Phosphatid-Phosphor-Bestimmung durch Hochtemperatur-Flammenphotometrie mittels eines Plasmabogens¹⁾

Von D. STAMM und K. RÖTGER

Aus der Klinisch-chemischen Abteilung (Leiter: Dr. Dr. D. Stamm) an der Chirurgischen Klinik und aus der Abteilung für Medizinische Physik (Leiter: Prof. Dr. R. Herrmann) an der Hautklinik der Universität Gießen

(Eingegangen am 6. April 1966)

Es wird eine Methode zur spezifischen Bestimmung des Phosphatidphosphors durch Hochtemperatur-Flammenphotometrie nach vorausgegangener Lipoidextraktion beschrieben. Gemessen wird die Intensität der charakteristischen Phosphor-Atomlinie bei 213,62 m μ . Die Präzision und die Richtigkeit der neuen Methode werden geprüft und mit entsprechenden Werten einer bewährten chemischen Methode verglichen. Die Präzision ist wesentlich besser als bei der chemischen Methode, der Zeitaufwand für Probenvorbereitung und Messung wesentlich kürzer.

A method is described for the specific determination of phosphatide phosphorus by high temperature flame photometry after the initial extraction of lipids. The intensity of the characteristic atomic line of phosphorus at 213,62 m μ is measured. The precision and accuracy of the new method is tested and compared with corresponding values from proven chemical methods. The precision is essentially better than in chemical methods, and the time for preparation of the sample and measurement is considerably less.

Mit dem in der vorstehenden Arbeit (1) beschriebenen Plasmabogen soll im folgenden als Anwendungsbeispiel eine einfache, schnelle und spezifische Methode zur Bestimmung des Lipoidphosphorgehaltes im Serum mitgeteilt werden.

Bisher werden bei uns die Phosphatide durch Extraktion mit Lipoidlösungsmitteln von den übrigen Phosphorverbindungen des Serums abgetrennt. Der Trockenrückstand des Chloroform-Methanol-Extraktes (2) wird verascht und anschließend Phosphormolybdänblau entwickelt, das photometrisch durch Molekülaborption bei 830 m μ mit einem Spektral-Photometer bestimmt wird (3). In der vorliegenden Arbeit wird von demselben Lipoidextrakt ausgegangen und es wird die neue Phosphor-Atomlinienmethode, bei der der Extrakt unmittelbar, also ohne vorherige Veraschung und anschließende Farbreaktion, der Messung zugeführt werden kann, mit dem bisher von uns benutzten chemischen Routineverfahren verglichen.

Methodik

Hochtemperatur-Flammenphotometrie

Probenvorbereitung

Die Extraktion erfolgt nach ZÖLLNER (2). Der Lipoidphosphor liegt dann in der Chloroform-Unterphase vor²⁾. 2 ml des Chloroformextraktes werden in einen 5 ml Erlenmeyerkolben gegeben, bei 75° bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand mit 1 ml Eisessig p. a. (Fa. Merck) aufgenommen. Diese Lösung wird aus dem gleichen Gefäß direkt in das Plasma zerstäubt. Bei dem Aufnehmen erfolgt eine Anreicherung um den Faktor 2; das wird durch den Anreicherungsfaktor 0,5 in der Berechnung berücksichtigt.

¹⁾ Unterstützt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

²⁾ Prinzipiell wäre nun schon eine spektroskopische Bestimmung des Phosphorgehaltes in der Chloroform-Phase möglich, jedoch zeigte sich eine starke Verrußung der mittleren Kammer unseres Brenners, die auch durch Öffnen der normalerweise geschlossenen tangentialen Gaseinblasöffnung in der mittleren Kammer nicht ganz beseitigt werden konnte. Außerdem bewirkte das Chloroform ein Herauslösen von Messing aus der Brennerwandung. Die infolgedessen auftretende benachbarte Cu-Linie bei 213,598 m μ führte zu Störungen. Diese Schwierigkeiten wurden durch die Wahl von Eisessig als Lösungsmittel behoben. Störungen durch die Linie anderer Elemente in der Umgebung der genannten P-Linie traten nicht auf.

