

# Ethylenbis(dithiocarbamate) und Ethylenthioharnstoff – Bestimmung von Ethylenthioharnstoff in Urin mittels LC-MS/MS

## Biomonitoring-Methode

### Keywords

Ethylenbis(dithiocarbamate); Ethylenthioharnstoff; Biomonitoring; Urin; Flüssigkeits-Chromatographie; Tandem-Massenspektrometrie; LC-MS/MS

L. Kenny<sup>1</sup>  
K. Jones<sup>1</sup>  
J. Cocker<sup>1</sup>  
M. Bader<sup>2</sup>

T. Brodbeck<sup>2</sup>  
T. Göen<sup>3,\*</sup>  
A. Hartwig<sup>4,\*</sup>  
MAK Commission<sup>5,\*</sup>

- <sup>1</sup> *Methodenentwicklung, The HSE Science and Research Centre, Harpur Hill, SK17 9JN Buxton, Derbyshire, Vereinigtes Königreich*
- <sup>2</sup> *Methodenprüfung, BASF SE, ESG/CB Corporate Health Management, Gebäude H308, Carl-Bosch-Straße 38, 67056 Ludwigshafen*
- <sup>3</sup> *Leitung der Arbeitsgruppe „Analysen in biologischem Material“ der Ständigen Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Institut und Poliklinik für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin, Friedrich-Alexander-Universität (FAU) Erlangen-Nürnberg, Henkestraße 9–11, 91054 Erlangen*
- <sup>4</sup> *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*
- <sup>5</sup> *Ständige Senatskommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Kennedyallee 40, 53175 Bonn*

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

### Citation Note:

Kenny L, Jones K, Cocker J, Bader M, Brodbeck T, Göen T, Hartwig A, MAK Commission. Ethylenbis(dithiocarbamate) und Ethylenthioharnstoff – Bestimmung von Ethylenthioharnstoff in Urin mittels LC-MS/MS. Biomonitoring-Methode. MAK Collect Occup Health Saf. 2021 Jun;6(2):Doc046. DOI: [https://doi.org/10.34865/bi9645d6\\_2or](https://doi.org/10.34865/bi9645d6_2or)

Manuskript abgeschlossen:  
03 Mai 2016

Publikationsdatum:  
30 Jun 2021

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



## 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 biomonitoring method presented herein, which is used to determine the concentration levels of ethylenethiourea (ETU) in the urine of potentially exposed workers as well as non-occupationally exposed individuals in the general population with a quantitation limit of 0.5 µg/l.

ETU is extracted from urine with dichloromethane using solid-supported liquid extraction on diatomaceous earth columns. Eluates are blown to dryness, then the residues are reconstituted in the mobile phase and analysed by LC-MS/MS. Calibration is carried out with calibration standards prepared in pooled urine and treated in the same manner as the samples to be analysed. An isotopically labelled analogue of ETU (d<sub>4</sub>-ETU) is used as an internal standard.

## 1 Kenndaten der Methode

<b>Matrix</b>	Urin
<b>Analytisches Messprinzip</b>	Flüssigkeits-Chromatographie gekoppelt mit Tandem-Massenspektrometrie (LC-MS/MS)

### Parameter und entsprechende Arbeitsstoffe

Arbeitsstoff	CAS-Nr.	Parameter	CAS-Nr.
Ethylenthioharnstoff (Imidazolin-2-thion)	96-45-7		
Amobam (Diammoniumethylenbis(dithiocarbamat))	3566-10-7		
Mancozeb (Manganzinkethylenbis(dithiocarbamat))	8018-01-7		
Maneb (Manganethylenbis(dithiocarbamat))	12427-38-2	Ethylenthioharnstoff (Imidazolin-2-thion)	96-45-7
Metiram (Zinkammoniatethylenbis(dithiocarbamat)- poly[ethylenbis(thiuramdisulfid)])	9006-42-2		
Nabam (Dinatriumethylenbis(dithiocarbamat))	142-59-6		
Zineb (Zinkethylenbis(dithiocarbamat))	12122-67-7		

## Zuverlässigkeitskriterien

### Ethylenthioharnstoff in Urin

Präzision in der Serie:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 2,50\%$ bzw. $1,89\%$
	Streubereich bei einer Konzentration von $1\ \mu\text{g}$ bzw. $10\ \mu\text{g}$ ETU pro Liter Urin ( $n = 10$ )	$u = 5,66\%$ bzw. $4,28\%$
Präzision von Tag zu Tag:	Standardabweichung (rel.)	$s_w = 6,28\%$ bzw. $4,83\%$
	Streubereich bei einer Konzentration von $1\ \mu\text{g}$ bzw. $10\ \mu\text{g}$ ETU pro Liter Urin ( $n = 6$ )	$u = 16,1\%$ bzw. $12,4\%$
Richtigkeit:	Wiederfindungsrate (rel.)	$r = 119\%$
Nachweisgrenze:	0,25 $\mu\text{g}$ ETU pro Liter Urin	
Bestimmungsgrenze:	0,5 $\mu\text{g}$ ETU pro Liter Urin	

## 2 Allgemeine Informationen zu Ethylenbis(dithiocarbamaten) und Ethylenthioharnstoff

### Ethylenbis(dithiocarbamate) (EBDC)

Amobam, Mancozeb, Maneb, Metiram, Nabam und Zineb gehören zu der Stoffgruppe der Ethylenbis(dithiocarbamat)-Pestizide und werden hauptsächlich als Fungizide eingesetzt, wobei sie auch insektizide und herbizide Eigenschaften besitzen. Neben ihrer Anwendung in der Landwirtschaft werden sie auch als Schleimbekämpfungsmittel in Wasserkühlsystemen und als Hilfsmittel in der Abwasseraufbereitung eingesetzt (IPCS 1988).

Strukturell handelt es sich bei den Wirkstoffen um Ammonium-, Mangan-, Natrium- oder Zinksalze (Amobam, Mancozeb, Maneb, Nabam, Zineb) oder um polymere Metall-Koordinationskomplexe (Metiram), die – abgesehen von Amobam und Nabam – eine geringe Löslichkeit in Wasser sowie nicht-polaren Lösungsmitteln aufweisen (IPCS 1988).

