

166. Biogenese der Betalaine

Biotransformation von Dopa und Tyrosin in den Betalaminsäureteil des Betanins

Vorläufige Mitteilung¹⁾

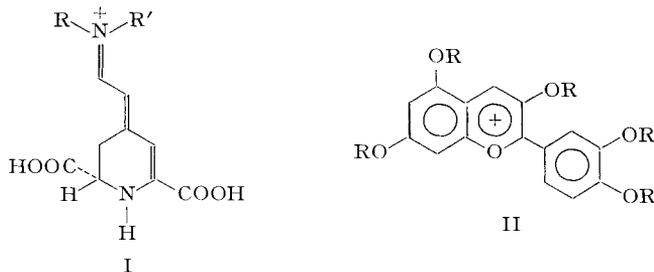
von **H. E. Miller**²⁾, **H. Rösler**, **A. Wohlpart**, **H. Wyler**, **M. E. Wilcox**, **H. Frohofer**,
T. J. Mabry und **André S. Dreiding**

Organisch-chemisches Institut der Universität Zürich
Cell Research Institute und Department of Botany, the University of Texas, Austin

(23. VII. 68)

Summary. During studies on the biogenesis of betalains (I) in cactus fruits (*Opuntia sp.*), DL-dopa-1-^[14C] and -2-^[14C] were incorporated into betanin (III) which was obtained radiopure after crystallization. The specific activity remained constant after conversion to betanidin (IV) and to a neobetandin derivative (IX). Reaction of radiobetandin with proline afforded indicaxanthin (V) carrying more than 90% of the radioactivity. Dopa (VI) is thus an efficient precursor for betalamic acid (VIII) but not for cyclodopa (VII). Decarboxylation of radiobetandin and radioindicaxanthin showed that the carboxyl group of dopa remained a carboxyl group in the biotransformation to betalamic acid. It is concluded that the aromatic ring of dopa is cleaved and that re-cyclization involving the nitrogen generates the dihydropyridine moiety. Under the same conditions mevalonic acid, aspartic acid and phenylalanine showed low incorporations. Studies with beet seedlings and DL-dopa-1-^[14C], -2-^[14C] and DL-tyrosine-1-^[14C] afforded similar results but with low incorporations.

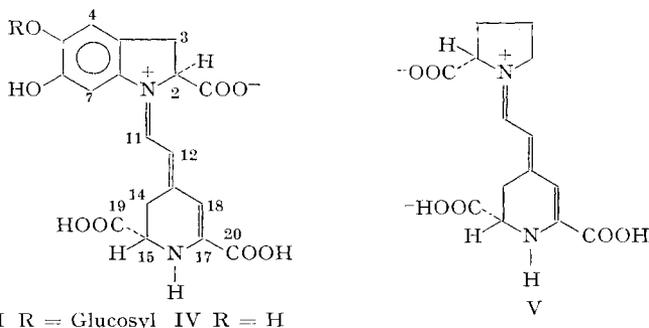
Die Betalaine (I) [1] sind rotviolette (Betacyane) oder gelbe (Betaxanthine) wasserlösliche Pigmente mit alkaloidähnlicher Struktur [2]. Ihre vermutliche Funktionsverwandtschaft mit den Anthocyanen (II), deren Platz sie bei allen Centrospermen ausser Caryophyllaceen und Illecebraceen einnehmen [3], sowie ihre von der der Anthocyane (II) so grundlegend verschiedene Struktur I präsentieren ein phylogenetisches Problem, das die Frage nach der Biogenese der Betalaine von Bedeutung erscheinen lässt.



