

Pigmente aus rötlichen Haaren und Federn

Von R. H. Thomson^[*]

Trotz sporadischer Untersuchungen in früheren Jahren blieben die Strukturen der meisten Pigmente unbekannt, welche Säugetierhaare und Vogelfedern gelb, orange und braun färben. Neuere Arbeiten ergaben, daß die Hauptpigmente, die rötlich-braunen Gallophaeomelanine, Polymere mit Benzothiazol- und Tetrahydroisochinolin-Einheiten sind. Daneben findet man die gelb-orange und violetten Trichochrome, die $\Delta^{2,2'}$ -Bi(1,4-benzothiazin), einen neuen Chromophor, enthalten. In vivo entstehen beide Gruppen von Pigmenten aus Tyrosin und Cystein auf einem Weg, der vom Biogeneseweg der schwarzen Eumelanine abzweigt.

1. Einleitung

Pflanzenpigmente sind schon seit Jahren intensiv untersucht worden. So kennt man heute annähernd 2000 derartige Stoffe, die genau beschrieben sind. Tierische Pigmente kommen dagegen in wesentlich geringerer Anzahl vor und sind auch häufig nicht genau definiert. Dies gilt ganz besonders für die polymeren Pigmente, die sich meist schwierig handhaben und untersuchen lassen. Die Haare der Säugetiere zeigen neben den Farben schwarz und weiß zahlreiche gelbe, orange und braune Schattierungen. Während die Struktur der schwarzen Pigmente heute als gesichert gilt^[1], war bis vor kurzem nur wenig über die helleren Pigmente bekannt; die Untersuchungen darüber wurden zudem durch irreführende Informationen und eine verwirrende Nomenklatur erschwert.

Den Sammelbegriff Melanin ($\mu\epsilon\lambda\alpha\varsigma$ = schwarz) verwendet man allgemein für dunkle Pigmente von Tieren und Pflanzen. Im Tierreich wird die in Häuten, Haaren, Federn, der Cuticula von Insekten, Melanomen usw. weit verbreitete schwarze Pigmentierung auf Eumelanine ($\epsilon\tilde{\upsilon}$ = gut, schön), das breite Spektrum von violetten bis gelben Farbtönen auf Phaeomelanine ($\phi\alpha\iota\acute{o}\varsigma$ = düster) zurückgeführt. Diese Einteilung ist natürlich recht unbefriedigend. Sinnvoller ist es, die Eumelanine als Pigmente zu definieren, die in Melanocyten^[**] vorkommen und aus Tyrosin durch Oxidation mit Tyrosinase entstehen; Phaeomelanine sind dagegen Pigmente aus Melanocyten, die

sich aus Tyrosin durch Oxidation mit Tyrosinase und anschließende Reaktion mit Cystein bilden. Damit stehen die Phaeomelanine, die bisher nur in Vogelfedern und Säugetierhaaren (einschließlich „rotem“ Menschenhaar, das ja in Wirklichkeit orange ist) gefunden wurden, in naher biogenetischer Beziehung zu den Eumelaninen, obwohl sie sich in ihrer Struktur von diesen unterscheiden. Eumelanine und Phaeomelanine können zusammen vorkommen und das getupfte, gestreifte oder gesprenkelte Aussehen von Tieren hervorrufen; in der Tat sind sie für die Farben der meisten Säugetiere gemeinsam verantwortlich. Wahrscheinlich bewirken sie zusammen mit Carotinoiden auch die meisten Farben der Vogelfedern (blaue und grüne Farbtöne entstehen oft durch Lichtbeugung oder -streuung; hier spielen die Eumelanine indirekt eine wichtige Rolle).

Eumelanine^[1] sind uneinheitliche, quervernetzte Polymere, die sich hauptsächlich aus 5,6-Dihydroxyindol-Einheiten aufbauen und an Protein gebunden vorliegen. Diese Pigmente finden sich vor allem in schwarzem Haar; einige Schattierungen von braunem, ja sogar blondem Haar lassen sich durch Unterschiede in Konzentration, Form, Struktur und Oxidationsgrad der Pigmentkörnchen erklären.

Früher wurde die spezifische Farbe von „rotem“ Haar auf Melanin-Oxidationsprodukte zurückgeführt^[2]. 1878 extrahierte *Sorby*^[3] aus „rotem“ Menschenhaar ein rotes Pigment, jedoch behielt das Haar dabei seine ursprüngliche Farbe. Dieses Pigment wurde 1943 von *Flesch* und *Rothman*^[4] erneut isoliert; die Autoren gaben die vorläufige Formel $(C_{15}H_{20}N_2O_9)_2Fe$ an und schlugen den Namen „Trichosiderin“ ($\tau\rho\iota\chi\acute{o}\varsigma$ = Haar, $\sigma\acute{\iota}\delta\eta\rho\omicron\nu$ = Eisen), „zum vorübergehenden

[*] Prof. R. H. Thomson
Department of Chemistry, University of Aberdeen
Old Aberdeen AB9 2UE (Schottland)

[**] Melanocyten sind auf die Pigment-Herstellung spezialisierte Zellen.

Gebrauch, bis die chemische Struktur der Verbindung gesichert ist“ vor^[*].

1956 zeigte *Barnicot*^[7], daß das „Trichosiderin“ ein Artefakt ist: Durch Extraktion von „rotem“ Haar mit kalter verdünnter Alkalilauge erhielt er ein orange-gelbes Pigment, das beim Erhitzen mit Säure in das rote „Trichosiderin“ überging. Danach fand *Boldt*, daß das rohe Pigment, das bei der Säure-Extraktion anfiel, chromatographisch in neun (gelbe, orange, braune und violette) Komponenten aufgetrennt werden konnte^[8], von denen sich einige ineinander umwandeln ließen. Die Analyse dieser Pigmente ergab, daß sie Schwefel enthielten; da sich Eisen dagegen nur in Spuren fand, traf der Name „Trichosiderin“ mit Sicherheit nicht zu. Die Artefakte wurden daraufhin als Pyrrotrichole (πυρρός = feurig) bezeichnet.

Parallel zu diesen Arbeiten wurden auch rote Geflügelfedern untersucht^[9]; man erhielt hier bei der Extraktion mit Säure ähnliche Pigment-Gemische. Trotz der sporadischen Forschungen in mehr als 80 Jahren war aber noch kaum etwas über die eigentliche Chemie der Pigmente aus rötlichen Haaren und Federn bekannt, abgesehen von Indikator-Eigenschaften, Elektronenspektren und zweifelhaften Elementaranalysen. Einer Arbeitsgruppe in Neapel gelang es nun in den letzten Jahren, die Strukturen der Trichochrome zu ermitteln und auch den allgemeinen Aufbau der polymeren Gallophaeomelanine aufzuklären.

2. Neuere Arbeiten

Die Erforschung der chemischen Struktur der Phaeomelanine begann 1964 an der Universität Neapel. Zunächst wurden rote Federn von New-Hampshire-Hühnern mit heißer Salzsäure extrahiert^[10]. Man erhielt ein Gemisch mehrerer roter und violetter Pigmente, bei denen sich die Anwesenheit von Stickstoff und Schwefel bestätigen ließ, jedoch fand man kein Eisen, obwohl dieses am Anfang der Reinigungsoperationen nachweisbar war und auch tatsächlich im Haar enthalten ist. Bei analoger Aufarbeitung von „rotem“ Menschenhaar erhielt man ein Gemisch von vier roten Komponenten, jedoch in wesentlich geringerer Menge; zwei von ihnen waren auch aus Federn erhalten worden.

