

21. Recherches dans la série des cyclitols XX¹⁾. Chromatographie sur papier de cyclitols et de cyclosoes par Th. Posternak, D. Reymond et W. Haerdi.

(14 XII 54)

Quelques auteurs²⁾ ont déjà publié occasionnellement des indications concernant la chromatographie sur papier d'inositols. Depuis plusieurs années nous employons systématiquement cette technique dans nos recherches sur les cyclitols et, dans la présente note, nous désirons communiquer quelques observations à ce sujet.

Nous indiquons (Tableau) les Rf de divers cyclitols et de quelques substances apparentées³⁾ dans 4 systèmes de dissolvants sur papier *Whatman* N° 1 à température ordinaire. Dans tous les essais on a employé du ms-inositol comme substance de référence.

Ainsi qu'on l'a constaté d'une manière générale dans la famille des sucres et des polyalcools linéaires, les Rf des cyclitols diminuent *grosso modo* lorsque le nombre de groupes hydroxyle augmente. On voit toutefois (Tableau) que certains cyclitols à même nombre d'hydroxyles se laissent séparer dans des systèmes de dissolvants appropriés. La présence de groupes O- ou C-méthyle ou encore C-halogénométhyle se traduit par une augmentation de Rf.

Modes et durées des chromatographies. En général, on doit opérer, vu les faibles valeurs des Rf, en chromatographie descendante continue (Durchlaufchromatographie) sauf dans le cas des substances à Rf plus élevé pour lesquelles on peut procéder par chromatographie ascendante dans l'acétone aqueuse. La durée des chromatographies varie suivant le système de dissolvants employé. Une migration de 5 cm du méso-inositol nécessite approximativement les durées suivantes: butanol-acide acétique-eau 20 h.; collidine-eau 20 h.; phénol-eau 12 h.; acétone-eau 8 h.

Dissolvants employés et dessiccation des chromatogrammes. Les dissolvants doivent être purs et fraîchement distillés.

Il est recommandé de purifier le phénol d'après *Partridge*⁴⁾ par entraînement à la vapeur d'eau et agitation avec de l'ammoniaque, bien que des échantillons commerciaux de phénol puriss. nous aient donné parfois de bons résultats sans purification préalable. Les chromatogrammes, dans le système phénol-eau, sont séchés par un séjour de 30–48 h. à l'air, à 20–25° dans une chapelle bien ventilée. Dans ces conditions, les traces de phénol retenu ne gênent pas la révélation des taches, sauf dans le cas de la révélation biochimique (voir plus loin) qui nécessite une dessiccation de plus longue durée (72 h.).

Lorsqu'on emploie d'autres systèmes de dissolvants, une dessiccation de 15 h. à température ordinaire est suffisante.

¹⁾ Communication XIX: *P. Fleury, J. Lecocq & Th. Posternak*, Bull. Soc. chim. France **1954**, 1107.

²⁾ *C. E. Ballou & A. B. Anderson*, J. Amer. chem. Soc. **75**, 648 (1953); *P. Fleury, J. Courtois & P. Malangeau*, Bull. Soc. Chim. biol. **35**, 537 (1953).

³⁾ Il y figure quelques substances nouvelles dont la préparation sera décrite ultérieurement. ⁴⁾ Biochem. J. **42**, 238 (1948).

Réactifs de révélation: Tollens I: AgNO_3 0,1-n. + NH_3 5-n. + NaOH 2-n. (1:1:2 en vol.).
Tollens II: AgNO_3 0,1-n. + NH_3 5-n. + NaOH 0,2-n. (1:1:2 en vol.).

Tableau.

