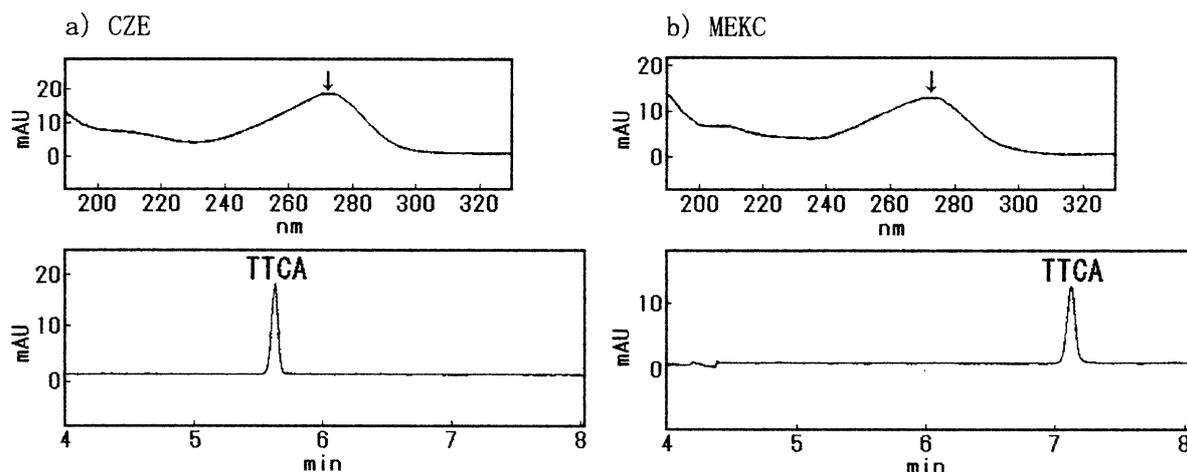


図1 HPCE エレクトロフェログラムと吸収スペクトル  
TTCA 標準溶液, 10 mg/L .

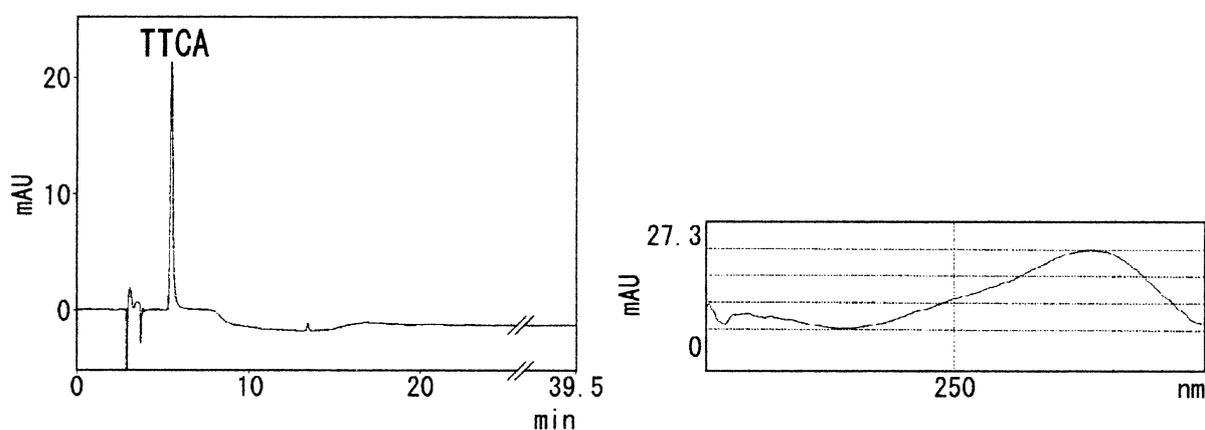


図2 HPLC クロマトグラムと吸収スペクトル  
TTCA 標準溶液, 10 mg/L .

