

OTTO TH. SCHMIDT, PAULINE BECHER und MANFRED HÜBNER<sup>1)</sup>

## Zur Kenntnis der Farbstoffe der Roten Rübe, III<sup>2)</sup>

Aus dem Chemischen Institut der Universität Heidelberg

(Eingegangen am 15. Februar 1960)

Die Darstellung der freien Farbsäuren des Betanins und Betanidins wird beschrieben, ihre Bruttoformeln werden erörtert. Beide Verbindungen sind optisch aktiv. Sie spalten mit starker Natronlauge in der Hitze etwa 1/3 ihres Stickstoffes als Ammoniak ab. Quantitative Decarboxylierungsversuche und potentiometrische Titration weisen für das Glucosid wie für das Aglykon auf drei Carboxylgruppen, von denen eine durch eine basische Gruppe neutralisiert zu sein scheint, und eine schwach saure (phenolische) Gruppe hin. Beim oxydativen Abbau des Betanidins wurde L-Asparaginsäure erhalten.

In einer vorläufigen Mitteilung „Zur Konstitution des Randenfarbstoffes Betanin“ geben H. WYLER, G. VINCENTI, M. MERCIER, G. SASSU und ANDRÉ S. DREIDING<sup>3)</sup> als mittlere Bruttoformel für das Betanin  $C_{25}H_{28-30}N_2O_{13}$  bekannt. Diese Formel ist errechnet aus einer größeren Anzahl von Elementaranalysen des Kaliumsalzes, Ammoniumsalzes und Pyridinsalzes des Betanins sowie eines amorphen Gemisches von Betanin- und Betanidin-hydrochlorid. Sie findet eine Stütze in der Bruttoformel  $C_{19}H_{18-20}N_2O_8$  des Betanidins<sup>4)</sup>, die aus den Analysen des Betanidin-hydrochlorids sowie des Kalium- und Ammoniumsalzes errechnet ist und sich von der Formel des Betanins um die Elemente eines Glucoserestes  $C_6H_{10}O_5$  unterscheidet.

Wir können die von den Schweizer Autoren beschriebene Inkonstanz der Zusammensetzung der kristallisierten Betaninsalze mit Basen bestätigen. Besonders stark schwankte der Kationengehalt beim Bariumsalz, wo das Verhältnis Ba : N von 1 : 5.1 bis 1 : 31.8 variierte. Beim Pyridinsalz und Kaliumsalz fanden wir meistens Werte, die einer Verbindung aus 1 Mol. primärem Farbsalz und 1 Mol. Farbsäure entsprachen.

Unsere eigenen Elementaranalysen<sup>1)</sup> des Glucosids und des Aglykons sind mit den obigen Bruttoformeln vereinbar. Die Farbsäure des Glucosids erhielten wir aus dem Kaliumsalz durch Ansäuern auf  $p_H$  1.95 kristallisiert. Die Analysen der lufttrockenen Verbindung führen zur Formel  $C_{25}H_{35-37}N_2O_{17.5} = C_{25}H_{26-28}N_2O_{13} \cdot 4.5 H_2O$ . Auch das freie Betanidin haben wir kristallisiert erhalten und zwar aus dem Betanidinchlorid. Die Analysen der lufttrockenen Substanz liefern die Formel  $C_{19}H_{24}N_2O_{11} = C_{19}H_{18}N_2O_8 \cdot 3 H_2O$ . Für das Chlorid ergeben die Analysen die Formel  $C_{19}H_{21}ClN_2O_{10} = C_{19}H_{17}ClN_2O_8 \cdot 2 H_2O$ . Da wir unsere Substanzen lufttrocken analysiert und nur den im Exsikkator bei gewöhnlicher Temperatur eingetretenen Wasserverlust bestimmt haben, liegt hier eine Unsicherheit, insbesondere in den H-Werten. Aber jedenfalls liegen unsere H-Werte an der unteren Grenze der von den Schweizer Auto-

<sup>1)</sup> Diplomarb. Univ. Heidelberg 1958.

<sup>2)</sup> II. Mitteil.: O. TH. SCHMIDT und W. SCHÖNLEBEN, Z. Naturforsch. 12b, 262 [1957].

<sup>3)</sup> Helv. chim. Acta 42, 1696 [1959].

<sup>4)</sup> H. WYLER und A. S. DREIDING, Helv. chim. Acta 42, 1699 [1959].

ren angegebenen Intervalle oder sogar noch darunter. Angesichts der analytischen Schwierigkeiten bei diesen z. T. unstöchiometrischen Verbindungen (K- usw. -Salzen), bei ihrer Empfindlichkeit und Hygroskopizität in getrocknetem Zustand, sind wir der Meinung, daß den bis jetzt errechneten Bruttoformeln, so wichtig und wertvoll sie für die weitere Arbeit sind, doch noch eine gewisse Unsicherheit, sogar in Bezug auf die Zahl der C-Atome anhaftet.

