

Allgemeine Methode des Ausgleichs- und Berechnungsverfahrens linear verlaufender Umsetzungen : mit einer Anwendung auf die colorimetrische Cholesterinbestimmung mit Hilfe des Lumetrons

Autor(en): **Dannacher, Sabine / Dannacher, Simon**

Objektyp: **Article**

Zeitschrift: **Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène**

Band (Jahr): **43 (1952)**

Heft 1

PDF erstellt am: **13.07.2024**

Persistenter Link: <https://doi.org/10.5169/seals-982638>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Inhalten der Zeitschriften. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern.

Die auf der Plattform e-periodica veröffentlichten Dokumente stehen für nicht-kommerzielle Zwecke in Lehre und Forschung sowie für die private Nutzung frei zur Verfügung. Einzelne Dateien oder Ausdrucke aus diesem Angebot können zusammen mit diesen Nutzungsbedingungen und den korrekten Herkunftsbezeichnungen weitergegeben werden.

Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Die systematische Speicherung von Teilen des elektronischen Angebots auf anderen Servern bedarf ebenfalls des schriftlichen Einverständnisses der Rechteinhaber.

Haftungsausschluss

Alle Angaben erfolgen ohne Gewähr für Vollständigkeit oder Richtigkeit. Es wird keine Haftung übernommen für Schäden durch die Verwendung von Informationen aus diesem Online-Angebot oder durch das Fehlen von Informationen. Dies gilt auch für Inhalte Dritter, die über dieses Angebot zugänglich sind.

Allgemeine Methode des Ausgleichs- und Berechnungsverfahrens linear verlaufender Umsetzungen

Mit einer Anwendung auf die colorimetrische Cholesterinbestimmung
mit Hilfe des Lumetrons

Von *Sabine Dannacher*

(Mitteilung aus dem kantonalen Laboratorium Zürich)

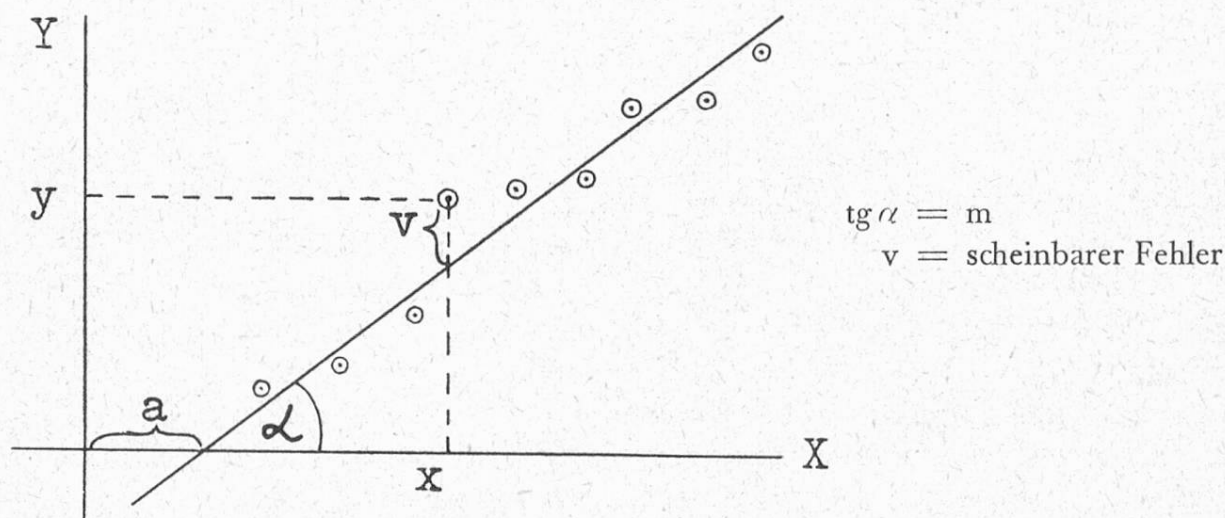
Mathematischer Teil von *Simon Dannacher*, Mathematiker, Frauenfeld

Einleitung

Um einen bestimmten Stoff als Bestandteil einer zusammengesetzten Substanz quantitativ bestimmen zu können, braucht man eine geeignete Reaktion dieses Stoffes, die ein gut messbares Umsetzungsprodukt liefert. Mathematisch spielt dabei die Menge des gesuchten Stoffes die Rolle des Argumentes (frei veränderliche Variable) und die Grösse des Umsetzungsproduktes die Rolle der Funktion (abhängige Variable). Zur Feststellung der Art dieser Funktion werden zunächst bekannte Mengen des Argumentes (reiner Stoff) umgesetzt und die zugehörigen Umsetzungsgrössen (z.B. Farbstärke) tabellarisch und graphisch in einem Koordinatensystem dargestellt. Das allgemeine Verfahren setzt eine lineare Beziehung voraus, d.h. algebraisch eine Gleichung ersten Grades und graphisch eine gerade Linie. In gewissen Fällen lässt sich dies durch Logarithmieren von Argument oder Funktion erreichen.

Aufstellung der Eichkurve

Es wird eine passende Lösung aus dem zu bestimmenden reinen Stoff hergestellt. Von dieser Stammlösung bringt man verschiedene Volumina mit der gleichen Reagensmenge und Lösungsmittel zu dem immer gleichen Gesamt-



volumen ergänzt zur Reaktion. Die dabei verwendete Anzahl Volumeneinheiten der Stammlösung wird auf der X-Achse als Abszisse x aufgetragen. Die dazugehörige Ordinate y ist der gemessene Umsetzungswert.

Die so erhaltenen Punkte liegen zunächst infolge von Messungenauigkeiten nicht genau auf einer geraden Linie; ihre Ordinaten müssen daher ausgeglichen werden. Das geschieht allgemein nach *Gauss* mit dem Prinzip der minimalen Summe der Fehlerquadrate (Summe v^2). Die Fehler v sind dabei die Abweichungen der erhaltenen Ordinaten von denjenigen der entsprechenden Punkte auf der ausgeglichenen Geraden. *Diese Gerade wird im allgemeinen keineswegs durch den Nullpunkt des Koordinatensystems gehen, sondern einen gewissen Abschnitt a auf der X-Achse erzeugen*, so dass keine direkte Proportionalität zwischen x und y vorliegt. Dieser Abschnitt bestimmt mit dem Richtungstangens die genaue Lage der Geraden. Diese beiden Grössen müssen mit Hilfe der Differentialrechnung so ermittelt werden, dass die obengenannte Summe der Fehlerquadrate zu einem Minimum wird. Diese Rechnung gibt für die beiden Grössen die folgenden Formeln:

$$a = \frac{\sum xy \cdot \sum x - \sum x^2 \cdot \sum y}{n \sum xy - \sum x \cdot \sum y} \quad m = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

wobei \sum das Summenzeichen und n die Anzahl der ausgeführten Bestimmungen ist.

Nach der Berechnung dieser beiden Grössen ergibt sich die Gleichung der Geraden:

$$y = m (x - a)$$

Zum Einzeichnen der Geraden braucht man 2 Punkte. Den ersten Punkt gibt der oben berechnete Abschnitt a auf der X-Achse. Einen zweiten, möglichst weit vom ersten entfernten Punkt, bekommt man mit Hilfe der Gleichung, indem man für ein bestimmtes x das dazugehörige y berechnet. Als zweiten Punkt kann man auch den zentral liegenden Punkt benutzen, dessen Koordinaten X und Y die arithmetischen Mittel der entsprechenden Koordinaten der experimentell erhaltenen Punkte sind:

$$X = \frac{\sum x}{n} \quad \text{und} \quad Y = \frac{\sum y}{n}$$

Diese Koordinaten sind leicht ohne Ausgleich zu erhalten. Sie befriedigen die Gleichung der Geraden, d.h. die Gleichung wird identisch, wenn für x und y die Werte von X , Y und für a und m die formellen Brüche eingesetzt werden; damit ist die Lage dieses zentralen Punktes auf der Geraden bewiesen. Sind die Koordinaten dieses zentralen Punktes berechnet, so lässt sich mit ihrer Hilfe aus der Gleichung der Geraden eines der Bestimmungsstücke a oder m berechnen.

