

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 19, 1981, pp. 1063–1066

Systematische Fehler durch Phosphat- und Sulfatgehalte in Human- und Kontrollseren bei der atomabsorptionsspektrometrischen Calcium-Bestimmung

Von W. Schulz

Fachhochschule Aalen, Fachbereich Chemie, Aalen

K. Böttger, B. Meder

Carl Zeiss, Oberkochen und

E. Grallath

Max-Planck-Institut für Metallforschung, Institut für Werkstoffwissenschaften, Laboratorium für Reinstoffe, Schwäbisch Gmünd

(Eingegangen am 3. Februar/22. Mai 1981)

Zusammenfassung: Es wird anhand von Messungen mit dem Elektrolytautomaten FL 6 an Kontroll- und Humanseren gezeigt, daß bei optimaler Zerstäuber- und Brennereinstellung auf den Lanthanzusatz zum Ausschalten von Störungen durch Phosphat bei der atomabsorptionsspektrometrischen Calciumbestimmung verzichtet werden kann. Bei einigen Kontrollseren traten dann jedoch Abweichungen auf, die auf die Gegenwart von Sulfat zurückzuführen sind. Zwischen den Sulfatgehalten und den Abweichungen von den mit Lanthanzusatz ermittelten Calciumwerten besteht ein direkter Zusammenhang.

Systematic errors due to phosphate and sulphate in human and control serum in the determination of calcium by atomic absorption spectroscopy

Summary: Investigations of control and human serum with the Elektrolytautomat FL 6 demonstrated that it is not imperative to add lanthanum to eliminate phosphate interference in the atomic absorption spectrometric determination of calcium, providing nebulizer and burner are adjusted optimally. However, a few control specimens showed deviations due to the presence of sulphate. There is a correlation between sulphate content and the deviation of calcium values from those obtained with the addition of lanthanum.

Einleitung

Für die Bestimmung des diagnostisch wichtigen Ca-Gehalts in Serum werden im klinischen Laboratorium Atomemission mit Flammenanregung, Atomabsorption (AAS) und die Messung mit ionensensitiven Elektroden angewandt. Bei diesen Bestimmungsmethoden ist in jedem Fall eine Kalibrierung mit Standardlösung erforderlich, wobei im allgemeinen eine Einpunktkalibrierung ausreicht, da die Zusammensetzung der Matrix nur in relativ engen Grenzen variiert. Um das Auftreten systematischer Fehler bei der Bestimmung auszuschließen, müssen Kontrollproben für die Überprüfung (Richtigkeitskontrolle) in jeder Analysenserie mitgeführt werden (1). Systematische Fehler bei der Bestimmung von Ca durch Atomabsorptionsspektrometrie können von

Phosphat- und Sulfationen hervorgerufen werden (2–6). Die am häufigsten angewandten Maßnahmen zu ihrer Beseitigung sind der Lanthanzusatz bei Verwendung einer Acetylen-Luft-Flamme oder die Anwendung der heißeren Acetylen-Lachgas-Flamme. Beim Elektrolytautomaten FL 6 der Firma Carl Zeiss werden Störungen durch unterschiedliche Phosphatgehalte im Serum bei Verwendung einer Acetylen-Luft-Flamme durch apparative Maßnahmen zur Optimierung von Zerstäuber, Brenner und Strahlengang unterdrückt (7). Dabei wird der Einfluß von Sulfat nicht beseitigt. Es wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit der Sulfatgehalt von Kontrollseren bestimmt, und der Zusammenhang zwischen gemessenen Ca-Werten und der Sulfatkonzentration untersucht.

Material und Methoden

Atomabsorptionsgerät

Zur Durchführung der Messungen wurde der Elektrolytautomat FL 6 (C. Zeiss, Oberkochen) verwendet. Dabei handelt es sich um ein Gerät zur simultanen Bestimmung von Na, K in Emission und Ca, Mg in Atomabsorption (vgl. Abb. 1). Zerstäuber und Brenner sind in Verbindung mit dem Strahlengang für die Matrix Serum optimiert (7). Die Auswertung des Detektorsignals erfolgt über den eingebauten Mikroprozessor unter Berücksichtigung der Kalibrierkurvenkrümmung. Die Ergebnisse werden in mmol/l ausgedrückt; für diese Untersuchungen waren nur die Ca-Werte von Interesse. Das Gerät wurde mit den vom Hersteller vorgegebenen Einstellwerten (Acetylen-Luft) betrieben. Zur Kalibrierung wurde die Bezugswertlösung der Fa. C. Zeiss verwendet.

