

PHENYLPOLYENES D'ASPERGILLUS NIGER: STRUCTURE ET PROPRIETES DE L'ASPERRUBROL

MAURICE RABACHE, JOSEPH NEUMANN et JEAN LAVOLAY

Laboratoire de Chimie Agricole et Biologique, Conservatoire National des Arts et Métiers,
292 rue Saint-Martin, 75003 Paris, France

(Reçu le 31 juillet 1973. Accepté le 24 août 1973)

Key Word Index—*Aspergillus niger*; Hyphomycetes; Fungi; phenylpolyenes; asperenone; asperrubrol; keto-enolisation; fungal pigments.

Abstract—When grown on a synthetic medium containing Zn^{2+} and Cd^{2+} in toxic concentrations and a high concentration of Mg^{2+} , the mycelium of *Aspergillus niger* ATCC 9029 is pigmented yellow. Four pigments have been chromatographically separated. Two are still unknown; the others are asperenone and asperrubrol. Asperrubrol is the methyl ester of a dimethyl 13-phenyl-3-ol-2,4,6,8,10,12-tridecahexaenoic acid. One of the methyl groups is on C_2 and the other is probably at C_8 . Asperrubrol has been obtained as the enol of the *all trans* molecule; keto-enolisation can be obtained by action of heat or alkalis. When grown on the same medium, 13 of 17 strains of *A. niger* produced asperrubrol and asperenone.

Résumé—*Aspergillus niger* ATCC 9029 cultivé sur un milieu de composition définie renfermant des concentrations élevées de Zn^{2+} , Cd^{2+} et Mg^{2+} se pigmente en jaune. Quatre pigments ont été séparés par chromatographie: l'asperrubrol dont la structure correspond à l'ester méthylique de l'acide diméthyle, phényle-13, ol-3, tridécahexaène-2,4,6,8,10,12 oïque, l'asperénone et deux pigments non identifiés. L'un des méthyles de l'asperrubrol est situé sur le C_2 , la position 8 est retenue comme la plus probable pour le second. Lors de son isolement l'asperrubrol est sous la forme énolique et entièrement *trans*. La cetoénolisation peut-être obtenue par chauffage ou alcalinisation. Parmi 17 souches d'*Aspergillus niger* cultivées dans les mêmes conditions, 13 produisent de l'asperrubrol et de l'asperénone.

INTRODUCTION

A PARTIR du mycelium d'*Aspergillus awamori*, Arima *et al.*¹ ont isolé un pigment jaune de formule $C_{20}H_{22}O$: l'asperyellone dont la structure moléculaire, étudiée par Yu *et al.*² est celle d'un phénylpolyène, dérivé méthylé de la phényle-13, tridécapentaène-4,6,8,10,12 one-3. Le groupement méthyle porté par la chaîne polyénique a été situé en position 7 (1a). Les Auteurs avaient trouvé ce pigment dans huit souches d'*A. awamori* et trois souches d'*A. niger*.

Indépendamment, Jefferson³ a obtenu à partir du mycelium d'*Aspergillus niger* NRRL 3, cultivé dans un milieu au glycérol fortement aéré, un pigment de même formule: l'asperénone, dont le groupe méthyle a été situé sur le C_8 de la chaîne polyénique (1b). La synthèse des dérivés méthylés en position 6, 7 ou 8 de la phényle-13, tridécapentaène-4,6,8,10,12 one-3 a été réalisée par Pattenden,⁴ ce qui lui a permis de confirmer la présence du méthyle sur le C_8 . Il a été suggéré par Jefferson que l'asperyellone est identique à l'asperénone.

¹ ARIMA, K., YU, J. et TAMURA, G. (1967) *Nippon Nogei Kagaku Kaishi* **41**, 571; *Chem. Absts* (1969) **70**, 64456.

² YU, J., TAMURA, G., TAKAHASHI, N. et ARIMA, K. (1967) *Agric. Biol. Chem. Japan* **31**, 831.

