J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 18, 1980, pp. 603–610

Untersuchungen zur Kupplung des 1-Naphthols mit Fast-red-TR

Untersuchungen zur Optimierung einer kontinuierlichen Bestimmung der sauren Phosphatase, 1. Mitteilung

Von G. Gundlach und B. Mühlhausen¹⁾

Zentrum für Biochemie am Klinikum der Justus-Liebig-Universität Gießen

(Eingegangen am 9. November 1979/27. März 1980)

In memoriam Gabor Szasz

Zusammenfassung: Die im Rahmen von Untersuchungen zur Optimierung einer Methode zur kontinuierlichen Bestimmung der sauren Phosphatase durchgeführten Experimente zur Kupplung von 1-Naphthol mit Echtrot-TR ergaben:

1. In Gegenwart von Detergenz oder Protein ist die Nachweisreaktion im Bereich der spektralen Absorption von 0–1 der Konzentration linear proportional.
2. Die Reaktion zwischen 1-Naphthol und Echtrot-TR-salz verhält sich in Bezug auf 1-Naphthol wie eine Reaktion 1. Ordnung.
3. Um die lag-phase der Reaktion unter 2 Minuten zu halten, muß die Halbwertszeit der Kupplung $< 0,5$ Minuten sein.
4. Eine Verkürzung der Kupplungshalbwertszeit (Erhöhung der Geschwindigkeit der Indikatorreaktion) wird erreicht durch Erhöhung der Echtrot-Konzentration, Erhöhung des pH-Wertes, in gewissen Grenzen durch Änderung der Ionenstärke und des Zusatzes an Protein und/oder Detergenzien.
5. Die Entwicklung der Chromophore ist abhängig von der Zeit und der Anwesenheit von Proteinen und/oder Detergenzien. Eine zuverlässige Messung ist nur möglich bei den isosbestischen Punkten der Chromophore. In Gegenwart von Albumin sind dies: 460 nm und 390 nm.
6. Die reproduzierbare Bildung der Chromophore erfordert die Anwesenheit von Protein (Albumin), ein Ersatz durch Detergenzien ist beschränkt möglich.
7. Puffersubstanzen sollten zur Ausschaltung eines zeitabhängigen bathochromen Effektes eine Mindestkonzentration besitzen. Citratpuffer: 0,2 mol/l; Acetatpuffer: 0,4 mol/l.
8. Serumproteine täuschen durch Kupplung mit Echtrot-TR-salz eine Enzymaktivität je nach benutzter Meßstrahlung für die Chromophore bis zu 2,6 U/l vor.
9. Die molaren spektralen Absorptionskoeffizienten für die Wellenlängen bei 390, 405 und 460 nm wurden bestimmt.
10. Empfehlungen für die Optimierung der Indikatorreaktion bei der Bestimmung der sauren Phosphatase durch Hydrolyse von Naphthylphosphat werden angegeben.

Coupling of 1-naphthol with fast-red-TR

Studies on the optimization of a continuous determination of acid phosphatase, I.

Summary: In the course of studies on the optimization of a method for the continuous determination of acid phosphatase, the coupling of 1-naphthol with fast-red-TR was investigated:

1. In the presence of detergents or protein, the detection reaction gives a linear response for spectral absorption in the range 0–1 against concentration.
2. The reaction between naphthol and fast-red-TR salt is first order with respect to 1-naphthol.

¹⁾ Teile der Dissertation B. Mühlhausen, Gießen 1980.

3. The half life time for the coupling must be less than 0.5 min, in order to keep the lag phase of the reaction below 2 min.
4. Shortening of the coupling half life time (increase in the rate of the indicator reaction) was achieved by increasing the fast-red concentration and pH-value, and by alterations, within certain limits, of ionic strength and the concentration of protein and/or detergents.
5. Development of the chromophore depends on time and the presence of proteins and/or detergents. Reliable measurements are only possible at the isosbestic point of the chromophore. In the presence of albumin, these are 460 nm and 390 nm.
6. Reproducible formation of the chromophore requires the presence of protein (albumin); replacement by detergents is possible to a limited extent.
7. In order to avoid a time-dependent bathochromic effect, buffer materials should be present in the lowest possible concentration: citrate buffer 0.2 mol/l; acetate buffer 0.4 mmol/l.
8. By coupling with fast-red-TR salts, serum proteins result in increased positive values (apparent enzyme activity) up to 2.6 U/l, depending on the measurement wavelength for the chromophore.
9. Molar absorption coefficients for wavelengths 390, 405 and 460 nm were determined.
10. Recommendations are given for the optimization of the indicator reaction in the determination of acid phosphatase by hydrolysis of naphthyl phosphate.

