

## NEUE STERINE IN *HELIANTHUS ANNUUS*

ELFRIEDE ELIZABETH HOMBERG und HELMUT PAUL KURT SCHILLER

Bundesanstalt für Fettforschung, 44 (Westf.) Münster, Piusallee 68/76, Germany

(Eingegangen 20. November 1972. Angenommen 3. Januar 1973)

**Key Word Index**—*Helianthus annuus*; Compositae;  $\Delta^7$ -sterols; stigmasta-dienol and -trienol.

**Abstract**—Six  $\Delta^7$ -sterols were isolated from sunflower seed oil by preparative TLC. On the basis of physical and chemical data five of the  $\Delta^7$ -sterols were identified:  $\Delta^7$ -stigmastenol,  $\Delta^7$ -campestenol,  $\Delta^{7,24(28)}$ -stigmastadienol,  $\Delta^{7,24(25)}$ -stigmastadienol, and  $\Delta^{7,9(11),24(28)}$ -stigmastatrienol. The last two sterols have not previously been detected in nature.

**Zusammenfassung**—Aus Sonnenblumenöl konnten sechs  $\Delta^7$ -Sterine durch präparative DC isoliert werden. Mit Hilfe chemischer und physikalischer Untersuchungsmethoden wurden fünf von ihnen identifiziert:  $\Delta^7$ -Stigmastenol,  $\Delta^7$ -Campestenol,  $\Delta^{7,24(28)}$ -Stigmastadienol,  $\Delta^{7,24(25)}$ -Stigmastadienol und  $\Delta^{7,9(11),24(28)}$ -Stigmastatrienol. Die beiden letzt genannten Sterine sind in der Natur bisher noch nicht aufgefunden worden.

### EINLEITUNG

IN DEN letzten Jahren wurden in der Literatur zahlreiche neue Sterine beschrieben, vor allem  $\Delta^7$ - und  $\Delta^{24}$ -Sterine, die als Zwischenstufen der Biosynthese pflanzlicher Sterine angesehen werden können. Auch in Sonnenblumenöl, Safloröl, Teesamenöl, Sesamöl und Leinöl<sup>1-6</sup> wurde ein neues Sterin mit Hilfe gaschromatographischer und teilweise auch massenspektrometrischer Untersuchungen als  $\Delta^7$ -Stigmastenol identifiziert. Für einen eindeutigen Konstitutionsbeweis sind jedoch weitere chemische und physikalische Untersuchungen notwendig, die eine präparative Isolierung größerer Substanzmengen erfordern. Deshalb wurde das Gemisch der Gesamtsterine von Sonnenblumenöl mit Hilfe der präparativen DC aufgetrennt und neben den schon bekannten  $\Delta^5$ -Sterinen Sitosterin, Campesterin, Stigmasterin und Cholesterin sechs weitere Sterine mit einer  $\Delta^7$ -Doppelbindung nachgewiesen. Folgende Sterine wurden identifiziert:  $\Delta^7$ -Stigmastenol,  $\Delta^7$ -Campestenol,  $\Delta^{7,24(28)}$ -Stigmastadienol,  $\Delta^{7,24(25)}$ -Stigmastadienol,  $\Delta^{7,9(11),24(28)}$ -Stigmastatrienol. Ein weiteres  $\Delta^7$ -Sterin konnte zwar präparativ isoliert, aber noch nicht eindeutig identifiziert werden.

$\Delta^7$ -Stigmastenol wurde außer in den bereits erwähnten Fetten auch in anderen höheren

<sup>1</sup> WOLFF, J. P. (1968) *Riv. Ital. Sost. Grasse* **45**, 634.

<sup>2</sup> GRACIAN-TOUS, J. und MARTEL, J. (1969) *Grasas Aceites* **20**, 231.

<sup>3</sup> FEDELI, E., DAGHETTA, A., BARONI, D. und CORTESI, N. (1972) *Riv. Ital. Sost. Grasse* **49**, 159.

<sup>4</sup> KARLESKIND, A. (1968) *Rev. Fr. Corps Gras* **15**, 379.

<sup>5</sup> TATEO, F. (1971) *Grasas Aceites* **22**, 452.

<sup>6</sup> FIRESTONE, D., THORPE, C. W., BROWN, N. L. und BARRON, R. P. (1970) *J. Am. Oil Chemists, Soc.* **47**, 89A.

und niederen Pflanzen nachgewiesen.<sup>7-25</sup>  $\Delta^7$ -Campestenol ist ein Bestandteil der Hafersterine.<sup>26</sup> Auch das isomere  $\Delta^7$ -Ergostenol konnte schon häufiger in Pilzen und Algen nachgewiesen werden.

