—原著—

血液・尿中での硫化物およびチオ硫酸塩の冷蔵保存変化

柘 浩一郎, 片岡 美江子, 瀬戸 康雄

科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉6-3-1

Stability of Sulfide and Thiosulfate in Blood and Urine during 4°C Storage

Kouichiro Tsuge, Mieko Kataoka and Yasuo Seto

*National Research Institute of Police Science**6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan**(Received 29 July 1999; accepted 19 January 2000)*

The stability of sulfide and thiosulfate in human blood and urine during 4°C storage has been investigated. A human blood and urine samples supplemented with a known amount of sulfide or thiosulfate were stored at 4°C, and periodically analyzed for concentration of these compounds by GC-MS after pentafluorobenzyl derivatization. In urine supplemented with sulfide, its level was quickly decreased, resulting in no detection after 24 hr, and instead the metabolite thiosulfate was produced, which level reached the plateau of about 30% molar recovery of the added sulfide. In urine supplemented with thiosulfate, its level was quickly decreased within 1 hour and reached the plateau of about 50% molar recovery. In blood supplemented with sulfide, its level was quickly decreased within 1hr and the level reached the plateau of 60% molar recovery. The metabolite thiosulfate was produced, which level reached the plateau of about 50% molar recovery. Thiosulfate level in blood returned to the original level within a few hours after a quick decrease. The production of the derivatives of sulfide and thiosulfate in blood showed remarkable matrix effect (about one fifth in peak area) compared to those in water or urine. From blood supplemented with sulfide, a slightly raised recovery level of sulfide was obtained by addition of 2-mercaptoethanol, suggesting that a part of sulfide spiked to blood was trapped covalently in disulfide containing substances.

Key words: sulfide, thiosulfate, blood, urine, stability

緒 言

硫化水素は強い臭気をもった刺激性の有害性ガスであり, 火山ガスとして, あるいは下水道・し尿処理施設等で発生する腐敗ガスとして広く知られている。硫化水素による中毒死者は毎年数名発生しており¹⁾, 火山等での中毒事故はもとより, 下水道内や工場等で発生した産業中毒事案に関しては, 事故, 事件両面の可能性があることから, その中毒原因の

法科学的な証明が必要とされている。

硫化水素は生体内で H_2S および HS^- の2つの解離状態で存在しており, また同様にチオ硫酸についても生体内で解離して塩として存在していることから, 本論文では生体内に入った硫化水素をまとめて硫化物と称し, チオ硫酸についてはチオ硫酸塩と称する。

硫化物の代謝経路はFig. 1に示すように, (1) 硫酸

Fig.1 Metabolic pathways of sulfide

への酸化, (2) メチル化, (3) metalloproteinやジスルフィド結合をもった物質との反応の3通りの経路があると考えられている²⁾. 硫化物の主代謝経路は(1)であるといわれており, 肝臓のsulfide oxidaseを介する経路³⁾などでチオ硫酸塩となり⁴⁾, 次いでグルタチオン(GSH)を介した亜硫酸塩への酸化⁵⁾, および肝臓・腎臓に存在するsulfite oxidase⁶⁾によって最終代謝産物である硫酸塩へ至る. (2)の経路については, Weisiger⁷⁾らが⁸⁾, ヒトのthiol S-methyltransferaseを同定し, この反応が硫化物の代謝経路の一つであると考えられるようになった. また(3)の経路としては, metalloproteinやジスルフィド結合を持った物質との反応がある. チトクロームオキシダーゼ aa_3 はシアンと同様に硫化物の毒性発現の要となるターゲット酵素であり^{8,9)}, 硫化物と結合して活性を失うことが知られている. また, 硫化物はこれ以外にも生体内のタンパク質などと結合¹⁰⁾するものと考えられている.

