

211. Ernst Waldschmidt-Leitz und Anton Schöffner: Adsorptionsanalyse der Proteine und ihrer Abbauprodukte.

[Aus d. Chem. Laborat. d. Bayer. Akademie d. Wissenschaften in München.]

(Eingegangen am 14. März 1927.)

Der fraktionierte enzymatische Abbau von Proteinen mit einheitlichen Enzymen, der uns am Beispiel des Clupeins¹⁾, des Caseins²⁾ und des Hists³⁾ zu einer Reihe definierter Zwischenstufen geführt hat, stellt die Aufgabe, die spezifischen Abbauprodukte auf den einzelnen Stufen der Hydrolyse zu isolieren und zu kennzeichnen. Die Lösung dieser Aufgabe nur mit chemischen Agenzien, die bisher fast ausschließlich üblich waren, beispielsweise mit Fällungs- oder Lösungsmitteln, scheint uns wenig aussichtsreich; selbst bei den einfachsten Eiweiß-Abbauprodukten, den Amino-säuren, deren Eigenschaften deutlicher noch als die der Proteine zu unterscheiden sind, gelingt die glatte Auflösung von Gemischen nur dann, wenn ausgesprochene Unterschiede im chemischen Charakter wie zwischen den Diamino-säuren und den Monoamino-säuren, vorliegen; sie versagt oder sie wird umständlich bei der Trennung der Amino-säuren von sehr ähnlichen chemischen Eigenschaften. So fehlt es auch an chemischen Handhaben zur Unterscheidung der einzelnen, während eines Teilvorgangs der Proteolyse gebildeten Abbauprodukte oder zur Beurteilung der chemischen Einheitlichkeit von Proteinen selbst, zumal bei den Protaminen mit ihrem überwiegenen und das ganze chemische Verhalten bestimmenden Gehalt an Arginin. Es bedarf hierzu eines Verfahrens, welches gestattet, feinere Unterschiede der in Gemischen vorliegenden und in ihren Eigenschaften ähnlichen Körper zu erfassen und zu ihrer Trennung zu verwerten. Ein solches Verfahren bietet sich mit der Anwendung der auf kleine Affinitätsbeträge ansprechenden Adsorptionsmittel.

Die Anwendbarkeit der Adsorption, die R. Willstätter⁴⁾ zuerst für präparative Zwecke in der Physiologischen Chemie eingeführt hat, ist nicht auf die Abscheidung und Reinigung enzymatischer Stoffe beschränkt. So wie es durch Anwendung von Adsorptionsmitteln gelungen ist, die einheitliche oder die zusammengesetzte Natur einer Enzymlösung oder eines enzymatischen Reaktionssystems zu ermitteln, so gelingt es mit solchen Mitteln auch zu entscheiden, ob in der Lösung eines hochmolekularen Stoffes oder seines Abbauproduktes ein einheitlicher Körper oder ob Gemische verschiedener Substanzen vorliegen.

Die Auswertung von Adsorptionskurven, wie sie H. Kraut und E. Wenzel⁵⁾ zur Beurteilung des einheitlichen Adsorptionsverhaltens von Enzym-Lösungen herangezogen haben, und die bei reinen Stoffen der Adsorptions-Isotherme entsprechen sollten, hat sich in den vorliegenden Fällen als unzuverlässig erwiesen; der Verlauf der Adsorptionskurven bei der Aufnahme von Proteinen kann durch ihre wechselnde und ungleichmäßige Dispersität in den Lösungen gestört werden, durch welche ihr Konzentrations-

¹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Grassmann, *Ztschr. physiol. Chem.* **156**, 68 [1926].

²⁾ E. Waldschmidt-Leitz und E. Simons, *Ztschr. physiol. Chem.* **156**, 99 [1926].

³⁾ E. Waldschmidt-Leitz, *B.* **59**, 3000, und zwar S. 3006 [1926].

⁴⁾ vergl. den zusammenfassenden Vortrag, *B.* **55**, 3601, und zwar S. 3610 [1922].

