

Ueber das Melanin der Augenhäute.

Von

Dr. H. Landolt,

I. Assistenten der Augenklinik zu Strassburg.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Strassburg. Neue Folge Nr. 22.)
(Der Redaction zugegangen am 6. Juli 1899.)

Ob die normalen und pathologischen Pigmente, welche gemeinhin als Melanine bezeichnet werden, vom Blutfarbstoff abstammen oder nicht, ist eine noch immer offene Frage. Die histogenetische Untersuchung hat es wahrscheinlich gemacht, dass die Entstehung des Gewebspigmentes im Thierkörper an das Vorhandensein der Blutbahnen gebunden ist.¹⁾ Damit ist aber noch nicht der Nachweis erbracht, dass ein direkter materieller Zusammenhang zwischen Melanin und Blutfarbstoff besteht, denn Blutbahn und Blutfarbstoff können auch auf anderem Wege, zum Beispiel durch Sauerstoffzufuhr, die Melaninbildung einleiten oder begünstigen.

Die chemische Untersuchung hat Nencki²⁾ schon vor langer Zeit dazu geführt, jede chemische Beziehung zwischen melanotischem Pigment und Blutfarbstoff zu läugnen. Später hat Nencki³⁾ dann auf Grund der Untersuchung des Proteinochromogens auf die Beziehungen zwischen dem Skatol liefernden

1) Ehrmann, Das melanotische Pigment u. s. w., Bibliotheca medica. Abth. D. H. H. 6, 1896. Scherl, Einige Untersuchungen über das Pigment des Auges. Graefe's Archiv für Ophthalmologie, 39, II, S. 130.

2) Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 20 S. 357.

3) Chemische Berichte, 1895, S. 567.

aromatischen Kern der Eiweisskörper und den thierischen Pigmenten, speciell dem Melanin hingewiesen.

Der Beweis, dass künstlich aus Eiweissstoffen Pigmente von den Eigenschaften der Melanine erhalten werden, ist von Schmiedeberg¹⁾ geführt worden. Dabei ergab sich, dass von den untersuchten pathologischen, normalen und künstlichen Melaninen auch nicht zwei die gleiche Zusammensetzung aufweisen, eine Beobachtung, die durch in gleicher Richtung ausgeführte Untersuchungen an künstlich gewonnenen Melaninen von Chittenden und Albro²⁾ ihre Bestätigung gefunden hat. Worin diese auffallenden Verschiedenheiten begründet sind, lässt sich zur Zeit noch nicht übersehen. Nur so viel ist sicher, dass die Art der Gewinnung auf die Zusammensetzung der isolirten Melanine von grösstem Einfluss ist, und zwar nicht bloss betreffs der künstlich aus Eiweiss erhältlichen, sondern auch der natürlich vorkommenden. — Da nun die Frage nach den genetischen Beziehungen der Melanine zum Eiweiss, beziehentlich zum Hämatin, nur auf Grund genauer chemischer Untersuchung erledigt werden kann, habe ich auf Anregung von Herrn Prof. Hofmeister neuerdings die Untersuchung des Chorioidealpigmentes, als des am besten zugänglichen, normal vorkommenden Melanins, in Angriff genommen.

Hierbei handelte es sich

1. um die Elementarzusammensetzung der möglichst intacten Pigmentkörner,
2. um die Trennung des Farbstoffes von einem etwa vorhandenen Stroma und Untersuchung des isolirten Farbstoffes,
3. um Gewinnung von Spaltungsprodukten oder sonstigen chemischen Derivaten des Melanins, welche Schlüsse auf die Constitution des Pigmentes gestatten könnten.

1) Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 39, 1.

2) Americ. Journal of Physiology, Vol. II, 291.

I. Die Elementarzusammensetzung der Pigmentkörnchen.

Entstehen die Pigmentkörner aus dem Blutfarbstoff, so kann man erwarten, dass sie entweder eisenhaltig sind und in ihrer Zusammensetzung die Abstammung vom Haematin erkennen lassen, oder, wenn sie nicht eisenhaltig sind, doch ihrer Zusammensetzung nach dem eisenfreien Hämatin (Hämatoporphyrin) nahe stehen.

Die bisherigen Angaben sind zur Beurtheilung dieser Frage deshalb nicht ganz ausreichend, weil die chemische Untersuchung, von ganz wenigen Ausnahmen abgesehen, sich auf Pigment bezog, das zu seiner Darstellung chemisch nicht indifferenten Prozeduren unterworfen worden war, denn die grösste Schwierigkeit seine Elementarzusammensetzung richtig festzustellen, besteht eben darin, es chemisch unverändert und doch frei von verunreinigenden Beimengungen wie Eiweiss, Gewebs- und Zellresten, Blut u. s. w. zu erhalten.

Der erste, welcher den Farbstoff der Augenhäute untersuchte, war Scherer.¹⁾ Er gewann denselben dadurch, dass er die Chorioidea von den umgebenden Häuten befreite, durch Waschen mit Wasser das Blut entfernte und dann das Pigment mittelst Pinsels von dem Gewebe trennte. Der Farbstoff wurde in Wasser aufgefangen, absitzen gelassen, mit Wasser gewaschen, auf dem Filter gesammelt und zur Reinigung von Fett und anderen Verunreinigungen mit Alkohol und Aether behandelt.

In ähnlicher Weise verfuhr Gmelin,²⁾ nur filtrirte er, um die Membraureste zu entfernen, durch ein Leinwandfilter, wobei der Farbstoff mit hindurchging. Er verdunstete dann die ablaufende Flüssigkeit und kochte den Rückstand mit Alkohol und Aether aus.

N. Sieber³⁾ liess nach dem Filtriren durch ein Lein-

1) Annalen der Chemie und Pharmacie, 40. Bd., 1841, S. 63.

