

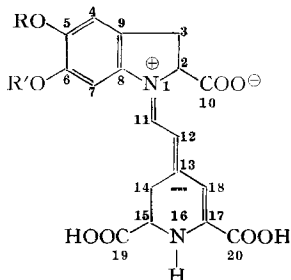
24. Die Struktur des Betanins¹⁾7. Mitteilung²⁾

Über die Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin.

von M. E. Wilcox, H. Wyler, T. J. Mabry³⁾ und André S. Dreiding

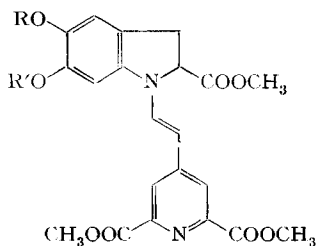
(7. XII. 64)

Ein erster Hinweis, dass Betanin ein Glykosid ist, ergab sich aus einer Arbeit von HAVERLAND [2], der nach der Hydrolyse eines aus der Kermesbeere isolierten (siehe [3]) Betanin-Präparates ein Phenylsazon vom Smp. 192° herstellte. SCHUDEL [4] fand sowohl jodometrisch wie polarimetrisch in seinem aus der Rande (*Beta vulgaris*, var. *rubra*) isolierten Betanin-Präparat eine Molekel gebundene Glucose. Die quantitative Zuckerbestimmung von PUCHER, CURTIS & VICKERY [5], zusammen mit den Elementaranalysen für Betanin (C₂₄H₂₆O₁₃N₂) und Betanidin (C₁₈H₁₆O₈N₂) [6] [7] [8] [9], erlaubten den definitiven Schluss, dass Betanin ein Monoglucosid ist.



- 1 R = R' = H
- 2 R = Glu, R' = H
- 3 R = H, R' = Glu
- 4 R = AcGlu, R' = CH₃CO
- 5 R = CH₃CO, R' = AcGlu

AcGlu = acetylierte β-Glucopyranosid-Gruppe



- 6 R = R' = CH₃
- 7 R = H, R' = CH₃
- 8 R = CH₃, R' = H
- 9 R = CH₃CO, R' = CH₃
- 10 R = CH₃, R' = CH₃CO

Die Haftstelle der Glucose an einer der beiden phenolischen Hydroxylgruppen offenbarte sich aus der Beobachtung, dass Betanin (2 oder 3) bei der Behandlung mit Diazomethan und nachfolgender saurer Hydrolyse einen O-Monomethyl-neobetanidin-trimethylester (7 oder 8) bildete, während aus Betanidin unter den gleichen Bedingungen O, O-Dimethyl-neobetanidin-trimethylester (6) entstand [9].

Diese Schlussfolgerungen liessen sich nun auch durch die Protonenresonanzspektren von Betanin (2 oder 3) (Figur) und acetyliertem Betanin (4 oder 5) bestätigen:

¹⁾ Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden im Rahmen von zwei Vorträgen (A.S.D.) an der Universität Göttingen und am «Symposium on Recent Advances of Plant Phenolics» in New Delhi am 24. September und 5. Oktober 1964 bekannt gegeben.

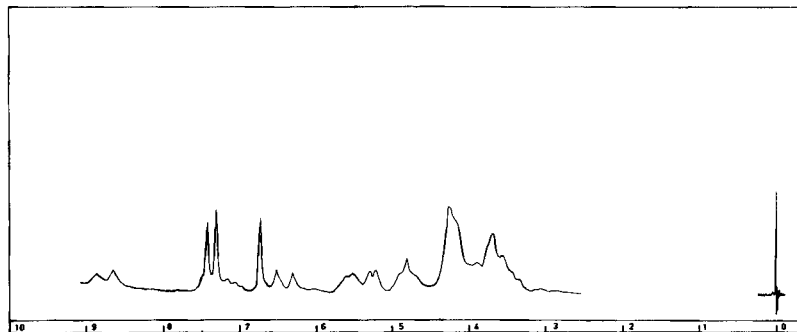
²⁾ 6. Mitteilung siehe [1].

³⁾ Stipendiat des NATIONAL CANCER INSTITUTE, United States Public Health Service, 1960/61. Gegenwärtige Adresse: The Cell Research Institute & Dept. of Botany, Univ. of Texas, Austin, USA.

