Literatur

Lehrbücher und Monographien

1. DEAN, J. A., Flame Photometry, McGraw-Hill Book Company, Inc., New York-Toronto-London (1960). 2. HERRMANN, R. und C. T. J. ALKEMADE, Chemical Analysis by Flame Photometry, Interscience Publishers A division of J. Wiley & Sons, New York-London (1963). 3. MAVRODINEANU, R. und H. BOITEUX, Flame Spectroscopy, John Wiley & Sons, Inc., New York-London-Sydney (1965). 4. MITCHELL, A. C. G. and M. W. ZEMANSKY, Resonance Radiation and Excited Atoms, Cambridge, At the University Press (1961).

Übersichtsarbeiten

1. DAVID, D. J., The Application of Atomic Absorption to Chemical Analysis, *Analyst* 85, 779 (1960). 2. HERRMANN, R., Absorptions-Flammenphotometrie, *Chem. Labor Betrieb* 14, 45 (1963). 3. HERRMANN, R., Neuere Entwicklungen der flammenphotometrischen Analysenverfahren, *Z. analyt. Chem.* 212, 1 (1965). 4. KOIRTYOHANN, S. R. und E. E. PICKETT, Background corrections in long path atomic absorption spectrometry, *Analytic. Chem.* 37, 601 (1965). 5. PERKIN ELMER, Atom-Absorptions-Spektrophotometrie im medizinischen und biologischen Labor, *Analysentechnische Berichte (Bodenseewerk)* (1964). 6. SLAVIN, W. und S. SPRAGUE, The Determination of Trace Metals in Blood and Urine by Atomic Absorption Spectrophotometry, *Atomic Absorption Newsletter* 17, 1 (1964). 7. WILLIS, J. B., The Analysis of Biological Materials by Atomic Absorption Spectroscopy, *Clin. Chem. (New York)*, 11, 251 (1965).

Einzelarbeiten

1. BERMAN, E., The Determination of Lead in Blood and Urine by Atomic Absorption Spectrophotometry, *Atomic Absorption Newsletter*, 3, 111 (1964). 2. DAWSON, J. B., und F. W. HEATON, The Determination of Magnesium in Biological Materials by Atomic Absorption Spectrophotometry, *Biochem. J.* 80, 99 (1961). 3. HERRMANN, R. und W. LANG, Analysen von Natrium und Kalium in Seren mit Hilfe der Absorptionsflammenphotometrie, *Zschr. exper. Med.* 134, 268 (1961). 4. HERRMANN, R. und W. LANG,

Analysen von Magnesium im Serum und in anderen Körperflüssigkeiten mit Hilfe der Absorptionsflammenphotometrie, *Zschr. exper. Med.* 135, 569 (1962). 5. HERRMANN, R. und W. LANG, Serum-Kupfer-Analysen mit Hilfe der Absorptionsflammenphotometrie, *Diese Z.* 1, 183 (1963). 6. HONEGGER, N., Serum-Zink-Analysen mit Hilfe der Absorptionsflammenphotometrie, *Ärzt. Laborat.* 2, 41 (1963). 7. NEWBURN, E., Application of Atomic Absorption Spectroscopy to the Determination of Calcium in Saliva, *Nature (London)* 192, 1182 (1961). 8. SEIDEL, H. und W. THIELE, Atomabsorptionsanalytische Magnesiumbestimmung im Serum des Schweines, *Jenaer Rundschau* 2, 122 (1965). 9. TRENT, D. und W. SLAVIN, Factors in the determination of strontium by atomic absorption spectrophotometry with particular reference to ashed biological samples, *Atomic Absorption Newsletter* 22, 1 (1964). 10. WILLIAMS, C. H., D. J. DAVID, and O. ISMAA, The Determination of Chromic Oxide in Faeces Samples by Atom. Abs. Spectrophot. *J. agric. Sci.* 59, 381 (1962). 11. WILLIS, J. B., The Determination of Magnesium in Blood Serum by Atomic Absorption, *Nature (London)* 184, 186 (1959). 12. WILLIS, J. B., The Determination of Metals in Blood Serum by Atomic Absorption Spectroscopy I, *Spectrochim. Acta (London)* 16, 259 (1960). 13. WILLIS, J. B., The Determination of Metals in Blood Serum by Atomic Absorption Spectroscopy II, *Spectrochim. Acta (London)* 16, 273 (1960). 14. WILLIS, J. B., The Determination of Calcium in Blood Serum by Atomic Absorption Spectroscopy, *Nature (London)* 186, 249 (1960). 15. WILLIS, J. B., The Determination of Metals in Blood Serum by Atomic Absorption Spectroscopy III, *Spectrochim. Acta (London)* 16, 551 (1960). 16. WILLIS, J. B., Determination of Calcium and Magnesium in Urine by Atomic Absorption Spectroscopy, *Analytic. Chem.* 33, 556 (1961). 17. WILLIS, J. B., Determination of Lead in Urine by Atomic Absorption Spectroscopy, *Nature (London)* 191, 381 (1961). 18. WILLIS, J. B., Determination of Lead and other Heavy Metals in Urine by Atomic Absorption Spectroscopy, *Analytic. Chem.* 34, 614 (1962). 19. ZETTNER, A. und D. SELIGSON, The Determination of Serum Calcium using Atomic Absorption Spectroscopy, 5th Intern. Congr. Clin. Chem., Detroit, August 1963.

