

## UBER DIE QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON STERINDERIVATEN IN PFLANZEN UND DIE INTRAZELLULARE VERTEILUNG DER STERINGLYCOSIDE IN BLÄTTERN

W.EICHENBERGER und E.C.GROB

*Institut für organische Chemie der Universität Bern, Schweiz\**

Received 6 October 1970

The contents of sterol derivatives (sterols + esters, glycosides and acylated glycosides) have been determined using thin layer chromatography in leaves and bulky organs from carrots (*Daucus carota* L.), potato (*Solanum tuberosum* L.), onion (*Allium cepa* L.), two varieties of radish (*Raphanus sativus* L.), and *Gentiana purpurea* L. plants. Ether-soluble lipids of leaves contain 2.8–5.2%, those of storage tissue 3.1–8.9% sterol derivatives. The fractionation of lettuce (*Lactuca sativa* L., Burpee's Ruby Red) leaf homogenates indicates sterol glycosides to be accumulated in a microsomal fraction.

### 1. Einleitung

Sterine werden in Pflanzen in 4 verschiedenen Formen gefunden, nämlich als freie Alkohole, Ester, Glycoside und Acyl-Glycoside [1–3]. Die allgemeine Verbreitung der Sterinderivate [4] und die Mengen, in denen sie vorkommen (in Apfelschalen bis zu 29% des Gesamtlipids [5]) legen den Gedanken an eine bestimmte Funktion dieser Verbindungen in der Pflanze nahe. So kommen vor allem die Steringlycoside (SG) und Acyl-Steringlycoside (Acyl-SG), welche in vielen Eigenschaften den typischen Membranlipiden sehr ähnlich sind, als Bestandteile zellulärer Membranen infrage. Aus diesem Grunde haben wir begonnen, Vorkommen, Biosynthese und intrazelluläre Verteilung dieser Verbindungen zu studieren [3, 6–9]. Quantitative Untersuchungen über die Glycoside und Acyl-Glycoside wurden nur an Kartoffeln [1, 10, 11], Äpfeln [5], einem Farn [12] und Lattich- und Spinatblättern [8] durchgeführt, während direkte Vergleiche von Blättern und nichtassimilierenden Organen derselben Pflanze nicht unternommen worden sind. Wir haben eine Methode entwickelt, mit der es nach dünnschichtchromatographischer Trennung der Lipide möglich ist, die verschiedenen Bindungsformen von

Sterinen auf photometrischem Weg gesondert zu bestimmen. Dieses Verfahren wurde dazu verwendet, den Steringehalt in Blättern und Speicherorganen von 6 verschiedenen Pflanzen zu bestimmen und ausserdem Angaben über die intrazelluläre Verteilung der Steringlycoside im Blattgewebe zu gewinnen.

### 2. Material und Methoden

Blätter und Speicherorgane frisch geernteter Pflanzen von Zwiebel (*Allium cepa* L.), Karotte (*Daucus carota* L.), Bierrettich (*Raphanus sativus* L. ssp. niger (Mill.) D.C.var. albus D.C.), Radieschen (*Raphanus sativus* L.ssp.radicula (Pers.) D.C.var.rotundus D.C.), Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) und Purpur-Enzian (*Gentiana purpurea* L.) wurden gefriergetrocknet und extrahiert, das ätherlösliche Lipid (E-Lipid) eingewogen und in Benzol aufgenommen [13]. Zur chromatographischen Trennung wurden auf einer Platte von 20 × 20 cm (Kieselgel G, Schichtdicke 0,3 mm) zwei Probefahnen von je 6 cm Breite mit einer genau bekannten Menge E-Lipid (je 5–10 mg) belegt. Ungefähr ein Drittel dieser Menge wurde zwischen die beiden Probefahnen auf eine Referenzbahn von 2 cm Breite aufgetragen. Nach Entwicklung in einem Gemisch von Chloroform–Methanol (6:1, v/v) wurde unter Ab-

\* CH-3012 Bern, Schweiz, Länggassstrasse 7.

