

Steigert man die Silber-Konzentration auf das 5—10-fache, so tritt nach 1—2 Min. in der silber-haltigen Lösung eine ohne jedes Hilfsmittel deutlich erkennbare Trübung auf, während die silber-freie noch völlig klar ist. Der Versuch ist auch im Hörsaal gut erkennbar, wenn man die Lösungsmengen entsprechend vergrößert.

Frankfurt a. M., Chem. Institut d. Universität.

### 166. Wolfgang Langenbeck: Über Imidazol-Hämatine.<sup>1)</sup>

[Aus d. Chem. Institut d. Universität Münster i. W.]

(Eingegangen am 16. April 1932.)

Komplexverbindungen einfacher organischer Basen mit reduziertem Hämin sind schon seit längerer Zeit in krystalliner Form bekannt<sup>2)</sup>. Sie werden als Hämochromogene bezeichnet. Dagegen ist erst kürzlich von H. Fischer, Treibs und Zeile<sup>3)</sup> ein „Para-hämatin“<sup>4)</sup> krystallin dargestellt worden, das Additionsprodukt von Pyridin und Hämatin. Die Verbindungen, die in der vorliegenden Arbeit beschrieben werden, gehören ebenfalls zu der Klasse der Para-hämatine. Sie entstehen, wenn man Hämatin mit Lösungen von Imidazol und seinen Derivaten zusammenbringt. Die Imidazol-Hämatine verdienen eine nähere Untersuchung, weil sie sich von allen anderen, bisher bekannten Para-hämatinen durch eine große Beständigkeit auszeichnen, weil ihr Spektrum zu dem des Methämaglobins in naher Beziehung steht, und endlich, weil sie katalytisch besonders wirksam sind<sup>5)</sup>.

Die Additionsprodukte von Hämatin mit Imidazol und 4(5)-Methyl-imidazol lassen sich aus Chloroform-Methanol leicht krystallin gewinnen. Die Krystalle enthalten auf 1 Mol Hämatin genau 2 Mol. Base. Sie sind so beständig, daß man sie beliebig lange im Vakuum auf 100° erhitzen kann, ohne daß sie ihre Zusammensetzung ändern. Dagegen verliert Pyridin-Hämatin schon bei 40° das gesamte Pyridin<sup>3)</sup>, und selbst die Pyridin-Hämochromogene geben die Base bei 55° zur Hälfte ab<sup>6)</sup>. Man kann sogar die Imidazol-Hämatine aus einem großen Überschuß von Pyridin auskrystallisieren lassen, ohne daß dabei das Imidazol durch Pyridin verdrängt würde. Imidazole, deren Iminogruppe methyliert ist, besitzen die gleiche hohe Affinität zum Hämatin. Als Beispiel habe ich ein Pilocarpin-Hämatin dargestellt, das besonders schön krystallisiert. Es enthält ebenfalls 2 Mol. Alkaloid auf 1 Mol. Hämatin.

<sup>1)</sup> 5. Mitteilung über Imidazol-Derivate; 4. Mitteil.: Ztschr. physiol. Chem. **182**, 305 [1929].

<sup>2)</sup> Donagány, Mathem.-naturwiss. Berichte aus Ungarn, Bd. XI (1893), zitiert nach: E. Kalmus, Ztschr. physiol. Chem. **70**, 217 [1910]; R. v. Zeynek, Ztschr. physiol. Chem. **70**, 224 [1910]; H. Fischer, A. Treibs u. K. Zeile, Ztschr. physiol. Chem. **195**, 23 [1931].

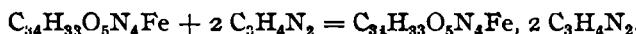
<sup>3)</sup> H. Fischer, A. Treibs u. K. Zeile, Ztschr. physiol. Chem. **193**, 138 [1930].

<sup>4)</sup> D. Keilin, Proceed. Roy. Soc. (B) **100**, 129 [1926].

<sup>5)</sup> W. Langenbeck, Naturwiss. **20**, 124 [1932].

<sup>6)</sup> H. Fischer, A. Treibs u. K. Zeile, Ztschr. physiol. Chem. **195**, 23 [1931].

