

69, 139 (1956). — <sup>49</sup> SACHS, B. A., P. CADY and G. ROSS: Amer. J. Med. 17, 662 (1954). — <sup>50</sup> SACHS, B. A., and G. ROSS: Cancer (Philad.) 11, 640 (1958). — <sup>51</sup> SCHRADE, W., E. BÖHLE, R. BIEGLER, H. BRUCH: Folia haemat. N. F. 2, 337 (1958). — <sup>52</sup> SCHRADE, W., E. BÖHLE u. H. BRUCH: Klin. Wschr. 34, 695 (1956). — <sup>53</sup> SCHULTZE, H. E.: Klin. d. Gegenw. 9, 407 (1960). — <sup>54</sup> SCHULTZE, H. E.: Scand. J. clin. Lab. Invest. 10, 135 (1957). — <sup>55</sup> SCHULTZE, H. E., R. SCHMIDTBERGER u. H. HAUPT: Biochem. Z. 329, 490 (1958). — <sup>56</sup> SIEGEL, E., B. A. SACHS and F. A. GRATZ: Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 101, 53 (1959). — <sup>57</sup> SMITH, E. L., D. M. BROWN, M. L. MCFADDEN, N. BUETTNER-JANUSCH and B. V. JAGER:

J. biol. Chem. 216, 601 (1955). — <sup>58</sup> SONNET, J., L. LOUIS u. J. HEREMANS: Acta haemat. (Basel) 14, 193 (1955). — <sup>59</sup> SPENGLER, G. A., D. L. A. ROULET, R. BÜTLER, A. HÄSSIG u. G. RIVA: Schweiz. med. Wschr. 90, 1261 (1960). — <sup>60</sup> STARY, Z., F. BURSA, O. TEZOK u. R. CINDI: Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 288, 55 (1951). — <sup>61</sup> WAGNER, A. Klin. Wschr. 38, 1187 (1960). — <sup>62</sup> WIEDERMANN, B., R. PODIVINSKY, Z. VODICKA u. M. JANICEK: Neoplasma, Ceskoslov. Onkologia 4, 366 (1957). — <sup>63</sup> WUKETICH, ST., u. G. SIEGMUND: Dtsch. Arch. klin. Med. 205, 213 (1958). — <sup>64</sup> WUKETICH, ST., u. G. SIEGMUND: Wien. klin. Wschr. 69, 977 (1957). — <sup>65</sup> WUKETICH, ST., u. G. SIEGMUND: Wien. klin. Wschr. 70, 553 (1958).

## Die enzymatische Bestimmung von Glucose und Fructose nebeneinander

Von

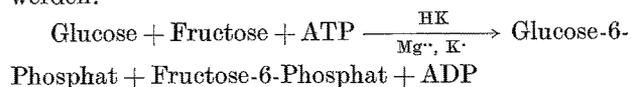
F. H. SCHMIDT

Aus den medizinischen Forschungslaboratorien der Firma C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim (Leiter: Prof. Dr. J. D. ACHELIS)

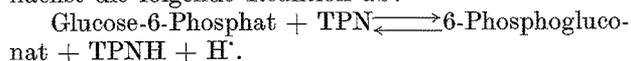
Die quantitative Bestimmung von Fructose wird im allgemeinen mittels der Resorcin-Methode nach ROE durchgeführt<sup>1</sup>. Hierbei führt die Anwesenheit anderer Zucker, insbesondere Glucose, zu erheblichen Störungen. Die chromatographische Abtrennung der Fructose ist zeitraubend und mit Verlusten verbunden. Glucose vor der Fructosebestimmung durch Glucoseoxydase (GOD) zu Gluconsäure umzusetzen und damit der Oxymethylfurfurol-Reaktion zu entziehen, ist mit Erfolg von FRÖSCH u. Mitarb.<sup>2</sup> beschrieben worden. Für die Bestimmung von Ribose in biologischem Material hat sich das Verfahren der Glucoseoxydation mittels GOD ebenfalls bewährt<sup>3</sup>. Der Nachteil dieses Vorgehens besteht darin, daß im Versuchsansatz nicht gleichzeitig beide Hexosen nebeneinander bestimmt werden können. Darüber hinaus ist eine relativ lange Inkubationsdauer nötig. Außerdem werden andere, die Resorcin-Reaktion störende Kohlenhydrate und Aminozucker nicht entfernt.

