

SUMMARY.

Acidity constants at 20° C and the ionic strength $\mu = 0,1$ were determined for the following substances: benzoic acid, terephthalic acid, phenol, p-nitrophenol, salicylic acid, m- und p-hydroxybenzoic acids.

The pK-values are discussed in terms of *Hammett's* rule and a σ^* -value (for use with reactions of phenols and anilines) is calculated for p-COO⁻: $\sigma^* = 0,351$.

Wissenschaftliche Abteilung der *CILAG Aktiengesellschaft*,
Schaffhausen.

150. Biochimie des cyclitols I.

Contribution à l'étude du métabolisme du méso-inositol chez le Rat

par Th. Posternak, W. H. Schopfer et D. Reymond.

(30 VI 55)

Substance extrêmement répandue dans le monde vivant, présentant pour certains organismes des propriétés vitaminiques, le méso-inositol est un principe naturel dont le mode de biogenèse est encore inconnu. Il y a déjà 68 ans, *L. Maquenne*¹⁾ faisait remarquer que, par cyclisation de sa chaîne carbonée (résultant peut-être d'une aldolisation interne)²⁾, un aldohexose tel que le glucose pourrait donner naissance à un inositol. Cette représentation, reprise depuis par plusieurs auteurs³⁾, devint vraisemblable au moment où l'on établit la structure dans l'espace du méso-inositol qui est effectivement apparentée à celle du glucose⁴⁾. Faisons toutefois remarquer qu'aucune preuve expérimentale de cette hypothèse n'a été apportée.

Des essais ont été décrits d'après lesquels le glucose se convertirait en méso-inositol dans certaines plantes⁵⁾.

¹⁾ Ann. Chim. Pharm. [6] **12**, 129 (1887).

²⁾ *L. Maquenne*, Les sucres et leurs principaux dérivés, p. 189, Gauthier-Villars éd., Paris 1900.

³⁾ Voir en particulier: *H. O. L. Fischer*, Harvey Lectures **40**, 156 (1945); Chem. Abstr. **1950**, 180.

⁴⁾ *S. Posternak & Th. Posternak*, Helv. **12**, 1165 (1929) (formation d'acide DL-saccharique par oxydation du méso-inositol); *Th. Posternak*, Helv. **25**, 748 (1942); *G. Dangschat*, Naturwissenschaften **30**, 146 (1942).

⁵⁾ *O. Fernandez, G. Izquierdo & E. Martinez*, Farm. nueva **9**, 563 (1944).

Après administration de glucose uniformément marqué par du ^{14}C à des rats et à des embryons de poulet, *N. Daughaday, J. Larner & C. Hartnett*¹⁾ ont isolé récemment de ces organismes du méso-inositol renfermant une radioactivité à vrai dire très faible. Comme le font remarquer les auteurs, on ne saurait en tirer des conclusions relatives au mécanisme de conversion du glucose en méso-inositol chez l'animal.

Par un processus inverse de celui envisagé par *Maquenne*, on pourrait supposer une formation biologique de glucose aux dépens du méso-inositol, par ouverture directe du cycle de ce dernier. *M. R. Stetten & D. Stetten*²⁾ considèrent ce processus comme probable à la suite des observations suivantes: après injection intrapéritonéale de méso-inositol deutérié (contenant 1,75 at. % D) à des rats rendus glucosuriques par la phlorhizine, ces auteurs trouvèrent du deutérium dans le glucose urinaire (0,116 at. % D dans le gluconate de potassium obtenu par oxydation).

