

DIE QUANTITATIVE VERTEILUNG DER STERINE UND STERINDERIVATE IN ORGANEN VON SOLANUM DULCAMARA

GÜNTHER WILLUHN und JOACHIM KÖSTENS

Pharmakognostisches Institut im Fachbereich Biochemie und Pharmazie der Johann Wolfgang Goethe-Universität,
Frankfurt/M., Deutschland

(Revidiert Eingegangen 14 February 1975)

Key Word Index—*Solanum dulcamara*; Solanaceae; sterols; sterol esters; glycosides and acylated glycosides;
quantitative determination.

Abstract—The following sterols were found in the roots, stems, leaves, unripe and ripe fruits of *Solanum dulcamara*: cholesterol, sitosterol, stigmasterol, campesterol, brassicasterol, isofucosterol and 24-methylenecholesterol. The most abundant components are cholesterol, sitosterol and stigmasterol (77-84%). In all parts of the plant the sterols are present in the free form and as esters, glycosides and acylated glycosides. The total sterol content and the content of combined forms were determined photometrically. In the leaves 58% of the sterols were found in the form of glycoside (26%), acylated glycoside (29%) and ester (2%). In the roots only 25% of the sterol were found in combined form. In the other organs the ratio of free and combined sterols was intermediate. In all cases, the ester fraction was the least.

Die Blätter von *Solanum dulcamara* L. führen ein Steringemisch, das sich aus Cholesterin, 24-Methylencholesterin, Campesterin, Brassicasterin, Isofucosterin, Sitosterin und Stigmasterin zusammensetzt [1, 2]. Diese Sterine liegen im Blatt sowohl frei als auch als Ester, Glykoside und Acylglykoside vor. Bei den Glykosiden handelt es sich um Galaktoside, bei den Acylglykosiden um die Palmitinsäureester dieser Steringalaktoside [3]. Als Säurekomponente der Ester wurde ein Gemisch aus verschiedenen Fettsäuren identifiziert.

Über die qualitative und quantitative Verteilung der Sterine und Sterinderivate in verschiedenen Organen derselben Pflanze liegen bisher nur wenige Informationen vor. Aus diesem Grunde wurde bei *S. dulcamara* eine vergleichende Gehaltsbestimmung vorgenommen, die neben dem Gesamt-Steringehalt auch die Bestimmung der Anteile der freien Alkohole, der Ester, Glykoside und Acylglykoside an den Gesamt-Sterinen der Wurzeln, Stengel, Blätter, unreifen und reifen Früchten dieser Art erfaßt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Quantitative Bestimmung der Gesamt-Sterine

Zu den Analysen wurde ein kultivierter Klon der Soladulcidin-Sippe von *S. dulcamara* herangezogen. Die quantitativen Bestimmungen wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten innerhalb der Vegetationsperiode durchgeführt. Zum ersten Erntezeitpunkt hatten die Pflanzen gerade einige Blätter ausgetrieben (20.5.72). Bei der zweiten Ernte (23.6.) blühten sie, bei der dritten begannen sich die ersten Früchte zu röten (9.8.). Beim letzten Erntezeitpunkt (27.9.) waren die unteren Blätter bereits gelb. Nur diese wurden für die quantitative Analyse herangezogen.

Die Gesamt-Sterine wurden aus dem unverseifbaren Anteil der Acetonextrakte nach der modifizierten Methode von Wall und Kelly [4], bzw. Eichenberger und Grob [5] durch Farbreaktion mit Liebermann-Burchard-Reagenz bestimmt. Die Einzelkomponenten wurden durch DC- und GC-Analyse identifiziert. Das Ergebnis der Analysen ist in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Den höchsten Steringehalt von allen untersuchten Organen haben mit 103 bzw. 112 mg/100 g Droge die Blätter zum Zeitpunkt des Blühens und Fruchtens. Zu Beginn und gegen Ende der Vegetationsperiode ist ihr Gehalt geringer. In den Stengeln nimmt der Steringehalt, bezogen auf das Trockengewicht, während der Vegetationsperiode kontinuierlich ab (75–62 mg/100 g), was durch den zunehmenden Anteil an Festigungsgewebe bedingt sein dürfte. Der Steringehalt der Wurzeln entspricht dem der Stengel. Die unreifen Früchte haben nach den Blättern mit 86 mg/100 g Trockengewicht den höchsten Steringehalt. In den reifen Früchten ist der Gehalt nur noch halb so groß. Die Ursache hierfür jedoch nicht ein Abbau, sondern eine vermehrte Synthese anderer Stoffe während der Fruchtröfung sein. Der auf die Einzelfrucht bezogene absolute Steringehalt hat sich bei anderen Untersuchungen während der Fruchtröfung als unveränderlich gezeigt [6].

