

Eine automatisierte Haptoglobinbestimmungsmethode

Von C. KÖHNE

Zentrallaboratorium, Centrallasarettet (Direktor: B. von Porat, M. D.) Eskilstuna/Schweden

(Eingegangen am 31. März 1970)

Eine automatisierte Bestimmungsmethode der Hämoglobin-Bindungskapazität des Serums mit dem System Wasserstoffperoxid — salpetrige Säure wird beschrieben. Die Nitritkonzentration wird kolorimetrisch bestimmt, Konzentrationsminderungen sind dem Haptoglobingehalt direkt proportional. Beim Vergleich der Methode mit der von TARUKOSKI (10) angegebenen zeigt sich eine gute Übereinstimmung. Das Vorkommen von Seren mit Inhibitoren gegen den Hämoglobin-Haptoglobin-Komplex wird nachgewiesen. Normalwerte werden angegeben.

An automated method for the determination of haptoglobin

An automated method is described for the colorimetric determination of serum haptoglobin, based on the measurement of its peroxidase activity with the system hydrogen peroxide — nitrous acid. The results are in good agreement with those from the method of TARUKOSKI (10). Normal values are presented.

Zur Bestimmung des Haptoglobin(Hp)-Gehaltes des Serums sind zahlreiche Methoden beschrieben worden. Von immunologischen Verfahren (1—3) abgesehen, sind es einmal elektrophoretische Bestimmungsmethoden (4—6), die die größere Wanderungsgeschwindigkeit des Hämoglobin-Haptoglobin-Komplexes (Hb-Hp) im Vergleich zu freiem Hämoglobin (Hb) ausnutzen, zum anderen Methoden, die auf der höheren Peroxydase-Aktivität des Hb-Hp-Komplexes im Vergleich zu freiem Hb beruhen (7—10).

Im allgemeinen sind elektrophoretische Methoden zeitraubender, jedoch technisch einfacher als die auf Messung der Peroxydase-Aktivität beruhenden Verfahren. Durch Anwendung der Agargelhochspannungselektrophorese (11) oder durch Elektrophorese auf Membranfolien (12) wurde die Elektrophoreselaufzeit wesentlich verkürzt; die Schwierigkeiten bei den die Peroxydase-Aktivität messenden, manuellen Methoden hat man durch deren Automatisierung (13—15) zu mindern versucht.

Ziel dieser Untersuchung war es, ein System zu finden, das mit relativ haltbaren Reagenzien arbeitet, ohne ein sehr teures Alkylperoxid auskommt und für Serienanalysen geeignet ist.

Die im folgenden beschriebene Methode fußt auf einer Veröffentlichung von B. CHANCE (16). Danach ist bei Gegenwart von Peroxydasen die Umsetzungsgeschwindigkeit von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) mit salpetriger Säure (HNO_2) wesentlich größer als die mit Alkoholen. — Die Nitritkonzentration läßt sich kolorimetrisch nach dem Prinzip der BRATTON-MARSHALL-Reaktion bestimmen (17). Die Einwirkung des Hb-Hp-Komplexes und in weit geringerem Maße auch die von freiem Hb auf das System H_2O_2 - HNO_2 bewirkt eine Verringerung der Ausgangskonzentration des Nitrits und damit eine Extinktionsabnahme, welche in weiten Bereichen der Hämoglobin-Bindungskapazität des Haptoglobins direkt proportional ist.

Substanzen und Methodik

Alle Reagenzien wurden von Fa. E. Merck-Darmstadt in p. a.-Qualität bezogen.

1. Acetat-Puffer (18) 0,1M; pH 4,20; 0,4M an NaCl: 736 ml 0,2M Essigsäure + 264 ml 0,2M Natriumacetat + 1 l 0,8M NaCl. (Der NaCl-Zusatz bewirkt eine pH-Minderung um 0,12).
2. Wasserstoffperoxid 0,98 bzw. 4,9 mm 0,1 bzw. 0,5 ml einer 30proz. (w/w) H_2O_2 -Lösung (Perhydrol) mit demineral. Wasser auf 1 l auffüllen. Täglich frisch bereiten.
3. Natriumnitrit 0,3 mm 20,7 mg $NaNO_2$ mit demineral. Wasser auf 1 l lösen. Mehrere Wochen verwendbar.
4. Sulfanilsäure 11,55 mm 2 g Sulfanilsäure in 1 l 30proz. (v/v) Essigsäure lösen (Magnet-rührer). Unbegrenzt haltbar.
5. N-[Naphthyl-(1)]-äthylendiammoniumdichlorid 3,43 mm 200 mg des Salzes mit demineral. Wasser auf 200 ml lösen. Im Kühlschrank aufbewahrt mehrere Wochen verwendbar.
6. Natriumchlorid 0,154M (physiol. NaCl-Lösung).
7. Kaliumhexacyanoferrat-[III] 40 mm. Im Dunkeln aufbewahren.
8. Methämoglobin (400 mg/100 ml).

Die Herstellung der Hämoglobinlösung erfolgte nach der von NYMAN (5) angegebenen Modifikation der Methode von MCQUARRIE und BENIAMS (19).

1 Volumen Erythrocyten (vom Menschen) — mit 0,154M NaCl-Lösung gewaschen, bis sich mit einer der üblichen Eiweißfällungsmethoden keine Trübung der Waschflüssigkeit mehr nachweisen läßt — wird mit 2 Volumina demineral. Wasser hämolysiert. Durch Ansäuern der Lösung mit 0,1N HCl auf pH $5,8 \pm 0,1$ und anschließendes Zentrifugieren werden die Zellmembranen abgetrennt. Die Lösung wird dann mit 0,1N NaOH auf pH $7,1 \pm 0,1$ neutralisiert und die nochmals auftretende sehr kleine Niederschlagsmenge abzentrifugiert. Diese Hb-Lösung, deren Gehalt bei ungefähr 5 g/100 ml liegen sollte, wird in Portionen zu etwa 5 ml bei -23° aufbewahrt.

