

Cyanwasserstoff, Cyanide und Cyanidbildner – Bestimmung von Thiocyanat in Plasma/Serum, Urin und Speichel mittels GC-MS

Biomonitoring-Methode

Keywords

Cyanwasserstoff, Cyanide, Thiocyanat, Plasma, Serum, Urin, Speichel, Gaschromatographie, Massenspektrometrie, Biomonitoring

G. Scherer¹
M. Piller¹
K. Riedel¹
M. Müller²

M. Lange²
T. Göen^{3,*}
A. Hartwig^{4,*}
MAK Commission^{5,*}

- ¹ Entwickler der Methode, ABF GmbH – Analytisch-biologisches Forschungslabor München, Semmelweisstraße 5, 82152 Planegg, Deutschland
- ² Prüfer der Methode, Institut für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Universitätsmedizin Göttingen, Waldweg 37 B, 37073 Göttingen, Deutschland
- ³ Leiter der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen, Deutschland
- ⁴ Vorsitzende 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, Deutschland
- ⁵ Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn, Deutschland

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

Abstract

Citation Note:

Scherer G, Piller M, Riedel K, Müller M, Lange M, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Cyanwasserstoff, Cyanide und Cyanidbildner – Bestimmung von Thiocyanat in Plasma/Serum, Urin und Speichel mittels GC-MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2020 Jul;5(2):Doc045. DOI: [10.34865/bi30204d5_2or](https://doi.org/10.34865/bi30204d5_2or)

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.

Thiocyanate (SCN⁻) is the main metabolite of cyanide and can thus be used as a biomarker of exposure to cyanide or cyanide-releasing compounds. Thiocyanate in plasma/serum, urine and saliva is a suitable biomarker especially for chronic exposure to low cyanide concentrations, such as those associated with smoking or found at some workplaces.

In the presented procedure thiocyanate is isolated from the matrix using liquid-liquid extraction in the presence of a phase transfer catalyst whilst it is simultaneously derivatised in the organic phase with PFBBr (2,3,4,5,6-pentafluorobenzylbromide). Analysis is then performed using GC-MS in NCI mode (negative chemical ionisation). This method allows the quantification of thiocyanate in occupationally exposed and non-exposed individuals.

Calibration standards are prepared in water and processed in the same way as the samples to be analysed. ¹³C, ¹⁵N-labelled potassium thiocyanate is used as internal standard.

Manuskript abgeschlossen:
14 Mai 2014

Publikationsdatum:
31 Jul 2020

License: This article is distributed under the terms of the Creative Commons 4.0 International License. See license information at <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



1 Kenndaten der Methode

Matrix Plasma/Serum, Urin und Speichel

Analytisches Messprinzip Gaschromatographie mit Massenspektrometrie (GC-MS)

Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Cyanwasserstoff	74-90-8		
Cyanidanionen	57-12-5		
Natriumcyanid	143-33-9		
Kaliumcyanid	151-50-8		
Chlorcyan	506-77-4	Thiocyanat	302-04-5
Oxalsäuredinitril	460-19-5		
Acetonitril	75-05-8		
Acrylnitril	107-13-1		

Zuverlässigkeitskriterien

Thiocyanat in Plasma/Serum

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,9\%, 2,9\%$ bzw. $7,2\%$
	Streubereich	$u = 13,6\%, 8,1\%$ bzw. $20,0\%$
	bei einer Konzentration von $0,75\text{ mg}$, $2,78\text{ mg}$ bzw. $10,7\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Plasma/Serum und $n = 5$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 3,4\%, 2,6\%$ bzw. $3,3\%$
	Streubereich	$u = 9,4\%, 7,2\%$ bzw. $9,2\%$
	bei einer Konzentration von $0,73\text{ mg}$, $2,93\text{ mg}$ bzw. $10,6\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Plasma/Serum und $n = 5$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 93,5\%, 92,9\%$ bzw. $93,6\%$
bei einer Konzentration von $0,73\text{ mg}$, $2,93\text{ mg}$ bzw. $10,6\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Plasma/Serum und $n = 5$ Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	$0,0005\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Plasma/Serum	
Bestimmungsgrenze:	$0,0015\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Plasma/Serum	

Thiocyanat in Urin

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 5,4\%, 4,4\%$ bzw. $5,3\%$
	Streubereich	$u = 15,0\%, 12,2\%$ bzw. $14,7\%$
	bei einer Konzentration von $0,27\text{ mg}$, $5,83\text{ mg}$ bzw. $38,0\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,4\%, 6,0\%$ bzw. $3,6\%$
	Streubereich	$u = 17,8\%, 16,7\%$ bzw. $10,0\%$
	bei einer Konzentration von $0,26\text{ mg}$, $5,81\text{ mg}$ bzw. $35,5\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 94,6\%, 94,1\%$ bzw. $90,5\%$
bei einer dotierten Konzentration von $0,56\text{ mg}$, $12,2\text{ mg}$ bzw. $38,3\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Urin und $n = 5$ Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	$0,0006\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	$0,0017\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Urin	

Thiocyanat in Speichel

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 4,1\%, 5,6\%$ bzw. $6,0\%$
	Streubereich	$u = 11,4\%, 15,6\%$ bzw. $16,7\%$
	bei einer Konzentration von $13,6\text{ mg}$, $92,1\text{ mg}$ bzw. 162 mg Thiocyanat pro Liter Speichel und $n = 5$ Bestimmungen	
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 8,2\%, 1,7\%$ bzw. $4,8\%$
	Streubereich	$u = 22,8\%, 4,7\%$ bzw. $13,3\%$
	bei einer Konzentration von $12,9\text{ mg}$, $91,6\text{ mg}$ bzw. 157 mg Thiocyanat pro Liter Speichel und $n = 5$ Bestimmungen	
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 97,9\%, 89,9\%$ bzw. $88,4\%$
bei einer dotierten Konzentration von $28,9\text{ mg}$, 113 mg bzw. 209 mg Thiocyanat pro Liter Speichel und $n = 5$ Bestimmungen		
Nachweisgrenze:	$0,0007\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Speichel	
Bestimmungsgrenze:	$0,0020\text{ mg}$ Thiocyanat pro Liter Speichel	

2 Allgemeine Informationen zu Thiocyanat

Thiocyanat (Rhodanid; SCN^-) ist das Detoxifizierungsprodukt des starken Zellatmungsgiftes Cyanid und kann daher als Biomarker für eine Cyanidexposition bzw. eine Exposition gegenüber Cyanidbildnern eingesetzt werden. Vor allem bei chronischer Exposition gegenüber Cyanidkonzentrationen, wie sie beispielsweise beim Rauchen und an einigen Arbeitsplätzen vorkommen, ist Thiocyanat in Plasma/Serum, Urin und Speichel ein geeigneter Biomarker.

Durch enzymatische Übertragung von Schwefel aus 3-Mercaptopyruvat (mittels 3-Mercaptopyruvat-Cyanid-Sulfurtransferase) oder aus Thiosulfat (mittels Rhodanase) erfolgt die Bildung von Thiocyanat aus Cyanid. Die Entstehung von Thiocyanat wird hauptsächlich durch die Rhodanase katalysiert (siehe Abbildung 1) (Eben und Lewalter 1988). Diese Umsetzung durch Rhodanase wird auch zur Entgiftung im Falle einer Cyanidintoxikation genutzt. Hierzu wird Natriumthiosulfat als Antidot injiziert bzw. infundiert (Eyer 2004).

