

Schwefelwasserstoff – Bestimmung von Thiosulfat in Urin mittels GC-MS

Biomonitoring-Methode

K. Jones¹
F. Garner¹
E. Eckert²
J. Müller²

T. Göen^{2,3,*}
A. Hartwig^{4,*}
MAK Commission^{5,*}

Keywords

Thiosulfat; Schwefelwasserstoff;
Biomonitoring; Urin; GC-MS

- ¹ *Methodenentwicklung, The HSE Science and Research Centre, Harpur Hill, Buxton (Derbyshire) SK17 9JN, Vereinigtes Königreich*
- ² *Methodenprüfung, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen*
- ³ *Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen*
- ⁴ *Vorsitz der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung Lebensmittelchemie und Toxikologie, Karlsruher Institut für Technologie (KIT), Adenauerring 20a, Geb. 50.41, 76131 Karlsruhe*
- ⁵ *Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn*

* E-Mail: T. Göen (thomas.goen@fau.de), A. Hartwig (andrea.hartwig@kit.edu), MAK Commission (arbeitsstoffkommission@dfg.de)

Abstract

The working group “Analyses in Biological Materials” of the Permanent Senate Commission for the Investigation of Health Hazards of Chemical Compounds in the Work Area developed and verified the presented biomonitoring method. The method described herein allows for the sensitive and sufficiently precise determination of thiosulfate in human urine as a marker of hydrogen sulfide exposure. Samples are derivatised using pentafluorobenzyl bromide and extracted into iodine ethyl acetate solution. Analysis is conducted by gas chromatography-mass spectrometry. Calibration is carried out with calibration standards prepared in pooled urine from individuals with no known exposure to hydrogen sulfide. The calibration standards are processed analogously to the samples to be analysed. The method is specific and sensitive, and its quantitation limit of 0.22 mg/l is sufficient to determine both occupational and background exposure to hydrogen sulfide.

Citation Note:

Jones K, Garner F, Eckert E, Müller J, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Schwefelwasserstoff – Bestimmung von Thiosulfat in Urin mittels GC-MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2022 Dez;7(4):Doc086. https://doi.org/10.34865/bi778306d7_4or

Manuskript abgeschlossen:
07 Nov 2019

Publikationsdatum:
19 Dez 2022

Lizenz: Dieses Werk ist
lizenziert unter einer [Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).



1 Kenndaten der Methode

Matrix	Urin		
Analytisches Messprinzip	Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)		
Parameter und entsprechender Arbeitsstoff			
Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Schwefelwasserstoff	7783-06-4	Thiosulfat	14383-50-7

Zuverlässigkeitskriterien

Thiosulfat

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 16,3\%$ bzw. $8,1\%$
	Streubereich	$u = 36,9\%$ bzw. $18,3\%$
bei einer dotierten Konzentration von 2,80 mg bzw. 22,4 mg Thiosulfat pro Liter Urin und n = 10 Bestimmungen		
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 23,1\%$ bzw. $20,1\%$
	Streubereich	$u = 64,1\%$ bzw. $55,8\%$
bei einer dotierten Konzentration von 2,80 mg bzw. 22,4 mg Thiosulfat pro Liter Urin und n = 5 Bestimmungen		
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 106-148\%$
	bei einer dotierten Konzentration von 22,4 mg Thiosulfat pro Liter Urin unter Verwendung von n = 10 Individualurinen	
Nachweisgrenze:	0,08 mg Thiosulfat pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,22 mg Thiosulfat pro Liter Urin	

2 Allgemeine Informationen zu Schwefelwasserstoff

Schwefelwasserstoff (H_2S ; Molmasse: 34,08 g/mol) ist ein toxisches Gas, das durch unspezifische und anaerobe bakterielle Reduktion von Sulfaten und schwefelhaltigen organischen Verbindungen gebildet wird. In der Natur kommt es in Rohöl, Erdgas, vulkanischen Gasen und heißen Quellen vor (ATSDR 2016). Es kann auch im Grundwasser vorkommen und aus stehenden oder verunreinigten Gewässern sowie aus Gülle oder Kohlegruben freigesetzt werden. Industriell wird Schwefelwasserstoff hauptsächlich bei der Reinigung von Erdgas und Raffineriegas gewonnen, bei der es als Nebenprodukt anfällt. Zudem wird es als Nebenprodukt bei der Zellstoff- und Papierherstellung sowie bei der Schwefelkohlenstoffherstellung gebildet und wird als Zwischenprodukt z. B. bei der Herstellung von Schwefelsäure verwendet (Jones 2014; WHO und IPCS 2003).

