

ISOLEMENT DE POLY-ISOPRENOLS DANS L'EXTRAIT NEUTRE DE *PISTACIA TEREBINTHUS* (II)*

CH. TABACIK-WLOTZKA et P. PISTRE

Ecole Nationale Supérieure de Chimie de Montpellier, Montpellier, France

(Received 9 August 1966)

Résumé—L'extrait total à l'éther de pétrole de *Pistacia terebinthus* est constitué essentiellement par un mélange de substances aliphatiques (hydro-carbures et esters), triterpéniques (alcools triterpéniques et esters aliphatiques de triterpènes et de stérols), ainsi que d'une famille d'alcools poly-isopréniques non encore décrits (en C₅₅, C₆₀ et C₆₅).

Abstract—The light petroleum extract from *Pistacia terebinthus* is composed mainly of a mixture of aliphatic compounds (hydrocarbons and esters), triterpenoids (triterpenic alcohols, aliphatic esters and sterols), as well as a series of poly-isoprenoid alcohols (C₅₅, C₆₀ and C₆₅) which have not been previously isolated.

INTRODUCTION

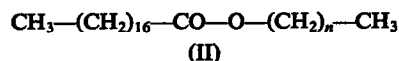
L'ANACARDIACÉE méditerranéenne, *Pistacia terebinthus*, a fait l'objet de quelques études chimiques qui ont porté essentiellement sur les fruits¹ et les graines^{2, 3} de la plante, c'est-à-dire sur les constituants aliphatiques.

En 1956, une variété voisine, le *P. lentiscus*, a permis l'isolement de plusieurs substances triterpéniques: le tirucalol, les acides mastica et iso-mastica-diénoniques⁴ et l'acide oléanonique.⁵ Cependant, ces travaux ont été réalisés sur la gomme mastic, sécrétion résineuse de la plante, laquelle était, d'autre part, récoltée dans le proche orient; or, les variétés languedociennes ne produisent pas de gomme. L'étude d'un extrait total à l'éther de pétrole des feuilles et petits rameaux de *P. terebinthus* (ramassés dans les environs immédiats de Montpellier), devait donc, *a priori*, se montrer très différente.

RESULTATS

La fraction neutre de l'extrait a été chromatographiée sur alumine (activité II–III) et les divers groupes de substances ainsi séparés, repris et purifiés dans des chromatographies ultérieures. On a isolé successivement: I—un mélange d'hydrocarbures aliphatiques; II—une famille d'esters aliphatiques saturés; III—un mélange d'esters aliphatiques d'alcools triterpéniques et de stérols; IV—une série d'alcools poly-isopréniques; V—le lupéol; VI—le β -sitostérol; VII—un mélange de substances hydroxylées non identifiées; et VIII—une petite quantité de xanthophylle.

La famille d'esters aliphatiques (II) est infractionnable par chromatographie d'élution et donne une tache unique en chromatographie sur couche mince. Ce sont des cristaux de



* Une première communication sur ce sujet a fait l'objet d'un exposé aux journées de la Société Chimique de France, Sections du Sud-Est, Montpellier 5–6 Novembre 1965. *Bull. Soc. Chim. France* 493 (1966).

¹ T. YAZICIOGLU, *Fette, Seifen, Anstrichmittel* 52, 6 (1950).

² L. BIELCEN et F. BAYKUT, *Rev. Fac. Sci. Univ. Istanbul* 29, 142 (1965).

³ C. A. MARCOPOULOS, *J. Am. Oil Chemists' Soc.* 42, 1 (1965).

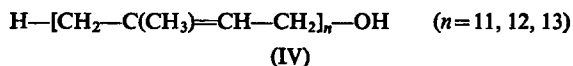
⁴ D. H. R. BARTON et E. SEOANE, *J. Chem. Soc.* 4150 (1956).