Nach dem Auftauen und evtl. nochmaligem Zentrifugieren wird der Hb-Gehalt nach der Hämoglobin-Cyanid-Methode genau bestimmt, und die Anzahl ml, die zur Herstellung von 50 ml einer 400 mg/100 ml-Lösung erforderlich sind, berechnet. In einen 50 ml Meßkolben pipettiert man 0,5 ml der 40 mm $K_3[Fe(CN)_6]$ -Lösung, die berechneten ml der Hb-Lösung und füllt mit 0,154M NaCl-Lösung zur Marke auf.

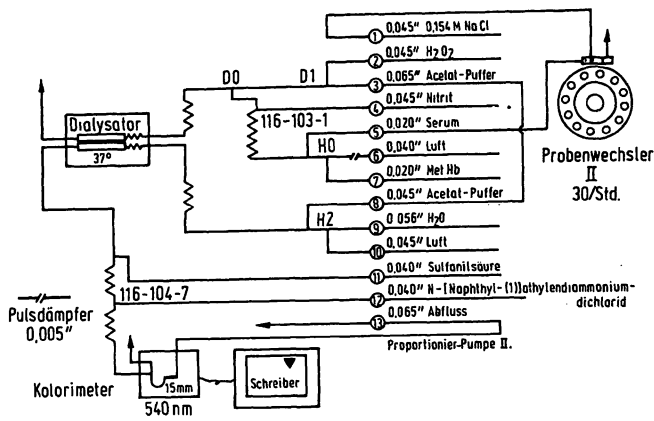


Abb. 1

Fließschema für die Haptoglobinbestimmung. Volumenverhältnisse im Reaktionsansatz: Puffer: Peroxid:Nitrit:MetHb:Serum = 2:1:1:0,2:0,2

Apparatur

Es wurde das Auto-Analyzer-System der Fa. Technicon mit folgenden Einheiten verwendet: Probenwechsler II, Proportionierpumpe II, Dialysator, Kolorimeter (540 nm) und Registrier-einrichtung. Das Fließschema zeigt Abbildung 1.

Anmerkungen

Es hat sich ein Kamm (30 1/1) mit längerer Zwischenspülzeit als zweckmäßig erwiesen, da aufeinanderfolgende Peaks unterschiedlicher Höhe ohne Schwierigkeit ausgemessen werden können. — Das Zustandekommen eines einwandfreien Blasenmusters bei H0 ist für die Beschaffenheit der Peaks entscheidend. — Eine Veränderung der Basislinie im Laufe einer Analysenfolge kommt nicht vor, da die Methode mit Dialyse arbeitet und so die Küvette von allmählich auftretendem Belag frei bleibt. — Die Zeit vom Einsaugen der Probe bis zum Erscheinen des Peaks auf dem Registrierpapier beträgt etwa 9 Min. — Die Umrechnung von der auf dem Registrierpapier angegebenen Transmission T [%] in Extinktionsunterschiede ΔE erfolgt nach der Formel: $\Delta E = \log_{10}^0 T_{\text{Probe}} - \log_{10}^0 T_{\text{Basis}}$.

Vorgehen bei Serienanalysen

Man setzt zunächst die Puffer-, Peroxid-(0,98 mm), Sulfanilsäure-, N-[Naphthyl-(1)]-äthylendiammoniumdichlorid-Lösung und anstatt MetHb 0,154M NaCl-Lösung ein und justiert das Kolorimeter auf E = 0. Danach läßt man die Nitrit-Lösung eingehen. Die Extinktion soll dann zwischen 0,9 und 1,0 liegen. Schließlich tauscht man die 0,154M NaCl- gegen die MetHb-Lösung aus und wartet, bis sich die neue Basislinie nach 3—4 Min. stabilisiert hat. Dann startet man den Probenwechsler.

Ergebnisse und Diskussion

Zur Wahl der Reaktionsbedingungen

In einem idealen System sollte nur der Hb-Hp-Komplex katalytisch eine Beschleunigung des Reaktionsablaufes bewirken, freies Hämoglobin dagegen nicht. Auch das hier angewandte System ist nicht ideal, deshalb müssen die Bedingungen so gewählt werden, daß die Eigenaktivität des Hämoglobins möglichst klein bei möglichst großer Aktivität des Hb-Hp-Komplexes bleibt. Das Verhältnis der Aktivitäten ist zu beeinflussen durch:

1. pH der Pufferlösung

Wie Abbildung 2 zeigt, ist der durch den Hb-Hp-Komplex (Hb-Bindungskapazität 80 mg/100 ml) hervorgerufene Extinktionsunterschied über den untersuchten pH-Bereich nahezu konstant, während MetHb (400 mg/100 ml) mit steigendem pH eine starke Zu-

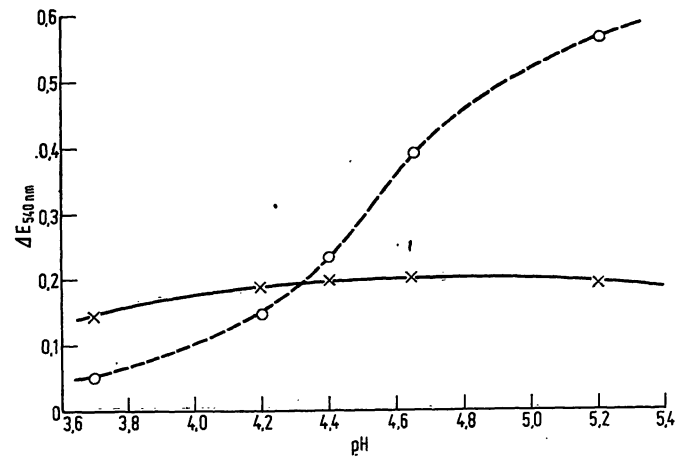


Abb. 2

Extinktionsunterschiede bei variiertem pH des 0,1M Acetat-Puffers, 0,4M an NaCl, bewirkt durch den MetHb-Hp-Komplex (Hb-Bindungskapazität 80 mg/100 ml) x—x bzw. durch MetHb (400 mg/100 ml) o—o, 0,98 mM Peroxid-, 0,3 mM Natriumnitritlösung

