

Sterine in Weidegräsern

Matthias Pailer* und Peter Riedl

Institut für pharmazeutische Chemie, Universität Wien, A-1090 Wien,
Österreich

(Eingegangen 9. November 1977)

Sterols in Grasing Plants

During the course of investigations concerned with a cattle disease („Weidekrankheit“) in Austrian alpine regions, it became of interest to examine the sterol fractions of some typical grasing plants, since it seemed possible that a biological connection exists between the phytosterols, Vitamin D and related compounds and the cause of the „Weidekrankheit“.

The sterol contents of eight different species of Austrian alpine grasses especially of *Trisetum flavescens*, were studied by gas—liquid chromatography and mass spectrometry. All contained sitosterol as the main component, besides cholesterol, campesterol, stigmasterol, Δ^7 -cholestenol and $\Delta^{7,24}$ (28)-stigmastadienol.

The aim of this examination was to establish whether there is an influence of fertilizing on the content of the above mentioned compounds: no remarkable difference between the sterol contents of fertilized and non-fertilized grasses could be found.

Der Anlaß für die vorliegenden Untersuchungen ist das Auftreten einer als „Weidekrankheit“ bezeichneten Erkrankung von Rindern (*Libiseller*¹). Diese Krankheit trat erstmals im Jahre 1960 im alpinen Grünlandbereich Österreichs (Tirol, Vorarlberg, Niederösterreich und Steiermark) auf. Als Ursache für diese Krankheit werden Stoffwechselstörungen bei den Rindern angenommen.

Um den Ertrag in der Landwirtschaft (Hektarertrag, Milchleistung u. a.) zu steigern, werden seit Jahren verschiedene Intensivierungsmethoden (z. B. starke Mineraldüngung) angewendet. Neben den erwarteten Leistungssteigerungen traten aber auch unerwünschte Nebenerscheinungen auf:

So wurde in den letzten Jahren eine Reihe von Gesundheitsstörungen bei Rindern beobachtet. Unter anderem werden Stoffwechselschäden durch die Ernährung bewirkt, die stark von Boden, Klima und Düngungsart beeinflußt wird („Weidekrankheit“).

Die „Weidekrankheit“ tritt nur in mineraldünger-intensiven Grünlandbetrieben auf, wo durch starke Düngung der Futterertrag gesteigert wurde. Wurden die Tiere auf ungedüngte Naturweiden gebracht oder die Ernährung der Rinder auf Winterfutter (Heu) umgestellt, so verschwanden die Krankheitserscheinungen oder gingen zumindest stark zurück.

Ein Aspekt der pathologisch-anatomischen Untersuchungen soll hier herausgegriffen werden:

Bei den befallenen Rindern tritt eine starke Kalkablagerung außerhalb des Knochens in den weichen Geweben auf (Arterien, Herz, Lunge, Muskeln u. a.). Es liegt also eine schwere Störung des Ca-Stoffwechsels vor.

Pathologische Kalkablagerungen außerhalb des Knochens konnten auch experimentell, und zwar durch Verabreichung von Mg-armer Diät, Gaben von Vitamin D, Dihydro-tachysterol u. a. erreicht werden. Vitamin D bewirkt zwar vor allem den Einbau von Ca in den Knochen, aber bei hohen Gaben von Vitamin D₃ und UV-Bestrahlung wird die Resorption von Ca wesentlich erhöht und die Ablagerung von Ca im Gewebe verstärkt.

Die Beobachtung, daß das Auftreten der „Weidekrankheit“ durch frisches Gras von intensiv gedüngten Weiden verursacht wird, die Symptome nach Fütterung von Heu aber rasch zurückgehen, machen es wenig wahrscheinlich, daß ein abnormaler Mineralstoffwechsel des Weidegrases als Krankheitsursache in Frage kommt. Aus dem unterschiedlichen Einfluß von frischem und getrocknetem Futter kann man schließen, daß anorganische Verbindungen nicht die auslösenden Faktoren sind, da sie sehr wahrscheinlich in frischem wie auch in getrocknetem Zustand identisch vorliegen sollten. Hingegen ist es gut möglich, daß unter den Verhältnissen, die durch starke Mineraldüngung hervorgerufen werden, der Gehalt an organischen Pflanzeninhaltsstoffen verändert wird. Die Frage, wie diese Stoffe die Symptome der Krankheit auslösen — ob durch direkten Einbau in den tierischen Stoffwechsel, durch Stimulierung der Produktion von Sekundärstoffen oder über einen anderen Weg — muß naturgemäß dabei vorläufig offen bleiben.

