

# Bestimmung von Serumeisen und Eisenbindungskapazität ohne Enteiweißung

Von K. LAUBER

Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Universität Bern (Direktor: Prof. Dr. med. H. Aebi)

(Der Schriftleitung zugegangen am 21. Dezember 1964)

Eine Methode zur direkten Bestimmung des Serumeisens wird in allen technischen Einzelheiten beschrieben. Sie besteht in der Abtrennung des Eisens vom Transferrin durch das anionaktive Detergens „Teepol“, der Reduktion mit Dithionit, der Farbkomplexbildung mit Bathophenanthrolindisulfonat und der Photometrie. — Die Durchführung der ganzen Analyse in der Photometerküvette erfordert nur eine Minute. Die Bestimmung wird durch Serumeiweiß, Bilirubin, Lipämie oder Hämolyse nicht gestört. Es besteht gute Übereinstimmung der Analysenergebnisse mit denjenigen einer bewährten Methode mit Enteiweißung.

Full practical details are given for a direct determination of iron in serum. The iron is separated from the transferrin with the anionic detergent "Teepol"; it is then reduced with dithionite and the colour complex with bathophenanthroline disulphonate is determined photometrically. The total analysis is carried out in the photometer cuvette and requires only one minute. Serum protein, bilirubin, lipaemia or haemolysis do not interfere. The results are in good agreement with those from an approved method with deproteination.

Die Bestimmung des Serumeisens gilt in vielen Laboratorien noch als eine Aufgabe, die nur von besonders geschultem Personal bewältigt werden kann. Hauptgrund für die Sonderstellung dieser Analyse ist wohl ihre Störanfälligkeit wegen des ubiquitären Vorkommens von Eisensparten. Es gilt für alle Analysen, nicht nur für die Eisenbestimmung: Je weniger Manipulationen und vor allem je weniger Gefäße eine Methode erfordert, desto geringer ist die Verunreinigungsgefahr. Im folgenden wird ein Verfahren beschrieben, das eine genaue Serumeisenbestimmung *ohne* Verwendung von Reagentgläsern *direkt in der Photometerküvette* erlaubt. An die Stelle des sonst üblichen sauren Aufschlusses des Transferrins tritt die Abtrennung des Eisens durch ein Netzmittel. Durch geeignete Wahl der Reaktionsbedingungen sowie der reduzierenden und komplexbildenden Reagentien gelingt es, den Zeitaufwand für eine vollständige Eisenbestimmung auf eine Minute zu reduzieren. Die Methode lehnt sich an das von SANFORD (3) beschriebene Verfahren an, enthält jedoch einige grundlegende Verbesserungen.

## Methodik

### Reagentien

1. „Teepol 710“ (Anionaktives Netzmittel der „Shell Chemical Company“)
2. Natriumdithionit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )
3. Magnesiumsulfat 1-proz.: 10 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  mit aqua dest. ad 1000 ml
4. Natronlauge 3-proz.: 30 g NaOH mit aqua dest. ad 1000 ml  
Die Reagentien 1—4 brauchen *nicht* besonders eisenarm zu sein.
5. „Teepol“-Reagens, eisenfrei: 5 g Dithionit 2 werden in 100 ml Magnesiumsulfatlösung 3 aufgelöst und sofort mit 100 ml Teepol 1 gemischt. Unmittelbar danach werden 50 ml Natronlauge 4 zugesetzt. Das entstandene trübe Gemisch wird 10 bis 15 Min. stehengelassen und dann zentrifugiert. Dabei geht alles Eisen als  $\text{Fe}(\text{OH})_2$  mit dem Magnesiumhydroxyd-Niederschlag ins Sediment. Der Überstand wird dekantiert und mit Eisessig auf  $\text{pH} = 5,4\text{—}6,2$  eingestellt. Das nunmehr gebrauchsfertige Reagens wird in Kunststoffgefäße abgefüllt, deren Volumen ungefähr einem Tagesbedarf entspricht und bei 4° aufbewahrt. In gut verschlossenen, bis oben gefüllten Gefäßen ist die Lösung mindestens 2 Monate haltbar. Bei

Luftzutritt nimmt sie allmählich Sauerstoff auf und büßt ihre reduzierende Wirkung ein.