Diese Ergebnisse bestätigten im wesentlichen die Arbeiten von *Boldt*^[8]. Da aber einige der Pigmente Artefakte sind und da sich nur ein kleiner Teil der Farbstoffsubstanzen durch Säure extrahieren läßt, verwendete man bei den folgenden Untersuchungen schwach alkalische Medien zur Extraktion^[11]. Die Extraktion der Federn von New-Hampshire-Hühnern mit kalter 0.1 M NaOH ergab ein sehr kompliziertes Pigment-Gemisch, das sich jedoch bequem durch Ansäuern in zwei strukturell verschiedene Gruppen trennen ließ: Die rotbraunen Gallophaeomelanine wurden ausgefällt, dagegen blieben die in geringerer Menge vorhandenen Pigmente (Trichochrome), die eine starke Absorption im sichtbaren Bereich zeigen, in Lösung.

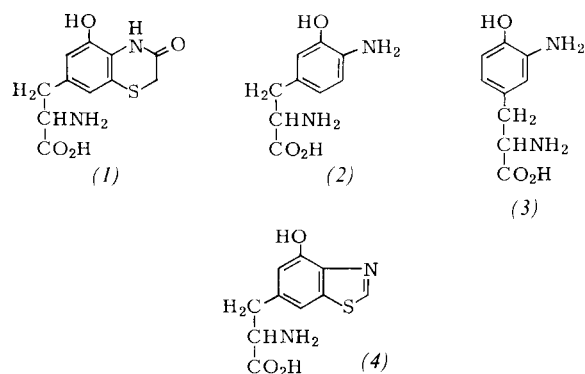
3. Die Trichochrome

Die säurelösliche Pigment-Fraktion wurde über eine Ionenaustauscher-Säule gereinigt und durch Chromatographie an

Sephadex in drei gelbe Pigmente – B1 (Spuren), B2 und C1 – sowie zwei violette Pigmente – E und F – aufgetrennt. Kurz nach Beginn dieser Untersuchung erkannten *Prota* und *Nicolaus*^[10, 11] intuitiv, daß die Phaeomelanine in vivo wahrscheinlich auf einem Wege entstehen, der sich von der normalen Eumelanin-Genese durch die Beteiligung von Cystein unterscheidet. Die enge biogenetische Beziehung zwischen beiden Gruppen zeigte sich dadurch, daß sowohl die Eumelanine als auch die Phaeomelanine in Melanocyten gebildet werden; ferner deuteten auch der „Wechselmechanismus“ bei den Agutis^[*] und das konstante Stickstoff-Schwefel-Verhältnis von 2:1 in allen Feder-Pigmenten darauf hin. Schon sehr frühzeitig konnte gezeigt werden, daß die enzymatische Oxidation^[11] von Dopa (3,4-Dihydroxy-phenylalanin, s. auch Schema 3) in Gegenwart von Cystein zu einem rotbraunen Stoff führt, der den Gallophaeomelaninen sehr ähnlich ist. Die blaß-gelbe Lösung wechselte ihre Farbe innerhalb weniger Minuten nach violett, wenn man die Oxidation nach kurzer Zeit durch Säurezusatz unterbrach, und es gelang, geringe Mengen der violetten Pigmente Trichochrom E und F zu isolieren, die auch aus Federn erhalten worden waren. So spielten bei der Struktur-Aufklärung der Pigmente von Anfang an biogenetische Gesichtspunkte eine wesentliche Rolle.

3.1. Trichochrom B und Trichochrom C

Die gelb-orange Hauptkomponente C (früher als C1 bezeichnet) verliert bei schwachem Erhitzen in saurer Lösung Kohlendioxid unter Bildung einer roten Substanz, die mit einem der Pigmente identisch ist, die man vorher durch Extraktion roter Federn und Haare mit heißer Säure erhalten hatte; d.h. „Descarboxy-C“ ist eines der Trichosiderine. „Descarboxy-C“ verhält sich, anders als Trichochrom C, als ein Indikator: Es ist in saurer Lösung rot ($\lambda_{\max} = 525 \text{ nm}$) und in alkalischer Lösung gelb-orange ($\lambda_{\max} = 462 \text{ nm}$). Es enthält zwei Alanin-Reste, zwei Phenol-Gruppen und einen δ -Lactam-Ring; beim Abbau mit Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor^[12] ergibt



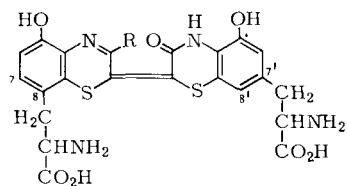
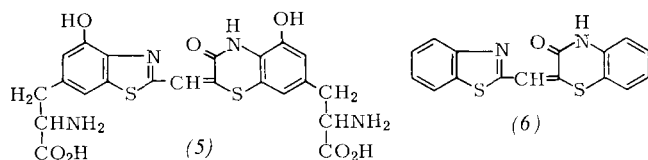
es die Aminosäuren (1) und (2) [sowie geringe Mengen (4)].

Die rote Substanz konnte demnach entweder die Formel (5) oder (8a) haben. Die Entscheidung zugunsten von (8a) fiel durch spektroskopischen Vergleich mit der Modell-Substanz (6). Weiter ergab sich, daß Trichochrom C die Struktur (8b) hat, da sein NMR-Spektrum sich von demjenigen der Verbin-

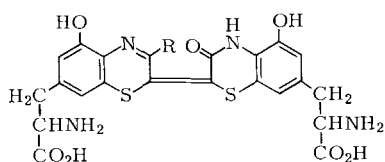
[*] Obwohl einige der Trichosiderin-Strukturen inzwischen aufgeklärt sind, wurde der Name noch 1972 „vorläufig“ benutzt [5]. In diesem Beitrag wird an seiner Stelle die Bezeichnung Trichochrome verwendet [6].

[*] Die Agutis (oder Gutis), südamerikanische Nagetiere, haben gestreifte Haare, z. B. in den Farben gelb und schwarz; die Verteilung von Eumelaninen und Phaeomelaninen kann in sehr kurzer Zeit wechseln.

dung (8a) nur dadurch unterscheidet, daß das Signal des Methin-Protons ($\delta = 9.13$) fehlt^[12].



(7b), Trichochrom B, R = CO₂H



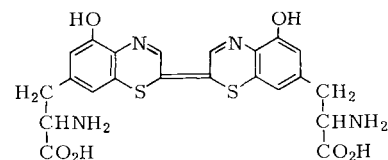
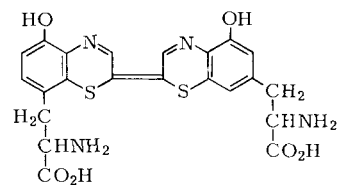
(8b), Trichochrom C, R = CO₂H

Trichochrom B (früher als B2 bezeichnet) hat sehr ähnliche Eigenschaften wie das isomere Trichochrom C. Der Abbau des roten „Descarboxy-B“ mit Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor führte zu den Aminosäuren (1), (2) und (3). Da (2) unter diesen Bedingungen aus (1) gebildet wird, entsteht (3) (das man nur in sehr geringer Menge erhält) vermutlich aus einem Isomeren von (1); nach diesem Befund stellten *Prota et al.*^[13] für die rote Substanz die Formel (7a) und für Trichochrom B die Formel (7b) auf. Demnach unterscheiden sich die Trichochrome B und C nur durch die Stellung ihrer Alanyl-Seitenketten; dieser Befund ist mit den biosynthetischen Untersuchungen im Einklang (s. Abschnitt 5).

Die Trichochrome B und C sind in „rotem“ Menschenhaar enthalten; wahrscheinlich kommen neben ihnen noch zwei weitere Isomere [Strukturen wie (7b) und (8b) mit den Alanyl-Seitenketten in den Positionen 7,8' und 8,8'] vor^[6]. Die entsprechenden roten decarboxylierten Pigmente, die man durch saure Extraktion erhielt, konnten identifiziert werden^[6].

