

Autoren, die eine „Zuschrift“ veröffentlichen wollen, sollten vor der Abfassung ihres Manuskripts unbedingt die „Hinweise für Autoren“ lesen, die jeweils im Januarheft eines Jahrgangs nach dem Inhaltsverzeichnis gedruckt sind; auf Anforderung können sie auch von der Redaktion erhalten werden.

### Zur Struktur von Eumelaninen: Identifizierung von Konstitutionsmustern durch Festkörper-NMR-Spektroskopie\*\*

Von Martin G. Peter\* und Hans Förster

Melanine sind komplexe polyphenolische Polymere. In der Natur entstehen sie durch meist enzymkatalysierte oxidative Polymerisation von *o*-Diphenolen (Übersichten: [1-3]). Man unterscheidet die aus Dopa 1 oder Dopamin 3 hervorgehenden, tiefschwarzen Eumelanine von den aus Dopa in Gegenwart von Cystein entstehenden, gelben bis braunen Phäomelaninen. Charakteristisch für Eumelanine sind Indol-Einheiten, die aus den Catecholaminen durch intramolekulare Addition der Aminogruppen an die oxidativ erzeugten *o*-Chinone entstehen (Abb. 1). Bei der Polymerisation dieser Indole bilden sich durch nucleophile Additionen und durch oxidative radikalische Phenolkupplungen C-C- und C-O-Bindungen [4]. Allomelanine sind Polyarene aus stickstofffreien Catecholen.

Dopamin-Melanin hat im Gegensatz zu Dopa-Melanin basischen Charakter und läßt sich höher benzoyleieren als dieses [1]. Nach Swan [2a] ist Dopa-Melanin statistisch wie folgt zusammengesetzt (Abb. 1): aus ca. 10% 1 und 2, ca. 10% 7 und 9, ca. 65% 11 und 12 sowie aus ca. 15% Pyrrol-carbonsäure-Einheiten. Dopamin-Melanin enthält ca. 35% 3 und 4, ca. 55% 11, 12, 8 und 10 sowie ca. 10% Pyrrol-carbonsäure-Einheiten. Letztere sind in Abbildung 1 nicht berücksichtigt (vgl. [1, 2a, 5]). Das Verhältnis der relativen Anteile an nicht cyclisierten Einheiten in Dopa- und Dopamin-Melanin entspricht ungefähr dem Verhältnis der Geschwindigkeitskonstanten  $k_c$  der Cyclisierung (Dopa:  $k_c = 72 \text{ s}^{-1}$  [6], Dopamin:  $k_c = 25.6 \text{ s}^{-1}$  [7]). Die Umlagerungsgeschwindigkeiten von Dopachrom 9 und Dopaminochrom 10 zum 5,6-Dihydroxyindol 11 sind unseres Wissens bisher nicht bestimmt worden. Im Basischen bis Neutralen sollte die Decarboxylierung des Dihydroindols jedoch rascher verlaufen als die Deprotonierung. Das bei pH 7 erzeugte Dopamin-Melanin sollte daher im wesentlichen aus Dopamin- und Dihydroindol- statt Indol-Einheiten bestehen.

Diese Überlegungen werden durch  $^{13}\text{C}$ -Festkörper-NMR-Spektren bestätigt. Wir haben Dopa- sowie Dopamin-Melanin durch Oxidation von Dopa bzw. Dopamin mit  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  im Überschuß in Wasser hergestellt. Die

Elementaranalyse (Doppelbestimmungen) lieferte für Dopa-Melanin  $49.02 \pm 0.03\% \text{ C}$ ,  $3.71 \pm 0.01\% \text{ H}$  und  $8.29 \pm 0.03\% \text{ N}$  ( $\text{C}_9\text{H}_{8.15}\text{N}_{1.30}$ ) und für Dopamin-Melanin  $50.83 \pm 0.11\% \text{ C}$ ,  $4.20 \pm 0.03\% \text{ H}$  und  $9.52 \pm 0.01\% \text{ N}$  ( $\text{C}_8\text{H}_{7.92}\text{N}_{1.28}$ ).

