

Über den Verlauf der Hydrolyse von Proteinen mit wässriger oder mit alkoholischer Salzsäure

von

Dr. M. Pfannl.

Aus dem II. chemischen Universitätslaboratorium in Wien.

(Vorgelegt in der Sitzung am 16. Dezember 1909.)

In unserem Institute ist von Dr. Przibram die Beobachtung gemacht worden, daß Proteine, in absolutem Alkohol suspendiert, der mit Salzsäuregas gesättigt ist, beim Erwärmen relativ leicht in Lösung gehen und hydrolisiert werden. Anfänglich ist die Hydrolyse nur partiell, späterhin treten aber die einfachsten Spaltungsprodukte in Form ihrer Ester auf. Als diese in der Gelatine der Menge nach bestimmt wurden, zeigte sich, daß Glykokoll relativ in viel kleinerer Menge nachzuweisen war als bei der Hydrolyse mit wässriger Salzsäure, während die Ester der kohlenstoffreicheren Aminosäuren, wie Leucin, in relativ nicht wesentlich verminderter Ausbeute erhalten wurden.

Es konnte dieses in verschiedener Weise gedeutet werden; einmal so, daß die Hydrolyse durch alkoholische Salzsäure anders verläuft als durch wässrige, daß bei jener zunächst an jenen Stellen des Proteinmoleküls vollständiger Zerfall eintritt, an welchen vorwiegend Leucin und Alanin peptidartig verkettet sind, mit anderen Worten, daß Leucin unter Umständen weniger fest gebunden ist als das Glykokoll. Andererseits war es ebensogut möglich, daß bei der Hydrolyse in Alkohol aus diesem und Salzsäure Wasser entsteht, dieses die Esterifizierung hindert, was bei dem viel unbeständigeren Glykokollester mehr Ausschlag gibt wie bei den Estern von Leucin, Alanin etc.

Wenn die erste Möglichkeit die richtige ist, wäre für die Untersuchung der Proteine ein neuer Weg vorhanden. Ich habe deshalb über Aufforderung von Prof. Skraup die Versuche von Dr. Przibram mit der Gelatine wiederholt und sie auch auf das Seidenfibroin ausgedehnt, welches gleichfalls viel Glykokoll enthält.

Es sei von vornherein bemerkt, daß die Untersuchung ergeben hat, daß sowohl bei Gelatine wie bei Seidenfibroin qualitativ und quantitativ dieselben Produkte entstehen, ob die Hydrolyse durch wässrige oder alkoholische Salzsäure erfolgt, vorausgesetzt, daß man Sorge trägt, daß der leicht zersetzliche Ester des Glykokolls nicht schon während des Darstellungsverfahrens wieder teilweise verseift wird.

Daß die Hydrolyse der Proteine aus alkoholischer Salzsäure relativ leicht vor sich geht, ist immerhin bemerkenswert. Ob in manchen Fällen die Überführung der Produkte der Hydrolyse in Ester präparativ erleichtert wird, wenn von vornherein mit alkoholischer Salzsäure erhitzt wird, wobei ein Teil der entstandenen Aminosäuren von vornherein esterifiziert wird, kann ich nicht ohneweiters entscheiden. Beim Seidenfibroin, das durch alkoholische Salzsäure sehr schwer in Lösung gebracht wird, liegt ein solcher Vorteil nicht vor.

Experimenteller Teil.

Das Fibroin aus Seide wurde nach E. Fischer durch Erhitzen von Rohseide mit Wasser im Autoklaven dargestellt. Es wurden 500 g Rohseide zweimal hintereinander in 2·5 l Wasser 5 Stunden auf 130° erhitzt.

70 g lufttrockene Substanz, 6·2% Wasser enthaltend, wurden mit 500 cm³ rauchender Salzsäure übergossen, die fast sofort löste. Es wurde 8 Stunden am Wasserbad erhitzt und im übrigen die Vorschrift von E. Fischer befolgt. Die Abscheidung der freien Ester erfolgte mit Natronlauge.

Von salzsaurem Glykokollester erhielt ich nach der ersten Veresterung 36·3 g, nach der zweiten 4·8 g, in Summe 41·2 g vakuumtrockener Substanz. Die Rohkrystallisation hatte den Schmelzpunkt: 133°, nach der Umkrystallisation aus Alkohol den Schmelzpunkt: 144·5°.

Das Filtrat wurde auf Ester verarbeitet. Die Rohester wogen 61 g.

