

wäßrigem Methylamin. Es entsteht sofort ein orangestichig roter, krystallinischer Niederschlag, der nach etwa 1 Stde. abgesaugt und mit Wasser gewaschen wird. Unter dem Mikroskop: kleine Krystalle von taflicher oder mehr prismatischer Ausbildung, die braun-gelb durchsichtig sind.

Die Verbindung ist, bei gewöhnlicher Temperatur, mit orangeroter Farbe leicht löslich in Pyridin, Chloroform, Aceton, Alkohol und Äther, mit oranger Farbe löslich in Ligroin, fast unlöslich in Wasser (schwache Gelbfärbung des Wassers). In Eisessig spielend löslich mit hellgrüner Farbe (Zersetzung).

Zur Analyse trocknet man die Substanz neben Phosphorpentoxyd. 0.0498 g Sbst.: 0.0256 g NiSO<sub>4</sub>. — 3.232 mg Sbst.: 0.392 ccm N (19°, 756 mm).

C<sub>11</sub>H<sub>19</sub>O<sub>3</sub>N<sub>3</sub>Ni. Ber. Ni 19.58, N 14.03. Gef. Ni 19.50, N 14.10.

Bonn, Chem. Institut d. Universität, im Juni 1930.

## 272. Otto Warburg und Erwin Negelein: Grünes Haemin aus Blut-Haemin.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.]

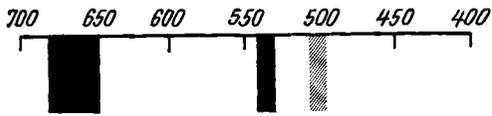
(Eingegangen am 27. Mai 1930.)

Haemin aus Blutfarbstoff, gelöst in pyridin-haltigem Wasser, überträgt auf viele Substanzen — z. B. Cystein, Glycerinaldehyd, Hydrazin — katalytisch Sauerstoff, indem sein Eisenatom reduziert und durch molekularen Sauerstoff reoxydiert wird. Wir haben gefunden, daß sich hierbei aus dem Haemin unter gewissen Bedingungen ein grüner, eisenhaltiger Farbstoff bildet, den wir, weil er in seiner empirischen Zusammensetzung dem Haemin nahesteht, „grünes Haemin“ nennen. Das „grüne Haemin“ ist ein Oxydationsprodukt des roten Haemins und wie dieses eine Dicarbonsäure. Es ist nur beständig in Gegenwart von Pyridin und zeichnet sich aus durch eine chlorophyll-ähnliche Absorptionsbande im Rot bei 645 bis 680  $\mu\mu$  (vergl. Abbildung 1).

Beobachtungen über haemin-artige grüne Farbstoffe liegen zwar schon vor („Haemoverdin“), doch war es bisher nicht geglückt, einen eisen-haltigen Farbstoff dieser Körperklasse rein darzustellen. Auch wir haben das freie grüne Haemin nicht zur Krystallisation bringen können. Doch erhielten wir beim Kochen des grünen Haemins mit methylalkohol. Salzsäure einen krystallinischen grünen Ester, der 2 Methoxylgruppen und 4 Atome Chlor enthält, während das grüne Haemin, von dem wir ausgingen, chlorfrei ist.

Wir beschreiben im Folgenden die Darstellung des Esters. Zunächst wird eine rote Haemin-Lösung in eine Lösung des grünen Haemins verwandelt, was in einigen Minuten so vollständig vor sich geht, daß das Absorptionsspektrum des roten Haemins nicht mehr wahrnehmbar ist. Dann bringen wir das grüne Haemin in Chloroform, fällen es mit Petroläther und verestern mit Methylalkohol und Salzsäure.

Darstellung des grünen Haemins: 6 g kryst. Haemin (aus Rinderblut) löst man in 1500 ccm Pyridin und 4000 ccm Wasser, erwärmt auf 50° und gießt unter Turbinieren und kräftigem Sauerstoff-Durchleiten eine Lösung hinzu, die 16.4 g Hydrazin-Hydrochlorid in 380 ccm Wasser und 120 ccm 2-n. Natronlauge enthält. Nach 5 Min.



grünes Hämin in Chloroform-Pyridin.  
645 — 680  $\mu\mu$ , 530 — 540  $\mu\mu$ , (495 — 505  $\mu\mu$ ).



Hämin in 25% Pyridin (mit Hydrazin reduziert)  
550 — 560  $\mu\mu$ , 518 — 530  $\mu\mu$ .

Abb. 1.

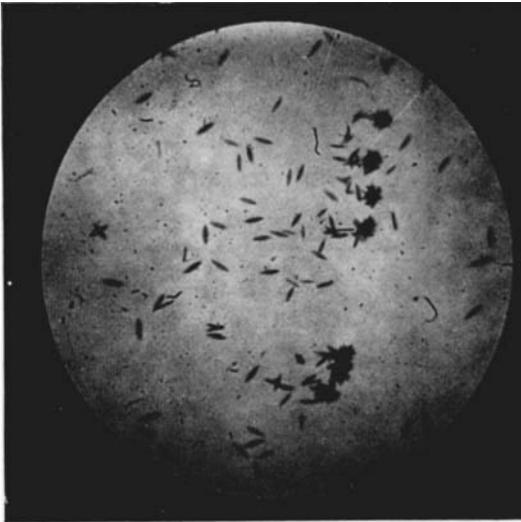


Abb. 2.