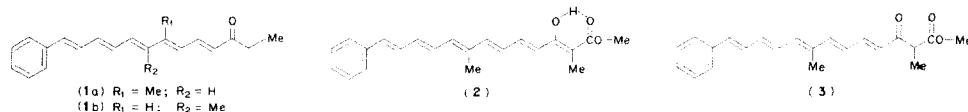
³ JEFFERSON, JR., W. E. (1967) *Biochemistry* **6**, 3479.

⁴ PATTENDEN, G. (1970) *J. Chem. Soc. C*, 1404.

D'autre part, sur un milieu de culture dérivé de celui de Steinberg,⁵ contenant les ions Zn^{2+} et Cd^{2+} en concentrations toxiques et un excès de Mg^{2+} , le mycélium aérien d'*A. niger* ATCC 9029 produit un mélange de pigments jaunes liposolubles; l'un d'eux, l'asperrubrol, a été précédemment isolé et décrit.⁶ Le présent travail concerne l'identification d'un second pigment et une étude plus approfondie de la structure et des propriétés de l'asperrubrol.

RESULTATS ET DISCUSSION

La chromatographie en couche mince (CCM) d'un extrait purifié révèle la présence de quatre composés jaunes: α , β , γ , δ . Ils ont été séparés par chromatographie sur colonnes de silice-gel. Seuls les pigments β et γ ont été obtenus à l'état cristallisé.



Pigment β

Le spectre de masse (SM) (M^+ 278) est en accord avec la formule brute $C_{20}H_{22}O$. La molécule comprend: (a) un noyau aromatique (m/e 77; δ 7,2 ~ 7,5, *m*); le noyau est mono-substitué (m/e 91; l'intensité du signal à 7,2 ~ 7,5 correspond à 5 H); (b) une chaîne polyénique (m/e 221, 249; δ 6 ~ 7, *m*). La chaîne polyénique porte un groupe méthyle (δ 1,94, *s*) et un groupe éthyle (m/e 57, 221 et 29, 249; δ 2,47, *q* et 1,05, *t*).

TABLEAU 1. SPECTRES RMN: ASPERYELLOWNE (1a), ASPERÉNONE (1b), PIGMENT β

| Absorption | Intensité relative | 1a) ¹ | 1b) ³ | Pigment β |
|--|--------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| <u>H</u> aromatiques | 5 | 7.4 ~ 7.7 (m) | 7.2 ~ 7.5 (m) | 7.2 ~ 7.5 (m) |
| <u>H</u> oléfiniques | 9 | 6 ~ 7.4 (m) | 6 ~ 7 (m) | 6 ~ 7 (m) |
| -CO-CH ₂ - | 2 | 2.64 (q) (J 7 Hz) | 2.55 (q) (J 7 Hz) | 2.47 (q) (J 7 Hz) |
| $\begin{array}{c} \\ =C-CH_3 \\ -CH_3 \end{array}$ | 3 | 1.98 (s) | 1.90 (s) | 1.94 (s) |
| | 3 | 1.15 (t) (J 7 Hz) | 0.90 (t) (J 7 Hz) | 1.05 (t) (J 7 Hz) |

Le déplacement chimique des protons du groupe méthylène est très voisin de celui décrit par Jefferson pour l'asperénone.³ Comme dans le cas de ce pigment, les fragments qui comportent 10, 11, 13 et 14 carbones sont plus abondants que ceux qui en comportent 12. Les différences que présentent les spectres UV-visible de ces deux pigments dans l'hexane, d'une part et dans l'éthanol, d'autre part, sont identiques. Ces différences sont caractéristiques d'un carbonyle conjugué avec un polyène. La comparaison des données des Tableaux 1 et 2 montre l'identité du pigment β avec l'asperénone (1b) et la parenté de ces deux pigments avec l'aspervellone.

