

Beiträge zur chemischen Kenntnis der Echinodermen.¹⁾

Von

A. Kossel und S. Edlbacher.

I. Über die Dissoziation des Spermakerns bei Echinodermen.

Als Dissoziation des Zellkerns ist eine Erscheinung bezeichnet worden, welche darin besteht, daß die Kernproteine im Laufe der Entwicklung basische Eigenschaften annehmen und mit der Nucleinsäure eine «salzartige» Verbindung bilden.²⁾ Diese chemische Umbildung des Zellkerns findet sich in vielen Organen der Säugetiere, z. B. in der Thymusdrüse, den Lymphdrüsen, der Milz usw. Ihre Untersuchung ist bisher fast ausschließlich mit chemischen Hilfsmitteln ausgeführt worden, da es an einer mikroskopischen Methode zur Erkennung des Vorganges fehlt. Erst in neuerer Zeit hat M. A. van Herwerden versucht, ein für die weitere Bearbeitung dieser Fragen so sehr wünschenswertes mikrochemisches Verfahren zu entwickeln.³⁾

Für die chemische Untersuchung haben sich besonders die Spermakerne als günstige Objekte erwiesen. In den Spermien der Säugetiere ist die Dissoziation bisher nicht nachgewiesen, hingegen zeigte sich dieser Vorgang in ausgeprägter Form in den Spermaköpfen der Fische und die wertvollsten chemischen Befunde sind an diesem Material gewonnen. Über die Ver-

¹⁾ Ein Teil dieser Untersuchungen ist in den Sitzungsberichten der Heidelberger Akademie der Wissenschaften vom 29. März d. J. (Jahrgang 1915, Abt. B der math.-naturw. Klasse) vorläufig mitgeteilt worden.

²⁾ A. Kossel, Diese Zeitschrift, Bd. 88, S. 163 (1913).

³⁾ M. A. van Herwerden, Anatom. Anzeiger, Bd. 47, S. 312; und Onderzoekingen gedaan in het Physiologisch Laboratorium der Utrechtsche Hoogeschool, Vijfde Reeks XV S. 273 (1914).

breitung bei den Wirbellosen ist aber noch wenig bekannt und unsere Untersuchungen sollten dazu dienen, hierüber weitere Kenntnisse zu gewinnen.

Hierzu benutzten wir zunächst die Spermien von Echinodermen und zwar verwandten wir die ganzen geschlechtsreifen Testikel von *Astropecten aurantiacus*, von *Strongylocentrotus lividus* und von *Echinus acutus*. Die Organe der beiden erstgenannten Spezies wurden von A. Kossel auf der zoologischen Station in Neapel im März und April gesammelt, die Testikel von *Echinus* verdanken wir Herrn Dr. O. Warburg, welcher sie im Juni in Plymouth sammelte und dem wir für die Beschaffung dieses Materials unsern besten Dank abstaten.

Bei den Spermien, in welchen diese Umbildung stattgefunden hat, kann das Kernprotein als Histon oder als Protamin durch verdünnte Säuren aus dem Kernanteil der Samenzelle herausgelöst werden. Bei Echinoiden und zwar bei *Arbacia pustulosa* ist schon von A. Mathews¹⁾ das Vorkommen eines «histonähnlichen Körpers», des Arbacins, in den Testikeln nachgewiesen worden. Ferner teilen B. Moore, E. Whitley und A. Webster mit, daß sich aus den Testikeln von *Echinus esculentus* eine basische Substanz von dem Molekulargewicht 8780 extrahieren lasse, welche als ein Zwischenprodukt zwischen dem Protamin und Histon anzusehen sei.²⁾

Wir konnten auch in den Testikeln von *Strongylocentrotus* und *Echinus*, sowie in denen von *Astropecten* das Vorkommen eines Histons und damit die Dissoziation dieser Kernsubstanzen feststellen. Das aus den Testikeln von *Astropecten* gewonnene Protein betrug mehrere Gramm und konnte somit etwas genauer untersucht werden. Im Vergleich mit früheren Untersuchungen ergibt sich aus unsern Analysen, daß die Histone eine Gruppe von Proteinstoffen bilden, die untereinander verschieden sind.

Protamine haben wir bisher bei den Echinodermen nicht gefunden; diese bleiben daher nach unseren heutigen Kennt-

¹⁾ Albert Mathews, Diese Zeitschrift, Bd. 23, S. 399 (1897).

²⁾ B. Moore, E. Whitley and A. Webster, Biochemical Journal, VII, S. 142 (1913).

nissen eine bestimmten Familien der Fische eigentümliche chemische Bildung.

Darstellung, Zusammensetzung und Eigenschaften der Histone.

Die aus ungefähr 50 Exemplaren von *Astropecten aurantiacus* gesammelten männlichen Geschlechtsdrüsen wurden mit Alkohol ausgekocht und die Extraktion mit Äther vervollständigt. Der trockene Rückstand wurde sodann in der früher beschriebenen Weise mit einprozentiger Schwefelsäure im Schüttelapparat ausgezogen und das Extrakt mit Alkohol gefällt. Der in Wasser gelöste Niederschlag des Histonsulfats wurde mit Natriumpikrat gefällt und das Histonpikrat durch Äther bei Gegenwart überschüssiger Schwefelsäure von Pikrinsäure befreit. Zum Schluß wurde das Histon als Sulfat durch Alkohol niedergeschlagen. Das trockene Sulfat ist ein weißes in Wasser lösliches Pulver. Die Lösung wird durch Ammoniak gefällt; sie gibt die Biuretreaktion und Rotfärbung mit Millons Reagens. Hingegen fehlt die Reaktion mit α -Naphthol nach Molisch, die Schwefelbleireaktion und die Tryptophanreaktion mit Glyoxylsäure nach Hopkins, sowie die Reaktion mit Dimethylaminobenzaldehyd nach Ehrlich, welche nach Rohde ein feines Reagens auf Tryptophan ist.¹⁾

Zur weiteren Prüfung wurden 0,2 g Astropectenhiston mit 20 ccm einer 0,1%igen Lösung stark wirksamen Pepsins versetzt, welche 0,29% HCl enthielt. Nach 16stündiger Digestion im Brütöfen wurde eine Probe mit Ammoniak übersättigt und mit einer ammoniakalischen Lösung von Eiweiß versetzt. Die Flüssigkeit blieb klar, es war also kein Protamin zugeben. Eine zweite Probe wurde mit Natron neutralisiert und mit Natriumpikrat versetzt; es entstand ein reichlicher Niederschlag, somit war die Entstehung von Histopecton nachgewiesen.

