

Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.
11. Jg. 1973, S. 333—334

Vereinfachte photometrische Calciumbestimmung im Serum ohne Eiweißfällung

VON J. HOEFLMAYR UND R. FRIED

Aus den wissenschaftlichen Laboratorien der Firma Dr. Heinz Haury, München

(Eingegangen am 8. Januar/26. Februar 1973)

Eine vereinfachte Methode zur Bestimmung des Calciums im Serum ohne Eiweißfällung wird angegeben. Der Calciumwert wird aus der Extinktionsdifferenz des Farbkomplexes mit Glyoxal-bis(2-hydroxyanil) vor und nach Zugabe von Äthylendiamintetraessigsäure bestimmt. Die Präzision und Richtigkeit der Methode sind ausgezeichnet.

Simplified photometric determination of Calcium in serum without deproteinisation

A simplified method for the determination of Calcium in serum without protein precipitation is described. The calcium values are obtained from the difference in optical density of the Glyoxal-bis(2-hydroxyanil) colour complex before and after the addition of EDTA. Precision and accuracy of the method are excellent.

Auf der Suche nach einem Reagenz für eine einfache photometrische Calciumbestimmung im Serum, das so empfindlich ist, daß diese Bestimmung im stark verdünnten Serum und folglich ohne Eiweißfällung durchzuführen ist, sind wir auf das Glyoxal-bis(2-hydroxyanil) gestoßen. Ursprünglich von KERR (1) für die photometrische Calciumbestimmung im Regenwasser vorgeschlagen, wurde dieses Reagenz zur photometrischen Serumcalciumbestimmung von MAGER und FARESE (2) erstmalig verwendet. BURR (3) hat dieses Reagenz für eine automatische Calciumbestimmung im Serum eingesetzt.

Wir haben die von MAGER und FARESE vorgeschlagene Methode überprüft und zur weiteren Vereinfachung modifiziert und konnten dabei die vorzügliche Eignung von Glyoxal-bis(2-hydroxyanil) für diese Bestimmung ohne Eiweißfällung unter Beweis stellen. Die Methode beruht auf folgendem Prinzip: Das Serum wird durch einen alkalischen Boratpuffer stark verdünnt und mit einer methanolischen Glyoxal-bis(2-hydroxyanil)-Lösung versetzt. Dabei bildet sich ein orange-roter Farbkomplex, dessen Intensität bei 510—560 nm (z. B. Hg 546) gemessen wird. Durch Zusatz von Äthylendiamintetraessigsäure wird dieser Komplex zerstört und danach die Messung wiederholt. Die Differenz der

beiden Messungen ergibt nur den auf der Calciummenge beruhenden Extinktionswert; eventuelle Trübungen werden dadurch eliminiert.

Material und Methoden

Reagenzien¹⁾

1. Pufferlösung pH 13
875 mmol/l di-Natriumtetraborat und
83 mmol/l Natriumhydroxyd
2. Glyoxal-bis(2-hydroxyanil)-Lösung
0,31 mmol/l Glyoxal-bis(2-hydroxyanil) in Methanol
3. Äthylendiamintetraessigsäure-Lösung
134 mmol/l
4. Standard-Lösung
2,5 mmol/l (10 mg/100 ml) Calcium.

Arbeitsvorschrift

In drei calciumfreie Reagenzgläser (z. B. Plastikröhrchen) für Analyse, Standard und Leerwert werden je 3 ml Pufferlösung pipettiert. Zur Analyse werden 0,05 ml Serum, zum Standard 0,05 ml Standard-Lösung gegeben. Dann wird allen Proben 1,0 ml Glyoxal-bis(2-hydroxyanil)-Lösung zugefügt und gut gemischt. Die Proben werden in sauberen Küvetten genau 10 min nach Zugabe der letzten Lösung gegen destilliertes Wasser bei 510 bis 560 nm (z. B. Hg 546, Spektralphotometer 520 nm) gemessen: = Extinktion I. Dann gibt man in jede Küvette 0,05 ml Äthylendiamintetraessigsäure-Lösung, mischt und mißt nach 10 min erneut gegen destilliertes Wasser: = Extinktion II.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\frac{(\text{Analyse Ext. I—II}) - (\text{Leerwert Ext. I—II})}{(\text{Standard Ext. I—II}) - (\text{Leerwert Ext. I—II})} \times 2,5 = \text{mmol/l} (\times 10 = \text{mg/100 ml}) \text{ Calcium im Serum.}$$

Ergebnisse und Diskussion

Wie MAGER et al. sowie BURR konnten auch wir uns durch Zusatzversuche überzeugen, daß Magnesium- und Phosphat-Ionen in einer im Serum üblichen Konzentration nicht stören. Der von MAGER et al. vorgeschlagene Zusatz eines mit Wasser mischbaren organischen Lösungsmittels ist nach unseren Untersuchungen unnötig. Dagegen hat der Zusatz von

Äthylendiamintetraessigsäure zur Zerstörung des Komplexes vor der zweiten Messung die Methode auch für schwach lipämische Seren brauchbar gemacht.

Da die entstehende Farbe nicht konstant ist, muß die Zeit zwischen Zugabe der Glyoxal-bis(2-hydroxyanil)-Lösung und der Messung für alle Proben gleich sein.