⁵ E. SEOANE, *J. Chem. Soc.* 4158 (1956).

point de fusion 64–66°, dont le spectre i.r., l'analyse élémentaire et le spectre de RMN correspondent à la formule de l'ester aliphatique $C_xH_{2x}O_2$ avec x voisin de 42. La composition du mélange II a pu être précisée par spectrométrie de masse: En effet, son spectre de masse comporte un pic fragment à 239, correspondant à $-(CH_2)_{16}-CH_3$, ainsi qu'une série de pics complémentaires à 465, 437, 409 . . . , correspondant à $CH_3(CH_2)_n-OCO-$. On isole, après saponification, un acide unique, identifié à l'acide stéarique (par chromatographie de son ester méthylique sur couche mince et en phase gazeuse), ainsi qu'un mélange d'alcools: $CH_3(CH_2)_{n-1}-CH_2OH$, dans lequel n'a été déterminé par spectrométrie de masse ($17 \leq n \leq 29$).

Le groupe d'esters, III, a fourni, par saponification, un mélange de plusieurs alcools dont les deux principaux ont, en chromatographie sur couche mince, un R_f semblable à ceux du lupéol et du β -sitostérol. Les autres alcools, qui existent en faible pourcentage dans le mélange, n'ont pas encore été identifiés. Les acides issus de la saponification sont examinés par chromatographie en phase gazeuse de leurs esters méthyliques: le constituant essentiel est l'acide palmitique.

Le groupe IV est un mélange de 3 alcools poly-isopréniques que nous avons appelés *pistaciaprénols*. L'isolement de IV à partir des fractions issues de la chromatographie initiale a pu être réalisé par chromatographie sèche des acétates,⁶ la chromatographie d'élution ne permettant pas de séparer les isoprénoides des substances de polarités très différentes qui les accompagnent. Nous avons travaillé sur le mélange des *acétates* ainsi obtenu.



Le spectre i.r. est celui d'un ester insaturé non conjugué (CO à 1738 cm^{-1} , insaturation visible à 3030 , 1660 et 835 cm^{-1}), porteur de doubles liaisons tri-substituées (bande à 835 cm^{-1}). Le spectre u.v. indique une forte absorption vers $215\text{ m}\mu$, correspondant à plusieurs doubles liaisons non conjuguées.

Le spectre de RMN comporte: (a) un triplet constitué par les protons méthyliques ($8,43$ – $8,35$ et $8,27\tau$). Ces valeurs correspondent à des protons fortement déblindés, caractéristiques de groupements méthyles fixés sur des doubles liaisons; (b) un autre triplet dû aux protons méthyléniques et centré autour de 8τ ; et (c) un multiplet non résolu, constitué par les protons éthyléniques et dont la position vers $4,93\tau$ confirme l'absence de conjugaison. Les protons en α de la fonction acétate se manifestent sous forme d'un doublet à $5,48$ – $5,60\tau$, confirmant la position "en bout de chaîne" de cette fonction; son groupement méthyle est difficile à distinguer des protons méthyléniques; cependant, par comparaison ultérieure avec le spectre de RMN des acétates hydrogénés (CH_3CO à $8,03\tau$) et celui des alcools eux-mêmes, on en a déduit que le méthyle de la fonction acétate pourrait être identifié à l'un des pics situés à $8,03$ ou $8,05\tau$ ($8,05\tau$, d'après le spectre mesuré avec expansion d'échelle).

Les résultats obtenus par intégration des différents groupes de protons sont, en accord avec le reste des données analytiques, en faveur d'une structure isoprénoïde. La présence de méthyles très déblindés a été confirmée par leur transformation en méthyles "normaux", c'est-à-dire, par hydrogénation de la molécule. Un échantillon d'acétates, hydrogéné sous pression normale, en présence d'oxyde de platine, a donné un mélange d'acétates (B) et de carbures (A) saturés qui ont été, après chromatographie, caractérisés par leur spectre i.r. et RMN. En outre, le spectre de RMN des alcools, obtenus par saponification des acétates de

⁶ B. LOEV et K. M. SNADER, *Chem. Ind.* 15 (1965).