Einführung

Die von *Hillmann* (1) vorgeschlagene kinetische Bestimmung der sauren Phosphatase bedient sich einer Hilfsreaktion, die zur Bildung des Chromophors durch Kupplung eines Diazoniumsalzes an 1-Naphthol führt.

Die Optimierung dieser Hilfsreaktion unter Beachtung der für die enzymatische Spaltung von 1-Naphthylphosphat durch saure Phosphatase wesentlichen Bedingungen soll nachfolgend untersucht werden.

Material und Methoden

Reagenzien

Echtrot-TR-salz (Sigma Nr. 1500); 1-Naphthylphosphat p. a., naphtholfrei, Serva Nr. 30130; 1-Naphthol (p. a. Merck Nr. 6234) wurde vor Gebrauch sublimiert; Rinderserumalbumin (lyophil. rein 92% min, Serva Nr. 11930); Natriumacetat p. a.; Citronensäure p. a.; Triton X-100®; Brij 35 pract.®; Tween 80 rein®; Natriumdodecylsulfat, reinst.

Die genannten Substanzen waren von der reinsten erhältlichen Qualität.

Alle Lösungen wurden in den entsprechenden Konzentrationen kurz vor Beginn der Versuche hergestellt. Ein besonderer Lichtschutz der Substanzen und Lösungen wurde nicht vorgenommen. Die Acetatpufferlösung wurde durch Mischen gleichkonzentrierter Lösungen von Natriumacetat und Essigsäure auf den erforderlichen pH-Wert gebracht. Der Citratpuffer wurde aus Citronensäure und 500 g/l Natronlauge hergestellt und auf die entsprechende Konzentration gebracht. Pufferlösungen wurden bei 4 °C aufbewahrt. Die für die Versuche benutzte Enzymlösung wurde durch Verdünnung eines bei -18 °C aufbewahrten 8 Jahre alten Ejakulatpools hergestellt. Die Aufbereitung dieses Ejakulatpools erfolgte durch viermalige Wiederholung von Zentrifugieren, Entfernen des Niederschlages und Wiedereinfrieren und anschließende Portionierung zu etwa 1 ml. Vorversuche hatten ergeben, daß wiederholtes Einfrieren und Auftauen keinen nennenswerten Einfluß auf die enzymatische Aktivität hatten. Die Verdünnung des Enzyms erfolgte mit einer Lösung, die 600 mg/l Albumin enthielt.

Geräte

Die Messungen wurden am Eppendorf-Photometer bei 405 nm oder am Perkin-Elmer-Doppelstrahlphotometer (PE-124) bei den angegebenen Wellenlängen und einer Schichtdicke von 1 cm durchgeführt. Während der Versuche wurden Lösungen und Küvettenräume bzw. Küvettenhalter bei $25 \pm 0,1$ °C gehalten.

Ergebnisse und Diskussion

Linearität der Reaktion

Voraussetzung für die analytische Erfassung einer Reaktion ist deren zeit- und konzentrationsabhängige Linearität. Für die Kupplung von 1-Naphthol mit Echtrot ist im erforderlichen Bereich eine Linearität zwischen spektraler Absorption und Konzentration nur gegeben, wenn ein Detergenz (2) oder ein Protein zugesetzt wird. Im Bereich zwischen Absorption 0 und 1,0 können abhängig von der Enzym- bzw. Serumkonzentration bis zu 100 U/l Enzym bei einer Meßdauer von bis zu 10 Minuten linear erfaßt werden (Abb. 1).

Kinetik der Indikatorreaktion

Die Geschwindigkeit der Indikatorreaktion soll der vorgeschalteten enzymatischen Reaktion deutlich überlegen sein. Zumindest muß sie aber der Geschwindigkeit der Bildung der entstehenden Substanz proportional sein. Eine Reaktion erster Ordnung, wie sie für die Kupplung von 1-Naphthol und Echtrot-TR gegeben ist, erfüllt den zweiten Teil der genannten Bedingungen. Bei der halb-logarithmischen Auftragung von c_0/c_1 gegen die Zeit (Abb. 2) ergeben sich unabhängig von Detergenz- oder Proteinzusätzen stets lineare Abhängigkeiten. Bei keiner der von uns untersuchten Bedingungen ist ein Widerspruch zur Annahme einer Kinetik erster Ordnung in

Abb. 1. Standardkurve zur Kupplung von 1-Naphthol mit Echtrot-TR-salz (1,5 mmol/l) in Citratpuffer (0,2 mol/l; pH 5,2) bei 25 °C in Abwesenheit (x—x) oder Gegenwart von 1,5 ml/l Triton X-100 (□—□) oder 3 g/l Rinderserumalbumin (○—○).

