

Über den blauen Farbstoff aus den Flossen des *Crenilabrus pavo*

von

R. v. Zeynek.

(Vorgelegt in der Sitzung am 12. Dezember 1912.)

Die Beobachtungen, welche unter dem gleichen Titel in der Zeitschrift für physiologische Chemie¹ veröffentlicht worden sind, hatten bekannt gemacht, daß in den Flossen des *Crenilabrus pavo*, eines Fisches, welcher jedem Besucher des Triester Fischmarktes um die Osterzeit durch seine prächtige Farbe auffallen mag, aber auch in den Schuppen und in der Haut, und zwar insbesondere an den beiden Seiten des Fisches ein blauer, wasserlöslicher Farbstoff enthalten ist. Dieser Farbstoff tritt in größerer Menge nur während des Frühjahres auf, als sogenanntes Hochzeitskleid des Fisches. In dieser Zeit können auch das Fleisch und die Knochen² des Fisches einen blauen Farbenton aufweisen, der während des übrigen Jahres ganz verschwindet, während die blaue Haut-, Schuppen- und Flossenfärbung zwar wesentlich, aber nie vollständig abblaßt. Von der Blaufärbung sind die Kiemenflossen ausgenommen; sie sind ständig hellgelb gefärbt.

Der blaue Farbstoff scheint im Gegensatz zu den anderen — gelben, gelbgrünen, roten und schwarzen — Pigmenten der Fischhaut die Gewebe nur diffus zu imprägnieren.

Es hatte sich ergeben, daß eine Reindarstellung des Farbstoffes lediglich aus den stark gefärbten Flossen Erfolg versprach, während die Extrakte aus der Haut, den Schuppen, den

¹ Zeynek, Zeitschr. f. physiol. Chem., 34, 148 und 36, 568.

² Auch das Blut; Nolf, Arch. intern. d. Physiol., 4, cit. nach v. Frisch, Zool. Jahrb. 32.

Muskeln des Fisches, obwohl sie auch intensiv blau gefärbt waren, so viel Verunreinigungen enthielten, daß von ihrer Verarbeitung zweckmäßig abgesehen wurde.

Der Farbstoff wurde in meiner vorigen Mitteilung auf Grund seiner Elementarzusammensetzung und durch eine Reihe von Reaktionen als ein Eiweißkörper, also ein Chromoproteid erkannt.

Da nur wenige Farbeiweiße bekannt sind — außer den Sauerstoffträgern Hämoglobin und Hämocyanin sind eigentlich nur die von Molisch¹ in Meeresalgen gefundenen Farbstoffe Phykoerythrin und Phykocyan, welche sicher auch Eiweißkörper sind, näher charakterisiert — schien ein eingehenderes Studium des *Crenilabrus*-Blau von Interesse zu sein. Dank der Munifizienz der Hohen kaiserlichen Akademie der Wissenschaften war es mir möglich, eine größere Materialmenge in verschiedenen Jahren zu verarbeiten, wofür ich mir an erster Stelle den ergebensten Dank auszudrücken erlaube.

Die Herstellung einer etwas größeren Menge des Farbstoffes bot nach den früheren Erfahrungen keine sonderlichen Schwierigkeiten, doch hatte ich durch unbekannte Ursachen während mehrerer Jahre nur wenig Material erhalten können.

Nachdem die intensiv blau gefärbten Flossen mit wenig destilliertem Wasser rasch von Verunreinigungen befreit worden waren, wurden sie mit öfters gewechseltem Aceton bei Zimmertemperatur extrahiert, welches gelbe und rote Farbstoffe löst, hierauf solange mit (reinem!) einige Male gewechseltem Äther gleichfalls bei Zimmertemperatur stehen gelassen, bis der Äther nichts mehr aufnahm.

Nach dem Abdunsten des Acetons werden ölige, rotgelb gefärbte Rückstände erhalten, welche sich in Äther zum größten Teil lösen. Diese Lösungen wurden mit den direkt gewonnenen Ätherextrakten vereinigt. Nach der Entfernung des Äthers blieben rotgelbe ölige Tropfen, welche am diffusen Tageslicht ziemlich rasch abblaßten; es traten gleichzeitig Trübungen auf durch mikroskopische Krystallnadeln, welche zu Rosetten

¹ Molisch, Bot. Zeitung (1894), p. 177 und (1895), p. 131.

gruppiert waren. Die Krystalle lösten sich leicht in Chloroform. Diese Lösung gab mit Essigsäureanhydrid und einem Tropfen konzentrierter Schwefelsäure sofort eine intensiv rote Färbung, welche in einigen Minuten in ein intensives schönes Blaugrün überging. —

Nach dem Verdunsten des an den Flossen anhaftenden Äthers wurden sie mit destilliertem Wasser übergossen; schon nach kurzer Zeit trat die Lösung des Farbstoffes ein. Die von abgeschwemmten Gewebspartikelchen trübe Lösung läßt sich durch ein dichtes Filter vollkommen klar filtrieren.

