

krankheit. Berlin 1917. — 13. Schweitzer, Sekretinwirkung von Hydrolysaten pflanzlicher Stoffe. (Manuskript.) — 14. Underhill, Journ. of Biolog. Chemistry Bd. 17, S. 293. — 15. Derselbe, Journ. of Biolog. Chemistry Bd. 17, S. 296. — 16. Derselbe und Fine, Journ. of Biolog. Chemistry Bd. 10, S. 271. — 17. Uhlmann, Beiträge zur Pharmakologie der Vitamine. (Habilitationsschrift.) München 1918.

IX.

Über die Darstellung und einige Eigenschaften des pathologischen Melanins.

(Aus der chemischen Abteilung des Pathologischen Instituts der Universität.)

Von

Prof. E. Salkowski, Abteilungsvorsteher.

In den beiden letzten Jahren habe ich vielfach Gelegenheit gehabt, mich mit der Isolierung schwarzer bzw. braunschwarzer Pigmente der Darmschleimhaut und melanotischer Geschwülste zu beschäftigen. Die dabei gemachten Erfahrungen und Beobachtungen über einige Eigenschaften der erhaltenen Pigmente möchte ich im folgenden mitteilen.

Bei der Reindarstellung haben wir ähnliche Schwierigkeiten zu überwinden, wie der Organismus bei der Nutzbarmachung fettreichen Fleisches oder anderer fettricher Gewebe der Nahrung. Der Darmkanal wird mit dieser Aufgabe nach einer Richtung hin in bewundernswertem Grade fertig, nämlich mit der Verdauung und Resorption des Eiweißes, mit der andern, der Nutzbarmachung des Fettes dagegen nicht. Während die normalen Faeces kaum nachweisbare Spuren von Pepton enthalten — eine merkliche Steigerung der Menge desselben weist immer auf Störungen des Verdauungsvorganges hin — und auch nur winzige Mengen von der Verdauung entgangenen Muskelfasern, sind sie niemals frei von Fett, was, nebenbei bemerkt, auf eine größere physiologische Dignität des Eiweißes gegenüber dem Fett hinweist. In Beziehung auf das Fett sind nun die chemischen Methoden den Verdauungssäften überlegen: wir können das Fett direkt in Lösung bringen, immerhin ist die Reindarstellung des Pigments schwierig. Es gelingt nicht, das Eiweiß aus dem möglichst zerkleinerten Material durch künstliche Verdauung, auch wenn sie noch so lange fortgesetzt und mehrfach wiederholt wird, vollständig in Lösung zu bringen, und ebensowenig können wir durch wiederholte Behandlung mit Äther das Fett vollständig herauslösen, das ist nur durch alternierende Behandlung mit den angegebenen Lösungsmitteln möglich, weil Eiweiß und Fett sich gegenseitig durchdringen und dadurch dem betreffenden Lösungsmittel ein Teil seiner Wirksamkeit geraubt wird. Als sehr wichtiges Mittel zur Isolierung kommt dann noch die Löslichkeit des Pigments in schwacher Natronlauge und Fallbarkeit aus dieser Lösung durch Säuren hinzu. Der allgemeine Gang der Isolierung war danach folgender.

In erster Linie handelt es sich um möglichste Beseitigung des Eiweißes durch lange fortgesetzte Verdauung bei 40° mit künstlichem Magensaft. Derselbe war anfangs aus 5 l Wasser, 50 ccm offizineller Salzsäure von 1,126 D und 10 g Pepsin (Finzelberg) zusammengesetzt, später, als der Vorrat von diesem vorzüglich wirksamen Pepsin knapper wurde, wurde die Menge desselben etwas vermindert, ohne daß übrigens eine Abnahme der verdauenden Wirkung zu bemerken war. Von dem Gemisch wurde das Zehnfache der Quantität des zu verdauenden Materials angewendet, öfters auch mehr. Zu diesen ersten Verdauungen konnte man das Pepsin in Substanz anwenden, später, d. h. bei der letzten Reinigung durch Pepsinsalzsäure, mußte das natürlich vermieden werden, um nicht Eiweiß unnötig hineinzubringen. Zur Herstellung der Verdauungsflüssigkeit wurde z. B. 2 g Pepsin in der Reibschale mit einer kleinen Quantität von 200 ccm einer Salzsäuremischung von der angegebener Konzentration verrieben, allmählich der Rest hinzugesetzt und unter öfterem Schütteln 24 Stunden stehen gelassen, dann filtriert.

Nach einigen Tagen der Digestion ließ sich der größte Teil der Lösung mit einem Teil des Fettes von dem Unverdauten abgießen, das dann aufs neue der Verdauung unterworfen wurde ¹⁾. Die weitere Behandlung war etwas verschieden: anfangs versuchte man zur vorläufigen Entfernung des Fettes den verdauten Brei mit Äther auszuschütteln, sehr bald aber wurde diese Behandlung unterlassen, weil sie sich als schwer ausführbar und vor allem zu teuer erwies, da ein großer Teil des Äthers in dem Brei zurückblieb, der unverdaute Rückstand vielmehr abfiltriert — die Filtration erforderte viel Zeit — einigermaßen gewaschen und in Alkohol absolut. gebracht. Nach längerem Stehen, mindestens 24 Stunden, wurde abfiltriert und der Filterrückstand, ohne ihn vom Filter zu nehmen, 10 Stunden am Soxhlet-Apparat mit Äther extrahiert. Nunmehr ließ sich die trockene Masse gut vom Filter nehmen. Sie wurde mit kleinen, dann steigenden Mengen 2 bis 3 prozentiger Natronlauge in der Reibschale angerieben, gelinde erwärmt und filtriert. Auch diese Filtration erforderte viel Zeit, es mußte in der Regel auch das Filter gewechselt, öfters auch auf völlige Filtration des Restes verzichtet, ein Teil also verloren gegeben werden. Das alkalische Filtrat wurde mit Salzsäure angesäuert, die entstandene Fällung auf einem gehärteten Filter gesammelt und aufs neue der Verdauung mit Pepsinsalzsäurelösung unterworfen, nach 24 Stunden die Lösung von dem am Boden liegenden Pigment abgegossen und die Lösung durch die Biuretreaktion auf Peptongehalt geprüft. Meistens war solches vorhanden, und es wurde dann die Verdauung wiederholt, so lange, bis die überstehende Flüssigkeit keine Biuretreaktion mehr gab. Die Anwendung eines gehärteten Filters ist unerlässlich, weil sonst eine Verunreinigung des Präparates mit Papierfasern unvermeidlich ist. War die Biuretreaktion negativ, so wurde das

¹⁾ Anfangs wurde die halbverdaute Masse durch ein Sieb gerieben, dieses Verfahren jedoch bald aufgegeben.

Pigment abfiltriert und so lange gewaschen, bis das Waschwasser mit Silbernitrat und Salpetersäure keine oder nur minimale Trübung gab, dann das Pigment mit Alkohol absol. in einem verschließbaren Zylinder gespült, 24 Stunden stehen gelassen, dann in Äther gebracht und am nächsten Tage wieder abfiltriert. Da es sich bei der Verarbeitung des Pigments aus den Därmen immer nur um sehr kleine Mengen Pigment handelte, bestand eine Schwierigkeit darin, diese kleinen Mengen vom Filter zu bringen. Sie wurde dadurch umgangen, daß man den Fettrückstand mit Äther in ein Schälchen spritzte und der freiwilligen Verdunstung überließ ¹⁾. Es ist besonderes Gewicht darauf zu legen, daß man, wenn das Pigment nicht noch einmal in Lösung gebracht werden soll, gehärtete Filter anwendet, da sonst eine Verunreinigung mit Papierfasern nicht zu vermeiden ist.

Dieses Verfahren reicht aus, wenn es sich um die Isolierung des Pigments aus Därmen handelt, deren Schleimhaut mehr oder weniger schwarz gefärbt erscheint. Um wie geringe Mengen von Pigment es sich dabei handelt, mögen einige Zahlen zeigen:

315 g Dünndarm (Fall 307, 1918)	gaben 0,0684 g Pigment,
215 g Dickdarm (Fall 307, 1918)	„ 0,1840 g Pigment,
150 g Dünndarm (Fall 316, 1918)	„ 0,1316 g Pigment,
165 g Dickdarm (Fall 316, 1918)	„ 0,0824 g Pigment,
160 g Blinndarm (Fall 369, 1918)	„ 0,0242 g Pigment.

