

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
12. Jg. 1974, S. 103–107

Flammenphotometrische Bestimmung der freien Sulfationen im Harn

Von G. Weidmann und R. Leskovar

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

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

Es wird über eine schnelle flammenphotometrische Bestimmungsmethode im Harn berichtet, bei der die Sulfationen durch eine im Überschuß zugegebene BaCl_2 -Menge ausgefällt werden und der Überschuß an Ba-Ionen flammenphotometrisch bestimmt wird. Aus der Differenz von zugesetzter und der gemessenen Rest-Barium-Ionen-Konzentration berechnet sich der Sulfationen-Gehalt der Proben. Durch Zumischen einer Lösung mit 160 mmol/l Na und 100 mmol/l K zur Harnprobe im Verhältnis 1:1 wird die durch Alkali-Ionen verursachte Ba-Emissionsstörung eliminiert. Die optimalen Meßbedingungen wurden ermittelt und die Zuverlässigkeit der Methode überprüft. Die Durchführung der Untersuchungen kann sowohl manuell als auch halbautomatisch erfolgen.

Determination of free sulphate in urine by flame photometry

A rapid determination of urinary sulphate is reported in which sulphate ions are precipitated by the addition of excess BaCl_2 , and the excess of Ba ions is determined by flame photometry. The sulphate concentration of the sample is calculated from the difference between the added and the measured remaining barium ion concentrations. Interference with the Ba emission by alkali ions is eliminated by adding to the urine an equal volume of a solution containing 160 mmol/l Na and 100 mmol/l K. The optimal conditions for the method and its reliability are reported. The method may be manual or semiautomatic.

Beim Versuch, die einfache und schnelle flammenphotometrische Methode der Sulfatbestimmung im Serum (1) auch auf den Harn anzuwenden, sind neue Probleme aufgetreten, die Anlaß zu diesem gesonderten Bericht geben.

Auch die Sulfatbestimmung im Harn beruht zwar auf einer flammenphotometrischen Bestimmung der Rest-Barium-Konzentration nach Zugabe von BaCl_2 , doch besteht die Schwierigkeit dieser Methode darin, die durch Na- und K-Ionen verursachten Blindwert- und Untergrundstörungen auszuschalten (2). Diese Störeffekte sind einmal abhängig von der Konzentration der im Harn vorhandenen Gesamt-Alkali-Ionen und weiterhin von dem Konzentrationsverhältnis der Na-Ionen zu den Kalium-Ionen.

In Vorversuchen überprüften wir vorerst, in welchem Alkali-Konzentrationsbereich, dann aber auch bei welchen Mengenverhältnissen der Natrium- zu den Kalium-Ionen diese Störeffekte in ihrer Wirkung auf die Ba-Emission konstant sind.

Es wurden Na-Lösungen in einem Na-Konzentrationsbereich, der dem des menschlichen Harns entspricht, (3) durch K-Zugabe so lange durchmustert, bis der Störeffekt auf die Ba-Emission konstant wurde. Dasselbe wurde, ausgehend von dem im Harn vorkommenden K-Konzentrationsbereich, durch Zugabe von Natrium überprüft. Es zeigte sich, daß die Konstanz der Ba-Emission ab einer Gesamt-Alkali-Konzentration von 130 mmol/l erreicht wurde und es bei weiterer Alkali-Zugabe bis zu dem für Harnuntersuchungen

infrage kommenden Gesamt-Alkaligehalt von 310 mmol/l weiterhin blieb. Durch Zugabe von 160 mmol/l Na und 100 mmol/l K, die im Verlauf des Vorgehens 1:1 mit dem Harn verdünnt werden, ist man im Bereich der Emissionskonstanz für Barium ab 130 mmol/l Alkali-Ionen. Der Flammenuntergrund selbst ist freilich von der Alkali-Konzentration abhängig und muß als Blindwert berücksichtigt werden (Näheres siehe Barium-Emissionskurven).

Der Sulfatgehalt des Harns erreicht Werte von 15–35 mmol/l · 24 h (3). Bei Einzelproben fanden wir Werte von 2,5–45 mmol/l SO_4^{2-} . Durch Zugabe der Reaktionslösung mit 50 mmol/l Ba – 1:1 – wird die Gesamtmenge des Sulfates im Harn erfaßt. Um in den Meßbereich des Flammenphotometers zu gelangen, muß diese 1:1-Verdünnung noch weiter verdünnt werden. Bei der manuellen Arbeitsweise geschieht das im Verhältnis 1:10 (s. Probenvorbereitung), bei der automatisierten wird sie durch entsprechende Pumpenschlauch-Wahl erreicht (s. Abb.).

