

## 122. Stereochemie von Betanidin und Isobetanidin<sup>1)</sup>

8. Mitteilung<sup>2)</sup>

### Zur Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin

von M. E. Wilcox, H. Wyler und André S. Dreiding

(15. V. 65)

Bei der salzsauren Hydrolyse des Randenfarbstoffes Betanin in der Hitze stellten wir fest, dass nicht ein einheitliches Aglucon, sondern ein kristallines Gemisch zweier Isomeren gleichen Farbcharakters entstanden war [1]. Die beiden Aglucone konnten auf Grund eines wenn auch geringen Wanderungsunterschiedes in der Papierchromatographie mit Pufferlösungen voneinander getrennt werden. Das schneller wandernde Pigment, welches in den erwähnten Hydrolysegemischen mit einem Anteil von ca. 70% überwog, nannten wir Betanidin, das langsamer wandernde Minderheitsprodukt (ca. 30%) bezeichneten wir als Isobetanidin.

Die Zueignung des Isomerieverhältnisses wurde mit dem Verhalten der beiden Aglucone gegenüber Säure und Alkali begründet. Eine Verlängerung der Reaktionszeit bei der Behandlung mit 18-proz. Salzsäure bei 87° bewirkte nämlich eine allmähliche Zunahme des Isobetanidins auf Kosten des Betanidins. Durch eine Milderung der Bedingungen (konz. Salzsäure bei 25°, wie sie SCHMIDT, HÜBNER & BECHER [2] für die Zuckerabspaltung aus Betanin anwendeten) wurde hingegen eine Isomerisierung praktisch vermieden; das unter diesen Bedingungen gewonnene Aglucon enthielt nach unseren Erfahrungen nur ca. 5% Isobetanidin.

Das Ausmass der Isomerisierung in sauerstofffreien alkalischen Lösungen studierten wir in Versuchen mit kleinen Substanzmengen: Aus chromatographisch reinem Betanidin, gelöst in 0,4N Kalilauge, war bei Zimmertemperatur nach 1 Std. ein Gemisch von 47% Betanidin und 53% Isobetanidin, nach 2 Std. ein solches von 33% Betanidin und 67% Isobetanidin entstanden. Längeres Verweilen in Lauge änderte das relative Gewicht der Anteile nur unwesentlich, bedingte aber wegen fortschreitenden Abbaus zunehmenden Materialverlust: Während die Lösung z. B. nach 2 Std. noch ca. 95% des ursprünglichen Farbmateriale enthielt, waren es nach 16 Std. nur noch 46%. Das durch eine solche alkalische Isomerisierung angereicherte und chromatographisch gereinigte Isobetanidin ergab hinwieder durch eine Behandlung mit 0,4N Kalilauge in 2 Std. ein Gemisch von 72% Isobetanidin und 28% Betanidin. Die Einstellung eines Gleichgewichtszustandes ausgehend von jedem der beiden Aglucone dokumentiert hinreichend ihre Isomerie.

Die Zuckerhydrolyse von anderen Betacyanproben, die einer repräsentativen Gruppe von Pflanzen aus allen in Betracht fallenden Centrospermenfamilien mit dieser Pigmentausrüstung entstammten, führte nach unserer Methode stets zu den

<sup>1)</sup> Von A.S.D. im Rahmen von 2 Vorträgen an der Universität Göttingen und am «Symposium on Recent Advances of Plant Phenolics» in New Delhi am 24. 9. bzw. am 5. 10. 64 bekanntgegeben.

<sup>2)</sup> 7. Mitteilung siehe [14].

erwähnten Gemischen von Betanidin und Isobetanidin, so dass wir zur Annahme gelangten, die beiden Isomeren seien die Grundkörper aller Betacyane [3]. Die Existenz von Isomerenpaaren liess sich tatsächlich auch unter den nativen Glycosiden feststellen. In Begleitung des in der roten Rübe überwiegend vorhandenen Betanins ( $E_B = 1,0$ ,  $R_B = 1,0^3$ ) fanden wir in kleinen Mengen das isomere Isobetanin ( $E_B = 0,89$ ,  $R_B = 0,89$ ) und als Trabanten des zu ca. 2% beteiligten Präbetanins ( $E_B = 1,4$ ,  $R_B = 1,2$ ) das isomere Isopräbetanin ( $E_B = 1,3$ ) [4].

Die isomeren Glucoside wanderten in der Papierelektrophorese (400 V) und Papierchromatographie in Pyridiniumformiatpuffer pH 4,5 in charakteristischer Weise als hantelförmiges Fleckenpaar wie die isomeren Betanidine. Die Korrelation des Glucosids Isobetanin mit dem entsprechenden Aglucon Isobetanidin wurde sowohl durch die Beobachtung einer Anreicherung von Isobetanin bei der Alkalibehandlung von Betanin (analog der Isomerisierung von Betanidin in Isobetanidin) als auch neuerdings direkt durch milde salzsaure und enzymatische Hydrolyse von reinem natürlichem Isobetanin<sup>4</sup>) zu Isobetanidin [5] gewährleistet.

Sowohl aus eigenen Untersuchungen [8] als auch aus den Befunden von PIATELLI & MINALE [5] [6] geht hervor, dass die natürlich vorkommenden Betacyane vorwiegend aus Derivaten des Betanidins und nur in geringem Masse aus solchen des Isobetanidins bestehen, so dass das Betanidin den eigentlichen biogenetischen Grundkörper der Betacyane darzustellen scheint.

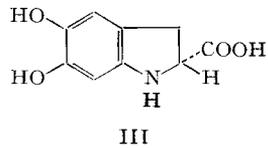
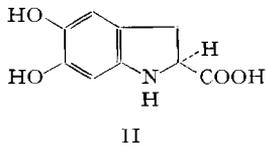
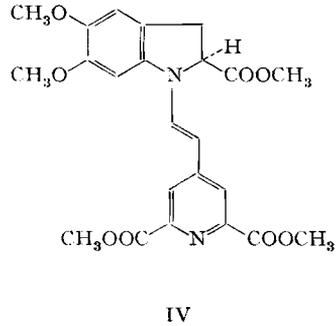
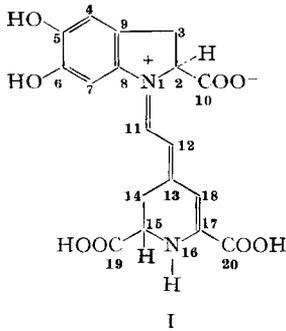
Die Art der Betanidin-Isobetanidin-Umwandlung weist im Prinzip entweder auf Strukturisomerie, auf *cis-trans*-Isomerie oder auf Epimerie hin. Die Tatsache, dass die UV-, IR- und NMR.-Spektren von Betanidin und Isobetanidin praktisch deckungsgleich sind und dass die RÖNTGEN-Pulverdiagramme von reinem Betanidinhydrochlorid und von verschiedenen Gemischen der beiden Hydrochloride dasselbe Muster aufweisen<sup>5</sup>), spricht dafür, dass die gegenseitige Lage der Atome in den beiden Isomeren nicht sehr stark verschieden ist. In der vorgeschlagenen Struktur [9] [10] für das Betanidin (I) bietet sich eine Epimerie als attraktive Möglichkeit an. Diese Annahme wird auch durch die Rotationsdispersionskurven von Betanidin und Isobetanidin gestützt [10], welche multiple COTTON-Effekte mit spiegelbildlichem Charakter in der Region der Hauptabsorptionsbande bei 540 nm aufweisen (Fig. 1, Kurven A und D). Wir sind nun in der Lage, die Epimerie von Betanidin und Isobetanidin zu beweisen und somit die Struktur I für Betanidin zu bestätigen.

