

*Krebs* hat als wichtiges Kriterium zur Charakterisierung der *l*-Aminosäure-oxydase neben der Blausäure-Hemmung die hemmende Wirkung des Octylalkohols hervorgehoben. Wir möchten nochmals betonen, dass wir seine Untersuchungen an Ratten-Nierenpräparaten in vollem Umfang bestätigen konnten. Die Tatsachen jedoch, dass unter anderen experimentellen Bedingungen die *d*-Aminosäure-oxydase einerseits durch Octylalkohol kräftig gehemmt und andererseits durch Blausäure aktiviert wird, lassen es fraglich erscheinen, ob solche Kriterien zur Abgrenzung einzelner Enzym-Individuen geeignet sind.

#### Zusammenfassung.

1. Die gereinigte *d*-Aminosäure-oxydase lässt sich durch Blausäure und Pyrophosphat in eminenter Weise aktivieren.
2. Die Aktivierung erfolgt analog der Aktivierung durch Aminosäuren und Proteine.
3. Semicarbazid und Octylalkohol hemmen die gereinigte *d*-Aminosäure-oxydase.

Fräulein *Frieda Nebiker* sei für wertvolle Mithilfe bestens gedankt.

Diese Arbeit wurde dem einen (A. W.) von uns durch ein Stipendium von der *Stiftung für biologisch-medizinische Stipendien der Schweizerischen Akademie der medizinischen Wissenschaften* ermöglicht, für das er auch hier seinen herzlichsten Dank aussprechen möchte.

Basel, im Dezember 1945

Physiologisch-chemisches Institut der Universität.

### 23. Die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd.

#### VI. Über die Ursache des Versagens der Methode von *Highberger* und *Retzsch* zur quantitativen Bestimmung des Formaldehyds in gehärteten Caseinen

von Hs. Nitschmann und H. Lauener.

(21. XII. 45.)

Zu Beginn unserer Untersuchungen über die Umsetzung des Caseins mit Formaldehyd bemühten wir uns um die Ausarbeitung einer Methode zur quantitativen Bestimmung des vom Protein gebundenen Formaldehyds<sup>1)</sup>. Für formaldehydgegerbtes Kollagen lag eine sehr gute Analysenvorschrift von *Highberger* und *Retzsch*<sup>2)</sup> vor, von deren Zuverlässigkeit wir uns durch eigene Testversuche über-

<sup>1)</sup> Helv. **24**, 237 (1941) und **26**, 1069 (1943).

<sup>2)</sup> J. Am. Leather Chem. Assoc. **33**, 341 (1938).

zeugten. Beim Casein und einigen anderen Proteinen wurden mit dieser Methode jedoch regelmässig zu tiefe Werte gefunden. Nach *Highberger* und *Retzsch* wird das gegerbte Protein mit 2-n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  destilliert und der übergegangene Formaldehyd im Destillat titrimetrisch nach (*Clausen*<sup>1)</sup>) bestimmt. Es zeigte sich dann, dass der Formaldehyd auch beim Casein quantitativ abgespalten werden kann, wenn die Destillation bei viel geringerer  $\text{H}^+$ -Ionenkonzentration, beispielsweise mit 0,1-m.  $\text{H}_3\text{PO}_4$  vorgenommen wird. Eine blosser Destillation mit Wasserdampf bei neutraler Reaktion gestattet andererseits auch wieder keine vollständige Abspaltung des Formaldehyds. Der Grund für die Formaldehydverluste bei der Destillation in stark saurem Milieu konnte zunächst nicht festgestellt werden. Seine Kenntnis schien uns aber einigermaßen wichtig, denn sie würde es erleichtern, bei andern Proteinsystemen die Gefahr von Fehlanalysen zu vermeiden. Wir haben deshalb diese Frage in der Zwischenzeit weiterverfolgt. Folgende drei Möglichkeiten für das Verbleiben des nicht erfassbaren Formaldehyds wurden in Betracht gezogen:

1. Hydrierung zu Methylalkohol.
2. Dehydrierung zu Ameisensäure.
3. Irreversible Bindung an das Protein oder gewisse Abbauprodukte desselben.

1. Die Bildung von Methylalkohol konnte ausgeschlossen werden, wie die nachfolgenden Versuche zeigen.

0,7 g Casein wurde mit 100 cm<sup>3</sup> 2-n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 20 cm<sup>3</sup> Formaldehydlösung enthaltend 40,59 mg  $\text{CH}_2\text{O}$  bis auf einen Rückstand von 20 cm<sup>3</sup> destilliert<sup>2)</sup>. Das Destillat wurde mit 1 g  $\text{NaHSO}_3$  versetzt und 24 Stunden stehen gelassen (quantitative Bildung der Formaldehyd-Hydrogensulfiterverbindung). Dann wurden von dieser Lösung 50 cm<sup>3</sup> abdestilliert. In diesem Destillat befindet sich quantitativ allfällig vorhandener Methylalkohol<sup>3)</sup>, während der Aldehyd zurückgehalten wird. Die Bestimmung des Methylalkohols im zweiten Destillat geschah nach der Methode von *Wright*<sup>4)</sup>. Das Ergebnis dieser Versuche geht aus Tab. 1 hervor.

