

Zusammenfassung.

Es wird eine Methode zur Ermittlung der Bildungskonstanten sehr stabiler Chelatkomplexe beschrieben. Sie führt über die aus einer Neutralisationskurve erhaltliche Gleichgewichtskonstante einer Reaktion, bei der das Metall vom zu untersuchenden Chelatkomplex MX auf einen Hilfskomplexpartner tren übertritt oder umgekehrt:



oder:



wobei M' ein Metallion ist, das nur mit dem Komplexon, nicht aber mit tren einen Komplex zu bilden vermag.

Als Hilfskomplexpartner eignet sich insbesondere das Triamino-triäthylamin tren. Die drei Aciditätskonstanten von $\text{H}_3\text{tren}^{+3}$ sowie die Bildungskonstanten der Komplexe $\text{Zn}(\text{tren})^{+2}$, $\text{Ni}(\text{tren})^{+2}$, $\text{Fe}(\text{tren})^{+2}$ und $\text{Cu}(\text{tren})^{+2}$ werden angegeben. Mit Hilfe dieser Methode sind die Bildungskonstanten von $\text{Zn}(\text{Cim}\alpha)^-$, $\text{Zn}(\text{Cim}\beta)^-$, $\text{Zn}(\text{Sim}\beta)^-$ und $\text{Zn}(\text{Pim}\beta)^{-2}$ bestimmt worden, wobei $\text{Cim}\alpha^{-3}$, $\text{Cim}\beta^{-3}$, $\text{Sim}\beta^{-3}$ und $\text{Pim}\beta^{-4}$ die Anionen von Nitrilo-triessigsäure, β -Alanin-diessigsäure, Taurin-diessigsäure und β -Aminoäthyl-phosphonsäure-N,N-diessigsäure bedeuten. Weiter sind die Komplexbildungskonstanten von ZnY^{-2} , FeY^{-2} und CuY^{-2} bestimmt worden, wobei Y^{-4} das Anion der Äthylendiamin-tetraessigsäure bedeutet.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

205. Spektralphotometrische Analyse der Antigen/Antikörper Reaktion.

1. Mitteilung

von Ch. Wunderly und A. Hässig.

(17. VI. 49.)

Schon 1909 hat *Dhéré*¹⁾ gezeigt, dass Proteine im Gebiete von 2500—3000 Å eine selektive Absorption zeigen, die sich in erster Linie auf die aromatischen Aminosäurebausteine Tryptophan und Tyrosin, und in geringem Umfang auf Phenylalanin, zurückführen lässt. Seit-herige Untersuchungen²⁾ haben dargetan, dass die molekularen Extinktionskoeffizienten von Tryptophan und Tyrosin nur unwesent-

¹⁾ C. Dhéré, Diss. Fribourg (Schweiz) 1909.

²⁾ F. W. Ward, Biochem. J. **17**, 903 (1923); K. Feraud, M. Dunn und J. Kaplan, J. Biol. Chem. **112**, 323 (1935); G. Anslow und S. Wassar, J. Optical Soc. Am. **31**, 118 (1940); E. Holiday, Biochem. J. **30**, 1795 (1936); E. Holiday und A. Ogston, Biochem. J. **32**, 1166 (1938).

lich verändert werden, wenn diese Aminosäuren in Peptidbindung vorliegen. Nach *Barkdoll* und *Ross*¹⁾ haben gehaltgleiche Lösungen von Tyrosin, Tyrosyltyrosin und Tyrosyltyrosyltyrosin annähernd dieselbe Absorption. Ferner wurden die genauen Gehalte von reinem Albumin (human und bovin), γ -Globulin sowie Fibrinogen an Tryptophan und Tyrosin durch die Analysen von *Brand et al.*²⁾ sowie *Stein* und *Moore*³⁾ ermittelt. Nach *Lerner et al.*⁴⁾ entsprechen die daraus berechneten Absorptionsmaxima den spektralphotometrisch ermittelten Maxima der Absorption von Albumin, γ -Globulin und Fibrinogen.

