

FUNGI

BASIDIOMYCETES

TRITERPÈNES ET STÉROLS DE *LENZITES TRABEA*

VICTOR RAUL VILLANUEVA

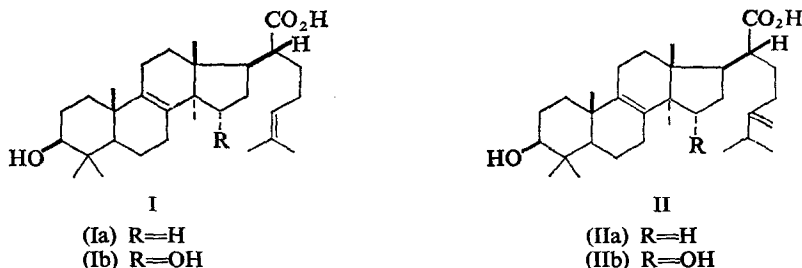
Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91-Gif-sur-Yvette, France

(Received 27 July 1970)

Abstract—Triterpenoid acids and sterols from the mycelium of the woodrotting fungus *Lenzites trabea* have been investigated. In addition to trametenolic and 15 α -hydroxytrametenolic acids the following compounds were identified: eburicoic and sulfurenic acids, 24-methylenelanosterol, ergosterol and fungisterol. Triterpenoid composition of normal cultures was compared to that of submerged cultures. The main effects of submerged cultures is the increase of trametenolic and eburicoic acids and the decrease of 15 α -hydroxytrametenolic acid.

INTRODUCTION

DEUX acides en C₃₀: l'acide traméténolique C₃₀H₄₈O₃ (Ia) et l'acide 15 α -hydroxytraméténolique C₃₀H₄₈O₄ (Ib) ont été précédemment isolés du basidiomycète *Lenzites trabea* par Lawrie et coll.¹ Nous nous sommes intéressé à ces acides en raison de leur rôle possible comme précurseur de leurs homologues possédant un groupe méthylène en C-24: les acides éburicoïque (IIa) et sulfurénique (IIb).



Dans le cadre d'essais préliminaires ayant pour but l'obtention rapide des acides traméténolique et 15 α -hydroxytraméténolique, nous avons mis au point des méthodes de culture agitées et submergées de *Lenzites trabea*; elles nous ont permis de réduire le temps de croissance maximale de 3 mois à 15 jours. Nous avons été ainsi amené à comparer les principaux composants triterpéniques de ce champignon obtenus à partir des ces cultures. Les résultats de ce travail font l'objet de la présente note.

RESULTATS

Nous avons largement utilisé les techniques chromatographiques et de spectrométrie de masse pour l'analyse des fractions isolées, en nous référant à des échantillons authentiques et à leurs dérivés acétylés. Nous avons mis au point une technique d'isolement portant sur les acides libres (et non sur leurs esters méthyliques). Les résultats obtenus sont resumés au tableau.

¹ W. LAWRIE, J. MCLEAN et J. WATSON, *J. Chem. Soc. (C)* 1776 (1967).

TABLEAU 1

Substances	Culture statique (3 mois) (%)	Culture agitée (15 jours) (%)
acide traméténolique	35	50
acide OH-15 α traméténolique	40	18
acide éburicoïque	20	25
acide sulfurénique	5	7
méthylène-24 lanostérol	non décelé	présent en traces
ergostérol		
fungistérol		

Ces chiffres sont exprimés en pourcentage de la fraction triterpénique totale; ils sont calculés à partir de la hauteur des pics moléculaires en spectrométrie de masse et sont valables à $\pm 10\%$ des valeurs indiquées.

On constate que l'effet principal de la culture agitée est l'acroissement de la quantité des acides traméténolique et éburicoïque et la diminution de celle de l'acide 15 α -hydroxytraméténolique. Signalons que les acides éburicoïque et sulfurénique ainsi que le méthylène-24 lanostérol, l'ergostérol et le fungistérol n'avaient jamais été trouvés dans cette souche.