Das Histonsulfat gab in sodaalkalischer Lösung mit Diazobenzolsulfosäure eine starke Rotfärbung. An dieser Farben-

¹⁾ E. Rohde, Diese Zeitschrift, Bd. 44, S. 161 (1905).

reaktion ist jedoch anscheinend kein Histidin beteiligt, wie aus der folgenden Untersuchung¹⁾ hervorgeht: 0,5 g des Sulfats wurden 8 Stunden mit konzentrierter Salzsäure am Rückflußkühler gekocht, die Reaktionsflüssigkeit alkalisch gemacht und mit Benzoylchlorid bei Gegenwart von Natriumcarbonat geschüttelt. Die jetzt erhaltene Lösung gab keine Farbenreaktion mit Diazobenzolsulfosäure bei Gegenwart überschüssigen Natriumcarbonats.

Aus diesen Reaktionen ergibt sich, daß der Körper zur Gruppe der Histone gehört. Unter den Bausteinen dieses Histons ist das Tyrosin durch die Millonsche Reaktion nachweisbar; auch kann es direkt durch Krystallisation aus der Monoamidosaurefraktion erhalten werden, hingegen fehlen die Farbenreaktionen auf Tryptophan, Cystin und auf die Kohlenhydratgruppe.

Die quantitative Untersuchung der basischen Spaltungsprodukte dieses Proteins ergab weitere Beweise für seine Zugehörigkeit zur Histongruppe, insofern die Gesamtmenge der basischen Spaltungsprodukte sehr hoch ist; hingegen zeigte sich eine Abweichung von den bisher bekannten Histonen in der Verteilung des Stickstoffs zwischen dem Arginin und dem Lysin. Die folgende Zusammenstellung gibt eine Übersicht über die Verteilung des Stickstoffs in dem der Analyse leichter zugänglichen Teil der Spaltungsprodukte.

Prozente des Gesamtstickstoffs:

Ammoniak	0,9
«Histidinfraktion»	3,7
Arginin	19,4
Lysin (als Pikrat gewogen)	11,5
«Monoamidosauren» (durch Phosphorwolframsäure nicht fällbarer Teil)	39,2

Das bei 105° getrocknete Histonsulfat ergab einen Gehalt von 15,83% N und 12,28% H₂SO₄. Hieraus berechnet sich

¹⁾ Vgl. Inouye, Diese Zeitschrift, Bd. 83, S. 79 (1913). A. Kossel und S. Edlbacher, Diese Zeitschrift, Bd. 93, S. 396 (1915).

für das freie Histon ein Stickstoffgehalt von 18,05% und für 100 g Histon folgende Mengen der Spaltungsprodukte:

Arginin . . .	10,9 g,
Lysin . . .	10,8 g.

Die bei der Hydrolyse gebildete Ammoniakmenge entspricht nur 0,2% des Histons, offenbar ist diese äußerst geringfügige Ammoniakbildung auf eine Nebenreaktion zu beziehen.

Der Gehalt an Arginin ist etwas niedriger, der Lysingehalt etwas höher als bei den bisher bekannten Histonen; außerdem tritt bei der Spaltung einiger Histone auch Ammoniak auf. Zum Beispiel beträgt im Thymushiston der Gehalt an Argininstickstoff 25,2, an Lysinstickstoff 8,0, der in Form von Ammoniak abgespaltene Stickstoff 7,5% des Gesamtstickstoffs.¹⁾

Besonders auffallend ist das Verhalten der «Histidinfraktion», d. h. desjenigen Teils der hydrolytischen Spaltungsprodukte, welcher durch Silbernitrat bei Gegenwart von überschüssigem Barythydrat gefällt wird, gleichzeitig aber auch bei neutraler oder alkalischer Reaktion durch Silbersalze fällbar ist. Diese Fraktion gab eine intensive Rotfärbung mit Diazobenzolsulfosäure bei Gegenwart von überschüssigem Natriumcarbonat, welche weder auf Histidin noch auf Tyrosin bezogen werden könnte. Letzteres war ausgeschlossen, da die Millonsche Reaktion in dieser Fraktion fehlte, ersteres ist unwahrscheinlich, weil die Farbstoffbildung nach der oben erwähnten Reaktion nicht eintrat, wenn die Lösung vor der Einwirkung der Diazobenzolsulfosäure bei Gegenwart von Alkali mit Benzoylchlorid geschüttelt war.²⁾

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 49, S. 307 (1906).

²⁾ A. Kossel und F. Kutscher haben früher Zweifel geäußert, ob der aus dem Thymushiston durch Hydrolyse gewonnene und in der Histidinfraktion enthaltene Körper wirklich Histidin ist (Diese Zeitschrift, Bd. 31, S. 193). Da die obigen Beobachtungen geeignet waren, diese Zweifel zu vermehren, so haben wir eine größere Menge Thymushiston durch Schwefelsäure gespalten und daraus Histidin dargestellt. Dasselbe zeigte die bekannten Reaktionen und gab bei der Stickstoffbestimmung folgenden mit Histidin übereinstimmenden Wert:

1,770 mg ergab 0,407 ccm Stickstoff (761 mm, 19°).

