

ZUR CYANOGENESE IN *PRUNUS AVIUM*

A. NAHRSTEDT

Pharmakognostisches Institut der Universität Freiburg i. Brsg., Deutschland

(Received 14 January 1970)

Abstract—D-Mandelonitril- β -glucoside (prunasin) is found in the stems of the fruits of *Prunus avium*, increasing in amount with ripening to 0.35%. It was identified by thin layer, paper and gas-liquid chromatography. Its quantitative determination by gas-liquid chromatography is described.

Zusammenfassung—D-Mandelsäurenitril- β -Glucosid (Prunasin) wird in den Fruchtsielen von *Prunus avium* L. gefunden. Der Gehalt steigt während der Wachstumsperiode bis etwa 0,35% an. Prunasin wird dünn-schicht-, papier- und gaschromatographisch identifiziert. Eine gaschromatographische quantitative Bestimmungsmethode des Glycosides wird angegeben.

EINLEITUNG

ZAHLEICHE Species in der Familie der Rosaceae synthetisieren cyanogene Glycoside.¹ Bisher wurden drei Glycoside nachgewiesen: D-Mandelsäurenitril- β -gentiobiosid (Amygdalin), D-Mandelsäurenitril- β -glucosid (Prunasin) und ein Gemisch aus Prunasin und L-Mandelsäurenitril- β -glucosid (Prulaurasin).^{2,3} Letzteres muß jedoch als Isolierungsartefact angesehen werden.⁴ L-Mandelsäurenitril- β -glucosid (Sambunigrin) wurde u.a. aus *Sambucus nigra* L., einer Caprifoliaceae, erhalten.²

Die Unterfamilie der Prunoideae stellt eine besonders große Anzahl Vertreter mit derartigen Glycosiden. Diese wurden bei ihnen in fast allen Organen nachgewiesen. Am häufigsten und in großer Menge wurden sie zunächst aus den Samen isoliert; weiterhin aus Blättern, Zweigen, Rinden und Blüten. Das cyanogene Prinzip der Samen ist vielfach Amygdalin, in den übrigen Teilen der Pflanze wurde zumeist Prunasin nachgewiesen.²

In der Süßkirsche, *Prunus avium* L., wurde so in den Samen nur Amygdalin gefunden.^{2,3,5} Über das Vorkommen weiterer Glycoside außerhalb des Samens, in Blüten und Früchten, liegen in der Literatur keine sicheren Angaben vor.²

ERGEBNISSE

Im Verlauf der Untersuchungen von Organen der Süßkirsche auf cyanogene Glycoside fanden wir nach enzymatischer Hydrolyse mit Emulsin unerwartet hohe Gehalte an Blausäure in den Fruchtsielen. Untersucht wurde der Methanol-Aethylacetat-Extrakt der

¹ R. HEGNAUER, *Pharm. Ztr. Halle* **99**, 322 (1960).

² *Handbuch der Pflanzenanalyse*, III/2, p. 1058 ff., Springer-Verlag, Berlin (1932).

³ W. KARRER, *Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe*, p. 947 ff., Birkhäuser Verlag, Basel-Stuttgart (1958).

⁴ V. PLOUVIER, *C.R. Acad. Sci., Paris* **200**, 1985 (1935).

⁵ G. HEGI, *Illustrierte Flora von Mitteleuropa*, IV/2, p. 1084, Lehmanns-Verlag, München (1906).

mit Petroläther vorextrahierten, gefriergetrockneten Stiele. In dem mit Wasser aufgenommenen Extrakt wurde nach Hydrolyse mit Emulsin die Blausäure nach Aldridge⁶ modifiziert nach Kröller⁷ bestimmt. In den Stielen der Blüten wurde keine, nach Befruchtung der Blüten wenig Blausäure gemessen gefolgt von einem steilen Anstieg bis etwa 0,03% zur Zeit der Fruchtreife. Anschließend fiel der Gehalt bis auf 0,025% bei Stielen der überreifen Früchte ab (Tabelle 1).

TABELLE 1. BLAUSÄURE- UND PRUNASINGEHALTE VERSCHIEDENER VEGETATIONSSTADIEN DER FRUCHTSTIELE NACH ENZYMATISCHER (ENZYM) UND GASCHROMATOGRAPHISCHER (GC) BESTIMMUNG

Probe vom:	CN' (enzym) (ppm)	Prunasin (gc) (ppm)	CN' daraus errechn (ppm)
19.4.69	0	—	—
10.5.69	3	—	—
4.6.69	189	2034	180
20.6.69	323	3470	307
4.7.69	281	2880	255
18.7.69	251	2540	225

Ohne Zusatz von Emulsin zum Extrakt wurde keine Blausäure im Destillat nachgewiesen. Das freigesetzte CN' kann demnach nur aus glycosidischer Bindung stammen.