Sehr merkwürdig ist das Verhalten der Imidazol-Hämatine in soda-alkalischer Lösung: Versetzt man die Hämin-Lösung mit einem großen Überschuß von Imidazol, so beobachtet man zwar einen sofortigen Farbenumschlag von braun nach rot, bei geringeren Konzentrationen tritt aber die Unisetzung nur langsam ein. Bildung und Zerfall der Komplexe sind Zeitreaktionen, deren Geschwindigkeit stark abhängig ist von der Konzentration der Komponenten und von der Temperatur. Bei anderen Para-hämatinen hat man den zeitlichen Verlauf ihrer Bildung wohl deshalb nicht beobachtet, weil dort die Komplexbildung überhaupt erst bei höheren Basen-Konzentrationen merklich wird. Im allgemeinen ist man gewohnt, Komplexbildungen als sehr schnell verlaufende Vorgänge zu betrachten, und es bedarf einer besonderen Erklärung, daß die Imidazol-Hämatine in verdünnter Lösung langsam entstehen. Vielleicht geht man nicht fehl, wenn man annimmt, daß es sich um eine Reaktion 3. Ordnung handelt, wie es auch die Reaktionsgleichung verlangt:



Das würde aber bedeuten, daß das Additionsprodukt von Hämatin mit einem Mol. Imidazol nicht beständig ist. Abschließendes kann man hierüber vorläufig nicht sagen. Wie zu erwarten, wird durch Temperatur-Erhöhung nicht nur die Reaktionsgeschwindigkeit vergrößert, sondern auch das Gleichgewicht nach der Seite des Zerfalls verschoben. Ich habe darüber bisher nur qualitative Versuche ausgeführt (vergl. Versuchs-Teil).

Das Spektrum alkalischer Lösungen des Imidazol-Hämatins zeigt, falls man einen großen Überschuß von Base anwendet, zwei Banden. Sie liegen bei etwa 589—567  $\mu\mu$  und 552—527  $\mu\mu$ . Eine dritte Bande beobachtet man, wenn die Konzentrationen des Hämatins und Imidazols von der gleichen Größenordnung sind. Diese Bande ist schwächer und verwaschener als die beiden anderen, und liegt bei etwa 625—608  $\mu\mu$ . Sie röhrt von einer partiellen Dissoziation des Imidazol-Hämatins her und ist identisch mit der Bande alkalischer Hämatin-Lösungen.

Es liegt nahe, an einem Zusammenhang zwischen den Imidazol-Hämatinen und dem Methämoglobin zu denken. Daß Methämoglobin eine Verbindung des Hämatins mit Globin ist, wurde von Hill und Holden<sup>7)</sup> auf synthetischem Wege endgültig bewiesen. Globin ist besonders reich an Histidin, dessen charakteristische Gruppe der Imidazolkern ist. Nimmt man das Molekulargewicht des Globins zu 17000, seinen Gehalt an Histidin zu 11% an, so ergibt sich, daß im Methämoglobin das Gewichtsverhältnis von Hämatin zu Imidazol etwa 1 : 1.5 ist. Bei demselben Gewichtsverhältnis erhält man mit Imidazol und Hämatin Lösungen, die das Drei-Banden-Spektrum zeigen. Dieses ist in der Tat dem Spektrum des Methämoglobins sehr ähnlich. Allerdings bestehen in der Lage der Banden kleine Unterschiede. Vor allem ist die schwache Bande im Rot beim Methämoglobin um 12—15  $\mu\mu$  nach dem Gelb zu verschoben. Auch ist das Imidazol-Hämatin-Spektrum etwas weniger scharf. Worauf diese Unterschiede beruhen, bliebe noch zu untersuchen. Die Tatsache, daß die Imidazole von den bisher untersuchten Basen bei weitem die höchste Affinität zum Hämatin besitzen, scheint jeden-

<sup>7)</sup> R. Hill u. H. F. Holden, Biochem. Journ. 20, 1326 [1926].

falls sehr dafür zu sprechen, daß sie auch im Methämoglobin an der Komplexbildung beteiligt sind.

Hrn. Dr. R. Hutschenreuter danke ich für seine Hilfe bei der Darstellung der Präparate.