Die Gleichung

$$Y = m (X - a)$$

kann also eine der beiden ersten komplizierten Formeln ersetzen.

Die Formeln für die Koordinaten des Zentralpunktes und den Richtungstangens m (unter der Bezeichnung b), sowie die Gleichung der Geraden in teilweise abgeänderter Form wurden bereits von *Allemann*¹⁾ in einer Arbeit «Über die Bestimmung antibiotisch wirksamer Substanzen» veröffentlicht. Dagegen zeigen seine beigefügten Berechnungsbeispiele, dass stillschweigend angenommen ist, alle Geraden gehen durch den 0-Punkt des Koordinatensystems, während die praktischen Messungen dies im allgemeinen nicht bestätigen. Vielmehr erzeugen die Geraden in vielen Fällen so grosse Abschnitte auf der X-Achse, dass deren Vernachlässigung bei der Benützung der Geraden zu quantitativen Bestimmungen auf fehlerhafte Resultate führen muss.

Anwendung der ausgeglichenen Eichkurve

Das allgemein übliche Verfahren zur quantitativen Bestimmung eines bestimmten Stoffes mit Hilfe einer Eichlinie ist folgendes:

Eine bestimmte Menge der zu untersuchenden Substanz wird auf passende Weise in Lösung gebracht. Mit einem aliquoten Teil dieser Lösung wird auf die gleiche Weise wie bei der Stammlösung des reinen Stoffes die Reaktion ausgeführt und die Umsetzungsgrösse (z.B.: Extinktion der gefärbten Lösung, Verbrauch an Lösung bei der Titration) gemessen. Nun sucht man denjenigen Punkt auf der Eichlinie, der der gleichen Umsetzungsgrösse entspricht (gleiche Ordinate y). Die Abszisse x dieses Punktes entspricht der bekannten Menge des zu bestimmenden Stoffes in der Stammlösung der Eichlinie. Dasselbe Stoffquantum befindet sich dann im umgesetzten aliquoten Teil der Probelösung und liefert auf die Ausgangsmenge umgerechnet das Resultat.

Dieses Verfahren gibt nur dann richtige Resultate, wenn folgende Umstände zutreffen:

1. die Eichlinie muss genau durch den Nullpunkt des Koordinatensystems gehen, und 2. müssen die Umsetzungen in der zu untersuchenden Lösung ebenso direkt proportional verlaufen.

Da diese beiden Bedingungen im allgemeinen nicht zutreffen, entstehen beim üblichen Verfahren Fehler. Diese Fehlerquellen können durch folgende *Erweiterung des Verfahrens* ausgeschaltet werden: Es wird nicht nur eine einzige Umsetzung mit einem aliquoten Teil der Probelösung, sondern es werden mehrere Umsetzungen mit verschiedenen Volumenteilen der Probelösung ausgeführt. Mit den auf diese Weise erhaltenen Daten wird für die Probelösung auf die gleiche Art wie bei der Stammlösung des reinen Stoffes eine Gerade ausgeglichen und ihre Gleichung aufgestellt. Sie laute:

$$x = m_p (x - a_p)$$

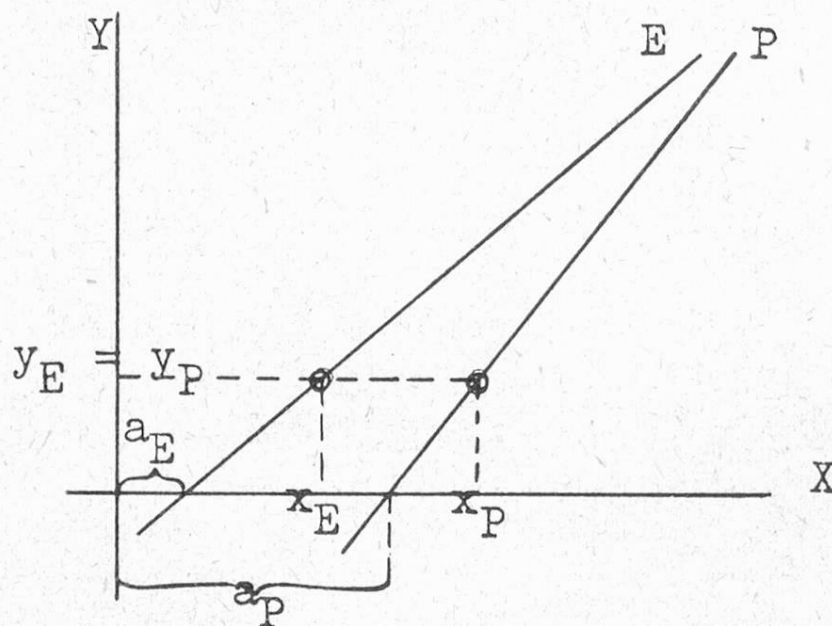
Wenn keine grössere Genauigkeit verlangt wird, kann man sich bei dieser Geraden der Probelösung auf 2 Messungen beschränken und die Gerade ohne Ausgleich durch 2 Punkte bestimmen. Der Richtungstangens ergibt sich dabei nach der einfachen Formel:

$$m_P = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

wobei x_1, x_2 und y_1, y_2 die Koordinaten der beiden Punkte sind.

Zum Vergleich der Geraden der Probelösung mit der Eichlinie betrachtet man auf den beiden Geraden zwei Punkte mit gleichen Ordinaten:

y_E (auf der Eichlinie) = y_P (auf der Geraden der Probelösung)
mit den dazugehörigen Abszissen x_E und x_P .



Diese Koordinaten erfüllen die Gleichungen der beiden Geraden:

$$y_E = m_E (x_E - a_E) \text{ und } y_P = m_P (x_P - a_P)$$

Nun kann man die beiden Ausdrücke für y einander gleichsetzen:

$$m_E (x_E - a_E) = m_P (x_P - a_P)$$

Daraus entsteht die Proportion:

$$\frac{x_E - a_E}{x_P - a_P} = \frac{m_P}{m_E}$$

Die beiden Differenzen auf der linken Seite sind zunächst die Lösungsvolumina, die die gleichen Mengen des zu bestimmenden Stoffes enthalten; es sind das die Stoffmengen, welche sich direkt proportional umsetzen. Die Pro-

portion sagt, dass sich die Lösungsvolumina umgekehrt proportional wie die Richtungstangens der Geraden verhalten. Die Differenz $(x_p - a_p)$ stellt ein beliebig grosses Volumen der Probelösung dar. Um zu erfahren, welche Menge des zu bestimmenden Stoffes in 1 cm^3 dieser Lösung enthalten ist, setzen wir:

$$x_p - a_p = 1 \text{ cm}^3$$

Dann ergibt sich die entsprechende Anzahl Volumeneinheiten Eichlösung aus der Proportion:

$$\frac{x_E - a_E}{1} = \frac{m_p}{m_E}$$

Die Anzahl Volumeneinheiten der Eichlösung, die 1 cm^3 der Probelösung entsprechen, sind gleich dem Quotienten aus dem Richtungstangens der Geraden der Probelösung und demjenigen der Eichlinie. Die in diesem Volumen $(x_E - a_E)$ der Eichlösung enthaltene Menge des zu bestimmenden Stoffes ist aber bekannt und gibt zugleich dieselbe Menge des Stoffes in 1 cm^3 der zu untersuchenden Lösung an.