Im Spektrum des Betanins sieht man die erwarteten Signale eines Monoglucosids, nämlich das 6-Protonen-Multiplett bei $\delta = 4,26$ ppm mit einer Schulter bei 4,18 ppm, und das 1-Proton-Dublett bei 5,26 ppm. Die Ähnlichkeit dieser Signale mit den entsprechenden der Methyl-glucopyranoside und die chemische Verschiebung des H1-Dubletts der Glucosidgruppe ($\delta = 5,26/D$ ($J = 5$ Hz)) lassen vermuten [10], dass es sich beim Betanin um ein β -Glucopyranosid handelt. (α -Methyl-glucopyranosid in CF_3COOH zeigt für H1: $\delta = 5,01/D$ ($J = 3$ Hz), das β -Anomere jedoch: $\delta = 5,33/D$ ($J = 8$ Hz).) Dies wird durch einen enzymatischen Hydrolyseversuch bekräftigt: Betanidin entsteht ungefähr 4mal so schnell mit Emulsin als mit einem Cellulase-Rohpräparat⁴⁾. Das Protonenresonanzspektrum des acetylierten Betanins zeigt ein 3-Protonen-Singlett bei $\delta = 2,43$ ppm, was für die Gegenwart von nur einer acetylierbaren phenolischen Hydroxylgruppe in Betanin (**2** oder **3**) spricht.

Dass die für das Betanidin (**1**) abgeleitete Struktur [1] [9] auch im Detail für das Betanin (**2** oder **3**) gilt, d. h. dass die saure oder enzymatische Hydrolyse der Glucose keine Strukturveränderung mit sich brachte, war schon aus der grossen Ähnlichkeit der Chromophore von Glucosid (λ_{max} 536–538 nm⁵⁾/ $\epsilon = 60500$ [6] [9] [11]) und Aglucosin ($\lambda_{\text{max}} = 542\text{--}546$ nm/ $\epsilon = 49400$ [7] [9]) zu vermuten. Ein Vergleich der Protonenresonanzspektren von Betanidin [9] und seinem Glucosid (siehe Figur) demonstriert nun eindeutig, dass dies der Fall ist: Alle für das Betanidin charakteristischen Signale sind, bei analoger Feldstärke, mit gleicher Multiplizität und relativer Intensität auch im Spektrum des Betanins aufzufinden. Einzig die Resonanz eines der Aromatenprotonen ist, vermutlich unter dem Einfluss des benachbarten Glucosidrestes, gegen tiefere Feldstärke verschoben (von $\delta = 7,07$ nach 7,31 ppm).

Es bleibt nun nur noch festzustellen, an welcher der beiden phenolischen Hydroxylgruppen (in Stellung 5 oder 6) der Glucosidrest haftet. Zu diesem Zweck haben wir den oben erwähnten O-Monomethyl-neobetanidin-trimethylester (**7** oder **8**) acetyliert und das sorgfältig gereinigte Monoacetylderivat (**9** oder **10**) mit 10-proz. Kali-



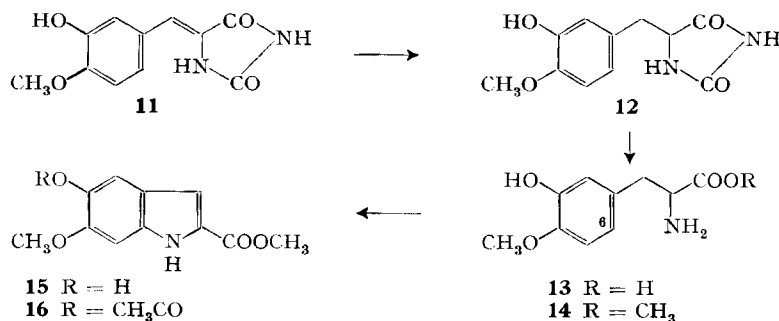
Protonenresonanzspektrum von Betanin (**2**) in Trifluoressigsäure
Skala in δ -Werten⁶⁾

- ⁴⁾ Die enzymatische Hydrolyse wurde zum Teil von Dr. CH. WEISSMANN in diesem Laboratorium ausgeführt. Schon SCHMIDT, BECHER & HÜBNER [8] haben die Hydrolyse mit Hefe beschrieben.
- ⁵⁾ Den neuen IUPAC-Regeln entsprechend wird in den Helvetica chimica Acta ab 1965 die bisherige Bezeichnung $m\mu$ durch nm (= Nanometer) ersetzt.
- ⁶⁾ Wegen des ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnisses wurde das Spektrum dreimal übereinander geschrieben und ist hier als Ausmittelung wiedergegeben.

