

## CYANOGENESIS IN *COTONEASTER*-ARTEN

ADOLF NAHRSTEDT

Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Freiburg i. Brsg., Germany

(Eingegangen 3. Januar 1973. Angenommen 12. Februar 1973)

**Key Word Index**—*Cotoneaster praecox*; *C. bullata*; Rosaceae; cyanogenesis; mandelonitril- $\beta$ -D-glycosides; seasonal variation.

**Abstract**—The presence of the cyanogenic glycoside prunasin in leaves and fruits of *Cotoneaster* species was confirmed by GLC. In addition amygdalin was found in ripe fruits. The variation in prunasin and amygdalin was measured during development of the flowers and fruits of *C. praecox* and *C. bullata*. The importance of these findings for chemotaxonomy and physiology is discussed.

**Zusammenfassung**—Das Vorkommen des cyanogenen Glycosides Prunasin in Blättern und Früchten von *Cotoneaster* Arten wird gaschromatographisch bestätigt. Zusätzlich wird vor allem in reifen Früchten Amygdalin nachgewiesen. Das Auftreten von Prunasin und Amygdalin wird in den Blüten und Früchten zweier *Cotoneaster*-Arten während einer Reifungsperiode verfolgt. Die chemotaxonomische und physiologische Bedeutung der Befunde wird diskutiert.

### EINLEITUNG

Das Vorkommen cyanogener Verbindungen in *Cotoneaster*-Arten ist seit langem bekannt.<sup>1,2</sup> Erste systematische Untersuchungen wurden von Plouvier<sup>3</sup> vorgenommen. Er kam vor allem durch Bestimmung des sogenannten 'enzymolytischen Index'<sup>4</sup> zu dem Ergebnis, daß in vielen *Cotoneaster*-Arten Prunasin (D-Mandelonitril- $\beta$ -D-glucosid) als cyanogenes Prinzip in Blättern, Früchten und Zweigholz enthalten sei. Die Aussagekraft des 'enzymolytischen Index' ist jedoch bei Anwesenheit reduzierender Stoffe und vor allem bei Glycosidgemischen nicht zuverlässig.

Kürzlich gaben Weinges *et al.* für die Früchte von *Cotoneaster*-Arten Sambunigrin (L-Mandelonitril- $\beta$ -D-glucosid) an.<sup>5</sup> Die erwähnten physikalischen Konstanten der isolierten Substanz verglichen mit denen der Literatur<sup>6</sup> deuten jedoch eher auf Prunasin als auf Sambunigrin.

Um diese Frage auch im Interesse der Chemotaxonomie<sup>7</sup> zu klären, untersuchten wir gaschromatographisch eine Reihe von *Cotoneaster*-Früchten und -Blättern auf ihren Gehalt an Blausäureglycosiden der Benzaldehydcyanhydrinreihe.

<sup>1</sup> HADDERS, M. und WEHMER, C. (1932) in *Handbuch der Pflanzenanalyse*, Bd. III/2, Springer, Wien.

<sup>2</sup> HEGNAUER, R. (1959) *Pharm. Weekbl.* **94**, 248.

<sup>3</sup> PLOUVIER, V. (1941) Contribution à l'Etude biochimique des quelques Rosacées, Thesis Sci. Nat., Univ. Paris.

<sup>4</sup> ROSENTHALER, L. (1928) *Grundzüge der chemischen Pflanzenuntersuchung*, 3. Aufl., p. 23 ff, Springer, Berlin.

<sup>5</sup> WEINGES, K., BÄHR, W., THEOBALD, H., WIESENHÜTTER, A., WILD, R. und KLOSS, P. (1969) *Arzneimittelforsch.* **19**, 328.

<sup>6</sup> BEILSTEIN, S. (1938) *Handbuch der organischen Chemie*, 4. Aufl. Bd. 31, Springer, Berlin.

<sup>7</sup> HEGNAUER, R. (1971) *Pharm. Acta Helv.* **46**, 585.

## ERGEBNISSE

Als Untersuchungsmaterial dienten 1971 und 1972 im Botanischen Garten der Universität Freiburg gesammelte Frucht- und Blattproben. Sie wurden nach früher angegebenen;<sup>8</sup> Aufarbeitungs- und Extraktionsverfahren behandelt. In den anfallenden Extrakten wurden Blausäure quantitativ nach enzymatischer Hydrolyse mit Emulsin<sup>9</sup> und Benzaldehydcyanhydringlycoside gaschromatographisch qualitativ an OV-1 und OV-17,<sup>10</sup> quantitativ an OV-1<sup>9,10</sup> bestimmt. Wir untersuchten zunächst Proben von willkürlich Ende Juli und Anfang September 1971 gesammelten Blättern und Früchten.