Aus den obenerwähnten Resultaten ergeben sich neue Möglichkeiten der Spektralanalyse von Proteingemischen. Voraussetzung dafür ist ein hinreichend verschiedener Gehalt der Proteinkomponenten an Tryptophan oder Tyrosin. Ein Unterschied im Tryptophangehalt gibt sich gleich durch ein verschieden hohes Maximum bei 2750 Å zu erkennen, während der Tyrosingehalt durch die Verschiebung der Absorption bei alkalischer Reaktion von $p_H > 12$ charakterisiert werden kann. Diese Verschiebung zum längeren Wellenbereich ist mitbedingt durch die Ionisation der paraständigen Phenolgruppe⁵⁾. Bedeutsamerweise wird die Absorption von Tryptophan hiervon nicht betroffen⁶⁾; der Imino-Stickstoff besitzt nur äusserst schwache saure und basische Eigenschaften. Die beiden genannten Merkmale des Tyrosin- und Tryptophangehaltes erfüllen die folgenden notwendigen Voraussetzungen:

1. Die Absorptionskurven der beiden Aminosäuren werden durch die Bindung an ein Protein nicht verändert;
2. im Spektralbereich > 2800 Å zeigen von allen Aminosäurebausteinen nur die genannten beiden aromatischen Aminosäuren eine Absorption.

Folgende Gesichtspunkte waren für unsere Zielsetzung massgebend. Wenn die Proteingehense im Organismus, insbesondere im Knochenmark, krankheitshalber gestört wird, dann kommt es im Blutserum der Patienten zu extremen Gehalten an einzelnen Globulinuntergruppen. Es findet gleichsam eine einseitige Bahnung der Proteinsynthese im Organismus statt. Über die quantitative Zusammensetzung solcher Sera gibt uns die Elektrophorese genau Bescheid

¹⁾ *A. Barkdoll* und *W. Ross*, *Am. Soc.* **66**, 951 (1944).

²⁾ *E. Brand*, *B. Kassell* und *L. Sidel*, *J. Clin. Invest.* **23**, 437 (1944); *E. Brand*, *Am. New York Acad. Scie.* **47**, 187 (1946).

³⁾ *W. Stein* und *S. Moore*, *J. Biol. Chem.* **178**, 79 (1949).

⁴⁾ *A. Lerner* und *C. Barnum*, *Arch. Biochem.* **10**, 417 (1946).

⁵⁾ *W. Stenström* und *M. Reinhard*, *J. Biol. Chem.* **66**, 819 (1925); *G. Groh*, *Kolloid-Z.* **94**, 1 (1941); *G. Florence* und *S. Bessières*, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **27**, 293 (1945).

⁶⁾ *Arnold* und *Kistiakowsky*, *Am. Soc.* **54**, 1713 (1932); *Gulland*, *Holiday* und *Macrae*, *Soc.* **1934**, 1639; *T. W. Goodwin* und *R. A. Morton*, *Biochem. J.* **40**, 628 (1946).

(vgl. *Wuhrmann* und *Wunderly*¹⁾) und würde keine weitere Untersuchungsmethode mit herangezogen, dann müsste der Eindruck entstehen, es wären extrem viel Globuline entstanden, welche als solche auch unter physiologischen Bedingungen gebildet werden. Dem ist jedoch nicht so. In gewissen Fällen hat die Krankheit die Bildung von eigentlichen Paraproteinen zur Folge. Da deren Beweglichkeit im elektrischen Feld dieselbe ist wie jene der physiologischen Proteine, bilden die Paraproteine zumeist keine eigenen Gipfel im Electrophorese-Diagramm. Dagegen weichen sie in ihrer antigenen Reizwirkung ab, was uns gestattete, sie immunserologisch nachzuweisen (*Wuhrmann*, *Wunderly*, *Hässig* und *Hugentobler*²⁾). Nun können als determinante Gruppen entweder stark polare Atomgruppen oder auch aromatische Gruppen wie im Tyrosin oder Tryptophan (vgl. *Boyd*, 1947)³⁾ wirksam werden. Das Letztere würde die Möglichkeit ergeben, Paraproteine auf Grund ihrer Ultraviolett-Absorption zu charakterisieren. Um die Grundlagen der Methode auszuarbeiten, haben wir für den Tierversuch als Antigen kryst. Albumin, bovin, benutzt. Im Präzipitationstest fällt ein Albumin/Globulin-Symplex aus, dessen Komponenten einen prozentualen Tyrosingehalt von 4,66 resp. 6,75 und einen Tryptophangehalt von 0,19 resp. 2,86% besitzen. Diese Kenntnis schafft eine genaue Ausgangslage und soll später die Analyse des Globulin/Globulin-Symplexes aus der Präzipitation von Paraproteinen erleichtern.

Experimenteller Teil.

Das kryst. Albumin (bovin) war von *Armour & Co.* (Chicago) geliefert; der Feuchtigkeitsgehalt war an einer Probe ermittelt worden, die längere Zeit auf 110° erhitzt worden war. Die Aminosäuren⁴⁾ wurden zweimal aus Wasser umkrystallisiert.

