

140. Zur Biogenese der Betacyane: Versuche mit [2-¹⁴C]-Dopaxanthin

von Hugo Wyler und Ursula Meuer

Institut de Chimie organique, Université de Lausanne, Rue de la Barre 2, CH-1005 Lausanne

Herrn Professor Dr. André S. Dreiding zu seinem 60. Geburtstag gewidmet

(14. II. 79)

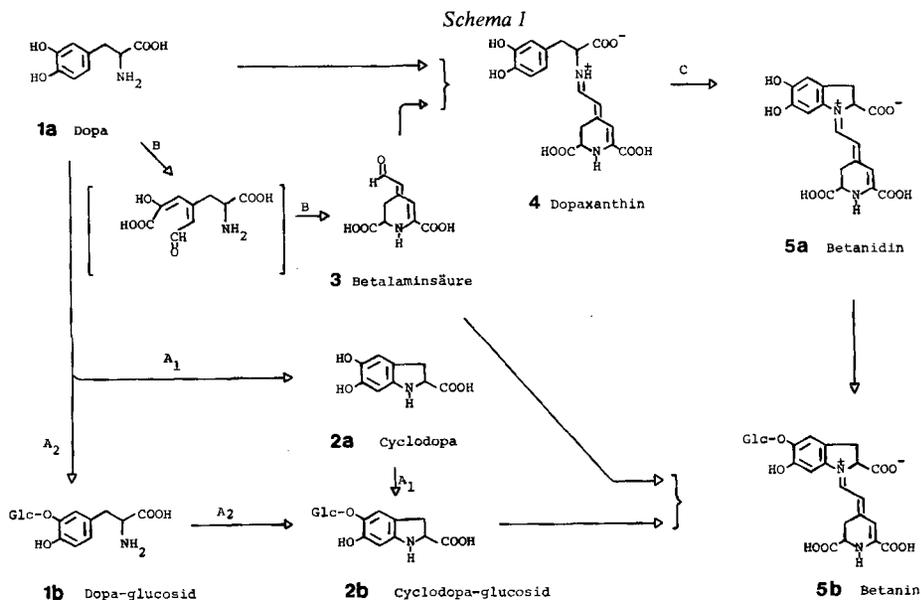
On the biogenesis of betacyanins. Experiments with [2-¹⁴C]-dopaxanthine

Summary

Labelled dopaxanthine is prepared from betanin by a double exchange procedure replacing first its cyclodopa part by diethylamine and effecting the second exchange with 2-[¹⁴C]-dopa on the purified intermediate 'DEA-betalain'; the specific activity delivered with the dopa allowed accurate determination of ϵ in the electronic spectrum of dopaxanthine (λ_{\max} 488 nm, $\epsilon = 41.800$). The C(2)-labelled dopaxanthine is incubated into the fruits of *Opuntia bergeriana*. The incorporation rates into betanin are found to correspond approximately to those obtained in earlier experiments with labelled dopa alone: Only 1-5% of the label showed up in the cyclodopa moiety of the betanin (which is isolated as cyclodopa-glucoside) whereas 99-95% of the radioactivity was associated with the betalamic acid part (recovered in form of indicaxanthine).

Einleitung. - Das allen Betacyanen gemeinsame Aglukon Betanidin (**5a**) setzt sich aus zwei isomeren C₉N-Bauteilen zusammen, die bei der Behandlung mit Base in Form von Betalaminsäure (**3**) [1] [2] und Cyclodopa (**2a**) [3] frei werden. Unsere Hypothese, dass die beiden Synthone-Hälften demselben biogenen Vorläufer, Dopa, entstammen [4], fand eine vorläufige Bestätigung durch Einbauversuche in Betanin: Radioaktiv markiertes Dopa - in das Fruchtfleisch von Kaktusfeigen inkubiert - wurde im Verhältnis 1:19 in den Cyclodopa- bzw. den Betalaminsäure-Teil des Betanins eingebaut [5a-c]. Beide Wege (vgl. *Schema 1*), lassen sich je als eine 2stufige Umwandlung von Dopa formulieren: für die Bildung von Cyclodopa - oxydative Cyclisierung und Glucosylierung (Weg A₁, oder in umgekehrter Reihenfolge, Weg A₂) - für die Bildung der Betalaminsäure - «extra-diol»-Spaltung des Catechol-Rings und nachfolgende Cyclisierung des hypothetischen Zwischenprodukts (Weg B). Anschliessend erfolgt in dieser Art konvergenter Biosynthese der Zusammenbau der beiden Synthone **2** und **3**. Ungeklärt bleibt die Ursache für das unterschiedliche Ausmass des Einbaus von Dopa in die beiden Bausteine.

Für die Bildung von Cyclodopa bzw. dessen Glucosid fehlt eine plausible mechanistische Erklärung. Bekanntlich führt die Oxydation von Dopa *in vitro* zum Dopachinon, welches unter neutralen oder basischen Bedingungen rasch den Ring-



schluss zum Cyclodopa eingeht; das sehr oxydationsempfindliche Cyclodopa unterliegt unverzüglich einer weiteren Oxydation zum roten, instabilen Chinon «Dopachrom» [7]. Es ist deshalb nicht einzusehen, wie das als Zwischenprodukt auftretende Cyclodopa abgefangen wird.

Cyclodopa wurde bisher nur im Zusammenhang mit Betacyanen gefunden, während die Betalaminsäure, abgesehen von ihrem Fundort in «Betelain-haltigen» Pflanzen [2] [6], auch in gewissen höheren Pilzarten nebst einem isomeren «extradiol»-Spaltungsprodukt, dem Muscaflavin, auftritt [8]. Eine attraktive Möglichkeit schien uns, dass zuerst Dopaxanthin (4), ein aus Betalaminsäure und Dopa kombiniertes Betalain, entsteht, dessen oxydative Cyclisierung zum stabilen Betanidin führen müsste (*Schema 1*, Weg C). Botanisch-phenomenologische Beobachtungen deuten an, dass der Betacyan-Bildung stets diejenige von Betaxanthinen vorangeht. Dopaxanthin ist als Naturstoff bereits bekannt; *Impellizzeri & Piattelli* [9] haben es aus Blüten von *Gottiphyllum longum* isoliert. Gegen eine Vorläufer-Rolle des Dopaxanthins sprechen jedoch die Tatsachen, dass dieses Betaxanthin bisher nicht in Betacyan-produzierenden Pflanzen bemerkt wurde und dass, wie *Sciuto et al.* feststellten [10], in gelben *Celosia*-Arten die Betacyan-Bildung wohl durch zugeführtes Cyclodopa oder Cyclodopa-glucosid nicht aber durch Dopaxanthin induziert werden kann. Wir wollten diesen Biogenese-Weg noch durch einen direkten Versuch überprüfen.