Das Hauptaugenmerk wurde darauf gerichtet, eine Lösung zu erhalten, welche nicht die geringste Spur von Zersetzungs-, respektive Fäulniserscheinungen zeigte. Während die unzersetzte Flüssigkeit neutral reagiert, nimmt sie durch die Fäulnis eine ammoniakalische Reaktion an; der Farbstoff scheint zwar im Beginn der Fäulnis noch nicht angegriffen zu werden, doch werden durch die alkalische Reaktion die Fällungserscheinungen in dem Sinne beeinflusst, daß dann eine höhere Salzkonzentration zur Ausfällung des Farbstoffes erforderlich ist. So ist es zu erklären, daß ich aus den Lösungen nunmehr bei einem Zusatz von 6 bis 8% Ammoniumsulfat den Farbstoff zum größten Teil ausfällen konnte, während bei meinen ersten Versuchen, bei welchen die rasche Verarbeitung noch nicht möglich war, ein Ammonsulfatzusatz von über 10% zur Fällung gebraucht wurde. Übrigens kommt, betreffend die Fällungsgrenzen, auch die Konzentration der Farbstofflösung in Betracht. Daß kein sauer reagierendes Ammonsulfat verwendet werden darf, ist nur insofern zu bemerken notwendig, als die Materialverarbeitung ferne von gut eingerichteten Laboratorien erfolgen sollte.

Die Fällung durch Ammonsulfat tritt nicht sofort ein, es entsteht zuerst eine feine Trübung, welche sich nach einigen Stunden vermehrt und nach 24 Stunden beim Zentrifugieren sich vollständig absetzt.

Der so erhaltene Niederschlag wurde durch Filtrieren von der Flüssigkeit befreit, in Wasser gelöst und in analoger Weise mit Ammonsulfat mehrmals umgefällt. Bei diesen Umfällungen war ein, wenn auch geringfügig höherer Zusatz von Ammon-

sulfat notwendig. So gab, wenn die erste Hauptfällung bei 6% Ammonsulfatzusatz erreicht worden war, die Umfällung wohl auch bei 6% Ammonsulfatgehalt der Flüssigkeit eine Fällung, die sich aber schlecht absetzte; erst durch 7 oder 8% Ammonsulfat wurde dann die Hauptmenge des Farbstoffes niedergeschlagen. Die erhaltenen Niederschläge waren immer amorph.

Wie Ammonsulfat fällen auch Magnesiumsulfat, Chlorammon und Chlornatrium. Ich habe mich davon überzeugt, daß durch diese Fällungsmittel der Farbstoff (entgegen meinen früheren Angaben) ohne Zersetzung gefällt werden kann, nur muß sorgsam jede Spur einer sauren Reaktion der Lösungen ausgeschlossen sein, sonst tritt rasch eine Verfärbung ins Grüne ein. Da die optischen Qualitäten den Farbstoff am besten charakterisieren und nur in meiner ersten Mitteilung eine mit nicht gereinigtem Material durchgeführte spektrophotometrische Aufnahme der Lichtabsorption gegeben worden ist, sind vorerst darüber genauere Daten mitgeteilt.

Zur Untersuchung diente ein Hüfner'sches Spektrophotometer mit einer Auerlampe als Lichtquelle, der Collimatorspalt war $\frac{1}{40}$ mm breit. Die Stellung der Schieber an der Okularlupe war derart, daß bei der *D*-Linie des Sonnenspektrums Licht von $11 \mu\mu$ (589—578 $\mu\mu$), bei der *E*-Linie solches von $9 \mu\mu$ (527—518 $\mu\mu$), bei der *B*-Linie von $16 \mu\mu$ (687—671 $\mu\mu$) gleichzeitig ins Auge gelangte. Die Wellenlängenangaben in den folgenden Tabellen beziehen sich also nicht auf vollkommen monochromatisches Licht, sondern immer noch auf ein der obigen Bemerkung entsprechendes Licht geringerer Wellenlänge. Jeder angegebene Wert der Extinktionskoeffizienten ist aus dem Mittel mehrerer, meistens von vier Ablesungen berechnet.

Die Schwierigkeit solcher Serienaufnahmen liegt, abgesehen von den Fehlern der genauesten spektrophotometrischen Messungen, welche auf zirka 1% zu schätzen sein dürften, darin, daß man nicht immer die zur Untersuchung günstigste Lichtextinktion wählen kann, besonders wenn Spektralgebenden von starker Lichtextinktion neben solchen geringer Lichtauslöschung vorkommen. Dann kommt, weil jede Aufnahme in kürzerer Zeit wegen etwaiger Änderungen in den

Qualitäten der Flüssigkeit ausgeführt werden muß, die Ermüdung des Auges in Betracht, welches schließlich Helligkeitsdifferenzen als Farbenverschiedenheiten empfindet. Ich habe mich daher geübt, beide Augen abwechselnd zu verwenden und bestimme vorerst einige auffallende Stellen des Spektrums (Maxima und Minima der Lichtauslöschung sowie die Stellen rascher Übergänge von geringer zu stärkerer Lichtauslöschung), wobei das Auge nicht zu lange bei einer Farbenqualität verweilen soll.

