

## 146. Dosage polarographique indirect de la scopolamine (II)

par P.-E. Wenger, D. Monnier et H. Schmidgall.

(5 IV 52)

Certains alcaloïdes, la scopolamine en particulier<sup>1)</sup>, donnent un saut catalytique qui rend possible, dans des conditions déterminées, un dosage approximatif. Les polarogrammes, en effet, ne présentent pas une bonne reproductibilité; d'autre part, les sauts se produisent à des potentiels supérieurs à 1 volt.

Par contre, les nitro-dérivés se prêtent particulièrement bien à l'examen polarographique, aussi avons-nous essayé de soumettre la dinitro-2,4-scopolamine au polarographe.

*Conditions de travail:* 0,07 g de bromhydrate de scopolamine sont nitrés par 5 cm<sup>3</sup> d'acide nitrique concentré, selon la méthode donnée à la page 1192/1193.

Nous avons fait deux séries de déterminations polarographiques à des pH différents afin d'établir les meilleures conditions de travail. Les solutions tampons utilisées sont: tampon de pH 4,7: 7,71 cm<sup>3</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2-m., 12,29 cm<sup>3</sup> d'acide acétique 0,1-m.; tampon de pH 9 (*Soerensen*): borax + HCl.

Nous avons préparé les solutions suivantes:

1. 1 cm<sup>3</sup> d'une solution contenant 0,07 g de scopolamine nitrée dans 50 cm<sup>3</sup> est additionné de 5 cm<sup>3</sup> du tampon de pH 4,7. On complète à 10 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bidistillée.
2. 5 cm<sup>3</sup> de la solution tampon de pH 4,7 sont complétés à un volume de 10 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bidistillée (solution témoin).
3. 1 cm<sup>3</sup> d'une solution contenant 0,07 g de scopolamine nitrée dans 50 cm<sup>3</sup> est additionné de 5 cm<sup>3</sup> de tampon pH 9. On complète à 10 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bidistillée.
4. 5 cm<sup>3</sup> de tampon pH 9 sont complétés à un volume de 10 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bidistillée.

Travaillant à de grandes sensibilités, nous avons établi le polarogramme du tampon seul (solutions 2 et 4) et nous avons pu constater qu'au pH 4,7 la courbe de la solution tampon se superpose à la courbe de la scopolamine nitrée, rendant de ce fait impossible la mesure du saut de celle-ci, saut situé entre 0,4 et 1 volt. Les sauts provoqués par le tampon sont dus à l'oxygène encore présent dans la solution. Ces sauts se trouvent à des potentiels de 0,3 et 1 volt. Pour éliminer complètement les traces d'oxygène dissous, il faudrait prendre des précautions spéciales et ne pas se limiter au simple passage d'un courant d'hydrogène dans la solution pendant 10 min.

Par contre, il est possible de mesurer le saut dû à la réduction du nitro-dérivé au pH 9, car à ce pH, l'oxygène en petite quantité ne gêne pas. Nous avons alors:

$$E_{1/2} = 0,74 \text{ v.}; h = 27 \text{ mm}; i = 2,28 \mu\text{a.}$$

Toutes nos recherches ont été exécutées à 18°, au polarographe Sargent XXI avec une cuve à électrode à gouttes de mercure. Avant chaque polarogramme, nous avons fait passer dans nos solutions un courant d'hydrogène durant 10 min., afin d'éliminer la plus grande partie de l'oxygène dont les sauts trop accentués gênaient notre dosage.

*Nitration:* Une quantité déterminée de bromhydrate de scopolamine est traitée par 5 cm<sup>3</sup> d'acide nitrique concentré ( $d = 1,4$ ). La solution se colore en brun par suite de la mise en liberté de brome. Après élimination du brome, la coloration jaune persistante passant à l'orange en milieu alcalin est à l'appui de la formation de dérivés nitrés. Le volume est réduit à environ 1 cm<sup>3</sup> au B. M., on dilue alors avec de l'eau bidistillée. Le

<sup>1)</sup> *Kirkpatrick*, Quart. J. Pharm. Pharmacol. **19**, 526 (1946).

pH de la solution ainsi obtenue est compris entre 1 et 2. On neutralise avec de la potasse caustique jusqu'à pH 6,8 ou 12 et on complète le volume à 50 cm<sup>3</sup> avec de l'eau bidistillée. Cette solution est conservée pour les essais polarographiques.