$\Delta^7$ -Sterine mit einer oder mehreren zusätzlichen Doppelbindungen sind bisher selten in der Natur aufgefunden worden. Nur das  $\alpha$ -Spinasterin kommt häufiger und in verschiedenen Pflanzengattungen vor. Außerordentlich selten ist dagegen das  $\Delta^{7,24(28)}$ -Stigmastadienol,<sup>7,8,23,24,27-32</sup> das wir aus Sonnenblumenöl isolieren und identifizieren konnten. Ein zweites von uns im Sonnenblumenöl nachgewiesenes Dien, das  $\Delta^{7,24(25)}$ -Stigmastadienol, wurde bisher noch nicht in der Natur entdeckt. Das dritte der isolierten Sterine enthält das bei Sterinen außerordentlich seltene  $\Delta^{7,9(11)}$ -Diensystem, das außer bei dem Triterpenoid Agnosterin bisher noch bei keinem in der Natur vorkommenden Sterin nachgewiesen werden konnte. Demnach wird auch das aus Sonnenblumenöl isolierte  $\Delta^{7,9(11),24(28)}$ -Stigmastatrienol hier erstmals erwähnt.

### ERGEBNISSE

Aus dem Sonnenblumenöl wurde zunächst das Unverseifbare isoliert und durch anschließende Fällung mit Digitonin das Gemisch der Gesamtsterine gewonnen. Diese ließen sich dünnschichtchromatographisch auf Kieselgel-Platten in  $\Delta^5$ - und  $\Delta^7$ -Sterine trennen. Die  $\Delta^7$ -Sterine wurden im Umkehrphasensystem in die Fraktionen I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> und I<sub>3</sub> aufgetrennt. I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> erwiesen sich als reine Sterine, I<sub>3</sub> als ein Gemisch aus vier Sterinen, aus denen über AgNO<sub>3</sub>-Platten noch ein Sterin I<sub>3</sub>S<sub>1</sub> präparativ abgetrennt werden konnte. Die Mischung I<sub>3</sub>S<sub>2</sub> ließ sich dünnschichtchromatographisch nicht mehr trennen.

Insgesamt konnten von der Fraktion I<sub>1</sub> 70 mg, von I<sub>2</sub> 9 mg, von I<sub>3</sub>S<sub>1</sub> 2 mg und von dem Gemisch I<sub>3</sub>S<sub>2</sub> 30 mg als Acetate isoliert werden.

Eine exakte quantitative Bestimmung der Sterinzusammensetzung im Sonnenblumenöl ist nicht möglich, da sowohl  $\Delta^5$ - und  $\Delta^7$ -Sterine als auch einige  $\Delta^7$ -Sterine untereinander bel

<sup>7</sup> JACKSON, L. L. und FREAR, D. S. (1968) *Phytochemistry* **7**, 651.

<sup>8</sup> LIU, H. K., LANGENBACH, R. J. und KNOCH, H. W. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2319.

<sup>9</sup> TOYAMA, Y. und TAKAGI, T. (1956) *Bull. Chem. Soc. Japan* **29**, 317.

<sup>10</sup> MATSUMOTO, T., WAINAI, T. und HIRAI, C. (1956) *J. Chem. Soc. Japan (Pure. Chem.)* **77**, 531.

<sup>11</sup> HEED, W. B. und KIRCHER, H. W. (1965) *Science* **149**, 758.

<sup>12</sup> DJERASSI, C., KRAKOWER, G. W., LEMIN, A. J., LIU, L. H., MILIS, J. S. und VILLOTTI, R. (1958) *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 6284.

<sup>13</sup> BENNETT, R. D., LIEBER, E. R. und HEFTMANN, E. (1967) *Plant Physiol.* **42**, 973.

<sup>14</sup> BIGLINO, G. (1961) *Congr. Sci. Farm. Conf. Comun.* **21**, Pisa 193.

<sup>15</sup> CLARK-LEWIS, J. W. und DAINES, I. (1967) *Australian J. Chem.* **20**, 1961.

<sup>16</sup> DEVYS, M. und BARBIER, M. (1967) *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 865.

<sup>17</sup> ECHEINBERGER, W. und MENKE, W. (1966) *Z. Naturforsch.* **21b**, 859.

<sup>18</sup> POPOV, St. (1969) *Dokl. Bolg. Akad. Nauk.* **22**, 293.

<sup>19</sup> SUCROW, W. und REIMERDES, A. (1968) *Z. Naturforsch.* **23b**, 42.

<sup>20</sup> TERANCHI, H., TAKEMURA, S., KAMIYA, Y. und UENO, Y. (1970) *Chem. Pharm. Bull.* **18**, 213.

<sup>21</sup> MATSUNO, T. und NAGATA, S. (1971) *Phytochemistry* **10**, 1949.

<sup>22</sup> NOWAK, R., KIM, W. K. und ROHRINGER, R. (1972) *Can. J. Botany* **50**, 185.

