

Über den Abbau des Sinapins während der frühen Ontogenese der Keimlinge von *Sinapis alba* L.

Degradation of Sinapine during the Early Development of *Sinapis alba* L.

Martin Bopp und Werner Lüdicke

Botanisches Institut der Universität Heidelberg

(Z. Naturforsch. **30 c**, 663–667 [1975]; eingegangen am 12. Mai 1975)

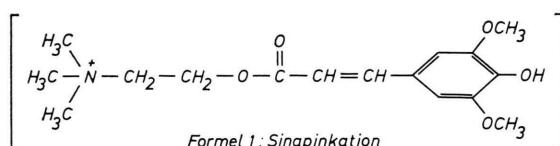
Sinapis alba, Sinapine, Sinapic Acid, Seedling Development

The amount of sinapine in immature seeds of *Sinapis alba* is very low; it increases during ripening. Most of the sinapine is located in the cotyledons. Hypocotyls and roots contain only traces of it. During the early development of seedlings the amount of sinapine in the cotyledons decreases in 26 °C very rapidly. Simultaneously the amount of a substance X increases. Darkness retarded both these processes. The same effect has a temperature of 10 °C. In both cases the increase of X is completely proportional to the decrease of sinapine. Therefore X is probably a derivative of sinapine. After pretreatment with 26 °C the decrease of sinapine in the cold is stronger. The amount of sinapic acid increases only in the beginning of the development and remains constant at a very low level for a long period.

Einleitung

In den letzten Jahren wurde deutlich, daß sekundäre Pflanzenstoffe vielfach keine stabilen Endprodukte sind, sondern einem Ab- oder Umbau unterliegen können¹. Auch dieser Abbau wird durch Außenfaktoren reguliert². Auch „Endprodukte des Stoffwechsels“ müssen deshalb notwendigerweise in ihrer gegenseitigen möglichen Verflechtung gesehen werden. So kommt z. B. das Zimtsäurederivat Sinapinsäure in den Samen von *Sinapis alba* im Sinapin als Ester zwischen Sinapinsäure und Cholin vor, aber auch in den Keimlingen an Anthocyan gebunden¹⁹ und schließlich frei. Obwohl *Sinapis alba* nicht das der Substitution des Sinapins entsprechende Anthocyan Malvidin enthält, ist dieses auch eine mögliche Vorstufe in der Anthocyansynthese³. Eine mehrfache Verknüpfung dieser Substanzen ist damit gegeben. Sinapin (siehe Formel 1) wird bei der

mit dem *p*-Hydroxybenzylglucosinolat-anion eingehen^{6–8}. Gadamer⁹ geht davon aus, daß diese Salzverbindung „Sinalbin“ in den Samen selbst vorliegt und bei der Keimung dann dem enzymatischen Abbau durch „Myrosinase“ unterliegt, vergleiche auch^{8, 10, 11}. Es entsteht dabei *p*-Hydroxybenzylisothiocyanat, Sinapinhydrogensulfat und Glucose. Gmelin vertritt demgegenüber die Ansicht, daß Sinalbin ein zufälliges Isolationsprodukt ist, das bei der Extraktion entsteht^{6, 7}. Dies ist durch unsere chromatographischen Befunde bestätigt. Wegen der oben aufgezeigten Stoffwechselverflechtung ist es nun notwendig, den Sinapinkatabolismus während der Keimung unter dem Einfluß von Außenfaktoren wie Licht und Temperatur zu untersuchen. Der Glucosinolatstoffwechsel während der Ontogenese von *Sinapis alba* wurde bereits von Bergmann¹² untersucht.



