

原 著

尿中 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*1 河辺聡子*2 藤井俊子*3

要 約

尿中 2-チオチアゾリジン-4-カルボン酸 (TTCA) の定量法について, 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) を用いて検討した. CZE 用泳動溶液は 15 mM β -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. キャピラリーは溶融シリカ製, 内径 75 μ m \times 長さ 50 cm を用い, 25 , 15 kV の定電圧で測定した. 試料注入量は約 24 nL, 測定波長は 273 nm である.

分析用の試料は, 被験者がアブラナ科野菜のキャベツまたはブロッコリーを摂取後, 8 時間以内に適宜採取された尿をエーテル抽出した試料を用いた. アブラナ科野菜摂取後尿のエーテル抽出尿試料中 TTCA 濃度を MEKC と高速液体クロマトグラフ法 (HPLC) で測定した結果, TTCA 濃度の測定値は MEKC と HPLC による値がほぼ同値であることが認められたことから, 本ミセル動電クロマトグラフ法は尿中 TTCA の測定法として HPLC より短時間に分析できる利点があることが認められた.

緒 言

我が国では, 昭和初期に人絹工場で二硫化炭素 (CS₂) が使用され, 高濃度の CS₂ の吸入による急性, 亜急性中毒の職業病が多く見られた¹⁾.

CS₂ は, 蒸気の吸入に伴う経気道侵入のほか, 経皮的にも体内に侵入し, その代謝産物である 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) は CS₂ 曝露量と高い相関があることが認められたため²⁾, 尿中 TTCA 濃度を測定することが CS₂ 取扱い作業者の特殊健康診断検査項目に定められている. ACGIH (American Conference of Governmental Industrial Hygienists) は CS₂ の生物学的曝露指標値 (BEI; Biological Exposure Indices) として, 尿中 TTCA 濃度を 5 mg/g クレアチニンと定めている.

TTCA は職業的に CS₂ に曝露されていない人の尿中には検出されないと考えられていたが, 近年農業曝露³⁻⁵⁾, アブラナ科の野菜 (キャベツ, ブロッコリー等) の摂取⁶⁻⁸⁾, アルコール摂取⁹⁾ および喫煙¹⁰⁾ により尿中への TTCA 排泄が報告されたことになり, 尿中 TTCA のバックグラウンド値について

再考する必要が生じ, 微量の尿中 TTCA 濃度の測定法についての検討することも必要となっている.

尿中 TTCA は高速液体クロマトグラフ法 (HPLC; High-performance liquid chromatography)²⁻²⁰⁾ で分析されることが多いが, 我が国では曝露指標としての尿中 TTCA 濃度の測定は中央労働災害防止協会が推奨する HPLC¹⁹⁾ で行われている. しかし, この HPLC では 1 分析に 40 分程度を要し, また TTCA を尿試料からジエチルエーテルにより抽出する必要があり, 試料の調製操作も煩雑であるなどの短所がある. したがって, 簡便で, 短時間分析が可能な尿中 TTCA 濃度の測定法が要求されている.

最近, 著者らは近年発展しているキャピラリー電気泳動法 (HPCE; High-performance capillary electrophoresis) を用いて, アブラナ科野菜中の TTCA 分析が簡便に, 精度高く, かつ, 短時間に実施できることを報告²¹⁾ した. 本研究では, HPCE のうち, キャピラリーゾーン電気泳動法 (CZE; Capillary zone electrophoresis, イオン性物質の分離を行う) とミセル動電クロマトグラフィー (MEKC; Micellar electrokinetic chromatography, 電氣的に中性の物質の分離を行う) の二つの分離モードを用いてアブ

*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 山口市桜島 3 丁目 2-1 山口県立大学

ラナ科野菜摂取後の尿中 TTCA 濃度測定を試みた。その結果、尿中 TTCA 濃度は MEKC による成績と HPLC による成績とはきわめて高い相関を示したことから、尿中 TTCA 濃度の測定に MEKC が適用できることが認められた。

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 μm ; 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); 泳動溶液, ①CZE 用泳動溶液 (15 mM β -CD, 20 mM 四ほう酸ナトリウム溶液), ②MEKC 用泳動溶液 (50 mM SDS, 15 mM β -CD, 20 mM 四ほう酸ナトリウム溶液)。

