

## Über die Cyanogenese von *Bambusa vulgaris* und *B. guadua*<sup>1)</sup>

Ulrich Schwarzmaier

Institut für Organische Chemie der Universität Kiel,  
Olshausenstr. 40–60, D-2300 Kiel

Eingegangen am 18. Februar 1976

Das Cyanogen der Bambusschößlinge wird isoliert und als Taxiphyllin (3) identifiziert. Die Thermolabilität von 3, die für die Eßbarkeit der Sprosse verantwortlich ist, wird untersucht und die Umwandlung von 3 in acetyliertes Dhurrin (5) beschrieben. Als weitere Extraktivstoffe werden  $\beta$ -Sitosterol (1), dem etwas Campesterol und Stigmasterol beigemischt sind, 4-Hydroxybenzaldehyd (2) und L-Asparagin (7) nachgewiesen. Die Aminosäuren, die 7 begleiten, sind aufgeführt, ihre mögliche Rolle bei Cyanogenese und Metabolismus wird diskutiert.

### On the Cyanogenesis of *Bambusa vulgaris* and *B. guadua*<sup>1)</sup>

The cyanogen of bamboo shoots is isolated and identified as taxiphyllin (3). The thermolability of 3 responsible for the edibility of the shoots is studied and the conversion of 3 into acetylated dhurrin (5) described. As further extractives  $\beta$ -sitosterol (1) containing some campesterol and stigmasterol, 4-hydroxybenzaldehyde (2) and L-asparagine (7) are identified. The amino acids accompanying 7 are presented and their possible role in cyanogenesis and metabolism discussed.

Die *Bambuseae*<sup>2)</sup> sind eine in den Tropen und Subtropen heimische Unterfamilie der *Gramineae* (Gräser) mit 500 vornehmlich baumförmigen oder strauchigen, selten krautigen Vertretern. Die Halme des Bambus<sup>3)</sup> stellen wegen ihres schnellen Wuchses und der hervorragenden mechanischen und ästhetischen Eigenschaften einen Holzersatz von enormer ökonomischer und ökologischer Bedeutung für die Tropenbewohner dar<sup>4)</sup>. Ein weiteres begehrtes Produkt sind die üppigen Schößlinge, die die Bambusstauden zur Regenzeit aussenden und die besonders in der fernöstlichen Küche als Gemüse Verwendung finden<sup>2b, 4, 5)</sup>. Hervorstechende chemische Merkmale der Sprosse sind die starke Cyanogenese<sup>6, 7)</sup> (über 100 mg HCN/100 g Frischdroge) und der damit verbundene bittere

<sup>1)</sup> Auszug aus der Habilitationsarbeit, Univ. Kiel 1976.

<sup>2)</sup> <sup>2a)</sup> F. A. McClure, Genera of Bamboos Native to the New World (*Gramineae: Bambusoideae*), herausgegeben von T. R. Soderstrom, Smithsonian Contributions to Botany, No. 9, Smithsonian Institution Press, Washington 1973; sowie dort zitierte Literatur. – <sup>2b)</sup> A. Engler's, Syllabus der Pflanzenfamilien, 12. Aufl., Bd. 2, S. 577, Gebrüder Borntraeger, Berlin-Nicolassée 1964.

<sup>3)</sup> Sammelbegriff: vgl. Der kleine Brockhaus, Bd. 1, S. 96, Eberhard Brockhaus, Wiesbaden 1952.

<sup>4)</sup> A. Engler und K. Prantl, Die natürlichen Pflanzenfamilien, II. Teil, Abt. 1–6, S. 89, Verlag von Wilhelm Engelmann, Leipzig 1889; O. Warburg, Die Pflanzenwelt, Bd. 3 (Neudruck), S. 367, Bibliographisches Institut, Leipzig 1926; E. Pérez-Arbeláez, Plantas útiles de Colombia, S. 385, Sucesors de Rivadeneyra (S. A.), Madrid, Librería Colombiana, Bogotá 1956; A. Arber, The Gramineae, S. 58, Wheldon & Wesley, Ltd., Stechert-Hafner Service Agency, Inc., New York, Nachdruck von J. Cramer, Weinheim 1965.

<sup>5)</sup> S. G. Harrison, G. B. Masefield, B. E. Nicholson und M. Wallis, The Oxford Book of Food Plants, S. 162, Oxford University Press, London 1973.

<sup>6)</sup> R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen, Bd. 2, S. 156, Birkhäuser Verlag, Basel und Stuttgart 1963.

<sup>7)</sup> R. D. Gibbs, Chemotaxonomy of Flowering Plants, Vol. III, S. 1896, McGill-Queen's University Press, Montreal und London 1974.

Geschmack. Beide Eigenschaften beeinträchtigen die EBbarkeit jedoch nicht, da sie sich beim Kochen verlieren<sup>8)</sup>. Unser Interesse galt von den Inhaltsstoffen in erster Linie dem thermolabilen, bislang nicht faßbaren Cyanogen.

Die Untersuchung wurde an den in Kolumbien wildwachsenden baumförmigen Arten *Bambusa vulgaris* Schrader und *B. guadua* Humboldt et Bonpland durchgeführt, die von uns<sup>9)</sup> im Oktober 1973 bei Minca, Sierra Nevada de St. Marta, bzw. Garzón, Rio Magdalena, gesammelt wurden und die hier aufgrund starker chemischer Ähnlichkeit zusammen besprochen werden sollen. Nach dem *Guignard-Mirande-Test*<sup>10)</sup> mit Pikratpapier konzentriert sich das Blausäurevorkommen fast ausschließlich auf die Sproßspitze. Blätter, Holz, Rhizom und Wurzeln sind blausäurefrei, nodial aufsitzende Knospen jedoch ebenfalls leicht cyanogen, wodurch frühere Angaben<sup>6)</sup> weitgehend bestätigt werden.

