

# PHOTOCHEMISCHE SPALTUNG DES KOHLENOXYDMYOGLOBINS DURCH ULTRAVIOLETTE STRAHLUNG (WIRKSAMKEIT DER DURCH DIE PROTEINKOMPONENTE DES PIGMENTS ABSORBIERTEN QUANTEN)

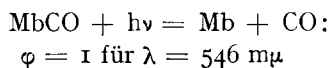
von

THEODOR BÜCHER UND JACOB KASPERS

*Kaiser Wilhelm Institut für Zellphysiologie, Liebenberg (Mark, Deutschland)*

## I. ÜBERSICHT

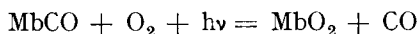
Wird Kohlenoxydmyoglobin durch grünes Licht, das in einer *Häminbande* des Pigments absorbiert wird, gespalten, dann ist die photochemische Ausbeute  $\varphi = 1$  und es gilt die Reaktionsgleichung



bedeutet also, dass jedes in der *Häminkomponente* des Kohlenoxydmyoglobins absorbierte Lichtquant vom Hämineisen ein Kohlenoxydmolekül abspaltet.

In den folgenden Versuchen sind wir — angeregt durch das ultraviolette Wirkungsspektrum der Kohlenoxydverbindung des sauerstoffübertragenden Ferments der Atmung<sup>2</sup> — von der Fragestellung ausgegangen, ob auch Licht, das in der *Eiweisskomponente* des Kohlenoxydmyoglobins absorbiert wird, vom Hämineisen des Myoglobins Kohlenoxyd abzuspalten vermag gleich dem, das direkt in der Häminkomponente absorbiert wird, und haben die photochemische Spaltung von Kohlenoxydmyoglobin durch ultraviolette Strahlung untersucht.

Dabei sind wir nach demselben Prinzip verfahren wie bei den vorgenannten Versuchen mit grünem Licht<sup>1</sup> und haben Gemische von Kohlenoxyd- und Sauerstoffmyoglobin in optisch dünner Schicht mit monochromatischem Licht gemessener Intensität durchstrahlt. Die Lichtwirkung, eine Verschiebung der Verteilung des Myoglobins zwischen Kohlenoxyd- und Sauerstoffverbindung



wurde spektrophotometrisch bestimmt.

Unser Ergebnis ist, dass in jedem ultravioletten Spektralbezirk, auch bei  $\lambda = 280 \text{ m}\mu$  die photochemische Ausbeute  $\varphi = 1$  ist (Tab. I).

TABELLE I

Wellenlänge der wirkenden Strahlung [ m $\mu$ ]	Moleküle CO abgespalten Lichtquanten absorbiert [ $\varphi$ ]
280	1,01 $\pm$ 4%
313	0,97 $\pm$ 3%
334	1,09
366	0,99 $\pm$ 2%
546	0,91 $\pm$ 5%

Dies ist eine eindeutige Antwort auf unsere Fragestellung, denn während die anderen Wellenlängen nur oder fast nur von der Häminkomponente (Molgewicht 600) des Myoglobins absorbiert werden, wird die Wellenlänge  $\lambda = 280 \text{ m}\mu$ , die im Maximum der Eiweissbande liegt, zu 40% von der Eiweisskomponente (Molgewicht 16 000) des Myoglobins absorbiert (Abb. 1) — und zwar von den über das ganze Proteinmolekül verteilten Tyrosin- und Tryptophanresten :

$$\varphi = 1 \text{ für } \lambda = 280 \text{ m}\mu$$

bedeutet, dass jedes in einem Tyrosin- und Tryptophanrest des Proteinanteils absorbierte Lichtquant vom Hämineisen des Myoglobins ein Kohlenoxydmolekül abspaltet genau so wie ein im Hämin selbst absorbiertes Lichtquant.

Abb. 1 zeigt das molare Absorptionsspektrum von Kohlenoxydmyoglobin, das wir mit der Apparatur von WARBURG und NEGELEIN<sup>3</sup> bestimmt haben.

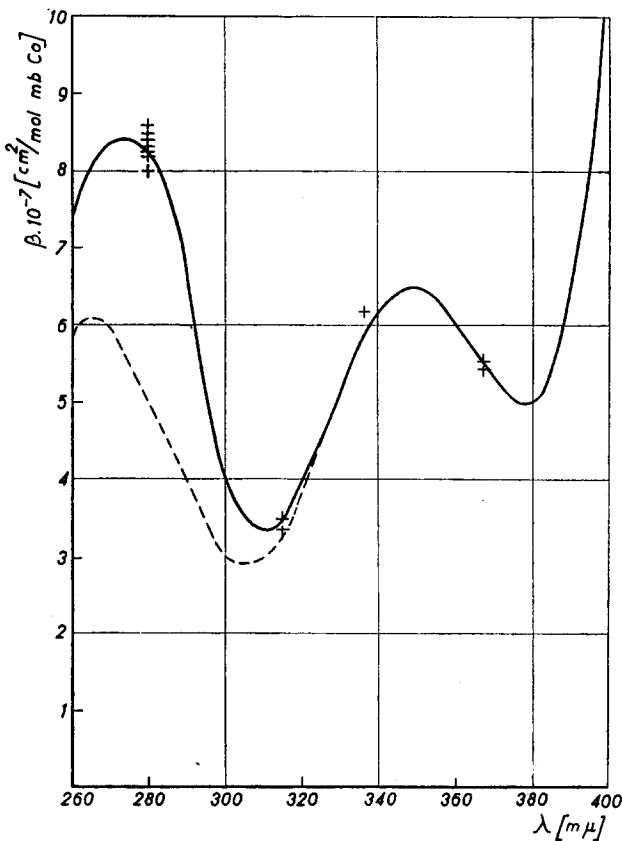


Abb. 1. Molarer Absorptionsspektrum ( $\beta = \ln \frac{I_0}{I}$  c.d) von Kohlenoxydmyoglobin (ausgezogen), molarer Absorptionsspektrum der Häminkomponente von Kohlenoxydmyoglobin (gestrichelt) und photochemisches Wirkungsspektrum von Kohlenoxydmyoglobin (Kreuze).

Ihm ist das photochemische Wirkungsspektrum des Kohlenoxydmyoglobins (zugrundegelegt  $\varphi = 1$ ; vgl. Gleichung (6) S. 11) gegenübergestellt. Wirkungsspektrum und Absorptionsspektrum stimmen in jedem Spektralbereich überein — eine der Tab. I gleichberechtigte Darstellung unserer Versuchsergebnisse.

