

0.1785 g Sbst.: 0.4016 g CO₂, 0.0824 g H₂O. — 0.1087 g Sbst.: 21.1 ccm N (23°, 724 mm).

C₁₄H₁₄O₂N₄. Ber. C 62.22, H 5.18, N 20.73.
Gef. » 62.30, » 5.21, » 20.80.

Das Diaminodimethoxydiphenazon ist unlöslich in Ligroin und Aether, etwas löslich in Wasser. Benzol, Alkohol und Chloroform lösen die Substanz besonders in der Siedehitze gut mit gelber Farbe auf. Die Lösung in Eisessig ist gelbroth gefärbt.

Das Chlorhydrat wird durch Auflösen der Base in verdünnter, warmer Salzsäure erhalten. Es scheidet sich dann aus der dunklen, blutrothen Lösung in schönen, rothen, metallisch-glänzenden Kryställchen aus. Dieselben lösen sich in Wasser mit orangegelber Farbe. Das auf diese Weise erhaltene Salz scheint zweisäurig zu sein. Bei 105° verliert es bereits etwas Salzsäure, wodurch die Chlorbestimmung zu niedrige Zahlen gab.

0.3118 g Sbst.: 0.2313 g AgCl.

C₁₄H₁₄O₂N₂.2HCl. Ber. Cl 20.73. Gef. Cl 18.35.

C₁₄H₁₄O₂N₄.HCl. » » 11.60.

Genf, November 1903. Universitätslaboratorium.

6. R. Chodat und A. Bach: Untersuchungen über die Rolle der Peroxyde in der Chemie der lebenden Zelle.

VII. Einiges über die chemische Natur der Oxydasen.

(Eingegangen am 9. December 1903.)

Von der Annahme ausgehend, dass die sogenannten Oxydasen nur leicht oxydable Körper seien, welche den molekularen Sauerstoff unter Peroxydbildung aufnehmen, versuchten wir¹⁾, die bei der Einwirkung von Sauerstoff auf Oxydasen intermediär entstehenden Peroxyde näher zu charakterisiren. Beim Behandeln des frischen, oxydasehaltigen Saftes der *Lathraea squamaria* mit einem reinen Luftstrom unter tropfenweisem Zusatz von 1-procentiger Barytlösung erhielten wir einen Barytniederschlag, welcher nach Auswaschen und Zersetzen mit verdünnter Schwefelsäure die bekannte Hydroperoxydreaction mit Titanschwefelsäure nicht gab, dagegen das Jodkalium-Stärke-Reagens sofort und intensiv bläute. Da, mit dem Griess'schen Reagens geprüft, die schwefelsaure Lösung sich als völlig frei von salpetriger Säure erwies, so drängte sich der Schluss auf, dass die Jodausscheidung aus Jodkalium durch ein substituirtes Hydroperoxyd hervorgerufen war. Ein ähnlicher Versuch mit beim Stehenlassen inactiv gewordenem *Lathraea*-Saft ergab, was die Jodausscheidung be-

¹⁾ Diese Berichte 35, 2466 [1902].

trifft, ein vollkommen negatives Resultat. Die Entstehung des Peroxyds war daher anscheinend mit der Anwesenheit von Oxydase im *Lathraea*-Saft verbunden.

Dieses Ergebniss veranlasste uns, oxydasehaltige (guajacbläuende) Pflanzenobjecte auf ihre Fähigkeit, Jod aus Jodkalium frei zu machen, einer eingehenden Prüfung zu unterziehen. Die Versuche wurden in der Weise ausgeführt, dass mit Guajactinctur und Jodkalium-Stärkekleister getränktes Reagenspapier mit frischen Schnitten der Pflanzentheile berührt und die erhaltenen Abdrücke untersucht wurden. In zahlreichen Fällen konnten wir auf diesem Wege constatiren, dass zwischen der Guajacreaction auf Oxydase und der Jodentbindung aus Jodkalium ein strenger Parallelismus bezüglich der relativen Intensität beider Reactionen, sowie der Localisation des oxydirenden Principes besteht.

