

OXYDATION VON BENZIDIN, *o*-TOLIDIN UND *o*-DIANISIDIN MIT DEM DIPHOSPHATKOMPLEX DES DREIWERtigen MANGANS IM PUFFERMEDIUM*

J. BAREK und A. BERKA

*Institut für analytische Chemie,
Karlsuniversität, 128 40 Prag 2*

Eingegangen am 13. Mai 1976

Es wurde nachgewiesen, daß die Oxydation der untersuchten Substanzen mit dem Diphosphatkomplex des dreiwertigen Mangans im Puffermedium in zwei Stufen verläuft, wobei es sich beim Reaktionsprodukt um das freie Radikal vom Semi-chinondiiminotyp handelt, das sich im Gleichgewicht mit seinem Dimer vom Chinhydrontyp befindet; es wurde die Abhängigkeit der Dimerisationskonstanten vom pH-Wert gemessen.

In der vorhergehenden Mitteilung dieser Serie¹ wurde die Aufmerksamkeit auf die Oxydation von Benzidin, *o*-Tolidin und *o*-Dianisidin mit dem Diphosphatkomplex des dreiwertigen Mangans und dem Mangan(III)-sulfat im sauren Medium gerichtet. Im übersichtlichen Referat² wurde u. a. auf die Vorteilhaftigkeit der Verwendung des Diphosphatkomplexes des dreiwertigen Mangans zwecks Untersuchung des Verlaufs von Modelloxydationsreaktionen in weiten Aziditätsgrenzen gelenkt. Mit Rücksicht auf die Voraussetzung³, daß der Oxydationsmechanismus von Benzidin, *o*-Tolidin und *o*-Dianisidin im Puffermedium unmittelbar mit der Problematik der karzinogenen Einwirkung dieser Substanzen in Zusammenhang steht, wurde in der vorliegenden Arbeit die Aufmerksamkeit auf den Mechanismus deren Oxydation mit dem Diphosphatkomplex des dreiwertigen Mangans im Puffermedium, also unter Bedingungen, die denen der enzymatischen Oxydation im lebenden Organismus relativ nahe sind, gelenkt.

EXPERIMENTELLER TEIL

Reagentien

Die 0,01M Lösung des Diphosphatkomplexes des dreiwertigen Mangans im Medium mit der erforderlichen Chlorwasserstoffsäure-, Natriumdiphosphat- und Mangan(II)-sulfatkonzentration wurde auf früher beschriebene Weise⁴ hergestellt. Die Konzentration des Wirkungsstoffes

* VI. Mitteilung in der Reihe Oxydation organischer Substanzen mit Verbindungen des dreiwertigen Mangans; V. Mitteilung: diese Zeitschrift 41, 1334 (1976).

wurde mittels potentiometrischer Titration mit Eisen(II)-sulfat bestimmt. 0,005M Benzin-, *o*-Tolidin- und *o*-Dianisidinlösungen wurden durch Lösen einer präzise abgewogenen Substanzmenge in 200 ml 0,1M-HCl und Auffüllen mit Wasser auf 1 Liter hergestellt. Die Britton-Robinsonschen und Acetatpufferlösungen wurden auf herkömmliche Weise bereitet, wobei deren pH-Wert potentiometrisch kontrolliert wurde.

Apparatur

Die potentiometrischen Titrations wurden mit Hilfe des Titers TTTI und der automatischen Bürette ABU1 unter Verwendung der Platinelektrode P101 als Indikator- und einer gesättigten Kalomelektrode K401 als Bezugselektrode (sämtliche Erzeugnisse Radiometer, Kopenhagen) durchgeführt. Die spektrophotometrischen Messungen wurden mit Hilfe des Spektrophotometers „Unicam SP 800“ (Unicam Instruments, Otd., England) in 1 cm-Quarzküvetten vorgenommen. Die EPR-Spektren wurden mittels des im X-Band arbeitenden „EPR-Spektrometers E4“ (Varian) gemessen.