2) Gmelin's Handbuch der organischen Chemie, VIII, 3, S. 2353.

3) N. Sieber, Ueber die Pigmente der Chorioidea und der Haare. Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie, 20, S. 362.

wandfilter das Pigment sich zu Boden setzen und kochte den Bodensatz am Rückflusskühler mit 10%iger Salzsäure, um das beigemengte Eiweiss in lösliche Substanzen zu verwandeln. Danach filtrirte sie, wusch aus und behandelte mit Alkohol und Aether, bis von beiden Flüssigkeiten nichts mehr gelöst wurde.

Rosow¹⁾ behandelte die Pigmentschicht der Chorioidea 3—4 Wochen lang mit concentrirter Essigsäure, wusch dann gründlich aus und trocknete den Rückstand unter der Luftpumpe. Den Rest, d. h. die Augenhäute ohne die Epithelial-schicht der Chorioidea, überliess er eine Woche der Fäulniss, zerrieb ihm dann unter starkem Wasserstrahle auf einem Leinenfilter und behandelte das durchgeflossene Pigment $\frac{1}{4}$ — $\frac{3}{4}$ Stunden mit kochender concentrirter Essigsäure. Nach Auswaschen mit Wasser trocknete er das Pigment wieder unter der Luftpumpe.

Mays²⁾ gewann den Farbstoff der Augenhäute durch Verdauung mit Pankreassaft. Das Pigment blieb unverdaut zurück und wurde mit Wasser gewaschen.

Scherl³⁾ legte die pigmentirten Häute auf $\frac{2}{4}$ Stunden in verdünnte Salpetersäure (1 : 10) und danach in eine schwache Lösung von doppeltkohlensaurem Natron, worin sich das Pigment löste. Auf Zusatz von Salpetersäure bis zur schwach sauren Reaction fiel der Farbstoff aus der Lösung flockig aus.

Hirschfeld⁴⁾ zerkleinerte die Pigmenthäute des Auges mit der Scheere und behandelte die Fetzen nach öfterem Auswaschen in Wasser mit Alkohol und Aether, danach mit 5%iger kalter Salzsäure. Zur Entfernung der Säure wusch er wieder mit Wasser aus und brachte die Gewebsetzen darauf in 2%ige

1) Rosow, Ueber das körnige Augenpigment. Archiv für Ophthalmologie, 9 III, S. 63.

2) Mays, Ueber den Eisengehalt des Fuscins. Ebenda 39 III, S. 89.

3) Scherl, loc. cit.

4) Hirschfeld, Untersuchungen über die schwarzen Farbstoffe der Chorioidea und verwandte Pigmente. Zeitschrift für physiologische Chemie, Bd. XIII, S. 407.

Kalilauge, die er auf dem Wasserbade erhitzte. Das Pigment löste sich in der Kalilauge. Er filtrirte und versetzte das Filtrat, in dem der Farbstoff gelöst enthalten war, mit Essigsäure bis zur deutlich sauren Reaction, wobei das Pigment in braunschwarzen Flocken ausfiel, die sich zu Boden setzten. Beim Filtriren blieb jetzt das Pigment auf dem Filter zurück, wurde gewaschen, getrocknet und wieder der Extraction mit Alkohol und Aether unterworfen.

Scherer und Gmelin gewannen also das Pigment auf rein mechanischem Wege, Mays durch Verdauung mit Pankreas-saft, alle anderen durch Behandlung mit Säuren: Salzsäure, Salpetersäure oder Essigsäure.

Die Frage, ob Eisen im Pigment enthalten sei, beantworteten Scherer, Rosow, Mays im bejahenden Sinne, während Sieber, Scherl, Hirschfeld kein Eisen in ihren Präparaten fanden. Da nun Scherer sein Pigment ohne Säurebehandlung, Rosow durch Behandlung mit concentrirter Essigsäure, die auf den Farbstoff nur wenig einzuwirken scheint, Mays durch tryptische Verdauung gewann, während die Uebrigen Salzsäure und Salpetersäure zur Darstellung benutzten, und da, wie Mays nachgewiesen hat, das Eisen aus dem Pigment durch Säuren (10^oige Salzsäure) leicht ausgezogen werden kann, so lässt sich, worauf auch Scherl schon hingewiesen hat, das Fehlen des Eisens in dem mit Säure behandelten Pigment und der nur geringe Eisengehalt in dem Rosow'schen Präparat nicht zur Widerlegung der positiven Befunde verwerthen.

Schwefel wurde weder von Sieber, noch von Rosow oder Hirschfeld gefunden.

Der Aschegehalt schwankte in den untersuchten Präparaten ungemein. Am meisten fand Scherer, nämlich 9,8^o %, sehr wenig Rosow, 0,59^o %, und Hirschfeld, 0,9^o %. Sieber fand einen Aschegehalt von 2,15^o %. Die Asche der Präparate von Rosow, Sieber und Hirschfeld bestand zum grössten Theil aus Kieselsäure.

Zum Vergleich der Präparate gebe ich in einer Tabelle das Ergebniss der Elementaranalysen verschiedener Pigmentpräparate, aschefrei berechnet:

	Scherer			Sieber		Rosow
C	58,273%	58,672%	57,908%	60,34%	59,9%	54,29%
H	5,973%	5,962%	5,817%	5,02%	4,61%	5,35%
X		13,768%			10,81%	10,18%
O	21,986%	21,598%	22,507%	23,83%	24,68%	30,18%

Ich wählte zur Darstellung des Augenpigmentes ein Verfahren, das ähnlich dem von Scherer und Gmelin den Farbstoff nur chemisch indifferenten Proceuren unterwarf.