lauge unter Sauerstoffausschluss abgebaut. Die entstandenen Produkte wurden mit methanolischer Salzsäure verestert und in Gegenwart von wässrigem Natriumhydrogencarbonat mit Kaliumisonitrosodisulfonat («FRÉMY-Salz») oxydiert. Dabei entstand neben dem bekannten [7] 4-Methylpyridin-2,6-dicarbonsäure-dimethylester ein Indolderivat, Smp. 178–180°, das sich im direkten Vergleich (Misch-Schmelzpunkt, Dünnschicht- und Papierchromatographie, UV-, IR.- und NMR.-Spektren) mit 5-Hydroxy-6-methoxy-indol-2-carbonsäure-methylester (**15**) identisch erwies und dessen authentische Synthese wir im nachfolgenden Paragraph beschreiben wollen. Die Vorläufer dieses Alkaliabbaus sind also 5-O-Acetyl-6-O-methyl-neobetanidin-trimethylester (**9**) bzw. 6-O-Methyl-neobetanidin-trimethylester (**7**), und *Betanin ist das 5-O-β-Glucopyranosid des Betanidins (Struktur 2)*⁷⁾.

In Abwandlung einer Methode von DEULOFEU & REPETTO [13] kondensierten wir Isovanillin mit Hydantoin in Gegenwart von Morpholin [14], reduzierten das erhaltene Benzalhydantoin **11** mit Natriumamalgam zum Benzylhydantoin **12** und hydrolysierten dieses zum 3-Hydroxy-4-methoxy-phenylalanin (**13**). Die Oxydation des Methylesters **14** dieses Dopaderivats mit Kaliumisonitrosodisulfonat [15] in einem zweiphasigen System von wässrigem Natriumhydrogencarbonat und Essigester führte glatt zum 5-Hydroxy-6-methoxy-indol-2-carbonsäure-methylester (**15**). Das Produkt schmolz bei 181–182°; in der Carbonylgegend des IR.-Spektrums zeigte sich ein breites Dublett 1690 und 1671 cm^{-1} , welchem wir auch im IR.-Spektrum des 5,6-Dihydroxy-indol-2-carbonsäure-methylesters begegneten. Das Monoacetylderivat **16** unseres Syntheseprodukts (Smp. 225–226°) wie auch der 5,6-Diacetoxy-indol-2-carbonsäure-methylester wiesen in derselben Region des IR.-Spektrums nur ein Singlett auf (1685 cm^{-1}).

Der entscheidende Schritt unserer Synthese, die oxydative Cyclisation, findet ein Vorbild in einer Arbeit von CROMARTIE & HARLEY-MASON [16], welche das 2,5-Dihydroxyphenylalanin durch Oxydation mit Kaliumferricyanid zum 5-Hydroxyindol

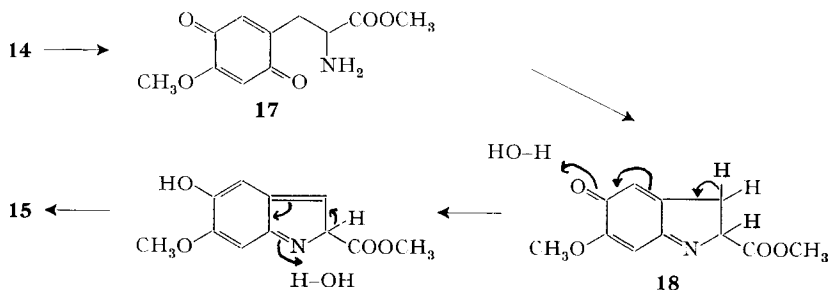


cyclisierten. Die intermediäre Bildung des *p*-Chinons, welche dort ausgehend vom Hydrochinon geschieht, wird in unserem Fall schon ausgehend von einer früheren Oxydationsstufe erreicht. Die Reaktion dürfte den im folgenden Schema aufgezeichneten Verlauf nehmen.

Aus dem Ablauf anderer FRÉMY-Salz-Oxydationen von Phenolen [15] schliessend könnte man ein *p*-chinoides Zwischenprodukt **17** erwarten, welches sich entsprechend

⁷⁾ Vor kurzem sind PIATELLI, MINALE & PROTA [12] auf ähnliche Weise zum gleichen Schluss gekommen.

den Erfahrungen von CROMARTIE & HARLEY-MASON [16] zu **18** cyclisieren würde. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass die Reaktion insbesondere deshalb so erfolgreich ist, weil die Aminogruppe den Kohlenstoff-6 intramolekular schon in einer interme-



diären Oxydationsstufe angreifen kann. Die Heranziehung von FRÉMY-Salz als Oxydationsmittel bereichert auf alle Fälle die Möglichkeiten oxydativer Cyclisationsreaktionen zur Synthese von 5-Hydroxyindolen⁸).

Diese Arbeit wurde vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTLICHEN FORSCHUNG unterstützt. Wir danken auch der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co AG, Basel, für eine Unterstützung, insbesondere für die Isolierung des hier gebrauchten Betanins.

