

## 부타놀 추출법을 이용한 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid와 thiocarbamide의 동시정량에 관한연구

연세대학교 의과대학 산업보건연구소<sup>1)</sup>

이상희<sup>1)</sup> · 송재석<sup>1)</sup> · 윤영식<sup>1)</sup> · 김치년<sup>1)</sup> · 원종욱<sup>1)</sup> · 노재훈<sup>1)†</sup>

### - Abstract -

#### Simultaneous analysis for 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid and thiocarbamide using butanol extraction method

Sanghoi Lee<sup>1)</sup> · Jaesok Song<sup>1)</sup> · youngshik Yoon<sup>1)</sup> · Chinyon Kim<sup>1)</sup> · Jonguk Won<sup>1)</sup> · Jaehoon Roh<sup>1)</sup>  
*Institute for Occupational Health, Yonsei University College of medicine<sup>1)</sup>*

This study was conducted to supplement limit of previous study. The objectives of this study were to select optimal conditions of high performance liquid chromatography(HPLC) operation for detecting urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid(TTCA) and thiocarbamide simultaneously, and to evaluate recovery rates for various liquid-liquid extraction method of these metabolites.

The results are as follows :

1. The urinary TTCA and thiocarbamide were separate sharply when flow rate is 0.7 ml/min, using a series C<sub>8</sub> and C<sub>18</sub> column, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : acetonitrile (93.5 : 6.5) and pH 3.5 as a mobile phase. The retention time was TTCA, 12.07±0.11(mean±SD, n=6), thiocarbamide, 7.85±0.01(mean±SD, n=6), respectively. The calibration curve for TTCA and thiocarbamide was linear within the range 0.05 to 30 µg/ml.

2. By the liquid-liquid extraction, butanol extraction with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> as a salting-out reagent was used as a simultaneous extraction method for these metabo-

lites in acid state, and recovery rates of this method are urinary TTCA, 49.6±17.7 (mean±SD, n=16), thiocarbamide, 43.9±5.50 (mean±SD, n=16), respectively

3. The precision(pooled coefficients of variation for 4 concentration) of the urinary thiocarbamide analysis was 0.03754 by butanol liquid-liquid extraction with(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> as a salting-out reagent, and TTCA was 0.04082 by ethyl acetate liquid-liquid extraction with (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> as a salting-out reagent.

The above results show that the butanol liquid-liquid extraction with(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> as a salting-out reagent in acid state, and using a series C<sub>8</sub> and C<sub>18</sub> column, 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : acetonitrile (93.5 : 6.5) and pH 3.5 as a mobile phase are suitable for the analysis of urinary TTCA and thiocarbamide simultaneously. The detection limit of TTCA and thiocarbamide was about 0.17 µg/ml, 0.07 µg/ml.

**Key Words** : 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid, Thiocarbamide, high performance liquid chromatography, liquid-liquid extraction

접수일 : 2000년 3월 23일, 채택일 : 2000년 4월 27일

† 교신저자 : 서울 서대문구 신촌동 134번지 연세의대 산업보건연구소

(Tel) 02-361-5375, (Fax) 02-392-8622, (E-mail) jhroh@yumc.yonsei.ac.kr

## I. 서론

근로자들이 이황화탄소(carbon disulfide, CS<sub>2</sub>)에 오랜 기간 동안 노출되면 중추신경계에 독성이 나타나고(Mancuso와 Locke, 1972; Seppalainen과 Tolonen, 1974; Hanninen등, 1978; WHO, 1979) 지속적인 만성중독이 진행되면 신경계에 영구적인 손상을 입히고 심혈관계에도 장애를 준다(Tiller 등, Tolonen 등, 1979, 1968; Vertin, 1978; WHO, 1979). 또한 이황화탄소는 동맥경화증(atherosclerosis)과 관상동맥질환(coronary disease)을 유발시키는 독성이 강한 유기용제 중의 하나이다(Beauchamp 등, 1983).

우리나라의 경우, 노동부에서 이황화탄소에 대한 시간가중평균 허용농도를 10 ppm으로 규정하고 있으며(노동부, 1998) 미국의 경우, 산업위생협의회(American Conference of Governmental Industrial Hygienists, ACGIH)에서는 8시간 시간가중 노출기준(Threshold limit value-time weighted average, TLV-TWA)으로 10 ppm을 권고하고 있으며 미국 산업안전보건청(Occupational Safety and Health Administration, OSHA)에서는 노출기준(permissible exposure limit, PEL)을 20 ppm으로 규정하고 있다.

작업장 내 공기 중 이황화탄소의 농도를 분석하는 방법으로는 이황화탄소의 증기를 황산나트륨이 충전된 튜브(sodium sulfate, 270 mg)를 앞 부분에 부착한 활성탄관(coconut shell charcoal, 100 mg/ 50 mg)으로 포집하고 1 ml 톨루엔으로 탈착하여 가스크로마토그래피/불꽃광이온화검출기(gas chromatography/flame photoionization detector; GC/FPD)로 일반적으로 분석하고 있다(NIOSH, 1995). 이 방법은 시료 포집 및 분석절차가 복잡할 뿐만 아니라 0.1 mg 이하의 낮은 농도에서는 탈착율이 낮아 작업환경 평가시 많은 어려움이 따른다. 또한 이러한 환경 모니터링(environmental monitoring) 방법은 작업환경 자체만을 고려하는 방법이며 근로자의 작업량 및 작업강도, 호흡량 등을 고려하지 않아 실제 근로자들의

노출과는 다르게 나타날 수가 있다(Zielhuis, 1978). 또한 피부로 흡수되는 양도 고려되지 않아 생물학적 모니터링(biological exposure monitoring)과 함께 실시하여야 근로자들의 건강보호를 위한 정확한 평가를 할 수 있다.

지금까지 이황화탄소에 대한 생물학적 모니터링에 대해서는 많은 연구가 이루어졌으나(Vasak 등, 1963; Lee 등, 1995; Cox 등, 1992) 아직까지 이황화탄소의 대사기전에 대해서는 명확하게 규명되지 않았다. 현재까지 밝혀진 내용을 살펴보면 이황화탄소는 체내에서 아미노산(amino-acids)과 단백질의 sulfhydryl groups과 결합하여 dithiocarbamides와 tri-thiocarbonates를 형성하며(Lam과 Distefano, 1986), 대사과정을 거치지않은 CS<sub>2</sub> 자체가 호기로 60~90%가 배출되고 1%가 소변으로 배출된다고 하였다(Harashima와 Masuda, 1962). Baselt (1980)은 흡입된 이황화탄소의 50~90%는 몸에서 대사되어 제거되고, 8~20%는 호흡을 통하여 배기되고 요중에는 0.5% 존재한다고 하였다. TTCA는 이황화탄소외에 dithiocarbamide와 같은 다른 화학물질의 대사물질이며(Brugnone 등, 1992), 또한 Captan(Van Welie 등, 1991)과 Disulfiram을 섭취하였을 때도 발견된다(Doom 등, 1981). Simon 등 (1994)은 음식물, 특히 양배추의 섭취가 요중 TTCA의 배설량과 관계가 있다고 하였다. 이러한 내용은 특이성이 높은 이황화탄소의 생물학적 모니터링을 실시하기 위해서는 TTCA 이외의 이황화탄소 대사물질에 대한 연구가 필요하다. Vasak 등(1963)은 최초로 이황화탄소에 폭로된 근로자들의 소변내에서 대사물질을 Iodine-azide test로 정량하였는데 이 방법은 낮은 감도와 특이성이 없기 때문에 적당하지 않은 방법으로 평가되었다. Doom 등(1981)은 레이온 섬유 생산 공정 근로자들의 요를 산성화 시킨 후 에틸 아세테이트(ethyl acetate)로 추출하여 이황화탄소와 글루타치온(glutathione)의 포함체인 TTCA를 얇은막 크로마토그래피(thin-layer chromatography, TLC)와 고성능 액체크로마토그래피(high-performance liquid chro-

matography, HPLC), 자외선 흡광광도법(UV- spectrophotometer)을 이용하여 확인하였다.

