

Rhythmus von den übrigen Fesseln, der bisher geltenden musikalischen Grundgesetze, zu befreien.

Insbesondere, selbige Komponisten suchen die Tonalität abzuschaffen und verstellen sie mit den Regeln eines neuen Zwölftonmusiksystems, wie sie Schönberg festgestellt hat.

Diese neuen Regeln sind, vielleicht mehr bändigend als die vorhergehenden. Von Natur selbst sind sie wider- und internationalistisch. Sie vertragen die Tönenbenutzung irgend einer Volksmusik nicht und infolgedessen verhindern sie die Entwicklung einer neuen Nationalmusikschule, die, ohne aus einem sicheren Attavismus quellen zu können, eine eigene Musik mit eigenartiger Personalität, wie sie die heutige neugriechische Musik, zu schaffen versucht.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΜΗ ΜΕΛΩΝ

BIOXHMEIA.— Beiträge zur Kenntnis der Natur der Proteine von Seetieren. Mitteilung IV. Über die Farbstoffe der *Aplysia depilans* *, von *Anast. A. Christomanos* **. Ἀνεκοινώθη ὑπὸ τοῦ κ. Γεωργ. Ἰωακείμογλου.

Die zu den Meeresschnecken bzw. Kugelschnecken gehörende Aplysien (*Apl. punctata*, *Apl. depilans*, *Apl. limacina*) sezernieren aus bestimmten Drüsen einen violeten Farbstoff, über dessen Natur noch Ungewissheit besteht.

Ziegler¹ hielt dieses Pigment als eine Mischung von Anilinfarbstoffen, Moseley² und Mc. Munn³ äussern sich im Sinne eines kompliziert gebauten Stoffes und Derrien und Turchini⁴ wollen dagegen in Aplysiafarbstoff einen Pyrrolabkömmling erkennen. Fontaine und Raffy⁵, und neuerdings

* Aus dem Forschungslaboratorium für Biochemie der Meerestiere. St. Georg, Limni, Euboea.

** ΑΝΑΣΤ. Α. ΧΡΗΣΤΟΜΑΝΟΣ, Συμβολαὶ εἰς τὴν μελέτην τῶν πρωτεϊνῶν τῶν θαλασσίων ζῴων. Ἀνακοίνωσις IV. Αἱ χρωστικαὶ τῆς *Aplysia depilans*.

1. Nach *E. Lederer*, Les Pigments des invertébrés. *Biol. Rev.* Vol. 15. p. 273. 1940.

2. *Ibidem*.

3. *Journ. Physiol.* 17, 245.

4. *Compt. rend. Soc. Biol. Paris.* 92, 1030.

5. *Bull. Soc. Zool. Franc.* 61, 49.

Lederer und Hutter¹ neigen dazu ihn als einen den Gallenfarbstoffen eng verwandten Pigment, anzusehen.

Wir haben in der vorliegenden Arbeit, die leider wegen Stoffmangels — es stand zu unserer Verfügung nur ein einziges, aber ziemlich grosses Tier der Gattung *Apl. depilans* — die gesetzten Ziele nicht vollkommen erschöpfen konnte, die Chromatographische und Spectrophotometrische Analyse des Pigmentes vorgenommen.

Experimentelles

Durch reizen des Tieres mittels eines Glasstabes konnten wir ca. 4 ccm. einer dickflüssigen eigentümlich riechenden, violettzinnerroten Flüssigkeit gewinnen, welche sich im destil. Wasser mit dunkelrotvioletter Farbe und Zinnerroten Fluorescenz löste. Das Filtrat, ca. 50 ccm., wurde im Vacuumexsiccator getrocknet, der Rückstand in destilliertem Wasser wieder aufgenommen, auf 90° erhitzt, filtriert und wiederum getrocknet.

Der dunkelviolette metallisch glänzende Rückstand löst sich mit intensiver violetter Farbe sowohl in Wasser, als auch in Chloroform.