Im Kontakt mit Wasser unterliegen die Substanzen einer raschen Hydrolyse mit einer Halbwertszeit im Bereich von wenigen Stunden, wobei Ethylenthioharnstoff (ethylenethiourea; ETU), Ethylenharnstoff sowie Ethylenbis(isothiocyanat) als Abbauprodukte entstehen (IPCS 1988).

Die metall-komplexierten Ethylenbis(dithiocarbamate) werden dermal und gastrointestinal nur in geringem Ausmaß resorbiert. Die Verstoffwechslung der EBDC in Säugetieren ist komplex. Der Hauptmetabolit in Mäusen und Ratten ist ETU, weitere Metaboliten sind Ethylenharnstoff, Ethylendiamin, N-Acetylethylendiamin und Ethylenbis(isothiocyanat). ETU stellt auch den Hauptmetaboliten beim Menschen dar, wobei ETU aber auch als Abbauprodukt der EBDC in der Umwelt oder als produktionsbedingte Verunreinigung der EBDC auftreten und als solches aufgenommen werden kann (Lindh et al. 2008). Ein generalisiertes Metabolismuschema der EBDC ist in [Abbildung 1](#) dargestellt.

Pflanzenschutzmittel auf Basis von Mancozeb bzw. Metiram sind in Deutschland zugelassen, wobei die letzten Zulassungen im Dezember 2026 bzw. Januar 2023 auslaufen (Europäische Kommission 2020, 2021). Darüber hinaus dürfen verschiedene Zineb-haltige Biozidprodukte (Produktart 21) in Deutschland aufgrund eines laufenden Entscheidungsverfahrens verkauft und verwendet werden (Verkehrsfähigkeit bis Dezember 2024) (Europäische Kommission 2014).

Die systemische Toxizität der EBDC wird als gering eingestuft, allerdings gibt es Bedenken hinsichtlich des als Verunreinigung auftretenden bzw. als Metabolit entstehenden ETU aufgrund von in Tierversuchen aufgetretenen teratogenen und strumatogenen Effekten (Lentza-Rizos 1990).

Die Kommission hat Maneb wegen der sensibilisierenden Wirkungen am Menschen mit „Sh“ markiert (Greim 2001). Die übrigen EBDC wurden von der Kommission nicht bewertet.

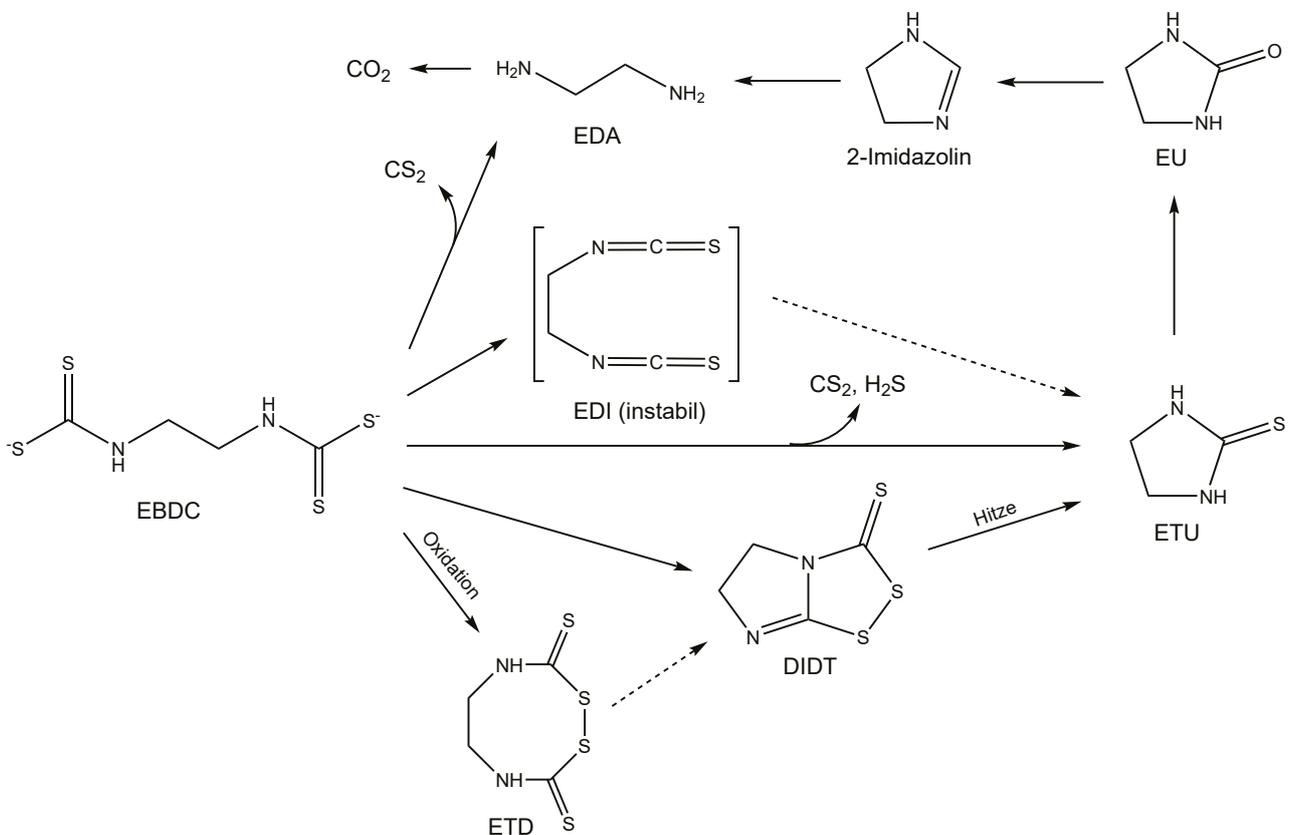
### Ethylenthioharnstoff (ETU)

Ethylenthioharnstoff wird als Vulkanisationsbeschleuniger und Antioxidans in der Kautschukindustrie, insbesondere für die Herstellung von Polychloropren (Neopren), eingesetzt (DECOS 1999; NTP 2011). Darüber hinaus wird ETU in Galvanisierbädern, Farben, Kunstharzen und als Radikalfänger in der Abwasserbehandlung eingesetzt. Zu einer beruflichen Exposition gegen ETU kann es folglich in den aufgeführten Einsatzgebieten und auch bei der Handhabung oder Ausbringung von Ethylenbis(dithiocarbamat)-haltigen Produkten kommen.

