

Copyright ©

Es gilt deutsches Urheberrecht.

Die Schrift darf zum eigenen Gebrauch kostenfrei heruntergeladen, konsumiert, gespeichert oder ausgedruckt, aber nicht im Internet bereitgestellt oder an Außenstehende weitergegeben werden ohne die schriftliche Einwilligung des Urheberrechtinhabers. Es ist nicht gestattet, Kopien oder gedruckte Fassungen der freien Onlineversion zu veräußern.

German copyright law applies.

The work or content may be downloaded, consumed, stored or printed for your own use but it may not be distributed via the internet or passed on to external parties without the formal permission of the copyright holders. It is prohibited to take money for copies or printed versions of the free online version.

Quantitative Bestimmung von Eiweiß im Plankton mittels der Biuretreaktion¹⁾

Von Johannes KREY

Schon seit langem besteht in der quantitativ arbeitenden Planktonkunde eine Tendenz, die Untersuchungen der Planktonproben, die bislang meist nur auf Art und Anzahl der Individuen erfolgte, durch chemische Bestimmungen zu erweitern. Das Bedürfnis zu solcher Erweiterung ist vorwiegend bei produktionsbiologischen Fragestellungen gegeben. Man bemüht sich dabei um zahlenmäßige Angaben, die uns etwas über die gesamte lebende Substanz sowie über besonders charakteristische Komponenten derselben aussagen sollen. Bei den Untersuchungen dieser letzteren haben die Chlorophyllbestimmungen seit langem einen festen Platz bei produktionsbiologischen Untersuchungen inne (vgl. HARVEY, 1950). LOHMANN (1908) versuchte als erster, die Gesamtheit der Planktonbevölkerung durch Berechnung ihres Volumens aus den Zählungen und Messungen an Planktern zu erfassen. Aus diesem Volumen kann man nach Multiplikation mit dem spezifischen Gewicht des Planktons ein Gewichtsmaß für die Biomasse erhalten. (Vgl. dazu auch MACFADYAN, 1948.) L. verwendet in seiner Arbeit zwar nur den Begriff des Planktonvolumens. Dieses hat aber bei ihm eine wesentlich andere Bedeutung als die einer Raumbezeichnung, denn er schließt ausdrücklich alle „Ablagerungen von Mineralstoffen“ sowie die Vakuolen und „Safträume“ aus seinen Berechnungen aus und bezeichnet diese als „physiologisch wertlos“. Er will nur, „daß die Masse der lebenden Substanz im Volumen zum Ausdruck gebracht wird, nicht aber die sekundären Anpassungen der Organismen an die spezielle Lebensweise des Planktons“. Durch diese Definition kommt L. dem Wesen dessen, was wir heute als Biomasse bezeichnen, sehr nahe, wenn er auch diesen Begriff noch nicht gebraucht.

Andere Autoren versuchten auf dem Wege über das Absetzvolumen oder das Verdrängungsvolumen in weniger mühevoller Weise als LOHMANN der gesuchten Biomasse näher zu kommen. Über die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methoden ist bereits in einer früheren Arbeit einiges gesagt worden (KREY, 1950). Einen kleinen Schritt auf dem Wege, die Biomasse durch direkte Gewichtsbestimmungen näher zu erfassen, bedeutete eine vom Verf. ausgearbeitete Methode zur Bestimmung der Trockensubstanz kleiner Planktonproben. Diese Methode läßt jedoch keine Unterscheidung zu zwischen echtem lebenden Plankton und dem gleichzeitig mit erfaßten anorganischen und organischen Detritus. Sie erfaßt ohne Unterschied das gesamte durch ein Filter Absiebbare, das Seston. Trotzdem hat sie ihren Wert für die Erfassung aller im Wasser schwebenden geformten Partikel, aber auch als Bezugsgröße für weitergehende Bestimmungen, wie z. B. des Chlorophylls oder des Oxydationswertes.

In der neueren ökologischen Literatur weist besonders MACFADYAN (1948, 1949) darauf hin, daß alle allgemeinen Gewichtsangaben für die Gesamtbevölkerung erhebliche Mängel aufweisen. In ihnen sind fast stets die zum Teil sehr erheblichen Mengen an Skelettsubstanz enthalten, deren Werte z. B. bei Diatomeen über 50 % der Trockensubstanz ausmachen können (vgl. dazu HARVEY, 1950, und

¹⁾ Herrn Prof. Dr. G. WUST zum 60. Geburtstag gewidmet.
Herrn Prof. Dr. C. HOFFMANN und Herrn Dozent Dr. K. KALLE danke ich herzlich für ihr Interesse an dieser Arbeit und für manche Ratschläge und Anregungen.

BRANDT und RABEN, 1919). MACFADYAN fordert daher ein energetisches Äquivalent als Ausdruck für die Biomasse. Das bedeutet gewiß einen erheblichen grundsätzlichen Fortschritt, da das energetische Äquivalent frei von dem gerade bei Stoffwechselvorgängen sehr lebhaften materiellen Austausch ist. Die Energie wird nur einmal bei der Urproduktion an die organische Substanz gebunden. Durch alle weiteren Lebensvorgänge wird sie immer weiter reduziert im Gegensatz zur organischen Substanz, welche durch Anlagerungen an Gewicht zunehmen kann selbst bei Energieverlust. Leider stößt die praktische Ermittlung dieses Äquivalentwertes besonders an kleinen Proben von wenigen Milligramm auf erhebliche Schwierigkeiten, sodaß es noch in der marinen Planktonkunde an einer Methode fehlt, mit Mengen von 0,1 bis 10 mg organischer Substanz eine Bestimmung des kalorischen Wertes in Serienarbeit durchzuführen.

Alle vorgenannten Methoden befriedigen nur in begrenztem Maße den Wunsch, ein festes Maß für die Biomasse in einem bestimmten Wasservolumen zu erhalten. Man hat daher weiter versucht, mit Hilfe chemischer Methoden einzelne Elemente, welche besonders repräsentativ für die gesamte Biomasse sein sollen, zu bestimmen. Als solche wurden vor allem die Elemente C, P und N vielfach untersucht. HARVEY (1950) gibt eine kurze Zusammenfassung aus bisherigen Arbeiten über das Verhältnis zwischen diesen Elementen und der gesamten organischen Substanz. Man kann allgemein aus diesen Untersuchungen auf die organische Substanz, aber nur recht begrenzt auf die Biomasse schließen. Bei diesen chemischen Methoden ist weiter zu beachten, daß kein Unterschied zwischen der lebenden organischen Substanz und dem z. T. weitgehend abgebauten Detritus gemacht werden kann. Alle genannten Autoren und Methoden haben das gemeinsame Bestreben, ein Maß für die lebende Substanz zu gewinnen, einerlei, ob sie es direkt zu bestimmen versuchten, oder ob sie ein methodisch besonders leicht erfaßbares Element als repräsentativen Wert untersuchten. LOHMANN kam diesem Ziel noch am nächsten, nur haftet seiner Methode der Nachteil eines sehr großen Arbeitsaufwandes an, womit die Möglichkeiten, damit Serienbestimmungen durchzuführen, stark begrenzt werden.

Für die meisten produktionsbiologischen Untersuchungen interessiert das Gesamtgewicht aller Lebenssubstanz bzw. aller organischer Substanz jedoch weniger, da hierin sehr wechselnde Anteile an Reserve- und Stützsubstanzen enthalten sind. Man muß vielmehr den Begriff der Biomasse dahin einengen, daß man darunter nur alle unmittelbar lebenstragenden Stoffe zählt und die Stoffe mit sekundärer Bedeutung ausschließt. Als eigentlicher Lebensträger gilt nun allgemein das Eiweiß. Es erscheint möglich, das Eiweiß als Biomasse im engeren Sinne anzusehen, wenn man sich von vornherein nur auf das native Eiweiß beschränkt und alles Eiweiß, welches in Reserve- und Stützsubstanzen eingelagert ist, ausschließt. Damit ist der Begriff der Biomasse mehr von der Seite der Physiologie und des aktiven Lebewesens her gefaßt und bietet uns eine Möglichkeit, produktionsbiologischen Fragen auf dem Wege über eine Gesamtbestimmung des Eiweißes näherzukommen.

