

CHROM. 8426

Note

Hydroxylamin/Eisen(III)chlorid, ein stereospezifisches Farbreagenz für Mandelsäurenitrilglycoside

ULRICH SCHWARZMAIER

*Institut für Organische Chemie**, Neue Universität, D-23 Kiel (G.F.R.)

(Eingegangen am 13. Mai 1975)

Die Mandelsäurenitrilglycoside stellen die grösste Gruppe unter den cyano-genen Glycosiden dar¹. Bedingt wird ihre relativ grosse Zahl u.a. durch die Fähigkeit, aufgrund der asymmetrischen Struktur des Aglycons als D- und L-Formen aufzutreten. Früher bediente man sich bei der Bestimmung der Konfiguration der Polari-metrie, heute werden dazu weitgehend magnetische Kernresonanz (NMR)^{2–4} und Gaschromatographie (GC)⁵ herangezogen. An einer technisch weniger aufwendigen Bestimmungsmethode besteht Bedarf.

Bei einer Untersuchung des Racemisierungsverhaltens von Mandelsäure-nitrilglycosiden zeigte sich, dass die Diastereomeren mit einem Aglycon der D-Form jene mit einem L-Aglycon an CH-Acidität übertreffen und dass demzufolge die auf nucleophiler Addition an die Nitrilgruppe beruhenden Nebenreaktionen bei den D-Isomeren merklich schneller verlaufen als bei den L-Formen³. In den Amidoximen⁶, die sich bei Einwirkung von Hydroxylamin aus den Nitrilglycosiden bilden, wurden auf Kieselgelschichten leicht erzeugbare chromogene Derivate gefunden, die dieses charakteristische Verhalten beim Besprühen mit Eisen(III)chlorid auch im dünn-schichtchromatographischen (DC) Farbttest widerspiegeln und daher nicht nur zum Nachweis, sondern auch zur Bestimmung der Konfiguration von Mandelsäurenitril-glycosiden geeignet sind. Da die einfache stereospezifische Farbreaktion sich bei unseren phytochemischen Arbeiten ebenso wie der kürzlich von uns entwickelte Nachweis mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumhydroxid⁷ vorzüglich bewährt hat, möchten wir in dem vorliegenden Beitrag darüber kurz berichten.

MATERIAL UND METHODE

DC-Platten mit Kieselgel GF₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, G.F.R.) werden mit steigenden Mengen (1.0–10.0 µg, aus Mikropipetten) verschiedenen Mandelsäure-nitrilglycosiden sowie methanolischen Extrakten bekannter Stammdrogen¹ getüpfelt, mit wassergesättigtem Chloroform–Methanol (2:1) entwickelt und nach dem Trocknen zunächst mit einer Lösung von 4.5% Hydroxylamin und 4.5% Hydroxylaminhy-drochlorid in verdünntem Äthanol, dann nach 15 min mit einer 1.25% methanolischen Lösung von Eisen(III)chlorid besprüht. Die benötigte Hydroxylaminlösung lässt

* Direktor: Prof. Dr. A. Mondon.

sich folgendermassen herstellen: Zu 14.0 g Hydroxylaminhydrochlorid in 20 ml Wasser gibt man unter äusserer Eiskühlung und Rühren portionsweise 9.5 g fein gemahlene wasserfreies Kaliumcarbonat. Wenn die Gasentwicklung beendet ist, fügt man 80 ml Äthanol hinzu, rührt bei 0° weitere 30 min und filtriert. Die Lösung hat einen pH-Wert von 5.0–5.5 und im Kühlschrank eine Haltbarkeit von ca. 10 Tagen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Mandelsäurenitrilglycoside mit D-Konfiguration wie z.B. Prunasin, Taxiphyllin, *p*-O-Methyltaxiphyllin^{3,8}, Amygdalin und Vicianin geben sofort rotbraune Farbflecken auf farblosem Grund, während L-Isomere wie z.B. Sambunigrin, Dhurrin, *p*-O-Methyldhurrin^{3,8} und Neoamygdalin⁹ erst allmählich mit zunächst hellbrauner Farbe in Erscheinung treten. Nicht nur die Anfärbung, sondern auch die anschliessenden charakteristischen Farbwechsel erfolgen bei den L-Derivaten mit erheblicher Verzögerung. Während die D-Isomeren bereits nach 1 h die für Amidoxime typischen stahlblauen Flecken zeigen, haben die L-Formen dann gerade eine rotbraune Farbe angenommen (Tabelle I). Auf diesem sehr augenfälligen Farbunterschied nach 1 h beruht die Stereospezifität des Nachweises. Bei L-Glycosiden tritt die stahlblaue Färbung erst nach 9 h auf. Nach 24 h zeigen die Flecken in beiden Fällen die gleiche intensive, aber uncharakteristische dunkelbraune Endfarbe.

