

zwischen Harnsäurespiegel und *Körpergewicht*. Abbildung 6 zeigt, daß der Harnsäurespiegel mit dem Körpergewicht nicht zunimmt. Bemerkenswert sind vielleicht die etwas höheren Werte bei ausgeprägtem Über-

gewicht. Wegen der geringen Zahl der Fälle ist nicht zu entscheiden, ob es sich hier um Zufallsbefunde oder die Folge der mit Fettsucht zwangsläufig verbundenen Vielesserei handelt.

Literatur

1. BLAUCH, M. B. und F. C. KOCH, J. biol. Chemistry 130, 443 (1939). — 2. KALCKAR, H. M. und J. SHAFRAN, J. biol. Chemistry 167, 429 (1947). — 3. PRAETORIUS, E. und H. POULSEN, Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 5, 273 (1953). — 4. HAUGE, M. und B. HARVALD, Acta med. Scand. 152, 247 (1955). — 5. SMYTH, C. J., Metabolism, Baltimore 6, 218 (1957). — 6. SANDBERG, A. A., G. E. CARTWRIGHT und M. M. WINTROBE, Blood 11, 154 (1956). — 7. ZÖLLNER, N., Moderne Gichtprobleme Ätiologie, Pathogenese, Klinik. In: Erg. inn. Med. Kinderhk., 14. Band. Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960).

Professor Dr. med. Nepomuk Zöllner
Medizinische Poliklinik der Universität
8 München 15, Pettenkoferstr. 8a

Serum-Kupfer-Analysen mit Hilfe der Absorptions-Flammenphotometrie¹⁾

Von

ROLAND HERRMANN und WALTER LANG

Aus dem Laboratorium für Medizinische Physik an der Universitäts-Hautklinik Gießen (Leiter: Prof. Dr. R. Herrmann)

Herrn Professor Dr. FR. KRÖHNKE, Chemisches Institut, Gießen, zum 60. Geburtstag gewidmet.

(Der Schriftleitung zugegangen am 12. April 1963)

Zur Bestimmung des Kupfers im Serum wird eine Atomabsorptionsmethode mit vorangehender Extraktion beschrieben. Diese Atomabsorptionsmethode bietet infolge ihrer Spezifität eine Reihe von Vorteilen gegenüber den bisher meist angewandten spektrophotometrischen (Molekül-) Absorptionsmethoden.

A method is described for the determination of copper in serum by extraction, followed quantisation by atomic absorption. Owing to its specificity, the atomic absorption method has many advantages over the hitherto mostly used spectrophotometric (molecular) absorption methods.

In vorangegangenen Veröffentlichungen (1, 2, 3, 4) haben wir über die Bestimmung der Elemente Na, K, Mg und Zn in Seren mit Hilfe der relativ neuen Absorptionsflammenphotometrie berichtet. Im folgenden wird eine Methode zur Bestimmung des Spurenelementes Cu in Seren mit der gleichen Methode angegeben. Die Bestimmung dieses Elementes ist aus folgenden Gründen schwieriger als die der vorangegangenen Elemente:

1. Die Absorptionsfähigkeit der Cu-Atome ist infolge ihrer geringeren Oscillatorenstärke ($f_{324,8} = 0,62$) kleiner als die der Elemente Ca ($f_{422,7} = 2,27$), Mg ($f_{285,2} = 1,75$), Na ($f_{589,0} = 0,67$), K ($f_{766,5} = 0,70$).
2. Kupfer kommt im Serum in geringerer Konzentration vor als

die vorangegangenen Elemente, (Cu = 1 mg/l, Na = 3300 mg/l, K = 160 mg/l, Ca = 100 mg/l).

3. Es entzieht sich ein Teil der Cu-Atome dem atomaren Nachweis durch die Bildung von Molekülen wie CuOH in der Flamme (5, 6).

Man muß daher für den atomaren Nachweis einen größeren apparativen Aufwand treiben.

