

dass das Desaminocasein immer noch geringe Reste von freien Aminogruppen enthielt. Bemerkenswerter noch ist der zusätzliche Gerbéffekt (Verminderung der Quellung von 4,3 auf 2,4), der hier in der Hitze erreicht wird. Für diesen Effekt gibt es kaum eine andere Erklärung, als dass die alkoholischen OH-Gruppen, welche bei der Desaminierung eingeführt worden sind, in der Hitze zu einer Brückenbindung mit dem Formaldehyd befähigt sind. Das Quellungsvolumen bleibt allerdings noch wesentlich über demjenigen eines kaltgegerbten Normalcaseins.

Zusammenfassung.

Es wurde das Formaldehydbindungsvermögen des Caseins bei 70° verfolgt. In 5 Tagen übersteigt dasselbe 10%. Als ungefähres Mass musste die Gewichtszunahme des Caseins bei der Gerbung dienen, denn es erwies sich bei den heissgegerbten Präparaten als unmöglich, den gebundenen Formaldehyd quantitativ abzuspalten und zu bestimmen. Ein Teil bleibt irreversibel an das Casein fixiert. Der in der Hitze zusätzlich aufgenommene Formaldehyd bewirkt, verglichen mit der Kaltgerbung, keinen erhöhten Gerbéffekt, gemessen durch die Quellungsverminderung bei Caseinpulver und durch die Nassreissfestigkeit bei Caseinfasern.

Bern, Institut für allgemeine und spezielle
organische Chemie.

25. Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd.

VIII. Versuche mit Acetylcasein

von Hs. Nitschmann und H. Lauener.

(21. XII. 45.)

In der V. Mitteilung¹⁾ haben wir auf die Bedeutung der freien NH₂-Gruppen für die Formaldehydhärtung hingewiesen. Es wurde dort neues Beweismaterial für die auch von anderen Autoren vertretene Ansicht beigebracht, dass die freien Aminogruppen unbedingt erforderlich sind, wenn der Formaldehyd eine eigentliche Gerbwirkung (Aufhebung der Löslichkeit in Alkalien, starke Verminderung der Quelfähigkeit) ausüben soll. Casein wurde durch Behandeln mit salpetriger Säure desaminiert. An diesem Desaminocasein wurde gezeigt, dass es bei der Formaldehydgerbung in der Kälte für jede entfernte Aminogruppe 1 Mol CH₂O weniger bindet. Zudem bindet es nur unter Anlagerung, während gewöhnliches

¹⁾ Helv. 27, 299 (1944).

Casein an seine NH_2 -Gruppen den Formaldehyd unter Kondensation bindet. Auf Grund dieser Versuche kamen wir zu der Auffassung, dass der Formaldehyd Methylenbrücken zwischen den freien NH_2 -Gruppen und den Peptidiminogruppen bildet. Das Desaminieren zwecks Ausschaltung der freien Aminogruppen hat den Nachteil, dass salpetrige Säure sicher auch noch anderweitig mit dem Protein reagiert. Bekannt ist z. B., dass der Phenolkern des Tyrosins nitrosiert wird; diese Reaktion ist für die braune Färbung des Desamino-caseins verantwortlich. Bei der Desaminierung treten an Stelle der NH_2 -Gruppen OH-Gruppen, über deren Reaktionsfähigkeit mit Formaldehyd Genaues nicht bekannt ist. Eine andere Möglichkeit zur Blockierung der Aminogruppen hat man in der Acetylierung. Bei dieser Reaktion werden Peptidiminogruppen gebildet, wie sie ja bereits in grosser Zahl im Protein enthalten sind. Ausserdem ist damit zu rechnen, dass alkoholische und phenolische OH-Gruppen verestert werden. Ein Vergleich der Formaldehydbindefähigkeit und der Gerbbarkeit des Acetylcaseins mit der von gewöhnlichem Casein verspricht deshalb ebenfalls gewisse Einblicke in den Chemismus des Gerbprozesses. Wir berichten über einige solche Versuche, welche vor allem erneut die entscheidende Rolle der primären Aminogruppe für die Gerbung beweisen.

1. Die Darstellung der Acetylcaseine.

Zur Acetylierung des Caseins bedienten wir uns der eleganten Methode der Umsetzung mit Keten. Wir arbeiteten dabei nach den Angaben von *Schöberl* und *Krumey*¹⁾, indem wir Keten in eine Caseinlösung von mässig alkalischem p_H einleiteten. Das acetylierte Casein wurde durch Fällen mit Säure isoliert.