Durch die Vermittelung der Jodkalium-Stärke-Reaction wurde von uns¹⁾ weiter der Beweis geführt, dass die Peroxydbildung — insofern dieselbe durch die Jodentbindung aus Jodkalium gekennzeichnet wird — nicht nur im ausgetretenen Saft der Pflanzen, sondern auch in der lebenden Zelle selbst stattfindet. Mit Jodkaliumlösung versetzte Dünnschnitte von oxydasehaltigen Kartoffelknollen zeigten unter dem Mikroskop eine intensive Blaufärbung der im Inneren der Zellen enthaltenen Stärkekörner. Dass die so behandelten Zellen noch am Leben waren, wurde durch nachträgliche Plasmolyseversuche nachgewiesen. Auch hier war der Parallelismus der Guajacreaction auf Oxydase und der Jodausscheidung ein vollkommener. Denn dem Inneren der Kartoffelknollen entnommene Dünnschnitte, welche Guajactinctur nicht bläuten, zeigten auch beim Behandeln mit Jodkaliumlösung unter dem Mikroskop nicht die mindeste Blaufärbung der Stärkekörner. Dass die Zersetzung des Jodkaliums gerade durch die Oxydase und nicht durch einen anderweitigen Bestandtheil der Zelle oder des Pflanzensaftes bewirkt wird, wurde von uns²⁾ später dadurch bestätigt, dass wir aus Pilzen (*Russula foetens*, *Lactarius vellereus*) eine Oxydase darstellten, welche neben den üblichen Oxydasereactionen auch die Fähigkeit, Jod aus Jodkalium zu entbinden, in hohem Grade besass. Die Identität des guajacbläuenden Principes mit demjenigen, welches Jod aus Jodkalium frei macht, war somit mit voller Bestimmtheit festgestellt.

Neuerdings suchte Aso³⁾ zu beweisen, dass das jodentbindende, oxydirende Princip mit den eigentlichen Oxydasen nicht identisch sei.

¹⁾ l. c. 2469.

²⁾ Diese Berichte 35, 3043 [1902].

³⁾ Beihefte z. bot. Centralbl. 15, 208 [1903], und (mit einigen Abänderungen) Bull. Coll. of Agric. Tokyo, 5, 481 [1903].

Er beruft sich dabei auf die von uns¹⁾ gemachte Beobachtung, dass beim Stehen der Pflanzensäfte oder beim Verwelken der Pflanzen sowohl die Guajacreaction, wie die Jodkalium-Stärke-Reaction allmählich abgeschwächt werden, dass aber dabei Letztere rascher verschwindet als Erstere. Also folgert daraus, dass die betreffenden oxydirenden Agentien von verschiedener chemischer Natur seien. Er trägt aber hier keine Rechnung der längst bekannten Thatsache, dass die Guajacreaction auf Peroxyde bei weitem empfindlicher ist als die Jodkalium-Stärke-Reaction²⁾. Es ist daher kein Wunder, dass diese bereits versagt, wenn jene nur mehr oder weniger abgeschwächt erscheint. Dazu kommt noch, dass beim Stehen der Pflanzensäfte in Folge der Autolyse Körper entstehen können, welche auf Guajacblau ohne Einwirkung sind, während sie Jod leicht addiren und die Empfindlichkeit der Jodstärkereaction noch weiter herabsetzen.

Das von Aso angeführte Argument trifft also nicht zu.

Um seine Ansicht experimentell zu begründen, stellte Aso Versuche mit 6 Pflanzensäften an und erhielt dabei die Guajacreaction, nicht aber die Jodstärkereaction. Berücksichtigt man die oben erwähnten Eigenschaften der betreffenden Reagentien, so wird der von Aso gemachte Befund nicht unerwartet erscheinen, um so weniger, als das Verschwinden der Jodstärkereaction im Saft zahlreicher Pflanzen (Phanaerogamen), welche im frischen Zustande diese Reaction in sehr ausgeprägter Weise zeigen, von uns bereits in der II. Mittheilung eingehend besprochen worden ist.