Professor Dr. R. Herrmann, Abt. f. Med. Physik an der Univ.-Hautklinik, 63 Gießen, Gaffkystr. 14

Flammenspektrophotometrische Methode zur Serum-Chlorid-Bestimmung mit der Silberlinie 338,3 m μ ¹⁾

Von W. LANG

Aus der Abteilung für Medizinische Physik an der Universitäts-Hautklinik Gießen (Leiter: Prof. Dr. R. Herrmann)

(Eingegangen am 4. April 1965)

Es wird eine indirekte flammenspektrophotometrische Methode zur Serum-Chlorid-Bestimmung angegeben. Der Serumprobe (50 μ l) wird Silbernitrat im Überschuß zugesetzt, das gefällte Silberchlorid abgetrennt und der restliche Silbergehalt der Lösung flammenspektrophotometrisch gemessen. Der Serumbedarf kann erforderlichenfalls noch wesentlich verringert werden. Wegen der 410-fachen Verdünnung des Serums arbeitet die angegebene Analysenmethode störungsfrei. Aus 25 Messungen wurde die Standardabweichung zu $\pm 0,75\%$ ermittelt. Orientierende Messungen lassen den Schluß zu, daß die vorgeschlagene Methode auch mit einfachen Flammenphotometern (Filtergeräten) durchführbar ist. Die Abhängigkeit der erzielbaren Bestimmungsgenauigkeit von der Bemessung des Silberüberschusses wird theoretisch erörtert und experimentell verifiziert.

An indirect flame-photometric method is described for the determination of serum chloride. Excess silver nitrate is added to the serum sample (50 μ l), the precipitated silver chloride removed and the silver remaining in solution determined by flame photometry. If necessary, the required amount of serum can be greatly decreased. Since the serum is diluted 410-fold, the method is free from interference. From 25 determinations, the standard deviation was $\pm 0.75\%$. Orienting measurements indicate that the method may also be carried out with simple flame photometers (filter apparatuses). The dependence of the accuracy of the determinations on the measurement of the excess silver is theoretically discussed and verified experimentally.

¹⁾ Unterstützt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Für routinemäßige Na-, K- Ca-Analysen im klinischen Labor hat sich die Flammenphotometrie als Standardmethode bewährt. Aus diesem Grunde wäre es erwünscht, mit dem gleichen Flammenphotometer auch die klinisch sehr wichtigen Chloridbestimmungen durchzuführen.

Für eine *direkte* flammenphotometrische Chloridanalyse mit einer Atomlinie des Chlors — ähnlich wie bei den Alkalien — ist die Anregungsenergie der Flamme nicht ausreichend. So erfordert beispielsweise die Chlorlinie 725,7 m μ eine 5 mal größere Anregungsenergie als die Natriumlinie 589,6 m μ .

Mit Hilfe der *indirekten* flammenspektrophotometrischen Analysenmethoden ist jedoch die quantitative Bestimmung von Anionen möglich (1). Bei der sehr einfachen und übersichtlichen Kupferchloridmethode für indirekte Chloridanalysen wird der Probe eine bekannte Menge Kupfer, z. B. als Sulfat, zugesetzt und aus der Intensität einer Kupferchloridbande in der Flamme bei 428, 435 oder 443 m μ (2) auf die Chloridkonzentration geschlossen. Nach diesem Prinzip haben HONMA und SMITH (3) den Chloridgehalt von Seewasser bestimmt und MARSH (4) ermittelte organisch gebundenes Chlorid in Insektenvertilgungsmitteln. Als schwerwiegender Nachteil dieser Methode erweist sich die Tatsache, daß die Kupferchloridbanden einem sehr hohen Untergrund überlagert sind (vgl. Registrierkurven bei HERRMANN und ALKEMADE (1)). Deshalb muß die Kupferkonzentration der Meßlösung verhältnismäßig groß sein, wenn das Verhältnis von Nutzausschlag zu Untergrund einen brauchbaren Wert annehmen soll. So wählte MARSH (4) die Kupferkonzentration zu 1% und den Arbeitsbereich für die Chloridbestimmung zwischen 0,3% und 1,0%. Wollte man diese Methode auf die Chloridbestimmung im Serum anwenden, so müßte man mit nahezu unverdünntem Serum arbeiten. Da außerdem nach Angaben von MARSH Lithium, Calcium, Kalium, Natrium und Eisen die Kupferchloridemission beeinflussen, erscheint dieses Bestimmungsverfahren für Serum-Chlorid-Analysen wenig geeignet.

Eine andere *indirekte* flammenphotometrische Chloridbestimmung wurde bereits 1929 von LUNDEGARDH (5) vorgeschlagen und später auf die Untersuchung sehr verdünnter Nährlösungen angewendet (s. 5). Bei dieser Methode wird der Probenlösung eine bekannte Menge Silbernitrat im Überschuß zugesetzt, das gefällte Silberchlorid abgetrennt und der restliche Silbergehalt der Lösung flammenspektrophotometrisch bestimmt. MENIS und Mitarbeiter (6) fanden dieses Differenzverfahren insbesondere für extrem verdünnte Halogenlösungen (Chlorid, Bromid oder Jodid) geeignet. Nach Angaben der Autoren sind noch 0,5 μ g Chlorid pro Milliliter bei einem Probenbedarf von insgesamt 3 ml nachweisbar.

