

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 20, 1982, pp. 557-565

Die Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure mit Fluram® im Urin nach Durchführung des Pankreasfunktionstests mit Bentiromid

Von H. G. Eisenwiener, F. Morger, W. Lergier und D. Gillessen

Aus den Forschungs- und Entwicklungs-Laboratorien der Sparte Diagnostica, Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel

(Eingegangen am 11. Dezember 1981/20. April 1982)

Zusammenfassung: Es wird ein Verfahren vorgestellt, das bei der Durchführung des Pankreas-Funktions-Tests die Ausscheidung von *p*-Aminobenzoesäure in Urin nach Verabreichung von Bentiromid (N-Benzoyl-*L*-tyrosyl-*p*-aminobenzoesäure) mit (Fluram) (Fluorescamin) bestimmt. Das Verfahren liefert zuverlässige Werte und erlaubt eine einfache faktorielle Berechnung der ausgeschiedenen Menge an *p*-Aminobenzoesäure.

The Use of Fluram® for the determination of p-aminobenzoic acid in test for pancreatic function with bentiromide

Summary: A procedure is presented for the use of (Fluram) (Fluorescamine) in the detection of *p*-aminobenzoic acid in urine after administration of bentiromide (N-benzoyl-*L*-tyrosyl-*p*-aminobenzoic acid) as a pancreas function test. This procedure gives accurate values and allows a simple factorial calculation of the amount of *p*-aminobenzoic acid excreted.

Einführung

Für die Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure im Urin wurde bislang die Methode von Bratton-Marshall (1) beziehungsweise Modifikationen davon eingesetzt. Alle auf dieser Methode basierenden Verfahren bestimmen *p*-Aminobenzoesäure oder andere diazotierbare primäre Arylamine über die Bildung eines stabilen Azofarbstoffes. In unseren Forschungslaboratorien wurde die Möglichkeit des Einsatzes von Fluorescamin (Fluram) zur photometrischen Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure und ihrer Metaboliten im Urin erarbeitet.

Reagenzien, Vorbereitungen und Vorgehen

Chemikalien

(Fluram) Roche (3) (Fluorescamin) = [4-phenylspiro furan-2(3H),1'-phthalan]-3,3'-dion, 4-Aminobenzoesäure puriss. 99% (Fluka), Ethanol 95% (Merck), Kaliumchlorid z. A. (Merck), Natriumacetat krist. z. A. (Merck), Essigsäure z. A. (Merck), Natriumnitrit z. A. (Merck), Ammoniumamidosulfonat z. A. (Merck), N-(1-Naphthyl)-ethylendiammoniumdichlorid z. A. (Merck), Salzsäure rauchend 37% (Merck), Salzsäure 32% z. A. (Merck).

Reaktionslösungen für die (Fluram)-Methode

1. Pufferlösungen: *KCl/HCl-Puffer*, pH 2,4: 950 ml Kaliumchlorid 0,1 mol/l (7,456 g/l) und 50 ml Salzsäure 0,1 mol/l werden gemischt.

Natriumacetatpuffer, pH 3,0: 6,80 g Natriumacetat in ca. 500 ml dest. Wasser lösen, 105 g Essigsäure zusetzen und mit dest. Wasser auf 1000 ml auffüllen.

2. Fluramlösung: 1 g/l in Ethanol, 950 ml/l.
3. Standardlösung: 18,2 mg 4-Aminobenzoesäure werden in einem 100 ml-Meßkolben mit 10 ml Ethanol 950 ml/l gelöst und mit KCl/HCl- oder Acetatpuffer auf 100 ml aufgefüllt.
4. Chromogen-Gebrauchslösung: Diese wird stets frisch durch Mischen von 100 ml Pufferlösung und 30 ml Fluramlösung hergestellt.

Reaktionslösungen für die modifizierte Bratton-Marshall-Methode

1. Natriumnitrit-Lösung: 14,49 mmol/l: 1 g/l bidest. Wasser.
2. Ammoniumamidosulfonat-Lösung: 43,81 mmol/l: 5 g/l bidest. Wasser.
3. Naphthyl-ethylendiamin-Lösung: 3,86 mmol/l: 1 g/l bidest. Wasser (in brauner Flasche aufbewahren).

Vorbereitungen

Die Urine werden je nach dem Ausscheidungsvolumen folgendermaßen verdünnt:

bei Ausscheidung von < 120 ml: 1 Teil Urin + 9 Teile Wasser
bei Ausscheidung von 120–500 ml: 1 Teil Urin + 4 Teile Wasser
bei Ausscheidung von > 500 ml: unverdünnt

Die Urine wurden sowohl 1 h bei etwa 96 ± 2 °C als auch 16 h bei 37 °C mit Salzsäure (30% ~ 10 mol/l) inkubiert, wofür 1 ml

Urin und 0,1 ml Salzsäure 10 mol/l angesetzt wurden. Der Einfluß der Inkubationszeiten auf das Ausmaß der Hydrolyse wurde näher untersucht. Die späteren Befunde zeigten, daß auch mit Salzsäure 25% (~ 7,5 mol/l) gearbeitet werden kann.

Durchführung des Pankreas-Funktions-Tests

Der Pankreas-Funktions-Test wurde folgendermaßen durchgeführt: Nach der Entleerung der Blase wurden 200 ml Flüssigkeit zum Trinken gegeben und die nach 1 h ausgeschiedene Menge Urin gemessen (= V_B). Anschließend wurde nach Verabreichung von Bentromid und Trinken von etwa 400 ml Flüssigkeit innerhalb der nächsten Stunden, die während 6 h ausgeschiedene Menge an Urin (= V_A) gemessen. In beiden Urinmengen V_A und V_B wurden die *p*-Aminobenzoesäure-Konzentrationen bestimmt. Bei der (Fluram)-Methode wurden bei 30 Proben sowohl bei der Ermittlung des Ausscheidungswertes als auch des Basiswertes stets Proben-Leerwerte mitgeführt. Die Hydrolyse wurde bei 96 °C teilweise während 60 min, teilweise während 30 min Inkubation und mit 300 g/kg beziehungsweise 250 g/kg HCl durchgeführt.

Vorgehen mit der (Fluram)-Methode

Weder die auf *Bratton & Marshall* zurückgehenden Methoden noch diese neue Methode mit (Fluram) sind auf *p*-Aminobenzoesäure absolut spezifisch; (Fluram) erfaßt unter den hier gewählten Bedingungen generell primäre Arylamine. Aus diesem Grunde wurde prinzipiell je eine Urinprobe vor (für den Basiswert) und nach der Belastung (für den Ausscheidungswert) eingesetzt.