Grundlagen zur Bestimmung der Biomasse des Planktons

Die Forderungen, welche an eine Methode zur Erfassung der Biomasse des Meeresplanktons gestellt werden müssen, sind entsprechend den Zielen, welche man verfolgen will, unterschiedlich. Sie gliedern sich in zwei Hauptgruppen: die

Gewinnung des Materials und dessen Aufarbeitung. Bei der Materialgewinnung sind zunächst die obere wie vor allem auch die untere Grenze des zur Verarbeitung gelangenden Materials festzulegen. Die untere Grenze ergibt sich durch die Empfindlichkeit der Verarbeitungsmethode, die obere durch den gerade an Bord ausschlaggebenden Zeit- und Raumfaktor. Wenn Fragen zur Beantwortung stehen, welche sich mit der zeitlichen und räumlichen Erfüllung des Lebensraumes mit Biomasse befassen, so kann man entweder mit einer integrierenden Methode der Materialgewinnung wie den Vertikalnetzen oder dem Planktonrecorder einen Mittelwert gewinnen oder man kann sich durch punktförmige Probennahme ein zeitliches und räumliches Mosaikbild verschaffen. Beide Methoden der Materialgewinnung finden Anwendung bei produktionsbiologischen Untersuchungen, womit man sowohl der z. T. sehr differenzierten Heterogenität als auch den sich in gleichen Größenordnungen bewegenden Zahlen gerecht wird. Diese Grundüberlegungen finden sich verwirklicht in allen bisherigen planktologischen Untersuchungen, wie auch in den meisten der neueren Bestimmungsmethoden, wie z. B. der Chlorophyllbestimmung, der Bestimmung des Fettgehaltes an Netzplankton, der Sestonbestimmung u. a. Aus allem resultiert für unser Bemühen zur Erfassung der Biomasse die Notwendigkeit, mit einer möglichst geringen Menge von Material auszukommen.

Für die Aufarbeitung des Materials ergeben sich zwei besonders wichtige Forderungen: 1. Die Konservierung der Untersuchungsproben muß mit einfachen Mitteln erfolgen, falls eine sofortige Verarbeitung nicht möglich ist. 2. Falls die Umstände dieses gestatten, soll man möglichst sofort an Bord die Biomasse bestimmen, denn erfahrungsgemäß kann man dadurch oft die Probennahme der folgenden Untersuchungsstationen, u. a. wegen der biologischen Heterogenität, nach dem Eindruck von den vorhergehenden Proben sinngemäßer anlegen. Die Empfindlichkeit der Methode muß es ermöglichen, auch relativ kleine Planktonmengen in planktonreichen Gebieten mit annehmbarer Genauigkeit zu bestimmen. Als solche wäre etwa 1 mg Trockensubstanz des Planktons im Gebiet von Nord- und Ostsee anzusehen*).

Auf der Suche nach einer Methode, welche den oben präzisierten Ansprüchen nahekommt, wurden zunächst einmal alle Modifikationen der als Standardmethode bekannten Kjeldahlbestimmung ausgeschieden. Wenn auch mit dieser Methode die geforderte Empfindlichkeit und Genauigkeit erreicht, ja durch die von SHAW und BEADLE (1949) entwickelte Ultramikro-Kjeldahlbestimmung weitüberboten wird, so ist doch an eine Umgestaltung für Bordverwendung, zumal für Serienbestimmungen, nicht zu denken. Das Hauptaugenmerk wurde auf die Verwendung von Farbreaktionen des Eiweißes gelegt, die für photometrische und kolorimetrische Messungen geeignet waren. Für das Gesamteiweiß wie für seine Spaltprodukte werden eine Anzahl von Farbreaktionen beschrieben (z. B. Ninhydrinreaktion, Millonsche Reaktion, Biuretreaktion, Paulysche Reaktion usw. (vgl. WALDSCHMIDT-LEITZ, 1950). Von diesen erschien für unsere Zwecke die Biuretreaktion besonders geeignet, da sie ausschließlich auf größere Spaltprodukte des Eiweißes

*) Anm.: Wenn z. B. 1 mg Seston (bestimmt als Trockensubstanz) zu etwa 50 % aus weitgehend abgebautem Detritus und die übrigen 50 % ganz vorwiegend aus Diatomeen bestehen, die 50 % Asche und 20 % Eiweiß enthalten (vgl. HARVEY 1950), so würde sich für diese Probe ein Eiweißgehalt von 100 γ ergeben. Wenn man für diese Untersuchungsziele eine Bestimmungsgenauigkeit von 10 % fordert, dann müßte die untere Grenze der Methode zur Eiweißbestimmung bei etwa 10 γ liegen.

von den Tripeptiden an aufwärts anspricht und nicht durch Spaltprodukte wie Aminosäuren gestört wird. Die Substanzen, welche dieselbe Reaktion abgeben, das sind alle Stoffe, die zwei oder mehr CO-NH- oder CO-CH₂-Reste enthalten, z. B. Malonamid, Oxamid, sind in unserem Untersuchungsmaterial nicht in so beträchtlicher Menge zu erwarten, als daß sie einen größeren Gehalt an Eiweiß vor-täuschen könnten.

Diese Methode hat somit den Vorteil der Spezifität für relativ große Eiweißbau-steine, wie sie nur in der lebenden Substanz vorkommen. Man darf erwarten, daß damit die niederen Eiweißbausteine, wie sie im Laufe des Stoffwechsels auftreten und vor allem nach dem Tode der Planktonorganismen entstehen, nicht erfaßt werden. In der technischen Durchführung wirkt sich die Einfachheit des Reagens und seiner Handhabung sowie die Beständigkeit des rotvioletten Biuret-komplexes günstig aus.

In der Literatur wird die Anwendung der quantitativen Eiweißbestimmung mittels der Biuretmethode erst in neuerer Zeit zitiert. Dabei befassen sich die meisten Arbeiten mit der Bestimmung des Eiweißes unter relativ einfachen Be-dingungen wie hoher Konzentration in vorgegebener Lösung, wie z. B. im Blut, in der Cerebrospinalflüssigkeit usw. Noch KIRK (1947) bedauert, daß die Methode nur selten an heterogenen Systemen wie Geweben usw. erprobt wurde. Von den neuesten Arbeiten wären besonders die von PEREIRA (1944), KUNTZEL und DROSCHE (1940) und FRANK (1950) zu erwähnen. Diese Autoren bedienen sich des Pulfrichphotometers zur Bestimmung der Rotfärbung, welche sich proportional der Konzentration an Tripeptiden nach Zugabe des Kupferreagens entwickelt. Als Reagens wird eine Cu-Lösung in NaOH verwendet, die KNa-Tartrat oder nach MEHL (1945) Äthylenglykol zur Vermeidung von nachträglich auftretenden Nie-derschlägen von Cu(OH)₂ enthält.