Mehrere hundert Rinderaugen wurden, nachdem sie äusserlich roh von anhängenden Gewebstheilen befreit waren, durch einen ca. 1 cm. hinter dem Hornhautrande verlaufenden Schnitt in 2 Theile getheilt, eine vordere und eine hintere Hälfte. Der hintere Bulbustheil wurde umgestülpt, die Retina mit dem Finger nach dem Schnerveneintritt zusammengestrichen und hier abgeschnitten. Dann wurde die Chorioidea mit der Pigmentschicht mittelst Pincette vom Rande der Sklera abgelöst. Dem vorderen Bulbustheil wurde gleichfalls alles pigmenthaltige Gewebe wie Iris, Ciliarkörper, Chorioideareste mit der Pincette entnommen und mit dem vorhergewonnenen Theile der Chorioidea in einem Gefäss mit Wasser aufgefangen.

Nach öfterem Wechseln des Wassers wurde das Pigment mit einer Federfahne von den Augenhäuten in Wasser abgestrichen und so von den Häuten getrennt. Zur Trennung von noch vorhandenen Gewebstetzen wurde nun durch ein Rohseidenfilter filtrirt, durch das das Pigment hindurchging. Um das langsame und unvollständige Absetzen des Pigmentes zu beschleunigen, wurde ein gleiches Volumen gesättigter Ammonsulfatlösung zugesetzt und das Ganze kurz bis auf ca. 80° C. erhitzt.¹⁾ Jetzt ballte sich das Pigment in kleinen Flocken zusammen und setzte sich leicht ab. Der grösste Theil der Flüssigkeit über dem am Boden des Gefässes lagernden Farbstoff konnte abgegossen werden, der Rest wurde filtrirt. Das Pigment blieb jetzt auf dem Seidenfilter zurück und wurde so lange mit Wasser gewaschen, bis das abfliessende Wasser mit Baryumchlorid keinen Niederschlag mehr gab. Darauf wurde das Pigment in der Rohseide längerer Extraction mit Alkohol und Aether im Soxhlet'schen Extractionsapparat unterworfen, sorgfältig.

¹⁾ Da die Augenhäute vorher gut ausgewässert waren, war nicht zu befürchten, dass dabei eine Coagulation von gelöstem Eiweiss und damit eine Verunreinigung des Präparates zu Stande käme.

ohne Seidenfasern mitzunehmen, vom Filter entfernt, wurde es dann in einer Schale auf dem Sandbade getrocknet und fein zerrieben.

Das so gewonnene Pigment besteht aus einem amorphen Pulver von dunkelbrauner Farbe, gänzlich unlöslich in Wasser, Alkohol, Aether, Chloroform, Benzol, Schwefelkohlenstoff, Eisessig, Chloralhydrat. Es hinterlässt beim Verbrennen 1,9^o Asche.

Die Asche stellt eine weisse Schmelze dar, die den Boden des Platintigels überzieht. Sie löst sich nicht in Wasser, jedoch leicht in Salzsäure, langsamer in Salpetersäure. Auf Zusatz von Kaliumferrocyanid entsteht momentan deutliche Blaufärbung, später ein Niederschlag. Sie enthält also Eisen. Daneben findet sich Phosphorsäure, aber kein Chlor.

Das Präparat wurde längere Zeit bei 110^o C. getrocknet und dann der Elementaranalyse unterzogen.

Dieselbe ergab: 1)

C	53,74 ^o o	53,26 ^o o	53,33 ^o o
H	5,301 ^o o	5,17 ^o o	5,26 ^o o
N	12,5 ^o o	12,5 ^o o	12,2 ^o o

Aschefrei berechnet:

C	54,78 ^o o	54,29 ^o o	54,36 ^o o
H	5,40 ^o o	5,27 ^o o	5,37 ^o o
N	12,74 ^o o	12,74 ^o o	12,47 ^o o
O	27,08 ^o o	27,70 ^o o	27,80 ^o o

Nach der von mir eingehaltenen Darstellungsweise musste das von mir analysirte Präparat aus den Pigmentkörnchen in toto, Stroma und Farbstoff, bestehen. Nur das von Scherer dargestellte Präparat war mit ebensowenig eingreifenden Mitteln erhalten und es war darnach zu erwarten, dass meine Analysenzahlen mit jenen Scherer's übereinstimmen würden. Das ist jedoch, wie eine Nebeneinanderstellung der Zahlen zeigt, nicht der Fall.

Scherer ²⁾	Mittel aus meinen Bestimmungen
C 58,28 ^o o	54,48 ^o o
H 5,92 ^o o	5,35 ^o o
N 13,77 ^o o	12,65 ^o o
O 22,03 ^o o	27,52 ^o o

1) Die Kohlenstoffbestimmung geschah mit Kupferoxyd und vorgelegter Kupferspirale. — Der Stickstoff wurde nach der Methode von Kjeldahl bestimmt.

2) Im Mittel.

Dieser Widerspruch ist jedoch nur scheinbar, insofern sich beide Präparate wesentlich nur durch den Sauerstoff- resp. Wassergehalt unterscheiden. Das Verhältniss von C : N ist in beiden nahezu identisch, sehr nahe 5 : 1. Auch ist zu beachten, dass der hohe Aschengehalt von Scherer's Präparat (9,8%) die Berechnung des Sauerstoffs sehr unsicher macht.

Es frägt sich nun, ob der gefundene Eisengehalt einen Beweis für die Abstammung des Pigmentes vom Hämatin, beziehungsweise Hämoglobin abgeben kann.

Im Pigment habe ich einen Eisengehalt gefunden, der sicher unter 0,01% bleibt, ein Werth, wie er auch in Geweben, die sicher nichts mit Hämoglobin zu thun haben, erhalten werden kann. Das Hämatin dagegen hat einen Eisengehalt von 8,8%, ja selbst das Hämoglobin mit 0,4% Eisen ist noch viel eisenreicher als das Pigment. Sollte der Farbstoff in engerer Beziehung zum Hämatin oder Hämoglobin stehen, so müsste in ihm jedenfalls der Eisengehalt weit höher sein.