Da während der Hydrolyse des Urins eine Braunfärbung – deren Intensität bei den verschiedenen Proben unterschiedlich ist – auftritt, wurden prinzipiell Proben-Leerwerte mitgeführt, um deren Einfluß auf die Bestimmung zu ermitteln. Dazu wurden alle Absorptionen ausschließlich gegen eine mit Wasser gefüllte Küvette gemessen. Die Berechnung erfolgte über einen mitgeführten Standard von 182 mg/l *p*-Aminobenzoesäure. In die Berechnung geht dann infolge der Verdünnung des Urins für den Inkubationsschritt (1 ml Urin + 0,1 ml Salzsäure) der Faktor $182 \times 1,1 = 200$ mg/l ein:

$$p\text{-Aminobenzoesäure: } c \text{ [mg/l]} = \frac{A(P)}{A(S)} \times 200$$

wobei

$A(P)$ = gemessene Absorptionsdifferenz zwischen Probe und Proben-Leerwert

$A(S)$ = gemessene Absorptionsdifferenz zwischen Standard und Reagenzien-Leerwert

Pipettierschema

P = Probe, PL = Proben-Leerwert, S = Standard, RL = Reagenzien-Leerwert, A = Absorption.

Ansätze (in µl)	Basiswert		Ausscheidungswert		S	RL
	P ₁	PL ₁	P ₂	PL ₂		
Hydrolysiertes Urin (von vor der Einnahme)	50	50				
Hydrolysiertes Urin (von nach der Einnahme)	-	-	50	50	-	-
Standard (182 mg/l)	-	-	-	-	50	-
Dest. Wasser	-	-	-	-	-	50
Pufferlösung	-	2500	-	2500	-	-
Chromogen-Gebrauchslösung	2500	-	2500	-	2500	2500

Gut mischen und etwa 10 min reagieren lassen.

Da der jeweilige Einfluß der einzelnen Komponenten zu ermitteln war, wurden alle Absorptionen gegen Wasser gemessen und für die Berechnung folgende Differenzen gebildet:

$$\begin{aligned} &A(P_1) - A(PL_1) - A(RL) \\ &A(P_2) - A(PL_2) - A(RL) \\ &A(S) - A(RL) \end{aligned}$$

Um den Einfluß der einzelnen Einflußgrößen auf die Ausscheidungsmenge zu eruieren, wurden folgende Berechnungen durchgeführt:

a) Berücksichtigung der Proben-Leerwerte sowohl beim Ausscheidungs- als auch beim Basiswert.

Verfahren I:

$$\begin{aligned} m \text{ [mg]} = & \left[\frac{A(P_2) - A(PL_2) - A(RL)}{A(S) - A(RL)} \right. \\ & \left. \times 200 \times V \times \frac{V_A}{1000} \right] \text{Ausscheidungswert} \quad \text{--- (Gl. 1)} \\ & 6 \times \left[\frac{A(P_1) - A(PL_1) - A(RL)}{A(S) - A(RL)} \right. \\ & \left. \times 200 \times \frac{V_B}{1000} \right] \text{Basiswert} \end{aligned}$$

b) Berücksichtigung des Proben-Leerwertes nur bei dem Ausscheidungswert (Verfärbung durch Hydrolyse).

Verfahren II:

$$\begin{aligned} m \text{ [mg]} = & \left[\frac{A(P_2) - A(PL_2) - A(RL)}{A(S) - A(RL)} \right. \\ & \left. \times 200 \times V \times \frac{V_A}{1000} \right] \text{Ausscheidungswert} \quad \text{--- (Gl. 2)} \\ & 6 \times \left[\frac{A(P_1) - A(RL)}{A(S) - A(RL)} \right. \\ & \left. \times 200 \times \frac{V_B}{1000} \right] \text{Basiswert} \end{aligned}$$

c) keine Berücksichtigung der Proben-Leerwerte.

Verfahren III:

$$\begin{aligned} m \text{ [mg]} = & \left[\frac{A(P_2) - A(RL)}{A(S) - A(RL)} \right. \\ & \left. \times 200 \times V \times \frac{V_A}{1000} \right] \text{Ausscheidungswert} \quad \text{--- (Gl. 3)} \\ & 6 \times \left[\frac{A(P_1) - A(RL)}{A(S) - A(RL)} \right. \\ & \left. \times 200 \times \frac{V_B}{1000} \right] \text{Basiswert} \end{aligned}$$

d) Weder Berücksichtigung von Proben-Leerwerten noch von Basiswerten.

Verfahren IV:

$$\begin{aligned} m \text{ [mg]} = & \left[\frac{A(P_2) - A(RL)}{A(S) - A(RL)} \right. \\ & \left. \times 200 \times V \times \frac{V_A}{1000} \right] \text{Ausscheidungswert} \quad \text{--- (Gl. 4)} \end{aligned}$$

m = *p*-Aminobenzoesäure [mg]
 V = Verdünnung des Urins
 V_A = Gesamtmenge der Urinausscheidung in ml
 V_B = Urinmenge pro Stunde vor der Einnahme; der Faktor 6 ergibt sich unter der Annahme, daß die vom Test unabhängige stündliche Basisausscheidung während der sechs-stündigen Testzeit die gleiche ist, wie in der Kontrollperiode.

Die relative Ausscheidung von *p*-Aminobenzoesäure ergibt sich unter Zugrundelegung der theoretisch möglichen Menge von 339 mg bei Verabreichung von 1 g Bentiromid (= *N*-Benzoyl-*L*-tyrosyl-*p*-aminobenzoesäure) als

$$\text{Anteil ausgeschieden} = 0,295 \times m,$$

bzw. von 322 mg bei Verabreichung von 1 g des entsprechenden Natriumsalzes als

$$\text{Anteil ausgeschieden} = 0,311 \times m.$$

Vorgehen bei der modifizierten Bratton-Marshall-Methode

Die modifizierte Bratton-Marshall-Methode wurde wie folgt durchgeführt: Die Urinhydrolysate wurden so weit verdünnt, daß ihr Gehalt zwischen 0,5 und 2,5 mg/l an *p*-Aminobenzoesäure betrug. Zu 1 ml verdünntem Urin wurden 0,2 ml HCl 1,2 mmol/l und 0,1 ml Natriumnitrit-Lösung gegeben und nach 4 min 0,1 ml Ammoniumamidosulfonat-Lösung zugesetzt und wiederum 4 min gewartet. Dann wurden 0,1 ml Naphthylethylendiamin-Lösung dem Ansatz zugefügt und nach 10 min die Absorption bei 546 nm gegen den Reagenzien-Leerwert gemessen. Die Berechnung erfolgte über eine Standardkurve.

