

## 212. Richard Kuhn und Kurt Wallenfels: Über den Stachelfarbstoff von *Arbacia*.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung Heidelberg, Institut für Biologie.]  
(Eingegangen am 28. Juli 1941.)

Aus den Stacheln von *Strongylocentrotus (Paracentrotus) lividus* haben E. Lederer und R. Glaser<sup>1)</sup> einen Farbstoff  $C_{12}H_{10}O_8$  (Spinochrom) isoliert, der bei 185° schmilzt und dessen Absorptionsbanden in Schwefelkohlenstoff bei 595, 548 und 507 m $\mu$  liegen. Aus den Stacheln von *Arbacia pustulosa* wurde, wie bereits berichtet<sup>2)</sup>, ein davon verschiedener Farbstoff erhalten, der tiefrote Blättchen vom Schmp. 229° darstellte und dessen Absorptionsbanden bei 555, 515 und 465 m $\mu$  (CS<sub>2</sub>) lagen. Nach einer inzwischen erschienenen Untersuchung von Ch. Kuroda und H. Oshima<sup>3)</sup> scheint die Mannigfaltigkeit der Stachelpigmente noch weiter zu gehen. Sie gewannen aus *Pseudocentrotus depressus* (japanisch: Aka-Uni) das bei 285—295° sublimierende Spinochrom Aka, aus *Heterocentrotus mammilatus* (japanisch: Ogasawara-Futozao-Uni) Spinochrom F vom Schmp. 229° und aus *Anthocardaris crassispina* (japanisch: Murasaki-Uni) Spinochrom M vom Schmp. 193°. Alle diese Farbstoffe<sup>4)</sup> scheinen, entsprechend dem von uns für den Farbstoff aus den Eiern von *Arbacia pustulosa* geführten Nachweis<sup>2)</sup>, der Gruppe der Oxy-naphthochinone anzugehören, doch ließ sich noch in keinem Falle die chemische Konstitution eines Stachelfarbstoffs der Seeigel ermitteln.

Ausgangsmaterial für die vorliegende Untersuchung waren die nahezu schwarzen Stachelpanzer von *Arbacia pustulosa*, die im Golf von Neapel gefangen und an der dortigen Zoologischen Station präpariert worden waren. Durch Mahlen in einer Kugelmühle erhielten wir ein grauviolettes Pulver, das sich bis auf einen geringen schwarzen Rückstand in 10-proz. Salzsäure unter lebhafter Kohlendioxyd-Entwicklung löste und dann den roten Farbstoff an Äther abgab. Ohne Auflösung des Calciumcarbonats läßt sich der Stachelfarbstoff als Natriumsalz in Lösung bringen, wenn man unter Zusatz von Natriumoxalat oder von Natriumfluorid unter Wasser energisch verreibt. Diese Versuche sprechen dafür, daß der Stachelfarbstoff nicht in freiem Zustande sondern in Form eines schwerlöslichen Calciumsalzes im Panzer vorliegt. Wobei anzunehmen ist, daß Calciumoxalat und Calciumfluorid noch weniger löslich sind.

Die Reindarstellung des Farbstoffs aus den Stacheln von *Arbacia*, bei der die Isolierung von Echinochrom A als Vorbild diente, hat sich als verlustreich erwiesen. Man gelangt verhältnismäßig rasch zu Präparaten vom Schmp. 229—230°, die aber bei der Elementaranalyse schwankende C- und H-Werte ergeben, aus denen sich eine sichere Summenformel kaum ableiten läßt. Die besten Präparate, gereinigt durch Filtration der Ätherlösung über Calciumcarbonat, krystallisieren aus Dioxan-Wasser in grünschimmernden, in der Durchsicht granatroten, sternförmig angeordneten Nadeln vom Schmp. 229—230°, deren Zusammensetzung auf die Formel  $C_{12}H_8O_8$  stimmt. Entscheidend gesichert wurde diese Formel durch die Analyse der prachtvoll krystallisierenden Molekülverbindung, die der Farbstoff mit Sarkosin-

<sup>1)</sup> Compt. rend. Acad. Sciences **207**, 454 [1938].

<sup>2)</sup> R. Kuhn u. K. Wallenfels, B. **72**, 1407 [1939].