Die Darstellung des Ketens geschah durch pyrogene Zersetzung von Acetondampf in einer „Ketenlampe“, die im wesentlichen derjenigen von *E. Ott*²⁾ nachgebildet war.

Die Glühlampe, von der nur die Drähte mit dem Gestell auswechselbar in die Apparatur eingesetzt wurden, bezogen wir von der *Glühlampenfabrik Aarau A.G.* Wir verwendeten Lampen zu 125 Volt/40 Watt ohne Sockel und nicht evakuiert mit geradem Glühdraht³⁾. Lampen, deren Glühdraht eine enge Spirale ist, sind nicht geeignet, weil sich diese bald mit dichtem, leitendem Kohlenstoff anfüllt. Zum Einsetzen in die Schliffapparat wird der Glaskolben der Lampe zertrümmert und das Glas vorsichtig bis zum Quetschfuss, wo die Zuführungsdrähte eingeschmolzen sind, abgetragen. Die Zuführungsdrähte, deren einer mit einem dünnen Glasröhrchen isoliert wird, und das Evakuierungsröhrchen mit dem ganzen Glühdrahtgestell werden nun in das Glasrohr des Schliffstopfens eingeführt. An dessen oberen Ende werden die Drähte mit einem Zäpfchen eingeklemmt und damit das ganze Glühdrahtgestell fixiert. Beim Inbetriebsetzen der Lampe wird zuerst das Aceton im Kolben zum Sieden gebracht. Wenn alle Luft verdrängt ist, wird die Lampe mit 220 Volt unter Vorschaltung eines Schiebewiderstandes von max. 4–500 Ohm zum Glühen gebracht. Bei mittlerer Rotglut liefert sie etwa 0,6 g Keten pro

¹⁾ Beih. Z. Ver. dtsh. Chem. **45**, 43 (1942); Zellw., Kunstseide, Seide **46**, 445 (1941).

²⁾ J. pr. [2] **130**, 177 (1931).

³⁾ Für 125 V.-Lampen war die Netzspannung von 220 V. gerade gross genug, um die Drähte auch im Acetondampf zum Glühen zu bringen.

Stunde. Es empfiehlt sich, das Ketengas nach dem Verlassen des Kühlers noch durch ein mit Glaswolle gefülltes und aussen mit Eiswasser gekühltes U-Rohr zu schicken, um Acetonreste und gelbe, teerige Verunreinigungen zurückzuhalten.

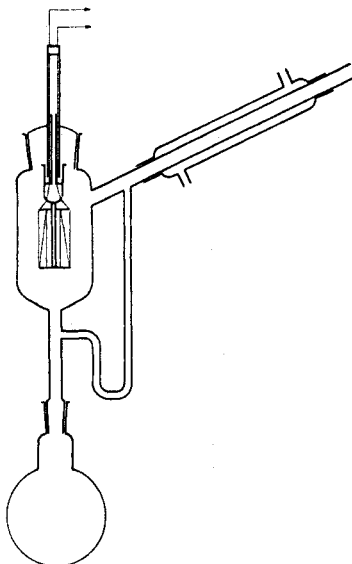


Fig. 1.

Apparat zur Ketenerzeugung. Maßstab 1:6.

Wir acetylierten jeweils 250 cm³ einer 10-proz. Natriumcaseinatlösung vom p_H 7,8. Das Keten wurde unter kräftigem Rühren durch ein Glasrohr mit Spitze eingeleitet. Das lästige Schäumen kann durch Zusatz von Amylalkohol bekämpft werden. Durch langsames Zutropfenlassen von verdünnter NaOH bei ständiger Kontrolle wird das p_H konstant gehalten. Es wurde 2, 6, 22 und 40 Stunden lang Keten eingeleitet. Die Isolierung des acetylierten Caseins bereitete einige Schwierigkeiten. Der isoelektrische Punkt sinkt durch die Acetylierung stark ab. Das 6 Stunden ketenisierte Präparat musste zur Fällung bis p_H 3,8 angesäuert werden. Das Acetylcasein ist schleimig und kaum filtrierbar. Es wurde durch Zentrifugieren und Dekantieren bis zur Freiheit von Cl⁻-Ionen gewaschen. Zuletzt wurde das Wasser durch Alkohol und Äther, oder — bei den stärkst acetylierten Präparaten, die ziemliche Alkohollöslichkeit zeigten — mit Aceton verdrängt. Trocknen im Exsikkator gibt ein leicht zerreibbares Produkt. Die Ausbeute an acetyliertem Casein betrug nur 80% des eingesetzten Caseins. Gewisse Anteile werden durch die Acetylierung löslich und gehen deshalb bei der Aufarbeitung verloren¹⁾.

