

Ein neues cyanogenes Glykosid aus der Rosacee *Sorbaria arborea*

A New Cyanogenic Glycoside from *Sorbaria arborea* (Rosaceae)

Adolf Nahrstedt

Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität Freiburg im Breisgau

(Z. Naturforsch. 31 c, 397–400 [1976]; eingegangen am 2. April 1976)

Cyanogenic Glycoside, Rosaceae-Spiraeoidea, *Sorbaria arborea*, 2- β -D-Glucopyranosyloxy-4-p-hydroxybenzoyloxy-3-methylenbutyronitrile, Cardiospermin-p-hydroxybenzoate

A new cyanogenic glycoside was isolated from *Sorbaria arborea* L. (Rosaceae) and identified as 2- β -D-glucopyranosyloxy-4-p-hydroxybenzoyloxy-3-methylenbutyronitrile (cardiospermin-p-hydroxybenzoate) mainly by 1 H-NMR-spectroscopy. The new glycoside is atypical for this family known for its mandelonitrileglycosides.

Innerhalb der artenreichen Familie der Rosaceae tritt das Merkmal der Cyanogenese häufig und in allen Unterfamilien auf¹. Als cyanogene Verbindungen wurden immer wieder die Benzaldehydcyanhydringlykoside Prunasin und Amygdalin gefunden^{1, 3}, wobei Prunasin in den generativen und vegetativen Teilen, Amygdalin dagegen nur in den generativen Teilen (Frucht) vorkommt^{1–3}. Prunasin und besonders Amygdalin werden deshalb als typische Cyanglykoside der Rosaceen betrachtet. Innerhalb der Unterfamilie der Spiraeoideae dagegen, die ebenfalls cyanogene Arten enthält^{4–8}, konnte Benzaldehyd als Abbauprodukt der Benzaldehydcyanhydringlykoside nicht nachgewiesen werden⁸. Es wurde deshalb vermutet, daß hier andere cyanogene Verbindungen als Prunasin oder Amygdalin vorliegen^{1, 8}. Die Klärung der Struktur dieser Cyanogene, zunächst aus *Sorbaria arborea* L., ist das Ziel der vorliegenden Arbeit.

Material und Methoden

Untersuchungsmaterial: Die im September 1975 gesammelten entstielten Fiederblätter wurden sofort unter flüssigem Stickstoff eingefroren, pulverisiert, gefriergetrocknet und bei –20 °C gelagert.

Isolierung: 40 g Trockenpulver wurden 3 h mit Petroläther extrahiert und die Petrolätherphase verworfen. Anschließend wurde 12 h mit Äthylacetat extrahiert, der Extrakt (Gehalt an enzymatisch abspaltbarer HCN ca. 0,1% entspr. 1,5% Glucosid) zur Trockne eingeengt und in 100 ml Wasser suspendiert, zentrifugiert und der Überstand über eine mit 90 g Polyamid trocken eingefüllte Säule gegeben. Es

Sonderdruckanforderungen an Dr. Adolf Nahrstedt, Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität, Schänzlestr. 9/11, D-7800 Freiburg.

wurde zunächst mit 200 ml Wasser, anschließend mit 250 ml Methanol/Wasser 1:1 eluiert. Diese Fraktion wurde getrocknet, aus Methanol auf wenig Kieselgel (Merck) aufgezogen und an 350 g Kieselgel (Merck) mit Äthylacetat-Wasser-Essigsäure 98:1:0,5 chromatographiert. Die dc durch Fluoreszenzlösung bei 254 nm ermittelten positiven Fraktionen (ml 1300–4200) wurden erneut getrocknet, aus Methanol auf wenig Kieselgel aufgezogen und noch einmal an 150 g Kieselgel (Merck) mit Äthylacetat-Methanol-Essigsäure 99:1:0,1 chromatographiert. Die positiven Fraktionen wurden getrocknet (ml 900–2100), in wenig Wasser aufgenommen, über wenig Aktivkohle klar filtriert und das wäßrige Filtrat lyophilisiert. Ausbeute 410 mg, ca. 1% bezogen auf das Trockenpulver.

