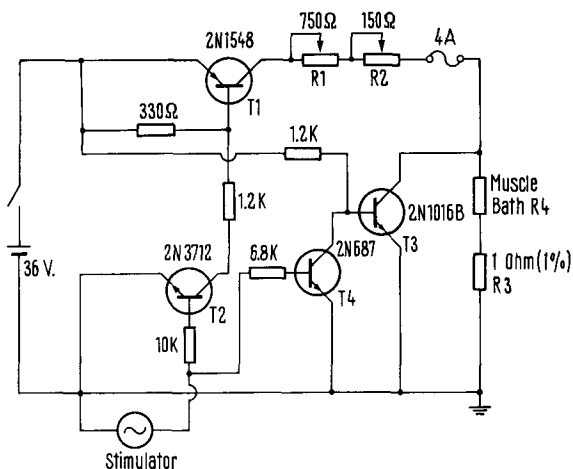


or lower voltage DC power supply with appropriate alteration of the biasing resistors if necessary. Its operation is as follows: on arrival of a positive pulse greater than 5 V, T1 is turned on and T3 turned off; on the decay of the switching pulse, T1 is turned off and T3 turned on shorting the electrodes and thus reducing electrode polarization. The inclusion of T3 in this circuit also insures that any current leakages through T1 are largely shunted away



A schematic drawing of the electronic switch for massive stimulation described in the text.

from the muscle bath (R3). T2 and T4 are controlling transistors while R1 and R2 are series current regulators. The stimulus current is adjustable by means of these resistors from 40 mA to 4 amp. R4 is included to monitor current at a scale of 1 V per amp.

In conditions of constant operation, the current leakage across a 10 ohm resistor, substituted for the physiological salt solution, is less than 0.10 mA, which is too small to cause perceptible physiological changes in the muscle under investigation. The rise time of the output of the switch when operated with the output of a Grass S8 stimulator is 5 μ sec; and is thus identical with the rise time of the switching pulse⁵.

Zusammenfassung. Es wird ein schneller, transistorisierter Schalter für massive Muskelreizung beschrieben.

O. OKONG'O⁶, R. BECKER
and N. R. ALPERT

Department of Physiology, and
Biophysics, Instrumentation and Model Facilities,
University of Vermont,
Burlington (Vermont, U.S.A.), 26 November 1969.

⁵ This study was supported in part by USPHS Grant No. HE10892-04.

⁶ Current address: Department of Medical Physiology, University College Nairobi, Nairobi (Kenya).

Verhalten des Eisenstoffwechsels unter experimentellem Stress. Methodik zur Bestimmung des «non-haem» - Eisens im Gewebe

Das nicht aus dem Haem-Molekül stammende Eisen im Gewebe wurde 1928 von STARKENSTEIN und WEDEN¹ mit heisser HCl extrahiert und die Farbreaktion mit Thiocyanat ausgelöst. Nach Einführung der Chromogene in die Diagnostik²⁻⁸ wurde die Ausarbeitung neuer und empfindlicherer Methoden möglich⁹⁻¹⁵, aber gleichgültig, mit welcher davon wir auch arbeiten, kommt es jedoch häufig vor, dass die erhaltenen Ergebnisse schlecht reproduzierbar sind¹⁰. Aufgrund unserer Erfahrungen beruht die Streuung der Ergebnisse hauptsächlich darauf, dass im Verlauf der Extraktion mehr oder weniger Haem-Eisen ebenfalls freigesetzt wird und die zum optimalen Ablauf der Farbreaktion nötige pH-Einstellung erschwert, sowie dass ausfallende Lipide die zu fotometrierende Farblösung eintrüben können.

Die im folgenden mitgeteilte Eisenbestimmung im Gewebe beseitigt die erwähnten Mängel. Die Extraktion erfolgt mit 4%iger heisser HCl, die Enteiweissung wird in ebenfalls heissem Milieu mittels Trichloressigsäure und die Farbreaktion mit sulfoniertem Bathophenanthrolin durchgeführt.

Reagenzien, Lösungen, Ausführung. Sämtliche Reagenzien von p.a. Reinheitsgrad wurden in durch Glasdestillation eisenfrei gemachtem Aqua dest. gelöst. Die zu den Bestimmungen verwandte Glasware machten wir in 6N HNO₃ eisenfrei. 10%ige HCl, 33%ige Trichloressigsäure, hergestellt aus redestillierter Substanz. «A-Lösung», 1% Ascorbinsäure enthaltendes 0,4M Na₂HPO₄ in 1N NaOH, hergestellt unmittelbar vor Verbrauch. «B-Lösung», Bathophenanthrolindisulfonsäure als Di-Natriumsalz in 0,4M Phosphatpuffer von pH 5,5. Die Sulfonation wurde nach WATKINS und BUTLER¹⁶ durchge-

führt. Das entstandene Di-Natriumsalz lösten wir in 10 ml Aqua dest. und stellten mit konzentrierter HCl auf pH = 5,5 ein. Diese Stammlösung wurde vor Verwendung mit 2,8%igem Na₂HPO₄ × 2H₂O, 13,05%igem KH₂PO₄ und Aqua dest. im Verhältnis 1:1:4:4 versetzt. Die Phosphatlösungen machten wir nach JONES¹⁷ mit in redestilliertem Chloroform gelöstem 8-Hydroxychinolin eisenfrei. Farbreaens: Mischung von «A»- und «B»-Lösung im Verhältnis 1:2. Eisenstandard: 200 μ g Fe/100 ml in 6,6% Trichloressigsäure und 3,2% HCl enthaltender Lösung. Leerwert-Lösung wie Standard-Lösung, nur ohne Eisen.

