

ist in beiden Fällen gering, in Gegensatz zu kolloiden Carotinelösungen, die nur Eiweiss (ohne Lecithin) enthalten. Das Carotin lässt sich in beiden Fällen (zusammen mit Eiweiss, Lecithin etc.) mit Ammoniumsulfat ausfällen und löst sich nach dem Trocknen wieder in Wasser; in beiden Fällen entziehen organische Solventien der Lösung keine Spur Pigment. Es ist daher wahrscheinlich, dass in den Serumcarotinoiden ähnliche Systeme vorliegen, wie wir sie künstlich aus kolloidalen Carotinelösungen, Eiweiss und Lipoiden dargestellt haben.

Kolloide wässrige Carotinelösungen, die Eiweiss-haltig sind, zeigen nach den vorstehenden Ausführungen eine Reihe von Eigenschaften, die an diejenigen des Sehpurpurs erinnern, z. B. Hauptabsorption im Grün (Übergang des Absorptionsspektrums zu einer Bande), Lichtempfindlichkeit, Hitze-Unbeständigkeit, Fällbarkeit durch Ammoniumsulfat, Farbumschlag von rot nach gelb bei Zusatz organischer Lösungsmittel. Wir wollen damit selbstverständlich nicht sagen, dass eine Komponente des Farbstoffs des Sehpurpurs Carotin sei; es kam uns hauptsächlich darauf an, zu zeigen, dass die spektralen Eigenschaften und die Lichtempfindlichkeit von Carotinoiden sehr stark durch ihren Dispersitätsgrad, in zweiter Linie durch die in der Lösung gleichzeitig vorhandenen Stoffe bestimmt werden.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

184. Molekulare Resonanzsysteme VII.

Die verschiedenen Ionisationsstufen der Indophenole und Indamine und ihre Absorptionsspektren

von G. Schwarzenbach, H. Mohler und J. Sorge.

(31. X. 38.)

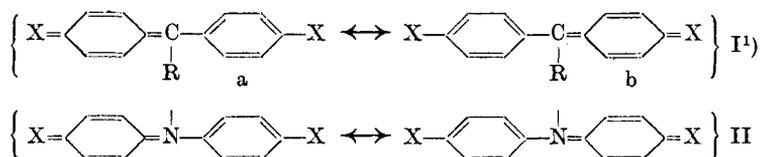
In den ersten vier Abhandlungen¹⁾ dieser Artikelserie besprachen wir die sog. Sulfonphtaleine der allgemeinen Formel I (der Phenylrest R trägt eine Sulfogruppe in ortho-Stellung zum Zentralkohlenstoffatom), von denen wir eine grosse Anzahl bisher unbekannter Vertreter, welche sich als brillante Indikatoren mit neuartigen Eigenschaften erwiesen haben (s. Abhandlung II) herstellten. Als auxochrome Gruppe X fungierte dabei OH, NH₂, NH-Aryl, NH-Alkyl, NH₂—NH₂, und NH—SO₂-Aryl, also sowohl saure als auch basische Gruppen. Wir haben gezeigt, dass man die Dissoziationskonstanten und das allgemeine Verhalten dieser Körper als Indikatoren im gesamten p_H-Bereich, also von Lösungen in konzentrierter Schwefelsäure bis zu solchen in starken Lösungen von Alkalihydroxyd

¹⁾ Abhandlung I, Helv. **20**, 490; II, 498; III, 627; IV, 654 (1937).

verstehen und vorhersagen kann, wenn man die heute gut fundierte Annahme macht, dass sich die Molekel in dem sog. Resonanz- oder Mesomeriezustand befindet, einem besonders energiearmen Zwischenzustand zwischen den Elektromeren a und b.