2. Das Formaldehydbindungsvermögen von acetylierten Caseinen.

In Tab. 1 ist für unsre Acetylcaseine der nach *van Slyke* bestimmbare Gehalt an freien Aminogruppen sowie der bei 30tägiger Gasgerbung erzielte Formaldehydgehalt eingetragen.

¹⁾ In einem Falle wurden $\frac{3}{5}$ des fehlenden Caseins in der Mutterlauge der ersten Fällung und $\frac{2}{5}$ in der alkoholischen Waschflüssigkeit nachgewiesen. Die Ketenisierungsdauer hatte bei diesem Präparat 6 Stunden betragen.

Gasgerbung im Exsikkator neben einer Lösung von 26 g CaCl_2 in 100 cm³ 38-proz. Formalin; Zimmertemperatur. Lüften der Präparate durch Ausbreiten an der Luft während 14 Tagen.

Es zeigt sich, dass bereits nach 6 Stunden praktisch alle NH_2 -Gruppen acetyliert sind. Vergleicht man die Zahlen in der 4. Kolonne, so ergibt sich folgendes: 1. Das Formaldehydbindungsvermögen hat durch die Acetylierung sämtlicher NH_2 -Gruppen überraschend wenig abgenommen, nämlich nur um ca. 0,03 Mmol pro g, während im Casein 0,63 Mmol/g NH_2 -Gruppen enthalten sind. Daraus muss geschlossen werden, dass auch die acetylierte Aminogruppe Formaldehyd bindet. 2. Acetyliert man länger als nötig ist, um alle NH_2 -Gruppen umzusetzen, so erfährt das Formaldehydbindungsvermögen eine weitere Verminderung. Der Grund liegt darin, dass auch OH-Gruppen acetyliert werden. Im freien Zustand sind sie zur Bindung von Formaldehyd befähigt, acetyliert natürlich nicht mehr¹⁾. Wir haben schon früher²⁾ aus Versuchen mit Desaminocasein geschlossen, dass die OH-Gruppen unter den angewandten Bedingungen Formaldehyd binden. Die neuen Versuche bestätigen dies.

Tabelle 1.

Präp.	Dauer der Ketenbehandlung in Stunden	<i>Van Slyke</i> - NH_2 vor der Gerbung Mmol/g	CH_2O -Gehalt	
			in %	in Mmol/g
Casein	0	0,634	2,68	0,88
AC 1	2	0,188	—	—
AC 2	6	0,032	2,55	0,85
AC 3	22	nicht nachweisbar	2,51	0,84
AC 4	40	„	2,21	0,75

Wir untersuchten nun weiter, ob bei der Formaldehydbindung des Acetylcaseins Wasser kondensiert wird oder nicht. Wir hatten früher gezeigt, dass dies beim nativen Casein der Fall ist, beim desaminierten aber nicht.

Die Arbeitsweise war die gleiche wie früher: 28 Tage Gasgerbung der genau gewogenen Proben, 14 Tage Lüften, Bestimmung der Gewichtszunahme und des Formaldehydgehaltes³⁾. Aus der Differenz der beiden Werte lässt sich die kondensierte Wasser-

¹⁾ *Schöberl* und *Krumey* (loc. cit.) erzielten beim Ketenisieren von Casein einen maximalen Acetylgehalt von 4,7%. Die *Van Slyke*-Aminogruppen könnten allein nur 2,7% binden. Die phenolischen OH-Gruppen des Tyrosins reagieren viel langsamer als die NH_2 -Gruppen, wie *Stern* und *White* am Insulin (*J. Biol. Chem.* **122**, 371 (1938)) und *Sandor* und *Goldie* (*C.* **1939**, I, 1186) am Pferdeserum gezeigt haben.

²⁾ *Helv.* **27**, 302 (1944).

³⁾ Vgl. *Helv.* **26**, 1070 (1943). Bei der Destillation der gegerbten Acetylcaseine mit Phosphorsäure zeigte sich, dass sie nicht in Lösung gingen. Deshalb wurde auch der Formaldehyd langsamer abgespalten, und es musste dreimal statt nur zweimal destilliert werden.

menge und damit die Menge des als Methylol- und als Methylengruppe gebundenen Formaldehyds berechnen.

Tabelle 2.