Methodik

Manuelle Arbeitsweise

Geräte

Flammenphotometer der Firma Eppendorf-Gerätebau mit Ba-Filter 510 nm
Einstellung des Verstärkerreglers auf V = 6
Meßbereich-Einstellung „100“

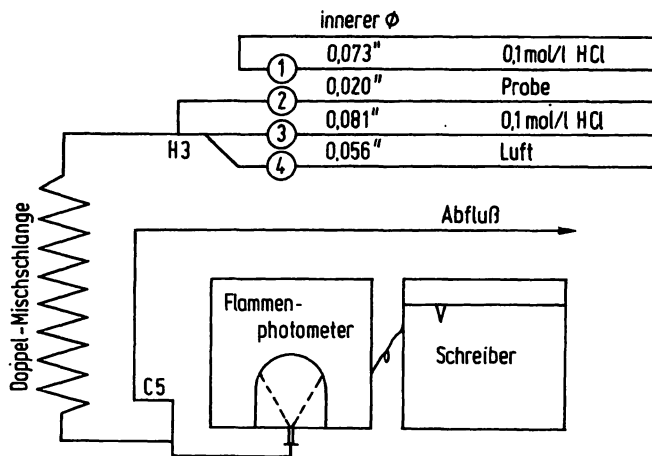


Abb. 1. Fließdiagramm Sulfat im Harn.

Brenngasgemisch: 500–520 mm Wassersäule Acetylen bei 0,5 kp/cm² Luft

Stammlösungen: 1 mol/l HCl
1 mol/l NaCl
1 mol/l KCl
0,1 mol/l BaCl₂

Reaktionslösung (zur Fällung des Sulfates im Harn):
50 mmol/l BaCl₂
160 mmol/l NaCl
100 mmol/l KCl in 0,1 mol/l HCl

Null-Lösung (zur Herstellung der Harn-Blindlösung):
160 mmol/l NaCl
100 mmol/l KCl in 0,1 mol/l HCl

Barium-Standardlösung:
2,5 mmol/l BaCl₂
16 mmol/l NaCl
10 mmol/l KCl in 0,05 mol/l HCl

Standard-Blindlösung:
16 mmol/l NaCl
10 mmol/l KCl in 0,05 mol/l HCl

Probenvorbereitung

Gleiche Teile (z. B. 6 ml) Harn werden in einem Spitzzentrifugenglas mit gleichen Teilen (z. B. 6 ml) Reaktionslösung versetzt und etwa 12 h stehen gelassen. Darauf wird das ausgefallene BaSO₄ bei 1000 g abzentrifugiert.

Der Überstand wird bei der automatisierten Methode unverändert weiter verwendet (s. dort). Bei der manuellen Arbeitsweise werden 10 ml, ohne den BaSO₄-Niederschlag aufzuwischen, in einen 100 ml Meßkolben abpipettiert und mit 0,05 mol/l HCl bis zur Marke aufgefüllt; damit ist die Probe fertig zum photometrieren. Zur Herstellung der Harn-Blindlösung werden 5 ml Harn mit 5 ml Null-Lösung in einem 100 ml Kolben ebenfalls mit 0,05 mol/l HCl aufgefüllt.

Messung am Flammenphotometer

Der manuellen Ausführung der Analysen liegt die im Eppendorf-Handbuch (4) beschriebene Arbeitsweise zugrunde. Mit der Standard-Blindlösung wird der Nullpunkt elektrisch und mechanisch eingestellt. Mit der Ba-Standardlösung wird sodann unter Benutzung des Feinreglers „Meßbereich“ die Lichtmarke auf der in mval graduierten Kalium-Skala auf den Wert 5 mval eingestellt.

Nach dem Einbringen der Harn-Blindlösung wird erneut der elektrische 0-Punkt eingestellt und gleich darauf die Ba-haltige Harnprobe eingegeben. Der Rest-Ba-Gehalt kann direkt an der Skala abgelesen werden. Aus der Differenz von zugesetzter und abgelesener Rest-Ba-Menge ergibt sich der Sulfatgehalt in der verdünnten Harnprobe. Dieser Wert $\times 20$ ergibt die Menge Sulfat in mval/l. Es ist zweckmäßig, den Meßvorgang zu wiederholen.