Hydrolysen: sauer: 2 mg Glykosid werden in 1 ml 1 N HCl 1 h bei 100 °C hydrolysiert. Der Ansatz wird lyophilisiert und in 1 ml Methanol aufgenommen.

Enzymatisch: 2 mg Glykosid werden 10 min, 30 min, 1 h oder 12 h bei pH 6 (Citratpuffer) oder in reinem Wasser mit 0,1 mg β -Glucosidase (Serva 22830) hydrolysiert. Der Ansatz wird lyophilisiert und in 1 ml Methanol aufgenommen.

Sauer katalysierte Umesterung: 10 mg Glykosid werden 3 h in 4 ml 0,03 N schwefelsaurem Methanol am Rückfluß gekocht. Der Ansatz wird direkt zur dc verwendet. Für die GC wird 1 ml getrocknet und mit Trisil (Serva) silyliert.

Derivatisierungen: Die Herstellung der TMS-Äther für die GC erfolgte nach²⁰, für die NMR-Spektroskopie nach¹¹. Für das Peracetat wurden 50 mg Glykosid in 1 ml Pyridin und 1 ml Acetanhydrid gelöst, 24 h belassen, am Hochvakuum getrocknet und mehrmals aus Methanol umkristallisiert: Schmelzpunkt (korrig.) 137–138 °C.

UV-Spektren: Glykosid in Methanol: λ_{max} : 257 nm, $\epsilon = 17500$; + Natriummethylat: λ_{max} : 298 nm,



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

$\varepsilon = 21500$; Peracetat in Methanol: λ_{max} : 235 nm,
 $\varepsilon = 22000$.

IR-Spektrum: KBr-Preßling. 3300 – 3500 (s), 2900 (m), 1690 (s), 1600 (s), 1510 (m), 1440 (s), 1360 (s), 1270 (s), 1160 (s), 1000 – 1100 (s), 900 (w), 850 (m), 770 (m), 700 (w) cm⁻¹.

60 MHz-NMR-Spektren: (TMS als innerer Standard, δ -Skala).

- a. **Glykosid in Aceton-d₆:** 3 – 3,8 ppm (Multipletts, 10H, Glucose); 4,65 ppm (Duplett, 1H, anomeres Glucoseproton, $J = 7$ Hz, β -konf.); 4,9 ppm (Singulett, 2H, –CH₂O – CO –); 5,65 ppm (Singulett, 2H, geminale Äthylenprotonen); 5,55 ppm (Singulett, 1H, Cyanhydrinproton); 6,85 ppm (Duplett, 2H, m-H am Aromaten, $J = 9$ Hz); 7,9 ppm (Duplett, 2H, o-H am Aromaten, $J = 9$ Hz).
- b. **TMS-Glykosid in CCl₄:** 3,2 – 3,85 ppm (Multipletts, 6H, Glucose); 4,58 ppm (Duplett, 1H, anomeres Glucoseproton, $J = 7$ Hz, β -konf.); 4,92 ppm (breites Singulett, 2H, –CH₂O – CO –); 5,37 ppm (Singulett, 1H, Cyanhydrinproton); 5,67 und 5,85 ppm (je ein breites Singulett, je 1H, geminale Äthylenprotonen); 6,88 ppm (Duplett, 2H, arom. H in m-Position, $J = 9$ Hz); 8,02 ppm (Duplett, 2H, arom. H in o-Position, $J = 9$ Hz).
- c. **Peracetat in CDCl₃:** 2,0 ppm (scharfes Multiplett, 12H, Glucoseacetyl); 2,35 ppm (Singulett, 3H phenolisches Acetyl); 4,2 ppm (Multiplett, 2H); 4,9 – 5,4 ppm (Multipletts, 7H; 5,65 ppm (breites Singulett, 1H); 5,75 ppm (breites Singulett, 1H); 7,25 ppm (Dublett, 2H); 8,15 ppm (Duplett, 2H).

Elementaranalyse:

Gef.: C	54,08	H	5,39	N	2,90,
Ber.: C	54,68	H	5,35	N	3,54.