In der vorliegenden Arbeit wird die zuletztgenannte *indirekte* (Differenz-)Methode auf die flammenspektrophotometrischen Chloridbestimmungen im Serum mit der Silberlinie 338,3 m μ angewandt. Für die Durchführung einer Einzelbestimmung sind bei der vorgeschlagenen Methode 50 μ l Serum erforderlich. Prinzipiell ist aber eine weitere wesentliche Verringerung der Probenmenge möglich. Die Analyse mit der im Verhältnis 1:410 verdünnten Serumprobe ist frei von Störungen. Als Nachweisgerät für die Silberemission benutzen wir ein Spektrophotometer. Die vorgeschlagene Methode müßte aber auch mit einfachen Flammenphotometern (Filtergeräten) durchführbar sein. An anderer Stelle soll über eine solche Bestimmungsmethode sowie über potentiometrische Vergleichsmessungen der Chloridanalyse berichtet werden. — Die Vorzüge der indirekten flammenphotometrischen Differenz-Analyse bezüglich der erzielbaren Genauigkeit werden theoretisch abgeleitet und experimentell bestätigt.

Methodik

Meßanordnung

Die aus handelsüblichen Bauteilen zusammengestellte Meßanordnung ist die gleiche, welche bereits für die Bestimmung von Lithium im Serum benutzt wurde (7). Die Zerstäuber-Brenner-Kombination mit weiter Kapillare (Fa. Beckman, Bestell-Nr. 4090) wird mit einem Preßluftdruck von 0,7 kp/cm² und mit 160 mm WS Wasserstoffdruck betrieben. Der Abstand der Brennerspitze von der optischen Achse beträgt 3,5 cm. Die turbulente Flamme wird auf den Eintrittsspalt des Quarzprismen-Monochromators „Uvispec“ der Fa. Hilger & Watts abgebildet. Die mechanische Spaltbreite des Monochromators wird zu 0,2 mm gewählt; die spektrale Bandbreite bei 338 m μ beträgt dann 1 m μ . Dem Photomultiplier (1P28 der Fa. RCA) ist zur Nachverstärkung des Photostromes das Röhrenelektrometer der Fa. Keithley, Type 610A, nachgeschaltet. Als Anzeigeinstrument wird der Linienschreiber „Mikrograph BD2“ der Fa. Kipp & Zonen verwendet. Eine Vorrichtung zur Registrierung über die Wellenlänge, sowie ein automatischer Probenwechsler, über den in einem anderen Zusammenhange berichtet werden soll, sind die beiden einzigen nicht handelsüblichen Bauteile. Für Routinemessungen sind sie durchaus entbehrlich.

Blind- und Eichlösung, Probenvorbereitung

Zur Herstellung der *Blindlösung* werden 296 mg Natriumnitrat, 10,3 mg Kaliumnitrat, 11,8 mg Calciumnitrat $\cdot$ 4H₂O und 12,8 mg Ammoniumphosphat (sek.) eingewogen, mit 500 ml 1 n HNO₃ versetzt, mit entsalztem¹⁾ und nachdestilliertem Wasser auf 1 Liter aufgefüllt und 1:10 nachverdünnt.

Für die Herstellung der *Eichlösung* werden zusätzlich 117,8 mg Silbernitrat eingewogen, aber sonst wie bei der Blindlösung verfahren. Die Eichlösung enthält also 7,5 μ g Ag/ml; 8 μ g Na/ml; 0,4 μ g K/ml; 0,2 μ g Ca/ml; 0,3 μ g P/ml. Vom Silber in der Eichlösung abgesehen, entspricht also die Zusammensetzung der Blind- bzw. Eichlösung in etwa den anorganischen Bestandteilen des 1:410 verdünnten Serums. Andere Elemente, wie z. B. Cu und Fe, treten im Serum in so geringen Konzentrationen auf, daß sie hier wegen der angewandten starken Verdünnung vernachlässigt werden können.

Probenvorbereitung: In ein Zentrifugenglas werden 50 μ l Serum, 1 ml 1 n HNO₃ und 1 ml AgNO₃-Lösung (Konzentration 650 μ g Ag/ml) pipettiert, mit einem Platindraht umgerührt (6) und 15 Min. bei 5500 U/Min. (etwa 4500 g) zentrifugiert. Von der überstehenden Lösung wird 1 ml abpipettiert, mit 9 ml entsalztem (und nachdestilliertem) Wasser verdünnt und in dieser Lösung der Silbergehalt flammenphotometrisch gemessen. Um etwaige Fehler bei der Probenvorbereitung erkennen und eliminieren zu können (s. u.), empfiehlt es sich, mit 3 Serumproben zu je 50 μ l in der angegebenen Weise die Chloridanalyse durchzuführen.

¹⁾ In einer Ionenaustauschersäule (Wasserreiniger der Fa. Serva, Type WR-12) gereinigtes Leitungswasser.

50 μl normales Serum enthalten etwa 180 μg Chlorid. Orientierende Messungen mit vorher verdünntem Serum haben gezeigt, daß noch mit einem Hundertstel dieser Konzentration (also 1,8 μg Chlorid) quantitative Analysen möglich sind. Man könnte deshalb z. B. auch so vorgehen, daß man 50 μl Serum (oder weniger) zunächst in gewünschter Weise verdünnt und mit dieser verdünnten Probe die Parallelbestimmungen durchführt.

