

Experimentelles. – *Aciditätskonstanten:* Sie wurden nach einem früher beschriebenen Verfahren an Mengen zwischen 0,5 und 1,5 mg durch Mikrotitration bei 25° im Lösungsmittelsystem 80 Gew.-Proz. Methylcellosolve/20 Gew.-Proz. Wasser bestimmt⁹⁾42). Die Daten der Verbindungen I bis V (vgl. Tab. 2) sind nach einem analogen Verfahren ermittelt worden und stammen aus der Arbeit von TICHÝ, JONÁŠ & SICHER⁶⁾.

Carbonsäuren: Die untersuchten Säuren sind uns freundlicherweise überlassen worden (vgl. Tab. 2, letzte Kolonne). Sie gelangten ohne zusätzliche Reinigung zur Messung.

Wir danken aufrichtig für die Überlassung von Proben (vgl. Tab. 2). Der eine von uns (V. P. A.) dankt dem CIBA FELLOWSHIP TRUST für die Gewährung eines CIBA POSTDOCTORAL FELLOWSHIP.

SUMMARY

A simple rule for the estimation of acidity constants of cyclohexane-carboxylic acids is given. It may be used in the determination of the structure and conformation of these acids.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich

42) W. SIMON, E. KOVÁTS, L. H. CHOPARD-DIT-JEAN & E. HEILBRONNER, *Helv.* 37, 1872 (1954).

189. Zur Struktur des Betanidins

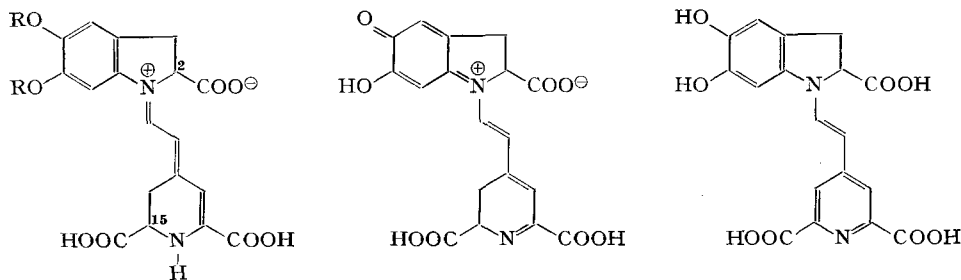
6. (vorläufige) Mitteilung¹⁾²⁾

Über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin

von H. Wyler, T. J. Mabry³⁾ und Andre S. Dreiding

(6. VI. 63)

Vor Jahresfrist haben wir die Struktur des Neobetamidins (IV), eines Umwandlungsproduktes von Betanidin, aufgeklärt und aus einem Vergleich der Protonenresonanzspektren gewisse Schlüsse auf die Struktur des Betanidins selbst gezogen²⁾.



I R = H, Betanidin, $C_{18}H_{18}O_8N_2$
II R = CH_3CO , Di-O-acetylbetanidin

III $C_{18}H_{14}O_8N_2$

IV Neobetamidin, $C_{18}H_{14}O_8N_2$

1) Ein Teil der hier beschriebenen Resultate wurde von H. WYLER und A. S. DREIDING an der 142. Versammlung der Schweizerischen Naturforschenden Gesellschaft am 8. IX. 1962 in Ftan-Scuol-Vulpera vorgetragen; *Chimia* 17, 23 (1963).

2) 5. Mitteilung; *Helv.* 45, 640 (1962).

3) Stipendiat des National Cancer Institute, United States Public Health Service, 1960/61.

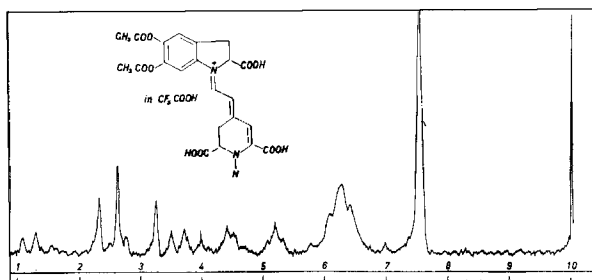
Es wurden zwei Strukturen, nämlich ein Catecholsystem I ($C_{18}H_{16}O_8N_2$) und ein Chinonsystem (Aminochromsystem) III ($C_{18}H_{14}O_8N_2$) zur Diskussion gestellt, zwischen denen das Protonenresonanzspektrum in Ermangelung adaequater Modellsubstanzen nicht unterscheiden konnte.