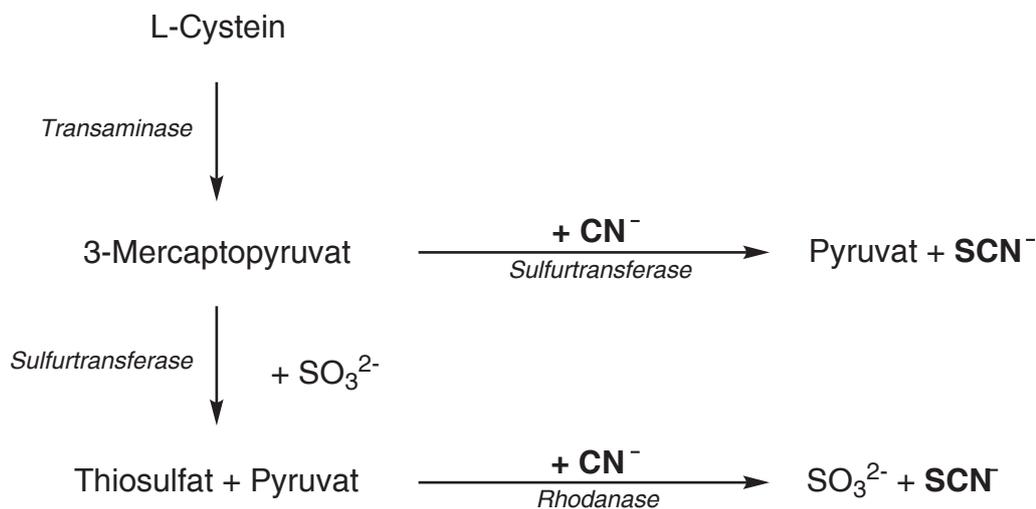


Abb. 1 Thiocyanatbildung aus Cyanid nach Eyer (2004)

Thiocyanat weist in Plasma/Serum, Urin und Speichel relativ lange Halbwertszeiten von 6–14 Tagen auf (Junge 1985; Pettigrew und Fell 1972), so dass es vor allem zur Erfassung einer chronischen Exposition gegenüber Cyanid geeignet ist. Im Falle einer akuten Cyanidexposition bietet sich auch die Bestimmung von Cyanid im Blut an (Eben und Lewalter 1988). Im Speichel sind die Thiocyanatkonzentrationen etwa 20-fach höher als im Plasma/Serum oder im Urin, was wahrscheinlich durch eine aktive Sezernierung des Thiocyanations in den Speicheldrüsen bewirkt wird. Die Speichelkonzentration an Thiocyanat ist aber auch vom Speichelfluss abhängig (Steinmaus et al. 2007) und unterliegt somit starken intra-individuellen Schwankungen.

Einatembare Blausäure, die sich aus Cyanidsalzen schon unter kohlen-sauren Bedingungen bildet, entsteht überall dort, wo mit Cyaniden umgegangen wird. Dies ist u. a. beim Einsatz galvanischer Bäder der Fall. Sie bildet sich außerdem aus Nitrilen wie Acetonitril, Acrylnitril sowie aus Cyanhydrinen und kann auch bei der Verbrennung und Pyrolyse stickstoffhaltiger Kunststoffe entstehen. Des Weiteren findet Blausäure bei der Schädlingsbekämpfung auf Schiffen Verwendung (Eben und Lewalter 1988).

Der Hauptstromrauch einer Zigarette enthält ca. 50–200 µg Blausäure (Rickert et al. 1983). Dementsprechend weisen Raucher gegenüber Nichtrauchern ca. zwei- bis dreifach höhere Thiocyanatkonzentrationen in Körperflüssigkeiten auf (siehe Tabelle 1). Bis in die 80er Jahre wurde Thiocyanat häufig zur Differenzierung von Rauchern und Nichtrauchern sowie als objektives Maß für die Tabakrauchexposition verwendet. Heute steht hierfür mit Cotinin ein wesentlich spezifischerer Biomarker zur Verfügung (Scherer et al. 2000). Die Spezifität von Thiocyanat als Marker für die Exposition gegenüber sehr geringen Cyanidmengen am Arbeitsplatz oder durch aktives Rauchen ist dadurch eingeschränkt, dass Cyanide oder Thiocyanat selbst in diversen Nahrungsmitteln vorkommen. So sind Cyanide in Form von Cyanoglycosiden Bestandteil von Mandeln, Nüssen, Hülsenfrüchten, Bambussprossen, Bohnen, Leinsamen und Bier. Des Weiteren sind Cyanide in Kernen von Steinobst vorhanden und gelangen beispielsweise in den Obstbranntwein. Vorgebildetes Thiocyanat ist ebenfalls ein Bestandteil von Kohl, Rüben, Senf und Milch (Baumeister et al. 1975; Bliss und O’Connell 1984; Ockene et al. 1987; Steinmaus et al. 2007). Diese natürlichen Quellen erschweren generell die Bewertung von Thiocyanat als Expositionsbiomarker.

Tab. 1 Thiocyanatkonzentrationen in Plasma, Urin und Speichel bei Nichtrauchern und Rauchern (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Nichtraucher	Raucher	Literatur
Thiocyanat in Plasma [mg/l]		
3,47 \pm 2,39 (n = 6815)	9,09 \pm 3,41 (n = 10 377)	Bliss und O'Connell 1984
3,16 \pm 1,75 (n = 1356)	10,10 \pm 3,22 (n = 5090)	Ockene et al. 1987
3,08 \pm 1,59 (n = 3274)	10,04 \pm 3,03 (n = 4553)	Ruth et al. 1991
Thiocyanat in Urin [mg/l]		
0,81 \pm 0,06 (n = 260)	4,34 \pm 0,65 (n = 66)	Steinmaus et al. 2007
0,77 (n = 1197)	4,71 (n = 351)	Jain 2013 a
Thiocyanat in Speichel [mg/l]		
70,9 \pm 44,2 (n = 242)	158 \pm 64,5 (n = 287)	Bliss und O'Connell 1984
75,5 (n = 100)	142 (n = 94)	Jarvis et al. 1984
97,0 (Median) (n = 207)	170 (Median) (n = 117)	Degiampietro et al. 1987

Neben der Rolle als Biomarker einer Cyanidexposition, kommt dem Thiocyanat auch eine toxikologische Bedeutung zu. Seit längerem ist bekannt, dass Thiocyanat die endogene Entstehung von kanzerogenen Nitrosaminen katalysieren kann (Ladd et al. 1984; Prue et al. 1980; Tsuda und Kurashima 1991). In den letzten Jahren wurde zudem die Rolle von Thiocyanat bei der Entstehung von Schilddrüsenfehlfunktionen, vor allem in Kombination mit einer erhöhten Perchlorat- und einer geringen Iodaufnahme diskutiert (Steinmaus et al. 2013). In den NHANES-Studien der USA (*National Health and Nutrition Examination Survey*) wurden seit 2001 die Konzentrationen an Thiocyanat, Perchlorat und Schilddrüsenhormonen gemessen, um diese Hypothese zu überprüfen (Bruce et al. 2013; Jain 2013 a, b; Steinmaus et al. 2007, 2013). Generell wurde festgestellt, dass der Effekt von Thiocyanat auf die Schilddrüsenfunktion zwar gering ist, in Kombination mit einer erhöhten Perchloratexposition und einer hierdurch reduzierten Iodaufnahme aber toxikologisch relevant sein kann.

Details zur toxikologischen Bewertung von Cyanwasserstoff, Cyaniden und Cyanidbildnern können den entsprechenden MAK-Begründungen der Kommission entnommen werden (siehe Tabelle 2). In Tabelle 2 sind Arbeitsstoffe aufgeführt, die u. a. zu einer Cyanidbelastung des Organismus und zu einer erhöhten Thiocyanatausscheidung mit dem Urin führen. Es ist allerdings zu beachten, dass die Kommission bei keinem der aufgeführten Arbeitsstoffe einen biologischen Beurteilungswert auf Basis des Thiocyanats abgeleitet hat. Dies ist vor allem der Tatsache geschuldet, dass das Thiocyanat, aufgrund ernährungsbedingter Hintergrundgehalte, einen eher unspezifischen Parameter darstellt.

Die in Tabelle 2 verwendeten Kürzel für die Einstufungen bzw. Markierungen sind in der von der Kommission herausgegebenen MAK- und BAT-Werte-Liste beschrieben (DFG 2019).

Tab. 2 Toxikologische Einstufung von Arbeitsstoffen, die zu einer Cyanidbelastung führen und die u. a. zu Thiocyanat verstoffwechselt werden

Arbeitsstoff	MAK ^{a)} [mg/m ³]	SchwGr ^{b)}	Hautres/Sens ^{c)}	KanzKat ^{d)}	MAK-Begründung
Cyanwasserstoff	2,1	C	H	–	Greim 2001
Cyanide (als CN ⁻)	2 E	C	H	–	Greim 2001
Natriumcyanid	3,8 E	C	H	–	Greim 2001
Kaliumcyanid	5,0 E	C	H	–	Greim 2001
Acetonitril	17	C	H	–	Hartwig und MAK Commission 2018
Acrylnitril	–	–	H/Sh	2	Greim 1999
3-Dimethylaminopropionitril	–	–	–	–	Greim 2004
Oxalsäuredinitril	11	D	H	–	Greim 2003; Hartwig und MAK Commission 2019
Cyanacrylsäuremethylester	9,2	D	–	–	Henschler 1979
Cyanacrylsäureethylester	–	–	–	–	Henschler 1979
Chlorcyan	–	–	–	–	Henschler 1973
Passivrauchen am Arbeitsplatz	–	–	–	1	Greim 1998

a) maximale Arbeitsplatz-Konzentration

b) Schwangerschaftsgruppe

c) Gefahr durch Hautresorption/Gefahr der Sensibilisierung

d) Kanzerogenitäts-Kategorie

3 Grundlage des Verfahrens

Das Thiocyanat wird durch Flüssig-Flüssig-Extraktion in Anwesenheit eines Phasentransferkatalysators aus der Matrix isoliert und gleichzeitig in der organischen Phase mit PFBBr (2,3,4,5,6-Pentafluorbenzylbromid) derivatisiert (siehe Abbildung 2). Die Analyse erfolgt anschließend mittels GC-MS im NCI-Modus (negative chemische Ionisation). Die Methode erlaubt die Quantifizierung von Thiocyanat bei beruflich belasteten und beruflich nicht belasteten Personen.

