

## 79. Richard Kuhn und Kurt Wallenfels: Echinochrome als prosthetische Gruppen hochmolekularer Symplexe in den Eiern von *Arbacia pustulosa*.

[Aus d. Institut für Biologie am Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung Heidelberg u. aus d. Zoolog. Station Neapel.]  
(Eingegangen am 3. April 1940.)

Die Farbstoffe der Seeigel sind von Art zu Art (*Arbacia*, *Paracentrotus*, *Echinus* usw.) verschieden. Man weiß ferner, daß auch bei ein und demselben Seeigel in den einzelnen Organen (Gonaden, Mesenterium, Stacheln usw.) gleichzeitig verschiedene, chemisch mitunter nahe verwandte Farbstoffe vorkommen (Carotinoide, Naphthochinone). Im folgenden wird am Beispiel der Ovarien von *Arbacia pustulosa* gezeigt, daß selbst in ein und demselben Organ einer bestimmten Art, im Laufe der jahreszeitlichen Entwicklung (Reifung) bemerkenswerte Unterschiede festzustellen sind.

Vollreife *Arbacia*-Weibchen aus dem Golf von Neapel, die März-April 1939 gefangen worden waren, lieferten Echinochrom A, über dessen Konstitution bereits berichtet wurde<sup>1)</sup>. Die Ovarien der Ende November 1939 bis Anfang Januar 1940 gesammelten Tiere waren noch sehr klein. Sie befanden sich im Zustande der beginnenden Reife und waren tief violettrot gefärbt. Aus solchen Ovarien ließ sich nur sehr wenig Echinochrom A gewinnen, dafür fanden wir darin 2 noch unbekannte Farbstoffe, die wir als Echinochrom B und Echinochrom C bezeichnen. Im Zustande fortgeschrittener Reife (Februar 1940) waren die Ovarien bereits größer und nicht mehr tief violettrot sondern schon braunrot. Sie enthielten die Farbstoffe B und C nicht mehr sondern nur noch A, wie dann auch die vollreifen großen Ovarien im März 1940. Es hat sich gezeigt, daß alle 3 Echinochrome als prosthetische Gruppen hochmolekularer Symplexe in den Eiern von *Arbacia* vorkommen.

### 1) Die prosthetischen Farbstoffe.

Echinochrom A, B und C lassen sich aus den Ovarien nach Zusatz von Salzsäure mit Äther ausschütteln. Die Farbstoffe A und B können dem Äther mit Natriumbicarbonatlösung entzogen werden. Echinochrom C bleibt selbst nach Durchschütteln mit  $n/_{10}$ -Natronlauge im Äther. Echinochrom B ist in warmem, niedrigsiedendem Benzin viel leichter löslich als Echinochrom A, wodurch es sich von diesem trennen läßt.

Charakteristisch sind die Farbe (Absorptionsbanden) und die Fluoreszenz der in Äther gelösten Farbstoffe:

	Farbe	Banden (m $\mu$ )		Fluoreszenz
A	orangerot	531	~495	(orange)
B	carminrot	559 519	~485	rosaviolett
C	violett	580 536	~492	(violett)

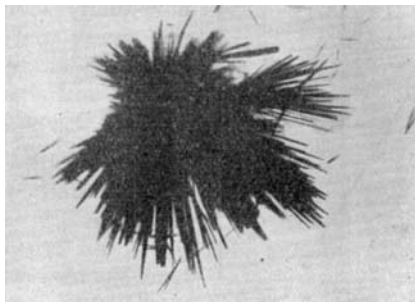
Die bei 490—500 m $\mu$  liegenden Absorptionsbanden sind sehr stark, aber unscharf. Bei Echinochrom C ist die violette Farbe, die der des Joddampfes gleichkommt, bei Echinochrom B die lebhaft rosaviolette Fluoreszenz vor der Quarzlampe besonders auffallend. A fluoresciert in Äther nur schwach orange, in verd. Sodalösung aber stark grün (blaustichig). Das Fluoreszenzlicht von B in verd. Sodalösung ist gelbstichig grün.

<sup>1)</sup> B. 72, 1407 [1939].