Berechnung der mittleren Fehler zur Feststellung der Genauigkeit

1. Fehler der Ordinaten der ausgeglichenen Geraden $y = m(x - a)$

$$f = \pm \sqrt{\frac{\sum v^2}{n(n-1)}}$$

v sind die Abweichungen der Messresultate von der ausgeglichenen Geraden $\{y - m(x-a)\}$; es ist:

$$\sum v^2 = \sum y^2 + ma \sum y - m \sum xy$$

und $n =$ Anzahl der gemessenen Punkte.

Diesem Fehler entsprechen 2 Parallele zur Geraden in vertikaler Verschiebung um die Beträge $\pm f$. Zwei weitere Parallele mit den Verschiebungsbeträgen $\pm 4f$ schliessen — wie eine nähere Betrachtung und Rechnung zeigt — diejenigen beobachteten Punkte aus, deren Genauigkeit unbefriedigend ist.

2. Fehler des Richtungstangens m

(berechnet nach dem Fehlerfortpflanzungsgesetz von Gauss)

$$F = \pm \sqrt{\frac{\sum v^2}{\sum x^2 - 2a \sum x + na^2}}$$

F ist massgebend für die Genauigkeit der Anwendung, während f nur die Genauigkeit der einzelnen Geraden angibt.

3. Fehler des Quotienten $\frac{m_P}{m_E}$ (pro Volumeneinheit der Lösung)

$$F_{PE} \frac{(m_P)}{(m_E)} = \pm \cdot \sqrt{\frac{m_E^2 \cdot F_P^2 + m_P^2 \cdot F_E^2}{m_E^2}}$$

Darin sind m_E und m_P die Richtungstangens der Eichlinie und der Linie des Präparates und F_E und F_P die zugehörigen Fehler, wie sie sich nach Formel 2 ergeben.

Gleiche Genauigkeit des Messinstrumentes im ganzen Messbereich vorausgesetzt, ergeben sich aus den obigen Formeln für die Erzielung grösstmöglicher Genauigkeit folgende Richtlinien:

1. Eichlinie möglichst steil
2. Präparatengerade flach
3. Verwendung vorzugsweise einer grösseren Anzahl von Volumeneinheiten.

Ergebnis des theoretischen Teils

Die bei linear verlaufenden Umsetzungen experimentell erhaltenen Werte werden ohne Anspruch auf grössere Genauigkeit graphisch nach Augenmass ausgeglichen. Besser und sicherer geschieht dies nach Methoden der minimalen Summe der Fehlerquadrate. In diesem Sinn werden die Formeln zur Berechnung der beiden Bestimmungsstücke der ausgeglichenen Geraden — Achsenabschnitt a und Richtungstangens m — aus den experimentell gefundenen Grössen y , die den umgesetzten Stoffmengen x entsprechen, aufgestellt. Bei der bisher geläufigen Methode zur Gehaltsbestimmung einer Lösung wird ein bestimmtes Volumen derselben umgesetzt und auf der Eichkurve der Punkt gesucht, dessen Ordinate dem gefundenen Umsetzungswert entspricht. Die Abszisse dieses Punktes wird als der gesuchte Wert betrachtet. Dieses Verfahren gibt nur dann richtige Resultate, wenn 1. die Eichlinie durch den Nullpunkt des Koordinatensystems geht und 2. die Umsetzungen der zu untersuchenden Lösung ebenso direkt proportional verlaufen. Beides trifft im allgemeinen nicht zu, so dass bei dieser Methode oft grössere Fehler entstehen müssen. Es wird ein korrektes Verfahren entwickelt, welches von den störenden Achsenabschnitten unabhängig ist. Es besteht darin, dass man auch für die zu untersuchende Lösung eine Gerade wie für die Eichlinie ausgleicht. Der Gehalt einer Lösung ist direkt proportional dem Richtungstangens der Geraden (Tangens des Neigungswinkels der Geraden), und der Wert pro Volumeneinheit ist gleich dem Quotienten der Richtungstangens der Geraden und der Eichlinie. Diese neue Methode hat noch den Vorteil, dass man für alle in Betracht kommenden Grössen und Resultate eine korrekte Fehlerberechnung aufstellen kann; die zugehörigen Formeln sind im letzten Abschnitt zusammengestellt.

Colorimetrische Cholesterin- bzw. Phytosterinbestimmung in Fetten aus diätetischen Nahrungsmitteln, in Eieröl, Milchfett und Kakaofett

Prinzip: Die Bestimmung ist in allen Einzelheiten nach den Angaben von *Hadorn* und *Jungkunz* ²⁾ in ihrer Arbeit «Zur Untersuchung und Beurteilung diätetischer Nahrungsmittel» ausgeführt worden. Darnach wird die von *Liebermann* und Mitarbeitern zuerst mitgeteilte Farbreaktion des Cholesterins mit Essigsäureanhydrid und konz. Schwefelsäure in der von *Riffart* und *Keller* ³⁾ angegebenen Arbeitsweise vorgenommen. Als Lösungsmittel dient Essigester, in dem auch die konz. Schwefelsäure gut löslich ist.

Messinstrument für die Farbstärke: Die den umgesetzten Cholesterinmengen entsprechenden Farbstärken sind durch Extinktionsmessungen mit dem lichtelektrischen Colorimeter Lumetron, Modell 400 A der Photovolt Corporation, New York, ermittelt worden (Benützung des Rotfilters 650). Als Messgläschen dienen bei diesem Apparat Spezialreagensgläschen aus Pyrexglas mit einem innern Durchmesser von 16 mm und einem äussern Durchmesser von 18 mm. Um das Maximum der Lichtabsorption, welches nach ungefähr einer Stunde erreicht wird, festzustellen, sind die Lösungen in Abständen von ca. 10 Minuten immer wieder gemessen worden. Zum Ausgleich von Messungenauigkeiten wurden in jedem Zeitpunkt mehrere Ablesungen gemacht und die Mittel benützt. Als Blindprobe diente eine Reaktionsmischung ohne Essigsäureanhydrid.

Einzelheiten der Methodik:

Reagenzien: Essigester (über CaCl_2 destill.)
Essigsäureanhydrid (über CaCl_2 destill.)
konz. H_2SO_4

Cholesterin- bzw. Fettlösung: Zur Herstellung der Eichkurve wurde eine Lösung von reinem Cholesterin Siegfried in Essigester verwendet. Die Fette aus den diätetischen Nahrungsmitteln, aus Trockenvolleipulver und Vollmilchpulver sind nach Angabe von *Hadorn* in der eingangs erwähnten Arbeit isoliert und mit Petroläther gereinigt worden. Für die Umsetzungen wurde jeweils eine passende Lösung in Essigester hergestellt.

Zur Umsetzung eines bestimmten Volumens der Cholesterin- bzw. Fettlösung werden zunächst die mittels Büretten abgemessenen Reagenzien in Glaszylinderchen in folgender Reihenfolge gemischt:

Hauptversuch: Menge Essigester, die das vorgesehene Volumen Fettlösung zu 10 cm^3 ergänzt,
+ 4 cm^3 Essigsäureanhydrid
+ $0,8 \text{ cm}^3$ konz. H_2SO_4 .

Blindversuch: Menge Essigester, die das vorgesehene Volumen Fettlösung zu 14 cm^3 ergänzt,
+ $0,8 \text{ cm}^3$ konz. H_2SO_4 .

Die Lösungen werden während genau 10 Minuten bei 20°C im Thermostaten gehalten, dann die Fettlösung zu beiden Proben gegeben und die fertigen Re-

aktionsgemische, die nun beide 14,8 cm³ betragen, bis zur ersten Messung der Lichtabsorption nach 30—40 Minuten weiter bei 20° C gehalten.