Die verschiedenen Ionisationsstufen der Farbstoffe teilen sich in zwei Gruppen, die sich charakteristisch in der Farbe unterscheiden, während die Glieder ein und derselben Gruppe untereinander ein ähnliches Absorptionsspektrum besitzen (s. Abhandlung IV), nämlich in symmetrische (a identisch mit b) und unsymmetrische Systeme (a verschieden von b, wenn sich die beiden auxochromen Gruppen ein und derselben Molekel in verschiedenen Ionisationsstufen befinden). Beim Durchlaufen der p_H -Skala gelangen wir abwechselnd zu symmetrischen und unsymmetrischen Systemen, und die Farbe der Lösung wechselt periodisch, indem die symmetrischen Systeme alle bei längern Wellen und die unsymmetrischen bei kürzern Wellen absorbieren. Dabei besitzen die symmetrischen Systeme einen grössern Existenzbereich auf der p_H -Skala, nämlich etwa 10 p_H -Einheiten gegenüber 6 bis 7 für die unsymmetrischen Systeme. Diese besondere Stabilität verdanken die symmetrischen Systeme ihrer grösseren Resonanzenergie (s. Artikel III).

Wenn wir nun den Zentralkohlenstoff in I durch Stickstoff ersetzen, so gelangen wir zu den im Titel genannten Körpern (Formel II), von denen wir gleiches Verhalten erwarten müssen.



*Kehrmann*²⁾ hat schon auf die Farbähnlichkeit der Indamine mit Malachitgrün hingewiesen. Diese Ähnlichkeit erschien jedoch damals noch rätselhaft, und auch die Deutung der Struktur der verschiedenen Ionisationsstufen der Farbstoffe machte Schwierigkeiten.

Wie aus der Tabelle I ersichtlich ist, zeigt auch das Phenolindophenol (III) den periodischen Farbwechsel blau \rightarrow orange \rightarrow blau beim Durchlaufen der p_H -Skala. Der unsymmetrischen orange farbigen Form kommt aber ein übermässig grosses Existenzgebiet zu.

¹⁾ In den Formeln bedeutet jeder Strich ein Elektronenpaar. Auf S. 1639 fand die Schreibweise von *Inggld* Verwendung. Dem Vorschlag von *B. Eistert* (B. 71, 237 (1938)), die einsamen Elektronenpaare durch einen Querstrich zu symbolisieren, können wir uns deshalb nicht anschliessen, weil es uns nicht richtig erscheint, eine Formelsprache, welche sich in der englischen Literatur schon seit Jahren eingeführt hat, ohne zwingenden Grund zu ändern.

²⁾ *Kehrmann, Goldstein und v. Salis, Helv. 10, 33 (1927).*

Tabelle I.

Phenol-indo-phenol:	Blau (III''')	$\xrightarrow{-5,3^1}$	Orange (III'')	$\xrightarrow{+0,95^1}$	Orange (III')	$\xrightarrow{+8,1^2}$	Blau (III)
Phenol-sulfon-phtalein:	Gelb	$\xrightarrow{-9^3}$	Rot	$\xrightarrow{+1,5^4}$	Gelb	$\xrightarrow{+7,9^4}$	Rot
<i>Bindschedler's</i> Grün:	Gelb (IV'')	$\xrightarrow{-2,5^4}$	Blaugrün (IV')	$\xrightarrow{+3,4^5}$	Grün (IV)		
Malachitgrün:	Gelb	$\xrightarrow{+1,13^4}$	Grün				
Phenolblau:	Gelb (V''')	$\xrightarrow{-6,5^1}$	Violett (V'')	$\xrightarrow{?}$	Violett (V')	$\xrightarrow{+4,8^5}$	Blau (V)

Während sich der Farbumschlag bei p_H 8 fast an derselben Stelle befindet wie der entsprechende beim Benzaurin (Formel I; R = Phenyl) und Phenol-sulfon-phtalein (die Indikator konstanten dieser beiden Farbstoffe unterscheiden sich nur wenig), liegt der erste Farbumschlag schon im Aciditätsgebiet von etwa 80-proz. Schwefelsäure. Dieses unterschiedliche Verhalten findet nun aber seine Erklärung in einem weiteren Aciditätsgleichgewicht $III' \rightleftharpoons III''$, welches zwischen den beiden erwähnten liegt mit einem p_K von 0,95. Das Proton wird dabei an das Zentralatom angelagert und die Unsymmetrie des Resonanzsystems bleibt bestehen, was den geringen Farbunterschied zwischen III' und III'' erklärt. Das Ion III'' ist sehr unbeständig und wird rasch hydrolytisch zerlegt, worauf wir eine Methode zum Nachweis und Bestimmung des betreffenden Aciditätsgleichgewichtes gründen.