¹ E. STARKENSTEIN und H. WEDEN, Klin. Wschr. 7, 1220 (1928).

² G. BARKAN und B. WALKER, J. biol. Chem. 135, 37 (1940).

³ H. JOSEPHS, J. Lab. clin. Med. 44, 63 (1954).

⁴ M. L. MOSS und M. G. MELLON, Ind. Eng. Chem. 14, 862 (1942).

⁵ R. E. PETERSON, Analyt. Chem. 25, 1337 (1953).

⁶ W. RAMSAY, Biochem. J. 53, 227 (1953).

⁷ A. SCHADE, J. OYAMA, R. REINHART und J. MILLER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 87, 443 (1954).

⁸ P. TRINDER, J. clin. Path. 9, 170 (1956).

⁹ G. BRÜCKMANN und S. G. ZONDEK, J. biol. Chem. 135, 23 (1940).

¹⁰ A. L. FOY, H. L. WILLIAMS, S. CORTELL und M. E. CONRAD, Analyt. Biochem. 18, 559 (1967).

¹¹ R. HILL, Proc. R. Soc., B, 107, 205 (1930).

¹² I. KALDOR, Austr. J. exp. Biol. 32, 795 (1954).

¹³ R. E. THIERS, Meth. biochem. Analysis 5, 273 (1957).

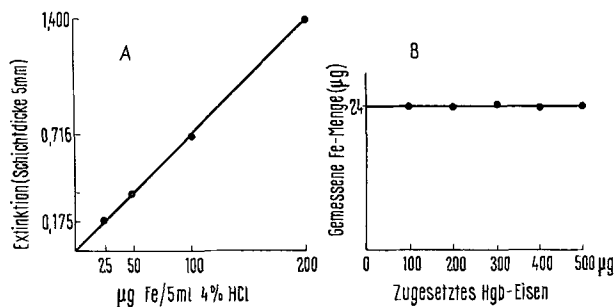
¹⁴ S. L. TOMPSETT, Biochem. J. 29, 480 (1935).

¹⁵ M. YONEYAMA und K. KONNO, J. biol. Chem., Japan 40, 377 (1953).

¹⁶ D. K. WATKINS und E. B. BUTLER, Clin. Chim. Acta 13, 449 (1966).

¹⁷ W. A. JONES, Biochem. J. 43, 429 (1948).

Die zu untersuchenden Organe wurden nach Entnahme unter fließender physiologischer Kochsalzlösung gereinigt und zwischen Filterpapier getrocknet. Ein genau abgewogenes Gewebestück, im allgemeinen mit einem Gewicht zwischen 0,3 und 0,4 g, wurde in der 11fachen Menge Aqua dest. homogenisiert (Ultra-Turrax, Janke und Kunkel, Staufen i. Br.) und 3 ml des Homogenisates, das einer Gewebemenge von 0,25 g entspricht, in ein 10 ml fassendes kalibriertes Zentrifugenröhrchen mit Schliffstößel übertragen, in dem sich bereits 2,0 ml HCl befanden. Die 4% HCl-erhaltenden Homogenisat-Proben wurden sodann für 30 min in ein Wasserbad von 85°C gebracht und nach jeweils 5 min gründlich gemischt. Nach schneller Abkühlung mit Leitungswasser zentrifugierten wir die Proben. Je 2,0 ml des Überstandes wurden in ein Wassermannröhrchen übertragen, mit 0,5 ml Trichloressigsäure versetzt, nach gründlicher Mischung für 15 min in das oben erwähnte Wasserbad gebracht und nach rascher Abkühlung erneut zentrifugiert. Zur Auslösung



Kalibrationskurve und «non-haem»-Eisengehalt in Gewebeproben nach Hgb-Eisenzusatz. (A) Kalibrationskurve. 200 µg Fe entsprechen 800 µg/g Eisengehalt im Gewebe. (B) Eisengehalt identischer Leberhomogenisatproben nach Zusatz verschiedener Mengen von Hgb-Eisen.