Formel 1: Sinapinaktion

Keimung durch das Enzym Sinapinesterase in Sinapinsäure und Cholin gespalten^{4, 5}. Sinapin ist positiv geladen und kann eine Salzverbindung

Material und Methode

Pflanzenmaterial

Die Samen von *Sinapis alba* L. (Landwirtschaftliche Ein- und Verkaufsgenossenschaft Raiffeisen Heidelberg-Kirchheim, Ernte 1972) wurden bis zur Verwendung im Kühlschrank aufbewahrt. Anzucht der Keimlinge entsprechend der bei Bopp und Cepsius¹³ angegebenen Methode in Knop'scher Nährösung. Zur Nährösung wurde ein Eisenkomplex zugegeben, der folgendermaßen hergestellt wurde: 26,1 g Titriplex II in 268 ml 1 n KOH zu 24,9 g FeSO₄ × 7 H₂O mit Aqua dest. auf 1000 ml aufge-

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. Martin Bopp,
Botanisches Institut, D-6900 Heidelberg, Hofmeisterweg 4.

füllt, nach 4 Stunden mit KOH auf pH 5,5 eingestellt. Von dieser Lösung wurden 10 ml zur Stammlösung von $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ zugegeben.

Anzuchtbedingungen

Licht: 6 Osram L-Tageslichtröhren 25 W/15; 4 Philips TLF-Röhren 25 W/33; 10 000 lx in Schalenhöhe. Temperaturen: $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$ bzw. $10 \pm 0,2^\circ\text{C}$. Schalen im Dunkeln zusätzlich mit schwarzem Papier abgedunkelt. Am Anfang wurden 10 ml Nährlösung pro Schale gegeben. Bei 26°C war es notwendig, nach zwei Tagen erneut 5 ml Nährlösung zuzugeben. Jeweils zu den entsprechenden Auswertungszeiten wurden die Keimlinge den Schalen entnommen und sofort bei -20°C eingefroren.

Extraktion

Nach dem Wiegen der gefrorenen Keimlinge (jeweils 20) wurden sie im eisgekühlten Mörser mit Seesand und 2 ml eisgekühltem Aqua dest. 5 min homogenisiert, mit 1 ml nachgespült, danach bei 17 000 rpm in 4°C 15 min zentrifugiert, der Überstand im Meßzylinder auf 6 ml aufgefüllt und sofort 5 min in kochendem Wasserbad erhitzt. Nach erneutem Zentrifugieren wurde der Überstand dekantiert und konnte nach Einfrieren chromatographiert werden. Zum Vergleich wurde auch mit kochendem Wasser und Methanol extrahiert. Bei der Methanolextraktion von Samen erhielt man nur dann die gleiche Sinapinmenge, wenn wie bei der Wasserextraktion nach der heißen Methanolextraktion noch zusätzlich im Mörser homogenisiert wird. Bei getrennter Aufarbeitung von Kotyledonen, Hypokotylen und Wurzeln wurde nur mit 1 ml extrahiert, mit 1 ml nachgespült und anschließend auf 3 ml aufgefüllt. Bei der Darstellung der Kurven ist die verwendete Extraktionsmenge jeweils berücksichtigt. Eine Artefaktabbildung bei der kalten wässrigen Extraktion kann durch den Vergleich der beiden Methoden ausgeschlossen werden.

Dünnschichtchromatographie

Chromatographiert wurde auf Polyamidplatten DC 6,6 (der Firma Macherey-Nagel und Co., 516 Düren). Polyamid hat sich als günstige Trägerschicht bei der Trennung von Phenolcarbonsäuren erwiesen¹⁴. Der Extrakt wurde mit einem Cordis Mikroapplikator für wässrige Lösungen mit einem dazugehörigen Trog (Desaga Heidelberg) aufgetragen. Der beweglich aufgehängte kammförmige Mikroapplikator entnimmt dem Tropf 50 μl Lösung, die gleichmäßig auf einem Streifen von 10 cm verteilt wird. Durch fünfmalige Wiederholung gelangten so 250 μl Lösung zum Auftrag. Nach zweimaligem Auftragen wurde die Platte geföhnt, nach fünfmalig-

gem ganz trocken. Die Auftragungsmethode gibt quantitativ sehr gut reproduzierbare Werte.

Als geeignetes Laufmittel erwies sich Methanol/Wasser/Aceton (20/35/5). Die Laufzeit beträgt etwa 2,5 Stunden.

Die Papierchromatographie gab keine gute Trennung von Sinapin und der sich bei der Keimlingsentwicklung anhäufenden Substanz X.

