

# Beiträge zur Charakterisirung des Sarcommelanins vom Menschen.

Von

Dr. Leo v. Zumbusch.

(Aus dem Universitäts-Laboratorium f. med. Chemie in Wien);

(Der Redaction zugegangen am 11. September 1902.)

Die grosse Anzahl brauner und schwarzer Pigmente, welche unter dem Namen der melanotischen Farbstoffe zusammengefasst werden, kann sicherlich nicht, weder nach der Genese, noch nach der chemischen Zusammensetzung, eine einheitliche Gruppe bilden: die Unterscheidung dieser Körper ist jedoch von besonderer Schwierigkeit, da die einzelnen Glieder mit Ausnahme ihres Tinctionsvermögens keine auffallenden Eigenschaften besitzen, auch bei der spectrokopischen Untersuchung kein charakteristisches Bild geben. Zudem kann leicht bei dem Versuche, diese Pigmente zu isoliren, die Bildung neuer, verunreinigender Farbstoffe eintreten, indem manche, an sich farblose, Verunreinigungen bei der Behandlung des Rohproductes mit stärker wirkenden Reagentien in intensiv und ähnlich braun bis schwarz gefärbte Veränderungsproducte übergehen. Dadurch ist wohl zu erklären, dass eine der Fragen von allgemeinem Interesse: ob das Melanin der Sarcome in Beziehungen zum Blutfarbstoff stehe, bisher noch nicht endgiltig gelöst ist, wiewohl eine ganz beträchtliche Zahl sorgfältiger Arbeiten über dieses Thema existirt.

In aller Kürze sei der gegenwärtige Stand dieser Frage vorgetragen. Während in den älteren Lehrbüchern, z. B. in Lehmann's Lehrbuch der physiol. Chemie (1853) und selbst noch in Frey's Handbuch der Histologie und Histochemie des Menschen (1870), es als selbstverständlich angenommen wird,

dass alles Pigment aus dem Blutfarbstoff stamme, war, soweit ich feststellen kann, Dressler<sup>1)</sup> der erste, der eine Elementaranalyse eines aus Tumoren dargestellten Melaninpigmentes veröffentlichte und der Ansicht, das Melanin sei ein Derivat des Hämoglobins, entgegentrat. Nach ihm könne es kaum zweifelhaft sein, dass zwischen Hämatin und Melanin kein näherer Zusammenhang bestehe. Sein Präparat, das durch Ausfaulen von Eiweiss befreit worden war, enthielt 51,73% Kohlenstoff, 5,07% Wasserstoff, 13,24% Stickstoff, auf aschefreie Substanz berechnet. Der Aschengehalt betrug 14,7% (Dressler schreibt zwar 1,47%, doch gibt er an, in 0,847 g Substanz seien 0,126 g Asche enthalten gewesen, in welcher Eisen, Kalk, Kieselsäure und Thonerde nachgewiesen wurden. Sein gesamtes Material betrug 2—3 g.<sup>2)</sup>

Im Jahre 1886 erschien die erste Arbeit von Berdez<sup>3)</sup> und Nencki, welche Autoren zur Entfernung von Eiweissstoffen ihr Rohproduct 1—2 Stunden mit 10%iger Salzsäure kochten. Aus dem grossen Schwefelgehalte des Productes wurde geschlossen, es könne nicht wohl ein Derivat des Blutfarbstoffes sein. «Die Vorstellung, dass das melanotische Pigment durch Missbildung des Blutfarbstoffes entstehe, muss fallen gelassen werden» (Bd. XX, S. 357).

In den späteren Arbeiten verwahrt sich Nencki lediglich gegen eine Entstehung des Melanins aus Hämatin. Sein zur Entfernung der Eiweisskörper durch 1—2 Stunden mit 10%iger Salzsäure gekochtes Präparat war frei von Eisen. Es enthielt 54,21% Kohlenstoff, 4,27% Wasserstoff (bezogen auf aschefreie Substanz), 10,59% Stickstoff, 10,04% Schwefel, 1,11% Asche. Die Autoren sprechen die Annahme aus, dass das Phymatorhusin, mit welchem Namen der von ihnen aus dem menschlichen melanotischen Sarcom isolirte Farbstoff be-

1) Vierteljahrschrift für pract. Heilkunde. Prag 1865. 4 Bd. S. 9. Vergl. Mörner's Arbeit, Diese Zeitschr., Bd. XI.

