

STERINE UND TRITERPENOIDE—V¹

ÜBER DIE 4 α -METHYL-STERINE DER KARTOFFELPFLANZE *SOLANUM TUBEROSUM* L.²

K. SCHREIBER und G. OSSKE³

Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben der Deutschen Akademie der
Wissenschaften zu Berlin

(Received 1 July 1964)

Abstract—In addition to cycloartenol, stigmasterol, β -sitosterol, campesterol and cholesterol a mixture of 4 α -monomethyl sterols has been isolated from leaves of the potato plant, *Solanum tuberosum* L., which is probably identical with α_1 -sitosterol. The structure of the main component of this mixture has been established as 4 α -methyl-5 α -stigmasta-7,24(28)-diene-3 β -ol (24-ethylidene-lophenol, III). Molecular mass spectrographic and gas chromatographic investigations indicated in addition to III two minor 4 α -methyl sterols, lophenol (I) and a yet unknown sterol, the structure of which was tentatively assumed to be 24-methylene-lophenol (II).

IN FRÜHEREN Mitteilungen^{4,5} berichteten wir, dass im unverseifbaren Anteil des Petrolätherextrakts von Blättern der Kartoffelpflanze *Solanum tuberosum* 'Aquila' 3 digitoninfällbare Fraktionen A–C vorkommen. Sie liessen sich dünnschichtchromatographisch differenzieren und durch Säulenchromatographie an Silicagel bzw. Florisil präparativ trennen (Mengenverhältnis: Fraktion A 60·4%, B 6·8%, C 32·8%).

Bei Fraktion A handelt es sich im wesentlichen um das Triterpen Cycloartenol (9 β ,19-Cyclo-5 α -lanost-24-en-3 β -ol).⁵ Durch Molekül-Massenspektrographie (negative Ionisierung⁶) liess sich in geringer Menge eine Begleitsubstanz der Masse 440 nachweisen, die mit 24-Methylen-cycloartanol⁷ bzw. Cyclolaudenol ((24S)-24-Methyl-9 β ,19-cyclo-5 α -lanost-25-en-3 β -ol)⁸ identisch sein dürfte. Auf das gemeinsame Vorkommen von Cycloartenol und 24-Methylen-cycloartanol im Reiskleieöl sei hingewiesen.⁹

Fraktion C besteht hauptsächlich aus β -Sitosterin.⁴ Daneben liessen sich auch hier Begleitsterine massenspektrographisch nachweisen, und zwar Stigmasterin, Campesterin und Cholesterin.⁶ Die Anwesenheit von Stigmasterin wurde IR-spektroskopisch gesichert (Bande bei 970 cm⁻¹)⁴. Das Vorkommen von Cholesterin in *S.*

¹ IV. Mitteil. K. Schreiber und G. Osske, *Tetrahedron* **20**, 1803 (1964).

² Vorläufige Mitteil. K. Schreiber und G. Osske, *Experientia* **19**, 69 (1963).

³ Teil der Dissertation von G. Osske, Univ. Halle (1963).

⁴ K. Schreiber, G. Osske und G. Sembdner, *Experientia* **17**, 463 (1961).

⁵ K. Schreiber und G. Osske, *Kulturpflanze* **10**, 372 (1962).

⁶ M. v. Ardenne, K. Steinfelder, R. Tümmeler und K. Schreiber, *Experientia* **19**, 178 (1963); ausführliche Veröffentlichungen sind in Vorbereitung.

⁷ G. Ohta und M. Shimizu, *Chem. & Pharm. Bull.* **6**, 325 (1958); G. Ohta, *Ibid.* **8**, 5, 9 (1960).

⁸ H. R. Bentley, J. A. Henry, D. S. Irvine, D. Mukerji und F. S. Spring, *J. Chem. Soc.* 596 (1955); J. A. Henry, D. S. Irvine und F. S. Spring, *Ibid.* 1607 (1955).

⁹ M. Shimizu, G. Ohta, S. Kitahara, G. Tsunoo und S. Sasahara, *Pharm. Bull.* **5**, 36 (1957); G. Ohta und M. Shimizu, *Ibid.* **5**, 40 (1957); M. Shimizu und G. Ohta, *Chem. & Pharm. Bull.* **8**, 108 (1960).

tuberosum wurde fast gleichzeitig und unabhängig von uns durch andere Autoren¹⁰ bestätigt. Auf den wechselnden Campesteringehalt von β -Sitosterinpräparaten ist von Thompson und Mitarb.¹¹ hingewiesen worden.

Auch Fraktion B erwies sich als nicht einheitlich. Sie liess sich durch Säulenchromatographie an Florisil in 2 Komponenten, B₁ und B₂, auftrennen, die sich dünnschichtchromatographisch weniger durch ihre R_F -Werte als durch ihre Farbreaktionen beim Nachweis mit Cer(IV)-sulfat-Reagens unterscheiden (B₁ gelbe, B₂ blaurote Färbung).

Die etwas schwächer polare Komponente B₁ schmolz nach mehrfacher Chromatographie an Florisil und verlustreicher Umkristallisation aus Methanol unscharf bei 129° und hat $[\alpha]_D +68.2^\circ$ in Chloroform. Durch das Molekül-Massenspektrogramm⁶ konnten 2 Hauptkomponenten der Masse 412 (C₂₉H₄₈O) und 426 (C₃₀H₅₀O) nachgewiesen werden, ausserdem geringe Mengen höherer, zum Teil ungesättigter (?) aliphatischer Alkohole: C₁₈H₃₇OH, C₂₀H₃₉OH und C₂₁H₄₁OH. Substanz B₁ zeigte negative Liebermann-Burchard-Reaktion und nahm bei Umsetzung mit Perbenzoesäure 1.79 Äquivalente Sauerstoff auf (ber. auf ein durchschnittliches Mol.-Gew. von 418).