Messung und Auswertung

Nach mindestens einstündiger Einbrennzeit der Meßanordnung werden die oben angegebenen Meßparameter eingestellt und die Meßempfindlichkeit während der Zerstäubung der Blind- und Eichlösung eingeregelt. Die Messung wird in der Reihenfolge Blind-, Eich- und Analysenlösung durchgeführt. Die Serum-Chlorid-Konzentration c_s ist mit der Gleichung

$$(1) \quad c_s = 4273 - 134,8 \frac{b_M^*}{b_E^*} \quad \text{bzw.} \\ c_s = 4273 - 1011 \frac{b_M^*}{b_E^*} \quad (c_s \text{ in } \mu\text{g Cl/ml})$$

zu berechnen. Dabei ist b_E^* der Nutzausschlag des Anzeigeinstrumentes während der Zerstäubung der Eichlösung und b_M^* der Nutzausschlag während der Zerstäubung der Meßlösung (Analysenlösung; vgl. Registrierkurven in Abb. 5). Die Herleitung der Gleichung erfolgt weiter unten. Die graphische Darstellung von Gleichung (1) (vgl. Abb. 6) auf Millimeterpapier im DIN A4-Format erlaubt eine raschere und hinreichend genaue Auswertung.

Zur Wahl der Meßparameter

Der Preßluftdruck der Zerstäuber-Brenner-Kombination wurde zu 0,7 kp/cm² gewählt. Bei diesem Druck ist einerseits eine sehr gleichmäßige und konstante Zerstäubung der Lösungen gewährleistet, und andererseits ist der Probenverbrauch in der Zeiteinheit nicht übermäßig groß. Die beiden Variablen, Beobachtungshöhe in der Flamme und Wasserstoffdruck, wurden bei konstant gehaltenem Preßluftdruck ermittelt (Abb. 1). Bei

Abb. 1

Zur Ermittlung der optimalen Beobachtungshöhe (Abszisse) und des optimalen Wasserstoffdruckes (Parameter der Kurvenschar) der Emission (Ordinate) der Silberlinie 338,3 m μ . Preßluftdruck konstant 0,7 kp/cm². Wäßrige Silbernitratlösung, Konzentration 10 μg Ag/ml

Abb. 2

Eichkurve für flammenspektrophotometrische Emissionsmessungen mit der Silberlinie 338 m μ

den oben erwähnten Meßparametern, nämlich 3,5 cm Beobachtungshöhe und 180 mm WS Wasserstoffdruck, erreicht die Silberemission nahezu ein Maximum, und die betreffende Kurve verläuft recht flach, so daß sich kleine Änderungen des Wasserstoffdruckes auf die Messung kaum auswirken. — Mit den so gewählten Meßparametern wurde die Eichkurve mit wäßriger Silbernitratlösung ermittelt (Abb. 2). Bis zu etwa 20 μg Ag/ml verläuft die Eichkurve linear und ist für höhere Konzentrationen nach der Konzentrationsachse hin gekrümmt.

Als Arbeitsbereich kommt das Konzentrationsintervall von etwa 2 bis 16 μg Ag/ml in Betracht. Für höhere Konzentrationen wird infolge der Eichkurvenkrümmung die Bestimmungsgenauigkeit vermindert, und für niedrigere Konzentrationen wird mit Annäherung an die untere Nachweisgrenze die Meßgenauigkeit ebenfalls sehr rasch abnehmen. Bei den gewählten Meßbedingungen sind in wäßriger Lösung 0,05 μg Ag/ml noch quantitativ nachweisbar. — Die Analysenlinie 338,3 m μ wurde der Silberlinie 328,1 m μ vorgezogen, weil der Untergrund beiderseits der Linie 338 konstant ist und in diesem Spektralbereich keine störenden Linien oder Banden bei der Serum-Chloridbestimmung auftreten, wie auch aus den Registrierkurven der Abbildung 7 hervorgeht.

Zur Wahl der Konstanten in Gleichung (1)

Für die folgenden Betrachtungen wird vorausgesetzt, daß die verwendete Salpetersäure und das zur Verdünnung benutzte entsalzte Wasser weder Silber noch Chlorid als Verunreinigung enthalten, und daß die Silbernitratlösung chloridfrei ist. Ferner muß gefordert werden, daß die Fällung des Chlorids quantitativ erfolgt und das gefällte Silberchlorid vollständig von der zu messenden Lösung abgetrennt wird.

Wie oben geschildert, wird das Serumvolumen $V_s = 0,05$ ml mit Salpetersäure ($V_{\text{HNO}_3} = 1,0$ ml) und Silbernitratlösung $V_{\text{AgNO}_3}^* = 1,0$ ml versetzt und zentrifugiert. (Die auf Silber bezogenen Größen sind im folgenden mit einem Stern indiziert, um Verwechslungen zu

vermeiden.) Von der überstehenden Lösung wird nur ein Teilvolumen $V_T = 1 \text{ ml}$ abpipettiert, um sicherzustellen, daß kein Silberchlorid in diese Probe gesaugt wird. Dem Teilvolumen V_T wird zur Verdünnung entsalztes Wasser ($V_{\text{H}_2\text{O}} = 9 \text{ ml}$) zugesetzt und anschließend der Silbergehalt flammenspektrophotometrisch bestimmt. Das Serum ist also insgesamt im Verhältnis 1:410 verdünnt. Wie weiter unten gezeigt wird (Gleichung 6b), ist es zweckmäßig, als Meßvolumen V_M zu definieren:

$$(2) \quad V_M = (V_S + V_{\text{HNO}_3} + V_{\text{AgNO}_3}^*) \left(1 + \frac{V_{\text{H}_2\text{O}}}{V_T} \right).$$

Anschaulich läßt sich diese Gleichung wie folgt deuten: Dem Volumen $V_S + V_{\text{HNO}_3} + V_{\text{AgNO}_3}^*$ wird bereits vor dem Zentrifugieren soviel Wasser zugesetzt, daß das Serum im gewünschten Verhältnis (hier 1:410) verdünnt ist.