Herstellung des radioaktiven Dopaxanthins. - *Impellizzeri et al.* [9] haben Dopaxanthin nach der üblichen Prozedur [1] hergestellt, indem sie den Cyclodopa-Teil des Betanins in verd. Ammoniak gegen (in Überschuss vorhandenes) Dopa austauschten. Zur Herstellung unseres radioaktiven Precursors war uns daran gelegen, mit stöchiometrischen Mengen auszukommen. Eine solche Möglichkeit bietet an

sich das Verfahren von *Kimler et al.* [2] durch direkte Kondensation von Betalaminsäure (3) mit Dopa 1:1. Wir haben es vorgezogen, anstelle der freien Betalaminsäure als Zwischenprodukt ein aus Diäthylamin und Betalaminsäure zusammengesetztes Betaxanthin - genannt «DEA-Betalain» (6)¹⁾ - herzustellen, dessen flüchtiger Basenrest in einer weiteren Austausch-Reaktion durch Dopa ersetzt werden kann.

«DEA-Betalain» entsteht bei der Behandlung von Betanin in verd. Ammoniak und unter Sauerstoff-Ausschluss mit überschüssigem Diäthylamin²⁾. Seine Reinigung erfordert allerdings zwei Schritte: Eine Chromatographie an Sephadex-Kationen-Austauscher (H⁺-Form) mit Wasser entfernt allfällig enthaltenes Neobetain (7)³⁾ sowie restliches Betanin; «DEA-Betalain» (6) verlässt die Kolonne im Gemisch mit Cyclo-dopa-glucosid 2b und wird erst im zweiten Reinigungsschritt, einer Säulen-Elektrophorese bei pH 4,5, von diesem abgetrennt. Zur weiteren Reinigung kann die aus der Elektrophorese erhaltene Lösung, zur Befreiung vom Pufferkation, erneut durch eine Sephadex-Ionenaustauscher-Säule filtriert werden; nach dem Eindampfen erhält man das reine «DEA-Betalain» in ca. 61% Ausbeute ($\epsilon_{477} = 40\,800$, H₂O). Die wässrige Lösung ist neutral einige Tage gut haltbar.

Für den zweiten Austausch, der zum Dopaxanthin führen soll, lässt sich die in der Elektrophorese erhaltene Lösung des reinen «DEA-Betalains» direkt verwenden. Nach Messung des Gehaltes fügt man die äquivalente Menge [2-¹⁴C]-Dopa bei und destilliert im Vakuum 0,6N Ammoniak dazu. Das angesäuerte Reaktionsgemisch enthält zur Hauptsache Dopaxanthin und «DEA-Betalain» sowie wenig von einigen nicht bekannten Nebenprodukten, die sich alle als wohl definierte Zonen in der Säulenelektrophorese bei pH 4,5 voneinander absetzen. Die radioaktive Dopaxanthin-Lösung wurde unmittelbar verwendet oder bis zum Gebrauch tiefgefroren aufbewahrt. Auf der Basis der bekannten spezifischen Radioaktivität des eingesetzten Dopa liess sich durch eine kombinierte Absorptions- und Radioaktivitäts-Messung⁴⁾ die molare Extinktion des Dopaxanthins bestimmen ($\epsilon_{478} = 41\,800$, H₂O).

Die Einbauversuche. - In Anlehnung an die früheren Arbeiten von *Miller et al.* [5a] haben wir die Einbauversuche an roten Kaktusfrüchten von *Opuntia bergeriana* vorgenommen. Konzentrate von aliquoten Mengen der Dopaxanthin-Lösung wurden auf die angeritzten Schnittflächen von halbierten Früchten pipettiert.

-
- 1) Diäthyl-[6-carboxy-2,3-dihydro-4-(1*H*)-pyridylden]-äthyliden]ammonium-2-carboxylat; die Bezeichnung «DEA-Betalain» verwenden wir hier der Vereinfachung halber.
 - 2) In Gegenwart von Diäthylamin allein findet keine Reaktion statt.
 - 3) Neobetain findet sich stets in gelagerten Betanin-Präparaten. Wir haben das Produkt bisher nicht beschrieben, seine Entstehungsweise ist nicht geklärt. Charakteristisch, wie für alle Neobetain-Derivate, ist die bathochrome Verschiebung des Hauptabsorptionsmaximums in saurer methanolischer Lösung: neutral 472 nm, sauer 500 nm. In der Elektrophorese bei pH 4,5 wandert Neobetain als dunkelgelbes Band unmittelbar vor der Betanin-Zone, in der Chromatographie auf saurem Sephadex-Ionenaustauscher passiert Neobetain unbehindert.
 - 4) Bestimmungen der Extinktionswerte von Betaxanthinen sind erfahrungsgemäss mit einer gewissen Unsicherheit behaftet, die auf verschiedenen Faktoren beruht: Feuchtigkeit, evtl. variabler Versalzungsanteil und Stabilität. Ein von uns früher berichteter Wert für Indicaxanthin $\epsilon_{488} = 62\,000$, H₂O [1] kann deshalb nicht zutreffen.

Das Verfahren zur Isolierung des reinen Betanins beschränkt sich auf 4 Reinigungsschritte. Die Frucht-Extrakte mit 80proz. Alkohol wurden durch eine kurze Schicht Sephadex-Kationen-Austauscher SP C25 filtriert. Der Hauptschritt, eine Chromatographie mit 0,01N Ameisensäure an Sephadex SP C25 entfernte den grössten Teil der Fremdaktivität aus der relativ rasch wandernden Betanin-Zone. Diese wurde in einer Hochspannungs-Papierelktrophorese bei pH 4,5 gereinigt, wobei die spezifischen Aktivitäten um 24 bzw. 29% zurückgingen. In der letzten Stufe wurde das Eluat der Betaninzone zusammen mit der frisch bereiteten Eluatlösung einer präparativen Elektrophorese von Betanin kristallisiert; hier erreichte der Aktivitätsverlust 27 bzw. 39%. Insgesamt geht die spezifische Aktivität des Betanins nach der ersten Reinigungsstufe nur auf etwa die Hälfte zurück, während in früheren Verfahren noch in der letzten Stufe der Kristallisation erheblich höhere Verluste auftraten.

