

Über das Uromelanin, das Abbauprodukt des Harnfarbstoffs.

Von
St. Dombrowski.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität in Lemberg [Lwów].)

(Der Redaktion zugegangen am 30. August 1909.)

In früheren Untersuchungen über die chemische Natur des Harnfarbstoffs wurde festgestellt, daß der spezifische gelbe Farbstoff des Harns, das sogenannte Urochrom, zu den Oxyproteinsäuren, der eigentümlichen Gruppe von Verbindungen gehört,¹⁾ welche als Produkte des normalen Stoffwechsels wohl im Harne aller Säugetiere erscheinen.

Alle Oxyproteinsäuren enthalten bekanntlich außer Stickstoff Schwefel. Dieser Umstand ist von nicht geringer Wichtigkeit. Hauptsächlich eben auf Grund des Schwefelgehaltes wurde die eigentümliche Stellung dieser Verbindungen unter den Produkten des tierischen Stoffwechsels, ihre nahen Beziehungen zu den Eiweißstoffen und die Bedeutung ihrer Ausscheidung für die Erforschung des tierischen Stoffwechsels erkannt. In der Tat wurde von Gawinski²⁾ in quantitativen Untersuchungen erwiesen, daß die ganze oder beinahe ganze Menge (88—90%) des sogenannten neutralen Schwefels des Harns eben der Schwefel der Oxyproteinsäuren bildet.

Der Gehalt an Schwefel ist ebenfalls die am meisten auffallende Eigenschaft des Harnfarbstoffs. Das Urochrom, welches unter normalen Verhältnissen in einer Quantität von nur 0,5 g pro die, also in einer im Verhältnis zu der Gesamt-

¹⁾ Bulletin intern. de l'Académie des Sciences de Cracovie, Juillet 1905 und Octobre 1907, sowie diese Zeitschrift, Bd. XLVI, S. 83 (1905), und Bd. LIV, S. 118 (1907).

²⁾ Bulletin intern. de l'Académie des Sciences de Cracovie, Novembre 1908, und diese Zeitschrift, Bd. LVIII, S. 454 (1909).

menge der Oxyproteinsäuren geringer Menge ausgeschieden wird, hatte sich als die schwefelreichste Verbindung unter den Oxyproteinsäuren erwiesen; denn, während in der Autoxyproteinsäure der Schwefelgehalt zu 0,61%, in der Oxyproteinsäure zu 1,12% und in der Alloxyproteinsäure zu 2,19% gefunden wurde, betrug der Schwefelgehalt des Urochroms bis 5%.

Bereits früher habe ich außer über den Prozentgehalt an Schwefel auch über die Art und Weise seiner Bindung im Harnfarbstoffe berichtet. Es wurde damals schon mitgeteilt, daß der größere Teil (über 60%) des Schwefels des Urochroms in demselben in lockerer Bindung erscheint und beim Kochen des den Harnfarbstoff enthaltenden rohen Kupferniederschlags mit Kalilauge abgespaltet wird. Durch diesen Umstand erklären sich nicht nur die Schwankungen des Prozentgehaltes von Schwefel im Urochrom, sondern es ergab sich daraus auch die Notwendigkeit, bei der Gewinnung des Urochroms sich möglichst milder Reagenzien zu bedienen. Es resultierte nämlich aus diesen Untersuchungen, daß bei der Darstellung des Urochroms nicht nur verdünnte Alkalilaugen und verdünnte Mineralsäuren, sondern auch konzentrierte organische Säuren (Essigsäure) vom Gebrauch von vornherein ausgeschlossen werden mußten; ferner, daß die Lösungen des Farbstoffs in offenen Gefäßen auf dem Wasserbade, zumal bei Gegenwart von sogar geringer Menge einer Säure nicht eingedampft werden durften, weil das Urochrom dabei einer Zersetzung unterlag.