Die im Vergleich zu B₁ etwas stärker polare, dünnschichtchromatographisch einheitliche Komponente B₂ vom Schmp. 163–164° und $[\alpha]_D +1.0^\circ$ in Chloroform (Ausbeute 8·10⁻³% des Blatt-Trockengewichts) gab das in Abb. 1 wiedergegebene Molekül-Massenspektrum⁶ (Ionisierung nach dem für Sterine geltenden Prozessstyp $ROH + e \rightarrow ROH^\ominus \rightarrow RO^\ominus + H$), womit ein Gemisch aus mindestens 3 Substanzen der Masse 400, 412 und 426 angezeigt wird. Das mit authentischem Lophenol übereinstimmende dünnschichtchromatographische Verhalten¹² der Substanz B₂, ihre Elementaranalyse (1 Sauerstoffatom) und Digitoninfällbarkeit, das IR-Spektrum (starke OH-Bande, keine Carbonylabsorption), das Fehlen einer UV-Absorption bis 220 nm, ein positiver Selendioxydtest nach Fieser¹³ und schließlich der für Δ^7 -Sterine charakteristische Verlauf der Liebermann-Burchard-Reaktion¹⁴ (Abb. 2) deuteten auf ein Gemisch der 3 β -Hydroxy-4 α -methyl- Δ^7 -Sterine C₂₈H₄₈O (M = 400), C₂₉H₄₈O (M = 412) und C₃₀H₅₀O (M = 426). In der Tat liess sich durch gaschromatographische Untersuchung der Substanz B₂ (Abb. 3) die Verbindung C₂₈H₄₈O als Lophenol (4 α -Methyl-5 α -cholest-7-en-3 β -ol, I) identifizieren, das von Djerassi *et al.*¹⁵ aus *Lophocereus schottii* (Engelmann) Britton et Rose isoliert und in seiner Struktur aufgeklärt worden ist. Die Hauptkomponente C₃₀H₅₀O besitzt, wie durch die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen bewiesen wird, die Konstitution des 4 α -Methyl-5 α -stigmasta-7,24(28)-dien-3 β -ol (24-Äthyliden-lophenol, III). Bei der

¹⁰ D. F. Johnson, R. D. Bennett und E. Heftmann, *Science* **140**, 198 (1963).

¹¹ M. J. Thompson, S. J. Louloudes, W. E. Robbins, J. A. Waters, J. A. Steele und E. Mosettig, *Biochem. biophysic. Res. Commun.* **9**, 113 (1962); M. J. Thompson, W. E. Robbins und G. L. Baker, *Steroids* **2**, 505 (1963).

¹² Vgl. K. Schreiber, O. Aurich und G. Osske, *J. Chromatog.* **12**, 63 (1963).

¹³ L. F. Fieser, *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 4395 (1953).

¹⁴ D. R. Idler und C. A. Baumann, *J. Biol. Chem.* **203**, 389 (1953).

^{15a} C. Djerassi, J. S. Mills und R. Villotti, *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 1005 (1958); C. Djerassi, G. W. Krakower, A. J. Lemin, L. H. Liu, J. S. Mills und R. Villotti, *Ibid.* **80**, 6284 (1958).

^{15b} Vgl. auch W. W. Wells und D. H. Neiderhiser, *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 6569 (1957); D. H. Neiderhiser und W. W. Wells, *Arch. Biochem. Biophysics* **81**, 300 (1959).



ABB. 1. Molekül-Massenspektrogramm der 4 α -Methyl-Sterine aus *S. tuberosum*;
 $T_v = 140^\circ$

dritten Substanz $C_{29}H_{48}O$ dürfte es sich auf Grund vorliegender Befunde* und biogenetischer Überlegungen um das bisher noch unbekannte 24-Methylen-lophenol (II) handeln. Hiermit in Übereinstimmung sind die Ergebnisse der molekülmassenspektrographischen Untersuchung von B_2 -Acetat und dessen Hydrierprodukt: Substanzen der Masse 442, 454 und 468 bzw. 444 (Dihydroprodukt von I-Acetat;

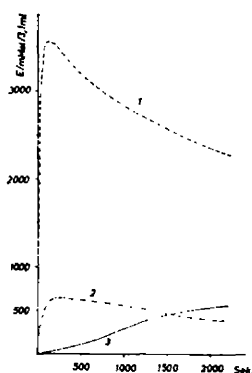


ABB. 2. Der zeitliche Verlauf der Extinktion bei der Liebermann-Burchard-Reaktion mit (1) Substanz B_2 (ber. auf III), (2) Zymosterin (5 α -Cholesta-8,24-dien-3 β -ol) und (3) Cholesterin; berechnet als E_{522} von 1 mMol Sterin/3.1 ml Farblösung ($d = 1.00$ cm, $t = 21^\circ$)

sehr geringe Menge), 458 und 472 (Tetrahydroprodukte von II-Acetat bzw. von IV). Die im Gaschromatogramm der Fraktion B_2 (Abb. 3), in deren Molekül-Massenspektrogramm jedoch nicht gesondert auftretende 4. Komponente konnte noch nicht zugeordnet werden.

