

SUR LES PIGMENTS VERTS DES LIPIDES DES MOLLUSQUES BIVALVES
MYTILUS GALLOPROVINCIALIS LMK. ET MYA ARENARIA L.

Molnar I.A.¹, Panteli Camena¹ et Mirza Maria²

)¹ Institut de Recherches Chimiques-Pharmaceutiques București

)² Institut Roumain de Recherches Marines-Constanța

ABSTRACT:

The presence of liposolubles green pigments from Mytilus galloprovincialis (seven) and Mya arenaria (six) was demonstrated. Absorption spectra (CHCl₃) of these pigments presented absorption bands at 505-510; 537-540; 608-612 and 668 nm (Mytilus galloprovincialis); 500-505; 535; 610-615 and 668-670 nm (Mya arenaria). Seasonal changes of the green pigments level were determined for Mytilus galloprovincialis.

Certaines espèces de mollusques contiennent des pigments verts. HIROMITSU et coll. (2; 3) ont étudié des pigments verts sur les huîtres. MOLNAR et coll. (6) ont signalé la présence de 5 pigments verts dans les lipides de l'espèce Mya arenaria L. Les lipides des espèces Mytilus ont été étudiées davantage et différents auteurs ont attiré l'attention sur les caroténoïdes et les ont identifiés. CAMPBELL (1) a montré que M. edulis et M. californianus contiennent de l'alloxanthine, de la mytiloxanthine, du carotène, des esters de l'alloxanthine et de la mytiloxanthine, de la xanthophylle, de la zeaxanthine de la diatoxanthine, de la mu-

tatoxanthine et de la tetrahydroxyxanthophylle. LEE et coll. (4) ont identifié dans Mytilus edulis du β -carotène, de la lutéine, zeaxanthine, de l'astacène et ont décélé des xanthophylles, et esters, mais ils n'ont pas signalé la présence de pigments verts. Quant a nous, dans un ouvrage antérieur (5), nous avons mis en évidence dans Mytilus galloprovincialis la présence de 5 pigments caroténoïdes et 4 esters de caroténoïdes, mais nous n'avons pas observé la présence de pigments verts. En continuant nos travaux, nous avons constaté à un moment donné que les lipides extraits du Mytilus g. dans une autre période de l'année présentent une teinte verdâtre et alors nous nous sommes proposé la mise en évidence de ces pigments et l'observation des fluctuations saisonnières.

MATERIAUX ET MÉTHODES

Le tissu des mollusques collecté a été séparé des coquilles et utilisé entièrement, il a été haché menu, séché sous vide à max. 40°C et pulvérisé. Pour obtenir les lipides totaux le tissu séché a été extrait dans un appareil Soxhlet au dichloréthane à l'abri de la lumière. Le dichloréthane a été évaporé dans le vide à max. 40°C jusqu'au poids constant. Pour obtenir les fractions de lipides libres et combinés sous forme de cénapses, le tissu séché a été d'abord extrait par l'éther éthylique, cette fraction contenant des lipides libres, puis par l'extraction au dichloréthane on obtient les lipides combinés.

Pour l'observation des fluctuations saisonnières les mollusques ont été collectés chaque mois pendant une année a Agigea (Constanța Sud). Les lipides totaux ont été dissous dans le chloroforme en concentration de 1-2% et on a déterminé le spectre d'absorption dans le visible à l'aide d'un appareil Spekol (Zeiss).

La mise en évidence des pigments a été effectuée par la chromatographie en couche mince. On a utilisé des plaques de silicagel G de 10 x 20 cm, l'épaisseur de la couche étant de 0,5 mm. Sur une plaque on spotule 4-5 spots, chacun ayant 0,25-2 mg lipides dissous dans le chloroforme. Le migration s'effectue dans le système benzène-éthanol 95% (9:1). Après le séchage des plaques on observe directement et on identifie la position des taches vertes.

