

Neues aus Chemie und Biochemie der Gallenfarbstoffe^[**]

Von Wolfhart Rüdiger^[*]

Gallenfarbstoffe sind nicht nur Abfallprodukte beim Abbau des Hämoglobins, sondern haben bei Pflanzen und niederen Tieren, in denen sie in Form von Chromoproteiden (Biliproteiden) vorkommen, spezifische Funktionen. Für Strukturuntersuchungen eignet sich besonders der Chromsäureabbau unter definierten Bedingungen. Bei den Phycobillinen (Gallenfarbstoffen von Rot- und Blaualgen) sind inzwischen nicht nur die Strukturen aufgeklärt, sondern auch die Bindungen mit dem Protein lokalisiert worden.

1. Entstehung und Vorkommen von Gallenfarbstoffen bei Wirbeltieren

Hämoglobin (1), der rote Blutfarbstoff des Menschen und der Wirbeltiere, unterliegt einem dauernden Auf- und Abbau^[1,2]. Während das zuvor komplex gebundene Eisen im Organismus zurückgehalten und wiederum zum Aufbau des Blutfarbstoffs verwendet wird, werden die Abbauprodukte des Komplexbildners (des Porphyrins) ausgeschieden. Das erste faßbare Abbauprodukt ist das Bilirubin (2), das hauptsächlich in der Galle vorkommt und der Hauptfarbstoff dieser Körperflüssigkeit ist. Man bezeichnet daher (2) als „den Gallenfarbstoff“ und Verbindungen mit dem gleichen Grundgerüst wie (2) unabhängig von ihrem Vorkommen als „die Gallenfarbstoffe“.

Bilirubin, das mit der Galle in den Darm gelangt, wird dort durch Mikroorganismen zu Urobilinogen (3) und Stercobilinogen (4) hydriert. Dieses sind die Hauptausscheidungsprodukte, die an der Luft z.T. in Urobilin (5) bzw. Stercobilin (6) übergehen; aus (3) entstehen daneben etwas Mesobiliviolin (7) und Mesobiliverdin [= Glaukobilin, (8)].

Bilirubin (2) kommt bei gesunden Individuen in kleiner Menge auch (an Albumin gebunden^[3]) im Blut-

serum vor; unter pathologischen Bedingungen (Ikterus) ist seine Konzentration hier (sowie in der Galle) erhöht; es wird dann auch im Harn ausgeschieden und besonders in elastin-reichen Geweben abgelagert. Auch die Folgeprodukte (3), (4), (5) und (6) werden unter pathologischen Bedingungen vermehrt gebildet. Nachweis und Bestimmung von Gallenfarbstoffen haben deshalb klinische Bedeutung^[4].

In der Galle der Vögel und einiger Reptilien findet man statt (2) das blaugrüne Biliverdin (9), das in vitro leicht durch Dehydrierung von (2) entsteht, in vivo jedoch wahrscheinlich die Vorstufe von (2) ist^[5-7]. Auch im Serum einiger Fische findet man (9)^[8-10].

2. Zum Vorkommen von Gallenfarbstoffen bei anderen Organismen

Während die Gallenfarbstoffe der Wirbeltiere als Abfallprodukte beim Abbau des Blutfarbstoffs bezeichnet werden können, trifft eine solche Zuordnung bei anderen Organismen meist nicht zu: Bei Pflanzen und niederen Tieren kommen häufig Gallenfarbstoffe vor, ohne

[*] Priv.-Doz. Dr. W. Rüdiger

Institut für Biochemie der Universität des Saarlandes
66 Saarbrücken 11

[**] Auszug aus der Habilitationsschrift W. Rüdiger, Universität Saarbrücken 1968.

[1] R. Lemberg u. J. W. Legge: Hematin Compounds and Bile Pigments. Interscience Publ., New York 1949, S. 453 ff., 603 ff.

[2] Vgl. C. Rimington, Annu. Rev. Biochem. 26, 561 (1957).

[3] T. K. With: Biologie der Gallenfarbstoffe. Thieme, Stuttgart 1960, S. 124.

[4] Vgl. [3], dort S. 319.

[5] R. Lemberg, Biochem. J. 29, 1322 (1935).

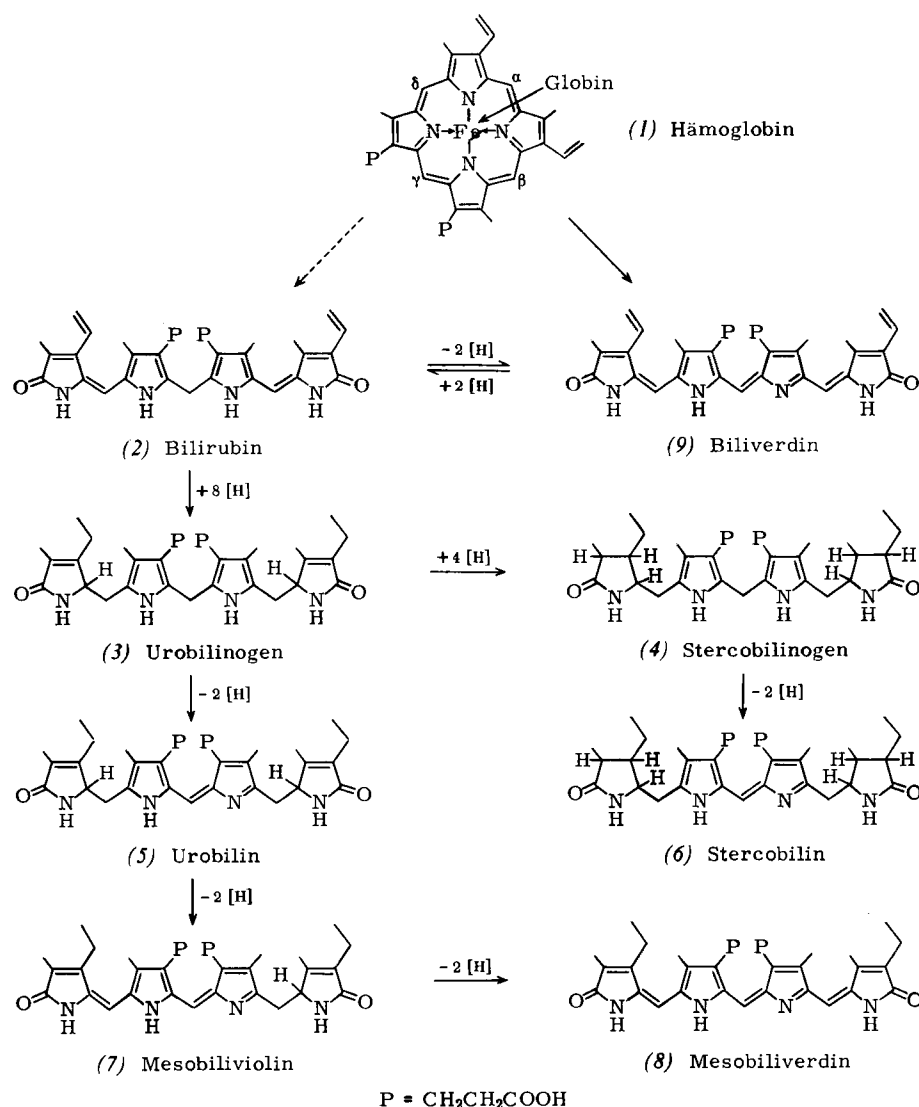
[6] Vgl. R. Lemberg, Rev. pure appl. Chem. 6, 1 (1956).