硫化水素中毒の証明は, 被害者の試料から硫化物およびその代謝物を定量することによって行われる. 硫酸塩は健常人の尿や血液中にも多量に含まれており, 硫化水素中毒によるその濃度変化は小さいので中毒の指標としては適切でないとされている¹¹⁾. 一方, 硫化物の健常人での血中濃度は $0.1 \sim 1.6 \mu\text{M}$ 程度であり, 硫化水素中毒死者の場合, 血液中から $4 \sim 150 \mu\text{M}$ 程度の硫化物が検出されている¹¹⁾. また, チオ硫酸塩も中毒の指標として用いられており, チオ硫酸塩の健常人での血中濃度は $0.6 \sim 3.0 \mu\text{M}$ 程度であるのに対し, 死者では $25 \sim 143 \mu\text{M}$ が検出された例がある¹¹⁾. 尿については健常人で $7 \mu\text{M}$ 程度, 中毒事故の生存者で $120 \sim 500 \mu\text{M}$ 程度が報告されており¹¹⁾, 特に, 生存者においては尿中のチオ硫酸塩の定量が有効であるといわれている¹²⁾.

硫化物およびチオ硫酸塩の生体試料からの分析法としては, これまでに多様な方法が報告されている. 硫化物の分析は有機溶媒抽出¹³⁾やConway微量拡散器¹⁴⁾などを用いた前処理を行った後, イオンクロマトグラフィー^{15,16)}, 誘導体化HPLC^{14,17,18)}, GC-FPD¹³⁾, 誘導体化GC-MS¹⁹⁾等による分析例が報告されている. チオ硫酸塩は前処理を行った後, イオンクロマトグラフィー²⁰⁾, 誘導体化HPLC^{21,22)}, 誘導体化GC²³⁾(GC-MSまたはGC-ECD)などで分析が行われている. それらの分析法の中でKageらのペンタフルオロベンジル誘導体化を利用したGC-MSによる分析法^{19,23)}は, 血液などの生体試料を用いた場合でも煩雑な前処理操作を必要とせず, 比較的高感度で分析できるという点, さらに, 質量スペクトルによって化合物の確実な同定が行えるという点で裁判化学的に優れた分析法である.

中毒事故の際には, 速やかに分析が行われ, 中毒原因の推定が行われるが, 実際には様々な問題が残されている. すなわち, 中毒死者は大学の法医学教室などで解剖に付され, 生体試料が採取される. また, 生存者は病院等で検査のために採血あるいは採尿を受ける. しかしながら, 解剖や採血などの後, 直ちに分析が行われず, 他の検査機関や都道府県の科学捜査研究所等で検査が行われる場合もある. そこで, 試料の採取後, 分析に至るまでの保存中に中毒物質あるいは中毒の指標となりうる物質が失われたり, 逆に腐敗等によって生成することも有りうる. したがって, 中毒原因の推定にあたっては, 死後変化や保存中の変化についても十分に考慮して判定を行わねばならない. 硫化水素中毒の証明に用いられる硫化物およびチオ硫酸塩の試料採取後の保存変化については, 死体や試料の腐敗の過程で硫化物が生成するといった知見²⁴⁾を除いては, これまでほとん

ど検討が行われてはいない。そこで、本研究では血液および尿試料中に硫化物およびチオ硫酸塩を添加して定量を行い、生体試料中でのこれらの物質の安定性について検討を行った。またこれとあわせて硫化物の生体試料中における動態についても検討を行った。

実験方法

材料

血液および尿試料

血液はヒト輸血用保存血を用い、尿は健常人より採取した。

試薬

(1) 硫化物分析用試薬

硫化物の標準溶液は硫化ナトリウム九水和物（和光純薬製）を、窒素を吹き込み脱酸素処理した蒸留水で作成した飽和四ホウ酸ナトリウム溶液に溶解して作成し、用時調製した。ペンタフルオロベンジルブロマイド(PFBBBr)はArdrich製を用い、20 mMトルエン溶液を作成した。tetradecyldimethylbenzylammonium chloride (TDMBA)は東京化成工業製を用い、脱酸素蒸留水で5 mM水溶液とした。内部標準物質としては1,3,5-tribromobenzene(TBB)を用い、20 μ M酢酸エチル溶液を作成した。