Seren

Die verwendeten Patientenserum wurden vom Kreiskrankenhaus Aalen zur Verfügung gestellt. Die Kontrollseren (Firmen: Gödecke, Berlin; Merz + Dade, München; E. Merck, Darmstadt; Boehringer, Mannheim; Behring, Marburg; Asid Bonz, Unterschleißheim) wurden nach Herstellerangaben aufbereitet und gelagert.

Die für die Sulfatbestimmung erforderliche Proteinabtrennung erfolgte durch Zusatz von 200 µl Trichloressigsäure-Lösung (80 g/l) zu 500 µl Serum. Unter diesen Bedingungen treten keine Sulfatverluste durch Mitfällung auf (8).

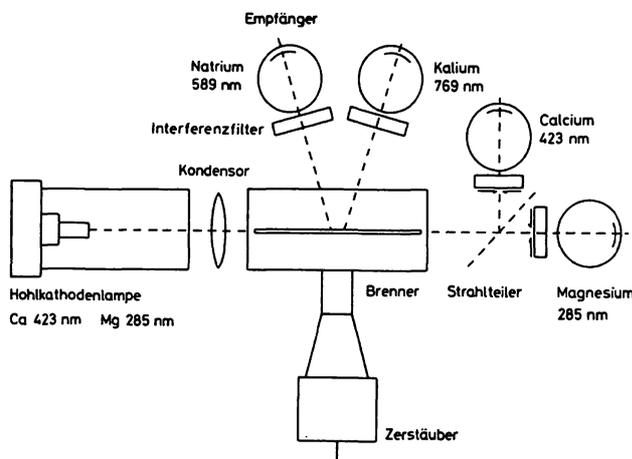


Abb. 1. Schematisches Bild des Elektrolytautomaten FL 6.

Reagenzien

Verdünnungslösungen

Lösung 1: Verdünnungslösung C. Zeiss: 0,1 mol/l HCl; 0,1 g/l Cs, Netzmittel

Lösung 2: 5 mmol/l HCl; 0,1 g/l Cs; 5 mmol/l bzw. 10 mmol/l La.

Standardlösung

Aus der Bezugswertlösung (C. Zeiss) wurde durch 1:50 Verdünnung mit jeder der Verdünnungslösungen eine Kalibrierlösung mit 2,5 mmol/l Ca hergestellt. Alle Verdünnungen wurden mit einem Dilutor (C. Zeiss) durchgeführt.

Die bei der Sulfatbestimmung benutzten Reagenzien (E. Merck) waren vom Reinheitsgrad z.A..

Experimentelle Ergebnisse

Unterdrückung der Störung durch Phosphat

Die Wirksamkeit der apparativen Maßnahmen zur Unterdrückung von Störungen durch Phosphat wurden an Kontroll- und Humanserum durch Ca-Bestimmung mit und ohne La-Zusatz geprüft.

An 144 Patientenserum mit unbekanntem Phosphatgehalt wurden nach Verdünnen (1:50) mit Lösung 1 bzw. Lösung 2 (5 mmol/l La) jeweils eine Doppelbestimmung durchgeführt. Die Unterschiede der ermittelten Ca-Gehalte betragen weniger als 2%, bezogen auf die Werte mit La-Zusatz.

In einer weiteren Meßreihe wurden die Ca-Gehalte von Patientenserum mit gegenüber dem Normalwert erheblich erhöhten Phosphatgehalten nach Verdünnen mit Lösung 1 bzw. Lösung 2 (10 mmol/l La) gemessen. Die Bestimmung der Phosphatgehalte erfolgte nach Enteiweißung photometrisch durch die Reaktion mit Ammoniummolybdat und Reduktion zu Molybdänblau (9). Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß trotz der relativ hohen Phosphatgehalte der Seren auch ohne La-Zusatz keine Störung durch Phosphat auftritt.

An 28 verschiedenen Kontrollserum wurden in analoger Weise die Ca-Gehalte bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 2 mit den Sollwerten und den relativen Abweichungen $((c_{La} - c_o)/c_{La})$ zusammengestellt. Man erkennt, daß bei den Seren 10, 17, 21, 23, 25, 26, 28 der Ca-Wert

Tab. 1. Vergleich der mit und ohne Lanthanzusatz ermittelten Ca-Werte von Humanserum mit erhöhtem Phosphatgehalt.

