

The activation energy of the enzyme presents a sharp break at 20°. Values of 16200 cal/mole between 0° and 20° and 5530 cal/mole between 20° and 55° have been found.

The enzyme is an albumine, very soluble in water where it can be stocked in the cold for long periods without activity losses. Contrarily to crystalline malt α -amylase, it is relatively stable towards low pH but rapidly destroyed at high temperatures. It is totally and irreversibly destroyed by the salts of heavy metals.

The electrophoretic mobility curve of crystalline malt β -amylase has been determined; its isoelectric point lies at pH 6.1 ± 0.1 . As for the other crystalline amylases, its absorption spectrum shows a maximum at 280 m μ .

The enzyme has no action on the α -phenylmaltoside.

Laboratoires de Chimie organique et inorganique
de l'Université de Genève.

33. La méthanolyse de l'acide hyaluronique méthylé.

Recherches sur l'acide hyaluronique et les substances apparentées V¹)

par R. W. Jeanloz.

(10 XII 51)

*Meyer, Fellig & Fischer*²) ont proposé récemment une structure de l'acide hyaluronique quelque peu différente de celle que nous avons présentée³). Comme nous, ils ont observé que l'acide hyaluronique n'était pratiquement pas oxydé par l'ion periodate, et ils en ont conclu que le reste glucuronique était lié au reste glucosaminique par les positions 1—3, alors qu'une liaison 1—6 était exclue entre le reste glucosaminique et le reste glucuronique. Pour établir la nature de cette dernière liaison, ils ont effectué l'oxydation, par l'ion periodate, du produit de scission méthanolytique de l'acide hyaluronique méthylé. Ils en ont déduit que seule une liaison 1—4 est possible, alors que nos résultats s'accordaient mieux avec une liaison 1—3⁴). Les données qui

¹) 4me communication, R. W. Jeanloz & E. Forchielli, J. Biol. Chem. **190**, 537 (1951). Cette communication porte le N°. 126 des communications du Robert W. Lovett Memorial for the Study of Crippling Disease, Harvard Medical School.

²) K. H. Meyer & J. Fellig, Exper. **6**, 186 (1950); K. H. Meyer, J. Fellig & Ed. H. Fischer, Helv. **34**, 939 (1951).

³) R. Jeanloz, Exper. **6**, 52 (1950); R. W. Jeanloz & E. Forchielli, J. Biol. Chem. **190**, 537 (1951).

⁴) Meyer, Fellig & Fischer (loc. cit. p. 944) ont écrit que nous avons basé notre choix entre ces deux possibilités, sur une comparaison avec l'oxydation par le periodate de l'acétylglucosamine. Cette interprétation de notre article³) est erronée; nous avons basé notre choix sur une comparaison de l'oxydation par le periodate de l'acide hyaluronique désacétylé avec l'oxydation du chitosane et de l' α -méthylglucosaminide.

ont conduit *Meyer* et coll. à cette conclusion ne nous paraissent pas à l'abri de la critique. Dans leur schéma II¹⁾, décrivant la méthanolyse et l'oxydation par le periodate, ainsi que dans leur discussion, ils indiquent que la scission du polysaccharide est complète et que la glucosamine se trouve sous forme de monoside. Il a été toutefois rapporté que la scission méthanolytique des uronosides méthylés est souvent impossible²⁾. D'autre part, *Meyer* et coll. établissent que le groupe N-acétyle de la glucosamine est complètement scindé. Or, leurs conditions (CH₃OH—HCl 5% pendant 24 h.) ne sont pas assez différentes de celles qui sont employées pour la préparation de l' α -méthyl-N-acétylglucosaminide (CH₃OH—HCl 2% pendant 2 h.)³⁾, pour qu'elles ne mettent en doute la précision du dosage utilisé. Enfin, ils ne différencient pas dans la teneur finale en groupes méthoxyyles de l'acide hyaluronique méthylé, les esters méthoxyliques des éthers méthoxyliques, alors que seuls ces derniers entrent en ligne de compte pour connaître le degré de méthylation.