Apparatur

Die Meßanordnung wird in der vorstehenden Arbeit (1) beschrieben. Die empfindlichste Phosphor-Emissions-Atomlinie fanden wir bei 213,62 m μ . Als günstigste Betriebsbedingungen wurde eine Stromstärke von 20 A bei etwa 60 V Gleichspannung und eine Meßhöhe von 6 mm über dem der Anode zugekehrten Rand der 8 mm breiten Beobachtungsöffnung bei 2 $\times$ 20 l/Min. Tangentialgasdurchflußmenge ermittelt (Abb. 1).

Eichung

Die Eichung kann mit einer Lösung von D,L- α -Lecithin purum erfolgen. Man löst 25 mg β , γ -Dipalmitoyl-DL- α -lecithin (Fa. Fluka Nr. 55205) in 100 ml Eisessig p. a. (Fa. Merck Nr. 90063), was einem Phosphorgehalt von 1,055 mg/100 ml Eisessig entspricht (Abb. 2).

Abb. 1

Quotient Linie/Untergrund in Abhängigkeit von der Meßhöhe im Plasmabogen mit der P-Nachweislinie 213,62 m μ

Abb. 2

Phosphor-Eichkurve des Plasmabogens

Als gleichwertig, aber wesentlich billiger, erwies sich die Lösung von 35,97 mg Ammoniumphosphat ($[(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4]$ p. a. (Fa. Merck Nr. 1207) in 100 ml Eisessig p. a. (Fa. Merck). Diese Lösung wird 1+3 ml Eisessig verdünnt und enthält dann ebenfalls 1,055 mg Phosphor/100 ml.

Als Blindlösung wird Eisessig p. a. verwandt.

Messung

Durch Zerstäuben der entsprechenden Lösungen wird zu jedem Analysenwert ein Eich- und ein Blindwert ermittelt. Dadurch werden langzeitige Empfindlichkeitsschwankungen der Gesamtanordnung eliminiert. Die Abbildung 3 zeigt die vom Schreiber registrierte Kurve bei mehrmaligem Zerstäuben derselben Lösungen.

Abb. 3

Registrierkurve beim abwechselnden Zerstäuben von Eich-, Analysen- und Blindlösung

Berechnung

Aus dem vom Registrierstreifen ablesbaren Phosphorgehalt der Probe berechnet man den Lipoidphosphorgehalt des Serums in mg/100 ml in folgender Weise:

$$\text{Lipoidphosphor im Serum (mg/100 ml)} = c \cdot V_E \cdot V_V \cdot V_A \\ = c \cdot V_E \cdot 0,625$$

c = gemessene Phosphorkonzentration im Eisessig-Ansatz

V_E = Extraktvolumen

V_V = Volumenkorrektur aus den Extraktionsverfahren = 1,25

V_A = Anreicherungsfaktor = 0,5

Prüfung der Methode

Präzision der Geräteanzeige

Eine Lecithin-Lösung in Eisessig wird 25 mal nach obiger Vorschrift gemessen. Der Mittelwert beträgt 4,23 mg/100 ml, die Standardabweichung 0,048 mg/100 ml und der Variationskoeffizient damit 1,1%.

Linearität der Eichkurve

Die Linearität der Eichkurve wurde in dem interessierenden Konzentrationsbereich von 0 bis 50 mg/100 ml überprüft. Die unteren Werte sind in Abbildung 2 wiedergegeben. Die Eichkurve ist im gesamten Bereich linear.

Präzision der Extraktion und der Bestimmung

1. Aus ein und demselben Extrakt wurden 25 Ansätze für die chemische Bestimmung und 25 Ansätze für die Bestimmung mit dem Plasmabogen gemacht. Dabei ergaben sich folgende Werte:

	Mittelwert mg/100 ml	Standard- abweichung mg/100 ml	VK %
Chemische Bestimmung	9,04	0,46	5,00
Bestimmung mit Plasmabogen	8,95	0,11	1,22

2. Die Bestimmung der Präzision der Extraktion und der Präzision der Phosphorbestimmung aus ein und demselben Extrakt wird mit dem von H. BÜTTNER (4) angegebenen Rechenverfahren vorgenommen. Mit ein und demselben Serum werden 4 Extraktionen angesetzt. Aus jedem Extrakt werden je 3 Bestimmungsansätze für die chemische Bestimmung und die Bestimmung mit dem Plasmabogen gemacht.

