

4,541 mg Subst. gaben 7,09 mg CO₂ und 1,448 mg H₂O

2,870 mg Subst. gaben 464 mm³ N₂ (21°, 736 mm)

C₂₂H₂₂O₁₄N₈ Ber. C 42,45 H 3,56 N 18,00%

Gef. „, 42,60 „, 3,65 „, 18,18%

N-Acetyl-decahydro-isochinolin: 4,54 g (0,12 Mol) LiAlH₄ wurden in 300 cm³ absolutem Äther gelöst. Dazu liess man 8,95 g (0,05 Mol) N-Acetyl-decahydro-isochinolin in 300 cm³ absolutem Äther eintropfen. Es wurden 6,95 g N-Äthyl-decahydro-isochinolin, entsprechend 84% der Theorie, erhalten. Kp.₁₂ 92—94°. Hydrochlorid, Smp. 203—204°.

4,644 mg Subst. gaben 11,07 mg CO₂ und 4,57 mg H₂O

6,305 mg Subst. verbrauchten 4,40 cm³ AgNO₃ (1 cm³ = 0,250 mg Cl')

C₁₁H₂₁N, HCl Ber. C 64,84 H 10,88 Cl 17,40%

Gef. „, 65,04 „, 11,01 „, 17,45%

Die Analysen wurden in unserem mikroanalytischen Laboratorium unter der Leitung von Herrn Dr. Gysel ausgeführt.

Zusammenfassung.

An Hand von 9 Beispielen wird gezeigt, dass sich Säureamide im allgemeinen leicht mit Lithium-Aluminium-Hydrid zu den entsprechenden Aminen reduzieren lassen.

CIBA Aktiengesellschaft,
Pharmazeutische Abteilung, Basel.

187. Constitution de l'acide chondroïtine-sulfurique

par Kurt H. Meyer, M. E. Odier et A. E. Siegrist.

(21 VI 48)

En 1923, Heidelberger et Avery¹⁾ découvrirent, dans certaines bactéries pathogènes, des polysaccharides possédant une spécificité immunologique. Depuis lors, des polysaccharides spécifiques furent trouvés dans le sang, dans beaucoup d'autres organes et dans de nombreux microorganismes. Ces polysaccharides contiennent des restes d'hexoses et d'acides uroniques; ils contiennent en outre très souvent des restes de sucres aminés ou de l'acide sulfurique lié comme ester acide. L'acide chondroïtine-sulfurique, les acides hyaluroniques et l'héparine sont des polysaccharides chimiquement apparentés à ce groupe.

Comme la constitution d'aucune de ces substances n'est complètement connue, nous avons entrepris l'étude de l'acide chondroïtine-sulfurique, qui est la substance de ce groupe la plus facilement accessible; notre but était de mettre au point des méthodes de détermina-

¹⁾ M. Heidelberger et O. T. Avery, J. Exptl. Med. **38**, 73 (1923); **40**, 301 (1924).

tion de constitution susceptibles d'être appliquées aux autres polysaccharides apparentés.

L'acide chondroïtine-sulfurique est un des principaux constituants des tissus cartilagineux animaux (trachée, cartilages nasaux, aorte, tendons, etc.). Il représente, d'après *Winter*¹⁾, environ 40 % du cartilage sec.

Fischer et *Boedeker*²⁾, en 1861, furent les premiers à isoler l'acide chondroïtine-sulfurique; *Krunkenberg*³⁾, en 1884, réussit à obtenir un produit assez pur. Les premières recherches sur la constitution chimique sont dues à *Schmiedeberg*⁴⁾ en 1891. Les produits d'hydrolyse totale de l'acide chondroïtine-sulfurique sont: l'acide sulfurique, l'acide acétique, l'acide D-glucuronique et la chondrosamine que *Stacey* et coll.⁵⁾ ont identifiée récemment comme étant l'amino-2-D-galactose. D'après *Bray*, *Gregory* et *Stacey*⁶⁾, l'acide glucuronique et la galactosamine se trouvent sous forme pyranosique dans le polysaccharide, puisque leur groupe hydroxyle en position 4 a pu être méthylé. En ce qui concerne la structure du polysaccharide, *Levene* et *La Forge*⁷⁾, en 1913, estiment qu'il s'agit d'un tétrasaccharide symétrique non réducteur, composé de 2 restes de 6-sulfate de N-acétylhexosamine et de 2 restes d'acide glucuronique, qui donne par hydrolyse avec ClH le chlorhydrate d'un disaccharide, la «chondrosine», comprenant un reste d'acide glucuronique et un reste de chondrosamine. *Fürth* et *Bruno*⁸⁾ trouvent un poids moléculaire moyen d'environ 950 pour le sel calcique, ce qui correspond à un tétrasaccharide. *Bray*, *Gregory* et *Stacey*⁹⁾ ainsi que *Haworth*¹⁰⁾ envisagent, par contre, un polymère élevé à structure ramifiée, dont l'unité de base (période) serait un reste trisaccharidique possédant un groupe disposé latéralement selon la fig. 1.

Mais les teneurs en soufre, azote, acétyle, cations, cendres, déterminées par *Fürth* et *Bruno*¹¹⁾, *K. Meyer* et coll.¹²⁾¹³⁾, *Wolfson* et

¹⁾ *W. Winter*, *Bioch. Z.* **246**, 22—28 (1932).

²⁾ *C. Fischer* et *C. Boedeker*, *A.* **117**, 111 (1861).

³⁾ *C. F. W. Krunkenberg*, *Z. Biol.* **20**, 307 (1884).

⁴⁾ *O. Schmiedeberg*, *Arch. exp. Path. Pharmak.* **28**, 355 (1891).

⁵⁾ *S. P. James*, *F. Smith*, *M. Stacey*, *L. F. Wiggins*, *Nature* **156**, 308 (1945); *Soc. 1946*, 625.

⁶⁾ *H. G. Bray*, *J. E. Gregory* et *M. Stacey*, *Biochem. J.* **38**, 142 (1944).

⁷⁾ *P. A. Levene* et *F. B. La Forge*, *J. Biol. Chem.* **15**, 72, 157 (1913); **18**, 238 (1914); **31**, 609 (1917); *P. A. Levene*, *J. Biol. Chem.* **140**, 267 (1941).

⁸⁾ *O. Fürth* et *T. Bruno*, *Bioch. Z.* **294**, 158 (1937).

⁹⁾ *H. G. Bray*, *J. E. Gregory* et *M. Stacey*, *Biochem. J.* **38**, 142 (1944); *M. Stacey*, *Advances in Carbohydrate Chemistry* **11**, 182 (1946).

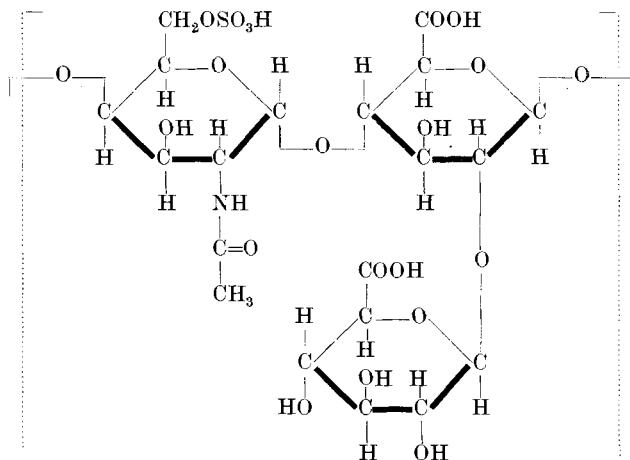
¹⁰⁾ *W. N. Haworth*, *Lecture Proc. Roy. Soc. A*, **136**, 15 (1946).

¹¹⁾ *O. Fürth* et *T. Bruno*, *Bioch. Z.* **294**, 158 (1937).

¹²⁾ *J. W. Palmer*, *E. M. Smyth* et *K. Meyer*, *J. Biol. Chem.* **119**, 491 (1937).