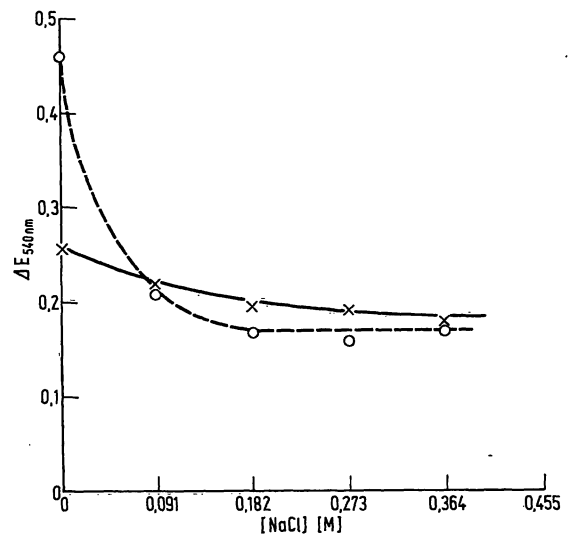


Abb. 3

Extinktionsunterschiede bei Variation der NaCl-Molarität (Abszisse: Endkonzentrationen im Reaktionsgemisch) des 0,1M Acetat-Puffers, pH 4,2. Übrige Bedingungen wie in Abb. 2

nahme von ΔE und damit der Aktivität erkennen läßt. Unter pH 4 wirkt sich die zunehmende Säuredenaturierung des MetHb störend aus (vgl. eine jüngst beschriebene Methode (20)).

2. NaCl-Konzentration der Pufferlösung

Abbildung 3 zeigt, daß Zusatz von NaCl zum Puffer die Eigenaktivität von MetHb wesentlich herabsetzt. Die optimale NaCl-Konzentration ist mit 0,182 Mol/l im Reaktionsgemisch erreicht.

3. Wasserstoffperoxidkonzentration

Für die Reaktion dieses Systems



wäre eine der Nitrit- äquimolare Peroxidmenge theoretisch ausreichend. Eine genügende Empfindlichkeit erhält man jedoch erst bei höheren Peroxidkonzentrationen (s. Abb. 4).

Bei weiterer Steigerung der Peroxidkonzentration tritt ab etwa 5,4 mM für den Hb-Hp-Komplex wieder eine

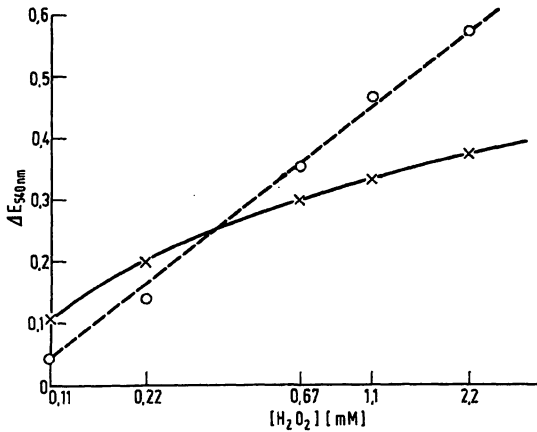


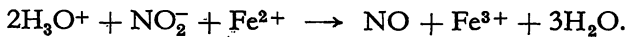
Abb. 4

Extinctionsunterschiede bei Variation der Wasserstoffperoxidkonzentration (Abszisse: log. Einteilung, Endkonzentrationen im Reaktionsgemisch). 0,1M Acetat-Puffer pH 4,2; 0,4M an NaCl. Übrige Bedingungen wie in Abb. 2

Verminderung von ΔE , also eine Abnahme der Aktivität, ein.

Zur Wahl von Methämoglobin

NYMAN (5) und andere Autoren wiesen nach, daß Hb und MetHb bei der Kopplung an Haptoglobin identische Peroxydase-Aktivitäten entfalten. In dem hier beschriebenen System tritt jedoch beim Arbeiten mit Hb eine weitere Nitrit-verbrauchende Reaktion auf, die bei Verwendung von MetHb unterbleibt. — Bei Prüfung des Systems *ohne* Wasserstoffperoxid findet man bei der Untersuchung von hämolysefreien Seren einen Nitritverlust von etwa 1—2% im Vergleich zu proteinfreien Lösungen, der dadurch eintritt, daß Nitrit-Moleküle in der Proteinstruktur haften bleiben und nicht die Dialyse passieren. (Für die Haptoglobinbestimmung ist dies bedeutungslos, da in den Standardseren der gleiche Effekt auftritt.) Untersucht man aber hämolytische Seren oder Hb-Lösungen, so treten dem Hb-Gehalt entsprechend größere Nitrit-Verluste auf, sie unterbleiben, wenn man das Hb-Fe²⁺ vorher mit K₃[Fe(CN)₆] oxydiert. Offensichtlich wird Nitrit für einen etwa folgendermaßen zu formulierenden Vorgang verbraucht:



Es läßt sich weiterhin zeigen, daß sich diese Reaktion innerhalb sehr kurzer Zeiten in quantitativ gleichem Ausmaß sowohl für Hb als auch für den Hb-Hp-Komplex abspielt, was ein weiterer Beweis für die allgemeine Ansicht sein mag, daß das Häm bei der Kopplungsreaktion zwischen Hb und Hp unbeteiligt bleibt.

Die Ermittlung der Hämoglobin-Bindungs-kapazität von Standardseren

Überschüssig anfallende, hämolysefreie Seren von Patienten werden gesammelt. Die Hb-Bindungs-kapazität so gewonnener Poolseren pflegt zwischen 100 bis 200 mg/100 ml zu liegen. (Seren von gesunden Personen sind wegen des zu niedrigen Titters weniger geeignet.)

Die *Standardisierung* kann erfolgen:

1. durch Titration mit steigenden Methämoglobin-mengen. Vorgehen: Von der genau 400 mg/100 ml enthaltenden MetHb-Lösung stellt man sich durch Verdünnen mit 0,154M NaCl MetHb-Lösungen der Konzentrationen 40, 80, 120 usw. mg/100 ml her und setzt diese in den Probenwechsler. In Schlauch 7 läßt man das zu standardisierende Serum eingehen. Bei graphischer Darstellung der erhaltenen Extinctionsunterschiede gegen die entsprechenden MetHb-Konzentrationen erhält man zwei sich schneidende Geraden (s. Abb. 5). Der Schnittpunkt entspricht der MetHb-Konzentration, bei der die Bindungskapazität des Haptoglobins erschöpft ist. Die geringe Steigung der zweiten Geraden ist auf die kleine Eigenaktivität des MetHb zurückzuführen.

