

Zusammenfassung.

4-Phenyl-2-oxytetronimid (I) lässt sich katalytisch zu γ -Phenyl- α , β -dioxybutyramid hydrieren, dessen Konstitution bewiesen wird. Andere 4-Aryl-oxytetronimide reagieren analog; im 4-m-Nitrophenyl-2-oxytetronimid lässt sich die Nitrogruppe selektiv zur Aminogruppe reduzieren, bevor das Redukton-System hydriert wird.

Organisch-Chemische Anstalt der Universität Basel.

190. Sur la détermination du poids moléculaire des polysaccharides. Recherches sur l'amidon 54

par Kurt H. Meyer †, A. J. A. van der Wyk et Chen-Piao Feng.

(25 VI 54)

Au cours d'une étude de la structure du grain d'amidon, nous avons été frappés par le fait que le poids moléculaire (P. M.) moyen que nous trouvions pour un « amidon de pomme de terre total » variait considérablement suivant qu'il était déterminé pour un amidon commercial ou pour un amidon que nous préparions nous-mêmes à partir de tubercules. Nous nous sommes rapidement aperçus de ce que ce désaccord avait deux origines distinctes, provenant du traitement auquel avait été soumis l'amidon lors de sa préparation industrielle, d'une part, et d'autre part, de la méthode elle-même utilisée pour la détermination des P. M.

Ces constatations nous ont amenés à reprendre l'étude de cette méthode et à vérifier dans quelles conditions elle pouvait être appliquée d'abord aux dosages de différents constituants de l'amidon puis à celui des grains entiers eux-mêmes.

A. Détermination du poids moléculaire des polysaccharides par l'acide dinitro-3,5-salicylique.

Cette méthode est basée sur la réduction de l'acide dinitro-3,5-salicylique (ADS)¹⁾ par le groupe aldéhydique libre des polysaccharides. Pour être valable, la méthode doit satisfaire à plusieurs exigences; elle doit:

1^o être spécifique du groupe aldéhydique. Ce n'est qu'alors que les valeurs fournies par un polysaccharide peuvent être rapportées à une substance de référence (maltose);

¹⁾ J. B. Sumner, J. Biol. Chem. 47, 5 (1921).

2° fournir une coloration d'une intensité indépendante du degré de ramification du polysaccharide étudié, de son état de dispersion et de la viscosité de ses solutions, et enfin

3° être suffisamment sensible pour qu'on puisse l'appliquer à des quantités relativement petites de polysaccharides de P. M. élevé, ayant environ un groupe réducteur sur mille restes d'oses.

La méthode ne sera évidemment utilisable que si le polysaccharide étudié a bien un groupe réducteur libre par molécule, ce qui n'est pas toujours le cas.

Depuis la première publication de *Meyer, Noelting & Bernfeld*¹⁾, deux nouveaux mémoires ont été consacrés à la détermination du P. M. de polysaccharides par l'acide dinitro-3,5-salicylique. *Lansky, Kooi & Schoch*²⁾ comparent cette méthode à celle à l'hypoiodite d'après *Willstätter-Schudel*³⁾, à celle au Br₂-KBr à pH 4,5—7,0, à celle au ferricyanure⁴⁾ et à celle au cuivre alcalin d'après *Fehling-Bertrand*⁵⁾. Ces auteurs remarquent fort justement que les deux derniers procédés, pas plus que celui à l'ADS, ne conduisent à une relation stœchiométrique entre l'oxydation du glucose et celle du maltose de sorte que toute extrapolation aux polysaccharides est peu sûre. Ils adoptent néanmoins la méthode à l'ADS parce qu'elle est très simple, et les résultats sont reproductibles. Elle fournit avec des amyloses de différents P. M. des valeurs relatives raisonnables à condition de comporter une durée de réaction de 30 à 60 minutes.