Aus der für das Betanidin postulierten Konstitutionsformel I geht hervor, dass C2 und C15 als chirale Zentren ins Spiel treten können. Wir wissen bereits, dass das natürliche Betanidin am C2 die S-Konfiguration besitzt, da bei der Alkalisplaltung

<sup>3</sup>)  $E_B$  &  $R_B$  = relatives Wanderungsbestreben der Substanz in bezug auf Betanin, bei der Papierelektrophorese (E) und bei der Papierchromatographie (R).

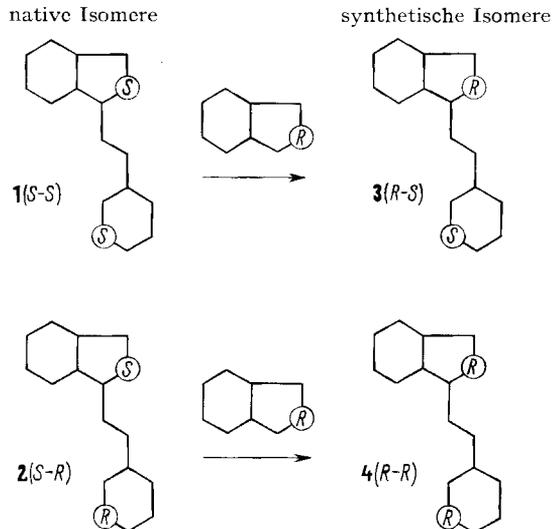
<sup>4</sup>) PIATELLI & MINALE [5] [6] haben zur Isolierung des Isobetanins erfolgreich die schon von SCHMIDT & SCHÖNLEBEN [7] benützte Methode der Chromatographie an Polyamid angewendet. Durch Polyamidchromatographie konnten sie auch solche Betacyane in Isomerenpaare auftrennen, die in der Papierelektrophorese und Papierchromatographie bisher einheitlich schienen (z. B. Amarantin – Isoamarantin).

<sup>5</sup>) Unveröffentlichte Arbeiten. Die Linien der RÖNTGEN-Pulverdiagramme von Betanidin-Isobetanidinhydrochlorid-Gemischen sind lediglich etwas unschärfer als diejenigen des reinen Betanidinhydrochlorids.



S-Cyclodopa (L-Cyclodopa<sup>6)</sup>) (II) entsteht [10]. Isobetandin weist am C2 dieselbe Konfiguration auf, da sowohl Betandin als auch Isobetandin bei der Behandlung mit Diazomethan in dasselbe optisch aktive methylierte Dehydrierungsprodukt IV (Di-O-methyl-2S-neobetandin-trimethylester) umgewandelt werden<sup>7)</sup>. Im Falle einer Epimerie können sich die isomeren Betandine nur in der Konfiguration am C15 unterscheiden, d. h. als absolute Konfiguration von Betandin oder Isobetandin

*Konfigurationschema*

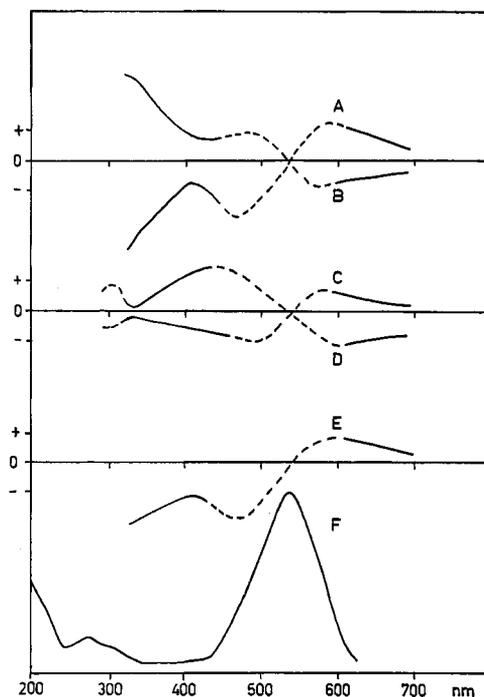


<sup>6)</sup> Cyclodopa ist der von uns gewählte Ausdruck für 5,6-Dihydroxy-2,3-dihydroindol-2-carbonsäure (II und III) [11].

<sup>7)</sup> Die experimentellen Angaben dieser in einer vorläufigen Mitteilung erwähnten Umwandlung [10] sind hier im experimentellen Teil niedergelegt.

kommen die im Konfigurationsschema angedeuteten Möglichkeiten  $S-S$  (1) oder  $S-R$  (2) in Frage<sup>8)</sup>.

Durch die Anwendung des Basenaustauschprinzips, wie wir es für die Synthese von Indicaxanthin gebrauchten [11], ist es möglich, selektiv die Konfiguration an C2 umzukehren, indem das im nativen Betanidin bzw. Isobetanidin eingebaute  $S$ -Cyclodopa (II) durch  $R$ -Cyclodopa (III) ersetzt wird (vgl. Konfigurationsschema). Wir dürfen erwarten, dass bei dieser Operation das native  $S-S$ -Isomere in die  $R-S$ -Verbindung umgewandelt wird, welche enantiomer mit dem anderen nativen  $S-R$ -Isomeren ist. Dieselbe Operation am nativen  $S-R$ -Isomeren sollte zur  $R-R$ -Verbindung führen, welche ihrerseits das Enantiomere der nativen  $S-S$ -Verbindung darstellt. Mit anderen Worten: Aus natürlichem Betanidin sollte das «*enantio-Isobetanidin*» und aus natürlichem Isobetanidin das «*enantio-Betanidin*» entstehen.



Rotationsdispersion der epimeren Aglucone

A Betanidin (VII): ( $S-S$ ) (nativ); B *enantio*-Betanidin: ( $R-R$ ) (synthetisch); C *enantio*-Isobetanidin: ( $R-S$ ) (synthetisch); D Isobetanidin (IX): ( $S-R$ ) (nativ); E Betanidin (aus nativem Indicaxanthin synthetisiert); F Elektronenspektrum von Betanidin.

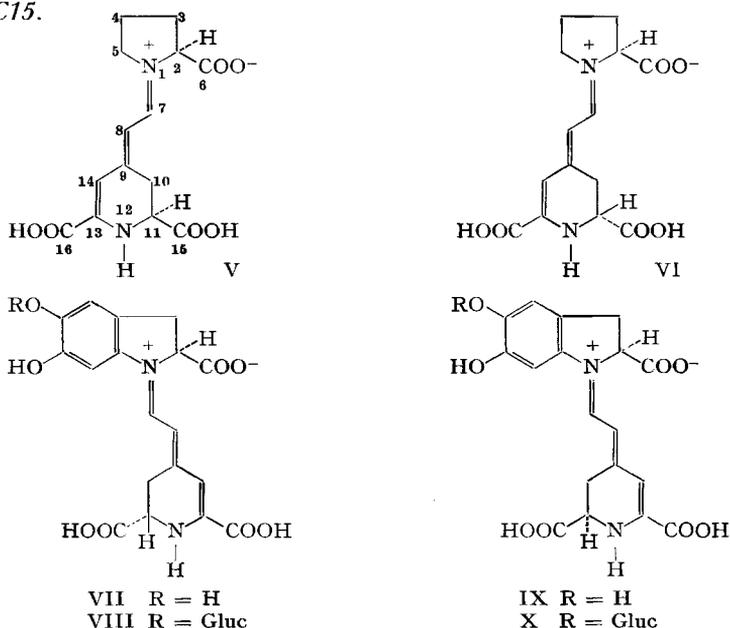
Die Rotationsdispersionskurven A–E sind als Ausmittelung der Originalmessungen wiedergegeben. Im Gebiet des Hauptabsorptionsmaximums (540 nm) war eine Messung wegen allzu schwacher Durchlässigkeit nicht möglich; der wahrscheinliche Kurvenverlauf ist gestrichelt angedeutet. Lösungsmittel: für A, D und F Kaliumacetat-Essigsäure-Puffer, pH 4,5; für B, C und E Wasser.

