

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 98–102

Flammenphotometrische Bestimmung der freien Sulfationen im Serum

Von R. Leskovar und G. Weidmann

Aus der Balneologischen Forschungsstelle (Ärztlicher Leiter: Prof. Dr. R. Leskovar) des Staatsbades Bad Kissingen

(Eingegangen am 14. September/21. Dezember 1973)

Es wird eine Methode beschrieben, in der im nichtentweißten Serum die freien Sulfationen durch eine im Überschuß zugegebene bekannte BaCl_2 -Menge ausgefällt werden. Die restlichen Barium-Ionen der Proben werden anschließend flammenphotometrisch bestimmt unter Verwendung eines natürlichen Serums als Standard, dessen Rest-Barium-Ionen-Konzentration vorher auf gravimetrischem Weg ermittelt wurde. Aus der Differenz von zugesetzter und der gemessenen Rest-Barium-Ionen-Konzentration berechnet sich der Sulfationen-Gehalt der Proben. Die optimalen Meßbedingungen wurden ermittelt und die Zuverlässigkeit der Methode überprüft. Die Durchführung der Untersuchungen kann sowohl manuell als auch halbautomatisch nach dem System Technicon „Auto-Analyzer“ erfolgen. Folgender Mittelwert wurde bei 50 Kurpatienten festgestellt: $0,315 \text{ mmol/l SO}_4^{2-} \pm 0,031 \text{ (s)}$.

Determination of free sulphate in serum by flame photometry

A method is described in which the free sulphate ions of non-deproteinized serum are precipitated by the addition of an excess known quantity of BaCl_2 . The remaining barium ions of the sample are then determined by flame photometry, using a natural serum as a standard in which the residual barium ion concentration has been measured gravimetrically. The sulphate ion concentration of the sample is calculated from the difference between the added and the measured remaining barium ion concentrations. The optimal conditions for the method and its reliability are reported. The method may be performed manually, or semiautomatically using the Technicon „Autoanalyzer“ System. An average of $0.315 \text{ mmol/l SO}_4^{2-} \pm 0.031 \text{ (s)}$ was found for 50 patients under treatment.

In Verbindung mit den Studien über den Ionenhaushalt im menschlichen Körper, die auch im Rahmen der balneologischen Fragestellung von Bedeutung sind, wurde eine schnelle Analysenmethode zur Bestimmung der freien Sulfationen im Serum notwendig. Gravimetrische (1, 2), kolorimetrische (3, 4) und titrimetrische Verfahren (5) sind schwierig und zeitraubend. Neuerdings werden auch nephelometrische Verfahren (6, 7, 8) verwendet, die aber wiederum eine recht umständliche Probenvorbereitung verlangen. Allen diesen Verfahren haftet außerdem der Nachteil an, daß sie große Substanzmengen für Routine-Untersuchungen verlangen, da sie wie die bisher entwickelten flammenphotometrischen (9, 10, 11) und radiochemischen Verfahren (12) vom entweißten Serum ausgehen.

Im Folgenden wird eine flammenphotometrische Routinemethode zur Bestimmung der freien Sulfationen im nativen Serum beschrieben und über die Prüfung von Zuverlässigkeitskriterien berichtet. Die Methode kann bei gleichbleibender Vorbereitung der Proben und unter Verwendung derselben Standards sowohl manuell als auch halbautomatisch (AutoAnalyzer) durchgeführt werden.

Material und Methoden

Manuelle Arbeitsweise

Geräte

Flammenphotometer der Firma Eppendorf mit Barium-Filter (510 nm).

Einstellung des Verstärkungsreglers auf $V = 6$
Meßbereicheinstellung „100“
Brenngasgemisch: 500–520 mm Wassersäule Acetylen bei $0,5 \text{ kp/cm}^2$ Luft

Chemikalien

Stammlösungen: $0,1 \text{ mol/l HCl}$
 $0,05 \text{ mol/l BaCl}_2$ -Lösung

Reaktionslösung

2 mmol/l BaCl_2 in $0,1 \text{ mol/l HCl}$ zur Fällung des Sulfates im Serum.

