

59. Präbetanin, ein Schwefelsäure-halbesther des Betanins.

Ein Beitrag zur Kenntnis der Betacyane

von H. Wyler¹⁾, H. Rösler, M. Mercier und André S. Dreiding

(13. I. 67)

Allgemeines über Betacyane. – Bisherige Versuche zur Strukturaufklärung der vielen in Centrospermen-Pflanzen festgestellten [1–5] *Betacyane* und *Isobetacyane*²⁾ machen es wahrscheinlich, dass sie alle sauerstoffgebundene Derivate der zwei 15-epimeren Chromogene, *Betanidin* (1) bzw. *Isobetanidin* (2) darstellen [2] [4] [7–10]. Die offenbar sehr wandlungsfähigen Konjugat-Reste können theoretisch sowohl an den zwei phenolischen Hydroxylgruppen wie auch an den drei Carboxylgruppen haften. Mit Ausnahme des *Mesembrianthemum*-Pigmentes (*Betanidin*) [2] handelt es sich bei den bisher in dieser Richtung untersuchten Betacyanen um 5-O-Zuckerderivate. So ist das Betanin (3)³⁾ ein β -D-Glucopyranosid und das Amarantin⁴⁾ ein 2'-O-(β -D-Glucopyranosyluronsäure)- β -D-glucopyranosid [8]. Vor kurzem sind noch ein Malonsäurederivat des Betanins (*Phyllocactin*⁵⁾), ein 3-Hydroxy-3-methyl-glutarsäurederivat (*Iresinin-I*⁶⁾) und einige Mono-, Di- und Trihydroxyzimtsäurederivate (*Celosianin*⁷⁾, *Iresinin-III*⁶⁾ und *Iresinin-IV*⁶⁾) des Amarantins beschrieben worden [10].

In der Rande (*Rote Rübe* = *Beta vulgaris*, var. *rubra*) und auch in der Kermesbeere (*Phytolacca decandra*) kommt neben dem Hauptpigment *Betanin* (3) noch das *Präbetanin* im Ausmass von etwa 0,3–3% vor [4] [7] [13]. Beide sind von geringen Mengen der entsprechenden *Isobetacyane* begleitet [13]. Wir werden zeigen, dass das *Präbetanin* (5) ein Schwefelsäure-halbesther (Sulfat) des Betanins ist und somit eine neue Variante unter den Betacyanen darstellt.

Analytische Methoden. – Zur Mikrocharakterisierung der (stark sauren und amphoterer) Betacyane leisten die Papierchromatographie und die von SCHMIDT & SCHÖNLEBEN eingeführte [14] Papierelektrophorese in sauren Medien gute Dienste [1] [2] [3]. Die «fleckanalytischen» Wanderungstendenzen können im Vergleich zum Verhalten des Betanins (3) zahlenmässig ausgedrückt werden. Für die in der vorliegenden Arbeit angetroffenen Betacyane sind diese Werte in Tabelle 1 zusammenge-

1) Gegenwärtige Adresse: Laboratoire de Chimie Organique, Université de Lausanne, 1000 Lausanne.

2) Wir wollen die Derivate des *Isobetanidins* *Isobetacyane* nennen; in der Pflanze erscheinen sie oft als geringfügige Begleitstoffe der Betacyane. Ein *Isobetacyan* ist also das 15-R-Epimere des entsprechenden (15S)-Betacyans [6]. Die Frage, ob die *Isobetacyane* vom pflanzlichen Enzymapparat synthetisiert werden, oder ob sie durch thermodynamisch kontrollierte Epimerisierung aus den Betacyanen entstehen, ist noch nicht abgeklärt.

3) Isoliert aus Rande (*Rote Rübe*) [11] [12], Kermesbeere [7] und zwei Kaktusarten [9].

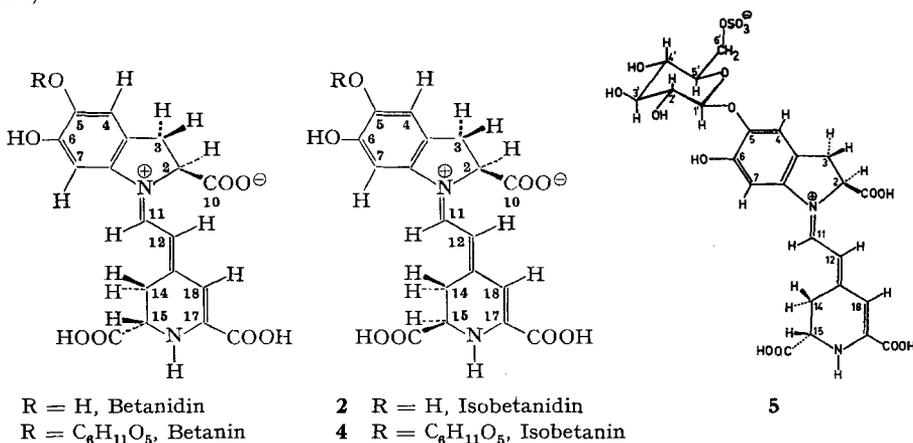
4) Isoliert aus *Amaranthus tricolor* [8].

5) Isoliert aus *Phyllocactus hybridus* HORT. [10].

6) Isoliert aus *Iresine herbstii* HOOK [10].

7) Isoliert aus *Celosia cristata* L. [10].

fasst: Man sieht, dass Papier die Isobetacyane etwas stärker als die entsprechenden Betacyane⁸⁾ adsorbiert. Der Effekt ist klein, so dass sich die Epimeren erst nach längerem Laufen trennen; er ist markanter in den weniger sauren Medien und zeigt sich am deutlichsten bei den Agluconen Betanidin (**1**) und Isobetanidin (**2**). Das *Präbetanin* zeichnet sich durch seine grosse elektrophoretische Mobilität aus⁹⁾. Im Vergleich zu Betanin ist diese ausgeprägter in den stärker sauren Medien (z. B. verdünnte Ameisensäure).



Auch die Polycaprolactam-Dünnschichtchromatographie eignet sich hervorragend zur Charakterisierung von Betacyanen¹⁰⁾. Die für den Erfolg der Plattenbeschichtung wichtige, vorgängige Umfällung des Polycaprolactams¹¹⁾ aus konzentrierter Salzsäure, verdünnt mit Methanol oder Äthanol, zur Erreichung einer gleichmässigen Feinkörnigkeit wurde nach einem von RÖSLER, WAGNER & HÖRHAMMER [16] ausgearbeiteten Verfahren adaptiert¹²⁾. Die bevorzugten Laufmittel sind ebenfalls saure Medien, in denen Betacyane längliche, aber relativ scharf umrissene Flecke bilden (s. Tabelle 1): Besonders hier haften die Isobetacyane stärker am Adsorbens als die entsprechenden Betacyane, insbesondere wiederum in den weniger sauren Laufmitteln. Das *Präbetanin* jedoch fällt durch seine *starke Adsorption*, speziell in den saureren Medien, auf.

Die «fleckanalytische» Verfolgung der sauren Hydrolyse und Methanolyse kann ebenfalls zur Charakterisierung von Betacyanen herangezogen werden, wobei die An-

⁸⁾ Dieser Unterschied in der Adsorption, wie übrigens auch in der Stabilität, der beiden C15-Epimeren ist noch nicht genau erklärbar. Die zwei chiralen Zentren sind relativ weit voneinander entfernt und müssen sich durch eine (oder mehrere) spezifische Konformation(en) des konjugierten Systems gegenseitig beeinflussen.

⁹⁾ Auch wenn nur in kleiner Konzentration vorhanden, ist es in der Elektrophorese sofort sichtbar, da es schon nach kurzer Zeit dem Betanin vorausseilt. Der Name sollte diese Beobachtung ausdrücken [15].

¹⁰⁾ Die Polyamid-Säulenchromatographie wurde von SCHMIDT & SCHÖNLEBEN [12] auf diesem Gebiet eingeführt und später auch von PIATELLI & MINALE [4] gebraucht.

¹¹⁾ Das Polycaprolactam (DURETHAN BK 40 F) wurde uns freundlicherweise von der Herstellerfirma BAYER, Leverkusen, zur Verfügung gestellt.

¹²⁾ Die damals auf Flavonoide angewandte und auch von ENDRES [17] wiedergegebene Methode ist hier verbessert worden.

Tabelle 1. «Fleckenanalytische» Wanderungseigenschaften von Präbetanin, Betanin, Betamidin, deren 15-Epimeren und deren Ester

