

Zeitschrift: Bulletin der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften = Bulletin de l'Académie suisse des sciences médicales = Bollettino dell' Accademia svizzera delle scienze mediche

Herausgeber: Schweizerische Akademie der Medizinischen Wissenschaften

Band: 11 (1955)

Heft: 6

Artikel: Mikrotitration von Proteinen

Autor: Maehly, A.C.

DOI: <https://doi.org/10.5169/seals-307236>

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. [Siehe Rechtliche Hinweise.](#)

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. [Voir Informations légales.](#)

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. [See Legal notice.](#)

Download PDF: 15.03.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>

Medicinska Nobelinstitutet, Biokemiska Avdelningen Stockholm (Schweden)
und E. R. Johnson Foundation for Medical Physics, University of Pennsylvania
Philadelphia, Pa. (USA)

Mikrotitration von Proteinen

Von A. C. Maehly¹⁾

A. Einleitung

Proteine sind im Prinzip aus Aminosäureresten aufgebaut, obwohl außerdem Gruppen von abweichendem chemischem Bau in vielen Eiweißstoffen enthalten sind (Glykoproteide, Nucleoproteide, viele Enzyme usw.). Quantitative Analysen des Aminosäuregehaltes von Proteinen sind neuerdings vervollkommenet und technisch erleichtert worden, wozu besonders mikrobiologische Methoden und die Benutzung von Ionenaustauschern nach *Stein* und *Moore* (1, 2) beigetragen haben. Oft aber sind wir mehr an den chemisch leicht zugänglichen Gruppen der Proteinmoleküle interessiert als an der Zusammensetzung ihres «Inneren». Die Bestimmung mancher «Endgruppen» mit chemischen Methoden ist auf sehr elegante Weise ausgearbeitet worden, besonders durch die Pionierarbeit von *Sanger* und seinen Mitarbeitern (3, 4).

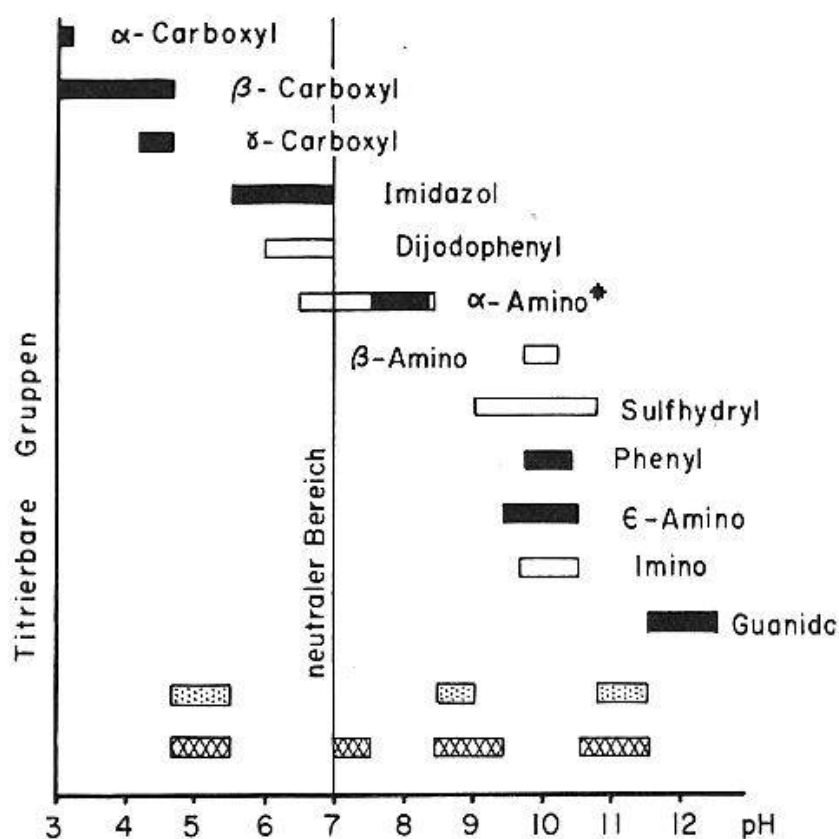
Untersuchungen des intakten nativen Proteinmoleküls müssen mit Mitteln unternommen werden, die keine irreversible Denaturierung oder chemische Veränderung mit sich bringen. Zur quantitativen Bestimmung reaktiver Gruppen kann man sich unter anderm der Elektrophorese, Chromatographie, Spektrophotometrie oder Titration bedienen. Titrationsen können sich auf bestimmte Gruppen beschränken (amperometrische Bestimmung von SH-Gruppen, Messung der Potentiale von Redoxsystemen, spektrophotometrische Titration von Metallionen mit Cyanid usw.), oder es kann versucht werden, die Mehrzahl der «chemisch freien» (also nicht an Peptidbindungen beteiligten) Gruppen eines Eiweißmoleküls zu erfassen. Zu diesem Zweck hat wohl die Säure-Basen-Titration (von nun an abgekürzt mit SBT) den größten Anwendungsbereich gefunden.

Proteine sind – in ihrer Eigenschaft als Polyaminosäuren – Ampholyte, d. h. sie tragen eine Anzahl positiver wie auch negativer Ladungen,

¹⁾ Jetzige Adresse: The E. R. Johnson Foundation, University of Pennsylvania, Philadelphia 4, Pa.

die sich nur bei einem gewissen Aciditätsgrad genau die Waage halten²⁾. Im übrigen p_H -Bereich dagegen überwiegt die eine oder andere dieser Ladungstypen. Durch Zugabe positiv geladener H-Ionen können diese Ladungen sukzessive neutralisiert werden.

In Tab. 1 und Abb. 1 sind diejenigen Gruppen angeführt, die in Proteinen vorkommen, sei es als Endgruppen von Peptidketten (oder ihrer Verzweigungen), sei es als normale Bestandteile von Aminosäuren (Imidazolkerne, aromatische Ringe, Sulfhydrylgruppen). Die Dissoziationskonstanten sind ebenfalls angegeben, soweit sie mit Sicherheit bekannt sind.



- häufig vorkommende Gruppen
- seltener vorkommende Gruppen
- p_H -Regionen, in denen keine Gruppen titriert werden
- p_H -Regionen, in denen keine häufigen Gruppen vorkommen

*) Das leere Rechteck gibt die Region an, in der die Aminogruppe von Cystin titriert wird.

Abb. 1. Eine graphische Darstellung der Daten von Tab. 1. Die p_H -Regionen, in denen die Gruppen titriert werden, sind durch Rechtecke angegeben.

²⁾ Zur Definition dieses Zustandes als isoelektrischen Punkt oder isoionischen Punkt vgl. *Alberty* (5).

Tabelle 1
Gruppen, die in Peptiden bekannter Struktur vorkommen und der SBT zugänglich sind¹⁾. Dissoziationskonstanten (als pK) bei 25°

Gruppe	Vorkommen	pK ²⁾
α -Carboxyl	Alle Aminosäuren außer den Prolinen	3,0– 3,2
β -Carboxyl	Asparaginsäure	3,0– 4,7
γ -Carboxyl	Glutaminsäure	~4,4
Imidazol	Histidin	5,6– 7,0
Dijodophenyl	Jodgorgosäure	~6,5
α -Amino	a) Cystin b) Alle Aminosäuren außer β -Alanin und den Prolinen	6,5– 8,5 7,6– 8,4
Sulfhydryl	Cystein	9,1–11,0
Phenyl	Tyrosin	9,6–10,4
ϵ -Amino	Lysin	9,4–10,6
β -Amino	β -Alanin	10,2 ³⁾ 5)
Imino	Prolin, Oxyprolin	9,7–10,6 ⁵⁾
δ -Amino	Ornithin ⁴⁾	10,8
Guanidino	Arginin	11,0–12,6

¹⁾ Nach *Cohn und Edsall* (ref. 7, S. 445), wo nicht anders vermerkt.

²⁾ In Proteinen oder Polypeptiden. Die freien Aminosäuren haben etwas andere pK-Werte.

³⁾ *M. May und W. A. Felsing*: J. Amer. Chem. Soc. **73**, 406 (1951).

⁴⁾ Diese Aminosäure wurde in Bacitracin A gefunden (*L. C. Craig, W. Hausmann, J. R. Weisiger*, J. biol. Chem. **199**, 865 [1952]).

⁵⁾ Für die freien Aminosäuren.

Tabelle 2
Die titrierbaren Gruppen von menschlichem Serumalbumin nach *C. Tanford* (6)*

Gruppe	pK	Anzahl (Titration)	Anzahl (Analyse)
Carboxyl	4,00	108	≥ 100
Imidazol	6,10	16	16
α -Amino	8,00	1	1
ϵ -Amino	9,40	59	58
Phenyl	9,60	18	18
SH	11	–	0,7
Guanido	11	24	24
Basischer N (Imidazol + NH ₃ + Guanidin)	–	100	99

* Korrigiert nach *Alberty* (5).

Wenn in einem gegebenen Protein alle oder die meisten dieser Gruppen zugleich vorkommen, wird eine Analyse der SBT-Kurve praktisch unmöglich sein. Glücklicherweise ist dieser Fall äußerst selten. Außerdem können durch chemische Veränderungen (Veresterung, Methylierung, Jodierung, Salzbildung mit Schwermetallen, Reaktion mit Dinitrofluorbenzol usw.) gewisse Gruppen maskiert werden. Immerhin wird es nicht möglich sein, z. B. β - und γ -Carboxyl-Gruppen oder δ - und ε -Amino-Gruppen voneinander zu differenzieren. Ein gutes Beispiel einer Protein-SBT ist die Analyse von menschlichem Serumalbumin durch *Tanford* (6), die die erreichbare Genauigkeit moderner Methodik zeigt (Tab. 2).

B. Anwendung des Massenwirkungsgesetzes auf Polyelektrolyte

Für ein Verständnis der Probleme, die mit der Analyse von Dissoziationskurven verknüpft sind, ist eine klare Definition der gemessenen Größen und der aus solchen Messungen berechneten Größen äußerst wichtig.

Im Falle der Dissoziation einer einzelnen Gruppe fallen viele dieser Größen zusammen und führen zu einem sehr vereinfachten Sonderfall. Betrachten wir in Kürze diesen Sonderfall am Beispiel einer einbasischen Säure. Hier gelten für die Reaktion



folgende Beziehungen:

$$\text{Dissoziationskonstante} = K = \frac{[\text{H}^+][\text{An}^-]}{[\text{HAn}]} \quad (2)$$

$$\text{Dissoziationsgrad} = \alpha = \frac{[\text{An}^-]}{[\text{An}^-] + [\text{HAn}]} \quad (3)$$

$$\text{Dissoziationsrest} = \varrho = \frac{[\text{HAn}]}{[\text{An}^-] + [\text{HAn}]} \quad (4)$$

wo $[\text{H}^+]$ Wasserstoffionenkonzentration

$[\text{An}^-]$ Anionenkonzentration

$[\text{HAn}]$ Konzentration der undissoziierten Säure.

Durch Kombination von Gleichung 2 und 3

$$\alpha = \frac{1}{1 + \frac{[\text{HAn}]}{[\text{An}^-]}} = \frac{1}{1 + \frac{[\text{H}^+]}{K}} = \frac{K}{K + [\text{H}^+]} \quad (5)$$

$$\varrho = \frac{1}{\frac{[\text{An}^-]}{[\text{HAn}]} + 1} = \frac{1}{1 + \frac{K}{[\text{H}^+]}} = \frac{[\text{H}^+]}{K + [\text{H}^+]} \quad (6a)$$

$$\frac{1}{\varrho} = 1 + \frac{K}{[\text{H}^+]} \quad (6b)$$

und weiter

$$\alpha = 1 - \varrho \quad (7)$$

Graphisch wird gewöhnlich der negative Logarithmus der $[H^+]$ gegen α aufgetragen. Die reziproke Kurve wird durch Ersatz von α durch ϱ erhalten.

Oft werden statt α oder ϱ lineare Funktionen dieser Größen auf der Ordinate aufgetragen, wie optische Dichte, magnetische Suszeptibilität, Viskosität usw. In einfachen Fällen kann die Dissoziationskonstante auf diese Weise graphisch bestimmt werden, wie aus der Henderson-Hasselbach-Gleichung³⁾ hervorgeht:

$$\begin{aligned} \text{pK} &= \text{pH}, \quad \text{wenn} \quad [\text{An}^-] = [\text{HAn}] \\ \text{oder} \quad \alpha &= \varrho = \frac{1}{2} \end{aligned} \quad (8)$$

Im Fall der Protein-SBT finden wir nun aber erheblich komplexere Verhältnisse vor, denn wir haben hier:

1. mehrere chemisch gleichwertige Gruppen mit sehr ähnlichem pK;
2. Gruppen mit verschiedenem chemischem Bau, deren pK-Werte aber oft nahe beieinander liegen;
3. die Möglichkeit intramolekularer Beeinflussung der einzelnen Gruppen aufeinander;
4. erhebliche Abweichungen von den idealen Voraussetzungen des Massenwirkungsgesetzes: Die Aktivität der ionisierten Gruppen kann sehr weit von den tatsächlichen Konzentrationen entfernt sein, und die Dissoziationskonstanten ändern sich als Funktion der Ionenstärke⁴⁾.

Die beiden ersten Punkte sind theoretischer Analyse zugänglich, während die zwei letzteren nur noch empirisch erfaßbar sind.