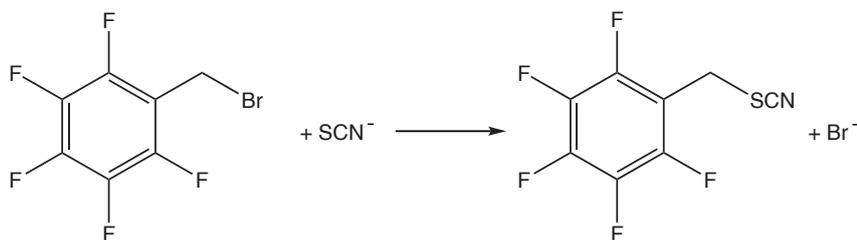


Abb. 2 Reaktion von Thiocyanat mit PFBBr zum Pentafluorbenzylthiocyanat

Die Kalibrierung erfolgt mit Kalibrierstandards, die in Wasser angesetzt und in gleicher Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben. Als interner Standard wird ein ¹³C,¹⁵N-markiertes Kaliumthiocyanat verwendet.

4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

4.1 Geräte

- GC-MS-System (z. B. Trace GC Ultra mit massenselektivem Detektor DSQ und TriPlus, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)
- Autosampler mit gekühltem Probensteller (z. B. Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)
- GC-Säule (z. B. Rxi-5ms, 25 m × 0,25 mm × 0,25 µm, Restek GmbH, Bad Homburg)
- Analysenwaage (z. B. Sartorius AG, Göttingen)
- Kühlzentrifuge (z. B. Rotanta 460 R, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen)
- Reagenzglasschüttler (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Vakuumzentrifuge (z. B. RC 10.22 Jouan, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich)
- Kolbenhubpipetten mit variabler Volumeneinstellung 10–100 µl, 100–1000 µl und 500–5000 µl mit den passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Verschiedene Multipipetten mit den dazugehörigen Combitips 1,25 ml, 2,5 ml und 5 ml (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- pH-Meter (z. B. SCHOTT AG, Mainz)
- Rollenmischer (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)
- Verschiedene Bechergläser (z. B. SCHOTT AG, Mainz)
- Crimp-Cap GC-Vials mit teflonkaschierten Bördekkappen (z. B. Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- 4-ml-Schraubgläschen mit Deckel (z. B. Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- 20-ml-Schraubgläschen mit Deckel (z. B. Klaus Ziemer GmbH, Langerwehe)
- 100-ml-Laborflaschen mit Gewinde (z. B. SCHOTT AG, Mainz)
- 250-ml-Weithalsflaschen (z. B. SCHOTT AG, Mainz)
- 10-ml- und 100-ml-Messkolben (z. B. SCHOTT AG, Mainz)
- Flaschenaufsatz-Dispenser (z. B. Dispensette® organic, 10 ml, BRAND GMBH + CO KG, Wertheim)
- Kalium-EDTA-Monovetten® zur Blutabnahme (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- S-Monovetten® zur Blutabnahme (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Salivetten® zur Speichelgewinnung (z. B. Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht)
- Urinbecher (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.

- Dichlormethan, Picograde® (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt, Nr. SO-1185-C011)
- Eisessig $\geq 99,0\%$, purum (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. 45740)
- Hexadecyltrimethylammoniumbromid (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. H9151)
- Methanol, HPLC grade (z. B. LGC Standards GmbH, Wesel, Nr. 3041)
- Natriumchlorid $\geq 99,5\%$ (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. S-9625)
- Natriumhydroxid-Plätzchen $\geq 98,0\%$ (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. 71690)
- 2,3,4,5,6-Pentafluorbenzylbromid (PFBBBr) $\geq 99,0\%$ (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. 17910)
- Toluol (z. B. LGC Standards GmbH, Wesel, Nr. 1350)
- Hochreines Wasser (z. B. Merck KGaA, Darmstadt, Nr. 1.16754.5000)
- Helium 5.0 (z. B. Linde AG, Pullach)
- Methan (z. B. Linde AG, Pullach)
- Kaliumthiocyanatlösung, 0,1 M (volumetrische Standardlösung) (z. B. Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nr. 35194)
- Kaliumthiocyanat (^{13}C , 99% ^{15}N , 98%+) (z. B. Eurisotop GmbH, Saarbrücken, Nr. CNLM-3952-0.5)

4.3 Lösungen

- Derivatisierungslösung

300 mg Hexadecyltrimethylammoniumbromid werden in ein 20-ml-Schraubgläschen eingewogen. 10 ml Dichlormethan und 3 ml Methanol werden dazugegeben und die Lösung wird schließlich mit 130 μl PFBBBr versetzt.

Die Lösung ist bei einer Lagerungstemperatur zwischen 2 °C und 8 °C mindestens vier Wochen verwendbar.

- Acetatpuffer (1 M)

In einem Becherglas werden 90 ml hochreines Wasser vorgelegt und genau 5,758 ml Eisessig hinzu pipettiert. Die Lösung wird mit Natriumhydroxid-Plätzchen auf pH 5,5 eingestellt und in einen 100-ml-Messkolben umgefüllt. Nach Auffüllen auf 100 ml mit hochreinem Wasser wird der Acetatpuffer zur Aufbewahrung in eine 250-ml-Weithalsflasche umgefüllt.

Der Puffer wird im Kühlschrank gelagert und ist bei einer Temperatur von 2 °C bis 8 °C mindestens zwölf Wochen verwendbar.

- Natriumchloridlösung (gesättigt)

50 g Natriumchlorid werden in eine 250-ml-Weithalsflasche eingewogen und in 100 ml hochreinem Wasser aufgenommen.

Die gesättigte Natriumchloridlösung wird bei Raumtemperatur gelagert und ist unter diesen Bedingungen mindestens zwölf Monate verwendbar.

4.4 Interner Standard (ISTD)

- ISTD-Stammlösung (1,5 mM \approx 149 mg SCN⁻ (¹³C,¹⁵N)/l)
Exakt 14,87 mg KSCN (¹³C,¹⁵N) werden in einen 100-ml-Messkolben eingewogen und in hochreinem Wasser gelöst. Der Kolben wird mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.
- ISTD-Dotierlösung (60 μ M \approx 5,95 mg SCN⁻ (¹³C,¹⁵N)/l)
4 ml der ISTD-Stammlösung werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert. Der Messkolben wird mit hochreinem Wasser bis zur Marke aufgefüllt.

Die ISTD-Lösungen werden bei 2 °C bis 8 °C gelagert. Die Stabilität der ISTD-Arbeitslösung sollte zu Beginn jeder neuen Analysenserie überprüft werden (siehe Abschnitt 8).

4.5 Kalibrierstandards

- Stammlösung (0,1 M KSCN \approx 5,81 g SCN⁻/l)
Die 0,1 M Kaliumthiocyanatlösung (5,81 g SCN⁻/l) wird als volumetrische Standardlösung gekauft.
Die Lösung wird bei 2 °C bis 8 °C gelagert und ist laut Herstellerangaben mindestens zwei Jahre stabil.
- Dotierlösung 1 (DL 1; 750 μ M KSCN \approx 43,6 mg SCN⁻/l)
75 μ l der Kaliumthiocyanat-Stammlösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Die Lösung wird mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Dotierlösung 2 (DL 2; 93,8 μ M KSCN \approx 5,45 mg SCN⁻/l)
1250 μ l der Dotierlösung 1 werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Die Lösung wird mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Dotierlösung 3 (DL 3; 5,86 μ M KSCN \approx 0,34 mg SCN⁻/l)
78,1 μ l der Dotierlösung 1 werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Die Lösung wird mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

Die Dotierlösungen werden bei 2 °C bis 8 °C gelagert und sind mindestens zwei Jahre stabil.