Substanz	Papierelektrophorese ^{a)} b)		Papierchromatographie ^{a)} b)		Polycaprolactam-Dünnschichtchromatographie ^{a)} b)		
	E_B 0,05 Pf	E_B 0,1 F	R_B 0,05 Pf	R_B 0,1 F	D_B 0,33 Pf	D_B 1 HCl	D_B 0,2 HCl/Et
Präbetanin	1,4-1,5 (rv)	2,15 (rv)	1,1 (rv)	1,1 (rv)	0,4 (rv)	0,35 (bv)	0,4 (bv)
Isopräbetanin	1,3-1,4 (rv)	2,0-2,15 (rv)	1,0-1,1 (rv)	-	0,20 (rv)	0,35 (bv)	0,4 (bv)
Betanin	1,0 (rv)	1,0 (rv)	1,0 (rv)	1,0 (rv)	1,0 (rv)	1,0 (bv)	1,0 (bv)
Isobetanin	0,9 (rv)	0,9-1,0 (rv)	0,9-1,0 (rv)	-	0,65 (rv)	1,0 (bv)	1,0 (bv)
Betanidin	1,03 (v)	0,7 (v)	0,7 (v)	0,55 (v)	0,25 (bv)	0,2 (b)	1,3 (b)
Isobetamidin	0,9 (v)	0,6-0,7 (v)	0,6 (v)	0,45-0,55 (v)	0,15 (bv)	~0,2 (b)	~1,3 (b)
Sulfobetanin A	2,0 (rv)	3,1 (rv)	-	-	0,07 (rv)	0,1 (bv)	0,1 (bv)
Betanin-monomethylester ^{c)} d)	0,5 (rv)	0,7 (rv)	-	-	-	-	-
Betanin-dimethylester ^{e)} f)	0,0 (rv)	-0,1 (rv)	-	-	-	-	-
Präbetanin-monomethylester ^{g)} h)	1,0 (rv)	2,1 (rv)	-	-	-	-	-
Pentaacetylbetanin ⁱ⁾	0,95 (r)	1,0 (r)	1,1 (r)	0,9 (r)	-	-	-
Tetraacetylpräbetanin ^{j)}	1,4 (r)	1,9 (r)	1,1 (r)	1,2 (r)	-	-	-
Di-O-acetylbetanidin ^{k)}	1,3 (r)	1,5 (r)	1,1 (r)	1,2 (r)	-	-	-
Mono-O-acetylbetanidin ^{l)}	-	1,2 (r-rv)	-	-	-	-	-

a) Die Zahlenwerte sind die auf- oder abgerundeten Verhältnisse der Wanderungsdistanzen der angegebenen Substanzen zu denjenigen von Betanin, E_B in der Papierelektrophorese, R_B im Papierchromatogramm, D_B im Dünnschichtchromatogramm. Als Laufmittel und Puffer dienten die folgenden Lösungen: 0,05 M Pyridiniumformiat, 0,33 Pf = 0,33 M Pyridiniumformiat, 0,1 F = 0,1 M Ameisensäure, 1 HCl = 1 N Salzsäure, 0,2 HCl/Et = 0,2 N äthanolische Salzsäure (siehe auch Exper. Teil).

b) Die Farben der Flecke auf dem Papier oder auf der Dünnschicht sind durch die folgenden Buchstaben symbolisiert: r = rot, v = violett, b = blau.

c) Diese Substanz wurde nicht in fassbarer Menge isoliert; der Ausdruck soll nur einen analytisch festgestellten Fleck bezeichnen.

d) *A priori* sind drei Betanin-monomethylester möglich. Es ist noch unbekannt, welcher hier vorliegt, oder ob es sich nicht vielleicht sogar um ein Gemisch handelt.

e) *A priori* sind drei Betanin-dimethylester möglich. Auch hier sind die Reinheit und die Struktur noch unbekannt. Aus der violetten Farbe am kationischen Rand dieses Flecks lässt sich vermuten, dass er etwas Betanidin-dimethylester (auch davon sind drei möglich) enthält.

f) Auch für den «Präbetanin-monomethylester» gilt die unter d) beschriebene Unsicherheit.

g) In allen diesen Fällen ist auch die Existenz der entsprechenden Isobetacyan-Derivate denkbar; mit den angegebenen Methoden liessen sich diese bisher nicht differenzieren.

wesenheit hydrolysierbarer Derivatreste und veresterbarer Carboxylgruppen zusammen mit der Epimerisierbarkeit des Zentrums C15 ins Spiel treten können. Wenn man im Laufe einer dieser Reaktionen regelmässig Proben entnimmt, diese nebeneinander auf das Trägermaterial auftupft und anschliessend elektrophoretisch oder chromatographisch zum Wandern bringt, dann entwickelt sich ein Muster von Flecken, deren Verteilung, Grössen, Formen, Farbtöne und -intensitäten für das betreffende Betacyan charakteristisch sind. So erlauben z. B. die «chromatographischen Hydrolysemuster» und speziell auch die «elektrophoretischen Methanolysenmuster» zunächst rein phänomenologisch zwischen Betanin, Betanidin, Amarantin, Bougainvillein und auch Präbetanin zu unterscheiden [18] (siehe unten).

Isolierung und Struktur des Präbetanins. – Im Hydrolysemuster einer im Mikromaßstab (μg -Mengen) gereinigten Probe von Präbetanin hatten wir schon früher [13] Betanin (3), Betanidin (1), Isobetanidin (2) und Glucose nachweisen können. Die damals in Betracht gezogene Betanidin-diglucosid-Struktur erschien aber zweifelhaft, als sich Präbetanin gegenüber Emulsin als resistent erwies (s. Exper. Teil). Das Problem wurde deshalb wieder aufgegriffen, nachdem wir eine genügende Menge Präbetanin zur Verfügung hatten.

Die bei der präparativ elektrophoretischen Reinigung des Randfarbstoffes anfallenden Präbetanin-Fractionen wurden gefroren aufbewahrt, bis sich Material aus achtzehn etwa 500-mg-Ansätzen gesammelt hatte. Eine weitere säulenelektrophoretische Reinigung lieferte nach dem Ansäuern auf pH 0,6 ein Präbetanin-Präparat als amorphe Fällung¹³⁾.

Das Verhältnis der Cl- und N-Analysenwerte ergab (unter Annahme von N_2 per Molekel, wie im Betanin), dass dieses Präparat einem Semihydrochlorid ($\text{Cl}_{0,5}$) entsprach. Die im Vergleich zum Betanin auffallend tiefen C- und N-Analysenwerte liessen einerseits auf eine nicht weit von der Zahl der C-Atome des Betanins (C_{24}) entfernte Kohlenstoffzahl schliessen, deuteten aber andererseits auf eine gegenüber dem Betanin (O_{13}) ungewöhnlich hohe Zahl von Sauerstoffatomen (O_{18-19}) oder dann auf die Gegenwart mindestens eines weiteren Heteroatoms hin. Tatsächlich fanden wir Schwefel in diesem Präparat, so dass sich eine Deutung der vorhandenen elementaranalytischen Werte mit einer Zusammensetzung von Betanin + $\text{SO}_3 + \frac{1}{2}\text{HCl}$ ($\text{C}_{24}\text{H}_{26}\text{O}_{16}\text{N}_2\text{S}(\text{HCl})_{0,5}$) anbot. Dies wurde auch durch die Integration des NMR.-Spektrums (Fig. 1) gestützt, welches sich in der Zahl der sichtbaren Protonen nicht vom Spektrum des Betanins unterschied.

Die Hypothese, dass es sich beim Präbetanin um ein Sulfat des Betanins handle, bestätigte sich durch die saure Hydrolyse, welche Sulfat-Ionen und (wie früher [13]) Betanin (3) lieferte (siehe auch unten).

Die Sulfatgruppe am Betanin stellt eine neue, stark saure Funktion in der Molekel dar; diese ist für die gesteigerte elektrophoretische Mobilität des Präbetanins verantwortlich. Sowohl Äquivalentgewicht (189) wie auch $\text{p}K_{a1}$ -Wert (3,12) der ersten Titrationsstufe dieses Präparates sprechen für die Formel $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{N}_2^+\text{Cl}_{0,5}(\text{COOH})_3(\text{SO}_3\text{H})_{0,5}(\text{SO}_3^-)_{0,5}$ (die Titration des freien Betanins bei $\text{p}K_{a1} = 3,4$ wies auf $\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_7\text{N}_2^+(\text{COOH})_2(\text{COO}^-)$ hin [13]).

¹³⁾ Betanin kristallisiert nach den gleichen Operationen schon gegen pH 3 als partielles Salz mit dem Puffer-Kation [13].

Die nächste Frage betrifft die Veresterungsstelle. Zwei Beobachtungen schliessen die phenolische OH-Gruppe aus: 1) Die zweite Titrationsstufe (Äqu.-Gew. 639 bei pK_{a_2} 8,8), die übrigens auch die Grössenordnung des Molekulargewichts bestätigt, ist derjenigen des Betanins [13] sehr ähnlich. (Eine Verseifung während der Titration ist ausgeschlossen, da Präbetanin auch aus einer 0,6N NH_4OH -Lösung zurückgewonnen werden kann.) 2) Das acetylierte Präbetanin, hergestellt nach der für das Betanin beschriebenen Methode [19], zeigt die NMR.-Signale einer aromatischen ($\delta = 2,48$) neben mehreren aliphatischen Acetoxygruppen ($\delta = 2,28$), wie es auch beim acetylierten Betanin ($\delta = 2,43$ und 2,28) der Fall ist [19].

Die Schwefelsäure muss also mit einer der vier Zuckerhydroxylgruppen (an C2', C3', C4' oder C6') verestert sein; dafür spricht auch die Resistenz gegen Emulsin. Die Gründe für die Bevorzugung der C6'-Hydroxylgruppe stammen aus einem Vergleich (s. Tab. 2) der NMR.-Spektren von Präbetanin (5) (Fig. 1) und Betanin (3) in CF_3COOH ¹⁴). Unter der Annahme, dass die Eichungen gegenseitig um etwa 0,03 ppm verschoben sind (Betanin aufwärts oder Präbetanin abwärts auf der δ -Skala), kann man erkennen, dass sich die im übrigen fast gleichen Spektren in folgenden drei Aspekten unterscheiden: 1) Das Aromatenprotonensignal bei 7,31 in Betanin (H4) ist soweit gegen das tiefere Feld verschoben, dass es im Präbetanin mit demjenigen des anderen Aromatenprotons (H7) zu einem verbreiterten Singlett $\delta = 7,37$ zusammen-

Tabelle 2. Vergleich der NMR.-Signale von Betanin (3) und Präbetanin (5) in Trifluoressigsäure (Chemische Verschiebungen in δ -Werten, Kopplungskonstanten in Hz)^{a)}b)

Zuordnung und Intensität ^{c)}	H11	H7	H4	H18	H12
Betanin	8,75 <i>D J = 12,5</i>	7,41 <i>S</i>	7,31 <i>S</i>	6,74 <i>S</i>	6,42 <i>D J = 12,5</i>
Präbetanin	8,73 <i>D J = 12,5</i>	7,37 <i>S</i>	7,37 <i>S</i>	6,69 <i>S</i>	6,39 <i>D J = 12,5</i>

Zuordnung und Intensität ^{c)}	H2	H1'	H15	2 × H6'	H2', H3' H4', H5'	2 × H3 2 × H14
Betanin	5,58 <i>M</i>	5,27 <i>D J = 5</i>	4,80 <i>M</i>	4,23 <i>M</i>	4,23 <i>M</i>	3,69 <i>M</i>
Präbetanin	5,52 <i>M</i>	5,21 <i>D J = 5</i>	4,70 <i>M</i>	4,70 <i>M</i>	4,19 <i>M</i>	3,67 <i>M</i>

^{a)} Hier sind die tatsächlich gemessenen δ -Werte angegeben. Für einen übersichtlichen Vergleich sollten die Signale des Betanins um 0,03 ppm feldaufwärts oder dann diejenigen des Präbetanins um ebensoviel in der anderen Richtung verschoben werden.

