

Literatur

1. HELD, E., O. HOEFLE, G. REICH, U. STEIN, E. WERRIES und E. BUDDECKE, diese Z., vorstehend. — 2. KAPLAN, D. und K. MEYER, Proc. Soc. exper. Biol. Med. N.Y. 105, 78 (1960). BUDDECKE, E. J. Atheroscler. Res. 2, 32 (1962). — 3. HAUSS, W. H., Verh. Dtsch. Ges. inn. Med., 69, 554 (1963). HAUSS, W. H. und G. JUNGE-HÜLSING, Dtsch. med. Wschr. 86, 763 (1961). — 4. BUDDECKE E. und D. PLATT, diese Z., 3, 4 (1965). — 5. BURTON, K., Biochem. J. 62, 315 (1956). — 6. KALTWASSER, F., P. WOLTERS und J. PIEPER, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 15, 347 (1967). — 7. MEYER, W. W., Virchows Arch. path. Anat. 320, 67 (1951). — 8. FILIPOVIC, I. und E. BUDDECKE, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. im Druck. — 9. ADAMS, C. W. M., Vascular Histochemistry, S. 33. LLOYD-LUKE, Ltd., London (1967). — 10. ZEMPLÉNYI, T., Z. LOJDA u. O. MRHOVÁ, Atherosclerosis and its Origin, S. 504, ed. by M. Sandler u. G. H. Bourne, Academic Press., New York (1963). — 11. REICH, G., Dissertation (Math.-Naturwiss. Fakultät, Univ. Tübingen) (1966). HOEFLE, O., Dissertation (Math.-Naturwiss. Fakultät, Univ. Tübingen) (1966). — 12. KIRK, J. E., J. Gerontol. 17, 158 (1962). — 13. BRANWORD, A. W. und C. J. CARR, Lancet II, 1254 (1960). — 14. DYRBYE M. und J. E. KIRK, J. Gerontol. 11, 33 (1956). — 15. PLATT, D., Klin. Wschr. 45, 92 (1967). — 16. HAUSS, H. W., G. JUNGE-HÜLSING, K. J. MATTHES und W. WIRTH, J. Atheroscler. Res. 5, 451 (1965).

Prof. Dr. E. Buddecke
44 Münster (Westf.)
Waldeyerstraße 15

Eine automatisierte Bestimmung von anorganischem Phosphat

Von G. F. HOPPE-SEYLER und G. GUNDLACH

Aus der Klinisch-Chemischen Abteilung (Leiter: Priv.-Doz. Dr. G. Gundlach) der Urologischen Universitätsklinik Homburg/Saar (Direktor: Prof. Dr. C. E. Alken)

(Eingegangen am 13. Dezember 1967)

Herrn Prof. Dr. Dr. Ernst Schütte zum 60. Geburtstag zugeeignet

Eine einfache, empfindliche, automatisierte Methode zur Bestimmung des anorganischen Phosphates in Serum, Harn und biologischen Flüssigkeiten wird beschrieben. Der Molybdänphosphorsäurekomplex wird durch Hydrazinsulfat bei 95° reduziert. Eine Modifikation der angegebenen Technik erlaubt die automatische Bestimmung sehr geringer P-Konzentrationen (0,05 ppm P). Die Interferenz stabiler Phosphatester und anderer Substanzen wird diskutiert.

A simple, sensitive, automated method is described for the determination of inorganic phosphate in serum, urine, and other biological fluids. The molybdenum-phosphoric acid complex is reduced by hydrazine sulphate at 95°. The method can be modified for the automatic determination of very low phosphate concentrations (0.05 ppm P). Interference by stable phosphate esters and other substances is discussed.

Die Grundlage der gebräuchlichen Phosphatbestimmungen ist die Reduktion der Molybdänphosphorsäure zu Molybdänblau. Empfindlichkeitsunterschiede der einzelnen Methoden beruhen auf der Verwendung verschiedener Reduktionsmittel. Für die automatische Bestimmung wird das Verfahren nach FISKE und SUBBAROW mit dem Reduktionsmittel 1, 2, 4-Aminonaphtholsulfosäure empfohlen (1, 2).