decken der beiden Probefahnen mit Alufolie und Glas die Referenzbahn mit Perchlorsäure (25%) besprüht und während einigen Minuten unter einer IR-Lampe erwärmt. Sterinderivate ergaben dabei rötliche ( $\Delta^5$ -Sterine) oder bräunliche ( $\Delta^7$ -Sterine) Flecken. Die  $R_f$ -Werte betrugen für Steringlycoside 0,43, für Acyl-Steringlycoside 0,68 und für freie Sterine 0,83. Sterinester, die unter diesen Bedingungen praktisch an der Front laufen, wurden mit den freien Sterinen zusammengefasst. Die Zonen in den Probefahnen wurden auf entsprechender Höhe mit einer Rasierklinge ausgeschabt. Zur Bestimmung von SG und Acyl-SG wurde das ausgeschabte Kieselgel nach einem leicht modifizierten Verfahren von Heinz [14] in einem Zentrifugenglas mit 5 ml Anthronreagens versetzt, während 15 min auf genau  $90^\circ$  erwärmt und nach Abkühlen und Abzentrifugieren des Kieselgels auf einem Beckman DK-2A Spektrophotometer bei 625 nm photometriert. Entsprechende Eichwerte wurden mit SG und Acyl-SG erhalten, die säulenchromatographisch aus Lattichblättern isoliert worden waren [6]. Nach den Eichkurven, die in fig. 1 dargestellt sind, entspricht eine Extinktion von 0.1 bei 625 nm einer Menge von 42  $\mu\text{g}$  SG oder 75  $\mu\text{g}$  Acyl-SG. Der Vergleich der Eichkurven von Präparaten aus Spinat ( $\Delta^7$ -Sterine [4, 6]) und Lattich ( $\Delta^5$ -Sterine [4]) zeigt, dass die spezifischen Extinktionen der Glycoside vom darin enthaltenen Sterintyp nicht beeinflusst werden. Die Zonen mit den freien Sterinen und Sterinestern wurden vereinigt und auf einer Glasfilternutsche G4 dreimal mit Aceton

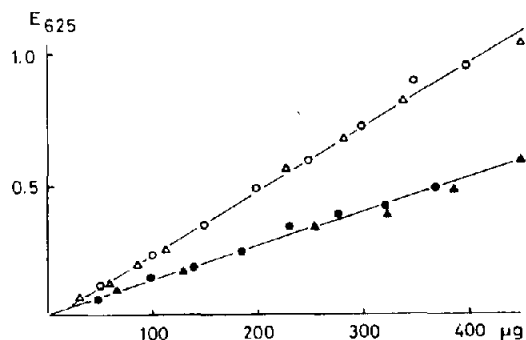


Fig. 1. Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von Steringlycosiden (○—○ Lattich, △—△ Spinat) und Acyl-Steringlycosiden. (●—● Lattich, ▲—▲ Spinat) mit der Anthron-Methode.

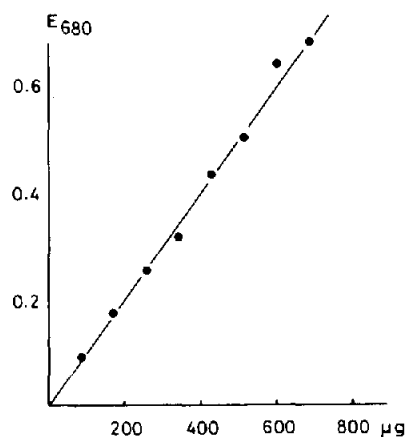


Fig. 2. Eichkurve zur quantitativen Bestimmung von freien Sterinen nach dünnstichtchromatographischer Trennung.

eluiert und der Rückstand des Eluats mit 0,5 ml einer Mischung von KOH (fest)–Wasser–Methanol (1:1:10) während 30 min bei  $50^\circ$  hydrolysiert. Nach Zufügen von 1 ml Wasser wurden die Sterinalkohole durch dreimaliges Ausschütteln mit Petroläther zurückgewonnen und in der oben beschriebenen Weise auf einer DC-Platte auf 6 cm breiten Bahnen rechromatographiert (Chloroform–Äthanol abs., 100:2). Der

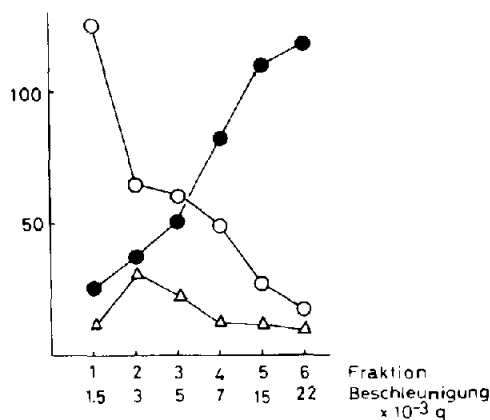


Fig. 3. Verteilung von Chlorophyll (○—○, in  $\mu\text{g}$  pro 100 mg Protein-N), Cytochromoxidase (△—△, in  $\mu\text{Mol}$  Cytochrom *c* oxidiert pro 10 mg Protein-N und Minute) und Steringlycosiden (●—●, in  $\mu\text{g}$  pro mg Protein-N) in verschiedenen durch Differential-zentrifugation gewonnenen Partikelfractionen aus Lattichblättern.