Aus der chemischen Bestimmung werden die folgenden Werte errechnet:

Streuung der Extraktion	0,799 mg/100 ml
Streuung der Messung	0,352 mg/100 ml

Aus der Analyse mit dem Plasmabogen werden die folgenden Werte errechnet:

Streuung der Extraktion	0,724 mg/100 ml
Streuung der Messung	0,121 mg/100 ml

Richtigkeit

Die Richtigkeit ergibt sich aus dem Vergleich der Ergebnisse von Hochtemperatur-Flammenphotometrie und herkömmlicher chemischer Methode, die gut übereinstimmen.

Parallelbestimmungen mit der chemischen Methode und mit dem Plasmabogen

Aus dem Serum von 25 Patienten werden je ein Extrakt hergestellt und der Phosphorgehalt mit beiden Methoden in Doppelbestimmungen ermittelt. Die Mittelwerte beider Methoden werden errechnet. Sie betragen bei der

chemischen Methode	8,34 mg/100 ml
Hochtemperatur-Flammenphotometrie	8,74 mg/100 ml

Der Erwartungswert der Streuung beider Methoden gegeneinander wird mit Hilfe der Beziehung

$$E_{(\text{Str.})} = \sqrt{\frac{\sum \Delta^2}{2m}}$$

berechnet, wobei m die Anzahl der Doppelbestimmungen und Δ die Abweichung der einzelnen Wertepaare untereinander bedeuten (5, 6). Der Erwartungswert der Streuung beträgt $\pm 0,855$ mg/100 ml, das sind etwa 10%, von denen der größere Anteil, wie die Varianzanalyse zeigt, zu Lasten der chemischen Methode geht.

Diskussion

Nach den vorliegenden Untersuchungen ist die Phosphorbestimmung durch Spektralanalyse mit dem Plasmabogen sehr gut für die Bestimmung des Lipoidphosphors im Serum geeignet. Sie hat gegenüber der chemischen Analyse folgende Vorteile:

1. Die Präzision der Bestimmung ist wesentlich besser.

2. Das Verfahren ist außerordentlich *spezifisch*, da die Intensität der charakteristischen Phosphor-Atomlinie ausgenutzt wird und es wegen der hohen Temperatur völlig gleichgültig ist, in welcher Bindung und in welcher Mischung mit anderen Elementen es vorliegt.
3. Die Probenvorbereitung und Messung sind *einfach* und benötigen wenig Zeit. Das Ergebnis steht

spätestens nach 30 Minuten zur Verfügung. Bei der chemischen Methode werden allein für die Veraschung 5 Stunden benötigt.

Ein wesentlicher Nachteil ist es, daß der benutzte Plas-mabogen noch nicht im Handel ist.

Frau I. HOFMEISTER und Frau R. RISTIG danken wir für die sorgfältige Durchführung der chemischen Bestimmungen.

Literatur

1. HERRMANN, R. und K. RÖTGER, diese Z. 4, 217 (1966). — 2. ZÖLLNER, N., diese Z. 1, 18 (1963). — 3. BARTLETT, G. R., J. biol. Chemistry 234, 466 (1959). — 4. BÜTTNER, H., diese Z. 3, 69 (1965).
- 5. GEBELEIN, H. und I. HEITE, Statistische Urteilsbildung, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1951). — 6. RAUSCH, L. und H. GRAUL, Ärztl. Wschr. 4, 591. (1949).

Dr. med. Dr. rer. nat. D. Stamm
Klin.-chem. Abt. an der
Chirurg. Universitätsklinik
63 Gießen, Klinikstr. 37

Mikrolitermethode zur Bestimmung von Serum-Eisen

Von D. STAMM, HJ. STAUDINGER und W. WEIS

Aus dem Physiologisch-chemischen Institut (Direktor: Prof. Dr. Hj. Staudinger) und der Klinisch-chemischen Abteilung (Leiter: Dr. Dr. D. Stamm) an der Chirurgischen Universitätsklinik der Universität Gießen

(Eingegangen am 6. April 1966)

Es wird eine Mikrolitermethode zur Bestimmung des Serumeisens unter Verwendung eines neuen Komplexbildners mit hohem molaren Extinktionskoeffizient beschrieben, für die nur 50 μ l Serum benötigt werden und die zuverlässiger als die Millilitermethode ist, wie sich aus der Qualitätskontrolle und Richtigkeitsprüfung ergibt.

