

243. Gertrud Woker: Die Theorie der Benzidin-Oxydation in ihrer Bedeutung für Peroxydase-Untersuchungen.

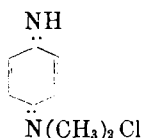
[Mitteilung aus dem Institut für Phys.-chem. Biologie der Universität Bern.]

(Eingegangen am 3. August 1916.)

Alle Arbeiten über Peroxydasen, die mit Hilfe des Benzidins als Substrat ausgeführt werden, verlangen in erster Linie ein Studium des Oxydationsmechanismus dieser Substanz. Dieser ist nun viel verwickelter, als im allgemeinen angenommen wird, und mit allen Nebenprozessen ist er noch durchaus nicht lückenlos erkannt. Immerhin können die wesentlichen Punkte dank der schönen Arbeiten von Willstätter und seinen Mitarbeitern Kalb, Piccard usw., sowie Kehrman, Schlenk und Knorr heute als aufgeklärt gelten.

Die Benzidin-Oxydation kann vorerst nicht als ein Ding für sich betrachtet werden. Ihre Aufklärung hängt vielmehr aufs engste mit derjenigen der Oxydation der Phenole und Amine der Monophenylreihe zusammen und mit der Kenntnis der hierbei gebildeten Oxydationsprodukte von ganz- oder partiell-chinoidem Typus.

Die ersten hierher gehörigen Beobachtungen verdanken wir Wurster¹⁾, der bei der Oxydation der alkylierten *p*-Diamine eine nach seinem Entdecker als Wurstersche Salze bezeichnete intensiv gefärbte Körperklasse auffand. Das sog. Wurstersche Rot wurde zuerst im Jahre 1885 von Bernthsen²⁾ als chinoides Salz angesprochen, eine Annahme, die Nietzki³⁾ durch die Formel eines Chinon-imoniumsalzes,



zum Ausdruck brachte, während Willstätter⁴⁾ im Gegensatz zu dieser ganz- oder »holo-chinoiden« Struktur auf eine »teilweise und verteilte« oder »meri-chinoide« Struktur schloß. Bei der Oxydation von Di- wie Tetramethyl-*p*-phenylendiaminsalz erhielt er⁵⁾ partiell-chinoide

¹⁾ Wurster, B. 12, 1803, 1807, 2071 [1879].

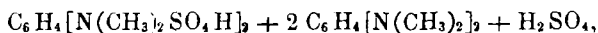
²⁾ Bernthsen, A. 230, 162 [1885]; 251, 11, 49, 82 [1889].

³⁾ Nietzki, Org. Farbstoffe, 5. Aufl., S. 199 [1906].

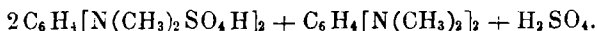
⁴⁾ Willstätter, B. 41, 1462 [1908].

⁵⁾ Willstätter, l. c., vorige Fußnote und Willstätter und Piccard, B. 41, 1473 [1908].

Salze. Im ersten Fall wurde die Oxydation mit Brom durchgeführt und lieferte bei 1 Atom pro Molekül ein partielles Oxydationsprodukt von maximaler Färbung, während bei Anwendung von 2 Atomen Brom ein farbloses, ganz-chinoides Salz entstand, das sich mit der Leukobase zu dem schon erwähnten Wursterschen Rot vereinigte. Diese Bildungsweise, wie die Tatsache, daß der Körper von den beiden Extremen aus, vom alkylierten Diamin durch partielle Oxydation, vom ganz-chinoiden Salz aus durch partielle Reduktion erhalten werden kann, stützte die Willstättersche Auffassung, daß es sich bei den gefärbten Salzen um partiell-chinoide Verbindungen von der Art der Chinhydrone handle, auf die schon früher Kehrmann¹⁾ bei seiner Deutung der von Jackson und Calhane²⁾ erhaltenen grünen und blauen Oxydationsprodukte des *p*-Phenylendiamins und des Dibrom-*p*-phenylendiamins nachdrücklichst hingewiesen hatte. Auch waren die erwähnten, von Kehrmann als »chinhydrontartige Additionsprodukte der schwach gefärbten Diiminsalze an die Salze der Diamine resp. an die freien Diamine« betrachteten Verbindungen von diesen Forschern zu den Chinhydronsalzen des Phenazins³⁾ in Parallele gesetzt worden. Bei den partiellen Chinoiden, auf welche Willstätter bei der Aufklärung der Wursterschen Salze stieß, würde es sich nach ihm bei stark gefärbtem Farbsalz um eine $\frac{1}{3}$ -chinoide Verbindung,



handeln, bei schwach gefärbtem dagegen um eine $\frac{2}{3}$ -chinoide Verbindung.



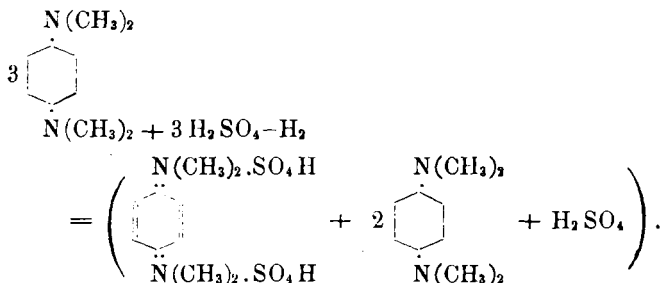
Die Oxydation des Tetramethyl-*p*-phenylendiaminsulfats wurde mit Stickoxyden bewerkstelligt und führte zur sukzessiven Bildung zweier partiell-chinoider Salze, von denen das eine schwarze, mit intensiv blauer Farbe in Lösung gehende Krystalle liefert, während das andere nur in Lösung schwächere Blaufärbung zeigt. Das intensiv

¹⁾ Kehrmann, B. 38, 3777 [1905].

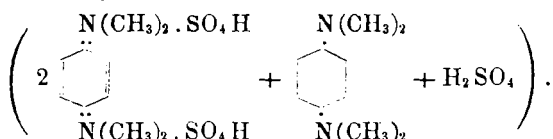
²⁾ Jackson und Calhane, B. 35, 2496 [1902]; Am. 31, 209 [1904]; s. auch Pringsheim, B. 38, 3354 [1905], dessen Ansichten über zwei isomere Reihen von Chinondiiminsalzen jedoch auf einer auch von Willstätter, B. 38, 2244 [1905] ursprünglich hier zur Erklärung herangezogenen Hypothese von v. Baeyer über gerade und gezackte Doppelbindung als Ursache von Isomerie fußen.