¹³⁾ *K. Meyer* et *E. M. Smyth*, *J. Biol. Chem.* **119**, 507 (1937).

coll.¹⁾ et *K.-H. Meyer* et *Odier*²⁾, de même que les résultats des dosages de chondrosamine et acide glucuronique de *Wolfstrom* et coll.¹⁾, ne permettent pas d'envisager une telle période et semblent nettement indiquer que le rapport acide glucuronique/chondrosamine est bien



Formule (période) de l'acide chondroïtine-sulfurique d'après *Haworth*.

Fig. 1.

de 1:1 dans la molécule. Enfin, *Blix* et *Snellmann*³⁾, en 1945, obtiennent par extraction au moyen d'une solution aqueuse de Cl_2Ca , avec un rendement minime d'ailleurs, un produit auquel ils attribuent un poids moléculaire de 200.000 à 300.000, calculé d'après leurs mesures de viscosité et de double réfraction de courant.

Isolement et purification de l'acide chondroïtine-sulfurique.

Levene et *La Forge*⁴⁾ ont extrait l'acide chondroïtine-sulfurique au moyen d'une solution de KOH 2% et, depuis lors, c'est cette méthode, plus ou moins modifiée, qui a été employée par *Jorpes* et *Bergström*⁵⁾, *Jorpes*⁶⁾, *Fürth* et *Bruno*⁷⁾, *Karrer* et *Mayer*⁸⁾, et, plus récemment, par *Bray*, *Gregory* et *Stacey*⁹⁾ ainsi que *Wolfstrom* et coll.¹⁾

¹⁾ *M. L. Wolfstrom, D. J. Weisblat, J. V. Karabinos, W. H. McNeely et J. McLean, Am. Soc.* **65**, 2077 (1943).

²⁾ *K.-H. Meyer et M. Odier, Exper.* **II**, 311 (1946); *M. Odier, thèse* n° 1093, Université de Genève (1946).

³⁾ *G. Blix et O. Snellmann, Ark. Kem.* **19 A**, No. 32 (1945).

⁴⁾ *P. A. Levene et F. B. La Forge, J. Biol. Chem.* **15**, 72, 157 (1913); **18**, 238 (1914); **31**, 609 (1917).

⁵⁾ *E. Jorpes et S. Bergström, J. Biol. Chem.* **118**, 447—457 (1937).

⁶⁾ *E. Jorpes, Bioch. Z.* **204**, 354 (1928).

⁷⁾ *O. Fürth et T. Bruno, Bioch. Z.* **294**, 158 (1937).

⁸⁾ *P. Karrer et J. Mayer, Helv.* **20**, 415 (1937).

⁹⁾ *H. G. Bray, J. E. Gregory et M. Stacey, Biochem. J.* **38**, 142 (1944).

D'autres auteurs ont cherché à extraire l'acide chondroïtine-sulfurique au moyen de chlorures alcalins ou alcalino-terreux. Quoique ce procédé soit plus doux, les rendements ainsi obtenus par *Jorpes*¹⁾, *Meyer et Smyth*²⁾ et *Blix et Snellmann*³⁾ sont bien inférieurs à ceux de l'extraction alcaline.

Après quelques essais infructueux de solubilisation de cartilages de la paroi médiane du groin de porc dans des solutions d'urée, de thio-urée et d'hydrate de chloral, nous nous sommes rendus à l'évidence que seule une extraction en milieu alcalin dilué (NaOH 2%) permettait de séparer l'acide chondroïtine-sulfurique du collagène dans le cartilage et, par conséquent, d'extraire une grande partie du polysaccharide. Afin d'éviter toute dégradation, nous opérons à 5°. Nous avons en effet constaté que la solution du produit ne subit dans ces conditions aucune altération au cours d'au moins deux mois.

Les protéines sont ensuite éliminées par précipitation à l'acide phospho-tungstique. En modifiant et simplifiant la méthode de *Fürth et Bruno*, nous obtenons un rendement de 31% par rapport au cartilage sec. Il importe cependant de travailler rapidement aussi longtemps que l'on se trouve en milieu fortement acide et d'effectuer toutes les opérations à froid (5°).

Dans ces conditions, la dégradation hydrolytique est négligeable. Nous avons vérifié ce fait par comparaison du produit obtenu avec un autre dont les protéines étaient éliminées au pH 7 selon *Sevag*⁴⁾ (secouages répétés avec du chloroforme en présence d'un peu d'alcool amylique provoquant la coagulation des protéines). N'étant à aucun moment exposé à une réaction acide, ce produit n'avait certainement pas subi d'hydrolyse. Comme les produits obtenus par les deux méthodes avaient les mêmes viscosités et pratiquement le même degré de polymérisation, nous avons adopté la méthode à l'acide phospho-tungstique.

Après déprotéinisation et élimination des sels minéraux par dialyse, le sel sodico-calcique du polysaccharide est transformé en sel sodique au moyen d'un échangeur de cations: «Amberlite IR-100»⁵⁾. On isole finalement le polysaccharide de la solution aqueuse par précipitation à l'éthanol en présence d'un peu de ClNa.

Composition de l'acide chondroïtine-sulfurique.

Nos dosages des éléments sodium, azote et soufre et des groupes acétyles confirment les résultats de la plupart des auteurs et montrent que les 4 produits d'hydrolyse totale — acides sulfurique, acétique,

¹⁾ *E. Jorpes*, Bioch. Z. **204**, 354 (1928).

²⁾ *K. Meyer et E. M. Smyth*, J. Biol. Chem. **119**, 507 (1937).

³⁾ *G. Blix et O. Snellmann*, Ark. Kem., **19 A**, No. 32 (1945).

⁴⁾ *M. Sevag*, Bioch. Z. **273**, 419 (1934).

⁵⁾ Produit de *Resinous Products and Chemical Company*, Philadelphia.

glucuronique et amino-2-D-galactose (chondrosamine) — sont représentés en proportions équimoléculaires dans le polysaccharide. La formule est donc $(C_{14}H_{19}O_{14}NSNa_2)_n$.

Poids moléculaire et forme de la molécule.

Etant donné que pratiquement tous les polysaccharides naturels connus possèdent un groupe réducteur par molécule, nous avons déterminé les poids moléculaires moyens par titrage des pouvoirs réducteurs, selon *Linderström-Lang* et *Holter*¹⁾ (modification de la méthode de *Willstätter* et *Schudel*²⁾). — Nous avons trouvé des valeurs comprises entre 27.000 et 32.900 pour les produits préparés d'après nos méthodes, alors que pour un produit extrait à température ordinaire selon *Fürth* et *Bruno* nous ne trouvions que 17.200. Des mesures de viscosité ont donné des résultats semblables: en effet, la valeur limite du rapport η spé./c (intrinsic viscosity $[\eta]$) est d'environ 0,8 pour nos produits, alors qu'elle n'est que de 0,5 pour celui obtenu selon *Fürth* et *Bruno*, qui, par conséquent, a subi une nette dégradation au cours de son extraction.

En comparant les valeurs des rapports P.M./ $[\eta]$ avec celles que l'on trouve pour d'autres polysaccharides, ramifiés ou non ramifiés³⁾, on constate que l'acide chondroïtine-sulfurique ne doit pas être ramifié, ce qui confirme les conclusions de *Blix* et *Snellmann*⁴⁾ sur le même sujet. Par contre, ces derniers auteurs attribuent un poids moléculaire de 200.000 à 300.000 à leur produit extrait par une solution aqueuse de Cl_2Ca . Mais comme en solution alcaline diluée il est rapidement transformé en un composé semblable aux nôtres, nous croyons qu'il se compose d'agrégats polymoléculaires contenant peut-être encore des traces de protéines.

Constitution.

Par des mesures polarimétriques sur des solutions aqueuses, nous obtenons pour $[\alpha]_D^{20}$ une valeur moyenne de -31° . Les liaisons entre les restes d'hexoses sont donc du type β .

