

Hydrazinhydrat umgesetzt. Das als roter Niederschlag gefällte Rohprodukt löst man zum Umkrystallisieren in heißem Anisol und versetzt nach dem Erkalten mit Ligroin, worauf sich das *N*-Äthyl-acridonazin in kleinen braunroten Krystallen abscheidet. Die Verbindung schmilzt bei 204°.

$C_{30}H_{26}N_4$ (442.3). Ber. C 81.40, H 5.93, N 12.67. Gef. C 81.22, H 5.92, N 12.72.

6) *N*-Phenyl-acridonazin.

Beim Eingießen einer kalten wäßrigen Lösung der Phosphoroxchlorid-Verbindung des *N*-Phenyl-acridons in überschüssiges wäßr. Hydrazinhydrat bildet sich das Azin augenblicklich als roter Niederschlag. Zum Umkrystallisieren löst man das Rohprodukt in heißem Xylol. Auf Zusatz von Alkohol krystallisiert das *N*-Phenyl-acridonazin in derben weinroten Krystallen aus, die bei 286° schmelzen.

$C_{38}H_{26}N_4$ (538.3). Ber. C 84.72, H 4.87, N 10.41. Gef. C 84.54, H 4.88, N 10.44.

233. Richard Kuhn und Kurt Wallenfels: Über die chemische Natur des Stoffes, den die Eier des Seeigels (*Arbacia pustulosa*) absondern, um die Spermatozoen anzulocken.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut f. Medizin. Forschung, Heidelberg, Institut für Physiologie u. d. Stazione Zoologica, Neapel.]

(Eingegangen am 8. Juni 1939.)

Eine gemeinsame Untersuchung der Kaiser-Wilhelm-Institute für Biologie, Berlin-Dahlem, und für Medizinische Forschung, Heidelberg, hat zu dem Ergebnis geführt, daß der Wirkstoff, den die Eier von *Arbacia pustulosa* an das Meerwasser abgeben, um die Spermatozoen beweglich zu machen und chemotaktisch anzulocken, ein schön krystallisierender tiefroter Farbstoff ist, dessen biologische Wirksamkeit noch in einer Verdünnung von $1:2 \times 10^9$ in Erscheinung tritt¹⁾. Die Mengen, in denen sich dieser Farbstoff in den Ovarien zur Zeit der vollen Reife findet, sind erstaunlich groß: 1 einzelnes Ovar liefert über 10 mg krystallisierten Farbstoff. Dank der Unterstützung von Hrn. Prof. Dr. R. Dohrn, dem Leiter der Zoologischen Station in Neapel, und dem Eifer von Hrn. Dr. O. Schartau, der die Ovarien von über 1000 Tieren präpariert hat, war es uns möglich, größere Mengen rein darzustellen und einen Einblick in die chemische Eigenart dieses Sexualstoffes zu gewinnen.

Über die Farbstoffe verschiedener Seeigel-Arten finden sich bereits zahlreiche Angaben im Schrifttum. Man hat diese Pigmente, ehe sie in krystallisierter Form bekannt waren, unter dem von Mac Munn²⁾ geprägten Namen „Echinochrom“ vielfach zusammengeworfen, ohne darauf besonderen Wert zu legen, ob im einzelnen Fall der Farbstoff aus den Stacheln, der Panzerhaut, den Elaeocyten oder den Eiern stammte, sehr oft auch in der Voraussetzung, daß der Farbstoff bei den verschiedenen Arten (*Arbacia*, *Paracentrotus*, *Echinus* usw.) identisch sein werde. Dadurch ist eine erhebliche Unsicherheit entstanden. Denn es hat sich herausgestellt, daß nicht nur bei den einzelnen Arten, sondern auch bei ein und demselben Seeigel in den einzelnen Organen verschiedene, chemisch oft nahe verwandte Farbstoffe vorkommen. Durch

¹⁾ M. Hartmann, O. Schartau, R. Kuhn u. K. Wallenfels, Naturwiss. 27, 433 [1939].

²⁾ Quart. Journ. Microsc. Sci. 25, 469 [1885].