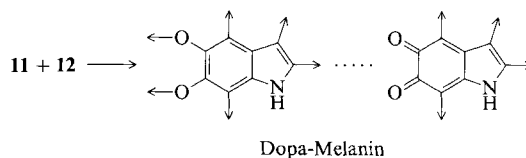
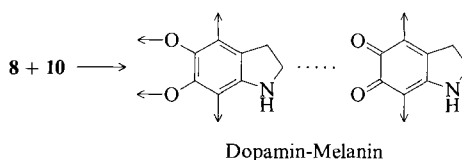
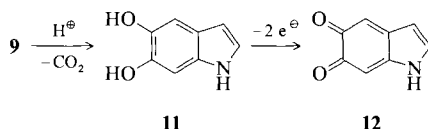
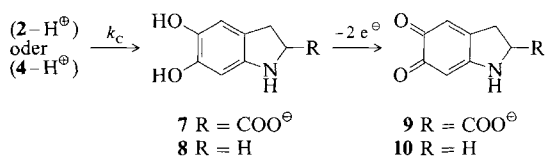
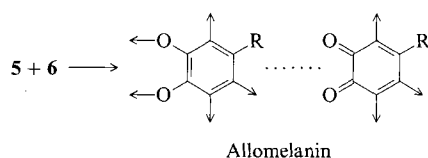
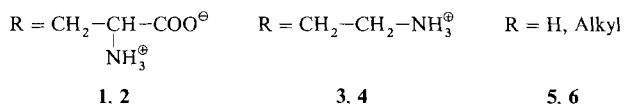
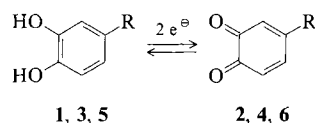


Abb. 1. Schematische Darstellung der Bildung von Melaninen aus Catecholen.

Tabelle 1. Zuordnung der Signalgruppen im CP/MAS- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Dopa-Melanin (Abb. 2b).

$\delta$	Zuordnung
175	Carboxy- und chinoide Carbonyl-C-Atome
144	diphenolische Phenoxy-C-Atome
127–116	Aren-C-H und -C-C; C2, C3a, C4 und C6a von Indol-Einheiten
107–104	C3 von Indol- und Pyrrol-Einheiten
54, 36 und 31	Seitenketten-C-Atome von nicht cyclisierten Dopa- sowie C2 von Dihydroindol-Einheiten

Das CP/MAS- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Dopa-Melanin ist in Abbildung 2b gezeigt. Aus dem Vergleich mit dem Festkörper- $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektrum von Dopa (Abb. 2a) läßt sich die in Tabelle 1 angegebene Signalzuordnung ableiten.

[\*] Prof. Dr. M. G. Peter  
Institut für Organische Chemie und Biochemie der Universität  
Gerhard-Domagk-Straße 1, D-5300 Bonn 1

Dr. H. Förster  
Bruker Analytische Meßtechnik GmbH  
Silberstreifen, D-7512 Rheinstetten 4

[\*\*] Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und vom Fonds der Chemischen Industrie gefördert.

In der Aliphatenregion sind bei Auflösungsverbesserung durch Gauß-Modifikation auch die Seitenketten-C-Atome der Dopa- und C3 der Dihydroindol-Einheiten zu erkennen. Werden die Resonanzen nicht-quartärer C-Atome mit einer NQS-Sequenz unterdrückt, so verschwinden außer den Signalen der Aliphatenregion auch die betreffenden der Indol- und Pyrrol-C-Atome bei  $\delta = 107-104$  (Abb. 2c). Im Bereich der Aren-C-Atome beobachtet man eine Intensitätsabnah-