Von größtem Interesse ist die Beobachtung der Schweizer Autoren, daß Betanidin bei der Zinkstaubdestillation Indol, 2-Methyl-indol, 4-Methyl- sowie 4-Äthyl-pyridin und bei der Kalischmelze 5,6-Dihydroxy-indol-carbonsäure-(2) sowie 4-Methyl-pyridin-dicarbonsäure-(2,6) ergibt.

Auch wir halten es für wahrscheinlich, daß mindestens eines der beiden Produkte der Kalischmelze nicht als solches im Betanidin vorhanden, sondern erst während der Reaktion entstanden ist. Wie schon in der vorangegangenen Abhandlung<sup>2)</sup> mitgeteilt wurde, kann aus Betanin Ammoniak abgespalten werden. Wir haben diese Reaktion quantitativ verfolgt und festgestellt, daß Betanin oder leichter noch Betanidin beim Erhitzen mit starker Natronlauge etwa 1/3 des vorhandenen Stickstoffs als Ammoniak abgeben.

Im Gegensatz zu den Schweizer Autoren, die angeben, „daß die Betanidine, wie auch das Betanin, zwei Carboxylgruppen, eine schwach saure Gruppe (vielleicht Phenol) und eine basische Gruppe enthalten“<sup>4)</sup>, weisen unsere Versuche<sup>1)</sup> auf 3 Carboxylgruppen, eine schwach saure Gruppe und eine basische Gruppe hin. Durch Erhitzen des Pyridinsalzes des Betanins in Chinolin auf 235° werden 19.2 bis 19.8% CO<sub>2</sub> in Freiheit gesetzt (Ber. für 3 CO<sub>2</sub> 20.6%). Etwa 1/3 davon (6.5%) wird schon abgespalten, wenn das Pyridinsalz in wäßriger Lösung einige Stunden im siedenden Wasserbad erhitzt wird. Beim Betanidin-chlorid in Wasser ergaben sich Werte um 8.7% (ber. 9.3%), in Chinolin 26.3–26.6% (ber. 27.9%). Bei der potentiometrischen Titration der Farbsäure sowohl des Glucosids wie des Aglykons werden scharf 2 Carboxylgruppen titriert. Wir nehmen daher an, daß die dritte Carboxylgruppe durch eine basische Gruppe in den Molekülen neutralisiert ist, wofür auch der Zwitterionencharakter der Verbindungen, insbesondere die Unlöslichkeit der Farbsäuren in unpolaren Lösungsmitteln, spricht.

Wie zu erwarten, ist das Betanin optisch aktiv:  $[\alpha]_{D}^{25} : +310^\circ$ ,  $[\alpha]_{D,3}^{25} : +370\text{--}380^\circ$  (in Natriumacetat-Puffer von pH 5). Die Abspaltung des Zuckers aus Betanin gelingt sowohl mit Hefe (Emulsin ist ohne Einwirkung) wie auch (wesentlich besser) mit starker Salzsäure, doch gelangt man in beiden Fällen zum kristallisierten Hydrochlorid des Betanidins. Unter den Eigenschaften dieser Verbindung sei ihre optische Aktivität hervorgehoben:  $[\alpha]_{D}^{25} : +530 \pm 50^\circ$  (Acetatpuffer). Die Hydrolyse dieses Hydrochlorids mit Wasser führt in guter Ausbeute (80% d. Th.) zur kristallisierten Betanidin-Farbsäure. Die violetten, wäßrigen Lösungen von Betanidin ergeben mit Natriumcarbonatlösung zuerst eine prächtig kornblumenblaue Farbe, die aber schon nach wenigen Sekunden über Olivgrün in Gelb übergeht. Mit Eisen(III)-chlorid oder Aluminiumsulfat gibt Betanidin in hydrogencarbonathaltiger Lösung blaue Färbungen, mit Zinn(II)-chlorid tritt Blaufärbung schon in schwach saurer Lösung auf. Auch diese Blaufärbungen sind unbeständig. Von Natriumdithionit werden Lösungen von Beta-

nin oder Betanidin nicht entfärbt. Die blaue Farbe der natriumcarbonat-alkalischen Betanidinlösung scheint von Dithionit sogar stabilisiert zu werden.

