

## Zur Kenntnis des Hippomelanins.

### III. Mitteilung.

Von

Otto Rießer und Peter Rona.

Aus dem pharmakologischen Institut zu Frankfurt a. M. und dem biochemischen  
Laboratorium des Urbankrankenhauses zu Berlin<sup>1)</sup>.  
(Der Redaktion zugegangen am 18. Dezember 1919.)

Vor einer Reihe von Jahren<sup>2)</sup> beschrieben wir ein Verfahren zur Spaltung des Hippomelanins, das in der Einwirkung einer 3%igen  $H_2O_2$ -Lösung bei Wasserbadtemperatur besteht. Wir erhielten so eine klare, gelbe Lösung von saurer Reaktion. Dieser wurde durch Destillation mit  $MgO$  im Vakuum bei  $45^\circ$  das gebildete Ammoniak entzogen. Das an Säuren gebundene  $Mg$  wurde durch Baryt, überschüssiges  $Ba$  mittels  $H_2SO_4$  quantitativ entfernt und die Lösung eingedampft. Durch Extraktion des Rückstandes mit absolutem Alkohol erhielten wir schließlich eine in Alkohol leicht lösliche Fraktion, in deren wässriger Lösung Pikrinsäure einen Niederschlag von Guanidinpikrat lieferte. Diese Base wurde in mehreren Versuchen mit verschiedenen Melaninpräparaten gefunden und auch als Platindoppelsalz und als Pikrolonat identifiziert. Daneben ergaben sich Anhaltspunkte für die Entstehung fettsäureartiger Körper, insbesondere auch von Oxalsäure.

<sup>1)</sup> Das Manuskript dieser Arbeit war schon im Herbst 1914 beendet. Die Veröffentlichung wurde wegen des zum Teil polemischen Inhalts während der Kriegszeit zurückgestellt. Da eine Klärung der behandelten Teilfrage erwünscht erscheint und eine weitere Fortsetzung der Versuche aus äußeren Gründen vorderhand den Verfassern nicht möglich ist, sollen die Ergebnisse der Versuche aus dem Jahre 1914 nunmehr niedergelegt werden.

<sup>2)</sup> Diese Zeitschr. Bd. 57. S. 143 (1908) und Bd. 61. S. 12 (1909).

Die Resultate waren nicht besonders befriedigend, zumal ein erheblicher Teil gerade des N als  $\text{NH}_3$  abgespalten wird. Wir haben denn auch auf den Befund des Guanidins kein besonderes Gewicht gelegt und es vermieden, irgend welche Hypothesen über die Bedeutung dieses Befundes für die Zusammensetzung des Melanins aufzustellen. Dies um so weniger, als die Ausbeuten an Guanidin recht geringe waren: aus 20 g Melanin erhielten wir 0,1 g, aus 100 g 1,1 g Guanidinpikrat. Da die Spaltungsmethode zweifellos nach mehr als einer Richtung modifizierbar erschien, hofften wir dennoch, durch weitere Untersuchungen charakteristischere Spaltungsprodukte finden zu können. Da die Verfasser inzwischen örtlich getrennt wurden, unterblieb leider eine Fortsetzung unserer Versuche. Zu einer Wiederaufnahme und Fortsetzung, die von dem einen von uns (Rießer) durchgeführt wurde, veranlaßte uns erst eine im Februar unter v. Fürths Leitung angefertigte Arbeit von J. Adler-Herzmark<sup>1)</sup>, die sich zur Aufgabe gestellt hatte, die Menge des nach unserem Verfahren erhaltbaren Guanidins festzustellen. Dabei ging sie davon aus, daß eine erhebliche Ausbeute an dieser Base im Widerspruch zu der von v. Fürth aufgestellten Hypothese der Melaninbildung stehen würde, nach der diese Substanz ausschließlich durch Oxydation zyklischer Komplexe des Eiweißes entstehen soll. Die Gegenwart von viel Guanidin würde dagegen, nach der Meinung der Verfasserin, die Beteiligung des Arginins an der Konstitution des Melanins nahelegen. Diese Aufgabenstellung ist, wie wir zu unserem Bedauern zugestehen müssen, vielleicht durch einen Druckfehler in unserer zweiten Mitteilung veranlaßt worden. Dort findet sich nämlich neben der richtigen Ausbeute von 0,1 g Guanidinpikrat aus 20 g Melanin die Bemerkung, daß aus 100 g Melanin 11, g (statt 1,1 g, mit falscher Stellung des Kommas) Guanidinpikrat erhalten wurden. Fräulein Adler-Herzmark, die offensichtlich, durch den Druckfehler getäuscht, eine erhebliche Ausbeute an Guanidin erwartete, hat nun den von uns in mehreren Ver-

<sup>1)</sup> Biochem. Zeitschr. Bd. 49, S. 130 (1913).

suchen erhobenen Befund von Guanidin überhaupt nicht bestätigen können und aus dem einen Experiment, das ihr hierüber zur Verfügung stand, den Schluß gezogen, daß „bei genügender Reinheit“ des Melanins die  $H_2O_2$ -Spaltung nicht zu Guanidin führe, d. h. daß unsere Präparate guanidinliefernde Verunreinigungen enthielten. Aus der Schilderung ihrer Versuchsanordnung, die in wesentlichen Punkten von den ausführlichen Vorschriften unserer Mitteilung abweicht, geht nun allerdings hervor, daß, wenn unter den von Fräulein Adler-Herzmark eingehaltenen Versuchsbedingungen überhaupt Guanidin entstand, es mit dem von ihr gewählten Verfahren schwerlich hätte nachgewiesen werden können.