혈액을 이용한 생물학적 모니터링은 Roh 등 (1998) 이 흰쥐를 이용하여 이황화탄소를 경구 투여한 후 free form과 acid-labile 형태의 이황화탄소를 가스 크로마토그래피/광이온화검출기(gas chromatography/p hotoionization detector, GC/PID)로 분석하였다.

흡수된 이황화탄소는 체내 대사과정을 거쳐 6% 이하만 TTCA로 전환된다. 이 대사물질은 이황화탄소의 노출 지표로서 특이성과 민감성 그리고 신뢰성을 가지고 있는 것으로 인정되어 ACGIH(1988)에서는 이황화탄소에 대한 생물학적 노출 기준을 5 mg/g creatinine을 권고하고 있다. 이황화탄소의 또 다른 대사물질인 thiocarbamide는 흰 쥐에서 발암가능성이 있다고 보고되었으며, thiocarbamide와 그것의 유도체화물은 탄수화물(carbohydrates)의 대사에 유해한 영향이 있다고 판단되어 1983년부터 발암성물질로 규정하였다(U.S Department of Health and Human Services, 1983). 이황화탄소의 대사물질인 thiocarbamide는 발암가능성을 가지고 있는 물질임에도 불구하고 분석상의 어려움으로 연구 자료가 부족한 실정이며, 또한 요중 TTCA와 요중 thiocarbamide를 동시에 분석하여 비교 평가한 연구는 거의 없는 실정이다. Roh 등(1999)은 액체-액체추출법을 이용하여 이황화탄소의 요중 대사산물인 TTCA와 thiocarbamide를 동시 분석하였다. 액체-액체 추출시 TTCA의 회수율은 높은 반면 thiocarbamide는 회수율이 낮았다. 또한 thiocarbamide의 분리시간이 너무 빠르게 나타나 요중에 있는 간접물질과 분리도가 좋지 않았다. 따라서 본 연구의 목적은 이황화탄소의 요중 대사물질인 TTCA와 thiocarbamide를 대상으로 선행 연구의 제한점을 보완하기 위함이며 구체적으로는

첫째, TTCA와 thiocarbamide 동시 정량을 위한 이동상 및 고정상에 따른 최적의 HPLC 분석 조건을 선정하고,

둘째, 액체-액체 추출시 여러 용매를 이용하여 두

대사물질의 회수율을 비교하여 분석 목적에 맞는 전처리 방법을 제시하는데 있다.

## II. 실험 방법

### 1. 실험 재료 및 기기

정상인의 소변에 TTCA와 thiocarbamide를 각각 첨가하여 일정 농도로 제조하여 냉장 보관하여 표준물질로 사용하였다. 아세토니트릴(acetonitrile, ACN, Lot I 843030 847, Merk, 64271 Darmstadt, Germany)을 HPLC 이동상으로 사용하였고 이황화탄소의 요중 대사물질인 TTCA는 합성하여 사용하였으며(조영봉 등, 1992) 3차 증류수 Milli Q plus (Model 67120, Millipore SA, France)를 사용하였다. 합성한 TTCA의 구조를 확인하기 위해 IR 435 Spectrophotometer (Model 435, Shimazu, Japan)과 TLC (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, 20×20 cm, 0.5 mm, Merk, Darmstadt, Germany)를 이용하였다. 요중 대사물질의 분리 및 정량을 위해 HPLC/UV (Gilson, France)을 사용하였으며, 분리관은 C<sub>18</sub> (5 $\mu$ m, 4.6mm×250mm, Higgins Analytical, USA), C<sub>8</sub> (5 $\mu$ m, 4.6mm×150mm, Higgins Analytical, USA), 그리고 NH<sub>2</sub> (4.6mm×250mm, Waters, USA) 컬럼을 사용하였다. 두 표준물질의 자외선 스펙트럼은 UV-VIS Spectrophotometer (Model 160A, Shimazu, Japan)로 분석하였다.

### 2. 실험 방법

#### 1) TTCA 합성 및 확인

표준물질로 사용한 TTCA 합성은 실온에서 증류수 60 ml에 수산화나트륨 8 g과 L-시스테인 10 g을 첨가하여 혼합한 후 이황화탄소 9.2 g을 가하였고 혼

합물을 실온에서 20시간 정도 교반한 후 진한 염산으로 pH 6까지 산성화하여 에틸아세테이트 로 추출하였다. 추출액을 증발시켜 얻어진 점도가 높은 노란색의 물질에 염산을 가하여 결정화 시켰으며 6 N 염산으로 재결정화 하여 흰색의 TTCA를 얻었다. 그리고 TLC, 적외선 스펙트럼으로 확인한 후 표준 물질로 사용하였다 (조영봉 등,1992).

2) 고정상과 이동상에 따른 TTCA와 thiocarbamide의 분리도 측정

가장 적합한 요중 TTCA와 thiocarbamide의 HPLC 분석조건을 설정하기 위하여 C<sub>18</sub>-Column, C<sub>8</sub>-Column 과 NH<sub>2</sub>-Column을 각각 또는 직렬로 HPLC에 연결하였다. 증류수에 녹인 TTCA와 thiocarbamide의 표준물질을 표 1의 이동상을 이용하여 분석하였다. 또한 본 실험에서 사용된 HPLC 작동 조건은 표 2와 같다.

3) 액체-액체 추출시 용매에 따른 회수율 평가  
표준 물질이 첨가된 소변 1 ml에 6 M 염산 (hydrochloric acid, HCl), 증류수, 수산화나트륨 (sodium hydroxide, NaOH) 100 µl 첨가하여 산성, 중성, 염기성화 시킨 후 염화나트륨, 황산나트륨, 황산암모늄을 포화될 때까지 가하였다. 에틸 아세테이트, 에테르, 부타놀을 각각 2 ml 첨가한 후 혼합하였다. 원심분리기를 이용하여 3000 g에서 2분간 원심 분리 하고 각 용액의 상층액을 다른 용기에 담은 후 반복하여 추출한다. 모아진 상층액은 완전 건조시킨 후 0.1% 인산(phosphoric acid) 2 ml에 녹여서 0.45µm filter(Lot 2693, Gelman, USA)를 이용하여 여과한 후 20 µl를 HPLC용 분석시료로 사용하였다.