Experimenteller Teil

Die Smp. wurden auf einem LEITZ-Mikroskop-Heiztisch beobachtet und sind unkorrigiert. Die IR.-Spektren wurden in KBr aufgenommen. Die Signale der NMR.-Spektren (aufgenommen mit dem VARIAN-A60-Spektrometer) sind hier in der folgenden Weise beschrieben: NMR. (Lösungsmittel): δ -Wert in ppm/Multiplizität (Aufspaltung in Hertz), Anzahl der Protonen Pr (Zuordnung). Die δ -Werte beziehen sich auf internes Tetramethylsilan ($\delta = 0$). Im Falle eines Multipletts ist der δ -Wert des arithmetischen Mittelpunktes (scheinbare chemische Verschiebung) angegeben; die Multiplizität wird durch folgende Symbole ausgedrückt: *S* = Singlett, *D* = Dublett, *T* = Triplett, *M* = Multipllett; ein dem Symbol vorangehendes *b* bedeutet, dass das entsprechende Signal aus verbreiterten Linien besteht.

Die Elementaranalysen und IR.-Spektren stammen aus dem Mikrolaboratorium dieses Institutes (Leitung H. FROHOFER). – Einige der NMR.-Spektren wurden in verdankenswerter Weise von den Herren PD Dr. W. v. PHILIPSBORN und INDU PARIKH aufgenommen.

1. NMR.-Spektren von Betanin und acetyliertem Betanin. – NMR.-Spektrum von *Betanin* in CF_3COOH : 8,75/*D* ($J = 12,5$), 1 Pr (H11); 7,41/*S*, 1 Pr (H7); 7,31/*S*, 1 Pr (H4); 6,74/*S*, 1 Pr(H18); 6,41/*D* ($J = 12,5$), 1 Pr (H12); 5,55/*bM*, 1 Pr(H2); 5,26/*D* ($J = 5$), 1 Pr (H1 an Glucopyranosyl); 4,80/*bM*, 1 Pr (H15); 4,26–4,18/*bS*, 6 Pr (CH u. CH_2 an Glucopyranosyl); 3,68/*bM*, 4 Pr (2H3 u. 2H14).

Acetyliertes Betanin: Zu 120 mg elektrophoretisch reinem Betanin-Kaliumsalz wurden im Hochvakuum 5 ml CF_3COOH destilliert. Nach dem Lösen der Substanz destillierte man 0,5 ml Acetylchlorid dazu. Die violette Lösung verfärbte sich in kurzer Zeit himbeerrot. Nach 10 Min. wurde zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wurde in 20 ml Kaliumacetat-Essigsäure-Puffer pH 4,5 (5 g Kaliumacetat und 3,5 ml Eisessig/l) suspendiert und filtriert. Das feste Material löste man in einem Gemisch von 10 ml Puffer und 0,5 ml 0,5*N* KOH und brachte die Farbblösung auf eine Papierelektrophoresensäule (2,6 × 83 cm; 100 g Papierpulver). Die himbeerfarbene, auf 13 cm verbreiterte Zone des acetylierten Betanins (λ_{max} 525 nm), welche in kurzem Abstand einer vorgelagerten schwach rotorangen Zone in Richtung zur Anode folgte, wanderte in 26 Std. bei 1000 V und 55 mA 60 cm und wurde nach dem Eluieren auf 5 ml eingengt. Das Konzentrat (pH 5) wurde durch tropfenweise Zugabe von 1:1 konz. HCl-Wasser unter Eiskühlung bis zum Auftreten einer

⁸) Für eine Zusammenfassung solcher Reaktionen siehe [17].

Fällung (pH 2,98) angesäuert (Säureverbrauch 1,3 ml). Das filtrierte, mit 0,5 ml Wasser gewaschene und getrocknete Material wog 16 mg. Aus der Mutterlauge liessen sich durch weiteres Ansäuern (0,4 ml Säure) noch 19 mg Substanz gewinnen. Wanderungseigenschaften (Werte rel. zu Betanin): Papierelektrophorese: 0,05 M Pyridiniumformiat $E_B = 0,95$ (pH 4,5), 0,1 M Ameisensäure $E_B = 1,01$ (pH 2,4); Papierchromatogramm: 0,05 M Pyridiniumformiat $R_B = 1,08$, 0,1 M Ameisensäure $R_B = 0,92$. – UV. (Methanol): λ_{max} 525 nm (himbeerrot, $\epsilon = 62000$). – NMR. (CF_3COOH): 8,78/D ($J = 12,5$), 1 Pr (H11); 7,57/S, 1 Pr (H7); 7,33/S, 1 Pr (H4); 6,74/S, 1 Pr (H18); 6,41/D ($J = 12,5$), 1 Pr (H12); weitere Signale 5,56/bS; 4,48/bM; 3,72/bM; 2,43/S, 3 Pr (CH_3COO an C6); 2,28/bS (Acetyl- CH_3).