Gefunden: 26,92% N, berechnet für $C_6H_9N_3O_2$: 27,09% N.

Die aus den Testikeln von *Echinus acutus* und *Strongylocentrotus lividus* dargestellten Histone zeigten im wesentlichen die gleichen Eigenschaften, wie das *Astropectenhiston*. Auch sie gaben weder die Tryptophanreaktion, noch die Schwefelbleifärbung beim Erhitzen des Proteins mit einer Lösung von Bleioxyd in Natronlauge, wohl aber die Millonsche Reaktion. Im Gegensatz zum *Astropectenhiston* ergab sich bei den beiden Echinoidenhistonen bei der Molischschen Probe mit α -Naphthol eine starke Rotfärbung. Durch Ammoniak war das *Strongylocentrotushiston* in der Kälte leicht fällbar, während das aus *Echinus* erhaltene Histon bei gewöhnlicher Temperatur nur eine Trübung mit Ammoniak gab, welche sich erst auf Zusatz von ammoniakalischer Proteinlösung oder (ohne diesen Zusatz) beim Erhitzen zu einem Niederschlag zusammenballte. Beim Echinushiston wurde die Histo-peptonreaktion in der oben erwähnten Weise angestellt; sie fiel positiv aus.

II. Über die Extraktivstoffe bei Echinodermen.

Während der größere Teil der stickstoffhaltigen Gewebsbausteine in den Proteinstoffen, Nucleinsäuren usw. festgelegt ist, tritt ein anderer geringerer Teil in freiem Zustande auf und dieser letztere bietet für eine vergleichende Histochemie bemerkenswerte Gesichtspunkte. Schon älteren Untersuchern ist es aufgefallen, daß bei gewissen Meerestieren größere Mengen solcher stickstoffhaltiger Gewebsbestandteile angehäuft werden, welche in anderen Tierklassen nur in geringer Menge vorkommen oder ganz fehlen. Ein bekanntes Beispiel dieser Art ist das Auftreten bedeutender Harnstoffmengen bei Seelachiern. Ebenso kommt das Taurin in den Muskeln von Cephalopoden,¹⁾ Gastropoden, Lamellibranchiaten in erheblicher Menge vor, während es in den Geweben höherer Tiere als freie Amidosäure nur spärlich gefunden ist²⁾ und auch bei manchen wirbellosen Seetieren fehlt. Wir haben es z. B. beim Hummer vergebens gesucht. Ähnlich ist das Verhalten des

¹⁾ M. Henze, Diese Zeitschrift, Bd. 43, S. 477 (1905).

²⁾ K. Micko, Diese Zeitschrift, Bd. 56, S. 180 (1908).

Glykokolls, welches in den Muskeln einzelner Lamellibranchiaten (Pecten) angehäuft ist, während es in anderen (Mytilus) nicht nachgewiesen werden konnte.¹⁾ Auch das Kreatin ist kein regelmäßiger Bestandteil des Muskelgewebes, es fehlt den Muskeln des Octopus²⁾ und gewissen Krebsen und findet sich bei anderen darauf untersuchten Wirbellosen nur in zweifelhaften Spuren.³⁾

Unsere Untersuchungen ergaben neue Erfahrungen der gleichen Art. Sie zeigen, daß auch das Sarkosin zu den Stoffen gehört, welche sich in freiem Zustand in den Geweben anhäufen können. Wir fanden es in den radialen Blinddärmen von *Astropecten aurantiacus*. Daneben zeigte sich in allen bisher untersuchten Organen dieser Species eine sehr reichliche Menge von Taurin und ferner Glykokoll. Außerdem konnten wir aus den radialen Blinddärmen dieser Spezies noch Tyrosin, Isoleucin und Glutaminsäure darstellen. Vermutlich ist auch noch Leucin und Prolin vorhanden, doch war der Nachweis dieser beiden letztgenannten Stoffe nicht mit Sicherheit zu erbringen.

Da die radialen Blinddärme der Nahrungsaufnahme dienen und da ferner nach Griffith und Cohnheim⁴⁾ aus diesem Organ Fermente entstehen können, welche eine Autolyse unter Bildung von Leucin und Tyrosin hervorrufen, so wäre es denkbar, daß das Tyrosin, Isoleucin, die Glutaminsäure und vielleicht auch das Leucin und Prolin während des Lebens durch einen Verdauungsprozeß aus dem Nahrungseiweiß hervorgegangen sind. Eine postmortale Autolyse ist in unserm Falle nicht anzunehmen, da die Leberschläuche unmittelbar nach der Herausnahme in Alkohol gebracht worden sind. Das Glykokoll kann nicht ausschließlich unter diesem Gesichtspunkt angesehen werden, da es sich auch in anderen Organen (Testikeln, Ovarien) reichlich vorfindet.

¹⁾ A. Kelly, Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, Bd. 5, S. 380 (1904).

²⁾ M. Henze, l. c.

³⁾ Y. Okuda, zitiert nach «Chemisches Zentralblatt» 1913 I, 1289.

⁴⁾ Cohnheim, Diese Zeitschrift, Bd. 33, S. 9 (1901).

Die Testikel von *Strongylocentrotus lividus*, von denen wir eine kleine Menge untersuchten, ließen im Gegensatz zu denen des *Astropecten* keine Krystallisation von Taurin erkennen, wohl aber enthielten sie eine reichliche Menge Glykokoll.

Das freie Auftreten dieser stickstoffhaltigen Körper und andererseits ihre Verankerung in den großen Verbänden der Proteine, ist natürlich von Einfluß auf die Regelung des osmotischen Drucks der Gewebe, der bekanntlich bei den «poikilosmotischen¹⁾» wirbellosen Meeresbewohnern dem des Meerwassers entspricht. Auf diese Weise ergibt sich eine neue oder bisher zu wenig beachtete Betrachtungsweise für diese «Extraktivstoffe», insbesondere für die Beurteilung des reichlichen Vorkommens von Taurin, Glykokoll usw. in den Geweben der genannten Arten.