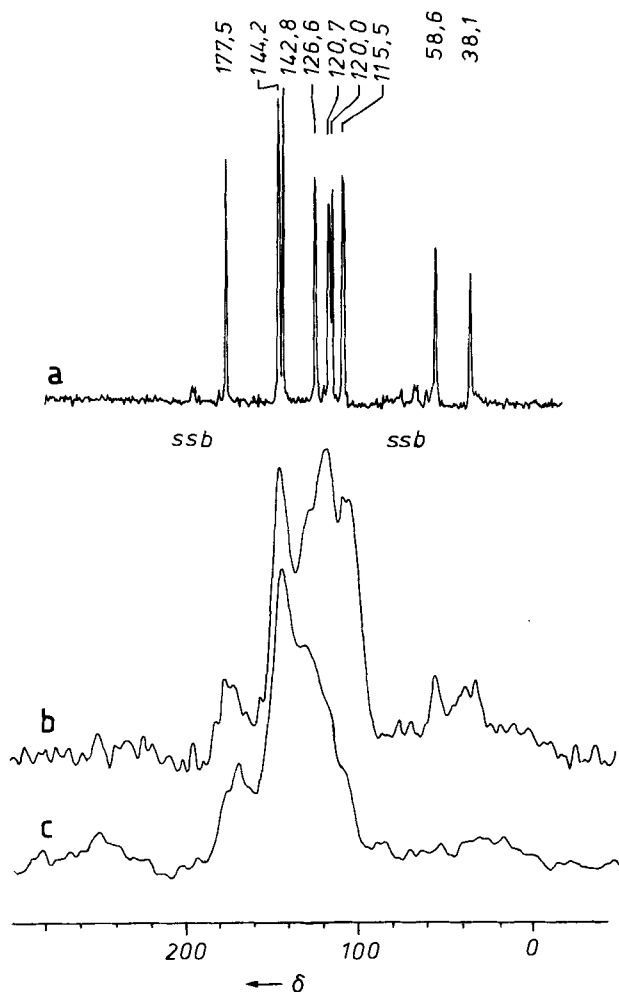


Abb. 2. CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren a) von Dopa, b) von Dopa-Melanin, c) von Dopamin-Melanin, aufgenommen mit einer NQS-Sequenz mit 60  $\mu$ s Verzögerungszeit. Meßbedingungen: Bruker MSL 200 CP/MAS (50 MHz); <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C-Kreuzpolarisation mit Probenrotation um den magischen Winkel; Spinfrequenz 5.19 kHz; Entkopplungsfeldstärke 20 G; Kontaktzeit 500  $\mu$ s; 1606 Akkumulierungen bei 297 K; Rotationsseitenbanden (ssb) wurden weitgehend unterdrückt.

me, die auf die Unterdrückung der Resonanz der unsubstituierten Phenyl- und Indol-C-Atome zurückzuführen ist. Somit werden die im Konstitutionsschema des Dopa-Melanins enthaltenen Partialstrukturen durch das Festkörper-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum überzeugend bestätigt.

Das in Abbildung 3b gezeigte CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von Dopamin-Melanin unterscheidet sich deutlich von dem des Dopa-Melanins (vgl. Abb. 2b). Die Carbonyl-Resonanzen ( $\delta \approx 170$ ) sind infolge der Abwesenheit von Carboxygruppen im Edukt schwächer als bei Dopa-Melanin. Signale von unsubstituiertem Indol- und Pyrrol-C3 sind bei Dopamin-Melanin kaum erkennbar. Die intensiven Aliphatsignale korrelieren eindeutig mit denen der Seitenketten-C-Atome von Dopamin (Abb. 3a), wobei die bei  $\delta \approx 46$  erwarteten Dihydroindol-C2-Signale nicht auftreten. Die

Unterdrückung der Resonanzen nicht-quartärer C-Atome liefert ein dem NQS-Spektrum des DOPA-Melanins sehr ähnliches Bild (Abb. 3c).