Piament γ

Ce pigment s'identifie à l'asperrubrol. Il a été montré⁶ que la molécule de ce composé comporte un noyau aromatique monosubstitué (*m/e* 77, 91; δ 7.2 \sim 7.5, *m*; ν_{KBr}^{KBr} 745 et 686

⁵ LABOREY E et LAVOLLAY J (1967) *Compt. Rend.* **264D**, 2937

⁶ RABACHE, M., LABOREY, F., NEUMANN, J. et LAVOLLAY, J. (1970) *Compt. Rend.* **271D**, 795.

cm⁻¹) et une chaîne polyénique (*m/e* 221, 249; δ 6,1 ~ 6,9, *m*; ν_{\max}^{KBr} 1610, 1550, 1065, 990 cm⁻¹). La chaîne polyénique possède un groupement ester méthylelique, elle est insaturée en α - β et hydroxylée en β (*m/e* 304; δ 3,75, *s*; ν_{\max}^{KBr} 1645 et 1245 cm⁻¹) et porte deux méthyles (δ 1,84 et 1,92, *2s*) dont un sur le C₂ (*m/e* 249, 304). La chaîne comporte 6 doubles liaisons conjuguées (l'intensité du signal à δ 6,1 ~ 6,9 correspond à 9 protons; la chaîne latérale porte 3 substituants). Ce corps est donc l'ester méthylelique de l'acide méthyle-2, phényle-13, ol-3, tridécahexaène-2,4,6,8,10,12 où, comportant en outre un méthyle sur la chaîne polyénique, dont la position est plus difficile à assigner.

TABLEAU 2. INTERPRÉTATION DES SM DE L'ASPERÉNONE (1b), DU PIGMENT β , ET DU PIGMENT γ (2)

| Fragments | <i>m/e</i> | (1b) ³ (%) | Pigment β (%) | (2) (%) |
|---|----------------------|--------------------------|------------------------|------------|
| C ₆ H ₅ -(CH) ₅ -CCH ₃ -(CH) ₄ -COH-CCH ₃ -CO ₂ Me | 336(M ⁺) | — | — | 38 |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₅ -CCH ₃ -(CH) ₄ -CO-CCH ₃ -CO ⁺ | 304 | — | — | 7 |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₅ -CCH ₃ -(CH) ₄ -CO-CH ₂ -Me | 278(M ⁺) | 72 | 69 | — |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₅ -CCH ₃ -(CH) ₄ -CO ⁺ | 249 | 7 | 5 | 14 |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₅ -CCH ₃ -(CH) ₄ ⁺ | 221 | 20 | 17 | 26 |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₅ -CCH ₃ -CH ₂ ⁺ | (-2H) | 181 (183 - 2) | 11 | 11 |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₅ -C ⁷ Me | (-2H) | 167 (169 - 2) | 13 | 8 |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₄ -CH=CH ⁺ | (+2H) | 157 (155 + 2) | 5 | 12 |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₄ -CH ₂ ⁺ | 143 | 18 | 17 | 12 |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₂ -CH=CH ⁺ | 129 | 27 | 19 | 20 |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₂ -CH ₂ ⁺ | 117 | 22 | 18 | 24 |
| C ₆ H ₅ -(CH) ₂ -CH ₂ ⁺ | (-2H) | 115 (117 - 2) | 22 | 38 |
| C ₆ H ₅ -CH=CH ⁺ | (+2H) | 105 (103 + 2) | 30 | 34 |
| C ₆ H ₅ -CH ₂ ⁺ | 91 | 100 | 100 | 100 |
| C ₆ H ₅ ⁺ | 77 | 12 | 12 | 18 |
| Me-O-CO ⁺ | 59 | — | — | 12 |
| Me-CH ₂ -CO ⁺ | 57 | 65 | 64 | 8 |
| MeO ⁺ | 31 | — | — | 31 |
| Me-CH ₂ ⁺ | 29 | 22 | 22 | — |