Die Farbtonung der Lösung hängt von ihren pH ab. Aus nachstehender Tabelle ist dieses Verhalten in Citratpuffergemisch ersichtlich:

pH	Farbe	
unter 2.00	dunkelblau	} Durch Änderung des pH in einander reversibel
2.00 — 5.00	violettblau	
5.40	violettblau	
	mit rötlich. Tönung.	
5.90	rotviolett	
6.00 — 7.50	rotviolett	
8.00 — 12.30	granatroter	
über 12.30	graurosa	nicht reversibel

Ziemlich ähnlich verhalten sich auch die Chloroformlösungen des Pigmentes.

Die durch Erhitzen Ihres Chromoproteincharacters beraubte genuine Pigmenteiweißverbindung, verliert gleichzeitig ihr Fluorescenzvermögen. Dagegen tritt sofort nach Zusatz von alkoholischen Zinkacetat zur

1. Trans. mem. Soc. Chim. Biol., p. 1055-1061, 1942.

gereinigten Chloroformlösung des Pigmentes, ohne Jodzusat, die Zinnoberrote Fluorescenz auf.

Pyridin löst das Pigment mit roter Farbe auf, doch ist die Farbe nicht beständig, indem sie sich nach einiger Zeit bräunt. Ebenso wenig beständig, vor allem beim Verdunsten des Lösungsmittels über 40°, sind die Methyl- bzw. Aethylalkohollösungen.

In CS₂ löst sich der Farbstoff zum Teil, mit roter Farbe, die sich auch beim Verdunsten des CS₂, nicht ändert.

Spectroskopisch (subjectiv) ergaben die wässerigen bzw. Chloroformlösungen des Pigmentes drei Absorptionsbänder, von denen das im roten Teil des Spectrums auftretende, das intensivste war.

Die genaue Spectrophotometrische Analyse ergab die auf Fig. I angegebene Kurven, aus denen folgende Maxima bestimmt werden konnten:

Für die wässrige neutr. Lösung (A) 5450 und 4950 Å.

Für die wässrige saure Lösung (B) 5900, 5700 und 4940 Å.

Für die Chloroformlösung neutr. (C) 6100, 5350, 4975 und 3800 Å.

Für die CS₂ Lösung 5518 und 5125 Å.

Lederer hatte schon darauf aufmerksam gemacht, dass das genuine Aplysiapigment ein Mischpigment darstellt, und dass man durch CaCO₃ einen violetten und einen roten Farbstoff getrennt isolieren kann¹, die er an Anlehnung an den aus den Mesobilirubinogen entstehenden Farbstoffen, Mesobiliviolin und Mesobilirhodin, Aplysiaviolin und Aplysiarhodin benannte.

Aus Gründen die weiter unten dargelegt werden sollen, werden wir von Aplysiaviolett, bzw.—rot, sprechen, da wir Ihre engere Beziehungen zu den Gallenfarbstoffen nicht als gesichert ansehen können.

Zur Trennung der Farbstoffe aus dem genuinen Pigment gebrauchten wir eine Staubzuckersäule von 30 ccm. Länge, durch die nicht nur eine bessere Trennung des violetten und roten Pigments stattfand, sondern auch das Vorhandensein eines dritten grünblauen Farbstoffes festgestellt werden konnte.