Pour caractériser les taches vertes, on enlève de la

plaque les taches provenant de plusieurs migrations parallèles et on élue au chloroforme, au besoin on chauffe légèrement et on filtre. On évapore le chloroforme et on dissout le résidu dans une petite quantité de chloroforme et on détermine la spectre. Pour la solution témoin on enlève des plaques le silicagel sur une surface de la même grandeur que les taches et on soumet au même traitement. Cette opération en apparence simple présente plusieurs difficultés. Très souvent les taches se trouvent tout près des taches de caroténoïdes, quelquefois elles se superposent partiellement; de cette façon l'éluat est impurifié par des caroténoïdes et le spectre est dénaturé. On peut éliminer cet inconvénient en exposant les plaques à la lumière du jour ou à la lumière solaire. A la lumière solaire les taches de caroténoïdes se décolorent relativement vite, en 5-20 minutes, tandis que les taches de pigments verts ne subissent pas de modifications. Les produits de décomposition des caroténoïdes, incolores, n'influent plus sur les spectres d'absorption dans le visible des pigments verts. Une autre difficulté réside dans le fait que dans la partie inférieure des chromatogrammes, du point de départ jusqu'à environ 6-7 cm entre les taches observées, s'étend une longue trainée jaune brunâtre, ce qui n'empêche pas l'observation directe, mais elle s'élue dans le chloroforme et modifie l'aspect de spectre. Pour éviter cet inconvénient, on doit purifier partiellement les lipides totaux en éliminant les phospholipides. Pour cela on dissout 1 partie de lipides totaux dans 6 parties d'éther éthylique et on précipite avec 30 parties d'acétone. On refroidit à 0°C et on laisse en repos jusqu'à l'agglomération du précipité. On filtre. On évapore la solution sous vide à sec et on reprend avec la quantité nécessaire de chloroforme pour spotuler. Dans ces conditions de travail l'aspect des chromatogrammes est plus clair. Les taches se séparent plus nettement, la trainée du départ est plus courte et elle est de couleur beige claire.

RESULTATS ET DISCUSSIONS

- A. Etude des pigments du Mytilus galloprovincialis Lmk.
1. Etude des fluctuations saisonnières des pigments verts.

On a déterminé le spectre d'absorption dans le visible en solution chloroformée pour les lipides totaux extraits des mou-

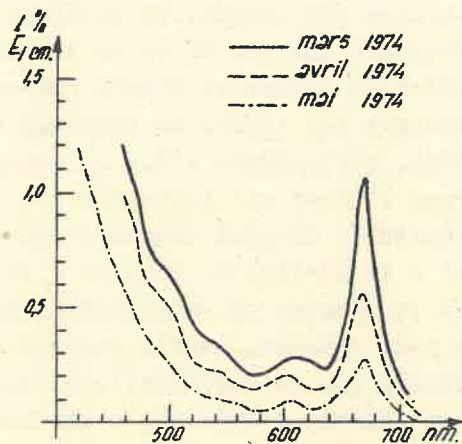


Fig.1 - Le spectre d'absorption des lipides totaux du Mytilus galloprovincialis Lmk. dans le chloroforme.

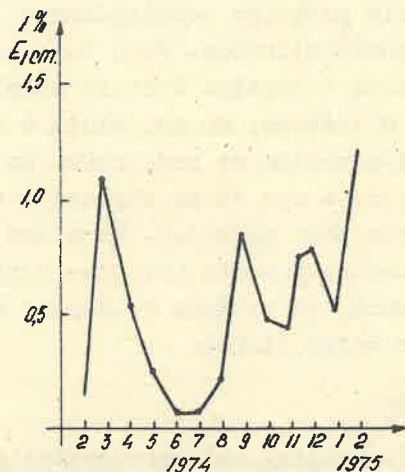


Fig.2 - Les variations saisonnières de la teneur totale des pigments verts en lipides totaux du Mytilus galloprovincialis.

les et on a constaté que le spectre présente un maximum intense d'extinction à 668 nm et un autre maximum aux environs de 600-610 nm. Le maximum observé à 668 nm est très caractéristique et il est apparu nettement dans tout l'intervalle de temps étudié. Le spectre d'absorption des lipides totaux est reproduit dans la (Fig.1).

Les modifications saisonnières ont été observées en comparant les valeurs de $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 668 nm (Fig.2). Ces résultats montrent que pendant l'intervalle de temps étudié entre février 1974 et février 1975 la teneur en pigments verts présente des fluctuations très intenses et présente 3 valeurs maxima pendant les mois de juillet, novembre et janvier. Ces modifications de la teneur en pigments verts, n'ont aucune corrélation, ni avec le cycle de reproduction, ni avec la température de l'eau.

2. Répartition des pigments verts dans les lipides libres et combinés.

Le spectre d'absorption des lipides libres (extraits à l'éther éthylique) et combinés (extraits au dichloréthane) présente les mêmes bandes d'absorption que les lipides totaux, à savoir un maximum intense à 660 nm et un autre maximum moins intense aux environs de 600 nm (Tab.1)

Tableau 1

Répartition des pigments verts dans les pigments libres et combinés du Mytilus galloprovincialis Lmk.