Verfahren, Glucose und Fructose in einem Versuchsansatz enzymatisch zu bestimmen, sind bislang nicht durchgeführt worden. Mit Hilfe der Enzyme Hexokinase (HK)\*, Phosphohexoseisomerase (PHI)\*, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH)\*, ist es möglich, Glucose und Fructose nebeneinander im optischen Test zu ermitteln.

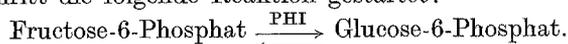
Die Bestimmung erfolgt in der Weise, daß nach Zugabe von Hexokinase sowohl Glucose als auch Fructose in Gegenwart von ATP phosphoryliert werden.



In Gegenwart von G-6-PDH und TPN läuft zunächst die folgende Reaktion ab:



TPNH ist in diesem System Meßgröße. Durch Zugabe von PHI wird in einem zweiten Enzymschritt die folgende Reaktion gestartet:



Im Gleichgewichtszustand liegt G-6-P zu 68% und F-6-P zu 32% vor<sup>4</sup>. In Gegenwart von G-6-PDH und TPN wird aber G-6-P kontinuierlich aus dem Gleichgewicht entfernt, so daß die Reaktion völlig in

Richtung G-6-P abläuft. Durch geeignete, zeitlich hintereinander geschaltete Zugabe der einzelnen Enzyme kann man im gleichen Versuchsansatz auch G-6-P bestimmen. Für die Erfassung von F-6-P neben G-6-P startet man zunächst die Reaktion mit G-6-PDH und TPN. Nach Stillstand der Reaktion erfolgt Zugabe von PHI für die Bestimmung von F-6-P. Da das die TPN-abhängige Folgereaktion 6-Phosphogluconat  $\rightleftharpoons$  Ribulose-5-Phosphat + CO<sub>2</sub> katalysierende Enzym 6-Phosphogluconatdehydrogenase nur in kaum meßbaren Aktivitäten in den verwendeten Enzympräparationen vorhanden ist, werden hierdurch keine zu hohen Werte an einzelnen Hexosen bzw. Hexosephosphaten vorgetäuscht, wie dies von PFLEIDERER und GREIN<sup>5</sup> bei der Glucosebestimmung mittels HK und G-6-PDH gefunden wurde.

Die Reaktion für die Glucosebestimmung läuft bei Konzentrationen bis 100  $\gamma$  Glucose pro Ansatz innerhalb von 1—4 min ab, bei Konzentrationen bis 100  $\gamma$  Fructose-Ansatz innerhalb von 8—22 min. Bei geringerer Konzentration ist die Bestimmung beider Hexosen innerhalb weniger Minuten durchzuführen. Die von FRUNDER<sup>6</sup> u. Mitarb. bei der Glucosebestimmung benötigten Reaktionszeiten von über 40 min bei einer Glucose-Konzentration bis 20  $\gamma$  bzw. 120 min bei 50  $\gamma$  Ansatz sind bei den hohen Umsatzzahlen der „Boehringer“-Enzympräparationen nicht erforderlich. Die Einhaltung weiterer Kautelen wie N<sub>2</sub>-Begasung und O<sub>2</sub>-Ausschluß haben sich als überflüssig erwiesen. Lediglich bei hohen Fructose-Konzentrationen (ab 25  $\gamma$ /Ansatz) stellt sich nach Ablauf der Glucoseumsetzung eine konstante Extinktionszunahme ohne PHI-Zugabe ein, die zu hohe Glucosewerte vortäuschen kann. Dieser Gang ist durch eine Aktivität von <0,6% PHI in der HK bedingt<sup>7</sup>.

Andere in der HK\* vorhandene Enzymverunreinigungen stören die Reaktion nicht. Dies gilt auch für Glutathionreduktase (Aktivität <0,5%), da in Gegenwart von Glutathion, ox. (5, 10 und 25  $\gamma$ /Ansatz) theoretische Glucose-Konzentrationen ermittelt wurden.