Wird Betanidin-chlorid in einer Lösung von Eisessig/Methanol bei Raumtemperatur bis zum Erreichen einer schwach gelblichen Färbung mit Ozon behandelt, so resultieren u. a. zwei ninhydrin-positive Substanzen, deren eine sich als L-Asparaginsäure erwies (Papierchromatogramme, Drehung, Schmelzpunkt und Misch-Schmelzpunkt des Benzoats). Die andere scheint eine höhere Mono-amino-monocarbonsäure zu sein. Die Menge der Aminosäuren wird erhöht, wenn die Lösung nach der Ozonisierung noch der Oxydation mit Eisessig/Perhydrol<sup>5)</sup> unterworfen wird. Schließlich zeigte es sich, daß Asparaginsäure auch entsteht, wenn Betanidin-chlorid ohne vorherige Ozonbehandlung mit Perhydrol/Eisessig abgebaut wird, während dieser Abbau mit Essigsäure allein nicht stattfindet. Die Ausbeute an Asparaginsäure (etwa 20–25% d. Th., wenn man 1 Mol. auf 1 Mol. Betanidin annimmt) ist so groß, daß ihr Auftreten keinesfalls einer 0.1-proz. Beimengung eines Tetrapeptids, wie sie die Schweizer Autoren beim Betanin beobachtet haben<sup>3)</sup>, zuzuschreiben ist. Zudem haben wir das durch Hydrolyse des Betanin-kaliums erhaltene, kristallisierte Aglykon-hydrochlorid eingesetzt, das sicher frei von beigemengter Aminosäure ist.

Unter der Voraussetzung, daß Betanin und Betanidin die angenommenen Mol-Gewichte haben, sind nur 2 Stickstoffatome in ihnen enthalten. Eines der beiden von den Schweizer Autoren bei der Zinkstaubdestillation und Kalischmelze erhaltenen heterocyclischen Systeme sollte also in Beziehung stehen mit der Anordnung, die bei der Ozonspaltung oder Peressigsäure-Oxydation Asparaginsäure liefert. Man könnte an eine Dihydroxy-phenylalanin(Dopa)-Anordnung denken. Doch haben wir uns davon überzeugt, daß Dopa mit Peressigsäure unter den von uns angewandten Bedingungen keine Asparaginsäure liefert. Ferner haben wir geprüft, ob Asparaginsäure oder Dopa unter den Bedingungen unserer Ammoniak-Abspaltung aus den Farbstoffen ebenfalls Ammoniak liefert. Dies ist nicht der Fall. Zudem ist bekannt, daß Dopa bei der Kalischmelze Protocatechusäure ergibt<sup>6)</sup>. Andererseits sollte aber — immer unter der Voraussetzung zweier und nur zweier N-Atome im Betanin — die Anordnung, die zu Asparaginsäure führt, auch die Abspaltung von Ammoniak erklären. Diese Anordnung sollte aber die einer  $\beta$ -Amino-carbonsäure oder sonstigen  $\beta$ -Amino-carbonylverbindung sein.

Dem VERBAND DER CHEMISCHEN INDUSTRIE danken wir aufrichtig für die Gewährung der Mittel, der BADISCHEN ANILIN- & SODA-FABRIK für die Überlassung von größeren Mengen Polyamidpulver.

<sup>5)</sup> E. KLENK und W. BONGARD, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **290**, 181 [1952].

<sup>6)</sup> M. GUGGENHEIM, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **88**, 276 [1913].

## BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

### 1. *Betanin (BECHER, HÜBNER)*

#### a) *Kaliumsalze*

Zur Darstellung kristallisierter Kaliumsalze von konstanter Zusammensetzung haben wir die früher angegebene Arbeitsweise<sup>2)</sup> verwendet, jedoch auf die Elektrophorese verzichtet und darauf geachtet, daß die durch den Austauscher gegangenen Lösungen ein  $p_{\text{H}}$  von 3.0 bis 3.4 hatten. Beim Einengen solcher Lösungen i. Vak. bei 30–40° Badtemperatur scheiden sich schon in der Wärme Kristalle ab, die durch weiteres Einengen auf 30–50 ccm (z. B. Fraktion III aus 4 Polyamidsäulen mit je 2 g Rohfarbstoff) und Aufbewahren über Nacht im Kühl-schrank noch vermehrt werden. Ausb. ca. 100 mg.



Ber. C 47.77	H 5.21	N 4.46	K 3.11	$\text{H}_2\text{O}$ 7.17
Gef. C 47.28–47.63	H 5.07–5.24	N 4.64–4.75	K 3.16–3.41	$\text{H}_2\text{O}$ 6.2–8.4



Ber. C 47.10	H 5.29	N 4.39	K 3.07	$\text{H}_2\text{O}$ 8.46
--------------	--------	--------	--------	---------------------------



Ber. C 47.52	H 5.07	N 4.62	K 3.22	$\text{H}_2\text{O}$ 8.86
--------------	--------	--------	--------	---------------------------

Der Kaliumgehalt der Präparate nahm etwas ab, wenn wir sie aus heißem Wasser oder wäsr. Äthanol (unter erheblichen Verlusten) umkristallisierten. Er blieb in den angegebenen Grenzen konstant, wenn aus 0.1-proz. wäsr. Lösung von Kaliumchlorid umkristallisiert wurde, wobei sich der  $p_{\text{H}}$  der Lösung durch Einbau eines weiteren Kaliumions in die Verbindung nicht wesentlich geändert hätte.

