

182. Zur Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin

2. (vorläufige) Mitteilung¹⁾

von H. Wyler, G. Vincenti, M. Mercier, G. Sassu und André S. Dreiding

(13. VI. 59)

Vor einiger Zeit konnte über kristallisierte Betaninpräparate berichtet werden^{1) 2)}. Der Hinweis von SCHMIDT & SCHÖNLEBEN²⁾, dass es sich bei diesen aus Pufferlösungen ausgefallten Präparaten um Salze des Betanins handelte, kann nun wenigstens teilweise bestätigt werden.

Unsere Titrationsdaten zeigen, dass das Betanin zwei stark saure Gruppen ($pK_a \sim 3,4$, Carboxyl) und eine schwach saure Gruppe ($pK_a = 8,5$, vielleicht Phenol) enthält. In wässrigen Pufferlösungen (Pyridiniumformiat, Ammoniumacetat-Essigsäure, Kaliumacetat-Essigsäure) von pH 4,5 ist das Betanin hauptsächlich als Bis-Anion gelöst. Durch sorgfältiges Ansäuern solcher Lösungen haben wir in allen Fällen kristalline Präparate erhalten, welche als variable Gemische von freiem Betanin und seinem dem Pufferkation entsprechenden Salz angesehen werden können (Mischkristalle oder Gemisch von Kristallen). Nur auf Grund dieser Hypothese können die stark schwankenden Analysen- und Titrationsresultate (siehe Tab.) auf einen gemeinsamen Nenner gebracht werden. Es lassen sich verschiedene Gleichungen ableiten, aus welchen man beim Einsetzen der analytischen und titrimetrischen Daten eines bestimmten Präparates einerseits ein *Molekulargewicht* und eine *Bruttoformel* für das freie Betanin und andererseits auch das *Molverhältnis (x) des Betaninsalzes* im Gemisch berechnen kann. Die auf diese Weise aus den Daten für elf Kristallisate erhaltenen Zahlen geben als Durchschnittswert für das Molekulargewicht 564–566 (± 22) und eine mittlere Bruttoformel von $C_{25}H_{28-30}O_{13}N_2$. Die relative Konstanz dieser Resultate kann als Bestätigung der oben erwähnten Hypothese angesehen werden. In den Tab. sind neben den gefundenen analytischen Werten die auf Grund der jeweiligen x-Werte berechneten Zahlen angegeben.

Beim Konzentrieren einer salzsauren Lösung eines der in den Tab. angeführten kristallinen Betaninsalze fällt ein amorphes Hydrochlorid aus, welches 80% Betanin und 20% Betanidin³⁾, das Aglucon von Betanin (chromatographisch-spektrophotometrisch bestimmt), enthält.

$0,8 \cdot C_{25}H_{28}O_{13}N_2Cl + 0,2 \cdot C_{19}H_{18}O_8N_2Cl$	Ber. C 50,27	H 4,78	N 4,93	Cl 6,23%
	Gef. „ 50,30	„ 4,42	„ 4,96	„ 6,43%

Durch Verreiben mit Wasser wird ein chlorfreies Produkt erhalten. Betanin besitzt also auch eine basische Gruppe, welche mit einer der stark sauren Gruppen ein Zwitterion bilden kann. Dies ist ersichtlich aus den Infrarotspektren, welche auch zeigen, dass die zwei stark sauren Gruppen Carboxylgruppen sind: Ein Betaninpräparat mit hohem Kationengehalt zeigt fast keine Carbonylabsorption bei $5,8 \mu$;

¹⁾ 1. Mitteilung, H. WYLER & A. S. DREIDING, Helv. **40**, 191 (1957).

²⁾ O. TH. SCHMIDT & W. SCHÖNLEBEN, Z. Naturforsch. **12b**, 262 (1957).

³⁾ Das Betanidin wird in der folgenden Mitteilung beschrieben. Helv. **42**, 1699 (1959).

beim kationenfreien Betanin ist die Carbonylbande bei $5,81 \mu$ klar erkennbar und beim Hydrochlorid etwa doppelt so intensiv.

Alle hier angeführten Präparate zeigen dasselbe Absorptionsspektrum in Wasser.

Die Maxima und Intensitäten, umgerechnet auf freies Betanin (M.-Gew. 564), sind wie folgt: 536–538 $m\mu$ ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 1100$, $\epsilon = 62000$), 273 $m\mu$ ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 158$, $\epsilon = 8900$). Eine Schulter findet sich bei 295 $m\mu$ ($E_{1\%}^{1\text{cm}} = 138$, $\epsilon = 7800$).

Kristalline Betaninpräparate aus Kaliumacetat-Essigsäure-Puffer

Gefunden							Berechnet nach Formel $C_{25}H_{28}O_{13}N_2 \cdot x(K-H)$					
C	H	N	K	A ₁ *)	A ₂ *)	x**)	C	H	N	K	A ₁	A ₂
51,03	4,92	4,88	2,70	376	548	0,442	51,62	4,78	4,82	3,00	373	582
50,72	4,67	4,92	4,80	464	585	0,731	50,68	4,67	4,73	4,81	466	592
50,24	4,77	4,85	4,85	466	548	0,742	50,63	4,63	4,72	4,94	472	593

*) A₁ und A₂ sind die Äquivalentgewichte, welche aus der ersten ($pK_a = 3,4$) und zweiten ($pK_a = 8,5-9,0$) Titrationsstufe berechnet wurden.
**) x ist das Molverhältnis des Salzkations im betreffenden Präparat.