Plus récemment *Bell* et collaborateurs⁶⁾ constatent que si l'ADS peut être utilisé pour certains dérivés méthylés du fructose, de polyfructosanes ou de polyglucosanes, son emploi conduit à des degrés de polymérisation (D. P.) beaucoup trop faibles lorsqu'on détermine des P. M. des dextrines résultant d'une dégradation α -amylatique. Cependant, nous allons montrer que les objections de *Bell* et collaborateurs ne valent pas pour nos conditions de travail (notre solution de ADS est différente de la leur⁷⁾, et nous travaillons à 65° et non à 100°). Nous avons adopté cette température de 65°, car nous avons constaté — ce qui fut confirmé par *Schoch* — qu'à 100°, l'oxydation est trop poussée et conduit à des D. P. trop faibles.

1) *K. H. Meyer, G. Noelting & P. Bernfeld, Helv. 31, 100 (1948).*

2) *S. Lansky, M. Kooi & T. J. Schoch, Am. Soc. 71, 4066 (1948).*

3) *R. Willstätter & G. Schudel, B. 51, 780 (1918); Martin, Smith, Whistler & Harris, J. Research Nat. Bur. Stand. 27, 449 (1941); Kline & Acree, Bur. Stand. J. Research 5, 1063 (1930).*

4) *Gore & Steeke, Ind. Chem. Eng. Analyt. Ed. 7, 324 (1935); Farley & Hixon ibid. 13, 616 (1941).*

5) *Richardson, Higginbotham & Farrow, J. Textile Inst. 27, 131 (1936).*

6) *D. J. Bell, D. J. Manners & A. Palmer, Soc. 1952, 3760.*

7) *J. B. Sumner & Sisler, J. Biol. Chem. 62, 287 (1924—1925); 65, 393 (1925).*

I. *Influence de la pureté de l'acide dinitro-3,5-salicylique.* L'ADS utilisé doit être extrêmement pur; des traces d'impuretés peuvent provoquer une coloration très intense de la solution lors de la chauffe.

Nous avons vérifié ce point en traitant de manière identique deux échantillons de l'ADS, dont le premier n'avait subi qu'une seule recristallisation, tandis que le second avait été purifié par 6 recristallisations successives. En maintenant de 1 à 6 heures à 65° chacun des 2 échantillons dans les conditions habituelles (1 cm³ solution à 1,5 g/100 cm³ + 1 cm³ NaOH 6-n. + 2 cm³ H₂O), on constate que la couleur du premier augmente régulièrement, alors que celle du second reste parfaitement inchangée. Il est alors évident qu'en traitant un polysaccharide avec un réactif impur, on obtient une réaction beaucoup trop forte et donc des P. M. beaucoup trop faibles.

II. *Influence de certaines substances qui contaminent souvent les polysaccharides examinés.* Les produits soumis à l'action de l'ADS peuvent renfermer des traces de substances qui faussent le résultat. C'est ainsi que des amidons commerciaux contiennent des traces d'hydrogénosulfite ou de composés analogues, provenant d'un traitement au SO₂ qu'on leur fait généralement subir pour les désinfecter et les blanchir.

On peut éliminer ces réducteurs par extraction à l'eau tiède et nous avons trouvé que bien souvent, les produits ainsi traités accusent une «augmentation apparente» du P. M. de 10 à 30 %.

Une autre cause d'erreurs importantes provient de l'utilisation de méthanol impur pour le dégraissage ou le séchage de l'amidon. Ces impuretés forment avec les polysaccharides des composés d'addition¹⁾ qu'on ne peut pas décomposer même en les soumettant au vide poussé. Il faudrait ici encore laver les produits plusieurs fois par de l'eau avant de les sécher; or, un tel traitement ne peut malheureusement pas être appliqué aux constituants de l'amidon qui sont partiellement solubles dans l'eau. On évite ces inconvénients en utilisant du dioxanne à la place du méthanol; ce solvant, plus facile à purifier, n'a aucune action sur l'ADS.

