

Ueber Verbindungen der Eiweisskörper mit Aldehyden.

Von
Dr. Leo Schwarz (Prag).

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 42.)

(Der Redaction zugegangen am 27. November 1900.)

Bei der ungemeynen Reactionsfähigkeit der Aldehyde einerseits, der Eiweisskörper andererseits ist von vornherein zu erwarten, dass sie auf einander leicht einwirken. Nähere Angaben in dieser Richtung liegen aber nur in Betreff des Formaldehyds vor, der wegen seiner hohen Desinfectionswirkung und seiner Fähigkeit, Gewebe zu fixiren und in natürlicher Färbung zu erhalten, besondere Aufmerksamkeit auf sich gelenkt hat.

Blum¹⁾ in Frankfurt hat anscheinend zuerst die bemerkenswerthe Thatsache festgestellt, dass Eier- und Serumalbumin durch Zusatz von Formaldehyd seine Coagulirbarkeit in der Hitze einbüsst. Als weiteres Merkmal der so erhaltenen Methylenverbindungen der Albumine bezeichnete er deren Fällbarkeit durch Säuren, durch concentrirten Alkohol und durch Aceton bei erhaltener Löslichkeit auf neuerlichen Wasserzusatze. Bach²⁾ brachte bald darauf eine Bestätigung dieser Angaben bei, Benedicenti³⁾ ergänzte sie in mehrfacher Richtung. Er liess Gelatine, Fibrin, Casein, Blutserum und Eieralbumin längere Zeit mit Formaldehydlösung in Berührung und constatirte titrimetrisch eine Abnahme des Formaldehydgehaltes der Lösung. Die «Formaldehydproteine» waren in

1) Diese Zeitschr., Bd. XXII. 1896/97, S. 127.

2) Archives des sciences physiques et naturelles. Bd. 3, 1897, S. 88.

3) Arch. f. Physiologie 1897, S. 219.

wesentlichen Eigenschaften vom Ausgangsmaterial verschieden. So wurde Gelatine gehärtet und unlöslich, Blutserum gallertig. Fibrin und Casein verloren ihre Quellbarkeit und wurden, ebenso wie auch das Eiereiweiss, unverdaulich. Durch Erhitzen im Dampfstrom wurde Formaldehyd wieder abgespalten und die Produkte gewannen ihre ursprünglichen Eigenschaften wieder.

Den im Nachfolgenden mitgetheilten Versuchen lag die Absicht zu Grunde, über die chemische Natur der Eiweissaldehydverbindungen Näheres zu erfahren. Um sicher zu gehen, war dazu nothwendig, als Ausgangsmaterial homogene krystallisirte Eiweisskörper zu benützen und die Versuche nicht auf den Formaldehyd zu beschränken.

I. Darstellung, Eigenschaften. Zusammensetzung von Aldehydeiweissverbindungen.

A. Versuche mit krystallisirtem Serumalbumin.

Zur Darstellung der Serumalbuminkrystalle aus Pferdeblutserum bediente ich mich des combinirten Ammonsulfatschwefelsäureverfahrens, wie es von Pemsel im hiesigen Institute ausgearbeitet worden ist.¹⁾ Die mindestens einmal umkrystallisirten Serumalbuminkrystalle wurden in möglichst wenig destillirtem Wasser gelöst und zur Entfernung des anhaltenden Ammonsulfats ausgiebiger Dialyse unterworfen.

1. Einwirkung von Formaldehyd.

In Verwendung kam das 40%ige «Formalin» des Handels. Wenige Tropfen dieser Formaldehydlösung reichen bereits hin, um einige Cubikcentimeter der Serumalbuminlösung beim Erhitzen uncoagulirbar zu machen. Man kann die Lösung beliebig lange im Kochen erhalten, ohne dass Trübung eintritt. Sowohl die gekochte, als die ungekochte Lösung bleibt beim Stehen unbegrenzte Zeit klar. Die Lösungen behalten ihre Ungerinnbarkeit beim Wiedererhitzen bei. Concentrirte Ammonsulfatlösung erzeugt Fällung noch vor Halbsättigung. Der Niederschlag ist in Wasser nicht so leicht löslich, wie ausgesalzenes Serumalbumin. Doch löst er sich vollständig.

¹⁾ Siehe Krieger, Ueber die Darstellung krystallinischer thierischer Eiweissstoffe. Inaug.-Diss. Strassburg 1898.

96%iger Alkohol, sowie absoluter Alkohol bewirken keine Fällung.¹⁾ Nur durch Alkoholäther ist eine flockige Ausfällung zu erzielen. Dieser Niederschlag ist nur frisch nach der Fällung und in grösserem Ueberschusse von destillirtem Wasser löslich, nach einigem Stehen oder nach Aufkochen geht er im Wasser nicht mehr in Lösung. Jedenfalls ist die Wasserlöslichkeit des Niederschlages gering. Aceton fällt nur unvollkommen. Der Niederschlag ist in Wasser unlöslich. Die Fällung durch Aceton scheint um so unvollständiger zu erfolgen, je länger der Formaldehyd auf das Serumalbumin eingewirkt hat.

Da das verwendete Formaldehydpräparat schwach sauer reagirte, musste an die Möglichkeit gedacht werden, dass diese saure Reaction bei der Ungerinnbarkeit in der Hitze eine Rolle spielt. Doch bleibt die Aldehydeiweisslösung auch nach dem Abstumpfen der sauren Reaction ungerinnbar.