Auf dieser Grundlage wurde eine Methode zur quantitativen Bestimmung des nativen Eiweißes entwickelt, welche den oben aufgestellten Forderungen zum größten Teil nahekommmt und deren Verwendung, gegebenenfalls mit einigen Ver-besserungen, in der meereskundlichen Methodik möglich erscheint. Der hier durch-geführte Untersuchungsgang ist folgender: Das auf seinen Gehalt an Biomasse zu untersuchende Wasser wird über ein Papierfilter — das man evtl. vorher zur Be-stimmung des Sestons wägen kann — filtriert. Der Filtersatz wird kurz mit destil-liertem Wasser gewaschen, um anhaftende Meersalze zu entfernen. Anschließend wird das Filter zur Bestimmung der Trockensubstanz bei 95° getrocknet. Dadurch bewirkt man gleichzeitig eine Konservierung, die eine längere Aufbewahrung er-möglicht. Darauf folgt die Auflösung des Eiweißes durch Zusatz von 2 n NaOH, die man etwa 12—24 Stunden einwirken läßt. Durch die starke NaOH werden die großen Eiweißmoleküle in Lösung gebracht und in Teile zerschlagen. Die Verdün-nung der Aufschwemmung mit destilliertem Wasser auf 0,2 n NaOH soll sowohl der Freisetzung aus der Zellohülle dienen als auch den weiteren Zerfall des Eiweißes in Aminosäuren usw. verhindern. Die Suspension wird darauf durch ein gehärtetes Papierfilter filtriert und anschließend die Extinktion des Filtrats im Pulfrichphotometer bestimmt^{*)}. Das Filtrat hat je nach der Zusammensetzung des vorherrschenden Planktons eine braune bis gelbgrüne Farbe. Die zur Bestimmung

^{*)} Anm.: Die Bezeichnungen für die Filter des Pulfrichphotometers geben den optischen Schwer-punkt an, z. B. hat S 53 seine größte Durchlässigkeit bei 530 m μ .

der Eigenfarbe benutzte Flüssigkeit wird nun mit dem Kupferreagens versetzt und nach voller Entwicklung der Biuretfarbe erneut photometriert. Nach Abzug der verschiedenen Blindwerte bekommt man den Extinktionswert für die Biuretfärbung. Durch Vergleich mit einer Eichsubstanz kann man den Gehalt der untersuchten Probe an löslichem Eiweiß berechnen.

Dieser Untersuchungsgang ist in seinem ersten Teil, der Gewinnung und Vorbehandlung des Materials sehr modifizierbar. So kann man statt des auf einem Papierfilter gewonnenen Sestons ebensogut einen Netzfang verarbeiten. Auch ist die Trocknung des Materials zur Bestimmung des Trockengewichts und zur Konservierung nicht notwendig, zumal, wenn man sein Material in frischem Zustande verarbeiten will. Im übrigen kann man beliebige Substanzen, wie z. B. die obersten Schichten eines Sedimentpropfes mit dieser Methode untersuchen, falls keine zu starke Eigenfärbung der Auflösung dabei entsteht. In einer weiteren Mitteilung soll auf die Anwendung dieser Methode auf das Plankton eingegangen werden.

Einzelheiten der Bestimmungsmethode

Im Verlaufe der Entwicklung der Methode tauchten eine Reihe von Fragen und Schwierigkeiten auf, die kurz erörtert werden sollen.

1. Die spektrale Extinktion der Färbungskomponenten

Die spektrale Extinktionskurve einer mit Kupferreagens versetzten Eiweißlösung ohne meßbare Eigenfärbung ist zusammen mit ihren Komponenten in Abb. 1 dargestellt. Das Extinktionsmaximum des Kupferreagens in NaOH liegt bei Filter S 61 (Abb. 1, Nr. 1) im Gegensatz zu einer Lösung von CuSO_4 in Wasser, welche ihr Maximum bei S 75 hat. Dieser Unterschied erklärt sich aus der Bildung eines tiefblauen Kupferkomplexes aus der Klasse der Cuprite, der bei Gegenwart eines Überschusses von NaOH auftritt. Die Gesamtkurve (3) zeigt ihr Extinktionsmaximum bei Filter S 53. Aber auch der Wert bei Filter S 57 ist dem Maximum sehr nahe gelegen, so daß es gegebenenfalls auch als Meßfilter in Betracht käme. Um aber einen möglichst hohen Wert für die reine Biuretfärbung, wie sie durch Kurve 2 wiedergegeben ist, zu erreichen, wurde Filter S 53 zu den weiteren Messungen gewählt.

Als nächstes wurde die Extinktionskurve untersucht, welche sich bei der Biuretreaktion einer Auflösung von Dorschmehl, die eine ausgeprägte Gelbfärbung zeigt, ergibt (Abb. 2). Kurve 1 zeigt wieder die Extinktionswerte für die Lösung von Kupferreagens in NaOH. Kurve 3 gibt die Werte für die Eigenfärbung der Auflösung vor Zugabe des Reagens wieder mit einem Maximum im kurzwelligen Teil bei S 43 und S 47. Die Kurve 4 gibt die Summe dieser beiden Komponenten wieder mit Extinktionswerten, welche sich in fast gleicher Höhe über den ganzen Bereich von S 43 bis S 66 erstrecken und nur im langwelligen Rot einen bedeutenden Abfall erfahren. Wenn wir diese Summenkurve mit der Gesamtextinktion nach der Biuretfärbung (Kurve 5) vergleichen, so zeigen sich zwei bemerkenswerte Tatsachen: Im kurzwelligen Teil bis S 61 beträgt die Extinktion der Blindwerte etwa die Hälfte der Gesamtextinktion, dadurch rückt die Gesamtextinktion im Meßfilter S 53 in den Bereich größter Ablesungsgenauigkeit für das Pulfrichphotometer. Dieses gilt auch später in ähnlicher Weise für die Planktonextrakte mittleren Gehaltes. Im langwelligen Teil nähern sich Kurve 4 und 5 stark einander und er-

reichen bei S 72 und S 75 die gleichen Werte. Das bedeutet, daß die reine Biuret-kurve (Kurve 2) hier ebenso wie in Abb. 1 bei S 72 und S 75 den 0-Wert erreicht. Wir sehen hierin eine Bestätigung, daß die Messung nicht durch die auch beim Plankton auftretende Gelbfärbung gestört wird.

Nachdem es so gelungen ist, die Eigenfärbung der Meßlösung zu eliminieren, wurde der Fall einer nachträglich auftretenden Trübung untersucht. Derartige Trübungen können besonders bei Verwendung derselben Flüssigkeit zur Bestimmung der Eigenfarbe als auch zur Reaktion leicht auftreten. So kann z. B. während der Wartezeit, in welcher sich die Biuretfarbe ausbildet, die an den Wänden des Reagensglases anhaftende NaOH sich mit der CO_2 der Luft zu dem schwerer löslichen Na_2CO_3 verbinden, das schon in geringen Mengen bei großen Schichtdicken zu einer meßbaren Eintrübung führen kann. Als weitere Trübungs- und damit Störungskomponenten treten Staubpartikel auf, die man gerade bei Serienarbeit an Bord nicht ausschließen kann. In Abb. 3 wird der Fall einer sehr starken flockigen Trübung untersucht, wie er sich bei einer Auflösung von *Calanus finmarchicus* in NaOH zeigte. Die Eigenfarbe des Filtrats (2) zeigt eine sehr starke Extinktion bei Filter S 43 im Vergleich mit den Werten bei S 75. Die Gesamtkurve (4) unterscheidet sich von der entsprechenden der vorigen Abb. (2, Nr. 5) durch eine nur flache Andeutung der Biuretspitze bei S 53. Die Ursache dafür liegt in der bei gleicher Konzentration des Untersuchungsmaterials geringeren Eiweißkonzentration des *Calanus*-Materials. Die Differenzkurve 3 gibt jedoch die reine Biuretfarbe gut wieder. Nur liegen das Maximum hier bei S 50 und die Werte für S 72 und S 75 sehr erheblich über dem 0-Wert. Die allgemeine Hebung der Biuret-Nettokurve hat ihren Grund in der flockigen Trübung. Eine grobflockige Trübung extinguiert nicht spektral, so daß man ihren Wert aus der Messung bei Filter S 75 ermitteln kann. Wenn man ihren Wert mit der Parallelverschiebung der Gesamtkurve gleichsetzt, so liegt es nahe, den Wert von S 75 von dem bei S 53 gemessenen abzuziehen. Dadurch bekommt man den reinen Biuretwert. In diesem speziellen Falle liegt aber sehr wahrscheinlich doch eine gewisse spektrale Extinktion der Ausflockung vor. Nach dem Rayleighschen Gesetz ist bei Partikeln, welche gegenüber der Lichtwellenlänge klein sind, die spektrale Extinktion eine reziproke Funktion der 4. Potenz der Wellenlänge, d. h. also, daß das blaue Licht am stärksten extinguiert wird. Mit zunehmender Partikelgröße nimmt die Potenz ab, bis schließlich bei Partikeln von der Größenordnung der Lichtwellenlänge keine spektrale Extinktion durch Beugung mehr stattfindet. Aus der Verlagerung des Extinktionsmaximums der sogenannten Nettokurve (Nr. 3) von S 53 auf S 50 kann man schließen, daß eine spektrale Extinktion der Ausflockung stattgefunden hat. Auf Grund der hier vorliegenden Messungen kann jedoch ihr Anteil für Filter S 53 nicht ermittelt werden. Er dürfte sich schätzungsweise auf 50 Einheiten belaufen. Eine genaue Bestimmung ist nur mit Hilfe eines Spektralphotometers möglich. Hier muß man sich zunächst mit dem sicherlich zu hohen Wert für S 53 zufrieden geben. Daraus folgert, daß man für exakte Bestimmungen nicht mit Lösungen arbeiten darf, die eine Feintrübung zeigen. Im allgemeinen wird man die Entscheidung schon auf Grund rein visueller Beobachtung fällen können, zumal bei großen Schichtdicken. Die hier dargelegte Reduktionsmethode ist nur für grobe Verunreinigung der Meßlösung sowie für eine in gleicher Richtung wirkende optische Störung durch Verlagerung bzw. Verkantung der Meßgefäße gedacht. Sie hat sich später bei Vergleichsuntersuchungen bewährt.

