

## INVERTEBRES MARINS DU LAGON NEO-CALEDONIEN—VI†

### ISOLEMENT ET IDENTIFICATION DE ONZE STEROLS DE TYPE HYDROXYMETHYL-3 $\beta$ NOR-A CHOLESTANE DU SPONGIAIRE, *PSEUDAXINYSSA CANTHARELLA*

G. DE NANTEUIL, A. AHOND,\* C. POUPAT\* et P. POTIER  
Institut de Chimie des Substances Naturelles du C.N.R.S., 91190 Gif-sur-Yvette, France

M. PUSSET et J. PUSSET  
Laboratoire des Plantes Médicinales du C.N.R.S., B.P. 643, Nouméa, Nouvelle-Calédonie, France

et

P. LABOUTE  
Centre O.R.S.T.O.M., B.P. A5, Nouméa Cédex, Nouvelle-Calédonie, France

(Received in France 12 October 1984)

**Résumé**—Onze stérols, tous de type hydroxyméthyl-3 $\beta$  nor-A cholestane, ont été isolés de l'extrait chlorométhylénique d'une nouvelle Eponge récoltée en Nouvelle-Calédonie, *Pseudaxinyssa cantharella*, qui ne contient aucun stérol à squelette "conventionnel". Deux sont nouveaux, 9 et 10 : leur chaîne latérale porte une double liaison Z ; huit, déjà décrits, ont été isolés ici pour la première fois d'une espèce de *Pseudaxinyssa* ; une hypothèse de structure est proposée pour le dernier, 11.

**Abstract**—Eleven sterols, all having a 3 $\beta$ -hydroxymethyl-A-norcholestane skeleton, have been isolated from a methylene chloride extract of the new sponge from New Caledonia, *Pseudaxinyssa cantharella*, which contains no sterols with conventional skeletons. Two are new, 9 and 10 : their side chain has a Z double bond. Eight are known compounds but are isolated for the first time from a *Pseudaxinyssa* species. A structure is proposed for 11.

La présence des stérols à squelette hydroxyméthyl-3 $\beta$  cholestane 5 $\alpha$  dans les Eponges de la seule famille des Axinellidées est connue depuis les travaux de Minale et Sodano.<sup>1</sup> Ces stérols, qui ont suscité de nombreux travaux,<sup>2-9</sup> constituent un argument taxonomique chez les Spongiaires. L'étude de l'extrait chlorométhylénique de *Pseudaxinyssa cantharella* a été entreprise dans ce sens, les résultats obtenus sont bien en faveur de l'identification de cette Eponge.

Les techniques classiques de chromatographie ne permettant pas de séparer les constituants de l'extrait chlorométhylénique, obtenu par traitement direct de l'organisme par CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, l'extrait brut a été chromatographié par chromatographie liquide haute performance (C.L.H.P.) sur silice phase inverse : onze stérols ont été détectés et caractérisés, certains en mélange (Tableau 1).

Deux caractéristiques spectrales ont permis d'identifier le squelette hydroxyméthyl-3 $\beta$  nor-A cholestane : la présence, sur le spectre de RMN <sup>1</sup>H, de deux doublets de doublets à environ 3,40 et 3,70 ppm

† Partie V. Voir publication précédente.<sup>10</sup>

Tableau 1.

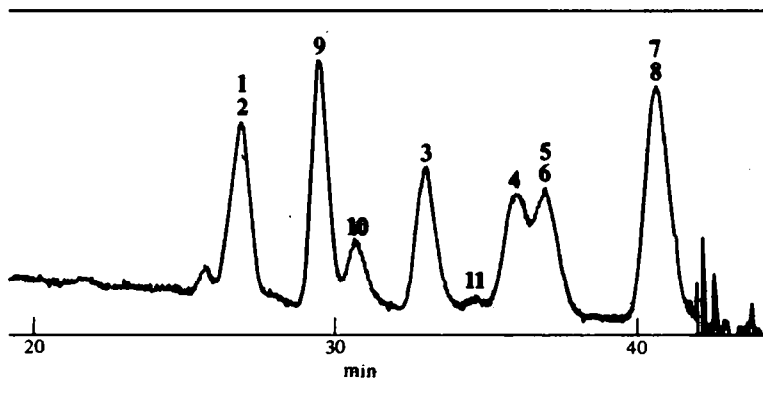


Tableau 2. Stérols isolés de *Pseudaxinyssa cantharella*

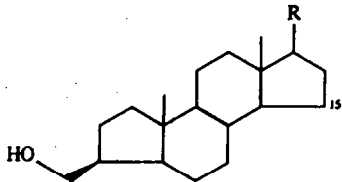
<div></div>				
	R	M <sup>+</sup>	Rendement en g%	Temps de retention relatif
1		Δ15 386	14,0	0,81
2		386		
3		388	9,9	1,00
4		414	16,1	1,09
5		402	13,3	1,12
6		402		
7		416	23,4	1,42
8		416		
9		400	13,9	0,89
10		400	4,7	0,93
11		428	2,1	1,05