Für den 24-Stunden-Harn errechnet sich der Sulfatgehalt in g/l = mmol/l $\cdot 0,96 \cdot 24^{\text{h}}$ -Harnmenge in l.

Automatische Ausführung der Analysen

Chemikalien

wie oben

Reaktionslösung: wie oben

Null-Lösung für Harn-Blindlösung: wie oben

Ba-Standard-Lösung:

25 mmol/l BaCl₂
160 mmol/l NaCl
100 mmol/l KCl in 0,1 mol/l HCl

Standard-Blindlösung:

160 mmol/l NaCl
100 mmol/l KCl in 0,1 mol/l HCl

Geräte

Flammenphotometer (wie oben)

Probenehmer der Fa. Technicon (AutoAnalyser)

Nockenscheibe: 60 Proben/h 1:1

Als Proportionier-Schlauchpumpe benutzen wir ein Gerät der Firma Desaga, bei dem allerdings die Kanäle für die Pumpenschläuche (Fa. Technicon) auf der ganzen Länge erst freige-macht werden müssen.

Pumpen-Geschwindigkeit „60“.

Als Debubbler wurde der Glas-Fitting C 5 der Fa. Technicon knapp vor dem Einlauf des Leitsystems in die Zerstäuberglocke zwischengeschaltet. Schreiber „Servogor“.

Fließdiagramm s. Abbildung 1. Durch diese Pumpenschlauchwahl wird die Probe mit 0,1 mol/l HCl 1:15 bis 1:20 verdünnt.

Probenvorbereitung

Wie bei manueller Arbeitsweise (s. dort).

Der unverdünnte Überstand wird aus den Zentrifugenröhrchen in die größeren, 4 ml fassenden Plastikbecher der Fa. Technicon vorsichtig umgegossen.

Von den Schreiber-Ausschlagsweiten (peaks) der Proben bzw. des Ba-Standards müssen die dazugehörigen Ausschläge der Harn-Blindlösung abgezogen werden. Die so gewonnenen reduzierten Ausschlagsweiten (I) werden nach dem Quotientenverfahren rechnerisch ausgewertet.

Wie sich leicht ableiten läßt, ergibt sich die Berechnung des Sulfat-Gehaltes G (= mmol/l SO₄²⁻):

$$G = a - (100 \cdot F)$$

a = Zusatz an Ba zur Probe (= 50 mmol Ba/l)

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

Prüfung der Methode

Die Zuverlässigkeit der manuellen wie auch der automatisierten Arbeitsweise ergibt sich einerseits aus der auf flammenphotometrischem Weg überhaupt erreichbaren Genauigkeit – die Nachweisgrenze für den angewandten Apparat wird von der Herstellerfirma mit 2 mg/l Ba (4), also 0,0145 mmol/l angegeben –, andererseits aus der Reproduzierbarkeit der Werte.

Ba-Emissionskurven

Zunächst wird untersucht, wie sich die Emissionskurven

a) von reinen Ba-Lösungen in den anzuwendenden Konzentrationen verhalten,

b) inwieweit die Ba-Emission von den im Harn vorhandenen Ionen und

c) inwieweit sie von anderen, im Harn vorkommenden Stoffen beeinflusst wird.

zu a) Die Messung reiner Ba-Lösungen in 0,1 mol/l HCl ergab mit steigendem Ba-Gehalt eine geradlinig verlaufende Kurve, die durch den 0-Punkt des Koordinatensystems geht (Kurve I in Abb. 2).

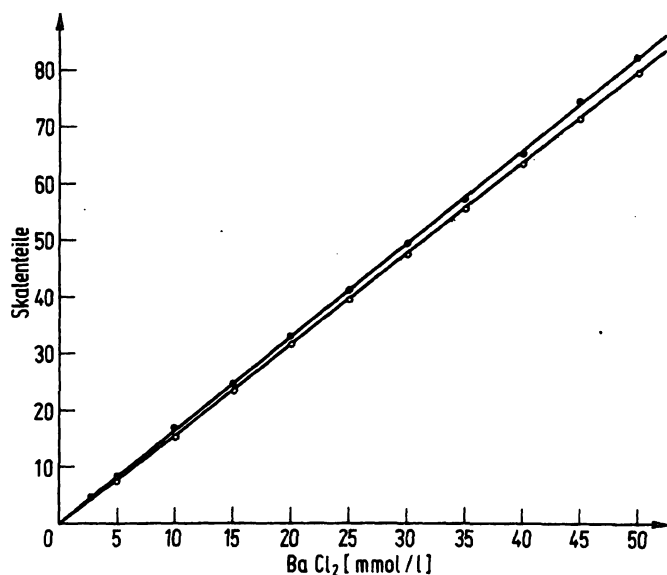


Abb. 2. Barium-Eichkurven.