Nous pouvons dès lors partir des faits suivants qui nous semblent bien établis:

1^o L'acide chondroïtine-sulfurique contient un nombre égal de restes d'amino-2-D-galactose<1,5> et d'acide glucuronique<1,5>. Nous désignerons désormais par «période» un groupe formé de ces 2 restes. Le degré moyen de polymérisation exprimé en monoses est d'environ 120, soit 60 périodes.

¹⁾ *K. Linderström-Lang* et *H. Holter*, Ann. chim. anal. **39**, 116 (1934).

²⁾ *R. Willstätter* et *G. Schudel*, B. **51**, 780 (1918).

³⁾ Cf. *K.-H. Meyer*, «Die hochpolymeren Verbindungen», tableau p. 26, Leipzig (1940).

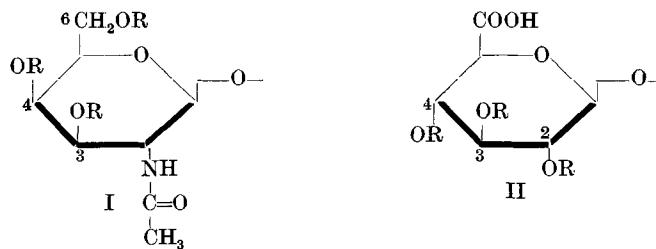
⁴⁾ *G. Blix* et *O. Snellmann*, Ark. Kem. **19 A**, No. 32 (1945).

2^o Dans chaque période, une molécule d'acide sulfurique est liée à un —OH libre sous forme d'ester acide.

3^o Les restes d'hexoses sont liés entre eux par des liaisons β -glucosidiques.

4^o La chaîne n'est pas ramifiée. Cette hypothèse sera d'ailleurs confirmée par des expériences rapportées plus loin.

Tableau 1.



I = reste d'acétyl-amino-galactose.

II = reste d'acide glucuronique.

R = H ou SO₃H ou reste de monose.

Constitution possible	Reste d'acétyl-amino-2-galactose	Reste d'acide glucur.	Constitution possible	Reste d'acétyl-amino-2-galactose	Reste d'acide glucur.
N ^o	positions 3 4 6	positions 2 3 4	N ^o	positions 3 4 6	positions 2 3 4
1	C S H	C H H*	19	C H H	C S H**
2	C S H	H C H	20	C H H	C H S**
3	C S H	H H C*	21	C H H	S C H
4	C H S	C H H*	22	C H H	S H C**
5	C H S	H C H	23	C H H	H C S
6	C H S	H H C*	24	C H H	H S C**
7	S C H	C H H*	25	H C H	C S H**
8	S C H	H C H	26	H C H	C H S**
9	S C H	H H C*	27	H C H	S C H
10	S H C	C H H*	28	H C H	S H C**
11	S H C	H C H**	29	H C H	H C S
12	S H C	H H C*	30	H C H	H S C**
13	H C S	C H H*	31	H H C	C S H*
14	H C S	H C H	32	H H C	C H S*
15	H C S	H H C*	33	H H C	S C H*
16	H S C	C H H*	34	H H C	S H C*
17	H S C	H C H**	35	H H C	H C S*
18	H S C	H H C*	36	H H C	H S C*

C = liaison glucosidique; S = reste sulfurique; H = non substitué.

En nous basant d'une part sur ces faits, et d'autre part sur les résultats d'oxydation à l'acide périodique de l'acide chondroïtine-sulfurique et de ses produits de méthylation et de dégradation, nous avons pu déterminer la constitution de l'acide chondroïtine-sulfurique.

Calculons d'abord le nombre de constitutions compatibles avec ce qui précède. Admettons premièrement que les restes sulfuriques se trouvent liés aux restes d'amino-2-galactose. Ces derniers ont 3 groupes hydroxyles, 3, 4, 6, dont l'un est libre et les deux autres liés, soit avec le reste voisin par une liaison glucosidique, soit avec le reste sulfurique; le nombre des possibilités s'élève donc à $3! = 6$. Chacun de ces cas peut se combiner avec une des constitutions possibles du reste glucuronique. L'un des groupes 2, 3, 4 de ce reste glucuronique est lié comme glucoside avec un reste voisin, ce qui nous donne 3 possibilités; pour une période on a $6 \times 3 = 18$ possibilités. Pour le cas où le groupe sulfurique serait fixé sur le reste glucuronique, on obtient 3 possibilités pour la galactosamine et $3! = 6$ pour l'acide glucuronique, donc 18 pour une période. Nous devons trancher entre les $18 + 18 = 36$ constitutions possibles (voir tableau 1, p. 1405).

Les réactions de l'acide périodique sur 1) l'acide intact, 2) l'acide partiellement désulfaté 3) les produits de scission méthanolytique de la chaîne complètement méthylée, 4) les produits de la scission hydrolytique de la chaîne «perméthylée», nous ont permis d'exclure 35 de ces possibilités et d'attribuer à l'acide chondroïtine-sulfurique la constitution représentée par le n° 5.

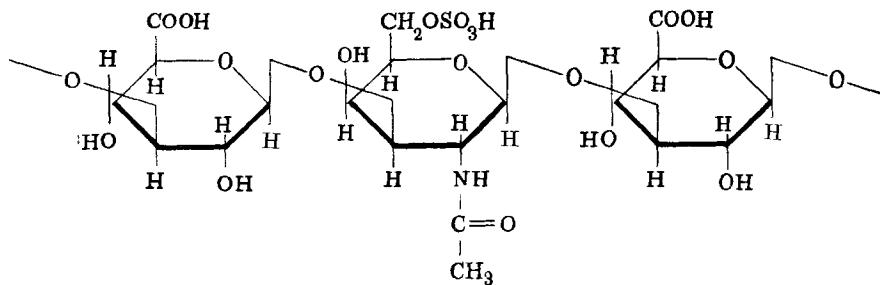


Fig. 2.
Constitution de l'acide chondroïtine-sulfurique.

Voici les résultats: une molécule d'acide chondroïtine-sulfurique ne réduit en moyenne que 4 molécules d'acide périodique. Etant composée d'environ 120 restes de monoses (60 périodes), elle n'est oxydée qu'à ses extrémités (groupe réducteur et groupe terminal non-réducteur). Nous pouvons donc déjà écarter tous les types de formules marqués d'un *, où deux $-\text{OH}$ voisins sont libres (positions 3 et 4 libres pour l'amino-sucre et 2 et 3, ou 3 et 4, pour le reste glucuronique).

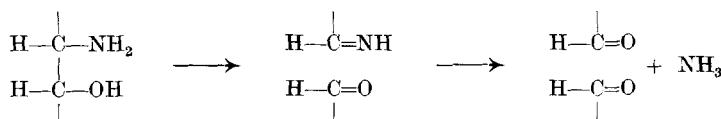
Nous avons ensuite effectué une oxydation à l'acide périodique sur un acide chondroïtine-sulfurique partiellement hydrolysé par ClH 5-n. à 37° pendant 3 heures. Par cette dernière opération, 51,4% des restes sulfuriques ont été hydrolysés, alors que 3% seulement des liaisons glucosidiques ont été scindées. La vitesse d'hydrolyse des restes sulfuriques est donc beaucoup plus grande que celle des liaisons glucosidiques. Pour cette nouvelle chaîne, la consommation en acide périodique était encore de 4 molécules. Les chaînons internes, même lorsqu'ils ont perdu leurs restes sulfuriques, ne réagissent toujours pas avec l'acide périodique.

Ceci nous permet d'exclure les constitutions dans lesquelles le soufre se trouve voisin d'un groupe $-\text{OH}$ libre; ces possibilités sont marquées d'un ** dans le tableau 1.