Dans le présent travail, nous avons repris les expériences de *Stetten & Stetten*. Pour préparer leur cyclitol deutérié, ces auteurs avaient traité durant 30 jours, à 130–150°, en présence de platine, du méso-inositol dissous dans de l'eau lourde; ils obtinrent ainsi un produit contenant 1,75 at. % D. Ce procédé présente des inconvénients: faible teneur en deutérium du produit obtenu, possibilité d'inversion de *Walden*, et surtout indétermination de l'emplacement des atomes de deutérium entrés dans la molécule. Nous avons opéré de la manière suivante. Du scyllo-ms-inosose (I) a été deutérié catalytiquement, en solution dans l'eau lourde, en présence d'oxyde de platine; de même que par hydrogénation catalytique³⁾, il se forme essentiellement du ms-inositol (II). Sa teneur en deutérium lié au carbone peut atteindre 8,5 at. % (1 D pour 11 H). Par oxydation biochimique au moyen d'*Acetobacter suboxydans*³⁾, trois échantillons contenant resp. 7,5; 6,8; 7,8 at. % D ont fourni du scyllo-ms-inosose ne contenant plus que 0,71; 1,09 et 0,82 at. % D; on peut en conclure qu'en moyenne 88 % de l'isotope étaient liés au carbone 2, le reste étant sans doute fixé symétriquement aux carbones 1 et 3.

Ajoutons que notre ms-inositol deutérié est attaqué par *Acetobacter suboxydans* à peu près à la même vitesse que le ms-inositol ordinaire. Dans d'autres cas, on a observé par contre un ralentissement des déshydrogénations biologiques lorsque les atomes d'hydrogène amovibles du substrat sont remplacés par le deutérium.

D'autre part, nous avons constaté que le ms-inositol deutérié a une action de facteur de croissance sur *Neurospora crassa mutant inositolless*, identique à celle du ms-inositol ordinaire.

¹⁾ J. biol. Chemistry **212**, 869 (1955).

²⁾ J. biol. Chemistry **164**, 85 (1946).

³⁾ *Th. Posternak*, Helv. **24**, 1045 (1941).

Après injection intrapéritonéale de ms-inositol (contenant 6,0–8,0 at. % D) à des rats phlorhizinés, à raison de 1 g par animal, on récupère dans l'urine environ 50 % du cyclitol deutérié. L'urine de 24 h. contient en moyenne 1 g de glucose (dosé à l'anthrone), isolé comme p-nitro-phénylhydrazone cristallisée; le sucre a été libéré ensuite par le traitement habituel au moyen du benzaldéhyde. La teneur moyenne en D de la p-nitrophénylhydrazone (0,177 at. % D) correspond à un glucose de base contenant 0,25 at. % D. On peut en conclure que l'isotope provenant d'au moins 6 % du ms-inositol métabolisé se retrouve dans le glucose urinaire¹).

Par les essais suivants, nous nous sommes assurés que ces chiffres ne sont pas entachés d'erreurs notables dues à la présence dans le glucose d'impuretés deutériées, en particulier de ms-inositol.

1° Un échantillon de glucose isolé par l'intermédiaire de la p-nitrophénylhydrazone a été transformé en β -penta-acétyl-glucose. La teneur en deutérium rapportée au glucose est restée invariable: a) 0,276 at. % d'après le dosage dans la p-nitrophényl-hydrazone; b) 0,276 at. % d'après le dosage dans le β -penta-acétylglucose.

2° Un échantillon de glucose a été converti en gluconate de potassium contenant 0,232 at. % D. Le même échantillon purifié préalablement par chromatographie sur papier dans le système butanol-acide acétique-eau (4:1:5 en vol.) a fourni du gluconate de potassium ayant pratiquement la même teneur en isotope (0,250 at. % D).

3° Un échantillon de gluconate de potassium ainsi obtenu n'a exercé aucune action de facteur de croissance sur *Neurospora crassa inositolless*. Compte tenu de la sensibilité du test²), la teneur en ms-inositol de cet échantillon doit être inférieure à 0,1 %.

Pour localiser l'isotope, nous avons préparé par les méthodes habituelles les dérivés suivants à partir du glucose deutérié: *phényl-glucosazone*, *gluconate de potassium*, *saccharate acide de potassium*.

La conversion en gluconate de potassium et en phénylglucosazone doit provoquer l'élimination de l'isotope lié respectivement aux carbones 1 et 2. L'examen du tableau I montre que la teneur en D rapportée au glucose de base, n'est guère modifiée dans ces deux dérivés, preuve de l'absence de quantités notables d'isotope en ces deux emplacements 1 et 2. La conversion du gluconate en saccharate amène par contre une disparition presque complète du D. Il faut en conclure que celui-ci est lié essentiellement au carbone 6 (formule III).