Für die Suche nach Substanzen, die die „Weidekrankheit“ bei Rindern verursachen, wurde von folgenden Überlegungen ausgegangen:

Eine Analyse der Zusammensetzung des Weideaufwuchses ergab: über zwei Drittel des gesamten Pflanzenbestandes bestand aus verschiedenen Gräsern. Daher wurde die Aufmerksamkeit zunächst auf die Gräser bzw. deren Inhaltsstoffe gerichtet. Nach den vorhin entwickelten Vorstellungen ist es plausibel, daß die gesuchten Substanzen organische Verbindungen sind. An organischen Pflanzeninhaltsstoffen der Familie Gramineae — die Gräser (Festucaideae) sind eine Unterordnung dieser Familie — sind bekannt (Hegnauer)²:

Polyphenole (Flavonole, Anthocyane, Cumarine), Alkaloide, cyanogene Verbindungen, N-haltige, antimikrobielle Stoffe, Saponine, ätherische Öle, org.

Säuren, Kohlehydrate, Aminosäuren und Proteine sowie Lipide (fette Öle, Sterine und Triterpene sowie Wachse).

Es ist bekannt, daß Cholecalciferol in einer Grasart (*Dactylis glomerata*) vorkommt (Raoul³), und daß diese Substanz hohe Werte von Ca und PO₄ im Serum verursacht. Weiters wurde gefunden, daß Dihydro-tachysterol eine hohe calcifizierende Wirkung hat, aber dabei nur schwach Vitamin D-wirksam ist. Durch Gaben von Dihydro-tachysterol ließ sich exper. Kalkablagerung auch außerhalb des Knochens herbeiführen und ein der „Weidekrankheit“ ähnliches Krankheitsbild hervorrufen.

Aus den angeführten Gründen war es naheliegend, von organischen Inhaltsstoffen der Gräser solche in Betracht zu ziehen, die den Vitaminen D₂ (Ergocalciferol) und D₃ (Cholecalciferol) chemisch ähnlich sind und biosynthetisch sowie metabolisch mit ihnen in Beziehung stehen können. Daher wurde zunächst eine Untersuchung der Pflanzensterine heimischer Weidegräser durchgeführt.

Ein weiteres Ziel war es, festzustellen, ob intensive Minereraldüngung einen Einfluß auf den Gehalt an Sterolen haben kann.

Im Zusammenhang mit dem Krankheitsbild der von der „Weidekrankheit“ befallenen Rinder wurde auch auf das Auftreten einer Rinderkrankheit mit gleichen Symptomen in Südamerika hingewiesen (*Köhler* und *Libiseller*)⁴. Die pathologisch-anatomischen Befunde der beiden Krankheiten zeigen keine Unterschiede. Diese als „Enteque Seco“ bezeichnete Erkrankung wird durch die Blätter der Pflanze *Solanum malacoxylon* verursacht (*Worker*)⁵. * Obwohl die Krankheitsbilder von „Enteque Seco“ und „Weidekrankheit“ einander sehr ähnlich sind, darf daraus noch nicht der Schluß gezogen werden, daß beide Krankheiten auf die gleiche Ursache zurückzuführen sind. Andererseits ist es aber zumindest naheliegend, in beiden Fällen nach gleichen oder ähnlichen Stoffen für das Auftreten der Krankheitssymptome zu suchen.