Das optische Drehungsvermögen wurde wegen der etwas größeren Löslichkeit in einer Acetatpuffer-Lösung von  $p_{\text{H}}$  5 (34.5 g kristallisiertes Natriumacetat und 5 ccm Eisessig in 1 l) gemessen.

#### Kaliumsalz der Fraktion III:

$$[\alpha]_c^{25}: +377 \pm 26^\circ (c = 0.08–0.16) \quad [\alpha]_{\text{D}20}^{25}: +315 \pm 24^\circ (c = 0.08–0.16)$$

#### Kaliumsalz der Fraktion II:

$$[\alpha]_c^{25}: +378 \pm 20^\circ (c = 0.08–0.16) \quad [\alpha]_{\text{D}20}^{25}: +314 \pm 20^\circ (c = 0.08–0.16)$$

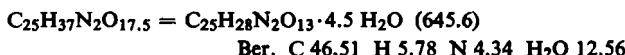
#### b) *Betanin (freie Farbsäure)*

Die frisch abgesaugten Kristalle von *Betanin-Kaliumsalz* der Fraktion III aus 8 Polyamidsäulen wurden in 40 ccm Wasser von 45° gelöst, die Lösung durch eine Glasfritte gesaugt und noch warm unter dauernder  $p_{\text{H}}$ -Messung mit der Glaselektrode mit verd. Salzsäure bis  $p_{\text{H}}$  1.95 angesäuert. Während des Abkühlens schied sich das Betanin in Form von Nadelchen neben amorph aussehenden Flocken ab. Der Niederschlag wurde abgesaugt und sofort wieder in Wasser von 45° gelöst, wozu jetzt 100 ccm erforderlich waren. Beim Abkühlen schieden sich mikroskopisch einheitliche, violette Nadelchen ab, die viel kürzer als die des Kaliumsalzes sind und exsikkatorgetrocknet 20.5 mg wogen. Das Filtrat gab beim Einengen i. Vak. auf 20 ccm weitere 30.5 mg gleichartiger Kristalle.

Die Löslichkeiten der Säure weichen von denen des Kaliumsalzes nicht wesentlich ab: etwas löslich in Wasser, schwerer in Methanol und Eisessig, sehr schwer löslich in Äthanol, unlöslich in Aceton, Dioxan, Äther und den noch weniger polaren organischen Lösungsmitteln.



Ber. C 46.66	H 5.48	N 4.35	$\text{H}_2\text{O}$ 12.60	Asche
Gef. C 46.49–46.62	H 5.59–6.06	N 4.60–4.87	$\text{H}_2\text{O}$ 11.7–12.5	0–0.54



## 2. *Betanidin (BECHER, HÜBNER)*

### a) *Betanidin-hydrochlorid*

**a) Durch Spaltung des Glucosids mit Salzsäure:** Die Hydrolyse des Betanins mit Salzsäure ist in hohem Maße von deren Konzentration abhängig. Konz. Salzsäure spaltet bei 25° in 2–3 Stdn. vollständig, halbkonz. Salzsäure in 24 Stdn. ungefähr zu 50%, während mit 2 n HCl auch nach Tagen kein Betanidin auftritt.

100 mg *Betanin-Kaliumsalz* werden unter Röhren in 25 ccm konz. Salzsäure von etwa 25° gelöst. Die Hydrolyse lässt sich papierchromatographisch (aufsteigend; Laufmittel: 1-proz. Essigsäure) verfolgen. Betanin gibt einen roten Fleck bei *R*<sub>f</sub> 0.75–0.80, Betanidin einen violetten Fleck bei *R*<sub>f</sub> 0.35–0.45. Die Reaktion ist nach etwa 2–2.5 Stdn. beendet, bei 18° sind über 4 Stdn. erforderlich. Man saugt die Lösung durch eine Glasfritte und destilliert sofort i. Vak. bei ca. 40° Badtemperatur einen Teil der Salzsäure ab. Schon nach wenigen Minuten, wenn in der Hauptsache nur Chlorwasserstoff entwichen und das Volumen noch nahezu unverändert ist, scheiden sich reichlich Kristalle von Betanidin-chlorid ab. Weiteres Einengen auf etwa 10 ccm erhöht die Ausbeute. Man lässt über Nacht im Kühlschrank stehen, saugt dann über ein Hartfilter ab und wäscht mit 2 n HCl (nicht Wasser!). Zum Umkristallisieren löst man bei Raumtemperatur in konz. Salzsäure und engt die Lösung i. Vak. wieder ein. Es empfiehlt sich, die Kristalle zunächst im Exsikkator über KOH und H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> zu trocknen, und anschließend an der Luft bis zur Gewichtskonstanz wieder Wasser aufnehmen zu lassen. Die Ausbeute beträgt meistens etwa 55 mg (70% d. Th.), bei größeren Ansätzen (300–600 mg Betanin) bis zu 80% d. Th.