2) Vergl. damit die Bemerkung in Mörner's Arbeit, Diese Zeitschr., Bd. XI. S. 71.

3) Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmak. Bd. 20, S. 346, ferner Bd. 24, S. 27 und S. 448.

zeichnet wurde, durch eigenthümliche Condensation aus dem Eiweiss gebildet werde.

Kurz darauf hat Mörner<sup>1)</sup> mehrere von ihm aus einem Tumor und aus Harn desselben Kranken isolirte Fractionen von Melanin untersucht und zum Ausgangspunkte einer Erörterung über die Genese der Pigmente gemacht. Seine Resultate stehen zu denen Nencki's im Gegensatz. Mörner erklärt die von Nencki geübte Methode der Reindarstellung für zu energisch und hält das Phymatorhusin für ein weitgehendes Zersetzungsproduct, denn auf das Kochen mit Salzsäure sei der Mangel an Eisen und die niedere Zahl für Stickstoff zurückzuführen. Aus dem Eisengehalt seiner Präparate schliesst Mörner, das Melanin sei ein Derivat des Blutfarbstoffs, obgleich er zugibt, dass der hohe Schwefelgehalt des Melanins schwer zu erklären sei. Mörner's Eisenbestimmungen wurden photometrisch durchgeführt. Die Zusammenstellung der Analysenzahlen findet sich in seiner ersten Arbeit S. 128. In seiner Entgegnung auf diese Arbeit (Arch. f. exp. Pathol. Bd. 24 S. 30) hebt übrigens Nencki hervor, dass die Bildung des Melanins aus der eiweissartigen Componente des Häoglobins nicht ausgeschlossen sei.

In der Folge wurden wiederholt Untersuchungen über dieses Thema unternommen, deren Resultate bald die eine, bald die andere Ansicht zu stützen schienen. So gründet Oppenheimer<sup>2)</sup> auf chemische und histologische Untersuchungen seine Ansicht, das Melanin entstehe durch metabolische Zellthätigkeit, und nicht aus dem Blutfarbstoff. Auch die Untersuchungsergebnisse von Miura<sup>3)</sup> stimmen mit denen von Berdez und Nencki überein, während Wallach<sup>4)</sup> das Eisen für einen integrirenden Bestandtheil des Melanins hält. Brandl und Pfeifer<sup>5)</sup> beschreiben einen Fall von melanotischem Sarcom, sowie die Darstellung von Pigment aus Tumormasse

1) Diese Zeitschr., Bd. XI. S. 66 und Bd. XII. S. 229.

2) Virchow's Arch., Bd. 106, S. 515.

3) Ebenda. Bd. 107, S. 250.

4) Ebenda. Bd. 119, S. 175.

5) Zeitschr. f. Biologie. Bd. 26, S. 348 (1890).

und aus Harn; sie reinigten das Melanin, mit welchem sie ihre Versuche anstellten, durch Verdauung mit Pepsinsalzsäure. Ihr Präparat enthielt rund 10% Stickstoff, 2—3% Schwefel, ferner etwa 0,5% Eisen, woraus sie den Eindruck gewannen, das Melanin sei ein Abkömmling des Hämoglobins. Für diese Anschauung schien auch zu sprechen, dass die Anämie des Patienten mit auffallender Schnelligkeit, dem Wachsthum des Tumors entsprechend, zunahm.

Ein sehr bemerkenswerther Beitrag zur Theorie der Bildung melaninartiger Substanzen ist in der Arbeit von v. Fürth und Schneider<sup>1)</sup> «Ueber thierische Tyrosinasen und ihre Beziehungen zur Pigmentbildung» enthalten. In dieser Arbeit ist das Umwandlungsproduct, welches aus Tyrosin durch die Wirkung von Tyrosinase (welche aus *Deiliphilapuppen* erhalten worden war) als Melanin, allerdings im weiteren Sinne, angesprochen worden. Es ist von Interesse, dass ein solches Melanin, welches natürlich frei von Schwefel und von Eisen ist, nach einer orientirenden Analyse 55,44% Kohlenstoff, 4,45% Wasserstoff, 13,74% Stickstoff enthielt, also Zahlen, welche jenen der Präparate aus *Sarcommelanin* nicht ferne liegen. Ob aber eine derartige Tyrosinase im menschlichen Körper vorhanden ist, oder ob vielleicht der Blutfarbstoff selbst — unter Umständen — die Rolle einer solchen übernehmen könne, müsste wohl erst durch Versuche erwiesen werden. Dass bei einer schweren Krankheit wie der *Melanosarcomatose* ein im normalen Organismus nicht vorhandenes Ferment zur Entstehung komme, dürfte kaum annehmbar sein: man hätte eventuell in der hier und da behaupteten, aber anscheinend nicht bewiesenen Contagiosität dieser Geschwülste dafür eine schwache Stütze.