III. *Influence du temps de chauffe.* Comme l'ont constaté *Schoch* et collaborateurs, le temps de chauffe préconisé par *Meyer, Noelting & Bernfeld* est insuffisant. Nous avons systématiquement étudié ce facteur lors de l'oxydation du maltose, de l'amylose, de l'amylopectine et des grains d'amidon entiers par l'ADS. Alors qu'avec le maltose et l'amylose un palier est atteint après une heure à 65° (fig. 1), l'oxydation de la totalité des groupes aldéhydiques n'est obtenue qu'après 4 heures avec l'amylopectine ou de grains entiers (fig. 2).

Nous avons donc adopté une durée de chauffe de 4½ heures, quel que soit le produit étudié, afin d'être sûrs que l'oxydation soit toujours complète.

Ensuite, nous avons comparé notre méthode à celle à l'hypoiodite, pour laquelle, sous certaines conditions, les valeurs de réduc-

¹⁾ R. W. Kerr & G. M. Severson, Am. Soc. 65, 1154 (1943).

tion sont proportionnelles au nombre des groupes aldéhydiques (des quantités équivalentes de glucose et de maltose donnant les mêmes valeurs). Ici encore nous avons légèrement modifié la méthode afin de pouvoir l'appliquer au dosage des groupes réducteurs contenus dans les grains d'amidon entiers.

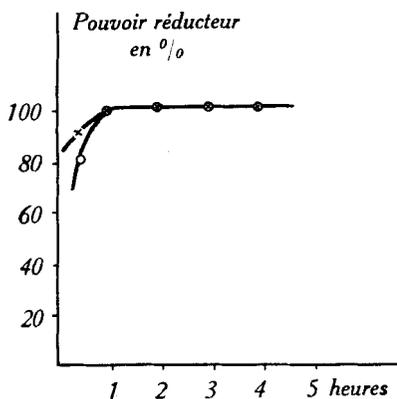


Fig. 1.

x Maltose
o Amylose

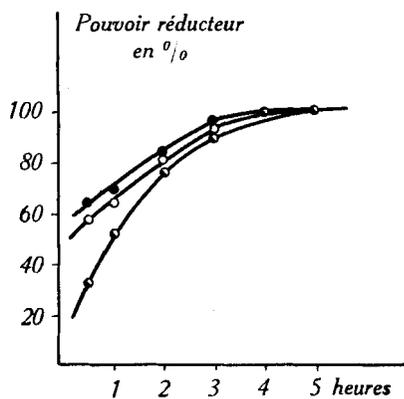


Fig. 2.

● Amylopectine ○ P. de terre en grains
◐ Riz en grains

B. Dosage direct des groupes réducteurs par la méthode de Willstätter-Schudel.

Quatre obstacles (qu'on peut éviter) limitent l'emploi de la méthode habituelle.

1° D'après *Schoch* et collaborateurs¹⁾, plus on augmente le pH de la solution lors de la réaction, et plus les oxydations secondaires (sur les groupes alcooliques voisins) deviennent importantes. Nous avons confirmé cette observation en opérant à des pH supérieurs à 10,5. Mais²⁾ à pH 10,2 – comme l'indiquent les courbes de la fig. 3 – l'oxydation du groupe aldéhydique est terminée en 40 minutes. La «suroxydation» (résultant de réactions beaucoup plus lentes que la première) se manifeste par une droite à peine inclinée: en effet, après 2 heures à pH 11, l'oxydation ne dépasse que de 2% de la valeur obtenue à 10,2. Il suffirait donc d'extrapoler cette droite au temps zéro pour distinguer l'oxydation des groupes aldéhydiques des réactions secondaires.