Das Verfahren zur Bestimmung der Aktivitätsverteilung innerhalb des Betanins liess sich ebenfalls vereinfachen: Aus dem kristallinen Betanin erhielten wir in der bekannten Austausch-Reaktion mit Prolin in 0,6N Ammoniak [1] ein Gemisch von wenig Neobetain (7), Betanin (5a) und hauptsächlich Indicaxanthin (8), Cyclo-dopa-glucosid (2b) und Prolin, welches in dieser Reihenfolge in einem Arbeitsgang

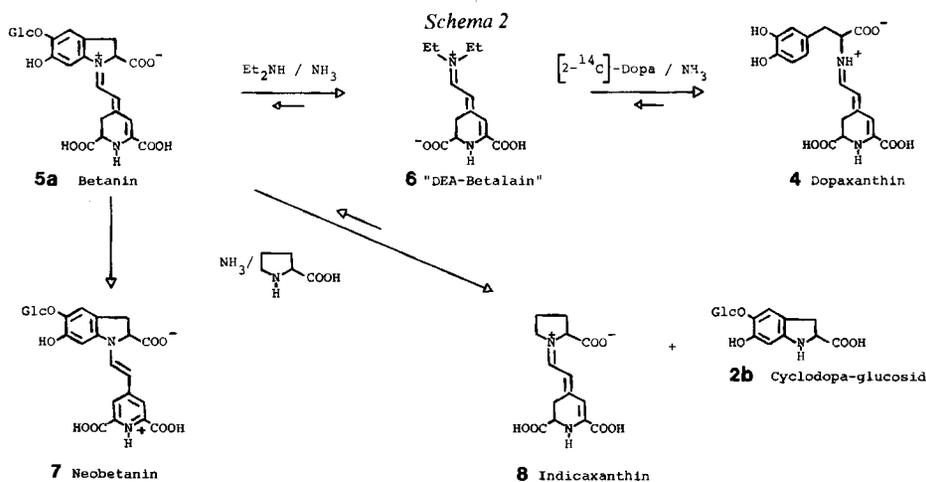


Tabelle I. Charakterisierung der Produkte

Substanz	E_B -Werte ^{a)}		Spektrum λ_{\max} in nm (ϵ)	
	pH 2,4	pH 4,5		
Neobetain			469 (18200)	H ₂ O
			472 (16000)	MeOH, neutral
			500 (18400)	MeOH, sauer
DEA-Betalain	-0,15	+0,95	475 (40800)	H ₂ O (Schulter 465)
Dopaxanthin	+0,70	+1,4	478 (41800)	
Cyclo-dopa-glucosid	-0,35	+0,08	284 (4200)	

a) Relative Wanderungswerte in der Papierelktrophorese bezogen auf Betanin, $E_B = 1,0$, und Glucose, $E_B = 0$.

Tabelle 2. *Einbauversuche mit Dopaxanthin in Früchte von Opuntia bergeriana*

Einbaubedingungen	½ Kaktusfrucht, 8,6 g Auftragslösung pH 4,5 Inkubationsdauer 5 Std.			½ Kaktusfrucht, 14,2 g Auftragslösung pH 8 Inkubationsdauer 15 Std.				
	Menge nmol	Ausbeute pro Stufe	Aktivität nCi	Spezif. Aktivität Ci/mol · 10 ⁻⁶	Menge nmol	Ausbeute pro Stufe	Aktivität nCi	Spezif. Aktivität Ci/mol · 10 ⁻⁶
	gesamt	gef.	korr.	gef.	gesamt	gef.	korr.	gef.
Angebot an Dopaxanthin	1393			6268	4500000			4500000
Extrakt								
Dopaxanthin	1000							
Betanin	1620							
Sephadex Chromatogramm								
Dopaxanthin	180							
Betanin	1275	100 %	45,1	45,1	35400	35400	112,8	112,8
Papier-Elektrophorese								
Betanin aufgetragen	1122	88 %	(39,7)					
Betanin eluiert	966	86 %	26	34,3	26940	26940	63,7	80,9
Kristallisation								
PE-gereinigtes Betanin	937	97 %	73,4%		(26940)			(59,8)
inaktives Betanin	38250							
Total	39187							
kristallines Betanin	23330	61 %	44,8%	11,3	25,1	483	25,1	49,7
Betanin in Mutterlauge	14800	38,7%	28,4%	12	42,2	809	29,3	129,9
Austausch gegen Prolin								
kristallines Betanin	22860	98 %	43,9%	(11,0)	(483)	(19700)	(24,1)	(49,7)
Produkte:								
Neobetain	1440	6 %	2,6%	0,8	32,4	586	2,5	93,6
restliches Betanin	652	2,8%	1,2%	0,7	55,3	1040	0,9	86
Indicaxanthin	21100	92	40,4%	11,1	27,4	525	24,1	49,6
Cyclodopa-glucosid	17000	74,4%	32,6%	0,5	1,6	30	0,2	0,5

Anmerkungen. Die korrigierten Werte (korr.) sind aus den gemessenen (gef.) an Hand der spektroskopisch bestimmten Gesamtausbeuten auf die ursprünglich im Sephadex-Chromatogramm gefundene Betainmenge bezogen umgerechnet: Aktivität korr. = Aktivität gef. (100/Gesamtausbeute), spezif. Aktivität = (Aktivität korr. (nCi)/Sephadex-Betanin (nmol)). Zahlen in Klammern bedeuten keine unabhängige Bestimmung, sondern entsprechen vorangehend gemessenen Werten.

an Sephadex-Kationen-Austauscher (Lösungsmittel: 0,01 N Ameisensäure) in seine Komponenten zerlegt wurde. Der Gehalt der Fraktionen wurde spektrophotometrisch bestimmt, wobei wir uns auf die in der *Tabelle 1* aufgeführten Extinktionswerte stützen. Parallel dazu wurden die Radioaktivitäten durch Verbrennungsanalyse nach *Frohofer* [11] bestimmt; die Genauigkeit der Messungen liegt innerhalb von 3%. Alle Daten sind in der experimentellen *Übersichtstabelle 2* verzeichnet, die wir nachfolgend kommentieren. Von Belang sind hierbei die sog. korrigierten Werte für Aktivität und spezifische Aktivität. Der Korrektur besteht darin, dass diese Werte für Vergleiche mit Bezug auf die aus der Pflanze gewonnene Betaninmenge (Sephadex gereinigtes Betanin) umgerechnet sind.