Da die Krankheitserscheinungen, wie erwähnt, bei Fütterung mit Heu nicht oder bedeutend schwächer auftraten als bei Fütterung mit Frischgras, mußte als Rohmaterial Frischgras verwendet werden; dementsprechend wurde die Extraktion mit Äthanol durchgeführt.

Das geerntete Gras wurde nach dem Schnitt bis zur Weiterverarbeitung bei –20 °C in der Tiefkühltruhe aufbewahrt, dann zerkleinert, wiederholt mit EtOH macerisiert, das Lösungsmittel im Vak. abdestilliert und so der Rohextrakt (RE) erhalten. Dieser RE wurde nach bekannten Methoden (*Goad* und *Goodwin*)⁷ weiterbearbeitet: der RE wurde mit alkohol. KOH verseift und daraus durch Extraktion mit Äther der unverseifbare Anteil (US) erhalten.

Zur Abtrennung der Sterine von den Begleitstoffen wurde Säulenchromatographie (SC) an Al₂O₃ benutzt.

* Nach Beendigung dieser Arbeit wurde bekannt, daß die Ursache für die pathologischen Erscheinungen von „Enteque Seco“ ein Glykosid von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ ist (*Wasserman*)⁶. Dieses ist die biologisch aktive Form von Vitamin D.

Die einzelnen Fraktionen wurden durch Gradienten-Elution mit Petroläther—Äther—Äthanol erhalten. Die Trennung wurde durch *DC* kontrolliert, die Fraktionen jeweils mit einer Mischung der Referenz-Sterole verglichen. Die entsprechenden, sterolhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, das Lösungsmittel abdestilliert und der Rückstand getrocknet.

Wir haben anfänglich verschiedene Grassorten untersucht, worüber nachfolgend noch berichtet werden wird. Da aber inzwischen festgestellt wurde (*Köhler*⁸), daß die „Weidekrankheit“ bei Rindern ausschließlich (oder zumindest hauptsächlich) auf Goldhafer (*Trisetum flavescens*) zurückzuführen ist, haben wir uns mit dieser Grasspezies eingehender beschäftigt.

Frischgras 250 g, ausgelesener Goldhafer aus einem Versuchsbetrieb (Walchsee/Tirol, 2. Aufwuchs, gedüngt mit Mineraldünger: 150 kg N/ha, 250 kg P₂O₅/ha, 250 kg K₂O/ha) wurde wie üblich aufgearbeitet. Nach der *SC* an Al₂O₃ wurden die sterinhaltigen Fraktionen zu drei Unterfraktionen vereinigt (Gesamtausb. 447 mg, 0,18% bez. auf Frischgras).

In einem zweiten Trennschritt wurde erneut an Al₂O₃ getrennt. Von den sterinhaltigen Fraktionen wurden einander ähnliche wieder zu Unterfraktionen vereinigt (Gesamtausb. 125 mg, 0,05%).

Die Fraktionen wurden in drei — ungleiche — Teile geteilt:

etwa 10% jeder Fraktion wurden unverändert gelassen: *St*—OH;

etwa 10% wurden (mit Pyridin—*HMDS*—*TMS*) in die Silyl-Derivate übergeführt: *St-TMS*;

die restlichen 80% wurden (mit Pyridin—*Ac*₂O) acetyliert: *St-Ac*.

Mit den *St-Ac* wurde die weitere Auftrennung der Sterin-Fraktion durchgeführt (siehe später). Die OH-, *TMS*- und *Ac*-Derivate der Sterin-Fraktionen wurden direkt für *GC*-Analysen verwendet.

Die *GC*-Trennungen der gereinigten Sterin-Fraktionen (als *St*-OH, *St-TMS* und *St-Ac*) wurden an folgenden Phasen durchgeführt: SE-30, XE-60, QF-1 und HiEff-8B.

Die *RT* von Fraktionen, die nicht unmittelbar hintereinander in die *GC*-Säule injiziert wurden, wiesen zwar kleine Unterschiede auf, die *RRT* (relative Retentionszeiten, bez. auf *Chol*-OH, *Chol-TMS* und *Chol-Ac*) waren aber nahezu identisch.