Aso versuchte auch, die chemische Natur des jodentbindenden Principis näher zu ermitteln. Durch Extraction von Knospen der *Sagittaria sagittifolia* mit heissem Wasser erhielt er eine Flüssigkeit, welche sowohl die Guajacreaction, wie die Jodkalium-Stärke-reaction gab. Da nach Erhitzen Letztere nicht verschwand, so vermuthete Aso, dass die Jodentbindung durch ein Nitrit bedingt war, und konnte in der That mit dem Griess'schen Reagens die Anwesenheit von Salpetrigsäure nachweisen. Er meint, dass auch in anderen Pflanzen die Jodentbindung durch diese Säure bewirkt wird.

Wir wiederholten Aso's Versuch mit den *Sagittaria*-Knospen und fanden, dass seine Angabe insofern richtig ist, als nach kurzem Erhitzen das wässrige Extract Jodkalium noch merkbar zersetzt. Wird es aber 3—4 Minuten zum Sieden erhitzt, so verliert es vollständig seine Fähigkeit, Jodkalium zu zersetzen. Der von uns erhaltene wässrige Auszug war röthlich-braun und für die directe Ausföhrung der Griess'schen Reaction unbrauchbar. Durch Versetzen

¹⁾ Diese Berichte 35, 2468 [1902].

²⁾ Em. Schöne, Zeitschr. für analyt. Chem. 1893, 137.

mit basischem Bleiacetat konnte die Flüssigkeit entfärbt werden. Sie gab aber in diesem Zustande weder die Jodstärkereaction, noch die Griess'sche Reaction. Der anfangs ziemlich active Auszug verlor nach 24-stündigem Stehen seine oxydirenden Eigenschaften gegenüber der Guajactinctur und dem Jodkalium-Stärkekleister, was ebenfalls gegen das Vorhandensein eines Nitrites spricht.

Aso untersuchte auch den aus den Knollen der *Sagittaria sagittifolia* gewonnenen Saft und fand, dass derselbe völlig nitritfrei war. Hätte er die Knollen nach der von uns angewandten Methode weiter geprüft, so hätte er sich überzeugen können, dass dieselben — trotz der Abwesenheit von Nitriten — die Fähigkeit besitzen, Jod aus Jodkalium frei zu machen. Berührt man nämlich mit einem frischen Schnitt der *Sagittaria*knolle ein Jodkalium-Stärke-Papier, so entsteht nach kurzer Zeit auf der berührten Stelle ein blauvioletter Ring, welcher den peripherischen Zellschichten der Knolle entspricht. Auf mit Guajactinctur getränktem Papier erhält man in ähnlicher Weise einen tiefblauen, auf mit *m*-Phenylendiamin getränktem Papier einen prachttollen blauen Ring. Alle drei Abdrücke decken sich vollständig mit einander, was wiederum auf die Localisation des oxydirenden Principis in denselben peripherischen Zellschichten deutet.

Zu der Annahme, dass die Zersetzung des Jodkaliums durch ein Agens bewirkt wird, welches von den Oxydasen verschieden ist, liegt also keinerlei Veranlassung vor. Will man nun die Jodentbindung der salpetrigen Säure zuschreiben, wie es Aso thut, so kann man nicht umhin, sämtliche durch die Oxydasen hervorgerufenen Oxydationserscheinungen ebenfalls auf die Anwesenheit dieser Säure zurückzuführen. Denn das Verhalten der Salpetrigsäure ist — bei den hier in Betracht kommenden Oxydationserscheinungen — demjenigen der Oxydasen in qualitativer und quantitativer Hinsicht auffallend ähnlich.

Dass die üblichen Reagentien auf Oxydasen — Guajactinctur, Pyrogallol u. s. w. — durch Salpetrigsäure in derselben Richtung wie durch Oxydasen oxydirt werden, ist längst bekannt. Es war aber von Interesse, durch quantitative Versuche festzustellen, in wie weit diese Säure bei der Oxydation des Pyrogallols, wie die Oxydasen, als sauerstoffübertragendes Agens fungiren kann.

Die von uns angestellten Versuche wurden in 3 Apparaten, wie in der IV. Mittheilung beschrieben, gleichzeitig ausgeführt. Die Apparate wurden mit gleichen Mengen einer 10-procentigen Pyrogallollösung, wachsenden Mengen einer Kaliumnitritlösung von bekanntem Gehalt in Salpetrigsäure und den berechneten Mengen verdünnter Essigsäure beschickt und das Volumen der Gemische mit Wasser auf 30 ccm gebracht.