⁵⁾ *Ztschr. physiol. Chem.* **133**, 1 [1923/24], **142**, 71 [1924/25].

verhältnis in Adsorbat und Lösung in unregelmäßiger Weise beeinflußt wird. Um zu erkennen, ob in den untersuchten Lösungen einheitliche Körper oder aber Gemische von solchen vorliegen, haben wir ein anderes Verfahren vorgezogen, nämlich die vergleichende Bestimmung gewisser analytischer Merkmale der Substanz in den Adsorptions-Mutterlaugen bei fraktionierter Adsorption. Die Konstanz oder Inkonzanz der Quotienten aus den ermittelten Werten, beispielsweise dem Stickstoff-Gehalt, dem Gehalt an freien Aminogruppen oder dem spezifischen Drehungsvermögen, ist ein Kennzeichen für die einheitliche oder zusammengesetzte Natur des untersuchten Produktes.

So ergibt die Analyse der drei Protamine Clupein, Salmin und Scombrin bei der Fraktionierung mit Ferrihydroxyd innerhalb der Fehlergrenzen konstante Werte für die spezifische Drehung der einzelnen Fraktionen; sie haben danach als einheitliche chemische Individuen zu gelten. Die gleiche Aussage ergibt sich nach Beobachtungen des einen von uns mit G. Künstner, die wir hier gleichfalls belegen, auf Grund der Adsorptions-Analyse auch für ein anderes basisches Protein, das Histon der Thymusdrüse.

Von den Protaminen und vom Histon, für welche sich aus ihrem Verhalten bei der fraktionierten Adsorption, auch unabhängig von der Acidität, das Bild einheitlicher chemischer Körper ergibt, sind ihre enzymatischen Abbauprodukte deutlich zu unterscheiden, unter welchen wir zunächst das Produkt der Einwirkung von nicht-aktiviertem Trypsin auf Clupein, das „Trypto-Clupeon“, genauer untersucht haben. Zwar beobachtet man auch in diesem Falle bei der fraktionierten Aufnahme durch Ferrihydroxyd aus alkalischer Lösung Konstanz des spezifischen Drehungsvermögens in den einzelnen Fraktionen; die basischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten des vorliegenden Gemisches sind zu ausgesprochen und zu ähnlich, als daß sie sich mit diesem Mittel unterscheiden ließen. Allein wie sich das Gemisch zweier sehr nahestehender Enzyme, beispielsweise von Pankreas-Trypsin und Pankreas-Erepsin, nur unter bestimmten Reaktionsverhältnissen mit Adsorbentien fraktionieren läßt, so wird auch die auswählende Adsorption proteolytischer Abbauprodukte durch die Acidität der Lösung, aus der man sie aufnimmt, in hohem Maße bestimmt. Es geht aus unseren Versuchen hervor, daß das Trypto-Clupeon, das sich in alkalischem Milieu gegenüber dem Adsorbens wie ein einheitlicher Stoff verhält, bei neutraler und deutlicher noch bei saurer Reaktion sich durch Adsorption an Eisenhydroxyd in mehrere Einzelindividuen auflösen läßt, wie es scheint, in einen höhermolekularen, leichter adsorbierbaren Anteil mit höherer spezifischer Drehung und geringerem Gehalt an Amino-Stickstoff, dessen Einheitlichkeit noch nicht sicher zu beurteilen ist, und in einen niedrigermolekularen, schwerer adsorbierbaren Anteil, der nach der Abtrennung des ersteren in einheitlicher Form, mit übereinstimmenden Werten für Drehungsvermögen oder für das Verhältnis von Gesamt-Stickstoff zu Amino-Stickstoff in den Mutterlaugen der Adsorption verbleibt. Wir haben mit dem Versuch begonnen, die beiden, durch Adsorption getrennten Anteile des Trypto-Clupeons durch Analyse und Hydrolyse näher zu kennzeichnen.

Für die präparative Fraktionierung der einzelnen proteolytischen Abbauprodukte, die dazu dienen soll, einen näheren Einblick in die strukturelle Anordnung der Protein-Bausteine zu gewinnen, scheint uns mit der Adsorptionsanalyse eine brauchbare Handhabe gegeben. Zwar ist noch nicht erkennbar,

inwieweit die Adsorptionsmittel einerseits zwischen Körpern von ähnlichem chemischem Charakter, aber verschiedener Molekulargröße, und inwieweit sie andererseits zwischen Körpern von ähnlicher Molekulargröße, aber verschiedener chemischer Natur auszuwählen vermögen; aber die Analyse proteolytischer Abbaugemische durch fraktionierte Adsorption, für die wir ein Beispiel geben, ist geeignet, die gebräuchlichen präparativen Verfahren, die sich auf größere Unterschiede in den chemischen Eigenschaften der einzelnen Komponenten gründen, zu ergänzen und zu erweitern.