Resultate und Diskussion. - Unsere beiden Versuche unterscheiden sich in mehreren Parametern: Grösse der Früchte, Konzentration und pH der angebotenen Precursor-Lösung sowie Inkubationsdauer; die Resultate weichen erwartungsgemäss voneinander ab, weisen aber im wesentlichen in dieselbe Richtung. Im zweiten Versuch erhielt die grössere Frucht (14,2 g gegenüber 8,6 g) die grössere Portion an Dopaxanthin (16470 gegenüber 6268 nCi) während einer längeren Inkubationsdauer (15 gegen 5 Std.) angeboten; dementsprechend finden wir in diesem Versuch den kleineren Verdünnungswert⁵⁾ (108 gegen 228) d. h. den höheren spezifischen Einbau⁵⁾ (0,0093 gegenüber 0,0044) der Dopaxanthin-Aktivität im Betanin. Die beobachtete Variation des Verdünnungswerts bleibt durchaus im Rahmen des zu Erwartenden bei unterschiedlichem «pool» in verschiedenen Pflanzenindividuen (bis zu 300-400% gemäss [12]). Das prozentuelle Einbau-Ausmass⁵⁾ ist hingegen in beiden Versuchen annähernd gleich (0,4 gegenüber 0,3%) also proportional dem Precursor-Angebot.

Aus beiden Versuchen geht nun übereinstimmend hervor, dass Dopaxanthin nicht im Betanin eingebaut sein kann. Der Betalaminsäure-Teil (siehe Indicanxanthin) enthielt fast die ganze Aktivität des Betanins, 95-99%, der Cyclodopa-Teil, erstmals direkt isoliert, nur deren 5-1%. Ein auch nur teilweise erfolgter direkter Übergang des Dopaxanthins in Betanidin hätte wesentlich mehr Aktivität im Cyclodopa-Teil aufzeigen müssen.

Diese Resultate entsprechen effektiv denjenigen, die beim Einbau von Dopa allein schon beobachtet wurden [5a] [5c]; sowohl halten sich die absoluten Verdünnungswerte des Einbaus im Betanin im selben Rahmen⁶⁾ als auch die relativ-Werte des Einbaus in den beiden Skeletteilen. Dopa wird demnach leicht aus dem gelieferten Dopaxanthin ausgebaut und sogleich, wie bekannt, zur Betalaminsäure-Synthese verwendet. Die Bildung des Cyclodopa-glucosids und dessen Vereinigung mit der Betalaminsäure steht offenbar im Wettbewerb mit dem Angebot aus dem pflanzen-eigenen Haushalt. Die Frage, ob Dopa tatsächlich Vorläufer des Cyclodopa ist, bleibt weiterhin berechtigt; hierzu fehlt noch eine Bestimmung der Aktivitätsverteilung im geernteten Cyclodopa-glucosid.

5) Die hier verwendeten Ausdrücke entsprechen folgenden englischen Bezeichnungen: Verdünnungswert = dilution value (spec. activity of precursor/spec. act. of product); spezifischer Einbau = specific incorporation (reciprocal of dilution value); proz. Einbau-Ausmass = perc. degree of incorporation ($100 \times \text{total activity of product} / \text{total activity of precursor}$) [12].

6) Verdünnungswerte der Literatur: [1-¹⁴C]-Dopa 390 [5a]; [2-¹⁴C]-Dopa 30 [5a] und 577 [5c].

Dem Schweizerischen Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschung danken wir für die gewährte Unterstützung dieser Arbeit (Projekte 2.696-0.76, 2.496-0.75 und 2.0890-0.73). Wir danken Herrn Dr. J. Würsch und der Firma F. Hoffmann-La Roche & Co. für eine Gabe von [2-¹⁴C]-Dopa, Herrn Jean Amiguet, Le Mont Lausanne, für seine freundliche Besorgung der Kaktusfrüchte.

Experimenteller Teil

Allgemeines. - UV-Spektren wurden auf einem Unicam SP 1800 registriert. Die Eluatkontrolle erfolgte mit einem Spectrophotometer Cecil 202 in einer Durchflusskuvette Hellma Typ 178 (1 cm und 0,1 cm Schichtdicke). Hochspannungs-Papiererelektrophoresen wurden mittels eines Camag-HVE-Systems ausgeführt. Das zur präparativen Trennung verwendete Whatmann-3MM Papier wurde vor Gebrauch mit 0,01M EDTA-Lösung und destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Präparative Säulenelektrophorese führen wir in unserem eigenkonstruierten System durch (das in einer späteren Publikation beschrieben wird). Zur Bestimmung der Radioaktivität werden Proben von 0,05 bis 0,2 ml der Lösungen in Schiffchen aus Aluminiumfolie pipettiert und bei mässigem Vakuum im Exsikkator über P₂O₅ eingetrocknet. Die Proben wurden nach der Methode von Frohofer [11] mit inaktiver Benzoesäure zusammen verbrannt und das entstehende CO₂ durch Scintillationszählung in Äthanol/Äthanolamin 9:1 ausgemessen; diese Analysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium der chemischen Institute der Universität Zürich (Leitung H. Frohofer) ausgeführt.

Die Früchte von *Opuntia Bergeriana* stammen aus der Gärtnerei von Herrn Jean Amiguet, Le Mont/ Lausanne; Kaktuszweige mit jungen Früchten wurden (im Juni) aus Spanien hergebracht, eingepflanzt und bis zur Reife (im Dezember) aufgezo-gen.