Mannose und Glucosamin werden durch HK ebenfalls phosphoryliert; die entsprechenden Phosphorsäureester stören aber den optischen Test nicht, da insbesondere bei Mannose-6-Phosphat keine Isomerisierung festgestellt werden konnte.

\* Als Kristallsuspensionen der Fa. C. F. Boehringer & Soehne GmbH, Mannheim, im Handel.

\* Die spezifische Aktivität beträgt in der Definition nach RACKER<sup>8</sup> 140 Einheiten/mg Enzymprotein.

Durch Extrapolation der Extinktionszunahme werden sowohl richtige Glucose- als auch Fructose-Werte gemessen. In Konzentrationen unter 25  $\gamma$  Fructose im Ansatz ist der Fehler zu vernachlässigen.

*Material*

1. *Enteweißungslösung.* Lösung 1: 4,5 g Ba(OH)<sub>2</sub> · 8H<sub>2</sub>O in 100 ml Aqua bidest. Lösung 2: 5%ige ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O.
2. *Lösungen für den Phototest.* TRA-Puffer pH 7,6 0,05 m; MgCl<sub>2</sub>-Lösung 0,1 m (952,3 mg in 100 ml); ATP 8,5  $\mu$ Mol (51,4 mg in 1 ml). Hexokinase (100  $\gamma$  in 0,05 ml); G-6-PDH (2 mg in 1 ml); PHI (2 mg in 1 ml); TPN (5 mg in 1 ml).

*Methode*

0,1 ml Hexosen-Gemisch, Blut oder andere biologische Flüssigkeiten, werden in 0,2 ml Lösung 2 gegeben, mit 0,2 ml Lösung 1 versetzt und anschließend mit 0,5 ml Aqua bidest. auf das Volumen von 1 ml gebracht und zentrifugiert.

Der Reihe nach werden zusammengegeben: 3,1 ml TRA; 0,1 ml MgCl<sub>2</sub>-Lösung; 0,1 ml ATP; 0,05 ml Hexokinase; 0,05 ml G-6-PDH; 0,5 ml enteweißte Flüssigkeit; nach Messung der Extinktion wird mit 0,1 ml TPN gestartet.

Messung mit Photometer Eppendorf, Filter Hg 366 nm. Schichtdicke 20 mm.

Die Extinktionsdifferenz wird in Abständen von 1 min gemessen und nach Stillstand der Reaktion — dies ist bei Konzentrationen bis 100  $\gamma$  Glucose/Ansatz nach 1—4 min der Fall — werden 0,05 ml PHI zugegeben und der erneut ablaufende Extinktionszuwachs gemessen.

In Gegenwart von 25  $\gamma$  und mehr Fructose/Ansatz verbleibt — bedingt durch die PHI-Begleitaktivität in HK — ein geringer Gangwert. In diesem Fall wird die durch den Gangwert hervorgerufene Extinktionszunahme auf  $t = 0$  extrapoliert und der Extinktionsdifferenz nach PHI-Zugabe zugerechnet; bei der Bestimmung der Glucosekonzentration wird dann der auf  $t_0$  reduzierte  $\Delta E$ -Wert der Extinktionszunahme für die Berechnung eingesetzt.

*Berechnung*

$$\Delta E \cdot \frac{4 \cdot 180}{3,3 \cdot 2} = \Delta E \cdot 109 = \gamma \text{ Glucose bzw. Fructose/Ver-} \\ \text{suchsansatz.}$$

Für die Bestimmung im Blut gilt  $\Delta E \cdot 214,7 = \text{mg. \%}$  Glucose bzw. Fructose.

Der Faktor 214,7 ergibt sich aus der Verdünnung und der Enteweißung des eingesetzten Blutvolumens. Blut enthält etwa 80% seines Gewichts an Flüssigkeit; 1 ml Blut wiegt 1,06 g. Bei Einsatz von 0,1 ml Blut = 0,106 g ergibt die Enteweißung  $0,106 \cdot 80/100 + 0,9 = 0,985$  ml Extrakt. Davon werden 0,5 ml für den Test eingesetzt.

