

Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft

76. Jahrg. Nr. 4. — Abteilung B (Abhandlungen), S. 323—447. — 17. April.

49. Kurt Wallenfels: Der Farbstoff der roten Blutzellen des Seeigels *Arbacia pustulosa*.

Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Institut für Biologie, Heidelberg.]
(Eingegangen am 19. Februar 1943.)

Echinochrom ist der Name, der im Jahre 1885 und 1889 von McMunn¹⁾ dem Pigment der Leibeshöhlenflüssigkeit der Seeigel *Strongylocentrotus lividus*, *Amphidotus cordatus*, *Echinus sphaera* und *Echinus esculentus* gegeben wurde. Auf Grund von Farbänderungen unter dem Einfluß von stark reduzierenden Mitteln schloß er, daß es sich um einen Sauerstoffüberträger handeln müsse, der dem Farbstoff der roten Blutzellen der Säugetiere entspreche. 1892 schloß sich Griffiths²⁾ dieser Meinung an und teilte Analysenwerte mit, auf Grund deren er eine Bruttoformel $C_{102}H_{98}O_{12}N_{12}S_2Fe$ errechnete. Er berichtete, daß Echinochrom mit Mineralsäuren sich in ein Haematoporphyrin spalten lasse.

McClendon³⁾ untersuchte 1912 den Farbstoff der roten Blutzellen von *Arbacia punctulata*, den er ebenfalls mit Echinochrom bezeichnete, und stellte fest, daß der gleiche Farbstoff in den Chromatophoren der Eier und in den Stacheln des Tieres enthalten sei. 1927 bestimmte R. K. Cannan⁴⁾ das Redoxpotential unreiner Echinochrom-Lösungen aus *Arbacia*-Blutzellen und -Stacheln. Er gab dafür einen Wert von $E_0 = -0.199$ mV an. Nachdem es im Jahr 1936 E. G. Ball⁵⁾ zum ersten Male gelungen war, den Farbstoff der Eier von *Arbacia punctulata* zu kristallisieren und 1938 von E. Lederer und R. Glaser⁶⁾ die Bruttoformel $C_{12}H_{10}O_7$ aufgestellt wurde, zeigten R. Kuhn und K. Wallenfels⁷⁾ 1939, daß dem Farbstoff der Eier von *Arbacia pustulosa* die Struktur eines 2-Äthyl-pentaoxy-naphthochinons-(1.4) zukomme. 1941 wurde dann die Struktur des Stachelfarbstoffs ermittelt⁸⁾ und festgestellt, daß er an Stelle der Äthyl-Gruppe des Echinochroms eine Acetyl-Gruppe trägt. Ihm wurde der Name Spinon A⁹⁾ gegeben. Einen von diesem verschiedenen Farbstoff haben E. Lederer und R. Glaser⁶⁾ in den Stacheln von *Strongylocentrotus* (Syn. mit *Paracentrotus*) *lividus* festgestellt. Außer diesem Pigment mit den Absorptionsbanden 595, 548, 507 (CS_2) $m\mu$ und der Bruttoformel $C_{12}H_{10}O_8$ fanden sie in den *Paracentrotus*-Stacheln noch einen Farbstoff der Bruttoformel $C_{12}H_{10}O_7$, den sie für Echinochrom hielten. Musajo und Minchilli¹⁰⁾ zeigten jedoch, daß er sich von Echinochrom A wesentlich unterschied und schrieben ihm entsprechend dem Spinon A die Konstitution eines 2-Acetyl-tetraoxy-naphthochinons zu. Weitere ähnliche Farbstoffe wurden von Ch. Kuroda und H. Ohshima¹¹⁾ in japanischen Seeigelarten aufgefunden. Die Eier von *Paracentrotus lividus* enthalten zwei

1) Quart. Journ. Micro. Sci. [2] **25**, 469 [1885]; **30**, 51 [1889].

2) Compt. rend. Soc. Biol. **115**, 419 [1892]; Proceed. Roy. Soc. Edinburgh **19**, 117 [1892]; Physiology of the Invertebrata, New York 1892; Respiratory Proteids London 1897.

3) Journ. biol. Chem. **11**, 435 [1912].

4) Biochem. Journ. **21**, 184 [1927].

5) Journ. biol. Chem. **114**, 649 [1936].

6) Compt. rend. Acad. Sciences **207**, 454 [1938].

7) B. **72**, 1407 [1939].