3.2. Trichochrom E und Trichochrom F

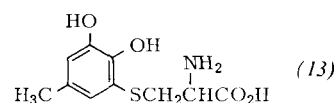
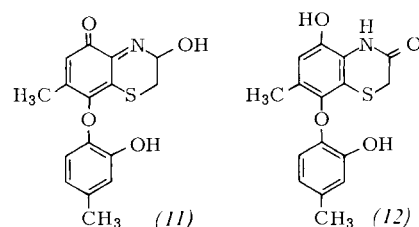
Die Absorption der beiden violetten Pigmente in der säurelöslichen Fraktion der Federn ändert sich von $\lambda_{\max} = 482 \text{ nm}$ in alkalischer Lösung auf $\lambda_{\max} = 587 \text{ nm}$ bei Zusatz von Säure. Trichochrom F enthält zwei Alanyl-Seitenketten und zwei Phenol-Gruppen, jedoch fehlt ihm die Amid-Gruppe des Trichochroms C; beim Erhitzen mit Jodwasserstoffsäure und rotem Phosphor erhielt man die Aminosäuren (2) und (etwas) (4), die auch bei der Spaltung von (8a) entstanden. Nach diesem Befund wurde die Struktur (10) für Trichochrom F vorgeschlagen^[14]; diese ist mit dem NMR-Spektrum (Resonanz der beiden Azomethin-Protonen bei $\delta = 8.21$) völlig im Einklang. Das isomere Pigment E, das nur in sehr geringer



Menge erhalten wird, hat die gleiche chromophore Gruppe wie Trichochrom F; man nimmt an^[14], daß es die Struktur (9) hat, da der übliche Abbau zu den isomeren Aminosäuren (2) und (3) führt, die chromatographisch identifiziert wurden. Die Strukturen (9) und (10) wurden durch eine biogenese-artige Synthese bestätigt^[14]. Bekanntlich waren schon früher geringe Mengen der Trichochrome E und F durch Oxidation eines Gemisches von Dopa und Cystein erhalten worden. Anschließend fand man, daß 5- und 2-S-Cysteinyl-dopa (43) Zwischenprodukte dieser Reaktion sind; bei Oxidation eines Gemisches dieser Verbindungen mit alkalischem Eisen(III)-cyanid wurden drei violette Produkte gebildet. Zwei von diesen ließen sich chromatographisch als Trichochrom E und F identifizieren; die dritte Substanz erwies sich als das symmetrische 8,8'-Isomere, das nur aus 2-S-Cysteinyl-dopa entstanden war. (Näheres über die Reaktionen s. Abschnitt 5.) Vor kurzem wurde auch dieses dritte Pigment in den Federn der New-Hampshire-Hühner gefunden^[6].

3.3. Modell-Reaktionen

Die Struktur-Aufklärung dieser neuartigen Pigmente und die Auffindung ihres neuen Chromophors wurden durch Untersuchungen an Modell-Verbindungen^[12, 15] wesentlich gefördert. Die Oxidation eines Gemisches aus 4-Methyl-brenzcatechin (anstelle von Dopa) und Cystein mit Eisen(III)-cyanid in schwach alkalischem Medium (NaHCO₃) ergab das instabile gelbe Chinonimin (11), das sich in stärkeren Basen (NaOH) sofort zum isomeren Lactam (12) umlagerte. Bei Behandlung mit Säure wurde die Lösung von (11) augenblicklich intensiv violett; das Produkt enthielt den gleichen Chromophor wie die Trichochrome E und F. Dieser Befund war im Prinzip

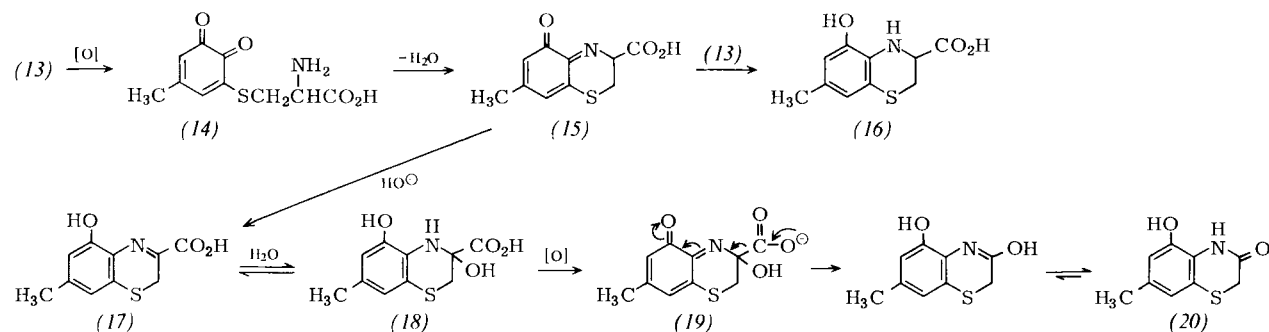


recht befriedigend, jedoch störte die Aryloxy-Gruppe in diesen Verbindungen, die sich aus einem Molekül Cystein und zwei Molekülen 4-Methyl-brenzcatechin gebildet hatten.

Um eine derartige Reaktion zu vermeiden, wurde nun der Aufbau des Dihydrothiazin-Rings ausgehend von 4-Methyl-1,2-benzochinon untersucht. Die Umsetzung mit Cystein-hydrogenchlorid ergab die Aminosäure (13); bei Behandlung mit Sauerstoff in kalter 0.1 M NaOH entstand aus dieser das Lactam (20) ($\lambda_{\max}^{\text{HO}^-} = 322 \text{ nm}$). Bei der spektrophotometrischen Untersuchung des Reaktionsverlaufs fand man, daß in den ersten Stufen ein gelbes Vorprodukt ($\lambda_{\max}^{\text{HO}^-} = 370 \text{ nm}$) entsteht; daneben gelang es auch durch Abbrechen der Reaktion nach 20 Minuten, die labile Säure (17) (nach Methylierung) zu isolieren.

In späteren Versuchen^[16] wurde die Aminosäure (13) unter verschiedenen Bedingungen cyclisiert. Bei Oxidation bei pH = 6.8 mit Pilz-Polyphenol-Oxidase, oder nicht-enzymatisch mit einer katalytischen Menge Sauerstoff, entstand sofort die Aminosäure (16) in hoher Ausbeute. Da für diese Reaktion nur eine geringe Menge Sauerstoff benötigt wird, entsteht wahrscheinlich zunächst das *o*-Chinon (14), das unter Eliminierung von Wasser zum Chinonimin (15) cyclisiert; dieses wird anschließend durch die Ausgangsverbindung (13) zum Produkt (16) reduziert, wobei sich gleichzeitig neues *o*-Chinon (14) bildet, das den Cyclus fortsetzt.

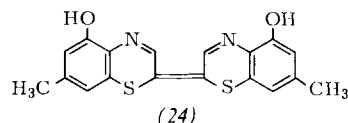
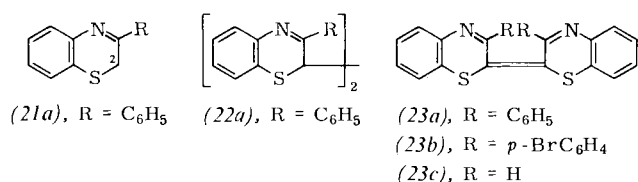
Schema 1 zeigt die Reaktionsfolge, nach der sich die 1,4-Benzothiazin-Derivate aus der Aminosäure (13) bilden (vgl.^[15, 16]).