Ergebnisse

Optimierung der Inkubationsbedingungen bezüglich Hydrolyse

Das Arbeiten mit 300 g/kg HCl (~ 10 mmol/l) ist geruchsbelästigend und die Pipettierung nicht problemlos.

Der zeitaufwendigste Schritt der *p*-Aminobenzoesäure-Bestimmung ist der Hydrolyseschritt. Dieser sollte effektiv und möglichst bei Raumtemperatur beziehungsweise bei 37 °C ausführbar sein sowie keine langen Inkubationszeiten erfordern.

Um den Einfluß der Hydrolysezeit zu eruieren, wurden Urine verschieden lange inkubiert und die *p*-Aminobenzoesäure-Konzentration nach der Hydrolyse bestimmt.

Aus den Abbildungen 1 und 2 gehen die Abhängigkeit der Inkubation bei 37 °C und 96 °C mit 300 g/kg HCl

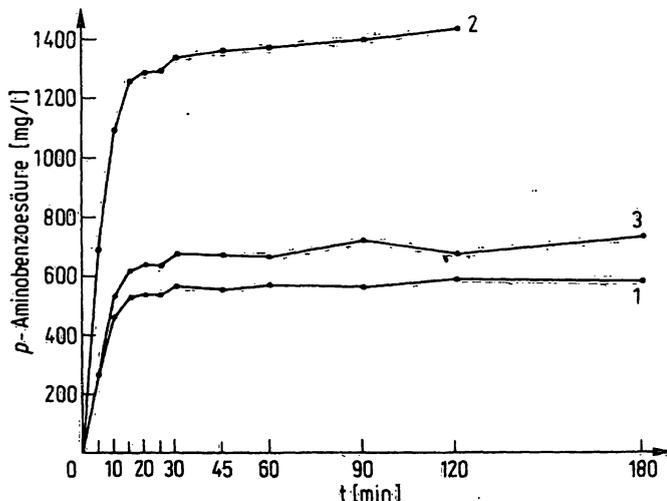


Abb. 1a. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Abklärung der erforderlichen Inkubationszeiten bei 96 °C mit HCl 300 g/kg. Kurve 1, 2, 3: Einsatz von 3 verschiedenen Urinen.

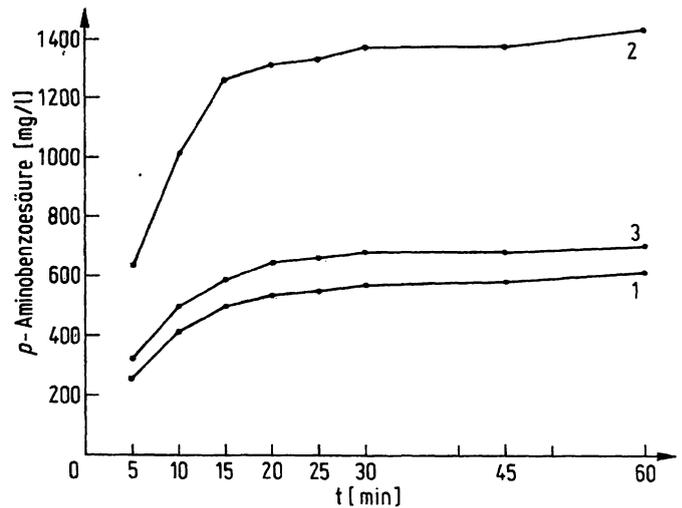


Abb. 1b. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Abklärung der erforderlichen Inkubationszeiten bei 96 °C mit HCl 250 g/kg. Kurve 1, 2, 3: Einsatz von 3 verschiedenen Urinen.

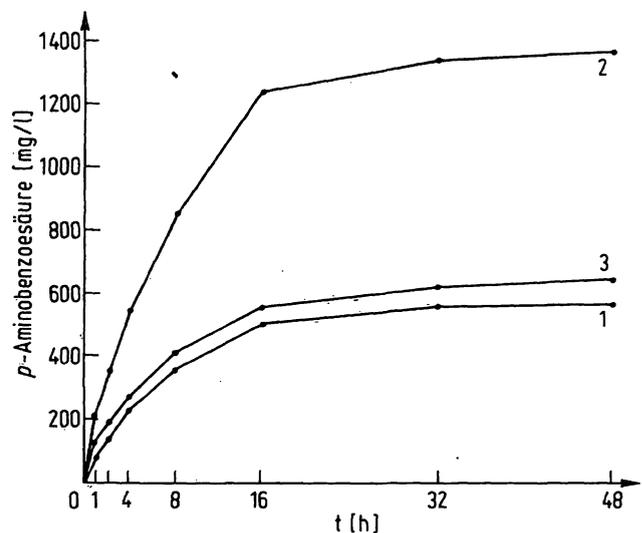


Abb. 2. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Abklärung der erforderlichen Inkubationszeiten bei 37 °C mit HCl 300 g/kg. Kurve 1, 2, 3: Einsatz von 3 verschiedenen Urinen.

(~ 10 mmol/l) hervor. Die Ergebnisse zeigen, daß mindestens 32 h bei 37 °C inkubiert werden muß, um die gleichen Ergebnisse zu erhalten wie nach etwa 30 min bei 96 °C.

30 min Inkubationszeit bei etwa 96 °C erwiesen sich als ausreichend. Die dunklere Farbe der Hydrolysate bei Inkubation von 96 °C spielt eine untergeordnete Rolle, da das Proben- zu Reagenzverhältnis bei der anschließenden photometrischen Bestimmung 1:50 beträgt. Auch kann durch Mitführen eines Proben-Leerwertes die Eigenfarbe des hydrolysierten Probenmaterials berücksichtigt werden. Ein größeres Problem stellen die manchmal auftretenden Niederschläge während der Hydrolyse dar. Um anschließend reproduzierbare, photometrische Bestimmungen ausführen zu können, wird eine Zentrifugation empfohlen.

