

Étude sur la précipitation de la protéine par les sels complexes métalliques II Précipitation de la protéine par les sels complexes du chrome, du fer, de l'argent, et du platine

par Réinosouké Hara

(Reçu le 20 Avril, 1949)

Il existe depuis longtemps beaucoup d'études sur la réaction entre la protéine et le sel inorganique. Certains sels minéraux, comme le phosphotungstate, l'acide hydroferrocyanique, et l'acide métaphosphorique, peuvent précipiter la protéine en solution acide, mais le sel métallique peut la précipiter en solution neutre ou faiblement alcaline. S.E. Michael⁽¹⁾ a classé tous les sels complexes métalliques en deux, complexes cationiques et complexes anioniques, et il a aussi démontré que le sel cationique est capable de précipiter la protéine au domaine plus alcalin que le point isoélectrique et le complexe anionique précipite au domaine acide. Comme les sels complexes du cobalt sont exposés dans mon dernier mémoire,⁽²⁾ j'ai fait la précipitation de la protéine, et montré que la protéine et le sel complexe peuvent stoichiométriquement réagir, c'est-à-dire, la protéine et le sel complexe forment un composé défini. La protéine est chimiquement un composé qui se combine avec l'acide aminé en donnant un certain type de la liaison, et le corps principal de cette réaction doit être cet acide aminé. H. Ley⁽³⁾ a déjà donné une formule d'un

complexe interne
$$\begin{array}{c} \text{OC} \text{---} \text{O} \\ | \\ \text{H}_2\text{C} \text{---} \text{H}_2\text{N} \end{array} \text{---} \text{Cu} 1/2 \text{ au glyco-}$$

col-cuivre, et après, P. Pfeiffer⁽⁴⁾ a préparé des composés d'addition qui ont une composition défini entre divers sels neutres et des acides aminés comme $\text{LiCl} \cdot \text{CH}_2\text{---NH}_2 \cdot \text{COOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$. Il

a aussi montré leur constitution $\text{X} [\text{H}_3\text{N}^+ \text{---} \text{COO}^-] \text{M}^+$, et donne le nom "amphisalze" à ces composés. En employant des sels complexes du chrome, du fer, de l'argent, et du platine dans ce présent mémoire, je vais comparer ce résultat au cas des sels complexes cobaltiques déjà publiés dans mon dernier compte-rendu. Les sels complexes utilisés sont des complexes du chrome, et du platine, des complexes cationiques. Des complexes du chrome, du l'argent, et du fer sont encore employés comme des complexes anioniques. Les conditions d'expérience sont identiques aux cas présentés dans le mémoire précédent. Les solutions de tampon employées sont $\text{NH}_4\text{OH} \text{---} \text{NH}_4\text{Cl}$ à 1/10 N et $(\text{HOOC})_2(\text{CHOH})_2 \text{---} (\text{NaOOC})_2(\text{CHOH})_2$ à 1/10 N, montrent les pH 8.8 et 2.

Détermination de la concentration du sel complexe qui est capable de précipiter la protéine En prenant la solution de la protéine à 0.5 %, on les a dissous dans le tampon (pH 8.8 ou 2), ensuite on a ajouté 1 cc. de la solution de diverses concentrations du sel complexe à 1 cc. de chaque solution. On en a examiné les résultats de précipitation après 30 minutes, le résultat est montré dans la table 1 en indiquant "##" la précipitation parfaite, "#, +" la précipitation imparfaite, "±" la louche (pas claire) et "—" pas de précipité.

Les complexes cationiques du chrome, du platine ne peuvent pas toujours précipiter la protéine comme ceux du cobalt, tandis que les sels complexes anioniques du chrome, du fer, et de l'argent le font très remarquablement. L'albumine d'oeuf n'est presque jamais pré-

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

(2) R. Hara, *Ce. Bulletin*, **22**, 109 (1949)

(3) H. Ley, *Ber.*, **42**, 354 (1909)

(4) P. Pfeiffer et J.V. Modelski, *Z. physiol. chem.*, **81**, 329 (1912), **85**, 1 (1913)