Bei der Herstellung der Anti-albuminseren hielten wir uns an eines der gebräuchlichen Immunisierungsschemata. Als Antigen verwendeten wir eine 1-proz. Rinderalbumin-Lösung. Diese wurde Seitzfiltriert und bei 4° aufbewahrt. Wir immunisierten damit 3 Kaninchen; die Tiere erhielten jeweils an den ersten 4 Wochentagen je 1 cm³, nach der 8. Injektion je 2 cm³ Antigen in die Ohrvene. 2 Tiere hatten nach 4 Serien reichlich Antikörper gebildet, welche noch bei stärkerer Verdünnung des Antigens rasch und kräftig flockten. Diese beiden Tiere, Nr. 1645 und 1644, wurden aus der Carotis entblutet, die Seren Seitzfiltriert und ohne weiteren Zusatz zu den Versuchen verwendet.

Für die Aufnahme der Ultraviolett-Absorptionskurven diente das *Beckman*-Spektrophotometer Modell DU. Die Trennschärfe bei den zumeist gebrauchten Wellenlängen von 280 m μ und 305 m μ beträgt 12,2 Å und 14,7 Å. Nach *Coumou*⁵⁾ ist die erreichbare Genauigkeit 0,1%. Die Extinktionskoeffizienten werden angegeben als $E_{1\text{cm}}^{1\%}$, wobei c in g% und die Schichtdicke in cm ausgedrückt werden.

¹⁾ *Wuhrmann* und *Wunderly*, „Die Bluteiweisskörper des Menschen“, Basel 1947, Seite 257.

²⁾ *Wuhrmann*, *Wunderly*, *Hässig* und *Hugentobler*, *Helv. med. acta* (1949) (im Druck).

³⁾ *W. C. Boyd*, *Fundamentals of Immunology*, New York (1947).

⁴⁾ Waren uns in verdankenswerter Weise von der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co.* Basel, zur Verfügung gestellt worden.

⁵⁾ *D. J. Coumou*, *Anal. chim. acta* **2**, 693 (1948).

1. UV.-Absorption von Tyrosin, Tryptophan und Albumin im p_H -Bereich von 2—11.

Dazu wurden wässrige Lösungen mit einem Gehalt an Tyrosin von 28 mg%, an Tryptophan von 8 mg% und an kryst. Albumin (bovin) von 140 mg% hergestellt. Dieselben wurden im Verhältnis 1:1 mit Pufferlösungen gemischt, die nach *H. T. Britton* und *R. A. Robinson* aus Mischungen von 0,04-m. Phosphorsäure, Essigsäure, Borsäure und 0,2-n. NaOH bestanden. Die p_H -Werte wurden mit hoehohmiger Glaselektrode kontrolliert.

Tabelle 1.

p_H	$E_{cm}^{\%}$ -Werte von					
	L-Tyrosin		L-Tryptophan		Albumin, kryst.	
	280 $m\mu$	305 $m\mu$	280 $m\mu$	305 $m\mu$	280 $m\mu$	305 $m\mu$
2,0	65,5	0,24	290,1	6,3	5,9	0,24
3,3	65,7	0,28	291,0	6,4	6,0	0,24
5,0	65,7	0,36	292,2	6,5	6,1	0,26
7,2	68,0	2,29	292,4	6,5	6,1	0,30
9,1	75,1	17,3	293,0	6,5	6,3	0,34
11,0	87,2	59,0	293,9	6,6	7,9	1,41

Die spez. Absorption von Tryptophan ist bei neutraler Reaktion ca. 4mal so gross wie jene von Tyrosin. Sie unterscheidet sich ferner dadurch, dass sie im beobachteten p_H -Bereich praktisch unverändert bleibt. Albumin zeigt im alkalischen Gebiet etwelche Zunahme der Absorption, die aber kleiner bleibt wie diejenige von Tyrosin.