テル抽出試料を分析した HPLC の 3 つの分析法で比較的近い値を示していることが認められた。

アブラナ科野菜の TTCA 濃度についての報告では, 生キャベツの TTCA 濃度として, P.Simon らが 6 mg/kg<sup>7)</sup>, Y.Kikuchi らが 4.3 mg/kg<sup>9)</sup> と報告している。本成績では生キャベツの TTCA は HPLC で 0.8 mg/kg で前述の報告よりも低濃度であるが, これはキャベツの種類や個体差によるものと考えられる。HPCE では P.Simon らがキャベツの TTCA ピークを CZE で確認しているが, 定量値の報告は見られない。なお, 本研究でも CZE によるアブラナ科野菜の TTCA 濃度測定を試みているが, P.Simon らが指摘するように, CZE では TTCA ピークと他

の成分が少し重なる可能性があると考えられる。なお, アブラナ科野菜中の TTCA は植物による代謝産物であり, 個体別の含有量の変動幅が大きい。また, 本研究で用いた野菜は無農薬栽培品で収穫時期が限定されていることなどから, 多量の試料を分析することが出来ず, その上, 野菜試料は保存がきわめて難しく冷蔵保存では腐敗が速かったので, 表 6 には一個体について 1 分析 3 施行の成績を示した。今後, 例数をあげてアブラナ科野菜中の微量の TTCA 濃度測定について検討する予定である。

本研究は, 平成 15 年度川崎医療福祉大学プロジェクト研究費の助成を受けて行ったものの一部である。

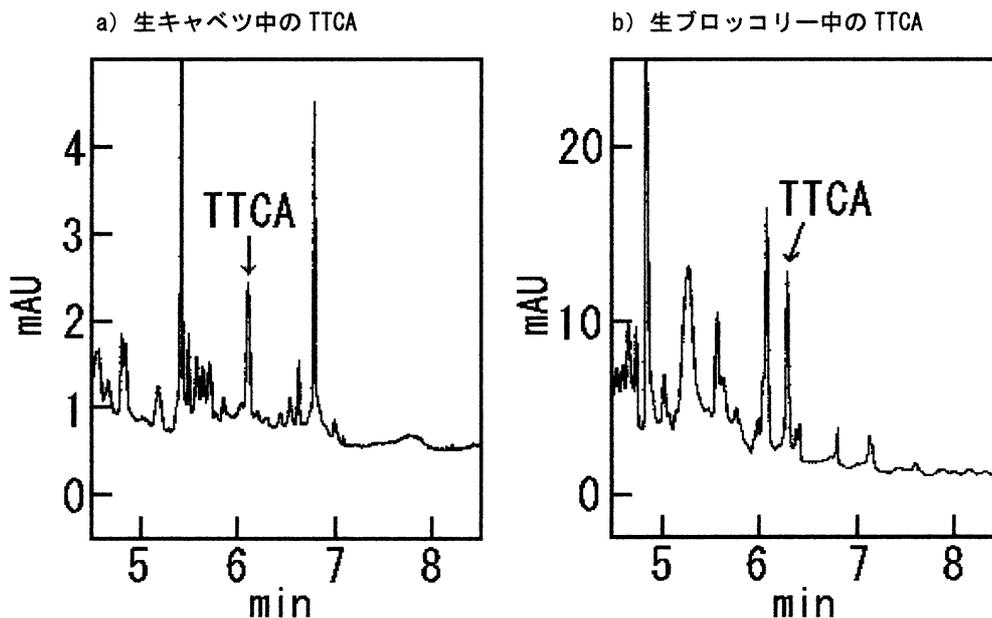


図3 アブラナ科野菜中 TTCA の CZE エレクトロフェログラム  
アブラナ科野菜の水抽出試料を分析 .