Standardlösungen

Blindlösung (Null-Lösung): Sammel-Serum mit $0,1 \text{ mol/l HCl}$ im Verhältnis 1:1 gemischt

Eichlösung = Standard-Serum: Serum mit bekanntem Rest-Barium-Gehalt

Herstellung des Standard-Serums

Es wird eine größere Menge Serum mit der Reaktionslösung im Verhältnis 1:1 versetzt und einen Tag bei Raumtemperatur stehen gelassen. Der pH-Wert dieser Lösung beträgt etwa 3,5. Diese Acidität reicht aus, um das Mitfällen von Phosphaten zu verhindern. Das nach dieser Zeit ausgefallene Bariumsulfat wird abzentrifugiert, gewaschen und nach den üblichen Methoden der Gravimetrie weiter behandelt. Aus der Differenz von zugesetztem und gefälltem Barium errechnet sich die Rest-Barium-Ionen-Konzentration im Serum und daraus wiederum die Sulfationenmenge. Mit der Rest-Barium-Ionen-Konzentration dieser Serum-Lösung werden die Untersuchungsproben verglichen. Die von uns auf diesem Weg in 8 Sammelseren gefundenen Sulfationen-gehalte im nichtentweißten Serum zeigten einen Mittelwert $0,309 \text{ mmol} \pm 0,010 \text{ (s)}$ und entsprechen den Werten anderer Autoren (1, 9, 12, 14), die nach vorheriger Entweißung des Serums festgestellt wurden.

Probenvorbereitung

1 ml des Probenserums wird mit 1 ml der Reaktionslösung in einem gut 4 ml fassenden Plastikbecher (Technicon-Auto-Analyzer) versetzt und 24 h lang verschlossen mit einer Plastik-kappe stehen gelassen. Darauf wird das ausgefallene Barium-sulfat bei 1000 g 5 min zentrifugiert. Damit ist die Probe zur Analyse fertig. Beim weiteren Arbeitsvorgang muß darauf geachtet werden, daß das im Becherboden befindliche BaSO₄ nicht aufgerührt wird.

Der manuellen Ausführung der Analysen liegt die im Eppendorf Handbuch (15) beschriebene Arbeitsweise zugrunde. Mit der Null-Lösung wird der 0-Punkt elektrisch und mechanisch eingestellt. Mit der Eichlösung wird unter Benutzung des Feinreglers „Meßbereich“ die Lichtmarke auf den Ba-Wert eingestellt, der dem Rest-Barium-Gehalt der Eichlösung entspricht. Als dazu gut geeignet erwies sich die Kalium-Skala (mval). Wird der Meßstrich 4 mval mit 2 mmol/Ba gleichgestellt bzw. die Rest-Barium-Ionen-Konzentration des Eichserums auf den ihr zukommenden Wert, z. B. 1,7 mmol auf den 3,4 mval Skalenstrich eingestellt, so entspricht jeder Teilstrich der Skala 0,10 mval d. h. 0,05 mmol Barium. Liest man in umgekehrter Richtung, also von 4,0–0, so ergibt die jeweilige Differenz den Sulfatgehalt in mval. Es ist zweckmäßig, die Einstellung des 0-Punktes sowie des Eichpunktes nach 5 Probenmessungen zu wiederholen (vgl. auch Tabelle 2).

Automatische Ausführung der Analysen

Geräte

Flammenphotometer (wie oben)

Probennehmer II der Firma Technicon, AutoAnalyzer : Nockenscheibe 50 Proben/h, Verhältnis Probe-Spülung 1:2,5.

Proportionschlauchpumpe. Wir benutzen die Schlauchpumpe der Firma Desaga, bei der die Kanäle für die Pumpenschläuche (Fa. Technicon) in der ganzen Länge freigemacht werden müssen. Pumpengeschwindigkeit: „90“.

Zur Entfernung der Luftblasen wird knapp vor dem Saugstutzen des Flammenphotometers ein C 5 Glas-Fitting der Fa. Technicon als „Debubler“ angebracht.

Materialverbrauch je Probe: 1,6 ml ± 0,2 ml, davon die Hälfte Serum. Fließdiagramm siehe Abbildung 1.