Zur Vermeidung zufälliger Fehler und um das im 1. Teil entwickelte Vergleichsverfahren mit der Eichgeraden anwenden zu können, werden mehrere Umsetzungen mit verschiedenen Mengen der zu untersuchenden Fettlösung ausgeführt. Die den umgesetzten Mengen der Fettlösung entsprechenden Extinktionswerte trägt man in eine passende graphische Darstellung ein. Aus der Lage der Punkte ergeben sich Vorhandensein und Bereich der Linearität. Der Ausgleich der Punkte zu der Probeeraden geschieht gleich wie bei der Eichgeraden. Zur Gehaltsbestimmung der Fettlösung an Cholesterin wird der Quotient der Richtungstangens der Probeeraden und der Eichgeraden aufgestellt. Jeder Richtungstangens ist eine *spezifische Extinktion*, nämlich diejenige, die von einer Volumeneinheit der entsprechenden Lösung erzeugt wird. Der Quotient der spezifischen Extinktionen ergibt die in einer Volumeneinheit der Probelösung enthaltene Menge Cholesterin.

Cholesterin-Eichgerade

(vgl. Seite)

Eichlösung: 100 mg Cholesterin Siegfried mit Essigester zu 100 cm³ gelöst. Diese Konzentration ermöglicht ein Beobachtungsgebiet von 0,3 bis 2,0 cm³. Schon hier ist die Blindprobe etwas gelblich gefärbt, mit steigenden Cholesterinmengen mehr, was auf Einwirkung der konz. H₂SO₄ auf das Cholesterin schließen lässt.

Nach der Aufstellung einer ersten Eichlinie wurde das Lumetron revidiert und die Lampe erneuert. Zur Kontrolle ist hierauf die Bestimmung der Eichlinie wiederholt worden. Es zeigte sich, dass die Eichlinie sich gleichmässig gesenkt, d.h. parallel abwärts verschoben hatte. Dadurch wird wohl der Achsenabschnitt etwas vergrößert, dagegen bleibt die massgebende spezifische Extinktion innerhalb der Grenze der Beobachtungsgenauigkeit unverändert.

Die praktische Durchführung der Rechnung sei am Beispiel der zweiten Aufstellung der Eichlinie gezeigt:

| Anzahl der Bestimmungen n = 5 | cm ³ Lösung x | Extinktion · 10 y | x · y | x ² | y ² für Fehler |
|----------------------------------|-----------------------------|----------------------|--------|----------------|------------------------------|
| | 0,5 | 0,81 | 0,405 | 0,25 | 0,6561 |
| | 1,0 | 1,70 | 1,700 | 1,00 | 2,8900 |
| | 1,5 | 2,74 | 4,110 | 2,25 | 7,5076 |
| | 1,7 | 3,08 | 5,236 | 2,89 | 9,4864 |
| | 2,0 | 3,80 | 7,600 | 4,00 | 14,4400 |
| Summe Σ | 6,7 | 12,13 | 19,051 | 10,39 | 34,9801 |

Es folgt die Berechnung der Bestimmungsstücke der Geraden: Achsenabschnitt a und Richtungstangens m :

$$a = \frac{\sum xy \cdot \sum x - \sum x^2 \cdot \sum y}{n \sum xy - \sum x \sum y} = \frac{19,051 \cdot 6,7 - 10,39 \cdot 12,13}{5 \cdot 19,051 - 6,7 \cdot 12,13}$$

$$a = + 0,115 \text{ Volumeneinheiten (Abszisseneinheit } 1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ mg)}$$

$$m = \frac{n \cdot \sum xy - \sum x \sum y}{n \cdot \sum x^2 - (\sum x)^2} = \frac{5 \cdot 19,051 - 6,7 \cdot 12,13}{5 \cdot 10,39 - (6,7)^2}$$

$$m = 1,9807 \text{ Extinktionseinheiten.}$$

Die Grösse dieses m erscheint im Masstab der Zeichnung als spezifische Extinktion dargestellt durch die Ordinate zur Abszisse ($a+1$).

Zum Einzeichnen der Geraden benützt man ausser dem Achsenabschnitt a die Ordinate zur grössten Abszisse. Sie berechnet sich aus der Gleichung der Geraden:

$$y = m(x - a) = 1,9807 \cdot (2 - 0,115)$$

$$y_{x=2} = 3,733$$

Berechnung des mittleren Ordinatenfehlers f :

$$\begin{aligned} \sum v^2 &= \sum y^2 + ma \sum y - m \sum xy \quad (v = \text{scheinbarer Fehler}) \\ &= 34,9801 + 1,9807 \cdot 0,115 \cdot 12,13 - 1,9807 \cdot 19,051 \\ &= 0,0130 \quad (\text{muss genau berechnet werden}) \end{aligned}$$

$$\text{mittlerer Ordinatenfehler } f = \pm \sqrt{\frac{\sum v^2}{n(n-1)}} = \pm \sqrt{\frac{0,0130}{5 \cdot 4}} = \pm 0,0255$$

Zur Ausscheidung der eventuell ungenauen Beobachtungspunkte wird die äusserste Fehlerschranke $4 \cdot f$ berechnet:

$$4f = \pm 0,102$$

Im vorliegenden Fall sind demnach alle Punkte brauchbar. Andernfalls müsste man zur Erzielung besonderer Genauigkeit nach Ausscheidung der misslungenen Punkte die ganze Ausgleichsrechnung wiederholen.

Prinzipiell unbrauchbare Punkte können dadurch entstehen, dass sie ausserhalb des linearen Bereiches fallen. Die an den Enden der linearen Strecke auftretenden gleichsinnigen Abweichungen werden schon in der graphischen Darstellung ersichtlich. Im Fall der Cholesterinbestimmung liegt die obere Grenze der Linearität bei einem Extinktionswert von etwas unter 4; bei grösseren umgesetzten Mengen fallen die Werte zu hoch aus. Die untere Grenze der Linearität lässt sich bei positivem Achsenabschnitt, wie die folgende Betrachtung zeigt, abschätzen. Da praktische Messungen in der unmittelbaren Nähe des Nullpunktes

nicht gelingen, muss die Übergangslinie vom geraden Bereich zum Nullpunkt mathematisch verfolgt werden. Sie muss folgende Eigenschaften aufweisen: im untern Endpunkt der Linearität von der Geraden tangential und mit der Krümmung Null abzweigen, mit zunehmender Krümmung gegen den Nullpunkt streben und schliesslich mit spitzem Neigungswinkel der Tangente in diesem Punkt einmünden. Die mathematische Untersuchung zeigt, dass alle diese Bedingungen erfüllt werden, wenn die Abszisse des untern Endpunktes der Linearität mindestens die 3fache Länge des positiven Achsenabschnittes a besitzt. Es sind also Umsetzungen mit Mengen unter dem 3fachen Betrag des Achsenabschnittes zu vermeiden, da die Punkte sonst zu hoch ausfallen. — Im Falle eines negativen Achsenabschnittes gilt für die Abschätzung der untern Linearitätsgrenze dieselbe Regel wie bei einem positiven Abschnitt, nur kommt beim negativen Achsenabschnitt nur der absolute Betrag desselben in Rechnung. Umsetzungen unter dem Betrag $3a$ liefern hier zu tiefe Punkte.

