

## ISOLEMENT ET CARACTERISATION DU CHOLECALCIFEROL DES VEGETAUX SUPERIEURS

Y.RAOUL, N.LE BOULCH, J.C.GOUNELLE, C.MARNAY-GULAT et G.OURISSON  
*Laboratoire de Physiologie, Faculté de Pharmacie, Paris et Institut de Chimie, Strasbourg*

Reçu le 30 mai 1968

### 1. Introduction

Steenbock, Hart, Elvehjem et Kletzien [1] ont montré que le trèfle séché au soleil possède une activité antirachitique et Grant [2] a confirmé cette observation sur des extraits de diverses espèces de feuilles mortes. Nous-mêmes [3] avons mis en évidence une activité antirachitique dans des fractions de feuilles de Graminées renfermant notamment des composés cétoniques analogues à ceux préparés par oxydation catalytique de calciférol 3. Néanmoins Goodwin [4] écrivait en 1963: "there is no convincing evidence that they (vitamin D) are synthesized by plants or by protists". Nous présentons ici des preuves de cette biosynthèse tirées de l'extraction, de la caractérisation et de l'essai biologique d'une vitamine D extraite de l'huile de palme. Les résultats préliminaires des analyses de racines et de feuilles de Graminées (*Dactylis glomerata* notamment) apportent des arguments dans le même sens.

### 2. MATERIEL ET METHODES

#### 2.1. Isolement et concentrations

a) *Isolement à partir de l'huile de palme:* L'huile est saponifiée par fractions de 50g avec 500 ml de KOH-méthanol ([5], p. 100) 2h à reflux et extraction de l'insaponifiable par l'éther privé de peroxyde. L'insaponifiable de 200g d'huile est distillé sous pression réduite ( $10^{-4}$  mm de mercure) étalé au fond d'un ballon de 150ml chauffé dans un bain d'huile à 85°C pendant 24h; le distillat est recueilli à l'extrémité d'un tube refroidi pénétrant dans le ballon de façon que le parcours moyen des

vapeurs n'excède pas 2cm [5]. Le distillat, dissous dans l'éther de pétrole est filtré sur une colonne (diam. 1cm, haut. 3cm) de Kieselgel Merck (0,05-0,2 mm) et élue par le benzène et la présence de vitamine D contrôlée par chromatographie sur couche mince. On estérifie par le chlorure de 3,5 dinitrobenzoyle en milieu pyridinique à température ambiante pendant 14h. Les dinitrobenzoates provenant de 5 kg d'huile sont purifiés par chromatographie préparative avec élution par le benzène. Après hydrolyse des esters par LiAlH<sub>4</sub> en suspension benzénique à température ambiante pendant 1h, les stérols β sont précipités par le digitonoside et la fraction non combinée est soumise à une sublimation sous  $10^{-4}$  mm de mercure dans un tube horizontal (diam. 15mm) chauffé à 75°C. Le sublimat est à nouveau estérifié par le chlorure de 3,5 dinitrobenzoyle et cristallisé dans le benzène-méthanol. Poids des cristaux séparés: 6,9 mg.

b) *Concentration à partir des racines de Dactylis glomerata.* Les racines (récoltées en janvier) sont extraites par 10 fois leur poids d'ammoniaque RP (28°Bé) à température ambiante pendant 14h, extraction des liqueurs par l'éther sans peroxyde puis distillation en tube horizontal comme précédemment.

c) *Concentration à partir des feuilles de Dactylis glomerata ou d'autres espèces:* Les feuilles sont extraites par macération avec KOH-méthanol ([5], p. 100) à température ambiante pendant 14h et distillation comme en a) mais la purification n'est poursuivie qu'en fonction des contrôles fournis par la chromatographie en couche mince.

