

**15. W. Madelung: Die Theorie der Benzidin-Oxydation in ihrer Bedeutung für Peroxydase-Untersuchungen. — Bemerkungen zu der gleichnamigen Abhandlung von Frl. Gertrud Woker<sup>1)</sup>.**

[Aus dem Chemischen Institut der naturw.-mathem. Fakultät der Universität Freiburg i. Br.]

(Eingegangen am 30. Oktober 1916.)

Die im Jahre 1904 zuerst von O. und R. Adler<sup>2)</sup> angegebene Benzidin-Reaktion zum Nachweis von Peroxydasen und Stoffen von peroxydase-artiger Wirkung wie dem Blutfarbstoff hat seitdem eine sehr häufige Anwendung gefunden. Der Chemismus dieser Reaktion wurde erst vor fünf Jahren durch meine Veröffentlichungen in Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie<sup>3)</sup> und in diesen Berichten<sup>4)</sup> auf Grund der Arbeiten von Willstätter<sup>5)</sup> und dessen Schülern Kalb und Piccard, sowie von Schlenk<sup>6)</sup> über chinoide und *meri*-chinoide Oxydationsprodukte des Benzidins aufgeklärt. Ich konnte in den genannten Veröffentlichungen nicht nur die sich aus der Konstitution und den Eigenschaften der chinoiden und *meri*-chinoiden Oxydationsprodukte des Benzidins ergebenden Bedingungen für das Eintreten der Reaktion feststellen, sondern auch eine einfache titrimetrische Bestimmungsmethode für das dabei gebildete Benzidinblau, somit also auch für den Wirkungswert des oxydierenden Agens angeben, die in verschiedener Richtung, besonders aber für eine Untersuchung über die Beziehungen der Hämoglobinderivate und Peroxydasen zu anorganischen Katalysatoren benutzt wurde<sup>7)</sup>.

<sup>1)</sup> B. 49, 2319 [1916].    <sup>2)</sup> H. 41, 59 [1904].    <sup>3)</sup> H. 71, 204 [1911].

<sup>4)</sup> B. 44, 626 [1911].

<sup>5)</sup> Willstätter und Kalb, B. 39, 3476 [1906]; Willstätter und Piccard, B. 41, 1458, 3245 [1908].

<sup>6)</sup> A. 363, 313 [1908].

<sup>7)</sup> In meiner erstgenannten Mitteilung wurde ausgeführt, unter welchen Bedingungen Metallverbindungen mit wechselnder Valenz, besonders Eisenverbindungen eine dem Blutfarbstoff und dessen Derivaten analoge Wirkung ausüben, d. h. in welchen Fällen sie wie diese gegenüber Wasserstoffsuperoxyd und etwa anwesenden oxydierbaren Substanzen, z. B. Chromogenen, als Katalysatoren aufzufassen sind, in welchen Fällen sie andererseits mit denselben nur einfache induzierte Reaktionen eingehen. Auf Grund quantitativer Befunde bei den in ihrer Wirkung den Peroxydasen in jeder Beziehung entsprechenden Hämoglobinderivaten wird dann die Vermutung ausgesprochen, daß die Peroxydasereaktion, ebenso wie die auch schon von mir auf die gleiche Ursache zurückgeführte Katalasereaktion auf die Anwesenheit von Metallverbindungen mit wechselnder Valenz, vermutlich komplexen Eisenverbindungen zurückzuführen

Es wäre wohl naheliegend gewesen, wenn Frl. Gertrud Woker in ihrer in der Überschrift genannten Mitteilung auf meine Vorarbeit in dem von ihr gewählten Arbeitsgebiet in diesem Zusammenhang hingewiesen hätte. Wenn sie mich darin zitiert, so geschieht das jedoch nur, um sich gegen einen Teil meiner letzterwähnten Mitteilung zu wenden, der mit der Bedeutung der Benzidin-Oxydation für Peroxydase-Untersuchungen in keinem Zusammenhang steht, und den ich selber nur als einen Nebebefund meiner Arbeit betrachtet, dementsprechend auch nicht ausführlicher bearbeitet habe. Dieser Nebebefund schien mir seinerzeit aber gerade deshalb wichtig genug, um in einer Mitteilung hervorgehoben zu werden, weil er anscheinend nicht mit der bekannten Theorie Willstätters und Kehrmanus in Übereinstimmung gebracht werden konnte, nach der tiefe Farbe ganz allgemein nicht chinoiden, sondern nur chinhydron-artigen und *meri*-chinoiden Verbindungen zukommt.