Berechnung der Fehlergrenzen der spezifischen Extinktion

$$F = \pm \sqrt{\frac{\sum v^2}{\sum x^2 - 2a \sum x + na^2}} = \pm \sqrt{\frac{0,0255}{10,39 - 2 \cdot 0,115 \cdot 6,7 + 5 \cdot (0,115)^2}}$$

$$F = \pm 0,0382$$

| | |
|--|-----------------------------|
| spezifische Extinktion der zweiten Eichlinie | $m = 1,981 \pm 0,038$ |
| spezifische Extinktion der ersten Eichlinie | $m = 1,994 \pm 0,042$ |
| Differenz im m | 0,013; also kleiner als die |
| beiden Fehlerbreiten. | |

| | |
|---|-------------|
| Die Achsenabschnitte sind für erste Eichlinie | $a = 0,074$ |
| oben berechnete zweite Eichlinie | $a = 0,115$ |

Die Differenz von 0,041 ist für die folgende Anwendung belanglos, da nur die spezifische Extinktion für den Gehalt massgebend ist.

Kontrollmessungen

Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der Cholesterinbestimmung mit Verwendung des Lumetrons wurde eine neue Cholesterinlösung mit bekanntem Gehalt von 0,5 mg reinem Cholesterin pro cm^3 Lösung hergestellt und wie eine unbekannte Lösung der Untersuchung unterworfen.

Aus 4 verschiedenen Umsetzungen ergaben sich für:

| | | | | | |
|--------------|------|------|------|------|----------|
| x | 1,0 | 1,3 | 1,5 | 2,5 | folgende |
| $E \cdot 10$ | 0,83 | 1,08 | 1,26 | 2,26 | |

Die daraus ausgeglichene Gerade hat die Bestimmungsstücke:

$$a = 0,167 \text{ Volumeneinheiten; } m = 0,9639 \text{ Extinktionseinheiten}$$
$$y_{x=2} = 1,767$$

Zur Berechnung der in einer Volumeneinheit enthaltenen Menge Cholesterin berechnet man — wie unter Einzelheiten der Methodik erwähnt — den Quotienten der spezifischen Extinktionen der Probelösung und der Eichlösung (zweite Eichlinie). Darnach ergibt sich für den Quotienten mit den zugehörigen Genauigkeitsgrenzen (letzte Formel der Fehlerrechnung) der Wert:

$$\frac{m_P}{m_E} = \frac{0,9639}{1,9807} = 0,48663 \pm 0,01409 \text{ mg Cholesterin pro cm}^3$$

Der gefundene Wert mit der obern Fehlergrenze 0,50072 liegt nur wenig über dem wirklichen Wert 0,50000. Damit ist die Leistungsfähigkeit der Methode erwiesen.

Praktische Anwendungen der Cholesterinbestimmungen bei Fetten aus Nahrungsmitteln

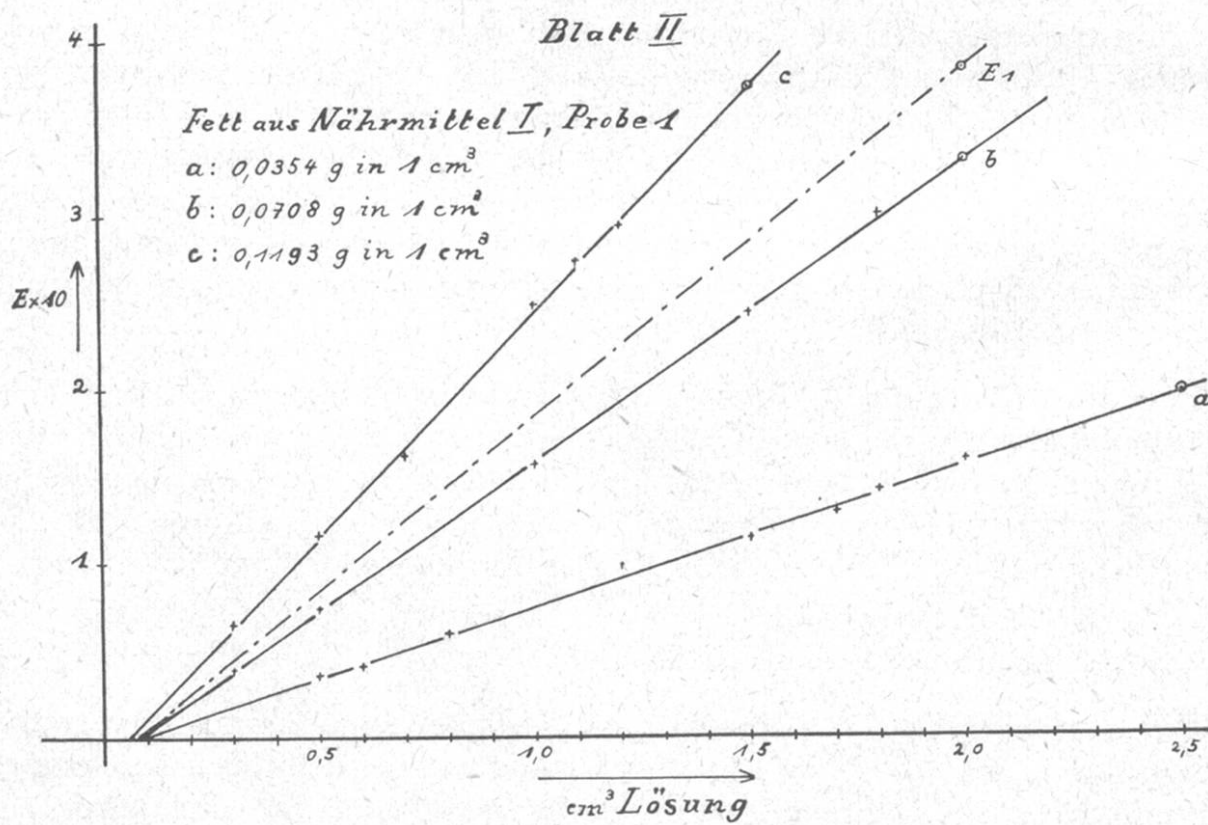
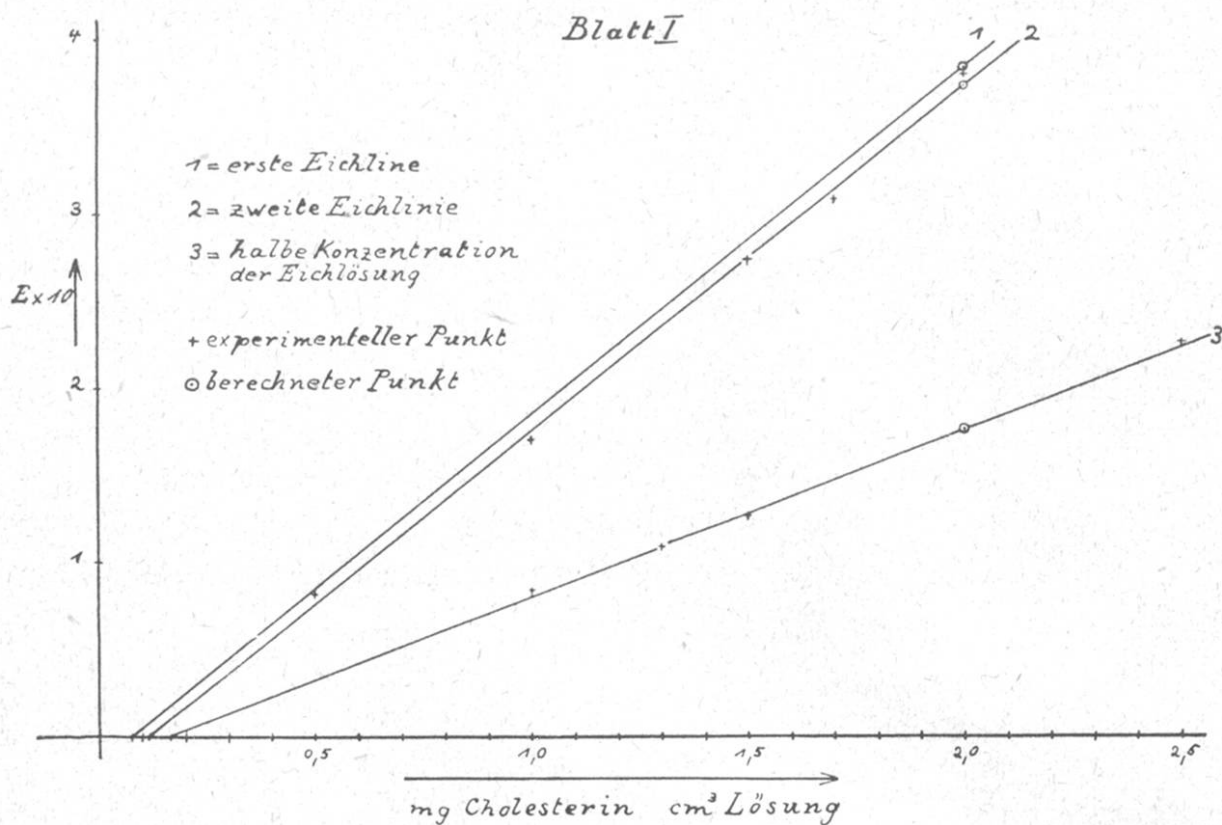
Die in den graphischen Darstellungen enthaltenen Grössen sind zur Übersicht in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Fett aus Nahrungsmittel I, Probe 1: Zum Studium des Verlaufs der Geraden und der zugehörigen Fehlergrenzen wurde beim gleichen Fett die Cholesterinbestimmung in 3 verschiedenen konzentrierten Lösungen untersucht. Der Verlauf der Geraden illustriert die Proportionalität zwischen Gehalt des gesuchten Stoffes pro Volumeneinheit und spezifischer Extinktion (Blatt II). Die Fehler pro Volumeneinheit nehmen mit wachsender Steilheit der Probegeraden zu, wie bereits aus der Fehlerformel im ersten Teil vorausgesehen wurde. Diese Umstände können bei der Berechnung des prozentualen Fehlers im Fett und im Nahrungsmittel verwischt werden, da bei geringer Fettkonzentration der Umrechnungsfaktor entsprechend grösser ist.