Molekulargewichtsbestimmung: Dampfdruckosmometer (Perkin-Elmer 115), in Methanol; gef.: 397, theor.: 395,4.

Spezifische Drehung: Perkin-Elmer 141 Polarmeter, $[\alpha]_D^{20} = -39,33$, Lösungsmittel: Wasser, $c = 2,612$.

DC-Systeme:

- a. DC-Alufolie-Merck, Äthylacetat-Methanol-Wasser-Essigsäure, 80:8:2:1 (Sorbaria-CN-Glykosid, p-OH-Benzoesäure).
- b. DC-Alufolie-Merck, Benzol-Äthylacetat-Aceton-Essigsäure, 70:20:5:0,5 (cyanogenes Aglykon, p-OH-Benzoesäure, p-OH-Benzoesäureester).
- c. DC-Alufolie-Merck, Äthylacetat-Methanol-Wasser-Essigsäure, 80:10:2:0,1 (Cardiospermin, p-OH-Benzoesäure).

d. Glucose nach Wiehle u. Horak²⁴.

Dektion: UV₂₅₄, Feigl-Anger-Test¹³, Anisaldehyd-Schwefelsäure.

GC-Analysen: Glucose nach Reduktion zum entsprechenden Hexit und Peracytylierung nach Björndahl et al.²². Sorbaria-CN-Glykosid als TMS-Äther²⁰ an OV-17, 3% auf Chromosorb AW-DMCS 80 – 100 mesh, 1,80 m × 2 mm i.D., Glas, 250 – 260 °C, 1 °C/min; Trägergas N₂, 25 ml/min; $t_R = 24$ min. Cardiospermin nach Hübel u. Nahrstedt¹⁵ an OV-1 und OV-225.

Quantitative Bestimmungen:

- a. Glucose: 0,6 mg Sorbaria-CN-Glykosid werden in 2,5 ml Methanol-Schwefelsäure 20-prozentig 1:1 am Rückfluß 3 h gekocht, auf 5 ml aufgefüllt und Glucose nach der Anthron-Methode (z. B. 23) photometrisch gegen eine Eichkurve bestimmt.
- b. Blausäure: 0,5 mg Glykosid werden in 0,3 ml Wasser und 3 Tropfen Citratpuffer pH 6 gelöst und unter Zugabe von 3 × 0,5 mg β -Glucosidase (Serva 22830) in Abständen von 90 min bei 42 °C hydrolysiert. HCN wird in einer Vorlage von 1 N NaOH aufgefangen und nach Nahrstedt² photometrisch bestimmt.

Ergebnisse

Das Untersuchungsmaterial stammt aus dem Botanischen Garten der Universität Freiburg. Die im September gesammelten entstielten Fiederblätter enthielten in Übereinstimmung mit Plouvier⁸ ca. 0,1% enzymatisch abspaltbare Blausäure in der Trockensubstanz. Gc-Untersuchung der methanolischen Extrakte nach Nahrstedt^{9, 10} ergaben, daß von Phenylalanin ableitbare aromatische Cyanglykoside wie Prunasin, Sambunigrin, Amygdalin, Holocalin und Zierin nicht nachweisbar sind. Das Sorbaria-CN-Glykosid ist mit Äthylacetat quantitativ extrahierbar, wird an Polyamid aus wäßriger Lösung adsorbiert und ist von Polyamid mit Wasser-Methanol 1:1 quantitativ eluierbar. Diese Eigenschaften wurden zur Vorräumigung des Äthylacetat-Extraktes genutzt; eine folgende zweimalige Chromatographie an Kieselgel ergab nach Lyophilisation schließlich ein weißes, nicht hygroskopisches Pulver, das dc und gc einheitlich und ohne nachweisbare Verunreinigungen vorliegt.

