

ANALYSE DES STEROLS DU POLLEN PAR SPECTROMETRIE DE MASSE

MARIE-FRANCE HÜGEL, WALTER VETTER, HENRI AUDIER,
MICHEL BARBIER et EDGAR LEDERER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, Gif-sur-Yvette (Seine-et-Oise), France

(Received 14 June 1963)

Résumé—La spectrométrie de masse montre que le pollen de différentes espèces de plantes contient des stérols en C₂₇, C₂₈ et C₂₉ mono- et di-insaturés. La filiation biogénétique de ces stérols est discutée.

Abstract—Mass spectrometry shows that pollen from various species of plants contains mono- and di-olefinic sterols with 27, 28 and 29 carbon atoms. The biogenetic relation of these sterols is discussed.

INTRODUCTION

D'APRÈS un travail précédent, le principal stérol du pollen de certaines plantes est le 24-méthylène cholestérol C₂₈H₄₆O (ergosta-5,24(28)diène-3 β -ol).¹ Dans la présente communication, nous décrivons les résultats d'une analyse des stérols de pollen par spectrométrie de masse; des stérols en C₂₇, C₂₈ et C₂₉ ont été décelés.

Trois lots de pollen ont été analysés : (a) un pollen mixte recueilli sur des trappes à l'entrée des ruches; (b) un pollen de châtaignier (*Castanea vulgaris*) obtenu par la même méthode; la pureté botanique de cet échantillon est* de 85%; (c) une préparation de stérols de pollen de noisetier (*Corylus avellana*), que nous devons à l'amabilité de Monsieur A. Sosa.²

(1.) STÉROL DE POLLEN MIXTE

L'analyse des stérols de pollen mixte a permis la mise au point des méthodes analytiques utilisées par la suite.

Les extraits alcooliques obtenus à partir d'un pollen mixte ont été saponifiés et la fraction insaponifiable chromatographiée sur colonne d'acide silicique Mallinckrodt, suivant une technique déjà décrite.¹ Les fractions éluées par le mélange benzène-éther 95:5 et donnant une coloration bleu-vert avec le réactif de Liebermann, ont été réunies et chromatographiées une seconde fois. Après cristallisation dans le méthanol des fractions ayant une réaction de Liebermann positive, on obtient des cristaux incolores, F. 140–143° (plaques) $[\alpha]_D^{20} = -39^\circ \pm 3^\circ$. Les eaux-mères de cristallisation ont été réunies et cristallisées de nouveau; on a obtenu ainsi des cristaux F. 92–95° (plaques incolores) $[\alpha]_D^{20} = +35^\circ \pm 2^\circ$. L'étude de ces cristaux fera l'objet d'une publication ultérieure.

* Nous remercions M. R. Chauvin (Station de Recherches sur les Insectes Sociaux, Bures/Yvette, Seine-et-Oise) pour ces deux échantillons de pollen.

¹ M. BARBIER, M. F. HÜGEL et E. LEDERER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **42**, 91 (1960).

² C. SOSA-BOURDOUIL et A. SOSA, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **36**, 393 (1954).

*Etude de la fraction F. 140–143°**Spectre U.V.*

Le spectre U.V. de la fraction F. 140–143° mesuré dans l'éther ne montre aucune absorption entre 200 et 360 m μ ; ceci écarte la présence de stérols possédant un système conjugué.

Spectre de résonance magnétique nucléaire (R.M.N.)

Le spectre de R.M.N.* de la fraction stérolique F. 140–143° dans CCl₄ présente des analogies avec le spectre du cholestérol (purifié par le dibromure) mesuré dans les mêmes conditions; on relève dans ces spectres les caractères communs suivants: pic de C—CH₃ à δ = 0,67 ppm et à δ = 1,00 ppm que l'on peut attribuer aux 2 méthyles en 18 et 19; multiplet du CH en position 3 α centré à δ = 3,35 ppm; multiplet du proton éthylénique à δ = 5,26 ppm. Ces résultats suggèrent que les cycles A, B, C et D ont une structure identique dans le cholestérol et dans les stérols de la fraction F. 140°–143°.

La présence du groupe méthylénique dans la fraction F. 140–143° est confirmée par deux pics caractéristiques à δ = 5,60 ppm. Mais, la courbe d'intégration indique que la substance est un mélange avec d'autres composés ne possédant pas le groupe méthylénique. En effet, le rapport de l'intensité des pics correspondant à ce groupe à l'intensité du multiplet du proton éthylénique résonnant à δ = 5,26 ppm est de 0,60 environ, alors qu'il devrait théoriquement être de 2, si la substance était uniquement constituée de composés contenant tous un groupe méthylénique. L'examen du spectre R.M.N. ne permet pas de connaître la nature des autres constituants.

