

STERINE IN *TRICHOSANTHES KIRILOWII*

ELFRIEDE ELISABETH HOMBERG und ARTUR SEHER

Bundesanstalt für Fettforschung, 4400 Münster, W. Germany

(Received 31 May 1976)

Key Word Index—*Trichosanthes kirilowii*; Cucurbitaceae; Δ^5 -sterols; Δ^7 -sterols.

Abstract—Four Δ^5 -sterols and six Δ^7 -sterols were isolated from the seed oil of *Trichosanthes kirilowii* and identified as campesterol, sitosterol, stigmasterol, Δ^7 -campesterol, $\Delta^{7,22}$ -stigmastadienol, 24-ethylcholesta-5,25-diene-3 β -ol, 24-ethylcholesta-7,24(25)-diene-3 β -ol, 24-ethylcholesta-7,25-diene-3 β -ol, and 24-ethylcholesta-7,22,25-triene-3 β -ol.

EINLEITUNG

Trichosanthes kirilowii Max. (Cucurbitaceae) ist eine koreanische Wildpflanze, deren Samen wegen ihres hohen Ölgehaltes (ca 29 %) als Quelle für die Gewinnung von Speiseölen in Betracht gezogen wird. Die Samen anderer Kürbisarten werden bereits zur Ölgewinnung verwandt. Die Sterin Zusammensetzung in Kürbiskernöl weicht auffallend vom Sterinmuster der meisten anderen Öl pflanzen ab [1-3]. Sie besteht hauptsächlich aus Δ^7 -Sterinen, die teilweise eine bisher noch selten nachgewiesene Δ^{25} -Doppelbindung aufweisen. Diese könnte als typisch für Cucurbitaceensterine angesehen werden. Aus dem komplexen Steringemisch von *Trichosanthes kirilowii* ließ sich nur ein Sterin präparativ dünnenschichtchromatographisch abtrennen. Die Identifizierung dieses Sterins sowie der übrigen Sterine des Gemisches erfolgte mit Hilfe chemischer Reaktionen, durch Gaschromatographie, Massenspektroskopie, IR- und UV-Spektrometrie. Campesterin, Δ^7 -Campesterin, Stigmasterin und 24-Äthylcholesta-7,24(25)-dien-3 β -ol liegen nur in geringen Mengen vor. Die Hauptsterine sind $\Delta^{7,22}$ -Stigmastadienol und 24-Äthylcholesta-7,22,25-trien-3 β -ol. Sitosterin, Δ^7 -Stigmastenol, 24-Äthylcholesta-5,25-dien-3 β -ol und 24-Äthylcholesta-7,25-dien-3 β -ol stellen ebenfalls einen wesentlichen Anteil am Gesamtsteringemisch. $\Delta^{7,24(28)}$ -Stigmastadienol, das in verschiedenen Spezies der Cucurbitaceen gefunden wurde und als Vorläufer der anderen Stigmastenole angesehen wird [4], konnte in *Trichosanthes kirilowii* nicht nachgewiesen werden.

ERGEBNISSE

Aus den zerkleinerten Samen wurde das Öl mit Hexan extrahiert und daraus das Unverseifbare gewonnen. Die Isolierung der Sterinzone erfolgte dünnenschichtchromatographisch auf Kieselgelpfatten. Eine Trennung der nur geringe R_f -Wert Differenzen aufweisenden Δ^5 - und Δ^7 -Sterine war in diesem Gemisch nicht möglich. Das Steringemisch wurde auf AgNO_3 -haltigen Platten in zwei Fraktionen aufgetrennt, von denen die polarere (F_1) das dreifach ungesättigte Sterin und die weniger

polare (F_2) das Gemisch der zweifach und einfach ungesättigten Sterine enthielt.