- = reine BaCl₂-Lösungen.
●—● = auf ein Ionengemisch von 160 mmol/l Na und 100 mmol/l K aufgestockte BaCl₂-Lösungen (Näheres vgl. Text).

zu b) Werden diese Ba-Lösungen auf verschieden konzentrierte Na/K-Ionengemische aufgestockt, so hebt sich der Flammenuntergrund. Außerdem wurde eine Blindwert-Störung festgestellt, d. h. nach Abzug der durch den Flammenuntergrund verursachten Ausschlagsweite wurde eine Zunahme der Ausschlagsweiten gegenüber denen reiner Ba-Lösungen festgestellt, so daß diese Kurve steiler verläuft als die einer reinen Ba-Lösung. In einem Konzentrationsbereich dieser Fremdionen, der zwischen

- a) 80 mmol/l Na bei gleichzeitiger Anwesenheit von 50 mmol/l K und 320 mmol/l Na bei 100 mmol/l K
b) 80 mmol/l K bei 50 mmol/l Na und 150 mmol/l K bei 100 mmol/l Na

liegt, verursachen die Blindwert-Störungen eine gleiche Zunahme der Ba-Ausschläge. Unter Berücksichtigung des harneigenen Salzgehaltes und der mit der Reaktionslösung bzw. Null-Lösung (für die Harn-Blindlösung) zugegebenen Na/K-Konzentrationen wurde für die Standard-Lösungen ein mittlerer Konzentrationsbereich von 160 mmol/l Na und 100 mmol/l K gewählt. Bei Aufstellung der Ba-Kurve (s. Kurve II der Abb. 2) enthielten die Lösungen diese Na- bzw. K-Gehalte.

Nach Abzug des Flammenuntergrundes wurden die Meßpunkte der Kurve erhalten, indem die Ausschlagweiten der einzelnen Ba-Konzentrationen auf die entsprechenden Ausschlagweiten einer reinen Ba-Lösung mit 50 mmol/l bezogen wurden. Die Kurve verläuft etwas steiler als Kurve I, aber ebenfalls geradlinig durch den 0-Punkt.

zu c) Für die Untersuchungen über die Beeinflussung der Ba-Emission durch den Harn wurden aliquote Vo-

lumina eines Sammelharns, dessen Sulfatgehalt sehr niedrig war und sich aufgrund einer gravimetrischen Bestimmung zu 2,3 mmol/l ergab, mit abgestuften BaCl₂-Mengen versetzt. Der auf gravimetrischem Weg ermittelte Sulfatgehalt des Harns wurde durch Zusatz von 2,30 mmol/l Ba kompensiert. Die BaCl₂-Lösungen enthielten außerdem 160 mmol/l Na und 100 mmol/l K. Der Flammenuntergrund wurde mit Hilfe einer Harn-Blindlösung ermittelt und von Ba-haltigen Harnproben abgezogen.

Aus dem Vergleich der Ausschlagsweiten der dem Harn zugesetzten Ba-Konzentrationen mit den Ausschlagsweiten, die der reinen Ba-Standardlösung (50 mmol/l Ba) entsprechen — reduziert um den Flammenuntergrund mit Hilfe einer Standard-Blindlösung —, ergeben sich die wiedergefundenen Ba-Konzentrationen im Harn. Eine so konstruierte Ba-Harnkurve verläuft geradlinig durch den 0-Punkt und entspricht in ihrer Steilheit der Kurve II (Abb. 2).

Reproduzierbarkeit der Methode

Entsprechend unseren Messungen über die Beeinflussung der Ba-Emissionskurven bezieht sich die Reproduzierbarkeit der Methode auf

- a) reine Ba-Lösungen (Tab. 1)
b) Ba-Lösungen bei gleichzeitiger Anwesenheit von 160 mmol/l Na und 100 mmol/l K (Tab. 2) und
c) dem Harn zugegebene Ba-Mengen bei gleichzeitigem Vorhandensein von 160 mmol/l Na und 100 mmol/l K im Harn (Tab. 3).