«DEA-[2-¹⁴C]-Betain». - *Austausch.* Zu 107,6 mg 64,9proz. Betain, d.h. 69,8 mg (0,127 mmol) wird im geschlossenen System i.H.V. ein Gemisch von 5 ml, i.V. 2mal entgastes 0,6N Ammoniak und 124,6 mg (1,70 mmol) Diäthylamin destilliert. Nach 30 Min. wird dem gefrorenen, gelbbraunen Gemisch unter Stickstoff 0,4 ml 50proz. Ameisensäure zugesetzt, so dass sich beim Auftauen ein pH von 4,1 einstellt. Eine für die spektroskopische Untersuchung verdünnte Probe der rötlichen Lösung zeigt bei 477 bzw. 536 nm das Maximum des Diäthylamin-Betains bzw. des Betains. (Aus der Absorption des Maximums bei 536 nm wird ein Rest-Betain-Gehalt von 9,06 mg (0,016 mmol) errechnet; nach Abzug des Absorptionsbeitrags des Betains bei 477 nm ergibt sich ein Gehalt von 18 mg (0,058 mmol) «DEA-Betain».)

Chromatographie. Die Reaktionslösung wird auf 4 ml eingengt und auf eine Kolonne Sephadex SP C25 H⁺-Form 58 × 4 cm gegeben. Im Laufe der Chromatographie mit Wasser zieht sich das Trägerbett auf 54 cm zusammen. Nach 240 ml Vorlauf hat eine erste orange Zone, Neobetain, das Säuleneende erreicht und es ergibt sich, von unten nach oben geschildert, folgendes Trennungsbild: orange (14 cm), farblos (22 cm), violett (3 cm), gelb (13 cm), farblos (2 cm); die gelbe Zone unterteilt sich im weiteren Verlauf der Chromatographie in eine gelbe (35 cm, «DEA-Betain») und eine citrongelbe (8 cm) Zone, die durch einen farblosen Streifen (5 cm) eben voneinander getrennt sind. *Fraktion 1:* Orange, 102 ml, 29,6 mg (0,054 mmol) Neobetain (Mol.-Gew. 548); λ_{max} (H₂O) 469 (ε = 18200); λ_{max} (Methanol) 472 nm (ε = 16000 ± 1000); λ_{max} (Methanol/HCl) 500 nm (ε = 18400 ± 300). *2. Fraktion:* farblos, 320 ml. *3. Fraktion:* rotviolett, 29,5 ml Betain (Mol.-Gew. 550), spektroskopisch ermittelter Gehalt 0,009 mmol (7%) (basierend auf λ_{max} (H₂O) 538 nm (ε = 60000)⁷⁾). *4. Fraktion:* rot, 61 cm, Gemisch von Betain und «DEA-Betain»; spektroskopisch ermittelte Anteile: Betain 0,005 mmol (4%). «DEA-Betain»-formiat 0,002 mmol (2,5%) (Betainbeitrag bei 478 nm (ε = 19500) angerechnet). *5. Fraktion:* gelb, 1250 ml, «DEA-Betain»-formiat (Mol.-Gew. 312), spektroskopisch ermittelter Gehalt 0,054 mmol (λ_{max} 477 m (ε = 41000)) (Ausbeute 42,5%). Ausbeute berechnet nach Abzug des ursprünglich vorhandenen Neobetains (Betain korr. = 0,073 mmol) «DEA-Betain» total 76%, isoliert 74%, Rest Betain 19%, unbekannt 5%.

Elektrophorese. Eine mit 100 g Whatman-Papierpulver nass gefüllte Säule, Trägerschicht 81 × 2,5 cm, wird zuerst mit 0,01M EDTA (3,72 g/l), dann mit ca. 0,05M Ammoniumformiat-Puffer pH 4,5 gewaschen (18,7 ml 25proz. Ammoniak und 11,5 g Ameisensäure auf pH 4,5 eingestellt). Die durch Sephadex-Chromatographie erhaltene «DEA-Betain»-Fraktion (0,054 mmol) wird auf 3 ml eingengt; auf diese Säule eingetragen ergibt sich eine Startzone von 3 cm. Nach einem Lauf in Richtung Anode

⁷⁾ Siehe Wylar et al., Helv. 42, 1969 (1959); der in jener Publikation erwähnte Wert für Betain war auf ein Mol.-Gew. von 564 berechnet und wurde hier korrigiert.

11,5 Std. bei 900 V/130 mA und 5,5 Std. bei 1130 V/163 mA ist eine genügende Trennung erreicht (farblos 32 cm, gelblich 4 cm, rosa 4,5 cm, intensiv gelb 9 cm, grau 6,5 cm, rosa 4 cm, gelblich 7 cm, farblos 14 cm); man lässt 100 ml auslaufen wobei die gelbe Frontzone um 20 cm vorverlegt wird. Zur Fokussierung der Zonen belässt man weitere 2,5 Std. bei 1130 V/163 mA und erhält nun folgendes Trennungsbild von der Front=Anodenseite her aufgezählt; farblos 2 cm, gelblich 4,5 cm, rosa 4,5 cm, farblos 3 cm, gelb 10 cm (Hauptzone), gelblich 10 cm, rosa 10 cm, gelblich 12 cm, farblos 25 cm. Die Fraktionierung wird mit Hilfe einer 1 cm Durchflusskuvette bei 280 nm kontrolliert: 1) gelblich, 49 ml, 2) gelb, (intensiv) 55 ml «DEA-Betalain», 3), gelb, 30 ml, 4) orange, 20 ml, 5) gelblich, 200 ml (enthält Cyclodopa-glucosid). Spektroskopisch ermittelter Gehalt der «DEA-Betalain»-Lösung: 0,044 mmol.

[2-¹⁴C]-Dopaxanthin. - Die durch vorangehende Elektrophorese erhaltene «DEA-Betalain»-Fraktion (0,044 mmol) wird i.V. schonend zur Trockene eingedampft. Man fügt 8,77 mg (0,044 mmol) [2-¹⁴C]-Dopa (4,5 Ci/mol) bei und destilliert dazu 5 ml i.HV. 2mal entgastes 0,6N Ammoniak. Nach 30 Min. wird im geschlossenen System zur Trockene eingedampft. Nun werden wiederum 5 ml 0,6N Ammoniak zudestilliert und nach 30 Min. wieder entfernt. Der Rückstand, in 3 ml Ammoniumformiat-Puffer gelöst, wird auf eine Elektrophoresensäule gebracht. Nach 15 Std. bei 860 V/60 mA ergibt sich, von der Anodenseite her notiert, folgendes Bild: farblos 15 cm, citronengelb 17 cm, gelb (intensiv) 9 cm, schwach gelb 4,5 cm, gelb 10 cm, grau 19 cm, leicht violett 2 cm, farblos 5 cm. Das Eluat wird mit der UV.-Durchflusskuvette (1 cm) 280 nm kontrolliert; nach 110 ml (erste citronengelbe Zone) werden 100 ml der reinen Dopaxanthin-Fractionen zusammengenommen. UV. (H₂O), Verdünnung 1 ml auf 25 ml, OD (λ_{\max} 488 nm) 0,271. Radioaktivität: 2 Proben von je 0,05 ml eingetrocknet mit inaktiver Benzoesäure verbrannt ergeben 81062 bzw. 80854 dpm, Mittel: 80958 dpm = 36,467 nCi. Bei angenommen gleicher spezifischer Aktivität wie die des eingesetzten Dopa ergibt sich ein Gehalt von 0,0162 mmol (36%) der Dopaxanthin-Lösung; aus der UV.-Absorption wird nun der Extinktionswert des Dopaxanthins berechnet ($\epsilon = 41800 \pm 100$). Im Anschluss an die Dopaxanthin-Zone folgt das restliche «DEA-Betalain». Restliches Dopa wird erst viel später eluiert.

