

Freie Universität



Berlin



# **Entwicklung von primären Referenzverfahren zur Quantifizierung und Bestimmung des Beladungsgrades von Transferrin**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von  
CLAUDIA FRANK, M. SC.  
aus Berlin

Berlin, 2013



Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom Oktober 2008 bis Januar 2013 an der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) in Braunschweig im Fachbereich 3.1 „Metrologie in der Chemie“ angefertigt.

1. Gutachter: Dr. Detlef Schiel, Physikalisch-Technische Bundesanstalt
2. Gutachter: Prof. Dr. Ulrich Abram, Freie Universität Berlin

Tag der Disputation: 25. März 2013



## **MEINEN ELTERN**

„Die Endlosigkeit des wissenschaftlichen Ringens sorgt unablässig dafür, dass dem forschenden Menschegeist seine beiden edelsten Antriebe erhalten bleiben und immer wieder von neuem angefacht werden: die Begeisterung und die Ehrfurcht.“

- Max Planck -



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei den Menschen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit im Wesentlichen beigetragen haben.

Meinem Erstgutachter und Arbeitsgruppenleiter Dr. Detlef Schiel sowie meinem Fachgruppenleiter Dr. Bernd Güttler möchte ich für den Einsatz und die Möglichkeit danken, meine Arbeit an der PTB anzufertigen.

Prof. Dr. Ulrich Abram danke ich für die sofortige Bereitschaft das Zweitgutachten trotz so großer räumlicher Distanz zu übernehmen.

Mein besonderer Dank geht an Claudia, für die vielen Diskussionen, Anregungen, das kritische Lektorat dieser Arbeit und die stets nachwachsenden Schokoladenberge zwischen unseren Schreibtischen und so vieles unzähliges mehr in- und außerhalb der Anstalt.

Sabine danke ich für das in mich gesetzte Vertrauen, die stets gute und auch lustige Zusammenarbeit sowie die vielen Messungen mit Raman.

Für die neu entwickelten Formeln, Anregungen, vielen mehr oder weniger schönen Fotos aus allen Lebenslagen, die stete Hilfsbereitschaft und die Möglichkeit IDMS mit Tischtennisbällen erklären zu dürfen, danke ich Olaf.

Für die Reinheitsbestimmungen am ESI-TOF danke ich Dirk und Dr. André Henrion für das „Ausleihen“ von Personal und Geräten.

Natürlich danke ich auch denjenigen aus meiner Arbeitsgruppe, die weiter oben noch nicht mit aufgeführt sind (Christine, Julia, Volker, Anna-Lisa, Reinhard Jährling, Javis, Janine, Carola, Axel, Karin, Jan, Uschi, Rainer, Christoph, Olav und Stephan) für die große Hilfsbereitschaft in jeglicher Hinsicht sowie für die freundliche Atmosphäre und die stete Bereitschaft neue Kuchenkreationen zu probieren.

Ich danke auch allen hier nicht einzeln erwähnten Personen aus meinem Fachbereich, die immer ein offenes Ohr für dienstliches und nicht dienstliches hatten.

Für die ideelle und zuweilen auch finanzielle Unterstützung meiner Eltern möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Ohne die Unterstützung und Förderung, hätte ich es nie so weit gebracht. Und auch bei meiner Oma und meinem Bruder mit der gesamten Familie möchte ich mich bedanken, gerade, da sie in der Endphase dieser Arbeit so selbstverständlich auf mich verzichtet haben.

Und vielen Dank an alle, die mich auf meinem Weg in den letzten Jahren begleitet haben!



## Kurzzusammenfassung

Transferrin (Tf) als Akute-Phase-Protein ist ein wichtiger diagnostischer Marker für entzündliche Prozesse im menschlichen Körper. Deshalb wurde es auch in der „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen“ (RiLiBÄK) in die Liste wichtiger Analyte aufgenommen. Klinisch-chemische Laboratorien sind daher dazu verpflichtet, regelmäßig in Ringversuchen nachzuweisen, dass sie die Tf-Konzentration in den von der RiLiBÄK vorgegeben Grenzen verlässlich bestimmen können. Von der Bundesärztekammer wird eine Rückführung auf das SI-System dieser Messergebnisse angestrebt, da nur auf diese Weise ein bundes- bzw. weltweiter Vergleich möglich ist. Der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB) fällt dabei die Aufgabe zu, die Voraussetzung für die Rückführung zu schaffen, indem sie ein an das SI-System angeschlossenes Weitergabesystem aufbaut. Dafür ist es notwendig, eine Referenzmethode zu entwickeln und bereitzustellen, die es ermöglicht Tf mit einer Unsicherheit zu bestimmen, die deutlich unter der in der RiLiBÄK geforderten Unsicherheit liegt.

Vor diesem Hintergrund sowie dem weiteren Ziel den Tf-Gehalt in Referenzmaterialien rückgeführt bestimmen zu können, wurden im Rahmen dieser Arbeit primäre Referenzverfahren zur Quantifizierung und Bestimmung des Fe-Beladungsgrades von Tf entwickelt.

Die Quantifizierung erfolgte über eine chromatographische Trennung des Tf von der Serummatrix mit HPLC und anschließender elementspezifischer Detektion des in dem Tf gebundenen Fe mit ICP-MS. Zur Quantifizierung wurde sowohl post column (PC) als auch spezies spezifische (SS) Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (IDMS) eingesetzt. Beide Verfahren wurden als double IDMS unter Verwendung des Exakt Matching Prinzips angewandt. Außerdem fand zum ersten Mal in der Speziesanalytik die triple IDMS Anwendung. Alle Methoden ergaben für das humane Serum ERM-DA470k/IFCC vergleichbare Tf-Gehalte von  $w_x = (2,36 \pm 0,13)$  g/kg für PC-IDMS,  $w_x = (2,317 \pm 0,092)$  g/kg für double SS-IDMS und  $w_x = (2,426 \pm 0,086)$  g/kg für triple SS-IDMS, die gut mit dem zertifizierten, über herkömmliche Methoden bestimmten Wert von  $w_x = (2,41 \pm 0,08)$  g/kg übereinstimmen.

Da der Fe-Beladungsgrad von Tf wichtige Rückschlüsse auf die Fe-Versorgung eines Patienten zulässt, wurde dieser ebenfalls mit IDMS bestimmt. Zusätzlich wurde erstmals auch eine Raman-Methode zur Bestimmung der Fe-Beladung entwickelt. Die Methoden, angewandt auf ein gefriergetrocknetes nat. Tf, ergaben auch hier vergleichbare Werte:  $b = (30,20 \pm 1,20)$  % mit IDMS und  $b = (28,2 \pm 2,0)$  % mit Raman.

Alle Ansätze wurden, wie in der Metrologie üblich, gravimetrisch angesetzt und erweiterte Unsicherheiten ( $k = 2$ ) entsprechend der Vorgabe des Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) in "Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement" (GUM) berechnet.

## Abstract

Transferrin (Tf), as an acute phase protein, is an important diagnostic marker for inflammation processes in the human body. Therefore, it was included in the List of important analytes in the guidelines of the German Medical Association (RiLiBÄK). Hence, clinical chemical laboratories are bound to participate in interlaboratory comparisons periodically to guarantee their ability to determine Tf within the limits defined in the RiLiBÄK. The German Medical Association aspires the traceability to the SI of those measurement results, because this is the only reliable way to ensure comparability nationwide as well as globally. The Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) is responsible for establishing traceability. This requires a traceability chain, which is connected to the SI, and a reference method which uncertainty is significantly lower than the uncertainty required in RiLiBÄK.

Considering this as well as the goal to achieve traceable results for the content of Tf in reference materials, primary reference methods were developed in this work to quantify the content and to determine the iron saturation of human Tf.

For the quantification, Tf was chromatographically separated from the serum matrix with HPLC and subsequently measured with element mass spectrometry (ICP-MS) via the Fe bound to Tf. Post column (PC) and species specific (SS) isotope dilution mass spectrometry (IDMS) were used. Both, PC- and SS-IDMS, were performed as double IDMS using the exact matching principle. Furthermore, triple IDMS was used for the first time in species analysis. All methods were applied to the human serum reference material ERM-DA470k/IFCC and comparable results for the content of Tf were achieved with  $w_x = (2.36 \pm 0.13)$  g/kg for PC-IDMS,  $w_x = (2.317 \pm 0.092)$  g/kg for double SS-IDMS and  $w_x = (2.426 \pm 0.086)$  g/kg for triple IDMS. These results were in good agreement with the value given in the certificate of  $w_x = (2.41 \pm 0.08)$  g/kg which was determined with conventional methods.

The iron saturation of Tf allows important conclusions on the Fe supply of patients. Therefore, it was also determined with IDMS and additionally a Raman procedure was developed the first time. The methods were adopted to a freeze dried natural Tf and also achieved comparable results:  $b = (30.20 \pm 1.20)$  % for IDMS and  $b = (28.2 \pm 2.0)$  % for Raman.

All necessary solutions were produced gravimetrically and the expanded uncertainties ( $k = 2$ ) of the results were calculated according to the recommendations of the Bureau International des Poids et Mesures (BIPM) in "Evaluation of measurement data — Guide to the expression of uncertainty in measurement" (GUM).



---

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Motivation</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>7</b>
2.1	Akute-Phase-Proteine und das Transportprotein Transferrin .....	7
2.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC).....	11
2.3	Induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (ICP-MS) .....	14
2.4	Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (IDMS) .....	20
2.5	Raman-Spektroskopie .....	28
2.6	Luftauftriebskorrektur und Differenzwägung.....	32
2.7	Herstellung und Lagerung von (Referenz)Lösungen.....	36
<b>3</b>	<b>Experimenteller Teil mit Ergebnissen und Diskussion</b> .....	<b>39</b>
3.1	Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte .....	39
3.2	Chromatographische Abtrennung von Transferrin mit anschließender elementspezifischer Detektion (HPLC – ICP-MS) .....	43
3.2.1	Gerätekonfiguration.....	43
3.2.2	Entwicklung der chromatographischen Trennung.....	46
3.2.2.1	Auswahl der Säule .....	46
3.2.2.2	Eluent und Gradient.....	47
3.2.2.3	Optimierung der ICP-MS Parameter.....	49
3.2.3	Gegenläufiger post-column Gradient .....	50
3.3	Allgemeine Probenvorbereitungen .....	54
3.3.1	Rekonstituieren des Serums ERM-DA470k/IFCC.....	54
3.3.2	Vollständige Sättigung von Transferrin mit Eisen .....	54
3.3.3	Versuche zur Matrixanpassung mit Albumin.....	55
3.3.4	Lipoproteinfällung.....	56
3.3.5	Stabilität von holo-Transferrin .....	57
3.3.6	Reinheit und Wassergehalt von apo-Transferrin.....	59
3.3.7	Gehalt und Isotopenverteilung in der Fe-Spike-Lösung.....	60
3.4	Quantifizierung von Transferrin .....	62
3.4.1	Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (IDMS).....	62
3.4.1.1	Double post-column IDMS .....	62
3.4.1.2	Double spezies-spezifische IDMS .....	64
3.4.1.3	Double PC-IDMS versus double SS-IDMS .....	66

3.4.1.4	Triple spezies-spezifische IDMS .....	67
3.4.1.5	Double SS-IDMS versus triple SS-IDMS .....	69
3.5	Fe-Beladungsgrad von Transferrin .....	74
3.5.1	Bestimmung der Beladung mit single IDMS .....	74
3.5.2	Bestimmung der Beladung mit Raman-Spektroskopie .....	79
3.5.2.1	Probenvorbereitung .....	79
3.5.2.2	Ausschließen von Matrixstörungen .....	80
3.5.2.3	Photobleaching .....	81
3.5.2.4	Kalibrierung .....	82
3.6	Unsicherheitbudgets .....	85
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>6</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>107</b>
6.1	Herleitung der Formel für die triple SS-IDMS .....	107
6.2	Herleitung der Formel für die Sättigung von Transferrin mit single IDMS .....	110
6.3	Sequenz-Alignment von Serotransferrin .....	112
6.4	Sialoformen des Transferrins .....	113
6.5	Abkürzungen .....	114
6.6	Größensymbole .....	116
6.7	Indizes .....	117
6.8	Konstanten und Stoffgrößen .....	118
6.9	Abbildungsverzeichnis .....	119
6.10	Tabellenverzeichnis .....	124

# 1 Einleitung und Motivation

Transferrin (Tf) ist als Akute-Phase-Protein (APP) ein wichtiger diagnostischer Marker in der Humanmedizin. Bei akuten Entzündungen reagiert der Körper innerhalb von einigen Stunden bis hin zu wenigen Tagen mit einer Konzentrationsänderung der APPs von mindestens 25 % [1, 2]. Außerdem ist Tf ein Marker für den Eisengehalt im Blutserum. Eisen (Fe) ist ein essenzielles Spurenelement, das in freier Form toxisch für den menschlichen Körper ist [3, 4]. Daher hat der menschliche Organismus effiziente Methoden entwickelt, die freie Fe-Konzentration zu minimieren. Die Proteingruppe der Tf spielt dabei eine wichtige Rolle. Die unterschiedlichen Formen dieser Proteingruppe nennt man Sialoformen. Diese unterscheiden sich an der Oberfläche des Tf-Moleküls durch unterschiedliche Zuckerseitenketten. Im Anhang in Abbildung 53 (Kapitel 6.4) sind diese gezeigt. Deren Verteilung kann Aufschluss über den Gesundheitszustand geben. Carbohydrat-defizientes Tf (CDT), bei dem die Bildung einzelner Sialoformen bevorzugt wird, ist zum Beispiel ein Marker für chronischen Alkoholmissbrauch [5] oder auch für eine angeborene Form der Dysfunktion der Glykosylierung (CDG, congenital disorder of glycosylation) [6]. Tf gehört deshalb zu den 67 wichtigen Analyten bei Blutanalysen, die in der „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen“ (RiLiBÄK) gelistet sind [7]. In Abbildung 1 ist ein Ausschnitt aus dieser Liste zu sehen. Daraus geht hervor, dass klinische Laboratorien in der Lage sein müssen, Tf bei Ringversuchen in einem Konzentrationsbereich von 0,5 bis 6 g/L mit einer maximalen relativen Abweichung von 15,0 % vom Referenzwert zu bestimmen.

Gegenwärtig wird in klinischen Laboratorien die Tf-Konzentration überwiegend mit antikörperbasierten Methoden wie Immunoblotting [8, 9], Immunoaffinität [10, 11] oder Immunoturbidimetrie [12, 13] bestimmt. Diese Methoden sind schnell und günstig. Jedoch

1 Ifd. Nr.	2 Analyt	3 Zulässige relative Abweichung des Einzelwertes bzw. des relativen quadratischen Mittelwertes	4 Gültigkeitsbereich der Spalten 3 und 5			5 Zulässige relative Abweichung beim Ringversuch	6 Zielwertart beim Ringversuch
			von	bis	Einheit		
1	Aktivierte partielle Thromboplastinzeit (aPTT)	10,5 %	20	120	s	18,0 %	SW
60	Transferrin	9,5 %	0,5	6	g/l	15,0 %	SW
61	Trijodthyronin	0,0 %	60	100	pmol/l	15,0 %	DMW

Abbildung 1 Ausschnitt aus der RiLiBÄK „Tabelle B 1 a Analyte in Plasma/ Serum/ Vollblut“ [7]

zeigt sich, dass bei den regelmäßig vom Referenzinstitut für Bioanalytik (RfB) ausgerichteten Ringversuchen die vorgegebenen Grenzen nicht eingehalten werden können (Abbildung 2). Dies zeigt sich zum Beispiel an dem 2012 vom RfB durchgeführten Ringversuch IG1/12. An diesem nahmen 517 klinische Laboratorien in ganz Deutschland teil, um unter anderem Tf im menschlichen Blutserum zu bestimmen [14]. In der Abbildung ist der Mittelwert aller Messungen als Referenzwert für die zulässigen Abweichungen gesetzt. Die Ringversuche zeigen, dass es zu starken Unterschieden der Messwerte für die Konzentration kommen kann, je nachdem, welche Methode verwendet wird. Aber auch bei gemessenen Werten, die mit nur einer Methode bestimmt wurden, herrschen große Unterschiede zwischen den einzelnen Kits verschiedener Hersteller. In Abbildung 3 sind beispielhaft die Messungen mit Nephelometrie mit drei unterschiedlichen Kits zu dem oben angegebenen Ringversuch IG1/12 dargestellt.

Ein weiterer wichtiger diagnostischer Marker ist die Sättigung des Tf mit Eisen. Bei einem gesunden Organismus ist humanes Tf normalerweise zwischen 20 und 30 % mit Fe gesättigt [3]. Allerdings gibt es einige Krankheiten, bei denen der Tf-Sättigungsgrad, auch

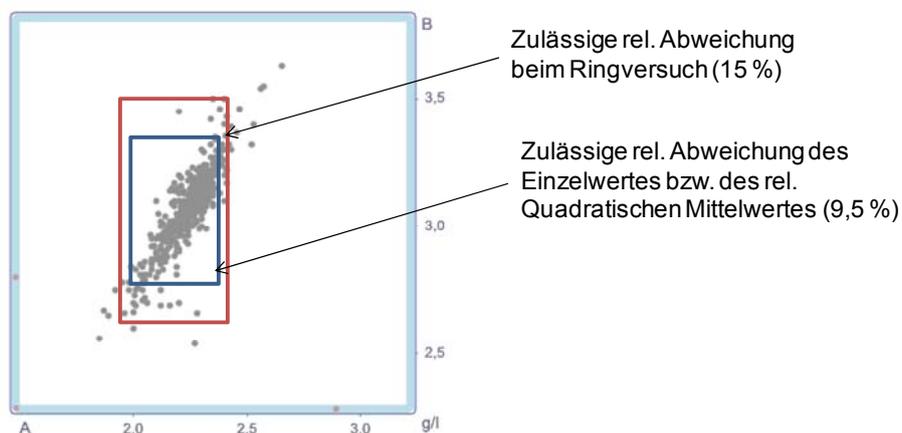
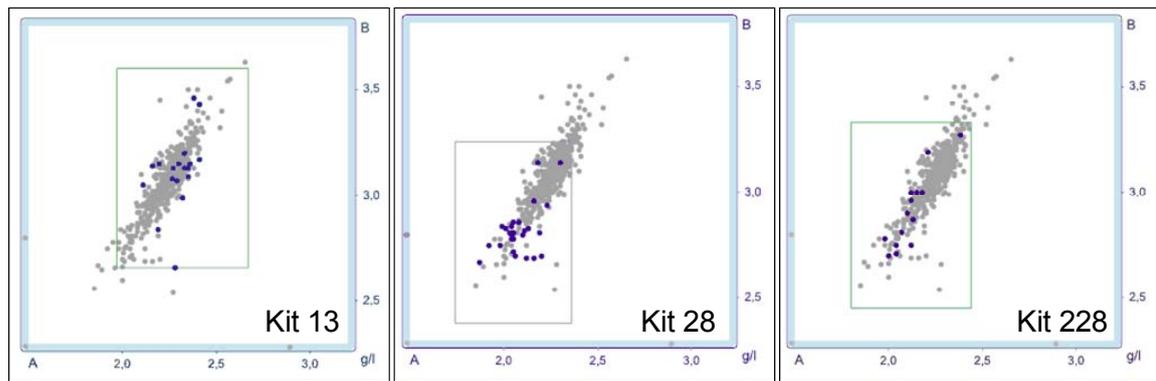


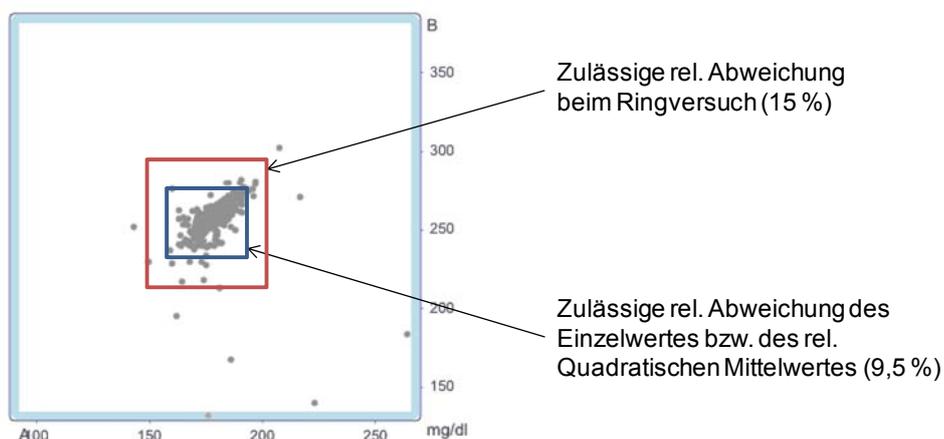
Abbildung 2 Youdenplot des Ringversuchs IG1/12 zur Quantifizierung von Tf in humanem Blutserum [14]



**Abbildung 3** Youdenplots des Ringversuchs IG1/12: Quantifizierung von Tf durch Nephelometrie mit drei unterschiedlichen Kits [14]

Tf-Beladungsgrad genannt, außerhalb dieses Bereiches liegt. So zeichnet sich zum Beispiel der manifeste Eisenmangel durch eine erhöhte Tf-Konzentration aber einen erniedrigten Tf-Sättigungsgrad aus [15], während es bei der sideroblastischen Anämie (Sammelbezeichnung für Blutarmut, bei der das Blut blass erscheint, aber eine hohe Eisenkonzentration aufweist) zu einer erniedrigten oder normalen Tf-Konzentration mit einem erhöhten Tf-Sättigungsgrad kommt [16]. In klinischen Laboratorien wird, um die Tf-Sättigung zu bestimmen, zusätzlich zur Tf-Konzentration die Serumeisenkonzentration gemessen [17, 18]. Aus diesen beiden unabhängigen Faktoren wird, unter der Annahme, dass alles Serumeisen an Tf gebunden ist, die Tf-Konzentration berechnet. Fe wird aber zu geringen Teilen auch unspezifisch von andern Plasmaproteinen, wie zum Beispiel Albumin, aufgenommen [19]. Die Konzentration des Serumeisens wird bestimmt, indem jegliches Fe aus dem Serum gelöst, komplex durch einen Chelatbildner gebunden und der entstehende Farbkomplex photometrisch gemessen wird [20, 21, 22].

In Abbildung 4 sind die Ergebnisse als Youdenplot des Ringversuchs KS4/12 des RfB für

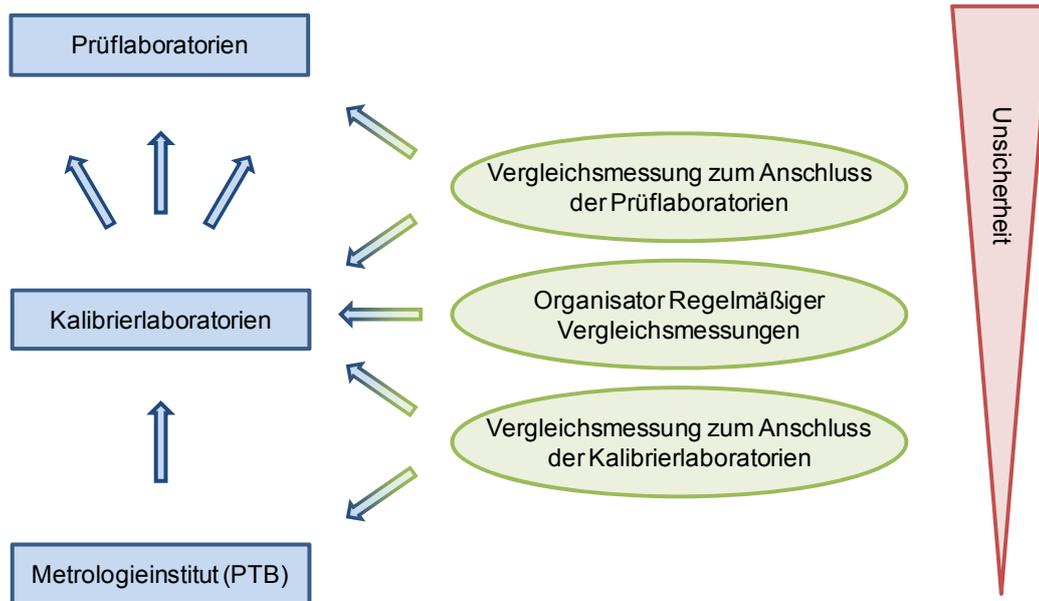


**Abbildung 4** Youdenplot des Ringversuchs KS4/12 zur Quantifizierung von Serumeisen [14]

die Serumeisenkonzentration dargestellt. Wie bei dem Ringversuch IG1/12 für Tf in Serum ist auch hier zu erkennen, dass die erlaubten 15 % der relativen Abweichung vom Referenzwert nicht von allen Teilnehmern eingehalten werden. In dieser Abbildung ist ebenfalls der Mittelwert aller Messungen als Referenzwert gesetzt.

Bei den in den Ringversuchen verwendeten Methoden kann es zu Querempfindlichkeiten kommen. Damit lassen sich auch die abweichenden Konzentrationen erklären, die bei den Quantifizierungen mit unterschiedlichen immunobasierten Methoden auftreten. Ein weiteres daraus resultierendes Problem ist, dass die unterschiedlichen Methoden und auch Kits nicht vergleichbar sind. Aus diesen Gründen ist die Bereitstellung unabhängiger, zuverlässiger und rückgeführter Referenzwerte notwendig, mit denen die gemessenen Konzentrationen validiert werden können. Eine Bestimmung dieser Referenzwerte erfolgt mit Hilfe von Primärmethoden. Eine Primärmethode beschreibt „eine Methode, die die höchsten messtechnischen Qualitäten besitzt, deren Funktionsweise vollständig beschrieben und verstanden ist und für die eine vollständige Angabe der Messunsicherheit in SI-Einheiten gemacht werden kann“ [23]. Die dafür notwendige Rückführbarkeit ist die Eigenschaft, das Messergebnis durch eine ununterbrochene Kette von Vergleichsmessungen mit bekannter Messunsicherheit auf ein Normal, und damit verbunden auf die Maßeinheit des SI (in diesem Fall das Mol), zu beziehen [24, 25]. Durch die Rückführung zweier Messwerte auf ein Normal wird die Vergleichbarkeit und größtmögliche Richtigkeit der Messungen ermöglicht [25, 26, 27, 28, 29]. Sowohl die Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (IDMS), als auch die Raman-Spektroskopie eignen sich zur Entwicklung von Primärmethoden.

Die Bundesärztekammer strebt eine Rückführung der klinisch-chemischen Messergebnisse auf die SI-Einheiten an, da nur so ein bundesweiter bzw. auch weltweiter Vergleich der Ergebnisse der unterschiedlichen Laboratorien hergestellt werden kann. Ohne diese Rückführung ist dies nicht realisierbar [30]. Die Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB) hat dabei die Aufgabe, die Voraussetzungen für die Rückführung der Messungen zu schaffen, indem sie Weitergabesysteme aufbaut und bereitstellt, die es ermöglichen, Messungen an die nationalen Normale und somit an die SI-Einheiten anzuschließen. In Abbildung 5 ist schematisch das Rückführungssystem aus dem Bereich der klinischen Chemie für Deutschland dargestellt. Praktisch sieht das so aus, dass die PTB nationale Normale zur Verfügung stellt. Diese sind durch weltweite Vergleichsmessungen mit anderen Metrologieinstituten im Rahmen der Meterkonvention (Certificate in Investment Performance Measurement (CIPM)) abgesichert. Der Anschluss der medizinischen Laboratorien (Prüflaboratorien) erfolgt über die Zwischenstufe der Kalibrierlaboratorien. Zumeist werden Materialien mit rückgeführten Referenzwerten, zum Beispiel im Rahmen von Vergleichsmessungen, weitergegeben. Die Rückführung kann



**Abbildung 5** Rückführungssystem aus dem Bereich der klinischen Chemie in Deutschland

entweder durch eine Primärmethode direkt erfolgen oder indirekt durch den Vergleich mit einem primären Referenzmaterial, das wiederum mit einer Primärmethode charakterisiert wurde [31].

In Europa ist unter anderem das Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) für die Bereitstellung zertifizierter Referenzmaterialien (CRM) zuständig. Für Proteine geschieht dies fast ausschließlich über das IRMM. Da das Herstellen dieser CRMs nicht immer leicht zu realisieren ist, stehen leider nur für wenige Analyten zur Verfügung. So war das Kupferspeicherprotein Ceruloplasmin noch in dem Referenzmaterial ERM-DA470 [32] zertifiziert, aber in dem Nachfolgematerial ERM-DA470k/IFCC [33] nicht mehr. Jedoch ist gegenwärtig weder das ursprüngliche Material noch ein anderes zertifiziertes Referenzmaterial für Ceruloplasmin verfügbar. Zudem ist das erwähnte Referenzmaterial auch das einzige derzeit verfügbare für Proteine in einer Serummatrix.

Bereits 1971 hat die Bundesärztekammer die „Richtlinie zur Durchführung der statistischen Qualitätskontrolle und von Ringversuchen im Bereich der Heilkunde“ herausgegeben [34]. Diese wurde dann später zur derzeitigen RiLiBÄK. Um die Qualitätssicherung in medizinischen Laboratorien zu sichern, wurden diese dann verpflichtet, vierteljährlich an Ringvergleichen teilzunehmen, sofern sie Messungen für Analyten im geregelten Bereich anbieten.

Im Bereich der Quantifizierung von Tf in Serum gibt es in der Literatur zwei grundsätzliche Methoden basierend auf der Trennung des Tf von anderen Serumbestandteilen mit HPLC und anschließender elementspezifischer Detektion des gebundenen Eisens mit ICP-MS. Das eine ist die Flussinjektions-Analyse (FIA), bei der mehrfach eine bezüglich ihrer Fe-

Konzentration bekannte Element-Fe-Lösung in den Fluss der HPLC gegeben wird, nachdem das Tf eluiert wurde. Über die Peakfläche des Fe-Kalibranten kann dann das Tf quantifiziert werden [35]. Ein weiterer Ansatz ist die Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (IDMS). Dabei wird die Probe, die Fe natürlicher isotopischer Zusammensetzung enthält, mit einem isotopisch angereicherten Spike versetzt. Über das neu entstehende Isotopenverhältnis kann dann das Tf quantifiziert [36, 37] bzw. die Fe-Beladung bestimmt werden [38]. Die Literatur hat gezeigt, dass sich beide Methoden gut eignen. Die IDMS eignet sich laut CCQM als eine primäre Referenzmethode für die Quantifizierung [39]. Jedoch wurden für diese Methode in Bezug auf das Tf unter den Aspekten einer Referenzmethode noch keine Unsicherheitsbudgets erstellt und auch sonst wurde die Rückführbarkeit bisher außer Betracht gelassen. Auch wurde bisher das Exact Matching Prinzip auf dieses Problem noch nicht angewandt.

Ziel dieser Arbeit ist es, vor dem Hintergrund der Physikalisch-Technischen Bundesanstalt (PTB), Primärmethoden für die Quantifizierung und den Fe-Sättigungsgrad von Tf mit Hilfe der IDMS zu entwickeln, um Verfahren zur Verfügung zu stellen, die die von der Bundesärztekammer vorgegebenen relativen Abweichungen deutlich unterschreiten. Diese Methoden können dann als Referenz dienen, an die die Methoden in den Prüflaboratorien angeschlossen werden können, die wiederum in der Lage sein müssen, mit ihren eigenen Methoden die Vorgaben der RiLiBÄK einzuhalten. Für die Quantifizierung des Tf wurde dies mit unterschiedlichen IDMS-Methoden realisiert, für die Beladung des Tf durch Einsatz der IDMS und Raman-Spektroskopie.

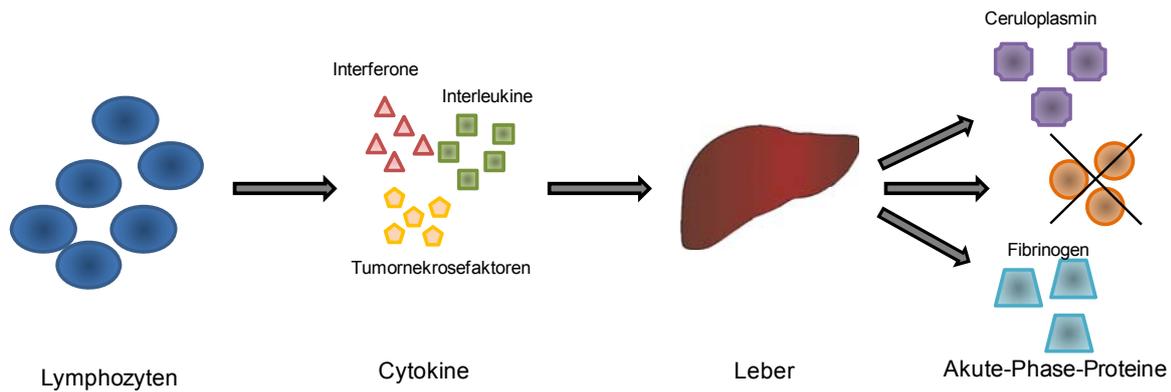
## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Akute-Phase-Proteine und das Transportprotein Transferrin

Ein Biomarker ist ein spezifisches Molekül, welches auf die Entwicklung einer Krankheit, eines körperlichen Zustandes oder einer therapeutischen Behandlung hinweist oder zu dessen Bemessung genutzt werden kann [40]. Transferrin, als Akute-Phase Protein (APP), ist einer dieser Biomarker im menschlichen Körper.

Bei höheren Säugetieren und somit auch beim Menschen, ist der schnelle erste Abwehrmechanismus die unspezifische Immunantwort. Sie ist angeboren und wird hervorgerufen durch APPs, die als Reaktion auf einen „Angriff“ auf den Organismus gebildet bzw. deren Produktion eingeschränkt oder verhindert wird. Diese Immunität wird innerhalb von Stunden aktiviert. Als erstes werden dabei vermehrt Lymphozyten gebildet (Lymphozyten-Proliferation). Diese exprimieren daraufhin Cytokine, wie Interferone, Tumornekrosefaktoren und Interleukine, die wiederum als unspezifische Mediatoren wirken. Zum einen bewirken sie eine Erweiterung der Blutgefäße und bessere Durchlässigkeit der Kapillarwände, zum anderen regen sie die Leber dazu an, sowohl vermehrt positive APPs auszuschütten, als auch die Bildung von negativen APPs zu hemmen (Abbildung 6).

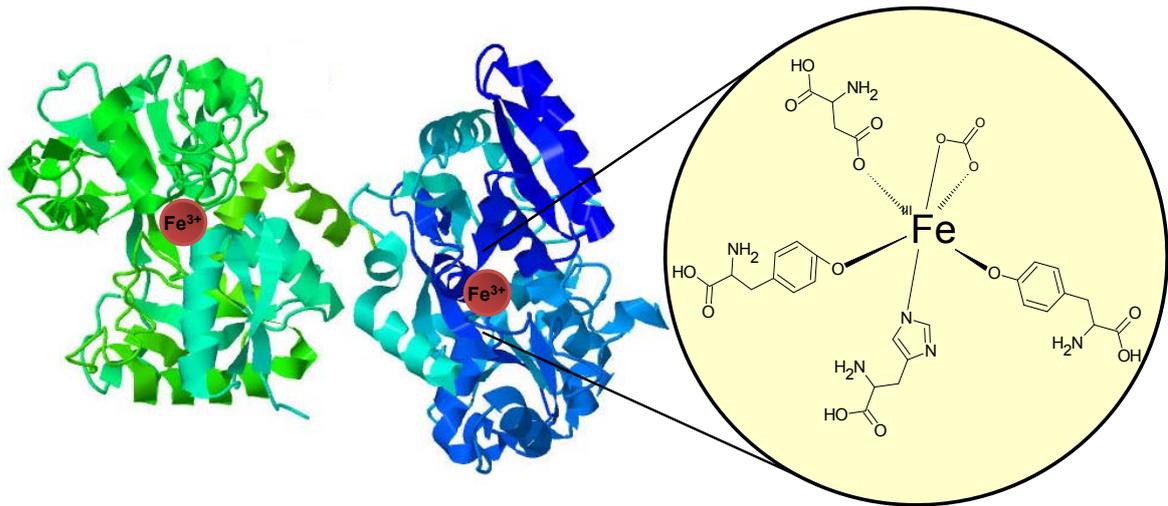
Die Konzentrationen von APPs werden bei der Akute-Phase-Reaktion (APR) verändert, um ein mikrobielles Wachstum zu verhindern und das verschobene Gleichgewicht im Körper wieder richtig einzustellen [41]. Die APR ist ein schnell reagierender Prozess zum Beispiel auf Traumata, Entzündungen oder Infektionen, der mit einer signifikanten Änderung von mindestens 25 % der APP-Konzentration einher geht [1]. Zu den positiven APPs zählen unter anderem Proteine wie Fibrinogen, saures  $\alpha_1$ -Glykoprotein, C-reaktives



**Abbildung 6** Schema der unspezifischen Immunantwort, die zu Veränderungen in den Akute-Phase-Protein-Konzentrationen führt. (Zeichnung nach [43])

Protein, Hämopexin, Ceruloplasmin und Haptoglobin. Zu den negativen APPs gehören unter anderem Albumin, Transthyretin, Apolipoprotein A1 und Tf. Die verschiedenen APPs reagieren unterschiedlich schnell [2] und stark auf einen Auslöser, so dass es sinnvoll ist, mehrere APPs im Zusammenhang mit anderen diagnostischen Parametern zu bestimmen [42, 43].

Eisen ist das häufigste Spurenelement im menschlichen Organismus. Es ist essenziell für den Stoffwechsel und dient hauptsächlich der Sauerstoffzufuhr des Körpers. Es kann sowohl als Elektronen-Donator als auch Elektronen-Akzeptor fungieren. Auf Grund dieser Eigenschaften kann freies Fe auch zur Bildung von Superoxid-Anionen sowie Hydroxyl-Radikalen beitragen, die beide toxisch für den menschlichen Organismus sind [3, 4]. Der menschliche Organismus schützt sich vor diesen Eigenschaften, indem Fe fast vollständig proteingebunden vorliegt. Es fungiert häufig als Zentralatom in unterschiedlichsten Proteinen, wie zum Beispiel dem Hämoglobin (Hb), in dem es eine verzerrt oktaedrische Koordinationsphäre besitzt. In der äquatorialen Ebene ist es quadratisch planar von Porphyrin koordiniert. Eine weitere Koordinationsstelle wird von Histidin besetzt, so dass an der letzten freien Bindungsstelle Sauerstoff angelagert werden kann. Damit ist Hb unerlässlich für den Sauerstofftransport innerhalb des menschlichen Organismus. Außerdem kommt Fe in den Cytochromen vor und ist damit notwendig für die Zellatmung. Auch als Co-Faktor in Enzymen ist es anzutreffen, wie zum Beispiel in der Methan-Monooxygenase oder der Ribonukleotid-Reduktase [44]. 66 % des Fe im humanen Organismus sind an Hb gebunden, 6 % an Myoglobin, 1 % an Häm-Enzyme und 1 % an Eisen-Schwefel-Cluster, die zum Beispiel in der Atmungskette als Co-Faktoren benötigt werden. Die verbleibenden 26 % entfallen auf das Eisenspeicherprotein Ferritin und das Eisentransportprotein Tf [45].

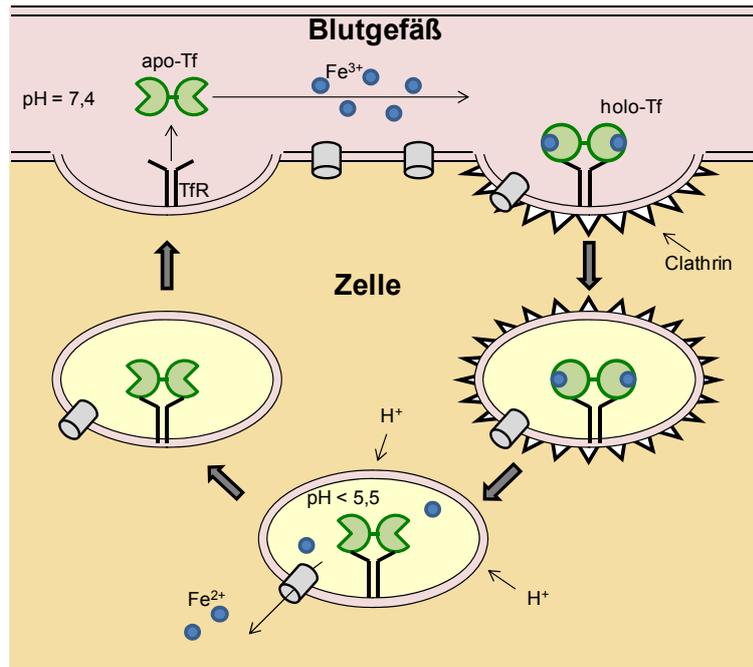


**Abbildung 7** Schematische Darstellung von humanem Transferrin [47, 48] mit den beiden Bindungsstellen für Fe sowie die Koordinationssphäre des Fe<sup>3+</sup>-Ions umgeben von den vier Aminosäuren Asparaginsäure, 2 x Tyrosin und Histidin und dem Carbonation

Tf ist ein ca. 80 kDa großes Protein, das in allen Säugetieren vorkommt. Zum einen dient es zum Eisentransport im Blutserum, zum anderen bindet es sämtliches freies Fe im Blutplasma, so dass die Konzentration an freiem Fe unter  $10^{-10}$  mol/L gehalten wird. Höhere Konzentrationen sind toxisch, da sie die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies oder freien Radikalen katalysieren. Außerdem wird durch eine niedrige Konzentration von freiem Fe das Wachstum von pathogenen Pilzen und Bakterien gehemmt [3, 4, 45, 46].

Für Fe gibt es keine gesteuerten Ausscheidungsprozesse. Die Aufnahme in den Organismus erfolgt durch regulierte Transportprozesse über den Darm. Bei einem gesunden Menschen wird dabei nur so viel Fe aus der Nahrung aufgenommen, wie gerade benötigt wird (ca. 1 – 2 mg/Tag). Der weitaus größere Teil des Eisenbedarfs wird über Recycling der Häm beim Abbau von gealterten Erythrozyten gedeckt [3]. Tf ist ein monomeres Protein, das in zwei gleichartige Domänen geteilt werden kann. Jede Domäne kann ein Fe<sup>3+</sup>-Ion reversibel koordinativ komplexieren. Fe<sup>3+</sup> ist dabei verzerrt oktaedrisch von vier Aminosäureresten (Asparaginsäure (Asp), zweimal Tyrosin (Tyr), Histidin (His)) umgeben. Die beiden freien Bindungsstellen werden kooperativ von einem CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>-Ion besetzt [49, 50, 51, 52]. Diese Bindung ist sehr stabil. In der Literatur sind Dissoziationskonstanten von  $10^{-19}$  –  $10^{-23}$  mol/L zu finden [3, 46, 50, 37, 53]. In Abbildung 7 ist eine schematische Darstellung von Tf sowie die Koordinationssphäre des gebundenen Fe-Ions zu sehen.

Fe wird von Tf zu den Zellen transportiert, in denen es benötigt wird. Diese Zellen haben auf der Oberfläche den Transferrin-Rezeptor-1 (TfR1). Herrscht ein Eisenüberschuss, wird das Fe zur Speicherung in die Leber transportiert. Auf den Leberzellen ist der TfR2, der Tf mit einer geringeren Affinität bindet als der TfR1. Die Eisenbindung und der



**Abbildung 8** Schematische Darstellung der Fe-Bindung und des Transports durch Tf (Zeichnung nach [55])

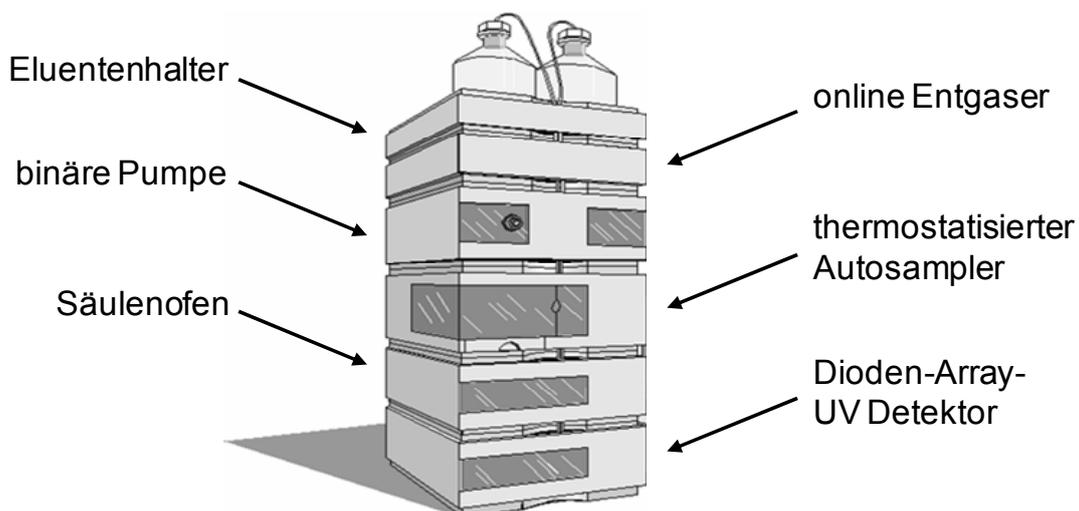
Transport beschreiben einen Kreislauf, der in Abbildung 8 dargestellt ist. Dabei erfolgt die Bindung des Fe an das eisenfreie Tf (apo-Tf) im Blutplasma bei einem neutralen bis leicht basischen pH-Wert von 7,4. Durch eine Konformationsänderung kann der so entstandene Fe-Tf-Komplex an den TfR binden. Das doppelt beladene Tf (holo-Tf) bindet dabei mit einer höheren Affinität als das nur einfach beladene Tf. Der Fe-Tf-TfR-Komplex wird mit Hilfe von Clathrin umhüllten Vesikeln in die Zellen transportiert. Durch einen pH-Wert-Abfall auf unter 5,5 kommt es zu einer weiteren Konformationsänderung und das Fe wird aus dem Tf-TfR-Komplex entlassen. Der apo-Tf-TfR-Komplex wird im Vesikel wieder zur Zellmembran transportiert. Beim Öffnen des Vesikels in das neutrale Medium der Blutgefäße dissoziiert der apo-Tf-TfR-Komplex und der Zyklus kann wieder neu beginnen. Ein Tf-Molekül kann diesen Zyklus mehr als 100-mal durchlaufen [3, 44, 53, 54]. Ein Zyklus dauert dabei etwa 16 Minuten. Auf diese Weise kann eine Leberzelle so ca. 20 000 Fe-Atome pro Minute aufnehmen [44]. Die unterschiedlichen Bedingungen des pH Wertes für die Bindung des Fe an das Tf lassen sich auch sehr gut in vitro nachstellen.

Die Sättigung von humanem Tf liegt bei einem gesunden Menschen bei 20 – 30 % [38]. Tf gehört zu den höher konzentrierten Plasmaproteinen mit einer Konzentration von 2 – 3 g/L. Die Bundesärztekammer gibt in Ihren Richtlinien zur Qualitätssicherung einen Bereich von 0,5 – 6 g/L an, in dem die Referenzlaboratorien in der Lage sein müssen, Tf zu messen [7].

