

240. Identification de stérols à chaîne latérale oxygénée dans une éponge de l'espèce *Hyrtios*¹⁾

par Patrick Koch* et Carl Djerassi

Department of Chemistry, Stanford University, Stanford, California 94305

et Vijai Lakshmi et Francis J. Schmitz

Department of Chemistry, University of Oklahoma, Norman, Oklahoma 73019

(21.VII.83)

Summary

Thirty-two sterols are identified in the sponge *Hyrtios* sp. In addition to fourteen monohydroxylated compounds, the sterol fraction contains eight functionalized side-chain sterols, three of them new: 3 β -hydroxy-24-norchol-5-en-23-al (**19**), (22-*trans*)-3 β -hydroxycholest-5,22-dien-24-one (**20**) and (22*R*, 23*R*, 24*S*) or (22*S*, 23*S*, 24*S*)-22,23-epoxy-24-methylcholest-5-en-3 β -ol (**24**). The probable biological origin, rather than artifact production, of these undescribed components is discussed.

Introduction. – Les surprenantes alkylations des stérols d'organismes marins ont suscité dans la dernière décennie un regain d'intérêt concernant la biosynthèse de ces composés [2]. Les structures hydrocarbonées monohydroxylées les plus fréquentes, de 27 à 30 atomes de carbone, ont fait l'objet principal de ces recherches. Les stérols dioxygénés ou/et les stérols à chaîne latérale courte dont la valeur biosynthétique ou taxonomique peut également être significative [3–5], ont été, comparativement, beaucoup moins étudiés. Le présent travail décrit l'identification dans une éponge de l'espèce *Hyrtios*²⁾ de 32 stérols parmi lesquels 8 stérols oxygénés dans la chaîne latérale; la rapide congélation après récolte des éponges à analyser nous permet d'envisager des hypothèses d'origines autres que l'autoxydation accidentelle au cours des manipulations. Un rôle d'intermédiaire biosynthétique ou une origine symbiotique possible sont discutés.

Résultats et discussion. – L'éponge, récoltée en mai 1979 à Guam, *Hotel Reef*, à environ 10 m de profondeur, a été congelée dans les 5 h qui suivirent sa récolte et conservée à –20°C. L'isolement et la purification des composants du mélange brut de stérols est faite progressivement et successivement par chromatographie sur colonne de gel et silice, chromatographie des dérivés acétylés sur plaques chromatographiques pré-

¹⁾ Partie 45: [1].

²⁾ Éponge incomplètement identifiée, appartenant à l'ordre *Dictyoceratida*, famille *Thorectidae*, genus *Hyrtios*?, espèce *Hyrtios*?, enregistrée au Smithsonian National Museum: «Specimen No. 31755».

Tableau 1

Stérol	R = Chaîne latérale	M^+	Temps de rétention relatifs en		% ^{a)}
			CLHP	CPV	
	R ¹				
1		370	0,65	0,67	0,5
2		384	0,74	0,89	0,6
3		384	0,77	0,94	2,5
4		386	1,00	1,00	26,9
5		398	0,84	1,15	14,0
6		398	0,89	1,13	11,3
7		398	1,23	1,31	0,2
8		400	1,13	1,31	12,1
9		412	1,03	1,42	2,8
10		412	1,00	1,80	4,0
11		414	1,13	1,61	4,1
12		426	1,03	2,05	1,5
	R ²				
13		388	1,13	0,97	0,4
14		416	1,23	1,61	0,1

^{a)} Pourcentage dans le mélange total de stérols.

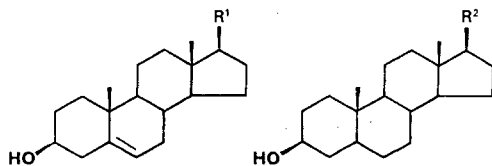
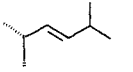
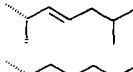
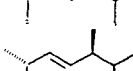
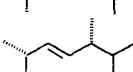
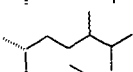
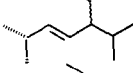
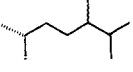
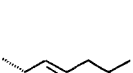
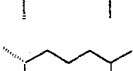

