 DOI: 10.2478/cttr-2013-0264

# Gaschromatographische Bestimmung von Kohlenmonoxid in der Ausatmungsluft und im Blut*

*von K. Grieder und H. Buser*

*Forschungslaboratorium Vereinigte Tabakfabriken AG, Neuchâtel, Schweiz*

## 1. EINLEITUNG

Um das CO der Ausatmungsluft bei Rauchern und Nichtrauchern zu bestimmen, muß eine Methode zur Verfügung stehen, die empfindlich genug ist, einige ppm sicher nachzuweisen. *Forster* et al. (3) und *Lutmer* et al. (6) haben das CO der Ausatmungsluft nur bei relativ hohen Konzentrationen untersucht, da die verwendeten Infrarot-Gasanalysatoren auf Mengen unter 15 ppm nicht mehr ansprechen. Das von *Franke* (4) beschriebene Gasspürgerät (Farbindikator) erlaubt eine ausreichende Differenzierung bei CO-Gefährdung, Einzelmessungen sind jedoch für viele Untersuchungen mit einem zu großen Fehler behaftet. *Schwek* et al. (11) und *Porter* et al. (8) haben das CO zu $CH_4$ hydriert, welches mit einem FID eines Gaschromatographen nachgewiesen wurde.

Wie *Collison* et al. (2) gezeigt haben, läßt sich die katalytische Hydrierung auch auf die Bestimmung von kleinen CO-Konzentrationen im Blut, bei denen die Methoden von *Maehly* (7), *Chinn* et al. (1) und *Sachs* (9) versagen, anwenden.

Mit der in unserem Labor entwickelten Anordnung ist es möglich, das CO in der Ausatmungsluft wie auch im Blut von Rauchern und Nichtrauchern zu bestimmen.

## 2. PRINZIP DER METHODE

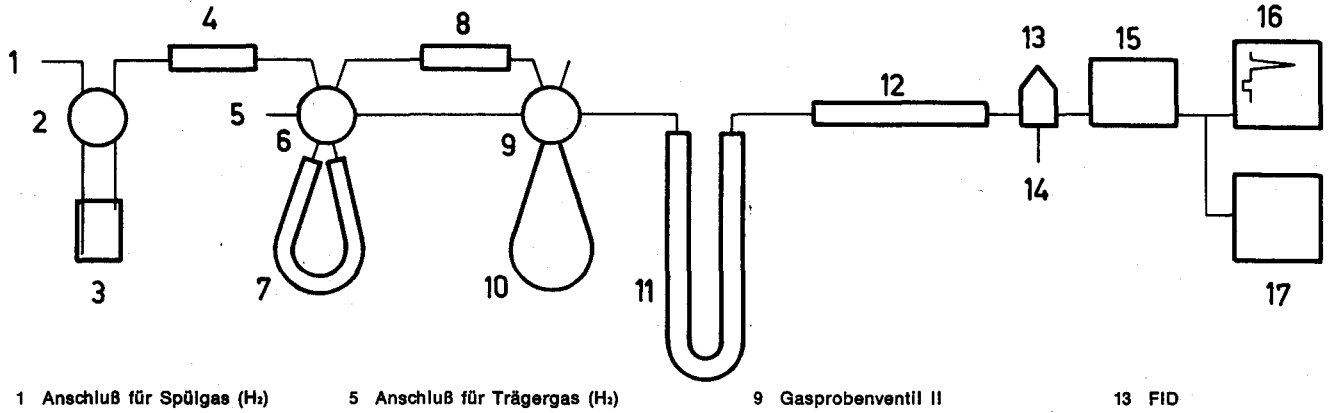
Die zu untersuchende Luftprobe wird mittels Gasprobenventil in den Trägergasstrom ($H_2$) geschleust. Auf einer Molekularsiebsäule 13X findet die Trennung des CO von $O_2$, $N_2$, Ar, $CH_4$** und $CO_2$ statt. Eine anschließende quantitative Hydrierung des CO zu $CH_4$ über einem Ni-Katalysator bei 290° C erlaubt die Erfassung mit der für den FID charakteristischen Empfindlichkeit.

