

Über Ichthyopterin, einen blafluoreszierenden Stoff aus Fischhaut; von *Rudolf Hüttel* und *Gerhard Sprengling**).

Mit 2 Figuren im Text.

[Aus dem Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie
der Wissenschaften zu München.]

(Eingelaufen am 23. Januar 1943.)

Extrakte aus Elritzenhaut, wie sie bei den Anreicherungsversuchen des von Frischsches Schreckstoffes¹⁾ gewonnen werden²⁾, zeigen eine sehr starke violettblaue Fluoreszenz. Sie verschwindet auf Zusatz von Natriumhyposulfit und erscheint wieder beim Schütteln mit Luft. Auch durch Säuren und Alkalien wird sie reversibel gelöscht. Diese Eigenschaften, die auffallend an das Fluoreszenzverhalten des Lactoflavins (Vitamin B₂) erinnern, erschienen uns interessant genug, die Isolierung der zugrunde liegenden Substanz zu versuchen.

Die reversible Reduzierbarkeit, die p_H-Abhängigkeit, die Löslichkeitseigenschaften und das Adsorptionsverhalten der Blafluoreszenz zeigten uns bald, daß es sich bei unserer Substanz nicht um einen der schon genau bekannten blafluoreszierenden Naturstoffe handeln könne. Mit einem der vielen — allerdings kaum genügend charakterisierten — blafluoreszierenden Naturstoffe, denen im letzten Jahrzehnt ein gesteigertes Interesse dargebracht wurde, z. B. in Gelben Rüben³⁾, in Hefen⁴⁾, in der Netzhaut von Seefischen⁵⁾, in

*) Die Dissertation G. Sprengling, München 1941, bildet einen Teil dieser Arbeit.

¹⁾ Naturwiss. **26**, 601 (1938); **29**, 321 (1941); Z. vergl. Physiol. **29**, 46 (1941).

²⁾ R. Hüttel, Naturwiss. **29**, 333 (1941).

³⁾ F. H. Cohen, Chem. Weekbl. **32**, 441 (1935).

⁴⁾ L. B. Pett, Biochemic. J. **29**, 937 (1935).

⁵⁾ H. v. Euler u. E. Adler, H. **228**, 1 (1934).

Karpfenaugen⁶⁾, aus den Netzhäuten verschiedener Tiere⁷⁾, z. B. vom Rind⁸⁾, in Kaulquappen⁹⁾, im Corpus luteum der Kuh⁷⁾ ¹⁰⁾ und in den Pterin-Mutterlaugen aus Pieriden¹¹⁾, dürfte unsere Substanz — soweit ersichtlich — ebenfalls nicht identisch sein.

Im Jahre 1932 beschrieb A. Hadjioloff¹²⁾ eine blaufluoreszierende Schicht bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung von Fischhäuten, z. B. der Barbe. Wenn hierüber auch keine eingehenden chemischen Angaben vorliegen, so kann nach dem Ergebnis unserer Nachprüfung doch kein Zweifel bestehen, daß es sich hier um die gleiche Substanz wie aus Elritzenhaut handelt. Das gleiche gilt für die blaufluoreszierenden Substanzen, die M. Fontaine¹³⁾ in den Häuten anderer Fische nachgewiesen hat. Nicht alle Fische aber enthalten den blaufluoreszierenden Stoff; einige Arten besitzen statt dessen in der Haut eine Grünfluoreszenz, die von Fontaine gemäß ihren Eigenschaften mit großer Wahrscheinlichkeit dem Lactoflavin zugeordnet wird. Die Tab. 1 enthält die Beobachtungen von Hadjioloff, von Fontaine und unsere eigenen, soweit sie jeweils über die der Voruntersucher hinausgehen.

Tabelle 1.

I. Blaufluoreszenz

a) Beobachtungen von Hadjioloff:

Cypriniden. Barbe (*Barbus fluviatilis* L.), Bartgrundel (*Cobitis barbatulus* L.), Gründling (*Gobio fluviatilis* L.), Blei (*Abramis brama* L.), Hasel (*Leuciscus leuciscus* L.).

⁶⁾ A. Gourévitch, C. r. Séances Soc. Biol. Filiales Assoc. **127**, 214, 1061 (1938).

⁷⁾ H. v. Euler u. E. Adler, H. **223**, 105 (1934).

⁸⁾ H. v. Euler, H. Hellström u. E. Adler, Z. vergl. Physiol. **21**, 739 (1935).

⁹⁾ A. Gourévitch, C. r. Séances Soc. Biol. Filiales Assoc. **130**, 15 (1939).