Die in den Ovarien von je 500 Weibchen vorkommenden Mengen sind etwa: 5000 mg Echinochrom A (vollreife, große Ovarien), 10 mg Echinochrom B und 2 mg Echinochrom C (kleine Ovarien im Zustand beginnender Reife).

## 2) Krystallisation von Echinochrom B.

Die in der Zeit von Ende November 1939 bis Anfang Januar 1940 in Neapel unter 500 ccm gesättigter Ammonsulfatlösung gesammelten Ovarien von etwa 500 *Arbacia*-Weibchen wurden wie folgt verarbeitet. Es wurde die Gesamtmenge (1 l) zentrifugiert und die klare tief violettrot gefärbte Ammonsulfatlösung (etwa 600 ccm) mit 2-n. Salzsäure (100 ccm) angesäuert, wobei die Farbe unter Ausfallen eines voluminösen Niederschlages nach Hellrot umschlug. Nun wurde wiederholt mit Äther ausgeschüttelt bis der Äther farblos blieb und das Gemisch von Echinochrom A und B dem Äther mit gesättigter Natriumbicarbonatlösung entzogen. Im Äther blieb Echinochrom C mit violetter Farbe zurück. Der bicarbonatlösliche Anteil wurde nach dem Ansäuern mit verd. Salzsäure wieder in Äther getrieben, dieser mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und verdampft. Der rote, ölige Rückstand wurde in wenig warmem Dioxan aufgenommen und durch vorsichtigen Zusatz von Wasser (Reiben mit dem Glasstab) teilweise krystallisiert erhalten. Aus Benzol: Benzin = 2:1 lieferte dieses Produkt 36 mg Echinochrom A vom Schmp. 217° (Absorptionsbanden in Äther: 531 und ~495 m $\mu$ ). Der in der Mutterlauge verbliebene Farbstoff wurde mit NaHCO<sub>3</sub>-Lösung ausgeschüttelt und nach dem Ansäuern mit verd. Salzsäure in Benzin (Sdp. 70—80°) aufgenommen. Die stark eingeeengte Lösung schied nach mehrtägigem Stehenlassen im Eisschrank 1.5 mg Echinochrom B in carminroten, zu Drusen vereinigten Stäbchen (Abbild. 1) ab. Schmp. 173—175° (Kofler). Absorptionsbanden in Äther: 559, 519 und ~485 m $\mu$ , in Chloroform: 559, 522 und ~490 m $\mu$ , in *n*-Sodalösung: 2 breite Streifen um 572 und 539 m $\mu$ .



Abbild. 1. Echinochrom B aus Benzin.

Eine weitere Menge Echinochrom B (2—3 mg) ließ sich krystallisiert gewinnen aus dem nach Abzentrifugieren der Ammonsulfatlösung verbleibenden Rückstand der Eier. Die Art der Isolierung entsprach der eben beschriebenen. Auffallend war, daß dabei kein Echinochrom A angetroffen wurde.

Methylierung: Eine Lösung von Echinochrom B in Benzin wurde mit ätherischer Diazomethanlösung versetzt. Nach 10 Min. ging beim Durch-

schütteln mit Natriumbicarbonatlösung kein Farbstoff mehr in die untere Schicht. In 2-n. Natronlauge ging aber der gebildete Methyläther mit blauvioletter Farbe. Dieses Verhalten entspricht ganz den Beobachtungen, die bei der Methylierung von Naphthopurpurin, von Echinochrom A und anderen kernhydroxylierten Naphthazarinderivaten mit Diazomethan zu machen sind. Wir schließen daraus, daß auch Echinochrom B ein hydroxylierter Abkömmling des Naphthazarins ist.

Der Echinochrom-B-methyläther fluoresciert in Äther lebhaft orange und zeigt in diesem Lösungsmittel Absorptionsbanden bei 538, 499 und  $\sim 470 \mu$ .

### 3) Eigenschaften der ternären Echinochrom-Symplexe.

Die Echinochrome A, B und C finden sich in den Eiern von *Arbacia* nicht in freier Form sondern in Bindung an hochmolekulare Träger. Diese Symplexe sind binär und ternär gebaut nach dem Schema:

Echinochrom...Träger und Echinochrom...Träger...Hilfsträger.