Die Masse des restlichen Silbers in der Meßlösung m_M^* ist abhängig von der Masse des Chlorids in der Serumprobe m_S und der Masse des mit der Silbernitratlösung zugesetzten Silbers $m_{\text{AgNO}_3}^*$ gemäß der Beziehung

$$(3) \quad m_M^* = m_{\text{AgNO}_3}^* - \frac{A_{\text{Ag}}}{A_{\text{Cl}}} m_S.$$

A_{Ag} und A_{Cl} sind die Atomgewichte des Silbers bzw. des Chlors. Die Silberkonzentration der Meßlösung ist

$$(4) \quad c_M^* = \frac{m_M^*}{V_M} = \frac{m_{\text{AgNO}_3}^* - \frac{A_{\text{Ag}}}{A_{\text{Cl}}} m_S}{V_M}.$$

Löst man diese Gleichung nach m_S auf und dividiert durch das Serumvolumen V_S , so erhält man mit $m_{\text{AgNO}_3}^* = c_{\text{AgNO}_3}^* V_{\text{AgNO}_3}^*$ die gesuchte Serumkonzentration

$$(5) \quad c_S = \frac{m_S}{V_S} = \frac{A_{\text{Cl}}}{A_{\text{Ag}}} \frac{c_{\text{AgNO}_3}^* V_{\text{AgNO}_3}^* - c_M^* V_M}{V_S}.$$

Für eine gegebene Methode sind alle Größen der rechten Seite bis auf c_M^* konstant. Setzt man abkürzend

$$(6a) \quad a = \frac{A_{\text{Cl}}}{A_{\text{Ag}}} \frac{c_{\text{AgNO}_3}^* V_{\text{AgNO}_3}^*}{V_S} \quad \text{und}$$

$$(6b) \quad b = \frac{A_{\text{Cl}}}{A_{\text{Ag}}} \frac{V_M}{V_S}, \quad \text{so wird aus Gl. (5)}$$

$$(7) \quad c_S = a - b c_M^*.$$

In Gleichung (6b) gibt der Quotient $\frac{V_M}{V_S}$ den Verdünnungsfaktor des Serums an, im vorliegenden Falle also 410. — Wird für die Silberanalyse der Meßlösung eine Eichlösung der Konzentration c_E^* (hier $7,5 \mu\text{g Ag/ml}$) verwendet und bedeuten wieder b_M^* und b_E^* die Nutzausschläge des Anzeigeinstrumentes für die Meß- bzw. Eichlösung, so wird mit $c_M^* = c_E^* \cdot b_M^* / b_E^*$ aus Gl. (7)

$$(7a) \quad c_S = a - b c_E^* \frac{b_M^*}{b_E^*}.$$

Nach Einsetzen der Zahlenwerte folgt hieraus Gl. (1). Für die praktische Anwendung ist die Frage von Bedeutung, wie sich eine relative Änderung der Serum-Chlorid-Konzentration dc_S/c_S auf die relative Änderung der Silberkonzentration dc_M^*/c_M^* in der Meßlösung auswirkt. Die Differentiation der Gl. (7) liefert

$$(8a) \quad dc_S = -b dc_M^*.$$

Nach Division dieser Gleichung durch c_S und Erweiterung der rechten Seite mit c_M^*/c_M^* erhält man

$$(8b) \quad \frac{dc_S}{c_S} = -\frac{b c_M^*}{c_S} \frac{dc_M^*}{c_M^*}.$$

Führt man $c_M^* = \frac{a - c_S}{b}$ aus Gl. (7) in (8b) ein, so wird

$$(8c) \quad \frac{dc_S}{c_S} = \frac{c_S - a}{c_S} \cdot \frac{dc_M^*}{c_M^*},$$

oder nach dc_M^*/c_M^* aufgelöst:

$$(9) \quad \frac{dc_M^*}{c_M^*} = \frac{c_S}{c_S - a} \frac{dc_S}{c_S}.$$

Die Konstante b ist in dieser Gleichung implizit enthalten, wie man leicht erkennt, wenn man $c_S = a - b c_M^*$ einführt. Dann wird nämlich

$$(10) \quad \frac{dc_M^*}{c_M^*} = \left(1 - \frac{a}{b c_M^*} \right) \frac{dc_S}{c_S}.$$

Für die numerische Auswertung ist jedoch Gl. (9) handlicher. Der Mittelwert der Chloridkonzentration von normalem Serum liegt nach JEANNERET und Mitarbeitern (8) bei $3650 \mu\text{g Cl/ml}$. Bezieht man die relative Änderung der Serumchloridkonzentration auf diesen Mittelwert, so ist in Gl. (9) für $c_S = 3650 \mu\text{g Cl/ml}$ zu setzen. Dann erhält man die relative Änderung der Silberkonzentration in der Meßlösung, bezogen auf diejenige Silberkonzentration, welche dem Mittelwert der Chloridkonzentration von normalem Serum entspricht. Die Abbildung 3 zeigt das Ergebnis der Auswertung für verschiedene Werte von a .

Abb. 3

Ergebnis der numerischen Auswertung von Gl. (9) für verschiedene Werte der Konstanten a .

Bezugswert ist der Mittelwert der Chloridkonzentration von normalem Serum ($3650 \mu\text{g Cl/ml}$). Erläuterungen siehe Text

Abb. 4

Betrag des Dehnungsfaktors F als Funktion von a .