¹⁰⁾ H. v. Euler u. K. M. Brandt, Naturwiss. **23**, 544 (1935).

¹¹⁾ C. Schöpf, A. Kottler u. R. Reichert, A. **539**, 168 (1939).

¹²⁾ A. Hadjioloff u. T. Kresteff, Bull. Histol. appl. **9**, 153 (1932).

¹³⁾ C. r. **204**, 1367 (1937); M. Fontaine u. R. G. Busnel, C. r. **204**, 1591 (1937); **206**, 372, 1679 (1938).

b) Beobachtungen von Fontaine:

Cypriniden. Karpfen (*Cyprinus carpio* L.), Goldfisch (*Carassius auratus* L.), Schleie (*Tinca vulgaris* Cuv.).

Labriden. Lippfisch (französ. Labre).

Spariden. Geißbrasse (französ. Sargue).

c) Eigene Beobachtungen:

Cypriniden. Elritze (*Phoxinus laevis* Ag.), Rotfeder (*Scardinius erythrophthalmus* L.), Bitterling (*Rhodeus amarus* Bl.), Laube (*Alburnus lucidus* Heck.), Plötze (*Leuciscus rutilus* L.), Blicke (*Blicca björkna* L.), Perlfisch (*Leuciscus Meidingeri* Heck.), Strömer (*Telestes agassizi* Heck.), Aitel (*Squalius cephalus* Heck.).

Cyprinodontiden. Xiphophorus helleri var. rubra.

Salmoniden. Bachforelle (*Salmo fario* L.), Saibling (*Salmo fontinalis* Mitch.), Huchen (*Salmo hucho* L.), Blaufelchen (*Coregonus wartmanni* Bl.), Gangfisch (*Coregonus macrophthalmus*), Kilch (*Coregonus acronus*).

Perciden. Flußbarsch (*Perca fluviatilis* L.)*).

Esociden. Hecht (*Esox lucius* L.)*).

Cottiden. Koppe (*Cottus gobio* L.)*).

II. Grüne**), bzw. keine Fluorescenz.

a) Beobachtungen von Fontaine:

Anguilliden. Aal (*Anguilla vulgaris* L.), Meeraal (französ. Congre).

Muraeniden. Muräne (französ. Murène).

Siluriden. Katzenwels (*Amiurus catus* L.).

Gasterosteiden. Stichling (*Gasterosteus aculeatus* L., var. leiurus).

Blenniiden. Schleimfisch (französ. Blennie).

b) Eigene Beobachtungen:

Siluriden. Wels (*Silurus glanis* L.), Zwergwels (*Amiurus nebulosus* Raf.).

Gadiden. Quappe (*Lota vulgaris* Cuv.), Kabeljau (*Gadus morrhua* L.), Schellfisch (*Melanogrammus aeglefinus* L.).

Pleuronectiden. Scholle (*Pleuronectes platessa* L.).

Petromyzontiden. Flußneunauge (*Petromyzon fluviatilis* L.).

*) Die Extrakte aus der Haut von Flußbarsch, Hecht und Koppe fluorescieren mehr weißlich-blau. Diese Fluorescenz ist viel schwächer als die violettblaue der Cypriniden (vgl. Tab. 2, S. 72). Es war uns bisher nicht möglich, der Frage der Identität der diesen beiden Fluorescenznuancen zugrunde liegenden Stoffe nachzugehen. p_H -Abhängigkeit und Redoxcharakter sind sich zumindest sehr ähnlich.

**) Die Identität des grünfluoreszierenden Stoffes mit Lactoflavin ist durch die Versuche von Fontaine nicht streng bewiesen. Man könnte z. B. auch an ein neues grünfluoreszierendes Pterin (vgl. Xanthopterin!) denken.

Es ist schwer aus dieser Aufstellung mehr herauszulesen, als daß die Anwesenheit der Blau- bzw. Grünfluorescenz eine Familieneigenschaft zu sein scheint. Von Interesse ist der Hinweis Fontaines, daß die Gruppe II nur Arten mit fehlendem bzw. gering entwickeltem Schuppenkleid umfaßt, was durch die von uns beigebrachten weiteren Beispiele bestätigt wird. Die schuppenlose Koppe allerdings gehört wiederum zur Gruppe I, wird aber besser in einer *Untergruppe* mit geringer weißlich-blauer Fluorescenz abgetrennt, der auch der stark beschuppte Flußbarsch und der Hecht angehören. Hier sind die Verhältnisse noch nicht geklärt.