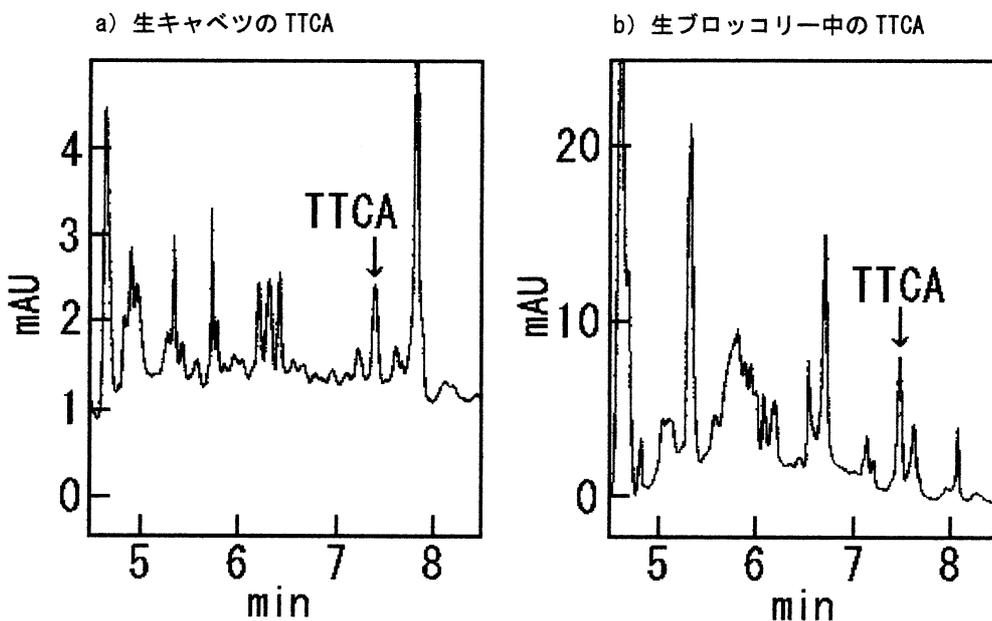


図4 アブラナ科野菜中 TTCA の MEKC エレクトロフェログラム  
アブラナ科野菜の水抽出試料を分析 .

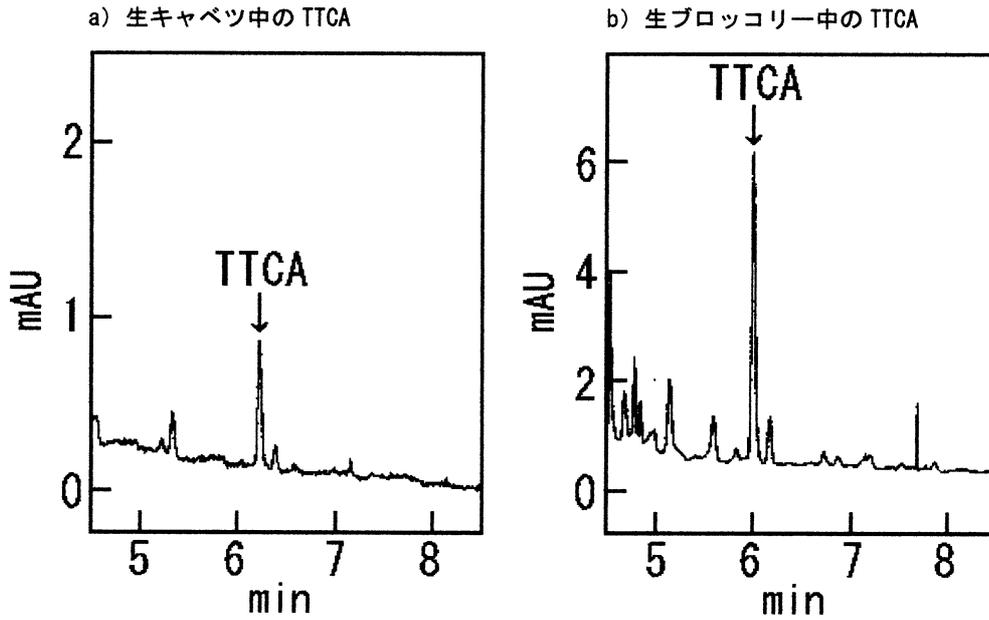


図5 アブラナ科野菜中 TTCA の CZE エレクトロフェログラム  
アブラナ科野菜のエーテル抽出試料を分析 .