¹⁾ Diese Berichte 36, 604 [1903].

Apparat A erhielt 1 g Pyrogallol, 2.5 mg Salpetrigsäure, 30 ccm Wasser.

» B » 1 » » 5.0 » » 30 » »
 » C » 1 » » 7.5 » » 30 » »

Die Versuche wurden unter sonst gleichen Bedingungen ausgeführt, und der absorbirte Sauerstoff auf den Gasburetten gleichzeitig abgelesen. Wir erhielten dabei folgende Zahlen:

Absorbirter Sauerstoff.						
	A	B	C			
Nach 1 Stunde . . .	0.4 ccm	1.0 ccm	1.8 ccm	Temperatur	16.5 ^o	
» 2 Stunden . . .	1.0 »	2.2 »	3.4 »		—	
» 3 » . . .	1.6 »	3.2 »	5.2 »		—	
» 24 » . . .	4.4 »	6.2 »	7.6 »	Temperatur	16.7 ^o	
» 48 » . . .	8.6 »	9.8 »	11.6 »		» 16.3 ^o	

(nicht reducirt).

Zum Vergleich wurden ähnliche Oxydationsversuche mit wechselnden Mengen einer möglichst reinen Oxydase Lösung ausgeführt. Die angewandten Oxydasemengen standen, wie es bei der salpetrigen Säure der Fall war, im Verhältnisse A:B:C = 1:2:3.

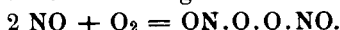
Absorbirter Sauerstoff						
	A.	B.	C.			
Nach 1 Stunde . . .	1.6 ccm	2.6 ccm	4.4 ccm	Temperatur	16 ^o	
» 2 Stunden . . .	2.6 »	3.8 »	5.6 »		—	
» 3 » . . .	3.4 »	5.0 »	7.2 »		—	
» 24 » . . .	5.8 »	8.4 »	10.4 »	Temperatur	16.5 ^o	
» 48 » . . .	7.1 »	9.8 »	14.4 »		» 16.5 ^o	

(nicht reducirt).

Aus diesen Versuchen geht hervor, dass in passender Verdünnung¹⁾ die salpetrige Säure sich bei der Oxydation des Pyrogallols genau wie eine Oxydase verhält. Berücksichtigt man nur die nach 24 und 48 Stunden absorbirten Sauerstoffmengen, so ergibt sich sogar, dass dieselben der Quadratwurzel aus den angewandten Mengen der salpetrigen Säure fast genau proportional sind, ein Verhältniss, welches als charakteristisch für die Wirkungsweise der Fermente gilt. Bei der Oxydation des Pyrogallols durch Oxydase ist diese Proportionalität gerade weniger deutlich. Zieht man noch in Betracht, dass in beiden Fällen dasselbe Oxydationsproduct — das Purpurogallin — erhalten wird, und dass die wichtigsten, die Oxydasewirkung illustrierenden, quantitativen Versuche mit Pyrogallol ausgeführt wurden, so erscheint als a priori nicht ausgeschlossen, dass die salpetrige Säure oder eine der Nitrosylschwefelsäure analoge Verbindung das active

¹⁾ In weniger verdünnten Lösungen von salpetriger Säure tritt nach rascher Sauerstoffabsorption beträchtliche Gasentwicklung ein, sehr wahrscheinlich in Folge der jüngst von C. Oppenheimer (diese Berichte 36, 1744 [1903]) beobachteten Reduction des Stickstoffoxyds zu Stickstoffoxydul durch das Pyrogallol.