Bei einem Versuche wurde in eine Serumalbuminlösung mit Soda neutralisirte Formaldehydlösung in kleinen Portionen eingetragen. Nachdem eine Probe noch Gerinnung gezeigt hatte, wurden weiter einige Cubikcentimeter Formaldehydlösung zugesetzt. Da erfolgte plötzlich diffuse Trübung mit nachfolgender Abscheidung eines flockigen Niederschlages. Dieser Niederschlag war in Wasser unlöslich, er ging auch weder in einem Säure- noch in einem Alkaliüberschuss in Lösung.

Trotz wiederholter Versuche ist es später nicht wieder gelungen, eine derartige Fällung zu erzielen.

Von den weiteren Reactionen, die mit der Formaldehydserumalbuminlösung angestellt wurden, seien die folgenden hier angeführt:

Chlorcalcium, Magnesiumsulfat: kein Niederschlag.

Eisenchlorid: Niederschlag, im Ueberschuss des Fällungsmittels löslich.

Kupfersulfat: leichte, wolkige Trübung.

Zinksulfat, Bleiacetat: dichte Fällung.

Essigsäure-Ferrocyankalium, Sublimat, Jodquecksilberkalium, Metaphosphorsäure, Tannin: massiger Niederschlag.

¹⁾ Auch Bach (l. c.) hat beobachtet, dass die Coagulirbarkeit seines Präparates durch Alkohol geringer war, als die des genuinen Eiweisses.

Kochen mit Natronlauge und Bleiacetat: Bräunung, beim Stehen reichliche Abscheidung von Schwefelblei.

Biuretprobe mit Kupfersulfat: Violettfärbung.

Millon'sche Reaction: positiv.

Xanthoproteinprobe: positiv.

Reactionen nach Molisch, Adamkiewicz, Liebermann: negativ.

Zahlreiche und mannigfach variirte Versuche, die Eiweiss-Formaldehydverbindung zur Krystallisation zu bringen, sind resultatlos verlaufen. Die Abscheidung erfolgte immer amorph.

Die zur Analyse bestimmten Präparate wurden aus salzfreier Serumalbuminlösung auf verschiedene Weise hergestellt. Bei der ersten Serie von Präparaten wurde sofort nach dem Aldehydzusatz mit Alkoholäther gefällt, der Niederschlag mit Wasser aldehydfrei gewaschen, dann nochmals mit Alkoholäther behandelt und schliesslich im evacuirten Exsiccator getrocknet. Auf die Trocknung bei 100° bis zur Gewichtconstanz wurde verzichtet, nachdem die Erfahrung gelehrt hatte, dass bei dieser Procedur nicht nur Wasser weggeht, sondern auch Aldehyd abgespalten wird.

Bei einer zweiten Serie von Präparaten wurde die Alkoholätherfällung erst nach zweimonatlichem Stehen der Aldehydeiwesslösungen vorgenommen, sonst wie früher verfahren. Es galt zu untersuchen, ob längere Berührung des Eiweisses mit Aldehyd den Eintritt von Aldehydgruppen in das Eiweissmolekül begünstigt.

Benedicenti (l. c.) hat nämlich bis zur Grenze von ungefähr drei Wochen bei seinen titrimetrischen Bestimmungen um so weniger freien Formaldehyd in den Proben gefunden, je länger die verschiedenen Eiweisskörper mit dem Formaldehyd in Berührung gewesen waren. Auch Muraközy¹⁾ findet, dass die Wirkung des Formaldehyds auf Eiweisskörper bei längerem Stehen zunehme.

Die mit Formaldehyd hergestellten Präparate bilden ein farbloses Pulver, sind auffallend schwer löslich, schwerer als sonst coagulirtes Eiweiss. Beim Kochen mit Natronlauge tritt nur allmählig Lösung ein unter Gelbfärbung der Flüssigkeit.

¹⁾ Ref. im Jahresber. für Thier-Chemie Bd. 28. für 1898, S. 255.

In Eisessig und in concentrirter Schwefelsäure erfolgt auch beim Erwärmen nur mangelhafte Lösung.

Um sicher zu sein, dass den so gewonnenen Präparaten kein freier Aldehyd mehr anhafte, wurde mit einem Formaldehydpräparate die Bayer'sche Phloroglucinsalzsäurereaction¹⁾ zum Nachweise freien Formaldehyds angestellt. Die Reaction verlief negativ. Die Lösung färbte sich zwar beim Erwärmen gelblich, aber es trat keine Trübung mit Abscheidung gelbrother Flocken ein, wie dies schon bei Gegenwart von Spuren von Formaldehyd der Fall ist.

Diese Reaction weist allerdings auch gebundenen Formaldehyd, also die CH_2 -Gruppe, nach. Aber sie tritt nicht mit allen Methylenverbindungen ein, z. B. nicht mit Methylenzuckersäure und Methylenweinsäure²⁾. Ebenso, wie nun hinzugefügt werden kann, auch nicht mit « Methylenserumalbumin ».

Dass diese Bezeichnung berechtigt ist, dürfte aus der Betrachtung der Analysenergebnisse hervorgehen.

Formaldehyd-Serumalbumin.

a) Kurze Einwirkung.

Präparat I.

	a)	b)	Mittel
C	51,38 %	51,18 %	51,28 %
H	7,36 %	7,42 %	7,39 %
N	14,26 %	14,10 %	14,18 %

100 N = 362 C.

Präparat II.