Abb. 3.

ist die rote Farbe der Lösung in Grün umgeschlagen. Man unterbricht das Sauerstoff-Durchleiten, kühlt sofort auf Zimmer-Temperatur und filtriert. Das Filtrat wird in 3 Partien geteilt und 3—4-mal mit dem gleichen Volumen Äther ausgeschüttelt, wobei Zusatz von Pyridin die Trennung der Schichten erleichtert. Zweck des Ausätherns ist das Entfernen eines gelben Farbstoffs, der nicht untersucht wurde. Je 2 l der zurückbleibenden grünen, wäßrigen Lösung werden 2-mal mit 2500 ccm Chloroform ausgeschüttelt, wobei für die 3 Portionen dasselbe Chloroform verwendet wird, in das viel Pyridin und der gesamte grüne Farbstoff übergeht. Man filtriert die Chloroform-Lösung durch trockne Faltenfilter, schüttelt sie mit wasser-freiem Natriumsulfat, filtriert und engt unter vermindertem Druck (Wasserbad nicht über 40°) auf ca. 100 ccm ein. Hieraus wird das grüne Haemin mit 2 l Petroläther (Sdp. 30—50°) gefällt. Man saugt auf der Nutsche ab, wäscht mit Petroläther und erhält etwa 3.6 g an luft-trocknem Farbstoff, der pyridin-haltig ist. Löst man das pyridin-haltige Produkt in Chloroform und wäscht oft mit Wasser, so verschwindet das charakteristische Spektrum (Abb. 1) dann, wenn der Chloroform-Lösung das Pyridin entzogen worden ist. Das grüne Haemin ist also nur beständig in Gegenwart von Pyridin.

Darstellung des grünen Esters: Das auf der Nutsche kurz luft-trocknen gesaugte grüne Haemin (3.6 g) wird sofort in 400 ccm methylalkohol. Salzsäure (1/2-n. HCl) eingetragen und unter kräftigem Rühren auf dem Wasserbade 15 Min. am Rückflußkühler zum Sieden erhitzt. Die heiße Lösung wird filtriert und das Filtrat 24 Stdn. in den Eisschrank gestellt. Es fallen etwa 360 mg Krystalle aus (Abb. 2), die in der Durchsicht blaugrün, im reflektierten Licht rot gefärbt sind. Zur Reinigung löst man sie in 200 ccm heißem Methylalkohol, filtriert, engt unter vermindertem Druck auf ca. 20 ccm ein und erhält 195 g mg Krystalle von der Form der Abbildung 3. Zur Analyse trocknet man bei gewöhnlicher Temperatur im Vakuum-Exsiccator über festem Kaliumhydroxyd bis zur Gewichtskonstanz (24 Stdn.).

Analyse des grünen Esters: 4.610 mg Sbst.: 8.775 mg CO<sub>2</sub>, 2.02 mg H<sub>2</sub>O. — 4.782 mg Sbst.: 9.080 mg CO<sub>2</sub>, 2.06 mg H<sub>2</sub>O. — 2.787 mg Sbst.: 0.155 ccm N (20°, 758 mm). — 2.791 mg Sbst.: 0.155 ccm N (20°, 758 mm). — 6.140 mg Sbst.: 0.601 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. — 5.709 mg Sbst.: 0.582 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, — 6.027 mg Sbst.: 0.584 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, — 5.692 mg Sbst.: 0.540 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. — 8.400 mg Sbst.: 6.095 mg AgCl. — 7.685 mg Sbst.: 5.490 mg AgCl. — 3.436 mg Sbst.: 2.155 mg AgJ. — 3.373 mg Sbst.: 1.950 mg AgJ. — 3.528 mg Sbst.: 2.090 mg AgJ.

Gef. C 51.92, 51.79, H 4.90, 4.82, N 6.47, 6.46, Fe 6.85, 7.13, 6.78, 6.64, Cl 17.93, 17.66, OCH<sub>3</sub> 8.29, 7.64, 7.83.

Zu den Analysen, die Dr. A. Schoeller ausgeführt hat, ist zu bemerken, daß das Eisen nicht als Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Rückstand der C-H-Analyse bestimmt worden ist. Vielmehr wurde zur Eisen-Bestimmung die Substanz mit konz. Schwefelsäure angefeuchtet, 3 Stdn. über dem Mikro-brenner abgeraucht, dann 1 Stde. im elektrischen Ofen bei etwa 560° geglüht und als Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gewogen.

Formel des grünen Esters. Nach den Analysen ist die wahrscheinlichste Formel des grünen Esters C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>FeCl<sub>4</sub>O<sub>6</sub>, in der die Unsicherheit ± 1 C und ± 1 H ist.