Es wäre weiter ein Zusammenhang zwischen dem Pigment und dem eisenfreien Hämatin, dem Hämatoporphyrin, denkbar, aber schon der oberflächliche Vergleich der Zusammensetzung des Hämatoporphyrins mit der des Pigmentes ergibt das Unstatthafte einer solchen Annahme.

Die Zusammensetzung des Hämatoporphyrins ist bei Zugrundelegung von Nencki's Formel $C_{16}H_{18}N_2O_3$

$$C = 67.1\% \quad H = 6.2\% \quad N = 9.8\% \quad O = 16.8\%$$

Wie ein Vergleich mit Scherer's oder meinen Analysenwerthen zeigt, ist weder die direkte Zusammensetzung des einen Körpers ähnlich der des anderen, noch kann das Pigment aus dem Hämatoporphyrin durch Sauerstoff- oder Wasseraufnahme hervorgegangen sein, schon weil der Stickstoffgehalt des Pigmentes grösser ist als jener des Hämatoporphyrins.

Der Kohlenstoff steht zum Stickstoff im Hämatoporphyrin in einem Verhältniss von 8 : 1, im Pigment dagegen wie 5 : 1.

Wollte man trotzdem an dem genetischen Zusammenhang von Pigment und Hämatoporphyrin festhalten, so müsste man sich das Pigment aus dem Hämatoporphyrin durch Aufnahme von stickstoffhaltigen oder durch Abspaltung von stickstofffreien Complexen entstanden denken.

Hier ist aber die Zahl der Möglichkeiten so gross, dass ein Eingehen auf dieselben schlechterdings unfruchtbar ist.

Dagegen bleibt die Möglichkeit bestehen, dass das Augenpigment aus der chromogenen Gruppe des Eiweissmoleküls (Nencki) hervorgeht.

In seiner Arbeit über die pankreatischen Verdauungsprodukte des Eiweisses macht Nencki, wie Eingangs erwähnt, auf die Aehnlichkeit der Zusammensetzung aufmerksam, die zwischen dem Proteinochromogen, dem Spaltungsprodukt des Eiweisses, und den thierischen Pigmenten besteht. Er weist ferner darauf hin, dass, wie das Hämatin und Hämatoporphyrin beim Schmelzen mit Kali viel Pyrrol, und das Hämatoporphyrin mit Zinn und Salzsäure reducirt und mit Alkali übersättigt, Skatol entwickelt, so auch das rohe Bromprodukt des Proteinochromogens mit Kali geschmolzen, Pyrrol, Skatol und Indol in reichlicher Menge ergibt. Er schliesst daraus, dass im Eiweiss eine chromogene Gruppe vorhanden ist, die bei der Pankreasverdauung losgelöst wird, und die zum Aufbau des Blutfarbstoffes und der anderen thierischen Pigmente verwendet wird, dass also das Proteinochromogen die Muttersubstanz der thierischen Farbstoffe sei.¹⁾

Leider ist es bis jetzt noch nicht gelungen, das Proteinochromogen, das also anscheinend bei der Pankreasverdauung losgelöst wird, zu isoliren. Nencki's Schüler Beitler theilt ihm vorläufig die Formel zu: $C_{96}H_{119}O_{31}N_{21}S$. Es bleibt jedoch fraglich, ob es sich bei ihm wirklich um ein so hohes Molekulargewicht handelt, wie diese Formel des Schwefelgehaltes wegen anzeigt, oder um ein viel niedrigeres. Beachtenswerth ist aber, dass in der Formel das Atomverhältniss C : N sich wie 4.57 : 1 stellt, also ähnlich wie in dem von Scherer und mir analysirten Pigment.

Aehnliches ergibt sich für die Bromderivate des Proteinochromogens. In Kurajeff's²⁾ rothem Bromkörper stellt sich das

1) Beitler: Ueber das Chloroproteinochrom. Berichte der deutsch. chem. Gesellsch., 31, S. 1604.

2) Kurajeff: Zur Kenntniss der Bromproteinochrome. Hoppe-Seyler's Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. XXVI, S. 501.

Verhältniss C : N wie 5,43 : 1, in Kurajeff's schwarzem Körper wie 5,1 : 1. Da in all diesen Fällen ausserdem ein auffallend geringer Wasserstoffgehalt nachgewiesen ist, der auf das Vorhandensein ungesättigter Gruppen hindeutet, so lässt sich auf Grund der Elementarzusammensetzung in der That die Vermuthung nicht von der Hand weisen, dass das Augenpigment von der chromogenen Gruppe des Eiweisses abstammt. Das Pigment müsste danach aus dem Chromogen wesentlich durch Sauerstoffaufnahme hervorgehen. Dass es noch mannichfache andere Momente gibt, welche eine chemische Beziehung des Augenpigmentes zur chromogenen Gruppe des Eiweisses wahrscheinlich machen, soll nach Anstellung von weiteren auf Abbau des Pigmentes gerichteten Versuchen in einer späteren Arbeit zur Sprache kommen.

II. Besitzen die Pigmentkörner ein Stroma oder nicht?

Abel und Davis,¹⁾ die das Pigment der Negerhaut untersuchten, fanden, dass die Farbstoffgranula derselben, zunächst unlöslich in Alkalien, nach Einwirkung von verdünnter Salzsäure ihr Pigment an verdünnte Alkalien abgaben. Bei andauernder Anwendung von Hitze lösten sich die Körner in der alkalischen Flüssigkeit bis auf einen unbedeutenden Rückstand auf. Abel und Davis fanden weiter, dass sie sich aus einem farblosen Substrat, aus dem Pigment und anorganischer Substanz zusammensetzen. Aehnliches war auch beim Augenpigment zu erwarten, und thatsächlich spricht dafür, dass nach der Behandlung mit 5%iger Salzsäure in der Kälte das Pigment sich in Alkali löst und durch Säure wieder ausfällbar ist, wie Hirschfeld gezeigt hat.