[7] C. Ó hEocha in T. W. Goodwin: Porphyrins and Related Compounds. Academic Press, London 1968, S. 91.

[8] L. Abolinš, Ark. Zool. (2) 13, 541 (1961).

[9] Y. Kōchiyama, K. Yamaguchi, K. Hashimoto u. F. Matsuura, Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries 32, 867 (1966).

[10] K. Yamaguchi, Y. Kōchiyama, K. Hashimoto u. F. Matsuura, Bull. Japan. Soc. Sci. Fisheries 32, 873 (1966).



Schema 1. Bildung von Gallenfarbstoffen der IX α -Reihe beim Menschen und bei Wirbeltieren. „IX α “ wird von Protohäm IX durch oxidative Öffnung der α -Methin-Brücke abgeleitet.

daß Hämoglobin oder andere Häm- oder Porphyrin-komponenten in entsprechenden Mengen vorhanden sind. Die Farbstoffe sind häufig an Protein gebunden (Biliproteide); von einigen sind spezifische Funktionen bekannt (Schutzfärbung bei Insekten, photosynthetische Aktivität bei Algen, Photoregulation von Wachstum und Entwicklung bei höheren Pflanzen).

In Tabelle 1 sind die Vorkommen von Gallenfarbstoffen (abgesehen vom Vorkommen in Galle und Serum) zusammengestellt. Es ist auffällig, daß Biliverdin IX α (9) am weitesten verbreitet ist; andere Gallenfarbstoffe kommen nur bei einigen Tieren vor [Biliverdin IX γ (10), Aplysioviolins (11a)] oder Pflanzen [Phycobiline (11) und (12), Phytochrom-Chromophor (13)]. Angaben zum Vorkommen weiterer Gallenfarbstoffe (unbekannter Struktur) wurden nicht berücksichtigt (Verwechslungen mit Carotinoiden und Ommochromen s. [11–13]).

[11] J. Verne: Les pigments dans l'organisme animal. Doin, Paris 1926, zit. nach M. Fontaine, Bull. Inst. océanogr. Monaco 1941, Nr. 792.

[12] L. Abolinš, Acta Zool. 38, 223 (1957), und zwar S. 235.

[13] Vgl. A. Butenandt, U. Schiedt, E. Bieker u. P. Kornmann, Liebigs Ann. Chem. 586, 217 (1954).

Tabelle 1. Vorkommen von Gallenfarbstoffen außerhalb von Galle und Serum.

Farbstoff	Tier oder Pflanze	Organ	Lit.
Biliverdin IX α (9)	Hund	Placenta	[14, 15]
Biliverdin IX α (9)	Vögel	Eierschalen	[16, 17]
Biliverdin IX α (9)	Fische	Gräten	[18–21]
Biliverdin IX α (9) [a]	Fische	Flossen, Haut	[22, 23]
Biliverdin IX α (9) [a]	Heuschrecken	Tegument, Hämolymphe	[24–28]
Biliverdin IX α (9)	Blaue Koralle	Kalkskelett	[29, 30]
Biliverdin IX γ (10) [a]	Schmetterlinge	Tegument	[31, 32]
Aplysioviolins (11a) [a]	Seehase (Aplysia)	Sekret	[33, 34]
Biliverdin IX α (9) [a]	Leguminosen	Wurzelknöllchen	[35, 36]
Phycobiline (11), (12) [a]	Rot- und Blaualgen	Thallus	
Phytochrom-Chromophor (13) [a]	höhere Pflanzen	alle Teile	[37, 38]

[a] Als Chromoprotein.

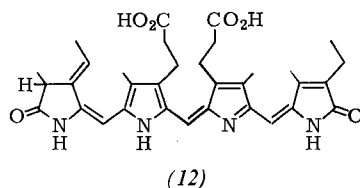
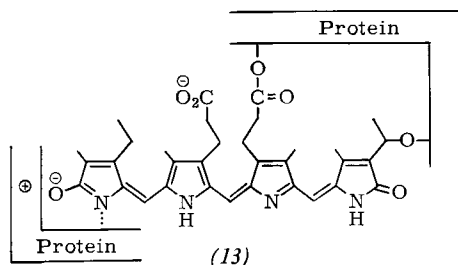
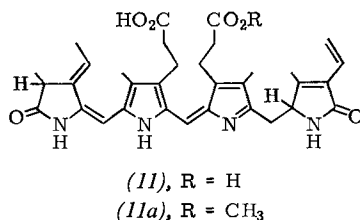
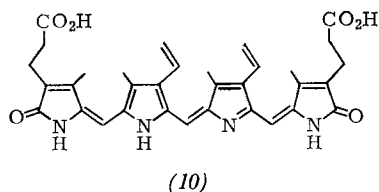
[14] R. Lemberg u. J. Barcroft, Proc. Roy. Soc. (London), Ser. B 110, 362 (1932).

[15] R. Lemberg u. J. Barcroft, Biochem. J. 28, 978 (1934).

[16] Möven: R. Lemberg, Liebigs Ann. Chem. 488, 74 (1931); 499, 25 (1932).

[17] Emu: R. Tixier, Ann. Inst. océanogr. Monaco 22, 343 (1945).

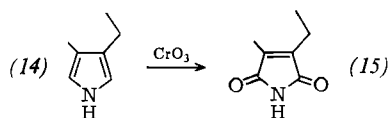
[18] *Zoarcus viviparus*: H. Willstaedt, Enzymologia (Den Haag) 9, 260 (1941).



3. Allgemeine Untersuchungsmethoden

3.1. Chromsäure- und Chromat-Abbau

Pyrrolfarbstoffe sowie einige einfache Pyrrolkörper, z.B. (14), liefern bei der Oxidation mit Chromsäure Maleinimide, wobei die β -ständigen Substituenten erhalten bleiben [39].



Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist pH-abhängig [40]. Es zeigte sich, daß man Gallenfarbstoffe mit dieser Reaktion von anderen Pyrrolverbindungen (Porphyrinen, Chlorophyllen, Vitamin B₁₂) unterscheiden kann; das sei am Beispiel von

Protoporphyrin [(1) ohne Fe und Globin] und Biliverdin IX α (9) erläutert: Bei gleichem pH-Wert (hier pH = 1.7) nimmt die Extinktion des Gallenfarbstoffs fast 100-mal schneller ab als die des Porphyrins ($t_{1/2}$ = 4.5 min bzw. 420 min) [40].

Die Halbwertszeiten dieser Entfärbungsreaktion [40] liegen bei den hier angewendeten Bedingungen für Gallenfarbstoffe zwischen 0.5 und 20 min; Farbstoffe mit ungesättigten Seitenketten [z.B. (9) mit seinen Vinylgruppen] werden dabei schneller entfärbt als solche mit gesättigten Seitenketten [z.B. (8) mit seinen Äthylgruppen]. Porphyrine, Chlorine und Corrine werden unter gleichen Bedingungen mit Halbwertszeiten von mehreren Stunden bis Tagen oxidiert.

Bei den Untersuchungen von Gallenfarbstoffen haben sich der Abbau mit Dichromat/Hydrogensulfat (pH = 1.7), im folgenden „Chromatabbau“ genannt, und der Abbau mit Chromsäure in 2 N H₂SO₄, im folgenden als „Chromsäureabbau“ bezeichnet, bewährt. Er wird bei 20 °C („nicht-hydrolytisch“) oder bei 100 °C („hydrolytisch“) ausgeführt.

Je nach den gewählten Bedingungen erhält man verschiedene Abbauprodukte aus dem gleichen Gallenfarbstoff (Schema 2): So bildet sich beim Chromatabbau von (9a), dem Dimethylester von (9), neben Methylvinylmaleinimid (16) und dem in geringer Ausbeute entstehenden Hämatinsäureimid-methylester (17a) der Pyrroldicarbaldehyd (18a) als neues Abbauprodukt. (18a) ist ein Zwischenprodukt der Imidbildung: Beim Chromsäureabbau geht es in das erwartete Imid über, und zwar bei 20 °C in (17a), bei 100 °C in (17). (17a) und (17) entstehen auch direkt aus dem Farbstoff (9a).

Methylvinylmaleinimid (16) entsteht unter allen erwähnten Bedingungen in etwa gleicher Ausbeute, jedoch wird es in stärker saurem Medium (z.B. 6 N H₂SO₄) von Chromsäure zerstört. Da früher beim Chromsäureabbau von Pyrrolfarbstoffen [42–44] durchweg 6–10 N H₂SO₄ verwendet wurde, konnte (16) damals nicht gefunden werden.

Pyrrol-2,5-dicarbaldehyde können sich nicht von den endständigen (Pyrrolon-)Ring (I und IV) des ursprünglichen Gallenfarbstoffs ableiten, da sie zwei der ehemaligen Brücken-C-Atome enthalten. Es hat sich gezeigt [41], daß sich bei

[19] *Katsuwonus pelamis* L.: D. L. Fox u. N. Millott, *Experientia* 10, 185 (1954).

[20] *Belone belone*: W. Rüdiger, unveröffentlicht.

[21] *Cololabis saira* Brevoort: Y. Tsuchiya u. T. Nomura, C. R. Séances Soc. Biol. Filiales 155, 34 (1961).

[22] *L. Abolins* u. W. Rüdiger, *Experientia* 22, 298 (1966).

[23] W. Rüdiger u. L. Abolins, *Experientia* 25, 574 (1969).

[24] *Mantis religiosa*: M. Passama-Vuillaume, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 258, 6549 (1964).

[25] *Locusta migratoria*: M. Passama-Vuillaume, *Bull. Soc. zool. France* 90, 485 (1965).

[26] *Oedipoda coerulescens*: M. Passama-Vuillaume u. B. Levita, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 263, 1001 (1966).

[27] *Clitumnus extradentatus*: W. Rüdiger, W. Klose, M. Vuillaume u. M. Barbier, *Bull. Soc. Chim. biol.* 51, 559 (1969).

[28] *Carausius morosus*: W. Rüdiger, unveröffentlicht.

[29] R. Tixier, *Ann. Inst. océanogr. Monaco* 22, 379 (1945).

[30] W. Rüdiger, W. Klose, B. Tursch, N. Houvenaghel-Crevecœur u. H. Budzikiewicz, *Liebigs Ann. Chem.* 713, 209 (1968).

[31] W. Rüdiger, W. Klose, M. Vuillaume u. M. Barbier, *Experientia* 24, 1000 (1968).

[32] M. Vuillaume u. M. Barbier, C. R. hebd. Séances Acad. Sci. 268, 2286 (1969).

[33] W. Rüdiger, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 129 (1967).

[34] W. Rüdiger, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 348, 1554 (1967).

[35] A. I. Virtanen u. J. K. Miettinen, *Acta chem. scand.* 3, 17 (1949).

[36] W. Rüdiger, W. Klose u. R. Lichter, unveröffentlicht.

[37] H. W. Siegelman, B. C. Turner u. S. B. Hendricks, *Plant Physiol.* 41, 1289 (1966).

[38] W. Rüdiger u. D. L. Correll, *Liebigs Ann. Chem.* 723, 208 (1969).

[39] Vgl. H. Fischer u. H. Orth: *Die Chemie des Pyrrols*. Akad. Verlagsges., Leipzig 1934, Bd. 1, S. 39.

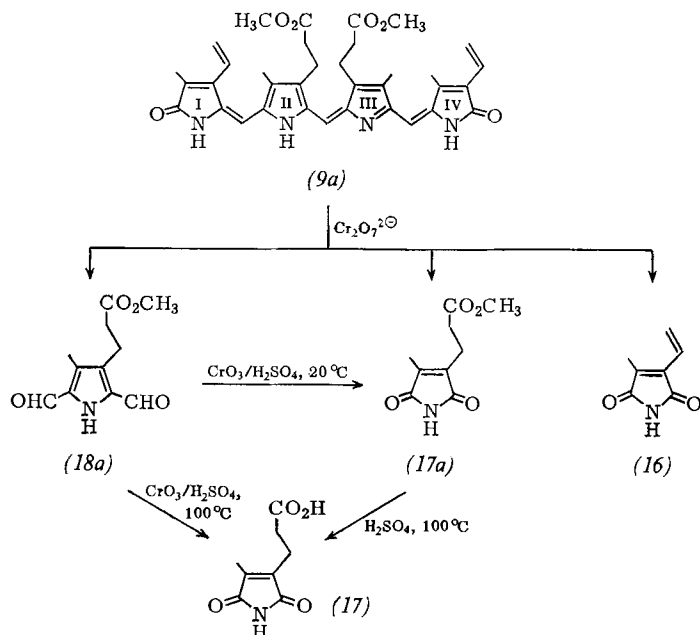
[40] W. Rüdiger, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 350, 1291 (1969).