Spectrométrie de masse

Les résultats ci-dessus sont confirmés par la spectrométrie de masse, qui permet en outre d'obtenir quelques précisions sur le poids moléculaire des stérols accompagnant le 24-méthylène-cholestérol et sur la structure de leur chaîne latérale.³

Le spectre de masse de la fraction stérolique F. 140–143° montre la présence d'un mélange de stérols homologues possédant différents degrés de saturation.

Afin de déterminer la composition de ce mélange, nous avons préparé des dérivés qui ont facilité l'étude par spectrométrie de masse.

Spectre de l'acétate hydrogéné (Fig. 1). Le spectre de la fraction stérolique F. 140–143° acétylée et hydrogénée (F. 135°) montre un groupe de pics à m/e 370 (C₂₇H₄₆), m/e 384 (C₂₈H₄₈), m/e 398 (C₂₉H₅₀). Ces 3 pics peuvent être interprétés comme provenant de trois acétates homologues C₂₉H₅₀O₂, C₃₀H₅₂O₂ et C₃₁H₅₄O₂, formés avec perte d'acide acétique (M = 60) à partir des ions moléculaires; les pics des masses moléculaires sont absents.

Calculée à partir des pics à M-60 fournis par les acétates hydrogénés, la composition du mélange est approximativement la suivante: stérols en C₂₇, 15%; en C₂₈, 50%; et en C₂₉, 35%.

Le spectre de masse de stéroïdes dont la chaîne latérale est comparable à celle du cholestérol et dont les seuls groupes fonctionnels sont, soit un hydroxyle, soit un dérivé de cette fonction, soit une double liaison dans le cycle A, montre dans tous les cas, 2 pics caractéristiques dans la région des masses moléculaires élevées: l'un dû au clivage α avec perte d'un

* Les spectres de R.M.N. ont été obtenus avec un spectromètre Varian A-60. Les déplacements chimiques sont exprimés en δ (ppm) par rapport à la raie du tétraméthylsilane prise comme raie de référence.

Nous remercions M. A. Gaudemer et M. P. Laszlo d'avoir bien voulu effectuer cette étude.

³ P. DE MAYO et R. I. REED, *Chem. & Ind. (London)* 1481 (1956).

hydrogène ,l'autre obtenu selon le clivage *b*,* la charge restant sur le fragment à gauche de la ligne de coupure.⁴⁻⁶

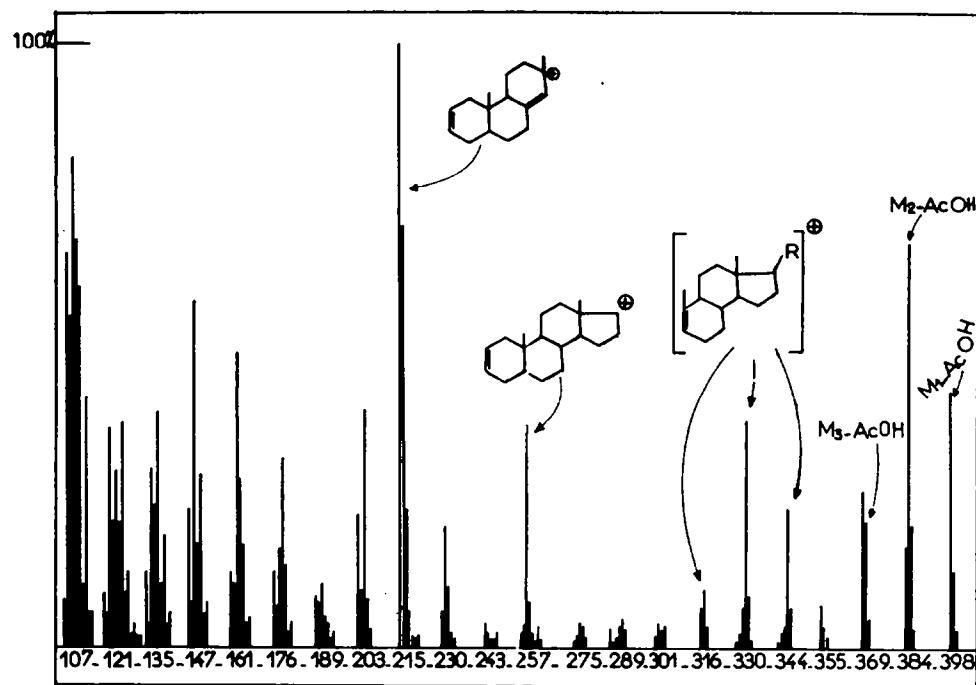
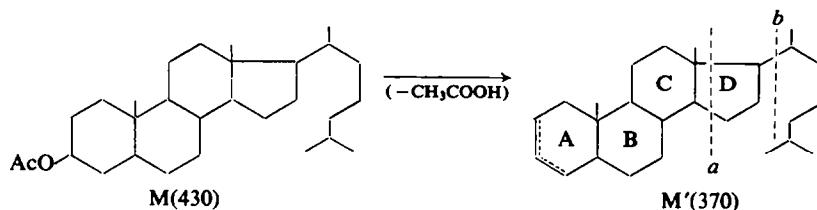