Im ganzen haben also 995 g Darm nur 0,4406 g Melanin gegeben = 0,044 %. Das ist gewiß sehr auffallend gegenüber der starken Färbung der Darmschleimhaut, indessen beruht die schwarze Färbung zum großen Teil auf einem Gehalt der Schleimhaut an Schwefeleisen. Dementsprechend zeigte sich die Verdauungsflüssigkeit auch stets stark eisenhaltig. Es kommt weiterhin in Betracht, daß mehr oder weniger große Verluste bei der Darstellung des Melanins unvermeidlich sind.

Da Melanin aus dem Darm wohl kaum schon einmal untersucht worden ist, habe ich die kleinen Mengen zu einigen Proben benutzt.

1. Im Glühröhrchen erhitzt, gab das Melanin Pyrrolreaktion, kenntlich an der Rotfärbung eines eingeschobenen mit Salzsäure benetzten Fichtenspahns.
2. Es gab die Siegfriedsche Probe auf Schwefelgehalt: beim Erhitzen im Glühröhrchen schwärzten die Dämpfe einen eingeschobenen mit Bleiessig getränkten abgedrückten und dann zusammengefalteten Streifen Filterpapier.
3. Es braucht kaum erwähnt zu werden, daß die Dämpfe auch Ammoniak enthielten.
4. Die Untersuchung auf Eisengehalt wurde dadurch erschwert, daß die Salzsäure selbst nicht völlig eisenfrei war. Kleine Proben wurden in der Platinschale verascht (der Rückstand schien aus Kieselsäure zu bestehen), die Asche mit 1 ccm Salzsäure übergossen, auf 10 ccm verdünnt, ebenso wurde 1 ccm Salzsäure für sich auf 10 ccm verdünnt, mit beiden Proben wurde die Ferrocyanalkaliumprobe angestellt: sie schien aus der Ascheprobe etwas stärker zu sein.

In 0,1299 g bei 110° getrockneter Substanz wurde in der üblichen Weise durch Schmelzen mit Salpetermischung usw. der Schwefelgehalt bestimmt. Es wurden erhalten 0,0128 g Baryumsulfat. Daraus berechnet sich der Schwefelgehalt zu 1,38%.

¹⁾ Anfangs wurde dazu Alkohol genommen und der Alkohol auf dem Wasserbad verdampft. Dabei stellte sich aber der Überstand heraus, daß das Pigment zum Teil ein pseudokristallinisches Aussehen annahm. Ein kleiner Teil ging dabei auch mit bräunlicher Farbe in Lösung, wie das Aussehen des Schälchens nach dem Abdampfen zeigte.

Noch in einer Reihe weiterer Fälle wurde aus Därmen mit schwärzlich gefärbter Schleimhaut das Pigment dargestellt. Die erhaltenen Quantitäten bewegen sich ganz in den angegebenen Zahlenwerten oder wenig darüber, es erübrigt sich daher wohl, auf Einzelheiten einzugehen. Nicht unerwähnt möchte ich lassen, daß der schwarze Farbstoff häufig durch Natronlauge nicht völlig gelöst wurde, ein Umstand, der sich bei der Verarbeitung melanotischer Geschwülste in erhöhtem Grade bemerkbar machte, sowie ferner, daß in einem Fall von bräunlich gefärbter Schleimhaut (Fall 344, 1919) die durch die Verdauung entstandene Lösung sich in erheblichem Grade bräunlich gefärbt zeigte. Sie wurde daher mit Natriumkarbonat neutralisiert und auf dem Wasserbad zum Trocknen gedampft, der Rückstand mit Alkohol behandelt. Der Alkohol nahm einen braunen Farbstoff auf, ohne daß indessen an dieser Lösung irgendwelche charakteristischen Eigenschaften festgestellt werden könnten. Bei der Verarbeitung des Verdauungsrückstandes wurde in diesem Falle nur eine äußerst kleine in Alkohol zum Teil löslichen Farbstoffs von braunschwarzer Farbe erhalten.

Bezüglich sämtlicher Präparate ist noch zu bemerken, daß der Verdacht einer Verunreinigung durch Hämatin nahe liegt. Es zeigte sich indessen, daß dieser Verdacht unbegründet ist. Die alkalische Lösung der Melanin-Präparate bewirkte in der Kälte keine Zersetzung von Wasserstoffsuperoxyd unter Aufschäumen, wie dies nach meinen Beobachtungen¹⁾ beim Hämatin schon in der Kälte der Fall ist; dies ist nicht gerade an allen Präparaten festgestellt, aber doch an sehr vielen. Das Hämatin ist offenbar in die Verdauungslösung übergegangen, was nur im beschränkteren Grade der Fall ist, wenn man Blut selbst kurze Zeit der Verdauung unterwirft.

Während sich das angegebene Verfahren bei den kleinen Mengen Pigment im Darm als ausreichend zeigte, war das bei den eigentlichen melanotischen Geschwülsten nicht der Fall. Auch frühere Autoren haben diese Schwierigkeit empfunden und sich zur Beseitigung derselben eines Mittels bedient, das, wenn überhaupt, nur mit äußerster Beschränkung angewendet werden darf, nämlich des Erhitzens mit rauchender Salzsäure. Allerdings kommt man damit schneller und besser zum Ziel, es ist aber bekannt, daß sich aus allen Eiweißkörpern dabei neben den in Lösung gehenden Mono- und Diaminosäuren ein schwarzes, Melanoidin genanntes Pigment bildet, wie jeder weiß, der einmal eine Hydrolyse von Eiweiß mit rauchender Salzsäure ausgeführt hat. Aus der Benennung geht schon die große äußerliche Ähnlichkeit mit dem pathologischen Melanin hervor, und es ist daher nicht verständlich, wie namentlich v. Fürth und seine Schüler zur Isolierung des Melanins stundenlanges Erhitzen der Organe mit rauchender Salzsäure haben anwenden können. Es unterliegt nicht dem mindesten Zweifel, daß die von ihnen dargestellten Präparate zum großen Teil künstliche gewesen sind. Wenn sich nun auch später eine sehr nahe Übereinstimmung des pathologischen Melanins mit dem Melanoidin in der Elementarzusammensetzung herausgestellt hat, so beweist das noch nichts für die innere Konstitution, auf die Fürth aus seinen Präparaten Schluß zieht. Auch ich habe bei der Darstellung des Melanins einmal Erhitzen mit starker Salzsäure angewendet, die Zeitspanne des Erhitzens aber auf 10 Minuten beschränkt, nachdem ich mich überzeugt hatte, daß in dieser Zeit eine Farbstoffbildung aus Eiweiß nicht eintritt, spätere Versuche von Braun und Schmidtmann (siehe die folgende Arbeit) haben ergeben, daß man auch bei den Melanomen ohne Erhitzen mit Salzsäure zu reinen Präparaten gelangen

¹⁾ Biochem. Zeitschr. Bd. 320. 348 (1911).