Darstellung und Analyse der Extraktivstoffe.

Das Taurin wurde aus den radialen Blinddärmen, den Testikeln und Ovarien von *Astropecten* gewonnen; es findet sich in diesen Organen in freiem Zustande. Ein Teil des Taurins war durch den Alkohol schon bei gewöhnlicher Temperatur, ein anderer Teil in der Siedehitze aufgenommen worden und schied sich nach mehrtägigem Stehen an den Wandungen des Gefäßes krystallinisch ab oder konnte durch Fällung mit Äther oder Aceton abgeschieden werden. In ähnlicher Weise wurde das Taurin aus den Testikeln und Ovarien erhalten. Durch Umkrystallisieren aus heißem Wasser, nötigenfalls durch Alkoholfällung aus der wässerigen Lösung kann leicht eine Reinigung erzielt werden.

Die Analyse führte zu folgenden Zahlen:

Krystalle aus Testikeln:

1. 5,780 mg = 0,545 ccm N (763 mm, 16°).

Gefunden: 11,18%

Berechnet: 11,19% N.

¹⁾ Vgl. R. Höber, *Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe*, 4. Aufl., 1914, S. 37.

2. 3,690 mg = 0,357 ccm N (752 mm, 19°).
 Gefunden: 11,19%
 Berechnet: 11,19% N.
3. 4,460 mg = 2,32 mg H₂O und 3,19 mg CO₂.
 Gefunden: 5,82% H und 19,50% C
 Berechnet: 5,64% H und 19,18% C.
4. 3,400 mg = 6,310 mg BaSO.
 Gefunden: 25,50% S
 Berechnet: 25,62% S.

Krystalle aus Ovarien:

1. 3,230 mg = 0,305 ccm N (752 mm, 19°).
 Gefunden: 10,92%
 Berechnet: 11,19% N.
2. 5,735 mg = 3,11 mg H₂O und 4,14 mg CO.
 Gefunden: 6,06% H und 19,68% C
 Berechnet: 5,64% H und 19,18% C.

Krystalle aus radialen Blinddärmen:

1. 5,240 mg = 0,486 ccm N (763 mm, 16°)
 Gefunden: 11,00% N
 Berechnet: 11,19% N.
2. 3,500 mg = 1,84 mg H₂O und 2,50 mg CO
 Gefunden: 5,88% H und 19,45% C
 Berechnet: 5,64% H und 19,18% C.

Krystalle aus Testikeln: 19,50% C; 5,82% H; 11,18,
 11,19% N; 25,50% S
 „ Ovarien: 19,68% C; 6,06% H; 10,92% N
 „ Blinddärmen: 19,45% C; 5,88% H; 11,00% N
 Berechnet für Taurin: 19,18% C; 5,64% H; 11,19% N;
 25,62% S.

Diese und die weiter unten aufgeführten C, H und N-Bestimmungen sind nach der Methode von Pregl ausgeführt worden.

Zur Darstellung des Glykokolls dienen die Testikel. Wenn man das heiß bereitete alkoholische Extrakt nach Entfernung der beim Erkalten ausgeschiedenen Krystalle mit Aceton versetzt, so scheidet sich ein Öl ab, welches über Nacht krystallisiert. Die Krystalle sind eine Mischung von Taurin und

Glykokoll. Ersteres ist in Wasser schwerer löslich und kann dadurch größtenteils abgetrennt werden. Zur Reingewinnung des Glykokolls wird die Mutterlauge der Taurinkrystalle mit Kupfercarbonat gekocht, um das schwerer lösliche Glykokollkupfer zu gewinnen.

Von diesem schwerer löslichen Kupfersalz wurden drei Fraktionen erhalten, welche alle aus Glykokollkupfer bestanden, wie die folgenden Stickstoffbestimmungen zeigen:

Fraktion I. 3,955 mg = 0,425 ccm N (748 mm, 21°).
Gefunden: 12,27% N.

Fraktion II. 5,745 mg = 0,603 ccm N (748 mm, 21°).
Gefunden: 11,99% N.

Fraktion III: 200,3 mg nach Kjeldahl erforderten 17,5 ccm n'_{10} -Säure. Gefunden: 12,23% N.

Fraktion: I:	Fraktion II:	Fraktion III:
12,27% N	11,99% N	12,23% N.

Berechnet für Glykokollkupfer: 12,20% N.

Beim langsamen Verdunsten der analog behandelten von Taurin und Glykokoll befreiten kupferhaltigen Lösungen aus den radialen Blinddärmen bildeten sich große Krystalle eines tiefblauen Salzes. Diese Kupferverbindung wurde in Wasser gelöst und heiß mit Alkohol versetzt. Auf Zusatz einer geringen Menge Äther schieden sich die Krystalle von neuem aus und dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die abgesaugten und bei 120° bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Krystalle ergaben folgende Werte:

1. 3,160 mg = 0,311 ccm N (762 mm, 19°)

Gefunden: 11,54% N.

2. 3,966 mg = 1,74 mg H₂O, 4,39 mg CO₂, 1,310 mg CuO.

Gefunden: 4,91% H; 30,18 C; 26,39% Cu.

Gefunden: 4,91% H; 30,18% C; 26,39% Cu; 11,54% N.

Berechnet für (C₃H₆NO₂)₂Cu:

5,01% H; 30,06% C; 26,52% Cu; 11,69% N.

Die Zusammensetzung läßt die Frage offen, ob Alanin oder Sarkosin in der Kupferverbindung vorliegt.

