

# Einfache Methode zur Bestimmung von kleinen Mengen Cyanid in Zigarettenrauch und biologischem Material

RÜDIGER BAUMEISTER und HELMUT SCHIEVELBEIN

Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München

Eingegangen am 3. März 1971

*Simple Method for the Estimation of Small Amounts of Cyanide in Tobacco Smoke and Biological Materials.* A method is described, which can be used to estimate small amounts of cyanide (0.1  $\mu\text{g}$ ) in solutions and biological materials. The principle of the method is based on the relatively stable binding of cyanide to haemoglobin.

*Zusammenfassung.* Es wird eine Methode beschrieben, welche nach dem Prinzip der Cyanhämglobinbildung erlaubt, noch 0,1  $\mu\text{g}$   $\text{CN}^-$  in Lösungen und biologischem Material quantitativ zu bestimmen.

Für die Bestimmung von geringen Konzentrationen von Cyanid sind titrimetrische, polarographische, gas-chromatographische und colorimetrische Methoden bekannt, letztere werden für die Routinebestimmung am häufigsten verwendet. In einer Übersicht, in welcher die Literatur bis 1962 berücksichtigt ist, fordern Bark u. Higson [3] eine Verbesserung der vorhandenen colorimetrischen Methoden in folgender Hinsicht: geringerer Zeitaufwand, Erfassung von Cyanid im Mikrogrammbereich als Routinemethode, Einführung von nicht-carcinogenen Verbindungen bei Verwendung der Königschen Reaktion, Verwendung von Verbindungen, welche stabiler sind und einen höheren molaren Extinktionskoeffizienten besitzen als Pyrazolon oder Benzidin. Die Einführung nicht-carcinogener Amine wurde durch die oben erwähnten Autoren bereits vorgenommen [4], sie verwendeten anstelle von Benzidin p-Phenylendiamin, die anderen Forderungen konnten bisher nicht erfüllt werden.

Unsere Arbeiten auf dem Gebiet der Resorption von Tabakrauchbestandteilen erforderten eine schnelle Methode, welche die von Bark u. Higson geforderten Kriterien möglichst weitgehend erfüllt. Außerdem sollten nur  $\text{CN}^-$ -Ionen, aber nicht Thiocyanat erfaßt werden, insbesondere sollte die Methode auf die Bestimmung von Cyanid in biologischem Material anwendbar sein. Das Austreiben des  $\text{CN}^-$  durch starkes Ansäuern der Probe sollte vermieden werden.

Seit 1920 ist bekannt, daß man Hämoglobin als Hämoglobin-Cyanid bestimmen kann [5]. Da das Hämoglobin-Cyanid ein stabiles Hämoglobinderivat

ist, benutzen wir das Prinzip der Hämoglobin-Cyanidbildung um die vorliegende Methode zu erarbeiten.

## Prinzip

Mit einem geeigneten Oxydationsmittel wird Hämoglobin zu Hämoglobin (Methämoglobin) oxydiert; dieses bildet mit Cyaniden den erwähnten stabilen Komplex. Anhand einer Eichkurve oder Mitführen eines Standards ist die vorhandene Menge  $\text{CN}^-$  zu ermitteln, bzw. zu errechnen. Aufgrund des Absorptionsspektrums von Cyanhämglobinlösungen mit verschiedenen Konzentrationen wurde als optimale Meßwellenlänge 422 nm gewählt. Die Messung dieser Standardlösungen erfolgte gegen das weiter unten beschriebene Methämoglobinreagens.

## Methodik

### Reagentien

1. Rinderhämoglobin, lyophilisiert, rein (Proteasensubstrat nach Anson, Serva, Heidelberg), Lösung: 0,034 g/100 ml (ca.  $5 \cdot 10^{-6}$  M).

2. Natriumnitrit, p.a., Lösung: 3,45 mg/100 ml ( $5 \cdot 10^{-4}$  M) in Aqua bidest.

3. 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,9.

4. KCN-Lösung in Aqua dest. zur Anlegung von Eichkurven in entsprechenden Konzentrationen.

### Durchführung

0,034 g Hämoglobin werden in Natriumnitritlösung gelöst, 50 ml 0,1 M Phosphatpuffer zugefügt und mit der Natriumnitritlösung auf 100 ml aufgefüllt (Hämoglobinreagens).

**Meßansatz.** 1. Zu 4 ml Hämoglobinreagens werden 0,5 ml der Probe gegeben, durchgemischt und 30 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Danach wird nicht später als 30 min gegen einen Ansatz von 4 ml Hämoglobinreagens und 0,5 ml Aqua dest. gemessen.

2. Bei Bestimmung von  $\text{CN}^-$  in Lösungen mit von Wasser abweichender optischer Dichte müssen folgende Messungen durchgeführt werden:

- a) 4 ml  $\text{H}_2\text{O}$  + 0,5 ml Probe gegen  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- b) 4 ml Methämoglobinreagens + 0,5 ml Probe gegen  $\text{H}_2\text{O}$ ;
- b - a = Extinktion gemäß Cyanidkonzentration.