	Casein		Acetylcasein AC 2	
	1.	2.	1.	2.
Gewicht vor der Gerbung in mg	290,33	335,78	449,18	294,58
Gewicht nach der Gerbung in mg	299,20	345,70	464,92	304,94
Gewichtszunahme (a) in % . . .	2,96	2,87	3,38	3,39
Analyse: CH ₂ O (b) in %	3,77	3,75	3,37	3,36
Differenz: b—a	0,81	0,88	-0,01	-0,03
CH ₂ O angelagert in %	2,42	2,28	3,38	3,39
CH ₂ O kondensiert in %	1,35	1,47	0	0
CH ₂ O kondensiert in Mmol/g . .	0,45	0,49	0	0

Tab. 2 zeigt, dass in Bestätigung der früheren Versuche beim nativen Casein ein Teil des Formaldehyds unter Kondensation gebunden wird, unter den hier angewandten Bedingungen ca. 0,47 Mmol/g. Bei der Reaktion mit Acetylcasein hat keine Kondensation stattgefunden, trotzdem dasselbe ebenfalls beträchtlich Formaldehyd gebunden hat¹⁾. Wenn das Acetylieren der freien Aminogruppen die Kondensation bei der Formaldehydhärtung (mindestens in der Kälte) verhindert, so muss es damit auch die Bildung von Hauptvalenzbrücken zwischen den Proteinmolekeln verunmöglichen. Da nur die Bildung solcher Brücken eine eigentliche Gerbwirkung mit sich bringt, ist eine solche bei der Einwirkung von Formaldehyd auf Acetylcasein nicht zu erwarten. Die Tatsachen bestätigen diese Erwartung.

3. Das Quellungsvermögen von Formaldehyd-Acetylcasein.

Wir haben bei zwei verschiedenen hohen Luftfeuchtigkeitsgraden die Wasseraufnahme vor und nach der Gerbung, sowie das Quellvolumen in 0,1-n. NaOH an 0,25 g der pulverförmigen Präparate bestimmt²⁾.

¹⁾ Die Differenz des Formaldehydgehaltes des gewöhnlichen und des Acetylcaseins ist hier grösser als beim Gerbversuch der Tab. 1.

Wir deuten dies folgendermassen: Die grössere Differenz kommt durch die Formaldehydbindung der freien OH-Gruppen zustande, die im Präparat AC 2 zum Teil blockiert sind. Bei längerem oder intensiverem Lüften wird die halbacetalische Bindung mehr und mehr gespalten, und dadurch gleichen sich die Formaldehydgehalte der beiden Präparate wieder an. In der Tat war beim früheren Versuch die Lüftung viel wirksamer, weil das Casein damals in dünner Schicht ausgebreitet wurde und nicht in den Wägegläschen blieb, wie hier.

²⁾ Diese Messungen wurden in gleicher Weise wie in Helv. 26, 1085 (1943) beschrieben ausgeführt.

Tabelle 3.

Präparat	CH ₂ O-Gehalt in %	H ₂ O-Gehalt in g/100 g feuchtes Casein bei		Quellungsvol. in 0,1-n. NaOH nach 24 Std. cm ²
		82,6% relat. Luftfeuchtigkeit	94,4%	
AC 2 (Acetylcasein) . . .	0	15,5	20,83	löslich
AC 2, 28 Tage Gasgerbung bei 18°	3,36	15,45	20,70	7,0
AC 2, 1 Tag Gasgerbung bei 70°	ca. 6 ¹⁾	15,45	20,55	2,8
AC 2, 5 Tage Gasgerbung bei 70°	ca. 10 ¹⁾	—	20,58	2,3
C (Casein)	0	18,58	24,32	löslich
C, 28 Tage Gasgerbung bei 18°	3,75	17,58	22,68	1,7

Aus der Tab. 3, in der zum Vergleich noch zwei Werte für gewöhnliches Casein aufgeführt sind, ergibt sich:

1. Durch das Acetylieren wird das Wasserbindungsvermögen des Caseins sehr beträchtlich herabgesetzt, weil das Hydratationsbestreben der NH₂- und der OH-Gruppen durch die Umsetzung vermindert wird.

2. Das Wasserbindungsvermögen des Acetylcaseins wird durch nachhaltige Formaldehydgerbung (sogar bei 70°) so gut wie gar nicht herabgesetzt, im Gegensatz zu den Verhältnissen beim gewöhnlichen Casein.