<sup>23</sup> KNIGHTS, B. A. (1972) *Phytochemistry* **11**, 1177.

<sup>24</sup> KNIGHTS, B. A. (1965) *Phytochemistry* **4**, 857.

<sup>25</sup> IDLER, D. R., KANDUTSCH, A. A. und BAUMANN, C. A. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4325.

<sup>26</sup> KNIGHTS, B. A. und LAURIE, W. (1967) *Phytochemistry* **6**, 407.

<sup>27</sup> FROST, D. J. und WARD, J. P. (1968) *Tetrahedron Letters* **34**, 3779.

<sup>28</sup> FIORITI, J. A., KANUK, M. J. und SIMS, R. J. (1971) *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **48**, 240.

<sup>29</sup> SUCROW, W. (1968) *Tetrahedron Letters* **20**, 2443.

<sup>30</sup> GUPTA, K. C. und SCHEUER, P. J. (1968) *Tetrahedron* **24**, 5831.

<sup>31</sup> BOWDEN, B. N. und WILLIAMS, P. M. (1971) *Phytochemistry* **10**, 3135.

<sup>32</sup> ARENE, E. O. (1972) *Phytochemistry* **11**, 2886.

der gaschromatographischen Untersuchung kritische Paare bilden. Aus den präparativ isolierten Mengen an  $\Delta^7$ -Sterinen sowie der gaschromatographischen Untersuchung des Gesamtsteringemisches läßt sich die Sterinzusammensetzung dieses Sonnenblumenöls jedoch annähernd ermitteln (Tabelle 1). Sie kann jedoch nicht als repräsentativ für alle Sonnenblumenöle gelten, da bei der Untersuchung der Öle verschiedener Sonnenblumenrassen erhebliche qualitative und quantitative Unterschiede für die  $\Delta^7$ -Sterine gefunden wurden.

TABELLE 1. QUANTITATIVE ZUSAMMENSETZUNG EINES STERINGEMISCHES AUS SONNENBLUMENÖL

Sterine	% der Gesamtsterine	Sterine	% der Gesamtsterine
$\Delta^5$ -Sterine		$\Delta^7$ -Sterine	
Cholesterin	0,9	$\Delta^7$ -Stigmasterol	11,3
Campesterin	8,7	$\Delta^7$ -Campestenol	1,5
Stigmasterin	10,4	$\Delta^{7,24(25)}$ -Stigmastadienol	3,6
Sitosterin	62,0	$\Delta^{7,24(28)}$ -Stigmastadienol	1,0
		$\Delta^{7,9(11),24(28)}$ -Stigmastatrienol	0,3
		unbekannt	0,3

Die Strukturaufklärung der  $\Delta^7$ -Sterine erfolgte mit Hilfe von UV, IR, NMR und massenspektrometrischen Untersuchungen, colorimetrischer Nachweise sowie dünn- und gaschromatographischer Verfahren. Zur eindeutigen Identifizierung wurden als Vergleichssubstanzen  $\Delta^7$ -Stigmasterol,  $\Delta^7$ -Ergosterol und  $\Delta^{7,9(11)}$ -Stigmastadienol<sup>33</sup> synthetisiert und die Untersuchungsergebnisse mit denen der isolierten Substanzen verglichen.

Als Glieder einer homologen Reihe weisen die Sterine  $I_1$  und  $I_2$  große Ähnlichkeit auf. Die gaschromatographische Untersuchung dieser Substanzen wurde auf drei verschiedenen Säulenfüllungen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften durchgeführt: 3% OV17, 3,8% UCCW 982 und 3% SE30. Auf allen drei Säulen stimmten die relativen  $R_f$  des Sterins  $I_1$  mit dem von  $\Delta^7$ -Stigmasterol überein und von  $I_2$  mit  $\Delta^7$ -Campestenol und  $\Delta^7$ -Ergosterol. Aus der Differenz der  $R_f$  zwischen den beiden Sterinen geht hervor, daß die Seitenkette von  $I_1$  um eine  $\text{CH}_2$ -Gruppe länger ist als von  $I_2$ . Nach der Hydrierung der Sterine in Eisessig über Platinoxid ergab sich eine Verkürzung der relativen  $R_f$  um den gleichen Wert wie bei der Wanderung einer  $\Delta^7$ -Doppelbindung in die 8(14)-Stellung. Unter den angegebenen Reaktionsbedingungen erfolgt bekanntlich eine derartige Isomerisierung von der  $\Delta^7$ - in die 8(14)-Position. Eine 8(14)-Doppelbindung ist als tetrasubstituierte Doppelbindung nicht hydrierbar. Während bei der gaschromatographischen Untersuchung des Gemisches  $I_3S_2$  auf einer Säule mit den stationären Phasen UCCW 982 bzw. SE30 nur eine unvollständige Trennung in zwei Komponenten erfolgte, gelang auf OV17 als stationärer Phase eine einwandfreie Fraktionierung in drei Komponenten. Die Substanz mit der kürzesten  $R_f$  (a) wurde als  $\Delta^{7,9(11),24(28)}$ -Stigmastatrienol identifiziert, gefolgt von  $\Delta^{7,24(28)}$ -Stigmastadienol (b) und  $\Delta^{7,24(25)}$ -Stigmastadienol (c). Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die relativen  $R_f$  der Sterinacetate der Fraktion  $I_3S_2$  sowie der Vergleichssubstanzen.

