were determined, and the relationship between the above-mentioned ratios and the mole ratios was examined. The results were as follows.

(1) Compositions of the pyrolysates of uncured resins and the corresponding cured resins were almost the same. In the case of the cured resins, a stable base line was attainable immediately after air purge. However, in the case of uncured resins, the base line was disturbed for a long time by gradual emergence of methanol, water and unreacted phenol derived from the samples after air purge. This defect was excluded by the use of cured resins.

Thus, cured resins were suitable for the pyrolysis, and uncured resins were cured by heating at 135°C for 60 min (JIS K 6802, 6909, the condition for determining non-volatile contents of liquid phenolic resins).

(2) At 850°C cresol in the pyrolysate decreased, and the standard deviation of F/P was large. At

700~800°C, the standard deviations (as F/P) were 0.1~0.2, so that the determination of the mole ratios was satisfactory.

The main source of error was fluctuation of the pyrolysis temperature. In this respect, lower pyrolysis temperature is desirable. But, it should not be too low since at 700°C the experimental data indicated the delay of the pyrolysis. Accordingly 750°C was recommended for the pyrolysis temperature.

(3) This method was applied to the analysis of commercial samples of known mole ratio. It was observed that higher values were obtained for samples which were prepared by using alkaline earth hydroxides as catalysts. This fact suggests that the difference in the catalysts used in preparing samples can be detected by comparing the result of this method to that obtained by the I. R. or U. V. spectrophotometric analysis.

(Received May 16, 1972)

血液中一酸化炭素ヘモグロビンの測定法

有元 博三， 森井 貞治*

(1972 年 5 月 27 日受理)

血中ガス分析装置を製作し、これを用いて血液中一酸化炭素ヘモグロビンの定量条件を検討した。本法は Van Slyke 法とガスクロマトグラフィーを組み合わせた方法である。本法は血液の量が 20~50 μ l という少量で、変動係数が 0.024 という精度で血液中一酸化炭素ヘモグロビンの測定ができる。また分析時間も解離反応時間を含めて約 10 分なので、1 日に 40~50 検体の分析が容易にできる。ほかに、一酸化炭素をヘモグロビンから解離する試料量、反応時間などについて検討を行なった。

この測定法は公害問題、法医学関係（一酸化炭素中毒など）の問題にも大いに貢献することと思われる。

1 緒 言

血液中一酸化炭素ヘモグロビンの測定法にはピロタンニン酸法¹⁾、拡散分析法²⁾³⁾、Van Slyke & Salvesen 法⁴⁾、赤外線吸収法^{5)~7)}、マイクロシリンジ法⁸⁾、ガスクロマトグラフィーによる測定法⁹⁾などの諸法があるが、これらはいずれも操作が複雑であったり、高度の熟練度と比較的長い測定時間が必要なためにあまり使用されていない。

1924 年に Van Slyke によって開発されたいわゆる Van Slyke 法 (macro method) は非常に有効であった。

この方法が 1952 年に 50 μ l 程度の少量の血液試料による測定法 (micro method) になり一酸化炭素中毒患者の一酸化炭素ヘモグロビンの測定に用いられてきた。

Van Slyke 法とは密封してある装置に血液試料と脱気剤 (Van Slyke 試薬) とを注入し、装置を真空にして血液中的一酸化炭素を引き出してから、ガス吸収剤に一酸化炭素を吸収させ、その含有量を決定する方法である。

この Van Slyke 法は有効であるが、測定に熟練を要することや 1 回の測定に長時間 (約 30 分) を要することから、最近急速に普及している電気化学的測定法の進歩にしたがって、使用されることが少なくなってきた。しかし、電気化学的測定法で得られる値は血液中的一酸化炭素の分圧であるが、実際に必要なのは血液に含まれて

* 株式会社島津製作所科学計測第 2 工場：京都市中京区西ノ京桑原町

いる一酸化炭素の全容積を求めることなので、この方法は完全に満足いくものではない。著者らはガスクロマトグラフィーにより簡単に正確に血液中の一酸化炭素量を測定する方法を考案し¹⁰⁾、それにより良好な結果を得ることができたので報告する。