Es zeigt sich, dass bei der Destillation von 2-n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mit Casein und Formaldehyd im Destillat wohl etwas Methylalkohol nachgewiesen werden kann, jedoch nicht mehr als sich aus dem verwendeten Formalin auch in Abwesenheit von Casein herausholen lässt. Damit ist sichergestellt, dass bei der Destillation nach *Highberger* und *Retzsch* das Formaldehydefizit nicht durch die Bildung von Methylalkohol verursacht wird.

2. Falls sich Ameisensäure gebildet haben sollte, so müsste dieselbe – wie Testversuche gezeigt haben – im Destillat leicht durch Titration mit Natronlauge und Phenolphthalein erfasst werden

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **52**, 263 (1922).

<sup>2)</sup> Es war zuvor festgestellt worden, dass der Fehlbetrag an Formaldehyd genau derselbe ist, wenn man ihn vor der Destillation erst 24 Stunden auf das Casein einwirken lässt, wie wenn man Casein, Formaldehyd und  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zusammengiesst und sofort destilliert.

<sup>3)</sup> Mit Testversuchen bei dosierten Alkoholzusätzen sichergestellt.

<sup>4)</sup> C. **1927**, II, 1494.

können. Wir haben diese Probe auf flüchtige Säuren gemacht, aber nicht mehr gefunden, als sich im Blindversuch ohne Casein in dem verwendeten Formalin nachweisen liess.

Tabelle 1.

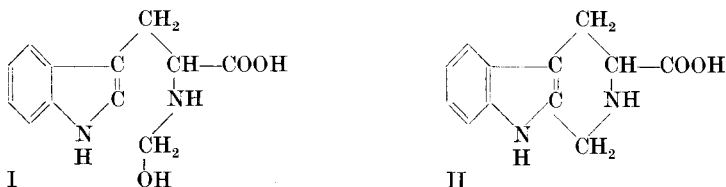
	HCHO gefunden	HCHO- Verlust	Methyl- alkohol gefunden
Versuch I. Dest. von Casein mit 100 cm <sup>3</sup> 2-n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> + 40,59 mg HCHO aus Handelsformalin	36,28 mg	4,31 mg	0,41 mg
Blindversuch: 40,59 mg HCHO aus Handelsformalin dest. mit 2-n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40,59 mg	—	0,76 mg
Versuch II. Wie Versuch I, aber 40,98 mg HCHO als Hexamethylentetramin	36,60 mg	4,38 mg	0,07 mg
Blindversuch: 40,98 mg HCHO als Hexamethylentetra- min dest. mit 2-n. H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	40,98 mg	—	0,07 mg

3. *Signer* und *Arber*<sup>1)</sup>, welche für gewisse Zwecke Caseinhydrolysat mit Formaldehyd sterilisieren wollten, haben festgestellt, dass sich der Formaldehyd aus solchen Lösungen weder mit Wasserdampf, noch beim Kochen mit verdünnter Phosphor- oder Schwefelsäure quantitativ austreiben lässt. Das Formaldehyddefizit wurde – asymptotisch einem Grenzwert zustrebend – um so grösser, je länger der Formaldehyd vor der Destillation auf das Aminosäuregemisch eingewirkt hatte. Bei Testversuchen mit reinem Glykokoll trat kein Verlust auf. *Signer* und *Arber* haben bei ihren Ansätzen mit Caseinhydrolysat auch nachgewiesen, dass aus dem fehlenden Formaldehyd keine Ameisensäure gebildet wird. Der Vergleich der Versuchsergebnisse von *Signer* und *Arber* mit unsern eigenen führte zu der Folgerung, dass nicht das Casein selber, sondern gewisse Hydrolyseprodukte desselben für die Formaldehydverluste verantwortlich sind.