IV, a été mesuré dans le tétrachlorure de carbone et dans le diméthylsulfoxyde deutérié:⁷ cette seconde mesure met en évidence la fonction alcool primaire, sous forme d'un triplet centré à 5,05 τ . Le spectre i.r. est semblable à celui du solanesol.⁸

Toutes les données analytiques concordent donc pour attribuer aux pistaciaprénols (IV) la formule d'alcools poly-isopréniques avec $n > 10$ (n déterminé par l'analyse élémentaire et l'intégration des spectres de RMN). La spectrométrie de masse a permis de préciser la valeur de n : $n = 11, 12, 13$. Le spectre de masse a été mesuré sur les acétates de pistaciaprénols ainsi que sur leur produit d'hydrogénation: on observe, dans les deux cas, 3 pics moléculaires accompagnés de pics fragments correspondant au départ d'une molécule d'acide acétique.

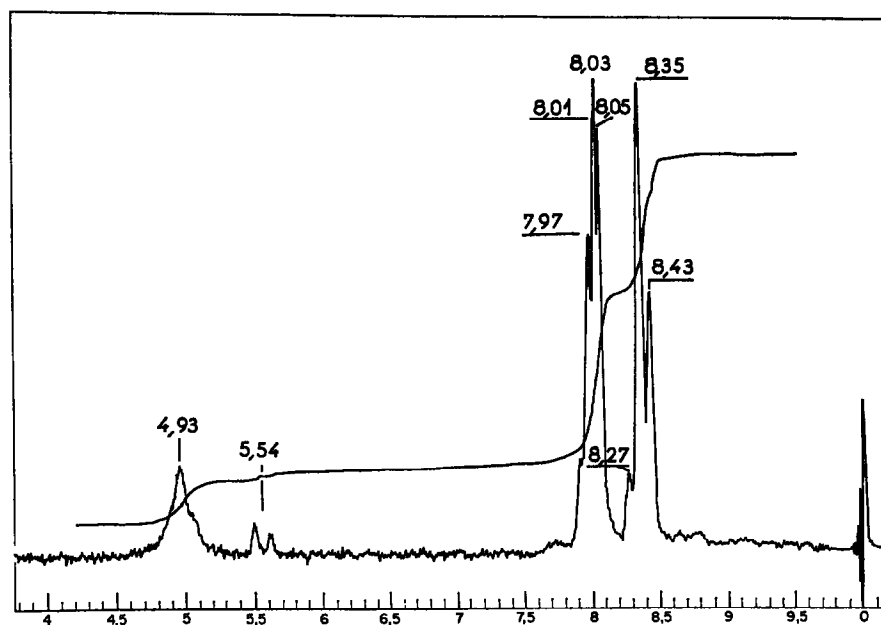


FIG. 1. SPECTRE RMN DES ACÉTATES DE PISTACIAPRÉNOLS.

Ces résultats, en particulier ceux de la spectrographie RMN, ont été rapprochés d'une étude récente par Lindgren⁹ de bétulaprénols, isoprénols naturels dans lesquels $n = 6, 7, 8, 9$. Nous donnons dans le Tableau 1 l'analyse des spectres RMN des bétulaprénols et des pistaciaprénols.* On donne les valeurs de τ , les mesures étant effectuées en solution dans le tétrachlorure de carbone, par rapport au T.M.S. (Réf. int.)

* Au cours de la rédaction de ce travail, nous avons en connaissance d'un article de K. J. I. Thorne et E. Kodicek¹⁰ décrivant le bactoprénol, isoprénol comportant 10 unités isopréniques insaturées et une unité isoprénique saturée, ainsi que d'une publication de A. R. Wellburn et F. W. Hemming^{10a}; portant sur l'analyse chromatographique en phase gazeuse de mélanges de poly-isoprénols.

⁷ O. L. CHAPMAN et R. W. KING, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 1256 (1964).