6. Bathophenanthrolin-disulfonat (2): 100 mg Bathophenanthrolin werden in 0,5 ml Chlorsulfonsäure gelöst und während etwa 1 Min. auf kleiner Flamme zum Sieden erhitzt. Die bräunliche Lösung wird in kaltem Wasser abgekühlt und mit 10 ml Wasser verdünnt. Die dabei sich bildende Fällung wird durch leichtes Erwärmen wieder in Lösung gebracht. Zur Verkleinerung der Oberflächenspannung und damit der Tropfengröße werden der Lösung ein paar Tropfen „Teepol“-Reagens 5 zugesetzt. Die Haltbarkeit ist unbeschränkt.
7. Eisenstandard: 50 mg reines Eisen (z. B. Klavierdraht „Merck“) werden in ein paar ml konz. Salpetersäure gelöst und mit Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Aus dieser Stammlösung wird durch 100fache Verdünnung mit DM-Wasser der Gebrauchsstandard von 100  $\mu\text{g}/100\text{ ml}$  hergestellt.
8. Eisen-III-chloridlösung 2,5 mg/100 ml.
9. Magnesiumcarbonat „basisch“.

### Arbeitsweise

Die Methode ist mit einem Spektral-Photometer mit Filter Hg 546 und Küvette  $1 \times 1\text{ cm}$  ausgearbeitet worden. Sie kann aber auf ein beliebiges Photometer mit Licht zwischen 500 und 550  $\text{m}\mu$  (Absorptionsmaximum des Farbkomplexes um 530  $\text{m}\mu$ ) adaptiert werden. Das Verhältnis Serum/„Teepol“-Reagens sollte aber nicht wesentlich erhöht werden (3). Größere „Teepol“-Menge bei gleichbleibendem Serumvolumen ist wohl zulässig, verkleinert aber die Extinktion und damit die Genauigkeit der Bestimmung.

**Reagentien-Leerwert:** 0,5 ml DM-Wasser wird in die Photometerküvette gegeben und mit 1,4 ml Teepol-Reagens 5 gut gemischt. Die Extinktion wird auf 0 gestellt. Aus einem Tropffläschchen oder einer Bürette wird ein Tropfen (etwa 10  $\mu\text{l}$ ) Farbreagens 6 zugesetzt und gut mit dem Küvetteninhalt vermischt; dann wird die Extinktion abgelesen:  $E_L$ .

**Standard:** 0,5 ml Eisenstandard 7 wird gleich behandelt wie das Wasser der Leerprobe; abgelesene Extinktion:  $E_{St}$ .

**Klares Serum:** 0,5 ml Serum wird der gleichen Prozedur unterworfen wie Leerprobe und Standard; abgelesene Extinktion:  $E_A$ . Die Extinktion der Serumprobe soll

sich 10 Sek. nach dem Zusatz des Farbreagens nicht mehr verändern. Nimmt sie allmählich ab, dann wird wie bei einem lipämischen Serum verfahren.

*Lipämisches Serum:* 0,5 ml Serum und 1,4 ml „Teepol“-Reagens 5 werden in einem besonders gereinigten Gläschen (über Nacht in Salpetersäure eingelegt und mit DM-Wasser gespült) gemischt und 15 Min. stehen gelassen. Durch das Netzmittel werden die Chylomikronen aufgelöst. Die klare Probe wird in die Meßküvette gegossen und wie ein normales Serum weiterbehandelt (Extinktion auf 0 stellen usw.).

*Berechnung des Eisengehaltes:*

$$\frac{E_A - E_I}{E_{St} - E_L} \cdot 100 = \mu\text{g Fe}/100 \text{ ml Serum.}$$

*Eisenbindungskapazität:* 0,5 ml Serum wird mit 1 ml Eisen-III-chlorid-Lösung 8 gemischt und 5 Min. stehen gelassen; dann werden 50 mg Magnesiumcarbonat 9 zugesetzt. Während 30 Min. wird die Probe etwa alle 5 Min. aufgewirbelt. Das Magnesiumcarbonat mit dem als Hydroxyd adsorbierten Eisen wird dann abzentrifugiert (Methode nach RAMSAY (1)). 0,5 ml des Überstandes wird wie eine klare Serumprobe auf Eisen analysiert.