* In der entsprechenden, durch Chromatographie und Umkristallisation gereinigten B-Fraktion aus Blattwachs von *Saccharum officinarum* L. (Schmp. 172–173° und $[\alpha]_D + 6.0^\circ$ in Chloroform (s. Tab.), gleiches Verhalten bei Dünnschichtchromatographie und Liebermann-Burchard-Reaktion wie die B_2 -Fraktion aus *S. tuberosum*) liess sich durch Molekül-Massenspektrographie und Gaschromatographie das gleiche Sterin $C_{29}H_{48}O$ (II) nachweisen, und zwar in diesem Fall als Hauptkomponente. Daneben konnte man in geringer Menge III, jedoch kein Lophenol (I) feststellen (K. Schreiber und G. Osske, unveröffentlicht; über weitere Untersuchungen zur Konstitution des neuen 4 α -Methyl-Sterins II wird später an anderer Stelle berichtet).

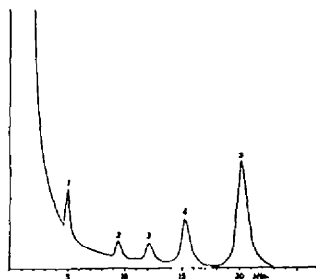
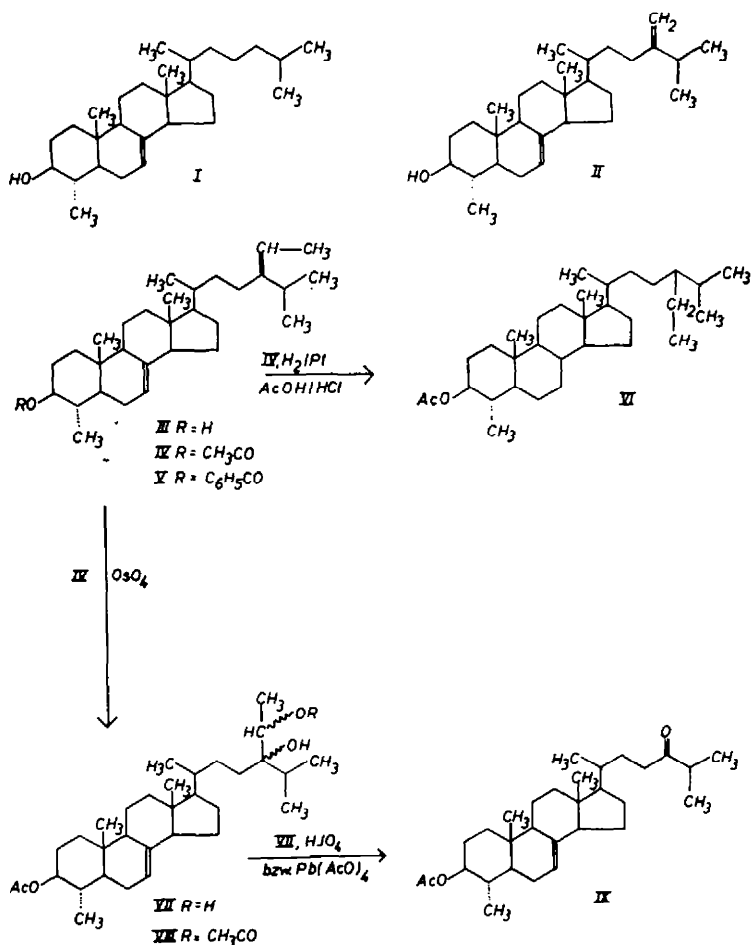


Abb. 3. Gaschromatographische Trennung der 4 α -Methyl-Sterine aus *S. tuberosum* an SE-30 bei $t = 236^\circ$. (1) Cholestan (Standard), (2) unbekannte Substanz (relat. Retentionszeit = 1.88), (3) Lophenol (I) (2.42), (4) vermutlich 24-Methylen-lophenol (II) (3.06), (5) 24-Äthyliden-lophenol (III) (4.06).



Die Hauptkomponente III der Substanz B₂ liess sich durch Chromatographie und Kristallisation des acetylierten Gemisches wesentlich anreichern. Verseifung des so gewonnenen Acetats IV lieferte eine Substanz mit unverändertem Schmp. (164°), jedoch höherem Drehwert ($[\alpha]_D + 8.5^\circ$ in Chloroform), die nach dem Molekül-Massenspektrum im wesentlichen aus III neben nur geringen Mengen I und II zusammengesetzt ist.