Eine Aufklärung hierüber gaben die folgenden Untersuchungen, für welche das heißbereitete Alkohol-extrakt der

radialen Blinddärme von *Astropecten* diente. Dasselbe wurde zunächst von den beim Erkalten ausgeschiedenen Krystallen des Taurins und von öligen Abscheidungen befreit, dann wurde der Alkohol abdestilliert und der Rückstand mit Aceton extrahiert. Der in Aceton unlösliche Teil wurde mit Wasser aufgenommen, die wässrige Lösung filtriert und das Filtrat eingedampft. Der Verdampfungsrückstand wurde zunächst wiederum von neuen krystallinischen Abscheidungen des Taurins abgesaugt, sodann nach dem Verfahren von E. Fischer verestert und die Ester bei einem Druck von 15 mm Quecksilber destilliert. Die Hauptmenge ging bei 80° über. Wir teilten die veresterte Substanz auf diese Weise in zwei Fraktionen, deren erste «A» den zwischen 60 und 100° destillierenden Anteil bildete, deren zweite «B» einen über 100° liegenden Siedepunkt hatte.

Fraktion A. Das überdestillierte Estergemisch wurde in bekannter Weise verseift und die freien Amidosäuren fraktioniert krystallisiert. Die zuerst krystallisierenden Anteile ergaben einen der Formel $C_6H_{13}NO_2$ entsprechenden Stickstoffgehalt.

2,69 mg = 0,247 ccm N (757 mm, 19°). Gefunden: 10,69 %.

Berechnet für $C_6H_{13}NO_2$: 10,69 %.

Zur Entscheidung der Frage, ob Leucin oder Isoleucin vorhanden war, wurde 0,1 g der Substanz in wässriger Lösung mit 0,3 g Kupfercarbonat gekocht, und dann das Ganze, ohne zu filtrieren, zur Trockne verdunstet. Der Rückstand wurde mit Methylalkohol extrahiert, filtriert und eingedampft. Das in Methylalkohol lösliche Kupfersalz wog 0,12 g. Aus der ganzen Menge der verwandten Amidosäure kann sich 0,15 g Kupfersalz bilden, das Kupfersalz war daher zum größten Teil in Methylalkohol löslich, und der Körper bestand somit fast völlig aus Isoleucin. Da die Stickstoffbestimmung gut übereinstimmende Werte gegeben hat, kann eine etwa vorhandene Beimischung wohl nur aus Leucin bestanden haben.

Die Mutterlauge des Isoleucins wurde zur Trockne gebracht und mit Äthylalkohol ausgekocht.

Der in Äthylalkohol lösliche Teil sollte zum Nachweis des Prolins dienen, doch wurden bei der Analyse der daraus

dargestellten Phenylcyanatverbindung keine genügend scharf stimmenden Analysenzahlen erhalten, so daß die Gegenwart dieses Körpers zweifelhaft bleibt.

Der in Äthylalkohol unlösliche Teil löste sich in der Siedehitze leicht in Methylalkohol und krystallisierte daraus nach dem Erkalten langsam in gut ausgebildeten Krystallen, welche bei der Analyse den der Formel $C_9H_7NO_2$ entsprechenden Stickstoffwert ergaben.

4,240 mg = 0,571 ccm N (759 mm, 19°). Gef.: 15,71%.

Für $C_9H_7NO_2$ berechnet: 15,73%.

Es lag hier somit offenbar dieselbe Substanz vor, deren Kupfersalz früher untersucht war. Die Identität mit dem Sarkosin wurde nachgewiesen 1. durch den Schmelzpunkt der ursprünglichen Krystalle; derselbe lag, den Angaben von Mylius¹⁾ entsprechend, bei 215°, 2. durch den Schmelzpunkt der Naphthalinsulfoverbindung, welche nach der Methode von E. Fischer dargestellt war. Die aus verdünntem Alkohol umkrystallisierte Substanz schmolz bei 176°; Friedmann²⁾ fand den Schmelzpunkt bei 172--173°, 3. durch die Krystallform.

Die krystallographische Untersuchung, welche Herr Prof. Dr. Wülfing auszuführen die Güte hatte, wurde durch die hygroskopische Beschaffenheit der aus Methylalkohol erhaltenen Krystalle erschwert, bewies aber mit Sicherheit, daß die Krystalle Sarkosin waren. Wir statten Herrn Professor Wülfing für seine wertvolle Hilfe unsern Dank ab.

Eine erste Krystallisation zeigte Formen, wie sie A. Schmelcher³⁾ abbildet. Nur wurde der Winkel des Querdomas etwas kleiner, als bei Schmelcher, nämlich zu etwa 81½ gegenüber dem von Schmelcher beobachteten Wert von 82° 44' gefunden. Übrigens haben auch Revisionsmessungen des frisch aus Methylalkohol umkrystallisierten käuflichen Sarkosins (Merck) ebenfalls diesen kleineren Wert (etwa 81° 20') ergeben.

¹⁾ Mylius, Berichte der deutschen chem. Ges., Bd. 17, S. 286 (1884).

²⁾ Friedmann, Beiträge zur chemischen Physiologie und Pathologie, Bd. 11, S. 161 (1908).

³⁾ Vgl. Groth, Chemische Krystallographie III, 1910, S. 100, Fig. 992.

Das obige aus *Astropecten* gewonnene Präparat wurde nochmals aus Methylalkohol umkrystallisiert. Hierbei entstanden Krystalle, die zuerst gänzlich von den erst erhaltenen abzuweichen schienen. Diese stellten sich aber bald als Verzerrungen heraus, die dadurch entstanden waren, daß neben dem vollständig ausgebildeten Querdoma nur eine Prismenfläche mit der Gegenfläche sich entwickelt hatte. Auch an diesem Präparat wurde der Querdomenwinkel wieder etwas kleiner wie bei Schmelcher, nämlich zu etwa 81° gefunden. Der Winkel von Prisma zu Doma ergab sich zu etwa 54° , wie auch Schmelcher angibt.

