

Darstellung und Analyse einiger Nucleinsäuren.

VIII. Mitteilung.

Über die Milznucleinsäure.

Von

P. A. Levene.

(Aus dem Rockefeller Institute for Medical Research.)

(Der Redaktion zugegangen am 19. Juni 1905.)

Bei der Analyse verschiedener Nucleinsäuren, soweit sie bis jetzt beschrieben sind, richtete der Verfasser seine Aufmerksamkeit auf das Studium der Komponenten ihrer Moleküle.¹⁾ Eine quantitative Schätzung der Bestandteile konnte deshalb nicht vorgenommen werden, weil von den beiden Darstellungsmethoden der Säuren, die eine die Substanz nicht in hinreichender Menge lieferte, die andere aber ein Produkt, das nicht völlig frei von Verunreinigungen war.

Im Verlaufe dieser Untersuchungen wurde nun die Beobachtung gemacht, daß Nucleinsäuren in großem Überschuß von konzentrierter Essigsäure löslich sind, und aus solchen Lösungen frei von den gewöhnlichen Verunreinigungen durch Kupferchlorid oder Salzsäure gefällt werden. Die Ausbeute war außerdem ganz zufriedenstellend und so wurde es möglich, die Frage der quantitativen Bestimmung der basischen Komponenten der Säuren in Angriff zu nehmen. In dieser Publikation sollen die Resultate der Analyse von Milznucleinsäure mitgeteilt werden.

Die Darstellung der Säure war folgende:

Die zerkleinerten Drüsen wurden ungefähr 2 Stunden in einer 5%igen Kochsalzlösung gekocht, worauf 7% des Gewichtes

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXII, S. 541; Bd. XXXI, S. 402; Bd. XXXVII, S. 402; Bd. XXXIX, S. 4; Bd. XXXIX, S. 479.

der frischen Drüse an Natriumacetat hinzugefügt wurde und die Mischung abkühlte. Darauf erfolgte Zusatz von Natronlauge und die so behandelten Drüsen wurden über Nacht stehen gelassen. Wie in früheren Mitteilungen beschrieben, wurden nun die Eiweißkörper der Drüse mit Pikrin- und Essigsäure entfernt, und im Filtrat die Nucleinsäure mit Alkohol gefällt. Nachdem die Alkoholfällung mit Natronlauge wieder aufgelöst war, wurde ein großer Überschuß von Eisessig hinzugefügt und abgesaugt. Hierauf erfolgte Fällung der Nucleinsäure mit 20%iger Kupferchloridlösung, dann Waschen und Trocknen in gewöhnlicher Weise.

Die Analyse der auf diese Weise erhaltenen Substanz gab folgende Werte:

Präparat I: 0,3584 g Substanz wurden für eine Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwandt. Sie erforderten zur Neutralisation 38,8 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,001418 g N); N = 15,35%.

0,2010 g Substanz enthielten 0,0524 g Asche = 26,07%.

0,1905 » » gaben 0,0560 » $Mg_2P_2O_7$; P = 8,02.

Präparat II: 0,1378 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet. Sie erforderten zur Neutralisation 13 ccm Schwefelsäure (1 ccm = 0,00162 g N); N = 15,30%.

0,1265 g Substanz gaben bei der Verbrennung 0,1632 g CO_2 und 0,0525 g H_2O ; C = 35,10%; H = 4,61%.

0,1180 g Substanz gaben 0,0310 g Asche = 26,26%.

0,1670 » » » beim Schmelzen 0,0494 g $Mg_2P_2O_7$;
P = 8,27%.

0,1178 » » » bei der Verbrennung 0,1502 g CO_2 und
0,0480 g H_2O ; C = 34,78%; H = 4,53%.

Wenn man das Kupfer in Rechnung zieht, war die Zusammensetzung der Säure:

	Präparat I	Präparat II	Älteres Präparat
C	—	37,78%	36,40%
H	—	4,86%	5,10%
N	16,62%	16,51%	17,30%
P	8,99%	8,91%	9,03%
(Basen —	7,7 %	7,35%	11,56%)

Somit differierte die elementare Zusammensetzung der Säure nur wenig von derjenigen, die in meiner früheren Mitteilung angegeben war. Die Verschiedenheit erklärt sich wohl aus der Anwendung von Ammoniak bei der früheren Dar-

stellung: denn die Erfahrung hat ergeben, daß es beinahe unmöglich ist, aus der Nucleinsäure irgend ein Mineralsalz völlig zu entfernen, das im Laufe der Darstellung angewandt wurde.