*Ergebnisse*

Aus Abb. 1 geht hervor, daß bei der Bestimmung der Glucose strenge Proportionalität zwischen 5 und 100  $\gamma$ /Versuchsansatz besteht. Die gleiche gute Proportionalität besteht auch bei Verwendung von Fructose als Substrat (Abb. 2).

In Gegenwart von Konzentrationen bis 50  $\gamma$  Fructose/Ansatz sind Meßdauern bis 14 min ausreichend. Darüber hinausgehende Substratkonzentrationen (bis 100  $\gamma$ /Ansatz) benötigen Meßdauern bis 22 min; Glukosekonzentrationen bis 100  $\gamma$ /Ansatz sind innerhalb von 4 min umgesetzt.

Der durch die PHI-Begleitaktivität in der HK-Präparation bedingte Gangwert ist abhängig von der Fructose-Konzentration im Versuchsansatz, wie dies durch Abb. 3 demonstriert wird. Die auf  $t_0$  extrapolierten Extinktionsdifferenzen gestatten aber, auch in Gegenwart sehr hoher Fructosekonzentrationen, die richtige Glucosekonzentration zu ermitteln. Für die Ermittlung der Fructose-Konzentration muß dieser auf  $t_0$  extrapolierte Gangwert der Extinktionsdifferenz nach PHI-Zusatz zugeschlagen werden. Der Gangwert

beträgt bei 50  $\gamma$ /Ansatz etwa 0,02/min. Bei Fructosekonzentrationen unter 25  $\gamma$ /Ansatz ist der Fehler zu vernachlässigen.

Abb. 4 demonstriert die Kinetik einer kombinierten Glucose- und Fructose-Bestimmung. Bei Verwendung von Blut als Untersuchungsmaterial sind Störreaktionen nicht nachgewiesen worden.

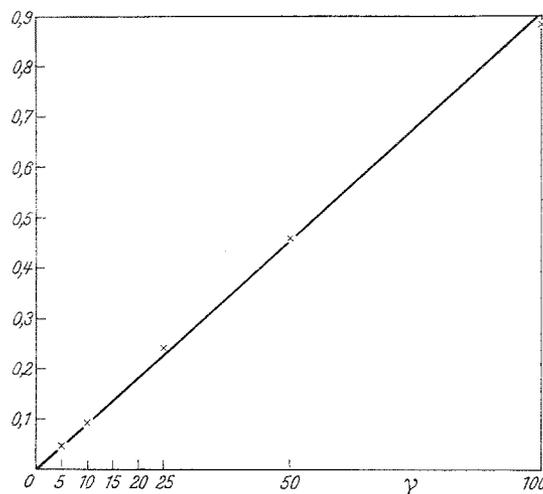


Abb. 1. Glucose-Eichkurve (Testzusammensetzung wie im Text beschrieben)

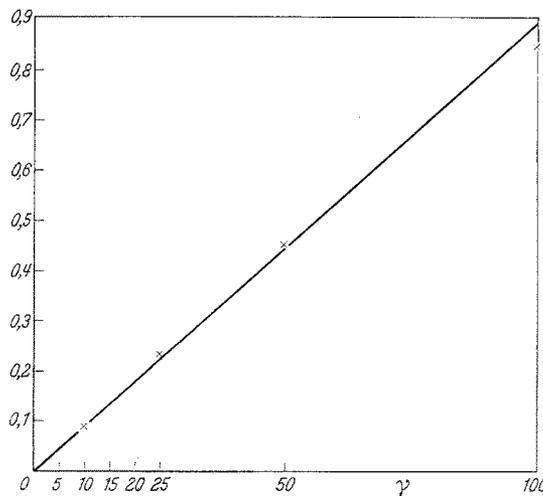


Abb. 2. Fructose-Eichkurve (Testzusammensetzung wie im Text beschrieben)

Tabelle 1. Glucose- und Fructosebestimmung in wäßriger Lösung bei variierenden Konzentrationen

Eingesetzt		Gefunden	
Glucose ( $\gamma$ )	Fructose ( $\gamma$ )	Glucose ( $\gamma$ )	Fructose ( $\gamma$ )
10	0	9,8	0
25	0	25	0
25	2,5	25,1	2,7
25	25	26,1	23,4
25	50	26,1	48,6
25	100	26,4	93
50	0	49,2	0
50	5	48,6	5,2
50	50	47	48,2
100	0	96	0
0	50	0	47,8
0	100	0	93,9

In Tabelle 1 sind die Meßergebnisse variierender Glucose- und Fructose-Konzentrationen in wäßriger Lösung dargelegt. Hierbei ergaben sich gut übereinstimmende Recoveries.