Skala der spezifischen Drehung  $[\alpha]^\circ$ : 1 Teilstrich = 1000°.

<sup>8)</sup> Bei der für die Konfigurationsbezeichnung gewählten Abkürzung bezieht sich der erste Buchstabe auf das Zentrum C2 und der zweite auf C15 (für die Numerierung s. Formel I); z. B.  $S-R = 2S-15R$  oder  $R-S = 2R-15S$ .

Diesen Erwartungen entsprechend ergibt das Experiment, dass bei der Behandlung von Betanidin mit *R*-Cyclodopa in verd. Ammoniak unter Sauerstoffausschluss fast ausschliesslich ein Isobetanidin gebildet wird, dessen Rotationsdispersionskurve (Fig., Kurve C) ein Spiegelbild derjenigen des natürlichen Isobetanidins (Fig., Kurve D) ist, und dass bei der entsprechenden Behandlung des natürlichen Isobetanidins mit *R*-Cyclodopa mehrheitlich Betanidin entsteht, dessen Rotationsdispersionskurve (s. Fig., Kurve B) ihrerseits ein Spiegelbild derjenigen des natürlichen Betanidins (Fig., Kurve A) darstellt.

Es ist damit erwiesen, dass in Betanidin neben C2 *noch* ein, und *nur* noch ein chirales Zentrum vorhanden ist und dass Isobetanidin sich von Betanidin in der Konfiguration dieses zweiten chiralen Zentrums unterscheidet. Die bisher angenommene Strukturformel I verlangt ein zweites solches chirales Zentrum, nämlich C15, so dass die bisher nur auf NMR.-spektroskopischen Erwägungen beruhende [9] Partialstruktur um C15 eine Bestätigung findet. *Somit sind Betanidin und Isobetanidin epimer am C15.*



Um die Zuordnung der absoluten Konfiguration von Betanidin und Isobetanidin zu ermöglichen, verbleibt einzig noch die Bestimmung der absoluten Konfiguration des C15-Zentrums. SCHMIDT, BECHER & HÜBNER [2] haben durch Ozon-Abbau und Peressigsäure-Oxydation von Betanidin 22% *L*-Asparaginsäure erhalten (als kristallines Benzoat charakterisiert). Dieses Produkt könnte sehr wohl ein Fragment des Dihydropyridinringes darstellen, in dem die Zentren 13, 14, 15, 16 und 19 (Formel I) erfasst sind; wir finden aber, dass auch aus *S*-Cyclodopa-methylester bei Anwendung von Peressigsäure und nachfolgender salzsaurer Hydrolyse etwa 10% Asparaginsäure entsteht, so dass eine sichere Schlussfolgerung über die Konfiguration von C15 nicht möglich ist. Ein weiteres wertvolles Studienobjekt bietet daher das von PIATELLI, MINALE & PROTA [12] isolierte Indicaxanthin (V), welches wir kürzlich durch

einen Austausch der terminalen Base S-Prolin gegen S-Cyclodopa in Betanidin umwandeln [11]. PIATELLI *et al.* haben Indicaxanthin ebenfalls mit Persäure oxydiert und konnten im Mikromaßstab L(S)-Asparaginsäure nachweisen [12]. Wir haben uns durch Persäureoxydation von S-Prolin davon überzeugt, dass aus diesem Teil keine Asparaginsäure entstehen kann, so dass die Herkunft der Asparaginsäure aus Indicaxanthin eindeutig auf die Zentren 9, 10, 11, 12 und 15 (Formel V) beschränkt bleibt. Da wir Betanidin direkt mit Indicaxanthin verknüpft haben [11], ohne die Konfiguration des chiralen Zentrums im Dihydropyridinring zu ändern, *muss Betanidin am C15* dieselbe, nämlich *die S-Konfiguration besitzen* wie Indicaxanthin am C11. Somit kommen dem Betanidin die vollständige Struktur VII, dem Isobetanidin die Struktur IX, dem Glucosid Betanin [13] [14] dementsprechend VIII und dem Isobetanin X zu. Die im Konfigurationsschema aufgezeichneten Formelskizzen entsprechen daher: **1** dem Betanidin, **2** dem Isobetanidin, **3** dem *enantio*-Isobetanidin und **4** dem *enantio*-Betanidin.

Die hier beschriebenen Schlussfolgerungen verlangen, dass die Alkali-Behandlung von Betanidin vorwiegend eine Epimerisierung am C15 herbeiführt. Ein kleiner Teil des gebildeten Isobetanidins könnte auch durch Epimerisierung am C2 entstanden sein, in welchem Falle das durch Alkali-Umlagerung hergestellte Isobetanidin optisch nicht rein wäre. Die Möglichkeit einer Epimerisierung am C2 fällt aber aus folgendem Grunde ausser Betracht: Der Triacetyl-methylester des beim Alkali-Abbau von Betanidin unter stärker basischen Bedingungen abgespaltenen S-Cyclodopa [10] [15] war optisch rein<sup>9)</sup>.

Bei den drei Austauschversuchen von Betacyanen mit Cyclodopa<sup>9)</sup> (siehe Tab. 1, Nr. 2) lässt sich eine nur geringfügige, wenn überhaupt eine Epimerisierung feststellen. Wie auch in einem besonderen Versuch bekräftigt wurde, sind wässrige Ammoniaklösungen nicht fähig, Betanidin in Isobetanidin umzuwandeln.

Währendem eine Epimerisierung von Betanidin nur mit Alkalilösungen zustande kommt, müssen wir aus folgenden Beobachtungen schliessen, dass Indicaxanthin

Tabelle 1. Austauschversuche mit S-Prolin und S-Cyclodopa

Nr.	Ausgangsmaterial (Zusammensetzung)		Austausch mit S-Prolin	Indicaxanthin [ $\alpha$ ] <sub>D</sub>	Austausch mit S-Cyclodopa	Produkte	
	Betanin	Isobetanin				Betanin	Isobetanin
1	> 98%	< 2%	→	+ 189° [11]	→	85%	15%
2	> 98%	< 2%	→		→	a) 94% b) 92% c) 93%	6% 8% 7%
3	75% Betanidin	25% Isobetanidin	→	0° (± 60°)	→	76%	24%
4	13%	87%	→	- 610°	→	20%	80%
5				natives Produkt aus <i>Opuntia ficus indica</i> + 209° [11]	→	88%	12%

<sup>9)</sup> Die optische Reinheit des Triacetyl-R- oder -S-cyclodopa-methylesters wurde sichergestellt; eine erhebliche Racemisierung während der der Austauschreaktion vorangehenden sauren Hydrolyse wurde ebenfalls ausgeschlossen.