In Tab. 1 sind die *RRT* an verschiedenen Phasen wiedergegeben.

Die in Tab. 1 angeführten Werte sind die Ergebnisse aus mehreren Versuchen, die im allgemeinen so ausgeführt wurden, daß eine Mischung der jeweiligen Referenzverbindungen vor und nach den Sterin-Fraktionen in die Säule injiziert wurde.

Aus den *RRT* der Komponenten lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

Da die *RRT* von **5** als OH-, *Ac*- und *TMS*-Verbindung an allen fünf Phasen mit den *RRT* von *Sito*-OH, *Sito-Ac* und *Sito-TMS* übereinstimmt, erscheint es zumindest sehr wahrscheinlich, daß **5** mit

Tabelle 1. *RRT* (bezogen auf *Chol*) der Sterole, *TMS*- und *Ac*-derivate

SE-30		<i>RRT</i>		XE-60		<i>RRT</i>	
Fraktion	<i>St</i> -OH	<i>St</i> - <i>TMS</i>	<i>St</i> - <i>Ac</i>	Fraktion	<i>St</i> -OH	<i>St</i> - <i>TMS</i>	<i>St</i> - <i>Ac</i>
1	1,00	1,00	1,00	1	1,00	1,00	1,00
<i>Chol</i>	1,00	1,00	1,00	<i>Chol</i>	1,00	1,00	1,00
2	1,12	1,14	1,12	2	1,11	1,14	1,15
3	1,28	1,28	1,28	3	1,32	1,32	1,31
<i>Camp</i>	1,28	1,28	1,29	<i>Camp</i>	1,32	1,32	1,31
4	1,40	1,39	1,40	4	1,36		1,36
<i>Stig</i>	1,39	1,38	1,40	<i>Stig</i>	1,36	1,36	1,36
5	1,61	1,59	1,60	5	1,59	1,59	1,59
<i>Sito</i>	1,59	1,59	1,60	<i>Sito</i>	1,60	1,59	1,60
6	1,80	1,81	1,80	6	1,85	1,96	1,83

QF-1		<i>RRT</i>		HiEff 8 B		<i>RRT</i>	
Fraktion	<i>St</i> -OH	<i>St</i> - <i>TMS</i>	<i>St</i> - <i>Ac</i>	Fraktion	<i>St</i> -OH	<i>St</i> - <i>TMS</i>	<i>St</i> - <i>Ac</i>
1	1,00	1,00	1,00	1	1,00		1,00
<i>Chol</i>	1,00	1,00	1,00	<i>Chol</i>	1,00		1,00
2	1,12		1,09				
3/4	1,31	1,29	1,29	3/4	1,31		1,32
<i>Camp</i>	1,30	1,29	1,30	<i>Camp</i>	1,32		1,32
<i>Stig</i>	1,32	1,31	1,32	<i>Stig</i>	1,34		1,34
5	1,55	1,55	1,54	5	1,58		1,58
<i>Sito</i>	1,54	1,55	1,54	<i>Sito</i>	1,58		1,58
6	1,77		1,67	6	1,74		1,80

Sitosterin identisch ist. Ebenso macht es die Übereinstimmung der *RRT* von **3** und **4** als OH-, *Ac*- und *TMS*-Verbindung an SE-30 und XE-60 mit *Camp*-OH und *Stig*-OH, *Camp*-*Ac* und *Stig*-*Ac* sowie *Camp*-*TMS* und *Stig*-*TMS*, aber auch die Übereinstimmung der *RRT* von **3** und **4** an QF-1, HiEff 8 B und PMPE mit den unter den entsprechenden Bedingungen gleichen *RRT* von *Camp* und *Stig* in Form ihrer OH-, *Ac*- und *TMS*-Verbindung sehr wahrscheinlich, daß **3** mit Campesterin und **4** mit Stigmasterin identisch ist. Schließlich läßt sich für **1** Entsprechendes aussagen:

1 gibt auf allen fünf verwendeten Phasen als OH-, *Ac*- und *TMS*-Verbindung die gleichen *RRT* wie *Chol*-OH, *Chol*-*Ac* und *Chol*-*TMS*. Daher ist eine Identität von **1** mit Cholesterin anzunehmen.