Sicher ist in der Frage nach der Genese des Melanins sein Schwefelgehalt von der grössten Wichtigkeit, welchen schon Nencki (l. c. Bd. XX, S. 348) als wesentlich erklärte. Zweck dieser Arbeit sollte es nun sein, bezugnehmend auf den

1) Beiträge zur chem. Physiol. u. Pathol. Bd. I. S. 229 (1901).

Schwefel des Hämoglobins und den des Melanins aus Sarcomen zu versuchen, ob nicht die Form der Bindung des Schwefels in beiden Substanzen festgestellt und dadurch ein Anhaltspunkt zur Lösung der strittigen Frage geboten werden könnte. Durch Mörner's<sup>1)</sup> wichtige Untersuchungen über die Bindung des Schwefels in den Proteinstoffen war der Weg gebahnt, und die wenig später als Mörner's erste Mittheilung, zum Theil im Anschlusse an diese publicirte Modification des Cystin-nachweises von Embden<sup>2)</sup> liess die gestellte Aufgabe als noch leichter ausführbar erscheinen.

Von der Vermuthung ausgehend, dass eine Verwandtschaft zwischen Hämoglobin und Sarcommelanin bestehe, habe ich daher Parallelversuche darüber angestellt, in welcher Bindung der Schwefel im Hämoglobin einerseits, im Sarcommelanin andererseits enthalten sei: beginnend damit, ob etwa durch den Nachweis von Cystin in hinreichender Menge die Frage rasch zu lösen wäre.

#### I. Versuche. den Hämoglobinschwefel betreffend.

1440 g feuchtes, in Nadeln krystallisirtes und mehrfach umkrystallisirtes Oxyhämoglobin vom Pferde, mit 44,23% Trockensubstanz, also 636,71 g trockenes Oxyhämoglobin, wurden mit 2000 g rauchender (40%iger) Salzsäure übergossen und durch acht Stunden am Rückflusskühler zum Sieden erhitzt. Im Anfange des Versuches trat eine stärkere Gasentwicklung ein, dem Gase war kein Schwefelwasserstoff beigemischt. Die erhitzte Flüssigkeit wurde in Eis gekühlt, hierauf wurde mit Natronlauge der grösste Theil der Säure neutralisirt, so dass die Flüssigkeit nur mehr ganz schwach saure Reaction zeigte. Es wurde genau nach der Vorschrift Embden's verfahren: nach 24 Stunden hatte sich der sogenannte Melanin-niederschlag abgesetzt und konnte leicht durch Filtration getrennt werden. Nach dem Auswaschen und Trocknen bei 110° betrug sein Gewicht 352 g (ein kleiner Theil des Niederschlages

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXVIII, S. 595 (1899) und Bd. 34, S. 207 (1901).

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXXII, S. 94 (1901).

hatte von dem grossen Filter, der verwendet worden war, nicht getrennt werden können). Das Filtrat war mässig gelbbraun, ganz klar und noch in dicker Schichte durchsichtig, weshalb die Anwendung von Thierkohle zum Entfärben unterbleiben konnte. Nach zweitägigem Stehen des Filtrates an einem kühlen Orte hatte sich ein reichlicher gelblichgrauer Niederschlag am Boden und an den Wänden des Glases abgesetzt. Dieser Niederschlag wurde filtrirt und aus Ammoniakwasser umkrystallisirt. Er bestand ausschliesslich aus Tyrosin, welches durch rein mikroskopisches Aussehen, die positive Millon'sche Reaction und die leichte Löslichkeit in ganz verdünnter Salpetersäure genügend charakterisirt wurde. Der Tyrosinniederschlag war absolut schwefelfrei. Beim Umkrystallisiren blieb eine kleine Menge eines feinkörnigen grauen Niederschlages, die in Ammoniakwasser, ebenso in concentrirter Salzsäure unlöslich war, zurück. Mikroskopisch bestand dieser Rückstand aus amorphen Krümeln, beim Glühen hinterblieb viel Asche. Zu einer weiteren Untersuchung reichte diese Menge nicht aus. Auch die Mutterlauge des Tyrosins war schwefelfrei.

