

183. Darstellung und Abbauprodukte des Betanidins

3. (vorläufige) Mitteilung¹⁾

Über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin

von H. Wyler und André S. Dreiding

(13. VI. 59)

Bei früheren Versuchen, durch Hydrolyse mit Mineralsäuren das Aglukon des Betanins, genannt Betanidin^{2) 3)}, darzustellen, wurde weitgehende Zerstörung des Farbstoffes beobachtet. Unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen ist es uns dennoch gelungen, mit Salzsäure ein kristallines Aglukon-hydrochlorid zu erhalten (Fig. 1).

$C_{10}H_{19}O_8N_2Cl$	Ber. C 52,00	H 4,36	N 6,38	O 29,16	Cl 8,08%
$C_{10}H_{21}O_8N_2Cl$	Ber. „ 51,76	„ 4,80	„ 6,35	„ 29,03	„ 8,05%
	Gef. „ 52,00	„ 4,44	„ 6,28	„ 29,90	„ 7,56%

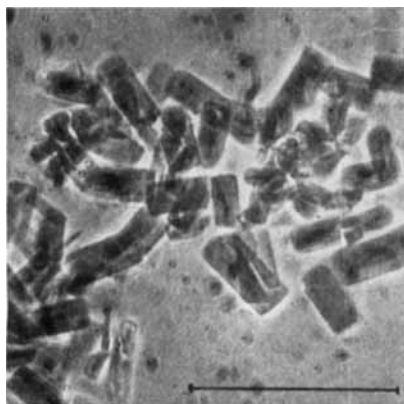


Fig. 1. Kristallines Gemisch von Betanidin- und Isobetanidin-hydrochlorid (unter dem Phasenkontrastmikroskop)

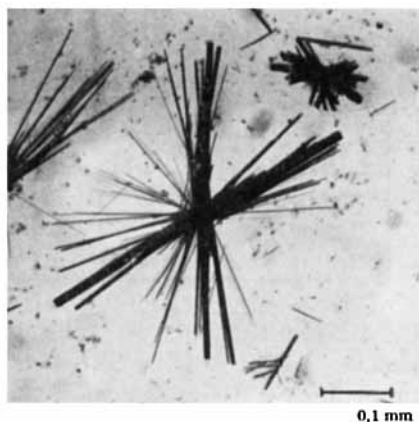


Fig. 2. Kristallines Gemisch von Betanidin- und Isobetanidin-ammoniumsalz, enthaltend 1,4 Äquivalente Ammoniak (unter dem Mikroskop)

Mittels wiederholter Papierchromatographie in Kaliumacetat-Essigsäure- oder Ammoniumacetat-Essigsäure-Puffer kann dieses Präparat in zwei vielleicht isomere Farbstoffkomponenten zerlegt werden: Das schneller wandernde Betanidin und das unmittlerbar folgende Isobetanidin, deren Anteile im Gemisch 68% bzw. 32% sind. Beide Komponenten, sowie auch Gemische derselben, lassen sich aus den konzentrierten Eluaten als Mono-kalium-, bzw. Mono-ammoniumsalze kristallisieren.

Die Mono-kaliumsalze kristallisieren in grossen abgerundeten Prismen.

¹⁾ 2. Mitteilung Helv. **42**, 1696 (1959).

²⁾ G. SCHUDEL, Dissertation ETH, Zürich 1918.

³⁾ A. D. AINLEY & R. ROBINSON, J. chem. Soc. **1937**, 446.

Präparat	Analyse				Äquivalentgewicht 1. Stufe	
	C	H	N	K		
$C_{19}H_{17}O_8N_2K$ Ber.	51,81	3,89	6,36	8,88%	440	
$C_{19}H_{19}O_8N_2K$ Ber.	51,57	4,33	6,33	8,84%	442	
Gemische von	52,02	4,01	6,63	8,3 %	467	
Betanidin und	} Gef. }	51,51	4,05	6,65	8,53%	471
Isobetanidin		51,39	4,43	6,74	8,2 %	494
Reines Betanidin Gef.	51,20	4,41	6,47	8,31%	469	

Ein Gemisch der Mono-ammoniumsalze von Betanidin und Isobetanidin kristallisiert in Büscheln von prismatischen Stäbchen.

Analyse		C	H	N	Äquivalentgewicht
$C_{19}H_{18}O_8N_2 \cdot NH_3$ Ber.		54,41	5,05	10,01%	419
$C_{19}H_{20}O_8N_2 \cdot NH_3$ Ber.		54,15	5,50	9,97%	421
	Gef.	54,34	4,65	9,88%	409

Ein anderes kristallisiertes Präparat des Ammoniumsalzgemisches enthielt 1,41 Äquivalente Ammoniak (Fig. 2).