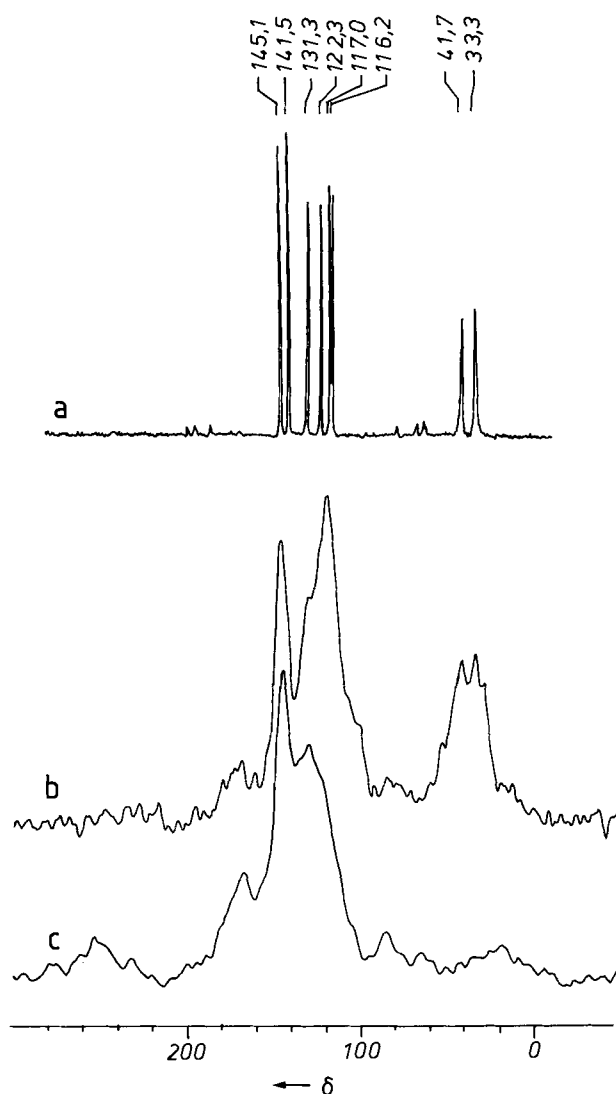


Abb. 3. CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren a) von Dopamin (Hydrochlorid), b) von Dopamin-Melanin, c) von Dopamin-Melanin, aufgenommen mit einer NQS-Sequenz mit 60  $\mu$ s Verzögerungszeit. Meßbedingungen wie in der Legende zu Abb. 2 beschrieben.

Vergleiche der relativen Intensitäten einzelner Signalgruppen in den Spektren der monomeren Vorläufer und der Polymere lassen erkennen, daß Dopamin-Melanin einen viel größeren Anteil an unveränderten Seitenketten als Dopa-Melanin enthält. Demnach entsteht Dopamin-Melanin in entsprechend höherem Ausmaß durch Polymerisation der offenkettigen Vorstufen **3** und **4** (Abb. 1) und enthält Substrukturen vom Typ eines Allomelanins (vgl. die Polymerisation von **5** und **6** in Abb. 1). Daneben sind in geringerem Maße auch Konstitutionsmuster vorhanden, die aus der Copolymerisation von **3** und **4** mit **8**, **10**, **11** und **12** resultieren. In Dopa-Melanin überwiegt dagegen die Polymerisation von **11** mit **12**.

Die Festkörper-<sup>13</sup>C-NMR-Spektren ermöglichen auch eine ungefähre Abschätzung des Oxidationszustandes der Polymere. Ein Vergleich der Intensitäten der Carbonyl- und der diphenolischen Phenoxy-C-Signale deutet auf hohe Anteile von Catechol-Einheiten, was für einen Polymerisationsablauf über oxidative Phenolkupplungen spricht.