Ein Vergleich der auf vier verschiedene Phasen erhaltenen *RRT* mit Literaturangaben (*Patterson*⁹) unter ähnlichen äußeren Bedingungen (Länge der Säule, Trägermaterial, Belegung des Trägers, stationäre Phase, Temperatur und Durchflußgeschwindigkeit) ergab eine recht gute Übereinstimmung der eigenen Werte für die Referenzverbindun-

gen mit den Literaturangaben. Für die Komponenten **1**, **3**, **4** und **5** ergab sich deshalb eine Übereinstimmung mit *Chol*, *Camp*, *Stig* und *Sito* sowohl als *St-OH*, als auch als *St-Ac*.

Komponente **2** zeigte an SE-30 und QF-1 eine recht gute Übereinstimmung der *RRT* mit Δ^7 -Cholestenol (vgl. Tab. 2).

Tabelle 2. Vergleich der *RRT* von **2** und Δ^7 -Cholestenol an SE-30 und QF-1

		<i>RRT</i>	
		<i>St-OH</i>	<i>St-Ac</i>
SE-30	2	1,12	1,12
	Δ^7 -Cholestenol*	1,12	1,12
QF-1	2	1,12	1,09
	Δ^7 -Cholestenol*	1,11	1,11

* *Patterson*⁹.

Die Sterin-*Ac* wurden durch Hochdruck-Flüssig-Chromatographie weiter aufgetrennt bzw. angereichert. Die Fraktionierung erfolgte an MgO mit Petroläther-Essigester (99,5:0,5) als Fließmittel. Die aufgefangenen Fraktionen wurden durch *GC* kontrolliert und Fraktionen mit ähnlicher Zusammensetzung vereinigt. Derartige Fraktionen wurden (wenn sie mehr als einige mg Substanz enthielten) einer neuerlichen *HPLC*-Trennung unterzogen. Auf diese Weise gelang es, die Acetylverbindungen von **3**, **4** und **5** soweit anzureichern, daß sie gaschromatographisch als frei von Begleitstoffen anzusehen sind. Ein Teil der Verbindungen wurde alkalisch verseift, um die freien Sterine zu erhalten. Von den freien Sterinen wurde die Hälfte in die *TMS*-Derivate übergeführt. Es wurde nun versucht, auch die übrigen Komponenten in einer ähnlich hohen Konzentration anzureichern. Zu diesem Zweck wurden nach den ersten beiden Fraktionierungen mittels *HPLC* die jeweils ähnlichen Fraktionen vereinigt und neuerlich auf die Säule aufgetragen. Es wurden insgesamt 4 solche Schritte — Vereinigung ähnlicher Fraktionen einer *HPLC*-Trennung und Wiederauftragen dieser Sammelfraktionen — durchgeführt. Durch dieses Verfahren gelang es, auch das Sterin-*Ac* **1** soweit zu isolieren, daß es gaschromatographisch rein erschien. Weiters konnte eine Anreicherung der Acetylderivate von **2** und **6** erzielt werden. Eine vollständige Isolierung gelang nicht. Anschließend wurden von den Sterinen **1**, **3**, **4** und **5** und ihren Derivaten Massenspektren mit Direkteinlaß der Substanzen hergestellt. Die erhaltenen Spektren waren in guter Übereinstimmung mit Literaturangaben (*Knights*¹⁰) und eigenen Spektren der Referenzverbindungen *Cholesterin*, *Camp*, *Stig* und *Sito* (als *St-OH*, *St-Ac* und *St-TMS*).

Die wesentlichsten Fragmentierungen der Sterine **2** und **6** bzw. ihrer Derivate sind:

2: m/e 386 (100%, M^+); 247 [17%, ($M^+ - C_9H_{13} - ROH$)].