Die Hauptmenge an Farbstoff befindet sich im Innern des reifen Seeigeleies, während die umgebende Gallerthülle nur sehr wenig Farbstoff enthält. Durch vorsichtiges Schütteln und Stehenlassen mit Seewasser kann man die Gallerthüllen von den Eiern entfernen.

Wenn man die Eier mit ihren Gallerthüllen in Kohlensäureschnee härtet, zerreibt und mit Seewasser extrahiert, so geht ein Farbstoff-Symplex in Lösung, der ternär gebaut ist: Echinochrom...Träger...Hilfsträger. Wenn man die Eier ohne Gallerthüllen zerreibt und extrahiert, so erhält man Lösungen des binären Symplexes Echinochrom...Träger. Die Gallerthülle des Eies belädt das schon im Ei-Innern hochmolekular gebundene Echinochrom mit einem weiteren Träger, der dem entstehenden ternären Symplex chemisch auffallende und biologisch wichtige Eigenschaften verleiht.

**Löslichkeit und Fällbarkeit.** Die ternären Symplexe von Echinochrom A, B und C sind löslich in 4-proz. Natriumchloridlösung bzw. Meereswasser. Bei der Dialyse solcher Lösungen gegen 4-proz. Natriumchloridlösung wird Cellophan von den Farbstoffen nicht durchdrungen. Durch Zusatz von Ammonsulfat lassen sich die ternären Symplexe von A, B und C aussalzen. Die Fällungen sind in 4-proz. NaCl-Lösung

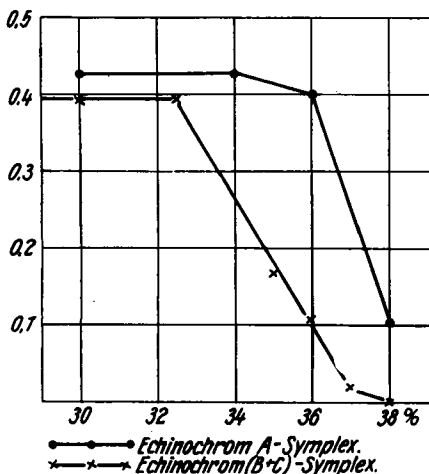
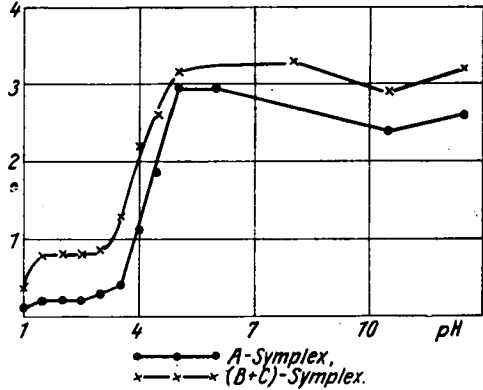


Abbildung 2. Ammonsulfat-Fällungskurven. Abscissen: g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/100 ccm. Ordinate: in Lösung gebliebener, durch Tannin fällbarer Stickstoff (mg N/ccm).

wieder klar löslich. Als Beispiel für die Fällbarkeit durch Ammonsulfat seien 2 Versuche angeführt (Abbildung 2). So wie Ammonsulfat eignen sich zur Fällung der Symplexe ohne Denaturierung auch CdSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub> und MgSO<sub>4</sub>.