Arbeitsgänge

Potentiometrische Reaktionsprüfung. 1,00 ml der 0,005M Lösung des entsprechenden Diamins wurde mit 49 ml Britton-Robinsonscher Pufferlösung vom diesbezüglichen pH-Wert versetzt, worauf die Lösung mit einer 0,01M Lösung des Diphosphatkomplexes des dreiwertigen Mangans in 0,2M-HCl, 0,05M- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und 0,02M- MnSO_4 unter potentiometrischer Kontrolle titriert wurde.

Spektrophotometrische Reaktionsüberprüfung. Bei der Untersuchung der Spektraländerungen in Abhängigkeit von der Oxydationsstufe wurde so vorgegangen, daß 0,25 ml der 0,005M entsprechenden Diaminlösung mit 25 ml Britton-Robinsonscher Pufferlösung von bestimmtem pH-Wert und mit 1,25, 2,50, 3,75 und 5,00 ml der $5 \cdot 10^{-4}$ M Lösung des Diphosphatkomplexes des dreiwertigen Mangans in 0,05M-HCl, 0,01M- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und 0,01M- MnSO_4 versetzt wurden, worauf nach Auffüllen mit Wasser auf 50 ml sofort ihr Absorptionsspektrum gemessen wurde.

Beim Messen der Absorptionsspektren der bei der Oxydation der untersuchten Diamine entstehenden Produkte im Medium mit verschiedenem pH-Wert wurde so vorgegangen, daß 5,00 ml einer 0,005M Lösung des entsprechenden Diamins mit 25 ml Britton-Robinsonscher Pufferlösung von bestimmtem pH-Wert und mit 0,5 ml 0,01M Lösung des Diphosphatkomplexes des dreiwertigen Mangans in 0,2M-HCl, 0,05M- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ und 0,02M- MnSO_4 versetzt wurden. Darauf

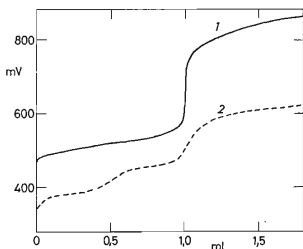


ABB. 1

Potentiometrische Titrationskurve für die *o*-Tolidintitration mit 0,01M-Lösung des Diphosphatkomplexes des dreiwertigen Mangans im Medium mit dem pH-Wert 1 2,0 und 2 4,0

wurde nach Auffüllen der Lösung mit destilliertem Wasser auf 50 ml sofort ihr Absorptionsspektrum gemessen.

Messung der EPR-Spektren. 5,00 ml der 0,005M Lösung des entsprechenden Diamins wurden mit 40 ml Acetatpufferlösung vom pH-Wert 4 und 1,00 ml der 0,025M Lösung des Diphosphatkomplexes des dreiwertigen Mangans in 0,2M-HCl, 0,1M-Na₄P₂O₇ und 0,1M-MnSO₄ versetzt worauf nach Auffüllen mit destilliertem Wasser auf 50 ml sofort das EPR-Spektrum gemessen wurde.

Messung der Dimerisationskonstantenwerte. 1,00 ml der 0,005M Lösung des entsprechenden Diamins wurde mit 49 ml Britton-Robinsonscher Pufferlösung mit dem entsprechenden pH-Wert versetzt, worauf aus einer Bürette aufeinmal eine 0,01M Lösungsmenge des Diphosphatkomplexes des dreiwertigen Mangans in 0,2M-HCl, 0,05M-Na₄P₂O₇ und 0,02M-MnSO₄, entsprechend einer 25%igen, bzw. 50%igen Oxydation (berechnet mit Bezug auf die vollständige Zweielektronenoxydation) zugegeben wurde; der Wert des Platinelektrodenpotentials wurde dann sofort abgelesen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Potentiometrische Reaktionsuntersuchung

Aus den potentiometrischen Titrationsergebnissen der untersuchten Substanzen durch den Diphosphatkomplex des dreiwertigen Mangans im Puffermedium ergibt sich folgendes Bild: Während sich im Medium mit dem pH-Wert 2 direkt Zweielektronenoxydation zu den entsprechenden Chinondiimin einstellt (Abb. 1, Kurve 1), erfolgt bei höherem pH-Wert ein stufenförmiger Reaktionsverlauf, der sich einerseits in der Änderung der Gestalt der potentiometrischen Titrationskurve (Abb. 2, Kurve 2), andererseits in ausgeprägten Farbänderungen beim Titrationsverlauf äußert. Aus ihnen kann desweiteren geschlossen werden, daß im Verlauf der untersuchten Reaktionen das Entstehen intensiv gefärbter Reaktionszwischenprodukte erfolgt, deren Absorptionsspektren sich von denen der Ausgangssubstanzen und der Endprodukte unterscheiden werden. Im Bestreben, diese Reaktionszwischenprodukte zu identifizieren, wurde die spektrophotometrische Untersuchung des Ablaufs der untersuchten Reaktionen in Angriff genommen.