Voraussetzung für die Anwendung einer Methode in der klinisch-chemischen Routine und zur Durchführung von Reihenuntersuchungen ist die exakte Reproduzierbarkeit der Meßwerte und eine gute Haltbarkeit der Reagenzien. Dieser Forderung entspricht die Reaktion nach BOLZ und MELLON (3), die Hydrazinsulfat als Reduktionsmittel verwendet, einen mindestens 12 Stdn. haltbaren Farbkomplex bildet und gegenüber dem vorgenannten Verfahren den Vorteil höherer Empfindlichkeit hat (4).

Material und Methoden

Reagenzien

Schwefelsäure p. a. (Merck 731)
Ammoniummolybdat (Merck 1182)
Hydrazinsulfat (Merck 4602)
Salzsäure p. a. (Merck 317)

Lösungen

A. Methode für Serum (10—100 ppm P)

1. Zu 4500 ml dest. Wasser werden 270 ml Schwefelsäure gegeben. Nach Mischen und Abkühlen¹⁾ der Lösung fügt man 30,0 g Ammoniummolybdat zu. Auffüllen mit dest. Wasser auf 5000,0 ml.
2. 0,4 proz. Hydrazinsulfat
3. 1N HCl

B. Mikromethode (0,05—1 ppm P)

1. Zu 4000 ml dest. Wasser werden 665 ml Schwefelsäure gegeben. Nach Mischen und Abkühlen¹⁾ der Lösung fügt man 100,0 g Ammoniummolybdat zu. Auffüllen mit dest. Wasser auf 5000,0 ml.
2. 1 proz. Hydrazinsulfat
3. 0,18 proz. HCl

Ausführung

A. Methode für Serum

Das Verhältnis der Reagenzmengen zueinander geht aus Abbildung 1a hervor; wobei die Zahlenangaben an den Pumpschläuchen den geförderten ml/Min. entsprechen. Reagenzkonzentrationen s. Lösungen.

¹⁾ Es ist unbedingt erforderlich zuerst die Schwefelsäurelösung herzustellen und vor Zugabe des Ammoniummolybdatmolybdates gut abkühlen zu lassen. Die Reagenzlösungen sind dann in jeder Konzentration beständig.

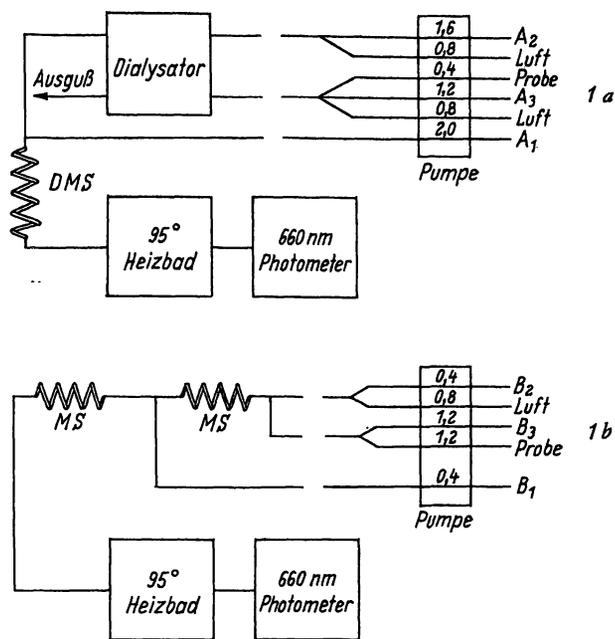


Abb. 1a

Aufbau der Autoanalyzereinheit (Methode für Serum)