Il nous paraît possible d'interpréter différemment les résultats obtenus par *Meyer, Fellig & Fischer* et d'expliquer ainsi la divergence entre la formule qu'ils proposent pour l'acide hyaluronique et celle qui semble correspondre le mieux à nos résultats. Dès lors, il nous a semblé nécessaire de reprendre l'étude de leur méthode et d'essayer de caractériser les produits obtenus par méthanolyse de l'acide hyaluronique méthylé.

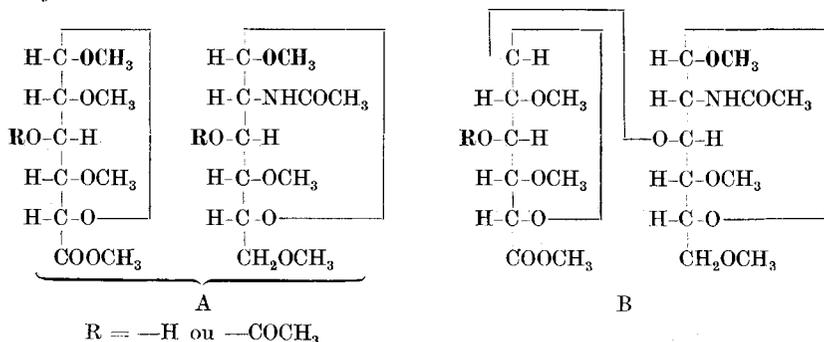


Fig. 14).

La méthanolyse peut fournir théoriquement, soit un mélange de monosides (A, fig. 1), soit un bioside (B, fig. 1), ou encore un mélange

1) Loc. cit. p. 945.

2) Voir entre autres *M. A. G. Kaye & M. Stacey*, *Biochem. J.* **46**, xiii (1950), et *B. Lythgoe & S. Tripett*, *Soc.* **1950**, 1983. — *R. E. Reeves & W. F. Goebel*, *J. Biol. Chem.* **139**, 511 (1941), ont réduit le groupe carboxyle du polysaccharide de pneumocoque III méthylé, avant de l'hydrolyser.

3) *R. C. G. Moggridge & A. Neuberger*, *Soc.* **1938**, 745.

4) Les structures chimiques représentées dans cette figure ne servent qu'à illustrer les différences analytiques entre A et B; ni la position des groupes méthoxyyles, ni la position de la liaison entre les deux sucres ne sont établies de façon certaine.

de biosides et/ou de tétraosides. Pour établir laquelle de ces possibilités est réalisée, nous avons mis au point une méthode de dosage du groupe méthoxyle hétérosidique, puis nous avons peracétylé le produit de méthanolyse et avons déterminé les groupes acétyles, acides et méthoxyles hétérosidiques. Ces déterminations, appliquées à un mélange de monosides ou à un bioside, sont assez différentes pour qu'un choix soit possible.

Méthanolyse et acétylation.

L'acide hyaluronique méthylé employé a été préparé avec un rendement de 60% (75% en tenant compte de la fraction moins méthylée récupérée) à partir d'un acide hyaluronique isolé de cordons ombilicaux humains et débarrassé de l'acide chondroïtine-sulfurique (teneur en S < 0,3%); cette préparation est décrite dans la communication VI de cette série. Ses caractéristiques sont les suivantes: $[\alpha]_D^{24} = -51^\circ$ dans le méthanol; N 3,1%; acétyle 10,4%; OCH₃ totaux 30,4%; OCH₃ éthers 23,2%; OCH₃ esters 6,9%; degré moyen de méthylation: 3,5 hydroxyles méthylés sur 4 par période de base (N-acétylglucosamine + acide glucuronique - 2 H₂O); le produit est soluble dans l'eau et le méthanol seulement.

La méthanolyse a été effectuée dans des conditions identiques à celles décrites par Meyer, Fellig & Fischer, pendant 12 h., 24 h. et 72 h. Les produits de méthanolyse ont été ensuite N-acétylés par traitement à l'anhydride acétique en présence d'oxyde d'argent en solution méthanolique, puis peracétylés par l'anhydride acétique en présence de pyridine.

Analyses.

Le produit méthanolysé pendant 24 h. a été spécialement étudié, cette durée de contact étant celle utilisée par Meyer et coll. Les résultats des trois méthanolyses sont rapportés dans le tableau I, comparés aux résultats calculés pour un mélange de monosides, un bioside et un tétraoside, obtenus à partir d'un acide hyaluronique méthylé à 75% (3,5 groupes sur 4).