ガスクロマトグラフィーによる血液中のガス分析の可能性は、ガスクロマトグラフの出現時の 1952 年に Martin と James の最初の論文にも示唆されているが、血液中のガスを抽出するのが困難なことで、安定性のよい高感度のガスクロマトグラフの製作が困難であったので実用化の段階までには到達しなかった。ここで報告する一酸化炭素測定法は Van Slyke 法とガスクロマトグラフィーとを組み合わせ、上記の難点を解決した簡便で迅速な測定法である。

2 試薬および試料

2.1 試薬

一酸化炭素解離剤 (Van Slyke 試薬): 500 ml の蒸留水に Saponin 4 g とフェリシアン化カリウム 16 g とを溶解させたものである。

この試薬は直射日光で分解するので、かっ色の保存びんに入れて保存する必要がある。

消ほう剤: 高級アルコール(カプリルアルコールなど)か市販の消ほう剤 {antifoam solution (GE antifoam 60)} など。

2.2 試料

血液は空気中の一酸化炭素と容易に結合するので、血液を採取するとき空気に接触しないようにして行なった。測定は採血後 5 時間以内に行なった。採血した血液を保存する場合には、凝固防止剤としてヘパリンを採血した正常人血液 1 ml に対して 0.02~0.04 mg 添加し、保存容器(注射器または試薬びん)を窒素ガスのような不活性ガスのふんい気にして冷暗所に保存する。

3 実験装置と測定法

3.1 実験装置

本研究に使用した実験装置は島津ガスクロマトグラフ GC-4BPTF 形と血中ガス分析装置 BGS-1A 形を組み合わせたもので、そのデータ処理には島津デジタルインテグレータ ITG-1A 形を使用した。

血中ガス分析装置は血液中のガスを抽出するための一種のサンプル前処理調整装置である。全体の流路図は Fig. 1 に示した。

反応管は血液と一酸化炭素解離剤とを反応させて一酸化炭素を抽出する部分である。この反応管の中には試薬と血液を速く反応させるために magnetic stirrer がはいっている。この反応管の構造を Fig. 2 に示す。反応管

Fig. 1 Flow line system of blood gas sampler

1: Column selector cock; 2: Buffer tube; 3: Restrictor; 4: Sampling cock; 5: Reaction tube; 6: Choke column; 7: Precut cock; 8: Precut column; 9: Durny column; 10: Carrier gas "IN"; 11, 12: Column; Position of sampling cock: ●● sampling, —●— injection, ●—●— purge; Position of precut cock: ●● precut, ●—●— purge

Fig. 2 Reaction tube (Dimensions in mm)

(a) Glass; (b) Silicone rubber; (c) Magnetic stirrer; (d) Glass filter (50~40 μ); (e) Carrier gas "IN"

の上下はガスケットでシールし、下部にはグラスフィルターが取り付けられている。キャリアガスはグラスフィルターの目を通して下部より上部へ流れている。このようにすることによって、抽出したガスを拡散することなく完全に追い出すことができる。

Fig. 1 からわかるように、サンプリングコックは 3 方 (purge, injection, sampling) の各位置で次のような流

路構成をとる。

サンプリングコックは破線の場合 (“purge”) の位置のときはキャリアガスは反応管の内部をパージする。したがって、この段階で、管内の気体は外部に排出される。次に、この位置のままで、一酸化炭素解離剤と消ほう剤を反応管にゴムキャップを通して注射器で注入する。パージ用ガスを流した状態で反応管内の magnetic stirrer を回転させ、試薬をかき混ぜて試薬中に含まれているガスを追い出す。

次に、コックを一点破線の位置 (“injection”) にする。この位置では反応管内にはキャリアガスが流れず、不活性ガス (ヘリウム) のふんい気になっていて、反応管は外部としゃ断される。この状態で、反応管に取り付けてあるゴムキャップから採血した血液をシリンジで反応管に注入し、4 分間、magnetic stirrer によりかき混ぜる。この操作により血液から一酸化炭素は完全に脱気され、管内に拡散する。