2. Die Zusammensetzung des Kupferreagens

Das Kupferreagens mußte so zusammengestellt werden, daß:

- a) die Cu-Menge durch den Verbrauch der Farbreaktion nicht meßbar verändert wird (untere Grenze),
- b) die durch das Reagens hervorgerufene Extinktion die Gesamtextinktion im Raume der optimalen Meßgenauigkeit hält,
- c) der Zusatz von Äthylenglykol zuverlässig jeden Niederschlag von $\text{Cu}(\text{OH})_2$ selbst bei niedrigen NaOH-Konzentrationen verhütet,
- d) das Reagens durch Zusatz von Äthylenglykol ein genügend hohes spezifisches Gewicht erhält, um im Reaktionsgefäß langsam zu Boden zu sinken und sich dabei möglichst intensiv mit der zu untersuchenden Flüssigkeit zu mischen.

Diesen Anforderungen entsprach eine Reagenszusammensetzung von
60 ccm CuSO_4 -Lösung, 2%ig in aqua dest.
+ 50 ccm Äthylenglykol.

In den nachfolgenden Eichungen, den Untersuchungen zur Bestimmung der Genauigkeit sowie den Serienuntersuchungen an natürlichem Material wurde stets eine Zugabe von 0,5 ccm Reagens zu 10 ccm Untersuchungsflüssigkeit als ausreichend gefunden. Bei den ersten Versuchen, bei denen es sich um relativ einfache und homogene Substanzen handelte (Versuche zur Auflösung und Zersetzung des Eiweißes bei verschiedenen Temperaturen), fand eine reine 2%ige Lösung von $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ Verwendung ohne Zusatz von Äthylenglykol, und zwar jeweils 0,3 ccm zu 10 ccm Untersuchungsflüssigkeit*).

3. Lösung und Zerfall der Eiweißsubstanzen

Eine der wichtigsten Teilfragen war die, nach welcher Zeit und unter welchen Außenbedingungen eine bestimmte Substanz die intensivste Biuretfärbung ergab. Diese Frage gliedert sich in zwei Teilfragen:

1. In welcher Zeit nach Reagenszugabe zeigt eine schon vorhandene Auflösung einer Eiweißsubstanz, in der sich sonst keinerlei Veränderungen vollziehen, die maximale Ausfärbung des Biuretkomplexes?

2. In welcher Zeit nach Zugabe des Lösungsmittels zum Untersuchungsobjekt ist die größte Menge von Eiweiß in Lösung?

Die erste Frage ist bereits in der Literatur, zuletzt von FRANK und KOECHER (1950) beantwortet worden. Diese beiden Autoren fanden, daß etwa 30 Minuten nach Zugabe des Kupferreagens eine volle Ausfärbung eingetreten war, die sich über 48 Stunden als beständig erwies. Dieser Befund konnte im wesentlichen bestätigt werden und zwar an einer Reihe verschiedener Lösungen aus Pepton (WITTE), Albumin aus Eiern (MERCK), Eiweiß rein, einer gealterten Auflösung von getrocknetem und pulverisiertem Dorschfilet sowie an einer ähnlich behandelten Auflösung von Trockenplankton. Nach einiger Zeit (> 48 Stunden) nahmen die Werte bei Zimmertemperatur langsam ab, was als Folge der langsamen Aufspaltung der Tripeptide in einfache Aminosäuren zu deuten ist.

*) Anm.: CuSO_4 löst sich in überschüssiger NaOH zu einem tiefblauen Komplex, welcher der Formel $\text{Cu}(\text{OH})_2 \cdot \text{Na}_2$ entspricht. Dieser Komplex hat seinen optischen Schwerpunkt bei Filter S 61, die grünblaue Ausgangssubstanz dagegen bei S 75. Bei Herabsetzung der Konzentration der NaOH unter 0,1 n fällt leicht ein sehr voluminöser Niederschlag von $\text{Cu}(\text{OH})_2$ aus, welcher die optischen Messungen gerade bei großen Schichtdicken erheblich stört und sogar unmöglich machen kann, wenn man ihn nicht in einem weiteren Arbeitsgang abfiltriert.

Die zweite Frage ist wesentlich schwerer zu beantworten und zeigt eine grundsätzliche Grenze für unsere Methode. Nach Zugabe des Lösungsmittels zur Trockensubstanz werden zunächst die Eiweißkörper unter Wasseraufnahme quellen. Im Laufe der Untersuchungen bewährte sich eine 2 n NaOH als optimale Konzentration. Anschließend daran werden die großen Moleküle in die gegenüber den Aminosäuren noch großen Bausteine der Polypeptide gespalten. Diese reagieren mit dem Kupferreagens, wobei 2 Moleküle Biuret mit 2 Molekülen NaOH und 1 Cu ein inneres Komplexsalz ergeben, welches die intensive rotviolette Färbung zeigt. Die Ausfärbung dieses Komplexes erreicht ihr Maximum, sobald das gesamte Eiweiß in Form von Polypeptiden in Lösung gegangen ist. Aber noch während sich die Biuretfarbe ausbildet, wird ein zunächst noch kleiner Teil der Polypeptide durch die relativ starke NaOH zu Aminosäuren abgebaut. Es wird sich ein Zerfallsgleichgewicht einstellen, das sowohl zeitlich als auch hinsichtlich der Größe seiner Komponenten für die verschiedenen Eiweiße verschieden ist. Wir müssen aber in unserem von Natur aus sehr heterogenen Untersuchungsmaterial mit einer nicht übersehbaren Anzahl verschiedener Kombinationen von qualitativ und quantitativ verschiedenen Eiweißen rechnen, die sicherlich eine sehr unterschiedliche Reaktion auf die Einwirkung der NaOH zeigen. Mit der von uns zu bestimmenden größten Biuretausfärbung erhalten wir nur einen summativen Wert der Gleichgewichtszustände der Spaltungsprodukte der einzelnen Eiweiße in der Zeit ihres größten Gesamtwertes.

