

Εὐαγγελισμός». Ἦδη πρὸ τοῦ πολέμου τὸν προέτρεπον νὰ ἐκδώσῃ σύγγραμμα περιλαμβάνον τὰς σπουδαιοτέρας Βιοχημικὰς μεθόδους, αἵτινες εἶναι σήμερον ἀπαραίτητοι εἰς τὸν ἱατρὸν, καὶ ἄνευ τῶν ὁποίων ἡ παροχὴ βοήθειας εἰς τοὺς πάσχοντας δὲν εἶναι ἐφικτή.

Εἶμαι ἰδιαίτερος εὐτυχής, διότι ὁ κ. Παναγόπουλος ἔφερεν εἰς αἴσιον πέρας ἓνα δύσκολον ἔργον. Ἐβασίσθη ἅφ' ἑνὸς εἰς τὴν μακράν του πεῖραν καὶ ἅφ' ἑτέρου εἰς τὴν μελέτην τῆς ἐκτεταμένης βιβλιογραφίας.

Ὁ πρῶτος τόμος ἐκ 411 σελίδων περιλαμβάνει τὰς γενικὰς χημικὰς μεθόδους καὶ τὰς εἰδικὰς μεθόδους τῆς ἐξετάσεως τῶν οὕρων. Εἰς τὸν δεύτερον τόμον ἐξ 703 σελίδων περιλαμβάνονται στοιχειώδεις φυσικοχημικαὶ ἔννοιαι, καθὼς καὶ αἱ μέθοδοι ἐξετάσεως τοῦ αἵματος.

Τέλος εἰς τὸν τρίτον τόμον, ἐκ 425 σελίδων, ὁ συγγραφεὺς περιγράφει τὰς μεθόδους ἐξετάσεως τοῦ σιέλου, τοῦ γαστρικοῦ ὑγροῦ, τοῦ παγκρεατικοῦ ὑγροῦ, τῆς χολῆς, τοῦ σπέρματος, τοῦ ἀμνιακοῦ ὑγροῦ, τοῦ γάλακτος, τοῦ ἐγκεφαλονωτιαίου ὑγροῦ, καθὼς καὶ τὰς λειτουργικὰς δοκιμασίας τῆς ὑποφύσεως, τοῦ θυροειδοῦς ἀδένους, τοῦ παγκρέατος, τῶν ἐπινεφριδίων, τῆς ψοθήκης, τοῦ ἥπατος καὶ τῶν νεφρῶν.

Τὸ βιβλίον τοῦτο διακρίνει ἀκρίβεια καὶ σαφήνεια. Ὁ συγγραφεὺς εἶναι ἄξιος πολλῶν συγχαρητηρίων.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΜΗ ΜΕΛΩΝ

ΧΗΜΕΙΑ.—Versuche zur Chromatographischen und Spectroskopischen Trennung der Farbstoffe des Schwammes Ectyon Oroides*, von Anast. A. Christomanos.** Ἀνεκρινώθη ὑπὸ τοῦ κ. Γεωργ.

Ἰωακείμογλου.

Die Alkohollöslichkeit verschiedener Schwämmefarbstoffe wurde seit langem von Kruckenberg¹ festgestellt. Dabei wurden über ihre Natur

* Aus dem Laboratorium für Marine Biochemie in St. Georg. Limni Euboea und dem Biochemischem Institut der Universität Saloniki.

** ΑΝΑΣΤ. ΧΡΗΣΤΟΜΑΝΟΣ, Πειράματα πρὸς χρωματογραφικὸν καὶ φασματοφωτομετρικὸν διαχωρισμὸν τῶν χρωστικῶν τοῦ σπόνγυς Ectyon Oroides.

¹ C. F. KRUCKENBERG, Vergleichende physiologische Studien. Heidelberg, Verl. Karl Winter, 1878.

keine nähere Angaben gemacht. Später wurde von anderen Forschern¹, ihre teilweise Zugehörigkeit zu den Karotinoiden erkannt. Bei einer Anzahl roter Schwämme, z. B. *Axinella Crista Galli*, *Suberitas Domuncula* u.s.w. wurden die Karotinoide Astacin, bzw. Torulen, ein Verwandter des Lycopins gefunden².