Eine exakte quantitative Bestimmung der Sterin Zusammensetzung ist schwierig, da bei der gaschromatographischen Untersuchung des Gesamtgemisches kritische Paare auftreten und teilweise nur geringe Differenzen zwischen den relativen Retentionszeiten der einzelnen Sterine bestehen. Auf OV_{25} bilden sich nur zwei kritische Paare: $\Delta^{7,22}$ -Stigmastadienol und 24-Äthylcholesta-5,25-dien-3 β -ol sowie Δ^7 -Stigmastenol und 24-Äthylcholesta-7,25-dien-3 β -ol. Die Δ^{22} -Doppelbindung läßt sich mit Raney Ni als Katalysator selektiv hydrieren, so daß in dem Gaschromatogramm der hydrierten Probe eine Unterscheidung der beiden Komponenten dieses kritischen Paars möglich ist. Das andere Paar wird auf Dexsil 300 getrennt. Die Tabelle 1 gibt einen Überblick über die quantitative Zusammensetzung des Steringemisches.

Tabelle 1. Quantitative Zusammensetzung eines Steringemisches aus dem Samenöl von *Trichosanthes kirilowii*

Sterine	% der Gesamtsterine
Campesterin	0,9
Sitosterin	10,4
Stigmasterin	1,5
24-Äthylcholesta-5,25-dien-3 β -ol	12,1
Δ^7 -Campesterin	0,6
Δ^7 -Stigmastenol	4,9
$\Delta^{7,22}$ -Stigmastadienol	29,4
24-Äthylcholesta-7,24(25)-dien-3 β -ol	0,6
24-Äthylcholesta-7,25-dien-3 β -ol	10,9
24-Äthylcholesta-7,22,25-trien-3 β -ol	28,7

Die Strukturaufklärung der Sterine erfolgte mit Hilfe von UV, IR und massenspektrometrischen Untersuchungen sowie gaschromatographischen Bestimmungen der TMSi-Äther auf sieben verschiedenen Säulen mit unterschiedlichen Trenneigenschaften. Durch die charakteristischen Peakverschiebungen auf Grund der unterschiedlichen Doppelbindungstypen auf den verschiedenen polaren Phasen kann ein hoher Grad an Charak-

Tabelle 2. RR, (benzogen auf Cholesterin TMSi-Äther = 1,00) der aus dem Samenöl von *Trichosanthes kirilowii* isolierten Sterine und der Vergleichssubstanzen als TMSi-Äther auf verschiedenen stationären Phasen

Verbindung	SE ₃₀	D ₃₀₀	QF ₁	OV ₁₇	OV ₂₅	HJ-EFF-8BP	Silar 5 CP
Cholesterin	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Campesterin	1,29	1,28	1,33	1,30	1,30	1,31	1,30
Stigmasterin	1,40	1,34	1,37	1,40	1,41	1,36	1,36
Sitosterin	1,60	1,56	1,63	1,60	1,61	1,59	1,57
24-Äthylcholesta-5,25-dien-3 β -ol	1,54	1,52	1,55	1,64	1,70	1,65	1,70
Δ^7 -Campesterin	1,43	1,43	1,49	1,52	1,55	1,58	1,60
$\Delta^{7,22}$ -Stigmastadienol	1,60	1,58	1,53	1,65	1,69	1,66	1,72
24-Äthylcholesta-7,22,25-trien-3 β -ol	1,56	1,52	1,58	1,74	1,85	1,87	1,92
24-Äthylcholesta-7,25-trien-3 β -ol	1,73	1,72	1,76	1,90	1,96	2,04	2,06
Δ^7 -Stigmasterol	1,79	1,80	1,84	1,86	1,93	1,91	1,93
24-Äthylcholesta-7,24(25)dien-3 β -ol	1,93	2,03	1,97	2,16	2,19	2,22	2,27
I	1,28	1,27	1,32	1,30	1,31	1,31	1,29
II	1,39	1,33	1,38	1,41	1,42	1,37	1,35
III	1,43	1,43	1,49	1,51	1,53	1,59	1,56
IV	1,57	1,55	1,59	1,62	1,61	1,67	1,68
VI	1,80	1,71	1,83	1,90	1,84	1,92	2,06
VII	1,93	1,79	1,97	2,15	1,94	2,05	2,25
VIII		2,03			2,18	2,22	

terisierung erreicht werden. Die Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die relativen Retentionszeiten der TMSi-Äther der zehn isolierten Sterine sowie der Vergleichssubstanzen auf den sieben verschiedenen stationären Phasen.