2. durch Titration mit steigenden Serum-mengen bei konstanter MetHb-Konzentration. Dieses Vorgehen entspricht im Prinzip JAYLES Saturations-Methode. Von dem zu standardisierenden Serum stellt man sich mit 0,154M NaCl eine Verdünnungsreihe mit 0,1, 0,2 usw. ml Serum auf 1,0 ml her und setzt diese in den Probenwechsler. Die MetHb-Konzentration (Schlauch 7) muß kleiner sein als die zu erwartende Hb-Bindungs-kapazität, zweckmäßig 80 oder 100 mg/100 ml. Es ergeben

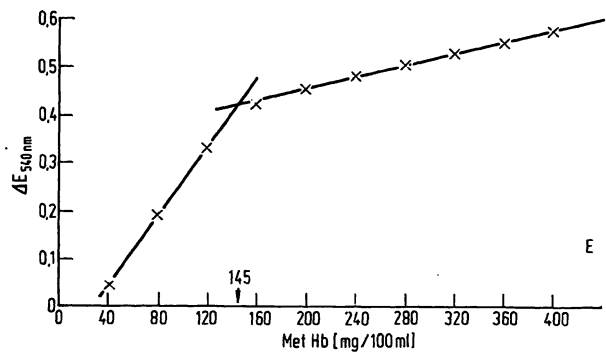


Abb. 5

Standardisierung eines Poolserums durch Titration mit steigenden MetHb-Mengen. 0,98 mM H₂O₂-Lösung

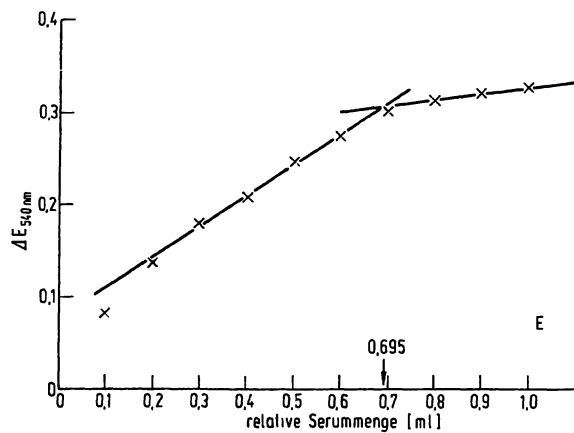


Abb. 6

Standardisierung eines Poolserums durch Titration mit steigenden Serum-mengen. 4,9 mM H₂O₂-Lösung. Berechnung der Hb-Bindungs-kapazität (Hb-Bk):

$$Hb-Bk = \frac{100}{0,695} = 144 \text{ mg/100 ml}$$

Abszisse: Relative Serummenge (ml Serum im Gesamtvolumen von 1,0 ml)

sich bei der graphischen Darstellung von ΔE gegen die Serumverdünnungen wieder zwei sich schneidende Geraden (Abb. 6); der Schnittpunkt entspricht der Serummenge, bei der die vorgelegte MetHb-Menge gerade verbraucht ist. Die Hämoglobin-Bindungs-kapazität (Hb-Bk) berechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Hb-Bk [mg/100 ml]} = \frac{\text{vorgelegtes Hb [mg/100 ml]} \cdot 1,0 \text{ [ml]}}{\text{austitrierte Serummenge [ml]}}$$

Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse der Titrationsen einiger Standardseren mit den eben beschriebenen zwei Ver-fahren, dazu die bei Anwendung der Serienanalyse dieser Methode (s. unter „Serienanalysen“) erhaltenen sowie die Ergebnisse nach der Methode von TARUKOSKI¹⁾.

Tab. 1
Ergebnisse der Titrationsen einiger Standardseren

Standard-serum	MetHb-Titration	Hämoglobin-Bindungs-kapazität (mg/100 ml)		
		diese Methode Serum-Titration	Serienanalyse, B als Standard	nach TARUKOSKI ¹⁾
A	182	179	—	180
B	166	161	/	159
C	163	166	158	158
D	—	76	67	62
E	145	144	145	135
F	190	187	202	190

Die Standardseren wurden bei -23° aufbewahrt. Bei einmaligem Auftauen nach 8 Monaten ließ sich keine Veränderung der Hb-Bindungs-kapazität nachweisen. Für die Untersuchung einer größeren Anzahl von Proben sind die oben beschriebenen Verfahren wegen der relativ großen benötigten Serummenge, der zeit-raubenden Pipettier- und graphischen Auswertungs-arbeit gleichermaßen ungeeignet.

Serienanalysen

Ist eine größere Anzahl von Proben zu untersuchen, geht man analog JAYLES Aktivationsmethode vor, d. h., man läßt die Seren stets mit einem Überschuß an MetHb reagieren. Um primär einen möglichst großen Bereich zu erfassen, werden etwa 400 mg MetHb/100 ml eingesetzt, so daß sich Seren bis zu einer Hb-Bindungs-kapazität von etwa 300 mg/100 ml bestimmen lassen, da bis dahin das LAMBERT-BEERSche Gesetz gilt (s. Abb. 7). Seren mit noch höheren Titern müssen verdünnt werden. Bei der Berechnung der Hb-Bin-dungs-kapazität (Hb-Bk) geht man von den in der Probenfolge mitgeführten Standardseren (s. oben) aus. Der Haptoglobingehalt der unbekanntenen Proben be-rechnet sich dann wie folgt:

$$\text{Hb-Bk}_{\text{Probe}} \text{ [mg/100 ml]} = \frac{\text{Hb-Bk}_{\text{Standard}} \text{ [mg/100 ml]} \cdot \Delta E_{\text{Probe}}}{\Delta E_{\text{Standard}}} \quad (1)$$

$= f \cdot \Delta E_{\text{Probe}}$

Der Faktor f lag während einer Untersuchungsreihe bei 460 ± 35 ($2s_x$), während einer zweiten bei 390; zu

¹⁾ Die Bestimmungen nach der Methode von TARUKOSKI wurden im chem. Zentrallaboratorium, Allmänna Sjukhuset, Malmö (Direktor: Prof. Dr. C. B. LAURELL) ausgeführt.