Bei der Bestimmung von Glucose neben Fructose im Blut läuft die Enzymreaktion ebenfalls innerhalb weniger Minuten ab, zugesetzte Fructose wird unter

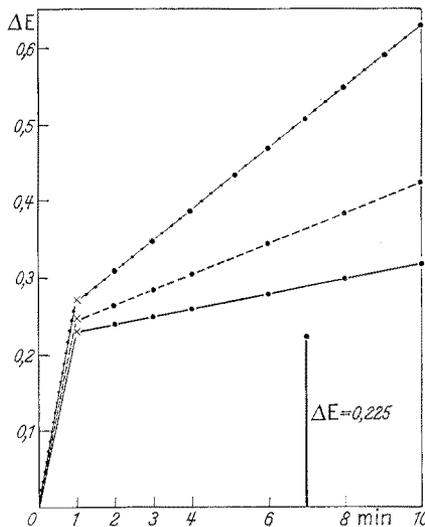


Abb. 3. Kinetik der Glucosebestimmung in Gegenwart von Fructose (25  $\mu$  Glucose/Ansatz neben 25, 50 und 100  $\mu$  Fructose/Ansatz) Testzusammensetzung wie im Text ohne P.H.I. 25  $\mu$  Fructose —; 50  $\mu$  Fructose - - -; 100  $\mu$  Fructose ······

Beachtung des Vorhergesagten exakt wiedergefunden (Abb. 5).

In Tabelle 2 sind Blut-Recoveries sowohl von Glucose als auch von Fructose aufgeführt. Den Blut-

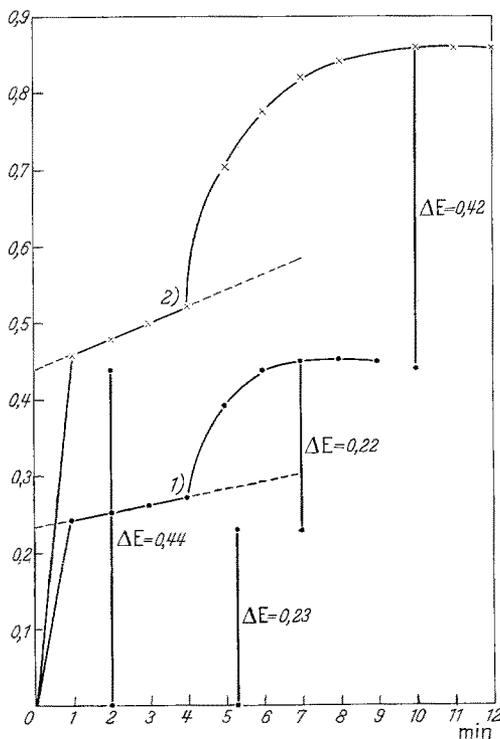


Abb. 4. Kinetik der kombinierten Glucose- und Fructose-Bestimmung. 1. 25  $\mu$  Glucose + 25  $\mu$  Fructose; 2. 50  $\mu$  Glucose + 50  $\mu$  Fructose

proben zugesetzte Fructose bzw. Glucose war unter Berücksichtigung der bereits vorliegenden Konzentrationen gut zurückbestimmbar. Die nativ vorliegenden Fructose-Konzentrationen sind bei Verwendung von Kaninchenblut (nüchtern) sehr gering und geben nach Isomerase-Zusatz nur sehr geringe Extinktionszunah-

Tabelle 2. Recovery-Versuche nach Zusatz von Glucose bzw. Fructose zu Kaninchenblut

Glucose ( $\mu$ /Ansatz)		Fructose ( $\mu$ /Ansatz)	
zugesetzt	gefunden	zugesetzt	gefunden
0	38,2	0	1,1
50	87,2	0	1,1
25	63,2	25	25,0
		50	49,1

men. Unsere Werte von 1—3 mg-% sind in guter Übereinstimmung mit der Literatur.