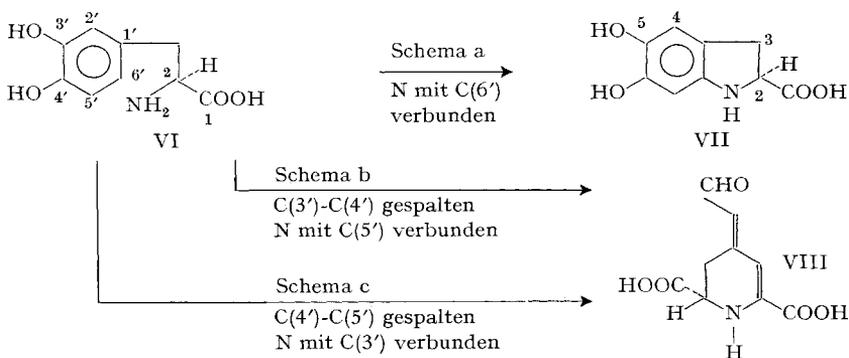
Im Zusammenhang mit der Strukturaufklärung des Betanins (III) wurde die Hypothese gemacht [4], dass die zwei Hälften der Betanidinmolekel (IV) – Cyclodopa

¹⁾ Eine ausführliche Mitteilung ist in Vorbereitung.

²⁾ National Institutes of Health Postdoctoral Fellow 1967/68.



(VII) und Betalaminsäure (VIII) – von den Pflanzen aus je einer Molekel Dopa (VI) synthetisiert werden (Schemata a, b und c; siehe auch [5]).



Wegen der Ähnlichkeit mit einem in der Melaninchemie [6] postulierten Mechanismus erschien das Schema a auf den ersten Blick besonders plausibel. Bald wurden Versuche bekannt, die den Einbau von markierten Dopa, Tyrosin und Phenylalanin in Betacyane zu bestätigen schienen [7]. Eine Unterstützung für das Schema b oder c wurde aus einem Einbau von Dopa in Indicaxanthin (V) abgeleitet [8]. Allen diesen Schlussfolgerungen haftet jedoch eine gewisse Unsicherheit an, da die *Reinheit* der auf ihre Radioaktivität geprüften Naturprodukte nicht erwiesen wurde. Nach unseren Erfahrungen haben sogar mehrfach vorgereinigte Präparate bei der Kristallisation nie weniger als 70% der Radioaktivität verloren. Offenbar können gewisse Pflanzen aus Dopa Substanzen bilden, die mit Ausnahme der Lichtabsorption den Betalainen sehr ähnlich sind.

Unsere Einbauversuche erfolgten mit DL-Dopa-1-[¹⁴C] und DL-Dopa-2-[¹⁴C] (5 bis 7,5 µc) in reifenden Früchten der *Opuntia decumbens* und *O. bergeriana* (1 bis 4 Früchte per Experiment) während 5 Std. Das Betanin in den alkoholischen (80-proz.) Extrakten wurde durch Säulenchromatographie an Aluminiumoxid und nachher an Polycaprolactam gereinigt und anschliessend durch Ansäuern einer neutralen Lösung auskristallisiert.

Die spektroskopisch (bei 538 nm) ermittelten Betacyanmengen (bei weitem zur Hauptsache Betanin) sowie die Radioaktivitäten in den verschiedenen Isolierungs-

stufen sind im folgenden Diagramm angegeben. Die Farbstoffmengen beziehen sich hier nur auf das aus den Früchten isolierte Betanin; sie sind von den gemessenen Werten durch Korrektur für die jeweils zumindest in der letzten Stufe vorgenommenen Verdünnungen mit total etwa 60 mg kristallinem Betanin berechnet worden. In allen Diagrammen beziehen sich die normal gedruckten Zahlen auf den Einbau von DL-Dopa-1-[^{14}C] und die *kursiv* gedruckten auf den Einbau von DL-Dopa-2-[$^{14}\mathbf{C}$].