Sämtliche Meßwerte der drei Tabellen wurden in Tag zu Tag-Untersuchungen mit Hilfe der automatischen Arbeitsweise erhalten. Die Standard-Abweichungen, die für reine Ba-Lösungen, für Ba-Lösungen mit einem Zusatz an Na- und Kalium-Ionen und für gleichkonzentrierte Ba-haltige Harn-Lösungen erhalten wurden, weisen keine wesentlichen Unterschiede voneinander auf.

Tab. 1. Meßwerte für reine Ba-Lösungen von verschiedener Konzentration. Die Standard-Abweichung *s* gibt die Streuung der Meßwerte von Tag zu Tag wieder. VK = Variations-Koeffizient.

Ba-Zugabe [mmol/l]	n	Ba [mmol/l]		VK [%]	Differenz Meßwert- Sollwert in %
		\bar{x}	$\pm s$		
2,5	9	2,57	0,122	4,75	+ 3,1
5,0	9	4,71	1,107	2,30	- 5,9
10	9	9,72	0,079	0,82	- 2,8
15	9	14,76	0,078	0,53	- 1,6
20	9	19,77	0,123	0,62	- 1,1
25	9	24,78	0,185	0,75	- 0,88
30	9	29,82	0,127	0,43	- 0,60
35	9	34,81	0,192	0,55	- 0,54
40	9	39,93	0,164	0,42	- 0,18
45	9	44,93	0,118	0,25	- 0,15
50	9	49,94	0,126	0,25	- 0,12

Tab. 2. Meßwerte für Ba-Lösungen verschiedener Konzentration bei gleichzeitiger Anwesenheit von 160 mmol/l Na und 100 mmol/l K. Die Standard-Abweichung gibt die Streuung von Tag zu Tag wieder.

Ba-Zugabe [mmol/l]	n	Ba [mmol/l]		VK [%]	Differenz Meßwert- Sollwert in %
		\bar{x}	$\pm s$		
2,5	11	2,56	0,106	4,15	+ 2,4
5	10	5,10	0,081	1,58	+ 2,0
10	11	10,02	0,105	1,05	+ 0,25
15	11	14,97	0,126	0,85	- 0,17
20	11	20,10	0,099	0,50	+ 0,50
25	10	25,01	0,078	0,31	+ 0,60
30	11	30,05	0,115	0,38	+ 0,17
35	11	34,99	0,093	0,27	+ 0,03
40	11	39,95	0,112	0,28	+ 0,12
45	10	45,10	0,117	0,26	+ 0,22
50	11	50,01	0,097	0,20	+ 0,02

Tab. 3. Zugabe abgestufter Ba-Mengen mit 160 mmol/l Na und 100 mmol/l K zu ein- und demselben Harn. Zur Kompensation des Harn-Sulfates von 2,30 mmol/l wurden dem Harn zusätzlich 2,30 mmol/l Ba zugesetzt. Die Standard-Abweichung gibt die Streuung von Tag zu Tag wieder.

Ba-Zugabe [mmol/l]	n	Ba [mmol/l]		VK [%]	Differenz Meßwert- Sollwert in %
		\bar{x}	$\pm s$		
2,5	14	2,37	0,102	4,35	- 5,40
5	14	4,93	0,110	2,24	- 1,70
10	14	9,85	0,146	1,47	- 1,45
15	14	15,02	0,143	0,95	+ 0,16
20	13	19,96	0,171	0,82	- 0,20
25	14	25,05	0,128	0,51	+ 0,20
30	14	30,04	0,142	0,47	+ 0,15
35	14	34,93	0,155	0,44	- 0,19
40	13	39,95	0,152	0,38	- 0,12
45	14	45,07	0,127	0,28	+ 0,17
50	14	50,02	0,116	0,23	+ 0,04
50*	14	47,77 = 2,23 SO ₄	0,096	4,32	- 3,39

* Der SO₄-Gehalt dieser Probe wurde erhalten durch Vergleich mit einer Ba-Standard-Lösung. Der Zusatz von 2,3 mmol/l Ba unterblieb.

Im weiteren wird die Streuung der Meßwerte in der Serie untersucht. Dazu wurde wieder der gleiche Harn mit einem Sulfatgehalt von 2,30 mmol/l verwendet, dem zur Kompensation dieses Sulfatgehaltes 2,30 mmol/l Ba zugesetzt wurden. In den untersten beiden Reihen der Tabelle 4 erfolgt außerdem eine Gegenüberstellung der Standard-Abweichung der im Harn nach der automatischen und der manuellen Arbeitsweise gewonnenen Sulfatgehalte.