Das Filtrat wurde wiederholt eingeengt, nachdem von dem jeweilig entstandenen Niederschläge abfiltrirt worden war. Die Niederschläge bestanden hauptsächlich aus Chlornatrium. Ich versuchte aus ihnen Cystin zu isoliren, jedoch durchwegs ohne Erfolg. Ebenso wenig gelang die Darstellung des Cystins aus dem letzten, bereits sehr eingeengten Filtrate, wie aus den verschiedenen kochsalzhaltigen Waschwässern.

Aus diesem negativen Befunde glaube ich schliessen zu dürfen, dass das untersuchte Oxyhämoglobin frei ist von Cystin, oder höchstens nur Spuren davon enthalten mag. Ich habe zu meiner Orientirung die Embden'sche Methode an Hornspähnen erprobt, und es gelang mir ohne Schwierigkeit, grosse Mengen von Cystin zu gewinnen. Allerdings bedaure ich, die in der zweiten Publication Mörner's beschriebene Modification der Cystindarstellung damals nicht gekannt zu haben, da ihre Resultate, was die quantitative Ausbeute betrifft, bei fast ebenso einfacher Ausführbarkeit (abgesehen von der etwas längeren Zeitdauer) in quantitativer Hinsicht nach meinen Erfahrungen

bei weitem bessere sind. Leider ist es mir momentan unmöglich, den beschriebenen Versuch nach letzterer Methode zu wiederholen.

Um zu erfahren, in welche Fraction der Schwefel des Blutfarbstoffes bei der Zerkochung mit Salzsäure geräth, habe ich, soweit es durchführbar war, quantitativ arbeitend, aus jeder Fraction den Schwefelgehalt bestimmt. Vorproben hatten ergeben, dass ein Theil des Schwefels in oxydierter Form, als Schwefelsäure, vorhanden war. Es wurden demnach 1. das Pseudomelanin (a), dessen Menge, wie schon erwähnt, 352 g betrug, 2. die mit dem letzten Filtrate vereinigten Waschwässer, die beim Einengen der von dem Pseudomelanin filtrirten Flüssigkeit erhalten worden waren (b), und 3. die Fällungen, welche während des Einengens dieser Flüssigkeit entstanden (c) und die vorwiegend aus Kochsalz bestanden, separat untersucht und zwar einerseits direct auf den Gehalt an Schwefel oder Schwefelsäure, andererseits nach dem Schmelzen mit Soda und Salpeter. (Ich habe einen Versuch gemacht, die Oxydation mit Natrium-superoxyd auszuführen, der Versuch ging jedoch nicht glatt von Statten wegen des starken Schäumens nach dem Zusammenbringen des angefeuchteten Melanins mit dem Peroxyd.) Vom Pseudomelanin (a) wurden 3,1766 g mit Soda und Salpeter oxydirt. Die Schmelze gab 0,0842 g reines Baryumsulfat, entsprechend 0,0116 g Schwefel, oder für die Gesamtmenge 1,286 g Schwefel. 5 g Pseudomelanin wurden mit 3 g Aetznatron e Natrio in wenig Wasser gelöst und durch 6 Stunden im Wasserbade erhitzt, hierauf mit Aetzbaryt versetzt; der Barytniederschlag war schwefelsäurehaltig, doch wurde auf eine quantitative Bestimmung verzichtet, da eine Oxydation beim Schmelzen vorauszusehen war. Das Filtrat vom Barytniederschlage wurde nach dem vorsichtigen Entfärben mit Thierkohle mit Nitroprussidnatrium geprüft. Die Probe fiel negativ aus.

Die Flüssigkeit (b) wurde auf 1000 cem gestellt, 50 cem davon enthielten 0,5540 g Baryumsulfat, entsprechend 0,0761 g Schwefel, daher enthält die gesammte Flüssigkeit 1,522 g Schwefel. Bei der Oxydation mit Soda und Salpeter wurden analog 0,5913 g Baryumsulfat, resp. 0,0810 g Schwefel, für

die Gesamtflüssigkeit 1,620 g Schwefel ermittelt. Es ist leider hier und bei dem folgenden Versuche übersehen worden, den Baryumsulfatniederschlag vom anhaftenden Baryumnitrat zu reinigen, wonach die Differenz der Schwefelwerthe sich wohl noch verringert hätte. Dass sich die gefundene Differenz auf Schwefel bezieht, der in nicht oxydirter Form vorhanden war, ist nicht wahrscheinlich. Ich habe auch den directen Nachweis desselben mit Nitroprussidnatrium gar nicht versucht.

