

ZUR CYANOGENESE VON *PRUNUS AVIUM**

A. NAHRSTEDT

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Freiburg, Freiburg, Germany

(Eingegangen 2. Mai 1972. Angenommen 8. Juni 1972)

Key Word Index—*Prunus avium*; Rosaceae; wild cherry; cyanogenesis; developmental stage.

Zusammenfassung—In allen oberirdischen Organen von *Prunus avium* wird enzymatisch abspaltbare Blausäure gefunden. Gaschromatographisch wird in den vegetativen Teilen (außer Zweigholz) D-Mandelsäurenitril- β -glucosid (Prunasin), in den generativen Teilen Prunasin und D-Mandelsäurenitril- β -gentiobiosid (Amygdalin) nachgewiesen. Die Blausäure- und Cyanglycosidegehalte werden in verschiedenen Entwicklungsstadien während der Vegetationsperiode 1969 quantitativ gemessen.

Abstract—Enzymatically labile cyanide is found in all aerial parts of *Prunus avium*. D-Mandelonitrile- β -glucoside (prunasin), identified by GLC occurs in the vegetative parts (except the wood of twigs). Prunasin and D-mandelonitrile- β -gentiobioside (amygdalin) are found in the generative parts. The concentration of cyanide and the cyanogenic glycosides during the vegetation-period 1969 have been measured at different stages of development.

EINLEITUNG

IN DER Familie der Rosaceae tritt das Merkmal der Cyanogenese in erster Linie in den Unterfamilien der Maloideae und Prunoideae auf.¹ Es wurden Amygdalin (D-Mandelsäurenitril- β -gentiobiosid) und Prunasin (D-Mandelsäurenitril- β -glucosid) nachgewiesen.

TABELLE 1. ÜBERSICHT ÜBER PFLANZENMATERIAL UND SAMMELDATUM

Datum	Blüten	Früchte	Frucht-fleisch	Samen	Stiele	Blätter	Zweigholz
5. 4.69	Bn 1	—	—	—	—	Br 1	H 1
10. 4.69	Bn 2	—	—	—	—	—	—
19. 4.69	Bn 3	—	—	—	St 3	Br 3	H 3
10. 5.69	—	Fr 4	—	—	St 4	Br 4	H 4
4. 6.69	—	Fr 5	—	—	St 5	Br 5	H 5
20. 6.69	—	—	Ff 6	Sa 6	St 6	Br 6	H 6
4. 7.69	—	—	Ff 7	Sa 7	St 7	Br 7	H 7
19. 7.69	—	—	Ff 8	Sa 8	St 8	Br 8	H 8
8. 8.69	—	—	—	—	—	Br 9	H 9
5. 9.69	—	—	—	—	—	Br 10	H 10
26. 9.69	—	—	—	—	—	Br 11	H 11
17.10.69	—	—	—	—	—	Br 12	H 12
11.11.69	—	—	—	—	—	—	H 13
8. 1.70	—	—	—	—	—	—	H 14
8. 3.70	—	—	—	—	—	—	H 15

Die entsprechenden Diastereoisomeren Neoamygdalin (L-Mandelsäurenitril- β -gentiobiosid) und Sambunigrin (L-Mandelsäurenitril- β -glucosid) wurden bisher innerhalb der Prunoideae nicht gefunden. Systematische Untersuchungen einzelner Organe wurden nur in wenigen

* Teil einer Dissertation der Albert-Ludwigs-Universität, Freiburg i. Br. 1971.

¹ R. HEGNAUER, *Pharm. Weekbl.* **94**, 248 (1959).

Fällen vorgenommen. Man fand, daß Amygdalin meist in den Samen vorkommt, Prunasin jedoch weitestgehend auf die vegetativen Teile der Pflanze beschränkt bleibt.^{1,2} *Prunus avium* L. enthält in den Samen Amygdalin.^{3,4} Untersuchungen an anderen Organen wie Blättern, Blattnospen und Rinde zeigten keine positiven Ergebnisse.³ Kürzlich wurde von uns in den Fruchtstielen der Kirsche Prunasin nachgewiesen.⁵

