

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 biogénèse est encore inconnu. Il y a déjà 68 ans, L. Maquenne¹⁾ 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 *Maquegne*, 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 hydrogénéation 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^o 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^o 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^o 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 périodique, 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 deutériisé 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.

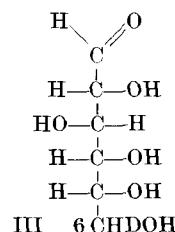
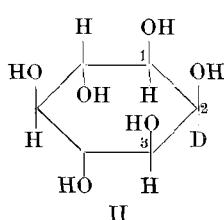
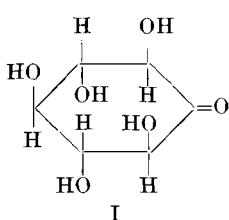
Ces recherches sont poursuivies.

Tableau I.

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

p-Nitrophényl-hydrazone	Gluconate de potassium + $\frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}^1)$	Phényl-glucosazone	Hydrogénosaccharate 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 M.M. 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 deutériations 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 4B* (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 *Nelson*⁵⁾.

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 épouse 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. ob- servé	Formule brute	at.% D de l'échant. analysé	Calculé ¹⁾			Trouvé		
				% C	% H	% N	% C	% H	% N
p-Nitrophénylhydrazone du glucose	185°	C ₁₂ H ₁₇ O ₇ N ₃	0,150	45,71	5,44	13,33	45,83	5,63	13,34
Phénylglucosazone	206° (déc.)	C ₁₈ H ₂₂ O ₄ N ₄	0,113	60,60	6,19	15,64	60,42	6,25	15,53
Gluconate de potassium ²⁾	—	C ₆ H ₁₁ O ₇ K + ½H ₂ O	0,240	29,62	4,97	16,07	29,72	5,14	16,04
Hydrogénosaccharate de potassium ³⁾	—	C ₆ H ₉ O ₈ K	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 NaBH₄ 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 ± 0,009 at.% D, ce qui correspond pour la substance non diluée à 0,30 ± 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).