kann. Die Erhitzung mit Salzsäure wurde an der Stelle eingeschoben, wo sonst die Behandlung mit Alkohol einsetzte, die Salzsäure wurde natürlich vor der Behandlung mit Alkohol gut ausgewaschen. Eine zweite Schwierigkeit ergab sich bei größeren Melaninmengen dadurch, daß es nicht gelang, das Pigment völlig frei von Eiweiß und Fett zu erhalten. Für das Fett ist es ja bekannt, daß es sich aus trockener, pulverförmiger Substanz, wenn ihre Quantität irgend erheblich ist, auch durch noch so lange Extraktion mit Äther in der Wärme nicht vollständig entfernen läßt; als Methode zur quantitativen Bestimmung des Fettes ist ja auch die Extraktion pulverförmiger Substanzen vollständig verlassen, soweit es sich nicht um Annäherungswerte handelt. Beim Nachdenken über ein Lösungsmittel, das imstande wäre, Fett und Eiweiß gleichzeitig, wenn auch nur in beschränkter Quantität, zu lösen, ohne das Pigment zu verändern, verfiel ich auf die Behandlung mit Eisessig in der Hitze. Dieses Verfahren erwies sich in der Tat nicht nur als äußerst erfolgreich, sondern gestattete auch das Freisein von Eiweiß und Fett mit Sicherheit festzustellen. Verdünnt man eine Probe des eisessigsauren Filtrats mit Wasser, so darf es sich nicht trüben — das zeigt die Gegenwart von Fett in demselben an, die Abwesenheit von Eiweiß läßt sich dadurch feststellen, daß man das Filtrat verdünnt, mit $\frac{1}{3}$ des Volumens gesättigter Kochsalzlösung versetzt und zum Sieden erhitzt: es darf keine Trübung oder gar Ausscheidung von geionnenem Eiweiß in Flockenform eintreten. Genügt das Filtrat diesen Anforderungen nicht, so muß das Erhitzen mit Eisessig wiederholt werden. Unterworfen wurde das Präparat der Eisessigbehandlung in dem Stadium, wo es gründlich mit Äther im Soxleth behandelt, dann einer nochmaligen Verdauung unterworfen und wiederum mit Alkohol und Äther entwässert als schwarzes Pulver vorlag. Hatte die eventuell wiederholte Behandlung mit Eisessig die Abwesenheit von Eiweiß und Fett ergeben, so wurde zuerst mit gewöhnlicher Essigsäure, dann mit Wasser nachgewaschen, schließlich aufs neue mit Alkohol und Äther entwässert, vom Filter (gehärteten) genommen und in einer glasierten Reibschale trocken gerieben. Es muß zugegeben werden, daß dieses Verfahren lästig und umständlich, unter den jetzigen Verhältnissen auch recht teuer ist, es ist mir aber nicht gelungen, auf einem andern Wege zu eiweiß- und fettfreien Präparaten zu gelangen. Von einer Veränderung des Melanins durch die Essigsäure kann wohl kaum die Rede sein, wohl aber von einem Verlust. Die eisessigsaure Lösung ist braun gefärbt und hinterläßt beim Verdunsten auf dem Wasserbad einen braunen, ziemlich spröden, harzartigen Rückstand.

Es ist im Vorhergehenden schon erwähnt worden, daß ein Teil des Melanins bei der Behandlung mit 3prozentiger Natronlauge, selbst in der Wärme, nicht in Lösung ging, in weit höherem Maße zeigte sich dies bei den eigentlichen Melanomen.

Es handelte sich um 2 Fälle: 1. eine melanotische Leber im Gewicht von 1600 g (Nr. 269, 1919) und um melanotische Lymphdrüsen aus dem Abdomen (Nr. 368, 1919), über deren Gewicht ich leider keine Notiz mehr finden kann, das aber sehr erheblich gewesen sein muß, da zur Verdauung 3 große Flaschen von 5—6 l Inhalt

gebraucht wurden. Aus der Leber wurden 1,7 g lösliches und 1,45 g unlösliches Melanin, zusammen also 3,15 g, erhalten, aus den melanotischen Lymphdrüsen 3,1 g lösliches und 1,9 g unlösliches, zusammen also 5 g. Die Verunreinigung der unlöslichen Melanine mit Papierfasern ist nicht ganz ausgeschlossen, wie bei allen, als „Rückstand“ von einer Anzahl chemischer Operationen erhaltenen Präparaten, da man nicht von Anfang an gehärtete Filter verwenden kann; das würde im vorliegenden Falle die Arbeit ins Unendliche vermehrt, vielleicht (bei der Langsamkeit der Filtrationen) die Darstellung überhaupt unmöglich gemacht haben. Es wäre vielleicht ausführbar gewesen, die Papierfasern noch durch nachträgliche Behandlung mit Kupferoxydammoniak zu beseitigen, auf diese Behandlung würde aber verzichtet, da mit Sicherheit vorauszusehen war, daß die Präparate dabei Kupfer adsorbieren würden. Das „unlösliche“ Melanin war übrigens auch in 15 prozentiger Natronlauge unlöslich.

Es seien mir nun noch einige Bemerkungen über das menschliche pathologische Melanin gestattet, wie ich ausdrücklich bemerke, nur über dieses, sie werden bezüglich der von mir selbst angestellten Versuche kurz ausfallen, da die Zeit bis zur Ablieferung des Manuskripts ein näheres Eingehen nicht gestattete, außerdem das Material hierzu zu knapp war.

Die Elementaranalysen von unanfechtbaren Beobachtern haben über den Schwefelgehalt der Melanine so außerordentliche Abweichungen ergeben, daß man an der Verschiedenheit der untersuchten Melanine nicht zweifeln kann. Ich führe einige Beobachtungen an: K. A. H. Mörner¹⁾ fand 7,97% Schwefel, Hensen und Nölke²⁾ 7,57%, denen steht eine Reihe von Befunden eines weit niedrigeren Schwefelgehaltes gegenüber, z. B. von Zdarek und Zdeynek 1,92%³⁾, Wolff⁴⁾ 1,67%, Helmann⁵⁾ fand sogar eins von vier untersuchten Melaninen schwefelfrei. Da nicht abzusehen ist, wie durch die Bearbeitung bei der Darstellung der Schwefelgehalt erhöht werden sollte, so muß der Ausdruck „Melanin“ sogar für die pathologischen Melanine als Sammelbegriff betrachtet werden. Während für die mäßig schwefelreichen Melanine eine Abstammung von Eiweiß als naturgemäß angesehen werden muß in Analogie mit der Bildung von Melanoidin aus Eiweiß bei der totalen Hydrolyse, kann man bei den so außerordentlich schwefelreichen Melaninen an eine direkte Beziehung zum Eiweiß nicht denken. Ich möchte auf diesen Punkt nicht näher eingehen, da er in der folgenden Arbeit von Dr. Brahn⁶⁾ berührt werden wird.

Für die Frage der mehr oder weniger unmittelbaren Abstammung aus Eiweiß⁷⁾ ist entscheidend, ob sich das Melanin hinsichtlich seiner Konstitution dem Eiweiß

¹⁾ Mörner, Ztschr. f. phys. Chemie Bd. 11, S. 66, 1881.

²⁾ Hensen und Nölke, Malys Jahresber. f. Tierchemie Bd. 30, S. 1919.

³⁾ Ztschr. f. phys. Chemie Bd. 36, S. 495 (1902). Diese Zahl bezieht sich aber nur auf eine von vielen aus demselben Material hergestellten „Fraktionen“, die weit höheren Schwefelgehalt zeigten, eine sogar 8,23%!

⁴⁾ Malys Jahresb. Bd. 34, S. 937 (1905).

⁵⁾ Malys Jahresb. Bd. 32, S. 59.

⁶⁾ Vgl. hierüber die folgende Arbeit von Brahn.

⁷⁾ Die Annahme der Abstammung des Melanins aus Hämoglobin, d. h. aus der Farbstoffkomponente desselben, zu welcher der (oft auch fehlende) Eisengehalt geführt hat, kann wohl als erledigt gelten. Ausgeschlossen wäre diese Abstammung durch das Fehlen von Eisen übrigens nicht, geht doch auch das Bilirubin aus Hämatin hervor.

nähert. Die Eiweißkörper bestehen bekanntlich der Hauptsache nach aus miteinander verketteten Aminosäuren der aliphatischen Reihe, enthalten aber ausnahmslos auch Atomgruppen der sogenannten zyklischen und heterozyklischen Reihe, und zwar ist mit Bestimmtheit nachgewiesen, daß die eigentlichen Eiweißkörper eine Phenylgruppe in Form des Phenylalanin, eine Phenolgruppe als Tyrosin und eine Indolgruppe in Form von Indolaminopropionsäure (Tryptophan), außerdem aber noch einen Atomkomplex der heterozyklischen Reihe in Form der α -Pyrrolidinkarbonsäure enthalten. Gehört nun das Melanin der aliphatischen Reihe an oder der zyklischen, oder sind beide Komplexe in ihm nachweisbar? Für die Entscheidung dieser Frage kommt in Betracht, daß das Melanin zu den resistentesten organischen Körpern gehört, eine wesentliche Einwirkung daher nur von den am energischsten wirkenden Agentien zu erwarten ist. Dieser halten aber die Atomkomplexe der aliphatischen Reihe nicht stand, größer ist die Aussicht für den Nachweis des Zusammenhangs mit den Eiweißkörpern, wenn man versucht, Körper resp. Atomkomplexe der Benzolderivate, also der zyklischen Reihe nachzuweisen. Dies hat schon Nencki erkannt. Meines Wissens liegt über diese Frage für das menschliche pathologische Melanin nur eine einzige Beobachtung von Berdez und Nencki¹⁾ aus dem Jahre 1886 vor. Sie ist bezüglich der Deutung des Befundes so wichtig, daß ich mich, um sie diskutieren zu können, nicht enthalten kann, sie wörtlich mitzuteilen:

„50 g reines aus der salzsauren Lösung abgeschiedenes Phymatorhusin²⁾ wurden in einer Silberschale mit etwas Wasser befeuchtet und mit 40 g KOH erhitzt. Bei 210—220° kam die Masse in Fluß. Ammoniak wurde nur wenig entwickelt, jedenfalls weit weniger, als wie unter gleichen Bedingungen von Eiweiß entstanden wäre, dagegen roch die Schmelze stark nach Skatol. Das Erhitzen wurde fortgesetzt, bis die ursprüngliche rote Farbe graugelb wurde; Kohle wurde dabei nicht abgeschieden. Die erkaltete Schmelze wurde kleingestoßen, in eine tulutierte Retorte gebracht und allmählich mittels eines in den Tulus eingebrachten Scheidetrichters mit Wasser übergossen. Beim Destillieren ging anfangs Skatol über, das aus dem Destillate durch Zusatz von Salzsäure und etwas Pikrinsäure in der in roten Nadein kristallisierenden Pikrinsäureverbindung abgeschieden wurde. Der alkalische Retortenrückstand wurde mit einer Lösung von 70 g Oxalsäure allmählich versetzt und von neuem destilliert. Das widrig riechende Destillat, ähnlich wie bei der Eiweiß-Kalischmelze, enthielt flüchtige Fettsäuren, Nitrite, viel Blausäure und Schwefelwasserstoff und daneben eine flüchtige, organische, schwefelhaltige Säure. Eine genaue Charakterisierung war bei der geringen Menge der Produkte nicht möglich. Phenol, auf das besonders geachtet wurde, konnte in dem sauren Destillat nicht nachgewiesen werden, der Retortenrückstand wurde jetzt mit Wasser aufgenommen, filtriert, das Filtrat eingedampft und sukzessive mit Äther und Alkohol extrahiert. Der ätherische Auszug hinterließ einen phenolartigen, harzigen Körper, der sich mit Eisenchlorid blauschwarz färbte, aber nicht kristallinisch zu erhalten war. Leucin oder Tyrosin konnten weder in den alkoholischen noch wäßrigen Auszügen nachgewiesen werden.“

¹⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharmacie. Bd. 20, S. 358.

²⁾ So nennt Nencki das Sarkommelanin beim Menschen von φῦμα Geschwulst und πούστος rotbraun. Die Bezeichnung hat sich im Gegensatz zu „Hippomelanin“ nicht eingeführt, ist auch inkonsistent, eher könnte man von Anthropomelanin sprechen.

Soweit Nencki und Berdez. Sind nun diese Angaben ganz beweisend dafür, daß das angewendete Sarkom-Melanin¹⁾ die Tryptophangruppe des Eiweißes enthält? Ich glaube, diese Frage bejahen zu müssen, und zwar, weil die Quantität des Skatols offenbar nicht gering war. Das von Nencki und Berdez angewendete Sarkom-Melanin, von ihnen Phymatorhusin genannt, war zwar nicht rein, wenn es auch von den Autoren als „reines“ bezeichnet wird. Sie sagen i. c. S. 350 „das Phymatorhusin ist stark hygroskopisch, so daß alle Wägungen für die Elementaranalyse in geschlossenen Gefäßen ausgeführt werden mußten“. Diesseits ist von einer hygroskopischen Beschaffenheit des Melanins nichts bemerkt worden. Hygroskopische Beschaffenheit ist also nicht als eine dem Melanin zukommende Eigenschaft anzusehen, sondern bei Nencki und Berdez durch irgendeine Verunreinigung bedingt gewesen, ich halte es aber für ausgeschlossen, daß ihr Präparat soviel Eiweiß enthalten hat, daß die Ergebnisse der Kalischmelze durch einen Gehalt des Melanins an Eiweiß erklärt werden können.

Bei der Wichtigkeit der Frage hielt ich es für angemessen, den Schmelzversuch mit Kalhydrat zu wiederholen, und zwar zunächst mit dem Melanin, das sich als in Natronlauge unlöslich erwiesen hatte. Die gesamte Ausbeute hiervon = 3,35 g wurde mit etwa dem zehnfachen Gewicht Ätzkali und ein wenig Wasser in einer Silberschale auf freiem Feuer so lange geschmolzen, bis die Schmelze anfing, einen helleren Ton anzunehmen, das Melanin also größtenteils zerstört war. Dabei ließ sich allerdings nicht vermeiden, daß die Schmelze an den Rändern noch grau gefärbt war. Nach dem Abkühlen wurde die Schmelze durch Ansäuern mit verdünnter Schwefelsäure in Lösung gebracht (wobei die Schale, um Erhitzung möglichst zu vermeiden, stark abgekühlt wurde), die Lösung von dem reichlich ausgeschiedenen Kaliumsulfat abgesaugt. Dasselbe zeigte sich schwärzlich gefärbt. Zur Bestimmung des Gewichts des ungelösten Rückstandes wurde das Kaliumsulfat gelöst, die Lösung heiß durch ein gewogenes getrocknetes Filter filtriert. Das Filtrat und Waschwasser waren klar, die Filtration erfolgte schnell bis zu dem Zeitpunkt, als das Waschwasser keine oder nur noch minimale Schwefelsäurereaktion mehr gab. In diesem Zeitpunkt stockte die Filtration, und der Niederschlag fing an, in kolloidaler Form unter Trübung und Graufärbung des Waschwassers in Lösung zu gehen. Dieses Verhalten steht im Einklang mit dem von Brahn (vgl. die folgende Arbeit) bei der Darstellung des Melanins erhobenen Befunde. Das Filter wurde nun mit Alkohol gefüllt, der bis zum nächsten Tage abgelaufen war. Nach dem Trocknen bei 110° betrug das Gewicht des Rückstandes 0,125 g²⁾, es sind somit nur 3,125 g Melanin zerstört worden.

¹⁾ Manche Autoren schreiben „Sarkomelanin“, das halte ich für irreführend; andere „Sarkom-melanin“. Dabei ist allerdings das Doppel „m“ störend. Daher empfiehlt sich wohl obige Schreibweise, vielleicht auch „Pathologisches Melanin“.

²⁾ Der schwarze Rückstand war nach dem Trocknen nur zum Teil in Natronlauge löslich. Das alkalische Filtrat gab beim Ansäuern einen schwarzen Niederschlag = Melaninsäure der Autoren.

Die durch Absaugen vom Kaliumsulfat erhaltene kongosaure Lösung wurde möglichst weit destilliert. Das Destillat reagierte sauer auf Lacmus, nicht auf Kongo, und auch auf Lacmus nicht besonders stark, hatte einen stechenden Geruch, der von einem Gehalt von schwefliger Säure herrührte.

Dies ist so festgestellt, daß einige Streifen Aluminiumblech in einem Erlenmeyer-Kölbchen mit Salzsäure übergossen wurden, in dessen Hals mit einem locker schließenden Kork ein zusammengelegter Filtrerpapierstreifen eingeklemmt war, der in Bleiessig getaucht dann etwas abgedrückt war. Der sich entwickelnde Wasserstoff erwies sich frei von Schwefelwasserstoff. Als nun einige ccm des Destillats in das Kölbchen gegossen wurden, trat sofort eine intensive Schwärzung des Bleipapiers ein. Beim Erwärmen einer Probe des Destillates mit Quecksilberchlorid trat weiße Trübung und Ausscheidung von Quecksilberchlorür ein, bei Zusatz von Silbernitrat weiße Trübung, die beim Erhitzen sich grau färbte. Vielfach werden diese Reaktionen auf Ameisensäure bezogen, der sie ebenso zukommen, wie der schwefligen Säure, in letzterem Falle beruht die Graufärbung des Silberniederschlages allerdings nicht auf Reduktion, sondern auf Bildung von Schwefelsilber, in dessen sind die äußeren Erscheinungen dieselben. Ob auch Ameisensäure vorhanden, lässt sich nicht entscheiden, da die Feststellung kleiner Mengen von Ameisensäure neben schwefliger Säure kaum möglich ist¹⁾. Ich stehe deshalb der Angabe von O. v. Fürth und Jerusalem²⁾, daß die Kalischmelze von Hippomelanin, zu dessen Darstellung übrigens auch von dem Kochen mit rauchender Salzsäure reichlich Anwendung gemacht war, auch Ameisensäure enthalten habe, einigermaßen skeptisch gegenüber, denn schweflige Säure wird in derselben schwerlich gefehlt haben.