FIG. 1. SPECTRE DE MASSE DE L'ACÉTATE DE LA FRACTION F. 140-143° HYDROGÉNÉ (POLLEN MIXTE). Les numéros en abscisse indiquent les m/e des pics les plus intenses de chaque groupe. Tous les pics supérieurs à 1 % du pic de base sont indiqués. La structure du fragment m/e = 215 est hypothétique⁶.

Avec les stérols acétylés, ces ruptures ont lieu principalement dans les fragments ayant déjà perdu l'acide acétique ($M = 60$)



Donc, l'acétate de cholestanyle ($M = 430$) montre un pic correspondant au clivage *a*, à m/e = 215 ($M'-155$) et un autre dû au clivage *b*, à m/e = 257 ($M'-113$).

L'homologue supérieur ($M = 444$) ayant un CH_2 supplémentaire dans la chaîne latérale, montrera les mêmes pics, alors que l'homologue isomère ayant le CH_2 supplémentaire

* Le pic dû à ce clivage est parfois petit (5 % du pic de base pour l'acétate de 3-hydroxy-lanostane, par exemple); mais puisqu'il se rencontre dans une région du spectre où seulement quelques autres pics sont présents, il peut souvent être considéré comme caractéristique.

⁴ R. RYHAGE et E. STENHAGEN, *J. Lipid Res.* 1, 361 (1960).

⁵ S. S. FRIEDLAND, G. H. LANE, R. T. LONGMAN, K. E. TRAIN et M. J. O'NEAL, *Anal. Chem.* 31, 169 (1959).

⁶ H. BUDZIKIEWICZ et C. DJERASSI, *J. Am. Chem. Soc.* 84, 1430 (1962).

quelque part dans les cycles A, B, ou C, donnerait les deux pics à $m/e = 229$ et $m/e = 271$ (augmentés chacun de 14).

De cette façon il paraît possible de décider de la localisation des carbones supplémentaires dans les trois régions déterminées par les lignes de coupure. Cependant, il n'est pas possible, par cette méthode, de situer les groupes CH_2 à l'intérieur de ces régions.

Des masses attendues pour ces homologues et produites par le clivage *a* (215, 229, 243), seule celle à 215 est abondante. La même remarque est valable pour les pics attendus du clivage *b*: des possibilités m/e 257, 271 et 285, on observe seulement la valeur inférieure, 257. Ces deux pics (215 et 257) sont identiques à ceux donnés par le cholestène-2, ce qui montre que les carbones additionnels des homologues supérieurs sont situés à la droite de la ligne de clivage *a* et aussi à la droite de la ligne de clivage *b*. Cependant, il n'est pas possible de déduire leur position sur la chaîne latérale.

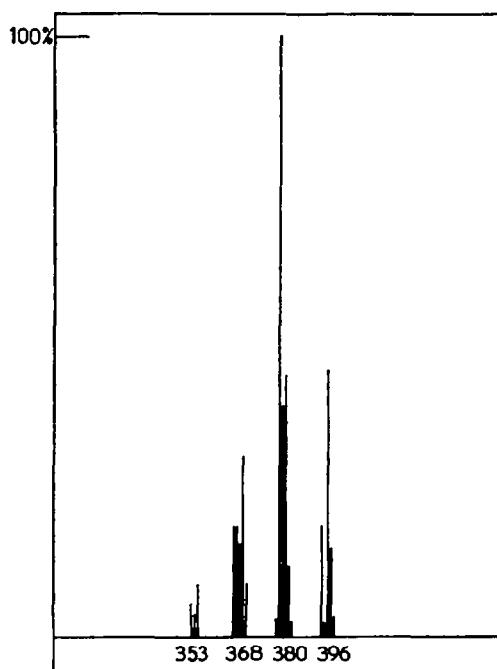


FIG. 2. SPECTRE DE MASSE DE L'ACÉTATE DE LA FRACTION F. 140-143° (POLLEN MIXTE).

