

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 440–443

Zur Methodik der Phenolrot-Bestimmung im Plasma

Von G. Heimann

Aus der Kinderklinik (Direktor: Prof. Dr. E. Gladtke) der Universität Köln

(Eingegangen am 5. Juni/31. Juli 1974)

Die bisher bekannten Methoden zur Phenolrot-(Phenolsulfonphthalein)-bestimmung im Plasma verlangen hämolysefreie Analysenproben. Bestimmungen aus dem Kapillarblut im Mikrolitermaßstab waren dadurch bisher nicht möglich. Mit der beschriebenen Methode gelingt es, nach Verdünnung des Plasmas mit Essigsäure den Farbstoff aus seiner Albuminbindung vollständig zu verdrängen. Nach anschließender Präzipitation der Proteine einschließlich des Hämoglobins wird der Farbumschlag durch Zugabe alkalischer Äquivalente im Überschuß quantitativ erfaßt. Plasmatrübungen oder Plasmaeigenfarbe (Hyperbilirubinämie) beeinflussen die Extinktionsmessung nicht.

Methodology for the determination of phenol red in plasma

The measurement of the concentration of phenol red (phenolsulfonphthaleine) in plasma is disturbed by hemolysis. Estimations in capillary blood on a microscale are therefore impossible. In the new method phenol red is displaced from its albumin-binding by acetic acid. After precipitation of plasma proteins and hemoglobin the color change can be measured completely by adding alkaline equivalents in excess. The extinction measurement is not influenced by turbidity or hyperbilirubinemia.

Der als pH-Indikator bekannte Farbstoff Phenolrot (Phenolsulfonphthalein) ist für die funktionelle Nierendiagnostik geeignet, da er bei der Nierenpassage vorwiegend tubulär sezerniert wird (1, 2, 3). Zur Beurteilung der tubulären Sekretionsleistung der Niere kann die innerhalb einer bestimmten Zeit ausgeschiedene Farbstoffmenge in Relation zur verabfolgten Dosis gemessen werden (4, 5).

Auf die Nachteile dieser Methoden ist wegen inkonstanter Diurese und notwendiger Katheterisierung mit Harnblasenspülung wiederholt hingewiesen worden (6, 7, 8). Bei Kindern ist das Verhältnis zwischen Restharnvolumen aus dem Nierenbecken und den Ureteren und der gewonnenen Harnmenge noch ungünstiger als bei Erwachsenen. Auch Harnabflußstörungen, Atonie der Ureteren oder vesico-ureteraler Reflux verfälschen den Phenolrotausscheidungstest. Diese Fehlermöglichkeiten entfallen, wenn anstatt dieser Verfahren die Zeitclearance mit Hilfe der Phenolrotelimination aus dem Plasma bestimmt wird (9, 10, 11).

Bisher wurden verschiedene Phenolrot-Plasma-Tests angegeben (12, 13, 14). Diese Methoden benötigen mindestens 1 ml Plasma oder Serum. Sie liefern nur bei absolut hämolysefreien Analyseproben exakte Ergebnisse, weil sich die Absorptionsmaxima von Hämoglobin und Phenolrot überschneiden. Da zur Bestimmung der Zeitclearance mit Hilfe der kinetischen Standardgrößen (Eliminationshalbwertszeit und totale Clearance)

mehrere Blutentnahmen notwendig sind, war die Anwendung der bisher bekannten Phenolrot-Plasma-Tests in der Pädiatrie erheblich eingeschränkt. Besonders fehlte die Möglichkeit der Bestimmung im Mikrolitermaßstab aus dem Kapillarblut, da dabei unterschiedlich starke Hämolyseraten zu erwarten sind.

Es lag daher nahe, eine Methode zu entwickeln, die folgenden Anforderungen genügt:

1. Die Konzentration von Phenolrot im Plasma muß quantitativ erfaßt werden.
2. Die bei der Entnahme von Kapillarblut zu erwartenden unterschiedlichen Hämolyseraten dürfen keinen Einfluß auf das Meßergebnis haben.
3. Die Methode muß unabhängig von der Eigenfarbe des Plasmas (z. B. Bilirubin) und von Plasmatrübungen sein.