A₁, A₂, A₃ = Reagenzlösungen (s. Methodik A)
 Die Zahlenangaben an den Pumpschläuchen geben die geförderte Reagenzmenge (ml/Min.) an
 DMS = doppelte Mischspirale
 Probenfrequenz bis 60/Std.
 Die Pumpschläuche entsprechen dem Technicon-Autoanalyzersystem

Abb. 1b

Aufbau der Autoanalyzereinheit (Mikromethode)

B₁, B₂, B₃ = Reagenzlösungen (s. Methodik B)
 Die Zahlenangaben an den Pumpschläuchen geben die geförderte Reagenzmenge (ml/Min.) an
 MS = einfache Mischspirale
 Probenfrequenz bis 60/Min.
 Die Pumpschläuche entsprechen dem Technicon-Autoanalyzersystem

Die mit Salzsäure versetzte Probe wird im Dialysator gegen Hydrazinsulfat dialysiert. Danach wird dem Dialysat Ammoniummolybdatlösung zugepumpt und in einer Glasspirale gemischt. Die Reduktion der Phosphormolybdänsäure findet beim Durchlaufen der Probe durch das Heizbad bei 95° statt. (Erhitzungsdauer 7 Min.) Die Extinktion der gebildeten Farblösung wird mit Hilfe eines Doppelstrahlkolorimeters bei 660 nm registriert.

B. Mikromethode

Abbildung 1b stellt eine Anordnung dar, die unter Verwendung anderer Reagenzkonzentrationen den Nachweis sehr geringer Phosphatkonzentrationen gestattet. Die Steigerung der Empfindlichkeit wird durch Änderung des Proben-Reagenzverhältnisses und Fortlassen des Dialysators erreicht.

Ergebnisse und Diskussion

Die beschriebene Methode ist in bezug auf Änderung der Reagenzkonzentrationen wenig empfindlich. Dies hat insbesondere dann eine Bedeutung, wenn — z. B. durch Alterung der Pumpschläuche — ein gleichmäßiges Reagenzverhältnis nicht gewährleistet ist.

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß Änderungen der Ammoniummolybdatkonzentration um 50%, der Hydrazinsulfatkonzentration zwischen 0,1% und 1% oder der Schwefelsäurekonzentration zwischen 0,5N und 3N die Farbbildung nicht wesentlich beeinflussen. Lediglich im unteren Konzentrationsbereich findet sich bei der Summierung über sämtliche Werte ein Variationskoeffizient von 12%. Eine Erhöhung der Ammoniummolybdatkonzentration in dem angegebenen Bereich führt zu einer geringen Verminderung der Extinktionen. Eine Erhöhung der Farbausbeute kann durch Senkung der Säurekonzentration oder Erhöhung der Hydrazinsulfatkonzentration erreicht werden. Die von uns gewählten Konzentrationen gewährleisteten eine gute Reproduzierbarkeit in der Serie, wie auch von Tag zu Tag. In einer Serie von 138 Meßwerten (Tab. 2) ergibt sich eine Abweichung der ersten 20 Meßwerte gegenüber den letzten 20 Werten von 0,6%. Der Variationskoeffizient ist < 1%. Die Drift in diesem Experiment bleibt innerhalb der Standardabweichung der einzelnen Meßwerte. Der statistischen Auswertung der Reproduzierbarkeit von Tag zu Tag lagen jeweils 40 Meßwerte zugrunde. Die Reagenzlösungen wurden während der gesamten Versuchszeit nicht verändert oder neu angesetzt. Die

Tab. 2

Untersuchungen zur Reproduzierbarkeit innerhalb der Serie und von Tag zu Tag (n = 40/Tag)

Probe	Gefundener Mittelwert ppm P	s ppm P	V %
1—20	30,1	0,16	0,53
1—138	30,0	0,23	0,77
119—138	29,9	0,24	0,80
Tag			
1	30,3	0,15	0,50
2	29,7	0,19	0,64
3	29,3	0,20	0,68
4	29,7	0,10	0,33
5	30,3	0,10	0,32
6	29,4	0,07	0,23
7	30,3	0,12	0,40
8	30,2	0,10	0,32
9	30,7	0,08	0,25
10	30,2	0,08	0,23
Mittelwert:	30,0	0,14	0,39