La scission des liaisons glycosidiques semble être déjà complète après une douzaine d'heures, les pouvoirs rotatoires et la teneur en groupes méthoxyles hétérosidiques étant devenus pratiquement constants. Les groupes N-acétyles ne sont alors que partiellement scindés; même après 72 h., ils ne le seront pas totalement. Ce fait explique la teneur basse en chlore du méthanolysat isolé sous forme de chlorhydrate du groupe amine désacétylé.

La teneur en méthoxyles totaux du méthanolysat est trop basse si l'on admet des tétraosides ou des oligosides de poids moléculaires inférieurs; à peine 1,5% de groupes méthoxyles sont introduits par la méthanolyse et même les erreurs de dosage (qui peuvent aller jusqu'à 1% dans cette détermination) ne peuvent en expliquer la raison. Par

contre, le dosage des groupes méthoxyles hétérosidiques et du pouvoir réducteur montre que dans le cas d'un bioside, 45% des groupes aldéhydiques seraient hétérosidifiés, alors que 30% seraient libres; dans le cas d'un tétraoside, ces proportions sont respectivement 85% et 60%. Ces deux oligosides sont probablement présents. Malheureusement, il n'est pas possible de connaître de façon certaine si le groupe

Tableau I.

Analyses des produits de scission méthanolytique, avant et après acétylation, obtenus à partir de l'acide hyaluronique méthylé¹⁾.

	Calculé			Trouvé		
	Monosides	Bioside	Tétraoside	12 h.	24 h.	72 h.
	Méthanolysat					
$[\alpha]_D$	—	—	—	+ 63,3 ^o	+ 58,9 ^o	+ 66,6 ^o
Cl %	7,1	7,6	7,8	—	5,6	—
N (<i>Kjeldahl</i>) %	2,8	3,0	3,1	—	3,1	—
OCH ₃ totaux %	40,2	36,4	34,2	—	31,4; 31,8	—
OCH ₃ esters %	6,2	6,6	6,8	7,3	6,7; 7,3	7,5; 7,6
OCH ₃ hétérosides %	12,4	6,6	3,4	2,9	2,9	3,0
Acétyles %	—	—	—	4,9; 4,9	3,7; 4,1	1,5; 1,9
Groupes aldéhydiques %	0,423	0,220	0,112	—	0,069	0,051
	Méthanolysat peracétylé					
Acétyles totaux %	24,6	20,0	17,4	21,0	18,3	18,1
Groupes acides %	0,571	0,464	0,404	—	0,382	0,413
OCH ₃ esters %	5,1	5,8	6,3	6,9	6,1	8,1
OCH ₃ hétérosides %	10,1	5,8	3,1	2,4	3,0	2,6

aldéhydique est voisin d'un groupe amine libre, ce qui affecterait la valeur de la détermination du pouvoir réducteur. Il semble pour le moins étrange que d'une méthanolyse, effectuée en l'absence complète d'eau, résulte une hydrolyse partielle; toutefois une telle possibilité avait déjà été envisagée par *Kaye & Stacey*²⁾ dans leur discussion de la méthylation suivie de scission de l'acide hyaluronique.

Tous les résultats analytiques (groupes méthoxyles hétérosidiques du méthanolysat, acétyles totaux, groupes acides et groupes méthoxyles hétérosidiques du méthanolysat acétylé) excluent la possibilité d'une scission jusqu'au stade de monosides. Il est difficile d'établir si l'on est en présence de biosides ou de tétraosides, car il n'est pas exclu que les groupes méthyles hétérosidiques existant dans ces produits ne

¹⁾ Les résultats sont calculés sur la base de produits complètement désacétylés et hétérosidifiés, à l'exception de ceux marqués d'un astérisque, calculés sur la base de produits complètement désacétylé et ne possédant pas de méthoxyle hétérosidique.

²⁾ *M. A. G. Kaye & M. Stacey*, *Biochem. J.* **48**, 249 (1951).

s'y trouvent sous une forme difficilement scindable dans les conditions employées pour leur dosage; seul un emploi systématique de cette méthode de dosage permettrait d'en juger les limites.