A microlitre method for the determination of serum iron is described. A new complexing agent with a high molar extinction coefficient is used. Only 50 μ l of serum are required and, as shown by quality control and accuracy tests, it is more reliable than the millilitre method.

Bei den bisher üblichen *Millilitermethoden* zur Bestimmung des Serum-Eisens gibt es drei Schwierigkeiten: Erstens die Beschaffung der einwandfreien Probemengen von 1—2 Milliliter; zweitens die genaue Einhaltung des pH im Bestimmungsansatz; drittens die Reinigung der Glasgeräte von Eisenspuren (1). Nachdem nun KRÖHNKE und STAUDINGER mit ihren Mitarbeitern (2) einen neuen Komplexbildner mit einem ungewöhnlich hohen, nur wenig vom pH abhängigen molaren Extinktionskoeffizienten ($\epsilon = 26900$) für die Serumeisenbestimmung eingeführt haben, erscheint es sinnvoll, dieses Verfahren als *Mikrolitermethode* (3) auszuarbeiten und seine Zuverlässigkeit, Präzision und Richtigkeit zu prüfen. Denn zu allen anderen Vorzügen der Mikrolitermethoden kommt der Vorteil, daß man bei dem Mikrolitersystem „Eppendorf“¹⁾ die Reaktionsgefäße und die Pipettenspitzen unmittelbar aus den zugeschweißten Beuteln des Herstellers entnehmen und ohne vorherige Reinigung für die Eisenbestimmung verwenden kann (4). Da man nur ganz geringe Reagenzienmengen benötigt, kann man „super-reine“ Chemikalien verwenden; dadurch wird eine Vielzahl von Fehlermöglichkeiten ausgeschaltet.

Methode

Die Untersuchungen werden mit dem Mikrolitersystem „Eppendorf“ durchgeführt. Die Konzentration der

Reagenzien und der Volumina sind auf dieses System abgestimmt.

Reagenzien

Für die Lösungen und die Reaktionsansätze wird eisenfreies aus Quarz destilliertes, entmineralisiertes Wasser verwendet.

6 N-Salzsäure: Aus 60 ml Salzsäure ($D = 1,15$) „ultrarein“ (Fa. Merck Nr. 318), die etwa 9,5 N ist, werden 95 ml 6 N Salzsäure durch Zugabe von 35 ml Wasser hergestellt.

20proz. Trichloressigsäure: Zu 30 ml 40-proz. Trichloressigsäure (CCl_3COOH) p. a. zur Eisenbestimmung (Fa. Merck Nr. 811) sind 30 ml Wasser hinzuzugeben.

3,5 M Natriumacetat-Lösung pH 4,8—5,4: Man löst 28,7 g Natriumacetat (CH_3COONa) „ultrarein“ (Fa. Merck Nr. 6264) in 100 ml Wasser.

Ascorbinsäure $1,5 \cdot 10^{-2}$ M: Man löst 2,64 mg p. a. Ascorbinsäure (Fa. Merck Nr. 127) in 100 ml Wasser.

Eisenreagenz: 2,6-Di-[pyridyl-(2)]-4-[p-methoxy-phenyl]-pyridin $5 \cdot 10^{-4}$ M. Man löst 17,0 mg des Reagenzes, dessen Darstellung bei KRÖHNKE und STAUDINGER (2) beschrieben ist, in 100 ml Isopropylalkohol (Fa. Merck Nr. 9634).

Eisenstandardlösung 1000 μ g Fe/100 ml: Man wiegt 70,4 mg Mohrsches Salz, Ammoniumeisen-(II)-sulfat, $[(\text{NH}_4)_2 \text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}]$, $M = 392,16$ p. a. (Fa. Merck Nr. 3792) ein und füllt in einem Meßkolben auf 1000 ml auf.

Arbeitsstandard 100 μ g/100 ml: Die Eisenstandardlösung wird in einem 100-ml-Meßkolben 1+9 mit Wasser verdünnt.

¹⁾ Hersteller: Fa. „Eppendorf Gerätebau“, Netheler und Hinz GmbH, Hamburg.