

Zusammenfassung.

Aus Dihydro-corynanthean und Corynantheidan wurden durch Oxydation mit Ozon stereoisomere Pyrro-chinolon-Derivate IVa bzw. IVb hergestellt.

Durch Oxydation von Allo-yohimban mit Blei(IV)-acetat erhielt man Tetradehydro-allo-yohimban (VIIIb), das als Perchlorat isoliert wurde.

Aus dem Vergleich der molekularen Drehungsverschiebungen folgt, dass das Dihydro-corynanthean, das Corynantheidan und das Allo-yohimban die gleiche absolute Konfiguration am asymmetrischen Kohlenstoff-Atom 3 besitzen wie das Yohimban.

Auf Grund dieser Feststellung und der Ergebnisse, die von anderen Forschungsgruppen über die Stereochemie des Reserpins und Deserpidins erhalten wurden, werden neue Konfigurationen für das Allo-yohimban und die erwähnten Alkaloide zur Diskussion gestellt.

Laboratoire de Pharmacie Galénique,
Faculté de Pharmacie de Paris, und
Organisch-chemisches Laboratorium der
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

124. Über Melanine, die dunklen Haut- und Haarpigmente

von B. Schmidli.

(27. IV. 55.)

Infolge des plötzlichen Todes von Prof. P. Robert mussten unsere experimentellen Arbeiten auf dem Gebiet der Melanine unterbrochen werden. Es scheint uns daher angezeigt, eine kurze zusammenfassende Darstellung unserer Beiträge zur rein chemischen Seite des Melaninproblems zu geben.

Natürliche Melanine. Die Melanine stellen im ganzen Tierreich vorkommende, korpuskuläre, hellgelbe bis tiefschwarze organische Farbstoffe von noch ungeklärter Konstitution dar. Neben dem physiologischen Melanin findet man oft durch pathologische Vorgänge entstandene ähnliche Pigmente. Es ist nicht entschieden, ob die Pigmente verschiedener Zell- und Tierarten identisch sind oder nicht.

Die enge Verbindung der Melanine mit dem Protein in den Geweben und der geringe Gehalt (in dunklen Haaren z. B. ca. 0,16%) sowie die Unlöslichkeit in den meisten Lösungsmitteln erschweren die Isolierung dieser Pigmente. Sie erfolgt durch Hydrolyse des Ausgangsmaterials mit Säuren und Alkalien¹⁾ sowie durch fraktioniertes

¹⁾ Nach Angaben von N. Sieber²⁾ und von B. Bloch & F. Schaaf³⁾.

²⁾ N. Sieber, Arch. exper. Pathol. Pharmacol. **20**, 362 (1886).

³⁾ B. Bloch & F. Schaaf, Biochem. Z. **162**, 184, 200 (1925).

Zentrifugieren und durch chromatographische Adsorption aus Homogenaten melaninhaltiger Tumore. Die mittlere Zusammensetzung der Melanine (C 57 %, H 3,5 %, N 9 %) unterliegt grösseren Schwankungen je nach Herstellung. Ob ein geringer Schwefelgehalt als Verunreinigung zu betrachten ist, ist umstritten. – Natürliche Melanine sind unlöslich in Wasser und in organischen Lösungsmitteln, löslich in verdünnten Alkalien und in konz. Schwefelsäure.

Gegen chemische Eingriffe erweist sich das Melanin als sehr widerstandsfähig. Durch energische Hydrolyse mit Alkali und Säure unter Druck konnte *Piettre*¹⁾ Melanin aus Pferdetumoren in einen Farbstoffkern mit höherem C- und niedrigerem N-Gehalt und in eine albuminoide Gruppe aufspalten. *Serra*²⁾ erreichte bei der Hydrolyse von Melanin aus Kaninchenhaar ebenfalls eine Spaltung in Farbstoffkern und Proteinkomponente. Die energische Oxydation führte zur Entfärbung der Melaninlösungen und ergab eine geringe Menge niedriger Fettsäuren. Die Reduktion nach verschiedenen Methoden führte ebenfalls zur Entfärbung unter Bildung uncharakteristischer Bruchstücke. Im Elektronenmikroskop³⁾ zeigte Melanin aus Tumorgewebe definierte kugelige oder ovale Partikel mit einem Durchmesser von 0,2–1 μ . Eine Oberflächenstruktur, die auf den Aufbau schliessen liesse, war nicht zu erkennen. Verschiedene natürliche und künstliche Melanine zeigten totale Absorption in violett, blau und grün⁴⁾. Genauere Angaben über das Molekulargewicht dieser Pigmente fehlen⁵⁾.