^{b)} Die zusammenfallenden Signale sind punktiert umrandet. Die Signale, die beim Übergang von Betanin (3) zu Präbetanin (5) ihren Platz wechseln, sind ausgezogen umrandet.

^{c)} Die Integrationen dieser Spektren sind nicht sehr verlässlich; sie stimmen aber qualitativ mit der in dieser Zeile angeführten Zahl der Protonen überein.

¹⁴⁾ Das NMR.-Spektrum von Betanin (3) ist in [19] abgebildet. Siehe auch Abschnitt über Protonenresonanzspektren im experimentellen Teil dieser Arbeit, sowie Fussnote 6 in [19].

fällt. 2) Das Signal bei 4,80, das im Betanin nur einem Proton entspricht, ist im Präbetanin auf etwa 3 Protonen angestiegen (bei 4,70), während 3) gleichzeitig das 6-Protonensignal (Glucose-Wasserstoffatome) bei 4,23 zu einem 4-Protonensignal (bei 4,19) abgesunken ist. Aus 2) und 3) kann man schliessen, dass die Einführung der Sulfatgruppe *zwei* Glucose-Wasserstoffsignale um etwa 0,5 ppm feldabwärts verschoben hat. Zwei auf gleiche Weise beeinflussbare Wasserstoffatome sind aber nur am C6' vorhanden; es ist somit sehr wahrscheinlich, dass die Schwefelsäure mit der Hydroxylgruppe am C6' verestert ist. Damit ist auch der Unterschied 1) nicht in Widerspruch, denn ein mit O6' verbundener Substituent kann in gewissen Konformationen recht nahe an H4 (und *nur* an H4) herankommen. Die sonstige Gleichheit der NMR.-Spektren bestätigt, dass das Präbetanin ein einfaches Derivat des Betanins ist, d. h. dass bei der Hydrolyse keine Umlagerung stattgefunden hat und dass die D-Glucose auch im Präbetanin β -pyranosidisch verknüpft ist.

Das IR.-Spektrum des Präbetanins (5) ist in Fig. 2 abgebildet und mit demjenigen des Betanins (3) verglichen.

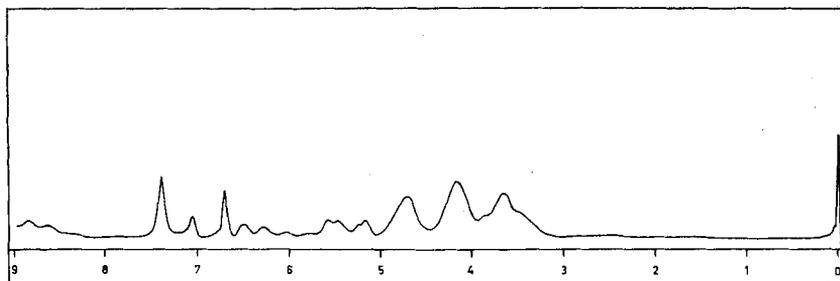


Fig. 1. Protonenresonanzspektrum von Präbetanin (5) in Trifluoressigsäure (Skala in δ -Werten). Das Originalspektrum wurde wegen des ungünstigen Signal-Rausch-Verhältnisses dreimal auf dem gleichen Papier übereinander geschrieben. Die hier wiedergegebene Kurve stellt die sich ergebende Ausmittelung (Spur der dichtesten Farbe) dar.

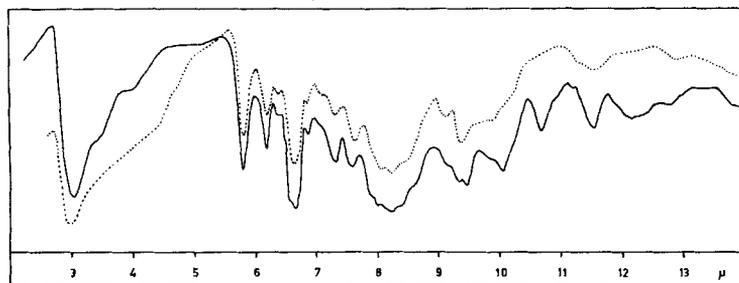


Fig. 2. IR.-Spektren von Präbetanin (5) — und Betanin (3) in KBr

Interpretation des Hydrolyse- und Methanolyse-Musters von Präbetanin. — Fig. 3 zeigt das dünnschichtchromatographische Hydrolysemuster von Präbetanin im Vergleich mit dem des Betanins. Die Zuordnung der Zonen erfolgte auf Grund der Farbtönung und der D_B -Werte im Vergleich zu authentischen Substanzen (s. Tab. 1). Das Muster von Betanin zeigt, dass die Epimerisierung wesentlich langsamer vor sich geht als die Glucosidspaltung. Im Muster des Präbetanins fällt auf, dass Be-

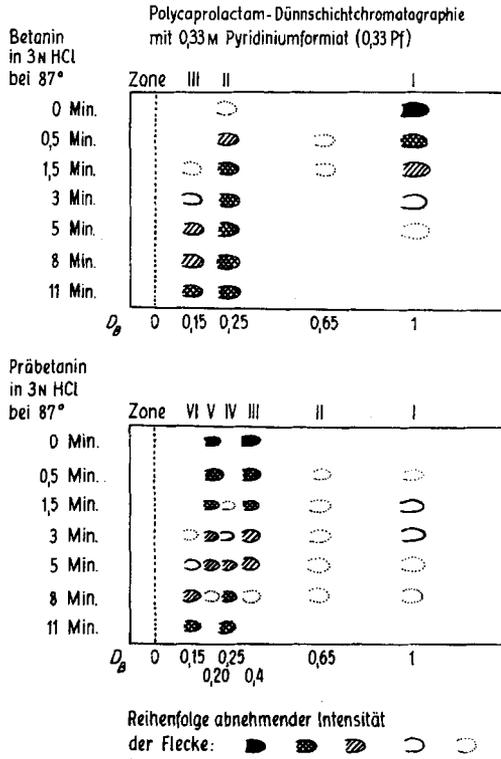


Fig. 3. «Hydrolysemuster» von Betanin (3) und Präbetanin (5) auf Dünnschichtplatten

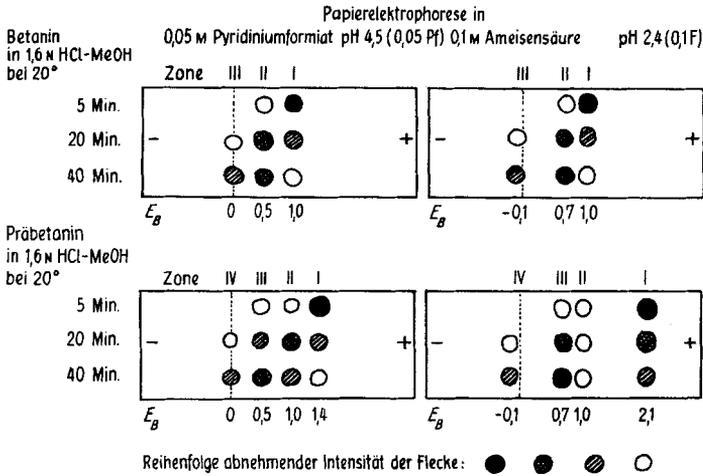
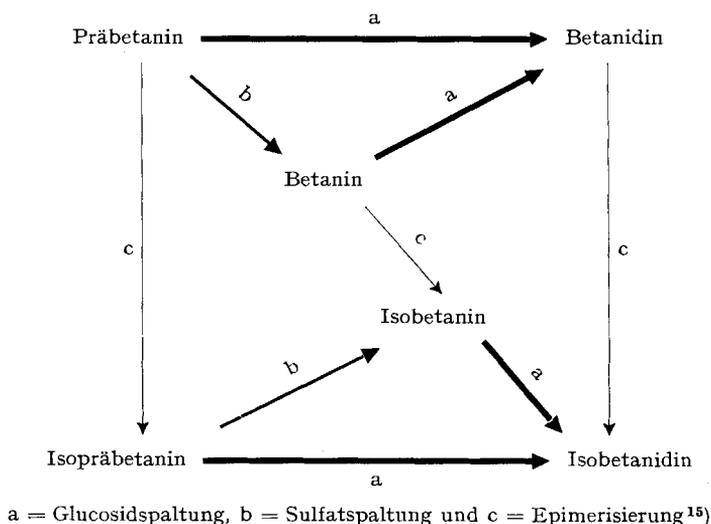


Fig. 4. «Methanolysemuster» von Betanin (3) und Präbetanin (5) auf Papierelektrophorese-Streifen

tanin im Vergleich zu Betanidin auch im frühen Hydrolysestadium nur in geringer Menge erscheint. Offenbar spaltet sich unter diesen Bedingungen die Glucosidbindung schneller als die Sulfatbindung, ein Effekt, der auch bei Polysaccharidsulfaten beobachtet worden ist [20] [21]. Das Präbetanin-Hydrolysemuster spiegelt also die folgende Serie von Reaktionen wieder:



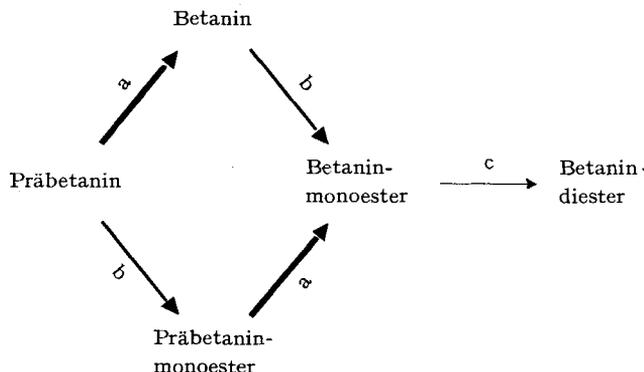
In Fig. 4 sind einander je zwei elektrophoretische Methanolysemuster von Präbetanin und Betanin gegenübergestellt. Beide Betanin-Muster zeigen drei Zonen, welche zwei aufeinanderfolgende Veresterungsstufen darstellen (Betanin \rightarrow Betanin-monoester \rightarrow Betanin-diester). Die dritte Veresterungsstufe wird von der Glucosidspaltung überschattet und führt somit zum Betanidin-triester [22]. Da sie unter diesen Bedingungen (1,6N HCl-MeOH bei Zimmertemperatur) erst nach einigen Stunden sichtbar wird, ist sie in allen hier aufgeführten Methanolyse-schemata nicht angegeben. (Es ist noch nicht bekannt, welche der drei Carboxylgruppen zuerst verestert wird, oder ob nicht sogar zwei isomere, in der Elektrophorese nicht unterscheidbare Monoester gleichzeitig gebildet werden; auch in der Bildung der zwei möglichen Diester besteht diese Unsicherheit.)

Beide Präbetanin-Methanolysemuster sind durch vier Zonen charakterisiert (zwei sehr schwache Zonen, welche im 0,1F Muster bei $E_B = 1,3$ und $1,9$ erscheinen, sind hier vernachlässigt). Gestützt auf die Ähnlichkeit der Zonen II, III und IV mit dem Methanolysemuster des Betanins in beiden Lösungen würde man auf den ersten Blick einfach eine schnelle Abspaltung des Sulfatrestes und eine folgende Veresterung des gebildeten Betanins vermuten. Bei näherer Betrachtung der Zonen I und II sieht man jedoch, dass die Intensitätsverhältnisse in den beiden Elektrolyten gerade umgekehrt sind. Eine genauere Analyse ergab, dass auch der Präbetanin-monoester gebildet wird und dass er in 0,05Pf zusammen mit dem Betanin in Zone II, und in 0,1F zusammen mit dem Präbetanin in Zone I wandert. Die Analyse bestand aus der Isolierung

¹⁵⁾ Die Dicke der Pfeile soll ungefähr die Grössenordnung der Geschwindigkeitskonstanten andeuten.

nung des 0,05Pf-Zone-II-Materials, welches sich bei der 0,1F-Elektrophorese in zwei Substanzen mit $E_B = 1,0$ und 2,1 auftrennte und welches bei der schwach alkalischen Verseifung¹⁶⁾ Betanin und Präbetanin ergab. Auch die 0,05Pf-Zone-III wurde isoliert; sie war in der 0,1F-Elektrophorese einheitlich ($E_B = 0,7$) und lieferte nach der Verseifung nur Betanin.

Das im folgenden dargestellte Reaktionsschema zeigt, dass der Schwefelsäurehalbester in der Methanolyse schneller gespalten wird als die Glucosidbindung, wie es auch bei Polysaccharidsulfaten bemerkt wurde [20] [26].



a = Sulfatspaltung, b = erste Veresterungsstufe, c = zweite Veresterungsstufe¹⁵⁾
(der Grad der Epimerisierung lässt sich mit dieser Methode nicht feststellen)

Synthese des Präbetanins (5) aus Betanin (3). – Da die Gegenwart von Schwefel und von Sulfat-Ionen im Präbetanin nur qualitativ festgestellt werden konnte, schien uns zu seiner endgültigen Strukturaufklärung noch eine Synthese nötig. Schwefelsäurehalbester von Zuckern oder Zuckerderivaten werden u. a. mittels Chlorsulfonsäure, bisher meistens in Pyridinlösung, hergestellt [24] [27], wobei die primäre Hydroxylgruppe oft schneller reagiert als die sekundären [2].

Betanin reagierte in *Trifluoressigsäurelösung* mit Chlorsulfonsäure zu einem orange-gelben Komplex, der sich in verdünnter Salzsäure in ein präbetaninfarbenes Produkt oder Produktgemisch verwandelte. Dieses wanderte in der Elektrophorese sehr schnell, in der Polycaprolactam-Dünnschichtchromatographie aber äusserst langsam. Wir möchten es als «Polysulfat» des Betanins ansprechen. Polysulfate von Zuckern sollen schneller hydrolysiert werden als Monosulfate [28], und die sekundären Sulfatgruppen schneller als die primären [21]. Tatsächlich wurde das «Polysulfat» des Betanins in 1N Salzsäure langsam hydrolysiert, wobei zuerst nebeneinander Präbetanin und ein neues Produkt, genannt *Sulfobetanin A*, entstanden; später bildeten sich auch Betanin (3) und Betanidin (1).

Nach Reinigung auf einer Polycaprolactamsäule im Mikromaßstab verhielt sich das so synthetisierte Präparat in jeder Hinsicht, inklusive Hydrolyse- und Methanolyse-Muster, wie Präbetanin.

¹⁶⁾ Unter den hier angewandten Bedingungen (0,6N NH_4OH [6]) war wohl eine Verseifung von Carbomethoxygruppen, nicht aber eine Spaltung der Glucosidbindung [6] [23] und auch keine Abspaltung der Sulfatgruppe [24] [25] zu erwarten. In einem Kontrollversuch wurde Präbetanin aus einer solchen Lösung unverändert zurückgewonnen.

Das *Sulfobetain A* zeigt ein dem Betain sehr ähnliches Elektronenspektrum und ähnliche elektrophoretische sowie dünn-schichtchromatographische Wanderungstendenzen, welche zwischen denjenigen des «Polysulfates» und des Präbetains lagen (s. Tab. 1). Es könnte sich um ein dem Präbetain isomeres Monosulfat oder um ein Disulfat des Betains handeln.

Diese Arbeit wurde vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFOND 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 Randenfarbstoffes. Die Anschaffung gewisser Apparaturen verdanken wir der JUBILÄUMSSPENDE FÜR DIE UNIVERSITÄT ZÜRICH.

Experimenteller Teil

Elementaranalysen: Die Wasserbestimmung erfolgte durch 24stdg. Trocknen der Präparate über KOH und P₂O₅ bei 0,01 Torr und Zimmertemperatur; die Analysen, sowie die IR.-Spektren (siehe unten) stammen aus dem Mikrolaboratorium dieses Institutes (Leitung H. FROHOFER).

Spektroskopie: Die spektroskopischen Daten sind in der folgenden Weise beschrieben: Elektronenspektren = UV. (Lösungsmittel): Max. oder Min. in nm (ϵ oder $E_{1\%}^{1\text{cm}}$). Infrarotspektren = IR. (Verdünnungsmittel): K (Kaiser = cm⁻¹). Die den Zahlen nachgestellten Symbole bedeuten s = starke, m = mittlere Absorption, b = breite Bande, i = Inflektion (Schulter).

Protonenresonanzspektren: Von den betreffenden Präparaten konnten nur sehr verdünnte Lösungen in Trifluoressigsäure hergestellt werden. Die damit im VARIAN-A60-Spektrometer aufgenommenen Spektren wiesen ein ungünstiges Signal:Rausch-Verhältnis auf; daher wurden die Spektren je drei- bis viermal übereinander geschrieben, was ein ausgemittelttes Spektrum ergab. Mit grösserer Unsicherheit war die Auswertung der Integration behaftet, obschon auch die Integralkurven mehrere Male nacheinander geschrieben und arithmetisch ausgemittelt wurden. – Notierung: NMR. (Lösungsmittel): δ -Wert in ppm/Multiplizität (Aufspaltung in Hz), 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 = Triplet, M = Multiplett; ein dem Symbol vorangehendes b bedeutet, dass das entsprechende Signal aus verbreiterten Linien besteht.

Papierelektrophorese: Die gelösten Proben, sowie die Vergleichssubstanzen Betain und Glucose, wurden als Tupfen auf einer Startlinie in 1,2 cm Entfernung von der Mittellinie des WHATMAN-Nr.1-Streifens (6,6 × 28 cm) auf der kathodischen Seite aufgetragen. Nach Befeuchtung der Streifen von beiden Seiten gegen die Startlinie mit den entsprechenden Pufferlösungen (0,05M Pyridiniumformiat pH 4,5 (0,05 Pf) oder 0,1M Ameisensäure pH 2,4 (0,1F)) wurden sie in der vereinfachten DURRUM-Apparatur nach WUNDERLY [29] 1–2 Std. der Elektrophorese bei 440 V unterworfen. Die Abstände der Fleckschwerpunkte von einer auf der Höhe der Glucoseflecke (entwickelt nach PARTRIDGE [30] mit Anilinphthalat) gezogenen Querlinie wurden als Werte relativ zur ebenso bestimmten Wanderungsdistanz des Betainflecks (= E_B -Werte) ausgedrückt (s. Tabelle 1). Auch wenn diese Werte (besonders die sehr hohen) durch unterschiedliche apparative Anordnungen gewissen Schwankungen unterworfen sind (bis zu 10% bei E_B -Werten über 1,7), können sie durch paralleles Mitlaufen von schnell wandernden Substanzen dennoch zur Identifizierung herangezogen werden. Gewisse Abweichungen (bis 15%) können auch in Abhängigkeit von den Proben beigemengten Verunreinigungen (besonders Säuren oder Salze) auftreten. In diesen Fällen muss das Präparat durch eine adäquate Operation vorgereinigt werden.