4) 검출한계 및 통계학적 분석

반응시료의 농도를 5 µg/ml, 10 µg/ml, 20 µg/ml, 30 µg/ml를 조제하여 염석제, pH, 추출용매에 따른 분석

Table 1. Mobile phase for the analysis of TTCA and thiocarbamide by HPLC

Elution Type	Column	Mobile phase	pH
1	NH <sub>2</sub>	50mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : Acetonitrile (90 : 10)	3.1
2	C <sub>18</sub>	50mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : Acetonitrile (90 : 10)	3.1
3	C <sub>8</sub> +C <sub>18</sub>	50mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : Acetonitrile (93.5 : 6.5)	3.5
4	NH <sub>2</sub>	0.1 M Ammonium sulfate (100 %)	7.2
5	NH <sub>2</sub>	0.1M (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> : Acetonitrile (90 : 10)	8.0

Table 2. Operation conditions of high performance liquid chromatograph

Descriptions	Conditions
Column	C <sub>18</sub> (5µm,4.6mm×150mm) NH (5µm,4.6mm×250mm) C <sub>8</sub> (5µm,4.6mm×250mm)
Mobile phase	Type 1- Type 5
Detector	UV 119 detector (TTCA 272nm : thiocarbamide 236nm)
Injection Vol.	20 µl
Chart speed	1.0 cm/min

의 정밀성(precision)을 비교 평가하였다. 분석의 정밀성 평가는 4 가지 농도 (5, 10, 20, 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 대상으로 각각의 변이계수(coefficient of variation)를 계산하였다. 이 변이계수들을 이용하여 통합 변이계수(pooled coefficient of variation)를 계산하였으며 통합 변이계수의 계산식은 다음과 같다 (OSHA, 1990) (식 1).

$$\text{pooled CV} = \left[ \frac{\sum_{i=1}^n f_i (CV)^2}{\sum_{i=1}^n f_i} \right]^{1/2} \dots\dots\dots (1)$$

단, *pooled.CV* ; 통합 변이계수 (pooled coefficient of variation)

*i* ; n 가지에 대한 농도지표

*CV<sub>i</sub>* ; i 농도에 대한 변이계수

*f<sub>i</sub>* ; 자유도 (분석수 - 1)

검출한계(limit of detection, LOD)는 NIOSH (1995)에서 제시한 방법에 따라 산출하였다. 시료량과 반응 면적간의 선형회귀식( $Y = mX + b$ )을 작성하여 각 시료량에 따른 반응 기대값 (*y*)과 표준오차 (standard error of regression, *sy*)를 구하여 (식 2) 아래와 같은 식으로 검출한계를 구하였다 (식3).

$$\text{LOD} = 3 \text{ sy} / m \dots\dots\dots (2)$$

$$\text{sy} = \left[ \frac{\sum (y_i - Y_i)^2}{(N - 2)} \right]^{1/2} \dots\dots\dots (3)$$

단, N = 표준용액 시료수, m = 기울기

이와 같이 구한 검출한계와 가장 낮은 표준용액의 시료량 또는 X 절편 (Y절편이 음수인 경우)을 서로 비교하여 가장 높은 값을 최종적인 검출한계로 구하였다.

동일한 중위수를 갖는 모집단으로부터 각 추출 용매간 회수율에 차이가 있는가를 알아보기 위해 Kruskal-Wallis test를 실시하였으며, 각 염색제에 따른 회수율 차이를 비교하고자 Willcoxon Singed ranks test를 실시하였다.

### III. 실험 결과

#### 1. 요증 이황화탄소 대사물질의 정량분석 조건

1) TTCA와 thiocarbamide의 최대흡수 파장 및 흡광계수 측정

UV 검출을 위한 최대흡수파장을 구하기 위하여

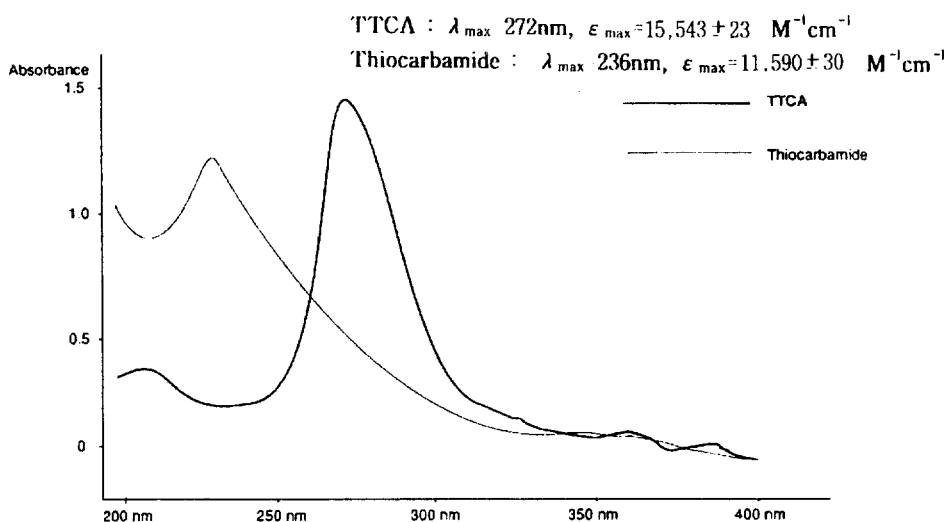


Figure 1. UV-spectrum of thiocarbamide and TTCA in distilled water.

TTCA와 thiocarbamide를 증류수에 각각 녹인 후 자외선 영역에서 분석하여 Figure 1의 UV spectrum을 얻었다.

TTCA의 최대흡수파장( $\lambda_{max}$ )은 272nm이며 최대흡광계수는 ( $\epsilon_{max}$ )는  $15.543 \pm 23 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD, n=3)이었다. 또한 thiocarbamide의 최대흡수파장 ( $\lambda_{max}$ )은 236nm이며 최대흡광계수는 ( $\epsilon_{max}$ )  $11.590 \pm 30 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  (mean  $\pm$  SD, n=3)이다 (Roh 등, 1999).

## 2) 이동상과 고정상에 따른 TTCA와 thiocarbamide의 분리도 측정

요중 이황탄소의 대사물질인 TTCA와 thiocarbamide를 분석하기위해 이동상과 고정상을 5가지 조건으로 비교한 결과(Table 1) C<sub>8</sub> column과 C<sub>18</sub> column을 직렬로 연결한 후 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 아세트니트릴을 93.5대 6.5의 비율로하여 0.7 ml/min 조건으로(Table 2) 하였을 때 공시료와의 분리도가 가장 좋게 나타났다(Figure 2) 표3에서 제시한 조건으로

