

## NOUVEAUX RESULTATS SUR LES STEROLS DES ALGUES ROUGES

A. ALCAIDE, M. BARBIER et P. POTIER

Institut de Chimie des Substances Naturelles, C.N.R.S., 91—Gif s/Yvette, France

et

A. M. MAGUEUR et J. TESTE

Faculté des Sciences, 29N-Brest, France

(Received 3 June 1969)

**Abstract**—In contrast to preceding results on the sterols of Rhodophytes,  $C_{28}$  sterols predominate (63 per cent) in the red alga *Rytiphlea tinctoria*.

### INTRODUCTION

LES TRAVAUX de divers laboratoires<sup>1-3</sup> ont montré que les stérols principaux des algues rouges (Rhodophycées) étaient en  $C_{27}$ . Des analyses par spectrométrie de masse ont cependant établi l'existence de stérols en  $C_{28}$  et  $C_{29}$ .<sup>4</sup>

L'algue rouge *Rytiphlea tinctoria* (Rhodomélacée-Amansiee) doit sa coloration non seulement à la présence de phycocérythrines,\* mais aussi à celle de pigments rouges<sup>5</sup> dont la structure chimique est actuellement en cours d'élucidation.<sup>6</sup>

Pour mener à bien les travaux sur ces pigments, des quantités relativement importantes de cette algue ont été récoltées dans l'Océan Atlantique (rade de Brest) et en mer Méditerranée (environs de Marseille). Nous présentons les résultats de l'analyse des fractions insaponifiables de l'algue de ces deux provenances.

\* Bien que ces phycobilines n'aient jamais été trouvées dans cette algue,<sup>5,10</sup> leur présence est rendue probable par des études cytologiques récentes.<sup>11</sup>

<sup>1</sup> K. TSUDA, S. AKAGI et Y. KISHIDA, *Science* **126**, 927 (1957); *Chem. Pharm. Bull., Tokyo* **6**, 101 (1958).  
<sup>2</sup> K. TSUDA, S. AKAGI, Y. KISHIDA, R. HAYATSU et K. SAKAI, *Chem. Pharm. Bull., Tokyo* **6**, 724 (1958).  
<sup>3</sup> K. TSUDA, K. SAKAI, K. TANABE et Y. KISHIDA, *Chem. Pharm. Bull., Tokyo* **7**, 747 (1959); *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1442 (1960).

<sup>4</sup> A. SAITO et D. R. IDLER, *Can. J. Biochem.* **44**, 1195 (1966).

<sup>5</sup> G. F. GIBBONS, L. J. GOAD et T. W. GOODWIN, *Phytochem.* **6**, 677 (1967).

<sup>6</sup> A. ALCAIDE, M. DEVYS et M. BARBIER, *Phytochem.* **7**, 329 (1968).

<sup>7</sup> J. FELDMANN et R. TIXIER, *Rev. Gén. Botan.* **54**, 341; (1947); *Compt. Rend.* **225**, 201 (1947).

<sup>8</sup> A. M. MAGUEUR, J. TESTE et P. POTIER, Travaux non publiés.

<sup>9</sup> H. BUDZIKIEWICZ, C. DJERASSI et D. H. WILLIAMS, *Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry*, Holden Day, Londres p. 122, (1964).

<sup>10</sup> H. E. AUDIER, R. BEUGELMANS et B. C. DAS, *Tetrahedron Letters* **36**, 4341 (1966).

<sup>11</sup> M. DEVYS, A. ALCAIDE et M. BARBIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **50**, 1751 (1968). M. DEVYS, A. ALCAIDE et M. BARBIER, *Bull. Soc. Chim. Biol.* **51**, (1969) sous presse. J. P. ALLAIS et M. BARBIER, *Qualitas Plant. Mater. Veget.* **16**, 215 (1968).

<sup>12</sup> C. ÓHEOCHA, Colloque du CNRS, Chimie et Physicochimie des principes immédiats tirés des algues, Dinard 1960, 121-123.