Benzoylierung von III ergab das Monobenzoat V. Die bei Acetylierung bzw. Benzoylierung auftretenden molaren Rotationsdifferenzen ($\Delta[M]_D +118^\circ$ bzw. $+207^\circ$) bestätigen das Vorliegen einer 3β -Hydroxy- 4α -methyl- Δ^7 -Struktur von III (Literaturwerte vgl.⁹). Katalytische Hydrierung des Acetats IV mit Platin in Essigsäure + etwas HCl führte zu einem Tetrahydroderivat, das in allen Eigenschaften (Schmp., Misch-Schmp., Drehwert und IR-Spektrum) mit authentischem 3β -Acetoxy- 4α -methyl- 5α -stigmastan (3β -Acetoxy- 5α -ciclostano, VI)^{16,17} übereinstimmte. Hydroxylierung von IV mit Osmium(VIII)-oxyd-Pyridin lieferte 3β -Acetoxy- 4α -methyl- 5α -stigmast-7-en-24 ξ ,28 ξ -diol (VII), das mit Perjodsäure bzw. Blei(IV)-acetat unter Bildung von Acetaldehyd und 3β -Acetoxy- 4α -methyl- 5α -cholest-7-en-24-on (IX)¹⁸ gespalten wurde. Der Acetaldehyd wurde in Form seines 2,4-Dinitrophenylhydrazons durch Schmp., Misch-Schmp., IR-Spektrum und Papierchromatographie identifiziert. Das Hydroxylierungsprodukt VII ergab bei Acetylierung mit Acetanhydrid-Pyridin 3β ,28 ξ -Diacetoxy- 4α -methyl- 5α -stigmast-7-en-24 ξ -ol (VIII). Die Verbindungen VIII und IX zeigen, ebenso wie III, positiven Selendioxydtest nach Fieser¹³ sowie die für Δ^7 -Verbindungen charakteristische¹⁴ stark positive Liebermann-Burchard-Reaktion. Bei der Perbenzoesäuretitration des doppelt ungesättigten III wurden 3 Äquivalente Sauerstoff verbraucht, und zwar 1 Äquival. für die $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung und 2 Äquival. für die Δ^7 -Doppelbindung (säurekatalysierte Isomerisierung des primär gebildeten 7α , 8α -Epoxyds zur 7α -Hydroxy- $\Delta^{8(14)}$ -Verbindung und Aufnahme eines weiteren Äquivalents Sauerstoff unter Bildung des 7α -Hydroxy- 8α ,14 α -epoxy Derivats¹⁹).

Bemerkenswert ist, dass im Gegensatz zu dem Ergebnis der Perbenzoesäureoxydation bei Umsetzung von IV mit 2·4 Mol. Osmium(VIII)-oxyd lediglich die $\Delta^{24(28)}$ - und nicht auch die Δ^7 -Doppelbindung hydroxyliert wurde. Das ebenfalls $\Delta^{7,24(28)}$ -ungesättigte Ciclostadienol gab unter etwa gleichen Bedingungen 4α -Methyl 5α -stigmastan- 3β , 7α , 8α ,24 ξ ,28 ξ -pentol;¹⁷ vgl. zur Hydroxylierung von Δ^7 -Verbindungen auch l.c.¹⁹

Das aus Kartoffelblättern isolierte 4α -Methyl-Sterin III besitzt somit die gleiche Konstitution wie das aus Pampelmusen- bzw. Orangenschalenöl gewonnene 5α -Ciclostadien-7,24(28)-dien- 3β -ol^{16,18,20}, von dem es sich, soweit bisher bekannt, nur durch seine spezifische Drehung unterscheidet (vgl. Tab.). Da beide Sterine auch in der Konfiguration ihrer Asymmetriezentren übereinstimmen, sollte dieser Unterschied auf einer *cis-trans*-Isomerie an der $\Delta^{24(28)}$ -Doppelbindung beruhen, so wie es für ein analoges Isomerenpaar, Fucosterin (Stigmasta-5,24(28)-dien- 3β -ol) und "29-Isocucosterin", angenommen wird.²¹ Jedenfalls ist die Frage der räumlichen Anordnung der C-29-Methyl-Gruppe in III bzw. Ciclostadienol noch offen und erfordert weitere Untersuchungen.

¹⁶ Y. Mazur, A. Weizmann und F. Sondheimer, *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 1007, 6293 (1958).

¹⁷ Stigmastan und seine Derivate besitzen 20β , 24α - d.h. (20R:24R)-Konfiguration; vgl. u.a. K. Tsuda, R. Hayatsu und Y. Kishida, *Chem. & Ind.* 1411 (1959); K. Tsuda, Y. Kishida und R. Hayatsu, *J. Amer. Chem. Soc.* **82**, 3396 (1960); Y. Kishida, *Chem. & Ind.* 465 (1960); *Chem. & Pharm. Bull.* **8**, 357 (1960).

¹⁸ Y. Mazur und F. Sondheimer, *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 6296 (1958).

¹⁹ O. Wintersteiner und M. Moore, *J. Amer. Chem. Soc.* **65**, 1507 (1943); L. F. Fieser und M. Fieser, *Steroide* S. 268, Verlag Chemie, Weinheim, Bergstrasse (1961).

²⁰ A. Weizmann und Y. Mazur, *J. Org. Chem.* **23**, 832 (1958).

²¹ J. P. Dusza, *J. Org. Chem.* **25**, 93 (1960).