*Berechnung der Gesamt-Eisenbindungskapazität (TIBC):*

$$\frac{E_A - E_L}{E_{St} - E_L} \cdot 300 = \mu\text{g Fe}/100 \text{ ml Serum.}$$

## Diskussion

*Reinigung des „Teepol“-Reagens:* SANFORD (3) verwendet zur Entfernung der recht beträchtlichen Eisenmengen aus dem technischen Detergens einen Ionenaustauscher. Eigene Versuche haben gezeigt, daß eine restlose Abtrennung des Eisens nur bei kleiner Durchflußgeschwindigkeit oder aber einer sehr großen Austauschersäule erreicht wird. Die oben beschriebene Methode ist weniger umständlich und führt rascher zum Ziel. Magnesiumionen interferieren nicht mit der Farbkomplexbildung. Die Extinktion des Reagentienleerwertes kann durch Ausfällen des Eisens mit  $\text{Mg}(\text{OH})_2$  bis auf 0,003 heruntergedrückt werden. Mit Ionenaustauscher-Reinigung ist dieser tiefe Wert bei uns nie erreicht worden.

*Wahl des Reduktionsmittels:* SANFORD (3) arbeitet mit Ascorbinsäure als Reduktionsmittel. Unter den angegebenen Bedingungen zeigte sich bei allen Serumproben ein leichtes asymptotisches Ansteigen der Extinktion während mehrerer Minuten, und zwar unabhängig vom pH (5,0—6,6). Beim Durchtesten verschiedener anderer Reduktionsmittel hat sich Dithionit als am besten geeignet erwiesen. Der Extinktionsendwert stellt sich fast augenblicklich nach dem Zusatz des Farbreagens ein und bleibt mehrere Minuten unverändert — klares Serum vorausgesetzt. Das verwendete Dithionit braucht nicht besonders rein zu sein, da es mit dem „Teepol“ zusammen von Eisen befreit wird. Die Haltbarkeit des fertigen „Teepol“/Dithionit-Reagens unter Luftabschluß ist besser als diejenige der „Teepol“/Ascorbatlösung.

*Wahl des Komplexbildners:* Die für die Eisenbestimmung früher verwendeten Komplexbildner Dipyridyl und o-Phenanthrolin sind heute meist ersetzt durch deren Derivate Tripyridyl-s-triazin und Bathophenanthrolin-disulfonat, welche  $\text{Fe}^{II}$ -Komplexe mit wesentlich höheren Extinktionskoeffizienten bilden. Vergleiche zwischen Tripyridyl-s-triazin und Bathophenanthrolin-disulfonat ergaben erstens etwas höhere Extinktionen bei den zur Verfügung stehenden Hg-Linien und zweitens geringere pH-Abhängigkeit für das Phenanthrolinderivat.

*pH-Optimum:* Die nach der Reinigung leicht alkalische „Teepol“/Dithionit-Lösung wurde mit Eisessig auf verschiedene pH-Werte eingestellt (4,6; 4,8; 5,0... 6,8; 7,0; 7,2). Zwischen pH = 5,2 und 6,4 wurden anhand eines Mischserums übereinstimmende Resultate erhalten. In diesem Bereich laufen die Eisenabspaltung, Reduktion und Komplexbildung innerhalb weniger Sekunden vollständig ab. Oberhalb pH = 6,4 stellt sich der Extinktions-Endwert nicht mehr augenblicklich ein und er wird zudem um so kleiner, je höher das pH angesetzt wird. Bei pH = 5,2 bildet sich eine leichte Fällung beim Mischen von Serum und „Teepol“, die aber durch Rühren rasch wieder zum Verschwinden gebracht wird. Je tiefer das pH unter 5,2, desto länger muß gerührt werden. Unterhalb pH = 4,7 ist die Fällung kaum mehr in Lösung zu bringen. Es empfiehlt sich somit, im pH-Bereich von 5,4—6,2 zu arbeiten. Steht kein Meßgerät zur Verfügung, so kann zur pH-Einstellung auch Indikatorpapier verwendet werden. Wegen der leichten Störwirkung des „Teepol“ auf die Indikatorfarbe vergewissere man sich jedoch, daß beim Serumzusatz keine oder höchstens eine flüchtige Fällung entsteht und daß andererseits nach Zusatz des Farbreagens die Extinktion rasch ihren stabilen Endwert erreicht.

*Gültigkeit des Beerschen Gesetzes:* Das Beersche Gesetz gilt mindestens über den Bereich von 0—1000  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ . Bei Extinktionen über 0,4 sind sicherheitshalber 2 Tropfen Farbreagens zuzusetzen.