C	48,17 %
H	7,33 %
N	13,42 %

100 N = 359 C.

b) Lange Einwirkung.

Präparat III.

	a)	b)	Mittel
C	52,01 %	52,22 %	52,12 %
H	7,33 %	7,38 %	7,36 %
N	14,01 %	13,88 %	13,95 %

100 N = 381 C.

¹⁾ S. Ber. der deutschen chem. Gesellsch., Bd. 5. 1872. S. 1094 und Bd. 25. 1892. S. 3213.

²⁾ S. Weber und Tollens, Ber. der deutschen chem. Gesellsch., Bd. 30/III, 1897. S. 2511.

2. Einwirkung von Acetaldehyd.

Trägt man Acetaldehyd¹⁾ in eine Serumalbuminlösung ein, so entsteht zunächst eine Trübung, die aber nicht von einer Fällung herrührt, sondern von der Bildung einer Emulsion. Beim Erwärmen nimmt die Trübung anfangs zu, bald aber erfolgt völlige Klärung. Die Acetaldehyd-Serumalbuminlösung bleibt nach dem Kochen dauernd klar, bei längerem Stehen nimmt sie einen röthlichgelben Stich an.

In den Fällungsreactionen verhält sich die Lösung im Wesentlichen wie die Formaldehyd-Serumalbuminverbindung. Alkohol erzeugt auch hier keine Fällung. Der Alkoholätherniederschlag der aufgekochten Lösung ist noch weniger wasserlöslich, als der Niederschlag der nicht gekochten Lösung.

Erwähnt sei, dass die Acetaldehydverbindung sich beim Neutralisiren etwas anders verhält, als die Formaldehydverbindung. Stumpft man die von der sauren Reaction des Aldehyds her sauer reagirende Lösung mit Soda ab, so tritt, sobald neutrale Reaction erreicht ist, regelmässig ein Niederschlag auf, der im geringsten Ueberschusse von Säure sowohl als von Alkali mit grosser Leichtigkeit in Lösung geht. Für die Analyse wurden die Präparate mit Acetaldehyd genau so dargestellt, wie oben für Formaldehyd angegeben wurde. Nach dem Trocknen im Vacuum waren sie gelbroth gefärbt, im Uebrigen boten sie das Verhalten der Formaldehydverbindung dar.

Die Analyse des bei kurzer Einwirkung erhaltenen Präparates ergab:

Acetaldehyd-Serumalbumin.

Präparat IV.

	a)	b)	Mittel	
C	53.45 %	53.38 %	53.42 %	
H	7.34 %	7.28 %	7.31 %	100 N = 413 C.
N	13.10 %	12.77 %	12.94 %	

¹⁾ Das Präparat wurde vor der Verwendung überdestillirt.

Das durch lange Acetaldehydeinwirkung erhaltene Präparat enthielt:

Präparat V.

	a)	b)	Mittel	
C	55,63 %	55,35 %	55,49 %	
H	7,54 %	7,66 %	7,60 %	100 N = 431 C.
N	13,00 %	12,73 %	12,87 %	

3. Einwirkung von anderen Aldehyden.

Propionaldehyd verhält sich gegen Serumalbumin fast genau wie Acetaldehyd. Die mit Propionaldehyd gekochte Albuminlösung trübt sich beim Erkalten wieder. Die Reactionen der Lösung und die Lösungsverhältnisse des Alkoholätherniederschlags entsprechen jenen des Acetaldehydproduktes.

Durch Oenanthaldehyd wurde die Gerinnbarkeit des Serumalbumins beim Kochen nicht völlig aufgehoben. Wahrscheinlich coagulirt das Serumalbumin allein, ohne dass mit dem Aldehyd, der nach Massgabe seiner geringeren Löslichkeit weniger reactionsfähig ist, eine Verbindung eingetreten wäre.

Als gänzlich unfähig, die Gerinnung hintanzuhalten, erwiesen sich Isovaler- und Isobutyraldehyd. Sie liefern eine Emulsion, aus der sich beim Erhitzen und auch beim Stehen Häutchen oder Flocken abscheiden.

Anders verhalten sich die aromatischen Aldehyde. Bei Zusatz von Benz- und Salicylaldehyd zur Serumalbuminlösung entsteht eine dichte, milchige Emulsion: beim Erhitzen tritt keine Coagulation ein, die Trübung wird vielmehr geringer. Völlige Aufhellung erfolgt durch Zusatz von Alkohol. Dieser nimmt die überschüssigen suspendirten Aldehydtröpfchen auf. Die alkoholische Lösung ist durch Aether fällbar.

Die Darstellung des zur Analyse bestimmten Präparates erfolgte in der oben für die Form- und Acetaldehydverbindungen angegebenen Weise mit Fällung nach nur einstündigem Stehen. Hier das Ergebniss der Doppelanalyse:

Benzaldehyd-Serumalbumin (kurze Einwirkung)
Präparat VI.

	a)	b)	Mittel
C	52.36 ‰	52.36 ‰	52.36 ‰
H	6.82 ‰	6.94 ‰	6.88 ‰
N		14.27 ‰	14.27 ‰

100 N = 367 C

4. Einfluss des Salzgehaltes auf die Bildung der Aldehydeiweissverbindungen.

In der geschilderten Weise liegen die Verhältnisse bei der Vereinigung der Aldehyde mit ausdialysirtem, also salzfreiem oder wenigstens sehr salzarmem Serumalbumin. Bringt man hingegen eine Lösung von Serumalbuminkristallen, ohne sie durch Dialyse vom Ammoniumsulfat befreit zu haben, mit den verschiedenen Aldehyden zusammen, so ergeben sich vielfach andere Fällungserscheinungen. Durch den Salzgehalt wird, wie auch sonst zumeist, die Fällung begünstigt.