Kalibrierstandards im Konzentrationsbereich von 0,043 mg bis 43,6 mg Thiocyanat pro Liter werden in hochreinem Wasser nach dem in Tabelle 3 angegebenen Pipettierschema angesetzt. Als Leerwert wird hochreines Wasser mitgeführt. Die Kalibrierstandards werden für jede Analysenserie frisch hergestellt und bei 2 bis 8 °C gelagert.

Für die Kalibrierung in Speichel werden die Konzentrationen der Kalibrierstandards umgerechnet (Multiplikation mit Faktor 5), da das eingesetzte Probenvolumen bei Speichel nur 20 μ l beträgt, aber wie bei Plasma/Serum und Urin jeweils 100 μ l der Kalibrierstandards pipettiert werden. Die Aufarbeitung der Kalibrierstandards erfolgt analog zu den Proben (vgl. Abschnitt 5.2).

Tab. 3 Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards in Wasser

Kalibrierstandard	DL 1 [μl]	DL 2 [μl]	DL 3 [μl]	Wasser [μl]	Konz. Kalibrierstandard [$\text{mg SCN}^-/\text{l}$]	
					Plasma/Serum, Urin	Speichel
0 ^{a)}	–	–	–	1000	0	0
1	–	–	–	1000	0	0
2	–	–	125	875	0,043	0,213
3	–	–	250	750	0,085	0,425
4	–	–	1000	–	0,340	1,70
5	–	250	–	750	1,36	6,81
6	–	500	–	500	2,72	13,6
7	125	–	–	875	5,45	27,2
8	250	–	–	750	10,9	54,5
9	500	–	–	500	21,8	109
10	1000	–	–	–	43,6	218

^{a)} Aufarbeitung ohne Zusatz von ISTD

5 Probenahme und Probenaufbereitung

5.1 Probenahme

Plasma

Nach der Blutentnahme mit einer EDTA-Monovette wird die Probe für 20 bis 30 Minuten auf einem Rollenmischer gut durchmischt. Die Probe kann bis zur weiteren Aufarbeitung bei 4–6 °C für maximal 16 Stunden gelagert werden. Zur Plasmagewinnung wird die Blutprobe für fünf Minuten bei 1200 × g zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bis zur Analyse bei –20 °C eingefroren. Plasmaproben können bei –20 °C für 24 Monate ohne Analytverlust gelagert werden.

Serum

Zur Serumgewinnung wird nach der Blutentnahme mit S-Monovetten die vollständige Blutgerinnung abgewartet, was etwa 20 bis 30 Minuten dauert. Die Probe wird bei Raumtemperatur für 10 Minuten bei 1500 × g zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bis zur Analyse bei –20 °C eingefroren. Die Serumproben können bei –20 °C für 24 Monate ohne Analytverlust gelagert werden.

Urin

Die zur Urinsammlung verwendeten Polyethylenbecher werden vor der Probenahme mit einem Reinigungsmittel gespült, mit hochreinem Wasser nachgewaschen und trocknen gelassen. Die gewonnenen Urinproben werden in 1-ml-Aliquote aufgeteilt und bis zur Analyse bei –20 °C eingefroren. Die Urinproben können unter diesen Bedingungen sieben Jahre ohne Analytverluste gelagert werden.

Speichel

Für die Speichelgewinnung werden Speichelröhrchen mit Watterolle (z. B. Salivette®, Sarstedt AG & Co. KG, Nümbrecht) verwendet. Die Watterolle wird ein bis zwei Minuten im Mund bewegt, danach in das Röhrchen gegeben

und für 10 Minuten bei $3000 \times g$ zentrifugiert. Der so gewonnene Speichel sollte so bald wie möglich aufgearbeitet und analysiert werden, da es bei Lagerung des Speichels zu Minderbefunden kommen kann.

5.2 Probenaufbereitung

Tiefgefrorene Proben werden bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend auf dem Reagenzglasschüttler durchmischt.

100 μl Plasma/Serum oder Urin bzw. 20 μl Speichel werden in ein 4-ml-Schraubgläschen pipettiert. Es werden 300 μl hochreines Wasser, 25 μl Acetatpuffer, 50 μl der ISTD-Dotierlösung, 50 μl der gesättigten Natriumchloridlösung, 25 μl Toluol und 75 μl der Derivatisierungslösung hinzu pipettiert. Bei Speichelproben werden 400 μl anstelle von 300 μl hochreinem Wasser verwendet. Das 4-ml-Gläschen wird verschlossen und 30 Minuten auf dem Reagenzglasschüttler gut durchmischt. Danach werden zum Reaktionsgemisch 2 ml Toluol gegeben und es wird nochmals auf dem Reagenzglasschüttler für 5 Minuten geschüttelt. Anschließend wird die Probe bei Raumtemperatur 10 Minuten bei $2250 \times g$ zentrifugiert. 300 μl der Toluolphase werden in ein Mikrovial überführt.

Die Probe wird in einer Vakuumzentrifuge bei Raumtemperatur auf 150–200 μl eingengt (ca. 5 Minuten), um Reste des Dichlormethans aus der Derivatisierungslösung zu entfernen, die die Messung stören würden. Die Analyse erfolgt anschließend mittels GC-MS (NCI).

6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die analytischen Messungen erfolgen an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einem Gaschromatographen gekoppelt mit einem Massenspektrometer, wobei die Messungen im NCI-Modus erfolgen.

6.1 Gaschromatographie

Kapillarsäule:	Stationäre Phase:	Rxi-5ms
	Länge:	25 m
	Durchmesser:	0,25 mm
	Filmdicke:	0,25 μm
Detektor:	Massenselektiver Detektor	
Temperaturen:	Säule:	Ausgangstemperatur 50 °C, Anstieg mit 70 °C/min auf 270 °C, 3 min bei Endtemperatur
	Injektor:	220 °C
	Probenteller:	15 °C
Trärgas:	Helium 5.0	
	Fluss:	1 ml/min, konstant
	Injektionsvolumen:	1 μl , Split 1 : 20

6.2 Massenspektrometrie

Ionisationsart:	NCI mit Methan (2 ml/min)
Quellentemperatur:	150 °C
Interface-Temperatur:	270 °C
Detector gain:	300 000
Dwell time:	20 ms
Solvent Delay:	2,5 min
Detektionsmodus:	Selected Ion Monitoring (SIM) Modus

Die angegebenen Arbeitsbedingungen sollen lediglich als Orientierungshilfe dienen. Da die angeführten Parameter gerätespezifisch sind, müssen sie vom Anwender individuell eingestellt werden. Alle anderen Parameter sind nach Herstellerangaben zu optimieren.

7 Analytische Bestimmung

Die Identifizierung der gemessenen Substanzen erfolgt anhand ihrer Retentionszeiten und ihrer Ionenspuren (Tabelle 4). Pentafluorbenzylthiocyanat (PFBSCN) und der ISTD zeigen jeweils ein Massenfragment bei dem die markierten Atome im ISTD (N- und C-Atom beim Analyten sowie ¹⁵N- und ¹³C-Atom beim ISTD) noch vorhanden sind und das sowohl mit leichtem als auch mit schwerem Schwefelisotop vorkommt. Beim PFBSCN sind es die Fragmente mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von $m/z = 58$ und 60 und beim ISTD die Fragmente mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von $m/z = 60$ und 62 . Die Intensität des Fragments mit dem schwereren Schwefelisotop beträgt ungefähr 5,5 % der Intensität des Fragments mit dem leichteren Schwefelisotop und ist bei hohen Thiocyanatkonzentrationen nicht mehr zu vernachlässigen. Es hat sich aber gezeigt, dass es möglich ist, für das unmarkierte Thiocyanat das Fragment mit dem leichteren Schwefelisotop ($m/z = 58$) und für den internen Standard das Fragment mit dem schwereren Schwefelisotop ($m/z = 62$) auszuwerten. Das mitgemessene Fragment mit einem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis von $m/z = 60$ wird nur im Rahmen der Validierung benötigt.

Tab. 4 Retentionszeiten und Ionenspuren für die Bestimmung von Thiocyanat in Plasma/Serum, Urin oder Speichel

Analyt	Retentionszeit [min]	Ionenspur [m/z]
Thiocyanat	2,95	58, 60 ^{a)}
Thiocyanat (¹³ C, ¹⁵ N)	2,95	60 ^{a)} , 62

^{a)} wird nur für die Validierung benötigt

Die in Tabelle 4 angegebenen Retentionszeiten können nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten analytischen Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten der Substanzen zu überzeugen. Abbildungen 3 bis 5 zeigen exemplarisch Chromatogramme eines Raucherplasmas, eines Nichtraucherurins und eines Nichtraucherspeichels. Die Ionenspur $m/z = 60$ wird nur für die Validierung benötigt.