³⁾ Hinsberg und Garfunckel, A. 292, 260 [1896]; Kehrmann, A. 322, 71 [1902].

gefärbte Farbsalz würde nach Willstätter und Piccard $\frac{1}{3}$ -chinoid sein und nach folgender Reaktionsgleichung entstehen:



Es wäre dies das ebenfalls nach seinem Entdecker benannte Wurstersche Blau, während das höher oxydierte, viel schwächer und nur in Lösung gefärbte Salz, dessen Farbe sich durch Zusatz von Leukochlorid — offenbar durch Zurückführung auf die $\frac{1}{3}$ -chinoide Verbindung — um ein Vielfaches verstärken läßt, wahrscheinlich $\frac{2}{3}$ -chinoid ist, entsprechend der Formel:



Zu ganz analogen Produkten führt nun auch die Oxydation der Amine und Phenole der Biphenylreihe. Hier war es Liebermann¹⁾, der zuerst die chinoid Natur des durch Destillation von Buchenholz-teer dargestellten Cörolignons erkannte, und zahlreiche andere Forscher stellten in der Folge Chinone dieser Reihe dar²⁾, wobei sich jedoch die Frage aufwerfen läßt, ob dort, wo es sich um stark gefärbte, meist bläustichige Produkte handelt, *meri*-chinoide Verbindungen und nicht *holo*-chinoide vorgelegen haben, da zwischen diesen hochmolekularen Körpern die Analyse allein kaum entscheiden kann. Schon von Moir³⁾ ist auch in der Tat durch Zusatz von Brom zu einer angesäuerten Toluidinlösung ein blauer, chinhydronartiger Körper erhalten worden. In systematischer Weise ist jedoch erst durch Willstätter und seine Schüler⁴⁾ Kalb und Piccard das Studium

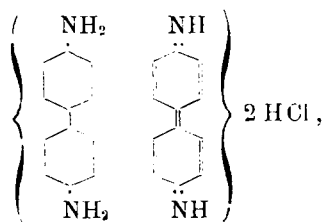
¹⁾ Liebermann, B. 5, 746 [1872]; 6, 381 [1873]; A. 169, 221.

²⁾ S. die Literatur hierüber in der Arbeit von Schlenk, A. 363, 313, 314 [1908].

³⁾ Moir, Proc. chem. Soc. 22, 258; s. ferner derselbe Soc. 91, 1308.

⁴⁾ Willstätter und Kalb, B. 37, 3761 [1904]; 38, 1232 [1905]; 39, 3474 [1906]; Kalb, Inaug.-Dissert. München [1905]; Willstätter und Piccard, B. 41, 1458 [1908].

der blaugefärbten Verbindungen in Angriff genommen worden, die bei der Oxydation von Hydroxyl- und Aminoderivaten des Biphenyls entstehen, und die je nach den Bedingungen der Oxydation auf dieser Stufe stehen bleiben oder zu gelb gefärbten Produkten weiter oxidiert werden können. Die Auffassung Willstätters, daß im ersteren *meri*-chinoide, im zweiten Fall *holo*-chinoide Verbindungen vorliegen, ist auch diejenige von Kehrman¹⁾ und Schlenk²⁾. Eine kleine Differenz zwischen den Anschauungen Willstätters und denjenigen der beiden letztgenannten Forscher besteht nur in Bezug auf den Grad der Analogie der *meri*-Chinon-imoniumsalze von der Art der Wursterschen Salze und der Chinhydrone. Willstätter und Piccard (l. c.) sehen in der neben der sehr geringen Dissoziation der Wursterschen Salze auffallenden äußerst leichten Spaltbarkeit der Chinhydrone eine Stütze für die Annahme einer nicht ganz analogen Konstitution, während Kehrman und Schlenk eine absolute Analogie in der Konstitution von Chinhydrone und Wursterschen Salzen annehmen. Kehrman sieht den erwähnten Unterschied nur als einen graduellen an und Schlenk weist darauf hin, daß das *meri*-Dichlor-ditoluchinondiimmoniumchlorid sich ebenso leicht in Lösung zu spalten vermag, wie die Mehrzahl der Chinhydrone. Die Dissoziationstendenz würde bei einem Wursterschen Salz nur durch den Grad der Basizität der zum Komplex vereinigten Amin- und Iminkomponente bestimmt und zwar in dem Sinne, daß die Dissoziationstendenz mit Abnehmen der Basizität zunimmt. Man hätte demnach in einem gegebenen Fall im wesentlichen nur darüber schlüssig zu werden, ob in dem blauen *meri*-chinoiden Produkt eine $\frac{1}{3}$ -, $\frac{1}{2}$ - oder $\frac{2}{3}$ -chinoide Verbindung vorliegt, vorausgesetzt, daß man nicht noch andere als diese bei den Wursterschen Salzen und Chinhydrone geläufigen Bruchteile anzunehmen gezwungen sei. Ein $\frac{1}{2}$ -chinoides Oxydationsprodukt des salzsauren Benzidins z. B. würde nach der von Willstätter gewählten und von Schlenk übernommenen Schreibweise folgendermaßen zu formulieren sein:



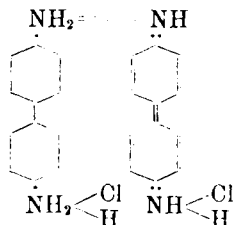
¹⁾ Kehrman, B. 41, 2340 [1908].

²⁾ Schlenk, A. 363, 313 [1908].

während die $\frac{1}{3}$ - und $\frac{2}{3}$ -chinoiden Verbindungen einen Amin- bzw. einen Iminkomplex mehr in der Klammer enthalten würden, wie bei den Wursterschen Salzen der Monophenylreihe.

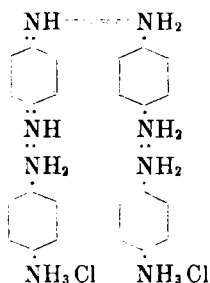
Von einer näheren Bezeichnung der Bindung zwischen den Amin- und Imin-Komponenten hat Willstätter und nach ihm Schlenk abgesehen, da er der Ansicht ist, daß hier wie bei den Chinhydrone aus Phenolen nur Partialvalenzen die spezifisch chinhydrontartige Bindung vermitteln. Soweit es sich um Chinone und nicht um Chinonimide handelt, wird man dieser Auffassung unbedingt zustimmen müssen, es wäre denn, daß man die Vierwertigkeit des Sauerstoffes als regulären Zustand betrachtet.

