

l'éther, 0,7 gr. d'acide undécène-9-oïque fondant à 2,5—3° et à 3—3,5° après distillation.

La saponification complète de l'amide s'effectue par chauffage à reflux pendant 8 heures, avec 6 parties de lessive de soude à 10 % et 5 parties d'alcool.

Dérivé p-phényl-phénacylique.

P. de f. 65—66° (alcool).

2,925 mgr. subst. ont donné 8,500 mgr. CO₂ et 2,120 mgr. H₂O

C₂₅H₃₀O₃ Calculé C 79,32 H 7,99%

Trouvé „ 79,25 „ 8,11%

RÉSUMÉ.

L'hydrogénation catalytique partielle de l'acide undécène-9-oïque, effectuée sur le sel de sodium, en solution aqueuse et légèrement alcaline, en présence de nickel *Raney*, conduit à un acide α -undécène-9-oïque, de p. de f. 3—3,5°, qui est l'isomère géométrique de l'acide de *Krafft* et *Seldis* ou acide β -undécène-9-oïque, de p. de f. 20°. L'amide du nouvel acide fond à 84,5—85° et son dérivé p-phényl-phénacylique à 65—66°.

Laboratoires scientifiques de
L. Givaudan & Cie, S.A., Vernier-Genève.

107. Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd.

II. Zur quantitativen Bestimmung des Formaldehyds in mit
Formaldehyd gehärtetem Casein¹⁾

von Hs. Nitschmann, H. Hadorn und H. Lauener.

(13. IV. 43.)

Vor zwei Jahren haben wir darüber berichtet, dass es nach der von *Highberger* und *Retzsch*²⁾ vorgeschlagenen Methode der Destillation mit 2-n. Schwefelsäure nicht möglich ist, den an Casein gebundenen Formaldehyd quantitativ als solchen abzuspalten, um ihn im Destillat titrimetrisch zu bestimmen. Wir zeigten, dass man dagegen zum Ziele gelangt, wenn man die Schwefelsäure durch die schwächere Phosphorsäure ersetzt, oder die Schwefelsäure nur in sehr geringen Konzentrationen zur Anwendung bringt. Die Analysenvorschrift, welche wir damals aufstellten, stützte sich auf eine grosse Reihe von Testversuchen, bei denen eine bekannte Menge Formaldehyd als verdünnte Lösung mit Casein über Nacht stehengelassen und dann der

¹⁾ Die I. Mitteilung erschien in *Helv.* **24**, 237 (1941).

²⁾ *J. Am. Leather Chem. Assoc.* **33**, 341 (1938).

Destillation unterworfen worden war. Wir empfahlen schliesslich diejenige Arbeitsweise als Analysenmethode, welche bei möglichster Einfachheit und Raschheit in der Ausführung den Formaldehyd quantitativ ins Destillat übergehen liess.

Inzwischen haben wir eine grosse Anzahl von quantitativen Formaldehydbestimmungen an Caseinen, die unter sehr verschiedenen Bedingungen gehärtet worden waren, durchgeführt. Die dabei gemachten Erfahrungen, sowie die Ergebnisse einer Reihe neuer Testversuche veranlassen uns, unsere erste Mitteilung zu ergänzen.

I. Analyse von bei Zimmertemperatur gehärtetem Casein.

Bei unseren Analysen machten wir, insbesondere bei kräftig gererbten Caseinproben, bald die Beobachtung, dass die Resultate bei Doppelbestimmungen um 2—3% streuten. Da die Titriergenauigkeit viel grösser ist, mussten die Gründe bei der Destillation gesucht werden. In der Tat schien es, dass man immer dann höhere Werte für den Formaldehydgehalt bekam, wenn die Phosphorsäure im Destillierkolben besonders stark eingedampft wurde. Offenbar waren wir also mit der Destillationszeit oder der Menge des überdestillierten Wassers gerade an der Grenze desjenigen, das nötig ist, um ein quantitatives Abspalten und Übertreiben des Formaldehyds zu gewährleisten.

Folgender Versuch zeigt, dass bei der von uns angegebenen Destillationsweise tatsächlich bis zuletzt Formaldehyd übergeht, wobei es sich allerdings am Schluss meist nur um sehr kleine Mengen handelt.

Versuch.