Alle drei Sterine haben eine längere  $R_f$  als die entsprechenden Sterine mit gesättigter Seitenkette. Eine Erhöhung der relativen  $R_f$  durch eine Doppelbindung im Sterinmolekül ist

<sup>33</sup> ANDERSON, R. C., STEVENSON, R. und SPRING, F. S. (1952) *J. Chem. Soc.* 2901.

selten; die meisten Doppelbindungen verkürzen die  $R_f$ . Nach Patterson<sup>34</sup> bewirkt eine  $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung in einem C-27 Sterin (Desmosterin) auf SE30 eine Verlängerung der  $R_f$ . Eigene Versuche an Desmosterin und Lanosterin ergaben auf SE30 ein ähnliches Resultat. OV17 bewirkt für diesen Doppelbindungstyp eine auffallend starke Verlängerung der  $R_f$ , die der Differenz zwischen den  $R_f$  von  $\Delta^7$ -Stigmastenol und dem Sterin c der Mischung  $I_3S_2$  entspricht. Daraus läßt sich ableiten, daß es sich bei diesem Sterin um  $\Delta^{7,24(25)}$ -Stigmastadienol handelt. Für das Sterin b fanden wir eine Übereinstimmung der relativen  $R_f$  auf SE30 mit dem von Patterson angegebenen Wert für  $\Delta^{7,24(28)}$ -Stigmastadienol. Sterin a hat auf SE30 und OV17 eine gegenüber  $\Delta^{7,9(11)}$ -Stigmastadienol um den gleichen Wert erhöhte  $R_f$ , wie sie durch eine  $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung hervorgerufen wird. Danach handelt es sich bei dem Sterin a um  $\Delta^{7,9(11),24(28)}$ -Stigmastatrienol. Die bisher erst einmal beobachtete Ausbildung eines Cyclopropanringes über den C-Atomen 22 und 23 führt ebenfalls zu einer Erhöhung der  $R_f$ ,<sup>35</sup> scheidet aber als Alternative für eins der  $I_3S_2$ -Sterine aus, da sich im NMR-Spektrum keine Anhaltspunkte für eine solche Konfiguration ergeben. Nach der Hydrierung der  $I_3S_2$ -Acetatmischung in Eisessig über Platinoxid trat im Gaschromatogramm nur noch ein Peak auf mit der gleichen  $R_f$  wie  $\Delta^{8(14)}$ -Stigmastenol. Unter diesen Bedingungen sind Seitenkettendoppelbindungen leicht zu hydrieren. Die  $\Delta^7$ -Doppelbindung isomerisiert in die 8(14)-Stellung. Bei der Hydrierung eines 7,9(11)-Diens erfolgt die Hydrierung einer Doppelbindung unter gleichzeitiger Wanderung der verbleibenden in die 8(14)-Position.

TABELLE 2. RELATIVE  $R_f$  (BEZOGEN AUF CHOLESTERINACETAT = 1,00) DER AUS SONNENBLUMENÖL ISOLIERTEN STERINACETATE  $I_3S_2$  UND DER VERGLEICHSSUBSTANZEN AUF VERSCHIEDENEN STATIONÄREN PHASEN

Verbindung	3% OV17	3,8% UCCW982	3% SE30
$I_3S_2$ -Acetat' a	1,84	1,71	1,71
b	1,94		
c	2,01	1,83	1,83
$\Delta^{7,9(11)}$ -Stigmastadienolacetat	1,76	1,69	1,69
$\Delta^7$ -Stigmastenolacetat	1,86	1,80	1,80