8) R. Kuhn u. K. Wallenfels, B. **74**, 1594 [1941].

9) Für das hypothetische Carbinol, welches als Vorstufe des Spinons vermutet wird, soll der Name Spinochrom A vorbehalten bleiben.

10) Boll. sci. Fac. Chim. ind., Bologna **3**, 113 [1942] C. **1943** I., 1275).

11) Proceed. Imp. Acad. [Tokyo] **16**, 214 [1940].

Carotinoide, die von Lederer kristallisiert und Echinon und Pentaxanthin genannt wurden¹²⁾. In den Eiern dieses Seeigels konnten bisher ebensowenig wie in den Hoden Naphthochinonfarbstoffe nachgewiesen werden. 1940 wurden von R. Kuhn und K. Wallenfels in den *Arbacia*-Eiern noch zwei weitere Farbstoffe, Echinochrom B und C, in geringer Menge aufgefunden, deren Konstitution noch nicht bekannt ist¹³⁾.

Als es sich gezeigt hatte, daß die Farbstoffe aus den Eiern und Stacheln von *Arbacia* sicher verschieden sind, wurde es wünschenswert, auch die Natur des roten Farbstoffs der Blutzellen sicherzustellen. Dies erschien deshalb von besonderem Interesse, weil das Echinochrom in Verbindung mit einem Trägerprotein aus den Eiern eine biologische Bedeutung als Befruchtungsfaktor (Fertilisin) besitzt¹⁴⁾. Das Proteid aktiviert und agglutiniert die Spermatozoen, während, wie Lillie¹⁵⁾ festgestellt hat, das Blut von männlichen und weiblichen Seeigeln eine Substanz enthält, welche die Befruchtung verhindert, ohne jedoch einen sichtbaren Einfluß auf Sperma oder Eier zu besitzen.

Zur Gewinnung von Blutzellen frei von Eiern oder Eifragmenten wurden die Tiere während der Monate Oktober und November, also in geschlechtsunreifem Zustand, präpariert. Sie wurden durch kreisförmigen Einschnitt in die Weichteile neben dem Mund geöffnet. Man ließ dann die Leibeshöhlenflüssigkeit in eine Boveri-Schale laufen¹⁶⁾.

Während der Unreife sind die Gonaden so klein und fest, daß es nicht möglich ist, daß Eier mit in die Leibeshöhlenflüssigkeit gelangen. Durch mikroskopische Kontrolle ließ sich außerdem feststellen, daß die Flüssigkeit nur die Blutzellen enthielt, welche etwa 10-mal kleiner sind als die Eier. Männchen und Weibchen wurden getrennt verarbeitet. Die Blutzellensuspension wurde mit Ammoniumsulfat bzw. Toluol konserviert von Neapel nach Heidelberg versandt.

Um den Farbstoff zu gewinnen, wurde mit Salzsäure angesäuert und mit Äther extrahiert. Der Ätherextrakt wurde nach dem Waschen und Trocknen eingedampft. Die Blutzellen enthalten bedeutend weniger Lipide als die Eier. Der Rückstand nach dem Verdampfen des Äthers war daher bereits größtenteils kristallisiert. Nach 3-maligem Umkristallisieren aus Exluan-Wasser zeigte der Farbstoff den Schmelzpunkt 219° und ergab keine Schmelzpunktserniedrigung mit Echinochrom A. Die Leibeshöhlenflüssigkeit männlicher und weiblicher Tiere lieferte in annähernd gleicher Ausbeute ein und denselben Farbstoff.

Die Sarkosinanhidrid-Verbindung erwies sich nach der Analyse als identisch mit der entsprechenden Komplexverbindung von Echinochrom aus den Eiern. Aus den Blutzellen von tausend Tieren konnten so 400 mg reiner Farbstoff gewonnen werden.

Es besteht also kein Unterschied zwischen dem Farbstoff der Blutzellen von männlichen und weiblichen *Arbacia* und dem Eifarbstoff der Tiere. Die Hoden sind dagegen nur hell orange gefärbt und enthalten kein Echinochrom.

Die Fertilisin-Wirksamkeit des Echinochrom-Komplexes aus den Eiern scheint daher wesentlich durch die Natur des Trägers bestimmt zu werden.

¹²⁾ Bull. Soc. Chim. biol. **20**, 567 [1938]. ¹³⁾ B. **73**, 458 [1940].