Eine potentielle Exposition der Allgemeinbevölkerung gegen ETU durch die Migration aus Chloropren-Kautschuk konnte nicht nachgewiesen werden (DK EPA 2004, 2012). Jedoch ist eine Belastung der Allgemeinbevölkerung gegen ETU mit dem Verzehr von Nahrungsmitteln, die zuvor mit Ethylenbis(dithiocarbamaten) behandelt wurden, gegeben. Rückstände von EBDC und ETU lassen sich in und auf mit EBDC-behandelten Feldfrüchten nachweisen. Die Rückstandsgehalte ändern sich bei Lagerung, Zubereitung und beim Kochen, da die Ausgangssubstanzen während dieser Vorgänge in ETU umgewandelt werden können (IPCS 1988). Darüber hinaus findet sich ETU auch in Zigaretten, sofern der verwendete Tabak mit EBDC behandelt wurde (Aprea et al. 1996).

Das sowohl in Wasser als auch in Öl gut lösliche ETU wird nach Inhalation, dermalen Exposition oder oraler Aufnahme gut resorbiert, schnell metabolisiert und zu bis zu 90 % mit dem Urin ausgeschieden (NTP 2011). Die Verteilung im Körper scheint recht gleichmäßig zu sein, abgesehen von einer relativen Anreicherung in der Schilddrüse. ETU wird in Säugetieren, Pflanzen und auch in der Umwelt zu Ethylendiamin (EDA), Harnstoff, Kohlendioxid und Oxalsäure verstoffwechselt oder in Imidazolderivate umgewandelt (IPCS 1988). Für ETU und seine Metaboliten wurden Halbwertszeiten von 28 h in Affen, 9–10 h in Ratten und 5 h in Mäusen bestimmt (Rose et al. 1980). Im Menschen wurde die Eliminationshalbwertszeit von ETU zu 17–23 h bestimmt (Lindh et al. 2008).

Während die IARC (*International Agency for Research on Cancer*; Internationale Agentur für Krebsforschung) ETU in Gruppe 3 „nicht klassifizierbar hinsichtlich der krebserzeugenden Wirkung beim Menschen“ einstuft (IARC 2001), wurde die Substanz im Rahmen des U.S.-amerikanischen *National Toxicology Program* (NTP) als „vermutlich krebserregend beim Menschen“ eingestuft (NTP 2011). Die Kommission stuft ETU in die Kanzerogenitäts-Kategorie 3 („Verdacht auf krebserzeugende Wirkung“) ein (Greim 1995).



**Abb. 1** Metabolismusschema der EBDC (nach IPCS 1988) mit EDA: Ethylendiamin, EDI: Ethylendiisothiocyanat (instabil), DITD: 5,6-Dihydro-3H-imidazo[2,1-c]-1,2,4-dithiazol-3-thion, EU: Ethylenharnstoff, ETU: Ethylenthioharnstoff, CS<sub>2</sub>: Kohlenstoffdisulfid und H<sub>2</sub>S: Schwefelwasserstoff

### 3 Grundlage des Verfahrens

Die beschriebene Methode erlaubt die Bestimmung von Ethylenthioharnstoff (ETU)-Gehalten im Urin beruflich belasteter Beschäftigter sowie nicht beruflich belasteter Personen der Allgemeinbevölkerung mit einer Bestimmungsgrenze von 0,5 µg/l. ETU wird aus den Urinproben mittels festphasenunterstützter Flüssig-Extraktion (*solid-supported liquid extraction*, SLE) unter Verwendung von Kieselgursäulen mit Dichlormethan extrahiert. Anschließend werden

die Eluate zur Trockne abgeblasen, die Rückstände in Laufmittel aufgenommen und mittels LC-MS/MS analysiert. Die Kalibrierung erfolgt mit Kalibrierstandards, die in Poolurin angesetzt und in der gleichen Weise behandelt werden wie die zu analysierenden Proben. Isotopenmarkiertes ETU ( $d_4$ -ETU) wird als interner Standard verwendet. Die Methode basiert auf einer bereits von Jones et al. (2010) publizierten Methode.

## 4 Geräte, Chemikalien und Lösungen

### 4.1 Geräte

- HPLC-System (z. B. Shimadzu UK Limited, Milton Keynes, Vereinigtes Königreich)
- HPLC-Säule: Gemini 5  $\mu$  C18, 150  $\times$  2 mm (z. B. Phenomenex Inc., Macclesfield, Vereinigtes Königreich)
- Tandem-Massenspektrometer (z. B. Life Technologies Applied Biosystems API 3200 QTRAP, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt)
- C18-Vorsäule (z. B. Phenomenex Inc., Macclesfield, Vereinigtes Königreich)
- Chem Elut Säulen, nicht gepuffert, 3 ml (z. B. Agilent Technologies UK Ltd., Yarnton, Vereinigtes Königreich)
- Vorrichtung zum Eindampfen im Stickstoffstrom (z. B. Biotage AB, Uppsala, Schweden)
- Reagenzgläser ohne Rand, 100  $\times$  16 mm (z. B. Fisher Scientific GmbH, Schwerte)
- 1,8-ml-Gläschen mit Micro-Inserts und Bördelkappen mit Gummisepten (z. B. Chromatography Direct Ltd., Run-corn, Vereinigtes Königreich)
- Multipipetten<sup>®</sup> mit passenden Combitips<sup>®</sup> (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Variabel einstellbare Pipetten mit passenden Pipettenspitzen (z. B. Eppendorf AG, Hamburg)
- Verschiedene Bechergläser und Messkolben (z. B. VWR International GmbH, Darmstadt)