Das UV-Spektrum des Glykosides in Methanol zeigt ein scharfes Maximum bei 257 nm ($\varepsilon = 17500$); auf Zusatz von Natriummethylat erfolgt eine bathochrome Verschiebung um 42 nm nach 298 nm ($\varepsilon = 21500$), die bei Ansäuerung reversibel ist (Hinweis auf ein freies phenolisches Hydroxyl¹¹). Metallionen

als Komplexbildner zeigen keinen Effekt auf die Lage des Maximums. Im IR-Spektrum fehlt eine Nitrilbande im Bereich von 2200 bis 2250 cm⁻¹ (Hinweis aus ein α,β -gesättigtes, oxygeniertes Nitril¹²) ; eine starke, breite Absorptionsbande bei 1690 cm⁻¹ deutet auf eine Estergruppierung, scharfe Banden bei 700, 770 und 850 cm⁻¹ auf einen Aromaten. Das Molekulargewicht wurde osmometrisch zu 397, durch Felddesorptions-MS zu 395 ($M + H = 396$) bestimmt; die darauf bezogene Elementaranalyse ergibt eine Bruttoformel von C₁₈H₂₁O₉N. Die spezifische optische Drehung des Glykosides in Wasser liegt bei -39,3°.

Hydrolyse in HCl liefert als faßbare Produkte Glucose (dc, gc), Blausäure (Feigl-Anger-Test¹³) und p-Hydroxybenzoësäure (dc, gc, UV). Auch β -Glucosidase (Serva, reinst) ergibt dieselben Abbauprodukte; der Glucosylrest sollte danach unsubstituiert sein. Die enzymatische Hydrolyse liefert bei kurzer Hydrolysezeit (10 bis 60 min) als Zwischenprodukte ein cyanogenes Aglykon (Hinweis auf eine Cyanhydrinstruktur) und einen noch unbekannten, nicht beständigen p-Hydroxybenzoësäureester (dc). Vollständige saure und enzymatische Hydrolyse ergeben HCN und Glucose im molaren Verhältnis von 1:1.

Die Zahl der freien Hydroxylgruppen wird bestätigt durch das ¹H-NMR-Spektrum des peracetylierten Glucosides. Danach liegen insgesamt fünf acetylable Hydroxylgruppen vor, vier davon am Zucker (schmales Multiplett bei $\delta = 2,0$ ppm, 12 Protonen), eine am Aromaten (Singulett bei $\delta = 2,35$ ppm, 3 Protonen). Die Integration dieser Signale belegt zudem, daß auch Glucose und der Aromat im molaren Verhältnis von 1:1 im Molekül vorliegen.

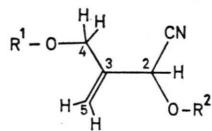
Die bisherigen Befunde weisen auf ein Cyanoglucosid, dessen Aglykon mit p-Hydroxybenzoësäure verestert ist. Der nach Abzug des p-Hydroxybenzoyl- (C₇H₅O₂) und des Glucosylrestes (C₆H₁₁O₅) von der Bruttoformel verbleibende Teil des unsubstituierten Aglykon ergibt C₄H₅O₂CN.

Das ¹H-NMR-Spektrum des trimethylsilylierten Glucosides zeigt bei 3,2 – 3,7 ppm (δ -Skala, TMS als innerer Standard) ein vier Protonen entsprechendes Multiplett der C₂ – C₅-Protonen der Glucose. Bei 3,85 ppm treten beide C₆-Protonen der Glucose als Duplett in Resonanz, bei 4,58 ppm das Duplett des anomeren Glucoseprotons, dessen Kopplungskonstante von 7 Hz β -Konfiguration der glykosidischen Bindung belegt. Je zwei Multipletts bei 8,02 und 6,88 ppm (jeweils 2 Protonen) resultieren aus dem AA'BB'-System des p-substituierten Aromaten.