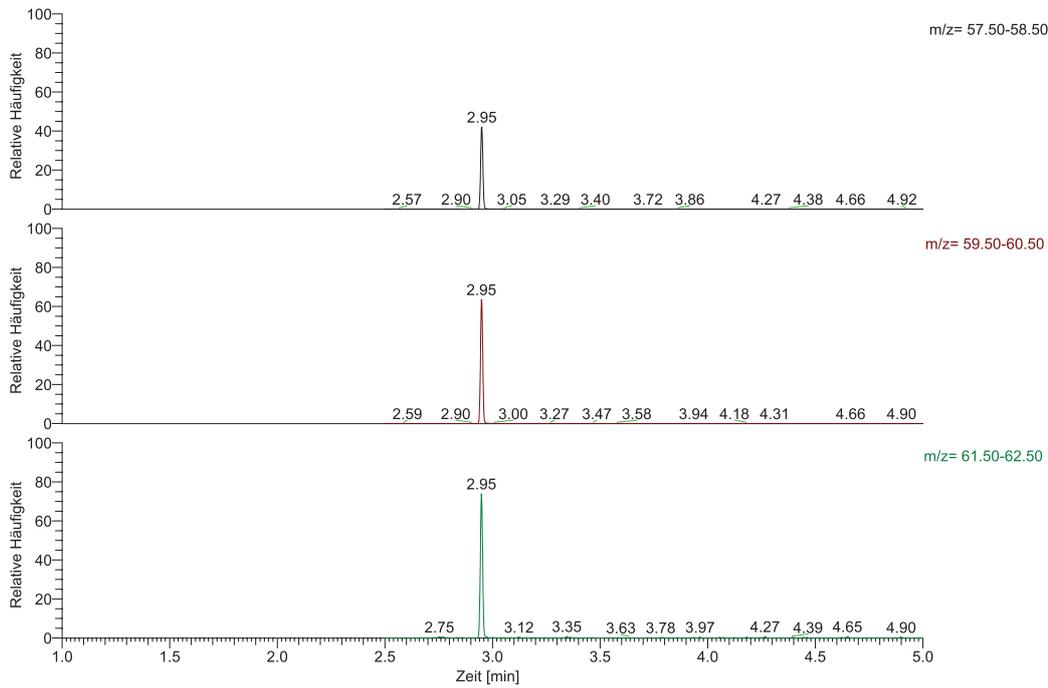


Abb. 3 Chromatogramm eines Raucherplasmas mit einer Thiocyanat-Konzentration von 205 $\mu\text{mol/l} \approx 120 \text{ mg/l}$ (SCN^- : $m/z = 58, 60$; $\text{SCN}^- (^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$: $m/z = 60, 62$)

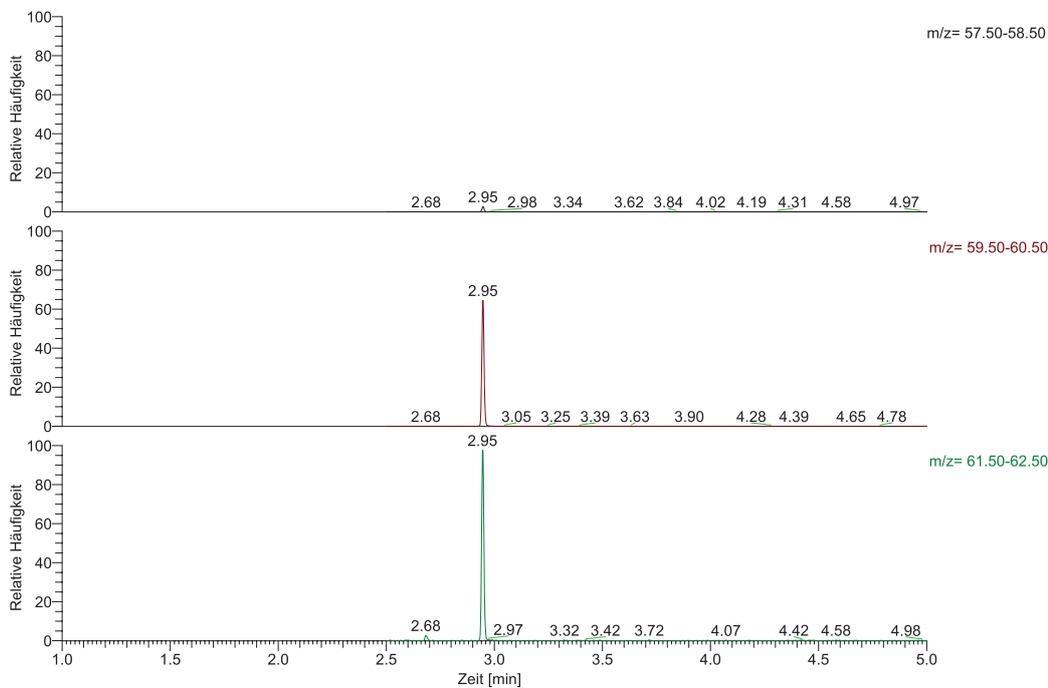


Abb. 4 Chromatogramm eines Nichtraucherurins mit einer Thiocyanat-Konzentration von 9,5 $\mu\text{mol/l} \approx 0,552 \text{ mg/l}$ (SCN^- : $m/z = 58, 60$; $\text{SCN}^- (^{13}\text{C}, ^{15}\text{N})$: $m/z = 60, 62$)

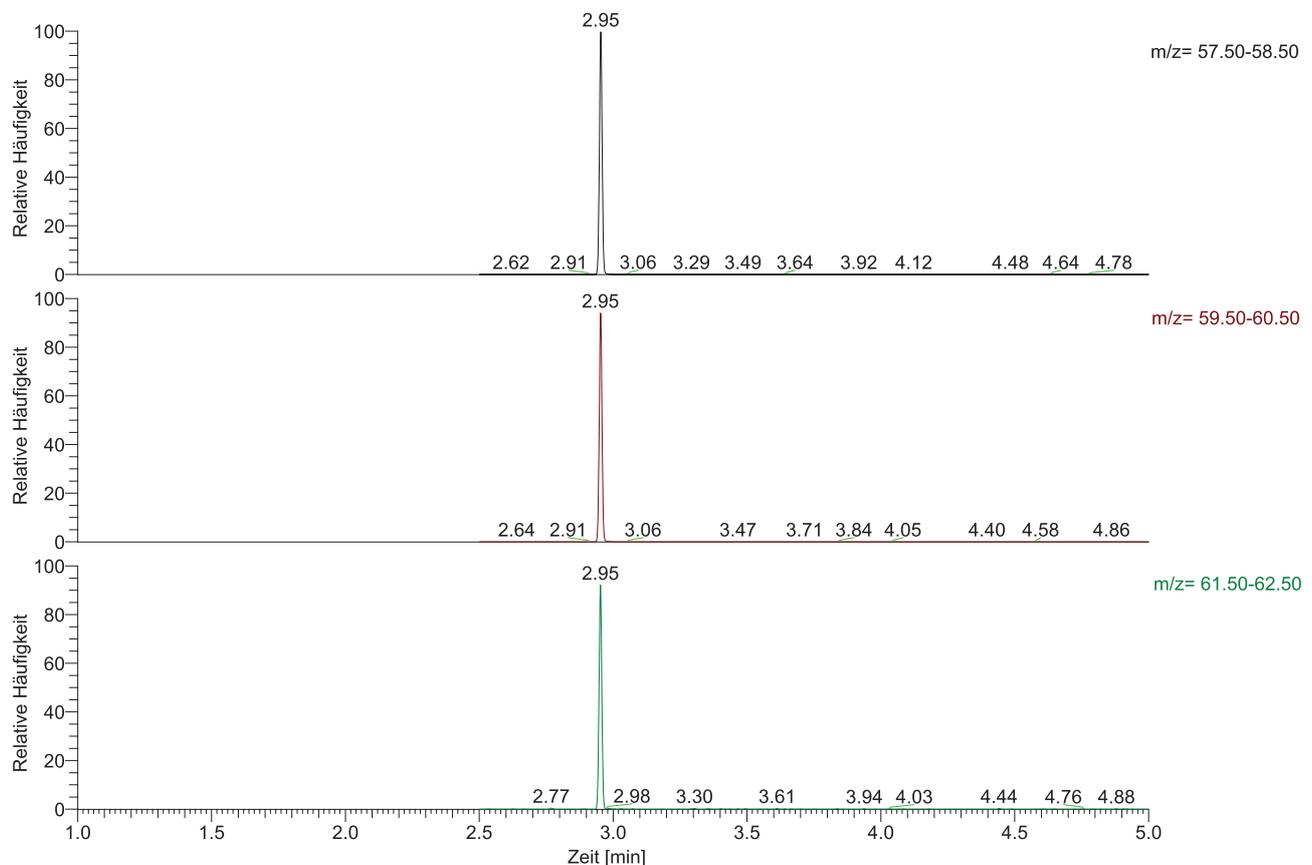


Abb. 5 Chromatogramm eines NichtraucherSpeichels mit einer Thiocyanat-Konzentration von $1962 \mu\text{mol/l} \approx 114 \text{ mg/l}$ (SCN^- : $m/z = 58, 60$; SCN^- ($^{13}\text{C}, ^{15}\text{N}$): $m/z = 60, 62$)