Spektrophotometrische Reaktionsuntersuchung

Vorerst wurde festgestellt, wie sich die Spektren bei verschiedenem pH-Wert der Lösungen der oxydierten Substanzen im Reaktionsverlauf ändern. Daher wurden die Spektren der $2,5 \cdot 10^{-5}$ M Lösungen der untersuchten Diamine gemessen, in denen im Medium mit verschiedenem pH-Wert sukzessive 25, 50, 75 und 100% der anwesenden Substanz oxydiert wurden (berechnet mit Bezug auf die Zweielektronenoxydation zum entsprechenden Chinondiimin). Beim pH-Wert 2,0 zeigten diese Spektren ohne Rücksicht auf die Oxydationsstufe nur ein einziges Absorptionsmaximum, dessen Lage mit der des früher beschriebenen¹ Absorptionsmaximums des entsprechenden

Chinondiimins (Abb. 2a) übereinstimmt. Demgegenüber zeigen sich bei höherem pH-Wert bei unvollständiger Oxydation zwei weitere Maxima, die jedoch bei der Oxydation des gesamten anwesenden Amins verschwanden (Abb. 2b). Diese Maxima lassen sich nämlich übergangsmäßig dem entsprechenden Zwischenprodukt zuordnen, bezüglich dessen Konzentration geschlossen werden kann, daß sie dann maximal ist, wenn 50% der anwesenden Substanz oxydiert wurden, und daß sie den Nullwert annimmt, wenn die gesamte gegenwärtige Substanz oxydiert wurde.

Zwecks besserer Feststellung der präzisen Lage der diesem Zwischenprodukt entsprechenden Absorptionsmaxima wurden die Spektren von $5 \cdot 10^{-4}$ M Lösungen der untersuchten Diamine gemessen, in denen 10% der anwesenden Substanz bei

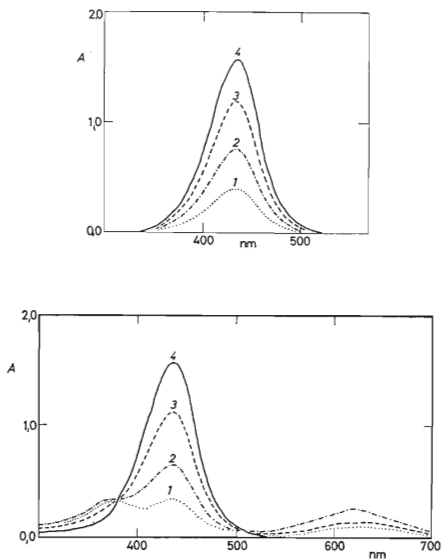


ABB. 2

Spektrophotometrische Untersuchung der *o*-Tolidinoxydation durch den Diphosphatkomplex des dreiwertigen Mangans mit dem pH-Wert 2,0 (Abb. 2a) und dem pH-Wert 4,0 (Abb. 2b) Oxydiert wurde 25% (1), 50% (2), 75% (3) und 100% (4).

verschiedenem pH-Wert mit dem Diphosphatkomplex des dreiwertigen Mangans oxydiert wurden. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 angeführt. Die Absorptionsmaxima befinden sich bei 360, 425 und 610 nm beim Benzidin, bei 365, 437 und 630 nm