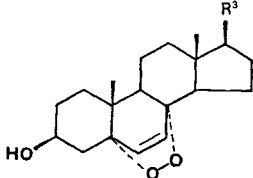
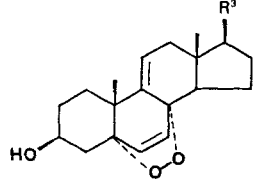


Tableau 2

Chaîne latérale	M^+	Temps de rétention relatifs en CLHP (MeOH/H ₂ O, 92:8)
	400	0,61
	414	0,75
	416	1,00
	428	0,88
	428	0,91
	430	1,27
	442	1,15
	444	1,35
	412	0,61
	426	0,71






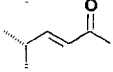
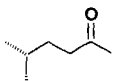

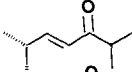
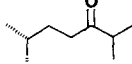
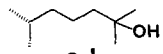

paratives traitées au nitrate d'argent et une ou deux séparations et purification, selon la complexité des sous-fractions, par chromatographie liquide haute performance (CLHP) des stérols après saponification. Les fractions sont analysées par chromatographie en phase vapeur avec détection par spectrométrie de masse (CPV/SM) puis étudiées par ¹H-RMN.

L'identification du composé isolé est faite par comparaison du comportement chromatographique (temps de rétention relatif en CPV et en CLHP) et des données spectrales (SM et ¹H-RMN) avec ceux du produit de référence.

Les stérols conventionnels (81 % des stérols totaux), monohydroxylés en position 3β et épidioxydes-5α,8α, identifiés dans l'éponge *Hyrtilios sp.* sont présentés dans les Tableaux 1 et 2; ils sont tous connus et caractérisés [6] [7].

Après élution du cholestérol 4, stérol majeur, et des autres stérols conventionnels de polarité voisine, la colonne chromatographique de gel de silice livre une fraction de stérols plus polaires (19% des stérols totaux), mélange très complexe d'après l'analyse en CLHP (MeOH/H₂O, 92:8) et dont 60% des composants ont été identifiés (Tableau 3).

Tableau 3

Stérol	Chaîne latérale	M^+	Temps de rétention en CLHP (min)	Temps de rétention relatif en CPV ^{b)}	% ^{a)}
	R ¹				
15		316	14,1	0,54	1,3
16		370	20,4	1,80	2,2
17	non identifiée (n.i.)	370	28,8	1,82	2,8
18		372	24,6	1,60	0,5
19		386 ^{c)}	31,2	1,35 ^{c)}	2,7
20		398	28,8	2,41	0,8
21		400	37,8	2,19	3,4
22	n.i.	400	48,6	1,80	0,3
23		402	31,2	2,68 ^{c)}	0,1
24		414	62,4	2,27	0,5
25	n.i.	414	59,4	2,24	0,2
26	n.i.	414	52,8	2,62	0,2
27	n.i.	428	62,4	2,90	1,0
28	n.i.	442	78,6	3,40	0,6
29	n.i.	444	99,6	1,90 ^{c)}	0,3
Produits mineurs non analysables					2,1

^{a)} Pourcentage dans le mélange total de stérols.

^{b)} Cholestérol = 1,00.

^{c)} Dérivé acétylé.

Les stérols **15** et **18** ont été également identifiés dans l'éponge *Psammaphysilla purpurea*, dans des pourcentages similaires, soit 0,9 et 1,1% [8]. La cétone **16**, analogue α, β -insaturé de **18**, a été isolée de l'éponge *Damiriana hawaiiiana* dans les mêmes proportions (2,1%) [4]. De la deuxième paire de cétones, saturée **21** et insaturée **20**, seule **21** a été isolée de l'éponge *D. hawaiiiana*, en moindre quantité toutefois (1%). Si l'autoxydation est responsable de l'origine de ces stérols, il est intéressant de noter que l'hydroxy-25-cholestérol (**23**), important produit d'autoxydation du cholestérol *crystallin*, n'est présent dans l'éponge *Hyrtilios* qu'à l'état de trace (0,1%), contre 4,9% dans *D. hawaiiiana*. Cette observation permet de supposer que dans une éponge au moins l'autoxydation n'a pas lieu. Aucun autre diol n'a par ailleurs été identifié ni détecté dans l'éponge *Hyrtilios*.