⁸ R. L. ROWLAND, R. H. LATIMER et J. A. GILES, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 4680 (1956).

⁹ B. O. LINDGREN, *Acta Chem. Scand.* **18**, 836 (1964); **19**, 1317 (1965).

¹⁰ K. J. I. THORNE et E. KODICEK, *Biochem. J.* **99**, 123 (1966).

^{10a} A. R. WELLBURN et F. W. HEMMING, *J. Chromatog.* **23**, 51 (1966).

TABLEAU 1. COMPARAISON DES SPECTRES RMN DES BETULAPRENOLS ET DES PISTACIAPRENOLS

Groupe de protons	Valeurs de τ			
	Bétulapré-nols acétates	Solanesol	Pistacia- prénols	Pistacia- prénols acétates
—CH ₃	8,43	8,42	8,42	8,43
	8,35	8,34	8,35	8,35
	8,28	—	8,27	8,27
—CH ₃ (CO)	8,07	—	—	8,05
—CH ₂ —	7,99	8,08	8,02	8,03
	7,94	7,98	8,01	8,01
	—	—	7,98	7,97
—CH ₂ (OAc)	5,46	—	—	5,60
—CH—	4,82	4,95	4,92	5,48
				4,93

Le constituant V, le lupéol a été identifié par comparaison de ses spectres (i.r. et NMR)¹¹ avec ceux d'un échantillon authentique.* Ce résultat a été confirmé par l'étude du spectre de masse. Le constituant VI, le β -sitostérol a également été identifié par comparaison avec un échantillon authentique* (spectre i.r., RMN, constantes de l'acétate, spectre de masse).

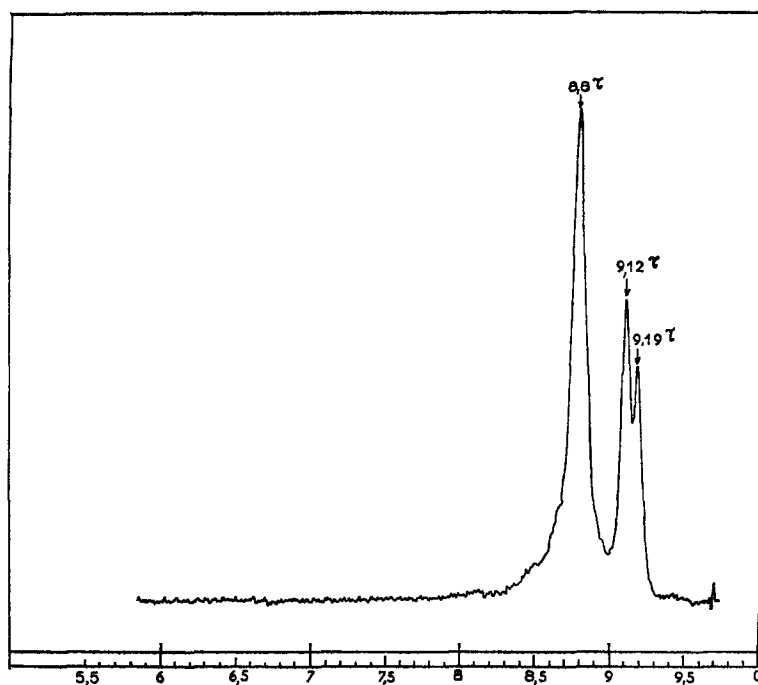


FIG. 2. SPECTRE RMN DES CARBURES A.

* Les échantillons ont été aimablement fournis par le Professeur Ourisson (lupéol) et le Docteur Winternitz (β -sitostérol).

¹¹ J. M. LEHN et G. OURISSON, *Bull. Soc. Chim. France* 1138 (1962).