schon unter milderen Bedingungen epimerisiert werden kann: Das durch eine Austauschreaktion von Betanin mit S-Prolin synthetisierte Indicaxanthin [11] zeigte eine optische Drehung von nur  $[\alpha]_D = +189^{\circ 10)}$  und lieferte nach einer Austauschreaktion mit S-Cyclodopa neben 85% Betanidin noch 15% Isobetanidin (siehe Tab. 1, Nr. 1). Ein anderes synthetisches Präparat von Indicaxanthin wurde aus einem Gemisch von 75% Betanin und 25% Isobetanin hergestellt; es zeigte eine optische Drehung von  $[\alpha]_D = 0^{\circ} (\pm 60^{\circ})$  und führte nach einem Rückaustausch mit S-Cyclodopa zu 76% Betanidin und 24% Isobetanidin (Tab. 1, Nr. 3). Weiterhin hatte ein von uns aus Kaktusfeigen isoliertes und elektrophoretisch gereinigtes Indicaxanthin eine Drehung von nur  $[\alpha]_D = +209^{\circ 10)}$  und ergab nach einer Austauschreaktion mit S-Cyclodopa 88% Betanidin und 12% Isobetanidin [11] (siehe Tab. 1, Nr. 5). Da wir bei der Austauschreaktion mit Cyclodopa keine Epimerisierung erwarten (s. oben), müssen wir schliessen, dass sowohl unser synthetisches wie auch unser natives Indicaxanthin gewisse Mengen von Isoindicaxanthin VI enthalten. Diese Indicaxanthinpräparate waren jedoch chromatographisch und elektrophoretisch einheitlich; es scheint demnach, dass sich das Isoindicaxanthin mit den von uns angewandten Methoden nicht vom Indicaxanthin trennen lässt.

Um dies zu prüfen, synthetisierten wir ein angereichertes Isoindicaxanthin durch eine Austauschreaktion eines Gemisches von 13% Betanidin und 87% Isobetanidin mit S-Prolin. Dieses wies tatsächlich die gleichen elektrophoretischen und chromatographischen Wanderungswerte und natürlich auch das gleiche UV.- und ein fast gleiches IR.-Spektrum wie das oben erwähnte Indicaxanthinpräparat auf. Seine optische Drehung,  $[\alpha]_D = -610^{\circ}$ , zeigte jedoch eindeutig, dass dieses Präparat hauptsächlich aus einem Epimeren des Indicaxanthins bestand. Eine Rückaustauschreaktion mit S-Cyclodopa ergab 20% Betanidin und 80% Isobetanidin ( $\pm 5\%$ ) (siehe Tab. 1, Nr. 4).

Wieder unter der Annahme, dass bei den Austauschreaktionen mit S-Cyclodopa keine Epimerisierung auftritt (s. oben) und dass deshalb das nach dem Austausch beobachtete Betanidin/Isobetanidin-Verhältnis ein direktes Mass für das Indicaxanthin/Isoindicaxanthin-Verhältnis ist, können wir jetzt eine Kurve aufzeichnen, welche dieses Verhältnis mit der optischen Drehung korreliert (siehe Tab. 1). Tatsächlich erhält man eine Gerade, welche sich auf der einen Seite auf die Drehung von reinem Indicaxanthin,  $[\alpha]_D = +400^{\circ}$ , in guter Übereinstimmung mit dem veröffentlichten Wert<sup>10)</sup>, und auf der andern Seite auf die Drehung von reinem Isoindicaxanthin,  $[\alpha]_D = -850^{\circ}$ , extrapolieren lässt. Diese Resultate stimmen gut überein mit der Annahme, dass die Epimerisierung im Indicaxanthin ausschliesslich an C11 (Formel V) stattfindet. Ein separates Experiment ergab zudem, dass S-Prolin unter den Austauschbedingungen nicht racemisiert wurde.

Eine Erklärung für die Tatsache, dass a) das chirale Zentrum im Dihydropyridinring (C11 im Indicaxanthin und C15 im Betanidin) wesentlich leichter epimerisiert wird als C2 und dass b) diese Epimerisierung im Indicaxanthin schneller vor sich geht als im Betanidin, ist vorläufig noch nicht offensichtlich.

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

<sup>10)</sup> PIATELLI *et al.* [12] geben für das native Produkt  $[\alpha]_D = +394^{\circ}$  an.

Experimenteller Teil<sup>11)</sup>

## A. Darstellung von Betanidin VII und Isobetanidin IX

1. *Untersuchung des Isomerisierungsgleichgewichts.* – a) *Chromatographische Bestimmung der Zusammensetzung von Betanidin-Isobetanidingemischen im Mikromaßstab:* Eine kleine Lösungsprobe des Farbmateri als in 0,05M Pyridiniumformiat (ca. 0,1 mg in 0,2 ml) wurde als Zone auf einem Streifen WHATMAN-Papier Nr. 1 (7×36 cm) aufgetragen und, nach gleichmässiger Befeuchtung des Streifens von beiden Seiten gegen die Zone, 6 Std. im absteigenden Durchlaufverfahren chromatographiert. Die nach dieser Zeit deutlich voneinander getrennten Zonen (Betanidin wandert schneller als Isobetanidin) wurden ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und die Eluate auf gleiche Volumen gebracht (3–5 ml). Aus den Drehungswerten bei 540 nm wurden die prozentualen Anteile der beiden Pigmente berechnet.

b) *Isomerisierung von Betanidin und Isobetanidin in 0,4N KOH:* In einen der beiden abwärts weisenden Schenkel eines «h»-förmigen Glassystems wurde 0,40 ml 0,43N KOH, in den andern 0,2 ml 1,0N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingefüllt. Nach dem Einfrieren mit flüssiger Luft liess man die Lösungen im Hochvakuum (0,005 Torr) auftauen, wobei die gelösten Gase entwichen. Nach zweimal wiederholtem Gefrieren, Evakuieren und Auftauen wurde die Betanidinprobe (1 mg) in den Schenkel mit der gefrorenen Lauge eingeworfen; das System wurde evakuiert und zugeschmolzen. Beim Auftauen entstand eine grüne Lösung; nach beendeter Reaktionszeit (s. Kolonne 1, Tab. 2) wurde durch Kippen des Systems angesäuert, wobei die Farbe nach Rotviolett umschlug und ein Teil des Produktes ausfiel. Die Fällung wurde abfiltriert, getrocknet und ihre Zusammensetzung nach der oben beschriebenen Methode bestimmt (s. Kolonne 3 und 4, Tab. 2).

Tabelle 2. *Isomerisierung von Betanidin  $\rightleftharpoons$  Isobetanidin in 0,4N KOH*

Reaktionszeit: Std.	Farbstoffausbeute: in % des Ausgangsmaterials <sup>12)</sup>	Zusammensetzung des ausgefällten Materials	
		Betanidin	Isobetanidin
<i>Ausgangsmaterial: Betanidin</i>			
1	89%	40,3%	59,7% <sup>13)</sup>
1		47 %	53 %
2		30,4%	69,6%
2		33 %	67 %
4		35,2%	64,8%
8	67,9%	33,9%	66,1%
16	46 %	30,3%	69,7%
16		35,8%	64,2%
<i>Ausgangsmaterial: Isobetanidin</i>			
2		25 %	75 %

c) *Entstehung von Isomerengemischen bei der salzsauren Hydrolyse von Betanin in der Hitze:* Proben von je 100 mg eines Betanin-Rohpräparates (ca. 70% Farbstoffgehalt der Zusammensetzung 83% Betanin (VIII) und 17% Isobetanin (X), wurden im evakuierten (0,005 Torr), geschlossenen Rohr mit 10 ml 18-proz. Salzsäure (HCl konz./Wasser 4:5) verschieden lang auf 87° erhitzt. Das Aglucon kristallisierte beim Kühlen in pfeilförmig abgewinkelten, dichroitischen Blättchen; es wurde abfiltriert, mit 0,5N HCl gewaschen und im Vakuum über KOH getrocknet. Die Produkte hatten die in Tab. 3 angegebene Zusammensetzung:

<sup>11)</sup> Allgemeine Bemerkungen über IR. und NMR. vgl. [14].