Es ist klar, daß in später erschienenen Untersuchungen anderer Forscher, in welchen diese Vorsichtsmaßregeln außer acht gelassen wurden, es zur Abspaltung von Schwefel kam. So hatte H. Hohlweg¹⁾ das Urochrom aus dem Harn mit Tierkohle adsorbiert und es daraus mit Eisessig ausgezogen, K. E. Salomonsen und St. Mancini¹⁾ den nach der gleichen Methode gewonnenen Farbstoff noch einer Wirkung von Brom unterworfen und als sie den Farbstoff resp. das erhaltene bromhaltige Derivat desselben schwefelfrei fanden, setzten sie

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. XIII, S. 199 und folgende.

sich über das Resultat einer ernsten Forschung hinweg und beeilten sich, zu schließen, daß das Urochrom schwefelfrei wäre und daß der gefundene Schwefelgehalt von Verunreinigungen herrühren könne, statt die eigenen Methoden der Behandlung des Urochroms, welche den Eigenschaften dieser Verbindung so wenig Rechnung trugen, einer kritischen Prüfung zu unterziehen.

Außer dem leicht abspaltbaren Schwefel enthält das Urochrom noch Schwefel in festerer Bindung. Mehr als 10% des im Urochrom enthaltenen Schwefels fiel nämlich¹⁾ auf den amorphen schwarzen Körper, welchen ich beim Kochen des Harnfarbstoffs mit verdünnter Salzsäure erhielt.

In einer früheren Abhandlung habe ich die Resultate allerdings nur einer einzigen Elementaranalyse dieses Körpers mitgeteilt. Auf Grund ihres Schwefelgehaltes, welcher 3,5% betrug, sowie ihres Verhaltens gegenüber Alkalien und Säuren habe ich diese Verbindung zu den Melaninen zugerechnet und dieselbe unter dem alten, obwohl wenig präzisen Namen von Uromelanin beschrieben. Es galt jetzt, die Zusammensetzung dieser Verbindung endgültig festzustellen und die Eigenschaften derselben näher kennen zu lernen.

Ein Präparat des Uromelanins wurde zunächst aus der rohen Kupferverbindung des Urochroms bereitet. Die letztere wurde nämlich zu dem Zweck wegen besserer Ausbeute aus dem Harn eines Typhuskranken²⁾ dargestellt und zwar nach der Methode, welche von mir früher beschrieben wurde (Fällen des Harns mit einer ammoniakalischen Lösung von Baryum- und Calciumacetat und des Filtrates von dieser Fällung mit Kupferacetat). Der ausgewaschene Kupferniederschlag wurde in Wasser aufgeschwemmt, mit Schwefelwasserstoff zerlegt und das Filtrat vom Schwefelkupfer bei gelinder Wärme in vacuo auf etwa 100 ccm eingeengt. Diese Lösung von Urochrom wurde nun mit dem gleichen Volumen von konzentrierter Salzsäure (spez. Gew. 1,18) versetzt und darauf in einem Kolben

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 225.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 390, und Journal de physiol. et de pathol. générale, A. 5 septembre 1908.

mit Rückflußkühler 8 Stunden lang gekocht. Nach dem Erkalten wurde der abgeschiedene schwarze, flockige Niederschlag auf ein Filter gebracht, sorgfältig mit Wasser ausgewaschen und getrocknet. Da bei der Zersetzung von Urochrom mit Salzsäure regelmäßig und zwar ähnlich, wie dies bei der Hydrolyse von Eiweiß zur Untersuchung auf Cystin beobachtet wurde (K. A. H. Mörner), auch Schwefel in Krystallen sich auszuscheiden pflegte, wurde das Pulver von Uromelanin behufs Entfernung der letzten Spuren von Schwefel in einem Treadwellschen Apparat noch mit Alkohol und darnach mit Schwefelkohlenstoff und Äther ausgezogen. Das Uromelanin (freies Uromelanin, Präparat A) stellte dann schwarze, glitzernde Körner dar, welche wie Asphalt aussahen und sich zu einem schwarzen Pulver zerreiben ließen. Ein Teil von diesem Präparat diente zur Elementaranalyse, der Rest wurde auf Silbersalz verarbeitet.

Zur Darstellung des Silbersalzes wurde das Uromelanin in sehr verdünntem Ammoniak gelöst und nachdem der Überschuß vom Ammoniak teils durch Erwärmen der Lösung in vacuo auf dem Wasserbade, teils durch Stehenlassen unter einer Glocke über Schwefelsäure entfernt worden war, die Lösung des Ammoniumsalzes mit Silbernitrat gefällt.