En même temps, l'hypothèse de la structure non-ramifiée se trouve confirmée, car chaque groupe terminal non-réducteur ayant perdu son reste sulfurique devrait consommer une molécule d'acide périodique s'il était formé d'un reste d'acétylaminogalactose (oxydation des $-\text{OH}$ en position 3 et 4), et deux molécules s'il était formé d'un reste d'acide glucuronique (oxydation des $-\text{OH}$ en position 2, 3 et 4). Or la «désulfatation» n'est pas accompagnée d'augmentation de la consommation d'acide périodique; il n'est donc pas question de ramifications.

En examinant maintenant les 8 constitutions encore possibles, on remarque qu'en tout cas le reste glucuronique porte une liaison glucosidique «C» en position 3.

Nous avons ensuite méthylé entièrement l'acide chondroïtine-sulfurique avec conservation des groupes sulfates; le produit «perméthylé» a été hydrolysé et le mélange des produits de scission oxydé à l'acide périodique. Après l'oxydation, nous trouvons tout l'azote sous forme de NH_3 dans le mélange réactionnel. Ceci prouve que le groupe $-\text{NH} \cdot \text{CO} \cdot \text{CH}_3$ a été saponifié lors de l'hydrolyse et que le groupe $-\text{NH}_2$ ainsi formé a réagi comme un groupe $-\text{OH}$ voisin d'un autre groupe $-\text{OH}$ libre:



La consommation en acide périodique du produit méthylé hydrolysé est de 3 molécules par période. Ceci nous permet d'exclure dans le tableau 1 les possibilités n° 8, 21, 23, 27 et 29 (pour lesquelles la consommation d'acide périodique serait de 4 molécules par période). Il est évident que cette consommation de 3 molécules d'acide périodique par période est due uniquement à la chondrosamine méthylée,

puisque, dans l'acide glucuronique méthylé, il n'y a que les groupes $-\text{OH}$ 1, 3 et 5 qui soient libres, ce qui ne permet aucune consommation en IO_4H .

L'acide chondroïtine-sulfurique «perméthylé» a ensuite été soumis à une méthanolysé et le mélange des produits de scission oxydé à l'acide périodique. La consommation en IO_4H est de 1 molécule par période, et après oxydation, la totalité de l'azote se trouve sous forme de NH_3 dans le mélange réactionnel. Le groupe $-\text{OH}$ de l'atome 3 de la galactosamine n'est donc pas méthylé; il est bloqué, dans l'acide chondroïtine-sulfurique, soit par «C», soit par «S». Cette constatation exclut la constitution n° 14. La constitution n° 2, enfin, est écartée par le fait que sa consommation en IO_4H serait de 2 molécules par période. Il ne reste donc que la constitution n° 5. Elle est confirmée par un cinquième essai, où nous avons hydrolysé l'acide chondroïtine-sulfurique complètement méthylé, puis oxydé l'hydrolysat au IO_4Na et dosé l'aldéhyde formique dans le mélange réactionnel d'après *Criegee*¹⁾ et *Jeanloz*²⁾. Seul le groupe alcoolique primaire (il n'en existe qu'un par période) peut donner une réaction positive. Or, nous trouvons pratiquement une molécule d'aldéhyde formique produite par période, ce qui indique que ce groupe $-\text{CH}_2\text{OH}$ doit être bloqué dans l'acide libre.

Nous avons donc bien affaire, dans l'acide chondroïtine-sulfurique «perméthylé» puis hydrolysé, à un mélange de monométhyl-4-chondrosamine et d'acide diméthyl-2,4-glucuronique (ce dernier étant probablement décarboxylé). Pour arriver à ce résultat, il nous a fallu étudier soigneusement l'hydrolyse acide du polysaccharide et mettre au point une méthode de méthylation.

Hydrolyse acide de l'acide chondroïtine-sulfurique.

Il y a plusieurs genres de scissions hydrolytiques possibles, à savoir: scission des liaisons glucosidiques entre les monoses (2 sortes), scission des groupes $-\text{SO}_3\text{H}$ et scission des groupes acétyles. D'autre part, il peut y avoir décarboxylation de l'acide glucuronique.

La figure 5 (page 1416) montre l'hydrolyse des liaisons glucosidiques du produit natif par $\text{SO}_4\text{H}_2\text{n.}$, 2,5-n. et 5-n. à 37° en fonction du temps. On obtient l'hydrolyse complète après 82 jours.

D'autre part, nous avons suivi la scission des restes sulfuriques par l'acide chlorhydrique 5-n. à 37° (titrage de $\text{SO}_4^{\text{''}}$ libéré par Cl_2Ba en milieu éthanol 50%, indicateur: rhodizonate de K^3). La figure 3 montre que lorsque la moitié des restes sulfuriques sont scindés, 3% seulement des liaisons glucosidiques sont hydrolysées.

¹⁾ *R. Criegee*, A. **495**, 211 (1932).

²⁾ *R. Jeanloz*, Helv. **27**, 1509 (1944).

³⁾ *J. F. Alicino*, Analytical Chem. **20**, 85 (1948).

La scission des restes sulfuriques est quantitative après traitement à reflux pendant 2 heures à ClH n.

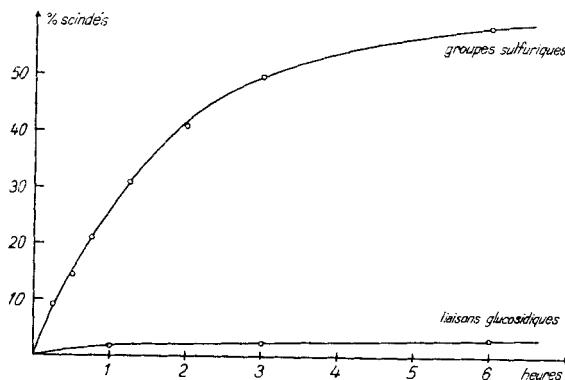


Fig. 3.
Hydrolyse acide partielle du produit natif.

Les hydrolyses acides à 20° et 37° sont accompagnées de dégagement de CO₂ (décarboxylation des restes uroniques). Nous nous en sommes rendu compte par des dosages qualitatifs du CO₂ en l'absorbant dans Ba(OH)₂.

Les groupes acétyles sont également scindés en milieu acide. Nous avons constaté, après oxydation à l'acide périodique des produits d'hydrolyse totale, que l'azote avait été transformé quantitativement en NH₃, ce qui démontre que la totalité de l'azote se trouve sous forme de groupes —NH₂ libres dans les produits soumis à cette oxydation.

Pour éviter la décarboxylation de l'acide glucuronique, nous avons enfin effectué une méthanolysé de l'acide chondroïtine-sulfurique perméthylé. Le pouvoir rotatoire est devenu constant après 44 heures d'ébullition à reflux dans le méthanol absolu contenant 7,3% de ClH gazeux. $[\alpha]_D^{20} = +0,038^\circ$.

Méthylation de l'acide chondroïtine-sulfurique.

N'ayant pas réussi à méthylérer complètement l'acide chondroïtine-sulfurique natif, Stacey et coll.¹⁾ procèdent à une hydrolyse partielle qui abaisse le poids moléculaire et scinde en même temps les groupes sulfuriques. Ils méthylent ensuite leur «dégradé chondroïtin». Il est évident que seul un produit méthylé non-dégradé et contenant encore la totalité de son soufre peut nous renseigner définitivement sur le mode de liaison entre les monoses et sur la place du soufre.

Nous avons étudié la méthylation au moyen du sulfate de méthyle à différentes températures. La méthylation à 20°, ainsi que celle à 5° aboutissent à la perméthylation en gardant pratiquement la totalité des restes sulfuriques. Notons cependant que, tout en étant plus facile au point de vue pratique, la première se fait dans un temps 8 fois plus court que la deuxième qui dure plusieurs mois. Une méthylation plus prolongée n'augmente plus la teneur en —OCH₃ au-dessus d'une valeur correspondant à 3 groupes hydroxyles libres par période. À 40° et 60°, par contre, on n'arrive pas à une méthylation totale:

¹⁾ H. G. Bray, J. E. Gregory et M. Stacey, Biochem. J. **38**, 142 (1944).

les groupes $-\text{OH}$ libres semblent diminuer, ce qui serait dû probablement à la scission alcaline des groupes sulfuriques avec formation d'anhydro-sucres¹). Il se produit en outre une légère dégradation indiquée par une baisse de $[\eta]$ (de 0,8 à 0,46 pour le produit méthylé à 60°).