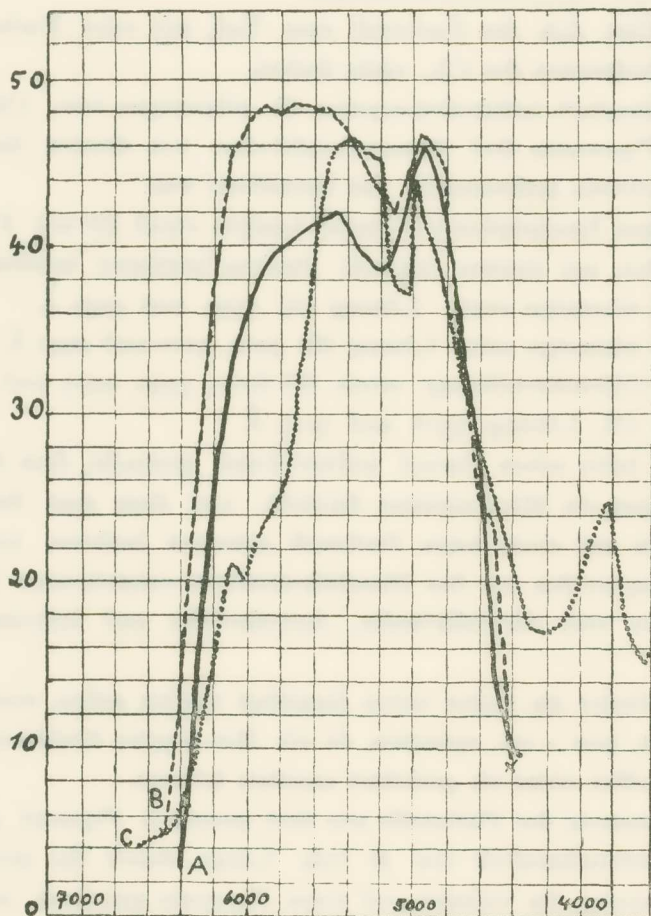
Im obersten Teil der Säule wird das Aplysiaviolett, und weiter unten das Aplysiarot—an Menge, um das drei bis vierfache des ersteren überwie-

1. Die Angaben Lederers beziehen sich auf Analysen der Pigmente der Gattung *Aplys. punctata*. *D. Fox*, *Animal Biochromes and Structural Colours*, London 1953. Cambridge University Press.

gend—, zurückgehalten. Weiter unten, am schnellsten wandernd, wird eine diffuse grünblaue Zone beobachtet.

Die Farbstoffschichten werden mechanisch getrennt und die Pigmente mit Methylalkohol bzw. Chloroform aufgenommen.

Die Methylalkoholischen Lösungen fluorescieren intensiv rot, ohne Zin-

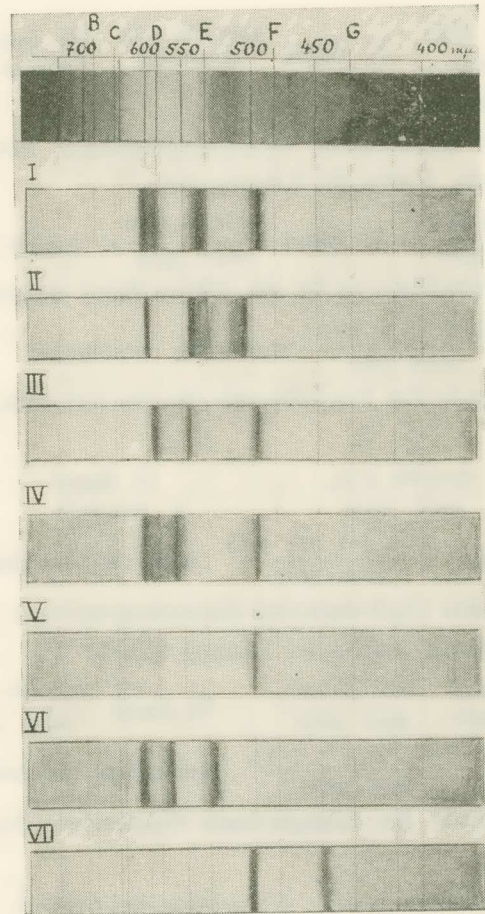


Ab. 1.

kacetatzusatz. Die Fluorescenz nimmt nach einigen Stunden ab, und verschwindet später vollkommen, dabei verblasst die Farbe der Lösungen etwas.

Zinkacetatzusatz verstärkt die Fluorescenz indem aber gleichzeitig die Fluorescenzfarbe nach Zinnoberrot wechselt,

Spektroskopisch subjectiv, ergaben die von der *Aplysia depilans* chromatographisch isolierten Farbstoffe in Chloroformlösung folgende Absorptionsbänder¹:



Ab. 2.

Spectrale Absorbtionsbänder.

I. Violetes genuines Mischpigment. II. Rotes Pigment. III. Violetes Pigment. IV. Blaues Pigment. V. Grünes Pigment. VI. Farbstoff der Rhizostoma Pulmo (s. Practica, Bd. 29, 1954, S. 53). VII. Farbstoff der Actinie Adamsia (s. Practica, Bd. 27, 1952, S. 443).