Bei den Chinonimiden scheint es mir dagegen nicht notwendig zu sein, zu Partialvalenzen zu greifen, da in der Fünfwertigkeit des Stickstoffs die notwendige Voraussetzung zum Zustandekommen von Hauptbindungen gegeben ist. Ich würde nicht so vermessen sein, hier den Versuch zu wagen, Konstitutionsformeln für *meri*-chinoiden Oxydationsprodukte der Amine aufzustellen, wenn damit nicht zugleich ein Anhaltspunkt für das Verständnis der Färbung bei den Chinhydrone und Wursterschen Salzen gewonnen werden könnte, und wenn nicht verschiedene Beobachtungen über die Oxydation des Benzidins — zum Teil anlässlich der im vorigen Jahre im hiesigen Institut ausgeführten, später ausführlich zu veröffentlichenden Untersuchung der Benzidinreaktion des Blutes durch meinen Mitarbeiter Hrn. Dr. med. vet. Kjöllnerfeldt — nur durch Konstitutionsformeln einer »Erklärung« zugänglich würden. Die obige Formulierung des halbchinoiden Benzidinblaus, die nach dem Typus des von Schlenk untersuchten *meri*-Dichlor-ditoluchinon-diimoniumchlorids aufgestellt ist, zeigt, daß 2 Moleküle HCl auf den Chinhydrontkomplex kommen. Nimmt man an, daß je eine Amino- und eine Iminogruppe Träger von 1 HCl sind, so blieben je eine NH_2 - und eine NH -Gruppe mit ungesättigtem, d. h. dreiwertigem N, und es wäre durchaus begreiflich, daß sich diese beiden ungesättigten Stickstoffatome unter einander binden. Es würde dies der nebenstehenden Formel für das Chinhydront entsprechen:



Diese Formel steht mit folgenden Tatsachen im Einklang:

1. Sie stimmt überein mit der Beobachtung von Hrn. Dr. Kjöllfeldt — die für die von ihm angestrebte Herstellung eines Benzidinreagens von konstantem Wirkungswert äußerst wichtig war —, daß ein Optimum der Reaktionsfähigkeit des Benzidins erreicht wird, wenn man das Dichlorhydrat mit soviel Natronlauge neutralisiert, daß auf 1 Mol. Benzidin noch 1 Mol. HCl kommt. Nur bei einer solchen, auf halbem Wege stehenden Neutralisation ist durch das intermediäre Auftreten von dreiwertigem Stickstoff eine Grundbedingung für das Zustandekommen der Chinhydronbindung erfüllt. Eine ähnliche Erklärung dürfte auch gültig sein für das Optimum der Oxydation des *p*-Phenylendiamins, welches Bach¹⁾ für einen Säurezusatz zur Base im Verhältnis 0.5 : 1 festgestellt hat. Vielleicht wäre dem blauen *meri*-chinoiden Oxydationsprodukt des *p*-Phenylendiamins die Konstitution zuzuschreiben:



2. Die auf voriger Seite angegebene Formel für das Diphenochinon-diimoniumchlorid erklärt die ungemein leichte Zerstörbarkeit des gefärbten Produktes durch Säuren wie durch Basen. Beide wirken durch Sprengung der Doppelbindung zwischen den Stickstoffatomen, die Säuren vermöge ihrer stärkeren Affinität zu den basischen Gruppen, wahrscheinlich unter Bildung von je 1 Mol. des entsprechenden Benzidinsalzes und eines *holo*-chinoiden Salzes²⁾, die Basen durch Begünstigung der Hydrolyse, indem an Stelle der gegenseitigen Absättigung der vierten und fünften Valenz einer Imin- und Aminstickstoffgruppe die Absättigung durch die Elemente des Wassers H und OH erfolgt.

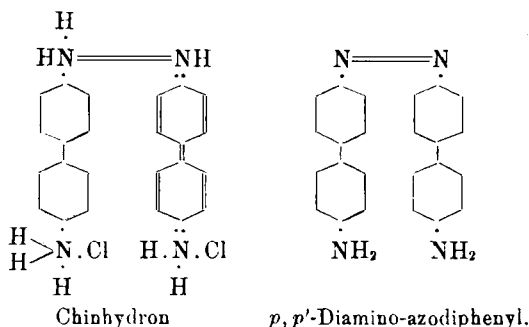
3. Die angegebene Chinhydronformel erklärt den leichten Zerfall der Verbindung in ein vollständiges Reduktionsprodukt wie in ein

¹⁾ Bach, Fermentforschung 1, 197 [1915].

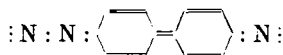
²⁾ Die primäre Säurewirkung kann auch als mit der Basenwirkung identisch betrachtet werden. Der hierdurch bedingten Hydrolyse zu Ammonium- und Immoniumbase würde dann bei Gegenwart von Säure die Salzbildung nachfolgen.

vollständiges Oxydationsprodukt (*holo*-Chinoid) durch reduktive bzw. oxydative Agenzien.

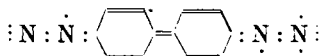
4. Die Chinhydronformel erklärt am zwanglosesten das Auftreten eines roten Farbstoffs gerade in den aktivsten Benzidinlösungen, da diesem Körper nach Kalb (l. c.) die Konstitution eines Azofarbstoffs zuzuschreiben ist. Sein Zusammenhang mit dem Ringsystem des Chinhydrons geht ohne weiteres aus den beiden folgenden Formeln hervor:



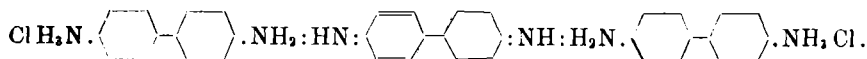
5. Dieselbe Formel kann das Auftreten der Farbe im *meri*-chinoiden Zustand und ihre Abnahme beim Übergang in den *holo*-chinoiden Zustand erklären; denn nach der Theorie von Liebermann und Kostanecki ist es die Anhäufung von Chromophoren — jener durch Doppelbindungen ausgezeichneten Gruppen —, welche farbgebend wirkt. Vor den *holo*-chinoiden Immoniumsalzen haben aber die *meri*-chinoiden Verbindungen das voraus, daß bei ihnen mindestens an einer Stelle im Molekül (bei den halbchinoiden Chinhydronen) das komplexe Chromophor, das den Chinonimidkomplex charakterisiert, unmittelbar mit einer weiteren Doppelbindung gekoppelt ist:



Sind $\frac{1}{3}$ -chinoide Verbindungen möglich, so würde sich das chinoiden Chromophor nochmals mit einer Doppelbindung beladen:



wenn man wenigstens Körpern dieser Art die folgende Formel zuschreibt:



Unter bestimmten Bedingungen scheint sich auch bei der Oxydation des Benzidins eine solche $\frac{1}{3}$ -chinoide Verbindung zu bilden,

die sich durch eine abnorm intensive Blaufärbung auszeichnet. Hr. Dr. Kjöllnerfeldt konstatierte eine derartige multiple Färbung nur in Gegenwart von suspendierten Benzidinkristallen, und dieser Umstand ließ leider einen, die Annahme eines $\frac{1}{2}$ -Chinoids beweisenden Versuch, durch Bestimmung des Oxydationswerts des Niederschlags mittels Zinnchlorür-Titration so lange als zwecklos erscheinen, bis eine quantitative Trennung des unveränderten Benzidins vom Benzidinblau gefunden ist.

Die angegebenen Konstitutionsformeln haben natürlich zur Voraussetzung, daß die Grundvorstellung der weiter oben genannten Forscher, nach welchen es sich bei den erwähnten Farbsalzen um partiell-chinoide Verbindungen handelt, den Tatsachen entspricht.