Identifizierung der Banden

Alle untersuchten Banden zeigten im langwelligen UV-Licht Blaufluoreszenz. Für „Sinabin“ und Sinapinsäure standen Vergleichssubstanzen der Firma Roth, Karlsruhe, zur Verfügung. Sinapin als Sinapinrhodanid wurde von Professor Gmelin zur Verfügung gestellt *. Sinabin und Sinapinrhodanid gaben bei Chromatographie auf Polyamid den gleichen R_F -Wert. Das „Sinabin“ der Firma Roth spaltet sich bei der Chromatographie wie bei Gmelin in Anion und Kation auf. Das Anion ließ sich mit Silbernitrat/Dichromat¹² am Start als gelboranger Fleck anfärbten. Das Kation des „Sinabins“, das Sinapin, gibt eine charakteristische grüne Fluoreszenz bei Bestrahlung mit langwelligem UV und Belebung mit Ammoniak. Diese Eigenschaft zeigt auch die Substanz X. Sinapinsäure gibt bei Behandlung mit wässriger FeCl_3 -Lösung eine Rotfärbung.

Absorptionsspektren und quantitative Bestimmung

Aus dem Dünnschichtchromatogramm wurden die entsprechenden Banden ausgekratzt und mit konstanten Mengen Methanol p.A. eluiert. Das Polyamid wurde bei 3200 Umdrehungen in der Kälte abzentrifugiert. Für die quantitative Bestimmung wurde jeweils im Maximum der Extinktion (vgl. Abb. 1, 320, 328 und 332 nm)^{15–18} mit dem Spektralphotometer Zeiss PM QII gemessen. Die angegebenen Extinktionswerte beziehen sich auf jeweils 20 Keimlinge.

Ergebnisse

Bei der Dünnschichtchromatographie wässriger Extrakte von Keimpflanzen verschiedenen Alters traten mehrere blau fluoreszierende Banden auf, die nur zum Teil bestimmt werden konnten. Eine Bande entsprach dem Sinapin. Es hatte einen R_F -Wert von 0,88. Die Bande der Sinapinsäure zeigte einen R_F -Wert von 0,16. Zwischen der Sinapinsäurebande und der Bande des Sinapins können je nach Entwicklungszustand noch vier weitere Banden auftre-

* Wir danken Herrn Prof. Gmelin für die Übersendung dieser und weiterer Substanzen.

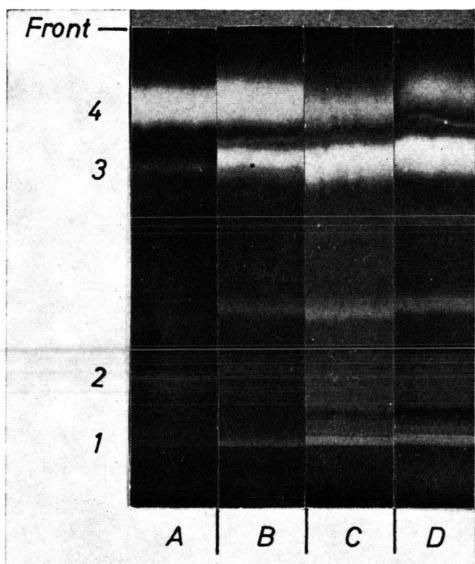


Abb. 3. Photographien von Dünnschichtchromatogrammen.
Schicht Polyamid DC 6,6. Laufmittel Methanol/Wasser/Aceton (20/35/5). A, 24 Stunden Licht; B, 48 Stunden Licht;
C, 72 Stunden Licht; D, 96 Stunden Licht. 1. Start, 2.
Sinapinsäure, 3. Substanz X, 4. Sinapis.

ten, die gleichfalls blau fluoreszieren (Abb. 3). Eine dieser vier Banden mit dem R_F -Wert 0,72 tritt sehr regelmäßig auf – sie steht, wie noch gezeigt wird, in engem quantitativen Zusammenhang mit Sinapin. Es gelang bisher nicht, sie zu identifizieren, sie soll deshalb als Substanz X bezeichnet werden.