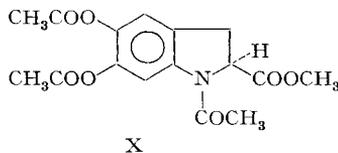
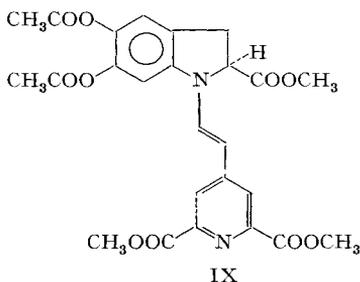
Betaninextrakt:	$4,79 \times 10^{-5} / 0,154 \times 10^{-5}$ Mol	
↓ Al_2O_3 -Chromatographie		
1. Reinigungsstufe:	$3,77 \times 10^{-5} / 0,102 \times 10^{-5}$ Mol,	$35,5 \times 10^3 / 2510 \times 10^3 \mu\text{Ci/Mol}$
↓ Polycaprolactam-Chromatographie		
2. Reinigungsstufe:	$1,93 \times 10^{-5} / 0,051 \times 10^{-5}$ Mol,	$50,2 \times 10^3 / 776 \times 10^3 \mu\text{Ci/Mol}$
↓ Kristallisation		
Krist. Betanin: (Total 4 Ernten/2 Ernten)	$1,72 \times 10^{-5} / 0,025 \times 10^{-5}$ Mol,	$3,61 \times 10^3 / 86,4 \times 10^3 \mu\text{Ci/Mol}$

Die ersten Ernten der Kristallisation hatten manchmal eine nur kleine spezifische Aktivität, da nicht immer alles zugegebene nicht-markierte Betanin in Lösung gegangen war. Die spezifische Aktivität des aus der Pflanze stammenden Anteils im kristallisierten Betanin wurde deshalb durch Kombination der gemessenen Werte mehrerer Ernten berechnet. Der Einbau der Radioaktivität betrug $3,45/2,65\%$ des zugegebenen Racemats VI.

Die Reinheit unserer kristallinen radioaktiven Betaninpräparate wurde durch saure Hydrolyse zu kristallisiertem Betanidin (IV) [9] sowie durch Umwandlung in 5,6-Di-O-acetyl-neobetanidin-trimethylester (IX) [2] ohne Verlust der spezifischen Aktivität bewiesen:

Betanin (III):	$3,54 \times 10^{-5} / 3,59 \times 10^{-5}$ Mol,	$136 / 34,0 \mu\text{Ci/Mol}$	$7,24 \times 10^{-5}$ Mol,	$139 \mu\text{Ci/Mol}$
	↓ saure Hydrolyse		↓ saure Hydrolyse	
Betanidin (IV):	$1,78 \times 10^{-5} / 2,06 \times 10^{-5}$ Mol,	$140 / 26,6 \mu\text{Ci/Mol}$	$5,15 \times 10^{-5}$ Mol,	$149 \mu\text{Ci/Mol}$
			↓ 1. $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}^+$ 2. $\text{Ac}_2\text{O}/\text{Pyr.}$	
5,6-Di-O-acetylneobetanidin-trimethylester (IX)			$2,17 \times 10^{-5}$ Mol,	$158 \mu\text{Ci/Mol}$

Diese Resultate zeigen auch, dass keine Radioaktivität in die Glucose eingeführt worden war. Eine Randomisierung fällt also nicht in Betracht.



Um die Verteilung der Radioaktivität zwischen dem Cyclodopa- und dem Betalaminsäure-Teil des Betanidingerüsts zu studieren, wurde das markierte Betanin einer Austauschreaktion mit Prolin unterworfen [10]. Dabei wurden Indicaxanthin (V) und Triacetylcyclodopa-methylester (X) mit folgenden Aktivitäten isoliert.

Betanin (III):	$16,57 \times 10^{-5} / 15,55 \times 10^{-5}$ Mol,	220	$49,5 \mu\text{Ci}/\text{Mol}$
		↓ Austausch mit Prolin	
Indicaxanthin (V):	$5,56 \times 10^{-5} / 5,16 \times 10^{-5}$ Mol,	212	$42,6 \mu\text{Ci}/\text{Mol}$
+			
Triacetylcyclodopa-methylester (X):	$3,28 \times 10^{-5} / 2,73 \times 10^{-5}$ Mol,	13,1	$2,4 \mu\text{Ci}/\text{Mol}$

Offenbar werden wesentlich mehr (über 90%) markierte Dopamolekeln (VI) in die Betalaminsäure (VIII) als in das Cyclodopa (VII) eingebaut. Dies könnte bedeuten, dass Cyclodopa oder sein 5-O-Glucosid auf einem anderen Wege, z. B. über Dopa-3'-O-glucosid oder gar über ein anderes C₉-System gebildet wird. Auf jeden Fall funktioniert Dopa (VI) als Vorläufer für die Betalaminsäure (VIII).

