

147. Identification de stérols à chaînes latérales courtes dans l'éponge *Damiriana hawaiiiana*¹⁾

par Claude Delseth, R.M.K. Carlson et Carl Djerassi

Department of Chemistry, Stanford University,
Stanford, California 94025

et Timothy R. Erdman et Paul J. Scheuer

Department of Chemistry, University of Hawaii at Manoa,
Honolulu, HI 96822

(7.II.78)

Identification of short side chain sterols in the sponge *Damiriana hawaiiiana*

Summary

The steroidal composition of the sponge *Damiriana hawaiiiana* is examined. Twenty-seven components are identified. In addition to the C₂₆-C₂₉, Δ⁵-mono and diunsaturated sterols, the sponge contains sterols without side-chain: androsta-5,16-dien-3β-ol (**1**), androst-5-en-3β-ol (**2**); sterols with a non-functionalized side-chain consisting of two, three, four, five and six carbon atoms: pregna-5,20-dien-3β-ol (**5**), pregn-5-en-3β-ol (**6**), 23,24-bisnor-chola-5,20-dien-3β-ol (**7**), 23,24-bisnor-chol-5-en-3β-ol (**8**), 24-nor-chol-5-en-3β-ol (**10**), chol-5-en-3β-ol (**11**), 26,27-bisnor-cholest-5-en-3β-ol (**12**), and sterols possessing a short oxygenated side-chain such as 3β-hydroxy-androst-5-en-17-one (**3**), androst-5-en-3β,17β-diol (**4**) and 3β-hydroxy-26,27-bisnor-22-*trans*-cholesta-5,22-dien-24-one (**14**). The probable biological or dietary origin rather than artifact production of these hitherto undescribed components from marine sources is supported by their relatively high concentration and their relative proportions, both very different from those expected for autoxidation.

Introduction. - Poursuivant nos travaux [2-4] sur la recherche de nouveaux stéroïdes marins en tant que «chaînes manquants» potentiels dans certains processus biosynthétiques [5] [6] nous avons examiné les composants de l'éponge *Damiriana hawaiiiana*. Parmi les 27 stérols identifiés, plus de la moitié possèdent soit une chaîne latérale courte non fonctionnalisée, soit un atome d'oxygène additionnel dans la chaîne latérale. Diverses hypothèses sur leur origine seront discutées.

¹⁾ 'Minor and Trace Sterols in Marine Invertebrates', Partie 4, Partie 3: [1].

Tableau. *Stérols identifiés dans l'éponge Damiriana hawaiiiana*

Stérols	M ⁺	Nombre atomes de carbone	Fractions CLHP. (1 à 11) et de chromatographie sur colonne (A à D) analysées par CPV./SM.	Temps de rét. rel. en CPV. OV25-3%-265°	Pourcentage dans le mélange ^{a)}
1	272	C ₁₉	2 et B	0,16	0,4
2	274	C ₁₉	2 et B	0,17	3,1
3	288	C ₁₉	1 et C	0,43	0,6
4	290	C ₁₉	1 et D	0,43	0,6
5	300	C ₂₁	3	0,24	0,4
6	302	C ₂₁	4,5 et B	0,25	0,7
7	314	C ₂₂	4	0,39	0,8
8	316	C ₂₂	6 et B	0,34	0,2
9	316	C ₂₁	1,2 et C	0,62	6,7
10	330	C ₂₃	B	0,44	0,2
b)	330	b)	1,2 et C	0,78	0,5
11	344	C ₂₄	6 et B	0,53	0,5
12	358	C ₂₅	B	0,68	t ^{c)}
13	370	C ₂₆	6 et A	0,71	0,2
14	370	C ₂₅	2 et C	2,01	2,1
15	382	C ₂₇	5 et D	1,41	0,4
16	384	C ₂₇	7 et A	0,96	1,2
17	384	C ₂₇	6	1,47	t ^{d)}
18	386	C ₂₇	9 et A	1,0	45,1
19	398	C ₂₈	7,8 et A	1,17	5,9
20	400	C ₂₈	10 et A	1,29	4,3
21	400	C ₂₇	2 et C	2,36	1,0
22	400	C ₂₇	5 et D	2,89	0,8
23	402	C ₂₇	3 et D	2,12	4,9
24	412	C ₂₉	9 et A	1,43	3,7
25	414	C ₂₉	11 et A	1,59	14,4
26	420	C ₂₇	2	4,41	t ^{d)}
27	430	C ₂₉	4	3,19	0,2

a) Calculé par pesée des pics CPV. du mélange initial et des fractions récoltées par chromatographie sur colonne.

b) Non identifié.