Das Betanidin-chlorid hat keinen scharfen Schmelzpunkt. Es erreicht unter gleichzeitiger Gasentwicklung bei etwa 205° (korrig.), wobei zwischen den Fraktionen II, III und dem Gemisch dieser beiden kein Unterschied auftritt. Es löst sich am besten (zu einigen Prozent) in Methanol, auch noch gut in Äthanol, schlechter in Propanol, n-Butanol, Eisessig, Aceton und Dimethylformamid. In Äther, Chloroform, Benzol und anderen wenig polaren Lösungsmitteln ist es unlöslich. In konz. Salzsäure löst es sich recht gut, wesentlich weniger in halbkonz. oder 2 n Salzsäure. In Wasser löst es sich nur wenig unter Hydrolyse, besser in Pufferlösungen vom *pH* 4 bis 5 als Anion.



Ber. C 48.06	H 4.46	Cl 7.47	N 5.90	H <sub>2</sub> O 7.59
Gef. C 47.60–47.84	H 4.45–4.93	Cl 7.18–7.75	N 5.62–5.94	H <sub>2</sub> O 7.30–7.57



Ber. C 47.85	H 4.46	Cl 7.85	N 6.20	H <sub>2</sub> O 9.9
--------------	--------	---------	--------	----------------------

$[\alpha]_{D}^{25}: +530 \pm 50^\circ (c = 0.025, \text{ Natriumacetat-Puffer}, p\text{H } 7^{\circ})$

**b) Durch Spaltung von Betanin mit Hefe:** 30 mg *Betanin-Kaliumsalz* wurden mit 25 ccm Wasser, 5 g Bäckereihefe und einigen mg NH<sub>4</sub>Cl und KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in einem Wasserbad von 30° mechanisch gerührt. Nach wenigen Stunden trat im Papierchromatogramm der Fleck des Aglykons auf. Als nach etwa 40 Stdn. papierchromatographisch kein unverändertes Glucosid mehr festzustellen war, wurden zur Adsorption eines braunen Zersetzungspproduktes einige Spatelspitzen Papierpulver eingerührt und zusammen mit der Hefe nach wenigen Minuten abgesaugt. Nach Zugabe von 2 ccm 2 n Essigsäure passierte das Filtrat mit 1-proz. Essigsäure

<sup>7)</sup> Vgl. Drehung des Glucosids in Versuch 1 a.

als Laufmittel eine Papiersäule (3.4 cm Ø, 40 cm Länge), wodurch ein rascher laufendes, gelbes Zersetzungspunkt abgetrennt wurde. Die essigsäure Lösung wurde i. Vak. eingedampft und der amorphe Rückstand (aus mehreren Ansätzen) aus konz. Salzsäure zur Kristallisation gebracht. Das so erhaltene *Betanidin-chlorid* zeigte die gleiche Kristallform, gleiche *R<sub>F</sub>*-Werte und gleiche Farbreaktionen wie das durch Salzsäurespaltung dargestellte.

b) *Betanidin (freie Farbsäure)* (HÜBNER)

Die Lösung von 115 mg lufttrockenem *Betanidin-chlorid* in 10 ccm Methanol lässt man unter mechanischem Rühren sehr langsam in 130 ccm Wasser eintropfen. Besonders wenn man sich in kleineren Vorversuchen (0.6 ccm Lösung des Chlorids in 15 ccm Wasser) Impfkristalle hergestellt hat, scheidet sich die Farbsäure laufend kristallisiert aus. Nach mehrstündigem Aufbewahren im Kühlschrank wird abgesaugt und gründlich mit Wasser gewaschen. Ausbeute 92.5 mg (lufttrocken) (83% d. Th.). Die freie Farbsäure bildet kleine dreieckige, sehr dünne Blättchen, die unter dem Mikroskop schwach violett erscheinen. Die Suspension in ihrer Mutterlauge schimmert metallisch. Das trockene Kristallpulver sieht grün aus. Die Verbindung ist in Methanol und Äthanol viel schwerer löslich als das Chlorid, jedoch sind diese beiden Alkohole noch die günstigsten Lösungsmittel. Schwerer lösen Wasser, n-Propanol, n-Butanol, Glykol, Dimethylformamid, noch schwerer höhere Alkohole und Aceton. Äther, Dioxan, Benzol und Chloroform lösen nicht. Beim Ausschütteln einer salzauren Lösung mit Butanol oder Amylalkohol geht der größere Teil des Betanidins in die organische Phase, während Betanin bei dieser Probe hauptsächlich in der wässr. Phase bleibt.