Date de la détermination	$E_{1\text{cm}}^{1\%}$ 668 nm	
	lipides libres	lipides combinés
avril 1975	1,12	0,36
mai 1975	0,35	0,19
juin 1975	0,66	0,04
juillet 1975	0,075	0,035

Pendant les mois étudiés $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 668 nm a été toujours plus grand en lipides libres, ces résultats montrent que les lipides libres contiennent une proportion plus grande de pigments

que les lipides combinés.

3. Isolation et caractérisation des pigments verts

Le chromatogramme des lipides totaux, purifiés, extraits des mollusques collectés en décembre 1974, présente 7 taches (Fig.3) ayant des couleurs comprises entre le jaune et l'orange, qui correspondent aux caroténoïdes et à leurs esters, décrits dans

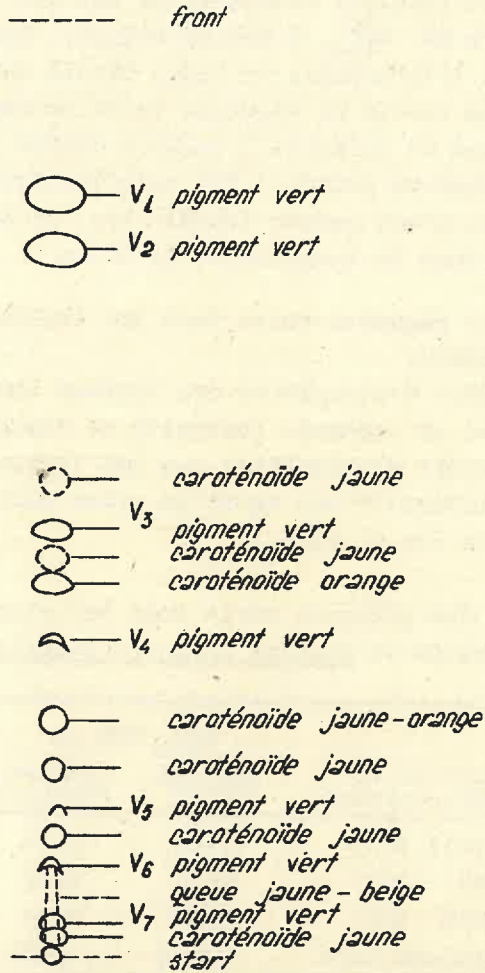


Fig.3 - Chromatogramme en couche mince des lipides totaux purifiés du Mytilus galloprovincialis.

un ouvrage antérieur (5). Sur le chromatogramme on observe aussi 7 taches de couleur verte, ayant des intensités différentes. Après l'élu-tion dans le chloroforme des taches de plusieurs plaques, on a déterminé les spectres d'absorb-tion en solution chloroformée dans le visible pour toutes les taches vertes excepté la tache V 6 qui est très faible et où l'extinction de la solution chloroformée a été trop petite pour la détermination du spectre. Pour déterminer les spectres nous avons employé de différentes diluti-ons, de cette façon nous n'avons pas pu déterminer la concentra-tion de chaque composant séparément. La ressemblance entre les spectres d'absorb-tion des 6 pigments verts (Fig. 4-5). Tous pré-sentent 4 maxima d'extinction: à 505-510, 537-540, 608-612 et 668 nm. Le maximum avec la plus grande valeur d'extinction est situé à 668 nm. Les spectres des pigments des taches V₁, V₂, V₃, V₄ et V₅ sont presque identiques. Le spectre de la tache V₇ diffère, mais le maximum de 668 est identique. Dans le cas de la tache V₇ on n'a pas pu obtenir du chromatogramme le pigment pur, parce que cette tache se superpose au dessus de la traînée de nuance jaune beige, qui part du point de départ, ce qui dénature le spec-tre. La grande ressemblance entre les spectres d'absorb-tion de ces pigments verts indique que leur structure doit être très rap-prochée.

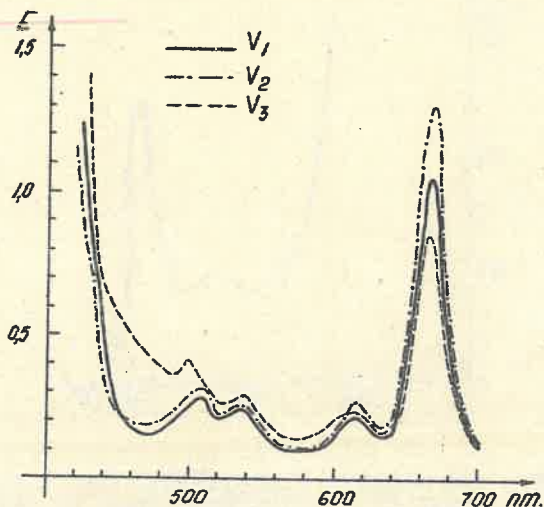


Fig. 4 - Les spectres d'absorb-tion des pigments verts du Mytilus galloprovincialis Lmk.