In der vorliegenden Arbeit versuchten wir die Farbstoffe des orangefarbenen Schwammes *Ectyon Oroides* näher kennen zu lernen, welcher im Mittelmeer in Tiefen zwischen 100 und 200 meter lebt. Die Exemplare dieses Schwammes wurden anlässlich der oceanographischen Studienreise der «*Kalypso*» 1956, die unter der wissenschaftlichen Leitung von Prof. Pérès stand, zwischen der Inseln Rodos und Castellorizon, aus einer Tiefe von ca. 100 meter heraufgebaggert.

EXPERIMENTELLER TEIL

Die Schwämme wurden sofort nach dem Auffischen in kleine Stücke zerschnitten, das überschüssige Wasser zwischen Filtrierpapier ausgepresst, und bei Zimmertemperatur im Dunkeln mit Aceton einige Tage ausgezogen. Nach Ablauf dieser Zeit, wird der Aceton gewechselt, und die Extraction solange fortgesetzt bis der Aceton keine nennenswerte Farbstoffmengen mehr aufnimmt.

Die gesamten Acetonextracte wurden vereinigt, und nach Filtration mit Petroläther, nach dem von Fox und Pantin angegebenen Verfahren zur fraktionierten Trennung der epi- und hypophasischer Karotinoide³, ausgezogen. Zwecks Vermeidung von Wiederholungen wird das Extraktionsverfahren des Acetonextractes tabellarisch angegeben. Die auf Grund dieses Verfahrens erhaltene Fractionen werden auf Aluminiumoxyd, stand-

¹ MC. MUNN, Proc. Birmingham. Natur. Hist. Soc. 3, 1883, 407. L. S. PALMER, Carotinoids and relativ pigments. New York, 1922. E. LEDERER, Les Carotenoides des animaux. Paris. HERMANN et Cie, E. LÖNNBERG, Untersuchungen über das Vorkommen Carotinoider Stoffe bei marinen Evertrebraten. Archiv. Zool. 22 A, 14. 23 A, 15.

² R. KUHN und N. A. SÖRENSEN, Über die Farbstoffe des Hummers. Angew. Chem. 51. 465, 1938. E. LEDERER, Recherches sur les carotenoides des invertébrés. Bull. Soc. Chim. Paris. 20, 562. 1938. Biologic. Rew. Vol. 15 (1940), p. 273.

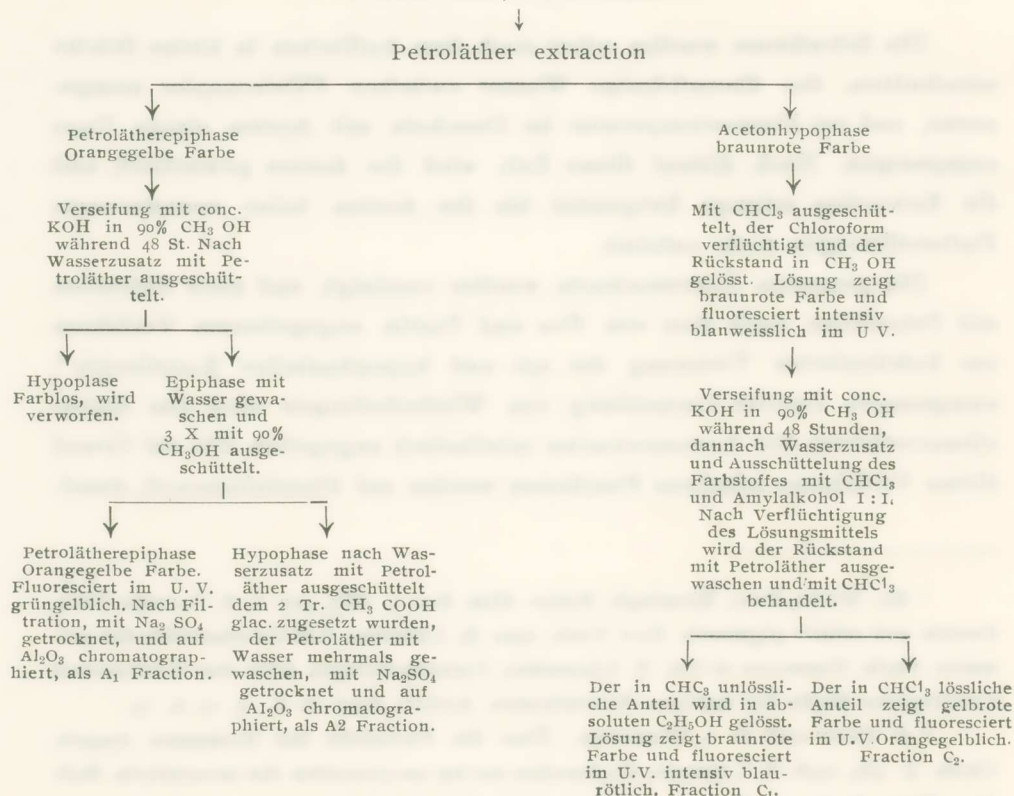
³ D. L. FOX., Animal Biochromes. Cambridge Univ. Press. 1953, p. 75.