In Anbetracht der Fehler wurden die abgelesenen Winkelwerte nur auf eine Dezimale, die Werte für die Extinktionskoeffizienten $\epsilon = -\log \cos^2 \varphi$ auf drei Dezimalen in Rechnung gebracht.

Trotz der hier aufgezählten Schwierigkeiten und Ungenauigkeiten ist aber dennoch die spektrophotometrische Methode die einzige, welche quantitative Angaben über die Beziehung der Farbenintensität zur Konzentration einer Farbstofflösung ermöglicht und dadurch ein Mittel gibt, die Reinheit eines Farbstoffes zu bestimmen.

Wellenlängen	A	B	C
	Konz. = 0·0240/0	Konz. = 0·0310/0	Konz. = 0·0700/0
Extinktionskoeffizienten			
720	—	—	0·043
708	0·030	0·030	—
702	—	—	0·160
690	—	—	0·328
687	0·120	—	—
680	0·179	0·231	—
665	—	—	1·002
660	0·365	0·455	1·143
640	0·368	0·466	1·131
620	0·341	0·416	1·058
600	0·321	0·395	1·015
590	0·273	0·364	0·857
580	0·238	0·318	0·755

Wellenlänge	A	B	C
	Konz. = 0·0240%	Konz. = 0·0310%	Konz. = 0·0700%
Extinktionskoeffizienten			
570	0·219	0·289	0·668
580	0·180	0·228	0·537
550	0·154	0·194	0·431
540	0·137	0·180	0·380
530	0·112	0·148	0·318
520	0·090	0·127	0·298
510	0·074	0·093	—

Die vorstehende Tabelle bezieht sich auf klare blaue Lösungen, welche aus verschiedenen Jahren stammen. Im Spektroskope zeigt sich neben einer diffusen Verdunkelung eine starke Auslöschung zwischen $\mu\mu$ 678—635.

Aus diesen Daten ergibt sich, daß die untersuchten Farbstoffproben als optisch identisch aufzufassen sind, da die Differenzen innerhalb der Beobachtungsfehler liegen.

Die Lichtauslöschung im Ultraviolett wurde qualitativ beobachtet. Dazu diente eine Einrichtung, welche der von Rost, Franz und Heise¹ beschriebenen im Prinzip nachgebildet war. Am einen Ende einer optischen Bank war in einer sonst lichtdichten Kammer, welche nur in der Achse der optischen Bank einen vertikalen Ausschnitt besaß, ein Nernststift. Das von ihm ausgestrahlte Licht ging durch eine Quarzlinse, von dieser durch die Quarzküvette mit der Untersuchungsflüssigkeit, dann durch den $\frac{1}{50}$ mm breiten Collimatorspalt, dessen untere Hälfte mittels eines totalreflektierenden Prismas das Spektrum einer Heliumröhre (nach A. v. Tschermak²) weitergab. Die beiden Lichtstreifen gelangten auf ein dünnes Abklatschgitter, welches zwischen Quarzplatten montiert war,³ von da in die mit einer Uviolglaslinse ausgestattete, von der

¹ Rost, Franz und Heise, Arbeiten des Reichsgesundheitsamtes, 32, p. 223.

² A. Tschermak, Pflüger's Archiv, 88, p. 95; die Heliumröhren in der von Götze angegebenen Form.

³ Bezogen von Wm. Gaertner & Co., Scientific Shop, Chicago, 5345 Lake Avenue.

Firma Heele gelieferte Camera. Lumière's Σ -Platten erwiesen sich zur Photographie im Violetten und Ultravioletten geeignet.

Die scharfe Einstellung des Systems ist vorteilhaft mit ganz verdünnten Lösungen von Blutfarbstoff zu kontrollieren.

Herrn Hofrat Prof. Dr. Eder erlaube ich mir, für seine Hinweise auf die Verwendbarkeit von Abklatschglittern und seine sonstigen liebenswürdigen Ratschläge auch an dieser Stelle den ergebensten Dank auszudrücken.

Weder bei dem *Crenilabrus*-Blau selbst, noch bei seinen weiter unten beschriebenen Zersetzungsprodukten wurde ein scharfer Absorptionsstreifen im Ultraviolett gefunden. Es ergab sich das Minimum der Lichtauslöschung zwischen $\mu\mu$ 460—430, auf diese Helligkeitszone folgt eine Lichtabsorption, welche bei konzentrierten Lösungen ziemlich scharf bei $\mu\mu$ 400 ansteigt und über $\mu\mu$ 330 hinausreicht; bei verdünnteren Lösungen tritt die Lichtauslöschung allmählich, bei $\mu\mu$ 394—386 ein.