2° Il est possible que les résultats aberrants de *Schoch* et collaborateurs proviennent de la consommation de l'iode par des graisses encore présentes dans l'amidon. En effet, nous avons remarqué que, en prolongeant l'extraction de l'amidon au dioxanne jusqu'à 48 h.,

¹⁾ *S. Lansky, M. Kooi & T. J. Schoch, Am. Soc. 71, 4066 (1948).*

²⁾ *F. Auerbach & E. Bodländer, Z. angew. Ch. 36, 602 (1923).*

la consommation d'iode en solution neutre tend à disparaître. Cet effet varie d'ailleurs avec les différentes sortes d'amidon, celui du maïs étant le plus difficile à purifier complètement. Pour éviter cette extraction très longue, nous faisons réagir, sur un blanc, une même quantité d'iode sur une même quantité d'amidon, en solution neutre où l'oxydation des groupes aldéhydiques est nulle. La quantité d'iode consommée dans ces conditions est soustraite de celle consommée à pH 10,2, la différence étant attribuée à l'oxydation du polysaccharide.

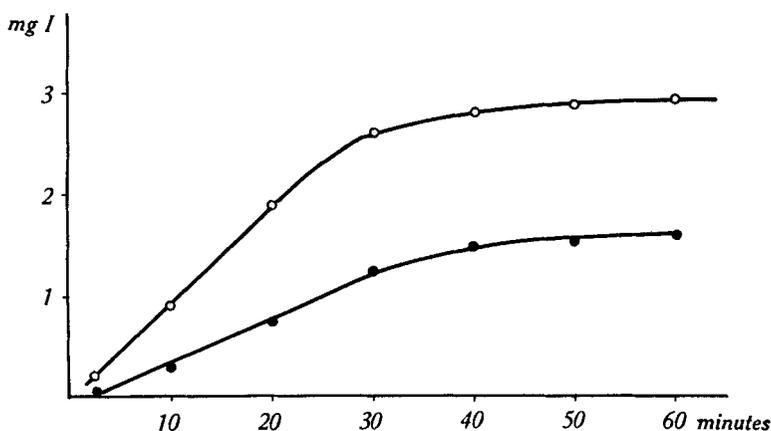


Fig. 3.

○ Riz en grains (Amidon)

● P. de terre en grains

3° Par suite de la forte adsorption de l'iode par l'amidon, on ne peut effectuer un titrage direct par le thiosulfate. Il faut en ajouter un excès et titrer en retour par l'iode après 10 minutes. Mais cet excès de thiosulfate demande l'abandon de l'acide sulfurique utilisé par *Willstätter & Schudel* et son remplacement par l'acide phosphorique n. qui, tamponné à un pH final de 3, n'a aucune influence sur le résultat du titrage.

4° Enfin comme dans le cas du dosage à l'ADS, il faut rigoureusement éviter l'emploi d'alcool ou d'acétone pour dégraisser les grains ou précipiter les fractions et remplacer ces solvants par le dioxanne.

C. Discussion des résultats.

Le tableau I rapporte les valeurs obtenues pour l'oxydation de différents polysaccharides par l'ADS et par l'hypoiodite.

On constate qu'il est possible de trouver des conditions dans lesquelles les deux méthodes conduisent à des résultats comparables et reproductibles, pour différents polysaccharides. Néanmoins, bien que le résultat obtenu par la méthode à l'hypoiodite soit pratiquement stœchiométrique pour le maltose, on n'est pas en droit d'affirmer que les résultats obtenus avec des polysaccharides soient exacts.

Tableau I.