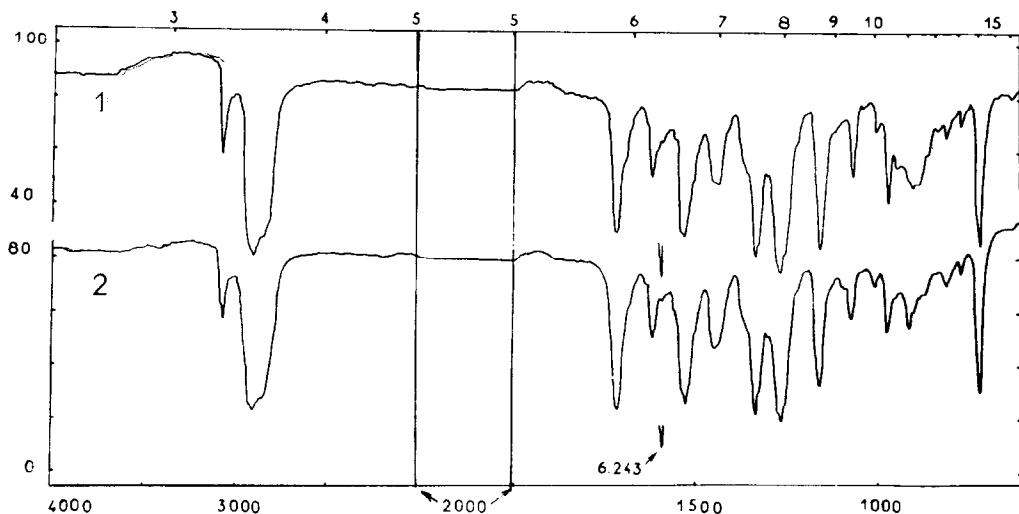


Fig. 1. Spectres I.R. (KBr, Beckman). 1: 3,5 dinitrobenzoate du calciférol 3 de référence; 2 : 3,5 dinitrobenzoate du calciférol de l'huile de palme.

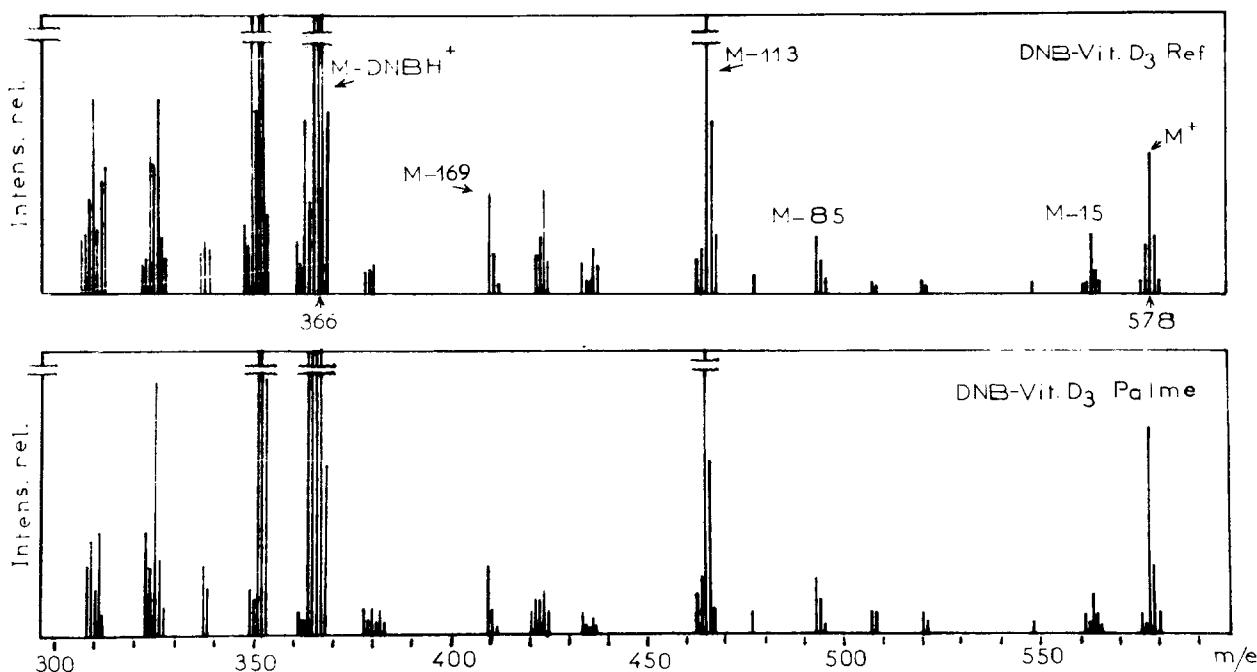


Fig. 2. Spectres de masse des 3,5 dinitrobenzoate du calciférol 3 de référence et de l'huile de palme (température de source 220°, introduction directe).