Beim *Bindschedler's* Grün ist es die symmetrische grüne Form, welche einen besonders grossen Existenzbereich aufweist im Vergleich mit dem Malachitgrün, dessen Dissoziationskonstante als Base wir ebenfalls hier mitteilen. Daran ist das Gleichgewicht zwischen IV und IV' schuld, welches gut messbar⁵⁾ ist. Das zweifach positiv geladene Ion IV'' wird ebenfalls ziemlich rasch zerlegt, während IV vollkommen stabil ist. Jedoch ist die Geschwindigkeit der Hydrolyse viel kleiner als beim Indophenol, wo sie die Messung des Gleichgewichtes III'/III'' mit gewöhnlichen Mitteln verunmöglicht.

Beim Phenolblau schliesslich ist der Farbwechsel bei p_H 4,8 mit dem Übergang $V \rightleftharpoons V'$ zu deuten. Eine Anlagerung des Protons an den Dimethylamin-Stickstoff würde die Resonanz aufheben, so dass eine gelbe Ionisationsstufe entstehen müsste. Diese entsteht erst bei $p_H - 6$, nachdem auch hier vorher ein Proton an das Zentralatom getreten ist.

¹⁾ Diese Abhandlung S. 1642 und 1643.

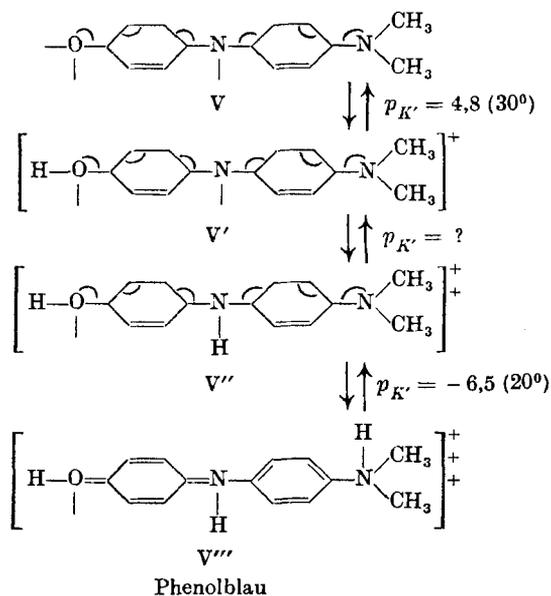
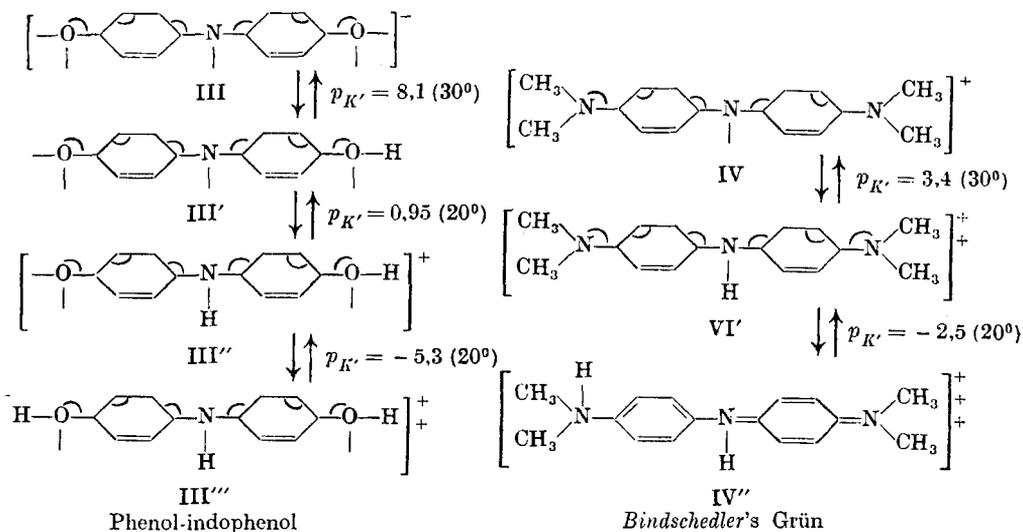
²⁾ W. M. Clark, Hygienic Laboratory Bulletin Nr. 11, 151. United States Public Health Service, Washington D. C. 1928.