(2) チオ硫酸塩分析用試薬

チオ硫酸塩の標準溶液はチオ硫酸ナトリウム五水和物（和光純薬製）を蒸留水に溶解して作成した。PFBBBr溶液は20mMアセトン溶液として、ヨウ素溶液は25mM酢酸エチル溶液として作成した。内部標準物質（TBB）は80 μ M酢酸エチル溶液として作成した。

また、その他の試薬については和光純薬特級を用いた。

装置

GC-MS分析はサーモクエスト製GC-Qガスクロマトグラフ質量分析計を用い、カラムはJ & W社製DB-5MS (30m, 0.25mm I.D., 膜厚 0.25 μ m)を用いた。

実験操作

各試料中における硫化物・チオ硫酸塩の安定性

試料血液および健常人の尿5.0mlに、硫化物については100 μ M、チオ硫酸塩については250 μ Mとなるようにそれぞれ標準液を添加し、4℃で保存した。なお、この濃度は実際の中毒事例を参考に設定した。次に、これを経時的に採取し、下記に示す誘導体化

反応の後、GC-MSによる定量を行った。また、検量線は血液、尿および蒸留水に各標準液を添加し、直後に誘導体化反応およびGC-MSを行って作成した。

誘導体化反応

誘導体化反応は既報^{19,23)}に基づいて行ったが、内部標準物質の濃度を変更した。

(1) 硫化物の誘導体化

試料200 μ lを共栓付試験管に採取し、5mM TDMBA溶液800 μ l, 20mM PFBBBr溶液500 μ l, 20 μ M TBB溶液2.0mlを加え、Vortexミキサーで1分間激しく攪拌した。次に、リン酸二水素カリウム50mgを添加し、再び30秒間激しく攪拌した。遠心分離後、その上層1 μ lをGC-MS分析に供した。

(2) チオ硫酸塩の誘導体化

試料200 μ lを共栓付試験管に採取し、200mMアスコルビン酸水溶液50 μ l, 5%塩化ナトリウム水溶液50 μ l, および20mM PFBBBr溶液500 μ lを添加し、Vortexミキサーで1分間激しく攪拌した。その後、25mMヨウ素溶液2.0ml, 80 μ M TBB溶液500 μ lを加え、再び30秒間激しく攪拌した。遠心分離後、その上層1 μ lをGC-MS分析に供した。

GC-MS条件

カラム温度：110℃で2分間保持、20℃/minで290℃まで昇温し、5分間保持。注入口温度：250℃。キャリアガス：ヘリウム (1.0ml/min)。試料注入：スプリットレス法。イオン化法：電子衝撃イオン化(ED)法。イオン化電圧：70eV。イオン化電流：250 μ A。測定質量範囲： m/z 50-450（スキャン法）および m/z 181, m/z 314（SIM法）。

血液成分と結合した硫化物の還元

血液試料2.0mlを共栓付き試験管に採取し、硫化物が1mMとなるように硫化ナトリウム標準液を添加し、十分に混和した。その直後、2-メルカプトエタノールを原液のまま0~50mMとなるように添加し、十分に攪拌した。常温で30分静置した後、試料が均質になるように攪拌してから、誘導体化GC-MSによる硫化物の定量を行った。

結 果

血液および尿試料中の硫化物およびチオ硫酸塩の分析

硫化物、チオ硫酸塩のPFB誘導体および内部標準であるTBBの全イオンクロマトグラムをFig. 2に、また、各ピークに対するマススペクトルをFig. 3に示した。硫化物のPFB誘導体は保持時間6分35秒、チオ硫酸塩のPFB誘導体は7分20秒に、内部標準物質である

Fig. 2 Total ion chromatograms and extracted ion chromatograms of pentafluorobenzylated sulfide (A) and thiosulfate (B).

I.S.: 1,3,5-tribromobenzene

Fig.3 Mass spectra of pentafluorobenzylated sulfide (A), thiosulfate(B), and 1,3,5-tribromobenzene(C).