### Beschreibung der Versuche.

Imidazol-Hämatin: 1. 0.1 g nach der Pyridin-Methode umkristallisiertes Chlor-hämin (nach Schalfejeff) wurden in 10 ccm 5-proz. Kalialauge gelöst, mit wenig Eisessig gefällt, abgesaugt und mit verd. Essigsäure gewaschen. Das möglichst gut abgepreßte, noch feuchte Hämatin wurde in einer Mischung von 50 ccm Chloroform, 50 ccm Methanol und 0.5 g Imidazol durch kräftiges Schütteln gelöst, die Lösung filtriert und bei Zimmer-Temperatur im Vakuum auf wenige ccm eingeengt. Nach mehrstdg. Stehen hatte sich ein violettes Pulver abgeschieden, das abgesaugt, mit Methanol gewaschen und im Vakuum bei 100° über Phosphorpentoxyd 2 Stdn. getrocknet wurde. Krusten, die sich an der Wandung des Kolbens abgesetzt hatten, wurden verworfen.

Imidazol-Hämatin krystallisiert nicht so gut, wie die anderen, hier beschriebenen Komplexe. Unter dem Mikroskop erschienen runde, undurchsichtige Knöllchen, die aber durch ihr allmähliches Wachstum und ihre konstante Zusammensetzung als krystallin gekennzeichnet waren.

3.83 mg Sbst.: 0.488 ccm N (15°, 749 mm).

$C_{34}H_{33}O_5N_4Fe, 2C_4H_8N_2$ . Ber. N 14.57. Gef. N 14.88.

2. Hämatin aus 0.1 g Hämin (s. o.) wurde in einer Mischung von 7 ccm Pyridin und 0.5 g Imidazol gelöst. Die Lösung wurde filtriert und mehrere Tage stehen gelassen. Nach dieser Zeit hatte sich ein rotviolettertes Pulver abgeschieden, das unter dem Mikroskop die gleiche Krystallform zeigte wie das nach der 1. Methode gewonnene Produkt. Die Substanz blieb bei mehrständigem Trocknen im Vakuum bei 100° unverändert.

4(5)-Methyl-imidazol-Hämatin: 1. Hämatin aus 0.1 g Hämin wurde in einer Mischung von 0.3 g 4(5)-Methyl-imidazol und 50 ccm Chloroform durch kräftiges Schütteln gelöst, durch ein trocknes Filter filtriert und bei Zimmer-Temperatur im Vakuum auf ein kleines Volum eingeengt. Nach Zugabe von 15 ccm Methanol und 0.3 ccm Methyl-imidazol wurde nochmals auf wenige ccm verdampft. Nach längerem Stehen wurden die ausgeschiedenen Krystalle abgesaugt, mit Methanol gewaschen und 2 Stdn. im Vakuum bei 100° getrocknet. Rotviolettertes Krystallpulver. Unter dem Mikroskop gut ausgebildete Prismen.

4.23 mg Sbst.): 9.78 mg CO<sub>2</sub>. — 3.53 mg Sbst.: 8.15 mg CO<sub>2</sub>. — 6.62 mg Sbst.: 3.60 mg H<sub>2</sub>O, 0.69 mg Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. — 1.99 mg Sbst.: 0.236 ccm N (15°, 749 mm).

$C_{34}H_{33}O_5N_4Fe, 2C_4H_8N_2$ . Ber. C 63.21, H 5.69, N 14.06, Fe 7.00. Gef., 63.06, 62.97, .. 6.08, .. 13.85, .. 7.29.

2. Hämatin aus 0.1 g Hämin und 0.3 g Methyl-imidazol in 10 ccm Pyridin gelöst, filtriert und 24 Stdn. stehen gelassen. Die ausgeschiedenen Krystalle wurden 1 Stde. im Vakuum bei 60° getrocknet. Violettrottes Krystallpulver, unter dem Mikroskop feine, zu Büscheln vereinigte Nadelchen.

5.07 mg Sbst.: 0.608 ccm N (20°, 755 mm).

$C_{34}H_{33}O_5N_4Fe, 2C_4H_8N_2$ . Ber. N 14.06. Gef. N 13.88.

<sup>8)</sup> Zwecks gleichmäßiger Verbrennung mit Mangandioxyd gemischt; vergl. A. 485, 57 [1931].

