

## Étude sur la précipitation de la protéine par les sels complexes métalliques. I.

### Précipitation de la protéine par les sels complexes du cobalt.

Par Réinosuké HARA.

(Reçu le 13 Décembre, 1948.)

**Introduction.** Quand on a l'intention d'étudier l'action du composé inorganique donné à l'organisme, on doit d'abord penser à celle sur les protéines qui constituent cet organisme. Comme beaucoup de sels inorganiques cependant se hydrolysent dans leur solution aqueuse, l'étude systématique est assez difficile. J'ai donc utilisé pour ce but les sels complexes métalliques qui ne subissent pas l'hydrolyse dans leur solution aquéuse. Récemment, Brintzinger<sup>(1)</sup> et ses collaborateurs ont déterminé la constante de la dialyse des ions complexes dans la solution aqueuse, et ils ont démontré que beaucoup de sels complexes donnent leur poids moléculaire calculé par cette formule. L'étude sur la précipitation de la protéine par les sels complexes métalliques a été étudiée par S. E. Michael<sup>(2)</sup>. Il a principalement employé les sels complexes du chrome. Il a classé tous les sels complexes métalliques en sels complexes cationiques et anioniques et il a aussi démontré que le premier précipite la protéine dans le domaine alcalin du point isoélectrique et le second précipite la protéine dans le domaine acide. Comme exemples il a donné  $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ ,  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]\text{Cl}$  pour le premier,  $\text{K}_3[\text{Cr}(\text{CNS})_6]$  pour le second. Dans ce cas, la protéine et les ions complexes peuvent réagir stoichiométriquement. J'ai déjà utilisé les sels complexes du cobalt et je vais maintenant procéder à l'expérience avec certains sels complexes typiques du fer, du chrome etc. En employant les sels complexes du cobalt, dans ce présent mémoire, je les ai classés en sel complexe cationique et sel complexe anionique comme Michael l'a déjà fait. Les solutions employées pour mes expériences montrent les pH 8.8 et 2, et celles du tampon sont  $\text{NH}_4\text{OH}-\text{NH}_4\text{Cl}$  à 1/10 N et  $(\text{HOOC})_2(\text{CHOH})_2-(\text{NaOOC})_2(\text{CHOH})_2$  à 1/10 N.

(1) H. Brintzinger, *Z. anorg. allgem. Chem.*, 222 (1935). 312; 223 (1935). 253.

(2) S. E. Michael, *Biochem. J.* 33 (1939), 924.

**Détermination du domaine de la concentration du sel complexe qui précipite la protéine.** Les sels complexes cationiques ne peuvent pas toujours précipiter la protéine, tandis que les sels anioniques le font. L'alubumine d'oeuf n'est guère précipitée par les sels complexes cationiques, ni la gélatine non plus. En prenant la solution de la caséine à 0.5 % ou celle de l'alubmine à 0,5 %, on les a dissous dans le tampon (pH 8.8 ou 2), et on a ajouté 1cc. de la solution de diverses concentrations du sel complexe à 1 cc de chaque solution. On en a examiné les résultats de précipitation après trente minutes, le résultat est montré dans la table suivante en indiquant # la précipitation parfaite, et ++, + la précipitation imparfaite.

a. *Précipitation de la protéine par les sels complexes cationiques.* Les sels complexes cationiques ne précipitent pas toujours la protéine. Aucune protéine n'est précipitée par les sels complexes du cobalt de la valence +1. Le sel complexe qui n'a pas de charge électrique tel que  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_8(\text{NO}_2)_8]$  ne précipite jamais la protéine. Le domaine de la concentration du sel complexe pour la précipitation est montré ci-dessous.

Table 1.