Der Rest des Spektrums zeigt auffallende Ähnlichkeit mit denjenigen des u. a. in Sapindaceen vorkommenden Fettsäurediesters (**2**)^{16, 18} sowie des Monoglucosides (**1**)^{14, 16} des 2,4-Dihydroxy-3-methylenbutyronitrils und belegt damit in Verbindung mit den Daten des IR-Spektrums, der enzymatischen und sauren Hydrolyse sowie des Molekulargewichtes und der Bruttoformel Struktur **3** für das Cyanglucosid aus *Sorbaria arborea* (Tab. I). Ein breites Singulett bei 4,92 ppm (2 Protonen) weist auf eine veresterte primäre allylische Alkoholgruppe. Bei 5,37 ppm (1 Proton) erscheint das Singulett des Methinprotons der Cyanhydringruppe in guter Übereinstimmung mit Cardiospermin (5,51 ppm), Acacipetalin (5,29 ppm) und den (R)-konfigurierten Benzaldehydcyanhydringlykosiden Amygdalin (5,46 ppm), Lucumin (5,44 ppm), Prunasin (5,43 ppm), Holocalin (5,37 ppm) und Taxiphyllin (5,36 ppm)¹⁶. Zwei breite Singulets bei 5,67 und 5,85 ppm (je-

Tab. I. Chemische Verschiebung (δ -Skala) in ppm der Protonen des Grundkörpers von **1** (nach¹⁶) und **2** (nach¹⁸) im Vergleich zum *Sorbaria*-CN-Glucosid (**1** und **3** als TMS-Äther in CCl₄, **2** in CDCl₃).

	R ¹	R ²	H ₂	2 × H ₄	2 × H ₅
1 Cardiospermin ^{14, 16}	H	Glucosyl-	5,51	4,13	5,11
2 Cyanolipid Typ I ¹⁸	C ₁₆ –C ₂₀ Acyl	C ₁₆ –C ₂₀ Acyl	5,94	4,63	5,50
3 <i>Sorbaria</i> -CN-glucosid	p-Hydroxy- benzoyl	Glucosyl	5,37	4,92	5,67
					5,85



weils 1 Proton) repräsentieren die geminalen Protonen einer disubstituierten Äthylengruppierung. Beide Protonen erscheinen im Vergleich zum Cyanolipid Typ I (Tab. I) bei tieferem Feld, offensichtlich auf Grund eines Anisotropieeffektes des in der Nähe stehenden Aromaten. Im Spektrum des underivatisierten Glucosides in Aceton-d₆ fallen diese beiden Signale bei 5,65 ppm in eines zusammen.

Diskussion

3 ist der p-Hydroxybenzoësäureester des kürzlich in den Sapindaceen *Cardiospermum hirsutum*¹⁴ und *Heterodendron oleaeifolium*¹⁵ gefundenen Cardiospermins. Sauer katalysierte Umesterung in Methanol von **3** liefert neben weiteren Abbauprodukten erwartungsgemäß p-Hydroxybenzoësäuremethylester und ein cyanogenes Glykosid, welches dc und gc an zwei Trennphasen mit Cardiospermin aus¹⁵ identisch ist. Für das chirale Zentrum im Aglykon von Cardiospermin wird auf Grund der Lage des anomeren Glucoseprotons im ¹H-NMR im Vergleich zu den (R)-konfigurierten Linamarin und Lotaustralin ebenfalls (R)-Konfiguration angenommen¹⁶. Dementsprechend besitzt vermutlich auch **3** (R)-Konfiguration am C₂; diese Frage ist jedoch erst dann abschließend zu klären, wenn das entsprechende (S)-konfigurierte Epimere zugänglich ist.

3 weicht als Ester vom üblichen Bauprinzip cyanogener Glykoside ab. Zwar sind einige Cyanglykoside

mit acylierbarer Hydroxylgruppe bekannt (Gynocardin, Barterin, Dhurin, Taxiphyllin, Holocalin, Zierin (z. B.¹⁶)), entsprechende Ester wurden jedoch nicht gefunden. Beim einzigen bislang bekannten Cyanglykosid-Ester, dem Triglochininmonomethyl-ester¹⁹, stellt das Cyanglykosid selbst die Säurekomponente.