Es handelt sich um die Feststellung, daß bei Zugabe von Jodlösung zu einer wäßrigen Benzidinlösung in nicht zu großem Überschuß das Benzidin über das zunächst ausfallende halbchinoide Imo-

sei. Wenn rein organische Verbindungen dazu befähigt wären, unter gleichen Bedingungen die gleiche Reaktion wie Peroxydasen zu geben, so wären die Gründe für diese Ansicht natürlich als nicht stichhaltig zu bezeichnen. Frl. Woker glaubt nun auf ihre Beobachtung hin, daß Benzidin unter gewissen Bedingungen bei Gegenwart von einfachen Aldehyden und Wasserstoffsuperoxyd zu Benzidinblau oxydiert wird, solche einfache Verbindungen wie Formaldehyd und Acetaldehyd als Modelle der Peroxydasen und Katalasen bezeichnen zu können (B. 47, 1024 [1914]). Ich glaube indessen, daß es sich hier nicht um vergleichbare Vorgänge handelt, da ja die Menge des angewandten Aldehyds verhältnismäßig sehr groß sein muß, und die Oxydation verhältnismäßig sehr langsam erfolgt. Unter anderen Bedingungen, also etwa in verdünnter wäßriger Lösung, tritt die Reaktion nicht ein, während Peroxydasen sich in diesem Falle völlig gleichartig wie Blutfarbstoff oder anorganische Katalysatoren verhalten. Man müßte nach Frl. Woker nun trotz des gleichartigen Verlaufs ganz verschiedene Mechanismen für diese Reaktionen annehmen, also im Gegensatz zu der katalytischen Reaktion der letzteren Verbindungen induzierte oder gekoppelte Reaktionen bei Peroxydasen bzw. Katalasen. Wenn man Peroxydasen im Gegensatz zu den meisten anderen Enzymen nicht mehr als Katalysatoren ansehen will, so sollte man erwarten, daß sie sich in hinreichend großer Menge vorfinden, um auch als chemische Verbindungen mit charakteristischen Eigenschaften isoliert werden zu können. Sicherere Anhaltspunkte für die Beurteilung der chemischen Natur der Peroxydasen wird man wohl nur aus quantitativen Untersuchungen gewinnen können, bei denen die von mir angegebene Methode der Bestimmung des Benzidinblaus vielleicht einen gangbaren Weg bieten dürfte.

niumjodid hinweg unter Farbvertiefung in eine Verbindung übergeführt wird, die zweifellos die Zusammensetzung und auch die Eigenschaften eines *holo*-chinoiden Imoniumjodids besitzt, da sie bei der Reduktion unter Entwicklung eines der angewandten Jodmenge entsprechenden Oxydationswertes wieder in Benzidin übergeführt werden kann.

Die Auffassung, daß es sich dabei in der Tat um ein echtes *holo*-chinoides Imoniumsalz handle, schien auch dadurch eine Stütze zu finden, daß die dem halb-chinoiden Jodid in jeder Weise gleichenden ersten Einwirkungsprodukte anderer Oxydationsmittel ebenfalls durch weitere Einwirkung dieser in tiefer gefärbte Verbindungen vom Aussehen des vermeintlichen *holo*-chinoiden Jodids übergeführt werden mit dem Unterschied allerdings, daß sie meist nicht wie dieses auch noch bei Anwesenheit eines Überschusses des Oxydationsmittels existenzfähig sind. Gegen meine Vermutung, es möchte sich hier um stark gefärbte *holo*-chinoide Imoniumsalze des Benzidins handeln, wandte sich dann Hr. Piccard<sup>1)</sup> mit dem Einwurf, die Einwirkungsprodukte von Jod und anderen Halogenen auf Benzidin seien nicht nur Oxydations-, sondern auch Substitutionsprodukte. Diesen Einwand wies ich als nicht zutreffend zurück<sup>2)</sup>. Ich habe den Einwand allerdings, wie wohl jeder, der ihn gelesen hat, verstand und, wie ihn auch nach der mir persönlich gemachten Mitteilung der Verfasser gemeint hatte, in dem Sinne aufgefaßt, daß das Benzidin im Kern substituiert sein könnte, eine Vermutung, die nach dem Verhalten von Halogen gegen andere aromatische Amine ganz natürlich ist.