La teneur en groupes aldéhydiques libres plus basse pour la méthanolyse de 72 h., ainsi que le dosage des acétyles totaux et les modifications du pouvoir rotatoire semblent indiquer une polymérisation des produits de scission, d'une manière analogue à la réversion du glucose lors de l'hydrolyse de la cellulose ou de l'amidon.

Oxydation par l'ion periodate.

Il nous a semblé intéressant de soumettre à l'oxydation par l'ion periodate les produits de la méthanolyse, dans les conditions établies pour les dérivés de la glucosamine¹). Les résultats en sont rapportés dans le tableau II.

Tableau II.

Oxydation à pH 4,5, par l'ion periodate, des méthanolysats de l'acide hyaluronique méthylé, à 0° pour la détermination de la consommation d'oxydant, et à 25° pour la détermination de l'ammoniaque libérée.

	Durée en heures	Méthan- olysat de 24 h.	Durée en heures	Méthan- olysat de 72 h.	<i>Meyer, Fellig & Fischer</i>
Consommation de periodate en moles par 100 g de sub- stance	20	0,110	23	0,105	0,051
	40	0,118	47	0,110	
	85	0,121	90	0,118	
Libération d'ammoniaque en moles par 100 g de sub- stance	4	0,045	20	0,07	—
	22	0,05	66	0,06	
	75	0,05			

Toute interprétation de ces résultats en vue d'établir une structure chimique est aléatoire pour les raisons suivantes :

1° Le méthanolysat est composé d'oligosides en proportions inconnues.

2° La position des groupes aldéhydiques libres n'est pas déterminée. S'ils sont fixés sur la glucosamine, ils peuvent être voisins d'un groupe amine libre ou acétylé.

3° La méthylation du produit de départ est incomplète et la position de l'hydroxyle, laissé partiellement libre de ce fait, est inconnue.

Si le choix d'une structure est impossible, vu le très grand nombre de possibilités, on peut cependant tirer quelques indications du résultat de cette oxydation.

La faible consommation d'oxydant et la libération d'ammoniaque excluent la présence de monosides. La plus grande quantité d'ammo-

¹) R. W. Jeanloz & E. Forchielli, J. Biol. Chem. **188**, 361 (1951).

niacque libérée par le méthanolysat de 72 h. semble indiquer que le groupe aldéhydique libre serait fixé sur la glucosamine et voisin d'un groupe amine libre, alors que les quantités identiques d'oxydant consommées par les méthanolysats de 24 h. et de 72 h. appuient l'hypothèse d'une réversion.

Les différences entre nos résultats et les résultats de *Meyer, Fellig & Fischer*, peuvent s'expliquer partiellement par le fait que ces derniers ont été obtenus par extrapolation au temps zéro et probablement par un degré de méthylation différent ou par l'emploi d'une quantité insuffisante d'oxydant.

Chromatographie du méthanolysat peracétylé.

On sait qu'il est aisé de séparer, par chromatographie, la glucosamine de l'acide glucuronique ou leurs dérivés. C'est pourquoi nous avons soumis à une séparation chromatographique très poussée sur l'acide silicique le méthanolysat de 72 h. après acétylation. Bien que 50 fractions différentes aient été obtenues, 82 % du produit soumis à la séparation ont été retrouvés dans deux fractions consécutives; le reste est réparti entre les autres fractions sans qu'aucune n'en renferme plus de 2 %. Les deux fractions fournissant la majorité du produit ont été éluées par un mélange de chloroforme et d'acétone ou par un mélange de chloroforme et de méthanol; l'acétone ou le méthanol étaient indispensables pour cette élution, alors que le chloroforme seul était sans aucune action. Par comparaison, nous avons adsorbé sur l'acide silicique l' α -méthyl-diméthyl-3,4-acétyl-6-N-acétylglucosamine¹⁾: ce corps était déjà élué par un mélange d'acétate d'éthyle et de chloroforme. Cette différence de comportement est une nouvelle preuve de ce que le méthanolysat n'est pas formé d'un mélange de glucuronosides méthylés et de méthyl-diméthylglucosaminides.

Les produits de la séparation chromatographique des méthanolysats de 24 h. et de 72 h. peracétylés ont donné des biosides cristallins sur la constitution desquels nous reviendrons dans un prochain travail.