Schon für den Formaldehyd ist eine Differenz erweislich. Während die salzfreie Verbindung, wie betont, auch durch absoluten Alkohol nicht fällbar ist, wird die salzhaltige Verbindung bereits durch 96% igen Alkohol gefällt. Ebenso bewirkt Aceton flockige Fällung.

Noch deutlicher sind die Unterschiede, die der Salzgehalt der Lösung bewirkt, bei den anderen Aldehyden. In ammoniumsulfathaltiger Serumalbuminlösung erzeugt ein grosser Ueberschuss von Acetaldehyd oder von Propionaldehyd Trübung, die anfangs noch beim Umschütteln verschwindet, bei weiterem Aldehydzusatz aber bestehen bleibt; schliesslich fallen Flocken aus, die sich beim Erwärmen zusammenballen.

Benzaldehyd und Salicylaldehyd aber erzeugen sofort, schon bei Zusatz weniger Tropfen zur salzhaltigen Albuminlösung, Fällung.

B. Versuche mit Eieralbumin, Serumglobulin, Edestin, Heteroalbumose, jodirtem Eieralbumin.

1. Eieralbumin.

Die Coagulirbarkeit einer Lösung von krystallisirtem Eieralbumin wird durch die Aldehyde nur dann aufgehoben, wenn die Lösung salzfrei ist. Bei starkem Salzgehalt erfolgt auch durch Formaldehyd schon in der Kälte Fällung.

Ebenso gilt für das Eierklar die Aufhebung der Gerinnbarkeit beim Kochen durch Formaldehyd nur für verdünnte

Lösungen. Blum (l. c.) und Bach (l. c.) haben mit solchen gearbeitet. Eierklar direkt mit Formaldehyd behandelt gibt zunächst ein gelatinöses Produkt, das beim Erkalten nicht gerinnt. Bei weiterem Zusatz entsteht schon in der Kälte Trübung, durch einen grossen Ueberschuss von Formaldehyd bildet sich eine starre Gallerte.

So besteht also die älteste Angabe über die Wirkung von Formaldehyd auf Eiweiss von Trillat¹⁾ zu Recht und der Widerspruch mit den späteren Beobachtungen ist nur ein scheinbarer. Sie lautet: L'aldéhyde formique coagule l'albumine, avec laquelle elle donne une masse transparente et d'aspect gélatineux.

2. Serumglobulin.

Wenn man eine Serumglobulinlösung möglichst lange ausdialysirt, bis nur noch so viel Ammonsulfat vorhanden, als zur Lösung des Globulins nothwendig ist, so zeigt sie Aldehyden gegenüber das nämliche Verhalten, wie die salzfreie Serumalbuminlösung. Nur nehmen die Lösungen bei längerem Stehen milchige Opalescenz an.

Die salzhaltige Globulinlösung gibt mit geringen Mengen von Formaldehyd eine klare, hitzebeständige Lösung, aus der später kleine Flocken ausfallen. Beim Zusatz eines Ueberschusses von Formaldehyd nimmt die vorher klare Lösung Opalescenz an, die rasch zunimmt. Innerhalb weniger Minuten bildet sich eine dicke Gallerte, so dass man die Eprouvette umstülpen kann. Acet- und Propionaldehyd erzeugen sofort flockigen Niederschlag, Benz- und Salicylaldehyd voluminöse Fällung.

Versetzt man Blutserum (vom Pferde) direkt mit Formaldehyd, so erhält man eine klare Lösung, die beim Kochen nicht gerinnt. Nach 24stündigem Stehen tritt jedoch starke Trübung ein, und nach einigen Tagen bildet sich, wie bereits Benedicenti (l. c.) beobachtet hat, eine compacte Gelatine. Acet- und Propionaldehyd erzeugen schon in der Kälte massige Fällung und die ganze Masse wird sofort starr gallertig.

1) Compt. rend. de l'Acad. d. Sc. Bd. 114. 1892, S. 1278.

3. Edestin.

Das schön krystallisirte Präparat¹⁾ wurde unter Zusatz von etwas Soda gelöst und blieb mit neutral reagirendem Formaldehyd drei Tage lang stehen.²⁾ Dann wurde mit Salzsäure gefällt, der Niederschlag mit Wasser und mit Alkoholäther chlor- und aldehydfrei gewaschen und lufttrocken analysirt.

Die Doppelbestimmung des Präparats ergab folgende Werthe:

Formaldehyd-Edestin.

Präparat VII.

	a)	b)	Mittel	
C	48,27 %	47,84 %	48,06 %	
H	7,33 %	7,44 %	7,39 %	100 N = 291 C.
N	16,50 %	16,52 %	16,51 %	

4. Heteroalbumose des Fibrins.

Das mir von Herrn Dr. Pick freundlichst zur Verfügung gestellte Präparat von Heteroalbumose wurde in warmem Wasser gelöst, warm filtrirt und sofort mit Formaldehyd versetzt. Am nächsten Tage wurde mit Alkoholäther gefällt und der weisse flockige Niederschlag, nachdem er aldehydfrei gewaschen, lufttrocken analysirt.