Reaktionen des *Crenilabrus*-Blaufarbstoffs.

Obwohl einige Reaktionen, welche ich mit dem unreinen Material der ersten Mitteilung erhalten hatte, schon richtiggestellt sind, mögen doch der Übersicht wegen die schon früher erhaltenen Reaktionen kurz neben den neuen Beobachtungen zusammengestellt werden.

Die wässrige Lösung des *Crenilabrus*-Blau reagiert neutral, sie ist nicht fadenziehend, verändert ihre Farbe nicht im diffusen Tageslicht. Der Farbstoff ist nicht dialysierbar, wird bei der Dialyse nicht verändert. Durch Fäulnisbakterien wird er mißfärbig, unter Auftreten von Indolgeruch.

Die dialysierte Lösung, im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, gibt einen amorphen, rein blauen Rückstand, welcher erst nach langem Aufbewahren seinen Farbenton und seine Löslichkeit ändert. Die Farbe wird blaugrün, nach mehreren Monaten wird der Farbstoff schließlich in Wasser und verdünnten Salzlösungen vollkommen unlöslich, analog wie Hämoglobinpräparate. Die Lösung des schon veränderten Farbstoffs zeigt den Absorptionsstreifen im Roten nur undeutlich, dafür ist eine diffuse Lichtauslöschung im Grünen aufgetreten.

Die Fettlösungsmittel, Äther, Chloroform etc. lösen weder den Farbstoff selbst noch seine Zersetzungsprodukte.

Die sogenannten Alkaloidreagentien, Phosphorwolframsäure, Phosphormolybdänsäure, Kaliumquecksilberjodid, Kaliumwismutjodid, Gerbsäure nach dem Zusatz von wenig Chlornatrium, fällen bei Gegenwart einer Spur Säure vollständig; die Niederschläge sind blaugrün. Weingeist fällt den Farbstoff bei einer Weingeistkonzentration von etwa 70%, der anfangs blaue Niederschlag wird bald grün und löst sich dann nicht mehr in Wasser. Reines Aceton in großem Überschuß fällt den Farbstoff, ohne ihn zu verändern.

Von den zur Fällung von Eiweißkörpern verwendeten Neutralsalzen fällen alle den Farbstoff; mit Magnesiumsulfat, Chlorammon und Chlornatrium tritt die Fällung nur allmählich ein. Alle diese Niederschläge sind schlecht filtrierbar, wenn nicht ein Überschuß von Salz verwendet wird. Konzentriertere Lösungen werden durch geringeren Salzzusatz gefällt als verdünntere. Wiederholt wurde beobachtet, daß nach längerem Stehen Lösungen des Farbstoffes, welche mit zur Fällung unzureichenden Salzmengen versetzt waren, schließlich den ganzen Farbstoff, anscheinend ohne Denaturierung, ausfallen ließen.

Ferrocyankalium plus Essigsäure gibt nach Zusatz von etwas Chlornatrium eine sich zwar langsam absetzende, doch vollständige Fällung.

Wird eine neutrale, schwach salzhaltige Lösung des Farbstoffes erwärmt, so färbt sie sich bei zirka 56° blaugrün, bei etwa 75° trübt sie sich und bei etwa 77° wird der Farbstoff in Form grüner Flocken gefällt. Analog geht die Koagulation bei Gegenwart von wenig Essigsäure vor sich; beim Erwärmen mit größeren Mengen von Essigsäure entsteht eine hellgrüne Lösung, nach deren Abdampfen der Farbstoff als grüner, wasserunlöslicher Niederschlag zurückbleibt.

Durch reichlichen Laugenzusatz wird die blaue Flüssigkeit hellgrün gefärbt; wird nun etwas Kupfersulfatlösung zugefügt, so entsteht eine blaue Färbung ohne Ausscheidung von Kupferhydroxyd. Wurde nach dem Zusatz der Lauge gekocht, so tritt die Biuretreaktion mit violetter Farbe auf.

Auch bei anhaltendem Kochen von *Crenilabrus*-Blau mit Lauge tritt keine Bräunung auf.

Millon's Reagens gibt eine grüne Fällung. Wird die Probe mit verdünntem Millon'schen Reagens gekocht, so färbt sie sich zunächst braun, bei längerem Kochen jedoch typisch und intensiv rot.

Mit alkalischer Bleilösung entsteht beim Kochen eine Bräunung und später Ausscheidung von Schwefelblei.

Molisch's Reaktion mit α -Naphtol gibt beim Unterschichten mit konzentrierter Schwefelsäure einen deutlichen rotvioletten Ring, während beim Unterschichten der Farbstofflösung mit konzentrierter Schwefelsäure allein eine viel schwächere Violett färbung entsteht.