Unsere Beobachtung, dass innerhalb des Eiweissanteils des Myoglobins die Wirkung absorbierter Quanten nicht an den engeren Absorptionsbereich gebunden

ist, steht mit den Ergebnissen der vorgegangenen photochemischen Arbeiten dieses Instituts an anderen Eiweisskörpern im Einklang. Möglicherweise ist dies eine allgemeine Eigenschaft aller Eiweisskörper, ist die Übertragung von Aktivierungsenergie, die im Fermentprotein absorbiert wird, ein Grund dafür, dass die Proteinteile der Fermente die Wirkungsstellen der Fermente chemisch aktivieren.

Das photochemische Wirkungsspektrum der Kohlenoxydverbindung des *sauerstoffübertragenden Ferments der Atmung*<sup>2</sup>, oberhalb 300 m $\mu$  nahezu übereinstimmend mit dem Absorptionsspektrum von Kohlenoxyd-Spirographishämochromogenen, zeigt in der Eiweissbande ( $\epsilon$  Bande  $\lambda = 280$  m $\mu$ ) sehr viel stärkere Absorption als dem Spirographishämin und allen anderen bekannten Häminen zu eigen ist.

In Tab. II sind die molaren Absorptionen in den beiden ultravioletten Banden des sauerstoffübertragenden Ferments denen der Cysteinhämochromogene des Spirographishämins und des Protohämins gegenübergestellt. In der  $\delta$  Bande, einer reinen Häminbande, herrscht Übereinstimmung; in der  $\epsilon$  Bande, also im Maximum der Eiweissabsorption überragt die *photochemisch wirkende* Absorption des sauerstoffübertragenden Ferments die der Hämine um ein Vielfaches, was darauf schliessen lässt, dass das Hämin des sauerstoffübertragenden Ferments der Atmung an einen Eiweiss-träger gebunden ist, und dass die in den Tyrosin- und Tryptophanresten dieses Eiweiss-trägers absorbierte Energie im Hämin des Ferments zu wirken vermag, wie beim Myoglobin.

TABELLE II

Kohlenoxyd- verbindung des	$\delta$ Bande		$\epsilon$ Bande	
	Lage des Maximums	Absorptions- koeffizient	Lage des Maximums	Absorptions- koeffizient
sauerstoffübertragenden Ferments der Atmung.	356 m $\mu$	$6 \cdot 10^7$ cm <sup>2</sup> /mol	280 m $\mu$	$20 \cdot 10^7$ cm <sup>2</sup> /mol
Spirographishämo- chromogen . . . . .	360 „	$6,2 \cdot 10^7$ „	285 „	$4 \cdot 10^7$ „
Protohämochromogen .	340 „	$6,5 \cdot 10^7$ „	268 „	$6,2 \cdot 10^7$ „

Bei der *photochemischen Zerstörung der Urease* ist die Ausbeute zwar klein, jedoch über den ganzen von KUBOWITZ und HAAS durchgemessenen Spektralbereich konstant<sup>4</sup>. Beispielsweise ist

$$\varphi \text{ bei } \lambda = 280 \text{ m}\mu \text{ gleich } \varphi \text{ bei } \lambda = 196 \text{ m}\mu.$$

Dies bedeutet aber, dass es für die photochemische Zerstörung der Urease, deren Mechanismus im übrigen noch unbekannt ist, den gleichen Effekt hat, ob die wirkende Energie in einigen wenigen (Tyrosin oder Tryptophan) oder sämtlichen Aminosäureresten absorbiert wird, was darauf hindeutet, dass auch in diesem Fall die Wirkung der absorbierten Energie nicht an den engeren Bereich der Absorption gebunden ist.

## 2. METHODE

Das Prinzip der Methode — in der Einleitung skizziert — ist in der vorangegangenen Arbeit ausführlich geschildert worden. Es basiert auf der Theorie der photochemischen Spaltung der Carbonyle, die OTTO WARBURG im Verlauf seiner Arbeiten über das Wirkungsspektrum des sauerstoffübertragenden Ferments der Atmung entwickelt hat.

a. *Zerfallskonstanten.*

Befindet sich das System



im Ungleichgewicht, dann strebt es, je nachdem ob es belichtet wird oder nicht, verschiedenen Gleichgewichtszuständen mit verschiedenen Geschwindigkeiten zu.

Das Zeitgesetz des Reaktionsablaufes ist in beiden Fällen analog. Der Unterschied besteht lediglich darin, dass sich im Lichte die *natürliche* (Dunkel-) Zerfallskonstante der Myoglobinkohlenoxydverbindung um die *photochemische* Zerfallskonstante  $z_J$  der Myoglobinkohlenoxydverbindung vermehrt.

Unter gewissen Bedingungen (bedeutender Überschuss der reagierenden Gase, Konstanz der photochemisch wirkenden Strahlung) sind die Reaktionsabläufe erster Ordnung. Dann ist, wie wiederholt \* abgeleitet worden ist,

im *Dunkeln*

$$\frac{dn}{n_d - n_t} = k; \quad k = \frac{1}{t - t_0} \ln \frac{n_{t_0} - n_d}{n_t - n_d} \quad (2)$$

bei *Belichtung* in einem zeitlich und räumlich konstanten Strahlungsfeld

$$\frac{dn}{n_h - n_t} = k + z_J; \quad k + z_J = \frac{1}{t - t_0} \ln \frac{n_{t_0} - n_h}{n_t - n_h} \quad (3)$$

Dabei ist  $n$ , die Verteilungszahl, definiert als der jeweilige Anteil des Sauerstoffmyoglobins am gesamten Myoglobin

$$n = \frac{\text{MbO}_2}{\text{MbO}_2 + \text{MbCO}}; \quad 1 - n = \frac{\text{MbCO}}{\text{MbO}_2 + \text{MbCO}} \quad (4)$$

( $n_d$ : Dunkelgleichgewicht,  $n_h$ : Lichtgleichgewicht,  $n_t$ : Verteilung zur Zeit  $t$ )