artisiert nach Brockmann, chromatographiert, da sich CaCO_3 als nicht geeignet erwies. Für diese Versuche wurde eine 200 mm. lange und 16 mm. weite Al_2O_3 Säule verwendet.

Die bei der Chromatographie der verschiedenen Fractionen erhaltene Zonen werden im Folgendem der Reihenfolge nach von oben nach unten angeführt werden:

AUSSCHÜTTELUNGSVERFAHREN DES ACETONEXTRACTES DES SCHWAMMES ECTYON OROIDES

Acetonextract, Farbe braunrot.



Petrolätherepiphase

Fraction A₁

- 1^{ste} Zone: Breite 15 mm. Farbe Zinnoberrot, Intensität nach unten abnehmend. Elution mit Aceton, Lösung fleischfarben, fluoresciert im U. V. grüngelblich. Subjectiv spectroscopisch Absorption ab 5670 Å, zunehmend gegen das kurzwellige Spectrumende. Spectrophotometrische Absorptionskurve zeigt Max. bei 4700 Å. Acetonrückstand löslich in CHCl₃, gibt mit SbCl₃ keine Blaufärbung.
- 2^{te} Zone: Breite 3 mm. Farbe Rotorange nach unten an Intensität abnehmend. Elution mit Aceton-Chloroform 1:1. Lösung orangefarben, grüngelblich im U. V. fluorescierend. Subjectiv spectroscopische Absorption ab 5900 Å gegen das kurzwellige Ende. Spectrop. Absorptionskurve zeigt Max. bei 4600 Å. Elutionsrückstand mikrokristalline Blättchen, Smp. 128,5°, geben mit SbCl₃ zuerst eine violette dannach in Blaugrün übergehende Färbung.
- 3^{te} Zone: Breite 8 mm. Besteht aus zwei dicht aneinander liegenden Zonen von orangegelber Farbe. Elution mit Aceton. Lösung orangegelb mit gleicher Fluoreszenz im U. V. Subject. Absorption ab 5375 Å gegen das kurzwellige Ende. Spectrophotometrisch Max. bei 4450 Å. Der amorphe Acetonrückstand sintert bei ca 160°, ohne scharfen Smp. Mit SbCl₃ keine Färbung.
- 4^{te} Zone: Breite 1,5 mm. Farbe goldgelb. Elution mit Aceton. Lösung gelborange

fluoresciert gelbgrünlich im U. V. Subj. Absorption ab 5220 Å gegen das kurzwellige Ende zunehmend. Spectrophotometrisch Max. bei 4800 und 4400 Å. Acetonrückstand ölige Tropfchen geben mit SbCl_3 keine Färbung.

→ 5^{te} Zone: Besteht aus einer diffusen Färbung A_1V des ganzen unteren Teils der Säule. Elution mit Aceton-Chloroform 1:1. Farbe der Lösung goldgelb, zeigt die gleichen spectroscopischen Eigenschaften wie die Zone IV. Ölige Tröpfchen.

Da Zone 5 keine scharfe Absorptionsgrenze aufwies, wurde die Zone rechromatographiert, indem das Acetoneluat nach Verdunsten des Acetons, im Petroläther aufgenommen wurde. Dabei wurden folgende Zonen beobachtet:

Rechromatographie-
rung der A_1V Zone

→ 1^{ste} Zone: Breite ca 1 mm. Farbe rot. Aceton-Petroläthereluat zeigt rote Farbe und fluoresciert im U. V. intensiv blau.

→ 2^{te} Zone: Breite 100 mm. Farbe orange, kaum zu trennen von der nächsten Zone.