Table 1

sel complexe	caséine	insuline	albumine d'oeuf	gélatine	pH
$[\text{Cr}(\text{en})_2\text{Cl}_2] \cdot \text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (<i>cis</i>)	—	—	—	—	8.8
$[\text{Cr}(\text{en})_2(\text{SCN})_2] \cdot \text{SCN} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (<i>trans</i>)	—	—	—	—	"
$[\text{Cr}(\text{NH}_3)_5\text{SCN}](\text{SCN})_2$	+	+	—	—	"
$[\text{Cr}(\text{en})_3] \text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	++	++	±	—	"
$[\text{Cr}(\text{Co} \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{NH}_2)_6] \text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	+++	+++	+++	±	"
$[(\text{en})_2\text{Cr} \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \diagup \diagdown \\ \text{OH} \end{smallmatrix} \text{Cr}(\text{en})_2] \text{Cl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	+++	+++	+	—	"
$[\text{Cr} \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \diagup \diagdown \\ \text{OH} \end{smallmatrix} \text{Cr}(\text{en})_2]_3 \text{Cl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	+++	+++	+	—	"
$[\text{Pt}(\text{NH}_3)_4] \text{Cl}_2$	—	—	—	—	"
$[\text{Pt}(\text{en})_2] \text{Cl}_2$	—	—	—	—	"
$[\text{Pt}(\text{S} \cdot \text{C} \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{NH}_2)_4] \text{Cl}_2$	—	—	—	—	"
$[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ (<i>α-cis</i>)	—	—	—	—	8.8 et 2
$\text{NH}_4 [\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$ (sel Reinécké)	+++	+++	+++	+	2
$\text{K}_3 [\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	+++	+++	+++	+	"
$\text{K}_3 [\text{Cr}(\text{SCN})_6] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	+++	+++	+++	+	"
$(\text{NH}_4)_4 [\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \text{Cr} \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \diagup \diagdown \\ \text{OH} \end{smallmatrix} \text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2]$	+++	+++	+++	+	"
$\text{K} [\text{Ag}(\text{CN})_2]$	+++	+++	+++	+	"
$\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (prussiate rouge de potasse)	+++	+++	+++	+	"
$\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (prussiate jaune de potasse)	+++	+++	+++	+	"

cipitée par les sels complexes cationiques, excepte un complexe d'urée $[\text{Cr}(\text{urée})_6] \text{Cl}_3$, la gélatine ne l'est guère non plus. Les complexes cationiques du platine ne peuvent pas précipiter même la caséine. Le complexe chromique d'urée peut très remarquablement précipiter la protéine.

a) *Précipitation de la protéine par les sels complexes cationiques* Les complexes cationique du chrome et du platine ont été utilisés et ces sels, excepte $[\text{Cr}(\text{urée})_6] \text{Cl}_3$, ne peuvent pas toujours précipiter la protéine, et les complexes du platine employés, ne sont pas capables de précipiter même la caséine et l'insuline.

Aucune protéine n'est précipitée par le complexe chromique de la valence +I comme le sel cobaltique, et le sel complexe qui n'a pas de charge électrique tel que $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ ne précipite jamais la protéine, tandis que le complexe d'urée peut considérablement précipiter la protéine. La concentration du complexe cationique qui est nécessaire pour la précipitation est montrée ci-dessous.

b) *Précipitation de la protéine par les sels complexes anioniques* J'ai employé les complexes du chrome, du fer, et d'argent, qui peuvent parfaitement précipiter la protéine de même que dans le cas du complexe cobaltique.

Table 2

sel complexe	protéine	concentration qui est nécessaire pour la précipitation (mol)	pH
$[\text{Cr}(\text{NH}_3)_5\text{SCN}](\text{SCN})_2$	caséine	1/60	8.8
$[\text{Cr}(\text{en})_3] \text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	"	1/30 — 1/300	"
$[\text{Cr}(\text{Co} \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{NH}_2)_6] \text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	"	1/20 — 1/1000	"
$[(\text{en})_2\text{Cr} \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \diagup \diagdown \\ \text{OH} \end{smallmatrix} \text{Cr}(\text{en})_2] \text{Cl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	"	1/100 — 1/1000	"
$[\text{Cr} \begin{smallmatrix} \text{OH} \\ \diagup \diagdown \\ \text{OH} \end{smallmatrix} \text{Cr}(\text{en})_2]_3 \text{Cl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	"	1/100 — 1/3000	"