Ein erster Versuch mit 20 g Melanin scheidet, wie die Verfasserin selbst feststellt, für die zur Diskussion stehende Frage deshalb aus, weil bei dem zur Entfernung des  $NH_3$  ausgeführten Kochen mit  $MgO$  auch etwa gebildetes Guanidin hätte zerstört werden müssen.

Beim zweiten Versuch wurden wiederum 20 g Melanin mit  $H_2O_2$  tagelang erhitzt. Trotzdem geht aus den eigenen Angaben der Verfasserin deutlich hervor, daß sie die Spaltung nicht vollständig durchgeführt hat. Während wir nämlich in allen unseren Versuchen stets zu einer klaren, gelben Flüssigkeit gelangten, erhielt Fräulein Adler-Herzmark eine dunkelbraune Lösung, aus der Säurezusatz einen nicht unbeträchtlichen Anteil braunflockiger „Melaninsäure“ ausfällt. In keinem unserer Versuche wurde derartiges beobachtet oder gar beschrieben. Allerdings entsteht zunächst eine dunkelbraune Lösung, in der, wie Verfasserin richtig darlegt, das Ammonsalz der als erstes Abbauprodukt entstehenden Melaninsäure vorliegt. Diese Lösung bzw. Umbildung kann man sogar in wenigen Minuten erzielen, wenn man von vornherein einen Überschuß von Ammoniak zugleich mit dem Wasserstoffsperoxyd hinzugibt. Das Melanin löst sich unter der Zusammenwirkung von  $H_2O_2$  und  $NH_3$  unter den Augen des Beobachters zu einer tiefbraunen Flüssigkeit, aus der Mineralsäure einen schwarzbraunen, flockigen Niederschlag ausfällt. Setzt man aber, wie wir dies in unseren früheren

Mitteilungen beschrieben haben, das Erwärmen mit  $H_2O_2$  weiter fort, so hellt sich allmählich im Lauf vieler Stunden die Lösung auf, bis schließlich eine klare hellgelbe Lösung entsteht, aus der nunmehr Säurezusatz keine Fällung mehr erzeugt.

Im Gegensatz hierzu hat Fräulein Adler-Herzmark die Spaltung schon unterbrochen, als die Lösung noch mehr oder weniger tief braun gefärbt war, und die noch unangegriffene Melaninsäure mit Schwefelsäure ausgefällt. Wieviel Melaninsäure so zurückerhalten und der vollständigen Oxydation entzogen wurde, wird nicht angegeben.

Das Filtrat wurde nun mit  $MgO$  im Vakuum bei  $50^\circ$  von  $NH_3$  befreit. Während wir nun in allen unseren Versuchen das in Lösung gegangene  $Mg$  durch Baryt, überschüssiges  $Ba$  quantitativ mittels  $H_2SO_4$  entfernten, die Lösung eindampften, mit Alkohol extrahierten und schließlich mit Pikrinsäure das Guanidin ausfällten, hat sich Fräulein Adler-Herzmark damit begnügt, die nach Vertreiben des  $NH_3$  mittels  $MgO$  erhaltene, noch  $Mg$ -haltige Lösung mit Phosphorwolframsäure zu versetzen. In dem Fehlen eines Niederschlags sieht sie den Beweis für die Abwesenheit des Guanidins. Daß das Ausbleiben eines Niederschlages mit Phosphorwolframsäure, insbesondere in salzhaltiger Lösung und bei Gegenwart geringer Basenmengen, kein Beweis für die Abwesenheit von Basen ist, sollte bekannt sein. Da Fräulein Adler-Herzmark nach Entfernen des  $NH_3$  nur noch  $0,14$  g N in ihrer Spallösung fand, so hätte sie, selbst bei der kaum berechtigten Annahme, daß dieser ganze N in Form von Guanidin vorliege, nicht mehr als  $0,19$  g dieser Base erwarten können. Um diese aber sicher nachzuweisen, bedarf es eines empfindlicheren und gründlicheren Verfahrens, als es die bloße Fällung mit Phosphorwolframsäure ist.