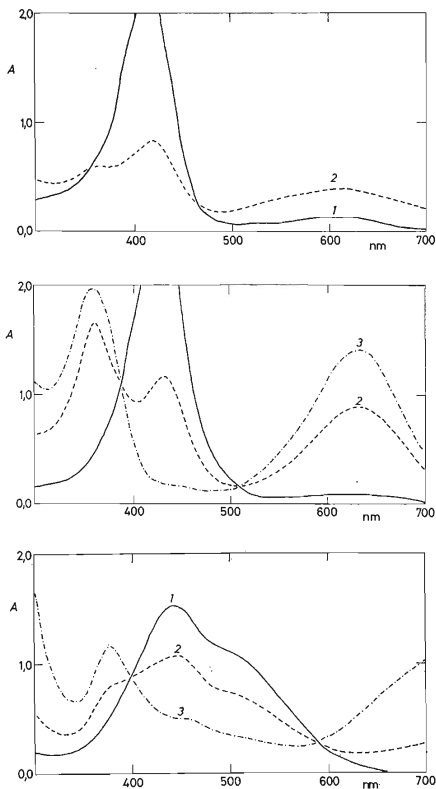


ABB. 3

Absorptionsspektren der Oxydationsprodukte des Benzidins (Abb. 3a), des *o*-Tolidins (Abb. 3b) und des *o*-Dianisidins (Abb. 3c) mit dem Diphosphatkomplex des dreiwertigen Mangans mit dem pH-Wert 2,0 (Kurve 1), mit dem pH-Wert 3,0 (Kurve 2) und dem pH-Wert 4,0 (Kurve 3)

beim *o*-Tolidin und bei 380 und 441 nm beim *o*-Dianisidin (das dritte Absorptionsmaximum beim *o*-Dianisidin liegt im Bereich über 700 nm). Wie aus diesen Abbildungen weiter hervorgeht, verläuft die Oxydation bei höherem pH-Wert und Überschuß der oxydierten Substanz mit Bezug auf das Oxydationsmittel bis auf das entsprechende Chinondiimin – wie dies beim pH-Wert 2,0 der Fall ist – nicht, sondern es erfolgt lediglich die Bildung des oben erwähnten Zwischenproduktes. Die Gegenwart der isosbestischen Punkte in Abb. 3 zeugt dann von der Existenz eines chemischen Gleichgewichts zwischen dem Zwischenprodukt und der Zweielektronen-oxydation mit dem entstehenden Chinondiimin.

EPR-Spektren

Auf Grund der Analogie der Benzidin-, *o*-Tolidin- und *o*-Dianisidinoxidation mit Brom im Puffermedium³ wurde die Voraussetzung ausgesprochen, daß es sich bei diesem Reaktionszwischenprodukt um ein freies, durch Einelektronenoxydation der untersuchten Diamine entstandenes Radikal vom Semichinondiimintyp handelt. Deshalb wurden die EPR-Spektren der $5 \cdot 10^{-4}$ M untersuchten Diaminlösungen gemessen, in denen 50% der anwesenden Substanz bei verschiedenen pH-Werten mit dem Diphosphatkomplex des dreiwertigen Mangans oxydiert wurden. In allen drei Fällen wurde nur ein sehr schwaches Signal ohne hyperfeine Struktur gewonnen, aus dessen Intensität geschlossen werden konnte, daß die Konzentration der freien Radikale um ungefähr drei Größenordnungen niedriger liegt als die Konzentration der oxydierten Diamine. Daraus ergibt sich, daß es sich bei den in Frage kommenden Zwischenprodukten um kein freies Radikal handelt, denn dann müßte seine Konzentration annähernd der Menge des zugegebenen Oxydationsmittels entsprechen.

Auf Grund der oben angeführten Ergebnisse kann in Übereinstimmung mit der Michaelischen Theorie der reversiblen Zweistufenoxydation organischer Substanzen^{5,6} geschlossen werden, daß im Reaktionsverlauf zuerst Abtrennen eines Elektrons aus dem Molekül der oxydierten Substanz erfolgt, so daß ein freies Radikal vom Semichinondiimintyp entsteht. Bei der elektrochemischen *o*-Tolidinoxidation⁷, wo von den Autoren gleichfalls das Entstehen eines freien Radikals vom Semichinondiimintyp vorausgesetzt wird, wurde nachgewiesen, daß dieses Radikal unter Entstehen einer Verbindung vom Chinhydrontyp dimerisiert, die ähnlich wie das von uns beobachtete Reaktionszwischenprodukt, das Absorptionsmaximum bei 365 und 630 nm aufweist. Das entstehende Dimer ist dann im Gleichgewicht mit dem Ausgangsdiamin und dem durch Zweielektronenoxydation entstandenen Chinondiimin.