Es ist uns nun gelungen nachzuweisen, dass Betanidin zwei Hydroxylgruppen besitzt, so dass die Chinonformel III eindeutig auszuschliessen ist. Bei einer kurzen Behandlung von Betanidin mit Acetylchlorid in Trifluoressigsäurelösung entstand Di-O-acetylbetanidin (II), welches sich durch präparative Elektrophorese reinigen und anschliessend als partielles Kaliumsalz kristallisieren liess.

$C_{22}H_{19,7}O_{10}N_2K_{0,3}$ (483.81)	Ber. C 54,61	H 4,10	N 5,79	CH_3CO 17,79	K_2O 2,92 %
	Gef. „ 54,81	„ 4,08	„ 5,87	„ 17,24	Asche 2,79 %

Für die Unversehrtheit der Betanidinstruktur im Diacetylderivat zeugen zwei Umstände: a) Bei der Hydrolyse mit starker Salzsäure wurde das Ausgangsmaterial Betanidin zurückerhalten, und b) das Protonenresonanzspektrum des Diacetats II in Trifluoressigsäure (Figur) zeigte, abgesehen vom neuen Singlett der sechs Acetylprotonen ($\tau = 7,52$) und einer erwarteten leichten Verschiebung der Singlette der den Acetoxygruppen benachbarten aromatischen Protonen, praktisch dasselbe Bild wie dasjenige²⁾ des Betanidins. Diacetylbetanidin löst sich in Wasser mit himbeerroter Farbe. Die Lösung zeigt ein Absorptionsmaximum bei 522–524 $m\mu$ ($\epsilon = 48000$). In verdünnten neutralen bis schwach alkalischen Pufferlösungen erweist es sich stabiler als Betanidin.

Betanidin-trimethylester wandelt sich bekanntlich²⁾ mit Acetanhydrid und Pyridin in Diacetylneobetanidin-trimethylester um. Mit Acetylchlorid findet dagegen bloss Acetylierung statt; es entsteht Di-O-acetylbetanidin-trimethylester, dessen Protonenresonanzspektrum sechs Acetylprotonen und die Abwesenheit von Neobetanidin-Derivaten zeigt.



Protonenresonanzspektrum von Di-O-acetylbetanidin (II) in Trifluoressigsäure
Skala in τ -Werten

Wenn das Betanidin die Struktur I besitzt, dann müssen die Umwandlungen in Neobetanidin-Derivate²⁾ Reaktionen oxydativer Natur sein. Als Oxydationsmittel kommt unter anderem der Luftsauerstoff in Frage. Tatsächlich ist die schon längst bekannte Instabilität⁴⁾ des Betanidins bei schwach erhöhtem pH auf eine äusserst grosse Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff zurückzuführen: Eine völlig sauerstoff

⁴⁾ Für Literaturangaben s. A. S. DREIDING, The Betacyanins, a Class of Red Pigments in the Centrospermae, in W. D. OLLIS «Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds». Pergamon Press, 1961.

freie verdünnte Lösung von Betanidin in 0,1M Kaliumacetat zeigte nach 19 Stunden noch 89% der ursprünglichen Absorptionsintensität bei 540 m μ , während eine gleiche Lösung an der Luft schon nach 2 Stunden zu mehr als 60% zersetzt war.

Die Empfindlichkeit des Betanidins gegenüber Sauerstoff scheint am Catecholsystem zu liegen: Die Absorptionsspektren von Betanin und von Di-O-acetylbetanidin bei pH 7 blieben auch in Gegenwart von Luft während 3 Stunden zu 95%, resp. 85% stabil. Die präzise Klärung der oxydativen Umwandlungen des Betanidins bedarf noch weiterer Studien.