Nach *Schwenk* et al. (11), *Porter* et al. (8) und *Collison* et al. (2) kommen Hydriertemperaturen zwischen 250° C und 300° C in Frage. Bei 290° C würde auch $CO_2$, das jedoch an der Molekularsiebsäule adsorbiert bleibt, zu Methan reduziert (11). Zur Bestimmung des CO im Blut wird das CO mit $K_3[Fe(CN)_6]$ aus 0,1 ml antikoaguliertem Blut freigesetzt und bei —196° C an einer Adsorptionssäule*** mit Molekularsieb 5A aufgefangen. Nach Beendigung der Reaktion wird das aufkonzentrierte CO ausgetrieben und in den Trägergasstrom geschleust.

## 3. APPARATUR

Die Versuchsanordnung geht aus Abb. 1 hervor. Die Hydriersäule von 30 cm × 4/2 mm aus rostfreiem Stahl,

**Abbildung 1. Versuchsanordnung zur gaschromatographischen Bestimmung von CO in der Luft und im Blut.**




1 Anschluß für Spülgas ($H_2$)
2 4-Weg-Hahn
3 Reaktionsgefäß (5 ml)
4 Trocknungsrohr
5 Anschluß für Trägergas ($H_2$)
6 Gasprobenventil I
7 Adsorptionssäule, 40 cm × 4/2 mm
8 Trocknungsrohr
9 Gasprobenventil II
10 Gasprobenschlaufe 4 ml
11 Trennsäule, 1 m × 4/2 mm
12 Hydriersäule, 30 cm × 4/2 mm
13 FID
14 Anschluß für Luft
15 Verstärker
16 Schreiber
17 Integrator

* Eingegangen am 1. Februar 1971.

** Wir haben in der Ausatmungsluft $CH_4$-Konzentrationen von 1—50 ppm festgestellt.

*** Ohne Aufkonzentrierung des CO würde eine Peakbreite von ungefähr 3 Min. erhalten. Der Peak würde außerdem ein starkes Tailing aufweisen, was besonders bei kleinen Konzentrationen störend wirkt.

gefüllt mit 10 % Ni auf Chromosorb P, befindet sich im thermostatisierten Ofen von 290° C des mit einem FID ausgerüsteten Gaschromatographen. Mit dieser Anordnung konnte die von *Schwenk* et al. (11) berichtete Nullpunktschwankung, verursacht durch den Hydrierofen, eliminiert werden.

Zur Herstellung des Ni-Katalysators wird Chromosorb P in einer wäßrigen $Ni(NO_3)_2$-Lösung getränkt und bei 350° C und < 1 mm Hg während 2 Stunden erhitzt.

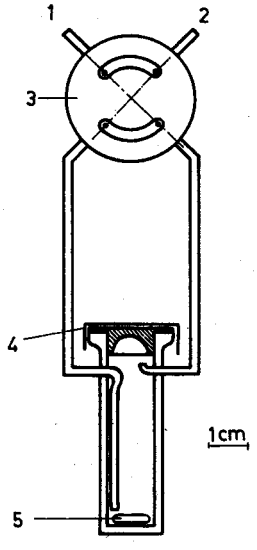
Die Reduktion vom Nickeloxid zum Nickel erfolgt anschließend in der Hydriersäule während 6 Stunden bei 350° C mit Wasserstoff (Trägergas).

Beim Gasprobenventil 1 ist die Gasprobenschlaufe durch eine Adsorptionssäule von 40 cm × 4/2 mm, gefüllt mit Molekularsieb 5A, ersetzt.

Sowohl die Trennsäule 1 m × 4/2 mm mit Molekularsieb 13X wie auch die Gasprobenschlaufe von 4 ml befinden sich außerhalb des Gaschromatographen in einem Wasserbad von 30° C. Trenn- und Hydriersäule sind durch Kapillarrohr verbunden. Das Reaktionsgefäß Abb. 2 ist über ein Trocknungsrohr an das Gasprobenventil 1 angeschlossen. Die angebrachten Trocknungsrohre mit Adsorptionsmittel für $CO_2$* und $H_2O$** verhindern eine zu rasche Desaktivierung der Adsorptions- und der Trennsäule.