### 4.2 Chemikalien

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

- Ethylenthioharnstoff (z. B. Nr. E057P025, Qmx Laboratories, Thaxted, Vereinigtes Königreich)
- $d_4$ -Ethylenthioharnstoff (z. B. Nr. D-5348, C/D/N Isotopes Inc., EQ Laboratories GmbH, Augsburg)
- Acetonitril (z. B. Nr. RH1015, Rathburn Chemicals (Mfg) Ltd., Walkerburn, Vereinigtes Königreich)
- Ameisensäure (z. B. Nr. 533002, Merck KGaA, Darmstadt)
- Dichlormethan (z. B. Nr. RH1010, Rathburn Chemicals (Mfg) Ltd., Walkerburn, Vereinigtes Königreich)
- Methanol (z. B. Nr. RH1019, Rathburn Chemicals (Mfg) Ltd., Walkerburn, Vereinigtes Königreich)
- Hochreines Wasser (z. B. Milli-Q plus VE System (> 18 M $\Omega$ ), Merck KGaA, Darmstadt)

### 4.3 Lösungen

- HPLC-Laufmittel A (0,1% Ameisensäure in Methanol)  
In einen 1000-ml-Messkolben wird 1 ml Ameisensäure pipettiert, anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit Methanol aufgefüllt.

- HPLC-Laufmittel B (0,1% Ameisensäure in hochreinem Wasser)  
In einen 1000-ml-Messkolben wird 1 ml Ameisensäure pipettiert, anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.
- Mobile Phase (0,1% Ameisensäure in 20 % Methanol)  
In einem 10-ml-Messkolben werden 2 ml des HPLC-Laufmittels A vorgelegt, anschließend wird der Messkolben bis zur Markierung mit dem HPLC-Laufmittel B aufgefüllt.

#### 4.4 Interner Standard (ISTD)

- d<sub>4</sub>-ETU-Stammlösung (10 g/l)  
Etwa 100 mg d<sub>4</sub>-ETU werden in einen 10-ml-Messkolben genau eingewogen und dieser bis zur Markierung mit Acetonitril aufgefüllt.
- d<sub>4</sub>-ETU-Dotierlösung (1 mg/l)  
10 µl der d<sub>4</sub>-ETU-Stammlösung werden in einen 100-ml-Messkolben pipettiert. Anschließend wird dieser bis zur Markierung mit hochreinem Wasser aufgefüllt.

Die Stamm- und die Dotierlösung werden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens drei Monate stabil (Montesano et al. 2007).

#### 4.5 Kalibrierstandards

- ETU-Stammlösung (1 g/l)  
Etwa 10 mg ETU werden in einen 10-ml-Messkolben genau eingewogen. Dieser wird anschließend mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- ETU-Arbeitslösung (10 mg/l)  
100 µl der ETU-Stammlösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Dieser wird anschließend mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.
- ETU-Dotierlösung (100 µg/l)  
100 µl der ETU-Arbeitslösung werden in einen 10-ml-Messkolben pipettiert. Dieser wird anschließend mit Methanol bis zur Markierung aufgefüllt.

Die Stamm-, die Arbeits- und die Dotierlösung werden bei 4 °C im Kühlschrank gelagert und sind unter diesen Bedingungen mindestens drei Monate stabil (Montesano et al. 2007).

Die Lösungen der Kalibrierstandards werden arbeitstäglich frisch in Poolurin angesetzt. Zur Herstellung des Poolurins wird eine Mischung verschiedener Urine von Nichtrauchern verwendet, bei denen keine bekannte Exposition gegen Ethylenbis(dithiocarbamate) oder ETU vorliegt. Dieser Poolurin wird bei -20 °C gelagert und vor der Verwendung durch einen Faltenfilter filtriert. Zur Herstellung der Kalibrierstandards wird die ETU-Dotierlösung gemäß dem in [Tabelle 1](#) angegebenen Pipettierschema mit Poolurin zu einem Endvolumen von 2 ml gemischt. Die Aufarbeitung der Kalibrierlösungen erfolgt analog zu den zu analysierenden Proben wie unter [Abschnitt 5](#) angegeben.

**Tab. 1** Pipettierschema zur Herstellung der Kalibrierstandards für die Bestimmung von ETU in Urin

Kalibrierstandard	Dotierlösung [µl]	Poolurin [µl]	ETU-Konzentration [µg/l]
1	0	2000	0
2	50	1950	2,5
3	100	1900	5
4	200	1800	10
5	300	1700	15
6	400	1600	20
7	500	1500	25

## 5 Probenahme und Probenaufbereitung

### 5.1 Probenahme

Die Urinproben werden in Urinbechern gesammelt und bis zur Probenaufbereitung bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Für eine längere Lagerung sollten die Urinproben bei -20°C eingefroren werden. Unter diesen Bedingungen sind die Proben für mindestens ein Jahr stabil (Aprea et al. 1996).

### 5.2 Probenaufbereitung

2 ml der Urinprobe werden in ein Probengläschen pipettiert und mit 50 µl der Dotierlösung des internen Standards ( $d_4$ -ETU-Dotierlösung; 1 mg/l) versetzt. Nach Zugabe von 1 ml hochreinem Wasser wird die Probenlösung gemischt und auf die SLE-Kartuschen gegeben. Nach zehn Minuten werden für die Extraktion der Analyten 6 ml Dichlormethan auf die Kartusche gegeben und nach weiteren zehn Minuten werden erneut 6 ml Dichlormethan aufgegeben. Das eluierende Dichlormethan wird vollständig aufgefangen und im Stickstoffstrom zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird mit 100 µl der mobilen Phase (0,1% Ameisensäure in 20% Methanol) aufgenommen. Die Messlösung wird in das Mikro-Insert eines 1,8-ml-Bördelgläschens pipettiert. Das Gläschen wird verschlossen und die Probe zur Analyse mittels LC-MS/MS verwendet.

## 6 Instrumentelle Arbeitsbedingungen

Die Messung erfolgt an einer Gerätekonfiguration bestehend aus einer HPLC-Anlage gekoppelt mit einem Tandem-Massenspektrometer (LC-MS/MS).

### 6.1 Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie

Analytische Säule:	5 µ C18 Gemini (150 × 2 mm)
Eluent:	A: 0,1% Ameisensäure in Methanol B: 0,1% Ameisensäure in hochreinem Wasser
Elution:	isokratisch (20% Eluent A)
Flussrate:	0,2 ml/min
Injektionsvolumen:	20 µl
Laufzeit:	5 min

Die Proben werden zu Beginn des Laufs mit Hilfe eines Sechswegventils von der Ionenquelle weggeleitet und nach einer Minute wieder zur Ionenquelle hingeleitet.