1. Für die violettgefärbte neutrale Lösung des genuinen Pigments in Chloroform:

1. Siehe Ab. 2.

I Band $\frac{6175 \text{ bis } 5755,}{\text{max. } 6000}$, II Band $\frac{5445 \text{ bis } 5237}{\text{max. } 5282}$ schwach III Band $\frac{5045 \text{ bis } 4890}{\text{max. } 4935}$
intensiv

Das entsprechende Zn- Komplexsalz fluoresciert rotbraun. In der Durchsicht blau.

I Band $\frac{6182 \text{ bis } 5775,}{\text{max. } 6045}$, II Band $\frac{5605 \text{ bis } 5402}{\text{max. } 5477}$ III Band $\frac{5135 \text{ bis ca. } 4938,}{\text{max. } 5050}$,
intensiv
violetes Ende beschattet.

2) Für das rote (Aplysiarot) chromatographisch isolierte Pigment in neutralen Chloroform, Farbe der Lösung rot:

I Band $\frac{6070 \text{ bis } 5820,}{\text{max. } 5910}$, II Band $\frac{5582 \text{ bis } 5170}{\text{max. } 5315}$, gegen Blau beschattet.
schwach

Bei grösseren Verdünnung ist ein drittes Band sichtbar

$\frac{5057 \text{ bis ca } 4965}{\text{max. } 5007}$ weiterhin beschattet.

Das entsprechende Zn- Komplexsalz fluoresciert rötlich. In der Durchsicht violettrosa:

I Band $\frac{6105 \text{ bis } 5735,}{\text{max. } 5950}$, II Band $\frac{5605 \text{ bis } 5435}{\text{max. } 5500}$
intensiv s. schwach

IIIBand $\frac{5183 \text{ bis ca. } 4915}{\text{max. } 5015}$ weiterhin beschattet.

3) Für das violette (Aplysiaviolett) chromatographisch isolierte Pigment, in neutralen Chloroform, Farbe der Lösung violett:

I Band $\frac{6100 \text{ bis } 5967,}{\text{max. } 5860}$, II Band $\frac{5510 \text{ bis } 5182}{\text{max. } 5290}$
intensiv

III Band $\frac{5085 \text{ bis ca. } 4845,}{\text{max. } 4925}$ weiterhin beschattet.

Das entsprechende Zn- Komplexsalz fluoresciert Zinnoberrot. In der Durchsicht hellblau.

I. Band. Eine sehr schwache Absorption bei 6280 \AA .

II Band $\frac{6045 \text{ bis } 5830,}{\text{max. } 5927}$, III Band, äusserst schwach bei 5440 \AA .

IV Band $\frac{5115 \text{ bis } 4960,}{\text{max. } 5040}$ weiterhin beschattet.

Lässt man durch die Chloroformlösung des genuinen Pigmentes, sowie durch diejenigen des aus ihm chromatographisch isolierten violetten und roten Teilpigmentes, für einige Minuten einen trockenen HCl Strom durchperlen, so beobachtet man dass die Farbe bei allen drei Farbstofflösungen nach einiger Zeit zu Dunkelblau umschlägt. Beim Verdunsten des Chloroforms bleibt ein schwarzblauer metallisch glänzender Rückstand der sich mit

unveränderter Farbe in Chloroform wieder auflöst. Spectroskopisch zeigt dieser Farbstoff folgende Absorptionsbänder :

Das rote Ende des Spectrums ist bis 6545 Å beschattet.

I Band $\frac{6200 \text{ bis } 5820}{\text{max. } 5950}$ II Band $\frac{5805 \text{ bis } 5355}{\text{max. } 5475}$
intensiv schwach

III Band $\frac{5040 \text{ bis } 4858}{\text{max. } 4927}$ unscharf, violetes Ende beschattet.

Das Zn-Komplexsalz fluoresciert rotbräunlich. In der Durchsicht grünlichblau. Es zeigt folgende Absorptionsbänder :

I Band $\frac{6122 \text{ bis } 5810}{\text{max. } 5982}$, II Band $\frac{5570 \text{ bis } 5465}{\text{max. } 5495}$
s. schwach

III Band $\frac{5165 \text{ bis } 4967}{\text{max. } 5055}$ violetes Ende beschattet ab 4920 Å.