Über die Pigmentbildung aus den chemischen Vorstufen, den Melanogenen, existieren verschiedene Theorien. Am besten fundiert ist die meist anerkannte *Bloch'sche*⁶⁾ Theorie der Bildung aus Dioxyphe-nylalanin (Dopa) bzw. Tyrosin durch die Einwirkung spezifischer Oxydationsfermente (Dopaoxydase, bzw. Tyrosinoxydase). Die ersten Stufen des Bildungsmechanismus aus Tyrosin wurden von *Raper*⁷⁾ aufgeklärt: Die Oxydation verläuft über Chinonkörper und Ringchluss vorerst zu 5,6-Dioxindol und 5,6-Dioxindolcarbonsäure. Daraus entsteht das Melanin durch verschiedene unbekannte Oxydations-, Kondensations- und Polymerisationsvorgänge. Experimentelle Untersuchungen über den Diaminstoffwechsel und die Angaben von *Zeller*⁸⁾ sowie *Edlbacher & Zeller*⁹⁾ über die fermentative Her-

¹⁾ *M. Piettre*, 1er Congrès int. de Pathologie Comparée, Paris 1912.

²⁾ *J. A. Serra*, *Nature* **157**, 771 (1946); *Rev. da Fac. de Cienc. da Univ. de Coimbra (Portugal)* **7**, 235 (1939).

³⁾ *H. S. Mason, H. Kahler, R. C. McCardle & A. J. Dalton*, *Proc. exptl. Biol. Med.* **66**, 421 (1947). ⁴⁾ *W. J. Young*, *Biochem. J.* **8**, 460 (1914).

⁵⁾ *A. J. Lea*, *Nature* **159**, 843 (1947).

⁶⁾ *B. Bloch*, *Handb. der Haut- und Geschlechtskrankheiten* **1**, 434, Berlin 1927.

⁷⁾ *H. S. Raper*, *Biochem. J.* **21**, 89 (1927).

⁸⁾ *E. A. Zeller*, *Helv.* **22**, 837 (1939).

⁹⁾ *S. Edlbacher & E. A. Zeller*, *Helv.* **20**, 717 (1937).

stellung eines Melanins aus Histamin führten jedoch *Robert*¹⁾ zur Annahme, dass evtl. Histamin die Muttersubstanz des natürlichen Melanins darstellen könnte.

Die Abklärung der Frage nach der Grundsubstanz des natürlichen Pigments kann sich auf seine Konstitutionsaufklärung oder auf Analogieschlüsse mit künstlichen Produkten aus definierten Ausgangssubstanzen stützen. Der erste, ausserordentlich schwierige Weg hat trotz verschiedenster Versuche keine entscheidenden Fortschritte erlaubt. Wir entschlossen uns daher zum Umweg über den Vergleich mit künstlichen Melaninen als Modellsubstanzen, die aus den verschiedensten Melanogenen leicht herstellbar sind. Das erste Problem ist die Ausarbeitung von Charakterisierungsmethoden für die verschiedenen Melanine, ein weiteres der Vergleich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften zur Gewinnung von Einblicken in den Aufbau des natürlichen Melanins. Nach der Ausarbeitung einer chromatographischen Testmethode zeigte sich, dass nach den von *Sieber*²⁾ und von *Bloch & Schaaf*³⁾ angegebenen Verfahren nur ein uneinheitliches Melanin gewonnen wird. Es ist uns nun gelungen, ein reines, gut definiertes Produkt herzustellen, das eine sichere Basis für die weitere Erforschung der Melanine bildet.