3. Quellung in 0,1-n. NaOH: 28 Tage Gasgerbung bei 18° nimmt dem Präparat AC 2 gerade die Löslichkeit, jedoch ist das Quellungsvolumen ausserordentlich gross. In diesem Präparat waren nach 6-stündiger Ketenisierung ca. 95% aller NH₂-Gruppen acetyliert. Wir untersuchten noch die 22 und 40 Stunden ketenisierten Caseine AC 3 und AC 4 und fanden, dass dieselben nach 28 Tagen Gasgerbung bei 18° in 0,1-n. NaOH löslich blieben. Es ergibt sich somit, dass bei quantitativer Acetylierung der NH₂-Gruppen Formaldehyd in der Kälte keine Brückenbindungen mehr eingehen kann. Bei der Heissgerbung scheinen die Verhältnisse allerdings anders zu sein, denn hier wird das Quellungsvermögen in verdünnter Natronlauge sehr stark herabgesetzt; allerdings bleibt es noch beträchtlich über dem des gewöhnlichen, kaltgegerbten Caseins. Man muss daraus wohl schliessen, dass bei 70° auch ohne NH₂-Gruppen noch einzelne Brücken gebildet werden können.

Zusammenfassung.

Es wurden verschieden stark acetylierte Caseine durch Einleiten von Keten in Natriumcaseinatlösung hergestellt. Aus dem

¹⁾ Gewichtszunahme bei der Gerbung.

wenig verminderten Formaldehydbindungsvermögen der acetylierten Caseine muss geschlossen werden, dass auch die acetylierte NH_2 -Gruppe noch Formaldehyd zu binden vermag (28 Tage Gasgerbung bei 18°). Bei dieser Reaktion wird kein Wasser kondensiert. Dagegen konnte erneut nachgewiesen werden, dass die freien Aminogruppen im gewöhnlichen Casein den Formaldehyd unter Kondensation binden. Die Gerbung in der Kälte bewirkt somit beim Acetylcasein auch keine eigentliche Gerbung: Stark acetylierte und dann formalisierte Caseine bleiben wegen der fehlenden Brückenbindungen in verdünnter Natronlauge löslich. Die Heissgerbung (70°) bringt diese Löslichkeit allerdings zum Verschwinden, jedoch bleibt das Quellungsvermögen eines solchen Präparates weit über dem des gewöhnlichen Caseins, das bei 18° gegerbt worden ist. Die Versuche bestätigen erneut die entscheidende Bedeutung der freien NH_2 -Gruppen für die Formaldehydgerbung.

Bern, Institut für allgemeine und spezielle
organische Chemie.

26. Polarographische Untersuchungen an organischen Verbindungen¹⁾

von R. Pasternak und H. v. Halban.

(22. XII. 45.)

Die Absicht, polarographische Untersuchungen an organischen Verbindungen anzustellen, ging aus dem Wunsch hervor, vielleicht auf diesem Wege etwas über die Konstitution der Verbindungen zu erfahren, die bei den Arbeiten über die Photochemie des Tetrabenzoyl-äthylens gefunden wurden²⁾. Es erwies sich aber bald als lohnend und erwünscht, den Rahmen etwas weiter zu spannen, da die Anwendung der Polarographie auf organische Verbindungen noch keineswegs so ausgebaut ist, wie das heute bei einigen andern physikalischen Methoden der Fall ist.

Die quantitative Deutung der polarographischen Erscheinungen ist erst für reversible Elektrodenvorgänge durchgeführt worden, von J. Hejrovský³⁾, dem Schöpfer der Methode, für anorganische, von O. H. Mueller⁴⁾ für organische Systeme. Eine Darstellung der Theorie würde den Rahmen dieser Zusammenfassung überschreiten. Es sei für sie, sowie für die Aufnahmetechnik, auf die Originalliteratur und auf die kurze Darstellung in der Dissertation verwiesen.

¹⁾ Kurzer Auszug aus einem Teil der Diss. von R. Pasternak, Zürich 1946.

²⁾ Vgl. Keller, H. und v. Halban, H., Über die Photochemie des Tetrabenzoyl-äthylens V, *Helv.* **28**, 542 (1945), und die dort angeführten früheren Mitteilungen.

³⁾ Hejrovský, J. *Polarographie*, Springer 1941, s. auch Kolthoff, J. M. und Lingane, J. J., *Chem. Rev.* **24**, 1—94 (1939); v. Stackelberg, M., *Z. El. Ch.* **45**, 466—491 (1939).

⁴⁾ Mueller, O. H., *Chem. Rev.* **24**, 95—124 (1939) und *Am. Soc.* **62**, 2434 (1940).