Aus den Abbildungen 1a, 1b und 2 folgt, daß aus zeitlichen Gründen die Inkubationstemperatur von etwa 96 °C beibehalten werden sollte. Aus Abbildung 3 ist ersichtlich, daß eine 250 g/kg Salzsäure zur Hydrolyse ausreichend ist. Versuche, das Verhältnis Urinvolumen zu Salzsäure-Volumen zu verändern, zeigten, daß das Verhältnis 10 Teile Urin zu 1 Teil Salzsäure am besten geeignet ist. Es traten weniger Trübungen beziehungsweise Ausfällungen auf.

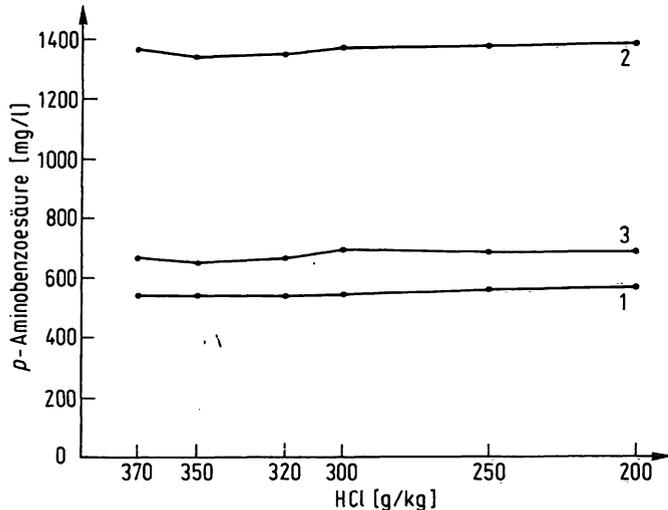


Abb. 3. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Abklärung der erforderlichen Salzsäure-Konzentration. Inkubationszeit 30 min, Inkubationstemperatur 96 °C. Kurve 1, 2, 3: Einsatz von 3 verschiedenen Urinen.

Aus den Versuchen ist zu schließen, daß eine Hydrolyse mit 250 g/kg Salzsäure während 30 min bei etwa 96 °C bei einem Volumenverhältnis Urin zu Salzsäure von 10:1 optimal sein dürfte.

Spektrum

Abbildung 4 zeigt den Verlauf der Spektren der Reaktionsansätze aus 2,5 ml Chromogen-Gebrauchslösung und 50–250 µl *p*-Aminobenzoesäure 182 mg/l. Kurve I zeigt das Spektrum des Reagenzien-Leerwertes. Alle Absorptionsmaxima (402/403 nm) liegen unter den gewählten Bedingungen übereinander.

Farbentwicklungskurve und Farbstabilität

Aus Abbildung 5 gehen die Farbentwicklungskurve und die Farbstabilität eines Reaktionsansatzes aus 2,5 ml Chromogen-Gebrauchslösung und 50 µl *p*-Aminobenzoesäure-Standard hervor. Es ist ersichtlich, daß die Farbentwicklung unter den gewählten Bedingungen nach 6 min bereits abgeschlossen ist. Die Absorptionsstabilität ist mindestens 20 min lang gegeben, danach ist die Absorptionsabnahme etwa 0,005 Absorptionseinheiten pro Stunde.

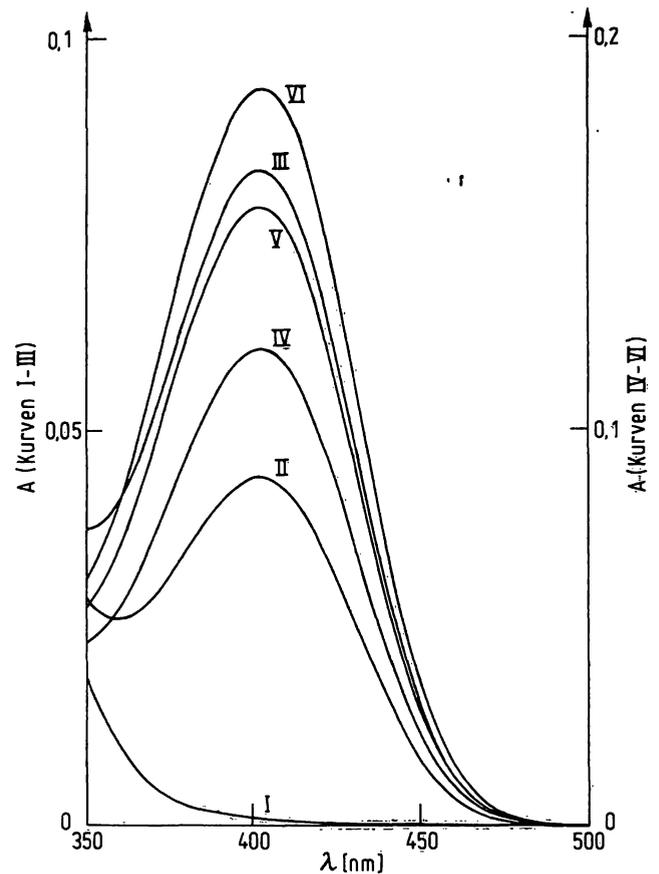


Abb. 4. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Spektrenaufnahme der Reaktionsansätze.

2,5 ml Chromogen-Gebrauchslösung
 + 50 µl (I) Wasser
 + 50 µl (II)
 + 100 µl (III) } *p*-Aminobenzoesäure
 + 150 µl (IV) } 182 mg/l
 + 200 µl (V)
 + 250 µl (VI)

Wellenlängenbereich: 350–500 nm

Papiervorschub: 5 cm/min = 50 nm/min

Registrierung: I–III: A = 0 – 0,1 (1 x)
 IV–VI: A = 0 – 0,2 (0,5 x)

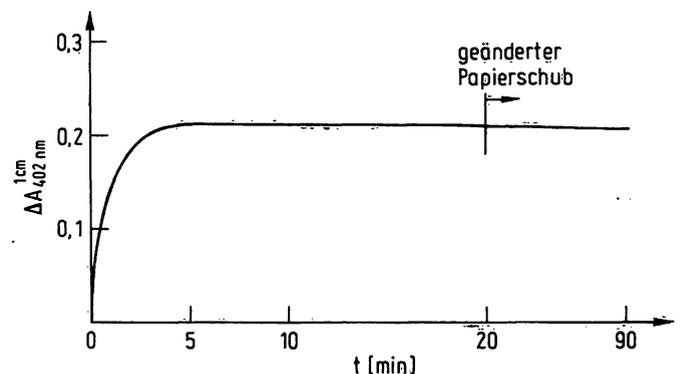


Abb. 5. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Farbentwicklungskurve und Farbstabilität.