Ce groupe méthyle est situé sur l'un des carbones C₄-C₁₃ de la chaîne polyénique, comme l'indique la présence du fragment de masse *m/e* 249, fragment qui est commun aux spectres de masse de l'asperénone et de l'asperrubrol. L'abondance des fragments de masse *m/e* 115 (38% du pic de base) avait conduit à situer le—Me sur le carbone 12 de la chaîne polyénique.⁶ La SM à haute résolution a révélé la présence de deux types de fragments: l'un de masse exacte 115,090 correspondant à C₉H₇, l'autre de masse exacte 115,076 correspondant à C₅H₇O₃. Les fragments C₉H₇ participent pour 22-24% du pic de base. Leur abondance relative est du même ordre de grandeur que celle trouvée sur le spectre de l'asperénone par Jefferson et sur celui du pigment β . Il n'y a donc plus de raisons pour attribuer au groupe méthyle une autre position que dans l'asperénone. La structure proposée pour l'asperrubrol est représentée en (2). L'asperrubrol et l'asperénone étant trouvés ensemble dans le mycélium, il est probable qu'ils dérivent biogénétiquement l'un de l'autre.

Dans les conditions décrites par Jefferson,³ l'asperénone était accompagnée de deux autres pigments appelés: "Inconnus A et B". L'auteur avait obtenu 1,7 mg de cristaux de l'*Inconnu B* (F. 117-121°) et donnait les λ_{\max} de son spectre UV, qui sont identiques à celles du spectre de l'asperrubrol. L'*Inconnu B* était probablement de l'asperrubrol impur, compte tenu de la différence entre les points de fusion.

Dans le proche UV, le spectre d'absorption de l'asperrubrol est encore plus plat que celui du phénylundécapentaènal entièrement *trans*.⁷ En vue d'étudier la conformation de sa chaîne polyénique, l'asperrubrol a été soumis à l'isomérisation par la lumière en présence d'iode, suivant Zechmeister. Les modifications spectrales résultant de ce traitement sont analogues à celles qui ont été décrites pour le phénylundécapentaènal⁷: diminution de l' ϵ des trois maximums situés dans le visible, sans déplacement apparent des pics, et augmentation de l' ϵ dans la région du pic *cis* (λ_{\max} à 300 nm). L'asperrubrol a donc été isolé à l'état entièrement *trans*.

L'asperrubrol comporte un groupement ènol dont le proton est chélaté (δ 12,50, s, 1 H; déplacement de la bande carbonyle⁸ à ν_{\max}^{KBr} 1645 cm⁻¹). Le spectre UV des solutions d'asperrubrol dans l'hexane est modifié par le chauffage à 80°, à l'abri de l'air, de façon d'autant plus marquée que la durée du chauffage est plus longue. Les modifications produites, après 2 hr, consistent en la suppression des bandes fines (λ_{\max} 391, 412, 436 nm) et l'augmentation de l'absorption dans la région du pic *cis*. Le spectre comporte alors un maximum unique à 398 nm et deux épaulements situés aux longueurs d'onde des maximums de l'asperrubrol; l'épaulement le plus marqué est situé à 412–414 nm. L'augmentation de l'absorption dans la région du pic *cis* a rendu le spectre, dans cette région, très voisin de celui de l'asperénone. Ces modifications spectrales sont partiellement réversibles et régressent au cours du temps à la température du laboratoire: réapparition du pic à 412 nm et de deux épaulements très marqués à 436 et 394 nm. Or, la chaîne polyénique de l'asperrubrol comporte six doubles liaisons conjuguées dans la forme ènolique de la molécule et seulement cinq dans la forme cétonique (3); le système chromophore de cette dernière est alors identique à celui de l'asperénone. L'expérience montre que les spectres UV-visible des solutions d'asperrubrol chauffées sont effectivement semblables à ceux de mélanges d'asperrubrol et d'asperénone.