Polysaccharides	A l'ADS.		A l'hypiodite	
	D. P.	P. M.	D. P.	P. M.
Pomme de terre native en grains . . .	1150	207000	1040	187200
Riz en grains	610	109600	530	95400
Waxy maïs en grains	930	167400	900	162000
Maïs commercial, en grains après ext. à l'eau chaude	700	126000	640	115000
Maïs commercial, en grains avant ext. à l'eau chaude	480	86400	450	81000
Amylose, fraction A, pomme de terre .	115	20700	—	—
Amylopectine de maïs	1000	180000	—	—

En effet, il a fallu choisir des conditions particulières (durée de chauffe, concentration, etc.), pour obtenir un rapport stœchiométrique entre l'iode consommé et la quantité de maltose; il y a tout lieu de croire que ce résultat est obtenu, non parce que sous ces conditions les groupes carbonyles sont oxydés à 100 % et les autres groupes (surtout les groupes carbinol) pas du tout, mais surtout parce qu'il y a compensation des deux erreurs: si cela est vrai pour le maltose, ce ne le sera plus, dans les mêmes conditions, pour des polysaccharides.

En effet, dans les deux méthodes décrites ci-dessus, le rapport entre le réactif oxydant et le nombre de groupes CHO à oxyder est maintenu à peu près constant, donc le rapport entre le réactif et le nombre des groupes hydroxyles augmente avec le P. M. du polysaccharide.

Notons par 1 l'efficacité d'une réaction complète (stœchiométrique) du réactif avec les groupes aldéhydiques: si la réaction n'est pas complète, il y aura $1 - \varepsilon_1$ équivalents consommés par les groupes aldéhydiques; en même temps, il peut y avoir une faible réaction avec les hydroxyles qui consomment ε_2 équivalents de réactif par groupe hydroxyle. Nous supposons naturellement:

$$\varepsilon_1, \varepsilon_2 \ll 1.$$

Soit M le P. M. vrai d'un holoside ayant un groupe CHO et a groupes COH par molécule. Le P. M. trouvé par le dosage est alors:

$$M' = M/(1 - \varepsilon_1 + a \varepsilon_2).$$

Nous avons standardisé la méthode par rapport au *maltose*: donc si $a = 7$, on aura $M' = M$ et par conséquent

$$1 - \varepsilon_1 + 7 \varepsilon_2 = 1, \text{ d'où: } \varepsilon_1 = 7 \varepsilon_2.$$

Pour fixer les idées, prenons par exemple $\varepsilon_1 = 1\% = 0,01$ et appliquons la méthode standardisée au *glucose* ($a = 4$). On aura:

$$M' = M/(1 - 10^{-2} + 4/7 \cdot 10^{-2}), \text{ d'où: } M' = M \cdot 1,0043.$$

L'erreur de 0,4 % sur le P. M. du glucose passera inaperçue.

Mais pour un holoside de degré de polymérisation D on aura $a = (3D + 1)$ et, en appelant D' le degré de polymérisation trouvé par le dosage décrit, on aura sensiblement

$$D' = D/[1 - \varepsilon_1 + \varepsilon_2(3D + 1)].$$

Preons comme exemple ε_1 resp. 1 % et 0,1 % et donc $\varepsilon_2 = 1,4$ % et 0,14 % resp.: on trouve les résultats suivants:

Tableau II.

D (<i>D.P. vrai</i>)	D' ($\varepsilon_1 = 0,01$)	D' ($\varepsilon_1 = 0,001$)
10	9,97	9,997
100	74	96
500	121	414
1000	189	700
2000	210	1080
5000	223	1590
10000	228	1890
30000	234	2170

On arrive ainsi à la conclusion que, même si $\varepsilon_1 = 0,1$ %, donc si le réactif employé n'attaque qu'un seul groupe hydroxyle sur 7000, l'erreur devient 50 % à $D = 1000$ et presque 100 % si $D = 2000$, et cela malgré le fait qu'en comparant glucose et maltose par la même méthode, l'erreur ne serait que 0,04 % c. à d. imperceptible.