Reaktionsansatz: 2,5 ml Chromogen-Gebrauchslösung
 50 µl *p*-Aminobenzoesäure 182 mg/l
 Papiervorschub: 0–20 min = 1 cm/min, dann
 0,1 cm/min
 Wellenlänge: 402 nm

Linearität und Empfindlichkeit

Abbildung 6 zeigt, daß bei diesem Vorgehen und bei den eingesetzten Konzentrationen ein gesicherter Linearitätsbereich bis 700 mg/l *p*-Aminobenzoesäure vorliegt. Die Empfindlichkeit ist etwa 0,0022 Absorptionseinheiten pro mg/l *p*-Aminobenzoesäure.

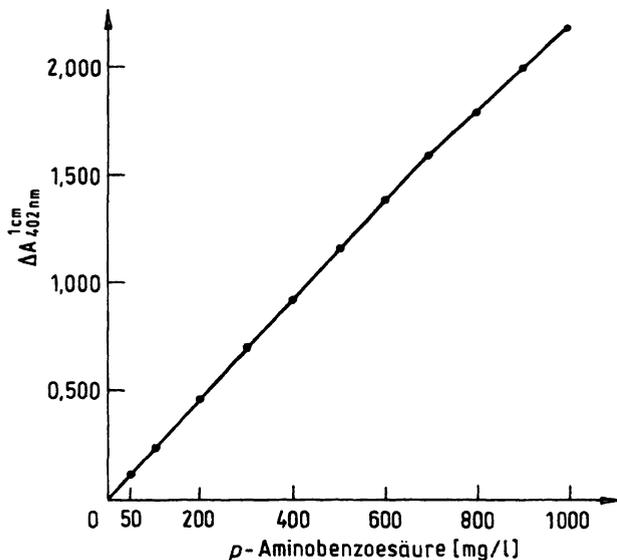


Abb. 6. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Linearität und Empfindlichkeit.

2,5 ml Chromogen-Gebrauchslösung
50 µl Probemenge

Präzision und Abklärung einer faktoriellen Berechnungsmöglichkeit

Für die Präzisionsaussagen wurden folgende Daten erhalten (vgl. Tab. 1):

1. Präzision der Inkubation (Hydrolyseschritt):
3 Urine wurden in 12-fach-Bestimmung hydrolysiert.
2. Präzision der photometrischen Bestimmung:
In 3 hydrolysierten Urinen wurden in 12-fach-Bestimmung die *p*-Aminobenzoesäure bestimmt.

Tab. 1. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Präzisionsdaten für Hydrolyse-Schritt und photometrische Bestimmung.

a) Präzision der Inkubation

(n = 12)	\bar{x}	s	VK (%)
$\Delta A_{402\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$ Urin 1	0,259	0,002	0,9
Urin 2	0,620	0,004	0,6
Urin 3	0,307	0,003	1,1

Die Hydrolyse wurde 12 X und die photometrische Bestimmung 1 X durchgeführt.

b) Präzision der photometrischen Bestimmung

(n = 12)	\bar{x}	s	VK (%)
$\Delta A_{402\text{ nm}}^{1\text{ cm}}$ Urin 1	0,251	0,001	0,3
Urin 2	0,603	0,003	0,4
Urin 3	0,300	0,001	0,4

Die Hydrolyse wurde bei jedem Urin nur 1 X durchgeführt.

3. Faktorielle Berechnung:

Über 6 Wochen wurden täglich mehrere Standards mitgeführt und aus der Größe $A(S) - A(RL)$ der Berechnungsfaktor ermittelt.

Der Berechnungsfaktor schwankte bei 136 innerhalb von 6 Wochen durchgeführten Bestimmungen bei einem Mittelwert von 4620 ($s = 8,7$, $VK = 1,9\%$) um maximal 389; Maximalwert: 4454. Die sehr gute Reproduzierbarkeit der Größe $A(S) - A(RL)$ erlaubt es, die Berechnung auch direkt mit einem Faktor vorzunehmen.

Vergleichsuntersuchungen

Im Urin von 44 Patienten, bei denen der Pankreas-Funktions-Test durchgeführt worden war, wurden vor und nach der Einnahme von Bentriomid die Ausscheidung an *p*-Aminobenzoesäure sowie sich wie die *p*-Aminobenzoesäure verhaltenden Komponenten sowohl nach der *Bratton-Marshall*- als auch nach der (Fluram)-Methode ermittelt.

Aus Tabelle 2 geht ein Vergleich der erhaltenen Ausscheidungswerte von 28 Patientenproben, bei denen alle 4 Verfahren parallel durchgeführt wurden, hervor.

Tab. 2. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Vergleich der nach den verschiedenen Berechnungsverfahren erhaltenen Resultate (mit/ohne Berücksichtigung von Proben-Leerwerten und Analysen der Basis-Ausscheidungswerte). Die *Bratton-Marshall*-Methode wurde stets ohne Proben-Leerwert durchgeführt.

Urin-Nr.	<i>p</i> -Aminobenzoesäure [mg]				
	<i>Bratton-Marshall</i>	Verfahren I	Verfahren II	Verfahren III	Verfahren IV
1	285,0	257,0	251,3	256,7	265,6
2	244,0	243,9	232,0	237,2	241,9
3	277,0	230,4	226,1	240,5	247,5
4	170,0	152,8	147,9	153,5	161,8
5	251,0	219,8	214,0	221,4	235,2
6	268,0	242,4	235,4	251,8	261,7
7	245,0	218,8	213,4	223,1	231,2
8	270,0	254,6	219,0	236,0	274,5
9	134,0	111,1	107,4	116,4	122,1
10	60,0	53,9	42,3	48,8	64,9
11	242,0	208,5	199,0	218,6	233,1
12	206,0	193,2	185,3	195,2	206,8
13	124,0	121,3	107,2	111,4	128,2
14	268,0	250,9	239,6	248,4	267,3
15	277,0	206,4	197,2	233,9	249,0
16	131,0	97,4	92,8	126,3	134,5
17	159,0	131,9	118,1	127,8	146,4
18	287,0	249,9	241,7	259,1	271,1
19	80,0	78,0	51,7	67,0	92,0
20	242,0	195,1	127,0	157,6	228,3
21	293,0	248,6	239,5	253,2	265,0
22	230,0	203,9	193,5	214,0	220,7
23	278,0	232,9	218,3	243,2	259,3
24	179,0	151,4	143,9	160,6	166,8
25	302,0	258,9	254,2	275,1	280,4
26	236,0	190,5	184,4	204,4	211,5
27	103,0	85,7	77,9	93,1	102,9
28	327,0	291,9	271,2	293,0	313,0

Verfahren I (Berechnung gemäß Gl. 1):

Mit Berücksichtigung aller Proben-Leerwerte und mit Berücksichtigung von 6 × Basiswert-Ausscheidung.