*Vergleichende Eisenbestimmungen nach zwei Methoden:* Methode I: Oben beschriebenes Verfahren. Methode II: Leicht modifiziertes Verfahren von LANDERS und ZAK (2): Salzsäure Spaltung des Transferrins, Enteiweißung mit Trichloressigsäure, Reduktion mit Ascorbinsäure, Entwickeln mit Bathophenanthrolin-disulfonat in gesättigtem Natriumacetat. 100 beliebige Patientenserum mit Eisengehalt zwischen 18 und 317  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$  wurden parallel nach beiden Methoden analysiert. Die Resultate mit Verfahren II waren im Durchschnitt 0,2  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$  höher als diejenigen mit Methode I. Bei 8 Bestimmungen war der Unterschied zwischen 5 und 8  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ , bei allen übrigen 92 Analysen unter 5  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ . Für Korrelationskoeffizient und Regressionsgerade ergaben sich beim Vergleich der beiden Methoden folgende Werte:  $r = 0,999$ ;  $Y = 0,32 + 0,998 X$ .

*Normalbereiche:* Anhand von 50 Blutspenderseern wurden folgende Normalbereiche gefunden ( $\bar{X} \pm 2s$ ): Serumeisen 52—178  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ ; Eisenbindungskapazität 279—399  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ .

Tab. 1. Prozentuale Wiederfindung bei Eisenzusatz (Extinktion  $\times$  1000)

Probe-Nr.	Aqua dest.		Serum							
			I		II		III		IV	
	a	b	a	b	a	b	a	b	a	b
Mit Fe-Zusatz	103	103	266	267	213	212	156	156	128	128
Ohne Fe-Zusatz	4	4	169	168	112	111	57	57	28	27
% Wiederfindung	99	99	97	99	101	101	99	99	100	101

**Zusatzversuche:** 2 ml Wasser sowie je 2 ml von vier beliebigen Patientenserum wurden mit je 20  $\mu$ l Eisenchloridlösung (enthaltend 2  $\mu$ g Eisen) bzw. mit 20  $\mu$ l Wasser versetzt und auf ihren Eisengehalt untersucht. Die Resultate zeigt Tabelle 1. Die mittlere Wiederfindungsquote der 4 Proben betrug 100,5%.

**Reproduzierbarkeit:** Das gleiche Mischserum wurde 10 mal nacheinander analysiert. Folgende Extinktionen wurden dabei erhalten:  $E \cdot 1000 = 169; 170; 170; 171; 170; 170; 170; 169; 170; 170$ . — Mittelwert: 169,9; Standardabweichung: 0,33%. Dank der minimalen Zahl von Manipulationen ist die Reproduzierbarkeit ausgezeichnet.

**Einfluß der Hämolyse:** Die Zellen von zwei verschiedenen Proben Oxalatblut wurden mit isotonischer Kochsalzlösung gewaschen und dann mit aqua dest. hämolysiert. Das eine Hämolyt (etwa 250 mg/100 ml Hämoglobin, entsprechend etwa 800  $\mu$ g/100 ml Fe) wurde sofort, das andere (etwa 350 mg/100 ml, entsprechend etwa 1200  $\mu$ g/100 ml Fe) erst nach drei Tagen analysiert. In der ersten Probe wurden 8  $\mu$ g/100 ml, in der zweiten 5  $\mu$ g/100 ml Eisen gefunden. Die Schwächung der Eigenfarbe infolge Verdünnung mit dem Farbreagens tropfen (etwa 0,5%) wurde in die Rechnung einbezogen. Die Extinktion stellte sich ebenso rasch auf ihren Endwert ein wie bei einem Serum und blieb auch mehrere Minuten konstant. Eine Miterfassung von Porphyrin-Eisen findet somit nicht statt. Dank der nur sehr geringfügigen Schwächung der Eigenfarbe durch den Zusatz des konzentrierten Farbreagens können selbst stark hämolytische Seren ohne Korrektur analysiert werden. Bei einer Eigenextinktion der Serum/„Teepol“-Lösung von 1,0 (normalerweise um 0,03) beträgt der Fehler zufolge Verdünnung nur — 5  $\mu$ g/100 ml.