$C_{34}H_{35,8}O_{18}N_2K_{0,2} \cdot 1H_2O$	Ber. C 51,93	H 4,84	N 3,56	K 0,99%
	Gef. „ 51,70	„ 4,84	„ 3,70	„ 0,86%

2. Abbau von Betanin. – 6-O-Methyl-neobetandin-trimethylester («Tetramethyl-neobetandin») (7): Zu 670 mg Betanin (ca. 62-proz.) in 100 ml trockenem Methanol destillierte man unter lang samem N_2 -Strom Diazomethan aus 12 g *p*-Tolylsulfonyl-methylnitrosamid. Die filtrierte orangefarbene Reaktionslösung wurde eingedampft. Der ölige Rückstand wurde in 25 ml 1 N HCl-Methanol aufgenommen; nach dem Gefrieren bei der Temperatur flüssiger Luft evakuierte man das Gefäss auf 0,005 Torr. Bei geschlossenem Gefäss wurde 3 Std. auf 50° erhitzt. Das beim Eindampfen erhaltene ölige Produkt wurde mit Methylenechlorid an säuregewaschenem Aluminiumoxid (Akt. 2, 3% Wasser enthaltend) chromatographiert. Die erste, gelbe Fraktion (65 mg) kristallisierte beim Bespritzen mit Methanol und wurde aus Methylenechlorid-Methanol umkristallisiert: Smp. 165–168°. – UV. (Methanol): λ_{max} 407 (29200), 320 (5500), 268 (7700) nm (ϵ). (0,1 N HCl in Methanol): λ_{max} 519 (36500), ca. 320 (5000), 260–270 (13000) nm (ϵ). – NMR. ($CDCl_3$): 8,07/S 1 Pr (H14 u. H18); 7,72/D ($J = 14$), 1 Pr (H11); 6,77/S, 1 Pr (H7 od. H4); 6,60/S, 1 Pr (H4 od. H7); 5,33/D ($J = 14$), 1 Pr (H12); 4,78/DD ($J = 10$ u. 5), 1 Pr (H2); 4,03/S, 6 Pr (OCH_3 an C19 u. C20); 3,98/S, 3 Pr (OCH_3 an C6); 3,80/S, 3 Pr (OCH_3 an C10); 3,59/DD ($J = 17$ u. 10), 1 Pr (H3 α); 3,09/DD ($J = 17$ u. 5), 1 Pr (H3 β).

5-O-Acetyl-6-O-methyl-neobetandin-trimethylester («Acetyl-tetramethyl-neobetandin») (9): Das rohe Hydrolysegemisch eines wie oben beschriebenen Ansatzes aus 1 g Betanin (150 ml Methanol, 18 g *p*-Tolylsulfonyl-methylnitrosamid) wurde in üblicher Weise (Acetanhydrid-Pyridin) acetyliert. Chromatographie des Produktes an säuregewaschenem Aluminiumoxid mit Methylenechlorid ergab in der ersten, gelben Fraktion 118 mg mit Methanol kristallisierendes Material; aus Methylenechlorid-Methanol umkristallisiert, hellgelbe Nadeln (65 mg), Smp. 239–240°. – UV. (Methanol): λ_{max} 393 (34500), 311 (7700), 263 (16300), 223 (25000) nm (ϵ); (0,1 N HCl in Methanol): λ_{max} 496 (45300), 306 (6200), 260–270 (16000) nm (ϵ). – NMR. ($CDCl_3$): 8,11/S, 2 Pr (H14, H18); 7,73/D ($J = 14$), 1 Pr (H11); 6,82/S, 1 Pr (H7 od. H4); 6,63/S, 1 Pr (H4 od. H7); 5,42/D ($J = 14$), 1 Pr (H12); 4,80/DD ($J = 10$ u. 5), 1 Pr (H2); 4,03/S, 6 Pr (OCH_3 an C19 u. C20); 3,89/S, 3 Pr (OCH_3 an C6); 3,80/S, 3 Pr (OCH_3 an C10); 3,59/DD ($J = 17$ u. 10), 1 Pr (H3 α); 3,09/DD ($J = 17$ u. 5), 1 Pr (H3 β); 2,32/S, 3 Pr (CH_3COO an C5).