Auch die hydrierten Produkte wurden gaschromatographisch untersucht. Bei der Hydrierung über Raney Ni in Benzol bei Raumtemperatur wird die Δ^{22} -Doppelbindung quantitativ abgesättigt [5], während die $\Delta^{24(25)}$ - und die Δ^{25} -Doppelbindung nicht angegriffen werden. Diese lassen sich über PtO₂ in Äthylacetat hydrieren. Eine Isomerisierung der Δ^7 - in die $\Delta^{8(14)}$ -Stellung findet statt, wenn die Hydrierung in Eisessig über PtO₂ durchgeführt wird. Die massenspektrometrische Untersuchung der Fraktion F₂ gab weitere Aufschlüsse über Molekulargewicht und Doppelbindungen der Sterine dieses Gemisches. Die Größe der Molekülpeaks *m/e* 414 und *m/e* 412 deutet auf C₂₉-Sterine mit einer Δ^7 -Doppelbindung hin, *m/e* 412 hat noch eine zusätzliche Doppelbindung. Aus den Δ^5 -Sterinen wird teilweise Wasser abgespalten, so daß zusätzliche Peaks mit Massen von *m/e* 394 (24-Äthylcholesta-5,25-dien-3 β -ol und Stigmasterin), *m/e* 396 (Sitosterin) und 382 (Campesterin) entstehen. Der Hauptpeak im Spektrum des Gemisches liegt bei *m/e* 271 und ist charakteristisch für Sterine, die eine ungesättigte Seitenkette aufweisen. Typisch für ungesättigte Seitenketten ist auch die Masse *m/e* 300. Die Fragmentierung läßt keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Lage der Doppelbindung in der Seitenkette zu. Der Molekülpeak im Massenspektrum der Fraktion F₁ weist auf ein C₂₉-Sterin mit drei Doppelbindungen hin, die Höhe des Peaks auf ein Δ^7 -Sterin. Der Hauptpeak bei *m/e* 271 sowie ein intensiver Peak bei *m/e* 300 zeigen an, daß auch dieses Sterin eine ungesättigte Seitenkette hat.

In den IR-Spektren der Fraktionen F₁ und F₂ findet sich eine schwach ausgebildete Schulter im Bereich von 3010–3040 cm⁻¹, die den C-H-Valenzschwingungen der Δ^5 - bzw. Δ^7 -Doppelbindungen zuzuordnen ist, sowie eine schwache Absorption bei 3080 cm⁻¹ durch die disubstituierte Δ^{25} -Doppelbindung. Absorptionen mit schwacher Intensität treten auch im Bereich von

1140–1670 cm⁻¹ auf durch die verschiedenen Doppelbindungstypen. Die Absorptionsbande bei 970 cm⁻¹ weist auf eine disubstituierte *trans* 22–23-Doppelbindung hin. Eine starke Bande bei 887 cm⁻¹ ist charakteristisch für eine endständige Methylengruppe, wie sie z.B. in Δ^{25} -Sterinen vorkommt [6]. Nach der Hydrierung über Raney Ni in Benzol war die Bande bei 970 cm⁻¹ (Δ^{22}) verschwunden, nach der weiteren Hydrierung über PtO₂ in Äthylacetat auch die bei 887 cm⁻¹ (Δ^{25}).

Das UV-Spektrum der Fraktionen F₁ und F₂ zeigt im Bereich von 325–220 nm keine charakteristischen Maxima, nur die für Δ^7 -Sterine typische starke Endabsorption bei 220 nm.