Innerhalb dieser Vorgänge lassen sich zwei Phasen voneinander trennen: die Zeit, in welcher die Zufuhr an Polypeptiden aus dem Untersuchungsmaterial ihren Zerfall überwiegt. Darauf folgt die Zeit, in welcher trotz weiterer, wenn auch geringerer Zufuhr die Aufspaltung der Polypeptide überwiegt, so daß ihre Gesamtmenge abnimmt. Beide Phasen werden sich bei verschiedenen Eiweißen unterschiedlich verhalten und vor allem auch temperaturabhängig sein. Der zeitliche Verlauf des Lösungsvorganges und des Zerfalls wurde in 3 verschiedenen Versuchsserien bei 18, 50 und 70° mit 4 verschiedenen in sich aber homogenen Substanzen untersucht (Abb. 4 a—d). Als Ausgangssubstanzen wurden Dorschmehl (s. unten), Pepton (WITTE), Albumin aus Eiern (MERCK) und Eiweiß rein (ohne Herkunftsbezeichnung) benutzt. Die Bestimmungen erfolgten unter völlig gleichen Bedingungen innerhalb jeder Serie mit 0,1 %igen Lösungen der betreffenden Substanzen in 2 n NaOH mit einer Zugabe von 0,3 ccm CuSO₄, 2 %ig.

In Abb. 4 a zeigen die relativ einfachen in Wasser löslichen Eiweiße (Pepton, Albumin, Eiweiß) schon 45 Minuten nach Zugabe der NaOH ihre maximale Ausfärbung. Das Dorschmehl braucht zur Erreichung seines Höchstwertes, der sich nicht wesentlich von dem der reinen Eiweißsubstanzen unterscheidet, reichlich 4 Stunden. Bei den einfachen Eiweißkörpern ist der sich so schnell einstellende Höchstwert zeitlich wenig beständig. Nach längstens 24 Stunden hat sich jedoch für alle untersuchten Stoffe eine nur langsam absinkende Gleichgewichtslage eingestellt. Dieser Abfall, der bei der 18°-Serie nur schwach ist, zeigt sich sehr deutlich bei den Serien von 50 und 70° (Abb. 4 c, d). Nachdem sich entsprechend den höheren Temperaturen das Maximum auch beim Dorschmehl sehr schnell eingestellt hat (Pepton bei 35 Minuten, Dorschmehl 60 Minuten bei 50°) fallen im Laufe der nächsten Stunden alle Werte rapide. Dabei zeigt Dorschmehl die größte, Pepton die geringste Beständigkeit. Dieser Befund wird durch die 70°-Serie (Abb. 4 d) sowie durch die über 13 Tage laufende Ausweitung der 18°-Serie bestätigt. Hier

zeigt sich, wie Dorschmehl mit einem Anfangswert von 640 im Laufe von 13 Tagen auf 440 abfällt. Die entsprechenden Werte für Pepton betragen 620 und 310.

Wegen dieses gleich zu Anfang besonders schnellen Zerfalles der Polypeptide ist es ratsam, die Messungen auf den langsam abfallenden Ast der Kurve zu verlegen. Dadurch erreicht man eine größere Unabhängigkeit vom Zeitpunkt der Messung, die gerade bei Serienbestimmungen sehr erwünscht ist. Nach dem Verlauf dieser Versuche erschien es zweckmäßig, den Eiweißgehalt des Untersuchungsmaterials erst 24 Stunden nach Zugabe der als Lösungsmittel gebrauchten 2 n NaOH zu bestimmen. Gleichzeitig wird eine Eichlösung aus dem Merckschen Präparat Albumin aus Eiern angesetzt und in der gleichen Weise wie das Untersuchungsmaterial behandelt. Untersuchungsreihen an natürlichem Plankton, das in der Kieler Förde gewonnen wurde und zur Hauptsache aus *Skeletonema costatum* bestand, bestätigten die zeitliche Konstanz des Peptidgehaltes unter denselben Bedingungen in weitem Umfang. Vergleichsserien gleicher Art mit größeren Mengen von einheitlichem Kulturplankton konnten bislang noch nicht durchgeführt werden.

Auch über die Stärke und die Einwirkungsdauer des Auflösungsmittels wurden Versuche angestellt. Als Material diente das bereits im vorigen Abschnitt erwähnte Netzplankton, das jeweils in gleichen Mengen mit verschiedenen Zusätzen von Lösungsmittel versehen wurde. Während durch 0,2 n NaOH nach einer Einwirkungsdauer von 29 Stunden eine Biurettextinktion von 90 erreicht wurde, ergab die gleiche Menge, nach 26stündigem Einweichen in dest. Wasser mit darauffolgender 2stündiger Auflösung in 2 n NaOH und anschließend 1 Std. in 0,2 n NaOH schon eine Biurettextinktion von 130. Am stärksten wirkte 2 n NaOH nach 24 Stunden und 4 n NaOH nach 13 Stunden mit jeweils anschließender Verdünnung; es wurden dabei Biurettextinktionen von 310 bzw. 300 erzielt. Wenn man die 0,2 n-Lösung 2 weitere Tage stehen läßt, dann sinkt der BiuretWert auf 208 Einheiten herab. Aus diesen Versuchsreihen erscheint es notwendig, das Trockenplankton mit einer 2 n NaOH 24 Stunden bei Zimmertemperatur mit nachfolgender Verdünnung auf eine 0,2 n-Lösung anzusetzen. In den weiteren Bestimmungen wurde hiernach verfahren und nach Möglichkeit eine längere Einwirkungszeit von 0,2 n NaOH vermieden.

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Taf. 9)

Abb. 1: Spektrale Extinktion der Biuretreaktion einer farblosen Lösung von 0,1 % Eiweiß rein in 2 n NaOH mit den Färbungskomponenten

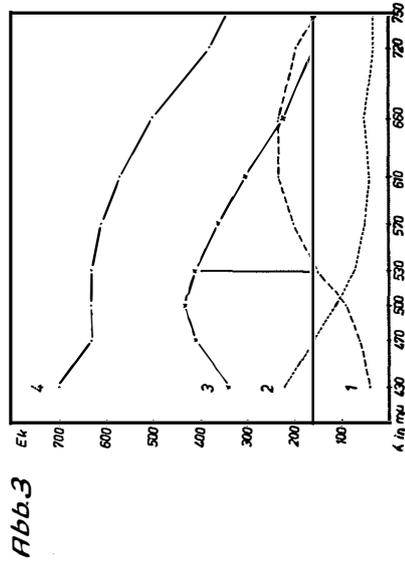
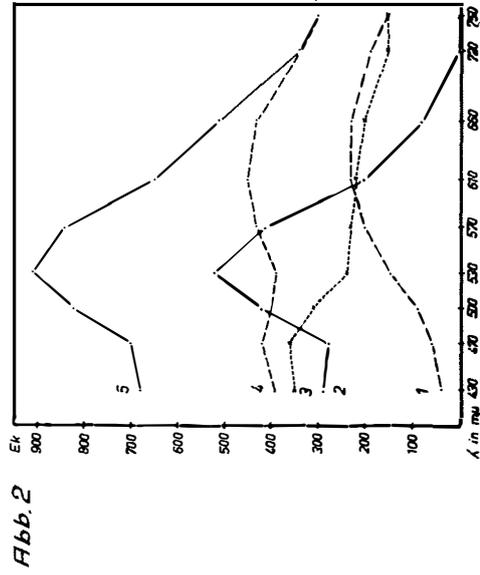
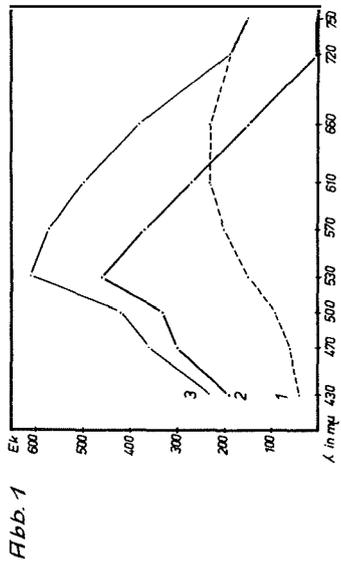
1 = 0,5 ccm Cu-Reagenz in NaOH 3 = Gesamtfärbung
2 = reine Biuretfärbung