Frl. Woker glaubt nun eine Erklärung meiner Befunde im Sinne der von Hrn. Piccard geäußerten Ansicht geben zu können, wenn sie sagt, überschüssiges Halogen wirke auf die zunächst gebildete halb-chinoide Verbindung derart ein, daß die Wasserstoffatome der Iminogruppen im chinoiden Teil durch Halogen ersetzt werden, so daß also jetzt eine halb-chinoide Verbindung entsteht, deren eine Komponente Benzidin, die andere Diphenochinon-halogenimin wäre. Diese Erklärung erscheint mir sehr unwahrscheinlich, denn Halogenimine haben ein sehr viel höheres Oxydationspotential als einfache Imine, und wenn, wie ich gezeigt habe, Diphenochinon-halogenimine mit überschüssigem Benzidin unter Bildung des entsprechenden halb-chinoiden Imoniumsalzes reagieren, so kann man wohl kaum annehmen, daß zwei Verbindungen von so verschiedenem Energiegehalt wie Benzidin und Diphenochinon-halogenimin miteinander vereinigt sein können, ohne daß irgend ein Energieausgleich zwischen den beiden Teilen der entstehenden Doppelverbindung einträte. Die Zersetzung mit Säuren

<sup>1)</sup> B. 44, 626 [1911].

<sup>2)</sup> B. 44, 1674 [1911].

unter Bildung von Benzidiniumsalz und Diphenochinon-halogenimin kann aber schon aus dem Grunde nicht im Sinne der Wokerschen Deutung herangezogen werden, weil man mit demselben Recht auch z. B. den halb-chinoiden Imoniumhalogeniden des Benzidins eine Zusammensetzung aus 3 Mol. Benzidin und 1 Mol. Diphenochinon-halogenimin zuschreiben müßte, denn die Zersetzung verläuft auch hier in diesem Sinne.

Wenn ich somit die Deutungsversuche Frl. Wokers ablehnen muß, so möchte ich doch andererseits bei dieser Gelegenheit hervorheben, daß es mir in der erwähnten Mitteilung mehr darauf ankam, eine mich selber überraschende Tatsache mitzuteilen, als etwa eine neue theoretische Ansicht zu verkünden, und ich es also, wie ich übrigens schon vor Jahren Hrn. Piccard gegenüber äußerte, für ganz natürlich halte, daß man die von mir mitgeteilte Tatsache in einer Weise zu deuten versucht, die im Einklang mit der durch zahlreiche Beispiele gestützten Willstätter-Kehrmann-Schlenkschen Ansicht steht, nach der intensive Farbe bei Chinonen und Chinoniminen nur dann auftritt, wenn sie mit nicht-chinoiden Systemen, Phenolen oder Aminen, zu chinhydronartigen oder *meri*-chinoiden Verbindungen vereinigt sind. Die Deutung des vermeintlich *holo*-chinoiden Imoniumjodids könnte man also etwa in der Weise suchen, wie auch M. M. Richter<sup>1)</sup> eine Verbindung gedeutet hat, die er durch Einwirkung überschüssigen Jods auf eine benzolische Benzidinlösung erhielt. Sie bildet ein schwarzgraues Pulver, das leicht Jod abspaltet und auf 1 Mol. Benzidin sogar 3 Atome Jod enthält; sie ist also augenscheinlich ein Perjodid. Ganz ebenso wie diese Verbindung könnte man nun natürlich auch eine Verbindung, die auf 1 Mol. Benzidin 2 Atome Jod enthält, als *meri*-chinoides Perjodid bezeichnen, wenn sie auch nicht in dem Maße wie die Verbindung M. M. Richters die charakteristischen Eigenschaften eines solchen besitzt. In anderen, in quantitativer Beziehung weniger gut untersuchten Fällen, die von mir als Analoge des *holo*-chinoiden Jodids aufgefaßt wurden, könnte man ebenfalls *meri*-chinoide Systeme erblicken, in denen vielleicht mehrere chinoide Anteile auf einen nicht-chinoiden Anteil entfallen.

Es scheint mir aber, daß für eine Deutung noch wesentlich andere Gesichtspunkte heranzuziehen sind.

Ich glaube, daß Willstätter und mit ihm Schlenk durchaus berechtigterweise auf Strukturformeln bei diesen Verbindungen verzichten, und daß hier, wie so oft, eine energetische Betrachtungsweise fruchtbarer ist, als die strukturelle, bei der wir uns doch klar sein

<sup>1)</sup> B. 44, 3466 [1911].

müssen, daß die üblichen Strukturbilder nur in sehr unvollkommener und oft irreführender Weise die wirklichen Affinitätsbeziehungen zwischen den einzelnen Atomen zum Ausdruck bringen. Nach der energetischen Betrachtungsweise muß man aromatischen Diaminen, Chinoniminen, Chinonhalogeniminen entsprechend den verschiedenen Oxydationspotentialen einen verschiedenen Energiegehalt zuschreiben und zwar nicht nur den ganzen Molekeln, sondern auch ihren Teilen.