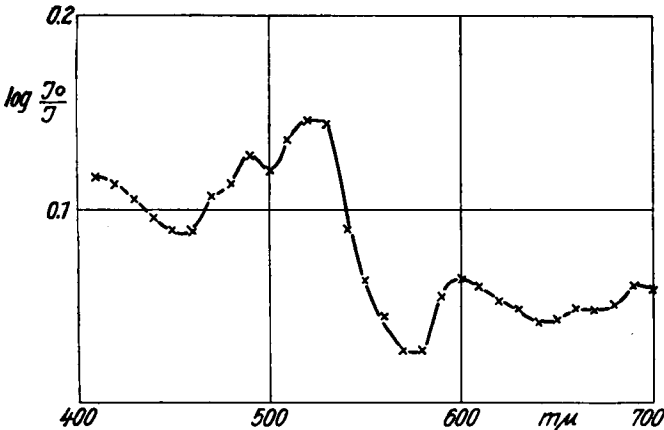
Übergießt man den durch Ammonsulfat ausgefällten ternären Symplex mit Pufferlösungen von verschiedenem  $p_{H}$ , die 4% NaCl enthalten, so findet man, daß die Löslichkeit zwischen  $p_{H}$  12 und 5 maximal ist und nach kleineren  $p_{H}$ -Werten zu rasch abfällt. Die Hauptkomponente bleibt bei  $p_{H}$  3 praktisch ungelöst, die Nebenkompente findet man noch zwischen  $p_{H}$  1.5 und 3.0 in Lösung.

Beim Aufkochen der in Seewasser gelösten Symplexe von A und B + C bleiben die Lösungen vollkommen klar. Auch bei Zusatz des doppelten Vol. Alkohol tritt keine Fällung ein. Gibt man wäßr. Tanninlösung nach A. Roche und F. Marquet<sup>2)</sup> zu, so erhält man N-haltige Fällungen, die allen Farbstoff enthalten. Die Tanninmethode von Roche-Marquet diente zur Bestimmung der Ammonsulfat-Fällungskurve (Abbild. 2) und der  $p_{H}$ -Löslichkeitskurve (Abbild. 3).



Abbild. 3.  $p_{H}$ -Löslichkeitskurve von Echinochrom... Träger... Hilfsträger. Abscissen:  $p_{H}$ . Ordinaten: in Lösung gebliebener, durch Tannin fällbarer Stickstoff (mg N/ccm).

Von  $p_{H}$  1 bis  $p_{H}$  5:  $m/10$ -Citrat-HCl, bis  $p_{H}$  8:  $m/10$ -Phosphat,  $p_{H}$  10.5:  $n/10$ -Natriumcarbonat,  $p_{H}$  12.5:  $n/10$ -NaOH.



Abbild. 4. Absorptions-Spektrum von Echinochrom A... Träger... Hilfsträger in 4-proz. NaCl-Lösung (gereinigt durch Fällungen mit Ammonsulfat und Dialyse gegen 4-proz. NaCl-Lösung).  $d = 0.121$  cm.

Farbe und Redoxverhalten: Der Symplex Echinochrom A... Träger... Hilfsträger in 4-proz. NaCl-Lösung ist viel dunkler und braunstichiger gefärbt als die freie Farbstoffkomponente und zeigt neben der Hauptbande (520  $m_{\mu}$ ) unscharfe Nebenbanden bei 490 und 600  $m_{\mu}$  (Abbild. 4).

Der ternäre A-Symplex enthält  $\sim 8.0\%$  N und 1 Mol. Echinochrom A in etwa 70000 g Substanz.

Noch in großer Verdünnung geben die Lösungen des A- und B+C-Symplexes in 4-proz. NaCl-Lösung mit Dodecyl-dimethyl-benzyl-ammoniumbromid Fällungen, die den gesamten Farbstoff enthalten, aber in 4-proz. NaCl-Lösung nicht wieder löslich sind (Denaturierung, Abspaltung des Hilfsträgers).

<sup>2)</sup> Bull. Soc. Chim. biol. 17, 1630 [1935] und 19, 613 [1937].

Der ternäre A-Symplex wird nach Zusatz von etwas  $\text{NaHCO}_3$  durch Natriumhydrosulfit nur träge entfärbt, der B-Symplex sehr leicht und reversibel. Auch das freie Echinochrom B wird durch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  erheblich leichter als Echinochrom A zur Leukostufe hydriert, aus der es sich beim Schütteln mit Luft zurückbildet. Das violette Echinochrom C konnten wir mit Natriumhydrosulfit nicht entfärben, wohl aber durch Zn-Staub in Gegenwart von Pyridin und Essigsäureanhydrid.