Bezüglich der histologischen Lokalisierung des Fluoreszenzstoffes in der Fischhaut weichen die Angaben Hadjioloffs und Fontaines voneinander ab. Ersterer fand ihn in einer Bindegewebsschicht, die der Oberseite der Schuppen unmittelbar aufliegt, letzterer in den Melanophoren (beim Goldfisch in den gelben Pigmentzellen). Hadjioloffs Beobachtung würde mit der von Fontaine vermuteten Beziehung von Blaufluorescenz und Schuppenkleid gut übereinstimmen, Fontaines Angabe aber mehr mit unserem Befund, daß in der dunkel pigmentierten Rücken- und Schwanzflosse viel mehr des Fluoreszenzstoffes enthalten ist als in der hellen Bauchhaut und den dort befindlichen Flossen. Wir haben die Ergebnisse unserer quantitativen Messungen an verschiedenen Fischarten in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2.

Art	γ/g Frischgewicht						
	Rücken- haut	Rücken- flosse	Schwanz- flosse	Brust- flossen	Bauch- flossen	After- flosse	Bauch- haut
Elritze . . .	1000	700	540	290	165		67
Xiphophorus	610	—	400	350	—	—	59
Rotfeder . .	610	380	240	120	96	122	8
Hecht*) . .	43	17	13	< 1	< 1	< 1	< 1
Koppe*) . .	27	12	6	5	4		4

*) Wegen des Unterschiedes in der Fluoreszenzfarbe wurde hier mit dem Filter L 3 gemessen (über die Bestimmungsmethode vgl. im Versuchsteil). Die ohne Filter erhaltenen Werte liegen um etwa 85 Proc. höher. Als Absolutwerte sind diese Zahlen kaum zu brauchen.

Bemerkenswerterweise ist das Flavin der Aalhaut gleichfalls in den Melanophoren lokalisiert und kommt deshalb vorzugsweise ebenfalls in der Rückenhaut vor. Diese enthält 17—26 γ /g Frischhaut, die Bauchhaut weniger als 1 γ /g¹⁴).

Die *intakte* Haut eines lebenden Fisches fluoresciert weder blau noch grün. Aus der Tatsache, daß sowohl die Blau- als auch die Grünfluoreszenz erst nach Einwirkung von verdünnter Essigsäure erscheint, schloß Fontaine, daß der Fluoreszenzträger in beiden Fällen als Chromoproteid vorliege. Wir sind bezüglich der blauen Fluoreszenz durch zahlreiche Versuche an lebenden Elritzen zu einem anderen Schluß gekommen und glauben diesen auch auf die Grünfluoreszenz ausdehnen zu können. Schon sehr leichte Störungen genügen, um die Fluoreszenz der Elritzenhaut zum Vorschein zu bringen, z. B. ein leichter Schnitt in die Haut oder das Entfernen einer Schuppe mit der Pinzette. Wenn man eine Elritze ohne jede äußere Verletzung tötet, z. B. durch Einleiten von Stickstoff ins Wasser oder durch Erstickten an der Luft, so tritt unter der Analysenlampe sichtbare Fluoreszenz erst nach 1—2 Stunden langsam auf, offenbar mit Einsetzen autolytischer Prozesse. Alkohole, 1-proc. Formaldehyd- oder Urethanlösungen töten die Tiere fast momentan, wobei gleichzeitig die Fluoreszenz austritt. Verdünnte Säuren und Alkalien bringen die Fluoreszenz nur dann zum Vorschein, wenn die Schädigung des Tieres so weit geht, daß es innerhalb der Versuchsdauer (15 Minuten) stirbt. Dies geht aus folgender Aufstellung hervor:

Tabelle 3.

		Tod	Fluoreszenz
Schwefel- oder Essigsäure	n/10 n/100	nach 3—5 Minuten bleibt am Leben	sofort nach dem Tod keine
Natronlauge oder Ammoniak	n/10 n/100	nach 2 Minuten nach etwa 10 Minuten	sofort nach dem Tod schon vor dem Tod

Die Untersuchung des Einflusses von 10-proc. *Neutralsalzlösungen* auf lebende Elritzen hatte das interessante

¹⁴) M. Fontaine, C. r. 204, 1367 (1937).

Ergebnis, daß hierbei dem *Anion* die entscheidende Rolle zukommt. Nur *einwertige* Anionen rufen die Fluorescenz hervor, zwei- und dreiwertige sind ohne Wirkung. Dies erinnert daran, daß die Zellpermeabilität für einwertige Ionen viel größer ist als für mehrwertige. Auffallenderweise geht die Gerinnung des Hautschleimes mit dem Fluorescenzaustritt parallel. Die Wertigkeit des Kations ist unter den Versuchsbedingungen nicht von Einfluß. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengestellt:

Tabelle 4.