Wegen der besonderen Labilität des Cyanogens wurden die von den Hüllblättern befreiten Sproßspitzen bereits am Fundort mit 1proz. Essigsäure in 96proz. Äthanol extrahiert. Die filtrierten Auszüge erwiesen sich als ausreichend haltbar und wurden erst einige Zeit später unter möglichst geringem Erwärmen (<40°C) eingengt. Chloroform entzog dem in wenig Wasser suspendierten Eindampfrückstand die Lipide (Lipidfraktion). Der sirupöse Rückstand der wäßr. Lösung ergab bei Extraktion mit heißem Methanol/Eisessig (99:1)<sup>11)</sup> einen methanollöslichen Anteil (Methanolfraktion) und einen kristallinen Rückstand (Restfraktion). Als wirksames Spaltenzym für das gesuchte Cyanogen konnte in Vorproben Emulsin ermittelt werden. Mit seiner Hilfe ließ sich der Inhaltsstoff im *Guignard-Mirande-Test* nur in der Methanolfraktion nachweisen.

## Lipidfraktion

Die Lipidfraktion besteht nach dünnenschichtchromatographischem Befund bei beiden *Bambusa*-Spezies im wesentlichen aus den Komponenten R1 und R2 (Tab. 1), die auf Kieselgel beim Besprühen mit Schwefelsäure und Erhitzen rotviolette Farbflecken ergeben. Trennung und Reinigung der beiden Stoffe gelingt durch Säulenchromatographie an Kieselgel.

Tab. 1. Kristalline Substanzen aus der Lipidfraktion von *B. vulgaris* und *B. guadua*

Substanz	$R_F$ -Wert <sup>a)</sup>	Schmp. <sup>b)</sup>	Gehalt <sup>c)</sup>		Struktur
			<i>B. v.</i>	<i>B. g.</i>	
R1	0.75	136–137°C	0.028%	0.026%	$\beta$ -Sitosterol (1) <sup>d)</sup>
R2	0.45	116°C	0.063%	0.067%	4-Hydroxybenzaldehyd (2)

a) Auf Kieselgel 60 PF 254 + 366 mit Chloroform/Methanol (98/2) entwickelt.

b) Korrigiert.

c) Bezogen auf Frischdroge.

d) Gemisch.

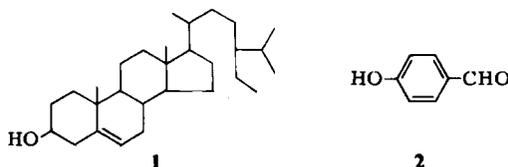
<sup>8)</sup> *J. B. Domingues*, Anais fac. farm. e odontol. univ. São Paulo 13, 169 (1956) [C. A. 54, 15751i (1960)].

<sup>9)</sup> Bei der Bestimmung des Pflanzenmaterials habe ich die wertvolle Hilfe der Botaniker Professor Dr. Luis Eduardo Mora Osejo, Univ. Bogotá, und Dr. Eberhard Waldvogel, Univ. Kiel, in Anspruch genommen.

<sup>10)</sup> Vgl. *R. Eyrólfsson*, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Bd. 28, S. 74, Springer-Verlag, Wien-New York 1970; sowie dort zitierte Literatur.

<sup>11)</sup> In diesem Lösungsmittel ist die Thermolabilität des Cyanogens erheblich abgeschwächt.

Die unpolarere Verbindung R1 ist ein farbloses, schuppiges Kristallisat mit der Mol.-Masse 414 und zeigt im Massenspektrum alle Fragmente, die für  $\beta$ -Sitosterol (1) (das in natürlicher Form gewöhnlich schwankende Beimengungen von Campesterol und Stigmasterol enthält<sup>12)</sup> typisch sind<sup>13)</sup>. Identität besteht auch mit authentischem 1 aus Samenöl von *Prunus amygdalus* Batsch var. *amara* (DC.) Focke<sup>14)</sup>. Die genaue Zusammensetzung des Phytosterols ergibt sich aus dem Gaschromatogramm des Trimethylsilylderivats<sup>15)</sup> (vgl. Tab. 2).



Tab. 2. Zusammensetzung des Phytosterols

Substanz	Retentionszeit <sup>1)</sup>	<i>B. guadua</i>	<i>B. vulgaris</i>
Campesterol	553 s	24.6%	21.5%
Stigmasterol	589 s	13.5%	12.0%
$\beta$ -Sitosterol	679 s	61.9%	66.5%

<sup>1)</sup> GC an 3.8% Silicone Gum Rubber SE 30 (Methyl) auf Chromosorb G bei 255°C.

Die Komponente R2 bildet farblose Kristalle und ist auf Kieselgel F charakterisiert durch UV-Aktivität sowie durch eine rotbraune Enolreaktion mit Eisen(III)-chlorid und eine orangefarbene Aldehydreaktion mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Durch die Mol.-Masse von 122, charakteristische Fragmente mit *m/e* 121 (Hydroxybenzoylkation)<sup>16)</sup> und 93 (Hydroxyphenylkation)<sup>16)</sup> sowie die Kopplungskonstante von  $J = 8.5$  Hz für zwei benachbarte Protonenpaare<sup>17)</sup> wird R2 als 4-Hydroxybenzaldehyd (2) charakterisiert.

### Methanolfraktion

Die cyanogene Methanolfraktion enthält nach dünnschichtchromatographischem Befund neben den üblichen Kohlenhydraten Glucose, Fructose und Saccharose bei beiden *Bambusa*-Spezies als Hauptbestandteil eine unbekannte Komponente R3, die beim Ansprühen mit Schwefelsäure und Erhitzen einen zunächst rotvioletten, dann schwarzen Farbfleck ergibt. Aufgrund deutlich niedrigerer Polarität läßt sich R3 an Kieselgel mit wassergesättigtem Chloroform/Methanol (3:1) leicht von den uninteressanten Begleitstoffen befreien.

Die bitterschmeckende Verbindung kristallisiert sofort, zersetzt sich aber bereits unterhalb des Schmelzpunkts und wird durch Emulsin in 4-Hydroxybenzaldehyd (2), Glucose und Blausäure gespalten. Mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid/konz. Ammoniak<sup>18)</sup>

<sup>12)</sup> H. Auerhoff und R. Nickoleit, Arch. Pharm. (Weinheim) **305**, 104 (1972).

<sup>13)</sup> A. Mondon und U. Schwarzmaier, Chem. Ber. **108**, 925 (1975).

<sup>14)</sup> U. Schwarzmaier, Phytochemistry **11**, 2358 (1972).