Die Bildung dieses Dimers muß also bei der chemischen Oxydation, und zwar sowohl beim *o*-Tolidin als auch beim Benzidin und *o*-Dianisidin vorausgesetzt werden. Desweiteren kann auch die Existenz einer beschränkten Menge freier Radikale vorausgesetzt werden, die mit diesem Dimer im Gleichgewicht stehen, ähnlich wie auch eine gewisse Gleichgewichtskonzentration freier Radikale in Chinhydronlösungen

zugesen ist⁶. Diese freien Radikale können auch durch Abtrennen eines weiteren Elektrons in das entsprechende Chinondiimin überführt werden. Die Abnahme der freien Radikale wird zufolge des oben angeführten Gleichgewichts durch Dissoziierung des Dimers ersetzt, das auf diesem Weg weiter zum entsprechenden Chinondiimin oxydiert werden kann.

Bestimmung der Dimerisationskonstantenwerte

Durch die Gegenwart isosbestischer Punkte in Abb. 3 wird die Existenz eines vom pH-Wert abhängigen chemischen Gleichgewichts zwischen dem Chinondiimin und dem entsprechenden Dimer nachgewiesen. Dieses Gleichgewicht kann mit Hilfe der durch die Beziehung⁸

$$K = [\text{Dim}]/[\text{Ox}][\text{Red}] \quad (1)$$

gegebenen sog. Dimerisationskonstanten K beschrieben werden, wo $[\text{Dim}]$ die Dimerkonzentration, $[\text{Ox}]$ die oxydierte und $[\text{Red}]$ die reduzierte Form der untersuchten Substanz bezeichnen. Da aus der Messung der EPR-Spektren hervorging, daß die Konzentration der freien Radikale im Vergleich mit der Konzentration des Amins, des Dimers und des entsprechenden Chinondiimins vernachlässigbar ist, kann für die Stoffbilanz des untersuchten Vorgangs die Beziehung

$$\text{red} + 2 \text{dim} + \text{ox} = a \quad (2)$$

$$2 \text{dim} + 2 \text{ox} = x \quad (3)$$

geschrieben werden; hier ist a die Gesamtmenge der oxydierten Substanz in Molen, dim die Menge des anwesenden Dimers, red die reduzierte, ox die oxydierte Form in Molen und x die Menge des zugegebenen Oxydationsmittels, das sich also vom Titrationsbeginn bis zum Augenblick, in dem die gesamte Substanz vollständig oxydiert ist, in Grenzen von 0 bis $2a$ ändert. Im Punkt, in dem die Menge des Oxydationsmittels zugegeben wurde, die einer 25%igen Oxydation der untersuchten Substanz entsprach, ist x gleich $a/2$, so daß die Gleichung (3) in die Form

$$2 \text{dim} + 2 \text{ox} = a/2 \quad (4)$$

übergeht.

Für die Zweistufenoxydation gilt ohne Rücksicht auf den Charakter des Zwischenprodukts die Beziehung⁵

$$E_i = 29 \cdot \log (\text{red}/\text{ox}) \quad (5)$$

wo red , bzw. ox die Menge der reduzierten, bzw. oxydierten Form in Molen im Punkt der Titrationskurve bedeuten, in dem das Oxydationsmittel in einer Menge zugegeben

wurde, die einer 25%igen Zweistufenoxydation der untersuchten Substanz entspricht, und E_i das sog. Indexpotential in mV bezeichnet, das angibt, um wieviel sich das Potential der Platinelektrode in den Punkten der Titrationskurve unterscheidet, in denen eine Menge des Oxydationsmittels zugegeben wurde, die einer 25%igen, bzw. 50%igen Oxydation der anwesenden Substanz entspricht. Die Oxydationsstufe ist hierbei mit Rücksicht auf den vorausgesetzten Austausch zweier Elektronen berechnet.