F stellt den Quotienten aus der relativen Änderung der Silberkonzentration und der relativen Änderung der Serumchloridkonzentration dar

Dem Diagramm ist zu entnehmen, daß mit dem Anwachsen des Parameters a (d. h. mit zunehmendem Silberüberschuß) die Geraden flacher verlaufen, die Bestimmungsgenauigkeit des Serumchlorids also abnimmt und im Grenzfalle (mit der Annäherung der Geraden an die Abszisse) gegen Null strebt. Nähert sich jedoch der Wert des Parameters a dem Mittelwert der Serumchloridkonzentration, dann verlaufen die Geraden steiler: Schon eine geringfügige Abweichung der Serumchloridkonzentration vom Mittelwert hat eine sehr starke prozentuale Änderung der Silberkonzentration in der Meßlösung zur Folge. So wird z. B. mit $a = 4000 \mu\text{g/ml}$ (Gerade I) für $\Delta c_S/c_S = +2,0\%$ der Wert von $\Delta c_M^*/c_M^* = -20,8\%$; die Änderung der Meßgröße (Silberkonzentration) ist also in diesem Falle um den Faktor $|F| = |-20,8\%| / |+2,0\%| = 10,4$ größer als die Änderung der zu bestimmenden Größe (Chloridkonzentration). Abbildung 4 zeigt, wie sich der Betrag des Dehnungsfaktors F mit dem Wert von a ändert. Mit Annäherung von a an den Mittelwert der Serumchloridkonzentration ($3650 \mu\text{g Cl/ml}$) geht $|F| \rightarrow \infty$. Für $a \rightarrow \infty$ gilt $|F| \rightarrow 0$.

Die Registrierkurven der Abbildung 5 veranschaulichen die praktische Anwendung dieser Überlegungen. Hierbei wurde absichtlich ein anderer Bezugswert der Chloridkonzentration gewählt, um zu zeigen, in welcher Weise die zu erwartende Bestimmungsgenauigkeit (Dehnungsfaktor F) leicht ermittelt werden kann.

Eine wäßrige Lösung A ($3540 \mu\text{g Cl/ml}$) enthält 4,80% mehr Chlorid als die Lösung B ($3370 \mu\text{g Cl/ml}$). Mit jeweils $50 \mu\text{l}$ beider Lösungen wurde ähnlich wie für Serum das Chlorid gefällt und der restliche Silbergehalt gemessen. Die Konstante a wurde zu $5280 \mu\text{g/ml}$ gewählt, die Konstante b zu 134,8. Mit diesen Daten und den bekannten Chloridkonzentrationen der Lösungen kann man aus Gleichung (7) die zu erwartenden

Abb. 5

Emission der Silberlinie $338,3 \mu\text{m}$ während der Zerstäubung von Blindlösung (einfache Pfeile), Eichlösungen (E_1 : $15,0 \mu\text{g Ag/ml}$, E_2 : $7,5 \mu\text{g Ag/ml}$) und Analyselösungen

(A_1 : $3540 \mu\text{g Cl/ml}$; $a = 5280 \mu\text{g/ml}$,

A_2 : $3370 \mu\text{g Cl/ml}$; $a = 5280 \mu\text{g/ml}$,

B_1 : $3540 \mu\text{g Cl/ml}$; $a = 4273 \mu\text{g/ml}$,

B_2 : $3370 \mu\text{g Cl/ml}$; $a = 4273 \mu\text{g/ml}$).

Doppelpfeile: Keine Zerstäubung (leer brennende Flamme). Spaltbreite $0,2 \text{ mm}$ (spektrale Bandbreite $1 \mu\text{m}$)

Silberkonzentrationen der Meßlösungen zu $12,85 \mu\text{g Ag/ml}$ (Lösung A) bzw. $14,12 \mu\text{g Ag/ml}$ (Lösung B) berechnen. Die Meßlösung B enthält also 9,88% mehr Silber als A, der Dehnungsfaktor beträgt $9,88\%/4,80\% = 2,06$. Gemessen wurden (vgl. Abb. 5) 12,5 bzw. $13,8 \mu\text{g Ag/ml}$ (Dehnungsfaktor 2,2).

In einer zweiten Meßreihe wurden die gleichen Lösungen A und B, aber eine andere Konstante $a = 4273 \mu\text{g/ml}$ (Konstante b wie vorher) verwendet. Die berechneten Silberkonzentrationen der Meßlösungen sind $5,47$ (A) bzw. $6,72 \mu\text{g Ag/ml}$ (B) und $F = 4,75$. Gemessen wurden (s. Abb. 5) $5,5$ bzw. $6,8 \mu\text{g Ag/ml}$ (Dehnungsfaktor 4,9).

In zwei weiteren Meßreihen wurde unter Anwendung der Konstanten $a = 5280 \mu\text{g/ml}$ bzw. $4273 \mu\text{g/ml}$ mit 10 Einzelmessungen die Standardabweichung der Silberanalyse ermittelt. Sie beträgt für den erstgenannten Fall $\pm 3,0\%$, im zweiten Fall jedoch nur $\pm 1,7\%$. Also auch hieraus geht hervor, daß man den Silberüberschuß möglichst *niedrig* halten sollte (s. u.).

Aus diesen Beispielen läßt sich ein prinzipieller Vorteil indirekter flammenphotometrischer Analysen mit vorausgehender Fällungsreaktion gegenüber direkten Emissionsanalysen ableiten, wenn es sich darum handelt, kleine Änderungen einer verhältnismäßig hohen Konzentration zu messen: Durch geeignete Wahl der Parameter a und b in Gl. (7) kann man die Nachweisempfindlichkeit innerhalb gewisser Grenzen frei wählen. Diese Grenzen sind hier durch die Forderung gegeben, daß die Konzentration des Silberüberschusses im Arbeitsbereich, also zwischen etwa 2 und $18 \mu\text{g Ag/ml}$ liegen soll.