Eichkurven sind entsprechend den oben angeführten Meßansätzen und den entsprechenden Cyanidkonzentrationsbereichen anzulegen.

### Zuverlässigkeit der Methode

1. **Eichkurve.** Eine Eichkurve, z.B. für den Bereich von 0,1–1,5  $\mu\text{g CN}^-$  verläuft linear. Die Extinktion ist nach 30 min mindestens weitere 30 min lang gleichbleibend.

2. **Präzision und Richtigkeit.** Bei 10 Bestimmungen von KCN, welches Serum zugesetzt wurde, fanden wir 0,59  $\mu\text{g CN}^- \pm 0,06$  ( $\bar{x} \pm 2s$ ). Der Variationskoeffizient betrug 4,87. Die gemessenen Werte entsprechen einer Wiederfindung von 80%.

Bei 10 Bestimmungen von  $\text{CN}^-$  im Hauptstromrauch einer Zigarette fanden wir 100,5  $\pm 0,7 \mu\text{g CN}^-$  ( $\bar{x} \pm s$ ). Der Variationskoeffizient betrug 0,68.

3. **Empfindlichkeit.** Wie oben erwähnt, können mit dieser Methode noch 0,1  $\mu\text{g CN}^-/0,5 \text{ ml}$  erfaßt werden.

4. **Spezifität.** Eines der wesentlichsten Merkmale der Methode ist, daß Thiocyanat nicht miterfaßt wird. KSCN in Konzentrationen von 0,2–2 mg übt keinen Einfluß auf die Bestimmung von Cyanid (0,5  $\mu\text{g}/0,5 \text{ ml}$ ) aus.

### Anwendungsbeispiele und Diskussion

Als Beispiel für die praktische Anwendung der Methode untersuchten wir den Gehalt von Cyanid im Hauptstromrauch von Zigaretten. Die Zigaretten wurden auf 23 mm Stummellänge mit Hilfe einer Pumpe abgeraucht (mit einer Zugdauer von 2 sec/min). Der Rauch wurde durch eine Gaswaschflasche geleitet, die mit 50 ml einer 0,1 N NaOH beschickt

Tabelle. Gehalt von  $\text{CN}^-$  im Hauptstromrauch von Zigaretten  
Angaben in  $\mu\text{g CN}^-/\text{g abgeraucher Tabak}$

Zigarettentyp	n	$\bar{x}$	Bereich	s
Maryland	10	119	57–180	42
„german blend“	10	71	43–89	16

war. Zur Bestimmung wurden 0,5 ml der Lösung eingesetzt, die Ergebnisse sind in der Tabelle enthalten.

Der von uns gefundene Gehalt an  $\text{CN}^-$  im Hauptstromrauch stimmt größenordnungsmäßig mit den Werten anderer Autoren [2], welche mit einer aufwendigeren Methodik arbeiteten, überein. Auffallend ist die sehr starke Schwankung zwischen den einzelnen Zigaretten gleicher Fertigung, dies wurde auch von Artho [2] beobachtet. Diese Erscheinung könnte auf die nicht optimale Methode der Erfassung des flüchtigen  $\text{CN}^-$  oder auf die nicht exakt steuerbare Pyrolyse zurückgeführt werden.

Im Verlauf von Untersuchungen über den Thiocyanatstoffwechsel unter dem Einfluß von Tabakrauch versuchten wir den Gehalt an freiem  $\text{CN}^-$  des Serums von Versuchstieren nach extensiver Berauchung zu ermitteln. In orientierenden Versuchen konnten wir bei Meerschweinchen nach Berauchung mit 5 bzw. 10 Zigaretten innerhalb von 12–25 min kein freies Cyanid nachweisen.

Die Bestimmung von  $\text{CN}^-$  in Gewebshomogenaten nach Durchleitung von Zigarettenrauch mit der Methode von Aldridge [1] führte häufig zur Trübung der Meßansätze; die Ursache für diese Störung konnte nicht festgestellt werden. Mit der vorliegenden Methode wurden keine Störungen dieser oder ähnlicher Art beobachtet.

### Literatur

1. Aldridge, W. N.: *Analyst* **69**, 262 (1944).
2. Artho, A., Koch, R.: *Beitr. Tabakforsch.* **5**, 58 (1969).
3. Bark, L. S., Higson, H. G.: *Analyst* **88**, 751 (1963).
4. — — *Talanta* **11**, 471 (1964); vgl. diese *Z.* **211**, 134 (1965).
5. Stadie, W. C.: *J. Biol. Chem.* **41**, 237 (1920).

Prof. Dr. H. Schievelbein  
Institut für Klinische Chemie  
und Klinische Biochemie der Universität  
BRD-8000 München 15, Nußbaumstr. 20  
Deutschland