Tab. 1

Abhängigkeit der Farbausbeuten (E 660 nm) von verschiedenen Reagenzkonzentrationen
 x̄: Mittelwert; s: Standardabweichung; V: Variationskoeffizient

eingesetzt P ppm	Konstante Reagenzkonzentration										gefunden x ppm, s ppm, V %		
	Hydrazinsulfat 0,4% Schwefelsäure 1N			Ammoniummolybdat 0,6% Schwefelsäure 1N			Ammoniummolybdat 0,6% Hydrazinsulfat 0,5%						
	Variierte Reagenzkonzentration			Varierte Reagenzkonzentration			Varierte Reagenzkonzentration						
Ammoniummolybdat %			Hydrazinsulfat %			Schwefelsäure N							
0,4	0,6	0,8	0,1	0,3	0,7	1,0	3	2	0,5				
10	0,088	0,081	0,079	0,089	0,093	0,112	0,112	0,083	0,087	0,097	10	1,1	11
30	0,297	0,292	0,289	0,298	0,308	0,333	0,333	0,310	0,291	0,303	30	1,6	5,3
50	0,500	0,505	0,500	0,500	0,510	0,535	0,535	0,495	0,484	0,500	50	1,6	3,2
60	0,600	0,575	0,550	0,580	0,580	0,625	0,636	0,580	0,575	0,580	60	2,6	4,3
100	1,010	0,990	0,980	1,000	1,000	1,050	1,040	0,980	0,960	0,980	100	4,1	4,1

Ergebnisse ergaben sich durch direkte Berechnung aus den Extinktionswerten bei 660 nm. Es wurden also nicht täglich Eichkurven angelegt.

Der Variationskoeffizient der insgesamt 400 Einzelmessungen würde also auch von etwa auftretenden Veränderungen der Reagenzlösungen mitbeeinflusst werden. Die so erhaltenen Werte weichen von dem Mittelwert aller Werte um höchstens 2,5% bei einem Variationskoeffizienten von 0,4% ab. Dieser systematische Fehler weist keine Drift auf und läßt sich, wie schon aus dem Variationskoeffizienten der in Tabelle 2 angeführten Serien hervorgeht, durch tägliche Kontrollanalysen verringern.

Über den gesamten Meßbereich zwischen 0 und 100 ppm P herrscht Linearität (Abb. 2). Bei der Darstellung dieser Eichkurve wurden die gefundenen maximalen Abweichungen auch bei den in Tabelle 1 angegebenen Änderungen der Reagenzzusammensetzung berücksichtigt, stellen also die ungünstigsten Verhältnisse dar. Während Phosphatester vom Typ der Glycerinphosphorsäure zu weniger als 0,5% erfaßt werden, zeigen Polyphosphate unter den beschriebenen Bedingungen eine erhebliche Farbbildung. So wird Pyrophosphorsäure nahezu quantitativ, die Triphosphorsäure zu 80%, die Tetraphosphorsäure zu 60% erfaßt, während Polymetaphosphat 20% Farbausbeute, bezogen auf Orthophosphat, ergibt. Diese Verbindungen finden sich jedoch nicht oder im Verhältnis zu anorganischem Orthophosphat nur in einem verschwindend geringen Anteil in physiologischen Flüssigkeiten.

Bei der Reduktion der Phosphormolybdänsäure durch Eisen (II)-sulfat stören Komplexbildner die Reaktion (5). Die Anwesenheit von z. B. einer 40 mM Mannitol-Lösung setzt die Farbausbeute um 40% herab. Diese Schwierigkeit tritt bei der Reduktion mit Hydrazin-sulfat nicht auf. Die Farbausbeute wird in Gegenwart einer 50 mM Mannitol-Lösung nicht meßbar beeinträchtigt. Erst bei Gegenwart einer 0,5M Lösung dieser Substanz sinkt die Farbausbeute um 5,1%.