8 Kalibrierung

Für die Erstellung der Kalibriergeraden werden die unter Abschnitt 4.5 beschriebenen Kalibrierstandards analog zu den Proben aufgearbeitet (vgl. Abschnitt 5.2) und mittels GC-MS (vgl. Abschnitt 6) analysiert. In der Regel wird für jede Konzentrationsstufe eine Doppelbestimmung durchgeführt. Der Kalibrierstandard 0, der ohne Zusatz von ISTD aufgearbeitet wird, dient dazu, die Ionenspur des internen Standards auf Störpeaks zu überprüfen. Außerdem kann im Vergleich zu Kalibrierstandard 1 festgestellt werden, ob eine Kontamination mit unmarkiertem Analyten vorliegt.

Die Erstellung der Kalibriergeraden erfolgt durch Auftragen der Quotienten aus der Peakfläche des Analyten und des internen Standards gegen die dotierte Konzentration der jeweiligen Kalibrierstandards. Das Flächenverhältnis von Kalibrierstandard 1 wird nicht von den Flächenverhältnissen der übrigen Standards abgezogen, weil das Thiocyanat in Kalibrierstandard 1 aus dem internen Standard stammt und somit auch in jeder Probe enthalten ist. Bei gewichteter Regression ergibt sich im Bereich von der Nachweisgrenze bis $43,6 \text{ mg SCN}^-/\text{l}$ (Plasma/Serum und Urin) bzw. $218 \text{ mg SCN}^-/\text{l}$ (Speichel) eine lineare Kalibriergerade, die nicht durch den Ursprung des Koordinatensystems verläuft. In Abbildung 6 und 7 sind beispielhaft Kalibriergeraden in Plasma sowie in Speichel dargestellt.

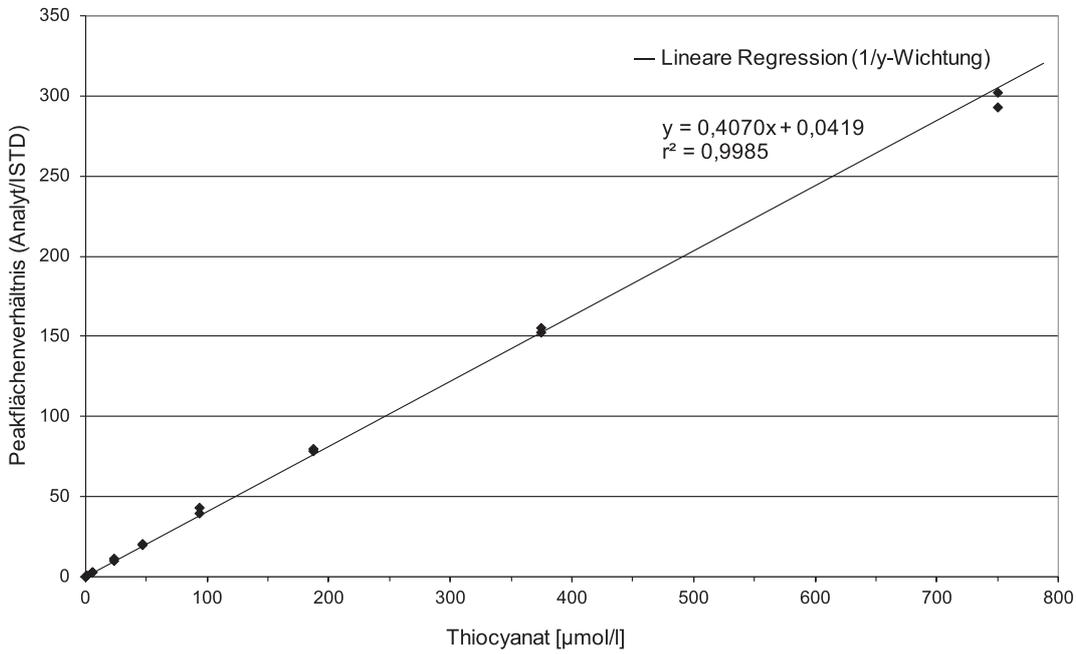


Abb. 6 Kalibriergerade für die Bestimmung des Thiocyanats in Plasma/Serum (BG–750 µmol/l ≙ BG–43,6 mg/l)

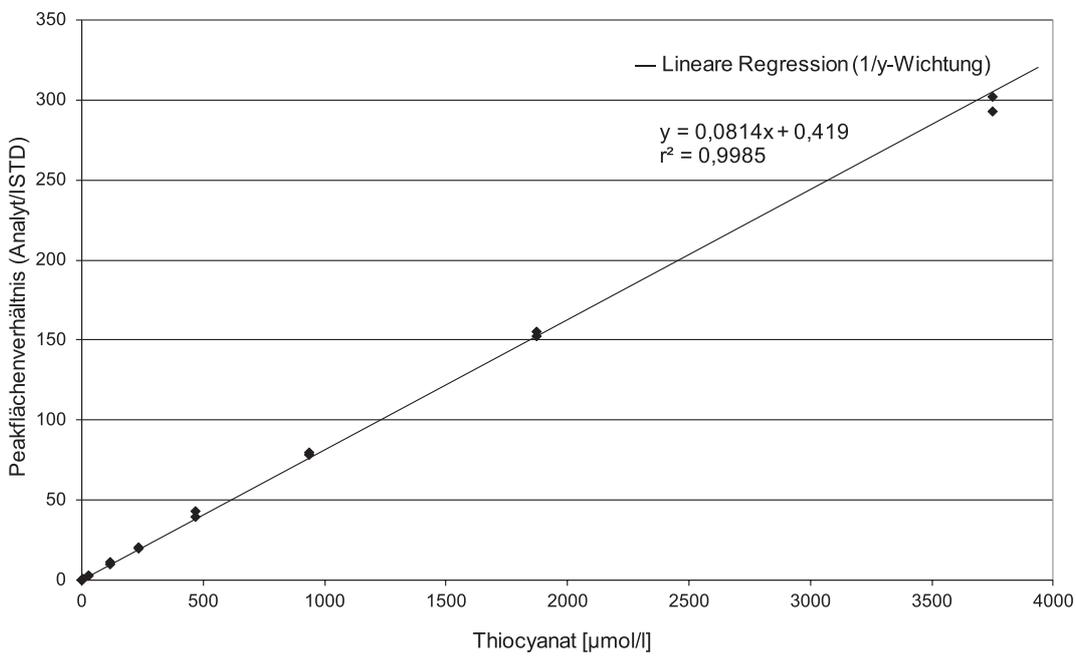


Abb. 7 Kalibriergerade für die Bestimmung des Thiocyanats in Speichel (BG–3750 µmol/l ≙ BG–218 mg/l)

9 Berechnung der Analysenergebnisse

Zur Bestimmung des Analytgehaltes einer unbekannt Probe wird der Quotient aus der Peakfläche des Analyten und des internen Standards berechnet und in die nach Abschnitt 8 erstellte Kalibriergeradengleichung eingesetzt. Man erhält die Analytkonzentration in mg SCN⁻/l.

10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analysenergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Vorgaben in dem von der Kommission publizierten allgemeinen Kapitel verfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014).

Zur Präzisionskontrolle werden in jeder Analysenserie Qualitätskontrollproben mit untersucht, die bekannte Konzentrationen des Analyten aufweisen. Als Kontrollproben werden Plasma/Serum-, Urin- bzw. Speichelproben mit niedrigen, mittleren und hohen Konzentrationen (Q_{low} , Q_{medium} und Q_{high}) eingesetzt.

Aliquote dieser Proben werden bei -20 °C gelagert und bei jeder Analysenserie als Qualitätskontrollproben mitgeführt. Die Sollwerte und die Toleranzbereiche der Qualitätskontrollmaterialien werden im Rahmen einer Vorstudie ermittelt (Bader et al. 2010).