6: m/e 412 (22%, M^+); 314 [38%, ($M^+ - C_{23} - C_{27} + H$)]; 271 [100%, ($M^+ - \text{Seitenkette} - 2H$)].

Sterin-Acetate:

2: *m/e* 428 (95 %, M^+); 315 [16 %, (M^+ —Seitenkette)]; 255 [100 %, (M^+ —Seitenkette—ROH)].

6: *m/e* 454 (12 %, M^+); 313 [100 %, (M^+ —Seitenkette)]; 253 [16 %, (M^+ —Seitenkette—2 H—ROH)].

Sterin-TMS-Äther:

6: *m/e* 484 (6 %, M^+); 386 [63 %, (M^+ — C_{23} — C_{27} + H)]; 343 [100 %, (M^+ —Seitenkette—2 H)].

Die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse der *GC*- und *MS*-Analysen zeigte das Vorhandensein folgender Verbindungen in der Sterin-Fraktion von Goldhafer: Cholesterin, Δ^7 -Cholestenol, Campesterin, Stigmasterin, Sitosterin, $\Delta^{7,24}$ -Stigmastadienol.

Der relative Gehalt der einzelnen Komponenten der Sterin-Fraktion wurde aus den Peakflächen der Gaschromatogramme ermittelt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3 wiedergegeben.

Tabelle 3. *Relative Mengen der Sterin-Komponenten in gereinigten Grasextrakten*

Komponente	Verbindung	rel. Menge (%)
1	Cholesterin	12,3
2	Δ^7 -Cholestenol	1,1
3	Campesterin	8,5
4	Stigmasterin	3,8
5	Sitosterin	65,0
6	$\Delta^{7,24}$ -Stigmastadienol	6,5

Das Auftreten von Sitosterin, Campesterin und Stigmasterin in Gramineae ist seit längerem bekannt. Cholesterin wurde ebenfalls in verschiedenen Gattungen der Familien Gramineae nachgewiesen (*Knights*¹⁰). Auch $\Delta^{7,24}$ -Stigmastadienol und Δ^7 -Cholestenol konnten in der Sterol-Fraktion identifiziert werden (*Knights*¹⁰).

Sitosterin, Campesterin, Stigmasterin, Cholesterin und $\Delta^{7,24}$ -Stigmastadienol konnten vor kurzem auch in den Samen von zwölf verschiedenen Grasarten nachgewiesen werden (*Bowden*¹¹), nicht aber Δ^7 -Cholestenol.

Da nun bekannt war, daß vor allem oder sogar ausschließlich Goldhafer (*Trisetum flavescens*) für das Auftreten von Krankheitssymptomen verantwortlich war, sollte die Sterin-Fraktion dieser Grasart, verschieden gedüngt bzw. ungedüngt vergleichend analysiert werden.

Es wurde zu diesem Zweck Goldhafer (Halltal/NÖ., 2. Aufwuchs), der ausschließlich mit Stalldünger behandelt worden war (d. h. der Dünger bestand nur aus tierischen und pflanzlichen Abfallprodukten), mit Goldhafer aus dem Versuchsgarten Korneuburg, einmal ungedüngt und einmal nach sehr starker Kunstdüngerbehandlung, verglichen.

Das Pflanzenmaterial wurde, wie üblich, mit *EtOH* extrahiert, eingeeengt, der so erhaltene Rohextrakt verseift und das *US* mit Äther extrahiert. Das rohe *US* wurde, wie vorher beschrieben, auf einer Al_2O_3 -Säule chromatographiert. Die Trennung wurde durch *DC* kontrolliert, die einzelnen Fraktionen mit einer Referenz-Sterin-Mischung verglichen. Die Ausbeuten an Roh-Sterinen betrug etwa 185 mg (entsprechend 0,19% vom Frischgras). Ein quantitativer *DC*-Vergleich der Sterin-Fraktion mit einer Sterin-Lösung bekannter Konzentration ergab einen Gehalt von ungefähr 10 mg/100 g Frischgras (entsprechend 0,01% Sterin-Gehalt).