ANALYSE DES TRITERPENES ET STEROLS

(a) *Monohydroxyacides triterpéniques*. Les acides traméténolique (Ia) et éburicoïque (IIa) chromatographiés sur plaque d'acide silicique impregné de carbonate de sodium (solvent, benzène-acétone, 9:11) ont respectivement un R_f de 0,42 et 0,52 (de 0,65 et 0,72 pour les acétates correspondants). La spectrométrie de masse* effectuée sur le mélange des alcools libres ou de leurs dérivés acétylés donne des résultats tout à fait comparables à ceux obtenus avec des échantillons authentiques. On voit la fragmentation caractéristique de ces composés triterpéniques avec des pics à $M^+ - 15$ ($M^+ - CH_3$), $M^+ - 15 - 18$ ($M^+ - CH_3 - H_2O$) et m/e 281 et m/e 299 (attribuables à la perte de la chaîne latérale et d'un groupe méthyle avec ou sans perte d'une molécule d'eau par un mécanisme selon McLafferty).²

(b) *Dihydroxyacides triterpéniques*. Les acides OH-15 α traméténolique (Ib) et sulfurénique (IIb), chromatographiés sur les mêmes plaques que précédemment (solvent, éther éthylique) ont respectivement un R_f de 0,54 et 0,60. Le spectre de masse du mélange des alcools libres montre des pics à $M^+ - 15$ ($M^+ - CH_3$), $M^+ - 15 - 18$ ($M^+ - CH_3 - H_2O$) et $M^+ - 15 - 36$ ($M^+ - CH_3 - 2H_2O$), qui suggèrent la présence de deux groupes hydroxyles, confirmée par la spectrométrie de masse des dérivés acétylés et méthylés. Le pic à m/e 289 peut être attribué à la perte de la chaîne latérale et d'un groupe méthyle.

D'après la spectrométrie de masse on decèle à côté de ces acides, des pics de faible intensité possédant deux unités de masse de moins attribuables aux diènes 7, 9(11) correspon-

* Nous remercions MM. Cosson et Bardey qui ont effectué les spectres de masse sur un appareil AEI MS9; température d'introduction: entre 180° et 240°. De même nous remercions vivement MM. les Drs. B. C. Das et A. Alcaide pour les discussions très fructueuses concernant la spectrométrie de masse de triterpènes et stérols.

² V. R. VILLANUEVA, M. BARBIER et E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **49**, 389 (1967).

dants. En effet, le spectre ultraviolet de ces acides contient un triplet de basse intensité à 236, 243 et 252 nm. Cette observation est fréquente pour la série des acides triterpéniques des champignons.³⁻⁶

(c) *Alcools triterpéniques*. La fraction isolée par chromatographie sur colonne puis par chromatographie sur couche mince (R_f 0,56) a été soumise à la réaction de Liebermann-Burchard; elle donne une coloration jaune, comparable à celle produite par des échantillons authentiques de lanostérol⁷ et méthylène-24 lanostérol. L'analyse par spectrométrie de masse montre un pic principal à m/e 440 ($C_{31}H_{52}O$). Ce spectre est comparable à celui d'un méthylène-24 lanostérol authentique. Il donne un pic de base à m/e 425 ($M^+ - CH_3$) et un pic à m/e 407 ($M^+ - CH_3 - H_2O$). La présence du groupe méthylène-24 est indiquée par le pic à m/e 341 représentant la perte d'une partie de la chaîne latérale (-84) à partir de $M^+ - 15$, par un mécanisme selon McLafferty dû à la double liaison 24(28)⁸⁻¹¹

On observe aussi des pics de masse de plus faible intensité à $M^+ 426$ ($C_{30}H_{50}O$) et à $M^+ 428$ ($C_{30}H_{52}O$) pouvant correspondre respectivement au lanostérol et au dihydro-24 lanostérol.