Tableau 3. Comparaison des spectres de RMN  $^1\text{H}$  de 9 et 10 avec les dérivés *trans* décrits dans la littérature

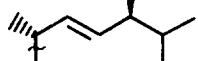

N° composé \ N° protons	18	19	21	22, 23	26, 27	28
<b>9</b>	0,675 s	0,75 s	0,99 d, J = 7	5,17 pseudo t, J = 4	d 0,825 J = 7 d 0,84 J = 7	0,9 d, J = 7
<b>10</b>	0,66 s	0,74 s	1,0 d, J = 7	5,20 pseudo t, J = 6	d 0,824 J = 7 d 0,84 J = 7	0,9 d, J = 7
 (référence 8)	0,663	0,739	0,989 d, J = 6,5	5,153 m	d 0,816 J = 6,8 d 0,834 J = 6,1	0,908 d, J = 6,8
 (référence 8)	0,663	0,740	0,998 d, J = 6,5	5,172 m	d 0,815 J = 6,5 d 0,833 J = 6,5	0,908 d, J = 6,8

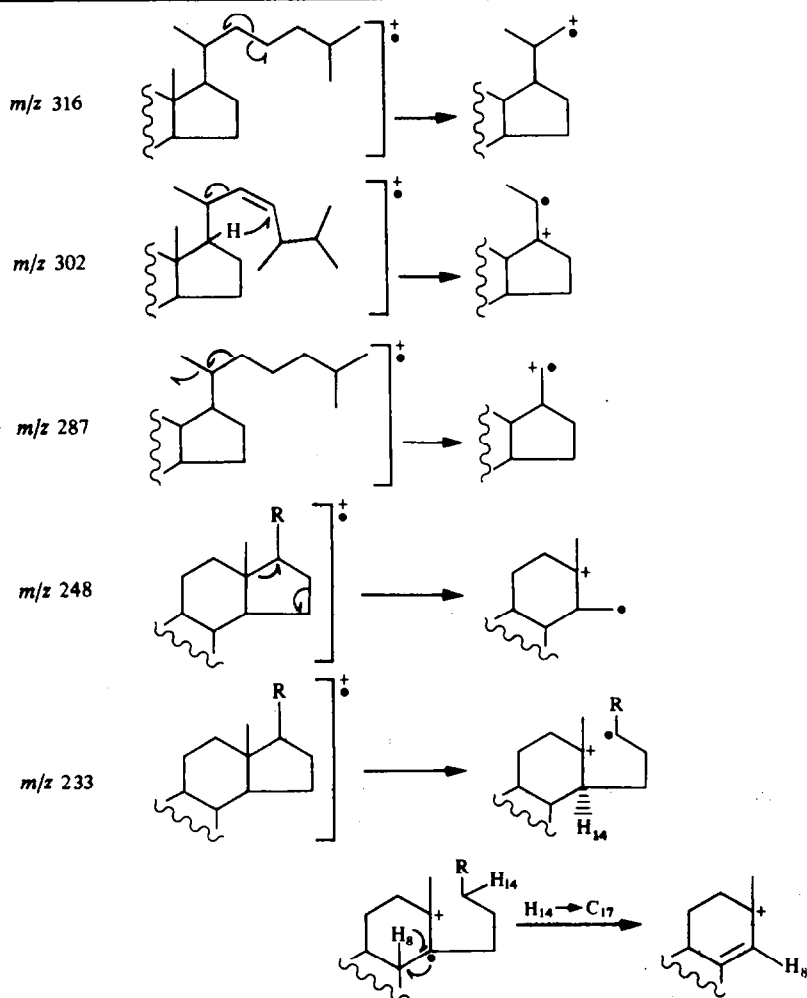
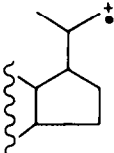
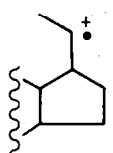
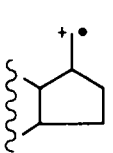
Tableau 4. Explication proposée pour les principales fragmentations en spectrométrie de masse des nor-A cholestanes isolés de *Pseudaxinysa cantharella*