Künstliche Melanine. Wegen der Schwierigkeit der Untersuchung natürlicher Melanine wurde die Herstellung künstlicher Produkte auf photosynthetischem, fermentativem und chemischem Weg stark gefördert. Photosynthetische Melanine wurden erhalten durch UV.-Bestrahlung aromatischer Aminosäuren. Ihre Spektren sind denjenigen natürlicher Melanine sehr ähnlich⁴⁾. Durch fermentative Oxydation von Tyrosin mit Tyrosinase wurde ein Melanin der Summenformel $C_{16}H_{10}O_5N_2$ erhalten. Die Oxydation von Dioxyphenylalanin in alkalischer Lösung mit Luftsauerstoff sowie diejenige einer grossen Zahl anderer, meist phenolartiger Substanzen nach verschiedenen Methoden führte ebenfalls zu dunklen, Melanin-ähnlichen Körpern.

Experimenteller Teil.

Isolierung von natürlichem Melanin: Aus gewaschenen, dunklen menschlichen Haaren wurde das Melanin durch Hydrolyse mit 5-proz. KOH oder 25-proz. Schwefelsäure bei 100° während 6 Std. freigesetzt. Während bei saurer Hydrolyse das Melanin ungelöst zurückbleibt, wird bei alkalischer Hydrolyse die tiefdunkle Lösung filtriert und das Melanin durch Ansäuern mit Eisessig ausgefällt. Das nach beiden Verfahren erhaltene Rohmelanin wird durch mehrmaliges Umfällen mit verd. NH_3 oder KOH und Salzsäure gereinigt. Nach einer mehrstündigen Behandlung mit 1-n. HCl am Rückfluss wird mit Schwefelkohlenstoff, Alkohol und Äther extrahiert und das trockene Melanin pulverisiert.

¹⁾ *P. Robert & H. Zürcher*, *Dermatologica* **100**, 217 (1950); **104**, 276 (1952); *P. Robert & B. Schmidli*, *Dermatologica* **106**, 219 (1953); **108**, 343 (1954).

²⁾ *N. Sieber*, *Arch. exper. Pathol. Pharmacol.* **20**, 362 (1886).

³⁾ *B. Bloch & F. Schaaf*, *Biochem. Z.* **162**, 184, 200 (1925).

⁴⁾ *M. Spiegel-Adolf*, *Biochem. J.* **31**, 1303 (1937).

Künstliche Melanine: *Histamin-Melanin*¹⁾ wird erhalten durch die Oxydation von 1 g Histamin-hydrochlorid in 250 cm³ Phosphatpuffer von pH 7 in Gegenwart von 3,6 g Ascorbinsäure und 1 cm³ FeCl₃ (0,16-m.) bei 37° unter Durchleiten von Luft während 24 Std. Die tiefdunkle Lösung wird angesäuert, zur Trockne verdampft, der Rückstand mehrmals mit dest. Wasser ausgewaschen und das Melanin durch Umfällen mit 1-n. NaOH–1-n. HCl gereinigt. *Histidin-Melanin* und *Carnosin-Melanin* werden analog hergestellt.

*Dopa-Melanin nach Arnow*²⁾ wird durch Oxydation von Dioxyphenylalanin in 0,01-n. Natronlauge unter Durchleiten von Luft erhalten. Mit 1-n. Salzsäure wird das Melanin ausgefällt und wie oben weiter gereinigt.

*Tyrosin-Melanin nach Heinlein*³⁾: Tyrosin in 1-proz. Natronlauge wird mit Kaliumpersulfat oxydiert, die dunkle Lösung filtriert, das Melanin mit 5-proz. Salzsäure gefällt und weiter gereinigt.

*Melanine nach Neuberg & Kikkoi*⁴⁾: Die wässrigen Lösungen oder Aufschwemmungen von Phenol, Phenylalanin, Dioxyphenylalanin, Histamin, Pyrrol und Tyramin werden in Gegenwart von Ferrosulfat bei 40° mit 3-proz. Wasserstoffperoxyd oxydiert. Phenol, Phenylalanin und Pyrrol geben sofort dunkle Niederschläge, die übrigen erst nach längerem Stehen. Die Pigmente werden durch Umfällen aus alkalischer Lösung gereinigt.

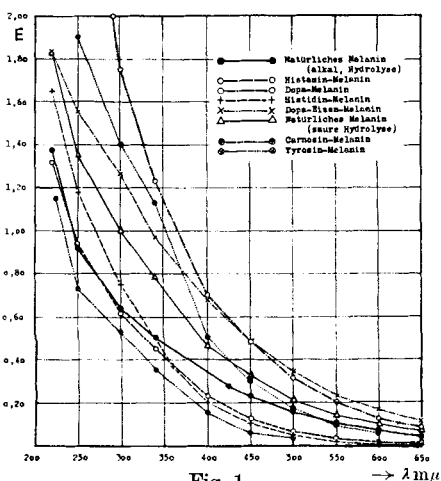


Fig. 1.