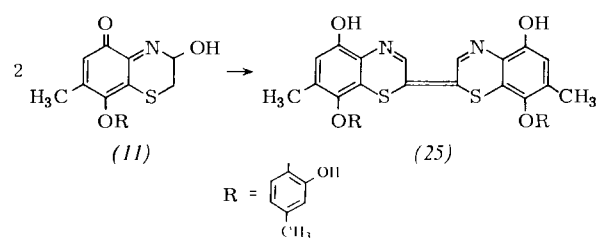
Schema 1

Interessant ist, daß das *o*-Chinon (14) stets nur einer 1,2-Addition unterliegt und unter Dehydratisierung das Chinonimin (15) bildet. Auch die analoge Verbindung aus 4-Methyl-1,2-benzochinon und 2-Aminoäthan-thiol verhält sich so^[17]; in keinem Fall cyclisiert die Verbindung in 1,4-Stellung zu einem Aminochinon. Die Reaktion von (13) in alkalischer Lösung (Schema 1) verläuft über folgende Schritte: Basen-katalysierte Aromatisierung zu (17), Hydratisierung der Azomethin-Gruppe in (17), Oxidation des entstandenen *o*-Aminophenols (18) und zuletzt Decarboxylierung des Produkts (19) unter Aromatisierung und Bildung des Lactams (20).

Hinsichtlich der Umwandlung dieser Derivate in Verbindungen vom Trichochrom-Typ war bereits bekannt, daß sich 2H-1,4-Benzothiazine sehr leicht oxidativ dimerisieren lassen. Diese Reaktion wurde zuerst am 3-Phenyl-Derivat (21a) beobachtet, das beim Erhitzen mit Pikrinsäure das Dehydro-Dimere (22a) ergab^[18]; die italienische Arbeitsgruppe^[19] zeigte später, daß dieselbe Reaktion schon unter Einwirkung von Sauerstoff in angesäuertem Äthanol bei Raumtemperatur abläuft. Chloranil führt zu einer weitgehenden Wasserstoff-Ab-



spaltung; man erhält hier sowohl aus (21a) als auch aus (22a) in kaltem Dioxan mit guter Ausbeute die Verbindung (23a)^[12]. Ähnlich wird (16) unter oxidativer Decarboxylierung in (24) umgewandelt^[20].

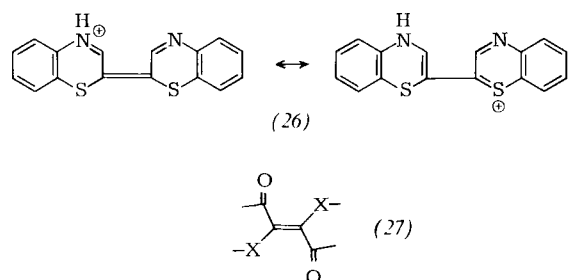


Die vermutlich radikalisch verlaufenden Reaktionen bei der Bildung der synthetischen $\Delta^{2,2'}$ -Bi(1,4-benzothiazine) wie (23a) haben auch für die Biosynthese derartiger Pigmente

Bedeutung. Dagegen ist die Umwandlung des Chinonimins (11) in das Produkt (25) in saurer Lösung ein nicht-oxidativer Vorgang, der in Abwesenheit von Sauerstoff verläuft.

3.4. Der Trichochrom-Chromophor

Die Auffindung eines neuen natürlichen Chromophors ist ein seltenes Ereignis. Die Trichochrome enthalten das konjugierte System $-\text{S}-\text{C}=\text{C}-\text{C}=\text{N}-$ und gehören damit wie die Betacyanine - Pigmente aus Pflanzen - in die Gruppe der Polymethin-Farbstoffe. Die Protonierung in saurer Lösung



führt zu mesomeren Kationen vom Typ (26), die sich bei (9), (10) und (25) durch eine ausgeprägte bathochrome Verschiebung um ca. 100nm bemerkbar machen (s. Tabelle 1). Bei Lactamen wie (7a) und (8a) ist diese Verschiebung auf ca. 70nm erniedrigt; in den Trichochromen B (7b) und C (8b) verringert die zusätzliche Carboxy-Gruppe an C-3 die Basizität so stark, daß normalerweise keine Protonierung am benachbarten Stickstoffatom stattfindet. In Essigsäure wird der Thiazin-Stickstoff jedoch basischer, und mit Chlorwasserstoff gelingt die Protonierung, die zur Verschiebung des Absorptionsmaximums nach 550nm führt^[12].

Tabelle 1. Absorption der $\Delta^{2,2'}$ -Bi(1,4-benzothiazine) im sichtbaren Bereich.

Verb.	in C ₂ H ₅ OH	λ_{\max} [nm] (log ϵ) in 0.1 M NaOH	in HCl [a]
(7b), Trichochrom B		454 (3.98)	450 Sch [b]
(8b), Trichochrom C		452 (4.13)	460 Sch [b]
(9), Trichochrom E		482	587 [c]
(10), Trichochrom F		482 (4.33)	587 (4.42) [c]
(7a)		462 (4.19)	525 (4.16) [c]
(8a)		458 (4.21)	525 (4.18) [c]
(23a)	466 (3.78)		594 (3.78) [d]
(23b)	478 (3.89)		625 (3.57) [d]
(25)	487 (4.34)		596 (4.45) [e]

[a] pH-abhängig.

[b] In 1 N HCl.

[c] In 2 N HCl.

[d] In C₂H₅OH/12 N HCl (84:16, v/v).

[e] In C₂H₅OH/12 N HCl (99:1, v/v).

Durch Oxidation von 3-Aryl-2H-1,4-benzothiazinen vom Typ (21) mit Chloranil entstehen die *cis*- (rot) und *trans*-Formen (gelb) nebeneinander; bei (23b) wurden diese isoliert und durch Röntgen-Analyse untersucht^[11]. Beide Formen sind in festem Zustand stabil, lassen sich aber in Lösung schon bei Raumtemperatur ineinander überführen und haben folglich eine sehr ähnliche Absorption im UV und im sichtbaren Bereich. Überraschenderweise ist das *cis*-Isomere stabiler, obwohl die Gruppen im Zentrum des Moleküls sehr gedrängt sind.

Die unsubstituierte Verbindung (23c) ist nicht bekannt^[1]. Es wäre interessant, an ihr die *cis-trans*-Beziehung zu studieren, da hier die raumfüllenden Gruppen an C-3 und C-3' fehlen; außerdem müßte nach Lüttke die *trans*-Form ein indigoider Farbstoff sein. Theoretisch^[12] und experimentell^[13] wurde gezeigt, daß als Grund-Chromophor dieser Farbstoffe die Gruppierung (27) angesehen werden kann. *trans*-(23c) enthält (wie die Trichochrome allgemein) die wichtigsten Bestandteile, nämlich zwei Donor- und zwei Acceptor-Gruppen, die wie in (27) angeordnet sind und ein doppelt-kreuzkonjugiertes System bilden.

4. Die Gallophaeomelanine

Die Gallophaeomelanine sind die Hauptpigmente in den Federn der New-Hampshire-Hühner (*Gallus gallus*). Die Pigmente wurden durch Dialyse und Chromatographie an Sephadex in vier Hauptfraktionen, die Gallophaeomelanine-1 bis -4, aufgetrennt^[24] und auf diesem Wege als feste, rotbraune, amorphe, unschmelzbare, aus C, H, N, O und S aufgebaute Stoffe erhalten, die sich nur in Natronlauge, Ameisensäure und saurem

Äthylenchlorhydrin lösen. Die Fraktionen bestehen aus Gemischen sehr ähnlicher Makromoleküle und sind keine einheitlichen chemischen Substanzen.