<sup>12)</sup> Die Bestimmung des gesamten Aglucongehaltes erfolgte spektroskopisch in Verdünnungsproben von Fällung und Mutterlauge. Als Grundlage wurde die früher bestimmte Extinktion ( $\epsilon = 49400$  bei 542–546 nm) von reinem Betanidin-hydrochlorid gebraucht. Die Lösung des ausgefällten Materials wurde anschliessend im Rotationsverdampfer eingengt und chromatographisch analysiert.

<sup>13)</sup> Zusammensetzung der Mutterlauge in diesem Versuch: 62,2% Betanidin, 37,8% Isobetanidin.

Tabelle 3. *Isomerisierung des Aglucons bei salzsaurer Hydrolyse von Betanin*

Reaktionszeit Min.	Ausbeute mg (%)	Zusammensetzung Betanidin %	Isobetanidin %
7	25 (46)	71,7	28,3
15	29 (54)	61,6	38,4
30	19 (35)	48,5	51,5

Präparativer Ansatz: Eine Suspension von 250 mg reinem Betanin-Kaliumsalz in 15 ml Wasser wurde mit 12 ml konz. HCl versetzt und unter Umschwenken im Vakuum (bei 11 Torr geschlossenes Gefäss) 10 Min. auf 85° erhitzt. Beim Abkühlen auf Zimmertemperatur kristallisierte das Aglucongемisch als Hydrochlorid, wurde abfiltriert, mit 3 ml konz. HCl/Wasser 4:5 gewaschen und im Vakuum über KOH getrocknet: Ausbeute 102 mg (58%). Das Produkt setzte sich aus 83,4% Betanidin und 16,6% Isobetanidin zusammen.

d) *Anreicherung von Isobetanin durch Alkalisisomerisierung*: 200 mg Betanin-Rohpräparat (70% Reinheit; 83% Betanin VIII, 17% Isobetanin X) wurden im Hochvakuum in 5,0 ml 0,41 N KOH gelöst (vgl. A 1 b). Nach  $\frac{3}{4}$  Std. wurde mit 2,30 ml 0,89 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> angesäuert. Die braunrote, trübe Lösung wurde filtriert. Eine Probe davon zeigte in der chromatographischen Analyse (vgl. A 1 a) ein Gemisch von 64% Betanin und 36% Isobetanin.

Die Lösung wurde auf 5 ml eingengt, mit 4 ml konz. HCl versetzt und 7 Min. auf 87° erhitzt. Das beim Kühlen kristallisierende Aglucon-hydrochlorid (18,6 mg, 17%) enthielt 48% Betanidin und 52% Isobetanidin.

2. *Darstellung von Betanidin-hydrochlorid*<sup>14</sup>. 454 mg reines Betanin-Kaliumsalz und 120 ml konz. HCl wurden im geschlossenen, evakuierten Gefäss (11 Torr)  $\frac{1}{4}$  Std. auf 35° erwärmt. Das beim Abkühlen in feinen Nadeln kristallisierende Material wurde abfiltriert, mit 2 ml 0,5 N HCl gewaschen und im Vakuum über KOH und CaCl<sub>2</sub> getrocknet: Ausbeute 140 mg (42%) Betanidin-hydrochlorid, welches nur Spuren von Isobetanidin enthielt. Eine zweite Ernte von 124 mg (37%) kristallisierte beim Einengen der Mutterlauge auf ca. 15–20 ml. Dieses Material setzte sich aus 92% Betanidin und 8% Isobetanidin zusammen.

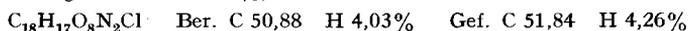
3. *Darstellung von Isobetanidin*. In zwei durch ein «h»-förmiges Rohrsystem verbundene 100 ml Rundkolben (A und B) füllte man einerseits (Kolben A, in der verlängerten Vertikalen) 119 mg Betanidin-hydrochlorid und 20 ml Wasser, andererseits (Kolben B) 7,5 ml 0,89 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Die Einfüllöffnung (vertikal über Kolben A) wurde durch einen Rundkolben (C) mit seitlichem Hahn verschlossen (Dichtung mit Apiezonfett M). Beide Lösungen wurden gefroren und durch dreimaliges Auftauen und Wiedereinfrieren im Hochvakuum (0,005 Torr) entlüftet. Unter vorübergehender Wegnahme des Kolbens C wurden 350 mg festes KOH (ca. 87-proz.) zur gefrorenen Lösung in A eingeworfen und das System wieder auf Hochvakuum evakuiert; beim Auftauen entstand eine dunkelgrüne Lösung. Nach 5 Std. liess man Säure- und Laugeteil durch Umkehren des Systems in den Kolben C zusammenlaufen, wobei die Farbe nach Dunkelweinrot umschlug und ein grosser Teil des Produktes als feiner Niederschlag anfiel. Dieser wurde abzentrifugiert und in 15 ml Kaliumacetat-Essigsäure-Puffer pH 4,5<sup>15</sup> durch Zusatz von 0,5 N KOH unter pH-Kontrolle gelöst (pH 5,7). Zur Vorreinigung filtrierte man diese Lösung durch eine kleine, nass gefüllte Säule von 20 g WHATMAN-Papierpulver und chromatographierte anschliessend auf einer durch Strömungs-sedimentation von 1 kg Papierpulver in 10 l desselben Puffers vorbereiteten Säule (200×5 cm). In der Elution folgten die knapp, aber deutlich voneinander getrennten violetten Zonen des Betanidins (10 cm) und Isobetanidins (13 cm) einer vorangehenden gelb bis orangen Bande (9 cm). Im Anschluss an die Isobetanidinzone beobachtete man noch eine rosarote Zone (35 cm). Die Betanidinfraktion (225 ml) wurde im Vakuum auf 5 ml eingengt, mit 18-proz. HCl sorgfältig auf pH 4 angesäuert und auf 0° gekühlt. Das kristallisierte Betanidin-Kaliumsalz wurde abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und getrocknet; Ausbeute 26 mg (22%). Nach einigen Übergangs-

<sup>14</sup>) Nach einer Vorschrift von SCHMIDT *et al.* [2].

<sup>15</sup>) Nach SCHMIDT *et al.* [7] 3,5 ml Eisessig und 5 g Kaliumacetat/l.

fraktionen (72 ml), die gemäss papierelektrophoretischer Prüfung (0,05 M Pyridiniumformiat, vgl. A 1 a) Gemische von Betanidin und Isobetanidin in verschiedenen Verhältnissen enthielten, wurde die Isobetanidinfraktion gesammelt (375 ml), auf 5 ml eingeeengt, mit 18-proz. HCl auf pH 4 gebracht und gekühlt. Das kristallisierte Isobetanidin-Kaliumsalz wurde abfiltriert, mit wenig Wasser gewaschen und getrocknet; Ausbeute 36 mg (30%). Das Produkt erwies sich in Papierelektrophorese ( $E_B = 0,89$ ) und Papierchromatographie ( $R_B = 0,67$ ) in 0,05 M Pyridiniumformiat als einheitlich. NMR.-Spektrum: 30 mg Isobetanidin-Kaliumsalz wurden im Hochvakuum in frisch destillierter Trifluoressigsäure (0,5 ml) gelöst und im NMR.-Probenröhrchen eingeschmolzen. Das im VARIAN A 60 registrierte Spektrum war praktisch deckungsgleich mit demjenigen von Betanidin [9]. NMR. ( $CF_3COOH$ ): 8,70/D ( $J = 12$ ), 1 Pr (H11); 7,36/S, 1 Pr und 7,05/S, 1 Pr (H4 oder H7); 6,70/S, 1 Pr (H18); 6,39/D ( $J = 12$ ), 1 Pr (H12); 5,55/M, 1 Pr (H2); 4,70/M, 1 Pr (H5); 3,66/bM, 4 Pr (2H3 und 2H4).