Auf die mögliche Identität des 4 α -Methyl-Sterins III bzw. des Citrostadienols mit dem schon 1936 aus Getreidekeimölen isolierten, aber in seiner Konstitution noch nicht aufgeklärten α_1 -Sitosterin²² (vgl. Tab.) ist bereits früher hingewiesen worden.^{2,18,23} Nach den nunmehr vorliegenden Ergebnissen dürfte es sehr wahrscheinlich sein, dass die bislang mit α_1 -Sitosterin bezeichneten Präparate 4 α -Methyl- Δ^7 -Steringemische darstellen, die in Abhängigkeit von Herkunft und Isolierungsmethode wechselnde Zusammensetzung aufweisen können. Die in der Tabelle angeführten Konstanten stehen hiermit im Einklang.²⁴

Zusammenfassend sei festgestellt, dass bis heute folgende Steroide (bzw. Triterpene) in der Kartoffelpflanze *Solanum tuberosum* L. nachgewiesen wurden: Cycloartenol,⁶ Lophenol (I), 24-Methylen-lophenol (II) (?), 24-Äthyliden-lophenol (III), Cholesterin,^{8,10} Campesterin,⁷ β -Sitosterin,^{4,25} Stigmasterin,^{4,26} das Steroidsapogenin Yamogenin ((25S)-22 α O-Spirost-5-en-3 β -ol)²⁶ sowie die Steroidalkaloide Tomatidenol ((25S)-22 β N-Spirosol-5-en-3 β -ol)²⁶ und Solanidin (Solanid-5-en-3 β -ol)²⁶. Die 4 α -Monomethyl-Sterine I–III sind wahrscheinlich direkte Abkömmlinge von Zwischenprodukten der pflanzlichen Steroidbiosynthese. Das gemeinsame Vorkommen der genannten Steroide in *S. tuberosum* ist eine weitere Bestätigung der Theorien, die zur Biogenese dieser Verbindungen aufgestellt wurden.²⁷

EXPERIMENTELLER TEIL

Alle Schmelzpunkte wurden auf dem Mikroheitzisch nach Boëtius bestimmt und sind korrigiert; alle optischen Drehungen in Chloroform. Die IR-Spektren wurden mit dem Zeiss-Zweistrahlspektralphotometer UR 10 in Nujol aufgenommen; für die Spektren dienten lufttrockene Substanzen. Für die Extinktionsmessungen bei der Liebermann-Burchard-Reaktion wurde das Zeiss-Elektrophotometer "Elko" verwendet. Zur Elementaranalyse wurden die Proben i. Hochvak. über P₂O₅-Paraffin bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, und zwar bei 100°, wenn nicht anders angegeben.

Die Dünnschichtchromatographie (DC) der Sterine erfolgte aufsteigend an Kieselgel G (Merck) mit Benzin (Sdp. 60–90°)-Essigester-Benzol 80:15:5.^{4,6,13} Für die übrigen Verbindungen wurden die bei der Säulenchromatographie benutzten Gemische verwendet. Zum Nachweis der Substanzen besprühte man die Chromatogramme mit einer gesätt. Lösung von Cer(IV)-sulfat in 65% H₂SO₄aq und erhitze anschliessend 5–10 Min. auf 110–120°.

Für die Säulenchromatographie wurde ausschliesslich Florisil (Floridin Co., Clarendon, Pa.) verwendet.

²² E. S. Wallis und E. Fernholz, *J. Amer. Chem. Soc.* **58**, 2446 (1936); S. Bernstein und E. S. Wallis, *Ibid.* **61**, 1903, 2308 (1939); S. W. Gloyer und H. A. Schuette, *Ibid.* **61**, 1901 (1939); vgl. auch S. Bernstein, E. J. Wilson jr. und E. S. Wallis, *J. Org. Chem.* **7**, 103 (1942); D. H. R. Barton, *J. Chem. Soc.* 813 (1945); 512 (1946).

²³ Y. Mazur, A. Weizmann und F. Sondheimer, *Bull. Res. Council Israel Sect. A.*, **7**, 82 (1958).

²⁴ Nach neueren Untersuchungen von J. W. Rowe und J. H. Scroggins, *J. Org. Chem.* **29**, 1554 (1964) bzw. J. W. Rowe, *Phytochemistry* (im Druck) dürfte das in Rinden mehrerer *Pinus*-Arten nach gewiesene α_1 -Sitosterin nach gaschromatographischen Befunden wie das α_1 -Sitosterin aus *S. tuberosum* im wesentlichen aus III bestehen. Wir danken Herrn Dr. J. W. Rowe, Madison, Wisconsin, bestens für die Überlassung der im Druck befindlichen Manuskripte. Vgl. auch S. Ito, *Nippon Daigaku Kogaku Kenkyusho Iho* No. 13, 114 (1956).

²⁵ J. J. Schwartz und M. E. Wall, *J. Amer. Chem. Soc.* **77**, 5442 (1955).

²⁶ Vgl. K. Schreiber, in R. Schick und M. Klinkowski, *Die Kartoffel - Ein Handbuch*, Bd. **1**, S. 191, VEB Deutscher Landwirtschaftsverlag, Berlin (1961).

²⁷ E. Heftmann, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **14**, 225 (1963); M. Castle, G. Blondin und W. R. Nes, *J. Amer. Chem. Soc.* **85**, 3306 (1963); S. Bader, L. Guglielmetti und D. Arigoni, *Proc. Chem. Soc.* 16 (1964); D. F. Johnson, E. Heftmann und G. V. C. Houghland, *Arch. Biochem. Biophysics* **104**, 102 (1964); J. W. Rowe, *Phytochemistry* (im Druck) u.a.