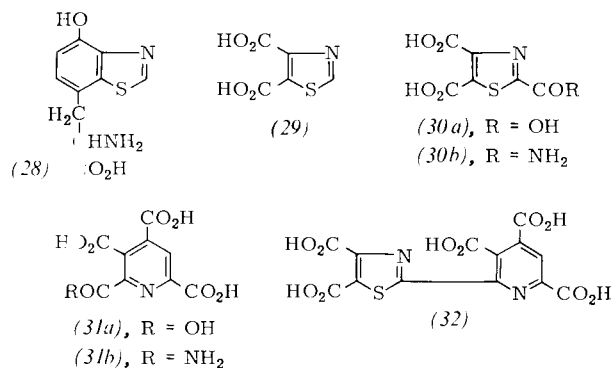
Gallophaeomelanin-1 ist das häufigste Pigment, es ist proteinfrei und hat ein mittleres Molekulargewicht von etwa 2000. Die Gallophaeomelanine-2, -3 und -4 sind dagegen Chromoproteine. Sie bestehen zu etwa 60% aus einem Protein, das sich vom Feder-Keratin unterscheidet, denn bei der Hydrolyse erhält man 16 Aminosäuren, aber kein Cystin. Die Phaeomelanine sind allgemein schwierig zu handhaben und lassen sich nicht mit den üblichen spektroskopischen Methoden un-

tersuchen. Ihre UV-Spektren und sichtbaren Spektren zeigen keine definierten Maxima, und bei den IR- und NMR-Spektren finden sich nur breite Banden von geringem Aussagewert. Das Strukturproblem liegt also hier ähnlich wie bei den Eumelaninen, und es wurde auch wie bei diesen durch klassischen chemischen Abbau angegangen.

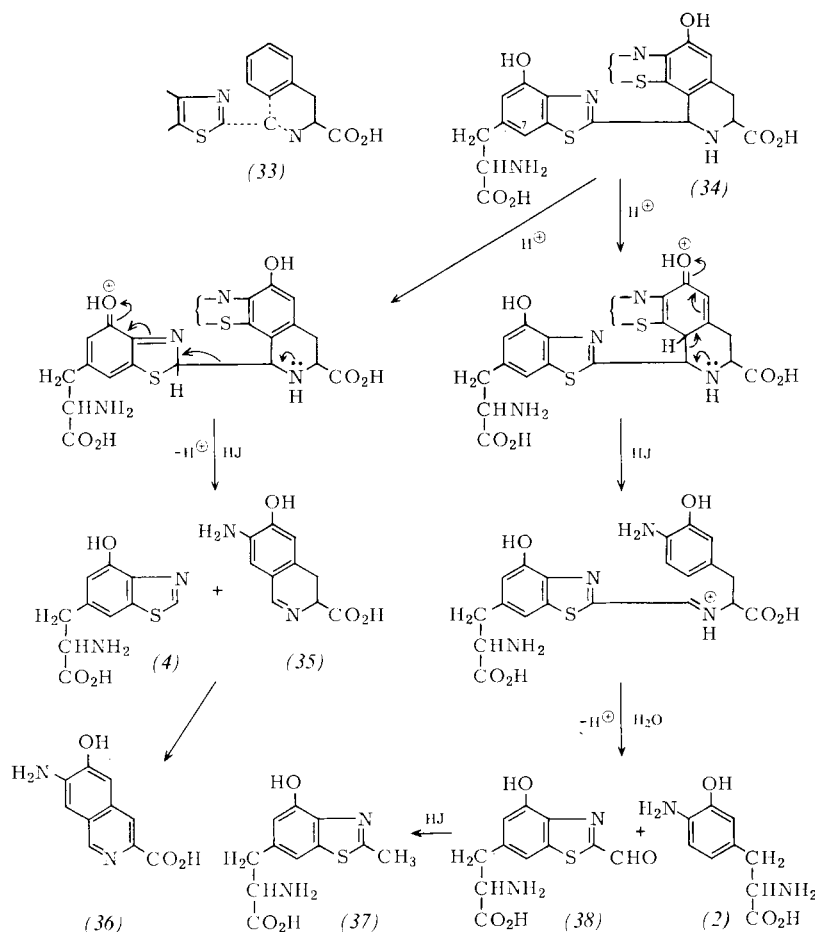
4.1. Gallophaeomelanin-1

Dieses Pigment enthält Carboxy-, primäre Amino- und Phenol-Gruppen. In der Alkali-Schmelze^[24] ergab es ein Gemisch einfacher Brenzcatechine und *o*-Amino-phenole, insbesondere 4-Amino-3-hydroxy-benzoesäure; bei der Oxidation mit Wasserstoffperoxid^[24] wurden dagegen Cysteinsäure sowie kleine Mengen an Glycin und Asparaginsäure erhalten. Bezeichnenderweise fehlten aber Pyrrol- und Indol-Derivate, die charakteristischen Abbauprodukte der Eumelanine; hieraus ergab sich, daß die Phaeomelanine keine Abwandlungsprodukte der Eumelanine sind. Größere Fragmente, vor allem die Aminosäuren (2) und (4) mit kleineren Mengen von (1) und (3) sowie die Benzothiazol-Derivate (28) und (37), wurden beim Kochen des Pigments mit Jodwasserstoffsäure^[24, 25] erhalten. Die Oxidation mit Permanganat^[26, 27] ergab dagegen kleine Mengen der Thiazol- und Pyridincarbonsäuren (29), (30a), (31a) und (32). Die Säure (29) entsteht bei dieser Reaktion aus der Säure (30a); die Säuren (30a) und (31a) bilden sich während dieser Reaktion aus den Amidinen (30b) bzw. (31b). Die Schlüsselsubstanz ist Verbindung (32). Während der Thiazol-Teileindeutig aus einer Benzothiazol-Einheit des Pigments entsteht, ist die Herkunft des Pyridin-Teils weniger offensichtlich. Da sich die Gallophaeomelanine jedoch wahrscheinlich aus Dopa und Cystein bilden, vermuteten Minale et al.^[27], daß ein reduzierter Pyridin-Ring im Verlauf der Biogenese

[*] Anmerkung bei der Korrektur (17. April 1974): Diese Verbindung ist inzwischen synthetisiert worden (G. Prota, E. Ponsiglione u. R. Ruggiero, Tetrahedron, im Druck).



durch Cyclisieren einer Alanyl-Seitenkette [wie bei (33) angegeben] entstehen könnte. Wenn man diesen Vorgang auf Verbindung (34) (oder das Isomere mit der Seitenkette an C-7 der Benzothiazol-Einheit) überträgt, lassen sich die meisten Abbauprodukte erklären (s. Schema 2). Die Benzothiazole (4), (28) und (37) könnten durch umgekehrte Mannich-Reaktionen entstehen, wobei das Methyl-Analogon (37) durch Reduktion aus dem noch nicht gefundenen (38) entstehen könnte. In einer Modell-Reaktion ließ sich zeigen, daß Benzothiazol-2-carbaldehyd in siedender Jodwasserstoffsäure rasch zu 2-Methyl-benzothiazol reduziert wird.



Schema 2

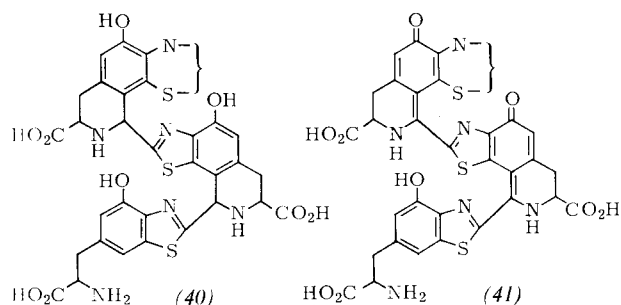
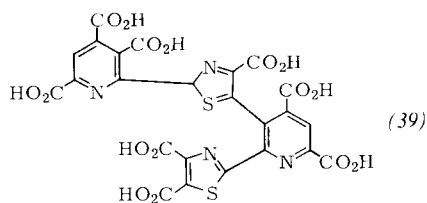
Nach Schema 2 müßte eines der Abbauprodukte ein 3,4-Dihydroisochinolin (35) sein. Dieser Befund wurde durch weitere Modell-Versuche^[28] gestützt; außerdem führte die erneute chromatographische Untersuchung sämtlicher beim Säureab-

bau von Gallophaeomelanin-1 erhaltener Produkte zur Isolierung von drei Isochinolin-Derivaten^[29], einschließlich der Verbindung (36) (als Dimethyl-Derivat). Demnach ist es sehr wahrscheinlich, daß im Gallophaeomelanin-1 Tetrahydroisochinolin-Einheiten vom Typ (34) vorliegen.