auf die Referenzbahn aufgetragenen Probe wurde ausserdem noch etwas  $\beta$ -Sitosterin (Fluka) beige-mischt. Die Sterinzonen wurden ausgeschabt, viermal mit Aceton eluiert und der Rückstand des Eluats nach einem leicht modifizierten Verfahren von Wall und Kelley [15] der Reiche nach mit 1 ml Eisessig, 2 ml Acetanhydrid (destilliert) und 0.1 ml konz. Schwefel-säure p.a. versetzt und auf einem thermostatisierten Wasserbad während 30 min auf genau 24° gehalten. Die Extinktionen wurden am Maximum bei 680 nm gemessen. Da alle für unsere Versuche verwendeten Pflanzen als Hauptkomponenten Sterine vom  $\Delta^5$ -Typ enthalten [4, 6], wurden für die Eichkurven aus Lat-tichblättern isolierte [6] Sterine verwendet, die eben-falls zu diesem Typus gehören (fig. 2). Nach diesen entspricht eine Extinktion von 0.1 einer Menge von 100  $\mu$ g Sterin.

Zur Fraktionierung von Zellpartikeln aus Lattich-blättern wurden 400 g frische Blätter von Lattich (*Lactuca sativa* L., Burpee's Ruby Red) auf einer Walzenmühle (Greve und Behrens, Hamburg) mit 0,37 M Saccharose-Lösung zermahlen und anschliessend durch ein grobporiges Faltenfilter filtriert. Das Filtrat wurde während je 15 min bei 1500, 3000, 5000, 7000, 15,000 und 20,000 g zentrifugiert (Arbeitstemperatur 0–4°). In den Sedimenten und im Ueberstand der letzten Zentrifugation wurden Chlorophyll [16], Cy-tochromoxidase [17] (mit Cytochrom *c* aus Pferde-herz (Fluka) als Substrat) und Protein-N [18] be-stimmt. Die Bestimmung der Steringlycoside erfolgte nach obiger Methode.

Tabelle 1  
Prozentualer Anteil der Sterinderivate im ätherlöslichen Lipid (E-Lipid) verschiedener Pflanzen und Organe.

	Sterinderivate in % des E-Lipids				Total
	E-Lipid in % des T'gewichts	Freie + veresterte Sterine	Steringlycoside (SG)	Acyl-Sterin- glycoside (Acyl-SG)	
<i>Radieschen</i>					
Blätter	7,3	2,6	0,7	0,3	3,6
Rübe	2,0	6,1	1,1	1,7	8,9
<i>Kartoffel</i>					
Blätter	12,3*	0,8	0,8	1,2	2,8
Knolle	1,0*	0,6	1,0	3,6	5,2
<i>Bierrettich</i>					
Blätter	5,9	2,2	0,8*	0,5	3,5
Rübe	2,1	5,8	0,8	0,8	7,4
<i>Zwiebel</i>					
Blätter	5,8	2,7*	1,7	0,8	5,2
Zwiebel	0,7	4,5	1,5	1,5	7,5
<i>Karotte</i>					
Blätter	5,1	3,7	0,8	0,9	5,4
Rübe	2,0	4,3	0,8	3,6	8,7
<i>Purpur-Enzian</i>					
Blätter	9,1*	2,6*	0,8*	0,6*	4,0*
Wurzel	2,1*	1,8*	0,8*	0,5*	3,1*

Mittelwerte aus 4 oder mehr Bestimmungen.

\* Mittelwerte aus zwei Bestimmungen.