Dass durch Einwirkung von Säure eine Veränderung eintritt, geht mit Sicherheit aus den Analysen von Sieber hervor, welche ergaben, dass das mit Salzsäure gekochte Rinderaugenpigment kohlenstoffreicher und stickstoffärmer ist, als das nicht mit Säure behandelte. Doch beweist das noch nicht

1) John C. Abel und W. S. Davis, Ueber das Pigment der Negerhaut und der Haare. Journ. of exp. Medicine, 1. 361.

die Anwesenheit eines Stromas, da eine solche Aenderung der Zusammensetzung auch auf anderem Wege, z. B. durch Abspaltung von Ammoniak und Wasser, denkbar ist.

Es wurden nun verschiedene Versuche vorgenommen, um die Existenz eines aus Eiweiss bestehenden Stromas der Pigmentkörnchen nachzuweisen oder zu widerlegen.

Der Versuch, das Stroma durch Säure- und darauffolgende Alkalibehandlung, wie Abel und Davis gethan hatten, sichtbar zu machen, ergab ein negatives Resultat.

Den Eiweissgehalt des Stromas direkt durch Eiweissreactionen darzuthun, erwies sich wegen der tiefen Eigenfärbung des Pigmentes als unmöglich.

Ein anderer Versuch, das Eiweiss nachzuweisen, ging dahin, das Pigment intensiver Pepsinverdauung zu unterwerfen und die Zusammensetzung des unverdauten Restes festzustellen.

Es wurden die pigmenthaltigen Häute auf dieselbe Art wie oben geschildert, den Augen entnommen, in eine grössere Menge Pepsinsalzsäure¹⁾ hineingethan und mehrere Tage auf dem Sandbade bei ca. 40° stehen gelassen. In dieser Lösung war innerhalb einiger Tage alles Gewebe verdaut und nur das Pigment blieb am Boden des Gefässes zurück. Dann wurde die Flüssigkeit abgehebert und durch Wasser ersetzt, das nach jedesmaligem Absitzen des Pigmentes mehrmals erneuert wurde, bis eine Probe der klaren Flüssigkeit nach Zusatz von Kalilauge und einigen Tropfen verdünnter Kupfersulfatlösung keine rotviolette Färbung mehr zeigte. Nun wurde das Pigment auf einem Seidentfilter gesammelt und der Alkohol- und Aetherextraction unterworfen, getrocknet und pulverisirt.

Auch dieses Pigmentpräparat stellt wie das auf mechanischem Wege und durch Aussalzen gewonnene ein amorphes braunes Pulver dar, ist aber ein wenig heller in der Farbe als jenes. Es enthält 1,4% Asche. Diese stellt gleichfalls eine weisse Schmelze dar, die dieselben Reactionen zeigt, wie die Asche des ersten Präparates. Sie enthält gleichfalls Eisen, doch in noch geringerer Menge.

Die Elementaranalyse (wie oben vorgenommen) ergab:

C	52.14%	51.82%
H	3.58%	3.70%
N	11.5%	11.3%

¹⁾ Es wurde Grübler'sches Pepsin genommen und eine Lösung von 1:7000 hergestellt.

	Aschefrei berechnet:		Im Mittel:
C	52,88%	52,57%	52,72
H	3,63%	3,76%	3,69
N	11,66%	11,46%	11,56
O	—	—	32,03.

Vergleichen wir diese Zahlen mit jenen, die die Analyse des ersten Präparates ergab, so sehen wir, dass das Verhältniss vom Kohlenstoff zum Stickstoff annähernd dasselbe geblieben ist, nämlich 5:1, während der Wasserstoff eine Abnahme, der Sauerstoff eine Zunahme erfahren hat.

Wenn durch die Pepsinverdauung ein Eiweisskörper entfernt worden wäre, so hätte eine Erhöhung des Kohlenstoffgehaltes neben einer Verminderung des Stickstoffgehaltes Platz greifen müssen. Der vorliegende Befund spricht daher nicht zu Gunsten der Annahme eines Eiweissstromas.

Gegen diese Deutung kann eingewandt werden, dass der Eiweisskörper des angenommenen Stromas für Pepsinsalzsäure möglicher Weise nicht angreifbar ist.

Da concentrirte Salzsäure bei anhaltendem Kochen coagulirte Eiweisskörper unter Bildung von löslichen Spaltungsprodukten löst, so wurde noch folgender Versuch gemacht:

Es wurden 3 g Pigment 5 Stunden lang mit concentrirter Salzsäure gekocht, wobei nur ein ganz geringer Theil in Lösung ging, denn die Salzsäure färbte sich nur wenig hellbraun. Dann wurde abfiltrirt und das Filtrat durch Eindampfen unter wiederholtem Wasserzusatz von Salzsäure möglichst befreit. Der Rest wurde mit Wasser aufgenommen und zeigte schwache Millon'sche Reaction. Beim Verdunsten im Exsiccator schieden sich tyrosinähnliche Nadelbüschel aus, doch war die Menge der Krystalle zu klein, um sie genauer untersuchen zu können. — Das auf dem Filter zurückgebliebene Pigment wurde durch oftmaliges Waschen mit Wasser von Salzsäure befreit, dann mit Alkohol und Aether behandelt und getrocknet.