Der Mensch ist gegen Schwefelwasserstoff vor allem inhalativ exponiert, wobei das Gas rasch resorbiert wird. Schwefelwasserstoff wird über drei Stoffwechselwege metabolisiert: durch Oxidation zu Sulfat, durch Methylierung zu Methanthiol und Dimethylsulfid sowie durch Reaktion mit Metalloproteinen und disulfidhaltigen Proteinen. Der Hauptstoffwechselweg ist die Oxidation in der Leber, wodurch Thiosulfat gebildet wird, das in Sulfat umgewandelt und mit dem Urin ausgeschieden wird (Greim 2007). Über die Ausscheidungskinetik von Thiosulfat liegen nur wenige Daten vor. Thiosulfat ist 24 Stunden nach Ende der Exposition vollständig ausgeschieden, wobei die Urinkonzentrationen 5 bis 15 Stunden nach der Exposition am höchsten sind (Jones 2014; Kangas und Savolainen 1987). Auch die Methylierung stellt einen Entgiftungsweg dar.

Die Giftigkeit des Schwefelwasserstoffs beruht auf seiner Reaktion mit für den Stoffwechsel wichtigen Metalloproteinen (ATSDR 2016; WHO und IPCS 2003). So wird in den Mitochondrien die Cytochromoxidase, das finale Enzym in der Atmungskette, durch Schwefelwasserstoff inhibiert. Dies unterbricht die Elektronentransportkette und beeinträchtigt dadurch die Zellatmung. Dies wirkt sich vor allem auf Nerven- und Herzgewebe aus, die aufgrund ihres hohen Sauerstoffbedarfs auf den aeroben Metabolismus angewiesen sind. Der Sauerstoffmangel im zentralen Nervensystem kann zu Bewusstlosigkeit oder sogar zum Tod durch Atemstillstand führen (WHO und IPCS 2003).

Schwefelwasserstoff hat eine sehr niedrige Geruchsschwelle (0,008 ml/m³), allerdings geht die Geruchswahrnehmung bei Konzentrationen oberhalb von 150–250 ml/m³ verloren (WHO 2000). Dies trägt zur Gefährdung durch hohe Konzentrationen bei, da die Exposition von den Betroffenen olfaktorisch gegebenenfalls nicht wahrgenommen wird. Die Kommission hat für Schwefelwasserstoff einen MAK-Wert von 5 ml/m³ (5 ppm; Spitzenbegrenzung I, Überschreitungsfaktor 2) abgeleitet. Details zur toxikologischen Bewertung können den entsprechenden Dokumentationen der Kommission entnommen werden (Greim 2007; Hartwig 2010).

Die hier dargestellte Methode ermöglicht sowohl die Erfassung einer beruflichen Exposition als auch der allgemeinen Hintergrundbelastung. Die Thiosulfatkonzentrationen im Urin von Personen ohne bekannte Exposition gegen Schwefelwasserstoff liegen im einstelligen mg/l-Bereich (Chwatko und Bald 2009; Kangas und Savolainen 1987). Bei akuten Vergiftungen mit sofortigem Todeseintritt lässt sich in der Regel kein Thiosulfat im Urin nachweisen. In diesen Fällen kann aber Thiosulfat im Blut als Biomarker herangezogen werden (siehe Abschnitt 12). Bei verzögertem Todeseintritt können Thiosulfatwerte bis zu 137 mg/l Urin gemessen werden (Kage et al. 2002).

Daten zu Thiosulfatkonzentrationen im Urin der beruflich nicht belasteten Allgemeinbevölkerung sowie im Urin von Arbeitern nach beruflicher Exposition (zum Teil mit Todesfolge) sind exemplarisch in Tabelle 1 dargestellt.

Tab. 1 Thiosulfatkonzentrationen in Urin

Kollektiv (Personenanzahl n)	Probenahmezeitpunkt	Thiosulfatkonzentration	Literatur
Hintergrundbelastung, Finnland (29)	–	2,9 ± 2,5 mg/g Kreatinin ^{a)}	
Probandenstudie, Finnland (1)	15 h nach Exposition	29,7 mg/g Kreatinin	Kangas und Savolainen 1987
H ₂ S-Exposition; Abwasserbehandlung in der Fell-/Pelzverarbeitung, Finnland (4)	15 h nach Exposition	5–60 mg/g Kreatinin ^{b)}	
Hintergrundbelastung, Polen (13)	–	1,35–4,85 mg/g Kreatinin	Chwatko und Bald 2009
H ₂ S-Exposition; Reinigungsarbeiten in einem Fischbrutbetrieb, USA (1)	Tag 1 nach Einlieferung ins Krankenhaus	78 mg/g Kreatinin (überlebender Arbeiter)	Nikkanen und Burns 2004
H ₂ S-Exposition; Sickerwassergrube einer Abfalldéponie, Japan (2)	2 h nach Exposition	29,4 mg/l (überlebender Arbeiter)	Kage et al. 2002
	2 h nach Exposition	137 mg/l (Todeseintritt nach 22 d)	
H ₂ S-Exposition; Sickerwassergrube einer Abfalldéponie, Japan (2)	–	< BG–0,90 mg/l (sofortiger Todeseintritt)	
H ₂ S-Exposition; Papierrecycling, Japan (2)	6 h nach Exposition	13,5–48,2 mg/l (überlebende Arbeiter)	Kage et al. 1997
H ₂ S-Exposition; Papierrecycling, Japan (2)	15 h nach Exposition	< BG–43,7 mg/l (überlebende Arbeiter)	
H ₂ S-Exposition; Tierkörperverwertungsanlage, UK (2)	9 h nach Exposition	36,6 mg/l (überlebender Arbeiter)	Jones 2014
	unbekannt	11,2 mg/l (überlebender Arbeiter)	
H ₂ S-Exposition; Biogasanlage, UK (1)	–	< BG (sofortiger Todeseintritt)	Jones 2014