Material und Methodik

Phenolrot¹⁾ lag als Natriumsalz gelöst in dest. Wasser in einer Konzentration von 16,93 mmol/l vor. Als Reagenzien wurden NaOH (6,75 mol/l), Essigsäure in Konzentrationen von 1,66 mol/l, 2,49 mol/l, 4,16 mol/l und Trichloressigsäure 3 mol/l verwendet.

Die Extinktionsmessungen erfolgten bei 546 nm in einer Mikrodurchflußküvette (Schichtdicke 10 mm, Spaltbreite 1 × 4 mm,

¹⁾ Phenolrot (Phenolsulfonphthalein) Fa. Merck, Darmstadt, gekennzeichnet als 0,6 %ige Lösung, 10 ml Ampulle.

Füllvolumen 200 µl). Für die in-vitro-Versuche wurden Mischplasmen unterschiedlicher Plasmaproteinkonzentration (41–83 g/l), sowie eine standardisierte Hämoglobinlösung (1,53 mmol/l) benutzt. Mit einer Bilirubinstandardlösung (Bilirubin Control, Dade) wurde der Einfluß der Plasmaeigenfarbe auf die Messung bestimmt.

Methodik

1. 100 µl Plasma werden zunächst mit 400 µl Essigsäure (4,15 mol/l) verdünnt.
2. Zur Enteiweißung werden 200 µl Trichloressigsäure (3 mol/l) hinzugegeben, 2 Minuten geschüttelt und 10 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.
3. Nach Zentrifugation für 2 Minuten bei 12 000 U./min werden 500 µl als Aliquot des Überstandes zu 250 µl NaOH (6,75 mol/l) pipettiert. Das Endvolumen beträgt 750 µl.
4. Nach kurzem Mischen kann die Extinktionsmessung bei 546 nm gegen Wasser als Leerwert erfolgen. Das Mitführen eines Plasmaleerwertes ist nicht erforderlich. Bei wiederholten Kontrollen ergab sich stets gegen Wasser die Extinktion 0.

Zur Berechnung der Phenolrotkonzentration wird die gemessene Extinktion mit dem Eichfaktor multipliziert. Dieser ergibt sich als Produkt des durch die Eichkurve ermittelten Faktors

$$f = \frac{c}{E} = 12,2 \text{ mit dem methodisch bedingten Verdünnungsfaktor } E$$

1,4. Dieser kommt dadurch zustande, daß nur 500 µl des Überstandes zu 250 µl NaOH (6,75 mol/l) gegeben werden. Das Bezugsvolumen beträgt aber 700 µl. Der Fehler, der mit der Präzipitation der Proteine durch Änderung des Gesamtvolumens eintritt, ist wesentlich kleiner als der methodische und kann daher vernachlässigt werden. Der Eichfaktor beträgt 170,8 µmol/l (oder 60,6 mg/l).

Bestimmung des zufälligen Fehlers

Durch 20fach-Analysen wurde bei verschiedenen Phenolrotkonzentrationen der methodische Fehler bestimmt. Die statistische Auswertung ergab einen Variationskoeffizienten von 2,27%.

Ergebnisse

Die Aufstellung einer Eichkurve erfolgte durch 1:100 Verdünnung der Phenolrot-Standardlösung (16,93 mmol/l) mit destilliertem Wasser oder physiologischer NaCl-Lösung. Abbildung 1 zeigt, daß diese Eichkurve von Phenolrot in wäßriger Lösung innerhalb des geprüften Konzentrationsbereichs dem Lambert-Beer'schen Gesetz folgt.