0,3 g gehärtetes Casein mit ca. 2,8% Formaldehydgehalt wurde mit 15 cm³ 1-m. Phosphorsäure und 200 cm³ Wasser versetzt und destilliert. Das Destillat wurde in Portionen von je 10 cm³ aufgefangen und alle diese Fraktionen mit der Farbreaktion von *Rimini* und *Shryver*¹⁾ auf Formaldehyd geprüft. Das Ergebnis ist aus Tabelle I ersichtlich. Man sieht, dass tatsächlich bis zuletzt Formaldehyd übergeht. Nachdem die Phosphorsäure bis auf ca. 15 cm³ eingedampft war, setzten wir nochmals 50 cm³ Wasser zu und destillierten dieselben ebenfalls noch ab. Erst die letzten dieser fünfmal 10 cm³ Destillat waren praktisch ganz frei von Formaldehyd.

Diese Beobachtungen veranlassten uns, unsere ursprüngliche Destillationsmethode etwas abzuändern. Bei kaltgererbten Caseinen arbeiten wir jetzt wie folgt:

0,2 bis 0,5 g Formaldehydcasein (je nach dem Formaldehydgehalt) werden im Destillierkolben mit 15 cm³ 1-m. Phosphorsäure und 155 cm³ dest. Wasser (Gesamtvolumen 170 cm³) übergossen. Man destilliert im Verlaufe von ca. $\frac{3}{4}$ Stunden bis auf ein Volumen von ca. 25 cm³ ab, das man mit Hilfe einer aussen am Kolben angebrachten Marke abschätzt. Jetzt gibt man 60 cm³ Wasser nach und destilliert weiter bis auf einen Rückstand von 10 cm³. Die Volumina sind so gewählt, dass als Vorlage ein 250 cm³

¹⁾ Farbreaktion nach *Rimini* und *Shryver*: Zu 10 cm³ der zu prüfenden Lösung fügt man 2 cm³ 1-proz. Phenylhydrazin-hydrochlorid-Lösung und 1 cm³ 5-proz. Kaliumhexacyanoferrat(III)-Lösung. Nach dem Durchmischen gibt man 5 cm³ konz. Salzsäure zu. Es entsteht eine fuchsinrote Färbung. Empfindlichkeit 1:1 000 000.

fassender Messkolben genügt. Mit 8 cm³ vorgelegter Hydrogensulfidlösung enthält dieser nach beendeter Destillation ca. 228 cm³ Flüssigkeit; man kann also gerade noch Kühler und Vorstoss abspritzen und dann zur Marke auffüllen. Im Destillat wird der Formaldehyd nach *Clausen* titrimetrisch bestimmt, wie wir es früher beschrieben haben¹⁾.

Tabelle 1.

Fraktion Nr.	cm ³	Reaktion	Vergleichs- lösung
1. a	10	stark positiv	
9. a	90—100	„	
15. a	150—160	„	1 : 20000
17. a	170—180	positiv	1 : 30000
18. a	180—190	„	1 : 30000
Der Kolbenrückstand betrug noch 15 cm ³ . Es wurden 50 cm ³ Wasser zugesetzt und weiter destilliert.			
1. b	10	schwach positiv	1 : 100000
2. b	10—20	„	
3. b	20—30	„	
4. b	30—40	sehr schwach	1 : 1000000
5. b	40—50	Spur	

Die Differenzen zwischen den Resultaten, welche mit der alten einstufigen und mit der neuen zweistufigen Destillation erhalten werden, sind nicht gross, zeigen aber stets das gleiche Vorzeichen und sind deshalb zu berücksichtigen. In Tab. 2 sind die beiden Werte (%-Zahlen für Formaldehyd) für vier verschiedene Präparate nebeneinandergestellt.

Tabelle 2.

Präparat	alte Methode	neue Methode	Differenz	
			absolut	in % des CH ₂ O-gehaltes
0,5 III	1,66%	1,684%	0,02	1,4
38 III	3,14%	3,19%	0,05	1,6
2 II	1,78%	1,80%	0,02	1,1
0,2 III	1,05%	1,115%	0,065	5,8

Die mitgeteilten Beobachtungen lassen es angezeigt erscheinen, dass man sich bei jedem mit Formaldehyd gehärteten Protein speziell vergewissert, ob genügend lang destilliert worden ist, so dass aller Formaldehyd abgespalten und übergetrieben werden konnte. Nach beendeter Destillation wird man ganz einfach nochmals etwas Wasser in den Destillierkolben geben und dieses überdestillieren und gesondert auffangen. Im Destillat darf mit der Probe von *Rimini* und *Shryver* kein Formaldehyd mehr nachweisbar sein. Wenn dies doch

¹⁾ Helv. 24, 241 (1941).

der Fall ist, muss die Destillation für die quantitative Bestimmung verlängert werden. Wir machten diese Probe stets, wenn wir Präparate zu analysieren hatten, die andersartig als die bereits untersuchten gehärtet worden waren.