Table 3

sel complexe	protéine	concentration qui est nécessaire pour la précipitation (mol)		pH
$\text{NH}_4[\text{Cr}(\text{NH}_3)_5(\text{SCN})_2] \cdot \text{H}_2\text{O}$	caséine	1/30	1/60	2
"	albumine d'oeuf	1/30	1/60	"
$\text{K}_3[\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	caséine	1/10	1/300	"
"	albumine d'oeuf	1/10	1/350	"
$\text{K}_3[\text{Cr}(\text{SCN})_6] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	caséine	1/10	1/300	"
"	albumine d'oeuf	1/10	1/300	"
$(\text{NH}_4)_4[(\text{C}_2\text{O}_4)_2\text{Cr} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{OH} \end{array} \text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2]$	caséine	1/20	1/500	"
"	albumine d'oeuf	1/20	1/700	"
$\text{K}[\text{Ag}(\text{CN})_2]$	caséine	1/20	1/100	"
"	albumine d'oeuf	1/20	1/80	"
$\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	caséine	1/10	1/300	"
"	albumine d'oeuf	1/10	1/350	"
$\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$	caséine	1/10	1/600	"
"	albumine d'oeuf	1/10	1/600	"

Le domaine de la concentration du sel complexe pour la précipitation est comme suit.

Calcul de l'équivalent de l'ion complexe combiné avec 1 g. de protéine La protéine est précipitée par les complexes, séparée par centrifugation en la lavant cinq fois par l'eau, et on peut sécher dans l'exsiccateur. Le dosage du chrome a été fait comme suit : en prenant 20-30 g de la protéine précipitée, en la décomposant par l'acide azotique fumant, en la neutralisant par l'ammoniaque, et en y ajoutant le peroxyde du sodium pour oxyder le sel chromique en chromate, j'ai colorimétriquement fait le dosage du chrome. Pour le dosage du fer, on a traité la protéine précipitée par l'acide azotique fumant, et s'il y a quelque chose d'insoluble, on y ajouté l'acide hydrochlorique, on chauffe au bain-marie pour dissoudre le composé insoluble et on réduit par le chlorure stanneux, puis on peut en faire le titrage par KMnO_4 à 1/100N. Pour le dosage de l'argent, en décomposant la protéine précipitée par l'acide azotique fumant, en la diluant avec l'eau et en y ajoutant l'acide hydrochlorique,

on peut peser gravimétriquement l'argent comme chlorure. Pour ce dosage du chrome, du fer, et de l'argent, on a d'abord calculé la quantité de l'ion complexe combinée avec 1 g. de protéine, et déterminé l'équivalent de son ion complexe.

a) *Equivalents des ions complexes des sels complexes cationiques* Les équivalents des ions complexes cationiques sont montrés dans la table 4.

Quant à la caséine, les équivalents des complexes cationiques du chrome présentent généralement des résultats concordants, en indiquant approximativement $90-100 \times 10^{-5}$, mais les complexes cobaltiques montrent individuellement des valeurs assez variables. Mais, la valence +2, comme $[\text{Cr}(\text{NH}_3)_5(\text{SCN})_2]$, m'apparaît qu'assez petite. L'équivalent de $[\text{Cr}(\text{urée})_6]\text{Cl}_3$ donne 63×10^{-5} en albumine d'oeuf qui est plus élevé que dans le cas du complexe cobaltique.

b) *Equivalents des ions complexes des sels complexes anioniques* Quant aux sels complexes anioniques, leurs équivalents restent constants

Table 4

protéine (solution à 0.5 %)	sel complexe	concentration de la solution du sel complexe (mol)	Cr % dans la protéine précipitée	ion complexe (%)	équivalent de l'ion complexe combiné avec 1 g. de la protéine $\times 10^{-5}$
caséine	$[\text{Cr}(\text{NH}_3)_5(\text{SCN})_2](\text{SCN})_2$	1/30	1.75 1.64	6.56 6.15	72 67
:	$[\text{Cr en}_3]\text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1/50	1.50 1.38	6.69 6.16	93 85
:	$[\text{Cr}(\text{Co} \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{NH}_2)_6]\text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1/50	1.52 1.48	12.04 11.73	100 97
:	$[\text{en}_2\text{Cr} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{OH} \end{array} \text{Cr en}_2]\text{Cl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1/100	2.30 2.27	8.36 8.25	97 95
:	$[\text{Cr} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{OH} \end{array} \text{Cr en}_2]\text{Cl}_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1/250	3.12 3.14	10.05 10.11	100 101
albumine d'oeuf	$[\text{Cr}(\text{Co} \cdot \text{NH}_2 \cdot \text{NH}_2)_6]\text{Cl}_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1/20	1.04 0.97	8.24 7.69	65 61