*Essais de reproductibilité de la courbe polarographique:* Effectuant des nitrations sur des prises de 0,05 g de bromhydrate de scopolamine avec 5 cm<sup>3</sup> d'acide nitrique concentré dans chaque cas, nous obtenons à partir des quatre solutions préparées, comme il vient d'être dit (solution 3), des polarogrammes dont les résultats sont données ci-dessous.

i ( $\mu$ a)	1,08	1,11	1,10	1,12
--------------	------	------	------	------

Ces résultats montrent une bonne reproductibilité, l'intensité moyenne du courant des quatre sauts étant 1,10  $\mu$ a, l'erreur ne dépassant pas  $\pm 2\%$ .

*Essais de stabilité:* Nous avons constaté que le composé nitré était stable au pH 6,8 pendant au moins 48 heures (il est bien entendu que la polarographie s'effectue néanmoins au pH 9). Par contre, si le dérivé nitré est abandonné au pH 12 pendant quelques heures, les courbes obtenues ensuite au pH 9 montrent une évolution dans le processus réactionnel (tableau 1), ce qui nous laisse supposer que la dinitro-2,4-scopolamine se transforme, par une réaction lente, en un pseudo-acide. Nous essayerons d'ailleurs de confirmer l'existence de ce phénomène par une étude logarithmique des courbes.

**Tableau 1.**

0,0008 g de scopolamine soit  $1,82 \cdot 10^{-4}$  mol. Sensibilité 0,015.

temps en h . . . . .	0	3	5	8	21	26	47	62
hauteur en mm . . . . .	57	63	67	70	77	83	78	83
i en $\mu$ a . . . . .	0,85	0,94	1,00	1,05	1,16	1,23	1,17	1,23

*Influence de la concentration de l'acide nitrique sur la nitration:* Afin de déterminer la concentration minimum d'acide nitrique nécessaire à une nitration complète (pour rendre la méthode de dosage plus sélective), nous avons nitré des quantités constantes de scopolamine par de l'acide nitrique de concentration variable.

C'est ainsi, par exemple, que des prises de 0,05 g de scopolamine sont traités successivement par 5 cm<sup>3</sup> d'acide nitrique de 10 à 100% (de l'acide concentré du commerce). Après concentration au b. m., les solutions sont alcalinisées par la potasse jusqu'à pH 6,8 et les volumes complétés à 50 cm<sup>3</sup>.

Les caractéristiques des polarogrammes obtenus à pH 9 sont consignées dans le tableau 2, d'où il ressort clairement que la concentration minimum en acide nitrique nécessaire à une nitration complète est voisine de 50%.

**Tableau 2.**

0,001 g de scopolamine soit  $2,29 \cdot 10^{-4}$  mol. Sensibilité 0,015; pH 9.

conc. HNO <sub>3</sub> (en % d'ac. conc.)	100%	50%	45%	40%	35%	25%	10%
h en mm . . . . .	74	74	68	52	31,5	8	0
i en $\mu$ a . . . . .	1,11	1,11	1,02	0,78	0,47	0,12	0,00

La question de savoir si à concentration plus faible, une prolongation du temps de nitration ou une élévation de la température pourraient néanmoins conduire à une nitration complète n'a pas été étudiée.

Remarquons encore que pour un acide à 10% la nitration n'a pas lieu, ce qui pourrait permettre la séparation de la scopolamine d'une substance plus facilement nitrée.

*Courbe d'étalonnage:* Pour l'établissement d'une courbe d'étalonnage donnant la hauteur des sauts polarographiques en fonction de la concentration en scopolamine, des

quantités variables d'alcaloïde ont été nitrées, comme déjà vu, par 5 cm<sup>3</sup> d'acide nitrique concentré.

1 cm<sup>3</sup> de chaque solution préparée comme indiqué à la page 1192 est additionné de 5 cm<sup>3</sup> du tampon de pH 9 et complété à 10 cm<sup>3</sup> par de l'eau bidistillée. Ces différentes solutions sont alors polarographiées. Les valeurs obtenues (tableau 3) montrent que la hauteur des sauts est bien proportionnelle à la concentration du produit. D'autre part, nous avons vu (voir page 1193) que les hauteurs restent constantes pendant 74 h. Nous avons travaillé avec des quantités de 0,0002 à 0,0018 g dans 10 cm<sup>3</sup>. Comme il est possible d'effectuer la polarographie sur des volumes 5 fois plus petits, la quantité minimum dosable est de 0,00005 g dans 2 cm<sup>3</sup> de solution (50 γ). L'erreur maximum sur 0,0002 g de scopolamine est de ± 0,000012 g. Dans toutes les mesures, le potentiel est pris par rapport à la surface de mercure qui joue le rôle de l'anode.