Was weiterhin den Einwand betrifft, daß das von uns gefundene Guanidin aus einer Verunreinigung der Melaninpräparate entstanden sein könne, und daß der fehlende Befund in den Versuchen der Verfasserin einem besseren Reinigungsprozeß zuzuschreiben sei, so erscheint dieser Einwand zunächst

für jeden durchaus diskutabel, der einmal Gelegenheit hatte, die Schwierigkeiten zu erproben, welche die Befreiung des alle möglichen Stoffe zäh adsorbierenden Melanins von löslichen Verunreinigungen bietet. Gerade darum aber wird der Einwand von Fräulein Adler-Herzmark, daß ihre Präparate sich durch größere Reinheit auszeichneten, hinfällig. Unserem Verfahren: 12stündiges Kochen der Tumoren mit konzentrierter Salzsäure, Auskochen mit Wasser bis zur Cl-Freiheit (ein selbstverständliches Postulat, dessen Erfüllung allerdings ein überaus häufiges Auskochen mit immer erneutem Wasser erfordert), und je 24stündiges Extrahieren mit Alkohol und mit Äther, stellt die Verfasserin folgendes Verfahren als das angeblich gründlichere gegenüber: 4stündiges Kochen der Tumoren mit Salzsäure, nur 2maliges Auskochen mit Wasser, 2maliges Auskochen mit Alkohol, 1malige Extraktion mit Äther. Es bedarf wohl keines weiteren Hinweises, daß es schwerlich eine größere Reinheit der Präparate war, die eine Erklärung des negativen Resultats der Untersuchung von Fräulein Adler-Herzmark gestattet.

### 1. Die Reinigung des Melanins.

Obwohl aus Verlauf und Durchführung des Versuches von Fräulein Adler-Herzmark die Ursache ihres Mißerfolges deutlich hervorging, so hielten wir uns doch für verpflichtet, nachdem unsere Ergebnisse einmal angegriffen waren, eine Nachprüfung vorzunehmen, wobei wir der Frage der Darstellung eines tunlichst reinen Melaninpräparats besondere Aufmerksamkeit zuwandten. Wenn auch das Darstellungs- und Reinigungsverfahren von Fräulein Adler-Herzmark als völlig unzulänglich zu betrachten ist, so genügt doch auch das von uns bisher geübte, viel weiter gehende Verfahren nicht den strengsten Ansprüchen, solange man genötigt ist, ein Präparat von Melanin, unter der Voraussetzung seiner absoluten Widerstandsfähigkeit und Unlöslichkeit beim Kochen mit Säure, Wasser und Alkohol, erst dann als rein zu betrachten, wenn in jene Lösungsmittel, auch bei wiederholtem Auskochen, keine löslichen Produkte mehr übergeben.

Vorausschicken möchten wir, daß der Vorschlag von Fräulein Adler-Herzmark, das Melanin durch Kochen mit 10%iger Natronlauge weiter zu reinigen, deswegen nicht annehmbar ist, weil Melanin, auch nach vorhergehender weitestgehender Reinigung, beim Kochen mit Natronlauge  $\text{NH}_3$  abspaltet, also teilweise zersetzt wird.

Wir haben nun zunächst ein tunlichst reines Präparat auf folgende, recht zeitraubende Weise hergestellt:

Die Tumoren werden 12 Stunden mit  $\text{HCl}$  (spez. Gewicht 1,19) gekocht, die Lösung mit Wasser verdünnt und das Melanin abgesaugt. Sodann wurde mehrmals mit Wasser ausgekocht und die Pigmentmasse dann ein zweites Mal 12 Stunden mit konzentrierter  $\text{HCl}$  gekocht.

Nach erneutem Absaugen wurde nun zunächst so oft mit Wasser ausgekocht, bis das Filtrat, auch nach dem Einengen, keine  $\text{Cl}$ -Reaktion mehr gab. Das letzte  $\text{Cl}$ -freie Waschwasser gab aber noch starke Nesslerische Reaktion auf  $\text{NH}_3$ . Solange noch nicht bewiesen ist — was uns neuerdings allerdings wahrscheinlich geworden ist —, daß Melanin sich schon beim Kochen mit Wasser langsam zersetzt, mußte auch dieses  $\text{NH}_3$ , das vielleicht an andere Säuren gebunden war, durch weiteres Auskochen entfernt werden. Es gelang denn auch schließlich, nach weiterem, mehr als 20maligem Auskochen von je  $\frac{1}{2}$  bis  $\frac{1}{4}$  Stunden Dauer das Waschwasser  $\text{NH}_3$ -frei zu machen (fehlende Nesslerische Reaktion im eingeeengten Filtrat). Das Präparat wurde nunmehr getrocknet und dann je 1 Stunde mit Alkohol auf dem Wasserbade ausgekocht. Jedesmal wurde filtriert und das alkoholische Filtrat verdunstet. Der zunächst ziemlich beträchtliche Rückstand nahm allmählich ab. Nach überaus häufigem Auskochen (das Zählen wurde schließlich aufgegeben) war der Rückstand minimal, doch immer noch vorhanden. Doch fing nun das Melanin an, teilweise kolloidal zu werden, so daß das Filtrieren kaum noch möglich und auch das Zentrifugieren mit Verlust verbunden war. Wir hörten daher an dieser Stelle auf, in dem Bewußtsein allerdings, daß noch Spuren der alkohollöslichen Verunreinigung im Präparat steckten. Für die uns zunächst interessierende

Frage, ob auch völlig gereinigtes Melanin Guanidin liefert, war es aber wichtig, daß die letzten Rückstände des Waschalkohols keine Spur N enthielten. Endlich wurde das Präparat noch 2 Tage lang mit warmem Äther extrahiert. Der Äther hinterließ beim Verdunsten nur noch eine geringe Spur eines Rückstandes.