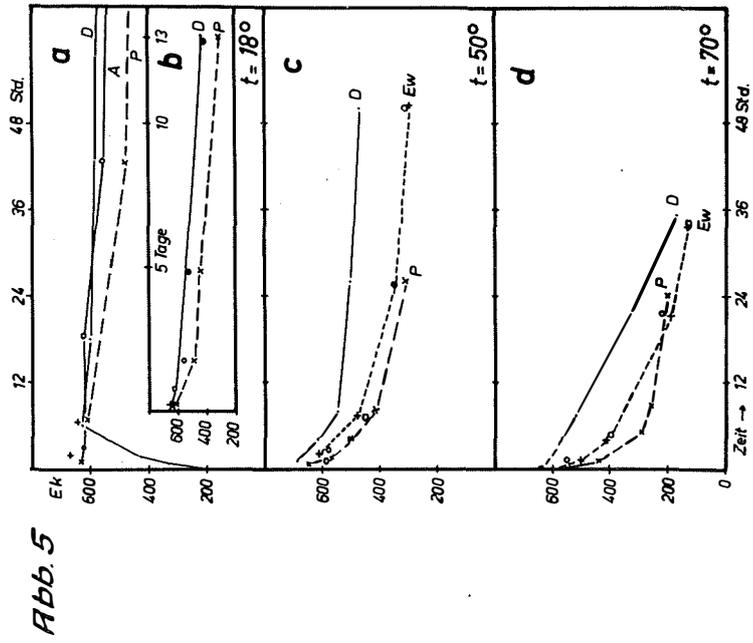
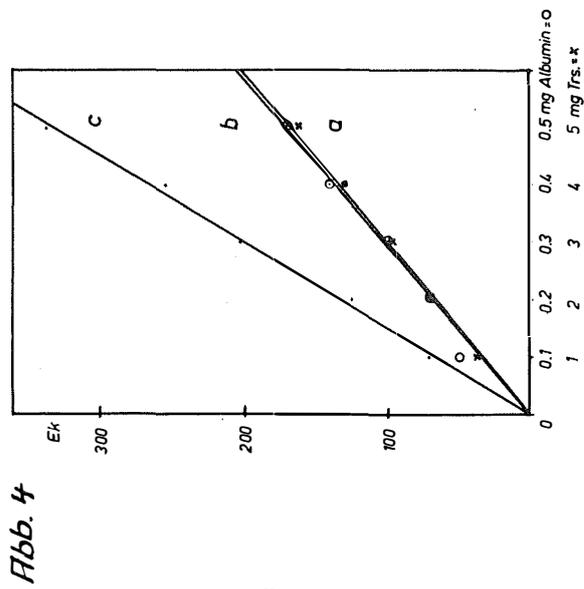
Abb. 2: Spektrale Extinktion der Biuretreaktion einer gelbgefärbten Lösung von 0,1 % Dorschmehl in 2 n NaOH mit den Färbungskomponenten

1 = 0,5 ccm Cu-Reagenz 4 = Summe der Eigenfärbung und des
2 = reine Biuretfärbung Cu-Reagenz
3 = Eigenfärbung der Lösung 5 = Gesamtfärbung

Abb. 3: Spektrale Extinktion der Biuretreaktion einer gelbgefärbten Lösung von 0,1 % *Calanus finmarchicus* in 2 n NaOH mit nachträglicher Trübung und den Färbungskomponenten

1 = 0,5 ccm Cu-Reagenz 3 = scheinbare Biuretfärbung
2 = Eigenfärbung der Lösung 4 = Gesamtfärbung





4. Eichung des Verfahrens

Die hier dargelegte Methode ist keine Absolutmessung wie z. B. die photometrische Phosphatbestimmung. Denn aus dem Untersuchungsmaterial wird nur ein Teil des Eiweißes herausgelöst, den man nur unter gewissen Einschränkungen mit dem nativen Eiweiß identifizieren kann. Eine Eichung mit der Kjeldahlmethode ist deshalb nur bedingt zuverlässig, da mit dieser auch die in der echten Lösung vorhandenen Aminosäuren und andere N-haltige einfachere Bausteine, welche mit der Biuretmethode nicht erfaßt werden können, bestimmt werden. Hier wurde eine Eichung mit einer Eichsubstanz auf photometrischem Wege durch Vergleich der Extinktionen durchgeführt. Dieses Verfahren ist in der photometrischen Analyse üblich und wird für diesen speziellen Fall der Eiweißanalyse mittels der Biuretreaktion auch von KIRK (1947, 1950) zitiert. Auf 0,1 % genau ausgewogene Mengen einer Standardsubstanz von Albumin aus Eiern (MERCK) wurden in denselben Konzentrationen und unter denselben Lösungsbedingungen wie die Untersuchungsobjekte zur Auflösung gebracht. Um einen möglichst zuverlässigen Eichwert zu erhalten, wurden Serien mit abgestuften Albuminproben (vgl. Tabelle) durchgeführt, deren Stufen sich in ihrer Biurettextinktion in der Größenordnung der Biurettextinktion des Untersuchungsmaterials halten. In Abbildung 5 ist ein Beispiel einer Eichung gegeben. Die Gerade b gibt den Eichwert von 342/1 mg Albumin wieder. Die einzelnen Meßpunkte zeigen eine Streuung von + 16 bis - 3 Einheiten. Da die Gerade im 0-Punkt endet, ist der Wert für + 16 als Fehlbestimmung zu werten. Zur gleichen Zeit mit dieser Eichung wurde eine gleichfalls 0,1 %ige Aufschwemmung von Trockenplankton angesetzt. Das Ergebnis der Bestimmungsserie, bei der Stufen von 1 ccm des Filtrats untersucht wurden, ist durch die Gerade a gemittelt, die einen Wert von 330/10 mg Trs anzeigt. Die Abweichungen von diesem Mittelwert betragen + 4 und - 3 im Extrem. Danach würde sich also eine Biurettextinktion von 33/1 mg ergeben, die ihrerseits bei einem Eichwert von 342/1 mg Albumin 96,5 γ Albumin entsprechen, was einen Eiweißgehalt von 9,65 % bedeutet. Zur Kontrolle wurde in einer weiteren Serie zu je 1 ccm Auflösung der Trockensubstanz 0,1 mg Albumin gegeben. Die Gerade c zeigt den dabei entstehenden Mittelwert mit 660 Einheiten für 10 mg Trs + 1 mg Albumin mit einer Streuung von + 6 bis - 9. Dieser Wert liegt prozentual nur wenig unter dem aus den Komponenten mit 672 Einheiten errechneten.