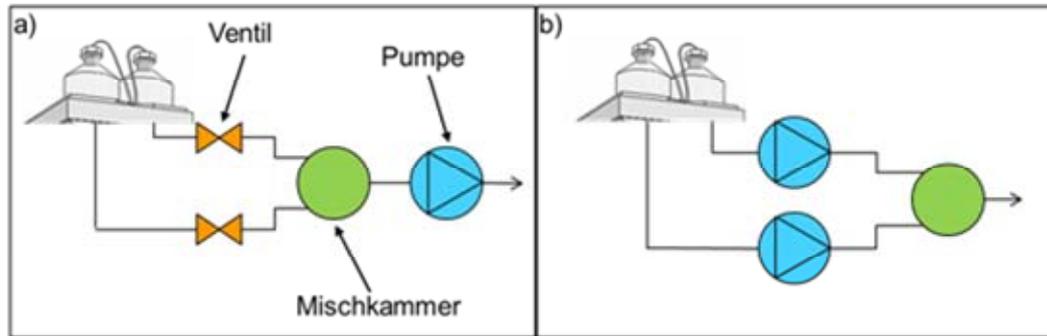
## 2.2 Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Bei der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) handelt es sich um eine Methode zur quantitativen und qualitativen Trennung und Analyse löslicher Stoffe durch Chromatographie, wobei die mobile Phase flüssig ist [56]. Die zu analysierende Probe wird dabei in gelöster Form mit Hilfe einer mobilen Phase (Eluent) über eine mit einer stationären Phase gefüllte Säule gepumpt [57]. Sowohl die stationäre als auch die mobile Phase dürfen weder miteinander noch mit der Probe chemisch reagieren. Zum Grundaufbau einer HPLC gehören ein Probenaufgabesystem, Hochdruckpumpen zur Förderung der mobilen Phase und eine Trennsäule, die über eine Kapillare mit einem Durchflussdetektor verbunden ist. Die physikalische Trennung auf der Säule unterliegt einer Adsorptionsisotherme. Daher ist die Trennleistung direkt von der Temperatur abhängig. Die Temperatur der Säule muss deshalb mit Hilfe eines Säulenofens stabil gehalten werden, um eine gute Reproduzierbarkeit zu gewährleisten. Eine schematische Darstellung des in dieser Arbeit verwendeten Agilent 1200 LC Systems ist in Abbildung 9 gezeigt.

Die Pumpen müssen besondere Anforderungen erfüllen. Das Lösungsmittel muss zum Beispiel pulsationsfrei gefördert werden, um die Retentionszeiten stabil zu halten und Rauschen weitestgehend zu unterdrücken. Auch müssen sie hohen Drücken bis zu 400 bar standhalten [56]. Um während der Trennung die Elutionskraft über die Zeit zu erhöhen, kann ein langsamer Wechsel von zwei Eluenten verwendet werden (Gradient). Damit können sowohl die Trennung als auch die Retentionszeiten einzelner Verbindungen optimiert werden. Die maximale Trennleistung ist von dem Säulenfüllmaterial vorgegeben und kann durch die Eluenten beeinflusst werden.



**Abbildung 9** Schematische Darstellung des Agilent 1200 LC-Systems [58]



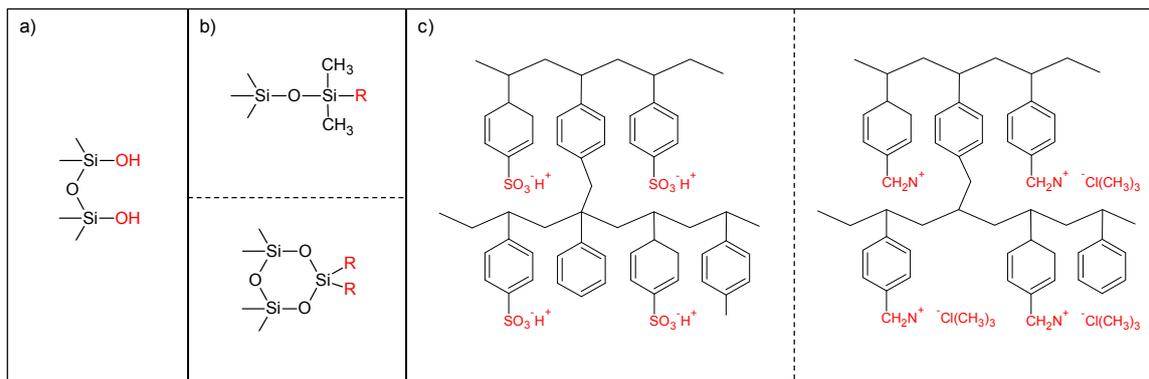
**Abbildung 10** Fließschemata von Pumpen mit Mischung der Laufmittel auf a) der Niederdruckseite, b) der Hochdruckseite (Zeichnung Eluentenflaschen [58])

Die gelösten Analyten haben in der Regel eine geringere Wechselwirkung mit dem ersten Eluenten. Dadurch fließen sie langsamer über die Säule und werden durch die längeren Retentionszeiten besser voneinander getrennt. Durch Wechseln zu einem Eluenten, der eine größere Elutionskraft auf den Analyten hat, eluiert die Probe schneller von der Säule. Damit wird verhindert, dass die Analyten mit längerer Retentionszeit zu lange auf der Säule verbleiben und zu breite Signale bilden [57].

Es gibt zwei Möglichkeiten, die Eluenten miteinander zu mischen: Zum einen auf der Niederdruckseite, das heißt vor der Pumpe, und zum anderen auf der Hochdruckseite, also hinter den Pumpen (Abbildung 10). Die Mischung auf der Niederdruckseite benötigt einen geringeren apparativen Aufbau, da nur eine Pumpe notwendig ist, um die Eluenten zu fördern. Der zeitliche Ablauf des Mischens wird über Ventile gesteuert. Beim Hochdruckgradientensystem braucht jeder Eluent eine eigene Pumpe. Dieser Aufbau ist zwar teurer als das Niederdrucksystem, bietet aber dafür auch mehrere Vorteile. Die Ansprechzeiten sind sehr kurz, so dass auch bei sprunghaften Konzentrationsänderungen ein genaueres Mischverhältnis der Eluenten gewährleistet werden kann [57].

Die Probenaufgabe muss mit einem definierten und reproduzierbaren Volumen erfolgen, ohne den Eluentenfluss zu unterbrechen. Bei dem hier verwendeten System wird dies mit Hilfe einer Probenschleife realisiert, die über ein Ventil in den Probenfluss geschaltet werden kann. Um Matrixeffekte zu vermeiden, ist es ratsam, die zu untersuchende Probe in einem der Eluenten, möglichst dem ersten, zu lösen.

Bei der Normalphasen-Chromatographie (NP-Chromatographie) besteht die stationäre Phase aus polaren Substanzen wie Silicagel oder Aluminiumoxid (Abbildung 11). Die mobile Phase ist dagegen unpolar, wie zum Beispiel Hexan oder Essigsäureethylester. Heute wird meist eine Umkehrphasen-Säule (RP-Säule) eingesetzt. Im Gegensatz zur „klassischen“ HPLC ist dabei die Säule unpolar und die mobile Phase polar. Hierbei dienen als mobile Phase häufig wässrige Eluenten oder Methanol. Die Säulenfüllung besteht aus einem Silikatgrundgerüst, dessen Oberfläche mit hydrophoben Alkyl- oder



**Abbildung 11** Beispiele für Säulenfüllmaterialien bei der HPLC: a) NP-Chromatographie, b) RP-Chromatographie (mit R =  $(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$  (Octadecyl), R =  $(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$  (Octyl), R =  $(\text{CH}_2)_3\text{C}_6\text{H}_5$  (Phenyl)), c) IC: links: stark saurer Kationenaustauscher, rechts: stark basischer Anionenaustauscher

Phenylgruppen funktionalisiert wurde (Abbildung 11). Diese Säulen zeichnen sich gegenüber den NP-Säulen meist durch eine höhere Trennleistung und Belastbarkeit aus [59]. Eine weitere wichtige Säulenart ist die Ionenchromatographie-Säule (IC-Säule). Die stationäre Phase besteht hier meist aus einem Polymerharz, an das die Ionenaustauschergruppen kovalent gebunden sind. Die Selektivität der Säule ist abhängig von den funktionellen Gruppen, dem Vernetzungsgrad und der Partikelgröße des Füllmaterials. Im Allgemeinen werden für die Anionenanalyse quarternäre Ammoniumfunktionen und für die Kationenanalyse sulfonsäuremodifizierte Polymere eingesetzt (Abbildung 11) [56, 59].

Die Trennleistung einer Säule ist unter anderem abhängig von der Teilchengröße der stationären Phase. Je kleiner die Teilchen, desto besser ist die Trennleistung. Daher werden heutzutage Füllmaterialien mit einer Korngröße von 1,2 – 10  $\mu\text{m}$  verwendet. Da die Teilchen der Säule dicht gepackt sind, ergeben sie hohe Strömungswiderstände, so dass bei üblichen Fördermengen von 0,5 – 2 mL/min Drücke zwischen 80 und 600 bar entstehen.

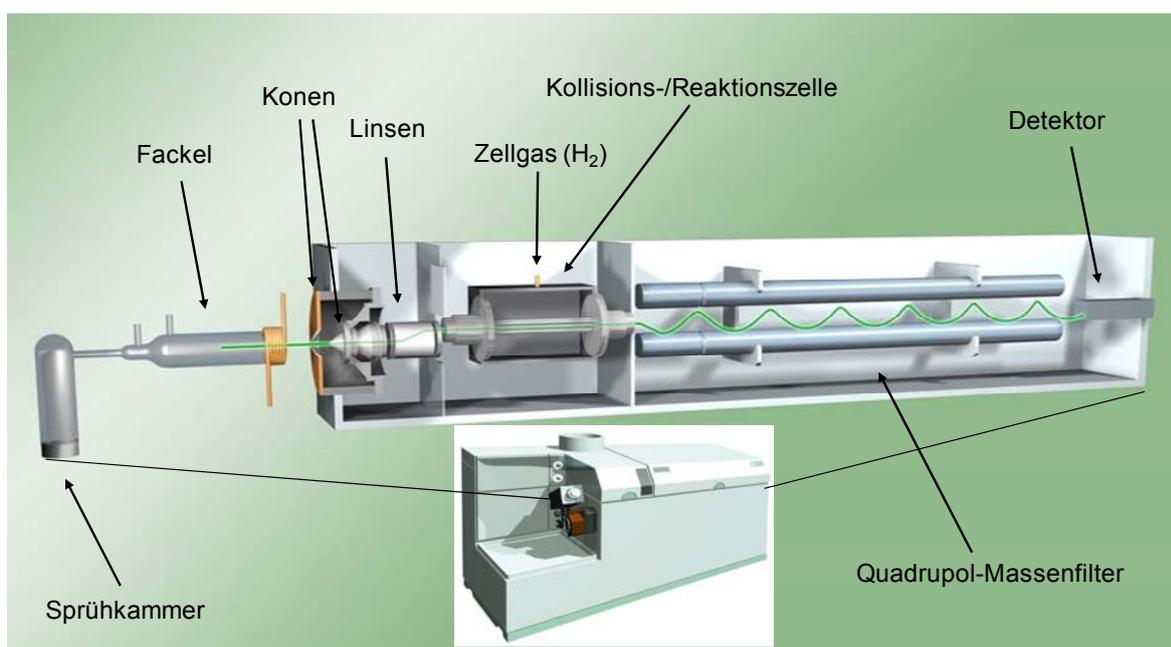
## 2.3 Induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (ICP-MS)

Die induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (ICP-MS) ist eine elementspezifische Analysenmethode. Der Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Agilent ICP-MS 7500cx ist schematisch in Abbildung 12 dargestellt.

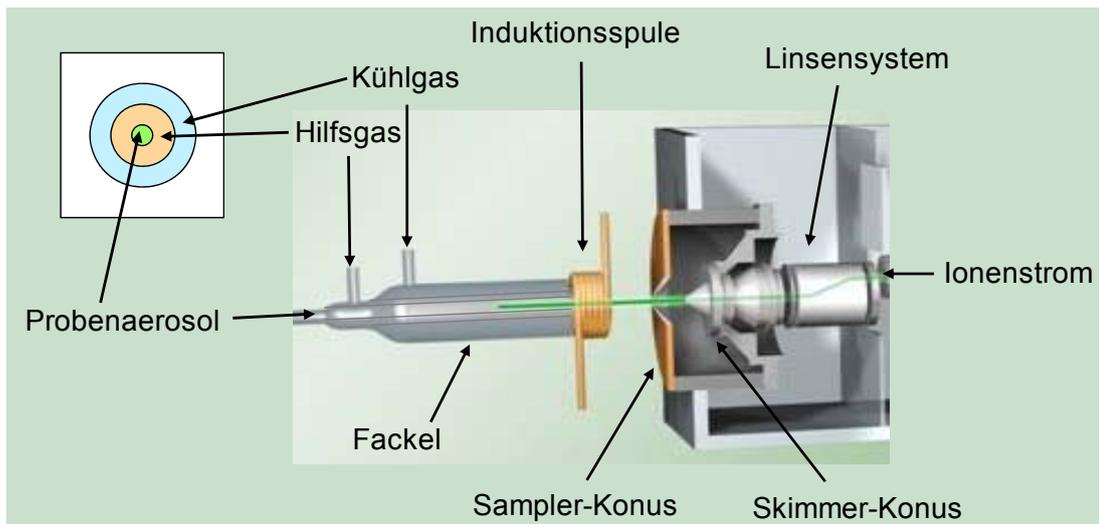
Im Zerstäuber wird aus der Probenlösung ein Aerosol erzeugt, das mit Hilfe eines Argonstroms (Ar) in die Sprühkammer gebracht wird. An der gekühlten Wandung der Sprühkammer kondensieren die größeren Tropfen und werden somit aus dem Aerosol entfernt. Nur Tropfen, die kleiner als 10  $\mu\text{m}$  sind, gelangen weiter in das Plasma. Diese Abtrennung ist erforderlich, da kleinere Tropfen weniger Plasmaenergie zur Desolvation benötigen; das Plasma wird somit weniger abgekühlt und ist stabiler. In Folge dessen kann die Probe besser atomisiert werden und die Ionisierungsrate ist höher.

Das Probenaerosol gelangt weiter in die Fackel und somit in das Plasma. Die Fackel besteht aus drei konzentrischen Quarzröhren. Mit Hilfe eines Ar-Stroms von etwa 1 L/min wird das Probenaerosol durch die innere Röhre geleitet (Abbildung 13). Zur Unterstützung des Transports wird durch den mittleren Ring ein Hilfsgas (Ar) von ca. 0,1 L/min gebracht. Durch den äußeren Ring wird ein Ar-Strom von 15 L/min zur Kühlung der Quarzfackel gepresst.

Das offene Ende der Fackel, in der das Plasma erzeugt wird, mündet in einer Teslaspule, welche von einem Hochfrequenzgenerator mit Leistungen zwischen 500 und 1500 W gespeist wird. Das Plasma wird durch Anlegen eines Hochfrequenzfeldes gespeist und



**Abbildung 12** Schematischer Aufbau eines ICP-MS mit Reaktions-/Kollisionszelle [58]



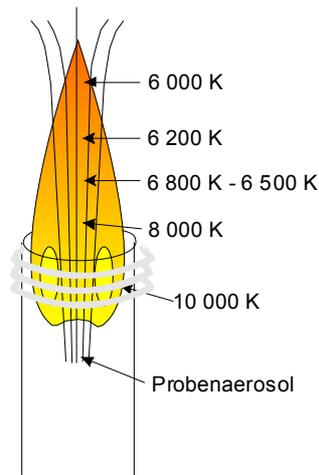
**Abbildung 13** Schematischer Aufbau einer ICP-MS Plasmafackel mit Interface, in dem kleinen Bild ist ein Querschnitt der Fackel zu sehen [58]

durch den Funken der Teslaspule erzeugt [60]. Dabei werden Ar-Atome ionisiert und Elektronen erzeugt. Diese werden im elektromagnetischen Feld beschleunigt. Durch Zusammenstöße mit dem Plasmagas werden weitere Elektronen aus den Ar-Atomen und Analytmolekülen herausgelöst und ionisiert. Es resultiert eine Kaskade aus neu erzeugten Elektronen, Analyt- sowie Ar-Ionen und es bildet sich schließlich ein kontinuierliches Plasma [61].

Ein Plasma, das auch als vierter Aggregatzustand bezeichnet wird, besteht aus den drei Teilsystemen Elektronen-, Ionen- und Neutralgas, die zusammen genommen nach außen hin neutral sind [62]. Der Ionisierungsgrad steigt mit der Temperatur. Elektronen bewegen sich schneller als die schwereren Atomkerne. Die Energie der Anregungsquelle wird daher zuerst auf die Elektronen übertragen. Die Plasmawellenlänge  $\lambda$  und somit die maximal verfügbare Anregungsenergie ist proportional zur Temperatur  $T$ :

$$\lambda \propto T^{\frac{5}{2}} \quad (1)$$

Als Plasmagas wird meist Ar verwendet, da es ein höheres erstes Ionisierungspotential (IP) (15,76 eV) besitzt als die meisten anderen Elemente. Da das zweite IP der anderen Elemente meist höher ist als das erste IP des Ar, liegen die meisten Analytionen, die im Plasma erzeugt werden, einfach positiv geladen vor. In Abbildung 14 ist die Temperaturverteilung einer Plasmafackel gezeigt. Mit zunehmendem Abstand zur Spule nimmt die Temperatur ab. Die Probe wird in die Fackel gebracht und dort unter Normaldruck verdampft, atomisiert und ionisiert, wobei überwiegend einfach geladene Ionen entstehen [63].



**Abbildung 14** Temperaturverteilung in einer Plasmafackel [63]

Eine technische Herausforderung bei dem ICP-MS sind die unterschiedlichen Umgebungsbedingungen bei der Anregung und der Detektion. Während die Anregung bei hohen Temperaturen von 6 000 – 10 000 K und Atmosphärendruck stattfindet, erfolgt die Detektion bei ca. 18 °C im Hochvakuum. Die unterschiedlichen Bereiche werden durch das Interface voneinander getrennt. Die im Plasma erzeugten Ionen treffen zunächst auf den Sampler-Konus. In der Mitte des Konus befindet sich eine 1 mm große Öffnung, durch die die Probe in das Vorvakuum ( $(1,3 - 3,9) \cdot 10^{-3}$  bar) strömt. Das Vorvakuum wird von einer Drehschieber-Ölpumpe erzeugt. Der Probenstrahl kühlt sich auf Grund der Expansion ab. Anschließend gelangen die Probenionen durch den Skimmer-Konus in das Innere des Massenspektrometers. Der Interfacebereich wird auf 18 °C gekühlt, um temperaturabhängige Schwankungen zu vermeiden. In den Konen wird durch den Ionenstrahl ein Strom induziert. Um eine Entladung und damit verbunden ein Plasma zwischen den Konen zu verhindern, werden diese aus gut leitfähigen und korrosionsbeständigen Materialien wie Nickel oder Kupfer hergestellt. Das Hochvakuum im Massenspektrometer wird mit Hilfe einer Turbopumpe erzeugt. Da der eintretende Ionenstrahl divergent ist, muss er mit Hilfe eines elektrostatischen Linsensystems auf den Detektor fokussiert werden. An den vier Linsen liegt jeweils eine unterschiedliche Spannung an, die für das entsprechende Analytium optimiert werden kann. Die vorfokussierten Ionen werden zu einem Ionenstrom gebündelt und von störenden Faktoren wie Lichtquanten oder ungeladenen Teilchen separiert, indem die geladenen Teilchen umgelenkt werden [60].

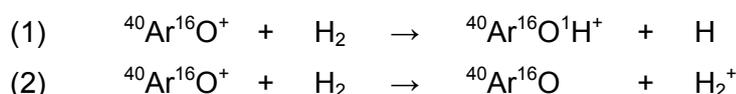
Bei der ICP-MS wird das Verhältnis von Masse zu Ladung ( $m/z$ ) bestimmt. Bei den Temperaturen, die im Plasma herrschen, können fast alle Elemente ionisiert werden. Bei der Detektion wird kein Unterschied gemacht, wie das Verhältnis  $m/z$  zustande kommt, so

**Tabelle 1** Einige Interferenzen für  $m/z$  für die stabilen Isotope des Eisens

Isotop	$m/z$	Molenbruch [66]	mögl. Interferenzen [67]
$^{54}\text{Fe}$	54	0,058 45(35)	$^{54}\text{Cr}^+$ (2,365 %); $^{38}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ (0,064 %)
$^{56}\text{Fe}$	56	0,917 54(36)	$^{40}\text{Ar}^{16}\text{O}^+$ (99,363 %); $^{112}\text{Cd}^{2+}$ (24,130 %)
$^{57}\text{Fe}$	57	0,021 19(10)	$^{40}\text{Ar}^{17}\text{O}^+$ (0,038 %); $^{56}\text{Fe}^1\text{H}^+$ (91,706 %)
$^{58}\text{Fe}$	58	0,002 82(4)	$^{58}\text{Ni}^+$ (68,077 %); $^{40}\text{Ar}^{18}\text{O}^+$ (0,199 %)

dass auch mehrfach geladene Ionen eines anderen Elementes entsprechend höherer Masse bei geringer Massenauflösung des Massenspektrometers nicht von dem Analyt ion unterschieden werden können [64, 65]. Aber nicht nur diese Isobaren können Interferenzen hervorrufen, es kann auch zu Molekülinterferenzen kommen. Dabei wird im Plasma nicht nur ein einatomiges Ion erzeugt, sondern ein Molekülion, dessen  $m/z$  ebenfalls dem des Analyt ions entspricht. Für die stabilen Isotope des Eisens sind mögliche Interferenzen in Tabelle 1 aufgelistet.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten diese Interferenzen zu beseitigen. Zum einen kann in der Probenvorbereitung darauf geachtet werden, so wenig Matrixmoleküle wie möglich in die Probe einzubringen. Zum anderen kann aber auch instrumentell dagegen vorgegangen werden: Zum Beispiel mit einem hochauflösenden Massenspektrometer, welches die geringen Massenunterschiede zwischen Analyt ion und Interferenzion unterscheiden kann [61, 68], oder aber, wie in dieser Arbeit verwendet, mit einer Reaktions-/ Kollisionszelle. Diese besteht aus einem linear angeordneten Oktopol, der auf das Linsensystem folgt. In diesem Oktopol können, durch Einbringen eines Zellgases, die interferierenden Molekülionen durch Kollision zerschlagen werden. Dies geschieht entweder durch Protonen- (1) oder Ladungstransfer (2) [69]:



Vom Oktopol wird der Ionenstrahl zum Quadrupol-Massenfilter weitergeleitet. Durch zusätzliche Einstellungen von Oktopol- und Quadrupol-Vorspannung kann eine kinetische Energie-Diskriminierung vorgenommen werden. Die eingestellte Potentialdifferenz verhindert, dass die Molekülionen mit zu geringer kinetischen Energie weiter in den Massenfilter geleitet werden [69, 70, 71].

Der Quadrupol-Massenfilter besteht aus vier gleichlangen Stäben, die, wie in Abbildung 15 gezeigt, in einem Quader angeordnet sind.

Zwischen zwei jeweils gegenüberliegenden Stäben befindet sich ein Hochfrequenz-Spannungsfeld. Die Phasenverschiebung zu dem benachbarten Paar beträgt 180 °.

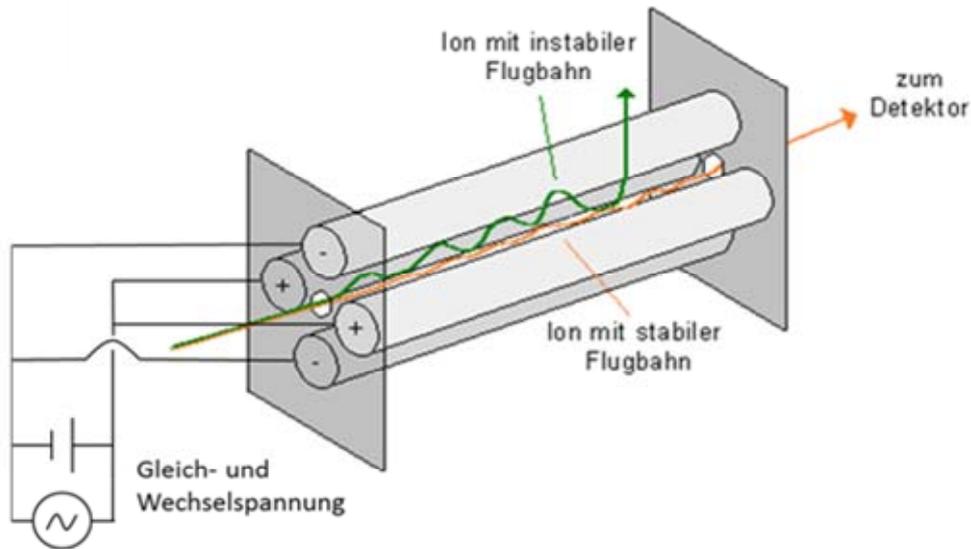


Abbildung 15 Schematischer Aufbau eines Quadrupols nach Lohninger [72]

Dieses Wechselfeld wird gleichzeitig mit einem Gleichspannungsfeld überlagert. Das eine Paar wird dabei positiv überlagert, das andere negativ [72, 73, 74]. Die beschleunigten Ionen gelangen in das Feld und beginnen planar um die Achse des Quadrupols zu oszillieren. Die resultierende Trajektorie der Ionen ist nur für ein bestimmtes  $m/z$  stabil. Ionen dieses Verhältnisses sind resonant und gelangen zum Detektor. Nicht resonante Ionen werden derart abgelenkt, dass sie entweder mit den Elektroden kollidieren oder aus dem Massenfilter katapultiert werden. Durch Variation der Felder können alle  $m/z$  sequenziell eingestellt werden. Dies geschieht so schnell, dass man auch von quasi simultan spricht. Mit Hilfe der Mathieu'schen-Gleichungen kann  $m/z$  über die Spannungsfelder beschrieben werden:

$$\frac{m}{z} = \frac{U_{=} \cdot U_{\approx} \cdot r_{\text{quad}}}{v} \quad (2)$$

Dabei steht  $U_{=}$  für die Gleichspannung,  $U_{\approx}$  für die Wechselfeldspannung,  $r_{\text{quad}}$  für den Radius des Quadrupols und  $v$  für die Frequenz.

Aus dem Quadrupol werden die Ionen zum Detektor, einem Elektronen-Vervielfacher, geleitet. Das Prinzip eines Elektronen-Vervielfachers kann zum Beispiel bei Becker nachgelesen werden [75].

Die meisten Elemente sind nicht monoisotopisch. Daher kann es zu Überlagerungen der Isotope verschiedener Elemente kommen, die nahezu dieselbe Masse besitzen. Beispielsweise liegt auf der Masse des  $^{54}\text{Fe}$ -Isotops (5,845(35) %) auch das  $^{54}\text{Cr}$ -Isotop

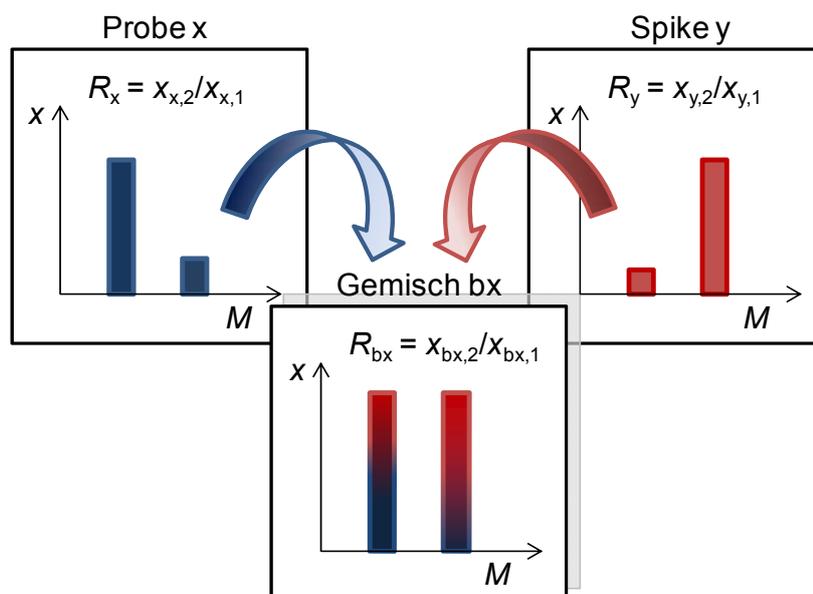
mit einer natürlichen Häufigkeit von 2,365(7) % und auf der Masse des  $^{58}\text{Fe}$ -Isotops (0,282(4) %) liegt ebenfalls das  $^{58}\text{Ni}$ -Isotop (68,077(19) %). Oft können solche Überlagerungen korrigiert werden, indem andere Isotope des interferierenden Elementes zur Konzentrationsbestimmung gemessen werden. Hat das Element eine natürliche Isotopenzusammensetzung nach IUPAC, kann der entsprechende Beitrag des störenden Elementes subtrahiert werden.

Die elementspezifische Detektion organischer Moleküle mittels ICP-MS lässt sich immer dann gut einsetzen, wenn die Quantifizierung eines Moleküls über ein einziges Element möglich ist. Bei Metalloproteinen, wie dem Tf, liegt bei vollständiger Sättigung mit Fe ein stöchiometrisch konstantes Verhältnis zwischen Protein und Fe vor. Dieses kann zur Quantifizierung ausgenutzt werden. Die elementspezifische Detektion bietet gegenüber organischen Messverfahren einige Vorteile. Zum Beispiel sind die Nachweisgrenzen deutlich kleiner, da das ICP eine energiereiche Ionenquelle mit hohem Ionisierungsgrad und guter Empfindlichkeit ist [76, 77]. Es ist in der Lage, eine Spezies bei gleichzeitigem Abbau der Matrix zu ionisieren. Im Gegensatz zur organischen MS kann also bei der anorganischen MS das Molekül direkt in das MS gegeben werden, während bei der organischen MS von Proteinen häufig ein Verdau oder andere komplizierte Probenvorbereitungen vorgenommen werden müssen [78]. Außerdem ist es möglich, mit ICP-MS mehrere Isotope während einer chromatographischen Trennung zeitaufgelöst gleichzeitig messen zu können und somit gleichzeitig mehrere zeitaufgelöste Signale zu erhalten [79].

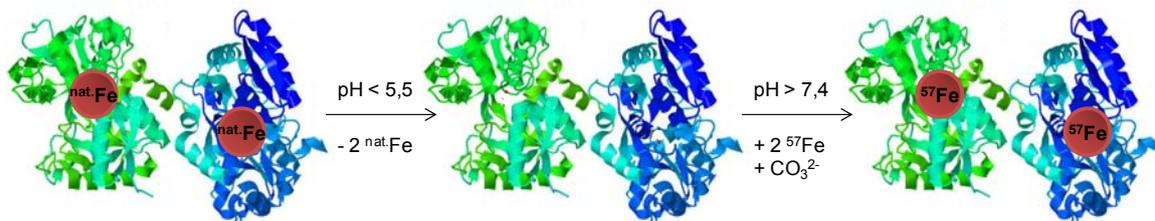
## 2.4 Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (IDMS)

Nach Definition des CCQM gilt die Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (IDMS) als Primärmethode [39]. Sie kann sowohl in der organischen als auch in der anorganischen Analytik angewandt werden und zeichnet sich durch hohe Richtigkeit und Präzision aus [80, 81, 82, 83]. Basis der IDMS ist die Veränderung mindestens eines Isotopenverhältnisses  $R_x = x'_{x,2}/x'_{x,1}$  eines Elementes der Probe  $x$  durch Zugabe eines isotonenangereicherten Materials  $y$  (Spike) desselben Elementes mit dem Isotopenverhältnis  $R_y = x'_{y,2}/x'_{y,1}$ , wobei  $x'$  für den Isotopenanteil steht, 1 bezeichnet das Referenzisotop (im hiesigen Fall  $^{56}\text{Fe}$ ) und 2 das Monitorisotop ( $^{57}\text{Fe}$ ). In Abbildung 16 ist die Isotopenverdünnung schematisch skizziert. Die IDMS stellt somit eine Messung mit idealem internen Standard dar, sofern der Spike vor Beginn der Probenvorbereitung zugegeben wird und eine vollständige Durchmischung von Probe und Spike gewährleistet ist. Prinzipiell kann damit jedes Element quantifiziert werden, das mindestens zwei stabile Isotope aufweist.

Im Folgenden wird die Quantifizierung über IDMS am Beispiel von Tf erläutert. Dabei wird eine Mischung aus Lösungen an Tf, an das isotopisch natürlich zusammengesetztes Fe gebundenen ist, und aus isotopisch angereichertem Fe hergestellt und das Isotopenverhältnis  $R = I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$  mit ICP-MS gemessen. Aus diesem Verhältnis und unterschiedlichen Eingangsgrößen, abhängig von der gewählten IDMS-Methode, kann die Konzentration in der Probe berechnet werden [84, 85, 24]. In der Literatur sind zwei



**Abbildung 16** Schematische Darstellung der IDMS, Veränderung der Isotopenverhältnisse  $R_i$  von Probe  $x$  und Spike  $y$



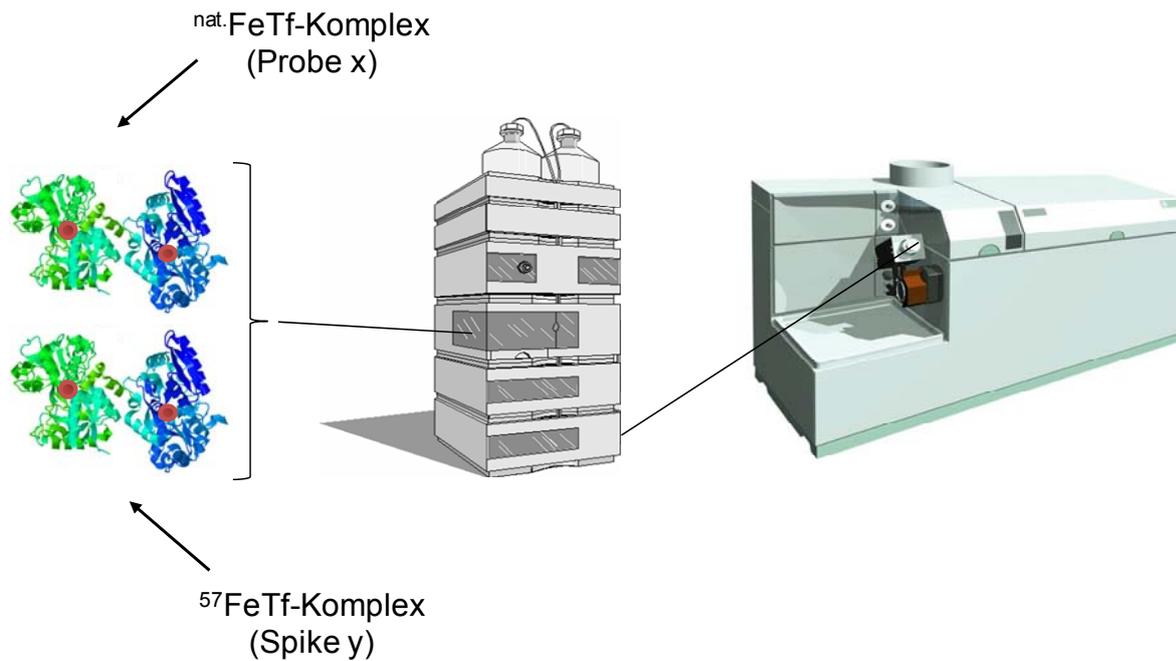
**Abbildung 17** Schema zur Herstellung eines  $^{57}\text{Fe}$ -Tf-Spikes (Proteinstruktur nach [47, 48])

prinzipielle Möglichkeiten beschrieben, wie die IDMS in Verbindung mit einer chromatographischen Trennmethode eingesetzt werden kann. Die eine ist die spezies-spezifische IDMS (SS-IDMS), die zweite ist die post-column IDMS (PC-IDMS). In beiden Fällen wird lediglich das Fe mit ICP-MS gemessen, während der organische Anteil des Tf im Plasma zerstört wird.

Bei der SS-IDMS wird die zu analysierende Probe mit einem Spike versetzt, der den gleichen chemischen Aufbau besitzt wie der Analyt, nur dass ein Element mit natürlicher isotopischer Zusammensetzung durch das gleiche Element, das in einem Isotop angereichert ist, ausgetauscht wird. Der Austauschprozess ist in Abbildung 17 skizziert. Da nur das Fe gemessen wird, entspricht die SS-IDMS der „klassischen“ IDMS von anorganischen Elementlösungen, bei denen jedoch vor der Detektion keine chromatographische Trennung erfolgen muss.

Der Vorteil der SS-IDMS liegt darin, dass jeglicher Probenverlust nach der Spikezugabe keinen Einfluss auf das Isotopenverhältnis hat und somit auch keinen Einfluss auf den ermittelten Probengehalt. Dies ist für die Speziesanalytik von besonderer Bedeutung. Sie beginnt meist mit einem Extraktionsschritt, der besonders kritisch hinsichtlich der Ausbeute ist. Durch Spiken der Probe vor der Extraktion und Anwendung der SS-IDMS kann dieses Problem überwunden werden. In Abbildung 18 ist der Messaufbau der SS-IDMS skizziert.

Steht ein hinsichtlich der Konzentration zertifizierter oder kalibrierter Spike zur Verfügung, kann die single IDMS angewandt werden. Dabei kann aus der Messung des Isotopenverhältnisses  $R_{bx}$ , der Mischung bx der Probe x und des Spikes y der Massenanteil  $w_x$  des Analyten in der Probe bestimmt werden (Gleichung 3) [24, 86]. Hierbei geht die Rückführung des Ergebnisses auf den Massenanteil des Analyten im Spike ( $w_y$ ) zurück. Der Ansatz der Proben erfolgt grundsätzlich gravimetrisch, um den hohen metrologischen Anforderungen gerecht zu werden und die Unsicherheiten so klein wie möglich zu halten.



**Abbildung 18** Schematischer apparativer Aufbau der SS-IDMS [47, 48, 58]

$$w_x = w_y \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{M_x}{M_y} \cdot \frac{(R_y - R_{bx})}{(R_{bx} - R_x)} \cdot \frac{\sum_i R_{x,i}}{\sum_i R_{y,i}} \quad (3)$$

Dabei steht  $m_x$  für die Masse der Proben- und  $m_{yx}$  für die Masse der Spikelösung.  $M_i$  bezeichnet die jeweiligen molaren Massen.  $R_x$  und  $R_y$  geben das Isotopenverhältnis in der Probe und im Spike wieder und  $w_y$  den Massenanteil in der Spikelösung. In diesem Fall muss die Isotopenzusammensetzung für das zu analysierende Element sowohl in der Probe als auch im Spike bekannt sein. Da die Isotopenzusammensetzung des Spikes aber nicht immer bekannt ist und kommerziell erhältliche Spikematerialien hinsichtlich ihrer Reinheit meistens nicht ausreichend genug oder gar nicht charakterisiert sind, wurde die double IDMS entwickelt [86, 87]. Dabei wird der Massenanteil  $w_y$  des Spikes durch eine vorgeschaltete weitere IDMS Messung bestimmt. Dies geschieht mit einer weiteren Lösung, der Referenz z (back spike), die hinsichtlich ihrer Reinheit und ihrer Isotopenzusammensetzung charakterisiert ist. Da es sich hierbei meist um ein isotopisch natürlich zusammengesetztes Material handelt, können die in den IUPAC Tabellen [66] angegebenen Isotopenhäufigkeiten verwendet werden. Die Rückführung des Ergebnisses der double IDMS erfolgt über den Massenanteil des Elementes in der Referenz z. Der Massenanteil  $w_y$  des Spikes errechnet sich analog zu Gleichung 3:

$$w_y = w_z \cdot \frac{m_z}{m_{yz}} \cdot \frac{M_y}{M_z} \cdot \frac{(R_z - R_{bz})}{(R_{bz} - R_y)} \cdot \frac{\sum_i R_{y,i}}{\sum_i R_{z,i}} \quad (4)$$

Weitere Vorteile besitzt die sogenannte Exact Matching Methode. Dabei muss bei der Variante für die Spezieanalytik die Referenz z der Probe x in den Isotopenverhältnissen  $R_{(b)i}$ , dem Massenanteil  $w_i$ , der molaren Masse  $M_i$  sowie der Matrix der Lösung so ähnlich wie möglich sein. Auf diese Weise heben sich systematische Fehler bei der Bestimmung der Isotopenzusammensetzung  $R_y$  gegenseitig auf. Ein weiterer Vorteil dieser Methode ist, dass Kontaminationen und Blanks sich nicht im Ergebnis niederschlagen [86].

Wird die Referenz z auf gleiche Weise wie die Probe x in der Probenvorbereitung und Messung behandelt, so kürzt sich nicht nur der Massenanteil des Spikes  $w_y$  aus den Berechnungen heraus, sondern auch die dazugehörige molare Masse  $M_y$  und man erhält die Gleichung für die double IDMS:

$$w_x = w_z \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_z}{m_{yz}} \cdot \frac{(R_y - R_{bx})}{(R_{bx} - R_x)} \cdot \frac{(R_{bz} - R_z)}{(R_y - R_{bz})} \quad (5)$$

Der Index bz steht dabei für die Mischung aus Referenz z und Spike y.

Aber auch andere Herausforderungen können bei Messungen des Spike-Isotopenverhältnisses auftreten. Zum Beispiel können Interferenzen auf dem Referenzisotop liegen, die aufgrund des hohen Anreicherungsgrades für  $R_x$ ,  $R_z$ ,  $R_{bx}$  und  $R_{bz}$  zwar vernachlässigt werden können, aber  $R_y$  stark beeinflussen. Auch können Memoryeffekte auftreten, die durch Messungen in unterschiedlichen Lösungen mit stark variierenden Isotopenverhältnissen hervorgerufen werden. Ein weiterer Punkt, der die Isotopenverhältnismessung angeht, spielt gerade bei Messungen mit Quadrupol MS eine wichtige Rolle. Und zwar ist die Flugbahn der Ionen innerhalb eines MS abhängig von der kinetischen Energie und somit auch von der Masse des Ions; mit Hilfe eines Quadrupol MS kann die Flugbahn aber nur für ein Isotop optimiert werden, für alle anderen Massen kann lediglich ein Kompromiss gefunden werden. Daraus folgt, dass trotz gleicher Konzentrationen für unterschiedliche Massen unterschiedliche Intensitäten detektiert werden, die sogenannte Massendiskriminierung [86]. Diese fehlerhafte Messung kann durch einen Korrekturfaktor ( $K$ -Faktor) berichtigt werden. Meist wird dazu eine Referenz des zu bestimmenden Elementes verwendet, die eine natürliche Isotopenzusammensetzung  $R_i^{IUPAC}$  besitzt. Diese wird mit der experimentell bestimmten Isotopenzusammensetzung  $R_i$  in Bezug gesetzt:

$$K_y = \frac{R_y^{\text{IUPAC}}}{R_y} \quad (6)$$

mit:

$$R_y = \frac{I_y}{I_z} \quad \text{und} \quad R_i^{\text{IUPAC}} = \frac{x_i^{\text{IUPAC}}}{x_z^{\text{IUPAC}}} \quad (7)$$

Die Isotopenverhältnisse  $R_i$  im Referenzmaterial werden experimentell durch die gemessenen Intensitäten  $I$  bestimmt.  $I_z$  ist dabei das Isotop mit der größten natürlichen Anreicherung (hier:  $^{56}\text{Fe}$ ). Die „wahren“ Isotopenverhältnisse werden über die Stoffmengenanteile  $x'$ , entnommen aus der IUPAC Tabelle [23] berechnet [86].

Mit dem  $K$ -Faktor werden anschließend aus den gemessenen Isotopenverhältnissen für alle Mischungen die Stoffmengenverhältnisse ermittelt:

$$R_i^{\text{true}} = K_i \cdot R_i^{\text{meas}} \quad (8)$$

Wie oben schon erwähnt, sind Spikematerialien meist nicht hinreichend gut charakterisiert. Außerdem lässt sich das Isotopenverhältnis  $R_y$  im Spike nicht immer gut bestimmen. Gerade bei Fe ist der Anreicherungsgrad  $R_y = x'_{57}/x'_{56}$  geringer als 100 mol/mol. Dadurch wird der Unsicherheitsbeitrag von  $R_y$  für die erweiterte Unsicherheit der Methode signifikant größer. Um diese Größe zu eliminieren und damit auch gleichzeitig die Unsicherheit der Messungen zu verbessern, muss eine zweite Mischung aus Referenz und Spike (bz2) eingeführt werden. Wird diese Mischung ebenfalls wie die Mischungen bx und bz1 behandelt, so führt dies in der Berechnung dazu, dass  $R_y$  ersetzt werden kann. Die folgenden Berechnungen setzen voraus, dass die molaren Massen  $M_{z1}$  und  $M_{z2}$  und damit verbunden natürlich auch die Isotopenverhältnisse  $R_{z1}$  und  $R_{z2}$  gleich sind. Für die Elementanalyse ist diese Methode in der Literatur beschrieben und wird als triple IDMS bezeichnet [88]. Sie wurde hier erstmals für die Speziesanalytik angewendet. Dabei wurden für die beiden Mischungen bz1 und bz2 dieselbe Stammlösung verwendet und nicht so wie bisher zwei unterschiedliche Referenzlösungen [84]. Es ist lediglich erforderlich, dass die Isotopenverhältnisse  $R_{bz1}$  und  $R_{bz2}$  unterschiedlich sind. Dies wird erreicht, indem unterschiedliche Mischungsverhältnisse von Spike und Referenz zur Herstellung der Mischungen verwendet werden. Aus den Massenanteilen  $w_{zi}$ , den Einwaagen der Referenz  $m_{zi}$  und des Spikes  $m_{yzi}$  sowie den molaren Massen des Spikes  $M_y$  und der Referenz  $M_z$  sowie den Isotopenverhältnissen  $R_i$  erhält man analog zu Gleichung 4 für die Massenanteile  $w_y$  des Spikes in den beiden Mischungen bz1 und bz2:

$$w_y = w_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{M_y}{M_z} \cdot \frac{(R_z - R_{bz1})}{(R_{bz1} - R_y)} \cdot \frac{\sum_i R_{y,i}}{\sum_i R_{z,i}} = w_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{M_y}{M_z} \cdot \frac{(R_z - R_{bz2})}{(R_{bz2} - R_y)} \cdot \frac{\sum_i R_{y,i}}{\sum_i R_{z,i}} \quad (9)$$

Stellt man Gleichung 9 nach  $R_y$  um und vereinfacht die Ausdrücke:

$$x_1 = x_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}}; \quad x_2 = x_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \quad (10)$$

um die Gleichung übersichtlicher zu machen, erhält man:

$$R_y = \frac{R_{bz2} \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - R_{bz1} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}{x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})} \quad (11)$$

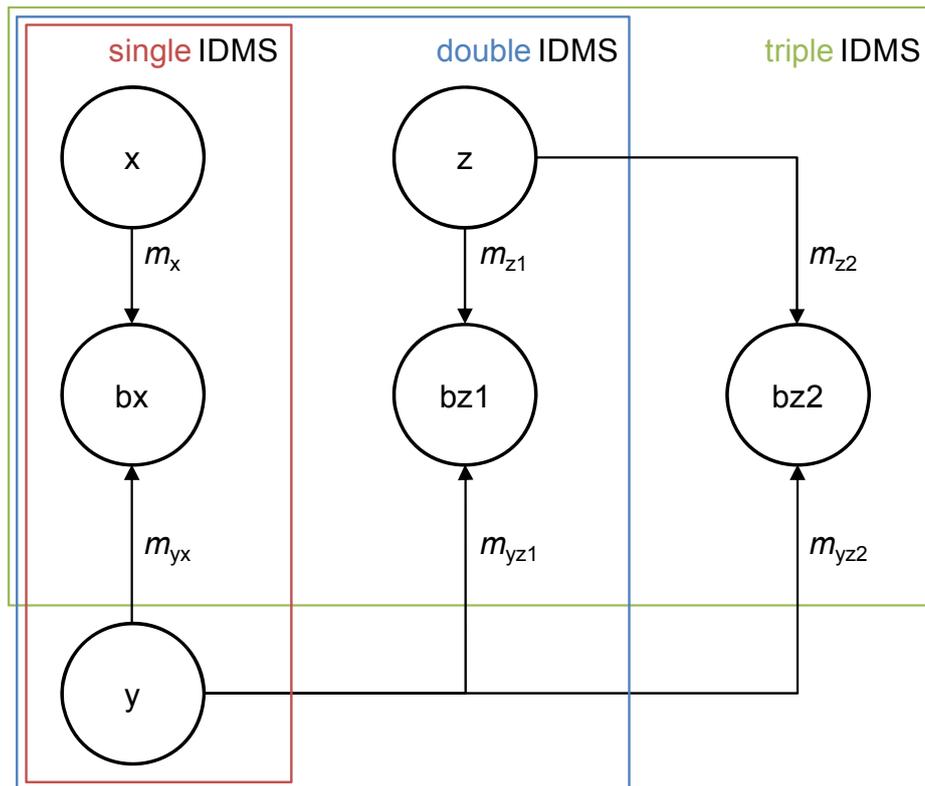
Setzt man dieses  $R_y$  nun in Gleichung 3 ein und ersetzt  $w_y$  durch Gleichung 4 unter der Annahme, dass  $M_x$  gleich  $M_z$  und damit folglich auch  $R_x$  gleich  $R_z$  ist – was bedeutet, dass Probe und Referenz das gleiche Isotopenverhältnis haben – so erhält man die Gleichung für den Massenanteil der Probe  $w_x$  in der Mischung bx [84]:

$$w_x = w_z \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{1}{R_x - R_{bx}} \left[ \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{R_{bz2} - R_{bx}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot (R_x - R_{bz1}) + \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{R_{bx} - R_{bz1}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot (R_x - R_{bz2}) \right] \quad (12)$$

Gleichung 12 für die Bestimmung des Massenanteils  $w_x$  in der Probe x zeigt also keine Abhängigkeit von der Isotopenzusammensetzung  $R_y$  im Spike y.