Spectre de masse de l'acétate (Fig. 2). Le spectre de masse de la fraction F. 140-143° acétylée (F. 133-135°, $[\alpha]_D^{20} -40^\circ$) confirme les résultats précédents. Il montre de plus que chacun des trois homologues existe sous deux degrés d'insaturation. Se fondant encore sur l'argument des pics à M-60, en absence de l'ion moléculaire de masse M, on trouve: m/e 368 ($\text{C}_{27}\text{H}_{44}$), 382 ($\text{C}_{28}\text{H}_{46}$), 396 ($\text{C}_{29}\text{H}_{48}$), 366 ($\text{C}_{27}\text{H}_{42}$), 380 ($\text{C}_{28}\text{H}_{44}$) et 394 ($\text{C}_{29}\text{H}_{46}$), correspondant aux acétates suivants: $\text{C}_{29}\text{H}_{46}\text{O}_2$, $\text{C}_{29}\text{H}_{48}\text{O}_2$, $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$, $\text{C}_{30}\text{H}_{50}\text{O}_2$, $\text{C}_{31}\text{H}_{50}\text{O}_2$, $\text{C}_{31}\text{H}_{52}\text{O}_2$.

L'acétate correspondant au 24-méthylène cholestérol (pic M-60 à m/e 380) est le principal composant du mélange.

En conclusion:

La spectrométrie de masse montre que la fraction stérolique F. 140–143° contient un mélange de stérols en C₂₇, C₂₈ et C₂₉; dans chacune de ces séries il existe des représentants ayant une double liaison (probablement dans le cycle B) et d'autres avec deux doubles liaisons (dont l'une liaisons serait dans le cycle B et l'autre se trouverait dans la chaîne latérale).

Dégénération chimique

En vue de compléter les données des mesures physiques, nous avons effectué une ozonisation et une oxydation selon Oppenauer:

(1) *Ozonisation.* L'acétate F. 133–135° du mélange de stérols de pollen mixte a été soumis à l'ozonisation; la partie neutre obtenue après chromatographie sur acide silicique, a donné l'acétate de 24-céto cholestérol, F. 127°, $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ$.

Le spectre de masse de cet acétate est rigoureusement identique à celui d'un acétate de 24-cétocholestérol authentique, que nous avons préparé par condensation de l'organocadmien du bromure d'isopropyle sur le chlorure de l'acide cholénique préalablement acétylé.⁸

La facile obtention de 24-céto cholestérol, par ozonolyse de mélange de stérols, concorde avec la présence du 24-méthylène cholestérol (II) et éventuellement du fucostérol (IV) et rend peu probable la présence de l'isomère du fucostérol portant en 24 un substituant vinyle.

La fraction volatile est entraînée à la vapeur d'eau et recueillie dans une solution de chlorhydrate 2,4-dinitrophénol hydrazine. Le précipité ainsi obtenu donne à la chromatographie circulaire sur papier (décaline-diméthylformamide) deux taches ayant le R_f des dérivés du formaldéhyde et de l'acétaldéhyde.¹¹

L'identification d'acétaldéhyde parmi les produits d'ozonisation indique la présence de stérols ayant le groupement R = CHCH₃ (par exemple le fucostérol, IV). Le fucostérol a déjà été trouvé dans des plantes supérieures.^{9, 10}

(2) *Oxydation selon Oppenauer.* Le mélange de stérols F. 140–143° a été soumis à une oxydation selon Oppenauer (voir⁷). La cétone insaturée ainsi obtenue avec un bon rendement, F. 75–82°, avait une absorption ultraviolette typique d'un 3-cétostéroïde insaturé en 4, 5 ($\lambda_{\text{max}} = 240 \text{ m}\mu$, $\epsilon = 15.000$). Ceci prouve que la plus grande partie du mélange de stérols est composée de 3-hydroxy-stérols insaturés en 5, 6, confirmant ainsi les conclusions tirées du spectre R.M.N.