ERGEBNISSE

Blausäure

Im Anschluß an die Bearbeitung von Fruchtstielen⁵ untersuchten wir nunmehr Blütenknospen und Blüten, Früchte, Fruchtfleisch, Samen, Zweigholz, Blattnospen und Blätter von *P. avium* auf enzymatisch abspaltbare Blausäure. Als Untersuchungsmaterial dienten in der Vegetationsperiode 1969 turnusmäßig gesammelte Proben der einzelnen Organe (Tabelle 1). Die Aufarbeitung des Materials und die Isolierung der Blausäure wurden wie früher beschrieben vorgenommen.⁵ In sämtlichen Proben wurde mit Emulsin abspaltbare Blausäure jedoch in sehr unterschiedlicher Menge nachgewiesen. Der Gehalt war in den Samen am höchsten (68 µmol/g TS), gefolgt von Fruchtstielen (12,4),⁵ jungen Früchten (8,7), Blüten (8,5), Fruchtfleisch (2,0), Laubblättern (0,08) und Zweigholz (0,03) (Tabelle 2 und 3).

TABELLE 2. BLAUSÄUREGEHALTE UND CYANGLYCOSIDGEHALTE VON STIELEN,⁵
BLÜTEN UND FRÜCHTEN BZW. FRUCHTFLEISCH UND SAMEN (ABKÜRZUNGEN
WIE IN TABELLE 1)

Probe	Prunasin (µmol/g TS)	Amygdalin (µmol/g TS)	CN' (enzym) (µmol/g TS)
Bn 1	1,6	—	1,5
Bn 2	8,3	—	8,4
Bn 3	4,2	—	4,2
Fr 4	9,1	—	8,7
Fr 5	3,6	4,1	7,3
Ff 6	1,8	0,41	2,0
Ff 7	0,3	0,36	0,7
Ff 8	0,4	0,27	0,7
Sa 6	8,4	53,1	68,1
Sa 7	4,1	47,3	50,7
Sa 8	1,6	52,2	54,6
St 3	—	—	—
St 4	—	—	0,1
St 5	6,9	—	7,1
St 6	11,8	—	12,4
St 7	9,8	—	10,8
St 8	8,6	—	9,6

Cyanogene Glycoside

Zur Charakterisierung des cyanogenen Prinzips wurden größere Mengen (1 bis 100 g, je nach Cyanid-Gehalt) des Untersuchungsgutes nach Schema 1 aufgearbeitet. Das resultierende Eluat wurde gaschromatographisch an SE-30,⁵ OV-1 und OV-17 auf cyanogene Glycoside vom Benzaldehydcyanhydrin Typ untersucht. Die Trennphasen OV-1 und OV-17

² G. DILLEMANN, in *Handbuch der Pflanzenphysiologie* Bd. VIII, p. 1050 ff, Springer, Heidelberg (1958).

³ M. HADDERS und C. WEHMER, in *Handbuch der Pflanzenanalyse*, Bd. III, p. 2, Springer, Wien (1932).

⁴ H. A. HOPPE, *Drogenkunde*, 7. Aufl., p. 738, de Gruyter, Hamburg (1958).

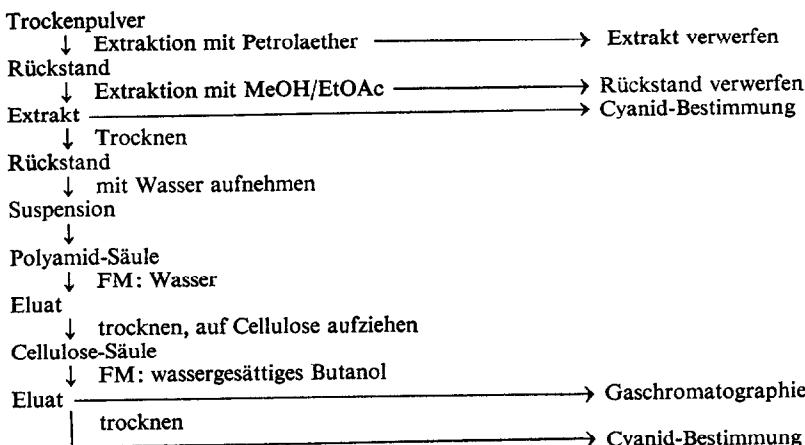
⁵ A. NAHRSTEDT, *Phytochem.* 9, 2085 (1970).

gestatteten eine Abgrenzung der Diastereomerenpaare der Glycoside.⁶ Die Gaschromatogramme wurden mit Triphenylbenzol (TPB) als innerem Standard⁷ quantitativ ausgewertet. Der Standardkorrekturfaktor gegen TPB betrug für Prunasin an SE-30 $1,211 \pm 7,2\%$ und an OV-1 $1,612 \pm 6,5\%$, für Amygdalin an SE-30 $1,409 \pm 6,2\%$ und an OV-1 $2,467 \pm 6,0\%$.