TBBは5分40秒にそれぞれピークが検出された。また、各ピークのマスペクトルでは、硫化物のPFB誘導体化物で分子イオンである m/z 394をはじめPFB誘導体に特徴的な m/z 181のフラグメントイオンが認められた。同様にチオ硫酸塩のPFB誘導体では、分子イオン m/z 426および m/z 181のフラグメントイオンが認められた。さらに、TBBにおいては分子イオンピーク $(M+2)^+$ として m/z 314、および臭素の脱離ピークである m/z 235の特徴的なフラグメントイオンが検出された。

Table 1 Calibration curves for sulfide and thiosulfate spiked to various matrix solution

Compounds	Matrix	Calibration curve	Range	r
Sulfide	Water	$y = 9.987x - 0.132$	(0-100 μM)	0.999
	Urine	$y = 10.585x - 0.119$	(0-100 μM)	0.999
	Blood	$y = 2.104x + 0.129$	(0-100 μM)	0.998
Thiosulfate	Water	$y = 8.093x + 0.014$	(0-1000 μM)	0.999
	Urine	$y = 8.191x - 0.008$	(0-1000 μM)	1.000
	Blood	$y = 1.284x + 0.055$	(0-1000 μM)	0.999

y: peak area ratio of each compound to internal standard
x: concentration (μM)

検量線の作成

蒸留水、尿および血液に、硫化物を終濃度0~100 μM 範囲で、チオ硫酸塩を終濃度0~1000 μM 範囲で添加し検量線を作成した(Table 1)。その結果、この濃度範囲内で良好な直線性が得られたが、血液に添加した場合の検量線の傾きは蒸留水および尿に添加した検量線の傾きに比べ1/5程度であった。

また、検出限界は硫化物で尿または蒸留水中2 μM 、血中10 μM 程度であり、チオ硫酸塩では尿または蒸留水中5 μM 、血中20 μM 程度であった。これは健康人の内因性硫化物量およびチオ硫酸塩量を測定するには感度が不十分であり、本実験ではブランク尿や血液からは硫化物やチオ硫酸塩は検出されなかった。再現性は良好であり、5回測定時の標準偏差は、蒸留水中の硫化物100 μM 測定時で3.2%、同じくチオ硫酸塩1000 μM 測定時で8.7%であり、尿、蒸留水および血液に添加した場合もほぼ同等の再現性が得られた。

尿、血液試料中における硫化物およびチオ硫酸塩の安定性

(1) 尿試料中における安定性

尿試料に硫化物を添加した場合、その濃度は対数的に減衰し、72時間後には検出限界以下となった。また、硫化物の減少に伴ってそれまで検出されなかったチオ硫酸塩に相当するピーク、すなわちbis(pentafluorobenzyl)disulfideが検出された。この量は12時間後以降安定しており、検出されたこの誘導体がすべてチオ硫酸塩由来のものと考え、硫黄の原子数から換算して添加硫化物の30%程度が変換されたことになる(Fig. 4)。

チオ硫酸塩については添加後、1、2時間までは減少傾向をみせたが、2時間後以降の濃度は安定し、その量は添加量の約50%程度であった(Fig. 5)。

Fig.4 Stability of sulfide in urine.

—●— sulfide —○— thiosulfate

Fig. 5 Stability of thiosulfate in urine.

(2) 血液試料中における安定性

血液試料において、硫化物は比較的安定に検出され、48時間後の検出量は添加量の約50%であった。また、尿試料の場合と同様に、チオ硫酸塩に相当するbis(pentafluorobenzyl)disulfideが検出され、その生成率は24時間後の硫黄原子数換算で添加硫化物の50%程度であった。(Fig. 6).

Fig. 6 Stability of sulfide in whole blood
—●— sulfide —○— thiosulfate

Fig. 7 Stability of thiosulfate in whole blood.

一方、チオ硫酸塩はFig. 7に示すように一旦減少傾向をみせたものの、24時間以降は安定的に検出された。これは添加量に相当する量であった。

血液成分と結合した硫化物の還元

血液試料に最終濃度1mMの硫化物を添加し、2-メルカプトエタノール(2-ME)を加えてタンパク質等に結合したと考えられる硫化物を還元した。その結果、Fig. 8に示したように蒸留水に1mMの硫化物を添加して誘導体化GC-MSを行った検出量を100%とした場合、2-ME無添加では回収率24.6%であったのに対し、2-MEを10mM添加した場合の回収率は32.2%と上昇した。しかしながら、2-MEの濃度をそれよりも上げて回収率の上昇は認められず、逆に低下する傾向を示した。

Fig. 8 Effect of 2-mercaptoethanol addition on sulfide recovery in blood.