Einbauversuch Nr.1. - Auf die Hälfte einer Kaktusfrucht (8,6 g, pH Fruchtfleisch 4,5) wird ein Konzentrat von 10 ml der [¹⁴C]-Dopaxanthin-Lösung (siehe oben) gegeben (Gehalt 0,0139 mmol; Aktivität total 6268 nCi; spez. Akt. 4,5 Ci/mol). Die Frucht-Schnittfläche wird mit einem Glasstab etwas angeritzt. Man belässt 5 Std. Die Frucht wird mehrmals mit 80proz. Äthanol im Porzellan-Mörser zerstoßen. Die gesamte Lösung wird zentrifugiert (spektroskopisch ermittelter Gehalt an Betanin: 0,00162 mmol; Dopaxanthin 0,001 mmol) und zur Trockene eingedampft. Der in wenig Wasser gelöste Rückstand wird durch eine Schicht Sephadex SP C25 H⁺-Form (H 5 cm, D 4 cm) abfiltriert, wobei Pflanzenreste und eine grünliche Schicht zurückgehalten werden.

Sephadex-Chromatographie. Die filtrierte Extraktlösung wird eingedampft. Der Rückstand, in wenig 0,01N Ameisensäure gelöst, wird auf eine frische Sephadex SP C25-Säule (H⁺-Form) (D 3 cm, H 17 cm) gebracht. Nachdem mit 0,01N Ameisensäure (pH 2,8) 88 ml Vorlauf und 35 ml einer schwach gelben Fraktion eluiert sind, ergibt sich - von unten nach oben aufgezählt - folgendes Bild der Kolonne: gelblich 5,5 cm, schwach violett 4 cm, violettrot (= Betaninzone) 3 cm, schwach gelblich 1 cm, violett 1 cm, gelb 1 cm = Dopaxanthin, gelblich 2 cm. Nach weiteren 36 ml einer gelblichen und 75 ml einer leicht orangen Fraktion, welche den gewichtsmässig bedeutendsten Zuckerteil des Extraktes enthält, wird mit 135 ml die Betaninzone eluiert. Nach weiteren 320 ml rosa Eluat erscheint die Dopaxanthin-haltige Zone (250 ml, 0,001 mmol).

Betanin-Fraktion auf 10,0 ml eingeengt; spektroskopisch ermittelter Gehalt 0,001275 mmol; 0,07-ml-Proben (8,925 nmol) ergeben 682, 696, 725 dpm, Mittel 701 dpm. spezif. Akt. 0,0354 \pm 0,001 Ci/mol; total Aktivität 45,1 nCi.

Hochspannungs-Papierelektrophorese. 8,8 ml der Betaninlösung (1122 nmol = 88% der ursprünglichen Menge) werden eingedampft. Der Rückstand, in wenig Wasser gelöst, wird quantitativ in einer 14 cm langen Zone auf Whatman 3MM Papier 20 \times 40 cm aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung erfolgt in Ammoniumformiat-Puffer pH 4,5 bei 3000 V/60 mA während 40 Min. Die Zonen ordnen sich, von der Startlinie zur Anodenseite aufgezählt, wie folgt: gelblich (3,5 cm), rotviolett (= Betanin, 4,2 cm), farblos (1,2 cm), rotviolett schwach = Präbetanin, farblos (5,2 cm), gelb (0,8 cm). Der Elektrophorese-Streifen wird getrocknet. Die Betanin-Zone wird ausgeschnitten und zum Auswaschen mehrmals in Wasser eingelegt; die Eluate werden zentrifugiert (total ca. 100 ml) und auf 10,0 ml

eingengt. Spektroskopisch ermittelter Gehalt 966 nmol. Aktivität: Proben von je 0,1 ml (= 966 nmol) ergeben 584, 570, 577 dpm, Mittel 577 dpm; total Aktivität 26 nCi, spezif. Akt. 0,0269 Ci/mol.

Kristallisation. 150 mg Betanin (70proz.) werden auf einer Elektrophoresesäule gereinigt⁸⁾. Puffer: Ammoniumformiat pH 4,5 750 V/70 mA 32 Std. Das Eluat der reinen Betanin-Zone enthält gemäss spektroskopischer Messung 0,00153 mmol Betanin/ml. 25 ml dieser Lösung (enthaltend 38250 nmol = 21 mg Betanin) und die durch Hochspannungs-Papier-Elektrophorese gereinigte Betanin-Fraktion (937 nmol) werden zusammen auf ca. 2,5 ml eingengt. Unter Eiskühlung wird der pH-Wert 3,7 dieses Konzentrats durch Zugabe von 3 Tropfen 1N HCl auf 3,2 gesenkt. Während die Kristallisation einsetzt, wird im Eisbad ca. 3 Std. gerührt. Das Kristallisat wird auf eine vorgekühlte Trichternutsche mit faserfreiem Hartfilter pipettiert und unter Kühlung abgesaugt. Mit einem Tropfen eiskalten Wassers wird nachgewaschen, dann scharf abgesaugt und im Exsikkator zuerst in leichtem Vakuum später bei 11 Torr über P₂O₅ getrocknet: 15,41 mg. Die gesamte Menge kristallisierten Betanins wird in Wasser vollständig gelöst; durch Eindampfen i.V. wird diese Lösung auf 10,0 ml gebracht. Gehalt: 0,0233 mmol (= 12,8 mg); Ausbeute: 61,0; Aktivität: 2 Proben von je 0,1 ml (= 233 nmol) ergeben 243, 258 dpm, Mittel 250 ± 8 dpm, spezif. Akt. 0,000483 Ci/mol; total 11,26 nCi. Gehalt der Kristallisations-Mutterlauge 0,0148 mmol (8,13 mg) Betanin (Ausbeute: 38,7%). (0,1 ml von 10,0 ml ergeben 278, 268, 252 dpm, Mittel 266 dpm; total Aktivität: 11,98 nCi, spezif. Aktivität 0,00081 ± 0,00004 Ci/mol (4,5%).