→ 3^{te} Zone: Breite 5 mm. Orangefarben wie Zone 2. Petroläther - Acetoneluat der Zonen 2 und 3 zeigt goldgelbe Farbe und fluoresciert im U. V. orangegrünlich. Nach Verdunsten des Lösungsmittels, hinterbleiben ölige Tröpfchen die in Chloroform gelöst mit SbCl_3 nach 10 Minuten eine grüne Färbung geben. Die Menge der Tropfen war zu gering um weitere Analysen durchzuführen.

Die Chromatographierung der Hypophasischen A_2 Fraction in Petrolätherlösung auf Al_2O_3 , lies zwei sehr schmale Zonen am obersten Teil der Säule erscheinen:

Chromatographie-
 rung der A₂ Fraction

- 1^{ste} Zone : Breite 1 mm. Farbe rotgelb.
- 2^{te} Zone : Breite 1,5 mm. Orangefarben. Die Eluate dieser Zonen konnten wegen ihrer geringen Konzentration nicht weiter untersucht werden.

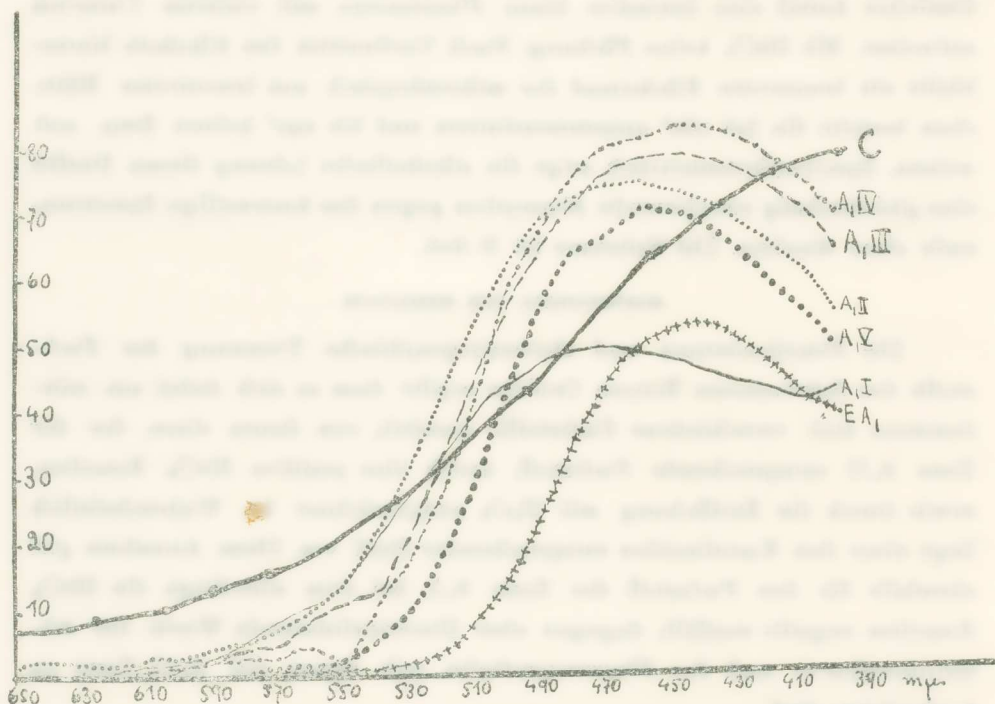
Die in Chloroform - Amylalkohol lösliche Fraction C, hinterlässt nach Verdunsten des Lösungsgemisches einen Rückstand dessen in C₂H₅OH löslicher Anteil eine intensive blaue Fluoreszenz mit violetten Unterton aufweist. Mit SbCl₃ keine Färbung. Nach Verdunsten des Alkohols hinterbleibt ein braunroter Rückstand der mikroskopisch aus braunroten Blättchen besteht die bei 160° zusammensintern und bis 240° keinen Smp. aufweisen. Spectrophotometrisch zeigt die alkoholische Lösung dieses Stoffes eine gleichmässig zunehmende Absorption gegen das kurzwellige Spectrum ohne Maxima. Die Substanz ist N-frei.