BG: Bestimmungsgrenze

^{a)} MW ± SD

^{b)} aus Diagramm abgelesen

3 Grundlage des Verfahrens

Das Verfahren zur Bestimmung von Thiosulfat in Urin basiert auf einer Methode von Kage et al. (1991). Die Urinproben werden mit Pentafluorbenzylbromid derivatisiert und in eine Iod-Ethylacetat-Lösung extrahiert, gefolgt von einem Waschschrift mit Wasser. Dabei wird aus dem Thiosulfat durch Alkylierung und Oxidation Bis(pentafluorbenzyl)-disulfid gebildet, das mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie quantifiziert wird. Die Kalibrierung erfolgt mit Kalibrierstandards, die in Poolurin von Personen ohne bekannte Exposition gegen Schwefelwasserstoff angesetzt werden. Die Kalibrierstandards werden analog zu den zu analysierenden Proben aufgearbeitet.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- Gaschromatograph mit Massenspektrometer (z. B. Agilent 6890 mit Agilent 5973, Agilent Technologies Germany GmbH & Co. KG, Waldbronn)
- Kapillargaschromatographische Säule: Zebron™ ZB-WAXplus™, 30 m × 0,32 mm × 1,0 µm (z. B. Phenomenex Ltd. Deutschland, Aschaffenburg)
- Gefriertrocknungsanlage (z. B. Cole-Parmer Instrument Company, LLC, Saint Neots, Vereinigtes Königreich)
- Zentrifuge (z. B. Heraeus Deutschland GmbH & Co. KG, Hanau)
- Vortex-Mischer (z. B. Whirlimixer™, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- Taumelrollenmischer (z. B. Adelab Scientific, Thebarton, Australien)
- Analysenwaage (z. B. Nr. AA-200DS, BDH Prolabo, VWR International GmbH, Darmstadt)
- Verschiedene Multipipetten® mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Mechanische Luftpolsterpipette mit 200-µl-Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Verschiedene Bechergläser (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- 5-ml-, 10-ml-, 20-ml- und 100-ml-Messkolben aus Glas (z. B. BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Pyrex-Röhrchen (100 × 16 mm) mit Schraubverschlüssen aus Bakelit, PTFE-kaschiert (z. B. Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- 10-ml-Gläschen mit Gummistopfen und Bördelkappen aus Aluminium (z. B. Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- 12-mm-Bördelgläschen mit Inserts und Aluminiumbördelkappen mit Gummisepten (z. B. Chromatography Direct Ltd, Runcorn, Vereinigtes Königreich)
- Urinbecher aus Polypropylen (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)

4.2 Chemikalien

Wenn nicht anders angegeben, sind alle genannten Chemikalien mindestens in p. a.-Qualität zu verwenden.

- Aceton, HPLC-Qualität (z. B. Nr. 103725, Merck KGaA, Darmstadt)
- L(+)-Ascorbinsäure (z. B. Nr. 100468, Merck KGaA, Darmstadt)
- Ethylacetat, für die Gaschromatographie (z. B. Nr. 100789, Merck KGaA, Darmstadt)
- Iod, sublimiert für die Analyse, EMSURE® (z. B. Nr. 104761, Merck KGaA, Darmstadt)
- 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzylbromid (PFBBBr) (z. B. Nr. 841643, Merck KGaA, Darmstadt)
- Natriumchlorid, zur Analyse (z. B. Nr. 10092740, Fisher Scientific GmbH, Schwerte)

- Natriumthiosulfat-Lösung (0,1 mol/l \approx 15,8 g/l; 11,2 g Thiosulfat/l) (z. B. Nr. 109147, Merck KGaA, Darmstadt)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q Direct Wasseraufbereitungssystem, Merck KGaA, Darmstadt)
- Helium 5.0 (z. B. Linde GmbH, Pullach)
- Urin von Personen ohne eine bekannte Exposition gegen Schwefelwasserstoff