<sup>13</sup> M. PEYRIÈRE, *Compt. Rend.* **266**, 2253 (1968).

### RÉSULTATS OBTENUS

Les stérols isolés de la fraction insaponifiable de l'algue rouge *R. tinctoria* ont été analysés par chromatographies sur couches minces (en particulier d'alumine imprégnée de nitrate d'argent), par chromatographie en phase gazeuse, et par spectrométrie de masse. Ils sont essentiellement constitués de composés  $\Delta$ -5. Le Tableau ci-après résume les proportions approximatives déterminées par spectrométrie de masse. Les résultats obtenus pour les lots des deux origines sont comparables; les stérols en C<sub>28</sub> sont les principaux constituants. Le pic à *m/e* 382 correspond, de même que les autres pics de fragmentation, à un stérol  $\Delta$ -5 possédant une chaîne latérale identique à celle du campestérol. Nous avons d'ailleurs pu vérifier par chromatographie en phase gazeuse l'existence dans le mélange, d'un stérol possédant le même temps de rétention qu'un échantillon authentique de campestérol. Les techniques utilisées ne permettent pas de choisir entre le campestérol et son épimère en 24 (dihydro-22 brassicastérol).

	C <sub>27</sub>		C <sub>28</sub>		C <sub>29</sub>	
	<i>m/e</i>	%	<i>m/e</i>	%	<i>m/e</i>	%
Origine	366	368	380	382	394	396
Atlantique	10	22	29	44	2,5	2,5
Méditerranée	6	20	20	54	4	6

Résultats de l'analyse des propionates des stérols de l'algue rouge *R. tinctoria* par spectrométrie de masse.\* (Ces stérols fournissent quantitativement des ions à M - 74 par suite de la perte d'acide propionique et en accord avec la présence d'une insaturation en 5. Les évaluations sont valables à  $\pm 10$  pour cent des valeurs indiquées). Les algues ayant été triées manuellement et lavées, nous ne pensons pas que les analyses aient pu être modifiées par l'introduction de matériel végétal d'une autre nature.

Le pic à *m/e* 380 correspond à un stérol en C<sub>28</sub> di-insaturé ayant une double liaison en 5 (chromatographies sur couches minces et spectrométrie de masse), la seconde insaturation devant se trouver dans la chaîne latérale (spectrométrie de masse). On observe un pic important à *m/e* 296 indiquant la présence de méthylène-24 cholestérol;<sup>8</sup> Ce résultat est confirmé par la chromatographie sur couche mince d'alumine imprégnée de nitrate d'argent.

C'est à notre connaissance la première fois que les stérols en C<sub>27</sub> ne sont pas les plus abondants dans une algue rouge. Il devient ainsi difficile d'établir des relations phylogénétiques chez les algues sur la seule base de leur composition en stérols.

Le cycloarténol a été recherché dans les fractions insaponifiables de *R. tinctoria*; cet alcool triterpénique n'y a pas été trouvé; s'il est présent, c'est donc en quantité plus faible que dans les végétaux supérieurs ou il existe généralement. Par contre, un mélange d' $\alpha$ - et  $\beta$ -amyrines, a été isolé. Une méthode de séparation a été mise au point, consistant en une chromatographie des propionates sur couche mince d'alumine imprégnée de nitrate d'argent et comparaison des *R<sub>f</sub>* avec ceux d'échantillons authentiques. La spectrométrie de masse montre, en plus du pic de masse attendu pour les propionates d'amyrines à *m/e* 482, un ion

\* Les spectres de masse ont été effectués par MM. Cosson et Varenne sous la direction du Dr. B. C. Das, sur des appareils Atlas CH<sub>4</sub> et A.E.I. type MS 9.

intense (pic de base) caractéristique à  $m/e$  218;<sup>7</sup> ces substances ayant la même masse moléculaire que le cycloarténol et des  $R_f$  voisins de ceux du cycloartanol, il est important de noter l'absence, dans les spectres de masse, d'ions à  $m/e$  288, dûe à une coupure qui serait induite par un cyclopropane 9-19.<sup>8</sup>