Es ist zur Genüge bekannt, dass sämtliche  $\alpha$ -Aminosäuren sehr leicht mit ihrer primären Aminogruppe Formaldehyd binden. Die dabei entstehenden Anlagerungs- oder Kondensationsprodukte können jedoch alle wieder gespalten werden. Durch Kochen der wässrigen Lösungen kann der Formaldehyd – besonders leicht bei saurem  $p_H$  – quantitativ ausgetrieben werden. Besondere Verhältnisse liegen nur beim Histidin und beim Tryptophan vor. Diese beiden Amino-

<sup>1)</sup> Diss. Ch. *Arber*, Bern 1944.

säuren, welche als gemeinsames Strukturelement einen stickstoffhaltigen Fünfring in  $\beta$ -Stellung zur Carboxylgruppe haben, kondensieren sich rascher mit Formaldehyd als die übrigen Aminosäuren<sup>1)</sup> und zudem ist die Bindung eine ganz andere; sie tritt auch in saurem Medium ein, was bei den anderen Aminosäuren nicht der Fall ist. Wie von verschiedenen Autoren<sup>2)</sup> gezeigt worden ist, kondensiert sich Tryptophan mit 1 Mol Formaldehyd nach vorheriger Anlagerung an die  $\text{NH}_2$ -Gruppe (I) unter Bildung eines neuen Ringes zur 2,3,4,5-Tetrahydro- $\beta$ -carbolin-4-carbonsäure (II):



Beide Stoffe können krystallisiert erhalten werden. Der Ringschluss ist irreversibel; Verbindung II spaltet nicht einmal beim Kochen mit verdünnter Mineralsäure Formaldehyd ab (*Baudouy*<sup>3)</sup>). Wie *Gortner*<sup>4)</sup> und *Holm*<sup>5)</sup> gezeigt haben, beruht auch die bei der Säurehydrolyse von Proteinen meist beobachtete Bildung brauner Huminsubstanzen auf einer Kondensation von Tryptophan mit Aldehyden, die aus Kohlehydratresten stammen dürften. Für Histidin und Formaldehyd ist eine analoge Reaktion von *Wellisch*<sup>6)</sup> beschrieben worden. Er erhielt den Ringschluss beim Kochen von Histidin, Formaldehyd-methylacetal und konz. Salzsäure am Rückflusskühler.

Wir haben selbst in einer kleinen Versuchsreihe untersucht, ob und in welchem Masse Tryptophan und Histidin bei der Destillation mit verdünnter Mineralsäure Formaldehyd zurückhalten.

Dazu wurde die reine Aminosäure (*F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G.*) mit 100 cm<sup>3</sup> 2-n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und einer bekannten Menge Formaldehyd versetzt und diese Mischung sofort mit Wasserdampf destilliert. Der mit 400 cm<sup>3</sup> Destillat übergegangene Formaldehyd wurde wie früher beschrieben<sup>7)</sup> bestimmt.

Die Tab. 2 zeigt, dass besonders Tryptophan sehr beträchtliche Mengen Formaldehyd zurückhält. Bemerkenswert ist die Tatsache, dass mit der starken Schwefelsäure viel mehr Formaldehyd irrever-

<sup>1)</sup> *Holden* und *Freeman*, Austral. J. exp. Biol. med. Sc. **8**, 189 (1931).

<sup>2)</sup> *Hahn*, *Bärwald*, *Schales* und *Werner*, A. **520**, 107 (1935); *Jacobs* und *Craig*, J. Biol. Chem. **113**, 759 (1936); *Wadsworth* und *Pangborn*, J. Biol. Chem. **116**, 423 (1936); *Harvey* und *Robson*, *Harvey*, *Miller* und *Robson*, Soc. **1941**, 152.

<sup>3)</sup> *Baudouy*, C. **1943**, II, 2160.

<sup>4)</sup> J. Biol. Chem. **26**, 199 (1916).

<sup>5)</sup> Am. Soc. **39**, 2494 (1917).

<sup>6)</sup> Bioch. Z. **49**, 182 (1913).

<sup>7)</sup> Helv. **26**, 237 (1941).

sibel gebunden wird als mit der schwachen Phosphorsäure. Während im zweiten Falle ziemlich genau 1 Mol  $\text{CH}_2\text{O}$  pro Mol Tryptophan fixiert wird, bewirkt die Schwefelsäure die Aufnahme von fast 2 Molen. Dabei tritt auch Braunfärbung ein (Huminsubstanzen), was mit Phosphorsäure nicht der Fall ist. Über das Versagen der Methode von *Higberger* und *Retzsch* kann jetzt kein Zweifel mehr bestehen. Sehr stark saures Milieu ist aus zwei Gründen ungünstig.

Tabelle 2.