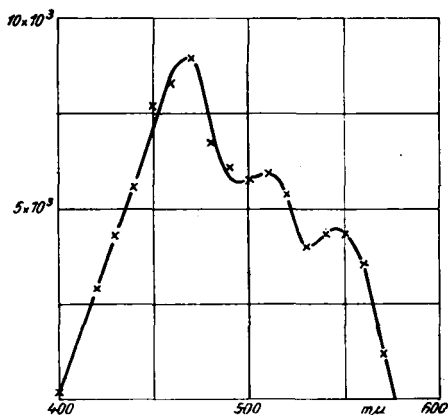
<sup>3)</sup> Proceed. Imp. Acad. [Tokyo] **16**, 214 [1940].

<sup>4)</sup> Zur Nomenklatur (A, P, F, M..) vergl. B. **72**, 1408 [1939].

anhydrid liefert<sup>5)</sup>. Der neue Farbstoff  $C_{12}H_8O_8$ , dem wir den Namen Spinon A geben, stellt sehr wahrscheinlich ein Dehydrierungsprodukt des ursprünglichen Stachelfarbstoffs, des Spinochroms A, dar, das sich im Laufe der Aufarbeitung durch Einwirkung von Luftsauerstoff auf die bicarbonat-alkalischen Lösungen gebildet hat. Das reine Spinon A löst sich in verd. Natriumbicarbonatlösung mit gelber Farbe, während der ursprüngliche Stachelfarbstoff unter denselben Bedingungen ein purpurviolettes Natriumsalz liefert.

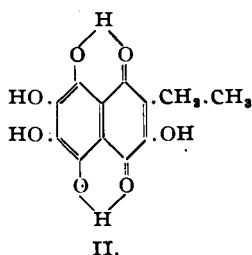
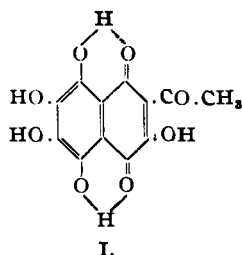
Das lichtelektrisch gemessene Absorptionsspektrum hat für die aus dem Panzer von männlichen und von weiblichen Tieren isolierten Pigmente keinen die Meßfehler übersteigenden Unterschied ergeben. Am Gitter-Meßspektroskop nach Löwe-Schumm fanden wir die Schwerpunkte der Absorptionsbanden von Spinon A bei

545, 508, ~460  $m\mu$  (Äther)      551, 513, ~460  $m\mu$  (Benzol)  
 545, 508, ~460  $m\mu$  (Chloroform)    553, 513, ~462  $m\mu$  (Schwefelkohlenstoff).



Abbild. Lichtabsorption vor Spinon A in Benzol.

Vom Echinochrom A  $C_{12}H_{10}O_7$  unterscheidet sich das Spinon A durch den Mindergehalt von 2 H und den Mehrgehalt von 1 O-Atom. Während der Ei-Farbstoff bei der Oxydation mit Chromsäure Propionsäure liefert, haben wir unter denselben Bedingungen aus dem Spinon 0.93 Mol. Essigsäure erhalten, die als Silbersalz zur Analyse gelangte. Diese wichtige Feststellung erklärt den Unterschied der Summenformeln sofort, wenn man annimmt, daß im Spinon A (I) der Rest  $CO \cdot CH_3$  die Stelle von  $CH_2 \cdot CH_3$  im Echinochrom A (II) vertritt. Damit wird zugleich die Vorstellung einer einfachen genetischen Beziehung zwischen den beiden Pigmenten nahegelegt.

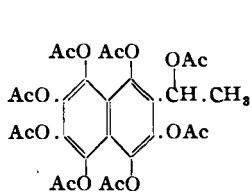


Bei der reduzierenden Acetylierung mit Zinkstaub und Essigsäureanhydrid-Pyridin liefert Spinon A eine Leukoverbindung, deren Analyse auf ein Oktaacetyl-tetrahydro-Derivat (III) paßt, während der Ei-Farbstoff eine Heptaacetyl-dihydro-Verbindung geliefert hatte.