Cette conclusion a été confirmée de la manière suivante. Un échantillon de glucose d'une teneur de 0,280 at. % D contient, à en juger par la teneur en isotope de l'hydrogénosaccharate de potassium obtenu à ses dépens, 0,235 at. % D en position 6. Après réduction en D-sorbitol et oxydation periodique, on isole le *formaldéhyde* provenant

¹) Stetten & Stetten (loc. cit.) arrivent à un chiffre analogue (7 %) mais, dans leur calcul, ils se basent sur la quantité totale de ms-inositol injecté, sans tenir compte du cyclitol éliminé dans l'urine auquel ils ne font d'ailleurs pas allusion.

²) W. H. Schopfer, Th. Posternak & M. L. Boss, Rev. int. Vitaminologie **20**, 121 (1948); W. H. Schopfer, Bull. Soc. chim. biol. **33**, 1113 (1951).

des carbones 1 et 6, sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazone. Dosage dans cette dernière: calculé 0,235 at. % D; trouvé $0,30 \pm 0,06$ at. % D.

Le ms-inositol deutérié de départ contenait essentiellement, ainsi qu'il a été indiqué, l'isotope en position 2. L'hypothèse de la conversion directe en glucose par décyclisation (inverse d'une aldolisation) exige la présence du deutérium essentiellement en position 5 du sucre; cette hypothèse devient ainsi fort peu probable.

Les faits expérimentaux dont nous disposons ne permettent pas encore de préciser le mécanisme de la glucogenèse à partir du ms-inositol. Il est probable que le cycle s'ouvre entre les carbones 1 (ou 3) et 2. On pourrait supposer en outre que par scission à d'autres endroits encore, il se formât au moins deux fragments dont un seul, contenant l'isotope, serait utilisé ensuite pour la glucogenèse.

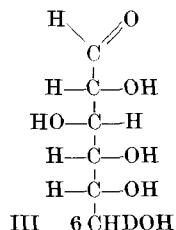
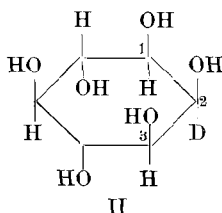
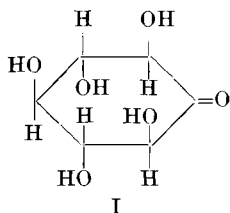
Ces recherches sont poursuivies.

Tableau I.

At. % D de dérivés du glucose urinaire marqué (moyenne de 7 rats).

p-Nitrophényl- hydrazone	Glucéonate de potassium + $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}^1)$	Phényl- glucosazone	Hydrogéo- saccharate de potassium
0,177	0,258	0,125	0,037
0,251	0,258	0,227	0,028

Dans la dernière ligne du tableau figurent les teneurs en D d'un glucose calculées dans l'hypothèse que sa transformation en dérivé indiqué ne s'accompagnerait pas d'une perte en isotope.



Nous adressons nos très vifs remerciements à la *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz*, pour l'aide qu'elle nous a apportée.

Quelques dosages de deutérium ont été exécutés dans le laboratoire du Prof. K. Bernhard, Bâle. L'un de nous (D. R.) a effectué tous les autres dosages dans l'Institut du Prof. P. Favarger, Genève, qui a bien voulu mettre ses appareils à notre disposition. Nous remercions vivement MM. les prof. Bernhard et Favarger et exprimons en outre notre gratitude à M. le Dr M. Roth, assistant de M. le Prof. Favarger, pour ses indications techniques.

¹⁾ Le produit séché sous vide sur P_2O_5 , durant 2—4 h., à 80—90°, que nous avons également employé pour les dosages de D, semble retenir $\frac{1}{2}$ mol. H_2O de cristallisation.

Partie expérimentale.