Tableau 5. Principales fragmentations en spectrométrie de masse des nor-A-cholestanes isolés de *Pseudaxinyssa cantharella*

<i>m/z</i> (%)	M <sup>+</sup>	M <sup>+</sup> - C <sub>21</sub> H <sub>(3)</sub>	M <sup>+</sup> - CH <sub>2</sub> OH	M <sup>+</sup> - iPr	M <sup>+</sup> - iPr-H <sub>2</sub> O			
1 et 2	386	371	355				302	287
3	388 (28)	373 (15)	357 (7)			316 (1)	302 (2)	287 (4)
4	414 (68)	399 (8)	383 (2)	371 (50)	353 (40)	316 (37)	302 (98)	287 (32)
5 et 6	402	387	371			316	302	287
7 et 8	416	401	385				302	287
9	400 (100)	385 (10)	369 (3)	357 (13)	339 (8)	316 (9)	302 (74)	287 (23)
10	400 (44)	385 (18)	369 (1)	357 (4)	339 (3)	316 (3)	302 (15)	287 (6)
11	428 (4)	413 (2)				316 (8)	302 (42)	

attribuables aux deux protons du méthylène porteur de la fonction alcool et celle, sur le spectre de masse, d'un fragment à M<sup>+</sup> - 31 correspondant à la perte du groupement CH<sub>2</sub>OH.

Minale et Sodano<sup>1</sup> ont démontré que la jonction des cycles A et B de ces stérols était *trans*. Ces mêmes auteurs ont précisé la configuration en 3 par l'examen des spectres de RMN <sup>1</sup>H (au niveau du signal du méthyle en 19) de l'hydroxyméthyl-3β nor-A-cholestane naturel et de son isomère synthétique, 3α. Plus récemment, Bohlin *et al.*<sup>8</sup> ont complété cette comparaison, au niveau des signaux des protons en 3 et 4.

Ainsi, le méthyle en 19 est légèrement plus blindé dans le cas de l'isomère 3α (δ = 0,725 ppm) que dans celui de l'isomère 3β (δ = 0,737 ppm); de même le signal du H-3 lui-même est à champ plus fort pour l'isomère 3α (1,86 ppm contre 2,1 ppm pour l'isomère 3β). De plus, alors que les constantes de couplage géminales des protons en 4 sont identiques quelle que soit la configuration en 3, les constantes vicinales J<sub>3,4</sub> sont différentes: dans la série 3α J = 4,0 et 6,1 Hz, dans la série 3β J = 6,5 et 9 Hz.

Des arguments de masse ont également été avancés:<sup>8</sup> en comparant l'intensité des trois fragments correspondant à (M<sup>+</sup> - CH<sub>3</sub>), (M<sup>+</sup> - CH<sub>2</sub>OH) et (M<sup>+</sup> - CH<sub>2</sub>OH - 2H), Bohlin *et al.* ont noté qu'en série 3β l'intensité du premier fragment était de 13% et que celle du second était double de celle du troisième; en série 3α, par contre, l'intensité du premier était de 41% et celle du troisième double de celle du second.

Ces arguments de RMN <sup>1</sup>H et de masse nous ont servi à déterminer la configuration en 3 des stérols isolés de *Pseudaxinyssa cantharella*: dans tous les cas, elle est 3β.

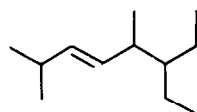
L'examen des données spectrales et leur comparaison avec celles des composés déjà conjus nous ont permis d'identifier les huit premiers composés, 1 à 8 (Tableau 2) qui sont ici décrits pour la première fois dans une espèce du genre *Pseudaxinyssa*.