## 6.2 Tandem-Massenspektrometrie

Ionisierung:	Positive Elektrospray-Ionisierung
Curtain-Gas:	25 psi
Kollisionsgasfluss:	medium
Ionenspray-Spannung:	3400 V
Desolvationstemperatur:	500 °C
Ionenquellen-Gas 1:	30 psi
Ionenquellen-Gas 2:	40 psi
Interface-Heizblock:	an
Parameterspezifische Einstellungen:	siehe <a href="#">Tabelle 2</a>

**Tab. 2** Parameterspezifische Einstellungen für die Bestimmung von ETU in Urin

Substanz	Retentionszeit [min]	Ionenübergang [ $m/z$ ]		Kollisionsenergie [V]
		Ausgangs-Ion	Produkt-Ion	
ETU	2,43	103	44,2	25
$d_4$ -ETU	2,40	107	48,2	27

Sämtliche Parameter sind gerätespezifisch und müssen vom Anwender nach üblicher Adjustierung des MS/MS-Systems individuell eingestellt werden. Die angegebenen Parameter können daher lediglich als Orientierungshilfe dienen.

## 7 Analytische Bestimmung

Von den nach [Abschnitt 5](#) aufgearbeiteten Proben werden jeweils 20 µl in das LC-MS/MS-System injiziert. Die Identifizierung des Analyten erfolgt anhand der Retentionszeit und der spezifischen Massenübergänge (siehe [Tabelle 2](#)). Dabei können die in [Tabelle 2](#) angegebenen Retentionszeiten nur als Anhaltspunkt dienen. Der Anwender hat sich selbst von der Trennleistung der verwendeten Säule und dem daraus resultierenden Retentionsverhalten des Analyten zu überzeugen. Bei jeder Analysenserie wird ein Reagenzienleerwert (hochreines Wasser anstelle der Urinprobe) mitgeführt.

## 8 Kalibrierung

Zur Kalibrierung der Methode werden die unter [Abschnitt 4.5](#) beschriebenen Kalibrierstandards analog zu den Proben aufgearbeitet (vgl. [Abschnitt 5](#)) und mittels LC-MS/MS analysiert (vgl. [Abschnitt 6](#) und [7](#)). Die Kalibriergerade wird erstellt, indem die Quotienten aus den Peakhöhen von Analyt und ISTD gegen die dotierten Konzentrationen der Kalibrierstandards aufgetragen werden. Die Kalibriergerade ist unter den beschriebenen analytischen Bedingungen im Konzentrationsbereich von 2,5 bis 25 µg/l linear, der  $R^2$ -Wert sollte größer 0,99 sein. [Abbildung 2](#) zeigt beispielhaft eine Kalibriergerade für die Bestimmung von ETU in Urin.

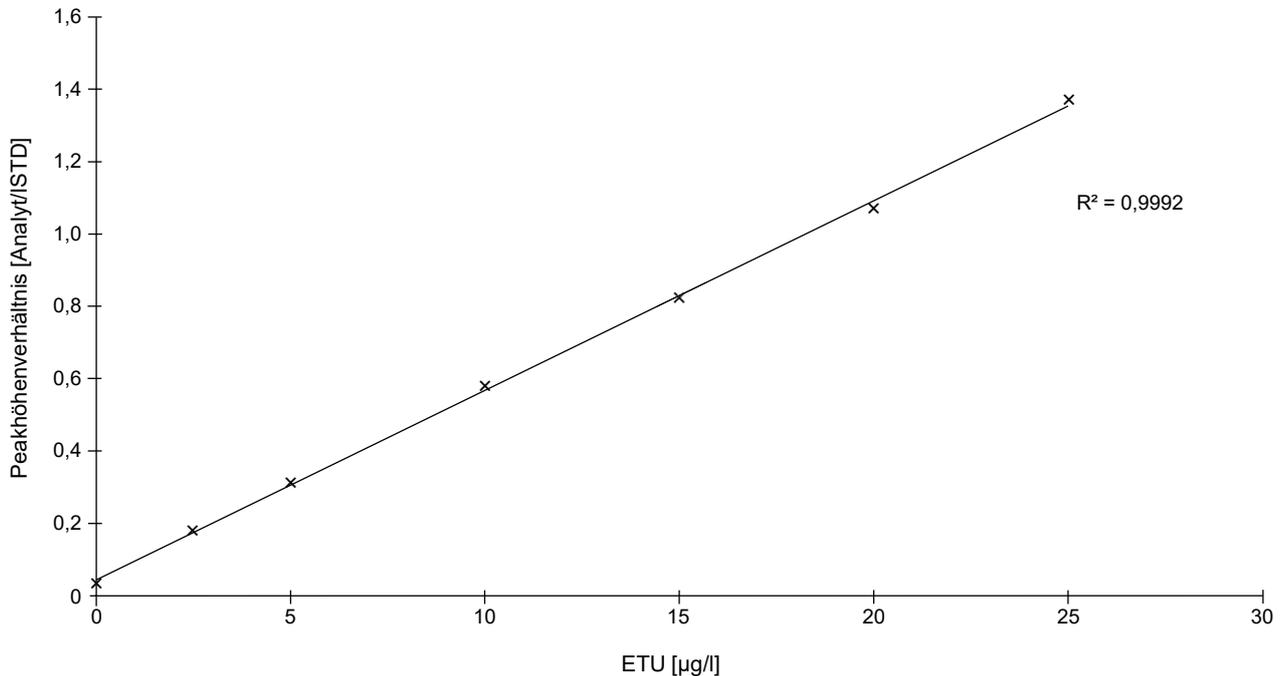


Abb. 2 Kalibriergerade für die Bestimmung von ETU in Urin

## 9 Berechnung der Analyseergebnisse

Zur Berechnung des Analytgehaltes in einer Urinprobe wird der Quotient aus der Höhe des Analytpeaks und der des ISTD-Peaks gebildet. Mithilfe der zur Analysenserie gehörenden Kalibrierfunktion (vgl. [Abschnitt 8](#)) kann aus dem ermittelten Quotienten der Analytgehalt in µg/l Urin berechnet werden. Liegt das Messergebnis oberhalb des Kalibrierbereichs, so wird die entsprechende Probe mit hochreinem Wasser verdünnt, erneut aufgearbeitet und analysiert.