Prüfung auf Störungen

Wie oben bereits erwähnt, entspricht die Verdünnung des Serums in der Meßlösung einem Verhältnis von

1:410. Bei normalem Serum beträgt dann beispielsweise der Natriumgehalt der Probe etwa $8 \mu\text{g/ml}$, der Kaliumgehalt $0,4 \mu\text{g/ml}$, der Ca-Gehalt $0,2 \mu\text{g/ml}$ und der Gesamtphosphorgehalt $0,3 \mu\text{g/ml}$. Andererseits sind die Parameter der vorgeschlagenen Analysenmethode so gewählt, daß die Silberkonzentration der Meßlösung von der Größenordnung einiger $\mu\text{g Ag/ml}$ ist. Aus diesen und anderen Gründen (s. u.) ist zu erwarten, daß die angegebene Serumchloridmethode störungsfrei arbeitet. Dies wurde auf verschiedene Weise experimentell verifiziert.

50 μl -Proben wäßriger Lösungen verschiedener, aber bekannter und merkurimetrisch (9) kontrollierter Chloridkonzentrationen wurden — wie für Serum angegeben — vorbereitet und flammenphotometrisch auf Silber analysiert. In den folgenden Meßreihen wurden den wäßrigen Lösungen zunächst nur Natrium, danach Natrium und Kalium usw. zugesetzt und wiederum die Silberkonzentrationen der Meßlösungen (unter Verwendung entsprechender Blind- und Eichlösungen) bestimmt. Für jede einzelne dieser Lösungen wurden drei Parallelbestimmungen vorgenommen, der Mittelwert der Silberkonzentration und der Bestimmungsfehler berechnet und mit der zugehörigen Eichkurve verglichen. Für die Lösungen mit den Zusatzkonzentrationen (in $\mu\text{g/ml}$) 5,0 Na — 0,25 K — 0,125 Ca und 0,15 P sind die Mittelwerte der gemessenen Silberkonzentrationen in Abbildung 6 eingetragen (obere Eichgerade, Konstante $a = 5280 \mu\text{g/ml}$, Konstante $b = 134,8$). Zwar liegen die Mittelwerte nicht auf der Geraden, aber immerhin ist im interessierenden Konzentrationsintervall und innerhalb der Bestimmungsgenauigkeit die Übereinstimmung zwischen den theoretisch zu erwartenden und experimentell gefundenen Silberkonzentrationen vorhanden.

Eine zweite Prüfung auf etwaige Störungen wurde mit Serumproben wie folgt durchgeführt: Der Chloridgehalt eines Aliquots Mischserum wurde merkurimetrisch (9) bestimmt und von dem anderen nicht enteiweißten Mischserum wurden nicht 50 μl -Proben, sondern verschiedene Volumina (40; 44; 48; 52; 56; 60 μl) für die Analyse verwendet. Auf diese Weise erhält man Proben verschiedenen (bekannten) Chloridgehaltes und unterschiedlicher Konzentrationen an Serum-Eiweiß, -Natrium, -Kalium usw. Auch hier wurden wieder jeweils 3 Parallelbestimmungen nach der eingangs angegebenen Vorschrift (mit der Konstanten $a = 4273 \mu\text{g/ml}$) durchgeführt und die Mittelwerte in Abbildung 6 eingetragen (untere Gerade). Erwartungsgemäß ist die Bestimmungsgenauigkeit besser als bei den vorigen Analysen und die Mittelwerte der Silberkonzentrationen weichen weniger stark von der Eichgeraden ab. Eine weitere Kontrolle auf etwaige Störungen bieten die im nächsten Abschnitt behandelten Vergleichsmessungen mit der merkurimetrischen Chloridbestimmungsmethode.

Aus den besprochenen Kontrollen der Methode darf man folgern, daß im interessierenden Arbeitsbereich eine Krümmung der experimentell ermittelten Eich-

Abb. 6

Eichkurven für die indirekte Chloridbestimmung mit dem Parameter $a = 5280 \mu\text{g/ml}$ bzw. $4273 \mu\text{g/ml}$.

Die Konstante b beträgt in beiden Fällen 134,8. Die verwendeten Eichlösungen enthalten $15 \mu\text{g Ag/ml}$ (obere Gerade) bzw. $7,5 \mu\text{g Ag/ml}$ (untere Gerade). Zur oberen Geraden gehört die obere Abszisse, zur unteren Geraden die untere Abszisse

kurve, wie sie verschiedentlich bei indirekten flammenphotometrischen Methoden beobachtet und von RAMÍREZ-MUÑOZ und NAVARRO-SERRANO (10) theoretisch diskutiert wurden, im vorliegenden Falle nicht festzustellen ist. Dies mag mit der hier angewandten starken Verdünnung und niedrigen Silberkonzentration der Meßlösung zu erklären sein.

Reproduzierbarkeit und Vergleich mit merkurimetrischer Methode

Die Reproduzierbarkeitsprüfung wurde nach der eingangs angegebenen Methode mit Mischserum durchgeführt. Mit 25 Proben wurde die Standardabweichung zu $\pm 0,76\%$ ermittelt. — Das Ergebnis eines Vergleiches der vorgeschlagenen Methode mit der merkurimetrischen Bestimmungsmethode für Serumchlorid ist in Tabelle 1 zusammengefaßt. Die größte beobachtete Abweichung beträgt $4,67\%$.