Abb. 2. Halblogarithmische Darstellung der Reaktionsgeschwindigkeit der Kupplung von 1-Naphthol mit Echtrot-TR-salz.

a) Acetätpuffer: 50 mmol/l; pH 5,2; Echtrot 1,3 mmol/l.
 b) Citratpuffer 0,2 mol/l; pH 5,2; Echtrot 1,3 mmol/l.
 c) Citratpuffer 0,2 mol/l; pH 5,2; Echtrot 0,7 mmol/l.
 Reaktion 1. Ordnung: $\frac{dc}{dt} = k \cdot c$; $k \cdot t = \ln \frac{c_0}{c_1}$
 c_0 : Konzentration an 1-Naphthol zur Zeit $t = 0$ min;
 c_1 : Konzentration an 1-Naphthol zur Zeit t min.

Bezug auf das eingesetzte 1-Naphthol aufgetreten. Dies bedeutet, daß bei höherer Enzymaktivität und parallel dazu höherer 1-Naphtholkonzentration auch die Kupplungsgeschwindigkeit proportional zur 1-Naphtholkonzentration zunimmt. Die Abbildung 2 liefert 3 Beispiele mit unterschiedlichen Echtrot-TR und Pufferkon-

zentrationen. Die Reaktion 1. Ordnung (oder Pseudo-1. Ordnung) gewährleistet zwar eine Proportionalität zur Enzymreaktion, es bleibt dennoch überaus wichtig, die Konzentration an freiem Naphthol so niedrig wie möglich zu halten. Dies geschieht am besten dadurch, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Kupplung erhöht wird. Als Größe für die Beurteilung wählten wir die Kupplungshalbwertszeit, die bei der Reaktion 1. Ordnung unabhängig von der Konzentration der Ausgangssubstanz 1-Naphthol ist. In der Reaktion

Gl. (1)

erfolgt die Bildung des 1-Naphthol bei genügend Substratüberschuß ($K_m \ll [S]$) in einer Reaktion nullter Ordnung: $v_1 = a$ (konstante Enzymkonzentration = U/l). Das Gleichgewicht mit der Kupplungsreaktion $v_2 = k \cdot c$ (k = Konstante; c = Konzentration an 1-Naphthol) ist gegeben, wenn $v_1 - v_2 = 0 = a - k \cdot c$ wird. Die im Gleichgewicht vorhandene Konzentration an freiem 1-Naphthol ist danach direkt proportional zur Enzymaktivität

$$c = \frac{a}{k} \quad \text{Gl. (2)}$$

Bis zur Einstellung des Gleichgewichts ist die Geschwindigkeit der Kupplungsreaktion kleiner als die der Enzymreaktion

$$v_1 - v_2 = \frac{dc}{dt} = a - kc \quad \text{Gl. (3)}$$

Die Lösung dieser Differentialgleichung erlaubt die Bestimmung von c in Abhängigkeit von der Zeit

$$c = \frac{a}{k} (1 - e^{-k \cdot t}) \quad \text{Gl. (4)}$$

Da a als enzymatische Aktivität bekannt und $k = \ln 2 / \tau_{1/2}$ aus der Halbwertszeit der Kupplungsreaktion bestimmbar ist, läßt sich ermitteln, mit welcher lag-phase gerechnet werden muß, bevor die Enzym- und Kupplungsreaktion praktisch im Gleichgewicht ist.