Weitere Schlüsse über die Konstitution eines Sterins lassen sich aus den Gesetzmäßigkeiten der dünnschichtchromatographischen Trennung im Umkehrphasensystem ziehen. Das Sterin  $I_1$  hatte den gleichen  $R_f$ -Wert wie Sitosterin,  $I_2$  wie Campesterin und Stigmasterin.  $\Delta^7$ -Sterine verhalten sich im Umkehrphasensystem wie  $\Delta^5$ -Sterine. Deshalb mußte es sich bei  $I_1$  um ein C-29 Sterin mit einer Doppelbindung handeln, bei  $I_2$  um ein C-28 Sterin mit einer Doppelbindung. Nach den gaschromatographischen Untersuchungen scheidet für  $I_2$  ein C-29 Sterin mit einer Ring- und einer  $\Delta^{22}$ -Doppelbindung aus. Nach den  $R_f$ -Werten der dünnschichtchromatographischen Trennung im Umkehrphasensystem müssen alle drei Sterine der Fraktion  $I_3S_2$  eine zusätzliche Doppelbindung haben, die eine Erhöhung des  $R_f$ -Wertes um zwei Einheiten bewirkt. Abweichend von den vielfach bestätigten Erfahrungen über die Gesetzmäßigkeiten der Trennung von Fettsäuren, Fettalkoholen und Glyceriden im Umkehrphasensystem entspricht bei den Sterintrennungen teilweise eine

<sup>34</sup> PATTERSON, G. W. (1971) *Anal. Chem.* **43**, 1165.

<sup>35</sup> SCHMITZ, F. J. und PATTABHIRAMAN, T. (1970) *J. Am. Chem. Soc.* **92**, 6073.

Doppelbindung nur einer Methylengruppe, z.B. in  $\Delta^{22}$ -Stellung. Bei Einführung einer  $\Delta^5$ -,  $\Delta^7$ -,  $\Delta^8$ -,  $\Delta^{24(28)}$ - oder  $\Delta^{24(25)}$ -Doppelbindung in das gesättigte Sterinmolekül entspricht sie wie bei den Fettsäuren zwei Methylengruppen. In konjugierten Systemen wie  $\Delta^{5,7}$  und  $\Delta^{8,14}$  addieren sich die Einflüsse der Doppelbindungen, die  $R_f$ -Wert Verschiebung entspricht also vier Methylengruppen. Bei  $\Delta^{7,9(11)}$ -Stigmastadienol wurde jedoch nur eine Erhöhung um drei Einheiten beobachtet. Auf Grund dieser Gesetzmäßigkeiten hatten die Sterine b und c einen um vier Einheiten erhöhten  $R_f$ -Wert gegenüber dem gesättigten C-29 Sterin und ließen sich dadurch von den Fraktionen  $I_1$  (2Einheiten) und  $I_2$  (3Einheiten) im Umkehrphasensystem dünnenschichtchromatographisch abtrennen. Das Sterin a mit drei Doppelbindungen hat gegenüber dem entsprechenden gesättigten Sterin einen um 5 Einheiten erhöhten  $R_f$ -Wert und wurde mit der darunter liegenden Zone zusammen isoliert.

Während bei der Trennung auf MgO-Platten<sup>36</sup> der  $R_f$ -Wert des Sterins  $I_1$  mit dem von  $\Delta^7$ -Stigmastenol übereinstimmte, ergab sich eine Differenz beim Vergleich des Sterins  $I_2$  mit  $\Delta^7$ -Ergostenol. Nach den Gesetzmäßigkeiten der Trennung auf MgO-Platten tritt eine solche Differenz bei  $24\alpha$ - und  $24\beta$ -Isomeren auf. Das Sterin  $I_2$  hat demnach  $24\alpha$ -Konfiguration entsprechend  $\Delta^7$ -Campesterin. Jüngst wurde eine weitere Methode zur Unterscheidung von C-24 isomeren Sterinen entwickelt, die auf den unterschiedlichen NMR-Spektren dieser Sterine beruht.<sup>37</sup>

Im Massenspektrum liegen die Molekülpeaks der beiden Sterinacetate bei  $m/e$  456 (53,1 %) bzw. 442 (36,0 %). Die Größe des Molekülpeaks weist auf eine  $\Delta^7$ -Doppelbindung hin; bei den entsprechenden  $\Delta^5$ -Derivaten wird Essigsäure abgespalten. Der Hauptpeak liegt bei  $m/e$  255 (49,9 % bzw. 40,2 %, M—Seitenkette—Essigsäure). Die Höhe dieses Peaks schließt eine Doppelbindung in 8(9)-Stellung aus.<sup>38</sup> Sämtliche von Knights<sup>39</sup> als charakteristisch für  $\Delta^7$ -Sterine angegebenen Peaks waren im Massenspektrum beider Sterine vorhanden. Alle Peaks, die aus Bruchstücken mit vollständig erhaltener Seitenkette stammen, unterschieden sich bei den beiden Sterinen um die Masse 14, alle übrigen waren identisch. Auch die Peakhöhen waren vergleichbar. Das Massenspektrum der Fraktion  $I_3S_2$  ist mit den für  $\Delta^{7,24(28)}$ -Stigmastadienol bekannten Spektren identisch.<sup>7,8,24,27,29</sup> Der Molekülpeak  $m/e$  454 ist nur schwach ausgeprägt (7 %) auf Grund der Äthylidengruppe, auf welche die Fragmentierung vorzugsweise ausgerichtet ist.<sup>24</sup> Das Auftreten eines Ions mit der Masse  $m/e$  213 zeigt, daß eine Doppelbindung in Ring A, B oder C liegt und die andere in Ring D oder in der Seitenkette. Die Hauptpeaks bei  $m/e$  313 (87,3 %) und 356 (41,5 %) sind typisch für eine Seitenkettendoppelbindung.<sup>40</sup> In  $\Delta^7$ -Sterinen ist die Intensität der Masse 313 bedeutend größer als die der Masse 356. Die Massenspektren der isomeren  $\Delta^{24(28)}$ - und  $\Delta^{24(25)}$ -Sterine sind identisch.<sup>40</sup> Die  $\Delta^{7,9(11)}$ -Sterine folgen im wesentlichen dem gleichen massenspektrometrischen Zerfallsschema wie die  $\Delta^7$ -Sterine. Da das  $\Delta^{7,9(11),24(28)}$ -Stigmastadienol in dieser Mischung nur zu weniger als 5 % enthalten war, konnte es massenspektrometrisch nicht identifiziert werden.