¹⁴⁾ M. Hartmann, O. Schartau u. K. Wallenfels, Biol. Zbl. **60**, 398 [1940].

¹⁵⁾ Journ. exp. Zoologie **16**, 523 [1914].

¹⁶⁾ Die Präparation der Seeigel wurde von der Zoologischen Station Neapel ausgeführt. Hrn. Prof. R. Doohrn und Hrn. Dr. G. Kramer danke ich vielmals für die wertvolle Unterstützung.

Auch in den Blutzellen ist das Echinochrom an einen hochmolekularen Träger gebunden. Der Symplex ließ sich aber nicht in Lösung bringen. Vielleicht war das Protein auf dem Transport unter Ammoniumsulfat denaturiert worden. Sättigte man eine Suspension von Blutzellen mit Harnstoff, so erhielt man nach dem Zentrifugieren eine tiefrote klare Lösung, welche eine scharfe Absorptionsbande bei 558 μ zeigte. Bei der Dialyse des Harnstoffs fiel jedoch der Farbstoff wieder aus, zusammen mit einer weniger gefärbten Gallerte. Die Untersuchung des Echinochromsymplexes aus den Blutzellen muß daher einer späteren Zeit vorbehalten werden.

Beschreibung der Versuche.

Die Blutzellensuspension wurde zentrifugiert, der Rückstand mit verd. Salzsäure verrührt. Dabei schlug die Farbe von Dunkelrot in Hellrot um. Die trübe Flüssigkeit wurde dann mehrmals mit Äther extrahiert, wobei fast der gesamte Farbstoff in den Äther ging. Die Ätherlösung wurde mehrmals mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der Rückstand wurde aus Exluan-Wasser umkrystallisiert. In mehreren Ansätzen gleicher Art wurden die Blutzellen männlicher und weiblicher Tiere getrennt aufgearbeitet. Die Ätherlösungen der Farbstoffe zeigten die gleichen Absorptionsbanden 530 und 500 μ . Der Schmelzpunkt lag nach 3-maliger Krystallisation aus Exluan-Wasser bei 219°. Mischschmelzpunkt mit Echinochrom aus Eiern 219°.

Echinochrom-Sarkosinanhidrid-Verbindung: 100 mg Echinochrom aus Blutzellen wurden zusammen mit 80 mg Sarkosinanhidrid in 15 ccm Essigester gelöst und heiß filtriert. Beim Abkühlen schied sich die Komplexverbindung in glänzenden Plättchen ab. Ausb. 110 mg.

3.670 mg Sbst.: 7.095 mg CO₂, 1.630 mg H₂O. -- 5.835 mg Sbst.: 0.366 ccm N₂ (22°, 751 mm).

C₁₂H₁₀O₇.C₆H₁₀O₂N₂. Ber. C 52.91, H 4.95, N 6.86. Gef. C 53.16, H 5.01, N 7.17.

50. Kurt Wallenfels und Adeline Gauhe: Synthese von Echinochrom A.

[Aus d. Kaiser-Wilhelm-Institut für Medizin. Forschung, Institut für Biologie, Heidelberg.]
(Eingegangen am 19. Februar 1943.)

Echinochrom A, der rote Farbstoff der Eier des Seeigels *Arbacia pustulosa*, der in Bindung an einen hochmolekularen Träger Bedeutung als Befruchtungsstoff besitzt^{1) 2) 3) 4)}, hat die Bruttoformel C₁₂H₁₀O₇. Die reduzierende Acetylierung lieferte eine Heptaacetyl-Verbindung, bei der Oxydation mit Chromsäure entstanden 0.83 Mol. Propionsäure, bei der Einwirkung von Diazomethan bildete sich ein Trimethyläther. Auf Grund dieser Beobachtungen wurde von R. Kuhn und K. Wallenfels²⁾ für Echinochrom A die Formel eines 2-Äthyl-3.5.6.7.8-pentaoxy-naphthochinons-1.4 (I) aufgestellt. Die Richtigkeit dieser Formulierung konnte nunmehr durch die Synthese bestätigt werden.

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

²⁾ R. Kuhn u. K. Wallenfels, B. **72**, 1453 [1939].

³⁾ R. Kuhn u. K. Wallenfels, B. **73**, 458 [1940].

⁴⁾ M. Hartmann, O. Schartau u. K. Wallenfels, Biol. Zbl. **60**, 398 [1940].