*Darstellung des Isobetanidin-hydrochlorids:* Die NMR.-Probelösung des gesamten oben erwähnten Isobetanidin-Kaliumsalzes in Trifluoressigsäure wurde in 2 ml 1 N HCl gegossen. Die ausgeschiedenen Kristalle von Isobetanidin-hydrochlorid wurden abfiltriert und im Vakuum über KOH getrocknet; Ausbeute 23 mg (77%). Das Material erwies sich bei der Prüfung in Papierchromatogramm und -elektrophorese immer noch als reines Isobetanidin, so dass man eine Epimerisierung des Isobetanidins in der NMR.-Probelösung ausschliessen kann. (Dasselbe wurde auch im Falle des reinen Betanidins festgestellt.) Zur Analyse<sup>16)</sup> wurde 24 Std. im Hochvakuum über  $P_2O_5$  getrocknet (Feuchtigkeitsverlust 8,75%).



## B. Identität der Konfiguration von Betanidin und Isobetanidin am C2

1. *Darstellung von Di-O-methyl-neobetanidin-trimethylester IV [9] aus Betanidin und aus Isobetanidin:* Die Lösungen von 9,0 mg Betanidin-hydrochlorid VII bzw. 7,8 mg Isobetanidin-hydrochlorid IX in je 2 ml 1 N HCl-Methanol wurden in zwei Röhrchen im Hochvakuum eingeschmolzen, 12 Std. auf 50° erwärmt und eingedampft. Zu den beiden Lösungen der Produkte in je 10 ml Methanol destillierte man separat Diazomethan in grossem Überschuss (ca. 0,01 Mol) und dampfte sie dann ein. Die gelben Reaktionsprodukte wurden in Methylenchlorid aufgenommen. Diese Lösungen filtrierte man durch 250 mg säuregewaschenes Aluminiumoxid (Akt. 2, 3%  $H_2O$ ) [16], wobei 5 mg bzw. 3 mg (52 und 36%) Di-O-methyl-neobetanidin-trimethylester (IV) eluiert wurden, die beim Bespritzen mit Methanol in feinen gelben Nadeln kristallisierten. Nach zweimaligem Umkristallisieren schmolzen sowohl das Methylierungsprodukt aus Betanidin als auch das aus Isobetanidin bei 254–255° nach Sintern bei 248–250°. Der Smp. eines innigen 1:1-Gemisches der beiden Substanzen zeigte keine Depression. UV. (Methanol): Produkt aus Betanidin: Max. bei 406 (33100), 317 (8200), 268 (15000) nm ( $\epsilon$ ); Produkt aus Isobetanidin: Max. bei 404 (36800), 317 (8500), 268 (17300) nm ( $\epsilon$ ).

Tabelle 4. Rotationsdispersion von methyliertem Betanidin bzw. Isobetanidin

$\lambda$ nm	Methylierungsprodukt aus Betanidin [ $\alpha$ ]°		Methylierungsprodukt aus Isobetanidin [ $\alpha$ ]°	
600	-113°	} $\pm 60^\circ$	-147°	} $\pm 60^\circ$
500	-113°		-118°	
500–350	starke Absorption (keine Messung möglich)			
350	-790°	} $\pm 120^\circ$	-880°	} $\pm 120^\circ$
340	-1300°		-1470°	
330	-1920°		-1950°	
320	-1070°			
310–314	0	} $\pm 600^\circ$	0	} $\pm 600^\circ$
300	+2150		+1180°	
290	+1190		+770°	

<sup>16)</sup> Im Mikrolabor des Institutes (Leitung H. FROHOFER) ausgeführt.

2. *Rotationsdispersion der Methylierungsprodukte* (aufgenommen<sup>17)</sup> bei ca. 25–30°): Benutzte Lösungen: 0,623 mg des Methylierungsproduktes aus Betanidin gelöst in 3 Tropfen Methylchlorid (0,014 ml) und 2,00 ml Methanol ( $c = 0,031$ ); 0,595 mg des Methylierungsproduktes aus Isobetanidin gelöst in 2,00 ml Methanol unter Erwärmen ( $c = 0,0297$ ).

Die Kurven beider Produkte (Auswertung s. Tab. 4) waren praktisch identisch und wiesen einen negativen Cotton-Effekt beim Nebenmaximum (ca. 310–314 nm) auf.

### C. Darstellung von *enantio*-Betanidin und *enantio*-Isobetanidin

1. *Allgemeines zur Versuchsanordnung*: Eine Lösung von Triacetyl-*R*-(od. *S*)-cyclodopa-methylester<sup>6)</sup> (ca. 25 mg) in 1N HCl-Methanol (3 ml) wurde gefroren und im Hochvakuum (0,005 Torr) aufgetaut. Nach erneutem Gefrieren und Evakuieren wurde im zugeschmolzenen Gefäß 5 Std. auf 80° erhitzt. Die Lösung des Methanolyseprodukts, *R*-(od. *S*)-Cyclodopa-methylester, wurde im Vakuum zur Trockene eingedampft. Zum Rückstand fügte man die Farbstoffprobe (1–3 mg Betanidin oder Isobetanidin, s. unten Abschnitte C 5 und C 6). Im Hochvakuum wurde sauerstoffreies 0,6N NH<sub>4</sub>OH (ca. 3 ml) hinzu destilliert und nach beendeter Umsetzung (1 Std.) auf demselben Wege wieder entfernt. Das Gemisch, in wenig 0,05M Pyridiniumformiat gelöst, wurde als Zone auf WHATMAN-Papier 3 MM aufgetragen. Auf vollständig benetztem Streifen (vgl. A 1 a) wurde mit demselben Puffer während 5–6 Std. absteigend chromatographiert, wobei eine Trennung in die Betanidin- und Isobetanidinzone erfolgte. Die Hauptzone wurde mit 2–2,5 ml Wasser ausgewaschen und die Farbstoffkonzentration dieser Lösung nach angemessener Verdünnung eines Aliquots spektroskopisch bestimmt.

2. *Nachweis der Erhaltung der optischen Reinheit von Cyclodopa-methylester unter den Hydrolysebedingungen*: Im Hochvakuum eingeschmolzene Lösungen von je 10 mg Triacetyl-*S*-cyclodopa-methylester in 5 ml 1N HCl-Methanol wurden in separaten Versuchen 5 bzw. 20 Std. auf 80° erhitzt. Der darauffolgende Basenaustausch mit reinem Betanin (vgl. C 1) in verdünntem Ammoniak und die chromatographische Analyse des Produktes (vgl. A 1 a) ergab Gemische von 92% Betanidin und 8% Isobetanidin im ersten, 93% Betanidin und 7% Isobetanidin im andern Fall.

3. *Behandlung des Betanidins und Betanins mit 0,6N Ammoniumhydroxid unter Sauerstoffausschluss*. Das Produkt der Einwirkung von 1,5 ml 0,6N NH<sub>4</sub>OH auf 2 mg reines Betanidin-hydrochlorid unter den erwähnten Austauschbedingungen (vgl. C 1) zeigte wie das Ausgangsmaterial im Papierchromatogramm nur spektroskopisch nicht erfassbare Spuren von Isobetanidin.