Bei häufigen Wiederholungen der Eichserien zeigte sich, daß der Eichwert für 1 mg Schwankungen unterliegt, die sich normalerweise im Bereich von 310 bis 350 halten. Es wurden aber auch schon Werte von 380, ja sogar 400 bestimmt, ohne daß eine Fehlerquelle erkennbar wurde. Auf diese Variabilität in der Ausfärbung

Legende zu den nebenstehenden Abbildungen (Taf. 10)

Abb. 4: Zeitlicher Verlauf der Auflösung und des Zerfalls der Polypeptide bei verschiedenen Temperaturen und Substanzen

A = Albumin aus Eiern (Merck) = ○	a: bei 18°, Zeitangabe in Stunden
Ew = Eiweiß rein = +	b: bei 18°, Zeitangabe in Tagen
P = Pepton (Witte) = ×	c: bei 50°, Zeitangabe in Stunden
D = Dorschmehl = ·	d: bei 70°, Zeitangabe in Stunden

Abb. 5: Serienbestimmung und Eichung einer Auflösung von Trockenplankton (a) mit einer Albuminlösung (b) und Kontrolle durch Zusatz von Albumin zur Auflösung des Trockenplanktons (c)

bezieht sich auch eine Bemerkung von KIRK (1950), in der diese mit dem Zusatz von Äthylenglykol in Verbindung gebracht wird. Um dieser Schwierigkeit aus dem Wege zu gehen, setzten wir immer zu jeder Serie von Untersuchungsproben eine solche der Eichsubstanz an. So erreicht man weitgehend gleiche Untersuchungsbedingungen, besonders hinsichtlich der Reaktionstemperatur.

5. Die Berechnung der Biuretextinktion und des Eiweißgehaltes

Die Berechnungsgrundlagen werden durch die Messungen bei den S-Filtern 53 und 75 gegeben und zwar für die Eigenfarbe des in NaOH gelösten Cu-Reagens, die Eigenfarbe der Untersuchungslösung und die Gesamtfarbe der ausgefärbten Lösung. Nach Abzug der beiden Eigenfarben verbleibt ein Rest (vgl. Abb. 3), welcher die Biuretfarbe einschließlich einer nachträglichen Trübung enthält. Unter der Annahme, daß diese Trübung spektral gleichmäßig extinguiert, wird der bei Filter S 75 gemessene Extinktionswert von dem bei S 53 gemessenen abgezogen. Dieser Rest stellt die reine Biuretfarbe dar. Durch Vergleich mit einer nach demselben Vorgang berechneten Eichlösung von einer fest definierten Substanz (hier Albumin von MERCK) wird der Gehalt an Albumin-Äquivalenten ermittelt. Voraussetzung ist natürlich die Verwendung gleicher Absorptionsrohre bzw. Umrechnung nach dem Lambert-Beerschen Gesetz.

6. Genauigkeit und Empfindlichkeit

Die Genauigkeit der Methode wurde an 14 voneinander unabhängigen Bestimmungsserien ermittelt, bei denen Konzentrationen benutzt wurden, wie sie in den Proben, die aus natürlichem Milieu stammen, zu erwarten sind. Die Serien umfaßten jeweils 5—6 Einzelbestimmungen, die ihrerseits das Ergebnis waren aus je 2×3 Einzelwerten mit jeweils 3 Ablesungen pro Einzelwert. Das sind also insgesamt rund 1200 Ablesungen. Die Serien wurden an abgestuften Mengen von 4 Untersuchungssubstanzen in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt (vgl. Tab.). Aus den Serienbestimmungen wurden auf graphischem Wege die Mittelwerte bestimmt und dabei die offenbaren Fehlbestimmungen herausgenommen. Die Tabelle enthält nur jene Serien, welche mit der endgültigen Serienmethodik, d. h. also Verwendung von 150 mm Mikrorohren und 10 ccm Untersuchungsflüssigkeit (vgl. auch unter 7) gewonnen wurden.

In die Bestimmungen gehen zunächst die apparativen Fehler ein, die mit dem Pulfrichphotometer verknüpft sind. Im Bereiche der Extinktionen von 150 bis 1300 beträgt die Einstellstreuung 10 Einheiten (vgl. KORTUM, 1948). Diese Einstellstreuung steigt jedoch bei Filter S 53 stark an, sobald in dessen Bereich ein steiler Anstieg einer Absorptionskante liegt. Dann kann man mit einer Streubreite von 30—50 Einheiten und bei ermüdetem Auge noch mehr rechnen. Diese Absorptionskante wird bei S 53 zum großen Teil durch das Cu-Reagens in NaOH hervorgerufen. Um diesen Fehler einzuengen, wurde in den Vergleichsstrahlengang ein gleiches Mikrorohr mit derselben Reagenszusammensetzung gebracht. Damit wurden die bei diesem Filter auftretenden Farbunterschiede zwischen den beiden Gesichtshälften zwar nicht völlig aufgehoben, aber doch stark vermindert. Sie werden sich gerade bei starker Eigenfärbung der Lösungen bemerkbar machen (vgl. Abb. 2 und 3). Weitere Fehler werden durch kleine Verschiedenheiten in der Zugabe des Reagens sowie in der Auflage des Meßrohres verursacht. Sie werden zum größten Teil durch die Differenzbildung Ek S 53 — Ek S 75 eliminiert.

Tabelle: Genauigkeit der Eiweißbestimmungen

Nr.	Material 0,1 %ige Lösung	Anzahl der Stufen	Stufen von je ccm	von . . bis ccm	Mittel- wert je l bzw. 10 ccm	Extremwerte d. gemessenen Abweichungen	Durch- schnittl. Fehler $\eta = \frac{\sum x}{n}$	Mittlere Ab- weich. $\sigma = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$	Wahrscheinl. Fehler $w = 0,8453 \cdot \frac{\sum x}{n}$
1	Albumin	5	0,5	0,5—2,0 sowie 3,0	325/1	+20 —25	±14,0	±15,80	±11,83
2	Eiweiß rein	5	0,2	0,2—1,0	380/1	+12 —14	8,0	9,38	6,76
3	Albumin	5	0,1	0,1—0,5	400/1	+10 —10	6,0	7,74	5,07
4	Calanus	5	0,5	0,5—2,5	560/10	+13 —21	10,6	12,37	8,96
5	Trs. I	4	1,0	2,0—5,0	208/10	+ 3 — 3	2,25	2,40	1,90
6	Trs. I A	6	1,0	1,0—6,0	406/10	+ 9 — 6	4,5	5,10	3,80
7	Trs. I B	6	1,0	1,0—6,0	320/10	+12 — 7	7,3	8,02	6,17
8	Trs. I C	5	1,0	1,0—5,0 (und 6 ccm)	360/10	+ 3 — 8 (+27)	3,2	4,47 (11,76)	2,70
9	Albumin	6	0,1	0,1—0,6	320/1	+12 — 7	5,3	6,50	4,46
10	Trs. I D ₁	6	1,0	1,0—6,0	320/10	+12 —17	8,0	9,83	6,76
11	Trs. I D ₂	6	1,0	1,0—6,0	340/10	+ 8 — 4	3,3	4,28	2,79
12	Albumin	5	0,1	0,1—0,5	342/1	+16 — 3	5,0	7,47	4,22
13	Trs. I	5	1,0	1,0—5,0	330/10	+ 4 — 3	3,0	3,13	2,50
14	Trs. I + Alb.	5	1,1	1,1—5,5	660/10/1	+ 6 — 9	6,6	6,80	5,58
Mittelwerte							± 6,5	± 8,16	± 5,50
aus 74 Einzel-							bestimmungen		

Anm.: Trs. = Trockensubstanz von natürlichem Plankton. Zu Nr. 1: Sehr hohe Gesamttextinktionen. Zu Nr. 8: Fehlbestimmung bei 6 ccm mit + 27.

Die Tabelle zeigt neben einer Anzahl von Serien mit geringen Extremwerten der Abweichung vom Mittel (vgl. Nr. 5, 8, 11, 13, 14) einige Serien mit hohen Extremwerten der Abweichungen (vgl. Nr. 1, 4). Diese Extremwerte wurden trotz der Mittelbildung aus je 18 Ablesungen erreicht. Sie erklären sich aus sehr hohen Gesamttextinktionen und zwar bei Nr. 1 verursacht durch die starke Biuret färbung und bei Nr. 4 durch starke Eigenfärbung der Calanus-Auflösung, die gerade im kurzwelligen Teil des Spektrums stark extinguiert. Außerdem ist es möglich, daß in diesem Falle eine geringe sehr feindisperse Ausfällung die Messungen störte. Bei insgesamt 74 Einzelbestimmungen hielten sich die extremen Abweichungen vom Mittelwert zwischen + 20 und — 25 Einheiten. Bei den niedrigsten Bestimmungsstufen können die Einzelabweichungen im schlechtesten Falle 50% der gemessenen Werte ausmachen.