(d) *Stérols*. Par chromatographie sur colonne nous avons isolé une fraction de même R_f que l'ergostérol, positive à la réaction de Liebermann-Burchard.¹² Les spectres u.v. et de masse sont tout à fait comparables avec ceux obtenus avec un échantillon authentique d'ergostérol. Le spectre de masse montre les coupures caractéristiques de ce stérol à m/e 363 ($M^+ - CH_3 - H_2O$), m/e 337, m/e 271 et m/e 253; ces deux derniers pics correspondant à la perte de la chaîne latérale accompagnée ou non de la perte d'une molécule d'eau.

D'autres fractions, moins pures que la précédente, mais positives à la réaction de Liebermann-Burchard ont été réunies et chromatographiées sur plaque préparative d'acide silicique (solvent, hexane-acétate d'éthyle 65:35). On isole ainsi une zone principale de même R_f que l'ergostérol (0,66) qui est fortement positive à la réaction de Moore et Baumann,¹² caractéristique des doubles liaisons en position 7. A la spectrométrie de masse elle donne deux pics principaux à m/e 396 ($C_{28}H_{44}O$) et m/e 400 ($C_{28}H_{46}O$) attribuables respectivement à l'ergostérol et au fungistérol (ergostène-7, α - β), déjà trouvé dans d'autres champignons.¹³⁻¹⁵ La présence du fungistérol peut être expliquée par l'abondance relativement importante du pic moléculaire (m/e 400) par rapport à m/e 385 ($M^+ - CH_3$) et la faible intensité des pics à m/e 382 ($M^+ - H_2O$) et à m/e 367 ($M^+ - CH_3 - H_2O$), fragmentation caractéristique des stérols Δ -7; la perte de la chaîne latérale accompagnée ou non d'une molécule d'eau est indiquée par les ions à m/e 255 et m/e 273.¹⁶

³ L. A. CORT, R. M. GASCOIGNE, J. S. E. HOLKER, B. J. RALPH, A. ROBERTSON et J. J. H. SIMES, *J. Chem. Soc.* 3713 (1954).

⁴ J. M. GUIDER, T. G. HALSALL, R. HODGES et E. R. H. JONES, *J. Chem. Soc.* 3234 (1954).

⁵ A. KANEMATSU et S. NATORI, *Chem. Pharm. Bull.* 18, 779 (1970).

⁶ H. UNOUE, K. TOKURA et T. HAYASHI, *Tetrahedron Letters* 2811 (1970).

⁷ E. LEDERER et P. K. TCHEN, *Bull. Soc. Chim. Biol.* 27, 419 (1944).

⁸ P. BENVENISTE, L. HIRTH et G. OURISSON, *Phytochem.* 5, 31, 45 (1966).

⁹ J. BERGMAN, B. O. LINDGREN et C. M. SVAHN, *Acta Chem. Scand.* 19, 1661 (1965).

¹⁰ R. T. APLIN et G. M. HORNBY, *J. Chem. Soc. (B)* 1078 (1966).

¹¹ L. J. GOAD, B. L. WILLIAMS et T. W. GOODWIN, *Europ. J. Biochem.* 3, 232 (1967).

¹² M. JAVILLIER, *Traité de Chimie Organique de Grignard* 16, 853 (1949).

¹³ N. FRÖSCHL et J. ZELLNER, *Monatsh.* 50, 201 (1928); *Monatsh.* 53-54, 146 (1929). E. HARTMANN et J. ZELLNER, *Monatsh.* 50, 193 (1928). J. ZELLNER et E. ZIKMUNDA, *Monatsh.* 56, 200 (1930), L. LUKACS et J. ZELLNER, *Monatsh.* 62, 214 (1933). O. RUTHNER et J. ZELLNER, *Monatsh.* 66, 76 (1935).

¹⁴ H. WIELAND et G. COUTELLE, *Annalen* 548, 270 (1941).

¹⁵ T. G. HALSALL et G. C. SAYER, *J. Chem. Soc.* 2031 (1959).

¹⁶ S. G. WYLLIE et C. DJERASSI, *J. Org. Chem.* 33, 305 (1968).