Dosage du deutérium: Il a été effectué d'après la méthode de A. Keston, D. Rittenberg & R. Schoenheimer¹⁾, modifiée par P. Favarger, R. Collet & E. Cherbuliez²⁾. La teneur en D de l'eau de combustion de la substance est calculée en fonction du temps de chute des gouttes dans le m-fluorotoluène.

Nous estimons que, dans nos mains, les dosages dans des substances ayant des teneurs de 0,02 à 0,30 at. % D comportent des erreurs provenant de la mesure des durées de chute correspondant à environ $\pm 0,008$ at. % D.

Préparation du ms-inositol deutérié: Du deutérium gazeux est préparé à partir d'eau lourde à 99,75% d'après le procédé de G. Schwarzenbach, A. Epprecht & H. Erlenmeyer³⁾. 970 mg de scyllo-ms-inosose dissous dans 10 cm³ de D₂O à 99,75% sont agités à pression et à température ordinaires dans une atmosphère de deutérium en présence de 225 mg d'oxyde de platine. Consommé après 15 h., 0,93 mol. D₂. Après filtration du catalyseur, l'eau lourde est évaporée sous vide. On reprend plusieurs fois le résidu par l'eau ordinaire en évaporant chaque fois à sec dans le vide; finalement on recristallise par dissolution dans un peu d'eau suivie d'addition d'alcool. F. 222–223° non déprimé par mélange avec du ms-inositol non marqué. La teneur en isotope atteint dans ces conditions la valeur théorique de 8,3 at. % D (1 at. D pour 11 at. H). Nous avons trouvé cette même teneur dans un échantillon purifié par l'intermédiaire de son hexa-acétate de F. 212–213°.

Des deutérations effectuées en solution dans de l'eau lourde récupérée ont conduit à des teneurs en deutérium plus faibles (6–8 at. % D).

Isolement du glucose urinaire: Un rat mâle adulte (Wander, Berne) d'un poids de 270 g est soumis à un jeûne de 18 h. On lui administre par injections intrapéritonéales (suivant l'horaire indiqué ci-après) les substances suivantes:

à 08 h 30: 40 mg phlorhizine Siegfried en suspension dans un mélange stérile de 0,25 cm³ d'huile de sésame et de 0,25 cm³ NaHCO₃ à 4%;

à 10 h 30, 14 h 30 et 16 h 30: 3,3 cm³ d'une solution aqueuse stérile à 10% de ms-inositol deutérié contenant 7,5 at. % D.

L'animal boit *ad libitum* mais ne reçoit aucun aliment jusqu'au lendemain à 10 h 30, heure à laquelle on prélève l'urine de 24 h. qui a été recueillie en présence de thymol. Au bout de 3 semaines, le même animal peut être utilisé pour des expériences analogues.

On réunit l'urine de plusieurs rats, mais, dans ce qui suit, les chiffres indiqués représentent des moyennes rapportées à l'urine d'un seul animal. L'urine filtrée est déféquée par 1/10 volume d'acétate de plomb à 30%. Après centrifugation et élimination des ions Pb⁺⁺ de la solution par l'hydrogène sulfuré, on déionise par passages successifs sur des colonnes de Dowex-50 (forme acide) et d'Amberlite IR 4 B (forme acétate) et évapore à sec. Après reprise par 5 cm³ d'eau et addition de 3 volumes d'alcool, il se produit une cristallisation de ms-inositol (en moyenne 1 g) qu'on recristallise dans un mélange eau-alcool. F. 222°; teneur en D pratiquement identique à celle du ms-inositol injecté.

La solution-mère du méso-inositol contient en moyenne 1 g de glucose, décelé par chromatographie sur papier et dosé, avec des résultats concordants, par la méthode à l'anthrone⁴⁾ ou par celle de Nelson⁵⁾.

On ajoute 1 g de p-nitrophénylhydrazine et maintient 20 min. à l'ébullition à reflux. Après évaporation à sec sous vide, reprise par 20 cm³ d'eau, séjour de 24 h. à l'obscurité, on essore et lave à fond à l'eau. Le produit desséché est recristallisé deux fois par dissolution dans 10 parties de méthylcellosolve bouillant suivie d'addition, après refroidissement, d'alcool éthylique (obtenu en moyenne 870 mg; F. 185° (déc.)).