Wenn nun zwei Molekeln mit verschiedenem Energiegehalt zusammentreten, sei es auch nur zu einer leicht wieder dissoziierenden Verbindung, die man mit mehr oder minder Berechtigung als molekulare Verbindung bezeichnen kann, so muß ein gegenseitiger Energieausgleich stattfinden, und man wird daher die Frage aufwerfen können, ob man überhaupt noch in einer chinhydronartigen Verbindung von einem chinoiden und einem nicht-chinoiden Anteil reden kann, oder ob nicht beide Teile sich nach der Vereinigung in einem Sättigungszustand befinden, der zwischen dem der ursprünglichen Komponenten liegt, mit andern Worten, ob nicht beide gleich, und wenn überhaupt, auch in gleicher Weise strukturell dargestellt werden müßten<sup>1)</sup>.

Ich glaube, daß man heute ziemlich einig in der Auffassung ist, daß die Farbe organischer Verbindungen nicht auf bestimmte Bindungsweisen, sondern auf bestimmte Energiezustände der einzelnen Kohlenstoffatome zurückzuführen ist, die allerdings mit der Bindungsweise zusammenhängt. Das Gleiche, was wir beobachten, wenn die eben genannten Verbindungen auf einander einwirken, tritt nun auch dann ein, wenn ein anderes oxydierendes Agens sich mit einem *p*-Diamin vereinigt, es tritt entsprechend der Menge und des Oxydationspotentials des letzteren ein Energieausgleich ein. Wenn das Oxydationspotential des angewandten Oxydationsmittels nicht so hoch ist, wie das eines aus dem Diamin hervorgehenden Chinouimins oder Chinonimmoniumsalzes, wie das z. B. gerade beim Jod der Fall ist, so kann wenigstens in energetischer Hinsicht das entstehende Produkt nicht einer echten chinoiden Verbindung entsprechen, während möglicherweise von rein strukturellem Standpunkt aus betrachtet die *holo*-chinoide Formulierung die richtigste sein kann insofern, als vielleicht, und ich halte das sogar für wahrscheinlich, jedes Jodatome zu einem Stickstoffatom in nächster und von der aller übrigen Jodatome zu den zugeordneten Stickstoffatomen nicht abweichender Affinitätsbeziehung steht. Ich glaube aber, daß man für die nähere Zusammengehörigkeit der Atome solcher labiler und veränderlicher Molekeln keine

<sup>1)</sup> Vergl. die Ansichten Willstätters, B. 41, 1467 [1908].

wirklich stichhaltigen Beweise erbringen kann und daher eine weitere Diskussion über die Struktur des »holo-chinoiden« Diphenochinon-imoniumjodids als unfruchtbar aufgegeben werden kann.

Im Folgenden seien nun noch einige Worte gesagt zu den Ausführungen Frl. Wokers über die Bedingungen des Eintritts der Benzidinblau-Reaktion und zu der von ihr versuchten theoretischen Deutung.

Was zunächst die von Frl. Woker bzw. von dem von ihr genannten Hrn. Dr. Kjöllnerfeldt ermittelten angeblich günstigsten Bedingungen für das Eintreten der Benzidinblau-Reaktion betrifft, so halte ich die von mir benutzte wäßrige Lösung der Benzidinbase nach meinen Erfahrungen trotz der geringen Löslichkeit des Benzidins für wesentlich geeigneter als die Lösung eines Benzidinsalzes. Alle Benzidinsalze unterliegen in wäßriger Lösung dem hydrolytischen Zerfall, und es erscheint mir als im höchsten Grade wahrscheinlich, daß immer nur der vollständig hydrolytisch zerfallene Anteil eines Salzes an der Reaktion teilnimmt, während umgekehrt die Gegenwart von H-Ionen auf schon gebildetes Benzidinblau spaltend einwirkt. Alle Beobachtungen von Frl. Woker, wie die der Autoaktivierung, der Abhängigkeit von der Herstellungsweise usw. stehen mit dieser Auffassung im besten Einklang. Daß die Gegenwart eines Benzidinsalzes für die Bildung von Benzidinblau nicht nötig ist, geht schon daraus hervor, daß sie auch in völlig neutraler Lösung mit wäßriger Benzidinlösung in nicht unbeträchtlicher Menge erfolgt, sofern nur die für die Bildung des salzartige Natur besitzenden Benzidinblaus notwendigen Anionen vorhanden sind, also auch bei Gegenwart eines neutralen Mineralsalzes. Da aber dann gleichzeitig mit der Bildung des Benzidinblaus Hydroxyl-Ionen auftreten müssen, gegen die diese Verbindung noch empfindlicher ist als gegen H-Ionen, so kann die Menge des gebildeten Benzidinblaus nicht sehr anwachsen, wenn man nicht für die Neutralisierung der Hydroxyl-Ionen Sorge trägt. Das geschieht zweckmäßig durch Zusatz einer nur schwach elektrolitisch dissoziierenden Säure, wie Essigsäure, zu einer wäßrigen Lösung von Peroxydase, Benzidin, Wasserstoffsuperoxyd und Natriumchlorid, oder noch besser durch Einleiten von Kohlensäure während der Reaktion.