Salpetersäure bewirkt eine Fällung von vergänglich rotvioletter Farbe; die Farbe wird bald rotgelb, beim Kochen intensiv gelb, durch nachfolgenden Laugenzusatz orange.

Durch diese Reaktionen erscheint das *Crenilabrus*-Blau hinreichend als Chromoprotein charakterisiert. Eine Elementaranalyse desselben wurde schon seinerzeit mitgeteilt,¹ sie zu wiederholen hatte kein Interesse, da selbst bei geringfügigen Differenzen kein weiterer Aufschluß über die Substanz zu erwarten war. Es sei nur hervorgehoben, daß das *Crenilabrus*-Blau frei von Eisen und von Kupfer ist. Meine Versuche gingen vielmehr dahin, den färbenden Komplex näher zu charakterisieren, womöglich etwas über seine Natur zu erfahren.

In dieser Hinsicht seien folgende Reaktionen mitgeteilt:

Verdünntes Hydrazinhydrat blaßt den Farbenton nur sehr langsam ab, durch Schütteln mit Luft wird er nicht restituiert. Ebenso wirkt ein durch Einleiten von überschüssigem Schwefelwasserstoff in verdünntes Ammoniak frisch hergestelltes Schwefelammon nur langsam auf den Farbstoff ein. Beziehungen des Farbstoffes zu einer Sauerstoffaufnahme sind allerdings von vornherein unwahrscheinlich gewesen.

Eine bemerkenswerte Resistenz zeigt der Farbstoff auch gegen neutrale Wasserstoffsperoxydlösungen. Der Farbenton bleibt vorerst intakt, verblaßt langsam, um nach mehrtägiger

¹ Zeitschr. f. physiol. Chemie, 36, p. 572.

Einwirkung des Wasserstoffsperoxids vollkommen zu verschwinden. Dabei entsteht ein weißer Niederschlag. Bis zur vollständigen Entfärbung bleibt der charakteristische Absorptionsstreifen im Rot seiner Lage nach unverändert sichtbar.

Sehr auffallend ändern den blauen Farbenton selbst minimale Mengen von Säuren, etwas weniger empfindlich ist das *Crenilabrus*-Blau gegen Alkalien.

Bei Zusatz von Essigsäure tritt eine Grünfärbung auf, rascher noch bei Zusatz von verdünnter Salzsäure und Schwefelsäure. Beim Aufkochen mit diesen Säuren färbt sich die Flüssigkeit gelbgrün, nach der Neutralisation entsteht ein Eiweißniederschlag, welcher den Farbstoff enthält. Eisenchlorid gibt einen, der Salzsäurewirkung analogen Farbumschlag.

Verdünnte, frisch bereitete, schwefelige Säure läßt den Farbstoff erst unverändert, später verblaßt der blaue Farbenton, beim Schütteln mit Luft wird er wieder etwas stärker; schließlich wird die Flüssigkeit grün und Schütteln mit Luft bewirkt dann keine Veränderung der Farbe mehr. Es dürften hier zwei Reaktionen eintreten, als erste die reduzierende Wirkung der schwefeligen Säure, dann die Wirkung der gebildeten Schwefelsäure. Diese Annahme wird durch die nächste Reaktion gestützt.

Zusatz von konzentrierter Schwefelsäure zur Lösung gibt einen zuerst gelbgrünen, rasch über intensives Kornblumenblau in Violett übergehenden Farbenton. Nach dem Zusatz von 80% Schwefelsäure wurde die Flüssigkeit gekühlt (bei größerem Schwefelsäurezusatz und Erwärmen trübt sich die Flüssigkeit und wird braun), sie bleibt dann klar und violett gefärbt. Über ihr Spektrum siehe p. 551. Die gleiche Reaktion, aber viel langsamer, gibt eine mit schwefeliger Säure gesättigte Lösung von *Crenilabrus*-Blau.

Wird die durch Salzsäure gelbgrün gewordene Lösung gekocht, so tritt je nach der Säuremenge rascher oder langsamer eine prachtvolle Indigblaufärbung auf, welche für das freie Auge die Blaufärbung des Ausgangsmateriales an Intensität bei weitem übertrifft. Nach langem Kochen mit konzentrierter Salzsäure verschwindet diese Färbung und es entsteht ein melaninartiger Niederschlag. Diese Reaktion im Verein mit der Spaltung des Chromoproteids durch Pepsinsalzsäure schien

geeignet, Aufschlüsse über die Art des farbgebenden (prothetischen) Komplexes im *Crenilabrus*-Blau zu geben und wurde daher eingehender studiert, worüber weiter unten berichtet werden soll.