Zur hydrolytischen Spaltung wurde das Kupfersalz verwendet. Zur Beurteilung des Purinbasengehaltes wurde die Säure das eine Mal in einer 2%igen, das andre Mal in einer 5%igen Schwefelsäurelösung drei Stunden lang im Autoklaven erhitzt. Da Steudel¹⁾ in seiner Mitteilung über den Abbau der Thymusnucleinsäure das Vorhandensein von vier Purinbasen im Molekül angibt, bemühte ich mich, besonders Xanthin und Hypoxanthin unter den Spaltungsprodukten der Milznucleinsäure aufzufinden, was aber nicht gelang.

Die Einzelheiten der Analyse lasse ich folgen.

64 g lufttrockenes Kupfersalz, enthaltend 45 g Säure, wurden im Autoklaven bei 125–150° C. mit 400 ccm 2%iger Schwefelsäure zersetzt: darauf wurde filtriert, das Filtrat mit Ammoniak neutralisiert und auf ein sehr kleines Volumen eingedampft. Die dabei entstehende Ausscheidung wurde abfiltriert und enthielt Guanin, sowie etwas Adenin und Phosphorsäure. Sie wurde in verdünnter Schwefelsäure gelöst, die Schwefel- und Phosphorsäure durch überschüssiges Baryumhydrat und dieses wieder durch Schwefelsäure entfernt. Das Filtrat vom Baryumsulfat wurde jetzt eingedampft und mit ammoniakalischer Chlorsilberlösung behandelt. Die Zersetzung des so gebildeten Niederschlages wurde durch Salzsäure bewirkt, worauf das Filtrat vom Chlorsilber mit Ammoniak neutralisiert und auf ein kleines Volumen eingedampft wurde. Nachdem das so ausgeschiedene Guanin abfiltriert war, wurde das Filtrat zu dem des ersten rohen Guaninniederschlages hinzugefügt und mit ammoniakalischer Chlorsilberlösung versetzt, worauf ich den entstandenen gelatinösen Niederschlag mit Salzsäure zersetzte. Das Filtrat vom Chlorsilber wurde nun mit Ammoniak neutralisiert und eingedampft, die vom Guanin abfiltrierte Lösung in der Hitze mit Pikrinsäure behandelt, und das Adeninpikrat abfiltriert. Aus dem Filtrat wurde die Pikrinsäure mit Schwefelsäure und Äther entfernt und dann wurden die übrigbleibenden

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XLII, S. 165 und Bd. XLIII, S. 402.

Purinbasen mit ammoniakalischer Chlorsilberlösung gefällt; doch bestand dieser Silberniederschlag nur aus Guanin und Adenin. Somit konnte weder Xanthin noch Hypoxanthin in nennenswerter Menge gefunden werden.

Die Ausbeute an Adeninpikrat betrug 4,5 g.

Das Guanin ging durch ein Mißgeschick verloren. In einem zweiten Versuch wurden 40 g lufttrockenes Kupfersalz, enthaltend 31 g freie Nucleinsäure im Autoklaven bei 125–160° C. mit 175 ccm 5%iger Schwefelsäure gespalten. Die Trennung der Basen erfolgte in der gleichen Weise wie vorher und die Ausbeute an Guanin betrug 0,505 g, an Adeninpikrat 2,8 g.

Die Analyse der Pyrimidinbasen erfolgte so, wie es in der vierten Mitteilung beschrieben ist.

30 g lufttrockenes Kupfersalz, enthaltend 21 g freie Säure, wurden verwandt.

Die Ausbeute betrug: Thymin 1,2 g
Cytosinpikrat 4,5 »

Das Uracil wurde nicht gewogen, da die Ausbeute im allgemeinen sehr gering ist.