Die Elementaranalyse dieses 5 Stunden lang mit concentrirter Salzsäure gekochten Pigmentes ergab:

			Mittel:
C	58,91	58,74	58,82%
H	3,40	3,33	3,37%
N	11,06	11,13	11,10%
O	—	—	26,61%

Wie ersichtlich, ist durch Einwirkung der concentrirten Salzsäure der Kohlenstoffgehalt des Pigmentes erhöht, der Stickstoff- und Wasserstoffgehalt erniedrigt worden. Dieser Befund könnte zu der Annahme führen, dass in der That Eiweiss, das kohlenstoffärmer und stickstoffreicher ist als der analysirte Körper, zur Abspaltung gelangt ist, zumal das Auftreten eines die Millon'sche Reaction gebenden Körpers unter den allerdings nur in kleinster Menge erhältlichen Zersetzungsprodukten einer solchen Auffassung Vorschub leistet. Ich möchte jedoch dieser Vermuthung so lange kein Gewicht beilegen, als nicht andere Spaltungsprodukte des Eiweisses sicher nachgewiesen sind, oder der Nachweis des Eiweisses auf anderem Wege sicher geführt ist. Hervorzuheben ist, dass das durch Kochen mit Salzsäure erhaltene Präparat bei der Kalischmelze eben so gut Indol und flüchtige Fettsäuren gab wie das ursprüngliche Pigment.

Dass bei Einwirkung von Alkali eine Veränderung des Pigmentes in gleichem Sinne wie durch Säure erfolgt, soll noch weiter unten erörtert werden.

III. Das chemische Verhalten des Pigmentes.

a) Oxydationsversuche.

Hirschfeld zeigte, dass in einer alkalischen Lösung des Pigmentes auf Zusatz von Wasserstoffsuperoxyd das Pigment in braunen Flocken ausfällt, ohne dass eine Oxydation des Farbstoffes dabei stattgefunden hätte, wenigstens war trotz Erhitzens und längeren Stehenlassens eine Entfärbung der Flocken nicht zu beobachten.

Eigene Versuche ergaben, dass das Pigment auch nach Zusatz von Säure durch Wasserstoffsuperoxyd nicht angegriffen wird. Hingegen wirkt Permanganat auf das Pigment deutlich ein, wie aus der Bildung eines braunen Niederschlags und dem Auftreten von Buttersäuregeruch nach Ansäuern zu entnehmen ist.

Wie Gamelin nachgewiesen hat, löst sich das Pigment in rauchender Salpetersäure unter Aufbrausen zu einer roth-

braunen Flüssigkeit, aus welcher durch Kalilauge und Wasser braune Flocken gefällt werden. Aus eigenen Versuchen ergab sich Folgendes:

Während das Pigment beim Kochen in verdünnter Salpetersäure kaum gelöst wird, löst es sich leicht in kochender concentrirter Salpetersäure unter starker Gasentwicklung zu einer klaren, dunkelbraunrothen Lösung.

Mit einem Gemenge von Schwefelsäure und Salpetersäure kurze Zeit erhitzt geht das Pigment gleichfalls unter Aufschäumen in eine klare braunrothe Lösung über. Auf Zusatz von Wasser entsteht dann eine ziemlich dichte Trübung, die sich bei längerem Stehen in braunrothen Flocken absetzt.

Dieser Niederschlag lässt sich nicht mit Aether aufnehmen. Kocht man jedoch das Pigment mit einem Gemenge von Schwefelsäure und Salpetersäure längere Zeit und ruft dann durch Verdünnen mit Wasser den Niederschlag hervor, so lässt sich dieser in Aether überführen. Der Aether nimmt gelbe Farbe an und gibt den gelösten Körper beim Schütteln mit Natronlauge an diese wieder ab. Die Lauge färbt sich dabei braunroth.

Ein Versuch, das Nitroprodukt, das hier offenbar vorlag, in etwas grösserer Menge darzustellen, verlief wie folgt:

3 g Pigment wurden mit conc. Schwefelsäure (ca. 30 ccm.) in einer Schale innig verrieben und in einen Kolben gebracht. Dann wurde langsam Salpetersäure (ca. 5 ccm.) zugesetzt und geschüttelt. Die Masse schäumte stark auf. Nach dreiviertel Stunden war alles Pigment gelöst, und nun wurde die Lösung in 2 Liter destillirten Wassers gegossen. Es bildete sich ein voluminöser dichter Niederschlag, der sich langsam zu Boden setzte. Nach Abgiessen der klaren Flüssigkeit wurde filtrirt, der Niederschlag auf dem Filter gewaschen, bis alle Säure entfernt war, und in wenig Wasser, das durch Ammoniak schwach alkalisch gemacht worden war, gelöst. Die Lösung wurde bei gelinder Temperatur bis zur Trockne eingedampft. Es blieb eine schwarzbraune, glänzende Substanz übrig, die sich in kleinen Platten leicht von der Wandung des Gefässes ablösen liess. Diese Substanz war unlöslich in Säuren, Alkohol, Amylalkohol, Aether, Chloroform, dagegen leicht löslich in Wasser und Alkalien.

Beim Reduciren des Nitroproductes mit Zinkstaub in alkalischer Lösung trat Entfärbung ein, und ein anilinähnlicher Geruch wurde wahrnehmbar.

In einer Lösung von Kaliumbichromat und verdünnter

Schwefelsäure löst sich das Pigment sehr schnell. Zusatz von Wasser ruft keinen Niederschlag hervor.

b) Einwirkung von Brom.

Nach Angabe von Hirschfeld kann das Pigment durch Chlor entfärbt werden und fällt aus einer alkalischen Lösung nach Uebersättigen mit Salzsäure in weissen Flocken aus, die beim Erhitzen sich wieder braun färben.

Nach meinen Versuchen scheint Bromwasser den Farbstoff bei gewöhnlichen Temperaturen nicht anzugreifen. Ich erhitze daher eine kleine Menge Pigment mit Bromwasser in einer wohlverschlossenen Flasche im Wasserbade mehrere Stunden lang. Nach dem Öffnen der Flasche fiel es auf, dass die Flüssigkeit kaum mehr nach Brom roch, obwohl das Pigment unverändert aussah. Ich filtrirte, wusch mit Wasser nach und löste dann den Filtrerrückstand in Ammoniak. Aus dieser Lösung fielen nach Ansäuern mit Salzsäure dunkelbraune Flocken aus. Der ausgewaschene Niederschlag erwies sich als bromfrei.