Nach (2) und (3) bestimmen wir  $z_J$ , die *photochemische Zerfallskonstante* des Kohlenoxydmyoglobins, experimentell aus der Differenz der Geschwindigkeitskonstanten der Zeitgesetze nach denen das System (1) bei Belichtung dem Lichtgleichgewicht, (Gleichung (3)) und bei darauffolgender Verdunkelung dem Dunkelgleichgewicht (Gleichung (2)) zustrebt:

$$z_J = (z_J + k) - k. \quad (5)$$

Bei der von uns gewählten Versuchsanordnung verfolgen wir die Reaktionsabläufe durch die Änderung der Absorption monochromatischen Lichts. Dabei sind \*\* — bei gleichbleibender Schichtdicke, Eingangsintensität und Gesamtmyoglobinkonzentration — die Differenzen der Verteilungszahlen proportional den Differenzen der Logarithmen der hinter der Versuchslösung gemessenen Intensitäten. Es ist also beispielsweise in Gleichung (2) zu substituieren

$$\frac{n_{t_0} - n_d}{n_t - n_d} = \frac{\ln i_{t_0} - \ln i_{t_\infty}}{\ln i_t - \ln i_{t_\infty}} \quad (6)$$

Ein Versuchsbeispiel für die Bestimmung von  $z_J + k$  und  $k$  nach den Gleichungen (3) und (2) auf dem oben geschilderten Wege findet man im Versuchsprotokoll.

\* z.B. O. WARBURG, E. NEGELEIN UND W. CHRISTIAN, *Biochem. Z.* **214** (1928) 26, bes. Gleichungen 6, 7 und 11, in denen  $\text{CH}_3\text{NC}$  hier durch  $\text{O}_2$  zu ersetzen ist.  $k = \omega + \rho$ .

\*\* Vgl. *Biochem. Z.*, **311** (1941) 163, bes. S. 169.

b. *Photochemische Ausbeute*

Die photochemische Zerfallskonstante  $z_J$ , derjenige Bruchteil der Kohlenoxydmyoglobinmoleküle, der in der Zeiteinheit photochemisch gespalten wird, ist proportional  $\epsilon$ , demjenigen Bruchteil der Kohlenoxydmyoglobinmoleküle, die in der Zeiteinheit durch ein Lichtquant getroffen werden. Der Proportionalitätsfaktor  $\varphi$  ist die photochemische Ausbeute.

Bei Bestrahlung einer optisch dünnen Schicht des Pigments, in der die eingestrahlte Intensität nur in praktisch zu vernachlässigender Weise geschwächt wird (räumlich konstantes Strahlungsfeld) kann, man setzen \*

$$\epsilon = J \cdot \beta \quad (7)$$

und erhält

$$z_J = \varphi \cdot J \cdot \beta$$

$$\varphi = \frac{z_J}{J \cdot \beta} \quad (8)$$

Darin ist :

$J$  die Bestrahlungsstärke  $\left[ \frac{(\text{Mole Quanten})}{\text{Min} \cdot \text{cm}^2} \right]$ ,

$\beta$  der Absorptionskoeffizient von Kohlenoxydmyoglobin  $\left[ \frac{\text{cm}^2 (\text{totalabsorbierende Fläche})}{\text{Mol MbCO}} \right]$

$\varphi$  die photochemische Ausbeute  $\left[ \frac{\text{Mole CO abgespalten}}{\text{Mole Quanten absorbiert}} \right]$ .

c. *Photooxydation von Myoglobin*

Neben der photochemischen Spaltung von Kohlenoxydmyoglobin findet bei der Bestrahlung mit Ultraviolett eine Photooxydation statt, deren photochemische Ausbeute mit zunehmender Frequenz der Einstrahlung steigt, jedoch im ganzen genommen um mehr als zwei Zehnerpotenzen geringer ist, als die bei der Kohlenoxydabspaltung.

Die Photooxydation bewirkt, dass die Lichtspaltung von Kohlenoxymyoglobin im Ultraviolett nicht mehr vollkommen reversibel ist. Sie ist die ernsteste Fehlerquelle unserer Untersuchung. Wir sind jedoch der sicheren Überzeugung, dass der durch sie verursachte Fehler innerhalb der allgemeinen Fehlergrenze von 10% liegt.

## 3. VERSUCHSANORDNUNG

Wie das Prinzip der Methode ist auch das Prinzip der Versuchsanordnung das gleiche wie in der vorangegangenen Arbeit, doch hat die Anwendung ultravioletter Strahlung eine weitgehende Umgestaltung der einzelnen Elemente der Apparatur erfordert.

a. *Apparatur*

Abbildung 2 und 3 zeigen Schnitte durch Versuchstrog und Thermostaten in Richtung der photochemisch wirkenden Strahlung und senkrecht dazu in Richtung des spektralphotometrisch analysierenden Strahlenganges.

\* Herleitung vgl. *Biochem. Z.*, **311** (1941) 163, bes. S. 167. Vgl. *ibid.*, S. 167, Anm. 1.

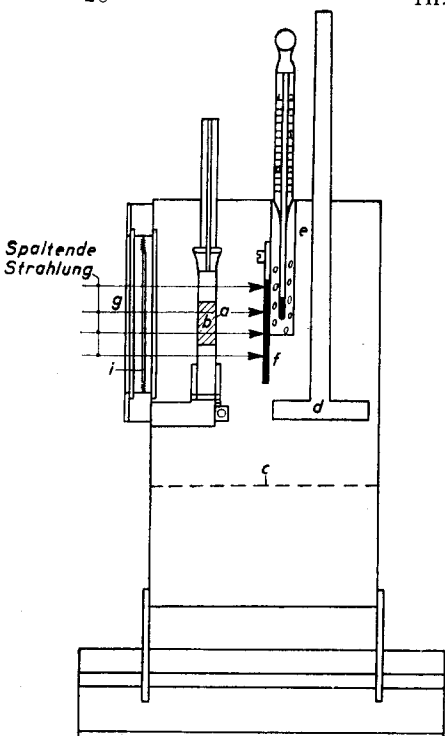


Abb. 2.

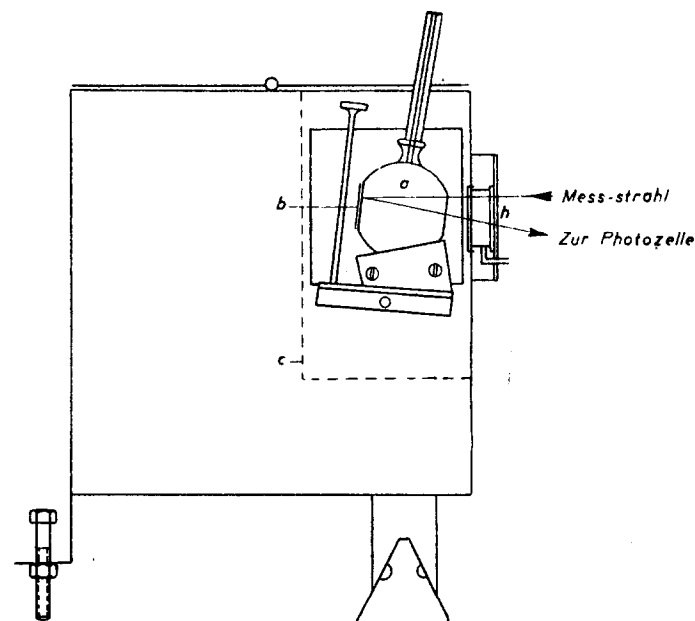


Abb. 3.