TABELLE 1. CYANID- UND CYANGLYCOSID-WERTE VON BLÄTTERN VERSCHIEDENER *Cotoneaster*-ARTEN BEZOGEN AUF TROCKENSUBSTANZ

Arten und Zeitpunkte der Ernte	CN' (enzym) (ppm)	Prunasin (%)	CN' (aus GC) (ppm)	Arten und Zeitpunkte der Ernte	CN' (enzym) (ppm)	Prunasin (%)	CN' (aus GC) (ppm)
<i>C. hybrida</i> 26. Juli 1971	1082	1,307	1155	<i>C. praecox</i> 26. Juli 1971	3940	4,61	4080
<i>C. integerr.</i> 26. Juli 1971	3615	4,09	3620	<i>C. dammeri</i> 26. Juli 1971	2162	2,61	2310
<i>C. congesta</i> 26. Juli 1971	4610	4,95	4380	<i>C. dielsiana</i> 1. Sept. 1971	537	0,51	448

Sämtliche Proben waren mehr oder weniger cyanogen. Dabei differierte das Spektrum der Cyanid-Werte bei den Früchten (15–1700 ppm) um eine Zehnerpotenz mehr als bei den Blättern (500–4500 ppm). Die Blattwerte lagen dabei grundsätzlich um ein mehrfaches über denen der Früchte (Tabellen 1 und 2).

In den Blättern wurde gaschromatographisch eindeutig Prunasin nachgewiesen. Andere cyanogene Glycoside wurden einerseits durch qualitative Gaschromatographie und andererseits durch den Vergleich der enzymatisch gemessenen Cyanidwerte mit denen aus den Glycosid-Werten berechneten ausgeschlossen (Tabelle 1).

In fünf von sechs untersuchten Fruchtproben wurde Prunasin festgestellt. In drei Proben wurde neben Prunasin auch Amygdalin (D-Mandelonitril- $\beta$ -gentiobiosid) nachgewiesen, in einer Probe nur Amygdalin. Sambunigrin war in den Früchten keiner der untersuchten Arten feststellbar. Auch in den Früchten stimmen enzymatisch bestimmte Cyanid-Werte mit denen aus den Glycosiden errechneten ausreichend überein (Tabelle 2).

Das Vorkommen der beiden Glycoside Prunasin und Amygdalin nebeneinander in den Früchten von *Cotoneaster*-Arten zeigt Parallelen zu den kürzlich von uns untersuchten Früchten der Süßkirsche.<sup>9</sup> Es interessierte deshalb die Frage, zu welchem Zeitpunkt Amygdalin nachweisbar war und ob es irgendwann innerhalb einer Vegetationsperiode auch in solchen Früchten festgestellt werden konnte, in denen wir es zu dem willkürlich gewählten Sammeltermin nicht ermitteln konnten.

<sup>8</sup> NAHRSTEDT, A. (1972) *Phytochemistry* **11**, 3121.

<sup>9</sup> NAHRSTEDT, A. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2085.

<sup>10</sup> NAHRSTEDT, A. (1970) *J. Chromatogr.* **50**, 518.

TABELLE 2. CYANID- UND CYANGLYCOSID-WERTE VON FRÜCHTEN VERSCHIEDENER *Cotoneaster*-ARTEN BEZOGEN AUF TROCKENSUBSTANZ

Arten und Zeitpunkte der Ernte	CN' (enzym) (ppm)	Prunasin (%)	Amygdalin (%)	CN' (aus GC) (ppm)
<i>C. hybrida</i> 24. Juli 1971	185	0,194	—	171
<i>C. intergerr.</i> 24. Juli 1971	15	0,012	0,006	13,8
<i>C. congesta</i> 24. Juli 1971	1350	1,65	Spuren	1460
<i>C. praecox</i> 24. Juli 1971	1772	2,1	—	1860
<i>C. bullata</i> 1. September 1971	18	—	0,036	21
<i>C. dielsiana</i> 1. September 1971	15,3	0,0026	0,029	18,8

Wir wählten für unsere Untersuchungen die im Juli nicht Amygdalin-haltigen Früchte von *C. praecox* und die im September ausschließlich Amygdalin enthaltenden Früchte von *C. bullata* aus. Tabelle 3 gibt die aus fünf Sammelterminen (eine Blütenprobe, vier Fruchtproben) ermittelten Veränderungen im Gehalt der Blausäureglycoside wieder. Amygdalin wird in den Früchten von *C. praecox* zwar in sehr geringer Konzentration, jedoch eindeutig ab August nachgewiesen. Der Prunasingehalt von *C. praecox* fällt dagegen kontinuierlich von Mai bis Oktober ab. In den Früchten von *C. bullata* tritt Prunasin zunächst nur in geringer Menge auf und verschwindet ab September. Dafür liegt ab August eine beträchtliche Menge Cyanglycosid als Amygdalin vor, das bis Oktober ebenfalls stetig abnimmt. Die zur Kontrolle ermittelten Cyanid-Werte decken sich bei beiden Arten mit denen aus den Glycosid-Werten errechneten (Tabelle 3).