(2.) POLLEN DE CHÂTAIGNIER (*CASTANEA VULGARIS*)

La même méthode d'extraction et de purification décrite ci-dessus appliquée au pollen de châtaignier, donne un mélange F. 138–139°, $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ \pm 3^\circ$, acétate F. 125–127°, acétate hydrogéné F. 130–132°. Le spectre U.V. du mélange de stérols F. 138–139° montre l'absence de diène conjugué.

Le spectre R.M.N. de ce mélange indique, comme précédemment, qu'il s'agit d'un mélange de stérols dont la plus grande partie aurait la structure cyclique du cholestérol et ne différant que par la structure de la chaîne latérale.

La composition du mélange, calculée à partir des pics à M-60 dans le spectre de masse des

⁷ C. MEYSTERE, H. FREY, R. NEHER, A. WETTSTEIN et K. MIESCHER, *Helv. Chim. Acta* **29**, 632 (1946).

⁸ B. RIEGEL et I. A. KAYE, *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 723 (1944).

⁹ B. ANDERSEN et B. KRAWACK, *Acta Chem. Scand.* **11**, 997 (1957).

¹⁰ S. A. KHAN, M. I. QURESHI, M. K. BHATTY et KARIMULLAH, *J. Am. Oil Chemists' Soc.* **38**, 542 (1961).

¹¹ L. HORNER et W. KIRMSE, *Liebigs Ann.* **599**, 48 (1955).

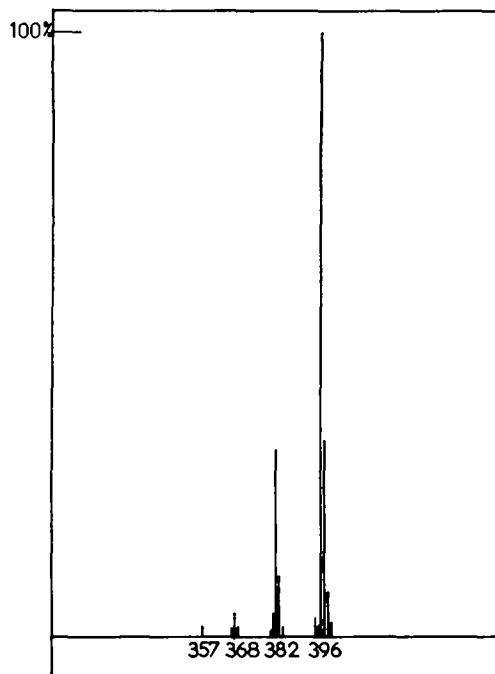


FIG. 3. SPECTRE DE MASSE DE L'ACÉTATE HYDROGÉNÉ DES STÉROLIS DE POLLEN DE CHÂTAIGNIER (MESURÉ À 10 eV).

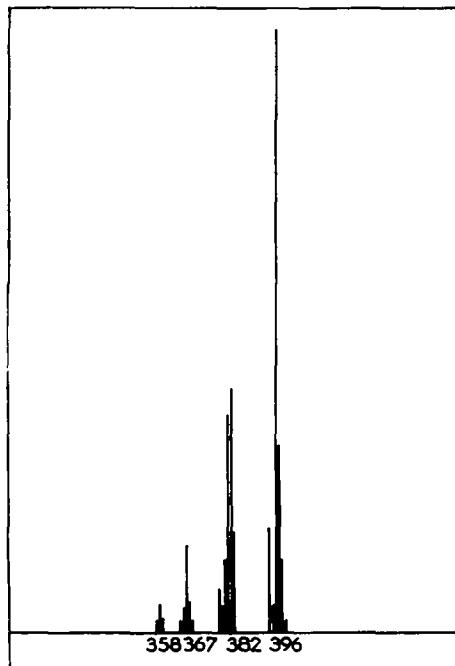


FIG. 4. SPECTRE DE MASSE DE L'ACÉTATE DES STÉROLIS DE POLLEN DE CHÂTAIGNIER.