Im Anhang ist die Herleitung der triple IDMS-Gleichung ausführlich beschrieben. Um deutlicher zu machen, welche Eingangsgrößen und Lösungen für die Ansätze der single, double und triple IDMS benötigt werden, sind diese schematisch in Abbildung 19 zusammengefasst.

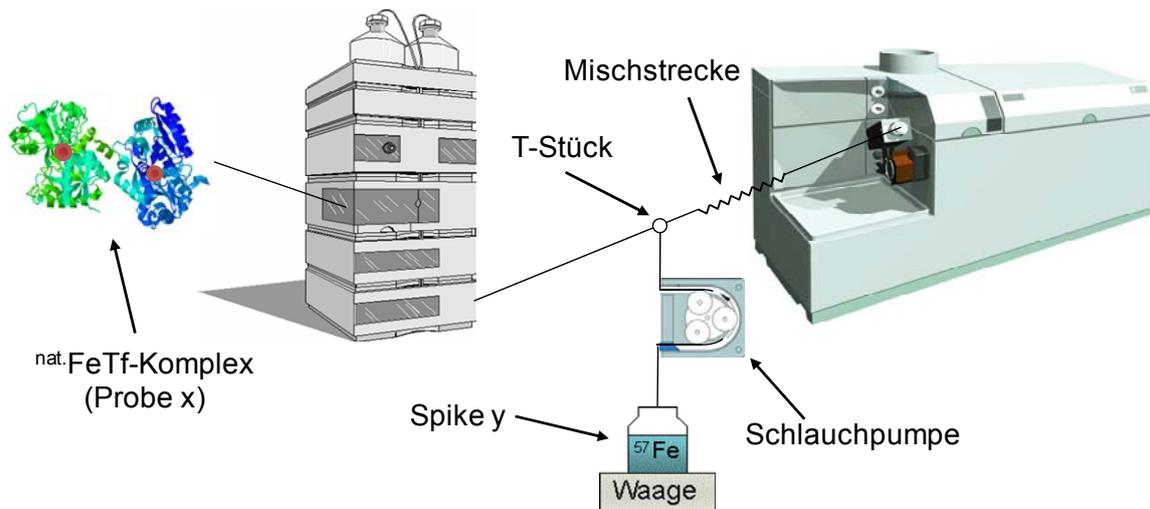
Bei der PC-IDMS, auch spezies-unspezifische IDMS genannt, wird eine isotopisch angereicherte anorganische Verbindung eines Elementes als Spike verwendet und nach der chromatographischen Trennung kontinuierlich in den Probenfluss gegeben. Welche anorganische Verbindung dazu verwendet wird ist unerheblich. Sie dient der kontinuierlichen Messung der Fe-Konzentration in der Probe nach der chromatographischen Trennung. Diese Methode kann zum Beispiel zum Einsatz kommen, wenn die Struktur des Analyten nicht vollständig bekannt ist oder kein spezies-



**Abbildung 19** Schematisches Diagramm der Ansatzlösungen von single, double und triple IDMS [84]

spezifischer Spike zur Verfügung steht. Erstmals wurde sie von Heumann und Rottmann beschrieben [89, 90]. Dabei wurde der Spike über einen zuvor kalibrierten Volumenfluss nach der chromatographischen Trennung in den Probenfluss gegeben. Später wurde diese Methode von Swart *et al.* [91] weiter entwickelt, indem die Zugabe des Spikes über den Massenfluss in die Rechnung eingeht. Dafür wird mit Hilfe einer Waage kontinuierlich die abnehmende Masse der Spikelösung beobachtet. Dieser apparative Aufbau ist schematisch in Abbildung 20 dargestellt. Im Falle von Tf bedeutet dies, dass das Tf aus einer Serumprobe mit HPLC von der Matrix abgetrennt und anschließend online mit einem anorganischen Fe-Spike versetzt wird.

Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass man keinen spezies-spezifischen Spike benötigt, und mehrere Spezies, die das gleiche Element enthalten, in einer Probe gleichzeitig bestimmen kann. Da bei der Isotopenverdünnung jeglicher Probenverlust erst nach Zugabe des Spikes keinen Einfluss mehr auf das Messergebnis hat, dies aber bei der PC-IDMS erst nach der chromatographischen Trennung erfolgt, haben Verluste, zum Beispiel durch Extraktion, Einfluss auf das Endergebnis. Dies erfolgt im Gegensatz zur SS-IDMS, bei der der Spike bereits zu Beginn der Probenvorbereitung zu der Probe gegeben wird. Außerdem sind die Unsicherheiten der PC-IDMS gegenüber der SS-IDMS größer.



**Abbildung 20** Schematischer apparativer Aufbau der post-column IDMS [47, 48, 58]

Betrachtet man ein double PC-IDMS Experiment, so wird dies analog zur SS-IDMS mathematisch beschrieben durch:

$$w_x = w_z \cdot \frac{\int \hat{R}_{bx} dt}{\int \hat{R}_{bz} dt} \quad (13)$$

Wobei  $w_x$  den Massenanteil in der Probe x und  $w_z$  in der Referenz z darstellt. Ferner gilt dafür:

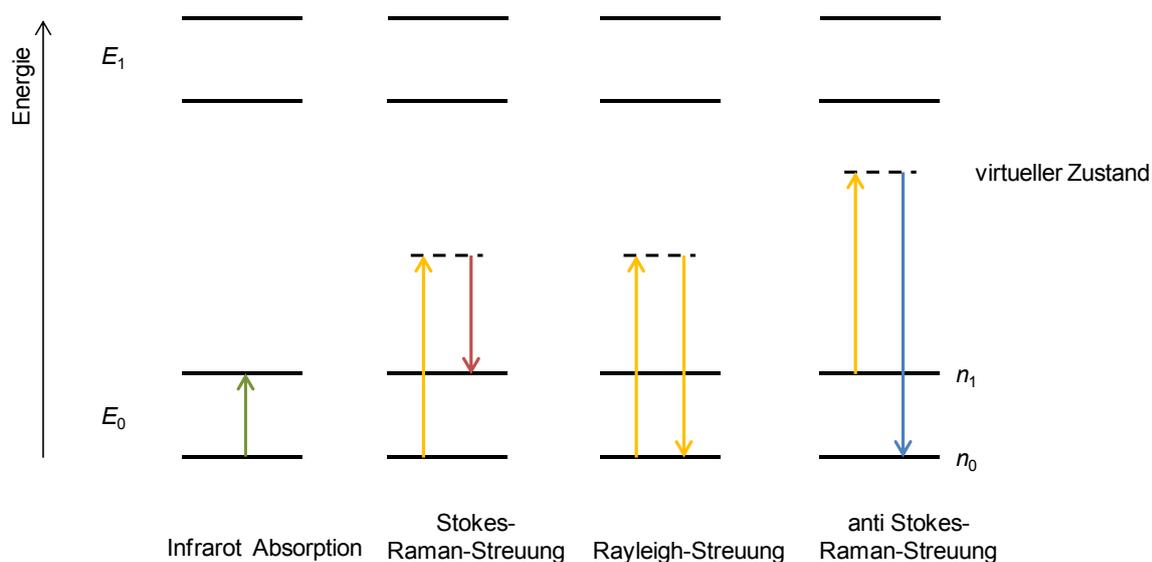
$$\hat{R}_{bx} = \frac{(R_y - R_{bx})}{(R_{bx} - R_x)} \quad \text{und} \quad \hat{R}_{bz} = \frac{(R_y - R_{bz})}{(R_{bz} - R_z)} \quad (14)$$

Da sich hier das Verhältnis von Analyt und Spike kontinuierlich ändert, muss das Verhältnis über den gesamten chromatographischen Peak integriert werden

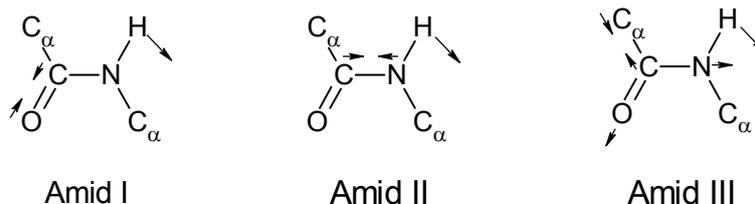
## 2.5 Raman-Spektroskopie

Bei der Raman-Spektroskopie handelt es sich um eine meist berührungs- und zerstörungsfreie Analysenmethode. Der Raman-Effekt geht auf eine Wechselwirkung von Strahlung und Materie zurück. Bestrahlt man Moleküle mit monochromatischer Strahlung, so wird diese in alle Raumrichtungen gestreut. Die Wechselwirkung von Molekülen und Molekülgittern mit Strahlung (Photonen) kann als Stoßvorgang angesehen werden. Man unterscheidet dabei drei unterschiedliche Prozesse. Beim elastischen Stoß verändert sich die Frequenz zur Strahlungsquelle nicht. Dies wird als Rayleigh-Streuung bezeichnet. Sie liefert von den drei möglichen Prozessen die intensivste Strahlung. Die beiden anderen Prozesse werden durch unelastische Stöße hervorgerufen und sind mit einer Energieübertragung zwischen Strahlung und Materie verbunden. Diese Prozesse liefern den Raman-Effekt. Besitzt das Molekül nach dem Stoß eine höhere Schwingungsenergie – das Streulicht ist also energieärmer und damit langwelliger geworden – so spricht man von der Stokes-Raman-Streuung. Besitzt das Molekül nach dem Stoß eine niedrigere Schwingungsenergie – das Streulicht ist also energiereicher und kurzwelliger – so erhält man die anti Stokes-Raman-Streuung. Dies ist nur möglich, wenn sich das Molekül vor dem Stoß in einem höheren Energiezustand als dem Grundzustand befindet (Abbildung 21).

Anhand eines Raman-Spektrums können sowohl qualitative als auch quantitative Aussagen getroffen werden. Raman-Spektren und Infrarot(IR)-Spektrern weisen eine gewisse Ähnlichkeit auf. Sie sind komplementär zueinander; beides sind



**Abbildung 21** Energiezustände für Rayleigh- und Raman-Streuung.  $E$  steht für die Energiezustände und  $n$  für die Ebene der Schwingungsfrequenz



**Abbildung 22** Schematische Darstellung der Schwingungsmodi für Amid I, II und III [94, 96]

Schwingungsspektren. Trotz unterschiedlicher physikalischer Prozesse der beiden Methoden liegen die Banden an nahezu den gleichen Stellen in den Spektren. Ob eine Bande beobachtet werden kann und mit welcher Intensität sie auftritt, hängt von den Auswahlregeln ab. Für die IR-Absorption bedeutet dies, dass eine Schwingung dann aktiv ist, wenn sich während der Schwingung das Dipolmoment ändert. Raman aktiv ist sie, wenn sich während der Schwingung die Polarisierbarkeit ändert [92]. Eine weitere Regel ist das Alternativ-Verbot, welches besagt, dass bei Molekülen mit einem Symmetriezentrum Schwingungen symmetrisch zum Zentrum IR verboten sind und Schwingungen antisymmetrisch zum Zentrum Raman verboten sind. Weitere Details können in der Literatur [92, 93, 94, 95] nachgelesen werden.

Die Banden in Protein-Raman-Spektren werden hervorgerufen durch Schwingungen des Peptidrückrads und den Aminosäureseitenarmen. Die Amidgruppe weist drei unterschiedliche Schwingungsmodi auf: Amid I, II und III. Diese sind in Abbildung 22 dargestellt.

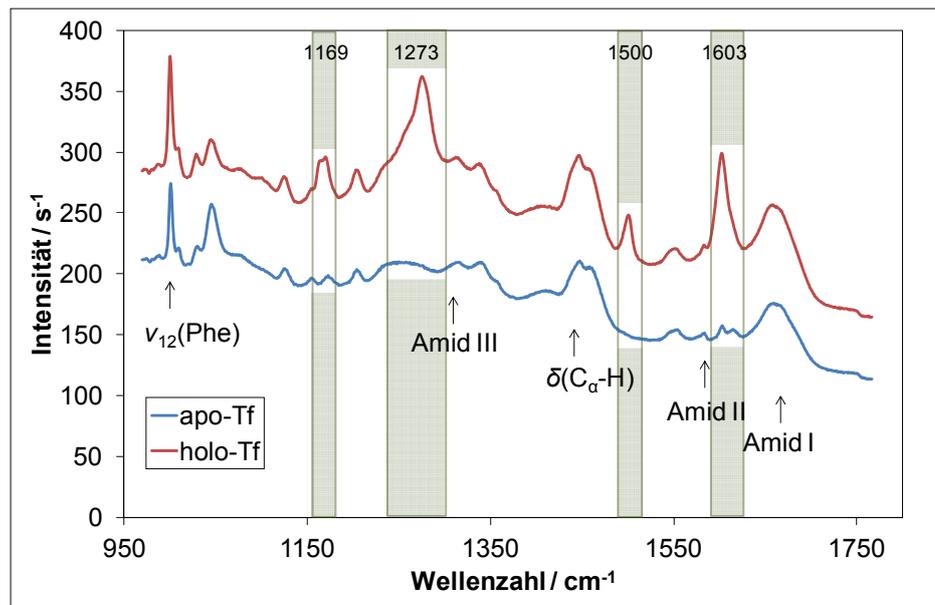
Die typischen Frequenzen zu den Amidschwingungen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Die drei Amidschwingungen sind natürlich auch im Tf-Spektrum zu sehen (Abbildung 23). In der Abbildung sind die Spektren von Fe freien apo-Tf und vollständig beladenem holo-Tf gegenüber gestellt. Dabei ist zu erkennen, dass bei holo-Tf vier weitere Banden induziert werden. Diese sind den Bindungen des Fe mit den Phenolateinheiten der beiden Tyrosingruppen zuzuordnen, die an der Fe-Bindung im Tf beteiligt sind (Abbildung 7) [100].

Die Intensitäten der Banden bei der „normalen“ Raman-Spektroskopie sind nur schwach.

**Tabelle 2** Schwingungen und Frequenzen der Amid I, II und III Banden von Proteinen ( $\nu$ : Valenzschwingung,  $\delta$ : Deformationsschwingung) [96, 97, 98, 99]

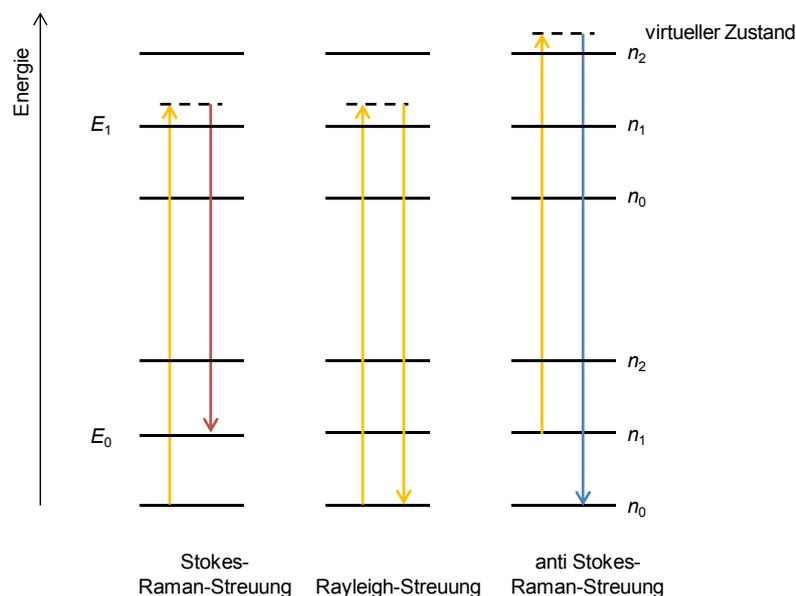
Amid I	Amid II	Amid III
$\nu(\text{C}=\text{O})$	$\nu(\text{C}-\text{H}) + \delta(\text{C}-\text{N}-\text{H})$	$\nu(\text{C}-\text{N}) + \nu(\text{C}-\text{C}) + \delta(\text{N}-\text{H})$
1680 bis 1630 $\text{cm}^{-1}$	ca. 1550 $\text{cm}^{-1}$	1310 bis 1250 $\text{cm}^{-1}$



**Abbildung 23** Resonanz Raman-Spektren von eisenfreiem Tf (apo) und vollständig mit Fe beladenem Tf (holo). Die grauen Bereiche markieren die Fe-induzierten Banden. Anregungswellenlänge: 532 nm

Daher wurden Methoden entwickelt, diese Banden zu intensivieren. Eine Möglichkeit ist die Resonanz-Raman(RR)-Spektroskopie. Dabei wird als Anregungsquelle ein Laser verwendet, dessen Emissionswellenlänge gleich oder nahe der Wellenlänge eines elektronischen Überganges ist. Die Moleküle können dadurch die Strahlung absorbieren, nehmen mehr Energie auf und werden in einen elektronisch angeregten Zustand gehoben (Abbildung 24).

Diese Anwendung beschränkt sich auf Moleküle, die im sichtbaren bzw. UV-Bereich



**Abbildung 24** Energiezustände bei der Resonanz Raman-Spektroskopie

absorbieren [96]. So ist dies auch bei Tf. Die Spektren in Abbildung 23 sind also RR-Spektren von Tf.

Ein Problem, das bei der Resonanz Raman-Spektroskopie auftreten kann, ist das Photobleaching (Quenchen). Dabei kommt es während der Einstrahlung des Lasers zu einer Schädigung bzw. Modifikation des Moleküls und somit zu einer geringer werdenden Intensität der Spektren [101]. Bei der Quantifizierung von Proteinen mit Resonanz Raman-Spektroskopie muss dieser Effekt durch Energieeinstellungen des verwendeten Lasers unbedingt verhindert werden.

## 2.6 Luftauftriebskorrektur und Differenzwägung

In der Chemie ist die grundlegende Größe die Stoffmenge  $n$ , die in der Einheit Mol gemessen wird. Von ihr abgeleitet sind die Gehaltsgrößen Konzentration und Stoffmengenanteil. Das Mol ist definiert als die Teilchenzahl, die der Anzahl Atome in 12 g  $^{12}\text{C}$  entspricht. Diese ist gleich der Naturkonstante der Avogadrokonstante  $N_A$ . Die Stoffmenge  $n$  ist über die Masse  $m$  mit der molaren Masse  $M$  verknüpft [102]:

$$n = \frac{m}{M} \tag{15}$$

Deshalb kann die Bestimmung der Stoffmenge durch eine Wägung realisiert werden, vorausgesetzt, die molare Masse und die stoffliche Zusammensetzung sind hinreichend bekannt [103].

Für die Entwicklung von Primärmethoden spielt die Wägung nicht nur wegen der Möglichkeit des Anschlusses der Messergebnisse an das SI-System eine wichtige Rolle, sondern auch aus praktischen Erwägungen und zur Minimierung der Messunsicherheit. Gerade in Bereichen, in denen politische, wirtschaftliche und rechtliche Konsequenzen oder aber auch Menschenleben vom Gehalt eines Stoffes abhängen, wird die Rückführbarkeit – als Voraussetzung für die Richtigkeit und auch Vergleichbarkeit – der Messungen unerlässlich [104, 105]. Da das Volumen einer Lösung und damit auch die Konzentration temperaturabhängig ist, verwendet man besser den Massenanteil anstelle der Konzentration. Dadurch lässt sich die Temperaturabhängigkeit als Fehlerquelle ausschließen.

Ein Körper, der eine Flüssigkeit verdrängt, erfährt einen Gewichtsverlust (Auftrieb), der dem Gewicht des verdrängten Flüssigkeitsvolumens entspricht [106]. Bei einer Wägung verdrängen sowohl das Wägegut als auch die Kalibriermassenstücke von elektronischen Waagen bzw. die Gegengewichte von mechanischen Waagen Luft. Unterscheidet sich nun die Dichte  $\rho_i$  des Wägegutes  $i$  von der Dichte der Kalibriermassenstücke  $\rho_{\text{cal}}$ , unterscheidet sich der Wägewert (abgelesene Masse)  $m'_i$  von der tatsächlichen Masse  $m_i$  des Wägegutes [107]. Der Auftriebskorrekturfaktor  $K_i$  kann mit Hilfe der Luftdichte  $\rho_{\text{air}}$  berechnet werden [108]:

$$K_i = \frac{\left(1 - \frac{\rho_{\text{air}}}{\rho_{\text{cal}}}\right)}{\left(1 - \frac{\rho_{\text{air}}}{\rho_i}\right)} \tag{16}$$

Daraus ergibt sich für die tatsächliche Masse des Wägegutes:

$$m_i = K_i \cdot m'_i \quad (17)$$

Aus dem Luftdruck  $p$ , der relativen Luftfeuchte  $\varphi$  und der Lufttemperatur  $\vartheta$  kann die Dichte der Luft näherungsweise empirisch bestimmt werden [107, 109]:

$$\rho_{\text{air}} = \frac{0,34844 \frac{\text{kg/m}^3}{\text{hPa}} \cdot p - \varphi \cdot \left( 0,252 \frac{\text{kg/m}^3}{\text{°C}} \cdot \vartheta - 2,0582 \frac{\text{kg}}{\text{m}^3} \right)}{273,15 + \frac{1}{\text{°C}} \cdot \vartheta} \quad (18)$$

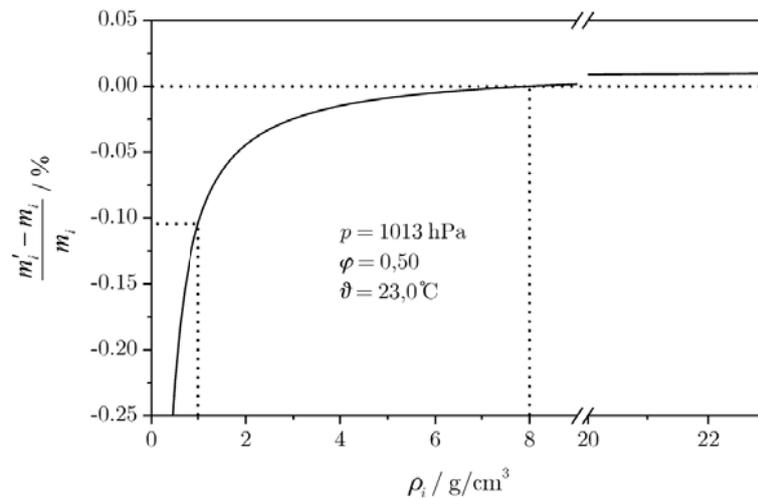
Betrachtet man die im Folgenden angegebenen Bereiche, die sich auf anzunehmende Bedingungen bei Variation zwischen den Grenzwerten, die in Braunschweig vorkommen, beziehen, mit den entsprechenden Unsicherheiten  $u$  für die Luftdichte:

$$\begin{array}{llll} 940 \text{ hPa} \leq p \leq 1080 \text{ hPa} & \text{mit} & u(p) = 2 \text{ hPa,} \\ \varphi \leq 0,80 & \text{mit} & u(\varphi) = 0,05, \\ 18 \text{ °C} \leq \vartheta \leq 30,0 \text{ °C} & \text{mit} & u(\vartheta) = 0,2 \text{ °C,} \end{array}$$

so erhält man für die Unsicherheit der Luftdichte  $u(\rho_{\text{air}}) < 0,005 \text{ kg/m}^3$  [24].

Bei Wägungen von Materialien mit einer Dichte  $\rho_i > 4 \text{ g/cm}^3$  ist der auftriebsbedingte Wägefehler in den meisten Fällen vernachlässigbar. Bei einer Materialdichte um  $\rho_i \approx 1 \text{ g/cm}^3$ , wie es bei den hier vorliegenden Experimenten der Fall ist, liegt der auftriebsbedingte Wägefehler bei 0,1 % und muss zur Senkung der Gesamtunsicherheit korrigiert werden. Beispielfhaft ist das für die Werte  $p = 1013 \text{ hPa}$ ,  $\varphi = 0,50$ ,  $\vartheta = 23,0 \text{ °C}$  und  $\rho_{\text{cal}} = 8000 \text{ kg/m}^3$  in Abbildung 25 dargestellt [24].

Üblicherweise wird das Wägegut in einem Gefäß gewogen. Dazu muss zuerst zur Zeit  $t_1$  der Wägewert des leeren Gefäßes  $m_1$  bestimmt werden und anschließend zur Zeit  $t_2$  der Wägewert des Gefäßes mit dem Wägegut  $m'_2$ . Ändern sich zwischen den beiden Wägungen die Umgebungsbedingungen (Lufttemperatur, -feuchte und -druck), so erfährt das Gefäß zum Zeitpunkt  $t_1$  einen andern Auftrieb als zum Zeitpunkt  $t_2$ . Aus der Dichte des Gefäßes  $\rho$  und den Umgebungsdaten zum Zeitpunkt  $t_1$  kann die tatsächliche Masse  $m_1$  berechnet werden:



**Abbildung 25** Abweichung des Wägewertes  $m'_i$  von der tatsächlichen Masse  $m_i$  als Funktion der Dichte des Wägegutes  $\rho_i$  [24]

Zeit  $t_1$   $\rho_{air,1} = \rho_{air,1}(\rho_1, \varphi_1, \vartheta_1)$  (19)

$$K_1 = \frac{\left(1 - \frac{\rho_{air,1}}{\rho_{cal}}\right)}{\left(1 - \frac{\rho_{air,1}}{\rho}\right)} \quad (20)$$

$$m_1 = K_1 \cdot m'_1 \quad (21)$$

Analog gilt zur Zeit  $t_2$  für das Gefäß:

Zeit  $t_2$   $\rho_{air,2} = \rho_{air,2}(\rho_2, \varphi_2, \vartheta_2)$  (22)

$$K_2 = \frac{\left(1 - \frac{\rho_{air,2}}{\rho_{cal}}\right)}{\left(1 - \frac{\rho_{air,2}}{\rho}\right)} \quad (23)$$

Um die tatsächliche Masse  $m_2$  zu ermitteln, wird zunächst der Wägewert des leeren Gefäßes zur Zeit  $t_2$  bestimmt. Dazu muss der Quotient aus der tatsächlichen Masse  $m_1$  und dem Auftriebskorrekturfaktor  $K_2$  gebildet werden. Die Differenz aus dem Wägewert des Gefäßes mit dem Wägegut  $m'_2$  zur Zeit  $t_2$  und dem berechneten Wägewert des leeren Gefäßes  $m_1/K_2$ , ebenfalls zu  $t_2$ , ergibt den Wägewert des Wägegutes  $m'_i$  zur Zeit  $t_2$ :

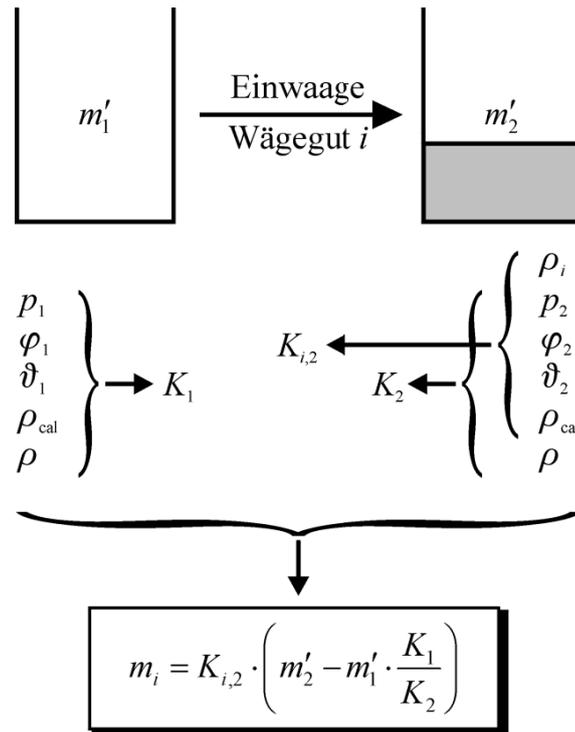


Abbildung 26 Auftriebskorrektur eines Wägegutes  $i$  in einem Gefäß [24]

$$m'_i = \left( m'_2 - m'_1 \cdot \frac{K_1}{K_2} \right) \quad (24)$$

Die tatsächliche Masse des Wägegutes  $m_i$  ergibt sich nun aus der Differenz in Gleichung 24 multipliziert mit dem Auftriebskorrekturfaktor  $K_{i,2}$ , der sich aus der Dichte des Wägegutes  $\rho_i$  sowie den Umgebungsbedingungen zum Zeitpunkt  $t_2$  ergibt:

$$m_i = K_{i,2} \cdot \left( m'_2 - m'_1 \cdot \frac{K_1}{K_2} \right) \quad (25)$$

mit:

$$K_{i,2} = \frac{\left( 1 - \frac{\rho_{\text{air},2}}{\rho_{\text{cal}}} \right)}{\left( 1 - \frac{\rho_{\text{air},2}}{\rho_i} \right)}. \quad (26)$$

In Abbildung 26 sind die Eingangsgrößen zur Differenzwägung noch einmal graphisch zusammengefasst [24].

## 2.7 Herstellung und Lagerung von (Referenz)Lösungen

Werden hohe Anforderungen an die Unsicherheit des Gehaltes in einer Lösung gestellt, so muss diese gravimetrisch hergestellt werden. Bei der Verwendung von Lösungen und Referenzlösungen über einen längeren Zeitraum kommt es zu Verdunstungen der Lösungsmittel und somit zur Erhöhung des Gehaltes in der Lösung. Um diesen Verlust zu korrigieren, muss die Lösung in ihrem Behälter vor und nach jeder Entnahme gewogen werden.

In den Abbildung 27 und Abbildung 28 sind Schemata zur Berechnung des auftriebs- und verdunstungskorrigierten Massenanteils  $w_z$  des (Referenz)Materials  $w_{z,s}$  in der (Referenz)Lösung z zu sehen.

Analog zu dem in Kapitel 2.6 beschriebenen Verfahren wird zuerst das leere Gefäß und anschließend das Gefäß mit dem (Referenz)Material gewogen. Die Masse  $m_{z,2}$  ergibt sich dann folgendermaßen:

$$m_{z,2} = f_M \cdot f_{\text{pur}} \cdot K_{z,2} \cdot \left( m'_{2,B} - m'_{1,B} \cdot \frac{K_{1,B}}{K_{2,B}} \right) \quad (27)$$

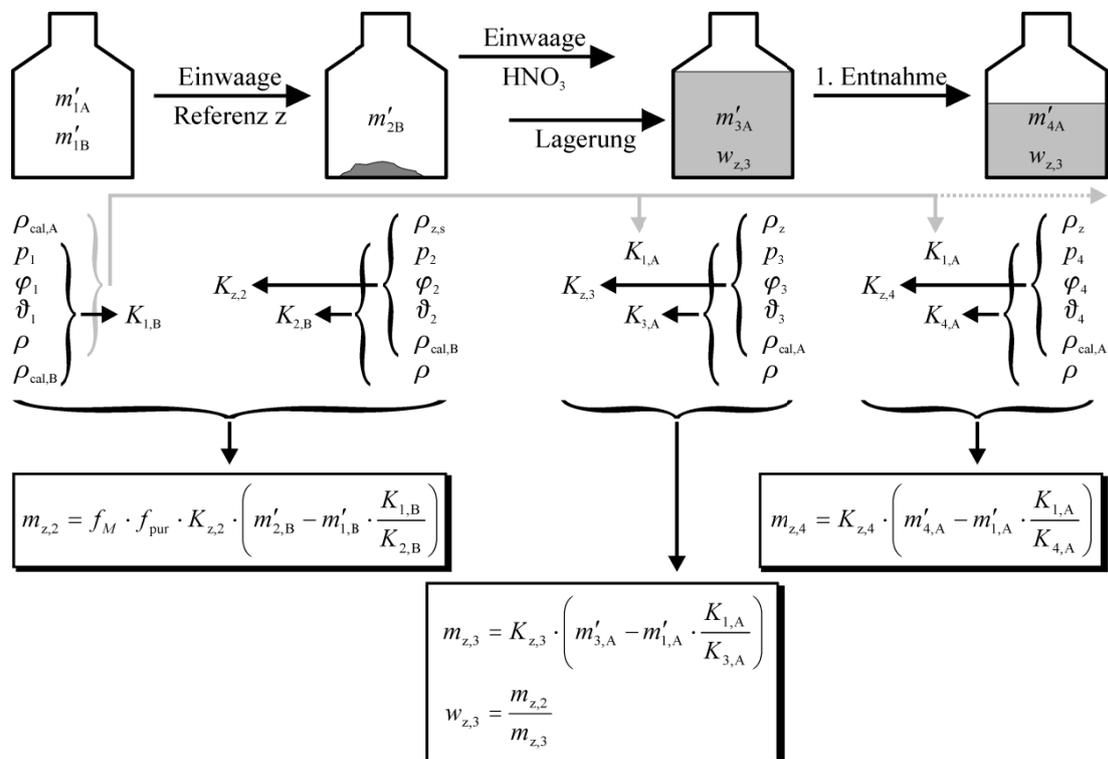
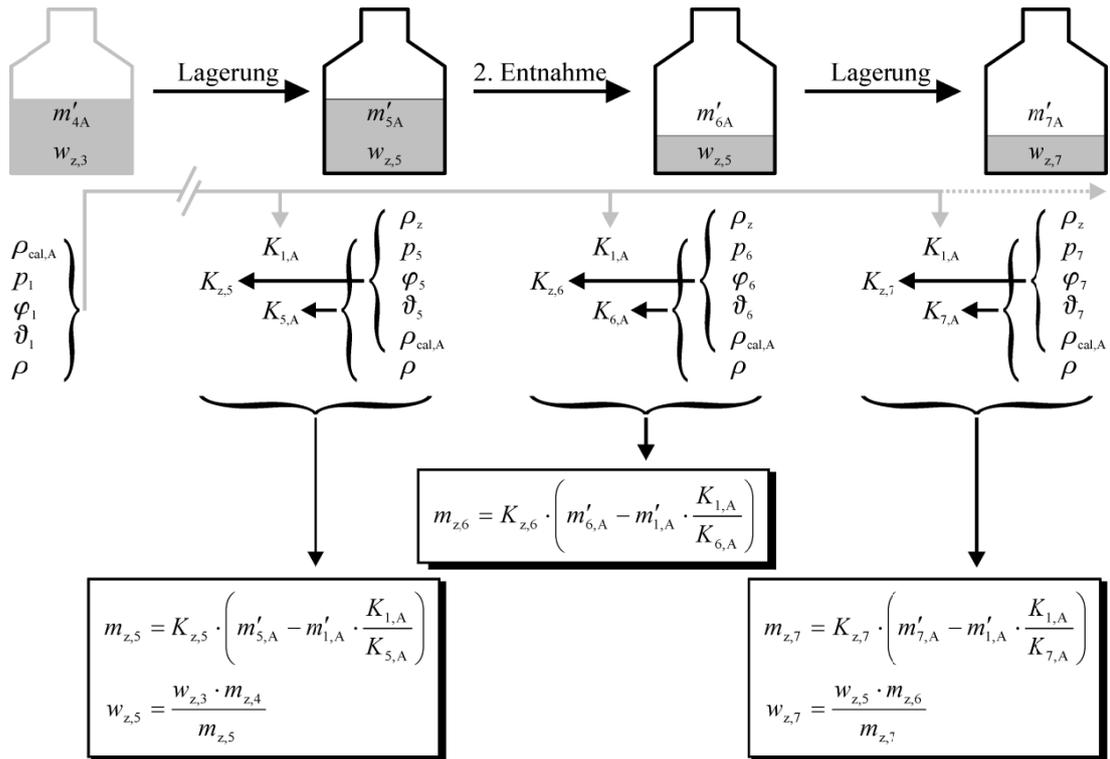


Abbildung 27 Schema zur Berechnung des auftriebs- und verdunstungskorrigierten Massenanteils  $w_z$  in der (Referenz)Lösung Teil 1 [24]



**Abbildung 28** Schema zur Berechnung des auftriebs- und verdunstungskorrigierten Massenanteils  $w_z$  in der (Referenz)Lösung Teil 2 [24]

Der Index B bezieht sich auf die verwendete Waage.  $f_{\text{pur}}$  steht dabei für die Reinheit des (Referenz)Materials und  $f_M$  für den stöchiometrischen Umrechnungsfaktor, falls das Referenzmaterial eine Verbindung ist, aber nur ein Teil davon relevant. Bei einer Eisenlösung, die aus  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  hergestellt wird, kann der Umrechnungsfaktor aus den molaren Massen  $M$  für Fe und die Verbindung berechnet werden:

$$f_M = \frac{M(\text{Fe})}{M(\text{Fe}) + 3 \cdot M(\text{Cl}) + 6 \cdot M(\text{H}_2\text{O})} \quad (28)$$

Meist wird zur Einwaage des (Referenz)Materials eine genauere Waage (B) mit niedrigerem Messbereich verwendet, als für die Lösung, die einen höheren Messbereich benötigt (A). Außerdem unterscheiden sich die verwendeten Waagen in den Unsicherheiten und Dichten der Gegengewichte ( $\rho_{\text{cal,A}}$  und  $\rho_{\text{cal,B}}$ ), da es sich bei der Waage A meist um eine mechanische und bei B meist um eine elektronische Waage handelt. Analog zu Formel 23 berechnet sich die Masse  $m_{z,3}$  der fertigen Lösung wie folgt:

$$m_{z,3} = K_{z,3} \cdot \left( m'_{3,A} - m'_{1,A} \cdot \frac{K_{1,A}}{K_{3,A}} \right) \quad (29)$$

Der Massenanteil des interessierenden Elementes ergibt sich dabei aus:

$$w_{z,3} = \frac{m_{z,2}}{m_{z,3}} \quad (30)$$

Wiegt man die (Referenz)Lösung vor und nach jeder Entnahme zum Zeitpunkt  $i$ , so kann die tatsächliche Masse  $m_{z,i}$  und der Massenanteil  $w_{z,i}$  folgendermaßen berechnet werden:

$$m_{z,i} = K_{z,i} \cdot \left( m'_{i,A} - m'_{1,A} \cdot \frac{K_{1,A}}{K_{i,A}} \right) \quad (31)$$

$$w_{z,i} = \frac{w_{z,i-2} \cdot m_{z,i-1}}{m_{z,i}} \quad (32)$$

Da der Massenanteil  $w_{z,i-1}$  vor der Entnahme dem Massenanteil  $w_{z,i-2}$  nach der Entnahme entspricht (siehe Abbildung 27),  $w_{z,i-1}$  jedoch nicht berechnet werden kann, wird in Gleichung 32  $w_{z,i-2}$  verwendet.

Nähere Einzelheiten zu den Berechnungen zu auftriebs- und verdunstungskorrigierten Wägungen können bei Rienitz [24] nachgelesen werden.

# 3 Experimenteller Teil mit Ergebnissen und Diskussion

## 3.1 Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte

Im Folgenden sind die verwendeten Chemikalien (Tabelle 3), Verbrauchsmaterialien (Tabelle 4), Geräte (Tabelle 5) sowie die für die Auswertungen benötigten Softwares (Tabelle 6) mit Herstellerangaben und Bezugsquellen aufgelistet.

Das verwendete Reinstwasser ( $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) zur Herstellung der Lösungen wurde mit einer Millipore Elix 5 UV in Kombination mit einem Milli-Q Element A10 vor Ort aus vorgereinigtem Leitungswasser hergestellt. Zur Aufreinigung der Salpetersäure diente eine Subboiling-Anlage. Soweit möglich, kamen Gefäße aus PFA zum Einsatz. Außerdem wurden die Gefäße vor dem Gebrauch für mehrere Stunden in 10 %iger HCl-Lösung gereinigt, um den Eisenuntergrund so weit wie möglich zu minimieren. Vorversuche zeigten, dass dies notwendig ist, da in mehreren Gefäßen erhöhte Eisenuntergrundkonzentrationen gefunden wurden.

Alle Lösungen, soweit nicht anders erwähnt, wurden gravimetrisch hergestellt, weil damit die Unsicherheit gegenüber volumetrischen Arbeiten minimiert wird.

**Tabelle 3** Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Reinheit	Hersteller/ Lieferant
Ammoniumacetat ( $\text{NH}_4\text{Ac}$ )	$\geq 99,0 \%$	Fluka
apo-Transferrin, human	$\geq 97 \%$	Sigma
Argon	5.0 (99.9990 %)	Air Liquide

Chemikalien	Reinheit	Hersteller/ Lieferant
Bis-Tris (Bis(2-hydroxyethyl)amino- tris(hydroxymethyl)methan)	Bio Ultra	Sigma-Aldrich
Dextransulfat, Na-Salz, von <i>Leuconostoc</i> ssp., Mr ~ 500000,	BioChemika	Fluka
Eisen(III)chlorid Hexahydrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ )	reagent grade, $\geq 98 \%$	Sigma-Aldrich
$^{57}\text{Fe}$ angereichertes Eisenoxid ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ )		Chemotrade
ERM-DA470k/IFCC, zertifiziertes Serum		IRMM via Aldrich
Essigsäure (Eisessig)	Suprapur	Merck GmbH
Ge-Standard	CertiPUR	Merck GmbH
Rh-Standard	CertiPUR	Merck GmbH
Magnesiumchlorid Hexahydrat, ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ )	BioChemika Ultra	Fluka
Natriumcarbonat, wasserfrei ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	suprapur, 99,999 %	Merck GmbH
Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )	p. a.	Merck GmbH
Salpetersäure ( $\text{HNO}_3$ )	p. a.	Merck GmbH
Seronorm, L1, humanes Serum		Sero via Invicon
Seronorm, L2, humanes Serum		Sero via Invicon
Transferrin, human	$\geq 98 \%$	Sigma
Trisma Acetat (Tris-HAc)	Bio Ultra	Sigma
Trisma Salzsäure (Tris-HCl)	Bio Ultra	Sigma
Wasserstoff	5.0 (99.9990 %)	Praxair

Tabelle 4 Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller/Lieferant
Eppendorf Reaktionsgefäße (safe lock tubes, PCR clean) - 1,5 mL, 2 mL	Eppendorf AG
IonPac AS7 Säule, 2 x 250 mm	Dionex
IonPac AG7 Vorsäule, 2 x 50 mm, Guard	Dionex
Mono-Q 5/50 GL Säule	GE Healthcare
Zorbax SB C8 Säule, 5 $\mu\text{m}$ , 3 x 250 mm	Agilent Technologies
PEEK Kapillaren und Verschraubungen	ERC GmbH

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Perflouralkoxyalkan (PFA) Gefäße mit Schraubdeckeln - 20 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL	AHF analysentechnik AG
Pipettenspitzen - 10 µL, 20 µL, 200 µL, 1000 µL, 2500 µL, 5000 µL, 10000 µL	Eppendorf AG
Schott Duran Glasflaschen - 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL	Duran Group GmbH
Schaubdeckel-Probengefäße mit 200 µL Einsatz (HPLC-Vial)	Agilent Technologies

Tabelle 5 Verwendete Geräte

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
Agilent 1200 HPLC System	Agilent Technologies
Agilent 7500 ICP-MS mit cs-Linsensystem	Agilent Technologies
Fackel und Shield	Agilent Technologies
Scott Sprühkammer, Quarz	Agilent Technologies
Zerstäuber, PFA-ST 700 µL MicroFlow	ERC GmbH
Zerstäuber, konzentrisch, Quarz	Agilent Technologies
Element 2, High Resolution ICP-MS	Thermo Scientific
LabRAM Aramis Raman Mikroskop	Horiba Jobin-Yvon
Eppendorfpipetten Reference (fix) - 500 µL, 1000 µL	Eppendorf AG
Eppendorfpipetten Reference (variable) - 0,1 – 2,5 µL, 0,5 – 10 µL, 2 -20 µL, 50 -200 µL, 100 – 1000 µL, 500 – 2500 µL, 500 – 5000 µL, 1000 – 10000 µL	Eppendorf AG
Inkubationshaube - UNIHOOD	UniEquip GmbH
Wasserreinigungsanlage - Millipore Elix 5 UV / Milli-Q Element A10	EMD Millipore Cooperation
Subboiling-Destille - ohne Typenbezeichnung	Kürner Analystechnik
Laborspülmaschine - G7733 mit G7749	Miele & Cie.
Schüttelplatte - IKA HS/KS 260 control	IKA-Werke
Trockenschränke	Memmert GmbH und Co. KG

<b>Geräte</b>	<b>Hersteller/Lieferant</b>
- Wärmeschrank UE 400	
Ultraschallbad	Brandelin Sonex
- PK 510 H	
Elektronische Waagen	Sartorius AG
- Analysenwaage MC210S	
- Analysenwaage ME215S	
- Analysenwaage 1702MP8	
- Oberschalenwaage BP2100S	
Mechanische Waage	Mettler-Toledo GmbH
- Analysenwaage H315	
Zentrifuge	Sigma Laborzentrifugen GmbH
- Sigma 3-16PK	
Membranpumpe	ABM Greifenberger Antriebstechnik
- 4EKF56CX-4	GmbH
SPE-Einheit	J. T. Baker
- SPE-12G	
Lufttemperatur, -feuchte, -druckmessgerät	testo GmbH & Co. KG
- testo 650 mit Sensor 0638.1645 und 0636.9741	

---

**Tabelle 6** Verwendete Softwares

<b>Software</b>	<b>Hersteller</b>
GUM WorkbenchPro 2.4.1.392	Metrodata GmbH
Microsoft Office Excel 2007 / 2010	Microsoft Deutschland GmbH
Origin / OriginPro	OriginLab Corporation
ChemStation for LC Systems B.01.01	Agilent Technologies
ICP-MS ChemStation B.03.05	Agilent Technologies
ICP-MS Chromatographic Software C.01.00	Agilent Technologies
LabSpec 5.0 Software	Horiba Jobin-Yvon

---

## 3.2 Chromatographische Abtrennung von Transferrin mit anschließender elementspezifischer Detektion (HPLC – ICP-MS)

### 3.2.1 Gerätekonfiguration

Für die Flüssigchromatographie (LC) und die anschließende elementspezifische Detektion wurde ein Agilent 1200 LC-System mit einem Agilent 7500cx ICP-MS mit cs-Linsensystem gekoppelt und verwendet.