Nun ist demgegenüber allerdings von Madelung¹⁾ gerade im Hinblick auf die Benzidin-Oxydation behauptet worden, daß auch stark gefärbte (blaue) *holo*-chinoide Verbindungen existieren. Madelung stützt sich hierbei auf die Angabe von Rößler und Glasmann²⁾, daß Benzidin aus überschüssiger Jodlösung 2 Atome Jod pro Molekül aufnehme, und auf seine eigene Beobachtung, daß bei der Benzidin-Oxydation mittels Jodlösung das zunächst gebildete blaue *meri*-chinoide Salz durch weiteren Jodzusatz statt einer Entfärbung eine Vertiefung »zu einer dunkelvioletten Nuance erfährt, wobei von der $\frac{1}{100}$ -normalen Jodlösung Quantitäten von 8.5—15 ccm auf 10 ccm des erstmals aufgenommenen Jods gebunden werden«. Ähnlich liegen die Verhältnisse bei der Oxydation mittels Broms.

Diese Tatsachen beweisen jedoch in keiner Weise die Annahme von Madelung, wonach die natürliche Deutung des unter Bindung von 2J pro Benzidinmolekül gebildeten Oxydationsproduktes diejenige eines *holo*-chinoiden Diphenochinon-diimoniumjodides sei, und wonach es sich bei dem analogen Produkt der Brom-Oxydation jedenfalls um das entsprechende *holo*-chinoide Bromid handelt.

Entsprechend der von Piccard³⁾ in seiner Erwiderung an Madelung geäußerten Ansicht, daß Brom und Jod nicht allein oxydierend, sondern zugleich substituierend in das Benzidinmolekül eingreifen, würde das folgende, mit der Auffassung der gefärbten Verbindungen als »*meri*-Chinoide« in Einklang stehende Reaktionsschema den von Madelung angeführten Tatsachen vollauf gerecht.

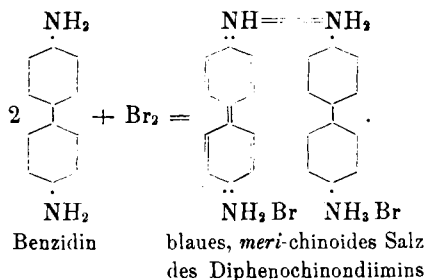
Der zunächst unter Verbrauch von 1 Jod- oder Bromatom gebildete blaue Körper wäre, wie auch Madelung annimmt, das *meri*-

¹⁾ Madelung, B. 44, 626 [1911].

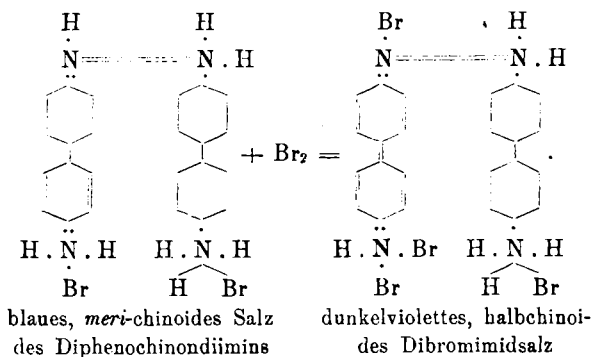
²⁾ Rößler und Glasmann, Ch. Z. 1903, 986.

³⁾ Piccard, B. 44, 959 [1911].

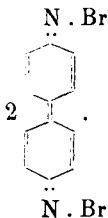
chinoide Imoniumsals, das der Einfachheit wegen als halb-chinoid gebaut betrachtet werden kann:



Die beobachtete Farbvertiefung würde nun aber nicht mit einer Weiteroxydation, sondern mit einem Eintritt von Halogen (Brom oder Jod) an Stelle von Iminwasserstoff verknüpft sein:



Erst nach dieser Substitution würde weitere Oxydation unter Bildung von 2 Mol. des chinoiden Dibromids folgen:



braunes, chinoides Dibromid, das teilweise mit gelber Farbe in Lösung geht.

Lassen sich also die Beobachtungen von Madelung mindestens ebensogut wie durch seine Annahme von blaugefärbten *holo*-Chinoiden, nach der Willstätter-Kehrmann-Schlenkschen Auffassung deuten, so sprechen andere Angaben von Madelung direkt für diese letztere und damit gegen seine eigene Deutung. So erwähnt Madelung das vollkommen gleichartige Verhalten seiner »meri- und

holo-chinoiden* Verbindungen — und was besonders schwer ins Gewicht fällt, die Spaltung auch seines »*holo*-Chinoids« in Benzidin und das chinoide Dichlorimid durch Salzsäure, wodurch geradezu der Konstitutionsbeweis für ein echtes *meri*-Chinoid geliefert ist.

Es besteht folglich kein Grund, die weiter oben dargelegten Grundlagen der Benzidin-Oxydation, wie wir sie den Arbeiten Willstätters und seiner Schüler, wie auch Kehrmanns und Schlenks verdanken, in Zweifel zu ziehen. Dieses sichere Fundament ist vielmehr das einzige, das in dem schwierigen Gebiete Halt gewährt.

An diese Arbeiten müssen daher auch alle Versuche anknüpfen, noch nicht geklärten Beobachtungen bei der Benzidin-Oxydation eine theoretische Deutung zu geben und Schlußfolgerungen von den Erscheinungen bei der Oxydation dieses Chromogens auf die anderen bei der Ermittlung von Oxydationsfermenten benutzten Amine und Phenole zu ziehen. Wahrscheinlich wird sich ganz allgemein dabei herausstellen, daß sehr viele von den »Aktivierungen« und »Paralysierungen« durch Säuren, Basen und andere Zusätze zum Reaktionsgemisch, die man auf Rechnung einer Beeinflussung des Oxydationsfermentes zu setzen gewöhnt ist, nur in einer Beeinflussung des Reagens ihre wirkliche Ursache besitzen.

Für das Benzidin konnte dies von Hrn. Dr. Kjöllnerfeldt direkt bewiesen werden. Als bei seinen Versuchen ein ungemein starker Wechsel im Ausfall der Benzidin-Oxydation unter dem Einfluß des Blut-Wasserstoffperoxyd-Gemisches zutage trat und systematische Änderungen des Mediums durch die erwähnten Zusätze den großen Einfluß dartaten, den namentlich Säuren und Basen auf die Reaktion auszuüben vermögen, entstand für uns die weitere Frage nach dem Angriffsort des betreffenden wirksamen Agens. War das Ferment durch den Zusatz betroffen, so mußte ein Ansäuern oder Alkalisieren des Benzidin-Reagens und nachheriges Neutralisieren vor Zusatz des Blutes einflußlos sein. Es zeigte sich jedoch, daß dies keineswegs zutraf. Trotz der stattgefundenen Neutralisation war der Verlauf der Oxydation mehr oder weniger stark geschädigt und zwar bei vorherigem Zusatz von Basen mehr als bei Zusatz von Säuren. Es mußte also mit dem Benzidin selbst durch die Änderung der Reaktion des Mediums eine Veränderung vor sich gegangen sein.