1. Mehrere gleichwertige Gruppen

Das einfachste Modell eines Polyelektrolyten mag wohl eine zweibasische Säure mit zwei chemisch gleichen geladenen Gruppen darstellen. Hier herrschen die folgenden Gleichgewichte:

$$K_1 = \frac{[H^+][\text{HAn}^-]}{[\text{H}_2\text{An}]} \quad (9a) \qquad K_2 = \frac{[H^+][\text{An}^-]}{[\text{HAn}^-]} \quad (9b)$$

$$K_1 K_2 = \frac{[H^+]^2 [\text{An}^-]}{[\text{H}_2\text{An}]} \quad (9c)$$

Das Vorhandensein von zwei Dissoziationsstufen zwingt uns nun zu einer Erweiterung der Definition der Größen K , α und ϱ , und zur Einführung neuer Größen. Wir haben daher:

³⁾ Nämlich $\text{pK} = -\log K = \text{pH} + \log \frac{[\text{An}^-]}{[\text{HAn}]}$.

⁴⁾ Mit andern Worten: Das Proteinmolekül ist nicht ein «Lösungsmittel» für die geladenen Gruppen, noch sind die letzteren ein «ideales Gas».

K_1, K_2 «wahre» Dissoziationskonstanten.

K^* Mittlere Dissoziationskonstante, d. h. diejenige Konstante, die dann gefunden würde, wenn jede der zwei Gruppen an ein separates Molekül gebunden wäre.

α_1, α_2 Dissoziationsgrade der 1. und 2. Dissoziationsstufe (vgl. Gleichungen 3 und 5).

ϱ_2 Dissoziationsrest: Das Verhältnis der Konzentration des undissoziierten Wasserstoffs zur Gesamtkonzentration des Polyelektrolyten (Proteins) in Molen per Liter.

$\bar{\varrho}_2$ Normalitätsrest: gleich dem Dissoziationsrest, dividiert durch die Wertigkeit des Polyelektrolyten.

Für 2 Dissoziationsstufen gelten somit die Beziehungen:

$$\alpha_1 = \frac{[\text{HAn}^-]}{[\text{H}_2\text{An}] + [\text{HAn}^-] + [\text{An}^-]} \quad (10)$$

$$\alpha_2 = \frac{[\text{An}^-]}{[\text{H}_2\text{An}] + [\text{HAn}^-] + [\text{An}^-]} \quad (11)$$

$$\varrho_2 = \frac{[\text{HAn}^-] + 2[\text{H}_2\text{An}]}{[\text{H}_2\text{An}] + [\text{HAn}^-] + [\text{An}^-]} \quad (12)$$

$$\bar{\varrho}_2 = \frac{[\text{HAn}^-] + 2[\text{H}_2\text{An}]}{2\{[\text{H}_2\text{An}] + [\text{HAn}^-] + [\text{An}^-]\}} = \frac{\varrho_2}{2} \quad (13)$$

2. Mehrere Gruppen mit verschiedenen Dissoziationskonstanten am gleichen Molekül

Wenn n -Gruppen verschiedenartigen Charakters am gleichen Molekül titriert werden, fällt der Begriff einer gemeinsamen mittleren Dissoziationskonstanten fort. Wenn wir annehmen, daß die Gruppen einander nicht beeinflussen, dürfen wir Gleichung 12 ausdehnen und erhalten⁵⁾:

$$\varrho_n = \frac{[\text{HAn}] + 2[\text{H}_2\text{An}] + \dots + (n-1)[\text{H}_{n-1}\text{An}] + n[\text{H}_n\text{An}]}{[\text{An}] + [\text{HAn}] + [\text{H}_2\text{An}] + \dots + [\text{H}_{n-1}\text{An}] + [\text{H}_n\text{An}]} \quad (14)$$

Eine Erweiterung von Gleichung 9 für n Gruppen gibt

$$K_1 K_2 \dots K_{n-1} = \frac{[\text{H}]^{n-1} [\text{HAn}]}{[\text{H}_n\text{An}]} \quad (9d)$$

$$K_1 K_2 \dots K_n = \frac{[\text{H}]^n [\text{An}]}{[\text{H}_n\text{An}]} \quad (9e)$$

und kann zur Eliminierung aller Konzentrationen von teilweise dissoziierten Molekülen dienen, so daß wir durch «Rückwärtslesen» von Gleichung 14 und Substitution den Ausdruck erhalten:

⁵⁾ Im folgenden werden die Ladungszeichen zur Vereinfachung weggelassen.

$$e_n = \frac{n + (n-1) \frac{K_1}{[H]} + (n-2) \frac{K_1 K_2}{[H]^2} + \dots + \frac{K_1 K_2 \dots K_{n-1}}{[H]^{n-1}}}{1 + \frac{K_1}{[H]} + \frac{K_1 K_2}{[H]^2} + \dots + \frac{K_1 K_2 \dots K_{n-1}}{[H]^{n-1}} \frac{K_1 K_2 \dots K_n}{[H]^n}} \quad (15)$$

Erweiterung dieser Gleichung mit $[H]^n$ gibt

$$e_n = \frac{n[H]^n + (n-1)K_1[H]^{n-1} + (n-2)K_1K_2[H]^{n-2} + \dots + K_1K_2 \dots K_n[H]}{[H]^n + K_1[H]^{n-1} + K_1K_2[H]^{n-2} + \dots + K_1K_2 \dots K_{n-1}[H] + K_1K_2 \dots K_n} \quad (16)$$

Der Nenner dieses Ausdrucks hat die Form eines Polynoms gemäß der allgemeinen Formel

$$P_n(x) = x^n + c_{n-1}x^{n-1} + \dots + c_1x + c_0 \quad (17)$$

Wenn x_1, x_2, \dots, x_n die Nullstellen dieses Polynoms sind, können wir schreiben:

$$P_n(x) = (x-x_1)(x-x_2) \dots (x-x_n) = \prod_{v=1}^n (x-x_v) \quad (18)$$

oder, differenziert⁶⁾,

$$\begin{aligned} \frac{dP_n(x)}{dx} &= nx^{n-1} + (n-1)c_{n-1}x^{n-2} + \dots + 1c_1 + 0c_0 = \\ &= \frac{P_n}{x-x_1} + \frac{P_n}{x-x_2} + \dots + \frac{P_n}{x-x_n} = P_n \sum_{v=1}^n \frac{1}{x-x_v} \end{aligned} \quad (19)$$

Zur Anwendung auf Gleichung 16 setzen wir nun:

$$\left. \begin{aligned} [H] &= x \\ K_1K_2 \dots K_n &= c_0 \\ K_1K_2 \dots K_{n-1} &= c_1 \\ &\dots\dots\dots \\ K_1 &= c_{n-1} \end{aligned} \right\} \quad (20)$$

so daß

$$e_n = \frac{nx^n + (n-1)c_{n-1}x^{n-1} + \dots + 1 \cdot c_1x + 0 \cdot c_0}{x^n + c_{n-1}x^{n-1} + \dots + c_1x + c_0} \quad (21)$$

oder, gemäß Gleichung 19,

$$e_n = \frac{x \frac{dP_n}{dx}}{P_n} = \frac{x}{P_n} \left(P_n \sum_{v=1}^n \frac{1}{x-x_v} \right) = x \sum_{v=1}^n \frac{1}{x-x_v} = \sum_{v=1}^n \frac{x}{x-x_v} \quad (22)^7$$

Durch teilweise Rücksubstitution nach Gleichung 20 erhalten wir endlich

$$e_n = \sum_{v=1}^n \frac{x}{x-x_v} \equiv \sum_{v=1}^n \frac{[H]}{[H]-\alpha_i} \quad (23a)$$

⁶⁾ Anwendung der «Produktregel» für die Differenzierung.

⁷⁾ Diese Beziehungen wurden auf etwas kompliziertere Weise und für einige Sonderfälle zuerst von *Simms* (11) und von *Weber* (10) abgeleitet. *A. von Muralt* (12) hat dann 1930 gezeigt, daß die Ableitung verallgemeinert und vereinfacht werden kann. *von Muralt's* Methode liegt im wesentlichen den obigen Ausführungen zugrunde.

oder ausgeschrieben

$$e_n = \left(\frac{[H]}{[H]-\alpha_1} + \frac{[H]}{[H]-\alpha_2} + \dots + \frac{[H]}{[H]-\alpha_n} \right) \quad (23b)$$

Die neuen Größen α sind die Nullstellen des Polynoms. Wenn $n = 1$, wird $\alpha \equiv -K$, und Gleichung 23b wird identisch mit Gleichung 6a. Wir werden im folgenden zeigen, daß die Nullstellen $\alpha_1, \alpha_2, \dots, \alpha_n$ mit den (negativen Werten) der mittleren Dissoziationskonstanten $K_1^*, K_2^*, \dots, K_n^*$ identisch sind, und zwar am Beispiel einer Säure mit 2 Dissoziationsstufen^{7a)}.

Der Zähler der Gleichung 16 ist die erste Ableitung des Nenners. Letzterer erhält für $n = 2$ die Form:

$$P_2([H]) = [H]^2 + K_1[H] + K_1K_2 \quad (24)$$

An den Nullstellen hat die Wasserstoffionenkonzentration somit die beiden Wurzeln (α_1 und α_2):

$$[H] = \frac{-K_1 \pm \sqrt{K_1^2 - 4K_1K_2}}{2} = -\frac{K_1}{2} \pm \sqrt{\frac{K_1^2}{4} - K_1K_2} \quad (25)$$

Durch Addition bzw. Multiplikation der Wurzeln erhalten wir:

$$\alpha_1 + \alpha_2 = -K_1 \quad (26)$$

$$\alpha_1\alpha_2 = K_1K_2 \quad (27)$$

Abb. 2 zeigt den Gang der Werte für K_1 und K_2 als Funktion des Verhältnisses von α_2 zu α_1 in logarithmischer Form.

Wenn die Logarithmen von $-\alpha_1$ und $-\alpha_2$ weit voneinander differieren, strebt K_1 nach $-\alpha_1$ und K_2 nach $-\alpha_2$, d. h. $-\alpha_1$ wird zur wahren Dissoziationskonstanten K_1 und $-\alpha_2$ zu K_2 bei unendlichem Abstand.

Ein Spezialfall liegt vor, wenn $\alpha_1 = \alpha_2$. Hier ist die Abweichung der Werte $\log K_1$ und $\log K_2$ ein Maximum, nämlich 0,602, so daß

$$\frac{K_2}{K_1} = 4; \quad K_2 = -2\alpha; \quad K_1 = -\frac{\alpha}{2} \quad (28)$$

Andererseits hat *Adams* (13) schon 1916 die Dissoziation zweibasischer Säuren untersucht unter Benutzung der Gleichgewichte⁸⁾:

$$K^* = \frac{[H][H-An-]}{[H_2An]} \quad (29a)$$

$$K^* = \frac{[H][-An-H]}{[H_2An]} \quad (29b)$$

ferner

$$[H-An-] + [-An-H] = [HAn] \quad (30)$$

^{7a)} Wir kehren also hier zu dem Problem «mehrerer gleichwertiger Gruppen» zurück (vgl. S. 437).

⁸⁾ K^* ist wieder die mittlere Dissoziationskonstante, proportional der Affinität der H^+ zum dissoziierten Rest.

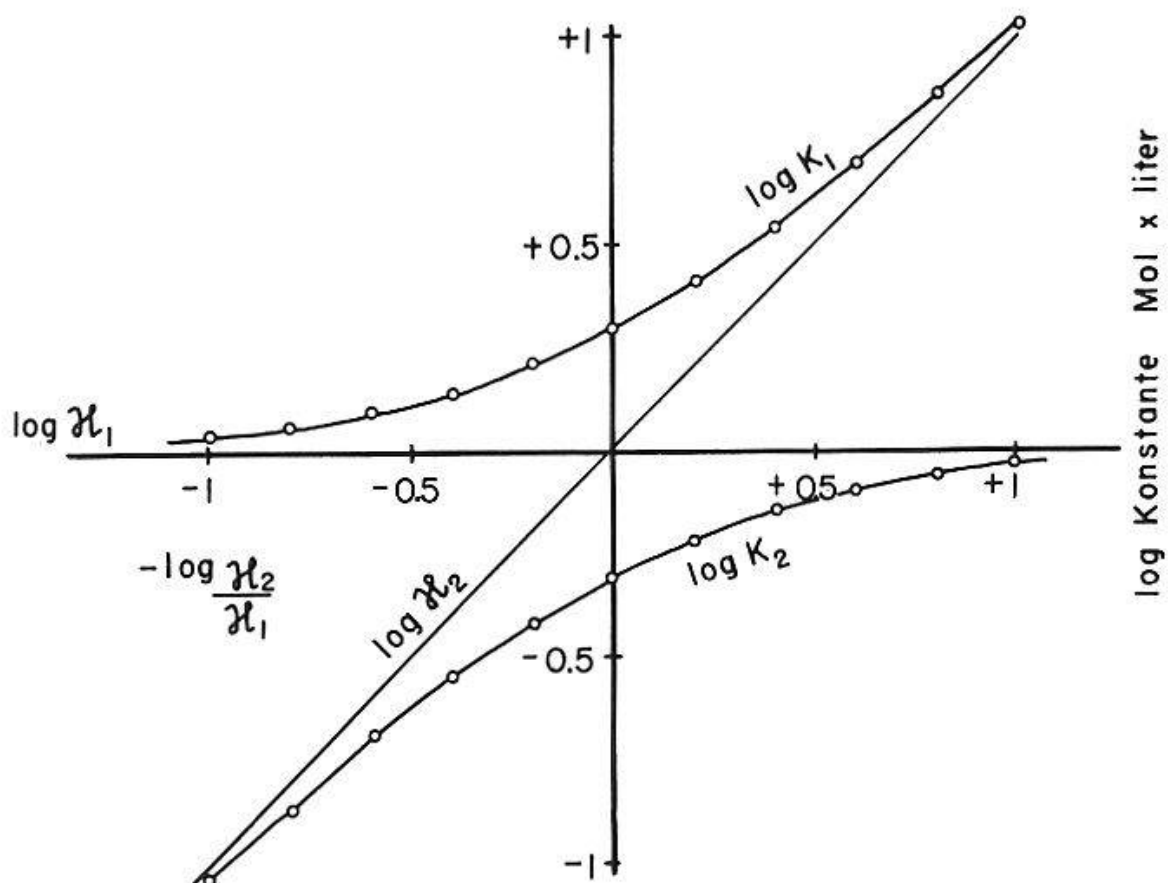


Abb. 2. Der Gang der pK-Werte bei Annahme zweier ungleicher Gruppen am gleichen Molekül. – Der Wert der Funktion z_1 ist als konstant angenommen ($z_1 = 1$, $\log z_2 = 0$), während $\log z_2$ von -1 bis $+1$ ansteigt. Die X-Achse wird so der geometrische Ort aller $\log z_1$ -Werte, die Diagonale der Ort aller $\log z_2$ -Werte. Die Werte von pK_1 und pK_2 liegen auf den Kurven, die bei großen Abständen zwischen $\log z_1$ und $\log z_2$ den Werten dieser Größen zustreben.