Wie aus dem Fließdiagramm hervorgeht, wird die Probe unverändert photometriert. Als Spülflüssigkeit dient 0,1 mol/l HCl. Um bessere Meßwerte zu erzielen, empfiehlt es sich, das Flammenphotometer vorher eine Stunde lang laufen zu lassen. Zur Herstellung eines Gleichgewichts in der Zerstäuberglocke, das sich in einer Beruhigung des Flammenuntergrundes (0-Linie) bzw. der gleichmäßigeren Ausschlaggrößen kundtut und durch einen gallertartigen Belag an der Wandung der Zerstäuberglocke sichtbar wird, sollen zunächst 5 Standard (Eich)-Serum den eigentlichen Messungen vorausgeschickt werden.

Zur rechnerischen Auswertung muß der Flammenuntergrund, d. h. der für das Leerserum erhaltene Ausschlag von den für die Proben und das Standard-Serum erhaltenen Ausschlagweiten abgezogen werden. Dann bildet man aus den Ausschlagweiten (I) von Probe und Standard den Quotienten $F = \frac{I(\text{Probe})}{I(\text{Standard})}$. Wie sich

leicht ableiten läßt, ergibt sich die Berechnung des Sulfatgehaltes nach:

$$a - (F \cdot c) = G$$

a = Zusatz an Ba mmol/l zur Probe (= 2 mmol/Ba/l)

$$F = \frac{I(\text{Probe})}{I(\text{Standard})}$$

c = Rest-Barium-Konzentration im Standard-Serum in mmol/l

G = Sulfatgehalt in der Probe in mmol/l.

Aufgrund des geschilderten Vorgehens stellten wir bei 50 Kurpatienten – vorwiegend Magenranke – einen Serum-Sulfatgehalt von $\bar{X} = 0,315 \text{ mmol/l} \pm 0,0315$ (s) fest.

Ergebnisse und Diskussion

Prüfung der Methode

Die Zuverlässigkeit sowohl der manuellen als auch der automatischen Arbeitsweise ergibt sich einerseits aus der auf flammenphotometrischem Weg bei gegebener Apparatur überhaupt erreichbaren Nachweisgrenze, andererseits aus der Reproduzierbarkeit der Werte. Die Nachweisgrenze wird von der Herstellerfirma mit 2 mg/l Ba, also 0,0145 mmol/l, angegeben. In diesen Bereich reichen kaum einige Standardabweichungen unserer Serum-Sulfatmessungen.

Barium-Emissionskurven

Zunächst muß festgestellt werden, wie sich

- die Emissionskurve von reinen Ba-Lösungen in den anzuwendenden Konzentrationen verhält,
 - ob die Bariumemission von den im Serum vorhandenen Ionen und
 - ob sie vom Serum selbst beeinflusst wird.
- zu a) Die Messung von Ba-Lösungen in 0.1 mol/l HCl mit steigendem Ba-Gehalt ergab eine geradlinig verlaufende Eichkurve, die durch den 0-Punkt des Koordinatensystems geht (s. Kurve a in Abb. 2).
- zu b) Werden diese Ba-Lösungen auf ein Elektrolytgemisch, das dem des menschlichen Serums entspricht, aufgestockt – wir benutzen dazu die Original-Standardlösung der Fa. Eppendorf – so hebt sich zunächst der Flammenuntergrund. Zieht man den Wert, der auf die Elektrolyte entfällt ab, so ergibt das aufgestockte Barium wiederum eine gerade, durch den 0-Punkt verlaufende Linie, die jedoch etwas steiler als die reine Ba-Lösungslinie verläuft (s. Kurve b in Abb. 2).
- zu c) Für die Untersuchungen des Verhaltens des Bariums im Serum wurden aliquote Teile eines Sammelserums, dessen SO₄-Gehalt vorher auf gravimetrischem Weg ermittelt wurde, mit abgestuften BaCl₂-Mengen (0,5 bis 2,5 mmol/l) versetzt und in der beschriebenen Weise flammenphotometrisch bestimmt. Bei unserem Sammelserum-Sulfatgehalt von 0,31 mmol/l SO₄ waren somit die entsprechenden zu erwartenden Restbariumwerte bei Zugabe von 0,5-, 1,0-, 1,5-, 2,0-, 2,5 mmol Ba/l jeweils um 0,31 mmol Ba/l niedriger, also 0,19-, 0,69-, 1,19-, 1,69-, 2,19 mmol Ba/l. Die photo-