Indicaxanthin und CyclodopaglucoSID aus Betanin. - Zu 12,5 mg radioaktiven kristallisierten Betanins (0,0228 mmol; spezif. Akt. 0,000483 Ci/mol; total 11,03 nCi) und 30 mg L-Prolin (0,26 mmol) destilliert man 5 ml i. HV. 2mal entgast 0,6N Ammoniak und belässt 1 Std. bei RT. Im geschlossenen System wird das Lösungsmittel wieder zurückdestilliert. Der Rückstand wird mit ca. 1-2 ml 0,01N Ameisensäure quantitativ auf eine Sephadex SP C-25-Säule gebracht (H⁺-Form, H 19 cm, D 3 cm; Startzone 2 cm) und mit derselben Pufferlösung chromatographiert. Der Kolonnen-Ausfluss wird spektrophotometrisch registriert (UV. 280 nm, 10 mm Kuvette). Die orange Zone des Neobetansins wandert allen voran rasch durch die Kolonne und erscheint nach 43 ml Vorlauf. Die anderen Zonen schieben sich teleskopartig auseinander. Nach dem Auslaufen der orangen Zone (Fr. 1, 34 ml) sowie einer schwach gelblichen Fraktion (Fr. 2, 77 ml) zeigt sich von unten nach oben notiert folgendes Kolonnenbild: violett (Betanin, 4,5 cm); gelb (Indicaxanthin, 5 cm); farblos (1,5 cm); gelblich (1 cm); farblos (1,5 cm); gelb (2,5 cm); farblos (3 cm). Fr. 1: 34 ml Neobetanin auf 50 ml verd. 468 nm (0,525), 1440 nmol (Ber. für $\epsilon = 18200$); 1/25 der Lösung: 72, 78, 120 dpm, Mittel 75 dpm; total 0,84 nCi; spezif. Akt. 0,00058 Ci/mol. Fr. 2: 77 ml gelblich; Aktivität 1/25 = 32, 37, 35 dpm, Mittel 34; total 0,38 nCi. Fr. 3: 100 ml Betanin, spektroskopisch ermittelter Gehalt 652 nmol; Aktivität: 1/25 = 59, 61,3, 60,9 dpm, Mittel 60,4 dpm; total 0,68 nCi; spezif. Aktivität 0,00104 Ci/mol. Fr. 4: 30 ml, leicht rosa; Aktivität: 1/25 = 145, 142, 147 dpm, Mittel 144; total 1,62 nCi. Fr. 5: 150 ml Indicaxanthin, spektroskopisch ermittelter Gehalt 21100 nmol; Aktivität: Proben à 0,1 ml von 10 ml Lösung ergeben 486, 500, 491 dpm, Mittel 492 dpm; total 11,08 Ci; spezif. Aktivität 0,000525 Ci/mol. Fr. 6: 825 ml farblos; Aktivität 1/25 = 23, 25, 27 dpm, Mittel 25; total 0,28 nCi. Fr. 7: 1000 ml Cyclodopa-glucoSID; Gehalt 17000 nmol (das UV.-Spektrum der eingengten Probe zeigt ein Gemisch von Cyclodopa-glucoSID (13400 nmol) und N-Formyl-cyclodopa-glucoSID (3600 nmol); die Gehaltswerte sind durch approximative Subtraktion der Absorptionskurven berechnet, die auf folgenden Annahmen basieren: Cyclodopa-glucoSID λ_{\max} (nm) 283 ($\epsilon = 4200$), 252 ($\epsilon = 370$) und N-Formyl-cyclodopa-glucoSID λ_{\max} (nm) 252 ($\epsilon = 11000$), 284 ($\epsilon = 3130$). Aktivität 1/100 = 11,1, 11,9, 11,6 dpm, Mittel 11,5; total 0,52 nCi; spezif. Aktivität 0,000030 Ci/mol.

Einbauversuch Nr. 2. - Auf eine halbe Kaktusfrucht (14,2 g) wird ein Konzentrat enthaltend 3660 nmol Dopaxanthin in pH 8 Puffer pipettiert und mit dem Messer in die Oberfläche eingeritzt. Nach 15 Std. wird auf - 30° eingefroren und bis zur Extraktion aufbewahrt. Die weiteren Operationen werden wie im ersten Einbauversuch beschrieben durchgeführt. Entsprechend den analogen Stufen werden nachfolgend nur die Ergebnisse notiert.

⁸⁾ Dieses Betanin wurde versehentlich auf der mit Puffer gewaschenen Papiersäule gereinigt, die vorher zur Trennung des Dopaxanthins gedient hatte. Die so erhaltene Betanin-Lösung war daher sehr schwach radioaktiv. Unsere Resultate werden dadurch nicht beeinträchtigt. Aktivität: 0,1 ml der Stammlösung (153 nmol) ergeben 8,8, 11,3, 4,5 dpm, Mittel 8,2 dpm (= 0,0037 nCi); spezif. Aktivität 0,000024 Ci/mol, total Aktivität in 25 ml der Lösung: 0,92 nCi.

Alkohol-Extrakt. 250 ml Lösung OD 540 nm 0,62 (2583 nmol Betanin) Beitrag der Betaninlösung bei 478 nm = 0,20; OD 478 nm = 0,74 korrigiert 0,54 (3230 nmol Dopaxanthin).

Vorreinigung auf Sephadex SP 25 C (H 4,5 cm, D 4 cm) mit 0,01N Ameisensäure. *Sephadex SP 25 C Chromatogramm* (Kolonne H 18,5 cm, D 3 cm) Betanin 1192 nmol; Aktivität: 3 Proben von je 0,1 ml von 50 ml Betanin-Lösung ergeben 5149, 5105, 4772 dpm, Mittel 5009; total 112,8 Ci; spezif. Aktivität 0,0946 Ci/mol. Dopaxanthin 466 nmol.