II. Analyse von bei 70° C gehärtetem Casein.

Während die oben beschriebene zweistufige Destillation bei allen kaltgegerbten Caseinen genügte, war dies nicht der Fall, wenn der Formaldehyd bei höherer Temperatur (70° C) auf das Casein eingewirkt hatte. Kaltgegerbte Caseine sind bei Beendigung der zweistufigen Destillation längst vollständig in Lösung gegangen, heissgegerbte Präparate sind zu diesem Zeitpunkt jedoch zum grössten Teil noch ungelöst. Es muss also offenbar noch Gerbstoff im Protein vorhanden sein. Diese Vermutung wurde beim Weiterführen einer solchen Destillation sofort bestätigt; das Destillat war noch formaldehydhaltig.

Es gelingt aber, auch aus heissgegerbten Caseinen den Formaldehyd quantitativ überzutreiben, so dass das Destillat zuletzt keine Reaktion nach *Rimini* und *Shryver* gibt, wenn man wie folgt arbeitet:

Zuerst zweistufige Destillation wie beschrieben. Nun wird dem Rückstand 15 cm³ konz. Phosphorsäure und 120 cm³ Wasser zugesetzt und auch dieses Wasser noch überdestilliert. Als Vorlage muss hier ein 500 cm³ fassender Messkolben verwendet werden, wenn man das Destillat in aliquoten Teilen titrieren will. Das Casein löst sich erst gegen Ende dieser dritten Destillation. Dass bei dieser noch beachtliche Mengen Formaldehyd übergehen können, zeigt folgendes Beispiel eines bei 70° C gegerbten Präparates:

CH ₂ O im Destillat der 1. und 2. Destillation	5,05%
CH ₂ O im Destillat der 3. Destillation	0,37%
	Total 5,42%

Beim Destillieren nach neuerlichem Wasserzusatz (40 cm³) konnte im Destillat kein Formaldehyd mehr nachgewiesen werden.

III. Betrachtung über die Fehlermöglichkeiten bei der Destillation.

Drei Gründe sind es, aus denen die im Destillat gefundene Formaldehydmenge zu gering sein könnte:

1. Es wurde nicht lange genug destilliert, so dass noch nicht sämtlicher abspaltbarer Formaldehyd abgespalten und übergetrieben ist. Dieser Fehler ist, wie gezeigt wurde, leicht zu erkennen und zu vermeiden.
2. Ein Teil des gebundenen Formaldehyds könnte mit dem Protein eine Bindung eingegangen sein, die durch Kochen mit verdünnten Säuren nicht mehr gespalten werden kann. Dieser Fall besitzt wenig Wahrscheinlichkeit.
3. Ein Teil des Formaldehyds wird in gebundenem oder in freiem Zustand durch Casein oder Hydrolysenprodukte von Casein in noch unbekannter Weise umgewandelt.

Wir haben Anhaltspunkte dafür, dass die beträchtlichen Formaldehydverluste beim Destillieren mit starken Säuren in der unter Punkt 3 angedeuteten Weise zustande kommen, doch sind die diesbezüglichen Versuche noch nicht abgeschlossen. Es scheinen Caseinhydrolysenprodukte zu sein, deren Gegenwart vor allem zu Formaldehydverlusten führt. Nach unveröffentlichten Versuchen von

Ch. Arber ist es auch bei unserer Destillation mit Phosphorsäure unmöglich, aus einem rohen Aminosäuregemisch, wie es durch Säurehydrolyse von Casein erhalten wird, von zugefügtem Formaldehyd mehr als 90 % herauszubringen. Dies steht im Einklang mit unserer Erfahrung, dass starke Säuren, welche eine rasche Spaltung der Peptidbindungen bewirken, ein quantitatives Überdestillieren des Formaldehyds nicht ermöglichen. Damit ist aber die Frage nach dem eigentlichen Grund für die gelegentlichen Formaldehyddefizite noch nicht beantwortet. Es schien uns deshalb im Hinblick auf die unter 2. und 3. angedeuteten Möglichkeiten wünschenswert, die Testversuche, auf denen wir unsere Analysenmethode aufgebaut hatten, in bestimmter Richtung zu ergänzen.