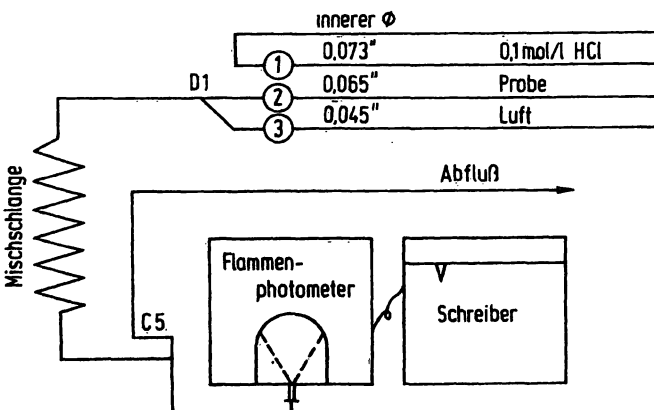


Abb. 1. Fließdiagramm Sulfat im Serum.

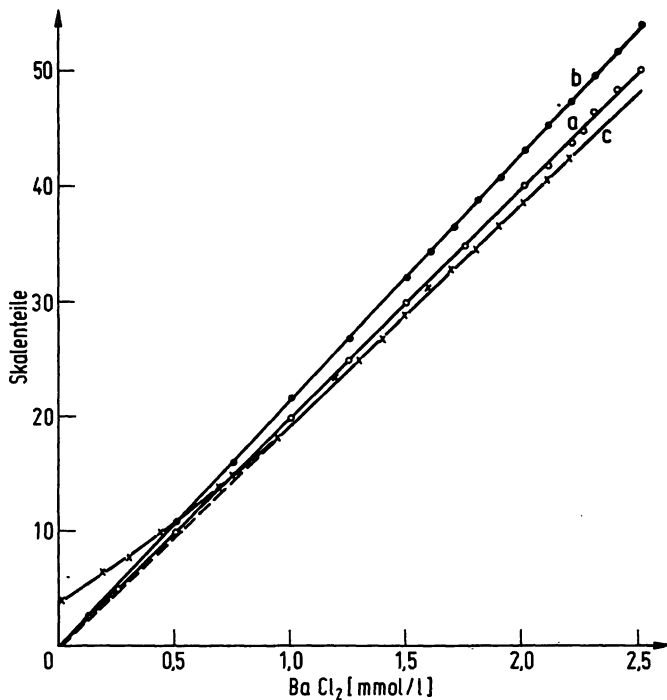


Abb. 2. Barium-Eichkurven.

- a) ○—○—○ = reine BaCl₂-Lösungen.
 b) ●—●—● = auf ein Elektrolytgemisch, das dem des menschlichen Serums entspricht, aufgestockte BaCl₂-Lösungen.
 c) ×—×—× = dem Serum zugegebene BaCl₂-Lösungen (Näheres vgl. Text).

metrisch angezeigten Meßwerte werden nun an diesen Punkten der Abszisse angesetzt. So entstand die Kurve c in Abbildung 2.

Dieselbe Bariumkonzentration weist somit beim Serum um rund 10% geringere Emissionsausschläge auf als bei einer entsprechend zusammengesetzten wäßrigen Elektrolytlösung („Eppendorf-Standard“).

Außerdem verläuft die Kurve nur im höheren Konzentrationsbereich, also zwischen 1 und 2,5 mmol Ba/l, geradlinig auf den 0-Punkt zu. Im unteren Teil biegt sie sich nach oben durch, d. h. die Ausschläge sind zu groß.

Zur Erklärung dieser Erscheinung kann nur angenommen werden, daß kleinere Ba-Mengen als 1 mmol Ba/l das Sulfat im Serum nicht mehr quantitativ ausfällen.

Daraus ergibt sich die Folgerung, Messungen im Serum so anzusetzen, daß eine Rest-Barium-Ionen-Konzentration von 1,0 mmol/l nicht unterschritten wird.