Tableau 3.

Scopolamine g/10 cm <sup>3</sup>	molarité	sens.	h en mm	i en μa	E <sub>1/2</sub> en volts
0,0002	4,68 · 10 <sup>-5</sup>	0,015	16	0,24	0,67
0,0006	1,37 · 10 <sup>-4</sup>	0,015	45	0,67	0,68
0,0010	2,29 · 10 <sup>-4</sup>	0,015	74	1,11	0,71
0,0014	3,20 · 10 <sup>-4</sup>	0,015	107	1,605	0,74
0,0016	3,66 · 10 <sup>-4</sup>	0,015	122	1,83	0,76
0,0018	4,12 · 10 <sup>-4</sup>	0,015	136	2,04	0,83

Nous avons établi une autre courbe d'étalonnage avec une solution du nitro-dérivé portée à pH 12 par addition d'hydroxyde de potassium. Nous avons alors remarqué une évolution en fonction du temps (voir ci-dessous), évolution qui s'arrête après 24 heures environ, ainsi qu'il est visible dans le tableau 4.

Tableau 4.

Scopolamine g/10 cm <sup>3</sup>	molarité	sens.	Après 10 minutes		Après 24 heures	
			h (mm)	i (μa)	h (mm)	i (μa)
0,00015	3,44 · 10 <sup>-5</sup>	0,015	10	0,15	—	—
0,0003	6,84 · 10 <sup>-5</sup>	0,015	22	0,33	33	0,495
0,0005	1,12 · 10 <sup>-4</sup>	0,015	35	0,52	53	0,795
0,0008	1,82 · 10 <sup>-4</sup>	0,015	57	0,85	83	1,245
0,0010	2,29 · 10 <sup>-4</sup>	0,015	74	1,11	106	1,590
0,0012	2,74 · 10 <sup>-4</sup>	0,015	87	1,30	129	1,940
0,0016	3,66 · 10 <sup>-4</sup>	0,015	118	1,77	171	2,565

courbe 1

courbe 2

Si l'on fait le polarogramme immédiatement après la préparation de la solution, on obtient exactement la même courbe qu'au pH 6,8. L'évolution ne s'arrêtant qu'après 24 h. et n'étant pas brusque, nous pouvons supposer être en présence d'un équilibre entre les formes nitro et aci (voir page 1193). Au pH 12, avec le temps, cet équilibre se déplace vers la forme aci. En étudiant la courbe 1, on peut penser, étant donné sa forme, que le saut obtenu est dû, non pas à une seule réaction, mais à la superposition de plusieurs réactions.

La courbe 2, par contre, effectuée après 24 h., montre une certaine régularité, ce qui nous laisse supposer qu'une seule forme est ici soumise à la réduction. L'augmentation de la hauteur des sauts est de 1/3.

L'allure de la courbe d'étalonnage de la solution préalablement portée au pH 12 pendant 24 h., puis ramenée au pH 9 pour la détermination polarographique, montre que la sensibilité est dans ce cas beaucoup plus grande, mais cet avantage est compensé partiellement par la durée de l'analyse.

*Etude logarithmique:* Le saut polarographique d'une substance est représenté par la fonction:

$$E = E_{\frac{1}{2}} - \frac{0,0591}{n} \log \frac{i}{i_d - i},$$

où E = potentiel en volts.

$E_{\frac{1}{2}}$  = potentiel de demi-onde en volts.

n = nombre d'électrons participant à la réaction.

i = courant de diffusion au potentiel E, en  $\mu a.$

$i_d$  = courant de diffusion max., en  $\mu a.$

Pour pouvoir calculer n par cette formule, il faut que la réaction soit réversible. Lors de réactions irréversibles, cette expression mathématique permet cependant de se rendre compte si la réaction est simple ou complexe.

Si donc en portant les valeurs du  $\log [i/(i_d - i)]$  en abscisses et celles de E en ordonnées, on obtient une droite, nous n'avons probablement qu'une réaction, la superposition de deux ou plusieurs réactions conduisant à une droite brisée.

Nous avons étudié tout d'abord trois solutions conservées au pH 6,8, dont les caractéristiques apparaissent dans la figure 1.