Recovery-Messungen (A) Rückmessung des zu Rattenleberhomogenisat zugesetzten Eisens

| Rattenleber (g) | Zugesetztes Fe (µg) | Kalkuliertes Fe (µg) | Gemessenes Fe (µg) | «Recovery» (%) |
|-----------------|---------------------|----------------------|--------------------|----------------|
| – | 25,0 | – | 25,0 | – |
| 0,25 | – | – | 24,3 | – |
| 0,25 | 12,5 | 36,5 | 35,7 | 97,8 |
| 0,25 | 25,0 | 49,0 | 50,8 | 103,4 |
| 0,25 | 50,0 | 74,0 | 77,2 | 104,3 |
| 0,25 | 100,0 | 124,0 | 124,0 | 100,0 |
| 0,25 | 200,0 | 224,0 | 214,0 | 95,0 |

(B) Eisengehalt verschiedener Mengen desselben Rattenmilzhomogenisates

| Rattenmilz (g) | Zugesetztes Fe (µg) | Kalkuliertes Fe (µg) | Gemessenes Fe (µg) | «Recovery» (%) |
|----------------|---------------------|----------------------|--------------------|----------------|
| – | 25,0 | – | 25,0 | – |
| 0,5 | – | – | 55,0 | – |
| 0,1 | 25,0 | 36,0 | 36,7 | 102,1 |
| 0,2 | 25,0 | 47,0 | 45,2 | 96,1 |
| 0,3 | 25,0 | 58,0 | 56,8 | 98,0 |
| 0,4 | 25,0 | 69,0 | 71,9 | 104,2 |

der Farbreaktion pipettierten wir in Wassermannröhrchen 0,5 ml des gewonnenen Überstandes, beziehungsweise 0,5 ml Arbeitsstandard, beziehungsweise 0,5 ml Leerwertlösung und setzten 1,5 ml Farbreagenz zu. Nach gründlichem Mischen des Röhrcheninhalts liessen wir die Röhrchen 15 min bei Zimmertemperatur stehen und lasen dann die Extinktionen des Arbeitsstandards und der Proben gegen die des Leerwerts bei 535 nm Wellenlänge am Spektrofotometer ab. Den Eisengehalt von 1,0 g Gewebe errechneten wir so, dass wir den Quotienten der Extinktionen der Gewebeproben und des Arbeitsstandards mit der angewandten Verdünnung (50) und dem eingemessenen Eisengehalt des Arbeitsstandards (1,0 µg) multiplizierten, das heisst

$$\mu\text{g Fe/1,0 g Gewebe} = \frac{\text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Standard}} \times 50.$$

Wir möchten darauf aufmerksam machen, dass sich eine Einstellung des sogenannten Gewebe-Leerwerts, der anstelle von Farbreagenz einen 0,4M Phosphatpuffer enthält, erübrigte, weil der Trichloressigsäure enthaltende Überstand immer kristallklar und farblos war, auch wenn sehr blutreiche Gewebe zur Aufarbeitung kamen. Zur Kontrolle der Methodik haben wir folgende Versuche durchgeführt: 25, 50, 100 und 200 µg Eisen in je 0,5 ml Volumen gaben wir zu je 0,5 ml einer 4%igen HCl beziehungsweise zu HCl und Rattenleberhomogenisat enthaltenden Proben. Als «Recovery»-Messung führten wir die Methode mit je 5 ml Homogenisat-HCl-Gemisch durch, wobei die Einzelprobe je 25 µg exogenes Eisen und 0,1 beziehungsweise 0,2 beziehungsweise 0,3 beziehungsweise 0,4 beziehungsweise 0,5 g Rattenmilzgewebe in 4%iger HCl enthielt. Die eventuelle Störwirkung von aus Haemoglobin stammendem Eisen untersuchten wir, indem wir 100 bis 500 µg Haemoglobineisen und jeweils die gleiche Menge Rattenleberhomogenisat enthaltende Proben in insgesamt 5 ml 4%igem HCl-Milieu auf ihren Gehalt an «non-haem»-Eisen untersuchten.

Ergebnisse, Diskussion. Wir hielten es für angebracht, bei der «non-haem»-Eisenbestimmung im Gewebe Eisenextraktion in heissem HCl-Milieu^{1,12} mit dem Eisennachweis durch Bathophenanthrolin^{5,8} zu verbinden. Die günstigsten Ergebnisse konnten wir dann erzielen, wenn wir nach der obigen Ausführung vorgehen; so ist es gelungen, die eingangs erwähnten Mängel zu umgehen. Wie die Figur und die Tabelle zeigen, sind die Ergebnisse gut reproduzierbar: die «Recovery» liegt zwischen 95,5% und 104,3% und die Kalibrationskurve verläuft im messbaren Absorptionsbereich linear. Verhältnismässig grosse Mengen Hgb-Eisen beeinflussten weder die Spezifität noch die Empfindlichkeit des Reaktionsablaufes. Die Abweichung der Ergebnisse der routinemässig durchgeführten Parallelbestimmungen voneinander lag in 97% der Fälle zwischen 0 und 4%, in den restlichen 3% der Fälle zwischen 5 und 10%. Eine Eintrübung des zu fotometrierenden Farbgemisches konnten wir bei unserer Ausführung niemals beobachten.

Summary. The non-haemin iron was extracted from tissues by hot hydrochloric acid and determined by sulphated bathophenanthrolin disodium salt. This method is of reasonable sensitivity, not influenced by haemoglobin iron and gives well-reproducible results.

S. ELEK und INGE SCHÄFER

Arzneimittelforschungsinstitut Budapest,
Pharmakologische Abteilung,
Budapest IV (Ungarn), 15. Dezember 1969.