Gegen die Brauchbarkeit der von uns früher mitgeteilten Testversuche stiegen uns selber im Laufe der Untersuchungen nämlich folgende Bedenken auf:

Der Ansatz für die Testversuche bestand jeweils aus 0,7 g Casein und 20 cm³ einer 0,07-proz. Formaldehydlösung, enthaltend 0,0140 g Formaldehyd = 2 % vom Caseingewicht. Die Ansätze wurden nie vor dem folgenden Tage, d. h. erst nach 16 bis 24 Stunden destilliert. In dieser Zeit wird aus der äusserst verdünnten Formaldehydlösung höchstens $\frac{1}{10}$ des gesamten Formaldehyds vom Casein gebunden. Dies ergibt sich aus eigenen Versuchen über die Geschwindigkeit der Formaldehydbindung bei verschiedenen Konzentrationen¹⁾. Der Rest befindet sich bei Beginn der Destillation frei in der Lösung oder höchstens noch leicht auswaschbar im Proteingel adsorbiert. Wenn es so wäre, dass bei der Destillation mit Säure die allfälligen Verluste an Formaldehyd proportional der chemisch gebundenen Menge sind, so müsste der Fehler bei den Testversuchen, wie sie bisher ausgeführt wurden, mindestens zehnmal kleiner sein als bei der gleich durchgeführten Analyse eines gehärteten Caseins mit einem Formaldehydgehalt von 2 %, was zur Folge haben könnte, dass dieser Fehler sich der Beachtung überhaupt entzieht. Unsere Testversuche hätten dann kein richtiges Bild von der Brauchbarkeit der Destillationsweise gegeben.

Folgende Überlegungen und Versuchsergebnisse scheinen geeignet, diese Bedenken zu entkräften.

1. Der erste Gedanke war natürlich der, die Konzentration der in den Testversuchen zur Anwendung gelangenden Formaldehydlösung zu erhöhen. Sicher wird dann vom Casein mehr Formaldehyd gebunden, und es fragt sich, ob unter diesen Umständen das Formaldehyddefizit entsprechend grösser ausfällt. Wir führten eine solche Versuchsreihe durch mit dem Ergebnis, dass wir mit unserer Destillationsmethode innerhalb der Fehlergrenzen stets die ganze eingesetzte

¹⁾ Vgl. die III. Mitteilung, welche unten folgt.

Formaldehydmenge wiederfanden. Die stärkste Formaldehydkonzentration, die wir anwandten, war 2% (sonst ca. 0,02) bei 10 cm³ zugegebener Lösung. Diese Versuchsreihe sagt aber nicht sehr viel, da natürlich die Versuchsfehlerbreite — absolut in mg Formaldehyd ausgedrückt — im selben Masse zunimmt wie die total zu bestimmende Formaldehydmenge.

2. Die allfällige Abhängigkeit der Formaldehydverluste vom Verhältnis von gebundenem zu ungebundenem Formaldehyd müsste beim Destillieren mit 2-n. Schwefelsäure nach *Highberger* und *Retzsch* viel deutlicher als bei unserer Methode mit Phosphorsäure zutage treten. Wir machten deshalb folgende zwei Testversuche:

a) 0,7 g Casein + 5 cm³ 0,2-proz. Formaldehydlösung, nach 24 Stunden Destillation mit 100 cm³ 2-n. Schwefelsäure nach *Highberger* und *Retzsch*.

Formaldehyd zugesetzt.	10,17 mg = 100 %
„ gefunden.	9,13 mg = <u>89,8%</u>
Formaldehydverlust	1,04 mg = <u>10,2%</u>

b) 0,7 g Casein, dazu 100 cm³ 2-n. Schwefelsäure, dann 5 cm³ 0,2-proz. Formaldehydlösung und sofort destilliert.

Formaldehyd zugesetzt.	10,17 mg = 100 %
„ gefunden.	9,07 mg = <u>89,2%</u>
Formaldehydverlust	1,10 mg = <u>10,8%</u>

Bei Versuch b) ist wegen des sehr stark sauren Milieus und wegen mangelnder Zeit sicher praktisch überhaupt kein Formaldehyd gebunden worden. Trotzdem ist der Formaldehydverlust derselbe wie beim Versuche, bei dem die Gerbung 24 Stunden gedauert hat (Versuch a).