Die HPLC ist modular aufgebaut, bestehend aus einem Vierkanal-Online-Entgaser, einer binären Pumpe, einem thermostatisierten automatischen Probengeber (Autosampler), einem Säulenofen und einem Dioden-Array-UV-Detektor (DAD) mit einer Standard-Flusszelle. Letzterer wurde am Anfang der Methodenentwicklung proteinunspezifisch bei 280 nm verwendet, um zu überprüfen, ob das in dem ICP-MS detektierte Fe proteingebunden ist. Bei 280 nm werden alle Proteine detektiert, da das Tf zuvor aber mit der Säule von den anderen Proteinen isoliert wurde, kann an dieser Stelle eine unspezifische Detektion verwendet werden. Gesättigtes Tf ist mit beiden Detektionsmethoden nachweisbar. Nach der Verifizierung, dass es sich bei den Peaks in den ICP-MS Chromatogrammen um proteingebundene Fe-Peaks handelt, wurde auf den DAD verzichtet.

Da die HPLC zu großen Teilen aus Edelstahl besteht, die einen hohen Eisenuntergrund hervorrufen, wurden alle Verbindungen aus Edelstahlkapillaren durch Polyetheretherketon(PEEK)-Kapillaren (AD 1/16“; ID 125 µm) mit PEEK-Verschraubungen ersetzt. Außerdem wurde der Probenfluss nicht durch den Säulenofen geleitet, sondern direkt vom Injektionssystem in die Säule. Einige Bauteile, wie zum Beispiel die Pumpenköpfe, konnten nicht durch edelstahlfreie Materialien ersetzt werden. Daher wurde zur Reduzierung des Untergrundes deren Oberfläche im Abstand von ca.

**Tabelle 7** Passivierungsprotokoll für die HPLC

Dauer	Eluent
20 min	Reinstwasser
15 min	Isopropanol
15 min	H <sub>2</sub> O
30 min	37,8 % HNO <sub>3</sub>
120 min	Reinstwasser mit mehrfachem Wasserwechsel bis pH 7

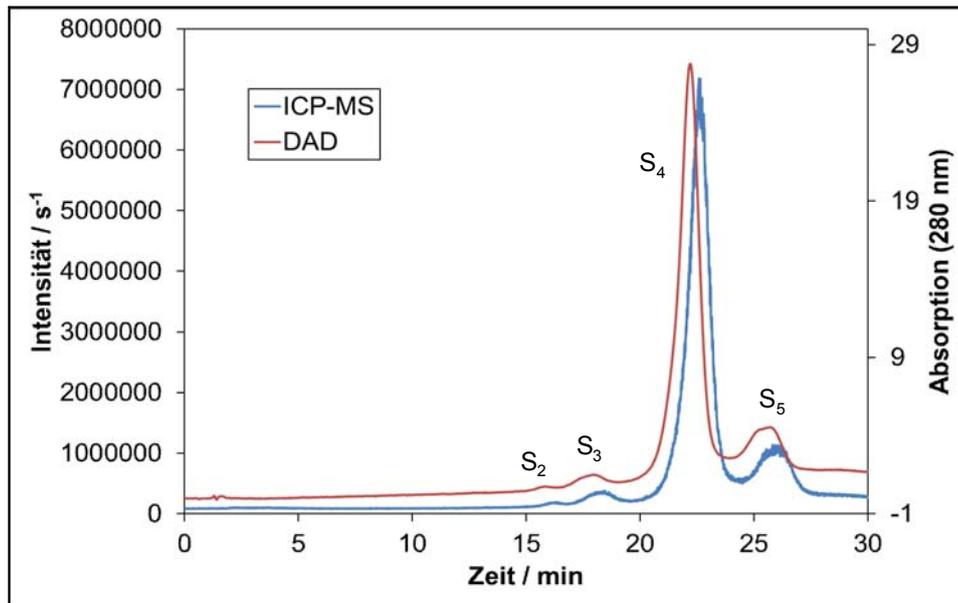
**Tabelle 8** Typische Parameter des Agilent ICP-MS 7500 zur Messung mit Kopplung an die HPLC

RF Energie	1500 W
Probentiefe	7,5 mm
Plasmagasfluss	15 L/min Ar
Trägergasfluss	0,81 L/min Ar
Makeup Gasfluss	0,11 L/min Ar
Spühkammertemperatur	2 °C
Reaktionsgas	6 mL/min H <sub>2</sub>
Zelleingang	- 40 V
Zellausgang	- 50 V
Quadrupol Fokus	- 12 V
Quadrupol Bias	- 16 V
Oktopol Bias	- 6 V
Peak-Muster	TRA (time resolved analysis)
Integrationszeit	0,1 s
Gemessene Isotope (m/z)	Cr 53
	Fe 54; 56; 57; 58
	Ni 60

sechs Monaten nach einer vom Hersteller der HPLC vorgeschlagenen Methode mit halbkonzentrierter Salpetersäure passiviert. Da die Oberfläche des Säulenofens relativ groß ist und zum Messen die Eluenten durch diesen nicht geleitet werden, wurde er kurzgeschlossen und für die Passivierung mit einem Fluss von 5 mL/min gearbeitet. Die Methode ist in Tabelle 7 beschrieben.

Das verwendete ICP-MS ist mit einem Oktopol ausgestattet, der als Reaktionszelle eingesetzt wurde. Als Reaktionsgas wurde H<sub>2</sub> mit einer Flussrate von 6 mL/min verwendet. Auf diese Weise konnten polyatomare Interferenzen minimiert werden (siehe auch Tabelle 1 (Kapitel 2.3)). Des Weiteren wurde eine kinetische Energiediskriminierung über die Einstellungen der Oktopol- und Quadrupol-Bias vorgenommen, um weitere Interferenzen zu minimieren. Einzelheiten zu den Parametern des ICP-MS sind in Tabelle 8 aufgelistet.

Da Fe und Tf im vollständig gesättigten Fe-Tf-Komplex ein Stoffmengenverhältnis von 2 : 1 haben, ist die Bestimmung des Stoffmengenanteiles an Tf über den darin gebundenen Stoffmengenanteil an Fe möglich. Je nach Methode werden dazu entweder nur das Hauptisotop <sup>56</sup>Fe und ein Spikeisotop (hier: <sup>57</sup>Fe) benötigt oder aber alle stabilen Isotope (zusätzlich also: <sup>54</sup>Fe und <sup>58</sup>Fe). <sup>53</sup>Cr und <sup>60</sup>Ni wurden ebenfalls detektiert, da



**Abbildung 29** Chromatogramme von vollständig mit Fe gesättigtem apo-Tf mit eisenspezifischer Detektion durch ICP-MS (blau) und proteinunspezifischer Detektion mit DAD (rot)

diese Elemente auch die Isotope  $^{54}\text{Cr}$  und  $^{58}\text{Ni}$  besitzen. Auf diese Weise konnte kontrolliert werden, dass keine Interferenzen auf den entsprechenden Fe-Massen vorhanden sind. Wären Interferenzen vorhanden, hätte man diese rechnerisch aus den Rohdaten entfernen können. Außerdem konnte auf diese Weise beobachtet werden, ob der Sampler-Konus korrodiert, da er aus Ni besteht.

In Abbildung 29 sind Chromatogramme mit der optimierten Methode für Tf mit ICP-MS und mit dem DAD zu sehen. Die Peaks in den Chromatogrammen von DAD und ICP-MS driften zeitlich auseinander, weil zwischen den beiden Detektoren eine räumliche Trennung von ca 2 m ist. Die Probe, die im DAD detektiert wird, benötigt ca. 40 s bis sie am ICP-MS Detektor angekommen ist. Dies ist am deutlichsten an den Peakmaxima zu erkennen, die auf der Zeitachse um diese Zeit verschoben auftreten. In dem Chromatogramm ist auch die Verteilung der einzelnen Sialoformen des Tf im Blutserum eines gesunden Menschen (Normalverteilung) zu erkennen. Die S<sub>4</sub> Form ist die dominante Form. Kommt es zu Entzündungen im Körper, so wird diese häufig zu Gunsten der S<sub>0</sub>- bis S<sub>3</sub>-Formen abgebaut, wie zum Beispiel bei einem chronischen Alkoholmissbrauch [5] oder bei Hepatitis [110]. Die S<sub>0</sub>-, S<sub>1</sub>- und S<sub>2</sub>-Form sind in einem gesunden Menschen nicht vorhanden.

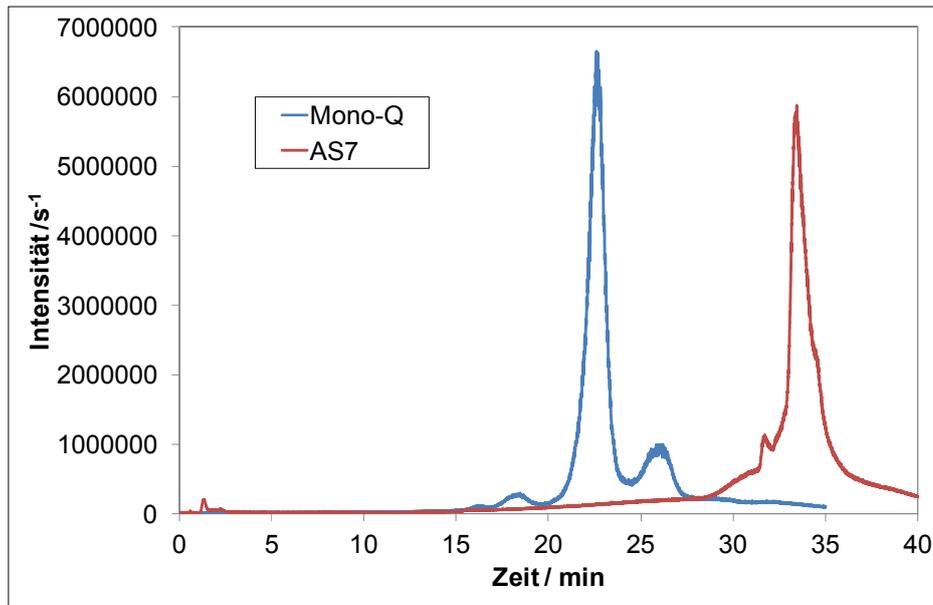


Abbildung 30 optimierte Trennung von Transferrin auf der Mono-Q-Säule (blau) und der AS7 (rot)

## 3.2.2 Entwicklung der chromatographischen Trennung

### 3.2.2.1 Auswahl der Säule

Zur Isolierung des Tf aus der Serummatrix wurden unterschiedliche Säulen ausprobiert. Unter anderem die RP-Säule Zorbax SB C8, die eine Standardsäule in der organischen Analytik für basische Stoffe ist [111]. Sie wurde isokratisch mit einem Fluss von 0,4 mL/min einer Lösung aus 0,1 % TFA und 2 % MeOH verwendet. Dies ist ein typischer Eluent für diesen Säulentyp. Es stellte sich jedoch heraus, dass die Wechselwirkungen des Tf mit dem Säulenmaterial im Vergleich zum Laufmittel zu stark waren um das Tf zu eluieren.

In der Literatur wird häufig ein starker Anionenaustauscher (strong anion exchange, SAX) in Verbindung mit einem Tris-Puffersystem (dieser wird in Kapitel 3.2.2.2 beschrieben) für die Tf-Analytik verwendet [38, 112, 113, 114]. Daher wurden weitere Vorversuche mit der IonPac AS7 mit vorgeschalteter Vorsäule AG7 durchgeführt. Beide Säulen sind mit dem gleichen starken SAX-Material gepackt. Die Vorsäule dient dazu, Verunreinigungen, die von den Proben oder den Eluenten kommen können, von der Hauptsäule fern zu halten, so dass diese eine länger Lebensdauer hat und nur die preisgünstigere Vorsäule getauscht werden muss. Um eine optimale Elution des Tf von der Säule zu erzielen, musste ein Gradient mit einem Fluss von 0,4 mL/min eingesetzt werden (siehe Kapitel 2.2). Als Eluent A diente Tris-HAc und als Eluent B Tris-HAc mit NH<sub>4</sub>Ac. Auf diese Eluenten wird in Kapitel 3.2.2.2 näher eingegangen.

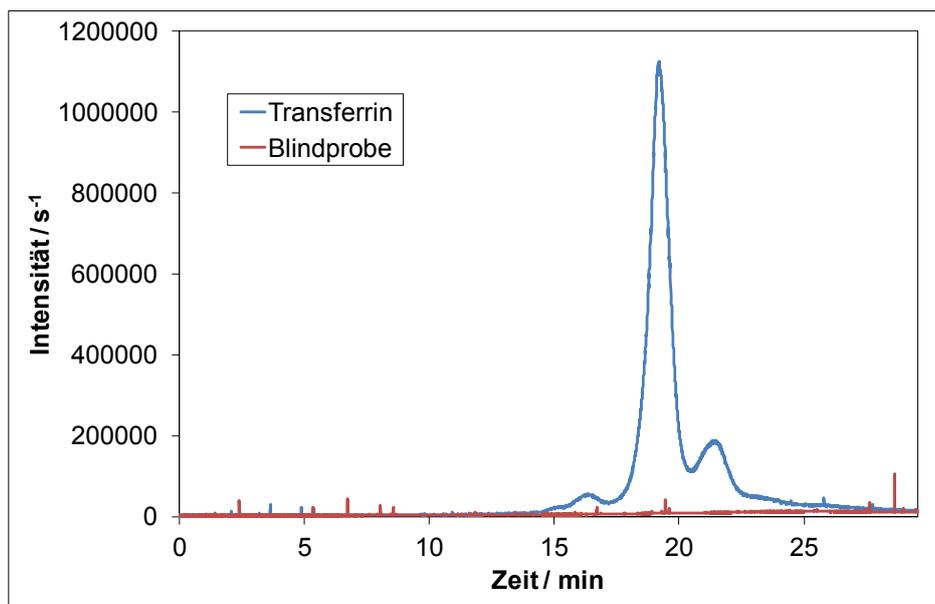
Die schließlich verwendete Säule, die Mono-Q 5/50 GL, ist ebenfalls ein starker Anionenaustauscher. Sie hat eine Partikelgröße von 10 µm und zeichnet sich durch eine

besonders gleichmäßige Oberfläche (MonoBeads) aus. Die Säule wurde ebenfalls mit einem Gradienten aus Tris-HAc mit steigender Konzentration an  $\text{NH}_4\text{Ac}$  verwendet, aber mit einem Fluss von 0,75 mL/min. In Abbildung 30 sind die Chromatogramme, die man mit der Mono-Q bzw. der AS7 erhält, gegenübergestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Mono-Q eine bessere Trennleistung erbringt, der Untergrund linearer verläuft und auf Grund der höheren Flussrate auch eine schnellere Trennung erreicht wird. Diese wurde deshalb für die weitere Quantifizierung verwendet.

### 3.2.2.2 Eluent und Gradient

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) wird in der Chemie häufig als Puffersubstanz für biologische Systeme verwendet, da es auf Enzyme nicht inhibierend wirkt und bei einem  $\text{p}K_s$ -Wert von 8,2 (20 °C) eine puffernde Wirkung zwischen pH 7,2 – 9,0 besitzt.

Für die Mono-Q Säule wurden unterschiedliche Tris-Puffer als mobile Phase ausprobiert, und zwar Bis-Tris-Puffer, Tris-HCl-Puffer und Tris-HAc-Puffer. Tris-HAc stellte sich für die Mono-Q als am besten geeignet heraus. Der Eluent A bestand aus 12,5 mmol/kg Tris-HAc und der Eluent B aus 12,5 mmol/kg Tris-HAc mit 125 mmol/kg  $\text{NH}_4\text{Ac}$ . Anfänglich wurde, wie in der Literatur beschrieben, mit einem Gradienten von 45 min und mit höheren Konzentrationen gearbeitet [36, 37]. Diese lagen bei 25 mM Tris-HAc und 500 mM  $\text{NH}_4\text{Ac}$ . Dies entspricht einer Salzlast von 5 %. Laut Herstellerangaben sollte das



**Abbildung 31** Chromatogramme von Tf eluiert mit 12,5 mmol/kg Tris-HAc (Eluent A) und 12,5 mmol/kg Tris-HAc und 125 mmol/kg  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (Eluent B) (blau) und anschließende Blindprobe mit 25 mmol/kg Tris-HAc (Eluent A) und 25 mmol/kg Tris-HAc und 250 mmol/kg  $\text{NH}_4\text{Ac}$  (Eluent B) (rot)

**Tabelle 9** Optimierte HPLC-Parameter für die Chromatographie mit dem Agilent 1200 HPLC System

<b>Säule</b>	Mono-Q, 5 mm x 50 mm, 10 µm Partikelgröße, Glas	
<b>Mobile Phase</b>	Eluent A: 12,5 mmol/kg Tris-HAc Eluent B: 12,5 mmol/kg Tris-HAc + 125 mmol/kg NH <sub>4</sub> Ac	
<b>Autosamplertemperatur</b>	4 °C	
<b>Injektionsvolumen</b>	50 µL	
<b>Fluss</b>	0,75 mL/min	
<b>Säulenofentemperatur</b>	30 °C	
<b>UV-Detektion</b>	280 nm	
<b>Gradient</b>	<b>Zeit / min</b>	<b>Puffer B / %</b>
	0 → 20	0 → 100
	20 → 25	100
	25 → 35	0

ICP-MS jedoch mit einer Salzlast von maximal 5 % verwendet werden, besser mit niedrigeren Salzlasten. Daher wurden Tf-Lösungen mit den geringer konzentrierten Eluenten über die Säule getrennt und gemessen. Anschließend wurde eine Blindprobe auf gleiche Weise aber mit hoch konzentrierten Eluenten behandelt, um sicher zu stellen, dass auf der Säule kein Analyt zurück bleibt. Ein weiteres Problem wurde auf diese Weise ebenfalls gelöst. Bei einer zu hohen Salzlast kann es zu elektronischen Überschlügen an den Ionen kommen, die sich in den Chromatogrammen als Spikes widerspiegeln. Durch Verringerung der Salzlast wurden diese Spikes ebenfalls verringert. Für die endgültig verwendete Konzentration ist ein Chromatogramm in Abbildung 31 dargestellt sowie das Chromatogramm einer anschließenden Blindprobe mit Eluenten höherer Konzentration, um auszuschließen, dass auf der Säule Analytmoleküle geblieben sind. Der Gradient wurde über einen längeren Zeitraum sukzessive auf 25 min verkürzt, da sich herausstellte, dass die Sialoformen bei längeren Gradientenzeiten nicht besser voneinander getrennt werden, sondern sich lediglich die Signale verbreitern.

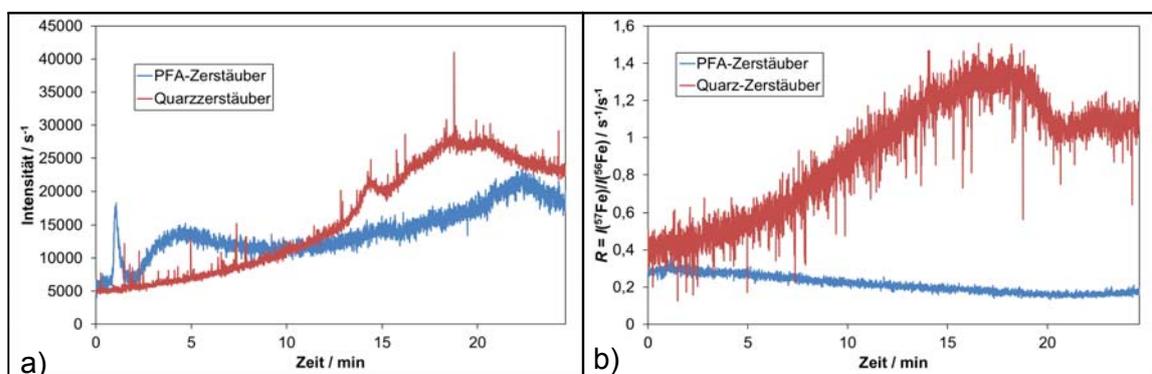
In der Abbildung ist zu erkennen, dass in der Blindprobe kein Tf mehr ist, also kein Analyt auf der Säule zurück blieb. Außerdem sind im Gegensatz zum Probenlauf wesentlich mehr Spikes in der Blindprobe, also dem Lauf mit der höheren Salzlast, vorhanden.

Die optimierten Bedingungen für die chromatographische Trennung über die HPLC sind in Tabelle 9 dargestellt.

### 3.2.2.3 Optimierung der ICP-MS Parameter

Die HPLC wurde nach der Säule direkt mit Hilfe einer PEEK-Kapillare an den Zerstäuber des ICP-MS gekoppelt. Zur Zerstäubung der Probe wurden eine serienmäßige Quarz Scott-Sprühkammer, ein konzentrischer Quarzzerstäuber und ein PFA 700 microFlow Zerstäuber der Firma ERC verwendet. Der Quarzzerstäuber ist auf einen Fluss ausgehend von der HPLC von 100  $\mu\text{L}$  ausgelegt. Erfahrungsgemäß kann dieser Fluss aber durch Erhöhen der Absaugleistung der Sprühkammer um ein Vielfaches erhöht werden. Dies wird realisiert, indem die Umdrehungen pro Minute der peristaltischen Pumpe erhöht werden, über die die Absaugleistung der Sprühkammer kontrolliert wird. Daher wurden Messungen mit dem Gesamtfluss von der HPLC durchgeführt und außerdem mit einem passiven Split vor der ICP-MS, um das Flussvolumen auf 100  $\mu\text{L}$  zu reduzieren. Jedoch konnte auf diese Weise kein konstanter Fluss zum ICP-MS realisiert werden. In Abbildung 32 sind für beide Zerstäuber beispielhaft Chromatogramme dargestellt. Dabei handelt es sich um Blindproben, um den Anstieg der Intensitäten des Untergrundes über die Zeit besser zu verdeutlichen.

In Abbildung 32 a) ist zu erkennen, dass das mit dem PFA-Zerstäuber aufgenommene Chromatogramm eine wesentlich ruhigere Grundlinie und kaum Spikes aufweist. Außerdem steigt der Untergrund mit der Zeit nicht so stark an. Beides ist darauf zurückzuführen, dass die Oberfläche des PFA-Zerstäubers glatter ist als die des Quarzzerstäubers. Dadurch wird ein feineres und gleichmäßigeres Aerosol erzeugt, das in der Fackel besser ionisiert werden kann. Trägt man die Isotopenverhältnisse  $R = I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$  für beide Zerstäuber auf (Abbildung 32 b)), so ist zu erkennen, dass das Chromatogramm außerdem wesentlich weniger Spikes und eine über die Zeit geringere Änderung des Isotopenverhältnisses aufweist. Die grundsätzliche Änderung des

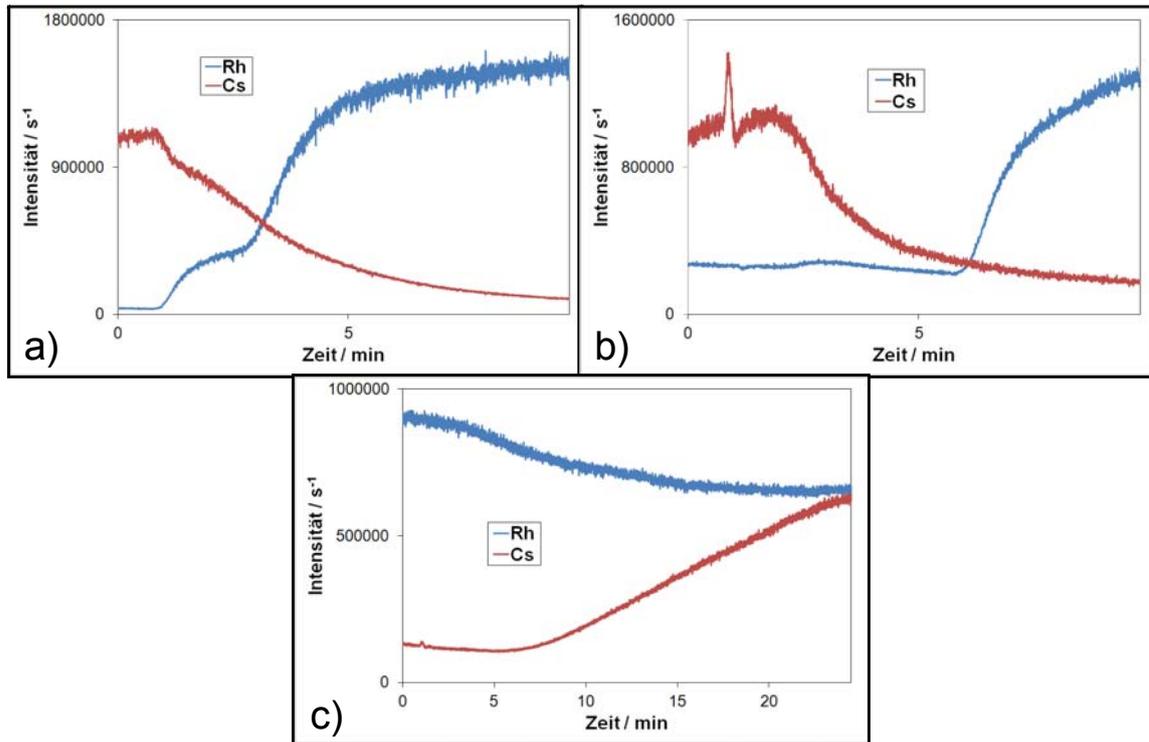


**Abbildung 32** a) Summe der Chromatogramme der gemessenen Ionen ( $I(^{54}\text{Fe}) + I(^{56}\text{Fe}) + I(^{57}\text{Fe}) + I(^{58}\text{Fe})$ ) von Blindproben mit einem Quarzzerstäuber (rot) und einem PFA-Zerstäuber (blau) sowie b) Isotopenverhältnisse  $R = I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$  der gleichen Proben

Isotopenverhältnisses  $R$  tritt in dieser Versuchsanordnung auf, da die hohe Salzlast des Gradienten die Ionisationsbedingungen in der Fackel verändert und somit die einzelnen Isotope nicht gleichermaßen ionisiert werden können. Darauf wird in Kapitel 3.2.3 noch genauer eingegangen.

#### 3.2.3 Gegenläufiger post-column Gradient

Die Ionisierung der zu analysierenden Elemente in dem ICP-MS hängt stark von der Matrix ab. In Abbildung 32 a) (Kapitel 3.2.2.3) ist zu sehen, dass der Untergrund aufgrund vom Gradienten verursachter Matrixänderung während einer Messung ansteigt. Dies ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass die erhöhte Salzlast des Eluenten B die Plasmabedingungen so verändert, dass sich das Ionisierungsverhalten der einzelnen Elemente, bzw. sogar deren Isotope, verändern. Dies ist in Abbildung 32 b) zu erkennen. Würde sich die Ionisierung der beiden Isotope  $^{56}\text{Fe}$  und  $^{57}\text{Fe}$  gleichermaßen ändern, so müsste das Isotopenverhältnis über die Zeit konstant bleiben. Natürlich gilt dies nicht nur für den Untergrund, sondern auch für die Analyten. Ein Ansatz, dem entgegen zu wirken, ist das Einbringen eines konstanten Flusses nach der Säule (constant post column sheath flow), wie zum Beispiel eines organischen Lösungsmittels, um die durch den Gradienten hervorgerufenen Veränderungen zu puffern [115, 116]. In einigen Fällen reicht diese Pufferleistung gerade am Ende des Gradienten nicht aus. Dies hat zur Folge, dass später eluierende Analyten immer stärker beeinflusst werden. Dieses Problem haben Pröfrock und Prange [117] gelöst, indem kein konstanter Fluss, sondern ein gegenläufiger Gradient post column in den Probenfluss gegeben wurde (reversed gradient post column sheath flow). Der Vorteil dieser Methode ist, dass im Plasma theoretisch immer konstante Matrixbedingungen herrschen sollten. Dieser Ansatz wurde weitestgehend nachgestellt, jedoch hier keine in den HPLC-Turm integrierte binäre Pumpe gleicher Firma verwendet, sondern eine externe HPLC-Pumpe L-6200 von Hitachi Merck. Der Fluss gelangte über ein T-Stück nach der Mono-Q-Säule in den Probenfluss. Der apparative Aufbau entspricht dem der PC-IDMS (siehe auch Abbildung 20 (Kapitel 2.4), jedoch wird hier anstelle des Spikes der gegenläufige Gradient über das T-Stück dazu gegeben). Die externe Pumpe wurde zuvor nach dem in Tabelle 7 (Kapitel 3.2.1) beschriebenen Protokoll passiviert. Zunächst wurden die Verzögerungszeiten der externen Pumpe und der Pumpe aus der HPLC bestimmt. Die Verzögerungszeit ist die Zeit, die der Eluent benötigt, um den Weg von der Pumpe bis zu Detektor zurückzulegen. Die Konditionen der HPLC entsprachen dabei den optimierten Messbedingungen, die in Tabelle 9 (Kapitel 3.2.2.2) dargestellt sind. Jedoch wurden andere Eluenten eingesetzt. Eluent A war eine Lösung aus 20  $\mu\text{g}/\text{kg}$



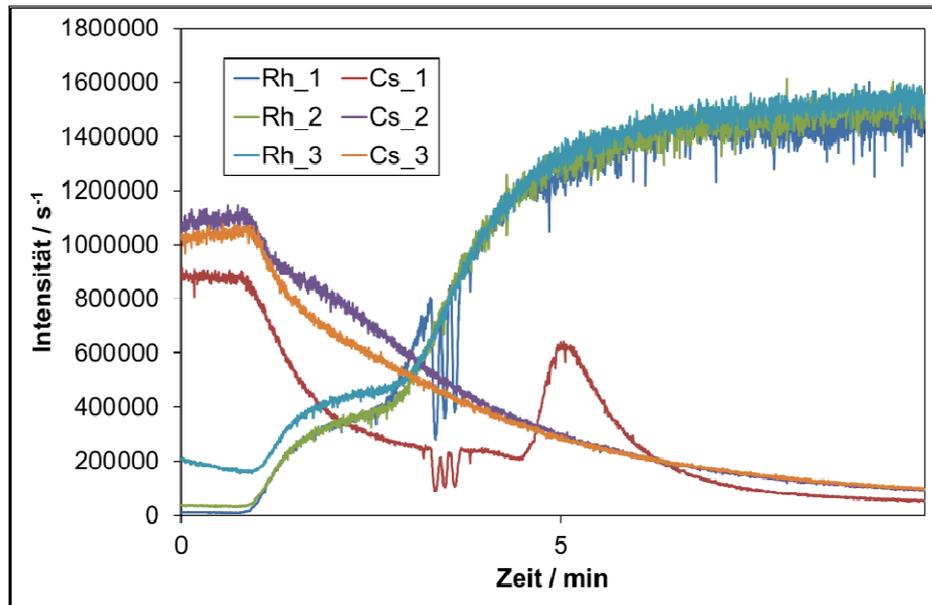
**Abbildung 33** Bestimmung der Verzögerungszeit für a) die externe Pumpe und b) die HPLC Pumpe. In c) ist das Ergebnis der Kopplung der beiden Pumpen zu sehen

Rh und Eluent B eine Lösung aus  $20 \mu\text{g/kg}$  Cs in  $12,5 \text{ mmol/kg}$  Tris-HAc-Puffer. Innerhalb von 10 min wurde ein Gradient von 0 % bis hin zu 100 % Eluent B verwendet. In Abbildung 33 a) ist beispielhaft ein Chromatogramm für den Gradienten der externen Pumpe zu sehen und in Abbildung 33 b) ein beispielhaftes Chromatogramm für die HPLC. Als Probe diente  $12,5 \text{ mmol/kg}$  Tris-HAc-Puffer.

Es ist zu erkennen, dass die externe Pumpe eine Verzögerungszeit von ca. 60 s und die HPLC eine Verzögerungszeit von ca. 120 s hat. Bei vorgegebenem Eluenten der HPLC resultiert der in Tabelle 10 angegebene Gradient für die externe Pumpe. Aus dem vorgegebenen Gradienten ergibt sich das Chromatogramm aus Abbildung 33 c). Man sieht, dass die Intensitäten nicht konstant bleiben. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass sich

**Tabelle 10** Gradienten für die HPLC und die externe Pumpe bei gemeinsamer Verwendung

HPLC		externe Pumpe	
Zeit / min	Puffer B	Zeit / min	Puffer B
0 - 20	0 → 100 %	0 - 1	100 %
20 - 25	100 %	1 - 21	100 → 0 %
25 - 35	0 %	21 - 25	0 %
		25 - 35	100 %



**Abbildung 34** Wiederholmessungen am Beispiel von drei Messungen mit der externen Pumpe

die Bedingungen im Plasma in dieser Versuchsanordnung über die Zeit ändern. Ebenso wie die stark voneinander abweichenden Intensitäten zu Beginn des Chromatogramms.

In dieser Versuchsanordnung traten weitere Probleme auf. So zeigt zum Beispiel die Abbildung 34, dass eine reproduzierbare Messung hier nicht möglich ist. Dies kann zum einen darauf zurückgeführt werden, dass es sich bei der externen Pumpe um eine Pumpe mit Mischkammer auf der Niederdruckseite handelt, in der die Mischungsverhältnisse nicht so genau eingestellt werden können, wie bei einer Pumpe mit Mischkammer auf der Hochdruckseite (siehe auch Kapitel 2.2). Zum anderen auch, weil die Pumpe keinen online Entgaser besaß. Trotz Entgasen der Eluenten vor ihrer Verwendung durch Einleiten von Ar für 30 min traten von Zeit zu Zeit Luftblasen auf, die auch in den Chromatogrammen zu sehen sind. Dies ist in der ersten Messung sowohl für Rh als auch für Cs in Abbildung 34 erkennbar. Sie zeigt auch, dass bei einigen Messungen die Intensität zu einem Signal mit starkem Fronting heranwächst. Vermutlich hat sich Material aus der Pumpe gelöst, das in der ICP-MS detektiert wurde.

Die Literatur zeigt, dass die dargestellte Methode unter Verwendung einer in den HPLC-Turm integrierten zweiten binären Pumpe gleicher Firma, die auch in die Software eingebunden ist, eine gute Realisierung der Matrixanpassung in der Fackel des ICP-MS ermöglicht [117]. Verwendet man aber wie hier beschrieben eine externe Pumpe mit Mischkammer auf der Niederdruckseite und ohne online Entgaser, ist es nicht von Vorteil, einen gegenläufigen post column Gradienten zu verwenden. Daher wurde dieser Messaufbau nicht weiter verfolgt. Stattdessen wurde mit dem in Kapitel 2.4 in den Abbildung 18 und Abbildung 20 gezeigten Aufbauten gearbeitet. Da der Anstieg des

Untergrundes im Gegensatz zum Signal relativ gering ausfällt (siehe Abbildung 29 (Kapitel 3.2.1)), wurde auf eine weitere Korrektur des Anstiegs verzichtet.

### **3.3 Allgemeine Probenvorbereitungen**

#### **3.3.1 Rekonstituieren des Serums ERM-DA470k/IFCC**

Das gefriergetrocknete Serum wurde entsprechend des mitgelieferten Protokolls durch Zugabe von exakt 1 g H<sub>2</sub>O rekonstituiert. Da von Seiten des Herstellers keine quantitativen Angaben zur Trockenmasse des Serums gemacht werden, wurde auf die Rückwägung des Vials nach vollständiger Entleerung verzichtet.

Das auf Raumtemperatur gebrachte Serumvial wurde belüftet und ohne Etikett und Schraubdeckel, aber mit Stopfen gewogen. Auf die Trockenmasse wurde ca. 1 g H<sub>2</sub>O gegeben und das Vial vorsichtig geschwenkt. Nach einer Stunde wurde das Vial noch einmal vorsichtig geschwenkt und war bereit zur Probenvorbereitung. Die zertifizierte Tf-Konzentration im Serum wurde entsprechend der H<sub>2</sub>O-Zugabe rechnerisch korrigiert. Bei quantitativen Angaben zur Trockenmasse seitens des Herstellers hätte das Serumvial nach vollständiger Entleerung erneut gewogen werden und die Massendifferenz ebenfalls rechnerisch korrigiert werden müssen.

#### **3.3.2 Vollständige Sättigung von Transferrin mit Eisen**

Zur Quantifizierung von Tf über den Fe-Gehalt ist es notwendig, dass das Tf einheitlich stöchiometrisch gesättigt ist. Pro Tf-Molekül können dabei zwei Fe-Atome aufgenommen werden.

Basierend auf einer Methode von del Castillo Busto *et al.* [36, 37] wurde die Sättigung optimiert. Dazu benötigt wurden Serum, Lösungen von Tf in Tris-HAc Puffer, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> beide in H<sub>2</sub>O sowie FeCl<sub>3</sub> in HNO<sub>3</sub>. Zum einen wurde die Konzentration des verwendeten Puffers zur Verdünnung der Tf-Lösung der Konzentration der Eluenten für die HPLC-Methode angepasst. Zum anderen wurden die Lösungen zur Sättigung und Verdünnung des Tf miteinander vermischt bevor sie zur Tf-Lösung gegeben wurden. Das hat den Vorteil, dass sich aufgrund der unterschiedlichen pH-Werte der einzelnen Lösungen nicht bei Zugabe jeder einzelnen Lösung der pH-Wert der Tf-Lösung ändert und somit die Konformation des Tf beeinflusst.

Dafür wurden zu 150 mg einer 12,5 mmol/kg Tris-HAc-Lösung, 5 mg einer 500 mmol/kg Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung, 5 mg einer 10 mmol/kg FeCl<sub>3</sub>-Lösung und 50 mg Serumprobe gegeben und für 30 min bei Raumtemperatur unter Verwendung einer Schüttelplatte inkubiert. Nach dieser Methode wurden alle Tf-Lösungen angesetzt.

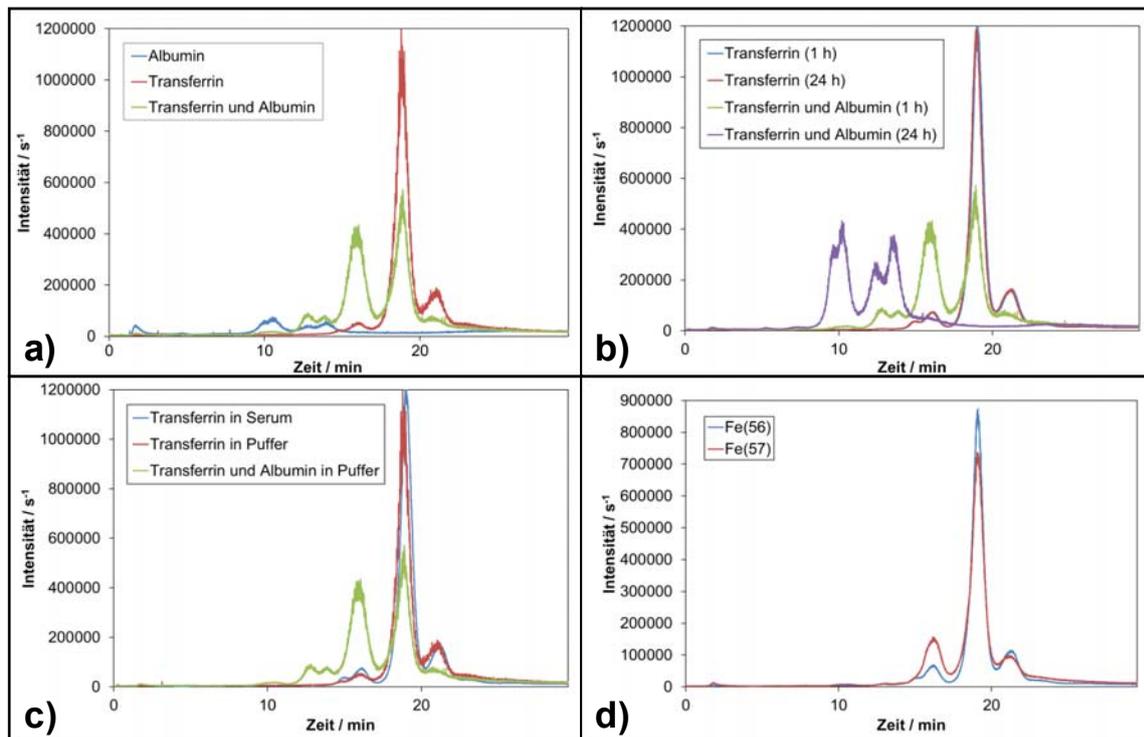
Zu Beginn wurden entsprechend der Literatur Versuche mit  $\text{NaHCO}_3$ -Lösungen durchgeführt. Es zeigte sich jedoch, dass das holo-Tf bei Verwendung von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  stabiler ist.

Zur Herstellung der Referenz- und Spikelösungen kam humanes apo-Tf zum Einsatz, dass in Tris-HAc-Puffer mit einer gravimetrisch eingestellten Konzentration von ca 2,3 g/kg gelöst war. Die genaue Konzentration wurde rechnerisch bestimmt. Diese Sättigung der Lösungen erfolgte analog der Sättigung der Serumprobe.

### 3.3.3 Versuche zur Matrixanpassung mit Albumin

Für die double und triple SS-IDMS ist es notwendig, auf Referenzen zurück zu greifen, die der Probe so ähnlich wie möglich sind. Serum besteht zu ca. 91 % aus Wasser und zu 7 % aus Proteinen, die restlichen 2 % sind Nährstoffe, Abfallstoffe und Elektrolyte. Von den 7 % Proteinen entfallen 62 % auf Albumin (Alb) [118]. Da Alb den größten Anteil an Proteinen im Serum ausmacht, wurde eine Matrixanpassung mit Albumin gemacht. Dafür wurde Tf in einer Lösung aus 50 g/kg Albumin in 12,5 mmol/kg Tris-HAc-Puffer so gelöst, dass eine Tf-Konzentration von 2,3 g/kg entstand. Diese Lösung wurde wie oben beschrieben mit Eisen gesättigt und jeweils sofort nach der Inkubation sowie nach 24 Stunden mit der HPLC – ICP-MS Kopplung gemessen. Als Referenz diente eine Lösung, die wie die vorherige behandelt wurde, jedoch ohne Alb angesetzt wurde sowie das Serum ERM-DA470k/IFCC. In Abbildung 35 sind diese Chromatogramme dargestellt.

In Abbildung 35 a) ist eine abgesättigte apo-Tf-Probe (rot), eine Alb-Probe (blau), die wie die Tf-Lösung während der Probenvorbereitung behandelt wurde, und eine Tf-Alb-Mischung (grün) dargestellt. Diese Lösungen wurden nach 1 Stunde gemessen. Es ist deutlich zu erkennen, dass es bei der Mischung aus Tf und Alb einen Abbau der  $\text{S}_4$ - und  $\text{S}_5$ -Form des Tf hin zur  $\text{S}_3$ -Form gibt. Die Flächen der Peaks für Tf und der Mischung aus Tf und Alb sind gleich, was darauf schließen lässt, dass lediglich die Zuckerketten des Tf abgebaut werden, die Bindung des Fe aber weiterhin besteht. In Abbildung 35 b) ist eine Tf-Probe nach 1 h (blau) und dieselbe nach 24 h (rot) zu sehen. Beide Chromatogramme sind gleich. Dies entspricht auch den Ergebnissen zur Stabilitätsuntersuchung des Tf aus Kapitel 3.3.5. Ferner sind in der Abbildung Tf-Proben zu sehen, die mit Alb angesetzt wurden. Diese sind ebenfalls nach 1 h (grün) und nach 24 h (violett) gemessen worden. Nach 1 h ist der oben beschriebene Abbau zu erkennen. Nach 24 h ist dieser Abbau zum Ende gekommen. Die entstandenen Sialoformen des Tf eluieren zeitlich vor den ursprünglichen. In Abbildung 35 c) ist erkennbar, dass beim Vergleich einer Serum-Probe (blau) mit einer Tf-Probe in Tris-HAc-Puffer (rot) diese eine sehr hohe Ähnlichkeit in der



**Abbildung 35** Chromatogramme von a) holo-Tf, Alb und einer Mischung aus beidem b) holo-Tf und Alb nach 1 h und nach 24 h c) holo-Tf in Serum und in Tris-HAc-Puffer sowie holo-Tf und Alb in Tris-HAc-Puffer d)  $^{56}\text{Fe}$  und  $^{57}\text{Fe}$  in einer Mischung aus mit  $^{56}\text{Fe}$  gesättigtem Serum und mit  $^{57}\text{Fe}$  gesättigter Tf-Lösung

Verteilung der Sialoformen aufweist, im Gegensatz zu einer Tf-Probe mit Alb (grün) gemessen im Vergleich mit einer Serumprobe (blau). Für Abbildung 35 d) wurde eine Serumprobe mit Fe natürlicher isotopischer Verteilung vollständig (blau) und apo-Tf mit einem  $^{57}\text{Fe}$ -angereichertem Fe in einer Alb-Lösung (rot) abgesättigt. Beide Lösungen wurden nach der Inkubation miteinander in einem Verhältnis von 1:1 vereint. Es ist zu erkennen, dass der  $^{57}\text{Fe}$ -Tf-Komplex eine leichte Verschiebung hin zur  $S_3$ -Form aufweist. Dies lässt darauf schließen, dass es während der Inkubation schon zu einem Abbau der Zuckerketten kommt, der durch Zugabe des vollständigen Serums gestoppt wird. Im Serum scheinen also, im Gegensatz zur reinen Tf-Lösung, Stabilisatoren vorhanden zu sein, die diesen Abbau verhindern. In den folgenden Versuchen wurde auf Grund dieser Ergebnisse kein Alb verwendet.

### 3.3.4 Lipoproteinfällung

Zur Optimierung der Probenvorbereitung wurde überprüft, ob eine Verbesserung der Auftrennung der einzelnen Sialoformen erreicht werden kann, wenn eine

Lipoproteinfällung durchgeführt wird. Die verwendete Methode wurde von Jeppsson *et al.* erstmals [119] beschrieben und in modifizierter Variante von Grebe [43] durchgeführt.