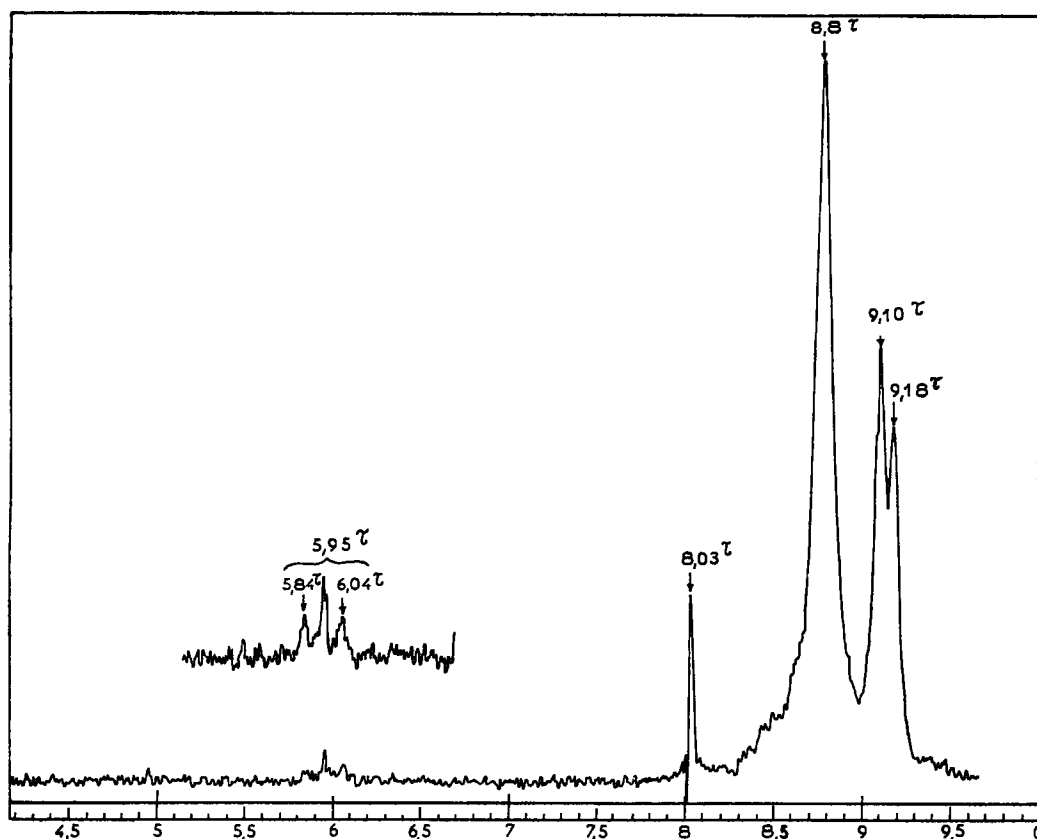


FIG. 3. SPECTRE RMN DES ACÉTATES B.

Le dernier composé isolé (VIII) existe en quantité très faible dans l'extrait de *P. terebinthus*: il en a été isolé environ 0,100 g à partir de 140 g d'extrait, sous forme de cristaux rouges qui fondent à 194–6°. C'est une xanthophylle dont toutes les données analytiques (spectres i.r., u.v., RMN, spectre de masse et étude chromatographique sur couche mince), coïncident avec celles de la lutéine. L'étude comparative sur couches minces, par rapport à des échantillons authentiques, a permis de confirmer l'identité avec la lutéine; la comparaison a été réalisée sur la xanthophylle elle-même ainsi que trois de ses dérivés (mono et di-acétate, 3'-mono-éthyl-éther), en utilisant successivement les 3 supports: polyamide, kieselgel et cellulose imprégnée de triglycéride.*

PARTIE EXPERIMENTALE

Les chromatographies ont été réalisées sur alumine ou silica-gel d'activité dosée; certaines opérations ont été effectuées par la méthode sèche⁶ qui a souvent donné des résultats meilleurs. Les éluants employés étaient en général des mélanges des solvants suivants: hexane, éther de pétrole (40–60°), benzène, éther, méthanol. Pour la révélation des couches minces, on a employé, suivant les cas: les vapeurs d'iode, l'acide phosphomolybdique en solution alcoolique ou encore le mélange aldéhyde anisique–acide sulfurique–acide acétique (1:1:98).