L'interprétation des modifications spectrales résultant du chauffage des solutions, par la transformation partielle de la forme ènolique dans la forme cétonique, est en accord avec les modifications des équilibres cétoènoliques des β cétoesters obtenues sous l'effet de la température, par Burdett et Rogers.⁹

Les spectres RMN des solutions d'asperrubrol dans le CDCl_3 , avant, puis après le chauffage, présentent des modifications qui peuvent également résulter de la transformation partielle de la forme ènolique dans la forme cétonique. Tous les signaux présents sur les spectres avant le chauffage des solutions se retrouvent sur les spectres après le chauffage. Mais, sur ces derniers, on note la présence d'un quadruplet centré à δ 3,5 (J 7 Hz) et d'un doublet centré à δ 1,25 (J 7 Hz). Les intensités des singulets méthyles à δ 1,92 et 1,84 correspondent à 3 protons chacune avant le chauffage. Après chauffage, ces intensités deviennent égales respectivement à 3 et 2. Cette modification est compatible avec la transformation d'un tiers de l'asperrubrol en sa forme cétonique.

Toutefois, un phénomène irréversible doit accompagner la cétonisation de l'asperrubrol par la chaleur: les modifications du spectre UV-visible ne régressent jamais totalement à la température du laboratoire et le spectre RMN présente, à côté du doublet centré à δ 1,25, un petit signal qui pourrait appartenir à un triplet partiellement masqué par le doublet précédent.

⁷ GANSER, CH. et ZECHMEISTER, L. (1957) *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 3854.

⁸ RAO, C. N. R. (1964) *Chemical Applications of Infrared Spectroscopy*, p. 194, Academic Press, New York.

⁹ BURDETT, J. L. et ROGERS, M. T. (1966) *J. Phys. Chem.* **70**, 939.

D'autre part, le spectre d'absorption de l'asperrubrol dans l'éthanol est modifié par chauffage ou par alcalinisation (MeONa ou NaOH): déplacement de la λ_{\max} du visible (414–416) vers une plus courte longueur d'onde (400–402) et augmentation de l'absorption dans la région du pic *cis*. L'ensemble du spectre UV-visible devient alors identique à celui de l'asperénone, ce qui doit-être effectivement le cas si la molécule est transformée en sa forme cétonique. L'acidification fait régresser immédiatement les modifications spectrales dues à l'alcalinisation ou au chauffage. L'asperrubrol a été obtenu cristallisé sous sa forme énolique. La facilité avec laquelle il se cétonise ne permet pas de préciser l'état dans lequel il se trouve *in vivo*.

TABLEAU 3. SPECTRE RMN DE L'ASPERRUBROL

| Absorption | Avant chauffage (2) | | Après chauffage (2) + (3) | |
|-----------------------------|---------------------|---------------|---------------------------|------------------------------|
| | Intensité relative | δ | Intensité relative | δ |
| –OH chelaté | 1 | 12,5 (s) | — | — |
| H aromatiques | 5 | 7,2 ~ 7,5 (m) | 5 | 7,2 ~ 7,5 (m) |
| H oléfiniques | 9 | 6,1 ~ 6,9 (m) | 9 | 6,1 ~ 6,9 (m) |
| –OCH ₃ | 3 | 3,75 (s) | 3 | 3,75 (s) |
| =C–CH ₃ | 3 | 1,92 (s) | 3 | 1,92 (s) |
| =C–CH ₃ | 3 | 1,84 (s) | 2 | 1,84 (s) |
| –CO–CH | — | — | <1 | 3,5 (q) (<i>J</i> 7 Hz) |
| –CH ₃ | — | — | >1 | 1,25 (d) (<i>J</i> 7 Hz) |

Pigments α et δ

Les spectres UV-visible des pigments α et δ sont très différents de ceux des pigments jaunes d'*Aspergillus niger* actuellement décrits^{10–13} et de celui de l'*Inconnu A* de Jefferson.³ Les spectres UV-visible des pigments α et δ comportent trois régions d'absorption qui sont celles des phénolpolyènes conjugués et, comme ces derniers, ces pigments donnent une réaction bleue fugace avec l'acide sulfurique concentré: leur structure moléculaire paraît voisine de celle de l'asperénone et de l'asperrubrol. Leurs λ_{\max} dans le visible étant très proches de celles de l'asperénone, leurs systèmes chromophores sont probablement semblables. La molécule du pigment α est moins polaire et celle du pigment δ , plus polaire que celles de l'asperénone et de l'asperrubrol.