*Kaye & Stacey*²⁾ ont également scindé par méthanolyse un acide hyaluronique méthylé, préparé à partir d'un produit de départ partiellement dégradé. A côté de sirops qu'il ne leur fut pas possible de cristalliser et d'identifier, ils ne purent isoler, après une nouvelle méthylation des produits de scission, que quelques milligrammes de l' α -méthylglucoside de l'acide triméthyl-2,3,4-glucuronique, sous forme d'amide, alors qu'ils étaient partis de plus de 2 g d'acide hyaluronique méthylé. D'après nos résultats, il semble bien que ces auteurs n'ont pu obtenir des monosides cristallins en plus grande quantité à cause d'une scission incomplète du polyoside méthylé.

¹⁾ La synthèse de ce composé sera publiée dans la 7ème communication de cette série.

²⁾ *M. A. G. Kaye & M. Stacey*, *Biochem. J.* **48**, 249 (1951).

Il ne fait aucun doute que le produit étudié par Meyer, Fellig & Fischer a dû être un mélange de composés résultant d'une scission incomplète de l'acide hyaluronique méthylé et que les monosides n'y étaient présents qu'en quantités faibles. Il ne semble, par conséquent, pas possible de déduire de leur travail une constitution de l'acide hyaluronique.

A notre avis, l'oxydation par l'ion periodate ne présente de valeur que lorsqu'elle est appliquée à des produits dont la majorité des propriétés sont connues. Dans le cas des polyosides complexes, cette oxydation ne peut que confirmer des structures établies par d'autres méthodes ou, utilisée préliminairement, éliminer certaines structures. Vouloir en faire un instrument de détermination rapide de ces structures sans passer par la voie laborieuse de la méthylation, suivie d'identification complète des produits de scission, ne peut que mener à un échec.

Partie expérimentale.

*Méthanolyse*¹⁾. 300 mg de l'éther méthylique de l'acide hyaluronique méthylé²⁾ sont séchés une nuit à 65° au vide poussé en présence de pentoxyde de phosphore. Ils sont additionnés de 15 cm³ d'une solution de gaz chlorhydrique à 5% dans le méthanol anhydre et chauffés à reflux pendant 12 h., 24 h. et 72 h. à l'abri de l'humidité. La solution est évaporée au vide et l'acide chlorhydrique chassé par des additions répétées de toluène sec, suivies d'évaporation au vide. Le sirop résiduel est laissé deux jours dans un dessiccateur sous un vide poussé en présence d'hydroxyde de potassium solide. Il est alors dissout dans 10 cm³ d'eau glacée et la solution est filtrée à travers une double couche de Filter Cel (Celite Johns Mansville) et de charbon actif (Darco G-60); le filtre est soigneusement lavé à l'eau glacée. Les solutions aqueuses sont réunies, congelées et lyophilisées; elles laissent un sirop de couleur jaune pâle, pesant en moyenne de 310 à 315 mg après séchage au vide poussé à poids constant. Le rendement calculé pour la formation d'un mélange de monosides est de 342 mg, pour un bioside de 319 mg et pour un tétraoside de 311 mg.

Acétylation. 42 mg de méthanolysat séché sont dissous dans 1 cm³ de méthanol anhydre et additionnés de 20 mg d'acétate d'argent et de 0,05 cm³ d'anhydride acétique. Après deux jours de repos à température ambiante en flacon fermé, le mélange est dilué avec du méthanol et les sels d'argent sont centrifugés et lavés avec du méthanol. La solution méthanolique est évaporée au vide, le résidu sirupeux est repris par l'acétone, filtré et évaporé, laissant un sirop pesant 42 mg, après séchage au vide poussé à 65°. Ce sirop est dissout dans 1 cm³ de pyridine anhydre et additionné de 0,6 cm³ d'anhydride acétique. Après deux jours à température ambiante en flacon fermé, le mélange est chauffé à 60° à l'abri de l'humidité pendant une demi-heure, puis il est refroidi dans un bain de glace, et additionné de 1 cm³ de méthanol. Après une heure à température ambiante, la solution est évaporée au vide et la pyridine chassée par plusieurs additions de toluène sec, suivies d'évaporation au vide. Le sirop résiduel est repris par le chloroforme, décoloré par addition de charbon actif Darco G-60, filtré sur Filter-Cel et Darco G-60 et le chloroforme est évaporé au vide, laissant un sirop de couleur jaune pâle, qui est alors séché pendant 2 h. au vide poussé à 65° en présence de pentoxyde de phosphore. Le rendement est de 48 mg.