Die Absorptionskurven von Sinapin, Substanz X und Sinapinsäure sind in Abb. 1 dargestellt.

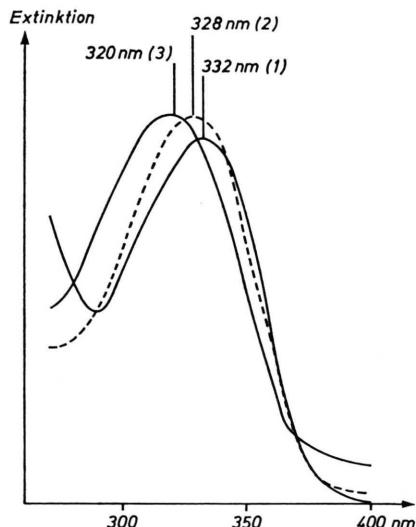


Abb. 1. UV-Spektren von Sinapin (1), Substanz X (2) und Sinapinsäure (3) in Methanol p.A.

Dünnschichtelektrophoretische Trennung mit schwach saurem Natriumazetat-Puffer bei 400 Volt gab eine Aufspaltung des Sinapins im Kathodenbereich in zwei Flecke. Die gleiche Aufspaltung zeigt auch die Sinapinsäure im Anodenbereich. Substanz X verhielt sich neutral. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei dieser Substanz um ein Sinapinderivat, wobei die für die grüne Fluoreszenz bei Ammoniakbedämpfung verantwortliche Gruppe erhalten bleibt. Vorkommen und Veränderung der einzelnen Substanzen in Samen und während der Keimung wird nun weiterverfolgt. Unreife, noch grüne Embryonen enthalten nur geringe Mengen an Sinapin. Dieses nimmt schnell zu, so daß im gelblichen Samen Sinapin in hoher Konzentration (Extinktionswert 1,5–1,7) vorliegt. Substanz X und Sinapinsäure lassen sich in reifen Samen nicht nachweisen. Ein minimaler Gehalt an Substanz X findet sich jedoch in reif werdenden grünen Samen. Werden reife gelbe Samen im Licht bei 26 °C zum Keimen ausgelegt, so nimmt in den sich entwickelnden Keimlingen der Sinapingehalt, vor allem zwischen

48 und 72 Stunden ziemlich rasch ab. Er erreicht 120 Stunden nach Keimungsbeginn einen Minimalwert, der dann mehr oder weniger konstant bleibt (Abb. 2). Gegenläufig dazu erhöht sich der Gehalt

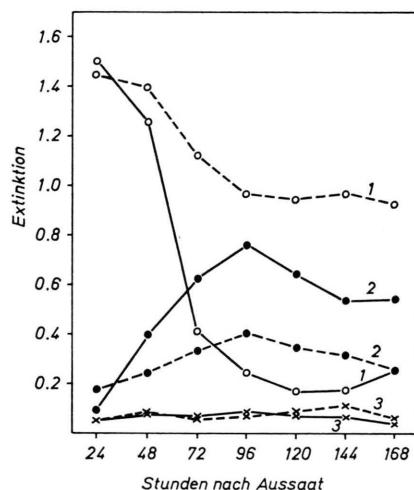


Abb. 2. Änderung des Sinapin-(1), X-(2) und Sinapinsäure-(3)-Gehalts in ganzen Keimlingen von *Sinapis alba*. —, im Licht; - - -, im Dunkeln. Temperatur 26 ± 0,5 °C. Abszisse: Zeit nach der Aussaat, Ordinate: Extinktion bezogen auf 20 Keimlinge. Gemessen wird die Extinktion der methanolischen Eluate der Dünnschichtchromatogramme.

an X (Abb. 3 *) in den Keimlingen bis zu einem Maximum bei 96 Stunden, danach sinkt der Gehalt an X langsam wieder ab. Sinapinsäure, die im Samen kaum nachzuweisen ist, nimmt nur geringfügig zu, sie bleibt dann über lange Zeit praktisch konstant. Aller Wahrscheinlichkeit nach wird Sinapinsäure metabolisiert, jedoch läßt sich das aus diesen Versuchen nicht entnehmen. Werden die Keimlinge dauernd im Dunkeln gehalten, verläuft die Abnahme des Sinapins langsamer (Abb. 2). Entsprechend verhält sich die Zunahme von X. Die wahrscheinliche Veränderung des Sinapins zu X wird also in seiner Stärke durch das Licht gesteuert. Der Gehalt an Sinapinsäure unterscheidet sich bei den verwendeten Nachweismethoden nicht von den Lichtpflanzen.