Fraktion B. Der im Kolben verbliebene Rückstand wurde mit Barytlösung 2 Stunden auf dem Wasserbade erwärmt, um die Ester zu verseifen, und der Baryt mit Schwefelsäure entfernt. Die sauer reagierende Flüssigkeit wurde mit Phosphorwolframsäure gefällt und das Filtrat des Phosphorwolframsäureniederschlags durch Schwefelsäure unter Vermeidung eines Überschusses vollkommen vom Baryt befreit. Aus der stark sauer reagierenden Flüssigkeit schieden sich schwer lösliche Krystallbüschel ab, welche sich durch ihr Aussehen, durch die Millonsche Reaktion und durch die Analyse als Tyrosin erwiesen.

2,13 mg = 0,149 ccm N (749 mm, 20°). Gef.: 8,03% N.

Berechnet: 7,74% N.

Die Mutterlauge des Tyrosins gab eine zweite und dritte Krystallisation und diese bestand aus Glutaminsäure. Die bis zum Verschwinden der Millonschen Probe aus Wasser umkrystallisierten Substanzen gaben folgende Stickstoffzahlen:

1. 3,79 mg = 0,314 ccm N (755 mm, 19°). Gef.: 9,62% N.

2. 4,68 mg = 0,390 ccm N (749 mm, 20°). Gef.: 9,56% N.

Für Glutaminsäure berechnet: 9,50% N.

Aus *Strongylocentrotus lividus* wurde Glykokoll in folgender Weise erhalten: die Testikel der im April in Neapel gesammelten Seeigel wurden in der Siedehitze mit Alkohol extrahiert. Der Alkohol hinterließ beim Verdunsten eine braungelbe Masse, welche zum Teil ölige, zum Teil

krystallinische Abscheidungen enthielt. Der ölige Teil konnte durch Äther größtenteils entfernt werden. Der krystallinische Teil wurde mit Tierkohle aus Wasser mehrfach umkrystallisiert. Die Krystalle waren schwefelfrei, enthielten also kein Taurin. Sie wurden durch Kochen mit Kupfercarbonat in das Kupfersalz übergeführt. Dieses gab nach dem Trocknen bei 120° die folgenden Stickstoffwerte.

2,35 mg = 0,291 ccm N (752 mm, 20°). Gefunden: 13,26% N.
Berechnet für Glykokollkupfer: 13,23% N.

III. Stellasterin und Astrol.

Zur Darstellung des Stellasterins wurde der in Äther lösliche Teil des heißbereiteten Alkoholextraktes mit alkoholischer Kalilauge verseift, der nach Entfernung des Alkohols verbleibende Rückstand in Wasser verteilt und mit Äther ausgeschüttelt. Für die Gewinnung des darin gelösten Sterins wurde das mit Natriumsulfat entwässerte und filtrierte Ätherextrakt verdunstet, der Rückstand nach dem Verfahren von Windaus¹⁾ aus alkoholischer Lösung mit Digitonin gefällt und das Digitonid durch einstündiges Kochen mit Essigsäureanhydrid zerlegt. Aus der erkalteten Flüssigkeit scheidet sich das Acetat zum größten Teil aus. Zur Gewinnung des kleinen Restes wurde das Essigsäureanhydrid auf dem Wasserbade abgeblasen und der Rückstand aus Alkohol umkrystallisiert, in welchem das Stellasterinacetat in der Siedehitze ziemlich leicht, bei Zimmertemperatur hingegen sehr wenig löslich ist. Das freie Stellasterin stellten wir aus dem mehrfach umkrystallisierten Acetat durch Verseifung mit 25%iger wässrig-alkoholischer Kalilauge dar. Während des zweistündigen Erhitzens am Rückflußkühler trat keine vollständige Lösung ein. Die Reaktionsflüssigkeit wurde mit Wasser verdünnt, mit Äther ausgeschüttelt, der Äther verdunstet und der Rückstand aus heißem Alkohol umkrystallisiert.

Wir erhielten das Stellasterin aus den Testikeln und den Blinddärmen von *Astropecten aurantiacus*. Für die Analyse wurden die Präparate beiderlei Ursprungs vereinigt und um-

¹⁾ A. Windaus, Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft, Bd. 42, S. 240 (1909).

krystallisiert. Die Löslichkeitsverhältnisse sind nahezu dieselben wie die des Cholesterins. Es ist sehr leicht löslich in Äther und in heißem Alkohol, ferner löslich in Ligroin und Chloroform, etwas weniger in Aceton, Benzol, Eisessig, wenig löslich in kaltem Methylalkohol, in letzterem ist es in der Hitze leicht löslich. Der Schmelzpunkt liegt bei 149 bis 150°. Es zeigt die Liebermann-Burchardtsche Reaktion und zwar entwickelt sich die Färbung beim Stellasterin schneller und intensiver, als dies beim Cholesterin der Fall ist. Der Unterschied zeigt sich besonders deutlich, wenn man eine sehr geringe Menge des Sterins in etwa 2 ccm Chloroform löst, dazu 4 Tropfen Essigsäureanhydrid und einen Tropfen konzentrierte Schwefelsäure hinzusetzt. Hingegen tritt beim Stellasterin die Salkowskische Reaktion mit Chloroform und konzentrierter Schwefelsäure nicht in typischer Weise ein. Die Färbung ist eine gelbrote. Auch ist keine Ausscheidung eines schwer löslichen Bromids zu bemerken, wenn man eine möglichst konzentrierte ätherische Lösung des Sterins nach Windaus mit einer Lösung von Brom in Eisessig versetzt. Hierbei tritt eine Entfärbung der ersten Tropfen der Bromlösung ein und im Laufe von mehreren Stunden entwickelt sich eine Grünfärbung der Flüssigkeit. Schneller läßt sich diese Färbung beobachten, wenn man ein Kryställchen des Stellasterins auf dem Deckel eines Porzellantiegels mit zwei bis drei Tropfen Bromeisessiglösung versetzt; beim Verdunsten der Eisessigbromlösung bei gewöhnlicher Temperatur färbt sich der Krystall grün.