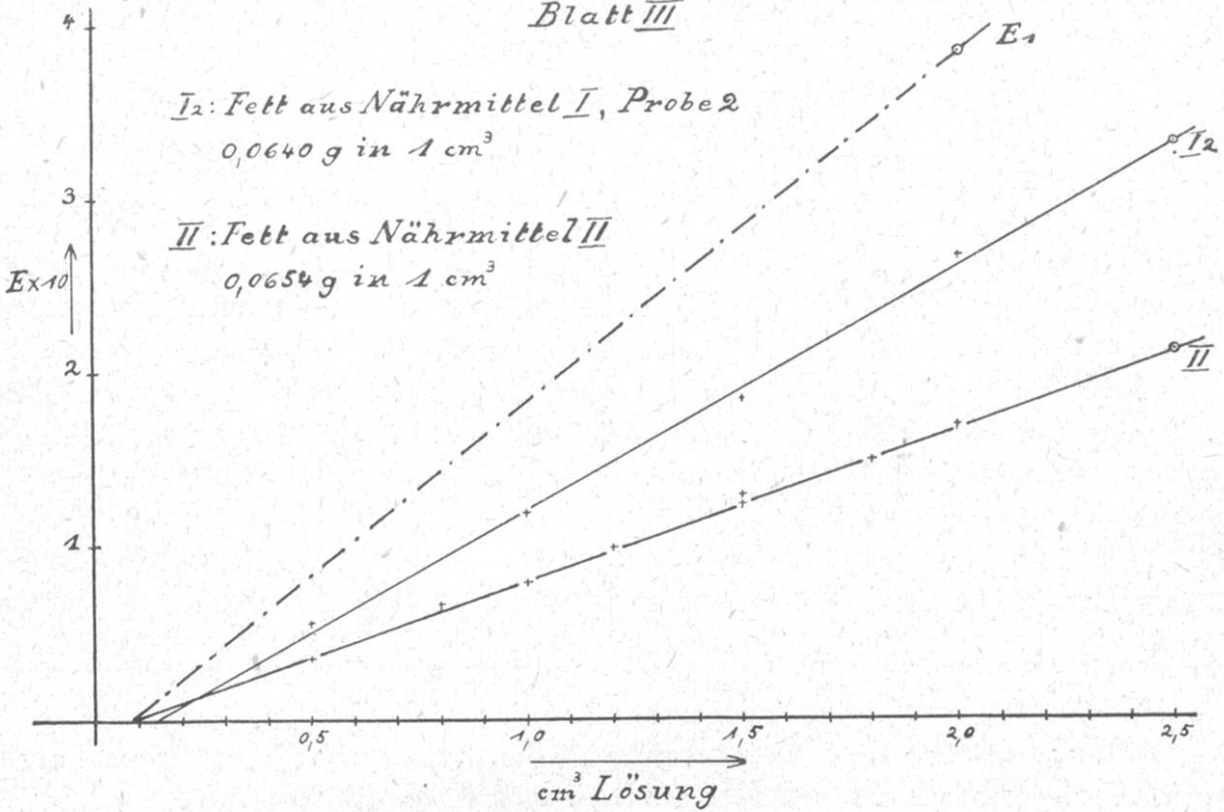
Fett aus Nahrungsmittel I, Probe 2: Absoluter Cholesteringehalt und Fehlergrenzen zeigen keine merklichen Abweichungen von den entsprechenden Werten der Probe 1. In diesem Nahrungsmittel konnte ausserdem der Trockenvolleigehalt einmal aus dem Cholesteringehalt und einmal aus dem Lezithinphosphorsäuregehalt berechnet werden (siehe zitierte Arbeit von *Hadorn* und *Jungkunz*):

| | | |
|---------------------------------|-----------|-----------------|
| aus Cholesteringehalt | berechnet | 3,0 % Trockenei |
| aus Lezithinphosphorsäuregehalt | berechnet | 3,1 % Trockenei |