In der qualitativen und quantitativen Zusammensetzung treten bei den Sterinen aus den untersuchten Organen praktisch keine Unterschiede auf. Alle Organe führen die in Tabelle 1 aufgeführten sieben Sterine, mit Cholesterin, Sitosterin und Stigmasterin als Hauptkomponenten (zusammen 77–84%). Die prozentuale Zusammensetzung des Steringemisches bleibt während der Vegetationsperiode praktisch unverändert. Auffallend ist lediglich die Abnahme von Sitosterin von 51 auf 34% unter gleichzeitiger Zunahme von Stigmasterin von 10 auf 17% in den Blättern bis zum Zeitpunkt des Fruchtens. Dies deutet auf

eine Umwandlung des ersten in das letztere Sterin hin. Die Bildung von Stigmasterin durch Dehydrierung von Sitosterin wird von mehreren Autoren bei verschiedenen Pflanzen angenommen [7–10].

Quantitative Bestimmung der freien Sterine und Sterinderivate

Zu den Analysen wurden Pflanzen des kultivierten Soladulcidin-Klones von *S. dulcamara* zur Blütezeit geerntet. Die unreifen und reifen Früchte wurden zu einem späteren Zeitpunkt von Pflanzen desselben Klones geerntet.

Im Acetonextrakt aller Organe konnte durch DC-Analyse das Vorkommen von freien Sterinen, Sterinestern, Acyl-Steringlykosiden und Steringlykosiden nachgewiesen werden. Die Anteile dieser vier Sterinformen an den Gesamt-Sterinen wurden photometrisch bestimmt, indem jeweils aliquote Teile des Acetonextraktes sauer (Gesamt-Sterine) oder alkalisch vor und nach durchgeföhrter Digitoninfällung (Ester und freie Sterine bzw. Estersterine) hydrolysiert und die Acyl-Steringlykoside und Steringlykoside durch präparative DC vorher isoliert wurden. Die Summe der auf diesem Wege ermittelten Anteile der freien Sterine und der drei Sterinderivate an den Gesamt-Sterinen sollte hierbei mit dem ermittelten Wert der Gesamt-Sterinbestimmung übereinstimmen. Die durchschnittliche Abweichung lag bei 7%. Das Ergebnis dieser Analysen ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Der Anteil, den die einzelnen Sterinderivate an den Gesamtsterinen haben, ist in den einzelnen

Tabelle 1. Der Sterin-Gesamtgehalt (1. Spalte) und die prozentuale Zusammensetzung der Gesamt-Sterine aus verschiedenen Organen von *Solanum dulcamara* zu verschiedenen Zeiten der Vegetationsperiode

Sterin	Wurzel				Stengel				Blätter				Früchte	
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	grün	rot
Gesamt-Sterine mg/100 g Droge	65	67	66	73	75	70	65	62	44	103	112	74	86	43
Proz. Verteilung														
Cholesterin	15	15	15	18	23	22	18	18	23	25	26	21	15	14
Brassicasterin	5	5	5	4	6	5	5	12	4	5	6	4	6	7
Campesterin	7	6	7	6	9	7	8	7	6	10	12	11	8	7
24-Methylen-cholesterin	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Stigmasterin	14	14	15	13	17	16	18	12	10	13	17	18	9	10
Sitosterin	52	53	51	52	40	44	45	47	51	41	34	40	55	55
Isofucosterin	6	6	6	6	4	5	5	5	5	5	4	5	6	6

I. Ernte Mai, erste Blätter entfaltet; II. Ernte Juli, Pflanzen in Blüte; III. Ernte August, erste Früchte rot; IV. Ernte September, erste Blätter sterben ab.

Tabelle 2. Der Anteil der freien Sterine, Sterinester, Steringlykoside und Acyl-Steringlykoside an den Gesamt-Sterinen in verschiedenen Organen von *Solanum dulcamara*

Organ	Gesamt-Sterine	freie Sterine	% Von den Gesamt-Sterinen		Acyl-Glykoside
	% vom TG		Ester	Glykoside	
Wurzel	0,07	74,8	9,0	10,2	6,0
Stengel	0,07	44,3	2,5	12,9	40,3
Blätter	0,10	42,4	2,0	26,3	29,3
Unreife Früchte	0,09	53,6	9,3	21,0	16,1
Reife Früchte	0,04	58,1	7,0	18,5	16,4