Die Abbildung 3 ermittelt die lag-phase in Abhängigkeit von einigen Kupplungshalbwertszeiten. Für praktische Zwecke wird es ausreichen, wenn man die lag-phase dann als beendet ansieht, sobald 95 % des Gleichgewichtes eingestellt sind. Um die lag-phase kürzer als 2 Minuten zu halten, muß die Kupplungsreaktion somit eine Halbwertszeit $\tau_{1/2} < 0,5$ min aufweisen. Das Echtrot-TR-salz hat einen deutlichen Einfluß auf die Geschwindigkeit der Reaktion (Abb. 4a). Eine Verdoppelung der Echtrot-

Abb. 3. Konzentration freien 1-Naphthols vor Einstellung des Gleichgewichtes zwischen Enzym- und Kupplungsreaktion in Abhängigkeit von der Zeit. Die Schnittpunkte der Geraden mit den Kurven geben die 90 bzw. 95 oder 99%ige Einstellung des Gleichgewichtes an (vergl. Text). Die Angaben sind errechnet für eine katalytische Konzentration des Enzyms von 1 U/l.

TR-Konzentration vermag die Reaktionszeit grob gesehen zu halbieren. Eine geringere Ionenstärke wirkt geschwindigkeitserhöhend. Die Erhöhung des pH-Wertes der Reaktionslösung bringt ebenfalls eine deutliche Verkürzung der Halbwertszeit (Abb. 4b) (2). In Gegenwart von Proteinen (Serumalbumin) wird bei niederen Konzentrationen bis zu 3 g/l die Halbwertszeit verkürzt. Sie steigt dann langsam bis 6 g/l. Im Bereich zwischen 9 und 15 g/l Albumin ist die Halbwertszeit zwar einigermaßen konstant, aber deutlich verlängert. So be-

trägt die Halbwertszeit der Kupplung sowohl in 0,4 mol/l Acetatpuffer wie in 0,2 mol/l Citratpuffer in Gegenwart von 3 g/l Rinderserumalbumin nur noch 12–14 Sekunden (vergl. mit Abb. 4). Zusätze von zweiwertigen Alkoholen (z. B. Pentan-1,5-diol) verkürzen die Halbwertszeit, so daß man deren Verlängerung durch Proteine mit Alkoholzusatz abfangen kann. Der Einfluß von Detergenzien in niederen Konzentrationen läßt sich analog dem von Albumin beschreiben. In höheren Konzentrationen, z. B. über 1 bis 2 g/l, verlängern Triton-X-100® und Brij 35® deutlich die Kupplungszeit.

Stabilität der bei der Kupplung entstehenden Farbstoffe

Die bei der Kupplung von 1-Naphthol mit Echtröt-TR-salz entstehenden Chromophore sind bezüglich ihrer spektralen Absorption höchst unterschiedlich. Ihre Bildung und Entwicklung ist von der Reaktionszeit und von der Gegenwart von Proteinen oder Detergenzien abhängig. Während die Kupplungsprodukte der reinen Komponenten deutliche Absorptionsmaxima bei 550 und 430 nm aufweisen, wird in Gegenwart von Albumin ein Maximum bei 380 nm deutlich hervorgehoben. Zusatz von Detergenzien bewirkt die Bildung intermediärer Chromophore mit wandernden Maxima (bei Triton X-100® z. B. bei 520, 420 und 375 nm). Außerdem ändert sich die Absorption in erheblichem Maße in Abhängigkeit von der Zeit (3). Die Abbildung 5 verdeutlicht dies für die Kupplung in Gegenwart von Albumin und von Triton X-100®. Beide Spektren zeigen isosbestische Punkte, bei denen unabhängig von der bei anderen Wellenlängen beobachteten zeitabhängigen Bildung der Chromophore gemessen werden kann. In Gegenwart

Abb. 4. Reaktionsgeschwindigkeit der Kupplung von 1-Naphthol mit Echtröt-TR-salz

a) Abhängigkeit von der Konzentration an Echtröt-TR-salz (Acetatpuffer: 50 mmol/l; pH 5,2; 25 °C (x—x); Citratpuffer: 0,2 mol/l; pH 5,2; 25 °C (o—o)).

b) Abhängigkeit vom pH-Wert der Reaktionslösung (Citratpuffer: 0,2 mol/l; 25 °C; o—o; Acetatpuffer: 50 mmol/l; 25 °C; x—x; Triton X-100: 1 ml/l)).

Echtröt-TR-Konzentration: 1,5 mmol/l; 1-Naphtholkonzentration: 50 μmol/l. $\tau/2$ ist die Zeit bis zum Erreichen der halben maximalen Absorption bei 405 nm.