Ainsi que nous pouvons le voir, il doit exister dans ce cas au moins deux réactions. En effet, les droites AB, BC; A' B', B' C': A'' B'', B'' C'', montrent bien une brisure en B, B' et B''. D'autre part, les différentes droites calculées pour des concentrations variables restent parallèles les unes aux autres.

Nous avons étudié de la même façon trois courbes au pH 12, après stabilisation des solutions, soit après 24 heures. Les résultats sont portés dans la fig. 2.

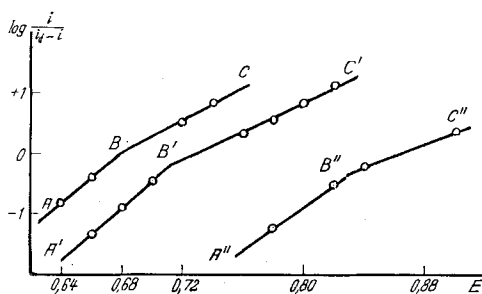


Fig. 1.

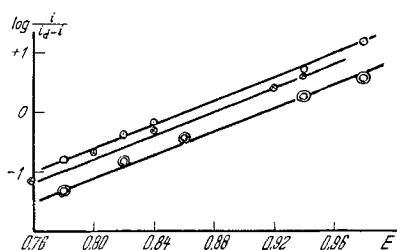


Fig. 2.

La fig. 2 montre que nous avons une réaction qui provient probablement de la réduction de la forme aci, seule existant dans ces conditions.

Nous tenons à remercier la Maison *Hoffmann-La Roche* qui nous a aimablement fourni les alcaloïdes nécessaires à ces recherches.

## SUMMARY.

The nitration of scopolamine under various conditions has been studied. The compounds derived from this nitration give perfectly well formed polarographic waves the height of which is directly proportional to the concentrations of the corresponding solutions. This allows the establishment of a standardization graphic. The behaviour of these nitrated derivatives at various pH has also been studied. There exist in equilibrium two tautomeric forms: the "nitro"- and the "aci"-form; at pH = 12, after 12 hours, only one form (the "aci"-form) subsists.

The smallest amount of substance that can be estimated in this way is 50  $\gamma$ , with a precision of  $\pm 10\%$ . For an amount of 200  $\gamma$  the error is decreased to  $\pm 6\%$ .

Laboratoire de Chimie analytique et de Microchimie de  
l'Université de Genève.

---

### 147. Phosphorylation biologique de la thiamine<sup>1)</sup>

par F. Leuthardt et H. Nielsen.

(7 IV 52)

La levure, les bactéries et les tissus animaux contiennent des enzymes capables de phosphoryler la thiamine. *Euler & Vestin*<sup>2)</sup> ont observé que le pouvoir de décarboxylation, vis-à-vis de l'acide pyruvique, d'une poudre de levure de bière, augmente lorsque cette dernière est incubée en présence de thiamine, de phosphate minéral et d'acide adénosine-triphosphorique (A.T.P.). *Goodhart & Sinclair*<sup>3)</sup>, *Tauber*<sup>4)</sup> et *Ochoa & Peters*<sup>5)</sup> ont étudié le mécanisme de la phosphorylation dans les tissus d'animaux. *Ochoa*<sup>6)</sup> a trouvé que le foie, ainsi que la muqueuse intestinale et le cerveau contiennent un système phosphorylant actif.

Les interprétations données aux résultats obtenus ont soulevé un certain nombre d'objections. Différents auteurs ont travaillé avec des concentrations en thiamine assez considérables. Dans ces conditions, l'augmentation de la décarboxylation que l'on observe en

<sup>1)</sup> Ce travail a été réalisé avec l'aide de la *Fritz Hoffmann-La Roche-Stiftung zur Förderung wissenschaftlicher Arbeitsgemeinschaften in der Schweiz*.

<sup>2)</sup> *H. V. Euler & R. Vestin*, *Naturwiss.* **25**, 416 (1937).

<sup>3)</sup> *R. S. Goodhart & H. M. Sinclair*, *Biochem. J.* **23**, 1099 (1939).

<sup>4)</sup> *H. Tauber*, *J. Biol. Chem.* **123**, 499 (1938).

<sup>5)</sup> *S. Ochoa & R. A. Peters*, *Nature* **142**, 356 (1942).

<sup>6)</sup> *S. Ochoa*, *Biochem. J.* **33**, 1262 (1939).