Berechnet auf 100 g	
Adeninpikrat	8,27 g
Guanin	1,62 »
Thymin	5,71 »
Cytosinpikrat	21,43 »

In einer früheren Mitteilung ist gezeigt worden, daß die Beschaffenheit der Mehrzahl der Nucleinsäurekomponenten wohl bekannt ist, man aber über die Art ihrer Verknüpfung im Molekül der Säure bisher wenig weiß. Neuerdings versuchten Schmiedeberg¹⁾ und seine Schüler zu zeigen, daß die Nucleinsäure aus einer Grundsubstanz bestehe, die sie Nucleotinphosphorsäure nennen, und die mit den Purinbasen eine verhältnismäßig lockere Bindung zur Bildung des Nucleinsäuremoleküls eingeht. Vorher schon hatten Kossel und Neumann²⁾ ein purinfreies Derivat der Nucleinsäure erhalten, welches sie als Thyminsäure bezeichneten. Die Zusammensetzung dieser Thymin-

¹⁾ Arch. f. exp. Path. u. Pharm., Bd. LXIII, S. 57, 1900.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXII, S. 77.

säure ist sehr wenig weiter untersucht worden und die hypothetische Nucleotolphosphorsäure konnte bisher nicht in reiner Form erhalten werden. Doch teilen alle Autoren die Ansicht, daß auf dem Wege der Spaltung in einfache kristallinische Komponenten, intermediär Produkte verschiedener Zusammensetzung gebildet werden, und das Studium solcher intermediärer Produkte scheint von großer Bedeutung für die Erweiterung unserer Kenntnisse betreffs der Bindungsart der einfachen Komponenten im Molekül der Nucleinsäure.

In einer früheren Mitteilung berichtete der Verfasser,¹⁾ daß es bei der Spaltung mit 20/oiger Schwefelsäure gelingt, eine in Wasser und sehr verdünnten Säuren unlösliche Substanz zu erhalten. Diese Substanz enthielt Stickstoff, Phosphor, nur Spuren von Purin- und Pyrimidinbasen, Spuren von Furfurol gebender Substanz und nachweisbare Mengen eines Körpers, der bei weiterer Spaltung mit Mineralsäuren Lävulinsäure liefert. Ob die andern Komponenten aus dem Molekül in freiem Zustande oder miteinander vereinigt abgespalten waren, wurde nicht konstatiert. Im Laufe dieser Untersuchung sollte nun auch der Versuch gemacht werden, außer diesem schon beschriebenen Produkt noch andere komplexe Moleküle unter den durch Mineralsäuren gebildeten Spaltungsprodukten der Nucleinsäure aufzufinden. Dies geschah folgendermaßen:

Nucleinsäure wurde mit Hilfe von verdünnten Säuren in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion gespalten. In einem Teil der löslichen Fraktion (I) wurde eine Bestimmung der Pyrimidinbasen vorgenommen, ein anderer Teil (II) wurde eingedampft und mit einer 250/oigen Lösung von Schwefelsäure weitergehend gespalten, worauf in dem Reaktionsprodukt ebenfalls die Menge der Pyrimidinbasen festgestellt wurde. Wenn komplexe Moleküle in der Lösung I vorhanden waren, so hätte bei dem zweiten Versuch (in Fraktion II) die Ausbeute an Pyrimidinbasen größer sein müssen. Die Produkte der zweiten Spaltung der löslichen Fraktion wurden dann verglichen mit denen des unlöslichen Restes.

¹⁾ American Journal of Physiology, Bd. XII, S. 213, 1904.

Die Verteilung der verschiedenen Körpergruppen war die folgende:

Purinbasen.

Im wesentlichen wurden alle Purinbasen aus dem Molekül durch Erhitzen der Substanz mit 2%iger Schwefelsäure auf 150° entfernt und dies stimmt überein mit der Tatsache, daß bei der weiteren Behandlung mit 5%iger Säure die Ausbeute im wesentlichen unverändert bleibt. Die unlösliche Fraktion enthält nur Spuren dieser Basen.

Pyrimidinbasen.