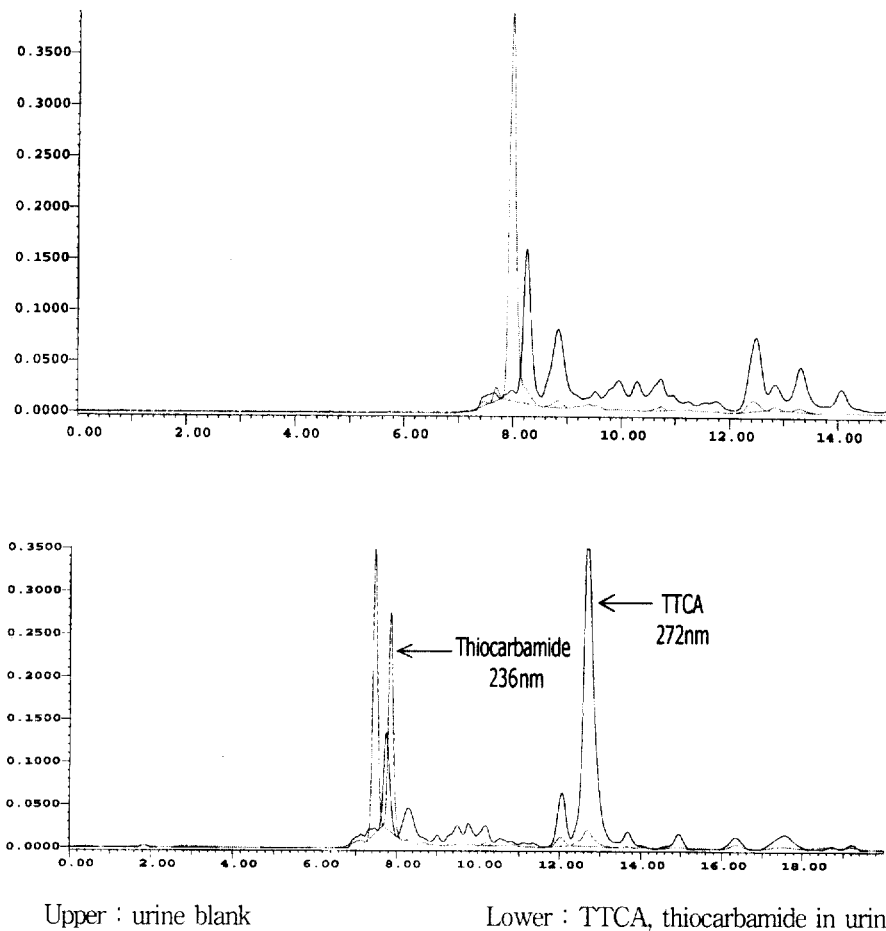


Figure 2. chromatograms of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid(TTCA) and thiocarbamide

Table 3. Analysis conditions of high performance liquid chromatography for TTCA and thiocarbamide in urine

Descriptions	Conditions
Column	C <sub>8</sub> +C <sub>18</sub>
Mobile phase	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (93.5) : ACN (6.5)
Flow rate	0.7 ml/min
Detector	UV 119 detector (TTCA 272 nm : thiocarbamide 236 nm)
Injection volume	20 $\mu$ l

요중 TTCA, thiocarbamide를 분석하기 위해 각각의 표준 물질을 분석한 결과로 용량과 반응의 높은 상관성 ( $R^2 = 0.9999$ )을 보였다.

3) 액체-액체 추출시 용매에 따른 회수율 평가  
일반 요중 TTCA, thiocarbamide의 농도를 5 $\mu$ g/ml (n=4), 10 $\mu$ g/ml (n=4), 20 $\mu$ g/ml (n=4), 30 $\mu$ g/ml (n=4)의 네가지로 조제하여 염석제로 황산나트륨, 황산암모늄, 염화나트륨을 각각 첨가하여 염석효과를 알아본 결과 각각의 염석제 따라 유의한 차이를 보였으며 ( $P < 0.05$  by Willcoxon Signed ranks test), TTCA는 황산암모늄을 이용하여 에틸 아세테이트로 추출시 회수율이 평균 90.4 $\pm$ 11.3 (mean $\pm$ SD) %이었고 (Table 4), thiocarbamide는 황산암모늄을 이용하여 부타놀로 추출시 43.9 $\pm$ 5.60 (mean $\pm$ SD) %였다 (Table 6). 추출용매에 따른 회수율을 살펴 본 결과

각각 용매에 따른 회수율은 통계학적으로 차이가 없었으나 ( $P > 0.05$  by Kruskal-Wallis Test) TTCA는 에틸 아세테이트 이용하여 추출시 56.8%~103.8로 회수율이 가장 높았고 (Table 4), 부타놀을 이용하여 추출시 TTCA는 38.9~74.7%, thiocarbamide 34.9~47.6%로 TTCA는 다소 낮았으나 thiocarbamide의 회수율은 향상되어 동시 정량에 적합하였으며 (Table 6) 산성일 때 높았다. 에틸아세테이트와 에테르를 이용하여 추출시 수용액층을 중성과 알칼리성으로 하였을 때는 추출용매와 염석제에 상관없이 TTCA, thiocarbamide 모두 검출되지 않아 수용액 층을 산성으로 한 결과만을 표기하였다 (Table 4, 5).

표 2에서 제시한 조건으로 TTCA와 thiocarbamide (10  $\mu$ g/ml)를 각 추출용매로 추출하여 분석한 크로마토그래피는 그림 3와 같다. 각 추출용매

Table 4. Recovery rate of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid and thiocarbamide extracted by ethyl acetate in acidic condition (mean  $\pm$  SD)

PH	Conc. (n=4)	TTCA(%)			Thiocarbamide(%)		
		AS	SC	SS	AS	SC	SS
Acid	a	74.0 $\pm$ 5.2*	56.8 $\pm$ 16.8	58.9 $\pm$ 4.4	13.3 $\pm$ 0.8	1.80 $\pm$ 1.8	7.90 $\pm$ 4.4
	b	88.7 $\pm$ 0.6	74.8 $\pm$ 3.7	92.6 $\pm$ 9.5	13.5 $\pm$ 0.3	2.30 $\pm$ 0.1	8.40 $\pm$ 3.4
	c	103.8 $\pm$ 0.8	74.6 $\pm$ 0.8	77.0 $\pm$ 7.1	13.4 $\pm$ 0.2	8.10 $\pm$ 0.2	25.5 $\pm$ 3.6
	d	94.4 $\pm$ 0.4	83.7 $\pm$ 0.5	72.3 $\pm$ 16.5	9.40 $\pm$ 0.2	6.70 $\pm$ 0.1	17.3 $\pm$ 1.1
	Mean	90.4 $\pm$ 11.3	72.5 $\pm$ 12.8	75.2 $\pm$ 15.5	12.4 $\pm$ 1.74	4.73 $\pm$ 2.94	14.8 $\pm$ 7.83

a, 5 $\mu$ g/ml; b, 10 $\mu$ g/ml; c, 20 $\mu$ g/ml; d, 30 $\mu$ g/ml; AS, ammonium sulfate; SS, sodium sulfate; SC, sodium chloride; TTCA, 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid; not detected extraction solvents in neutral and base

Table 5. Recovery rate of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid and thiocarbamide extracted by diethyl ether in acidic condition (mean  $\pm$  SD)

PH	Conc. (n=4)	TTCA(%)			Thiocarbamide(%)		
		AS	SC	SS	AS	SC	SS
Acid	a	31.0 $\pm$ 12.8*	2.30 $\pm$ 4.5	18.3 $\pm$ 2.9	N.D.	N.D.	0.40 $\pm$ 0.5
	b	25.8 $\pm$ 4.2	22.4 $\pm$ 1.2	49.4 $\pm$ 16.8	N.D.	N.D.	3.00 $\pm$ 3.5
	c	41.5 $\pm$ 12.5	24.5 $\pm$ 1.2	43.3 $\pm$ 16.2	0.30 $\pm$ 0.6	N.D.	3.50 $\pm$ 2.9
	d	45.0 $\pm$ 27.2	44.9 $\pm$ 1.6	33.2 $\pm$ 2.0	0.80 $\pm$ 0.6	0.50 $\pm$ 2.0	2.00 $\pm$ 1.1
	Mean	35.8 $\pm$ 16.7	23.5 $\pm$ 15.8	36.1 $\pm$ 16.1	0.28 $\pm$ 0.50	0.13 $\pm$ 0.50	2.22 $\pm$ 2.4

a, 5 $\mu$ g/ml; b, 10 $\mu$ g/ml; c, 20 $\mu$ g/ml; d, 30 $\mu$ g/ml; AS, ammonium sulfate; SS, sodium sulfate; SC, sodium chloride; TTCA, 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid; not detected extraction solvents in neutral and base