Meßanordnung:

Wir verwenden das *Spektralphotometer* PMQ II von Carl Zeiss (Oberkochen), bei dem zur Erhöhung der Empfindlichkeit, wie es bei (Emissions-) flammenphotometrischen Messungen auch üblich ist, der Gegenkopplungswiderstand im Anzeigergerät von 200 kOhm auf 1 MOhm erhöht wurde. Vor dem Eingangsspalt des Monochromators haben wir die aus Abbildung 1 ersichtliche, in eigener Werkstatt erstellte Spiegelanordnung nach WHITE (7) angebracht, die einen 5-fachen Durchgang des Meßstrahls durch

¹⁾ Unterstützt mit Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

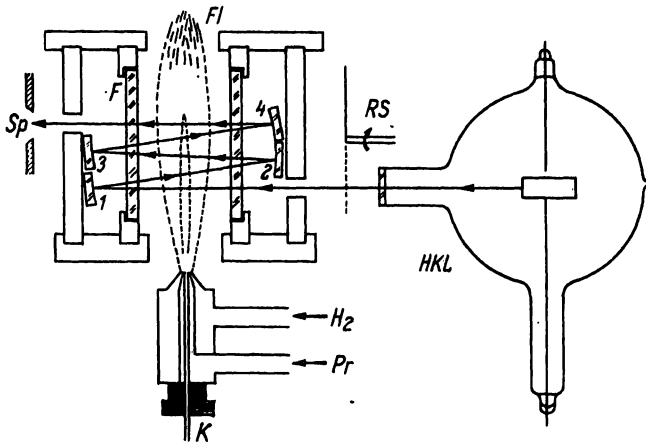


Abb. 1

Spiegelanordnung nach WHITE (7) vor dem Spektrophotometer für einen 5-fach-Durchgang des Meßstrahles durch eine Direktzerstäuberflamme Fl. Sp = Eingangsspalt des Monochromators, HKL = Hohlkathodenlampe, RS = rotierender Sektor, F = Fenster zum Schutz der WHITE-Spiegel (1, 2, 3, 4) vor Verschmutzung, K = Flüssigkeitsansaugkapillare des Direktzerstäubers, P = Preßluftzufuhr, H₂ = Wasserstoffzufuhr.

die H₂-Preßluft-Flamme des zum Gerät gehörigen Direktzerstäubers von Zeiss ermöglicht. Durch eine solche Anordnung sind die Nachweisgrenzen besser. Der Direktzerstäuber ist ein Originalzerstäuber von Zeiss, abgesehen von folgender Veränderung: Wir haben die Gasdüse des genannten Zerstäubers, bestehend aus Messing mit einem Chromüberzug, durch eine genauso dimensionierte Düse aus Eisen ersetzt, da die Original-Zeiss-Düse nach Korrosion des Chromüberzuges an ihren Innenkannten deutliche Mengen von Cu an die Flamme abgibt, was die Blindwertabsorption merklich und überdies noch ungleichmäßig erhöht. Den Direktzerstäuber betreibt man bei Untersuchungen dieser Art, entgegen den Empfehlungen bei Emissionsanalysen, vorteilhaft mit Preßluft, die auf einen Vordruck von 1,5 kp/cm² geregelt wird, sowie mit Wasserstoff von 125 mm WS Vordruck.

Der Monochromator ist der Original-Zeiss-Monochromator mit folgender Abweichung: Die im Monochromator eingebaute Schwingblende ist so weit seitlich herausgefahren, daß sie nicht mehr den Lichtstrahl moduliert. Statt dessen ist ein rotierender Sektor aus Pappe, mit entsprechenden Aussparungen, befestigt an der Achse eines Synchronmotors, zwischen Hohlkathodenlampe und WHITE-Spiegelanordnung so angebracht, daß nur das Licht der Hohlkathodenlampe mit 50 Hz moduliert wird (siehe Abb. 1). Das hat den Vorteil, daß die Eigenstrahlung der Flamme mit ihrem Einfluß auf die Meßwertanzeige weitgehend ausgeschaltet ist. An das bereits genannte Anzeigegerät haben wir ein Schreibergerät (Honeywell-Streifenblattschreiber mit 5 mV Eingangsempfindlichkeit) mit einer Einstellzeit von 1 sec angeschlossen, so daß man die Ablesungen am Anzeigegerät gleichzeitig dokumentarisch festhalten kann.

Die für die Messung erforderliche Cu-Strahlung bei 324,8 m μ entnehmen wir einer Hohlkathodenlampe von Hilger, Type Fl 152. Die Lampe wird mit 24–30 mA aus einem stabilisierten Netzgerät betrieben, die Spaltbreite des Monochromators beträgt 0,10–0,15 mm. Bei dieser Spalteinstellung wird die benachbarte Cu-Linie bei 327,4 m μ mit einer nur halb so guten Oscillatorenstärke nicht erfaßt. Das ist wesentlich, um die Nachweisgrenzen dadurch nicht zu verschlechtern (2, 8).