Wiederfindungsversuche

Die Bestimmung der Wiederfindungsrate wurde mit verschiedenen Mischplasmen unterschiedlicher Phenolrotkonzentrationen (8,46–67,72 µmol/l) nach Fällung der Plasmaproteine in Abhängigkeit von der vorherigen Verdünnung des Plasmas geprüft. Nach Zugabe von 400 µl physiologischer NaCl-Lösung zu 100 µl Plasma waren weniger als 80% des zugeführten Farbstoffs nachweisbar (Abb. 1, Tab. 1). Bei Verdünnung mit Essigsäure der Konzentrationen 1,66 mol/l, 2,49 mol/l und 4,16 mol/l betragen die Wiederfindungsraten im Mittel 82,5%, 87,9% und 97,8%.

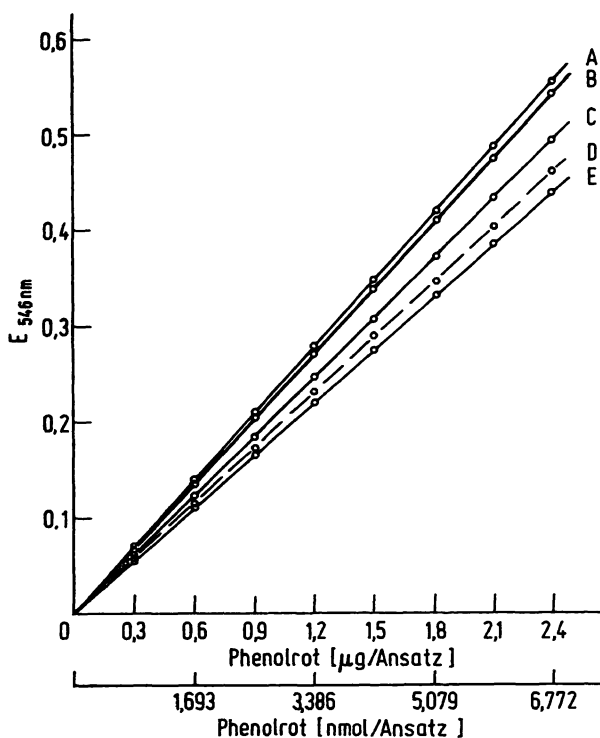


Abb. 1. Eichkurve und Wiederfindungsexperimente: Die Gerade A stellt die Eichkurve für Phenolrot in wäßriger Lösung dar; die Geraden B, C, D sind Eichkurven, die aus Mischplasmen nach Verdünnung mit Essigsäure (B = 4,16 mol/l, C = 2,49 mol/l, D = 1,66 mol/l) erhalten werden, die Gerade E nach Verdünnung mit physiologischer NaCl-Lösung.

Tab. 1. Wiederfindungsversuche:

Dargestellt sind die Mittelwerte \bar{x} und die Standardabweichungen (s) aus jeweils 10fach-Bestimmungen. In der ersten Spalte sind die vorgegebenen Phenolrotkonzentrationen in µmol/l angegeben. In den folgenden Spalten sind die Phenolrotkonzentrationen angegeben, die nach Verdünnung mit Essigsäure 4,16 mol/l (B), 2,49 mol/l (C), 1,66 mol/l (D) und physiologischer NaCl-Lösung (E) erhalten werden.

µmol/l	B		C		D		E	
	\bar{x}	± s	\bar{x}	± s	\bar{x}	± s	\bar{x}	± s
8,46	8,46	0,08	7,34	0,08	7,05	0,06	6,77	0,08
16,93	16,65	0,20	15,24	0,11	14,39	0,03	13,83	0,06
25,40	25,11	0,23	22,29	0,20	21,16	0,06	20,60	0,14
33,8t	33,58	0,31	30,19	0,51	28,78	0,20	27,37	0,17
42,33	41,76	0,48	37,25	0,23	35,84	0,23	33,86	0,20
50,79	49,95	0,45	44,87	0,42	42,33	0,37	40,07	0,17
59,26	58,69	0,79	52,49	0,51	49,95	0,23	46,56	0,34
67,72	67,16	0,71	60,10	0,68	56,72	0,51	53,61	0,45

Wurde anstatt der Essigsäure mit äquimolaren Mengen Salzsäure verdünnt, so konnten in vergleichenden Versuchsserien immer nur etwa 80% des zugeführten Farbstoffs bestimmt werden.