Abb. 5. Änderung der spektralen Absorption in Abhängigkeit von der Zeit für die Kupplung von 1-Naphthol mit Fast-red-TR-salz in Acetatpuffer (0,4 mol/l; pH 5,2; 25 °C).

a) bei Zusatz von Albumin (1 g/l)

b) bei Zusatz von Triton X-100 (1 g/l).

von Albumin oder Triton X-100® liegen die isosbestischen Punkte bei 460 und 395 nm (die möglichen Abweichungen betragen ± 5 nm). Die entstehenden Chromophore sind in ihrer Bildung abhängig von der Konzentration an Protein oder Detergenz. Für den Zusatz von Rinderserumalbumin wird dies in Abbildung 6 verdeutlicht. Die untere kritische Konzentration, bei der eine erhebliche Änderung des Spektrums erfolgt, liegt bei etwa 0,2 g/l an Albumin. Diese Konzentration wird bei jeder Untersuchung von Serum oder Blut-Plasma überschritten, spielt aber eine erhebliche Rolle bei der Untersuchung von Seminalplasma, das etwa 10000-fach verdünnt werden muß, um in den Bereich meßbarer Enzymaktivitäten zu gelangen. Eine analoge Änderung des Spektrums ist für die Detergenzien Triton X-100®, Tween 80®, Brij 35® und Natrium-dodecylsulfat (SDS) zu beobachten. Die kritischen Konzentrationen betragen für Brij 35 0,02 g/l und für SDS 0,005 g/l. Bei Triton X-100 tritt bei einer unteren Konzentration von 0,4 ml/l eine drastische Änderung des Spektrums auf. Dieses Spektrum, das ein ungewöhnlich hohes Absorptionsmaximum bei 400 nm aufweist, ist aber nur kurzfristig ausgebildet. Die

Abbildung 7 zeigt die Kinetik der Kupplungsreaktion in Abhängigkeit von der Detergenzkonzentration. Das ungewöhnliche Maximum bei Triton X-100® fällt zusammen mit der kritischen Konzentration für die Bildung von Micellen (4, 5). Über den Zusammenhang zwischen der Kupplungsreaktion und der Ausbildung von Micellen läßt sich aus diesen Beobachtungen noch nicht diskutieren. Ein Einfluß kann erwartet werden, weil die sich bildenden Chromophore eine eingeschränkte Wasserlöslichkeit aufweisen. Ohne Zusatz von Protein oder Detergenz flockt der gebildete Farbstoff nach kurzer Zeit aus. Es bleibt zunächst unklar, weshalb in Gegenwart von Triton X-100® bei 37 °C sehr schnell eine Trübung auftritt, die in Gegenwart von Albumin über lange Zeiten (Tage) unterdrückt werden kann.

Einfluß von Puffersubstanzen

Für die Bestimmung der sauren Phosphatase mit einem pH-Optimum um pH = 5,2 kommen als Puffersubstanzen sowohl Salze der Citronensäure wie der Essigsäure in Frage. In der neueren Literatur (1–3, 6–8) wird aus-

Abb. 6. Änderung der spektralen Absorption in Abhängigkeit von Rinderserumalbumin für die Kupplung von 1-Naphthol mit Echtrot-TR-salz in Acetatpuffer (0,4 mol/l) pH 5,2 und 25 °C. Ausgangskonzentration an 1-Naphthol: 50 μ mol/l.

schließlich Citratpuffer benutzt, während in älteren Arbeiten z. B. (9, 10) dem Acetatpuffer der Vorzug gegeben wird. In geringen Konzentrationen ist der Acetatpuffer (bei 50 mmol/l) dem Citratpuffer (0,1 mol/l) hinsichtlich der Kupplung überlegen: Die Halbwertszeit für die Kupplung ist kürzer (vergl. Abb. 4) und die Beständigkeit der Echtrot-TR-Lösung besser (Abb. 8).

Eine geringe Pufferkapazität kann in normalen Seren eine Kupplungsreaktion und damit verknüpft eine enzymatische Aktivität vortäuschen. Der Zusatz von Serum zu Acetatpuffer (pH 5,2; 0,1 mol/l) in einem Volumenanteil von 0,1 bewirkt bei den für die Kupplung optimalen Wellenlängen in den ersten 10 Minuten Absorptionsänderungen in der Größenordnung von 0,05–0,08 A. Dieser Effekt einer Hyperchromie ist auch in Citratpuffer (0,05 mol/l) nachweisbar, er läßt sich in Citratpuffer bei einer Konzentration oberhalb 0,1 mol/l und in Acetatpuffer oberhalb 0,3 mol/l unterdrücken. Deshalb sollten Citratpuffer einer Konzentration von 0,2 mol/l, Acetatpuffer einer solchen von 0,4 mol/l Verwendung finden.