und da K , $[H]$ und $[H_2An]$ in Gleichung 29a und b identisch sind:

$$[H-An-] = [-An-H] \quad (31)$$

In Gleichung 9a eingesetzt, erhalten wir

$$K_1 = \frac{[H] ([-An-H] + [H-An-])}{[H_2An]} = \frac{2[H] [-An-H]}{[H_2An]} = 2K^* \quad (32)$$

In ähnlicher Weise aus Gleichung 9b:

$$K_2 = \frac{[H] [An]}{[HAn]} = \frac{[H] [-An-]}{[H-An-] + [-An-H]} = \frac{K^*}{2} \quad (33)$$

Und endlich:

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{K^*}{2 \times 2K^*} = \frac{1}{4} \quad (34)$$

Die Gleichungen 32–34 geben also dasselbe Resultat wie Gleichung 28, so daß auch hier die Größen z und K^* identisch werden.

Klotz (9) gibt für n-Gruppen mit demselben K^* (chemisch gleichwertige Gruppen) die folgende allgemeine Formel zur Berechnung jeder wahren Dissoziationskonstante:

$$K_i = \frac{n-i+1}{i} K^* \quad (35)$$

wo $i = 1, 2, 3 \dots n$.

Abb. 3 zeigt die Verteilung der Konstanten mit zunehmenden Werten von n .

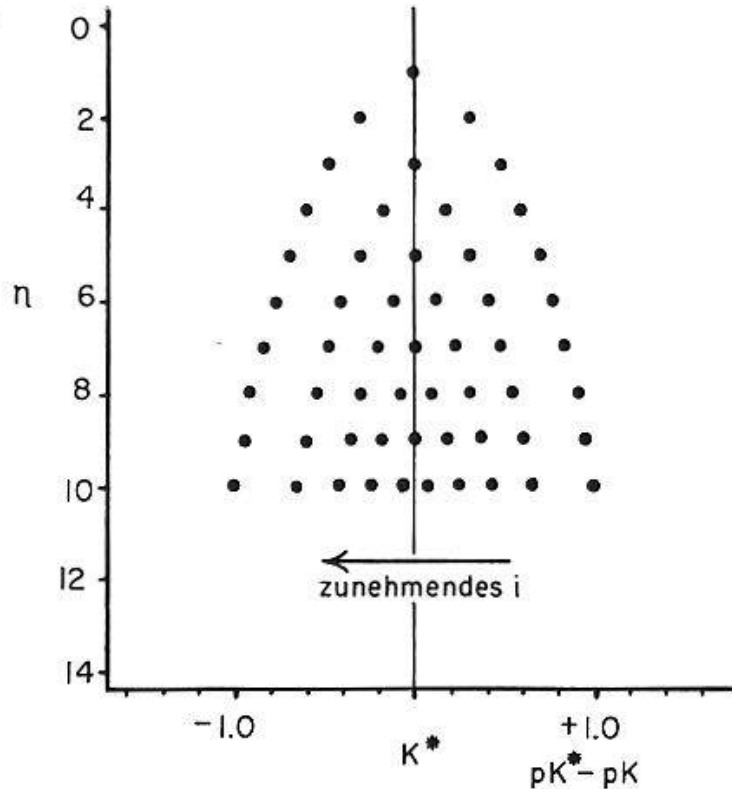


Abb. 3. Eine graphische Darstellung der pK-Werte für n -Gruppen mit der mittleren Dissoziationskonstante K^* gemäß Gleichung 35. Die Werte für $n = 1, 2, 3, \dots 10$ sind einbezogen. Abszisse = $pK^* - pK$, Ordinate n .

Wir sind nun in der Lage, uns darüber klar zu werden, welche Größen in der SBT von Proteinen eigentlich gemessen werden.

Bekannt ist für jeden Versuch die Eiweißmenge, in der Regel in Molen pro Liter. Gemessen wird das Volumen diskreter Zusätze von Säure (Base) bekannter Normalität sowie das p_H . Die Meßergebnisse werden gewöhnlich so aufgetragen, daß die zugegebenen H^+ -Äquivalente auf der Ordinate, das p_H auf der Abszisse erscheinen:

$$p_H = f([H]_{tot})$$

Die totale Konzentration an zugesetzten H-Ionen verteilt sich nun aber auf das Lösungsmittel (Wasser) und, in gebundener Form, auf das Gelöste (Protein). Der Anteil des Lösungsmittels kann entweder berechnet werden (unter Berücksichtigung der Aktivitätskoeffizienten), wie dies z. B. *Tanford* (6) getan hat, oder er kann experimentell bestimmt werden. Die letztere Methode hat verschiedene Vorteile, besonders weil sie alle möglichen vernachlässigten Fehlerquellen kompensiert und, aus rein

praktischen Gründen, weil sie erlaubt, titrierbare Verunreinigungen (besonders gelöstes CO_2) zu erkennen.

Die Differenz zwischen Meßkurve und Blindkurve ergibt somit ein Maß der H-Ionen-Konzentration als Funktion der Äquivalente gebundenen Wasserstoffs.

$$p_{\text{H}} = f\left(\frac{[\text{H}]_{\text{geb}}}{[\text{Protein}]_{\text{tot}}}\right) \text{ wo } \frac{[\text{H}]_{\text{geb}}}{[\text{Protein}]_{\text{tot}}} = \varrho_n$$

Wir erhalten also eine Kurve für die ϱ -Funktion gemäß Gleichung 14 und daher auch Gleichung 23. Dies bedeutet einfach, daß die Summe der Funktionen jeder einzelnen mittleren Dissoziationskonstante erhalten wird, oder

$$\varrho_n = \sum_{v=1}^n \frac{[\text{H}]}{[\text{H}] + K_v^*} \quad (36)$$

Praktisch trägt man ϱ_n gegen p_{H} auf.

Man erhält also gar nicht die wahren Dissoziationskonstanten, sondern die mittleren Konstanten. Die «wahren» Werte für $K_1, K_2 \dots K_n$ müssen aus Gleichung 16 berechnet werden. Sind mehrere Gruppen mit identischem K^* vorhanden, ist die Berechnung der zugehörigen wahren Konstanten einfacher, da Gleichung 35 gilt. Die ϱ -Kurve für m -Konstante mit identischem K^* ist eine Addition von m -Kurven für eine einzige Konstante $K = K^*$ und entspricht einer Änderung des Maßstabes der Ordinate. Die graphische Bestimmung des pK^* -Wertes geschieht daher auch einfach nach Gleichung 8, d. h. $pK^* = p_{\text{H}}$ am Wendepunkt der ϱ -Kurve.

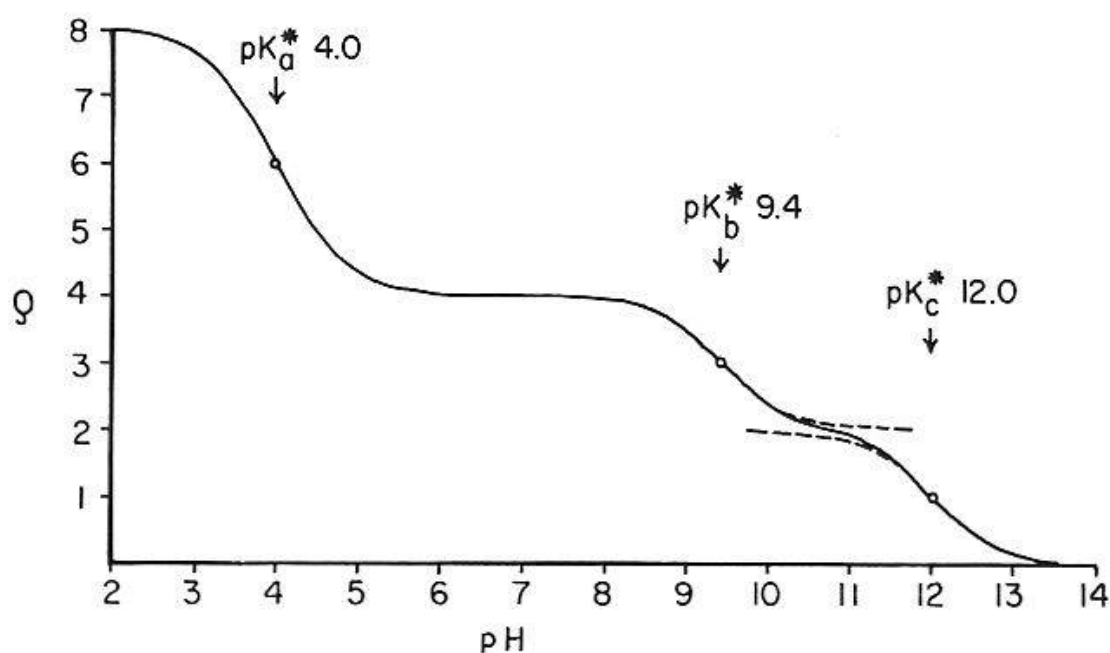


Abb. 4. Hypothetische SBT-Kurve für ein Protein mit den in Tab. 3 und 4 angegebenen Gruppen. Die Kurve ist die Summe von 3 individuellen SBT-Kurven (je eine für jedes pK^*). Abszisse: p_{H} , Ordinate: ϱ , definiert in Gleichung 6 a.

Ein einfaches Beispiel mag die Berechnung der K^* -Werte und daraus der Werte für K_1, K_2 usw. zeigen. Nehmen wir an, wir hätten ein Protein mit Säure titriert und die ausgezogene Kurve in Abb. 4 erhalten.

Aus den ρ -Werten können wir sofort die Anzahl der titrierten Gruppen ablesen, nämlich 4 saure und 2mal 2 basische. Vergleich mit Tab. 1 zeigt, daß nur eine begrenzte Anzahl Gruppen in die gemessenen pK-Gebiete passen. Tab. 3 gibt eine Liste der so erhaltenen Gruppen.

Tabelle 3

pK*	Anzahl	Art der Gruppe
4,0	4	β - und γ -Carboxyl
9,4	2	Sulfhydryl ¹⁾ ϵ -Amino
12,0	2	Guanidino

¹⁾ Vorhandensein und eventuell Anzahl von HS-Gruppen können relativ leicht chemisch oder amperometrisch bestimmt werden. In diesem Fall nehmen wir ihr Fehlen an.

Die wahren Werte der 8 Dissoziationskonstanten können nun durch Anwendung von Gleichung 35 berechnet werden. Die Resultate erscheinen in Tab. 4.

Tabelle 4

Wahre Dissoziationskonstante = $\frac{n - i + 1}{i} \times K^*$	pK = $-\log K$
$K_1 = \frac{4 - 1 + 1}{1} \times 10^{-4} = 4 \times 10^{-4}$	pK ₁ = 3,40
$K_2 = \frac{4 - 2 + 1}{2} \times 10^{-4} = 1,5 \times 10^{-4}$	pK ₂ = 3,82
$K_3 = \frac{4 - 3 + 1}{3} \times 10^{-4} = 0,67 \times 10^{-4}$	pK ₃ = 4,18
$K_4 = \frac{4 - 4 + 1}{4} \times 10^{-4} = 0,25 \times 10^{-4}$	pK ₄ = 4,60
$K_5 = \frac{2 - 1 + 1}{1} \times 10^{-9,4} = 0,8 \times 10^{-3}$	pK ₅ = 9,10
$K_6 = \frac{2 - 2 + 1}{2} \times 10^{-9,4} = 0,2 \times 10^{-4}$	pK ₆ = 9,70
$K_7 = \frac{2 - 1 + 1}{1} \times 10^{-12} = 2 \times 10^{-12}$	pK ₇ = 11,70
$K_8 = \frac{2 - 2 + 1}{2} \times 10^{-12} = 0,5 \times 10^{-12}$	pK ₈ = 12,30

Normalerweise sind diese wahren Konstanten allerdings von geringer Bedeutung für die Proteinchemie, da nicht die einzelnen wahren Werte durch die SBT bestimmt werden sollen, sondern der Charakter der chemischen Gruppierung, die zu diesen Werten führt. In unserem Beispiel würde die SBT das Vorhandensein von 4 (Asparagin + Glutamin) Säuregruppen, 2 Lysingruppen und 2 Arginylgruppen angeben.