11 Beurteilung des Verfahrens

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

11.1 Präzision

Die Bestimmung der Präzision in der Serie erfolgte bei drei Konzentrationen je Matrix. Als Probenmaterial dienten Individualproben und gepoolte Proben, die nativ oder dotiert verwendet wurden. Die Daten zur Präzision in der Serie sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tab. 5 Präzision in der Serie für die Bestimmung von Thiocyanat in Plasma/Serum, Urin und Speichel (n = 5)

Analytkonzentration [mg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Plasma/Serum		
0,75	4,9	13,6
2,78	2,9	8,1
10,7	7,2	20,0
Urin		
0,27	5,4	15,0
5,83	4,4	12,2
38,0	5,3	14,7
Speichel		
13,6	4,1	11,4
92,1	5,6	15,6
162	6,0	16,7

Zur Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurde Probenmaterial mit niedriger, mittlerer und hoher Analytkonzentration an fünf verschiedenen Tagen aufgearbeitet und untersucht. Die Daten zur Präzision von Tag zu Tag in den drei Matrices sind in Tabelle 6 zusammengestellt.

Tab. 6 Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von Thiocyanat in Plasma/Serum, Urin und Speichel (n = 5)

Analytkonzentration [mg/l]	Standardabweichung (rel.) s_w [%]	Streubereich u [%]
Plasma/Serum		
0,73	3,4	9,4
2,93	2,6	7,2
10,6	3,3	9,2
Urin		
0,26	6,4	17,8
5,81	6,0	16,7
35,5	3,6	10,0
Speichel		
12,9	8,2	22,8
91,6	1,7	4,7
157	4,8	13,3

11.2 Richtigkeit

Die Richtigkeit der Methode wurde durch Dotierung der entsprechenden Matrices mit definierten Mengen an Thiocyanat bestimmt. Es wurden jeweils drei verschiedene Konzentrationen gemessen. Je Konzentration wurden fünf Bestimmungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengestellt.

Tab. 7 Relative Wiederfindungsraten für Thiocyanat in Plasma/Serum, Urin und Speichel (n = 5)

Analytkonzentration [mg/l]	Wiederfindungsrate r [%]
Plasma/Serum	
0,73	93,5
2,93	92,9
10,6	93,6
Urin	
0,56	94,6
12,2	94,1
38,3	90,5
Speichel	
28,9	97,9
113	89,9
209	88,4

11.3 Matrixeffekte

Der Prüfer der Methode hat neben der Kalibrierung in Wasser auch Kalibrierungen in Plasma/Serum, Urin und Speichel durchgeführt. In den unterschiedlichen Matrices ergaben sich achsenverschobene Kalibriergeraden mit gut übereinstimmenden Steigungen.

11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen

Die Nachweisgrenze wurde aus dem dreifachen und die Bestimmungsgrenze aus dem neunfachen Signal/Rausch-Verhältnis berechnet, wobei für jede Matrix drei verschiedene Proben gemessen wurden. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von Thiocyanat in Plasma/Serum, Urin und Speichel sind in Tabelle 8 zusammengestellt.

Tab. 8 Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von Thiocyanat in Plasma/Serum, Urin und Speichel (n = 3)

Matrix	Nachweisgrenze [mg/l]	Bestimmungsgrenze [mg/l]
Plasma/Serum	0,0005	0,0015
Urin	0,0006	0,0017
Speichel	0,0007	0,0020

Im Konzentrationsbereich des niedrigsten Kalibrierstandards liegt die Abweichung der berechneten Konzentration von der dotierten Konzentration unter 5 %.

11.5 Störeinflüsse

Die Extraktionsausbeute von Thiocyanat in Anwesenheit eines Phasentransferkatalysators bei gleichzeitiger Derivatisierung mit PFBBBr ist stark von der Dauer der einzelnen Arbeitsschritte und von weiteren Parametern, wie der Temperatur und der Intensität des Schüttelvorgangs, abhängig. Daher ist die Verwendung eines geeigneten internen Standards (KSCN (^{13}C , ^{15}N)) unabdingbar.

Die Selektivität der Methode wurde im Rahmen der Methodenentwicklung überprüft, indem je Matrix sechs gering belastete Individualproben analysiert wurden. In keiner der Proben wurden interferierende Signale mit der Retentionszeit des internen Standards detektiert, die mehr als 5 % der ISTD-Menge ausmachten. Zudem wurde die Identität des Analytpeaks anhand des Quantifier/Qualifier-Verhältnisses unter Verwendung von sechs Proben je Matrix bestätigt.

Vom Entwickler der Methode wurden auch Untersuchungen zur Stabilität des Analyten in den unterschiedlichen Matrices durchgeführt. Die Stabilitätsuntersuchungen in Urin und Speichel wurden mit frischen Matrixproben durchgeführt, die Thiocyanat in einer niedrigen (ohne Dotierung) und einer hohen Konzentration (dotierter Urin bzw. Speichel) enthielten. Die Untersuchungen im Plasma/Serum erfolgten an etwa 12 Monate alten Serumproben. Sowohl die Kurzzeitstabilität (20 Stunden bzw. 24 Stunden bei Raumtemperatur), als auch die Frier-Taustabilität (drei und sechs Frier-Tau-Zyklen) sowie die Langzeitstabilität (verschiedene Zeiträume bei -20 °C) ist für beide Konzentrationsniveaus in den drei Matrices gegeben. Die Richtigkeit lag bei diesen Messungen für Plasma/Serum zwischen 93,5 und 112 %, für Urin zwischen 89,6 und 111 % sowie für Speichel zwischen 80,3 und 115 %. Die Daten der Speichelproben zeigen, dass für diese Matrix die Frage der Analytstabilität nicht abschließend geklärt ist (siehe Abschnitt 5.1). Speichelproben sollten daher nach der Gewinnung so bald wie möglich analysiert werden.

Verschleppungseffekte im chromatographischen System wurden durch mehrfache Injektion von aufgearbeiteten Proben mit hohen Thiocyanatkonzentrationen im Wechsel mit Lösungsmittelinjektionen untersucht. Nach jeweils fünf Injektionen einer Probe mit hoher Analytkonzentration wurde Lösungsmittel injiziert und analysiert. Dies

erfolgte dreimal je Matrix. Es wurde bei allen drei Matrizes ein minimaler Verschleppungseffekt beobachtet, der maximal bei 3 µg/l lag.

12 Diskussion der Methode

Die vorliegende Analysenmethode ist zur Bestimmung von Thiocyanat (SCN⁻) im arbeits- und umweltmedizinischen Bereich geeignet. Vor allem für chronische Expositionen mit Cyanidkonzentrationen, wie sie beispielsweise beim Rauchen und an einigen Arbeitsplätzen vorkommen, ist Thiocyanat im Plasma/Serum, Urin und Speichel ein geeigneter Biomarker. Im Unterschied zu den bereits von der Kommission publizierten Methoden (Riedel et al. 2012; Scherer et al. 2000) kann mit dem vorliegenden Verfahren Thiocyanat auch im Urin bestimmt werden.

Es handelt sich um eine gaschromatographische Analysenmethode mit massenselektiver Detektion unter Einsatz eines stabil isopenmarkierten internen Standards. Grundlage ist die von Toraño und van Kan (2003) publizierte Methode, die allerdings erheblich modifiziert wurde.

Die Verwendung eines stabil isopenmarkierten internen Standards ist unabdingbar, um mögliche Schwankungen während der Probenaufbereitung (Extraktion, Phasentransfer, Derivatisierung) auszugleichen. Das beschriebene Verfahren erlaubt die schnelle, sensitive, spezifische und zuverlässige Bestimmung von Thiocyanat in allen genannten Matrizes. Die Methodenkenndaten entsprechen allen Anforderungen, die an eine Analysenmethode im Humanbiomonitoring gestellt werden.