Ein Wechsel zwischen der Benzidinbase und ihren Salzen konnte für die Änderung allein nicht verantwortlich gemacht werden; denn eine solche wäre ja durch die Neutralisation wieder aufgehoben worden. Hierdurch wurde auch ausgeschlossen, daß Säure oder Base

ihre Wirkung nicht auf das Benzidin, sondern auf sein Oxydationsprodukt — intermediär gebildetes Benzidinblau — ausgeübt haben könnten. Ja selbst ohne irgend einen fremden Zusatz zeigten die verwendeten Lösungen von Benzidinchlorhydrat eine Änderung der »Farbenaktivität«, wie Hr. Dr. Kjöllnerfeldt die Neigung eines Chromogens zur Oxydation unter Farbstoffbildung bezeichnet hat. Die Farbenaktivität nahm in allen Fällen zu beim Stehen der Lösungen des Benzidinchlorhydrats, und vorhandener Bodenkörper zeigte nach jedem neuen Aufguß von Wasser größere Aktivität. Ursprünglich nahezu inaktive Benzidinkristalle und deren Lösung wurden mit der Zeit aktiv und aus solchen Lösungen fielen bisweilen spontan Krystalle von anderem Habitus (lange biegsame Nadeln) und maximaler Farbenaktivität aus. Dieser Polymorphismus und das ungleichartige chemische Verhalten zeigte sich auch, als Hr. Dr. Kjöllnerfeldt die Benzidinbase mit wechselnden Mengen von Salzsäure und Wasser behandelte und das Reaktionsprodukt in Bezug auf seine Krystallform und seine chemische Reaktionsfähigkeit prüfte.

Die chemische Aktivität, wie die Krystallform und die Löslichkeit der Krystalle erwiesen sich dabei als in hohem Maße abhängig von der Herstellungsweise des Benzidinchlorhydrats. Die ungleiche chemische Aktivität äußerte sich dabei nicht allein in der verschiedenen Befähigung des Benzidinpräparats zur Oxydation, sondern auch in einer ungleichen Zersetzungsfähigkeit beim Erhitzen. Trotz des gleichen Schmelzpunkts von ca. 341° war das Verhalten beim Erhitzen ein durchaus verschiedenartiges. Während die einen der in allen Fällen schön krystallisierten Präparate auch bei langsamem Erhitzen unzersetzt ohne jede Dunkelfärbung schmolzen, zersetzten sich die anderen beim allmählichen Erhitzen schon weit unter dem Schmelzpunkt. Schon von 160° an trat bisweilen Schwärzung ein, und von einem Schmelzpunkt der Substanz konnte infolgedessen nur dann gesprochen werden, wenn man die langsame Zersetzung bei tiefer Temperatur durch Vorwärmen des Schmelzpunktsapparats auf ca. 330° umging. Die ohne vorherige Zersetzung schmelzenden Krystalle erwiesen sich als nahezu inaktiv. Stabilität bzw. Labilität gegenüber dem Angriff des Benzidinchlorhydrat-Moleküls durch Erhitzen und durch oxydative Agenzien gingen also durchaus parallel. Eigentümlicher Art ist der Zusammenhang zwischen Löslichkeit und Aktivität der Benzidinsalz-Krystalle. Man hätte annehmen sollen, daß die Stärke des Ausfalls der Benzidinreaktion in hohem Maße abhängig sein würde von der Benzidin-Konzentration im Reaktionsgemisch. Je größer die Löslichkeit des Benzidins, desto intensiver würde danach die bei der Oxydation erhaltene Färbung sein.

Benzidin	Krystallform	Schmelzpunkt	Zersetzlichkeit	Löslichkeit bei 20°	Acidität der gesättigten Lösung bei 20° pro 1 ccm $\pi/100$ -NaOH ccm	Farbenaktivität	Bemerkungen
I ¹⁾	Blättchen	341°	von 160° an unter allmählicher Schwärzung	fast 0	0.9	1 : 10 000 000	Lösung enthält suspendierte Kry- stalle
II ¹⁾	Stäbchen	341°	kurz vor dem Schmelzen	50 %	1.0	1 : 1 000 000	die Acidität von II und III wurde erst nach länge- rem Stehen der Lösung bestimmt
III ²⁾	polymorphe Stäbchen	341 - 342°	keine; schmilzt scharf ohne merk- bare Schwärzung	70 %	4.8	Anfang = 0, nach längerem Stehen schwach aktiv	
I ³⁾	polymorphe Stäbchen	310°	teilweise von 117° ⁴⁾ an ohne Schwärzung	größer als 2	0.6	1 : 100 000	
2 ³⁾	Blättchen, Nadeln und kleine, schlecht ausgebildete Stäbchen	341°	groß, mit Schwär- zung vor dem Schmelzpunkt	größer als I, aber kleiner als 1	0.1	1 : 1 000 000	Phenolphthalein als Indicator

¹⁾ 2 g Benzidinbase wurden mit 4 ccm einer 25-prozentigen HCl-Lösung unter Wasserzusatz gekocht, ohne daß eine vollständige Lösung gelang und filtriert. Der auf dem Filter bleibende Rückstand ist mit I, der aus dem Filtrat auskristallisierte Anteil mit II bezeichnet.

²⁾ Zu 2 g Benzidinbase wurden 2 ccm 25-prozentiger HCl gesetzt und wie bei 1) mit Wasser bis zur vollständigen Lösung gekocht und filtriert. III ist das aus dem Filtrat auskristallisierte Benzidin.

³⁾ 1 g Benzidinbase wurde in 11.85 g HCl gebracht. 10.85 g norm. HCl ist die für ein Dichlorhydrat berechnete nötige Menge Salzsäure. Hierzu kam noch 1 g norm. HCl als Überschuß. Die Mischung wurde gekocht und bis zur vollständigen Lösung Wasser hinzugefügt. Nun wurde, um ein Monochlorhydrat zu erhalten, der Überschuß plus ein HCl mit 6.4 ccm norm. NaOH neutralisiert und filtriert. I bedeutet die Krystalle aus dem Filtrat; 2 diejenigen aus dem Filterrückstand. Rückstand, Filtrat und Mutterlauge zeigten bei der Beilsteinschen Probe Chlorgehalt, jedoch der Rückstand am wenigsten.

⁴⁾ Schmelzpunkt der Benzidinbase um 190°

Aller Erwartung zum Trotz war aber gerade das Gegenteil der Fall. Wie dies die vorstehende Tabelle der betreffenden Versuche von Hrn. Dr. Kjöllnerfeldt zeigt, in der Krystallform, Schmelzpunkt, Zersetzlichkeit beim Erhitzen, Löslichkeit, Acidität der Lösung und Farbenaktivität der Benzidin-chlorhydrat-Präparate verschiedener Herkunft nebeneinander gestellt sind, war das schwerlöslichste Benzidin-Präparat das weitaus farbenaktivste, das leichtlöslichste dagegen das beinahe inaktive Produkt. Hierdurch erscheinen die Aktivitätsunterschiede noch besonders prägnant.