**Abbildung 2. Reaktionsgefäß zur Freisetzung des CO aus dem Blut.**

1 Anschluß für Spülgas ($H_2$)
2 Anschluß zur Adsorptionssäule
3 4-Weg-Hahn
4 Tellergummikappe mit Verschlußring (Auer & Co. AG., Zürich)
5 Rührstäbchen




## 4. AUSFÜHRUNG DER BESTIMMUNG

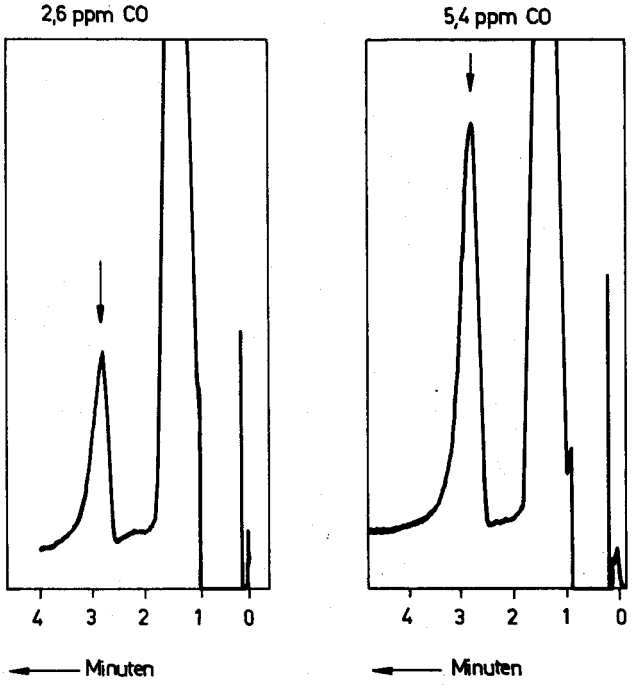
### *4.1 Kohlenmonoxid der Ausatmungsluft*

Die zu untersuchende Luft (4 ml) wird mit dem Gasprobenventil in den Trägergasstrom geschleust. Der CO-Gehalt kann an Hand vorher aufgenommener Eichkurven ermittelt werden. Eine Bestimmung dauert 4 Minuten.

* Natronkalk, Merck, Darmstadt.
** Sikkon, Fluka, Buchs.

**Abbildung 3. Chromatogramm von Ausatmungsluft.**

Gaschromatograph: Perkin Elmer F20 mit FID
Trennsäule: Molekularsieb 13X, 1 m × 4/2 mm, 30° C
Hydriersäule: 10 % Ni auf Chromosorb P, 30 cm × 4/2 mm, 290° C
Probevolumen: 4 ml
Trägergas ($H_2$): 23 ml/min.
Luft: 360 ml/min.
Schreiber: Honeywell, 0,5 mV, 1,25 cm/min.
Integrator: Aerograph Digital Integrator 471




### *4.2 Kohlenmonoxid des Blutes*

*Reagenzien*

Lösung A: 3,2 g $K_3[Fe(CN)_6]$ und 0,8 g Emulgator O/W (Dr. Hefti AG, Zürich) auf 100 ml $H_2O$. Dieses Reagens wird jede Woche frisch hergestellt.

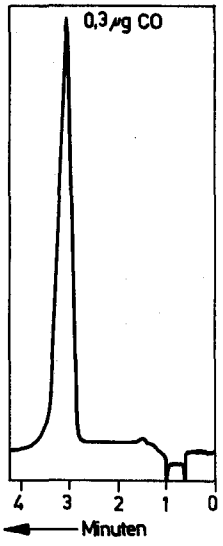
Lösung B: 1,0 g Milchsäure auf 100 ml $H_2O$.
„Antifoam A" (Dow Corning) = Antischaummittel.
Heparin-Lösung (Liquemin® Roche) (1 ml = 5000 USP-Einheiten Heparin) als Antikoagulationsmittel.

Je 1 ml der Lösungen A und B werden zusammen mit 4–6 Tropfen Antischaummittel in das Reaktionsgefäß Abb. 2 gegeben. Unter Rühren wird das System während 3 Minuten mit $H_2$ CO-frei gespült. Mit einer mit Heparinlösung benetzten gasdichten Spritze wird 0,1 ml Blut durch die Membrane eingespritzt und das Reaktionsgefäß während 2 Minuten mit dem 4-Weg-Hahn geschlossen. Anschließend erfolgt ein Überführen des CO in die mit flüssigem Stickstoff gekühlte Adsorptionssäule mit einem Spülgasstrom ($H_2$) von 40 ml/min. Nach 6 Minuten ist alles CO freigesetzt und am Molekularsieb 5A adsorbiert. Der Trägergasstrom wird nun direkt in die Adsorptionssäule geleitet und das aufkonzentrierte CO durch Erwärmen mit Wasser von 50° C desorbiert.

Nach 3 Minuten wird das CO als $CH_4$ registriert. In einer Stunde lassen sich 5 Bestimmungen durchführen. Die Lösungen A und B im Reaktionsgefäß müssen nach drei, das Molekularsieb 5A der Adsorptionssäule nach zehn Bestimmungen erneuert werden.