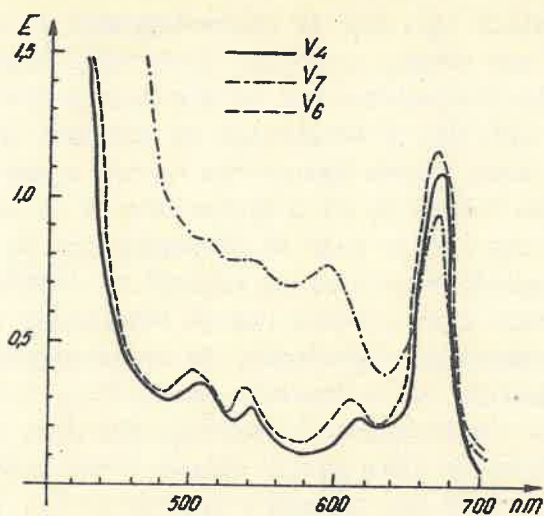


Fig.5 - Les spectres d'absorption des pigments verts du Mytilus galloprovincialis Lmk.

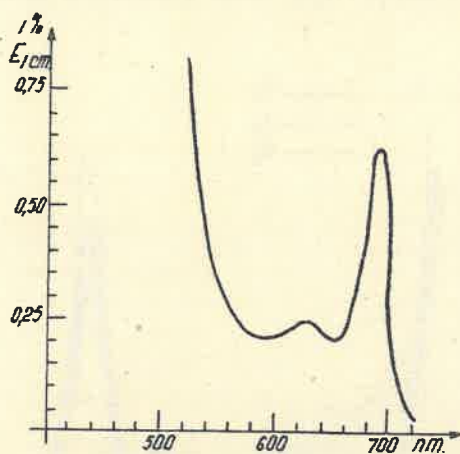


Fig.6 - Le spectre d'absorption des lipides totaux du Mya arenaria dans le chloroforme.

B. Etude des pigments du Mya arenaria L.

1. Repartition des pigments verts entre les lipides libres et combinés

Le spectre d'absorption des lipides totaux du Mya arenaria ressemble à celui des lipides totaux du Mytilus galloprovincialis, mais les maxima sont un peu déplacés à d'autres longueurs d'onde (Fig.6). Un maximum intense se trouve à 687 nm et un autre maximum à 631 nm. Les spectres des lipides libres et combinés et de ceux qui ont été partiellement purifiés (dont on a éliminé les phospholipides) ressemblent beaucoup aux spectres des lipides totaux, avec un léger déplacement des maxima.


En ce qui concerne la répartition des pigments verts dans la fraction des lipides libres et combinés, comme c'est aussi le cas pour Mytilus, les lipides libres contiennent plus de pigments verts ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 687 nm: 0,62) que les lipides combinés ($E_{1\text{cm}}^{1\%}$ à 687 nm: 0,50), mais les différences sont plus petites que c'est le cas pour Mytilus.

2. Isolation et caractérisation des pigments verts du Mya

Sur le chromatogramme des lipides totaux obtenus à partir des mollusques collectés en février 1975, on observe les taches ayant des nuances de couleur entre jaune - rose - orange, qui correspondent aux caroténoïdes et aux esters de caroténoïdes (Fig.7) et 6 taches de couleur verte, dont 5 ont été observées par nous dans des ouvrages antérieurs (6; 7; 8). Les spectres d'absorption des pigments V_1 et V_2 (Fig.8) présentent 4 maxima d'extinction dans le visible à 500-505, 535, 610-615, 668-670 nm et sont très ressemblants entre eux et avec les spectres des pigments verts du Mytilus galloprovincialis, ce qui montre que leur structure chimique est rapprochée.

La teneur des lipides en pigments verts, notés V_3 , V_4 , V_5 et V_6 , est très petite et la traînée jaune-beige, qui part du point de départ, se superpose au dessus des taches V_4 , V_5 , V_6 , ce qui falsifie l'aspect du spectre; cependant on a pu établir aussi pour ces pigments la position du maximum le plus intense, qui est situé entre 665-671 nm, dans la même zone que les maxima des taches V_1 et V_2 .