Im Zusammenhang mit der Vermutung, dass der Stickstoff im Betanin von am chromophoren Teil der Molekel haftenden Aminosäuren herrührt⁴⁾ 5), ist es von Interesse, dass wir nach saurer Hydrolyse eines kristallinen Betaninpräparates nur Spuren (total weniger als $10/100$ Gewicht) von Glykokoll, Serin, Glutaminsäure und Asparaginsäure⁵⁾ nachweisen konnten. Die Tatsache, dass die gleichen vier Aminosäuren in einem Rohpräparat in etwas höherer Konzentration aufgefunden wurden, lässt auf das hartnäckige Anhaften von Spuren eines Tetrapeptides an Betanin schliessen.

Kristalline Betaninpräparate aus Ammoniumacetat-Essigsäure-Puffer

Gefunden						Berechnet nach Formel $C_{25}H_{28}O_{13}N_2 \cdot x(NH_3)$				
C	H	N	A ₁ *)	A ₂ *)	x**)	C	H	N	A ₁	A ₂
52,44	5,21	6,09	368	386	0,468	52,45	5,18	6,04	374	390
51,37	5,56	6,84	491	–	0,823	51,90	5,31	6,83	491	–
52,01	5,36	5,90	361	374	0,541	52,33	5,20	6,20	393	372
52,84	5,11	6,16	380	386	0,473	52,44	5,18	6,05	375	389

*) A₁ und A₂ sind die Äquivalentgewichte, welche aus der ersten ($pK_a = 3,4$) und zweiten ($pK_a = 8,5-9,0$) Titrationsstufe berechnet wurden.
**) x ist das Molverhältnis des Salzkations im betreffenden Präparat.

Die Elektrophorese trennt Betanin sauber vom Betaninmonoester, welcher sich bei der Anreicherung des Rohfarbstoffes bilden kann und vom Präbetanin⁶⁾, das

4) O. TH. SCHMIDT & W. SCHÖNLEBEN, *Naturwissenschaften* **43**, 159 (1956); A. D. AINLEY & R. ROBINSON, *J. chem. Soc.* **1937**, 446.

5) W. KÖHLER, Dissertation, Heidelberg 1953.

6) Die Bezeichnung «Prä»-betanin wurde gewählt, weil dieses Pigment dem Betanin bei der Elektrophorese «voraus»-läuft.

etwa 3% des roten Farbstoffes der Rübe ausmacht. Die im Mikromaßstab ausgeführte saure Hydrolyse des elektrophoretisch vom Betanin befreiten Präbetanins ergibt chromatographisch Betanin, Betanidin und Glucose. Es ist möglich, dass das Präbetanin einfach ein weiteres Glucosid des Betanins darstellt.

Kristalline Betaninpräparate aus Pyridiniumformiatpuffer

Gefunden							Berechnet nach Formel $C_{25}H_{28}O_{13}N_2 \cdot x(C_6H_5N)$					
C	H	N	A_{1+2}^{**}	A_3^{**}	a_2/a_1^{***}	x	C	H	N	A_{1+2}	A_3	a_2/a_1
53,04 a) (54,12)	4,96 (4,83)	5,64 (5,76)	297	579	0,250	0,384	54,34	5,07	5,61	297	594	0,234
53,67 a) (54,76)	5,05 (4,93)	5,57 (5,68)			0,313	0,477	54,55	5,09	5,77			0,313
53,65 a) (54,74)	4,72 (4,59)	5,78 (5,90)	288	566	0,348	0,438	54,50	5,08	5,70	299	599	0,280
54,22 a) (55,33)	5,33 (5,21)	6,10 (6,22)			0,561	0,719	55,31	5,13	6,12			0,561

a) Die Zahlen in Klammern sind gefundene Werte, korrigiert auf Grund der Annahme, dass 2% Wasser beim Trocknen dieser äusserst hygroskopischen Präparate nicht entfernt worden sind.
 *) A_{1+2} Äquivalentgewicht berechnet aus der Summe der ersten ($pK_a = 3,4$) und zweiten ($pK_a = 5,3$) Stufe der Titration.
 **) A_3 Äquivalentgewicht berechnet aus der dritten Stufe ($pK_a = 8,5$) der Titration.
 ***) a_2/a_1 Verhältnis der Basenäquivalente verbraucht in der zweiten ($pK_a = 5,3$) und der ersten ($pK_a = 3,4$) Titrationsstufe. Dieser Wert lässt sich auch aus solchen Titrationsergebnissen ableiten, welche wegen ungenauer Einwaage die Berechnung von Äquivalentgewichten nicht erlauben.

Die mittels präparativer Elektrophorese voneinander abgetrennten Pigmente Betanin und Präbetanin sind noch durch ganz kleine Mengen von sehr ähnlichen Trabantenfarbstoffen verunreinigt, welche wir Isobetain⁷⁾ und Isopräbetain nennen wollen. Die kristallinen Betainpräparate sind frei von Isobetain.

Wir danken der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co AG., Basel, für die grosszügige Unterstützung dieser Arbeit. Danken möchten wir auch der *Jubiläumsspende für die Universität Zürich* für einen Beitrag zur Anschaffung von Apparaturen.

SUMMARY

An empirical formula ($C_{25}H_{28}O_{13}N_2$) and certain structural features of betain are reported.

In the beet betain is accompanied by three related violet compounds.

Zürich, Chemisches Institut der Universität

⁷⁾ Der Präfix «Iso» wird in Analogie zu einem beim Betainidin beobachteten Effekt gebraucht. Siehe folgende Mitteilung.