Die Analyse des freien Sterins führt zu folgenden Zahlen:

1. 5,426 mg = 5,65 mg H₂O; 16,70 mg CO₂

Gefunden: 11,65% H und 83,95% C.

2. 4,083 mg = 4,20 mg H₂O; 12,62 mg CO₂

Gefunden: 11,52% H und 84,30% C.

Gefunden:

Berechnet für C₂₇H₄₄O:

C 83,95 84,30

84,30%

H 11,65 11,52

11,54%

Das Stellasterinacetat kann aus dem freien Stellasterin durch Erhitzen mit Essigsäureanhydrid dargestellt werden.

Es wurde aus Alkohol, in welchem es in der Kälte sehr wenig löslich ist, umkrystallisiert. Der Schmelzpunkt der Krystalle lag nach zwölfmaligem Umkrystallisieren aus Alkohol bei 176 bis 177°.

Präparat I. 3,270 mg = 3,08 mg H₂O und 9,77 mg CO₂
 Gefunden: 10,54% H und 81,49% C

Präparat II. 1. 5,142 mg = 4,93 mg H₂O und 15,46 mg CO₂
 Gefunden: 10,74% H und 81,88% C

2. 5,957 mg = 5,72 mg H₂O und 17,86 mg CO₂
 Gefunden: 10,75% H und 81,77% C

Gefunden: Berechnet für C₂₉H₄₆O₂:

	Präp. I	Präp. II	
C	81,49	81,88	81,77
H	10,54	10,74	10,75
			81,62
			10,87.

Zur Darstellung des Stellasterinbenzoats wurden 0,15 g Stellasterin mit 0,06 g Benzoylchlorid während 15 Minuten auf 160 bis 170° erhitzt und die geschmolzene Masse nach dem Erkalten in Äther gelöst. Die warme Lösung wurde bis zur Krystallabscheidung mit Alkohol versetzt, eingeeengt und die Krystalle abgesaugt. Sie wurden aus wenig Alkohol umkrystallisiert.

In ähnlicher Weise wie das Cholesterinbenzoat zeigt dieser Körper die Erscheinung des doppelten Schmelzpunkts. Wird die Substanz erhitzt, so schmilzt sie zunächst bei 100° zu einer trüben prächtig opalisierenden Flüssigkeit, die sich bei 125° plötzlich aufhellt. Zur Analyse wurde die Substanz dreimal aus Alkohol umkrystallisiert.

3,452 mg = 3,00 mg H₂O und 10,55 mg CO₂
 Gefunden: 83,35% C 9,73% H
 Berechnet für C₃₄H₄₈O₂: 83,55% C 9,90% H.

Das Benzoat ist in Äther sehr leicht löslich; es löst sich ferner in Chloroform, Alkohol, Aceton, Eisessig und Ligroin, schwerer in Methylalkohol und Benzol.

Herr Professor F. Pregl hatte die Freundlichkeit, einige Molekulargewichtsbestimmungen des Acetats mit Hilfe der von ihm für kleine Substanzmengen ausgearbeiteten Siedemethode auszuführen. Diese ergaben für das Lösungsmittel Aceton:

$$L = 1,201$$

$$K = 16,7$$

$$1. s_1 = 9,21 \text{ mg}$$

$$\Delta_1 = 0,030^\circ.$$

$$2. s_2 = 16,79 \text{ mg}$$

$$\Delta_2 = 0,053^\circ.$$

Somit ergibt sich nach der Formel

$$M = 100 \frac{s}{\Delta} \cdot \frac{K}{L}$$

$$M_1 = 427$$

$$M_2 = 440$$

Berechnet für Stellasterinacetat:

$$M = 426.$$

Die krystallographischen Untersuchungen, bei denen wir uns wiederum der freundlichen Hilfe des Herrn Professor Wülfing zu erfreuen hatten, führten zu folgenden Ergebnissen:

Freies Stellasterin: Leistenförmige Krystalle mit grader Auslöschung. Die Zonenachse liegt parallel dem mittleren optischen Vektor (β). Auf dem Blättchen tritt im konvergenten Licht eine optische Achse aus unter etwa 33° gegen die Normale. Die Ebene der optischen Achsen steht senkrecht zur Längsausdehnung der Blättchen. Der optische Charakter ist positiv.

Stellasterinacetat: Die Kryställchen stellen außerordentlich dünne Blättchen von rhombischem Umriß mit einem Winkel von $70\frac{1}{2}^\circ$ dar. Auf diesem Blättchen tritt eine optische Achse fast senkrecht aus. Bei der unvollkommenen Ausbildung der Kryställchen ist eine genaue Messung nicht möglich. Es wurden zwischen optischer Achse in Luft und Blättchennormale Winkel von 1° bis 6° gemessen. Die Ebene der optischen Achsen halbiert etwa den spitzen Winkel der Rhomben. Der Achsenwinkel ist groß, der optische Charakter positiv.

Für die Aufsuchung des Stellasterins wird es wichtig sein, diese Krystalle mit denen anderer Sterine zu vergleichen.

Über das Phytosterin liegen Beobachtungen von Mügge und Weibull vor, die wir der Chemischen Krystallographie

von Groth entnehmen:¹⁾ das Phytosterin bildet mikroskopische monokline Täfelchen {001}, begrenzt von {100}, {110} und zuweilen {010}; $\{110\} : \{100\} = 54^\circ$; Ebene der optischen Achsen {010}, durch {001} ein Achsenbild sichtbar. Wir maßen noch an einem von uns aus Sesamöl dargestellten Präparat von Phytosterin den Winkel der optischen Achsen in Luft gegen die Plättchennormale zu etwa 50° .