Phosphatgehalt (mmol/l) ²⁾	Ca-Gehalt (mmol/l) ¹⁾	
	ohne La-Zusatz	mit La-Zusatz ³⁾
6,3	2,01	1,99
6,5	1,87	1,87
8,3	2,20	2,15
8,4	2,43	2,39
10,5	1,84	1,83

1) Mittelwerte aus zwei Bestimmungen

2) „Normal“werte (14): Erwachsene 0,8–1,6 mmol/l
Kinder 1,3–2,3 mmol/l

3) Lösung 2 mit 10 mmol/l La

ohne La-Zusatz außerhalb, mit La-Zusatz innerhalb des Vertrauensbereichs des Sollwertes liegt. Bei allen anderen Kontrollserum liegen beide Analysenwerte innerhalb des Vertrauensbereichs des betreffenden Sollwertes. Da zwischen den relativen Abweichungen und den Phosphatgehalten der Kontrollserum (0,8–2,5 mmol/l) keine Korrelation festgestellt werden konnte, wurde in einem Teil der Kontrollserum Sulfat bestimmt.

Untersuchung der Störung durch Sulfat

Bestimmung von Sulfat im Serum

Die Sulfatbestimmung erfolgte mit einer Mikromethode, die sich bei der Bestimmung niedriger Schwefelgehalte in Metallen gut bewährt hat (10). In einer speziellen Apparatur wurden die enteiweißten Seren (10–50 µl, je nach S-Gehalt) mit 5 ml einer Säuremischung (150 ml HI, 100 ml Ameisensäure, 26 ml 500 g/kg H₃PO₂ (hypo-

phosphorige Säure), 0,1 g Sb_2O_3) erhitzt. Dabei wurde Sulfat zu H_2S reduziert, das mittels eines N_2 -Stromes in eine Vorlage mit 1 ml NaOH-Lösung (4 g/l NaOH) überführt und mit einer $CdCl_2$ -Lösung ($1 \mu l \approx 113,6 \text{ ng S}$) und Dithizon als Indikator unter Verwendung einer Mikrokolbenbürette titriert wurde.

Da andere schwefelhaltige Verbindungen oder Ionen durch die verwendete Säuremischung ebenfalls zu H_2S reduziert werden, war sicherzustellen, daß der ermittelte Schwefelgehalt als Sulfat im Serum vorliegt. Bei einigen Seren wurde deshalb durch Mitfällung an $BaCrO_4$ (11) eine Abtrennung des Sulfats vorgenommen und anschließend der Schwefel im $BaCrO_4$ -Niederschlag bestimmt. Es wurde gute Übereinstimmung mit den S-Werten ohne Abtrennung erhalten. Durch Aufstocken mit bekannten Sulfatmengen wurde eine Trennausbeute der Mitfällung von > 95% ermittelt.

Die Analyseergebnisse sind in der letzten Spalte der Tabelle 2 aufgeführt. In Abbildung 2 sind die relativen Abweichungen der Ca-Gehalte den ermittelten Sulfatwerten gegenübergestellt.

Tab. 2. Vergleich der mit und ohne Lanthanzusatz ermittelten Ca-Werte der Kontrollseren.