Extinktionskurven verschiedener Melanine.

Entwicklung der Zonen erfolgte mit 0,1-n. NaOH und Phosphatpuffer vom pH 10,35. Die Chromatogramme zeigen einen grundsätzlichen Unterschied zwischen natürlichen und künstlichen Melaninen: Die aus Haaren isolierten Pigmente bilden im Chromatogramm zwei scharfbegrenzte, dunkelbraune Zonen (Fig. 2). Alle untersuchten künstlichen Melanine bilden dagegen eine einzige Zone, die durch die Anwesenheit polymerhomologer Bestandteile mehr oder weniger verwaschen ist (Fig. 3). Sie unterscheiden sich nur durch Farbastufungen von gelbbraun bis schwarz. Chromatographische Trennungen verschiedener Melanine sind im allgemeinen nicht möglich. Es lassen sich auf diesem Wege nur Dopa-Melanin und Histamin-Melanin voneinander trennen, die durch einen grossen Unterschied in der Zahl der adsorptionsaktiven bzw. löslichkeitsvermittelnden Gruppen charakterisiert sind. Leichtere Löslichkeit und stärkere Adsorption von Dopa-Melanin gehen parallel.

Spektralphotometrie im UV., im sichtbaren Licht und im Infrarot. Die Messungen wurden an 0,005-proz. Lösungen in 1% Ammoniak im UV. und im sichtbaren Licht ausgeführt. Alle untersuchten Melanine zeigen die gleiche Kurvenform (Fig. 1): Starke Absorption im UV., rasche Abnahme im sichtbaren Licht bis auf wenige Prozent. Maxima und Minima treten nicht auf. Geringe Unterschiede bestehen in der Lage der Kurven. Im Infrarot ergaben sich mit Melanin-Aufschwemmungen in Paraffinöl oder Tetra-chlorkohlenstoff und mit ammoniakalischen Lösungen keine Unterschiede der Spektren von denjenigen der reinen Lösungsmittel.

Chromatographische Untersuchungen. Die Adsorption gelang befriedigend aus 0,1-n. NaOH an Floridin XXF, einem Magnesium-Aluminium-Silikat. Die

¹⁾ S. Edlbacher & A. v. Segesser, Biochem. Z. **290**, 370 (1937).

²⁾ L. E. Arnow, Science **87**, 308 (1938).

³⁾ H. Heinlein, Biochem. Z. **154**, 24 (1924).

⁴⁾ C. Neuberg & T. Kikkoi, Biochem. Z. **20**, 523 (1909).

Die elektronenmikroskopische Untersuchung bestätigte die Uneinheitlichkeit der natürlichen Melanine. Sie zeigten im EM-Bild dichte Pigmentkörner variabler Grösse und ohne charakteristische Form neben lockeren, flockigen, proteinartigen Aggregaten.

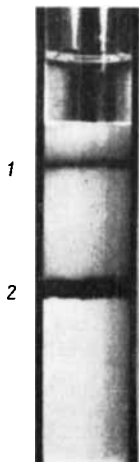


Fig. 2.

Natürliches Melanin

(Gemisch): 1. Farbstoff. 2. Melano-Protein.



Fig. 3.

Künstliches Melanin.

Chemische Untersuchungen an natürlichem Melanin. Mit der chromatographischen Testmethode stellten wir fest, dass durch energische Säurehydrolyse oder durch milde Reduktion mit Natriumsulfid aus dem natürlichen Melanin-Gemisch ein einheitliches Produkt erhalten wird. Die eine Komponente (untere Zone) geht unter Abspaltung eines durch Hydrolyse als Proteinkörper identifizierten Bestandteils in die andere Komponente (obere Zone) über. Im Hydrolysat dieses Proteins wurden folgende Aminosäuren gefunden: Cystin, Leucin, Phenylalanin, Valin, Alanin, Glycin, wahrscheinlich Tyrosin und Threonin sowie einige weitere, nicht identifizierte ninhydrin-positive Substanzen. Die relativ leichte reduktive Spaltbarkeit der Substanz aus der unteren Zone lässt an eine Disulfidbrückenbindung zwischen den beiden Anteilen denken. Jedenfalls steht fest, dass S-haltige Aminosäuren in nahem Zusammenhang stehen mit der Melaninmolekel, und Scott¹⁾ und Mitarbeiter halten es für möglich, dass gewisse oxydierte SH-Gruppen bei der Melaninbildung eingebaut werden. Damit sind die beiden Komponenten des natürlichen Melanins eindeutig als Melanoprotein (untere Zone) und eigentliches Melanin (obere Zone) charakterisiert.