C. Fehlerquellen und Abweichungen von der einfachen Theorie

Folgende Faktoren können die Analyse von Protein-SBT-Kurven erschweren:

a) Die p_H -Stabilität des Proteins erlaubt oft nur Titrierungen in einem begrenzten Bereich. Besonders das extrem alkalische Gebiet ist wegen Denaturierung und Hydrolyse schwer zu erfassen.

b) Spuren von CO_2 können die Erfassung des neutralen Gebietes (Histidin!) komplizieren.

c) Unlöslichkeit vieler Proteine beim isoelektrischen Punkt kann die Messung weiter p_H -Bereiche verunmöglichen.

d) Die pK^* -Werte liegen oft sehr nahe beieinander (im Gegensatz zum beinahe «idealen» Fall von Abb. 4), so daß eine geometrische Analyse der experimentellen Kurve nötig ist.

e) Punkte 3 und 4 auf Seite 437 beeinflussen die Ergebnisse.

Ein Verfahren zur Lösung von Punkt d) soll an Hand eines weiteren Beispiels erläutert werden. Die ρ -Kurve eines hypothetischen Proteins ist in Abb. 5 dargestellt (Kurve A). Aus dieser Kurve können pK^* -Werte offensichtlich nicht direkt abgelesen werden.

Von dem asymptotischen Teil (p_H 2–5) der Kurve ausgehend, kann ein pK^* von etwa 4,4 abgeschätzt werden mit 2 Äquivalenten. Die theoretische Kurve für diese Werte (Kurve 1) wird nun von A subtrahiert und gibt Kurve B, die bei $p_H \sim 7$ in A übergeht. In ähnlicher Weise wird Kurve 2 (2mal $pK_2^* 8,0$) von B abgezogen. Das Resultat ist Kurve C: nichts anderes als die ρ -Kurve für $1pK_2^* 6,4$. Die Analyse zeigt also unter Zuhilfenahme von Tab. 1:

- 2 Carboxylgruppen mit $pK^* 4,4$
- 1 Imidazolgruppe mit $pK 6,4$
- 2 α -Amino-Gruppen mit $pK^* 8,0$

Die Begrenzungen dieses analytischen Verfahrens hängen in erster Linie von den Meßgenauigkeiten der experimentellen Kurve ab, die im zweiten Teil dieser Arbeit besprochen werden sollen. Ein typischer Fall für die Anwendung der Methode stellt die Analyse von SBT-Kurven für

Cytochrom c dar (14). Die Messungen wurden von *S. Paléus* ausgeführt, und die Analyse der Kurven geht vor allem auf den Verfasser zurück. Die Unsicherheit der erhaltenen pK^* -Werte betrug in diesem Fall nicht mehr als $\pm 0,1 p_H$ -Einheiten, und die Resultate erlaubten eindeutige Schlußfolgerungen auf Art und Anzahl der titrierten Gruppen.

Auf eine Diskussion der intramolekularen Beeinflussung von dissoziierbaren Gruppen aufeinander (vgl. Punkt 3, Seite 437) kann hier nicht näher eingegangen werden. Relativ einfache Fälle (z. B. Dicarbonsäuren) können noch rechnerisch erfaßt werden. Auch ist versucht worden, den Einfluß von Wasserstoffbrücken auf benachbarte Gruppen zu berechnen, wie das z. B. *McDaniel* und *Brown* (15) getan haben. Bei den Proteinen wird dagegen das Problem in der Regel zu komplex, so daß von Fall zu Fall untersucht werden muß, ob, um wieviel und warum Dissoziationskonstanten aus ihrem normalen Bereich verschoben werden.

In den allermeisten Fällen wirken sich intramolekulare Kräfte so aus, daß die Dissoziation der ersten Gruppe die Dissoziation der folgenden

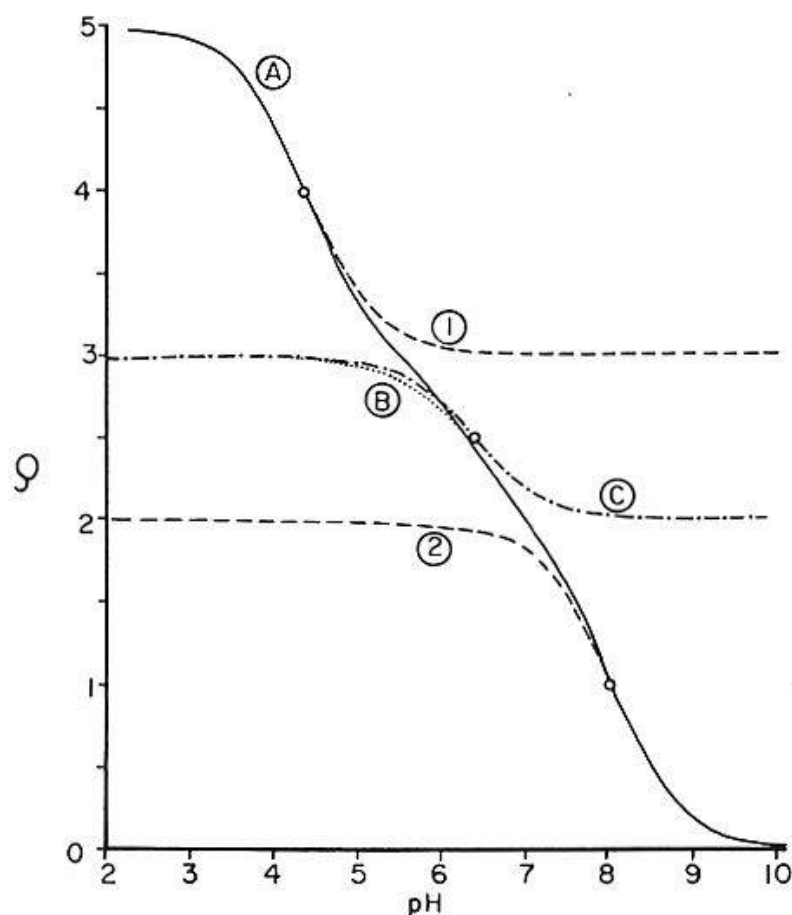


Abb. 5. SBT-Kurve für ein hypothetisches Protein (siehe Text). A = experimentell erhaltene Kurve; B = Kurve A, nach Subtraktion von Kurve 1; C = Kurve B, nach Subtraktion von Kurve 2 und identisch mit der theoretischen Kurve für $pK^* 6,4$; 1 = theoretische Kurve für 2 Äquivalente mit $pK^* 4,4$; 2 = theoretische Kurve für 2 Äquivalente mit $pK^* 8,0$. Koordinaten wie in Abb. 4.

Gruppe erschwert, mit andern Worten daß $K_1/K_2 > 4^9$). Eine der wenigen Ausnahmen ist bekanntlich die Sauerstoffbindung von Hämoglobin. Die Dissoziationskonstanten K_1, K_2, K_3, K_4 sind nicht alle bekannt, doch haben vor allem *Roughton* u. Mitarb. hier große Fortschritte gemacht, (vgl. z. B. 16).

Von den unter Punkt 4 (Seite 437) erwähnten Komplikationen ist die Ionenaktivität von untergeordneter praktischer Bedeutung. Die Annahme, daß die Zugabe des Proteins die Aktivität der H^+ und OH^- nicht meßbar ändert, ist offenbar gerechtfertigt (siehe z. B. *Cannan* u. Mitarb. [17]). Dagegen ist der Einfluß der Ionenstärke auf die Meßergebnisse bedeutend ernster zu nehmen.

Unser theoretisches Wissen über den Einfluß der Ionenstärke auf die Messung der H^+ -Konzentration ist noch sehr beschränkt, doch haben *Sørensen, Lindstrom-Lang* und *Lund* (18) schon 1926 eine empirische Formel aufgestellt, die sehr gut mit ihren experimentellen Resultaten an Ovalbumin und Lactoglobulin übereinstimmt.

Sie fanden, daß die Verschiebung der p_H -Werte eine lineare Funktion der Ladung Z des Proteinmoleküls ist:

$$p_H = aZ + c \quad (38)^{10}$$

Die Steigung der Kurve, a , ist wiederum von der Ionenstärke, μ , abhängig¹¹). Die Konstante c ist gewöhnlich klein ($< 0,1$ p_H -Einheiten bei $\mu_1 - \mu_2 \leq 0,6$). Eine graphische Darstellung der p_H -Verschiebung der SBT-Kurve für 2 Proteine ist in Abb. 6 wiedergegeben, und zwar für eine Änderung der Ionenstärke von 0,01 nach 0,20 (dem höchsten praktisch vorkommenden Wert). Man sieht, daß die Verschiebung am isoionischen Punkt fast Null¹²) ist, dann aber für beide Proteine 1,0 p_H -Einheiten per 40 Z -Einheiten beträgt.

Der Effekt dieser Verschiebung ist eine «Drehung» der ρ/p_H -Kurve um den isoionischen Punkt im Sinne einer Versteilung der Kurve. Die Abweichungen der gemessenen pK^* -Werte von den Werten bei $Z = 0$ nehmen mit der Ionenstärke ab und mit der Ladung des Moleküls zu.

Die Anwendung der Debye-Hückel-Theorie auf dieses Problem gibt Gleichungen, die in erster Annäherung mit den gemessenen Werten übereinstimmen. Freilich beruht diese theoretische Behandlung auf zwei Vereinfachungen, die in Wirklichkeit nicht gefunden werden. Es wird näm-

⁹) Werte von $K_1/K_2 = 900\,000$ sind bekannt, vgl. (15).

¹⁰) Z ist den ρ -Werten äquivalent, wenn der ρ -Wert beim isoionischen Punkt gleich Null gesetzt wird.

¹¹) Die Größe $\mu = I/2$ ist definiert als $\mu = \frac{1}{2} \sum c_i n_i^2$, wo c_i Konzentration des Ions i , n_i Ladung des Ions i , 0,2 m Ammoniumsulfat hat, z. B.:

$$\mu = \frac{1}{2} (0,4 \times 1) + (0,2 \times 4) = 0,6$$

¹²) Die Abweichung von Null entspricht der Konstanten c in Gleichung 38.

lich angenommen, daß die Proteinmoleküle kugelförmig sind und daß ferner die Ladungen auf der Oberfläche der Kugel gleichmäßig verteilt sind. Unter diesen Voraussetzungen berechnet sich z. B. die Verschiebung von «sauren» pK-Werten (Carboxylgruppen) nach folgenden Gleichungen:

$$\text{pK} = \text{pK}_0 - \frac{2Zw}{2,303} \quad (39)$$

wo pK_0 = pK-Wert bei isoionischem Zustand,

$Z = n - h$ (kationische Gruppen minus entfernte Protonen),

w = eine Größe, die durch Gleichung 40 definiert ist:

$$w = \frac{Ne^2}{2DRT} \left(\frac{1}{b} - \frac{z}{1 + za} \right) \quad (40)$$

wo N = Avogadros Zahl

e = Elementarladung

D = Dielektrizitätskonstante

R = Gaskonstante

T = absolute Temperatur

b = Radius des kugelförmigen Moleküls

$a = b$ plus die Schichtdicke von adsorbierten Ionen (etwa $b + 2\text{Å}$)

z = Äquivalent der reziproken Schichtdicke der Ionenatmosphäre und definiert durch Gleichung 41.

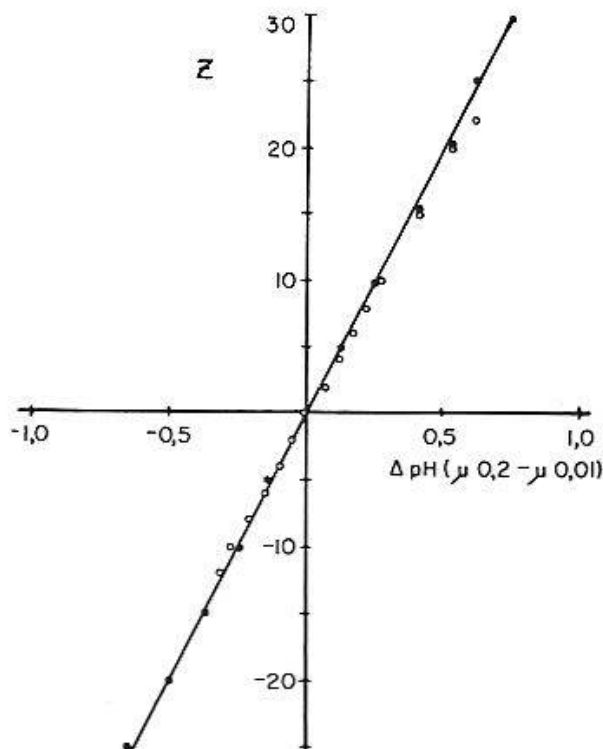


Abb. 6. Die Beeinflussung von pH-Messungen durch die Ladung des Proteinmoleküls. Bei einer Zunahme der Ionenstärke von 0,01 auf 0,20 werden bei zunehmender positiver Ladung (Z) zu hohe p_H -Werte gefunden. Bei zunehmendem negativem Z werden die experimentellen p_H -Werte zu klein. Ordinate: Ladung Z . Abszisse: Abgelesenes p_H minus dem bei $Z = 0$ gemessenen als Folge einer Zunahme von μ von 0,01 auf 0,2.