Durch Laugenwirkung, auch durch Ammoniak, wengleich langsamer, färbt sich das *Crenilabrus*-blau hellgrün, etwa chromgrün; die Farbe ist nicht beständig, sondern blaßt im Laufe einiger Tage bis auf einen hellgelben Ton ab. Wird nach kurzer Laugenwirkung neutralisiert, so erfolgt eine partielle Restitution des Farbstoffes, aber er fällt in Flocken aus. Die in meiner ersten Mitteilung durch Laugen direkt entstandenen Niederschläge haben sich als anorganische Verunreinigungen der Lösungen erwiesen.

Als weitere charakteristische Reaktionen sind die Einwirkungen von Oxydationsmitteln hervorzuheben.

Es wurde schon erwähnt, daß Salpetersäure einen vergänglichen, schön rotvioletten Farbenton bewirkt, welcher über Feuerfarb in einen orangefarbenen Ton übergeht, beim Kochen gelb wird.

Beim Erwärmen des *Crenilabrus*-Blau mit chlorhaltiger Salzsäure (Salzsäure und etwas Kaliumchlorat) tritt anfangs eine intensive Purpurfarbe auf, später entfärbt sich die Lösung. Nach dem Abdampfen bleibt ein farbloser Rückstand, welcher sich mit Ammoniak rauchbraun, mit Lauge orange färbt.

Eine ganz verdünnte, mit Essigsäure neutralisierte Lösung von unterchlorigsaurem Natrium gibt eine hellviolette Färbung, mit einem recht scharfen Absorptionsstreifen bei etwa $\mu\mu$ 510—480, durch eine größere Menge Hypochlorit wird die Farbe rasch hellrot, dann tritt Entfärbung ein. Analog wirkt Chlorwasser.

Zersetzung von *Crenilabrus*-Blau durch Salzsäure.

Daß die Grünfärbung von *Crenilabrus*-Blau durch Säuren nicht etwa nur auf die Reaktion der Lösung, sondern auf Zersetzung des Farbstoffes zurückzuführen ist, ergibt sich daraus, daß durch eine folgende Neutralisation selbst nach kurzdauernder Säureeinwirkung die ursprüngliche Farbe nur in geringem

Maße wieder hergestellt wird. Es erschien dies nicht sonderbar mit Bezug auf das analoge Verhalten von Hämoglobin.

Die erhaltene Lösung zeigt vor dem Spektroskop keinen deutlichen Streifen im Roten, aber eine starke Lichtauslöschung im Roten.

Spektrophotometrisch gaben zwei Lösungen von gleicher Konzentration (0·07 ‰), die zu verschiedenen Zeiten dargestellt waren, bei einem Salzsäuregehalt von a) 5 ‰, b) 2 ‰ folgende Werte:

Wellenlänge	ϵ	
	Lösung a)	Lösung b)
710	—	0·748
700	0·853	0·860
690	0·970	0·891
680	1·011	0·903
670	0·962	0·864
660	0·745	0·748
640	0·618	0·602
620	0·454	0·406
600	0·279	0·262
590	0·231	0·244
580	0·188	0·190
570	0·138	0·128
560	0·100	0·113
550	0·088	0·093
540	0·068	0·078
530	0·055	—
510	0·039	—

Werden diese Lösungen erwärmt, so verbreitert sich zuerst die Lichtauslöschung im Roten und wandert allmählich, im Spektroskop als geringer, breiter Schatten zu sehen, gegen das Gelb des Spektrum. Gleichzeitig tritt eine Verdunklung über das ganze sichtbare Spektrum auf, die bei Lösungen obiger

Konzentration Lichtextinktionen von $\epsilon = 0.5 - 0.7$ in den verschiedenen Spektralgebieten entspricht.

Nach etwa einstündigem Erwärmen mit zwei- bis fünfprozentiger Salzsäure tritt ein stabiler Zustand ein, welchem ungefähr die folgende Lichtauslöschung für eine 0.07% des ursprünglichen Farbstoffes enthaltende Lösung entspricht, da die einzelnen Proben kleine Differenzen in der Lichtauslöschung im Roten gaben.

Wellenlänge	ϵ	Wellenlänge	ϵ
700	0.357	580	0.975
680	0.375	570	0.936
660	0.509	560	0.802
648	0.707	550	0.615
640	0.887	540	0.514
620	0.979	530	0.383
600	1.063	520	0.288
590	1.029	510	0.258

Diese Flüssigkeit zeigt eine schöne Indigblaufärbung, welche, wie schon erwähnt, dem freien Auge intensiver erscheint als die Färbung der ursprünglichen Lösung. Die Lichtabsorption ist aber nicht ebenso auffallend erhöht, wie man erwarten möchte.

Im Ultravioletten nimmt die Lichtauslöschung nach der Wirkung kalter Säure gegen das sichtbare Blau hin zu, noch mehr nach dem Kochen mit Säure. Der Unterschied gegenüber dem ursprünglichen Farbstoffe beträgt im letzteren Fall etwa 20 $\mu\mu$.