Der *GC*-Vergleich der Sterin-Fraktion der 3 Extrakte von *Trisetum flavescens* zeigte eine weitgehende Übereinstimmung und auch große Ähnlichkeit mit der Sterin-Fraktion von *Dactylis glomerata*. Zwischen den Sterin-Fraktionen der 3 Goldhafer-Proben nach verschiedener Düngerbehandlung (Stalldünger, Mineraldünger, ungedüngt) konnte also kein Unterschied festgestellt werden.

Wie bereits anfangs erwähnt, wurden weitere sieben Grassorten (*Arrhenaterum elatium*, *Dactylis glomerata*, *Festuca pratensis*, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, *Phleum pratense*, *Poa pratensis*) auf das Vorhandensein von Unterschieden in ihren Sterin-Fraktionen untersucht. Außerdem wurde für jede Grasspezies ein Vergleich zwischen gedüngtem und ungedüngtem Material angestellt.

Das rohe *US* der 7 Grassorten, jeweils gedüngt und ungedüngt, wurde ohne weitere Auftrennung einem *GC*-Vergleich unterzogen. Es zeigte sich, daß zwischen den einzelnen Grassorten kein merklicher Unterschied besteht und daß sich auch bei gedüngtem oder ungedüngtem Material keine Abweichungen im Chromatogramm ergeben.

Experimenteller Teil

Das frische Gras wurde mit Äthanol übergossen und homogenisiert. Das Pflanzenmaterial wurde solange wiederholt mit Äthanol extrahiert, bis die überstehende Lösung nur mehr schwach grün gefärbt war. Es wurden etwa 1000 bis 1500 ml Äthanol/100 g Frischgras benötigt. Der Rohextrakt wurde im Vak. auf ein kleines Volumen eingeeengt und mit wäßrig-alkohol. KOH (Gewichtsverhältnis KOH— H_2O —*EtOH* 1:1:10) verseift. Anschließend wurde das Äthanol zum größten Teil abdestilliert, der Rückstand mit Wasser verdünnt und mit Äther extrahiert. Die Ätherphase wurde mit Wasser gewaschen, getrocknet und eingedampft: Unverseifbares (*US*) 36,5—44,5 mg/100 g Frischgras.

Säulenchromatographie

Das *US* wurde an Aluminiumoxid chromatographiert (Al_2O_3 III, Merck, üblicherweise 1 g *US* auf 45 g Al_2O_3 in einer 45 cm \times 1 cm Säule). Eluiert wurde mit Petroläther (*PÄ*)—Äther (0, 2, 5, 10, 20, 40, 100% Äther) und Äther—Äthanol (5, 10, 20, 50, 100% Äthanol). Die einzelnen Fraktionen wurden durch *DC* kontrolliert (Kieselgel 60 F, Merck, Benzol—Essigester 80:20, *Liebermann—Burchard*-Reagens). Der Gehalt an Roh-Sterinen betrug 176 mg bis 193 mg/100 g Frischgras (0,17—0,19% vom Frischgras).

Dünnschichtchromatographie

Die Schicht wurde aus MgO („MgO for Chromatographic Adsorption Analysis“ von B. D. H. 25 g in 50 ml H_2O) (nach *Kartnig*¹²) hergestellt.

Als Laufmittel wurden verwendet: Cyclohexan—Äther—Eisessig (20:80:0,5, 50:50:0,5) Benzol—Essigester (80:20) und *PÄ*—Aceton (90:10) für *St-OH* und *St-Ac*, *PÄ*—Aceton (98:2), *PÄ*—Eisessig (99,9:0,1) für *St-Ac*. Besprüht wurde mit Vanillin—Schwefelsäure und Pikrinsäure-Reagens.

Hochdruck-Flüssigchromatographie

Es wurde ein an unserem Institut entwickeltes Gerät benutzt, bestehend aus einer „Orlita“-Membran-Hochdruckpumpe, Metall-Injektorblock mit Gummiseptum und als Säule ein Polyamidschlauch (100 cm \times 0,4 cm).