Für alle Einzelwerte wurden die durchschnittlichen Fehler ($\eta = \frac{\sum x}{n}$), die mittlere Abweichung $\sigma = \sqrt{\frac{\sum x^2}{n}}$ und die wahrscheinlichen Fehler $w = 0,8453 \cdot \frac{\sum x}{n}$

berechnet. Für den durchschnittlichen Fehler der Einzelmessung ergaben sich Werte zwischen 2,25 und 14,0 Einheiten mit dem daraus gewonnenen Mittelwert von 6,5 für alle 74 Bestimmungen. Die mittlere Abweichung liegt entsprechend der Formel $\sigma \approx 1,2533 \cdot \eta$ in der Spanne von 2,40 bis 15,8 mit einem Mittelwert von 8,16. Für den wahrscheinlichen Fehler w lauten die entsprechenden Werte 1,90 bis 11,83 mit dem Mittelwert von 5,50.

Für die Beurteilung der Genauigkeit der hier dargelegten Methode erscheinen die Extremwerte der Bestimmungen von Nr. 1 erschwerend. Ohne diese Werte sowie die unter Nr. 4 aufgeführten wäre das Bild wesentlich günstiger. Man muß

aber bedenken, daß man u. U. gezwungen ist, derartige Extremfälle zu messen. Der sogen. Normalfall sieht günstiger aus, wie die Tabelle zeigt. Aus diesen Zahlen können wir auf die Leistungsfähigkeit der Methode hinsichtlich ihrer Empfindlichkeit schließen. Als untere Grenze für unsere Bestimmungen setzen wir 10 Einheiten der Biuretextinktion. Dieses entspricht einem Eiweißgehalt von etwa 30 γ je nach der Ausfärbung der Eichserie. Wenn sich bei der Berechnung negative Werte für die Biuretextinktion ergeben, so liegt bei hohen Negativ-Werten eine Fehlbestimmung vor, die sich in den meisten Fällen aus einem Fehler in der Ablesung der Werte für Filter S 53 erklärt. Niedrige Werte von -5 bis -10 liegen noch innerhalb der Extremwerte der Abweichungen und zeigen ggf. noch Spuren einer Biuretausfärbung an, die dann nur als qualitativer Hinweis zu werten sind. Derartige Negativwerte kommen nur bei sehr geringen Mengen von Eiweiß vor, d. h. wenn die Grenze der Methode erreicht ist.

Wenn man die untere Grenze der Bestimmung mit 30 γ Eiweiß angibt, dann entspricht das bei einem Diatomeen-Plankton mit 20 % Eiweiß einer Trockensubstanz von 150 γ . Das aber ist ein Wert, wie er in Nord- und Ostsee auch außerhalb der Plankton-Maxima oft zu finden ist (vgl. KREY, 1949, 1950). Wenn wir von einem Gehalt an Trockenplankton von 1,5 mg/L ausgehen — und das ist ein Wert, der gerade in unseren Küstengewässern nicht selten vorkommt, so beträgt der wahrscheinliche Fehler in der Bestimmung des Eiweißgehaltes bei einem Gesamteiweiß von 300 γ $\pm 16,5 \gamma$, d. s. $\pm 5,5 \%$.

7. Zusammenfassung der Methodik

1. Bestimmung der Trockensubstanz des Untersuchungsmaterials (d. i. bei Bestimmung des Sestonwertes gleichzeitig Gewinnung des Materials).
2. Zugabe von 2 n NaOH und 24 Stunden Einwirkung bei Zimmertemperatur (nicht unter 17°), anschließend Verdünnung mit aqua dest. auf 0,2 n NaOH mit Einwirkungsdauer 1—2 Stunden.
3. Filtration durch gehärtetes Papierfilter 1575 (SCHLEICHER und SCHÜLL).
4. Mit 10 ccm des Filtrats wird in einem Mikroabsorptionsrohr (150 mm lang, 10 ccm Volumen) im Pulfrichphotometer die „Eigenfärbung“ bei den Filtern S 53 und S 75 bestimmt. Zur Berechnung ist es notwendig, gleichzeitig die entsprechenden Werte für das Lösungsmittel 0,2 n NaOH und für das Kupferreagens*) zu bestimmen.
5. Zu derselben Lösung, an welcher die Eigenfärbung bestimmt wurde, gibt man 0,5 ccm Kupferreagens.
6. Nach 30 Minuten Messung der Biuretausfärbung bei S 53 und S 75.
7. Berechnung nach Abzug der Blindwerte für zugegebenes Kupferreagens und der Eigenfärbung der Lösung durch Differenzbildung Ek S 53 — Ek S 75.
8. Ermittlung des Eichwertes auf dieselbe Weise mit einer bekannten Substanz (hier Albumin aus Eiern von MERCK) in einer Konzentration der Stammlösung von 100 mg / 100 ccm 0,2 n NaOH; 5—6 Einzelproben von 0,1—0,6 mg / 10 ccm.

*) Reagens-Zusammensetzung: CuSO₄, 2 %ig, 60 ccm und Äthylenglykol 50 ccm.

Literaturverzeichnis

- BRANDT, K. und RABEN, E.: Zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des Planktons und einiger Bodenorganismen. *Wiss. Meeresuntersuchungen, Abt. Kiel*, Vol. 19, 1919—22.
- FRANK, H. und KOECHER, P.-H.: Der Serumeiweißspiegel beim Menschen nach Untersuchungen mit der Biuretmethode. *D. Arch. f. klin. Medizin*, Vol. 197, 1950.
- HARVEY, H. W.: The Production of Living Matter in the Sea. *Journ. of the Marine Biol. Ass. Plymouth*, Vol. 29, 1950.
- KIRK, P. L.: The Chemical Determination of Proteins. *Advances in Protein Chemistry*, Vol. 2, 1947.
- KIRK, P. L.: *Quantitative Ultramicroanalysis*. New York, 1950.
- KORTUM, G.: *Kolorimetrie und Spektralphotometrie*. Berlin und Göttingen 1948.
- KREY, J.: Über Art und Menge des Sestons im Meere. *Verh. d. Deutschen Zoologen Mainz*, 1949.
- KREY, J.: Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung des Planktons. *Kieler Meeresforschung*, Vol. 7, 1950.
- KUNTZEL, A. und DROSCHE, TH.: Über die bei der Biuretreaktion entstehenden farbigen Kupferkomplexe mit Eiweißkörpern und Eiweißabbauprodukten. *Biochem. Zeitschrift*, Vol. 306, 1940.
- LOHMANN, H.: Untersuchungen zur Feststellung des vollständigen Gehaltes des Meeres an Plankton. *Wiss. Meeresuntersuchungen, Abt. Kiel*, Vol. 10, 1908.
- MACFADYAN, A.: The Meaning of Productivity in Biological Systems. *Journ. Animal Ecology*, Vol. 17, 1948.
- MACFADYAN, A.: Population Ecology. *Science Progress*, Nr. 147, 1, 1949.
- MEHL: *Journ. Biol. Chemistry*, Vol. 157, 1945.
- PEREIRA, R. S.: *Rev. faculdade med. vet, Univ. Sao Paulo*, Vol. 2, 1944.
- SHAW, J. und BEADLE, L. C.: A simplified Ultramicro-Kjeldahl Method for the Estimation of Protein and Total Nitrogen in Fluid Samples of less than 1 μ l. *Journ. Exper. Biology*, Vol. 26, 1949.
- WALDSCHMIDT-LEITZ, E.: *Chemie der Eiweißkörper*. Stuttgart 1950.