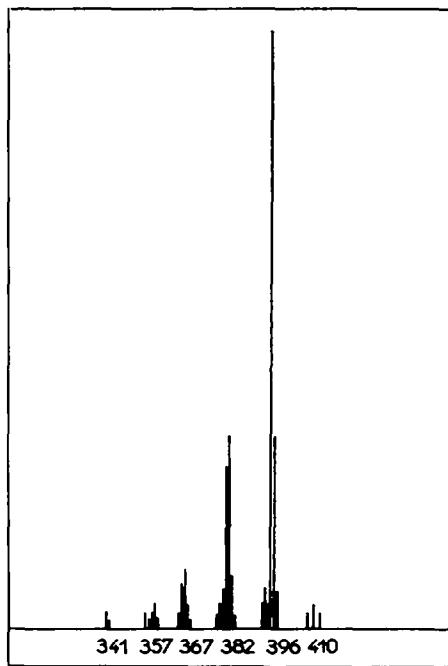


FIG. 5. SPECTRE DE MASSE DE L'ACÉTATE DES STÉROLIS DE POLLEN DE CHÂTAIGNIER (FRACTION INSAPONIFIABLE BRUTE).

stérols acétylés et hydrogénés, mesuré à basse tension, est à peu près la suivante (Fig. 3): Stérols en C₂₇, 3%; en C₂₈ 23%; et en C₂₉, 74%.

Le spectre de masse des acétates (Fig. 4) montre que le 24-méthylène cholestérol (pic à m/e 380) est présent en faible proportion dans ce pollen et que le principal composant en est un stérol possédant un méthyle dans la chaîne latérale, par exemple le 24-méthylcholestérol (pic à m/e 382) et un éthyle dans la chaîne latérale, par exemple le sitostérol (pic à m/e 396).

Afin de vérifier si la composition originale en stérols n'avait pas été modifiée au cours des diverses purifications, la même série de mesures spectrométriques a été répétée sur un insaponifiable brut. Les résultats obtenus sont presque les mêmes que ceux précédemment donnés pour la fraction purifiée. Les procédés de purification utilisés modifient donc peu les pourcentages relatifs des divers stérols (Fig. 5).

Les seules différences à remarquer sont, d'une part, la présence d'un pic d'intensité moyenne à m/e 366, correspondant au fragment M-60 d'un acétate de stérol en C₂₇ ayant apparemment une double liaison dans la chaîne latérale (p. ex. le desmostérol (I)), et d'autre part, la présence de petits pics autour de la masse 410 dûs peut-être à des acétates de dérivés du lanostane, à différents degrés d'insaturation.

(3.) POLLEN DE NOISETIER (*CORYLUS AVELLANA*)

Sosa-Bourdouil et Sosa² ont déjà décrit une préparation stérolique de pollen de noisetier. Un stérol a été isolé par chromatographie de l'insaponifiable sur colonne d'alumine, puis cristallisé dans le méthanol, F. 138,5°, $[\alpha]_D^{18} = -25,3^\circ$ (dans le chloroforme).*

Le spectre de masse de l'acétate montre une série de pics dûs aux masses M-60 d'acétates de stérols en: C₂₈ avec une double liaison, C₂₉ avec une et deux doubles liaisons.

Ces résultats sont comparables à ceux obtenus pour le pollen de châtaignier, sauf qu'aucun pic dû à des stérols en C₂₇ ne peut être observé.

Le spectre de l'acétate hydrogéné indique que les carbones supplémentaires (par rapport au cholestérol) sont situés dans la chaîne latérale. La composition approximative du mélange est la suivante: C₂₇, 0% C₂₈, 25%; et C₂₉, 75%.

Biosynthèse des stérols du pollen

Malgré les proportions très variables des divers stérols trouvés dans les échantillons de pollen examinés, nous pensons pouvoir proposer une filiation biogénétique de ces substances. Le résultat essentiel de notre travail nous semble être la mise en évidence de la présence simultanée de stérols en C₂₇, C₂₈ et C₂₉.

Le stérol monoinsaturé en C₂₇ présent dans le pollen est sans doute le cholestérol. Le cholestérol a été trouvé par Tsuda et coll.¹² dans des algues rouges et tout récemment par Johnson, Bennett et Heftmann¹³ dans des plantes supérieures (*Solanum tuberosum* et *Dioscorea spiculiflora*). Le stérol monoinsaturé en C₂₈ pourrait être le 24-méthyl cholestérol (ergosta-5-ène-3-ol) (III). Le stérol mono insaturé en C₂₉ est probablement le sitostérol (V).

D'après ce que l'on sait de la biosynthèse des stérols en général, le stérol doublement

* Nous remercions vivement M. et Mme Sosa d'avoir mis leur préparation à notre disposition. Il s'agit du stérol I de ces auteurs.² Nous n'avons pas examiné le stérol II qui n'était plus disponible.

¹² K. TSUDA, S. AKAGI, Y. KISHIDA, R. HAYATSU et K. SAKAI, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **6**, 724 (1958); K. TSUDA, S. AKAGI et Y. KISHIDA, *Science*, **126**, 927 (1957); K. TSUDA, S. AKAGI et Y. KISHIDA, *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **6**, 101 (1958).