Haftfestigkeit der prosthetischen Gruppe: Auch bei langdauernder Dialyse in Cellophanschläuchen gegen 4-proz. NaCl-Lösung sind A- und (B + C)-Symplex ganz beständig und geben keinen Farbstoff an die Außenlösung ab. Dialysiert man gegen  $n_{/100}$ -Salzsäure, die 4% NaCl enthält, so hellt sich die rote Farbe allmählich auf und im Laufe von 2—3 Tagen sind Echinochrom A und Echinochrom B völlig in die Außenlösung (die öfters erneuert wird) getreten. Echinochrom C wird unter diesen Bedingungen nicht abgespalten, auch  $n_{/10}$ -HCl reicht hierfür nicht aus. Erst 2-n. Salzsäure setzt die C-Komponente in Freiheit. Die Haftfestigkeit der prosthetischen Gruppen nimmt in der Reihenfolge A → B → C zu.

#### 4) Abspaltung des Hilfsträgers.

Unterwirft man den durch Ammonsulfat-Fällung und Dialyse gegen 4-proz. NaCl-Lösung gereinigten A-Symplex oder (B + C)-Symplex im Cellophanschlauch der Dialyse gegen dest. Wasser bis zur Entfernung aller Cl-Ionen (2—5 Tage, Eisschrank), so ist eine höchst merkwürdige Erscheinung zu beobachten. Es fällt praktisch aller Farbstoff in roten Flocken aus, während in der überstehenden klaren Flüssigkeit ein nicht dialysierbarer hochmolekularer Stoff, der Hilfsträger, in Lösung bleibt. Die Fällung enthält 7.5—8.0% N und hat die Eigenschaften eines denaturierten binären Symplexes. Das Verhältnis der Trockengewichte von Niederschlag zu Lösung nach der Dialyse gegen dest. Wasser ist von der Größenordnung 1:1. Der ausfallende Farbstoff-Symplex ist nicht nur in dest. Wasser sondern auch in 4-proz. NaCl-Lösung unlöslich. Der Hilfsträger löst sich sowohl in Wasser wie in 4-proz. NaCl-Lösung. Der Symplex Echinochrom...Träger...Hilfsträger wird durch dest. Wasser zerlegt. Eine Umkehrung dieser Reaktion war bisher nicht möglich, d. h.: der ausgefallene Farbstoff, den man mit einer Lösung des Hilfsträgers übergießt, geht auch dann nicht mehr in Lösung, wenn man so viel Natriumchlorid zugebt, daß die Lösung wieder 4% davon enthält.

Der Hilfsträger ist der chemischen Bearbeitung leichter zugänglich. Er läßt sich durch  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{ZnSO}_4$  u. a. aussalzen und durch Dialyse gegen dest. Wasser reinigen. Er enthält 8.0—8.5% N. Sehr charakteristisch ist seine Fällbarkeit durch  $n_{/100}$ -Salzsäure.

Zur Reinigung dialysieren wir die Lösung in dest. Wasser gegen  $n_{/100}$ -HCl, wobei sich der Hilfsträger in nahezu farblosen Flocken abscheidet. Die Substanz ist in verd. Natriumbicarbonatlösung erheblich leichter löslich als in Wasser, was auf die Anwesenheit von Carboxylgruppen hindeutet. Das Äquivalentgewicht eines Präparates betrug 475 (5.325 mg Sbst.: 1.12 ccm  $n_{/100}$ -NaOH).

Beim Erhitzen mit 20-proz. Salzsäure im Rohr auf 100° (18 Stdn.) schieden sich N-haltige Flocken ab. Das Filtrat gab positive Ninhydrinreaktion. Es enthielt nur noch 6.62% N (3.60 mg Sbst.: 1.70 ccm  $n_{/100}$ -HCl, Kjeldahl). Nach D. D. van Slyke waren 4.89%, d. h. etwa  $^2_3$ , Amino-N (10.80 mg Sbst.:

0.46 ccm N<sub>2</sub> 751 mm, 21°). Durch Zusatz von Phosphorwolframsäure ließ sich aus dem Hydrolysat eine N-reiche Base abscheiden, die näher untersucht werden soll.