Versuch I. 40 g lufttrockene Substanz, enthaltend 5,29% Phosphor, wurden im Autoklaven mit 100 ccm 25%iger Schwefelsäure vier Stunden auf 150—175° C. erhitzt. Unter den hydrolytischen Produkten fand sich Thymin und Cytosin in folgender Ausbeute:

Thymin	1,2 g
Cytosinpicrat	3,1

Versuch II. 40 g der gleichen Substanz wurden in 250 ccm 5%iger Schwefelsäure im Autoklaven bei 125—150° C. vier Stunden lang erhitzt. Unter den Produkten der Hydrolyse wurden die Pyrimidinbasen nach der Methode von Kossel-Jones bestimmt und gaben folgende Ausbeute:

Thymin	0,45 g
Cytosinpicrat	1,2

Versuch III. 40 g derselben Substanz wurden in der gleichen Weise wie im letzten Versuch gespalten. Die lösliche Fraktion wurde auf 100 ccm eingedampft und soviel konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt, daß ein Säuregehalt von 25% erzielt war. Darauf wurde die Lösung vier Stunden im Autoklaven erhitzt. Die Ausbeute an Pyrimidinbasen war

Thymin	1,4 g
Cytosinpicrat	2,7

Versuch IV. Die bei den Versuchen II und III durch Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure erhaltenen unlöslichen Rückstände wurden vereinigt und mit 25%iger Schwefelsäure

gespalten: es ergab sich kein Thymin und nur eine Spur von Basen, die ein unlösliches Pikrat bildeten.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß bei der Hydrolyse der Milznucleinsäure mit 5%iger Schwefelsäure die folgenden Reaktionen stattfinden: Praktisch werden alle Purinbasen in Freiheit gesetzt, desgleichen ein Teil der Pyrimidinbasen, während der Rest in Form eines Molekülkomplexes verloren geht. (Die Natur dieser Substanz soll in einer besonderen Mitteilung erörtert werden.) Es entsteht ein unlöslicher Körper, der frei von Purin- und Pyrimidinbasen ist.

Kohlehydrate.

In einer früheren Mitteilung war festgestellt worden, daß bei der Hydrolyse mit 2%iger Schwefelsäure ein Rückstand entsteht, der nicht mehr die Furfurol gebende Substanz enthält, jedoch bei weiterer Spaltung noch Lävulinsäure liefert. Bei der vorliegenden Untersuchung sollte nun versucht werden, festzustellen, wie die Hexose in den verschiedenen Fraktionen verteilt ist, die man bei der Hydrolyse der Milznucleinsäure mit Hilfe von verdünnten Mineralsäuren erhält, zu welchem Zwecke folgende Versuche ausgeführt wurden:

Versuch I. 10 g der auch in den früheren Versuchsreihen angewandten Substanz wurden mit 50 ccm 25%iger Schwefelsäure in einem Autoklaven bei 150° C. drei Stunden lang erhitzt. Aus den Produkten der Hydrolyse wurde dann das Silbersalz der Lävulinsäure auf die gewöhnliche Weise erhalten. Ausbeute: 0,7 g.

Versuch II. 40 g der gleichen Substanz wurden im Autoklaven bei 150° C. vier Stunden lang mit einer 5%igen Schwefelsäurelösung hydrolysiert, darauf wurde filtriert und der Rückstand mit Wasser ausgewaschen. Nach dem Eindampfen der vereinigten Filtrate und Waschwässer auf 100 ccm wurden 15 ccm konzentrierte Schwefelsäure hinzugefügt und die Lösung vier Stunden im Autoklaven bei 150° C. erhitzt. Das Silbersalz der Lävulinsäure, welches in der gewöhnlichen Weise gewonnen war, wog 3,4 g.

Versuch III. 4 g des nach der Spaltung mit 5%iger

Schwefelsäure erhaltenen, getrockneten Rückstandes wurden im Autoklaven mit 25%iger Schwefelsäure gespalten, worauf sich nur eine Spur Lävulinsäure erhalten ließ.

Versuch IV. 20 g des nach Spaltung mit 2%iger Schwefelsäure erhaltenen und getrockneten Rückstandes wurden im Autoklaven mit 25%iger Schwefelsäure gespalten und es ergaben sich nur ungefähr 0,150 g Thymin und 0,750 g Cytosinpicrat. Die Ausbeute an Silbersalz der Lävulinsäure betrug 0,5 g.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei der Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure alle Kohlehydrate des Moleküls der Nucleinsäure sich in den löslichen Spaltungsprodukten befinden. Ob sie in freiem Zustande oder in Form eines Molekülkomplexes vorhanden sind, soll später untersucht werden. Bei der Spaltung mit 2%iger Schwefelsäure entsteht eine unlösliche Substanz, in welcher das Verhältnis von Kohlehydraten zu Pyrimidinbasen größer als in der ursprünglichen Säure ist, obgleich die absolute Ausbeute an Lävulinsäure niedriger ist, als die bei der Hydrolyse der Nucleinsäure erhaltene.