La méthylation prolongée à froid nous semble être une méthode de valeur pour la détermination de la constitution de polysaccharides peu stables.

Partie expérimentale.

1^o Solubilisation du cartilage.

Des cartilages nasaux de 400 porcs sont soigneusement nettoyés, débarrassés de traches de graisses et durcis ensuite pendant 4 jours dans l'éthanol 90%²); le troisième jour ils sont coupés en petits morceaux. Puis, on les rape et les broie finalement dans un broyeur à cylindres d'acier au $1/100$ de mm.: on obtient 4250 gr. d'une poudre blanche, contenant 82 à 83% d'humidité. Elle est triturée dans un grand bêcher avec 3 l. de NaOH 2%, puis additionnée de 13 l. de NaOH 2% (320 gr. NaOH en tout) et agitée doucement pendant 48 h. à 5°. On centrifuge 15 minutes³), triture les culots avec 5,3 l. NaOH 2% (106 gr. NaOH) et laisse de nouveau réagir pendant 48 h. à froid. On centrifuge, rejette les culots et neutralise par ClH conc. en ayant soin que la température ne dépasse pas 5°. On obtient ainsi 21,5 l. d'une liqueur brun-clair visqueuse.

2^o Elimination des protéines.

a) par précipitation à l'acide phospho-tungstique.

17 l. de la liqueur neutralisée, contenant 604 gr. du produit initial sec, sont divisés en portions de 800 cm³. Chacune de ces portions est traitée à 5° par 18,6 cm³ ClH conc. (37%) et 30 cm³ d'une solution aqueuse saturée d'acide phospho-tungstique, sous très forte agitation pendant 3 minutes. On centrifuge 5 min. et verse la liqueur claire surnageante à travers un filtre à plis. Nous travaillons simultanément avec 4 filtres⁴) et râmenons immédiatement après, au p_{H} 7 par la soude caustique. Les solutions réunies sont concentrées à 3 l. dans le vide à 30°. On obtient ainsi une liqueur jaune-clair, très visqueuse qui ne présente plus les réactions des protéines.

b) au p_{H} 7, d'après Sevag⁵).

2 l. de la solution neutralisée, contenant 71 gr. du produit de départ sec, sont additionnés de 1,5 l. de chloroforme et 150 cm³ d'alcool amylique. On secoue 3 h. à température ordinaire et centrifuge 1 h. La couche aqueuse, claire surnageante est immédiatement siphonnée et les gels de protéines sont secoués pendant 10 h. avec 2 l. d'eau. On centrifuge de nouveau 1 h., sépare la couche aqueuse, la concentre au vide à 200 cm³ et l'ajoute au premier centrifugeat.

On répète les opérations ci-dessus encore 23 fois. On précipite la couche aqueuse par 2 fois son volume en éthanol, laisse déposer 1 nuit à froid, siphonne la couche claire surnageante, puis centrifuge 10 min. le dépôt. On lave les culots à l'éthanol et à l'éther par triturations suivies de centrifugations, et chasse l'excès d'éther sous vide.

¹⁾ E.G. V. Percival et T. H. Soutar, Soc. 1940, 1475; R. B. Duff et E. G. V. Percival, Soc. 1941, 830.

²⁾ Le méthanol donne des résultats non-satisfaisants.

³⁾ Toutes les centrifugations se font à 3000 tours/min.

⁴⁾ Toutes les opérations aux p_{H} fortement acides doivent se faire le plus vite possible.

⁵⁾ M. Sevag, Bioch. Z. 273, 419 (1934). F. Stockhausen et K. Silbereisen, Bioch. Z. 287, 276 (1936).

I. Extraction.

Schéma de l'extraction de l'acide chondroïtine-sulfurique.

1) Solubilisation du cartilage

Cartilages nasaux de porcs

durcis 4 jours dans l'éthanol
puis broyésNaOH 2%, 48 h. à 5°
(2 fois)résidu
rejetéliqueur
neutralisée

2) Elimination des protéines

méthode a

+ ClH + ac. phos-
pho-tungstique (5°)précipité (ttes
les protéines):
rejeté

méthode b

+ CHCl₃ + alcool
amylique 10:1, secouergels de
protéines
rejetésliqueur
neutralisée
concentrée
au vide

liqueur

24 fois
précipité par
l'éthanolprécipité
redissous
dans l'eauliqueur
aban-
donnée3) Elimination des
sels minéraux
et
transformation en
sel sodique

dialyse: 5 jours

échange des ions Ca⁺⁺ contre ions Na⁺
(Amberlite IR-100, chargée de ClNa)

précipité à l'éthanol

chondroïtine-sulfate de sodium

3^e *Elimination des sels minéraux et transformation en sel de Na.*

Les solutions débarrassées des protéines sont dialysées 3 jours contre l'eau courante, puis 2 jours contre l'eau distillée dans des sacs de cellophane «Visking» (de 8,5 em. de diamètre) avec agitation intérieure, jusqu'à élimination complète des ions chlore.

On ajoute aux solutions aqueuses dialysées, 2 à 3 fois la quantité nécessaire d'Amberlite IR-100 (3 gr. d'Amberlite pour 1 gr. de chondroïtine-sulfate sec), chargée préalablement par 5 traitements successifs avec une solution de ClNa 3-n. et lavée ensuite à l'eau distillée jusqu'à disparition des ions Cl⁻. On fait le vide pendant 30 minutes sur la liqueur (élimination des bulles d'air qui diminuent la surface de contact), agite mécaniquement pendant 50 minutes, filtre sur Büchner, lave à l'eau et répète ces opérations jusqu'à élimination complète des ions calcium.

Pour isoler le produit, on précipite la solution par 3 volumes d'éthanol à 95%, sous forte agitation, en ajoutant 0,2 à 0,5 gr. de ClNa. Après repos de 3 à 6 h. à 5°, on siphonne la liqueur claire surnageante et centrifuge le reste (10 min.). Les culots sont lavés 2 fois à l'éthanol à 95% et 2 fois à l'éther. On chasse l'excès d'éther au vide, pulvérise la substance et la séche 24 h. au vide sur silicagel. Il importe de ne pas sécher trop rapidement afin d'éviter la formation d'un produit extrêmement dur.

Nous avons obtenu des produits parfaitement blancs avec les rendements suivants:

Produit traité par:	Acide phospho-tungstique	Acide*) picrique	CHCl ₃ -alc. amyl.
gr. de produit de départ sec . . .	604	53	71
gr. de produit final	249,5	13,2	16,7
Teneur en humidité: %	23,25	6,19	647
Rendement: %	31,6	23,4	22
Durée de l'extr. en jours	18	43	86

*) Produit d'extraction alcaline débarrassé de la majeure partie de ses protéines par précipitation à l'acide picrique (p_H 4,2), et du reste selon *Sevag*¹).

Analyses.

Tous les produits ont été séchés à poids constant (60 h.) à 78° au vide poussé sur P₂O₅. Ainsi que le montre le tableau ci-dessous, il reste encore une certaine quantité d'eau.