Da sich bei dem stark aktiven Präparat zahlreiche Krystalle in der Lösung vorfinden, so konnte in diesem Umstand (der vielleicht die Bedingung für das Zustandekommen einer besonders farbkraftigen $\frac{1}{3}$ -chinoiden Verbindung darstellt) die Ursache der multiplen Färbung zu suchen sein. Um eine Adsorptionsercheinung, die durch die in der Lösung suspendierten Krystalle als solche veranlaßt würde, kann es sich jedoch nicht handeln, da andere feste Partikelchen einen solchen Einfluß nicht besitzen. Nur für Kohle konnte Hr. Dr. Kjöllnerfeldt eine schwache Begünstigung der Oxydation nachweisen, die aber in keinem Verhältnis zu der hier beobachteten Verstärkung der Färbung steht.

Die Wirkung der Löslichkeit mußte daher mit einer die Reaktionsfähigkeit ungünstig beeinflussenden Veränderung des Reaktionsmediums¹⁾ zusammenhängen, welche das Benzidin-chlorhydrat hervorzubringen vermag. Mit abnehmender Löslichkeit mußte daher auch die Quantität des »Paralysators« abnehmen und die Fähigkeit zur Oxydation eine entsprechende Zunahme erfahren.

Welches ist nun dieser »Paralysator«, den das Benzidin-chlorhydrat selbst in seine Lösung hineinbringt?

Die Tabelle (S. 2330) gibt hierüber sicheren Aufschluß. Vergleicht man in derselben Farbenaktivität, Acidität und Löslichkeit der verwendeten Präparate von Benzidin-chlorhydrat, so zeigt sich, daß das von Hrn. Dr. Kjöllnerfeldt als inaktiv befundene, sehr leicht lösliche Benzidin-chlorhydrat in gesättigter Lösung pro ccm 4.8 ccm $\frac{1}{100}$ -norm. Natronlauge verbrauchte, während die aktiven Produkte in gesättigter Lösung eine 5–50-mal geringere Acidität besitzen. Der Zusammenhang zwischen Aktivitätsgrad und Löslichkeit wird also durch diese

¹⁾ Die Bedeutung des Reaktionsmediums für die Peroxydase-Reaktionen hat auch Bach im Juliheft des Archives des sc. phys. et nat. 42, 56, 62 [1916] dargelegt, in Ausdehnung seiner früheren Untersuchungen in dieser Richtung auf den Einfluß der sauren oder basischen Natur der Chromogene auf deren Oxydation (bei verschiedener Reaktion des Mediums).

Tatsache in ein helles Licht gerückt; denn je leichter löslich ein Benzidin-chlorhydrat ist, desto mehr würde es die Acidität der Lösung vermehren und damit seine Oxydation hemmen, während umgekehrt gerade die schwer löslichsten Produkte am leichtesten oxydabel sind, weil sie nur verschwindende Mengen der hemmenden Säure in das Reaktionsgemisch hineintragen.

Auf denselben eigenartigen Zusammenhang zwischen Acidität und Farbenaktivität hatten schon die übrigen Beobachtungen von Hrn. Dr. Kjöllnerfeldt hingewiesen, so die unter Punkt 1 erwähnte Aktivierung, die mit einer Neutralisierung des Dichlorhydrates (entsprechend dem Verlust von ein HCl pro Benzidin-chlorhydrat-Molekül) einhergeht. Ferner erklären sich hierdurch die erwähnten Erscheinungen der allmählichen Selbstaktivierung, welche die Benzidin-chlorhydrat-Krystalle in Berührung mit Wasser, sowie die Lösung selbst erleiden. Es kann nach dem Vorausgeschickten wohl kaum zweifelhaft sein, daß es sich bei dieser Selbstaktivierung um einen Salzsäureverlust handelt. Mit jeder Erneuerung des über dem Bodenkörper stehenden Wassers geht dem Reaktionsgemisch die durch hydrolytische Spaltung des Salzes in die Lösung übergegangene freie Salzsäure verloren. Es wird dadurch allmählich bei einer beständig zunehmenden Zahl von Molekülen der durch Neutralisation mit Natronlauge rasch zu erreichende Zustand erhalten, der mit der Erzeugung freier Amino-
gruppen aus dem nachfolgend angegebenen Grunde die Hauptbedingung für die Aktivierung schafft. Auch bei längerem Stehen der Lösung ohne Auswechseln des Lösungswassers kann, namentlich bei höherer Temperatur¹⁾, eine allmählich zunehmende Aktivierung stattfinden. Hier würde man wohl die Abgabe von hydrolytisch abgespaltener Salzsäure an die Luft für die Aktivierung verantwortlich machen können. Auch die von Hrn. Dr. Kjöllnerfeldt, wie früher schon von meinem Mitarbeiter, Hrn. Briesenmeister, beobachtete Zunahme der Aktivität beim Umkrystallisieren des Benzidin-chlorhydrats kann im wesentlichen mit einem Salzsäure-Verlust in Zusammenhang gebracht werden. Dementsprechend würde umgekehrt die beim Kochen reichlich hydrolytisch abgespaltene Salzsäure die sehr geringe Aktivität des in der Mutterlauge enthaltenen Benzidins bedingen.

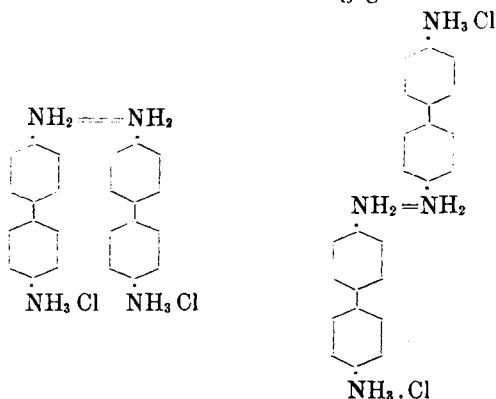
Welches können nun aber die Gründe für die erwähnte Wirkung der Salzsäure sein? Eine der Ursachen liegt wohl in der Zerstörung gebildeten Benzidinblaus durch Säuren. Aber diese Ursache ist nicht

¹⁾ Es handelte sich bei diesen Beobachtungen um Lösungen, die Dr. Kjöllnerfeldt bei seinen Peroxydase-Bestimmungen benutzte, die er anfänglich bei auf 45° erhitzten Lösungen ausführte.

die einzige und nicht die ausschlaggebende, denn wie schon erwähnt, ergibt sich aus den Versuchen von Hrn. Dr. Kjöllnerfeldt, daß dem Benzidin nicht nur während, sondern schon vor seiner beginnenden Oxydation die Reaktionsfähigkeit in mehr oder weniger weitgehendem Maße durch Säurezusatz genommen werden kann.