## 10 Standardisierung der Messergebnisse und Qualitätssicherung

Zur Sicherung der Qualität der Analyseergebnisse wird gemäß den Richtlinien der Bundesärztekammer und den Angaben in dem von der Kommission veröffentlichten allgemeinen Kapitelverfahren (Bader et al. 2010; Bundesärztekammer 2014). Zur Präzisionskontrolle sollten bei jeder Analysenserie mindestens zwei Qualitätskontrollproben mit niedriger ( $Q_{\text{low}}$ ) und hoher ( $Q_{\text{high}}$ ) Analytkonzentration mituntersucht werden.

Zur Herstellung der Qualitätskontrollproben wird Poolurin nicht gegen ETU exponierter Personen verwendet. Die Analytkonzentration im Qualitätskontrollmaterial sollte dabei im relevanten Konzentrationsbereich liegen (vgl. [Abschnitt 9](#)). Aliquote dieser Proben werden bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert und bei jeder Analysenserie als Qualitätskontrollproben mitgeführt.

## 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 bestätigt.

## 11.1 Präzision

Die Präzision in der Serie wurde bestimmt, indem zehn Individualurinproben von Personen ohne bekannte ETU-Exposition mit 1 µg ETU/l dotiert und analysiert wurden. Zudem wurden Qualitätskontrollproben (10 µg/l) zehnfach aufgearbeitet und analysiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in [Tabelle 3](#) zusammengestellt.

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

Analyt	Ermittelter Gehalt [µg/l]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
ETU	1,14	2,50	4,28
	8,72	1,89	5,66

Für die Bestimmung der Präzision von Tag zu Tag wurden die zehn mit 1 µg ETU pro Liter dotierten Individualurinproben sowie zehn Qualitätskontrollproben (10 µg ETU pro Liter) an sechs unterschiedlichen Tagen aufgearbeitet und analysiert. Die Daten sind in [Tabelle 4](#) zusammengestellt.

**Tab. 4** Präzision von Tag zu Tag für die Bestimmung von ETU in Urin (n = 6)

Analyt	Ermittelter Gehalt [µg/l]	Standardabweichung (rel.) $s_w$ [%]	Streubereich $u$ [%]
ETU	1,20	6,28	16,1
	8,63	4,83	12,4

## 11.2 Richtigkeit

Von den Prüfern der Methode wurde die Richtigkeit der Methode und der Einfluss möglicher Matrixeffekte an zehn Individualurinen mit Kreatiningehalten im Bereich von 0,65 bis 2,52 g/l geprüft. Die Urine wurden mit 12,6 µg ETU/l dotiert. Es wurden jeweils die undotierten sowie die dotierten Urinproben aufgearbeitet und analysiert. Die Berechnung der relativen Wiederfindung erfolgte anhand der ermittelten Gehalte in den dotierten Urinen unter Abzug eventueller Hintergrundgehalte. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen sind in [Tabelle 5](#) dargestellt.

**Tab. 5** Mittlere relative Wiederfindungsrate für die Bestimmung von ETU in Urin (n = 10)

Analyt	Hintergrundgehalt [µg/l]	Dotierte Konzentration [µg/l]	Mittlere rel. Wiederfindungsrate $r$ [%]	Bereich [%]
ETU	0,14–4,11	12,6	98 ± 5	89,6–105

## 11.3 Matrixeffekte

Acht Urinproben von Personen ohne bekannte ETU-Exposition sowie hochreines Wasser wurden jeweils dreimal mit 10 µg ETU/l und 25 µg  $d_4$ -ETU/l dotiert, aufgearbeitet und analysiert. Zusätzlich wurde Methanol mit 10 µg ETU/l sowie 25 µg  $d_4$ -ETU/l versetzt. Diese Methanolprobe wurde nicht aufgearbeitet, sondern direkt im Stickstoffstrom zur Trockne abgeblasen und der Rückstand in mobiler Phase wiederaufgenommen und vermessen. Das Peakhöhenverhältnis ETU/ $d_4$ -ETU der dotierten Urinproben wurde mit dem Peakhöhenverhältnis der Methanolprobe verglichen (siehe [Tabelle 6](#)). Ein Vergleich der Wiederfindung in Urin (Bereich 113–129 %) mit der in Wasser (102 %) zeigt, dass ein Matrixeffekt vorliegt. Um richtige Messergebnisse zu erhalten, muss demzufolge matrixangepasst in Urin kalibriert werden. Nimmt man die unterschiedlichen Kreatiningehalte der Urinproben als Maß für die Komplexität der Urinmatrix, so hat die Komplexität der Matrix insgesamt nur einen geringen Einfluss auf die Messergebnisse, da die Wiederfindung bei unterschiedlichen Kreatiningehalten nur geringfügig schwankt (siehe [Tabelle 6](#)).

**Tab. 6** Matrixeffekte bei der Bestimmung von ETU in Urin (n = 3)

Probe	Kreatinin [g/l]	Mittleres Peak-Verhältnis ETU/d <sub>t</sub> -ETU	Relative Wiederfindungsrate r [%]
1	0,35	0,25 ± 0,01	113
2	0,70	0,25 ± 0,01	113
3	1,14	0,26 ± 0,00	121
4	1,52	0,27 ± 0,01	125
5	1,62	0,27 ± 0,00	123
6	1,92	0,28 ± 0,00	129
7	2,22	0,26 ± 0,00	117
8	2,63	0,27 ± 0,01	125