Dosage de	Valeurs théoriques pour C ₁₄ H ₁₉ O ₁₄ NSNa ₂ %		Valeurs trouvées en % le produit ayant été traité par		
	0% H ₂ O	8% H ₂ O	acide phospho-tungst.	acide picrique	CHCl ₃ -alc.amyl.
Carbone (W) . . .	33,4	30,7	31,1	31,1	33,6
Hydrogène (W) . . .	3,78	4,37	4,3	5,3	5,0
Sodium (W) . . .	9,15	8,4	8,9	8,8	8,9
Soufre (W) . . .	6,37	5,87	6,2	5,9	6,1
Azote (Kjeldahl) . . .	2,78	2,56	2,7	2,6	2,8
N-Acétyle (S) . . .	8,55	7,85	8,4	8,3	8,1
—OCH ₃ ²	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cendres SO ₄ Na ₂ . .	28,25	26,0	26,2	25,8	25,0

¹⁾ Cf. *M. Odier*, thèse n° 1093, Université de Genève, p. 17 (1946).

²⁾ *F. Vieböck et A. Schwappach*, B. 63, 2818, 3207 (1930).

Les analyses marquées (*W*) ont été effectuées au Laboratoire de micro-analyses *F. Weiser*, à Bâle.

Celles marquées (*S*) ont été effectuées dans notre Laboratoire par *D. Schwartz*, d'après une modification de la méthode de *Bredereck*¹⁾.

*Dosage du pouvoir réducteur selon Linderström-Lang-Holter*²⁾.

Les produits ont été reprécipités par le méthanol.

Produit traité par:	ac. phospho-tungstique	acide picrique	CHCl ₃ -alc.amyl.	*)
Nombre de cm ³ I 0,04-n. . .	1,04	1,01	0,92	2,92
Prise: mgr.	593,4	600,0	604,8	1000
Degré de polymérisation . .	114	118	131	70
Poids moléculaire moyen . .	28.600	29.700	32.900	17.200

*) Produit préparé selon *Fürth* et *Bruno*³⁾.

Mesures de viscosité (t = 25°, viscosimètre d'*Ostwald*).

Produit traité par:	ac. phospho-tungstique	acide picrique	CHCl ₃ -alc.amyl.	*)
Concentration = 1%	0,81	0,87	0,84	0,50
Concentration = 2%	0,76	0,84	0,80	0,48
Concentration = 4%	0,81	0,92	0,87	0,65

*) Produit préparé selon *Fürth* et *Bruno*³⁾.

Mesures polarimétriques (polarimètre de *Lippich*).

Produit traité par:	ac. phospho-tungstique	ac. picrique	CHCl ₃ -alcool amyl.
[\alpha] _D ²⁰ (H ₂ O)	- 31,64	- 32,78	- 27,4

II. Méthylation.

1^o *Méthylation à 20°, 40° et 60°*: On opère sur 3 parties, en réglant la température avec un bain-marie à $\pm 0,5^\circ$, selon la méthode suivante:

On dissout 10 gr. du sel sodique de l'acide chondroïtine-sulfurique (correspondant à 7,67 gr. de produit sec) dans 200 cm³ NaOH 1%. On méthyle, sous forte agitation mécanique, dans un courant d'hydrogène, en ajoutant NaOH 30% qui a été bouillie préalablement, puis refroidie, dans un courant d'hydrogène (pour l'appareil, cf. *K.-H. Meyer, Wertheim et Bernfeld*⁴⁾). On ajoute simultanément, goutte à goutte, 50 cm³ de SO₄(CH₃)₂ (6,5 fois la quantité théoriquement nécessaire pour perméthyler), en portions de 5 cm³ par h., et 64 cm³ NaOH 30% en portions de 6,4 cm³/h. On contrôle régulièrement le pH qui doit rester au-dessus de 12 (indicateur: jaune d'alizarine R). On agite encore une heure après la dernière adjonction de l'agent méthylant.

¹⁾ *H. Bredereck*, Z. angew. Ch. **45**, 241 (1932).

²⁾ *K. Linderström-Lang* et *H. Holter*, Ann. Chim. anal. **39**, 116 (1934).

³⁾ *O. Fürth* et *T. Bruno*, Bioch. Z. **294**, 158 (1937).

⁴⁾ *Helv.* **23**, 869 (1940).

Les solutions, parfaitement claires, sont ensuite précipitées sous forte agitation mécanique par 2,5 à 3 volumes d'éthanol à 95%. Après repos de 12 h. à froid, on siphonne la couche claire surnageante et centrifuge le précipité 20 à 25 minutes. Les culots sont ensuite triturés plusieurs fois à l'éthanol et à l'éther sur la centrifugeuse. Enfin, l'excès d'éther est chassé au vide.

On tritue ensuite les culots avec 200 cm³ NaOH 1%, préleve une prise aliquote de 20 cm³ sur la solution claire et recommence 5 fois la méthylation sur le reste, comme ci-dessus.

Tableau 2.

Méthylation à 20°, 40° et 60°. (Les valeurs données pour chaque étape s'entendent à partir du début de la méthylation.)

Etape de méthylation	I	II	III	IV	V	VI
cm ³ tot. de SO ₄ (CH ₃) ₂ ajoutés	50	95	136	205	265	315
cm ³ tot. de NaOH 30% ajoutés	64	121,6	172,8	262,4	416	544
Nombre de fois la quantité théorique en SO ₄ (CH ₃) ₂	6,5	13	19,5	32	44	55,6
Durée totale en h.	11	22	33	45	58	69

Purification de la prise aliquote: Pour éliminer les ions sulfuriques, la prise aliquote est dialysée, sous agitation mécanique, dans un sac de cellophane « Visking » (diamètre: 2,2 cm.), contre l'eau distillée fréquemment renouvelée, pendant 5 jours. On a soin de contrôler le pH et de le tenir toujours au-dessus de 8 en ajoutant quelques gouttes de NaOH 30%.

Après élimination des ions sulfuriques, on concentre les dialysats au vide à un volume de 20 cm³, et, après filtration, on précipite le produit sous forte agitation avec 100 cm³ d'éthanol 95%, en ajoutant environ 0,1 gr. de ClNa. Cette précipitation, souvent très délicate, peut être facilitée par agitation prolongée, et, éventuellement, par une nouvelle addition de 0,1 gr. ClNa et 50 cm³ d'éthanol 95%.

Le produit est isolé comme ci-dessus, puis séché une nuit au vide sur silicagel.

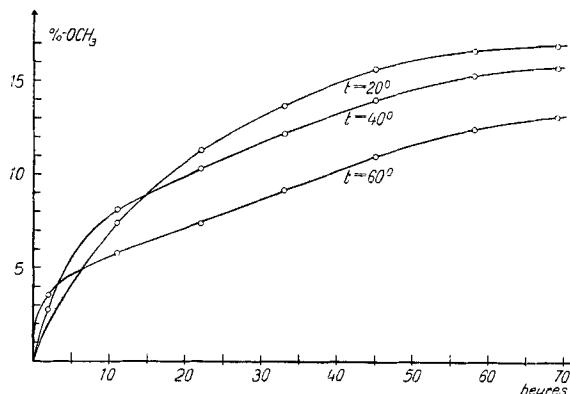


Fig. 4.

Méthylation, à 20°, 40° et 60°, du chondroitine-sulfate de sodium.

Nous avons obtenu, avec un rendement variant de 70 à 80% par étape de méthylation, des poudres parfaitement blanches dont les teneurs en —OCH₃ par rapport aux produits secs sont données dans la figure 4.

Les teneurs en soufre des produits finals sont de 5,27%, 5,05% et 4,83%, suivant que la méthylation a été effectuée à 20°, 40° ou 60°; les viscosités limites $[\eta]$ sont de 0,74, 0,57 et 0,46 respectivement.

Nous avons repris la méthylation à 20° sur 40 gr. de sel de sodium de l'acide chondroïtine-sulfurique (35,74 gr. de produit sec), et obtenu, après 5 étapes (55 h.), 25,4 gr. d'une poudre fine parfaitement blanche, contenant 11,22% d'eau, 17,42% de $-\text{OCH}_3$ et 5,19% de S. Le rendement est de 58% du rendement théorique et le degré de polymérisation de 104.