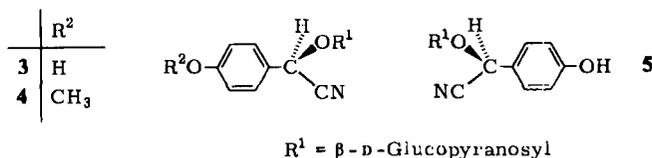
<sup>15)</sup> Vgl. A. Mondon, H. Callen und P. Hartmann, Chem. Ber. **108**, 1989 (1975).

<sup>16)</sup> Vgl. H. Kienitz, Massenspektrometrie, S. 467, Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. 1968.

<sup>17)</sup> Vgl. D. H. Williams und I. Fleming, Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie, S. 122, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1968.

<sup>18)</sup> U. Schwarzmaier, J. Chromatogr. **114**, 235 (1975).

erhält man die für Mandelsäurenitril-derivate typische karminrote Farbreaktion. Da sich bei Behandlung von **3** mit Diazomethan und anschließender enzymatischer Spaltung Anisaldehyd bildet, dürfte ein glycosidiertes Cyanhydrin mit phenolischer OH-Gruppe vorliegen. Die beiden möglichen 4-Hydroxy-D- bzw. L-mandelsäurenitrilglucoside<sup>19)</sup> sind aus der Natur als Taxiphyllin (**3**)<sup>20)</sup> in der Conifere *Taxus baccata* L. (Eibe) bzw. Dhurrin (**5**)<sup>21)</sup> in der Graminee *Sorghum vulgare* Pers. (Hirse) bereits bekannt.



Durch die chemische Verschiebung  $\delta = 4.61$  ppm für das vom anomeren Proton gebildete Dublett ( $J = 6.5$  Hz)<sup>22)</sup> sowie den stahlblauen stereospezifischen DC-Test mit Hydroxylamin/Eisen(III)-chlorid<sup>23)</sup> wird der Aglyconteil anders als bei dem oben erwähnten Gramineencyanosid **5** als D-Form charakterisiert. Damit ist **3** erstmals bei Monokotyledonen nachgewiesen worden. Der Gehalt der Frischdroge beträgt ca. 1%.

### Thermolabilität

Bereits von anderer Seite<sup>24)</sup> ist bei **3** besondere Thermolabilität festgestellt worden. Bei den an sich toxischen Bambussprossen ist sie unseres Erachtens für die Eßbarkeit nach dem Kochen verantwortlich und daher einer eingehenderen Studie wert.

Bei Raumtemperatur und pH 7 ist die wäßrige Lösung von **3** stabil. Bei Temperaturerhöhung erfolgt jedoch unter Trübung und Gelbfärbung Zersetzung. Dasselbe gilt für phosphatgepufferte Lösungen mit niedrigeren pH-Werten. Als Zerfallsprodukte können wie bei der enzymatischen Hydrolyse Glucose, 4-Hydroxybenzaldehyd (**2**), Blausäure und eine Spur 4-Hydroxybenzaldehyd-cyanhydrin nachgewiesen werden. Die dünnschichtchromatographisch halbquantitativ erhaltenen Ergebnisse sind Tab. 3 zu entnehmen.

Tab. 3. Bildungsrate von Glucose und **2** sowie Wiederfindungsrate von **3** beim pH-abhängigen thermischen Zerfall einer 1proz. Lösung in 0.2 M Phosphatpuffer nach 90 min bei 70°C

Komponente	R <sub>F</sub> -Wert <sup>a)</sup>	pH-Wert					
		7.3	6.7	6.1	5.5	5.0	4.4
Glucose	0.08	100 <sup>b)</sup>	100	90	66	10	3
4-Hydroxybenzaldehyd ( <b>2</b> )	0.85	100	100	90	66	10	3
Taxiphyllin ( <b>3</b> )	0.30	0	0	10	34	90	97

<sup>19)</sup> DC-Fertigplatten Woelm Kieselgel F 254, Laufmittel: wassergesätt. Chloroform/Methanol (3: 1).

<sup>b)</sup> Auf Ausgangsmaterial bezogene %-Angaben.

<sup>19)</sup> Aus Gründen der Einheitlichkeit wird hier die klassische Konfigurationsbezeichnung bevorzugt; nach der neuen Konvention heißt es (R) bzw. (S).

<sup>20)</sup> G. H. N. Towers, A. G. McInnes und A. C. Neish, *Tetrahedron* **20**, 71 (1964); vgl. auch l. c.<sup>18)</sup>.

<sup>21)</sup> C.-H. Mao, J. P. Blocher, L. Anderson und D. C. Smith, *Phytochemistry* **4**, 297 (1965).

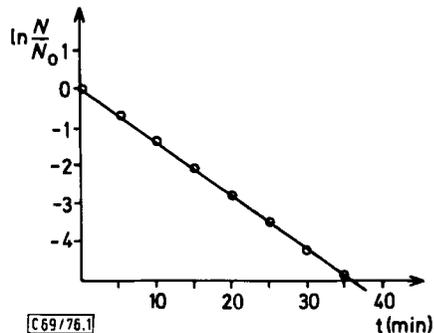
<sup>22)</sup> U. Schwarzmaier, *Chem. Ber.* **109**, 3250 (1976).

<sup>23)</sup> U. Schwarzmaier, *J. Chromatogr.* **111**, 430 (1975).

<sup>24)</sup> V. Plouvier, *C. R. Acad. Sci.* **259**, 665 (1964).

Der pH-Wert von Bambuspreßsaft beträgt ungefähr 5.5. Für den Zerfall einer 1 proz. Lösung von **3** in einer entsprechenden 0.2 M Phosphatpufferlösung von 99–101 °C findet man auf die oben erwähnte Weise die in Abb. 1 wiedergegebene Zeitabhängigkeit.

Reaktionszeit $t^{a)}$	$N/N_0$	$-\ln N/N_0$
0	1.00	0.000
5 <sup>b)</sup>	0.50	0.693
10	0.25	1.386
15	0.125	2.080
20	0.0625	2.775
25	0.0313	3.465
30	0.0156	4.162
35	0.0078	4.857
40	—	—



<sup>a)</sup> In Minuten (min).

<sup>b)</sup> Halbwertszeit  $t_{1/2} = 300$  s, Geschwindigkeitskonstante  $k = \frac{0.693}{t_{1/2}} = 2.31 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ .

Abb. 1. Zeitlicher Verlauf des Zerfalls von **3** in 1 proz. Lösung bei pH 5.5 und 99–101 °C (Reaktion 1. Ordnung)

Offensichtlich hat die Reaktion ein Zeitgesetz 1. Ordnung. Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  beträgt 300 s, die Geschwindigkeitskonstante  $k = 2.31 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ . Nach einer Kochzeit von 35–40 min ist demnach mit Sicherheit alles **3** zerstört und die freigesetzte Blausäure aufgrund ihrer Flüchtigkeit verschwunden.

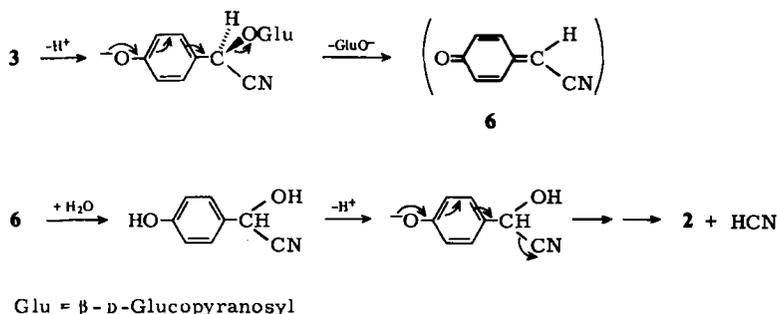
Da im Falle des mit Diazomethan erhältlichen 4-*O*-Methyltaxiphyllins (**4**) beim Erhitzen keine Zersetzung eintritt, ist für den Zerfall von **3** offenbar die phenolische OH-Gruppe verantwortlich. Der  $pK_a$ -Wert von **3** dürfte ähnlich wie bei **5** ungefähr 8.9<sup>21)</sup> betragen. Wenn man annimmt, daß der Dissoziationsgrad mit der Temperatur noch steigt, dürften selbst in schwach saurem Medium genug Phenolat-Ionen vorliegen. Für sie besteht die Möglichkeit, auf dieselbe wie von Mao und Anderson<sup>25)</sup> für die alkalische Hydrolyse von **5** postulierte Weise zu zerfallen. Durch den Elektronenschub, der von der Phenolatgruppe ausgeht, wird ein Glucopyranosyloxy-Anion ausgestoßen und die planare 1'-Cyan-*p*-chinomethan-Zwischenstufe **6** gebildet (s. Schema). Nach der Addition von Wasser an **6** zerfällt das entstandene Cyanhydrin über das **6**-analoge 1'-Hydroxy-*p*-chinomethan in den Aldehyd **2** und Blausäure. Da neben dem Cyanhydrin kein glucosidiertes Zwischenprodukt nachgewiesen werden kann, dürfte der vorgeschlagene Reaktionsweg dem mit 1'-*O*-Glucopyranosyl-*p*-chinomethan als Zwischenstufe vorzuziehen sein.

### Basenkatalysierte Racemisierung

Normalerweise reagieren Mandelsäurenitrilglycoside auf basische Katalysatoren mit rascher Racemisierung des Aglyconteils<sup>10)</sup>. Im Falle von **3** beobachtet man unter diesen Bedingungen jedoch, wie für **5** bereits beschrieben<sup>25)</sup>, Zerfall in **2**, Glucose und Blausäure. Wenn man dagegen **3**-Pentaacetat in Pyridin/Triäthylamin (1 : 10) eine Stunde auf 100 °C

<sup>25)</sup> C.-H. Mao und L. Anderson, J. Org. Chem. **30**, 603 (1965).

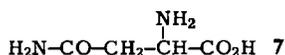
erhitzt, erfolgt ebenfalls partielle Racemisierung. Das entstandene Diastereomerenmischung enthält im Gleichgewicht 38% **3**- und 62% **5**-Acetat und kann an Kieselgel mit Chloroform/Äther (6:1) in die beiden Komponenten zerlegt werden. Somit besteht die Möglichkeit, das in Bambus wohlfeile **3** in das Acetat des relativ begehrten **5** umzuwandeln. Eine zersetzungsfreie Deacetylierung ist nach bisher bekannten Verfahren jedoch nicht möglich.



Schema. Mechanismus des thermischen Zerfalls von **3**, analog l.c.<sup>25)</sup>

## Restfraktion

Die Restfraktion besteht zu etwa zwei Dritteln aus Kohlenhydraten und einem Drittel aus freien Aminosäuren. Letztere können durch Papierchromatographie mit wassergesätt. Phenol und Besprühen mit Ninhydrin nachgewiesen werden. Beim Umkristallisieren aus Wasser scheidet sich eine der Hauptkomponenten bereits kristallin ab. Sie wird durch den Schmelzpunkt, die spezifische Drehung und Vergleichschromatographie mit Referenzmaterial als L-Asparagin (**7**) identifiziert. Die Begleitaminosäuren werden durch automatische Ionenaustauscherchromatographie aufgetrennt und mit Hilfe eines Testgemisches bekannter Zusammensetzung ebenfalls bestimmt (s. experimenteller Teil). Bemerkenswert ist das Vorkommen von freiem Tyrosin, aus dem **3** wahrscheinlich biogenetisch hervorgeht<sup>26)</sup>.



Ebenfalls bemerkenswert sind die Aminosäuren Serin und Phosphorylserin. Besonders letztere dient möglicherweise dazu, das bei der Metabolisierung von **3** freiwerdende Cyanid zu binden<sup>26)</sup>. Auf diese Weise würde  $\beta$ -Cyan-L-alanin entstehen, das in mehreren Blausäurepflanzen bereits nachgewiesen wurde. Aufgrund ihrer charakteristischen blauen Farbreaktion mit Ninhydrin können Spuren der Aminosäure auch in frischen Bambus-extrakten dünnschichtchromatographisch leicht erfaßt werden. Da sie bei der Wasseranlagerung direkt **7** ergibt, ist auch bei Bambus ein biogenetischer Zusammenhang zwischen dem Cyanglycosid und **7** zu erwarten.