Papierchromatographie: Mit den gleichen Pufferlösungen (0,05 Pf und 0,1F) als Laufmittel und auf gleiche Weise befeuchtet wie bei der Elektrophorese wurden die von den Farbflecken der Zielsubstanzen und des Betains auf einem 7 × 47 cm Papierstreifen zurückgelegten Wanderungsstrecken bei durchlaufend absteigender Chromatographietechnik miteinander verglichen. Diese Wanderungscharakteristiken der Substanzen sind in Tabelle 1 als Relativwerte bezogen auf Betain (R_B -Werte) angegeben.

Dünn-schichtchromatographie: Die Wanderungseigenschaften der Substanzen in Dünnschichten von Polycaprolactam (siehe unten) mit den Laufmitteln 0,33M Pyridiniumformiat (0,33 Pf),

1N Salzsäure (1HCl) und 0,2N äthanolischer Salzsäure (0,2HCl/Et) sind als relative Werte bezüglich auf mitlaufendes Betanin (D_B -Werte, s. Tabelle 1) angegeben. Bei letzterem Laufmittel zeichnet sich neben der eigentlichen Front noch eine «innere» Front ab, welche die Grenze zwischen salzsäurehaltigem und salzsäurefreiem Äthanol markiert.

Reinheitsprüfungen: Die in Wasser gelösten Substanzproben wurden auf $6,6 \times 28$ cm WHATMAN-Papierstreifen 3MM als Zonen aufgetragen und der Elektrophorese in 0,1F unterworfen. Nach erreichter Trennung (ca. 1 Std. bei 400 V) wurden die farbigen Zonen des feuchten Papiers ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und die Eluate, nach Verdünnung mit H_2O auf gleiche Volumina, im Spektrometer beim Absorptionsmaximum ausgemessen. Die prozentuale Zusammensetzung wurde auf Grund folgender $E_{1\%}^{1\text{cm}}$ -Werte berechnet: Betanin (3) $E_{538} = 1100$, Präbetanin (5) $E_{538} = 960$; Diacetylbetanidin $E_{524} = 1010$, Monoacetylbetanidin $E_{524} = 1110$, Pentaacetylbetanin $E_{525} = 815$ und Tetraacetylpräbetanin $E_{525} = 780$; Betanidin (1) $E_{540} = 1270$. Die erwähnten Farbstoffe erleiden in 0,1F nach einer Stunde Ausbleichung annähernd im gleichen Grad (ca. 10%), so dass eine Korrektur sich in erster Näherung erübrigt.

Zubereitung von Polycaprolactam für die Dünnschichtchromatographie. In einem mit KPG-Rührer und Rückflusskühler versehenen 1-l-Dreihalskolben wurden 500 ml 10N HCl und 250 ml Wasser auf die Temperatur des siedenden Wasserbades gebracht. Unter heftigem Rühren trug man 225 g DURETHAN BK 40 F¹¹)¹⁷⁾ durch einen weitulmigen Trichter langsam doch kontinuierlich ein, wobei die Trichteröffnung wenn nötig mit einem Glasstab durchgestossen wurde. Das Rühren und Erhitzen wurde bis zur vollständigen Auflösung und dann noch weitere 5 Minuten fortgesetzt. Diese Operation dauerte gewöhnlich insgesamt 35 bis 60 Min. Die dabei in kleinem Ausmass eintretende Oligomerisierung kann in der analytischen Dünnschichtchromatographie in Kauf genommen werden. Die sirupöse Lösung wurde nun in Eiswasser gekühlt, in einen 12-l-Filtrierstutzen umgeleert und mit 800 bis 1200 ml eisgekühltem, technischem Äthanol unter Ausspülen des Kolbens verdünnt. Aus der mit einem kräftigen Propellerrührstab durchgemischten Lösung fällte man das Polyamid mit einem auf den drehenden Wellenkamm gerichteten kräftigen Strahl von Leitungswasser. Nach einer viermal (bis zur Neutralität) ausgeführten Folge von Absitzenlassen der weissen Fällung (60–90 Min.), Abhebern der überstehenden Flüssigkeit und Aufschlänmen mit etwa 1,5 l Leitungswasser wurde die Fällung auf einer 20-cm-Nutsche bei ca. 500 Torr abgesaugt und jeweils gerade bis zum Erscheinen der Filterkuchenoberfläche der Reihe nach mit 1–2 l destilliertem Wasser, 500 ml Alkohol, 200–300 ml Essigester und 200–300 ml leichtem Petroläther gewaschen. Erst nach diesen zur Vermeidung von Filterverstopfung und Rissbildung im Filterkuchen sorgfältig durchgeführten Waschoperationen wurde scharf abgesaugt und das Polycaprolactam an der Luft getrocknet. Ausbeute 200 g.

Zur Beschichtung von zwanzig 100-cm²-Platten benötigte man 20 g trockenes Polycaprolactam (etwa 50 ml Schüttvolumen), welche mit Essigester zu einer Suspension von total 80 ml aufgeschlämmt worden waren. Auf jede Glasplatte goss man 4 ml der frisch durchgeschüttelten Suspension und verteilte sie durch vorsichtiges aber zügiges Hin- und Herneigen gleichmässig auf der ganzen Oberfläche. Ein letzter Ausgleich der Schichtdicke wurde durch flaches Auffallenlassen der noch feuchten Platte auf die horizontale Tischfläche erreicht. Diese Platten sind sofort nach dem Abdunsten des Essigesters brauchbar; ihr Trennvermögen wird jedoch durch 24stdg. Lufttrocknen bei Zimmertemperatur merklich verbessert.

In einer anderen, für den Laborbedarf einfacheren und billigeren Variante wurde der oben erwähnte Filterkuchen nur mit Wasser gewaschen, noch feucht mit einem Löffel in ein weit-halsiges, gut verschliessbares Gefäss von 0,5 l übergeführt und so aufbewahrt. Die für eine Beschichtung unmittelbar benötigte kleinere Menge (ca. 10–15 ml) wurde auf eine Nutsche gebracht, nacheinander mit Alkohol und Essigester gut gewaschen und ohne Trockensaugen sofort in etwa 30–50 ml Essigester suspendiert. Das Beschichten der 15–20 Platten fand dann ebenfalls nach dem oben beschriebenen Verfahren statt, nachdem die genaue Dicke der Suspensionsschicht durch Ausprobieren an 2 bis 3 Probepplatten eingestellt worden war.

¹⁷⁾ Da Polycaprolactam in seinen Eigenschaften je nach Charge wechseln kann, ist die Reproduzierbarkeit der hier beschriebenen Vorschrift nicht absolut gewährleistet. Insbesondere sollte die zur Lösung benötigte Erwärmungsdauer (zwischen 35 und 60 Min.) und die vor der Fällung zuzugebende Menge von technischem Äthanol (zwischen 800 und 1200 ml) in Vorversuchen mit kleineren Mengen ermittelt werden.

Zubereitung von Polycaprolactam für die Säulenchromatographie. 225 g DURETHAN BK 40 F¹¹⁾ wurden wie oben für die Dünnschichtchromatographie beschrieben, aber bei nur 50°, in 750 ml 10N HCl gelöst, was 2,5 bis 3 Stunden benötigte. (Hier wird eine tiefere Temperatur gewählt um die Chancen der Depolymerisierung etwas zu verringern.) Nach Durchmischen mit 2 l Alkohol in einem 12-l-Stutzen wurde solange mit 30-proz. Äthanol versetzt, bis die Fällung als vollständig angesehen werden konnte (etwa 2,5 l in 5–10 Min.); anschliessend füllte man mit Wasser voll auf. Die sehr voluminöse Fällung wurde in 2 Portionen auf einer Nutsche von 20 cm Durchmesser mit Wasser (je 5 l) gewaschen und dann in einem 3-l-Kolben unter kräftigem Rühren 1 Std. mit 2 l Wasser gekocht. Auf diese Weise wird mono- oder oligomeres Material herausgewaschen, welches in der präparativen Chromatographie stören kann. Nach dem heiss Absaugen und Nachwaschen mit etwa 2 l kochendem und dann 2 l kaltem destilliertem Wasser bewahrte man das feuchte Polycaprolactam (etwa 2 l) in einem gut schliessenden, weithalsigen Gefäss auf. Die für die Chromatographie benötigte Menge dieses Breis wurde während 5 Min. mit der ungefähr gleichen Menge destilliertem Wasser aufgeführt und dann in die Säule eingeleert. Zur Trennung der hier untersuchten Betacyane wurde das Wasser in der üblichen Weise durch 0,1N HCl verdrängt.