*Betanidin-Lösungen* sind violett. Gegen Alkalien ist das Aglykon noch unbeständiger als Betanin. Während es von Natronlauge sofort unter Gelbfärbung zersetzt wird, entsteht mit Natriumcarbonatlösung zuerst eine prächtige, kornblumenblaue Farbe, die aber schon nach wenigen Sekunden über Olivgrün in Gelb übergeht. Auch in einer hydrogencarbonatalkalischen Lösung ist Betanidin nach wenigen Minuten zersetzt. In essigsaurer oder schwach salzaurer Lösung dagegen hält sich Betanidin im Kühlschrank mehrere Tage ohne merkliche Veränderung.

Mit Eisen(III)-chlorid oder Aluminiumsulfat gibt Betanidin in hydrogencarbonathaltigen Lösungen, mit Zinn(II)-chlorid schon in schwach saurer Lösung blaue Färbungen.

Beim Erhitzen auf dem Block des Monoskops sintert das Kristallpulver bei etwa 203° unter Schwarzbraunfärbung, ist aber bis 250° noch nicht geschmolzen. Die exsikkatortrockene Substanz ist sehr hygrokopisch.



Ber. C 50.00      H 5.30      N 6.14      H<sub>2</sub>O 11.83

Gef. C 49.56–49.62    H 5.11–5.17    N 6.35–6.48    H<sub>2</sub>O 10.00–11.50



Ber. C 49.65    H 5.33    N 6.44    H<sub>2</sub>O 10.35

### 3. Abspaltung von Ammoniak (BECHER)

Die Reaktion wurde in dem von J. K. PARNAS<sup>8)</sup> angegebenen Apparat zur Halbmikrobestimmung von Stickstoff nach KJELDAHL durchgeführt. Die lufttrocken eingewogenen Substanzen (52 bis 78 mg) wurden in 15 ccm Natriumacetat/Essigsäure-Puffer (*pH* 5) gelöst und nach Zusatz von 50 ccm 32-proz. Natronlauge mit Wasserdampf destilliert. Die in etwa 15 Min. übergehenden ersten 50 ccm Destillat wurden in 20 ccm 0.02 n HCl aufgefangen. Nach Wech-

<sup>8)</sup> Z. analyt. Chem. 114, 261 [1938].

sel der Vorlage wurde weitere 10–15 Min. destilliert und in 10 ccm 0.02 *n* HCl aufgefangen. Beide Vorlagen wurden mit 0.02 *n* NaOH gegen Methylrot titriert. Die Ergebnisse enthält Tabelle 1. In einigen Fällen säuerte man die austitrierten Lösungen an, brachte zur Trockne, und wies papierchromatographisch nach, daß Ammoniak (kein Amin) abgespalten worden war. Außerdem wurde die allerdings nicht sehr spezifische Reaktion mit Nessler's Reagenz durchgeführt.

Tab. 1. Ergebnisse der Ammoniakabspaltung aus Betanin- bzw. Betanidinderivaten

Substanz	Gesamt-Stickstoff	NH <sub>3</sub> -Stickstoff
Betanin-Kaliumsalz (aus Fraktion II der Polyamidsäulen-Trennung)	4.58 %	1.45 %
Betanin-Kaliumsalz (aus Fraktion III der Polyamidsäulen-Trennung)	4.72 %	1.43 %
Betanidin-chlorid (aus Fraktion III der Polyamidsäulen-Trennung)	6.19 %	1.80, 1.93, 2.00 %
Betanidin-Farbsäure (aus Fraktion II der Polyamidsäulen-Trennung)	6.47 %	2.25 %
Betanidin-Farbsäure (aus Fraktion III der Polyamidsäulen-Trennung)	6.38 %	2.30 %

Wurde zur Zersetzung der Farbstoffe anstelle der 32-proz. Natronlauge 1-proz. Natronlauge verwendet, so war die abgespaltene Menge Ammoniak wesentlich kleiner, mit 8-proz. Lauge betrug sie etwas mehr als die Hälfte und erreichte mit 16-proz. Lauge etwa 90% der Werte, die mit 32-proz. Lauge gefunden wurden.

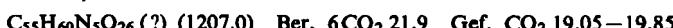
#### 4. Decarboxylierungen (HÜBNER)

Bei diesen Versuchen wurden die Substanzen (18 bis 39 mg) mit 2 ccm Chinolin bzw. Wasser in einem sehr langsamem Wasserstoffstrom (4 Blasen/Min.) erhitzt. Die Gase passierten einen kurzen Rückflußkühler, ein meistens leergelassenes Gefäß und schließlich 2 Vorlagen, die mit je 50 ccm *n*/50 Ba(OH)<sub>2</sub> beschickt und durch ein Natronkalkrohr mit der Außenluft verbunden waren. Am Ende der Versuche wurde die nicht verbrauchte Barytlösung mit *n*/20 Oxalsäure gegen Phenolphthalein zurücktitriert. In Vorversuchen wurde festgestellt, daß Betanin in Chinolin bei 235° in 1/2 Stde. vollständig decarboxyliert wird.