4.3 Lösungen

- Ascorbinsäurelösung (35,2 g/l; 200 mmol/l)
352 mg Ascorbinsäure werden mit Hilfe eines Wägeschiffchens eingewogen und mit hochreinem Wasser quantitativ in einen 10-ml-Messkolben überführt. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
Die Ascorbinsäurelösung kann bei Raumtemperatur für sechs Monate gelagert werden.
- Iodlösung (3,17 g/l; 25 mmol/l)
317 mg Iodsplitter werden mit Hilfe eines Wägeschiffchens einwogen und mit Ethylacetat quantitativ in einen 100-ml-Messkolben überführt. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Ethylacetat aufgefüllt.
Die Iodlösung wird arbeitstäglich frisch hergestellt.
- Natriumchloridlösung (50 g/l, 5 Gew.-%)
500 mg Natriumchlorid werden mit Hilfe eines Wägeschiffchens eingewogen und mit hochreinem Wasser quantitativ in einen 10-ml-Messkolben überführt. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
Die Natriumchloridlösung kann bei Raumtemperatur für sechs Monate gelagert werden.
- PFBBBr-Lösung (5,22 g/l; 20 mmol/l)
Unter einem Laborabzug werden 60 μ l PFBBBr (\approx 104 mg) in einen 20-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird bis zur Markierung mit Aceton aufgefüllt.
Die PFBBBr-Lösung wird arbeitstäglich frisch hergestellt.

4.4 Kalibrierstandards

- Natriumthiosulfat-Dotierlösung (79,05 mg/l \approx 56,1 mg Thiosulfat/l; 500 μ mol/l)
25 μ l der Natriumthiosulfat-Lösung (0,1 mol/l) werden in einen 5-ml-Messkolben pipettiert und dieser wird anschließend bis zur Markierung mit Poolurin aufgefüllt.
Die Natriumthiosulfat-Dotierlösung wird arbeitstäglich frisch hergestellt.

Die Kalibrierstandards werden durch Dotieren von Poolurin von Personen ohne bekannte Exposition gegen Schwefelwasserstoff hergestellt. Dazu wird die Dotierlösung gemäß dem in [Tabelle 2](#) angegebenen Pipettierschema in Pyrex-Röhrchen pipettiert und mit Poolurin versetzt. Die Aufarbeitung und Analyse der Kalibrierlösungen erfolgt analog zu den Urinproben gemäß [Abschnitt 5](#) und [6](#).

Tab.2 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von Thiosulfat in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung [μ l]	Urin [μ l]	Thiosulfat [mg/l]
1	0	200	0
2	20	180	5,61

Tab.2 (Fortsetzung)

Kalibrierstandard	Dotierlösung [µl]	Urin [µl]	Thiosulfat [mg/l]
3	40	160	11,2
4	80	120	22,4
5	120	80	33,6
6	160	40	44,9
7	200	0	56,1

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in verschließbaren Kunststoffgefäßen gesammelt. Die Proben sollten unmittelbar nach der Probenahme, möglichst bei -80 °C , eingefroren und innerhalb von zwei Wochen analysiert werden.

5.2 Probenaufbereitung

Die Urinproben werden auf Raumtemperatur gebracht und durchmischt. 200 µl Urin werden in Pyrex-Röhrchen pipettiert und mit 50 µl Ascorbinsäurelösung (35,2 g/l) und 50 µl der 5%igen Natriumchloridlösung versetzt. Unter dem Laborabzug werden zu jeder Probe 500 µl PFBBr-Lösung pipettiert. Die Röhrchen werden verschlossen und die Proben auf einem Vortex-Mischer durchmischt. Unter dem Laborabzug werden 2 ml Iodlösung (3,17 g/l) in die Röhrchen pipettiert, die anschließend wieder verschlossen und auf dem Vortex-Mischer durchmischt werden. Die Proben werden für fünf Minuten bei $1260 \times g$ zentrifugiert. Anschließend werden die Proben zur Derivatisierung für eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach der Derivatisierung werden zu jeder Probe 2 ml hochreines Wasser hinzugefügt und die Proben für 20 min auf einem Taumelrollenmischer gemischt und erneut zentrifugiert ($1260 \times g$, 5 min). Daraufhin werden 200 µl des Überstands in Bördelgläschen pipettiert, die anschließend verschlossen werden.

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytische Bestimmung erfolgte an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einem Gaschromatographen mit Massenspektrometer.

6.1 Gaschromatographie

Kapillarsäule:	Stationäre Phase:	100 % Polyethylenglycol
	Länge:	30 m
	Innendurchmesser:	0,32 mm
	Filmdicke:	1,0 µm
Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur 100 °C , 1 min halten, Anstieg mit 12 °C/min auf 240 °C , 3 min bei Endtemperatur
	Injektor:	220 °C
	Transfer-Line:	230 °C
Trägergas:	Helium	
	Flussrate:	1,2 ml/min, konstant
Injektion:	Injektionsvolumen:	1 µl, splitlos

6.2 Massenspektrometrie

Ionisierung:	Positive Elektronenstoßionisierung (EI+)
Ionisierungsenergie:	70 eV
Quellentemperatur:	230 °C
Quadrupoltemperatur:	150 °C
Solvent delay:	2 min
Detektionsmodus:	Single Ion Monitoring (SIM)
Ionenspur:	m/z 426
Retentionszeit:	13,1 min

Sämtliche Einstellungen sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender individuell angepasst werden. Die angegebenen Parameter können daher lediglich als Orientierungshilfe herangezogen werden.