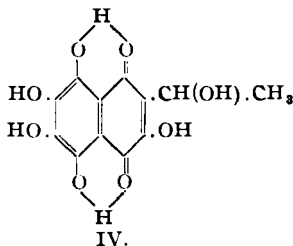
Bemerkenswert ist das Verhalten von Spinon A gegen Natriumdithionit ( $Na_2S_2O_4$ ) in bicarbonat-alkalischer Lösung. Dabei tritt nicht wie bei anderen

<sup>5)</sup> K. Wallenfels, B. 74, 1598 [1941].

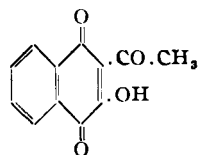
Naphthochinon-Farbstoffen Entfärbung sondern Violett-Färbung ein. Beim Schütteln mit Luft bildet sich aber auch hier der ursprüngliche Farbstoff



III.



IV.

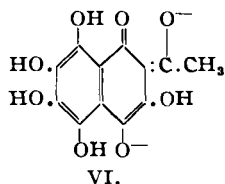


V.

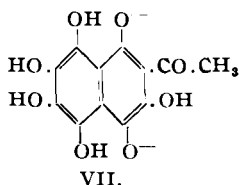
zurück. Es ist sehr auffallend, daß das violette Reduktionsprodukt mit dem molekularen Sauerstoff rascher reagiert als das im Überschuß angewandte Natriumdithionit. Man erkennt dies daran, daß die violette Lösung, deren Farbe durch Schütteln mit Luft eben nach Gelb umgeschlagen ist, nach kurzer Zeit neuerdings violett wird und daß sich dieses Spiel so oft wiederholen läßt, bis alles überschüssige Dithionit verbraucht ist.

Das Auftreten der violetten Reduktionsstufe scheint durch die Anwesenheit der Acetylgruppe bedingt zu werden. Das noch unbekannte, zum Vergleich dargestellte 2-Acetyl-3-oxy-naphthochinon-(1.4) (V) wird ebenfalls durch  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  nicht entfärbt sondern violett. Formel I trägt somit auch dem auffallenden Reduktionsverhalten des Spinons A Rechnung. Das violette Natriumsalz, das man durch Reduktion von 2-Acetyl-3-oxy-naphthochinon-(1.4) erhält, unterscheidet sich vom entsprechenden Reduktionsprodukt von Spinon A dadurch, daß es mit molekularem Sauerstoff langsamer reagiert. Beim Schütteln der bicarbonat-alkalischen, violetten Lösung mit Luft schlägt die Farbe erst dann nach Gelb um, wenn das im Überschuß angewandte Dithionit verbraucht ist. Neuerliche Violett-Färbung, wie im Versuch mit Spinon, ist nicht zu beobachten.

Es ist wahrscheinlich, daß die violette Reduktionsstufe das Dinatriumsalz eines Dienols (VI) des Dihydro-spinons darstellt. Das Dienol ist vermutlich stärker sauer und daher in alkalischer Lösung beständiger als das farblose bzw. gelbe Natriumsalz des Hydrochinons (VII), das aus Analogiegründen zu erwarten war.



VI.



VII.

Bei der Formulierung des violetten Reduktionsproduktes wird man auch andere Ladungsverteilungen wie in Formel VI sowie mesomere Zustände in Betracht zu ziehen haben.

Der rohe Farbstoff aus den Stacheln von *Arbacia* löst sich in  $\text{NaHCO}_3$  mit violetter Farbe und die ersten Krystallisationen, welche grünschillernde Blättchen (nicht Nadeln) vom bereits richtigen Schmp.  $229^\circ$  darstellen, aber bei der Analyse zu hohe H-Werte ergeben, annähernd auf  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_8$  stimmend,