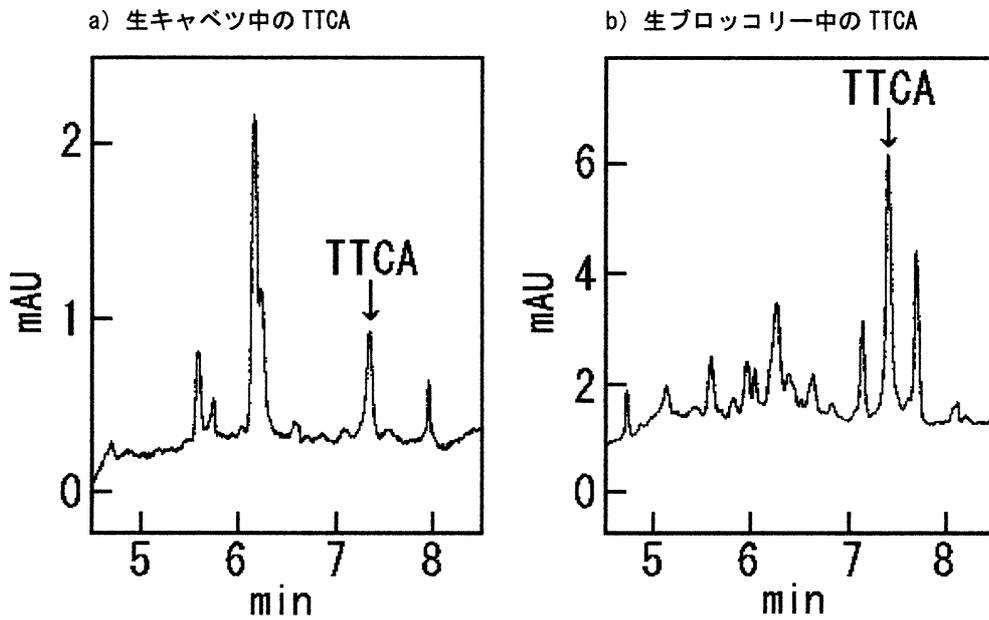


図6 アブラナ科野菜中 TTCA の MEKC エレクトロフェログラム  
アブラナ科野菜のエーテル抽出試料を分析 .

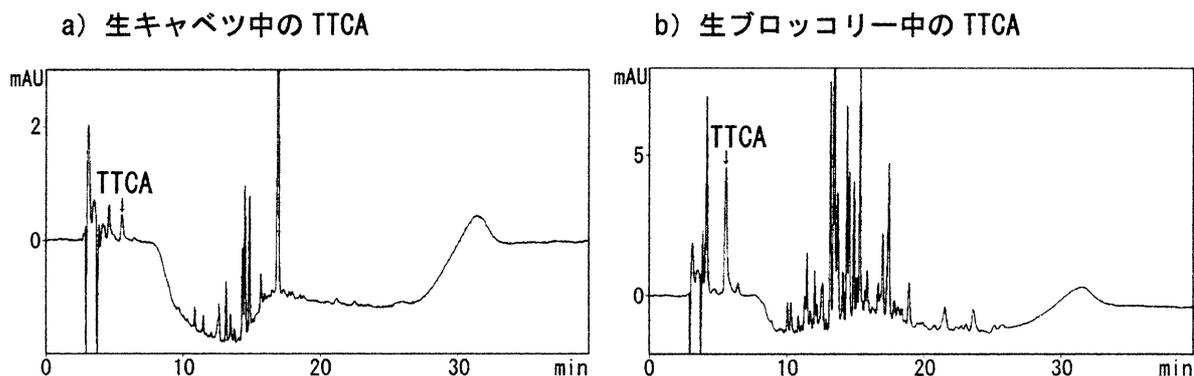


図7 アブラナ科野菜中 TTCA の HPLC クロマトグラム  
アブラナ科野菜のエーテル抽出試料を分析。

表6 アブラナ科野菜中 TTCA 濃度 ( mg/kg )

Method	Cabbage			Broccoli		
	Raw	Boiled* <sup>3</sup>	Juice	Raw	Boiled* <sup>3</sup>	Juice
MEKC* <sup>1</sup>	0.9±0.04	1.6±0.09	0.2±0.03	5.7±0.11	1.9±0.04	0.9±0.06
MEKC* <sup>2</sup>	0.9±0.02	1.9±0.10	0.2±0.00	4.3±0.04	1.9±0.09	0.7±0.00
HPLC	0.8±0.02	1.7±0.06	0.2±0.00	5.5±0.07	1.9±0.04	0.8±0.00

\*1, Aqueous extract from vegetables.