L'énone **20**, l'aldéhyde **19** et l'époxyde **24** n'ont jamais été décrits comme stérols naturels ni mentionnés comme produits d'autoxydation de stérols [9]. L'identification simultanée de l'époxy-22, 23-campesterol **24** et de l'hydroxy-3 β -nor-24-cholène-5-al-23 (**19**) est à mettre en parallèle avec l'isolement d'époxy-22, 23-stéroïdes et d'oxo-23-stéroïde dans *Echinaster Sepositus* [10] et apporte un appui supplémentaire au rôle biosynthétique que pourraient jouer les époxy-22, 23-stéroïdes dans la transformation biologique en composés carbonylés en position 23 [11].

Le nombre et l'importance des stérols à chaîne latérale fonctionnalisée dans l'éponge *Hyrtios* suggère l'hypothèse d'une dégradation oxydative biologique de la chaîne latérale des stérols majeurs. L'absence de stérols à chaîne latérale courte non fonctionnalisée dont l'origine autoxydative est quasi admise, renforce cette hypothèse [3].

Les auteurs expriment leur gratitude envers le *National Institutes of Health* (grant No. GM06840-25) pour leur support financier.

Partie expérimentale

Chromatographie en phase vapeur (CPV): chromatographe *Hewlett-Packard 402A* équipé d'un détecteur à ionisation de flamme, colonne en «U», 180 \times 0,4 cm diamètre intérieur; phase: 3% OV-17/GCQ; gaz vecteur: hélium, 100 ml/mn; température du four: 260°C. **Chromatographie liquide haute performance (CLHP):** pompe *Waters Assoc. M6000*; injecteur *Waters Assoc. U6K*; colonnes de phase inversée *Wathman Partisil M9 10/50 ODS-2* ou *Altex Ultrasphere-ODS 5 μ m (25 cm \times 10 mm diamètre intérieur, 2 colonnes en série) éluée (3 ml/min) au MeOH (stérols conventionnels) et au mélange MeOH/H₂O (stérols oxygénés); détecteur: réfractomètre différentiel *Waters Assoc. R401*. **Spectrométrie de masse (SM):** spectromètre *Varian MAT-44* opérant à 70 eV. SM-haute résolution: spectromètre *MS-50 Kratos* équipé d'une unité de traitement de données *DS-55* ¹H-NMR: *Nicolet XL 300* ou *Brucker HXS-360*. **Spectrométrie IR:** spectrophotomètre *Beckman AccuLab-3* (CDCl₃).*

Extraction et séparation. L'éponge, décongelée le jour de l'extraction, est immédiatement traitée par un mélange de CHCl₃ et de MeOH (2:1, v/v). Une première partition de l'extrait concentré entre CH₂Cl₂ et eau donne une phase organique partagée entre hexane et MeOH aqueux (10% d'eau dans le MeOH). Le résidu de la phase hexanique est chromatographié sur gel de silice, élué à l'aide d'un gradient hexane/benzène puis par 5% d'acétate d'éthyle dans le benzène qui livre successivement le mélange de stérols monohydroxylés en position 3 β (stérols conventionnels) et le mélange de stérols dioxylés plus polaires. Les stérols conventionnels sont acétylés, séparés par chromatographie sur plaques préparatives (épaisseur: 0,75 mm) traitées au nitrate d'argent, saponifiés puis purifiés par CLHP. La fraction enrichie de stérols polaires est injectée en CLHP. Les sous-fractions les plus complexes sont acétylées, purifiées par chromatographie sur plaques analytiques traitées au nitrate d'argent et réinjectées en CLHP pour purification finale.

Acétoxy-3 β -nor-24-cholène-5-al-23 (19). IR: 1710, 1720m 2720. ¹H-RMN: 0,731 (*s*, 3 H, 3 H-C(18)); 1,021 (*s*, 3 H, C(19)); 1,023 (*d*, *J* = 6, 3 H, 3 H-C(21)); 2,032 (*s*, 3 H, CH₃COO); 4,6 (*m*, 1 H, H α -C(3)); 5,37 (*d*, *J* = 5,1, 1 H, HC=C, cycle B); 9,756 (*d*, *J* = 3, 1 H). SM-haute résolution, fragments caractéristiques: 326,2610 (*M*⁺ - C₂H₄O, calc. pour C₂₃H₃₄O 326,2610), 311,2376 (C₂₂H₃₁O), 298,2660 (C₂₂H₃₄), 282,2332 (C₂₁H₃₀), 255,2087 (C₁₉H₂₇), 253,1994 (C₁₉H₂₅), 218,1662 (C₁₅H₂₂O), 213,1648 (C₁₆H₂₁).