Wird die Chloroformlösung des blauen Farbstoffes längere Zeit im Kühlschranks aufbewahrt, so verändert sich ihre Farbe zu grünblau unter gleichzeitiger Veränderung der Absorptionsbänder :

Das rote Ende des Spectrums ist bis 5583 Å beschattet, und zeigt ein schwaches Band $\frac{5005 \text{ bis } 4890}{\text{max. } 4955}$. Das Zn-Komplexsalz ist in der Durchsicht grün, und fluoresciert schwach gelblich, sein rotes Spectralende ist bis 6595 Å beschattet.

I Band $\frac{6370 \text{ bis } 6188}{\text{max. } 6255}$, II Band $\frac{5135 \text{ bis ca. } 4875}{\text{max. } 4983}$ (unklar)

Das violette Spectrumende ist ebenfalls beschattet.

Was den grünblauen am schnellsten in der Zuckersäule wandernden Farbstoff anbetrifft, so konnten wir wegen seiner äusserst geringen Konzentration, nur feststellen, dass seine Chloroformlösung eine starke Absorption im roten und violeten Spectralende aufweist.

Besprechung der Resultate.

Gestützt sowohl auf den negativen Ausfall der Gmelin'schen Reaction, sowie auf die rote Fluorescenz der frisch isolierten Pigmente, neigen wir zu der Ansicht, dass diese Farbstoffe eher zu den Porphyrinen, als zu den Gallenfarbstoffen zuzurechnen sind. Weiterhin möchten wir darauf hinweisen dass das Aplysiaviolett und -rot, zwei eng verwandte Stoffe darstellen, welche durch HCl, zu einem, beiden gemeinsamen, blauen Endproduct sich verwandeln lassen, welches ein ganz verschiedenes Spectroskopisches Verhalten aufweist.

Wir möchten weiterhin die Vermutung aussprechen dass der in geringer Menge aufgefundene und chromatographisch aus dem genuinen Aplysiapigment isolierte, dritte grünblauer Farbstoff, zu den grünen Porphyrinabkömmlingen gehört.

Die geringen Mengen des zur Untersuchung vorhandenen Pigmentes lassen leider diese Frage unbeantwortet. Weitere Untersuchungen müssen die Frage klären.

Zusammenfassung.

Aus dem violetten Excret eines Exemplares einer Mittelmeer Aplysia depilans wurde die genuine Farbstoffkomponente von ihrer Verbindung mit Protein durch Erhitzen getrennt. Die Farbe der wässrigen Lösung des Pigments erwies sich weitgehend von pH abhängig. Die violette Chloroformlösung des Farbstoffes zeigt folgende spectrophotometrisch bestimmte Maxima bei 6100, 5350, 4975 und 3800 Å.

Aus den genuinen Pigment wurden chromatographisch durch Adsorption an einer Staubzuckersäule drei verschiedene Farbstoffe isoliert. Ein violetter Farbstoff wird an den obersten Teil der Zuckersäule zurückgehalten während ein rotes Pigment schneller wandernd, das mittlere Teil der Säule einnimmt. Der dritte Grünblaue Farbstoff nimmt den untersten Teil der Säule ein. Die Elution erfolgt mit einer Chloroformmethylalkoholmischung (2 : 1). Der violette Farbstoff zeigt drei Absorptionsmaxima bei : 5860, 5290 und 4925 Å. Sein Zn-Komplexsalz bei 6280, 5927, 5440, und 5040 Å. Der rote Farbstoff zeigt entsprechende Maxima bei : 5910, 5315 und 5007 Å. Das Zn-Komplexsalz weist Maxima bei 5950, 5500 und 5015 Å. Der grünblaue, von uns isolierte Farbstoff, zeigt eine starke Absorption im roten und violetten Ende des Spectrums. Wegen seiner äusserst geringen Konzentration können keine nähere Angaben gemacht werden.