Der kochsalzreiche Rückstand (c) wurde getrocknet und gleichmässig gemischt. Sein Gewicht betrug 515 g. 5,601 g davon wurden mit Soda und Salpeter geschmolzen. Die Schmelze gab 0,0770 g ungereinigtes Baryumsulfat, entsprechend 0,0106 g Schwefel, oder 0,9728 g für den ganzen Rückstand. Der Rest des Rückstandes wurde hierauf in 4000 ccm Wasser gelöst, aus 100 ccm der Lösung wurden die Sulfate gefällt; dabei wurden 0,1660 g Baryumsulfat oder 0,0228 g Schwefel, für die gesammte Substanz (c) daher 0,922 g Schwefel gefunden.

Werden die einzelnen für den Schwefel gefunden Werthe addirt, so erhält man in einem Falle 0,586% Schwefel, im anderen Falle 0,609% Schwefel. Davon ist mehr als die Hälfte, nämlich 0,384%, ohne Oxydation als Schwefelsäure gefunden worden. Pferdeoxyhämoglobin enthält nach Kossel<sup>1)</sup> 0,65%, nach Zinoffsky<sup>2)</sup> 0,39% Schwefel. Da die beschriebenen Bestimmungen in Folge der unvermeidlichen Verluste eher zu kleine Resultate gegeben haben, so darf wohl gefolgert werden, dass der ganze Schwefel im Oxyhämoglobin in weitgehend oxydirter Form vorhanden ist. Ob der im «Pseudomelanin» so fest haftende Schwefel in Form von Schwefelsäure enthalten ist, konnte ich nicht entscheiden.

## II. Versuche, betreffend den Schwefel des Sarcommelanins

Das Material hierzu stammte aus drei Lebern von Kranken, die an primärem Augenmelanosarcom gelitten hatten. Dieselben waren enorm vergrössert, mit höckeriger Oberfläche, auf dem Schnitt massenhafte, nur schmale Brücken normaler (resp. braun

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. 2. S. 150.

<sup>2)</sup> Ebenda. Bd. 10. S. 16.

atrophischer) Lebersubstanz überlassende, kohlschwarze, zerfliesslich weiche Tumoren von Erbsen- bis Mannsfaustgrösse. Diese Lebern wurden, nach Herauspräpariren der grössten Tumoren, in feine Scheiben aufgeschnitten und die Tumormasse aus dem festeren Gerüst von Lebergewebe durch Schütteln und Schwenken in einem Tuch unter Wasser isolirt. Der schwarze Brei konnte durch wiederholtes Decantiren mit Wasser von dem grössten Theil der gelösten Eiweissstoffe getrennt werden. Sodann wurde die Masse getrocknet und im Soxhlet'schen Extractionsapparat so lange mit Aether extrahirt, als etwas in Lösung ging, was mehrere Wochen in Anspruch nahm. Dann wurde der Farbstoff, um ihn von allem Eiweiss sicher zu reinigen, zwei Wochen lang mit mehrmals gewechselter 0.4%iger Salzsäure und Pepsin digerirt, so lange, bis die Lösung nach tagelanger Einwirkung keine Biuretreaction zeigte; endlich wurde mit heissem Wasser extrahirt, dann 4 Tage mit 5%iger Salzsäure bei 37° digerirt, endlich wieder mit Wasser gewaschen. Auch die zuletzt angewendete Salzsäure gab die Biuretreaction nicht.

Es stellte ein grobkörniges, nicht leicht zerreibliches, kohlschwarzes, auf dem Striche braunes Pulver dar, das sich in organischen Lösungsmitteln und Säuren nicht löste, wohl aber starke Alkalien sofort braun färbte.