Reproduzierbarkeit der Methode

Im selben Serum wurde Sulfat teils hintereinander, teils in Abständen von einigen Tagen nach der automatisierten Methode bestimmt. Nachdem die Meßwerte auf ein Standard-Serum bezogen wurden, wurde mit Hilfe von Variations-Koeffizienten untersucht, ob und inwieweit sich eine häufigere Dazwischenschaltung von Standardseren auf die Genauigkeit der Meßergebnisse auswirkt. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 1 ersichtlich. Aus der nächsten Tabelle (Tab. 2) geht die

Tab. 1. Sulfatbestimmungen im selben Serum mit 0,308 mmol/l SO₄²⁻ (gravimetrisch) bei verschieden-häufiger Standard-Zwischenschaltung.

Standard auf Anzahl der Proben	n	SO ₄ ²⁻ [mmol/l]		VK [%]
		\bar{x}	$\pm s$	
1: 20	62	0,335	0,0218	6,72
1: 10	60	0,3025	0,0133	4,40
1: 5	57	0,3052	0,0148	4,84
1: 3	58	0,3125	0,0142	4,55
1: 1	59	0,3171	0,0194	5,35

Tab. 2. Reproduzierbarkeit der Meßwerte (Tag zu Tag-Bestimmungen) nach der manuellen (1) und der automatischen (2) Arbeitsweise

Methode	n	SO ₄ ²⁻ [mmol/l]		VK [%]	SO ₄ ²⁻ [mmol/l] gravimetrisch	Differenz Meßwert-Sollwert in %
		\bar{x}	$\pm s$			
1	13	0,292	0,0183	6,3	0,298	2,0
2	57	0,305	0,0148	4,84	0,308	1,0

Reproduzierbarkeit der Meßwerte nach der manuellen (1) und der automatischen (2) Arbeitsweise in Tag zu Tag-Bestimmungen hervor.

Erwartungsgemäß ist bei Anwendung der automatischen Arbeitsweise der Variationskoeffizient etwas niedriger als bei der manuellen. Die Abweichungen der flammenphotometrisch von den gravimetrisch bestimmten Werten betragen nur 2 bzw. 1%.

Wiederfindungsversuche

Diese wurden durchgeführt durch

- a) Zugabe von abgestuften Ba-Mengen,
 b) Zugabe von abgestuften SO₄-Mengen zum Serum.

zu a) Einem Serum, dessen SO₄-Gehalt durch gravimetrische Bestimmung bekannt war (0,308 mmol/l), wurden ansteigende Mengen BaCl₂ zugegeben und dann dessen SO₄-Gehalt photometrisch bestimmt. Das Ergebnis ist aus Tabelle 3 ersichtlich. Bei Konzentrationen unter 0,75 mmol/l Ba (= Zugabe von 1 mmol/l Ba) tritt die schon besprochene Abweichung (vgl. Abb. 2) der Meßwerte in Erscheinung.

zu b) Demselben, mit 2 mmol/l Ba versetzten Serum werden abgestufte Mengen an Schwefelsäure zugegeben. Wie aus der Tabelle 4 hervorgeht, entsprechen die Wiederfindungsraten den SO₄-Zugaben, jedoch nur bis zu einer Rest-Barium-Ionen-Konzentration von etwa 0,75 mmol/l Ba. Man kommt — unter Berücksichtigung des serumeigenen Sulfat-Gehaltes — somit auch hier wieder zu der Feststellung, daß bei geringer Ba-Konzentration die Reaktion nicht mehr vollständig abläuft.

Tab. 3. Bestimmung des Sulfat-Gehaltes desselben Serums (mit 0,308 mmol/l SO_4) bei abgestufter BaCl_2 -Zugabe.

BaCl ₂ -Zugabe mmol/l	n	SO ₄ ²⁻ [mmol/l]		VK [%]	Differenz Meßwert- Sollwert in %
		\bar{x}	± s		
2,5	12	0,3179	0,0278	8,75	+ 3,2
2,4	10	0,3460	0,0346	8,75	+ 2,2
2,3	13	0,3123	0,0211	6,77	+ 1,3
2,2	10	0,3165	0,0190	6,00	+ 3,0
2,1	10	0,3240	0,0131	4,02	+ 5,0
2,0	—	—	—	—	—
1,9	14	0,2985	0,0217	7,28	- 2,5
1,8	14	0,3070	0,0183	5,98	0
1,7	11	0,3135	0,0189	6,06	+ 1,5
1,6	12	0,3120	0,0201	6,45	+ 1,3
1,5	12	0,2925	0,0241	8,24	- 4,8
1,25	14	0,3060	0,0233	7,61	0
1,0	16	0,2730	0,0271	9,90	- 11,3
0,75	15	0,2440	0,0383	15,60	- 20,5
0,5	14	0,1970	0,1047	53,00	- 36,0

Tab. 5. Bestimmung des Reaktions-Endes zwischen zugesetzten Ba-Ionen und freien Sulfationen im selben Serum (mit gravimetrisch bestimmtem Wert 0,322 mmol/l SO_4).