Verfahren II (Berechnung gemäß Gl. 2):

Ohne Proben-Leerwert beim Basisurin und Berücksichtigung von 6 × Basiswert-Ausscheidung.

Verfahren III (Berechnung gemäß Gl. 3):

Ohne Proben-Leerwert-Berücksichtigung beim Ausscheidungs- und Basisurin und Berücksichtigung von 6 × Basiswert-Ausscheidung.

Verfahren IV (Berechnung gemäß Gl. 4):

Ohne jegliche Berücksichtigung von Proben-Leerwert und Basis-Ausscheidung.

Von den untersuchten Patientenerinen waren einige tiefgefroren, die anderen im Kühlschrank mindestens 14 Tage aufbewahrt worden. Bei den tiefgefrorenen Urinen tritt nach dem Auftauen eine Trübung in Erscheinung. Es ist notwendig, solche Urine vor der Entnahme eines entsprechenden Volumens für die Hydrolyse auf Raumtemperatur zu bringen und gut zu homogenisieren.

Diskussion

In Tabelle 3 sind die statistischen Daten der 28 parallel nach 4 Verfahren und der *Bratton-Marshall*-Methode

durchgeführten Bestimmungen aufgezeigt (Korrelationsdiagramm). Aus dem Diagramm ergeben sich folgende Schlußfolgerungen (vgl. auch Abb. 7):

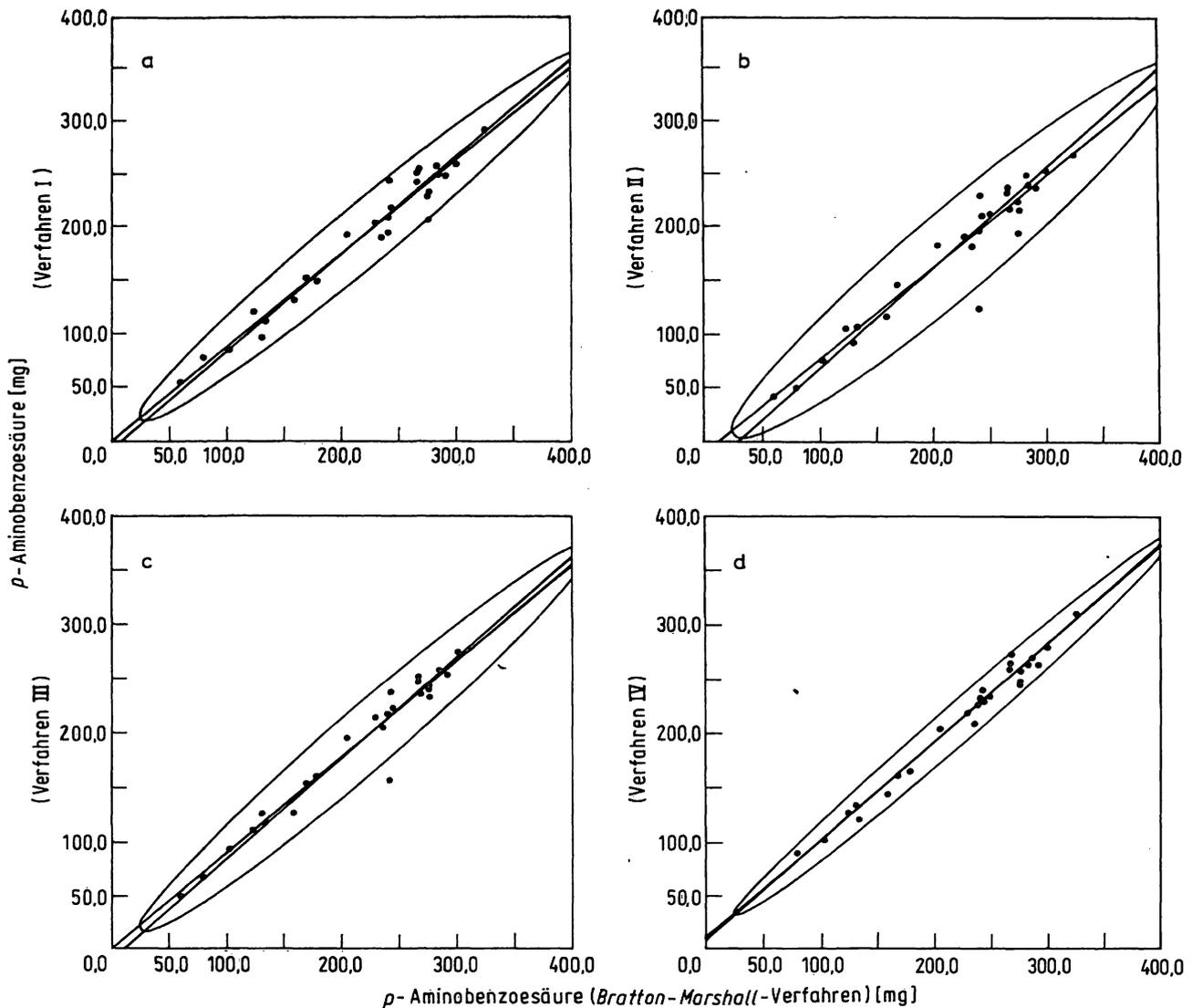
1. Der größte Korrelationskoeffizient (0,992) wird zwischen der *Bratton-Marshall*-Methode und Verfahren IV (ohne jegliche Berücksichtigung von Proben- und Ausscheidungswerten) erhalten. Dies ist erklärlich, denn auch bei der *Bratton-Marshall*-Methode wurden keine Proben-Leerwerte berücksichtigt.
2. Die nach der *Bratton-Marshall*-Methode erhaltenen Werte liegen zwischen 5 und 10% höher.
3. Je exakter die Bestimmung durchgeführt wird (Verfahren I und Verfahren II), desto größere Diskrepanzen ergeben sich gegenüber der *Bratton-Marshall*-Methode. Daraus ist ersichtlich, daß die Proben-Leerwerte keine unbedeutende Rolle spielen. Die Durchführung gemäß Verfahren I ist jedoch sehr zeitaufwendig und erfordert die Mitführung zahlreicher Ansätze.