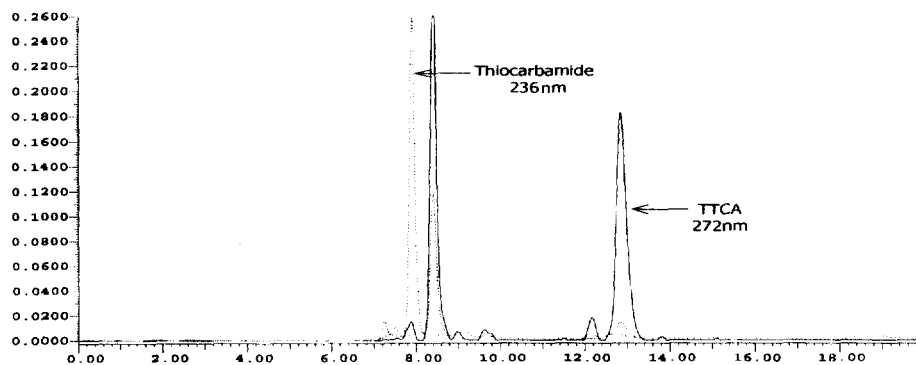
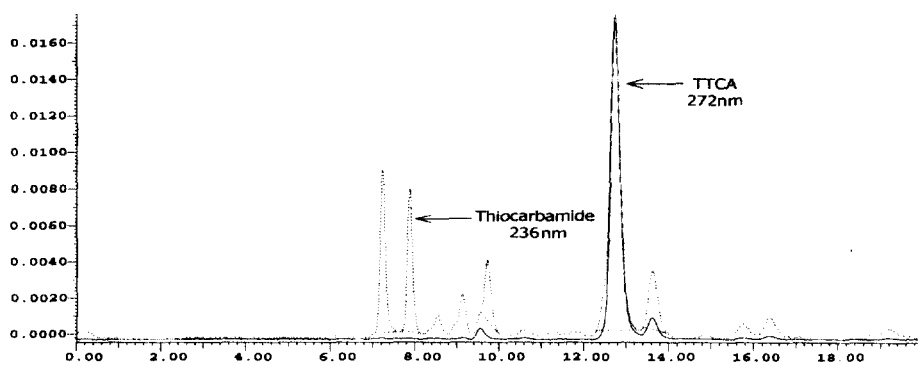
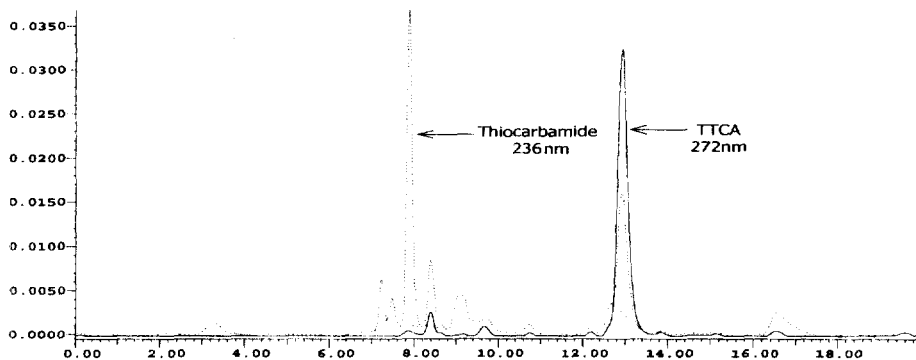
에 따른 머무름 시간 (retention time, RT)이 TTCA는 12.07 $\pm$ 0.11 (mean $\pm$ SD, n=6), thiocarbamide는 7.85 $\pm$ 0.01 (mean $\pm$ SD, n=6)로 소변에서 분리도가 좋았으며 부타놀을 이용하여 추출시 TTCA와 thiocarbamide 모두에서 회수율이 높았음을 크로마토그래피를 통하여 알 수 있다.

Table 6. Recovery rate of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid and thiocarbamide extracted by 1-butanol in acidic condition (mean  $\pm$  SD)

PH	Conc. (n=4)	TTCA(%)			Thiocarbamide(%)		
		AS	SC	SS	AS	SC	SS
Acid	a	44.3 $\pm$ 6.0*	10.3 $\pm$ 8.4	25.1 $\pm$ 2.6	34.9 $\pm$ 1.6	17.2 $\pm$ 15.2	20.2 $\pm$ 33.2
	b	38.9 $\pm$ 5.2	11.7 $\pm$ 9.2	28.5 $\pm$ 6.7	45.2 $\pm$ 1.5	13.7 $\pm$ 6.7	42.3 $\pm$ 7.9
	c	40.6 $\pm$ 6.0	11.8 $\pm$ 6.6	21.9 $\pm$ 4.4	47.8 $\pm$ 1.4	35.6 $\pm$ 7.7	51.3 $\pm$ 1.9
	d	74.7 $\pm$ 17.9	14.2 $\pm$ 5.3	42.3 $\pm$ 1.4	47.6 $\pm$ 0.6	30.7 $\pm$ 0.4	37.0 $\pm$ 2.6
	Mean	49.6 $\pm$ 17.7	12.0 $\pm$ 6.87	29.2 $\pm$ 8.89	43.9 $\pm$ 5.60	24.3 $\pm$ 12.5	37.7 $\pm$ 19.7
Neutral	a	57.8 $\pm$ 33.2	9.80 $\pm$ 7.4	25.1 $\pm$ 2.6	11.6 $\pm$ 5.5	8.6 $\pm$ 2.2	45.8 $\pm$ 8.9
	b	72.2 $\pm$ 21.7	20.5 $\pm$ 4.0	28.5 $\pm$ 6.7	20.4 $\pm$ 10.1	43.8 $\pm$ 10.3	31.1 $\pm$ 9.7
	c	78.5 $\pm$ 24.3	17.5 $\pm$ 1.5	21.9 $\pm$ 4.4	35.5 $\pm$ 15.0	27.0 $\pm$ 9.1	37.8 $\pm$ 4.1
	d	27.2 $\pm$ 19.2	15.5 $\pm$ 0.2	42.3 $\pm$ 1.4	41.8 $\pm$ 17.0	46.5 $\pm$ 0.3	37.4 $\pm$ 2.0
	Mean	58.9 $\pm$ 30.3	15.8 $\pm$ 5.55	29.3 $\pm$ 8.27	27.3 $\pm$ 5.60	31.5 $\pm$ 16.9	38.0 $\pm$ 14.1
Base	a	30.6 $\pm$ 44.5	N.D.	6.70 $\pm$ 7.4	10.2 $\pm$ 11.9	23.7 $\pm$ 15.8	20.0 $\pm$ 21.8
	b	48.1 $\pm$ 2.8	N.D.	9.50 $\pm$ 1.6	13.1 $\pm$ 0.4	40.4 $\pm$ 13.4	37.0 $\pm$ 18.7
	c	64.5 $\pm$ 3.2	N.D.	16.7 $\pm$ 18.7	22.1 $\pm$ 4.5	56.2 $\pm$ 14.6	21.4 $\pm$ 30.4
	d	80.7 $\pm$ 2.2	N.D.	14.4 $\pm$ 8.1	38.7 $\pm$ 0.8	36.1 $\pm$ 0.4	7.80 $\pm$ 2.5
	Mean	56.6 $\pm$ 27.8	N.D.	11.8 $\pm$ 10.6	21.0 $\pm$ 12.8	39.1 $\pm$ 16.5	21.6 $\pm$ 21.6

a, 5 $\mu$ g/ml; b, 10 $\mu$ g/ml; c, 20 $\mu$ g/ml; d, 30 $\mu$ g/ml; AS, ammonium sulfate; SS, sodium sulfate; SC, sodium chloride; TTCA, 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid; N.D.: not detected





upper : ethyl acetate, Middle : diethyl ether, Lower : 1-butanol

Figure 3. chromatogram of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid and thiocarbamide after liquid-liquid extraction by ethylacetate, diethyl ether, 1-butanol