C<sub>36</sub>H<sub>40</sub>N<sub>4</sub>FeCl<sub>4</sub>O<sub>6</sub>. Ber. C 52.5, H 4.90, N 6.82, Fe 6.78, Cl 17.2, O 11.7.  
Gef. ,, 51.9, ,, 4.86, ,, 6.47, ,, 6.85, ,, 17.8, ,, 12.2.

Nach der Methoxyl-Bestimmung ist der Ester ein Dimetyylester (ber. für 2(OCH<sub>3</sub>) 7.55%, gef. 7.92%). Die dem Ester zugrunde liegende freie Säure hätte also die Formel C<sub>34</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>FeCl<sub>4</sub>O<sub>6</sub> und unterscheidet sich von dem Ausgangsprodukt — dem Chlorhaemin — C<sub>34</sub>H<sub>32</sub>N<sub>4</sub>FeClO<sub>4</sub> durch Chlor, Wasserstoff und Sauerstoff, während sie in bezug auf Carboxylgruppen, Eisen und Stickstoff mit dem Ausgangsprodukt übereinstimmt.

Abspaltung des Eisens: Reduziert man den grünen Ester in alkohol. Lösung bei Zimmer-Temperatur mit Palladium und Wasserstoff oder mit Cytein, so wird das Eisen abgespalten, und es bleibt eine Substanz zurück, die nach der Farbe Beziehungen zu haben scheint zu dem Tetrachlor-mesoporphyrin von Nencki<sup>1)</sup> und von Hans Fischer<sup>2)</sup>. Während aber Tetrachlor-mesoporphyrin bei der Reduktion mit Jodwasserstoff und Phosphor ein Porphyrin (nämlich Meso-porphyrin) liefert, erhält man unter den gleichen Bedingungen aus dem grünen Ester kein Porphyrin.

### 273. S. A. Mumford und J. W. C. Phillips: Über den Parachor von Azoverbindungen.

(Eingegangen am 26. Mai 1930.)

In einer kürzlich veröffentlichten Arbeit über diesen Gegenstand<sup>1)</sup> kritisieren Lindemann und Groger die von uns ausgesprochene Vermutung<sup>2)</sup>, daß die doppelte Bindung zwischen zwei Stickstoff-Atomen einen niedrigeren Parachor-Wert hat, als die entsprechende Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindung. Sie tun dies aus dem Grunde, weil die experimentell bestimmten Parachor-Werte einer Anzahl von Azoverbindungen sich stark den Werten nähern, die unter Einsetzung von Sugdens Atom- und Struktur-Konstanten<sup>3)</sup> berechnet worden sind, wobei vorausgesetzt wurde, daß die  $-N:N-$  und  $-C:C-$ Doppelbindungen denselben Parachor-Wert, nämlich 23.2 Einheiten, besitzen.

Da indessen der niedrigere Parachor-Wert der Stickstoff-Stickstoff-Doppelbindung lediglich als Resultat einer gänzlichen Neuberechnung der verschiedenen Atom- und Struktur-Konstanten abgeleitet worden ist, so ist es klar, daß eine solche Verminderung nur dann wahrnehmbar sein wird, wenn die experimentell gefundenen Parachor-Werte mit Werten verglichen werden, die aus solchen Neuberechneten Konstanten ermittelt worden sind.

Nach der Neuberechnung<sup>4)</sup> hat das Stickstoff-Atom einen Parachor-Wert von 17.5, die Stickstoff-Stickstoff-Doppelbindung einen solchen von 12.5 und die Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindung von 19 Einheiten. Die Konstante für die Azogruppe  $-N:N-$  ist demnach  $(2 \times 17.5) + 12.5 = 47.5$  Einheiten, welcher Wert auf 54.0 anwachsen würde, wenn die betreffende Doppelbindung denselben Wert wie die Äthylen-Bindung hätte. Nun ist Sugdens Konstante für Stickstoff 12.5 und für eine Doppelbindung 23.2 Einheiten, so daß seine Konstante für die Azogruppe  $(2 \times 12.5) + 23.2 = 48.2$  Einheiten ist, also fast mit dem vorhin erwähnten Neuberechneten Wert zusammenfällt. Somit werden offenbar Parachore aus den Neuberechneten Konstanten, die unter der Annahme ermittelt sind, daß die Stickstoff-Stickstoff-Doppelbindung einen niedrigeren Parachor-Wert hat als die Äthylenbindung, genau so gut mit den experimentell gefundenen übereinstimmen wie die nach den Sugdenschen Konstanten berechneten (s. Tabelle I). Die notwendige Einführung von „Spannungs-Konstanten“ („strain constants“)<sup>5)</sup> führt bei

<sup>1)</sup> M. Nencki u. J. Zaleski, B. 34, 997 [1901].

<sup>2)</sup> H. Fischer u. H. Röse, B. 46, 2460 [1913].

<sup>3)</sup> B. 63, 715 [1930].

<sup>4)</sup> Journ. chem. Soc. London 1929, 2116.

<sup>5)</sup> Journ. chem. Soc. London 125, 1177 [1924].

<sup>4)</sup> l. c. 2113.

<sup>5)</sup> l. c. 2115.