Pour la libération du glucose, on maintient 10 min. à l'ébullition une suspension dans 20 parties d'eau de 1 partie de p-nitrophénylhydrazone, de 3 p. de benzaldéhyde et de

¹⁾ J. biol. Chemistry **122**, 227 (1937).

²⁾ Helv. **34**, 1641 (1951).

³⁾ Helv. **19**, 1292 (1936).

⁴⁾ R. Dreywood, Anal. Chemistry **18**, 499 (1946).

⁵⁾ J. biol. Chemistry **153**, 375 (1944).

0,1 p. d'acide benzoïque. Après refroidissement, on filtre sur charbon et épuise à l'éther le filtrat qu'on évapore à sec sous vide. Un échantillon du glucose ainsi obtenu a été transformé d'après *E. Fischer* en β -penta-acétyl-glucopyranose. F. et F. de mélange 130—132°.

Autres dérivés deutériés: Dans le Tableau II sont indiquées quelques données concernant divers autres dérivés du D-glucose deutérié préparés au cours de ce travail. Ils ont été caractérisés en outre par leur F. de mélange avec les dérivés correspondants non deutériés.

Tableau II.

Substance	F. observé	Formule brute	at. % D de l'échant. analysé	Calculé ¹⁾			Trouvé		
				% C	% H	% N	% C	% H	% N
p-Nitrophényl-hydrazone du glucose	185°	$C_{12}H_{17}O_7N_3$	0,150	45,71	5,44	13,33	45,83	5,63	13,34
Phénylglucosazone	206° (déc.)	$C_{18}H_{22}O_4N_4$	0,113	60,60	6,19	15,64	60,42	6,25	15,53
Gluconate de potassium ²⁾	—	$C_6H_{11}O_7K + \frac{1}{2}H_2O$	0,240	29,62	4,97	16,07	29,72	5,14	16,04
Hydrogénosaccharate de potassium ³⁾	—	$C_6H_9O_8K$	0,040	29,03	3,66	15,75	28,88	3,79	16,46

D-Sorbitol et oxydation périodique: Un échantillon de glucose deutérié est réduit par $NaBH_4$ en D-sorbitol isolé sous forme d'hexaacétate d'après *Ab-del-Akher, Hamilton & Smith*⁴⁾. Le polyol est dégradé par le métaperiodate de sodium et le formaldéhyde est isolé sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazone d'après une prescription indiquée pour la dégratation du D-ribitol⁵⁾.

Le glucose de départ contenait 0,280 at. % D dont 0,235 at. % D en position 6. 2,4-Dinitrophénylhydrazone du formaldéhyde: calculé 0,235 at. % D; trouvé après dilution par 5,87 parties de substance non deutériée: $0,043 \pm 0,009$ at. % D, ce qui correspond pour la substance non diluée à $0,30 \pm 0,06$ at. % D.

RÉSUMÉ.

Du méso-inositol deutérié essentiellement en position 2 a été administré par voie intrapéritonéale à des rats phlorhizinés. Le glucose retiré de leur urine contenait l'isotope essentiellement en position 6. Le mécanisme de la glucogenèse à partir du méso-inositol dans l'organisme du Rat a été discuté.

Genève, Laboratoire de Chimie biologique et organique
spéciale de l'Université.

Berne, Institut de Botanique de l'Université.

¹⁾ La teneur en D est négligeable dans le calcul.

²⁾ Préparé d'après *S. Moore & K. P. Link*, J. biol. Chemistry **133**, 293 (1940).

³⁾ Préparé d'après *E. Fischer*, Anleitung zur Darstellung organischer Präparate, 9^e éd., p. 84 (Braunschweig 1920).

⁴⁾ J. Amer. chem. Soc. **73**, 4691 (1951).

⁵⁾ *S. David & J. Renaut*, Biochim. biophys. Acta **16**, 598 (1955).