4) 액체-액체 추출시 분석시료의 정밀성 평가 및 검출한계

액체-액체 추출시 수용액 층을 중성과 알칼리성으로 하였을 때는 추출용매와 염석효과에 상관없이 TTCA와 thiocarbamide가 모두 검출되지 않아 수용액 층을 산성으로 한 결과만을 가지고 분석시료의 정밀성을 평가한 결과 thiocarbamide는 염석제를 황산암모늄을 사용하고 부타놀로 추출시 5  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  (0.04645), 10  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  (0.03304), 20  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  (0.02884), 30

$\mu\text{g}/\text{m}\ell$  (0.01204)의 정밀성이 다른 용매로 추출시보다 양호하다. 또한 농도에 따른 전체 통합 변이계수 값에서도 0.03754로 낮아 정밀성이 좋은 것으로 평가되었다 (Table 7). TTCA는 염석제를 황산암모늄을 사용하고 에틸 아세테이트로 추출시 농도에 따른 통합 변이계수 값이 0.04082로서 정밀성이 다른 용매로 추출시보다 양호하다 (Table 8). 검출한계는 선형회귀식의 표준오차로 계산한 결과 TTCA가 0.17  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$  이고 thiocarbamide가 0.07  $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ 이었다.

Table 7. Comparison between the coefficients of variation of thio carbamide by extraction solvent and salting agents in acidic condition.

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )	Extraction solvents								
	Ethyl acetate			Diethyl ether			1-butanol		
	AS	SS	SC	AS	SS	SC	AS	SS	SC
5	0.006*	0.0926	1.0284	N.D.	1.1547	N.D.	0.0465	0.0600	0.2617
10	0.0208	0.4110	0.0480	N.D.	1.1827	N.D.	0.0330	1.2970	0.2345
20	0.0159	0.1416	0.0294	2.0000	0.8529	N.D.	0.0288	0.5360	0.3376
30	0.0213	0.0625	0.0139	0.6019	0.5325	2.0000	0.0120	0.0166	0.0070
Pooled CV**	0.0396	0.2591	0.5947	2.0886	1.1170	-	0.0375	0.9548	0.5978

\*, coefficients of variation with 4 determinations; AS, ammonium sulfate; SS, sodium sulfate; SC, sodium chloride; \*\* Pooled coefficient of variation

Table 8. Comparison between the coefficients of variation of TTCA by extraction solvent and salting agents in acidic condition

Conc. ( $\mu\text{g}/\text{m}\ell$ )	Extraction solvents								
	Ethyl acetate			Diethyl ether			1-butanol		
	AS	SS	SC	AS	SS	SC	AS	SS	SC
5	0.007*	0.0751	0.2951	0.4131	0.1563	2.0000	0.1345	0.1034	0.8126
10	0.0062	0.1029	0.0492	0.1615	0.3408	0.0534	0.1336	0.2341	0.7868
20	0.0074	0.0923	0.0112	0.3024	0.3735	0.0480	0.1469	0.2020	0.5558
30	0.0045	0.2280	0.0058	0.6037	0.0595	0.0350	0.2400	0.0341	0.3720
Pooled CV**	0.0408	0.1599	0.5947	0.4664	0.3074	-	0.1958	0.1892	0.5978

\*, coefficients of variation with 4 determinations; AS, ammonium sulfate; SS, sodium sulfate; SC, sodium chloride; TTCA, 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid; \*\* Pooled coefficient of variation

#### IV. 고 찰

Pergal 등 (1972)은 이황화탄소에 노출된 근로자들의 소변에서 대사물질인 2-Mercapto-2-thiazolinone-5와 thiocarbamide를 적외선분광계와 질량분석계(mass spectrometry)로 확인 한 결과 thiocarbamide를 이황화탄소에 노출된 근로자들의 소변에 존재하는 주 대사물질로 보았으나 현재는 TTCA를 주 대사물질로 보고 있다. Hashimoto (1979)는 이동상 용매로 황산암모늄 용액을 사용하고 양이온 교환수지(cation-exchange resin)를 이용하여 HPLC로 토양속에서 thiocarbamide를 추출하여 분석하였다. 본 연구에서는 이황화탄소의 요중 대사물질이며 발암가능 물질로 규정되어 있는 thiocarbamide를 이동상 용매로 potassium dihydrogenphosphate를 사용하고 고정상으로 C<sub>8</sub>-column과 C<sub>18</sub>-column을 직렬로 연결하여 분석 효율을 높였다. 지금까지의 요중 이황화탄소의 대사물질에 관한 연구는 미국 산업위생협의회에서 생물학적 노출 지표 (Biological monitoring index, BEI)로 권장하고 있는 TTCA가 대부분이며 다른 대사물질에 대한 연구는 부족한 실정이다. 요중 TTCA와 thiocarbamide를 동시에 분석한 연구는 Roh 등(1999)의 연구만 있다. 따라서 본 연구에서는 이황화탄소의 요중 대사물질인 TTCA와 발암성 추정물질로 규정되어 있는 thiocarbamide를 동시 분리, 정량에 대한 최적의 조건을 선정하는데 목적을 두었다. Doorn 등 (1981)은 이동상 용매로 95 % 증류수와 4 % 메탄올, 1 % 초산을 혼합하여 TTCA를 분석하였으며 Cox와 Que Hee 등(1996)은 98 % 증류수와 1 % 아세트니트릴, 1 % 초산을 혼합하여 이동상 용매로하여 요중 TTCA를 분석한 결과 TTCA의 머무름 시간이 13.1 min 이었으며 검출한계는 100nM이었다. Roh 등(1999)은 이동상 용매를 50mM potassium dihydrogenphosphate를 인산(phosphoric acid)을 이용하여 H 3.0로 맞추는 후 아세트니트릴과 85 대 15의 비율로 혼합하여 요중 TTCA와

thiocarbamide를 동시 분석한 결과 TTCA와 thiocarbamide의 머무름 시간이 각각 4.5, 6.4 min이었다. 본 연구에서는 TTCA와 thiocarbamide를 동시에 정량하는데 있어서 이동상 용매로 50 mM potassium dihydrogenphosphate를 인산(phosphoric acid)을 이용하여 pH 3.5로 맞추는 후 아세트니트릴을 93.5 대 6.5의 비율로 혼합하여 사용할 때 가장 분리도가 좋았으며 머무름 시간은 TTCA는 12.07 min이었고 thiocarbamide는 7.85 min이었다. 고정상으로 Doorn 등(1981)은 C<sub>8</sub> (5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm)을 사용하여 TTCA를 분석하였으며 Cox와 Que Hee 등 (1996)은 소변에서 TTCA와 다른 피크와의 분리도를 높이기 위해 C<sub>18</sub>-column (5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm)과 C<sub>8</sub>-column (5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm)을 직렬로 연결하여 분석하였다. Roh 등 (1999)은 TTCA와 thiocarbamide를 동시 분석하기 위하여 NH<sub>2</sub>-column을 이용한 결과 TTCA는 좋은 분리도를 보였으나 thiocarbamide의 분리에는 용출 시간이 너무 빨라 적합하지 않았다. 본 연구에서는 TTCA와 thiocarbamide를 동시에 분리, 정량하기 위해서 C<sub>8</sub>-column (5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 250mm)과 C<sub>18</sub>-column (5 $\mu$ m 4.6mm $\times$ 150mm)을 직렬로 연결하여, 분석한 결과 TTCA와 thiocarbamide를 동시에 분리하는데 적합하였다.