Hier sei noch erwähnt, dass auch die Heteroalbumose gleich nach dem Zusatz von Formaldehyd ihre Fällbarkeit einbüsst. Beim Stehen erfolgt allerdings Trübung, die nach mehreren Tagen in Coagulation übergeht.

Die Analyse ergab Folgendes:

Formaldehyd-Heteroalbumose.

Präparat VIII.

C	48,86 %	
H	7,49 %	100 N = 356 C.
N	13,71 %	

¹⁾ Präparat der Höchster Werke.

²⁾ In einer stark salzhaltigen Edestinlösung entsteht bei Formaldehydzusatz ein Niederschlag.

5. Jodirtes Eieralbumin.

Von Interesse für die Deutung der Aldehydanlagerung schien die Beantwortung der Frage, ob Formaldehyd noch in ein Eiweissmolekül eintritt, das bereits eine andere Verbindung eingegangen ist. Dazu wurde ein von Herrn Professor Hofmeister aus krystallisirtem Eieralbumin dargestelltes Präparat von Jodalbumin benützt.

Das Präparat wurde unter Zusatz von wenig Soda in Wasser gelöst. Diese Lösung wurde mit einer neutralen Formaldehydlösung versetzt und so eine Woche stehen gelassen. Alkohol, Aether, Ligroin erzeugen keine Fällung, wohl aber Salzsäure. Der salzsaure Niederschlag wurde zur Entfernung der Salzsäure und des Formaldehyds mit Wasser, Alkohol und Aether gewaschen und lufttrocken analysirt.

Die Doppelanalyse des so mit Formaldehyd behandelten Jodalbumins lieferte folgende Werthe:

Präparat IX.

	a)	b)	Mittel	
C	44.83 %	44.56 %	44.70 %	
H	6.77 %	6.73 %	6.75 %	100 X = 337 C.
N	13.49 %	13.38 %	13.29 %	

II. Chemischer Vorgang bei der Aldehydanlagerung.

Bei dem complicirten Bau der Eiweissstoffe und unserer unzureichenden Kenntniss desselben können Vorstellungen über die Art der im Vorliegenden beschriebenen Reaction nur auf Wahrscheinlichkeit Anspruch erheben. Blum hat (l. c.) die Vermuthung ausgesprochen, dass der Formaldehyd, sei es mit Amingruppen, sei es mit Hydroxylgruppen, unter Wasser- Austritt in Reaction tritt, so dass Methylenverbindungen der Albumine resultirten.

Hiermit ist jedoch die Zahl der gegebenen Möglichkeiten bei Weitem nicht erschöpft, da der Stickstoff im Eiweiss nur zum Theil in Aminform, vermuthlich überwiegend als Imin-

rest und in tertiär gebundener Form¹⁾ vorhanden ist, und da überdies bei hippursäureartiger Bindung $-\text{CO} \cdot \text{NH} \cdot \text{CH}_2 \cdot \text{CO}-$ die Anlagerung des Aldehyds auch an ein dem N benachbartes C-Atom (der CH_2 -Gruppe) erfolgen kann.

Ferner ist zu beachten, dass eine einzige NH_2 -Gruppe zur Anlagerung von zwei, vielleicht von noch mehr Aldehydresten Veranlassung geben kann.²⁾ Auch die SH-Gruppe des Eiweisses könnte eine besondere Rolle spielen.

Da die Spaltung der Eiweisskörper vorwiegend Aminosäuren der Fettreihe liefert, wird man immerhin in erster Reihe an Verbindungen etwa analog dem von H. Schiff³⁾ dargestellten Monomethylenasparagin denken, in zweiter Reihe, so weit es sich um Eiweisskörper mit einer Kohlenhydratgruppe handelt, an Produkte, wie sie Tollens⁴⁾ und seine Schüler bei der Einwirkung von Formaldehyd auf mehrwerthige Alkohole und Säuren der Zuckergruppe erhalten haben. Auch in diesen Fällen reagirt der Formaldehyd derart, dass sein Sauerstoff mit 2 H der beigemengten Körper H_2O bildet und Methylen, CH_2 , statt des Wasserstoffes eintritt.

Zur Beurtheilung dieser Möglichkeiten ist zunächst erforderlich, ein Urtheil darüber zu gewinnen, wie viel Aldehydgruppen in das Eiweissmolekül eintreten und in wie weit daher sonstige chemische Umwandlungen im Eiweiss sich vollziehen. Darüber geben die Elementaranalysen Aufschluss.

Da die Produkte, wie oben erwähnt, wegen ihrer Zersetzlichkeit nicht bis zur Gewichtskonstanz getrocknet wurden, sondern lufttrocken analysirt sind, so ist auf den absoluten Gehalt an den einzelnen Elementarbestandtheilen kein Gewicht zu legen: denn dieser ist natürlich durch den wechselnden Wassergehalt stark beeinflusst. So musste auch darauf verzichtet werden, Molekularformeln aufzustellen. Aber, worauf es bei der Beurtheilung, ob und wie viel Aldehydgruppen in

1) S. Paal, Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 29, 1896, S. 1086.

2) S. Erlenmeyer jun., Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 30, 1897, S. 2896.

3) Chemiker-Zeitung, Bd. 23, 1899, S. 20.