Sel complexe	Caséine	Insuline	Albumine d'oeuf	Gélatine
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_8(\text{NO}_2)_8]$	—	—	—	—
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_4\text{CO}_3]_2(\text{SO}_4) \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	—	—	—	—
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_4(\text{NO}_2)_2]^{(1)}_{(6)}\text{Cl}$ (Trans) (Croséo)	—	—	—	—
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}](\text{NO}_3)_2$ (Purpuréo)	+	+	—	—
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{NO}_2]\text{Cl}_2$ (Xantho)	+	+	—	—
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{NO}_3]\text{Cl}_2$	+	+	—	—
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ (Luthéo)	++	++	—	—
$[\text{Co en}_3]\text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	++	++	—	—
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{H}_2\text{O}](\text{NO}_3)_3$ (Roséo)	++	++	—	—
$[\text{Co}(\text{NH}_3)_4(\text{H}_2\text{O})_2](\text{NO}_3)_3\text{H}_2\text{O}$ (Diroiséo)	++	++	—	—
$[\text{Co}(\text{en})_2(\text{NH}_3)_2]^{(1)}_{(6)}\text{Br}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Trans)	++	++	—	—
$[(\text{NH}_3)_4\text{Co}(\text{OH})_2\text{Co}(\text{NH}_3)_4]\text{Cl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ++	++	+	—	—
$[\text{en}_2\text{Co}(\text{OH})_2\text{H}_2\text{O}(\text{H}_2\text{O})\text{Co}(\text{OH})_2\text{en}_2]\text{Cl}_4$ ++	++	+	—	—
$[\text{Co}(\text{OH})_2\text{Co en}_2]_3(\text{NO}_3)_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ##	##	+	—	—

Table 2.

Sel complexe	Protéine	La concentration pour la précipitation (mol)
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> Cl](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (Purpuréo)	Caséine	1/60
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> NO <sub>3</sub> ]Cl <sub>2</sub>	„	1/60
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub> (Xantho)	„	1/40
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ]Cl <sub>3</sub> (Luthéo)	„	1/20—1/300
[Co en <sub>3</sub> ]Cl <sub>3</sub> ·3H <sub>2</sub> O	„	1/40—1/300
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> H <sub>2</sub> O](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (Roséo)	„	1/80—1/250
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O (Diroiséo)	„	1/40—1/250
[Co en <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ( <sup>11</sup> Br <sub>8</sub> ) <sub>2</sub> ]Br <sub>8</sub> ·H <sub>2</sub> O	„	1/40—1/300
[NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Co(OH) <sub>2</sub> Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> ]Cl <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	„	1/100—1/1000
[en <sub>2</sub> Co(OH) <sub>2</sub> Co(H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> Co(OH) <sub>2</sub> Co en <sub>2</sub> ]Cl <sub>4</sub>	„	1/100—1/1000
[Co(OH) <sub>2</sub> Co en <sub>2</sub> ] NO <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> ·3H <sub>2</sub> O	„	1/100—1/5000

b. *Précipitation de la protéine par les sels complexes anioniques.* Les sels complexes anioniques peuvent parfaitement précipiter la protéine.

Table 3.

Sel complexe	Caséine	Insuline	Albumine d'œuf	Gélatine
K[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ] (Sel Erdmann)	++	++	++	+
Na <sub>3</sub> [Co(NO <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ]	++	++	++	+
K <sub>3</sub> [Co(CN) <sub>6</sub> ]	++	++	++	+

Le domaine de la concentration du sel complexe pour la précipitation est montré ci-dessous.

Table 4.

Sel complexe	Protéine	La concentration pour la précipitation (mol)
K[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ] (Sel Erdmann)	„	1/60
Na <sub>3</sub> [Co(NO <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ]	„	1/40—1/300
K <sub>3</sub> [Co(CN) <sub>6</sub> ]	„	1/100—1/300
K[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (NO <sub>2</sub> ) <sub>4</sub> ] (sel Erdmann)	Albumine d'œuf	1/60
Na <sub>3</sub> [Co(NO <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> ]	„	1/40—1/350
K <sub>3</sub> [Co(CN) <sub>6</sub> ]	„	1/100—1/300