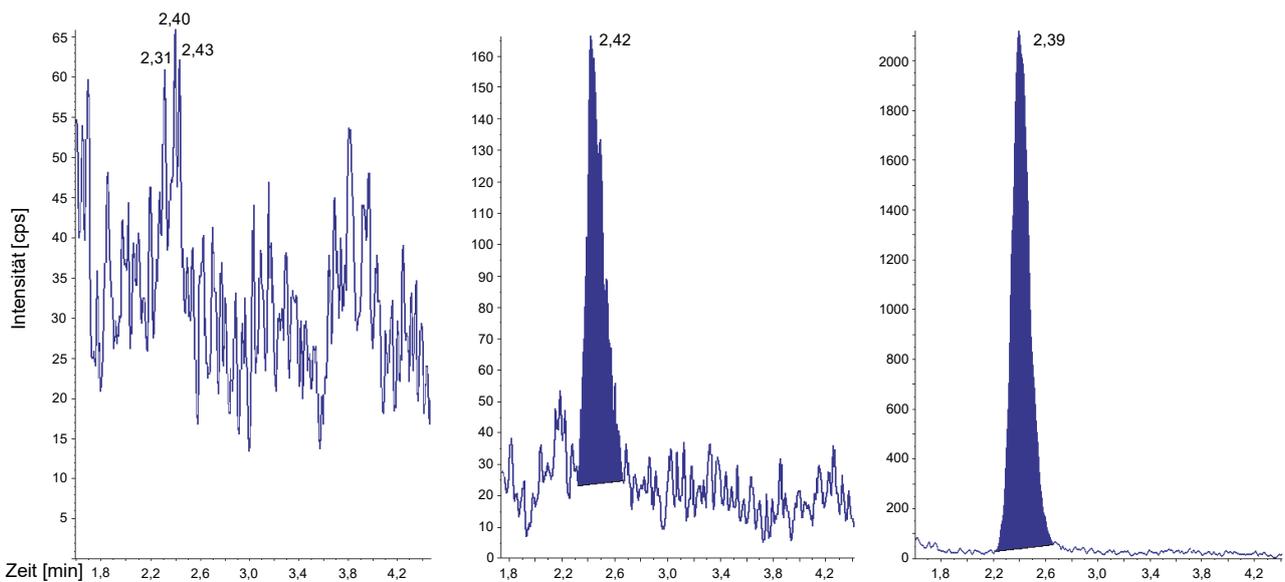
### 11.4 Nachweis- und Bestimmungsgrenze

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 7](#) dargestellt. Chromatogramme einer undotierten, einer im Bereich der Nachweisgrenze (0,25 µg/l) dotierten sowie einer mit 25 µg ETU/l dotierten Urinprobe sind in [Abbildung 3](#) dargestellt.

Die Prüfer der Methode hat die Nachweis- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645 (DIN 2008) bestimmt und Werte von 0,11 µg/l und 0,34 µg/l erhalten.

**Tab. 7** Nachweis- und Bestimmungsgrenzen für die Bestimmung von ETU in Urin

Analyt	Nachweisgrenze [µg/l]	Bestimmungsgrenze [µg/l]
ETU	0,25	0,5



**Abb. 3** Chromatogramme einer undotierten, einer im Bereich der Nachweisgrenze (0,25 µg/l) dotierten sowie einer mit 25 µg ETU/l dotierten Urinprobe

## 11.5 Störeinflüsse

ETU wird in Gegenwart von UV-Sensibilisatoren leicht zu Ethylenharnstoff photooxidiert (IPCS 1988). Um den Abbau von ETU und daraus resultierende Fehler zu vermeiden, sollten alle Stamm- und Arbeitslösungen vor direkter Sonneneinstrahlung geschützt werden.

## 12 Diskussion der Methode

Die hier beschriebene Analysenmethode gestattet eine einfache, zuverlässige und sensitive Bestimmung der ETU-Konzentration in Urin. Sie ist gut reproduzierbar und in einem Konzentrationsbereich von 2,5–25 µg ETU/l linear. Die hier vorgestellte Methode ähnelt einer von Jones et al. (2010) beschriebenen Methode und erreicht die gleiche Nachweisgrenze (0,25 µg/l), besitzt allerdings einige Vorteile. Die von Jones et al. (2010) beschriebene Methode verwendet APCI (*Atmospheric Pressure Chemical Ionisation*; Chemische Ionisierung bei Atmosphärendruck) zur Ionisierung, wodurch höhere Flussraten (0,8 ml/min) und damit größere Volumina an mobiler Phase erforderlich sind. Die hier dargestellte Methode nutzt dagegen positive Elektrospray-Ionisierung und benötigt bei einer Flussrate von 0,2 ml/min und gleichzeitig verkürzter Analysendauer nur ein Zwölftel des Eluentenvolumens verglichen mit der Methode von Jones et al. (2010). Durch die kurze Laufzeit von fünf Minuten eignet sich die hier beschriebene Methode auch für Labore mit hohem Probanddurchsatz. Die Verwendung der Tandem-Massenspektrometrie führt zu einer hohen Spezifität und Sensitivität der Methode.

Die Entwickler der Methode haben den Urin von 361 Personen aus der Allgemeinbevölkerung des Vereinigten Königreichs vermessen und eine mittlere ETU-Hintergrundbelastung von 1,3 µg/g Kreatinin ( $\approx 1$  µg ETU/l) gefunden (Jones et al. 2010).

**Verwendete Messgeräte** HPLC-System (Shimadzu UK Limited, Milton Keynes, Vereinigtes Königreich); HPLC-Säule: Gemini 5 µ C18, 150 × 2 mm (Phenomenex Inc., Macclesfield, Vereinigtes Königreich); Tandem-Massenspektrometer (Life Technologies Applied Biosystems API 3200 QTRAP, AB SCIEX Germany GmbH, Darmstadt); C18-Vorsäule (Phenomenex Inc., Macclesfield, Vereinigtes Königreich)

## Anmerkungen

### Interessenkonflikte

Die in der Kommission etablierten Regelungen und Maßnahmen zur Vermeidung von Interessenkonflikten ([https://www.dfg.de/dfg\\_profil/gremien/senat/arbeitsstoffe/interessenkonflikte/index.html](https://www.dfg.de/dfg_profil/gremien/senat/arbeitsstoffe/interessenkonflikte/index.html)) stellen sicher, dass die Inhalte und Schlussfolgerungen der Publikation ausschließlich wissenschaftliche Aspekte berücksichtigen.