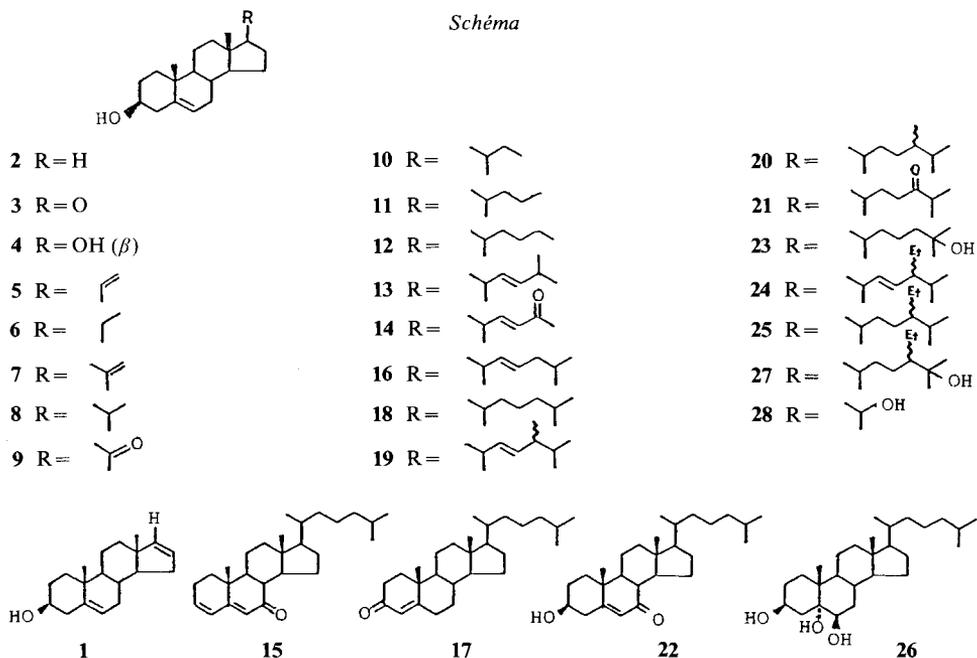
c) Traces; seul le pic moléculaire est détecté par CPV./SM. (mélange avec 9), le temps de rétention relatif en CPV. est identique à celui d'un échantillon authentique.

d) Traces ($\leq 0.1\%$).

Résultats. - Une éponge orange vif, causant de violentes démangeaisons et enflures lorsqu'elle est manipulée à main nue, a été collectée en janvier 1972 à Kaneohe Bay, Oahu et identifiée par le Dr. Ole Tendal, Musée zoologique, Université de Copenhague, comme étant *Damiriana hawaiiiana* décrite en 1950 par Laubenfels.

L'éponge fraîche est extraite à l'éthanol. L'extrait concentré est partagé entre eau et éther. Le résidu de l'extrait étheré est chromatographié sur colonne de gel de silice. Le mélange de stérols (740 mg), élué avec CH₂Cl₂/MeOH 99:1, est analysé.

Des fractions enrichies en stérols présents en quantité mineure, sont obtenues par chromatographie liquide à haute pression en phase inversée (CLHP.) du mélange brut; les fractions sont analysées par chromatographie en phase gazeuse



avec détection par spectrométrie de masse (CPV./SM.) (*Tableau, Schéma*). Une séparation partielle par chromatographie sur colonne de gel de silice est également effectuée (*Tableau*). Pour illustrer la séparation en chromatographie sur couche mince (CCM.), les R_f des stérols **2, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12** sont $0,93 \pm 0,02$ par rapport au cholestérol 1,0, alors que ceux de **3, 4, 9, 14** sont respectivement 0,65, 0,45, 0,74 et 0,74.