EXPERIMENTELLES

Die trockenen Samen wurden in einer Gewürzmühle zerkleinert und die Gesamtlipide mit Hexan extrahiert. Daraus wurde nach der Äthermethode das Unverseifbare gewonnen. Die Gesamtsterine wurden dünnenschichtchromatographisch abgetrennt auf 0,3 mm dicken Kieselgel-G-Schichten mit dem Fließmittel Hexan-Äther 1:1 [7]. Eine weitere Fraktionierung erfolgte auf Kieselgelplatten, die mit 5% AgNO₃ imprägniert waren; Fließmittel CHCl₃-Me₂CO (9:1). Sichtbarmachung der Zonen durch Besprühen mit einer 0,1%igen äthanolischen Dichlorfluoresceinlösung. Die GLC Untersuchung der Sterine erfolgte als TMSi-Äther mit einem Perkin-Elmer-Gaschromatographen F_{2,2} mit FID, 3,5 m \times 4 mm Glassäulen, Trägergasstrom (N₂) eingestellt auf eine Retentionszeit von 30 min für Cholesterin-TMSi-Äther. Sieben verschiedene stationäre Phasen wurden verwandt: 2% Dexsil 300 auf Chromosorb W, AW, 80–100 mesh 285° 3% SE₃₀ auf Chromosorb W, AW, DMCS, 80–100 mesh 253° 3% QF₁ auf Chromosorb W, AW, DMCS, 80–100 218° 3% OV₁₇ auf Chromosorb W, AW, DMCS, 80–100 mesh 265° 3% OV₂₅ auf Chromosorb W, AW, DMCS, 80–100 mesh 260° 3% HJ-EFF-8BP auf Chromosorb W, AW, DMCS, 80–100 mesh 238° 3% Silar 5 CP auf Chromosorb W, AW, DMCS, 80–100 mesh 240°. Die freien Sterine wurden fünf Stunden über Raney Ni in Benzol bei Raumtemperatur hydriert. Nach der GLC und IR-spektrometrischen Untersuchung dieses Gemisches wurde weitere fünf Stunden über PtO₂ in EtOAc bei Raumtemperatur hydriert.

Die Vergleichssubstanzen entstammten teils dem Handel: Cholesterin, Campesterin, Stigmasterin, Sitosterin, oder wurden synthetisiert: Δ^7 -Campesterin und Δ^7 -Stigmasterin [8, 9], $\Delta^{1,22}$ -Stigmastadienol [10]. Aus einem in seiner Zusammensetzung bekannten Steringemisch von Sonnenblumenöl wurde 24-Äthylcholesta-7,24(25)-dien-3 β -ol isoliert und aus Kürbiskernöl 24-Äthylcholesta-7,25-dien-3 β -ol und 24-Äthylcholesta-7,22,25-trien-3 β -ol. Die gaschromatographische Zuordnung des 24-Äthylcholesta-5,25-dien-3 β -ols erfolgte an Hand bekannter chromatographischer Gesetzmäßigkeiten [11].

Anerkennungen—Herrn Dr. H. Schiller danken wir für die Aufnahme der Massenspektren und Frau Birgitta Bielefeld für gewissenhafte und sorgfältige technische Assistenz bei der Durchführung dieser Arbeit.

LITERATUR

1. Sucrow, W. und Reimerdes, A. (1968) *Z. Naturforsch.* **23 b**, 42.

2. Sucrow, W. (1968) *Tetrahedron Letters* **20**, 2443.
3. Matsuno, T. und Nagata, S. (1971) *Phytochemistry* **10**, 1949.
4. Sucrow, W. und Raduechel, B. (1970) *Phytochemistry* **9**, 2003.
5. Kircher, H. W. und Rosenstein, F. U. (1973) *Lipids* **8**, 101.
6. Barnard, D., Bateman, L., Harding, A. J., Koch, H. P., Sheppard, N. und Sutherland, G. B. B. M. (1950) *J. Chem. Soc. (London)* 915.
7. Homberg, E. und Seher, A. (1972) *Z. Lebensmitt. Untersuch.* **148**, 133.
8. Kircher, H. W. (1974) *Lipids* **9**, 623.
9. Fieser, L. F. und Herz, J. E. (1953) *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 121.
10. Fieser, L. F., Fieser, M. und Chakravarti, R. N. (1949) *J. Am. Chem. Soc.* **71**, 2226.
11. Homberg, E. (1976) *Fette, Seifen, Anstrichmittel* (in Vorbereitung).