Die Dauer des Erwärmens, welche notwendig war, um diesen schönen Farbenton zu erreichen, war bei einzelnen Proben etwas verschieden. Kleine Proben zeigten öfters schon in einer halben Stunde die beschriebene Farbenänderung; meist wurde eine Stunde, selten darüber hinaus erwärmt. Aus der ziemlichen Gleichheit der Lichtabsorption darf geschlossen werden, daß die Reaktion in allen Fällen konform vor sich gegangen ist, die Zeitdifferenzen auf Unterschiede in der Konzentration oder in der Reaktionstemperatur zurückzuführen sind.

Die indigblaue Lösung zeigte ein unerwartetes Verhalten gegen Neutralsalze. Durch Eintragen von Chlornatrium, ferner schon vor der Halbsättigung mit schwefelsaurem Ammonium fällt der Farbstoff aus, der Niederschlag ist leicht filtrierbar. Das farblose Filtrat gibt eine positive Biuretprobe wie Millon's Probe positiv.

Weingeist fällt den gebildeten Farbstoff nicht, nach einiger Zeit blaßt die Farbe ab. Aceton fällt den Farbstoff unverändert.

Die Farbstoffniederschläge, welche durch Neutralsalze erhalten und durch Umfällung gereinigt worden waren, verhalten sich gegen Reagentien im übrigen wie das *Crenilabrus*-Blau selbst, d. h. sie geben die beschriebenen Farbenreaktionen der Eiweißkörper, auch die Molisch'sche Probe, die Fällungen durch die sogenannten Alkaloidreagentien, den Farbenumschlag mit konzentrierter Schwefelsäure und Salpetersäure, mit Chlorwasser, mit Alkalien etc., nur die Schwefelbleireaktion ist geringer als die des Ausgangsmateriales.

Hier ist demnach die interessante Erscheinung zu beobachten, daß die prosthetische, chromophore Gruppe beim Abbau des Eiweißkomplexes vorerst nicht als solche losgelöst wird, sondern noch in Verbindung mit einem Teile des Eiweißmoleküls bleibt.

Als diese Beobachtung zum ersten Mal gemacht wurde, lag die Ansicht nahe, daß sie ganz vereinzelt dastehe, da wir gewohnt sind, beim Abbau des Hämoglobinkomplexes, des einzigen in bezug auf seine prosthetische Gruppe sorgsam studierten Chromoproteids, als erste Reagentienwirkung die Abspaltung der prosthetischen Gruppe annehmen zu müssen.

Die Untersuchungen van Klaveren's ¹ haben aber zuerst, betreffend ein Kathämoglobin genanntes Abbauprodukt des Oxyhämoglobins, gezeigt, daß diese Ansicht nicht unter allen Umständen zutrifft. Verfasser hat die gleiche Vermutung in einer Studie über Hämatin ² ausgesprochen und seitdem mehrfach gestützt.

¹ van Klaveren, Zeitschr. f. physiol. Chem., 33, 293.

² Zeynek, Zeitschr. f. physiol. Chem., 49, 473, Salzburger Naturforscherversammlung, 1909, Verh. II, p. 83.

Immerhin ist die Empfindlichkeit des Hämoglobinmoleküls gegen Säuren eine große, während das beschriebene Abbauprodukt des *Crenilabrus*-Blaufarbstoffes mit der verdünnten Salzsäure stundenlang erhitzt werden kann, ohne weiter gespalten zu werden. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den beiden Chromoproteiden ist also vorhanden.

Es ist noch zu bemerken, daß das in der Hitze koagulierte *Crenilabrus*-Blau beim nachfolgenden Zerkochen mit zwei- bis fünfprozentiger Salzsäure keine schöne Blaufärbung mehr gibt, sondern nur einen schmutziggrünen Farbenton in der Lösung und einen reichlichen schwarzgrünen Niederschlag. Dagegen gibt die Weingeistfällung des *Crenilabrus*-Blaus, auch wenn der Niederschlag mit Weingeist aufgekocht worden war und grün gefärbt ist, nach Entfernung des Weingeistes und Kochen mit der verdünnten Salzsäure eine schöne Indigblaufärbung.

Es muß also beim Kochen mit Wasser die chromophore Gruppe alteriert worden sein. Auch Präparate, welche lange Zeit getrocknet aufbewahrt waren und ihre Wasserlöslichkeit eingebüßt hatten, gaben mit Salzsäure gekocht, keine schöne Färbung mehr.

Die durch Laugeneinwirkung entfärbten Proben des *Crenilabrus*-Blaufarbstoffes gaben beim Kochen mit Salzsäure nur einen hellroten Farbenton.

Es sei schließlich über die Versuche berichtet, welche sich auf die Abspaltung und Charakterisierung der chromophoren Gruppe bezogen.