Werden nur die Kotyledonen extrahiert, erhält man den gleichen Kurvenverlauf wie bei der Extraktion ganzer Keimlinge (Abb. 4). Im Hypokotyl findet man bei der Keimung einen ganz geringen Sinapineinhalt, der im weiteren Verlauf unter die Nachweisgrenze absinkt. In der Wurzel läßt sich Sinapin gar nicht nachweisen.

* Abb. 3 siehe Tafel auf Seite 664 b.

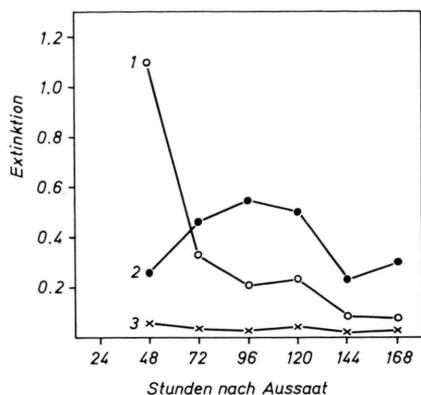


Abb. 4. Änderung des Sinapin- (1), X- (2) und Sinapinsäure- (3) Gehalts in Kotyledonen im Licht. Temperatur $26 \pm 0,5^\circ\text{C}$. Die Kotyledonen wurden zur Extraktion abgetrennt.

In weiteren Experimenten wurde der Sinapinabbau bei herabgesetztem Stoffwechsel untersucht. Die Pflanzen waren in diesem Fall von Anfang an in 10°C gehalten. Wie Abb. 5 zeigt, lief der Versuch über 10 Tage. Der Abbau ist wesentlich geringer als bei hoher Temperatur. Er erreicht nach 168

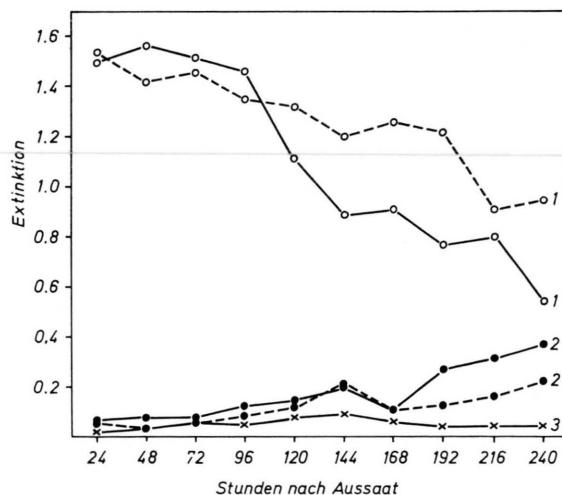


Abb. 5. Änderung des Sinapin- (1), X- (2) und Sinapinsäure- (3) Gehalts ganzer Keimlinge. —, im Licht; ---, im Dunkeln. Temperatur $10 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

Stunden im Licht etwa denselben Wert wie bei warm und dunkel gehaltenen Pflanzen. Im Dunkeln ist er deutlich schwächer. Die Zunahme von X ist gleichfalls gering, was der Erwartung entspricht. Sinapinsäure ist über die ganze Versuchsdauer im Licht und im Dunkeln in gleichbleibend niedriger Menge vorhanden.