7 Analytische Bestimmung

1 µl der aufgearbeiteten Urinprobe (siehe [Abschnitt 5.2](#)) wird in das GC-MS-System injiziert. Alle Proben werden in Doppelbestimmung gemessen und der Mittelwert dieser Messungen zur Ergebnisausgabe verwendet. Die Identifizierung des Analyten erfolgt anhand der spezifischen Ionenspur und der Retentionszeit. Die in [Abschnitt 6.2](#) angegebene Retentionszeit kann nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten des Analyten zu überzeugen. Exemplarische Chromatogramme sind in [Abbildung 1](#) dargestellt.

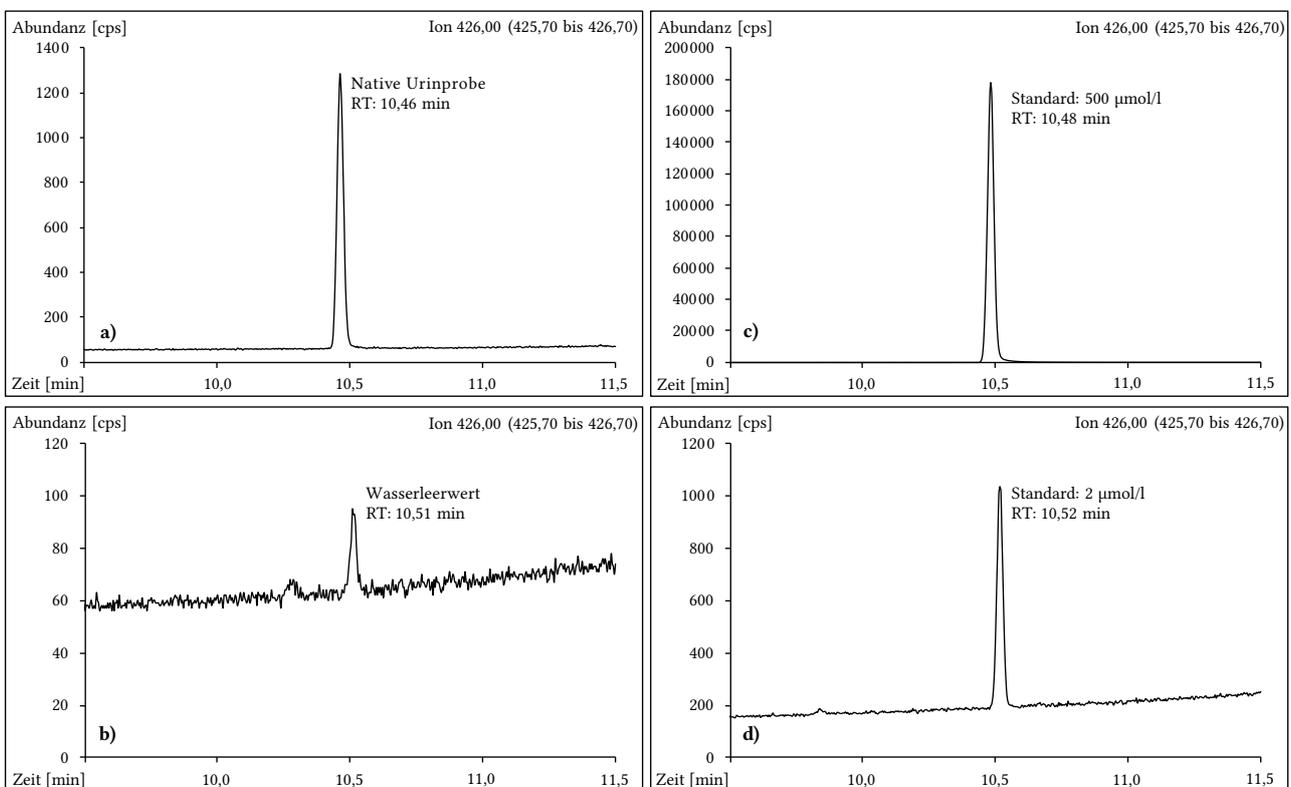


Abb. 1 Chromatogramm a) einer nativen Urinprobe, b) eines Wasserleerwertes, c) eines mit 500 µmol Thiosulfat/l dotierten Standards sowie d) eines mit 2 µmol Thiosulfat/l dotierten Standards

8 Kalibrierung

Kalibrierstandards werden wie unter [Abschnitt 4.4](#) beschrieben arbeitstäglich frisch hergestellt, analog zu den Urinproben aufgearbeitet (siehe [Abschnitt 5.2](#)) und analysiert (siehe [Abschnitt 6](#)). Die Kalibriergerade wird erstellt, indem die Peakhohle des Analyten gegen die jeweilige Konzentration der Kalibrierlösung aufgetragen wird. [Abbildung 2](#) zeigt beispielhaft eine Kalibriergerade für die Bestimmung von Thiosulfat in Urin.