Aus der Gegenüberstellung der nach den 4 verschiedenen Berechnungsmöglichkeiten unter teilweiser Berücksichtigung sowohl der Basis-Ausscheidung als auch der Proben-Leerwerte ergibt sich jedoch, daß die einfachste Berechnung (ohne Proben-Leerwerte und ohne Berücksichtigung des Basiswertes) im allgemeinen für klinisch-chemische Schlußfolgerungen ausreichend sein dürfte.

Die sich wie *p*-Aminobenzoesäure verhaltenden Substanzen im Basisurin (Basis-Ausscheidung × 6) machten einen Anteil von 0,014 an der Gesamt-Ausscheidung aus ($n = 29$, $\bar{x} = 0,0133$, Maximal-Betrag 0,083, Minimal-Betrag 0,0004, $s = 0,0158$, VK = 118%). Bei einem Urin

Tab. 3. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Korrelationsdiagramm, \bar{x} und \bar{y} mg.

x \ y	<i>Bratton-Marshall</i>	Verfahren I	Verfahren II	Verfahren III	Verfahren IV
<i>Bratton-Marshall</i>		$\bar{x} = 192,2$ $\bar{y} = 220,3$ $r = 0,979$ $y = 8,4856 + 1,1021x$	$\bar{x} = 179,7$ $\bar{y} = 220,3$ $r = 0,9597$ $y = 28,7121 + 1,0661x$	$\bar{x} = 195,3$ $\bar{y} = 220,3$ $r = 0,9790$ $y = 10,8346 + 1,0727x$	$\bar{x} = 210,1$ $\bar{y} = 220,3$ $r = 0,9919$ $y = -9,3162 + 1,0928x$
Verfahren I	$\bar{x} = 220,3$ $\bar{y} = 192,2$ $r = 0,9790$ $y = 0,5985 + 0,8697x$		$\bar{x} = 179,7$ $\bar{y} = 192,2$ $r = 0,9803$ $y = 18,3451 + 0,9674x$	$\bar{x} = 195,3$ $\bar{y} = 192,2$ $r = 0,9805$ $y = 5,8380 + 0,9543x$	$\bar{x} = 210,1$ $\bar{y} = 192,2$ $r = 0,9905$ $y = -11,5008 + 0,9695x$
Verfahren II	$\bar{x} = 220,3$ $\bar{y} = 179,7$ $r = 0,9597$ $y = -10,6236 + 0,8639x$	$\bar{x} = 192,2$ $\bar{y} = 179,7$ $r = 0,9803$ $y = -11,2269 + 0,9934x$		$\bar{x} = 195,3$ $\bar{y} = 179,7$ $r = 0,9917$ $y = -11,2913 + 0,9781x$	$\bar{x} = 210,1$ $\bar{y} = 179,7$ $r = 0,9639$ $y = -21,1488 + 0,9559x$
Verfahren III	$\bar{x} = 220,3$ $\bar{y} = 195,3$ $r = 0,9790$ $y = -1,5715 + 0,8935x$	$\bar{x} = 192,2$ $\bar{y} = 195,3$ $r = 0,9805$ $y = 1,6645 + 1,0024x$	$\bar{x} = 179,7$ $\bar{y} = 195,3$ $r = 0,9917$ $y = 14,5974 + 1,0054x$		$\bar{x} = 210,1$ $\bar{y} = 195,3$ $r = 0,9806$ $y = -11,9072 + 0,9861x$
Verfahren IV	$\bar{x} = 220,3$ $\bar{y} = 210,1$ $r = 0,9919$ $y = 11,7713 + 0,9003x$	$\bar{x} = 192,2$ $\bar{y} = 210,1$ $r = 0,9905$ $y = 15,5941 + 1,0121x$	$\bar{x} = 179,7$ $\bar{y} = 210,1$ $r = 0,9639$ $y = 35,4677 + 0,9718x$	$\bar{x} = 195,3$ $\bar{y} = 210,1$ $r = 0,9806$ $y = 19,6770 + 0,9752x$	

A *Bratton-Marshall* → Verfahren I

$$y = 0,60 + 0,87 x; s_{yx} = 13,48$$

$$x = 8,49 + 1,10 y; s_{xy} = 15,17$$

$$\bar{x} = 220,30 \text{ mg}$$

$$\bar{y} = 192,20 \text{ mg}$$

$$\text{Median} = 242,00 \text{ mg}$$

$$r = 0,98$$

$$n = 28$$

B *Bratton-Marshall* → Verfahren II

$$y = 10,62 + 0,86 x; s_{yx} = 18,83$$

$$x = 28,71 + 1,07 y; s_{xy} = 20,92$$

$$\bar{x} = 220,29 \text{ mg}$$

$$\bar{y} = 179,69 \text{ mg}$$

$$\text{Median} = 242,00 \text{ mg}$$

$$r = 0,96$$

$$n = 28$$

C *Bratton-Marshall* – Verfahren III

$$y = -1,57 + 0,89 x; s_{yx} = 13,85$$

$$x = 10,84 + 1,07 y; s_{xy} = 15,18$$

$$\bar{x} = 220,29 \text{ mg}$$

$$\bar{y} = 195,26 \text{ mg}$$

$$\text{Median} = 242,00 \text{ mg}$$

$$r = 0,98$$

$$n = 28$$

D *Bratton-Marshall* → Verfahren IV

$$y = 11,77 + 0,90 x; s_{yx} = 8,58$$

$$x = -9,32 + 1,09 y; s_{xy} = 9,45$$

$$\bar{x} = 220,29 \text{ mg}$$

$$\bar{y} = 210,07 \text{ mg}$$

$$\text{Median} = 242,00 \text{ mg}$$

$$r = 0,99$$

$$n = 28$$

Abb. 7. Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure. Bei allen vier Darstellungen wurde das *Bratton-Marshall*-Verfahren als Bezugsverfahren (*x*-Werte) zur Darstellung der Korrelation mit Verfahren I–IV eingesetzt.

betrug jedoch der sechsfache Basiswert 0,083 der Gesamtausscheidung. Bei solchen Urinen ist es erforderlich, bei Berücksichtigung der Basiswerte einen Proben-Leerwert mitzuführen, da sonst zu viel subtrahiert wird.