Die Lipoproteinfällung erfolgte im direkten Anschluss an die Sättigungsprozedur in abgewandelter Form zu der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Methode. Dazu wurden 100 µL einer Serumprobe mit 2,5 µL einer 500 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung und 2,5 µL einer 25 mM FeCl<sub>3</sub>-Lösung versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde für die Lipoproteinfällung die Probe mit 5 µL Fällungsreagenz, bestehend aus 200 mg MgCl<sub>2</sub> und 100 mg Dextransulfat in 1 mL H<sub>2</sub>O, versetzt. Nach weiteren 30 min Inkubation bei 4 °C wurde die Probe für 10 min bei 18000 g zentrifugiert. Das g steht dabei für die Erdschwerebeschleunigung. 100 µL des Überstandes wurden mit 400 µL eines 20 mM Bis-Tris-Puffers versetzt und erneut bei 4 °C mit 18000 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand fand für die chromatographische Trennung Verwendung. Da vor und nach der Lipoproteinfällung in den Chromatogrammen kein Unterschied und auch optisch keine Fällung erkennbar war, wurde auf die Lipoproteinfällung verzichtet.

### 3.3.5 Stabilität von holo-Transferrin

Sowohl für die Versuche zur Beladung des Tf als auch für die SS-IDMS muss sichergestellt werden, dass es zu keinem Austausch zwischen dem im Tf gebundenen Fe und dem freien Fe in der Lösung kommt, da diese, je nach Ansatz, unterschiedliche Isotopenverhältnisse aufweisen können. Um dies zu überprüfen wurden Lösungen, ähnlich wie in Kap. 3.1 beschrieben, hergestellt. Dafür wurden 2 g einer 2 g/kg apo-Tf-Lösung in 2 g eines 25 mmol/kg Tris-HAc-Puffers und 100 mg einer 50 mmol/kg NaHCO<sub>3</sub>-Lösung mit 100 mg einer 10 mmol/kg <sup>57</sup>Fe isotonenangereicherten Fe-Lösung versetzt und für 60 min inkubiert. Anschließend wurden drei Aliquote à 1 g abgenommen und zwei davon mit 25 mg einer 10 mmol/kg Fe-Lösung mit natürlicher Isotopenzusammensetzung und ein Aliquot mit 25 mg Tris-HAc-Puffer versetzt. Die Lösungen wurden dann über 30 Stunden verteilt mehrfach mit HPLC – ICP-MS gemessen. In Abbildung 36 ist dies dargestellt. Darin ist zu erkennen, dass das Isotopenverhältnis *R* in den unterschiedlichen Lösungen über einen Zeitraum von 30 Stunden im Rahmen einer relativen Standardabweichung aller Messungen von 3,8 % konstant ist.

Des Weiteren musste sichergestellt werden, dass sich das Tf über den Zeitraum der Messung nicht zersetzt. Dazu wurde eine Tf-Lösung angesetzt, nach dem gleichen Schema wie vorstehend beschrieben, zur Stabilität des <sup>57</sup>Fe-Tf-Komplexes in einer Lösung mit natürlichem Fe. Jedoch wurde das Tf mit natürlichem isotopisch zusammengesetzten Fe abgesättigt und nach der Inkubation kein weiteres Fe

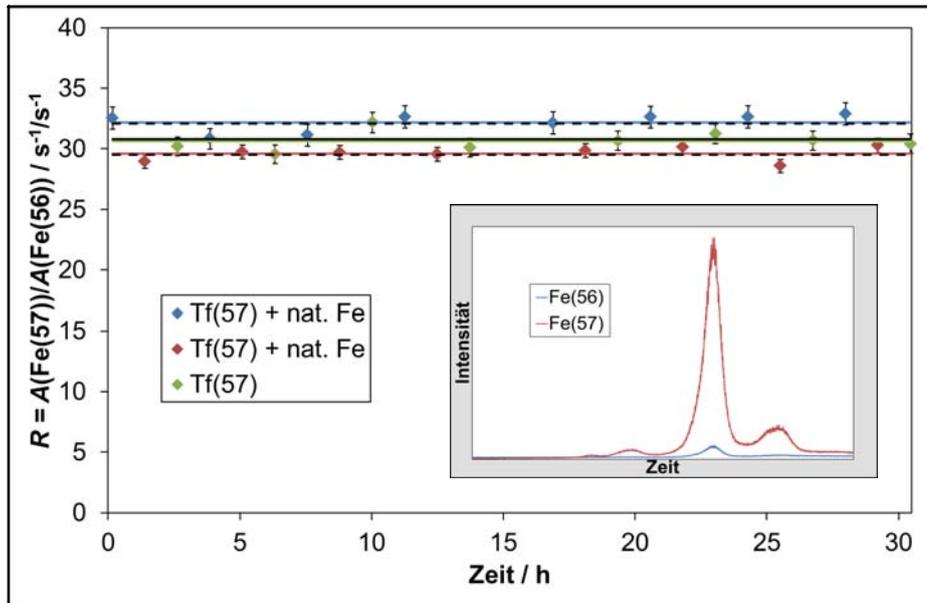


Abbildung 36 Stabilität von  $^{57}\text{Fe}$ -Tf in einer Lösung mit natürlichem Fe über von 30 Stunden

dazugegeben. Die Lösung wurde über einen Zeitraum von 30 Stunden mehrfach mit HPLC – ICP-MS gemessen und die Peakflächen miteinander verglichen. In Abbildung 37 sind einige der Chromatogramme dargestellt. In diesen ist zu erkennen, dass sie über den gesamten Zeitraum reproduzierbar sind und damit das Tf stabil ist.

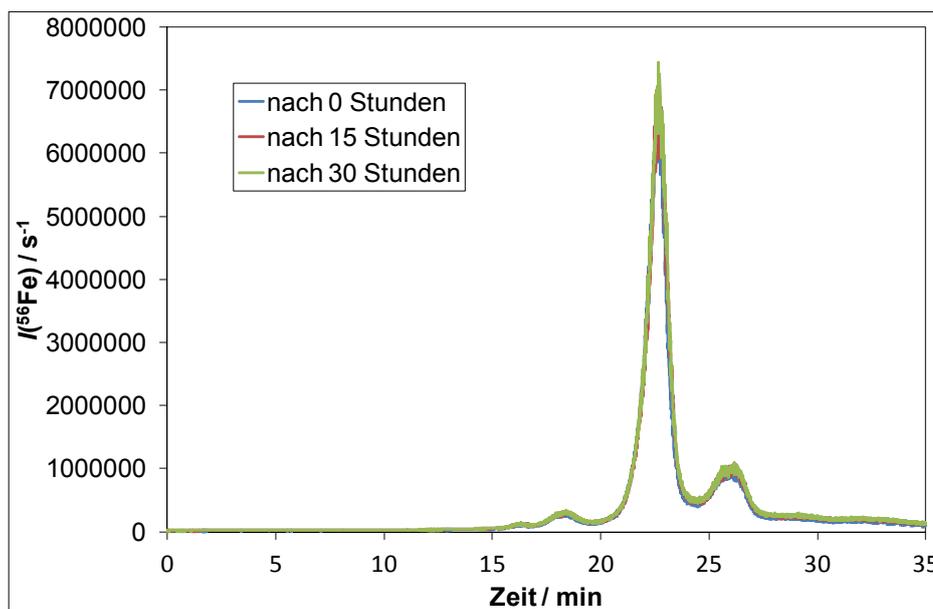
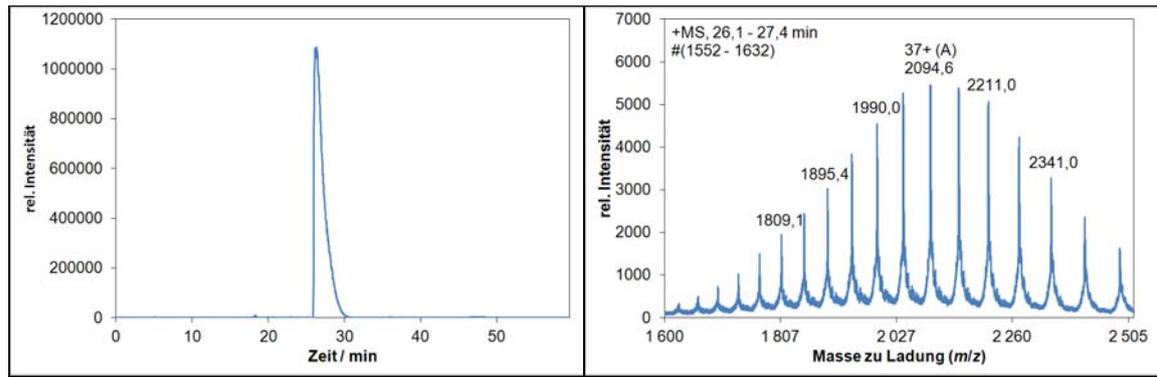


Abbildung 37 Stabilität des Tf über 30 Stunden



**Abbildung 38** links: HPLC – ESI-MS Chromatogramm von apo-Tf, rechts: Spektrum des Peaks bei bei (26,1 - 27,4) min

### 3.3.6 Reinheit und Wassergehalt von apo-Transferrin

Bei Messungen mit Isotopenverdünnung ist es notwendig, je nach Methode entweder über einen vollständig charakterisierten Spike oder eine vollständig charakterisierte Referenz zu verfügen. Sowohl die Referenz als auch der Spike wurden aus apo-Tf in vitro hergestellt. Dafür musste die Reinheit des Tf bestimmt werden. In Abbildung 29 (Kapitel 3.2.1) ist keine Verunreinigung des Tf zu sehen, weder bei der proteinunspezifischen Detektion mit dem DAD bei 280 nm noch bei der eisenspezifischen Detektion mit ICP-MS. Des Weiteren wurde die Reinheit des Tf ebenfalls mit HPLC – ESI-MS unter Verwendung eines Agilent 1200 LC-Systems in Kopplung mit einem Bruker microTOFq überprüft. Als Säule diente eine Jupiter 5 $\mu$  C4 von Phenomenex. Die Verunreinigungen liegen bei unter 0,1 % und sind somit vernachlässigbar (siehe auch Abbildung 38). Die Reinheit des Tf wurde deshalb nur über den Wasserverlust beim Ausheizen bestimmt, in dem Tf über ca. 4 Stunden bis zur Massenkonzanz bei 39 °C im Trockenschrank erhitzt wurde.

Die Reinheit mit Unsicherheit wurde mehrfach in unregelmäßigen Abständen bestimmt und mit der GUM Workbench berechnet. Dabei war die Wasseraufnahme abhängig von der Lagerdauer des Tf. Die größte Massendifferenz ergab eine Reinheit von  $93,798 \pm 0,054$  %. Der Hersteller gibt eine Reinheit des Tf von  $> 97$  % an. Um die Massendifferenz bezogen auf den Wassergehalt nicht einrechnen zu müssen, wurde das Tf vor jedem neuen Ansatz getrocknet und mit der Angabe der Reinheit des Herstellers verwendet.

Materialbezeichnung	<sup>57</sup> Fe						
Kolben-Nr.	III						
Kolbenvolumen	100 mL						
		Materialdichte	Luftdruck	Luftfeuchtigkeit, relativ	Lufttemperatur	Luftdichte	Faktor
		in g/cm <sup>3</sup>	in hPa	in %	in °C	in kg/m <sup>3</sup>	
m <sub>1</sub> (Probe vor Ätzen) in g	0.10092	7.87	991.15	31	21.76	1.16745603	1.00000241
m <sub>1,1</sub> (korrigiert) in g	0.10092						
m <sub>2</sub> (Probe nach Ätzen) in g	0.10091	7.87	991.15	31	21.76	1.16745603	1.00000241
m <sub>2,1</sub> (korrigiert) in g	0.10091						
w(Fe, abgeätzt) in %	0.010						
m <sub>3</sub> (Kolben, leer) in g	61.4690	2.07	987.96	30	21.50	1.1648968	1.00041646
m <sub>3,1</sub> (korrigiert) in g	61.4946						
V(HNO <sub>3</sub> , suprapur w = 20%) in ml	12.03						
m(H <sub>2</sub> O, soll) in g	86.48						
m <sub>4</sub> (Kolben+Fe-Lsg.) in g	161.5340	1.007	996.30	24	21.32	1.17619896	1.00102127
m <sub>5</sub> (Fe-Lsg.) in g	100.0652						61.4687516
m <sub>5,1</sub> (korrigiert) in g	100.1674						
w(Fe) in µg/g	1007.4156						
w(HNO <sub>3</sub> ) in %	1.996656765						

Abbildung 39 Ausschnitt aus dem Kontrollblatt für die Herstellung der <sup>57</sup>Fe-Spike-Lösung

### 3.3.7 Gehalt und Isotopenverteilung in der Fe-Spike-Lösung

Um eine Rückführung der in dieser Arbeit beschriebenen Methoden zu etablieren, ist es nicht notwendig, den genauen Fe-Gehalt der Spike-Lösung zu bestimmen. Zum einen, weil dieser bei der double und triple IDMS nicht benötigt wird und zum anderen bei der SS-IDMS nicht der Fe-Spike eingesetzt wird, sondern der Fe-Tf-Spike, dessen Gehalt über das Tf bestimmt wird. Da die Arbeitsgruppe aber eine Fe-Referenzlösung vorhält, wurde die Lösung nach der in Kapitel 2.7 beschriebenen Methode hergestellt und die Entnahmen mit einem Excel-Kontrollblatt begleitet. Ein entsprechendes Kontrollblatt ist in Abbildung 39 dargestellt. Die Isotopenverteilung in dieser Lösung wurde neu mit einem hochauflösenden (HR-)ICP-Sektorfeld-MS bestimmt. Dazu wurde das zertifizierte natürliche Fe-Referenzmaterial IRMM-014 in 20 %iger HNO<sub>3</sub> unter Wärmezufuhr gelöst und die abgekühlte Lösung mit Reinstwasser auf eine Endkonzentration von 1263.760064 µg/g und einen Gehalt von ca. 0,15 mol/kg HNO<sub>3</sub> verdünnt. Die <sup>57</sup>Fe-Spike-Lösung und die Lösung des Referenzmaterials wurden gegeneinander gemessen und die Isotopenverteilung wie in Tabelle 11 dargestellt bestimmt. Zum Vergleich wurde die Isotopenverteilung des Spikes ebenfalls mit der Q-ICP-MS bestimmt. Die Ergebnisse sind ebenfalls in der Tabelle 11 enthalten.

Aus der Tabelle geht hervor, dass die gemessenen Isotopenverhältnisse  $R_y = I(^{57}\text{Fe}) / I(^{56}\text{Fe})$  für HR-ICP-MS  $R_y^{\text{HR}} \approx 33$  mol/mol und für Q-ICP-MS  $R_y^{\text{Q}} \approx 19$  mol/mol sind. Gerade in den Bereichen sehr geringer Konzentrationen (im Fall des Spikes: <sup>54</sup>Fe, <sup>56</sup>Fe und <sup>58</sup>Fe) kann man mit einem hochauflösenden MS wesentlich genauere

**Tabelle 11** Massenanteil der Isotope in der Fe-Referenz (nat. Fe) und dem Fe-Spike ( $^{57}\text{Fe}$  angereichert)

<b>IRM-014</b>	$m(^{54}\text{Fe})/m(\text{Fe})$	$m(^{56}\text{Fe})/m(\text{Fe})$	$m(^{57}\text{Fe})/m(\text{Fe})$	$m(^{58}\text{Fe})/m(\text{Fe})$
<b>Zertifikat</b>	5,8465(23) %	91,754(24) %	2,1192(56) %	0,281(27) %
<b>Spike (Chemotrade)</b>	$m(^{54}\text{Fe})/m(\text{Fe})$	$m(^{56}\text{Fe})/m(\text{Fe})$	$m(^{57}\text{Fe})/m(\text{Fe})$	$m(^{58}\text{Fe})/m(\text{Fe})$
<b>Zertifikat</b>	---	2,40 %	95,20 %	2,40 %
<b>gemessen:</b>				
<b>- HR-ICP-MS</b>	0,003 %	2,857 %	95,291 %	1,849 %
<b>- Q-ICP-MS</b>	0,25 %	4,94 %	92,56 %	2,25 %

Ergebnisse erzielen. Bei der single IDMS gehen die Anteile aller Isotope in die Berechnung zur Konzentrationsbestimmung ein. Bei der double IDMS sind es die des Monitorisotopes ( $^{57}\text{Fe}$ ) und des Referenzisotopes ( $^{56}\text{Fe}$ ). Auf dieses Problem wird in Kapitel 3.4.1.2 näher eingegangen.

## 3.4 Quantifizierung von Transferrin

### 3.4.1 Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (IDMS)

Die IDMS erfolgte über zwei unterschiedliche Ansätze. Zum einen mit post-column (PC)-IDMS und zum anderen mit spezies-spezifischer (SS)-IDMS. Die PC-IDMS wurde als double IDMS, die SS-IDMS als double und triple IDMS Experiment durchgeführt. Dabei wurde auf die Exact Matching Methode zurückgegriffen. Beim Exact Matching wird eine Referenz angesetzt, die der Probe so ähnlich wie möglich ist. Diese Referenz wird auf die gleiche Weise behandelt wie die Probe. Die Vorteile dieser Methode sind in Kapitel 2.4 beschrieben. Nachdem die Methoden mit reinen Tf-Lösungen entwickelt wurden, wurden sie auf das Serum ERM-DA470k/IFCC angewandt, um dessen zertifizierten Tf-Gehalt zu validieren.

#### 3.4.1.1 Double post-column IDMS

Für die double PC-IDMS wird nach der Säule und damit nach der chromatischen Trennung ein konstanter Fe-Spike-Fluss in den Probenfluss gegeben. Dabei muss darauf geachtet werden, dass das Isotopenverhältnis zwischen Referenz- (hier:  $^{56}\text{Fe}$ ) und Monitorisotop (hier:  $^{57}\text{Fe}$ ) über das Verhältnis der Integrale der Peakflächen  $R = A(^{57}\text{Fe})/A(^{56}\text{Fe}) \approx 1$  ist. Die Proben bzw. die Referenzen wurden nach der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Methode vollständig gesättigt. Zur Methodenentwicklung wurde eine

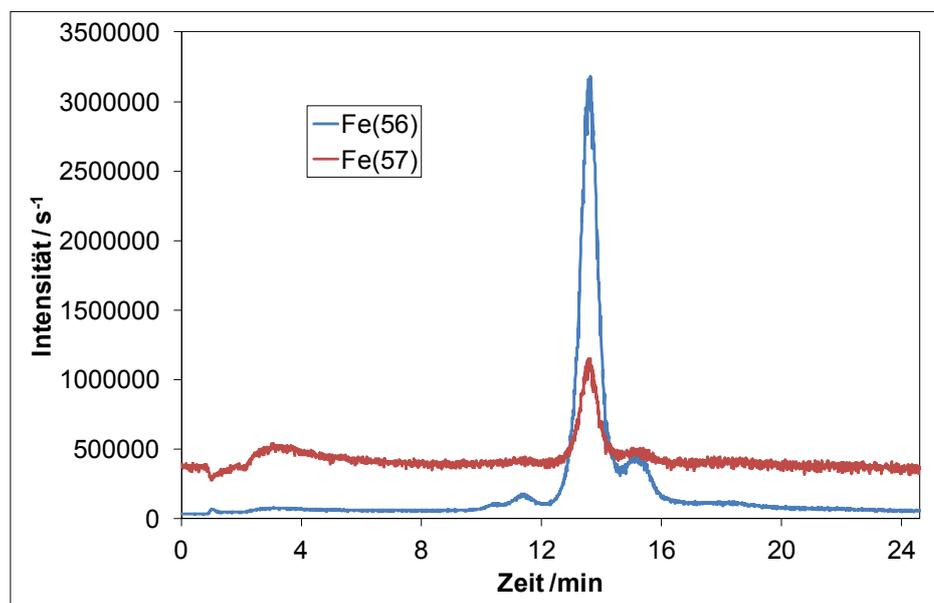


Abbildung 40 Chromatogramm von Tf gemessen mit post-column IDMS

**Tabelle 12** Gemessener Tf-Massenanteil  $w_x$  und Wiederfindungen in den unterschiedlichen Proben mit double PC-IDMS. Für apo-Tf und nat. Tf wurden für die Messungen unterschiedliche Stammlösungen mit leicht variierendem Gehalt angesetzt, diese wurden zum einfacheren Vergleich auf den zertifizierten Tf-Gehalt des ERM-Materials normiert.

Probe	gemessen	zertifiziert / norm. grav. Referenzwert	Wiederfindung
apo-Tf	(2,45 ± 0,13) g/kg	2,41 g/kg	(101,73 ± 5,39) %
nat. Tf	(2,33 ± 0,13) g/kg	2,41 g/kg	(96,86 ± 5,13) %
ERM-DA470k	(2,36 ± 0,13) g/kg	(2,41 ± 0,08) g/kg	(97,93 ± 5,19) %

gravimetrisch angesetzte und vollständig mit  $^{56}\text{Fe}$  abgesättigte apo-Tf-Lösung verwendet. Später kamen auch eine gravimetrisch angesetzte natürliche Tf-Lösung (isoliertes und lyophilisiertes humanes Tf (nat.Tf)) zum Einsatz sowie das für Tf zertifizierte Serum ERM-DA470k/IFCC. Der verwendete Messaufbau ist in Abbildung 20 (Kapitel 2.4) dargestellt. Dabei wurde die Zugabe des  $^{57}\text{Fe}$ -Spikes über eine Waage während der gesamten Messung überwacht. In Abbildung 40 ist ein Chromatogramm des Serums mit der PC-IDMS Methode zu sehen. Die Integration der Peakflächen  $A$  der einzelnen Isotope geschah mit Hilfe der Software Chromatographic Data Analysis mit Untergrundkorrektur. Das Monitorisotop ( $^{57}\text{Fe}$ ) wurde in den gleichen Retentionszeiten mit Untergrundkorrektur wie der Peak des Referenzisotops ( $^{56}\text{Fe}$ ) integriert. Anschließend wurden aus den Integralen die Isotopenverhältnisse  $R_i$  berechnet.

Zur Korrektur der Massendiskriminierung [120] wurden die  $K$ -Faktoren berechnet. Dafür wurden im  $^{\text{nat}}\text{Fe}$ -Tf-Komplex die Isotopenverhältnisse  $R_{z-K}^{\text{meas}} = A(^{57}\text{Fe})/A(^{56}\text{Fe})$  mit Q-ICP-MS gemessen. Mit Hilfe von Gleichung 8 (Kapitel 2.4) konnten die gemessenen Isotopenverhältnisse  $R_i^{\text{meas}}$  (mit  $i = x, y, z, \text{bx}, \text{bz}$ ) in die „wahren“ Isotopenverhältnisse  $R_i^{\text{meas}}$  konvertiert werden. Die gemessenen  $K$ -Faktoren variierten innerhalb  $\pm 2$  %. So konnten alle Matrixeffekte einbezogen werden, die auf das Protein, die Eluenten und/oder die chromatographische Trennung zurückzuführen sind. Die Messungen für den  $K$ -Faktor wurden vor und nach jeder Messsequenz durchgeführt. An dieser Stelle seien beispielhaft für eine Messung die  $K$ -Faktoren angegeben:  $K_{54}$ : (1,0513 ± 0,0058),  $K_{57}$ : (0,9848 ± 0,0036) und  $K_{58}$ : (0,9950 ± 0,0079).

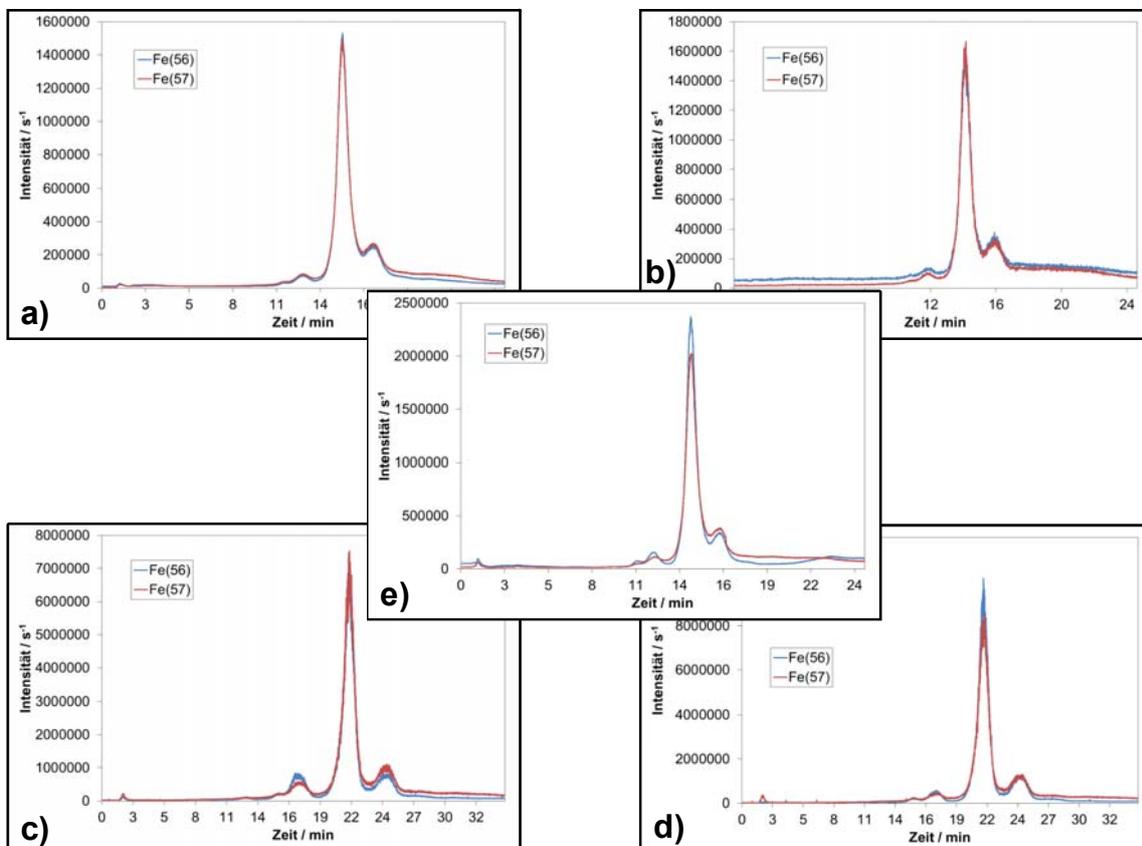
Die Konzentrationen und Unsicherheiten wurden mit der GUM Workbench berechnet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 zusammengestellt. Die Wiederfindungen beziehen sich für das apo-Tf und das natürliche Tf auf die gravimetrischen Ansätze. Da Stammlösungen unterschiedlicher Tf-Konzentrationen verwendet wurden, sind keine absoluten Messwerte

angegeben. Für das Serum ERM-DA470k/IFCC bezieht sich die Wiederfindung auf den zertifizierten Wert.

Bisher wurde in der Literatur zwar auch die PC-IDMS für die Quantifizierung beschrieben [37], jedoch wurde dort keine gravimetrische Kontrolle und Berechnung der Spikezugabe gemacht, sondern der Volumenfluss aus dem Fluss des Spikes berechnet. Er wurde vor der eigentlichen Messung kalibriert und als konstant angesehen. Der hier verwendete Ansatz hat den Vorteil, dass die Spikezugabe über die gesamte Messung kontrolliert und exakt berechnet werden kann. Auch ist hier im Gegensatz zur Literatur wieder der gravimetrische Ansatz gewählt, um Unsicherheiten so gering wie möglich zu halten.

### 3.4.1.2 Double spezies-spezifische IDMS

Für die Messungen mit SS-IDMS wurden alle Proben, Referenzen und Spikes nach der in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Methode vollständig gestättigt. Zur Methodenentwicklung wurde eine gravimetrisch angesetzte reine apo-Tf Lösung in Tris-HAc-Puffer angesetzt



**Abbildung 41** Chromatogramme der Mischungen der Spikelösungen mit Proben aus a) apo-Tf b) nat. Tf c) Seronorm L1 d) Seronorm L2 e) ERM-DA470k/IFCC mit Spikes

**Tabelle 13** Gemessener Tf-Massenanteil  $w_x$  und Wiederfindungen in unterschiedlichen Proben mit double SS-IDMS. Für apo-Tf und nat. Tf wurden für die Messungen unterschiedliche Stammlösungen mit leicht variierendem Gehalt angesetzt, diese wurden zum einfacheren Vergleich auf den zertifizierten Tf-Gehalt des ERM-Materials normiert.

Probe	gemessen	zertifiziert / norm. grav. Referenzwert	Wiederfindung
apo-Tf	(2,40 ± 0,10) g/kg	2,41 g/kg	(99,78 ± 3,99) %
nat. Tf	(2,35 ± 0,09) g/kg	2,41 g/kg	(97,34 ± 3,89) %
Seronorm L1	(0,982 ± 0,040) g/kg	Fe: (1,42 ± 0,08) mg/kg (entspricht Tf <sub>min</sub> : 1,01 g/kg)	–
Seronorm L2	(1,010 ± 0,042) g/kg	Fe: (2,07 ± 0,13) mg/kg (entspricht Tf <sub>min</sub> : 1,48 g/kg)	–
ERM-DA470k	(2,317 ± 0,092) g/kg	Tf: (2,41 ± 0,08) g/kg	(96,14 ± 3,85) %

und als Probe verwendet. Die Referenz wurde gleichermaßen angesetzt. Für den Tf-Spike wurde eine 10 mmol/kg Fe-Spike-Lösung mit einer Anreicherung auf dem Isotop  $^{57}\text{Fe}$  verwendet. Als Probe dienten neben dem apo-Tf auch ein gefriergetrocknetes natürliches humanes Tf, das auf Fe-Gehalt zertifizierte Serum „Seronorm Trace Elements Serum“ in den Konzentrationslevels L1 und L2, sowie das für Tf zertifizierte humane Serum ERM-DA470k/IFCC. Um die Messlösungen zu erhalten, wurden 100 mg der Probe und Referenz mit jeweils 100 mg Spikelösung versetzt, so dass in beiden Mischungen ein Isotopenverhältnis von  $R = A(^{57}\text{Fe})/A(^{56}\text{Fe}) \approx 1$  entstand. In Abbildung 41 sind Chromatogramme für Mischungen von Proben (apo-Tf, nat. Tf, Seronorm L1, L2 und ERM-DA470k/IFCC) und Spikes zu sehen. Die Resultate der Messungen sind in Tabelle 13 zusammengefasst. Die Wiederfindungen in der Tabelle beziehen sich bei apo-Tf und natürlichem Tf auf die gravimetrischen Ansätze und bei dem ERM-DA470k/IFCC auf den zertifizierten Tf-Gehalt. Die Seronorm Seren sind nur für Fe zertifiziert und nicht für Tf, daher kann keine tatsächliche Wiederfindung für Tf berechnet werden. Jedoch kann der zertifizierte Fe-Gehalt auf einen minimal möglichen Tf-Gehalt umgerechnet werden, unter der Voraussetzung, dass alles Fe Tf-gebunden ist. Die Konzentrationen und kompletten Unsicherheiten wurden mit der GUM Workbench berechnet. Die Isotopenverhältnisse  $R_i$  wurden aus den Integralen der Peakflächen  $A$  der einzelnen Isotope mit Untergrundkorrektur berechnet. Zur Korrektur der Massendiskriminierung wurde der  $K$ -Faktor wie für die PC-IDMS in Kapitel 3.4.1.1 ermittelt.

**Tabelle 14** Beitrag der einzelnen Größen zum Unsicherheitsbudget für die double PC-IDMS  $w_x = (2,36 \pm 0,13)$  g/kg Tf,  $U_{\text{rel}} = 5,3 \%$  mit  $k = 2$  (Beispiel für eine Messung des ERM-DA470k/IFCC)

Symbol	Bezeichnung	Unsicherheitsbeitrag $u$
$f_{\text{pur}}$	Reinheit des festen apo-Tf	13,3 %
$R_{\text{bx}}^{\text{meas}}$	Gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bx aus Probe x und Spike y	41,8 %
$R_{\text{bz}}^{\text{meas}}$	Gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bz1 aus Referenz z und Spike y	41,8 %
$m'_9$	Wägewert Gefäß + gesättigte Referenz	1,5 %
$m'_8$	Wägewert Gefäßes + $\text{Na}_2\text{CO}_3$ + $\text{FeCl}_3$ -Lsg zur Sättigung der Referenz	1,5 %

### 3.4.1.3 Double PC-IDMS versus double SS-IDMS

Um das Potential der SS-IDMS gegenüber der PC-IDMS zu demonstrieren, wurden beide Methoden als double Experiment unter Anwendung des Exact Matching Prinzips untersucht.

Dazu wurde das auf den Tf-Gehalt zertifizierte Serum ERM-DA470k/IFCC analysiert. Daraus ergaben sich für die SS-IDMS ein Massenanteil von  $w_x = (2,32 \pm 0,09)$  g/kg Tf (siehe Tabelle 13 (Kapitel 3.4.1.2)) und für die PC-IDMS ein Massenanteil von  $w_x = (2,36 \pm 0,13)$  g/kg Tf (siehe Tabelle 12 (Kapitel 3.4.1.1)). Beide Werte liegen im Bereich des zertifizierten Wertes von  $w_x = (2,41 \pm 0,08)$  g/kg Tf [33]. Die Unsicherheiten sind erweiterte Unsicherheiten mit einem Erweiterungsfaktor von  $k = 2$ .

In beiden Fällen tragen die gleichen Größen zur gesamten Messunsicherheit bei. Den Hauptanteil tragen die gemessenen Isotopenverhältnisse in den Mischungen bx und bz, des Weiteren auch die Reinheit des apo-Tf. Bei der PC-IDMS gehen noch einige Einwaagen zu einem geringen Teil in das Budget ein (Tabelle 14 und Tabelle 15). In den Tabellen sind nur die Beiträge aufgelistet, die in die Budgets eingehen. Wie ein Unsicherheitsbudget aufgestellt und berechnet wird, ist in Kapitel 3.6 beschrieben.

Die SS-IDMS hat einen allgemeinen Vorteil gegenüber der PC-IDMS: Ab dem Moment, in dem die Probe mit dem spezies-spezifischen Spike versetzt wird, hat jeglicher Probenverlust keinen Einfluss mehr auf das Endergebnis, da der Spike als idealer interner Standard fungiert. Dies setzt voraus, dass Probe und Spike vollständig homogenisiert werden. Jedoch sind diese Spikes nicht immer verfügbar und häufig teuer.

**Tabelle 15** Beitrag der einzelnen Größen zum Unsicherheitsbudget für die double SS-IDMS  $w_x = (2,317 \pm 0,046)$  g/kg Tf,  $U_{\text{rel}} = 4,0$  % mit  $k = 2$  (Beispiel für eine Messung des ERM-DA470k/IFCC)

Symbol	Bezeichnung	Unsicherheitsbeitrag $u$
$f_{\text{pur}}$	Reinheit des festen apo-Tf	13,7 %
$R_{\text{bx}}^{\text{meas}}$	Gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bx aus Probe x und Spike y	43,1 %
$R_{\text{bz}}^{\text{meas}}$	Gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bz1 aus Referenz z und Spike y	43,1 %

Der gerätetechnische Aufbau für die PC-IDMS ist etwas aufwändiger gegenüber der SS-IDMS, da bei der PC-IDMS zusätzlich eine Waage zur Überwachung des Spikes sowie eine Schlauchpumpe zu dessen Beförderung benötigt wird.

Die Wiederfindungen für den Gehalt von Tf in dem humanen Serum ERM-DA470k/IFCC sowohl für die PC-IDMS als auch für die SS-IDMS stimmen gut überein. Jedoch ist die erweiterte Unsicherheit  $U_{\text{rel}} = 4,0$  % mit  $k = 2$  für die SS-IDMS deutlich geringer als die für die PC-IDMS mit  $U_{\text{rel}} = 5,3$  %. In beide Budgets gehen die gleichen Größen mit fast gleichen prozentualen Beiträgen ein. Die genauere Bestimmung einer dieser Faktoren würde also für beide Methoden die Messunsicherheit in gleichem Maße verringern. Allerdings muss bei der PC-IDMS jeglicher Probenverlust ausgeschlossen werden, da dieser Fehler in das Endergebnis eingeht und nicht verlässlich in der Unsicherheitsberechnung berücksichtigt werden kann. Wahrscheinlich ist die Unsicherheit für die PC-IDMS noch größer. Bei Speziesanalysen, die in der Probenvorbereitung einen Reaktionsschritt enthalten, der nicht zu 100 % abläuft, würde, falls die Ausbeute nicht bekannt ist, ein nicht korrigierter systematischer Fehler entstehen.

Steht ein spezies-spezifischer Spike zur Verfügung bzw. kann, wie in dem vorliegenden Fall, in vitro hergestellt werden, sollte auf die Möglichkeit der SS-IDMS zurückgegriffen werden, um die Messunsicherheit des Systems und den gerätetechnischen Aufwand zu verringern. Steht jedoch kein spezies spezifischer Spike zur Verfügung ist die PC-IDMS eine gute Alternative, um ebenfalls auf ein primäres Referenzverfahren zurückgreifen zu können.

#### 3.4.1.4 Triple spezies-spezifische IDMS

Bei der triple SS-IDMS werden, wie bei der double SS-IDMS, Mischungen aus Probe und Spike sowie Referenzen und demselben Spike benötigt. Jedoch sind statt nur einer

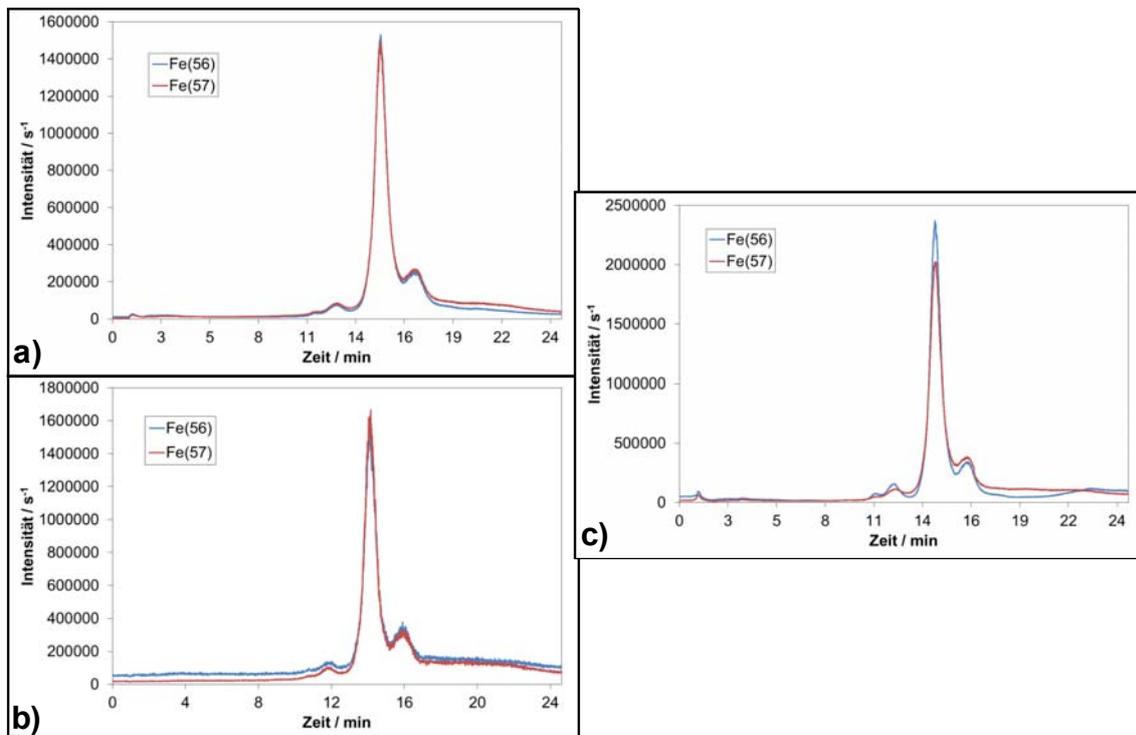
**Tabelle 16** Mischungsverhältnisse von Probe/Referenz und Spike in den Mischungen

Probe + Spike	Referenz + Spike (1)	Referenz + Spike (2)
bx	bz1	bz2
1 : 1	1 : 1,1	1 : 0,9

Referenz-Spike-Mischung zwei Mischungen (bz1 und bz2) mit unterschiedlichem Mischungsverhältnis erforderlich. Die Mischungen wurden nach den in Tabelle 16 aufgeführten Verhältnissen angesetzt. Apo-Tf, gefriergetrocknetes natürliches Tf und das Serum ERM-DA470k/IFCC wurden auch hier als Probe verwendet.

Die Isotopenverhältnisse  $R_i$  wurden wie für die double IDMS berechnet. In Abbildung 42 sind Chromatogramme für einen Probenansatz bestehend aus den Mischungen von Referenz und Spike (bz1), Referenz und Spike (bz2) sowie Probe und Spike (bx), zu sehen.

Die Konzentrationen und Unsicherheiten wurden mit Hilfe der Gleichung 12 berechnet. Dafür wurde die GUM Workbench eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefasst. Auch hier gilt, dass sich die Wiederfindungen in der Tabelle für apo-Tf auf den gravimetrischen Ansatz und für ERM-DA470k/IFCC auf das Zertifikat beziehen.



**Abbildung 42** Chromatogramme eines Probenansatzes a) Referenz und Spike (bz1), b) Referenz und Spike (bz2) und c) ERM-DA470k/IFCC und Spike (bx)

**Tabelle 17** Gemessener Tf-Massenanteil  $w_x$  und Wiederfindungen in den unterschiedlichen Proben mit triple SS-IDMS. Sowohl für apo-Tf als auch nat. Tf wurden für die Messungen unterschiedliche Stammlösungen mit leicht variierendem Gehalt angesetzt, diese wurden zum einfacheren Vergleich auf den zertifizierten Tf-Gehalt des ERM-Materials normiert.

Probe	gemessen	zertifiziert / norm. grav. Referenzwert	Wiederfindung
apo-Tf	(2,45 ± 0,09) g/kg	2,41 g/kg	(101,49 ± 3,65) %
nat. Tf	(2,39 ± 0,08) g/kg	2,41 g/kg	(98,97 ± 3,56) %
ERM-DA470k	(2,426 ± 0,086) g/kg	(2,41 ± 0,08) g/kg	(100,66 ± 3,62) %

Die  $K$ -Faktoren zur Korrektur der Massendiskriminierung und die Isotopenverhältnisse  $R_i$  wurden wie für die double IDMS berechnet.

### 3.4.1.5 Double SS-IDMS versus triple SS-IDMS

Um die Überlegenheit der triple IDMS über die double IDMS für die Speziesanalytik zu zeigen, wurden zunächst reine Tf-Lösungen untersucht und anschließend das für Tf zertifizierte humane Serum ERM-DA470k/IFCC analysiert. Die Ergebnisse für Tf in dem von  $w_x = (2,43 \pm 0,09)$  g/kg Tf mit der triple IDMS (siehe Tabelle 17) und  $w_x = (2,32 \pm 0,09)$  g/kg Tf mit der double IDMS (siehe Tabelle 13 (Kapitel 3.4.1.2)) liegen im Bereich des im Zertifikat angegebenen Wertes von  $w_x = (2,41 \pm 0,08)$  g/kg Tf [33]. Alle Unsicherheiten sind erweiterte Unsicherheiten mit einem Erweiterungsfaktor von  $k = 2$ . Die Berechnungen sowohl für die triple IDMS, als auch für die double IDMS beruhen auf den gleichen Messungen. Für die Berechnungen der double IDMS wurde lediglich die zweite Referenz-Spike Mischung bz2 außer Acht gelassen.

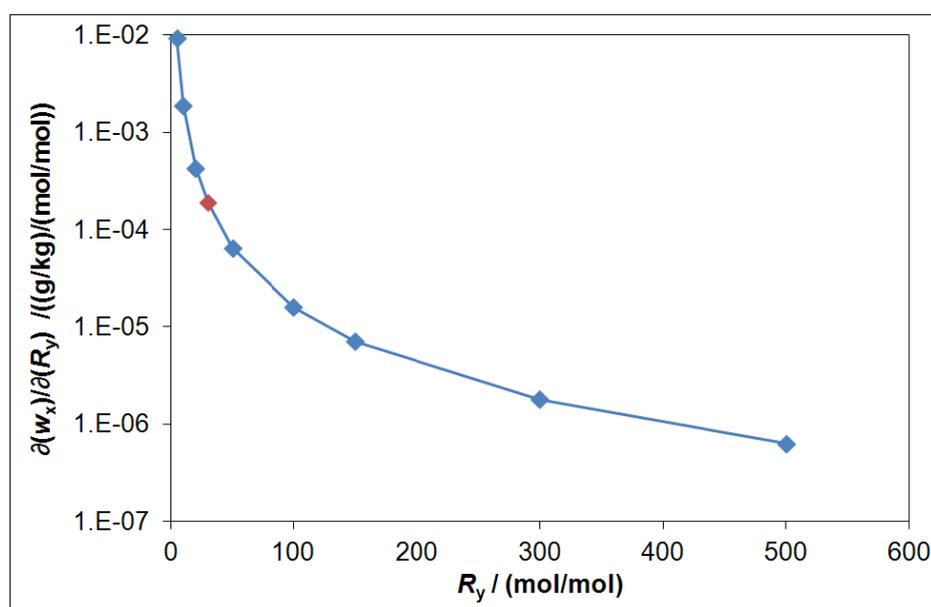
Wie schon in Kapitel 3.4.1.3 beschrieben, haben bei der double IDMS die gemessenen Isotopenverhältnisse in den Mischungen bx und bz den stärksten Einfluss auf die gesamte Messunsicherheit. Außerdem trägt die Reinheit des apo-Tf mit zur Unsicherheit bei (Tabelle 15 (Kapitel 3.4.1.3)).

Für die triple IDMS sind die Haupteinflüsse auf die Unsicherheiten der gemessenen Isotopenverhältnisse  $R_{bx}^{\text{meas}}$  in der Mischung bx,  $R_{bz1}^{\text{meas}}$  in der Mischung bz1 und die Reinheit des apo-Tf  $f_{\text{pur}}$  (Tabelle 18). Die Unsicherheit des gemessenen Isotopenverhältnisses  $R_{bz2}^{\text{meas}}$  der Mischung bz2 geht nur zu 3 % in die Unsicherheit des Endergebnisses ein. Eine Erklärung dafür ist nicht zu erkennen, da die Gleichung, die für die triple IDMS verwendet wird (Gleichung 12) völlig symmetrisch ist.