Betanidin-chlorid, lufttrocken



Betanin-Pyridinsalz, exsikkatortrocken

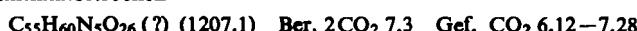


Bei den Decarboxylierungen von Betanidin-chlorid wurde die austitrierte Lösung der Vorlage mit negativem Ergebnis auf Cl-Ionen geprüft. In einem Fall war das sonst leere Gefäß, das den Barytvorlagen vorgeschaltet war, mit Wasser beschickt, ohne daß sich das Ergebnis der Analyse änderte. In einem anderen Versuch wurde Betanidin-chlorid normal decarboxyliert und das Bariumcarbonat gewogen: gef. 26.06% CO<sub>2</sub>. Bei den Decarboxylierungsversuchen durch Erhitzen in siedendem Wasser wurde durchschnittlich 5–7 Stdn. erhitzt.

Betanidin-chlorid, lufttrocken



Pyridinsalz, exsikkatortrocken



### 5. Potentiometrische Titration (HÜBNER)

Bei den Titrationen wurden 11 bis 30 mg Substanz in 18 ccm Wasser (W) gelöst bzw. suspendiert oder in 10 ccm Äthanol + 8 ccm Wasser (A) gelöst und unter kräftigem mechanischen Rühren mit  $n/20$  NaOH (Glaselektrode) titriert. Bei den Resultaten (Tab. 2) sind für das Kalium- und Pyridinsalz des Betanins die — verglichen mit Betanin und Betanidin — verdoppelten Mol.-Gewichte berücksichtigt worden. Die bei diesen Salzen gefundenen Carboxylzahlen müssen zum Vergleich zu den monomeren Verbindungen halbiert werden.

Tab. 2. Ergebnisse der potentiometrischen Titration von Betanin- und Betanidinderivaten

Substanz	Lösungsmittel	$p_{\text{H}}$ Anfang	Phenol $p_K$	Gef. Anzahl COOH	COOH auf Monomere bez.
Betanin-Kaliumsalz	W	2.96	8.7	3	1.5
Betanin-Pyridinsalz	W	2.97	8.7	4	2.0
Betanin (freie Farbsäure)	W	2.88	8.7	—	2.1
Betanidin-chlorid	W	2.61	8.7	—	3.1
Betanidin-chlorid	A	2.78	9.5	—	3.0
Betanidin (fr. Farbsäure)	W	3.02	8.8	—	2.0
Betanidin (fr. Farbsäure)	A	3.28	9.5	—	2.0

### 6. Abbau mit Ozon und Peressigsäure (BECHER)

In die Lösung von 1.188 g *Betanidin-chlorid* (aus Fraktion III der Polyamidsäulen-Trennung) in 27 ccm Methanol und 108 ccm Eisessig wurde bei Raumtemperatur ozonhaltiger Sauerstoff eingeleitet, bis (nach etwa 1–2 Stdn.) die Lösung nur noch schwach gelb gefärbt war und sich nicht mehr merklich aufhellte. Während des Einleitens wurden insgesamt 50 ccm Methanol zugefügt, um Verdunstungsverluste zu ersetzen und das Betanidin in Lösung zu halten.

20 ccm der Lösung wurden sodann i. Vak. eingedampft. Der braune Rückstand reagierte weder mit Kaliumjodid, noch ließ sich mit Sulfanilsäure/α-Naphthylamin Nitrit oder Nitrat nachweisen. Papierchromatogramme in verschiedenen Laufmitteln zeigten neben einigen im UV fluoreszierenden Flecken zwei mit Ninhydrin reagierende Substanzen, von denen die mit dem kleineren  $R_f$ -Wert in allen verwandten Laufmitteln mit Asparaginsäure übereinstimmte.

Die restliche Lösung, entsprechend etwa 1 g Betanidin-chlorid, wurde nach Zusatz von 120 ccm Eisessig und 10 ccm Perhydrol 40 Stdn. lang auf 35° gehalten. Dann wurde 10 Min. zum Sieden erhitzt und i. Vak. eingedampft. Der gelbliche Rückstand schäumte stark, besonders i. Vak. Das entweichende Gas bläute Kaliumjodid/Stärke-Papier. Auch der Rückstand selbst oxydierte Kaliumjodid in Eisessig. Mit Sulfanilsäure/α-Naphthylamin ließ sich zwar Nitrat nachweisen, Nitrit jedoch nur in Spuren. Die währ. Lösung des Rückstandes hatte den  $p_{\text{H}}$ -Wert 1.5. Nach mehrtätigem Trocknen des Rückstandes über  $P_2O_5$  wog die hygrokopische Masse 0.768 g. Sie wurde in 12 ccm Wasser gelöst. Im Papierchromatogramm waren jetzt die ninhydrin-positiven Substanzen in größerer Menge zu sehen als vor der Peressigsäure-Oxydation. Die fluoreszierenden Flecken waren jetzt nach Anzahl,  $R_f$ -Wert und Fluoreszenzfarben verändert.