TABELLE. PHYSIKALISCHE KONSTANTEN VON α -SITOSTERIN UND MEHREREN NATÜRLICHEN 4α -METHYL- Δ^7 -STERINEN
EINSCHLIESSLICH IHRER DERIVATE (*Drehwerte in Chloroform*)

Sterin	Schmp. [°]	Schmp. [°]	Schmp. [°]	Schmp. [°]	Schmp. [°]	Schmp. [°]	Schmp. [°]
α_1 -Sitosterin aus Getreidekeimöl ¹²	164-166°	-1.7°	137°	+28.6°	168-172°	+41.8°	185-186°
Lophenol (I) aus <i>Lophocereus schottii</i> ^{15a}	149-151°	+5.0°	119-121°	+28.0°	161-163°	+43.0°	166-168°
4α -Methyl- Δ^7 -Sterin aus <i>Saccharum officinarum</i> (vorwiegend II) l.c.* auf S.	172-173°	+6.0°	146-147°	+29.8°	170-171°		189-190°
4α -Methyl-5 α -stigmasta-7,24(28)- dien-3 β -ol (III) aus <i>S. tuberosum</i>	164°	+8.5°	142-144°	+32.8°	163°	+45.8°	—
5 α -Cytrosta-7,24(28)-dien-3 β -ol aus <i>Citrus</i> -Arten ^{16,18,20}	162-164°	+24.0°	142-143°	+43.0°	160-163°	+51.0°	186-187°
Perhydrosterin	Schmp. [°]				Schmp. [°]		+28.0°
Perhydrosterinacetat	Schmp. [°]				Schmp. [°]		144-145°
Perhydrosterinacetat	Schmp. [°]				Schmp. [°]		+39.0°

Gewinnung der 4 α -Methyl-Sterine (Substanz B₂)

B-Substanz vom R_f 0.70 (8.03 g, gewonnen durch Kieselgel-Chromatographie der digitonin-fällbaren "Sterin"-Fraktion bzw. des Unverseifbaren aus Kartoffelblättern⁶) wurde an 1.4 kg Florisil rechromatographiert (Säulengröße 7.5 × 55 cm). Man eluierte zuerst mit 2 l Benzin (Sdp. 70–80°)–Essigester–Benzol 91:4:5 und anschließend mit Benzin–Essigester–Benzol 90:5:5 (Tropfgeschwindigkeit 50 Tropfen/Min., Fraktionen zu 20 ml). Die DC ergab folgendes Ergebnis:

Fraktionen	Substanz	Menge
1– 62		468 mg
63– 88	Cycloartenol	1367 mg
89–103	Cycloartenol + Substanz B ₁	532 mg
104–152	Substanz B ₁	1850 mg
153–179	Substanz B ₁ + Substanz B ₂	625 mg
180–210	Substanz B ₂	544 mg

Die noch hellgelb gefärbte Substanz B₂ (130 mg) wurde nochmals an 20 g Florisil chromatographiert; Elution mit Benzin (Sdp. 70–80°)–Essigester–Benzol 88:7:5. Nach Kristallisation aus Äthanol abgeflachte Nadeln vom Schmp. 163–164° und $[\alpha]_D^{20} + 1.0^\circ$ ($c = 1.16$). IR-Banden: 820, 834, 890, 935, 960, 977, 1011, 1022, 1051, 1103, 1156, 1211–1221, 1258, 1311, 1339, 1380 (s), 1450–1470 (s), 1642, 3225 und 3300 (Hydroxyl, breit), 3663 cm^{-1} (Hydroxyl). Das Molekül-Massenspektrogramm ($T_r = 140^\circ$) zeigt einen Hauptpeak bei $M = 425$ (24-Äthyliden-lophenol, III) sowie Nebenpeaks bei $M = 411$ (24-Methylen-lophenol, II (?)) und $M = 399$ (Lophenol, I); vgl. Abb. 1 und Abb. 3. Zur Analyse wurde bei 70° getrocknet. (Ber: für $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ (426.7): C, 84.43; H, 11.81; Gef: C, 83.72; H, 11.65%).

Substanz B₂ (1 mg) wurde in 0.5 ml Benzol gelöst und mit 1 ml Selendioxyd–Reagens nach Fieser¹³ versetzt (1.11 g Selendioxyd in 2 ml siedendem Wasser gelöst und mit Essigsäure auf 100 ml aufgefüllt). Nach 5 Min. zeigte die Lösung eine gelbe Färbung und nach weiteren 5 Min. fiel rotes Selen aus.

Substanz B₂ (14.15 mg) wurde mit 2 ml 1.1% Perbenzoesäure in Chloroform versetzt und 3 Tage bei –5° aufbewahrt. Jodometrisch konnte ein Sauerstoffverbrauch von 1.56 mg (3 Äquiv., ber. auf III 1.59 mg) ermittelt werden.

Zur modifizierten Liebermann–Burchard–Reaktion¹⁴ wurden folgende Sterine in je 20 ml Essigsäure gelöst: 0.84 mg Substanz B₂ = $1.97 \cdot 10^{-3}$ mMol (ber. auf III), 10.7 mg Cholesterin = $2.76 \cdot 10^{-2}$ mMol und 4.29 mg Zymosterin (5 α -Cholesta-8,24-dien-3 β -ol) = $1.11 \cdot 10^{-2}$ mMol. Je 2 ml dieser Lösungen wurden mit jeweils 4.2 ml Reagens (20 ml Acetanhydrid + 1 ml konz. H_2SO_4) vermischt. Anschliessende Extinktionsmessungen erfolgten in Abständen von 50 Sek. bei 623 nm (Interferenzfilter), $d = 1.00$ cm und $t = 21^\circ$ (Ergebnisse siehe Abb. 2).