Salz	Tod nach Min	Fluorescenz	Hautschleim
NaCl	3—5	sofort stark	gerinnt
MgCl ₂	3—4	sofort stark	gerinnt
CaCl ₂	5	sofort stark	gerinnt
NaNO ₃	3	sofort stark	gerinnt
Ca(NO ₃) ₂	3	sofort stark	gerinnt
Na ₂ SO ₄	6—7	zunächst nicht sichtbar nach 30 Min. sehr schwach	gerinnt nicht
MgSO ₄	7	ebenso	gerinnt nicht
Na ₂ HPO ₄ (8 Proc.)	5	ebenso	gerinnt nicht

Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß es sich bei der Wirkung der Neutralsalzlösungen nicht um einen rein osmotischen Effekt (z. B. Zellsprengung) handelt, sondern vielleicht um eine spezifische Wirkung der Anionen auf das Eiweiß der Zellflüssigkeit oder der Zellmembran. Das erwähnte Verhalten des Hautschleimes legt diese Annahme nahe.

Wir suchten eine Entscheidung über den Bindungszustand des Fluorescenzstoffes in der Zelle durch die schonendste Methode der Zellsprengung herbeizuführen, durch Einfrieren der lebenden Elritze in flüssigem Stickstoff¹⁵⁾. Ein solches Tier fluoresciert sofort nach dem Auftauen der Hautoberfläche in Wasser sehr stark. Wir schließen daraus, daß die blaufluorescierende Substanz in der Zellflüssigkeit nach Maßgabe ihrer Löslichkeit frei vorhanden ist. Die intakte Haut fluoresciert aber nicht, weil die Substanz in den dunkel-

¹⁵⁾ F. Lynen, A. 539, 1 (1939).

gefärbten Chromatophoren lokalisiert ist; sie kann nur durch deren Zerstörung sichtbar gemacht werden.

Isolierung.

Den Fortschritt der Reinigung verfolgten wir durch Messung der Fluoreszenzstärke im Pulfrichphotometer mit der Analysenquarzlampe als Lichtquelle. Es sei die letzte der von uns durchgeführten Aufarbeitungen beschrieben.

Als Ausgangsmaterial dienten uns 3500 Weißfische (258 kg) aus dem Bodensee. Zur Verwendung kamen ausschließlich die Cypriniden *Leuciscus rutilus*, *Scardinius erythrophthalmus* und *Blicca björkna*. Die den frisch getöteten Tieren mit Pinzetten abgezogene Haut wog mitsamt den Schuppen frisch 26,6 kg. Sie wurde je nach Anfall mit etwa dem gleichen Gewicht Alkohol übergossen, der zur Konservierung und Vorextraktion diente. Der so entstehende, relativ verdünnte Alkohol nimmt wenig des Fluoreszenzstoffes auf, entfernt aber zahlreiche Begleitstoffe und denaturiert das Eiweiß, so daß die später erhaltenen Extrakte leichter zu behandeln sind.

Die Vorextraktion mit Alkohol wurde noch zweimal wiederholt, dann extrahierten wir die Häute siebenmal mit verdünnter Essigsäure bis zur praktisch völligen Erschöpfung. Nach Einengen der vereinigten Extrakte führten wir eine Vorfällung mit Alkohol durch und fällten dann in der eingedampften Lösung mit Oxalsäure eine große Menge aus den Schuppen in Lösung gegangenes Calcium aus. Das Filtrat vom Calciumoxalat brachte man mit Ammoniak auf p_H 8—9 und fällte dann unter Vermeidung eines Überschusses mit Bleiacetat, wobei durch Zusatz von Ammoniak das p_H konstant gehalten werden mußte. Der Bleiniederschlag wurde mit Schwefelsäure zerlegt und der Fluoreszenzstoff mit pyridinhaltigem Wasser vom Bleisulfat eluiert. Nach starkem Einengen dieser Lösung fiel der rohe Fluoreszenzstoff aus mit einem Substanzgehalt von etwa 15 Proc.

Die weitere Reinigung bestand darin, daß man die Substanz in Ammoniak löste, von Ungelöstem abfiltrierte und nun wieder ausfällte, indem man das Ammoniak durch

Einengen der Lösung i. V. entfernte. Nach dreimaliger Ausführung dieser Operation (unter Zusatz von Tierkohle) erhielten wir ein etwa 65-proc. Präparat. Das UV-Absorptionsspektrum dieses Konzentrats, das wir Fräulein Dr. F. Pruckner von der Technischen Hochschule verdanken, zeigte nun eine bemerkenswerte Analogie zu dem des *Leukopterins*¹⁶⁾ (vgl. Fig. 1, S. 77). Da die Löslichkeitseigenschaften und der hohe Stickstoffgehalt dieser Fraktion uns ohnehin eine Verwandtschaft mit den Pterinen nahegelegt hatten, empfahl es sich, die Weiterreinigung und schließliche Krystallisation nach den bei den Pterinen, speziell beim Leukopterin¹⁷⁾ ausgearbeiteten Methoden zu versuchen. Dies führte uns rasch zum Ziel.