Aus demselben Phytosterin stellten wir das Acetat dar; dasselbe bildete mikroskopische leistenförmige Krystalle. Die Achsenebene steht senkrecht zur Längsausdehnung der Plättchen, also Zonenachse der Leisten parallel dem mittleren optischen Vektor (b). Neigung der optischen Achse in Luft etwa 22° zur Plättchennormalen. Optischer Charakter positiv.

Die bisherigen optischen Bestimmungen am Cholesterin (aus Gallensteinen) seien dahin ergänzt, daß die auf {010} austretende optische Achse in Luft mit der Plättchennormale einen Winkel von etwa 56° bildet.

Die gemeinsame Eigentümlichkeit der drei Alkohole und der beiden Ester ist die für eine Untersuchung sehr bequeme Lage einer optischen Achse, welche auf derjenigen Fläche austritt, die sich der Beobachtung unmittelbar darbietet. Die Schiefe dieses Austritts ist so erheblich verschieden, daß sie ohne genauere Messung die Körper zu unterscheiden erlaubt. Wir stellen sie hier noch einmal übersichtlich zusammen:

Cholesterin	56°		
Phytosterin ²⁾	50°	Phytosterinacetat	22°
Stellasterin	33°	Stellasterinacetat	$1^\circ - 6^\circ$

Aus dem in Alkohol unlöslichen oder schwer löslichen Teil der Blinddarmgewebe von *Astropecten* konnte durch Äther ein Extrakt gewonnen werden, welches das Astrol enthielt. Das Ätherextrakt wurde durch zweistündiges Kochen mit alkoholischer Kalilauge verseift, die verseifte Masse in Wasser verteilt und die trübe Flüssigkeit mit Äther ausgeschüttelt. Nach

¹⁾ Groth, Chemische Krystallographie, Bd. 3 (1910), S. 525.

²⁾ Aus Sesamöl, wahrscheinlich identisch mit Sitosterin.

dem Abdestillieren des Äthers krystallisierte eine farblose Substanz, welche jetzt aus heißem Alkohol umkrystallisiert wurde, indem die heiße alkoholische Lösung bis zur beginnenden Trübung mit wenig heißem Wasser versetzt wurde. Beim Stehen schied sich über Nacht das Astrol in gebogenen nadel-förmigen Krystallen ab.

Das Astrol schmilzt bei 71°. Es ist in Alkohol leichter löslich wie Cholesterin und findet sich wahrscheinlich in Form eines in Alkohol schwer löslichen Esters in den Organen vor. In Äther und in Pyridin löst es sich leicht auf. Es kann nicht so leicht wie Cholesterin, Stellasterin und andere Sterine durch Digitonin als Komplexverbindung aus alkoholischer Lösung abgeschieden werden, erst nach dreitägigem Stehen begann in der mit Digitonin versetzten alkoholischen Lösung die Abscheidung eines krystallinischen Niederschlags. Das Astrol gibt weder die Liebermannsche Farbenreaktion mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure, noch die Salkowskische Probe mit Chloroform und Schwefelsäure. Durch einstündiges Erhitzen mit Essigsäureanhydrid wird es in ein niedrig schmelzendes Acetat umgewandelt.

Herr Professor Pregl führte nach seinen Methoden die unten aufgeführten Analysen 3 und 4, sowie die Molekulargewichtsbestimmungen des Astrols aus. Wir statten ihm auch an dieser Stelle unsern Dank ab.

Es ergaben sich folgende Zahlen:

1. 3,783 mg = 4,27 mg H₂O und 10,25 mg CO₂
Gefunden: 12,63% H und 73,89% C.
2. 4,105 mg = 4,59 mg H₂O und 11,12 mg CO₂
Gefunden: 12,52% H und 73,88% C.
3. 4,498 mg = 5,215 mg H₂O und 12,205 mg CO₂
Gefunden: 12,98% H und 74,01% C.
4. 4,708 mg = 5,425 mg H₂O und 12,765 mg CO₂
Gefunden: 12,90% H und 73,95% C.

	Gefunden:				Berechnet
	1	2	3	4	für C ₂₃ H ₄₈ O ₃
C	73,89	73,88	74,01	73,95	74,19
H	12,63	12,52	12,98	12,90	12,91

Als Ergebnis der Molekulargewichtsbestimmung nach seiner Siedemethode teilte uns Herr Professor Pregl folgende Zahlen mit:

A) Lösungsmittel: Aceton, $L = 1,201$ g, $K = 16,7$.

1. $s_1 = 10,38$ mg 2. $s_2 = 17,68$ mg

$\Delta_1 = 0,041^\circ$ $\Delta_2 = 0,065^\circ$.

B) Lösungsmittel: Alkohol, $L = 1,175$ g, $K = 11,7$.

$s = 18,47$ mg

$\Delta = 0,050^\circ$.

Somit gefunden:

A) $M_1 = 352$, $M_2 = 378$. B. $M = 371$.

Berechnet für $C_{23}H_{48}O_3$: $M = 372$.

Die Darstellung und das Verhalten des Astrols machen es sehr wahrscheinlich, daß es als Alkohol aufzufassen ist.

Das Vorkommen cholesterinartiger Körper in einem anderen Asteroiden, *Asterias rubens*, ist bereits von Ch. Dorée¹⁾ angegeben worden. Die Eigenschaften dieser Körper sind nicht genauer beschrieben worden, doch ist es nach den Angaben über Löslichkeitsverhältnisse und Zusammensetzung nicht wahrscheinlich, daß sie mit dem Stellasterin und dem Astrol identisch sind. —

¹⁾ Ch. Dorée, *Biochemical Journal*, Bd. 4, S. 86 (1909).