Durch Auflösen des Systems der Gleichungen (2), (4) und (5) mit Bezug auf die unbekanntene Werte red, dim und ox erhält man die Beziehungen

$$\text{red} = (a/2) [1 - 10^{E_i/29}]^{-1} \quad (6)$$

$$\text{ox} = (a/2) 10^{E_i/29} [1 - 10^{E_i/29}]^{-1} \quad (7)$$

$$\text{dim} = (a/4) [1 - 3 \cdot 10^{E_i/29}] [1 - 10^{E_i/29}]^{-1}. \quad (8)$$

Werden die Ausdrücke für die Werte der Dimerisationskonstanten mit Hilfe des Lösungsvolumens V und mit Hilfe der Substanzmenge in Molen ausgedrückt, erhält man die Beziehung

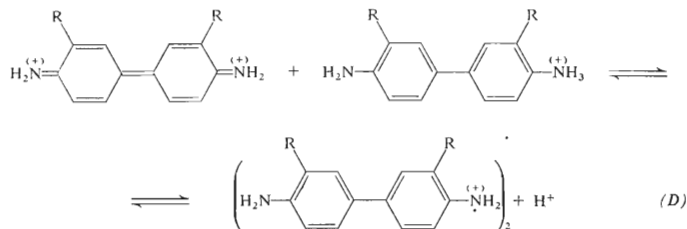
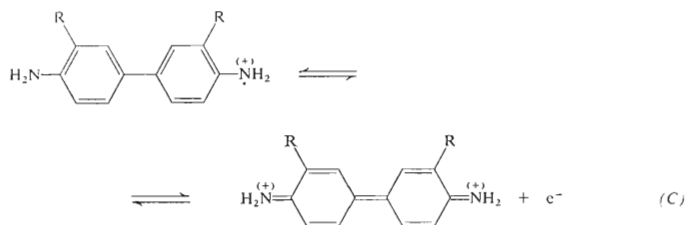
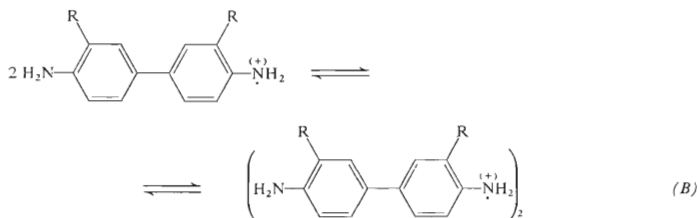
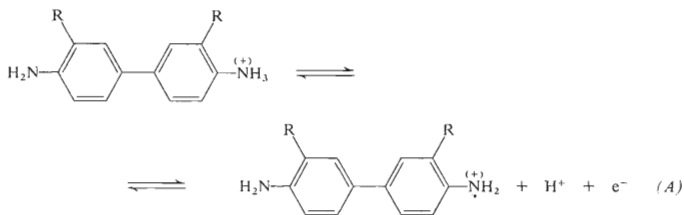
$$K = V \cdot \text{dim}/\text{ox} \cdot \text{red} \quad (9)$$

und nach Einsetzen der Beziehungen (6) (7) und (8) und nach Umformung erhält man den Ausdruck

$$K = (V/a) [10^{E_i/29} + 3 \cdot 10^{-E_i/29} - 4]. \quad (10)$$

Die gemessenen Werte der Indexpotentiale zusammen mit den nach (10) berechneten Werten der Dimerisationskonstanten sind in Abhängigkeit vom pH-Wert in Tabelle I angeführt. Wie aus dieser Tabelle hervorgeht, befindet sich im Fall des *o*-Dianisidins das Maximum der Dimerbildung beim pH-Wert 4, 5 und im Fall des *o*-Tolidins beim pH-Wert 5,0. Beim Benzidin wächst der Wert der Dimerisationskonstanten mit wachsendem pH-Wert, jedoch bei 5,0 übersteigenden pH-Werten, bei denen man das Maximum der Dimerbildung erwarten sollte, konnte der Wert der Gleichgewichtskonstanten nicht mehr bestimmt werden, da sich die Lösung im Oxydationsverlauf trübte und sich die Messung ziemlich unpräzise gestaltete. Diese Tatsache kann damit erklärt werden, daß die anwesenden freien Radikale unter diesen technischen Bedingungen beim Entstehen unlöslicher Produkte mit einander reagieren³.