[41] W. Rüdiger, unveröffentlicht.

[42] H. Fischer u. H. Wenderoth, *Liebigs Ann. Chem.* 537, 170 (1939).

[43] H. M. Muir u. A. Neuberger, *Biochem. J.* 45, 163 (1949).

[44] G. E. Ficken, R. B. Johns u. R. P. Linstead, *J. chem. Soc. (London)* 1956, 2272.



Schema 2. Chromsäure- und Chromatabbau von Biliverdin-IX α -dimethylester (9a).

Farbstoffen vom Typ des Biliverdins die Dialdehyde von *beiden* mittleren Ringen (II und III) ableiten, bei solchen vom Typ des Mesobiliviolins (7) jedoch fast ausschließlich von Ring II.

Durch die Identifizierung der Abbauprodukte beim Chromatabbau kann demnach nicht nur die Art, sondern u. U. auch die Reihenfolge der β -ständigen Substituenten eines Gallenfarbstoffs erkannt werden („Sequenzanalyse“).

3.2. Trennung und Identifizierung

Ein wirksames Trennverfahren ist nicht nur für Isolierung und Identifizierung der Abbauprodukte, sondern auch für Reinigung und Charakterisierung der Gallenfarbstoffe von Bedeutung. Als geeignet und im Falle der Farbstoffe z. B. der Säulenchromatographie überlegen erwies sich die Dünnschichtchromatographie; bei den Abbauprodukten sind diese beiden Methoden gleich gut.

Die Gallenfarbstoffe werden am besten in Form ihrer Dimethylester voneinander getrennt. Im Standardfließmittel (Benzol/Benzin/Methanol = 9 : 5 : 1)^[33] steigen die R_f -Werte mit der Zahl der konjugierten Pyrrolringe [z. B. (5) < (7) < (8)]; die Farbstoffe mit Vinylgruppen wandern weiter als ihre Analoga mit Äthylgruppen. Durch Mehrfachentwicklung^[45] gelingt auch die Trennung sehr ähnlicher Pigmente (z. B. isomerer Urobiline und Mesobiliverdine^[46]). Die Lokalisierung bietet aufgrund der Farbigkeit kein Problem; zur Charakterisierung können neben den Eigenfarben auch die im UV-Licht sichtbaren Fluoreszenzfarben der Zinkkomplexe dienen^[33]. Bereits von kleinen Mengen (ca. 0.1 mg) der dünn-schichtchromatographisch isolierten Farbstoffe erhält man brauchbare Massenspektren^[47].

Im Standardfließmittel für die *Abbauprodukte* (Tetrachlor-kohlenstoff/Essigester/Cyclohexan = 5 : 3 : 1)^[33,48] wandern Succinimide nicht so weit wie Maleinimide und Pyrrol-dicarbaldehyde; die R_f -Werte steigen bei allen Abbauprodukten mit der Kettenlänge der β -Alkylsubstituenten an. Schwierige Trennungen [z. B. (15) von (16)] gelingen durch

[45] Vgl. E. Stahl: Dünnschichtchromatographie. 2. Aufl., Springer-Verlag, Berlin 1967, S. 87.

[46] L. Paulmann, Diplomarbeit, Universität Saarbrücken 1968.

[47] H. Budzikiewicz u. W. Rüdiger, unveröffentlicht.

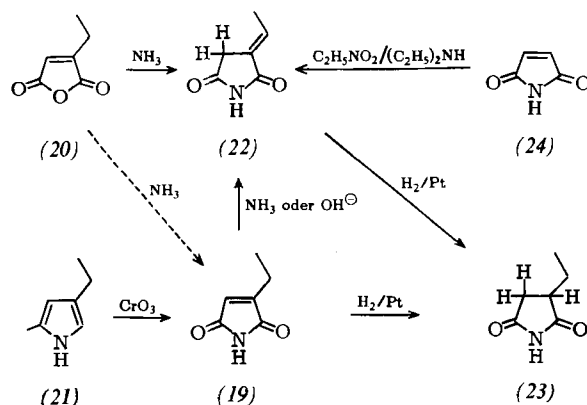
[48] W. Rüdiger u. W. Klose, Tetrahedron Letters 1966, 5893.

Mehrfachentwicklung^[40]. Die Farbreaktion der Imide mit Chlor/Benzidin^[40,49] ist empfindlich, jedoch nicht spezifisch; zur sicheren Identifizierung kann mit Vorteil die Massenspektrometrie der dünn-schichtchromatographisch isolierten Imide dienen^[50]. Pyrroldicarbaldehyde lassen sich durch Ansprühen mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin sichtbar machen^[40].

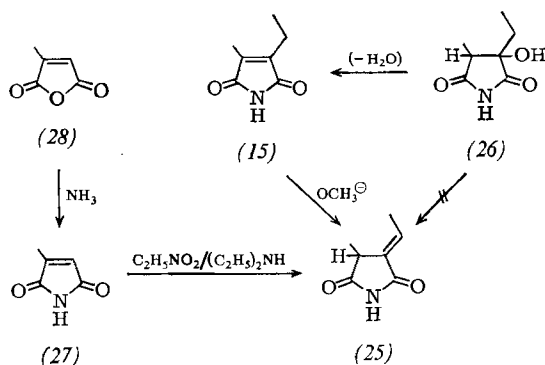
3.3. Synthese von Vergleichspräparaten

Malein- und Succinimide sind durch Umsetzung der Anhydride mit Ammoniak oder Harnstoff zugänglich und wiederholt als Vergleichssubstanzen für die Abbauprodukte von Pyrrolfarbstoffen dargestellt worden^[43,44,51].

Über Äthylmaleinimid (19) waren widersprüchliche Angaben zu finden: *Anschtz*^[52] hatte aus dem Anhydrid (20) mit Ammoniak ein Präparat vom Fp = 141 °C gewonnen, während das von *Fischer et al.*^[53] durch Chromsäureoxidation von 2-Methyl-4-äthylpyrrol (21) dargestellte (19) bei 80 °C schmolz. Das nach *Fischer* gewonnene Präparat erwies sich als einheitliches (19), während das nach *Anschtz* erhaltene Gemisch hauptsächlich aus Äthylidensuccinimid (22) bestand^[48]. (22) wurde unabhängig aus Maleinimid (24) und Nitroäthan dargestellt^[54].



(19) geht beim Erhitzen mit Alkali (z. B. bereits mit Ammoniak) glatt in (22) über. Eine entsprechende Umlagerung gelingt auch mit dem Methylhomologen (15), allerdings erst bei Verwendung von Methylat [Ausbeute an (25) maximal



Schema 3. Synthesewege für Äthylidenmethylsuccinimid (25).