Isolierung in kristallisierter Form sind heute, abgesehen von Carotinoiden (Carotin, Echinenon, Pentaxanthin), mindestens 3 andersartige Farbstoffe als voneinander verschieden gekennzeichnet, nämlich diejenigen aus den Ovarien und Stacheln von *Arbacia* sowie aus den Stacheln von *Paracentrotus*. E. Lederer und R. Glaser³⁾ waren die ersten, denen es gelang, das „Echinochrom“ kristallisiert zu gewinnen, und zwar den Farbstoff aus den Eiern von *Arbacia aequituberculata*, den sie durch die Bruttoformel $C_{12}H_{10}O_7$, den Schmp. 220° und die Absorptionsbanden 531, 495 und 461 $m\mu$ (in Schwefelkohlenstoff) kennzeichneten. Aus den Stacheln von *Strongylocentrotus*^{3a)} gelang es ihnen, einen Farbstoff $C_{12}H_{10}O_8$ zu isolieren, das Spinochrom, welches bei 185° schmilzt und viel langwelliger absorbiert: 595, 548 und 507 $m\mu$ (in Schwefelkohlenstoff). Wir selbst erhielten aus den Stacheln von *Arbacia pustulosa* einen in tiefroten Blättchen kristallisierenden Farbstoff vom Schmp. 229° (Zers.) und den Absorptionsbanden 555, 515 und 465 $m\mu$ (in Schwefelkohlenstoff), über den später näher berichtet werden soll. Trotz dieser Mannigfaltigkeit lassen sich die einprägsamen Namen Echinochrom (für die Farbstoffe aus den Eiern) und Spinochrom (für die Farbstoffe aus den Stacheln der Seeigel) beibehalten, wenn man sie durch ein Suffix ergänzt. Es soll demgemäß A die Herkunft aus *Arbacia*, P aus *Paracentrotus* usw. bezeichnen. Echinochrom A bedeutet dann das Pigment aus den Eiern von *Arbacia*, Spinochrom P dasjenige aus den Stacheln von *Paracentrotus* usw.

Unsere folgenden Angaben betreffen den Farbstoff aus den Eiern von *Arbacia pustulosa*. Er ist allem Anschein nach mit dem von E. Lederer und R. Glaser aus den Ovarien von *Arbacia aequituberculata* gewonnenen identisch; er schmilzt wie dieser bei 220° (unter Zers.) und hat die Zusammensetzung $C_{12}H_{10}O_7$.

Das Echinochrom A kristallisiert besonders schön aus Dioxan-Wasser (Abbild. 1a und 1b) und läßt sich unter 10^{-4} mm bei etwa 120° unzersetzt sublimieren. Im Hinblick auf die biologische Wirksamkeit haben wir auf die Reinigung viel Sorgfalt verwendet. Nach den von M. Hartmann und O. Schartau ausgeführten Versuchen war die aktivierende und chemotaktische Wirkung auf die Spermazoen auch nach oftmals wiederholten Kristallisationen und Hochvakuumsublimationen unverändert. Daraus ist zu schließen, daß im Echinochrom A tatsächlich der gesuchte Wirkstoff vorliegt.

Das lichtelektrisch gemessene Absorptions-Spektrum ist aus Abbild. 2 ersichtlich. Am Gittermeß-Spektroskop nach Löwe-Schumm fanden wir mit Kupferoxyd-ammoniak-Filter die Schwerpunkte der Banden bei

535, 499, 464 $m\mu$ (Schwefelkohlenstoff)

533, 497, 462 $m\mu$ (Chloroform)

532, 494, 461 $m\mu$ (Benzol)

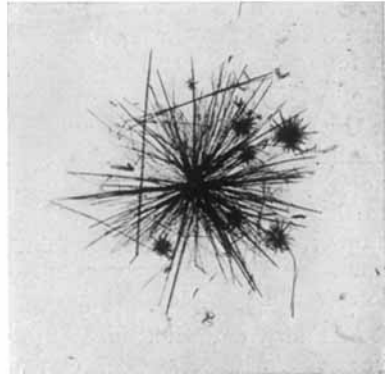
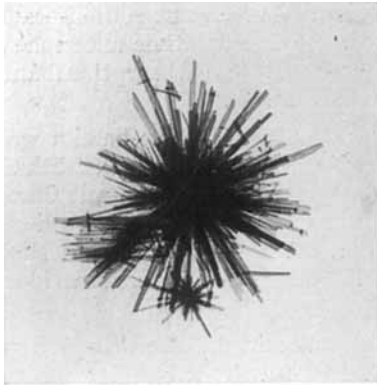
502, 469, — $m\mu$ (konz. Schwefelsäure).

Die Löslichkeit in kaltem Wasser ist so gering, daß dieses kaum angefärbt wird; doch muß man die gesättigte Lösung noch um mehrere Zehnerpotenzen verdünnen, ehe die Grenze der Wirksamkeit im biologischen Test

³⁾ Compt. rend. Acad. Sciences **1938**, 454.