Les techniques de séparation utilisées ici ont déjà fait l'objet d'une publication [2]. Les stérols à chaîne latérale courte, de même que ceux possédant un oxygène dans leur chaîne latérale sont récoltés dans les premières fractions de CLHP. (fractions 1 à 6, *Tableau*). Ils sont ainsi séparables des stérols majeurs du mélange et même séparables entre eux suivant leur degré d'insaturation ou leur poids moléculaire. Ils sont isolés en quantité plus importante par chromatographie liquide sur colonne de gel de silice; sur ce type de support et avec les éluants utilisés (voir partie expér.) ces stérols migrent en effet plus lentement que les stérols «normaux».

L'identification de chaque stérol du mélange est basée sur la comparaison avec des composés authentiques: temps de rétention relatifs en CPV. (coïnjection) et CLHP., ainsi que R_f en CCM. La spectrométrie de masse des stéroïdes apporte des données généralement suffisantes à une détermination de structure; les spectres de masse sont donc comparés à ceux, souvent disponibles [7] [8], des composés authentiques. Les spectres UV., IR. et $^1\text{H-RMN}$. sont aussi comparés lorsque l'une de ces techniques apporte un complément d'information (**14** par ex.). Les données relatives à l'analyse structurale des stérols nouveaux à chaîne latérale hydrocarbonée courte **5, 6, 7, 8, 10, 11, 12** identifiés dans *D. hawaiiensis* seront présentées

dans une prochaine communication concernant la distribution générale de ces composés dans les organismes marins [9].

Parmi les stérols possédant plus d'un groupement oxygéné, l'hydroxy-3 β -dinor-26,27-*trans*-22-cholestadiène-5,22-one-24 (**14**) n'a jamais été mis en évidence dans l'environnement marin. Ses propriétés (partie expér.) sont identiques à celles d'un composé authentique obtenu à partir de stigmastérol [10]. Les propriétés des autres stérols polyoxygénés du mélange **3**, **4**, **9**, **21**, **23**, **26**, **27** sont conformes aux données de la littérature [11] [13-18] [21-25]. Outre la liste du *Tableau*, un mélange de plusieurs stérols est détecté par CPV., avec des temps de rétention relatifs 2,19, 2,29, 2,44 et 2,70. La localisation du mélange de ces composés dans les fractions CLHP. 2 à 4 et de chromatographie sur colonne C et D ainsi que la détection par CVP./SM. des ions moléculaires 400 et 402 suggèrent des structures du type cholestérol avec une fonction oxygénée supplémentaire soit dans le noyau, soit dans la chaîne latérale. Ces composés présents en traces et sous forme de mélanges dans les différentes fractions, ne peuvent être identifiées de façon plus précise par spectrométrie de masse.

Discussion. - La présence de stérols sans chaîne latérale ou à chaîne latérale courte formée de 2 à 6 atomes de carbone a été mise en évidence récemment dans d'autres organismes marins [2]. Cependant dans les deux coelentérés étudiés, *Plexaura homomalla* et *Pseudoplexaura porosa*, la plupart de ces composés ne sont présents qu'en traces dans le mélange initial de stérols, ce qui rend leur identification difficile. Une étude des stérols de l'éponge *Haliclona rubens* [11] semble aussi indiquer la présence des stérols à chaîne courte en quantité plus importante mais deux composants seulement, **9** et **28**, ont été identifiés. Récemment le 5 α -prégnadiène-1,20-one-3 et 3 autres composés apparentés ont été identifiés dans un corail [12]. Un stérol de poids moléculaire 314 a également été décrit comme constituant du bivalve *Tapes philippinarum* [13], mais les constantes physiques reportées diffèrent notablement de celles d'un échantillon synthétique de **7** [9]. Notre étude serait donc la première à identifier en quantité appréciable dans un organisme marin plus d'une douzaine de stérols à chaîne latérale courte, **1** à **12**. La présence de plusieurs stérols à groupement oxygéné dans la chaîne latérale, **9**, **14**, **21**, **23** et **27**, mérite également d'être soulignée.