Soll die CO-Konzentration in % HbCO angegeben werden, muß der Hb-Gehalt bekannt sein. Nach *Maehly* (7), *Scholander* et al. (10), *Sachs* (9) u. a. kann im allgemeinen angenommen werden, daß 255 µg CO/ml Blut 100 % HbCO entsprechen.

**Abbildung 4. Chromatogramm von aus Blut freigesetztem CO.**




CO-Konzentration des Blutes ca. 1,2 % HbCO

Gaschromatograph: Perkin Elmer F20 mit FID
Trennsäule: Molekularsieb 13X, 1 m × 4/2 mm, 30 ° C
Hydriersäule: 10 % Ni auf Chromosorb P, 30 cm × 4/2 mm, 290 ° C
Trägergas ($H_2$): 23 ml/min.
Luft: 360 ml/min.
Adsorptionssäule: Molekularsieb 5A, 40 cm × 4/2 mm, −196 ° C/ 50 ° C
Spülgas ($H_2$): 40 ml/min.
Probemenge: 0,1 ml
Schreiber: Honeywell, 0,5 mV
Integrator: Aerograph Digital Integrator 471

## 5. EICHUNG DER METHODE

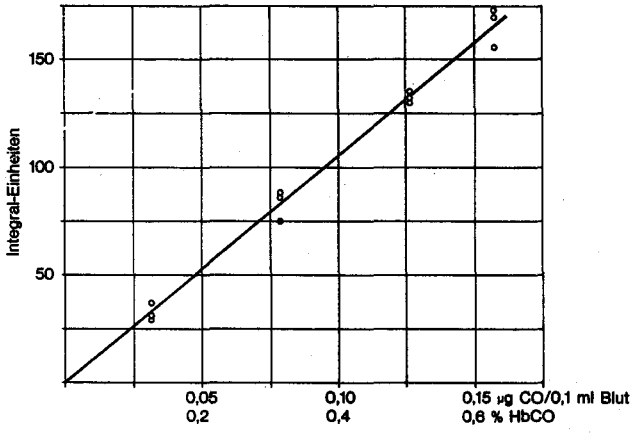
### *5.1 Kohlenmonoxid der Ausatmungsluft*

In einem mit möglichst CO-freiem He (Tab. 2) gefüllten 5-Liter-Kolben mit Gummimembrane werden mit einer Medizinalspritze 20 ml des He durch CO ersetzt. Durch Weiterverdünnen eines Teils dieser Mischung in einem zweiten Kolben werden die zur Aufnahme von Eichkurven gewünschten Konzentrationen erhalten. Der Kolben wird mit 2 Schläuchen von 1 mm Innendurchmesser an die Gasprobenschlaufe angeschlossen und die Eichmischung mit einer Schlauchquetschpumpe umgewälzt. Zur täglichen Überwachung verwendet man eine dafür herzustellende CO-Luft-Mischung aus einem Druckzylinder.

### *5.2 Kohlenmonoxid des Blutes*

In einem 20-ml-Kölbchen mit Gummimembrane werden zu 3,0 ml Blut und 0,1 ml Heparinlösung mit einer gasdichten Spritze reines oder mit Luft verdünntes CO entsprechend der gewünschten Konzentration (z. B. 75 µl reines CO für ca. 10 % HbCO) gegeben. Das Reaktionsgemisch wird mit einem Magnetrührer während 2 Stunden bis zur vollständigen Adsorption des CO gerührt und davon 0,1 ml analysiert. Bei der Herstellung von Eichmischungen ist immer ein Blindwert zu berücksichtigen.

**Abbildung 6. Beispiel einer Eichkurve zur Bestimmung von CO im Blut.**




## 6. DISKUSSION DER METHODE

### *6.1 Spezifität*

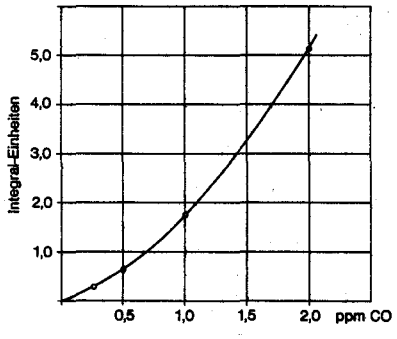
Das CO wird von den übrigen Gasen der Ausatmungsluft resp. des Blutes abgetrennt und bei einer charakteristischen Retentionszeit bestimmt.