Hochspannungs-Papierlektrophorese. Auftrag 1120 nmol (94% des Betanins) Betaninzone-Eluat in 5 ml, Gehalt 937 nmol; Aktivität: 3 Proben von je 0,1 ml ergeben 2852, 2863, 2770 dpm, Mittel 2829; total 63,7 nCi; spezif. Aktivität 0,068 Ci/mol.

Kristallisation. Betanin-Lösung (25 ml aus Säulenelektrophorese erhaltene reine Fraktion) enthaltend 0,039210 mmol (spektr. Messung) und elektrophoretisch gereinigtes Betanin aus Kaktusextrakt 0,00088 mmol zusammen auf 2,5 ml eingeengt; pH von 3,75 mit 3 Tropfen 1N HCl auf 3,1 gebracht. Kristallisiertes Betanin: 14,76 mg (0,0268 mmol), spektroskopisch gemessen. Aktivität: 0,1 ml einer Lösung von 10,0 ml des Betanins, 558 dpm, total Aktivität 26,13 nCi, spezif. Aktivität 0,000937 Ci/mol; Mutterlauge: Gehalt 0,012 mmol; Aktivität: 3 Proben von 0,1 ml einer Lösung in 5,0 ml ergeben 1314, 1305, 1291 dpm, Mittel 1303 dpm; total 29,35 nCi; spezif. Aktivität 0,00244 Ci/mol.

Austausch. 0,02576 mmol kristallisiertes Betanin (total 24,12 nCi) und 40 mg Prolin (0,35 mmol) in 5 ml 0,6N NH₃. Reinigung auf Sephadex SP 25 C (H 19 cm, D 3 cm). Vorlauf 42 ml. 1) Neobetanin: 19 ml auf 50 ml verd., OD 469 = 0,515 = 0,00145 mmol; Aktivität: Probe von 0,2 ml von 5 ml Lösung 222 dpm; total Aktivität 2,5 nCi; spezif. Aktivität 0,00177 Ci/mol. 2) Gelbe Zwischenzone 20 ml; Aktivität: 3 Proben à 0,2 ml von 5,0 ml ergeben 8,3, 4,5, 2,1 dpm, Mittel 5 dpm, total 0,056 nCi. 3) Betanin 37 ml: 0,000567 mmol; Aktivität: 3 Proben à 0,2 ml von 2,0 ml Lösung ergeben 207, 200, 207 dpm, Mittel 205, total 0,923 nCi; spezif. Aktivität 0,00163 Ci/mol. 4) Mischzone Betanin/Indicaxanthin 18 ml (0,00011 bzw. 0,00033 mmol); Aktivität: Proben à 0,2 ml von 5,0 ml Lösung ergeben 102, 99,6, 95 dpm, Mittel 98,9 dpm, total 1,11 nCi (Anteil Indicaxanthin ca. 0,83 nCi). 5) Indicaxanthin 112 ml 0,0197 mmol; Aktivität: Proben à 0,2 ml von 2,0 ml Lösung ergeben 4229, 4297, 4109 dpm, Mittel 4212, total 18,97 nCi; spezif. Aktivität 0,0014 Ci/mol. 6) Indicaxanthin (Rest) 46 ml 0,0058 mmol; Aktivität: Proben à 0,2 ml von 5 ml Lösung ergeben 451, 459, 449 dpm, Mittel 453 dpm, total 5,10 nCi; spezif. Aktivität 0,000879 Ci/mol. 7) Zitronengelbe und farblose Zwischenzonen (470 + 60 ml); Aktivität: Proben von 0,2 ml von 5 ml Lösung ergeben 57, 56,6, 54,8 dpm, Mittel 56,1, total 0,63 nCi. 8) Cyclodopa-glucosid 1000 ml. Gehalt 0,02 mmol; Aktivität: je 0,2 ml Proben von 2,0 ml Lösung 40 dpm, total 0,18 nCi; spezif. Aktivität 0,000009 Ci/mol. Indicaxanthin, durch Papierlektrophorese gereinigt: Eluat der Zone in 2,0 ml, Gehalt 0,0095 mmol; Aktivität: Proben von 0,2 ml ergeben 1940, 2031, 2033 dpm, Mittel 2001, total 9,0 nCi; spezif. Aktivität 0,000947 Ci/mol.

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. Wyler, M. E. Wilcox & André S. Dreiding, *Helv.* 48, 361 (1965).
- [2] L. Kimler, R. A. Larson, L. Messenger, J. B. Moore & T. J. Mabry, *J. chem. Soc. Chem. Commun.* 1971, 1329.
- [3] H. Wyler & J. Chiovini, *Helv.* 51, 1476 (1968).
- [4] H. Wyler, T. J. Mabry & André S. Dreiding, *Helv.* 46, 1745 (1963).
- [5] a) H. E. Miller, H. Rösler, A. Wohlpart, H. Wyler, M. E. Wilcox, H. Frohofer, T. J. Mabry & André S. Dreiding, *Helv.* 51, 1470 (1968); b) E. Dunkelblum, H. E. Miller & André S. Dreiding, *Helv.* 55, 642 (1972); c) N. Fischer & A. S. Dreiding, *Helv.* 55, 649 (1972).
- [6] M. Piattelli, 'The Betalains', Chap. in 'Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments', Vol. 1, p. 560, Edit. T. W. Goodwin, Acad. Press 1976.
- [7] Th. E. Young, J. R. Griswold & M. H. Hulbert, *J. org. Chemistry* 39, 1980 (1974).
- [8] R. von Ardenne, H. Döpp, H. Musso & W. Steglich, *Z. Naturforsch.* 29c, 637 (1974).
- [9] G. Impellizzeri, M. Piattelli & S. Sciuto, *Phytochemistry* 12, 2293 (1973).
- [10] S. Sciuto, G. Oriente, M. Piattelli, G. Impellizzeri & V. Amico, *Phytochemistry* 13, 947 (1974).
- [11] H. Frohofer, *Z. analyt. Chem.* 253, 97 (1971).
- [12] S. A. Brown & L. R. Wetter, 'Methods for Investigations of Biosynthesis in Higher Plants', p. 13-14, chapt. in *Progress in Phytochemistry* 3, p. 1-45, L. Reinhold & Y. Liwshitz Edit., Interscience 1972.