Analyse		C	H	N	Äquivalentgewichte	
					1. Stufe	2. Stufe
$C_{19}H_{18}O_8N_2 \cdot 1,41 NH_3$ Ber.		53,52	5,25	11,20%	723	177
$C_{19}H_{20}O_8N_2 \cdot 1,41 NH_3$ Ber.		53,27	5,70	11,15%	726	178
	Gef.	53,12	5,25	11,13%	725	196

Die Übereinstimmung der Analysenwerte mit der Bruttoformel $C_{19}H_{18-20}O_8N_2$ ergänzt in präziser Weise unsere Befunde¹⁾ am Betanin ($C_{25}H_{28-30}O_{13}N_2$), dessen Natur als Mono-glucosid somit bestätigt ist²⁾⁴⁾. Der früher von VICKERY *et al.* bestimmte Glucosegehalt⁴⁾ in einem Betanin-Rohpräparat (33,7%) zeigt sich nun, entgegen der Annahme der Autoren, als nahezu korrekt (berechnet 32%). Dies ist auch der Fall für eine Bruttoformel $C_{20}H_{19-23}O_7N_2Cl$, welche AINLAY & ROBINSON³⁾ für ein durch fermentative Zuckerabspaltung erhaltenes amorphes Betanidinpräparat abgeleitet haben.

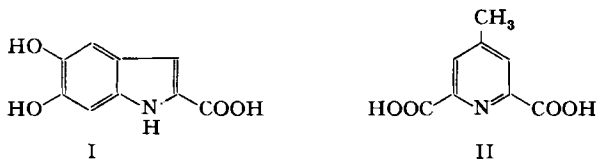
Das Hydrochlorid präsentiert sich als schwarze, das Kalium- und das Ammoniumsalz als bläulich-grün schimmernde Kristallmasse. Wässrige Lösungen der Betanidinpräparate sind violetter und wesentlich unbeständiger als diejenigen des Betanins. Die Absorptionsspektren des Betanidins und des Isobetanidins sind identisch. Die Maxima liegen bei 542–546 $m\mu$ ($\epsilon = 51000$) und bei 271–272 $m\mu$ ($\epsilon = 8530$), eine Schulter findet sich bei 295 $m\mu$ ($\epsilon = 7170$).

Aus der Ähnlichkeit dieser Spektren mit dem Spektrum des Betanins schliessen wir, dass das Chromophor des Farbstoffes bei der Zuckerabspaltung nicht verändert wurde. Unsere Titrations- und Analysenresultate sowie die IR.-Spektren zeigen, dass die Betanidine, wie auch das Betanin¹⁾, zwei Carboxylgruppen, eine schwach saure Gruppe (vielleicht Phenol) und eine basische Gruppe enthalten.

Reines Betanidin sowie reines Isobetanidin lassen sich durch Behandlung mit sauerstofffreiem Alkali ohne erheblichen Farbverlust in ein Gleichgewichtsgemisch von 70% Isobetanidin und 30% Betanidin umwandeln.

Bei der Zinkstaubdestillation des oben beschriebenen kristallinen «Rohbetanidin»-hydrochlorids (68% Betanidin und 32% Isobetanidin) entstanden Indol und 2-Methylindol sowie 4-Methyl- und 4-Äthylpyridin. Die Identifizierung geschah im Mikromaßstab durch Papierchromatographie ihrer Oxydationsprodukte, durch Gas-Chromatographie und durch IR.- sowie UV.-Spektren.

Bei der Alkalischmelze von «Rohbetanidin»-hydrochlorid haben wir, wie auch andere Autoren^{2) 3) 4)}, vergeblich versucht, Phloroglucin oder andere Phenole aufzufinden. Aus einem Alkaliabbau unter sorgfältig kontrollierten Bedingungen gelang es uns, zwei stickstoffhaltige Abbauprodukte, nämlich 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure (I) und 4-Methylpyridin-2,6-dicarbonsäure (II) in Form ihrer Methylester zu fassen. Die Struktur dieser Abbauprodukte wurde durch direkten Vergleich anhand von Smp., UV.- und IR.-Spektren und Rf-Werten mit den Methylestern der authentischen Präparate I⁵⁾ und II⁶⁾ sichergestellt.



Die Abbauprodukte sowie die authentischen Präparate besaßen die folgenden Eigenschaften. 5,6-Dihydroxyindol-2-carbonsäure-methylester: Smp. 255–260° Zers.; UV.-Spektrum in Alkohol, λ_{\max} 211 $m\mu$ ($\epsilon = 25200$) und 320–322 $m\mu$ ($\epsilon = 17800$); Rf in Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5 absteigend 0,74–4-Methylpyridin-2,6-dicarbonsäure-dimethylester: Smp. 129–130°; UV.-Spektrum in Alkohol, λ_{\max} 206 $m\mu$ ($\epsilon = 23400$) und 271 $m\mu$ ($\epsilon = 2950$), Schultern bei 266 $m\mu$ ($\epsilon = 2750$) und 278 $m\mu$ ($\epsilon = 2290$).