Wir haben verschiedene turbulente Direktzerstäuberflammen auf Eignung für die hier vorliegende Aufgabe erprobt. Flammen mit Sauerstoff wie O₂-H₂ oder O₂-C₂H₂ geben deutlich geringere Cu-Absorptionen, offenbar bedingt durch die größere Steiggeschwindigkeit der Flammengase (geringere Aufenthaltsdauer der Cu-Atome im Meßstrahl), infolge der höheren Verbrennungs- und Ausströmungsgeschwindigkeit der Gase und bedingt durch die höhere thermische Expansion der Gase (stärkere Verdünnung

der Cu-haltigen Gase) bei der Verbrennung. Am günstigsten erwies sich in unserem Falle die Verwendung von H₂-Preßluft. All diese Gemische sind mit dem gleichen Direktzerstäuber von Zeiss im Prinzip anwendbar.

Direkte Messung an Seren

Trotz der empfindlichen Meßanordnungen kann man sich eine Verdünnung des Serums vor der Analyse (wie bei Na-, K-, Ca- und Mg-Analysen) bei Cu-Analysen nicht leisten. Die Nachweisgrenze für wäßrige Cu-Lösungen liegt in unserem Falle, allerdings gemessen an einer Hilger-Apparatur (Hilger Uvispek H 700 mit Flammzusatz für atomare Absorption) bei 0,004 mg Cu/100 ml, die Nachweisgrenze für Cu in wäßrigen Eichseren (d. h. Modellsereen mit mittlerem Na-, K-, Ca-, Mg- und Cu-Gehalt) liegen bei 0,03 mg Cu/100 ml. Daß die Nachweisgrenzen im letztgenannten Fall bedeutend schlechter liegen, hat folgende Gründe: Beim Zerstäuben von konzentrierten (d. h. unverdünnten) Eichseren der genannten Zusammensetzung bilden sich an der Zerstäuberspitze Salzkristalle, die die Zerstäubung ungleichmäßig gestalten und ein ungleichmäßiges Schiefbrennen der Flamme bei Direktzerstäuberverbrennern und damit eine größere Schwankung der Meßwertanzeige bedingen. Beim Zerstäuben der natürlichen Seren verschlechtern sich diese Verhältnisse abermals, weil außer den Salzen noch Eiweiß u. ä. darin enthalten ist, das zu Krustenbildung an der Zerstäuber- bzw. Brennerspitze neigt. — Die Begleitelemente Na, K ... usw. verschlechtern aber bei direkter Verwendung des Serums nicht nur die Nachweisgrenzen, sondern es ergeben sich auch größere Störeinflüsse von variablen Na-Konzentrationen auf die Cu-Konzentration, vermutlich durch Einflüsse des Elementes Na auf das Flammenvolumen, auf den Absorptionsweg, auf die OH-Konzentration u. ä. Es empfiehlt sich also, aus den natürlichen und auch aus den Eichseren die Hauptmasse der Salze und Eiweiße zu entfernen oder das Cu quantitativ zu extrahieren. Wir haben uns für den letztgenannten Weg entschlossen da sich das Cu durch organische Komplexbildner wie Oxochinolin, Dithizon, Na-Diaethyldithiocarbaminat u. ä. leicht extrahieren läßt. Bei dieser von uns angestrebten Extraktion spielt es keine Rolle, wenn auch andere Spurenelemente in größenordnungsmäßig gleicher Konzentration wie z. B. Zink, Cobalt oder Eisen mitextrahiert werden, da die Atomabsorptionsmethode Störungen durch diese Elemente ausschließt. Es muß nur verlangt werden, daß durch diese Extraktion alles Cu oder ein immer gleichbleibender Prozentsatz des vorhandenen Cu extrahiert wird. Das ist aber nach dem, was man über Extraktionsverfahren bei Spurenanalysen bisher feststellen konnte (9–14) der Fall. Extraktionsverfahren liegen in dieser Hinsicht grundsätzlich besser als z. B. Fällungsreaktionen. — In unserem Falle ist also Ziel der Extraktion, die Nachweisgrenze für die folgende Atomabsorption zu verbessern und die Störungen von Lösungspartnern verhältnismäßig hoher Konzentration zu beseitigen.

Extraktionsverfahren

Reagenzien

Na-Diaethylthiocarbaminat (Merck Nr. 6689) als Komplexbildner. Davon wird eine 0,1proz. Lösung in aqua bidest hergestellt. Man gibt zweckmäßigerweise einige Tropfen Ammoniak-Lösung hinzu, da sich diese Lösung in alkalischem Milieu (in dunkler Flasche) besser hält.

2 n HCl zum Herauslösen des Cu aus dem Eiweißkomplex (Homogenisierung bzw. Denaturierung).

20proz. Trichloressigsäure als Enteiweißungsmittel.

Chloroform (Merck Nr. 2445) als Extraktionsmittel.