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-6B; システムコントローラー, SLC-6B; 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 (5 μm ; 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 μL ; 流速, 1 mL/min; 移動相, A (0.1 M 酢酸溶液), B (アセトニトリル) を用いて送液する (表 1)。

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)	

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), 蒸留水, 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の高速液体クロマトグラフ用を, ジエチルエー

ルは過氧化物フリーを用いた。1 M 塩酸, 酢酸, 四ほう酸ナトリウム (試薬特級), β -シクロデキストリン (β -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. 試料の調製法

被験者の女子大学生の尿に TTCA 標準溶液を添加して分析試料とした。被験者 (非喫煙者) には TTCA の尿中排泄に影響を与えるアブラナ科野菜 (キャベツ, ブロッコリー, カリフラワー, 白菜, 大根等) やアルコール類の摂取を摂取実験期間中にはしないよう注意した。

HPCE (CZE, MEKC) 分析には, 50 mM NaCl 溶液による希釈尿試料とエーテル抽出尿試料の 2 通りを用い, HPLC 分析にはエーテル抽出尿試料を用いた。

希釈尿試料の調製法: メスフラスコに尿 2.0 mL を入れ, 1,000 mg/L の TTCA 原液を 10 μL 添加し, 50 mM NaCl 溶液で 10 mL に定容した (1 mg/L の TTCA 添加尿)。溶液は遠心分離 (1,500 g, 10 分間) 後の上清をメンブランフィルター (0.2 μm , 東洋濾紙株式会社製) で濾過し, 超音波洗浄器で 10 分間脱気した。

エーテル抽出尿試料の調製法: 試験管に尿 1.0 mL を取り, 10, 50 および 100 mg/L の TTCA 標準溶液 (50 mM NaCl 溶液) を 100 μL ずつ添加し, 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 (1,500 g, 10 分間, 以下同じ) 後, 上清を 2.0 mL 分取する。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を除去した。残存する乾固物に, HPCE 測定用試料の場合は 50 mM NaCl 溶液を 1.0 mL, HPLC 測定用試料の場合は 50% メタノール溶液を 1.0 mL 加えてメンブランフィルターで濾過し, 超音波洗浄器で 10 分間脱気し分析に供した。

4. 検量線の作成

MEKC, HPLC とともに尿中濃度が 1, 5 および 10 mg/L の TTCA 添加尿試料からエーテル抽出試料を調製した。分析後, ピーク面積を用いて検量線を作成した。

5. 添加回収実験

MEKC, HPLC とともに尿中濃度が 1, 5 および 10 mg/L の TTCA 添加尿試料と TTCA 無添加尿試料からエーテル抽出試料を調製した。分析後に両

試料のピーク面積比率を求め添加回収率とした。

6. アブラナ科野菜の摂取実験

被験者(年齢21~24歳,女子大学生)には,実験前24時間と実験後8時間の間にはアブラナ科野菜やアルコール類の摂取をしないように注意した。生キャベツ100グラムを細切りしたもの,または,10分間加熱した茹でブロッコリーを200グラムを朝食の一部として摂取する。なお,これらの野菜は岡山県産の無農薬野菜である。

野菜摂取後8時間後までに数回採尿して,10 mLのねじ蓋付のプラスチック試験管に入れて分析時まで冷凍保存(-30)をする。

7. アブラナ科野菜摂取後尿の試料調製法

MEKC分析では,希釈試料(5倍希釈)およびエーテル抽出試料の2種類の尿試料を用いた。

HPLC分析では,エーテル抽出尿試料を用いた。

結果および考察

1. 検量線

標準溶液と TTCA 添加尿について,TTCA エーテル抽出試料を用いて MEKC と HPLC でピーク面積による回帰直線を作成し,表2に示す。MEKC, HPLC ともに,標準溶液と TTCA 添加尿試料の回帰直線の勾配はほぼ同値であること,および,相関係数がきわめて高いことが認められた。

表2 TTCA 標準溶液と TTCA 添加尿の回帰直線と相関係数

分析法		回帰直線	r
MEKC	標準溶液	$y_1=4.27x+0.28$	0.9992
	添加尿	$y_1=4.38x-0.33$	0.9999
HPLC	標準溶液	$y_2=17.41x-2.91$	0.9997
	添加尿	$y_2=18.42x-5.93$	1.0000

y_1 , ピーク面積(mAU×sec);
 y_2 , ピーク面積(AU×sec);
 x , 濃度(mg/L); r , 相関係数;
 濃度範囲, 1 - 10 mg/L.