Melanin.

Bei der Hydrolyse von Nucleinsäuren mit starken Mineral-säuren erhält man Substanzen, die wohl als Melanine zu betrachten sind. Dieser Substanz haben Schmiedeberg, Osborne und Harris ihre Aufmerksamkeit zugewandt.¹⁾ Die Substanz des ersten Untersuchers enthielt Phosphor, die von Osborne und Harris beschriebene war frei davon. Den Ursprung der Substanz dachte man sich in der Weise, daß sie durch Kondensation aus den Spaltungsprodukten von Purinbasen und Kohlehydraten entstanden sei.

Im Laufe der gegenwärtigen Untersuchung ergaben sich folgende Beobachtungen:

Versuch I. 40 g der bei der ersten und zweiten Versuchsreihe verwendeten Substanz wurden mit 5%iger Schwefelsäure gespalten. Der lösliche Teil wurde nun eingedampft und mit 25%iger Schwefelsäure weiter erhitzt. (Diese Fraktion

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXXVI, S. 83, 1902.

enthielt, wie aus der ersten und zweiten Versuchsreihe zu entnehmen ist, alle Kohlehydrate, sowie die Purin- und Pyrimidin-derivate des Nucleinsäuremoleküls.) Die Ausbeute an Melanin war in dieser Fraktion sehr unbedeutend.

Versuch II. 4 g des getrockneten Rückstandes, der bei der Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure erhalten war, wurde der weiteren Zersetzung und zwar mit 25%iger Schwefelsäure unterworfen. Der Erfolg war die Bildung von 1,8 g Melanin, frei von Phosphor und unlöslich in Alkalien und Säuren.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß Melanin und sein phosphorhaltiger Vorläufer entweder aus denjenigen Bestandteilen der Nucleinsäure entstehen, die weder Purinbasen noch Kohlehydrate sind, oder aber, daß sie durch Kondensation aus den Spaltungsprodukten der Kohlehydrate und Purinbasen gebildet werden. In letzterem Falle müßte die Kondensation einfach beim Erhitzen mit 5%iger Schwefelsäure stattfinden.

Um mehr Klarheit über den Prozeß der Melaninbildung zu bekommen, schien es ratsam, die Zusammensetzung der beiden Vorstufen — nämlich des Rückstandes nach Hydrolyse mit 2%iger Schwefelsäure und des anderen nach Spaltung mit 5%iger Schwefelsäure — mit der des Melanins und der ursprünglichen Nucleinsäure zu vergleichen. Es wurde also die Aufmerksamkeit den Spaltprodukten der beiden Muttersubstanzen des Melanins zugewandt. Sie sowohl wie das Melanin enthielten Kupfer und somit schien es zweckmäßig, die Vergleiche mit dem Kupfersalz der Nucleinsäure anzustellen.

Die Resultate der Analyse waren folgende:

I. Rückstand nach Hydrolyse mit 2%iger Schwefelsäure:

0,2220 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet; sie erforderten 29,6 ccm Schwefelsäure zur Neutralisation (1 ccm Säure = 0,00124 g N); N = 16,53%.

0,3380 g Substanz wurden zu einer Phosphorbestimmung verwendet. Sie gaben 0,0224 g $Mg_2P_2O_7$; P = 1,85%.

0,2352 g Substanz gaben 0,0682 g Asche = 29%.

0,2396 g Substanz gaben bei der Kupferbestimmung 0,0690 g CuO:
Cu = 21,75%.

II. Rückstand nach Hydrolyse mit 5%iger Schwefelsäure:

0,2683 g Substanz wurden zu einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl verwendet. Sie erforderten 48,2 ccm der Schwefelsäure des vorigen Versuches. N = 22,29%.

0,2099 g Substanz lieferten 0,666 g Asche = 31,25%.

0,2863 g Substanz wurden zu einer Phosphorbestimmung verwendet. Die Ausbeute war sehr gering.