**Lipämische Seren:** Durch die hohe Netzmittelkonzentration im Analysenansatz werden selbst starke lipämische Trübungen in einigen Minuten völlig klar aufgelöst. Je nach dem Grad der Lipämie nimmt daher die Eigenextinktion des Serum/„Teepol“-Gemisches während 2 bis 15 Minuten allmählich ab. Um unliebsame Wartezeiten zu umgehen, empfiehlt es sich, trübe Seren vor Beginn der Analysenserie auszusondern, in Reagensgläsern mit „Teepol“-Reagens zu mischen und erst nach völliger Klärung zu photometrieren.

**Technische Hilfsmittel für Serienanalysen:** Bei großen Analysenreihen empfehlen sich folgende zeitsparende Einrichtungen:

Sowohl Serum als auch „Teepol“-Dithionit-Lösung werden mit Hilfe von verstellbaren Injektionsspritzen (z. B. „Ultra-Asept“) mit angesteckten Polyäthylenpipetten

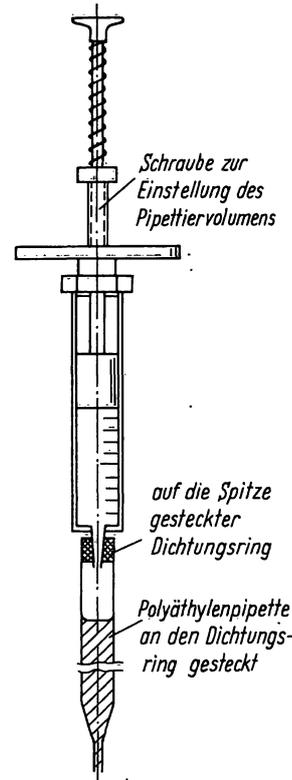


Abb. 1

abgemessen (Abb. 1). Die Länge des Polyäthylenrohrs wird so gewählt, daß die Flüssigkeit nicht in die eigentliche Spritze eingesogen wird. Zum Spülen der Pipette wird jeweils die erste Entnahme aus einem neuen Serum weggegossen. Man vermeidet so jegliche Fehler infolge unreiner Pipetten und andererseits gegenseitiger Kontamination der einzelnen Proben. Steht nur wenig Serum zur Verfügung, kann die Pipette auch mit Wasser statt mit dem neuen Serum gespült werden. Wenn die Pipettenspitze nicht tief in die Flüssigkeit eingetaucht und diese nicht zu rasch ausgestoßen wird, ist die Pipettiergenauigkeit ausgezeichnet. Da die Extinktion einer Probe mit 100  $\mu$ g/100 ml unter den angegebenen Bedingungen (0,5 ml/Probe, 1,4 ml „Teepol“, 1 cm-Küvette, 546 m $\mu$ ) um 0,100 liegt, empfiehlt es sich, zu Beginn jeder Analysenserie das Spritzenhubvolumen der „Teepol“-Lösung so einzuregulieren, daß die Extinktion der Standardlösung abzüglich Reagentien-Leerwert genau 0,100 wird. Man erhält dann ohne jede Eichkurve oder Umrechnungstabelle:  $\mu$ g/100 ml Fe = 1000 ( $E_A - E_L$ ). Voraussetzung ist monochromatisches Licht.

Das Eisen-Farbreagens wird mit Vorteil in einer kleinen Bürette unmittelbar über der Meßküvette angebracht

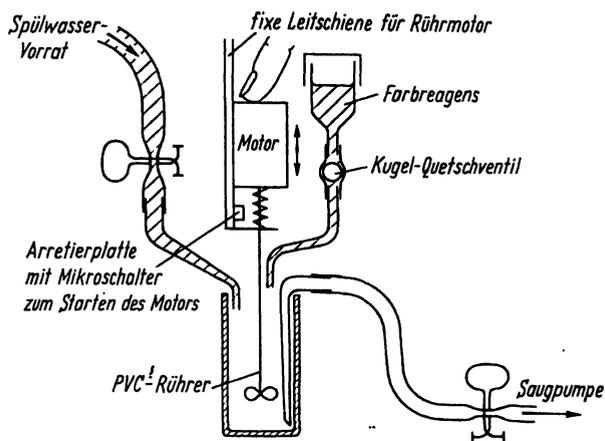


Abb. 2

(s. Abb. 2). — Zwischen den Messungen soll die Küvette mit Wasser gespült werden, damit nicht Reste von Farbreagens der vorhergehenden Probe in der neuen Probe die Eigenextinktion verfälschen. Ein rasches Arbeiten wird ermöglicht, wenn ein Reservoir mit Spülwasser über dem Photometer aufgestellt und andererseits eine Absaugküvette verwendet wird. Eine solche kann ohne großen Aufwand improvisiert werden