2. 添加回収率

TTCA 添加尿のエーテル抽出試料を用いて, MEKC と HPLC でピーク面積により TTCA 添加回収率を求め,表3に示す。TTCA 添加回収率は TTCA 添加濃度が 1.0~10.0 mg/L の範囲では, MEKC と HPLC はいずれも90%以上の良好な成績を示した。

表3 添加回収率(%)

分析法	TTCA添加濃度(mg/L)		
	1.0	5.0	10.0
MEKC	108±3.7 (1.13)	94±0.5 (0.58)	103±0.4 (0.36)
HPLC	95±1.9 (1.99)	99±1.7 (1.66)	105±3.4 (3.19)
平均±標準偏差(相対標準偏差)			

3. HPCE エレクトロフェログラム

図1にブランク尿(TTCA 無添加尿)と TTCA 添加尿の希釈尿試料の CZE エレクトロフェログラムを示す。CZE 分析では,添加尿では TTCA ピークが 6.247±0.044 分に認められた。この図に示すように TTCA ピークが他の尿中物質と分離泳動する場合もあるが,TTCA の次に出現するピークが大きい場合などではピークの分離が悪くピーク面積の測定が難しい例も多く認められた。MEKC 分析では,図1に用いた同じブランク尿と TTCA 添加尿の尿試料を分析し,図2にエレクトロフェログラムを示す。添加尿では TTCA ピークが 6.848±0.016 分に認められた。図2に示すように,MEKC エレクトロフェログラムには TTCA ピークの前後には大きな妨害ピークが認められなかった。これらの成績から,希釈尿試料で尿中 TTCA の分析をする場合は CZE 分析よりも MEKC 分析が適していることが認められた。

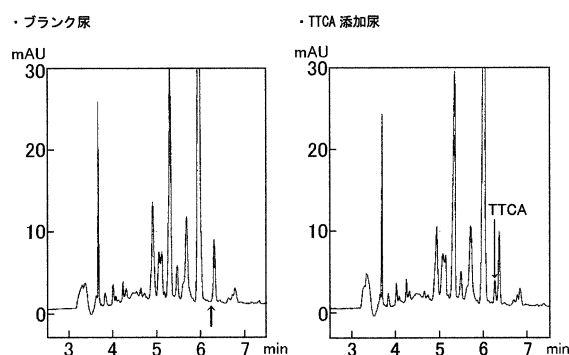


図1 尿試料の CZE エレクトロフェログラム
 尿試料は5倍希釈尿, TTCA 添加量は1 mg/L。

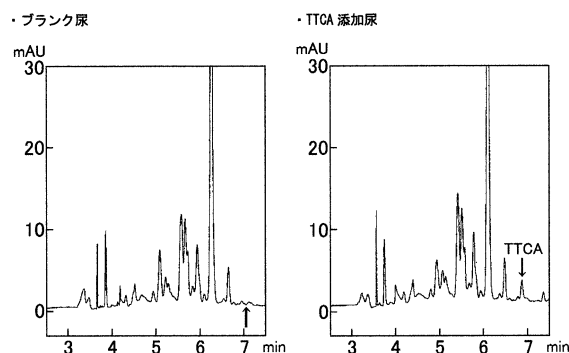
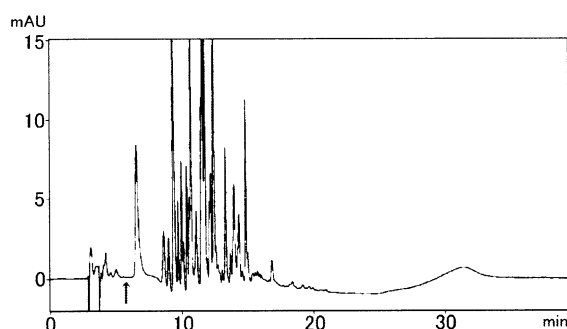