Vergleiche mit der GOD/POD- und der Hexokinase-Methode gaben gute Übereinstimmung (Tabelle 3). Mit beiden Methoden ermittelte Werte liegen im Kaninchenblut etwa 20—35 mg-% unter

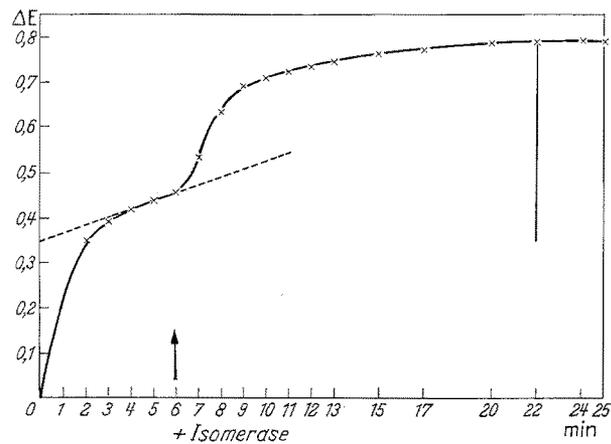


Abb. 5. Beispiel einer Fructose-Bestimmung im Blut in Gegenwart von Glucose, nach Zugabe von Fructose; Endkonzentration 100 mg-%

Tabelle 3. Vergleich der Blutglucosespiegel bei verschiedenen Tierespecies mit nach GOD/POD-Reaktion gefundenen Werten

	Glucose (mg-%)	
	Hexokinase	GOD/POD
Ratte (nüchtern) . . .	65,4	63,0
	62,0	60,0
Kaninchen (nüchtern) .	82	87
	77	81
	98	101
	100	106
Mensch (nüchtern) . .	76	81
	72	81
	82	87
	84	84
	80	81

Hagedorn-Jensen-Werten. Die Übereinstimmung der beiden enzymatischen Verfahren gibt einen guten Hinweis für die Richtigkeit der durch GOD/POD-Reaktion gefundenen Glucosewerte. Für die Routinebestimmung im klinischen Laboratorium dürfte diese Reaktion vor allem ihrer hohen Spezifität wegen die Methode der Wahl darstellen. Uns hat sich die GOD-POD-Methode an bisher über 50000 Bestimmungen gut bewährt. Ausführliche Ergebnisse mit der GOD-POD-Methode werden an anderer Stelle berichtet.

**Zusammenfassung.** Es wird eine enzymatische Methode beschrieben, die eine spezifische Bestimmung von Glucose und Fructose im gleichen Versuchsansatz gestattet. Die gekoppelten enzymatischen Reaktionen benötigen die Enzyme Hexokinase, Glucose-6-Phosphatdehydrogenase und Phosphoglucoseisomerase,

TPNH ist Meßgröße. Neben den beiden Hexosen sind auch deren 6-Phosphorsäureester bestimmbar. Die hohen Umsatzzahlen der Boehringer-Enzympräparationen gestatten kurze Meßzeiten.

Mittels GOD-POD-Reaktion gefundene Blutglucosewerte werden durch Parallelbestimmungen mit der beschriebenen Methode bestätigt.

Bei der Durchführung der Versuche wurde ich von Frau G. BEIKIRCH und Frau H. BISON unterstützt.