Abhängigkeit von der Plasmaproteinkonzentration

Der Einfluß unterschiedlicher Plasmaproteinkonzentrationen auf die Wiederfindungsrate wurde mit verschiedenen Mischplasmen der Proteinkonzentrationen 41, 62 und 83 g/l geprüft. Bei Phenolrotkonzentrationen von 8,46–67,72 µmol/l ergaben sich beim Vergleich der einzelnen Plasmen untereinander kaum meßbare Differenzen, die wesentlich kleiner als der methodische Fehler waren.

Einfluß der Hämolyse

Zum Nachweis des Einflusses der Hämolyse wurden Plasmaproben unterschiedlicher Phenolrotkonzentration mit steigenden Mengen einer standardisierten Hämoglobinlösung (1,53 mmol/l) versetzt. Tabelle 2 zeigt, daß sich bei Hämoglobinkonzentrationen von 30,7–246,1 µmol/l keine Unterschiede gegenüber den hämolysefreien Plasmaproben ergaben. Entsprechende Versuchsserien ohne Zusatz von Phenolrot führten zu keinen meßbaren Extinktionen.

Abhängigkeit von Plasmaeigenfarbe und Trübungen

Plasmaeigenfarbe wie bei Hyperbilirubinämie oder Plasmatrübungen stören die bisher bekannten Phenolrotbestimmungen im Plasma oder Serum insbesondere bei niedrigen Farbstoffkonzentrationen. Versuchsserien mit

steigenden Plasmabilirubinkonzentrationen von 17–85 µmol/l (entsprechend etwa 10–50 mg/l Plasma) zeigten keinen Einfluß auf die Farbstoffwiederfindung (Tab. 3). Plasmatrübungen wurden nach Ansäuern mit Essigsäure (4,15 mol/l) und anschließender Enteiweißung beseitigt, die Extinktionsmessung bei 546 nm wurde nicht gestört. Wird die gewonnene Blutprobe bald nach der Entnahme zentrifugiert, so kann das Plasma etwa 14 Tage lang bei 4 °C aufbewahrt werden, ohne daß ein Farbstoffverlust eintritt. Die Zentrifuga-

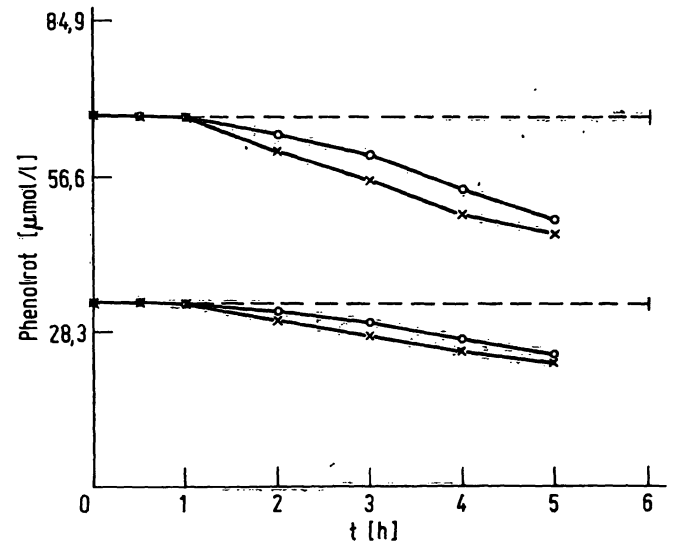


Abb. 2. Wiederfindung von Phenolrot aus Vollblut in Abhängigkeit von der Zeit der Aufbewahrung nach der Blutentnahme und der Temperatur (o—o = +4°C, x—x = +20°C). Angegeben sind die Mittelwerte aus 4fach-Bestimmungen.

Tab. 2. Abhängigkeit von der Hämolyse:

Die Mittelwerte der gemessenen Phenolrotkonzentrationen in µmol/l und die Standardabweichung (s) sind angegeben bei unterschiedlichem Hämoglobingehalt des Plasmas (10fach-Bestimmungen).