Das so dargestellte Präparat, das sich äußerlich natürlich in keiner Weise von dem Rohprodukt unterscheidet, enthält nur noch Spuren von Asche. Sein N-Gehalt ist kaum gestiegen, da offenbar bei dem Auskochen mit Wasser und Alkohol nicht nur N-haltige, sondern auch N-freie Verunreinigungen entfernt wurden. Er beträgt, wie aus dem unten geschilderten Versuch 3 hervorgeht, 10,4% gegenüber 9,9% in unserem alten Präparat.

## 2. Die Spaltung des Melanins mittels $H_2O_2$ .

Wir haben nun zunächst nochmals in einem unserer älteren Präparate die Spaltung vorgenommen. Wir konnten feststellen, daß dieses Präparat in der Tat noch bei weiterem Kochen  $NH_3$  bzw. Ammonsalze und beim Kochen mit Alkohol immer noch Substanzen von Säurecharakter abgab. Wir benutzten es dennoch zunächst, um auch unsere alten Versuche nochmals zu reproduzieren.

### Versuch 1.

18 g dieses Melanins wurden genau nach unseren früheren Angaben mittels 3%igem  $H_2O_2$  auf dem Wasserbad zur klaren Lösung gebracht. Wir verzichteten diesmal auf die Entfernung des  $NH_3$ , dampften vielmehr die schwach salzsauer gemachte, hellgelbe Spalllösung zur Trockne, trennten das leicht in Alkohol lösliche Basenchlorid vom Ammonchlorid durch wiederholte Extraktion mit absolutem Alkohol, nahmen mit Wasser auf und fällten mit Pikrinsäure (etwa noch vorhandene freie Säure muß mittels NaOH neutralisiert werden). Wir erhielten sofort eine Fällung des typischen Guanidinpikrats. Schmelzpunkt  $316^\circ$ . Ausbeute 0,12 g. Die weiteren Versuche wurden nun mit dem sorgfältigst gereinigten Präparat angestellt.

## Versuch 2.

5 g des reinen Melanins werden auf dem Wasserbade mit portionsweise zugesetzten etwa 800 ccm 3% iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung erwärmt. Die benutzte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung enthielt Spuren  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Schon nach kurzer Zeit ist die Reaktion, die zunächst kaum merkbar sauer ist, stark sauer. Es wurde nun darauf geachtet, durch wiederholten Zusatz von  $\text{NH}_3$  die Reaktion, die immer wieder bald sauer wurde, nahezu neutral zu halten. Infolge des  $\text{NH}_3$ -Zusatzes trat sehr bald vollständige Lösung des Melanins ein. Die Farbe der Lösung ist tiefbraun mit rotbrauner Nüance. Nach und nach wird die Lösung heller, bei stetiger langsamer Gasentwicklung. Am 3. Tage (die Lösung wurde nur tagsüber erwärmt) tritt schließlich vollständige Entfärbung ein. Ungelöst sind nur einige beigemengte Papierfasern, auch diese farblos. Die Lösung reagierte am Schluß wieder sauer.

Die Lösung wurde nun eingeeengt, wobei der Rest des noch vorhandenen  $\text{H}_2\text{O}_2$  sich zersetzte, dann mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  kräftig angesäuert und im Dampfbad destilliert. Das Destillat reagiert sauer und reduziert eine Sublimatlösung schnell zu Kalomel (Ameisensäure). Bei fortgesetzter Destillation gehen dauernd Spuren von Säure über, so daß an eine stetige, sekundäre Bildung von Ameisensäure unter der Einwirkung der  $\text{H}_2\text{SO}_4$  gedacht werden muß. Es wird daher die Destillation, obwohl das Destillat noch spurenweise sauer reagiert, nach ca. 4 Stunden unterbrochen. Die abgekühlte schwefelsaure Lösung, die ganz schwach gelb gefärbt und völlig klar ist, wird nun zur Ausfällung der  $\text{H}_2\text{SO}_4$  und etwaiger Fettsäuren mit Baryt versetzt, bis gerade schwach alkalische Reaktion eintritt. Der voluminöse Niederschlag wird schnell abgesaugt und im Filtrat der überschüssige Baryt mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ausgefällt. Die Lösung wird ganz schwach schwefelsauer gemacht. Der Niederschlag der Ba-Salze wird noch mehrmals mit Wasser ausgekocht und die vom Ba befreiten Waschwässer werden zusammen mit dem ersten Filtrat bei gerade saurer Reaktion auf dem Wasserbade zur Trockne gedampft. Von einer Destillation des  $\text{NH}_3$  wird abgesehen. Der fast farblose kristallinische Rückstand,

der natürlich viel Ammonsulfat enthält, wird mehrfach mit absolutem Alkohol bei Zimmertemperatur extrahiert. Der Alkohol wird verdunstet, der schwach gelbliche Rückstand wieder mit absolutem Alkohol aufgenommen, filtriert, und die Lösung wieder verdunstet. Endlich wird mit Wasser aufgenommen, falls nötig filtriert und mit einigen Tropfen NaOH neutralisiert, dann mit Pikrinsäure versetzt. Es fällt sofort der typische Niederschlag von Guanidinpikrat. Schmelzpunkt  $316-318^\circ$  in der für Guanidinpikrat charakteristischen Weise. (Das Schmelzröhrchen wird im Augenblick des Schmelzens, ohne eigentliche explosive Zersetzung, von dem geschmolzenen Pikrat bis zum oberen Rande beschlagen.) Gewicht des Pikrats 0,025 g.