Durch Einleiten von Kohlendioxyd in die alkalische Lösung der Substanz stellten wir zunächst das schwer lösliche saure Natriumsalz dar und bekamen, als wir dessen alkalische Lösung in siedende verdünnte Salzsäure eintropften, sofort ein reines, annähernd farbloses Krystallisat. Ausbeute 24 Proc. bei einem Gesamtgehalt der Frischhaut von 1,08 g. Die Anreicherung ist 26000-fach. Wir geben der Substanz den Namen Ichthyopterin.

Die analytische Zusammensetzung des Ichthyopterins entspricht der Formel $C_7H_8O_3N_4$. Bei den bekannten Schwierigkeiten der Pterinanalyse sei der Vorbehalt erlaubt, daß sie durch weitere Bestimmungen, vor allem auch an Derivaten, zu bestätigen oder zu berichtigen ist.

Wie schon erwähnt, ähnelt das UV-Absorptionsspektrum des Ichthyopterins, das wir in Fig. 1 wiedergeben, dem des Leukopterins $C_6H_5O_3N_5$ (I), das von Fräulein Dr. F. Pruckner nochmals gemessen wurde und ebenfalls in die Figur aufgenommen ist. Es bestehen aber im kurzwelligen Teil deutliche Unterschiede. Dagegen herrscht eine fast völlige Übereinstimmung in der Absorption des Ichthyopterins und des sog. „*Anhydroleukopterins*“¹⁸⁾, das in Wahrheit 8-Desoxy-

¹⁶⁾ H. Fromherz u. A. Kotzschmar, A. 534, 283 (1938).

¹⁷⁾ C. Schöpf u. H. Wieland, B. 59, 2067 (1926); H. Wieland u. Mitarb. A. 507, 226 (1933).

¹⁸⁾ H. Wieland u. Mitarb. A. 507, 237 (1933).

leukopterin¹⁹⁾ $C_8H_5O_2N_5$ (II) ist. Auch in den sonstigen Eigenschaften steht das Ichthyopterin dem 8-Desoxy-leukopterin (Isoxanthopterin) näher als dem Leukopterin.

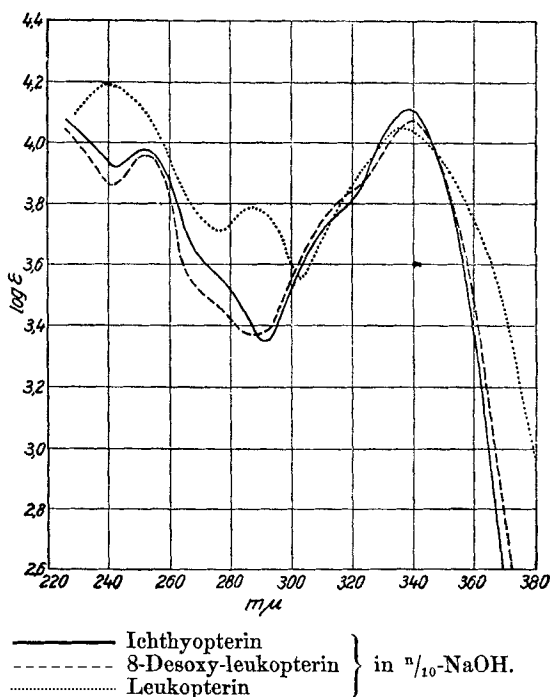
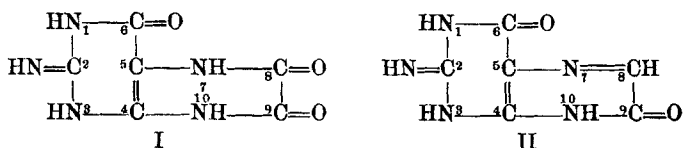


Fig. 1 *).

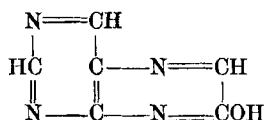
So zeigt es z. B. die charakteristische Redoxreaktion mit rauchender Jodwasserstoffsäure¹⁹⁾, die beim Leukopterin,

*) Ich danke Fräulein Dr. F. Pruckner u. Herrn Dr. R. Purrmann für die Erlaubnis, die Absorptionskurven des Leukopterins und Anhydroleukopterins an dieser Stelle zu veröffentlichen.