Aus dem NMR-Spektrum der Fraktion  $I_3S_2$  war ersichtlich, daß es sich um ein Gemisch mehrerer Sterine handeln mußte. Die Signale der C-18 und C-19 Methylgruppen sowie des olefinischen H-Atoms am C-7 waren auf Grund der  $\Delta^7$ -Doppelbindung gegenüber  $\Delta^5$ -Sterinen in den Bereich höherer Feldstärke verschoben. Die Lage der Signale für die

<sup>36</sup> SEHER, A. und HOMBERG, E. (1971) *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **73**, 557.

<sup>37</sup> THOMPSON, M. J., DUTKY, S. R., PATTERSON, G. W. und GOODEN, E. L. (1972) *Phytochemistry* **11**, 1781.

<sup>38</sup> GALLI, G. und MARONI, S. (1967) *Steroids* **10**, 189.

<sup>39</sup> KNIGHTS, B. A. (1967) *J. Gas Chromatog.* **5**, 273.

<sup>40</sup> WYLLIE, S. G. und DJERASSI, C. (1968) *J. Org. Chem.* **33**, 305.

angularen Methylgruppen entsprach der nach Zuercher<sup>41</sup> berechneten chemischen Verschiebung durch  $\Delta^{24(28)}$ -,  $\Delta^{24(25)}$ - und  $\Delta^{9(11)}$ -Doppelbindungen neben der  $\Delta^7$ -Struktur. Die Isopropyliden-Methylgruppen des 24(25)-Sterins geben charakteristische Signale bei  $\delta$  1,57 (C-26) und  $\delta$  1,66 (C-27). In den gleichen Bereich fällt jedoch auch das Dublett für die C-29 Methylprotonen der 24(28)-Sterine bei  $\delta$  1,59.<sup>27,29</sup> Das niedrige Plateau bei  $\delta$  2,84 gehört zum C-25 Proton eines 24(28)-Sterins. Nach Bates<sup>42</sup> hat dieses Sterin demnach (Z)-Konfiguration. Die Resonanz entsprechend der (E)-Konfiguration liegt bei  $\delta$  2,2. Die Signale bei  $\delta$  5,15 beruhen auf der Resonanz der olefinischen Protonen aller drei Sterine. Auf die Aufnahme von NMR-Spektren der Fraktionen I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> zur Identifizierung wurde verzichtet, weil die daraus abzuleitenden Aussagen bereits mit Hilfe der anderen Untersuchungen hinreichend geklärt werden konnten.

Im IR-Spektrum der Fraktionen I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> trat im Bereich von 3000–3100 cm<sup>-1</sup> eine schlecht zu erkennende Schulter auf der starken Bande bei 2940 cm<sup>-1</sup> auf, die auf der Absorption einer Äthylenbindung beruht. Sie fehlt bei  $\Delta^8$ -Sterinen.<sup>43</sup> Auch die schwach Absorption bei 1660 cm<sup>-1</sup> deutet auf eine Äthylenbindung hin. Sämtliche Banden für die beiden angularen Methylgruppen, weitere Methylgruppen im Ringgerüst und in der Seitenkette sowie die Absorption der Estergruppe am C-3 waren vorhanden.<sup>44</sup> Das IR-Spektrum der Fraktion I<sub>3</sub>S<sub>2</sub> unterscheidet sich nur wenig von den Spektren der Fraktionen I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub>. Charakteristisch ist jedoch die schwache Absorption bei 830 cm<sup>-1</sup>, die auf eine  $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung mit (Z)-Konfiguration hinweist.<sup>29,45</sup> Anzeichen für eine endständige Vinylgruppe waren nicht vorhanden.