2^o Méthylation à 5°: On dissout 10 gr. du sel sodique de l'acide chondroïtine-sulfurique (correspondant à 7,67 gr. de substance sèche) dans 200 cm³ NaOH 1% dans un flacon de 1 l. En secouant mécaniquement à une température de 5°, on ajoute, en 40 fois, 50 cm³ de sulfate de méthyle avec 64 cm³ de NaOH 30%, soit 6,5 fois la quantité théorique nécessaire pour perméthyler le produit, en admettant pour ce dernier 3 groupes $-\text{OH}$ libres par période. Les adjonctions d'agent méthylant se font toutes les 2 heures. Le p_H est ainsi gardé au-dessus de 12, ce qui est vérifié avant chaque nouvelle adjonction de l'agent méthylant (indicateur: jaune d'alizarine R).

Le produit est précipité, puis redissous, une prise aliquote étant prélevée et purifiée exactement comme lors des méthylations à 20°, 40° et 60°.

Nous avons répété encore 5 fois la méthylation en procédant comme ci-dessus (cf. tableau 2, p. 1414), sauf en ce qui concerne les durées totales d'opérations qui ont été de 80, 152, 216, 328, 424 et 504 h.

Ainsi, nous avons obtenu, avec des rendements variant entre 70% et 80% par étape de méthylation, des poudres parfaitement blanches dont les teneurs en $-\text{OCH}_3$ étaient les suivantes:

heures	80	152	216	328	424	504
% $-\text{OCH}_3$	10,35	13,45	16,02	17,02	17,34	17,50

D'après les résultats de nos titrages de pouvoir réducteur selon *Linderstrøm-Lang* et *Holter*¹⁾, nous trouvons un degré moyen de polymérisation de 111 pour le produit perméthylé.

Nous avons en outre soumis 30 gr. du sel sodique de l'acide chondroïtine-sulfurique à cette méthylation à 5° et obtenu, après 3 étapes, 23 gr. d'une poudre blanche contenant 7,04% d'eau et 16,3% de $-\text{OCH}_3$ par rapport à la substance sèche. Le rendement était de 78,8% par rapport au rendement théorique.

III. *Hydrolyses.*

1^o *Hydrolyse acide du produit natif à 37°:*

On opère sur 3 parties selon la méthode suivante: 10,87 gr. du sel sodique de l'acide chondroïtine-sulfurique (= 10,06 gr. de produit sec) sont dissous dans 500 cm³ SO_4H_2 n., resp. 2,5-n. et 5-n., et laissés au thermostat à 37°. Nous avons suivi l'hydrolyse des liaisons glucosidiques en fonction du temps en titrant les pouvoirs réducteurs selon la méthode de *Willstätter* et *Schudel*²⁾ modifiée par *Linderstrøm-Lang* et *Holter*¹⁾: au bout du temps déterminé, on prélève une prise aliquote, la neutralise goutte à goutte par NaOH 30% (indicateur: phénolphthaleïne), sous forte agitation et avec refroidissement extérieur. On tamponne au p_H 10,6 (15 cm³ tampon de carbonate et hydrogénocarbonate de Na m:m), ajoute 25 cm³ d'une solution d'iode 0,04-n., laisse 1 h. à l'obscurité et titre, après acidulation à SO_4H_2 , l'excès d'iode au thiosulfate 0,04-n. A la fin de l'hydrolyse, les solutions étaient brun-clair avec un petit dépôt brun-rouge.

¹⁾ *K. Linderstrøm-Lang et H. Holter*, Ann. chim. anal. **39**, 116 (1934).

²⁾ *R. Willstätter et G. Schudel*, B. **51**, 780 (1918).

La figure 5 montre la dégradation en fonction du temps.

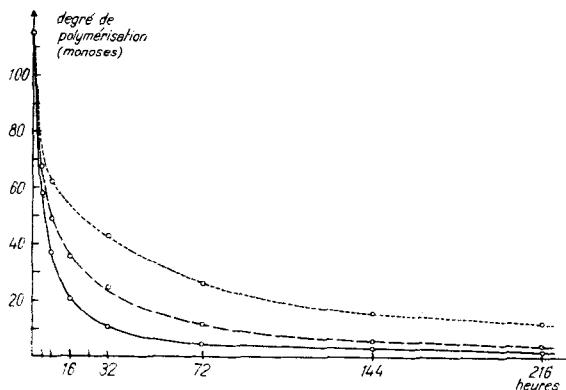


Fig. 5.

Hydrolyse du produit natif, à l'acide sulfurique n. (.....), 2,5-n. (----) et 5-n. (—).

2^o *Hydrolyse acide du produit perméthylé, à 20^o et 37^o.*

5 gr. du sel sodique de l'acide chondroïtine-sulfurique perméthylé à 5^o (= 4,407 gr. sec) sont triturés avec 250 cm³ ClH 5-n. et laissés au thermostat à 20^o et à 37^o respectivement. On opère comme pour 1^o.

La figure 6 montre la dégradation en fonction du temps.

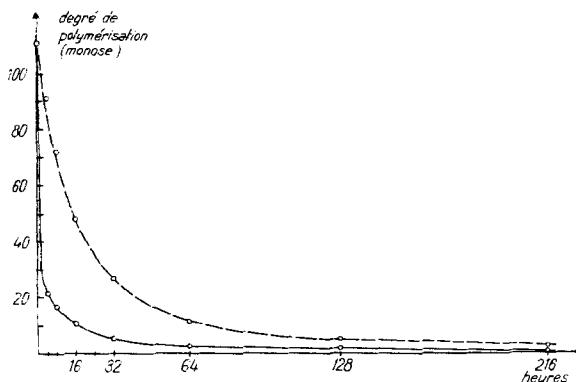


Fig. 6.

Hydrolyses acides, à 20^o (----) et à 37^o (—), du chondroïtine-sulfate de sodium perméthylé.

3^o *Etude de la scission des groupes sulfuriques¹.*

518,2 mgr. du sel sodique de l'acide chondroïtine-sulfurique (= 486 mgr. de produit sec) sont dissous dans 100 cm³ ClH 5-n. et laissés au thermostat à 37^o. Nous avons suivi la scission des groupes sulfuriques par dosage des ions SO₄²⁻ libérés au moyen de Cl₂Ba (indicateur: rhodizonate de K²):

¹) J. F. Alicino, Analytical Chem. 20, 85 (1948).

²) Produit Eastman Kodak Co., Rochester.

Au bout du temps déterminé, on prélève une prise aliquote de 10 cm³, la neutralise par NH₃ gazeux jusqu'à couleur rose de la phénolphtaléine, et ajoute 1 volume d'éthanol 95%. Puis on ajoute de 0,8 à 1 mgr. de rhodizonate de K, dissous dans 1 cm³ d'eau. On titre dans un courant d'azote, sous forte agitation, au moyen de Cl₂Ba 0,04-n., goutte à goutte, jusqu'au virage de la solution au rose.

La figure 3, page 1409, montre le pourcentage des groupes sulfuriques scindés en comparaison de celui des liaisons glucosidiques scindées.

Scission totale des groupes sulfuriques à chaud. 72,2 mgr. de sel sodique de l'acide chondroïtine-sulfurique (= 55,4 mgr. de produit sec) sont dissous dans 50 cm³ ClH n. et chauffés à reflux pendant 2 h. Après refroidissement, la solution claire et incolore est neutralisée par un courant d'ammoniac et titrée comme décrit ci-dessus. 55,4 mgr. consomment 5,45 cm³ Cl₂Ba 0,04-n. La teneur en soufre est de 6,3%. La scission des groupes sulfuriques dans ces conditions est donc complète.

4^o Méthanolyse de l'acide chondroïtine-sulfurique perméthylé.