Wie die angeführte Reinigungsmethode zeigt, dürfte das Präparat frei von Eiweiss gewesen sein, war jedoch (s. u.) sehr reich an Asche. Ich verzichtete jedoch lieber darauf, die schwerlösliche Asche wegzubringen (findet sich doch in der Litteratur fast immer nur aschehaltiges Melanin beschrieben), als dass ich solches durch Behandeln mit starken Säuren zu erreichen versucht hätte, oder durch andere eingreifende Behandlungsweisen, von denen allen ich fürchten musste, dass durch sie die Bindung des Schwefels geändert werde. Leider war gerade dieses Präparat, wie die Analyse zeigt, verhältnissmässig recht arm an Schwefel. Obwohl ich also keineswegs beanspruche, dass das angewandte Präparat als rein gelten möge, sondern nur trachtete, ein eiweissfreies und unzersetzt Melanin zu erhalten, habe ich zur Orientirung

Elementaranalysen des Körpers gemacht, deren Resultate folgende sind:

Es wurden 1,3724 g bei  $110^{\circ}$  zum constanten Gewicht getrockneten Melanins vorsichtig verascht. Sie ergaben 0,257 g oder 18,726% blassröthlicher Asche. Wurde die Asche 10 Stunden mit rauchender Salzsäure (40%) am Wasserbad erhitzt, so blieben 0,0032 g ungelöst, bestehend in weissen Kieselsäureflocken. Eine Kohlensäureentwicklung fand bei der Einwirkung der Salzsäure nicht statt.

Die abfiltrirte Lösung wurde mit Ferrocyankalium unter Vermeidung von grossem Ueberschuss versetzt, das überschüssige Ferrocyankalium mit Chorzink gefällt, der Niederschlag unter Kochsalzzusatz abfiltrirt, der Niederschlag auf dem Filter mit Kalilauge zersetzt, gewaschen, das Eisenhydroxyd mit Salzsäure gelöst und mit Ammoniak gefällt. Es wurden 0,0092 g Eisenoxyd nach dem Glühen gefunden, was 0,0065 g oder 0,474% Eisen entspricht.

Ausserdem enthielt die Asche reichlich Phosphorsäure, Schwefelsäure und eine bedeutende Menge von Calcium.

Für die Elementaranalysen wurde die Substanz gleichfalls bei  $110^{\circ}$  zum constanten Gewicht getrocknet.

Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff durch Verbrennung mit chromsaurem Blei:

1. 0,5955 g Substanz (0,1840 g aschefrei) ergaben:  
 0,2828 g  $H_2O$  oder 0,0314 g H; das ist 6,48% H.  
 0,9173 g  $CO_2$  > 0,2502 g C; > > 51,70% C.
2. 0,3765 g Substanz (0,3060 g aschefrei) ergaben:  
 0,1778 g  $H_2O$  oder 0,0197 g H; das ist 6,44% H.  
 0,5797 g  $CO_2$  > 0,1581 g C; > > 51,66% C.

Die Stickstoffbestimmung nach Dumas ergab:

1. 0,5950 g Substanz (0,4836 g aschefrei) lieferten  
 62,2 ccm N bei  $20,9^{\circ}$  C. und 742,5 mm Barometerstand;  
 das ist 14,664% N.
2. 0,2264 g Substanz (0,1840 g aschefrei) lieferten  
 23,3 ccm N bei  $20,2^{\circ}$  C. und 741,5 mm Barometerstand;  
 das ist 14,452% N.

Schwefelbestimmung nach Carius:

1. 0,7386 g Substanz (0,6047 aschefrei) ergaben, 8 Stunden mit

3 ccm rauchender Salpetersäure im Rohr auf  $180^{\circ}$  erhitzt 0.0858 g  $\text{BaSO}_4$  oder 0.0117 g S; das ist 1.77% S.

2. 0.5487 g Substanz (0.4492 g aschefrei), ebenso behandelt, ergaben 0.0557 g  $\text{BaSO}_4$  oder 0.00765 g S; das ist 1.70% S.

Alles auf aschefreie Substanz gerechnet.

Als Mittelwerthe für das bei  $110^{\circ}$  getrocknete, als aschefrei gerechnete Rohmelanin sind demnach gefunden worden:

51.68% Kohlenstoff, 6.46% Wasserstoff, 14.56% Stickstoff,  
1.74% Schwefel (0.47% Eisen.)

Mit 31.5 g (25.36 g aschefrei) Melanin wurde analog, wie für den Blutfarbstoff beschrieben, der Versuch gemacht, Cystin zu gewinnen. Das Melanin wurde mit 150 g rauchender Salzsäure durch 8 Stunden auf dem Wasserbade zerkocht, unter Anwendung eines Rückflusskühlers. Die erhaltenen Fractionen seien analog wie beim Blutfarbstoff a, b, c genannt.