Parallel zur Änderung des chromatographischen Verhaltens lässt sich elektronenmikroskopisch das Verschwinden der amorph-flockigen Anteile verfolgen.

Diese Feststellungen führten zu folgendem modifizierten Herstellungsverfahren:

Die Haare werden 12 Std. mit kaltesättigter Natriumsulfid-Lösung bei 50° behandelt. Die Keratinabbauprodukte gehen in Lösung und der dunkle, schmierige Rückstand enthält die Hauptmenge des Melanins. Durch Extraktion dieses Rückstandes mit 1-n. NaOH, durch Kochen mit verdünnter Salzsäure und durch mehrmaliges Umfällen wird ein chromatographisch einheitliches Melanin erhalten. Es weist bessere Alkali-Löslichkeit und höhere Farbtintensität auf als ein nach den bekannten Methoden isoliertes Produkt.

Zur Molekulargewichtsbestimmung des einheitlichen natürlichen Melanins und von Histamin-Melanin bestimmten wir mit der Mc-Bain²⁾-Diffusionszelle ihre Diffusionskoeffizienten. Aus den Diffusionskonstanten berechnete sich unter Annahme der Kugel-

¹⁾ E. J. Van Scott, St. Rothman & C. S. Green, J. invest. Dermatol. **65**, 111 (1953).

²⁾ J. W. Mc. Bain, J. Amer. chem. Soc. **55**, 545 (1933); **56**, 1021 (1934); **63**, 2008 (1941).

gestalt der Molekeln mit Hilfe der experimentell bestimmten Dichten (1,44 für natürliches Melanin; 1,342 für Histamin-Melanin) ein Molekulargewicht von rund 70000 für das natürliche, proteinfreie Melanin und ein solches von ca. 20000 für das künstliche Histamin-Melanin.

Substanz	Diff. Zeit Std.	Konz. oben mg/cm ³	Konz. unten mg/cm ³	Diff. Konstante cm ² /Tag
Natürliches Melanin .	109	2,0	0,085	0,0655
	110	2,0	0,098	0,0699
Histamin-Melanin . .	50	2,0	0,062	0,101
	110	2,0	0,125	0,0974

Diskussion.

Die Versuche mit Melaninen verschiedenster Herkunft bestätigten, dass aus ihren Absorptionskurven nicht auf die Natur der Melanogene geschlossen werden kann. Neben der Erklärung dieses Verhaltens durch den gleichen kolloidalen Zustand der Lösungen (*Florence*¹⁾) kann die Hypothese des ähnlichen Aufbaus der verschiedenen Substanzen als kondensierte Ringsysteme nicht ausgeschlossen werden.

Aufschlussreicher sind die Ergebnisse der chromatographischen Untersuchungen besonders an dem natürlichen Melanin. Diese Methode wurde bisher nur von *Riley*²⁾ zur Isolierung von Melanin aus Tumorphomogenaten und von *Serra*³⁾ zur Untersuchung von Haarhydrolysaten herangezogen. *Serra*³⁾ stellte bei allen Produkten eine stark adsorbierte Hauptzone fest, die er als eigentliches Melanin betrachtete, neben verschiedenen rasch wandernden Zonen je nach der Herkunft der Pigmente. Unsere Untersuchungen ergaben eine mässig starke Adsorption der künstlichen Melanine, die derjenigen der Melanoproteinkomponente des natürlichen Pigmentes entspricht. Der eigentliche proteinfreie Farbstoff wird dagegen aus 0,1-n. NaOH sehr stark adsorbiert. Nach unseren Erfahrungen bei den Trennungsversuchen mit verschiedenen künstlichen Melaninen ist für ihr chromatographisches Verhalten der Grundbaustein der Molekel nur von geringer Bedeutung. Die Unterscheidungsmöglichkeit für Dopa- und Histamin-Melanin sind in erster Linie auf die unterschiedliche Zahl ihrer adsorptionsaktiven Gruppen und kaum auf den Unterschied Benzolkern-Imidazolring zurückzuführen. Ebenso kann auch die starke Zunahme der Adsorption des eigentlichen Melanins gegenüber der Melanin-Protein-Verbindung durch die Freisetzung adsorptionsaktiver Gruppen infolge der Abspaltung der Proteinkomponente bedingt sein. Das proteinfreie natürliche Melanin und die verschiedenen künstlichen Produkte werden dadurch chromatographisch eindeutig unterscheid-