[49] Vgl. F. Reindel u. W. Hoppe, Chem. Ber. 87, 1103 (1954).

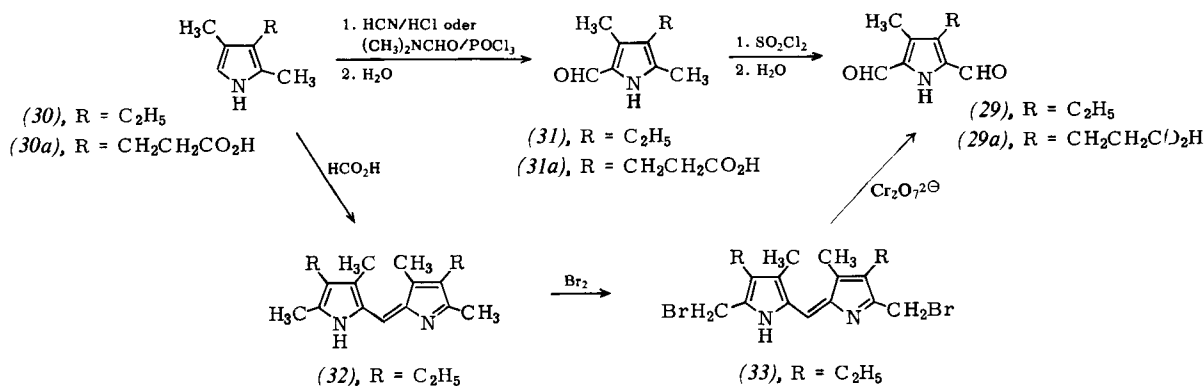
[50] R. K. Ellsworth u. S. Aronoff, Arch. Biochem. Biophysics 124, 358 (1968).

[51] W. Küster, Liebigs Ann. Chem. 345, 1 (1906), und zwar S. 18.

[52] R. Anschtz, Liebigs Ann. Chem. 461, 155 (1928), und zwar S. 169.

[53] H. Fischer, A. Treibs u. G. Hummel, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 185, 33 (1929), und zwar S. 53.

[54] W. Rüdiger u. W. Klose, unveröffentlicht.



Schema 4. Synthesewege für 3-Äthyl-4-methyl-pyrrol-2,5-dicarbaldehyd (29) und das Propionsäure-Derivat (29a).

5%]^[54]. Synthesewege für dieses Imid, das ein Abbauprodukt von Aplysioviolinen (11a) und der Phycobiline ist, sind in Schema 3 zusammengestellt^[40, 41, 55].

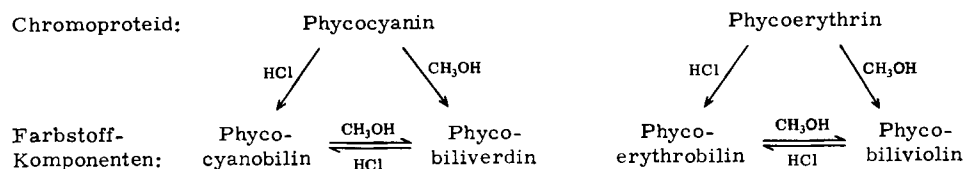
Als Vergleichspräparat für den Chromatabbau wurde der 3-Äthyl-4-methyl-pyrrol-2,5-dicarbaldehyd (29)^[56] gewählt. Seine Synthese aus Kryptopyrrol (30) geht aus Schema 4 hervor^[40, 54, 56, 57]. Die analogen Umsetzungen sind auch mit den Propionsäure-Derivaten möglich^[54].

4. Chromoproteide von Rot- und Blaualgen

Rotalgen (Rhodophytae), Blaualgen (Cyanophytae) und Cryptophytae zeichnen sich vor anderen Algen durch rote und blaue Farbstoffe aus. Diese sind wie die Chlorophylle Lichtrezeptoren für die Photosynthese^[58]. Man bezeichnet die roten Farbstoffe als Phycoerythrine, die blauen als Phycocyanine. Nach Herkunft und Eigenschaften unterscheidet man R-, B-, C- und Cryptomonad-Phycoerythrin sowie R-, C-, Allo- und Cryptomonad-Phycocyanin^[59].

Phycoerythrin von Rotalgen den proteinfreien Gallenfarbstoff Mesobiliverdin (8) abspalten, der später^[64] röntgenographisch als Mesobiliverdin IX α identifiziert wurde. Aufgrund des Farbwechsels bei dieser Spaltung wurde aber Mesobiliviolin (7) als die eigentliche prosthetische Gruppe angesehen.

Vor einiger Zeit wurden zwei Methoden beschrieben, die zu neuen Gallenfarbstoffen führen: 1. Mit konzentrierter Salzsäure werden bei Raumtemperatur aus den Phycobiliproteiden Farbstoffe abgespalten, deren Spektren mit denen der denaturierten Chromoproteide übereinstimmen und die als die nativen Chromophore Phycoerythrobilin und Phycocyanobilin angesehen werden^[65, 66]. 2. Mit siedendem Methanol erhält man ähnliche Gallenfarbstoffe, die zunächst^[67] für die proteinfreien, biologischen Vorstufen der Chromoproteide gehalten und „blue pigment“ bzw. „purple pigment“ genannt wurden, sich später^[68] jedoch als Spaltprodukte der Chromoproteide erwiesen. Diese Farbstoffe sollen als Phycobiliviolin und Phycobiliverdin bezeichnet werden. Phycoerythrobilin und



Schema 5. Gewinnung und Umwandlung von Phycobilinen. 12 N HCl, 30 min bei 20 °C; CH₃OH, 24 St. d. bei 65 °C.

Über die Strukturen gibt es bereits zahlreiche Untersuchungen: Kylin^[60] vermochte die Farbstoffe zu kristallisieren und die bereits früher^[61] vermutete Proteid-Natur durch die Spaltbarkeit mit Pepsin zu bestätigen; jedoch gelang es weder ihm noch Lemberg^[62] mit Pepsin oder mit Säure eiweißfreie, farbige Gruppen zu erhalten. Lemberg^[63] konnte aus dem

Phycobiliviolin sind ineinander umwandelbar, ebenso Phycocyanobilin und Phycobiliverdin^[68]. Die Entstehung dieser Gallenfarbstoffe (Phycobiline) aus den Chromoproteiden (Phycobiliproteiden) ist in Schema 5 dargestellt.

4.1. Vergleich von Phycobiliviolin mit Aplysioviolinen

Aplysioviolinen (11a), das Hauptpigment des Abwehrsekrets von Seehasen (Aplysien), leitet sich vermutlich von Phycoerythrin ab, welches diese Schnecken mit

[55] W. Rüdiger u. W. Klose, Tetrahedron Letters 1967, 1177.