Einen Hinweis auf den Mechanismus der Dopa-Betalaminsäure-Biotransformation liefern Decarboxylierungsversuche. Erhitzt man Betanidin (IV) oder Indicaxanthin (V) in Gegenwart von CuO zwischen 200 und 230° 30 Min. *in vacuo*, so wird CO₂ abgespalten (siehe auch [11]). Da die Decarboxylierungen manchmal nicht quantitativ verliefen (im Falle des Indicaxanthins wurden sogar – wahrscheinlich infolge Oxydation durch das CuO – zwischen 6 und 8 CO₂ entwickelt), drücken wir die Resultate nicht in spezifischer Aktivität, sondern in Totalradioaktivität aus:

Betanidin:	$0,985 \times 10^{-5} / 1,74 \times 10^{-5}$ Mol,	$1,38 \times 10^{-3}$	$0,465 \times 10^{-3} \mu\text{Ci}$
		↓ Decarboxylierung	
Decarboxylierungs-CO ₂ :	$4,92 \times 10^{-5} / 6,41 \times 10^{-5}$ Mol,	$1,04 \times 10^{-3}$ (95,1%)	$0,044 \times 10^{-3} \mu\text{Ci}$ (8,7%)
+			
CO ₂ aus der Oxydation des Rückstandes:	$14,10 \times 10^{-5} / 23,60 \times 10^{-5}$ Mol,	$0,054 \times 10^{-3}$ (4,9%)	$0,460 \times 10^{-3} \mu\text{Ci}$ (91,3%)

Betanidin aus den Dopa-1-[¹⁴C]-Einbauexperimenten verliert 95% der Radioaktivität mit dem CO₂, gegenüber ungefähr 10% bei dem aus Dopa-2-[¹⁴C] erhaltenen Betanidin. Da die Hauptaktivität im Betalaminsäureteil des Betanidins sitzt, ist zu folgern, dass das Dopa-COOH in eine der zwei Carboxylgruppen am Dihydropyridinring (C(19) oder C(20)) verwandelt wird, während das Dopa-C(2) in das Ringgerüst der Betalaminsäure eingebaut wird.

Diese Befunde werden durch die Decarboxylierung des durch Austausch aus dem Betanin gewonnenen Indicaxanthins bestätigt:

Indicaxanthin:	$2,36 \times 10^{-5} / 1,87 \times 10^{-5}$ Mol,	$4,32 \times 10^{-3}$	$0,806 \times 10^{-3} \mu\text{Ci}$
		↓ Decarboxylierung	
Decarboxylierungs-CO ₂ :	$15,19 \times 10^{-5} / 16,7 \times 10^{-5}$ Mol,	$4,18 \times 10^{-3}$ (95,7%)	$0,125 \times 10^{-3} \mu\text{Ci}$ (17,5%)
+			
CO ₂ aus der Oxydation des Rückstandes:	$18,90 \times 10^{-5} / 16,40 \times 10^{-5}$ Mol,	$0,19 \times 10^{-3}$ (4,3%)	$0,596 \times 10^{-3} \mu\text{Ci}$ (82,5%)

Obschon die oben beschriebenen Versuche noch keinen endgültigen Schluss erlauben, erachten wir es als sehr wahrscheinlich, dass der α -Kohlenstoff des S-Dopa seine Chiralität behält und somit in das Chiralitätszentrum der Betalaminsäure verwandelt wird. Unter dieser Voraussetzung muss man folgern, dass die Betalaminsäure aus S-Dopa durch Spaltung des aromatischen Rings und nachfolgender Sechsringcyclisierung an den Stickstoff entsteht; ob nach Schema a oder b, kann noch nicht beurteilt werden.

Unter den gleichen Bedingungen wurden weder Asparaginsäure noch Mevalonsäure, und erstaunlicherweise auch nicht Phenylalanin, in einem mit dem Einbau von Dopa vergleichbaren Ausmasse in Betanin eingebaut.