0,1925 g Substanz gaben bei der Kupferbestimmung 0,0640 g CuO; Cu = 19,05%.

III. Melanin:

0,2730 g Substanz erforderten bei einer Stickstoffbestimmung nach Kjeldahl 22,6 ccm der Schwefelsäure der vorigen Versuche. N = 10,28%.

0,2894 g Substanz lieferten 0,0590 g Asche = 20,39%.

0,2200 g Substanz lieferten bei der Phosphorbestimmung keine Ausbeute.

0,2700 g Substanz lieferten bei der Kupferbestimmung 0,0536 g Kupferoxyd. Cu = 15,87%.

In der folgenden Tabelle sind zum Vergleiche die Analysenergebnisse der vorherigen Substanzen und die der Nucleinsäure zusammengestellt: daneben findet sich die Zusammensetzung einer Substanz, die durch Hydrolyse einer freien Nucleinsäure (nicht des Kupfersalzes) mit 2%iger Schwefelsäure entsteht. Sie ist in einer früheren Mitteilung beschrieben.

Nucleinsäure	Rückstand I (Cu-Salz)	Rückstand I (freie Säure)	Rückstand II	Melanin	
N	15,35%	16,53%	8,83%	22,29%	10,28%
P	8,10%	1,85%	8,62%	wenig	0
Cu	—	21,75%	—	19,05%	15,87%
Asche	26,0%	29,0%	39,0%	31,25%	20,39%

Somit findet bei der hydrolytischen Bildung der Muttersubstanz des Melanins aus der Nucleinsäure zuerst eine Steigerung des Stickstoffgehaltes statt. Dem folgt ein Absinken des Stickstoffes im Melanin: auch ist eine allmähliche Abspaltung von Phosphor zu verzeichnen. Der Kupfergehalt zeigt eine Erhöhung in den Muttersubstanzen des Melanins, weniger im Melanin selbst.

Um über die Natur der Spaltungsprodukte der Vorstufen des Melanins näheres zu erfahren, werden folgende Versuche angestellt:

20 g trockene Substanz vom Rückstand I wurden mit 25%iger Schwefelsäure im Autoklaven bei 150—175° C. gespalten. In einem Teil des Filtrates wurde die Stickstoffmenge bestimmt und der Stickstoff der nichtbasischen Substanzen aus dem des Filtrates einer Phosphorwolframsäurefällung berechnet. Die Bestimmung des Ammoniaks geschah nach einer von Dr. Stookey und dem Verfasser¹⁾ angegebenen Methode.

4 g der getrockneten Substanz vom Rückstand II wurden in der gleichen Weise behandelt.

Die Verteilung des Stickstoffes ergab sich wie folgt:

	Rückstand I	Rückstand II
Gesamt-N	1.30 g	0.445 g
Ammoniak-N	13.5% des Gesamten	23.6% des Gesamten
Basisches N	40.5%	65.8%
Nichtbasisches N	45.5%	10.68%

Es wurde schon erwähnt, daß der Rückstand I bei der Hydrolyse Lävulinsäure lieferte, ferner etwas Thymin und eine Base, die ein unlösliches Pikrat bildete.

Bei der Spaltung des Rückstandes II konnte weder Lävulinsäure noch Thymin erhalten werden und nur 0,250 g eines unlöslichen Pikrates.

Es ist bemerkenswert, daß bei der Hydrolyse der freien Nucleinsäure (anstatt des Kupfersalzes) mit 2%iger Schwefelsäure²⁾ eine Substanz mit 11,33% Phosphor erhalten wird, während das Kupfersalz unter den gleichen Bedingungen einen Körper mit 2,45% Phosphor und mit 21,75% Kupfer liefert. Das weist auf die Tatsache hin, daß jene Kondensation schon stattgefunden hat. Auch ist es bemerkenswert, daß aus dem Melanin das Kupfer weder mit Ammoniak noch mit Salzsäure entfernt werden kann, somit also in einer noch stabileren Form als in der eines Salzes vorhanden zu sein scheint.

¹⁾ Journal of Medical Research, Bd. V (neue Folge), S. 455, 1903.

²⁾ American Journal of Physiology, Bd. XII, S. 213, 1904.