Als Aufbewahrungsgefäße sind Polyäthylenflaschen am besten geeignet.

Durchführung

In ein 20 ml Zentrifugenglas¹⁾ pipettiert man 1 ml Serum²⁾ und 1 ml der 2 n HCl³⁾ und läßt mindestens 15 Min. stehen⁴⁾. Dann gibt man 1 ml der 20proz. Trichloressigsäure hinzu⁵⁾ und läßt wieder mindestens 15 Min. stehen⁶⁾. Anschließend zentrifugieren (5—10 Min.) bei einer Beschleunigung von 3500—5500 g. Überstehende Flüssigkeit in ein 20 ml Reagenzglas mit Schliff⁷⁾ überführen (Abkippen genügt) und 1 ml der obengenannten Na-diaethylthiocarbaminatlösung zupipettieren und anschließend 1 ml Chloroform⁸⁾ zugeben. 2 Min. schütteln⁹⁾ und anschließend sofort wäßrige Phase entfernen¹⁰⁾. Der Cu-haltige Chloroformextrakt kann direkt gemessen werden. Falls die Messung nicht unmittelbar folgt, Reagenzglas gut verschließen, um Eindunstungen zu vermeiden. — Zu den einzelnen Schritten der Vorschrift seien im folgenden verschiedene Begründungen und mögliche Abwandlungen mit ihren Vor- und Nachteilen angegeben. Die folgenden Ziffern beziehen sich auf die Ziffern im obenstehenden Text.

1) Alle Gerätschaften müssen gründlich mit Chromschwefelsäure gereinigt, mit Wasser und dann mit aqua dest. nachgespült und staubfrei getrocknet werden. Man sollte sich bemühen, den Arbeitsgang so zu führen, daß das zu untersuchende Material mit möglichst wenig Glasgerätschaften in Berührung kommt. (Verschmutzungsgefahr, Spurenelementbestimmung.)

2) Wegen möglicher Entmischungserscheinungen (15) in länger stehenden Seren empfiehlt es sich, die benützte Menge sofort nach dem Zentrifugieren abzupipettieren. Ein längeres Stehen des fertig abgemessenen Serums vor dem Extraktionsarbeitsgang (s. unten) hat keine wesentlichen Nachteile. Allerdings benötigt man für die Trennung von Chloroformschicht und wäßriger Phase mehr Zeit, wenn das Serum älter ist.

3) An Stelle der 2 n HCl sind auch andere Homogenisierungsmittel möglich, um das Cu aus dem Eiweißkomplex herauszulösen, z. B.:

a) 6 n HCl. Vorteil: Etwas mehr Sicherheit bei der Herauslösung des Cu. Nachteil: Zerstäuber und andere optisch-elektronischen Bauteile werden stärker angegriffen. Man muß wegen der Selbstzerersetzung des Cu-Komplexes dann noch schneller die wäßrige Phase über dem Cu-haltigen Chloroform abpipettieren als das ohnehin schon empfehlenswert ist (s. u.).

b) 5 m Formamid. Vorteil: Man arbeitet nicht im sauren Milieu. Die unter a) genannten Nachteile entfallen, jedoch hat man hier folgende Nachteile: Die Homogenisierung ist nach unseren Erfahrungen nicht so vollständig wie bei 2 n HCl, was man an den vergleichsweise geringeren Cu-Atomabsorptionen bemerkt.

c) Ammoniaklösung, p. a. konz. Vorteil: Wie eben unter b) erwähnt. Nachteil: Der Umgang mit hochkonz. NH₄ OH-Lösung ist unangenehm. Im übrigen ist es schwer, ein im alkalischen Milieu

arbeitendes Eiweißfällungsmittel anzugeben. Ohne ein solches Fällungsmittel kommt es aber beim anschließenden Ausschütteln mit Chloroform oder ähnlichen organischen Extraktionsmitteln leicht zur Bildung eines formbeständigen Gels, aus dem man selbst bei schärfstem Zentrifugieren kaum Flüssigkeit für die flammenphotometrische Analyse gewinnen kann.

d) 10%-Pyrrolidon in aqua dest., Dimethylformamid konz., 20proz. wäßr. KCl-Lösung, 20proz. U-Lösung, konz. NaOH und 10proz. bzw. 30proz. NH₄OH-Lösung lösen das Cu nur unvollständig aus dem Eiweißkomplex heraus; im übrigen gleicher Nachteil wie bei c.

4) Kürzere Wartezeiten als 15 Min. verringern den Cu-Gehalt im Extrakt.