Tab. 4. Zugabe abgestufter Ba-Mengen zu ein und demselben Harn. Die Standard-Abweichung gibt hier die Streuung der Meßwerte in der Serie wieder.

Ba-Zugabe [mmol/l]	n	Ba [mmol/l]		VK [%]	Differenz Meßwert- Sollwert in %
		\bar{x}	$\pm s$		
10	18	9,84	0,707	7,16	- 1,58
20	14	19,87	0,144	0,705	- 0,63
30	14	30,00	0,103	0,350	0
40	14	40,18	0,125	0,31	+ 0,46
50	14	50,05	0	0	+ 0,10
automat.	14	2,25 SO ₄ "	0,078	3,46	- 2,2
manuell	14	2,20 SO ₄ "	0,197	8,90	- 4,5

Ein Vergleich der Streuwerte von Serien- und von Tag zu Tag-Untersuchungen ergibt kaum Unterschiede. Wie zu erwarten, ist die automatische Arbeitsweise der manuellen an Genauigkeit überlegen.

Wiederfindungsversuche

Der gleiche Harn, dessen Sulfatgehalt gravimetrisch zu 2,3 mmol/l ermittelt wurde, ist mit abgestuften Mengen an Sulfat versetzt worden. Unter Berücksichtigung des ursprünglich vorhandenen Sulfatgehaltes wurden die zugesetzten Sulfatmengen bestimmt. Die Durchführung erfolgte in Tag zu Tag-Untersuchungen automatisch wie auch manuell. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tab. 5. Zugabe abgestufter Sulfatmengen zu demselben Harn mit 2,3 mmol/l Eigensulfat.

SO ₄ -Zugabe [mmol/l]	n	SO ₄ ²⁻ [mmol/l]			VK [%]	Differenz Meßwert- Sollwert in %
		gefunden		$\pm s$		
		\bar{x}	ohne Eigensulfat \bar{x}			
5	34	7,61	5,31	0,353	6,65	+ 6,2
10	20	12,68	10,38	0,516	5,00	+ 3,8
15	29	17,66	15,36	0,353	2,20	+ 2,4
20	21	22,34	20,04	0,507	2,6	+ 0,2
20*	20	22,37	20,06	0,133	0,66	+ 0,33
25	34	27,28	24,98	0,403	1,60	- 0,08
30	27	32,30	30,00	0,497	1,60	0
35	19	37,37	35,07	0,619	1,70	+ 0,2
40*	19	42,52	40,22	0,363	0,90	+ 0,55
45	16	47,07	44,77	0,191	0,43	- 0,53

* Arbeitsweise automatisch, bei den Zugaben von 20 und 40 mmol/l SO₄²⁻ gleichzeitig auch manuelle Bestimmungen.

Wie aus der Tabelle hervorgeht, entsprechen die wiedergefundenen Sulfatmengen den zugesetzten Mengen.

Weitere Beobachtungen

Es wurde noch untersucht, ob andere harngängige Stoffe die Barium-Messung beeinflussen.

Die im Harn vorliegenden Ca- und Mg-Konzentrationen sind zu gering, um sich störend bemerkbar zu machen.

Ebenso üben bei der relativ großen Verdünnung der Harnproben auch organische Verbindungen wie Glucose und native Netzmittel keinen Störeffekt aus. Außer einer Erhöhung des Flammenuntergrundes machte sich auch das Phosphat auf die Ba-Emission nicht störend bemerkbar.

Abschließend kann gesagt werden, daß eine zuverlässige Sulfat-Bestimmung im Harn nur dann möglich ist, wenn der Flammenuntergrund der Fremdionen und die Blind-

wert-Störungen ausgeschaltet werden. Hält man jedoch die Alkali-Konzentration durch Zusatz entsprechender Mengen an NaCl und KCl zum Harn in den ermittelten Konzentrationsgebieten, so schaltet man bei Verwendung des entsprechenden Standard die Blindwert-Störung aus.

Wie zu erwarten, ist bei der Harn-Sulfat-Bestimmung die automatische Arbeitsweise der manuellen etwas überlegen.

Literatur

1. Leskovar, R. & Weidmann, G., diese Z. vorstehend.
2. Herrmann, R. & Alkemade, Th. J., Flammenphotometrie (1960), Springer Verlag, Berlin.
3. Geigy, J. R. (1968), Documenta Geigy. Wissenschaftliche Tabellen.
4. Eppendorf-Gerätebau, Netheler und Hinz GmbH (1965), Handbuch Flammenphotometer-Eppendorf.

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