4) S. Ber. d. d. chem. Ges., Bd. 27 II, 1894, S. 1892 und Bd. 30 III, 1897, S. 2510.

das Eiweissmolekül eingetreten sind, ankommt, das ist das Verhältniss zwischen Stickstoff und Kohlenstoff. Es wurde also für jedes Präparat berechnet, wie viel Atome C auf 100 Atome N entfallen.

Da eine Abspaltung von Stickstoff durch die Aldehyd- einwirkung nicht erfolgt, so kann der Stickstoffgehalt der verwendeten reinen Eiweisskörper zur Grundlage der weiteren Berechnung gemacht werden. Die Veränderungen, die das Verhältniss von N- und C-Atomen durch die Aldehydanlagerung erfährt, ist aus nachstehender Tabelle ersichtlich:

Präp.	Verwendeter Eiweisskörper	darin N : C	Verwendeter Aldehyd	Dauer der Einwirkung	im Produkt N : C	Zunahme der C-Atome auf 100 N	Zahl der eingetretenen Aldehydmoleküle auf 100 N
I.	Serumalbumin	100 : 3381)	Formaldehyd	sehr kurz	100 : 362	24	24
II.	100 : 359	21	21
III.	2 Monate	100 : 381	43	43
IV.	Acetaldehyd	kurz	100 : 413	75	37.5
V.	2 Monate	100 : 431	93	46.5
VI.	Benzaldehyd	1 Stunde	100 : 367	29	4
VII.	Edestin	100 : 2722)	Formaldehyd	3 Tage	100 : 291	19	19
VIII.	Heteroalbumose	100 : 3073)	..	1 Tag	100 : 356	49	49
IX.	jodirt. Ovalbumin	100 : 3364)	..	7 Tage	100 : 337	1	1

Bei Durchsicht dieser Tabelle ergeben sich merkliche Verschiedenheiten je nach der Art des verwendeten Eiweisskörpers und Aldehyds. Benzaldehyd reagiert ungleich träger auf Serumalbumin als Acet- und Formaldehyd. Heteroalbumose nimmt unter gleichen Umständen mehr, Edestin weniger Formaldehyd auf, das jodirte Ovalbumin gar keines: denn das gefundene Plus von 1C entspricht einer Er-

1) Berechnet nach Michel-Gürber, Serumalbuminkristalle, Würzburg (Stahel), 1895 (C = 53.04, N = 15.71).

2) Berechn. nach Ritthausen und Osborne im Mittel (C = 51.13, N=18.78) (s. Ref. Jahresh. f. Thierchemie Bd. 12 und 23).

3) Berechnet nach Ernst P. Pick, diese Zeitschr., Bd. XXVIII, 1899, S. 219.

4) Berechnet nach Hofmeister, diese Zeitschr., Bd. XXIV, 1898, S. 159.

höhung des C-Procentgehaltes um nicht ganz 0,2%, fällt also innerhalb der Fehlergrenzen der Analyse.

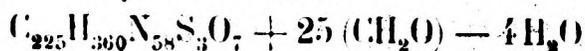
Zieht man nun die nach der Darstellung vergleichbaren Präparate in Betracht (Serumalbumin und die beiden einfachsten Aldehyde), so ergibt sich:

1. dass die Zahl der eintretenden Aldehydgruppen mit der Dauer der Einwirkung steigt,

2. dass bei sehr langer, maximaler Einwirkung die Zahl der eingetretenen Aldehydgruppen bei beiden Aldehyden nahezu gleich ist (43 bzw. 46,5 Moleküle auf 100 N-Atome).

Nach den oben entwickelten Vorstellungen dürfte die Anlagerung von Aldehyd mit Abspaltung einer gleichen Anzahl von Wassermolekülen verknüpft sein. Da aber die Präparate wegen Gefahr der Zersetzung nur bei Zimmertemperatur getrocknet werden konnten, bringen die Analysen nur einen kleinen Theil dieses Wasserverlustes zum Ausdruck. Sie zeigen aber doch, dass eine anderweitige Veränderung im Eiweissmolekül nicht Platz gegriffen hat.

So berechnet sich unter Benützung der von Kurajeff¹⁾ gegebenen Formel des Serumalbumins für das durch langdauernde Formaldehyd- einwirkung erhaltene Präparat III nach



der Gehalt an

$$C = 52,03, H = 6,97, N = 14,08\%$$

während im Mittel gefunden wurde:

$$C = 52,12, H = 7,36, N = 13,95\%$$

In Wirklichkeit dürfte der Wasserverlust ein viel grösserer sein, als diese Gleichung besagt.

Was den Ort der Anlagerung der Aldehydreste anlangt, so geht aus den gefundenen Zahlenverhältnissen hervor, dass die Anzahl der vorhandenen N-Atome, wenn sie in Form von Amin- resp. Imingruppen vorhanden sind, für die Bindung der Aldehydreste mehr als ausreicht.