Wie auf Grund der Analogie mit der elektrochemischen *o*-Tolidinoxydation und in Übereinstimmung mit unseren Erkenntnissen vorausgesetzt werden kann, erfolgt bei der Oxydation der untersuchten Substanzen im Medium im pH-Bereich 3,5–4,5 die Einstellung folgender Gleichgewichte:



wo R H für Benzidin bezeichnet, CH_3 für *o*-Tolidin und OCH_3 für *o*-Dianisidin. Dadurch wird die Tatsache bestätigt, daß der Ausdruck $K[\text{H}^+]$, der mit der Gleichgewichtskonstanten der Reaktion (*D*) identisch ist, in Grenzen der Versuchsfehler konstant ist (Tab. I). Bei höherem pH-Wert erfolgt dann offensichtlich eine Änderung der Protonisationsstufe, u. zw. nicht nur beim Ausgangsdiamin, sondern auch beim Dimer und Chinondiimin. Außerdem stellten sich Chinondiiminhydrolyse⁵ und eine ganze Reihe von Kondensationsreaktionen³ ein, die sich jedoch bis zu einem gewissen Maß auch im Medium mit niedrigerem pH-Wert geltend machen können.

Durch die Tatsache, daß beim Benzidin das Maximum der Dimerbildung bei pH-Werten um 6,0, also unter Bedingungen, die denen des lebenden Organismus am nächsten sind, erwartet werden kann, läßt sich die höhere Benzidinkarzinogenität im Vergleich mit den zwei verbleibenden untersuchten Substanzen erklären. Es kann nämlich vorausgesetzt werden, daß unter diesen Bedingungen auch die Menge der freien Radikale maximal ist, die mit biologischen Substanzen reagieren und damit deren Funktion in unerwünschter Weise beeinflussen können.

TABELLE I

Abhängigkeit der Indexpotentiale E_i , der Dimerisationskonstanten K und der Ausdrücke $K[\text{H}^+]$ vom pH-Wert

pH	Benzidin			<i>o</i> -Tolidin			<i>o</i> -Dianisidin		
	E_i , mV	$k \cdot 10^4$	$K[\text{H}^+]$	E_i , mV	$K \cdot 10^4$	$K[\text{H}^+]$	E_i , mV	$K \cdot 10^4$	$K[\text{H}^+]$
2,0	14	0,0	0,0	14	0,0	0,0	14	0,0	0,0
2,5	14	0,0	0,0	14	0,0	0,0	14	0,0	0,0
3,0	15	0,2	2,0	16	0,4	4,0	14	0,0	0,0
3,5	18	0,9	2,8	24	3,2	10,1	16	0,4	1,3
4,0	21	1,9	1,9	35	12,3	12,3	18	0,9	0,9
4,5	27	4,9	1,5	45	31,7	10,0	23	2,7	0,9
5,0	30	7,1	0,7	48	41,3	4,1	20	1,5	0,1
5,5	<i>a</i>	<i>a</i>		40	20,1	0,6	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>
6,0	<i>a</i>	<i>a</i>		17	0,6	0,0	<i>a</i>	<i>a</i>	<i>a</i>

^a Das Indexpotential kann nicht gemessen werden, da sich die Lösung nach Zugabe des Oxydationsmittels schnell trübt, ggf. sich ein Niederschlag bildet.

LITERATUR

1. Barek J., Berka A.: diese Zeitschrift 41, 1334 (1976).
2. Barek J. Berka A.: Chem. Listy 69, 1056 (1975).
3. Matrka M., Pípalová J., Ságner Z., Marhold J.: Chem. Prům. 21, 14 (1971).
4. Barek J., Berka A., Korečková J.: Chem. Anal. (Warsaw) 20, 749 (1975).
5. Michaelis L., Schubert M. P.: Chem. Rev. 22, 437 (1938).
6. Narni G., Mason H. S., Yamazaki I.: Anal. Chem. 38, 367 (1966).
7. Kuwana T., Strojek J. W.: Discuss. Faraday Soc. 45, 134 (1968).
8. Heyrovský J., Kůta J.: *Základy polarographie*, S. 139. Herausgegeben von Nakladatelství ČSAV, Prag 1962.

Übersetzt von K. Grundfest.