Substances	Butanol- ac. acé- tique-eau (4:1:5 en vol.)	S-Colli- dine-eau	Phénol- eau	Acétone- eau (85:15 en vol.)
Ms-inositol	0,09	0,13	0,23	0,26
Seyllo-ms-inosose ²⁾	0,09	0,15	0,20	0,28
Epi-ms-inosose ¹⁾	0,11	0,20	0,30	0,34
Scyllitol	0,09	0,13	0,18	0,26
Epi-inositol ¹⁾	0,11	0,13	0,38	0,28
(-)-Inositol	0,12	0,17	0,20	0,33
Mytilitol ³⁾	0,11	0,14	—	—
Isomytilitol ³⁾	0,14	0,17	0,31	0,31
Hydroxy-mytilitol ³⁾	0,11	0,14	0,18	0,27
Hydroxy-isomytilitol ³⁾	0,11	0,14	0,18	0,27
Chloro-isomytilitol ⁴⁾	0,34	—	—	—
Bromo-isomytilitol ⁴⁾	0,36	—	—	—
Iodo-isomytilitol ⁴⁾	0,44	—	—	—
Méthyl-pentahydroxy-cyclohexane ⁵⁾	—	0,30	—	—
Méthylène-pentahydroxy-cyclohexane ⁵⁾	0,31	0,35	—	—
Oxyde de méthylène-pentahydroxy- cyclohexane ³⁾	0,15	0,09	—	—
Chlorhydrate d'inosamine SA ⁶⁾	0,08	0,14	—	—
N-Acétyle-inosamine SA ⁶⁾	0,09	0,14	—	—
Québrachitol	0,18	—	0,43	0,45
Pinitol	—	—	0,39	0,49
(-)-Viburnitol	0,17	0,27	0,40	0,39
(+)-Quercitol	0,20	0,31	0,45	0,45
Désoxy-scyllitol ²⁾	0,20	—	—	—
DL-Désoxy-4-ms-inositol ⁷⁾	0,20	—	—	—
Cyclohexane-tétrols ⁸⁾ :				
DL-1,2,3/4	0,37	0,46	0,66	0,54
DL-1,2,4/3	0,37	0,46	0,70	0,54
DL-1,3/2,4	0,36	0,43	—	—
DL-1,2/3,4	0,41	0,57	—	—
1,4/2,3	0,41	0,57	0,60	0,61
Conduritol	0,37	—	0,54	0,61
Cyclohexane-triols ⁹⁾ :				
DL-1,2/3	0,57	0,77	0,80	0,74
1,3/2	0,57	0,75	0,80	0,74
1,2,3 <i>cis</i>	0,57	0,75	0,80	0,77

¹⁾ Th. Posternak, Helv. **19**, 1333 (1936).

²⁾ A. Kluyver & A. Boezardt, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **58**, 956 (1939); Th. Posternak, Helv. **24**, 1045 (1941).

³⁾ Th. Posternak, Helv. **27**, 457 (1944).

⁴⁾ C-halogénométhyl-2-ms-inositols préparés par A. Giddey (non publié).

⁵⁾ Th. Posternak & D. Reymond, Helv. **36**, 1370 (1953).

⁶⁾ H. E. Carter et coll., J. biol. Chemistry **175**, 683 (1948); Th. Posternak, Helv. **33**, 1597 (1950).

⁷⁾ B. Magasanik, R. E. Franzl & E. Chargaff, J. Amer. chem. Soc. **74**, 2618 (1952).

⁸⁾ Th. Posternak & H. Friedli, Helv. **36**, 251 (1953).

⁹⁾ Th. Posternak & F. Ravenna, Helv. **30**, 441 (1946).

Fehling I: 34,639 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{H}_2\text{O}$ ad 500 cm^3 .

Fehling II: 173 g de sel de *Seignette* + 50 g $\text{NaOH} + \text{H}_2\text{O}$ ad 500 cm^3 . Des volumes égaux de *Fehling I* et de *Fehling II* sont mélangés; 1 vol. de mélange est ensuite dilué de 2 vol. H_2O .

Arsénomolybdate: 25 g de molybdate d'ammonium sont dissous dans 450 cm^3 H_2O . On ajoute en mélangeant bien d'abord 21 cm^3 H_2SO_4 conc., puis une solution de 3 g $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dans 25 cm^3 H_2O . Après un séjour de 24–48 h. à l'étuve à 37°, on conserve dans un flacon bien bouché, de verre brun.

