

# Polarographische Untersuchungen zur Bestimmung der Stabilität von Metall-Protein-Bindungen

Polarographic Investigations for the Determination of the Stability of Metal-Protein Bonds

H. Reinecke, L. Dunemann und G. Schwedt\*

Institut für Anorganische und Analytische Chemie TU Clausthal,  
Paul-Ernst-Straße 4, D-3392 Clausthal-Zellerfeld

*Herrn Prof. Dr. E. Stumpf zum 60. Geburtstag gewidmet*

Z. Naturforsch. **44b**, 767–771 (1989); eingegangen am 3. März 1989

Speciation, Polarography, Proteins, Copper, Binding Stability

Bonds between metals (especially copper) and a protein fraction (18,100 g/mol) of a soya bean flour extract have been investigated. The binding capacity (304 nmol Cu/mg protein) and the binding stability ( $K = 1,046 \cdot 10^3$  in an ammonia buffer system) were determined by polarographic investigations. Changes in the polarogram caused by spiking the protein with metal ions were compared with effects in model substances. Cysteine, ethylenediamine, oxalic acid and derivatives of benzoic acid were used as chelating agents. The effects of functional groups on the metal-protein bonds were estimated by the determination of their different binding stabilities.

Die Elementspezies-Analytik (engl. speciation) hat die Aufklärung von Bindungsformen und -zuständen der Elemente in ihrer natürlichen Umgebung zum Ziel. In den letzten 15 Jahren sind eine Vielzahl von Analysemethoden auf ihre Anwendbarkeit in unterschiedlichen Matrices untersucht worden [1, 2]. Die Polarographie ist bisher vorwiegend zur Charakterisierung von Metall-Bindungsformen in Gewässern [3] unter Berücksichtigung von organischen Liganden wie Huminsäuren [4] oder synthetischen Komplexbildnern [5] eingesetzt worden. Der Vorteil der Polarographie als Analyse-methode liegt in der Möglichkeit, sowohl organische als auch anorganische Spezies nachzuweisen. Aufgrund der hohen Matrixabhängigkeit der elektrochemischen Analysenverfahren ist jedoch auch die Polarographie vielfältigen Störungen ausgesetzt. Dies hat die Anwendbarkeit auf Lebensmittel allgemein bisher stark eingeschränkt.

Für Aussagen über die Bioverfügbarkeit und Toxizität von Metallen in Lebensmitteln müssen deren Bindungsformen charakterisiert werden. Von besonderer Bedeutung sind hier die Bindungen an Proteine. Bereits gut untersucht sind die Metallothioneine, niedermolekulare, stark schwefelhaltige Metall-Pro-

tein-Komplexe [6]. Aufgrund der komplexen Matrix ist zunächst eine chromatographische Abtrennung der relevanten Spezies notwendig [7]. Zur Charakterisierung können sowohl summarische als auch spezifische Parameter herangezogen werden. Hierzu gehören die Charakterisierung spezieller Bindungspartner durch die Kopplung zwischen Gel-Chromatographie und chemischen Reaktionsdetektoren [8] und die Abschätzung der Bindungsstabilitäten und -kapazitäten mittels Ionenaustausch, Dialyse und Direkt-Potentiometrie [9, 10].

## Experimenteller Teil

Die Bestimmung der Konzentration der verschiedenen Stoffe wurde mit Hilfe der Polarographie vorgenommen. Als Polarograph wurde der Stand VA 663 und der Polarecord E 506 (Metrohm) eingesetzt. Als Arbeitselektrode diente die statische Quecksilber-Tropfelektrode, die Glaskohlenstoff-Elektrode, und die Silber/Silberchlorid-Elektrode wurden als Ableit- bzw. Referenzelektrode genutzt.

Die Analysen wurden mit Hilfe der Differential-Puls-Polarographie ausgeführt. Dabei wurde eine Potentialdifferenz von  $-1,5$  V gewählt und das Startpotential dem Elektrolyten angepaßt. Der Meßbereich wurde den Konzentrationen angepaßt und lag im Bereich von  $1-4 \cdot 10^{-10}$  A/mm. Die Tropfzeit betrug 0,8 s/Tropfen, bei einem Papiervorschub von 0,25–1,0 cm. Die Auswertung erfolgte durch Additionstechnik.