Das Destillat enthält ferner Pyrrol, kenntlich an der karmoisinroten Färbung eines mit Salzsäure getränkten Fichtenspahns beim Eintauchen in eine Probe des Destillates. Zweckmäßig stellt man übrigens die Reaktion so an, daß man eine Probe der zu prüfenden Flüssigkeit in ein Reagenzglas bringt, in dessen oberen Teil der mit Salzsäure befeuchtete Fichtenspahn eingeschoben ist, und dann die Flüssigkeit zum Sieden erhitzt.

Das Destillat gab endlich recht intensiv die Ehrlichsche Reaktion auf Indol mit Dimethylamidobenzaldehyd, namentlich, wenn man außerdem noch, wie Steensma³⁾ empfohlen hat, einen Tropfen $\frac{1}{2}$ prozentiger Natriumnitritlösung hinzusetzt. Der Zusatz von Natriumnitritlösung erwies sich aber noch weit wirkungsvoller, wenn man nicht nur einige Tropfen Salzsäure hinzusetzte sondern, wie Rohde⁴⁾ zur Prüfung auf Tryptophan empfohlen hat, das halbe Volumen rauchender Salzsäure.

Zur Isolierung des Indols wurde das Destillat mit Natronlauge alkalisiert und mit Äther ausgeschüttelt. Auffallenderweise hinterließ der Ätherauszug beim Abdestillieren und Verdunsten nur einen sehr geringen Rückstand, der nur schwache Ehrlichsche Reaktion gab. Der große Unterschied in dem Ausfall der Reaktion im Destillat direkt und in dem Ätherauszug-Rückstand führte mich zu der Vermutung, daß vielleicht nicht nur das Indol, das ein Pyrrolderivat ist, die

¹⁾ Über diesen Punkt habe ich mich in einer Arbeit über die Bindungsformen des Schwefels im Harn Ztschr. f. phys. Chemie Bd. 89, S. 490 ausgesprochen.

²⁾ Hofmeisters Beiträge usw. Bd. 10, S. 141 (1916).

³⁾ Ztschr. f. phys. Chemie Bd. 47, S. 25 (1906).

⁴⁾ Rohde, Ztschr. f. phys. Chemie Bd. 44, S. 160 (1905).

Ehrlichsche Reaktion gibt, sondern auch das Pyrrol selbst. Diese Vermutung bestätigte sich alsbald. Da Pyrrol käuflich nicht zu haben war, stellte ich mir eine kleine Quantität selbst dar. Nach den Angaben der Handbücher erhält man das Pyrrol durch Erhitzen von Succinimid mit Zinkstaub. Nun hat Neuberg¹⁾ die Pyrrolbildung als Reaktion auf Bernsteinsäure angegeben, und zwar in der Form, daß man bernsteinsaures Ammon mit Zinkstaub vermischt und erhitzt. Dieses vereinfachte Verfahren, das die Darstellung von Succinimid umgeht, wandte ich an. 10 g Bernsteinsäure wurden in überschüssigem Ammoniak gelöst, die Lösung auf dem Wasserbad möglichst weit eingedampft, der zurückbleibende Kristallbrei mit einem großen Überschuß von Zinkstaub²⁾ verrieben, so daß die Masse trocken erschien, dann auf dem Wasserbad noch etwas weiter getrocknet und fein gepulvert, in einer kleinen Retorte mit direkter Flamme erhitzt. In der Vorlage sammelte sich ein wenig Wasser mit darauf schwimmenden ölichen Tropfen an. Zur Prüfung auf Pyrrol wurde ein wenig des Destillates mit minimalsten Ölträpfchen im Reagenzglas mit Wasser erhitzt und abgekühlt. Diese Flüssigkeit gab mit Dimethylamidobenzaldehyd und etwas Salzsäure die Ehrlichsche Reaktion, weit stärker aber, als etwa das halbe Volumen rauchender Salzsäure angewendet wurde. Es entstand eine purpurne Flüssigkeit. Beim Schütteln mit Amylalkohol ging der Farbstoff zum Teil in diesen über. Bei der spektroskopischen Untersuchung zeigte die Amylalkohollösung, passend verdünnt, wobei sie violett wurde, einen ziemlich breiten, aber etwas verschwommenen und wenig intensiven Absorptionsstreifen etwa von der Mitte des Raumes zwischen C und D bis gegen E reichend. Daraus geht hervor, daß die an dem Destillat selbst beobachtete Indolreaktion nicht von diesem herrührt, sondern von Pyrrol; die Tatsache, daß auch das Pyrrol Indolreaktion gibt, wird künftig beachtet werden müssen.

Der Nachweis von Pyrrol in der Schmelze läßt nicht, wie viele Autoren annehmen, den Schluß zu, daß das Melanin einen Atomkomplex der heterozyklischen Reihe, etwa als α -Pyrrolidin-karbonsäure, enthält, wird es ja doch aus Bernsteinsäure, also einem Körper der aliphatischen Reihe, durch eine sogenannte pyrogene Reaktion erhalten (aus den pyrogenen Reaktionen kann man überhaupt nur mit großer Vorsicht Schlüsse ziehen), eher kann man daraus schließen, daß in dem Melanin der Atomkomplex der Amidobernsteinsäure enthalten ist. Ich möchte nicht mißverstanden werden: es ist nicht ausgeschlossen, daß das Pyrrol aus präformierter α -Pyrrolidin-karbonsäure im Melanin hervorgegangen ist, aber es ist nicht bewiesen.

Ich fahre nun in der Beschreibung der Verarbeitung des Destillates fort: Die ausgeätherte alkalische Flüssigkeit wurde von noch darin gelöst enthaltenem Äther befreit, indem man sie in einer Schale auf einer größeren, mit heißem Wasser gefüllten Schale schwimmen ließ und schließlich auf dem Wasserbad erhitzte. Nach der Vertreibung des Äthers wurde mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und destilliert: im Destillat war weder Indol noch Phenol nachweisbar. Zum

¹⁾ Neuberg, Ztschr. f. phys. Chemie Bd. 31, S. 574 (1900/1901).

²⁾ Rund 80 g.

Nachweis etwa vorhandener flüchtiger Fettsäuren, nach denen das Destillat roch, wurde es mit Natriumkarbonat alkalisiert und auf dem Wasserbad eingedampft. Der gebliebene Salzrückstand gab mit Alkohol und konzentrierter Schwefelsäure beim Erhitzen intensiven Geruch nach Butteräther. Die andere Hälfte des alkoholischen Auszugs wurde zur Trockne gedampft. Beim Übergießen mit verdünnter Schwefelsäure verbreitete sich ein intensiver Buttersäuregeruch. Damit ist nachgewiesen, daß ein Teil des Sarkommelanins der aliphatischen Reihe angehört. Damit steht auch in Übereinstimmung, daß Rona und Riesser¹⁾ bei der Oxydation von Melanin, allerdings Hippomelanin, mit Wasserstoffsuperoxyd u. a. Guanidin erhalten haben. Adler-Herzmark²⁾ hat diesen Befund freilich an künstlichem Melanin (Melanoidin) nicht bestätigen können, da aber das Guanidin durch Analysen sichergestellt ist und positive Resultate natürlich immer mehr beweisen als negative, so wird man an den Angaben von Rona und Riesser nicht zweifeln können.