### 3. Resultate und Diskussion

Wie aus der Tabelle hervorgeht, enthält das E-Lipid der 6 untersuchten Pflanzen 2,8–8,9% Sterinderivate. Das Verhältnis von freien + veresterten Sterinen, Glycosiden und Acyl-Glycosiden ist sehr unterschiedlich. Auf die Glycoside und Acyl-Glycoside entfallen Anteile von 22 bis 88% der Sterinverbindungen oder 1,0 bis 4,6% des E-Lipids. Andere Autoren fanden zum Teil noch höhere Werte [5, 10, 11]. Lipide aus nicht-assimilierenden Organen enthalten 3,1–8,9% Sterinderivate, die Blätter der gleichen Pflanzen hingegen nur 2,8–5,2%. Dieser geringe Gehalt in Blättern könnte durch die in diesen reichlich vorhandenen Chloroplastenlipide bedingt sein, deren Steringehalt bekanntlich gering ist [6, 8]. Da die Plastiden somit nur einen kleinen Teil der in der Zelle vorhandenen Sterinverbindungen enthalten können, muss die Hauptmenge in anderen Zellpartikeln lokalisiert sein. Deshalb haben wir ein Homogenat aus Lattichblättern durch Differentialzentrifugation in verschiedene Partikelfractionen zerlegt und in diesen SG quantitativ bestimmt. Als Marker für Chloroplasten diente Chlorophyll, für Mitochondrien die Cytochromoxidase. Alle gemessenen Werte wurden auf Protein-N bezogen. Wie Fig. 3 zeigt, sind Chloroplasten in Fraktion 1 und Mitochondrien in Fraktion 2 angereichert. Die Steringlycoside sind dagegen in kleineren Partikeln (Fraktionen 4–6) konzentriert, welche nach ihren Sedimentationseigenschaften den Mikrobodies oder Mikrosomen zuzurechnen sind. Aus der Tatsache, dass im Ueberstand der 20,000 g Zentrifugation nur Spuren von SG nachzuweisen sind, schliessen wir, dass diese Verbindungen ausschliesslich an Organellen gebunden sind. Aehnliche Ergebnisse wurden für die Verteilung der Steroidsapogenine in *Dioscorea tokoro* [19] und der Sterine und Sterinester in Maispflanzen [20] erhalten. Ob allerdings die Sterinderivate nur auf bestimmte Organellen beschränkt sind, lässt sich erst nach einer exakteren Fraktionierung der Zellpartikel entscheiden.

### Danksagung

Frl. Simone Reber danken wir für die Durchführung analytischen Arbeiten. Diese Arbeit wurde mit Unterstützung des Schweiz. Nationalfonds durchgeführt.

### Literatur

- [1] M.Lepage, J. Lipid Res. 5 (1964) 587.
- [2] T.Kiribuchi, T.Mizunaga und S.Funahashi, Agr. Biol. Chem. 30 (1966) 770.
- [3] W.Eichenberger und E.C.Grob, Chimia 22 (1968) 46.
- [4] A.Heusner, in: Handbuch der Pflanzenphysiologie, Bd. 10, ed. W.Ruhland (Springer, Berlin, 1958) p. 132.
- [5] T.Galliard, Phytochemistry 7 (1968) 1915.
- [6] W.Eichenberger und W.Menke, Z. Naturforsch. 21b (1966) 859.
- [7] W.Eichenberger und D.W.Newman, Biochem. Biophys. Res. Commun. 32 (1968) 366.
- [8] W.Eichenberger und E.C.Grob, in: Progr. in Photosynthetic Research, Vol. 1, ed. H.Metzner (Tübingen, 1969) p. 338.
- [9] W.Eichenberger und E.C.Grob, Chimia 23 (1969) 368.
- [10] M.Lepage, Lipids 3 (1968) 477.
- [11] T.Galliard, Phytochemistry 7 (1968) 1907.
- [12] A.Radunz, Z. Physiol. Chem. 349 (1968) 303.
- [13] E.C.Grob und W.Eichenberger, FEBS Letters 5 (1969) 335.
- [14] F.Heinz, Biochim. Biophys. Acta 144 (1968) 333.
- [15] M.E.Wall, und E.G.Kelley, Ind. Eng. Chem. Anal. Ed. 19 (1947) 677.
- [16] J.Bruinsma, Biochim. Biophys. Acta 52 (1961) 576.
- [17] G.H.Hoogbeem und W.C.Schneider, J. Biol. Chem. 194 (1952) 513.
- [18] W.W.Umbreit, R.H.Burris und J.F.Stauffer, Manometric Techniques (Burgess, Minneapolis, 1957).
- [19] A.Akahori, F.Yasuda, K.Kagawa, M.Ando und M.Togami, Phytochemistry 9 (1970) 1921.
- [20] R.J.Kemp und E.I.Mercer, Biochem. J. 110 (1968) 119.