Das UV-Spektrum der Fraktionen I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> zeigte im Bereich von 325–220 nm keine charakteristischen Maxima, nur die für  $\Delta^7$ -Sterine typische starke Endabsorption bei 220 nm.<sup>46</sup> Im UV-Spektrum der Fraktion I<sub>3</sub>S<sub>2</sub> erscheint ein charakteristisches, dreibandiges Spektrum bei  $\lambda_{\max}$  234,8, 242,3 und 250,5 nm, das für  $\Delta^{7,9(11)}$ -Sterine typisch ist. Eine quantitative Auswertung des UV-Spektrums zeigte, daß etwa 5% des Gemisches I<sub>3</sub>S<sub>2</sub> diese Dienkonfiguration aufweisen müssen. Die starke Endabsorption bei 220 nm wird durch die beiden anderen Sterine hervorgerufen, deren  $\Delta^7$ -Doppelbindung isoliert ist.

Die Lage der einen Doppelbindung in den Sterinen aller drei Fraktionen in  $\Delta^7$ -Stellung konnte auch durch den positiven Ausfall der Tortelli-Jaffé Reaktion<sup>47</sup> festgelegt werden. IR- und Massenspektren schlossen die alternativ mögliche Stellung in 8(9)- und 8(14)-Position aus.

Auch die modifizierte Liebermann-Burchard Reaktion<sup>48</sup> bewies sowohl durch die Schnelligkeit der Reaktion als auch durch die Intensität der Farbbildung das Vorhandensein einer  $\Delta^7$ -Doppelbindung. Bei dem Gemisch I<sub>3</sub>S<sub>2</sub> wurde das Extinktionsmaximum etwas später erreicht als bei den reinen Sterinen I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub>. Fp I<sub>1</sub> ( $\Delta^7$ -Stigmastenolacetat): 155°, Fp I<sub>2</sub> ( $\Delta^7$ -Campestenolacetat): 144°.

Von Nair und Chang<sup>49</sup> wurde über die Umwandlung von  $\Delta^{24(28)}$ -Sterinen in  $\Delta^{24(25)}$ -Isomere bei der Isolierung über Kieselgel G-Säulen berichtet. Demnach ist auch bei der

<sup>41</sup> ZUERCHER, R. F. (1963) *Helv. Chim. Acta* **46**, 2054.

<sup>42</sup> BATES, R. B., BREWER, A. D., KNIGHTS, B. A. und ROWE, J. W. (1968) *Tetrahedron Letters* **59**, 6163.

<sup>43</sup> JONES, R. N., HUMPHRIES, P., PACKARD, E. und DOBRINER, K. (1950) *J. Am. Chem. Soc.* **72**, 86.

<sup>44</sup> JONES, R. N. und COLE, A. R. H. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5648.

<sup>45</sup> DUSZA, J. P. (1960) *J. Org. Chem.* **25**, 93.

<sup>46</sup> ELLINGTON, P. S. und MEAKINS, G. D. (1960) *J. Chem. Soc.* 697.

<sup>47</sup> TORTELLI, M. und JAFFÉ, E. (1915) *Chemiker Ztg.* **39**, 14.

<sup>48</sup> IDLER D. R. und BAUMANN, C. A. (1953) *J. Biol. Chem.* **203**, 389.

<sup>49</sup> NAIR, M. G. und CHANG, F. C. (1971) *Tetrahedron Letters* **27**, 2513.

Isolierung über Kieselgel G-Platten eine solche Isomerisierung nicht auszuschließen. Um zu prüfen, ob das aus Sonnenblumenöl isolierte  $\Delta^{7,24(25)}$ -Stigmastadienol ein solches Artefakt des 24(28)-Isomeren ist, wurden die Sterine aus einer Probe des Unverseifbaren dieses Öls mit Digitonin unter Bedingungen gefällt, die ein Mitfallen der bei der gaschromatographischen Bestimmung störenden Triterpenoide und 4-Methylsterine ausschloß. In dem aus diesen Digitoniden gewonnenen Sterinacetatgemisch konnte  $\Delta^{7,24(25)}$ -Stigmastadienol einwandfrei gaschromatographisch nachgewiesen werden.

#### EXPERIMENTELLES

Zur Gewinnung größerer Mengen an Unverseifbarem wurden Portionen von je 300 g Fett mit 900 ml methanolischer KOH eine Stunde am Rückflußkühler verseift, dann ca. 400 ml MeOH abdestilliert und die Seifenlösung mit 1 l. H<sub>2</sub>O verdünnt. Aus dieser Lösung wurde auf die übliche Weise das Unverseifbare mit Et<sub>2</sub>O extrahiert. Durch Fällen mit Digitonin in 96% igem EtOH wurden die Sterine aus dem Unverseifbaren isoliert. Die im Vakuumexsiccator über P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> getrockneten Digitonide wurden mit der 10 fachen Menge an Pyridin auf 70–100° bis zur klaren Lösung erhitzt, dann das Pyridin im Vakuum weitgehend abgedampft. Der glasige Rückstand wurde zweimal mit Äther digeriert, die vereinigten Ätherauszüge dreimal mit 10% iger HCl und dreimal mit H<sub>2</sub>O gewaschen, die Ätherlösung getrocknet und der Et<sub>2</sub>O abgedampft.