Die ersten Versuche zum Studium der Betanin-Biogenese wurden mit DL-Dopa-1-[¹⁴C], DL-Dopa-2-[¹⁴C] und DL-Tyrosin-1-[¹⁴C] und Keimlingen der Roten Rübe (*Beta vulgaris*) ausgeführt. Die Resultate betreffend Einbau, Hydrolyse, Decarboxylierung und Austausch zu Indicaxanthin decken sich prinzipiell mit den oben beschriebenen mit der einzigen Ausnahme, dass die Radioaktivität der Cyclodopa- verglichen mit der Betalaminsäure-Hälfte grösser war. Diese Versuche werden hier nicht näher beschrieben, da die Einbaurate sehr klein war (0,01% im Vergleich zu 5% mit *Opuntia*-Früchten).

Diese Arbeit wurde vom SCHWEIZERISCHEN NATIONALFONDS FÜR WISSENSCHAFTLICHE FORSCHUNG unterstützt. Wir danken auch der Firma F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG, Basel, für eine Forschungsbeihilfe.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] T. J. MABRY & A. S. DREIDING, «The Betalains», S. 145 in «Recent Advances in Phytochemistry», herausgegeben von T. J. MABRY, R. R. ALSTON & V. C. RUNNECKLES, Appleton-Century-Crofts, New York 1968.
- [2] T. J. MABRY, H. WYLER, G. SASSU, M. MERCIER, I. PARIKH & ANDRÉ S. DREIDING, *Helv.* **45**, 640 (1962); T. J. MABRY, H. WYLER, I. PARIKH & ANDRÉ S. DREIDING, *Tetrahedron* **1967**, 3111.
- [3] A. S. DREIDING, «The Betacyanins, A Class of Red Pigments in the Centrospermae», S. 194 in «Recent Developments in the Chemistry of Natural Phenolic Compounds», herausgegeben von W. D. OLLIS, Pergamon Press, London 1961; T. J. MABRY, «The Betacyanins and Betaxanthins» in «Comparative Phytochemistry», herausgegeben von T. SWAIN, Academic Press, London 1966; H. REZNIK, *Z. Botanik* **43**, 499 (1955); *Planta* **49**, 406 (1957); H. WYLER & A. S. DREIDING, *Experientia* **17**, 23 (1961).
- [4] H. WYLER, T. J. MABRY & ANDRÉ S. DREIDING, *Helv.* **46**, 1745 (1963).
- [5] R. THOMAS, «Biosynthetic Pathways Involving Ring Cleavage», S. 155 in «Biogenesis of Antibiotic Substances», herausgegeben von Z. VANEK & Z. HOSTALEK, Academic Press, New York 1965.
- [6] H. S. RAPER, *Biochem. J.* **21**, 89 (1927); G. W. KIRBY & L. OGUNKOVA, *Chem. Comm.* **1966**, 546; K. HEMPEL, *Z. Naturforsch.* **22b**, 173 (1967); R. A. NICOLAUS, M. PIATELLI & E. FATTORUSSO, *Tetrahedron* **20**, 1163 (1964).
- [7] L. HÖRHAMMER, H. WAGNER & W. FRITZSCHE, *Biochem. Z.*, **339**, 398 (1964); W. FRITZSCHE, «Zur Biogenese der Betacyane und Betaxanthine», Dissertation, Universität München, 1964; A. S. GARAY & H. N. TOWERS, *Canad. J. Botany* **44**, 231 (1966).
- [8] L. MINALE, M. PIATELLI & R. A. NICOLAUS, *Phytochemistry* **4**, 593 (1965).
- [9] H. WYLER & A. S. DREIDING, *Helv.* **44**, 249 (1961).
- [10] H. WYLER, M. E. WILCOX & ANDRÉ S. DREIDING, *Helv.* **48**, 361 (1965).
- [11] O. TH. SCHMIDT, P. BECHER & M. HÜBNER, *Chem. Ber.* **93**, 1296 (1960).