3. Bei unseren Testversuchen hatte das Casein, wie schon gesagt, ca. 0,1% seines Gewichtes an Formaldehyd gebunden. Die Hauptmenge des Formaldehyds (d. h. ca. das Zwanzigfache) blieb ungebunden. Die Destillation mit Schwefelsäure nach *Highberger* und *Retzsch* ergab 10% weniger Formaldehyd als unsere Destillation mit Phosphorsäure. Destilliert man aber gegerbte Caseine mit einem Gehalt von 2—3% chemisch gebundenem Formaldehyd nach der einen und nach der anderen Methode, so findet man wieder Unterschiede von ca. 10%, gelegentlich sogar weniger. Nachfolgend eine kleine Zusammenstellung solcher Analysenresultate.

Tabelle 3.

	Destillation mit H ₃ PO ₄	Destillation mit 2-n. H ₂ SO ₄	
		gef. % CH ₂ O	CH ₂ O-Verlust bez. auf ganze Menge
1. Präparat	2,05 %	1,86%	9 %
	2,048%	1,80%	12 %
2. Präparat	2,54 %	2,43%	4,3%

Die Grösse der Fehler ist also nicht abhängig davon, wieviel von der zu bestimmenden Formaldehydmenge gebunden ist. Die eingangs erhobenen Bedenken gegen die Beweiskraft unserer Testversuche für die Zweckmässigkeit der Destillation mit Phosphorsäure sind somit unbegründet.

Zusammenfassung.

Die von uns vor zwei Jahren in dieser Zeitschrift veröffentlichte Methode zur quantitativen Bestimmung des Formaldehyds in mit Formalin gehärtetem Casein (Destillation mit verdünnter Phosphorsäure und Titration des Formaldehyds im Destillat nach *Clausen*) wurde dahin abgeändert, dass nach beendeter Destillation nochmals Wasser zugesetzt und zum zweitenmal destilliert wird. Auf diese Weise gelingt es, aus allen kaltgegerbten Caseinen den Formaldehyd quantitativ abzuspalten. Bei heissgegerbten Präparaten muss am Schluss noch mit stärkerer Phosphorsäure destilliert werden. Es wird empfohlen, sich mit der Farbreaktion von *Rimini* und *Shryver* stets davon zu überzeugen, dass das Destillat am Schluss der Destillation formaldehydfrei ist. Schliesslich wurden frühere sowie neue Testversuche diskutiert und gezeigt, dass sie als Grundlage für unsere Analysenmethode der Kritik standhalten.

Bern, chemisches Institut der Universität,
Organische Abteilung.

108. Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd.

III. Quantitative Verfolgung der Formaldehydbindung bei der Härtung des Caseins mit wässrigem und mit gasförmigem Formaldehyd¹⁾

von Hs. Nitschmann und H. Hadorn.

(4. V. 43.)

Es ist seit langem bekannt, dass Eiweissstoffe Formaldehyd chemisch zu binden vermögen, und dass sie dabei in ihren Eigenschaften sehr wesentlich verändert werden. Sie verlieren u. U. ihre Löslichkeit in den bekannten Lösungsmitteln für Proteine; sofern die Eiweissstoffe an sich schon unlöslich sind, wird ihre Quellfähigkeit in Wasser usw. bedeutend herabgesetzt. Diese Begleiterscheinungen sind der Grund dafür, dass der Umsetzung mit Formaldehyd bei manchen Proteinen erhebliche praktische Bedeutung zukommt. In der Gerberei wird neben anderen Gerbmitteln auch Formaldehyd gebraucht, um den Häuten ihre grosse Quellfähigkeit in Wasser zu nehmen. Die Anwendung des Formalins als universelles Desinfektionsmittel ist lange bekannt; sie beruht darauf, dass der Formaldehyd die lebenswichtigen Proteine der betr. Mikroorganismen denaturiert. Eine interessante Anwendung findet der Formaldehyd in der Immunologie. Mit Formaldehyd vorsichtig umgesetztes Diphtherietoxin verliert seine enorme Giftigkeit, regt den

¹⁾ II. Mitteilung: Helv. 26, 1069 (1943).