**Calcul de l'équivalent de l'ion complexe combiné avec 1g. de la protéine.** La protéine est précipitée par les sels complexes, et on peut séparer par la centrifugation en la lavant cinq fois par l'eau, et on peut la sécher dans l'exsiccateur. En prenant 20-30 mg. de la protéine précipitée et la décomposant par l'acide azotique fumant, on peut colorimétri-

quement faire le dosage du cobalt en utilisant le sel du nitroso-R<sup>(3)</sup>. Pour ce dosage du cobalt, on a d'abord calculé la quantité de l'ion complexe combiné avec 1g. de la protéine, et déterminé l'équivalent de son ion complexe.

a. *Equivalents des ions complexes des sels complexes cationiques.* Les équivalents des ions complexes des sels complexes cationiques sont montrés ci-dessous. (pH 8.8)

Table 5.

Sel complexe	Protéine	Concentra- tion du sel complexé (mol)	Co Ion com- plexé (%)	Equivalent combiné avec 1g. de la protéine ( $\times 10^{-5}$ )	
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> Cl](NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (Purpурео)	Caséine	1/30	{1.81 1.72	5.50 5.23	65 62
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> NO <sub>3</sub> ]Cl <sub>2</sub>	"	"	{1.54 1.72	5.38 6.01	55 62
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> NO <sub>2</sub> ]Cl <sub>2</sub> (Xantho)	"	"	{1.71 1.94	5.51 6.25	61 70
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> ]Cl <sub>3</sub> (Luthéо)	"	1/60	{1.47 1.32	4.01 3.60	78 70
[Co en <sub>3</sub> ]Cl <sub>2</sub> ·3H <sub>2</sub> O	"	"	{1.51 1.44	6.12 5.83	82 78
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>5</sub> H <sub>2</sub> O](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> (Roséo)	"	"	{1.35 1.41	3.71 3.87	71 75
[Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>2</sub> ](NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O (Diroseo)	"	"	{1.30 1.43	3.59 3.95	68 76
[Co en <sub>2</sub> (NH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> <sup>(1)</sup> <sub>(6)</sub> ]Br <sub>3</sub> ·H <sub>2</sub> O	"	"	{1.49 1.38	5.38 4.98	80 74
$\left[ (\text{NH}_3)_4 \text{Co} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Co}(\text{NH}_3)_4 \right] \text{Cl}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		1/150	{2.58 2.39	6.30 5.83	93 86
$\left[ \text{en}_2 \text{Co} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{H}_2\text{O} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Co en}_2 \right] \text{Cl}_4$	"	"	{3.49 3.60	10.23 10.60	88 91
$\left[ \text{Co} \left( \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Co en}_2 \right)_3 \right] (\text{NO}_3)_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	"	5/1125	{3.78 3.91	11.18 11.56	108 112
	Albuamime d'œuf	1/300	{1.18 1.62	3.48 4.79	31 43

Quant aux sels complexes cationiques du cobalt, les équivalents ne sont pas déterminés. C'est-à-dire, l'équivalent du  $\left[ \text{Co} \left( \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \\ \diagdown \end{array} \text{Co en}_2 \right)_3 \right] (\text{NO}_3)_6$  est  $108 \times 10^{-5}$ , et celui du  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$  est  $78 \times 10^{-5}$ , et celui du  $[\text{Co}(\text{NH}_3)_5\text{Cl}](\text{NO}_3)_2$  est  $65 \times 10^{-5}$ . Quant aux sels complexes de la valence +2, si on répète la précipitation dans les mêmes conditions, les équivalents des ions complexes ne s'accordent pas et donnent des différences assez grandes. (plus de 10 %).

(3) H. S. van Koooster, *J. Am. Chem. Soc.*, 43 (1921), 746; F. J. Stare et C. A. Elvehjem, *J. Biol. Chem.*, 99 (1933), 473; H. T. Macpherson et J. Stewart, *Biochem. J.*, 32 (1938), 763; N. Tanaka, *ce bulletin*, 18 (1943), 436.

b. *Equivalents des ions complexes des sels complexes anioniques.* Les équivalents des ions complexes des sels complexes anioniques sont montrés ci-dessous.