$C_{24}H_{24}O_9N_2$	Ber. C 59,50	H 4,99	N 5,78	OCH_3 25,62	CH_3CO 8,88%
	Gef. „ 59,71	„ 5,15	„ 5,72	„ 25,66	„ 9,03%

Alkaliabbau von 5-O-Acetyl-6-O-methyl-neobetandin-trimethylester (9): Ein Gemisch von 0,095 g 9 und 7 ml Wasser wurde durch wiederholtes Gefrieren und Auftauenlassen im Hochvakuum (0,005 Torr) «entgast». Dann wurde das Gemisch wieder eingefroren, das Gefäss geöffnet und nach Einwerfen der bereitgehaltenen 0,64 g KOH wieder evakuiert. Die durch Auftauen erhaltene Alkalilösung erhitzte man 8 Std. auf 70–80°. Die schwach gelbe Lösung wurde wieder gefroren bevor man das Gefäss öffnete und die vorausgerechnete Menge von 4 ml 2,66 N Schwefelsäure zugab. Beim Auftauen nahm die Lösung eine rötliche Farbe an. Nach dem Eindampfen zur Trockne wurden 12 ml 1 N HCl in Methanol zugegeben und das zuvor gefrorene, auf 0,005 Torr evakuierte Gemisch im geschlossenen Gefäss 4 Std. auf 60–70° erhitzt. Das Veresterungsprodukt löste man in Wasser und pufferte mit Natriumhydrogencarbonat auf pH 7; dieser Lösung fügte man 0,2 g Kaliumisonitrosodisulfonat [15], gelöst in 5 ml SÖRENSEN-Phosphatpuffer pH 8, bei. Nach 2 Min. gab man Essigester hinzu und rührte; nach weiteren 5 Min. wurde 0,5 g Natriumdithionit eingegeben, die organische Schicht über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Der in Methylenechlorid aufgenommene Rückstand wurde dreimal mit 3 N HCl ausgezogen. Das Material der organischen Phase sublimierte man im Hochvakuum (0,005 Torr). Bei 90–105° erhielt man 4-Methylpyridin-

2,6-dicarbonsäure-methylester (6 mg) vom Smp. 122–124°, Misch-Smp. mit authentischem Material (Smp. 126–127°) ohne Depression. Weitere Sublimation bei 145–160° brachte ein gelblich kristallines Produkt, Smp. 165–170°, dessen Smp. durch dreimal wiederholte Sublimation auf 178–180° verbessert wurde (2 mg). Durch folgende Tests wurde dieses Abbaumaterial mit synthetischem 5-Hydroxy-6-methoxy-indol-2-carbonsäure-methylester (**15**) identifiziert: Misch-Smp. 178–180°; auf Silicagel-Dünnschichtplatte (Laufmittel Methylenchlorid-Methanol 19:1) und auf dem Papierchromatogramm (Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:5, $R_f = 0,85$) zeigten die im UV.-Licht blau fluoreszierenden Vergleichsproben gleiche Laufstrecken.

UV. (Alkohol): λ_{max} 255 nm (Schulter, $\epsilon = 1450$), 314 nm ($\epsilon = 4100$); (Alkohol-NaOH): λ_{max} 310 nm ($\epsilon = 4900$), 363 nm ($\epsilon = 2900$). – IR. deckungsgleich mit Spektrum von **15**. – NMR. ($(CD_3)_2SO$): 8,65/S, 1 Pr (HO6); 6,93/S, 2 Pr (H4 u. H7); 6,88/S, 1 Pr (H3); 3,80/S, 6 Pr (CH_3O und CH_3OOC).

Fermentative Zuckerabspaltung aus Betanin. – a) *Mit Emulsin*: 1 mg Betanin in 1 ml Acetatpuffer (3,95 g Na-acetat, 3,0 g Eisessig, 20 ml 1N NaOH/l) wurde bei 38° mit einer Spatelspitze Emulsin inkubiert. Alle 10 Min. wurden Tupfproben auf WHATMAN-Papierstreifen Nr. 1 gebracht und getrocknet. Als Laufmittel des Chromatogramms diente 0,1M Ameisensäure; bereits 15 Min. Laufdauer genügte, um den rotvioletten Betaninfleck vom violetten, neu gebildeten Betaninfleck abzutrennen. Eine rohe Schätzung der Farbintensität der Flecke liess erkennen, dass nach 10 Min. ca. 30%, nach 20 Min. ca. 50%, nach 30 Min. 70% und nach 1 Std. über 95% des Betanins hydrolysiert worden waren.

b) *Mit Cellulase*⁹⁾: Dieses Ferment (Rohpräparat) enthielt als wirksamsten Anteil α -Glucosidase. In einem analog wie oben mit Emulsin beschriebenen durchgeführten Versuch betrug nach 1 Std. die Intensitätsabnahme des Betaninflecks zugunsten der Bildung des Betaninflecks erst etwa 30%.