2. UV.-Absorption von Tyrosin/Tryptophan-Gemischen im p_H -Bereich von 7,4—11,0.

Um den Verhältnissen im Albumin möglichst nahe zu kommen, wurden die Konzentrationen an Tyrosin und Tryptophan so gewählt, dass bei Mischung gleicher Volumina

Tabelle 2.

p_H	$E_{cm}^{\%}$ -Werte von Aminosäuremischungen (Tyrosin/Tryptophan) im Verhältnis.									
	4:1		3:2		2,5:2,5		2:3		1:4	
	280 $m\mu$	305 $m\mu$	280 $m\mu$	305 $m\mu$	280 $m\mu$	305 $m\mu$	280 $m\mu$	305 $m\mu$	280 $m\mu$	305 $m\mu$
7,4	73,4	1,1	83,9	1,6	92,7	1,5	103,6	2,0	141,0	3,2
8,2	73,6	1,5	84,4	1,9	93,0	2,2	104,1	2,5	141,3	3,8
9,0	73,9	2,2	84,9	2,6	94,3	2,9	104,8	3,1	142,0	4,3
9,6	74,4	3,4	85,6	3,3	94,9	3,6	105,4	3,8	142,6	5,0
10,2	75,2	3,9	86,1	4,4	95,6	4,6	106,1	4,9	143,1	5,8
11,0	78,1	9,4	88,2	9,0	96,6	8,6	106,7	8,2	144,8	7,7
Im Ansatz sind mg%										
Tyrosin . .	18,3		13,7		11,45		9,1		4,5	
Tryptophan	0,6		1,2		1,45		1,8		2,4	

Lösungen entstanden, in denen das Verhältnis der Aminosäuren dasselbe war wie im Albumin, nämlich 8:1. Dazu wurden Lösungen von 32 mg% Tyrosin und von 4 mg% Tryptophan hergestellt. Als Puffersystem diente dasjenige von *Atkins* und *Pantin*¹⁾ aus Mischungen von 0,1-m. Soda und 0,1-m. Borsäure. Von den Aminosäurelösungen wurden Mischungen im Volumenverhältnis 4:1, 3:2, 2,5:2,5, 2:3 und 1:4 hergestellt, wobei das Gesamtvolumen jeweils 2,5 cm³ betrug. Jeder Mischung wurde noch 1 cm³ Pufferlösung hinzugefügt.

Der Vergleich der UV.-Absorption der Aminosäuremischungen zeigt, wie die p_H -Abhängigkeit mit dem Ansteigen des Tryptophan-gehaltes abnimmt und gleichzeitig die spez. Absorption zunimmt. Die Alkaliempfindlichkeit des Gemisches 2,5:2,5 ist grösser als diejenige von Albumin (vgl. Tab. 1), obwohl Tyrosin und Tryptophan in demselben Verhältnis vorhanden sind.

3. Die Prüfung der Reproduktionsgenauigkeit der Präzipitation.

Für die Bestimmung der Fehlerbreite, mit welcher die Präzipitation behaftet ist, bietet die Messung der Absorption auf den Wellenlängen 280 m μ und 305 m μ eine zuverlässige Methode. Dazu wird, ausgehend vom 1-proz. Albumin als Antigen, mit NaCl phys. eine Verdünnungsreihe im Verhältnis $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ bis $\frac{1}{512}$ hergestellt. Diese Antigenverdünnungen haben je ein Volumen von 1,5 cm³. Nun wird in jedes Röhrchen 1,5 cm³ Kaninchenantiserum Nr. 1644 fliessen gelassen und durch Umschwenken genau homogenisiert. Darauf wird die Röhrchenreihe erst für 2 Stunden bei 37° gehalten und dann für 96 Stunden in einen auf 3° eingestellten Eisschrank gestellt. Nach dieser Zeit wird scharf abzentrifugiert, vorsichtig abgegossen, abtropfen gelassen, je 3 cm³ NaCl hinzugegeben, darin aufgerührt, 30 Minuten stehen gelassen und wieder scharf abzentrifugiert. Dieses Waschen wird noch zweimal wiederholt (vgl. *Heidelberger* und *Kendall*)²⁾. Bereits beim Herausnehmen aus dem Brutschrank lässt sich nach 2 Stunden ein erstes Urteil gewinnen, welches das optimale Verhältnis von Antigen zu Antikörper ist. In unserem Falle liegt dasselbe eindeutig im Röhrchen Nr. 8 mit der Antigenverdünnung $\frac{1}{128}$. Mit dieser als optimal erkannten Antigenverdünnung werden nun 8 Parallelversuche angesetzt. Zu je 1 cm³ Albuminverdünnung $\frac{1}{128}$ wird 1 cm³ Kaninchen-Antiserum gegeben und wie oben verfahren. Die gewaschenen Präzipitate werden in 3 cm³ 0,1-n. NaOH gelöst und ihre Absorption auf den Wellenlängen 280 und 305 m μ gemessen. Aus der Mikro-*Kjeldahl*-Bestimmung³⁾ ergibt sich ein Proteingehalt von 18 mg% im Ansatz zur Absorptionsmessung; dieser Gehalt ist hinlänglich klein, um eine messbare Streulichtwirkung auszuschliessen. Eine Opaleszenz der Lösung ist weder von Auge noch im Stufenphotometer von *Zeiss-Pulfrich* festzustellen. Nach *Holiday* (loc. cit.) muss für das gestreute Licht eine Korrektur dann vorgesehen werden, wenn der Proteingehalt in der Quarzküvette 100 mg% übersteigt.