TABELLE 3. CYANID- UND CYANGLYCOSID-WERTE DER FRÜCHTE VON *C. praecox* UND *C. bullata* ZU VERSCHIEDENEN STADIEN DER VEGETATIONSPERIODE 1972

$\mu\text{mol/g TS}$	24. Mai (Blüten)	29. Juni	8. August	6. September	16. Oktober
<i>C. praecox</i> CN'	131	80,3	54,6	41,9	38,7
Prunasin	127	87,8	48,5	39,7	36,6
Amygdalin	—	—	1,3	0,5	1,0
<i>C. bullata</i> CN'	0,08	0,5	2,4	1,1	0,85
Prunasin	Spuren	0,4	0,1	Spuren	—
Amygdalin	—	—	2,3	1,0	0,83

## DISKUSSION

Die Ergebnisse der Untersuchungen bestätigen die früheren Befunde von Plouvier,<sup>3</sup> daß es sich bei dem cyanogenen Prinzip der Blätter und Früchte von *Cotoneaster*-Arten um das D-Isomere Prunasin handelt. Gleichzeitig wird zusätzlich erstmals Amygdalin in den

Früchten von *Cotoneaster*-Arten nachgewiesen. Beide Glycoside enthalten D-Mandelsäurenitril als Aglycon. Im Gegensatz zu einigen Angaben in der Literatur<sup>1,5</sup> scheint L-Mandelsäurenitril als Aglycon cyanogener Glycoside in Rosaceen, zumindest der Prunoideae, nicht vorzukommen.<sup>2,7</sup> Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen dies ein weiteres Mal.

Trotz erheblicher quantitativer Unterschiede besitzen etliche der untersuchten *Cotoneaster*-Arten die biochemische Potenz zur Synthese des Diglucosides Amygdalin. Dabei verhalten sich die beiden näher untersuchten Arten *C. bullata* und *C. praecox* prinzipiell gleich. Während die grünen Früchte beider Arten nur Prunasin enthalten, beginnen sie während der Reifungsperiode mit zunehmender Rotfärbung des Fruchtfleisches mit der Synthese von Amygdalin. Dabei besteht große Ähnlichkeit zwischen der Süßkirsche<sup>9</sup> und *C. bullata* in der vegetationsperiodischen Abhängigkeit der Änderung der Glycosidgehalte. Auch hier nimmt der Prunasingehalt zugunsten von Amygdalin ab. Eine Glucosidierung des Prunasin zum Amygdalin, wie wir sie bei *Prunus avium* vermuten,<sup>9</sup> scheint auch hier nicht ausgeschlossen. In den Früchten von *Vicia angustifolia* konnten wir inzwischen gaschromatographisch Prunasin in geringer Menge nachweisen, dessen Vorkommen dort ebenfalls als Zwischenstufe bei der Biosynthese von Vicianin (D-Mandelonitril- $\beta$ -D-glucosyl- $\beta$ -D-arabinosid) erklärt werden kann.<sup>11</sup>

In *C. bullata* wird schliesslich alles Prunasin zu Amygdalin glucosidiert, während in *C. praecox* nur ein sehr geringer Teil umgesetzt wird. Eine Erklärung dieser unterschiedlichen Regulation einer eventuellen Prunasin- $\beta$ -glucosyl-Transferase ist vorläufig nicht möglich.

Wie in vielen anderen Rosaceen<sup>2,7,9,12</sup> kommt auch in *Cotoneaster*-Arten Amygdalin ausschließlich in den generativen Teilen vor, während Prunasin sowohl in den generativen als auch den vegetativen Teilen nachgewiesen wird. Möglicherweise beruht das Phänomen dieser scharfen Trennung der Lokalisation zweier sehr ähnlicher Glycoside in der unterschiedlichen Befähigung zur Translokation der Glycoside, wobei das Amygdalin mit seiner längeren Zuckerkette das immobile Molekül darstellt.

#### EXPERIMENTELLES

Die verschiedenen Proben stammen aus dem Botanischen Garten der Universität Freiburg. Sie wurden sofort nach der Ernte in flüssigem Stickstoff eingefroren und pulverisiert, gefriergetrocknet und bei  $-25^{\circ}$  gelagert.

Die Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials und die gaschromatographischen Messungen erfolgten wie in<sup>8,9</sup> und<sup>10</sup> angegeben.

Die Freisetzung der Blausäure erfolgte im wesentlichen wie in<sup>10</sup> beschrieben. Es wurde jedoch ein Enzympräparat der Firma Schuchardt, München, benutzt, bei dem die Hydrolysedauer auf 12 hr und die Hydrolysetemperatur auf  $55-60^{\circ}$  erhöht werden mußte (ähnlich hohe Temperaturen geben auch Hannsen und Sturm<sup>13</sup> für Emulsinpräparate an).

*Anerkennung*—Herrn B. Jakob danke ich für geschickte Hilfe bei der Durchführung der Messungen.

<sup>11</sup> NAHRSTEDT, A. Unveröffentlichte Ergebnisse.

<sup>12</sup> ROBINSON, M. E. (1930) *Biolog. Rev.* **5**, 126.

<sup>13</sup> HANNSEN, E. und STURM, W. (1967) *Z. Lebensmittelunters. Forschg.* **134**, 69.