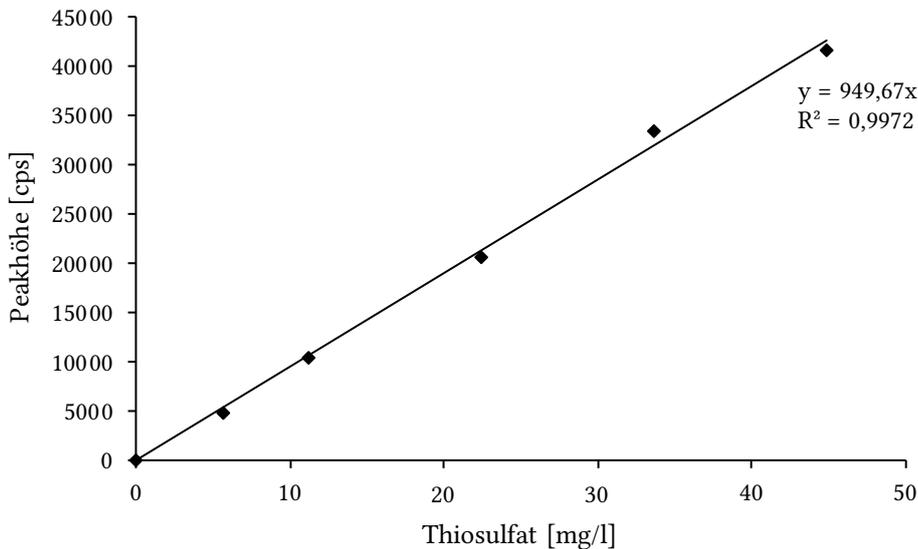


Abb. 2 Kalibriergerade für die Bestimmung von Thiosulfat in Urin

9 Berechnung der Analyseergebnisse

Die Berechnung der Analyseergebnisse erfolgt mit Hilfe der Kalibrierfunktion. Die Höhle des jeweiligen Analytpeaks wird in die zur Analysenserie gehörende Kalibrierfunktion eingesetzt und der Analytgehalt in mg/l Urin berechnet. Wenn ein Ergebnis den maximalen Kalibrierbereich (56,1 mg/l) überschreitet, muss die Probe mit hochreinem Wasser verdünnt, erneut aufgearbeitet und analysiert werden. Der Verdünnungsfaktor muss bei der Berechnung des Endergebnisses berücksichtigt werden.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesarztekkammer und den Angaben in dem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitel verfahren (Bader et al. 2010; Bundesarztekkammer 2014).

Zur Qualitätssicherung der Analyseergebnisse werden in jeder Analysenserie Qualitätskontrollproben parallel zu den Proben aufgearbeitet und analysiert. Da Kontrollmaterialien derzeit kommerziell nicht erhältlich sind, muss das Material selbst hergestellt werden. Hierzu wird Poolurin von Personen ohne bekannte Exposition gegen Schwefelwasserstoff mit 22,4 mg Thiosulfat/l dotiert. 5-ml-Aliquote der Qualitatskontrollprobe werden in 10-ml-Gläschen pipettiert. Für die Methodenentwicklung wurden diese Aliquote gefriergetrocknet und bei -20 °C gelagert. Vor der Verwendung wurden die Lyophilisate in 5 ml hochreinem Wasser wiederaufgenommen. Jeweils zwei Qualitätskontrollproben wurden nach den Kalibrierstandards und nach jeder fünften Probe gemessen.

11 Beurteilung des Verfahrens

Die Zuverlässigkeit des Verfahrens wurde durch eine umfassende Validierung sowie durch Nachstellung und Prüfung der Methode in einem zweiten, unabhängigen Labor bestätigt.

11.1 Präzision

Zur Bestimmung der Präzision wurden zehn Urinproben von Personen ohne bekannte Exposition gegen Schwefelwasserstoff mit 22,4 mg Thiosulfat/l (200 µmol/l) dotiert. Zudem wurden zehn mit 2,8 mg Thiosulfat/l (25 µmol/l) dotierte Qualitätskontrollproben verwendet.

Präzision in der Serie

Für die Bestimmung der Präzision in der Serie wurden diese Proben aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse sind in [Tabelle 3](#) dargestellt.

Tab.3 Präzision in der Serie für die Bestimmung von Thiosulfat in Urin (n=10)

Dotierte Konzentration [mg/l]	Gemessene Konzentration [mg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
2,80 (bei -20°C eingefroren)	1,15	16,3	36,9
22,4 (gefriergetrocknet)	17,1	8,1	18,3

Präzision von Tag zu Tag

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurden fünf Analysenserien (zehn Proben pro Serie an fünf verschiedenen Tagen) aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse sind in [Tabelle 4](#) dargestellt.