Reines Betanin (1,6 mg) nach 5 Std. in 0,6N NH<sub>4</sub>OH (0,5 ml) im Hochvakuum blieb ebenfalls unverändert.

4. *Betanidin aus Betanin*. Aus 2,90 mg Betanin (praktisch frei von Isobetanin) und dem Hydrolyseprodukt von 20 mg Triacetyl-*S*-cyclodopa-methylester entstand unter den in C 1 geschilderten Austauschbedingungen in 1 Std. ein Gemisch von 94% Betanidin und 6% Isobetanidin (ca. 80% Ausbeute).

5. *enantio-Betanidin*. Die Umsetzung von 3,35 mg Isobetanidin IX (enthaltend 13% Betanidin) mit dem Hydrolyseprodukt aus 42 mg Triacetyl-*R*-cyclodopa-methylester ergab ein Rohprodukt, welches hauptsächlich aus Betanidin bestand (Isobetanidin-Gehalt von Auge abgeschätzt etwa 15–20%). Die chromatographische Reinigung lieferte reines Betanidin, dessen Lösung in 2,0 ml Wasser spektroskopisch 2,43 mMol/l Farbstoff enthielt (57% Ausbeute<sup>12)</sup>). Bei der Auswertung der Rotationsdispersionskurve ( $c = 0,102$  ber. für Betanidinhydrochlorid) wurden die in Tab. 5, Kolonne 4 aufgeführten Drehwerte erhalten (s. auch Fig. 1, Kurve B).

6. *enantio-Isobetanidin*. 2 mg Betanidin-hydrochlorid (VII) (enthaltend 5% Isobetanidin) mit dem Hydrolyseprodukt aus 25 mg Triacetyl-*R*-cyclodopa-methylester umgesetzt ergaben ein Rohprodukt, welches von Auge abgeschätzt aus etwa 95% Isobetanidin und 5% Betanidin bestand. Die Lösung der chromatographisch reinen Isobetanidin-Zone in 2,2 ml Wasser enthielt spektroskopisch gemessen 2,40 mMol/l Farbstoff (69% Ausbeute<sup>12)</sup>). Bei der Auswertung der Rotationsdispersionskurve ( $c = 0,101$  ber. für Isobetanidin-hydrochlorid) wurden die in Tab. 5, Kolonne 5 aufgeführten Drehwerte erhalten (s. auch Fig., Kurve C).

<sup>17)</sup> Die Messung erfolgte auf einem automatischen Spektralarimeter nach Halbschattenprinzip unter Verwendung einer Xenonlampe in einer Zelle von 1 cm Schichtdicke im Laboratorium für physikalische Chemie der ETH durch die Herren P. KÄSER, P. GRABER und Dr. TH. BÜRER. Einen Teil der Messungen besorgte Dr. F. BURKHARDT in Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel.

Tabelle 5. Auswertung der Rotationsdispersionskurven

$\lambda$ nm	Betanidin [ $\alpha$ ] $^{\circ}$	Isobetanidin [ $\alpha$ ] $^{\circ}$	enantio- Betanidin [ $\alpha$ ] $^{\circ}$	enantio- Isobetanidin [ $\alpha$ ] $^{\circ}$	Betanidin aus Indicaxanthin [ $\alpha$ ] $^{\circ}$
700	+460	-820	-330	+160	+250
680	+560	-910			+346
650			-488	+415	+440
600	+1250	-970	-580	+690	+780
475			+550		
470				-870	
450			+725		-1630
440	-1310	+1550		-620	-1600
425			+780		
420					-1170
410				-400	
400	-770	+1210	+975		-1030
380	-1280	+890		-318	-1300
375			+1690		
360	-1850	+550		-276	-1630
350	-2020	+320	+2240		
340	-2380	+90	+2460	-138	-1800
333		0			
330	-2780	+60	+2550	0	
320	-3250	+520		-290	-2010
315	-3490				
310	-3300	+850			
Konz.	$c = 0,0294$	$c = 0,0288$	$c = 0,102$	$c = 0,101$	$c = 0,0032$

#### D. Oxydationen mit Peressigsäure

1. *Oxydation von S-Cyclodopa-methylester*. 35 mg Triacetyl-S-cyclodopa-methylester wurden in 9 ml 1N HCl-Methanol 5 Std. im Hochvakuum auf 80° erhitzt. Der erhaltene S-Cyclodopa-methylester, gelöst in 8 ml Methanol-Eisessig 1:1 und 0,4 ml 30-proz. Perhydrol blieb 40 Std. bei 37° stehen und wurde abschliessend 10 Min. unter Rückfluss erhitzt. Die zur Trockene gebrachten Oxydationsprodukte wurden in 2N HCl 3 Std. im Vakuum auf 100° erhitzt.

Ein Papierchromatogramm des Produkts in Butanol-Eisessig-Wasser 4:1:1 ( $R_f = 0,34$ ) und Papierelektrophorese bei pH 4,5 (Kaliumacetat-Essigsäure-Puffer:  $E_B = 1,33$ ; Pyridiniumformiat Puffer:  $E_B = 1,54$ ) ergab Flecken, die sowohl in ihren Wanderungseigenschaften wie auch im Ninhydrintest mit denjenigen authentischer Asparaginsäure identisch waren. Die Ausbeute war etwa 10%, bestimmt mit Hilfe der Ninhydrinkomplex-Methode nach Eluierung vom Elektropherogramm [17].

2. *Versuche zur Oxydation von Prolin*. 20 mg S-Prolin in 5 ml Eisessig-Methanol 4:1, mit 0,5 ml 30-proz. Perhydrol 40 Std. auf 37° erwärmt und 10 Min. unter Rückfluss erhitzt, ergaben bei der Prüfung im Papierchromatogramm und in der Papierelektrophorese keine Spur von Asparaginsäure oder anderen Ninhydrin-positiven Substanzen ausser Prolin.

#### E. Zur Bildung von Isoindicaxanthin

1. *Allgemeines*: Die Indicaxanthinpräparate wurden durch Behandlung von Betanin- oder Betanidinpräparaten mit S-Prolin in verd. Ammoniak dargestellt [11]. Proben der gereinigten gelben Produkte wurden nach Messung des optischen Drehvermögens gemäss der im Abschnitt C

beschriebenen Methode durch Behandlung mit *S*-Cyclodopa in 0,6*N* NH<sub>4</sub>OH in ein violettes Betanidin-Isobetanidin-Gemisch zurückverwandelt, dessen Zusammensetzung nach A 1 a quantitativ ermittelt wurde.

2. *Reinheitsprüfung von S-Prolin*: Kommerzielles *S*-Prolin (L-Prolin FLUKA;  $[\alpha]_D = -85^\circ$  ( $c = 5$ , H<sub>2</sub>O) nach Angaben der Firma) wurde zweimal aus Alkohol umkristallisiert, worauf der Drehwert von  $[\alpha]_D = -85^\circ$  ( $c = 0,599$ , Wasser) auf  $[\alpha]_D = -86^\circ$  ( $c = 0,477$ , Wasser) gestiegen war (Literaturwert:  $-86,1^\circ$ ; [18]).

3. *Optische Stabilität von S-Prolin in verd. Ammoniak*: Die spezifische Drehung einer wässrigen Lösung von *S*-Prolin (FLUKA) ( $c = 1,16$ ) in verd. Ammoniak wurde 1 Std. und 2 Std. nach der ersten Messung wieder gemessen. Alle drei Messungen ergaben denselben Wert von  $[\alpha]_D = -85,1^\circ$ .