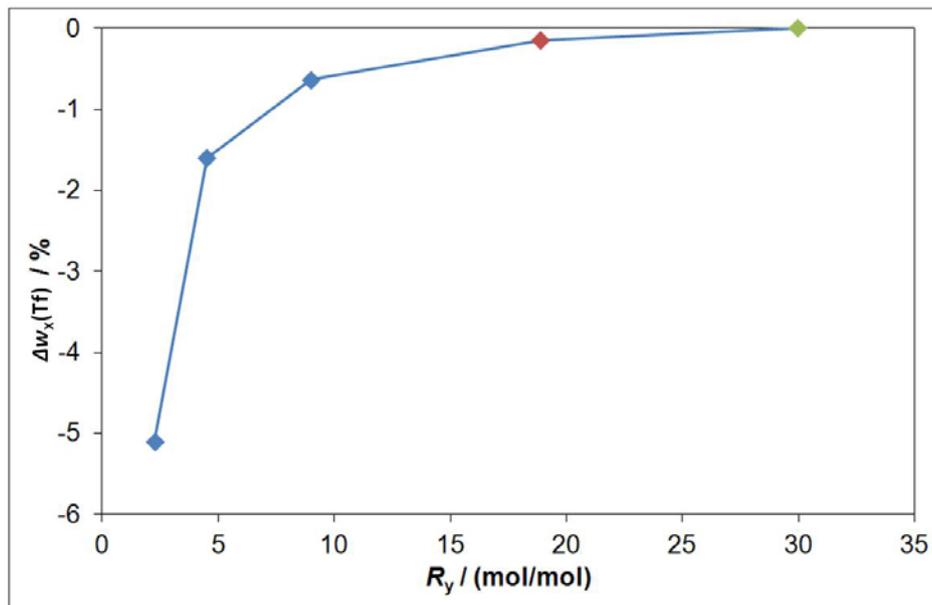
**Tabelle 18** Beitrag der einzelnen Größen zum Unsicherheitsbudget für die triple SS-IDMS (Beispiel für eine Messung des ERM-DA470k/IFCC)  $w_x = (2,426 \pm 0,043)$  g/kg Tf,  $U_{\text{rel}} = 3,6 \%$  mit  $k = 2$

Symbol	Bezeichnung	Unsicherheitsbeitrag $u$
$f_{\text{pur}}$	Reinheit des festen apo-Tf	17,1 %
$R_{\text{bx}}^{\text{meas}}$	Gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bx aus Probe x und Spike y	50,7 %
$R_{\text{bz1}}^{\text{meas}}$	Gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bz1 aus Referenz z und Spike y	29,2 %
$R_{\text{bz2}}^{\text{meas}}$	Gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bz2 aus Referenz z und Spike y	3,0 %

Ein allgemeines Problem für die double IDMS kann bei der Bestimmung der Isotopenzusammensetzung im Spikematerial auftreten. Das mit HR-ICP-MS gemessene Isotopenverhältnis  $R_{y\text{-HR}}^{\text{meas}}$  im Spikematerial weist eine relative erweiterte Messunsicherheit von  $U_{\text{rel}} = 4 \%$  auf. Abbildung 43 zeigt den Sensitivitätskoeffizienten für Änderungen in  $R_y$  auf das Messergebnis (den Massenanteil  $w_x$  des Analyten in der Probe). Der in dieser Arbeit verwendete Fe-Spike hat einen relativ geringen Anreicherungsgrad auf dem Isotop  $^{57}\text{Fe}$ . Für das Isotopenverhältnis  $R_y$  ergibt sich ein Wert von 33 mol/mol [84]. Dieser wurde mit HR-ICP-MS bestimmt und bedeutet, dass auf das Isotop  $^{56}\text{Fe}$  ein Massenanteil von 2,857 % und auf das Isotop  $^{57}\text{Fe}$  95,291 % entfällt (Tabelle 11 (Kapitel 3.3.7)).



**Abbildung 43** Simulation des Sensitivitätskoeffizienten für die Änderung in  $R_y$ . Der in dieser Arbeit verwendete Fe-Spike ist rot dargestellt [84]



**Abbildung 44** Abweichung  $\Delta$  vom Endergebnis  $w_x(\text{Tf})$  bei einer falsch bestimmten Isotopenverhältnis  $R_y$ . HR-ICP-MS (grün):  $R_y \approx 30$  mol/mol, Q-ICP-MS (rot):  $R_y \approx 19$  mol/mol (s. Kap. 3.3.7), die restlichen Punkte sind simuliert

Wie oben schon erwähnt ist die Sensitivität ein Maß dafür, wie stark die Ausgangsgröße ( $w_x$ ) auf Änderungen in der Eingangsgröße ( $R_y$ ) reagiert. Dies wird als partielle Ableitung dargestellt. In Abbildung 43 ist zu erkennen, dass bei kleiner werdendem Isotopenverhältnis  $R_y$  im Spikematerial (also die Anreicherung an  $^{57}\text{Fe}$  wird schlechter) der Unsicherheitsbeitrag von  $R_y$  immer stärkeren Einfluss auf die Messunsicherheit des Endergebnisses hat. In Anbetracht des sehr kleinen Sensitivitätskoeffizienten gehen jedoch nur Isotopenverhältnisse des Spikes von  $R_y \leq 10$  mol/mol signifikant ( $> 0,5$  %) in das Unsicherheitbudget des Endergebnisses ein. Daher beeinträchtigen auch relativ große Unsicherheiten, wie bei Messungen mit Q-ICP-MS entstehen, sowie geringe Anreicherungen im Spikematerial (hier:  $R_y \approx 30$  mol/mol) die Unsicherheit des Endergebnisses nur gering.

Jedoch können Probleme bei der Bestimmung des Isotopenverhältnisses im Spikematerial auftreten, die sich dann auf den berechneten Probengehalt auswirken. Zum Beispiel können Interferenzen auf dem Referenzisotop (hier:  $^{56}\text{Fe}$ ), die auf Grund der hohen Anreicherung vernachlässigbar für  $R_x$ ,  $R_z$ ,  $R_{bx}$  und  $R_{bz}$  sind, starken Einfluss auf  $R_y$  haben. In Abbildung 44 ist der Einfluss des Isotopenverhältnisses  $R_y$  im Fe-Spike auf das Ergebnis der Tf-Konzentration dargestellt. Der Massenanteil  $w_x$  des Tf, berechnet mit dem fehlerbehafteten Spikeisotopenverhältnis gemessen mit Q-ICP-MS ( $R_y \approx 19$  mol/mol), ist im Vergleich zu dem gemessen mit HR-ICP-MS, um  $\Delta = -0,15$  % kleiner. Ist dieser systematische Fehler unbekannt, ist es unmöglich, die Unsicherheit zu bestimmen. In Fällen, in denen keine oder eine schlechte Kollisionszelle verwendet wird, steigt der

systematische Fehler an und führt zu einem falschen Ergebnis. Die Differenz dieses Ergebnisses zu dem ohne systematischen Fehler kann in manchen Fällen die Unsicherheit des Endergebnisses übersteigen und somit signifikant werden.

Der Vorteil der triple IDMS liegt zum einen darin, wie sich aus Gleichung 12 ergibt, dass die Isotopenverteilung im Spikematerial nicht weiter für die Berechnungen benötigt wird. Dies ist besonders nützlich, wenn die Anreicherung im Spikematerial sehr gering ist, da bei kleinen Isotopenverhältnissen  $R_y$ , diese einen Einfluss auf das Ergebnis des Probengehalte  $w_x$  haben. Falls das Isotopenverhältnis im Spikematerial nicht mit HR-ICP-MS bestimmt werden kann, muss bei der double IDMS ein grundsätzlich unbekannter systematischer Fehler berücksichtigt werden. Zum anderen wird die Unsicherheit des gesamten Experimentes ( $U_{\text{rel}} = 3,6 \%$ ) im Vergleich zur double IDMS ( $U_{\text{rel}} = 4,0 \%$ ) kleiner. Dieser Vorteil wird besonders deutlich bei einer chromatographischen Kopplung an ein ICP-MS, da die Isotopenverhältnisse  $R_i$ , bedingt durch die HPLC, größere Unsicherheiten aufweisen, als bei Messungen ohne chromatographische Kopplung, wie bei der Gesamtelementbestimmung [88].

Ein weitere Punkt ist, dass die Präparation der triple IDMS im Vergleich zur double IDMS nicht wesentlich umfangreicher ist. Einerseits verlängert sich die Messzeit durch die zusätzliche Referenz-Spike-Mischung bz2, aber andererseits muss die Isotopenverteilung im Spikematerial nicht mehr bestimmt werden. Die Vorteile der triple IDMS in der SS-IDMS machen sie zu einer guten Alternative für die Bestimmung von Spezies, die Elemente wie Fe enthalten, für die nur Spikematerialien mit geringer isotopischer Anreicherungen erhältlich sind. Die triple IDMS kann auch verwendet werden, um zu überprüfen, ob unbekannte systematische Fehler in einem System auftreten oder um den Verdacht darauf zu bestätigen bzw. zu widerrufen. Um den hohen Anforderungen in der Metrologie gerecht zu werden, erweist sich die triple IDMS derzeit als einzige Methode, Metalloproteine zu bestimmen, bei denen die Messung über solche schwierigen Elemente abläuft.

Prinzipiell eignen sich beide hier aufgeführten Methoden der SS-IDMS als primäre Referenzmethoden, jedoch ist die triple SS-IDMS die Methode mit der größeren Richtigkeit und Genauigkeit. Daher sollte auf diese zurückgegriffen werden. Das Serum ERM-DA470k/IFCC wurde mit Immunoassays in Relation zum Vorgängermaterial ERM-DA470 zertifiziert, das wiederum in Relation zu einem Reinstoff gemessen wurde. Da diese Methoden wie in Kapitel 1 beschrieben starken Bias haben können, kann die hier aufgeführte Methode zur Validierung des Referenzmaterials verwendet werden.

Die hier gezeigten Methoden beruhen im Gegensatz zu den bisher in der Literatur beschriebenen auf gravimetrischen Ansätzen. Zudem sind auch komplette Unsicherheitsbudgets erstellt worden, das Prinzip des Exact Matching fand hier Anwendung sowie die Einführung einer weiteren Referenz zur Entwicklung der triple IDMS. Bisher sind in der Literatur zu der IDMS lediglich Standardabweichungen für drei Messungen zu finden. Diese variieren zwischen 2 und 3 % [36, 37, 121]. In diesen Literaturstellen werden auch die einzelnen Sialoformen einzeln quantifiziert. Sie stellen aber nur Näherungswerte dar, weil die Sialoformen im Chromatogramm nicht basisliniengetrennt sind.

### 3.5 Fe-Beladungsgrad von Transferrin

Der Beladungsgrad  $b$  ist der Anteil dafür, wie viel Fe in das Tf eingebunden ist. Jedes Tf-Molekül kann maximal 2 Fe-Atome aufnehmen. Allgemein gilt also für die maximale Beladung:

$$b = \frac{n(\text{Fe})}{2 \cdot n(\text{Tf})} = \frac{n(\text{Fe})}{n_{\text{max}}(\text{Fe})} \quad (33)$$

mit  $n$  als Stoffmenge.

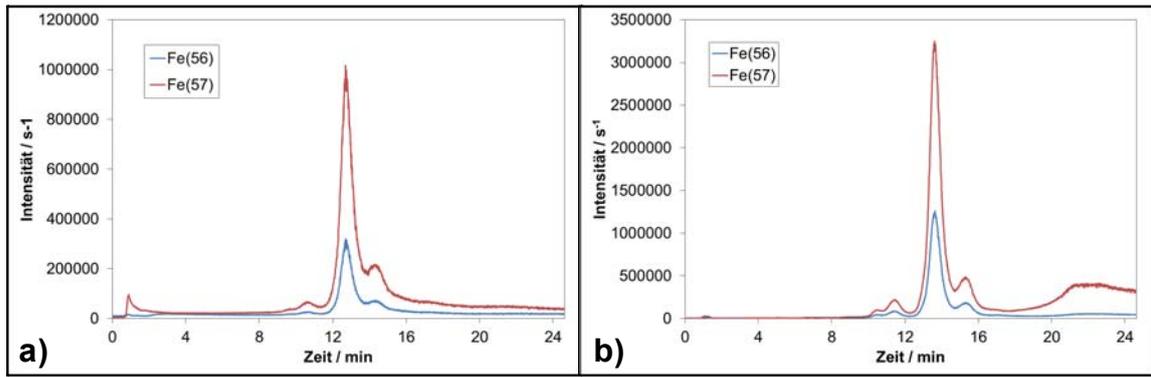
Die Beladung von Tf wurde zum einen mit Hilfe einer single IDMS-Methode bestimmt. Dafür wurde ein zum Teil mit natürlichem Fe beladenes Tf mit isotopisch angereichertem Fe vollständig abgesättigt. Aus dem resultierenden Isotopenverhältnis  $R$  konnte der ursprüngliche Beladungsgrad berechnet werden. Zum anderen wurde der Beladungsgrad mit einer Raman-Methode bestimmt. Dies ist möglich, da die entsprechenden Protein-Fe-Banden bei zunehmenden Beladungsgrad an Intensität zunehmen.

Zur Bestimmung des Beladungsgrades des Tf wurden für die Raman-Methode mehrere Kalibrierlösungen mit unterschiedlich starkem Beladungsgrad gravimetrisch hergestellt. Der Beladungsgrad der Kalibrierlösungen wurde zusätzlich mit single IDMS über HPLC – ICP-MS bestimmt. Allgemein wurden diese Kalibrierlösungen wie folgt angesetzt: Zu 50 mg einer 2,3 g/kg apo-Tf-Lösung wurden 2,5 mg einer 500 mmol/kg NaHCO<sub>3</sub>-Lösung gegeben sowie 2,5 mg Fe-Lösung mit der gewünschten Konzentration an Fe, um das Tf teilweise zu sättigen. Die Proben wurden für 30 min inkubiert und ein Aliquot für die Raman-Spektrometrie abgenommen. Der Rest wurde für die Bestimmung mit IDMS verwendet.

#### 3.5.1 Bestimmung der Beladung mit single IDMS

Die Berechnung der Beladung  $b$  des Tf aus dem gemessenen Isotopenverhältnissen  $R_i$  ist in Gleichung 34 dargestellt:

$$b = \frac{1}{1 + \frac{(R_{\text{bx}} - R_x) \cdot \sum_i R_{y,i}}{(R_y - R_{\text{bx}}) \cdot \sum_i R_{x,i}}}. \quad (34)$$

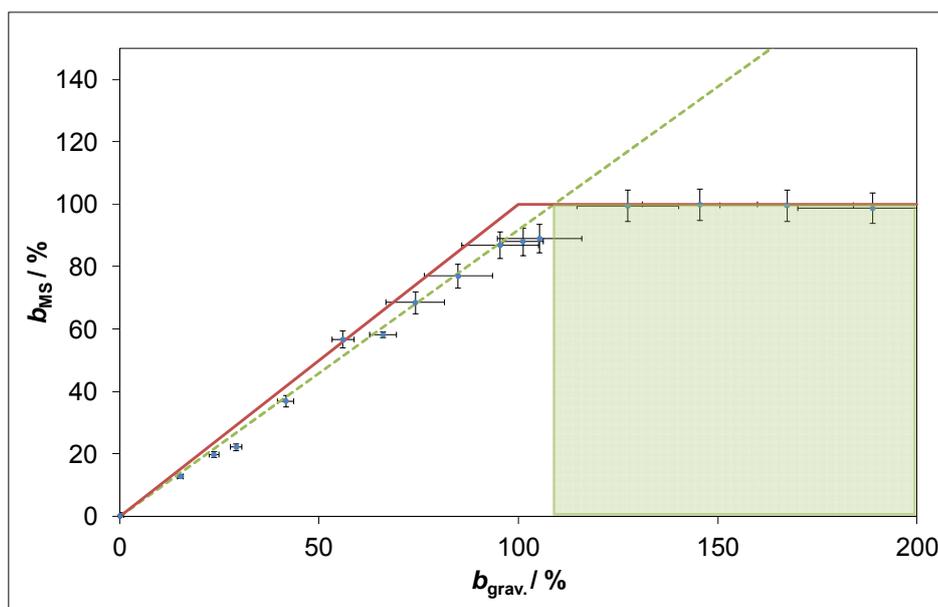


**Abbildung 45** Chromatogramme zur Bestimmung der Beladung von Tf in a) einer zu ca. 30 % beladenen apo-Tf-Lösung und b) im Serum ERM-DA470k/IFCC.

Dabei steht  $R_x$  für Isotopenverhältnisse des bereits im Tf vorhandenen Fe natürlicher Zusammensetzung,  $R_y$  für das Isotopenverhältnis des zugegebenen isotopisch angereicherten Fe und  $R_{bx}$  für das Isotopenverhältnis in der resultierenden Mischung aus Spike und Referenz.

Die Herleitung der Gleichung ist im Anhang (Kapitel 6.2) beschrieben.

Für die Messungen mit HPLC – ICP-MS wurden die nach Kapitel 3.5 angesetzten Proben 1:3 mit 12,5 mmol/kg Tris-HAc-Puffer verdünnt und mit 2,5 mg einer 10 mmol/kg  $^{57}\text{Fe}$ -Spike-Lösung versetzt. Nach weiteren 30 min Inkubation wurden die Proben mit HPLC – ICP-MS gemessen. Dies geschah mit der gleichen Methode wie für die Quantifizierung des Tf (Kapitel 3.2.2.2 und 3.2.2.3). Außerdem wurde die Beladung eines gefriergetrockneten natürlichen Tf sowie die des humanen Serums ERM-DA470k/IFCC



**Abbildung 46** Beladungsgrad des Tf in den Kalibrierlösungen bestimmt mit Hilfe des ICP-MS ( $b_{\text{MS}}$ ) sowie durch die gravimetrische Präparation  $b_{\text{grav}}$ . [122].

**Tabelle 19** Berechneter Beladungsgrad der gravimetrisch angesetzten Kalibrierlösungen sowie mit ID-ICP-MS gemessener Beladungsgrad. Außerdem angegeben sind die Beladungsgrade der Proben aus nat. Tf sowie dem Serum ERM-DA470k/IFCC.

	Beladungsgrad / %	
	gravimetrisch eingestellt	mit ID-ICP-MS bestimmt
<b>Kalibrierlösungen</b>	0,0	0,120 ± 0,029
	15,18 ± 0,21	14,54 ± 0,59
	23,53 ± 0,34	21,83 ± 0,75
	29,20 ± 0,40	24,33 ± 0,98
	41,56 ± 0,61	39,5 ± 1,0
	55,90 ± 0,77	59,0 ± 1,0
	65,97 ± 0,88	61,63 ± 0,59
	74,0 ± 1,1	70,5 ± 1,5
	84,8 ± 1,3	78,81 ± 0,79
	95,3 ± 1,4	88,08 ± 0,58
	101,0 ± 1,0	88,20 ± 0,44
	105,2 ± 1,5	90,09 ± 0,64
	127,3 ± 1,8	99,9 ± 1,1
	145,4 ± 1,4	100,01 ± 0,5
	167,2 ± 2,2	99,90 ± 0,24
188,7 ± 2,4	99,07 ± 0,18	
<b>Referenz</b>	32,46 ± 0,41	29,64 ± 0,36
<b>nat. Tf</b>	–	30,20 ± 0,40
<b>ERM-DA470k</b>	–	27,8 ± 1,1

bestimmt. Beide Proben sind bereits natürlich mit Fe beladen. Dazu wurden die Proben (2,3 g/kg natürliche Tf-Lösung und rekonstituiertes Serum) entsprechend mit NaHCO<sub>3</sub>, <sup>57</sup>Fe-Spike-Lösung vollständig gesättigt und inkubiert. Für das Serum und die Referenz (ein zu ca. 30 % in vitro beladenes apo-Tf) sind Chromatogramme in Abbildung 45 dargestellt.

Die Ergebnisse der Messungen des Beladungsgrades der für die Ramanspektroskopie benötigten Kalibrierlösungen sowie des Serums, der Referenz und des natürlichen human Tf sind in Tabelle 19 zusammengestellt. Die Bestimmung der Beladung erfolgt über eine Isotopenverdünnung. Dabei wird das Fe, das im Tf gebunden ist, gemessen. Zu einem bestimmten Grad ist das Tf mit Fe natürlicher Isotopenverteilung beladen. Der Rest wird mit isotonenangereichertem Fe vollständig gesättigt. Gemessen wird das resultierende Isotopenverhältnis *R* aus dem natürlichen Fe und dem isotopisch angereicherten Fe.

**Tabelle 20** Beitrag der einzelnen Größen zum Unsicherheitsbudget für die Beladung des Tf gemessen mit IDMS  $b = (27,8 \pm 1,1)$  mol/mol,  $U_{\text{rel}} = 4,0$  % mit  $k = 2$  (Beispiel für eine Messung des ERM-DA470k/IFCC)

Symbol	Bezeichnung	Unsicherheitsbeitrag $u$
$R_{z-K}^{\text{meas}}$	Gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ im natürlichen Referenzmaterial zur Bestimmung des K-Faktors am Q-ICP-MS	90,7 %
$R_{\text{bx}}^{\text{meas}}$	Gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bx aus Probe x und Spike y	6,0 %
$R_{y\text{-HR}}^{\text{meas}}$	Gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ im Spikematerial gemessen am HR-ICP-MS	1,6 %
$x_{57}$	Stoffmengenanteil $x(^{57}\text{Fe})$ (IUPAC)	1,5 %

Trägt man die gemessene Beladung über die berechnete auf und bestimmt eine Ausgleichsgerade, so zeigt sich, dass eine vollständige Sättigung des Tf erst eintritt, wenn mindestens 109 % Fe in Bezug auf das Tf dazu gegeben werden (Abbildung 46). Dies spricht dafür, dass es sich bei der Beladung des Tf durch Fe um eine Gleichgewichtreaktion handelt, deren Gleichgewicht in Richtung des Fe-Tf-Komplexes verschoben ist. Da bei den Messungen mit HPLC – ICP-MS grundsätzlich mindesten mit 3fachem Überschuss gesättigt wurde, kann man für die in Kapitel 3.4 beschriebenen ID-ICP-MS Messungen von einer vollständigen Sättigung ausgehen.

Für das für die Tf-Konzentration zertifizierte Serum ERM-DA470k/IFCC wurde eine Beladung von  $b = (27,8 \pm 1,1)$  % bestimmt. Die berechneten Unsicherheiten sind erweiterte Unsicherheiten mit einem Erweiterungsfaktor von  $k = 2,3$ . Der Beladungsgrad liegt in dem erwarteten Bereich von 20 – 30 % für einen gesunden Menschen [3]. Die Integration der Peakflächen  $A$ , die Korrektur der Massendiskriminierung und die Berechnung der Unsicherheiten wurden wie bei den zuvor beschriebenen Methoden durchgeführt.

Den stärksten Einfluss auf die gesamte Messunsicherheit hat das gemessene Isotopenverhältnis  $R_{z-K}^{\text{meas}}$ , das zur Bestimmung des K-Faktors benötigt wird (Tabelle 20). Weiteren Einfluss haben das gemessene Isotopenverhältnis  $R_{\text{bx}}^{\text{meas}}$  in der mit  $^{57}\text{Fe}$  abgesättigten Probe, das gemessene Isotopenverhältnis  $R_{y\text{-HR}}^{\text{meas}}$ , das zur Bestimmung der Isotopenverteilung im Spikematerial mit HR-ICP-MS gemessen wurde sowie der Stoffmengenanteil  $x_{57}$  von natürlichem Eisen, der aus der entsprechenden IUPAC-Tabelle [66] entnommen werden kann.

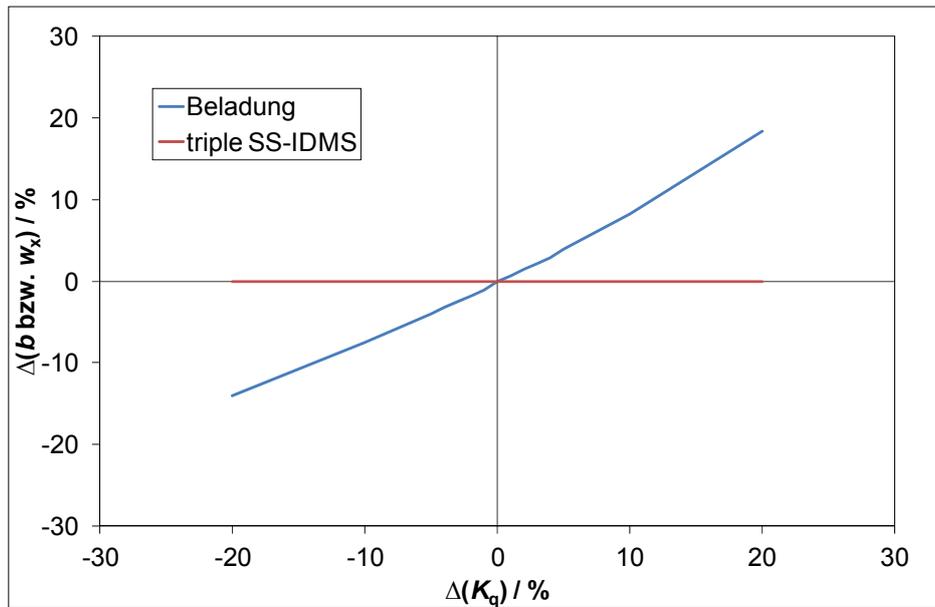
**Tabelle 21** eingehende Größen in das Unsicherheitsbudget für die gravimetrische Bestimmung des Verhältnisses zwischen Fe und Tf bei der Messung für die Beladung des Tf (Beispiel für einen Ansatz der Referenz (apo-Tf zu 31,26 %))

Symbol	Bezeichnung	Unsicherheitsbeitrag $u$
$m'_9$	Wägewert Gefäß + festes $\text{FeCl}_3$ für den Ansatz der Fe-Stammlösung	27,0 %
$m'_8$	Wägewert Gefäß für den Ansatz der Fe-Stammlösung	27,0 %
$f_{\text{purFe}}$	Reinheit des festen $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	22,5 %
$m'_5$	Wägewert Gefäß + festes Tf für den Ansatz der Tf-Stammlösung	10,0 %
$m'_{14}$	Wägewert Gefäß für den Ansatz der Tf-Stammlösung	9,8 %
$m'_3$	Wägewert Gefäß + $\text{NaHCO}_3$ + $\text{FeCl}_3$ für den Ansatz der Beladung des Tf	1,8 %
$m'_2$	Wägewert Gefäß + $\text{NaHCO}_3$ für den Ansatz der Beladung des Tf	1,6 %
$f_{\text{purTf}}$	Reinheit des festen Tf	0,3 %

In Tabelle 21 ist ein Unsicherheitsbudget für den gravimetrischen Ansatz der Lösungen zu sehen. Den größten Einfluss haben der Ansatz der  $\text{FeCl}_3$ -Lösung sowie die Reinheit des festen  $\text{FeCl}_3$ .

Die Bestimmung der Beladung des Tf erfolgte mit einer single IDMS Methode. Im Gegensatz zur double oder triple IDMS trägt der  $K$ -Faktor (über  $R_{z-K}^{\text{meas}}$ ) merklich zur gesamten Unsicherheit bei. Außerdem hat er auch starken Einfluss auf das Ergebnis der Beladung. Dies ist in Abbildung 47 dargestellt. Während bei einer fehlerhaften Bestimmung des  $K$ -Faktors das Endergebnis der triple IDMS nur gering bzw gar nicht beeinflusst wird, sind die Änderungen bei der Bestimmung der Beladung signifikant. Prozentual geht die falsche Bestimmung des  $K$ -Faktors in gleicher Größenordnung in das Endergebnis ein. Das muss vermieden werden.

Eine weitere Möglichkeit wäre, um die Quantifizierung des Tf und die Bestimmung des Beladungsgrades zu kombinieren, indem die Probe mit einem isotopisch angereicherten Fe (z.B.  $^{57}\text{Fe}$ ) vollständig gesättigt und dann post column mit einem anderen isotopisch angereicherten Fe (z. B.  $^{54}\text{Fe}$ ) quantifiziert wird. Dies wurde bereits auch schon in der Literatur beschrieben [38]. Bei diese Methode kann aber nicht auf das Exact Matching



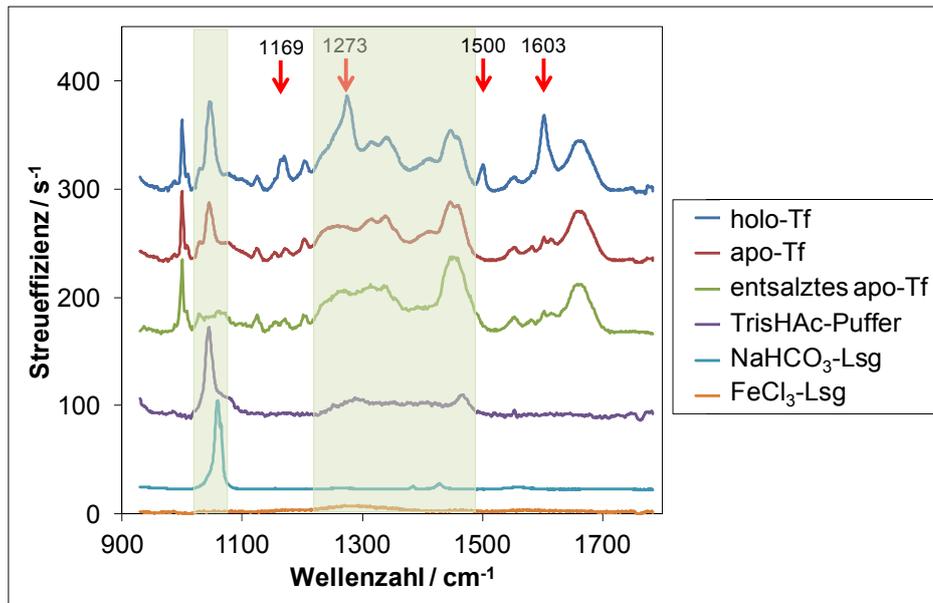
**Abbildung 47** Simulation des Einflusses eines fehlerhaft bestimmten  $K$ -Faktors auf das Endergebnis bei der Bestimmung der Beladung  $b$  des Tf mit single IDMS und des Massenanteils  $w_x$  des Tf mit triple IDMS gemessen im humanen Serum ERM-DA470k/IFCC

Prinzip oder die triple SS-IDMS zurückgegriffen werden und somit gehen die für die Metrologie essenziellen Vorteile dieser Methoden (siehe auch Kapitel 2.4 sowie 3.4.1.3 und 3.4.1.5) verloren.

## 3.5.2 Bestimmung der Beladung mit Raman-Spektroskopie

### 3.5.2.1 Probenvorbereitung

Zur Bestimmung der Beladung des Tf mit Raman-Spektroskopie musste zunächst ein Kalibriermodell erstellt werden. Dazu wurden die Lösungen, die nach Kapitel 3.5 angesetzt und mit HPLC – ICP-MS gemessen wurden, verwendet. Diese wurden zunächst 1:3 (v/v) mit Tris-HAc-Puffer verdünnt und mit 4  $\mu\text{L}$   $\text{NaHCO}_3$  versetzt, um den pH-Wert auf 8 anzuheben und somit eine Denaturierung des Proteins während des anschließenden Trocknungsprozesses zu verhindern. Ein Tropfen von 0,3  $\mu\text{L}$  dieser Lösung wurde auf einen mit 200 nm Gold beschichteten Si-Wafer mit einem 7 nm Ti-Layer gegeben und eingetrocknet. Die Ti-Schicht diente als Adhäsions-Promotor. Vor jeder Messung wurde das Raman-Spektrometer auf  $1000 \text{ cm}^{-1}$  (Phenylalanin-ring-breathing-mode) kalibriert, um eine Genauigkeit von  $0,25 \text{ cm}^{-1}$  der Wellenlänge zu erreichen. Um sicher zu stellen, dass innerhalb des Tropfens ein konstantes Fe-zu-Protein-Signal war, wurde ein line-mapping über den getrockneten Tropfen vor der

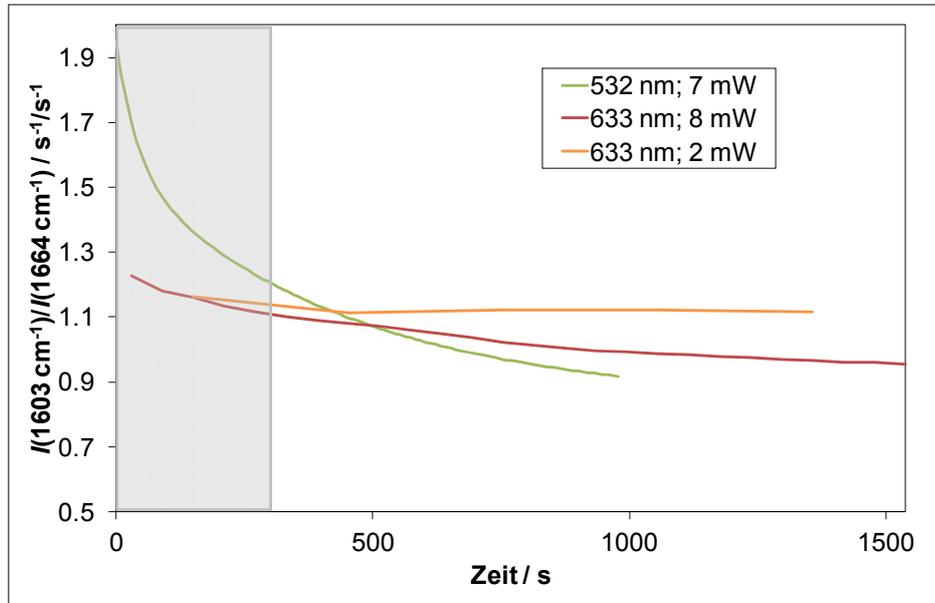


**Abbildung 48** Raman-Spektren unterschiedlicher Lösungen. Die roten Pfeile markieren die Banden, die erscheinen, wenn Fe in das Tf-Molekül eingelagert wird, die grünen Bereiche werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt [122].

eigentlichen Messung durchgeführt. Das bedeutet, dass über den Tropfen verteilt einzelne „Probemessungen“ gemacht und deren Intensitäten miteinander verglichen wurden.

### 3.5.2.2 Ausschließen von Matrixstörungen

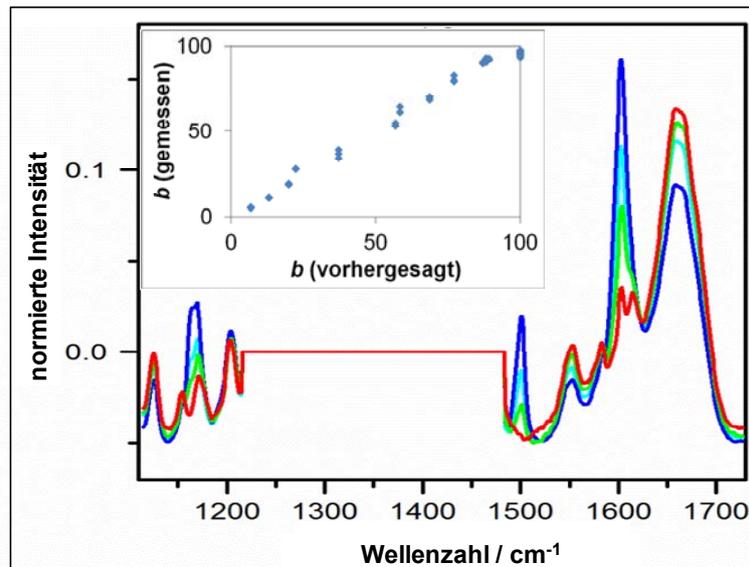
Im Vorfeld musste sichergestellt werden, dass die Matrix, also alle in dem Tropfen vorhandenen Substanzen abgesehen vom Tf, keinen Einfluss auf die Tf-Messungen hat. Dazu wurden Spektren von allen Substanzen aufgenommen, die zur Beladung des Tf und somit zur Herstellung der Kalibrierlösungen benötigt werden. In Abbildung 48 sind diese Spektren dargestellt. In der Abbildung werden die von Fe in Tf hervorgerufenen Banden, die im Spektrum erscheinen, durch rote Pfeile markiert. Die Abbildung zeigt eine apo-Tf-Lösung (rot) und eine entsalztes apo-Tf-Lösung (grün). Letztere Lösung wurde vor der Messung von dem Tris-HAc getrennt, indem sie mit Hilfe einer PD-10 Säule entsalzt und mit einem 5000 MW cut-off Zentrifugalfilter eingengt wurde. In einigen Bereichen (grün markiert) variieren diese Spektren ein wenig. Zur einfacheren Handhabung der Methode wurde auf die Entsalzung verzichtet und die Auswertung auf die Bereiche beschränkt, die keine Variationen aufwiesen.



**Abbildung 49** Verhältnis der Raman Intensitäten der Fe-induzierten holo-Tf Bande bei  $1603\text{ cm}^{-1}$  und der Amid I Bande bei  $1664\text{ cm}^{-1}$  bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge. Der graue Bereich, der 300 s Äquilibration, wurde zur Auswertung verwendet [122]

### 3.5.2.3 Photobleaching

Photobleaching, auch Quenchen genannt, ist das Ausbleichen eines Fluorophors beim Bestrahlen mit einem Anregungslicht. Dieses Phänomen tritt bei Tf auf. Die Charge Transfer Absorption des roten Fe-Tf-Komplexes bei  $\lambda_{\text{max}} = 464\text{ nm}$  wurde mit Hilfe der Resonanz Raman-Spektroskopie untersucht. Um eine quantitative Analyse durchführen zu können, muss zuvor sichergestellt werden, dass es zu keinem Photobleaching während der Aufnahme kommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde dies für den zur Verfügung stehenden grünen Laser (532 nm) und den roten Laser (633 nm) überprüft. Die Änderungen der Spektren über die Zeit sind in Abbildung 49 dargestellt. In der Abbildung ist zu erkennen, dass die Intensität, hervorgerufen durch den grünen Laser, über die Zeit stark abfällt. Bei dem roten Laser mit einer Leistung von 8 mW ist der Abfall deutlich schwächer, aber immer noch erkennbar. Wird die Leistung des Lasers auf 2 mW herabgesetzt, so stabilisiert sich das System innerhalb der ersten 300 s. Letztere Einstellungen wurden für die folgenden Messungen verwendet. Die ersten 300 s Äquilibrationzeit, in denen sich die Spektren verändern, wurden bei der Messung nicht berücksichtigt.

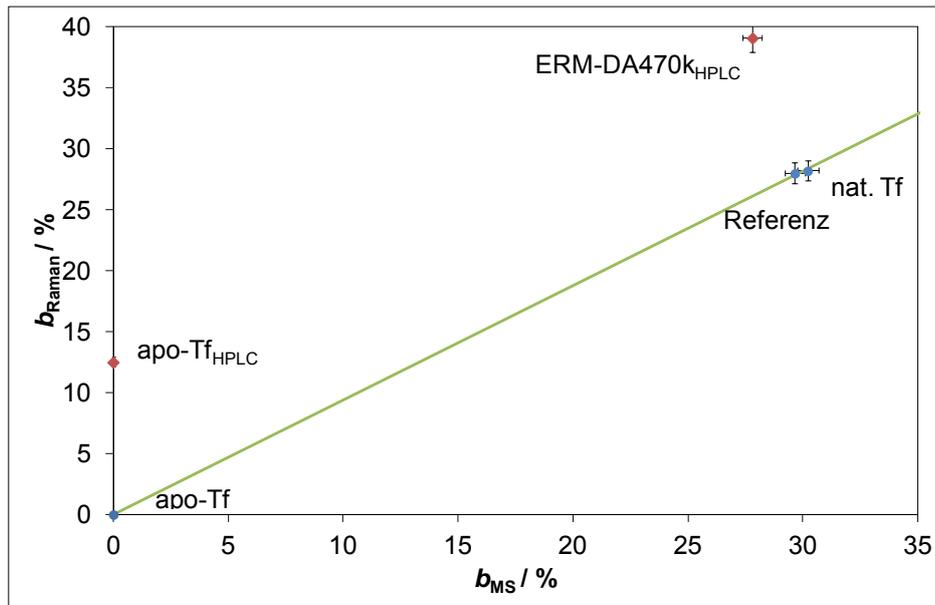


**Abbildung 50** Ausgewählte Raman-Spektren der Kalibrierlösungen mit Beladungen zwischen 0 % (rot) und 100 % (blau). Einige ausgewählte Beladungszustände zwischen 0 und 100 % sind grün dargestellt. Im kleinen Bild sind alle verwendeten Kalibrierlösungen gezeigt, die in das Kreuzvalidierungsverfahren zur Erstellung der Kalibration eingegangen sind [122].

### 3.5.2.4 Kalibrierung

Mit Hilfe der in Kapitel 3.5.2.1 hergestellten Kalibrierlösungen, die zuvor mit HPLC – ICP-MS gemessen wurden, wurde eine Kalibrierkurve für die Raman-Messungen erstellt, mit der die Beladung in einer unbekanntem isolierten Tf-Probe bestimmt werden konnte. In Abbildung 50 sind einzelne ausgewählte Spektren dargestellt. Die Banden bei  $1124\text{ cm}^{-1}$ ,  $1203\text{ cm}^{-1}$  und  $1650\text{ cm}^{-1}$  sind dem Protein zuzuordnen. Die drei Banden bei  $1169\text{ cm}^{-1}$ ,  $1500\text{ cm}^{-1}$  und  $1603\text{ cm}^{-1}$  resultieren aus der Fe-Beladung des Tf. Die Intensität der Banden nimmt linear mit dem Beladungsgrad zu. Diese Banden wurden für das Modell verwendet, indem die Spektren der Kalibrierlösungen zum Erstellen einer Kalibrierfunktion verwendet wurden (kleines Bild in Abbildung 50). Dieses Kalibriermodell ergab eine erweiterte Unsicherheit ( $k = 2$ ) von 7 %. Die vierte Bande, bei  $1273\text{ cm}^{-1}$  wurde nicht verwendet, da die Matrix auf dieser Wellenlänge interferiert.

Da die Raman-Spektroskopie für Proteine keine molekulspezifische Methode ist, da sie Gruppenschwingungen anzeigt, die in nahezu allen Proteinen vorhanden sind, müssen die zu untersuchenden Moleküle zuvor von der Serummatrix abgetrennt werden. Um das Modell auf das Tf aus dem Serum ERM-DA470k/IFCC anwenden zu können, wurde es mit Hilfe der HPLC isoliert. Dazu wurde der Probenfluss nach der Säule zwischen 8 und 18 min, in der Zeit eluiert das Tf, aufgefangen und anschließend mit einem 5000 MW cut-off Zentrifugalfilter eingengt. Die Messungen ergaben eine um 12 % höhere Beladung



**Abbildung 51** Beladung von Tf gemessen mit HPLC – ICP-MS ( $b_{MS}$ ) über die Beladung gemessen mit Raman ( $b_{Raman}$ ). Die roten Messpunkte sind Messungen, bei denen die Proben für Raman mit HPLC isoliert wurden. Die blauen Messpunkte sind wie die Kalibrierlösungen behandelt worden [122].

als die, die mit HPLC – ICP-MS bestimmt wurde (Abbildung 51). Anschließende Versuche mit apo-Tf, das auf die gleiche Weise behandelt wurde, mit einer neu passivierten HPLC und frisch gereinigter Säule, ergaben ebenfalls eine um 12 % erhöhte Beladung. Dies deutet darauf hin, dass es während der Abtrennung des Tf mit HPLC und anschließender Konzentrierung zu einer zusätzlichen Fe-Aufnahme kommt. Deshalb muss an dieser Stelle eine andere Methode verwendet werden, um das Tf von der Serummatrix zu trennen, was mit Gelelektrophorese möglich wäre. Um das entwickelte Kalibriermodell dennoch zu validieren, wurde ein kommerziell erhältliches natürlich beladenes Tf analysiert. Dies wurde laut Herstellerangaben durch Gelelektrophorese vom Serum getrennt. Diese Probe konnte ohne die vorherige Isolation mit Hilfe der HPLC direkt für die Raman-Messungen verwendet werden. Die Ergebnisse der Messungen mit HPLC – ICP-MS und mit Raman-Spektroskopie sind in Tabelle 22 gegenübergestellt. Die Beladung bestimmt mit Raman-Spektroskopie von  $b_{Raman} = (28,2 \pm 2,0) \%$  stimmt gut mit der gemessenen mit HPLC – ICP-MS von  $b_{MS} = (30,2 \pm 1,2) \%$  überein.

Die zusätzliche Fe-Aufnahme des unvollständig beladenen Tf bei der Isolierung mit HPLC macht diese Methode jedoch nicht praktikabel für die Bestimmung der Beladung mit Raman-Spektroskopie. Dies ist für die Messungen mit HPLC – ICP-MS allerdings ohne Bedeutung, da das Tf sowohl bei den Messungen für die Quantifizierung als auch für die Beladung immer vollständig gesättigt auf die Säule aufgetragen wird und somit kein weiteres Fe aufnehmen kann.

**Tabelle 22** Beladung von Tf gemessen mit HPLC – ICP-MS im Vergleich mit Raman

	<b>HPLC – ICP-MS / %</b>	<b>Raman / %</b>
		Tf mit HPLC isoliert
<b>apo-Tf</b>	(0,120 ± 0,029)	(12,5 ± 0,4)
<b>ERM-DA470k</b>	(27,8 ± 1,1)	(36,2 ± 1,1)
		Tf ohne Isolierung gemessen
<b>apo-Tf</b>	(0,120 ± 0,029)	0
<b>Referenz</b>	(29,64 ± 0,36)	(28,0 ± 0,4)
<b>nat. human Tf</b>	(30,20 ± 1,20)	(28,2 ± 0,9)

### 3.6 Unsicherheitbudgets

Für eine primäre Referenzmethode müssen die Ergebnisse auf die SI-Einheiten zurückführbar sein und es müssen vollständige Unsicherheitsbudgets erstellt werden, die alle bekannten Unsicherheiten der Probenvorbereitung und Messung einschließen. An dieser Stelle soll das Unsicherheitsbudget für die Messung mit triple SS-IDMS beispielhaft genauer betrachtet werden.