¹⁾ *G. Florence, J. Enselman & M. Pozzi, Bull. Soc. Chim. biol.* **17**, 268 (1935).

²⁾ *V. T. Riley, M. L. Hesselbach, S. Fiala, M. W. Woods & D. Burk, Science* **109**, 361 (1949).

³⁾ *J. A. Serra, Nature* **157**, 771 (1946); *Rev. da Fac. de Cienc. da Univ. de Coimbra (Portugal)* **7**, 235 (1939).

bar. Es scheint somit, dass Vergleiche mit diesen Modellsubstanzen keinen Einblick in den Bau des natürlichen Melanins geben können, da die zur Charakterisierung herangezogenen Methoden entweder überhaupt nicht auf den Feinbau dieser kondensierten Ringsysteme ansprechen oder nur Unterschiede aktiver Gruppen erfassen.

Die chromatographischen Untersuchungen sind aber in anderer Hinsicht von Interesse. Durch die Chromatographie des natürlichen Melanins gelang es, das zuerst von *Piettre*¹⁾ und *Serra*²⁾ vermutete Vorkommen eines Melanoproteins zu bestätigen und die nach den bisherigen Verfahren aus Haaren isolierten Melanine als aus zwei Komponenten bestehende Produkte zu charakterisieren, von denen die eine eine durch reduzierende Spaltung entfernbare Eiweisskomponente enthält. Durch eine derartige Behandlung lässt sich ein einheitliches, in schwach alkalischen Medien leicht lösliches Melanin vom ungefähren Molekulargewicht 70 000 erhalten, das als Ausgangsprodukt für weitere Untersuchungen über den chemischen Bau des natürlichen Melanins wertvoll ist.

Massgebenden Anteil an einzelnen Untersuchungen haben *H. Zürcher* (Spektralphotometrie) und *K. Müller* (Diffusionskonstanten).

Zusammenfassung.

Aus menschlichen Haaren gewonnenes natürliches Melanin und verschiedene synthetisch hergestellte „Melanine“ wurden chromatographisch, spektralphotometrisch und elektronenmikroskopisch untersucht. Das nach den bisherigen Methoden gewonnene natürliche Melanin wurde durch Chromatographie als ein Gemisch eines eigentlichen Farbstoffs mit einem Melano-protein erkannt. Es wurde eine neue Methode zur Isolierung eines einheitlichen, proteinfreien Melanins von besserer Löslichkeit und grösserer Farbintensität aus dunklen menschlichen Haaren ausgearbeitet. Durch Diffusionsmessungen wurde sein Molekulargewicht zu ca. 70 000 bestimmt.

Wissenschaftliches Laboratorium der Dermatologischen
Universitätsklinik, Bern. Prof. *H. Kuske*.

Erratum.

Helv. **38**, 830 (1955), Abhandlung Nr. 93 von *W. Buser & P. Graf*: In der Gleichung (1) fehlt im Zähler des ersten Gliedes der rechten Seite das Pluszeichen zwischen V_I und V_{Bn} , die als Summe in die Formel eingehen, wie es in der Formel (2) richtigerweise geschrieben ist. Es muss in beiden Fällen heissen: $(V_I + V_{Bn} + \Delta V_a)$.

¹⁾ *M. Piettre*, 1er Congrès int. de Pathologie Comparée, Paris 1912.

²⁾ *J. A. Serra*, Nature **157**, 771 (1946); Rev. da Fac. de Cienc. da Univ. de Coimbra (Portugal) **7**, 235 (1939).