<sup>26)</sup> Vgl. E. E. Conn und G. W. Butler, in *Perspectives in Phytochemistry*, herausgegeben v. J. B. Harborne und T. Swain, S. 47, Academic Press, London-New York 1969; H. R. Schütte, *Fortschritte der Botanik*, Bd. 35, S. 103, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1973; sowie dort zitierte Literatur.

Neben der Rolle einer biosynthetischen Vorstufe kann 3 u. U. als ganz andere Funktion auch die eines Fraßgiftes gegen Herbivoren und polyphage Insekten zufallen<sup>27)</sup>.

Herrn Professor Dr. *Albert Mondon* sei für Sachmittel herzlich gedankt. Den Biologen Herrn Dr. *R. Tutschek* und Frau *S. Thönes* verdanke ich eine Aminosäureanalyse.

## Experimenteller Teil

Die Analysen wurden im Mikroanalytischen Laboratorium *Ilse Beetz*, Kronach, ausgeführt. Für die DC und PSC wurde Kieselgel 60 PF 254 + 366, für die SC<sup>28)</sup> Kieselgel 0.05–0.2 mm der Fa. E. Merck verwendet. Die Schmp. sind korrigiert. – IR-Gitterspektrometer 421 der Fa. Perkin-Elmer, KBr-Preßlinge. – UV: Spektrometer RPQ 20 A der Fa. C. Zeiss, Lösungen in Methanol. – NMR: Varian A 60, Lösungen in CDCl<sub>3</sub>/TMS, (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO/TMS und 2 N DCl/DSS. – MS: Atlas CH 4, Angaben für 70 eV. – Drehwerte: Polarimeter 141 der Fa. Perkin-Elmer. – GC: Hewlett-Packard 7620 Research Chromatograph, Säulenfüllung: 3.8% Silicone Gum Rubber SE 30 auf Chromosorb G, Temp. 255°C, Detektor: FID. – Aminosäureanalyse: Autoanalysator Biotronik LC 6000, Säule 0.9 × 55 cm, Kationenaustauscher: Durrum DC-1A, 5 Puffer pH 2.59–4.56, Temperaturprogramm 37–70°C, Verwendung eines Vergleichstestgemisches mit Norleucin als Bezugssubstanz. – Blausäurenachweise<sup>10)</sup> bei Frischdrogen: *Guignard-Mirande*-Test, bei Extrakten und Fraktionen: *G.-M.-Test* unter Emulsin-Zusatz sowie PC/Sandwich-Technik. – Pflanzenmaterial: Schößlinge von *Bambusa vulgaris* und *B. guadua* (gesammelt in Kolumbien, Oktober 1973), die hier aufgrund starker chem. Verwandtschaft zusammen beschrieben werden.

### 1. Extraktion und Fraktionierung

Jeweils drei junge, 30 cm lange Sprosse werden von den Hüllblättern und dem in Streckung befindlichen unteren Abschnitt befreit. Das verbleibende hellgelbe Material (400 g) kann man unter 96proz. Äthanol/Eisessig (99 : 1, 1.5 Liter) leicht zerstoßen. Nach 1 h bei 30°C wird filtriert und der Filterrückstand mit 500 ml Lösungsmittel nachgewaschen. Die beiden gelblichen Extrakte (ca. 1.8 Liter) weisen über mehrere Wochen keine Anzeichen von Zersetzung auf. Beim Einengen i. Vak. unterhalb von 40°C hinterbleibt eine wäbr. Suspension, der mit 250 ml Chloroform die Lipidfraktion (in beiden Fällen ca. 1.0 g) entzogen wird. Der gelbe schaumige Eindampfrückstand der wäbr. Phase (19.3 g<sup>29)</sup> bzw. 20.2 g) wird zerkleinert und als Pulver zweimal mit jeweils 100 ml absol. Methanol/Eisessig (99 : 1) extrahiert. Aus dem auf 50 ml eingeeengten, auf 0°C abgekühlten Extrakt scheidet sich ein farbloses Kristallinat ab, das mit dem methanolunlöslichen Rückstand (Restfraktion: 12.4 g<sup>29)</sup> bzw. 13.0 g) vereinigt wird. Der Methanolextrakt gibt beim Eindampfen einen gelben, schaumigen Rückstand (Methanolfraktion) von 6.9 g<sup>29)</sup> bzw. 7.2 g.

### 2. Lipidfraktion

Die Lipidfraktion (1.0 g) wird in beiden Fällen auf einer Kieselgel-Säule (3 × 40 cm) mit Chloroform/Methanol (98 : 2) aufgetrennt. Die beiden Hauptkomponenten R1 und R2 (*R<sub>F</sub>* 0.75 und 0.45) geben als Kieselgeladsorbat eine rotviolette Farbreaktion mit Schwefelsäure (5 min, 120°C) und erfahren durch PSC mit dem obigen Laufmittel eine weitere Reinigung. R1 ist identisch mit  $\beta$ -Sitosterol (1), R2 mit 4-Hydroxybenzaldehyd (2). Es folgen die Angaben für *B. vulgaris*, für *B. guadua* vgl. Tab. 1.

<sup>27)</sup> Vgl. *D. A. Jones*, in *Phytochemical Ecology*, herausgegeben v. *J. B. Harborne*, S. 103, Academic Press, London-New York 1972.

<sup>28)</sup> Säulenchromatographie.

<sup>29)</sup> Werte für *B. v.* bzw. *B. g.*

***β*-Sitosterol (3 $\beta$ -Hydroxystigmast-5-en) (1):** Schmp. 136–137°C (aus Methanol), 111 mg (0.028%)<sup>30)</sup>,  $[\alpha]_D^{20} = -36.5^\circ$  ( $c = 0.33$  in Chloroform) (Lit.<sup>31)</sup> Schmp. 134–137°C,  $[\alpha]_D^{20} = -35.3^\circ$ . – IR (KBr): 3420 (breit), 1058 (3 $\beta$ -OH), 3024, 1660, 1638, 838, 798 cm<sup>-1</sup> (Olefin). – NMR (DCCl<sub>3</sub>): CH<sub>3</sub>-18  $\delta$  0.69 ppm s, CH<sub>3</sub>-19 1.02 s, 3-OH 1.68 s (austauschbar), 3-H 3.50 m (breit), 6-H 5.38 m; Stigmasterol: 22-H und 23-H 5.15 m, ca. 0.25 H. – MS: M<sup>+</sup> *m/e* 414 (100%), 412 (18), 400 (37), 399 (15), 396 (22), 381 (10), 329 (13), 303 (18), 273 (14), 255 (15), 231 (9), 213 (13); mit Beimengungen von Stigmasterol (M<sup>+</sup> 412) und Campesterol (M<sup>+</sup> 400).