Pilocarpin-Hämatin: Die Lösung von 2 g Pilocarpin-Chlorhydrat in Wasser wurde mit Pottasche gesättigt und mit Chloroform extrahiert, die Chloroform-Lösung abgedampft und das freie Pilocarpin mit 7 ccm Pyridin und Hämatin aus 0.1 g Hämin geschüttelt. Nachdem eine homogene Lösung entstanden war, wurde filtriert und so lange mit Äther versetzt, bis sich eben eine geringe Menge eines dunklen Harzes abschied (etwa 10 ccm). Nach mehrtagigem Stehen krystallisierte das Pilocarpin-Hämatin an der Wandung des Gefäßes in Form blauschwarzer, glänzender Prismen aus.

2.07 mg Sbst. (2 Stdn. im Vakuum bei 100° getrocknet): 0.170 ccm N (16°, 747 mm).  
 $C_{34}H_{33}O_5N_4Fe$ ,  $2C_{11}H_{16}O_5N_2$ . Ber. N 9.36. Gef. N 9.53.

#### Spektroskopisches Verhalten der Imidazol-Hämatine in wäßriger Lösung.

1. 50 mg Hämin wurden in 10 ccm 10-proz. Soda gelöst und diese Lösung mit 75 mg Methyl-imidazol versetzt. Die Farbe schlug sofort von braun nach rot um. 0.5 ccm dieser Stammlösung wurden mit 1-proz. Sodalösung auf 25 ccm verdünnt. Sofort nach dem Verdünnen zeigte die Lösung vor dem Spektroskop nur die beiden Banden des Imidazol-Hämatins im Gelb und Grün (vergl. theoret. Teil). Nach etwa 30 Min. erschien auch die dritte Bande im Rot. Beim Stehen über Nacht (Zimmer-Temperatur 18°) verschwand das Drei-Banden-Spektrum fast ganz und ging in das Hämatin-Spektrum über. 0.5 ccm der Stammlösung wurden mit 10 ccm 1-proz. Soda-Lösung verdünnt. Nach 2 Tagen gab die Lösung das Drei-Banden-Spektrum. Daraus folgt, daß bei dem gegebenen Mengen-Verhältnis von Hämin und Methyl-imidazol dann das Drei-Banden-Spektrum entsteht, wenn die Hämin-Konzentration zwischen 0.025 und 0.5% liegt.

2. 0.5 ccm der Stammlösung wurden im Wasserbade wenige Sekunden auf 80° erwärmt. Die Farbe schlug dabei von rot nach braun um. Nach dem Abkühlen erschien die Lösung in wenigen Sekunden wieder rot. Dieser Versuch zeigt, daß die Lage des Gleichgewichtes durch Temperatur-Erhöhung nach der Seite der Dissoziation verschoben wird. In zwei Gefäßen wurden je 0.5 ccm Stammlösung mit 1-proz. Sodalösung auf 10 ccm verdünnt. Der eine Kolben wurde im Wasserbade kurze Zeit auf 60° erwärmt, die Farbe der Lösung schlug von rot in braun um. Auch nach mehrtagigem Stehen bei Zimmer-Temperatur war der Farben-Ausgleich noch nicht vollständig, wenn auch eine Annäherung der Farbtöne stattgefunden hatte. Durch Temperatur-Erhöhung wird also die Reaktionsgeschwindigkeit, die in verd. Lösung nur gering ist, sehr gesteigert. Auch durch Zugabe von Ammoniak und noch mehr durch Natronlauge wird die Dissoziation verdünnter Lösungen beschleunigt.

3. Reduziert man Verdünnungen der obigen Stammlösung mit Natrium-hydrosulfit oder Stokesscher Lösung, so beobachtet man das Häm-Spektrum mit einem größeren Überschuß von Methyl-imidazol das des Hämochromogens. Beim Schütteln mit Luft tritt das Hämatin-Spektrum auf, bzw. die Banden des Imidazol-Hämatins, je nach der zugesetzten Menge Methyl-imidazol.

4. Pilocarpin-Hämatin zeigt in soda-alkalischer Lösung folgende Banden: 612—593 mμ, 578—552 mμ, ab 530 mμ eine breite Bande, die das blaue und violette Spektralgebiet bedeckt.