Tab.4 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von Thiosulfat in Urin (n=5)

Dotierte Konzentration [mg/l]	Gemessene Konzentration [mg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
2,80 (bei -20°C eingefroren)	1,38	23,1	64,1
22,4 (gefriergetrocknet)	19,8	20,1	55,8

11.2 Richtigkeit

Zur Bestimmung der Richtigkeit wurden Urinproben von Personen ohne bekannte Exposition gegen Schwefelwasserstoff verwendet. Jeweils drei Aliquote der zehn Individualurine wurden mit 22,4 mg Thiosulfat pro Liter (200 µmol/l) dotiert (siehe [Tabelle 5](#)). Anschließend wurden die Proben aufgearbeitet und analysiert. Die mittlere relative Wiederfindung lag nach Abzug von Leerwerten zwischen 106 % und 148 %.

Tab.5 Relative Wiederfindungsraten von Thiosulfat in Individualurinen (n=3)

Urin	Kreatinin [g/l]	Relative Wiederfindung r [%]	
		Mittelwert	Bereich der Mittelwerte
1	0,252	121	113–126
2	0,630	112	107–115
3	0,943	106	101–113
4	1,222	134	129–139
5	1,455	106	103–112

Tab.5 (Fortsetzung)

Urin	Kreatinin [g/l]	Relative Wiederfindung r [%]	
		Mittelwert	Bereich der Mittelwerte
6	1,710	148	132–160
7	2,114	147	140–159
8	2,523	120	90–153
9	2,811	124	77–150
10	3,546	114	95–123

11.3 Matrixeffekte

Zur Überprüfung von Matrixeinflüssen wurde von den Prüfern der Methode die Kalibrierung sowohl in Wasser als auch in Urin (Abbildung 3) durchgeführt. Dabei wurde zur Quantifizierung die Fläche der Thiosulfat-Peaks verwendet. Die in Wasser bzw. in Urin angesetzten Kalibriergeraden wiesen unterschiedliche Steigungen auf, so dass in Urin-matrix kalibriert werden muss, um die Thiosulfatkonzentration in Urin korrekt zu bestimmen.

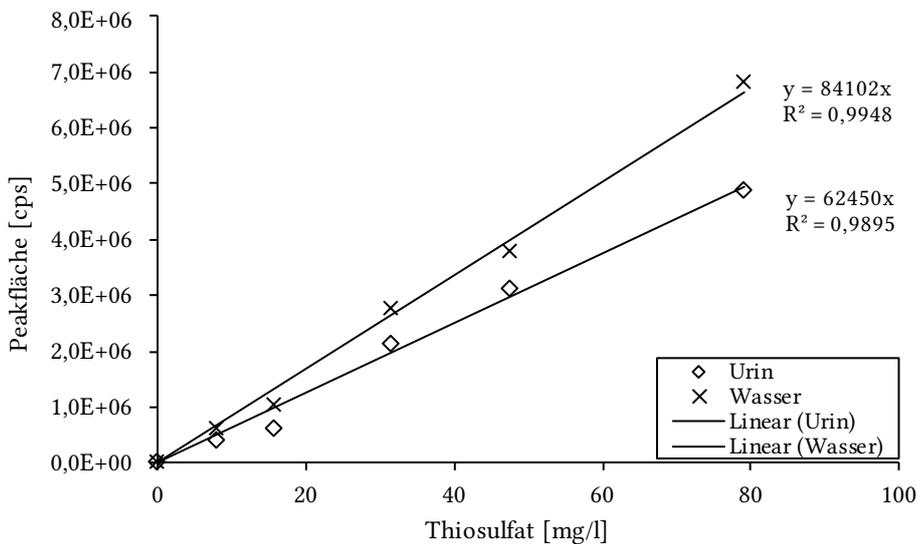


Abb.3 In Wasser bzw. Urin angesetzte Kalibriergeraden

11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

Die Nachweisgrenze wurde aus dem dreifachen Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde entsprechend aus dem zehnfachen Signal/Rausch-Verhältnis ermittelt. Die berechneten Werte sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tab.6 Nachweis- und Bestimmungsgrenze für die Bestimmung von Thiosulfat in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [mg/l]	Bestimmungsgrenze [mg/l]
Thiosulfat	0,08	0,22

11.5 Störeinflüsse

Die Stabilität von Thiosulfat in Realproben wurde nicht untersucht. Während der Methodenentwicklung wurden dotierte Proben bei -80°C eingefroren. Unter diesen Lagerungsbedingungen war das Thiosulfat über einen Zeitraum von zwei Wochen stabil. Es empfiehlt sich deshalb, die Urinproben unmittelbar nach Erhalt möglichst bei -80°C zu lagern und die Proben innerhalb von zwei Wochen zu analysieren. Für die lyophilisierten Qualitätskontrollproben (siehe [Abschnitt 10](#)) konnte gezeigt werden, dass sie bei -20°C für mindestens drei Wochen stabil sind.

Bei der externen Methodenprüfung wurden die Thiosulfatstandards frisch angesetzt, im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt und innerhalb einer Woche verwendet. Bei dieser Vorgehensweise ergaben sich geringere relative Standardabweichungen für die Präzision in der Serie, sie lagen für eine dotierte Konzentration von $11,2\text{ mg/l}$ bzw. $44,8\text{ mg/l}$ bei $8,66\%$ bzw. $4,36\%$.