Isolierung von Präbetanin. Wir gingen von einem angereicherten Betaninpräparat aus, das in unserem nach PUCHER, CURTIS & VICKERY [31] modifizierten Verfahren (zweimal wiederholte Fällung als Bleisalz) aus Randen (Roten Rüben) gewonnen worden war. Dieses wurde, in erster Linie zur Gewinnung reinen Betanins, in Ansätzen von je 400–600 mg an einer gekühlten 2,6 × 84 cm Papierpulversäule in schwach sauren Pufferlösungen¹⁸⁾ bei ca. 1000 V und 50 mA der Elektrophorese unterworfen. Die schneller wandernde *schmale* Präbetaninzone, welche unter den angegebenen Bedingungen nur knapp von der breiten Betaninzone abgetrennt war, wurde beim anschliessenden Eluieren aus der Säule mit Pufferlösung wieder mit etwas Betanin vermengt. Da sie jeweils nur geringe Farbstoffmengen enthielt, wurde sie sofort gefroren und bei –20° aufbewahrt, bis sich aus 18 Ansätzen (d. h. von insgesamt 9 g «Rohbetanin») genügend Material zur nachfolgend beschriebenen Reinigung angesammelt hatte. Die vereinigten Präbetaninfraktionen (200 ml) wurden zunächst zur Entsalzung durch 5 ml Dowex (H-Form) filtriert und im Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Der Rückstand, in 20 ml 0,05M Pyridiniumformiat aufgenommen, wurde in einer gekühlten 2,6 × 86 cm Säule mit 100 g WHATMAN-Papierpulver während 20 Std. einer Elektrophorese bei 1000 V und 50 mA unterworfen. Im Laufe der Wanderung breitete sich die rotviolette Farbstoffzone um 45 cm nach vorne aus, zeigte aber keine deutliche Trennung in eine Präbetanin- und eine Betanin-Zone¹⁹⁾. Der intensiv rotvioletten Front voran wanderten vier je ca. 1 cm breite schwach gefärbte Zonen, deren Farben in der Reihenfolge zunehmender Wanderungsdistanz 1. gelb, 2. dunkelrot, 3. hellrot und 4. hellgelb waren. (UV. des Gemisches von 1–4: Max. 529, 419, 343 nm). Die vordersten ca. 30 cm der intensiv farbigen Zone, welche offensichtlich die Hauptmenge des Farbstoffes enthielten, wurden bei der Eluierung mit Puffer in 154 ml Lösung aufgefangen; diese Fraktion enthielt gemäss einer papierelektrophoretischen Prüfung in 0,1F ausser Präbetanin nur Spuren von Betanin, während der anschliessend eluierte Ausläufer ein Gemisch von ca. 75% Präbetanin und 25% Betanin enthielt und nicht weiter verarbeitet wurde. Das Haupteluat (154 ml) wurde auf 6 ml eingengt und tropfenweise mit 18-proz. HCl (0,39 ml) auf pH 0,3 gebracht, wobei der Farbstoff bei pH 0,6 auszufallen begann. Die mikroskopisch feinkörnige Fällung wurde abgesaugt, mit 25 Tropfen 0,5N HCl gewaschen und über KOH im Vakuum getrocknet; Ausbeute 57 mg eines nicht ganz reinen (siehe unten) Präbetanin-Präparates, das etwa zur Hälfte aus Präbetanin-hydrochlorid bestand (der Anteil an Isopräbetanin ist unbekannt). Die Analyse wurde mit einem luftgetrockneten Präparat ausgeführt, dessen Gewichtsverlust beim Vakuumtrocknen 16,2% betrug. Die gefundenen Werte sind hier also mit einer Korrektur für 16,2% H₂O aufgeführt:

$C_{24}H_{26}O_{16}N_2S(HCl)_{0,5}$ (648,77)	Ber. C 44,42	H 4,12	N 4,32	Cl 2,73%
	Gef. „ 45,04; 43,25	„ 4,27; 4,36	„ 4,08	„ 2,67%

¹⁸⁾ 0,05M Pyridiniumformiat; Ammoniumacetat (3,85 g/l) – Eisessig (4,66 ml/l); Kaliumacetat (5 g/l) – Eisessig (3,5 g/l).

¹⁹⁾ Die «Verschmierung» der Zonen ist wahrscheinlich einer ungenügenden Entsalzung zuzuschreiben. In einem kleineren Ansatz mit der annähernd sechsfachen Menge Dowex führte die anschliessende Elektrophorese zur vollständigen Trennung der Präbetanin- von der Betanin-Zone.

Die potentiometrische Titration unter einer N_2 -Atmosphäre zeigte zwei Stufen: 1. $pKa_1 = 3,12$ und 2. $pKa_2 = 8,8$. Die Äquivalentgewichte beider Stufen, A_1 und A_2 , wurden aus der Einwaage einer luftgetrockneten Probe abgeleitet und sind deshalb ebenfalls für 16,2% H_2O korrigiert.

A_1 , Äqu.-Gew.: Ber. 185; Gef. 189 A_2 , Äqu.-Gew.: Ber. 649; Gef. 639

UV. (H_2O), lufttrockenes Präparat, korrigiert für 16,2% H_2O : Max. 536 (63400), 269 (8700), Infl. 293 (7300); Min. 380 (770), 240 (6000) nm (ϵ). – IR. (KBr): 1730 (s), 1623 (s), 1515 (sb), 1460 (m), 1370 (sb), 1317 (sb), 1261 (si), 1212 (sb), 1190 (sb), 1070 (sb), 1060 (sb), 1015 (s), 995 (s), 936 (s), 866 (sb) K. – NMR. (CF_3COOH)²⁰): 8,73/D ($J = 12,5$) 1 Pr (H11); 7,37/bS, 2 Pr (H4 und H7); 6,69/S, ~ 1 Pr (H18); 6,39/D ($J = 12,5$) 1 Pr (H12); 5,52/bM, 1 Pr (H2); 5,21/D ($J = \sim 5$) (H1'); 4,71/bM, 3 Pr (H15 und $2 \times H6'$); 4,19/bM, 4 Pr (H2', H3', H4' und H5'); 3,67/bM, 4 Pr ($2 \times H3$ und $2 \times H14$) δ Hz. (Ein schwaches Singlett bei 7,04 ist wahrscheinlich der Gegenwart von ein wenig Betanidin zuzuschreiben.) Die Reinheitsprüfung (siehe oben) zeigte, dass das aus der NMR.-Lösung zurückgewonnene Präparat ein Gemisch von 86% Präbetanin, 10% Betanin und 4% Betanidin darstelle²¹).

In einem anderen, auf ähnliche Weise ausgeführten Isolierungsversuch fiel ein Präbetanin-Präparat aus, das kein Hydrochlorid enthielt. Gewichtsverlust beim Trocknen 12,3%.

$C_{24}H_{26}O_{16}N_2S$ (630,54) Ber. C 45,70 H 4,12% Gef. C 45,73 H 4,53%

Durch Natrium-Aufschluss und Nachweis des dabei gebildeten H_2S , durch Hydrolyse in starker Salzsäure und Ausfällung der Sulfat-Ionen als $BaSO_4$ nach vorangehender Entfärbung mit Aktivkohle, sowie durch mikroanalytische Schwefelbestimmung nach SCHÖNIGER & WAGNER [32] wurde die Gegenwart von Schwefel in Form von Sulfat im Präbetanin sichergestellt. Die quantitativen Resultate (gef. 2,14% und 7,15% S; ber. 5,07% S für dieses Präparat) sind der kleinen Substanzmengen wegen offenbar nicht verlässlich.

Nachweis im Mikromaßstab der Bildung von Betanin durch partielle salzsaure Hydrolyse von Präbetanin. Eine Lösung von 1,5 mg elektrophoretisch reinem Präbetanin (es enthielt nur etwas Isopräbetanin, aber kein Betanin) in ca. 1 ml 5N HCl wurde 4 Min. auf 85° erhitzt und dann im Vakuum abgedampft. Der dunkelviolette Rückstand wurde in wenig Wasser aufgenommen und als Zone auf einen 7 \times 47 cm WHATMAN-Nr. 1-Papierstreifen aufgetragen. Nach 5 Std. absteigender Chromatographie mit 0,05 Pf als Laufmittel ergab sich folgendes Muster: Zone I, rotviolett (wie Betanin), breit, $R_B = 1$; Zone II, violett (wie Betanidin), $R_B = 0,7$; Zone III, violett (schwächer als II), $R_B = 0,6$. Die Zonen wurden aus dem noch feuchten Papier ausgeschnitten, wobei man die Zone I in zwei etwa gleich farbstarke Hälften, eine frontale Ia und eine rückwärtige Ib, aufteilte. Die wässrigen Eluate der Zonenausschnitte wurden auf ein kleines Volumen eingengt und mittels Tupfproben in der Papierelektrophorese und im Papierchromatogramm im Vergleich mit Betanin mit folgendem Resultat geprüft: Zone Ia, hauptsächlich Präbetanin und wenig Isopräbetanin; Zone Ib, Präbetanin, wenig Isopräbetanin und mehr Betanin; Zone II, Betanidin; Zone III, Isobetanidin. (Die beobachteten Wanderungswerte sind diejenigen, welche in der Tabelle angegeben sind.) Die von Auge abgeschätzten relativen Intensitäten von Präbetanin: Isopräbetanin: Betanin: Betanidin: Isobetanidin waren etwa 40:5:10:35:10.

Nachweis im Mikromaßstab der Bildung von Glucose durch salzsaure Hydrolyse von Präbetanin. Eine Lösung von 3 mg Präbetanin in 5 ml 5N HCl wurde 6 Min. auf 84° erhitzt und dann im Vakuum abgedampft. Der dunkle Rückstand wurde in Wasser aufgenommen und durch 5 ml Dowex (OH-Form) filtriert, wobei die gefärbten Produkte zurückblieben. Proben des konzentrierten Eluates wurden papierchromatographisch in Essigester-Wasser-Pyridin (2:2:1) und Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:5) geprüft und nach PATRIDGE [30] mit Anilinphtalat entwickelt. Der Hauptfleck wanderte in beiden Fällen gleich wie vergleichsweise mitlaufende Glucose. Ein Nebenprodukt wurde als ein im UV. nicht fluoreszierender Fleck ($R_G = 1,16$ im erstgenannten, $R_G = 1,40$ im zweiten Laufmittel) in sehr kleiner Menge beobachtet.