¹⁹⁾ H. Wieland, A. Tartter u. R. Purrmann, A. 545, 209 (1940); R. Purrmann, A. 548, 284 (1941).

Xanthopterin (= 9-Desoxy-leukopterin) und auch beim 6-Desoxy-leukopterin *nicht* auftritt. Nach R. Purrmann²⁰⁾, der außer den natürlichen Pterinen eine Reihe von weiteren Derivaten des Pteridins synthetisiert hat, darunter auch solche vom Typus des 8-Desoxy-leukopterins, ist diese Redoxreaktion spezifisch für diesen Typus. Die Fluoreszenz des Anhydroleukopterins ist von der des Ichthyopterins in der Farbe nicht zu unterscheiden, in der p_H -Abhängigkeit — in großen Zügen gemessen — und in der Intensität ihr gleich.

Trotz allem kann mit Bestimmtheit gesagt werden, daß die beiden Substanzen nicht identisch sind. Dazu sind die Analysenwerte, besonders die des Stickstoffes, zu verschieden. Mit sehr großer Wahrscheinlichkeit aber kann man dem Ichthyopterin das Chromophor des Anhydro-leukopterins zuerteilen, demzufolge es als ein Derivat des 9-Oxy-pteridins erscheint.



Aus den im ersten Teil dieser Arbeit erörterten Gründen halten wir es für interessant, einige für die biologische Funktion des Lacto-

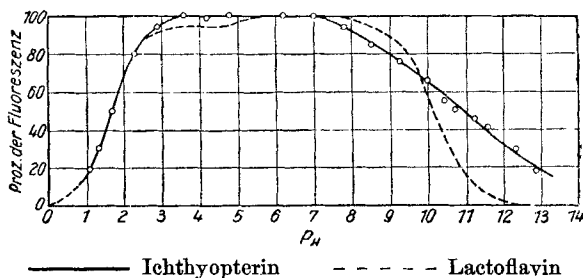


Fig. 2.

flavins wichtige Eigenschaften mit denen des Ichthyopterins zu vergleichen. In Fig. 2 ist die p_H -Abhängigkeit der Fluoreszenzen des Ichthyopterins und des Lactoflavins²¹⁾ eingezeichnet. Man sieht, daß

²⁰⁾ Privatmitteilung.

²¹⁾ R. Kuhn u. G. Moruzzi, B. **67**, 888 (1934).

sich beide Kurven recht ähneln, im sauren Abfall sogar identisch sind, während im alkalischen Gebiet die Übereinstimmung weniger gut ist.

Das *Redoxpotential* des Lactoflavins haben R. Kuhn und P. Boulanger²²⁾ zu $-0,185$ Volt (p_H 7; 20°) bestimmt. Das des Ichthyopterins dürfte nicht allzu weit davon entfernt liegen. Dafür spricht unsere Beobachtung, daß auch das Lactoflavin die Redoxreaktion mit Jodwasserstoffsäure gibt. Eine genauere Messung mit Redoxindikatoren, die wir auszuführen versuchten, halten wir wegen der geringen Löslichkeit des Pterins nicht für zuverlässig. Wir fanden für das Ichthyopterin ein Normalpotential E'_0 jenseits von $-0,3$ Volt. Wir werden dieser Frage, die uns im Zusammenhang mit Versuchen über die biologische Bedeutung interessiert, mit neuem Material nachgehen.

Wir danken Herrn Prof. von Frisch herzlich für Überlassung von Fischen und Benützung von Einrichtungen des Zoologischen Institutes. Dem Kaiser-Wilhelm-Institut für Seenforschung und Seenbewirtschaftung Langenargen a. B., besonders dem Kuratoriumsvorsitzenden Herrn E. Kauffmann, danken wir sehr für die Besorgung großer Mengen von Weißfischen und die Überlassung der Instituts-einrichtungen zur Benützung bei der Aufarbeitung. Die Bayerische Akademie der Wissenschaften unterstützte die Untersuchung durch Gewährung von Stiftungsmitteln.

Versuche.

Isolierung.