Table 5

protéine (solution à 0.5 %)	sel complexe	concentration de la solution du sel complexe (mol)	Cr, Ag, Fe % dans la protéine précipitée	ion complexe (%)	équivalent de l'ion complexe combiné avec 1g. de la pro- téine $\times 10^{-3}$
caséine	$\text{NH}_4 [\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$	1/20	3.69 3.75	22.57 22.93	91 95
	$\text{K}_3 [\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1/40	1.48 1.40	8.99 8.51	94 88
	$\text{K}_3 [\text{Cr}(\text{SCN})_6] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1/40	1.47 1.50	11.31 11.54	96 98
	$(\text{NH}_4)_4 \left[(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \text{Cr} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{OH} \end{array} \text{Cr} (\text{C}_2\text{O}_4)_2 \right]$	1/80	2.31 2.27	10.88 10.70	100 98
	$\text{K} [\text{Ag}(\text{CN})_2]$	1/20	7.74 8.00	11.47 11.85	81 84
	$\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$	1/40	1.61 1.75	6.10 6.62	92 105
	$\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$	1/80	1.27 1.18	4.81 4.47	96 88
	$\text{NH}_4 [\text{Cr}(\text{NH}_3)_2(\text{SCN})_4] \cdot \text{H}_2\text{O}$	1/20	2.98 2.71	18.22 16.58	70 63
	$\text{K}_3 [\text{Cr}(\text{C}_2\text{O}_4)_3] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	1/40	1.23 1.18	7.47 7.17	77 73
	$\text{K}_3 [\text{Cr}(\text{SCN})_6] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1/40	1.14 1.10	8.77 8.46	72 69
albumine d'oeuf	$(\text{NH}_4)_4 \left[(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \text{Cr} \begin{array}{c} \text{OH} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{OH} \end{array} \text{Cr} (\text{C}_2\text{O}_4)_2 \right]$	1/80	1.90 1.84	8.95 8.67	80 77
	$\text{K} [\text{Ag}(\text{CN})_2]$	1/20	6.25 5.78	9.26 8.56	64 59
	$\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$	1/40	1.25 1.18	4.73 4.47	70 66
	$\text{K}_4 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$	1/80	1.10 1.04	4.16 3.94	82 77

indépendamment de l'espèce et de la valence des complexes, et s'accordent suffisamment avec les valeurs données par les complexes anioniques du cobalt. Les équivalents des complexes anioniques ont montré ci-dessous.

Conclusion (1) La précipitation de la protéine par les sels complexes cationiques du chrome est imparfaite comme ceux du cobalt, tandis que les complexes anioniques du chrome, du fer, et de l'argent donnent une précipitation parfaite.

(2) Les complexes cationiques du chrome ne peuvent pas toujours précipiter la protéine, et ceux de la valence +1 ne peuvent jamais précipiter aucune protéine.

(3) Les complexes cationiques du platine ne peuvent pas non plus précipiter la protéine.

(4) Le sel complexe qui n'a pas de charge électrique, tel que $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}_2]$ ne peut jamais précipiter la protéine.

(5) Le complexe d'urée de chrome montre une grande capacité de précipitation sur la protéine, mais on ne comprend pas si ce caractère doit sa forme à la liaison dans son radical complexe.

(6) Les équivalents calculés de la quantité du métal dans la protéine précipitée ne sont pas déterminés au cas des complexes cationiques du chrome à cause de la précipitation

imparfaite, mais, cette variation est moindre que celle montrée par le complexe cobaltique.

(7) Les équivalents des sels complexes anioniques du chrome, du fer, et de l'argent ne sont pas différents les uns des autres, s'accordant suffisamment avec le cas du cobalt, et en générale ils restent constants, indépendamment de l'espèce et la valence des complexes.

(8) L'équivalent du complexe d'urée du chrome par rapport à l'albumine d'oeuf est plus élevé que celui donné par le complexe cobaltique.

(9) De ces résultats obtenus, on peut conclure que la protéine et le sel complexe réagissent stœchiométriquement, et les sels complexes cationiques du chrome, à l'exception de complexe d'urée du chrome, ne donnent pas de précipitation parfaite en ne montrant pas l'équivalent maximum de l'ion complexe combiné avec 1g de protéine. On peut cependant obtenir la précipitation parfaite et l'équivalent maximum par les complexes anioniques du chrome, du fer, et de l'argent. Le complexe d'urée du chrome est aussi parfaitement capable de précipiter la protéine et montré son équivalent maximum.

Les présentes recherches ont été menées à bien grâce à l'aimable indication de M. le

Prof. Kénjiro Kimura. Je tiens aussi à exprimer ma vive reconnaissance à M. M. les Prof. Toshi Inoué, Taku Uémura et Eiji Ochiai qui ont bien voulu me donner de très utiles conseils pour mes études.

*Institut de Chimie Minérale, Faculté
des Sciences, Université de Tokyo*