Der folgende Versuch sollte sichtbar machen, wie weit der tatsächliche Sinapinabbau von der Tempera-

tur abhängig ist. Die Pflanzen wurden dazu für 0, 24, 48 und 72 Stunden bei 26°C gehalten und anschließend in 10°C überführt. Während der ganzen Zeit standen die Keimlinge im Dauerlicht. Bei 24- oder 48-stündiger Vorbehandlung in der Wärme, verglichen mit dauernd kalt gehaltenen Pflanzen, fand anschließend in der Kälte eine beträchtliche Sinapinabnahme statt (Abb. 6). Da sich der Abbau

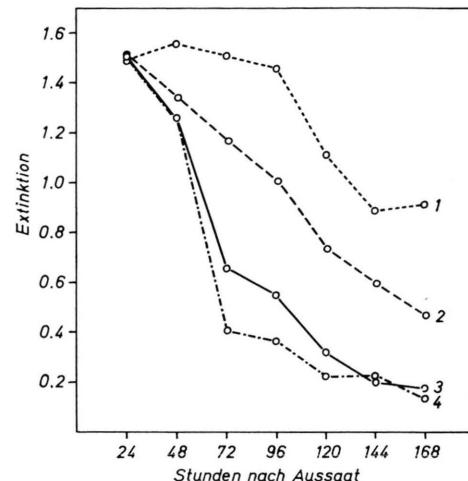


Abb. 6. Abnahme des Sinapin gehaltes in ganzen Keimlingen von *Sinapis alba* im Licht. 1. Pflanzen dauernd in 10°C . 2. 24 Stunden in 26°C , dann in 10°C . 3. 48 Stunden in 26°C , dann in 10°C . 4. 72 Stunden in 26°C , dann in 10°C .

in der Kälte nach Wärmeverbehandlung nicht verringert, sondern zunächst bis 48 Stunden praktisch genauso verhält wie bei Dauerwärme, müssen die entscheidenden temperaturabhängigen Schritte bereits vor dem sichtbaren Sinapinabbau ablaufen. Die Kurve für 72 Stunden Wärmeverbehandlung entspricht noch mehr der Dauerwarmbehandlung (Abb. 2), da nach 72 Stunden der Sinapinabbau sowieso nur noch schwach ist. Diese Resultate werden durch die entsprechende Zunahme der Sub-

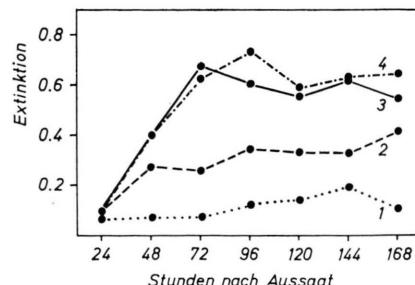


Abb. 7. Zunahme von X in ganzen Keimlingen von *Sinapis alba* im Licht. Versuchspogramm wie bei Abb. 6. Die strenge Gegenläufigkeit der beiden Substanzen ist klar zu sehen.

stanz X (Abb. 7) vollkommen bestätigt. Die Zunahme von X ist bis zur 96. Stunde proportional der Sinapinabnahme. 48 Stunden bei 26 °C ergibt bereits dieselben X-Werte wie Dauerwärme, d. h. der Gehalt an X nimmt auch in der Kälte noch unverändert zu. Da bei längerer Versuchsdauer Sinapin immer noch abnimmt, ohne daß X gleichzeitig ansteigt, muß auch dieses weiter metabolisiert werden. Bei höheren Temperaturen (Abbn. 2 und 4) nimmt X sogar wieder ab, in der Kälte jedoch nicht oder nicht wesentlich (Abb. 7), so daß auch dieser Abbau von X temperaturabhängig ist.

Diskussion

Samen von *Sinapis alba* akkumulieren während der Reife große Mengen an Sinapin. Die Akkumulation beginnt unmittelbar vor der Samenreife, denn in früheren Stadien der Schotenentwicklung finden sich nur geringe Spuren von Sinapin und X. Beide Substanzen sind also nicht in alternden Samen auftretende Abbauprodukte. Bei der Keimung wird Sinapin schnell abgebaut, so daß in den jungen Keimpflanzen nur noch 10–20% des Samensinapins vorhanden ist. Dies liegt fast ausschließlich in den Kotyledonen.