Zur Charakterisierung des cyanogenen Prinzips der Fruchstiele arbeiteten wir 50 g Trockensubstanz nach Schema 1 auf. Im Eluat wurde dünnschicht- und papierchromatographisch im Vergleich mit Amygdalin und daraus nach Fischer⁸ hergestelltem Prunasin R_f -Wert-Gleichheit mit Prunasin nachgewiesen. Zur Detektion verwendeten wir die empfindliche und äußerst spezifische Methode nach Bennet und Tapper⁹ in Modifikation.

Ein Teil des Eluates wurde nach Silylierung^{10,11} gaschromatographisch untersucht. An SE 30 ergaben Vergleiche mit Reinsubstanzen und Additionsanalyse Prunasin (Abb. 1 und 2). Aus Prunasin durch Behandeln mit 0,005 N Ammoniak hergestelltes Prulaurasin¹² wurde an ECNSS-M in die diastereomeren D- und L-Formen getrennt. Im Stielextrakt wurde an dieser Trennphase ebenfalls D-Mandelsäurenitril- β -glucosid (Prunasin) nachgewiesen (Abb. 3).

Zur Prüfung der Frage, ob alles enzymatisch bestimmte Cyanid aus Prunasin stammt, wurde eine quantitative gaschromatographische Bestimmungsmethode der Glycoside an SE 30 ausgearbeitet. Die Abtrennung störender Pigmente wurde mit einer Polyamid-trockensäule, die Abtrennung der meisten Zucker mit einer Cellulose-Trockensäule erreicht. Der Aufbereitungsgang entspricht im Prinzip dem Schema 1.

Nach weitgehender Standardisierung der veränderlichen Parameter (Extraktionszeit, Sorbentien, Eluatmengen) wurde mit Reinsubstanzen der Verlust an Glycosiden bestimmt. Prunasin wurde zu $76,7 \pm 2\%$ wiedergefunden. Als innerer Standard diente Triphenylbenzol (TPB).¹³ Der Standardkorrekturfaktor Prunasin/TPB wurde zu $1,211 \pm 0,087$ ermittelt.

⁶ W. N. ALDRIDGE, *Analyst* **69**, 262 (1944).

⁷ E. KRÖLLER, *Z. Lebensm. Untersuch.-Forsch.* **127**, 130 (1965).

⁸ E. FISCHER, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **28**, 1508 (1895).

⁹ W. D. BENNETT und B. A. TAPPER, *J. Chromatog.* **34**, 428 (1968).

¹⁰ C. C. SWEETLEY, R. BENTLEY, M. MAKITA und W. W. WELLS, *3. Am. Chem. Soc.* **85**, 2497 (1963).

¹¹ T. FURUYA, *J. Chromatog.* **18**, 152 (1965).

¹² BEILSTEIN, *Beilstein's Handbuch der organischen Chemie*, 4. Aufl. Bd. 31, Springer Ver. Berlin (1938).

¹³ A. R. PIERCE, H. N. GRAHAM, S. GLASSNER, H. MADLIN und J. G. GONZALEZ, *Analyt. Chem.* **41**, 298 (1969).

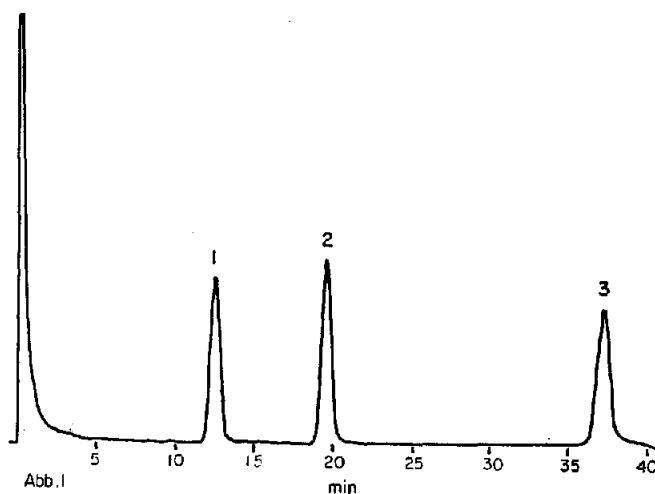


ABB. 1. GASCHROMATOGRAMM DER REINSUBSTANZEN AN SE 30. 1: PRUNASIN, 2: TRIPHENYLBENZOL, 3: AMYGDALIN.