Stunden nach Ba-Zusatz	n	SO ₄ ²⁻ [mmol/l]		VK [%]
		\bar{x}	± s	
1	7	0,1868	0,0421	22,6
2	4	0,2463	0,0189	9,2
3	4	0,2179	0,0139	8,7
4	3	0,2603	0,0201	7,6
6	3	0,2498	0,0134	5,3
8	5	0,2642	0,0405	15,3
10	3	0,3035	0,0054	1,8
16	3	0,3165	0,0071	2,2
18	3	0,3213	0,0112	3,5
20	4	0,3378	0,0201	5,9
24	3	0,3150	0,0152	4,7
nach 2 Tagen und mehr		0,3285	0,0187	5,5

Tab. 4. Zugabe abgestufter Sulfatmengen zu demselben mit 2 mmol/l Ba versetzten Serum (mit 0,30 mmol/l eigenem Sulfatgehalt) Mittelwerte von je 7 Messungen.

Zugabe von SO ₄ ²⁻ [mmol/l]	Ba-Restgehalt [mmol/l]		entspricht SO ₄ ²⁻ [mmol/l]		VK [%]	Differenz Sollwert- Meßwert in %
	be- rechn.	ge- funden	\bar{x}	± s		
0	—	1,70	0,30	—	—	—
0,25	1,45	1,434	0,266	0,0188	1,30	+ 6,4
0,50	1,20	1,183	0,518	0,0175	1,94	+ 3,5
0,75	0,95	0,920	0,780	0,0087	0,94	+ 4,0
1,00	0,70	0,671	1,029	0,0229	3,40	+ 3,0
1,25	0,45	0,4092	1,291	0,0127	3,10	+ 3,2
1,50	0,20	0,209	1,492	0,0154	7,40	- 0,6
1,75	0	0,087	1,613	0,0075	8,60	- 0,7
2,00	0	0,050	1,650	0,0116	23,20	- 1,7

Weitere Beobachtungen

Nachdem unsere Methode auf einer Ausfällung von BaSO_4 beruht, mußte zunächst der Zeitpunkt bestimmt werden, an dem die Reaktion zwischen den Ba- und den Sulfationen abgelaufen ist.

Es wurde eine größere Menge Serum mit 2 mmol/l Ba bei Raumtemperatur versetzt. In bestimmten Zeitabständen wurde sodann die Rest-Barium-Ionen-Konzentration bestimmt (s. Tab. 5). Das Ende des Reaktionsablaufes kann somit nach 16 Stunden angenommen werden; der Mittelwert der Bestimmungen schwankt ab diesem Zeitpunkt im selben Ausmaß um den gravimetrisch festgestellten Wert von 0,323 mmol/l SO_4 ²⁻ wie bei vorhergehenden Meßreihen.

Als Grundlage der Messungen dient ein Standard-Serum bekannter SO_4 -Konzentration, mit dem die Proben flammenphotometrisch verglichen werden. Infolgedessen sind auch die Meßergebnisse in erster Linie von der Genauigkeit der auf gravimetrischem Weg bestimmten Rest-

Barium-Ionen-Konzentration des Standard-Serums abhängig. Die Richtigkeit des Serumstandards kann aufgrund der Abbildung 2 kontrolliert werden. Die Ausschläge der Kurve c (Serum) sind um etwa 10% geringer als die der Kurve b (Eppendorf-Standard mit aufgestocktem Ba). Mit einem entsprechenden reinen Elektrolytstandard, z. B. Eppendorf-Standard mit 1,5 mmol/l Ba kann sofort Kurve b und daraus Kurve c konstruiert werden, aus der dann der Serum-Sulfatgehalt abgelesen werden kann.