Als statt mit Silbernitrat diese Lösung mit Baryumchlorid versetzt wurde, fiel aus demselben das Baryumsalz des Uromelanins, welches ebenso wie das Silbersalz in Wasser sehr schwer löslich ist.

Ich begnügte mich jedoch, und zwar weil zur Bereitung von anderen Salzen das Material nicht reichte, mit der Darstellung zur Elementaranalyse des Silbersalzes. (Uromelanin-Ag. Präparat A.) Der schwarze flockige Silberniederschlag wurde zu dem Zweck durch Auswaschen mit Wasser vom Silbernitrat befreit. Nach dem Trocknen stellte das Uromelaninsilber ein schwarzes Pulver dar.

Außer durch Zersetzung des direkt aus dem roten Kupfersalze erhaltenen Urochroms wurde Uromelanin zur Elementaranalyse in der Form seines Silbersalzes aus einem reinen Präparat des Calciumsalzes von Urochrom bereitet. 6 g des

Urochromcalciums wurden behufs Darstellung des Uromelanins in 250 ccm einer 5%igen Salzsäure gelöst und damit 12 Stunden lang in einem Kolben mit Rückflußkühler gekocht. Das ausgeschiedene Melanin wurde dann in der oben beschriebenen Weise durch Auswaschen mit Wasser und mit den genannten organischen Lösungsmitteln, sowie durch 2maliges Umfällen mit Salzsäure aus einer ammoniakalischen Lösung gereinigt, bevor es in der bekannten Weise in das Silbersalz umgewandelt wurde. (Uromelanin-Ag. Präparat B.) Es muß jedoch bemerkt werden, daß bei der Zersetzung des Urochroms mit Salzsäure nicht alles Melanin als flockiger Niederschlag abgeschieden wird: ein Teil des Melanins bleibt nämlich in der Lösung, welche auch mehr oder weniger braun gefärbt ist. Diesen Rest von Uromelanin habe ich aus der Lösung durch Aussalzen mit Ammoniumsulfat gefällt und kam auf diese Weise noch zu einem Präparat des Uromelanins (freies Uromelanin, Präparat C), dessen Menge jedoch bloß zu einer Schwefelbestimmung reichte.

Die Elementaranalysen dieser Präparate des freien Uromelanins, sowie seines Silbersalzes ergaben die folgende Zusammensetzung derselben:

Tabelle 1.

	Freies Uromelanin		Uromelanin-Ag		Uromelanin berechnet aus dem Ag-Salz %	Freies Uromelanin Präparat D ¹⁾ %
	Präparat A %	Präparat C %	Präparat A %	Präparat B %		
C	59,22	—	—	—	—	59,16
H	4,39	—	—	—	—	4,91
N	11,29	—	8,28	—	10,9	9,69
S	—	3,89	—	2,53	3,33	3,55
Ag	—	—	24,32	—	—	—

Aus diesen Prozentzahlen wurde die mittlere Zusammensetzung des Uromelanins und daraus die empirische Formel $C_{47}H_{44}N_7SO_{13}$ berechnet.

¹⁾ Diese Elementaranalyse wurde in einer früheren bereits zitierten Abhandlung veröffentlicht.

Tabelle 2.

	Mittelzahlen aus den Elementaranalysen des Uromelanins	Berechnet für die Formel $C_{47}H_{44}N_7SO_{13}$
	%	%
C	59,19	59,59
H	4,65	4,68
N	10,63	10,36
S	3,44	3,39
O	22,09	21,96

Bereits früher¹⁾ habe ich darauf hingewiesen, daß das Uromelanin eine auffallende Ähnlichkeit in der Zusammensetzung mit dem Proteinochromogen aufweist, in welchem Nencki die Muttersubstanz der schwarzen tierischen Pigmente sah.

Tabelle 3.

	Proteinochromogen von Nencki	Uromelanin
	%	%
C	59,8	59,59
H	4,5	4,68
N	10,0	10,36
S	2,8	3,39

Weitere Untersuchungen über die chromogene Gruppe der Proteinstoffe und das Uromelanin, sowie über die Melanine anderer Herkunft, welche eben im Gange sind, werden wohl noch mehr verwandtschaftliche Beziehungen dieser Verbindungen zu einander aufdecken.