Es ist mir nicht gelungen, Cystin abzuschneiden, auch Tyrosin konnte in keiner Fraction gefunden werden.

Die Menge des Pseudomelanins (a) betrug 9.672 g. 0.5152 g desselben gaben nach dem Schmelzen mit Soda und Salpeter 0.1051 g reines Baryumsulfat, entsprechend 0.0144 g Schwefel; die Gesamtmenge enthält demnach 0.2703 g Schwefel. 2 g des Pseudomelanins wurden mit etwa 20 ccm 40%iger Natronlauge e Natrio durch 5 Stunden auf dem Wasserbade erhitzt; nach dem Verdünnen wurde filtrirt. Das braune Filtrat, mit Thierkohle entfärbt, gab mit Nitroprussidnatrium keine Färbung.

Die neutralisirte Flüssigkeit (b + c), deren Menge 320 ccm betrug, wurde auf Sulfate untersucht, bevor die Cystindarstellung unternommen wurde. 20 ccm dieser Flüssigkeit gaben 0.0538 g Baryumsulfat, entsprechend 0.0074 g Schwefel; für die gesammten 320 ccm 0.1044 g Schwefel.

Es sind damit 0.3747 g Schwefel oder 1.48% nachgewiesen, und nur 0.255% des gesammten Schwefels könnten überhaupt auf Cystin entfallen. Auf den Nachweis dieser kleinen Menge nach der Oxydation mit Sodasalpeter habe ich

überhaupt verzichtet. Indem es nun nicht als wahrscheinlich angesehen werden kann, dass  $\frac{1}{6}$  des Schwefels im Sarcommelanin als Cystin gebunden sei, da doch nach Mörner das Cystin gemeiniglich den bedeutendsten Antheil des Schwefels, der in den von diesem Forscher untersuchten Eiweisskörpern enthalten war, ausmacht, so hat man zwei Möglichkeiten zu bedenken: 1. mag das Sarcommelanin keinen Cystincomplex enthalten, und die Differenz in den Schwefelbestimmungen wäre eventuell auf Versuchsfehler zu beziehen; 2. könnte der Schwefel in solcher Bindung durch das Kochen mit starker Salzsäure an der Luft oxydirt worden sein. Was diesen Punkt betrifft, gibt Mörner allerdings an, dass beim Kochen von Cystin mit Salzsäure selbst während längerer Zeit eine merkliche Oxydation nicht stattfindet.

Um den Einfluss der Luft zu untersuchen, wurden noch die folgenden Versuche gemacht:

Es wurden 0,8160 g (0,6632 g aschefreies) Melanin mit einigen Grammen 20%iger Salzsäure durch 12 Stunden auf 130° im zugeschmolzenen Rohre, das vorher mit Kohlensäure gefüllt worden war, erhitzt. Nach dem Oeffnen war ein scharfer brenzlicher Geruch und daneben auffallender Weise der des Schwefelwasserstoffs wahrzunehmen. Bleipapier wurde rasch geschwärzt. Die Lösung enthielt 0,0100 g Schwefel in Form von Schwefelsäure, die direct mit Chlorbaryum ausfällbar war, oder 0,23% (gefunden 0,0072 g Baryumsulfat), der ungelöste Rückstand 0,0047 g Schwefel oder 0,71% (gefunden 0,0340 g Baryumsulfat).

Um zu sehen, ob vielleicht die auffallende Bildung von Schwefelwasserstoff nur eine Wirkung der hohen Temperatur ist, wurden noch drei analoge Versuche gemacht, zu welchen schwefelreiche Melaninfractionen verwendet wurden, die aus der Versuchsreihe von v. Zeynek und Zdarek mir zur Verfügung gestellt wurden. Es wurden einerseits 0,315 g der als Nr. VIII dort beschriebenen Fraction mit 10 ccm Salzsäure und  $\frac{1}{2}$  g Chlorbaryum im zugeschmolzenen Rohre, in welchem die Luft durch Kohlensäure verdrängt worden war, durch 6 Stunden auf 170° erhitzt: beim Oeffnen des Rohres war