C<sub>29</sub>H<sub>50</sub>O (414.7) Ber. C 83.99 H 12.15 Gef. C 83.94 H 12.12

**1-Acetat:** Schmp. 124–127°C (aus Methanol),  $[\alpha]_D^{20} = -39.9^\circ$  ( $c = 0.31$  in Chloroform) (Lit.<sup>31)</sup> Schmp. 120–123°C,  $[\alpha]_D^{21} = -38.5^\circ$ . – MS: M<sup>+</sup> *m/e* 456 (1%), 396 (100), 381 (6).

C<sub>31</sub>H<sub>52</sub>O<sub>2</sub> (456.7) Ber. C 81.52 H 11.48 Gef. C 81.42 H 11.49

GC von 1: Die beiden Phytosterole werden auf die übliche Weise<sup>15)</sup> mit Hexamethyldisilazan/DMF bei Raumtemp. silyliert; für die Analysenergebnisse vgl. Tab. 2.

**4-Hydroxybenzaldehyd (2):** Schmp. 116°C (aus Äther/Hexan), 252 mg (0.063%) (Lit.<sup>32)</sup> Schmp. 115–116°C). – UV (CH<sub>3</sub>OH)<sup>33)</sup>:  $\lambda_{\max}$  221 nm ( $\lg \epsilon = 3.589$ ), 283.5 (4.155),  $\lambda_{\min}$  239 (2.532). – IR (KBr): 3400–1800, 1212 (Phenol), 3033, 1590 (breit), 1510, 1155, 831 (*p*-disubst. Aromat), 2770, 1663 cm<sup>-1</sup> (aromat. Aldehyd). – NMR ((D<sub>3</sub>C)<sub>2</sub>CO): 3-H und 5-H  $\delta$  7.03 ppm d ( $J_{3,2} = 8.5$  Hz), 2-H und 6-H 7.83 d ( $J_{2,3} = 8.5$  Hz), 4-OH 9.33 s (austauschbar), –CHO 9.91 s. – MS<sup>16)</sup>: M<sup>+</sup> *m/e* 122 (92%), 121 (100), 93 (59), 85 (39), 83 (57), 65 (73).

C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub> (122.1) Ber. C 68.84 H 4.95 Gef. C 68.87 H 4.93

### 3. Methanolfraktion

Die Methanolfraktion (6.9 g<sup>29)</sup> bzw. 7.2 g) wird in 10 ml Methanol gelöst, mit 10 g Kieselgel vermischt und i. Vak. zur Trockne eingedampft. Das pulverförmige Adsorbat gibt man auf eine mit Chloroform vorbereitete Kieselgel-Säule (7.5 × 40 cm) und eluiert mit wassergesätt. Chloroform/Methanol (3 : 1). Das Blausäureglycosid R3 mit R<sub>F</sub> 0.22 gibt als Kieselgeladsorbat beim Besprühen und Erhitzen mit konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> einen zunächst rotvioletten, später schwarzen Farbfleck. Die Ausb. an farbl., kristallinem R3 beträgt 3.76 g (0.94%)<sup>29)</sup> bzw. 3.92 g (0.98%). Weitere Reinigung gelingt durch Lösen in wenig Methanol und Ausfällen in der Wärme mit Isopropylalkohol bzw. beim zweiten Mal mit Essigester. R3 ist identisch mit Taxiphyllin (3)<sup>20)</sup>. Die Hydrolyse mit Emulsin bei pH 5.5 liefert 2, Glucose und Blausäure. Im DC-Test erhält man mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid/konz. NH<sub>3</sub><sup>18)</sup> (10 min 60°C) eine karminrote, mit Hydroxylamin/Eisen(III)-chlorid<sup>23)</sup> (1 h Raumtemp.) eine stahlblaue Farbreaktion.

**Taxiphyllin (4-Hydroxy-D-mandelsäurenitril- $\beta$ -D-glucopyranosid) (3):** Schmp. 176°C (Zers.)<sup>34)</sup> (aus Essigester),  $[\alpha]_D^{20} = -77.1^\circ$  ( $c = 0.25$  in Äthanol) (Lit.<sup>20, 35)</sup> Schmp. 174°C,  $[\alpha]_D^{24} = -72.9^\circ$ <sup>36)</sup>. – UV (CH<sub>3</sub>OH):  $\lambda_{\max}$  232 nm ( $\log \epsilon$  4.049),  $\lambda_{\min}$  254 (2.848),  $\lambda'_{\max}$  274.0 (3.167), 280.8 (3.079) und  $\lambda'_{\min}$  279.3 (3.071); nicht ganz übereinstimmend mit l. c.<sup>20, 35)</sup>. – IR (KBr): 3600–2400, 1072, 1050, 1020, 921, 902 ( $\beta$ -Glucosyl), 3040, 3020, 1612, 1598, 1515, 834 (*p*-disubst. Aromat) und 2240 cm<sup>-1</sup>

<sup>30)</sup> Die Mengenangaben sind auf Frischdroge bezogen.

<sup>31)</sup> W. Sucrow, Chem. Ber. **99**, 2765 (1966).

<sup>32)</sup> K. Reimer und F. Tiemann, Ber. Dtsch. Chem. Ges. **9**, 824 (1876).

<sup>33)</sup> Vgl. C. N. R. Rao, Ultra-Violet and Visible Spectroscopy, S. 39, Butterworths, London 1961.

<sup>34)</sup> Dieser Wert wird in Kapillaren aus NMR-Glas erhalten. Mit Normalglas tritt bereits unterhalb des Schmp. starke Zers. ein.

<sup>35)</sup> B. Bijl-van Dijk, A. C. van der Plas-de Wijs und H. W. L. Ruijgrok, Phytochemistry **13**, 159 (1974).

<sup>36)</sup> Das in l. c.<sup>20, 35)</sup> beschriebene Präparat ist offensichtlich noch lösungsmittelhaltig.