5) An Stelle von 20proz. Trichloressigsäure sind auch andere Eiweißfällungsmittel mehr oder weniger gut brauchbar: 6 m/20proz. Sulfosalicylsäure ist brauchbar. Uranylacetat verhindert bei einigen Arbeitstechniken das Ausbilden einer klaren Trennschicht zwischen wäßr. und organischer Phase, und die Extraktionsergebnisse sind mäßig.

6) Kürzere Wartezeiten verringern den Cu-Gehalt im Serumextrakt.

7) Die Reagenzgläser sollen so beschaffen sein, daß man den folgenden Arbeitsgang einschließlich Schütteln ohne nochmaliges Umschütten in ein anderes Gefäß erledigen kann. An Stelle der üblichen Schliffstopfen aus Glas haben sich Stopfen aus „Teflon“ bewährt, da man sie ohne Fetten (Verschmutzungsgefahr) nach dem Schütteln leicht aus dem Schliff herausbekommt. — Bei einigen Versuchsvarianten haben wir uns bemüht, den gesamten vorherigen und folgenden Arbeitsgang so zu führen, daß man mit einem einzigen Glas (Zentrifugenglas mit Schliff + Stopfen s. o.) auskommt. Ein solches Vorgehen ist nach unseren Erfahrungen jedoch weniger empfehlenswert, da es dann leicht zur Gelbildung beim Schütteln durch das dann immer noch vorhandene Eiweiß kommt.

8) An Stelle von Chloroform sind auch andere organische Lösungsmittel verwendbar. Wir haben einige Versuche mit Amylalkohol und einige Versuche mit n-Heptan durchgeführt und haben festgestellt, daß unter unseren Versuchsbedingungen die Cu-Extraktion nicht so vollständig ist wie bei Anwendung der polaren Flüssigkeit Chloroform. Deshalb blieben wir bei Chloroform. Es hat allerdings den Nachteil, daß bei der Zerstäubung in eine turbulente H₂-Preßluftflamme eine Geruchsbelästigung auftritt. Man muß daher, übrigens auch aus anderen Gründen (6) über der Flamme einen Abzug anbringen. Bei Amylalkohol tritt praktisch keine Geruchsbelästigung bei der Zerstäubung in die Preßluft-H₂-Flamme ein, allerdings ist die erzielte Cu-Extinktion weniger gut als die bei Verwendung von Chloroform. Der pH-Wert der wäßrigen Phase spielt nach unseren vergleichenden Ergebnissen, abgesehen von der unten besprochenen Selbstzerersetzung, bei der Extraktion keine Rolle (siehe 12, 16).

9) Nach unseren Erfahrungen kann das Ausschütteln nicht gründlich genug sein. Unsere Schüttelmaschine schüttelt vertikal in Richtung der Längsachse der Gläser mit einem Hub von 33 mm und einer Frequenz von 750/Min. Bei Anwendung kleinerer Frequenzen bzw. Hübe sind entsprechend längere Schüttelzeiten erforderlich. Diese sind allerdings ohne vorherige Neutralisierung (s. Punkt 10) bedenklich, da die Zersetzung des Cu-Komplexes und die Rückdiffusion der Dissoziationsprodukte schon beim Schütteln einsetzt. (Falls man einen anderen Arbeitsgang anwendet, z. B. einen solchen, bei dem das Eiweiß nicht durch Fällung entfernt wird, ist die Einhaltung einer optimalen Schüttelzeit sehr wichtig. Schüttelt man zu wenig, bekommt man zwar viel Chloroformextrakt, aber mit geringem Cu-Gehalt, schüttelt man zu viel, bekommt man praktisch keine abpipettierbare Flüssigkeit durch die Bildung eines formbeständigen Gels, auch dann nicht, wenn man scharf (bei etwa 3500—5500 g) zentrifugiert.) Der pH-Wert ist in gewissen Grenzen (11, 16) für die Extraktion an sich ohne Bedeutung.

10) Arbeitet man im sauren Milieu, ist es erforderlich, die wäßr. Phase schnell von der Cu-haltigen Chloroformschicht zu trennen,

und zwar um so schneller, je saurer die wäßr. Phase ist. Es findet nämlich eine Zersetzung der Cu-Komplexe mit Rückdiffusion der Spaltprodukte in die wäßr. Phase, unter anderem bedingt durch die Einwirkung von Licht, statt. Diesen Nachteil kann man ausschalten, wenn man vor der Carbaminatzugabe mit Hilfe von konzentrierter, Ammoniaklösung p. a. neutralisiert. Wir entschieden uns für die schnelle Arbeitsweise ohne Neutralisieren, da jedes Zugeben von Chemikalien das Einschleppen von Cu-Spuren begünstigt.