Hämoglobinkonzentration									
		30,77 µmol/l		61,54 µmol/l		123,0 µmol/l		246,1 µmol/l	
	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}
	8,46	0,06	8,75	0,08	8,18	0,06	8,46	0,03	
	16,93	0,17	16,93	0,20	16,65	0,20	16,93	0,17	
	25,40	0,11	24,83	0,14	25,11	0,20	24,83	0,23	
	33,86	0,42	33,58	0,42	34,14	0,40	33,58	0,31	
	42,33	0,34	41,76	0,42	42,05	0,45	42,33	0,40	
	50,79	0,45	50,51	0,14	50,79	0,45	51,07	0,14	
	59,26	0,34	58,41	0,31	58,69	0,42	58,98	0,48	
	67,72	0,51	68,01	0,14	67,72	0,54	68,01	0,31	

Tab. 3. Abhängigkeit von der Bilirubinkonzentration:

Die Mittelwerte in µmol/l und die Standardabweichung sind angegeben in Abhängigkeit von der Gesamtbilirubinkonzentration des Plasmas (10fach-Bestimmungen).

Bilirubinkonzentration										
		17,12 µmol/l		34,24 µmol/l		51,37 µmol/l		85,62 µmol/l		
	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	$\pm s$	\bar{x}	
	17,02	0,11	16,93	0,23	17,16	0,20	17,02	0,11	16,79	0,11

tion des Blutes sollte jedoch nicht länger als 1 Stunde nach der Entnahme erfolgen. Danach fällt die Wiederfindungsrate deutlich ab und beträgt nach 5 Stunden bei Raumtemperatur nur noch etwa 70% der ursprünglichen Menge (Abb. 2). Diese Befunde stimmen mit Untersuchungen überein, die in vivo die Penetration von Phenolrot in die Erythrocyten ausschließen, in-vitro jedoch nach längerem Stehen Schwundraten von 5%/Stunde nachweisen (15, 1).

Diskussion

Bei der bisher bekannten Methode zur Phenolrot-Bestimmung aus Plasma beschränken sich Höffler et al (12) auf eine einfache Alkalisierung von Plasma mit Natronlauge. Wesentliche Nachteile dieser Technik sind neben großen Schwankungen der Eigenextinktion des Plasmas inkonstante niedrige Wiederfindungsraten. Die Ursache dafür sind nach Fabricius & Marowski (13) pH-Verschiebungen durch den sinkenden CO₂-Gehalt des Plasmas während des Untersuchungszeitraumes. Deshalb wurde von ihnen eine Methode angegeben, in der die Differenz der Extinktionen nach Zugabe von saurem (pH 3,4) und alkalischem (pH 11,5) Phosphatpuffer gemessen wird. Die Wiederfindungsrate wird dadurch auf über 97% verbessert, vergleichbare Ergebnisse werden auch von Helger & Wendt (14) mitgeteilt. Alle diese Techniken sind jedoch nur bei klaren, nicht hämolytischen Analyseproben anwendbar.

Nach Schwartzkopff (16) und eigenen Untersuchungen (17) ist es möglich, 3–4 mg Phenolrot pro kg Körpergewicht zu injizieren, ohne daß dadurch die Selbstdepression der Clearance erreicht wird und die kinetischen Größen der Zeitclearance verfälscht werden. Die hohe Farbstoffdosierung hat den Vorteil, daß Plasmakonzentrationen erreicht werden, die Bestimmungen aus kleinen Kapillarblutmengen ermöglichen. Wesentliche Voraussetzung dafür ist jedoch, daß der Einfluß der dabei auftretenden Hämolyse eliminiert werden