### Versuch 3.

5 g des reinen Präparats werden ohne Zusatz von Ammoniak mit  $H_2O_2$  auf dem Wasserbade erwärmt. Die Lösung geht sichtlich langsamer vor sich wie im ersten Versuch. Die Reaktion wird durch Zufügen einiger Körnchen  $FeSO_4$  zu beschleunigen gesucht. Allmählich tritt aber auch hier Lösung ein und schließlich am vierten Tage (das Erhitzen wurde täglich etwa 10 Stunden durchgeführt) ist vollständige Entfärbung erreicht. Die Lösung ist wasserhell. Auch hier trat sehr bald kräftig saure Reaktion ein. Das Kondenswasser am aufgesetzten Rückflußkühler reagierte sauer. Am Schluß der Spaltung ist die Reaktion der Lösung wieder nahezu neutral. Die klare Lösung wird mit  $H_2SO_4$  versetzt, so daß Kongopapier gerade gebläut wird, und am absteigenden Kühler zunächst eingeeengt, dann mit Wasserdampf destilliert, bis insgesamt  $1\frac{1}{2}$  Liter Flüssigkeit übergegangen sind. Das Destillat reduziert  $HgCl_2$  in der Wärme. Die Destillation wird, obwohl das Destillat noch eine Spur Säure enthält, unterbrochen, die Lösung abgekühlt und auf  $\frac{1}{2}$  Liter aufgefüllt. Zwei Proben, die eine zu 10, die andere zu 5 cm, werden nach Kjeldahl verbrannt. Die erste Probe verbrauchte bei der Destillation 7,6, die zweite 3,6 cm  $\frac{1}{10-n}$   $H_2SO_4$ . Daraus berechnen sich 0,532 bzw. 0,504 g N, im Mittel 0,518 g, das sind 10,36% der angewandten Menge Melanin. Zwei weitere

Proben zu 10 ccm dienten zur  $\text{NH}_3$ -Bestimmung durch Destillation im Vakuum mit  $\text{MgO}$  bei  $45^\circ$ . Das erste Destillat verbrauchte 6,6, das zweite 6,4 ccm  $\frac{1}{10}$ -n.  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , im Mittel 6,5 ccm, entsprechend 0,455 g  $\text{NH}_3$ -N. Es sind also nur noch  $0,518 - 0,455 = 0,063$  g N als Nicht-Ammoniak-N vorhanden. Das sind erheblich weniger als in unseren älteren Versuchen und dementsprechend ist auch die Guanidinausbeute gering. Der Grund ist, wie wir weiter unten beweisen werden, der, daß, je länger die Einwirkung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  dauert, um so mehr auch die N-haltigen Substanzen zersetzt werden, und zwar auch das Guanidin. In dem letzten Versuch hatte die Spaltung abnorm lang gedauert.

Die schwefelsaure Lösung wurde nun wieder, wie bei Versuch 1, mit Baryt ausgefällt, das Filtrat nebst Waschwassern vom Ba durch  $\text{H}_2\text{SO}_4$  befreit und bei schwach saurer Reaktion eingedampft. Nach Extraktion mit Alkohol erhielten wir auch hier wieder das typische Guanidinpikrat vom Schmelzpunkt  $318^\circ$ . Seine Menge war geringer als in Versuch 1. Leider kann sie nicht zahlenmäßig angegeben werden, da das Präparat verunglückte. Schätzungsweise dürften es wenig mehr als 0,01 g gewesen sein.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß bei der Spaltung mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  auch aus denkbar sorgfältigst gereinigtem Melanin regelmäßig Guanidin gebildet wird.

### 3. Die Zersetzung des Guanidins durch $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Die Beobachtung, daß Versuch 3, bei dem das Melanin 4 Tage lang der Wirkung des  $\text{H}_2\text{O}_2$  ausgesetzt war, weniger Guanidin lieferte als Versuch 2, bei dem die Spaltung nur 3 Tage dauerte, legte die Vermutung nahe, daß das Guanidin selbst gegenüber  $\text{H}_2\text{O}_2$  nicht absolut resistent sei. Es wurden daher die folgenden Versuche angestellt.

1. 0,2 g Guanidincarbonat (Kahlbaum) in 100 ccm Wasser gelöst geben mit Pikrinsäure versetzt 0,579 g Pikrat = 93,6% der Theorie.