Analyses.

Avant chaque détermination, les substances sont séchées 2 h. au vide poussé à 65° en présence de pentoxyde de phosphore, puis pesées en flacon fermé.

¹⁾ K. H. Meyer, J. Fellig & Ed. H. Fischer, loc. cit.

²⁾ Les constantes sont décrites dans la partie théorique.

Pouvoir rotatoire: déterminé dans le méthanol anhydre, à une concentration variant de 0,8 à 1,5%, à 25°, dans un tube de 2 dm.

Chlore et groupes méthoxyles totaux. (Dosages effectués par MM. G. Weiler & F. B. Strauss, Oxford, Angleterre.)

Méthanolysat de 24 h.: 3,634 mg donnent 0,204 mg de Cl, Cl 5,63%. 1,645; 3,705 mg donnent 3,960; 8,806 mg AgI OCH₃ 31,44; 31,81%.

Azote (selon Kjeldahl).

Méthanolysat de 24 h.: 13,50; 13,01 mg ont consommé 2,12; 2,00 cm³

HCl 0,0143-n.

Azote 3,14; 3,08%

Acétyles. Les acétyles totaux sont déterminés par la méthode de *Hadidian & Pirie*¹⁾. Dans le cas des composés analysés sous forme de chlorhydrate, il a été vérifié que l'acide chlorhydrique n'est pas libéré dans les conditions de l'expérience.

Méthanolysat de 12 h.: 4,43; 4,50 mg consomment 0,50; 0,51 cm³

NaOH 0,01-n.

Acétyle 4,9; 4,9%

Méthanolysat de 24 h.: 10,95; 9,49 mg consomment 0,95; 0,91 cm³

NaOH 0,01-n.

Acétyle 3,7; 4,1%

Méthanolysat de 72 h.: 3,28; 5,55 mg consomment 0,12; 0,25 cm³

NaOH 0,01-n.

Acétyle 1,5; 1,9%

Méthanolysat de 12 h. acétylé: 8,52 mg consomment 4,18; 4,21 cm³

NaOH 0,01-n.

Acétyle 20,9; 21,2%

Méthanolysat de 24 h. acétylé: 7,57 mg consomment 3,16 cm³

NaOH 0,01-n.

Acétyle 18,3%

Méthanolysat de 72 h. acétylé: 3,46 mg consomment 1,45 cm³

NaOH 0,01-n.

Acétyle 18,1%

Groupes méthoxyles esters et hétérosidiques. Nous employons la méthode de détermination quantitative du méthanol de *Boos*²⁾.

La substance est additionnée de 2 cm³ d'hydroxyde de sodium 2-n. et chauffée 15 min. au bain-marie en ballon fermé par un bouchon rodé. Après refroidissement, la substance est transférée dans un ballon de 50 cm³, diluée avec 4 ou 5 cm³ d'eau et distillée dans un appareil muni d'une trappe et d'un réfrigérant descendant; 5 cm³ de distillat sont recueillis dans un flacon jaugé de 5 cm³, refroidi dans un bain de glace. Dans des prises de 1 cm³, on dose alors le méthanol selon *Boos*, ce qui donne la teneur en groupes méthoxyles esters. Le résidu de distillation est transféré avec 4 cm³ d'acide sulfurique 2-n. dans un ballon fermé par un bouchon rodé; ce dernier est scellé avec de la cire et la solution est chauffée une nuit au bain-marie. Après refroidissement, le contenu est neutralisé approximativement et dilué jusqu'à un volume de 6 ou 7 cm³, puis la solution est distillée comme ci-dessus. Le dosage du méthanol d'après *Boos* donne alors la teneur en groupes méthoxyles hétérosidiques. La quantité de substance est choisie de façon à avoir une teneur finale en méthanol de 20 à 50 γ dans chaque prise de 1 cm³. En même temps que chaque série de dosages, on effectue une série connue contenant approximativement 20, 40 et 60 γ de méthanol par cm³, pour établir la courbe colorimétrique.