Unter dem Namen Uromelanin haben ältere Forscher einen Körper von schwarzer Farbe beschrieben, welchen sie aus dem Harn erhielten. Vor allem hatte Thudichum²⁾ einen

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. LIV, S. 234.

²⁾ Journ. f. prakt. Chemie, Bd. CXCIV, S. 257 (1868), und Compt. rend. de l'Acad. d. Sciences, Vol. CVI, S. 1803.

solchen Körper in größerer Menge erhalten und seine Zusammensetzung mittels Elementaranalysen erforscht. Zur Gewinnung seines Uromelanins verwendete Thudichum teils gefaulten, teils frischen Harn; er fällte denselben, nach dem Ansäuern mit Schwefelsäure, mit Phosphormolybdänsäure, das Filtrat von der Phosphormolybdänsäurefällung mit Eisenchlorid und behandelte den letzteren Niederschlag mit Schwefelsäure. In einer früheren Abhandlung wurden die Methoden, mittels welcher Thudichum sein Urochrom und sein Uromelanin erhielt, von mir kritisch besprochen; es wurde dort dargelegt, daß dieser Forscher in seinem Urochrom nicht eine einheitliche Verbindung, sondern ein Gemenge von Proteinsäuren und ihren Zersetzungsprodukten in den Händen hatte. Daß das Uromelanin, welches Thudichum aus einem Gemenge von verschiedenen Körpern erhielt, kein chemisches Individuum war, ist um so sicherer, als, wie aus einer in unserem Laboratorium ausgeführten Untersuchung hervorgeht, nicht allein das Urochrom, sondern auch die Alloxyproteinsäure bei der Hydrolyse einen melaninartigen schwarzen Farbstoff liefert.

Mit besonderem Nachdruck muß aber bemerkt werden, daß Thudichum in dem Gemenge von Verbindungen, welches sein Urochrom darstellte, den Schwefel nicht gefunden hatte. Auf diesen wichtigen Umstand habe ich schon einmal hingewiesen, als ich vorschlug, für den spezifischen gelben Farbstoff des Harns den alten von Thudichum und Garrod eingeführten Namen «Urochrom» zu behalten, ungeachtet dessen, daß durch unsere Untersuchungen die durch unsere Vorgänger begründeten Ansichten sowohl über die Zusammensetzung des Harnfarbstoffs wie auch über seine chemische Natur, sowie seine Herkunft und Entstehung im Organismus von Grund an eine Änderung erfuhren.

Daß in dem Gemenge von schwarzen Farbstoffen, welches Thudichum erhielt, Schwefel enthalten war und daß er ihn nur übersehen hatte, ließ sich übrigens direkt erweisen.

20 l Harn wurden nämlich zu dieser Untersuchung in vacuo bis zum Sirup eingeengt, derselbe mit Salzsäure angesäuert, von dem entstandenen Niederschlag nach dem Absetzen

filtriert, auf 600 ccm verdünnt, mit $\frac{1}{3}$ seines Volumens von 10 %iger Salzsäure versetzt und darauf in einem Kolben mit Rückflußkühler 24 Stunden lang gekocht; der ausgeschiedene, dunkel gefärbte Niederschlag wurde auf ein gehärtetes Filter gebracht und dann mit Wasser, Alkohol, Schwefelkohlenstoff und Äther ausgewaschen. Auf diese Weise wurde ein dunkelgraues, glitzerndes Pulver erhalten, welches in der Menge von 0,8954 g zur Schwefelbestimmung verwandt, 0,0351 g BaSO₄ und somit einen Schwefelgehalt von 0,54 % ergab. Das Pulver war in fixen Alkalien leicht, in Ammoniak dagegen schwieriger und nur unvollständig löslich.

Durch Auflösung in Ammoniak und Fällen mit Salzsäure wurde aus der dunkelgrauen Substanz ein Körper von schwarzer Farbe erhalten, welcher aus 0,0961 g Substanz 0,014 g BaSO₄ lieferte und somit einen Schwefelgehalt von 1,63 % aufwies.