^{3a)} In der zoologischen Systematik ist der Name *Strongylocentrotus* neuerdings durch *Paracentrotus* ersetzt worden.

erreicht wird. Aus viel siedendem Wasser läßt sich der Farbstoff umkrystallisieren. Für den Test wurden Proben der verschiedenen Krystallisationen (z. B. 5 mg) auf einer Mikrowaage genau eingewogen, mit der für das Dinatrium-



Abbild. 1a.

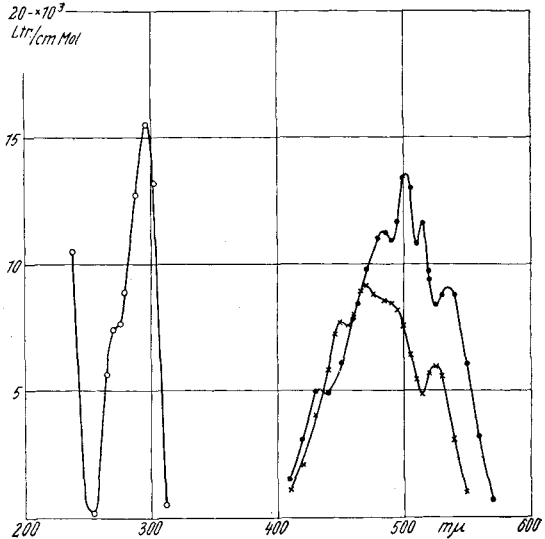
Abbild. 1b.

Echinochrom A aus Dioxan-Wasser 128-fach.

salz berechneten Menge festen Natriumbicarbonats versetzt und in zugeschnolzenen Ampullen nach Neapel gesandt. Beim Übergießen mit Meerwasser geht dann der Farbstoff als Natriumsalz verhältnismäßig leicht in Lösung, und es lassen sich die erforderlichen Verdünnungen exakt herstellen.

Bei der reduzierenden Acetylierung mit Zinkstaub und Essigsäure-anhydrid in Gegenwart von Pyridin erhielten wir eine in derben Prismen krystallisierende, farblose Leuko-Acetylverbindung. Elementaranalyse und Acetylbestimmung zeigten, daß es sich um ein Heptaacetyl-Derivat handelte. Damit war die Natur aller 7 Sauerstoffatome geklärt.

Bei der Zinkstaubdestillation bildeten sich, wenn diese nicht zu langsam bei etwa 600° durchgeführt wurde, geringe Mengen von Naphthalin. Mit Diazomethan lieferte das Echinochrom A einen schön krystallisierenden tief-



Abbild. 2.

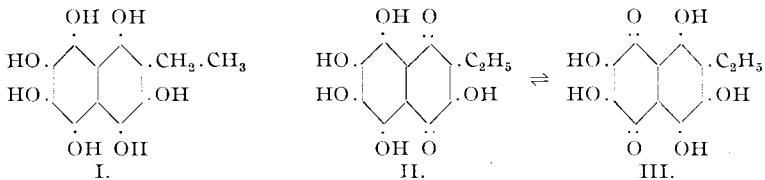
Lichtelektrisch gemessene Absorptionsspektren von
 ×—×—× Echinochrom A,
 ····· Echinochrom-A-trimethyläther,
 o—o—o Heptaacetyl-leuko-echinochrom A.
 Abszissen: Wellenlängen in μm.

$$\text{Ordinaten: } z = \frac{2.30}{c \times d} \log_{10} \frac{J_0}{J}$$

roten Trimethyläther, dessen Löslichkeit in Exalton eine einwandfreie Bestimmung des Molekulargewichtes ermöglichte. Der in Natriumbicarbonat unlösliche Trimethyläther zeigte die für die Konstitutionsaufklärung bemerkenswerte Erscheinung, sich in verd. Natronlauge mit tief blauvioletter Farbe zu lösen, während der freie Farbstoff von verd. Alkalien mit rötlich-brauner Farbe aufgenommen wird. Der Echinochrom-A-trimethyläther unterscheidet sich ferner von seiner Muttersubstanz dadurch, daß die Absorptionsbanden langwelliger und schärfer ausgeprägt sind (Abbild. 2).