Eichlösungen

Für die Eichung läßt man 1 m/ aqua bidest, in einer Quarzapparatur nachdestilliert, an Stelle von Serum als Blindprobe durch den ganzen Extraktionsgang hindurchlaufen und stellt damit den 100%-Punkt (Extinktion $E = 0$) am Instrument ein. Man eliminiert auf diese Weise einen möglichen Rest-Cu-Gehalt der benutzten Chemikalien. Hat man es ausnahmsweise mit Chemikalien mit hohem Cu-Gehalt zu tun, so empfiehlt sich eine vorherige Reinigung durch Ausschütteln mit Chloroform nach vorheriger Zugabe von Na-Diaethyldithiocarbaminat und, falls notwendig, mit anschließender Entfernung des überschüssigen Carbaminates. Ebenso läßt man 1,0 m/ Eichlösung (Modellserum) folgender Zusammensetzung: 3300 mg Na/l, 150 mg K/l, 100 mg Ca/l, 20 mg Mg/l, 1 mg Cu/l durch den Extraktionsarbeitsgang hindurchlaufen. Das eben genannte Modellserum kann man sich wie folgt herstellen: Der Inhalt einer Merck-Titrisolampulle Nr. 9976 wird in einen 1/-Meßkolben überführt. Diese Ampulle enthält alle oben genannten Elemente in richtiger Menge außer dem Cu. Dieses kann man wie folgt zugeben: Vor dem Auffüllen auf 1 / pipettiert man 10,0 m/ einer Cu-Stammlösung mit 1 g Cu/l in den gleichen Meßkolben (Stammlösung: 268,3 mg $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ad 1000 m/ H_2O). Der Cu-haltige Chloroformextrakt dieses Modellserums dient zur Eichung (s. unten), d. h. zur Eliminierung etwaiger Empfindlichkeitsvariationen der Apparatur, z. B. Ausschaltung der jeweiligen Zerstäuber- und Hohlkathoden- (Bandbreiten-) Eigenschaften.

Messung

Nachdem die Apparatur justiert ist, läßt man sie vor Beginn einer Meßreihe etwa $\frac{1}{2}$ bis 1 Std. „einbrennen“, d. h. die Elektronik und die Hohlkathodenlampe sind dabei in Betrieb, die Flamme noch nicht. Kurz vor Beginn der eigentlichen Meßreihe entzündet man auch die Flamme. Bei abgedunkeltem Strahlungsempfänger wird der O-Punkt, beim Zerstäuben der Blindlösung der 100%-Punkt einreguliert. Dann kann man in der Reihenfolge $E_e, E_{s_1}, E_e, E_{s_2}, E_e, \dots$ die Extinktionen der Eichlösungsextrakte E_e bzw. der einzelnen Serumextrakte $E_{s_1}, E_{s_2}, E_{s_3}, \dots$ ermitteln. Die Extinktion des Cu-Serum-Extraktes lag bei uns bei $E = 0,2$. Ein Absinken dieses Wertes bei längeren Versuchsreihen deutet auf Zerstäuberstopfungen hin. Die Lage des 100%-Punktes muß beim Zerstäuben von Blindlösung von Zeit zu Zeit nachkontrolliert und, falls erforderlich,

nachgestellt werden. Die Extinktionen kann man auch dem gleichzeitig mitgeschriebenen Registrierstreifen entnehmen. Das ist besonders dann empfehlenswert, wenn man Schwankungen der Meßwertanzeige auf graphischem Wege sicherer herausmitteln will.

Auswertung

Wir bilden interpolierte Eichextinktionen E_e z. B. durch Mittelung der der Ableseung E_{s_1} benachbarten beiden E_e -Ableseungen. Die gesuchte Cu-Konzentration des Serums c_s in mg Cu/l ergibt sich dann wie folgt:

$$c_s = \frac{E_s}{E_e} \cdot c_e.$$

Die Berechtigung dieses einfachen Rechenganges ergibt sich aus der Linearität der Eichkurve. Bis zu Konzentrationen, die weit oberhalb des physiologischen Schwankungsbereiches liegen, ist die Eichkurve streng geradlinig.

Reproduzierbarkeit

Wir haben eine größere Menge Mischserum in 14 Einzelproben aufgeteilt und nach Extraktion einzeln gemessen. Berechnen wir für die auf diese Weise gewonnenen einzelnen Cu-Analyseergebnisse die mittlere Streuung, so erhalten wir für die Standardabweichung $\sigma = \pm 3,3\%$. Hieraus läßt sich eine günstigere Nachweisgrenze ableiten als vorn angegeben wurde. Die Gründe für diese Unterschiede sind: a) Verschiedene Geräte: Hilger bzw. hier Zeiss. — b) Verschiedene Lösungsmittel: Wasser bzw. hier Chloroform. — c) Verschiedene Auswertung: Ableseung bzw. hier Registrierung.