3. Synthese von 5-Hydroxy-6-methoxy-indol-2-carbonsäure-methylester (15). – *3-Hydroxy-4-methoxy-benzalhydantoin (11)*: 8 g Hydantoin, 15 g Isovanillin, 16 ml Glycerin und 4 ml Morpholin wurden 4 Std. auf 160° erhitzt. Das Produkt, das aus dem verflüssigten Gemisch kristallisierte, wurde nach beendeter Reaktion abgesaugt, mit Alkohol gewaschen und getrocknet: 16,7 g (89% d. Th.) **11**, Smp. 270–280°. Aus Eisessig farblose Nadeln, Smp. 277–280°. IR.: ν_{max} 3390, 3145, 3030, 1750, 1714, 1659, 1610, 1580, 1512 cm^{-1} .

$C_{11}H_{10}O_4N_2$ Ber. C 56,45 H 4,29 N 11,95% Gef. C 56,53 H 4,58 N 11,54%

3-Hydroxy-4-methoxy-benzylhydantoin (12) [13]: Eine Lösung von 16,0 g **11** in 50 ml 4N NaOH wurde mit 450 g 2-proz. Natriumamalgam geschüttelt. Das Reduktionsprodukt **12** fiel beim Ansäuern der filtrierten Lösung aus und wurde aus Wasser in feinen Nadeln erhalten, Smp. 194° (Lit.: 194° [13]; Ausbeute 11,5 g (72%)). IR.: ν_{max} 3315, 3160, 1755 und 1724 (Dublett), 1610, 1590, 1521 cm^{-1} .

$C_{11}H_{12}O_4N_2$ Ber. C 55,9 H 5,09 N 11,9% Gef. C 55,83 H 5,02 N 11,92%

3-Hydroxy-4-methoxy-phenylalanin (13) [13]: 10 g **12** und 90 g $Ba(OH)_2$ in 400 ml Wasser wurden 24 Std. unter Rückfluss erhitzt. Nach Neutralisation mit verd. H_2SO_4 auf pH 7 und Entfernung der Fällung wurde die Lösung bis zur Kristallisation des Produkts im Vakuum eingengt: 6,7 g **13** (75%), Smp. 271–272° (Lit.: 272° [13]). IR.: ν_{max} 3340, 3120, 2600, 2040, 1612, 1551, 1527, 1509 cm^{-1} .

3-Hydroxy-4-methoxy-phenylalanin-methylester (14): Der nach der Methode von BRENNER *et al.* [18] mit Methanol-Thionylchlorid veresterte Dopa-methyläther **13** wurde nach 6 Std. Erhitzen unter Rückfluss und Eindampfen der Lösung als nicht kristallines Rohprodukt **14** gewonnen. IR.: ν_{max} 3500–3000, 1742, 1620, 1595, 1531, 1511 cm^{-1} .

$C_{11}H_{16}O_4NCl$ Ber. Cl 13,6% Gef. Cl 13,03%

5-Hydroxy-6-methoxy-indol-2-carbonsäure-methylester (15): Zu einer Lösung von 0,75 g **14** in 80 ml Wasser liess man unter Rühren bei Zimmertemperatur 60 ml Essigester und eine Lösung von 1,54 g Kaliumisotriosulfonat [15] und 0,56 g $NaHCO_3$ einfließen. Nach $1/2$ Std. sättigte man mit NaCl; die organische Phase wurde mit gesättigter Natriumdithionit-Lösung und Wasser gewaschen und über Na_2SO_4 getrocknet. Beim Eindampfen erhielt man 0,43 g **15** (68%); nach

⁹⁾ Dieses Präparat wurde uns in freundlicher Weise von der SCHWEIZ. FERMENT AG in Basel zur Verfügung gestellt.

Sublimation bei 160°/0,005 Torr oder Kristallisation aus Benzol, farblose Nadeln, Smp. 181–182° (Reinausbeute 0,40 g). – UV. (Alkohol): λ_{max} 255 nm (Schulter, $\epsilon = 1400$), 315 nm ($\epsilon = 3980$); (Alkohol–NaOH): λ_{max} 310 nm ($\epsilon = 4860$), 363 nm ($\epsilon = 3070$). – IR.: ν_{max} 3445, 3300, 1690 und 1671 (Dublett), 1640, 1588, 1529, 1499 cm^{-1} . – NMR. (CF_3COOH): 7,2/S, 1Pr, und 7,15/S, 1Pr (H4 oder H7); 6,90/S, 1Pr (H3); 4,05/S, 3Pr, und 3,98/S, 3Pr (CH_3O oder CH_3OOC). NMR. ($(CD_3)_2SO$): 8,60/S, 1Pr (HO–); 7,35/S, 1Pr (HN); 6,92/S, 2Pr (H4 u. H7); 6,81/S, 1Pr (H3); 3,80/S, 6Pr (CH_3O und CH_3OOC).