Alle eingesetzten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p. A. Die Metallstandardlösung wurde aus

---

*Abkürzungen:* EN: Ethylendiamin; RS: Cystein; Ox: Oxalsäure.

\* Sonderdruckerfordernungen an Prof. Dr. G. Schwedt.

einer  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}$  1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Standardlösung (Merck) hergestellt. Die Lösung enthielt 10  $\mu\text{g}$   $\text{Cu}^{2+}/\text{ml}$ . Als Elektrolyten wurden 0,1 mol/l KSCN, 0,1 mol/l  $\text{KNO}_3$ , 1 mol/l KCl und 1 mol/l  $\text{NH}_3/1$  mol/l  $\text{NH}_4\text{Cl}$  eingesetzt. Die Standardlösungen der Liganden setzten sich aus Lösungen von 0,11 mg/ml Cystein (0,91  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ), 1 mg/ml Ethylendiamin (16,64  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ), 1 mg/ml Oxalsäure (11,11  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ), 1 mg/ml 2-Hydroxybenzoesäure (7,24  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ), 1 mg/ml 2-Aminobenzoesäure (7,29  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ) und 0,14 mg/ml 2-Mercaptobenzoesäure (0,91  $\mu\text{mol}/\text{l}$ ) zusammen.

Bei der Probe handelte es sich um eine Fraktion der Gel-Chromatographie, die eine Konzentration von 0,1 mg Protein/ml Eluat aufweist und ein Molekulargewicht von 18100 g/mol hat. Die Fraktion stammt aus einem wäßrigen Sojamehl-Extrakt [7].

Die Untersuchungen fanden zum einen so statt, daß in einem Polarographiergefäß der Elektrolyt und die Probe vorgelegt und eine bekannte Metallsalzlösung zugegeben wurde. Um eine Verminderung der Bindungskapazität durch eventuell vorliegende Quecksilberionen zu vermeiden, wurden auch Metallsalzlösungen vorgelegt und Komplexbildner zugesetzt, oder sogar jede Messung in einem besonderen Gefäß durchgeführt.

### Ergebnisse und Diskussion

Die gel-chromatographische Trennung von Proteinen aus Sojamehl zur Analyse der Schwermetallgehalte in den einzelnen Fraktionen wurde schon in einer früheren Arbeit beschrieben [7]. Die in den Fraktionen weitergeführten Untersuchungen mittels Polarographie zur Bestimmung funktioneller Gruppen haben gezeigt, daß es prinzipiell möglich ist, Sulfhydrylgruppen in Proteinen mit dieser Methode

zu bestimmen. Bei der Zugabe von Kupferionen zu der Probelösung ergibt sich aufgrund der deutlichen Veränderungen im Polarogramm, daß auch eine Bestimmung von Bindungskapazitäten des Proteins durch Titration möglich sein müßte.

Abb. 1 zeigt zunächst den Einfluß verschiedener Elektrolyte anhand der Abhängigkeit des Diffusionsgrenzstromes vom Zusatz an Kupferionen zu einer Proteinfraktion. Obwohl Kaliumthiocyanat die höchsten Grenzströme und damit die größte Empfindlichkeit ergibt, ist eine Analyse der Sulfhydrylgruppen nur bei Anwesenheit von Kalium- oder Ammoniumchlorid möglich. Nur diese Grundelektrolyte ergeben in den jeweiligen Polarogrammen eine Verschiebung des SH-Gruppen-Signals nach der Zugabe von Metallsalzen (Cd, Cu), die auf eine Komplexbildung zurückzuführen ist. Bei höheren Metallkonzentrationen erscheint ein zusätzliches Signal, das den freien Metallionen zuzuordnen ist. Abb. 2 zeigt die beschriebenen Veränderungen in den Polarogrammen nach steigendem Zusatz von Kupferionen zur Proteinfraktion.