Die  $\Delta^7$ -Sterine wurden aus dem Gemisch von  $\Delta^5$ -,  $\Delta^7$ -Sterinen, 4-Methylsterinen und Triterpenoiden dünnstichtchromatographisch abgetrennt auf 0,3 mm dicken Kieselgel G-Schichten mit dem Fließmittel Hexan–Et<sub>2</sub>O (1:1).<sup>50</sup> Wegen der geringen  $R_f$ -Wert Differenz zwischen  $\Delta^5$ - und  $\Delta^7$ -Sterinen ist es notwendig, die Auftrennung mit den bei der ersten Fraktionierung gewonnenen  $\Delta^7$ -Sterinen zu wiederholen. Bei der ersten Trennung können je Platte ca. 10 mg der Gesamtsterine aufgetragen werden, bei der zweiten Trennung je 2 mg.

Die  $\Delta^7$ -Sterine wurden auf mit Tetradecan imprägnierten Kieselgur G-Platten mit Me<sub>2</sub>CO–MeCN–H<sub>2</sub>O–HOAc (45:45:10:1) als Fließmittel in die drei Fraktionen I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub> und I<sub>3</sub> aufgetrennt.<sup>51</sup> Eine weitere Auftrennung der Fraktion I<sub>3</sub> in die beiden Fraktionen I<sub>3</sub>S<sub>1</sub> und I<sub>3</sub>S<sub>2</sub> war möglich auf 0,3 mm dicken Kieselgel G-Platten, die mit 15% AgNO<sub>3</sub> imprägniert waren. Als Fließmittel diente Hexan–Diisopropyläther (9:1). Die Sichtbarmachung der Zonen erfolgte mit einer 0,1% igen äthanolischen 2,7-Dichlorfluoresceinlösung, die Wiedergewinnung der Sterine aus dem Kieselgel mit Hexan.

Zur Synthese von  $\Delta^7$ -Stigmastenolacetat wurde Sitosterinacetat (11,7 g) in Hexan (100 ml) mit *N*-Bromsuccinimid (5,4 g) zum 7-Bromsitosterinacetat umgesetzt. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Aceton wurde es in Xylol mit Kollidin debromiert<sup>52</sup> und das 5,7-Stigmastadienolacetat aus Aceton umkristallisiert. Die Hydrierung der  $\Delta^5$ -Doppelbindung erfolgte mit Raney Ni in Benzol, ohne Anwendung von Druck. Aus dem Gemisch von  $\Delta^7$ -Stigmastenolacetat und nicht umgesetztem Sitosterinacetat wurde das  $\Delta^5$ -Sterin über Kieselgel G-Platten präparativ abgetrennt.<sup>50</sup> Als Fließmittel für die Sterinacetate diente Hexan–Et<sub>2</sub>O (9:1). Die Darstellung des  $\Delta^7$ -Ergostenolacetats erfolgte nach Ruyle<sup>52</sup> aus Ergosterinacetat durch Hydrierung der  $\Delta^5$ -Doppelbindung mit Raney Ni und der  $\Delta^{22}$ -Doppelbindung mit Adams Katalysator.

Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden durchgeführt in einem Allglassystem auf 3,5 m langen Glassäulen,  $\phi$  4 mm, bei einer Ofentemperatur von 265°. Als Säulenfüllungen wurden verwandt: 3% OV17 auf Supelcoport, 80–100 mesh; 3,8% UCCW 982 auf Diatoport S, 80–100 mesh und 3% SE30 auf Supelco 10 AW DMCS, 80–100 mesh.

*Anerkennungen*—Der Firma Henkel und Cie, in Sonderheit den Herren Dr. Teupel und Dr. Köhler, danken wir für die Aufnahme der Massenspektren, Herrn Dr. Bergenthal, Institut für Pharmaz. Chemie der Univ. Münster, für die Anfertigung des 60 MHz NMR-Spektrums.

<sup>50</sup> HOMBERG, E. und SEHER, A. (1972) *Z. Lebensmitt. Untersuch.* **148**, 133.

<sup>51</sup> SEHER, A. und HOMBERG, E. (1968) *Fette, Seifen, Anstrichmittel* **70**, 481.

<sup>52</sup> RUYLE, B. V., CHAMBERLIN, E. M., CHERMERDA, J. M., SITA, G. E., ALIMINOSA, L. M. und ERICKSON, R. L. (1952) *J. Am. Chem. Soc.* **74**, 5929.