Der Versuchstrog (a) aus Quarzglas \* (Tiefe 0,6 cm, Breite zwischen den Seitenfenstern 4,5 cm) trägt links einen Spiegelbelag (b), an dem wir den Messstrahl durch den Trog zurückspiegeln.

Der Thermostat ist durch Zwischenwände aus Drahtgewebe (c) in zwei ungleiche Räume geteilt. Deren grösserer wird mit Eiswürfeln aus destilliertem Wasser gefüllt, die die Versuchstemperatur von 0° halten. Deren kleinerer trägt den Versuchstrog (a), Rührer (d), Thermometer (e) und einen schwarzen Schirm (f), der die den Versuchstrog durchstrahlende Intensität vernichtet.

Das Beschlagen der Thermostatenfenster verhüten wir jetzt sicher dadurch, dass wir den Luftraum in den Doppelfenster (g, h) trockenhalten und durch Heizfäden (i) elektrisch erwärmen.

*Photochemischer Strahlengang.* Der Entladungsbogen einer mit Gleichstrom betriebenen Quecksilberhöchstdrucklampe \*\* wird durch einen wassergekühlten Quarzglas-kondensor (dreilinsiger Brillenglaskondensor  $\varnothing$  8 cm,  $f = 8$  cm) auf eine bikonvexe Quarzlinse abgebildet ( $\varnothing$  3 cm,  $f = 20$  cm), die ihrerseits in der Ebene des Versuchstrogas ein Bild des Kondensors entwirft. Die homogen ausgeleuchtete Fläche beträgt 36 cm<sup>2</sup>. Im Strahlengang liegen ausser Filtern und Blenden eine wassergekühlte Küvette mit Wasserfüllung und Quarzfenstern, sowie ein von Hand verstellbarer rotierender Sektor.

*Analysierender Strahlengang.* Zur spektralphotometrischen Bestimmung der Lichtwirkung verwenden wir jetzt die violette Hg-Linie 405 m $\mu$ . Der Vorteil dieser Wellenlänge gegenüber der früher verwandten gelben Na-Linie liegt nicht in einem günstigeren Verhältnis der Absorptionskoeffizienten von Kohlenoxyd- und Sauerstoffmyoglobin, sondern in deren grösseren Absolutwerten, die es gestatten den gleichen Effekt mit wesentlich weniger konzentrierten Myoglobininlösungen zu erzielen. Dies ist wichtig bei Versuchen mit solchen Strahlungen, die wie 280 m $\mu$  vom Myoglobin stark absorbiert werden, denn

\* Geblasen von HANFF UND BUEST, Berlin.

\*\* Typ HBO der Studiengesellschaft für elektrische Beleuchtung (OSRAM), deren Herren Dr. EWEST und Dr. ROMPE wir für ihre Unterstützung unseren herzlichsten Dank sagen.

es ist ein entscheidender Punkt der Methode, dass die photochemisch wirkende Intensität auf ihrem Weg durch die Versuchslösung nicht wesentlich geschwächt wird.

Als Quelle für den Messstrahl haben wir unter einer Reihe von Quecksilberhöchst-druckklämpchen des Typs HBO 200 eine herausgesucht, die mit Gleichstrom aus einem Synchron- Drehstrom-Umformer betrieben (besonders wenn man sie von Zeit zu Zeit umpolt) ohne die geringsten Intensitätsschwankungen brennt, was für das Gelingen der Versuche sehr wichtig ist.

Die Linie 405  $m\mu$  gewinnen wir durch Filterung (16 mm UG<sub>3</sub>, \* 8 mm BG<sub>3</sub>, 6 mm Akridin 6mg/cm<sup>3</sup> in entlüftetem Alkohol). Die Strahlung enthält Ultrarot, das jedoch nicht stört, da wir als *Empfänger* eine Natriumzelle verwenden. Diese, vom Typ BM 122 BNaE der Firma PRESSLER, steht in Verbindung mit einem einfachen Gleichstrom-verstärker \*\* (zwei Elektrometerröhren T114 in Brückenschaltung). Die Ausschläge sind proportional den Intensitäten, die Bedienung ist nicht schwieriger als die eines Photoele-ments, die Empfindlichkeit jedoch um mehr als zwei Zehnerpotenzen grösser.

#### b. Lichtfilter zur Darstellung ultravioletter Hg-Linien

Die experimentell schwierigste Aufgabe unserer Untersuchung war die Darstellung monochromatischer Strahlungen in der erforderlichen Intensität und Homogenität des Strahlungsfeldes. Wir verwendeten Quecksilberhöchststrahlampen \*\* hoher Leistung und kamen mit den in der Tabelle III angegebenen Filterkombinationen zum Ziel.

\* Filtergläser von SCHOTT UND GEN., Jena.

\*\* Konstruiert und erbaut von Herrn Ing. KLICH, Optisches Institut der TH, Berlin.

TABELLE III

Wellen- länge ( $m\mu$ )	Filter			Verunreinigungen		Lichtquelle und erhaltene Intensität
	Konzen- tration (g/Liter)	Substanz und Lösungsmittel	Schicht- dicke (cm)	Andere Linien	Ultra- rot	
280	2,5	Anthranilsäure in Methanol (sauerstofffrei)	0,2	ca 5 % 276 $m\mu$	2,5 %	HBO 2000 Watt  0,1 cal/Min
	500	NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O *	3			
		in Wasser	10			
		Wasser	0,2			
313	500	UG 5 **		0	0	HBO 500 Watt 0,25 cal/Min
		NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O *	10			
		in Wasser	10			
		WG 5 **	0,2			
334	32 420	UG 5 **	0,2	0	8 %	HBO 500 Watt 0,1 cal/Min
		LiNO <sub>3</sub>	2			
		+ NiSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O *				
		in Wasser	10			
366	15	Wasser	0,2	0	0	HBO 500 Watt  0,3 cal/Min
		UG 2 **				
		CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	6			
		in Wasser	0,4			
		BG 12 **	0,6			
		UG 2 **	0,2			
		WG 2 **				

\* Nickelsulfat zur Analyse, E. MERCK, Darmstadt (das Präparat muss eisenfrei sein).