Die weiteren Untersuchungen wurden in dem hier verwendeten Ammoniak/Ammoniumchlorid-Puffersystem durchgeführt, da hier (im Unterschied zur KCl-Lösung) gewährleistet ist, daß die organischen funktionellen Gruppen aufgrund der  $\text{pK}_s$ -Werte in einem definierten Zustand vorliegen. Weiterhin wird mit Hilfe dieses Puffers erreicht, daß die Komplexbildner, bei denen es sich meist um protonierbare (pH-aktive) Substanzen handelt, das Halbstufenpotential der Signale nicht aufgrund von pH-Verschiebungen ändern. Es ist allerdings dabei zu berücksichtigen, daß Ammoniak besonders mit Kupfer relativ starke Komplexe bildet.

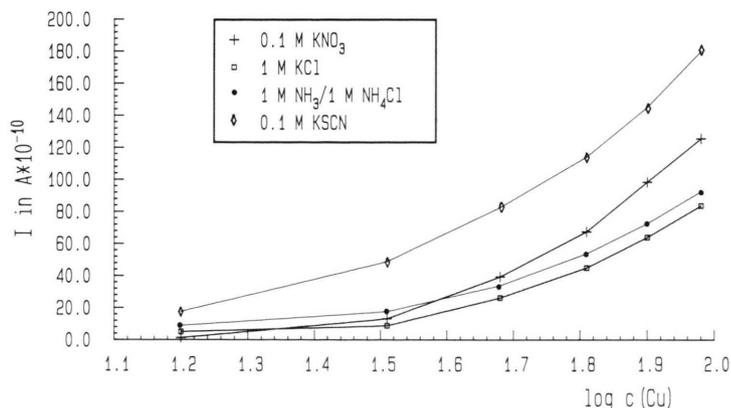


Abb. 1. Abhängigkeit des Diffusionsgrenzstromes von der Art des Grundelektrolyten für die Kupferbestimmung in Anwesenheit eines Proteins.

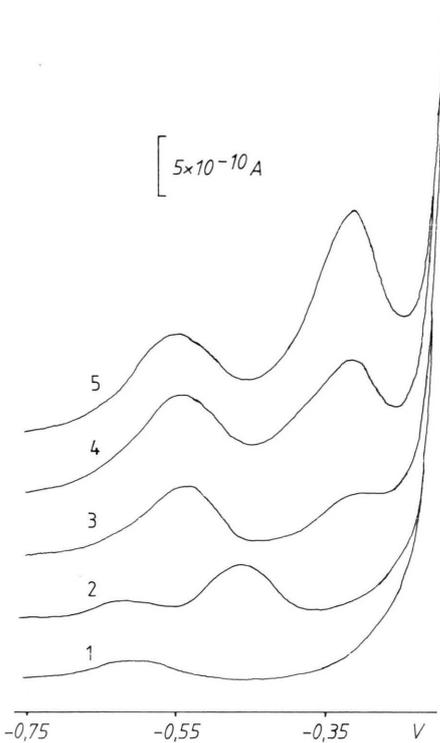


Abb. 2. Veränderungen des Polarogramms einer Proteinfraction durch Zugabe von Kupferionen: Grundelektrolyt (Kurve 1), +1 ml Protein (2), +3 · 100  $\mu$ l Kupferstandardlösung mit 10 mg/l (3–5).

Um zu bestätigen, daß die im Polarogramm auftretenden Signale tatsächlich von den Sulfhydrylgruppen hervorgerufen werden, wurde die Komplexbildung in diesem Puffer anhand von Modellsubstanzen polarographisch überprüft.

Untersuchungen mit Thioglykolsäure und Cystein haben ergeben, daß sich beide Substanzen bei der Komplexbildung polarographisch gleich verhalten. Abb. 3 zeigt die Polarogramme für freie Sulfhydrylgruppen und „freie“ Kupferionen sowie für Kupferkomplexe. Der Vergleich mit den Polarogrammen, die bei der Untersuchung von Proteinfractionen erhalten wurden (Abb. 2), ergibt eine gute Übereinstimmung in den Halbstufenpotentialen der einzelnen Gruppen.

Weitere in Proteinen vorkommende mögliche Metallbindungsstellen sind die Amino- und Carboxylfunktionen (chemische Bindung, stabil). Darüber hinaus können Metalle auch in die Tertiärstruktur eingelagert werden (physikalische Bindung, labil).