La spectrométrie de masse montre aussi que l'ergostérol et le fungistérol sont accompagnés des pics de très faibles intensité à m/e 394 ($C_{28}H_{42}O$) et à m/e 398 ($C_{28}H_{46}O$), pouvant correspondre à leurs dérivés déshydrogénés.

PARTIE EXPERIMENTALE

Cultures. *Lenzites trabea* a été cultivé pendant 3 mois selon une technique déjà décrite.¹ A partir de ces cultures âgées d'un mois on a adapté la souche au milieu agité,¹⁷ pendant 15 jours puis ensemencé dans un fermenteur "Biolafitte". Cette culture agitée a été poursuivie 15 jours à 30°.

Isolément des produits bruts. Le mycelium récupéré par centrifugation, lavé à l'eau et séché est extrait à l'aide d'un appareil Soxhlet, d'abord par l'éther de pétrole pendant 20 hr (700 mg) puis par l'éther éthylique pendant 5 jours. On obtient ainsi 4,5 g de produit brut, que l'on cristallise dans le mélange isopropanol-éther-acétone. Les cristaux obtenus (800 mg) ont été chromatographiés sur une colonne de 50 g d'acide silicique imprégné de CO_3Na_2 (50 g d'acide silicique sont homogénéisés dans 100 ml d'une solution 0,01 M de CO_3Na_2 ; on laisse sécher une nuit à la température du laboratoire et on l'active 30 min à 100° avant utilisation). Nous avons élué avec du benzène contenant des pourcentages croissants d'acétone (0, 15, 30 et 40 %). Les premières fractions contiennent de petites quantités d'alcools triterpéniques; les fractions suivantes, de l'acide éburicoïque et des mélanges variables des acides éburicoïque et traméténolique.

Les fractions contenant les alcools triterpéniques ont été réunies et chromatographiées sur plaque préparative d'acide silicique (solvent, benzène-acétone 85:15); on isole ainsi une zone principale de R_f 0,56 qui contient comme produit majeur le méthylène-24 lanostérol. Les eaux mères de cristallisation ont été amenées à sec puis extraites par le benzène à 60°. La partie insoluble (700 mg) représente les dihydroxyacides: OH-15 α traméténolique et sulfurénique. 1,4 g de la partie soluble dans le benzène ont été chromatographiés sur une colonne de 75 g d'acide silicique mélangé avec 25 g de celite. On développe avec de l'éther de pétrole contenant des pourcentages croissants d'éther éthylique (0, 2, 5, 10, 15, 20, 30 et 40 %). Nous avons ainsi obtenu l'ergostérol, le fungistérol et les monohydroxyacides: éburicoïque et traméténolique.

Remerciements—Nous remercions M. le Professeur E. Lederer pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

¹⁷ S. C. PAN et W. R. FRAZIER, *Biotechnology and Bioengineering Vol. IV*. 303 (1962).

Phytochemistry, 1971, Vol. 10, pp. 430 to 432. Pergamon Press. Printed in England.

BRYOPHYTA

HEPATICAE

FATTY ACID ESTERS IN THE VOLATILE OIL FROM THE LIVERWORT, *PELLIA FABBRONIANA**

AKIHIKO MATSUO, MITSURU NAKAYAMA and SHÛICHI HAYASHI

Department of Chemistry, Faculty of Science, Hiroshima University, Hiroshima, Japan

(Received 14 May 1970, in revised form 15 July 1970)

Abstract—Methyl decanoate, undecanoate, laurate, tridecanoate, myristate, pentadecanoate, palmitate, oleate and stearate were isolated as steam-volatile components from this liverwort. Total amounts of these methyl esters accounted for 75.3 per cent of the steam-volatile substances and methyl palmitate (60 %) was the major constituent.

INTRODUCTION

DURING the last few years the following sesquiterpenes and related compounds have been detected in the essential oils of some liverworts: 1,4-dimethyl- and 4-methyl-1-methoxy-

* Chemical constituents from Hepaticae, Part V: Part IV, A. MATSUO and S. HAYASHI, *Tetrahedron Letters* 1289 (1970).