\*2, Ether extract from vegetables.

\*3, sum of boiled vegetables and soup.

## 文 献

- 1) Van Doorn R , Leijdekkers CPMJM , Henderson PT , Vanhoorne M and Vertin PG : Determination of Thio Compounds in Urine of Workers Exposed to Carbon Disulfide . *Archives Environmental Health* , **36** ( 6 ) , 289-297 , 1981 .
- 2) 労働省労働基準局労働衛生課監修 : 有機溶剤健康診断のすすめ方 . 全国労働衛生団体連合会編 , 初版 , ( 社 ) 全国労働衛生団体連合会事務局 , 東京 , 33 , 1990 .
- 3) Van Welie RTH , Van Duyn P , Lamme EK , Jager P , Van Baar BLM and Vermeulen NPE : Determination of tetrahydrophthalimide and 2-thiothiazolidine-4- carboxylic acid , urinary metabolites of the fungicide captan , in rats and humans . *International Archives of Occupational Environmental Health* , **63** , 181-186 , 1991 .
- 4) Krieger RI and Thongsinthusak T : Captan metabolism in humans yields two biomarkers , tetrahydrophthalimide ( THPI ) and thiazolidine-2-thione -4-carboxylic acid ( TTCA ) in urine . *Drug and Chemical Toxicology* , **16** ( 2 ) , 207-225 , 1993 .
- 5) Van Doorn R , Leijdekkers CPMJM , Nossent SM , Henderson PT : Excretion of TTCA in human urine after administration of disulfiram . *Toxicology Letters* , **12** , 59-64 , 1982 .
- 6) Jian L : Alcohol and urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid . *Toxicology Letters* , **134** , 277-283 , 2002 .
- 7) Jian L and Cao WJ : Cigarette Smoking and Urinary Organic Sulfides . *Biomedical and Environmental Sciences* , **13** , 7-11 , 2000 .
- 8) Simon P , Nicot T and Dieudonne M : Dietary habits a non- negligible source of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid and possible overestimation of carbon disulfide exposure . *International Archives of Occupational Environmental Health* , **66** , 85-90 , 1994 .
- 9) Kivisto H : TTCA measurements in biomonitoring of low-level exposure to carbon disulphide . *International Archives of Occupational Environmental Health* , **73** , 263-269 , 2000 .
- 10) Kikuchi Y , Uemura T , Yamauchi T , Takebayashi T , Nishiwaki Y , Yamada K , Sakurai H and Omae K : Urinary Excretion of TTCA after Intake of brassica Vegetables . *Journal of Occupational Health* , **44** , 151-155 , 2002 .