[56] H. Fischer, E. Baumann u. H. J. Riedl, Liebigs Ann. Chem. 475, 205 (1929), und zwar S. 234.

[57] H. Fischer u. M. Schubert, Ber. dtsch. chem. Ges. 56, 1202 (1923).

[58] Vgl. F. T. Haxo u. L. R. Blinks, J. gen. Physiol. 33, 389 (1950).

[59] Zum Vorkommen der einzelnen Typen vgl. C. Ó. hEocha in T. W. Goodwin: Biochemistry of Chloroplasts. Academic Press, London 1966, Bd. 1, S. 409.

[60] H. Kylin, Hoppe-Seylers Z. physiol. Chem. 69, 169 (1910); 76, 396 (1911/12).

[61] H. Molisch, Bot. Ztg. 52, 177 (1894); 53, 131 (1895).

[62] R. Lemberg, Liebigs Ann. Chem. 461, 46 (1928); 477, 195 (1930).

[63] R. Lemberg u. G. Bader, Liebigs Ann. Chem. 505, 151 (1933).

[64] W. Siedel, Ber. dtsch. chem. Ges. 77, 21 (1944), und zwar S. 41.

[65] C. Ó. hEocha, Biochemistry 2, 375 (1963).

[66] P. Ó. Carra, C. Ó. hEocha u. D. M. Carroll, Biochemistry 3, 1343 (1964).

[67] Y. Fujita u. A. Hattori, J. gen. appl. Microbiol. (Tokyo) 9, 253 (1963); J. Biochemistry (Tokyo) 51, 89 (1962).

[68] P. Ó. Carra u. C. Ó. hEocha, Phytochemistry 5, 993 (1966).

ihrer (Rotalgen enthaltenden) Nahrung aufnehmen^[69]. (11a) ist leichter zugänglich als die Phycobiline, da es im Sekret nur locker (vermutlich salzartig) mit dem Protein verknüpft ist und somit unter schonenden Bedingungen ohne sekundäre Veränderung proteinfrei gewonnen werden kann. Seine Struktur wurde daher schon früher aufgeklärt^[33, 34]. Aplysioviolins (11a) ist ein Monomethylester; dagegen sind auch die durch Methanolyse gewonnenen Phycobiline unveresterte Dicarbonsäuren.

Für einen Vergleich wurden alle Pigmente in die Dimethylester übergeführt. Die Dimethylester aus Phycobiliviolin und Aplysiovioletin sind nach dem chromatographischen Verhalten (Mischchromatogramme in mehreren Fließmitteln), nach den Elektronenspektren der freien Basen, der Hydrochloride und der Zinkkomplexe sowie nach den Reaktionen mit Alkali und Säure miteinander identisch^[70, 71]. Der Algenfarbstoff ist demnach die dem Monomethylester Aplysiovioletin (11a) zugrundeliegende Dicarbonsäure (11). Damit wird die hier eingeführte Bezeichnung „Phycobilivioletin“ (statt „purple pigment“) begründet.

4.2. Chromat- und Chromsäure-Abbau der Phycobiline

Aplysiovioletin und Phycobilivioletin werden durch Chromat unter Standardbedingungen (vgl. Abschnitt 3.1) mit einer Halbwertszeit von 0.5 min entfärbt; sie sind damit die in dieser Reaktion am schnellsten reagierenden Gallenfarbstoffe^[40]. Die strukturelle Übereinstimmung dieser beiden Pigmente wurde weiter durch einen Vergleich ihrer Abbauprodukte bestätigt: (11) liefert beim Chromsäureabbau bei 20 °C Methylvinylmaleinimid (16), Äthylidenmethylsuccinimid (25) und Hämatinsäureimid (17), (11a) zusätzlich den Ester (17a). Beim Chromatabbau entsteht aus beiden Pigmenten neben den Imiden der Pyrroldicarbaldehyd (29a). Diese Ergebnisse stehen mit der für Phycobilivioletin angenommenen Struktur (11) in Einklang.

Aus Phycoerythrobilin entstehen beim Chromsäureabbau ebenfalls die Imide (16), (17) und (25), beim Chromatabbau außerdem der Dialdehyd (29a). Das bedeutet, daß die β -ständigen Substituenten bei diesem Farbstoff dieselben sind wie bei Phycobilivioletin; da beide Pigmente ineinander umwandelbar sind, müssen die Substituenten die gleichen Stellungen einnehmen. Die Unterschiede in den Spektren sind demnach auf bisher nicht näher untersuchte Differenzen in den α -Positionen der Pyrrolkerne zurückzuführen.

Die aus den Phycocyaninen erhältlichen Pigmente Phycobiliverdin („blue pigment“) und Phycocyanobilin liefern beim Chromsäure- und Chromatabbau die Imide (15), (17) und (25) sowie den Pyrroldicarbaldehyd (29a). Auch hier sind also die β -ständigen

[69] D. J. Chapman u. D. L. Fox, J. exp. Marine Biol. Ecology 4, 71 (1969).

[70] W. Rüdiger, P. Ó Carra u. C. Ó. hEocha, Nature (London) 215, 1477 (1967).

[71] W. Rüdiger u. P. Ó Carra, Europ. J. Biochem. 7, 509 (1969).

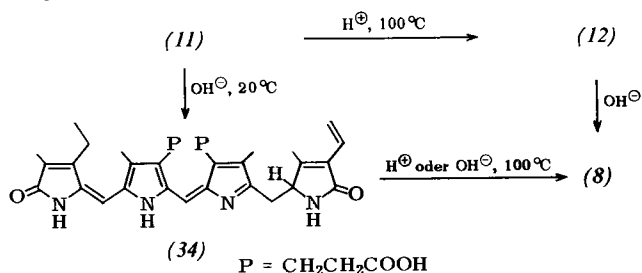
Seitenketten bei beiden Farbstoffen gleich. Da das erstgenannte Pigment („blue pigment“) dem Mesobiliverdin (8) in seinen spektralen Eigenschaften am ähnlichsten ist, soll es Phycobiliverdin genannt werden. Die Struktur (12) kann aus dem Ergebnis des Abbaus und aus dem spektralen Verhalten abgeleitet werden.

Die Strukturen (11) und (12) für die mit siedendem Methanol aus den Biliproteiden erhaltenen Pigmente^[72] wurden in unabhängigen Untersuchungen aufgrund der Massen- und NMR-Spektren vorgeschlagen^[73–76]. Der gegenüber Struktur (12) gefundene Mehrgehalt von 2 H-Atomen^[73] kann durch eine Disproportionierung des Farbstoffs im Massenspektrometer gedeutet werden^[76].