Tabelle 3.

m μ	8 Präzipitate aus Albumin und Kaninchenanti-Albuminserum zeigen bei $p_H > 12$ folgende Werte für $E_{cm}^{\%}$							
280	14,5	14,3	15,1	14,8	14,6	14,8	14,6	14,7
305	5,4	5,5	5,8	5,8	5,7	5,8	5,5	5,7

¹⁾ *W. R. Atkins* und *C. F. Pantin*, *Biochem. J.* **20**, 102 (1926).

²⁾ *Heidelberger*, und *F. Kendall*, *J. Exp. Med.* **55**, 555 (1932).

³⁾ Deren Ausführung Frl. Dr. *G. Bussmann*, Leiterin des mikroanalytischen Laboratoriums des Chemischen Institutes der Universität Zürich, freundlicherweise übernommen hatte.

Im Durchschnitt von 8 Bestimmungen beträgt $E_{cm}^{\%}$ bei $280 m\mu$ 14,68 und bei $305 m\mu$ 5,66; die Präzipitat-Reaktion lässt sich mit einer Fehlerbreite von $\pm 3\%$ reproduzieren.

4. Prüfung der Gültigkeit des *Beer-Lambert'schen* Gesetzes.

Wenn man sich die Frage vorlegt, ob bei der Absorptionsmessung hochverdünnter, farbloser Proteinlösungen die Voraussetzungen für die Gültigkeit des *Beer'schen* Gesetzes erfüllt sind, so kann man dies grösstenteils bejahen. Wird etwa Albumin im Konzentrationsgebiet von $0,10 \cdot 10^{-4}$ bis $0,03 \cdot 10^{-4}$ gemessen, so hält sich die Änderung des Brechungsindex in sehr engen Grenzen, und Gleichgewichtsverschiebungen sind nicht zu erwarten; ebenso darf man bei Benützung des *Beckman-Apparates* die Monochromasie des Lichtes als genügend voraussetzen. Eine Wechselwirkung der Albuminteilchen untereinander dürfte, falls sie eintritt, kaum erheblich sein, weil die Ladungsverteilung an der Oberfläche der nahezu kugeligen Teilchen sehr gleichmässig ist. Das Dipolmoment von Albumin beträgt 380 *Debye*-Einheiten, gegen 1100 für γ -Globulin. Deshalb auch die Änderung der Assoziation, wenn weitere Plasmaproteine, etwa γ -Globulin oder Fibrinogen hinzukommen (vgl. *Harkness*)¹). Von Fremdzusätzen sind Puffersysteme zu vermeiden, welche Phtalsäure-, Veronal- oder Citrationen enthalten, da deren bedeutende Affinität zu Albumin von *Klotz et al.*²) nachgewiesen wurde. Der Absorptionsmessung von Serum oder Plasma hat Dialyse vorauszugehen, da Harnsäure, freie Phenole und Tyrosin den Messwert beeinflussen können, wenn ihr Gehalt krankheitshalber erhöht ist (vgl. *Lerner*)³).

Während die genannten Faktoren entweder eliminiert oder in ihrer Wirkung vernachlässigt werden können, vermag die Tatsache, dass Proteine nicht molekulardispers, sondern kolloiddispers gelöst sind, das Messergebnis stark zu beeinflussen. Die besonders grosse Empfindlichkeit des kurzwelligen Lichtes für *Tyndall*-Streuung geht aus der Formel von *Rayleigh* hervor, in der die Wellenlänge λ des einstrahlten Lichtes in ihrer vierten Potenz im Nenner steht. Die Beeinträchtigung des Messergebnisses durch Lichtstreuung ist somit bei $280 m\mu$ grösser als bei $305 m\mu$. Die scheinbare, wie die wahre Abweichung vom *Beer'schen* Gesetz, die sich daraus ableiten, wurden von *Heller et al.*⁴) auf Grund von *Tyndall*-Spektren gemessen. Die Formel zeigt ferner, dass die von dem streuenden Sol ausgesandte Lichtintensität dem Quadrat des Eigenvolumens des Proteinteilchens proportional ist. Wenn wir das Mol.-Gew. des Albumins zu 70 000 und

¹) *J. Harkness*, *Biochim. biophys. acta* **3**, 34 (1949).