Il est intéressant de déterminer l'origine des composants mineurs d'un mélange de stérols. Certains stérols à chaîne latérale hydrocarbonée courte sont formés en traces par auto-oxydation du cholestérol [16] [17] [23]. La présence dans des extraits marins de ces composés, produits d'auto-oxydation reconnus ou plausibles de stérols, est un sujet délicat, particulièrement pour l'analyse de composants mineurs ou présents en traces. Une évaluation des origines de ces dérivés, rencontrés en quantité mineure dans d'autres extraits marins, fera l'objet d'une prochaine communication [9].

Certains stérols à chaîne latérale courte sont présents dans *D. hawaiiiana* à des concentrations bien plus importantes que celles prévues pour des produits d'auto-oxydation. De plus, le rapport des stérols oxygénés et à chaîne latérale courte est très différent de celui préconisé pour des produits d'auto-oxydation. Ces variations, considérées dans la suite, soutiennent une origine biologique plutôt qu'auto-oxydative de ces composés.

Les stérols **3**, **4**, **9**, **14**, **15**, **17**, **21**, **22**, **23**, **26** et **27** sont des candidats possibles de dégradation oxydative artificielle ou biologique des stérols présents en quantité majeure dans le mélange. Ainsi les composés **15**, **17**, **22** et **26** sont les produits courants d'auto-oxydation du cholestérol [14-17]. Leur présence en petite quantité, voire en traces, dans le mélange pourrait être la conséquence du stockage à l'air d'échantillons cristallins de stérols [15-18]. L'hydroxy-25-cholestérol (**23**) est également un des principaux produits d'auto-oxydation du cholestérol. Cependant ce composé apparaît après auto-oxydation de cholestérol *cristallin* exposé à l'air et ne se rencontre pas, en tant que tel, en solution, dispersion ou autres préparations de cholestérol [26]: 15 g de **23** ont été isolés par kilo de cholestérol stocké à l'air pendant 20 ans [17], tandis que de 0,34% et 0,14% ont été séparés dans d'autres échantillons datant respectivement de 24 et 2 ans [15]. Ces quantités sont nettement inférieures à celle reportée dans le *Tableau*: 4,9% de **23** dans le mélange de stérols de *D. hawaiiiana*, soit 10,9% par rapport au cholestérol présent dans cet échantillon. L'éponge et le mélange cristallin de ses stérols n'ayant pas été stockés longtemps à l'air, ni soumis à un chauffage excessif favorisant la formation et la décomposition de peroxydes [16], la majeure partie de **23** dans cet organisme ne doit pas être un artefact. La présence de **27** tend à le confirmer car ce composé n'a pas été détecté après auto-oxydation de l'éthyl-24-cholestérol (**25**) [19]. Le même raisonnement permet d'envisager l'origine naturelle de l'hydroxy-3 β -prégnène-5-one-20 (**9**). Sa proportion dans le mélange (6,7%) exclut sa formation par simple dégradation auto-oxydative artificielle du cholestérol, bien qu'il soit mentionné comme tel (12 mg de **9** isolés par kilo de cholestérol stocké à l'air pendant 20 ans [17]). Ce composé a d'ailleurs été isolé récemment d'une autre éponge [11] et il est peut-être un produit de bioconversion enzymatique du cholestérol. Cette scission oxydative biologique de la chaîne latérale du cholestérol est connue depuis longtemps chez les animaux supérieurs [20].

Les stérols **3** et **4** ont été aussi isolés à des concentrations inférieures à quelques millièmes % dans l'échantillon de cholestérol susmentionné [16] [17]. L'origine de **3** n'a pas été élucidée mais **4** est un produit de dégradation thermique de l'hydroperoxy-20 α -cholestérol. Ces composés sont aussi présents à l'état naturel (par ex. dans le sang périphérique humain [21]) et leur présence dans *D. hawaiiiana* à des concentrations nettement supérieures (0,6% du mélange) peut ne pas être un pur artefact mais provenir, comme pour **9**, d'une dégradation biologique du cholestérol ou d'un autre stérol à chaîne latérale «normale» [22].