(Nitril). — NMR (2 N DCl)<sup>22)</sup>: 3-H und 5-H  $\delta$  7.49 ppm d ( $J_{3,2} = 8.5$  Hz), 2-H und 6-H 6.98 d ( $J_{2,3} = 8.5$  Hz), Methin-H 5.83 s, anom. H 4.61 d ( $J = 6.5$  Hz), 6 Saccharid-H 4.20–3.25 m.

$C_{14}H_{17}NO_7$  (311.3) Ber. C 54.02 H 5.51 N 4.50 Gef. C 54.07 H 5.42 N 4.49

3-Acetat: Darstellung mit  $Ac_2O$ /Pyridin. Schmp. 144°C (aus Äthanol/Petroläther),  $[\alpha]_D^{20} = -22.1^\circ$  ( $c = 0.35$  in Äthanol) (Lit.<sup>20)</sup> Schmp. 144–144.8°C,  $[\alpha]_D^{20} = -22.1^\circ$ . — NMR ( $CDCl_3$ ): Methin-H  $\delta$  5.54 ppm s; identisch mit 1. c.<sup>20)</sup>. — MS:  $M^+$  *m/e* 521 (<1%), 520 (<1), 347 (3), 331 (24), 200 (9), 175 (17), 174 (7), 169 (59), 158 (10), 157 (37), 139 (42), 133 (50), 132 (100).

$C_{24}H_{27}NO_{12}$  (521.5) Ber. C 55.27 H 5.22 N 2.69 Gef. C 55.37 H 5.15 N 2.72

4-O-Methyltaxiphyllin (4): 1.0 g 3 wird in 50 ml Methanol gelöst und bei 0°C 1 h mit  $CH_2N_2$ /Äther im Überschuß versetzt. Nach DC-Befund ( $CHCl_3/CH_3OH$ , 4:1,  $H_2O$  gesätt.) ist 3 ( $R_F$  0.15) verbraucht und der Hauptbestandteil 4 ( $R_F$  0.44) von etwas Nebenprodukt ( $R_F$  0.56) begleitet. Die Reinigung erfolgt durch SC<sup>28)</sup>, Ausb. 870 mg (83.3%). Hydrolyse der bitter-schmeckenden Kristalle mit Emulsin liefert Anisaldehyd, Glucose und Blausäure.

Schmp. 132°C (aus Essigester),  $[\alpha]_D^{20} = -36.0^\circ$  ( $c = 0.34$  in 0.1 proz. Essigsäure). — UV ( $CH_3OH$ ):  $\lambda_{max}$  232 nm ( $lg \epsilon = 4.108$ ),  $\lambda_{min}$  254 (2.806),  $\lambda'_{max}$  273.0 (3.121), 279.5 (3.056) und  $\lambda'_{min}$  277.0 (2.980). — IR (KBr): 3600–3100, 1100–1000, 920, 898 ( $\beta$ -Glucosyl), 3065, 3039, 3015, 1612, 1586, 809 (*p*-disubst. Aromat), 2835, 1470 ( $OCH_3$ ) und 2235  $cm^{-1}$  (Nitril). — NMR (2 N DCl)<sup>22)</sup>: 3-H und 5-H  $\delta$  7.57 ppm d ( $J_{3,2} = 8.5$  Hz), 2-H und 6-H 7.08 d ( $J_{2,3} = 8.5$  Hz), Methin-H 5.88 s, anom. H 4.63 d ( $J = 6.5$  Hz),  $OCH_3$  3.87 s und 6 Saccharid-H 4.20–3.30.

$C_{15}H_{19}NO_7$  (325.3) Ber. C 55.38 H 5.89 N 4.31 Gef. C 55.39 H 5.95 N 4.24

4-Acetat: Darstellung mit  $Ac_2O$ /Pyridin. Schmp. 132–133°C (aus Äthanol/Petroläther),  $[\alpha]_D^{20} = -16.4^\circ$  ( $c = 0.21$  in Chloroform). — NMR ( $CDCl_3$ ): Methin-H  $\delta$  5.49 ppm s. — MS:  $M^+$  *m/e* 493 (1%), 347 (1), 331 (20), 169 (53), 147 (53), 146 (100), 139 (17).

$C_{23}H_{27}NO_{11}$  (493.5) Ber. C 55.98 H 5.52 N 2.84 Gef. C 55.91 H 5.54 N 2.95

#### 4. Experimente zur Thermolabilität

*pH-Bereich 7.3–4.4 bei 70°C*: Jeweils 2 mg 3 werden in 0.2 ml 0.2 M Phosphatpufferlösung<sup>37)</sup> mit pH 7.3, 6.7, 5.5, 5.0 und 4.4 90 min unter  $N_2$  erhitzt. Der Gehalt der Reaktionsgemische an 2, 3 und Glucose wird mit Hilfe von Referenzlösung dünn-schichtchromatographisch über Größe und Intensität der mit konz.  $H_2SO_4$  (5 min 120°C) erzeugten Farbflecke halbquantitativ bestimmt. Jedes Experiment wird durch Wiederholung auf Reproduzierbarkeit geprüft. Zur Ausschaltung der Kontaktkatalyse durch Gefäßglas benutzt man am besten Reaktionsröhrchen aus einem kationearmen Glas (z. B. NMR-Glas). Die chromatographischen Daten und Analysenergebnisse finden sich in Tab. 3.

*Zeitabhängigkeit des Zerfalls bei pH 5.5/99–101°C (Zeitgesetz 1. Ordnung)*. Das Experiment bei pH 5.5 (pH-Wert des Preßsaftes von Bambus) und 99–101°C wird auf die voranstehende Weise ausgeführt und alle 5 min ein aliquoter Teil des Reaktionsgemischs für den halbquantitativen DC-Test abgenommen. Als einziges weiteres Reaktionsprodukt von Interesse läßt sich spurenweise 4-Hydroxybenzaldehyd-cyanhydrin ( $R_F$  0.74) mit Hilfe von Referenzmaterial nachweisen. Die Ergebnisse sind in Abb. 1 zusammengefaßt.