²) *I. M. Klotz* und *J. M. Urquhart*, *J. Phys. Coll. Chem.* **53**, 100 (1949); *I. M. Klotz*, *Chem. Reviews* **41**, 373 (1947).

³) *A. Lerner* und *C. Barnum*, *Arch. Biochem.* **11**, 505 (1946).

⁴) *W. Heller* und *E. Vassy*, *J. Chem. Physics* **14**, 565 (1946).

seine minimale Valenz nach *Hooker et al.*¹⁾ zu 6 annehmen, so besitzt unser Antigen/Antikörper-Symplex ein ungefähres Teilchengewicht von minimal 1 084 000. Nach *Heidelberger*²⁾ würde dieses Verhältnis nur bei starkem Antikörper-Überschuss zustande kommen; seinen Messungen zufolge beträgt die Antigenvalenz von Albumin im optimalen Bereich nur 3—4; demnach hätte der Symplex nur ein ungefähres Teilchengewicht von 577 000 bis 746 000. Unter der Annahme, dass die Volumina der Proteinteilchen sich näherungsweise gleich verhalten wie die Teilchengewichte, ist ihr Verhältnis von Antigen zu Symplex wie 1 zu 7,2—10,7. Ihr Einfluss auf die *Tyndall*-Streuung steht somit im Verhältnis von 1 zu 52—114. Um dieser Gefahr der Beeinflussung der Absorptionsmessung durch Streulicht möglichst auszuweichen, haben wir die Anfangskonzentration der Verdünnungsreihen möglichst niedrig gehalten. Sie beträgt bei Albumin 75 mg% und beim Symplex 28,3 mg%.

Tabelle 4.

Protein-Konzentrationen und $E_{cm}^{\%}$ -Werte bei 285 m μ und $p_H > 12$					
Albumin (Antigen)		Antigen/Antikörper-Symplex		Serumrest	
c	$E_{cm}^{\%}$	c	$E_{cm}^{\%}$	c	$E_{cm}^{\%}$
0,075	7,21	0,0283	25,5	0,021	11,5
0,050	7,25	0,0189	24,5	0,014	11,4
0,0375	7,38	0,0126	24,4	0,0093	11,7
0,030	7,44	0,0084	24,5	0,0062	11,5
0,025	7,47	0,0056	25,0	0,0041	11,6
0,0214	7,49	0,0037	24,8	0,0028	11,6
Mittelwert	7,37		24,8		11,5
Fehlerbreite	$\pm 2,2\%$		$\pm 2,6\%$		$\pm 2,5\%$

Unter Serumrest verstehen wir denjenigen Bestandteil des Kaninchen Anti-Albumin-Serums, der übrig bleibt, nachdem das Antikörperprotein im optimalen Verhältnis durch homologes Albumin-Antigen ausgefällt worden ist. In diesem Serumrest der „equivalence zone“ (nach *Boyd*, loc. cit.) ist der Gehalt an Antigen wie an Antikörper ein Minimum. Vergleicht man die mittleren Extinktionskoeffizienten, so ergibt sich eine Zunahme im Sinne von Albumin (Antigen) < Rest-Serum < Antigen/Antikörper-Symplex. Die Extinktion von Albumin ist niedrig wegen des relativ geringen Tryptophangehaltes; diejenige des Serumrestes entspricht derjenigen von normalem Serum ($E_{cm}^{\%}$ 10,1—11,8 bei p_H 10, vgl. *Löffler*, *Wunderly* und

¹⁾ *S. Hooker* und *W. Boyd*, *J. Immunol.* **45**, 127 (1942).

²⁾ *M. Heidelberger*, *Bact. Rev.* **3**, 49 (1939); *Chem. Rev.* **24**, 323 (1939).

Wuhrmann¹⁾); auf die Extinktion des Symplexes wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

In der Folge wurden aus den obigen Daten die molaren Extinktionskoeffizienten von Albumin und dem Antigen/Antikörper-Symplex berechnet. Für Albumin wurde ein Teilchengewicht von 70 000 zugrunde gelegt, wie *Svedberg* und *Pedersen*²⁾ es aus der Kombination von Sedimentationsgeschwindigkeit und Diffusion ermittelt haben; für den Symplex wurde ein Teilchengewicht von 746 000 angenommen, was stöchiometrisch dem Verhältnis von 1 Albumin- zu 4 Globulin-Teilchen entspricht.