Lorsque le traitement par l'hydroxyde de sodium est supprimé, on obtient la teneur en groupes méthoxyles labiles en présence d'acide (esters et hétérosidiques); quelques composés connus ont été analysés de cette façon (Tableau III).

Le tétraméthyl-2,3,4,6-glucose traité d'une manière identique donne 2% de groupes méthoxyles, indiquant une certaine labilité, dans ces conditions, des groupes méthoxyles éthers (probablement le groupe en position 6). Il est évident que cette méthode, bien mise au point pour le dosage des groupes méthoxyles éthers³⁾, demande une plus ample vérification pour le dosage des méthoxyles hétérosidiques³⁾.

¹⁾ Z. *Hadidian & N. W. Pirie*, *Biochem. J.* **42**, 260 (1948).

²⁾ R. N. *Boos*, *Anal. Chem.* **20**, 964 (1948).

³⁾ Le dosage du groupe méthoxyle hétérosidique de composés insolubles dans l'eau, comme par exemple l' α -méthyl-triacétyl-2,3,6-D-mannoside, ne donne pas de résultat satisfaisant.

Tableau III.

Dosage des groupes méthoxytes labiles après action de H_2SO_4 2-n. pendant une nuit à 100° .

Substance	% OCH_3 esters ou hétérosidiques	
	Trouvé	Calculé
p-Aminobenzoate de méthyle	19,6	20,7
α -Méthylglucoside	15,0	16,0
β -Méthylriboside	18,6	18,9
α -Méthyl-diméthyl-2,3-glucoside	13,6	13,8

Méthanolysat de 12 h.: le traitement alcalin de 432 γ donne 30,5; 33,5; 33,5 γ CH_3OH . Le traitement acide du résidu donne 12,5; 17,5 γ CH_3OH . OCH_3 esters 7,3%; OCH_3 hétérosidiques 2,9%.

Méthanolysat de 24 h.: le traitement alcalin de 573 γ donne resp. 37; 41,5; 36 γ et 45,5; 42; 43,5 γ CH_3OH . Le traitement acide du résidu donne 17; 17; 17 γ CH_3OH . OCH_3 esters 6,7; 7,3%; OCH_3 hétérosidiques 2,9%.

Méthanolysat de 72 h.: le traitement alcalin de 617 γ donne resp. 49,5; 46,5; 50 γ et 49; 48; 49 γ CH_3OH . Le traitement acide du résidu donne 19; 19; 19 γ CH_3OH . OCH_3 esters 7,5; 7,6%; OCH_3 hétérosidiques 3,0%.

Méthanolysat de 12 h. acétylé: le traitement alcalin de 705 γ donne 51; 49; 49 γ CH_3OH . Le traitement acide du résidu donne 16,5; 16,5; 20 γ CH_3OH . OCH_3 esters 6,9%; OCH_3 hétérosidiques 2,4%.

Méthanolysat de 24 h. acétylé: le traitement alcalin de 437 γ donne 27; 27,5; 27 γ CH_3OH . Le traitement acide du résidu donne 17,5; 17,5; 17,5 γ CH_3OH . OCH_3 esters 6,1%; OCH_3 hétérosidiques 3,0%.

Méthanolysat de 72 h. acétylé: le traitement alcalin de 731 γ donne 61,58; 63 γ CH_3OH . Le traitement acide du résidu donne 19,5; 19,5; 19,5 γ CH_3OH . OCH_3 esters 8,1%; OCH_3 hétérosidiques 2,6%.

Groupes acides. Nous employons la méthode de microdosage des groupes O-acétyles d'*Alicino*¹⁾. Comme la saponification ne semble pas complète après 2 h. (l'ester méthylique étant relativement stable), la substance est laissée en contact avec l'alcali pendant 24 h. Le groupe N-acétyle de la N-acétylglucosamine n'est pas scindé dans ces conditions.

Méthanolysat de 24 h. acétylé: 5,10 mg consomment 1,95 cm^3 NaOH 0,01-n., soit 0,382 équivalents pour 100 g.

Méthanolysat de 72 h. acétylé: 5,28 mg consomment 2,18 cm^3 de NaOH 0,01-n., soit 0,413 équivalents pour 100 g.