Wenn ich wiederholt auf das Fehlen von Schwefel in dem Uromelanin von Thudichum und die Unrichtigkeit der von diesem Autor für das Uromelanin aufgestellten empirischen Formel hinweise, so geschieht dies deshalb, weil Nichtbeachtung dieser wichtigen Tatsache in Untersuchungen, welche der meinen nachfolgten, zu falschen Schlußfolgerungen geführt hatte. St. Mancini¹⁾ hatte nämlich behufs Erforschung der Abbauprodukte des Urochroms, welche von dem von mir im Urochrom gefundenen Pyrrolring sich ableiten, ebenso wie sein Vorgänger Salomonsen, wohl im Anschluß an die von mir hingewiesene Verwandtschaft des Uromelanins mit der Muttersubstanz des Proteinchroms, den Harnfarbstoff der Behandlung mit Brom unterworfen und erhielten ein Bromderivat desselben, welches als Substitutionsprodukt eines hypothetischen, von ihm «Uropyrryl» genannten Atomkomplexes: C₃₆H₄₇N₇O₁₃ aufzufassen war. Nun wurde er darauf aufmerksam, daß die empirische Formel des Uropyrryls bloß um ein Molekül Wasser von der von Thudichum für das Uromelanin aufgestellten Formel differierte; er schloß deshalb, daß das Uromelanin ein Anhydrid des Uropyrryls wäre und ihm gegenüber in einem ähnlichen Verhältnis stünde, wie etwa die Cholsäure zu Dyslysin.

¹⁾ Biochem. Zeitschrift, Bd. XIII, S. 211.

Nun entspricht diese so einfach gedachte Beziehung zwischen zwei Abbauprodukten des Urochroms der Wahrheit sicher nicht.

Das Uromelanin, welches aus dem Harnfarbstoff, welcher eine chemisch wohl definierte Verbindung ist, durch Säurehydrolyse erhalten wird, hat eine konstante Zusammensetzung und weist unter seinen Bestandteilen, ebenso wie seine Muttersubstanz, das Urochrom, Schwefel auf, dessen Gehalt für beide Körper besonders bezeichnend ist. Während das Bromderivat, welches Mancini aus dem Urochrom durch wiederholte Behandlung mit Brom gewonnen hatte, das bromsubstituierte Uropyrryl, Schwefel nicht enthielt, weil, beiläufig bemerkt, bei seiner Darstellung der Schwefel gänzlich vom Urochrom abgespalten wurde. Daß dies tatsächlich geschah, läßt sich daraus schließen, daß in der Mutterlauge vom Autor selbst reichlich Schwefelsäure gefunden wurde.

In Anbetracht der Gegenwart des Schwefels im Molekül des Urochroms und des Fehlens desselben im Uropyrryl kann das Uromelanin nicht ein Anhydrid des Uropyrryls sein, und eine solche Auffassung muß zu den in der biologischen Chemie so häufigen Spekulationen gezählt werden, welche einer Begründung mit geprüften Beobachtungen entbehren.

Analytische Belege zu Tabelle 1.

Bestimmung von C und H:

Präparat	Substanzmenge	Asche darin	Substanzmenge n. Abzug d. Asche	CO ₂ g	H ₂ O g	C %	H %
A	0,1392 g	0,0022 g	0,1370 g	0,2975	0,0542	59,22	4,39

N-Bestimmung, gasometrisch:

Uromelanin A	(1) 0,1132 g = 11,0 ccm N bei 734 mm Hg, 12° C., 11,24% N
(Nach Abzug d. Asche)	(2) 0,1009 g = 9,9 „ „ „ 734 „ „ 12° „ 11,34% „
Uromelanin-Ag	} 0,1546 g = 11 „ „ „ 736 „ „ 11° „ 8,28% „
Präparat A	

S-Bestimmung:

Uromelanin-Ag. Präparat B.	0,2663 g = 0,0491 g BaSO ₄ = 2,53% S.
----------------------------	--

Ag-Bestimmung:

Präparat A.	0,2612 g = 0,0844 g AgCl = 24,32% Ag.
-------------	---------------------------------------