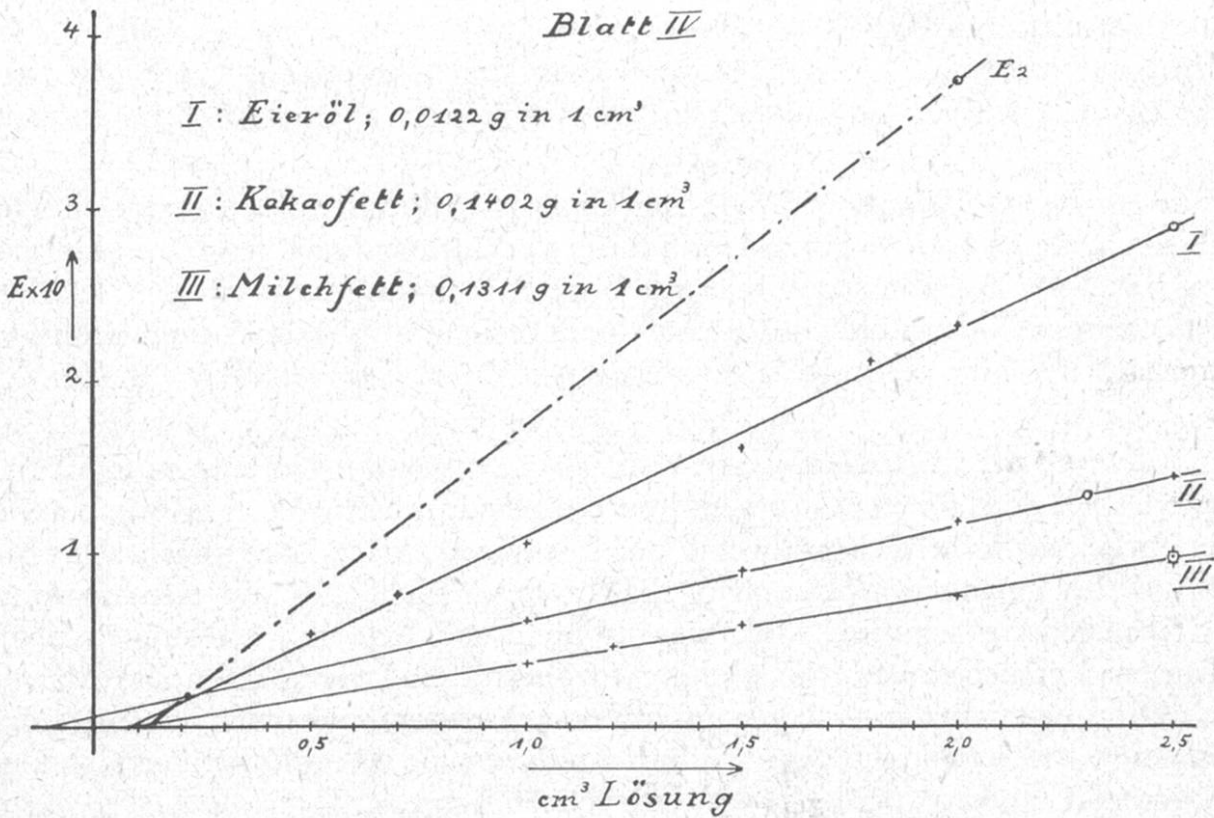
Fett aus Nahrungsmittel II: Obwohl die zur Cholesterinbestimmung verwendete Konzentration der Fettlösung fast gleich gross wie bei dem oben beschriebenen Nahrungsmittel I, Probe 2, gewählt wurde, ist die Probegerade merklich weniger steil



Blatt III



Blatt IV



Cholesterinbestimmungen

| Nährmittel | Fett im Nährmittel % | Fett in Essigester g/50 cm ³ | Blatt | Bestimmungsstücke für Probegerade | |
|------------------|----------------------------|---|-------|--------------------------------------|--------|
| | | | | a cm ³ | m |
| Nährmittel I: | 7,45 | 1,7708 | II | 0,0800 | 0,8203 |
| Probe 1 | | 3,5380 | II | 0,0782 | 1,7286 |
| | | 5,9657 | II | 0,0539 | 2,5891 |
| Probe 2 | 7,74 | 3,1976 | III | 0,1391 | 1,4020 |
| Nährmittel II | 7,86 | 3,2726 | III | 0,0760 | 0,8733 |
| Volleipulver USA | 36,60 | 0,6111 | IV | 0,0732 | 1,1924 |
| Ber. auf Tr's. | | | | | |
| Kakaofett | 100 | 7,0098 | IV | -0,1137 | 0,5540 |
| Vollmilchpulver | 21,25 | 6,5549 | IV | 0,0716 | 0,4004 |

ausgefallen, d.h. der Cholesteringehalt und demzufolge auch der Trockeneigehalt sind kleiner als bei Nährmittel I:

aus Cholesteringehalt berechnet 1,2 % Trockenei
aus Lezithinphosphorsäuregehalt berechnet 1,1 % Trockenei

Zur Berechnung des Trockeneigehaltes eines Nährmittels benötigt man einerseits den mittleren Gehalt des Trockenvolleipulvers bzw. des Eieröls an Cholesterin und andererseits zu Korrekturzwecken den Cholesterin bzw. Phytosterin-gehalt von Milchfett und Kakaofett. Es wurden daher auch diese Fette untersucht.

Eieröl aus Volleipulver USA: Der Cholesteringehalt im wasserfreien Volleipulver wurde zu 1,91 % gefunden, mit der verhältnismässig grossen Fehlergrenze von $\pm 0,35$ %. Die von *Hadorn* angegebene Berechnungsbasis für den Trockeneigehalt eines Nährmittels von 2,1 % Cholesterin im Trockenei liegt damit noch innerhalb der hier gefundenen Fehlergrenze.

Milchfett aus Vollmilchpulver (deutsche Walzware): Unter dem Einfluss der konz. H₂SO₄ erschienen bei diesem Fett die Blindproben sehr stark braun gefärbt; die Farbe vertiefte sich während der Messdauer noch wesentlich. Da zudem infolge des geringen Cholesteringehaltes des Milchfettes die Reaktionsfarben verhältnismässig schwach sind, war es nicht möglich, die Messungen über 40 Minuten Versuchsdauer auszudehnen, während im allgemeinen die Maximal-extinktion erst nach 75—80 Minuten Versuchsdauer beobachtet wurde. Der berechnete Cholesteringehalt des Vollmilchpulvers von 33 mg⁰/o ist merklich kleiner als der von *Hadorn* angegebene Wert von 76,5 mg⁰/o.

in Nahrungsmittelfetten

| $\frac{m_p}{m_E}$ mg/cm ³ | FPE Fehler ± mg/cm ³ | Sterin im Fett ‰ | Sterin im N.M. | Prozentualer Fehler ± | |
|---|--|------------------------|--|------------------------------------|--|
| | | | | im Fett | im N.M. |
| 0,4115 | 0,0145 | 1,16 | 87 mg ⁰ / ₀ | 0,04 g ⁰ / ₀ | 3,1 mg ⁰ / ₀ |
| 0,8671 | 0,0201 | 1,22 | 91 mg ⁰ / ₀ | 0,03 g ⁰ / ₀ | 2,1 mg ⁰ / ₀ |
| 1,2987 | 0,0347 | 1,09 | 81 mg ⁰ / ₀ | 0,03 g ⁰ / ₀ | 2,2 mg ⁰ / ₀ |
| 0,7078 | 0,0233 | 1,11 | 86 mg ⁰ / ₀ | 0,04 g ⁰ / ₀ | 2,8 mg ⁰ / ₀ |
| 0,4380 | 0,0125 | 0,67 | 53 mg ⁰ / ₀ | 0,02 g ⁰ / ₀ | 1,5 mg ⁰ / ₀ |
| 0,6020 | 0,1096 | 4,93 | 1,8 g ⁰ / ₀ 1,9 g ⁰ / ₀ | 0,90 g ⁰ / ₀ | 0,33 g ⁰ / ₀ 0,35 g ⁰ / ₀ |
| 0,2797 | 0,0057 | 0,20 | | 4,1 mg ⁰ / ₀ | |
| 0,2022 | 0,0060 | 0,15 | 33 mg ⁰ / ₀ | 4,5 mg ⁰ / ₀ | 1,0 mg ⁰ / ₀ |

Kakaofett: Während bei den bisherigen Fetten die Probegeraden ungefähr den gleichen Achsenabschnitt wie die Eichgerade ergaben, erscheint hier zum erstenmal ein negativer Achsenabschnitt ($-0,11 \text{ cm}^3$). Es soll an diesem Beispiel das übliche Berechnungsverfahren mit dem neuen kritisch verglichen werden. Die 4 experimentell erhaltenen Punkte, die zum Ausgleich der Probegeraden benützt wurden, und der sich ergebende Schnittpunkt mit der Eichgeraden haben folgende Koordinaten:

| | | |
|--------------------------|-----------|-----------|
| Schnittpunkt berechnet | x = 0,204 | y = 0,176 |
| 1. experimenteller Punkt | x = 1,0 | y = 0,61 |
| 2. » | x = 1,5 | y = 0,90 |
| 3. » | x = 2,0 | y = 1,18 |
| 4. » | x = 2,5 | y = 1,44 |

Mit Hilfe der bisherigen Methode ergeben sich aus den verschiedenen Punkten folgende Phytosterinwerte für das Kakaofett:

| | |
|--------------|--------------------|
| Schnittpunkt | 0,71 ‰ Phytosterin |
| 1. Punkt | 0,30 ‰ » |
| 2. » | 0,27 ‰ » |
| 3. » | 0,25 ‰ » |
| 4. » | 0,24 ‰ » |

Aus diesen Zahlen wird ersichtlich, dass die übliche Methode kein eindeutiges Resultat gibt. Vielmehr nehmen die erhaltenen Werte mit steigenden Mengen umgesetzter Fettlösung stetig ab und nähern sich langsam dem nach dem neuen Verfahren erhaltenen Wert von $0,20 \text{ ‰} \pm 0,004 \text{ ‰}$ Phytosterin. Theoretisch

würde dieser Wert mit der üblichen Methode erst bei Umsetzung von unendlich grosser Fettlösung erreicht, denn erst dann werden die vernachlässigten Achsenabschnitte unwirksam.