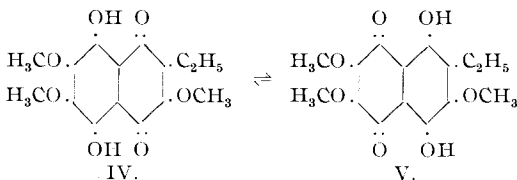
Unter der, durch das Ergebnis der Zinkstaubdestillation bereits wahrscheinlich gewordenen Annahme, daß es sich um ein Derivat des Naphthalins handelt, blieben noch 2 C-Atome aufzuklären. Durch Oxydation mit Chromsäure ließ sich feststellen, daß diese in Form einer Äthylgruppe vorliegen; denn wir erhielten 0.83 Mol. Propionsäure, die durch Schmp. und Misch-Schmp. des Natriumsalzes sowie durch die Analyse des Silbersalzes identifiziert wurde.

Aus der Gesamtheit dieser Befunde schließen wir, daß Leuko-Echinochrom A als 1.3.4.5.6.7.8-Heptaoxy-2-äthyl-naphthalin (I) zu formulieren ist. Der Farbstoff selbst ist als eines der 7 theoretisch möglichen Chinone



aufzufassen, die um 2 H-Atome ärmer sind. Unter diesen 7 Möglichkeiten werden vermutlich II und III bevorzugt sein. Die Annahme eines Gleichgewichts zwischen diesen beiden Formen dürfte bei Betrachtungen über die chemischen und physikalischen Eigenschaften des Echinochroms und seiner Lösungen im allgemeinen ausreichen.

Der Trimethyläther trägt die Alkoxygruppen sehr wahrscheinlich in 3.6.7-Stellung (IV, V), da er sich durch seine Farbreaktionen als Analogon des Naphthazarins und der β -Alkyl-naphthazarine zu erkennen gibt, während



das Echinochrom selbst, der Formel II \rightleftharpoons III entsprechend, in seinen Farb- und Fällungsreaktionen⁴⁾ sich analog dem Naphthopurpurin und den β -Alkyl-naphthopurpurinen verhält:

⁴⁾ Vergl. Ch. Kuroda u. M. Wada, Sci. Pap. Inst. phys. chem. Res. **34**, 1740 [1938], Tafel S. 1749 (C. **1939** I, 2792).

Farbreaktion	NaHCO ₃	NaOH	PbAc ₂ in CH ₃ OH
Echinochrom A	mit rotbrauner Farbe löslich	orangebraune Lösung	rotviolette Fällung
2.5.8-Trioxo-naphthochinon-(1.4) .	mit rotbrauner Farbe löslich	orangebraune Lösung	rotviolette Fällung
Echinochrom-A-trimethyläther ..	unlöslich	blaue Lösung	violette Lösung
5.8-Dioxy-naphthochinon-(1.4) ...	unlöslich	blaue Lösung	violette Lösung

Die bei der Vereinigung von männlichen und weiblichen Keimzellen wirksamen Verbindungen stellen, biologisch betrachtet, eine besondere Art von Sexualstoffen dar. Es sind Befruchtungsstoffe. Ihre physiologische Aufgabe ist von derjenigen der Sexualhormone der höheren Tiere, welche die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale steuern, durchaus verschieden. Gs zeigt sich nun, daß auch ihrer chemischen Natur nach beide Arten von Geschlechtsstoffen nichts miteinander gemein zu haben scheinen. Testosteron, Oestron und Progesteron gehören bekanntlich der Gruppe der Steroide an. Die Befruchtungsstoffe der Grünalge *Chlamydomonas* sind als Carotinoide erkannt worden. Der erste tierische Befruchtungsstoff, den wir chemisch kennen, hat sich als Naphthochinon-Farbstoff erwiesen.

Gleichwohl zeigt das Echinochrom A viele Eigenschaften, die für die Hormone der höheren Tiere als kennzeichnend gelten: Es wird in einem spezifischen Organ, dem Ovar, gebildet und in aktiver Form unter physiologischen Bedingungen sezerniert; freilich nicht in die Blutbahn, sondern ins Meerwasser, in dem sich eben die Befruchtung abspielt; es ist ein echter chemischer Sendbote, den das reife Ei aussendet; der Empfänger, das Spermatozoon, reagiert darauf und schlägt alsbald den umgekehrten Weg ein, zurück zum Ei, von dem der Bote kam; das Beweglichwerden der Spermatozoen zeigt, daß der Farbstoff die Eigenschaft besitzt, anzuregen ($\sigma\rho\mu\tilde{\nu}$).