Die Methylalkoholische Lösungen der Pigmente fluorescieren mit Zinnoberroten Farbe, auch ohne Zn-acetat Zusatz.

Die Chloroformlösungen sowohl des genuinen Mischpigmentes, sowie diejenigen des violetten und roten (Aplysiaviolett und Aplysiarot) werden durch einen trockenen HCl Strom, zu einem tief blauen Farbstoff übergeführt mit Absorptionsmaxima bei : 5950, 5475, und 4927 Å. Das Zn-Komplexsalz fluoresciert rotbraunlich und weist drei Maxima bei 5982, 5495 und 5055 Å auf. Gleichzeitig sind beide Spectralenden stark beschattet.

Die tiefblaue Pigmentlösung ändert nach einiger Zeit ihre Farbe zu grünbläulich, gleichzeitig ändern sich die Ab/bänder. Der rote Teil des Spectrums ist bis 5583 Å, beschattet, mit einem Max. bei 4955 Å. Das Zn-Komplexsalz fluoresciert schwach gelblich und weist ausser einer Beschattung bis 6595 Å, zwei Maxima bei 6255 und 4983 Å auf.

Die beschriebene, von uns untersuchten Farbstoffe der *Aplysia depilans*, weisen ein negative bzw. atypische Gmelin'sche Reaction auf. Dieser Befund, sowie die rote Eigenfluorescenz der Methylalkohollösungen der Pigmente würden eher für ihre Porphyrinnatur sprechen.

Π Ε Ρ Ι Λ Η Ψ Ι Σ

Ἐκ τοῦ ἰώδους ἐκκρίματος ἐνὸς κοιλίου τῆς Μεσογείου θαλάσσης τοῦ εἴδους *Aplysia depilans* ἀπεχωρίσθη διὰ θερμάνσεως ἢ αὐτόχθων χρωστικῆ ἐκ τῆς μετὰ πρωτεΐνης ἐνώσεως αὐτῆς. Τὸ χρῶμα τοῦ ὕδατικοῦ διαλύματος τῆς χρωστικῆς ἔξαορτᾶται, ὡς διεπιστώθη, ἐκ τοῦ pH τοῦ διαλύματος. Τὸ ἐν χλωροφορμῷ ἰώδες διάλυμα τῆς χρωστικῆς δεικνύει διὰ τῆς φασματοφωτομετρικῆς μεθόδου μέγιστα εἰς 6100, 5350, 4975 καὶ 3800 Å.

Ἐκ τῆς χρωστικῆς ταύτης διεχωρίσθησαν διὰ χρωματογραφικῆς προσροφῆσεως ἐπὶ στήλης ἐκ κόνεως σακχάρου τρεῖς διάφοροι χρωστικά.

Μία ἰώδης χρωστικῆ, συγκρατεῖται ὑπὸ τοῦ ἀνωτάτου μέρους τῆς στήλης, ἐνῶ ἑτέρα ἐρυθρὰ χρωστικῆ, ταχύτερον τῆς πρώτης μετακινουμένη, καταλαμβάνει εἰς μεγαλύτεραν ἔκτασιν τὸ μέσον τῆς στήλης. Τέλος εἰς τὸ κατώτατον μέρος τῆς στήλης συγκρατεῖται ἡ τρίτη πρασινοκυανῆ χρωστικῆ. Ἡ ἔκλουσις γίνεται διὰ μείγματος χλωροφορμίου καὶ μεθυλικῆς ἄλκοόλης 2 : 1.

Ἡ ἰώδης χρωστικῆ δεικνύει φασματοσκοπικῶς τρία μέγιστα εἰς 5860, 5290 καὶ 4925 Å. Τὸ διὰ Zn- σύμπλοκον ἄλλας τῆς χρωστικῆς δεικνύει μέγιστα εἰς 6280, 5927, 5440 καὶ 5040 Å. Ἡ ἐρυθρὰ χρωστικῆ κέκτεται μέγιστα εἰς 5910, 5315 καὶ 5007 Å, τὸ δὲ διὰ Zn- σύμπλοκον ἄλλας αὐτῆς δεικνύει μέγιστα εἰς 5950, 5500 καὶ 5015 Å. Τέλος ἡ τρίτη πρασινοκυανῆ χρωστικῆ δεικνύει ἰσχυρὰν ἀπορρόφησιν εἰς τὸ ἐρυθρὸν καὶ ἰώδες. Δυστυχῶς ἔνεκα τῆς ἐλαχίστης αὐτῆς ποσότητος δὲν δύνανται νὰ δοθοῦν λεπτομερέστερα γνωρίσματα αὐτῆς.