さらに、コックを実線の位置 (“sampling”) にすると、反応管の内部のガスはキャリアガスによりガスクロマトグラフのカラムに送り込まれ分離定量される。

Fig. 1 の流路図中の抵抗管、カラムは、コックの切り替え操作時にキャリアガスの流量変動をきわめて少なくし、ベースラインの変動をできるだけ小さくするためのものである。プレカットコックは血液の中の水分がガスクロマトグラフのカラムにはいる前に除去するためのものである。このコックはタイマーにより自動的に動作するようになっている。分析に使用したカラムは充てん剤として Molecular Sieve 5A (30/60 mesh) を長さ 2m, 内径 3mm のステンレススチール管に充てんしたものである。他の分析条件は次のとおりである。カラム温度 50°C, 検出器は熱伝導度型検出器, ブリッジ電流 200 mA, 検出器温度 70°C; キャリヤガスはヘリウム, 流量 50 ml/min である。データ処理はデジタルインテグレーターで一酸化炭素のピーク面積を測定することによって行なった。

3.2 測定法

サンプリングコックの切り替え時間、反応時間、注入時間はストップウォッチで正確に測定した。操作は下記の手順で行なった。

まず、血中ガス分析装置のサンプリングコックを “injection” にして、反応管を試料室内に取り付ける。次に、一酸化炭素解離剤 0.2~0.5 ml, 消ほう剤 5~10 μ l を注射器で反応管に入れる。次に、サンプリングコックを “purge” の位置にして、magnetic stirrer で

3~5 分間かき混ぜて反応管内の気体をパージする。その後、コックを “injection” の位置にし、注射筒内の血液を直接マイクロシリンジに採取して、20~50 μ l を反応管に注入する。その状態で 5 分間放置して一酸化炭素解離反応を完全に行なう。次に、サンプリングコックを “sampling” の位置にし、約 30 秒間放置し反応管中のガスを完全にガスクロマトグラフのカラムに導入してからふたたびコックを “injection” にもどして操作を完了する。

4 実験結果

4.1 反応時間とサンプリング時間の決定

Fig. 3 に反応時間とサンプリング時間 (抽出した反応管中のガスを完全に追い出す時間、すなわち一酸化炭素解離反応を終了し、サンプリングコックを “sampling” の位置にしてから反応管中のガスをガスクロマトグラフのカラムに導入し、ふたたびコックを “injection” にもどすまでの時間) と血液から脱気される一酸化炭素の量との関係を示した。Fig. 3 からわかるように、温度を上げれば反応時間は非常に短くなることが理解できる。これは温度上昇によって、血液から一酸化炭素が遊離する反応の反応速度が増加するからである。しかし、温度を上げれば血液が凝固して、反応管下部のグラスフィルターの目詰まりを起こさせて反応管を破損してしまうの

Fig. 3 Relation between temperature of sample chamber and reaction time, sampling time
— Reaction time; --- Sampling time; Temp. of chamber: ● 22°C, ▲ 60°C, ■ 100°C

で、普通は 20~30°C の温度範囲で使用するのが望ましい。この時、反応時間を 4~5 分ぐらいにする必要がある。また、サンプリング時間は Fig. 3 から 30 秒以上にする必要がある。このサンプリング時間が長すぎるとベースラインの変動が生じ、反対に短かすぎると血液中のガスが全部追い出されないことになる。また、この反応時間、サンプリング時間はよりよい再現性を得るために正確に測定する必要がある。この実験における一酸化炭素解離剤の量は 0.5 ml、血液量は 20 μ l である。また、ここで使用した試料の血液中一酸化炭素濃度は 22, 60, 100°C ではすべて違ったものを使用した。同じ濃度の試料を使用すれば同じピーク面積を示す。

4.2 一酸化炭素解離剤の量と血液量の決定

人間の身体から採取する血液量は少なければ少ないほどよいのであるが、反応管の容積とガスクロマトグラフの検出器の感度から考えて、20~50 μ l が最適である。本研究では 1 回の試料量として 20 μ l を血中ガス分析装置に導入した。この血液量に対する一酸化炭素解離剤の量は 0.2 ml でじゅうぶんであった。以下の実験に使用した解離剤の量は 0.2 ml である。

4.3 再現性

Fig. 4 に一酸化炭素で飽和した血液 20 μ l 中の一酸化炭素をくりかえし測定した場合のクロマトグラムの例を示す。また、Table I はこの実験でピーク面積を比較した再現性のデータで、変動係数 0.024、平均偏差 0.03 であり、非常によい再現性を示している。