Il résulte de ce qui précède que les D. P. ou P. M. indiqués dans le tableau I sont bien comparables, en ce sens que le D. P. des polysaccharides de la pomme de terre est certainement plus grand que celui provenant du riz et que leur rapport est d'env. 2 ou même plus grand, mais il est aléatoire d'attribuer aux valeurs des D. P. trouvés une signification absolue; au contraire, ce sont probablement des *limites inférieures*. Cette interprétation permet d'expliquer les désaccords persistants, entre les valeurs du D. P. obtenus par le titrage des groupes réducteurs et celles déduites de la mesure de la pression osmotique des dérivés acétylés¹⁾ ou de celle de la diffusion de la lumière²⁾. Ainsi p. ex. nous avons trouvé pour un glycogène un P. M. d'env. 5 millions³⁾ ou D. P. = 30000; avec la méthode de l'ADS on obtient 300000, donc D. P. = 1666. Cette différence s'explique quantitativement en admettant l'attaque par le réactif d'un seul groupe COH sur 6400.

¹⁾ A. L. Potter & W. Z. Hassid, Am. Soc. **70**, 375 (1948).

²⁾ L. P. Witnauer, M. D. Stern & F. R. Senti, Transact. of the Annual Assembly 1952 of the Am. Chem. Soc. p. 7.

³⁾ A. van der Wyk dans K. H. Meyer „Makromolekulare Chemie“, Leipzig, 1950, p. 468.

Le tableau des chiffres II suggère encore une autre conclusion. Considérant les valeurs successives de D' observées avec $\varepsilon_1 = 1\%$, on s'aperçoit qu'elles semblent s'approcher d'un palier. Cette allure est aussi celle des D' à $\varepsilon_1 = 0,1\%$ mais elle ne se manifeste que pour des valeurs plus grandes. Ainsi, on serait tenté de croire à une substance monodisperse si les P. M. de fractions, déterminés par une méthode comme celle à l'ADS, sont grands. Si on avait préparé 2 fractions dont les D' (observés) sont 1890 et 2170, on aurait affaire, dans le cas le plus favorable ($\varepsilon_1 = 0,1\%$), à deux fractions dont les P. M. vrais ne sont pas dans le rapport $1890:2170 = 1:1,15$, mais dans le rapport $10000:30000 = 1:3$; les vrais degrés de polymérisation ne différeraient pas de 15% mais de 300% . Dans des conditions moins favorables ($\varepsilon_1 = 1\%$ p. ex.) ce serait bien pire encore.

Enfin, il nous semble utile de remarquer que ces incertitudes sont inhérentes à toute méthode basée sur la détermination de groupes terminaux, donc sur une réaction supposée spécifique de ces groupes. Même si cette spécificité est très près de la perfection, les résultats restent quantitativement très mauvais dès que l'on a affaire à de grandes molécules n'ayant qu'un ou deux groupes terminaux pour plusieurs centaines au total.

Partie expérimentale.

I. Préparation de l'ADS.

On prépare l'ADS suivant la méthode décrite par Sumner¹⁾ et on le purifie par 6 recristallisations dans l'eau chaude. La cristallisation doit se faire par lent refroidissement dans un récipient calorifugé. Les solutions du produit pur sont jaune verdâtre, et cette couleur ne doit pas varier lorsqu'on les chauffe plusieurs heures à 65° dans des éprouvettes fermées.

II. Dosage de groupes réducteurs par l'ADS.

Solutions: a) NaOH 6-n.; b) ADS 1,5 g dans 100 cm^3 d'eau.

^{1°} *Etalonnage avec le maltose.* A une série de tubes contenant 2 cm^3 d'une solution à $0,1\text{ mg/cm}^3$ de maltose, on ajoute 1 cm^3 de a) et 1 cm^3 de b). On place les tubes dans un thermostat à 65° et les y laisse pendant des temps variant de 0,5 à 5 h. Après refroidissement on les dilue avec 20 cm^3 d'eau et compare au photomètre de Klett-Summerson, filtre vert, l'intensité de la couleur produite, à celle d'une série de «blancs» établis sans maltose et traités dans les mêmes conditions (les solutions de maltose étant remplacées par de l'eau distillée). Si les «blancs» varient, l'ADS est impur.