Phytochemistry, 1977, Vol. 16, pp. 290-291, Pergamon Press, Printed in England.

PRODUCTION OF METHYLATED PHENOLIC ACIDS BY SPECIES OF *LENTINUS* (BASIDIOMYCETES)

CHI-KIT WAT and G. H. NEIL TOWERS

Department of Botany, The University of British Columbia, Vancouver, B.C. Canada

(Received 25 August 1976)

Key Word Index—*Lentinus*; *Lentinellus*; Basidiomycetes; methylated phenolic acids; cinnamate metabolism.

Lentinus lepideus is a suitable organism for studies of cinnamate metabolism because it readily produces the methyl esters of a number of substituted cinnamic acids when grown in liquid culture [1,2]. We have examined the following species of *Lentinus* and of *Lentinellus*, a closely related genus, for their ability to produce these compounds: *Lentinus lepideus* Fr., *L. ponderosus* O.K. Miller, *L. edodes* (Berk.) Singer, *L. kauffmanii* Smith, *L. tigrinus* Bull. ex Fr., *L. sulcatus* Berk, and *Lentinellus vulpinus* (Fr.) Kuhner & Maire, *L. cochleatus* (Fr.) Karst.

Of these only *Lentinus lepideus* and *L. ponderosus* produced methyl esters of phenolic acids when grown under our conditions [3]. *L. ponderosus* yielded methyl cinnamate, methyl *p*-methoxycinnamate, methyl isoferulate and methyl anisate. *L. lepideus* produced methyl *p*-coumarate in addition to these compounds. The other fungi also produced phenolic compounds but they have not been identified. Neither *L. lepideus* nor *L. ponderosus* produced detectable amounts of free *p*-coumaric, caffeic or isoferulic acids and there were no qualitative or quantitative differences between light and dark grown cultures of *L. ponderosus*. *L. lepideus* has been previously reported to produce methyl *p*-methoxycinnamate when cultured in dark [4]. Light, therefore, does not seem to play a role in the regulation of cinnamate metabolism in these two species. Increased production of phenylalanine ammonia lyase, the enzyme which catalyzes the synthesis of cinnamate from L-phenylalanine, occurs when certain Basidiomycetes are cultured in light, but this is not a general phenomenon [5,6].

We have previously reported the occurrence, in *L. lepideus*, of a *p*-specific *O*-methyltransferase which can only methylate methyl esters of *p*-hydroxycinnamic acids [3]. This enzyme also occurs in *L. ponderosus*. We also have indirect evidence that a similar enzyme is produced by the rust, *Uromyces phaseoli*, the uredospores of which produce a germination inhibitor, methyl *cis*-3,4-dimethoxycinnamate [7]. Leaves of the Mexican bean, when infected by this fungus, yield an *O*-methyltransferase which catalyzes the methylation of methyl *p*-coumarate but not *p*-coumaric acid. Preparations from uninfected leaves are unable to methylate either methyl *p*-coumarate or *p*-coumaric acid [8].

'Woody' bracket fungi do not produce typical lignins of higher plants. This has been shown with *Polyporus* and *Fomes* [9], and more recently with *Phellinus igniarius* [10]. These results appear to confirm the prediction of Swain who stated in 1971 that "it appears, therefore that the fungi possess all the necessary enzymic system to produce lignin precursors, except one. This is the enzyme which catalyzes the methylation of the hydroxyl group oriented *meta* to the side chain, which would yield ferulic acid from caffeic acid . . ." [11].

EXPERIMENTAL

Culture conditions. All cultures were incubated in 200 ml medium in 500 ml Erlenmeyer flasks as described previously [3].

TLC, PC and GLC. TLC and PC have also been described previously [3]. GLC was carried out with a Tracor 500 Gas