Duff et al.<sup>[8]</sup> beschrieben kürzlich CP/MAS-<sup>13</sup>C- und -<sup>15</sup>N-NMR-Spektren von autoxidativ aus Dopa erzeugtem und aus biologischem Material isoliertem Melanoma- und Sepia-Melanin. Die Signalzuordnungen stimmen beim Dopa-Melanin weitgehend mit den hier für Abbildung 2b diskutierten überein, wobei allerdings die Indol-, Pyrrol- und Dihydroindol-Einheiten in dem publizierten Spektrum<sup>[8]</sup> aufgrund der vergleichsweise niedrigen Auflösung nicht eindeutig erkennbar sind. Im CP/MAS-<sup>15</sup>N-NMR-Spektrum sind jedoch Signale für aliphatische Aminogruppen vorhanden.

Das CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum von enzymatisch mit Tyrosinase (Monophenol-Monooxygenase; EC 1. 14. 18. 1.) aus Tyrosin erzeugtem Melanin stimmt qualitativ mit Abbildung 2b überein, wobei im Tyrosin-Melanin die Carboxy-/Carbonylsignale intensiver sind. Die Signale der Phenoxy-C-Atome bei  $\delta \approx 145$  sind weniger intensiv als die der übrigen Aren-C-Atome. Indol-C3- und Pyrrol-C-Atome lassen sich jedoch eindeutig erkennen. Das CP/MAS-<sup>13</sup>C-NMR-Spektrum eines Phäomelanins (hergestellt durch Oxidation einer Mischung aus Dopa und Cystein mit  $K_3[Fe(CN)_6]$ ) ist vor allem durch das prominente Carboxy-Signal und die Signale der aliphatischen Aminosäure-C-Atome charakterisiert.

Die Ergebnisse zeigen, daß die Festkörper-NMR-Spektroskopie zur zerstörungsfreien Untersuchung von komplexen Biopolymeren bestens geeignet ist. Die Analyse der Konstitutionsmuster führt nicht nur zu neuen Erkenntnissen über strukturelle Zusammenhänge, sondern wird darüber hinaus auch für die Zuordnung von unbekannten polyphenolischen Naturstoffen zu bestimmten Melanin-Klassen unentbehrlich sein.

### Experimentelles

Herstellung von Dopa-Melanin: Eine Lösung von 1.0 g (5.07 mmol) L-Dopa und 8 g (23.4 mmol)  $K_3[Fe(CN)_6]$  in 1 L  $H_2O$  wird mit ca. 2 N KOH auf pH 8 eingestellt und intensiv im offenen Erlenmeyerkolben bei 22 °C gerührt. Nach 7 h säuert man mit 10 mL konz. HCl an, zentrifugiert das ausgeflockte schwarze Melanin ab und wäscht intensiv mit  $10 \times 50$  mL  $H_2O$ . Anschließend suspendiert man in  $H_2O$  und lyophilisiert; Ausbeute: 897 mg Dopa-Melanin. Dopamin-Melanin wird analog hergestellt.

Eingegangen am 5. Januar 1989 [Z 3113]

[1] R. A. Nicolaus: *Melanins*, Hermann, Paris 1968.

[2] a) G. A. Swan, *Fortschr. Chem. Org. Naturst.* 31 (1974) 521; b) R. H. Thomson, *Angew. Chem.* 86 (1974) 355; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 13 (1974) 305.

[3] M. G. Peter, *Angew. Chem.* 101 (1989) 572; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 28 (1989) 555.

[4] P. Palumbo, M. d'Ischia, O. Crescenzi, G. Prota, *Tetrahedron Lett.* 28 (1987) 467.

[5] R. M. B. Deibel, M. R. Chedekel, *J. Am. Chem. Soc.* 106 (1984) 5884.

[6] T. E. Young, J. R. Griswold, M. H. Hulbert, *J. Org. Chem.* 39 (1974) 1980.

[7] T. E. Young, B. W. Babbitt, *J. Org. Chem.* 48 (1983) 562.

[8] G. A. Duff, J. E. Roberts, N. Foster, *Biochemistry* 27 (1988) 7112.