3 unterscheidet sich wesentlich vom biogenetisch von Phenylalanin abgeleiteten Cyanglykosid-Typus der Rosaceen. Derartige Nitrile wurden bisher als Glucoside in den Sapindaceen¹⁶ und Mimosaceen¹⁷, als Lipide in Sapindaceen¹⁶ und Boraginaceen¹⁸ nachgewiesen. Für ihre Biogenese wird Leucin als Vorstufe angenommen und ist in je einem Fall für Glykoside und Lipide experimentell belegt¹⁷. Weitere Untersuchungen sollen klären, wieweit **3** bei den Spiriaeoidae und bei Triben der Rosoideae⁸, deren Cyanogenese ebenfalls unbekannt blieb, verbreitet ist, und damit einen Beitrag zur Lösung taxonomischer Probleme bei den Rosaceen leistet.

Herrn Dr. H. Fritz (Ciba-Geigy, Basel) danke ich herzlich für das Felddesorptions-Massenspektrum des Glucosides, Herrn O. Windisch, Freiburg, für Elementaranalysen, Frau G. Siudzinsky für technische Assistenz, dem Pharmazeutischen Institut der Universität Freiburg für die Erlaubnis zur Nutzung eines Varian-T-60-NMR- und eines Perkin-Elmer-141-Polarimeters. Herrn Prof. Dr. H. Rimpfeller bin ich für kritische Diskussionen dankbar.

- ¹ R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen Bd. 6, p. 87 ff., Birkhäuser Verlag, Basel 1973.
- ² A. Nahrstedt, Phytochemistry 11, 3121 [1972].
- ³ H. Hadders u. C. Wehmer, Handbuch der Pflanzenanalyse Bd. III/2, Verlag Julius Springer, Wien 1932.
- ⁴ L. Rosenthaler, Pharm. Acta Helv. 1, 167 [1926].
- ⁵ W. Wicke, Ann. Chem. Pharm. 79, 79 [1851]; Ann. Chem. Pharm. 81, 241 [1852]; Ann. Chem. Pharm. 83, 175 [1852].
- ⁶ L. Guignard, Bull. Sci. Pharmacol. 13, 525 [1906].
- ⁷ M. Greshoff, Kew Bull. 397 [1909].
- ⁸ V. Plouvier, C. R. H. 227, 1260 [1948].
- ⁹ A. Nahrstedt, Planta med. 24, 83 [1973].
- ¹⁰ A. Nahrstedt, Phytochemistry 12, 2799 [1973].
- ¹¹ T. J. Mabry, K. R. Markham, and M. B. Thomas, The Systematic Identification of Flavonoids, Springer, New York 1969.
- ¹² L. J. Bellamy, Ultrarot-Spektrum und chemische Konstitution, Dr. Dietrich Steinkopf, Darmstadt 1966.
- ¹³ B. Tantisewie, H. W. L. Ruijgrok u. R. Hegnauer, Pharm. Weekblad 104, 1341 [1969].
- ¹⁴ D. S. Seigler, C. Eggerding u. C. Butterfield, Phytochemistry 13, 2330 [1974].
- ¹⁵ W. Hübel u. A. Nahrstedt, Phytochemistry 14, 2723 [1975].
- ¹⁶ D. S. Seigler, Phytochemistry 14, 9 [1975].
- ¹⁷ D. S. Seigler, Phytochemistry 14, 993 [1975].
- ¹⁸ D. S. Seigler, K. L. Mikolajczak, C. R. Smith u. I. A. Wolff, Chem. Phys. Lipids 4, 147 [1970].
- ¹⁹ D. Sharples, M. S. Spring u. J. R. Stoker, Phytochemistry 11, 3069 [1972].
- ²⁰ C. C. Sweeley, R. Bentley, M. Makita u. W. W. Wells, J. Amer. Chem. Soc. 85, 2497 [1963].
- ²¹ D. H. Williams u. I. Fleming, Spektroskopische Methoden in der Organischen Chemie, p. 124, Thieme-Verlag, Stuttgart 1971.
- ²² H. Björndahl, C. D. Hellerquist, B. Lindberg u. S. Svensson, Angew. Chemie 82, 643 [1970].
- ²³ L. Acker, Handbuch der Lebensmittelchemie Bd. II/2, p. 338, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1967.
- ²⁴ H. Wiehle u. E. Horak, J. Chromatogr. 47, 527 [1972].