Beschreibung der Versuche.

1. Fraktionierte Adsorption von Protaminen und von Histon mit Ferrihydroxyd.

Das zu den Versuchen angewandte Adsorbens bereiteten wir nach R. Willstätter, H. Kraut und W. Fremery⁶⁾; es enthielt in 10.0 ccm Aufschlammung 0.206 g Fe_2O_3 . Die geprüften Protamin-Präparate, Clupein-Sulfat, Salmin-Sulfat und Scombrin-Sulfat, sowie das Histon-Sulfat aus Thymus entsprachen nach elementarer Zusammensetzung und optischer Aktivität den Angaben der Literatur⁷⁾; sie kamen in 1-proz. Lösung zur Anwendung. Man trennte von den Adsorbaten mittels der Zentrifuge und bestimmte in den Restlösungen der Adsorption den Stickstoff-Gehalt nach der von I. K. Parnas und R. Wagner⁸⁾ modifizierten Preglschen Mikro-Kjeldahl-Methode, den Gehalt an freien NH_2 -Gruppen nach van Slyke, sowie die Drehung des polarisierten Lichtes.

Tabelle 1.

Fraktionierte Adsorption von Clupein-Sulfat mit $\text{Fe}(\text{OH})_3$ bei $\text{pH} = 7.0$.

Lösung	Angew. mg Fe_2O_3 (pro mg N)	Adsorption (%) (für N ber.)	$[\alpha]_D$ (für N ber.)
Ausgangslösung	—	—	— 345
Restlösung nach 1-malig. Adsorpt.	3.0	15	— 352
„ „ 2- „ „	2.5	29	— 349
„ „ 3- „ „	6.4	46	— 352
„ „ 4- „ „	8.3	68	— 353

Tabelle 2.

Fraktionierte Adsorption von Salmin-Sulfat mit $\text{Fe}(\text{OH})_3$ bei $\text{pH} = 7.0$.

Lösung	Angew. mg Fe_2O_3 (pro mg N)	Adsorption (%) (für N ber.)	$[\alpha]_D$ (für N ber.)
Ausgangslösung	—	—	— 325
Restlösung nach 1-malig. Adsorpt.	2.0	22	— 309
„ „ 2- „ „	1.6	34	— 320
„ „ 3- „ „	2.5	50	— 333
„ „ 4- „ „	4.2	69	— 323

⁶⁾ B. 57, 1491, und zwar S. 1498 [1924].

⁷⁾ siehe dazu O. Kestner, *Chemie der Eiweißkörper*, 4. Aufl., Braunschweig 1925, S. 252 ff.

⁸⁾ Biochem. Ztschr. 125, 253 [1921]; siehe auch Fr. Pregl, *Die quantitative organische Mikro-analyse*, 2. Aufl., Berlin 1923, S. 113 ff.

Tabelle 3.

Fraktionierte Adsorption von Scombrin-Sulfat mit $\text{Fe}(\text{OH})_3$ bei $\text{pH} = 7.0$.

Lösung	Angew. mg Fe_2O_3 (pro mg N)	Adsorption (%) (für N ber.)	$[\alpha]_D$ (für N ber.)
Ausgangslösung	—	—	— 393
Restlösung nach 1-malig. Adsorpt.	3.0	11	— 393
„ „ 2- „ „	2.1	23	— 400
„ „ 3- „ „	3.4	42	— 400
„ „ 4- „ „	8.0	64	— 398

Tabelle 4.

Fraktionierte Adsorption von Histon-Sulfat mit $\text{Fe}(\text{OH})_3$ bei $\text{pH} = 4.0$.

Lösung	Angew. mg Fe_2O_3 (pro mg N)	Adsorpt. (%)		N/ NH_2
		N	NH_2	
Ausgangslösung	—	—	—	10.6
Restlösung nach 1-malig. Adsorpt.	1.29	15	15	10.8
„ „ 2- „ „	1.25	28	28	10.5
„ „ 3- „ „	1.69	40	40	11.0
„ „ 4- „ „	2.47	57	57	11.0
„ „ 5- „ „	4.70	80	80	11.0

Tabelle 5.

Fraktionierte Adsorption von Histon-Sulfat mit $\text{Fe}(\text{OH})_3$ bei $\text{pH} = 7.0$.