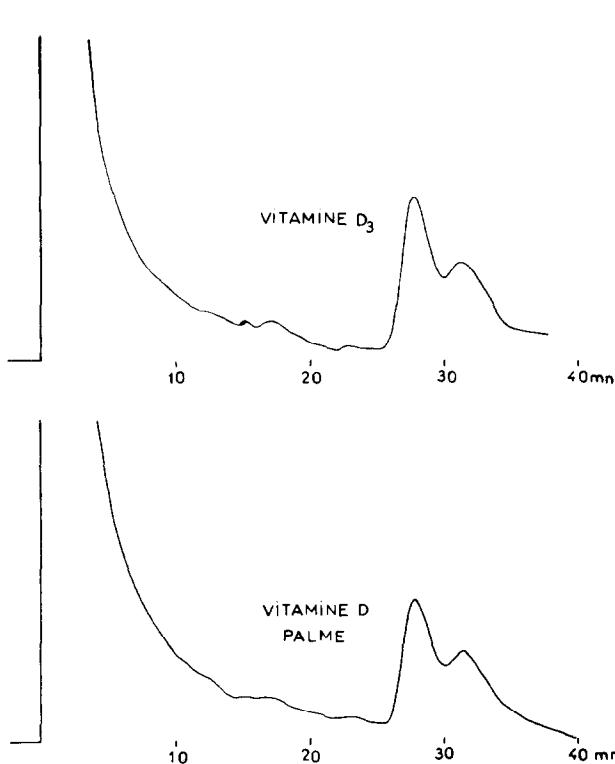


Fig. 3. Chromatographie en phase gazeuse de la vitamine D<sub>3</sub> de référence et de la vitamine D extraite de l'huile de palme (colonne de verre 150 × 0,3 cm; SE 30 à 2% sur gaschrom Q, 80-100 mesh; 220°C).

## 2.2 Chromatographie en couche mince

A l'aide de benzène-acétate d'éthyle (80v-20v) et révélation avec le réactif au furfural de Pesez [6], à chaud. Les calciférols 2 et 3 donnent une tache rose-violacée de même Rf 0,3 ne permettant pas de les différencier. Il peut arriver que les produits distillés à trop haute température présentent une seconde tache de Rf 0,35 environ attribuable vraisemblablement au précalciférol [7]. Les extraits non saponifiés présentent, de façon peu nette, une tache de Rf 0,9 attribuable aux esters de calciférol car se déplaçant à Rf 0,3 après saponification.

## 2.3. Déterminations physiques (voir les légendes des figures)

## 2.4. Essai antirachitique — préventif, sur le Poulet [8].

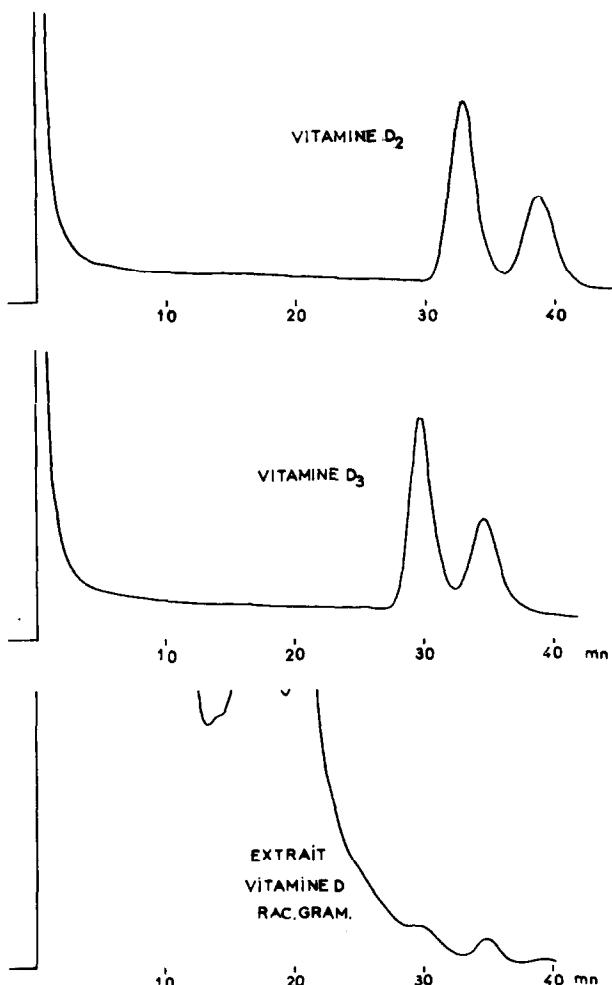


Fig. 4. Comportements respectifs en chromatographie en phase gazeuse des vitamines D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> de référence et de la vitamine D d'un extrait de racine de *Dactylis glomerata* (Graminées). (Mêmes conditions expérimentales que dans la fig. 3.)