Bei der Destillation wurde erhalten:

Fraktion bis 50° (Druck 18 <i>mm</i>)	... 11.1 g
Fraktion 50 bis 80° (Druck 13 <i>mm</i>)	... 17.5 g
Fraktion 80 bis 120°	6.6 g
Rückstand	9 g

Es wurden somit erhalten:

freies Glykokoll	33.8%
flüchtige Ester	53.8%

Diese Ziffern sind aus den Angaben von E. Fischer nicht ohneweiters vergleichbar, da er bloß die Gewichte nach zweimaliger Fraktionierung angibt. Nimmt man an, daß bei diesen dieselben Verluste eintreten, wie Fischer sie bei zweimaliger Fraktionierung der Ester aus Casein beobachtet hat, so berechnet sich die Menge der Ester nach der ersten Fraktionierung mit 46.8%.

Nach Fischer:

Glykokoll	38.3%
Ester (umgerechnet)	46.8%

Hydrolyse des Fibroins mit Alkohol.

Fibroin wurde 10 Stunden auf 100° bei 12 *mm* Druck erhitzt. Eine Probe ergab Gewichtskonstanz. 66 g des ganz trockenen Fibroins wurden in 1½ l absoluten Alkohols suspendiert und dieser mit trockenem Salzsäuregas gesättigt. Hierauf wurde im Glyzerinbade erhitzt. Die vollständige Lösung des Fibroins erfolgte erst nach etwa 30 Stunden. Während des Erhitzens wurde Salzsäuregas durchgeleitet und verdampfte ein sehr erheblicher Teil des Alkohols, welcher von Zeit zu Zeit ergänzt wurde. Nach vollständigem Lösen wurde noch 8 Stunden erhitzt. Przibram hat in ähnlichen Fällen zur Krystallisation gestellt, eventuell nach teilweisem Abdestillieren. Ich habe bei möglichst niedriger Temperatur im Vakuum vollständig abdestilliert, den Rückstand mit 250 *cm*³ absoluten

Alkohol gelöst, kalt mit Salzsäuregas gesättigt und dann 2 Stunden erhitzt. Beim Stehen im Eisschrank krystallisierten 43 g Chlorhydrat des Glykokollesters (vakuumtrocken), die den Schmelzpunkt 131° , nach dem Umkrystallisieren den Schmelzpunkt 144.5° hatten.

Die Mutterlauge der Rohkrystallisation krystallisierte, neuerdings verestert, nicht mehr. Die flüchtigen Ester wurden genau so, wie früher beschrieben, isoliert.

Fraktion bis 60° (Druck 16 mm) ...	15.3 g
Fraktion 60 bis 80° (Druck 12 mm) ...	18.3 g
Fraktion 80 bis 128° (Druck 15 mm) ...	4.6 g
Rückstand	9.0 g

In Prozenten wurden erhalten:

	Hydrolyse	
	mit wässriger	mit alkoholischer
	Salzsäure	
Glykokoll	33.8	35.1
Flüchtige Ester..	53.9	57.8

Der Unterschied beider Verfahren schwankt deshalb innerhalb der Versuchsfehler.

Der Rohester des Glykokolls wird aus Gelatine viel reiner und weißer erhalten wie aus Fibroin, gleichgültig ob dieses bei An- oder Abwesenheit von Alkohol hydrolysiert wird.

Hydrolyse der Gelatine mit Alkohol.

61 g Gelatine, die im Vakuumtrockenschrank bei 160° und 15 mm Druck zum konstanten Gewicht gebracht waren, wurden in 1200 g absoluten Alkohol suspendiert, der in der Kälte mit Salzsäure gesättigt worden war. Die Gelatine war schon nach achtstündigem Erhitzen verschwunden, welches noch weitere 8 Stunden fortgesetzt wurde. Im übrigen wurde ganz so verfahren wie bei dem Versuche mit Fibroin.

Das Glykokollesterchlorhydrat wog 12.2 g, es schmolz vakuumtrocken bei 140° , aus Alkohol umkrystallisiert bei 144.5° .

Die Rohester wogen 40 g.

Fraktion	bis 50° (Druck 14 mm)	3·5 g
Fraktion	50 bis 125° (Druck 10 mm)	10·4 g
Fraktion	125 bis 165°	8·3 g
Rückstand	4·0 g

In Prozenten wurden erhalten:

Glykokoll	10·8
Ester	36·7

Da E. Fischer auch bei der Gelatine eine zweimalige Destillation ausgeführt und nur die Gewichte nach der zweiten Fraktionierung angenommen hat, habe ich dessen Zahlen zum Vergleiche in der schon erwähnten Weise umgerechnet.

Es ergaben sich dann 31·5% Ester, während ich 36·7% erhielt, was gut übereinstimmt. Für das Glykokoll gibt Fischer 16·2% an, während ich nur 10·8% erhalten habe. Meine Zahl stimmt aber mit den späteren Bestimmungen von Skraup und Hummelberger,¹ die 9·7% angeben, recht gut überein.

¹ Monatshefte für Chemie, 451—469 (1908).