Meuling 등 (1990)은 이황화탄소 취급 근로자들의 소변을 0.5 ml/ℓ 염산으로 산성화 시킨 후 디에틸 에테르 (diethyl ether)를 이용하여 추출한 후 HPLC로 요중 TTCA를 분석하였다. 이 방법의 검출한계 (limit of detection)는 1  $\mu$ mol/ℓ 이다. Riihimaki 등 (1992)은 소변내 TTCA를 디에틸 에테르로 추출한 후 메탄올에 녹여 HPLC로 분석하여 약 80 %의 회수율을 얻었으며 검출한계는 0.5  $\mu$ mol/ℓ 였다. Antonin과 Miloslav (1985)은 0.25 mm<sup>2</sup> 수은 전극봉이 달린 polarographic thin-layer detector를 이용하여 요중 thiocarbamide를 HPLC로 검출하였으며 검출한계는 2  $\mu$ g/ml 였다. Cox 등 (1992)은 염화나트륨 (sodium chloride)을 첨가하고 5 M 염산으로 산성화

시킨 후 디에틸 에테르를 이용하여 추출한 후 고성능 액체크로마토그래피 (high performance liquid chromatography, HPLC)로 분석하였다. 이 분석법의 요중 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid(TTCA) 회수율은  $94.0 \pm 8.1$  % 이며 검출한계는 100 nM이다. Lee 등 (1995)은 소변 1ml에 황산나트륨 (sodium sulphate)으로 포화시킨 후 디에틸 에테르로 추출하여 HPLC로 분석하였으며 검출한계는 0.025 mg/l 이며 회수율은 90 % 이상이었다.

Doom 등 (1981), Meuling 등 (1990)은 이황화탄소 취급 근로자들의 요를 염산으로 산성화시킨 후 에틸 아세테이트와 디에틸 에테르를 이용하여 추출한 후 HPLC로 요중 TTCA를 분석하였으며, Cox 등 (1992), Lee 등 (1995)은 디에틸 에테르를 추출용매로 이용하여 분석한 결과, 요중 TTCA 회수율은 각각 94%, 90 % 이었으며 검출한계는 각각 100 nM, 0.025 mg/l 이었다. Roh 등 (1999)은 에테르를 이용하여 추출한 결과 TTCA에서 78.7 %의 높은 회수율을 얻었지만 thiocarbamide는 5.37 %로 회수율이 낮았다. 본 연구에서는 소변을 산성화시킨 후 부타놀을 이용하여 추출시 TTCA는 12%~49.6 %로 다소 낮은 회수율을 보였으나 thiocarbamide는 24.3 %~43.9 %로 회수율이 향상되어 동시 정량시 적합하였다. Meuling 등 (1990)은 염화나트륨을 염석제로 사용하여 요중 TTCA를 추출하였으며 Lee 등 (1995)은 황산나트륨을 염석제로 이용하여 요중 TTCA를 추출한 결과 90 %의 회수율을 얻었다. Roh 등 (1999)은 염화나트륨과 황산나트륨을 염석제로하여 요중 TTCA와 thiocarbamide를 추출한 결과 TTCA는 78.7 %로 황산나트륨을 이용하여 추출시 회수율이 높았으나 thiocarbamide는 회수율이 낮았다. 본 연구에서는 요중 TTCA를 황산나트륨을 염석제로하여 추출한 결과 90%의 회수율을 얻었으나 TTCA와 thiocarbamide를 동시 추출하는데 있어서는 황산암모늄을 염석제로 사용시 평균 TTCA는 49.6 %, thiocarbamide는 43.9 %로 모두에서 높은 회수율을 보였다.

본 연구의 예비실험에서 전개용매에 따른 TLC의

Rf 값을 비교한 결과 부타놀에서 TTCA와 thiocarbamide의 값이 각각  $0.26 \pm 0.01$ ,  $0.68 \pm 0.02$  이었으며  $C_{18}$ ,  $NH_2$ , Acell<sup>TM</sup> Plus QMA, Acell<sup>TM</sup> Plus CM Sep-pak을 이용하여 고체-액체 추출을 실시한 결과 TTCA와 thiocarbamide가 거의 추출되지 않았다.

본 연구에서는 에틸 아세테이트와 에테르, 부타놀을 추출용매로 하여 추출한 결과 TTCA는 에틸 아세테이트를 이용하여 추출하는 것이 가장 높은 회수율을 보였으나, TTCA와 thiocarbamide를 동시 추출할 경우 부타놀을 이용하여 추출하는 것이 가장 좋았다. 염석효과에 따른 회수율을 살펴본 결과 황산암모늄을 염석제로 사용할 경우 TTCA와 thiocarbamide 모두에서 회수율이 높았다. pH에 따른 회수율을 본 결과 산성일 경우에 TTCA와 thiocarbamide 모두에서 회수율이 높았다.

본 연구에서 얻은 결과를 이용하여 이황화탄소에 노출된 근로자들의 요중 대사물질에 관한 연구가 계속되어야 하며 이황화탄소의 중독예방의 실효를 위한 작업환경 평가시 작업장 내 유해물질의 환경모니터링과 생물학적 모니터링이 함께 이루어 질 수 있도록 해야 한다. 또한 thiocarbamide의 회수율을 높일 수 있는 전처리 방법에 대한 연구와 요중 TTCA와 thiocarbamide를 직접 분석할 수 있는 방법에 대한 연구가 계속 이루어져야 한다.

## V. 결 론

본 연구는 이황화탄소의 요중 대사물질인 TTCA와 thiocarbamide를 동시 분석한 선행연구의 제한점을 보완하기 위하여 이동상 및 고정상에 따른 최적의 HPLC 분석조건을 선정하고, 액체-액체 추출시 여러 용매를 이용하여 두 대사물질의 회수율을 비교 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 요중 이황탄소의 대사물질인 TTCA와 thio-

carbamide 를 분석하기 위해 이동상과 고정상의 5 가지 조건에서 비교한 결과 C<sub>8</sub> column과 C<sub>18</sub> column을 직렬로 연결한 후 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 아세토니트릴을 93.5대 6.5의 비율로 하여 0.7 ml/min 조건으로 하였을 때 분리도가 가장 좋았으며, TTCA의 검출한계는 0.17 µg/ml, thio-carbamide는 0.07 µg/ml 이었다.