Die Veränderung durch Säure muß also die Struktur des Benzidin-Moleküls selbst betreffen. Eine Erklärung, die zugleich den chemischen Eigenschaften (Reaktionsfähigkeit) der verschiedenartig hergestellten Benzidin-Präparate und der angeführten Variabilität in Bezug auf Krystallform und Löslichkeit gerecht zu werden vermag, bietet sich in der Vorstellung, daß es bei der Neutralisation der wäßrigen Lösungen des Benzidin-chlorhydrats und bei unvollständiger Zugabe von Salzsäure zur Benzidinbase zur Bildung von Doppelmolekülen kommt, die in einer *cis*-Form und einer *trans*-Form aufzutreten vermögen. Die *cis*-Form wäre die viel schwerer lösliche, aber die in chemischer Hinsicht labile Modifikation. Da sie schon das Ringsystem des Chinhydrons enthält — also gleichsam ein Leukochinhydron darstellt —, könnte sie mit größter Leichtigkeit durch Wegoxydation von 2H in das blaue Chinhydron übergehen.

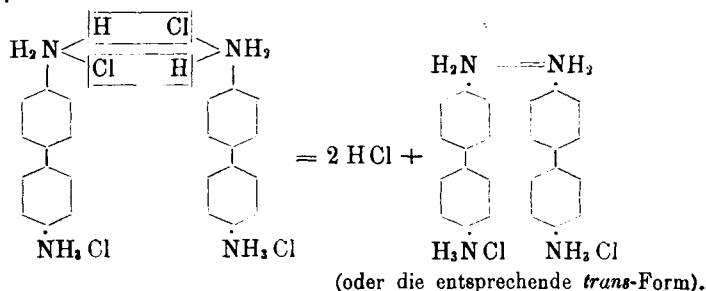
Aktives Benzidin würde demnach diesem reduzierten Chinhydron entsprechen. Die *trans*-Form wäre demgegenüber die bei der Oxydation wie bei der Zersetzung durch Erhitzen stabile Form und damit der Anteil des Benzidins, der die Farbenaktivität des Präparats herabsetzt. Die folgenden Konstitutionsformeln für das aktive und inaktive Benzidin werden dieser Auffassung gerecht.



Aktives Benzidin (Dibenzidin) Inaktives Benzidin (Dibenzidin)
 (*cis*-Form) (*trans*-Form).

Bedingung für das Zustandekommen des einen wie des anderen bimolekularen Benzidins ist die Fortnahme von 1 HCl aus dem Benzidin-dichlorhydrat, da der 5-wertige Stickstoff, wie er in den beider-

seitig mit HCl abgesättigten Aminogruppen des Dichlorhydrats vorliegt, begreiflicherweise keine Neigung zeigen wird, weitere Verbindungen, und noch dazu mit gleichartigen Gruppen, einzugehen. Bei Zusatz von Natronlauge und bei der Selbsthydrolyse wird dagegen Salzsäure abgespalten und in das relativ indifferente Kochsalz übergeführt. Die hierdurch freiwerdenden Aminogruppen vermögen sich nun, dank ihrem 3-wertigen Stickstoff, unter einander zu binden, wenn nicht schon die Bindung unmittelbar als Folge einer Salzsäure-Abspaltung von Molekül zu Molekül zustande kommt, entsprechend der Formel:



Ob die *cis*-Form oder die *trans*-Form resultiert, hängt offenbar von zahlreichen Faktoren ab. Da Hr. Dr. Kjöllnerfeldt durch Wegneutralisierung von 1 HCl pro Molekül Benzidinum hydrochloricum bei Zusatz von $\frac{1}{100}$ -n. Natronlauge zu einer $\frac{1}{100}$ -mol. Lösung des salzsauren Benzidins ein sehr haltbares Reagens von konstanter und starker, wenn auch noch weiter steigerungsfähiger Wirksamkeit¹⁾ darstellen konnte, so könnte man annehmen, daß unter diesen Bedingungen nur die *cis*-Form entsteht. Doch wäre es immerhin möglich, daß sich z. B. gleiche Mengen der *cis*- und *trans*-Modifikation bilden würden, daß aber bei Beginn der Oxydation der *cis*-Form durch die Störung des Gleichgewichts, das sich zwischen den beiden Stereoisomeren in der Lösung ausgebildet hat, der durch Oxydation auscheidende *cis*-Anteil sofort aus der *trans*-Form nachgeliefert würde, bis alles Benzidin, sei es direkt oder nach vorhergegangener Umlagerung, schließlich in Benzidinblau übergeführt ist²⁾. Die Acidität

¹⁾ Nähere Angaben folgen in der noch nicht publizierten ausführlichen Arbeit von Hrn. Dr. Kjöllnerfeldt.

²⁾ Weit unübersichtlicher gestalten sich die Aktivierungsverhältnisse beim umgekehrten Vorgang, dem Zusatz von Salzsäure zur Benzidinbase, da in diesem Fall mehr Reaktionsmöglichkeiten gegeben sind, die bei einem selbst geringen Wechsel der Reaktionsbedingungen zu einem völlig verschiedenartig zusammengesetzten Substanzgemisch führen können, wie dies aus den Untersuchungen von Hrn. Dr. Kjöllnerfeldt hervorgeht.

würde im Sinne dieser stereochemischen Auffassung nach 2 Richtungen hin eine Wirkung auszuüben vermögen:

1. Wird durch Überführung von Aminogruppen mit 3-wertigem N in Ammoniumsalzgruppen mit 5-wertigem N (der infolge seiner Absättigung keine Polymerisationstendenz mehr zeigen wird) die Bildung der Doppelmoleküle verhindert, die vermöge ihrer chemischen Eigenart als Leukochinhydrone besonders leicht in Chinhydrone überzugehen vermögen.

2. Wird durch die Wirkung der Säure die Umlagerung der labilen *cis*-Form, wie sie das Leukochinhydrone darstellt, in die stabile zur Oxydation wenig geneigte *trans*-Form katalytisch beschleunigt. Diese inaktivierende Umlagerung ist wohl auch die Ursache für die irreparable Veränderung des Benzidins durch Säuren wie durch Basen, da Wasserstoffionen und Hydroxylionen häufig solche Isomerisierungen eines labileren zu einem stabileren Produkte zu katalysieren vermögen, wie uns dies gerade in der erwähnten Umwandlung der aktiven *cis*-Form in die inaktive *trans*-Form entgegentritt. Ist diese Umwandlung irreversibel, so kann eine Rettung der Aktivität durch Neutralisation in einem bestimmten Moment nur in dem Maße stattfinden, als noch Moleküle in der *cis*-Form vorhanden sind. Auf die schon veränderten Moleküle besitzt dagegen, entsprechend den Beobachtungen von Hrn. Dr. Kjöllnerfeldt, die Neutralisation keine Wirkung mehr.

Zusammenfassung.