2. 0,1 g desselben Präparates wurden 2 Tage lang in einem Rundkolben mit insgesamt 250 ccm 3% iger  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung

auf dem Wasserbade erwärmt. Es entweicht  $\text{NH}_3$ , sowohl am Geruch, wie an der Bläuung von rotem Lackmuspapier kenntlich. Mit Pikrinsäure versetzt, liefert die Lösung 0,169 g Pikrat statt der zu erwartenden 0,29 g. Auch nach dem Einengen und längerem Stehenlassen vermehrt sich die Ausbeute nicht. Es sind also durch zweitägiges Erhitzen mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  41,7% des Guanidins zerstört worden.

3. 5 g Guanidincarbonat werden 4 Tage lang mit insgesamt etwa 1500 ccm  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung (portionsweise zugesetzt) auf dem Wasserbade erhitzt. Die Lösung wird schließlich auf etwa 200 ccm eingeengt und mit Pikrinsäure versetzt. Nach längerem Stehen wurden 5,16 g Pikrat gewonnen, statt der zu erwartenden Menge von 14,5 g. Es sind also 64,4% des Guanidins zerstört worden.

Sicher liegen die Verhältnisse bei der Melaninspaltung noch ungünstiger. Das Guanidin entsteht allmählich und kommt sofort unter die Einwirkung eines großen Überschusses an  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Wird ohne Zusatz von  $\text{NH}_3$  gespalten, so ist die Base bestenfalls an die gleichzeitig entstehenden organischen Säuren, wahrscheinlich aber an  $\text{CO}_2$  gebunden, die, wie wir weiter unten zeigen werden, in erheblicher Menge gebildet wird. Arbeitet man in ammoniakalischer Lösung, so gestalten sich die Verhältnisse noch ungünstiger, da freie Base entsteht, die in dieser Form besonders leicht zersetzlich ist.

Es ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die von uns bei der Spaltung des Melanins erhaltenen kleinen Guanidinemengen Minimalwerte darstellen.

#### 4. Die N-freien Spaltungsprodukte.

Schon in unseren früheren Mitteilungen hatten wir erwähnt, daß bei der Spaltung des Hippomelanins mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  Substanzen von Säurecharakter entstehen, die sich nach ihren Eigenschaften, insbesondere der Fällbarkeit durch Erdalkalien und Metallsalze, ähnlich wie höhere Fettsäuren verhielten. Die Gegenwart von Oxalsäure war wahrscheinlich gemacht. Wir haben auch in unseren neueren Versuchen, und zwar auch

in denen mit sorgfältigst gereinigtem Melanin, das Auftreten dieser Säuren regelmäßig beobachtet. Es läßt sich leicht zeigen, daß die von Mineralsäuren völlig freie und auch von  $\text{CO}_2$  durch Aufkochen befreite hellgelbe Spaltlösung mit Baryt,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , aber auch mit  $\text{AgNO}_3$  und alkoholischer Sublimatlösung flockige Niederschläge gibt, die in verdünnter  $\text{HNO}_3$  vollkommen löslich sind. Schüttelt man eine Probe der Spaltlösung, nach Ansäuern, mittels Äther aus, so hinterläßt der Äther nach dem Verdunsten eine geringe Menge hellgelben, teilweise kristallinen Rückstandes. In dem einen Versuche (Versuch 3) schüttelten wir nach Abdestillieren der flüchtigen Säuren die schwefelsaure, klare Lösung wiederholt mit Äther aus. Der Äther wurde mit Wasser gewaschen und verdunstet. Es hinterblieben etwa 0,2 g eines gelben Rückstandes von fettartiger Konsistenz, der aus dem Wasserbade zum größten Teil zu einer völlig klaren und durchsichtigen Flüssigkeit schmolz, beim Erkalten aber kristallinisch erstarrte. Der Rückstand löst sich nur zum kleinen Teil in Wasser und aus dieser wässrigen Lösung fällte  $\text{CaCl}_2$  einen in Essigsäure unlöslichen, in  $\text{HCl}$  löslichen Niederschlag vom Aussehen des oxalsauren Ca. Eine Analyse der Substanz zeigte aber, daß sie zum mindesten nicht reiner oxalsaurer Ca war, da sie statt der verlangten 40,0%  $\text{CaO}$  38,5%  $\text{CaO}$  enthielt.

Interessanter als ein selbst gesicherter Befund von Oxalsäure, deren Vorkommen in so geringer Menge in einem Oxydationsgemisch ohne jede Bedeutung wäre, erschien uns die Hauptmenge des Rückstandes, der in Wasser unlöslich oder doch sehr wenig löslich, in Alkohol und Äther überaus leicht löslich ist. Die Substanz wurde aus der wässrigen Aufschwemmung nochmals mit Äther extrahiert und hinterblieb beim Verdunsten des Lösungsmittels als eine in winzigen, überaus feinen Nadelchen kristallisierende Masse vom Schmelzpunkt  $53^\circ$ . Sie reagiert sauer gegen Lackmuspapier und löst sich in wässriger Alkalilösung auf. Obwohl an sich im Wasser sehr schwer löslich, ist sie in der ursprünglichen Spaltlösung dennoch gelöst enthalten und fällt auch beim Ansäuern nicht aus.