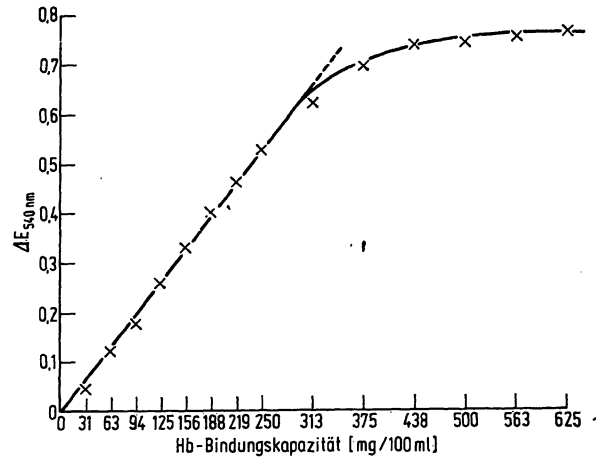


Abb. 7
Titration der Verdünnungsreihe eines Serums mit der Hb-Bindungs-kapazität 625 mg/100 ml bei 400 mg/100 ml vorgelegtem MetHb. Das LAMBERT-BEERSche Gesetz gilt bis zu der Hb-Bindungs-kapazität von etwa 300 mg/100 ml

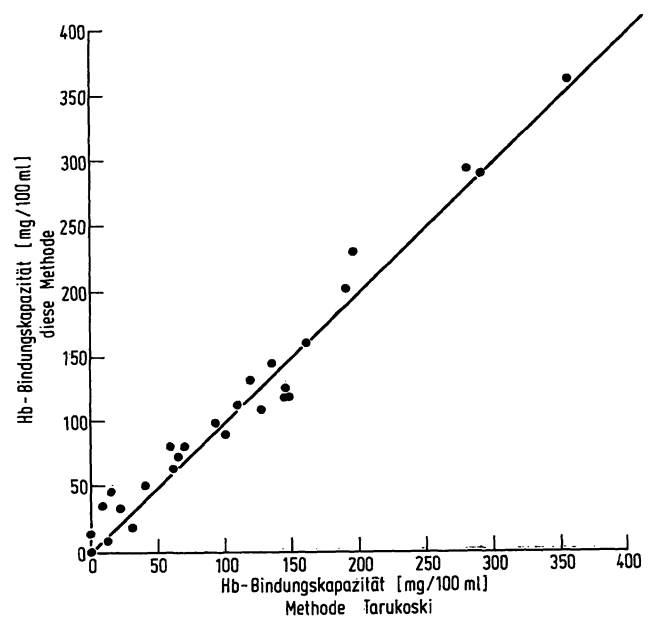


Abb. 8
Vergleich der nach dieser Methode ermittelten Hb-Bindungs-kapazitäts-Werte mit denen nach der Methode von TARUKOSKI¹⁾ ermittelten

Abweichungen tragen am stärksten Veränderungen der H₂O₂-Lösung bei. Die Reproduzierbarkeit der Stan-dards, an beliebiger Stelle in einer Analysenfolge ge-setzt, ist sehr hoch (V. K. = 1,1% im Bereich der Hb-Bindungs-kapazität von 160 mg/100 ml, vgl. auch Abb. 9).

Beim Vergleich dieser Methode mit der von TARUKOSKI¹⁾ zeigt sich eine gute Übereinstimmung (s. Abb. 8).

Abbildung 9 zeigt eine Analysenfolge mit dem Stan-dardserum B und verschiedenen Verdünnungsgraden desselben (die Zahlen geben die Hb-Bindungs-kapazität in mg/100 ml an), dazu einige pathologische und nor-male Seren. H. A. bezeichnet das Serum eines Patienten mit einer hämolytischen Anämie (Sphärocytosis here-ditaria), das erwartungsgemäß keine Aktivität zeigt. Es folgt ein Serum mit hoher Hb-Bindungs-kapazität P* von einem Patienten mit einer Pneumonie. Dieses Serum zeigte eine deutliche Hämolyse. Mit N* ist das stark hämolytische, aus der Nabelschnur gewonnene

Verzeichnis der Inserenten im Jahre 1970

Firma	Ausgaben					
	Januar Seite	März Seite	Mai Seite	Juli Seite	September Seite	November Seite
Beckman Instruments GmbH, 8 München		25	53	87		129
BF-Vertr. Gesellschaft mbH für Meßtechnik, 75 KA-Durlach			63			
BIO CAL Instrument GmbH, 8 M-Gräfelfing			41			
Biotronik, 6 Frankfurt/M.			54	87	102	
Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co. GmbH, 777 Überlingen	11	27	55			
C. F. Boehringer + Soehne GmbH, 68 MA-Waldhof	16	36	68	92	112	140
Burger Eisenwerke AG, 6348 Herborn			61			
Calbiochem AG, CH-6000 Luzern		Beilage				
Camag AG, CH-4132 Muttenz	8	26	50	74	104	128
Colora, 7093 Lorch/Wittbg.		31	50, 57	83	107	131
C. Desaga GmbH, 69 Heidelberg				82		118
Deutsche Metrohm GmbH & Co., 7024 Bernhausen						122
Deutsche Pharmacia GmbH, 6 Frankfurt/M.	9	23	39	77	101	121
Ferdinand Enke Verlag, 7 Stuttgart		Beilage				
Farbwerke Hoechst AG, 623 F-Hoechst	5	19	45	71	95	117
Ferak Berlin, 1 Berlin 47		Beilage				
Fry Consultants Inc., CH-8044 Zürich	6		64			
Gödecke & Co., 78 Freiburg	2, 7	18, 24	42, 47	70, 75	94, 99, 103	114, 125
Hartmann + Braun Digital GmbH, 1 Berlin				81	109	126
Karl Hecht, 8741 Sondheim/Rhön						132
Heidolph-Elektro KG, 842 Kelheim				84		
Heinrich-Wieland-Preis						123
Kurt Hillerkus, 415 Krefeld	Beilage					
A. Hölzel, 825 Dorfen			48			
Hormuth-Vetter, 69 Heidelberg + Wiesloch			46	74	100	118
Ima GmbH & Co. KG, 63 Gießen			48			
Janke & Kunkel KG, 7813 Staufien			54	80	102	
Jenaer Glaswerk Schott & Gen., 65 Mainz			59			
Dr.-Ing. Herbert Knauer & Co. GmbH, 1 Berlin			Beilage		100	128
Fritz Kniese, 355 Marburg-Marbach						128
Labotron Meßtechnik GmbH, 8191 Gelting					108	122
E. Merck, 61 Darmstadt	3	21	43	73	97	115
Merz & Dade SA, CH-3018 Bern	1	17	37	69	93	113
Millipore Filter GmbH, 6078 Neu-Isenburg			52			
Dr. Molter GmbH, 69 Heidelberg	15	35	67	91	111	139
Münchener Messe Ges.mBH, 8 München		29	61			
Philips industrie elektronik GmbH, 2 Hamburg			51	79, 85	105	
Carl Roth, 75 Karlsruhe			Beilage		Beilage	
Walter Sarstedt, 5221 Rommelsdorf			62			
Sartorius-Membranfilter GmbH, 34 Göttingen			Beilage		78	96
Serva-Technik GmbH & Co. KG, 6909 Malsch			40			
Shimadzu (Europa) GmbH, 4 Düsseldorf			65			
Siemens AG, 852 Erlangen						127
Sigma Chemical Comp., St. Louis/USA	4	22	44	72	98	116