Da aber bereits durch andere Untersuchungen gezeigt werden konnte, daß die Bindung zwischen Übergangsmetallen und dieser Proteinfraction stabil ist [7], kann die letzte Möglichkeit vernachlässigt werden. Polarographische Stufen waren für Amino- und Carboxylgruppen unter den genannten Bedingungen erwartungsgemäß nicht zu erhalten. Obwohl diese Gruppen im Polarogramm der Proteine nicht zu erkennen sind, wurden Untersuchungen zur Bestimmung ihres potentiellen Einflusses auf die Bindungskapazität von Eiweißstoffen durchgeführt.

Als Komplexbildner wurden chelatisierende Agenzien verwendet. Auch in Proteinen liegen funktionelle Gruppen oft benachbart vor. Als Beispiele für Aminogruppen wurden Ethylendiamin und für Carboxylgruppen Oxalsäure als Modellsubstanzen gewählt. Zur Bestimmung der Komplexstabilitäten wurden die folgenden vereinfachten Beziehungen herangezogen. Diese sind deshalb verwendbar, weil die Konzentration und die Zusammensetzung des Elektrolyten den größten Störeinfluß auf die Kom-

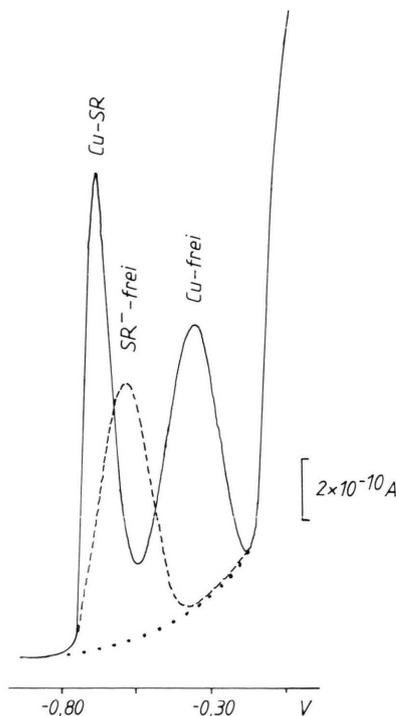


Abb. 3. Darstellung der polarographischen Signale für den Grundelektrolyten (gepunktete Kurve), freie Sulfhydrylgruppen (gestrichelte Kurve) und freie bzw. gebundene Kupferionen (durchgezogene Kurve).

plexbildung haben, in allen Fällen jedoch als konstant angesehen werden können.

$$K_{2 \text{ RS-Cu}} = \frac{[\text{RS-Cu-SR}]}{[\text{Cu}_{\text{frei}}] \cdot [\text{RS}]^2}$$

$$K_{2 \text{ EN-Cu}} = \frac{[\text{EN=Cu=EN}]}{[\text{Cu}_{\text{frei}}] \cdot [\text{EN}]^2}$$

$$K_{2 \text{ Ox-Cu}} = \frac{[\text{Ox=Cu=Ox}]}{[\text{Cu}_{\text{frei}}] \cdot [\text{Ox}]^2}$$

Die ermittelten Bildungskonstanten (Tab. I) sind zwar sehr gering, dabei muß allerdings berücksichtigt werden, daß die Bildungskonstante für den Kupfertetramminkomplex in Wasser schon  $10^{13}$  beträgt. Da sich die in Tab. I aufgeführten Kupferkomplexe im Ammoniakpuffer nachweisbar bilden, muß deren Stabilität in der gleichen Größenordnung wie der des Kupfertetramminkomplexes liegen. Das Verhältnis der Bildungskonstanten für Kupfer mit Cystein, Ethylendiamin bzw. Oxalsäure beträgt 1163:16:1. Kupferionen werden somit vorwiegend an Sulfhydrylgruppen gebunden.

Für das eingesetzte Protein kann nun mit Hilfe dieser Konstanten eine Berechnung der Zahl der SH-Gruppen pro Protein vorgenommen werden. Wenn man nur die Konstante für die Sulfhydrylgruppen berücksichtigt, ergibt sich für das Protein mit einem Molekulargewicht von 18100 g/mol (bei einer Proteinkonzentration von 0,1 mg/ml Eluat) ein Wert von durchschnittlich 11 SH-Gruppen pro Molekül (s. auch Tab. II). Um den Einfluß anderer benachbarter Gruppen auf die Komplexbildung von Metallen feststellen zu können, wurden weitere Untersuchun-

Tab. I. Bildungskonstanten für die verschiedenen Metallkomplexe im  $\text{NH}_3/\text{NH}_4\text{Cl}$ -Puffer.