Einfluß von Echtrot-TR auf Serumproteine

Eine bei der Benutzung von Echtrot-TR-salz zur Kupplung von 1-Naphthol unvermeidliche Reaktion ist die Kupplung von Echtrot-TR-salz mit Komponenten der Serumproteine. Wie man aus der Abbildung 9 entnehmen kann, trägt die Bildung von störenden Chromophoren durch Kupplung von Proteinen des Serums signifikant zu einer Fälschung der bestimmten Enzymakti-

Abb. 7. Kinetik der Kupplungsreaktion zwischen 1-Naphthol und Echtrot-TR-salz in Abhängigkeit von der Triton X-100®-Konzentration (Acetatpuffer 0,4 mol/l; pH 5,2 und 25 °C. Ausgangskonzentration an 1-Naphthol: 50 μ mol/l).

Abb. 8. Kupplung in Abhängigkeit vom Alter der eingesetzten Echtrot-TR-Lösung.
 ○—○ Kupplung in Acetatpuffer (50 mmol/l; pH 5,2; 25 °C).
 x—x Kupplung in Citratpuffer (0,1 mol/l; pH 5,2; 25 °C).
 Echtrot: 1,5 mmol/l; Albumin 3 g/l; 1-Naphthol 50 bzw. 45 µmol/l. Die unteren Kurven stellen die Leerwerte ohne 1-Naphthol dar.

Abb. 9. Kupplungskinetik von Echtrot-TR-salz mit Serumkomponenten. Echtrot-TR (2 mmol/l) in 0,4 mol/l Acetatpuffer, pH 5,2; 25 °C. Zu 1 ml Echtrot-TR-Lösung wurde 0,1 ml Serum gefügt.
 Im eingesetzten Diagramm ist die Farbbildung nach 60 Minuten in Abhängigkeit von der Echtrot-TR-Konzentration dargestellt.

vität bei. Ihre Größenordnung beträgt abhängig von der Wellenlänge des Meßstrahles zwischen 0,0014 und 0,0048 A/min (für die ersten 10 Minuten). Läßt man eine lag-phase von etwa 5 min zu und mißt dann während 5 min, so betragen die Absorptionsdifferenzen

0,0036 A/min bei 390 und 405 nm und 0,0012 A/min bei 460 nm. Diese Absorptionsdifferenzen entsprechen bei einem Zusatz von 0,1 Volumenanteil Serum zum Phosphatasetest einer vorgetäuschten Aktivität bis zu 2,6 U/l für 390 nm und 405 nm und 1,5 U/l für 460 nm. Aus den Abbildungen 5 und 7 geht hervor, daß die Absorption des gebildeten Farbstoffes bei 405 nm ein Maximum durchläuft und dann in Abhängigkeit von der Zeit abnimmt. Diese Abnahme der Absorption ist in vielen Fällen gerade so groß wie die Zunahme der Absorption durch die Kupplung des Echtrot-TR mit Serumkomponenten. Daraus resultiert ein scheinbar günstiger, relativ geringer Leerwert bei der Phosphatasebestimmung.

Molare spektrale Absorption des Chromophors

Aus den vorgelegten Daten geht hervor, daß die Bestimmung des Chromophors bei 405 nm durch 2 konkurrierende Reaktionen bestimmt wird. Die Bestimmung des Chromophors bei 390 nm und bei 460 nm wird durch die Reaktion mit Serumkomponenten gestört. Dabei ist der Einfluß des Serums bei 460 nm relativ geringer. Die molaren spektralen Absorptionskoeffizienten ergeben sich wie folgt (vergl. auch l. c. (1–3) und (7, 8)):

1. reine Chromophore in Gegenwart von Albumin (3g/l)

$$\epsilon_{390} : 13\,600 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$$

$$\epsilon_{460} : 8\,000 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$$

$$\epsilon_{405} : 14\,100 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$$

(Für den Wert bei 405 nm wurde die jeweils maximal entstehende Absorption zugrunde gelegt. Der Absorptionskoeffizient wurde in Gegenwart von Albumin von 0,5 g/l bis zu 15 g/l gemessen. Es ergab sich dabei die Regressionsgrade $y = 13,8 + 0,108 x$ ($x = \text{g/l Albumin}$) $r = 0,9154$)