³⁾ Schwarzenbach und Ott, Helv. **20**, 627 (1937).

⁴⁾ Kolthoff, Säure-Basen-Indikatoren, Verlag Springer 1932.

⁵⁾ Schwarzenbach und Michaelis, Am. Soc. **60**, 1667 (1938).

Das p_K des Gleichgewichtes $V \rightleftharpoons V'$ ist übrigens zu erwarten. Die Bindung des ionogenen Sauerstoffs mit dem benachbarten C-Atom hat in V wesentlich mehr Doppelbindungscharakter als in III, da die zweite auxochrome Gruppe in V schwächer basischen Charakter hat als in III. Infolgedessen ist der Sauerstoff in V weniger basisch als in III. Die Aciditätsdifferenz beträgt etwa 3 p_H -Einheiten, also etwa die Hälfte der Differenz Anilin-Phenol.



Die Basizitätsverminderung, welche das Auxochrom durch die Anlagerung eines Protons an den Zentral-Stickstoff erfährt, beträgt im Falle des Phenol-indophenols (Vergleich mit Phenol-sulfon-phtalein) etwa 6 und im Falle des *Bindschedler's* Grün etwa 3 p_H -Einheiten. Sie ist also wesentlich grösser als elektrostatisch zu erwarten wäre (etwa 2 p_H -Einheiten), was darauf hindeutet, dass in den Molekeln III, IV und V das einsame Elektronenpaar des Zentralatoms durch Hybridbildung an der Resonanz teilnimmt.

Der Nachweis des Aciditätsgleichgewichtes III'/III'' erbringen wir kinetisch und kolorimetrisch. Wie erwähnt, sind die gelben sauren Lösungen des Indophenols unterhalb p_H 3 sehr instabil und bleichen rasch aus, wobei sich Chinon und Amidophenol bildet. Wir haben nun die Hydrolysegeschwindigkeit des Farbstoffes kolorimetrisch in Lösungen verschiedenen p_H -Wertes gemessen, indem wir den Puffer möglichst rasch mit der Farbstofflösung mischten, das Gemisch in den Becher des Leifo-Photometers einfüllten und die Änderung des dekadischen Extinktionsmoduls α mit der Zeit verfolgten. Die Tabelle II enthält die Messresultate.

Tabelle II.
Hydrolysegeschwindigkeit und Extinktion von Phenol-indophenol.
Gemessen mit Zeissfilter S 47, Farbstoffkonzentration $2,5 \times 10^{-5}$.
Temperatur 20° .

Zusammensetzung des Puffers	2,09 HCl	0,980 HCl	0,436 HCl	0,109 HCl	0,0271 HCl
p_H des Puffers	- 0,56	- 0,04	+ 0,39	+ 1,04	+ 1,63
$\lg(k)$, k in sec.^{-1}	- 2,28	- 2,08	- 1,96	- 1,99	- 2,35
Extinktionsmodul der Lösung α	0,244	0,237	0,216	0,200	0,165
Zusammensetzung des Puffers	0,0108 HCl	0,00455 HCl	0,00150 HCl	Acetat- Puffer	Acetat- Puffer
p_H des Puffers	+ 2,01	+ 2,38	+ 2,86	+ 3,75	+ 4,75
$\lg(k)$, k in sec.^{-1}	- 2,64	- 3,02	- 3,52	- 4,17	- 4,80
Extinktionsmodul der Lösung α	0,156	0,150	0,147	0,146	0,145

In einer Lösung mit konstantem p_H ist der Ausbleichvorgang eine Reaktion erster Ordnung:

$$dc/dt = k \cdot c$$

wobei c die Farbstoffkonzentration bedeutet. Die Geschwindigkeitskonstante k nimmt mit wachsender Acidität rasch zu, um bei p_H 0,7 ein Maximum zu erreichen (s. Fig. 1). Hier beträgt die Halbwertszeit der Reaktion 63 Sekunden. Bei weiterer Erhöhung der Acidität

fällt die Konstante wieder langsam ab. Lösungen des Farbstoffes in konz. Schwefelsäure sind erstaunlich lange haltbar, so dass die dort auftretenden Farbänderungen leicht verfolgbar sind.