Fig. 4 Chromatogram of carbon monoxide in human blood showing reproducibility

① Oxygen; ② Nitrogen; ③ Carbon monoxide; Column: Molecular Sieve 5A (30~60 mesh), 2 m (L) $\times$ 3 mm (I.D.), stainless column; Temp.: 50°C; Carrier gas: He, 50 ml/min; Detector: TCD, 200 mA

Table I Reproducibility of carbon monoxide peak area measured from Fig. 4

Sample No.	Peak area ($\times 10^3 \mu V \cdot sec$)
1	134
2	135
3	131
4	132
5	133
Mean $\bar{X}$	133
S. D. σ	3.16
Coefficient of variance $\sigma/\bar{X}$	0.024
Mean deviation	0.030

4.4 飽和一酸化炭素血液の製法

血液中の一酸化炭素の量は飽和量に対する割合で示すので、一酸化炭素で飽和された血液を調製しなければならない。Fig. 5 は血液に一酸化炭素を通じて血液が一酸化炭素で飽和するまでの時間を測定したものである。この場合、赤血球中のヘモグロビンが一酸化炭素と接触する機会を多くするため血液を magnetic stirrer でかき混ぜた。このとき使用した一酸化炭素は一酸化炭素ボンベより得たもので、純度は 99.9% である。

Fig. 5 Determination of the time required for complete saturation of blood through carbon monoxide bubbling

(CO) Flow rate: 60 ml/min; Blood quantity: 3 ml

4.5 保存血液中一酸化炭素ヘモグロビン濃度の経時変化

Fig. 6 は血液の保存状態によって、試料中の一酸化炭素量がどの程度変化するかを示したものである。保存状態は冷蔵庫に入れて -2°C で保存した場合と室温 (22°C) で保存した場合とについて検討を行なった。保存は試料びんに入れて外気と接触した状態で行なった。この実験結果から、血液はできるだけ新鮮なものが好ましいということが判明した。測定時間を採血してから 5 時

Fig. 6 Decrement of carbon monoxide from HbCO

Reserve temperature: —●— -2°C , —▲— 22°C

間以内とした文献¹¹⁾もあるが、できるかぎり早く測定することが望ましい。また、血液は凝固しないように、凝固防止剤（ヘパリン、クエン酸ナトリウムなど）を添加して、冷蔵庫のような冷暗所に保存することが必要である。室温（ 22°C ）保存の血液は 70 時間経過で凝固が始まり、それ以後の測定が困難となった。血液が凝固すると、均一なサンプリングが困難になり測定値の変動が大きくなる。この点でも、血液を保存する場合には冷蔵する必要がある。

4.6 正常人血液中一酸化炭素ヘモグロビンについての検討

Fig. 7 は喫煙者と非喫煙者の一酸化炭素ヘモグロビンの代表的クロマトグラムである。Fig. 7 から喫煙者の一酸化炭素の量が非常に大きいことがわかる。Table II は正常人 12 名について血液中一酸化炭素ヘモグロビンの濃度を調査した結果である。Table II から、一酸化炭素の濃度かなり変動があることがわかる。この変動の原因は居住している環境（職場、家庭）自動車エンジンの排気、喫煙、大気汚染などによる一酸化炭素吸入程度の差が考えられるが、Fig. 7, Table II から明らかに、喫煙の影響が最も大きいように思われる。しかし、極度に環境が違う場合、その差も明確に現われるであろう。Table II で示している一酸化炭素濃度は被検者の血液の一酸化炭素飽和量を 100% としたときのものである。

5 結語および考察

本法による血液中一酸化炭素ヘモグロビンの分析法は

Fig. 7 Typical chromatogram of carbon monoxide in human blood

(a) Smoker; (b) Nonsmoker; ① Oxygen; ② Nitrogen; ③ Carbon monoxide; Column: Molecular Sieve 5A (30~60 mesh), 2m (L)×3mm (I. D.), stainless column; Column temperature: 50°C ; Carrier gas: He, 50 ml/min; Detector: TCD, 180 mA