Aminosäure	Aminosäure zugegeben in mg	Theoret. Bindungsverm. (1:1) für HCHO	HCHO zugegeben in mg	HCHO-Verluste		Bemerkungen
				mg	%	
Histidin	181,6	24,0 mg	97,5	2,4	2,3	sehr langsam destilliert
	179,4	23,7 mg	47,7	2,0	4,2	
Tryptophan	72,9	10,7 mg	47,7	18,0	37,7	Lösg. wird b. Erwärmen gelb, dann braun
Tryptophan	36,0	5,3 mg	47,7	5,1	10,7	mit 0,1-mol. $\text{H}_3\text{PO}_4$ destill., ohne Verfärbung

Einmal wird das Protein zu rasch hydrolytisch abgebaut. Noch bevor der Formaldehyd quantitativ abgespalten und abgetrieben ist, können Tryptophan und Histidin in Freiheit gesetzt werden und sich dann mit Formaldehyd in der bekannten Weise kondensieren. Die Reaktion dürfte auch schon eintreten, wenn die  $\alpha$ -Aminogruppe frei, die Carboxylgruppe aber noch gebunden ist. Dazu kommt nun noch, dass diese Kondensation selber durch eine hohe  $\text{H}^+$ -Ionenkonzentration begünstigt wird. Solange das Tryptophan in der Proteinmolekel eingebaut ist, tritt – mindestens bei der Härtung in der Kälte – keine ringschliessende Kondensation mit dem Formaldehyd ein. Dies ist durch unsere vielen Testversuche bewiesen. Bei der Heissgerbung ( $70^\circ$ ), über die in einer nachfolgenden Mitteilung berichtet wird, scheint allerdings mit dieser Reaktion gerechnet werden zu müssen.

Es bleibt nur noch zu ermitteln, ob die Formaldehydverluste, nicht das Bindungsvermögen des im Casein enthaltenen Tryptophans übersteigen. In diesem Falle wäre noch nach weiteren Fehlerquellen zu suchen. Der Aminosäurebestand des Caseins ist von verschiedenen Autoren quantitativ untersucht worden. Die Werte gehen stark auseinander: Histidin 1,8–5,9%, Tryptophan 0,7–2,0%. Wenn man annimmt, dass die höchsten Werte die richtigeren sind, und dass Tryptophan 2 Mole  $\text{CH}_2\text{O}$  und Histidin  $\frac{1}{10}$  Mol bindet (vgl. Tab. 2), so kommt man zum Grenzwert von 0,9 g  $\text{CH}_2\text{O}$  pro

100 g Casein in irreversibler Bindung. Die tatsächlich gefundenen Formaldehyddefizite bei der *Highberger*'schen Methode liegen bei kaltgegerbten Caseinen bei ca. 10% des gefundenen Wertes für  $\text{CH}_2\text{O}$ , betragen also 0,2–0,3 g pro 100 g Casein. Sogar bei extremen Bedingungen (240tägige Einwirkung von Formaldehyd auf Caseinhydrolysat) fanden *Signer* und *Arber*<sup>1)</sup> nicht mehr als 0,8 g  $\text{CH}_2\text{O}$  pro 100 g Casein irreversibel gebunden.

Kollagen und Gelatine enthalten überhaupt kein Tryptophan und nur sehr wenig Histidin<sup>2)</sup>. Dies ist der Grund, warum die Methode von *Highberger* und *Retzsch* hier sehr gute Resultate liefert.

Als praktische Schlussfolgerung ergibt sich, dass ganz allgemein bei Tryptophan- und Histidin-haltigen Proteinen die Formaldehydbestimmung umso ungenauer werden muss, je kräftiger gegerbt wurde und je schwerer die letzten Formaldehydanteile hydrolytisch abgespalten werden. Ein teilweiser Abbau des Proteins wird dann unvermeidlich, was zwangsläufig zu einem mehr oder weniger grossen Formaldehyddefizit führen muss.

#### Zusammenfassung.

Es wurde gezeigt, warum der Formaldehyd aus kalt gegerbten Caseinen beim Destillieren mit verdünnten Säuren nur dann quantitativ abgespalten und bestimmt werden kann, wenn die H-Ionenkonzentration nicht zu gross ist. Die sonst (z. B. mit 2-n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) auftretenden Formaldehyddefizite kommen dadurch zustande, dass gleichzeitig mit dem Formaldehyd Tryptophan und Histidin hydrolytisch aus dem Protein in Freiheit gesetzt werden. Beide Aminosäuren, besonders aber Tryptophan, reagieren auch mit verdünntem Formaldehyd in bekannter Weise unter Kondensation und Ringschluss. Diese Reaktion wird durch starke Säuren sehr beschleunigt und ist irreversibel.

Bern, Institut für allgemeine und spezielle organische Chemie.

---

<sup>1)</sup> Diss. *Ch. Arber*, Bern 1944.

<sup>2)</sup> *Gerngross*, Chemie und Technologie der Leim- und Gelatinefabrikation.