kann. Versucht man, Hämoglobin mit den Plasmaproteinen zu fällen, so wird ein Teil des an Albumin gebundenen Farbstoffs mit präzipitiert, die Wiederfindungsrate ist inkonstant und liegt bei etwa 80%. Durch vorherige Verdünnung des Plasmas mit Essigsäure kann sie verbessert werden. Bei Verwendung von Essigsäure (4,15 mol/l) beträgt die Wiederfindungsrate 97,8%. Dieser Effekt ist nach Zugabe äquimolarer Mengen HCl nicht zu beobachten. Danach gelingt die Verdrängung der schwachen Säure Phenolsulfonphthalein aus ihrer Bindung an Albumin nicht durch Erhöhung der H⁺-Ionen-Konzentration. Von anderen eiweißgebundenen Farbstoffen, wie z. B. Bilirubin, ist bekannt, daß sie durch Zugabe von Anionen (Natrium-Acetat, Natrium-Benzoat, Coffein und Theophyllin) aus ihrer Proteinbindung verdrängt werden können (18). Auch Phenolrot scheint durch eine definierte Konzentration von Acetat-Ionen aus seiner Albuminbindung vollständig freigesetzt zu werden. Erst dann ist zu erwarten, daß durch Zugabe alkalischer Äquivalente im Überschuß der charakteristische Farbumschlag quantitativ erfaßt wird.

Versuche von Ochwaldt & Pitts (19), Phenolrot durch Aceton zu extrahieren, gelingen nur bei hämolysefreiem Plasma. Schon bei geringer Hämolyse gehen Farbkomplexe in Lösung, die nicht mehr mit Trichloressigsäure präzipitierbar sind und die Extinktionsmessung erheblich verfälschen. Ähnliche Beobachtungen konnten auch bei Verwendung von Methanol und Äthanol gemacht werden.

Die hier beschriebene Methode der Phenolrotbestimmung aus dem Plasma verlangt gegenüber den bisher üblichen Methoden durch die vollständige Enteiweißung einen zusätzlichen Analysenschritt. Der damit verbundene geringe Mehraufwand erscheint dadurch gerechtfertigt, daß bei nahezu vollständiger Farbstoffwiederfindung Bestimmungen im Mikrolitermaßstab auch aus stärker hämolytischem Kapillarblut möglich sind.

Literatur

1. Goldring, E., Clarke, R. W. & Smith, H. W. (1936), J. Clin. Invest. 15, 221–228.
2. Grollman, A. (1925), J. Biol. Chem. 64, 141–160.
3. Smith, W. W. & Smith, H. W. (1938), J. Biol. Chem. 124, 107–113.
4. Möller, J. & Bedö, A. (1952), Ärztl. Wochenschr. 48, 1125–1128.
5. Stave, U. (1956), Z. Kinderheilk. 77, 554–562.
6. Heidelmann, G., Koch, E. & Haake, M. (1956), Verh. Deut. Ges. Inn. Med. 62, 621–623.
7. Heintz, R. (1956), Deut. Med. Wochenschr. 82, 2044–2048.
8. Mertz, D. P. & Sarre, H. (1962), Klin. Wochenschr. 40, 692–696.
9. Hand, G. (1953), Medizinische 25, 953–955.
10. Czok, G. (1963), Klin. Wochenschr. 41, 243–244.
11. Gault, M. H. (1966), Canad. Med. Ass. 94, 61–67.
12. Höffler, D., Offermann, G. & Frenz, H. (1968), Deut. Med. Wochenschr. 93, 397–402.
13. Fabricius, W. & Marowski, B. (1970), diese Z. 8, 431–433.
14. Helger, R. & Wendt, F. (1970), Klin. Wochenschr. 48, 1006–1008.
15. Smith, H. W., Goldring, W. & Chaisis, H. (1938), J. Clin. Invest. 17, 263–278.
16. Schwartzkopff, W. (1969), Z. Gesamte Exp. Med. 150, 120–138.
17. Heimann, G. & Twarock-Bergt, B. vorgetragen: 10. Arbeitstagung für Pädiatrische Forschung Marburg 18. – 19. April 1974.
18. zitiert aus: Richterich, R. (1971), Klinische Chemie, 3. Aufl. S. Karger, Basel, S. 455.
19. Ochwaldt, B. K. & Pitts, R. F. (1956), Amer. J. Physiol. 187, 318–322.

Dr. G. Heimann
Universitätskinderklinik Köln
5 Köln 41
Josef-Stelzmann-Straße 9