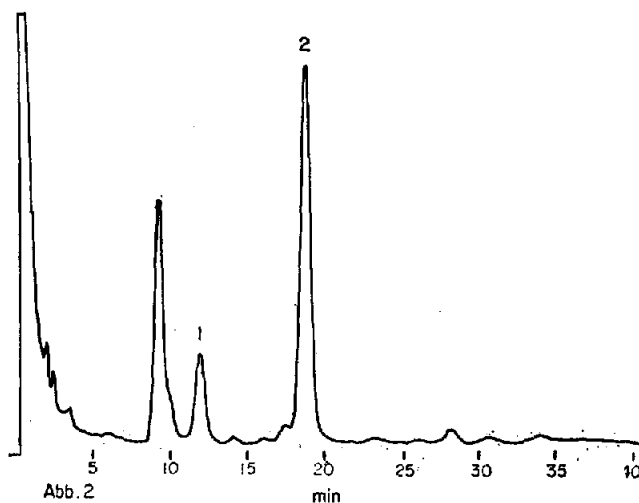


ABB. 2. GASCHROMATOGRAMM EINES STIELEXTRAKTES AN SE 30. 1: PRUNASIN, 2: TRIPHENYLBENZOL.

Die gute Übereinstimmung zwischen der enzymatischen Blausäure- und der gaschromatographischen Glycosid-Bestimmung zeigt Tabelle 1.

P. avium enthält neben dem bereits bekannten Amygdalin im Samen als zweites Glycosid in den Fruchtsielen Prunasin. Ähnliche Ergebnisse wurden bei *P. laurocerasus* erhalten, wo im Samen Amygdalin, in den Blättern Prunasin nachgewiesen wurde.¹⁴ Verschieden glycosidierte Aglyca können auch in demselben Organ vorkommen, wie in jüngster Zeit bei *Thalictrum aquilegifolium* gefunden wurde.¹⁵

¹⁴ P. SEIFERT, Blausäure-Verbindungen in PAECH-TRACEY: *Moderne Methoden der Pflanzenanalyse IV*, p. 676 Springer Verlag, Berlin (1955).

¹⁵ D. SHARPLES und I. R. STOKER, *Phytochem.* 8, 597 (1969).

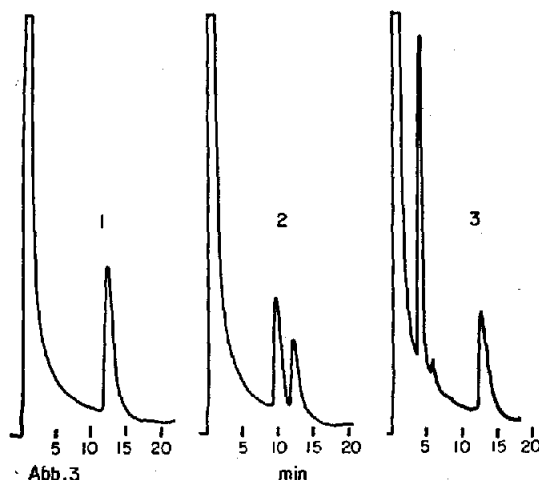


Abb. 3. GASCHROMATOGRAMM DER DIASTEREOMEREN GLUCOSIDE UND EINES STIELEXTRAKTES AN ECNSS-M. 1: PRUNASIN, 2: PRULAURASIN, 3: STIELEXTRAKT.

Trockensubstanz

Extraktion mit Petroläther

Extraktion mit Meth./Äthylacetat (Azeotrop)



Einengen, mit Wasser aufnehmen

↓
Polyamidsäule, trocken
FM: Wasser

Eluat einengen, auf Cellulose aufziehen

↓
Cellulosesäule, trocken
FM: wasserges. Butanol

Eluat einengen, mit Methanol aufnehmen

SCHEMA 1. AUFARBEITUNGSGANG DER STIELE.

Das Vorkommen zweier verschiedener Blausäureglycoside in eng zusammenliegenden Organen wie bei *P. avium* aufgezeigt bietet experimentelle Ansätze zur Klärung der Frage des Glycosid-Transportes und der Glycosidierung der Aglyca.

EXPERIMENTELLER TEIL

Material

Fruchstiele werden vom Baum in flüssigem Stickstoff gesammelt, in flüssigem Stickstoff zermahlen und gefriergetrocknet. Das Untersuchungsgut wird bei -25° gelagert.

Bestimmung der Bläusäure

0,3 g Trockensubstanz werden 3 hr mit Petroläther am Soxhlet vorextrahiert. Nach Entfernung des Petroläthers wird 3 × 3 hr mit dem Azeotrop aus Methanol und EtOAc¹⁶ extrahiert. 1/5 Der vereinigten Extrakte wird zur Bläusäurebestimmung eingesetzt. Die Bestimmung wird in der von Kröller⁷ vorgeschlagenen Apparatur vorgenommen.