La même conclusion est valable pour le céto-24-cholestérol (**21**) qui est un des produits obtenus par chauffage de l'hydroperoxy-24-cholestérol [23] et un artefact probable d'auto-oxydation du fucostérol [24] [25]. Cependant aucune trace de fucostérol n'a été détectée dans *D. hawaiiiana* et la présence de **21** en quantité relativement importante (1% du mélange) en fait un candidat de choix comme dérivé d'oxydation biologique du cholestérol.

Le stérol **14**, également oxydé dans sa chaîne latérale et présent à plus de 2% dans le mélange est particulièrement intéressant: il n'a encore jamais été isolé, ni comme constituant d'organisme marin, ni comme produit d'auto-oxydation d'autres stérols. Sa présence est à considérer comme une évidence supplémentaire

d'une dégradation oxydative biologique de la chaîne latérale des stérols majeurs, **19** et **24**, de *D. hawaiiiana*.

La mise en évidence dans un organisme marin d'une série de stérols présents plus qu'en traces et ne possédant pas de chaîne latérale (**1**, **2**) ou formés de chaînes latérales non fonctionnalisées à deux (**5**, **6**), trois (**7**, **8**), quatre (**10**), cinq (**11**) et six (**12**) atomes de carbone est sans précédent.

Les stérols **2**, **6** et **11** ont été détectés à des concentrations inférieures à un millième % dans l'échantillon de cholestérol stocké à l'air pendant 20 ans [17]. Leur formation aurait lieu *via* les hydroperoxy-25- et 20-cholestérols. La dégradation thermique du dernier composé donne d'ailleurs aussi le stérol **1** tandis que celle de l'hydroperoxy-24-cholestérol donne **10** [23]. Nous ne pouvons exclure que les composés correspondants isolés dans *D. hawaiiiana* soient des artefacts d'auto-oxydation mais il serait alors difficile d'expliquer leur présence en quantité si importante ainsi que la mise en évidence d'autres stérols à chaîne latérale courte **5**, **7**, **8**, **12** qui n'ont jamais été assimilés à des produits de dégradation artificielle. Nous nous sommes assurés (CPV.) que ces composants sont toujours présents après traitement du mélange initial avec NaBH₄ [26] [27], excluant ainsi le fait qu'ils soient engendrés uniquement par décomposition de peroxydes dans l'appareil. Si ces stérols à chaîne latérale hydrocarbonée courte ne sont pas des artefacts dérivés des stérols majeurs «normaux» ou des stérols à groupement oxygéné présents dans le mélange, ils peuvent être formés par dégradation biologique de ces mêmes stérols. Ceci est difficile à admettre car il n'existe pas, à notre connaissance, de dégradation biologique du cholestérol ou d'un autre stérol produisant un stérol non fonctionnalisé dans la chaîne latérale ou dans le cycle D [22]; ou bien, l'animal pourrait recevoir ces stérols particuliers par sa diète, hypothèse intéressante laissant supposer qu'il existe, dans le monde marin, des plantes ou organismes possédant ces composés en forte proportion.

Quoi qu'il en soit, l'origine générale des stérols dans les éponges est encore un sujet controversé [28] et la contribution relative de la synthèse des stérols *de novo* et de leur accumulation par la diète reste encore à évaluer dans les différentes familles d'éponges.

Les auteurs expriment leur gratitude envers le *Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique*, le *National Institutes of Health* (grants No. GM-06840, AM-04257 et RR-00612) pour leur support financier. Ils tiennent à remercier également les Dr. S. Popov, I. J. Massey et F. Gulaçar pour la mise à disposition d'échantillons de stérols de référence et Mlle A. Wegmann pour la prise des spectres de masse à haute résolution.