----- *front*

 *caroténoïde jaune-orange*
V₁ pigment vert

















 *caroténoïde jaune*
 *caroténoïde orange*
 *V₂ pigment vert*
 *caroténoïde rose*
 *caroténoïde rose-orange*
 *caroténoïde orange*
 *caroténoïde jaune*
 *caroténoïde jaune-orange*
 *caroténoïde jaune*
 *V₃ pigment vert*
 *caroténoïde jaune*
 *V₄ pigment vert*
 *V₅ pigment vert*
 *V₆ pigment vert*
 *queue jaune - beige*
 *start*

Fig. 7 - Chromatogramme en couche mince des lipides totaux purifiés du *Mya arenaria* L.

CONCLUSIONS

- Dans les lipides du *Mytilus galloprovincialis* Lmk. par la chromatographie en couche mince on a mis en évidence 7 pigments verts. Les spectres d'absorption dans le visible en solution chloroformée de ces pigments sont très rapprochés et tous présentent 4 bandes d'absorption, ayant des maxima situés à 505-510, 537-540, 608-612 et 668 nm. Le maximum qui présente la plus grande valeur

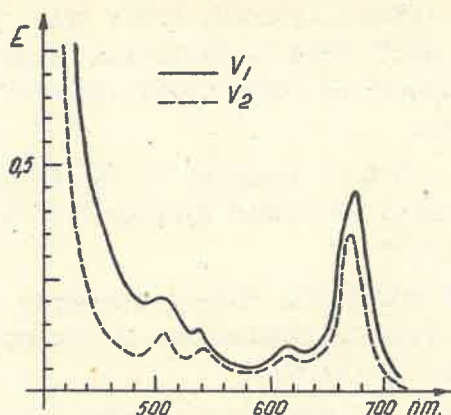


Fig.8 - Les spectres d'absorption des pigments verts du Mya arenaria

d'extinction est situé à 668 nm.

- La ressemblance entre les spectres d'absorption de ces pigments montre que leur structure chimique doit être très rapprochée.

- La fraction des lipides libres (extractibles à l'éther) est plus riche que la fraction des lipides combinés.

- La teneur totale des pigments en lipides totaux du Mytilus subit des variations saisonnières. Dans l'intervalle étudié entre février 1974 - février 1975 elle passe par des valeurs maxima en mars, septembre et décembre et par des valeurs minima en mai et novembre. Il n'y a pas de corrélation ni avec le cycle de reproduction ni avec la température de l'eau.

- Dans les lipides du Mya arenaria L. on a identifié 6 pigments verts. Leurs spectres d'absorption présentent dans le visible 4 bandes ayant des maxima à 500-505, 535, 610-615 et 668-670 nm et ressemblent aux spectres des pigments verts du Mytilus galloprovincialis Lmk.

BIBLIOGRAPHIE:

1. CAMPBELL S.A., 1970 - Carotenoid pigments of Mytilus edulis and Mytilus californianus. Comp. Biochem. Physiol. 32, 1:

97-115.

2. OSADA HIROMITSU, OTSUKA SHIGERU, SHIGA IVAO, 1970 - Greening of canned shell fish I. Isolation of green pigments of canned oysters and their physicochemical properties. C.A. 73: 119-363.
3. OSADA HIROMITSU, 1972 - Greening of canned shell fish II. Green pigments of canned oysters from Matsushima Bay. C.A. 77: 32976
4. LEE KUNG HO, KIM CHONG BAE, 1972 - Pigments in marine fish and shell fish I. Carotenoids in sea mussel, Mytilus edulis C.A. 77: 31769.
5. MOLNAR I.A., MIRZA M., PANTELI C., 1974 - Etude sur les fractions lipidiques du Mytilus galloprovincialis Lmk. Recherches marines 7: 179-199.
6. MOLNAR I.A., MIRZA M., PANTELI C., 1976 - Sur les fractions lipidiques de Mya arenaria L. Rapp.Comm.Int.Mer Médit., 23, 6: 85-86.
7. MOLNAR I.A., MIRZA M., PANTELI C., 1975 - Sur les fractions lipidiques de Mya arenaria L. Cercetări marine 8: 193-205.
8. MOLNAR I.A., MIRZA M., PANTELI C., 1976 - Studiu asupra pigmentilor verzi din lipidele moluștelor bivalve. Mytilus galloprovincialis Lmk. și Mya arenaria L. Al VI-lea simpozion Cercetarea și valorificarea produselor medicamentoase și biostimulatorilor, București: 45-46.