Die Nachweisempfindlichkeit beträgt 3 µg bei Glucosiden und 5 µg bei Biosiden. Für eine sichere Konfigurationsbestimmung werden etwa 10–15 µg Substanz und als Vergleichsproben die gleichen Mengen verschiedener D- und L-Glycoside benötigt. Wenn reine Stoffe vorliegen, erübrigt sich die chromatographische Entwicklung.

TABELLE I

ZEITLICHE FARBWECHELSEL BEI D- UND L-MANDELSÄURENITRILGLYCOSIDEN NACH DEM BESPRÜHEN MIT HYDROXYLAMIN/EISEN(III)CHLORID

Träger: Kieselgel GF₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, G.F.R.). Färbung: r = rotbraun, h = hellbraun, s = stahlblau, d = dunkelblau, db = dunkelbraun.

Diastereomere	Reaktionszeit			
	15 min	60 min	9 h	24 h
D-Form	r	s	d	db
L-Form	h	r	s	db

Für den mechanistischen Verlauf der Anlagerungsreaktion ergibt sich aus den Farbwechseln, dass die Mandelsäurenitrilglycoside bei der Überführung in die Amidoxime nicht racemisiert werden. Das Hydroxylamin greift also nicht als Base den aciden Methinwasserstoff an, sondern als Nucleophil den Nitrilkohlenstoff. Bemerkenswert ist ausserdem, dass bei Taxiphyllin und Dhurrin, die in Gegenwart von Basen ausserordentlich leicht in *p*-Hydroxybenzaldehyd, Blausäure und Glucose zerfallen⁸, keine Zersetzung erfolgt.

Beim Besprühen der Drogenextrakte zeigt sich, dass die Phenole aufgrund ihrer andersartigen Mobilität nicht stören. Auch die Eigenfärbung von Taxiphyllin und

Dhurrin mit Eisen(III)chlorid fällt wegen ihrer verschwindenden Intensität nicht ins Gewicht. Will man phenolische Gruppen trotzdem ausschalten, so genügt es, die Extrakte vor der chromatographischen Auftrennung mit überschüssigem Diazomethan zu veräthern. Die *p*-O-Methyl-derivate, in die Taxiphyllin und Dhurrin dabei übergehen, weisen die für die Konfiguration typische Färbung ebenfalls auf. Ganz klar geben sich die Blätter und Triebe von *Prunus padus* L. (Prunasin), die Nadeln von *Taxus baccata* L. (Taxiphyllin), die Samen von *Prunus amygdalus* var. *amara* Baill. (Amygdalin und Spur Prunasin¹⁰) und die Samen von *Vicia angustifolia* Grufb. (Vicianin) als D-Mandelsäurenitrilglycosiddrogen, die Blätter und Triebe von *Sambucus nigra* L. (Sambunigrin) und die Sämlinge von *Sorghum vulgare* Pers. (Dhurrin) als L-Glycosiddrogen zu erkennen (Tabelle II). Auch Neoamygdalin, das als Artefakt bei der Racemisierung von Amygdalin auftritt⁹, fügt sich vorzüglich in das vorliegende Farbschema ein.

TABELLE II

FÄRBUNG VERSCHIEDENER MANDELSÄURENITRILGLYCOSIDE UND ZUGEHÖRIGER STAMMDROGEN I h NACH DEM SPRÜHEN MIT HYDROXYLAMIN/EISEN(III)-CHLORID

Träger: Kieselgel GF₂₅₄ (E. Merck, Darmstadt, G.F.R.). Laufmittel: wassergesättigtes Gemisch von Chloroform-Methanol (2:1). Abkürzungen: s = stahlblau; r = rotbraun; A = Artefakt; D und L = D- und L-Konfiguration.