Genauigkeit

Wir haben die Methode durch eine Zumischtechnik geprüft: Es werden 30 m/ Mischserum in 5 einzelne Proben von 6 m/ aufgeteilt. Diese Proben nennen wir S_1, S_2, \dots, S_5 . Die Probe S_1 läuft unverändert mit. Zu den Proben $S_2 \dots S_5$ geben wir steigende Mengen Cu hinzu, und zwar so, daß die Konzentration um 0,5, 1,0, 1,5, und 2,0 mg Cu/l gegenüber der ursprünglichen Konzentration höher liegt und lassen dann wieder alle Proben durch den angegebenen Extraktionsarbeitsgang hindurchgehen, dazu entsprechende Konzentrationen Eichlösungen und Blindlösungen (letztere ohne Cu-Zugabe). Durch Vergleich der gefundenen Konzentrationen mit den erwarteten Konzentrationen (ermittelte Ausgangskonzentration + tatsächliche Zugabe) läßt sich ermitteln, wie weit man das zugegebene Cu „wiederfindet“. Die Abweichungen für alle Versuche mit entsprechenden Vorzeichen zusammengefaßt ergab die mittlere Abweichung von $-0,6\%$; die maximal vorkommende Abweichung betrug $-4,8\%$. Das ist nicht mehr als man auf Grund des obigen erwarten darf, denn man muß bedenken, daß die Reproduzierbarkeitsfehler von 3,3% und die Pipettierfehler bei solchen Zumischversuchen doppelt eingehen. Wir

können aus diesem Ergebnis schließen, daß unsere Ergebnisse frei von systematischen Fehlern sind.

Cu im Eiweißniederschlag

Die vorangehenden Untersuchungen lassen die Frage offen, wieviel Cu sich durch Fällung mit dem Eiweiß der Analyse entzieht. Der Ausgang des obigen Zuzugsversuches kann nicht unbedingt als Gegenargument gegen etwaige Verluste dieser Art in das Feld geführt werden; denn zupipettierte wäßrige Cu-Salzlösungen können sich anders verhalten als das Kupfer, das vorher am Eiweißkomplex gebunden war. — Zur Klärung dieser Frage haben wir die folgenden Versuche durchgeführt und gleichzeitig den wahrscheinlichen Fall mit untersucht, daß es sich bei etwa vorhandenen Verlusten nicht um eine echte Fällung des Cu handelt, sondern um Cu, das bei der Eiweißfällung mitgerissen wurde (Adsorption bzw. Einschlüsse):

20 ml Mischserum werden durch den Extraktionsgang geführt und ebenfalls 20 ml aqua bidest als Blindprobe. Diesmal wird der erhaltene Eiweißbodensatz *nicht* verworfen, sondern einmal mit HNO₃ p. a. feucht und ein anderes Mal trocken im Muffelofen verascht. Nach dem Abrauchen überschüssiger Säure und nach dem Abkühlen wird die Extraktion wie oben beschrieben für das erhaltene Veraschungsprodukt weitergeführt und im Extrakt die Cu-Konzentration mit der Absorptions-Flammenphotometrie bestimmt. Wir erhalten als Mittelwert aus 2 Bestimmungen einen Restgehalt von 0,01 mg Cu/l. Wir können also diese Verluste vernachlässigen.

Cu in der wäßrigen Phase

Wir haben schließlich untersucht, ob sich Cu der Analyse dadurch entzieht, daß die Extraktion des organischen Cu-Komplexes mit dem Chloroform nicht genügend vollständig ist. Solche Verluste müßten dadurch nachweisbar sein, daß nach der Extraktion noch merkliche Mengen Cu in der wäßr. Phase angetroffen werden. Wir haben diesbezügliche Untersuchungen durchgeführt und stellten fest, daß kein Cu in der wäßrigen Phase mit der Absorptions-Flammenphotometrie nachweisbar war. Die angewandte Extraktion ist also genügend vollständig.