Bei sehr niedrigen Ausscheidungswerten sollten auf jeden Fall die Proben-Leerwerte berücksichtigt werden.

Schlußfolgerungen

Aus den aufgezeigten Daten wird folgender Vorschlag zur Bestimmung der *p*-Aminobenzoesäure gemacht:

- Schnellverfahren ohne Berücksichtigung von Proben-Leerwert und Basiswert.
- Durchführung unter Berücksichtigung des Proben-Leerwertes und des Basiswertes. Dieses Verfahren sollte sich stets bei nicht eindeutigen, zweifelhaften und an der Entscheidungsgrenze der Ausscheidung liegenden Werten an das Schnellverfahren anschließen.

Reagenzien

1 Pufferlösung	Acetatpuffer	1,8 mol/l
2 (Fluram)	Fluorescamin	1,0 g/l
3 Standard	<i>p</i> -Aminobenzoesäure	182 mg/l
4 Hilfsreagenz	Salzsäure	250 g/kg

Vorbereitungen

- Gekühlte oder gefrorene Urinproben auf Raumtemperatur bringen, gut homogenisieren (nicht filtrieren oder zentrifugieren). Je nach Urinausscheidung folgende Verdünnungen vornehmen:

< 120 ml:	1 Teil Urin + 9 Teile Wasser Verdünnungsfaktor: $f = 10$
120–500 ml:	1 Teil Urin + 4 Teile Wasser Verdünnungsfaktor: $f = 5$
> 500 ml:	unverdünnt einsetzen Verdünnungsfaktor: $f = 1$

- Zur Hydrolyse werden 1 ml der jeweiligen Urinverdünnung mit 0,1 ml Salzsäure 250 g/kg in einem verschlossenen Pyrex-Reagenzglas 40 min bei etwa 96 °C (± 2 °C) inkubiert.

3. (Fluram)-Lösung

50 mg (Fluram) in 50 ml Ethanol 950 ml/l lösen.

4. Gebrauchslösung

20 ml Pufferlösung 1 und 6 ml (Fluram)-Lösung mischen.

Verwendbarkeit: etwa 1 Woche bei 2–8 °C, es wird jedoch empfohlen, die Gebrauchslösung stets frisch herzustellen.

Vorgehen**a) Schnellverfahren****Ansätze (in μ l)**

hydrolysiertes Urin	50
Gebrauchslösung	2500

Gut mischen. Nach etwa 10 min aber innerhalb 1 h A(P) gegen Gebrauchslösung in Küvetten mit 1 cm Schichtdicke messen.

Wellenlänge: Spektralphotometer 402 nm
Spektrallinienphotometer Hg 405 nm

P = Probe

A = Absorption

Ausscheidung der *p*-Aminobenzoesäure:

$$m \text{ [mg]} = A(P) \times 462 \times V \times \frac{V_A}{1000}$$

m = *p*-Aminobenzoesäure [mg]

V = Verdünnungsfaktor

V_A = Gesamt-Urinausscheidung [ml]

p-Aminobenzoesäureausscheidung als Anteil der theoretisch möglichen Menge unter Zugrundelegung einer Verabreichung von 1 g Bentiromid (als freie Säure):

$$\text{Anteil ausgeschieden} = 0,295 \times m.$$

b) Vorgehen unter Berücksichtigung von Proben-Leerwerten und Basisausscheidung

Ansätze (in μ l)	Basiswert		Ausscheidungswert			
	P ₁	PL ₁	P ₂	PL ₂	S	RL
hydrolysiertes Urin (von vor der Einnahme)	50	50	–	–	–	–
hydrolysiertes Urin (von nach der Einnahme)	–	–	50	50	–	–
Standard (182 mg/l)	–	–	–	–	50	–
dest. Wasser	–	–	–	–	–	50
Pufferlösung 1	–	2500	–	2500	–	–
Gebrauchslösung	2500	–	2500	–	2500	2500

Gut mischen. Nach etwa 10 min A(P₁) respektive A(P₂) und A(S) gegen den RL sowie A(PL₁) und A(PL₂) gegen Pufferlösung messen.

Wellenlänge: Spektralphotometer 402 nm
Spektrallinienphotometer Hg 405 nm

P = Probe

RL = Reagenzien-Leerwert

PL = Proben-Leerwert

A = Absorption

Ausscheidung der *p*-Aminobenzoensäure:

$$m \text{ [mg]} = \left[\frac{A(P_2) - A(PL_2)}{A(S)} \right. \\ \left. \times 200 \times V \times \frac{V_A}{1000} \right] \text{Ausscheidungswert} - \\ \left[\frac{A(P_1) - A(PL_1)}{A(S)} \right. \\ \left. \times 200 \times \frac{6 V_B}{1000} \right] \text{Basiswert}$$

m = *p*-Aminobenzoensäure [mg]

V = Verdünnung

V_A = Gesamt-Urinausscheidung in ml

V_B = Urinmenge pro Stunde vor der Einnahme, der Faktor 6 ergibt sich unter der Annahme, daß die vom Test unabhängige stündliche Basisausscheidung während der sechsständigen Testzeit die gleiche ist wie in der Kontrollperiode.

p-Aminobenzoensäureausscheidung als Anteil der theoretisch möglichen Menge unter Zugrundelegung einer Verabreichung von 1 g Bentiromid (als freie Säure):

Anteil ausgeschieden = $0,295 \times m$.

Literatur

1. Bratton, A. C. & Marshall, E. K. (1939) *J. Biol. Chem.* *128*, 537–550.
2. Gillessen, D. & Lergier, W.: Publikation in Vorbereitung.
3. Udenfriend, S., Stein, S., Böhlen, P., Daivman, W., Leimgruber, W. & Weigle, M. (1972) *Science* *178*, 871–872.

Dr. Hans-Georg Eisenwiener
F. Hoffmann-La Roche + Co. AG
Forschungs- und Entwicklungsabteilung
der Sparte Diagnostica
Postfach
CH-4002 Basel