Die Bildung von Bromanil oder anderen Bromprodukten wurde nicht beobachtet.

c) Reductionsversuche.

Hirschfeld reducirte den Farbstoff mit Natriumamalgam und constatirte bei längerem Erhitzen eine Entfärbung der Lösung. Nach Zusatz von Salzsäure fielen leicht gefärbte Flocken aus, die bei langsamem Stehen an der Luft wieder dunkler wurden.

Eigene Versuche zeigten, dass mit Zinnchlorür weder in alkalischer noch in saurer Lösung Entfärbung eintritt, wohl aber eine leichte Entfärbung zu beobachten ist, wenn man das Pigment in alkalischer Lösung mit Zinkstaub längere Zeit kocht. Auch hier scheint nach langem Stehen die Lösung wieder etwas dunkler zu werden.

d) Einwirkung von Mineralsäuren.

Dass, nach Angabe von Hirschfeld, beim Kochen mit verdünnter Schwefelsäure aus dem Pigment kein reducirender Körper abgespalten wird, bestätigten auch unsere Versuche. Desgleichen konnten wir die Angabe Gmelin's bestätigen, dass concentrirte Schwefelsäure beim Erwärmen das Pigment wenigstens zu einem Theil löst, und dass beim Verdünnen mit Wasser braune Flocken ausfallen. Dieser ziemlich dichte Niederschlag verschwindet wieder auf Zusatz von Natronlauge. Das saure Filtrat gibt keine Eiweissreactionen.

Auch concentrirte Salzsäure löst, wie schon oben angegeben, das Pigment nur zu einem ganz geringen Theil.

e) Einwirkung von Alkalien.

Mit Natronlauge und Kalilauge längere Zeit gekocht, löst sich das Pigment bis auf einen kleinen Rest. Aus der Lösung wird das Pigment wieder ausgefällt durch Zusatz von Salzsäure, Schwefelsäure, Salpetersäure, während Essigsäure keinen Niederschlag hervorrufft. Auch durch Hinzufügen von concentrirter Ammoniumsulfatlösung entstehen in der alkalischen Lösung Flocken. Das Filtrat zeigt keine Eiweissreactionen. Durch Zusatz von Alkohol wird das Pigment gleichfalls wieder gefällt.

Hirschfeld unterwarf sein Pigment der Einwirkung von schmelzendem Kali bei 250°, wobei neben etwas Indöl reichlich Ammoniak entwich. In dem Schmelzrückstand konnten flüchtige höhere Fettsäuren, Oxalsäure und ein Farbstoff nachgewiesen werden, welcher anscheinend noch die Eigenschaften des ursprünglichen Pigmentes aufwies, aber bei der Probe nach Lassaigne keinen Stickstoffgehalt erkennen liess und bei der Analyse einen Gehalt von 65,82% C und 4,13% H ergab.

Das Auftreten eines stickstofffreien Produktes wäre für die weitere Aufklärung der Natur des untersuchten Melanins von grösster Bedeutung. Ich habe daher Hirschfeld's Versuch wiederholt, aber das Resultat war ein anderes.

1 g Pigment wurde mit circa der fünffachen Menge Aetzkali unter Zusatz von Wasser in einem Nickeltigel, der in einem Oelbade stand, langsam auf 250° erhitzt und so lange auf dieser Temperatur erhalten, bis die Masse nicht mehr aufschäumte. Sodann wurde erkalten gelassen und die erstarrte Schmelze mit Wasser aufgenommen. Die klare, dunkelbraune Lösung wurde filtrirt, der Farbstoff durch Zusatz von Salzsäure gefällt, auf dem Filter gesammelt und mit Wasser, dann mit Alkohol und Aether ausgewaschen.

Die Analyse ergab:

C	60,05%
H	3,65%
N	10,70%

Es war also noch eine bedeutende Menge Stickstoff vorhanden.

Schon beim Schmelzen des Pigmentes war ein deutlicher Indolgeruch aufgefallen, und die in Wasser gelöste Schmelze

zeigte nach Ansäuern mit Salzsäure deutlich Rötung eines Fichtenholzspahns.

Warum ich trotz Einhaltung der von Hirschfeld angegebenen Bedingungen nicht den stickstofffreien Körper erhielt, ist vorläufig unverständlich. Ich bin nicht mehr in der Lage gewesen, den Versuch zu wiederholen und vermag daher nicht zu entscheiden, ob die Schuld an den Versuchsbedingungen lag, oder ob die Existenz des stickstofffreien Melanins überhaupt anzuzweifeln ist. Da sich Hirschfeld zum Stickstoffnachweis der bei schwer zersetzbaren Substanzen recht tückischen Lassaigne'schen Probe bediente, ist letztere Möglichkeit nicht ganz auszuschliessen, wenngleich der wesentlich höhere Kohlenstoffgehalt seines Produktes eine intensive Veränderung der Muttersubstanz ausser Zweifel stellt.

Von grossem Interesse scheint uns dabei der Nachweis, dass die Kalischmelze aus dem Augenpigment denselben oder einen ihm äusserst nahestehenden Körper bildet, wie die Behandlung mit 10%iger Salzsäure. Es geht dies aus der nahen Uebereinstimmung der analytischen Zahlen von Sieber mit den eben angeführten hervor.