\*\* Filterscheiben von SCHOTT UND GEN., Jena.

Die spektrale Reinheit haben wir visuell mit einem Flusspatspektographen, dessen Kassette durch ein Fluoreszenzglas ersetzt war, und photoelektrisch, durch Einschalten weiterer Filter und Filterkombinationen geprüft: sie ist der spektralen Reinheit, die man mit einem einfachen Monochromator erhält, nicht unterlegen.

Für das Anthranilsäurefilter benutzen wir die in Abb. 4 dargestellte Anordnung, die gestattet — durch Einleiten eines inerten Gases — die Filterlösung sauerstofffrei zu machen und während des Versuchs stetig zu erneuern. So wird Photooxydation vermieden, die die meisten organischen Substanzen bei starker UV-Bestrahlung erleiden. Die Schichtdicke der Küvette ist mit Rücksicht auf die störende Absorption des Lösungsmittels, klein gehalten. Im Spektrum der von uns benutzten Lampen fehlen die Linien unterhalb  $270\text{ m}\mu$  infolge Absorption durch den konzentrierten Quecksilberdampf.

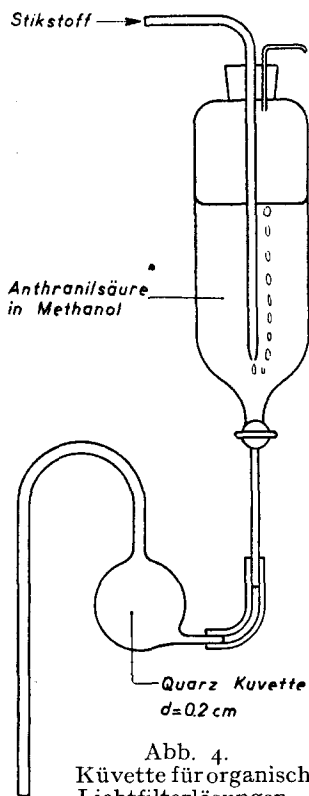


Abb. 4.  
Küvette für organische  
Lichtfilterlösungen.

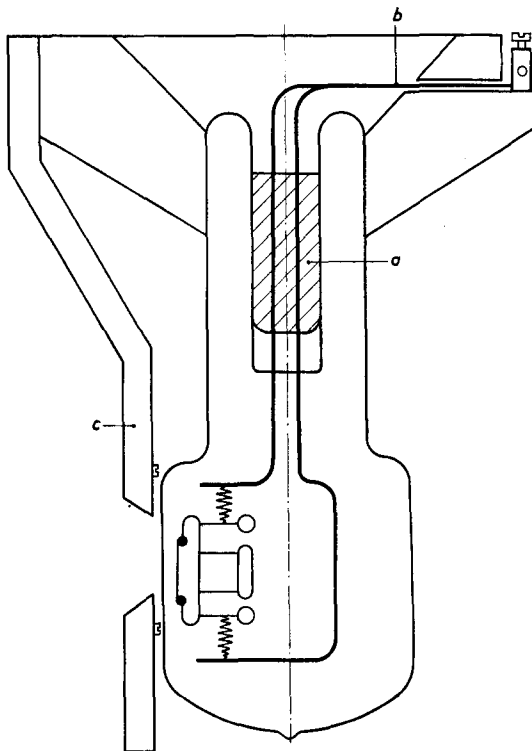


Abb. 5. Schnitt durch das Vakuumthermoelement.  
Zeichenerklärung im Text.

### c. Intensitätsmessung

Die Intensität der spaltenden Strahlung messen wir vor oder nach dem Versuch mit einem Vakuumthermoelement\*, das an ein ZERNICKE-galvanometer angeschlossen ist (Typ Za, Stromempfindlichkeit mit  $20\ \Omega$  Nebenschluss  $5,43 \cdot 10^{-9}$  Amp/mm, Widerstand mit Nebenschluss  $7,7\ \Omega$ , Widerstand des Thermoelements  $7,9\ \Omega$ , Spannungsempfindlichkeit der Anordnung  $8,48 \cdot 10^{-8}$  Volt/mm).

Die Eichung des Vakuumthermoelements, das planparallele Quarzfenster hat, durch Vergleich mit einem geeichten Flächenbolometer hat ergeben

Bei  $\lambda = 546\text{ m}\mu$ :  $4,02 \cdot 10^{-4}$  cal/min.  $\text{cm}^2$ /Mikrovolt.

Bei  $\lambda = 313\text{ m}\mu$ :  $4,00 \cdot 10^{-4}$  „ „ „ „

\* Erbaut von Dipl. ing. H. MÜLLER, Berlin-Zehlendorf.



Zur Erhöhung der Nullpunktskonstanz des Thermoelements, haben wir, nach Isolierung der Zuleitungen durch einen Schellacküberzug, den Glassockel des Elements (vgl. Abb. 5) mit Quecksilber (a) gefüllt und dann mit Paraffin (b) vergossen.

Das übliche Metall-Hartgummigehäuse haben wir entfernt und durch eine Kupferblende (c) mit scharfen Schneiden (Rasierklängen) ersetzt.

In diesem Zustande tauchen wir den Empfänger direkt an Stelle des Versuchstrokes in die Thermostatenflüssigkeit und mitteln, wegen der geringen Flächenausdehnung des Elements (d), ( $0,2 \times 5$  mm) die Intensität an fünf verschiedenen Stellen des Strahlungsfeldes.

Die (geringen) Intensitätsänderungen der spaltenden Strahlung in der Zeitspanne zwischen der Intensitätsmessung und dem Versuch registrieren wir mit einem kleinen Photoelement, das unter dem Versuchstrog dauernd im Strahlungsfeld liegt.

Weitere Einzelheiten gehen aus dem Versuchsprotokoll hervor.

#### d. Bemerkung zur photoelektrischen Messung chemischer Reaktionskinetik

Unsere Versuchsanordnung erfordert die Verfolgung relativ geschwinder Reaktionsabläufe, und es erhebt sich die Frage, inwieweit unsere Versuchsergebnisse durch die Trägheit des Messinstrumentes — eines Spiegelgalvanometers — verfälscht sind.