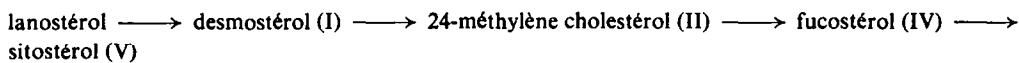
¹³ D. J. JOHNSON, R. D. BENNETT et E. HEFTMANN, *Science*, **140**, 198 (1963).

insaturé en C₂₇ serait le desmostérol (I),¹⁴ le principal dérivé doublement insaturé en C₂₈ est certainement le 24-méthylène cholestérol (II),¹ quant à l'homologue en C₂₉ il pourrait être le fucostérol (IV).

Il est connu que dans la levure l'ergostérol est synthétisé à partir d'un précurseur (lanostérol ou desmostérol ?) par une C-méthylation en C₂₄, grâce à l'intervention de la méthionine.¹⁵

On peut envisager la biosynthèse des phytostérols en C₂₉ par une nouvelle C-méthylation d'un stérol en C₂₈ (du 24-méthylène cholestérol (II) en particulier) en accord avec des hypothèses proposées récemment par A. J. Birch et par D. Arigoni. (Discussion au Corso Estivo di Chimica, Milan, Septembre 1962.)

On aurait ainsi la série biosynthétique suivante:

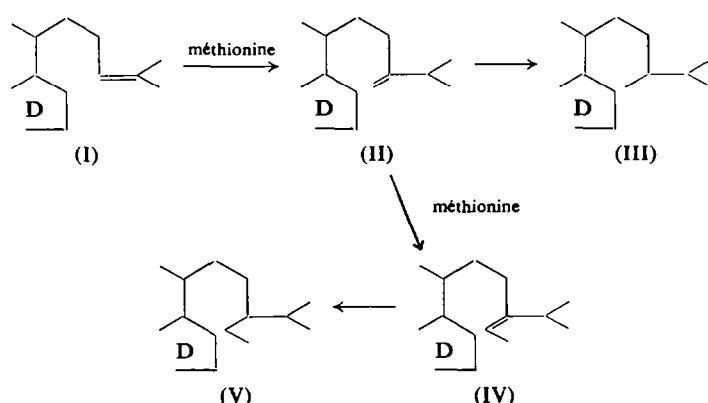


C₃₀ | lanostérol

C₂₇ | desmostérol (I) → +H₂ → cholestérol

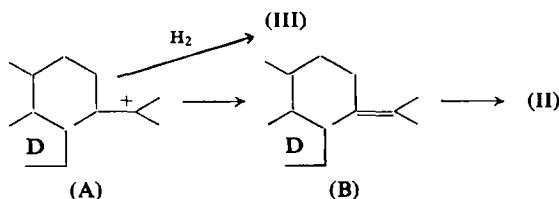
C₂₈ | 24-méthylène cholestérol (II) → 24-méthyl cholestérol (III)

C₂₉ | fucostérol (IV) → +H₂ → sitostérol (V)



La formation du 24-méthylène cholestérol (II) à partir du desmostérol (I) procède certainement par plusieurs étapes; on admet généralement que la première étape de la méthylation de (I) par la méthionine serait un cation (A) qui se stabilisera soit en (B), soit par réduction en (III).

Une migration de la double liaison de (B) pourrait donner le 24-méthylène cholestérol (II).

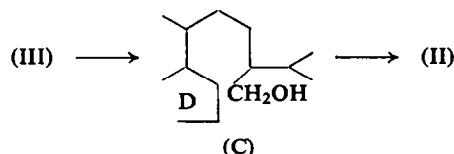


¹⁴ W. M. STOKES, F. C. HICKEY et W. A. FISH, *J. Biol. Chem.* **232**, 347 (1958).

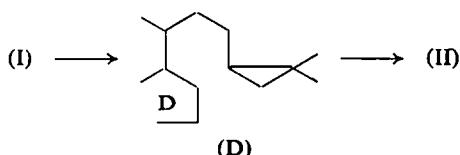
¹⁵ G. J. ALEXANDER et E. SCHWENK, *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4554 (1957).

Deux autres possibilités doivent être envisagées:

(1) Le 24-méthyl cholestérol (III) pourrait donner, par oxydation du méthyle en 24, la substance C dont la déshydratation donnerait le 24-méthylène cholestérol (II).