Meillère: 10 g $\text{HgO} + 10$ g HNO_3 D. 1,4 + H_2O ad 200 cm^3 . 1 vol. de cette solution est ensuite dilué de 2 vol. H_2O .

Acétate de baryum: 15 cm^3 de solution aqueuse à 10 % d'acétate de baryum + acide acétique glacial ad 100 cm^3 .

Révélation des chromatogrammes. Elle peut s'effectuer par les techniques suivantes:

a) Par les réactifs de *Tollens I* et *II*. Par pulvérisation du réactif de *Tollens I* sur les chromatogrammes, les inososes et les autres cycloses se révèlent presque instantanément à froid. Pour intensifier la révélation des substances non réductrices, on promène encore la feuille durant $\frac{1}{2}$ à 3 min. au-dessus d'une marmite d'eau en ébullition¹⁾. Il est indiqué de répéter la pulvérisation et l'exposition à la vapeur. La révélation est ainsi plus rapide et sensible que par chauffe à l'étuve à 105° d'après *Partridge*.

Par cette technique, on peut déceler sur papier n'importe quel cyclitol. La sensibilité de la révélation augmente *grosso modo* avec le nombre d'hydroxyles du composé (mais il y a de nombreuses exceptions) et dépend d'autre part de la nature des dissolvants. La quantité minimum de substance nécessaire varie entre 3–20 γ (inositols) et 60–100 γ (triols, pinitol, québrachitol); chiffres inférieurs: butanol-acide acétique-eau, acétone-eau; chiffres supérieurs: collidine-eau, phénol-eau.

Si l'on désire révéler sélectivement les cycloses par un réactif argentique, on se sert du réactif de *Tollens II*, à froid, qui fait apparaître les taches en quelques secondes. Certains cyclitols (cyclohexitols, cyclopentitols) présents en fortes quantités (100 γ et davantage) peuvent aussi apparaître à froid mais ceci ne se produit qu'après quelques minutes.

b) Par la réaction de *Scherer-Gallois* telle qu'elle a été appliquée à la chromatographie sur papier des inositols par *Fleury, Courtois* et *Malangeau*²⁾. Pulvérisation du réactif de *Meillère*; séjour de 10 min. à l'étuve à 85–100°; nouvelle pulvérisation et séjour à l'étuve de 5 min., ensuite pulvérisation du réactif «acétate de baryum» et mise à l'étuve pour 2 min. Le traitement à l'acétate de baryum suivi de dessiccation est répété éventuellement 4 fois. Apparition de taches roses. Cette réaction n'est donnée que par les cyclohexitols (inositols) et les inososes.

c) Par une méthode de *Nelson*³⁾ modifiée. La liqueur de *Fehling* est d'abord pulvérisée sur le chromatogramme. On laisse 15 min. horizontalement, à froid, puis on pulvérise abondamment le réactif «arsénomolybdate», promène le papier au-dessus d'une marmite d'eau bouillante et laisse encore $\frac{1}{2}$ h. horizontalement à l'étuve à 80°. Les cyclitols et les sucres réducteurs tels que le glucose ne sont pas révélés; les cycloses donnent des taches bleues.

d) Par une technique nouvelle consistant en un traitement sur papier au moyen d'*Acetobacter suboxydans*; elle permet de déceler les cyclitols susceptibles d'oxydation biochimique⁴⁾.

On effectue des cultures du microorganisme dans les conditions déjà décrites⁵⁾. Les bactéries sont centrifugées et lavées par centrifugation d'abord 2 fois par du chlorure de sodium à 0,9 %, puis 1 fois à l'eau distillée. Le culot provenant de 150 cm^3 de culture est

¹⁾ Cf. *F. Cramer*, Papierchromatographie, Verlag Chemie, 2^e éd. 69 (1953).

²⁾ Bull. Soc. Chim. biol. **35**, 537 (1953).

³⁾ J. biol. Chemistry **153**, 375 (1944); cette méthode avait été élaborée pour le dosage colorimétrique des sucres.

⁴⁾ *Th. Posternak & D. Raymond*, Helv. **36**, 260 (1953), en donnent la liste.