* Nous remercions vivement M. Le Prof. K. Egger, de l'Institut de botanique de Heidelberg, à qui nous devons l'étude comparative sur couches minces.

Toutes les séparations furent suivies et contrôlées par chromatographie sur couche mince, spectrographie i.r. (infra-cord) et, dans certains cas, par chromatographie en phase gazeuse.

Les spectres i.r. des différents composés isolés ont été mesurés sur Perkin-Elmer 21 ou 221, les spectres u.v. sur Beckman enregistreur, les spectres RMN sur Varian A 60 avec le T.M.S. comme référence interne, les spectres de masse sur A.E.I. MS 9, à plusieurs températures et sous plusieurs tensions d'ionisation.¹²

Chromatographie de l'Extrait Neutre

47 g d'extrait neutre portés sur une colonne d'alumine neutre d'activité II-III, ont fourni, par élution: à l'éther de pétrole: 1,7 g de mélange de carbures aliphatiques saturés; à l'éther de pétrole, puis avec un mélange éther de pétrole-benzène (95:5), 6 g de mélange d'esters aliphatiques; avec un mélange éther de pétrole-benzène de concentration croissante en benzène: 2,5 g d'un mélange d'esters aliphatiques d'alcools triterpéniques et de stérols; au benzène: successivement, des groupes de fractions huileuses, soit, un premier groupe (9,5 g) à partir duquel ont été isolés les pistaciaprénols, un second groupe (3,1 g) à partir duquel cristallise le lupéol, un troisième groupe (1,5 g), mélange non identifié de substances hydroxylées, un quatrième groupe (4 g), d'où on isole le β -sitostérol; avec un mélange benzène-éther (90-10 à 50-50): 7 g d'esters-alcools (non identifiés); à l'éther: 1 g de substances hydroxylées à partir desquelles cristallise une xantophylle.

Isolement des Pistaciaprénols

Acétylation. 800 mg de mélange de pistaciaprénols (premier groupe élué au benzène) sont dissous dans 10 ml de pyridine. On ajoute 400 mg d'anhydride acétique et le mélange, abandonné 24 hr à la température ordinaire est repris par l'eau et extrait à l'éther. Après lavage de la solution étherique avec de l'acide chlorhydrique à 10%, séchage sur sulfate de sodium et concentration, on obtient 810 mg d'acétates, sous forme d'une huile jaune qui donne par chromatographie sur couche mince, une tache principale, intensément révélée à l'iode, accompagnée de plusieurs taches secondaires d'intensité faible.

Chromatographie Sèche des Acétates. 810 mg du mélange d'acétates sont portés sur une colonne de 160 g d'alumine neutre d'activité II-III et élués, par la méthode sèche, avec un mélange éther de pétrole-benzène 80:20. Le chromatogramme est découpé suivant extrapolation des données obtenues dans la séparation sur couche mince sans liant du mélange initial (dans les mêmes conditions d'élution). Les différentes fractions sont extraites à l'éther et la bonne marche de la chromatographie est contrôlée par comparaison immédiate de ces fractions en chromatographie sur couche mince. Les fractions contenant le produit principal sont épuisées par extraction au soxhlet (éther de pétrole). Rendement en produit principal: 600 mg d'acétates donnant par chromatographie sur couche mince une tache principale intense, accompagnée d'une tache secondaire faible.

La purification par chromatographie sèche est répétée sur les 600 mg d'acétates en utilisant une colonne de silicagel (100 g activité II-III) et le système éluant: éther de pétrole-benzène 95:5. On obtient 525 mg d'acétates donnant une tache unique par chromatographie sur couche mince.

Spectre i.r. (CCl_4): fonction acétate (bandes à 1738, 1232, et 1019 cm^{-1}) et insaturation traduite par une forte intensité des bandes correspondantes (3030, 1662, 835 cm^{-1}).