Zunächst müssen die Modellgleichungen aufgestellt werden. Als Ausgangsgleichung dient die Gleichung der triple IDMS (Gleichung 12). Die genaue Definition der einzelnen Größen und deren Einheiten sind nachfolgend in Tabelle 23 angegeben:

Zunächst benötigt man die Gleichung für die triple IDMS (Gleichung 12):

$$w_x = w_z \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{1}{R_x - R_{bx}} \left[ \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{R_{bz2} - R_{bx}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot (R_x - R_{bz1}) + \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{R_{bx} - R_{bz1}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot (R_x - R_{bz2}) \right]$$

Die Isotopenverhältnisse  $R_x$  und  $R_z$  sind über die Stoffmengenanteile  $x(^{57}\text{Fe})$  definiert. Bei Probe und Referenz handelt es sich um Fe mit natürlicher isotopischer Zusammensetzung:

$$R_x = \frac{x(^{57}\text{Fe})}{x(^{56}\text{Fe})} \quad (35)$$

$$R_z = R_x \quad (36)$$

Der  $K_{57}$ -Faktor für das ICP-MS wird berechnet aus dem gemessenen Isotopenverhältnis einer natürlichen Fe-Referenz  $R_{z-K}^{\text{meas}}$  und dem „wahren“ natürlichen Isotopenverhältnis (nach IUPAC):

$$K_{57} = \frac{R_z}{R_{z-K}^{\text{meas}}} \quad (37)$$

Für die Berechnung des „wahren“ Isotopenverhältnisses des Fe in der Mischung bx aus Probe x und Spike y wird das gemessene Isotopenverhältnis mit dem  $K$ -Faktor multipliziert:

$$R_{bx} = K_{57} \cdot R_{bx}^{\text{meas}} \quad (38)$$

Analog dazu werden auch die „wahren“ Isotopenverhältnisse des Fe in den Mischungen bz1 und bz2 aus Referenz z und Spike y berechnet:

$$R_{bz1} = K_{57} \cdot R_{bz1}^{meas} \quad (39)$$

$$R_{bz2} = K_{57} \cdot R_{bz2}^{meas} \quad (40)$$

Der Massenanteil der apo-Tf-Stammlösung  $w_{zStamm}$  berechnet sich aus der Reinheit des Tf  $f_{pur}$ , den Massen  $m$  des apo Tf, der fertigen Lösung und einem stöchiometrischen Umrechnungsfaktor. Die Massen sind mit einem Luftauftriebskorrekturfaktor  $K_i$  behaftet, der auf die Wägewerte  $m'$  angewendet wird. Der Luftauftrieb ist abhängig vom Luftdruck  $p$  der Lufttemperatur  $\vartheta$  und der Luftfeuchte  $\varphi$ :

$$w_{zStamm} = f_M \cdot f_{pur} \cdot \frac{m_{apo}}{m_{Lsg}} \quad (41)$$

$$m_{apo} = K_{apo} \cdot (m'_2 - m'_1) \quad (42)$$

$$m_{Lsg} = K_{Lsg} \cdot (m'_3 - m'_1)$$

$$K_{apo} = \frac{\frac{1 - \rho_{air1}}{8000}}{\rho_{apo}} \quad (43)$$

$$K_{Lsg} = \frac{\frac{1 - \rho_{air1}}{8000}}{\rho_{Lsg}} \quad (44)$$

$$\rho_{air1} = \frac{0,34844 \cdot p_1 - \varphi_1 \cdot (0,252 \cdot \vartheta_1 - 2,0582)}{273,15 + \vartheta_1} \quad (45)$$

Analog dazu berechnet sich der Massenanteil  $w_{z1}$  der Verdünnung der apo-Tf-Stammlösung inklusive der dazugehörigen Luftauftriebskorrektur:

$$w_{z1} = w_{zStamm} \cdot \frac{m_{Stamm}}{m_{Verd1}} \quad (46)$$

$$m_{Stamm} = K_{Lsg2} \cdot (m'_5 - m'_4) \quad (47)$$

$$m_{Verd1} = K_{Verd1} \cdot (m'_6 - m'_4) \quad (48)$$

$$K_{Lsg2} = \frac{\frac{1 - \rho_{air2}}{8000}}{\rho_{Lsg}} \quad (49)$$

$$K_{\text{Verd1}} = \frac{\frac{1 - \rho_{\text{air2}}}{8000}}{\frac{1 - \rho_{\text{air2}}}{\rho_{\text{Verd1}}}} \quad (50)$$

$$\rho_{\text{air2}} = \frac{0,34844 \cdot p_2 - \varphi_2 \cdot (0,252 \cdot g_2 - 2,0582)}{273,15 + g_2} \quad (51)$$

In die Berechnung des Massenanteils  $w_z$  an Tf in der abgesättigten Referenzlösung z gehen der Massenanteil und die Masse der verdünnten apo-Tf-Lösung sowie die Masse der fertigen Referenzlösung ein; da die Lösungen die gleiche Dichte besitzen, kann der gleiche  $K$ -Faktor verwendet werden:

$$w_z = w_{z1} \cdot \frac{m_{z\text{Verd1}}}{m_{\text{abs}}} \quad (52)$$

$$m_{z\text{Verd1}} = K_{z\text{Verd1}} \cdot (m'_9 - m'_8) \quad (53)$$

$$m_{\text{abs}} = K_{z\text{Verd1}} \cdot (m'_9 - m'_7) \quad (54)$$

$$K_{z\text{Verd1}} = \frac{\frac{1 - \rho_{\text{air3}}}{8000}}{\frac{1 - \rho_{\text{air3}}}{\rho_{z\text{Verd1}}}} \quad (55)$$

$$\rho_{\text{air3}} = \frac{0,34844 \cdot p_3 - \varphi_3 \cdot (0,252 \cdot g_3 - 2,0582)}{273,15 + g_3} \quad (56)$$

Die Berechnung der Einwaage der Probe x für die Mischung bx ist abhängig von der Masse des Serums, des abgesättigten Serums und der Masse des verwendeten abgesättigten Serums:

$$m_x = \frac{m_{\text{Serum}}}{m_{\text{Serum}}^{\text{abs}}} \cdot m_x^{\text{virt}} \quad (57)$$

wobei  $m_x^{\text{virt}}$  für eine Einwaage steht, die nicht direkt eingewogen wurde.

$$m_{\text{Serum}} = K_{\text{Serum}} \cdot (m'_{12} - m'_{11}) \quad (58)$$

$$m_{\text{Serum}}^{\text{abs}} = K_{\text{Verd1}} \cdot (m'_{12} - m'_{10}) \quad (59)$$

$$m_x^{\text{virt}} = K_{\text{Verd1}} \cdot (m_{14} - m_{13}) \quad (60)$$

$$K_{\text{Serum}} = \frac{\frac{1 - \rho_{\text{air4}}}{8000}}{\frac{1 - \rho_{\text{air4}}}{\rho_{\text{Serum}}}} \quad (61)$$

$$\rho_{air4} = \frac{0,34844 \cdot p_4 - \varphi_4 \cdot (0,252 \cdot \vartheta_4 - 2,0582)}{273,15 + \vartheta_4} \quad (62)$$

Berechnung der Einwaagen der Referenzen z für die Mischungen bz1 und bz2 inklusive Luftauftrieb. Die Luftdichte ist die gleiche wie für die Einwaage der Probe:

$$m_{z1} = K_z \cdot (m'_{16} - m'_{15}) \quad (63)$$

$$m_{z2} = K_z \cdot (m'_{18} - m'_{17}) \quad (64)$$

$$K_z = \frac{\frac{1 - \rho_{air4}}{8000}}{\frac{1 - \rho_{air4}}{\rho_z}} \quad (65)$$

Analog werden die Einwaagen der Spikelösung berechnet. Es kann der gleiche K-Faktor der Einwaage der Referenz verwendet werden:

$$m_{yx} = K_z \cdot (m'_{19} - m'_{14}) \quad (66)$$

$$m_{yz1} = K_z \cdot (m'_{20} - m'_{16}) \quad (67)$$

$$m_{yz2} = K_z \cdot (m'_{21} - m'_{18}) \quad (68)$$

**Tabelle 23** Liste der verwendeten Größen aus dem Unsicherheitbudget für die triple SS-IDMS

Größe	Einheit	Definition
$f_M$	g/kg	Umrechnungsfaktor von g/g in g/kg
$f_{pur}$	g/g	Reinheit des festen apo-Tf
$K_{57}$	1	Korrekturfaktor für die gemessenen Isotopenverhältnisse $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$
$K_{Lsg2}$	g/g	Auftriebskorrekturfaktor der Stammlösung zum Zeitpunkt der Verdünnung
$K_{Verd1}$	g/g	Auftriebskorrekturfaktor von Tris-HAc-Puffer
$K_{apo}$	g/g	Auftriebskorrekturfaktor von festem apo-Tf
$K_{Lsg}$	g/g	Auftriebskorrekturfaktor der Stammlösung
$K_{Serum}$	g/g	Auftriebskorrekturfaktor des Serums
$K_z$	g/g	Auftriebskorrekturfaktor der Referenzlösung z zum Zeitpunkt des Ansatzes der Mischung bz
$K_{zVerd1}$	g/g	Auftriebskorrekturfaktor der Referenzlösung z zum Zeitpunkt der Absättigung
$m_{abs}$	g	Masse der abgesättigten Lösung

Größe	Einheit	Definition
$m_{apo}$	g	Einwaage des festen apo-Tf
$m_{Lsg}$	g	Masse der Stammlösung
$m_{Serum}$	g	Masse Serum zur Absättigung
$m_{Stamm}$	g	Masse der Stammlösung in der Verdünnung
$m_{Verd1}$	g	Masse der verdünnten Lösung
$m_x$	g	Einwaage der Serumprobe x in der Mischung bx
$m_{yx}$	g	Einwaage der Spikelösung y in der Mischung bx
$m_{yz1}$	g	Einwaage des Spikes y in der Mischung bz1 aus Referenz z und Spike y
$m_{yz2}$	g	Einwaage des Spikes y in der Mischung bz2 aus Referenz z und Spike y
$m_{z1}$	g	Einwaage der Referenz z in der Mischung bz1 aus Referenz z und Spike y
$m_{z2}$	g	Einwaage der Referenz z in der Mischung bz2 aus Referenz z und Spike y
$m_{zVerd1}$	g	Masse der Verdünnung zur Absättigung
$m_{Serum}^{abs}$	g	Masse des abgesättigten Serums
$m_x^{virt}$	g	Masse des abgesättigten Serums in der Mischung bx aus Probe x und Spike y
$m'_1$	g	Wägewert einer 20 mL PFA-Flasche, leer
$m'_2$	g	Wägewert der 20 mL PFA-Flasche mit festem apo-Tf
$m'_3$	g	Wägewert der 20 mL PFA-Flasche mit fertiger apo-Tf Stammlösung
$m'_4$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 1, leer
$m'_5$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 1 mit Stammlösung
$m'_6$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 1 mit verdünnter Tf-Lösung
$m'_7$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 2, leer
$m'_8$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 2 mit Zutaten zur Absättigung ohne apo-Tf
$m'_9$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 2 mit abgesättigter Verdünnung
$m'_{10}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 3, leer
$m'_{11}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 3 mit Absättigungszutaten ohne Serum
$m'_{12}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 3 mit abgesättigtem Serum
$m'_{13}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 4, leer
$m'_{14}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 4 mit abgesättigtem Serum

Größe	Einheit	Definition
		für Mischung bx aus Probe x und Spike y
$m'_{15}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 5, leer
$m'_{16}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 5 mit abgesättigter Referenz z für Mischung bz1 aus Referenz z und Spike y
$m'_{17}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 6, leer
$m'_{18}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 6 mit abgesättigter Referenz z für Mischung bz2 aus Referenz z und Spike y
$m'_{19}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 4 mit Mischung bx aus Probe x und Spike y
$m'_{20}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 5 mit Mischung bz1 aus Referenz z und Spike y
$m'_{21}$	g	Wägewert des 1,5 mL Eppendorf Tube 6 mit Mischung bz2 aus Referenz z und Spike y
$p_1$	hPa	Luftdruck beim Ansetzen der Stammlösung
$p_2$	hPa	Luftdruck beim Ansetzen des IDMS-Experimentes
$R_{bx}$	$s^{-1}/s^{-1}$	Signalverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bx aus Probe x und Spike y (Q-ICP-MS)
$R_{bz1}$	$s^{-1}/s^{-1}$	Signalverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bz1 aus Referenz z und Spike y (Q-ICP-MS)
$R_{bz2}$	$s^{-1}/s^{-1}$	Signalverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bz2 aus Referenz z und Spike y (Q-ICP-MS)
$R_x$	$s^{-1}/s^{-1}$	Signalverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Probe x (IUPAC)
$R_{bx}^{\text{meas}}$	$s^{-1}/s^{-1}$	gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bx aus Probe x und Spike y (Q-ICP-MS)
$R_{bz1}^{\text{meas}}$	$s^{-1}/s^{-1}$	gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bz1 aus Referenz z und Spike y (Q-ICP-MS)
$R_{bz2}^{\text{meas}}$	$s^{-1}/s^{-1}$	gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ in der Mischung bz2 aus Referenz z und Spike y (Q-ICP-MS)
$R_{z-K}^{\text{meas}}$	$s^{-1}/s^{-1}$	gemessenes Isotopenverhältnis $I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ im natürlichen Fe-Referenzmaterial (Q-ICP-MS)
$w_x$	g/kg	Massenanteil Tf in der Serumprobe x
$w_z$	g/kg	Massenanteil Tf in apo-Tf-Lösung (Referenz z), abgesättigte Verdünnung
$w_{z1}$	g/kg	Massenanteil apo-Tf
$w_{z\text{Stamm}}$	g/kg	Massenanteil apo-Tf in der Stammlösung
$X_{56}$	mol/mol	Stoffmengenanteil $x(^{56}\text{Fe})$ in nat. Fe (IUPAC)

Größe	Einheit	Definition
$x_{57}$	mol/mol	Stoffmengenanteil $x(^{57}\text{Fe})$ in nat. Fe (IUPAC)
$\rho_{\text{air1}}$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte der Luft beim Ansetzen der Stammlösung
$\rho_{\text{air2}}$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte der Luft beim Ansetzen der verdünnten apo-Tf-Lösung
$\rho_{\text{air3}}$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte der Luft beim Ansetzen der gesättigten Tf-Lösung
$\rho_{\text{air4}}$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte der Luft beim Ansetzen des IDMS-Experimentes
$\rho_{\text{apo}}$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte des festen apo-Tf
$\rho_{\text{Lsg}}$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte der Stammlösung
$\rho_{\text{Serum}}$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte des Serums
$\rho_{\text{Verd1}}$	kg/m <sup>3</sup>	Dichte des Tris-HAc-Puffers
$\varphi_1$	1	Luftfeuchte beim Ansetzen der Stammlösung
$\varphi_2$	1	Luftfeuchte beim Ansetzen der verdünnten apo-Tf-Lösung
$\varphi_3$	1	Luftfeuchte beim Ansetzen der gesättigten Tf-Lösung
$\varphi_4$	1	Luftfeuchte beim Ansetzen des IDMS-Experimentes
$\vartheta_1$	°C	Lufttemperatur beim Ansetzen der Stammlösung
$\vartheta_2$	°C	Lufttemperatur beim Ansetzen der verdünnten apo-Tf-Lösung
$\vartheta_3$	°C	Lufttemperatur beim Ansetzen der gesättigten Tf-Lösung
$\vartheta_4$	°C	Lufttemperatur beim Ansetzen des IDMS-Experimentes

Für die einzelnen Größen wurden unterschiedliche Annahmen bezüglich der Unsicherheiten gemacht. Diese sind in Tabelle 24 zusammengefasst. Unsicherheiten des Typs A können mit mathematisch statistischen Methoden berechnet werden, wie zum Beispiel die Standardabweichung bei Mehrfachmessungen. Beim Typ B sind Mehrfachmessungen nicht möglich. Daher stammen die Messunsicherheiten aus anderen Quellen wie zum Beispiel Herstellerangaben oder Spezifikationen.

**Tabelle 24** Angaben zur Berechnung des Unsicherheitsbudgets

Größe	Angaben
$f_M$	Konstante Wert
$f_{\text{pur}}$	Typ B Rechteckverteilung Wert Halbbreite der Grenzen
$m'$	Typ B Normalverteilung Wert in g erweiterte Messunsicherheit in g Erweiterungsfaktor

Größe	Angaben
$R$	Typ A zusammengefasst Mittelwert in $s^{-1}/s^{-1}$ Standardmessunsicherheit in % Freiheitsgrade
$x$	Typ B Normalverteilung Wert in mol/mol erweiterte Messunsicherheit in mol/mol Erweiterungsfaktor 2
$p$	Typ B Normalverteilung Wert in hPa erweiterte Messunsicherheit in hPa Erweiterungsfaktor
$\rho$	Typ B Rechteckverteilung Wert in $kg/m^3$ Halbbreite in den Grenzen in %
$\varphi$	Typ B Normalverteilung Wert erweiterte Messunsicherheit Erweiterungsfaktor
$\vartheta$	Typ B Normalverteilung Wert in $^{\circ}C$ erweiterte Messunsicherheit in $^{\circ}C$ Erweiterungsfaktor

Aus diesen Angaben wird ein Budget erstellt, aus dem hervorgeht, zu welchem Anteil die Unsicherheiten der einzelnen Größen in das Gesamtbudget eingehen. In Tabelle 18 (Kapitel 3.4.1.5) sind die Größen, die einen Einfluss  $> 0,1\%$  für die triple IDMS haben, zusammengefasst.

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden rückführbare Methoden entwickelt, die Konzentrationen für Transferrin (Tf) mit höchster Genauigkeit zu messen und den Fe-Beladungsgrad des Tf im Serum zu bestimmen. Als geeignet dafür erwies sich die Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (IDMS), die durch die Entwicklung einer Resonanz-Raman Methode zum Nachweis der Beladung des Tf ergänzt werden konnte.

In der Literatur ist bereits die Quantifizierung des Tf mit IDMS beschrieben [112, 121]. Darin zeigt sich auch das Potenzial dieser Methode, jedoch wurde dies bisher nur mit volumetrischer Probenpräparation und ohne Aufstellung eines vollständigen Unsicherheitsbudgets durchgeführt. In dieser Arbeit wurde das bisherige Verfahren auf den in der Metrologie üblichen gravimetrischen Ansatz gebracht, um die Unsicherheiten zu minimieren. Außerdem fanden das Exact Matching Prinzip und die Methode der triple SS-IDMS Anwendung, die besonders genaue Messergebnisse erwarten lassen, was besonders für die metrologische Anwendung von Bedeutung ist.

Ausgehend von bereits bestehenden Verfahren zur chromatographischen Trennung von Tf aus humanem Serum und anschließender elementspezifischer Detektion des Fe zur Quantifizierung des Tf wurde eine IDMS Methode entwickelt, die als primäres Referenzverfahren dienen kann. Zur Isolierung des Tf aus der Serummatrix mit HPLC wurden verschiedene Säulenmaterialien, Eluenten und Gradienten untersucht. Für die elementspezifische Detektion mit ICP-MS wurden unterschiedliche Zerstäuber verwendet und Versuche zu Matrixanpassungen über den HPLC-Gradienten (gegenläufiger post-column Gradient) durchgeführt. Mit Hilfe der in dieser Arbeit entwickelten und

**Tabelle 25** Ergebnisse zu den Bestimmungen des Gehaltes von Tf im Serum ERM-DA470k/IFCC

PC-IDMS	SS-IDMS		
double / g/kg	double / g/kg	triple g/kg	Zertifikat g/kg
(2,36 ± 0,13)	(2,317 ± 0,092)	(2,426 ± 0,086)	(2,41 ± 0,08)

beschriebenen Methoden konnte Tf auf unterschiedliche Weise mit IDMS quantifiziert und die entsprechenden kompletten Unsicherheitsbudgets nach dem „Guide of the Expression of Uncertainty in Measurement“ (GUM) aufgestellt werden.

Auch andere Aspekte wurden überprüft. So wurden die bekannten Verfahren zur Sättigung des Tf optimiert. Außerdem wurden Versuche zur Anpassung der Matrix der Spike- und Referenzlösungen an die des Serums sowie Untersuchungen zur Reinheit und Stabilität des Tf durchgeführt. Dies diente dazu, ein möglichst vollständiges Unsicherheitsbudget für das primäre Messverfahren zu erhalten.

Die Quantifizierung erfolgte sowohl über post-column IDMS (PC-IDMS), als auch über spezies-spezifische IDMS (SS-IDMS) in Verbindung mit dem Exact Matching Prinzip. Bei der PC-IDMS wurde isotopisch angereichertes Fe nach der chromatographischen Trennung kontinuierlich mit gravimetrischer Überwachung des Probenflusses zur Quantifizierung mit ICP-MS zugegeben. Die Experimente für die PC-IDMS wurden als double IDMS Experimente, also mit einer zusätzlichen Referenzlösung, durchgeführt. Für die SS-IDMS wurde ein spezies spezifischer Spike in vitro hergestellt und am Anfang der Probenvorbereitung zur Probe zugegeben. Dies geschah ebenfalls mit dem double IDMS Verfahren und zusätzlich mit der in der Speziesanalytik erstmals eingesetzten Methode der triple IDMS, bei der eine weitere Referenz-Spike-Mischung verwendet wird. In Tabelle 25 sind noch einmal die wichtigsten Ergebnisse für alle Verfahren für das humane auf Tf zertifizierte Serum ERM-DA470k/IFCC zusammengefasst.

Es erwies sich, dass alle drei hier erprobten Methoden als primäre Methoden geeignet sind und auch vollständige Unsicherheitsbudgets dafür erstellt werden konnten. Zum ersten Mal in der Speziesanalytik fand die triple SS-IDMS Anwendung, die sich als genaueste Methode im Vergleich zu den anderen hier verwendeten herausstellte. Es zeigte sich, dass trotz des damit verbundenen Messaufwands für die Referenz-Spike-Mischung keine nennenswert längere Gesamtmesszeit resultiert, da die Isotopenverteilung des Spikes nicht mehr bestimmt werden muss und somit an anderer Stelle Messzeit eingespart wird.

**Tabelle 26** Beladung des Serums ERM-DA470k/IFCC und eines natürlichen humanen Tf mit Fe

	ICP-MS / %	Resonanz-Raman / %
<b>ERM-DA470k</b>	(27,8 ± 1,1)	(36,2 ± 2,5)
<b>nat. Tf</b>	(30,20 ± 1,20)	(28,2 ± 2,0)

Gerade wenn nur Spikematerialien mit geringer isotopischer Anreicherung erhältlich sind, ist die triple SS-IDMS manchmal die einzige Alternative für rückführbare Ergebnisse. Auch eignet sie sich zum Auffinden systematischer Fehler bei der Bestimmung der Isotopenverteilung im Spike-Material. Diese Methode wird den hohen metrologischen Anforderungen am ehesten gerecht.

Für die Bestimmung des Beladungsgrades des Tf wurde ebenfalls ausgehend von der HPLC – ICP-MS Methode eine primäre Methode entwickelt. Hier wurde mit single IDMS gearbeitet. Dazu wurde ein partiell beladenes Tf mit einem <sup>57</sup>Fe angereicherten Fe vollständig gesättigt und die ursprüngliche Beladung über das Isotopenverhältnis berechnet. Dabei wurde eine lineare Korrelation zwischen dem zugegebenen Fe zu einer apo-Tf-Lösung und der Fe-Aufnahme in das Protein beobachtet. Eine vollständige Beladung des Tf konnte allerdings erst bei einem Fe-Überschuss von 9 % beobachtet werden.

Die Ergebnisse der Beladung für das Serum ERM-DA470k/IFCC und für ein natürliches humanes Tf entsprachen dem aus der Literatur für gesunde Menschen bekannten 20 – 30 %.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde eine weitere Methode zur Bestimmung der Beladung mit der Resonanz-Raman Spektrometrie entwickelt. Die Schwingungsbanden, die mit dem in Tf gebundenen Fe in Verbindung stehen, konnten zur Bestimmung der Beladung verwendet werden, nachdem ein mögliches Photobleaching ausgeschlossen wurde. Die Isolierung für unvollständig beladenes Tf aus dem Serum mit Hilfe der HPLC stellte sich als nicht geeignet heraus, da es während der Präparation Fe akkumuliert. Dennoch war es möglich, ein Kalibriermodell zu entwickeln und auf ein natürliches humanes Tf, welches laut Herstellerangaben durch Gelelektrophorese isoliert wurde, anwenden. Die wichtigsten Ergebnisse sind in Tabelle 26 noch einmal zusammengefasst. Die berechneten Unsicherheiten sind erweiterte Unsicherheiten von  $U_{\text{rel}} = 4 \%$  mit einem Erweiterungsfaktor von  $k = 2,3$  für die ICP-MS Methode und  $U_{\text{rel}} = 7 \%$  mit  $k = 2$  für die Resonanz-Raman Methode.

Die Bestimmung des Beladungsgrades mit IDMS ist ebenfalls in der Literatur zu finden [38]. Aber auch dafür wurden zum ersten Mal Unsicherheitsbudgets aufgestellt und der Ansatz gravimetrisch präpariert.

Auch die Raman-Spektroskopie wird in der Literatur erwähnt [100]. Jedoch konnte der Beladungsgrad von Tf damit bisher nicht bestimmt werden, möglich war lediglich eine qualitative Aussage über das Vorhandensein des Tf.

Mit den in dieser Arbeit entwickelten primären Methoden kann die Quantifizierung und Beladung von Tf mit einer erheblich höheren Genauigkeit und Richtigkeit bestimmt werden, als es mit den bisherigen Verfahren möglich ist. Sie eignen sich auch für eine Übertragung auf andere Metalloproteine, die mit einem Anteil von ca. 30 % an den gesamten Proteinen wichtige Funktionen im menschlichen Körper übernehmen.

Im Jahr 2012 hat ein neues Projekt der europäischen Metrologieinstitute (EMRP, European Metrology Research Programme) im Bereich Gesundheit (HLT05) begonnen, an dem auch die PTB beteiligt ist. Das Prinzip der SS-IDMS wird darin als Grundlage auch für die Bestimmung anderer Metalloproteine verwendet, so zum Beispiel zur Quantifizierung von Hämoglobin, in dem die Häm-Gruppen des Moleküls mit isotopisch angereichertem Fe ausgetauscht werden sollen. Des Weiteren kommt es auch zum Einsatz zur Bestimmung des Gehalts an Superoxiddismutase im Blutserum über das darin enthaltene Cu oder Zn [123].

## 5 Literaturverzeichnis

- [1] F. Cecillani und A. S. V. Giordano, „The systemic Reaction during inflammation: The acute-phase proteins,“ *Proteine and Peptide Letters*, Bd. 9, Nr. 3, pp. 211-223, 2002.
- [2] C. Gabay und I. Kushner, „Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation,“ *The New England Journal of Medicine*, Bd. 340, Nr. 6, pp. 448-454, 1999.
- [3] I. De Domenico, D. McVey Ward und J. Kaplan, „Regulation of iron acquisition and storage: consequences for iron-linked disorders,“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Bd. 9, Nr. 1, pp. 72-81, 2008.
- [4] E. D. Weinberg, „The hazards of iron loading,“ *Metallomics*, Bd. 2, Nr. 11, pp. 732-740, 2010.
- [5] T. Arndt, „Carbohydrate-deficient Transferrin as a Marker of Chronic Alcohol Abuse: A Critical Review of Preanalysis, Analysis, and Interpretation,“ *Clinical Chemistry*, Bd. 47, Nr. 1, pp. 13-27, 2001.
- [6] E. Quintana, A. Navarro-Sastre, J. M. Hernández-Pérez, J. García-Villoria, R. Montero, R. Artuch, A. Ribes und P. Briones, „Screening for congenital disorders of glycosylation (CDG): Transferrin HPLC versus isoelectric focusing (IEF),“ *Clinical Biochemistry*, Bd. 42, Nr. 4-5, pp. 408-415, 2009.
- [7] Bundesärztekammer, „Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung labormedizinischer Untersuchungen,“ *Deutsches Ärzteblatt*, Bd. 12, 2010.

- [8] A. Helander, G. Eriksson, H. Stibler und J.-O. Jeppson, „Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse,“ *Clinical Chemistry*, Bd. 47, Nr. 7, pp. 1225-1233, 2001.
- [9] L. Wu, J. Wu, J. Zhang, Y. Zhou, G. Ren und Y. Hu, „A simple method for obtaining transferrins in human plasma and porcine serum: Preparations and properties,“ *Journal of Chromatography B*, Bd. 867, Nr. 1, pp. 62-68, 2008.
- [10] L. Aubailly, A.-S. Drucbert, P.-M. Danzé und G. Forzy, „Comparison of surface plasmon resonance transferrin quantification with a common immunoturbidimetric method,“ *Clinical Biochemistry*, Bd. 44, Nr. 8-9, pp. 731-735, 2011.
- [11] T. Makino, K. Nakamura und K. Takahara, „A high-performance liquid immunoaffinity chromatography method for determining transferrin-bound iron in serum,“ *Clinica Chimica Acta*, Bd. 412, Nr. 11-12, pp. 914-919, 2011.
- [12] E. Fraenkel, G. Szabó, G. Lengyel, P. Jarčuška, I. Lazúrová, E. Dinya und J. Fehér, „Carbohydrate-deficient transferrin, a sensitive biomarker and diagnostic parameter in non-alcoholic fatty liver,“ *Clinical and Experimental Medical Journal*, Bd. 3, Nr. 3, pp. 479-486, 2009.
- [13] A. Helander, M. Fors und B. Zarkisson, „Study of Axis–Shield New %CDT Immunoassay for Quantification of Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT) in Serum,“ *Alcohol and Alcoholism*, Bd. 371, Nr. 1-2, pp. 187-190, 2001.
- [14] RfB, „Referenzinstitut für Bioanalytik,“ [Online]. Available: <http://www.dgkl-rfb.de/>. [Zugriff am 27. 07. 2012].
- [15] R. S. Porter und J. L. Kaplan, *The Merck Manual of Diagnosis and Therapie*, Bd. 19th, Whitehouse Station, NJ: Merck Sharp and Dohme Corp., 2011.
- [16] M. D. Fleming, „Congenital sideroblastic anemias: iron and heme lost in mitochondrial translation,“ *Hematology*, Bd. 2011, Nr. 1, pp. 525-531, 2011.
- [17] R. Pavelka, W. Linkesch und E. Kofler, „Hematologic parameters and iron state in the perinatal period,“ *Gynecology and Obstetrics*, Bd. 230, pp. 275-281, 1981.
- [18] D. m. O. Hagemann, „Laborlexikon, e-Journal für Labormedizin,“ medweb24 GmbH, 22. 07. 2011. [Online]. Available: <http://www.laborlexikon.de>. [Zugriff am 22. 07. 2012].
- [19] I. Kasvosve und J. Delanghe, „Total iron binding capacity and transferrin concentration in the assessment of iron status,“ *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, Bd. 40, Nr. 10, pp. 1014-1018, 2002.
- [20] K. Lauber, „Bestimmung von Serumeisen und Eisenbindungskapazität ohne Enteiweißung,“ *Zeitschrift für klinische Chemie*, Bd. 3, pp. 96-99, 1965.

- [21] E. Deggau, F. Kröhnke, K. E. Schnalke, H. J. Staudinger und W. Weis, „A routine method for the determination of serum iron,“ *Zeitschrift für klinische Chemie und klinische Biochemie*, Nr. 3, pp. 102-103, 1965.
- [22] D. Stamm, H. J. Staudinger und W. Weis, „Mikrolitermethode zur Bestimmung von Serum-Eisen,“ *Zeitschrift für klinische Chemie*, Bd. 4, pp. 222-224, 1966.
- [23] BIPM, „Consultative Committee for Amount of Substances (CCQM). Report of the 4th Meeting,“ 1998.
- [24] O. Rienitz, Dissertation: Entwicklung chemisch analytischer Primärmethoden zur Bestimmung physiologisch relevanter anorganischer Bestandteile in Humanserum, Berlin / Braunschweig: TU Berlin, 2001.
- [25] Deutsches Institut für Normung, Internationales Wörterbuch der Metrologie, D. I. f. Normung, Hrsg., Berlin: Beuth Verlag GmbH, 1994.
- [26] P. De Bièvre, K. Mayer und P. D. P. Taylor, „Traceability of Reference Materials and Reference Measurements: Blessing or Burden?,“ *Esarda Bulletin*, Bd. 27, pp. 38-43, 1996.
- [27] PTB, Hrsg., Die SI-Einheiten, Definition, Entwicklung, Realisierung, Braunschweig: Physikalisch-Technische Bundesanstalt, 1997.
- [28] W. Kessel, Messunsicherheit und Methoden ihrer Berechnung, Braunschweig: Physikalisch-Technische Bundesanstalt, 1998.
- [29] P. De Bièvre, K. Mayer und P. D. P. Taylor, „Traceability to the SI amount-of-substance measurements: from ignoring to realizing, a chemist's view,“ *Metrologia*, Bd. 34, pp. 67-75, 1997.
- [30] H. Büttner und D. Stamm, „Qualitätskontrolle klinisch-chemischer Untersuchungen,“ *Zeitschrift für klinische Chemie*, Bd. 4, Nr. 6, pp. 303-306, 1966.
- [31] W. Richter, „Primary methods of measurement in chemical analysis,“ *Accreditation and quality Assurance*, Bd. 2, pp. 354-359, 1997.
- [32] IRMM, *Certificate of Analysis ERM-DA470, accepted as ERM*, Geel, 2004.
- [33] IRMM, *Certificate of analysis ERM-DA470k/IFCC, accepted as ERM*, Geel, 2008.
- [34] Bundesärztekammer, „Richtlinien der Bundesärztekammer zur Durchführung der statistischen Qualitätskontrolle und von Ringversuchen im Bereich Heilkunde,“ *Deutsches Ärzteblatt*, Bd. 68, Nr. 31, pp. 2228-2231, 1971.
- [35] M. Grebe, D. Präfrock, A. Kakuschke, J. A. C. Broekaert und A. Prange, „Metallomics approach for the identification of the iron transport protein transferrin in the blood of harbour seals (*Phoca vitulina*),“ *Metallomics*, Bd. 2, Nr. 10, pp. 683-693, 2010.

- [36] M. E. del Castillo Busto, M. Montes-Bayòn, E. Blanco-Gonzalez, J. Meija und A. Sanz-Medel, „Strategies to Study Human Serum Transferrin Isoforms Using Integrated Liquid Chromatography ICPMS, MALDI-TOF, and ESI-Q-TOF Detection: Application to Chronical Alcohol Abuse,“ *Analytical Chemistry*, Bd. 77, Nr. 17, pp. 5615-5621, 2005.
- [37] M. E. del Castillo Busto, M. Montes-Bayon und A. Sanz-Medel, „Accurate Determination of Human Serum Transferrin Isoforms: Exploring Metal-Specific Isotope Dilution Analysis as a Quantitative Proteomic Tool,“ *Analytical Chemistry*, Bd. 78, Nr. 24, pp. 8218-8226, 2006.
- [38] M. E. del Castillo Busto, M. Montes-Bayon, J. I. Garcia Alonso, J. A. Caruso und A. Sanz-Medel, „Novel HPLC-ICP-MS strategy for the determination of beta2 transferrin, the boimarker of cerebrospinal fluid (CSF) leakage,“ *Analyst*, Bd. 135, Nr. 7, pp. 1538-1540, 2010.
- [39] BIPM, International vocabulary of metrology, JCGM 200, 2008.
- [40] H. Mischak, J. J. Coon, J. Novak, E. M. Weissinger, J. P. Schanstra und A. F. Dominiczak, „Capillary electrophoresis-mass spectrometry as a powerful tool in biomarkerdiscovery and clinical diagnosis: An update of recent developments,“ *Mass Spectrometry Reviews*, Bd. 28, Nr. 5, pp. 703-724, 2009.
- [41] H. Murata, N. Shimada und M. Yoshioka, „Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview,“ *The Verterinary Journal*, Bd. 168, Nr. 1, pp. 28-40, 2004.
- [42] N. Kalmovarin, W. E. Friedrichs, H. V. O'Brien, L. A. Linehan, B. H. Browman und F. Yang, „Extrahepatic expression of plasma protein genes during inflammation,“ *Inflammation*, Bd. 15, Nr. 5, pp. 369-379, 1991.
- [43] M. Grebe, Dissertation: Isolierung und Charakterisierung von Transferringlykoformen aus Blutproben von Seehunden mittels multidimensionaler chromatographischer Verfahren und molekül- und elementspezifischer massenspektrometrischer Detektion, Hamburg / Geesthacht: Universität Hamburg, 2011.
- [44] L. Stryer, Biochemie, 4 Hrsg., Heidelberg-Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1999.
- [45] J. Koolmann und K.-H. Röhm, Taschenatlas Biochemie des Menschen, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2009.
- [46] W. Kaim und B. Schwederski, Bioorganische Chemie zur Funktion chemischer Elemente in Lebensprozessen, 3. überarbeitete Hrsg., Stuttgart: B. G. Teuber Verlag / GWV Fachverlag GmbH, 2004.

- [47] D. R. Hall, J. Hadden, G. A. Leonhard, S. Bailey, M. Neu, M. Winn und P. F. Lindley, „The crystal and molecular structures of diferric porcine and rabbit serum transferrins at resolutions of 2.15 and 2.60 Å, respectively,“ *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, Bd. 58, pp. 70-80, 2002.
- [48] „RCSB PDB Protein Data Bank,“ [Online]. Available: <http://www.rcsb.org>.
- [49] T. E. Adams, A. B. Mason, Q.-Y. He, P. J. Halbrooks, S. K. Briggs, V. C. Smith, R. T. A. MacGillivray und S. E. Everse, „The Position of Arginine 124 Controls the Rate of Iron Release from the N-Lobe of Human Serum Transferrin,“ *The Journal of biological chemistry*, Bd. 128, Nr. 8, pp. 6027-6033, 2008.
- [50] S. L. Byrne, A. N. Steere und N. D. Chasteen, „Identification of a Kinetically Significant Anion Binding (KISAB) Site in the N-Lobe of Human Serum Transferrin,“ *Biochemistry*, Bd. 49, pp. 4020-4207, 2010.
- [51] R. T. A. MacGillivray, S. Moore, J. Chen, B. F. Anderson, H. Baker, Y. Lou, M. Bewley, C. A. Smith, M. P. Murphy, Y. Wang, A. B. Mason, R. Woodworth, G. Brayer und E. N. Baker, „Two High-Resolution Crystal Structures of the Recombinant N-Lobe of Human Transferrin Reveal a Structural Change Implicated in Iron Release,“ *Biochemistry*, Bd. 37, Nr. 22, pp. 7919-7928, 1998.
- [52] H. Sun, M. C. Cox, H. Li und P. J. Sadler, „Rationalisation of metal binding to transferrin: Prediction of metal-protein stability constants,“ in *Metal Sites in Proteins and Models*, 88 Hrsg., Berlin / Heidelberg, Springer, 1997, pp. 71-102.
- [53] J.-M. El Hage Chaine und R. Pakdaman, „Transferrin, a mechanism for iron release,“ *European Journal of Biochemistry*, Bd. 230, Nr. 3, pp. 1102-1110, 1995.
- [54] B. D. Grant und J. G. Donaldson, „Pathways and mechanisms of endocytic recycling,“ *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Bd. 10, Nr. 9, pp. 597-608, 2009.
- [55] H. Li, H. Sun und Z. M. Qian, „The role of the transferrin-transferrin-receptor system in drug delivery and targeting,“ *Trends in Pharmacological Science*, Bd. 23, Nr. 5, pp. 206-209, 2002.
- [56] J. Böcker, *Instrumentelle Analytik mit Chromatographie und Kapillarelektrophorese*, 1. Auflage, Würzburg: Vogel Buchverlag, 1997.
- [57] W. Hübl, „Säulen-Chromatographie: Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) und Gaschromatographie (GC),“ Online Skript: Deutsche Vereinte Gesellschaft für klinische Chemie und Laboratoriumschemie (DGKL).
- [58] Agilent, *mit freundlicher Genehmigung*.
- [59] D. Winklmaier, „Onlineskripte zur instrumentellen Analytik an der HS München,“ 2009. [Online]. Available: <http://www.winklmaier.de>. [Zugriff am 11 Juni 2012].

- [60] J. Frank, „Wie funktioniert eigentlich ein ICP-MS?“, Skript, Universität Heidelberg, Heidelberg.
- [61] P. Turner und A. Montasser, „4. Plasma generation in ICPMS,“ in *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry*, New York, Wiley-VCH, 1998, pp. 265-334.
- [62] T. Pfeifer, Eine neue Niedrigfluss-Ionenquelle für die induktiv gekoppelte Plasma-Massenspektrometrie (ICP-MS), W. Wilhelms-Universität, Hrsg., Münster, 2010.
- [63] C. Swart, Dissertation: Analyse römischer Ziegel mit ICP-OES / -MS: Methodenvergleich zwischen RFA und ICP, Berlin: Freie Universität Berlin, 2005.
- [64] F. Adams, R. Gijbels und R. van Gieken, *Inorganic Mass Spectrometry*, New York: John Wiley & Sons, 1988.
- [65] A. Montaser und D. Goighty, *Inductively Coupled Plasmas in Analytical Atomic Spectrometry*, Weinheim: VCH Weinheim, 1987.
- [66] J. R. de Laeter, J. U. Böhlke, P. Bièvre, H. Hidaka, H. S. Peiser, K. J. R. Rosman und P. D. P. Taylor, „Atomic weights of the elements,“ *Pure Appl. Chem.*, Bd. 75, Nr. 6, pp. 636-800, 2003.
- [67] Agilent, „Chromatographic Data Analysis, G1824C, ICP MS Chromatographic Software C.01.00“.
- [68] F. Vanhaecke und G. Köllensperger, „5.3 Detection by ICP-Mass Spectrometry,“ in *Handbook of Elemental Speciation: Techniques and Methodology*, Chichester, John Wiley and Sons Ltd, 2003, pp. 281-312.
- [69] S. D. Tanner, V. I. Baranov und D. R. Bandura, „Reaction cells and collision cells for ICP-MS: a tutorial review,“ *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, Bd. 9, pp. 1361-1452, 2002.
- [70] P. Leonhard, R. Pepelnik, A. Prange, N. Yamada und T. Yamada, „Analysis of diluted sea-water at the ng L<sup>-1</sup> level using ICP-MS with an octopole reaction cell,“ *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Bd. 3, pp. 189-196, 1997.
- [71] N. Yamada, J. Takahashi und K. Sakata, „The effects of cell-gas impurities and kinetic energy discrimination in an octopole collision cell ICP-MS under non-thermalized conditions,“ *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy*, Bd. 10, pp. 1213-1222, 2002.
- [72] H. Lohninger, J. Fröhlich und B. R. E. Mizaikoff, „Teach/Me Instrumentelle Analytik,“ 14.12.2010. [Online]. Available: [http://www.vias.org/tmanalytik\\_germ/index.html](http://www.vias.org/tmanalytik_germ/index.html). [Zugriff am 3. Juni 2012].
- [73] H. Budzikiewicz und M. Schäfer, *Massenspektrometrie*, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH und Co. KGaA, 2005.

- [74] F. Lottspeich und J. W. Engels, Hrsg., Bioanalytik, 2. Auflage Hrsg., München: Spektrum Akademischer Verlag, 2006.
- [75] J. S. Becker, Inorganic Mass Spectrometry - Principles and Applications, Chinchester: John Wiley & Sons, 2007.
- [76] D. A. Skoog und L. L. Leary, Instrumentelle Analytik, Berlin/Heidelberg: Springer, 1996.
- [77] G. K. Zoorob, J. W. McKiernan und J. A. Caruso, „ICP-MS for Elemental Speciation Studies,“ *Mircchimica Acta*, Nr. 128, pp. 145-168, 1998.
- [78] D. Pröfrock und P. Andreas, „Inductively Coupled Plasma-mass Spectrometry (ICP-MS) for Quantitative Analysis in Enviromental and Life Sciences: A Review of Challenges, Solutions, and Trends,“ *Applied Spectroscopy*, Nr. DOI: 10.1366/12-06681, pp. 843-868, 2012.
- [79] J. M. Marchante-Gayón, C. Sariego Muñiz, J. I. García Alonso und A. Sanz-Medel, „Multielemental trace analysis of biological materials using double focusing inductively coupled plasma mass spectrometry detection,“ *Analytica Chimica Acta*, Nr. 400, pp. 307-320, 1999.
- [80] G. Dube, A. Henrion, R. Ohlendorf und W. Richter, „Combining Isotope Ratio Monitoring with Isotope Dilution Techniques for high Accuracy Quantification in Organic Chemical Analysis,“ *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Bd. 12, pp. 28-32, 1998.
- [81] A. Henrion, G. Dube und W. Richter, „Evaluation of contributions to the uncertainty of cholesterol determination in human serum by means of gas chromatography / quadrupole mass spectrometry,“ *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, Bd. 358, pp. 506-508, 1997.
- [82] A. Henrion, „In- and off-laboratory sources of uncertainty in a use of a serum standard reference material as a means of accuracy control in cholesterol determination,“ *Accreditation and Quality Assurance*, Bd. 358, pp. 127-130, 1998.
- [83] K. G. Heumann, „Isotope dilution mass spectrometry of inorganic and organic substances,“ *Journal of Analytical Chemistry*, Bd. 325, pp. 661-666, 1994.
- [84] C. Frank, O. Rienitz, C. Swart und D. Schiel, „Improving species specific IDMS: the advantages of triple IDMS,“ *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, DOI: 10.1007/s00216-012-6315-x.
- [85] P. Rodríguez-González, J. M. Marchante-Gayón, J. I. García-Alonso und A. Sanz-Medel, „Isotope pattern deconvolution for internal mass bias corection in the characterisation of isotopically enriched spikes,“ *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy*, Bd. 60, Nr. 2, pp. 151-207, 2005.

- [86] M. Sargent, C. Harrington und R. Harte, Guidelines for Achieving High Accuracy in Isotope Dilution Mass Spectrometry (IDMS), Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2002.
- [87] R. L. Watters, Jr., K. R. J. Eberhardt, E. S. Beary und F. J. D., „Protocol for isotope dilution using inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) for the determination of inorganic elements,“ *Metrologia*, Bd. 34, pp. 87-96, 1997.
- [88] J. Vogl, „Measurement uncertainty in single, double and triple isotope dilution mass spectrometry,“ *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, Bd. 26, Nr. 3, pp. 275 - 281, 2012.
- [89] K. Heumann, L. Rottmann und J. Vogl, *Spectrochim. Acta B: Atom. Spectrosc.*, Bd. 53, pp. 273 - 287, 1998.
- [90] L. Rottmann und K. G. Heumann, „Development of an on-line isotope dilution technique with HPLC/ICP-MS for the accurate determination of elemental species,“ *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, Bd. 350, pp. 221-227, 1994.
- [91] C. Swart, O. Rienitz und D. Schiel, „Alternative approach to post column online isotope dilution ICP-MS,“ *Talanta*, Bd. 83, pp. 1544 - 1551, 2011.
- [92] R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto und H. M. Widmer, „Infrared and Raman Spectroscopy,“ in *Analytical Chemistry*, Weinheim, Wiley-VCH, 1998, pp. 541-565.
- [93] B. Schrader, Infrared and Raman spectroscopy, Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft, 1995.
- [94] G. Keresztury, Raman Spectroscopy: Theory in Handbook of vibrational spectroscopy Vol. I, Weinheim: Wiley, 2002.
- [95] M. Hesse und H. Z. B. Meier, „Infrarot- und Ramanspektren,“ in *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 1991, pp. 29-68.
- [96] L. Suemmchen, S. Machil, R. Salzer und S. Thiele, „ChemgaPedia,“ FIZ Chemie, 2012. [Online]. Available: <http://www.chemgapedia.de>. [Zugriff am 2012 7. 30.].
- [97] H. Welfle, „Optische Spektroskopie,“ in *Methoden der Proteinanalytik*, Berlin, Springer-Verlag, 1996, pp. 70 - 170.
- [98] R. Tuma, J. H. K. Bamford, D. H. Bamford, M. Russel und G. J. J. Thomas, „Structure, interactions and dynamics of PRD1 virus I. Coupling of subunit folding and capsid assembly,“ *J. Mol. Biol.*, Bd. 257, pp. 87-101, 1996.
- [99] R. Tuma, J. H. K. Bamford, D. H. Bamford und G. J. J. Thomas, „Structure, interactions and dynamics of PRD1 virus II. Organisation of the viral membrane and DNS,“ *J. Mol. Biol.*, Bd. 257, pp. 102-115, 1996.