2,194 gr. de chondroïtine-sulfate de sodium perméthylé à 20° (= 1,95 gr. en produit sec) sont séchés, à poids constant, pendant 60 h. à 78° sur P₂O₅, au vide poussé. On ajoute 100 cm³ de méthanol absolu contenant 7,3% ClH gazeux et chauffe à reflux (le produit se dissout rapidement). Après 44 h. le pouvoir rotatoire est devenu constant:

$[\alpha]_D^{20} = +0,038^\circ$. La solution finale est parfaitement claire.

IV. Oxydations à l'acide périodique¹⁾.

Toutes les oxydations ont été effectuées selon la méthode suivante:

La prise (60 à 100 mgr. pour les produits hydrolysés ou méthanolysés et environ 3 gr. pour les produits non-hydrolysés ou partiellement hydrolysés) est dissoute dans un peu d'eau (les produits déjà en solution ont toujours été neutralisés préalablement), puis additionnée de 15 cm³ d'un tampon d'acétate 2-m. de pH 4,7 et de 100 cm³ d'une solution de IO₄Na m./80. On dilue à 250 cm³ avec de l'eau et abandonne à 20°.

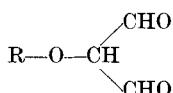
Au temps déterminé, on prélève une prise aliquote de 20 cm³ et titre en milieu acide, en présence d'un excès de IK, au thiosulfate de sodium 0,1-n.; 20 cm³ de thiosulfate 0,1-n. correspondent à 20 cm³ d'acide périodique m./80.

1^o *Oxydation du chondroïtine-sulfate de sodium natif.* 3,059 gr. de sel de sodium de l'acide chondroïtine-sulfurique natif sec (P. M. 27.000) sont ainsi oxydés. La figure 7, page 1418, montre la consommation en IO₄H.

2^o *Oxydation du chondroïtine-sulfate de sodium partiellement hydrolysé.* 1,084 gr. de sel de sodium de l'acide chondroïtine-sulfurique natif sec sont hydrolysés à 37° par 100 cm³ ClH 5-n. pendant 3 h. On neutralise et oxyde comme ci-dessus.

	Avant hydrolyse	Après hydrolyse
Degré de polymérisation .	107,5	26,5
Teneur en soufre: % . .	6,21	3,24

Remarque: Le fait que la réaction continue lentement après une consommation rapide de 4 molécules de IO₄H serait dû probablement à l'instabilité des restes propane-dial-1,3-ol-2 formés à partir de groupes terminaux réducteurs d'acide glucuronique.



R = reste de la chaîne du polysaccharide.

¹⁾ E. L. Jackson, Organic Reactions, II, 341 (1946).

Par hydrolyse lente, ces glucosides seraient transformés en propane-dial-1,3-ol-2 d'une part et en un reste terminal réducteur d'amino-sucre d'autre part. L'un et l'autre de ces produits pourraient réagir à leur tour avec l'acide périodique. Des observations semblables ont été faites lors de l'oxydation du maltose¹⁾ et de polyuronides²⁾.

La figure 7 montre la consommation en IO_4H .

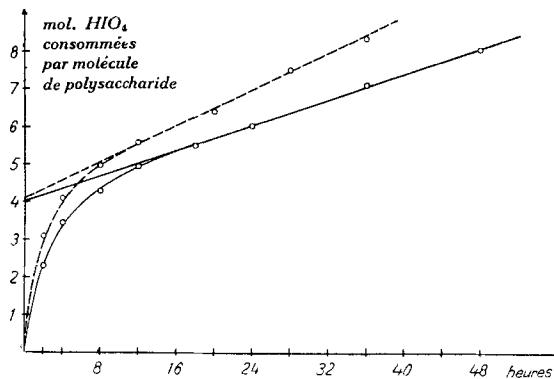


Fig. 7.

Oxydation du produit natif (---) et du produit de son hydrolyse partielle (—).

3^o *Oxydation du sel de sodium de l'acide chondroïtine-sulfurique perméthylé et hydrolysé à reflux avec ClH 5-n. pendant 24 h. 3 cm³ du mélange d'hydrolyse obtenu à partir de 57,7 mgr. de produit de départ, sont oxydés comme ci-dessus. La figure 8 montre la consommation en IO_4H .*

En libérant par la soude caustique l'ammoniac formé lors de l'oxydation, puis l'entraînant par la vapeur d'eau et le recevant dans ClH 0,01-n., nous avons trouvé un rendement en NH_3 de 103% par rapport à l'azote du produit.

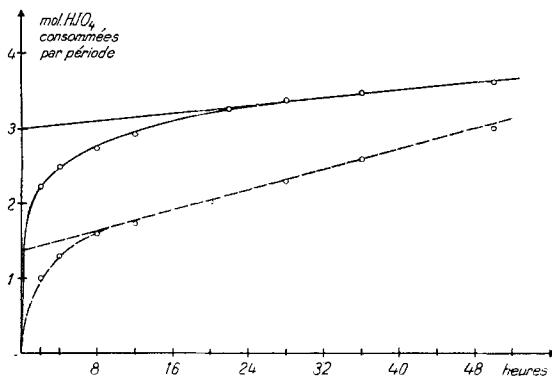


Fig. 8.

Oxydation des produits d'hydrolyse (—○—) et de méthanolysé (—○—) du chondroitine-sulfate de sodium perméthylé.

¹⁾ *P. Rathgeb*, thèse, Université de Genève (1948).

²⁾ *B. W. Lew* et *R. A. Gortner*, *Arch. Biochem.* **1**, 325 (1943); *P. A. Levene* et *L. C. Kreider*, *J. Biol. Chem.* **120**, 59 (1937).

4^o *Oxydation du chondroïtine-sulfate de sodium perméthylé et hydrolysé à 37° avec ClH 5-n. pendant 82 jours.* L'oxydation à IO₄H effectuée sur le mélange obtenu par hydrolyse à 37° a donné des résultats analogues à ceux de 3^o (consommation de 3 molécules de IO₄H par période et transformation de 94 à 107% de l'azote en NH₃).

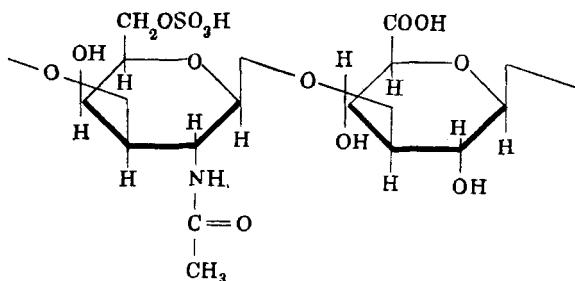
5^o *Oxydation du chondroïtine-sulfate de sodium perméthylé et méthanolysé.* 5 cm³ contenant 97,4 mgr. du mélange de méthanolysé sont oxydés comme ci-dessus. La figure 8 montre la consommation en IO₄H. Nous avons trouvé que les 89% de l'azote avaient été transformés en NH₃.

6^o *Détermination des groupes alcooliques primaires libres.* Nous avons travaillé selon la modification de Jeanloz¹⁾ de la méthode de Criegee²⁾:

Nous avons oxydé à l'acide périodique, au pH tamponné de 7,5, une solution des produits d'hydrolyse de 20,5 mgr. de chondroïtine-sulfate de sodium perméthylé — (hydrolyse de 82 jours à ClH 5-n.). Après adjonction du dimédon, nous avons obtenu un précipité qui a été isolé: 9,43 mgr. Son F. était de 188^o (F. théorique du formaldéhyde-dimédon: 188—190^o). Rendement: 86% de la quantité prévue en admettant 1 groupe —CH₂OH libre par période.

RÉSUMÉ.

L'acide chondroïtine-sulfurique est formé de chaînes non-ramifiées, composées chacune d'environ 60 périodes de la constitution suivante:



Les méthodes élaborées peuvent servir à la détermination de la constitution de polysaccharides semblables.

Laboratoire de Chimie inorganique et organique de l'Université, Genève.

¹⁾ R. Jeanloz, *Helv.* **27**, 1509 (1944).

²⁾ R. Criegee, *A.* **495**, 211 (1932).