Partie expérimentale

Séparation des stérols. - Chromatographie liquide à haute pression en phase inversée (CLHP.): [2]. Une colonne de Partisil M9 10/50 ODS-2 (*Whatman Inc.*), 50 cm × 8 mm diamètre intérieur, est utilisée à une pression de 1200 psi. Phase mobile: méthanol (~8 ml/min). 15 mg de mélange de stérols de *D. hawaiiiana* dans 5 ml de méthanol sont chargés pour chaque séparation. Les 11 fractions récoltées sont évaporées sous vide à température ambiante avant analyse ultérieure. On effectue 5 séparations.

Chromatographie sur colonne: 600 mg de mélange initial de stérols sont élués sur une colonne de 60 g de silica gel (*E. Merck*, type 60; particules 0,063-0,2 mm de diamètre), avec hexane/éther 1:1 (800 ml), hexane/éther 1:2 (500 ml), éther (200 ml), méthanol (200 ml). Des fractions de 20 ml sont collectées automatiquement, analysées par CCM, et groupées en 4 fractions A à D.

Caractérisation des stérols. - Chromatographie sur couche mince (CCM.): plaques de 20 × 5 cm, couche de 0,25 mm de silica gel (*E. Merck* HF254 + 366 type 60); agent de visualisation: sulfate cérique dans H₂SO₄; éluant: hexane/éther 2:1.

Chromatographie en phase gazeuse (CPV.): chromatographe *Hewlett-Packard* 402A équipé d'un détecteur à ionisation de flamme; colonne de verre en U, 1,80 m × 4 mm diamètre intérieur, 3% OV-25 sur Gas Chrom Q (*Applied Sci. Inc.*); température 265°; gaz porteur: He, débit 100 ml/min.

Chromatographie gazeuse avec détection par spectrométrie de masse (CPV./SM.): *Varian* MAT-44. Le chromatographe est équipé d'une colonne hélicoïdale, 2,7 m × 2 mm diamètre intérieur; 3% SP-2250 sur Supelcoport 100/200 (*Supelco Inc.*); température 265°. Le spectromètre de masse opère à une énergie d'électron ionisante de 70 eV.

Les spectres de masse à haute résolution sont enregistrés à 70 eV avec un appareil *Varian* MAT 711 équipé d'un ordinateur PDP 11/45 pour acquisition des données. Les spectres UV. (méthanol) sont obtenus à l'aide d'un spectrophotomètre *Cary* 14, les spectres IR. (CHCl₃) à l'aide d'un spectrophotomètre *Perkin Elmer* 421 et les spectres de ¹H-RMN. à l'aide d'un spectromètre *Varian* XL-100 (100 MHz, CDCl₃, réf. interne: TMS = 0 ppm).

Hydroxy-3β-26,27-bisnor-22-trans-cholesta-5,22-dien-24-one (14). - F. 163-165°. - UV.: λ_{max} = 225 nm (ε = 15000). - IR.: bandes intenses à 1613, 1662 et 1685 cm⁻¹. - ¹H-RMN.: 6,63 (d × d, J = 16,3 et 8,5 Hz, 1 H, CH=C-CO); 5,96 (d, J = 16,3 Hz, 1 H, C=CH-CO); 5,32 (d, J = 5 Hz, 1 H, proton oléfinique du cycle B); 3,49 (m, 1 H, CHOH); 2,22 (s, 3 H, CH₃-CO); 1,11 (d, J = 6,6 Hz, 3 H, H₃C-C(21)); 1,01 (s, H₃C-C(19)); 0,72 (s, H₃C-C(18)). - SM. fragments caractéristiques: 370,28691 (29, C₂₅H₃₈O₂ = M⁺), 355,26536 (2, C₂₄H₃₅O₂), 352,27326 (17, C₂₅H₃₆O), 337,25228 (9, C₂₄H₃₃O), 319,24601 (4, C₂₄H₃₁), 285,22069 (5, C₂₀H₂₉O), 273,22415 (3, C₁₉H₂₉O), 271,20915 (10, C₁₉H₂₇O), 259,20567 (4, C₁₈H₂₇O), 255,21020 (14, C₁₉H₂₇), 253,19630 (8, C₁₉H₂₅), 231,17503 (7, C₁₆H₂₃O), 213,16750 (12, C₁₆H₂₁), 124,08846 (21, C₈H₁₂O), 98,07256 (100, C₆H₁₀O), 43,01870 (49, C₂H₃O).