2. reine Chromophore in Gegenwart von Triton X-100 (1 g/l)

$$\epsilon_{405} : 15\,200 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$$

3. reine Chromophore ohne Albumin oder Detergenz

$$\epsilon_{405} : 10\,300 \text{ l/mol} \cdot \text{cm}$$

Bei den Untersuchungen über die Beständigkeit der entstehenden Chromophore stellte sich heraus, daß das reine Kupplungsprodukt bereits nach kurzer Zeit als Niederschlag aus der Kupplungslösung ausfällt. Auch in der Triton X-100® enthaltenden Lösung bildet sich bei 30 °C bereits nach einer halben Stunde eine Trübung mit danach ausfallendem Niederschlag. Lediglich in Gegenwart von Albumin hält sich der Farbkomplex bei 37 °C tagelang in klarer Lösung. Versuche, durch Zusatz von Lösungsmitteln wie Dimethylsulfoxid die Chromophore in Lösung zu halten, führten nicht zum Erfolg. Hingegen hatte der Zusatz von EDTA bis zu 10 mmol/l weder einen Einfluß auf das Kupplungsverhalten des Systems

(die Halbwertszeit der Kupplung in Acetatpuffer bei pH 5,2 wird nicht geändert) noch auf die Beständigkeit des Farbkomplexes in Gegenwart von Albumin (3 Tage).

Empfehlungen für die Optimierung der Kupplungsreaktion

1. Die Naphthylphosphatkonzentration sollte den Dissoziationskonstanten und damit den Erfordernissen für die Substratsättigung des Enzyms genau angepaßt werden (Minimierung des Leerwertes).
2. Die Konzentration an Ectrot-TR-salz sollte so niedrig wie möglich gehalten werden.
3. Der pH-Wert der Reaktion sollte bei pH 5,2 oder möglichst darüber liegen.
4. Die Ionenstärke der verwendeten Pufferlösung sollte etwa 0,4 mol/l betragen. Die Pufferlösung sollte 3 g/l Rinderserumalbumin enthalten.
5. Auf die Verwendung von Detergenzien sollte verzichtet werden.

6. Um den Einfluß von Serumproteinen zu verringern, sollte die Messung nach einer lag-phase von 5 Minuten begonnen werden.

7. Der Meßstrahl für die Bestimmung der Absorption sollte bei 460 nm gewählt werden (geringste Beeinflussung durch Fremdstoffen). Bei 405 nm sind geringe Störungen durch überlagernde Reaktionen zu erwarten.

8. Die Arbeitslösungen sollten täglich frisch angesetzt werden, die verwendete Pufferlösung kann bei 4 °C aufbewahrt werden. Ein Lichtschutz für die Lösungen ist nicht unbedingt erforderlich.

Danksagung

Frl. R. Doepp und Herrn P. Dotzauer danken wir für die gewissenhafte technische Mitarbeit, dem Fond der Chemischen Industrie (Frankfurt/Main) für die großzügige finanzielle Unterstützung.

Literatur

1. Hillmann, G. (1971), Z. Klin. Chem. Klin. Biochem. 9, 273–274.
2. Bais, R. & Edwards, J. B. (1976), Clin. Chem. 22, 2025–2028.
3. Warren, R. J. & Moss, D. W. (1977), Clin. Chim. Acta 77, 179–180.
4. Schulze, H. U., Gallenkamp, H. & Staudinger, H. J. (1973), Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 391–406.
5. Helenius, A. & Simons, K. (1975), Biochim. Biophys. Acta, 415, 29–79.
6. Shaw, L. M., Brummond, W. & Dorio, R. J. (1977), Am. J. Clin. Pathol. 68, 57–62.
7. Fabiny-Byrd, D. L. & Ertinghausen, G. (1972), Clin. Chem. 18, 841–844.
8. Sanders, G. T. B., Serné, P. & Hoek, F. J. (1978), Clin. Chim. Acta 89, 421–427.
9. Nigam, V. N. & Fishman, W. H. (1959), J. Biol. Chem. 234, 2394–2398.
10. Kilsheimer, G. S. & Axelrod, B. (1957), J. Biol. Chem. 227, 879–890.

Prof. Dr. G. Gundlach
Zentrum für Biochemie
Friedrichstraße 24
D-6300 Gießen