Als Säulenmaterial (Adsorbens) wurde MgO („MgO for Chromatographic Adsorption Analysis“ von B. D. H.) verwendet. Das MgO wurde trocken durch Anlegen eines Wasserstrahl-Vakuums unter Klopfen in die Säule eingefüllt. Anschließend wurde einige Std. durch Durchpumpen von Fließmittel konditioniert. Als Fließmittel wurde *PÄ*—Essigester (95,5:4,5) verwendet. Der Druck am Säulenkopf betrug 15 at, der Kolbenhub 1,5 mm; damit wurde eine Durchflußgeschwindigkeit von 0,5 ml/min erreicht. 5 bis 30 mg Probe wurden in 50 bis 200 μl *PÄ* gelöst und mit einer 100 μl -Hamilton-Spritze aufgebracht. Mit einem Fraktionskollektor LKB 7000 wurden 30 Tropfen/Fraktion aufgefangen. Bei jeder Trennung wurden etwa 50 Fraktionen hergestellt. Der Inhalt der einzelnen Fraktionen wurde durch *GC* geprüft.

Gaschromatographie

Die *GC*-Analysen wurden mit einem Varian 2100 Gaschromatographen durchgeführt, der mit Glassäulen von 1,8 m \times 2,5 mm i. D. und einem Flammen-Ionisations-Detektor ausgerüstet war. Als Phasenmaterial wurde verwendet: SE-30, XE-60, QF-1, HiEff 8 B, jeweils 3% auf Chromosorb W 100/120 mesh. Die Durchflußgeschwindigkeit von N_2 betrug 20 ml/min, von H_2 20 ml/min und von Luft 300 ml/min. Die Temp. des Detektors lag 10 bis 20°, die Temperatur des Injektors 20 bis 30° über der der Säule. Die Temperatur der Säule betrug für SE-30 270°C für Kontrollanalysen (*SC*- und *HPLC*-Fraktionen) und 240°C für analytische Untersuchungen, für die anderen Phasen: XE-60: 225°, QF-1: 225°, HiEff 8 B: 240°, PMPE: 245°, DEGS: 185°C.

Massenspektrometrie

Die Massenspektren wurden mit einem Varian Mat 111-Massenspektrometer aufgenommen. Die Ionisierungsspannung betrug 70 eV, der Emissionsstrom 270 μA , es wurden 50—100 Masseneinheiten/sec durchfahren. Für kombinierte *GC/MS*-Aufnahmen wurde eine Glassäule 1,5 m \times

× 1,5 mm mit 3 % SE-30 auf Chromosorb W 100/120 mesh benutzt. Die Temp. der Säule wurde von 200° bis 280 °C mit 6°/min programmiert. Als Trägergas diente He, Durchflußgeschwindigkeit 20 ml/min.

Die Spektren nahm Herr Ing. H. Begutter auf.

Literatur

- ¹ R. Libiseller und P. Gunhold, Naturwiss. **56**, 39 (1969).
- ² R. Hegnauer, Chemotaxonomie der Pflanzen, II. Basel: Birkhäuser. 1962.
- ³ Y. Rauol, Bull. Soc. Chim. Biol. **52**, 641 (1970).
- ⁴ H. Köhler und R. Libiseller, Zbl. Vet. Med. **A 17**, 289 (1970).
- ⁵ N. A. Worker und B. J. Carillo, Nature **215**, 72 (1967).
- ⁶ R. H. Wasserman, Science **194**, 853 (1976).
- ⁷ L. J. Goad und T. W. Goodwin, Biochem. J. **99**, 735 (1966).
- ⁸ H. Köhler, pers. Mitt.
- ⁹ G. W. Patterson, Anal. Chem. **43**, 1165 (1971).
- ¹⁰ B. A. Knights, Phytochem. **4**, 857 (1965).
- ¹¹ B. N. Bowden und P. M. Williams, Phytochem. **10**, 3135 (1971).
- ¹² T. Kartnig und G. Mikula, J. Chrom. **53**, 537 (1970).