Princip der Oxydase ist. Natürlich dürfte auch hier die von uns vertretene Peroxydtheorie der freiwilligen Oxydation sich geltend machen. Denn es kann kaum bezweifelt werden, dass bei der Einwirkung von molekularem Sauerstoff auf Stickstoffoxyd — den sauerstoffübertragenden Rest der salpetrigen Säure — zuerst nicht Stickstoffdioxyd, sondern ein Peroxyd von etwa folgender Zusammensetzung entsteht:



Ist eine oxydirbare Substanz (Acceptor) vorhanden, so wird das intermediär entstehende Peroxyd sofort zu Salpetrigsäureanhydrid und dann weiter zu Stickstoffoxyd reducirt. Im entgegengesetzten Falle erleidet es eine intramolekulare Oxydation und zerfällt in zwei Moleküle Stickstoffdioxyd:



Die auffallende Aehnlichkeit der Wirkungsweise der salpetrigen Säure mit derjenigen der Oxydasen veranlasste uns, die reinsten saurerer Oxydasepräparate auf die Anwesenheit von salpetriger Säure sorgfältigst zu prüfen.

0.03 g eines fast vollkommen weissen, sehr activen Oxydasepräparates aus *Lactarius vellereus* wurden in 30 ccm Wasser gelöst, und in einem Antheil der klaren Lösung wurde die Oxydase durch Erhitzen im siedenden Wasserbade zerstört. Die nicht erhitzten und die erhitzten Oxydaselösungen wurden dann mit verschiedenen Reagentien unter gleichen Bedingungen geprüft. Die erhaltenen Resultate sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

Reagentien	Nicht erhitzte Oxydaselösung	Erhitzte Oxydaselösung
Guajac-Emulsion	Sofortige intensive Blaufärbung	Farblos
Jodkalium-Stärkekleister ¹⁾	Nach 2 Min. deutlich violett, dann allmählich tiefblau	Farblos ebenso nach 24 Stunden
Diphenylamin in concentrirter Schwefelsäure	Farblos	Farblos
<i>m</i> -Phenylendiamin in sehr schwacher Essigsäure gelöst	Zuerst violett, dann prachtvoll blau	Wie das Reagens selbst
<i>m</i> -Phenylendiamin in Gegenwart von Schwefelsäure, nach Griess	Wie das Reagens selbst	Wie das Reagens selbst
α -Naphtylamin-Sulfanilsäure in verdünnter Essigsäure	Dunkel blauviolett	Schwach orangegeb.

¹⁾ Aso (l. c. 210) giebt an, dass gereinigte Oxydase die Fähigkeit nicht mehr besitzt, Jod aus Jodkalium frei zu machen. Diese Angabe ist vielleicht für die wenig haltbaren Phanärogamenoxydasen, nicht aber für die sehr beständigen Pilzoxidasen richtig.

Das Ausbleiben der so empfindlichen Reactionen auf Nitrite mit dem Diphenylamin und den beiden Griess'schen Reagentien zeigt in entschiedenster Weise, dass das von uns untersuchte Oxydasepräparat völlig frei von salpetriger Säure war. Trotz der überraschenden Aehnlichkeit der Wirkungsweise ist also das active Princip der Oxydase mit der salpetrigen Säure nicht identisch. Charakteristisch für die Oxydasewirkung ist weiter die Bildung eines schönen Blaufarbstoffes aus *m*-Phenylendiamin in Gegenwart von verdünnter Essigsäure. Derselbe Farbstoff entsteht auch bei der Einwirkung von Hydroperoxyd und Peroxydase auf *m*-Phenylendiamin, während andere Oxydationsmittel dasselbe zu einem braungelben Farbstoff oxydiren¹⁾. Diese Beobachtung bestätigt nochmals die von uns²⁾ festgestellte Gleichwerthigkeit der Systeme Peroxydase + Oxygenase und Peroxydase + Hydroperoxyd.

Bezüglich der näheren chemischen Natur der Oxydationsfermente sind wir noch leider in voller Dunkelheit. Die activsten der von uns dargestellten Oxydase- und Oxygenase-Präparate geben nur äusserst schwache, kaum als deutlich zu bezeichnende Eiweissreactionen; sie enthalten dagegen reichliche Mengen von gummiartigen Substanzen. Dass die reineren Peroxydasepräparate die Eiweissreactionen nicht geben, ist bereits in der IV. Mittheilung³⁾ erwähnt worden. Die Eiweissnatur der Oxydationsfermente ist daher für uns noch sehr fraglich.