Es ist noch nicht bekannt, ob das Indol- und das Pyridin-Ringsystem als solche im Betanidin vorhanden sind, oder ob sie erst während der Behandlung mit Alkali entstehen. Da sich bei dem von uns ausgeführten Alkaliabbau unter gewissen Bedingungen auch Ammoniak⁷⁾ (aber kein Methylamin^{2) 8)}) bildet, kann angenommen werden, dass mindestens eines dieser Ringsysteme entweder überhaupt nicht oder dann in oxydierter oder reduzierter Form im Betanidin vorkommt. Weitere Versuche werden zeigen, ob ein Teil des Chromophors im Betanidin einer chinoiden Form des Dihydroxy-indolsystems, ähnlich wie es beim Adrenochrom⁹⁾ vorkommt, zuzuschrei-

⁴⁾ G. W. PUCHER, L. C. CURTIS & H. B. VICKERY, *J. biol. Chemistry* **123**, 61 (1938).

⁵⁾ H. S. MASON, *J. biol. Chemistry* **172**, 83 (1948); W. L. DULIERE & H. S. RAPEL, *Biochem. J.* **24**, 239 (1930); R. J. S. BEER, L. McGRATH, A. ROBERTSON & A. B. WOODIER, *J. chem. Soc.* **1949**, 2061.

⁶⁾ W. MATHES & W. SAUERMILCH, *Chem. Ber.* **88**, 1276 (1955). Wir danken der Firma Dr. F. RASCHIG GmbH, Ludwigshafen a. Rh., für die freundliche Überlassung eines authentischen Präparates der 4-Methylpyridin-2,6-dicarbonsäure.

⁷⁾ O. TH. SCHMIDT & W. SCHÖNLEBEN, *Z. Naturforsch.* **12b**, 262 (1957).

⁸⁾ R. G. PETERSON & M. A. JOSLYN, *Nature* **182**, 45 (1958).

⁹⁾ D. E. GREEN & D. RICHTER, *Biochem. J.* **31**, 596 (1937); J. HARLEY-MASON, *J. chem. Soc.* **1950**, 1276.

ben ist. Die beiden wahrscheinlich aus verschiedenen Molekelteilen stammenden Abbauprodukte I und II würden 17 der 19 Kohlenstoffe des Betanidins repräsentieren.

Bei den ersten Versuchen über den Alkaliabbau sind Herr Dr. G. VINCENTI und Herr E. WETH beteiligt gewesen.

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

Two aglucones of betanin, called betanidin and *isobetanidin*, are described. Empirical formulas ($C_{19}H_{18-20}O_8N_2$) and certain structural features are deduced for them. Degradations of the aglucones are shown to yield indole and pyridine compounds.

Zürich, Chemisches Institut der Universität

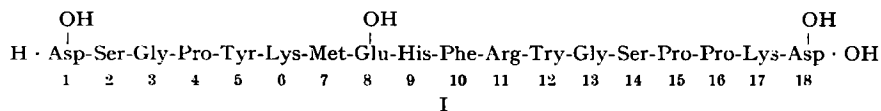
184. Synthese und biologische Aktivität von geschützten Polypeptidsequenzen des β -Melanophoren-stimulierenden Hormons (β -MSH) des Rindes

Vorläufige Mitteilung¹⁾

von R. Schwyzer, H. Kappeler, B. Iselin, W. Rittel und H. Zuber

(20. VI. 59)

Die Konstitution des β -MSH des Rindes ist nach GESCHWIND, LI & BARNAFI²⁾ die des Oktadekapeptides I. Das Rinder- β -Melanotropin unterscheidet sich von demjenigen des Schweines³⁾ durch den Ersatz der zweiten Aminosäure (Glu im letzteren) durch Serin.



Nachdem wir festgestellt hatten, dass natürliches β -MSH⁴⁾ durch die Behandlung mit Natrium in flüssigem Ammoniak nur geringfügige Abschwächung der Wirkung (und andere Veränderungen) erleidet, schritten wir zur Synthese eines Derivates des Oktadekapeptides I mit solchen Schutzgruppen (Carbobenzoxy- an N^α des Asp¹

¹⁾ Vorgetragen an der 2. Tagung der Schweiz. Gesellschaft für Biochemie in Zürich am 30. Mai 1959.

²⁾ I. I. GESCHWIND, C. H. LI & L. BARNAFI, J. Amer. chem. Soc. **79**, 1003 (1957).

³⁾ I. I. GESCHWIND, C. H. LI & L. BARNAFI, J. Amer. chem. Soc. **78**, 620 (1956); **79**, 620 (1957); J. I. HARRIS & P. ROOS, Nature **178**, 90 (1956); Biochemical J. **71**, 445 (1959).

⁴⁾ Das Präparat wurde uns in freundlicher Weise von Prof. Dr. C. H. LI (Berkeley) überlassen.