Tabelle 5.

Molare Extinktionskoeffizienten bei 285 m μ und p _H > 12 von	
Albumin	Symplex
50 540	18 990 $\times 10^3$
51 060	18 300
51 250	18 190
51 910	18 370
51 870	18 670
51 710	18 350

Wir finden somit für kryst. Albumin, bovin, einen mittleren molaren Extinktionskoeffizienten von 51 390 und für den Antigen/Antikörper-Symplex $18 480 \times 10^3$.

5. Die Bestimmbarkeitsgrenze des spez. Präzipitates.

Um zu erfahren, welche minimalen Gehalte an spez. Präzipitat (mit der angeführten Fehlerbreite) noch bestimmt werden können, haben wir die Reihe der Symplex-Verdünnungen (siehe Tab. 4) bis zu $c = 0,00167$ weitergeführt. In jedem Messansatz sind in der 3 cm³-Lösung, welche die Quarzzone aufnimmt, noch 50 γ Protein enthalten. Diese lassen sich somit bestimmen mit einer Fehlerbreite von $\pm 2,6\%$. Für eigentliche „feinspektral-photometrische“ Konzentrationsbestimmungen dürfte die Ablesegenauigkeit noch gesteigert werden können durch Beschränkung der Fehlermöglichkeiten aus Schichtdicke, Messblende, Teilkreis und Galvanometerskala. Wesentlich ist ferner eine weitere Steigerung der Empfindlichkeit der Photozelle für minimale Intensitätsunterschiede. Immerhin ist zu bedenken, dass schon die Fehlerbreite des hier verwendeten Messverfahrens unter derjenigen der Präzipitat-Reaktion ($\pm 3\%$, s. Abschnitt 3) liegt. Es ist somit in erster Linie dieser Teilvorgang nach Dauer, Temperatur, Salzeinfluss und p_H genau festzulegen.

¹⁾ *W. Löffler, Ch. Wunderly und F. Wuhrmann*, Schweiz. Med. Wschr. **79**, 595 (1949).

²⁾ *T. Svedberg und K. Pedersen*, The Ultracentrifuge, Oxford 1940, p. 406.

Zum Vergleich sei angeführt, dass *Heidelberger* und *Mac Pherson*¹⁾ mit dem Phenol-Reagens von *Folin-Ciocalteu* spez. Präzipitate mit einem Proteingehalt von 62,5 γ bestimmen, jedoch mit einer Messgenauigkeit von $\pm 12 \gamma$ (vgl. *Kabat*)²⁾.

6. Berechnung der Gehalte an Tyrosin und Tryptophan von Aminosäuregemischen und Albumin aus ihren $E_{cm}^{\%}$ -Werten bei $p_H > 12$.

Aus den molekularen Extinktionskoeffizienten von Tyrosin und Tryptophan in 0,1-n. NaOH, hat *Holiday* (loc. cit.) Beziehungen abgeleitet, welche die Gehalte von Mischungen obiger Aminosäuren zu berechnen gestatten. Um diese wertvolle analytische Möglichkeit nachzuprüfen, haben wir Gemische der obenerwähnten aromatischen Aminosäuren durchgemessen, wobei das Verhältnis derselben gleich wie im Albumin war, nämlich 8,6 T. Tyrosin zu 1 T. Tryptophan. Parallel dazu wurde Albumin gemessen, dessen Konzentration so bemessen wurde, dass Tyrosin- und Tryptophan-Gehalt gleich wie in den obigen Gemischen waren. In den letzteren war die Konzentration an Tyrosin $0,21 \cdot 10^{-3}$ mol/l. und die an Tryptophan $0,0215 \cdot 10^{-3}$; das Albumin-Sol hatte einen Gehalt von 70 mg $\%$.

Tabelle 6.