Dans les conditions de culture données dans la partie expérimentale, les teneurs en asperrubrol et en asperénone étaient respectivement de 0,06 et 0,008 pour 100 du mycélium sec. En admettant que les structures des pigments α et δ sont voisines de celles de l'asperénone, les valeurs de leur coefficient d'extinction moléculaire doivent être du même ordre de grandeur; il en résultera que leurs teneurs dans le mycélium seraient de l'ordre de 4 à 5% de celle de l'asperénone.

L'aptitude à produire des pigments phénolpolyéniques n'est pas exclusive de la souche ATCC 9029: douze souches d'*A. niger* de collection sur seize, et une souche sauvage produisent de tels pigments lorsqu'elles sont cultivées en présence de doses toxiques de Zn²⁺ et de Cd²⁺, associées à un excès de Mg²⁺.

¹⁰ BYCROFT, B. W., DODSON, T. et ROBERTS, J. L. (1962) *J. Chem. Soc.* 40.

¹¹ TANAKA, H., WANG, P. L., YAMADA, O. et TAMURA, T. (1966) *Agric. Biol. Chem. Japan* **30**, 107.

¹² WANG, P. L. et TANAKA, H. (1966) *Agric. Biol. Chem. Japan* **30**, 683.

¹³ ZAJIC, J. E. et KUEHN, H. H. (1962) *Mycopathol. Mycol. Appl.* **17**, 149.

D'autre part, le pouvoir de biosynthétiser des pigments phénolpolyéniques (non isopreniques), n'appartient pas seulement aux *Aspergillus*. Un phénolpolyène a été isolé de *Corticium salicinum*: la cortisaline.¹⁴

L'asperrubrol est le troisième phénolpolyène isolé à partir de champignons, dont la structure et les propriétés ont été décrites.

EXPERIMENTALE

Les points de fusion ont été déterminés au tube capillaire. Les spectres IR sont déterminés par incorporation dans une pastille de KBr. Les spectres de RMN ont été enregistrés avec un appareil Varian A-60 A à 60 MHz en utilisant le CDCl_3 comme solvant; les déplacements chimiques δ sont exprimés en ppm par rapport à la raie du tétraméthylsilane; les abréviations utilisées sont: *s*—singulet; *d*—doublet; *t*—triplet; *q*—quadruplet; *m*—multiplet; *J*—constante de couplage en Hz. Les SM ont été mesurés sur un spectromètre Thomson-CSF (TSN 218) et les SM à haute résolution sur un spectromètre MS 9-AEI. Les CCM sont effectuées sur silicagel "G" Merck chauffé 30 min à 100°, et développées par l'hexane-EtOAc (17:3).

Cultures. *Aspergillus niger* ATCC 9029 est cultivé sur le milieu de Steinberg modifié,⁵ comprenant par litre, 358 mg de Zn^{2+} , 5 mg de Cd^{2+} et 364 mg de Mg^{2+} (sulfates). Les cultures sont effectuées en surface, dans des cristallisoirs en verre de 19 cm de diamètre; hauteur de milieu 2 cm. La souche d'*Aspergillus niger* provient du Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn (P.B.). La production des pigments est favorisée par passage répété de la souche sur des tranches de carottes stérilisées. Le milieu estensemencé avec des conidies obtenues sur bouillon de carottes stérilisé. Durée de chaque culture: 72-84 hr à 34°.

Extraction. Après 24 hr de dessiccation à 45°, 500 g de mycélium sont pulvérisés puis extraits à l'éther de pétrole (35-60°), au Soxhlet. L'extrait, concentré, abandonne au froid une fraction insoluble qui est éliminée. La fraction soluble est reprise dans l'acétone, qui abandonne une nouvelle fraction insoluble au froid. La fraction soluble dans l'acétone est reprise dans l'hexane, chromatographiée successivement sur 2 colonnes de silicagel "H" Merck. Les deux colonnes sont élues par des mélanges d'hexane-EtOAc (17:3) pour la première, et 9:1 pour la seconde. Cette dernière permet d'obtenir 6 fractions homogènes: 2 incolores et 4 pigmentées. Les deux fractions incolores sont constituées par de l'ergosterol libre et de l'ergostérol estérifié.