Messung bei großen spektralen Bandbreiten

Üblicherweise werden die flammenphotometrischen Analysen auf Natrium, Kalium und Calcium im klinischen Labor mit Filtergeräten durchgeführt. Bei der vorgeschlagenen Methode der Serum-Chloridanalyse läßt sich u. E. der hier verwendete Quarzprismenmonochromator durch ein Interferenzfilter für $338 \text{ m}\mu$ ersetzen. Orientierende Messungen (Abb. 7) haben ergeben, daß bei der gewählten Verdünnung des Serums im Verhältnis 1:410 als nächste Linie mit merklicher Intensität die Silberresonanzlinie $328,1 \text{ m}\mu$ im Spektralbereich der Analysenlinie $338,3 \text{ m}\mu$ auftritt. Eine schwache Bande bei etwa 342 und $346 \text{ m}\mu$ sowie die OH-Banden unterhalb $325 \text{ m}\mu$ treten bereits in der leer brennenden Flamme (mit höherer Intensität) auf. Die Natriumlinie $330,3 \text{ m}\mu$ und die Kupferlinien $327,4$ bzw. $324,8 \text{ m}\mu$ werden unter den gewählten Bedingun-

Tab. 1

Vergleich der flammenspektrophotometrischen Serum-Chlorid-Bestimmung mit der merkurimetrischen Bestimmungsmethode

Proben-Nr.	Chloridgehalt ($\mu\text{g/ml}$) Fla.-Phot.	Chloridgehalt ($\mu\text{g/ml}$) Merkurim.	Differenz ($\mu\text{g/ml}$)	rel. Fehler in %
1	3420	3430	— 10	— 0,29
2	3750	3700	+ 50	+ 1,35
3	3550	3640	— 90	— 2,47
4	3810	3710	+ 100	+ 2,70
5	3420	3560	— 140	— 3,93
6	3760	3650	+ 110	+ 3,01
7	3710	3690	+ 20	+ 0,54
8	3720	3630	+ 90	+ 2,48
9	3510	3580	— 70	— 1,96
10	3660	3720	— 60	— 1,61
11	3590	3660	— 70	— 1,91
12	3850	3790	+ 60	+ 1,59
13	3490	3450	+ 40	+ 1,16
14	3920	3830	+ 90	+ 2,35
15	3490	3630	— 140	— 3,86
16	3880	3810	+ 70	+ 1,84
17	3470	3640	— 170	— 4,67
18	3710	3780	— 70	— 1,85
19	3300	3360	— 60	— 1,79
20	3760	3770	— 10	— 0,27
21	3860	3820	+ 40	+ 1,05
22	3780	3640	+ 140	+ 3,85
23	3670	3600	+ 70	+ 1,95
24	3770	3770	—	—
25	3820	3810	+ 10	+ 0,26
Summe der rel. Fehler:				— 0,48%

Abb. 7

Emission der Wasserstoff-Preßluft-Flamme im Spektralbereich von 323 bis 350 $m\mu$ während der Zerstäubung von Eichlösung (obere Kurve) bzw. Serum (untere Kurve)

Lösungen vgl. Text. Spaltbreite des Monochromators 0,1 mm (entspricht bei 338 $m\mu$ einer Bandbreite von 0,5 $m\mu$)

Der Deutlichkeit wegen sind die Kurven absichtlich in der vertikalen gegeneinander verschoben, wodurch ein höherer Untergrund der Eichlösung vorgetäuscht wird. (Mißweisung der Wellenlängenskala etwa 1 $m\mu$)

gen nicht beobachtet und scheiden somit als mögliche Störquellen aus. Zweckmäßig wird man die Bandbreite des Filters so wählen, daß die zweite Silberlinie und die starken OH-Banden nicht miterfaßt werden. Wegen des größeren Lichtleitwertes des Filters gegenüber einem Monochromator ist dann eine wesentlich geringere Empfindlichkeit der Meßanordnung erforderlich.

Herrn Professor Dr. R. HERRMANN danke ich für anregende Diskussionen und Korrekturhinweise. Fräulein B. GUTSCHE danke ich für die Durchführung der Messungen.

Literatur

1. HERRMANN, R. und C. TH. J. ALKEMADE, *Flammenphotometrie*, 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960). — 2. GAYDON, A. G. und H. G. WOLFHARD, *The Spectroscopy of Flames*, Chapman & Hall Ltd., London (1957). — 3. HONMA, M. und C. L. SMITH, *Analytic. Chem.* 27, 1656 (1955). — 4. MARSH, G. E., *Appl. Spectroscopy* 12, 113 (1958). — 5. LUNDEGARDH, H., *Die quantitative Spektralanalyse der Elemente*, 1. Teil 1929; 2. Teil 1934. Gustav-Fischer-Verlag, Jena. — 6. MENIS, O., H. P. HOUSE und T. C. RAINS, *Analytic. Chem.* 29, 76 (1957). — 7. LANG, W. und R. HERRMANN, *Zschr. exper. Med.* 139, 200 (1965). — 8. JEANNERET, P., H. ROSENMUND und A. F. ESSELLIER, *Helvet. med. acta* 21, 191 (1954). — 9. LANG, K., *Biochem. Z.* 290, 289 (1937). — 10. RAMÍREZ-MUÑOZ, J. und A. NAVARRO-SERRANO, *Rev. Univers. Indust. Santander* 5, 425 (1963).

Dipl.-Phys. Walter Lang
Abteilung für Medizinische Physik
an der Universitäts-Hautklinik
63 Gießen, Gaffkystr. 14