Unser Galvanometer ist aperiodisch gedämpft. Seine Trägheit ist gegeben durch die Eigenfrequenz

$$\omega_0 = \frac{2\pi}{T}$$

(T die Schwingungsdauer in ungedämpftem Zustand).

Der erwartete, durch die Trägheit des Galvanometersystems nicht verfälschte, Ausschlag zur Zeit t sei mit

$$\Phi = K i_t \quad (9)$$

( $i_t$  die Lichtintensität auf der Photozelle zur Zeit t) bezeichnet.

Nach Gleichung (2) und (6), die einen Reaktionsablauf nach der ersten Ordnung kennzeichnen, ist

$$i_t = i_{t\infty} e^{\left[ \ln \frac{i_{t0}}{i_{t\infty}} \right] e^{-kt}} \quad (10)$$

Entwickelt man darin  $e^{-kt}$  zur Reihe und bricht nach dem zweiten Gliede ab, dann erhält man

$$i_t' = i_{t\infty} e^{\left[ \ln \frac{i_{t0}}{i_{t\infty}} \right] (1 - kt)} = i_{t0} e^{\left[ \ln \frac{i_{t0}}{i_{t\infty}} \right] kt} \quad (11)$$

das Gesetz für eine Reaktion nullter Ordnung, die zu keiner Zeit langsamer, für  $t \ll k$  aber mit gleicher Geschwindigkeit wie die wahre Reaktion läuft.

Die Differentialgleichung für die durch Reaktion (11) erzwungene Bewegung des Galvanometersystems lautet

$$\ddot{\Phi} + 2\omega_0 \dot{\Phi} + \omega_0^2 \Phi = \omega_0^2 \Phi' \quad (12)$$

mit

$$\Phi' = K i_t'$$

Unter den Anfangsbedingungen  $t = 0$ ;  $\Phi_0 = K i_{t0}$ ;  $\dot{\Phi} = 0$  ist die allgemeine Lösung dieser Gleichung

$$\Phi_t = \Phi' \left[ \frac{1}{\left( \frac{d}{\omega_0} - 1 \right)^2} + e^{(d - \omega_0)t} \left( 1 + \omega_0 t - \frac{1}{\left( \frac{d}{\omega_0} - 1 \right)^2} + \frac{t\omega_0}{\left( \frac{d}{\omega_0} - 1 \right)} \right) \right] \quad (13)$$

mit

$$d = \left[ \ln \frac{i_{t0}}{i_{t\infty}} \right] k$$

die sich für  $t > 2T$  und  $\omega_0 \gg d$  vereinfacht zu

$$\varphi_t = \frac{\Phi'_t}{\left[ \left( \ln \frac{i_{t0}}{i_{t\infty}} \right) \frac{k}{\omega_0} - 1 \right]^2} \quad (14)$$

Setzt man in (14) die Daten unserer Versuchsanordnung

$$T = 1/60 \text{ [Min]}; \ln \frac{i_{t0}}{i_{t\infty}} \approx 0,5; k < 5 \text{ [1/Min]}$$

ein, dann überzeugt man sich, dass unsere Messergebnisse durch die erörterte Fehlerquelle maximal um 1% verfälscht sind.

#### 4. MESSUNGEN

##### a. Molares Absorptionsspektrum von Kohlenoxydmyoglobin im Ultraviolett.

Das Myoglobinpräparat, das wir zu unseren Versuchen benutzt haben ist 1941 von E. NEGELEIN aus einem Pferdeherz kristallisiert worden.<sup>1</sup> Es hat sich, mit CO gesättigt, unter gesättigter Ammonsulfatlösung seither unverändert erhalten. Insbesondere enthält es kein Metamyoglobin, denn die manometrisch gemessene Kohlenoxydkapazität \* und der Eisengehalt \*\* des Präparates sind äquivalent.

TABELLE IV

MOLARE ABSORPTIONSKOEFFIZIENTEN VON CO-MYOGLOBIN IN M/10 BORATPUFFER PH 8,9

mμ	cm <sup>2</sup> /Grammatom Fe . 10 <sup>-7</sup>	mμ	cm <sup>2</sup> /Grammatom Fe . 10 <sup>-7</sup>
240	9,19	340	6,32
250	6,41	350	6,36
260	7,38	360	5,82
270	8,36	370	5,11
280	8,20	380	5,03
290	6,66	390	6,48
300	4,02	400	10,9
310	3,34	405	13,4
320	4,05	546	3,20
330	5,25		

Tabelle IV zeigt die Absorptionskoeffizienten, die wir gemessen haben. Die absolute Höhe der Banden bei 274, 346 mμ sowie des Minimums bei 308 mμ ist die gleiche, wie bei den (einige mμ kurzwelliger liegenden) entsprechenden Banden des Kohlenoxydhämoglobins.

Das in Abb. 1 (gestrichelt) eingetragene Spektrum der Protohämochromogenkomponente haben wir gewonnen, indem wir vom molaren Absorptionsspektrum von Kohlenoxydhämoglobin das molare Absorptionsspektrum (16200 g/Mol) von, aus Hämoglobin gewonnenem, nativem Globin abgezogen haben. Es stimmt mit dem molaren Absorptionsspektrum von Cysteinprotohaemochromogen überein.

\* Vorschrift z.B. *Biochem. Zeitschr.* **214**, 26 (1928) bes. S. 30.

\*\* Bestimmung von W. LÜTTGENS. Methode: R. P. KENNEDY, *J. biol. Chem.* **74**, (1927) 386.

## b. Zerfallskonstanten und Ausbeuten

Tabelle V enthält die experimentellen Daten für fünfzehn Versuche bei fünf verschiedenen Wellenlängen, die zur Bestimmung von  $\varphi$  nach Gleichung (8) notwendig sind.

TABELLE V

## PHOTOCHEMISCHE SPALTUNG VON KOHLENOXYDMYOGLOBIN

$1,8 \cdot 10^{-6}$  Mole Myoglobin/Liter ; Gasmischung : 10 % CO und 90 %  $O_2$  ( $n_d$  0,4) ; Lösungsmittel : bei den ersten beiden Versuchen m/10 Phosphat  $p_H = 7,0$ , bei den anderen Versuchen m/10 Borat  $p_H = 8,9$  ; Versuchstemperatur :  $0,2^\circ - 0,4^\circ$ .