lösen sich in  $\text{NaHCO}_3$ , auch noch mit violetter Farbe, die beim Schütteln mit Luft in Gelb übergeht. Das tieffarbige Dienol VI läßt sich nun auch als Alkalisalz des Carbinols IV auffassen (vergl. die Bildung von Stilbendiolkalium aus Benzoin, die tieffarbigen Alkalisalze des Astaxanthins und anderer  $\alpha$ -Ketole<sup>6)</sup>). Es ist daher anzunehmen, daß das in den Stacheln vorkommende Spinochrom A das Carbinol IV darstellt. In Analogie zu den Erfahrungen am Astaxanthin<sup>6)</sup> wird man mit der Möglichkeit zu rechnen haben, daß ein Ketol der Formel IV in der Natur auch in Bindung an Eiweiß sowie mit Fettsäuren verestert, auftreten kann. Von den aus japanischen Seeigeln isolierten Stachelfarbstoffen, deren Absorptionsbanden leider nicht angegeben wurden, stimmt das Spinochrom F aus *Heterocentrotus mammillatus* im Schmp. 229° mit unserem Spinon A überein. Die für Spinochrom F angegebenen Elementaranalysen passen auf die Formel  $\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_8$ . (Ber. C 51.05, H 3.57. Gef. C 50.80, 50.51, H 3.44, 3.56.) Im Spinochrom F liegt vielleicht das mit Spinochrom A identische Carbinol IV vor, was durch direkten Vergleich noch zu prüfen sein wird.

### Beschreibung der Versuche.

#### Spinon A.

Die Schalen der Seeigel (*Arbacia pustulosa*) wurden mit Wasser gut gewaschen und dabei von den Weichteilen sorgfältig befreit. Dann wusch man die Schalen noch mit Alkohol und Äther und trocknete sie. In einer großen Kugelmühle wurden sie nun zu einem feinen grau-violetten Pulver zermahlen. Dieses wurde in eine Mischung von 10-proz. Salzsäure und Aceton (1 : 1) eingerührt, wobei die Menge der Salzsäure der Menge Pulver entsprach, das als  $\text{CaCO}_3$  angenommen wurde. Die Schalensubstanz löst sich unter heftiger  $\text{CO}_2$ -Entwicklung in kurzer Zeit fast ganz auf. Es bleibt nur wenig einer schwarzen, schmierigen Substanz übrig, von der abfiltriert wurde. Die braunrot gefärbte Lösung wird nun ausgeäthert. Der rote Farbstoff, der in den Äther geht, wurde, wie wir es für Echinochrom A beschrieben haben, über das Natriumsalz gereinigt, das violett gefärbt war. Schließlich wurde die Ätherlösung des Farbstoffs durch eine Säule von Calciumcarbonat gesaugt, getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde aus Exluan-Wasser umkristallisiert und in großen, stark grünschillernden, in der Durchsicht roten Nadeln erhalten. Der Schmelzpunkt lag bei 229–230°. Der Farbstoff sublimierte beim Schmelzpunkt stark in den kälteren Teil der Capillare. Die Ausbeute an Rohfarbstoff betrug aus etwa 150 Tieren 120 mg. Bei der Reinigung zur Analyse ging die Farbstoffmenge auf  $\frac{1}{4}$  zurück.

3.985 mg Sbst.: 7.32 mg  $\text{CO}_2$ , 1.09 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — 3.810 mg Sbst.: 6.98 mg  $\text{CO}_2$ , 1.035 mg  $\text{H}_2\text{O}$ . — 13.13 mg Sbst.: 4.38 ccm  $n_{10}$ -NaOH (5-n.  $\text{CrO}_3$ ).

$\text{C}_{12}\text{H}_{10}\text{O}_8$  (280). Ber. C 51.42, H 2.89, (C) $\text{CH}_2$  5.36.

Gef. „ 51.39, 51.52, „ 3.14, 3.13, „ 5.01.

Oxydation mit Chromsäure: 153 mg Sbst. lieferten bei der Oxydation mit 5-n. Chromsäure ein Destillat, das 43.48 ccm  $n_{100}$ -NaOH verbrauchte (ber. für 1 Mol. flüchtige Säure: 48.9 ccm). Die neutralisierte Lösung gab beim Verdampfen 38 mg Natriumsalz (ber. für Natriumacetat: 40 mg), das in 1 ccm verd. Alkohol gelöst und mit 0.5 ccm alkohol. Silbernitratlösung umgesetzt wurde. Das Silbersalz gab bei der Analyse:

4.715 mg Sbst.: 3.090 mg Ag. — 4.138 mg Sbst.: 2.730 mg Ag.

$\text{CH}_2\text{CO}_2\text{Ag}$ . Ber. Ag 64.90. Gef. Ag 65.54, 65.97.

<sup>6)</sup> R. Kuhn u. N. A. Sörensen, B. 71, 1879 [1938].