4 α -Methyl-5 α -stigmasta-7,24(28)-dien-3 β -ol (24-Äthyliden-lophenol III)

Durch Chromatographie und Umkristallisation gereinigtes Acetat IV (57 mg) wurde mit 1.0 g KOH in 60 ml Methanol bei Siedetemperatur verseift (1.5 Stdn.). Man extrahierte mit Äther, wusch die äther. Lösung mit n HCl und Wasser, trocknete mit Na_2SO_4 und dampfte ein. Nach Umkristallisation aus Äthanol 30 mg (59.8% d. Th.) III in flachen Nadeln vom Schmp. 164° und $[\alpha]_D^{20} + 8.5^\circ$ ($c = 0.76$). ($\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}$ (426.7): Ber: C, 84.43; H, 11.81; Gef: C, 83.83; H, 11.67%). Molekülmassenspektrographisch konnten neben III lediglich geringe Mengen I und II nachgewiesen werden.

3 β -Acetoxy-4 α -methyl-5 α -stigmasta-7,24(28)-dien (IV)

Substanz B₂ vom Schmp. 163–164° und $[\alpha]_D^{20} + 1.0^\circ$ (170 mg) wurde in 3.4 ml Pyridin mit 2.6 ml Acetanhydrid acetyliert (30 Stdn. bei 40°). Chromatographie des Rohprodukts an 24 g Florisil (Benzin (Sdp. 80–90°)–Essigester–Benzol 94:1:5) ergab 161 mg IV (86.3% d. Th.). Nach 2maliger Umkristallisation aus Äthanol Schmp. 142–144° und $[\alpha]_D^{20} + 32.8^\circ$ ($c = 1.57$). Zur Analyse wurde bei 70° getrocknet. ($\text{C}_{32}\text{H}_{52}\text{O}_2$ (468.8): Ber: C, 81.99; H, 11.18; Gef: C, 81.94; H, 11.09%).

3 β -Benzoxy-4 α -methyl-5 α -stigmasta-7,24(28)-dien (V)

Substanz B₂ (40 mg) wurde in 1 ml Pyridin gelöst und unter Eiskühlung mit 0.3 ml Benzoylchlorid versetzt. Nach 30 Stdn. Aufbewahren bei Raumtemperatur und Zugabe von 5 ml Wasser extrahierte

man mit Äther. Man wusch 2mal mit je 5 ml n HCl, 1% Na_2CO_3 aq sowie Wasser und trocknete über Na_2SO_4 . Chromatographie des Destillationsrückstandes an 10 g Florisil (Benzin (Sdp. 70–80°)–Essigester–Benzol 94:1:5) ergab 39.6 mg V (79.5% d. Th.); aus Chloroform–Methanol feine Nadeln vom Schmp. 163° und $[\alpha]_D^{20} + 45.8^\circ$ ($c = 1.31$). Zur Analyse wurde bei 70° getrocknet. ($\text{C}_{37}\text{H}_{64}\text{O}_8$ (530.8): Ber: C, 83.72; H, 10.26; Gef: C, 83.21; H, 9.95%).

3 β -Acetoxy-4 α -methyl-5 α -stigmastan (VI)

Verbindung IV (78 mg) wurde, in 14 ml Eisessig gelöst, in Gegenwart von 43.4 mg Platin und 2 Tropfen konz. HClaq 20 Stdn. bei 20° hydriert. Man versetzte mit Wasser und extrahierte mit Äther. Die organ. Phase wurde mit 1% Na_2CO_3 aq und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft: 77.7 mg VI (98.8% d. Th.), nach Chromatographie an 15 g Florisil (Benzin (Sdp. 60–70°)–Essigester–Benzol 94:1:5) und Kristallisation aus Äther–Methanol Nadeln vom Schmp. 145–146° und $[\alpha]_D^{18} + 40^\circ$ ($c = 1.00$). Misch-Schmp. mit authent. VI ohne Depression; die IR-Spektren beider Substanzen erwiesen sich als identisch; Lit. vgl. Tab. ($\text{C}_{32}\text{H}_{54}\text{O}_4$ (472.8): Ber: C, 81.29; H, 11.94; Gef: C, 81.44; H, 11.74%).

3 β ,28 ξ -Diacetoxy-4 α -methyl-5 α -stigmast-7-en-24 ξ -ol (VIII)

Verbindung IV (220 mg), in 35 ml Pyridin gelöst, blieb mit 290 mg Osmium(VIII)-oxyd (2.4 Mol.) 48 Stdn. bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen. Man dampfte das Pyridin i. Vak. ab, versetzte den Rückstand mit einer Lösung von 3.3 g Na_2SO_3 in 22 ml Wasser und 22 ml Äthanol und erhitze 90 Min. zum Sieden. Das Reaktionsgemisch wurde 2mal mit je 30 ml Äther und 30 ml Essigester extrahiert. Nach 2maligem Waschen mit Wasser trocknete man die vereinigten Extrakte über Na_2SO_4 und dampfte i. Vak. ein: 228 mg 3 β -Acetoxy-4 α -methyl-5 α -stigmast-7-en-24 ξ ,28 ξ -diol (VII).