$C_{11}H_{11}O_4N$ Ber. C 59,85 H 5,02 N 6,35% Gef. C 60,00 H 5,28 N 6,31%

5-Acetoxy-6-methoxy-indol-2-carbonsäure-methylester (**16**): Das in üblicher Weise (Acetanhydrid-Pyridin) aus **15** hergestellte Acetat **16** wurde aus Alkohol umkristallisiert: Smp. 225–226°. – IR.: ν_{max} 3300, 1751, 1685, 1630, 1575, 1531, 1500 cm^{-1} . – NMR. (CF_3COOH): 7,35/S, 1Pr (H4 od. H7); 7,30/S, 1Pr (H7 od. H4); 7,07/S, 1Pr (H3); 4,07/S, 3Pr, und 3,97/S, 3Pr (CH_3O od. CH_3OOC); 2,49/S, 3Pr (CH_3COO).

$C_{13}H_{13}O_5N$ Ber. C 59,45 H 4,98 N 5,32% Gef. C 59,53 H 5,14 N 5,27%

SUMMARY

It is shown that the glucose residue in betanin is attached at the 5-hydroxyl group (structure **2**): Treatment of betanin with diazomethane, acidic hydrolysis and acetylation afforded 5-O-acetyl-6-O-methyl-neobetainidin trimethylester (**9**), which was cleaved by alkali. The cleavage product was esterified with methanol and oxydized by means of FRÉMY salt to 5-hydroxy-6-methoxy-2-methoxycarbonyl-indole (**15**).

The 5-position of the free hydroxy group in this degradation product **15** has been proved by an authentic synthesis, which represents a new and convenient approach to 5-hydroxy-indoles: 4-O-Methyl-dopa methyl ester (**14**) was treated with FRÉMY salt in a system containing aqueous sodium hydrogencarbonate and ethyl acetate. In this way **15** was formed directly, presumably *via* the intermediate *p*-quinone **17** and dopachrome **18**.

The NMR.-spectrum of betanin confirms that the natural pigment **2** is a mono- β -glucopyranoside of betainidin (**1**).

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. WYLER, T. J. MABRY & A. S. DREIDING, *Helv.* **46**, 1745 (1963).
- [2] F. HAVERLAND, «Beiträge zur Kenntnis der in den Früchten von *Phytolacca decandra* enthaltenen Bestandtheile», Dissertation, Erlangen 1892.
- [3] H. WYLER & A. S. DREIDING, *Helv.* **44**, 249 (1961).
- [4] G. SCHUDEL, «Über die Anthocyane von *Beta vulgaris* L. (*var. rapacea* KOCH, *forma rubra* L.) und *Raphanus sativus* L. (*var. radícula* PERS.)», Dissertation ETH, Zürich 1918.
- [5] G. W. PUCHER, L. C. CURTIS & H. B. VICKERY, *J. biol. Chemistry* **123**, 61 (1938).
- [6] H. WYLER, G. VINCENTI, M. MERCIER, G. SASSU & A. S. DREIDING, *Helv.* **42**, 1696 (1959).
- [7] H. WYLER & A. S. DREIDING, *Helv.* **42**, 1699 (1959).
- [8] O. TH. SCHMIDT, P. BECHER & M. HÜBNER, *Chem. Ber.* **93**, 1296 (1960).
- [9] T. J. MABRY, H. WYLER, G. SASSU, M. MERCIER, J. PARIKH & A. S. DREIDING, *Helv.* **45**, 640 (1962).
- [10] L. M. JACKMAN «Applications of NMR-Spectroscopy», Pergamon Press 1959, S. 115.
- [11] H. WYLER & A. S. DREIDING, *Helv.* **40**, 191 (1957).
- [12] M. PIATELLI, L. MINALE & G. PROTA, *Ann. Chimica* **54**, 955 (1964).
- [13] V. DEULOFEU & O. REPETTO, *Anales Soc. españ. Física Quim.* **32**, 159 (1934).
- [14] J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, *Chemistry of the Amino Acids* **3**, 2357 (1961).
- [15] H. I. TEUBER & G. JELLINEK, *Chem. Ber.* **85**, 95 (1952).
- [16] R. I. T. CROMARTIE & J. HARLEY-MASON, *J. chem. Soc.* **1952**, 2525.
- [17] H.-W. WANZLICK, *Angew. Chem.* **76**, 313 (1964).
- [18] M. BRENNER & W. HUBER, *Helv.* **36**, 1109 (1953).