Die p_H -Werte der Salzsäurelösungen mit einer kleinern Konzentration als 0,05 wurden dabei gleich dem negativen Log. der mittleren Ionenaktivität gesetzt. Für die konzentrierteren Lösungen wurde die „Acidity Function“ von *Hammett*¹⁾ als p_H gewählt.

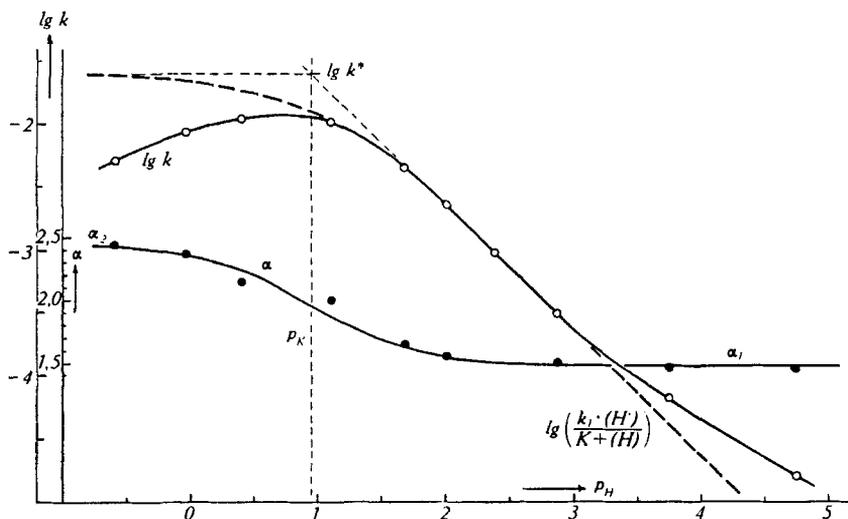


Fig. 1.

Die Versuchsergebnisse lassen nur die folgende Deutung zu: Nur III'' und nicht III' wird hydrolytisch gespalten. Dann wird gelten:

$$\begin{aligned} \frac{dc}{dt} &= k^* \cdot (\text{HB}^{\cdot}) = k^* \cdot c \cdot (\text{H}^{\cdot}) / (K + (\text{H}^{\cdot})) \\ k &= k^* \cdot (\text{H}^{\cdot}) / (K + (\text{H}^{\cdot})) \end{aligned} \quad (1)$$

wobei (HB^{\cdot}) die Aktivität der Form III'' bedeutet. k^* ist eine vom p_H unabhängige Geschwindigkeitskonstante, und K ist die Aciditätskonstante des Gleichgewichtes III'/III'', die wir finden wollen. In die Fig. 1 ist die nach (1) berechnete Abhängigkeit von k vom p_H als gestrichelte Kurve eingetragen worden, wobei die Werte $\lg k = -1,60$ und $K = 0,11$ eingesetzt wurden. Die Abweichungen der gemessenen Werte von den berechneten im sauren Gebiet rührt vornehmlich von der Abnahme der Aktivität des Wassers in diesen stark sauren Lösungen her und ist weiter nicht verwunderlich. Die Abweichungen auf der alkalischen Seite können erklärt werden durch die zunehmende Rolle, welche die Hydrolyse mittels Hydroxylionen zu spielen beginnt.

¹⁾ *Hammett* und *Deyrup*, *Am. Soc.* **54**, 2721 (1932), und *Hammett* und *Paul*, *Am. Soc.* **56**, 827 (1934).