Leuko-Acetyl-Verbindung (Oktaacetyl-tetrahydro-Verbindung).

9.6 mg Spinon A wurden in 0.2 ccm Acetanhydrid suspendiert und mit 50 mg Zinkstaub versetzt. Dann wurde 0.1 ccm Pyridin zugefügt. Die rotviolette Mischung wurde auf dem Wasserbad erwärmt, wobei sie sofort hellgelb wurde. Es wurde heiß vom Zinkstaub abgessogen, wobei die Leuko-Acetyl-Verbindung als weiße, flockige Substanz ausfiel. Es wurde zentrifugiert und der Bodenkörper aus 50-proz. Essigsäure umkrystallisiert. Beim Erhitzen über 200° findet allmählich Zersetzung unter Dunkelfärbung statt.

3.950 mg Stbst.: 7.865 mg CO<sub>2</sub>, 1.57 mg H<sub>2</sub>O. — 2.343 mg Stbst. verbr. 2.999 ccm  $n_{100}$ -NaOH.  
C<sub>28</sub>H<sub>28</sub>O<sub>18</sub> (620.2). Ber. C 54.18, H 4.55, COCH<sub>3</sub> 55.47. Gef. C 54.30, H 4.45, COCH<sub>3</sub> 55.07.

2-Acetyl-3-oxy-naphthochinon-(1.4).

Die Substanz krystallisiert aus Benzin in braungelben Blättchen vom Schmp. 126—126.5°. Sie ist in Wasser kaum, in Natriumbicarbonat leicht mit tiefgelber Farbe löslich.

3.905 mg Stbst.: 9.58 mg CO<sub>2</sub>, 1.27 mg H<sub>2</sub>O. — 12.160 mg Stbst.: 5.24 ccm  $n_{100}$ -NaOH (5-n. CrO<sub>3</sub>).

C<sub>12</sub>H<sub>8</sub>O<sub>4</sub> (216). Ber. C 66.67, H 3.70, (C)CH<sub>3</sub> 6.94. Gef. C 66.91, H 3.64, (C)CH<sub>3</sub> 6.47.

216 mg Stbst., in 4 ccm *n*-Natronlauge und 20 ccm Wasser gelöst, lieferten bei der Oxydation mit 525 mg Kaliumpermanganat in 25 ccm Wasser Phthalsäure, die als Anhydrid (55 mg) vom Schmp. 128.5—129° (Mischprobe 129.5—130.5°) identifiziert wurde.

Hrn. Dr. H. Hartmann sowie Hrn. W. Schulz haben wir für experimentelle Mitarbeit zu danken, Hrn. Prof. Dr. R. Dohrn sowie Hrn. Dr. O. Schartau für die Überlassung und Präparierung des Ausgangsmaterials.

### 213. Kurt Wallenfels: *Komplexverbindungen von Echinochrom und verwandten Oxynaphthochinonen.*

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung Heidelberg, Institut für Biologie.]  
(Eingegangen am 28. Juli 1941.)

#### A) *Komplexverbindungen mit Diketopiperazinen.*

P. Pfeiffer und O. Angern<sup>1)</sup> prüften 1926 die Frage, ob das Färben der Wolle und Seide ein echter chemischer Vorgang ist oder aber auf einer unspezifischen Adsorption des Farbstoffs an der Faseroberfläche beruht. Sie führten zu diesem Zweck Modellversuche mit Säureamiden durch und konnten zeigen, daß sich diese mit bestimmten phenolischen Farbstoffen zu wohlcharakterisierten Molekülverbindungen vereinigen. Das cyclische Säureamid Sarkosinanhydrid (I) erwies sich als besonders geeignet zur Darstellung derartiger krystallisierter Komplexe. Als Farbstoff-Komponenten kamen Phenole, Phenolazofarbstoffe und Oxychinone in Frage, die ein freies Hydroxyl enthielten, d. h. eines, das nicht mit einer im gleichen Molekül anwesenden Keto- oder Azogruppe Nebenvalenzbindung einzugehen in der

<sup>1)</sup> Ztschr. angew. Chem. **39**, 253 [1926]; P. Pfeiffer u. Liu Wang, Ztschr. angew. Chem. **40**, 983 [1927].