TABELLE 3. BLAUSÄUREGEHALTE VON BLÄTTERN UND ZWEIGHOLZ (ABKÜRZUNGEN WIE IN TABELLE 1)

Probe	CN' (enzym) ($\mu\text{mol/g TS}$)	Probe	CN' (enzym) ($\mu\text{mol/g TS}$)
Br 1	0,081	H 1	0,034
Br 3	0,038	H 3	0,032
Br 4	0,012	H 4	0,036
Br 5	0,027	H 5	0,036
Br 6	0,027	H 6	0,036
Br 7	0,025	H 7	0,034
Br 8	0,040	H 8	0,035
Br 9	0,046	H 9	0,029
Br 10	0,058	H 10	0,017
Br 11	0,073	H 11	0,031
Br 12	0,054	H 12	0,031
		H 13	0,033
		H 14	0,023
		H 15	0,036

Die quantitative Glycosidbestimmung wurde durch eine Cyanidbestimmung desselben Extraktes bestätigt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 4. Danach wurde in allen untersuchten Organen bis auf das Zweigholz Prunasin nachgewiesen. Im Samen und im Fruchtfleisch wurde zusätzlich Amygdalin gefunden.



SCHEMA 1. AUFARBEITUNG DES UNTERSUCHUNGSGUTES.

⁶ A. NAHRSTEDT, *J. Chromatogr.* **50**, 518 (1970).

⁷ A. E. PIERCE, H. N. GRAHAM, S. GLASSNER, H. MADLIN und J. G. GONZALES, *Analyt. Chem.* **41**, 298 (1969).

Prunasin in Blättern

Der Aufarbeitungsgang für Blattmaterial wurde wegen des hohen Überschusses an verunreinigenden Substanzen erweitert. Es wurden zu den in Schema 1 angegebenen Reinigungsschritten zusätzlich eine Perforation des wässrigen Eluates mit Aethylacetat nach der Polyamidsäule und eine Reinigung an einem schwach basischen Anionenaustauscher (Merck) vorgenommen. Modellversuche zeigten, daß die Basizität des Ionenaustauschers zur Isomerisierung der Blausäureglycoside Prunasin und Amygdalin nicht ausreichte.

TABELLE 4. ERGEBNISSE DER QUALITATIVEN UNTERSUCHUNGEN VERSCHIEDENER ORGANE VON *P. avium* NACH GASCHROMATOGRAPHISCHER (GC) UND ENZYMATISCHER (ENZYM) BESTIMMUNG

Organ	Probe	qual. GC	quant. GC = CN'	CN' (enzym)
Blüten Fruchtfleisch	Bn 3	Prunasin	15,8 mg	1,4 mg
	Ff 8	Prunasin Amygdalin	4,35 mg 1,46 mg	0,47 mg
Samen	Sa 6	Prunasin Amygdalin	1,2 mg 12,1 mg	0,82 mg
	St 6	Prunasin	31,3 mg	2,8 mg
Fruchtstiele Blätter	Br 11	Prunasin	12-15 μ g	1-1,3 μ g

Das Gaschromatogramm wies im Retentionsbereich von Prunasin zwischen einer Reihe unbekannter Signale eine schwache Schulter auf. Amygdalin konnte nach Addition von TMS-Amygdalin ausgeschlossen werden.

Ein Teil des Extraktes wurde praeparativ an OV-1 gaschromatographiert und der Erwartungsbereich von Prunasin aufgefangen. Das vom Kollektor erhaltene Eluat wurde analytisch an OV-1 und OV-17 isotherm bei 210° chromatographiert. Additionsanalysen zeigten, daß an beiden Trennphasen ein Signal Prunasin zuzuordnen war. Die halbquantitative Auswertung der Chromatogramme nach der Zumischmethode⁸ und eine enzymatische Mikroblausäurebestimmung eines aliquoten Teils des hydrolisierten Kollektorelates zeigten ausreichende Übereinstimmung (Tabelle 4).

Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß Prunasin in den Blättern von *P. avium* in sehr geringer Menge vorhanden ist. Im Zweigholz konnte mit dieser Methode bisher kein cyanogenes Glycosid nachgewiesen werden.

Quantitative Bestimmung der Glycoside

Bis auf Blätter und Zweigholz wurden in sämtlichen Proben Prunasin und Amygdalin quantitativ gaschromatographisch an SE-30 und OV-1 bestimmt. Der in Schema 1 angegebene Aufarbeitungsgang wurde dazu übernommen und standardisiert.⁵ Modellgemische mit Reinsubstanzen ergaben eine Wiederfindungsrate von 76,7% \pm 2 für Prunasin und 79,0% \pm 2,8 für Amygdalin. Daraus ergaben sich Korrekturfaktoren von 1,304 \pm 2,6% für Prunasin und 1,261 \pm 3,5% für Amygdalin. Unter Berücksichtigung der Standardkorrekturfaktoren gegen TPB ergibt sich ein Gesamtfehler der quantitativen Glycosidbestimmung von 9,5% (OV-1) und 9,7% (SE-30) für Amygdalin und 9,3% (OV-1) und 9,0% (SE-30) für Prunasin.

⁸ R. KAISER, *Chromatographie in der Gasphase*, Bd. IV, Bibliograph, Institut Mannheim (1965).

Testversuche mit Reinsubstanzen zeigten ebenfalls, daß bei Verwendung dieses Aufarbeitungsganges die Glycoside nicht abgebaut wurden, vor allem Amygdalin nicht zu Prunasin deglucosidiert wurde. Die Ergebnisse der Messungen sind in Tabelle 2 wiedergegeben.

DISKUSSION

Sämtliche untersuchten oberirdischen Teile von *P. avium* weisen einen Gehalt an Blausäure auf, der aus glycosidischer Bindung stammt. Alle Teile bis auf das Zweigholz enthalten als Cyanogene die Glycoside Prunasin und zum Teil gleichzeitig Amygdalin; weitere cyanogene Verbindungen können auf Grund der vergleichenden quantitativen Bestimmungen ausgeschlossen werden. Die vegetationsperiodisch bedingten Schwankungen im Cyanglycosidgehalt sind mit denen der Blausäure identisch (Tabelle 2).

Das Auftreten von Amygdalin ist auf die späten generativen Teile der Kirsche beschränkt. Hier findet offenbar eine Glucosidierung des Prunasin statt. Diese Beobachtung steht in Einklang mit der Biosynthese von Gentiobiosiden aus Glucosiden durch Umsetzung mit UDPG.⁹ Für die Glycosidierung des Benzaldehydcyanhydrin¹⁰ bis zum Gentiobiosid sind zwei Enzyme notwendig.¹¹ Die Aktivität einer Prunasin-Glucosyltransferase ist demnach eng verbunden mit dem Differenzierungsstand des Organismus. Ähnliche Verhältnisse scheinen auch bei einigen *Cotoneaster*-Arten vorzuliegen.¹²

Bemerkenswert ist der starke Anstieg der Prunasinkonzentration in Fruchtstielen zu der Zeit, in der die Frucht, speziell der Same, große Mengen an Amygdalin konzentriert. Es scheint wenig wahrscheinlich, daß in einem derart auf die Stoffleitung und Festigung spezialisierten Gewebe wie den Fruchtstielen eine nennenswerte de-novo-Synthese von Sekundärstoffen erfolgt. Dagegen wäre ein Glycosidtransport durch die Stiele denkbar. In diesem Zusammenhang ist der Nachweis von Prunasin in den Laubblättern von Bedeutung in Verbindung mit der Annahme älterer Autoren (zusammengefaßt bei²), daß eine Neusynthese von Blausäureglycosiden bevorzugt in chlorophyllhaltigen Teilen der Pflanze in Abhängigkeit von Licht und CO₂ stattfindet.