Die Tabelle II und die Figur 1 enthalten auch die Extinktionswerte der Lösungen zur Zeit 0, welche leicht aus den beobachteten Extinktionen zu späterer Zeit berechnet werden können. Diese Werte erhöhen sich bei zunehmender Acidität von 1,46 auf 2,44, woraus sich ebenfalls auf das Aciditätsgleichgewicht III'/III'' schliessen lässt. Die beiden Körper III' und III'' absorbieren offenbar die verwendete Lichtsorte ($\lambda = 4700 \text{ \AA}$) verschieden stark, was man schon von Auge beobachten kann. Durch die experimentellen Werte wurde nun die beste Kurve der Form:

$$\alpha = \alpha_2 / (1 + (K/H)) + \alpha_1 / (1 + (H/K)) \quad (2)$$

hindurch gelegt, wobei α_1 und α_2 die Extinktion der Lösung oberhalb $p_H 3$ und unterhalb $p_H 1$ bedeuten. Die Figur zeigt, dass der p_K -Wert, den wir mit Hilfe dieser Kurve erhalten, bestens mit den Resultaten der kinetischen Messung übereinstimmt.

p_K (des Gleichgewichtes III'/III'') = 0,95.

Über die Messung der Konstanten des Malachitgrüns, die wir zum Vergleich mit *Bindschedler's* Grün benötigen, unterrichtet die Tabelle III. α gibt dabei wieder den dekadischen Extinktionsmodul der Farbstofflösung der angegebenen Konzentration für die Wellenlänge 6100 \AA an. Das Absorptionsspektrum des Malachitgrüns weist bei dieser Wellenlänge ein stark ausgeprägtes Maximum auf¹⁾. Aus α berechnet sich die Konstante nach:

$$p_{K'} = p_H - \lg(\alpha / (\alpha_0 - \alpha)) \quad (3)$$

Tabelle III.

Der Farbumschlag des Malachitgrüns mit Salzsäure.
Farbstoffkonzentration = $7,5 \times 10^{-5}$.

HCl (Mole/Liter)	p_H	α	blau/gelb	$p_{K'}$
—	7	0,26 (= α_0)	∞	—
$2,71 \times 10^{-2}$	1,64	0,20	3,32	1,12
$5,43 \times 10^{-2}$	1,35	0,16	1,74	1,11
$1,086 \times 10^{-1}$	1,04	0,11	0,73	1,17
			Mittel	1,13

Die gelbe Ionisationsform des Malachitgrüns ist ebenfalls instabil und verwandelt sich langsam unter Wasseraufnahme in das farblose Carbinol. Diese langsame Entfärbung, die von *Sidgwick* und *Moore*²⁾ und *Biddle* und *Porter*³⁾ quantitativ verfolgt worden ist, fand natürlich bei der Extinktionsmessung Berücksichtigung.

¹⁾ Über das Absorptionsspektrum des Malachitgrüns s. *Mohler* und *Forster*, Z. anal. Ch. **108**, 167 (1937).

²⁾ *Sidgwick* und *Moore*, Z. physikal. Ch. **58**, 385 (1907); Soc. **95**, 889, 899 (1909).

³⁾ *Biddle* und *Porter*, Am. Soc. **37**, 1571 (1915).

Die Bestimmung der Umschlagspunkte der Indophenole und Indamine in starker Schwefelsäure ist in der Tabelle IV zusammengestellt. Die p_K -Werte sind dabei von keiner grossen Genauigkeit, da die Unbeständigkeit der Farbstoffe in diesen sauren Lösungen Schwierigkeiten bereitete. Doch sind ja auch die zur Berechnung verwendeten p_H -Werte aus den Arbeiten von *Hammett* und *Deyrup* sowie von *Hammett* und *Paul* nicht sehr sicher.