4.3. Reaktionen der Phycobiline mit Alkali und Säure

Die Spektren aller Phycobiline (und ihrer Chromoproteide) zeigen reversible bathochrome Verschiebungen im alkalischen Bereich. Die roten Gallenfarbstoffe werden vorübergehend blau, die blauen Farbstoffe zunächst farblos bis hellgelb, da die Hauptabsorptionsbande in das nahe Infrarot verschoben wird und keine Bande im sichtbaren Spektralbereich mehr auftritt.

Diese Verschiebung ist anfänglich durch Neutralisieren der Lösung rückgängig zu machen, jedoch entstehen in alkalischer Lösung (langsam in der Kälte, rasch beim Erhitzen) neue Pigmente. Aus (11) erhält man zunächst ein dem Mesobilivioletin ähnliches Pigment, dem nach dem Ergebnis des Chromsäureabbaus die Struktur (34) zukommt. Bei längerer Alkali-Einwirkung geht es in Mesobiliverdin (8) über, welches aus (12) sofort gebildet wird. Da das durch alkalische Hydrolyse des roten Chromoproteids erhaltene Mesobiliverdin bereits früher als das IX α -Isomere identifiziert worden war^[64], folgt die IX α -Struktur für alle Phycobiline.



Beim Erhitzen von (11) mit verdünnter Salzsäure entsteht hauptsächlich (12). In konzentrierter Salzsäure überwiegt dagegen die Reaktion zu Phycoerythro-

[72] In [73–76] Phycocyanobilin oder Phycoerythrobilin genannt.

[73] H. L. Crespi, L. J. Boucher, G. D. Norman, J. J. Katz u. R. C. Dougherty, J. Amer. chem. Soc. 89, 3642 (1967).

[74] W. J. Cole, D. J. Chapman u. H. W. Siegelman, J. Amer. chem. Soc. 89, 3643 (1967).

[75] D. J. Chapman, W. J. Cole u. H. W. Siegelman, J. Amer. chem. Soc. 89, 5976 (1967).

[76] H. L. Crespi, U. Smith u. J. J. Katz, Biochemistry 7, 2232 (1968).

bilin^[68] und weiter zu einem Urobilin^[77]. Bei allen diesen Reaktionen bleibt die Äthylidengruppe erhalten. Die Säure bewirkt eine prototrope Umlagerung einer Vinyl- in eine Äthylgruppe, wobei gleichzeitig eine Methylen- zur Methinbrücke wird. Derartige Umlagerungen sind von anderen Gallenfarbstoffen her bekannt^[78, 79].

4.4. Zur Bindung der Phycobiline an das Protein

Der Chromsäureabbau der nativen Chromoproteide liefert je nach den Bedingungen verschiedene Ergebnisse. Dies sei am Beispiel des C-Phycocyanins erläutert: Bei 100 °C (hydrolytischer Abbau) wird das zunächst ausgefällte Proteid zu Peptiden hydrolysiert, die in Lösung gehen; aus der Lösung erhält man die gleichen Imide [(15), (17) und (25)] wie aus dem freien Phycobilin (12). Baut man das Chromoproteid jedoch bei 20 °C (nicht-hydrolytisch) ab, so bleibt der Protein-Niederschlag erhalten; aus der Suspension ist zwar die gleiche Menge (15) extrahierbar wie beim hydrolytischen Abbau, jedoch nur die Hälfte an (17) und kein (25). Aus dem abgetrennten und gewaschenen Protein-Niederschlag lassen sich die bisher fehlenden Imide [(25) und die zweite Hälfte an (17)] durch Hydrolyse (ohne weiteres Oxidationsmittel) freisetzen.

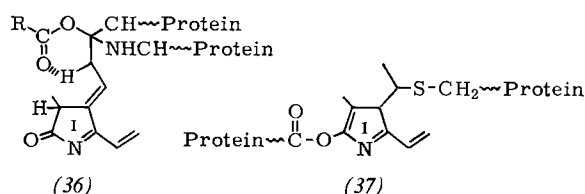
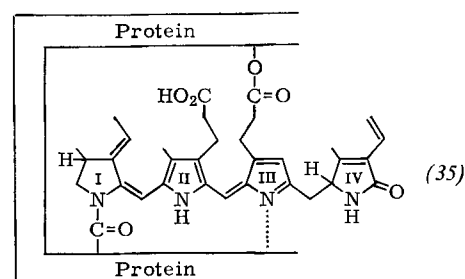
Dasselbe Ergebnis erhält man mit R-Phycocyanin und im Prinzip mit R- und C-Phycoerythrin sowie mit den aus C-Phycoerythrin mit Pankreatin erhältlichen Chromopeptiden, jedoch liefern die roten Farbstoffe (16) statt (15).

Nach diesen Abbaubersuchen liegen von den vier Pyrrolkernen der Phycobiline im nativen Chromoproteid nur zwei frei vor, während die anderen beiden kovalent an das Protein gebunden sein müssen. Bisher ist nicht bekannt, welche funktionellen Gruppen des Proteins an dieser Bindung beteiligt sind. Jedenfalls müssen der Endring I [der das Imid (25) liefert] und einer der mittleren Ringe [aus denen (17) entsteht] gebunden, Endring IV [der zu (15) oder (16) abgebaut wird] und der andere mittlere Ring frei vorliegen. Welcher der mittleren Ringe frei und welcher gebunden ist, konnte beim Phycoerythrin geklärt werden: Beim Chromatabbau bei 20 °C wird der Pyrroldicarbaldehyd (29a) freigesetzt, während das Imid (17) erst aus dem Protein-Niederschlag durch Hydrolyse abgelöst wird. Da bei Gallenfarbstoffen vom Biliviolin-Typ der Pyrroldicarbaldehyd aus Ring II entsteht (vgl. Abschnitt 3.1), muß dieser Ring frei sein, während der das Imid liefernde Ring III gebunden ist.

Der Pyrrol-Stickstoff von Ring III ist im nativen Chromoproteid wahrscheinlich durch eine Wasserstoffbrücke maskiert, die bei der Denaturierung zerstört wird: Dieses Stickstoffatom ist z.B. für die Bildung

eines Zinkkomplexes im denaturierten, nicht aber im nativen Chromoproteid zugänglich^[66,80]. An der oben diskutierten kovalenten Bindung von Ring III kann der Stickstoff nicht beteiligt sein; am wahrscheinlichsten ist eine Bindung über die Propionsäure-Seitenkette, die sicher nicht, wie früher^[81] angenommen, eine Amidbindung, sondern vermutlich eine (allerdings gegen Alkali relativ stabile) Esterbindung ist^[65,66]. Eine N-Acylbindung (z.B. Aspartoyl- oder Glutamoyl-) zwischen Ring I und dem Protein wurde von uns wahrscheinlich gemacht^[71]; demnach ergibt sich (35) als Teilformel des Biliproteids Phycoerythrin.