Zu den gleichen Substanzen gelangt man, wenn man die Fällung weiter verarbeitet, die auf Zusatz von überschüssigem Baryt zur mit  $H_2SO_4$  angesäuerten Spatlösung entsteht, wie dies bei der Beschreibung der Versuche oben (insbesondere Versuch 2) erwähnt wurde. In diesem Niederschlag sind naturgemäß die Ba-Salze der organischen Säuren neben dem  $BaSO_4$  enthalten. Durch Erwärmen des Ba-Salzgemisches mittels heißer Salzsäure bekommt man die organischen Säuren teilweise in Lösung und kann sie dann durch Extraktion mit Äther gewinnen. Doch werden bei diesem Verfahren immer gewisse Mengen der in Wasser wenig löslichen Säure vom  $BaSO_4$  festgehalten. Auch hier gelangt man zum gleichen Gemenge wasserlöslicher und unlöslicher Säuren, von denen die letzteren durch ihren niederen Schmelzpunkt immer wieder auffallen. Somit ist festzustellen, daß, entgegen den Angaben von Fr. Adler-Herzmark, bei der vollständigen oxydativen Spaltung des Melanins mittels  $H_2O_2$  regelmäßig auch in Äther lösliche Säuren gebildet werden.

#### 5. Die Bildung von $CO_2$ bei der Oxydation des Melanins durch $H_2O_2$ .

Es steht außer Frage, daß die von uns bisher angewandte Methode der völligen Oxydation des Hippomelanins mittels  $H_2O_2$  nicht geeignet ist, um charakteristische Spaltprodukte in genügender Menge zu gewinnen. Das geht schon aus der erheblichen Menge des als  $NH_3$  abgespaltenen N, der kleinen Guanidinmenge und der geringen Ausbeute an ätherlöslichen Säuren hervor. Wir haben, um die Verhältnisse völlig zu klären, in einem Versuche die Menge des gebildeten  $CO_2$  gemessen und festgestellt, daß bei der Einwirkung von  $H_2O_2$  ein erheblicher Anteil des Melanin-C zu  $CO_2$  oxydiert wird.

Zu dem Zweck wurde 1,00 g reinen Melanins unter Durchleiten eines  $CO_2$ -freien Luftstroms mit  $H_2O_2$  in der üblichen Weise auf dem Wasserbade gespalten. Der Luftstrom passierte die Spatlösung, gelangte weiter in einen Chlorcalcium-

turm und wurde schließlich durch zwei hintereinander geschaltete, gewogene Kaliapparate geleitet. Nach eingetretener völliger Lösung des Melanins zu einer wasserhellen Flüssigkeit wurde noch mehrere Stunden lang ein kräftiger Luftstrom hindurchgeleitet, um in der Lösung absorbierte  $\text{CO}_2$  zu entfernen. Es wurden 0,987 g  $\text{CO}_2$  gefunden. Unter Zugrundelegung eines C-Gehaltes von 55,56 % (1. Mitteilung S. 144) berechnen sich für die vollständige Verbrennung von 1 g Melanin 2,05 g  $\text{CO}_2$ . Es wurden also in diesem Versuch 48 % des Melanin-C zu  $\text{CO}_2$  verbrannt. Daß die Menge der  $\text{CO}_2$  bzw. der in Lösung bleibenden unzersetzten Spaltprodukte von der Dauer und Intensität der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Einwirkung abhängt, versteht sich von selbst.

#### 6. Weitere Beobachtungen.

Obwohl demnach die von uns bisher geübte Methode der oxydativen Spaltung wenig ermutigend erscheint, haben dennoch die inzwischen fortgesetzten Untersuchungen einige weitere Beobachtungen geliefert, die eine Fortsetzung wünschenswert machen. Die eine dieser Beobachtungen knüpft an die oben erwähnte ätherlösliche Säure vom Schmelzpunkt  $53^\circ$ . Es stellte sich nämlich die merkwürdige Tatsache heraus, daß Hippomelanin, und zwar Präparate verschiedener Darstellung, verschiedensten Reinheitsgrades und insbesondere auch die am weitesten gereinigten, bei der Destillation mit Wasser, besser mit überhitztem Wasserdampf, dauernd eine flüchtige Säure abgeben, die sich in Form eines feinen grauweisen Beschlages im Kühlrohr absetzt und im Destillat in Gestalt weißlicher Flocken schwimmt, die unter dem Mikroskop aus feinsten, biegsamen Nadelchen bestehend erkannt werden. Nach Extraktion der wässrigen Vorlagen mit Äther und Verdunsten des Lösungsmittels erhält man eine kristallinische Substanz von Säurecharakter, die bezüglich Schmelzpunkt ( $53^\circ$ ). Aussehen und Verhalten mit der bei der Spaltung erhaltenen, im Wasser unlöslichen Säure identisch erscheint. Obwohl eine bestimmte Probe Melanin bis zu 14 Tagen mit Wasserdämpfen destilliert wurde, hörte die Abscheidung der Säure im Kühler,

die in der Zeiteinheit dauernd sehr gering ist, nicht auf, nahm auch nicht sichtbar an Menge ab. Danach muß mit der Möglichkeit gerechnet werden, daß das Melanin schon durch Erhitzen mit Wasser angegriffen wird, wofür auch das immer erneut auftretende  $\text{NH}_3$  sprechen würde. Weitere Untersuchungen müssen darüber Klarheit bringen<sup>1)</sup>.