(Fortsetzung auf Seite 138)

Verzeichnis der Inserenten im Jahre 1970

(Fortsetzung von Seite 137)

Firma	Ausgaben					
	Januar Seite	März Seite	Mai Seite	Juli Seite	September Seite	November Seite
Carl Schleicher & Schüll, 3354 Dassel			48	82		
Günther Schmidt, 2 Hamburg 68		20		76		120
Max Schmidt-Römhild, 24 Lübeck	Beilage					
Schwabe & Co. GmbH, 7 Stuttgart	Beilage					
Otto Spatz, 8 München	82					
Springer-Verlag, 1 Berlin	49					
Studienförderung d. Ernährungswissenschaften	119					
Technicon GmbH, 6 Frankfurt/M.	8		38			
Tempus NV, Oegstgeest/Holland	84					
Thurgauisches Kantonsspital, CH-8596 Münsterlingen	100					
Travenol International GmbH, 8 München	124					
Vitatron GmbH, 5024 Pulheim	10					
M. Woelm, 344 Eschwege		29	63			
WTW Wissenschaftl. Techn. Werkstätten GmbH, 812 Weilheim	10	26	57			131
Carl Zeiss, 7082 Oberkochen	Beilage					

Anzeigenverwaltung: Merkur Werbung, 5210 Troisdorf 22, Hauptstraße 23—27, Tel. (02241) 42051-54 — Telex 08/83386

VERLAG CHEMIE

Als Abschlußband erscheint:

Neuere Methoden der präparativen organischen Chemie Band VI

Herausgegeben von Wilhelm Foerst

Über dieses Buch:

Mit dem vorliegenden Band VI wird die Reihe abgeschlossen. Sie brachte und bringt Methoden, die für die präparative Chemie klassisch geworden sind. Den in diesen Bänden veröffentlichten Aufsätzen liegen Arbeiten namhafter Autoren zugrunde, die zuerst in der Zeitschrift „Angewandte Chemie“ erschienen sind. Gegenüber der dort abgedruckten Fassung sind alle Beiträge erweitert und auf den neuesten Stand gebracht worden.

Inhalt:

H. Holtschmidt, E. Degener, H.-G. Schmelzer, H. Tarnow und W. Zecher: Herstellung, Eigenschaften und Reaktionen von Polychloraminderivaten · H. Reiff: Die gezielte Aldolkondensation · K. Bott und H. Hellmann: Carbonsäuresynthesen mit 1,1-Dichloräthylen · M. Regitz: Diazogruppen-Übertragung · E. Kühle, B. Anders und G. Zumach: Isocyaniddihalogenid-Synthesen · E. Grigat und R. Pütter: Synthese und Reaktionen der Cyansäureester · J. Falbe:

Ringschlußreaktionen mit Kohlenmonoxid · H. Ulrich und A. A. R. Sayigh: Synthesen von Isocyanaten und Carbodiimiden · E. Winterfeldt: Additionen an die aktivierte CC-Dreifachbindung · H. Ulrich und R. Richter: s-Triazinderivate durch polare Cycloaddition von Isocyanaten.

1970. VII, 297 Seiten mit 3 Abbildungen und 60 Tabellen. Kunststoffeinfband DM 49,—. Die Bände I-V sind weiterhin lieferbar.

VERLAG CHEMIE · GMBH
WEINHEIM/BERGSTR.

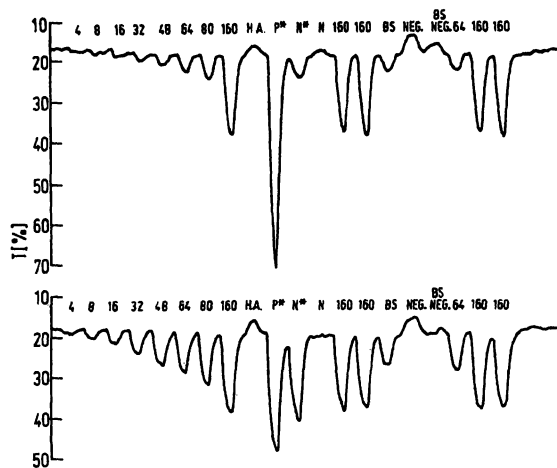


Abb. 9

Probenfolge von Seren mit bekannter Hb-Bindungskapazität (Zahlen), pathologischen und normalen Seren. — Oben: MetHb 400 mg/100 ml, 0,98 mM H₂O₂-Lösung. — Unten: MetHb 100 mg/100 ml, 4,9 mM H₂O₂-Lösung. (Erläuterungen s. Text.)

Serum eines Neugeborenen bezeichnet, mit N ein auf die gleiche Weise gewonnenes hämolysefreies Serum eines Neugeborenen. Im letzteren Fall findet man erwartungsgemäß eine Hb-Bindungskapazität nahe Null.