Für die Bindung zwischen Ring I und dem Protein im C-Phycocyanin sind auch die Möglichkeiten (36)^[76] und (37)^[82] diskutiert worden, bei denen die Äthylidengruppe nicht im Chromoproteid als solche vorhanden ist, sondern erst bei der Abspaltung des Phycobilins entsteht. Die Entscheidung zwischen diesen (und weiteren) Möglichkeiten wird wohl erst nach Aufklärung der Aminosäure-Sequenz der Phycobiliproteide getroffen werden.



5. Weitere Ergebnisse und Möglichkeiten

Von den weiteren mit den hier geschilderten Methoden erhaltenen Ergebnissen (vgl. Tabelle 1) sei die Auffindung von Biliverdin IX γ (10)^[31] erwähnt, dem ersten natürlichen Gallenfarbstoff der nicht zur IX α -Reihe gehört. Bei der Untersuchung seiner Biosynthese^[83] konnte analog zu den klassischen Untersuchungen über die Porphyrin-Biosynthese^[43,84] durch einen definierten Abbau (hier den Chromatabbau) der spezifische Einbau von radioaktiv markiertem Glycin in das Pigment bewiesen werden. Außerdem seien die Fälle hervorgehoben, in denen Gallenfarbstoffe kovalent an das Protein gebunden

[77] W. J. Cole, C. Ó hEocha, A. Moscowitz u. W. R. Krueger, Europ. J. Biochem. 3, 202 (1967).

[78] C. H. Gray u. D. C. Nicholson, J. chem. Soc. (London) 1958, 3085.

[79] C. H. Gray, A. Kulczycka u. D. C. Nicholson, J. chem. Soc. (London) 1961, 2268.

[80] C. Ó hEocha u. P. Ó Carra, J. Amer. chem. Soc. 83, 1091 (1961).

[81] Vgl. [1], dort S. 147.

[82] H. L. Crespi u. U. H. Smith, Phytochemistry 9, 205 (1970).

[83] W. Rüdiger, W. Klose, M. Vuillaume u. M. Barbier, Experientia 25, 487 (1969).

[84] Vgl. D. Shemin, Methods in Enzymol. 4, 643 (1957).

sind. Das ist bisher im Tierreich nur vom Crenilabrus-Blau [22, 23], im Pflanzenreich von den Phycobilliproteiden und vom Gen-Regulator Phytochrom [37, 38] bekannt.

Der Chromsäureabbau hat bei der Strukturaufklärung zahlreicher Pyrrolfarbstoffe seit jeher eine bedeutende Rolle gespielt [85]. Die Erarbeitung optimaler Abbaubedingungen für jeden Farbstofftyp, das Arbeiten im Mikromaßstab sowie die Kombination empfindlicher Trennmethode mit modernen analytischen Hilfs-

[85] Eine kurze Übersicht über die wichtigsten Arbeiten findet sich bei [40].

mitteln lassen bei der Untersuchung von neuen Vertretern dieser Verbindungsklasse rasche Fortschritte erwarten.

Die hier erwähnten eigenen Untersuchungen über die Phycobiline wurden zum größten Teil gemeinsam mit Herrn Dr. P. Ó Carra, Department of Biochemistry, University College, Galway (Irland), ausgeführt. Herrn Professor C. Ó hEocha danke ich für sein Entgegenkommen. Der Deutschen Forschungsgemeinschaft sei für großzügige Förderung gedankt.

Eingegangen am 18. September 1969 [A 762]

Polarität kovalenter Bindungen

Von Martin Klessinger [*]

Der Begriff des „partiellen Ionencharakters“ hat sich für eine qualitative Beschreibung der Elektronenstruktur von Molekülen als außerordentlich nützlich und fruchtbar erwiesen; die den empirischen Beziehungen zur Bestimmung des Ionencharakters einer Bindung zugrundeliegenden theoretischen Vorstellungen halten einer kritischen Prüfung jedoch nicht stand. Auch die Mullikensche Populationsanalyse als Mittel zur Interpretation quantenchemischer Rechnungen versagt in vielen Fällen. Dagegen erlaubt die graphische Darstellung der räumlichen Ladungsdichteverteilung eine anschauliche Interpretation auch komplizierter Rechnungen und ergibt, gegebenenfalls in Kombination mit einer Analyse der auf die Atomkerne wirkenden Kräfte, sehr viel weiterreichende Informationen über die Polarität einer Bindung, als man anhand zu stark vereinfachter Modelle durch die Zahlenwerte einiger Parameter ausdrücken kann.

„I believe the chemical bond is not so simple as some people seem to think.“ R. S. Mulliken [1].

1. Einleitung

Eine Bindung zwischen zwei Atomen A und B wird als polar bezeichnet, wenn die Verteilung der diesen beiden Atomen gemeinsamen Valenzelektronen unsymmetrisch ist, so daß die Schwerpunkte der negativen Elektronenladung und der positiven Kernladung nicht zusammenfallen. Jede Bindung zwischen nicht-äquivalenten Atomen ist daher mehr oder weniger polar; unpolar sind nur Bindungen zwischen gleichen Atomen in gleicher Umgebung, wie die Bindungen in homonuclearen zweiatomigen Molekülen wie H_2 , N_2 etc. oder etwa die C–C-Bindung im Äthan.

Der Begriff der Bindungspolarität ist von großem praktischen Wert für das qualitative Verständnis der

Eigenschaften und Reaktionen chemischer Verbindungen. So hängt der induktive Effekt, den eine Bindung auf ihre Nachbarschaft ausübt, von ihrer Polarität ab, ebenso wie die Reaktivität oder die Reaktionsweise der Bindung.

Es wäre daher sehr nützlich, wenn man die Polarität einer Bindung quantitativ erfassen und auf diese Weise jede Bindung zwischen den Grenzfällen einer idealen kovalenten Bindung mit symmetrischer Ladungsverteilung und einer idealen Ionenbindung mit vollständiger Ladungsübertragung einordnen könnte. Um dieses Ziel zu erreichen, sind zahlreiche empirische Zusammenhänge aufgestellt worden, von denen im folgenden zunächst einige beschrieben werden. Daran schließt sich eine knappe Diskussion der theoretischen Grundlagen des Begriffes der Bindungspolarität sowie eine Darstellung neuerer, aufgrund umfangreicher quantenchemischer Rechnungen gewonnener Ergebnisse und Vorstellungen an. In den Abschnitten 2 bis 5 sollen der Einfachheit halber nur zweiatomige Moleküle behandelt werden. Zum Abschluß bleibt dann zu zeigen, wie die an den zweiatomigen Molekülen erhaltenen Ergebnisse auf mehratomige Moleküle übertragen werden können.

[*] Doz. Dr. M. Klessinger
Chemisches Laboratorium der Universität
78 Freiburg, Albertstraße 21

[1] Zitat nach C. A. Coulson, Rev. mod. Physics 32, 177 (1960).