Table II Quantity of carbon monoxide in human blood

Age (Years)	Sex	CO concentration (%)†	
20	M	1.33	nonsmoker
24	M	1.58	smoker
25	M	6.37	smoker
30	M	4.70	smoker
32	M	3.75	smoker
26	M	1.03	nonsmoker
23	F	1.02	nonsmoker
28	M	1.20	nonsmoker
34	M	2.86	smoker
18	F	0.98	nonsmoker
56	M	11.20	smoker
27	F	1.36	nonsmoker

$$\dagger \text{ CO concentration} = \frac{\text{Quantity of CO in normal human blood}}{\text{Quantity of CO in CO saturated blood}}$$

従来の Van Slyke 検圧法、拡散法などに比べて、操作が簡単で、再現性の高い結果を与えた。また、使用する血液量が非常に少量でよく、分析時間が短い（約 10 分）ので、一酸化炭素中毒、高速道路の料金徴収を担当している人や交通整理を行なっている人々の健康管理などに有効に使用できる。

データ処理にデジタルインテグレーターのような積

分器を接続すれば精度が向上するうえに計算の手間を省くことができるので, 1日に非常に多くの検体の一酸化炭素含量を測定することができる。

本研究で使用した血中ガス分析装置を使用すれば, 報告した用途以外に血液中の酸素, 二酸化炭素, 麻酔剤(フローセン, ペントレン, エーテル, サイクロプロペインなど), アルコール, シンナーなどの測定も可能である。

文 献

- 1) 佐々木直亮ほか: 労働科学, **28**, 579 (1952).
- 2) M. B. Jacobs: "The Analytical Toxicology of Industrial Inorganic Poisons", p. 703 (1967), (Interscience Publishers, New York).
- 3) 日本薬学会編: "衛生試験法", 犯罪科学試験法昭和40年度追加, p. 41 (1965).
- 4) D. D. Van Slyke, *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **166**, 121 (1947).
- 5) M. B. Jacobs: "The Analytical Toxicology of Industrial Inorganic Poisons", p. 840 (1967), (Interscience Publishers, New York).
- 6) 百溪 浩ほか: 産業医学, **9**, 145 (1967).
- 7) 百溪 浩ほか: 日本産業医学雑誌, **23**, 76 (1967).
- 8) P. F. Scholander, F. J. W. Roughton: *J. Ind. & Toxi.*, **24**, 218 (1942).
- 9) 角谷昭三ほか: 科学警察研, **18**, 35 (1965).
- 10) 有元博三, 森井貞治: 日本分析化学会第20年会講演要旨集, p. B120 (1971).
- 11) 石西 伸ほか: 福岡医誌, **60**, 600 (1969).

☆

Method for quantitative determination of carbon monoxide hemoglobin in human blood. Hiromi ARIMOTO and Teiji MORII (Shimadzu Scisakusho

Ltd., Analytical Instrument Plant, Nakagyo-ku, Kyoto-shi)

A gas chromatographic method for the determination of CO-hemoglobin (CO-Hb) in human blood was investigated. A simple attachment for gas chromatograph, blood gas sampler (BGS-1A), in which CO was freed from CO-Hb with Van-Slyke reagent and directly transferred into gas chromatograph, was constructed. Performance of this BGS-1A, and analytical conditions were studied.

Co was released from CO-Hb and analysed by following conditions; blood sample was 20 μ l, releasing reagent, 0.5 ml, reaction time in BGS-1A, 5 minutes, sampling time for GC, 30 sec, respectively. The setting of these sampling and reaction time must be kept precisely.

Blood clotting disturb the release of CO from samples and the determination should be started as soon as blood samples were taken out. If the samples are required to be stored over 200 hours, the samples must be kept in refrigerators.

The content of CO-Hb in blood was calibrated from the saturated CO-Hb obtained by passing CO gas, or town gas through the blood for about 10 minutes.

A digital integrator is useful for processing gas chromatographic data, and this CO-Hb analysing system easily gave the content of CO-Hb in micro amounts of blood samples. (20 to 50 μ l). The coefficient of variance of this method was calculated to be 0.024 when blood samples were taken 20 to 50 μ l.

The higher level of CO-Hb in blood were obtained from the people, who were exposed in air pollution and smoking. It is interest that the smoking is one of the main factors to give higher content of blood CO-Hb.

In this study, it was proved that this gas chromatographic analysis of CO-Hb were superior to conventional Van-Slyke method and useful for the CO determination in micro amounts of blood samples.

(Received May 27, 1972)