Vergleicht man den Mittelwert unserer 8 Sammelseren von 0,309 mmol/l ± 0,010 (s) Sulfat mit den Werten anderer Autoren, so stimmen sie gut überein. So fanden *Berglund* und *Sörbo* (8) einen Mittelwert von 0,33 $\mu\text{mol/ml}$ mit einem Bereich von 0,21–0,48, *Guerrero* (16) 0,47 ± 0,15 mval, *Hinsberg-Lang* (1) geben 0,7–1,7 mg% S, was 0,22–0,53 mmol/l Sulfat entspricht, an, *Miller et al* (12), deren Ergebnisse auch von *Dokumenta Geigy* (14) angegeben werden, fanden einen Mittelwert von 0,645 ± 0,17 mval/l.

Vergleicht man jedoch unseren Sammelserum-Wert mit den an 50 Kurpatienten – vorwiegend Magenkranken – gewonnenen Werten 0,315 ± 0,0315 mmol/l, so fällt die etwas geringere Sulfatkonzentration der Sammelseren auf. Nun stammen die Sammelseren, die uns freundlicherweise von der Leberklinik Prof. *Kalk* abgetreten wurden, von Leberpatienten. Es dürfte daher der bei magenkranken Kurpatienten gefundene Mittelwert dem Normalwert, der unserer Methode entspricht, näherliegen.

Bei richtiger Aufbewahrung (Kühlschrank) blieb der Sulfatgehalt unseres Standard-Serums im Verlauf von drei Monaten unverändert.

Wie aus Tabelle 3 hervorgeht, ergibt die automatisierte Arbeitsmethode (VK 5%) etwas bessere Ergebnisse als die manuelle (VK 6%), beide liegen jedoch wesentlich unter der für klinische Analysen noch zugelassenen Grenze von 10% (16).

Literatur

1. Hinsberg, K. & Lang, K. (1957), *Medizinische Chemie für den klinischen und theoretischen Gebrauch*. Verlag Urban-Schwarzenberg/München.
2. Waelsch, H. & Klepetar, G. (1932), *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* *211*, 47–56.
3. Bertolacini, R. J. & Barney, J. E. (1958), *Anal. Chem.* *30*, 202–205.
4. Häkkinen, J. P. & Häkkinen, L. M. (1959), *Scand. J. Clin. Invest.* *11*, 294–297.
5. Baudisch, J., Beilstein, G. & Neuenhausen, H. E. (1968), *Fresenius Z. Analyt. Chem.* *235*, 231–234.
6. Dogson, K. S. (1961), *Biochem. J.* *73*, 312–319.
7. Ferrera, L. W., Floyd, R. S. & Blanchar, R. W. (1965), Sonderdruck R 623 Technicon (65-PJ 27) New York.
8. Berglund, F. & Sörbo, B. (1960), *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* *12*, 147–153.
9. Strickland, R. D. & Maloney, Clara M. (1954), *Am. J. Clin. Pathol.* *24*, 1100–1102.
10. Burriel-Marti, F., Ramirez-Munos, J. & Rexach, M. L. (1957), *Anal. Chem. Acta* *17*, 559–569.
11. Herbolsheimer, R. (1963), *Fresenius Z. Analyt. Chem.* *201*, 418.
12. Miller, E., J. Hlad, L., Stanley Levine, M. S., Holmers, J. H. & Elrick, H. (1961), *Labor. Methods* *58*, 656–661.
13. Herrmann, R. & Alkemade, Th. J.: *Flammenphotometrie* (1960), Springer Verlag, Berlin.
14. Geigy, J. R. (1968), *Documenta Geigy. Wissenschaftliche Tabellen*.
15. Eppendorf-Gerätebau Netheler und Hinz GmbH (1965), *Handbuch Flammenphotometer-Eppendorf*.
16. Guerrero, S. B., zit. Bersin Th. (1963), *Biochemie der Mineral- und Spurenelemente*, Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurt/Main.
17. Richterich, R. (1968), *Klinische Chemie*, Akad. Verlagsges. Frankfurt/M.

Prof. Dr. R. Leskovar
8730 Bad Kissingen
Balneologische Forschungsstelle
Prinzregentenstraße 2