⁵⁾ *Th. Posternak & D. Raymond*, l. c.

suspendu dans l'eau distillée (vol. total 8 cm³). Cette suspension est pulvérisée¹⁾ sur le chromatogramme²⁾ préalablement desséché de 23 × 58 cm (½ feuille *Whatman* N° 1). Celui-ci est ensuite abandonné horizontalement dans une atmosphère saturée de vapeur d'eau, à 30°³⁾, durant une heure; on laisse ensuite sécher horizontalement à l'air à température ordinaire. Les cyclitols transformés en polyoxycétones sous l'action des bactéries se révèlent alors, en quelques secondes à froid, sous l'action du réactif de *Tollens II* ou par les réactifs de *Nelson*; toutefois ces derniers ne donnent pas de bons résultats lorsqu'on emploie le système phénol-eau.

Dans le cas de mélanges complexes on utilisera plusieurs chromatogrammes obtenus dans des conditions identiques qu'on traitera chacun par un des réactifs de révélation sélectifs qui viennent d'être décrits.

Une des séparations chromatographiques les plus intéressantes au point de vue biochimique est celle du mélange ms-inositol-scyllitol, en raison de la présence fréquente dans la nature de ces deux composés⁴⁾. Cette séparation se réalise facilement dans le système phénol-eau comme l'avaient déjà constaté *Fleury*, *Courtois* et *Malangeau*⁵⁾. Ces auteurs avaient rencontré toutefois des difficultés lors de la révélation par la réaction de *Scherer-Gallois*, ce qui les amena à renoncer à ce système de dissolvants. En prenant les précautions indiquées plus haut pour l'emploi du phénol, nous avons pu faire apparaître facilement les taches, aussi bien par la réaction de *Scherer-Gallois* que par le réactif de *Tollens I*⁶⁾. De plus, la technique biochimique d) permet la révélation sélective du méso-inositol.

Nous remercions M. le Dr *A. Giddey* pour la détermination des Rf de quelques substances.

RÉSUMÉ.

Les auteurs indiquent les Rf, dans 4 systèmes de dissolvants, de divers cyclitols et de composés apparentés. Ces substances se laissent toutes révéler par le réactif de *Tollens I* (à chaud). Les cycloses sont sélectivement décelables par le réactif de *Tollens II* (à froid) ou par les réactifs de *Nelson*. La réaction de *Scherer-Gallois* sur papier permet d'autre part de déceler les inositols et les inososes alors que par traitements successifs du chromatogramme au moyen d'*Acetobacter suboxydans* et d'un des réactifs de cycloses on peut révéler les cyclitols susceptibles d'oxydation biochimique.

Bâle, Institut de Pharmacie de l'Université;
Genève, Laboratoire de Chimie biologique et
organique spéciale de l'Université.

¹⁾ Il est indispensable d'utiliser une suspension de bactéries fraîchement préparées d'une souche susceptible d'oxyder le méso-inositol, ce qui n'est pas le cas de tous les *Acetobacter suboxydans*.

²⁾ La présence sur les chromatogrammes de phénol et surtout de collidine insuffisamment éliminés par dessiccation, inhibe l'action des bactéries.

³⁾ Nous utilisons une boîte rectangulaire de dimensions convenables, fermant hermétiquement, dont le fond est recouvert d'une feuille de papier filtre imbibée d'eau. On y introduit un cadre rectangulaire muni d'un treillis de fils de nylon sur lequel repose horizontalement le chromatogramme portant les bactéries, et le tout est placé dans une étuve thermostatique à 30°.

⁴⁾ Cf. la présence simultanée de ms-inositol et de scyllitol dans l'urine: *P. Fleury*, *J. Courtois* & *A. Jouannet*, Bull. Soc. Chim. biol. **33**, 1885 (1951).

⁵⁾ Loc. cit.

⁶⁾ M. le Prof. *S. J. Angyal*, Sydney, a constaté indépendamment la séparation chromatographique dans le système phénol-eau du mélange ms-inositol-scyllitol, qu'il révèle au moyen d'un réactif argentique (communication personnelle).