Damit ist freilich nicht ausgeschlossen, dass auch Hydroxylgruppen, etwa jene des Kohlenhydratcomplexes, an der Bindung betheiligt sind. So kann man wenigstens den oben erwähnten

¹⁾ Diese Zeitschr., Bd. XXVI, 1899, S. 462.

negativen Ausfall der Furfurolreactionen deuten. Dieser Schluss ist jedoch nicht zwingend. Denn die Anwesenheit freien Formaldehyds im Reaktionsgemenge stört diese Farbenreactionen. Formaldehyd mit α -Naphthol und concentrirter Schwefelsäure allein liefert einen braunrothen Farbenton, der das Violett der Molisch'schen Reaction beeinträchtigt. Zwar fällt auch an einem von überschüssigem Formaldehyd befreiten Präparat die Reaction negativ aus. Doch ist auch da die Möglichkeit einer Beeinflussung durch Formaldehyd nicht ausgeschlossen, weil durch die Einwirkung der Schwefelsäure Formaldehyd aus dem Präparate abgespalten werden dürfte.

Beachtenswerth ist auch die Unfähigkeit des jodirten Eieralbumins, Aldehyd zu addiren. Man könnte daran denken, dass hier diejenigen Gruppen, welche zur Aufnahme des Aldehyds geeignet sind, durch Jod besetzt sind. Wie irrig eine solche Vorstellung wäre, ergibt sich sofort, wenn man überlegt, dass nach Kurajeff Serumalbumin auf 58 N bloss 5¹/₂ Jodatome, nach meiner Analyse aber 24 Formaldehydmoleküle, also die mehr als vierfache Zahl, aufzunehmen vermag. Dass die Jodirung des Eiweisses diesem die Fähigkeit raubt, mit Aldehyd zu reagiren, muss sonach einen anderen Grund haben.

Alles erwogen, darf man die erhaltenen Produkte wohl als Methylen-, Aethylen-, Benzylidenderivate des sonst unveränderten Eiweissmoleküls ansehen.

III. Verhalten des Methylen- und Aethylenserumalbumins gegen verdauende Fermente.

Ueber den Einfluss von Formaldehyd auf die Verdauung von Eiweisskörpern liegen einige Angaben in der Litteratur vor, die nicht ganz mit einander übereinstimmen. Nach Benedicenti (l. c.) sollen, wie schon Eingangs erwähnt, die Formaldehydverbindungen aller von ihm untersuchten Eiweisskörper weder durch Pepsin, noch durch Trypsin verdaut werden. Die anderen Beobachter haben sich nur mit der Pepsinverdauung beschäftigt. Sie finden nur eine Verzögerung

durch Formaldehyd, so Weigle und Merkel¹⁾ für Hühner-eiweiss und für die Milch, Mabery und Goldsmith²⁾ für Fibrin, und Lepierre³⁾ für verschiedene, von ihm dargestellte Eiweiss-Formaldehydverbindungen.

Zunächst wurde in einem Versuche (Versuch 1) die Einwirkung von Pepsin und Trypsin auf eine mit Formaldehyd versetzte Serumalbuminlösung untersucht.

Als Beweis für stattgehabte Verdauung diente die Biuretreaction in der völlig enteweissten Verdauungslösung. Zur Abscheidung des Eiweisses wurde das Verfahren von Hofmeister: Kochen mit Eisenchlorid und Natriumacetat nach genauer Neutralisation mit Natronlauge, benützt.

Dabei ergab sich, dass Trypsin bei Anwesenheit von überschüssigem Formaldehyd überhaupt nicht zur Wirkung kam. Die Pepsinverdauung war zwar gehemmt, doch nicht ganz aufgehoben.

Um den Einfluss freien Formaldehyds auszuschalten, wurde hierauf ein formaldehydfreies Präparat (Nr. III) der Verdauung unterzogen.

Versuch 2.

- a) Methylenserumalbumin in Wasser + Pepsin-Salzsäure.
- b) „ „ „ + Trypsin-Soda,
- c) und d) Kontrollprobe mit je einer Fibrinflocke.

Da das Präparat in Wasser unlöslich ist, konnte die Biuretreaction in der Verdauungsflüssigkeit direkt angestellt werden. Nach vier Stunden: Fibrinflocken in c) und d) zum Theil aufgelöst, Biuretreaction stark positiv, aber auch bei a) ganz deutlich. Bei b) auch nach 20 Stunden keine Spur von Biuretfärbung.

Der hier ersichtliche Unterschied zwischen der tryptischen und der peptischen Angreifbarkeit des Methylenserumalbumins lässt sich weiter noch auf folgende Weise darthun: Unterwirft man den unverdauten Rückstand des Trypsinversuches (2b) der Einwirkung von Pepsin-Salzsäure, so tritt nach wenigen Stunden in der Verdauungsflüssigkeit Biuretreaction auf.

1) Ref. Jahresber. f. Thierchemie für 1895, Bd. 25, S. 228.

2) Ref. Chem. Centralbl. 1898/I. S. 69.

3) Compt. rend. Acad. Sc. Bd. 128, 1899/I, S. 739.

Versuch 3.

Bei analoger Versuchsanordnung, wie in Versuch 2, ergab sich für ein Präparat von Aethylenserumalbumin (Nr. V) in der Pepsinprobe deutliche, in der Trypsinprobe eine Spur Biuretreaction.

Das methylenisirte Eiweiss ist also tryptisch gar nicht, das äthylenisirte Eiweiss fast gar nicht angegriffen worden: Pepsin aber war in beiden Fällen wirksam.

In Versuch 2 a) und b) und 3 a) und b) liess sich am Schlusse der Versuchszeit in den Verdauungsflüssigkeiten eine Spur freien Aldehyds nachweisen, der bei der Digestion bei 40° C. aus den Präparaten abgespalten worden war. Es war also noch die Möglichkeit nicht auszuschliessen, dass die Trypsinwirkung durch diese Spuren freien Aldehyds beeinträchtigt worden sein konnte.