(vgl. Abb. 2). Das Mischen von „Teepol“-Reagens, Serum und Farbreagens wird mittels Plastikrührer (nicht Glas, wegen Zerkratzens der Küvette!) vorgenommen. Auch hier kann man sich ein paar Handgriffe ersparen, wenn das Rühren mechanisiert wird (vgl. Abb. 2). Ein kleiner Batteriemotor mit PVC-Rührer, der auf einer fixen Schiene vertikal verschiebbar ist, wird durch eine Feder so festgehalten, daß der Rührpropeller in Ruhe oberhalb des Flüssigkeitsniveaus der Küvette steht. Durch Fingerdruck wird die Feder komprimiert, der Rührer in die Küvette getaucht und gleichzeitig durch einen Mikroschalter am fixen Arretierplättchen der Stromkreis geschlossen. Zum Ablesen der Extinktion wird der Fingerdruck aufgehoben. Der Rührer steht still und hebt sich über den Lichtweg. Da der Propeller nur läuft, wenn er vollständig untergetaucht ist, bildet sich kein Schaum in der Lösung. Rührmotor, Farbreagensbürette und evtl. auch die Spülwasserflasche werden an einem Stativ neben dem Photometer befestigt.

Für wertvolle Ratschläge und die Konstruktion der technischen Hilfsmittel bin ich Herrn J. TRACHSEL zu besonderem Dank verpflichtet.

### Literatur

1. RAMSAY, W. N. M., *Advances Clin. Chem.* 1, 1 (1958).
2. LANDERS, J. W. und B. ZAK, *Amer. J. Clin. Path.* 29, 590 (1958).
3. SANFORD, R., *J. Clin. Path., London* 16, 174 (1963).

Dr. chem. Konrad Lauber  
Medizinisch-Chemisches Institut  
der Universität Bern  
Bern/Schweiz, Bühlstr. 28

## Zur Bestimmung körpereigener Amine in biologischen Substraten

### 2. Mitteilung: Bestimmung von N,N-Dimethyltryptamin in Blut und Harn

Von H. GROSS und FR. FRANZEN

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Köln (Direktor: Prof. Dr. Dr. Dr. H. W. Knipping)

(Der Schriftleitung zugegangen am 1. Dezember 1964)

Es wird ein fluorimetrisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung des N,N-Dimethyltryptamins in Blut und Harn beschrieben. Während die in biologischen Substraten vorkommenden Homologen durch Umsetzung mit Schwefelkohlenstoff und andere ebenfalls in den gleichen Wellenbereichen fluoreszierende Verbindungen durch den Trennungsgang eliminiert werden, können Indol, Skatol und Indol-3-aldehyd ab einer bestimmten Konzentration das Analyseergebnis im Sinne eines Plusfehlers beeinträchtigen. Im Blut Gesunder fanden sich  $0,0398 \pm 0,006 \mu\text{g}$  Dimethyltryptamin/ml, im Harn  $42,98 \pm 8,59 \mu\text{g}/24$  Stdn.

A fluorimetric method is described for the quantitative determination of N,N-dimethyltryptamine in blood and urine. Homologues, which fluoresce at the same wavelengths and are present in biological substrates, can be eliminated by reaction with carbon disulphide or by extraction. Above a certain concentration, indole, skatole, and indole-3-aldehyde cause a positive error in the analytical results. The blood of healthy patients contained  $0.398 \pm 0.006 \mu\text{g}/\text{ml}$ , urine  $42.98 \pm 8.59 \mu\text{g}/24$  hrs.

Für die Bestimmung von N,N-Dimethyltryptamin liegen bisher nur biologische Verfahren (1—3) vor. Sie erlauben unter Auswertung des pharmakologischen Effektes dieser Verbindung auf isolierte Organe — z. B. Rattenuterus, Molluskenherz — den Nachweis von  $10^{-8}$  g/ml,

wurden jedoch lediglich auf reine Aminlösungen, nicht auf biologische Substrate angewandt.

N,N-Dimethyltryptamin ist zur Eigenfluoreszenz befähigt. Nach unseren Untersuchungen besitzt es wie die übrigen Indolaethylamine (Tryptamin (4), N-Methyl-