- [100] B. P. Gaber, V. Miskovski und T. G. Spiro, „Resonance Raman Scattering from Iron(III)- and Copper(II)-Transferrin and an Iron(III) Model Compound. A Spectroscopic Interpretation of the Transferrin Binding Site,“ *Journal of the American Chemical Society*, Bd. 96, Nr. 22, pp. 6868-6873, 1974.
- [101] L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young und H. J. Tanke, „Photobleaching Kinetics of Fluorescein in Quantitative Fluorescence Microscopy,“ *Biophysical Journal*, Bd. 68, pp. 2588-2600, 1995.
- [102] P. Drath, Leitfaden für den Gebrauch des Internationalen Einheitensystems, Braunschweig: Physikalisch-Technische Bundesanstalt, 1996.
- [103] P. De Bièvre und H. S. Peiser, „The reliability of values of molar mass, the factor that relates measurements expressed in two SI base units (mass and amount substance),“ *Metrologia*, Bd. 34, pp. 34-49, 1997.
- [104] W. Richter, „How to achieve international comparability for chemical measurements,“ *Accreditation and Quality Assurance*, Bd. 5, pp. 418-422, 2000.
- [105] W. Richter, „Comparability and recognition of chemical measurement results - an international goal,“ *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, Bd. 365, pp. 596-573, 1999.
- [106] C. Gertsen, H. O. Kneser und H. Vogel, Physik, 13. Hrsg., Berlin: Springer-Verlag, 1977.
- [107] F. Spieweck und H. Bettin, PTB-Bericht: Methoden zur Bestimmung der Dichte von Festkörpern und Flüssigkeiten, Braunschweig: Wirtschaftsverlag NW, 1998.
- [108] F. W. Küster und A. Thiel, Rechentafeln für die Chemische Analytik, Berlin: Walter de Gruyter, 1993.
- [109] M. Kochsieck, Handbuch des Wägens, Braunschweig: Friedrich Vieweg und Sohn, 1989.
- [110] K. A. Strauss, J. O'Kane und J. D. Cook, „Novel comparison of capillary electrophoresis versus immunoassay in the measurement of total percent carbohydrate deficient transferrin,“ *Clinical Biochemistry*, Bd. 39, Nr. 8, p. 826-832, 2006.
- [111] K. M. Biswas, B. C. Castle, B. A. Olsen, D. S. Riles, M. J. Skibic und P. B. Wright, „A simple and efficient approach to reversed-phase HPLC method screening,“ *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, Bd. 49, Nr. 3, pp. 692-701, 2009.
- [112] M. Grebe, D. Pröfrock, A. Kakuschke, M. E. del Castillo Busto, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, B. J. A. C. und A. Prange, „Comparation of different methods for the absolute quantification of harbour seal transferrin glycoforms using HPLC-ICP-MS,“ *Journal of Analytical Atomic Spectroscopy*, Bd. 27, pp. 440-448, 2012.

- [113] M. Grebe, D. Pröfrock, A. Kakuschke, J. A. C. Broekaert und A. Prange, „Absolute quantification of transferrin in blood samples of harbour seals using HPLC-ICP-MS,“ *Metallomics*, Bd. 3, pp. 176-185, 2011.
- [114] J.-O. Jeppsson, H. Kristensson und C. Fimiani, „Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol,“ *Clinical Chemistry*, Bd. 39, Nr. 10, pp. 2115-2120, 1993.
- [115] P. Giusti, D. Schaumlöffel, J. R. Encinar und J. Szpunar, „Interfacing reversed-phase nanoHPLC with ICP-MS and on-line isotope dilution analysis for the accurate quantification of selenium-containing peptides in protein tryptic digests,“ *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Bd. 20, Nr. 10, pp. 1101-1107, 2005.
- [116] A. Pereira Navaza, J. R. Encinar und A. Sanz-Medel, „Absolute and accurate quantification of protein phosphorylation by using an elemental phosphorous standard and element mass spectrometry,“ *Angewandte Chemie International Edition*, Bd. 46, Nr. 4, pp. 569-571, 2007.
- [117] D. Pröfrock und A. Prange, „Compensation of gradient related effects when using capillary liquid chromatography and inductively coupled plasma mass spectrometry for the absolute quantification of phosphorylated peptides,“ *Journal of Chromatography A*, Bd. 1216, Nr. 39, pp. 6706-6715, 2009.
- [118] DocCheck Medical Services GmbH, „DocCheckFlexikon,“ 2012. [Online]. Available: <http://flexikon.doccheck.com>. [Zugriff am 19. Juli 2012].
- [119] J. O. Jeppsson, H. Kristensson und C. Fimiani, „Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol,“ *Clinical Chemistry*, Bd. 39, Nr. 10, pp. 2115-2120, 1993.
- [120] J. Vogl, in *Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Handbook*, N. S.M., Hrsg., Oxford, Blackwell Publishing Ltd., 2005.
- [121] M. E. del Castillo Busto, M. Montes-Bayón, J. Bettmer und A. Sanz-Medel, „Stable isotope labelling and FPLC-ICP-SFMS for the accurate determination of clinical iron status parameters in human serum,“ *The Analyst*, Bd. 133, p. 379-384, 2008.
- [122] C. Frank, O. Rienitz, R. S. D. Jährling und S. Zakel, „Reference Measurement Procedures for the Iron Saturation in Human Transferrin Based on IDMS and Raman Scattering,“ *Analytical Chemistry*, p. submitted, 2012.
- [123] C. Swart, P. Fisicaro, H. Goenaga-Infante und S. Zakel, „Metalloproteins – a new challenge for metrology,“ *Metallomics*, Bd. DOI: 10.1039/c2mt90049a, 2012.
- [124] „UniProt,“ [Online]. Available: <http://www.uniprot.org/uniparc/UIP000013D5A6>. [Zugriff am 13.08.2012].

## 6 Anhang

### 6.1 Herleitung der Formel für die triple SS-IDMS

Bei der double IDMS sind 2 Mischungen notwendig: Mischung bx (Probe x plus Spike y) und bz (Referenz z plus Spike y):

$$w_y = w_z \cdot \frac{m_z}{m_{yz}} \cdot \frac{M_y}{M_z} \cdot \frac{R_z - R_{bz}}{R_{bz} - R_y} \cdot \frac{\sum_i R_{y,i}}{\sum_i R_{z,i}}$$

Bei der triple IDMS werden drei Mischungen benötigt: Mischung bx, Mischung bz1 (Referenz z1 plus Spike y) und bz2 (Referenz z2 plus Spike y):

$$w_y = w_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{M_y}{M_z} \cdot \frac{R_z - R_{bz1}}{R_{bz1} - R_y} \cdot \frac{\sum_i R_{y,i}}{\sum_i R_{z,i}} = w_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{M_y}{M_z} \cdot \frac{R_z - R_{bz2}}{R_{bz2} - R_y} \cdot \frac{\sum_i R_{y,i}}{\sum_i R_{z,i}}$$

$$w_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{R_z - R_{bz1}}{R_{bz1} - R_y} = w_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{R_z - R_{bz2}}{R_{bz2} - R_y}$$

$$(R_{bz2} - R_y) \cdot w_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot (R_z - R_{bz1}) = (R_{bz1} - R_y) \cdot w_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot (R_z - R_{bz2})$$

$$R_y \cdot \left[ w_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot (R_z - R_{bz1}) - w_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot (R_z - R_{bz2}) \right]$$

$$= R_{bz2} \cdot w_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot (R_z - R_{bz1}) - R_{bz1} \cdot w_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot (R_z - R_{bz2})$$

$$x_1 = w_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}}, \quad x_2 = w_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}}$$

$$R_y \cdot [x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})] = R_{bz2} \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - R_{bz1} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})$$

$$R_y = \frac{R_{bz2} \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - R_{bz1} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}{x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}$$

Mischung bx (Probe x plus Spike y)

$$w_x = w_y \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{M_x}{M_y} \cdot \frac{R_y - R_{bx}}{R_{bx} - R_x} \cdot \frac{\sum_i R_{x,i}}{\sum_i R_{y,i}}$$

$$w_x = w_z \cdot \frac{m_z}{m_{yz}} \cdot \frac{M_y}{M_z} \cdot \frac{R_z - R_{bz}}{R_{bz} - R_y} \cdot \frac{\sum_i R_{y,i}}{\sum_i R_{z,i}} \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{M_x}{M_y} \cdot \frac{R_y - R_{bx}}{R_{bx} - R_x} \cdot \frac{\sum_i R_{x,i}}{\sum_i R_{y,i}}$$

$$w_x = w_z \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_z}{m_{yz}} \cdot \frac{R_y - R_{bx}}{R_{bx} - R_x} \cdot \frac{R_z - R_{bz}}{R_{bz} - R_y} = w_z \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_z}{m_{yz}} \cdot \frac{R_y - R_{bx}}{R_y - R_{bz}} \cdot \frac{R_{bz} - R_z}{R_{bx} - R_x}$$

Im Fall der triple IDMS:

$$w_x = w_{z1} \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{R_y - R_{bx}}{R_y - R_{bz1}} \cdot \frac{R_{bz1} - R_z}{R_{bx} - R_x}$$

$$R_y = \frac{R_{bz2} \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - R_{bz1} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}{x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}$$

$$w_x = w_{z1} \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{\frac{R_{bz2} \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - R_{bz1} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}{x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})} - R_{bx}}{\frac{R_{bz2} \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - R_{bz1} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}{x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_{bz1} - R_z}{R_{bx} - R_x}$$

$$F = \frac{R_{bz2} \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - R_{bz1} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2}) - R_{bx} \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) + R_{bx} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}{R_{bz2} \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) - R_{bz1} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2}) - R_{bz1} \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) + R_{bz1} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}$$

$$F = \frac{(R_{bz2} - R_{bx}) \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) + (R_{bx} - R_{bz1}) \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}{(R_{bz2} - R_{bz1}) \cdot x_1 \cdot (R_z - R_{bz1}) + \underbrace{(R_{bz1} - R_{bz1})}_{=0} \cdot x_2 \cdot (R_z - R_{bz2})}$$

$$F = \frac{x_1 \cdot (R_{bz2} - R_{bx}) \cdot (R_z - R_{bz1}) + x_2 \cdot (R_{bx} - R_{bz1}) \cdot (R_z - R_{bz2})}{x_1 \cdot (R_{bz2} - R_{bz1}) \cdot (R_z - R_{bz1})}$$

$$w_x = w_{z1} \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{x_1 \cdot (R_{bz2} - R_{bx}) \cdot (R_z - R_{bz1}) + x_2 \cdot (R_{bx} - R_{bz1}) \cdot (R_z - R_{bz2})}{x_1 \cdot (R_{bz2} - R_{bz1}) \cdot (R_z - R_{bz1})} \cdot \frac{R_{bz1} - R_z}{R_{bx} - R_x}$$

$$w_x = w_{z1} \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{x_1 \cdot (R_{bz2} - R_{bx}) \cdot (R_z - R_{bz1}) + x_2 \cdot (R_{bx} - R_{bz1}) \cdot (R_z - R_{bz2})}{x_1 \cdot (R_{bz2} - R_{bz1}) \cdot (R_x - R_{bx})}$$

$$w_x = w_{z1} \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \left[ \frac{R_{bz2} - R_{bx}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_z - R_{bz1}}{R_x - R_{bx}} + \frac{x_2}{x_1} \cdot \frac{R_{bx} - R_{bz1}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_z - R_{bz2}}{R_x - R_{bx}} \right]$$

$$w_x = w_{z1} \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \left[ \frac{R_{bz2} - R_{bx}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_z - R_{bz1}}{R_x - R_{bx}} + \frac{w_{z2}}{w_{z1}} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{R_{bx} - R_{bz1}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_z - R_{bz2}}{R_x - R_{bx}} \right]$$

$$w_x = w_{z1} \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{R_{bz2} - R_{bx}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_z - R_{bz1}}{R_x - R_{bx}} + w_{z2} \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{R_{bx} - R_{bz1}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_z - R_{bz2}}{R_x - R_{bx}}$$

$$w_x = \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \left[ w_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{R_{bz2} - R_{bx}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_z - R_{bz1}}{R_x - R_{bx}} + w_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{R_{bx} - R_{bz1}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_z - R_{bz2}}{R_x - R_{bx}} \right]$$

$$R_z = R_x$$

$$w_x = \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \left[ w_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{R_{bz2} - R_{bx}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_x - R_{bz1}}{R_x - R_{bx}} + w_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{R_{bx} - R_{bz1}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot \frac{R_x - R_{bz2}}{R_x - R_{bx}} \right]$$

$$w_x = \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{1}{R_x - R_{bx}} \cdot \left[ w_{z1} \cdot \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{R_{bz2} - R_{bx}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot (R_x - R_{bz1}) + w_{z2} \cdot \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{R_{bx} - R_{bz1}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot (R_x - R_{bz2}) \right]$$

$$w_z = w_{z1} = w_{z2}$$

$$w_x = w_z \cdot \frac{m_{yx}}{m_x} \cdot \frac{1}{R_x - R_{bx}} \cdot \left[ \frac{m_{z1}}{m_{yz1}} \cdot \frac{R_{bz2} - R_{bx}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot (R_x - R_{bz1}) + \frac{m_{z2}}{m_{yz2}} \cdot \frac{R_{bx} - R_{bz1}}{R_{bz2} - R_{bz1}} \cdot (R_x - R_{bz2}) \right]$$

Einschränkung:

- $M_x = M_z \rightarrow R_z = R_x$

Vorteile:

- $w_y$  kürzt sich aus der Gleichung (wie bei der double IDMS)
- $R_y$  kürzt sich aus der Gleichung

## 6.2 Herleitung der Formel für die Sättigung von Transferrin mit single IDMS

$$b = \frac{n(\text{Fe})}{2 \cdot n(\text{Tf})} = \frac{N}{N_{\max}} = \frac{n(\text{Fe})}{n_{\max}(\text{Fe})}$$

$$R_x = \frac{n_{x,57}}{n_{x,56}}$$

$$R_y = \frac{n_{y,57}}{n_{y,56}}$$

$$R_{\text{bx}} = \frac{n_{\text{bx},57}}{n_{\text{bx},56}} = \frac{n_{x,57} + n_{y,57}}{n_{x,56} + n_{y,56}}$$

$$b = \frac{n(\text{Fe})}{n_{\max}(\text{Fe})} = \frac{n_x(\text{Fe})}{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})}$$

$$\begin{aligned} b_y &= \frac{n_y(\text{Fe})}{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})} \\ &= \frac{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})}{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})} - \frac{n_x(\text{Fe})}{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})} \\ &= 1 - b \end{aligned}$$

$$R_{\text{bx}} = \frac{n_{x,57} + n_{y,57}}{n_{x,56} + n_{y,56}} = \frac{x_{x,57} \cdot n_x(\text{Fe}) + x_{y,57} \cdot n_y(\text{Fe})}{x_{x,56} \cdot n_x(\text{Fe}) + x_{y,56} \cdot n_y(\text{Fe})} \cdot \frac{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})}{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})}$$

$$R_{\text{bx}} = \frac{x_{x,57} \cdot \frac{n_x(\text{Fe})}{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})} + x_{y,57} \cdot \frac{n_y(\text{Fe})}{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})}}{x_{x,56} \cdot \frac{n_x(\text{Fe})}{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})} + x_{y,56} \cdot \frac{n_y(\text{Fe})}{n_x(\text{Fe}) + n_y(\text{Fe})}}$$

$$R_{\text{bx}} = \frac{x_{x,57} \cdot b + x_{y,57} \cdot (1-b)}{x_{x,56} \cdot b + x_{y,56} \cdot (1-b)}$$

$$R_{\text{bx}} \cdot [x_{x,56} \cdot b + x_{y,56} \cdot (1-b)] = x_{x,57} \cdot b + x_{y,57} \cdot (1-b)$$

$$R_{\text{bx}} \cdot x_{x,56} \cdot b + R_{\text{bx}} \cdot x_{y,56} \cdot (1-b) = x_{x,57} \cdot b + x_{y,57} \cdot (1-b)$$

$$R_{\text{bx}} \cdot x_{x,56} \cdot b + R_{\text{bx}} \cdot x_{y,56} - R_{\text{bx}} \cdot x_{y,56} \cdot b = x_{x,57} \cdot b + x_{y,57} - x_{y,57} \cdot b$$

$$b \cdot (R_{\text{bx}} \cdot x_{x,56} - R_{\text{bx}} \cdot x_{y,56} - x_{x,57} + x_{y,57}) = x_{y,57} - R_{\text{bx}} \cdot x_{y,56}$$

$$b = \frac{x_{y,57} - R_{\text{bx}} \cdot x_{y,56}}{R_{\text{bx}} \cdot x_{x,56} - R_{\text{bx}} \cdot x_{y,56} - x_{x,57} + x_{y,57}}$$

$$b = \frac{x_{y,57} - R_{bx} \cdot x_{y,56}}{R_{bx} \cdot x_{x,56} - R_{bx} \cdot x_{y,56} - x_{x,57} + x_{y,57}}$$

$$b = \frac{x_{y,57} - R_{bx} \cdot x_{y,56}}{R_{bx} \cdot x_{x,56} - x_{x,57} + x_{y,57} - R_{bx} \cdot x_{y,56}}$$

$$b = \frac{\frac{R_{y,57}}{\sum_i R_{y,i}} - R_{bx} \cdot \frac{R_{y,56}}{\sum_i R_{y,i}}}{R_{bx} \cdot \frac{R_{x,56}}{\sum_i R_{x,i}} - \frac{R_{x,57}}{\sum_i R_{x,i}} + \frac{R_{y,57}}{\sum_i R_{y,i}} - R_{bx} \cdot \frac{R_{y,56}}{\sum_i R_{y,i}}}$$

$$b = \frac{\frac{R_{y,57}}{\sum_i R_{y,i}} - R_{bx} \cdot \frac{1}{\sum_i R_{y,i}}}{R_{bx} \cdot \frac{1}{\sum_i R_{x,i}} - \frac{R_{x,57}}{\sum_i R_{x,i}} + \frac{R_{y,57}}{\sum_i R_{y,i}} - R_{bx} \cdot \frac{1}{\sum_i R_{y,i}}}$$

$$\frac{1}{b} = \frac{R_{bx} \cdot \frac{1}{\sum_i R_{x,i}} - \frac{R_{x,57}}{\sum_i R_{x,i}} + \frac{R_{y,57}}{\sum_i R_{y,i}} - R_{bx} \cdot \frac{1}{\sum_i R_{y,i}}}{\frac{R_{y,57}}{\sum_i R_{y,i}} - R_{bx} \cdot \frac{1}{\sum_i R_{y,i}}}$$

$$\frac{1}{b} = \frac{R_{bx} \cdot \frac{1}{\sum_i R_{x,i}} - \frac{R_{x,57}}{\sum_i R_{x,i}}}{\frac{R_{y,57}}{\sum_i R_{y,i}} - R_{bx} \cdot \frac{1}{\sum_i R_{y,i}}} + 1$$

$$\frac{1}{b} = 1 + \frac{(R_{bx} - R_{x,57}) \cdot \frac{1}{\sum_i R_{x,i}}}{(R_{y,57} - R_{bx}) \cdot \frac{1}{\sum_i R_{y,i}}}$$

$$\frac{1}{b} = 1 + \frac{(R_{bx} - R_{x,57}) \cdot \frac{\sum_i R_{y,i}}{\sum_i R_{x,i}}}{(R_{y,57} - R_{bx})}$$

$$b = \frac{1}{1 + \frac{(R_{bx} - R_{x,57}) \cdot \frac{\sum_i R_{y,i}}{\sum_i R_{x,i}}}{(R_{y,57} - R_{bx})}}$$

$$b = \frac{1}{1 + \frac{R_{bx} - R_x}{R_y - R_{bx}} \cdot \frac{\sum_i R_{y,i}}{\sum_i R_{x,i}}}$$

### 6.3 Sequenz-Alignment von Serotransferrin

10	20	30	40	50
MRLAVGALLV	CAVLGLCLAV	PKTVRWCAV	SEHEATKCQS	FRDHMKSVIP
60	70	80	90	100
SDGPSVACVK	KASYLDCIRA	IAANEADAVT	LDAGLVYDAY	LAPNNLKPVV
110	120	130	140	150
AEFYGSKEDP	QTFYYAVAVV	KKDSGFQMNQ	LRGKKSCHTG	LGRSAGWNIP
160	170	180	190	200
IGLLYCDLPE	PRKPLEKAVA	NFFSGSCAPC	ADGTDFPQLC	QLCPGCGCST
210	220	230	240	250
LNQYFGYSGA	FKCLKDGAGD	VAFVKHSTIF	ENLANKADR	QYELLCLDNT
260	270	280	290	300
RKPVDEYKDC	HLAQVPSHTV	VARSMGGKED	LIWELLNQAQ	EHFGKDKSKE
310	320	330	340	350
FQLFSSPHGK	DLLFKDSAHG	FLKVPPRMDA	KMYLGYEYVT	AIRNLREGTC
360	370	380	390	400
PEAPTDECKP	VKWCALSHHE	RLKCDEWSVN	SVGKIECVSA	ETTEDCIAKI
410	420	430	440	450
MNGEADAMSL	DGGFVYIAGK	CGLVPVLAEN	YNKSDNCEDT	PEAGYFAIAV
460	470	480	490	500
VKKSASDLTW	DNLKGKKSCH	TAVGRTAGWN	IPMGLLYNKI	NHCRFDEFFS
510	520	530	540	550
EGCAPGSKKD	SSLCKLCMGS	GLNLCEPNNK	EGYYGYTGAF	RCLVEKGDVA
560	570	580	590	600
FVKHQVTPQN	TGGKNPDPWA	KNLNEKDYEL	LCLDGTRKPV	EEYANCHLAR
610	620	630	640	650
APNHAVVTRK	DKEACVHKIL	RQQQHLFGSN	VTDCSGNFCL	FRSETKDLLF
660	670	680	690	698
RDDTVCLAKL	HDRNTYEKYL	GEEYVKAVGN	LRKCSTSSLL	EACTFRRP

**Abbildung 52** Sequenz-Alignment von humanem Transferrin [124]. Die blau markierten Stellen sind die Bindungsstellen für die Fe-Ionen, die rot markierten Stellen sind die Bindungsstellen für die  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ionen und die gelb markierte Anfangssequenz ist ein Signalpeptid, das nach der Translation abgespalten wird.

Die in Abbildung 7 (Kapitel 2.1) gezeigte Darstellung der Koordinationssphäre des Fe im Tf zeigt nur die Einbindung der Fe-Ionen und nicht der  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ionen in das Tf-Molekül.

## 6.4 Sialoformen des Transferrins

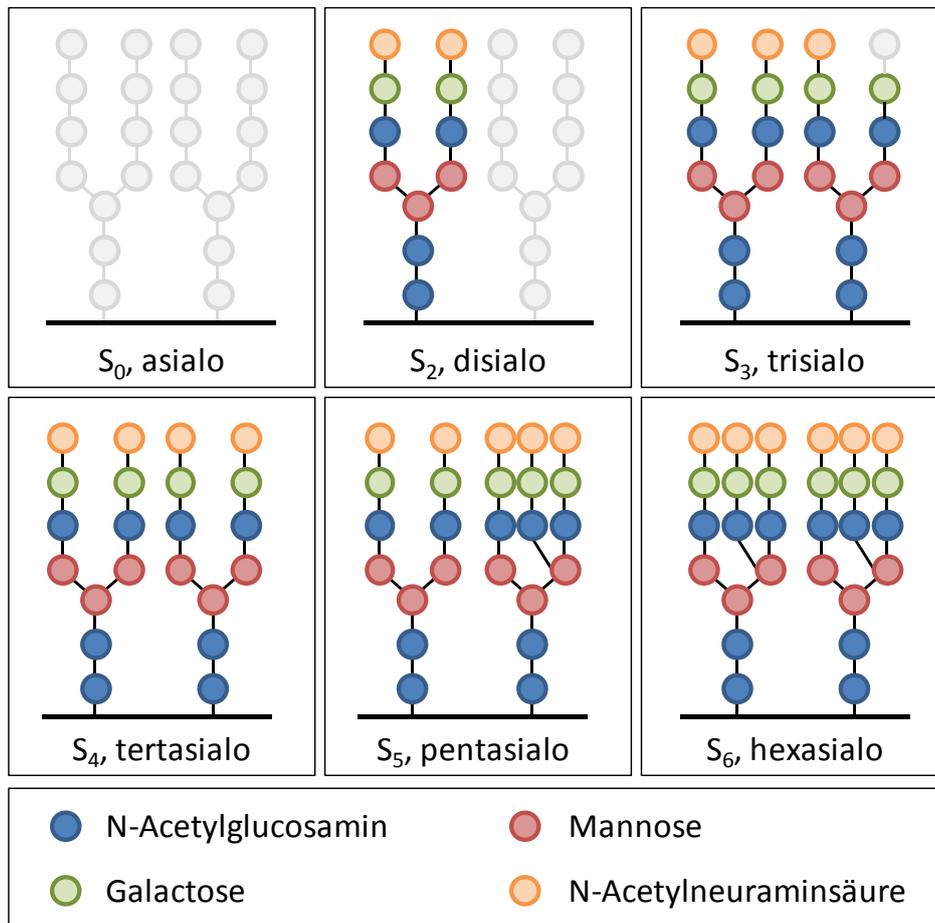


Abbildung 53 Struktur unterschiedlicher Sialoformen des Transferrins [36]

## 6.5 Abkürzungen

Abkürzung	Bedeutung
AD	Außendurchmesser
APP	Akute-Phase-Protein
APR	Akute-Phase-Reaktion
Asp	Asparaginsäure
bx	Mischung aus Probe und Spike
bz	Mischung aus Referenz und Spike
CCQM	Comité Consultatif pour la Quantité de Matière
CDG	Carbohydrat-defizientes Transferrin
CDT	angeborene Funktionsstörung der Glycosylierung (Congenital disorder of glycosylation)
CIPM	Certificate in Investment Performance Measurement
DAD	Dioden-Array-UV-Detektor
DC	Gleichspannung (direct current)
EMRP	European Metrology Research Programme
GUM	Guide to the expression of uncertainty in measurement
Hb	Hämoglobin
His	Histidin
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie (high power liquid chromatography)
HR	hochauflösend (high resolution)
IC	Ionenchromatographie
ICP-MS	induktiv gekoppelte Plasma Massenspektrometrie (inductively coupled plasma mass spectrometry)
ID	Innendurchmesser
IDMS	Isotopenverdünnungsmassenspektrometrie (isotope dilution mass spectrometry)
ID-Raman	Isotopenverdünnungs-Raman-Spektroskopie
IP	Ionisierungspotential
IR	Infrarot
IRMM	Institute for Reference Materials and Methods
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LC	Flüssigkeitschromatographie (liquid chromatography)
m/z	Masse zu Ladungsverhältnis
PC	Post-column

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PEEK	Polyetheretherketon
PFA	Perflouralkoxyalkan
Phe	Phenylalanin
PLS	Partial Least Squares
PTB	Physikalisch-Technische Bundesanstalt
Q	Quadrupol
RfB	Referenzinstitut für Bioanalytik
RiLiBÄK	Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung
RMSECV	Root Mean Square Error of Cross Validation
RP	Umkehrphase (reversed phased)
RR	Resonanz-Raman
S	Sialoform
SAX	Starker Anionenaustauscher (strong anion exchange)
SI	Internationales Einheitensystem (Système International d'Unités)
SS	spezies-spezifisch
Tf	Transferrin
TFA	Triflouressigsäure
TfR	Transferrin-Rezeptor
TRA	zeitaufgelöste Analyse (time resolved analysis)
Tris	Trisma
Tyr	Tyrosin
(v/v)	Verdünnung Volumen in Volumen
x	Probe
y	Spike
z	Referenz

## 6.6 Größensymbole

Größe	Einheit	Bedeutung
$A$	$s^{-1}$	Peakfläche
$b$	%	Beladung
$E_0$	eV	Energiegrundniveau
$E_1$	eV	erstes Energieniveau
$f_M$	mol/mol	stöchiometrischer Faktor
$f_{\text{pur}}$	kg/kg	Reinheit
$I$	$s^{-1}$	Intensität
$k$		Erweiterungsfaktor
$K$		Korrekturfaktor
$m$	g	Masse
$m'$	g	Wägewert
$M$	mol/kg	molare Masse
$n$	mol	Stoffmenge
$n_0$	$s^{-1}$	Grundschwingungsfrequenzebene
$n_1$	$s^{-1}$	erste Schwingungsfrequenzebene
$p$	Pa	Druck
$r_{\text{quad}}$	m	Radius des Quadrupols
$R$	mol/mol	Isotopenverhältnis
$t$	s	Zeit
$T$	K	absolute Temperatur
$U_{\text{rel}}$	%	relative Unsicherheit
$U_{=}$	V	Gleichstromspannung
$U_{\approx}$	V	Wechselstromspannung
$w$	g/g	Massenanteil
$x'$	mol/mol	Isotopenanteil / Stoffmengenanteil
$z$	1	Ladungszahl
$\lambda$	nm	Plasmawellenlänge
$\nu$	$s^{-1}$	Frequenz
$\rho$	$\text{kg/m}^3$	Dichte
$\varphi$	1	relative Luftfeuchte
$\vartheta$	$^{\circ}\text{C}$	Lufttemperatur

## 6.7 Indizes

---

<b>Index</b>	<b>Bedeutung</b>
air	die Luft betreffend
cal	die Massenkabrierstücke betreffend
<i>i</i>	allg. Laufzahl
<i>k</i>	Laufzahl für Entnahme
meas	gemessen
pur	die Reinheit betreffend
rel	relativ
yx	den Spike betreffend in einer Mischung aus Spike und Probe

---

## 6.8 Konstanten und Stoffgrößen

Größe	Wert	Einheit
Dichte $\rho$ , PFA	2,15	g/cm <sup>3</sup>
Dichte $\rho$ , Duranglas	2,23	g/cm <sup>3</sup>
Dichte $\rho$ , Serum	1,0221(2)	g/cm <sup>3</sup>
Dichte $\rho$ , HNO <sub>3</sub> ( $w = 2,5\%$ )	1,012	g/cm <sup>3</sup>
Avogadrokonstante $N_A$	$6,02214199(47) \cdot 10^{23}$	mol <sup>-1</sup>
molare Masse $M(\text{Fe})$	55,845(2)	g/mol
molare Masse $M(\text{Tf})$	79491	g/mol
molare Masse $M(\text{Cs})$	132,9054519(2)	g/mol
molare Masse $M(\text{Rh})$	102,90550(2)	g/mol
molare Masse $M(\text{Tris-HAc})$	181,19	g/mol
molare Masse $M(\text{Tris-HCl})$	157,60	g/mol
molare Masse $M(\text{BisTris})$	209,24	g/mol
molare Masse $M(\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O})$	270,2948	g/mol
molare Masse $M(\text{NaHCO}_3)$	84,01	g/mol
molare Masse $M(\text{Na}_2\text{CO}_3)$	105,99	g/mol
molare Masse $M(\text{NH}_4\text{Ac})$	77,08	g/mol
molare Masse $M(^{54}\text{Fe})$	53,9396172	g/mol
molare Masse $M(^{56}\text{Fe})$	55,9349393	g/mol
molare Masse $M(^{57}\text{Fe})$	56,9353958	g/mol
molare Masse $M(^{58}\text{Fe})$	57,9332773	g/mol
Isotopenanteil $x(^{54}\text{Fe})$ (nat Verteilung)	5,845(23)	mol/mol
Isotopenanteil $x(^{56}\text{Fe})$ (nat Verteilung)	91,754(24)	mol/mol
Isotopenanteil $x(^{57}\text{Fe})$ (nat Verteilung)	2,1191(65)	mol/mol
Isotopenanteil $x(^{58}\text{Fe})$ (nat Verteilung)	0,2819(27)	mol/mol

## 6.9 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Ausschnitt aus der RiLiBÄK „Tabelle B 1 a Analyte in Plasma/ Serum/ Vollblut“ [7].....	2
<b>Abbildung 2</b> Youdenplot des Rinversuchs IG1/12 zur Quantifizierung von Tf in humanem Blutserum [14].....	2
<b>Abbildung 3</b> Youdenplots des Ringversuchs IG1/12: Quantifizierung von Tf durch Nephelometrie mit drei unterschiedlichen Kits [14].....	3
<b>Abbildung 4</b> Youdenplot des Ringversuchs KS4/12 zur Quantifizierung von Serumeisen [14].....	3
<b>Abbildung 5</b> Rückführungssystem aus dem Bereich der klinischen Chemie in Deutschland.....	5
<b>Abbildung 6</b> Schema der unspezifischen Immunantwort, die zu Veränderungen in den Akute-Phase-Protein-Konzentrationen führt. (Zeichnung nach [43]).....	8
<b>Abbildung 7</b> Schematische Darstellung von humanem Transferrin [47, 48] mit den beiden Bindungsstellen für Fe sowie die Koordinationssphäre des Fe <sup>3+</sup> -Ions umgeben von den vier Aminosäuren Asparaginsäure, 2 x Tyrosin und Histidin und dem Carbonation.....	9
<b>Abbildung 8</b> Schematische Darstellung der Fe-Bindung und des Transports durch Tf (Zeichnung nach [55]).....	10
<b>Abbildung 9</b> Schematische Darstellung des Agilent 1200 LC-Systems [58].....	11
<b>Abbildung 10</b> Fließschemata von Pumpen mit Mischung der Laufmittel auf a) der Niederdruckseite, b) der Hochdruckseite (Zeichnung Eluentenflaschen [58]).....	12
<b>Abbildung 11</b> Beispiele für Säulenfüllmaterialien bei der HPLC: a) NP-Chromatographie, b) RP-Chromatographie (mit R = (CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> CH <sub>3</sub> (Octadecyl), R = (CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> CH <sub>3</sub> (Octyl), R = (CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> (Phenyl)), c) IC: links: stark saurer Kationenaustauscher, rechts: stark basischer Anionenaustauscher.....	13

<b>Abbildung 12</b> Schematischer Aufbau eines ICP-MS mit Reaktions-/Kollisionszelle [58].	14
<b>Abbildung 13</b> Schematischer Aufbau einer ICP-MS Plasmafackel mit Interface, in dem kleinen Bild ist ein Querschnitt der Fackel zu sehen [58].....	15
<b>Abbildung 14</b> Temperaturverteilung in einer Plasmafackel [63] .....	16
<b>Abbildung 15</b> Schematischer Aufbau eines Quadrupols nach Lohninger [72] .....	18
<b>Abbildung 16</b> Schematische Darstellung der IDMS, Veränderung der Isotopenverhältnisse $R_i$ von Probe x und Spike y .....	20
<b>Abbildung 17</b> Schema zur Herstellung eines $^{57}\text{Fe}$ -Tf-Spikes (Proteinstruktur nach [47, 48]) .....	21
<b>Abbildung 18</b> Schematischer apparativer Aufbau der SS-IDMS [47, 48, 58] .....	22
<b>Abbildung 19</b> Schematisches Diagramm der Ansatzlösungen von single, double und triple IDMS [84].....	26
<b>Abbildung 20</b> Schematischer apparativer Aufbau der post-column IDMS [47, 48, 58]....	27
<b>Abbildung 21</b> Energiezustände für Rayleigh- und Raman-Streuung. E steht für die Energiezustände und n für die Ebene der Schwingungsfrequenz .....	28
<b>Abbildung 22</b> Schematische Darstellung der Schwingungsmodi für Amid I, II und III [94, 96] .....	29
<b>Abbildung 23</b> Resonanz Raman-Spektren von eisenfreiem Tf (apo) und vollständig mit Fe beladenem Tf (holo). Die grauen Bereiche markieren die Fe-induzierten Banden. Anregungswellenlänge: 532 nm.....	30
<b>Abbildung 24</b> Energiezustände bei der Resonanz Raman-Spektroskopie.....	30
<b>Abbildung 25</b> Abweichung des Wägewertes $m'_i$ von der tatsächlichen Masse $m_i$ als Funktion der Dichte des Wägegutes $\rho_i$ [24].....	34
<b>Abbildung 26</b> Auftriebskorrektur eines Wägegutes $i$ in einem Gefäß [24] .....	35

<b>Abbildung 27</b> Schema zur Berechnung des auftriebs- und verdunstungskorrigierten Massenanteils $w_z$ in der (Referenz)Lösung Teil 1 [24] .....	36
<b>Abbildung 28</b> Schema zur Berechnung des auftriebs- und verdunstungskorrigierten Massenanteils $w_z$ in der (Referenz)Lösung Teil 2 [24] .....	37
<b>Abbildung 29</b> Chromatogramme von vollständig mit Fe gesättigtem apo-Tf mit eisenspezifischer Detektion durch ICP-MS (blau) und proteinunspezifischer Detektion mit DAD (rot).....	45
<b>Abbildung 30</b> optimierte Trennung von Transferrin auf der Mono-Q-Säule (blau) und der AS7 (rot) .....	46
<b>Abbildung 31</b> Chromatogramme von Tf eluiert mit 12,5 mmol/kg Tris-HAc (Eluent A) und 12,5 mmol/kg Tris-HAc und 125 mmol/kg NH <sub>4</sub> Ac (Eluent B) (blau) und anschließende Blindprobe mit 25 mmol/kg Tris-HAc (Eluent A) und 25 mmol/kg Tris-HAc und 250 mmol/kg NH <sub>4</sub> Ac (Eluent B) (rot).....	47
<b>Abbildung 32</b> a) Summe der Chromatogramme der gemessenen Ionen ( $I(^{54}\text{Fe}) + I(^{56}\text{Fe}) + I(^{57}\text{Fe}) + I(^{58}\text{Fe})$ ) von Blindproben mit einem Quarzzerstäuber (rot) und einem PFA-Zerstäuber (blau) sowie b) Isotopenverhältnisse $R = I(^{57}\text{Fe})/I(^{56}\text{Fe})$ der gleichen Proben.	49
<b>Abbildung 33</b> Bestimmung der Verzögerungszeit für a) die externe Pumpe und b) die HPLC Pumpe. In c) ist das Ergebnis der Kopplung der beiden Pumpen zu sehen.....	51
<b>Abbildung 34</b> Wiederholmessungen am Beispiel von drei Messungen mit der externen Pumpe .....	52
<b>Abbildung 35</b> Chromatogramme von a) holo-Tf, Alb und einer Mischung aus beidem b) holo-Tf und Alb nach 1 h und nach 24 h c) holo-Tf in Serum und in Tris-HAc-Puffer sowie holo-Tf und Alb in Tris-HAc-Puffer d) <sup>56</sup> Fe und <sup>57</sup> Fe in einer Mischung aus mit <sup>56</sup> Fe gesättigtem Serum und mit <sup>57</sup> Fe gesättigten Tf-Lösung .....	56
<b>Abbildung 36</b> Stabilität von <sup>57</sup> Fe-Tf in einer Lösung mit natürlichem Fe über von 30 Stunden .....	58
<b>Abbildung 37</b> Stabilität des Tf über 30 Stunden.....	58

- Abbildung 38** links: HPLC – ESI-MS Chromatogramm von apo-Tf, rechts: Spektrum des Peaks bei bei (26,1 - 27,4) min ..... 59
- Abbildung 39** Ausschnitt aus dem Kontrollblatt für die Herstellung der  $^{57}\text{Fe}$ -Spike-Lösung ..... 60
- Abbildung 40** Chromatogramm von Tf gemessen mit post-column IDMS..... 62
- Abbildung 41** Chromatogramme der Mischungen der Spikelösungen mit Proben aus a) apo-Tf b) nat. Tf c) Seronorm L1 d) Seronorm L2 e) ERM-DA470k/IFCC mit Spikes..... 64
- Abbildung 42** Chromatogramme eines Probenansatzes a) Referenz und Spike (bz1), b) Referenz und Spike (bz2) und c) ERM-DA470k/IFCC und Spike (bx) ..... 68
- Abbildung 43** Simulation des Sensitivitätskoeffizienten für die Änderung in  $R_y$ . Der in dieser Arbeit verwendete Fe-Spike ist rot dargestellt [84]..... 70
- Abbildung 44** Abweichung  $\Delta$  vom Endergebnis  $w_x(\text{Tf})$  bei einer falsch bestimmten Isotopenverhältnis  $R_y$ . HR-ICP-MS (grün):  $R_y \approx 30$  mol/mol, Q-ICP-MS(rot):  $R_y \approx 19$  mol/mol (s. Kap. 3.3.7), die restlichen Punkte sind simuliert..... 71
- Abbildung 45** Chromatogramme zur Bestimmung der Beladung von Tf in a) einer zu ca. 30 % beladen apo-Tf-Lösung und b) im Serum ERM-DA470k/IFCC. .... 75
- Abbildung 46** Beladungsgrad des Tf in den Kalibrierlösungen bestimmt mit Hilfe des ICP-MS ( $b_{\text{MS}}$ ) sowie durch die gravimetrische Präparation  $b_{\text{grav}}$ . [122]. .... 75
- Abbildung 47** Simulation des Einflusses eines fehlerhaft bestimmten  $K$ -Faktors auf das Endergebnis bei der Bestimmung der Beladung  $b$  des Tf mit single IDMS und des Massenanteils  $w_x$  des Tf mit triple IDMS gemessen im humanen Serum ERM-DA470k/IFCC ..... 79
- Abbildung 48** Raman-Spektren unterschiedlicher Lösungen. Die roten Pfeile markieren die Banden, die erscheinen, wenn Fe in das Tf-Molekül eingelagert wird, die grünen Bereiche werden bei der Auswertung nicht berücksichtigt [122]. .... 80

---

**Abbildung 49** Verhältnis der Raman Intensitäten der Fe-induzierten holo-Tf Bande bei  $1603\text{ cm}^{-1}$  und der Amid I Bande bei  $1664\text{ cm}^{-1}$  bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge. Der graue Bereich, der 300 s Äquilibration, wurde zur Auswertung verwendet [122] .....81

**Abbildung 50** Ausgewählte Raman-Spektren der Kalibrierlösungen mit Beladungen zwischen 0 % (rot) und 100 % (blau). Einige ausgewählte Beladungszustände zwischen 0 und 100 % sind grün dargestellt. Im kleinen Bild sind alle verwendeten Kalibrierlösungen gezeigt, die in das Kreuzvalidierungsverfahren zur Erstellung der Kalibration eingegangen sind [122]. .....82

**Abbildung 51** Beladung von Tf gemessen mit HPLC – ICP-MS ( $b_{MS}$ ) über die Beladung gemessen mit Raman ( $b_{Raman}$ ). Die roten Messpunkte sind Messungen, bei denen die Proben für Raman mit HPLC isoliert wurden. Die blauen Messpunkte sind wie die Kalibrierlösungen behandelt worden [122]. .....83

**Abbildung 52** Sequent-Alignment von humanem Transferrin [124]. Die blau markierten Stellen sind die Bindungsstellen für die Fe-Ionen, die rot markierten Stellen sind die Bindungsstellen für die  $\text{CO}_3^{2-}$ -Ionen und die gelb markierte Anfangssequenz ist ein Signalpeptid, das nach der Translation abgespalten wird. ....112

**Abbildung 53** Struktur unterschiedlicher Sialoformen des Transferrins [36] .....113

## 6.10 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1</b> Einige Interferenzen für $m/z$ für die stabilen Isotope des Eisens .....	17
<b>Tabelle 2</b> Schwingungen und Frequenzen der Amid I, II und III Banden von Proteinen ( $\nu$ : Valenzschwingung, $\delta$ : Deformationsschwingung) [96, 97, 98, 99] .....	29
<b>Tabelle 3</b> Verwendete Chemikalien .....	39
<b>Tabelle 4</b> Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	40
<b>Tabelle 5</b> Verwendete Geräte .....	41
<b>Tabelle 6</b> Verwendete Softwares .....	42
<b>Tabelle 7</b> Passivierungsprotokoll für die HPLC .....	43
<b>Tabelle 8</b> Typische Parameter des Agilent ICP-MS 7500 zur Messung mit Kopplung an die HPLC .....	44
<b>Tabelle 9</b> Optimierte HPLC-Parameter für die Chromatographie mit dem Agilent 1200 HPLC System .....	48
<b>Tabelle 10</b> Gradienten für die HPLC und die externe Pumpe bei gemeinsamer Verwendung .....	51
<b>Tabelle 11</b> Massenanteil der Isotope in der Fe-Referenz (nat. Fe) und dem Fe-Spike ( $^{57}\text{Fe}$ angereichert) .....	61
<b>Tabelle 12</b> Gemessener Tf-Massenanteil $w_x$ und Wiederfindungen in den unterschiedlichen Proben mit double PC-IDMS. Für apo-Tf und nat. Tf wurden für die Messungen unterschiedliche Stammlösungen mit leicht variierendem Gehalt angesetzt, diese wurden zum einfacheren Vergleich auf den zertifizierten Tf-Gehalt des ERM-Materials normiert .....	63

**Tabelle 13** Gemessener Tf-Massenanteil  $w_x$  und Wiederfindungen in unterschiedlichen Proben mit double SS-IDMS. Für apo-Tf und nat. Tf wurden für die Messungen unterschiedliche Stammlösungen mit leicht variierendem Gehalt angesetzt, diese wurden zum einfacheren Vergleich auf den zertifizierten Tf-Gehalt des ERM-Materials normiert. 65

**Tabelle 14** Beitrag der einzelnen Größen zum Unsicherheitsbudget für die double PC-IDMS  $w_x = (2,36 \pm 0,13)$  g/kg Tf,  $U_{rel} = 5,3$  % mit  $k = 2$  (Beispiel für eine Messung des ERM-DA470k/IFCC) ..... 66

**Tabelle 15** Beitrag der einzelnen Größen zum Unsicherheitsbudget für die double SS-IDMS  $w_x = (2,317 \pm 0,046)$  g/kg Tf,  $U_{rel} = 4,0$  % mit  $k = 2$  (Beispiel für eine Messung des ERM-DA470k/IFCC) ..... 67

**Tabelle 16** Mischungsverhältnisse von Probe/Referenz und Spike in den Mischungen... 68

**Tabelle 17** Gemessener Tf-Massenanteil  $w_x$  und Wiederfindungen in den unterschiedlichen Proben mit triple SS-IDMS. Sowohl für apo-Tf als auch nat. Tf wurden für die Messungen unterschiedliche Stammlösungen mit leicht variierendem Gehalt angesetzt, diese wurden zum einfacheren Vergleich auf den zertifizierten Tf-Gehalt des ERM-Materials normiert. .... 69

**Tabelle 18** Beitrag der einzelnen Größen zum Unsicherheitsbudget für die triple SS-IDMS (Beispiel für eine Messung des ERM-DA470k/IFCC)  $w_x = (2,426 \pm 0,043)$  g/kg Tf,  $U_{rel} = 3,6$  % mit  $k = 2$  ..... 70

**Tabelle 19** Berechneter Beladungsgrad der gravimetrisch angesetzten Kalibrierlösungen sowie mit ID-ICP-MS gemessener Beladungsgrad. Außerdem angegeben sind die Beladungsgrade der Proben aus nat. Tf sowie dem Serum ERM-DA470k/IFCC ..... 76

**Tabelle 20** Beitrag der einzelnen Größen zum Unsicherheitsbudget für die Beladung des Tf gemessen mit IDMS  $b = (27,8 \pm 1,1)$  mol/mol,  $U_{rel} = 4,0$  % mit  $k = 2$  (Beispiel für eine Messung des ERM-DA470k/IFCC) ..... 77

**Tabelle 21** eingehende Größen in das Unsicherheitsbudget für die gravimetrische Bestimmung des Verhältnisses zwischen Fe und Tf bei der Messung für die Beladung des Tf (Beispiel für einen Ansatz der Referenz (apo-Tf zu 31,26 %)) ..... 78

**Tabelle 22** Beladung von Tf gemessen mit HPLC – ICP-MS im Vergleich mit Raman .... 84

**Tabelle 23** Liste der verwendeten Größen aus dem Unsicherheitbudget für die triple SS-IDMS ..... 88

**Tabelle 24** Angaben zur Berechnung des Unsicherheitsbudgets ..... 91

**Tabelle 25** Ergebnisse zu den Bestimmungen des Gehaltes von Tf im Serum ERM-DA470k/IFCC ..... 94

**Tabelle 26** Beladung des Serums ERM-DA470k/IFCC und eines natürlichen humanen Tf mit Fe ..... 95