Fassen wir zum Schluß nochmals die wichtigsten Punkte über die Benzidin-Oxydation zusammen:

1. Das Benzidin gibt nach Willstätter und den anderen erwähnten Forschern bei seiner Oxydation wie die Amine und Phenole der Monophenylreihe (mit *para*-ständigen Substituenten) Oxydationsprodukte verschiedenen Grades, die sich durch ihre Färbung unterscheiden. *homo*-Chinoide sind gelb, *meri*-Chinoide blau gefärbt. Die *meri*-chinoiden Verbindungen können die halbchinoiden Chinhydrone sein, die also in ihrem Molekül je einen Chinon- (bzw. Chinonimid-) und einen Phenol- (bzw. Amin-)Komplex enthalten. Die *meri*-Chinoide können aber diese beiden Komponenten auch in einem anderen Verhältnis aufweisen. So besitzen die $\frac{1}{3}$ -chinoiden Wursterschen Salze 2 Amin- und einen Chinonimin-Komplex, während die $\frac{2}{3}$ -chinoiden umgekehrt einen Amin- und 2 Chinonimin-Komplexe enthalten. Die Färbekraft nimmt vom $\frac{1}{3}$ -chinoiden Salz an, das die tiefste blaue Nuance zeigt, ab. $\frac{2}{3}$ -*meri*-chinoide Verbindungen sind schwach blau, *homo*-chinoide, wie gesagt, gelb gefärbt.

2. Es wurde, auf den Arbeiten Willstätters basierend, eine Konstitutionsformel für das bei der Benzidin-Oxydation entstehende Chinhydron und andere *meri*-Chinoide aufgestellt und die Tatsachen angegeben, welche zur Aufstellung einer solchen Formel führten (S. 2323 und 2327).

3. Es wurde gezeigt, daß viele Aktivierungen und Paralsierungen durch Säuren und Basen, die man einer Beeinflussung des betreffenden Fermentes zuschreibt, auf eine Beeinflussung des Reagens (Benzidin) zurückzuführen sind.

4. Benzidin-chlorhydrat-Lösungen unterliegen einer Autoaktivierung beim Stehen, und vorhandener Bodenkörper zeigt mit jedem neuen Wasseraufluß eine Zunahme der Aktivität.

5. Chemische Aktivität (Oxydation, Zersetzung beim Erhitzen), Krystallform und Löslichkeit des Benzidinum hydrochloricum hängen von der Herstellungsweise dieses Reagens ab.

6. Unzersetzt schmelzende Krystalle von Benzidinum hydrochloricum sind von geringer Farbenaktivität, während unter starker Schwärzung sich zersetzende farbenaktiv sind.

7. Die Farbenaktivität eines Benzidinum hydrochloricum-Präparats ist um so größer, je geringer seine Löslichkeit ist und umgekehrt.

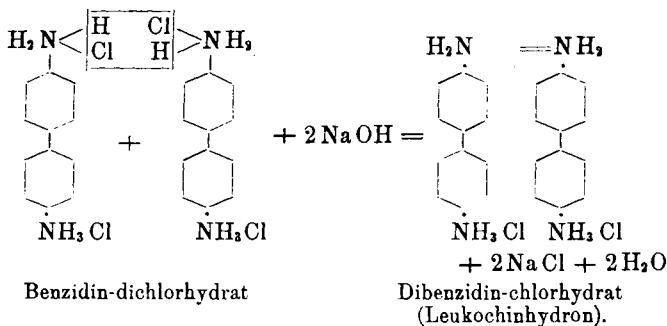
8. Die unter 4. und 7. erwähnten Erscheinungen sind eine Folge der hydrolytischen Spaltung des Benzidinum hydrochloricum. Je mehr Salzsäure durch diesen Vorgang in die Lösung hineingelangt, desto ungünstiger liegen die Bedingungen für die Überführung des Benzidins in Benzidinblau. Schwer lösliche Benzidin-dichlorhydrat-Präparate sind dementsprechend aktiv, leicht lösliche inaktiv, weil die hydrolytische Spaltung nur den gelösten Anteil betrifft. In gleicher Weise ist Salzsäureverlust für die Autoaktivierung der Lösungen beim Stehen und des Bodenkörpers bei Erneuerung des Lösungswassers, sowie beim Umkrystallisieren der Präparate verantwortlich zu machen.

9. Durch Alkalizusatz zum Benzidin-dichlorhydrat kann eine beträchtliche Erhöhung der Farbenaktivität des Präparats unmittelbar erzielt werden, die ihr Maximum bei der Wegneutralisation von 1 HCl pro Molekül Benzidin erreicht.

10. Umgekehrt kann auch die Aktivität der Benzidinbase durch Zusatz von Salzsäure bis zu dem erwähnten Maximum gesteigert werden.

11. Es wurde versucht, den optimalen Aktivitätspunkt bei partieller Neutralisation oder einem anderweitigen Salzsäureverlust mit der Bildung von Doppelmolekülen des Benzidins, die schon das Ringsystem des Chinhydrons enthalten und daher besonders leicht der

Oxydation verfallen, in Zusammenhang zu bringen, entsprechend den Formelbildern:



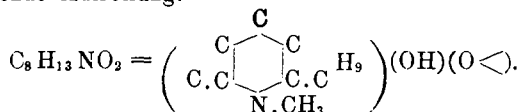
12. Es wurde angenommen, daß sich mit dieser »cis-Form« isomere Doppelmoleküle vom *trans*-Typus bilden können, die den nicht unter Zersetzung schmelzenden, schwer oxydablen und daher die Aktivität herabsetzenden Anteil mancher Benzidin-Präparate darstellen.

244. K. Heß: Über den Abbau des Scopolins. Erwiderung an Herrn E. Schmidt¹⁾.

[Aus dem Chem. Inst. d. naturw.-mathem. Fakultät der Universität Freiburg i. B.]

(Eingegangen am 19. September 1916.)

Vor Jahresfrist²⁾ habe ich mit A. Suchier eine zweibasische Säure der Piperidinreihe beschrieben, die durch Abbau aus Scopolin über Hydro-scopolin erhalten worden war, und die sich mit der von F. Wissing³⁾ und mir synthetisch dargestellten *N*-Methyl-piperidin- α, α' -dicarbonsäure⁴⁾ identisch erwiesen hat. Dadurch war es möglich geworden, das Scopolin-Molekül als einen Abkömmling der Piperidinreihe mit in α, α' -Stellung angegliederter Kohlenstoffkette aufzufassen. Wir gaben daher unter weiterer Berücksichtigung des vorliegenden experimentellen Materials anderer Forscher der Scopolin-Formel folgende Aufrollung:



¹⁾ Da ich seit 1 Jahr in Heeresdiensten tätig bin, erfolgt diese Erwiderung erst heute.

²⁾ B. 48, 2058 [1915]. ³⁾ B. 48, 1907 [1915].

⁴⁾ In unserer Mitteilung hat diese Säure irrtümlicherweise den Namen *N*-Methyl-hexahydro-lutidin- α, α' -dicarbonsäure erhalten.