Nr.	Tyrosin-Tryptophan-gemisch cm ³	NaOH 0,1-n. cm ³	HCl 0,01-n. cm ³	NaCl	$E_{cm}^{\%}$ -Werte	
					280 m μ	305 m μ
1	0,6	0,6	—	1,8	122,7	65,7
2	1,2	0,6	—	1,2	121,2	63,5
3	1,8	0,6	—	0,6	121,2	64,8
4	2,4	0,6	—	—	119,2	63,9
					121,1	64,5
5	0,6	—	0,6	1,8	107,1	—
6	1,2	—	0,6	1,2	105,9	5,9
7	1,8	—	0,6	0,6	106,2	5,7
8	2,4	—	0,6	—	105,5	5,6
					106,2	5,7
Nr.	Albumin-Sol cm ³	NaOH 0,1-n. cm ³	HCl 0,01-n. cm ³	NaCl	$E_{cm}^{\%}$ -Werte	
					280 m μ	305 m μ
9	0,6	0,6	—	1,8	6,3	3,9
10	1,2	0,6	—	1,2	6,1	3,8
11	1,8	0,6	—	0,6	6,1	3,7
12	2,4	0,6	—	—	6,1	3,7
					6,15	3,77
13	0,6	—	0,6	1,8	5,8	—
14	1,2	—	0,6	1,2	5,8	0,28
15	1,8	—	0,6	0,6	5,7	0,30
16	2,4	—	0,6	—	5,7	0,30
					5,75	0,29

¹⁾ *M. Heidelberger* und *C. Mac Pherson*, *Science* **97**, 405 (1943); **98**, 63 (1943).

²⁾ *E. A. Kabat*, *J. Immunol.* **47**, 513 (1943).

Auf Wellenlänge 280 $m\mu$ beträgt die Zunahme von $E_{cm}^{\%}$ des Aminosäuregemisches bei einer p_H -Verschiebung von 2 bis > 12 14,9 Einheiten, gegen nur 0,4 beim Albumin; auf Wellenlänge 305 $m\mu$ sind die betreffenden Zahlen 58,8 und 3,5. Somit liegt die Verschiebung der Proteinextinktion auf der letzteren Wellenlänge messtechnisch günstiger. Werden die Resultate, so wie sie bei $p_H > 12$ erhalten wurden, nach *Holiday* berechnet, so erhält man die folgenden Werte.

Tabelle 7.

Ansatz Nr. (vgl. Tab. 6)	Messart:	Gehalte an	
		Tyrosin $\times 10^{-3}$	Tryptophan $\times 10^{-3}$
1 9	Aminosäuregemisch, gef. . . .	0,0433	0,0043
	Aminosäuregemisch, ber. . . .	0,0420	0,0043
	Albumin, gef.	0,0436	0,0041
2 10	Aminosäuregemisch, gef. . . .	0,0856	0,0089
	Aminosäuregemisch, ber. . . .	0,0840	0,0086
	Albumin, gef.	0,0853	0,0089
3 11	Aminosäuregemisch, gef. . . .	0,1310	0,0130
	Aminosäuregemisch, ber. . . .	0,1266	0,0129
	Albumin, gef.	0,1320	0,0120
4 12	Aminosäuregemisch, gef. . . .	0,1758	0,0173
	Aminosäuregemisch, ber. . . .	0,1680	0,0172
	Albumin, gef.	0,1731	0,0175

Die für Tryptophan gefundenen Gehalte stimmen mit den berechneten Gehalten besser überein als die Tyrosingehalte, welche durchschnittlich etwas zu hoch liegen. Diese Feststellung gilt sowohl für die Messungen am Aminosäuregemisch wie auch am Albumin.

In einer nächsten Mitteilung werden wir prüfen, ob auch in Gemischen von Proteinen bekannter Zusammensetzung die Additivität von Tyrosin- und Tryptophangehalten zu Recht besteht; nach Abklärung dieser Frage kann man eine Aussage über die Zusammensetzung des spezifischen Präzipitates gewinnen.

Die vorliegende Arbeit wurde in dankenswerter Weise durch die *Sandoz-Stiftung zur Förderung der medizinisch-biologischen Wissenschaften* in Basel, sowie durch die *Stiftung zur Förderung der wissenschaftlichen Arbeit der Universität Zürich* unterstützt.

Zusammenfassung.

Die Proteinkomponenten einer serologischen Präzipitations-Reaktion werden auf spektrophotometrischem Wege charakterisiert. Massgeblich für letzteren sind die Gehalte an Tyrosin und Tryptophan. Es werden ferner die Bestimmbarkeitsgrenze sowie die Reproduktionsgenauigkeit des spez. Präzipitates geprüft; es lassen sich in 3 cm^3 Flüssigkeit 50 γ des Präzipitates mit einer Fehlerbreite von $\pm 2,6\%$ bestimmen.

Medizinische Universitätsklinik, Zürich und
Hygiene-Institut der Universität.