¹⁾ Enthalten in HAURYTEST „Calcium-S“ Firma Dr. Heinz Haury, 8 München 40, Postfach 400806.

Tab. 1

Vergleich der flammenphotometrischen Calciumbestimmung mit der beschriebenen Methode

Serum Nr.	mg/100 ml Calcium im Serum		Δ%
	Flammen- photometer	Glyoxal-bis (2-hydroxyanil)	
1	8,7	8,65	-0,58
2	9,6	9,42	-1,87
3	9,5	9,86	+3,79
4	9,3	9,58	+3,0
5	10,4	10,5	+0,96
6	8,6	9,0	+4,65
7	8,6	8,7	+1,16
8	10,0	10,8	+8,00
9	9,2	9,55	+3,80
10	9,4	9,65	+2,65
11	9,2	9,58	+4,13
12	9,4	9,3	-1,06
13	9,6	9,8	+2,08
14	9,6	9,8	+2,08
15	9,0	9,4	+4,44
16	9,2	9,4	+2,17
17	9,0	9,5	+5,55
18	9,4	9,46	+0,63
19	8,8	8,65	-1,70
20	9,0	8,7	-3,33
	9,28	9,47	

Korrelationskoeffizient: $r = 0,885$ Regressionsgerade: $y = 0,85 + 0,930 x$

Man gibt diese Lösung in dem Arbeitsrhythmus zu, in dem nach 10 min die Ablesung der Proben erfolgen kann.

Die Eichkurve ist bis über 5 mmol/l (20 mg/100 ml) Calcium im Serum geradlinig.

Durch Verwendung von Plastik-Einwegröhrchen vermeidet man die Reinigung der Zentrifugengläser mit verdünnter Salzsäure, um sie absolut frei von Calcium zu bekommen.

Um bei der Zugabe von Äthylendiamintetraessigsäure für alle Proben die gleichen Verdünnungen zu erhalten, werden die Ansätze zur Messung entweder vollständig in die Küvetten geleert, oder wenn dies nicht möglich ist, die Küvetten bis zur gleichen Höhe gefüllt.

Die Reproduzierbarkeit der Methode ist ausgezeichnet. In der Serie konnte bei 20 Bestimmungen eines Serums nach der Normalmethode unter Verwendung von

Tab. 2

Vergleich der Calciumbestimmungsmethode nach WEBSTER mit der beschriebenen Methode

Serum Nr.	mg/100 ml Calcium im Serum		Δ%
	Mod. Methode nach WEBSTER	Glyoxal-bis (2-hydroxyanil)	
21	9,5	9,7	+2,10
22	9,6	9,9	+3,12
23	9,3	9,7	+4,30
24	8,9	9,7	+8,98
25	13,4	12,8	-4,47
26	5,8	5,7	-1,72
27	11,4	12,1	+6,14
28	8,7	9,0	+3,44
29	9,7	9,1	-6,18
30	5,8	6,5	-12,06
31	10,1	10,1	+0,00
32	8,9	9,0	+1,12
33	8,0	8,4	+5,00
34	9,7	9,7	+0,00
35	8,8	9,3	+5,68
36	9,5	8,7	-8,42
37	10,2	10,3	+0,98
38	11,0	10,6	-3,63
39	10,1	9,6	-4,95
40	9,3	9,7	+4,30
	9,39	9,48	

Korrelationskoeffizient: $r = 0,961$ Regressionsgerade: $y = 0,03 + 1,007 x$

Marburg-Pipetten eine relative Standardabweichung von $\pm 0,01\%$ ermittelt werden. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse bei Untersuchung von Tag zu Tag ergab diesen Wert mit $V = \pm 1,05\%$. Die hohe Empfindlichkeit des Reagens gestattet noch 0,0125 mmol/l Calcium im Serum sicher zu erfassen. Die Richtigkeit der Bestimmung wurde durch Vergleich mit der flammenphotometrischen Bestimmung und der von uns modifizierten Chloranilat-Methode (4) nach WEBSTER (5) überprüft. Im Vergleich mit dem Flammenphotometer ergab sich ein Korrelationskoeffizient von $r = 0,885$ und eine Regressionsgerade von $y = 0,85 + 0,930 x$. Bei der Chloranilatmethode waren die entsprechenden Werte $r = 0,961$ und $y = 0,03 + 1,007 x$.

Wir danken Fr. L. REKITTKE für die exakte Durchführung der Untersuchungen.

Literatur

1. KERR, J. R. W. (1960), *Analyst* 85, 867 zit. nach l. c. (2). —
2. MAGER, M. & FARESE, G. (1966), *Clin. Chem.* 12, 234—242.
3. BURR, R. G. (1969), *Clin. Chem.* 14, 1191—1197. — 4. HOEFL-
- MAYR, J., FRIED, R. & STADELMANN, W. (1964), *Ärztl. Lab.* 10, 127—129. — 5. WEBSTER, W. W. (1962), *Am. J. Clin. Pathol.* 37, 330—333.

Dr. med. J. Hoeffmayr
Dr. rer. nat. R. Fried
8 München 40
Schleißheimer Str. 343