考 察

生体試料中における硫化物およびチオ硫酸塩の安定性

本研究では硫化水素中毒の指標となる硫化物およびチオ硫酸塩の生体試料中での保存変化について検討を行った。その結果、尿および血液に添加したチオ硫酸塩は比較的安定であり、24時間以降も十分な検出が可能であった。また、血液に添加したチオ硫酸塩は添加直後から数時間にかけて減少し、その後増加に転じているが、この原因については不明である。

一方、硫化物では尿に添加した場合には速やかに消失し、その一部はチオ硫酸塩に相当するピーク、すなわちbis(pentafluorobenzyl)disulfideとして検出され、その濃度は24時間後で約15 μMであった。この誘導体化物すべてがチオ硫酸塩由来であると仮定すると、添加した硫化物のうち約30%がチオ硫酸塩に

変化したと推定できる。これ以外の硫化物については、本実験に用いた尿のpHが約6.5であったことから、尿中で硫化物は一部 H_2S として存在し、揮散した可能性が考えられた。一方の血液中の硫化物は添加3日後でも約50%が残存していた。血液においても尿の場合と同様にbis(pentafluorobenzyl)disulfideが検出され、これがすべてチオ硫酸塩由来と仮定すると添加した硫化物の約50%がチオ硫酸塩に酸化されたと推定される。しかしながら、本分析法ではbis(pentafluorobenzyl)disulfideがチオ硫酸塩以外の含硫黄成分（ポリスルフィドなど）からも生成する可能性は否定できない。したがって、血液において硫化物がチオ硫酸塩に酸化された約50%の変換率は若干高く見積もっている可能性もある。

Baxterら³⁾は硫化物のチオ硫酸塩への酸化反応は、肝臓中のsulfide oxidaseによる酵素的な酸化と、熱に安定な非酵素的な酸化によるものの両者が存在することを示した。非酵素的な酸化はヘムを介した polysulfideの生成とその自発的なチオ硫酸塩への酸化によるもの^{25,26)}と考えられており、硫化物の主要な代謝場所は血液である²⁷⁾可能性を示唆している。

本研究の結果では、血液試料の場合だけでなく、尿試料においてもチオ硫酸塩が生成しており、ヘムを介さない何らかの非酵素的な酸化機構が存在することが示唆された。また、添加した硫化物は二硫化物（ HS-SH ）へ酸化される可能性もある。データは示さないが、少なくとも二硫化物についてはブランク血液の硫化物の分析時に、bis(pentafluorobenzyl)disulfideとして検出が可能であると考えられるが、それが検出されなかったことから、生成したチオ硫酸塩は二硫化物由来ではないと推定された。

一方、チオ硫酸塩は血液中、尿試料中ともに4℃での保存中は比較的安定であり、硫化水素中毒の証明にあたっては、保存中の変化が比較的少ないという点でもチオ硫酸塩の定量が適していると思われる。

硫化物の血液試料中における動態

本研究では、定量にあたり蒸留水、尿、血液に硫化物を添加して検量線を作成したが、血液をマトリクスとした場合の硫化物のPFB誘導体の検出量は蒸留水および尿をマトリクスとした場合の検出量の約20%程度であった。硫化物の添加直後に誘導体化反応を開始していることから、この回収率の低さは酵素的・非酵素的な酸化反応とは考えにくく、硫化物が血液成分と何らかの結合をしたためか、何らかの血液成分が誘導体化反応を阻害しているのではない