Unsere bisherigen Erfahrungen stimmen also mit den über die Natur der Oxydationsfermente — insbesondere der thierischen Oxydationsfermente — herrschenden Ansichten nicht überein. So hält z. B. Spitzer⁴⁾ die Oxydationsfermente für Nucleoproteide und zieht aus dieser Voraussetzung sehr weitgehende Schlussfolgerungen bezüglich der Bedeutung der Kernsubstanz der Zelle für die in Letzterer sich abspielenden Oxydationsprocessen. Die interessante Ansicht von Spitzer scheint uns aber auf einer ziemlich mangelhaften experimentalen Grundlage zu beruhen, da die Nucleoproteidnatur seiner Oxydationsfermente keineswegs als bewiesen anzusehen ist. Das Substrat der Fermente hängt ausschliesslich von der Natur der angewandten Materialien und der Darstellungsweise ab. Die Spitzer'schen Oxydationsfermente wurden aus Lösungen, welche reichlich Nucleoproteide enthielten, gewonnen und wiesen daher die Eigenschaften der Nucleoproteide auf, während bei den aus Pilzen dargestellten Oxydasepräparaten das

¹⁾ In Abwesenheit von Peroxydase wird *m*-Phenylendiamin in essigsaurer Lösung durch Hydroperoxyd nur äusserst langsam angegriffen; in Gegenwart von Ferrosulfat entsteht ein braungelber Farbstoff.

²⁾ Diese Berichte 36, 606 [1903]. ³⁾ Diese Berichte 36, 600 [1903].

⁴⁾ Pflüger's Archiv 67, 615 [1897].

active Princip von gummiartigen Stoffen festgehalten wird und mit denselben aufgelöst und ausgefällt werden kann. Unwillkürlich denkt man hier an eine Analogie mit den radioactiven Substanzen, welche ebenfalls an inerten Stoffen, wie Baryumsulfat, Bleichlorid u. s. w., haften. Nun ist es kaum nöthig hervorzuhellen, dass es bei den Fermenten ebensowenig, wie bei den radioactiven Substanzen, zulässig ist, die chemische Natur des Substrates auf das active Princip selbst ohne weiteres zu übertragen.

Genf. Pflanzenchemisches Laborat. des Botanischen Institutes.

7. A. Rising: Ueber die Methyl- und Aethyl-Aether des *p*-Oxyphenylhydroxylamins und die daraus dargestellten Azoxyverbindungen.

(Eingegangen am 16. December 1903.)

Mit Studien über die Reductionsproducte der Nitroanisole und Nitrophenetole beschäftigt, veranlassen mich die Untersuchungen von Th. Rotarski¹⁾ über die Schmelzerscheinungen des *p*-Azoxyanisols zu einer kurzen Mittheilung, durch welche die Widerlegung der von Rotarski gezogenen Schlüsse durch Schenck und Eichwald²⁾ in Bezug auf die Hypothese der flüssigen Krystalle bestätigt werden soll.

p-Anisolhydroxylamin (*p*-Methoxyphenylhydroxylamin).

Die Darstellung dieser Base aus *p*-Nitroanisol erfordert in Folge ihrer leichten Zersetzbarkeit noch genauere Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen als die der schon bekannten, von Bamberger und seinen Schülern dargestellten Arylhydroxylamine.

15.3 g *p*-Nitroanisol werden in 60 ccm Alkohol gelöst und mit einer Lösung von 2 g Salmiak in 50 ccm Wasser gemischt. Die Mischung wird auf 65° erwärmt und im Verlauf von 2 Minuten mit 15 g Zinkstaub versetzt, dann noch 3 Minuten bei 65° geschüttelt, schnell abgesaugt und mit ca. 50 ccm heissem Alkohol nachgewaschen. Das Filtrat wird in einer Kältemischung abgekühlt, die hierdurch entstandene Abscheidung abgesaugt und auf der Filterplatte mit Benzol gewaschen, bis der Rückstand rein weiss erscheint. Dieser stellt reines *p*-Anisolhydroxylamin in einer Ausbeute von ca. 50 pCt. der Theorie dar. Das alkoholische Filtrat enthält, neben unverändertem *p*-Nitroanisol und *p*-Anisidin, sehr wenig *p*-Anisolhydroxylamin; die

¹⁾ Diese Berichte 36, 3158 [1903].

²⁾ Diese Berichte 36, 3873 [1903].