## Literatur

- Aprèa C, Betta A, Catenacci G, Lotti A, Minoia C, Passini W, Pavan I, Saverio Robustelli della Cuna F, Roggi C, Ruggeri R, Soave C, Sciarra G, Vannini P, Vitalone V (1996) Reference values of urinary ethylenethiourea in four regions of Italy (multicentric study). *Sci Total Environ* 192(1): 83–93. DOI: [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(96\)05300-4](https://doi.org/10.1016/0048-9697(96)05300-4)
- 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*. Bd 2: Analysen in biologischem Material, 19. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim, 284–336. Auch erhältlich unter DOI: <https://doi.org/10.1002/3527600418.bireliabd0019>
- Bundesärztekammer (2014) Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen. *Dtsch Arztebl* 111(38): A1583–A1618

- DECOS (Dutch Expert Committee on Occupational Standards) (1999) Ethylene thiourea: health-based recommended occupational exposure limit. Report of the Dutch Expert Committee on Occupational Standards, a committee of the Health Council of the Netherlands, No. 1999/03OSH. DECOS, Den Haag. [https://www.healthcouncil.nl/binaries/healthcouncil/documents/advisory-reports/1999/08/30/ethylene-thiourea-health-based-recommended-occupational-exposure-limit.pdf](https://www.healthcouncil.nl/binaries/healthcouncil/documents/advisory-reports/1999/08/30/ethylene-thiourea-health-based-recommended-occupational-exposure-limit/advisory-report-ethylene-thiourea-health-based-recommended-occupational-exposure-limit.pdf), abgerufen am 14 Apr 2021
- DIN (Deutsches Institut für Normung) (Hrsg) (2008) DIN 32645:2008-11. Chemische Analytik – Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze unter Wiederholbedingungen – Begriffe, Verfahren, Auswertung. Beuth, Berlin. DOI: <https://doi.org/10.31030/1465413>
- DK EPA (Danish Environmental Protection Agency) (2004) Mapping and release of chemical substances from products made of chloroprene. Survey of chemical substances in consumer products. No. 51. DK EPA, Kopenhagen. <https://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2004/87-7614-767-3/pdf/87-7614-768-1.pdf>, abgerufen am 18 Mrz 2021
- DK EPA (Danish Environmental Protection Agency) (2012) Survey and health assesment of thiourea compounds in chloroprene rubber. Survey of chemical substances in consumer products. No. 118. DK EPA, Kopenhagen. <https://www2.mst.dk/Udgiv/publications/2012/06/978-87-92903-27-3.pdf>, abgerufen am 17 Mrz 2021
- Europäische Kommission (2014) Durchführungsverordnung (EU) Nr. 92/2014 der Kommission vom 31. Januar 2014 über die Zulassung von Zineb als alter Wirkstoff zur Verwendung in Biozidprodukten des Produkttyps 21 (Text von Bedeutung für den EWR). AB L (32): 16–18
- Europäische Kommission (2020) Durchführungsverordnung (EU) 2020/2087 der Kommission vom 14. Dezember 2020 zur Nichterneuerung der Genehmigung für den Wirkstoff Mancozeb gemäß der Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 des Europäischen Parlaments und des Rates über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln und zur Änderung des Anhangs der Durchführungsverordnung (EU) Nr. 540/2011 der Kommission (Text von Bedeutung für den EWR). AB L (423): 50–52
- Europäische Kommission (2021) Durchführungsverordnung (EU) 2021/52 der Kommission vom 22. Januar 2021 zur Änderung der Genehmigung für die Wirkstoffe Benfluralin, Dimoxystrobin, Fluazinam, Flutolanil, Mecoprop-P, Mepiquat, Metiram, Oxamyl und Pyraclostrobin (Text von Bedeutung für den EWR). AB L (23): 13–15
- Greim H (Hrsg) (1995) Ethylenthioharnstoff. In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 21. Lieferung. VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb9645d0021>
- Greim H (Hrsg) (2001) Mangan-N,N'-ethylen-bis-(dithiocarbamat) (Maneb). In: Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe, Toxikologisch-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten, 33. Lieferung. Wiley-VCH, Weinheim. Auch erhältlich unter DOI: <https://doi.org/10.1002/3527600418.mb1242738d0033>
- IARC (International Agency for Research on Cancer) (2001) Ethylenethiourea. In: Some thyrotropic agents. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Bd 79. IARC Press, Lyon, 659–702. <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono79.pdf>, abgerufen am 13 Apr 2021
- IPCS (International Programme on Chemical Safety) (1988) Dithiocarbamate pesticides, ethylenethiourea, and propylenethiourea: a general introduction. Environmental health criteria, No. 78. WHO, Genf. <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc78.htm>, abgerufen am 14 Apr 2021
- Jones K, Patel K, Cocker J, Bevan R, Levy L (2010) Determination of ethylenethiourea in urine by liquid chromatography–atmospheric pressure chemical ionisation–mass spectrometry for monitoring background levels in the general population. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 878(27): 2563–2566. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.10.028>
- Lentza-Rizos C (1990) Ethylenethiourea (ETU) in relation to use of ethylenebisdithiocarbamate (EBDC) fungicides. Rev Environ Contam Toxicol 115: 1–37. DOI: [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3416-6\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3416-6_1)
- Lindh CH, Littorin M, Johannesson G, Jönsson BAG (2008) Analysis of ethylenethiourea as a biomarker in human urine using liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 22(16): 2573–2579. DOI: <https://doi.org/10.1002/rcm.3647>
- Montesano MA, Olsson AO, Kuklenyik P, Needham LL, Bradman ASA, Barr DB (2007) Method for determination of acephate, methamidophos, omethoate, dimethoate, ethylenethiourea and propylenethiourea in human urine using high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. J Expo Sci Environ Epidemiol 17(4): 321–330. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.jes.7500550>
- NTP (National Toxicology Program) (2011) Report on carcinogens. NTP, Research Triangle Park, NC. <https://oehha.ca.gov/media/downloads/crntr/ntp2011roc12.pdf>, abgerufen am 10 Feb 2021
- Rose D, Pearson GM, Zuker M, Roberts JR (1980) Ethylenethiourea: criteria for the assessment of its effects on man. NRCC Publication No. 18469. National Research Council of Canada, Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality, Ottawa