Das größte, aus Gallophaeomelanin-1 erhaltene Abbauprodukt wurde bisher nicht erwähnt. Es ist die Polycarbonsäure (39), die mit 0.1% Ausbeute in Form ihres Permethylresters bei einer Oxidation mit Permanganat^[27] gewonnen wurde. Diese Verbindung muß von einem Teil des Makromoleküls stammen, der die drei in Formel (40) gezeigten Einheiten, darunter zwei Benzothiazol-Reste, enthält. Noch nicht gesichert ist, ob sich alles Benzothiazolyl-alanin (4), das beim Abbau entsteht, aus endständigen Resten wie in Formel (40) bildet; die isomere Aminosäure (28) muß von isomeren Benzothiazol-Einheiten stammen. Die Teilstruktur (40) zeigt, wie man sich derzeit den allgemeinen Aufbau des Gallophaeomelanins-1 vorstellt, das natürlich kein regelmäßiges Polymeres ist.

Unter den Abbauprodukten des Gallophaeomelanins-1 treten auch das Benzothiazinon (1) sowie Sulfoessigsäure^[26] auf; daraus ergibt sich, daß ein Teil des Schwefels in 1,4-Thiazin-Ringen vorliegt. Und der relativ große Anteil an Cysteinsäure (10%), den man bei der Oxidation mit Wasserstoffperoxid

erhält, legt die Annahme von nicht cyclisierten Cysteinyl-Seitenketten nahe. Außerdem deutet die Absorption im Sichtbaren darauf hin, daß einige Segmente der Gallophaeomelanin-1-Makromoleküle eine höhere Oxidationsstufe haben; wahr-



scheinlich liegen einige der Phenol-Ringe in (40) in chinoider Form, möglicherweise in Konjugation vor [(41)].

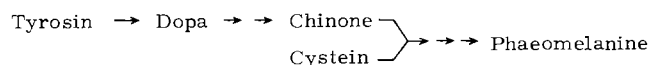
4.2. Weitere Gallophaeomelanine

Die Gallophaeomelanine-2, -3 und -4 ergaben die gleichen Abbauprodukte wie Gallophaeomelanin-1 und müssen daher die gleiche allgemeine Struktur wie dieses haben; möglicherweise unterscheiden sie sich von ihm nur durch ihr Molekulargewicht und ihre Bindung an Protein^[24].

Fattorusso et al.^[30] untersuchten auch die rotbraunen Pigmente in den Federn von Fasanen, Rebhühnern, Tauben und Rhodeländer-Hühnern, in den Haaren von Kaninchen und Ziegen sowie in „rotem“ Menschenhaar mit den üblichen Abbaureaktionen. Alle diese Pigmente sind Gallophaeomelanine. Dagegen enthält das Haar einiger brauner Ziegen und Schafe nur Eumelanine, das Haar von Rehen Eumelanine und Gallophaeomelanine.

5. Biogenese

Die Arbeitsgruppe in Neapel ließ sich bei ihren Forschungen von der Hypothese^[10] leiten, daß die Phaeomelanine in vivo aus Tyrosin und Cystein auf einem Wege entstehen, der vom normalen Syntheseweg der Eumelanine abzweigt. Eine direkte Bestätigung für diese Annahme wurde vor kurzem durch eine

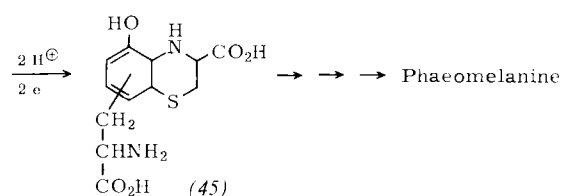
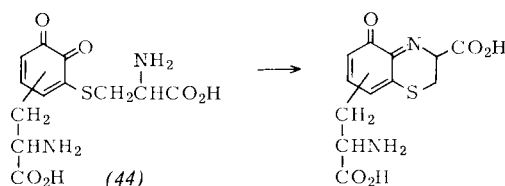
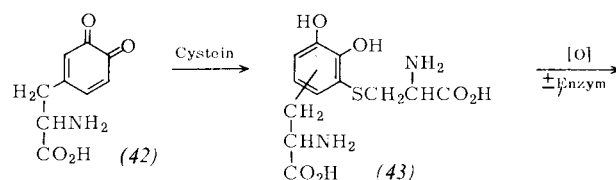
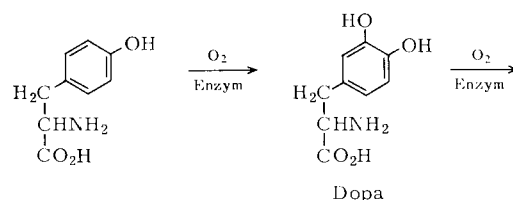


cytochemische Untersuchung^[31] über die Bildung von Phaeomelaninen in den Feder-Papillen von New-Hampshire-Küken-embryonen erhalten. Hierbei fand man, daß [3-¹⁴C]-Cystein und [2-¹⁴C]-Tyrosin spezifisch in die Pigment-Zellen eingebaut wurden; ein Tyrosinase-Inhibitor unterdrückte diesen Einbau jedoch fast vollständig. Dieser Befund steht mit früheren Beobachtungen^[32] über die Tyrosinase- und Dopa-Oxidase-Aktivität in Eumelanin- und Phaeomelanin-bildenden Haar-Follikeln und Feder-Papillen im Einklang.

Weitere Untersuchungen^[33a] über die enzymatische Oxidation von Dopa und Cystein zeigten, daß die rotbraunen, amorphen

Endprodukte sich nicht vom Gallophaeomelanin-1 unterscheiden; sie ergaben zudem die gleichen Abbauprodukte, vor allem solche, die aus Struktur-Einheiten auf Basis von 5-S-Cysteinyl-dopa entstehen. Trichochrome wurden unter diesen Bedingungen nicht gebildet; dagegen entstehen die violetten Trichochrome E und F, wenn das Oxidationsgemisch nach kurzer Zeit angesäuert wird. Diese Pigmente müssen sich aus Vorprodukten bilden, die auf einer frühen Stufe der Phaeomelanin-Genese entstehen. Während der ersten 30 Minuten der Oxidation treten 5- und 2-S-Cysteinyl-dopa (43), wie die automatische Aminosäureanalyse zeigte, sehr schnell auf (das erste in größerer Menge) und verschwinden dann wieder. Startreaktion ist demnach die Oxidation von Dopa zum Chinon (42), der sich die 1,6-Addition von Cystein^[33b] anschließt; diese Reaktion muß sehr schnell ablaufen und damit die Cyclisierung von (42) zu einem Produkt mit Indol-Gerüst zurückdrängen, die ein Schritt der Eumelanin-Biosynthese ist. [Bei einer Modell-Reaktion mit Cystein-äthylester und *N*-Acetyl-3-(1,2-benzochinon-4-yl)alanin-äthylester („*N*-Acetyl-dopachinon-äthylester“) konnten (nach Acetylierung) beide Produkte der 1,6-Addition isoliert werden, wobei das Verhältnis von 5- zu 2-S-Cysteinyl-Derivat bei 19:1 lag.] Bei getrennter enzymatischer Oxidation von 5- und 2-S-Cysteinyl-dopa (43) erhielt man die erwarteten Phaeomelanine, die auch die gleichen Produkte beim Säureabbau wie oben ergaben, außer daß erwartungsgemäß die Säuren (3) und (28) nur aus dem „2-S-Cysteinyl-dopa-phaeomelanin“ erhalten wurden.