Der Mechanismus dieser Anregung ist noch unbekannt. Da aber das Echinochrom einen umkehrbar hydrierbar-dehydrierbaren Farbstoff von bekanntem Redoxpotential⁵⁾ darstellt, so liegt die Vermutung nahe, daß nach H. Wielands Prinzip der Wasserstoffverschiebung die Farbstoffmolekeln im Spermatozoon, auf das sie treffen, den Ablauf bestimmter chemischer Reaktionen in Gang setzen. Diese stofflichen Umsetzungen werden, wie wir vermuten, die Quelle jener Energie sein, welche die Spermatozoen befähigt, auf das Ei zuzuschwimmen; die Arbeitsleistung, die das Schwimmen verlangt, muß offenbar so wie im arbeitenden Muskel chemisch gedeckt werden. Nach dieser Vorstellung, die wir experimentell zu prüfen beabsichtigen, kann man die Bedeutung des Echinochroms A für die Spermatozoen von *Arbacia* vergleichen mit derjenigen eines Co-Ferments bei der Muskelkontraktion.

Naphthochinon-Farbstoffe sind unseres Wissens noch nie als tierische Pigmente aufgefunden worden. Alle bisher bekannten, wie das Juglon, Lawson, Plumbagin, Droseron, Alkannin, Shikonin und viele andere entstammen dem Pflanzenreich. Es gibt keinen Anhaltspunkt dafür, daß die Seeigel das Echinochrom A nach Art eines Vitamins in fertigem Zustande

⁵⁾ R. K. Cannon, *Biochem. Journ.* **21**, 184 [1927]; E. A. H. Friedheim, *Biochem. Ztschr.* **259**, 257 [1933], bei $p_H = 7.0$: -0.230 Volt.

mit der Nahrung aufnehmen und in den Eiern lediglich speichern. Man muß annehmen, daß es sich um einen spezifischen tierischen Farbstoff handelt.

Von den bisher bekannten Naphthochinon-Farbstoffen pflanzlicher Herkunft unterscheidet sich das Echinochrom A dadurch, daß alle verfügbaren Stellen des Naphthalins mit Substituenten bespickt sind. Dadurch erinnert die Konstitutionsformel (I) — wie auch die Abscheidungsform der Krystalle (Abbild. 1) — an die äußere Gestalt des Tieres, das diesen Farbstoff erzeugt.

Beschreibung der Versuche.

1) Echinochrom A aus den Ovarien von *Arbacia pustulosa*.

Die Ovarien von 132 Weibchen wurden in einer Reibschale mit einer Mischung von 1200 ccm Aceton, 300 ccm Wasser und 15 ccm Eisessig unter Zusatz von Seesand verrieben. Es wurde abgenutscht und der Rückstand mit Aceton, das etwas Salzsäure enthielt, gewaschen, bis er fast farblos war. Die tiefrot gefärbten Auszüge wurden mit Wasser verdünnt und mit Äther erschöpfend extrahiert. Die Ätherlösung wurde nun 2-mal mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung durchgeschüttelt, wobei die Hauptmenge des Farbstoffs mit rotbrauner Farbe in die untere Schicht ging. Diese Lösung wurde noch mehrmals mit Äther ausgeschüttelt, um Aceton zu entfernen. Dann wurde mit 2-n. Salzsäure angesäuert, wobei die Farbe nach Tiefrot umschlug und der freie Farbstoff wieder in Äther aufgenommen. Die Reinigung über das Natriumsalz wiederholten wir in gleicher Weise noch einmal. Zum Schluß wurde die Ätherlösung des Farbstoffs mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand war bereits krystallin und konnte aus einer Mischung von 60 Tln. Exluan 06 und 40 Tln. Wasser umkrystallisiert werden. Aus der Gesamtmenge von 150 ccm Lösung krystallisierten nach dem Erkalten im Eisschrank tiefrote Nadeln mit starkem Oberflächenglanz, deren Gewicht nach dem Trocknen 1.537 g betrug. Der Schmp. lag nach 4-maligem Umkrystallisieren aus Dioxan-Wasser bei 220° (Zers.).

5.332 mg Sbst.: 10.575 mg CO₂, 2.040 mg H₂O.

C₁₂H₁₀O₇ (266.1). Ber. C 54.12, H 3.80. Gef. C 54.30, H 4.30.

14.317 mg Sbst. verbr. nach Oxydation mit 5-n. Chromsäure⁶⁾ und Destillation 4.47 ccm *n*₁₀₀-NaOH.

Gef. 0.83 Mol. flüchtige Säure.

2) Trimethyl-echinochrom A.