Ich glaube nun auch, daß die in der Zusammenfassung der Wokerschen Arbeit unter 3—10 angeführten Tatsachen gar nicht einer neuen theoretischen Deutung bedürfen, sondern sich in sehr einfacher Weise einerseits aus dem hydrolytischen Zerfall der Benzidinsalze, andererseits aus den Bedingungen der Bildungsweise und Existenzfähigkeit des Benzidinblaus ableiten lassen, auf die ich schon in meinen angeführten Mitteilungen hingewiesen habe.

Daß sich die Molekeln der Benzidinbase und ebenso diejenigen des teilweise hydrolytisch zerfallenen oder teilweise basischen Benzi-

diniumsalzes bezw. deren Ionen in wäßriger Lösung bei der außerordentlich geringen Löslichkeit zum großen Teile im assoziierten Zustande befinden, ist durchaus wahrscheinlich. Daß sich dabei aber Verbindungen mit fünfwertigem Stickstoff bilden sollen von einer Art, die bisher völlig analogielos dasteht, von der aber angenommen wird, daß ihre Bindungsweise eine neue Art von *cis-trans*-Isomerie ermögliche, ist eine derart überraschende Hypothese, daß sie wohl erst dann ernsthaft in Betracht gezogen zu werden braucht, wenn auf Analysen gestützte Beweise für die wirkliche Existenz solcher Isomeren vorliegen.

Vorläufig ist es jedenfalls das Einfachste, wenn man in der Substanz, die als ein Beispiel der aktiven Modifikation von Benzidinsalzen angeführt wird, und die der neuen Hypothese als einzige experimentelle Stütze dient, das basische Benzidinchlorhydrat erblickt, eine Verbindung, von der bekannt ist<sup>1)</sup>, daß sie sich durch hydrolytischen Zerfall des Benzidindichlorhydrats bildet, und die in ihren Eigenschaften wenigstens hinsichtlich der Krystallform und der Löslichkeit mit der von Frl. Woker beschriebenen Substanz übereinstimmt.

### 16. Franz Fischer und W. Glud: Notiz über die optische Aktivität von Tieftemperatur- und Steinkohlen-Generator-Teer.

[Mitteilung aus dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Kohlenforschung,  
Mülheim-Ruhr.]

(Eingegangen am 25. November 1916.)

In einer kürzlich<sup>2)</sup> erschienenen Arbeit berichten A. Pictet, L. Ramseyer und O. Kaiser über die am Benzolextrakt aus Steinkohle beobachtete optische Aktivität und geben an, daß sie bei den Produkten der Vakuumdestillation der Kohle niemals Drehung beobachtet haben. Sie schließen daraus, daß die für die Vakuumdestillation nötige Temperatur von 450° genügen müsse, um die Drehung der Kohleprodukte zu zerstören, und sehen daher in der Tatsache, daß sie optisch-aktive Produkte aus der Kohle isoliert haben, einen Beweis, daß die Kohle bei ihrer Entstehung keine solchen Temperaturen erlebt haben könne.

Anschließend hieran möchten wir nun im Folgenden über einige Fälle von an Kohleprodukten beobachteter optischer Aktivität berichten, die zeigen, daß beim Erhitzen von Kohle auch auf Tempe-

<sup>1)</sup> Beilstein, 3. Aufl., Bd. IV, 961.

<sup>2)</sup> C. r. 163, 358 [1916]; vergl. auch Ch. Z. 1916, 211.