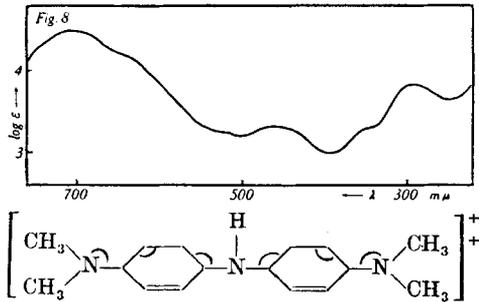
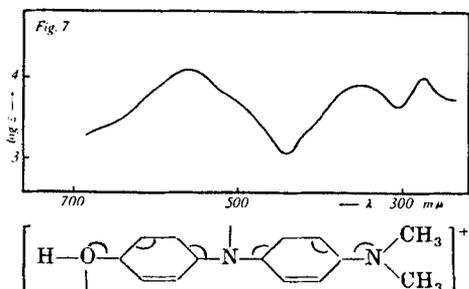
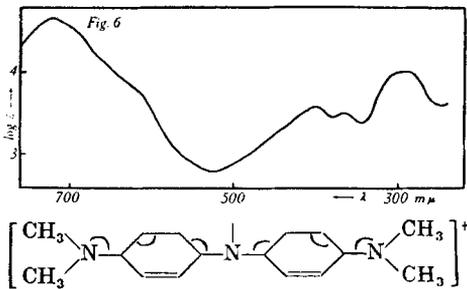
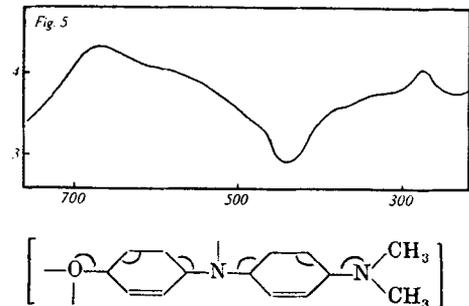
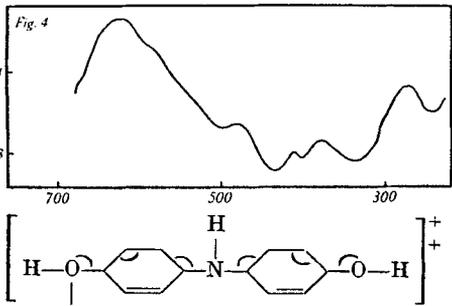
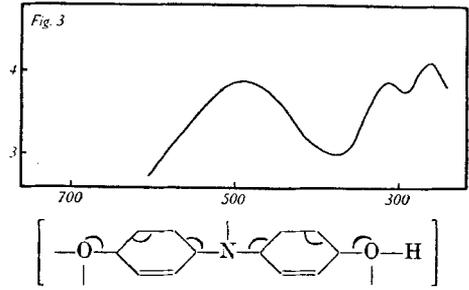
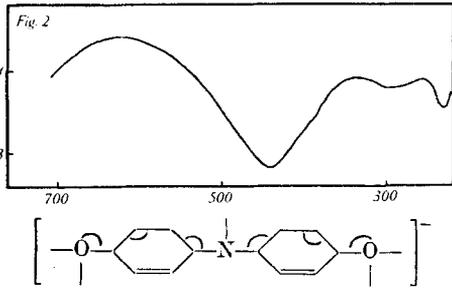
Tabelle IV.

Farbstoff	Konzentration der H_2SO_4 (%)	HB/B	p_H	p_K
Phenol-indophenol	79,4	blau/gelb = 0,35	- 4,8	- 5,3
<i>Bindschedler's</i> Grün	62,1	gelb/grün = 1,35	- 2,7	- 2,5
Phenolblau	90,5	gelb/violett = 0,59	- 6,3	- 6,5

Die Figuren 2 bis 8 schliesslich enthalten die Absorptionsspektren der verschiedenen Ionisationsformen der Indophenole und Indamine. Die Figuren 2, 3 und 4 gelten für Phenol-indophenol in 0,01-n. NaOH, einem Puffer von p_H 6 und in konz. H_2SO_4 . Die Figuren 6 und 8 enthalten die Kurven des *Bindschedler's* Grün in Acetatpuffer und 0,1-n. HCl und 5 und 7 diejenigen des Phenolblaus in Phosphatpuffer p_H 7 und 0,01-n. HCl. Die Genauigkeit der aufgetragenen Extinktionswerte ist wohl nicht die übliche und leidet etwas unter der Unbeständigkeit gewisser Farbstoff-Formen.