Meßverfahren. Die Stärke der Fluorescenz wurde im Pulfrich-photometer gemessen. Als Lichtquelle diente die Analysenquarzlampe, deren hinteres Fenster mit einem Schwarzglas versehen war. Als Vergleichslösung benützten wir eine vorgereinigte sterile Lösung des Ichthyopterins. Höhere Konzentrationen als etwa $0,8 \gamma/\text{cem}$ dürfen so nicht verglichen werden, weil dann keine lineare Proportionalität von Konzentration und Fluorescenz besteht. Es empfiehlt sich, die Fluorescenzhelligkeit der Standardlösung der der zu untersuchenden Lösung möglichst anzunähern, jedenfalls aber keine Lösungen zu vergleichen, deren schwächere weniger als 30 Proc. der Fluorescenz der stärkeren zeigt. Ein Filter ist unnötig, solange man gleiche Fluorescenzfarben vergleicht, was praktisch fast immer der Fall ist. Lediglich die Werte der Tab. 2 für Hecht und Koppe sind mit dem Filter L 3 gemessen. Für Vergleichsmessungen sei angegeben, daß der Zeißsche Fluorescenzstandard B einer Lösung entspricht, die $0,054 \gamma$ getrockneten Ichthyopterins im Kubikzentimeter enthält, gemessen in einer 30 mm langen Glasküvette (ohne Filter). Für den praktischen Gebrauch empfiehlt sich die Verwendung dieses Standards

²²⁾ B. 69, 1557 (1936).

nicht, wegen des Unterschiedes der Fluoreszenzfarbe, der die genaue Messung erschwert. Die untere Grenze der guten Meßbarkeit liegt bei etwa 0,04 γ Ichthyopterin/ccm bei Verwendung der 30 mm-Küvette.

Aufarbeitung. 26,6 kg Frischhaut (einschließlich der Schuppen) mit einem Gehalt von 1,08 g getrocknetem Ichthyopterin (im folgenden bedeuten die *kursiv* gedruckten Gewichtsangaben jeweils den Gehalt an Ichthyopterin) werden dreimal mit je 40 Liter Alkohol einige Tage stehen gelassen und dann siebenmal mit je 30 Liter verdünnter Essigsäure (zunächst mit 10, dann mit 5 und 4 Proc. Essigsäuregehalt) je 1 Tag extrahiert (990 mg), wobei die Ansätze durch etwas Toluol steril gehalten werden. Die vereinigten Extrakte werden i. V. stark eingeeengt und von 1,9 kg Niederschlag abzentrifugiert. Die Lösung (5,4 Liter, 950 mg) fällt man mit 11 Liter Alkohol, den entstehenden Niederschlag zentrifugiert man ab. Die Lösung (17 Liter, 915 mg) wird mit 850 g krystallisierter Oxalsäure versetzt und vom Calciumoxalat abgenutscht. Das Filtrat (885 mg) wird auf 4 Liter eingeeengt und mit Ammoniak auf p_H 8 bis 9 gebracht. Dann wird mit Bleiacetatlösung gefällt, wobei man durch weiteren Zusatz von Ammoniak den p_H -Wert in den angegebenen Grenzen hält. Ein Überschuß von Bleiacetat ist zu vermeiden; es sind etwa 380 g $PbAc_2 \cdot 3H_2O$ nötig. Der abzentrifugierte Niederschlag wird mit Schwefelsäure zerlegt und das Bleisulfat häufig mit einem Wasser-Pyridin-Gemisch (2:1) eluiert. Das Eluat (606 mg) befreit man mit Barytwasser von einem geringen Schwefelsäure-Überschuß und engt das Filtrat vom Bariumsulfat (538 mg) i. V. auf 300 ccm ein. Dabei entsteht ein Niederschlag (3,38 g, 520 mg), der abzentrifugiert wird. Dieser rohe Fluoreszenzstoff wird in verdünntem Ammoniak gelöst und von Unlöslichem (0,71 g) mit 15000 Touren abzentrifugiert. Nach Behandlung mit Tierkohle engt man die Lösung i. V. wieder ein. Durch Entfernen des Ammoniaks wird dabei die Substanz wieder ausgefällt und kann bei 15000 Touren abzentrifugiert werden: 1,61 g, (480 mg). Diese Operation wird noch zweimal wiederholt und so 488 mg (292 mg) angereicherten Ichthyopterins

erhalten. Man löst es in 8 ccm n/2-Natronlauge und fällt durch Sättigen mit Kohlendioxyd das gelbliche Natriumsalz (281 mg) aus. Dies wird in 18 ccm n/2-Natronlauge gelöst, mit Tierkohle filtriert und in 30 ccm siedende n-Salzsäure eingetropft. Das Ichthyopterin fällt krystallisiert aus: 274 mg (248 mg). Ausbeute also 24 Proc.

Eigenschaften. Das Ichthyopterin krystallisiert in fast farblosen, gelbstichigen dünnen Nadeln, die zu vielstrahligen Sternchen („Igeln“) vereinigt sind.