*Darstellung von 5-Acetat (Dhurrin-pentaacetat)*: 1.0 g 3-Acetat wird in einer Ampulle mit 2 ml wasserfreiem Pyridin und 20 ml absol. Triäthylamin übergossen und zusammen mit einem Rührstab eingeschmolzen. Anschließend erhitzt man das Gefäß unter Rühren 1 h auf 100°C, wobei das Ausgangsmaterial im Laufe von 20 min in Lösung geht. Das erhaltene Reaktionsgemisch, welches

<sup>37)</sup> Vgl. H. Römpf, Chemie-Lexikon, 6. Aufl., S. 5186, Franckh'sche Verlagshandlung, Stuttgart 1966.

nach NMR-Befund im Gleichgewicht aus 38% 3-Acetat und 62% 5-Acetat besteht, wird eingedampft, mit  $\text{Ac}_2\text{O}$ /Pyridin reacctyliert und mit Chloroform/Äther (6:1) über eine Kieselgel-Säule ( $4 \times 45 \text{ cm}$ ) geschickt; Ausb. an 5-Acetat ( $R_F$  0.18) 595 mg, an wiedergefundenem 3-Acetat ( $R_F$  0.12) 352 mg. 5-Acetat: Schmp.  $132^\circ\text{C}$  (aus Äthanol/Petroläther),  $[\alpha]_D^{20} = -50.4^\circ$  ( $c = 0.32$  in Äthanol) (Lit.<sup>20, 21</sup>) Schmp.  $132 - 132.5^\circ\text{C}$ ,  $[\alpha]_D^{20} = -50.5^\circ$ . — NMR ( $\text{CDCl}_3$ )<sup>22</sup>: Methin-H  $\delta$  5.70 ppm s; identisch mit l. c.<sup>20</sup>. — MS:  $M^+$   $m/e$  521 (<1%), 520 (<1), 347 (2), 331 (47), 200 (6), 175 (13), 174 (6), 169 (100), 158 (6), 157 (21), 139 (30), 133 (27), 132 (82).

$\text{C}_{24}\text{H}_{27}\text{NO}_{12}$  (521.5) Ber. C 55.27 H 5.22 N 2.69 Gef. C 55.36 H 5.26 N 2.77

### 5. Restfraktion

*Asparagin* (7): 1.0 g Restfraktion von *B. vulgaris* wird in 1 ml Wasser unter Erwärmen gelöst. Im Laufe von 2 d scheiden sich 198 mg (0.61%) eines farblosen Kristallisats ab, das nach PC (S & S 2043 b Mgl, wassergesätt. Phenol) und Ansprühen mit Ninhydrin (10 min  $120^\circ$ ) mit L-Asparagin ( $R_F$  0.41) übereinstimmt.

Tab. 4. Freie Aminosäuren der Restfraktion von *B. vulgaris* nach Abtrennung der Hauptmenge von 7 (nmol/1.0 mg Mutterlaugenprodukt, bestimmt durch automat. Analyse)

Nr.	Substanz	Retentionszeit (min)	Konzentration nmol/1.0 mg
1	Phosphorylserin <sup>a)</sup>	11	5
2	Phosphoryläthanolamin	20	330
3	Asparaginsäure	48	88
4	Threonin	74	14
5	Serin <sup>a)</sup>	79	110
6	Asparagin <sup>a)</sup>	92	510
7	Glutaminsäure	101	7
8	Glutamin	107	2
9	Prolin	129	Spur
10	Glycin	131	3
11	Alanin	137	4
12	Citrullin	144	Spur
13	$\alpha$ -Aminobuttersäure	148	Spur
14	Valin	158	2
15	Isoleucin	195	1
16	Leucin	205	1
17	Tyrosin <sup>b)</sup>	230	3
18	Phenylalanin	248	6
19	$\beta$ -Aminoisobuttersäure	266	Spur
20	$\gamma$ -Aminobuttersäure	283	Spur
21	Äthanolamin	290	13
22	allo-Hydroxylysin	317	Spur
23	Ornithin	338	2
24	Lysin	349	4
25	Histidin	365	10
26	Arginin	430	58

<sup>a)</sup> Von Bedeutung beim Metabolismus von 3<sup>26)</sup>.

<sup>b)</sup> Biogenet. Vorstufe von 3<sup>26)</sup>.

Schmp. 230°C (aus Wasser),  $[\alpha]_D^{20} = -5.5^\circ$  ( $c = 1.95$  in Wasser) (Lit.<sup>38)</sup> Schmp. 226–227°C,  $[\alpha]_D^{20} = -5$  bis  $-6^\circ$ . – IR (KBr): 3350, 1670, 1639 (Amid), 3150–2950, 2075, 1242, 1145, 1106, 845 (Ammonium), 1604, 1392 und 760 (Carboxylat).

$C_4H_8N_2O_3$  (132.1) Ber. C 36.36 H 6.10 N 21.20 Gef. C 36.41 H 6.24 N 21.06

*Begleitaminosäuren*: Die Mutterlauge von 7 wird eingedampft und 1.0 mg in 0.5 ml Puffer (pH 2.2) für eine automatische Analyse verwendet. Die Ergebnisse finden sich in Tab. 4.

Das Mutterlaugenprodukt enthält in Spuren noch einige weitere Aminosäuren, die nicht bekannt und daher nicht aufgeführt sind.

$\beta$ -Cyan-L-alanin<sup>39)</sup> ist in dem verwendeten Testgemisch nicht enthalten und folglich auch bei der automatischen Analyse nicht zu erfassen. Die Aminosäure kann jedoch aus einem frisch bereiteten, konz. Extrakt von *B. vulgaris* heraus dünnschichtchromatographisch ( $SiO_2$ ; n-BuOH/HOAc/H<sub>2</sub>O, 4 : 1 : 1) mit Hilfe von authent.  $\beta$ -Cyan-L-alanin ( $R_F$  0.33; dargestellt aus 7 nach l. c.<sup>40)</sup>) leicht durch seine charakteristische blaue Farbreaktion mit Ninhydrin nachgewiesen werden.

<sup>38)</sup> Vgl. *W. Karrer, Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, S. 966, Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart 1958.

<sup>39)</sup> Eine obligatorische Zwischenstufe bei der Metabolisierung von 3<sup>26)</sup>.

<sup>40)</sup> *B. Liberek, Cz. Buczel und Z. Grzonka, Tetrahedron* **22**, 2303 (1966).