## DÉTAILS EXPÉRIMENTAUX

### *Isolation et Analyses des Stérols*

15 Kg d'algue *Rytiphelea tinctoria* ont été extraits successivement par l'éthanol puis par le chlorure de méthylène. Les extraits totaux ont été saponifiés par la potasse méthanolique 4 N en présence de benzène. La fraction insaponifiable (4 g) a été chromatographiée sur une colonne d'acide silicique Mallinckrodt en contrôlant les éluations par chromatographie sur couche mince d'acide silicique (système pentane-acétate d'éthyle 7:3; révélation par une solution de  $SbCl_3$  dans le  $CHCl_3$ ). Les stérols sont élusés de la colonne par le mélange benzène-éther 95:5 (obtenu: 120 mg). Après une cristallisation du méthanol, le mélange des stérols fond à 143-149°.

L'absence de quantités notables des stérols autres que 4-5 a été vérifiée par chromatographie sur couche mince d'alumine\*/ $AgNO_3$ .<sup>9</sup> Nous avons préparé les propionates de ces stérols<sup>9</sup> et examiné le comportement en chromatographie sur couche mince d'alumine/ $AgNO_3$  dans le système hexane-acétate d'éthyle (100:6).

On observe une tache principale au niveau des stérols 4-5 mono-insaturés ( $R_f$  0,65) et des taches d'intensité secondaire, de  $R_f$  comparables aux propionates de desmostérol ( $R_f$  0,30) et méthylène-24 cholestérol ( $R_f$  0,24) authentiques ( $SbCl_3$ ). L'analyse par spectrométrie de masse a été effectuée sur ces propionates et les résultats observés sont résumés au Tableau. La chromatographie en phase gazeuse, effectuée également sur ces propionates, confirme ces résultats (Appareil Chromagaz CGI; colonne de 2 m; SE-30 1%; température 220°). Les temps de rétention obtenus correspondent, pour les substances principales, à ceux de propionates authentiques utilisés séparément ou en témoins internes.

### *Alcools Triterpéniques*

Les fractions élues avant les stérols, lors de la chromatographie sur colonne d'acide silicique, ont été réunies et étudiées par chromatographie sur couche mince d'alumine/ $AgNO_3$  dans le système chloroforme-éther de pétrole-acétone 55:40:5; dans ces conditions, on sépare la région correspondant par son  $R_f$  (0,80-0,90), aux alcools triterpéniques.

Nous avons obtenu 7 mg de produit et préparé les propionates. Par chromatographie sur couche mince d'alumine/ $AgNO_3$  (hexane-acétate d'éthyle 87:3) on constate une seule tache de même  $R_f$  (0,83) que le propionate de cycloartanol, et rien au niveau d'un propionate de cycloarténol, authentique ( $R_f$  0,51). Après une cristallisation du méthanol, le propionate isolé fond à 190-196°; (le propionate de cycloartanol fond à 80-82°). Le spectre de masse fournit un pic de masse à  $m/e$  482 avec un pic de base à 218 caractéristique des amyrines<sup>7</sup> (aucun pic n'est visible à  $m/e$  288, pouvant correspondre à la coupure induite par un cyclopropane, comme dans le cas d'un propionate de cycloartanol...). Par chromatographie sur couche mince d'alumine/ $AgNO_3$  dans le système hexane-acétate d'éthyle 87:1, nous avons pu isoler deux substances possédant les mêmes  $R_f$ , que des propionates d' $\alpha$ -amyrine ( $R_f$  0,31, coloration brune avec  $SbCl_3$ ) et de  $\beta$ -amyrine ( $R_f$  0,27, coloration violette) authentiques.

*Remerciements*—Nous remercions M. le Pr. E. Lederer pour l'intérêt porté à ce travail et le Centre National pour l'Exploitation des Océans pour son appui financier (Brest).

\* Nous avons obtenu des séparations satisfaisantes avec une alumine Merck neutre type T. Pour des détails sur cette technique, voir.<sup>9</sup>