Eine zweite Beobachtung betrifft den stufenweisen Abbau von Melanin mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Wie schon erwähnt, löst sich Melanin bei Gegenwart von überschüssigem  $\text{NH}_3$  in wenigen Minuten zu einer dunkelbraunen, klaren Flüssigkeit. Versetzt man jetzt sofort mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , so fällt die Melaninsäure, die als erstes Abbauprodukt zu betrachten ist, als voluminöser Niederschlag aus. Das schwefelsaure Filtrat der Melaninsäure ist dunkelgelb, mitunter rötlichbraun gefärbt. Der Niederschlag wird erneut in  $\text{NH}_3$  gelöst, was nun äußerst leicht vor sich geht, und wiederum mit einigen Kubikzentimeter  $\text{H}_2\text{O}_2$  kurze Zeit erwärmt. Die Lösung wird nun erneut angesäuert, filtriert und das gelbbraune Filtrat dem ersten zugefügt. Wieder-

<sup>1)</sup> Mit der geringen Menge reinen Materials wurde eine Molekulargewichtsbestimmung sowie eine C- und H-Analyse ausgeführt. Molekulargewichtsbestimmung nach der Gefrierpunkt-Methode in reinem Benzol.

Gewicht der angewandten Substanz: 0,1555 g.

Gewicht des Benzols: 15,0 g.

$\Delta$  des Benzols = 2,560,

$\Delta$  nach Zusatz der Substanz = 2,439.

Differenz = 0,121.

Nach der Formel

$$M = \frac{100 \cdot p}{d \cdot g} \cdot C$$

berechnet sich aus diesen Zahlen

$$M = 428,4.$$

Analyse des C und H.

A.S. 0,1972 g.

$\text{CO}_2 = 0,4899$  g.

$\text{H}_2\text{O} = 0,2713$  g.

Daraus berechnen sich 67,75% C, 15,29% H, 16,96% O. Diese Zahlen stimmen annähernd zu einer Formel  $\text{C}_{11}\text{H}_{33}\text{O}_2$  mit 67,0% C, 16,75% H und 16,25% O.

Da die Molekulargewichtsbestimmung 428 ergab, müßte die Formel verdoppelt werden. Für irgendwelche Hypothesen über die Natur der Substanz genügen diese Zahlen natürlich nicht.

holt man dies Verfahren in geeigneten Zwischenräumen, so nimmt die Menge der mittels  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ausfällbaren Melaninsäure stetig ab und die gelbbraunen Filtrate enthalten viel organische Substanz. Am wichtigsten erscheint es, daß die auf 5% freie Säure gebrachten, klaren, schwefelsauren Filtrate auf Zusatz einer Lösung von  $\text{HgSO}_4$  in 10%  $\text{H}_2\text{SO}_4$  einen voluminösen gelbweißen Niederschlag in reichlicher Menge geben.

Einige Versuche haben ergeben, daß diese in stark saurer Lösung lösliche, mittels  $\text{HgSO}_4$  ausfällbare Substanz eine Reihe interessanter Eigenschaften hat. Sie ist N-haltig, reduziert ammoniakalische Ag-Lösung in der Wärme unter Spiegelbildung und liefert mit Nitrophenylhydrazin eine bisher kristallinisch nicht erhaltene körnig ausfallende Verbindung. Weitere Untersuchungen sollten sich vorzugsweise mit den Produkten dieser stufenweisen Spaltung befassen.

### Zusammenfassung.

Die vorliegende Abhandlung diene im wesentlichen dem Zweck, die von Fräulein Adler-Herzmark unter v. Fürths Leitung gegen unsere früheren Ergebnisse erhobenen Einwände zu entkräften und zu zeigen, daß die eigenen Versuche der Verfasserin unzulängliche sind. Bei der hierdurch notwendig gewordenen Nachprüfung unserer Ergebnisse ergab sich die überaus große Schwierigkeit, Melanin von andersartigen Beimengungen zu befreien. Aber auch die denkbar gründlichst gereinigten Präparate lieferten regelmäßig bei der oxydativen Spaltung Guanidin und ätherlösliche Säuren in allerdings geringer Ausbeute. Daß die Guanidinausbeute einen Minimalwert darstellt, ergab sich aus der Beobachtung, daß Guanidincarboxylat durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei Wasserbadtemperatur in erheblichem Maße zerstört wird. Ein großer Anteil des Melanin-C wird durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei genügend langer Einwirkung zu  $\text{CO}_2$  oxydiert. Es wird zum Schluß auf Beobachtungen hingewiesen, wonach eine stufenweise Oxydation des Melanins mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  in ammoniakalischer Lösung bessere Aussichten auf Isolierung charakteristischer Spaltungsprodukte in genügender Ausbeute zu bieten scheint.

---