Hämolytische Seren (in Abb. 9 mit * bezeichnet) würden je nach Hämolysegrad eine fälschlich erhöhte Hb-Bindungskapazität vortäuschen, wenn man die Hämolyse unberücksichtigt ließe. — Vorgehen bei hämolytischen Seren: Man setzt anstelle von MetHb (Schlauch 7) 0,154M NaCl und zieht den so erhaltenen Leerwert von dem mit MetHb erhaltenen Extinktionsunterschied ab, bevor man mit dem Faktor f multipliziert. Der so erhaltene Wert gibt annähernd die Menge des noch Hb-bindungsfähigen Haptoglobins an. Außer bei hämolytischen sollte auch bei bilirubinhaltenen Seren, in denen der Hämolysegrad schwer zu beurteilen ist, so verfahren werden.

Das Serum eines gesunden Blutspenders ist in Abbildung 9 mit BS bezeichnet. Dann folgt ein Serum (NEG), dessen Peak unter die Basislinie abfällt. (Bei Abwesenheit von MetHb — Leerwert — wird keine Negativität beobachtet.) Das Auftreten sog. *negativer Seren*, d. h. Seren, in denen die Aktivität kleiner ist als die des vorgelegten MetHbs, ist aus Untersuchungen mit JAYLES System bekannt (5). Die Frage liegt nahe, ob durch Inhibitoren die Formierung des Hb-Hp-Komplexes in der Spirale (116—103—1) verhindert wird oder ob die Inhibitoren gegen den formierten Hb-Hp-Komplex wirksam werden. Geht man von im Reagenzglas präformiertem Hb-Hp aus (80 mg/100 ml); so findet man bei 1:1 Verdünnung mit 0,154M NaCl erwartungsgemäß eine Hb-Bindungskapazität von 40 mg/100 ml, nach Zusatz des NEG-Serums im gleichen Verhältnis aber nur 14 mg/100 ml. Abbildung 9 zeigt, wie das Serum BS nach Vermischen mit der gleichen Menge des NEG-Serums seine Aktivität vollständig verliert (BS/NEG). (Wegen der zu geringen Zahl zur Verfügung stehender negativer Seren konnten quantitative Verhältnisse nicht näher untersucht werden.) Die

Tab. 2
Hämoglobin-Bindungskapazität Hb-Bk (mg/100 ml) der in Abb. 9 gezeigten Seren

Hb-Bk Standard bzw. Serenbezeichnung	Hb-Bk berechnet nach Gleichung (1)	Hb-Bk graphisch ermittelt aus Abb. 10
4	4	
8	11	
16	17	
32	28	
48	38	
64	55	
80	70	
160	160	112
H. A.	(-10)	neg.
P*	264 ¹⁾	118 ¹⁾
N*	12 ¹⁾	8 ¹⁾
N	0	4
160	158	112
160	162	108
BS	54	52
NEG	(-46)	neg.
BS/NEG	(-18)	0
64	52	
160	157	109
160	163	107
<hr/>		
MetHb (mg/100 ml)	400	100
H ₂ O ₂ (mMol/l)	0,98	4,9
<hr/>		
f	474	400
a	—	0,0375

¹⁾ Nach Berücksichtigung der Hämolyse

Befunde beweisen jedoch, daß es Seren mit Inhibitoren nicht nur gegen freies Hb, sondern auch gegen den Hb-Hp-Komplex gibt.

Die Werte der nach Gleichung (1) berechneten Hb-Bindungskapazität der Seren von Abbildung 9 (obere Reihe) finden sich in Tabelle 2.

Vorgehen bei Seren mit einer Hb-Bk unter 100 mg/100 ml.

Bei Einschränkung des Untersuchungsbereiches auf Seren mit niedrigem Haptoglobingehalt läßt sich die Empfindlichkeit der Methode auf verschiedene Weise steigern, am einfachsten durch die Erhöhung der H₂O₂-Konzentration. Abbildung 9 (untere Reihe) zeigt die gleiche Serenfolge wie zuvor beschrieben, nur daß anstelle von 400 mg/100 ml jetzt 100 mg/100 ml MetHb und anstelle der 0,98 mM die 4,9 mM H₂O₂-Lösung gesetzt wurde. Das Standardserum mit der Hb-Bindungskapazität von 4 mg/100 ml liefert jetzt einen deutlichen Peak. Es ist jedoch zu beachten, daß die Eichgerade nicht durch den Nullpunkt geht und daß mehrere Standards mitzuführen sind, um die Konstante a für Gleichung (2) graphisch ermitteln zu können (s. Abb. 10). Auch die Bestimmung der Hb-Bindungskapazität (Hb-Bk) unbekannter Proben erfolgt am einfachsten aus der graphischen Darstellung (vgl. Tab. 2). Folgende Beziehung gilt für einen großen Bereich:

$$Hb-Bk_{\text{Probe}} = \frac{Hb-Bk_{\text{Standard}}}{\Delta E_{\text{Standard}} - a} \cdot (\Delta E_{\text{Probe}} - a) \quad (2)$$

Da nur 100 mg/100 ml MetHb eingesetzt wurden, sollten die höchsten zu erwartenden Werte für die Hb-Bindungskapazität etwa den gleichen Zahlenwert haben. Höhere Werte findet man bei hämolytischen

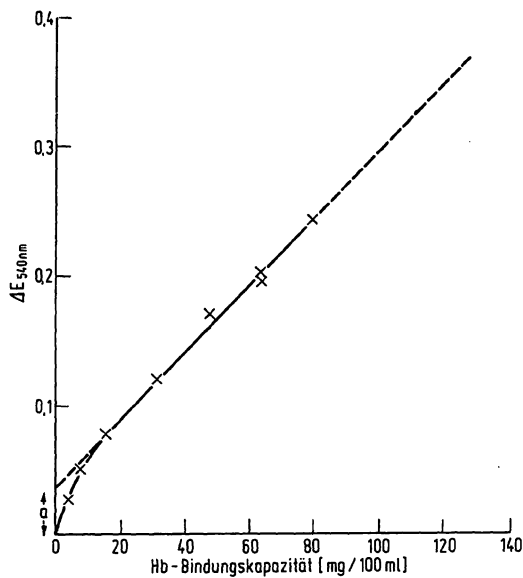


Abb. 10

Graphische Darstellung zur Ermittlung von Hb-Bindungskapazitäts-Werten < 100 mg/100 ml und der Konstanten a. Eichwerte aus Abb. 9, untere Reihe

Seren (P*, N* in Abb. 9). Die Wichtigkeit der Leerwertsubtraktion bei hämolytischen Seren wird so nochmals deutlich.