^{2°} *Dosage des polysaccharides.* Le dosage s'effectue comme en ^{1°} à cela près que le maltose est remplacé par 2 cm^3 d'une suspension dans l'eau chaude de polysaccharide, dont la quantité dépend du P. M. (100 mg d'amylose A_1 , 200 mg d'amylopectine ou de grains d'amidon entiers, etc.). Après refroidissement de cette suspension, on ajoute le NaOH comme ci-dessus. Pour certains polysaccharides les solutions ainsi obtenues sont légèrement troubles; il faudra les rajouter aux «blancs»: ceux-ci contiendront 1 cm^3 d'eau au lieu de la solution b) et ce n'est qu'après refroidissement qu'on rajoutera 1 cm^3 de b) et 19 cm^3 d'eau.

¹⁾ J. B. Sumner, J. Biol. Chem. **47**, 5 (1921).

III. Dosage de groupes réducteurs à l'hypiodite.

- Solutions: 1° Iode 0,02-n. dans KI
 2° Tampon pH 10,2: Na₂CO₃:NaHCO₃ 1:1
 3° H₃PO₄ n.
 4° Tampon pH 3: – 75 cm³ (2°) + 200 cm³ (3°)
 5° Na₂S₂O₃ 0,1-n.

Dans un erlenmeyer rôdé on pèse l'équivalent de 1 g d'amidon hydraté en grains préalablement dégraissés par du dioxanne, lavés plusieurs fois à l'eau, puis séchés au vide poussé à 45°. On ajoute 7,5 cm³ de 2°, puis 7,5 cm³ de 1° au moyen d'une microburette prolongée d'un capillaire et plongeant directement dans le liquide (pour éviter une volatilisation de l'iode). On bouche rapidement le récipient, le place dans une étuve obscure à 30° et soumet la suspension à une agitation magnétique. Au temps voulu, on acidifie la suspension par 20 cm³ de 3° et ajoute 1,5 cm³ de 5°. On laisse réagir 10 min. en agitant, centrifuge (20 min.) et titre sur une prise aliquote, l'excès de 5° par 1°. Les « blancs » sont traités dans les mêmes conditions, mais contiennent 7,5 cm³ d'eau au lieu du tampon 2°. On ajoute 20 cm³ de 4° (à la place de 3°), ce qui donne un même pH final de 3.

SUMMARY.

The determination of the mean degree of polymerization of polysaccharides with one reducing group by the action of 3,5-dinitrosalicylic acid has been restudied. In order to assure complete reduction the heating period of the reaction mixture has been prolonged to 4½ hours, especially for starch grains and for amylopectine. In spite of the reproductibility of the results of this rapid and simple method, they are only valid to a certain extent: the resulting degrees of polymerization can only be considered as an inferior limit, and the magnitude of the error increases with the real degree of polymerization.

Laboratoire de chimie organique de l'Université de Genève.

191. Über die Substitution von kerngebundenem Brom durch Chlor in aromatischen Verbindungen

von W. Voegtli¹⁾, H. Muhr und Paul Läger.

(21. VII. 54.)

Im Verlaufe von Studien über den Einfluss der p,p'-Halogen-substitution von Benzilsäureestern auf deren insektizide Wirksamkeit²⁾ stellten wir uns (W. V. & P. L.) vor 4 Jahren die als Ausgangsstoffe für die Benzilsäureumlagerung dienenden p,p'-halogensubstituierten Benzile nach einem von Walton³⁾ für das p,p'-Dichlorbenzil (III, X = Cl) angegebenen Wege dar:

¹⁾ Jetzige Adresse: Searle & Co., Chicago 80, Ill. (USA.).

²⁾ Publikation in Vorbereitung.

³⁾ W. L. Walton, Am. Soc. **69**, 1544 (1947).