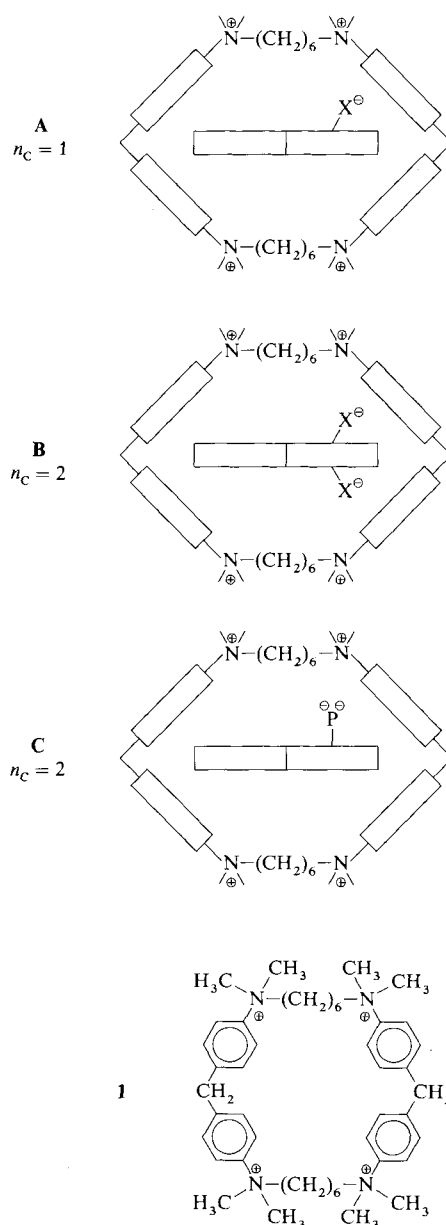
## Additivitäten von elektrostatischen und hydrophoben Wechselwirkungen in Wirt-Gast-Komplexen\*\*

Von Hans-Jörg Schneider\* und Isolde Theis

Nichtkovalente Wechselwirkungen spielen in biologischen Systemen ebenso eine große Rolle wie in synthetischen Wirt-Gast-Komplexen. Die Bedeutung der Quantifizierung elek-

trostatischer Beiträge<sup>[1]</sup> wurde z. B. bei der Untersuchung von Enzym-Substrat-Wechselwirkungen durch ortsspezifische Mutagenese<sup>[2]</sup> und der Bindung von Polyaminen durch Nucleinsäuren<sup>[3]</sup> erkannt. Synthetische Analoga von Rezeptor-Substrat-Komplexen<sup>[4]</sup> bieten den Vorteil, daß sich die wechselwirkenden Gruppen innerhalb einer relativ gut definierten konformativen Umgebung in Struktur und Art gezielt variieren lassen. Wir zeigen hier, daß sich für Salzbrücken in einer großen Zahl sehr unterschiedlicher synthetischer Rezeptormodelle in Wasser ein erstaunlich einheitlicher Wert von  $5 \pm 1$  kJ mol<sup>-1</sup> pro Ionenpaar-Wechselwirkung ergibt, wenn elektrostatische Kräfte dominieren.

Zahlreiche Substrate und Coenzyme werden sowohl durch elektrostatische als auch durch hydrophobe Wechselwirkungen gebunden. In den Komplexen A–C (Schema 1) aus dem



Schema 1.

Azoniacyclophan **1** und Naphthalinderivaten mit negativ geladenen Substituenten<sup>[5, 6]</sup> sind hydrophobe (lipophile) Wechselwirkungen dominierend, deren Anteile sich aus der Abhängigkeit der Assoziationskonstante von der Solvens-Hydrophobie quantifizieren läßt<sup>[7]</sup>. Etliche elektroneutrale

[\*] Prof. Dr. H.-J. Schneider, Dipl.-Chem. I. Theis  
Fachrichtung Organische Chemie der Universität  
D-6600 Saarbrücken 11

[\*\*] Wirt-Gast-Chemie, 21. Mitteilung. Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie gefördert. – 20. Mitteilung: H.-J. Schneider, T. Blatter, S. Simova, I. Theis, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1989, 580.