Ligand	Bildungskonstante
Cystein	$0,92 \cdot 10^3$
Ethylendiamin	$1,30 \cdot 10^1$
Oxalsäure	0,79
2-Mercaptobenzoessäure	$2,13 \cdot 10^3$
2-Aminobenzoessäure	9,80
2-Hydroxybenzoessäure	0,91

Tab. II. Charakterisierung des Proteins.

Merkmal	Wert
Molekulargewicht	18100 g/mol
Konzentration	0,1 mg/ml
Zahl der SH-Gruppen	11 Gruppen/Molekül
Bindungskapazität	5,5 nmol Cu/nmol Protein
	304 nmol Cu/1 mg Protein
Bildungskonstante	$1,046 \cdot 10^3$

gen an verschiedenen Derivaten der Benzoesäure durchgeführt. Dafür wurden die 2-Hydroxy-, 2-Amino- und 2-Mercaptobenzoessäuren eingesetzt. Die Messungen zeigen, daß der Einfluß der Hydroxylgruppe zu vernachlässigen ist. Lediglich bei der Mercaptobenzoessäure ist eine stärkere Komplexbildung festzustellen. Tab. I führt die für diese Substanzen ermittelten Konstanten auf.

Das am Beispiel einer Proteinfraction und von Modellsubstanzen entwickelte polarographische Verfahren ermöglicht im Rahmen der Elementspezies-Analytik prinzipiell folgende Aussagen: Bei einer Konzentration von freien Sulfhydrylgruppen von mehr als  $0,18 \mu\text{mol/ml}$  im Polarographiergefäß ist eine direkte Bestimmung der Anzahl je Proteinkomplex (bei Kenntnis des Molekulargewichtes) möglich. Das Molekulargewicht wird dafür mit Hilfe der Gel-Chromatographie oder der Elektrophorese ermittelt. Der Proteingehalt wird mit der Lowry-Technik bestimmt [11].

Sind nur Sulfhydrylgruppen zur Bindung von Schwermetallen befähigt, so läßt sich diese Tatsache aus den Polarogrammen quantitativ ermitteln. Stehen zusätzliche Bindungsstellen zur Verfügung, so ist die Bildung anderer Metallspezies aus den Veränderungen in den Polarogrammen nach der schrittweisen Addition von Metallionen zu erkennen: Das Signal für freie Metallionen tritt später auf, als nach einer Berechnung für die getrennt bestimmten Sulfhydrylgruppen zu erwarten ist.

Damit steht eine Methode zur Verfügung, die eine Charakterisierung von Proteinen hinsichtlich der Bindungskapazität und der Stabilität von Metallbindungen ermöglicht.

- [1] T. M. Florence, *Talanta* **29**, 345 (1982).
- [2] L. Dunemann und G. Schwedt, in P. Brätter und P. Schramel (eds): *Trace Element Analytical Chemistry in Medicine and Biology*, Vol. 5, pp. 99–118, W. de Gruyter, Berlin–New York (1988).
- [3] H. W. Nürnberg, P. Valenta, L. Mart, B. Raspor und L. Sipos, *Z. Anal. Chem.* **282**, 357 (1976).
- [4] F. H. Frimmel, *Vom Wasser* **53**, 243 (1979).
- [5] B. Raspor, P. Valenta, H. W. Nürnberg und M. Brannica, *Sci. Tot. Environ.* **9**, 87 (1977).
- [6] W. E. Rauser, *Plant Physiol.* **74**, 1025 (1984).
- [7] L. Dunemann und H. Reinecke, *Z. Anal. Chem.*, im Druck.
- [8] L. Dunemann und G. Schwedt, *Z. Anal. Chem.* **325**, 121 (1986).
- [9] G. Schwedt, A. Schweizer und G. Hendrich, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **187**, 229 (1988).
- [10] A. Schweizer und G. Schwedt, *Z. Anal. Chem.* **330**, 518 (1988).
- [11] O. H. Lowry, N. J. Rosebrough, A. L. Farr und R. J. Randell, *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).