### *6.2 Richtigkeit*

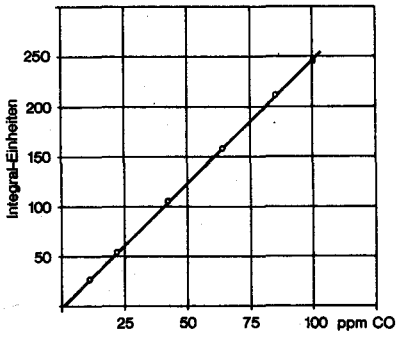
Beim Blut wird sowohl an Hämoglobin gebundenes wie auch physikalisch gelöstes CO erfaßt.

**Abbildung 5. Eichkurven zur Bestimmung von CO in Luft.**

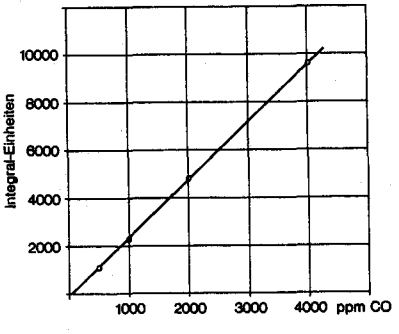
a) bis zu 2 ppm.




b) bis zu 100 ppm.




c) bis zu 4000 ppm.



*6.3 Wiederholbarkeit*

**Tabelle 1. Bestimmung der Wiederholbarkeit.**

| CO-Konzentration der Ausatmungsluft in ppm | CO-Konzentration des Blutes in % HbCO | Anzahl Messungen | Relative Standardabweichung |
|---|---|---|---|
| 134 | | 12 | 0,3 % |
| 10 | | 12 | 0,8 % |
| 1 | | 12 | 5 % |
| 0,2 | | 6 | 20 % |
| | 1,0 | 7 | 2,1 % |

*6.4 Nachweisgrenze*

In der Ausatmungsluft können bei Verwendung einer Gasprobenschlaufe von 4 ml noch 0,1 ppm CO nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze liegt daher bei 5 bis 10mal kleineren Gesamtmengen als bei *Schwenk* et al. (11) [0,1 ppm in 25 ml] und *Porter* et al. (8) [2,5 $10^{-10}$ Mol = 1 ppm in 5 ml].
Im Blut lassen sich noch 0,05 % HbCO nachweisen.

## 7. ANWENDUNG DER METHODE

Tabelle 2 zeigt einige mit der beschriebenen Methode gefundene CO-Konzentrationen in verschiedenen Gasen. Über eine Untersuchung der CO-Ausscheidung beim Raucher wird getrennt berichtet (5).

**Tabelle 2. Kohlenmonoxid-Konzentrationen in verschiedenen Gasen.**

| | |
|---|---|
| $H_2$ aus Druckzylinder | < 0,1 ppm CO |
| $O_2$ für medizinischen Gebrauch aus Druckzylinder | 0,3 ppm CO |
| He aus Druckzylinder | 0,2 ppm CO |
| $N_2$ aus Druckzylinder | 0,8 ppm CO |
| Laborluft | 2,7 ppm CO |
| Ausatmungsluft eines Nichtrauchers | 2,6 ppm CO |
| Ausatmungsluft eines Rauchers | 30 ppm CO |
| Blut eines Nichtrauchers | 0,6 % HbCO |
| Blut eines Rauchers | 7,1 % HbCO |


## ZUSAMMENFASSUNG

Die beschriebene Methode erlaubt die gaschromatographische Bestimmung von kleinen CO-Konzentrationen in der Luft und im Blute.
Zur Bestimmung des CO in der Ausatmungsluft wird eine Probe von 4 ml mit einer Gasprobenschlaufe in den Trägergasstrom geschleust. Das CO wird auf einer Molekularsiebsäule 13X von den übrigen Gasen der Ausatmungsluft getrennt und anschließend über einem Nickel-Katalysator bei 290° C zu $CH_4$ hydriert, welches mit einem Flammenionisations-Detektor (FID) bestimmt wird.
Die Nachweisgrenze beträgt bei einem Probevolumen von 4 ml 0,1 ppm. Die Standardabweichung im Bereich von 0,2 bis 10 ppm CO beträgt je Einzelbestimmung 0,04 bis 0,08 ppm.
Das CO des Blutes wird in einem Reaktionsgefäß mit $K_3[Fe(CN)_6]$ freigesetzt, in einer Adsorptionssäule aufkonzentriert und dann mit der gleichen Anordnung wie bei der CO-Bestimmung der Luft auf einer Molekularsiebsäule 13X von den übrigen Blutgasen getrennt, über einem Nickel-Katalysator quantitativ hydriert und mit einem FID bestimmt. Für eine Bestimmung wird 0,1 ml Blut benötigt; darin lassen sich noch 0,05 % HbCO nachweisen. Die Standardabweichung beträgt je Einzelbestimmung 0,02 % HbCO bei einem mittleren Gehalt von 1 % HbCO im Blutmuster.