● = β -Globulin; ○ = Ovalbumin. (Nach Cannan, Kibrick und Palmer [17, 17 a].)

$$\kappa = 2Ne \sqrt{\frac{\pi}{1000 DRT}} \sqrt{2\mu} \quad (41)$$

wo μ = Ionenstärke

Der Radius des Proteins in cm berechnet sich aus dem spezifischen Teilvolumen V_0 und dem Molekulargewicht M nach

$$r = \sqrt[3]{\frac{3 \times V_0 \times 1,66 \times 10^{-24} \times M}{4\pi}} = \sqrt[3]{3,96 \times 10^{-25} \times V_0 \times M} \quad (42)$$

Die berechneten w -Werte stimmen in vielen Fällen recht genau mit den experimentell erhaltenen überein (vgl. 17). Höhere Werte als $w=0,2$ werden bei Proteinen im allgemeinen nicht vorkommen.

Der Einfluß der hier besprochenen Fehlerquellen auf die Meßergebnisse und einige experimentelle Anordnungen zur Verminderung dieser Fehler werden im experimentellen Teil dieser Arbeit noch einmal berührt werden.

Zwei wichtige spezielle Methoden der SBT können in dieser Arbeit aus Raummangel nicht besprochen werden, nämlich Differenztitration und Bestimmung der Dissoziationswärme. In der ersteren Methode wird die Differenz der SBT-Kurven von 2 Derivaten des gleichen Proteins gemessen (Hämoglobin – Oxyhämoglobin, Peroxydase – Apoperoxydase¹³) usw.). Die letztere Methode erlaubt die Zuordnung der Dissoziationswärme zu spezifischen titrierten Gruppen. Beide Methoden haben in den Händen von *Wyman* (18a) und *Theorell* (19) zu wertvollen Erkenntnissen geführt.

D. Versuchsanordnung für Mikrotitration von Proteinen

Die meisten der bisher titrierten Proteine lagen in genügenden Mengen vor, um die Titrationsen mit konventionellen Apparaten auszuführen. Tab. 5 führt die wichtigsten bisher durchgeführten SBT an Proteinen an. Außer Meerrettichperoxydase und bis zu einem gewissen Maße Myosin sind alle Eiweißkörper in Tab. 5 leicht in größeren Mengen und in hoher Reinheit zu erhalten.

Titrationen von vielen Proteinen sind wegen Materialknappheit aufgegeben worden. Es sollte daher versucht werden, eine Anordnung zu konstruieren, die es erlaubt, kleine Mengen von Protein mit hinreichender Genauigkeit zu titrieren. Da *Theorells* Methodik (19) zu den genauesten und zuverlässigsten zählt und ferner die SBT des gleichen Proteins betrifft, das in dieser Arbeit besprochen werden soll (Meerrettichperoxydase), soll sie mit der neuen Mikromethode verglichen werden (Tab. 6).

¹³) Der Proteinteil des Enzyms nach Abspaltung der Wirkgruppe (Hämin).

Tabelle 5
Liste einiger Titrationsen von gereinigten (meist kristallinen) Proteinen¹⁾

Protein	Verfasser	Bemerkungen
Serumalbumin (Mensch)	Tanford (1)	vgl. Tab. 2
Serumalbumin (Pferd)	D'Agostino, Quagliariello (2) Cohn u. Mitarb. (3)	Erste pK-Bestimmung
Ovalbumin	Bugarsky, Liebermann (4), Cannan u. Mitarb. (5)	Erste Protein-SBT
Myosin	Dubuisson (6), Mihályi (7)	—
Lactoglobulin	Cannan u. Mitarb. (8)	—
Insulin	Harrington, Neuberger (9), Cohn u. Mitarb. (10)	—
Hämoglobin	Cohn u. Mitarb. (11), Steinhardt, Zaiser (12)	CO-Verbindung Schnellflußmethode
Cytochrom c	Theorell, Åkeson (13), Paléus (14)	Differenztitration 3 Tierarten
Peroxydase (Meerrettich)	Theorell (15), Maehly (16)	Differenztitration
Gelatin	Birch, Harris (17), Lichten- stein (18)	Nicht kristallin
Zein	Cohn u. Mitarb. (19)	In 80%igem Alkohol
Keratin (Wolle)	Steinhardt (20)	Protein unlöslich

¹⁾ Die ältere Literatur ist 1933 von *Pauli* und *Valko* (21) besprochen worden.

Literatur zu Tabelle 5

1. *Tanford, C.*: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 441 (1950). – 2. *D'Agostino, E.*, und *Quagliariello, G.*: Nernst Festschrift 27, Halle 1912. – 3. *Cohn, E. J.*, *Strong, L. E.*, und *Blanchard, M. H.*: in: Proteins, Amino Acids and Peptides. Herausgegeben von E. J. Cohn und J. T. Edsall. Reinhold Pub. Comp., New York 1943, S. 503. – 4. *Bugarsky, S.*, und *Liebermann, L.*: Pflügers Arch. ges. Physiol. **72**, 51 (1898). – 5. *Cannan, R. K.*, *Kibrick, A. C.*, und *Palmer, A. H.*: Ann. N.Y. Acad. Sci. **41**, 243 (1941). – 6. *Dubuisson, M.*: Arch. int. Physiol. **51**, 133 (1941). – 7. *Mihályi, E.*: Enzymologia (Amst.) **14**, 224 (1950). – 8. *Cannan, R. K.*, *Palmer, A. H.*, und *Kibrick, A. C.*: J. biol. Chem. **142**, 803 (1942). – 9. *Harrington, C. R.*, und *Neuberger, A.*: Biochem. J. **30**, 809 (1936). – 10. *Cohn, E. J.*, *Ferry, J. D.*, und *Blanchard, M. H.*: in: Proteins, Amino Acids and Peptides. Herausgegeben von E. J. Cohn und J. T. Edsall. Reinhold Pub. Comp., New York 1943, S. 502. – 11. *Cohn, E. J.*, *Green, A. A.*, und *Blanchard, M. H.*: J. Amer. Chem. Soc. **59**, 509 (1937). – 12. *Steinhardt, J.*, und *Zaiser, E. M.*: J. biol. Chem. **190**, 197 (1951). – 13. *Theorell, H.*, und *Åkeson, A.*: J. Amer. Chem. Soc. **53**, 1804 (1941). – 14. *Paléus, S.*: Acta chem. scand. **8**, 971 (1954). – 15. *Theorell, H.*: Arkiv Kemi Mineral. Geol. **16A**, Nr. 14 (1943). – 16. Diese Arbeit. – 17. *Birch, T. W.*, und *Harris, L. J.*: Biochem. J. **24**, 1080 (1930). – 18. *Lichtenstein, I.*: Biochem. Z. **203**, 20 (1940). – 19. *Cohn, E. J.*, *Edsall, J. T.*, und *Blanchard, M. H.*: J. biol. Chem. **105**, 319 (1934). – 20. *Steinhardt, J.*: Ann. N.Y. Acad. Sci. **41**, 287 (1941) und frühere Arbeiten. – 21. *Pauli, W. P.*, und *Valkó, E.*: Kolloidchemie der Eiweißkörper. Steinkopff, Dresden und Leipzig 1933, S. 31 ff.

Tabelle 6
Vergleich von Makro- und Mikromethode der SBT am Beispiel von Meerrettich-
peroxydase (HRP)¹⁾

Größe	Makromethode (Theorell [19])	Mikromethode (diese Arbeit)	Faktor zugunsten der Mikromethode
Volumen	3 ml	50–200 μ l	15–60
[HRP]	0,3–1,3 mm ⁴⁾	0,3–2,1 mm ⁴⁾	1
HRP-Menge	1–4 μ Mol	0,05–0,2 μ Mol	20
[H ⁺] oder [OH ⁻]	0,5 n	0,4 n	1
Volumen von Säure für p _H 2 ³⁾	60 μ l	3 μ l	20
Freies CO ₂ ³⁾	?	?	15–60
μ l Lauge per Äquivalent	6	0,3	–
Kleinster Zusatz	0,2 μ l	0,2 μ l	1
Meßgenauigkeit (Äquivalente)	0,02	0,3	1/15
Konstanz der Ionenstärke	+	–	
Volumänderungen	–	+	

1) Vom Englischen «Horseradish peroxidase».

2) Volumen von Säure (oder Base) zur Änderung des p_H um 5 Einheiten vom Neutralpunkt (Blindwert in Wasser).

3) CO₂ muß vor der Titration durch Säurezusatz und Mischen entfernt werden.

4) mm steht für millimolar.

Es zeigt sich zunächst, daß die Ersparnis an Material mit einer stark verminderten Meßgenauigkeit erkauft wird. Die viel flachere Blindkurve der Mikromethode bewirkt aber, daß die Fehlerbreite im Vergleich zur

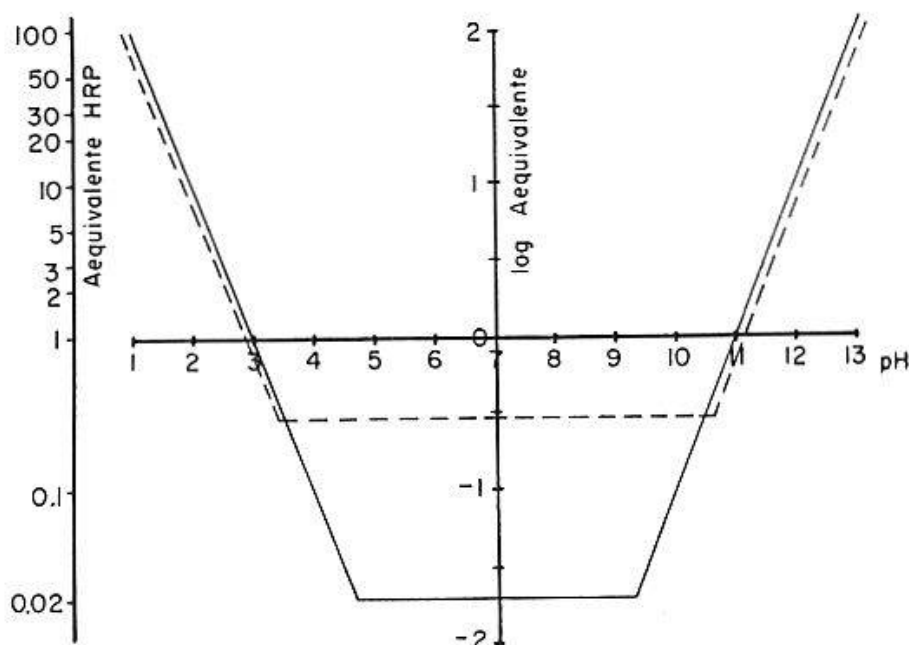


Abb. 7. Fehlerbreite der Makro- und Mikromethode der SBT (vgl. Tab. 6). Im «neutralen» Gebiet (p_H 4–10) ist die Fehlerbreite durch die Genauigkeit des Zusatzes des Titriermittels bedingt. Im sauren und alkalischen Gebiet ist vor allem die Größe der Blindwerte für die Meßgenauigkeit maßgebend. – Abszisse: p_H. Ordinate: Meßgenauigkeit in Äquivalenten ausgedrückt (logarithmischer Maßstab). Ausgezogene Kurve = Makromethode, gestrichelte Kurve = Mikromethode.

Makromethode auch bei extremen p_{H} -Werten nicht zunimmt. Diese Verhältnisse sind in Abb. 7 wiedergegeben. Die einzigen schwerwiegenden Nachteile der Mikromethode sind daher die Volumänderungen während der Messung und die Unsicherheit in der Bestimmung der Ionenstärke.

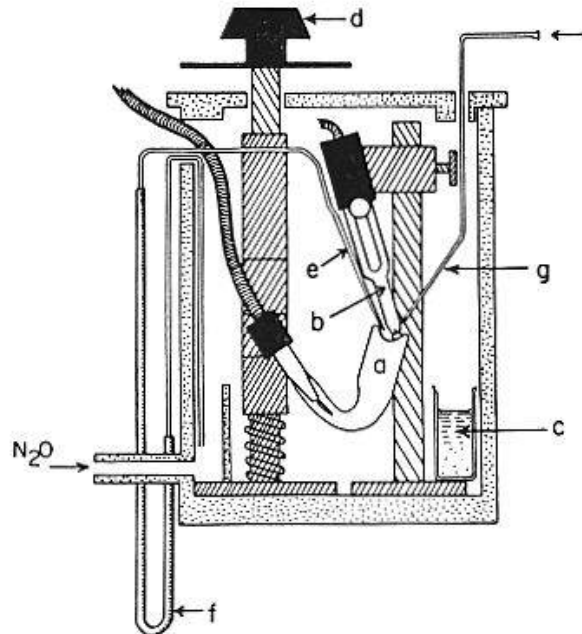


Abb. 8 A. Schematisches Bild der Apparatur zur Mikrotitration. Die 1-Tropfen-Glas-elektrode (Beckmann) (a) kann mit einem Schraubengewinde gehoben und gesenkt werden. Beide Elektroden sind mittels Schrauben justierbar. Die Kalomelelektrode (b) trägt eine Mischkapillare, die durch einen feinen Schlauch (f) im Inneren des Apparates endet. Die Titrierflüssigkeit wird durch eine dünne Kapillare (g) zugegeben. Der Apparat wird vor der Messung von unten her mit N_2O gefüllt und der Innenraum mit wäßriger KOH feucht und völlig CO_2 -frei gehalten. Der Apparat ist im Text näher beschrieben.