Ergebnis des praktischen Teils

Als Spezialfall linear verlaufender Umsetzungen wurden colorimetrische Cholesterinbestimmungen (*Liebermann'sche* Farbreaktion mit Essigsäureanhydrid und konz. H_2SO_4 , Methode von *Riffart* und *Keller*) in Fetten aus Nahrungsmitteln, in Eieröl, Milchfett und Kakaofett gewählt. Die Lichtabsorptionsmessungen wurden mit dem lichtelektrischen Colorimeter Lumetron, Modell 400 A, ausgeführt. Für jede Fettlösung war dabei der lineare Bereich der Umsetzungen festzulegen und die experimentell erhaltenen Werte auszugleichen. Die so erhaltenen Geraden gingen ebensowenig wie die Eichgerade durch den Nullpunkt des Koordinatensystems. Bei Kakaofett war der Achsenabschnitt negativ. Die Achsenabschnitte haben keine praktische Bedeutung; sie dienen lediglich zum Einzeichnen der Geraden in der graphischen Darstellung. Die Ursachen der Achsenabschnitte sind nicht abgeklärt. Es könnte z.B. in gewissen Fällen der Einfluss von Lichtverlust durch Reflexion in Betracht kommen. Mit Ausnahme von Milchfett und Kakaofett stimmen die Ergebnisse der Cholesterinbestimmungen innerhalb der Fehlergrenzen des neuen Verfahrens mit den von *Hadorn* angegebenen überein.

Zusammenfassung

Im ersten, theoretischen Teil der Arbeit werden Verfahren und Berechnung linear verlaufender Umsetzungen festgelegt. Zur Herstellung der Eichlinie durch Ausgleich der erhaltenen Messresultate werden die bekannten Formeln, wie sie z.B. im *Küster* zu finden sind, angewendet. Es hat sich nun gezeigt, dass für eine korrekte Gehaltsbestimmung einer unbekanntem Lösung eine einzige Umsetzung derselben nicht genügt. Vielmehr ist auch für die Probelösung die Aufstellung einer Geraden notwendig, zu deren Ausgleich mindestens 3 verschiedene Umsetzungen nötig sind. An vielen praktischen Beispielen zeigte die Ausgleichsrechnung, dass weder die Eichgeraden noch die Probegeraden durch den Nullpunkt des Koordinatensystems gingen. Die durch die Geraden auf der Abszissenachse erzeugten Abschnitte verursachen bei der bisher üblichen Methode zunächst Fehler bei der Berechnung des Verhältnisses der Abszissen bzw. der Volumina und dementsprechend Fehler im Endresultat. Der von diesen Fehlern unabhängige richtige Wert dieses Verhältnisses ergibt sich als Quotient der Richtungstangens der Probe- und Eichgeraden, welche sich aus den Ausgleichsformeln ergeben. Der Wert dieses Quotienten ergibt zugleich die Menge des gesuchten Stoffes pro Volumeneinheit. Diese neue Methode hat den Vorteil, dass man für alle in Betracht kommenden Grössen und Resultate eine korrekte Berechnung der Fehlergrenzen durchführen kann. Zunächst wird der mittlere Ordinatenfehler für jede Gerade berechnet. Die zwei Parallelen jeder Geraden im 4-fachen vertikalen Abstand ihres Fehlers schliessen diejenigen beobachteten Punkte aus, deren Genauigkeit unbefriedigend ist. Die für das Endresultat massgebenden Fehlergrenzen berechnen sich aus denjenigen der beiden Richtungstangens.

Im zweiten, praktischen Teil der Arbeit werden als Spezialfall linear verlaufender Umsetzungen colorimetrische Cholesterinbestimmungen in Fetten aus Nahrungsmitteln, in Eieröl, Milchfett und Kakaofett mitgeteilt. Die Lichtabsorptionsmessungen wurden mit dem lichtelektrischen Colorimeter Lumetron, Modell 400 A (nur 1 Selenzelle) ausgeführt. Von den dabei gemachten Erfahrungen seien die folgenden hervorgehoben:

1. Bei wiederholter Aufstellung der Eichgeraden machte sich eine Parallelverschiebung derselben vertikal abwärts bemerkbar. Dadurch wurde der Achsenabschnitt vergrößert, während der für die Anwendung der neuen Methode massgebende Richtungstangens innerhalb der berechneten Fehlergrenzen unverändert blieb.
2. Zur Überprüfung der Leistungsfähigkeit der neuen Methode wurde eine neue Cholesterinlösung von bekanntem Gehalt (50 % der Eichlösung) der Untersuchung unterworfen. Der gefundene Wert mit der oberen Fehlergrenze liegt nur um 0,072 % über dem wahren Wert, was die Leistungsfähigkeit der Methode beweist.
3. Theoretische und praktische Untersuchungen haben gezeigt, dass Umsetzungen unterhalb dem 3 fachen Achsenabschnitt unbrauchbar sind, da sie ausserhalb der untern Linearitätsgrenze liegen.
4. Bei der Untersuchung von Kakaofett wurde ausnahmsweise ein negativer Achsenabschnitt gefunden. Die nach der üblichen Methode aus verschiedenen Umsetzungen erhaltenen Phytosterinwerte wurden dem mit der neuen Methode erhaltenen Wert gegenübergestellt. Die übliche Methode liefert kein eindeutiges Resultat; die erhaltenen Werte nehmen mit steigenden Mengen umgesetzter Fettlösung stetig ab und nähern sich langsam dem nach dem neuen Verfahren erhaltenen Wert.

Die in den verschiedenen Fetten gefundenen Cholesterinwerte mit den zugehörigen Fehlergrenzen sind aus der angeführten Tabelle ersichtlich.

Résumé

On décrit dans la première partie de ce travail un mode de calcul et de compensation pour des réactions du premier ordre. Cette nouvelle méthode offre l'avantage de permettre de calculer exactement les limites d'erreur de toutes les grandeurs et de tous les résultats.

On décrit ensuite dans la partie expérimentale, comme application de la méthode proposée, le dosage colorimétrique (réaction colorée de *Liebermann*) de la cholestérine dans des graisses provenant de denrées alimentaires, dans de l'huile d'œuf, dans de la graisse de lait et dans du beurre de cacao. A l'exception des valeurs obtenues pour la graisse de lait et pour le beurre de cacao, les résultats donnés par cette nouvelle méthode sont compris dans les limites d'erreur de la méthode de *Hadorn*.

Literatur

- ¹⁾ Diese Mitt. **40**, 230 (1949).
- ²⁾ Diese Mitt. **40**, 416 (1949).
- ³⁾ Z.U.L. **68**, 114 (1934).