PIATELLI & MINALE⁵⁾ haben eine wässrige Lösung von Betanidin mit Semicarbazid behandelt und dabei das Auftreten eines Absorptionsspektrums beobachtet, das demjenigen des Semicarbazons des Adrenochroms ähnlich ist. Sie schlossen daraus, dass das Betanidin ein Semicarbazon bildete und dass der Farbstoff deshalb ein Aminochrom-Chromophor enthalten müsse (unsere Formel III). Wir finden, dass auch in diesem Fall die Luftoxydation eine Rolle spielt: In unseren Händen entstand das erwähnte Spektrum nur in der Gegenwart von Luft. Das Experiment von PIATELLI & MINALE lässt deshalb keine strukturelle Schlussfolgerung zu. In der Tat handelt es sich bei dem sogenannten «Semicarbazon des Betanidins»⁵⁾ wahrscheinlich um das Semicarbazon des Dopachroms, welches durch Luftoxydation des Betanidin-Spaltproduktes entstanden sein kann. Wir konnten das gleiche Produkt durch Behandlung von 5,6-Dihydroxy-2,3-dihydro-indol-2-carbonsäure mit Semicarbazid in Gegenwart von Luft erhalten und spektroskopisch sowie auch elektrophoretisch und chromatographisch charakterisieren und vergleichen.

Die optische Aktivität des Betanidins in Kaliumacetat-Essigsäure-Puffer (pH 4,5) wurde schon von SCHMIDT, BECHER & HÜBNER⁶⁾ als $\alpha_{680}^{25} = +530^{\circ} \pm 50^{\circ}$ beschrieben. Für die optische Drehung von Isobetanidin finden wir im selben Lösungsmittel $\alpha_{680}^{22} = -840^{\circ} \pm 60^{\circ}$. Wir haben nun auch die Rotationsdispersionskurven von Betanidin und Isobetanidin im Acetatpuffer gemessen: Die beiden Aglykone zeigen multiple COTTON-Effekt-Kurven⁷⁾. Beim Hauptabsorptionsmaximum (540 m μ) ist der COTTON-Effekt von Betanidin positiv⁷⁾, der von Isobetanidin negativ; die Amplituden sind ungefähr vergleichbar.

Sowohl Betanidin wie auch Isobetanidin lassen sich mit Diazomethan in den schon bekannten²⁾ Di-O-methyl-neobetanidin-trimethylester umwandeln, der aus beiden Reaktionen stammend jeweils die gleiche Rotationsdispersionskurve mit einem negativen COTTON-Effekt bei 310 m μ aufweist. Betanidin und Isobetanidin besitzen demnach dieselbe Konfiguration am C-2. Für dieses Zentrum haben wir die S-Konfiguration (V) abgeleitet: Es gelang nämlich, die aus dem Alkaliabbau des Betanidins erhaltene⁸⁾ optisch aktive 5,6-Dihydroxy-2,3-dihydro-indol-2-carbonsäure (V, R = H) als Triacetylderivat des Methylesters aus L-Dopa zu synthetisieren⁹⁾.

⁵⁾ M. PIATELLI & L. MINALE, Rend. Accad. Scienze Fisiche Matematiche Soc. Nat. Scienze, Lettere Arti Napoli, Serie 4, 29, 80 (1962).

⁶⁾ O. TH. SCHMIDT, P. BECHER & M. HÜBNER, Chem. Ber. 93, 1296 (1960).

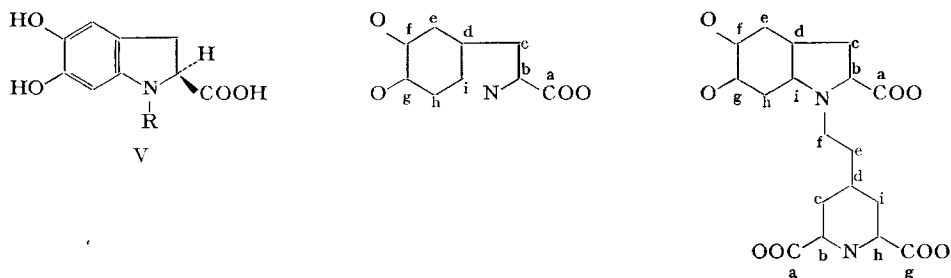
⁷⁾ Nach der Nomenklatur von C. DJERASSI, Optical Rotatory Dispersion, McGraw Hill, 1960, S. 14.