Wird *Crenilabrus*-Blau mit konzentrierter Salzsäure oder zirka 50prozentiger Schwefelsäure länger erwärmt, so bildet sich reichlich grünschwarzes oder blauschwarzes »Melanin«, welches mit kalter Salpetersäure eine prächtig rotviolette, bald ablassende Farbe gibt, beim Erwärmen entsteht eine gelbe Lösung, die durch Ammoniak dunkler wird, durch Laugen sich orange färbt. Durch Laugen wird das »Melanin« mit gelbgrüner Farbe gelöst.

Versuche, durch Pepsinverdauung die prosthetische Gruppe zu isolieren, gaben kein Resultat. Die Flüssigkeit, welche im

Anfang des Verdauungsversuches gelbgrün ist, wird später blaugrün, bei der spektrophotometrischen Untersuchung verschiedener solcher Proben wurden differente Werte erhalten. Meist wurden zwei geringe Maxima der Lichtauslöschung gefunden, das eine zwischen 680 und 660 $\mu\mu$, das andere bei zirka 600 $\mu\mu$, während das übrige Spektrum ziemlich gleichmäßig verdunkelt ist. Nach ein- bis zweitägiger Pepsinwirkung gab die Flüssigkeit beim Kochen mit verdünnter Salzsäure die typische Blaufärbung, später entstanden nur schwarzgrüne Farbentöne. Der durch Kochen mit verdünnter Salzsäure entstandene Körper ist gegen Pepsinwirkung sehr resistent.

Dies deutet nach den Erfahrungen über Hemi- und Anti-*gruppen*¹ wohl darauf hin, daß Tryptophan in diesem Komplexe nicht enthalten sei.

Zur Prüfung auf Tryptophan wurde eine Probe *Crenilabrus*-Blau einerseits, andererseits der durch Salzsäure entstandene Blaufarbstoff mit rauchender Salzsäure und Glyoxylsäure behandelt, unter Beachtung der Erfahrungen F. Bardachzi's.² Es ergab sich, daß selbst ein wiederholter Glyoxylsäurezusatz den blauen Farbenton der Lösungen nicht änderte. Beim Verdünnen mit Wasser blieb der blaue Farbenton bestehen, das für Tryptophan charakteristische Maximum der Lichtauslöschung bei etwa 580 $\mu\mu$ war nicht vorhanden.

Wenn es dadurch auch nicht ausgeschlossen ist, daß Tryptophan zu der Färbung des *Crenilabrus*-Blau in Beziehung steht, so darf behauptet werden, daß nur solche Umwandlungsprodukte des Tryptophans, welche die bekannten Tryptophanreaktionen nicht mehr geben, vorhanden sein können.

Die große Menge von »Melaninsubstanzen« bei der Einwirkung konzentrierter Säuren hat den Gedanken nahegelegt, daß ein Kohlehydrat die Farbbildung bewirke. Diesbezügliche Versuche fielen negativ aus. Ebenso wenig konnte Guanin oder ein anderer Purinkörper isoliert werden.

Die Gegenwart von Indigfarbstoffen war schon durch die oben mitgeteilten Proben, die Entfärbung durch Laugen und

¹ Vgl. die Zusammenstellung in Cohnheim, Eiweißkörper. 3. Aufl., p. 75.

² F. Bardachzi, Zeitschr. f. physiol. Chem., 48, p. 145.

die Unmöglichkeit, aus entfärbten Lösungen den ursprünglichen Farbenton wieder zu erhalten, unwahrscheinlich geworden. Die bei kurzem Erwärmen mit 80% Schwefelsäure erhaltene violettblaue Lösung gibt ein Spektrum, welches einen Absorptionsstreifen im Gelb zeigt, der einige Ähnlichkeit mit dem der Indigosulfonsäure aufweist. Die spektrophotometrische Aufnahme einer zirka 0·05prozentigen Lösung ergab folgende Werte:

Wellenlänge	ϵ	Wellenlänge	ϵ
680	0·075	570	0·421
660	0·116	560	0·373
640	0·254	550	0·351
620	0·427	540	0·304
600	0·447	530	0·244
590	0·451	520	0·192
580	0·427	510	0·174

Die Auslöschung ist der durch kochende verdünnte Salzsäure ähnlich, nur im Roten schwächer. Bei mannigfach variierten Proben ist es mir nicht gelungen, einen chloroformlöslichen Farbstoff zu erhalten. Die Destillation des blauschwarzen »Melanins« im Vakuum ergab weder Indigo noch Anilin.

Einige Wahrscheinlichkeit hätte die Annahme, daß das blaue Säurekochungsprodukt vom *Crenilabrus*-Blau verwandt sei mit den Farbstoffen, welche Abderhalden¹ und Guggenheim aus tyrosinhaltigen Polypeptiden erhalten haben. Zu einer experimentellen Prüfung dieser Annahme reichte das mir zur Verfügung stehende Material nicht aus.

¹ Abderhalden und Guggenheim, Zeitschr. f. physiol. Chem., 54, p. 331, insbes. 347.