	Sieber's Melanin (Mittel)		Produkt der
	nach Einwirkung von 10% HCl.	Kalischmelze.	conc. HCl.
C	60,12%	60,05%	58,82%
H	4,81%	3,65%	3,37%
N	10,81%	10,70%	11,10%
O	24,26%	25,60%	26,61%

Durch Säure wie durch Alkali scheint somit dasselbe Endprodukt zu entstehen. Auch das in meinem Versuch nach Einwirkung von concentrirter Salzsäure erhaltene Melanin, dessen Analyse ich deshalb beifüge, steht diesem Produkte nahe. Nach dem Angeführten vollzieht sich die Umwandlung bei der Kalischmelze unter Abgabe von Indol, Ammoniak und flüchtigen Fettsäuren, bei der Säurebehandlung unter Abspaltung eines die Millon'sche Reaction gebenden, jedenfalls der aromatischen Reihe angehörigen Körpers. Da, wie mehrfach erwähnt, andere Versuche, in dem Pigment Eiweiss nachzuweisen, negativ verliefen, so kann dies Verhalten allein nicht die Annahme der Präexistenz echter Eiweissstoffe im Pigmentkorn begründen, zumal die Indolbildung auch bei dem mit kochender Salzsäure erhaltenen Präparat eintritt.

f) Trockene Destillation.

Nach Angabe von Gmelin liefert das Pigment bei der trockenen Destillation brenzliche Produkte und kohlen-saures Ammoniak.

Ich habe 3 g Farbstoff in einem kleinen Kolben der trockenen Destillation unterworfen. Das Destillat bestand aus einer braunen harzigen Flüssigkeit von brenzlichem, tabakartigem Geruch und alkalischer Reaction. Es war in Wasser nur wenig, in Aether und Alkohol dagegen leicht löslich. Wurde das Destillat sauer gemacht, so verschwand der nicotinartige Geruch, und es blieb nur der Indolgeruch zurück.

Die wässerige saure Lösung fiel mit Jodquecksilberkalium, Jodwismuthkalium, Phosphorwolframsäure, Quecksilberchlorid und Platinchlorid. Sie gab die Fichtenspahnreaction und auf Zusatz von Salpetersäure, die etwas salpetrige Säure enthielt, Rotfärbung. Beim Kochen mit Salzsäure färbte sich die Lösung rothgelb.

Nach diesem Verhalten ist der Schluss gestattet, dass bei der trocknen Destillation neben Indol flüchtige, stickstoffhaltige Basen, wohl der Pyridinreihe angehörig, entstanden waren. Um diese von dem Indol zu trennen, wurde die mit Salzsäure schwach angesäuerte Lösung der Destillation unterworfen, bis kein Indol mehr überging, dann der Rückstand, welcher die basischen zur Verharzung neigenden Produkte enthielt, eingengt. Doch konnte eine Krystallisation der salzsauren Salze nicht erreicht werden.

In einem weiteren Versuch wurde das Pigment mit Zinkstaub der trocknen Destillation unterworfen. Das spärliche Destillat zeigte das gleiche Verhalten wie bei einfacher trockner Destillation.

Die Schwierigkeit, sich genügendes Ausgangsmaterial zu verschaffen, machte vorderhand weiteren Untersuchungen ein Ende. Aus dem Angeführten lassen sich aber einige der Hervorhebung würdige Punkte entnehmen:

1. Ein Stroma war in den Pigmentkörnchen auf keine Weise nachweisbar.
2. Die Zusammensetzung der Pigmentkörnchen bei Anwendung ganz indifferenten Isolirungsmethoden ergab sich zu $C = 54,56\%$, $H = 5,34\%$, $N = 12,7\%$, $O = 27,40\%$. Das Verhältniss $C : N$ ist darin nahezu 5 : 1, ebenso wie in dem

seinerzeit von Scherer ebenfalls mit indifferenten Methoden, aber viel aschereicher erhaltenen Farbstoff.

3. Bei der Einwirkung von Säuren und Alkalien verändert sich die Zusammensetzung, indem der Kohlenstoffgehalt steigt, der Stickstoffgehalt herabgeht. So erklärt sich die mehr oder weniger abweichende Zusammensetzung der von Rosow mit Essigsäure, von mir mit Pepsinsalzsäure, von Sieber und von mir mit Salzsäure erhaltenen Produkte.

4. Als Endprodukt der Einwirkung von kochender Säure und schmelzendem Kali wird ein Körper erhalten (Sieber und ich), in welchem das Verhältniss von C : N sich 13 : 2 stellt.

5. Es erfolgt eine Abspaltung von Indol, Ammoniak und flüchtigen Fettsäuren bei der Kalischmelze (Hirschfeld und ich), die Abspaltung eines aromatischen, die Millon'sche Reaction gebenden Complexes bei der Säureeinwirkung (ich).

6. Eine nähere chemische Beziehung des Augenpigmentes zu dem Blutfarbstoff oder dem Hämatin ist nirgends zu erkennen. Wohl aber ist die Bildung desselben aus dem indol-liefernden aromatischen Complex des Eiweissmoleküls nach Zusammensetzung und sonstigem Verhalten als durchaus möglich zu bezeichnen.

Anmerkung bei der Correctur. Das, wie oben erwähnt, bei den natürlich vorkommenden und künstlich aus Eiweiss erzeugten Melaninen, so wie bei den Halogenderivaten des «Proteinochromogens» anzutreffende Verhältniss der Kohlenstoff- und Stickstoffatome gleich 5 : 1 weist auf die Präexistenz einer entsprechend zusammengesetzten aromatischen Gruppe im Eiweissmolekül hin. Die von Herrn Prof. Hofmeister in dieser Richtung veranlassten Untersuchungen haben insofern Erfolg gehabt, als es Herrn Dr. Fritz Baum im hiesigen Laboratorium gelungen ist, unter den Produkten der Pankreasverdauung einen krystallisirenden, gut charakterisirten Körper von der Zusammensetzung $C_{10}H_{16}N_2O_2$ aufzufinden, welcher bei der Kalischmelze Indol bzw. Skatol liefert.