5) Eigenschaften des binären Echinochrom-A-Symplexes.

Aus den von ihrer Gallerthülle befreiten reifen Eiern läßt sich, wie erwähnt, ein Echinochrom-A-Symplex in Lösung bringen, der sich von dem eben beschriebenen ternären Farbstoff-Symplex chemisch und biologisch wesentlich unterscheidet. Abweichend von dem bei der Dialyse des ternären Symplexes gegen dest. Wasser ausfallenden Niederschlag, der ebenfalls nach dem Schema Farbstoff...Träger gebaut ist, ist der in diesem Abschnitt zu beschreibende binäre Symplex sowohl in dest. Wasser als auch in Seewasser löslich. Eine solche Lösung gibt auf Zusatz des gleichen Volumens Alkohol eine Fällung, die allen Farbstoff enthält. Diese Fällung kann aber durch Seewasser nicht wieder in Lösung gebracht werden. Man hat den Eindruck, daß bei der Abspaltung des Hilfsträgers aus dem ternären Symplex, ähnlich wie hier bei der Fällung des nativen binären Symplexes durch Alkohol, Denaturierung eintritt.

Fällbarkeit: Bei der Dialyse roher Lösungen gegen Seewasser geht zunächst eine geringe Menge Farbstoff durch das Cellophan, nach 2—3-maliger Erneuerung des Seewassers bleibt die Außenlösung völlig farblos. Der hochmolekular gebundene Farbstoff läßt sich nun durch Ammonsulfat aussalzen. Zur völligen Ausfällung genügt eine Ammonsulfat-Konzentration von 30—32%, die erheblich geringer ist als die beim ternären Symplex erforderliche. Die Ammonsulfat-Fällung ist in Meereswasser wieder klar löslich. Beim Aufkochen fällt kein Niederschlag, aus unbekanntem Gründen sind die Lösungen bei etwa 20° jedoch meist wenig haltbar. Durch Zusatz des gleichen Volumens Alkohol wird der Farbstoff ganz ausgefällt.

Farbe und Redoxverhalten. Der native binäre Symplex ist rein rot gefärbt, sehr ähnlich dem ternären. Im Taschenspektroskop sieht man eine nicht sehr scharfe Absorptionsbande bei 525m $\mu$ . Durch Natriumhydrosulfit tritt leicht Entfärbung ein. Beim Schütteln mit Luft bildet sich der Farbstoff zurück.

Einwirkung verd. Säure: Dialysiert man die binäre Symplexlösung gegen Seewasser, das n<sub>330</sub>-Schwefelsäure enthält, so geht die Farbe alsbald in Hellrot über und es wird etwas Echinochrom abgespalten, das die Membran durchdringt. Dialysiert man nach vollständigem Farbumschlag wieder gegen Seewasser von p<sub>H</sub> 8.4, so kehrt die ursprüngliche dunkelrote Farbe wieder zurück und es dialysiert kein weiterer Farbstoff. An Äther gibt die binäre Symplexlösung keine Spur Echinochrom ab.

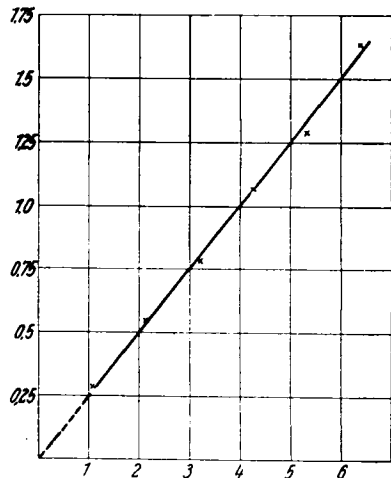


Abbildung 5. Eichkurve zur colorimetrischen Bestimmung von Echinochrom A. Stufenphotometer, Lichtfilter S 47 (470 m $\mu$ ). Lösungsmittel: Äther, Stammlösung: 2.640 mg kryst. Echinochrom A (Schmp. 220°) in 25 ccm. Abszissen: mg Farbstoff/100 ccm; Ordinaten: E.