(2) La méthylation du desmostérol (I) par la méthionine pourrait donner le dérivé cyclopropanique (D), en analogie avec la formation d'acide lactobacillique à partir d'acide vaccénique;¹⁶ (D) pourrait donner directement, par isomérisation, le 24-méthylène cholestérol (II).



Des essais ultérieurs permettront de préciser ces questions.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

Pollen mixte

La fraction stérolique, F. 140–143°, $[\alpha]_D^{20} = -39^\circ \pm 3^\circ$ (chloroforme) isolée suivant la technique déjà décrite⁽¹⁾ a été acétylée par action de l'anhydride acétique dans la pyridine (une nuit à 37°). Par cristallisation dans le méthanol on obtient un acétate F. 133–135°, $[\alpha]_D^{20} = -40^\circ \pm 3^\circ$ (chloroforme).

L'hydrogénéation de l'acétate de la fraction stérolique effectuée dans l'acide acétique en présence de platine conduit à un acétate hydrogéné F. 135°.

Ozonolyse

Nous avons soumis l'acétate de la fraction F. 140–143° à une *ozonolyse ménagée* dans l'acide acétique (10 moles d'ozone par mole de substance). Après destruction de l'ozonide, le produit obtenu a été chromatographié sur colonne d'acide silicique et les substances éluées ont été étudiées sur chromatoplaques (système pentane/acétate d'éthyle 7 : 3) en révélant par le chlorure d'antimoine et par le chlorhydrate de 2,4-dinitrophénylhydrazine. Le seul composé carbonylé élué de la colonne (par le mélange benzène-chloroforme 98 : 2) est l'acétate de 24-céto cholestérol, F. 127°, $[\alpha]_D^{20} = -42^\circ \pm 2^\circ$ (chloroforme). La saponification de cet acétate donne le 24-céto cholestérol, F. 138°, $[\alpha]_D^{20} = -37^\circ \pm 2^\circ$ (chloroforme).

L'*ozonolyse totale* de l'acétate a également été effectuée dans l'acide acétique. Les produits volatils formés ont été entraînés par la vapeur d'eau et directement recueillis dans une solution chlorhydrique de 2,4-dinitrophénylhydrazine. Après un séjour de 12 h à 0°, le précipité a été isolé par centrifugation et étudié par chromatographie circulaire sur papier dans le système décaline-diméthylformamide. On observe deux taches de R_f 0,24 et 0,34;

¹⁶ K. HOFMANN et T. Y. LIU, *Biochim. Biophys. Acta*, **37**, 364 (1960).

ces R_f sont identiques à ceux d'échantillons authentiques de 2,4-dinitrophénylhydrazones de la formaldéhyde et de l'acétaldéhyde.

Réaction d'Oppenauer

Dix mg de stérol F. 140–153° ont été traités par l'isopropylate d'aluminium en présence de cyclohexanone, suivant la technique décrite par Meystre et coll.⁷ Nous avons obtenu 8 mg d'une huile montrant le maximum caractéristique des 3-céto Δ_4 stéroïdes à 240 m μ (éthanol) $\epsilon = 15,000$. La cristallisation dans le mélange éther-pentane à 0° a donné 6 mg de cristaux F. 75–82° ($\lambda_{\text{max}} = 240$ m μ , $\epsilon = 17,000$ (éthanol)).

La chromatographie en phase gazeuse sur colonne de silicium SE-30 (3 % sur chromosorb P) a été effectuée avec un appareil F. and M. Scientific Corp., à température programmée entre 175 et 225° (avec différents programmes), ainsi qu'avec un appareil Argon Pye à 200°. Ces essais montrent que la fraction F. 140–143° n'est pas homogène, mais ne permettent pas d'évaluer le nombre de substances présentes.

La spectrométrie de masse a été effectuée avec un appareil Atlas CH₄; température de la source d'ions: 260°; tension d'ionisation: 70 eV; 10 eV pour Fig. 3. Température d'injection: 220°.

Pollen de châtaignier

Cinq cents grammes de pollen, extraits comme décrit précédemment, ont donné, après saponification, 14 g d'une huile insaponifiable, qui a été chromatographiée. Nous avons ainsi obtenu 640 mg de stérols bruts qui ont donné, après cristallisation selon¹: un stérol F. 138–139° $[\alpha]_D = -42^\circ \pm 2^\circ$ (chloroforme); un acétate F. 125–127°; un acétate hydrogéné F. 130–132° (hydrogénération dans l'éther en présence de platine).