eine reichliche Menge von Schwefelwasserstoff zu bemerken. Es wurde dabei gleichzeitig das gebildete Baryumsulfat gewogen: sein Gewicht betrug 0,0077 g, entsprechend 0,3% Schwefel der verwendeten Substanz. Andererseits wurden 0,293 g der gleichen Fraction in analoger Weise behandelt, nur wurde statt des Chlorbaryums ein Zusatz von Quecksilberchlorid gegeben; nach dem Abfiltriren des Schwefelquecksilbers und dem Waschen desselben mit verdünnter Salzsäure und schliesslich mit Ammoniak zur Entfernung organischer Producte wurde das Schwefelquecksilber mit Salzsäure und chlorsaurem Kalium gelöst, und in der Lösung wurde die Schwefelsäure bestimmt. Gefunden wurden 0,0397 g Baryumsulfat, entsprechend 1,73% Schwefel. In einem dritten Versuche endlich wurden 0,297 g der gleichen Fraction durch 10 Stunden auf 100° erhitzt, in analoger Weise im zugeschmolzenen Rohre. Dabei konnte kaum eine Spur von Schwefelwasserstoff wahrgenommen werden. An Schwefelsäure war auch nur eine Spur zugegen, die von einer Oxydation durch Luftreste im Rohr herrühren könnte. Die filtrirte Flüssigkeit wurde mit einer Lauge stark alkalisch gemacht und nach Zusatz von alkalischer Bleilösung durch eine Stunde in lebhaftem Kochen erhalten. Es war dabei keine Braunfärbung oder gar Ausscheidung von Schwefelblei eingetreten.

Besonders der letzte Versuch rechtfertigt den Schluss, dass der Schwefel im Melanin weder in Form eines Cystincomplexes, noch einer Esterschwefelsäure gebunden sein kann.

Zu einem weiteren Versuche verwendete ich 0,5 g eines schwefelreichen Melanins der angegebenen Darstellung (Fraction VII). Die alkalische Lösung desselben wurde in einen durch Auskochen von Luft befreiten Ammoniakdestillirapparat<sup>1)</sup> gebracht und im Wasserdampfstrom durch zwei Stunden gekocht. In der Kochflüssigkeit konnte Schwefelwasserstoff nicht nachgewiesen werden.

Wenn nun auch der Schwefelgehalt, der allerdings in verschiedenen Präparaten von Melanin resp. Phymatorhusin

1) Vergl. E. Ludwig, Lehrbuch der medic. Chemie, 2. Aufl., S. 116.

wechselnd gefunden wurde, manchmal sehr hoch ist, und wenn auch darin ein bedeutender Unterschied zwischen diesen Pigmenten und dem Blutfarbstoff besteht, so erscheint es doch auffallend, dass in beiden Körpern kein Cystincomplex aufzufinden war. In Anbetracht dessen, dass die Melanine untereinander so sehr differiren und bisher so wenig scharf charakterisirt werden konnten, wird allerdings eine besondere Vorsicht in der Verallgemeinerung solcher Resultate geboten sein. In Bezug auf das von mir untersuchte Melanin wäre es nicht unmöglich, dass dieses aus dem Blutfarbstoffe durch Einwirkung irgend eines fermentativen Agens sich gebildet habe.

Noch habe ich versucht, die salzsaure Flüssigkeit, welche vergebens auf Cystin untersucht worden war, zur Darstellung der Hexonbasen zu verwenden. Zu diesem Zwecke habe ich genau nach den Angaben von Kossel und Kutscher<sup>1)</sup> gearbeitet.

Vorher wurde die Flüssigkeit mit Phosphorwolframsäure ausgefällt, der Niederschlag durch wiederholtes Auskochen mit Wasser bis zum Verschwinden der Chlorreaction gewaschen und dann mit Aetzbaryt zersetzt. Doch habe ich, nachdem alles sorgsam nach der Vorschrift der beiden Forscher durchgeführt worden war, Hexonbasen nicht nachweisen können.

Zum Schlusse sei es mir gestattet, Herrn Doc. v. Zeynek für die vielfache lebenswürdige Unterstützung, welche er mir bei Ausführung dieser Arbeit in jeder Weise zu Theil werden liess, meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

#### Nachschrift.

Nach Fertigstellung dieses Manuscriptes kam mir die Abhandlung von F. Samuely «Ueber die aus Eiweiss hervorgehenden Melanine» in den Beiträgen zur chemischen Physiologie und Pathologie, Bd. II, Heft 7—9, zu.

Ich ersehe aus dieser Abhandlung, dass auch Samuely die Frage nach der Genese der Melanine für noch nicht erledigt hält.

<sup>1)</sup> Diese Zeitschr., Bd. XXXI, S. 165.