12 Diskussion der Methode

Die hier beschriebene Methode ermöglicht die selektive und sensitive Quantifizierung von Thiosulfat in Urin. Die Methode weist einen linearen Arbeitsbereich bis $56,1\text{ mg Thiosulfat/l Urin}$ ($500\text{ }\mu\text{mol/l}$) auf. Im Vergleich zu der von Jones (2014) veröffentlichten Methode wird bei der hier vorgestellten Methode nach der Derivatisierung Wasser zugegeben, damit überschüssiges Derivatisierungsreagenz abreagiert und die Lebensdauer der Säule verlängert wird. Zudem ermöglicht die hier vorgestellte Methode einen größeren Probendurchsatz und weist eine höhere Empfindlichkeit auf.

Die Präzisionsdaten der Methode könnten durch Verwendung eines geeigneten internen Standards verbessert werden. Die von Kage et al. (1997) beschriebene und von den Entwicklern dieser Methode getestete Verwendung von 1,3,5-Tribrombenzol (Jones 2014) hat sich als nicht optimal herausgestellt, da die Substanz Einflüsse während der Extraktions- und Derivatisierungsschritte nicht widerspiegelt. Zudem kam es durch die Verwendung von 1,3,5-Tribrombenzol zu keiner Verbesserung der Präzisionsdaten. Darüber hinaus wurde Natriumthiosulfat- ^{34}S -Pentahydrat als interner Standard getestet, aber aufgrund eines Problems mit der Stabilität des Standards von der weiteren Verwendung abgesehen.

Laut den Entwicklern der Methode eignet sich die Methode auch für die Bestimmung von Thiosulfat in Blut, wobei Blutproben hauptsächlich bei Vergiftungen mit Todesfolge genommen werden. Um die Stabilität des Analyten zu gewährleisten, sollten Blutproben bis zur Aufarbeitung gekühlt gelagert werden. Die Bestimmung von Thiosulfat in Blut wurde nicht extern überprüft.

Anmerkungen

Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten (www.dfg.de/mak/interessenkonflikte) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

Literatur

- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (2016) Toxicological profile for hydrogen sulfide and carbonyl sulfide. Atlanta, GA: ATSDR. <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp114.pdf>, abgerufen am 27 Sep 2022
- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller KH, Scherer G, Angerer J (2010) Allgemeine Vorbemerkungen. Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. In: Angerer J, Hartwig A, Hrsg. Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe. Band 2: Analysen in biologischem Material. Weinheim: Wiley-VCH. S. 284–336. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. Dtsch Ärztebl 111(38): A1583–A1618

- Chwatko G, Bald E (2009) Determination of thiosulfate in human urine by high performance liquid chromatography. *Talanta* 79(2): 229–234. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2009.03.040>
- Greim H, Hrsg (2007) Schwefelwasserstoff. In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*. 43. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb778306d0043>
- Hartwig A, Hrsg (2010) Schwefelwasserstoff. In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*. 48. Lieferung. Weinheim: Wiley-VCH. Auch erhältlich unter <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb778306d0048>
- Jones K (2014) Case studies of hydrogen sulphide occupational exposure incidents in the UK. *Toxicol Lett* 231(3): 374–377. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.08.005>
- Kage S, Nagata T, Kudo K (1991) Determination of thiosulfate in body fluids by GC and GC/MS. *J Anal Toxicol* 15(3): 148–150. <https://doi.org/10.1093/jat/15.3.148>
- Kage S, Takekawa K, Kurosaki K, Imamura T, Kudo K (1997) The usefulness of thiosulfate as an indicator of hydrogen sulfide poisoning: three cases. *Int J Legal Med* 110(4): 220–222. <https://doi.org/10.1007/s004140050071>
- Kage S, Kashimura S, Ikeda H, Kudo K, Ikeda N (2002) Fatal and nonfatal poisoning by hydrogen sulfide at an industrial waste site. *J Forensic Sci* 47(3): 652–655. <https://doi.org/10.1520/jfs2001216>
- Kangas J, Savolainen H (1987) Urinary thiosulphate as an indicator of exposure to hydrogen sulphide vapour. *Clin Chim Acta* 164(1): 7–10. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(87\)90101-X](https://doi.org/10.1016/0009-8981(87)90101-X)
- Nikkanen HE, Burns MM (2004) Severe hydrogen sulfide exposure in a working adolescent. *Pediatrics* 113(4): 927–929. <https://doi.org/10.1542/peds.113.4.927>
- WHO (World Health Organization) (2000) *Air quality guidelines for Europe*. WHO Regional Publications, European Series, No. 91, 2. Aufl. Copenhagen: WHO Regional Office for Europe. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/107335/9789289013581-eng.pdf>, abgerufen am 07 Feb 2022
- WHO (World Health Organization), IPCS (International Programme on Chemical Safety) (2003) *Hydrogen sulfide: human health aspects*. Concise International Chemical Assessment Document, No. 53. Geneva: WHO. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42638/9241530537.pdf>, abgerufen am 25 Apr 2022