In weiteren in-vitro-Untersuchungen oxidierten *Prota et al.*^[16] 5- und 2-S-Cysteinyl-dopa (43) getrennt mit Pilz-Polyphenol-



Schema 3

Oxidase bei pH = 6,8 und verfolgten die Reaktion spektrophotometrisch. Die Ausgangssubstanzen wandelten sich innerhalb

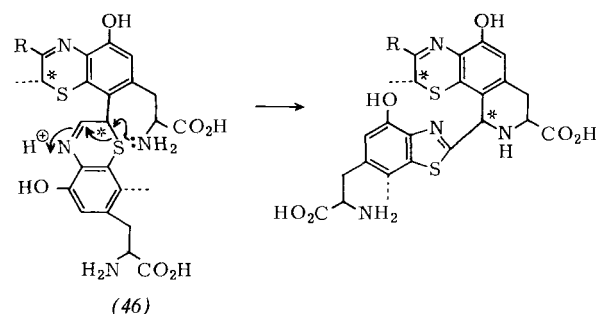
weniger Minuten quantitativ in neue Produkte um; diese wurden isoliert und durch Vergleich mit der Modell-Substanz (16) als die labilen Aminosäuren (45) identifiziert. [Die Aminosäuren (45) entstanden außerdem in nicht-enzymatischer Reaktion aus den beiden Cysteinyl-dopa-Verbindungen (43) durch Oxygenierung bei pH=8.3.] Bei der enzymatischen Oxidation wird nur eine katalytische Menge Sauerstoff benötigt, um die Bildung des *o*-Chinons (44) in Gang zu bringen; danach läuft die Reaktion spontan ab wie in der Modell-Reaktion (Schema 1).

In Schema 3^[20] sind die ersten Schritte der Phaeomelanin-Biogenese angedeutet. Enzyme sind wahrscheinlich nur, wie bei der Eumelanin-Biogenese, für die Bildung von Dopa-chinon (42) erforderlich. Die Abweichung vom Eumelanin-Syntheseweg beginnt nach der Bildung des Dopa-chinons; die An- oder Abwesenheit von Cystein entscheidet darüber, ob die Melanocyten Eumelanine und/oder Phaeomelanine produzieren.

Ein Wechsel der Cystein-Konzentration kann für die Änderung der Haarfarbe bei den Agutis verantwortlich sein. So zeigte Cleffmann^[34], daß der Thiol-Gehalt in den Pigment-Zellen der Agutis vor dem Wechsel der Pigment-Produktion von den Eumelaninen zu den Phaeomelaninen zunimmt. Interessanterweise wurde Cysteinyl-dopa vor kurzem auch in einem bösartigen Melanom eines Patienten mit „rotem“ Haar gefunden^[35].

Sehr wenig ist bisher über die weitere Biogenese der Phaeomelanine nach der Dihydrothiazin-Stufe (45) bekannt. Die roten und violetten Pigmente entstehen sicher durch oxidative Dimerisierung, jedoch sind die Einzelheiten hier noch nicht geklärt; aus den Modell-Untersuchungen ergab sich aber bereits, daß die oxidative Dimerisierung der Isomeren (45) zur Bildung aller Trichochrome führen kann: Unter Decarboxylier-

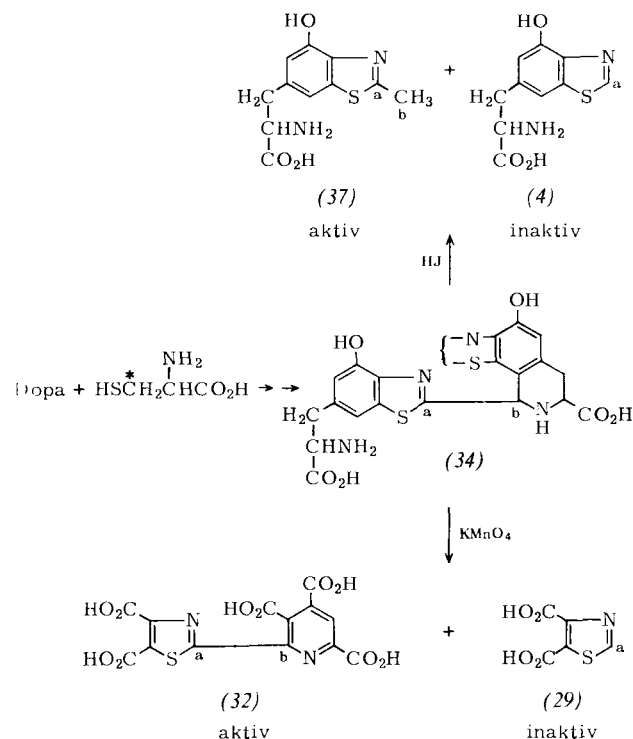
Weitere Einzelheiten über die Biogenese der makromolekularen Pigmente wurden durch enzymatische Oxidation von Dopa und [3-¹⁴C]-Cystein bekannt^[36]. Der Abbau des erhaltenen radioaktiven Dopa-phaeomelanins mit Jodwasserstoffsäure, oder mit Permanganat in alkalischer Lösung, ergab mehrere Produkte, von denen nur (32) und (37) aktiv waren; die spezifische Aktivität entsprach fast genau derjenigen des markierten Cysteins. Unter der Annahme von Teilstruktur (34) läßt sich zeigen, daß C_b aus C-3 des Cysteins und C_a aus C-2 hervorgeht. Da sich (34) aus Vorprodukten mit Benzothiazin-Einheiten bildet, muß eine Ring-Kontraktion in der Weise vor sich gehen, daß das Schwefel-Atom eines Thiazin-Rings an C-3 dieses Rings gebunden wird, wodurch C-2 exocyclisch wird. Benzothiazole können nicht vor der Pigment-Bildung nachgewiesen werden; somit ist anzunehmen, daß die Polymerisation auf der Benzothiazin-Stufe stattfindet und daß sich die Ring-Kontraktion anschließt. Um diesen Vorgang zu erklären, nehmen Minale et al.^[36] an, daß Benzothiazin-Einheiten an C-2 und C-8 miteinander kuppeln und sich dann wie in (46), R = H oder CO₂H, angeben, umwandeln. Hier-



bei werden gleichzeitig Benzothiazol- und Tetrahydroisochinolin-Einheiten gebildet. Dieser sehr plausible Vorschlag geht davon aus, daß der Dihydrothiazin-Ring (vgl. Schema 3) vor der Ring-Kontraktion dehydriert wird. Interessant wäre auch zu wissen, ob sich 2*H*-1,4-Benzothiazine und Phenole in vitro oxidativ miteinander kuppeln lassen.

Wie erwähnt wird als Nebenprodukt beim Abbau von Trichochrom C mit Jodwasserstoffsäure das Benzothiazol (4) erhalten. Außerdem entsteht diese Verbindung auch aus dem Dihydrobenzothiazin (1) durch Kochen mit Salzsäure^[25]. Diese Art der Ring-Kontraktion ist neu.

Ich danke dem Laboratorio per la Chimica e Fisica delle Molecole di Interesse Biologico, C. N. R., Arco Felice, Neapel, (Direktor: Professor R. A. Nicolaus), wo der vorliegende Beitrag geschrieben wurde, für die großzügige Gastfreundschaft. Meinen italienischen Kollegen Professor E. Fattorusso, Professor L. Minale und Professor G. Prota danke ich für Informationen und Kritik.



ung entstehen Trichochrom E und F und unter oxidativer Decarboxylierung Trichochrom B und C [vgl. (17)→(20)].