Farbstoffgehalt: Die Trockengewichtsbestimmung einer durch Ammonsulfat-Fällungen und Dialyse gegen dest. Wasser gereinigten Lösung des nativen binären Symplexes ergab 2.946 mg/ccm. 25 ccm dieser Lösung wurden mit *n*-Salzsäure gespalten und das Echinochrom A in Äther aufgenommen. Die Ätherlösung wurde mit Natriumbicarbonat ausgeschüttelt und der Farbstoff nach dem Ansäuern wieder in Äther getrieben. Die stufenphotometrische Bestimmung des Echinochromgehalts (Eichkurve vergl. Abbild. 5) ergab, daß 25 ccm der ursprünglichen Symplexlösung (73.70 mg Trockengewicht) 0.565 mg Echinochrom gebunden enthielten. 1 Mol. Echinochrom A (Mol.-Gew. 266) traf also auf 34700 g organische Substanz. Der binäre Symplex hat somit etwa den doppelten Farbstoffgehalt (das halbe Mol.-Gew.) des ternären.

#### 6) Die biologische Wirkung der Symplexe<sup>3)</sup>.

Die Lösung des *binären* Echinochrom-A-Symplexes vermag Seeigel-Spermatozoen weder zu aktivieren noch zu agglutinieren. Der Farbstoff liegt hier in einer biologisch unwirksamen Bindungsform vor. Durch Einwirkung von verd. Säure kann das Echinochrom daraus in Freiheit gesetzt werden. Dieses wirkt dann noch in einer Verdünnung von 1:2.5 Milliarden auf Sperma aktivierend.

Eine Lösung des *ternären* Echinochrom-A-Symplexes wirkt auf die Spermatozoen so wie das Sekretwasser der intakten Eier. Völlig bewegungslose Spermien werden in lebhafte Bewegung gebracht und agglutiniert. Versetzt man eine Lösung des Hilfsträgers<sup>4)</sup> mit etwas wirkungslosem, binärem Symplex, so wirkt die Mischung nach kurzer Zeit ebenso wie normales Eisekretwasser aktivierend und agglutinierend. Die im binären Komplex verlorengegangene aktivierende Wirkung des freien Farbstoffs tritt also im ternären Symplex wieder zutage.

Eine farbstofffreie Lösung des Hilfsträgers, wie man sie durch Dialyse des ternären Symplexes gegen dest. Wasser erhält, vermag bewegungslose Spermien nicht mehr zu aktivieren. Sie wirkt jedoch stark agglutinierend. Das Agglutinin (Fertilisin von F. R. Lillie) ist offenbar mit dem aus der Gallerthülle der Eier stammenden Hilfsträger identisch.

Die im Eisekretwasser nachweisbare aktivierende Substanz, d. h. der Farbstoff, durchdringt auch bei vieltägiger Dialyse gegen Seewasser Cellophan nicht. Es ist daher anzunehmen, daß auch unter den in der Natur herrschenden Bedingungen nicht freies Echinochrom A, sondern hochmolekular gebundene Naphthochinonfarbstoff auf die Spermatozoen wirkt. Das im Eiwasser-Symplex gebundene Echinochrom A kann Spermatozoen noch in einer Verdünnung von 1:300 Milliarden aktivieren, ist also etwa 100-mal wirksamer als der kristallisierte Farbstoff.

Hrn. W. Schulz haben wir für hervorragende Hilfe bei Ausführung aller Versuche zu danken, Hrn. Prof. Dr. M. Hartmann und Hrn. Dr. O. Schartau sowie Hrn. Dr. R. Dohrn für die Beschaffung des Materials aus dem Golf von Neapel.

<sup>3)</sup> Zusatz bei der Korrektur am 10. April 1940. Die folgenden Versuche sind mit Hrn. Prof. Dr. M. Hartmann und Hrn. Dr. O. Schartau ausgeführt worden, die darüber im „Biologischen Zentralblatt“ ausführlicher berichten werden.

<sup>4)</sup> oder längere Zeit belichtetes Eisekretwasser, das durch photochemische Zerstörung des Echinochroms seine aktivierende Wirkung eingebüßt hat.