BESPRECHUNG DER RESULTATE

Die Fractionierung und chromatographische Trennung der Farbstoffe des Schwammes Ectyon Oroides ergibt dass es sich dabei um mindestens drei verschiedene Farbstoffe handelt, von denen einer, der der Zone A₁II entsprechende Farbstoff, durch eine positive SbCl₃ Reaction, sowie durch die Entfärbung mit H₂O₂ ausgezeichnet ist. Wahrscheinlich liegt einer den Karotinoiden entsprechender Stoff vor. Diese Annahme gilt ebenfalls für den Farbstoff der Zone A₁I, bei dem allerdings die SbCl₃ Reaction negativ ausfällt, dagegen aber übereinstimmende Werte der Absorptionskurve und der Fluoreszenzfarbe, mit denen der A₁II Zone zu beobachten sind.

Die nicht weit von einander liegenden Absorptionsmaxima den Zonen A₁III bis A₁V, und deren gleiche Fluoreszenzfarben im U. V. deuten weitherhin auf eine Identität des ihnen zu Grunde liegenden Farbstoffes. Die verschiedene Grösse der Absorptionsmaxima ist durch eine verschiedene Konzentration der ihnen entsprechende Eluate zu erklären. Über die Natur dieses Farbstoffes können wir nichts bestimmtes aussagen. Die Reaction mit SbCl₃ verläuft negativ. Es ist möglich dass der Farbstoff ebenfalls eine Verwandtschaft zu den Karotinoiden besitzt, da bekanntlich einbändig absorbierende Karotinoide bei den niederen Seetieren aufgefunden worden sind. Was die Natur des der Fraction C entsprechenden Farbstoffes

anbelangt, so können wir mit Bestimmtheit behaupten dass es sich dabei um einen völlig verschiedenen Farbstoff handelt. Seine Lösungseigenschaften, der andere Verlauf der Absorptionskurve und vor allem die prächtige blaue Fluoreszenz im U. V. drängen die Vermutung auf, dass es sich im einen Farbstoff handelt der den Naphtochinonpigmenten der Seeigeln nahesteht, die ebenfalls blaue Fluoreszenz und hohe Schmelzpunkte aufweisen.



Absorptionskurven der chromatographisch getrennten Fractionen.

Leider waren die uns zur Verfügung stehenden Rohstoffmengen nicht genügend um eine weitere Untersuchung der Natur dieser chromatographisch getrennter Farbstoffe durchzuführen. Wir behalten uns vor diese Untersuchungen bei gegebener Gelegenheit weiter zu führen.

Ich möchte an dieser Stelle dem wissenschaftlichem Leiter der oceanographischen Kalypsso Expedition 1956, Prof. J. M. Pérès, sowie dem Commandanten J. Y. Cousteau, meinen herzlichsten Dank für das mir erwiesene Entgegenkommen aussprechen.

ΠΕΡΙΛΗΨΙΣ

Διὰ τοῦ κλασματικοῦ διαχωρισμοῦ τῶν χρωστικῶν τοῦ σπόγγου *Ectyon Oroides* κατέστη πιθανόν ὅτι τὸ ἐρυθροπορτοκαλλεόχρουν χρώμα αὐτοῦ ὀφείλεται εἰς τὴν παρουσίαν τοῦλάχιστον τριῶν διαφόρων χρωστικῶν. Ἡ χρωστικὴ τῆς ζώνης $A_1 II$, ἥτις χαρακτηρίζεται ἐκ θετικῆς μετὰ $SbCl_3$ ἀντιδράσεως, συγγενεῖται πιθανῶς, ὡς ἀποχρωματιζομένη καὶ διὰ H_2O_2 , πρὸς τὰς καροτινοειδεῖς ἐνώσεις. Ἀφ' ἐτέρου ἡ χρωστικὴ τῆς ζώνης $A_1 I$ ἂν καὶ δὲν δεικνύη μετὰ $SbCl_3$ θετικὴν ἀντίδρασιν, δεικνύει ὡς ἡ προηγουμένη τὴν αὐτὴν σχεδὸν μορφήν τῆς καμπύλης ἀπορροφήσεως, ὡς καὶ τὸ αὐτὸ χρώμα φθορισμοῦ εἰς τὸ ὑπεριώδες.