- [1] R. A. Nicolaus: Melanins. Hermann, Paris 1968.
- [2] L. E. Arnow, Biochem. J. 32, 1281 (1938).
- [3] H. C. Sorby, J. Anthropol. Inst. 8, 1 (1879).
- [4] S. Rothman u. P. Flesch, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 53, 134 (1943); P. Flesch u. S. Rothman, J. Invest. Dermatol. 6, 257 (1945).
- [5] R. A. Nicolaus, Chim. Ind. (Milano) 54, 427 (1972).
- [6] G. Prota, persönliche Mitteilung 1972.

- [7] N. A. Barnicot, *Nature* 177, 528 (1956);
 [8] P. Boldt, *Naturwissenschaften* 51, 265 (1964); P. Boldt u. E. Hermstedt, *Z. Naturforsch.* 22b, 718 (1967).
 [9] M. Nickerson, *Physiol. Zool.* 19, 66 (1946); J. R. Smyth, J. W. Porter u. B. B. Bohren, *ibid.* 24, 205 (1951); E. M. Nicholls, *J. Invest. Dermatol.* 53, 302 (1969).
 [10] G. Prota u. R. A. Nicolaus, *Advan. Biol. Skin* 8, 323 (1967).
 [11] G. Prota u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 97, 665 (1967).
 [12] R. A. Nicolaus, G. Prota, C. Santacroce, G. Scherillo u. D. Sica, *Gazz. Chim. Ital.* 99, 323 (1969).
 [13] G. Prota, A. Suarato u. R. A. Nicolaus, *Experientia* 27, 1381 (1971).
 [14] G. Prota, G. Scherillo, O. Petrillo u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 99, 1193 (1969).
 [15] G. Prota, G. Scherillo, E. Napolano u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 97, 1451 (1967).
 [16] G. Prota, S. Crescenzi, G. Misuraca u. R. A. Nicolaus, *Experientia* 26, 1058 (1970).
 [17] G. Prota, O. Petrillo, C. Santacroce u. D. Sica, *J. Heterocycl. Chem.* 7, 555 (1970).
 [18] K. Fujii, *J. Pharm. Soc. Jap.* 77, 347 (1957).
 [19] D. Sica, C. Santacroce u. G. Prota, *J. Heterocycl. Chem.* 7, 1143 (1970).
 [20] G. Prota in V. Riley: *Pigmentation: Genesis and Biological Control*. Appleton-Century-Crofts, New York 1972.
 [21] F. Giordano, L. Mazzarella, G. Prota, C. Santacroce u. D. Sica, *J. Chem. Soc. C* 1971, 2610.
 [22] M. Klessinger u. W. Lüttke, *Tetrahedron* 19, Suppl. 2, 315 (1963).
 [23] H. Hermann u. W. Lüttke, *Chem. Ber.* 101, 1708 (1968); E. Wille u. W. Lüttke, *Angew. Chem.* 83, 853 (1971); *Angew. Chem. internat. Edit.* 10, 803 (1971); L. Fitjer u. W. Lüttke, *Chem. Ber.* 105, 919 (1972).
 [24] L. Minale, E. Fattorusso, G. Cimino, S. De Stefano u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 97, 1636 (1967).
 [25] E. Fattorusso, L. Minale, S. De Stefano, G. Cimino u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 98, 1443 (1968).
 [26] E. Fattorusso, L. Minale, G. Cimino, S. De Stefano u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 99, 29 (1969).
 [27] L. Minale, E. Fattorusso, G. Cimino, S. De Stefano u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 99, 431 (1969).
 [28] L. Minale, E. Fattorusso, S. De Stefano, S. Magno, G. Cimino u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 100, 870 (1970).
 [29] E. Fattorusso, L. Minale, S. De Stefano u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 100, 880 (1970).
 [30] E. Fattorusso, L. Minale u. G. Sodano, *Gazz. Chim. Ital.* 100, 452 (1970).
 [31] G. Misuraca, R. A. Nicolaus, G. Prota u. G. Ghiara, *Experientia* 25, 920 (1969).
 [32] T. B. Fitzpatrick, P. Brunet u. A. Kukita in W. Montagna u. R. A. Ellis: *The Biology of Hair Growth*. Academic Press, New York 1958.
 [33] a) E. Fattorusso, L. Minale, S. De Stefano, G. Cimino u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 99, 969 (1969); b) G. Prota, G. Scherillo u. R. A. Nicolaus, *ibid.* 98, 495 (1968).
 [34] G. Cleffmann, *Exp. Cell Res.* 35, 590 (1964).
 [35] A. Björklund, B. Falck, S. Jacobsson, H. Rorsman, A.-M. Rosengren u. E. Rosengren, *Acta Dermato-Venereol.* 52, 357 (1972).
 [36] L. Minale, E. Fattorusso, S. De Stefano u. R. A. Nicolaus, *Gazz. Chim. Ital.* 100, 461 (1970).

Die Reaktivität des Porphyrinliganden^[**]

Von Jürgen-Hinrich Fuhrhop^[*]

Die physikalischen Eigenschaften und die chemische Reaktivität des Porphyrin-Makrocyclus, dessen Bildung mit einem einfachen statistischen Argument rationalisiert werden kann, sind in mannigfacher Weise mit denen der aromatischen Kohlenwasserstoffe verwandt. Die Reaktivität des Porphyrinliganden in seinen Metallkomplexen wird durch den unterschiedlich ausgeprägten induktiven Effekt der jeweiligen zentralen Metall-Ionen auf das konjugierte π -Elektronensystem in weiten Grenzen variiert. Einelektronenreaktionen, Phlorinbildungen durch Addition von Wasserstoff oder Sauerstoff an die Methinbrücken sowie die Bildung von π -Komplexen stehen dabei im Vordergrund. Die biochemische Reaktivität des Porphyrinliganden entspricht weitgehend seiner in-vitro-Chemie.

1. Einführung

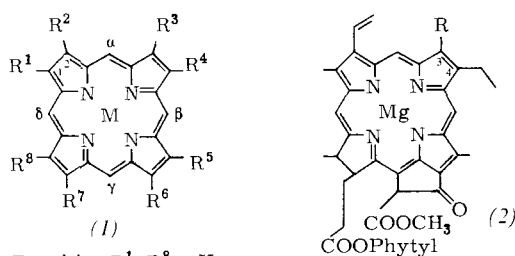
Metall-Porphyrin-Komplexe^[***] (1) sind in biologischen Redoxsystemen, z. B. Redoxketten der Photosynthese und der Atmung, allgegenwärtig. Der starre, planare Porphyrinligand

erfüllt dabei im wesentlichen zwei Aufgaben. Zum einen fixiert er redoxaktive Eisen-Ionen in einem Reaktionszentrum und modifiziert zugleich ihr Oxidationspotential durch die Ausbildung von kovalenten Stickstoff-Metall-Bindungen in der Porphyrinebene. Ein derartiges metallisches Reaktionszentrum

[*] Doz. Dr. J.-H. Fuhrhop
 Gesellschaft für Molekularbiologische Forschung
 3301 Stöckheim
 und Institut für Organische Chemie der Technischen Universität
 3300 Braunschweig, Schleinitzstraße

[**] Teile dieses Fortschrittsberichts sind der Habilitationsschrift des Autors, Technische Universität Braunschweig 1972 entnommen.

[***] Anmerkung zur Nomenklatur: Definitive IUPAC-Regeln für diese Verbindungsklasse gibt es u. W. noch nicht. Der unsubstituierte Makrocyclus aus vier Pyrrolringen und vier Methinbrücken wird Porphin oder Porphyrin genannt. Systeme mit partiell hydrierten Pyrrolringen heißen Chlorine, solche mit ein, zwei, drei bzw. vier reduzierten Methinbrücken heißen Phlorine. Porphodimethene, Porphomethene bzw. Porphyrinogene (s. auch R. Bonnett, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 206, 745 (1973)).



Chlorophyll a: $R = CH_3$
 Bacteriochlorophyll: $R = CHO$,
 hydriert in 3,4