Les deux composés 9 et 10, isomères, de formule

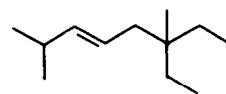
brute C<sub>28</sub>H<sub>48</sub>O, n'ont été identifiés à aucun stérol connu de type hydroxyméthyl-3β nor-A-cholestane. Ils présentent de grandes analogies spectrales: nous les avons identifiés par examen comparé de leurs spectres de RMN <sup>1</sup>H à haut champ (Tableau 3) et de leurs spectres de masse (Tableaux 4 et 5). Les fragments principaux observés sur leurs spectres de masse excluent la présence d'une double liaison sur le squelette; les expériences de découplage en RMN <sup>1</sup>H à 400 MHz nous ont permis de localiser cette double liaison en position 22, 23. Les deux protons éthyléniques sortent ensemble sous forme de pseudo-triplets à 5,17 ppm pour 9 et à 5,20 pour 10; les constantes de couplage de 4 et 6 Hz indiquent que ces protons sont *cis*, caractère inhabituel.

La comparaison des spectres de RMN <sup>1</sup>H de 9 et 10 avec ceux, décrits,<sup>8</sup> des dérivés Δ<sup>22</sup> *trans* méthyl-24S ou -24R (Tableau 3) nous a conduits à attribuer à 9 la structure de l'hydroxyméthyl-3β-méthyl-24S-nor-A-cholest-5α-ène-22-Z et à 10 celle de l'hydroxyméthyl-3β-méthyl-24R-nor-A-cholest-5α-ène-22-Z.

Le dernier stérol isolé, 11, l'a été en très faible quantité. De masse moléculaire 428, il appartient, comme les dix précédents, à la série des hydroxyméthyl-3β nor-A-cholestanes. Là encore, c'est l'examen minutieux du spectre de RMN <sup>1</sup>H à haut champ qui nous permet de proposer une structure: on y observe, outre les signaux des méthyles en 18, 19 et 21 à 0,67, 0,75 et 1,01 ppm, les signaux de deux protons éthyléniques *trans* (J = 16 Hz) à 5,03 et 5,17 ppm et un massif de neuf protons entre 0,75 et 0,85 ppm. L'aspect de ce massif particulièrement complexe nous a fait écarter les possibilités d'une structure symétrique comme 11a ou 11b.



11a

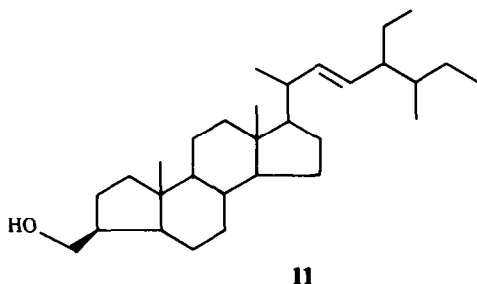


11b

Tableau 5—contd.

M <sup>+</sup> — chaîne — 2H	M <sup>+</sup> — chaîne — H <sub>2</sub> O				
273	257		233		
273	257		233		
(2)	(2)		(79)		
273	257	248	233		
(100)	(62)	(11)	(14)		
273	257	248	233		
	257	248	233		
273	257		233		
(79)	(5)		(8)		
273	257				
(18)	(15)				
273	257				
(100)	(48)				

En conséquence, nous proposons pour 11 une structure de type hydroxyméthyl-3 $\beta$  éthyl-24 $\xi$  méthyl-26 $\xi$  nor-A-cholest-5 $\alpha$  ène-22 (E).



## PARTIE EXPERIMENTALE

L'Eponge, *Pseudaxinyssa cantharella*, a été récoltée dans les conditions déjà indiquées.<sup>10</sup> Mesures des constantes physiques et enregistrements des spectres ont été réalisés dans les conditions déjà citées.<sup>10</sup>

### Extraction—séparation des stérols

2,6 kg d'organisme ont été lyophilisés pour donner 485 g d'une poudre reprise par le chlorure de méthylène. L'évaporation du solvant fournit une poudre blanche qui est purifiée directement par chromatographie liquide haute performance sur colonne de silice greffée (Ultrasphère ODS 10  $\times$  250 mm, 5  $\mu$ m) avec le méthanol comme éluant. Le temps de rétention relatif de chaque stérol est donné dans le Tableau 2. Les constantes physiques et données spectrales des stérols 1 à 8 sont conformes à celles de la littérature et ne seront donc pas redonnées ici.