Verwendete Messgeräte GC-MS-System (z. B. Trace GC Ultra mit massenselektivem Detektor DSQ und TriPlus, Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich), Autosampler mit gekühltem Probenhalter (z. B. Thermo Fisher Scientific GmbH, Dreieich) sowie Xcalibur 2.1 (Software)

Literatur

- Bader M, Barr D, Göen T, Schaller K-H, Scherer G, Angerer J (2010) Zuverlässigkeitskriterien einer analytischen Methode. Allgemeine Vorbemerkungen. In: Angerer J, Hartwig A (Hrsg) Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bd 2: Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim, 284–336. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.bireliabd0019](https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019)
- Baumeister RG, Schievelbein H, Zickgraf-Rüdel G (1975) Toxicological and clinical aspects of cyanide metabolism. *Arzneimittelforschung* 25: 1056–1064
- Bliss RE, O'Connell KA (1984) Problems with thiocyanate as an index of smoking status: a critical review with suggestions for improving the usefulness of biochemical measures in smoking cessation research. *Health Psychol* 3: 563–581. DOI: [10.1037/0278-6133.3.6.563](https://doi.org/10.1037/0278-6133.3.6.563)
- Bruce GM, Corey LM, Mandel JH, Pleus RC (2013) Urinary nitrate, thiocyanate, and perchlorate and serum thyroid endpoints based on NHANES 2001 to 2002. *J Occup Environ Med* 55: 52–58. DOI: [10.1097/JOM.0b013e31826bb774](https://doi.org/10.1097/JOM.0b013e31826bb774)
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl* 111: A1583–1618. <https://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=161921>, abgerufen am 20 Apr 2020
- Degiampietro P, Peheim E, Drew D, Graf H, Colombo JP (1987) Determination of thiocyanate in plasma and saliva without deproteinisation and its validation as a smoking parameter. *J Clin Chem Clin Biochem* 25: 711–717. DOI: [10.1515/cclm.1987.25.10.711](https://doi.org/10.1515/cclm.1987.25.10.711)
- DFG (Deutsche Forschungsgemeinschaft) (Hrsg) (2019) MAK- und BAT-Werte-Liste 2019, Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Mitteilung 55. Wiley-VCH, Weinheim. DOI: [10.1002/9783527826155](https://doi.org/10.1002/9783527826155)
- Eben A, Lewalter J (1988) Cyanid. In: Angerer J, Schaller K-H, Henschler D (Hrsg) Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bd 2: Analysen in biologischem Material, 9. Lieferung. VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.bi5712d0009](https://doi.org/10.1002/3527600418.bi5712d0009)
- Eyer P (2004) Gasförmige Verbindungen. In: Marquardt H, Schäfer SG (Hrsg) *Lehrbuch der Toxikologie*, 2. Aufl. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 821–849
- Greim H (Hrsg) (1998) Passivrauchen. In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*, 27. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb5411prad0027](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb5411prad0027)
- Greim H (Hrsg) (1999) Acrylnitril. In: *Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten*, 28. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb10713d0028](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb10713d0028)

- Greim H (Hrsg) (2001) Cyanwasserstoff, Kalium- und Natriumcyanid. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 32. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb7490verd0032](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb7490verd0032)
- Greim H (Hrsg) (2003) Oxalsäuredinitril. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 36. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb46019d0036](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb46019d0036)
- Greim H (Hrsg) (2004) 3-Dimethylaminopropionitril. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 38. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb173825d0038](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb173825d0038)
- Hartwig A, MAK Commission (2018) Acetonitril. MAK Value Documentation in German Language. MAK Collect Occup Health Saf 3: 606–613. DOI: [10.1002/3527600418.mb7505d0065](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb7505d0065)
- Hartwig A, MAK Commission (2019) Oxalsäuredinitril. MAK Value Documentation in German Language. MAK Collect Occup Health Saf 4: 1533–1536. DOI: [10.1002/3527600418.mb46019d0067](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb46019d0067)
- Henschler D (Hrsg) (1973) Chlorcyan. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 2. Lieferung. VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb50677d0002](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb50677d0002)
- Henschler D (Hrsg) (1979) Cyanacrylsäuremethylester, Cyanacrylsäure-Äthylester. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 7. Lieferung. VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.mb13705d0007](https://doi.org/10.1002/3527600418.mb13705d0007)
- Jain RB (2013 a) Impact of pregnancy and other factors on the levels of urinary perchlorate, thiocyanate, and nitrate among females aged 15–44 years: data from National Health and Nutrition Examination Survey 2003–2008. *Chemosphere* 91: 882–887. DOI: [10.1016/j.chemosphere.2013.02.040](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.02.040)
- Jain RB (2013 b) Urinary nitrate, thiocyanate, and perchlorate and serum thyroid endpoints based on NHANES 2001 to 2002 by Bruce et al. *J Occup Environ Med* 55: 1385–1386. DOI: [10.1097/JOM.0000000000000028](https://doi.org/10.1097/JOM.0000000000000028)
- Jarvis M, Tunstall-Pedoe H, Feyerabend C, Vesey C, Salloojee Y (1984) Biochemical markers of smoke absorption and self-reported exposure to passive smoking. *J Epidemiol Community Health* 38: 335–339. DOI: [10.1136/jech.38.4.335](https://doi.org/10.1136/jech.38.4.335)
- Junge B (1985) Changes in serum thiocyanate concentration on stopping smoking. *Br Med J* 291: 22. DOI: [10.1136/bmj.291.6487.22](https://doi.org/10.1136/bmj.291.6487.22)
- Ladd KF, Archer MC, Newmark HL (1984) Increased endogenous nitrosation in smokers. *IARC Sci Publ* 57: 811–817
- Ockene JK, Pechacek TF, Vogt T, Svendsen K (1987) Does switching from cigarettes to pipes or cigars reduce tobacco smoke exposure? *Am J Public Health* 77: 1412–1416. DOI: [10.2105/AJPH.77.11.1412](https://doi.org/10.2105/AJPH.77.11.1412)
- Pettigrew AR, Fell GS (1972) Simplified colorimetric determination of thiocyanate in biological fluids, and its application to investigation of the toxic amblyopias. *Clin Chem* 18: 996–1000. DOI: [10.1093/clinchem/18.9.996](https://doi.org/10.1093/clinchem/18.9.996)
- Prue DM, Martin JE, Hume AS (1980) A critical evaluation of thiocyanate as a biochemical index of smoking exposure. *Behavior Ther* 11: 368–379. DOI: [10.1016/S0005-7894\(80\)80053-0](https://doi.org/10.1016/S0005-7894(80)80053-0)
- Rickert WS, Robinson JC, Collishaw NE, Bray DF (1983) Estimating the hazards of “less hazardous” cigarettes. III. A study of the effect of various smoking conditions on yields of hydrogen cyanide and cigarette tar. *J Toxicol Environ Health* 12: 39–54. DOI: [10.1080/15287398309530406](https://doi.org/10.1080/15287398309530406)
- Riedel K, Hagedorn HW, Scherer G, Angerer J (2012) Thiocyanat in Plasma und Speichel. In: Göen T, Hartwig A (Hrsg) *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bd 2: Analysen in biologischem Material*, 20. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.bi5712sald0020](https://doi.org/10.1002/3527600418.bi5712sald0020)
- Ruth KJ, Neaton JD, MRFIT Research Group (1991) Evaluation of two biological markers of tobacco exposure. *Prev Med* 20: 574–589. DOI: [10.1016/0091-7435\(91\)90056-A](https://doi.org/10.1016/0091-7435(91)90056-A)
- Scherer G, Meger-Kossien I, Angerer J, Knecht U (2000) Cotinin. In: Angerer J, Schaller K-H, Greim H (Hrsg) *Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Bd 2: Analysen in biologischem Material*, 14. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: [10.1002/3527600418.bi48656d0014](https://doi.org/10.1002/3527600418.bi48656d0014)
- Steinmaus C, Miller MD, Howd R (2007) Impact of smoking and thiocyanate on perchlorate and thyroid hormone associations in the 2001–2002 national health and nutrition examination survey. *Environ Health Perspect* 115: 1333–1338. DOI: [10.1289/ehp.10300](https://doi.org/10.1289/ehp.10300)
- Steinmaus C, Miller MD, Cushing L, Blount BC, Smith AH (2013) Combined effects of perchlorate, thiocyanate, and iodine on thyroid function in the National Health and Nutrition Examination Survey 2007–08. *Environ Res* 123: 17–24. DOI: [10.1016/j.envres.2013.01.005](https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.01.005)
- Toraño JS, van Kan HJ (2003) Simultaneous determination of the tobacco smoke uptake parameters nicotine, cotinine and thiocyanate in urine, saliva and hair, using gas chromatography-mass spectrometry for characterisation of smoking status of recently exposed subjects. *Analyst* 128: 838–843. DOI: [10.1039/b304051h](https://doi.org/10.1039/b304051h)
- Tsuda M, Kurashima Y (1991) Tobacco smoking, chewing, and snuff dipping: Factors contributing to the endogenous formation of N-nitroso compounds. *Crit Rev Toxicol* 21: 243–253. DOI: [10.3109/10408449109017912](https://doi.org/10.3109/10408449109017912)