EXPERIMENTELLES

Die Sammlung des Untersuchungsmaterials, seine Aufbereitung, die Freisetzung und Messung der Blausäure wurde wie in⁵ beschrieben vorgenommen. Die Vorbereitung der aufgearbeiteten Extrakte zur Gaschromatographie sowie die gaschromatographischen Bedingungen zur qualitativen und quantitativen Messung wurden ebenfalls in⁵ und⁶ angegeben.

Präparative Gaschromatographie. Gerät: Varian Aerograph Modell 1520. Säule: OV-1, 6% auf Chromosorb AW-DMCS, 60–80 mesh, 6,4 mm × 2,70 m. Temperatur: 215–295°, 26 min lang 2°/min, dann 4°/min. Trägergas: He, 60 ml/min. Detektor: WLD, 310°, 190 mAmp. Injektor: 245°. Einspritzmenge: jeweils 100 µl.

Als Kollektor wurde ein U-förmiges Glasrohr benutzt, das wegen der schwierigen Kondensation der Substanzaerosole mit 50 mg Chromosorb, beschichtet mit 3% OV-1, gefüllt war. Das Röhrchen wurde mit seiner U-förmigen Ausbuchtung in ein Kältegemisch von –5° gehängt. Der Kollektor wurde 3 × abwechselnd eluiert mit einem Gemisch von 0,2 ml Tetrachlorkohlenstoff und 0,1 ml Hexamethyldisilazan einerseits und 0,2 ml Tetrachlorkohlenstoff und 0,1 ml Trimethylchlorsilan andererseits. Das Eluat wurde durch Überleiten von trockenem Stickstoff auf 0,1 ml eingeengt.

Hydrolyse der TMS-Derivate. Ein aliquoter Teil des erhaltenen Eluats wurde mit Stickstoff zur Trockne eingeengt, in 1 ml MeOH gelöst und mit 1 ml H₂O und 1 Tropfen HCOOH versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht geschüttelt, anschließend gefriergetrocknet und zur Mikroblausäurebestimmung verwendet.

⁹ T. YAMAHA und C. E. CARDINI, *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 133 (1960).

¹⁰ G. W. BUTLER und E. E. CONN, in *Perspectives of Phytochemistry* (edited by J. B. HARBORNE und T. SWAIN), p. 47 ff, Academic Press, London (1969).

¹¹ T. YAMAHA und C. E. CARDINI, *Arch. Biochem. Biophys.* **86**, 127 (1960).

¹² A. NAHRSTEDT, unveröffentlicht.

¹³ C. C. SWEENEY, R. BENTLEY, M. MAKITA und W. W. WELLS, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 2497 (1963).

Mikroblausäure-Bestimmung. Die Bestimmung wurde in einer Apparatur vorgenommen, die etwa nm den Faktor 5 kleiner gehalten war als die in¹⁴ beschriebene. Die Freisetzung der Blausäure erfolgte nach⁵ unter Zusatz von: 20 ml Citratpuffer pH 6,0, 50 mg Semicarbaziddihydrochlorid in H₂O, auf pH 6,0 eingestellt, 0,5 ml 0,1 M AeDTE-Lösung, 10 mg Emulsin (Fluka). Als Vorlage diente 1,0 ml NaOH in einem 2 ml Meßkölbchen. Der Stickstoffstrom aus der Apparatur wurde mittels einer Kapillare in das Meßkölbchen eingeleitet. Zur Messung der Blausäure wurde die Vorlage mit 1 Tropfen Methylrot-Lösung und bis zur sauren Reaktion mit ca. 0,1 ml einer 35%-igen HCl versetzt. Dann wurden im Abstand von 5 min hinzugefügt: 0,1 ml gesättigtes Bromwasser, 0,1 ml 5%-ige Ascorbinsäurelösung und auf 2,0 ml mit Pyridinreagens aufgefüllt.¹⁴ Der Ansatz wurde 15 min im Dunkeln stehen gelassen und gegen einen Reagenzienblindwert (vom U-Rohr an) bei 524 nm gemessen. Die Bestimmungsapparatur wurde mit einer Amygdalinlösung geeicht und der entsprechende CN'-Wert der Eichkurve entnommen.

¹⁴ E. KRÖLLER, *Z. Lebensmittelunters. Forschg.* **127**, 130 (1965).