Τὰ μεθυλικὰ ἀλκοολικὰ διαλύματα τῶν χρωστικῶν φθορίζουν μὲ ἐρυθρὰν ὀλίγον πρὸς τὸ πορτοκαλεόχρουν ἀποκλίνουσαν ἀπόχρωσιν, καὶ ἄνευ τῆς προσθήκης ὀξεικοῦ ψευδαργύρου.

Τὸ διὰ χλωροφορμίου διάλυμα τόσον τῆς αὐτοχθόνου χρωστικῆς, ὅσον καὶ τὰ διαλύματα τῶν ἐκ ταύτης ἀπομονωθείσων τριῶν νέων χρωστικῶν, μεταβάλλουν

διὰ ρεύματος ξηροῦ HCl τὸ χροῶμα αὐτῶν πρὸς βαθέως κυανοῦν. Ἡ οὕτω σχηματιζομένη νέα χρωστικὴ δεικνύει φασματοσκοπικῶς μέγιστα εἰς 5950, 5475 καὶ 4927 \AA , τὸ δὲ διὰ σύμπλοκον ἄλλας αὐτῆς φθορίζει ἐρυθροκαστανῶς μὲ τρία μέγιστα εἰς 5982, 5495 καὶ 5055 \AA . Συγχρόνως παρατηρεῖται μεγάλη ἀπορρόφησης εἰς τὰ δύο ἄκρα τοῦ ὄρατοῦ φάσματος. Μετὰ παρέλευσιν χρόνου τινὸς ἡ κυανῆ χρωστικὴ μεταπίπτει πρὸς πρασινοκυανῆν, ἣτις δεικνύει ἰδιόζουσαν ἀπορρόφησης εἰς τὸ ἐρυθρὸν ἄκρον μέχρις 5583 \AA , ὡς καὶ μόνον ἓν μέγιστον εἰς 4955 \AA . Τὸ διὰ Zn -ἄλλας δεικνύει ἀπορρόφησης τοῦ ἐρυθροῦ μέχρις 6595 \AA καὶ μέγιστα εἰς 6255 καὶ 4983 \AA .

Ἄπασαι αἱ ἀνωτέρω περιγραφεῖσαι χρωστικαὶ τῆς *Aplysia depilans* δεικνύουν ἀρνητικὴν ἢ τελείως ἄτυπον ἀντίδρασιν χολοχρωστικῶν κατὰ Gmelin. Ἐκ τοῦ γεγονότος τούτου καὶ τοῦ ἐρυθροῦ φθορισμοῦ τῶν χρωστικῶν νομίζομεν ὅτι αὗται συγγενεῖον μᾶλλον πρὸς τὰς πορφυρίνας ἢ πρὸς τὰς χολοχρωστικὰς*.

* Τὸν καθηγητὴν κ. Κ. Ἀλεξόπουλον εὐχαριστοῦμεν διὰ τὸν δανεισμὸν τοῦ φασματοκροῦ ὡς καὶ τὴν δίδα Εὐθυμίου διὰ τὴν πολύτιμον αὐτῆς βοήθειαν κατὰ τὴν διαβάθμισιν τοῦ ἀνωτέρω ὄργάνου.

Ἐοφείλομεν ἐπίσης χάριτας εἰς τὸν καθηγητὴν κ. Α. Ζέρβαν διὰ τὴν χρησιμοποίησιν τοῦ φασματομέτρου τοῦ ἐργαστηρίου του ὡς καὶ εἰς τὴν κ. Εἰρήνην Δηλάρη διὰ τὴν βοήθειαν ἣν παρέσχεν εἰς ἡμᾶς κατὰ τὰς μετρήσεις ταύτας.