RÉFÉRENCES

- [1] *D. J. Vanderah & C. Djerassi*, *Tetrahedron Letters* 1977, 683.
- [2] *S. Popov, R. M. K. Carlson, A. M. Wegmann & C. Djerassi*, *Steroids* 28, 699 (1976).
- [3] *S. Popov, R. M. K. Carlson, A. M. Wegmann & C. Djerassi*, *Tetrahedron Letters* 1976, 3491.
- [4] *E. Steiner, C. Djerassi, E. Fattorusso, S. Magno, L. Mayol, C. Santacroce & D. Sica*, *Helv.* 60, 475 (1977).
- [5] *C. Djerassi*, *Pure appl. Chemistry* 41, 113 (1975).
- [6] *C. Djerassi, R. M. K. Carlson, S. Popov & T. H. Varkony* dans 'Marine Natural Products Chemistry', *D. J. Faulkner & W. H. Fenical* Ed., Plenum Publishing Corp., New York 1977, p. 111.
- [7] *R. M. K. Carlson*, Ph.D. dissertation, Université de Stanford 1977.
- [8] *Z. V. Zaretskii*, 'Mass Spectrometry of Steroids', Israel Universities Press, Jerusalem 1976.
- [9] *R. M. K. Carlson, S. Popov, J. J. Massey, C. Delseith, E. Ayanoglu, T. H. Varkony & C. Djerassi*, *Bio-organic Chemistry*, sous presse.
- [10] *F. Gulaçar, I. J. Massey & C. Djerassi*, En cours de publication.
- [11] *J. A. Ballantine, K. Williams & B. A. Burke*, *Tetrahedron Letters* 1977, 1547.
- [12] *M. D. Higgs & D. J. Faulkner*, *Steroids* 30, 379 (1977).
- [13] *A. Kanazawa & S. Teshima*, *Bull. Japan. Soc. scientific. Fisheries* 37, 675 (1971).
- [14] *S. Bergström & B. Samuelsson* dans 'Autoxidation and Antioxidants', Vol. 1, *W. O. Lundberg*, Ed., Interscience Publishers, New York 1961, p. 233.
- [15] *L. F. Fieser & M. Fieser*, 'Steroids', Reinhold Publishing Corp., New York 1959, p. 233.
- [16] *J. E. Van Lier & L. L. Smith*, *J. org. Chemistry* 35, 2627 (1970).
- [17] *J. E. Van Lier & L. L. Smith*, *Steroids* 15, 485 (1970).
- [18] *J. I. Teng, M. J. Kulig, L. L. Smith, G. Kan & J. E. Van Lier*, *J. org. Chemistry* 38, 119 (1973).
- [19] *A. Dinner & K. Z. Farid*, *Lloydia* 39, 144 (1976).
- [20] *S. Burstein & M. Gut*, *Steroids* 14, 207 (1969).
- [21] *S. Sjovald & R. Viikko*, *Steroids* 7, 447 (1966).
- [22] *C. K. A. Martin* dans 'Advances in Applied Microbiology', vol. 22, *D. Perlman* Ed., Academic Press, New York 1977, p. 29.
- [23] *J. E. Van Lier & L. L. Smith*, *J. org. Chemistry* 36, 1007 (1971).
- [24] *B. A. Knights*, *Phytochemistry* 9, 903 (1970).
- [25] *A. M. Motzfeldt*, *Acta chem. Scand.* 24, 1846 (1970).
- [26] *L. L. Smith, W. S. Matthews, J. C. Price, R. C. Bachmann & B. Reynolds*, *J. Chromatogr.* 27, 187 (1967).
- [27] *J. E. Van Lier & L. L. Smith*, *J. Chromatogr.* 41, 37 (1969).
- [28] *L. J. Goad* dans 'Biochemical and Biophysical Perspectives in Marine Biology', Vol. 3, Academic Press, New York 1976, p. 213.