Lösung	Angew. mg Fe_2O_3 (pro mg N)	Adsorption (%)		N/ NH_2
		N	NH_2	
Ausgangslösung	—	—	—	10.5
Restlösung nach 1-malig. Adsorpt.	2.40	31	31	10.6
„ „ 2- „ „	4.00	60	60	10.5
„ „ 3- „ „	4.50	80	80	10.8

2. Fraktionierte Adsorption von Trypto-Clupeon mit Ferrihydroxyd.

Das tryptische Verdauungsprodukt aus Clupein-Sulfat gewann man, wie früher beschrieben⁹⁾, durch Einwirkung von erepsin- und enterokinase-freiem Trypsin, und zwar bis zum Stillstand der Enzymwirkung, entsprechend einem Aciditätszuwachs von 0.90 ccm 0.2-n. KOH für die Hydrolyse von 0.142 g wasser- und asche-freiem Clupein; die Reaktion der Lösungen, in denen die Adsorption vorgenommen wurde, stellte man durch Zusatz von *n*-Essigsäure, bzw. -Natronlauge mit Hilfe von Indicatoren ein, sie wurde nach jeder Adsorptionsvornahme kontrolliert. Die Adsorption und die Bestimmung der Restlösungen führte man, wie oben angegeben, aus.

⁹⁾ E. Waldschmidt-Leitz, A. Schöffner und W. Graßmann, Ztschr. physiol. Chem. **156**, 68, und zwar S. 89 [1926].

Tabelle 6.

Fraktionierte Adsorption von Trypto-Clupeon mit $\text{Fe}(\text{OH})_3$ bei $\text{pH} = 8.6$.

Lösung	Angew. mg Fe_2O_3 (pro mg N)	Adsorption (%) (für N ber.)	$[\alpha]_D$ (für N ber.)
Ausgangslösung	—	—	—253
Restlösung nach 1-malig. Adsorpt.	1.0	12	—248
„ „ 2- „ „	1.3	24	—249
„ „ 3- „ „	1.9	44	—237
„ „ 4- „ „	3.1	64	—250
„ „ 5- „ „	6.2	76	—245

Tabelle 7.

Fraktionierte Adsorption von Trypto-Clupeon mit $\text{Fe}(\text{OH})_3$ bei $\text{pH} = 7.0$.

Lösung	Angew. mg Fe_2O_3 (pro mg N)	Adsorption (%) (für N ber.)	$[\alpha]_D$ (für N ber.)	N/ NH_2
Ausgangslösung	—	—	—249	10.2
Restlösung nach 1-malig. Adsorpt. ...	1.5	16	—205	10.0
„ „ 2- „ „ ..	2.0	33	—169	9.5
„ „ 3- „ „ ..	3.0	48	—146	8.4
„ „ 4- „ „ ..	4.1	71	—139	8.4

Tabelle 8.

Fraktionierte Adsorption von Trypto-Clupeon mit $\text{Fe}(\text{OH})_3$ bei $\text{pH} = 5.5$.

Lösung	Angew. mg Fe_2O_3 (pro mg N)	Adsorption (%) (für N ber.)	$[\alpha]_D$ (für N ber.)	N/ NH_2
Ausgangslösung	—	—	—203	11.0
Restlösung nach 1-malig. Adsorpt. ...	1.5	14	—181	10.6
„ „ 2- „ „ ..	2.0	28	—178	11.0
„ „ 3- „ „ ..	3.3	46	—133	8.4
„ „ 4- „ „ ..	4.6	65	—130	8.3

Der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft danken wir ergebenst für die zur Verfügung gestellten Mittel.

213. Richard Kuhn, Ludwig Brann, Carl Seyffert und Max Furter: Über katalytische Hydrierung des Hämins.

[Aus d. Laborat. für allgem. u. analyt. Chemie d. Eidg. Techn. Hochschule Zürich.]
(Eingegangen am 26. März 1927.)

Die Feststellung, daß sehr geringe Veränderungen im Molekül des Hämins von entscheidendem Einfluß auf Katalase- und Peroxydase-Wirkung sind¹⁾, hat die Probleme der Konstitution des Blutfarbstoffs in den Kreis unserer Betrachtungen gerückt.

¹⁾ R. Kuhn und L. Brann, B. **59**, 2370 [1926]. Diese Versuche haben die frühere Annahme (Hsien Wu, Journ. Biochem. Tokio **2**, 173, 181, 189, 195 [1923]), daß zwischen Fe-Gehalt und katalytischer Wirksamkeit Parallelität herrsche, widerlegt.