⁸⁾ H. WYLER & A. S. DREIDING, Helv. 45, 638 (1962).

⁹⁾ Diese Synthese wird in einer späteren Publikation beschrieben werden. In der früheren Publikation⁸⁾ wurde die optische Drehung dieses Abbauproduktes irrtümlicherweise als $-6,7^{\circ}$ angegeben. Der richtige Wert ist -67° .

Es bleibt noch abzuklären, ob sich Betanidin und Isobetanidin gemäss Struktur I nur in der Konfiguration am C-15 unterscheiden. Dafür sprechen zwei Beobachtungen: 1) Betanidin und Isobetanidin sind, besonders unter dem Einfluss von Alkali (ohne Luft), leicht ineinander umwandelbar. 2) Das Protonenresonanzspektrum des reinen Isobetanidins in Trifluoressigsäure unterscheidet sich fast nicht von demjenigen²⁾ des Betanidins.

Zum Schluss sei uns noch erlaubt, eine mögliche Biogenese der Betacyane, deren Grundkörper das Betanidin ist¹⁰⁾, zur Diskussion zu stellen: Die Strukturformel I ($C_{18}N_2$) lässt sich formell aus den Elementen von zwei Dopa-Molekeln (C_9N) in der hier angegebenen Weise aufbauen; in der unteren Hälfte muss man eine Spaltung zwischen den Kohlenstoffen f und g¹¹⁾, sowie auch einen Ringschluss zwischen dem Stickstoff und dem Kohlenstoff h annehmen.



Diese Erwägungen sind von Interesse, da die Betacyane in gewissen Familien der Centrospermen-Pflanzen den Platz und die Funktion der strukturell so verschiedenen Anthocyane einzunehmen scheinen⁴⁾¹⁰⁾, so dass man an eine Abwandlung der biogenetischen Wege denken könnte.

Die Kernresonanzspektren wurden in verdankenswerter Weise von Herrn INDU PARIKH an unserem Institut, die Rotationsdispersionskurven von Herrn Dr. TH. BÜRER am Physikalisch-chemischen Institut der ETH aufgenommen.

Für die grosszügige Unterstützung dieser Arbeit danken wir dem SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG und der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. Die Anschaffung gewisser Apparaturen verdanken wir der Jubiläumsspende für die Universität Zürich. – T. J. MABRY dankt der AMERICAN-SWISS FOUNDATION FOR SCIENTIFIC EXCHANGE für eine Reiseentschädigung im Jahre 1960,

SUMMARY

A choice between structures I and III for betanidin is now possible in favour of I on the basis of the formation of a well-characterized di-O-acetyl derivative (II). The instability of betanidin and its ready transformation into other products at elevated pH's are shown to be due to its sensitivity to atmospheric oxygen. Betanidin and Isobetanidin have the same (namely S) configuration at C-2 and may differ only in the configuration at C-15. A possible biogenetic path is proposed.

Zürich, Organisch-chemisches Institut der Universität

¹⁰⁾ H. WYLER & A. S. DREIDING, *Experientia* 17, 23 (1961).

¹¹⁾ Ähnliche Spaltungen wurden bei der Biogenese von gewissen Alkaloiden in Erwägung gezogen. Siehe u. a.: R. B. WOODWARD, *Nature* 162, 155 (1948); *Angew. Chem.* 68, 13 (1956); E. WENKERT, *Experientia* 15, 165 (1959); E. WENKERT & N. V. BRINGI, *J. Amer. chem. Soc.* 81, 1474 (1959); A. R. BATTERSBY, *Quart. Rev.* 15, 259 (1961).