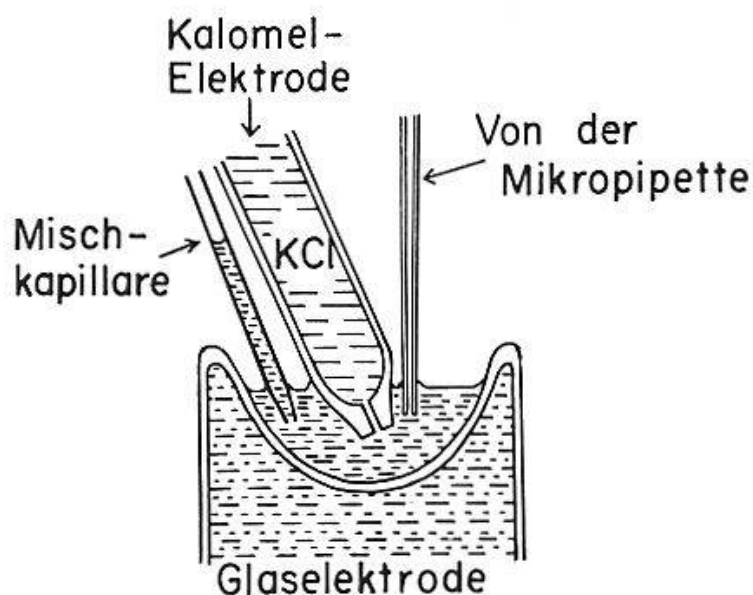


Abb. 8 B. Vergrößerte Ansicht des Titriertraumes (vgl. Abb. 8 A und Text).

Der wesentliche Teil der verwendeten Apparatur ist in Abb. 8 abgebildet. Die Messung der Spannungen zwischen der 1-Tropfen-Glaselektrode (a) und der Kalomelektrode (b) geschah mit einem Millivoltmeter der Firma Radiometer (Kopenhagen), das Ablesungen von 0,1 mV erlaubt. Das Titriergehäuse (Abb. 8A) ist von einem Faraday-Käfig umgeben, der auf einer geerdeten Metallplatte befestigt ist. Distickstoffmonoxyd (Bombe) wird 2mal mit NaOH und 1mal mit H₂O gewaschen und füllt den Gesamtraum mit CO₂-freier, aber H₂O-gesättigter Atmosphäre. Zur Vervollkommnung dieses Zustandes wird ein Docht am Deckel des Gehäuses befestigt, der in verdünnte Lauge (c) hineinreicht.

Das Beschicken und Waschen des Elektrodennapfes wird durch eine Schiebetüre in der Stirnwand des Gehäuses erleichtert. Die Glaselektrode wird dabei durch den Knopf (d) gesenkt. Das Mischen wird durch das Kapillarrohr (e) besorgt, das in der N₂O-Atmosphäre endet: durch Pressen des Schlauches (f) wird die Flüssigkeit aus dem Napf aufgesaugt und wieder ausgepreßt. Die Titrierkapillare (g) ist fein ausgezogen (ca. 0,1 mm innerer Durchmesser) und mit einer Mikropipette verbunden. Diese wird mit einer Zahnstange gehoben und gesenkt.

Die Kalibrierung der Meßanordnung geschah vor und nach der Durchführung einer SBT mit 3 Pufferlösungen:

0,05 m	KH-Phthalat	p_{H} 4,00 (20°)
0,07 m	Phosphat	p_{H} 6,85 (20°)
0,10 m	Beckmann-Standard	p_{H} 9,22 (20°)

Als alkalische Titrierlösung wurde 0,368 n KOH verwendet. Natriumionen wurden vermieden, um den Meßfehler der Glaselektrode im alkalischen Gebiet zu verkleinern. Als Säure diente 0,382 n H₂SO₄ statt der üblichen HCl, da Chlorionen die Spaltung der HRP in Hämin und Apoprotein im sauren Gebiet erheblich beschleunigen (20, 21). Als Mikropipette wurde die ausgezeichnete Agla-Spritze (Borroughs-Wellcome) gewählt, die Zusätze von 0,2 μ l erlaubt.

Die für HRP erhaltene, für die Wasserblindwerte korrigierten SBT-Kurven sind in Abb. 9 zusammen mit der von *Theorell* (19) veröffentlichten Kurve wiedergegeben. Man sieht, daß die Werte für die Mikro- und Makromethode recht stark voneinander abweichen. Dies geht wenigstens zum Teil darauf zurück, daß in den vorliegenden Experimenten die Proteinelösung vor der Titration stärker angesäuert wurde, was offenbar zu einer Auflockerung des Moleküls führt, die die Erfassung zusätzlicher Gruppen möglich macht. Vor der Messung von Kurve 1 wurde die Lösung auf p_{H} 2,7 gebracht, vor Messung von Kurve 2 auf p_{H} 3,5.

Kurve 1, die die titrierbaren Gruppen vollständiger erfaßt, wurde

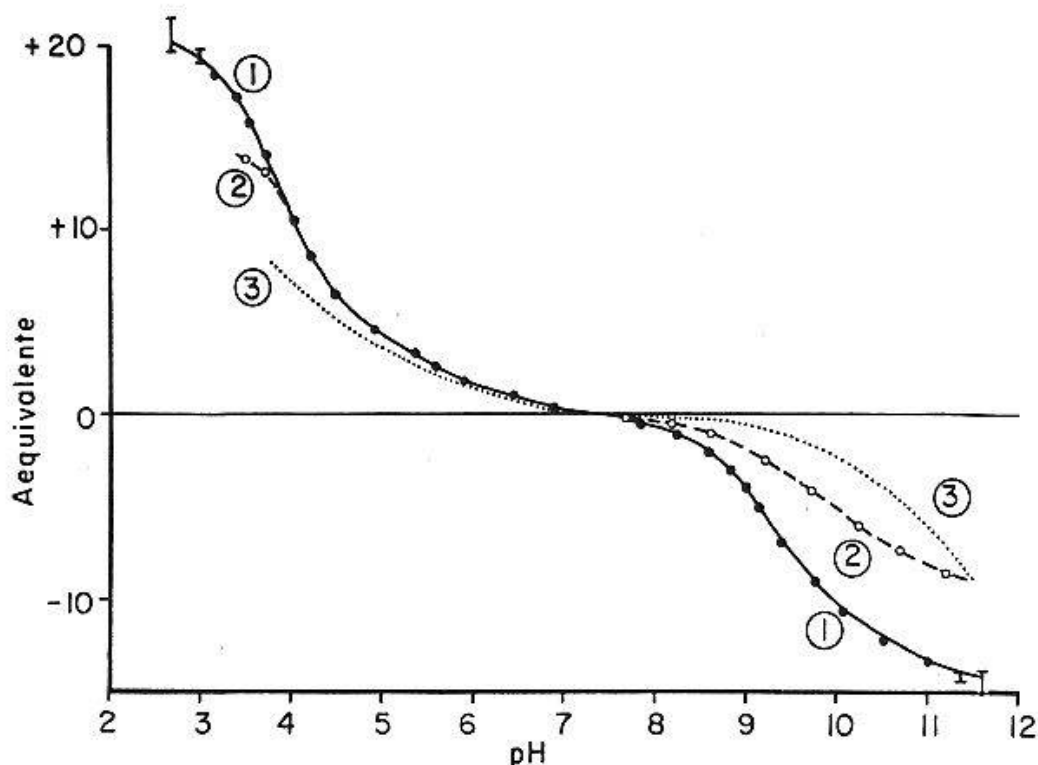


Abb. 9. Titrierkurven von Meerrettichperoxydase, Makro- und Mikromethode. Abszisse: p_H . Ordinate: ϱ , Äquivalente von an HRP gebundenen H^+ und OH^- -Ionen. 1 ——— Mikromethode nach Ansäuern auf p_H 2,7. — 2 ——— Mikromethode nach Ansäuern auf p_H 3,5. — 3 Makromethode (vgl. Theorell und Åkeson [19]) unter milden Bedingungen). Der isoelektrische Punkt von HRP liegt bei p_H 7,2 (27).

nach den oben beschriebenen Methoden analysiert. Die Resultate sind in Abb. 10 wiedergegeben.

Im sauren Gebiet wurden 19 Gruppen mit pK 3,88 gefunden, die Carboxylgruppen entsprechen dürften. Im leicht alkalischen Gebiet wurden 12 Gruppen mit pK 9,33 titriert, wahrscheinlich Lysin- ϵ -aminogruppen. Nach Subtraktion der theoretischen Kurven für diese Werte bleiben 3 Äquivalente im neutralen Gebiet übrig – wahrscheinlich Histidin – und ein schlecht definierter Rest im stark alkalischen Bereich. Bevor diese Ergebnisse näher diskutiert werden, soll der Einfluß der Ionenstärke auf die Kurve besprochen werden.

Die Gleichungen 39–41 erlauben, diesen Einfluß der Ionenstärke für den Fall einer kugelförmigen Molekel mit gleichmäßig verteilten Ladungen zu berechnen. Leider kennen wir die wahre Form der HRP-Molekel nicht, hingegen sind Molekulargewicht, Dichte und Reibungsverhältnis f/f_0 bekannt. Die letztere Größe gibt an, wieviellangsamergelöste Molekeln in das Lösungsmittel hineindiffundieren, als man unter Annahme einer Kugelgestalt berechnet¹⁴⁾. Als Gründe für ein $f/f_0 > 1$ werden vor allem zwei angenommen:

¹⁴⁾ Für eine genaue Definition siehe T. Svedberg und K. O. Pedersen: «The Ultracentrifuge». Clarendon Press, Oxford 1940, S. 40.

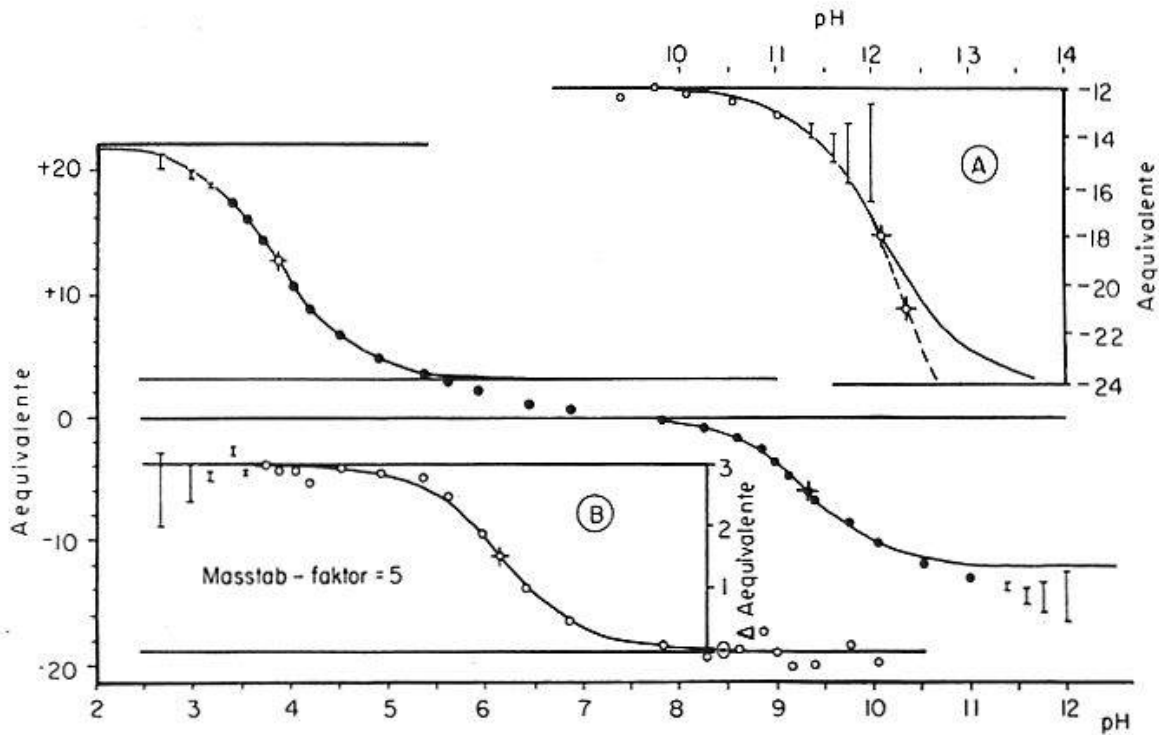


Abb. 10. Die durch die Mikromethode erhaltene SBT-Kurve (vgl. Tab. 7). – Abszisse: gemessenes p_H . Ordinate: Äquivalente gebundenes H^+ bzw. OH^- . ● Gemessene Punkte; I = Fehlerbreite der gemessenen Werte in Gebieten größerer Unsicherheit (vgl. Abb. 7); ——— theoretische Titrierkurven für 19 Äquivalente mit pK^* 3,89 und 12 Äquivalente mit pK^* 9,33. – Zusatzfigur B (vergrößerter Maßstab): ○ und I = Meßwerte nach Abzug der 2 theoretischen Kurven für pK^* 3,89 und 9,33; ——— theoretische Titrierkurve für 3 Äquivalente mit pK^* 6,15. – Zusatzfigur A: ○ und I = Meßwerte nach Abzug der Kurve für 12 Äquivalente mit pK^* 9,33; ——— theoretische Titrierkurve für 12 Äquivalente mit pK^* 12,10; - - - - - theoretische Titrierkurve für 18 Äquivalente mit pK^* 12,35.