Über die Bedeutung des raschen Sinapinabbaus läßt sich im Augenblick keine eindeutige Aussage machen, es liegt jedoch nahe, an die Bereitstellung von Bausteinen zu denken, zumal der Kurvenverlauf

von X zeigt, daß diese Substanz nicht stabil ist, sondern weiter verändert wird, möglicherweise zu Sinapinsäure. Da Sinapinsäure unter den genannten Veresuchsbedingungen nicht zunimmt, ist sie wohl ebenfalls nicht Endprodukt der Akkumulation. Sie könnte entweder als Baustein der im Licht ablaufenden Flavanoidsynthese dienen³, oder an das im Licht gebildete Anthocyan angeheftet werden¹⁹.

Unsere Experimente haben gezeigt, daß der Sinapinabbau wie viele andere Stoffwechselprozesse lichtgesteuert ist. Für welchen Schritt die Lichtwirkung verantwortlich ist, ist im Augenblick schwer zu sagen. Entweder verursacht es die Neusynthese der Sinapinesterase oder deren Aktivierung. Die Temperaturexperimente lassen aber Zweifel daran aufkommen, daß die enzymatische Reaktion überhaupt der für den Abbau begrenzende Schritt ist, da zwar die Vorbehandlung (Entstehung oder Aktivierung des Enzyms) stark temperaturabhängig ist, der weitere Abbau des Sinapins dann aber bei 10 °C und 26 °C in gleicher Geschwindigkeit erfolgen kann. Unabhängig davon, wie dies zu interpretieren ist, demonstrieren die Abbaukurven von Sinapin und die Zunahmekurven von X gerade in diesen Temperaturversuchen besonders deutlich den engen Zusammenhang zwischen beiden Substanzen und sprechen dafür, daß X ein nahes Derivat von Sinapin ist.

Wir danken Herrn Professor Gmelin für wichtige Hinweise und Diskussionsbemerkungen.

- ¹ W. Barz u. W. Hösel, The Flavanoids (T. J. Mabry u. I. B. Harborne, eds.), Chapman and Hill Ltd. 1973.
- ² M. Bopp u. H. Pop, Biochem. Physiol. Pflanze, im Druck.
- ³ A. M. Steiner, Z. Pflanzenphysiol. **63**, 370 [1970].
- ⁴ A. Tzagoloff, Plant Physiol. **38**, 202 [1963].
- ⁵ F. L. Austin u. I. A. Wolff, J. Agr. Food Chem. **16**, 132 [1968].
- ⁶ O. E. Schultz u. R. Gmelin, Z. Naturforsch. **7b**, 500 [1952].
- ⁷ O. E. Schultz u. R. Gmelin, Z. Naturforsch. **8b**, 151 [1953].
- ⁸ B. Raghavan, M. L. Shankaranarayana, S. Nagalakshmi u. C. P. Natarajan, Mikrochim. Acta **6**, 818 [1972].
- ⁹ J. Gadamer, Arch. Pharmaz. **235**, 44 [1897].
- ¹⁰ V. K. Srivastava u. D. C. Hill, Photochemistry **13**, 1043 [1974].
- ¹¹ A. Kjaer u. K. Rubinstein, Acta Chem. Scand. **8**, 598 [1954].
- ¹² F. Bergmann, Z. Pflanzenphysiol. **62**, 362 [1970].
- ¹³ M. Bopp u. I. Capesius, Planta **94**, 220 [1970].
- ¹⁴ A. Rapp u. A. Ziegler, Vitis **12**, 226 [1973].
- ¹⁵ L. A. Griffiths, Biochem. J. **113**, 603 [1969].
- ¹⁶ R. M. Horowitz u. B. Gentili, J. Org. Chem. **25**, 2183 [1960].
- ¹⁷ H. P. Kung u. W. Y. Huang, J. Amer. Chem. Soc. **71**, 1836 [1949].
- ¹⁸ M. Noda u. M. Matsumoto, Biochim. Biophys. Acta **231**, 131 [1971].
- ¹⁹ A. Havelange u. R. Schumacker, Bull. Soc. Roy. Sci. Liège **35**, 125 [1961].