Organen sehr unterschiedlich. In den Blättern und in den Stengeln liegt mehr als die Hälfte der Sterine gebunden vor (58 bzw. 56%). In den Wurzeln und Früchten dominieren dagegen die freien Sterine. Als Einzelfraktion gesehen bilden diese in allen Organen die Hauptmenge der Gesamtsterine. Den geringsten Anteil an den Gesamtsterinen haben mit 2–9% in allen Organen die Sterinester. Lediglich in den Wurzeln, in denen nur ca 25% der Sterine gebunden vorliegen, sind alle drei Sterinderivate in etwa gleichen Mengen vorhanden. Auffallend ist der gegenüber den anderen Organen deutlich höhere Anteil der Acyl-Steringlykoside in den Stengeln (40% der Gesamt-Sterine). Während das Acyl-Steringlykosid/Steringlykosid-Verhältnis in den anderen Organen zwischen 0,6 und 1,1 liegt, beträgt dieses Verhältnis in den Sproßachsen 3,1.

Diese Untersuchung ist eine der ersten, in der die Verteilung der in Pflanzen vorkommenden vier Sterinformen, d.h. der freien Alkohole, der Ester, Glykoside und Acylglykoside in allen Teilen derselben Pflanze vergleichend analysiert worden ist [5]. Der dabei zutage tretende auffallende Unterschied in der prozentualen Beteiligung der genannten Sterinderivate an den Gesamt-Sterinen der einzelnen Organe—insbesondere bei den assimilierenden und nichtassimilierenden Organen—könnte Ausdruck einer bestimmten Funktion dieser Verbindungen in den einzelnen Organen sein. Sterine, Steringlykoside und Acyl-Steringlykoside werden als Bestandteile der zellulären Membranen diskutiert [5, 11–13]. Die unterschiedlichen Anteile der einzelnen Sterinderivate in den untersuchten Organen können so durch die Unterschiede in der quantitativen und auch qualitativen Organell-Zusammensetzung der Zellen dieser Organe bzw. durch den unterschied-

lichen Charakter der Zellmembranen in diesen Organen bedingt sein.

EXPERIMENTELLES

Bestimmung der Gesamt-Sterine. Die quantitative Bestimmung der Sterine und Sterinderivate erfolgte photometrisch unter Verwendung der Farbreaktion mit Liebermann-Burchard-Reagenz. Zur Aufstellung der Eichkurve wurde das aus *S. dulcamara* isolierte Steringemisch herangezogen. Dazu wurden 0,2–0,8 mg in CHCl_3 gelöste Sterine wie bei der späteren quantitativen Bestimmung auf DC-Alufolien Kieselgel aufgetragen, mit $\text{CHCl}_3\text{-EtOH}$ (99:1) entwickelt und die Sterinzone herausgeschnitten (hR_f , 38). Die Elution der Sterine erfolgte mit $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (4:1) unter Verwendung des Desaga-Elutors. Nach Eindampfen der Eluate wurde der Rückstand nacheinander mit 1,00 ml Eisessig, 2,00 ml Essigsäureanhydrid und 0,10 ml konz. H_2SO_4 versetzt. Die Lösung wurde unter kräftigem Umschwenken 30 Min. in einem thermostatierten Wasserbad bei 24°C gehalten und die Extinktion in 10 mm Schichtdicke bei 680 nm mit dem Spektralphotometer gemessen.

Jeweils 12,5 g der gemahlenen Droge von den zu vier verschiedenen Zeitpunkten in der Vegetationsperiode geernteten Pflanzen wurden 3 Tage lang im Soxhlet mit Me_2CO extrahiert. Die Extrakte—Wurzeln 492–593 mg, Stengel 433–537 mg, Blätter 852–1130 mg, grüne Früchte 3200 mg, rote Früchte 3740 mg—wurden in 25 ml EtOH + 0,5 g H_2SO_4 konz. gelöst und 15 Std. am Rückfluß gekocht. Nach Abkühlen wurden 15 ml 10%ige äthanolische KOH zugesetzt und erneut 30 Min. zum Sieden erhitzt. Zum Hydrolysat wurde Petrol und soviel H_2O zugefügt, bis sich zwei Phasen bildeten. Nach Abtrennen des Petrols wurde die wässrige Phase 5mal mit je 25 ml Petrol ausgeschüttet und die vereinigten Petrol-Auszüge 2 × mit je 10 ml 90%igem MeOH gewaschen. Zur Entfernung der Carotinoide wurde die eingeengte Petrollösung mit Jod behandelt [4]. Der danach zur Trockne eingedampfte unverseifbare Anteil wurde in 2 ml CHCl_3 gelöst. Mit 2mal 0,1 ml und 2mal 0,2 ml dieser Lösung wurden wie bei der Aufstellung der Eichkurve beschrieben nach DC-Abtrennung die Sterine photometrisch bestimmt. Durchschnittliche Abweichung vom Mittelwert der 4 Bestimmungen 3%, maximale Abweichung 4%.