Tabelle 7
Korrektur der gemessenen pK -Werte für Ladung $Z = 0$

Anzahl Äquivalente	pK			Chemische Gruppe
	gemessen	nach Korrektur A ¹⁾	nach Korrektur B ²⁾	
19	3,89	3,34	3,62	α -, β - und γ -Carboxyl
3 ³⁾	6,15	6,10	6,10	Imidazol (Histidin)
12	9,33	9,51	9,47	ϵ -Amino (Lysin)
12 ⁴⁾	12,10	12,57	12,37	Guanidino (Arginin)
18 ⁴⁾	12,35	12,67	12,63	

¹⁾ Korrektur A: p_H -Verschiebung ohne Berücksichtigung des Einflusses von Protein auf die Ionenstärke (Abb. 13, Kurve A).

²⁾ Korrektur B: p_H -Verschiebung unter Berücksichtigung der Änderung der Ionenstärke durch die Gegenwart geladener HRP-Moleküle (Abb. 13, Kurve B).

³⁾ Diese Zahl ist etwas unsicher, da Störungen durch CO_2 nicht ausgeschlossen werden können.

⁴⁾ Die Zahl der Arginingruppen kann aus der SBT-Kurve nicht eindeutig abgelesen werden (vgl. Text).

1. Das Molekül ist abgeflacht (einfachste Modelle: «linsenförmige» oder «zigarrenförmige» Ellipsoide).

2. Das Molekül trägt eine Schicht von Lösungsmittel (Wasser) an seiner Oberfläche (Modell: hydratisierte Kugel).

Im Fall von HRP fand man:

M, Molekulargewicht 40 000 (*Theorell* und *Ehrenberg* [22], *Cecil* und *Ogston* [23]),

V_0 , Spezifisches Volumen 0,690 (*Theorell* [24]),

f/f_0 , Reibungsverhältnis 1,36 (*Theorell* [24]).

Hieraus berechnet sich das Volumen eines HRP-Moleküls zu $4,6 \times 10^{-20}$ cm³. Für eine Kugel ergibt dies einen Radius von 22 Å (Gleichung 42), und dieser Wert soll unten zur Berechnung von w (Gleichung 40) benutzt werden. Kugelgestalt setzt nun aber einen Hydratationsgrad von 1,47 voraus (1,47 g Wasser per g Protein; der Radius nimmt von 22 auf 32,5 Å zu). Völlig wasserfreie Rotationsellipsoide hätten bei $f/f_0 = 1,36$ ein Achsenverhältnis von etwa 1 : 7. Abb. 11 zeigt Modelle dieser 3 Extremfälle im gleichen relativen Maßstab. Die wahre Form liegt also zwischen diesen Extremen.

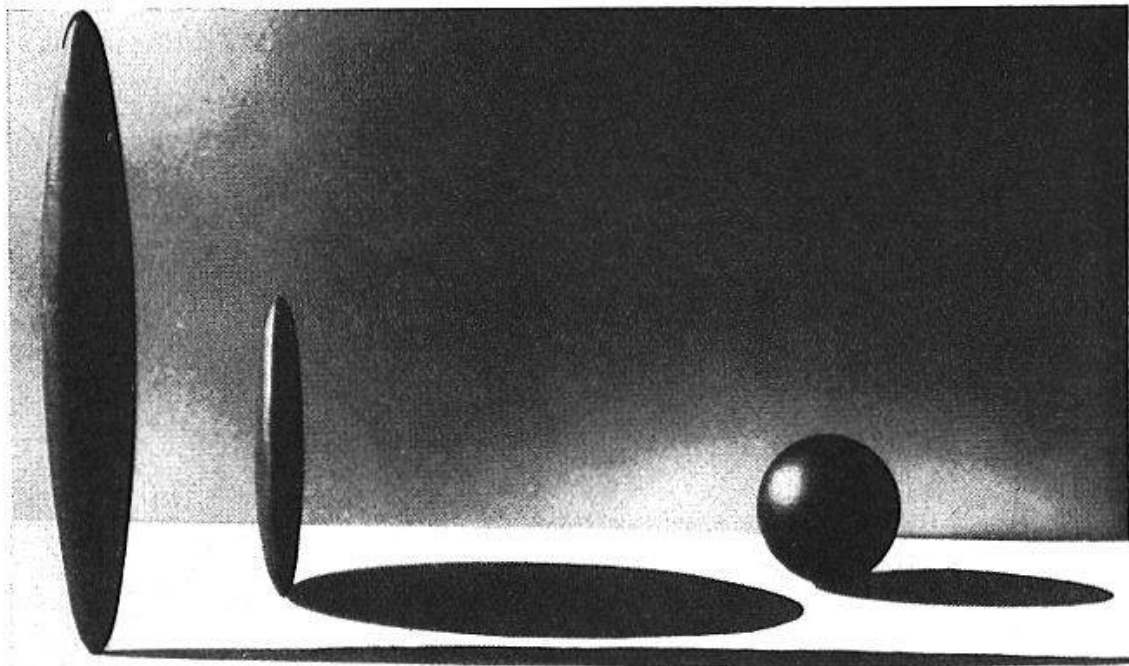


Abb. 11. Photographie von Modellen des HRP-Moleküls. Die im Text besprochenen 3 extremen Formen des HRP-Moleküls sind hier als Modelle dargestellt. Von links nach rechts: Zigarrenförmiges Ellipsoid; linsenförmiges Ellipsoid; Kugel. Das Hydratationswasser ist nicht sichtbar. Alle drei Körper haben dasselbe Volumen. Die Richtung der Schlagschatten steht im rechten Winkel zur Blickrichtung. $3,1 \times 10^6$ mal vergrößert.

Für Wasser ($D = 81$) und 25°C ($T = 298^\circ \text{K}$) berechnet sich die Größe κ nach Gleichung 41 zu $2,28 \times 10^7 \times \sqrt{2\mu}$. Bei Annahme von $a = b = r = 22 \text{ \AA}$ wird Gleichung 40:

$$w = 3,33 \times 10^{-8} \left(4,55 \times 10^6 - \frac{\kappa}{1 + 2,2 \times 10^{-7} \kappa} \right)$$

Die Werte für w als Funktion von $\sqrt{\mu}$ bei $Z = 12,5$ (also bei pK_1) sind in Abb. 12 dargestellt: w steigt mit Sinken der Ionenstärke erst sachte, dann sehr steil an. Abb. 13 zeigt den Einfluß der Ionenstärke auf die p_H -Änderung, und zwar unter zwei verschiedenen Annahmen:

1. Das Protein trägt nicht selbst zur Größe von μ bei. In diesem Fall bewirkt die Ladungszunahme bei der niedrigsten experimentell vorkommenden Ionenstärke ($\mu = 0,09$) eine rapide Zunahme der p_H -Verschiebung. Dies ist im Prinzip ein spezieller Fall von Abb. 6 und Gleichung 38. Eine p_H -Verschiebung von $\Delta \text{p}_\text{H} = 0,9$ wird so möglich.

2. Das Protein trägt zur Größe von μ bei. Trotz geringer HRP-Konzentration (2 mmolar) wird dieser Beitrag recht groß; bei $Z = 22$ wird

$$\Delta \mu = \frac{1}{2} \sum c_i n_i^2 = \frac{1}{2} \times 0,002 \times 22^2 = 0,483 \quad (43)$$

Die Ionenstärke wird also gerade im Gebiete der größten Ladung am stärksten erhöht und reduziert auf diese Weise die p_H -Verschiebung. Die Δp_H -Werte bewegen sich im Laufe der Titration entlang der Kurven A oder B (Abb. 13). Die größte p_H -Abweichung von $\text{p}_\text{H} = 0$ erreicht somit 0,36 Einheiten. Gestützt auf diese Resultate liegt pK_1 bei sehr hohem μ um 0,27 Einheiten niedriger als gemessen, wenn der Einfluß von HRP auf μ berücksichtigt wird oder 0,46 Einheiten niedriger als gemessen ohne Berücksichtigung des Einflusses von HRP auf μ . Das pK von Histidin liegt so nahe dem isoionischen Punkt, daß praktisch keine Verschiebung des pK erwartet werden kann. Dagegen wird die Verschiebung im alkalischen Gebiet wieder spürbar. Die Resultate sind in Tab. 7 zusammengestellt. Drei der pK -Werte können mit großer Wahrscheinlichkeit bestimmten Gruppen zugeordnet werden (vgl. Tab. 1). Die Werte für Lysin liegen dagegen etwas niedriger als der Durchschnittswert. Die Zahl der Arginingruppen kann durch SBT allein nicht bestimmt werden, doch liegen zwei Möglichkeiten zu ihrer Berechnung vor.

1. Einerseits weiß man, daß der isoelektrische Punkt von HRP bei $\text{p}_\text{H} 7,2$ liegt (27). Dies bedingt, daß die Zahl der Gruppen ober- und unterhalb dieses Punktes einander gleich sein müssen.

2. Andererseits haben *Theorell* und *Akeson* (27) eine chemische Analyse von HRP unternommen und 18 Arginingruppen gefunden. Tab. 8 gibt einen Vergleich zwischen ihren analytischen Resultaten und den hier erhaltenen Titrierdaten.

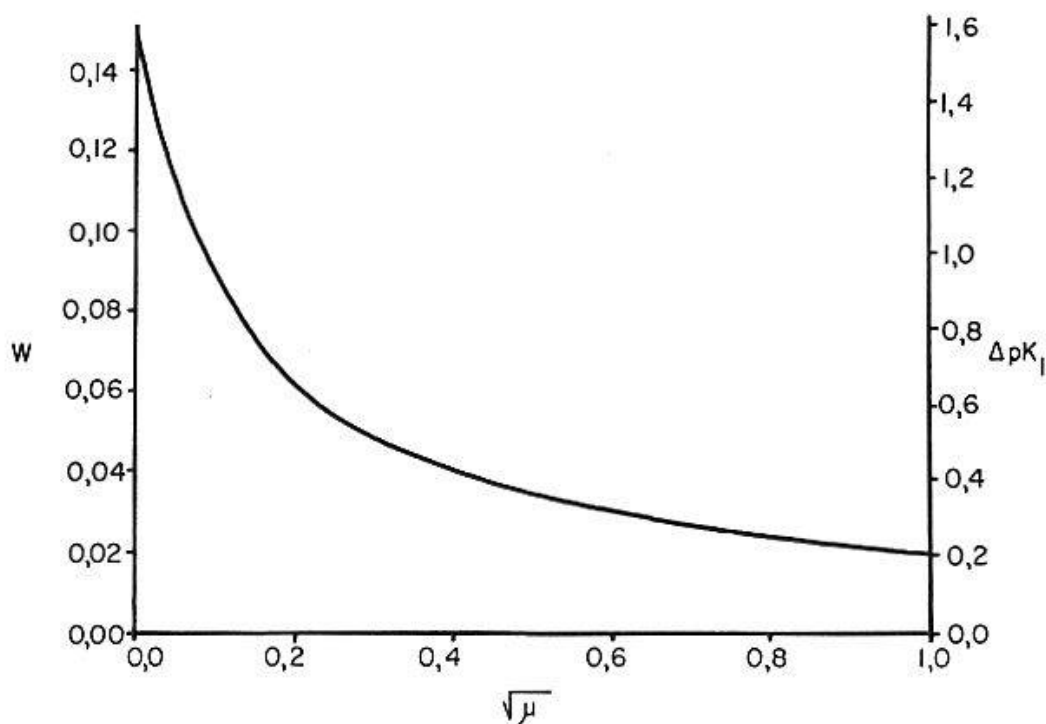


Abb. 12. Die Änderung der Größe w als Funktion der Quadratwurzel der Ionenstärke, berechnet für das kugelförmige HRP-Molekül. Zur Berechnung wurde angenommen, daß $a = b = r = 22 \text{ \AA}$ (Gleichung 40).