Verbindung VII (64 mg) wurde ohne weitere Reinigung in 2 ml Pyridin gelöst und mit 2 ml Acetanhydrid 15 Stdn. bei Raumtemperatur acetyliert. Nach Zugabe von 15 ml Wasser wurde das Reaktionsprodukt in Äther aufgenommen, die äther. Lösung 2mal mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingedampft. Chromatographie des Rückstandes an 40 g Florisil (Benzin (Sdp. 70–80°)–Essigester–Benzol 85:10:5) ergab 33 mg VIII (44.6% d. Th.), nach Kristallisation aus Äther–Methanol Schmp. 173–174° und $[\alpha]_D^{20} + 26.4^\circ$ ($c = 0.946$). ($\text{C}_{34}\text{H}_{58}\text{O}_6$ (544.8): Ber: C, 74.96; H, 10.36; Gef: C, 75.53; H, 10.36%).

3 β -Acetoxy-4 α -methyl-5 α -cholest-7-en-24-on (IX)

(a) Verbindung VII (64 mg) löste man in 5 ml Eisessig und liess nach Zusatz von 350 mg Blei(IV)-acetat in 25 ml Eisessig 15 Stdn. bei Raumtemperatur stehen. Überschüssiges Blei(IV)-acetat wurde durch Zugabe von 100 ml Wasser hydrolysiert und das Reaktionsprodukt mit Äther extrahiert, die organ. Phase mit Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Der Rückstand wurde an Florisil (Benzin (Sdp. 70–80°)–Essigester–Benzol 85:10:5) chromatographiert: 283 mg IX (48.7% d. Th.), nach Kristallisation aus Äther–Methanol Schmp. 116–117° und $[\alpha]_D^{18} + 28.8^\circ$ ($c = 0.849$). Zur Analyse wurde bei 50° getrocknet. ($\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_3$ (456.7): Ber: C, 78.89; H, 10.59; Gef: C, 79.17; H, 10.57%). IR-Banden: 806, 825 (m), 850, 878 (m), 912 (m), 934, 964, 983 (s), 1027 (s), 1043 (s), 1058 (m), 1074 (m), 1100 (m), 1103 (m), 1135, 1183, 1222 (m), 1248 (Acetyl), 1343, 1360 (s), 1380 (s), 1448 (m), 1472 (s), 1510, 1706 (s, 24-Keto), 1730 (s, Acetyl), 2830 (s), 2839 (m), 2870 (m), 2880 (m), 2910 (m), 2977 (s) cm^{-1} .

(b) Verbindung VII (100 mg) löste man in 15 ml peroxydfreiem Tetrahydrofuran. Nach Zugabe von 210 mg NaJO_4 in 2 ml n H_2SO_4 blieb das Gemisch 24 Stdn. bei Raumtemperatur im Dunkeln stehen und wurde dann zur Hälfte in eine eisgekühlte Lösung von 100 mg 2,4-Dinitrophenylhydrazin in 3 ml Äthanol und 7 ml 40% H_2SO_4 aq destilliert. Nach Entfernung des Tetrahydrofurans durch Vakuumdestillation der Vorlage fielen 28.8 mg Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon aus (68.9% d. Th.). Eine Blindprobe gab nur eine geringe Trübung. Nach Chromatographie an Florisil (Benzin (Sdp. 70–80°)–Essigester–Benzol 85:10:5) kristallisierte das Hydrazon aus Äthanol in Form kleiner Nadeln vom Schmp. 156–157°; Lit. 157°;²⁸ Misch-Schmp. mit authent. Acetaldehyd-2,4-dinitrophenylhydrazon ohne Depression; die IR-Spektren sowie das papierchromatographische Verhalten beider Verbindungen zeigten keine Unterschiede. Papierchromatographie:²⁹ Schleicher & Schüll 2043 a, mit Dimethylformamid imprägniert, absteigende Entwicklung mit Hexan, $R_f = 0.43$.

²⁸ N. D. Cheronis und J. B. Entrikin, *Semimicro Qualitative Organic Analysis*, S. 582 und 586. Interscience, New York–London (1958).

²⁹ L. Horner und W. Kirmse, *Liebigs Ann.* **597**, 48 (1955).

Zur Isolierung des bei der Perjodatspaltung entstandenen Ketons IX wurde der Destillationsrückstand mit einigen ml Wasser versetzt und mit Äther extrahiert. Die äther. Lösung wurde mit 1% Na_2CO_3 aq und Wasser gewaschen, über Na_2SO_4 getrocknet und eingeeengt. Nach Chromatographie an Florisil (Benzin (Sdp. 70–80°)–Essigester–Benzol 85:10:5) und Kristallisation aus Methanol Schmp. 114–115°, nach Misch-Schmp. und IR-Spektrum identisch mit dem bei der Blei(IV)–acetat-Spaltung von VII erhaltenen IX.

Herr Prof. Dr. F. Sondheimer und Herrn Dr. Y. Mazur, Rehovoth (Israel), sind wir für die Überlassung von authentischem 3 β -Acetoxy-4 α -methyl-5 α -stigmastan sowie Herrn Prof. Dr. W. Klyne, London, für die Überlassung von Lophenol aus der "Steroid Reference Collection" des Medical Research Council sehr verbunden. Herrn Dr. K. Heller, Wissenschaftliche Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena, danken wir für die Aufnahme der IR-Spektren, Herrn Dr. R. Tümmler, Forschungsinstitut Manfred von Ardenne, Dresden–Weisser Hirsch, für die Molekül-Massenspektrogramme und Herrn Dr. M. J. Thompson, Agricultural Research Service, Beltsville (Maryland), für die gaschromatographische Untersuchung. Die Mikroelementaranalysen wurden von Herrn Dr. A. Schoeller, Kronach/Obfr., ausgeführt.