(22-trans)-Hydroxy-3 β -cholestadiène-5,22-one-24 (20). IR: 1610, 1660, 1685. ¹H-RMN: 0,721 (*s*, 3 H, 3 H-C(18)); 1,012 (*s*, 3 H, 3 H-C(19)); 1,100 (*d*, *J* = 6,8, 9 H); 2,83 (*m*, 1 H, H-C(25)); 3,53 (*m*, 1 H, H α -C(3)); 5,3 (*d*, *J* = 5, 1 H); 6,068 (*d*, *J* = 15,6, 1 H, H-C(23)); 6,716 (*dd*, *J* = 15,7 et 8,97, 1 H, C-H(22)). SM: 398 (*M*⁺), 383 (*M*⁺ - CH₃), 380 (*M*⁺ - H₂O), 365, 355, 337, 313, 309, 287, 271, 255, 239, 126.

(22 R, 23 R, 24 S)- ou (22 S, 23 S, 24 S)-époxy-22,23-méthyl-24-cholestène-5-ol-3 β (24). ¹H-RMN: 0,670 (*s*, 3 H, 3 H-C(18)); 0,911 (*d*, *J* = 7, 3 H); 0,920 (*d*, *J* = 6,8, 3 H); 0,963 (*d*, *J* = 6,9, 3 H); 1,009 (*s*, 3 H, 3 H-C(19)); 1,093 (*d*, *J* = 5,5, 3 H, 3 H-C(21)); 2,372 (*dd*, *J* = 7,6 et 2,2, 1 H); 2,662 (*dd*, *J* = 8,3 et 2,1 1 H); 3,53 (*m*, 1 H, H α -C(3)); 5,35 (*d*, *J* = 5, 1 H). SM-haute résolution: 414,3493 (*M*⁺, calc. pour C₂₈H₄₆O₂ 414,3498), 396,3353 (C₂₈H₄₄O), 343,2648 (C₂₃H₃₅O₂), 325,2555 (C₂₃H₃₃O), 312,2474 (C₂₂H₃₂O), 299,2390 (C₂₁H₃₁O), 297,2224 (C₂₁H₂₉O), 281,2266 (C₂₁H₂₉), 255,2114 (C₁₉H₂₇), 239,1794 (C₁₈H₂₃), 213,1652 (C₁₆H₂₁).

BIBLIOGRAPHIE

- [1] *B. V. Crist, X. Li, P. R. Bergquist & C. Djerassi*, *J. Org. Chem.*, en cours de publication.
- [2] *C. Djerassi*, *Pure Appl. Chem.* **53**, 873 (1981).
- [3] *R. M. K. Carlson, S. Popov, I. Massey, C. Delseth, E. Ayanoglu, T. H. Varkony & C. Djerassi*, *Bioorg. Chem.* **7**, 453 (1978).
- [4] *C. Delseth, R. M. K. Carlson & C. Djerassi*, *Helv. Chim. Acta* **61**, 1470 (1978).
- [5] *E. Fattorusso, S. Magno, C. Santacroce & D. Sica*, *Phytochemistry* **14**, 1579 (1975).
- [6] *T. Itoh, D. Sica & C. Djerassi*, *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 1983, 147 et références citées.
- [7] *A. A. L. Gunatilaka, Y. Gopichand, F. J. Schmitz & C. Djerassi*, *J. Org. Chem.* **46**, 3860 (1981).
- [8] *E. Ayanoglu, C. Djerassi, T. R. Erdman & P. J. Scheuer*, *Steroids* **31**, 815 (1978).
- [9] *L. L. Smith*, 'Cholesterol Autoxidation', Plenum Publishing Corp., New York, 1981.
- [10] *L. Minale & R. Riccio*, *Tetrahedron Lett.* 1979, 645.
- [11] *Y. M. Sheikh, B. M. Tursch & C. Djerassi*, *J. Am. Chem. Soc.* **94**, 3278 (1972).