Serum Nr.	Ca-Gehalt (mmol/l) ¹⁾ Sollwert ²⁾ $\bar{x} (\pm 2s)$	Ca-Gehalt (mmol/l)		$\frac{c_{La} - c_o}{c_{La}}$	Sulfat-Gehalt (mmol/l)
		ohne La-Zusatz c_o	mit La-Zusatz ³⁾ c_{La}		
1	2,85 (0,24)	3,02	3,06	0,0131	n. b. ⁴⁾
2	2,30 (0,20)	2,29	2,30	0,0043	n. b.
3	1,70 (0,10)	1,65	1,70	0,0294	< 0,1
4	2,30 (0,22)	2,38	2,39	0,0042	n. b.
5	2,69 (0,11)	2,63	2,66	0,0113	n. b.
6	3,43 (0,13)	3,30	3,34	0,0120	n. b.
7	1,51 (0,09)	1,44	1,44	0,0000	n. b.
8	1,99 (0,16)	2,01	2,00	-0,0050	n. b.
9	2,00 (0,10)	2,02	2,01	-0,0050	n. b.
10	2,38 (0,12)	2,24	2,41	0,0705	n. b.
11	2,30 (0,20)	2,39	2,38	-0,0042	0,87
12	2,15 (0,20)	2,13	2,18	0,0229	n. b.
13	3,05	2,90	2,91	0,0034	n. b.
14	3,15 (0,10)	3,09	3,13	0,0128	n. b.
15	3,5 (0,30)	3,35	3,50	0,0429	n. b.
16	2,48 (0,18)	2,39	2,50	0,0440	n. b.
17	2,30 (0,15)	2,11	2,33	0,0944	12,65
18	3,22 (0,22)	3,07	3,26	0,0583	n. b.
19	2,15 (0,20)	2,14	2,18	0,0183	5,70
20	3,5 (0,30)	3,36	3,48	0,0345	n. b.
21	3,23 (0,17)	2,38	3,25	0,2677	26,79
22	2,33 (0,20)	2,31	2,32	0,0043	0,5
23	3,35 (0,25)	2,67	3,43	0,2216	25,55
24	3,15 (0,10)	3,03	3,09	0,0194	n. b.
25	2,45 (0,20)	1,98	2,54	0,2205	26,29
26	2,43 (0,23)	2,25	2,61	0,1379	18,60
27	2,35 (0,15)	2,35	2,44	0,0369	1,36
28	2,52 (0,18)	2,18	2,64	0,1742	17,61

1) Mittelwerte aus 4 Bestimmungen (Standardabweichung < 0,02 mmol/l)
 2) Herstellerangaben
 3) Lösung 2 mit 5 mmol/l La
 4) nicht bestimmt

Zusatz von Sulfat zu einem Mischserum

Ein Mischserum (Ca-Gehalt: 2,38 mmol/l) wurde mit unterschiedlichen Mengen an Sulfat ($(NH_4)_2SO_4$) versetzt. Nach entsprechender Verdünnung mit Lösung 1 wurde der Ca-Gehalt bestimmt. Die relativen Abweichungen als Mittelwerte von jeweils 5 Bestimmungen, bezogen auf den Meßwert ohne Sulfatzusatz, sind in Abbildung 2 mit eingezeichnet.

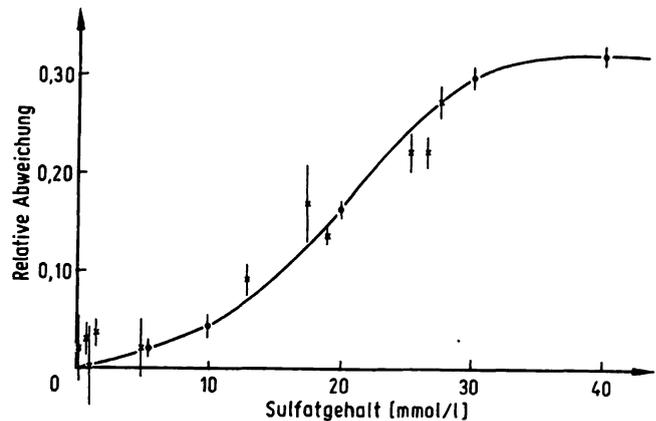


Abb. 2. Relative Abweichung der Ca-Gehalte $((c_{La} - c_o)/c_{La})$ in Abhängigkeit von der Sulfatkonzentration. Die angegebene Streubreite (2s) wurde aus den Standardabweichungen der Meßwerte c_o und c_{La} berechnet. x = Kontrollseren; • = Mischserum mit $(NH_4)_2SO_4$ -Zusatz.

Diskussion der Ergebnisse

Die hier mit dem Elektrolytautomaten FL 6 durchgeführten Messungen zeigen, daß durch die optimale Abstimmung des Zerstäubers und des Brenners auf die zu analysierende Matrix die Phosphatstörung auch mit der Acetylen-Luft-Flamme auf einen vernachlässigbaren Wert reduziert werden kann, ohne den Lanthanzusatz verwenden zu müssen. Das in der Verdünnungslösung vorhandene Cs dient lediglich als Ionisationspuffer bei gleichzeitiger Messung von Na und K. Die Abweichungen der mit und ohne La-Zusatz an Patientenseren mit normalen und erhöhten Phosphatgehalten (vgl. Tab. 1) ermittelten Ca-Werte sind < 2%.