Table 6.

Sel complexe	Protéine	Concentration du sel complexe	Co (%)	Ion complexe (%)	Equivalent combiné avec 1g. de la protéine ( $\times 10^{-5}$ )
$K[Co(NH_3)_2(NO_2)_4]$ (Sel Erdmann)	Caséine	1/25	4.44	20.85	95
$Na_3[Co(NO_2)_6]$	..	1/40	{1.61 1.58}	{9.14 8.97}	{90 88}
$K_3[Co(CN)_6]$	..	..	1.72	6.27	93
$K[Co(NH_3)_2(NO_2)_4]$ (Sel Erdmann)	Albumine d'oeuf	1/25	{3.56 3.55}	{16.43 16.67}	{71 72}
$Na_3[Co(NO_2)_6]$	..	1/40	{1.31 1.35}	{7.44 7.67}	{72 74}
$K_3[Co(CN)_6]$	..	..	1.45	5.29	78

Quant aux sels complexes anioniques du cobalt, les équivalents restent constants. C'est-à-dire, l'équivalent du  $K[Co(NH_3)_2(NO_2)_4]$  est  $95 \times 10^{-5}$  (caséine), et celui du  $Na_3[Co(NO_2)_6]$  est  $90 \times 10^{-5}$  (caséine).

**Conclusion 1.** Comme S. E. Michael, j'ai classé tous les sels complexes cobaltiques en complexe cationique et complexe anionique. Le premier précipite la protéine dans le domaine alcalin du point isoélectrique et le second précipite dans le domaine acide.

2. Le sel complexe qui n'a pas de charge électrique tel que  $[Co(NH_3)_2(NO_2)_4]$  ne précipite jamais la protéine.

3. Les sels complexes cationiques de cobalt ne précipitent pas toujours la protéine.

4. La précipitation de la protéine par les sels complexes cationiques du cobalt est imparfaite, et les complexes cobaltiques de la valence +1, tels que  $[Co(NH_3)_4CO_3]_2SO_4 \cdot 3H_2O$ ,  $[Co(NH_3)_4(NO_2)_2]Cl$  ne peuvent pas précipiter la protéine.

5. On peut cependant parfaitement précipiter la protéine par les complexes anioniques du cobalt.

6. Quant aux sels complexes cationiques du cobalt qui ne peuvent pas montrer la précipitation parfaite de la protéine, les équivalents ne sont pas déterminés. A la même valence, ses équivalents sont approximativement identiques, tandis qu'en valence différente, ils ne sont pas identiques et diminuent proportionnellement à la valence.

7. Quant aux sels complexes anioniques du cobalt, la précipitation est parfaite, et les équivalents combinés avec 1g. de la protéine restent constants indépendamment de la valence.

8. Les équivalents des ions complexes cationiques du cobalt combinés avec 1g. de l'albumine d'oeuf sont très petits.

9. De ces résultats, on peut conclure que la protéine et le sel complexe peuvent réagir stoichiométriquement, mais la précipitation de la

protéine par les sels complexes cationiques du cobalt n'est pas parfaite, et son équivalent de l'ion complexe combiné avec 1 g. de la protéine ne montre pas d'équivalent maximum. On peut cependant obtenir la précipitation parfaite par les sels complexes anioniques du cobalt, et son équivalent montre l'équivalent maximum.

En terminant ce compte rendu de mes recherches, j'ai à exprimer mes sincères remerciements à M. le Prof. Kénjiro Kimura pour les aimables et très utiles indications, ainsi qu'à M. M les Profs. Toshi Inoué, Taku Uémura, et Eiji Ochiai qui ont bien voulu me prêter leur bienveillant concours dans mes expériences.

*Laboratoire de Chimie minérale, Faculté  
des Sciences, Université de Tokyo.*

---