Pigment z. Huile jaune, CCM, R_f : 1 (bleu avec H_2SO_4). Fluorescence jaune. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{hexane}}$ 415, 394, 375, 278, 232.

Pigment β: Cristaux jaunes (F. recrist.: 130-132°), CCM, R_f : 0.46 (bleu avec H_2SO_4). UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{hexane}}$ 414 (ϵ 72600), 392 (ϵ 96000), 371 (ϵ 90100), 292 (ϵ 7000), 235. $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 400 (ϵ 63200), 293 (ϵ 11200), 242 (ϵ 9800). IR: $\nu_{\text{cm}^{-1}}$ 2945, 1670, 1605, 1598, 1550, 1450, 1350, 1190, 1070, 1010, 990, 975, 748, 690. RMN (voir Tableau 1). SM (voir Tableau 2). *Isomérisation cis-trans:* (addition de I_2 , 1 à 2% en poids par rapport au pigment, exposition pendant 30 min à la lumière diffuse). UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{hexane}}$ 414 (ϵ 65300), 392 (ϵ 89200), 371 (ϵ 86500), 292 (ϵ 8700). Ce pigment est identifié à l'aspernène par comparaison des spectres UV, IR, RMN, SM.

Pigment γ: Cristaux rouges (F. recrist. 140-141°), CCM, R_f : 0.35 (bleu avec H_2SO_4). (Trouvé: C 78,33; H 6,84. Calc. pour $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{O}_3$: C 78,57; H 7,14%). UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{hexane}}$ 436 (ϵ 80000), 412 (ϵ 103000), 391 (ϵ 78000), 300 2 (ϵ 4300), 242 (ϵ 9800). $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 414-6 (ϵ 94200), 300 (ϵ 9200), 242 (ϵ 13800). IR: $\nu_{\text{cm}^{-1}}$ 1645, 1610, 1550, 1440, 1355, 1245, 1190, 1140, 1065, 990, 910, 865, 745, 686. RMN (voir Tableau 3). SM (voir Tableau 2). *Isomérisation cis-trans* (traitement comme pour le pigment β). UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{hexane}}$ 436 (ϵ 72000), 412 (ϵ 95200), 391 (ϵ 74100), 300 (ϵ 12800). *Cétoénolisation:* (a) *dans l'hexane*, chauffage à 80° pendant 2 hr sous atmosphère d' N_2 . Immédiatement après chauffage: $\lambda_{\text{max}}^{\text{hexane}}$ 398 (ϵ 98500), 296 (ϵ 7200), 412 4_{ep} (ϵ 92000), 380_{ep} (ϵ 76400). RMN: (voir Tableau 3). 15 hr à 20° après chauffage: $\lambda_{\text{max}}^{\text{hexane}}$ 436 (ϵ 66100), 412 (ϵ 100000), 394 (ϵ 91000), 300 (ϵ 5800); (b) *dans l'alcool éthylique*, alcalinisation par MeONa 1%, $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH+MeONa}}$ 400 2 (ϵ 68500), puis après acidification par HCl : $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH+HCl}}$ 414 6 (ϵ 93500).

Pigment δ: Huile jaune, CCM, R_f : 0.07 (bleu avec H_2SO_4). Fluorescence jaune. UV: $\lambda_{\text{max}}^{\text{hexane}}$ 413, 392, 370, 350_{ep}, 280, 205.

Remerciements—Les Auteurs remercient les Professeurs: D. Molho (Muséum National d'Histoire Naturelle), pour la détermination des SM; E. Roth (Commissariat à l'Energie Atomique, Saclay), pour la détermination des SM à haute résolution; P. Seguin (Conservatoire National des Arts et Métiers), pour la détermination des spectres IR, ainsi que J. Acknine pour son aide dans l'interprétation des SM.

¹⁴ GRIPENBERG, J. (1952) *Acta Chem. Scand.* **6**, 580.