4. *Darstellung von angereichertem Isoindicaxanthin*: Aus 64 mg Isobetanidin und 200 mg *S*-Prolin in 5 ml 0,6*N* NH<sub>4</sub>OH wurden nach Reinigung durch Elektrophorese, Ionenaustausch und schliesslich Chromatographie an Polyamid 6 mg oranges Isoindicaxanthin gewonnen, welches jedoch noch etwa 20% Indicaxanthin enthielt (s. unten).  $[\alpha]_D^{22} = -610^\circ \pm 50^\circ$  ( $c = 0,039$ , Wasser).  $E_B = 1,68$ ,  $R_B = 1,10$ . UV. (Wasser): Max. 483 (51000), 296–298 (2110), 260 (6100) nm ( $\epsilon$ ). IR. deckungsgleich mit demjenigen von Indicaxanthin [11]. Rückreaktion von 1 mg dieser Substanz mit *S*-Cyclodopa aus 20 mg Triacetyl-*S*-cyclodopa-methylester ergab ein violettes Gemisch von 19,5% Betanidin und 80,5% Isobetanidin.

5. *Darstellung eines Indicaxanthin-Isoindicaxanthingemisches*: Aus Betanin-Rohpräparat (150 mg, 72% rein; Verhältnis Betanin: Isobetanin = 3:1) wurden 25 mg mikrokristallines Indicaxanthin gewonnen;  $[\alpha]_D = 0^\circ \pm 60^\circ$  ( $c = 0,043$ , Wasser). Rückreaktion (ausgeführt mit 1 mg) mit *S*-Cyclodopa-methylester aus 20 mg Triacetyl-*S*-cyclodopa-methylester ergab 76% Betanidin und 24% Isobetanidin.

#### SUMMARY

The base exchange of betanidin and isobetanidin with 5,6-dihydroxy-2,3-dihydroindole-2*R*-carboxylic acid (named *R*-Cyclodopa, III) led to the formation of *enantio*-isobetanidin and *enantio*-betanidin, respectively. The enantiomers exhibited rotatory dispersion curves which were the mirror images of those of betanidin and isobetanidin. Thus it is shown that, in agreement with our proposed structure for betanidin, there exists in the molecule another, and only one other, asymmetric centre in addition to that present at C2, and furthermore, that isobetanidin differs from betanidin only in its configuration at this second centre (C15).

A similar base exchange of natural indicaxanthine (which possesses the *S*-configuration at C11) with *S*-cyclodopa yielded betanidin, showing that the natural aglucone and hence its glucoside, betanin, possess the *S*-configuration at C15; conversely, isobetanidin must possess the *R*-configuration at this position.

Other experiments have shown that synthetic indicaxanthine consists of varying mixtures of indicaxanthine and isoindicaxanthine. In order to confirm that the two isomers have identical chromatographic and electrophoretic properties, a sample of enriched isoindicaxanthine has been prepared by treating isobetanidin with *S*-proline. Isoindicaxanthin can be distinguished from indicaxanthine by its optical rotation ( $[\alpha]_D^{22} = -610^\circ$ ). It is concluded that, under the conditions of the base exchange reaction, epimerisation takes place far more readily at C11 in indicaxanthine than at C15 in betanidin.

Organisch-Chemisches Institut,  
Universität Zürich

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. WYLER & ANDRÉ S. DREIDING, *Helv.* **42**, 1699 (1959).
- [2] O. TH. SCHMIDT, P. BECHER & M. HÜBNER, *Chem. Ber.* **93**, 1296 (1960).
- [3] H. WYLER & ANDRÉ S. DREIDING, *Experientia* **17**, 23 (1961).
- [4] H. WYLER, G. VINCENTI, M. MERCIER, G. SASSU & ANDRÉ S. DREIDING, *Helv.* **42**, 1696 (1959).
- [5] M. PIATELLI & L. MINALE, *Phytochemistry* **3**, 307 (1964).
- [6] M. PIATELLI & L. MINALE, *Phytochemistry* **3**, 547 (1964).
- [7] O. TH. SCHMIDT & W. SCHÖNLEBEN, *Z. Naturforsch.* **12b**, 262 (1957).
- [8] H. WYLER, unveröffentlichte Arbeiten.
- [9] T. J. MABRY, H. WYLER, G. SASSU, M. MERCIER, I. PARIKH & ANDRÉ S. DREIDING, *Helv.* **45**, 640 (1962).
- [10] H. WYLER, T. J. MABRY & ANDRÉ S. DREIDING, *Helv.* **46**, 1745 (1963).
- [11] H. WYLER, M. E. WILCOX & ANDRÉ S. DREIDING, *Helv.* **48**, 361 (1965).
- [12] M. PIATELLI, L. MINALE & G. PROTA, *Tetrahedron* **20**, 2325 (1964).
- [13] M. PIATELLI, L. MINALE & G. PROTA, *Ann. Chimica* **54**, 955 (1964).
- [14] M. E. WILCOX, H. WYLER, T. J. MABRY & ANDRÉ S. DREIDING, *Helv.* **48**, 252 (1965).
- [15] H. WYLER & ANDRÉ S. DREIDING, *Helv.* **45**, 638 (1962).
- [16] TH. WIELAND, *Z. physiol. Chem.* **273**, 24 (1942).
- [17] J. P. GREENSTEIN & M. WINITZ, *Chemistry of the Amino Acids* **2**, 1309 (1961).
- [18] J. W. PATTERSON & W. R. BRODE, *Arch. Biochemistry* **2**, 247 (1943).

### 123. Über die Herkunft der C-Atome 2 und 8 der Harnsäure bei *Drosophila melanogaster*

von O. Brenner-Holzach und F. Leuthardt

(15. V. 65)

Wir haben in einer früheren Arbeit [1] mitgeteilt, dass bei Verfütterung von C-1- bzw. C-6-markierter Glucose an Larven von *Drosophila melanogaster* mit Glucose-[6-<sup>14</sup>C] eine höher aktive Harnsäure erhalten wird als mit Glucose-[1-<sup>14</sup>C]. (Ähnliche Beobachtungen haben auch WEYGAND und Mitarb. [2] bei der Untersuchung der Biosynthese von Leukopterin beim Kohlweissling gemacht: Das C-Atom 2 des Pteridinskeletts zeigte nach Injektion von Glucose-[1-<sup>14</sup>C] eine wesentlich geringere Radioaktivität als nach Verfütterung von Glucose-[6-<sup>14</sup>C].) Wir vermuteten auf Grund dieser Beobachtungen, dass das C-6 der Glucose in spezifischer Weise für die Synthese der Harnsäure verwendet wird und zwar auf dem Weg Glucose-6-phosphat → Triosephosphat → Glycerinsäure → Hydroxypyruvat → Serin → aktiviertes Formiat. Um diese Annahme weiter zu stützen, untersuchten wir die Verteilung der Radioaktivität im Puringerüst der Harnsäure nach Verfütterung von Serin-[1-<sup>14</sup>C] und Serin-[3-<sup>14</sup>C] an *Drosophila*-Larven. Wir bauten die aus den frisch geschlüpften Fliegen isolierte Harnsäure nach der Methode von BRANDENBERGER [3] ab, bei welcher die Aktivität des C-8 der Harnsäure als Differenz der spezifischen Aktivitäten von Harnsäure und Alloxan berechnet werden kann. Wir nahmen dabei an, dass die spezifische Aktivität in den beiden Ureid-C-Atomen C-2 und C-8 gleich ist. Die Resultate unserer Versuche sind in Fig. 1 zusammengefasst. Man kann daraus schliessen, dass das C-Atom 3 des Serins die hauptsächlichste Quelle für das für die Purinsynthese benötigte aktivierte Formiat ist.