Αἱ ὑπόλοιποι ζῶναι τοῦ κλάσματος A_1 ἐνέχουν ἅπασαι, κατὰ πᾶσαν πιθανότητα, τὴν αὐτὴν ἀλλὰ διάφορον τῆς πρώτης χρωστικὴν. Τὸ διάφορον ὕψος τῶν φασματοφωτομετρικῶν καμπυλῶν ἀπορροφήσεως, αἵτινες δεικνύουν σχεδὸν τὰ αὐτὰ μέγιστα, ὀφείλεται εἰς τὴν διάφορον πυκνότητα τῶν ἐκλουομένων διαλυμάτων μιᾶς καὶ τῆς αὐτῆς ἐνώσεως.

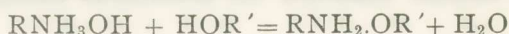
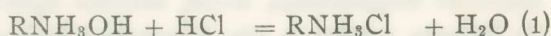
Τελείως διαφόρου συστάσεως εἶναι ἡ ἐκ τῆς ἀκετονικῆς ὑποφάσεως διὰ ἐκχειλίσεως διὰ μείγματος χλωροφορμίου-ἀμυλικῆς ἀλκοόλης ληφθεῖσα χρωστικὴ C. Ἡ χρωστικὴ αὕτη φαίνεται ὅτι ἀποτελεῖται ἐκ μείγματος δύο χρωστικῶν, τῶν ὁποίων ἡ μία διαλύεται εἰς τὸ χλωροφόρμιον φθορίζουσα πορτοκαλλεοχρόως πρὸς τὸ κίτρινον, ἡ δ' ἑτέρα, ἥτις εἶναι διαλυτὴ εἰς ἀπόλυτον αἰθυλικὴν ἀλκοόλην, φθορίζει λαμπρῶς κυανῶς μετ' ἐλαφροῦς ἰώδους ἀποχρώσεως. Μετὰ τὴν ἐξάτμισιν τῆς αἰθυλικῆς ἀλκοόλης παραμένει στερεὸν ὑπόλειμμα δεικνύον μικροσκοπικῶς σύστασιν ἐκ φυλλιδίων ἐρυθροκαστανοῦ χρώματος, ἅτινα ἀλλοιοῦνται εἰς 160° , ἀλλὰ δὲν δεικνύουν θερμαινόμενα μέχρι 240° σαφὲς σημεῖον τήξεως. Ἡ φασματοφωτομετρικὴ καμπύλη ἀπορροφήσεως τοῦ ἀλκοολικοῦ αὐτῶν διαλύματος δεικνύει διάφορον μορφήν ἐν σχέσει πρὸς τὰς καμπύλας τῶν ζωνῶν τοῦ κλάσματος A_1 .

Ἐνεκα τούτου κλίνομεν πρὸς τὴν γνώμην ὅτι ἡ εἰς τὴν ἀπόλυτον αἰθυλικὴν ἀλκοόλην διαλυομένη χρωστικὴ δεικνύει συγγενεῖς ἰδιότητας πρὸς τὰς ναφθοκινονικάς χρωστικάς τὰς ἀνευρισκομένας ἐντὸς τῶν θαλασσίων ἐχίνων, αἵτινες ὡσάυτως δεικνύουν κυανοῦν φθορισμὸν καὶ ὑψηλὰ σημεῖα τήξεως.

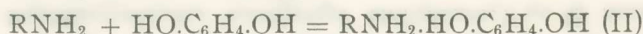
Δυστυχῶς αἱ μικραὶ ποσότητες σπόγγων ἐπὶ τῶν ὁποίων ἐπειραματίσθημεν, δὲν ἐπέτρεψαν τὴν περαιτέρω ἔρευναν ἐπὶ τῆς φύσεως τῶν ἀνωτέρω χρωστικῶν. Ἐπιφυλασσόμεθα νὰ ἐπανέλθωμεν ἐπὶ τοῦ θέματος τούτου ἐν τῷ προσεχεῖ μέλλοντι.

ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΕΙΑ. — Περί τοῦ χημισμού προσροφήσεως λιποδιαλυτῶν ὑδροξυλικῶν ἐνώσεων ὑπὸ ἀνιονανταλλακτικῶν ρητινῶν, ὑπὸ *Λυσίμ. καὶ Μαρίας Μπιρμπίλη - Νιννῆ* *. Ἀνεκοινώθη ὑπὸ Ἑμμ. Ἑμμανουήλ.