10 ccm der währ. Lösung (entsprechend 0.83 g Betanidin-chlorid oder 0.64 g Rückstand) wurden so lange kontinuierlich mit Äther extrahiert, bis alle ätherlöslichen Substanzen entfernt waren und der Extrakt schon eine schwache Ninhydrin-Reaktion zeigte. Der Ätherextrakt hinterließ beim Eindampfen insgesamt 0.434 g gelben Rückstandes. Der zuerst abgenommene Extrakt (0.255 g) begann bald, Kristalle abzuscheiden.

Die wäsr. Lösung ergab beim Eindampfen i. Vak. 0.247 g eines hygrokopischen Rückstandes. Seine Papierchromatogramme in verschiedenen Laufmitteln ergaben wiederum 2 ninhydrin-positive Substanzen. Diejenige mit dem kleineren  $R_f$ -Wert unterschied sich in ein- und zweidimensionalen Chromatogrammen und Mischchromatogrammen nicht von Asparaginsäure. Die zweite Substanz hatte in verschiedenen Laufmitteln den gleichen  $R_f$ -Wert wie Äthylamin, war aber im Gegensatz zu diesem und einigen anderen niederen Aminen nach dem Chromatographieren mit ammoniakalischem Äthanol noch vorhanden und gab mit Folin-Sprühreagenz (Natrium- $\beta$ -naphthochinon-sulfonat<sup>9)</sup>) eine andere Farbreaktion als die Amine. Die ionophoretische Untersuchung der beiden ninhydrin-positiven, durch aufsteigende Papierchromatographie ( $\text{CH}_3\text{OH}$ /konz.  $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$ ) voneinander getrennten Substanzen im Elphor-Gerät bei  $p_{\text{H}}$  1.75, 2.56, 2.77, 4.6, 6.0 und 10.4 ergab, daß beide Aminosäuren sind.

0.228 g des aminosäure-haltigen Rückstandes der wäsr. Lösung, der noch mindestens eine auf dem Papier im UV-Licht fluoreszierende Substanz enthielt, wurden in 50 ccm  $n$  Essigsäure in der von W. MAYER und K. LAUER<sup>10)</sup> beschriebenen Apparatur der kontinuierlichen Papierionophorese in  $n$  Essigsäure ( $p_{\text{H}}$  2.4) bei 1200 Volt unterworfen. Dadurch gelang die Trennung der beiden Aminosäuren und ihre Abtrennung von anderen Carbonsäuren. Aus den Asparaginsäure enthaltenden Fraktionen wurden 57.4 mg weitgehend kristallisierter Substanz erhalten, die polarimetriert wurde.

$[\alpha]_{D}^{25} : +19.1 \pm 1.6^\circ$  ( $c = 1.31, 0.15 \text{ } n \text{ HCl}$ ); (authent. L-Asparaginsäure:  $+21.4 \pm 1.6^\circ$ )  
 $[\alpha]_{D}^{25} : +22.9 \pm 0.8^\circ$  ( $c = 1.31, 0.15 \text{ } n \text{ HCl}$ ); (authent. L-Asparaginsäure:  $+28.2^\circ$ )

In zahlreichen Papierchromatogrammen (es wurden 6 verschiedene Gemische zur eindimensionalen und 3 verschiedene Gemische zur zweidimensionalen Chromatographie verwendet) erwies sich die Substanz als identisch mit *Asparaginsäure*. Das *Benzoyl*<sup>11)</sup> schmolz bei 181 bis 182° (unkorr.) und zeigte im Gemisch mit *N-Benzoyl-L-asparaginsäure* keine Depression.

100 mg Betanidin-chlorid (Fraktion II oder III der Polyamidsäulen-Trennung) wurden mit 2.5 ccm Methanol, 21 ccm Eisessig und 1 ccm Perhydrol 40 Stdn. auf 35° erwärmt. Darauf wurde die dunkelbraune Lösung aufgekocht, wobei sie sich etwas aufhellte, und i. Vak. eingedampft. Nitrit und Nitrat ließen sich nicht nachweisen, während Asparaginsäure papierchromatographisch identifiziert werden konnte.

<sup>9)</sup> F. CRAMER, Papierchromatographie, 4. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1958, S. 94.

<sup>10)</sup> Chemie-Ing.-Techn. 26, 81 [1954].

<sup>11)</sup> E. FISCHER, Ber. dtsch. chem. Ges. 32, 2451 [1899].