Analysen. Präparat I ist das oben erhaltene Krystallisat. Es wurde bei 60° i. V. getrocknet. Abnahme 9,52 Proc. II ist das durch je eine Fällung mit Kohlen- und Salzsäure weitergereinigte Präparat I. Trocknung bei 100° i. V., Abnahme 10,85 Proc. Substanz III und IV wurde nochmals über das Natriumsalz und zweimal mit Salzsäure gefällt. III wurde bei 140° i. Hochv. getrocknet. Abnahme 9,62 Proc. Da bei den Trocknungen eine geringfügige Dunklerfärbung eintrat, wurde IV nur bei Zimmertemperatur i. Hochv. getrocknet. Abnahme 8,27 Proc. (CH), 5,18 Proc. (N).

3,175, 3,834, 4,304, 4,410 mg Subst.: 4,959, 5,976, 6,715, 6,840 mg CO₂. 1,184, 1,385, 1,670, 1,810 mg H₂O. — 3,070, 3,673, 2,745, 3,748 mg Subst.: 0,714 (23°, 712 mm), 0,934 (22°, 720 mm), 0,675 (25°, 758 mm), 0,885 (23,5°, 758 mm) ccm N₂.

C ₇ H ₈ O ₃ N ₄ (196,2)	Ber.	C 42,86	H 4,11	N 28,56
	Gef. I	„ 42,62	„ 4,17	„ 27,76
	„ II	„ 42,54	„ 4,04	„ 27,88
	„ III	„ 42,58	„ 4,34	„ 28,11
	„ IV	„ 42,33	„ 4,59	„ 27,12

Substanz IV ist offenbar nicht völlig getrocknet.

Man sieht, daß eine weitere Reinigung auf diesem Weg nicht möglich ist; auch die Fluorescenzintensität wird durch das Umfällen nicht gesteigert.

Die Löslichkeit des Ichthyopterins in Wasser oder verdünnter Salzsäure beträgt etwa 0,3 mg/ccm. Die Folinsche Harnsäureprobe mit Phosphor-Wolframsäure fällt negativ aus. Die Substanz gibt eine sehr schwache Murexidreaktion, schwächer noch als Leukopterin. In konzentrierter Jodwasserstoffsäure löst sie sich unter Jodausscheidung, beim Verdünnen mit Wasser wird das Jod von der Leukoverbindung wieder reduziert.

Die Fluoreszenz des Ichthyopterins wird erregt vom Wellenbereich 265—390 $m\mu$, also vom Gebiet der langwelligsten Absorptionsbande. Das Fluoreszenzspektrum, das Fräulein Dr. Pruckner aufgenommen hat, zeigt eine breite verwaschene Bande von etwa 450—475 $m\mu$ und eine sehr schwache Bande im äußersten Rot bei etwa 690 $m\mu$.

p_H-Abhängigkeit der Fluoreszenz. Kurve vgl. Fig. 2, S. 78. Zum Einstellen des p_H diente Salzsäure für 1,08—1,35, Citrat-Salzsäure für 1,69—4,79, Phosphat für 6,22—7,78, Glykokoll-Natronlauge für 8,56—12,38 und Natronlauge für 12,90. Die Konzentration der Puffer war $m/20$, die des Ichthyopterins 0,5 γ/ccm . Ein Salzeffekt der Puffer war nicht zu bemerken. Die p_H-Werte wurden mit der Chinhydron- bzw. Wasserstoffelektrode gemessen.

Redoxpotential. Verwendet wurden 0,02-proc. Farbstofflösungen in $m/16$ -Phosphatpuffer von p_H 7. Von diesen Lösungen wurden je 2 ccm in einem Schenkel eines zweischenkelligen evakuierbaren Rohres mit Natriumhyposulfitlösung entfärbt und nun so lange mit Luft geschüttelt, bis die Farbe des Indikators gerade wieder auftrat. Nun wurde evakuiert und die Lösung in den zweiten Schenkel gekippt, in dem sich festes Ichthyopterin befand und 10 Minuten lang geschüttelt. In einem Blindversuch wurde festgestellt, daß sich unter diesen Umständen etwa 150 γ Ichthyopterin pro Kubikzentimeter auflösen. Keiner der geprüften reduzierten Indikatoren, deren negativster Neutralrot ($E'_0 = -0,32$ Volt) war, konnte Ichthyopterin reduzieren. 8-Desoxy-leukopterin verhielt sich entsprechend. Im Kontrollversuch oxydierte Lactoflavin Leuko-Safranin T ($E'_0 = -0,29$ Volt), nicht aber Leuko-Indigo-disulfonat ($E'_0 = -0,11$ Volt).

(Abgeschlossen am 9. März 1943.)