Αἱ λιποδιαλυταὶ ὑδροξυλικαὶ ἐνώσεις προσροθοῦνται ὑπὸ ἀνιονανταλλακτικῶν ρητικῶν, ἀσθενοῦς τύπου, ἐκ διαλυμάτων εἰς πετρελαϊκὸν αἰθέρα. Διὰ τὴν προσρόφησιν αὐτὴν ἀπαραίτητον εἶναι τὸ ὑδρογόνον τῆς ὑδροξυλικῆς ὁμάδος. Ἐὰν τὸ ὑδρογόνον τοῦτο ἀντικατασταθῇ ὑπὸ ἀλκυλίου, οὐδεμία προσρόφησις παρατηρεῖται (6). Πρὸς ἐξήγησιν τῆς προσροφήσεως ταύτης ὑπὸ τῆς ρητίνης, δὲν δυνάμεθα εἰς τὴν παροῦσαν περίπτωσιν νὰ δεχθῶμεν τὸν δι' ὕδατικά διαλύματα παραδεδεγμένον χημισμόν προσροφήσεως (1).



Πιθανώτερον εἶναι ὅτι ἡ ρητίνη δρᾷ διὰ μηχανισμοῦ προκαλοῦντος προσρόφησιν ὁλοκλήρου τοῦ μορίου (II).



Τοιαῦται προσροφήσεις ὁλοκλήρων μορίων ἔχουν παρατηρηθῇ ἐξ ὑδρογονανθράκων διὰ HCl , SO_2 , AlCl_3 , φαινόλην, ὑδροκινόνην καὶ ὀργανικὰ ὀξέα (I).

Τὰ λιπαρὰ ὀξέα προσροθοῦνται ἐξ ὑδρογονανθρακικῶν διαλυτῶν (ἀπρωτικῶν), εἰς τετραπλάσιον ποσότητα τῆς ἐξ ὕδατος παρατηρουμένης ἰσοδυνάμου προσροφήσεως ἀνοργάνων ὀξέων (ἀντίδρασις 1). Πρὸς ἐξήγησιν τῆς ὑπερβαίνουσας τὸ στοιχειομετρικὸν ἰσοδύναμον τῶν δραστικῶν ὁμάδων τῆς ρητίνης, προσροφήσεως, ὁ L. Hammet δέχεται ὅτι ἡ κατάστασις κατὰ τὴν προσρόφησιν αὐτὴν εἶναι μία συσσώρευσις (βοστρύχωσις clustering) τῶν πολικῶν μορίων τοῦ ὀργανικοῦ ὀξέος (ὀξικοῦ) πέριξ τῶν πολικῶν δραστικῶν ὁμάδων τῆς ρητίνης (2). Ἀξιοσημείωτον εἶναι ὅτι ἡ ὑψηλὴ αὐτὴ χωρητικότης ἐλαττοῦται εἰς τὰ φυσιολογικὰ περίπου ἐπίπεδα, ἐὰν χρησιμοποιηθῇ ὡς διαλύτης αἰθὴρ ἢ ἀλκοόλη. Οὕτω δι' ἀλλαγῆς τοῦ μὴ πολικοῦ διαλύτου ὑπὸ πολικοῦ ἐπέρχεται ἔκλουσις τῆς ἐπὶ πλεόν τοῦ στοιχειομετρικοῦ ἰσοδυνάμου ὑπὸ τῆς ρητίνης προσροφηθείσης ποσότητος λιπαρῶν ὀξέων.

Μία ἄλλη ἐξήγησις τῆς ὑπὲρ τὸ ὕδατικὸν στοιχειομετρικὸν ἰσοδύναμον προσροφήσεως εἶναι καὶ ὁ σχηματισμὸς δεσμοῦ ὑδρογόνου. Οὕτω κατὰ τὸν G. M. Barrow (3) ἡ ἀντίδρασις μεταξὺ πρωτονικῶν ὀξέων καὶ βάσεων ἐντὸς μὴ προκαλούντων διάστασιν διαλυτῶν ὀδηγεῖ εἰς τὸν σχηματισμὸν ἰοντικοῦ ζεύγους ἐξευγμένου διὰ δεσμοῦ

* LYSIM. and MARIA L. NINNIS, *The Chemism of absorption of the fat soluble hydroxyl compounds by anionexchange resins.*