かと推定された。

硫化物はmetalloproteinやジスルフィドをもつタンパク質と強く結合することが知られており、硫化物によるsuccinic dehydrogenaseの阻害機構は硫化物がこの酵素のジスルフィド結合を還元し、その結果、酵素活性を失わせるためと考えられている¹⁰⁾。また、Smithらは酸化型グルタチオン（GSSG）の投与がマウスにおいて硫化水素中毒における延命をもたらす一方、還元型(GSH)にはその効果がないことを示し²⁸⁾、これらジスルフィド系化合物が体内で硫化物と結合することを示唆している。また、血液中にはアルブミン等の高濃度のタンパク質が存在する。そこで、血液において硫化物の回収率が低い原因の一つは、硫化物が血液中のタンパク質とジスルフィド結合を形成したためではないかと考え、2-メルカプトエタノール(2-ME)の添加によるジスルフィド結合の還元を試みた。その結果、2-MEを加えた場合では回収率が24.6%から32.2%に上昇し、血液中のタンパク質等に結合した硫化物が還元されたものと考えられた。また、高濃度の2-MEを添加した場合、硫化物の回収率が低下しているが、これは2-MEもPFBBrによる誘導体化を受けることから、大過剰量の2-MEが硫化物の誘導体化反応を阻害したためと推察された。

しかしながら、本実験で示したように2-MEによって還元を行っても添加した硫化物の全量が回収されたのではないことから、硫化物に対して、血液中で誘導体化されず検出が困難になるような何らかの反応が起こっていることが示唆された。血液中にはメトヘモグロ빈をはじめ様々な Fe^{3+} 、 Cu^{2+} を含有するmetalloproteinが存在していることから、添加した硫化物はこれらと結合し、その結果、硫化物の回収率が低下した可能性もあると考えられる。

結 語

本研究では血液および尿中における硫化物およびチオ硫酸塩の冷蔵保存中における安定性について検討を行った。その結果、チオ硫酸塩は尿および血液中いずれにおいても比較的安定に存在し、添加後、24時間後以降も検出が可能であった。一方、硫化物は血液中では24時間後も検出が可能であったが、尿中では速やかに消失することが明らかとなった。