Die Befunde von Nencki und Berdey und die meinigen ergänzen sich in einem gewissen Grade; was die Differenzen betrifft, so muß man sagen, daß die Ergebnisse der Kalischmelze immer mit einer gewissen Unsicherheit behaftet sind. Es ist möglich, daß das von Nencki und Berdey gefundene, von mir vermißte Skatol als sehr flüchtig bei der Kalischmelze sich verflüchtigt hat, wenn ich auch zugeben muß, daß der Geruch nach Indol und Skatol bei der Ausführung der Kalischmelze nur schwach war.

Es blieb nun noch die Untersuchung des Rückstandes im Destillierkolben übrig. Derselbe wurde mit Äther ausgeschüttelt. Der ätherische Auszug hinterließ beim Verdunsten einen harten, lackartigen Rückstand, der zur Fahndung auf etwaige Bernsteinsäure mit starker Salpetersäure erhitzt wurde. Bernsteinsäure war nicht nachweisbar. Der Rückstand war in Wasser größtenteils mit intensiv gelber Farbe löslich, die beim Zusatz von Natronlauge in Tiefrot überging; auch bei starkem Verdünnen war die Lösung noch intensiv orange. Diese Erscheinung deutet auf die Oxyphenylgruppe im Melanin hin, könnte aber auch auf der Tryptophangruppe beruhen.

Es sei nun noch über einige Eigenschaften des Melanin berichtet.

Gelegentlich hatte ich beobachtet, daß beim Vermischen der alkalischen Lösung mit einer alkalisch-ammoniakalischen Silberlösung sich beim Stehen bis zum nächsten Tage ein Silberspiegel an den Wänden des Reagenzglases gebildet hatte. Da sich aus einer solchen Silberlösung bei tagelangem Stehen auch ohne Zusatz eines Reduktionsmittels metallisches Silber ausscheiden kann, so mußte die Erscheinung genauer festgestellt werden. Zu diesem Zweck wurden 0,25 g Melanin aus melanotischer Lymphdrüse in 50 ccm 3 prozentiger Natronlauge gelöst, und zwar in der Weise, daß das Melanin zuerst mit wenig Natronlauge in der Reibschale angerieben, dann mehr und mehr von derselben hinzugsetzt wurde. Dabei ergab sich nun die bemerkenswerte Tatsache, daß sich dieses vor einigen Monaten dargestellte lösliche Melanin in der Natronlauge nicht mehr ganz löste, auch beim

¹⁾ Rossa und Riesser, Ztschr. f. phys. Chemie Bd. 57, S. 143 und Bd. 61, S. 12 (1908).

²⁾ Adler-Herzmark, Biochem. Ztschr. Bd. 49, S. 132.

Erhitzen auf dem Wasserbade nicht. Dasselbe zeigte sich bei dem Melanin aus der Leber.

Diese Erscheinung erinnert an die bekannte Tatsache, daß gut lösliches, käuflches Serumalbumin beim Aufbewahren seine Löslichkeit mehr und mehr einbüßt und schließlich vollständig oder fast vollständig unlöslich wird, sowie weiterhin an eine von Herzfeld und Klinger¹⁾ gemachte Beobachtung. Diese Autoren fanden, daß auf Glasplatten eingetrocknetes Blutserum sich im Wasser vollständig wieder auflösen ließ, dagegen nicht mehr, wenn die getrocknete Masse in der Reibschale verrieben war. Die Löslichkeit war also durch feine Verteilung nicht, wie sonst gewöhnlich, verbessert, sondern im Gegenteil verschlechtert.

Es wurde nun in 2 Reagenzgläser je 10 ccm einer 3prozentigen Silbernitratlösung gebracht, die mit soviel Ammoniak versetzt war, daß das ausgeschiedene Silberoxyd sich eben wieder löste. Zu der einen Silberlösung wurden 5 ccm der 3prozentigen Natronlauge gesetzt, zu der andern 5 ccm der nicht ganz $\frac{1}{2}$ prozentigen Melaninlösung von demselben Natrongehalt, beide Gläser ins Dunkle gestellt. Der Befund nach 24 Stunden war zweifelhaft. Von beiden Gläsern wurde nur ein Teil abgenommen und erhitzt: es trat Spiegelbildung ein, in der Kontrolllösung nur Ausscheidung von etwas pulverigem, schwarzem Niederschlag. Die Reduktion war in der melaninhaltigen Lösung bedeutend stärker, wie ich mich noch durch das Verhalten des Silbers zu Salpetersäure und Zusatz an Salzsäure zu der Lösung überzeugte. Die Differenz zu dem ersten Befund erklärt sich vielleicht daraus, daß bei diesem die Melaninlösung konzentrierter war, außerdem ist aber die Reaktion auch an sich nicht ganz zuverlässig, da bei derselben sehr viel auf die relativen Verhältnisse von Silber, Ammoniak und Natronlauge ankommt. Die Reduktion von alkalisch-ammoniakalischer Silberlösung in der Kälte wird bei den aliphatischen Verbindungen in der Regel auf das Vorhandensein einer Aldehydgruppe bezogen, bei den Benzolderivaten wirken bekanntlich auch die Oxyphenole, speziell das Brenzkatechin, reduzierend.

Mit derselben nicht ganz $\frac{1}{2}$ prozentigen Melaninlösung wurden noch einige Versuche über das Verhalten zu Oxydationsmitteln ausgeführt.

1. Bei stundenlangem Erhitzen mit etwa dem gleichen Volumen 3prozentigen Wasserstoffsuperoxyd, teils direkt, teils im Wasserbad, wurde die Lösung allmählich rötlich, schließlich gelb, vollständige Entfärbung war nicht zu erzielen, ebensowenig wie in früheren, schon öfters angestellten Versuchen. Die Lösung gab beim Ansäuern mit Salzsäure einen sehr geringen hellbräunlichen, flockigen Niederschlag.

2. Eine Probe wurde mit einer Lösung von Kaliumpermanganat im Überschuß längere Zeit erhitzt, bis schließlich unverändertes Kaliumpermanganat in der Lösung bestehen blieb. Dieser Überschuß wurde durch Zusatz von etwas Alkohol entfernt, die Lösung von dem ausgeschiedenen Mangansuperoxyd abfiltriert, das Filtrat war fast völlig farblos, beim Ansäuern mit Salzsäure wurde es ganz farblos, ein Niederschlag trat nicht auf, das Melanin war also völlig abgebaut.

¹⁾ Herzfeld und Klinger, Biochem. Ztschr. Bd. 78, S. 349 (1917).

Mit kleinen Mengen des gemischten Melanins (Spatelspitzen; der benutzte Spatel war 13 mm breit, die Quantität betrug ungefähr 0,08 g) wurden noch folgende Versuche gemacht.

1. Beim Erhitzen mit 8 ccm Salpetersäure von 1,48 D trat allmählich unter Entwicklung nitroser Dämpfe Lösung und Hellerwerden der anfangs dunkelbraunen Lösung ein, jedoch blieb die Färbung trotz mehrstündigem Erhitzen — teils auf freier Flamme, teils im kochenden Wasserbad — dunkelgelb. Beim Eindampfen auf dem Wasserbad blieb ein schmieriger, dunkelgelber Rückstand, der beim Übergießen mit Natronlauge braunrot wurde und sich mit tieforangeroter Färbung in Wasser löste. Die Lösung war selbst nach dem Verdünnen auf 100 ccm, ja selbst 200 ccm intensiv orange gefärbt. Dieses Verhalten deutet nicht mit Bestimmtheit auf das Vorhandensein einer Oxyphenylgruppe (Phenolgruppe) im Melanin hin, es kann vielmehr auch von der Tryptophangruppe abhängen. Dieser Einwand ist im vorliegenden Falle zulässig, wie ein Kontrollversuch zeigte. 5 ccm einer Tryptophanlösung von 0,1% = 5 mg Tryptophan wurden ebenso mit starker Salpetersäure (von 1,48 D) behandelt. Auch hierbei entstand beim Verdünnen auf 200 ccm eine intensiv orange gefärbte Lösung, vielleicht nicht ganz so intensiv wie beim Melanin, aber doch sehr nahezu so. Danach würden in 0,08 Melanin 0,005 Tryptophan enthalten sein, gleich rund 6%. Das wäre auffallend viel, da nach den Untersuchungen von meinem Bruder und mir ¹⁾ die Tryptophangruppe im Eiweiß (Fibrin) nur auf 2,21% zu veranschlagen ist. Immerhin ist das Melanin nicht Eiweiß, es wäre ja möglich, daß die Tryptophangruppe in ihm sehr viel größer ist als im Eiweiß. Wie steht es nun mit der Ableitung aus einer Phenolgruppe? Diese wird durch den Versuch nicht unterstützt. Als 0,005 Tyrosin ebenso behandelt wurde, entstand nur ein schwach gelb gefärbter Rückstand, der beim Erwärmen mit Natronlauge zitronengelb wurde; bei weiterem Verdünnen mit Wasser wurde die Färbung so schwach, daß von einem Vergleich mit der aus Melanin erhaltenen Lösung gar nicht die Rede sein konnte. Erheblich mehr wurde bei gleicher Behandlung von 0,005 Phenol — so lange gekocht, bis keine intensiven Dämpfe mehr entweichen, dann eingedampft — erhalten. Die Färbung war etwa halb so stark wie die aus Melanin, die Nuance ein wenig abweichend.