図2 尿試料の MEKC エレクトロフェログラム
 尿試料は5倍希釈尿, TTCA 添加量は1 mg/L。

4. HPLCクロマトグラム

図3にブランク尿とTTCA添加尿のエーテル抽出試料のHPLCクロマトグラムを示す。HPLCでは、添加尿ではTTCAピークが 5.483 ± 0.008 分に認められ、他の妨害物質との分離が良い長所が認められた。しかし、尿中成分が全部移行するのに、HPCEでは7分程度かかるのに対し、HPLCでは約40分を要し、分析時間が長くなる短所も認められた。

・ ブランク尿



・ TTCA 添加尿

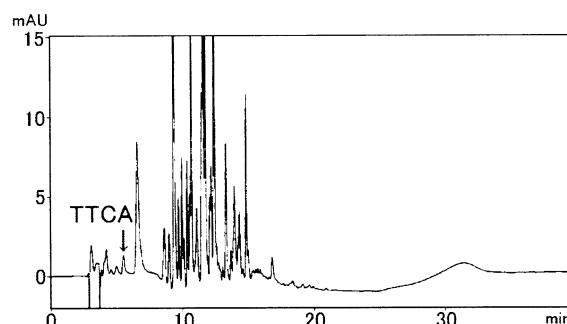


図3 尿試料のHPLCクロマトグラム
TTCA添加量は1 mg/L。

5. アブラナ科野菜摂取後のTTCA濃度の測定

4に茹でブロッコリー摂取4時間後の5倍希釈尿試料とエーテル抽出尿試料のMEKCエレクトロフェログラムを示す。本MEKCでは希釈尿試料、エーテル抽出尿試料ともにTTCAピークが分離泳動することが認められるが、アブラナ科野菜摂取後尿($n=20$)について、同一尿を希釈試料とエーテル抽出試料とに分けてTTCA濃度を測定した結果、図5に示すようにエーテル抽出尿試料によるTTCA濃度が希釈尿試料によるものよりもTTCA濃度が高い傾向があることが認められた。このことは、TTCAの添加回収率がエーテル抽出尿試料は希釈尿試料より高いと報告²²⁾されていることとも一致し、MEKC分析では希釈尿試料よりもエーテル

抽出尿試料を用いることが望ましいと考えられた。そこで、同じエーテル抽出尿試料を用いてアブラナ科野菜摂取後尿($n=20$)のTTCA濃度をMEKCで測定し、HPLCによる測定値と比較した。その結果、図6に示すように尿中TTCA濃度はMEKCとHPLCによる測定値が良く一致していることが認められた。

本MEKCによる尿中TTCA濃度測定値がHPLCによる値とほぼ同値であることが示されたことにより、CS₂曝露評価に用いられる微量の尿中TTCAの測定においても、本MEKCは分析時間が短い測定法として活用できると考えられる。ACGIHはCS₂の生物学的曝露指標値(BEI)としてクレアチニン補正値を用いており、著者らはこれまでにHPCEによる尿中TTCAとクレアチニンの同時定量的可能性を示唆している²³⁾ので、今後はこの点についての研究を進める予定である。