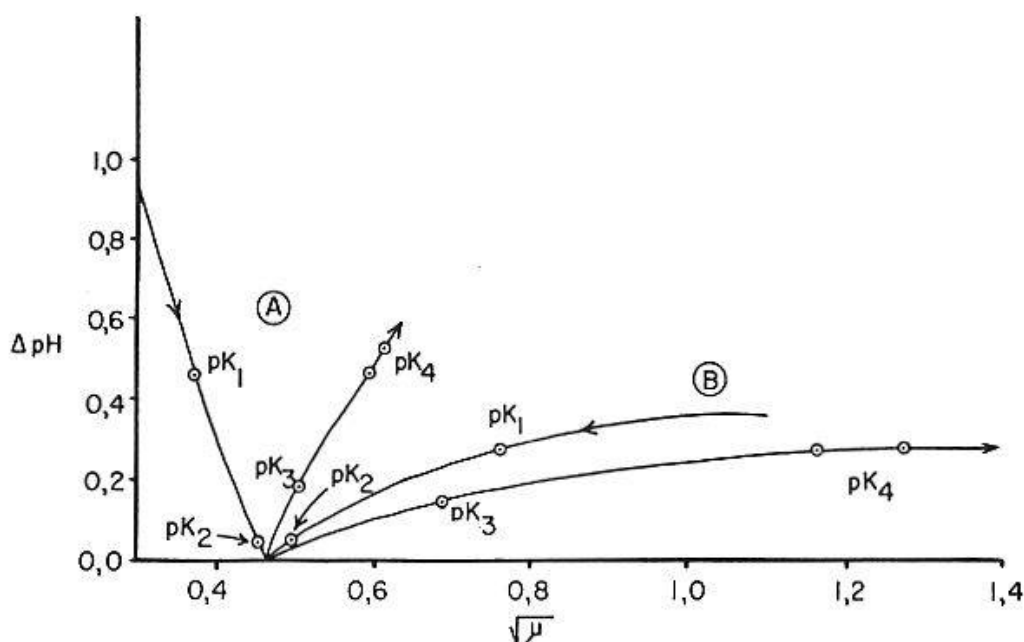


Abb. 13. Die Verschiebung der gemessenen pH -Werte unter dem Einfluß von Änderungen der Ladung des Proteins und der Ionenstärke. – Abszisse: $\sqrt{\mu}$. Ordinate: Abweichung des gemessenen pH vom bei $Z = 0$ erwarteten Wert. ΔpH ist positiv auf der sauren Seite und negativ auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes. Kurve A: Abweichung des pH während der Titration ohne Berücksichtigung des Einflusses des Proteins auf die Ionenstärke. Die pK^* -Werte für die Gruppen in Tab. 7 sind eingetragen. – Kurve B: Wie Kurve A, aber unter Berücksichtigung der Erhöhung der Ionenstärke durch die Gegenwart der geladenen Proteinmoleküle.

Tabelle 8
Zusammensetzung des HRP-Moleküls

Element oder Gruppe ¹⁾	Chemische Analyse %	Berechnet für				Berechnet von Titrierkurve			
		M ₁		M ₂		M ₁		M ₂	
		%	A ⁷⁾	%	A ⁷⁾	M ₁ ⁶⁾	A ⁷⁾	M ₂	A ⁷⁾
S	0,43 ²⁾	0,43	6	0,40 0,48	5 6	—	—	—	—
—SH	0 ³⁾		0 ³⁾		0 ³⁾	0	0	0	0
Fe	1,16 ⁴⁾ 1,38 ⁵⁾	1,26	1	1,39	1	—	—	—	—
Histidin	0,71 ²⁾	0,71	2	0,78	2	3,3	3,0	3,0	3,0
Arginin	6,91 ²⁾	7,11	18	6,98	16	?	?	?	?
Lysin	4,06 ²⁾	3,98	12	4,03	11	13,2	12,0	13,2	12,0
Glutamin- u. Asparagin- säure	—		13 ⁸⁾		12 ⁸⁾	21 ⁹⁾	19 ⁹⁾	21 ⁹⁾	19 ⁹⁾

Fußnoten zu Tabelle 8

¹⁾ *Theorell* und *Akeson* (27) fanden ferner 47,0% C, 7,25% H, 32,0% O und 13,2% N durch chemische Elementaranalyse.

²⁾ Nach *Theorell* und *Akeson* (27).

³⁾ Potentiometrisch konnten keine freien SH-Gruppen gefunden werden (29).

⁴⁾ Berechnet aus dem Hämingehalt nach Werten von *Paul* u. Mitarb. (26).

⁵⁾ Aus dem Hämingehalt nach *Keilin* und *Hartree* (30), die jedoch zur Berechnung einen älteren Wert des Extinktionskoeffizienten für das Pyridinhämochromogen verwendeten (vgl. 26).

⁶⁾ M₁ = 44 100, nämlich das von *Theorell* ursprünglich angegebene Molekulargewicht (24). M₂ = 40 000, nämlich das Mittel zwischen den Werten von *Cecil* und *Ogston* (23) – 39 800 – und von *Theorell* und *Ehrenberg* (22) – 40 200.

⁷⁾ A = Gruppen pro Mol HRP.

⁸⁾ Aus dem Stickstoffgehalt der anodischen Elektrodialysefraktion nach *Theorell* und *Akeson* (27).

⁹⁾ Wahrscheinlich wurden einige α -Carboxylgruppen miterfaßt.

Wird Punkt 1 allein berücksichtigt, kommen wir zum Schluß, daß nur 12 Argininreste vorliegen: 19 Aminosäure-carboxyle + 2 Hämincarboxyle + 3 Imidazole – 12 Aminogruppen = 12 Gruppen.

Bei alleiniger Berücksichtigung von Punkt 2 müssen wir 18 Arginingruppen annehmen und für den Überschuß von 6 basischen Gruppen eine Erklärung finden¹⁵⁾. *Theorell* und *Akeson* (27) haben dieses Problem schon im Lichte ihrer Analysenresultate besprochen. Da es wahrscheinlich ist, daß HRP etwa 18% Kohlenhydrat enthält (vgl. 27), postulieren *Theorell* und *Akeson*, daß dieses saure Gruppen enthält, die im nativen

¹⁵⁾ Das Eisen im Häminmolekül bindet ein OH⁻-Ion mit pK 11 (28) (aus der SBT-Kurve nicht ersichtlich), so daß die Zahl der Arginingruppen auf 17 bzw. 11 sinkt.

Molekül Argininreste neutralisieren, aber bei der Hydrolyse mit HCl (notwendig zur Aminosäureanalyse) zerstört werden.

Die hier beschriebene Methode der Mikrotitration soll zur weiteren Konstitutionsaufklärung von Hämoproteiden verwendet werden, und es wird erwartet, daß sie auch für andere Probleme der Eiweißforschung von Nutzen sein kann.

Der Verfasser möchte nicht verfehlen, der Schweizerischen Akademie der Medizinischen Wissenschaften¹⁶⁾ für einen Reisebeitrag, der diese und weitere Arbeiten ermöglichte, seinen besten Dank auszusprechen.

Außerdem dankt der Verfasser dem schwedischen « Statens Medicinska Forskningsrådet » für ein Stipendium. Es ist ihm ferner ein Vergnügen, Herrn Prof. *Hugo Theorell* für sein Interesse und seine Gastfreundschaft in seinem Laboratorium seinen warmen Dank auszusprechen, sowie Ing. *L. Salomonson* für seine Hilfe beim Bau des Mikrotitrationsapparates zu danken.

Zusammenfassung

Der Anwendungsbereich der Säure-Basen-Titration (SBT) auf Proteine wird diskutiert und die Abweichungen von der strengen Gültigkeit des Massenwirkungsgesetzes besprochen. Es folgt ein Abschnitt über die Vermeidung bzw. Berechnung von Fehlerquellen und über die Deutung und Auswertung von experimentell erhaltenen Kurven von SBT.

Eine neue Mikromethode zur Proteintitration wird erläutert und ihre Anwendung auf die Titration von Meerrettichperoxydase beschrieben. Die Resultate werden mit früheren Versuchen verglichen, die *Theorell* am gleichen Protein mit konventionellen Methoden durchgeführt hat. Von 2 mg Protein ausgehend, können so quantitative Messungen von ionisierbaren Gruppen des Proteins durchgeführt werden.

Résumé

L'application du titrage avec acides ou bases (TAB) aux protéines et la validité de la loi de l'action des masses pour les polyélectrolytes sont discutées. Ce chapitre est suivi d'une discussion des sources d'erreurs et des modes de les éviter ou, au moins, de les calculer. Un procédé est présenté qui se base sur ces discussions et qui permet de computer les constantes de dissociation depuis les courbes TAB expérimentales.

Le principe d'une méthode microtitrimétrique nouvelle et l'application de cette méthode sur le titrage de la peroxydase du raifort sont décrites. Les résultats ressemblent à ceux obtenus par *Theorell* avec la macrométhode classique.

¹⁶⁾ Forschungskommission der Akademie für den Schweiz. Nationalfonds.

La possibilità di misurare le gruppi e il numero di la plupart des groupes chargés d'une protéine utilisant moins que 2 mg de protéine, est démontrée.

Riassunto

Si discute il campo di applicazione della titrazione con acidi e basi (TAB) delle proteine e si menziona che la legge dell'azione della massa non ha sempre una validità assoluta. Segue un capitolo sulla maniera di evitare, rispettivamente correggere, eventuali errori, come pure sull'interpretazione di curve di TAB ottenute sperimentalmente.

Si spiega un nuovo micrometodo di titrazione delle proteine e si descrive la sua applicazione alla titrazione della perossidasi del ramolaccio. I risultati ottenuti vengono confrontati con esperimenti anteriori, fatti da *Theorell* sulla medesima proteina ma con metodi convenzionali. Partendo da 2 mg di proteina si possono eseguire misure quantitative di gruppi ionizzabili della proteina.

Summary

The applicability of acid-base titration methods (ABT) to proteins is discussed. The validity of the law of mass action for this type of titration is investigated with a brief analysis of some of the theoretical and experimental pitfalls. This is followed by a chapter on the analysis of experimental ABT curves including the calculation of the most important sources of error and their avoidance.

A new micromethod for protein titrations is described. The method was used for titrating horseradish peroxydase and the results compared with those obtained by *Theorell* who used a conventional method. Quantitative estimates of ionizable groups are shown to be possible, using as little as 2 mg of protein.

1. *Stein, W. H.*, and *Moore, S.*: J. biol. Chem. **176**, 337 (1948). – 2. *Moore, S.*, and *Stein, W. H.*: J. biol. Chem. **211**, 893 (1954). – 3. *Sanger, F.*: Biochem. J. **44**, 126 (1949). – 4. *Sanger, F.*: Advanc. Protein Chem. **7**, 1 (1952). – 5. *Alberty, R. A.*: In: The Proteins, Bd. I A, herausgegeben von H. Neurath und K. Bailey, Acad. Press, New York 1953, S. 461. – 6. *Tanford, C.*: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 441 (1950). – 7. *Cohn, E. J.*, and *Edsall, J. T.*: Proteins, Amino Acids and Peptides. Reinhold, New York 1943. – 8. *Schmidt, W.*, *Kirk, P. L.*, and *Schmidt, C. L. A.*: J. biol. Chem. **81**, 249 (1929). – 9. *Klotz, I. M.*: In: The Proteins, Bd. I B, herausgegeben von H. Neurath und K. Bailey. Acad. Press, New York 1953, S. 127. – 10. *Weber, H. H.*: Biochem. Z. **189**, 381 (1927). – 11. *Simms, H.*: J. Amer. Chem. Soc. **48**, 1251 (1926). – 12. *von Mural, A.*: J. Amer. Chem. Soc. **52**, 3518 (1930). – 13. *Adams, E. Q.*: J. Amer. Chem. Soc. **38**, 1503 (1916). – 14. *Paléus, S.*: Acta chem. scand. **9**, 971 (1954). – 15. *McDaniel, D. H.*, and *Brown, H. C.*: Science **118**, 370 (1953). – 16. *Roughton, F. J. W.*: In: Haemoglobin, herausgegeben von F. J. W. Roughton und J. C. Kendrew. Interscience Publ., New York 1949, S. 83. – 17. *Cannav, B. K.*, *Kibrick, A. C.*, and *Palmer, A. H.*: Ann.

N.Y. Acad. Sci. **41**, 243 (1941). – 17a. *Cannan, R. K., Palmer, A. H., und Kibrick, A. C.*: J. biol. Chem. **143**, 803 (1942). – 18. *Sørensen, S. P. L., Linderström-Lang, K., Lund, E.*: Compt. rend. trav. lab. Carlsberg **16**, No 5 (1926). 18a. *Wyman, J., Jr.*: Advanc. Protein Chem. **4**, 407 (1948) und Originalarbeiten. – 19. *Theorell, H.*: Arkiv. Kemi, Mineral. Geol. **16A**, Nr. 14 (1943). – 20. *Maehly, A. C.*: Biochem. biophys. Acta **8**, 1 (1952). – 21. *Maehly, A. C.*: Arch. Biochem. **44**, 430 (1953). – 22. *Theorell, H., und Ehrenberg, A.*: siehe Fußnote in A. C. Maehly: Methods in Enzymology, Bd. II, herausgegeben von S. P. Colowick und N. O. Kaplan, Acad. Press, New York 1955, S. 801. – 23. *Cecil, R., und Ogston, G.*: Biochem. J. **49**, 105 (1951). – 24. *Theorell, H.*: Arkiv Kemi Mineral. Geol. **15B**, Nr. 24 (1942). – 25. *Theorell, H., und Åkeson, Å.*: Arkiv Kemi Mineral. Geol. **17B**, Nr. 7 (1943). – 26. *Paul, K. G., Theorell, H., und Åkeson, Å.*: Acta chem. scand. **7**, 1284 (1953). – 27. *Theorell, H., und Åkeson, Å.*: Arkiv Kemi Mineral. Geol. **16A**, Nr. 8 (1942). – 28. *Theorell, H.*: Arkiv Kemi Mineral. Geol. **16A**, Nr. 3 (1942). – *Maehly, A. C.*: unveröffentlicht. – 30. *Keilin, D., und Hartree, E. F.*: Biochem. J. **49**, 88 (1951).