Test No.	Glycosid	Droge	R _F -Wert	Konfiguration	Färbung	Grenzkonzentration (µg)
1	Prunasin	<i>Prunus padus</i> L.	0.78	D	s	3
2	Sambunigrin	<i>Sambucus nigra</i> L.	0.78	L	r	3
3	Taxiphyllin	<i>Taxus baccata</i> L.	0.62	D	s	3
4	Dhurrin	<i>Sorghum vulgare</i> Pers.	0.62	L	r	3
5	<i>p</i> -O-Methyl-taxiphyllin	A	0.81	D	s	3
6	<i>p</i> -O-Methyldhurrin	A	0.81	L	r	3
7	Amygdalin	<i>Prunus amygdalus</i> var. <i>amara</i> Baill.	0.49	D	s	5
8	Neoamygdalin	A	0.49	L	r	5
9	Vicianin	<i>Vicia angustifolia</i> Grufb.	0.54	D	s	5

Von besonderem Interesse ist der stereochemische Befund bei Taxiphyllin und Dhurrin, deren Konfiguration sich nur durch NMR-Vergleiche aufklären liess². Durch den Farbstest werden die erhaltenen Ergebnisse auf unabhängige Weise bestätigt. Auch das kürzlich von uns aus *Taxus baccata* L. isolierte cyanogene Glycosid lässt sich durch DC eindeutig als Taxiphyllin identifizieren³.

Bemerkenswerte Konsequenzen ergeben sich für Sambunigrin. Sowohl DC als auch NMR³ sprechen dafür, dass es in *Sambucus nigra* L. entgegen einer kürzlich erfolgten Angabe⁴ doch optisch rein vorliegt und dass es sich bei dem als Begleitstoff nachgewiesenen Prunasin um ein durch Chromatographie an neutralem Al₂O₃ erzeugtes Aufarbeitungsartefakt handelt.

Der Nachweis für Mandelsäurenitrilglycoside hat gewisse Ähnlichkeit mit dem Hydroxamsäuretest¹¹ für Carbonsäurederivate. Um der enormen Alkaliempfindlichkeit der Nitrilglycoside und der Säureempfindlichkeit der Amidoxime Rechnung zu

tragen, verwendet man im vorliegenden Fall statt einer alkalischen jedoch eine schwach saure Hydroxylaminlösung und statt einer angesäuerten Eisen(III)chloridlösung eine solche ohne Säurezusatz. Es hat sich gezeigt, dass Carbonsäurederivate unter diesen speziellen Bedingungen im Gegensatz zu den Nitrilglycosiden nur mit schwacher Farbe erfasst werden.

Andere Übergangsmetallsalze als Eisen(III)chlorid, von denen verschiedene bekanntlich ebenfalls intensivfarbige Komplexe mit Amidoximen bilden^{12,13}, sind bisher nicht von uns verwendet worden.

Erwartungsgemäss werden auch andersartige cyanogene Glycoside wie z.B. Linamarin, Lotaustralin, Triglocholin und Gynocardin von Hydroxylamin/Eisen(III)chlorid mit bräunlicher Farbe erfasst, jedoch aus Gründen der geringeren Reaktivität mit erheblich verminderter Intensität.

LITERATUR

- 1 R. Eyjólfsson, in L. Zechmeister (Gründer), W. Herz, H. Grisebach und A. I. Scott (Herausgeber), *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe*, Band 28, Springer, Wien, New York, 1970, S. 74.
- 2 G. H. N. Towers, A. G. McInnes und A. C. Neish, *Tetrahedron*, 20 (1964) 71.
- 3 U. Schwarzmaier, *Chem. Ber.*, in Vorbereitung.
- 4 S. R. Jensen und B. J. Nielsen, *Acta Chem. Scand.*, 27 (1973) 2661.
- 5 A. Nahrstedt, *Phytochemistry*, 12 (1973) 2799.
- 6 H. Schiff, *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 32 (1899) 2699.
- 7 U. Schwarzmaier, *J. Chromatogr.*, im Druck.
- 8 C.-H. Mao und L. Anderson, *J. Org. Chem.*, 30 (1965) 603.
- 9 V. K. Kriable, *J. Amer. Chem. Soc.*, 34 (1912) 716.
- 10 U. Schwarzmaier, *Phytochemistry*, 11 (1972) 2758.
- 11 E. Stahl, *Dünnschichtchromatographie*, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2. Aufl., 1967, S. 834.
- 12 G. A. Pearce, Jr. und R. T. Pflaum, *J. Amer. Chem. Soc.*, 81 (1959) 6505.
- 13 J. Franc und K. Pospíšilová, *J. Chromatogr.*, 86 (1973) 159.