また、血液に添加した硫化物の一部は血液中のジスルフィド結合をもつタンパク質等に結合していることが示唆された。

文 献

- 1) 科警研資料「薬物による中毒事故の発生状況」1990年～1997年
- 2) Beauchamp, R. O., Bus, J. S., Popp, A. J., Boreiko, C. J., Andjelkovich, D. A.: A Critical Review of the Literature on Hydrogen Sulfide Toxicity. *CRC Critical Rev. Toxicol.*, **13**, 25-97 (1997).
- 3) Baxter, C. F., van Reen, R., Person, P. B., Rosenberg, C.: Sulfide oxidation in rat tissues. *Biochim. Biophys. Acta.*, **27**, 584-591 (1958).
- 4) Baxter, C. F., van Reen, R.: Some aspects of sulfide oxidation by rat-liver preparations. *Biochim. Biophys. Acta.*, **28**, 567-573 (1958).
- 5) Koj, A., Frendo, J., Janik, Z.: [35S]-Thiosulphate oxidation by rat liver mitochondria in the presence of glutathione. *Biochem. J.*, **103**, 791-795 (1967).
- 6) MacLeod, R. M., Farkas, W., Fridovich, I., Handler, P.: Purification and properties of hepatic sulfide oxidase. *J. Biol. Chem.*, **236**, 1841-1846 (1961).
- 7) Weisiger, R. A., Jakoby, W. B.: S-methylation: thiol S-methyltransferase, In *Enzymatic Basis of Detoxification*, Vol. 2, pp. 131, Jakoby, W. B., Academic Press, New York (1980).
- 8) Nicholls, P.: The effect of sulphide on cytochrome aa₃. Isoteric and allosteric shifts of reduced a-peak. *Biochim. Biophys. Acta.*, **396**, 24-35 (1975).
- 9) Nicholls, P., Peterson, L. C., Miller, M., Hansen, F. B.: Ligand-induced spectral changes in cytochrome c oxidase and their possible significance. *Biochim. Biophys. Acta.*, **449**, 188-196 (1976).
- 10) Bergstermann, H., Lummer, H. D.: Action of hydrogen sulfide and its oxidation products on succinic acid dehydrogenase. *Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, **204**, 509-519 (1947).
- 11) Kage, S., Kudo, K., Ikeda, N.: 硫化水素中毒の化学的証明. *法中毒*, **16**, 179-189 (1998).
- 12) Kage, S., Takekawa, K., Kurosaki, K., Imamura, T., Kudo, K.: The usefulness of thiosulfate as an indicator of hydrogen sulfide poisoning: three cases. *Int. J. Legal Med.*, **110**, 220-222 (1997).
- 13) 田中 栄之介, 中村 貴子, 寺田 賢, 三澤 章吾, 鈴木 康男, 黒岩 幸雄: 蛍光光度検出器付ガスクロマトグラフィーによる液体及び臓器試料中の硫化水素の定量. *衛生化学*, **33**, 149-152 (1987).
- 14) Ogasawara, Y., Ishii, K., Togawa, T., Tanabe, S.: Determination of trace amounts of sulphide in human red blood cells by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection after derivatization with p-phenylenediamine and iron(III). *Analyst*, **116**, 1359-1363 (1991).
- 15) Han, K., Koch, W. F.: Determination of Sulfide at the Parts-per-Billion Level by Ion Chromatography with Electrochemical Detection. *Anal. Chem.*, **59**, 1016-1020 (1987).
- 16) Goodwin, L. R., Francom, D., Urso, A., Dieken, F. P.: Determination of Trace Sulfides in Turbid Waters by Gas Dialysis/Ion Chromatography. *Anal. Chem.*, **60**, 216-219 (1988).
- 17) Haddad, P. R., Heckenberg, A. L.: Trace determination of sulfide by reversed-phase ion-interaction chromatography using pre-column derivatization. *J. Chromatogr.*, **447**, 415-420 (1988).
- 18) Yamamoto, Y., Umeda, M., Morishige, K., Nishikawa, Y.: チオニンの蛍光特性とチオニン生成反応を用いる硫化物イオンの蛍光定量. *分析化学*, **37**, 421-425 (1988).
- 19) Kage, S., Nagata, T., Kimura, K., Kudo, K.: Extractive alkylation and gas chromatographic analysis of sulfide. *J. Forensic. Sci.*, **33**, 217-222 (1988).
- 20) Kågedal, B., Källberg, M., Mårtensson, J., Sörbo, B.: Reversed-Phase Ion-Pair Liquid Chromatographic Procedure with Electrochemical Detection for the Analysis of Urinary Thiosulphate. *J. Chromatogr.*, **274**, 95-102 (1983).
- 21) Kangas, J., Savolainen, H.: Urinary thiosulphate as an indicator of exposure to hydrogen sulphide vapour. *Clin. Chim. Acta*, **164**, 7-10 (1987).
- 22) Shea, M., Howell, S.: High-Performance Liquid Chromatographic Measurement of Exogenous Thiosulfate in Urine and Plasma. *Anal. Biochem.*, **140**, 589-594 (1984).
- 23) Kage, S., Nagata, T., Kudo, K.: Determination of Thiosulfate in Body Fluids by GC and GC/MS. *J. Anal. Toxicol.*, **15**, 148-150 (1991).
- 24) Nagata, T., Kage, S., Kimura, K., Kudo, K., Noda M.: Sulfide concentrations in postmortem mammalian tissues. *J. Forensic. Sci.*, **35**, 706-712 (1990).
- 25) Sörbo, B.: On the formation of thiosulfate from inorganic sulfide by rat liver tissue and heme compounds. *Biochim. Biophys. Acta.*, **27**, 324-329 (1958).

-
- 26) Sorbo, B.: On the mechanism of sulfide oxidation in biological systems. *Biochim. Biophys. Acta.*, **38**, 349-351 (1960).
- 27) Evans, C. L.: The toxicity of hydrogen sulfide and other sulfides. *J. Exp. Physiol.*, **52**, 231 (1967).
- 28) Simth, R. P., Abbanat, R. A.: Protective effect of oxidized glutathione in acute sulfide poisoning. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **9**, 209-217 (1966).