**Literatur.** <sup>1</sup> ROE, J. H., J. H. EPSTEIN and N. P. GOLDSTEIN: A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J. biol. Chem.* **178**, 839 (1949). — <sup>2</sup> FROESCH, E. R., and A. E. RENOLD: Specific enzymatic determination of glucose in blood and urine using glucose oxidase. *Diabetes* **5**, 1–6 (1956). — <sup>3</sup> NAGEL, W., N. SAN-

PITAK u. F. WILLIG: Eine Methode zur Bestimmung von D-Ribose in Gegenwart von Hexosen und ihre Anwendung bei Untersuchungen über die Pentose-Verwertung von normalen und malignen Geweben. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **326**, (1961, im Druck). — <sup>4</sup> SLEIN, M. W.: In S. P. COLOWICK u. N. O. KAPLAN, *Methods in enzymology*, Bd. I, S. 305, Phosphohexoseisomerasen in Muscle. New York: Academic Press 1955. — <sup>5</sup> PFLEIDERER, G., u. I. GREIN: Eine enzymatische Bestimmung der D (+)-Glucose im Blut. *Biochem. Z.* **328**, 499–506 (1957). — <sup>6</sup> BÖRNIG, H., K. STADE, H. FRUNDE u. G. RICHTER: Der Stoffwechsel geschädigter Gewebe. IV. Blutzucker-, Leberglykogen- und Leberglykosekonzentrationen bei mit Tetrachlorkohlenstoff vergifteten Mäusen nach Glucosebelastung. *Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem.* **310**, 232 (1958). — <sup>7</sup> Boehringer-Information über „Hexokinase“, Januar 1961. — <sup>8</sup> RACKER, E.: The oxidative pentosephosphate cycle. II. Quantitative determination of intermediates and enzymes. *Arch. Biochem.* **74**, 306 (1958)

## Zur flammenphotometrischen Calciumbestimmung im Urin

Von

W. F. DILLER

Aus dem Zentralröntgeninstitut des Städt. Krankenhauses Leverkusen (Chefarzt: Priv.-Doz. Dr. A. LAUR)

Der Calciumstoffwechsel ist für den Röntgenologen und Onkologen interessant geworden durch die These, daß die Urin-Calciumausscheidung mit der Wachstumsgeschwindigkeit von osteolytischen Knochenmetastasen parallel gehen soll. Es erhebt sich die Frage nach einer geeigneten Bestimmungsmethode.

Die cerimetrische Titration des gefällten Calciums nach Versäuerung des Ausgangsmaterials wird heute als zuverlässigstes Verfahren angesehen<sup>12,15</sup> (Genauigkeit bei Serumcalciumbestimmungen  $\pm 0,5\%$ ). Die klassische Methode von KRAMER und TISDALL<sup>10</sup> bzw. deren übliche Modifikationen<sup>3,17</sup> sollen dagegen mit größeren Fehlern behaftet sein<sup>15</sup>.

Im klinischen Routinebetrieb erweisen sich diese Verfahren als zu umständlich. Für die Calciumbestimmung im Serum haben sich deshalb die komplexometrische und flammenphotometrische Methode eingebürgert; die zahlreichen Störfaktoren halten sich im Bluteserum innerhalb verhältnismäßig enger Grenzen und gestatten deshalb Genauigkeiten von etwa  $\pm 2\%$ <sup>13</sup> bzw.  $\pm 5\%$ <sup>14</sup>. Im Urin dagegen schwankt die Konzentration des Calciums, aber auch die der störenden Anionen, Kationen und Eiweißverbindungen innerhalb so großer Bereiche, daß sich mit beiden Methoden beträchtliche Fehler ergeben können<sup>5,8,14</sup>. Eine Flut von Modifikationen ist deshalb publiziert worden; fast immer werden dabei jedoch die entscheidenden Vorteile der komplexometrischen und der flammenphotometrischen Methode geopfert, nämlich ihre Einfachheit und Zeitersparnis.

Da sich in unserem Hause die flammenphotometrische Serumcalcium-Bestimmung bewährt hat, versuchten wir, diese Methode auch für die Urincalcium-Bestimmung einzurichten. Dabei befriedigten unsere Vorversuche mit initialer Calciumfällung<sup>5</sup> nicht; das Verfahren ist zeitraubend, umständlich und sehr störanfällig bei nicht peinlich exakt arbeitenden Hilfskräften; die Ausbeute war recht schwankend. Wir bemühten uns deshalb um andere, einfachere Möglichkeiten zur Beseitigung der hauptsächlichsten Störfaktoren bei der flammenphotometrischen Calciumbestimmung im Urin und möchten im folgenden darüber berichten.