Diese Ergebnisse mit Tryptophan und Tyrosin stehen nun in einem scheinbaren Widerspruch zu einem Schluß, zu dem C. Th. Mörner ²⁾ in einer ganz kürzlich erschienenen Arbeit: „Welchen Anteil haben Tyrosin und Tryptophan an dem Farbenaffekt bei den beiden Phasen der Xantoprotinreaktion“ gelangt ist. Mörner nennt die durch Salpetersäure allein erhaltene Färbung „Phase a“, die durch Alkalizusatz erhaltene „Phase b“. Hier interessiert nur die Phase b. Diese ist nach ihm bei Tyrosin, a. a. O. S. 210, fünfmal so intensiv wie beim Tryptophan, während ich beim Tyrosin nur ganz schwache Färbungen erhalten habe. Wollte man sein Ergebnis hier anwenden, so käme man auf $6 \times 5 = 30\%$ Tyrosingehalt, was natürlich ungereimt ist. Der Widerspruch ist nur ein scheinbarer. Seine Versuchsanordnung ist eine ganz andere. Er erwärmt

¹⁾ E. u. H. Salkowski, Ztschr. f. phys. Chemie Bd. 105, S. 247 (1919).

²⁾ C. Th. Mörner, Ztschr. f. phys. Chemie Bd. 107, S. 203 (1919).

0,005 Tryptophan bzw. Tyrosin nur 3 Minuten im Wasserbad bei einem Salpetersäuregehalt in der Mischung von etwa 5% HNO_3 . Seine Ergebnisse dürfen also nicht verallgemeinert werden.

Daß die „Xanthoproteinreaktion“ auf der Bildung von Nitroderivaten des Phenols beruhe, ist eine allgemein geläufige Annahme, aber meines Wissens hat bisher noch niemand versucht, diese zu isolieren oder auch nur zu charakterisieren. Aus der Lösung des Melanins in Salpetersäure ist mir dies nicht gelungen. Etwa 0,5 g Melanin wurden im Destillierkolben mit 150 Salpetersäure von 1,2 D destilliert bis auf etwa 50 g Rückstand. Die stark gelb gefärbte, filtrierte rückständige Flüssigkeit wurde mit Bromwasser versetzt: es entstand nur eine schwache Trübung. Nitrodeivate des Phenols hätten eine Ausscheidung geben müssen. Die Erhitzung war im Destillierapparat ausgeführt, um etwa entstandenes o-Nitrophenol, so unwahrscheinlich dessen Entstehung auch war, abzufangen. Es fand sich nicht im Destillat. Dasselbe roch weder danach (bittermandelartig), noch gab es mit Bromwasser einen Niederschlag oder Trübung, wie dieses tut. Man kann also bisher nur sagen: das Melanin gibt die Xanthoproteinreaktion, worauf diese beruht, bleibt unentschieden, doch ist beim Melanin die Abstammung vom Tryptophan die wahrscheinlichere; jedenfalls hat sich die Phenolgruppe im Melanin bisher nicht nachweisen lassen, nur eine Angabe von Berdez und Nencki (siehe oben) deutet darauf hin.

2. Beim Erhitzen einer Probe mit einem Gemisch von Kalumbichromat und Schwefelsäure trat unter starker Gasentwicklung Grünfärbung ein unter Reduktion der Chromsäure zu Chromoxyd; nach weiterem Zusatz von Kalumbichromat wurde die Färbung bräunlich. Der Überschuß von Chromsäure wurde durch Alkohol beseitigt, durch Natronlauge und Erhitzen Chromhydroxyd ausgefällt und filtriert. Das Filtrat war anfangs schwach grünlich gefärbt, wurde dann beim Eindampfen, nachdem zwischendurch noch einmal etwas ausgeschiedenes Chromhydroxyd entfernt war — es ist bekannt, daß sich dieses schwer vollständig abscheidet — farblos und lieferte schließlich einen farblosen Salzrückstand.

Es ist übrigens bemerkenswert, daß das augenscheinlich durch starke Oxydationsmittel schwer angreifbare Melanin doch durch ein so schwaches Oxydationsmittel wie alkalisch-ammoniakalische Silberlösung teilweise oxydiert wird.

Das Melanin gibt bekanntlich beim trockenen Erhitzen Pyrrol. Es schien mir, daß die Pyrrolbildung aus Melanin schon bei weniger starkem Erhitzen eintritt, wie beim Eiweiß. Zur Prüfung dieser Vermutung wurden drei Reagenzgläser mit locker schließenden Korken versehen, in denen ein mit Salzsäure befeuchteter Spahn Fichtenholz befestigt war. Zwei Gläser wurden mit den beiden Melaninen beschickt, das dritte mit trockenem Eiweiß, die Gläser dann in ein Ölbad versenkt. Dieses wurde auf etwa 230° erhitzt und eine Stunde lang annahernd bei dieser Temperatur erhalten, in keinem Falle hatte sich Pyrrol gebildet. Alle Proben wurden in andere Reagenzgläser geschüttet und erhitzt: alle gaben Pyrrol, durch die intensiv karminrote Färbung des mit Salzsäure befeuchteten Fichtenpahns nachweisbar. Diese Ergänzung des Versuches war notwendig, weil die lange erhitzten Stäbchen sich graugefärbt und zum Pyrrolnachweis ungeeignet erwiesen. Die Vermutung einer leichteren Pyrrolbildung aus Melanin hatte sich also nicht bestätigen lassen.

Weiterhin wurden einige Versuche über die Bindung des Schwefels im Melanin und daran anschließend ein Versuch über die Möglichkeit vollständiger Entschwefelung angestellt. Ich schalte hier ein, daß beide Melanine sich schwefelhaftig erwiesen, das aus der Leber anscheinend stärker als das aus den Lymphknoten¹⁾. Auf quantitative Bestimmungen des Schwefels glaube ich bei der Kostbarkeit des Materials und angesichts der vielen hierüber vorliegenden Literaturangaben (siehe auch die folgende Arbeit) verzichten zu dürfen. Die Ausführung der Versuche über die Bindung des Schwefels war folgende:

1. In einem Kölbchen wurden einige Stücke Aluminiumblech mit Natronlauge übergossen: der bei leichtem Erwärmen entwickelte Wasserstoff zeigte sich frei von Schwefelwasserstoff. Nunmehr wurde in das Kölbchen ein wenig der oben benutzten alkalischen Lösung von Melanin aus Leber gebracht und stehen gelassen. Am nächsten Tage wurde der Inhalt des Kölbchens mit Salzsäure angesäuert: nach kurzer Zeit zeigt sich Schwärzung des in den Hals des Kölbchens eingeschobenen Bleipapiers, indessen blieb sie doch ziemlich beschränkt, auch bei längerem Stehen. Im Kölbchen war der schwarzbräunliche Inhalt anscheinend unverändert geblieben. Er wurde nun abfiltriert und bis zum Verschwinden der Salzsäurereaktion im Filtrat gewaschen, durch Vollgießen des Filters mit Alkohol absolut getrocknet, am nächsten Tage vom Filter gekatzt und die Probe auf Schwefel nach Siegfried angestellt, es ergab sich ziemlich starker Schwefelgehalt, die Entfernung des Schwefels war also nicht vollständig gelungen.