60 mg Echinochrom A wurden in 5 ccm Äther unter Zusatz von einigen Tropfen Alkohol gelöst und mit einer ätherischen Lösung von Diazomethan versetzt. Nach $\frac{1}{4}$ -stdg. Stehenlassen wurde mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung ausgeschüttelt. Es ging nun kein Farbstoff mehr in die alkalische Schicht. Darauf wurde mit Wasser gewaschen, der Äther getrocknet und verdampft. Als das Volumen noch 1 ccm betrug, krystallisierte die Methylverbindung in roten Nadeln aus. Die Krystalle wurden abgesaugt und aus

⁶⁾ R. Kuhn u. H. Roth, B. **66**, 1274 [1933].

Exluan-Wasser (1:1) umkrystallisiert. Ausb. 12 mg. Schmp. 129—130° (Berl.).

3.880 mg Sbst.: 8.275 mg CO₂, 1.830 mg H₂O. — 2.732 mg Sbst.: 5.974 mg AgJ.

C₁₃H₁₆O₇ (308.1). Ber. C 58.44, H 5.20, 3OCH₃ 30.18.

Gef. 58.35, 5.29, „ 28.89.

0.328 mg Sbst. in 3.596 mg Exalton: Δ = 5.9°. Gef. Mol.-Gew. 329.

0.169 mg Sbst. in 3.199 mg Exalton: Δ = 3.5°. Gef. Mol.-Gew. 322.

Absorptionsbanden: 538, 502, 467 mμ (Äther).

3) Heptaacetyl-dihydro-echinochrom A.

50 mg Echinochrom A wurden in 0.5 ccm Acetanhydrid suspendiert und mit 150 mg Zinkstaub versetzt. Dann wurden noch 0.2 ccm Pyridin (reinst, 2-mal über Bariumoxyd destilliert) zugefügt. Die Mischung wurde auf dem Wasserbad erwärmt. Nach 2—3 Min. hellte sich die tief rotviolette Farbe auf und ging schließlich in Hellgelb über. Es wurde heiß filtriert, der Zinkstaub mehrmals mit heißem Eisessig gewaschen; die Filtrate wurden vereinigt und in 25 ccm Wasser gegossen. Der weiße, flockige Niederschlag, der hierbei ausfiel, wurde abgesaugt und getrocknet. Nach dem Lösen in heißem Eisessig wurde filtriert und mit heißem Wasser bis zur beginnenden Trübung versetzt. Beim Abkühlen krystallisierten farblose derbe Prismen vom Schmp. 225—230° (Zers., evak. Röhrchen, k. Th.). Ausb. 90 mg. Zur Analyse wurde noch mehrmals aus 50-proz. Essigsäure umkrystallisiert. Der Zersetzungspunkt lag nun zwischen 240 und 245° (evak. Röhrchen, k. Th.).

3.990, 4.045 mg Sbst.: 8.140, 8.230 mg CO₂, 1.730, 1.725 mg H₂O. — 3.299 mg Sbst. verbr. nach alkal. Verseifung und Destillation 4.11 ccm n₁₀₀-NaOH.

C₂₆H₂₆O₁₄ (562.2). Ber. C 55.50, H 4.66, 7CH₃CO 53.54.

Gef. „ 55.64, 55.49, „ 4.85, 4.77, „ 53.48.

4) Oxydation mit Chromsäure.

176 mg Echinochrom A wurden mit 20 ccm 5-n. Chromsäure-Schwefelsäure⁶⁾ 1½ Stdn. unter Rückfluß gekocht, die gebildete Säure wurde abdestilliert. Das Destillat (35 ccm) wurde mit 5.0 ccm n₁₀-NaOH beinahe neutralisiert, verdampft und der zu weißen weichen Krystallen erstarrte Rückstand im Vak. getrocknet. Schmp. 289° (Berl-Block, k. Th.). Der Mischschmp. mit Natriumpropionat vom Schmp. 288—289° lag bei 288°. Ausb. 48.1 mg; ber. für 5.0 ccm n₁₀-NaOH: 48.0 mg Natriumpropionat, 41.0 mg Natriumacetat.

30 mg Natriumsalz wurden in 0.5 ccm Alkohol-Wasser gelöst und in der Hitze mit 0.5 ccm 10-proz. alkohol. Silbernitratlösung versetzt. Das Silbersalz krystallisierte beim Erkalten unter Lichtausschluß aus.

0.880 mg Sbst.: 0.528 mg Ag.

C₃H₃O₂Ag. Ber. Ag 59.67. Gef. Ag 60.00.