### Vorversuche

Die Ausschaltung des Kationen-Fehlers (Na und K) gelingt weitgehend und einfach durch das „Korrekturverfahren“<sup>7</sup>, d. h. Korrektur für die flammenphotometrisch gefundenen Na- und K-Konzentrationen nach entsprechenden Eichkurven. Unsere Ca-Eichlösung enthält deshalb 15 mg-% Na und 10 mg-% K. Gegen den Bicarbonatfehler hilft Ansäuerung.

Zur weitgehenden Behebung des Phosphat- und Sulfatfehlers wählten wir das Parallelverfahren: Der deprimierende Effekt von  $\text{PO}_4$  und  $\text{SO}_4$  auf die Calciumemission soll von einem bestimmten  $\text{Ca}/\text{PO}_4$ - bzw.  $\text{Ca}/\text{SO}_4$ -Verhältnis ab über weite Bereiche dieser Anionen konstant sein<sup>1,7,9,11</sup>. Als Ursache wird die Bildung von schwer anregbaren Pyroverbindungen angesehen<sup>1</sup>. Das ermittelte Verhältnis differiert allerdings bei den einzelnen Autoren beträchtlich, was wohl auf verschiedene Untersuchungsbedingungen zurückzuführen ist. Außerdem scheint beim Phosphat ein geringer Unterschied zwischen organischen und anorganischen  $\text{PO}_4$ -Verbindungen zu bestehen<sup>2</sup>.

Wir haben deshalb zunächst geprüft, von welchem  $\text{Ca}/\text{PO}_4$ - bzw.  $\text{Ca}/\text{SO}_4$ -Verhältnis ab der Bereich der „konstanten Calciumdepression“ unter unseren Arbeitsbedingungen (s. unten) beginnt. Wie Abb. 1a zeigt, beträgt dieses  $\text{Ca}/\text{PO}_4$ -Verhältnis etwa 1:2, das  $\text{Ca}/\text{SO}_4$ -Verhältnis etwa 1:4. Eine wirkliche Konstanz der Calciumdepression liegt indessen bei unseren Arbeitsbedingungen nicht vor. Vielmehr nimmt der Depressionseffekt bei höheren  $\text{PO}_4$ -Konzentrationen wieder etwas ab, während er bei höheren  $\text{SO}_4$ -Konzentrationen noch etwas weiter ansteigt. Diese Änderungen sind jedoch so geringgradig, daß sie nach unserer Ansicht vernachlässigt werden können. Für praktische Belange darf man unterstellen, daß von einem  $\text{Ca}/\text{PO}_4$ -Verhältnis 1:2 bzw. von einem  $\text{Ca}/\text{SO}_4$ -Verhältnis 1:4 ab die weitere Konzentrationszunahme von  $\text{PO}_4$  und  $\text{SO}_4$  keinen Einfluß mehr auf die Calciumemission hat.

Wir möchten betonen, daß eine Änderung der Arbeitsbedingungen ganz andere Verhältnisse schaffen kann. Bei eigenen Kontrollversuchen fanden wir einmal zu unserer größten Überraschung überhaupt keine wesentliche Querbeeinflussung der Calciumemission durch  $\text{PO}_4$  und  $\text{SO}_4$ . Ursache dafür war eine beträchtliche Verschmutzung der Zerstäuberkantile des Flammenphotometers; dadurch wurde wesentlich weniger Probenflüssigkeit in die Flamme gebracht, so daß deren Temperatur natürlich anstieg. Wir gingen dieser Frage weiter nach und änderten in Kontrolluntersuchungen unsere Flammentemperatur mittels des Acetylendruckes (Abb. 1b). Dabei ergab sich, daß bei sinkendem Acetylendruck (sinkender Flammentemperatur!) sehr unübersichtliche Verhältnisse herrschen. Man sollte deshalb mit möglichst hohen Acetylendruck arbeiten.

Nachdem für unsere Arbeitsbedingungen das  $\text{Ca}/\text{PO}_4$ - bzw.  $\text{Ca}/\text{SO}_4$ -Verhältnis für die „konstante