Spaltende Strahlung und molarer Absorptionskoeffizient [cm <sup>2</sup> /Mol MbCO]	Quantenintensität $\left[ \frac{N_0 \cdot h \cdot \nu}{\text{Min} \cdot \text{cm}^2} \right]$	Geschwindigkeitskonstanten (1/Minuten)			Photochemische Ausbeute $\left[ \frac{\text{Moleküle CO}}{h \cdot \nu} \right]$
		$z_J + k$	$k$	$z_J$	
$\lambda = 280 \text{ m}\mu$ $N_0 h\nu = 101\ 000 \text{ cal}$ $\beta^{280} = 8,2 \cdot 10^7$	$2,44 \cdot 10^{-8}$	2,34	0,32	2,02	1,01
	$2,44 \cdot 10^{-8}$	2,20	0,25	1,95	0,98
	$2,79 \cdot 10^{-8}$	2,60	0,33	2,27	0,99
	$2,54 \cdot 10^{-8}$	2,45	0,36	2,09	1,00
	$2,45 \cdot 10^{-8}$	2,44	0,30	2,14	1,06
	$2,22 \cdot 10^{-8}$	2,16	} 0,30	1,86	1,02
	$2,11 \cdot 10^{-8}$	2,10		1,80	1,04
$\lambda = 313 \text{ m}\mu$ $N_0 h\nu = 90\ 600 \text{ cal}$ $\beta^{313} = 3,5 \cdot 10^7$	$6,87 \cdot 10^{-8}$	2,67	0,28	2,39	0,99
	$6,87 \cdot 10^{-8}$	2,57	0,30	2,27	0,94
$\lambda = 334 \text{ m}\mu$ $N_0 h\nu = 85\ 000 \text{ cal}$ $\beta^{334} = 5,8 \cdot 10^7$	$3,07 \cdot 10^{-8}$	2,26	0,33	1,93	1,09
$\lambda = 366 \text{ m}\mu$ $N_0 h\nu = 77\ 500 \text{ cal}$ $\beta^{366} = 5,4 \cdot 10^7$	$3,2 \cdot 10^{-8}$	1,98	0,30	1,68	0,97
	$3,2 \cdot 10^{-8}$	2,08	0,34	1,74	1,01
$\lambda = 546 \text{ m}\mu$ $N_0 h\nu = 52\ 000 \text{ cal}$ $\beta^{546} = 3,2 \cdot 10^7$	$15,1 \cdot 10^{-8}$	4,34	0,30	4,04	0,87
	$3,8 \cdot 10^{-8}$	1,46	0,29	1,17	0,96
	$15,0 \cdot 10^{-8}$	4,60	0,30	4,30	0,90

Aus versuchstechnischen Gründen, haben wir die wirkende Intensität stets so eingestellt, dass  $z_J$  annähernd gleich geblieben ist, wir haben also, wie man aus der zweiten Spalte der Tabelle ersieht, eine Variation der Absorption durch eine entgegengesetzte Variation der Intensität ausgeglichen.

Den Versuchsfehler schätzen wir zu maximal zehn Prozent.

## c. Versuchsprotokoll (Versuch vom 22.11.1944).

Versuchslösung :  $1,8 \cdot 10^{-9}$  Mole Myoglobin/cm<sup>3</sup> in m/10 Boratpuffer  $p_H$  8,9, gesättigt mit einer Gasmischung von 10 % CO und 90 %  $O_2$ .

Photochemisch wirkende Strahlung :  $\lambda = 280 \text{ m}\mu$ .

Messintensität :  $\lambda = 405 \text{ m}\mu$ .

Versuchstemperatur :  $0,3^\circ$ .

1. Spaltungsversuch

Versuchslösung belichtet :

t (Min)	i <sub>t</sub> Galvano- meter- ausschlag	ln i <sub>t</sub> —ln i <sub>t∞</sub>	$\frac{1}{t_2-t_1} \ln \frac{\ln i_{t_1}-\ln i_{t_\infty}}{\ln i_{t_2}-\ln i_{t_\infty}} = Z_J + k$ [1/Min]
0	134,8	0,551	—
0,049	129,8	0,514	—*
0,120	121,8	0,449	2,04
0,175	114,8	0,389	2,29
0,283	106,8	0,318	2,08
0,583	92,3	0,170	2,08
1,50	77,8	0	—

Mittel :  $z_J + k = 2,12$  [1/Min]

\* Bei der geschwinden Lichtreaktion beziehen wir zur Berechnung von  $Z_J + k$  alle Werte auf die erste gestoppte Zeit (fliegender Start).

Versuchslösung verdunkelt :

t (Min)	i <sub>t</sub> Galvano- meter- ausschlag	ln i <sub>t</sub> —ln i <sub>t∞</sub>	$k = \frac{1}{t} \ln \frac{\ln i_{t_0} - \ln i_{t_\infty}}{\ln i_t - \ln i_{t_\infty}}$ [1/Min]
0	77,8	0,492	—
1	88,0	0,368	0,29
2	96,8	0,272	0,30
3	103,6	0,272	0,30
4	109,8	0,147	0,30
20	127,0	0	—
∞			

Mittel :  $k = 0,30$  [1/Min]

Photochemische Zerfallskonstante :  $z_J = (z_J + k) - k = 1,82$  [1/Min]

2. Bestrahlungsstärke :

Spannung des Thermoelements an 5 verschiedenen Stellen des Strahlungsfeldes [Mikrovolt] :

5,47 ; 5,65 ; 5,60 ; 5,59 ; 5,58 ; Mittel : 5,58 [Mikrovolt].

Eichwert des Thermoelements :  $4,0 \cdot 10^{-4} \left[ \frac{\text{cal}}{\text{Min cm}^2 \text{ Mikrovolt}} \right]$

Korrektion (1) für eine wegfallende Reflexion Quarz-Luft (Thermoelement in Luft geeicht, Messung in Wasser) :

$$K_1 = \frac{1}{1,04}$$

Intensität der auf das Thermoelement fallenden Strahlung :

$$5,58 \frac{1}{1,04} 4,0 \cdot 10^{-4} = 2,14 \cdot 10^{-3} \left[ \frac{\text{cal}}{\text{Min} \cdot \text{cm}^2} \right]$$