¹² B. BLANCHARD, A. CORNU, J. L. IMBERT, K. PERSAUD, P. PISTRE et CH. TABACIK-WLOTZKA, à paraître dans *Bull. Soc. Chim. France*.

(Analyse: C 84,71; H 11,39; O 4,13. Calculé pour $C_{62}H_{100}O_2$: C 84,92; H 11,41; O 3,67 %.) Spectre u.v. ($CHCl_3$): λ_{max} à 215 m μ . Spectre de RMN: décrit dans la partie théorique. Spectre de masse: pics moléculaires aux masses 944, 876, 808; pics fragments: (944-60); (876-60); (808-60).

Saponification des acétates de pistaciaprénols. 240 mg d'acétates de pistaciaprénols en solution dans 15 ml de potasse méthanolique à 5 % sont chauffés à reflux pendant 1 hr. Après concentration partielle, la solution est diluée et extraite à l'éther. On isole 200 mg du mélange de pistaciaprénols, qui donne, en chromatographie sur couche mince, une tache unique (suivie d'une légère traînée).

Spectre i.r.: fonction alcool à 3620, 3360 et 1035 cm^{-1} ; double liaison trisubstituée à 3032 (ν_{CH}), 1660 ($\nu_{C=C}$), 830 (γ_{CH}) cm^{-1} .

Spectre RMN: (dans le diméthylsulfoxyde deutérié): fonction alcool primaire (triplet centré à 5,05 τ).

Hydrogénation des acétates de pistaciaprénols. 350 mg d'acétates en solution dans 25 ml de dioxan sont hydrogénés sous pression normale, en présence de 100 mg d'oxyde de platine. Après 40 mn, l'absorption d'hydrogène cesse (quantité totale absorbée: 112 ml).

Le produit d'hydrogénation donne deux taches en chromatographie sur couche mince. Il est soumis à une séparation par chromatographie sèche sur 35 g de silicagel d'activité II-III (système éluant: éther de pétrole-benzène 95:5).

On isole:

(a) *dans la partie frontale de la colonne:* 110 mg de carbures (A) donnant une tache unique en chromatographie sur couche mince. Analyse: Tr. C 86,17; H 14,15. Calc. pour $C_{60}H_{122}$ = (842): C 85,52; H 14,48 %.) Spectre i.r.: bandes de vibration des différentes liaisons C—H. Spectre u.v.: pas d'absorption. Spectre RMN (CCl_4): H méthyliques, doublet à 9,18 et 9,12 τ ; H méthyléniques à 8,80 τ .

(b) *dans la partie médiane de la colonne:* 200 mg d'acétates (B) donnant une tache unique en chromatographie sur couche mince. Test au tétranitrométhane: négatif. (Analyse: Tr. C 82,72; H 13,37; O 3,20. Calc. pour $C_{62}H_{124}O_2$ (900): C 82,66; H 13,77; O 3,55 %.) Spectre i.r.: fonction ester à 1738 et 1231 cm^{-1} . Spectre RMN: (CCl_4): protons méthyliques à 9,18 et 9,10 τ (doublet) protons méthyléniques et tertiaires à 8,80 τ (pic large et intense); méthyle de la fonction ester à 8,03 τ ; hydrogènes en α de la fonction acétate, multiplet centré à 5,95 τ . Spectre de masse: pics moléculaires aux masses 970, 900, 830; pics fragments à (970-60); (900-60); (830-60).

Remerciements—Nous remercions vivement: Monsieur le Professeur R. Salgues de l'Institut de Botanique de Montpellier, pour ses conseils quant au choix de la plante et à son identification sur le terrain; Monsieur A. Cornu, Chef de Laboratoire au C.E.N., à Grenoble (Spectrométrie de masse), ainsi que ses collaborateurs, Messieurs Blanchard et Persaud, pour la mesure et l'interprétation des spectres de masse.