## SUMMARY

The gas chromatographic method described here has been developed for the determination of low carbon monoxide concentrations in air and blood.
For the determination in expired air, a 4 ml sample is injected in a molecular sieve 13X column, where the CO is separated from the other gases. The CO is then hydrogenated to methane over a nickel catalyst column heated to 290° C, and the methane is determined with a flame ionization detector. The limit of detection is 0.1 ppm CO in a total sample volume of 4 ml. The standard deviation per single determination is 0.04 to 0.08 ppm CO in the CO concentration range 0.2 to 10 ppm.
For the determination in blood, the CO is liberated from the HbCO complex with $K_3[Fe(CN)_6]$, transferred into a molecular sieve 5A column which is cooled in liquid nitrogen, and then swept into the gas chromatographic set-up used for the determination of CO in air. 0.05 % HbCO can still be detected in a 0.1 ml blood sample. The standard deviation per single determination is 0.02 % HbCO for a total of 1 % HbCO in the blood sample.

## RESUME

Une méthode basée sur la chromatographie en phase gazeuse a été mise au point pour la détermination de concentrations faibles d'oxide de carbone dans l'air et dans le sang.
Pour la détermination dans l'air expiré, un échantillon de 4 ml est séparé dans une colonne de tamis moléculaire 13X, et le CO est ensuite hydrogéné sur un catalyseur de nickel maintenu à 290° C pour donner du méthane. Le dernier est déterminé quantitativement par un détecteur à ionisation de flamme. Encore 0,1 ppm de CO peut être détecté dans un échantillon d'air de 4 ml. La déviation standard par détermination est de 0,04 à 0,08 ppm dans le domaine de concentration 0,2 à 10 ppm de CO.
Pour la détermination du CO dans le sang, le CO est libéré du complexe HbCO par $K_3[Fe(CN)_6]$, entraîné par de l'hydrogène et concentré dans une colonne de tamis moléculaire 5A refroidie dans de l'azote liquide.

Par le réchauffement de ce piège, le CO est ensuite transféré dans le dispositif prévu pour la détermination du CO dans de l'air. 0,05 % de HbCO peut encore être détecté dans un échantillon de 0,1 ml de sang. La déviation standard par détermination est de 0,02 % de HbCO pour une concentration totale de 1 % de HbCO dans un échantillon de sang de 0,1 ml.

## LITERATUR


1. Chinn, H. I., Pawel, N. E. R., Field, R., Redmond, R. F.: J. Lab. & Clin. Med. 46 (1955) 905–909.
2. Collison, H. A., Rodkey, F. L., O'Neal, J. D.: Clin. Chem. 14 (1968) 162–171.
3. Forster, R. E., Fowler, W. S., Bates, D. V., van Lingen, B.: J. Clin. Invest. 33 (1954) 1135.
4. Franke, W.: Draeger-Hefte 227 (1955) 4877–4880.
5. Grieder, K., und Häusermann, M.: Publikation in Vorbereitung.
6. Lutmer, R. F., Busch, K. A., DeLong, P. L.: Air Pol. 1 (1967) 45–48.
7. Maehly, A. C.: Dtsch. Z. gerichtl. Med. 52 (1962) 369–382.
8. Porter, K., Volman, D. H.: Anal. Chem. 34 (1962) 748–749.
9. Sachs, V.: Draeger-Hefte 235 (1959) 5142–5144.
10. Scholander, P. F., Roughton, F. J. W.: J. Industr. Hyg. Toxicol. 24 (1942) 218–221.
11. Schwenk, U., Hachenberg, H., Föderreuther, M.: Brennstoff-Chem. 42 (1961) 295–296.



*Anschrift der Verfasser:*

*Vereinigte Tabakfabriken AG, Forschungslaboratorium, CH-2003 Neuchâtel, Schweiz.*