- 11) Van Doorn R , Leijdekkers CPMJM , Henderson PT , Vanhoorne M and Vertin PG : Determination of Thio Compounds in Urine of Workers Exposed to Carbon Disulfide . *Archives Environmental Health* , **36** ( 6 ) , 289-297 , 1981 .
- 12) Van Doorn R , Delbressine LPC , Leijdekkers CPMJM , Vertin PG and Henderson PT : Identification and Determination of 2-Thiothiazolidine -4-Carboxylic Acid in Urine of Workers Exposed to Carbon Disulfide . *Archives of Toxicology* , **47** , 51-58 , 1981 .
- 13) Rosier J , Vanhoorne M , Grosjean R , Van De Walle E , Billefont G and Van Peteghem C : Preliminary Evaluation of Urinary 2-Thio-Thiazolidine-4- Carboxylic-Acid( TTCA ) Levels As a Test for Exposure to Carbon Disulfide . *International Archives of Occupational Environmental Health* , **51** , 159-167 , 1982 .
- 14) Campbell L , Jones AH and Wilson HK : Evaluation of Occupational Exposure to Carbon Disulphide by Blood , Exhaled Air , and Urine Analysis . *American Journal of Industrial Medicine* , **8** , 143-153 , 1985 .
- 15) Ogata M and Taguchi T : Determination of Urinary 2-Thiothiazolidine-4-carboxylic Acid by Automated High Performance Liquid Chromatography , as an Index of Carbon Disulfide Exposure . *Industrial Health* , **27** , 31-35 , 1989 .
- 16) Riihimaki V , Kivisto H , Peltonen K , Helpio E and Aitio A : Assessment of Exposure to Carbon Disulfide in Viscose Production Workers From Urinary 2-Thiothiazolidine-4-Carboxylic Acid Determinations . *American Journal of Industrial Medicine* , **22** , 85-97 , 1992 .
- 17) Simon P and Nicot T : Automated column-switching high-performance liquid chromatography for the determination of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid in urine . *Journal of Chromatography* , **620** , 47-53 , 1993 .
- 18) Lee BL , Yang XF , New AL and Ong CN : Liquid chromatographic determination of urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid , a biomarker of carbon disulphide exposure . *Journal of Chromatography B* , **668** , 265-272 , 1995 .
- 19) Cox C , Shane S , Que H and Tolos WP : Biological Monitoring of Workers Exposed to Carbon Disulfide . *American Journal of Industrial Medicine* , **33** , 48-54 , 1998 .
- 20) 中央労働災害防止協会 : 尿中 TTCA の分析法の改良 . 1999
- 21) Amarnath V , Amarnath K , Graham DG , Qi Q , Valentine H , Zhang J and Valentine WM : Identification of a New Urinary Metabolite of Carbon Disulfide Using an Improved Method for the Determination of 2-Thiothiazolidine-4-carboxylic Acid . *Chemical Research Toxicology* , **14** , 1277-1283 , 2001 .
- 22) Li SFY : *Capillary Electrophoresis , Principles , Practice and Applications* . 2nd , Elsevier Science Publishers B.V. , Amsterdam , 1-30 , 1993 .
- 23) 厚生労働省医薬安全局審査管理課長 : 分析法バリデーションに関するテキスト ( 実施法 ) について . 医薬審第338号 , 1-9 , 1997 .
- 24) 楊井理恵 : 2-Thiothiazolidine-4-carboxylic acid の分析法に関する研究 . 平成15年度川崎医療福祉大学大学院医療技術学研究科臨床栄養専攻修士論文 , 19 , 2004 .

( 平成16年 6 月 5 日受理 )

## Determination of 2-Thiothiazolidine-4-carboxylic Acid in *Brassica* Vegetables using High-performance Capillary Electrophoresis : Comparison with High-performance Liquid Chromatography

Rie YANAI, Satoko KAWABE and Toshiko FUJII

(Accepted Jun. 5, 2004)

Key words : 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA), *Brassica* vegetables, capillary zone electrophoresis (CZE), micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC), high-performance liquid chromatography (HPLC)

### Abstract

A simple and rapid method is described using capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic capillary chromatography (MEKC) for the qualitative and quantitative analysis of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) in *Brassica* vegetables. Buffers used were a 20 mM sodium tetraborate buffer with 15 mM  $\beta$ -cyclodextrin for CZE and the same buffer containing 50 mM sodium dodecyl sulfate as an ionic surfactant for MEKC.

Analytical conditions were as follows: A fused-silica capillary 75  $\mu$  m I.D.  $\times$  50 cm length was used. The temperature was set at 25 and a constant voltage of 15 kV was applied. The injection volume was ca. 24 nL and the UV detector was set at a wavelength of 273 nm. Mean migration times in minutes were 6.1 and 7.1 using CZE and MEKC, respectively. The detection limits of TTCA were about 4  $\mu$  g/L in both methods. Linear relationships were found between peak areas and TTCA concentrations from 0.25 to 10.0 mg/L.

The present method was applied to the analysis of TTCA in *Brassica* vegetables (cabbage and broccoli). The MEKC method showed a good correlation with the high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the quantitative analysis of TTCA concentrations in cabbage and broccoli, whereas the CZE method was useful as a qualitative measure. A comparison of the two methods showed that MEKC was superior to HPLC because total analysis time was shorter, and the ether extraction procedure of TTCA in the vegetables could be saved.

Correspondence to : Rie YANAI

Department of Human Nutrition, Faculty of Human Life Sciences  
Yamaguchi Prefectural University  
Yamaguchi, 753-8502, Japan  
(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.14, No.1, 2004 135-144)