Wir haben in der Abhandlung IV auf die auffallende Ähnlichkeit der Absorptionskurven aller symmetrischen Formen untereinander und aller unsymmetrischen Formen untereinander hingewiesen. Diese Ähnlichkeit setzt sich bei den hier untersuchten Farbstoffen fort. Besonders der im sichtbaren Teil des Spektrums liegende Teil der symmetrischen Formen zeigt bei den Sulfon-phtaleinen (und andern Triphenyl-methanfarbstoffen mit zwei Auxochromen) und den Indophenolen und Indaminen gleiche Form und gleiches Verhalten beim Ändern der Konstitution. Die Form der Kurve ist eine scharfe Bande mit einer Inflexion in ihrem kurzwelligen Abfall (in Fig. 2 mit dem Maximum verschmolzen). Ersetzen wir die beiden ionogenen Sauerstoffe im voll ionisierten Phenolsulfon-phtalein oder Benzaurin durch zwei Hydroxylgruppen oder zwei Dimethylamino-gruppen¹⁾, so rückt diese Bande zuerst nach kürzeren und dann nach längeren Wellen. Genau dasselbe Verhalten erkennen wir beim Vergleich von III (Fig. 2) mit III''' (Fig. 4) und dann mit IV (Fig. 6). Der Vergleich der Figuren 6 und 8 zeigt, wie klein der Einfluss der Anlagerung des Protons an das zentrale Stickstoffatom ist. Die da-

¹⁾ Über das Absorptionsspektrum des Malachitgrüns s. *Möhler* und *Forster*, Z. anal. Ch. 108, 167 (1937).



durch in der Molekel bewirkte Änderung ist ohne Einfluss auf die Symmetrie der Molekel und lässt deshalb das Absorptionsspektrum der Substanz im Wesentlichen unberührt.

Zu diesen Messungen fanden dieselben Präparate von Phenolindophenol, *Bindschedler's* Grün und Phenolblau Verwendung, welche früher (s. Zitat 3) zu potentiometrischen Untersuchungen gebraucht wurden. Malachitgrün wurde als Perchlorat aus Eisessig umkrystallisiert.

Chemisches Institut der Universität Zürich.
Chemisches Laboratorium der Stadt Zürich.

185. Zur Kenntnis der Diamin-oxydase.

3. Mitteilung über den enzymatischen Abbau von Poly-aminen¹⁾

von E. Albert Zeller.

(1. XI. 38.)

In der vorangehenden Mitteilung dieser Reihe²⁾, hier als Mitteilung 2 zitiert, wurde der Nachweis geleistet, dass die Histaminase nicht, wie man früher annahm, spezifisch auf Histamin eingestellt ist, sondern dass das Enzym auch Äthylen-diamin, Putrescin, Cadaverin und Agmatin oxydativ desaminiert, wobei pro Molekel verbrauchten Sauerstoffs eine Molekel Wasserstoffperoxyd entsteht.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Problem der Spezifität erneut studiert und dabei weitere geeignete Substrate gefunden (Trimethylen-diamin, Spermin, Spermidin). Dadurch wurden die Bedingungen, die ein Körper erfüllen muss, damit er von der Diamin-oxydase angegriffen wird, genauer bekannt, und es fand sich beispielsweise ein Einfluss des Abstandes der zwei basischen Gruppen und der Substitution der letzteren. Für die Untersuchung der Enzymreaktion erwiesen sich verschiedene Carbonylreagentien und substituierte Guanidine als besonders günstig, und es konnten aus diesen Versuchen Rückschlüsse auf den Bau der prosthetischen Gruppe der Diamin-oxydase gemacht werden. Die Einwirkung der Blausäure wurde als neuer Typus einer Blausäure-Fermentreaktion erkannt. Durch die völlige Zerstörung des Enzyms durch eiweisspaltende Fermente wurde die Beteiligung von Eiweiss am Aufbau der Diamin-oxydase sichergestellt. Um einen Einblick in die Grösse der Redox-Potentiale zu erhalten, wurde das System Enzym-Substrat bei Anwesenheit einer Reihe von verschiedener Redox-Indikatoren geprüft.

¹⁾ Vorläufige Mitteilung: *E. A. Zeller*, *Naturwiss.* **26**, 578 (1938).

²⁾ *E. A. Zeller*, *Helv.* **21**, 880 (1938); *Naturwiss.* **26**, 282 (1938).