## 3. Résultats

La chromatographie sur silice en couche mince montre, dans tous les extraits étudiés, la présence d'une substance migrant et se colorant comme les vitamines D<sub>2</sub> ou D<sub>3</sub> de référence qui se comportent ici de même façon. La co-chromatographie avec addition des vitamines D authentiques montre notamment le renforcement attendu du spot de Rf 0,3. Le spectre I.R. du dinitrobenzoate cristallisé de l'huile de palme est identique à celui du cholecal-

Tableau 1

a) Pour le cholecalciférol de l'huile de palme (H.P.) ou de référence (Ref) à 0,05 µg/j

|          |                         |                       |                           |
|----------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|
| témoins: | poids corporel = +133%; | calcémie % = 6,6 mg;  | cendres de fémur % = 35,8 |
| H.P. :   | poids corporel = +266%; | calcémie % = 10,0 mg; | cendres de fémur % = 46,1 |
| Ref :    | poids corporel = +297%; | calcémie % = 10,0 mg; | cendres de fémur % = 45,3 |

b) Pour le calciférol des feuilles de Graminées évalué par chromatographie en couche mince (F.G.) ou de référence (Ref) à 0,5 µg/j

|          |                         |                       |                           |
|----------|-------------------------|-----------------------|---------------------------|
| témoins: | poids corporel = +139%; | calcémie % = 7,0 mg;  | cendres de fémur % = 42,5 |
| F.G. :   | poids corporel = +327%; | calcémie % = 10,2 mg; | cendres de fémur % = 51   |
| Ref :    | poids corporel = +280%; | calcémie % = 9,6 mg;  | cendres de fémur % = 56,2 |

ciférol de référence (fig. 1) ce qui précise la nature de l'alcool estérifié mais ne permet pas de distinguer des traces éventuelles de calciférol 2 dont le spectre I.R. est très comparable [9]. Le calciférol résultant de la saponification de 3,5 dinitrobenzoate présente un maximum à  $265 \text{ m}\mu E_{1\text{cm}}^{1\%} = 435$ .

L'identification de la vitamine D de l'huile de palme avec le calciférol 3 résulte de l'examen des spectres de masse (fig. 2), de la chromatographie en phase gazeuse (fig. 3) où apparaissent les pics d'élimination des pyrocalciférols et isopyrocalciférols correspondants [10]. Dans le cas des racines de *Dactylis glomerata*, la chromatographie en phase gazeuse (fig. 4) laisse également supposer la présence de vitamine D3 dans les racines (prélevées en janvier).

Les essais antirachitiques ont montré les résultats données dans le tableau 1.

#### 4. Discussion

L'éventualité que les calciférols mis en évidence proviennent d'un *artefact* d'extraction se pose. On pourrait envisager par exemple qu'ils résultent de la réduction des composés plus oxygénés signalés antérieurement [3], mais ces derniers pourraient aussi provenir de la transformation inverse des calciférols de telle sorte que les deux alternatives convergent néanmoins, pour l'essentiel, dans le sens de la synthèse des structures envisagées.

Les racines de *Dactylis glomerata* récoltées en hiver et les tiges récoltées au printemps ont montré également la présence du seul calciférol et l'absence d'esters décelables, par contre, dans les extraits neutres de feuilles. A l'exception de la vitamine D des racines, le type du calciférol des autres organes,

révélé en chromatographie sur couche mince et par son activité antirachitique, n'est pas encore déterminé.

La température de distillation des extraits ayant été maintenue la plus basse possible, le passage du calciférol 3 pouvait être favorisé; il est peu probable cependant que le calciférol 2 aurait été ainsi complètement éliminé et les possibilités de syncristallisation des dinitrobenzoates auraient conduit à partir de l'huile de palme à un ester mixte, ce que le résultat de la spectrographie de masse exclut.

#### Remerciements

Nous remercions l'Institut de Recherches pour les huiles et les oléagineux (I.R.H.O.), 11 Square Pétrarque à Paris, pour la fourniture de l'huile de palme et Madame Labitte pour son aide technique.

#### Bibliographie

- [1] H.Steenbock, E.B.Hart, C.A.Elvehjem et S.N.F.Kletzien, J. Biol. Chem. 66 (1925) 425.
- [2] A.B.Grant, Nature (London) 168 (1951) 789.
- [3] Y.Raoul, N.Le Boulch, C.Baron, R.Bazier et A. Guerillot-Vinet, Bull. Soc. Chim. Biol. 38 (1956) 885.
- [4] T.W.Goodwin, The biosynthesis of vitamins and related compounds (Academic Press, London and New York, 1963) p. 264.
- [5] Y.Raoul et P.Meunier, Oléagineux 5 (1950) 9.
- [6] M.Pesez, Bull. Soc. Chim. (France) (1949) 507.
- [7] R.Strohecker et H.M.Henning, Vitamin Assay (Verlag Chemie GMBH, Weinheim/Bergstr.).
- [8] Assoc. offic. Agr. Chemists. Official and tentative Methods of Analysis (1945) p. 625.
- [9] Y.Raoul et N.Le Boulch, Bull. Soc. Chim. Biol. 45 (1963) 145.
- [10] H.Ziffer, W.S.A.Van den Heuvel, E.C.A.Haahti et E.C. Horning, J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 6411.