2. 염석제에 따른 회수율을 본 결과 황산암모늄을 사용하였을 때 높은 회수율을 보였으며, 산성일 경우 회수율이 낮았다.
3. 추출용매에 따른 회수율을 살펴 본 결과 TTCA는 염석제로 황산암모늄을 사용하고 에틸아세테이트를 이용하여 추출시 회수율이 평균 90.4±11.3 % (mean±SD, n=16)로 가장 높았다. 그러나 thio-carbamide는 14.8±7.83(mean±SD, n=16) 이었다. 같은 조건에서 부타놀을 이용하여 추출시 TTCA는 49.6±17.7%(mean±SD, n=16)로 다소 낮았으나, thiocarbamide는 43.9±5.50%(mean±SD, n=16)로 향상되어 동시 정량시 적항하였다.
4. 액체-액체 추출시 분석시료의 정밀성을 평가한 결과 thiocarbamide는 염석제를 황산암모늄을 사용하고 부타놀로 추출시 전체 통합 변이계수 값이 0.03754, TTCA는 염석제를 황산암모늄을 사용하고 에틸 아세테이트로 추출시 통합 변이계수 값이 0.04082로서 정밀성이 다른 용매로 추출시보다 양호하게 나타났다.

본 연구 결과 요중 TTCA와 thiocarbamide의 분석 방법은. HPLC/UVD를 이용하여 C<sub>8</sub> column과 C<sub>18</sub> column을 직렬로 연결한 후 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 아세토니트릴을 93.5대 6.5의 비율로 하여 0.7 ml/min 조건으로 하였을 때 분리도가 가장 좋았으며, 소변의 pH를 산성으로 하고 황산암모늄을 과량 첨가한 후 부타놀로 2회 추출하여 요중 TTCA와 thio-carbamide의 추출율을 높일 수 있었다.

## REFERENCES

- 조영봉, 김치년, 안찬목. 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA)의 합성:이황화탄소 대사물질. 보건과학 논집 1992; 2: 61-69
- ACGIH. TLV'S and BEI threshold limit values for chemical Substances and physical agent and biological exposure indices. Cincinnati, OH:ACGIH:1988
- Antonin T, Miloslav, K. Thio-layer polarographic detector for the high-performance liquid chromatographic detection of thiourea derivatives. J Chromatogr 1985; 320: 127-133
- Baselt RC. Biological monitoring methods for industrial chemicals. Bio Pub 1980; 64-67
- Beauchamp RO Jr, Bus JS, Popp JS, Boreiko CJ, Goldberg L. A critical review of the literature on carbon disulfide toxicity. Crit Rev Toxicol 1983; 11: 169-278
- Brugnone F, Maranili G, Zotti S, Zanella I, De Paris P, Caroldi P, Betta A. blood concentration of carbon disulfide in "normal" subjects and in al-coholic subjects treated with disulfiram. Br J Ind Med 1992; 49: 658-663
- Cambell L, Jones AH, Wilson HK. Evaluation of occupational exposure to carbon disulfide by blood, exhaled air, and urine analysis. Am J Ind Med 1985; 8: 143-153
- Cox C, Lowry LK, Que Hee SS. Urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid as a biologic indicator of exposure to carbon disulfide derivation of a biological exposure Index. Appl Occup Environ Hyg 1992; 7: 672-676
- Cox C, Que Hee SS, Dennis WL. Urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid (TTCA) as the major urinary marker of carbon disulfide vapor

exposure in rats. *Toxicol Ind Health* 1996; 12(1): 81-92

Doorn RV, Vanhoorne M, Vertin PG, Henderson PT, Leijdkkers CM. Determination of thio compounds in urine of workers exposed to carbon disulfide. *Arch Environ Health* 1981; 36(6): 289-297

Hanninen H, Nurminen M, Tolonen M. Psychological test as a indicators of excessive exposure to carbon disulfide. *Scand J Psycho* 1978; 19: 163-174

Harashima S, Masuda Y. Quantitative determination of absorption and elimination of carbon disulfide through different channels in human body. *Int Arch fur Gewerbepathologie und Gewerbehygiene* 1962; 19: 236-269

Hashimoto A. Salting-out chromatography applied to separation and analysis of mixtures of thioureas and thioacetamide by high performance liquid chromatography. *Anal Chem* 1979; 51(3): 385-387

Lam CW, Distefano V. Characterization of carbon disulfide binding in blood and to other biological substances. *Toxicol Appl Pharmacol* 1986; 86: 235-242

Lee BL, Yang XF, New AL, Ong CN. Liquid chromatographic determination of urinary 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid, a biomarker of carbon disulphide exposure. *J Chrom B: Biomed Appl* 1995; 668(2): 265-272

Mancuso TF, Locke BZ. Carbon disulfide as a cause of suicide. epidemiological study of viscose rayon worker. *J Occup Med* 1972; 14: 595-6

Meuling WJ, Bragt PC, Braun CL. Biological monitoring of carbon. *Am J Ind Med* 1990; 17(2): 247-254

NIOSH. A NIOSH Technical report. Guideline for air sampling and analytical method development and evaluation, DHHS(NIOSH) pub. Cincinnati,

OH:NIOSH:1995.p.65-66

OSHA. Analytical methods manual. 2nd ed. Utah:OSHA:1990.p.3-4

Pergal M, Vukojevic N, Cirin-Popov N. Isolation and Identification of thiocarbamide. *Arch Environ Health* 1972; 25: 42-44

Riihimaki V, Kivisto H, Peltonen K, Helpio E, Aitio A. Assessment of exposure to carbon disulfide in viscose production workers from urinary 2-thiothiazolidine -4-carboxylic acid determinations. *Am J Ind Med* 1992; 22:85-97

Roh JH, Cho MH, Kim CN, Lee KJ, Won JU. Acid-labile bound carbon disulfide in whole blood of rats as a biological indicator for carbon disulfide exposure. *Appl Occup Environ Hyg* 1998; 13(4): 252-256

Roh JH, Kim CN, Lim NG, Chang JH, Cho YB. Simultaneous analysis of urinary 2-thiothiazolidine -4-carboxylic acid and thiocarbamide as a biological exposure index for carbon disulfide exposure. *Yonsei Med J* 1999; 40(3): 265-272

Seppalainen AM, Tolonen M. Neurotoxicity of long term exposure to carbon disulfide in the viscose rayon industry: A neurophysiological study. *Work Environ Health* 1974; 11: 145-153

Simon P, Nicot T, Dieudonne M. Dietary habits a non-negligible source of 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid and possible overestimation of carbon disulfide exposure. *Int Arch Occup Environ Health* 1994; 66: 85-90

U.S Department of Health and Human Services (DHHS). Third annual report on carcinogens. Washington DC:DHHS:1983

Tiller JR, Schilling RS, Morris JN. Occupational toxic factor in mortality from coronary heart disease. *Br Med J* 1968; 4: 407-411.

Tolonen M, Nurminen M, Hernberg S. Ten-year

coronary mortality of workers exposed to carbon disulfide. Scand J Work Environ Health 1979; 5: 109-144

Van Welie RT, Van Duyn P, Lamme EK, Jager P, Van Baar BL. Determination of tetrahydropt-alimide and 2-thiothiazolidine-4-carboxylic acid, urinary metabolites of the fungicide captan, in rats and humans. Int Arch Occup Environ Health 1991; 63(3): 181-186

Vasak V, Venecek M, Kinmelova B. The

assessment of the exposure of workers to carbon disulfide by the iodine azide test. Procov Lett 1963; 15: 145-156

Vertin PG. Incidence of cardiovascular disease dutch viscose rayon industry. J Occup Med 1978; 20: 346-350

WHO. carbon disulfide from environmetal health criteria 10. Geneva:WHO;1979;p.1-75

Zielhuis RL. Biological monitoring. Scand J Work Environ Health 1978; 4: 1-8