Pouvoir réducteur. Il est mesuré d'après la méthode mise au point pour la glucosamine et la N-acétylglucosamine²⁾.

Méthanolysat de 24 h.: 28,85 mg consomment 2,00 cm^3 d'iode 0,02-n., en 24 h. à 0° , soit 0,069 groupe aldéhydique pour 100 g.

Méthanolysat de 72 h.: 11,18 mg consomment 0,57 cm^3 diode 0,02-n., en 24 h. à 0° , soit 0,051 groupe aldéhydique pour 100 g.

Oxydation par l'ion periodate. Nous utilisons la méthode décrite précédemment³⁾, en travaillant à pH 4,5 (tampon à l'acétate), à l'abri de la lumière, avec une concentration en méthanolysat de 0,5 à 1% et une teneur en periodate de sodium de 0,3 moles pour 100 g de méthanolysat. La température est maintenue à 0° , pendant l'oxydation au cours

¹⁾ J. F. Alicino, Anal. Chem. **20**, 590 (1948).

²⁾ R. W. Jeanloz & E. Forchielli, J. Biol. Chem. **188**, 361 (1951).

³⁾ R. W. Jeanloz & E. Forchielli, J. Biol. Chem. **188**, 361 (1951); Helv. **23**, 1690 (1950).

de laquelle la consommation d'oxydant est mesurée, et à 25°, pendant l'oxydation pour la détermination de l'ammoniaque libérée. Dans cette détermination, il est nécessaire d'introduire quelques gouttes d'alcool octylique pour empêcher la formation de mousses, lors de la distillation en présence d'oxyde de magnésium. Un essai à blanc est effectué dans les mêmes conditions pour chaque détermination. Les résultats sont rapportés dans le tableau II.

Nous remercions M. E. Forchielli pour son aide dans la préparation de l'ester méthyl-lique de l'acide hyaluronique méthylé et M. M. Spivak pour son aide dans le dosage des groupes méthoxyles esters et glycosidiques.

SUMMARY.

Action of methanolic hydrochloric acid on the methyl ester of methylated hyaluronic acid does not produce monosides. Thus, periodate oxidation of the split product cannot be used to establish the structure of hyaluronic acid.

A microdetermination of the glycosidic methoxyl groups is described.

Research Laboratories of the Medical Clinic, Massachusetts General Hospital, et Department of Biological Chemistry, Harvard Medical School, Boston, Mass., U.S.A.

34. Isolierung von Alstonin aus afrikanischen Rauwolfia-Arten

von E. Schlittler, H. Schwarz und F. Bader.

(14. XII. 51.)

*Siddiqui & Siddiqui*¹⁾ haben als erste die beiden Alkaloide Ajmalin und Serpentin aus der indischen Rauwolfia serpentina *Benth.* isoliert. Mit der Chemie des Ajmalins haben sich *Robinson* und Mitarb.²⁾ befasst, während die Konstitution des Serpentin von *E. Schlittler & H. Schwarz*³⁾ aufgeklärt worden ist.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, afrikanische Rauwolfia-Arten vergleichend auf ihren Alkaloidgehalt zu prüfen. Dazu standen uns Rauwolfia vomitoria *Afzel* und Rauwolfia obscura *K. Schum.* zur Verfügung⁴⁾. Wir haben dieses Pflanzenmaterial ähnlich aufgearbeitet, wie dies früher beschrieben worden ist³⁾. Ein prinzipieller Unterschied bestand darin, dass keine Vorextraktion mit Äthylen-

¹⁾ *S. Siddiqui & R. H. Siddiqui*, J. Ind. Chem. Soc. **8**, 667 (1931); **9**, 539 (1932); **12**, 37 (1935); **16**, 421 (1939).

²⁾ *D. Mukherji, R. Robinson & E. Schlittler*, Exper. **5**, 215 (1949).

³⁾ *E. Schlittler & H. Schwarz*, Helv. **33**, 1463 (1950).

⁴⁾ Die Wurzeln von Rauwolfia vomitoria verdanken wir Père *Callens* vom botanischen Garten Kisantu (Belg. Kongo). Die Rinden von Rauwolfia obscura hat uns Herr Dr. *P. Speiser* (Afrikaexpedition der Universität Basel 1950) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.