Versuch einer enzymatischen Hydrolyse von Präbetanin. Eine Lösung von 1 mg elektrophoretisch gereinigtem Präbetanin in 1 ml Natriumacetat-Essigsäure-Puffer (pH 4,9) wurde bei 38° mit Emulsin inkubiert. Die im Verlauf einer Stunde entnommenen Proben zeigten weder in der Papier-

²⁰) Für die Zuordnung der Signale siehe Formel 5.

²¹) Möglicherweise fand in der stark sauren NMR.-Lösung durch das Kristallwasser eine teilweise Hydrolyse statt. Die Isobetacyane wurden nicht separat abgeschätzt.

elektrophorese noch im Papierchromatogramm (beide in 0,1F) irgend eine andere farbige Substanz ausser dem Ausgangsmaterial, während eine parallel dazu inkubierte Betaninprobe nach 1 Std. schon zu 95% in Betanidin umgewandelt war (Laufwerte: vgl. Tabelle 1).

Methanolyse von Präbetanin. Eine Lösung von ca. 1 mg Präbetanin (Analysenpräparat) in ca. 0,5 ml 1,6N methanolischer HCl wurde auf 45° erwärmt und in gewissen Zeitabständen durch Tupfproben auf 6,6 × 28 cm WHATMAN-Papierstreifen in 0,05 Pf und 0,1F elektrophoretisch untersucht. Dabei beobachtete man im Verlauf von 40 Min. das langsame Verschwinden der Eduktzone (Zone I) und das sukzessive Entstehen von drei Esterzonen (Zonen II, III und IV) (Methanolysemuster) mit folgenden elektrophoretischen Eigenschaften:

Elektrophorese-Lösung	E_B -Werte der Zonen			
	I	II	III	IV
0,05 Pf	1,4	1,0	0,5	0
0,1F	2,1	1,0	0,7	-0,1

In dieser Methanolyse entstehen noch einige Nebenprodukte in kleinen Mengen (unter 5%), welche hier nicht beschrieben werden. Erstaunlicherweise aber waren die relativen Intensitäten der Zonen I und II der zwei Elektrophoreselösungen im gleichen Methanolysestadium gerade umgekehrt. Deshalb wurden die Zonen durch mikropräparative 0,05 Pf-Elektrophorese auf einem SCHLEICHER & SCHUELL-Nr. 2727-Karton voneinander getrennt, und das aus Zonen II und III mit Wasser eluierte Farbmateriale in der 0,1F Elektrophorese untersucht. Das Farbmateriale aus der 0,05 Pf-Zone II trennte sich hier in zwei Flecke mit E_B 0,1F = 2,1 (etwa 20%) und E_B 0,1F = 1,0 (etwa 80%) auf, während das Farbmateriale aus der 0,05 Pf-Zone III in der 0,1F Elektrophorese einheitlich blieb, E_B 0,1F = 0,7. Zur Identifizierung der beiden Substanzen in der 0,05 Pf-Zone II wurde deren Farbmateriale unter Sauerstoffausschluss mit verdünntem Ammoniak verseift²²⁾, wobei ein Gemisch von etwa 80% Betanin (E_B = 1,0) mit 20% Präbetanin (E_B 0,05 Pf = 1,4; E_B 0,1F = 2,1) entstand. Daraus leiten wir die folgende Zusammensetzung für die vier Zonen in den zwei Lösungen (0,05 Pf und 0,1F) ab:

Zone	0,05 Pf	0,1F
I	Präbetanin	Präbetanin + Präbetanin-monomethylester
II	Betanin (80%) + Präbetanin-monomethylester (20%)	Betanin
III	Betanin-monomethylester	Betanin-monomethylester
IV	Betanin-dimethylester (mit ein wenig Betanidin-dimethylester)	Betanin-dimethylester (mit ein wenig Betanidin-dimethylester)

Bei dieser Methanolyse bildet sich offenbar hauptsächlich zuerst Betanin, das nachträglich verestert wird.

Tetraacetyl-präbetanin. – Bei der Zugabe von 0,4 ml Acetylchlorid zu einer Lösung von 30 mg Präbetanin-hydrochlorid (das höchstens 10% Betanin enthielt) in 2 ml CF_3COOH wechselte die Farbe in wenigen Minuten gegen rotviolett. Nach ca. 7 Min. dampfte man im Vakuum ein. Zum Abtreiben von Acetylchlorid und Essigsäure wurde der Rückstand zweimal in 0,5 ml CF_3COOH gelöst und die Lösung wieder eingedampft. Der Rückstand wurde in 0,5 ml CF_3COOH zur Aufnahme des NMR.-Spektrums gelöst.

NMR. (CF_3COOH)²⁰⁾: Die Integrationen sind nicht zuverlässig; sie wurden auf- oder abgerundet: 8,80/bD (J = 12,5) 1 Pr (H11); 7,53/bS, 2 Pr (H4 und H7); 6,75/S, 1 Pr (H18); 6,43/bD (J = 12,5), 1 Pr (H12); 5,58/bS, 5–6 Pr (H2, H1' und 3–4 Glucose-H); 4,81/bM, 1 Pr (H15); 4,49/bM, 3–2 Pr (3–2 Glucose-H); 3,75/bM, 4 Pr (2 × H3 und 2 × H14); 2,48/S, 3 Pr (1 aromati-

²²⁾ Die Methode ist in [6], S. 1144, beschrieben.

ches $\text{CH}_3\text{COO}-$); 2,28/S, ~ 9 Pr (3 aliphatische $\text{CH}_3\text{COO}-$) (weitere Signale sind bemerkbar bei 7,73 und 7,40, welche wahrscheinlich zu H7 und H4 von beigemengtem Di-O-acetylbetanidin gehören). Nach dem Eindampfen der NMR.-Lösung ergab die Reinheitsprüfung (siehe oben): 66% Tetraacetylpräbetanin, 18% Diacetylbetanidin, 12% Monoacetylbetanidin, nur Spuren Betanin (3) und 4% Betanidin (1). Das Tetraacetylpräbetanin-Präparat wurde während einer Stunde unter vollkommenem Sauerstoffausschluss mit 0,6N NH_4OH ²²⁾ behandelt. Die Reinheitsprüfung (siehe oben) ergab danach die folgende Zusammensetzung: 72% Präbetanin (5) und 28% Betanidin (1). Ein auf gleiche Weise mit 0,6N NH_4OH behandeltes reines Präbetanin-Präparat zeigte keine Veränderung.

Synthese von Präbetanin (5) aus Betanin (3). Als Reaktionsgefäß diente ein 5-ml-Kölbchen (A), an dessen 12 cm langem Hals in halber Höhe ein Seitenarm mit endständigem Kölbchen (B) spitzwinklig angeschmolzen war. Eine Lösung von 10 mg Betanin-Pyridiniumsalz (elektrophoretisch gereinigt und kristallin) in 1 ml CF_3COOH in Kölbchen A und eine solche von 10 Tropfen Chlorsulfonsäure in 1 ml CF_3COOH in Kölbchen B wurden mittels flüssiger Luft gefroren und durch wiederholtes Evakuieren, Auftauen und nochmaliges Gefrieren entgast. Durch vorsichtiges Neigen des im Hochvakuum geschlossenen Gefäßsystems wurde die Lösung in B in kleinen Portionen zur Lösung in A gegeben (beide bei etwa -10°), wobei an der Mischstelle jeweils eine gelb-orange Fällung haften blieb. Diese Zugabe erfolgte so lange, bis die violette Farbe des Betanins verschwunden war. Die flüchtigen Komponenten in den beiden Kölbchen wurden im Hochvakuum bei Zimmertemperatur abdestilliert und der gelbbraune Rückstand im Kölbchen A in 5 ml 1N HCl unter Entwicklung einer tief violetten Farbe gelöst. Die in dieser Lösung bei 63–65° stattfindende partielle Hydrolyse wurde durch Dünnschichtchromatographie kleiner Tupfproben auf Polycaprolactam in 0,33 Pf, in 1HCl und in 0,2HCl/Et verfolgt: Am Anfang zeigte sich nur ein einziger roter Fleck, der in allen drei Laufmitteln am Start stehen blieb; es handelt sich hier vielleicht um ein Polysulfat oder ein Gemisch von Polysulfaten. Nach etwa 1 Std. erschienen zwei neue, etwa gleich intensive Flecke, von denen der eine den D_B -Wert und die Farbe des Präbetanins (s. Tabelle 1) aufwies, während der andere im jeweiligen Laufmittel gleich gefärbt war, aber nur etwa halb so schnell wanderte. Die diesem letzteren Fleck entsprechende Substanz, die wir *Sulfobetanin A* benennen, wird weiter unten etwas näher beschrieben. Manchmal waren auch noch zwei oder drei noch langsamer wandernde gleichfarbige Substanzen bemerkbar. Nach ungefähr 3 Std. waren auch die Flecke des Betanins und des Betanidins (s. Tabelle 1) sichtbar geworden. Die weitere Hydrolyse brachte keinen Zuwachs an Präbetanin mehr, da dieses unter den gegebenen Bedingungen offenbar ebenso schnell hydrolysiert als gebildet wurde. Auf einer Polycaprolactamsäule liess sich die dem Präbetanin entsprechende, d. h. die zweite rotviolette Zone (die erste enthielt Betanin und etwas Betanidin) mit 1N HCl als Laufmittel abtrennen. Die Lösung wurde eingedampft und das zurückgebliebene Produkt spektroskopisch und mittels Papierelektrophorese, Papier- und Dünnschichtchromatographie analysiert: UV. (H_2O , qualitativ): Max. 534 (0,92), 268 (0,22), Infl. 300 (0,14); Min. 375 (0,04), 244 (0,17) nm (O.D.). Die Wanderungsdistanzen in allen untersuchten Laufmitteln entsprachen denjenigen des Präbetanins (s. Tabelle 1), was jeweils auch durch direkten Vergleich mit parallel laufenden authentischen Proben bekräftigt wurde. Diese Analysen zeigten auch, dass das so gereinigte halbsynthetische Präbetanin nur von kaum wahrnehmbaren Spuren von Betanin und Sulfobetanin A begleitet war.