Durch Fortlassen des Dialysators und Änderung des Fließsystems lassen sich in eiweißfreien Lösungen Phosphatbestimmungen bis herab zu 0,05 ppm P durchführen. Die Empfindlichkeit beträgt dabei 0,02 ppm. Dies bedeutet, daß sich nach der chromatographischen Abtrennung des Orthophosphates noch sehr geringe Mengen an Pyrophosphat und anderen Polyphosphaten bestimmen lassen. Außerdem entfällt die für solche geringen Mengen von Phosphat als notwendig er-

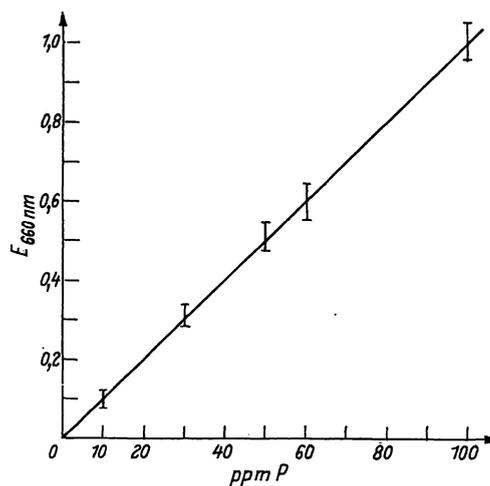


Abb. 2

Eichkurve zur Bestimmung des anorganischen Phosphates
Die Meßwerte wurden bei verschiedenen Reagenzkonzentrationen gewonnen und stellen die maximal gefundene Abweichung dar (Tab. 1)

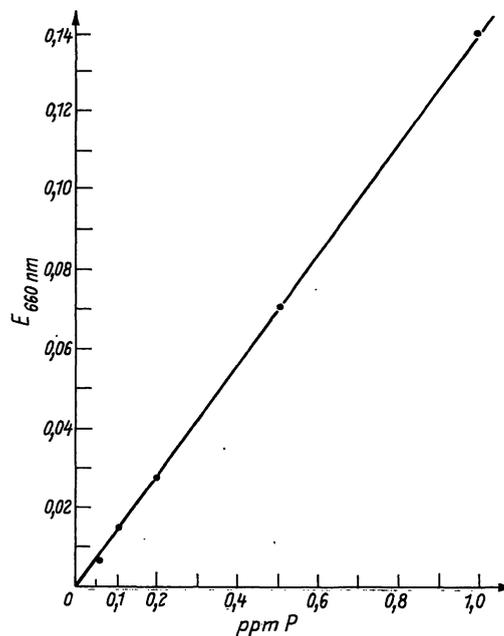


Abb. 3

Eichkurve für die Bestimmung von anorganischem Phosphat im Mikromaßstab

achtete Extraktion zur Anreicherung der Phosphormolybdänsäure (6).

Die Reagenzien für beide beschriebenen Methoden sind bei Raumtemperatur lange Zeit stabil. Im Autoanalyzer wird keine Zugabe von Netzmitteln für einen gleichmäßigen Durchfluß benötigt.

Literatur

1. FISKE, C. H. und J. SUBBAROW, *J. biol. Chemistry* 66, 375 (1925).
2. Technicon Autoanalyzer Methodology N-4b.
3. BOLZ, D. F. und M. G. M. MELLON, *Analytic. Chem.* 19, 873 (1947).
4. GOODWIN, S. F., R. THIBERT, D. MCCANN und A. J. BOYLE,

5. VREMAN, H. J. und F. F. JÖBSIS, *Analytic. Biochem.* 17, 108 (1966).
6. KIRSTEN, W. S., *Microchemical J.* 12, 307 (1967).

Dr. G. Hoppe-Seyler u. Dr. G. Gundlach
665 Homburg/Saar
Urologische Universitätsklinik