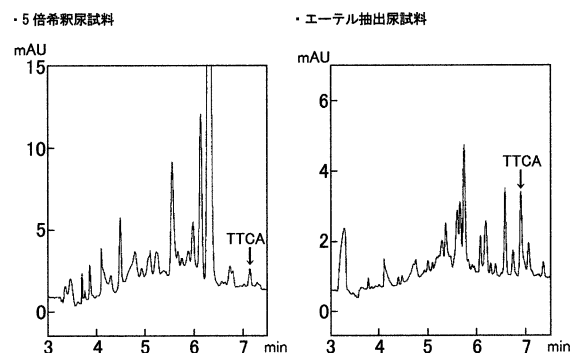


図4 尿試料のMEKCエレクトロフェログラム
試料；茹でブロッコリー摂取4時間後尿。

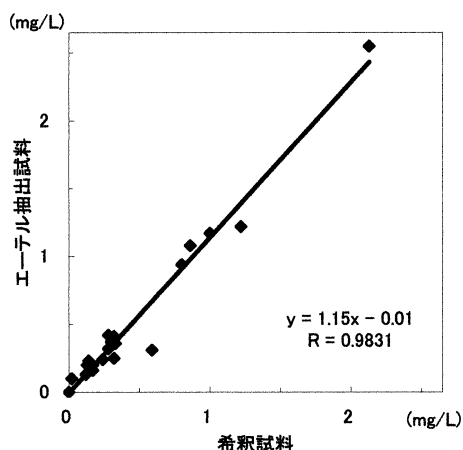


図5 試料調整法別の尿中TTCA濃度(MEKC)
 $n=20$ 。

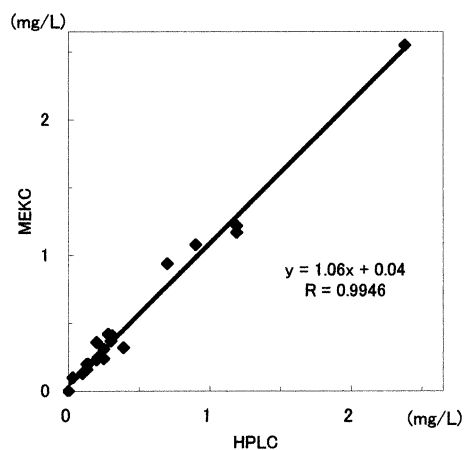


図6 分析法別尿中 TTCA 濃度
エーテル抽出尿試料, n=20 .

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。本研究に御協力いただいた臨床栄養学科11期生 赤木巳予子氏、荒内由加氏、池田恭子氏、曾我正美氏に感謝します。

文 献

- 1) 久保田重孝：二硫化炭素中毒の諸問題。日本医師会雑誌，**56**，1011-1017，1966。
- 2) 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.
- 3) Van Welie RTH, Van Duyn P, Lamme EK, Jager P, Van Baar BLM and Vermeulen NPE: Determination of tetrahydrophtalimide 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, tetrahydrophtalimide(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 and Henderson PT: Excretion of TTCA in human urine after administration of disulfiram. *Toxicology Letters*, **12**, 59-64, 1982.
- 6) Simon P, Nicot T and Dieudonné 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.
- 7) Kivistö H: TTCA measurements in biomonitoring of low-level exposure to carbon disulphide. *International Archives of Occupational Environmental Health*, **73**, 263-269, 2000.
- 8) 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.
- 9) Jian L: Alcohol and urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid. *Toxicology Letters*, **134**, 277-283, 2002.
- 10) Jian L and Cao WJ: Cigarette Smoking and Urinary Organic Sulfides. *Biomedical and Environmental Sciences*, **13**, 7-11, 2000.
- 11) 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.
- 12) Rosier J, Vanhoorne M, Grosjean R, Van De Walle E, Billemont 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.
- 13) 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.
- 14) 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 .
- 15) Riihimäki V , Kivistö H , Peltonen K , Helpiö 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 .
- 16) 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 .
- 17) 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 .
- 18) 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 .
- 19) 中央労働災害防止協会 : 尿中 TTCA の分析法の改良 , 1999 .
- 20) 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 .
- 21) 楊井理恵 , 河辺聡子 , 藤井俊子 : 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 . 川崎医療福祉学会誌 , **14** (1) , 135-144 , 2004 .
- 22) 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学専攻修士論文 , 40 , 2004 .
- 23) 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学専攻修士論文 , 41-43 , 2004 .

(平成16年11月20日受理)

**Determination of 2-Thiothiazolidine-4-carboxylic Acid in Urine by
High-performance Capillary Electrophoresis : Comparison with
High-performance Liquid Chromatography**

Rie YANAI, Satoko KAWABE and Toshiko FUJII

(Accepted Nov. 20, 2004)

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

Abstract

A simple and rapid method is described using capillary zone electrophoresis(CZE) and micellar electrokinetic chromatography(MEKC) for the quantitative analysis of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid(TTCA) in urine . Buffers used were a 20 mM sodium tetraborate buffer with 15 mM β -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 μ 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 .

This procedure was used to determine TTCA concentrations in urine samples obtained from subjects who had ingested 100 grams of raw cabbage or 200 grams of boiled broccoli with breakfast . Urine samples were collected eight hours after intake of the Brassica vegetables . TTCA in the urine samples were extracted with diethyl ether .

The MEKC method showed a good correlation with the high-performance liquid chromatography(HPLC) method for determining TTCA concentrations in the same urine samples . A comparison of the two methods showed that analysis time for MEKC was shorter than for HPLC .

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.2, 2005 341-347)