2. Auf locker gebundenen Schwefel (Schwefel in der Sulfurylbindung) pflegt man in der Weise zu untersuchen, daß man die betreffende Substanz mit alkalischer Bleiösung erhitzt. Schwärzung durch Schwefelblei zeigt locker gebundenen Schwefel an. In dieser Form läßt sich die Probe in vorliegendem Falle nicht anstellen, da die Lösung ja an sich schon schwarzbraun ist. Es wurde folgendermaßen verfahren. Die mit der Melaninlösung aus Leber angestellte Probe wurde nach dem Kochen mit der alkalischen Bleiösung stark mit Wasser verdünnt, der sich absetzende Niederschlag nochmals durch Dekantieren, dann auf dem Filter solange gewaschen, bis das Waschwasser sich mit Schwefelammonium nicht mehr bräunte. Der gebliebene Niederschlag wurde durch Aufgießen von heißer Salpetersäure von 1,2 D und mehrmaliges Zurückgießen gelöst. Auf dem Filter blieb ein fast rein gelber, aus Schwefel bestehender Rückstand, das Filtrat gab bei Zusatz von verdünnter Schwefelsäure Trübung bzw. allmählich Niederschlag von Bleisulfat. Da die Quantität des Schwefelbleies nicht unerheblich war, erschien mir der Versuch, auf diesem Wege das Melanin völlig zu entschwefeln, nicht aussichtslos. Die Herstellung eines schwefelfreien Melanins aus dem pathologischen schwefelhaltigen wäre insofern nicht ohne Bedeutung, als damit die Möglichkeit des Vergleiches mit andern nicht schwefelhaltigen, physiologischen und künstlich aus Tyrosin und Adrenalin dargestellten gegeben wäre.

¹⁾ Das Melanin aus den Lymphknoten enthielt eine eben nachweisbare Spur Eisen, das aus der Leber anscheinend etwas mehr, jedoch auch nur Spuren.

Es ist mir bisher nicht gelungen, dieses Ziel zu erreichen. Sowohl das nach zweistündigem Kochen von 1 g Melanin mit 7,5 prozentiger, stark bleihaltiger Natronlauge am Rückflußkühler ¹⁾, als auch das durch halbstündiges Kochen mit 30 prozentiger bleihaltiger Natronlauge erhaltenen Produkt erwies sich stark schwefelhaltig. Zur Isolierung nach dem Kochen wurde folgendermaßen verfahren. Die schwarzbraune Lösung wurde mit Salpetersäure leicht angesäuert, filtriert und so lange ausgewaschen, bis das Waschwasser mit Schwefelammonium keine Bräunung mehr gab, also frei war von gelöstem Blei. Der Rückstand erhielt nun Melanin und Bleisulfid, die durch Behandlung mit verdünnter Natronlauge getrennt wurden. Aus der alkalischen Lösung erhielt man durch Ansäuern usw. das Melanin zurück. Wenn nun das Ergebnis auch negativ war, so läßt es andererseits doch eine Schlußfolgerung zu. Es zeigt, daß der Schwefelgehalt des pathologischen Melanins nicht, wie manche Autoren wollen, etwas Zufälliges, Bedeutungsloses ist, sondern daß der Schwefel fest gebunden ist. Dadurch wird die Anschauung, daß das Melanin in einer nicht zu entfernten Beziehung zu dem Zelleneiweiß steht, verstärkt.

Die oben erwähnte Beobachtung, daß man aus dem Melanin durch Oxydation mit Kalumbichromat und Schwefelsäure, Entfernung des Überschusses von Chromsäure durch Alkohol und des gelösten Chroms durch Natronlauge eine wasserklare Lösung erhält, legt den Gedanken nahe, ein Gemisch von Melanin und der Oxydationsmischung der Destillation zu unterwerfen. Findet man im Destillat Benzoësäure, so ist damit bewiesen, daß das Melanin die dem Eiweiß zukommende Phenylgruppe enthält. Mit Versuchen hierüber bin ich noch beschäftigt; ich gedenke bald auf diesen Punkt zurückzukommen.

Zum Schluß scheint es mir zweckmäßig, die in bezug auf das chemische Verhalten des pathologischen Melanins der menschlichen Geschwülste festgestellten Tatsachen in einigen Sätzen zusammenzufassen.

1. Bei der Darstellung ist das übliche Kochen mit starker Salzsäure zu verwerfen, da es notwendig zu einer Verunreinigung des Präparats mit einem Kunstprodukt, dem sogenannten Melanoidin, führt.
2. Die endgültige Entfernung der letzten Spuren von Eiweiß und Fett wird zweckmäßig durch Erhitzen mit Eisessig bewirkt.
3. Das Melanin besteht in der Regel aus einem in verdünnter Natronlauge löslichen und einem darin und selbst in 15 prozentiger Natronlauge unlöslichen Teil; bei längerem Aufbewahren scheint auch der lösliche Teil mehr oder weniger unlöslich zu werden.
4. Das Melanin ist schwefelhaltig, der Schwefel ist fest gebunden.
5. Das Melanin ist, wie bekannt, äußerst resistent gegenüber Oxydationsmitteln, wird jedoch von Kaliumpermanganat in alkalischer Lösung und einem Gemisch von Kalumbichromat und Schwefelsäure u. U. vollständig zersetzt.

¹⁾ Am oberen Ende des Rückflußkühlers war ein mit verdünnter Salzsäure beschickter Will-Varrentrapp'scher Absorptionsapparat angebracht. Der Inhalt desselben, nach Beendigung des Kochens eingedampft, gab nur 0,6 mg. Rückstand. Eine Abspaltung von Ammoniak hatte also nicht merklich stattgefunden.

6. Das Melanin besteht, wie Nencki und Berdey nachgewiesen haben, zu einem großen Teil aus Atomkomplexen der zyklischen bzw. heterozyklischen Reihe, enthält jedoch auch solche der aliphatischen Reihe.

Um Mißverständnisse zu vermeiden, bemerke ich nochmals ausdrücklich, daß in dieser Zusammenstellung die bei der Untersuchung von Hippomelanin und Melanoidin erhaltenen Ergebnisse nicht berücksichtigt sind.

X.

Pigmentstudien.

Zur Kenntnis des Melanins und des braunen Abnutzungspigments.

(Aus der chem. und anat. Abteil. d. Institutes.)

Von

B. Brahn und M. Schmidtmann.

Assistenten am Institut.

I. Melaninuntersuchungen.

Von B. Brahn.

In diesem Heft gibt E. Salkowski ein Verfahren an, nach dem Melanin in größerer Reinheit wie bisher gewonnen werden kann. Nach diesem Verfahren aus menschlichen Geschwülsten hergestelltes Melanin war das Ausgangsmaterial für die folgenden Untersuchungen. Außerdem wurde, der unbeschränkten Mengen wegen, die zur Verfügung standen, das Melanin aus Hornsubstanzen und Eiweißkörpern benutzt, nachdem Aussehen, Elementaranalyse und physikalisches Verhalten die Identität der beiden Melanine in den Grenzen, in denen sich Melanine auch sonst nur gleichen, erwiesen hatte.

Bei der Reinigung des Melanins zeigte sich eine Eigenschaft der frisch gefällten Substanz, die bemerkenswert ist. Das schwach saure Filtrat wurde beim Auswaschen naturgemäß immer heller. In dem Augenblick aber, wo die Waschflüssigkeit genau neutral wurde, wo sich also in ihr, je nach dem Fällungsmittel, Salzsäure oder Schwefelsäure nicht mehr nachweisen ließ, wurde sie plötzlich ziemlich dunkelbraun und behielt diese Farbe auch bei weiterem Waschen bei. Es zeigte sich, daß es sich um eine kolloide Lösung des Melanins in Wasser handelte, aus der die Substanz durch einen Tropfen Säure nach längerem Stehen wieder ausfiel. Auch schon die schwachen Aminosäuren, die bei der Aufspaltung des Eiweißes entstehen, wie Alanin und Leucin, genügten, um nach längerer Zeit aus dieser kolloiden Lösung das Pigment auszufällen. Die kolloide Lösung ist nur aus frisch gefälltem Material herstellbar. Der Nachweis der kolloiden Natur wurde nach dem schon Graham bekannten Prinzip geführt, daß die Diffusionsgeschwindigkeit