Nach Einengen am Vakuumrotationsverdampfer wird mit Wasser aufgenommen und nacheinander hinzugefügt: 50 ml Citratpuffer pH 6, 500 mg Semicarbaziddihydrochlorid mit NaOH auf pH 6 eingestellt, 1 ml 0,1 M AcDTE-Lösung, 40 mg Emulsin (Fluka).

Sofort nach Emulsinzugabe wird die Apparatur verschlossen, Stickstoff durchgeleitet und 4 hr bei ca. 40° unter Umrühren hydrolysiert. In der Vorlage befinden sich 10 ml 0,5 N NaOH.

Anschließend wird der Ansatz 1 hr lang zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen werden nochmals 20 mg Emulsin hinzugefügt und die Hydrolyse wie oben wiederholt. In der Vorlage wird die Bläusäure nach Kröller⁷ bestimmt.

Papier- und Dünnschichtchromatographie

DC: Sorbens: Cellulose, luftgetrocknet, oder Fertigplatten (Merck). Fließmittel: wassergesättigtes Butanol, Kammersättigung; Laufstrecke 15 cm; R_f -Werte: Prunasin: 0,7; Amygdalin: 0,3.

PC: Papier Schleicher und Schüll Nr. 2043 b. Fließmittel: Butanol-Pyridin-Wasser (6:4:3); Laufstrecke 12 cm; R_f -Werte: Prunasin: 0,75; Amygdalin: 0,55.

Detektion. Die trockene Platte oder das Papier werden mit einer Mischung aus gleichen Teilen 0,1 M *p*-Nitrobenzaldehyd- und 0,1 M Dinitrobenzol-Lösung in Methylcellosolve besprüht. Nach dem Trocknen wird mit einer 0,1 %igen Lösung von β -Glucosidase (Serva) in Phosphatpuffer (pH 7,9) nachgesprüht. Die Platte oder das Papier werden sofort mit einer Polyäthylenfolie, Schaumstoff und einer Abdeckplatte zu einem Sandwich verschlossen. Die Hydrolysezeit beträgt 30 min. Nach dem Öffnen wird mit einer 2 %igen Lösung von NaOH in Wasser-Aceton (1:2) besprüht. Die Platte oder das Papier werden kurze Zeit im Trockenschrank bei ca. 80° belassen. Cyanogene Glycoside erscheinen als violett-blaue Flecken. Erfassungsgrenze ca. 5–10 μ g.

Gaschromatographische Bestimmung der Glycoside

4/5 des Extraktes zur Bläusäurebestimmung werden zur Trockne eingengt, mit 2 ml Wasser aufgenommen und über 3,0 g Polyamid (Woelm) trocken eingefüllt chromatographiert. Mobile Phase: Wasser. 12 ml Eluat werden aufgefangen, zur Trockne eingengt, mit etwas Methanol aufgenommen und auf 0,5 g Cellulose aufgezogen. Die Cellulose wird auf den Kopf einer Cellulose-Trockensäule gegeben (4,5 g Cellulose 24 hr mit Methanol am Soxhlet extrahiert, im Trockenschrank bei 120° getrocknet). Mobile Phase: Wasserges. Butanol. 12 ml Eluat werden aufgefangen, am Rotationsverdampfer zur Trockne eingengt, mit 5 ml Wasser aufgenommen und gefriergetrocknet.

Zum trockenen Ansatz wird 1 mg TPB als innerer Standard zugesetzt, in wasserfreiem Pyridin gelöst und mit 0,2 ml Hexamethyldisilazan und 0,1 ml Trimethylchlorsilan versetzt. Es wird 1 min gut geschüttelt und 1–2 hr stehen gelassen. 2–4 μ l werden zur GC eingesetzt.

GC-Bedingungen:

Gerät:	Varian Aerograph Modell 1200	
Säule:	Stahl, 1,50 m × 1/8 in. 3 % SE 30 auf Varaport 100–120 mesh	Kupfer, 1,80 × 1/8 in. 3 % ECNSS-M auf Gaschrom Q 100–120 mesh
Temperatur:	190–270°, 2°/min	155°
Detektor:	FID, 300°	FID, 310°
Injektor:	270°	240°
Trärgas:	Stickstoff 25 ml/min	Stickstoff 20 ml/min

Die quantitative Auswertung der Peaks erfolgt gegen TPB planimetrisch.

¹⁶ *Handbook of Chemistry and Physics*, 48. Edit. The Chemical Rubber Co., Cleveland, Ohio (1967–1968).