Ultrarote Verunreinigung der Strahlung (durchgelassen von WG 5 oder GG 14 oder RG 1), die vom vorigen Wert abzuziehen ist:

$$0,09 \cdot 10^{-3} \frac{\text{cal}}{\text{Min} \cdot \text{cm}^2}$$

Korrektion (2) für das Absinken der Intensität in der Zeit zwischen Versuch und Intensitätsmessung: (angezeigt durch ein Photoelement)

$$K_2 = \frac{39,5}{36,5}$$

Korrektion (3) für die Absorption der wirkenden Strahlung durch die halbe Schichtdicke der Versuchslösung (Mittelwert der Bestrahlungsstärke im Versuchstrog):

$$K_3 = 0,96.$$

Beim Spaltungsversuch wirksame mittlere Bestrahlungsstärke:

in Kalorienmass:

$$(2,14 - 0,09) \cdot 10^{-3} \frac{39,5}{36,5} \cdot 0,96 = 2,13 \cdot 10^{-3} \left[ \frac{\text{cal}}{\text{Min cm}^2} \right]$$

in Quantenmass (1 Mol Quanten bei  $\lambda = 280 \text{ m}\mu = 101\,000 \text{ cal}$ )

$$J = \frac{2,13 \cdot 10^{-3}}{101\,000} = 2,11 \cdot 10^{-8} \frac{\text{Mole Quanten}}{\text{Min. cm}^2}$$

3. Molarer Absorptionskoeffizient bei  $\lambda = 280 \text{ m}\mu$ :

$$\beta = 8,2 \cdot 10^7 \left[ \frac{\text{cm}^2}{\text{Mol MbCO}} \right]$$

4. Photochemische Ausbeute:

$$\varphi = \frac{zJ}{J \cdot \beta} = \frac{1,82}{2,11 \cdot 10^{-8} \cdot 8,2 \cdot 10^7} = 1,05 \left[ \frac{\text{Mole CO}}{\text{Mole Quanten}} \right]$$

### ZUSAMMENFASSUNG

Die photochemische Ausbeute bei der Spaltung von Kohlenoxyd-Myoglobin durch monochromatische ultraviolette Strahlung verschiedener Wellenlängen, besonders in der Eiweissbande des Chromoproteids bei  $280 \text{ m}\mu$  wurde bestimmt.

Es wurde gefunden, dass nicht nur die von der Häminkomponente absorbierte Strahlung, sondern auch die von der Eiweisskomponente absorbierte Strahlung Kohlenoxyd vom Hämeisen des Myoglobins abspaltet.

Dies bedeutet, dass innerhalb der Eiweisskomponente des Myoglobins die Wirkung absorbierter Strahlungsquanten nicht an den Ort der Absorption (bei  $280 \text{ m}\mu$  die über das Proteid verteilten Tyrosin- und Tryptophanreste) gebunden ist.

Die Ergebnisse früherer photochemischer Arbeiten Warburgs und seiner Mitarbeiter über das Wirkungsspektrum des sauerstoffübertragenden Ferments der Atmung und über das Zerstörungsspektrum der Urease lassen sich im gleichen Sinne deuten, und es wird die Frage aufgeworfen, ob dies eine allgemeine Eigenschaft der Eiweisskörper ist, ob die Übertragung quantenhaft absorbierter Aktivierungsenergie innerhalb eines Fermentproteids einer der Gründe dafür ist, dass die Fermentproteine die Wirkungsgruppen chemisch aktivieren.

Technische Einzelheiten der Apparatur, insbesondere Lichtfilter zur Isolierung ultravioletter Hg-Linien werden beschrieben. Daten für das UV-Absorptionsspektrum des Kohlenoxydmyoglobins werden angegeben.

## SUMMARY

A determination is made of the quantum efficiency when carbon monoxide myoglobin is split by monochromatic ultra-violet radiation of different wave lengths, especially within the protein band of the chromoprotein at  $280\text{ m}\mu$ .

It was found that not only the radiation absorbed by the haemin constituent, but also that absorbed by the protein constituent splits off CO from the haemin iron of the myoglobin.

This means that, within the protein component of myoglobin, the action of the absorbed quanta of radiation is independent of the place of absorption (being at  $280\text{ m}\mu$  the tyrosine and tryptophan radicals in the protein).

The results of previous photochemical work by WARBURG and co-workers, on the „activity spectrum” of the oxygen transferring enzyme of respiration and the „destruction spectrum” of urease may be interpreted in the same way. The question is raised whether this is a general property of proteins, and whether the transmission of the energy of activation absorbed in the form of quanta within an enzyme is one of the causes of the chemical activation of the prosthetic groups by the protein component of enzymes.

The technical details of the apparatus and of the lightfilters for the isolation of the ultra-violet Hg lines are described.

Data are given of the ultra-violet absorption spectrum of carbon monoxide myoglobin.

## RÉSUMÉ

Le rendement photochimique dans le dédoublement de la carboxyde-myoglobine par l'irradiation ultraviolette monochromatique de longueurs d'ondes diverses particulièrement dans la bande d'albumine du chromoprotéide à  $280\text{ m}\mu$  a été déterminé.

On a trouvé que l'irradiation absorbée par le composant hémine, mais aussi l'irradiation absorbée par le composant albumine éliminent de l'oxyde de carbone du fer d'hémine de la myoglobine.

Ceci signifie qu'à l'intérieur du composant albumine de la myoglobine, l'action des quantités d'irradiation absorbées n'est pas liée au lieu de l'absorption (à  $280\text{ m}\mu$  les restes de tyrosine et de tryptophane répartis dans le protéide).

Les résultats des travaux photochimiques antérieurs de WARBURG et de ses collaborateurs sur le spectre d'activité du ferment de la respiration transmettant l'oxygène et sur le spectre de destruction de l'uréase s'interprètent dans le même sens et la question suivante se pose : s'agit-il ici d'une propriété générale des corps albuminoïdes et est-ce que la transmission d'une quantité de l'énergie d'activation à l'intérieur d'un protéide fermentaire est l'une des raisons pour lesquelles les protéines fermentaires activent chimiquement les groupes d'action ?

Diverses particularités des appareils, et, en particulier, les filtres de lumière servant à l'isolation des lignes ultraviolettes Hg y sont décrites.

Les données relatives au spectre d'absorption UV de la carboxydemoglobine sont également indiquées.

## LITERATUR

- <sup>1</sup> TH. BÜCHER UND E. NEGELEIN, *Biochem. Z.*, **311** (1941) 163, bes. S. 181.
- <sup>2</sup> O. WARBURG, *Angew. Chemie*, **45** (1932) 1.
- <sup>3</sup> O. WARBURG UND E. NEGELEIN, *Biochem. Z.*, **214** (1929) 64, bes. S. 82 ; E. Haas, *ibid.*, **282** (1935) 224.
- <sup>4</sup> F. KUBOWITZ UND E. HAAS, *Biochem. Z.*, **257** (1933) 337.

Eingegangen den 3. Juli 1946