Diskussion

Die vorgeschlagene Methode unterscheidet sich hinsichtlich der Vorbereitung des Serums (Cu-Extraktion) für die eigentliche Analyse kaum von anderen Bestimmungsmethoden mit Hilfe spektrochemischer Absorptionsanalysen in Flüssigkeiten. Der Zeitbedarf ist hierfür praktisch der gleiche. — Die Durchführung einer Atomabsorption in der Flamme (Absorptions-Flammenphotometrie) bietet jedoch gegenüber den bisher fast ausschließlich angewandten spektralphotometrischen Absorptionsuntersuchungen an Lösungen in Küvetten (Molekularabsorption) folgende Vorteile:

Die gemessene Atomabsorption bei der Cu-Resonanzlinie 324,8 m μ ist nur für das Element Cu charakteristisch. Störungen durch andere ähnlich konzentrierte Elemente sind aus folgenden Gründen undenkbar: Die Anwendung von Tarnmischungen o. ä. zur Unterdrückung von störenden Molekülabsorptionen von anderen durch den Extraktionsgang mit hindurchgekommenen Elementen sind nicht erforderlich. Änderungen der Wertigkeit durch Oxydations- bzw. Reduktionsvorgänge können auf das Analyseergebnis keinen Einfluß nehmen, da es bei der Atomabsorptionsmethode keine Rolle spielt, in welcher Form das Cu in die Flamme gebracht wird. Bei der Durchführung von (Molekül-) Absorptionsuntersuchungen können dadurch aber schwerwiegende Fehler entstehen. Auch ist bei Atomabsorptionsmessungen keine Messung bei 2 oder mehr verschiedenen Wellenlängen des Spektrums mit entsprechenden Korrekturrechnungen zur Unterdrückung von nicht spezifischen Molekülabsorptionen oder von (Molekular-) Absorptionen der Störelementkomplexe mit flach verlaufenden (Molekular-) Absorptionsbanden erforderlich. Das bedingt größere Meßsicherheit und geringeren Zeitbedarf für den letzten Schritt des vorgeschlagenen Arbeitsganges (Atomabsorption im Vergleich zur Molekülabsorption).

Als Nachteil ist zu nennen: Man benötigt einen Atomabsorptionszusatz zu einem üblichen Spektralphotometer, der noch nicht häufig angetroffen wird.

Die genannte Methode ist ohne Änderung z. B. bei Liquor und mit geringfügigen Abweichungen auch bei anderen Körperflüssigkeiten anwendbar.

Herrn Professor Dr. W. GRAB, Pharmakologisches Institut und Herrn Dr. W. RICK, Medizinische Klinik Gießen, danken wir für anregende Diskussionen und Korrekturhinweise. Frau J. SPELZ danken wir für die unermüdliche Mithilfe bei der Durchführung unserer Versuche.

Literatur

1. HERRMANN, R. und W. LANG, Zschr. exper. Med. 134, 268 (1961). — 2. HERRMANN, R. und W. LANG, Quantitative Analysen von Spurenelementen mit der flammenphotometrischen Absorptionsmethode, Coll. Spectrosc. Intern. IX Lyon (1961). — 3. HERRMANN, R. und W. LANG, Zschr. exper. Med. 135, 569 (1962). — 4. HONEGGER, N., Ärztl. Laborat. 9, 51 (1963). — 5. GILBERT, P. T., Atomic Absorption Spectroscopy: A Review of recent Developments. 6. Ann. Conference on Analytical Chemistry in Nuclear Reactor Technology, Gatlinburg, Tennessee (1962). — 6. HERRMANN, R. und C. TH. J. ALKEMADE, Flammenphotometrie, 2. Aufl., Springer-Verlag Berlin-Göttingen-Heidelberg (1960). — 7. WHITE, J. U., J. Optic. Soc. America 32, 285 (1942). — 8. HERRMANN, R. und W. LANG, Arch. Eisenhüttenwes. 23, 643 (1962). — 9. BODE, H., Z. Analyt. Chem. 141, 414 (1954). — 10. BODE, H., Z. Analyt. Chem. 144, 165 (1955). — 11. BODE, H. und F. NEUMANN, Z. Analyt. Chem. 172, 1 (1960). — 12. BODE, H. und F. NEUMANN, Z. Analyt. Chem. 171, 1 (1959). — 13. POHL, H., Analyt. chim. Acta (Amsterdam) 12, 54 (1955). — 14. YOE, J. H. und H. J. KOCH, Trace Analysis, New York (1957). — 15. MERKER, W. und R. HERRMANN, Ärztl. Wschr. 9, 1196 (1954). — 16. MALISSA, H. und S. GOMISCEK, Z. Analyt. Chem. 169, 401 (1959).

Professor Dr. rer. nat. Roland Herrmann
Abteilung für Medizinische Physik an
der Universitäts-Hautklinik
63 Gießen, Gaffkystr. 14