Auch die dem *Sulfobetanin A* entsprechende Bande wurde von der Polycaprolactamsäule eluiert und eingedampft. Das Sulfobetanin A zeigte dann das folgende Spektrum: UV. (H_2O , qualitativ): Max. 534 (0,72), 265 (0,18), Infl. 294 (0,14); Min. 380 (0,04), 242 (0,16) nm (O.D.), und die in der Tabelle angegebenen Wanderungseigenschaften. Dementsprechend könnte das Sulfobetanin A ein isomeres Betanin-sulfat oder dann ein Betanin-disulfat sein.

Hydrolyse- und Methanolyse-Muster des halbsynthetischen Präbetanins. Eine Lösung von etwa 0,2 mg des Rückstandes der oben erwähnten Zone des halbsynthetischen Präbetanins in 0,1 ml 3N HCl wurde auf 87° erwärmt. Dünnschichtchromatographische Analyse laufend entnommener Proben auf Polycaprolactam in allen drei Laufmitteln (s. Tabelle 1) zeigte ein Hydrolysemuster von Präbetanin, Betanin, Betanidin und Isobetanidin, das dem eines mit natürlichem Präbetanin ausgeführten Parallelversuches in jeder Beziehung entsprach (s. Fig. 3). Nach 3 Min. bestand das Hydrolyseprodukt aus $\sim 70\%$ Präbetanin, 15% Betanin und $\sim 15\%$ eines Betanidin-Isobetanidin-Gemisches.

Auch die Methanolysenprodukte von etwa 0,2 mg des halbsynthetischen Präbetanins zeigten in Papierelektrophorese-Tupfproben dasselbe Muster von Präbetanin-monomethylester, Betanin, Betanin-monomethylester und Betanin-dimethylester (s. Tabelle 1 und Fig. 4) wie es ausgehend von natürlichem Präbetanin beobachtet wurde.

SUMMARY

Prebetanin, a minor companion of betanin in the red beet, was isolated and found to be the 6'-sulfuric acid half-ester of betanin. The arguments are based on elemental analyses, partial hydrolysis and methanolysis, and on comparison of the NMR-spectra of prebetanin and betanin, and of their derivatives.

A brief treatment of betanin with chlorosulfonic acid in trifluoroacetic acid, followed by partial acid hydrolysis, yielded a mixture from which prebetanin and a new compound, called sulfobetanin A, were isolated in microquantities.

A new «spot-analytical» method for betacyanins, *i. e.* thin-layer chromatography with polycaprolactam, is introduced. The properties of prebetanin in this system, in paper chromatography, and in paper electrophoresis are compared with those of betanin, betanidin, and some of their derivatives.

The use of «hydrolysis-» and «methanolysis-patterns» for the characterization of betacyanins is described, and the patterns of betanin and prebetanin are interpreted.

Organisch-Chemisches Institut
Universität Zürich

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. REZNIK, *Z. Bot.* **43**, 499 (1955); *Planta* **49**, 406 (1957).
- [2] H. WYLER & A. S. DREIDING, *Experientia* **17**, 23 (1961).
- [3] A. S. DREIDING, Kapitel 11 in «Recent Developments in the Chemistry of Phenolic Compounds», D. OLLIS, ed., Pergamon Press, 1961.
- [4] M. PIATELLI & L. MINALE, *Phytochem.* **3**, 547 (1964).
- [5] T. J. MABRY, Kapitel «The Betacyanins and Betaxanthins» in «Comparative Phytochemistry» (T. SWAIN, ed.), Academic Press, London 1966.
- [6] M. E. WILCOX, H. WYLER & A. S. DREIDING, *Helv.* **48**, 1134 (1965).
- [7] H. WYLER & A. S. DREIDING, *Helv.* **44**, 249 (1961).
- [8] M. PIATELLI, L. MINALE & G. PROTA, *Ann. Chimica* **54**, 963 (1964).
- [9] M. PIATELLI & L. MINALE, *Phytochem.* **3**, 307 (1964).
- [10] L. MINALE, M. PIATELLI, S. DE STEFANO & R. A. NICOLAUS, *Phytochem.* **5**, 1037 (1966).
- [11] H. WYLER & A. S. DREIDING, *Helv.* **40**, 191 (1957).
- [12] O. TH. SCHMIDT & W. SCHÖNLEBEN, *Z. Naturforsch.* **12b**, 262 (1957).
- [13] H. WYLER, G. VINCENTI, M. MERCIER, G. SASSU & A. S. DREIDING, *Helv.* **42**, 1696 (1959).
- [14] O. TH. SCHMIDT & W. SCHÖNLEBEN, *Naturwiss.* **43**, 159 (1956); G. LINSTAD, *Acta chem. scand.* **10**, 698 (1956).
- [15] Fussnote Nr. 6 in [13].
- [16] H. RÖSLER, Dissertation Universität München 1960.
- [17] H. ENDRES, Kapitel in «Stationary Phase in Paper & Thinlayer Chromatography» (K. MACEK & I. M. HAIS, ed.), S. 125, Elsevier 1965.
- [18] H. WYLER & A. S. DREIDING, unveröffentlichte Resultate.
- [19] M. E. WILCOX, H. WYLER, T. J. MABRY & A. S. DREIDING, *Helv.* **48**, 252 (1965).
- [20] D. A. REES, Kapitel über «Carbohydrate Sulfates», in *Annual Rep.* **62**, 469 (1965); J. R. TURVEY, *Adv. Carbohydrate Chemistry* **20**, 183 (1965).
- [21] D. A. REES, *J. chem. Soc.* **1963**, 1821; *Biochem. J.* **88**, 343 (1963).
- [22] T. J. MABRY, H. WYLER, G. SASSU, M. MERCIER, I. PARIKH & A. S. DREIDING, *Helv.* **45**, 640 (1962); T. J. MABRY, H. WYLER, I. PARIKH & A. S. DREIDING, *Tetrahedron*, im Druck.

- [23] H. WYLER, M. E. WILCOX & A. S. DREIDING, *Helv.* **48**, 361 (1965).
 [24] E. G. V. PERCIVAL, *Quart. Rev.* **3**, 369 (1949).
 [25] R. B. DUFF & E. G. V. PERCIVAL, *J. chem. Soc.* **1941**, 830; E. G. V. PERCIVAL, *ibid.* **1945**, 119.
 [26] R. JOHNSTONE & E. G. V. PERCIVAL, *J. chem. Soc.* **1950**, 1994; T. G. KANTOR & M. SCHUBERT, *J. Amer. chem. Soc.* **79**, 152 (1957).
 [27] H. OHLE, *Biochem. Z.* **131**, 601 (1922); **136**, 436 (1923).
 [28] T. SODA & W. NAGAI, *J. chem. Soc. Japan* **56**, 1258 (1935).
 [29] CH. WUNDERLY, G. SCHNEIDER & F. HUGENTOBLE, *Compt. rend. 3. Congrès International et Européen d'Hématologie, Rome 1951*; CH. WUNDERLY, *Chimia* **7**, 145 (1953).
 [30] S. M. PARTRIDGE, *Nature* **167**, 864 (1951).
 [31] G. W. PUCHER, L. C. CURTIS & H. B. VICKERY, *J. biol. Chemistry* **123**, 61 (1938).
 [32] H. WAGNER, *Microchim. Acta* **1957**, 19.

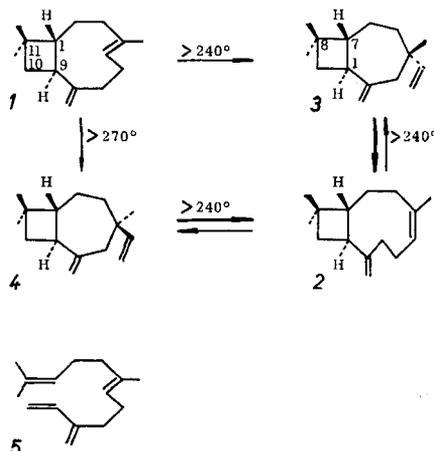
60. Thermische Umlagerungen der Caryophyllene

von G. Ohloff, G. Uhde und K. H. Schulte-Elte

(13. I. 67)

(-)-Caryophyllen (**1**) [1] neigt ebenso wie (-)-*iso*-Caryophyllen (**2**) bereits beim Erhitzen auf Temperaturen oberhalb 240° zu verschiedenartigen intramolekularen Umlagerungen.

Im Temperaturbereich bis 260° entsteht aus **1** sowohl in kondensierter als auch in gasförmiger Phase als erstes Isomerisierungsprodukt das bisher unbekannte Bicyclo[5.2.0]nonan-Derivat **3**, das jedoch schon unter Bildungsbedingungen in einer reversiblen Folgereaktion zum (-)-*iso*-Caryophyllen (**2**) [2] umgelagert wird. **2** isomerisiert sich dann seinerseits in einer weiteren, ebenfalls reversibel ablaufenden Reaktion zu



dem diastereomeren Bicyclo[5.2.0]nonan-Derivat **4**. Die Gleichgewichte dieser Sekundärreaktionen stellen sich in diesem Temperaturbereich bei 82% *iso*-Caryophyllen (**2**), 10% Bicyclo[5.2.0]nonan-Derivat **3** und 8% seines Diastereomeren **4** ein. Eine Rückbildung der Ausgangsverbindung **1** konnte nicht beobachtet werden.