Deshalb wurden die Trypsinverdauungsflüssigkeiten beider Versuche mit Fibrinflocken beschickt und neuerlich 12 Stunden im Wärmeschrank belassen. Die Flocken wurden verdaut, wenn auch schwächer, als durch frisches Trypsin. Die Spuren Aldehyd reichten also nicht hin, um die fermentative Wirksamkeit des Trypsins überhaupt zu unterdrücken.

Um über die Bedeutung grösserer Aldehydmengen für die beiden Fermentwirkungen ein Urtheil zu gewinnen, wurde folgende Versuchsserie angestellt, zu der als leicht verdaubares Eiweiss Fibrin herangezogen wurde.

Versuch 4. Versuchsdauer 9 Stunden.

I. Pepsin-Salzsäure	Biuret-reaction	II. Trypsin-Soda	Biuret-reaction
a) Fibrin allein	positiv	a))	positiv
b) Fibrin + Formaldehyd	positiv	b))	negativ
c) " + Acetaldehyd	positiv	c))	negativ
d) Methylenserumalbumin (Präparat IV.)	positiv	d))	negativ

Pepsin erwies sich also in allen Proben als wirksam. Es waren nur zeitliche Differenzen zu constatiren. Probe I a), I c) und I d) zeigten schon nach 4 Stunden Biuretreaction, I b) erst nach 9 Stunden. Durch Acetaldehyd wurde also der

zeitliche Ablauf der Pepsinverdauung des Fibrins nicht gehemmt, sondern nur durch Formaldehyd. Hingegen beeinträchtigt nicht nur Formaldehyd, sondern auch Acetaldehyd die Trypsinverdauung des Fibrins. Nach 9 Stunden war die Biuretprobe bei II b) und c) negativ, erst nach 24 Stunden zeigte sich bei c) eine Spur Biuretreaction.

Die Thatsache, dass auch die aldehydfreien Präparate von Trypsin nicht angegriffen werden, lässt für die Fibrinversuche noch die Deutung zu, dass durch die Aldehyde nicht eigentlich das Trypsin direkt in seiner Wirksamkeit gehemmt wird, sondern dass sich während des Versuches eine Aldehydfibrinverbindung bildet, die dann gegen Trypsin resistent ist.

Um diesem Einwande zu begegnen, wurde in einem anschliessenden Versuche die Fibrinflocke, nicht wie früher, direkt in Wasser, dem einige Tropfen Formaldehyd zugesetzt waren, eingebracht, sondern in einer Atmosphäre von Formaldehyddämpfen der Trypsinwirkung ausgesetzt.

Auch bei dieser Versuchsanordnung, bei der die Entstehung einer Fibrin-formaldehydverbindung recht unwahrscheinlich ist, erwies sich das Trypsin als unwirksam.

Uebrigens steht dieser Befund, dass die beiden Aldehyde die Trypsineinwirkung hemmen oder aufheben, die peptische Verdauung aber kaum beeinflussen, in bestem Einklange mit Beobachtungen, die in einer erst nach Abschluss meiner Versuche erschienenen Arbeit von Bliss und Novy¹⁾ mitgetheilt sind. Diese Autoren haben bei einer systematischen Untersuchung des Einflusses von Formaldehyd auf Enzyme gefunden, dass Trypsin durch Formaldehyd leicht zerstört wird, Pepsin aber bis zu 5% Formaldehyd wochenlang verträgt.

Die Schlussfolgerungen, die sich aus den mitgetheilten Verdauungsversuchen ableiten lassen, sind etwa folgende:

Die Trypsinverdauung wird durch Formaldehyd gehemmt oder aufgehoben, durch Acetaldehyd beeinträchtigt. Die Unangreifbarkeit der Aldehydeiweissverbindungen für Trypsin hängt aber nicht von diesem Umstande ab, da die Spuren

1) Ref. Centralbl. f. Physiol., Bd. 13, 1899, S. 144.

Aldehyd, die bei der Verdauung von solchen Verbindungen nach und nach frei werden, nicht zur totalen Aufhebung der Trypsinwirkung genügen.

Vielmehr scheint durch die Methylenisirung bezw. Aethylenisirung der Angriffspunkt für das Trypsin besetzt zu sein, sodass es nicht mehr einwirken kann. Aus der Thatsache, dass die Pepsinverdauung erhalten bleibt, lässt sich vermuthen, dass entweder der Angriff des Eiweissmoleküls durch Pepsin an anderer Stelle erfolgt als durch Trypsin, oder dass bei der Pepsinverdauung die Salzsäure die besetzten Stellen durch Aldehydabspaltung frei macht.

Fasst man ins Auge, dass die Spaltung der Eiweisskörper in Ganzen und Grossen durch Pepsin und Trypsin in gleichem Sinne erfolgt, insbesondere aber, dass die Versuche von Kurajeff (l. c.) und von Dr. F. Baum¹⁾ im hiesigen Institute sehr wahrscheinlich gemacht haben, dass im ersten Beginn der Spaltung, bei der Bildung der primären Albumosen, nur Verschiedenheiten in Betreff des zeitlichen Verlaufes, nicht aber der gebildeten Produkte bestehen, so wird man der zuletzt angeführten Vorstellung den Vorzug geben.

¹⁾ Noch nicht publicirte Versuche.