**Composé 9.** F: 152–154° (CHCl<sub>3</sub>).  $[\alpha]_D^{20} + 25,0^\circ$  (c = 0,12, CHCl<sub>3</sub>). UV (CH<sub>3</sub>OH): 214 (250), 280 (<100), 300 ép. (<100). IR (CHCl<sub>3</sub>): 2910, 2850. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,17 (pseudo t, J = 4 Hz, 2H, C22 et C23—H), 3,73 (dd, J = 11 et 8 Hz, 1H, C3—H), 3,49 (dd, J = 11 et 9 Hz, 1H, C3—H), 0,99 (d, J = 7 Hz, 3H, C21—H), 0,90 (d, J = 7 Hz, 3H, C28—H), 0,84 (d, J = 7 Hz, 3H, C26 ou C27—H), 0,825 (d, J = 7 Hz, 3H, C26 ou C27—H), 0,75 (s, 3H, C19—H), 0,675 (s, 3H, C18—H). SM (i.e.

170°) voir Tableaux 4 et 5. Quelques irradiations ont permis de localiser le proton en 20 à 2,05 ppm, le proton en 24 à 1,90 ppm, le proton en 25 à 1,80 ppm, et le proton en 4 à 2,20 ppm.

**Composé 10.** F: 156–158° (CHCl<sub>3</sub>).  $[\alpha]_D^{20} + 3,1^\circ$  (c = 0,32, CHCl<sub>3</sub>). UV (CH<sub>3</sub>OH): 216 (250), 280 (<100), 304 ép. (<100). IR (CHCl<sub>3</sub>): 2910, 2850. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,20 (pseudo t, J = 6 Hz, 2H, C22 et C23—H), 3,67 (m, 1H, C3—H), 3,49 (m, 1H, C3—H), 1,00 (d, J = 7 Hz, 3H, C21—H), 0,90 (d, J = 7 Hz, 3H, C28—H), 0,84 (d, J = 7 Hz, 3H, C26 ou C27—H), 0,824 (d, J = 7 Hz, 3H, C26 ou C27—H), 0,74 (s, 3H, C19—H), 0,66 (s, 3H, C18—H). SM (i.e. = 180°): voir Tableaux 4 et 5.

**Composé 11.** F: 118–120° (CHCl<sub>3</sub>).  $[\alpha]_D^{20} + 7,0^\circ$  (c = 0,1, CHCl<sub>3</sub>). UV (CH<sub>3</sub>OH): 213 (225), 228 (<100), 301 (<100). IR (CHCl<sub>3</sub>): 2900, 2830. RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): 5,17 (dd, J = 16 et 2 Hz, 1H, C22 ou C23—H), 5,03 (dd, J = 16 et 2 Hz, 1H, C22 ou C23—H), 3,72 (dd, J = 11 et 7 Hz, 1H, C3—H), 3,49 (pseudo t, J = 10 Hz, 1H, C3—H), 1,01 (d, J = 7 Hz, 3H, C21—H), 0,85 (d, J = 7 Hz, 3H, C28—H), 0,82 (m, 6H, C27—H + C30—H), 0,75 (s, 3H, C19—H), 0,67 (s, 3H, C18—H). SM (i.e. = 180°): voir Tableaux 4 et 5.

**Remerciements**—Nous remercions Madame M.-T. Adeline pour la séparation des stérols par C.L.H.P.

## BIBLIOGRAPHIE

- L. Minale et G. Sodano, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 2380 (1974).
- A. Kanazawa, S. Teshima et S. Hyodo, *Comp. Biochem. Physiol.* **62B**, 521 (1979).
- S. Teshima, A. Kanazawa et S. Hyodo, *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* **46**, 1517 (1980).
- L. Bohlin, H. P. Gehrken, P. J. Scheuer et C. Djerassi, *Steroids* **35**, 295 (1980).
- P. R. Bergquist, W. Hofheinz et G. Oesterheld, *Biochem. Syst. Ecol.* **8**, 423 (1980).
- L. Bohlin, U. Sjöstrand, C. Djerassi et B. W. Sullivan, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I* 1023 (1981).
- M. L. Eggersdorfer, W. C. M. C. Kokke, C. W. Crandell, J. E. Hochlowski et C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **47**, 5304 (1982).
- L. Bohlin, U. Sjöstrand, G. Sodano et C. Djerassi, *J. Org. Chem.* **47**, 5309 (1982).
- I. Kitagawa, M. Kobayashi, K. Kitanawa, M. Kido et Y. Kyogoku, *Chem. Pharm. Bull.* **31**, 2321 (1983).
- G. de Nanteuil, A. Ahond, J. Guilhem, C. Poupat, E. Tran Huu Dau, P. Potier, M. Pusset, J. Pusset et P. Laboute, *Tetrahedron* **41**, 6019 (1985).