Wie aus Tabelle 2 ersichtlich, treten bei manchen Kontrollseren erhebliche Abweichungen vom Sollwert auf. Bei der Auftragung der relativen Abweichung des Ca-Gehalts gegen den gefundenen Sulfat-Gehalt (Abb. 2) erkennt man eine gute Korrelation. Im gleichen Diagramm sind die Ergebnisse von Versuchen mit Sulfatzusatz eingezeichnet, bei denen zu einem Mischserum Ammoniumsulfat zugesetzt wurde. Die erhaltenen Ergebnisse für die unterschiedlichen Kontrollseren stimmen sehr gut mit den Werten für das Mischserum überein. Man muß dabei berücksichtigen, daß die Kontrollseren teilweise unterschiedliche Zusammensetzung haben. Dies zeigt sich besonders im Gesamteiweißgehalt, der bei den unterschiedlichen Seren zwischen 50 und 70 g/l variiert.

Da Albumin und Globulin Calcium komplex zu binden vermögen (12), wird durch unterschiedliche Konzentration dieser Proteine der Anteil an freiem Ca stark beeinflusst. Sulfat bildet jedoch primär mit dem freien Calcium in der Flamme das schwerdissoziierbare CaSO_4 , so daß die unterschiedlichen Anteile an freiem Ca in den verschiedenen Seren verantwortlich für die Abweichungen von der Kurve (Abb. 2) sein können. Der Kurvenverlauf ist typisch für eine Verdampfungsblockierung in der Atomabsorptionsspektrometrie (13). An 6 Humanseren wurde nach dem hier beschriebenen Verfahren der Sulfatgehalt zu 0,5 mmol/l bestimmt; der „Normal“be-

reich wird mit 0,3 bis 0,9 mmol/l SO_4^{2-} angegeben (14). Der Sulfatgehalt der Kontrollseren ist demgegenüber bis um den Faktor 50 erhöht. Dies steht im Widerspruch zu der Forderung, daß Kontrollprobe und Analysenprobe möglichst ähnliche Zusammensetzung haben sollten (1). Werden solche Kontrollseren zur Richtigkeitskontrolle der Ca-Bestimmung benutzt, so können die auftretenden systematischen Abweichungen vom Sollwert kosten- und zeitaufwendige Fehlersuche verursachen. Die Hersteller sollten daher bemüht sein, den Sulfatgehalt von Kontrollseren auf Werte unterhalb der oberen Grenze des „Normal“bereichs einzustellen.

Literatur

1. Stamm, D. (1974) *Z. Klin. Chem. Klin. Biochem.* 12, 137–145.
2. Willis, J. B. (1960) *Spectrochim. Acta* 16, 259–272.
3. Pybus, J., Feldman, F. J. & Bowers, G. N. (1970) *Clin. Chem.* 16, 998–1007.
4. Magill, W. A. & Svehla, G. (1974) *Z. Anal. Chem.* 268, 177–180.
5. Hwang, J. Y. & Sandomato, L. M. (1969) *Anal. Chim. Acta* 48, 188–191.
6. Komárek, J., Jambor, J. & Sommer, L. (1972) *Z. Anal. Chem.* 262, 94–96.
7. Böttger, K. & Meder, B. (1978) *Zeiss Information* 23, Heft 86, 11–14.
8. Cole, D. E. C., Mohyuddin, F. & Scriver, C. R. (1979) *Anal. Biochem.* 100, 339–342.
9. Empfehlungen der Deutschen Gesellschaft für klinische Chemie (1976) *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 14, 161–164.
10. Watson, A., Grallath, E., Kaiser, G. & Tölg, G. (1978) *Anal. Chim. Acta* 100, 413–428.
11. Wern, W. (1980) Ingenieur-Abschlußarbeit, Fachhochschule Aalen.
12. Perrin, D. D. & Agarwal, R. P. (1973) in *Metal ions in biological systems* (Sigel, H., ed.) New York: Marcel Dekker.
13. Pinta, M. (1975) *Atomic Absorption Spectrometry*. London: Adam Hilger.
14. Diem, K. & Lentner, C. (Red.) (1975) *Wissenschaftliche Tabellen*. Stuttgart: Georg Thieme.

Wolfgang Schulz
 Fachhochschule Aalen, Fachbereich Chemie
 D-7080 Aalen
 Postfach 1728