Bestimmung der Sterinderivate. DC-Nachweis: Kieselgel G, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (19:3); hR_f -Werte: Sterinester 81, freie Sterine 67, Acyl-Steringlykoside 53, Steringlykoside 39. Jeweils 50 g der getrockneten und gemahlenen Pflanzenorgane wurden 3 Tage lang im Soxhlet mit Me_2CO etrahiert, der Extrakt eingeengt und im Meßkolben mit Me_2CO auf 100 ml gebracht. Diese wurden in vier gleiche Teile geteilt.

Teil 1: Bestimmung der Gesamt-Sterine, wie dort beschrieben.

Teil 2: Bestimmung der freien und veresterten Sterine. Der Rückstand wurde in 25 ml 95%igem EtOH gelöst und nach Zugabe von 15 ml 10%iger äthanolischer KOH 30 Min. am Rückfluß hydrolysiert. Die Sterine im Unverseifbaren wurden, wie bei den Gesamt-Sterinen beschrieben, bestimmt.

Teil 3: Bestimmung der Sterinester. Der Rückstand wurde in 25 ml EtOH gelöst und mit Petrol ausgeschüttelt. Der Rückstand des Petrolextraktes wurde erneut in 25 ml EtOH aufgenommen, in der Siedehitze mit 10 ml einer Lösung von 2% Digitonin in 80%igem EtOH versetzt, noch etwa 1 Min. lang gekocht, danach mit 6 ml Wasser versetzt und kurz zum Sieden gebracht. Der Ansatz blieb über Nacht im Kühlenschrank. Nach Abtrennung der Digitonide wurde das Filtrat eingedampft und der Rückstand mit 15 ml 10%iger äthanolischer KOH 30 Min. lang gekocht. Die Sterine im Unverseifbaren wurden wie angegeben bestimmt.

Teil 4: Bestimmung der Steringlykosome und Acyl-Sterin glykoside. Zweimal 2 ml des Extraktes wurden jeweils auf 5 DC-Alufolien Kieselgel mit dem Laufmittel $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (6:1) präparativ aufgetrennt und die Zone der Steringlykosome (hR_f 63) und Acyl-Steringlykosome (hR_f 39) mit $\text{Me}_2\text{CO-MeOH}$ (1:1) eluiert. Die vereinigten Eluate von 5 Platten wurden eingeengt und die Rückstände mit 10 ml 2%iger äthanolischer H_2SO_4 15 Std. am Rückfluß gekocht. Die freigesetzten Sterine im Unverseifbaren wurden wie beschrieben bestimmt.

DC- und GC-Analyse der Gesamtsterine. Aus dem nicht zur quantitativen Bestimmung der Gesamt-Sterine benötigten unverseifbaren Anteilen wurden die Sterine durch präparative DC isoliert. Ein Teil wurde acetyliert und die freien Sterine

sowie ihre Acetate durch DC-Analyse in mehreren Systemen und GC-Analyse an Silicongummi SE 52 und Neopentenylglykolsuccinat wie bereits früher beschrieben [1] identifiziert.

Dankadresse—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danken wir für die Unterstützung der Arbeit durch eine Sachbeihilfe.

LITERATUR

1. Willuhn, G. und Köstens, J. (1974) *Planta Med.* **25**, 115.
2. Willuhn, G. und Köstens, J. (1975) *Herba Hung.* **15**, im Druck.
3. Willuhn, G. und Köstens, J. (1973) *Planta Med.* **24**, 278.
4. Wall, M. E. und Kelly, E. C. (1947) *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **19**, 677.
5. Eichenberger, E. und Grob, E. C. (1970) *FEBS Letters* **11**, 177.
6. Willuhn, G. (1967) *Planta Med.* **15**, 58.
7. Bennett, R. D., Heftmann, E., Preston, W. H. und Haun, J. R. (1963) *Arch. Biochem. Biophys.* **103**, 74.
8. Jacobsen, G. M. und Frey, M. J. (1968) *Arch. Biochem. Biophys.* **127**, 655.
9. Bennett, R. D. und Heftmann, E. (1969) *Phytochemistry* **8**, 2325.
10. Knapp, F. F. und Nicholas, H. J. (1971) *Phytochemistry* **10**, 85.
11. Brandt, R. D. und Benveniste, P. (1972) *Biochim. Biophys. Acta* **282**, 85.
12. Grünwald, C. (1970) *Plant. Physiol.* **45**, 663.
13. Kemp, R. J. und Mercer, E. J. (1968) *Biochem. J.* **110**, 111.