Normalwerte

Für die Aufstellung von Normalwerten wurden willkürlich Seren von Personen ausgewählt, die an einer Reihenuntersuchung in Eskilstuna bzw. an einer Reihenuntersuchung von Bauarbeitern teilgenommen hatten. Diese Personen wurden ärztlich untersucht und folgende Laboratoriumsuntersuchungen wurden vorgenommen: SMA7 (Leukocyten, Hämatokrit, Hb, Erythrocyten, Mean corpuscular volume (MCV), Mean corpuscular hemoglobin (MCH), Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)); SMA 12 (Gesamtcholesterin, Calcium, anorg. Phosphat, Gesamtbilirubin, Albumin, Gesamteiweiß, Harnsäure, Harnstoff, Glucose, alkal. Phosphatase, Lactat-Dehydrogenase, Serum-Glutamat-Oxalacetat-Transaminase); eiweißgebundenes Jod (PBI), Serumeisen und Transferrin. Hb-Bindungskapazitäts-Werte, erhalten aus Seren von Personen, die bei obigen Untersuchungen einen pathologischen Befund zeigten, wurden vor der sta-

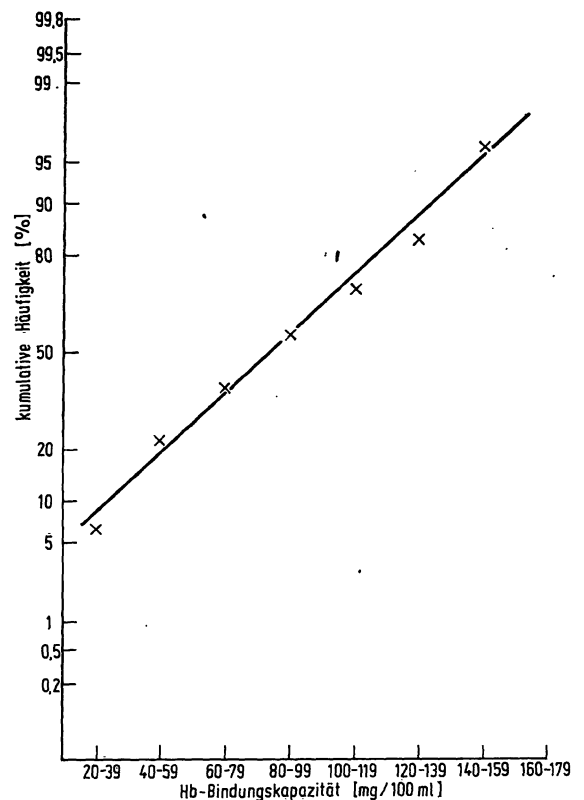


Abb. 11

Darstellung des Normalmaterials auf Wahrscheinlichkeitspapier. Ordinate: kumulative Häufigkeit, Abszisse: Klassen

Tab. 3
Normalwerte der Hämoglobin-Bindungskapazität (Hb-Bk)

	N	Alter (J.)	\bar{x} (mg/100 ml)	1s \bar{x}
Gesamt	104	30—70	95	39
♂	54	30—68	98	40
♀	50	45—70	92	38

tistischen Berechnung eliminiert. Die so erhaltenen Normalwerte finden sich in Tabelle 3.

Eine Differenzierung in genetische Haptoglobintypen konnte nicht vorgenommen werden; das Gesamtmaterial verhält sich wie eine echte Normalverteilung (Abb. 11).

B. VON PORAT, M. D., danke ich für die wertvollen Hinweise, Ing. D. HORVÁTH für das Anfertigen der graphischen Darstellungen.

Literatur

1. SCHULTZE, H. E. und G. SCHWICK, Behringwerk-Mitt., Marburg 35, 57 (1958). — 2. KLUTHE, R., J. FAUL und H. HEIMPEL, Nature, London 205, 93 (1965). — 3. GABL, F. und H. HUBER, Wien, klin. Wschr. 77, 1037 (1965). — 4. LAURELL, C. B. und M. NYMAN, Blood 12, 493 (1957). — 5. NYMAN, M., Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 11, Suppl. 39 (1959). — 6. HERMAN, E. C., J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 57, 825 (1961). — 7. JAYLE, M. F., Bull. Soc. chim. biol., Paris 33, 876 (1951). — 8. CONNELL, G. E. und O. SMITHIES, Biochem. J. 72, 115 (1959). — 9. OWEN, J. A., F. C. BETTER und J. HOBAN, J. Clin. Path., London 13, 163 (1960). — 10. TARUKOSKI, P. H., Scand. J. Clin. Laborat. Invest. 18, 80 (1966). — 11. BERNIER, G. M., Clin. chim. Acta, (Amsterdam) 18, 309 (1967). — 12. PANLITSCHKO, M. und G. WEIPPL, Clin.

chim. Acta (Amsterdam) 19, 439 (1968). — 13. LUPOVITCH, A. und R. Y. KATASE, Clin. chim. Acta (Amsterdam) 11, 566 (1965). — 14. BURROWS, S. und E. B. HOSTEN, Technicon Symp. 1965, Automation in anal. chem., Mediad Inc., N. Y. C. (1966). — 15. MORETTI, J., M. WAKS und M. F. JAYLE, Ann. biol. clin., Paris 25, 149 (1967). — 16. CHANCE, B., J. biol. Chemistry 194, 471 (1952). — 17. BRATTON, A. C. und E. K. MARSHALL, J. biol. Chemistry 128, 537 (1939). — 18. Documenta GEIGY, wissenschaftl. Tabellen, 6. Aufl., Basel (1960). — 19. McQUARRIE, E. B. und H. N. BENIAMS, Proc. Soc. exp. Biol. Med., 86, 627 (1954). — 20. ROY, R. B., R. W. SHAW und G. E. CONNELL, J. Laborat. Clin. Med., S. Louis 74, 698 (1969).

Dr. Chr. Köhne
S 63188 Eskilstuna, Centralasarettet