

187. Recherches dans la série des cyclitols XXXVI.
Oxydations biochimiques de cyclohexane-tétrols et -triols
et d'un méthoxy-cyclohexanediol

par **P. Barbezat, D. Raymond et Th. Posternak**

(4 VIII 67)

Dans des travaux antérieurs [1] nous avons montré qu'*Acetobacter suboxydans*, souche KLUYVER-DE LEEUW, s'attaque indistinctement à tous les hydroxyles axiaux d'un cyclohexane-polyol avec formation des cétooses correspondants. Dans certains cas, sans caractériser davantage les produits d'oxydation, nous nous étions basés uniquement sur la consommation totale d'at. d'oxygène qui correspondait au nombre total d'hydroxyles axiaux de la forme chaise préférentielle du substrat. Pour combler cette lacune, nous avons repris l'étude de l'oxydation biochimique des cyclohexanetétrols-1,2,4/3 (III et IV), -1,2,3/4 (XIII et XV) et du cyclohexanetriol-1,2/3 (XXI et XXIV).

Les formes racémiques des deux tétrols et du triol consomment, par action poussée des bactéries, 1 at. O par mol. de substrat, mais dans les trois cas celui des antipodes (III, XV, XXI) qui possède en *méta* par rapport à son hydroxyle axial un hydroxyle équatorial convenablement situé (deuxième règle de MAGASANIK & CHARGAFF [2]) est oxydé plus rapidement; si l'on arrête l'action des bactéries au moment où la consommation d'oxygène atteint 50%, on peut isoler l'autre antipode (IV, XIII, XXIV) sous forme de substrat résiduel [3] [4] [5].

Nous avons constaté que le produit primaire α (V) d'oxydation biochimique du cyclohexanetétrol-2,3/1,4 (I) subit, sous l'action d'une épimérase présente dans les bactéries, une conversion en une autre trihydroxycétone β (VII) par l'intermédiaire probable de la forme énolique VI [5]. L'oxydation complète ou à 50% du (\pm)-cyclohexanetétrol-1,2,4/3 (III + IV) a fourni de même deux cétooses séparables par chromatographie sur papier, p.ex. dans le système *n*-butanol ac. acétique-eau (4:1:5 en vol.). Leurs Rf (0,28 et 0,44) sont identiques à ceux des substances VII et V resp. L'oxydation à 50% affecte essentiellement, comme indiqué plus haut, le (+)-cyclohexanetétrol-1,3,4/2 (III). Une étude en fonction du temps montre que le cétoose de Rf 0,28 est le produit primaire d'oxydation qui apparaît avant la substance de Rf 0,44. Après oxydation complète du (\pm)-tétrol III + IV, on obtient, par hydrogénation catalytique ou au moyen de l'amalgame de sodium du composé de Rf 0,28, du (\pm)-cyclohexanetétrol-1,2,4/3 et du (\pm)-cyclohexanetétrol-1,3/2,4 (XI + XII), ce qui indique la présence primitive du mélange racémique des cétooses énantiomères VII + VIII dans la substance de Rf 0,28. Comme il fallait s'y attendre, l'épimérase transforme le composé β (VII) en composé α (V) de Rf 0,44. Ce dernier nous a fourni par hydrogénation catalytique du (-)-cyclohexanetétrol-1,2,3/4 (XIII).

L'oxydation bactérienne du (-)-cyclohexanetétrol-1,2,4/3 (IV) ne fournit qu'un seul cétoose VIII de Rf 0,28: ce dernier n'est donc pas un substrat pour l'épimérase. Par hydrogénation il fournit, à côté du tétrol de départ, du (+)-cyclohexanetétrol-2,4/1,3 (XII).

L'équilibre de la réaction de l'épimérase comporte env. 60% de cétose VII et 40% de cétose V. Après l'oxydation complète du tétrol III + IV, on a donc, une fois l'équilibre atteint: dans la bande β , 1 mol. de VIII et 0,6 mol. de VII; dans la bande α , 0,4 mol. de V. Les rotations des osazones cristallisées obtenues, après demi-oxydation et oxydation complète, à partir de α et β sont en accord avec ces considérations (voir partie expérimentale).

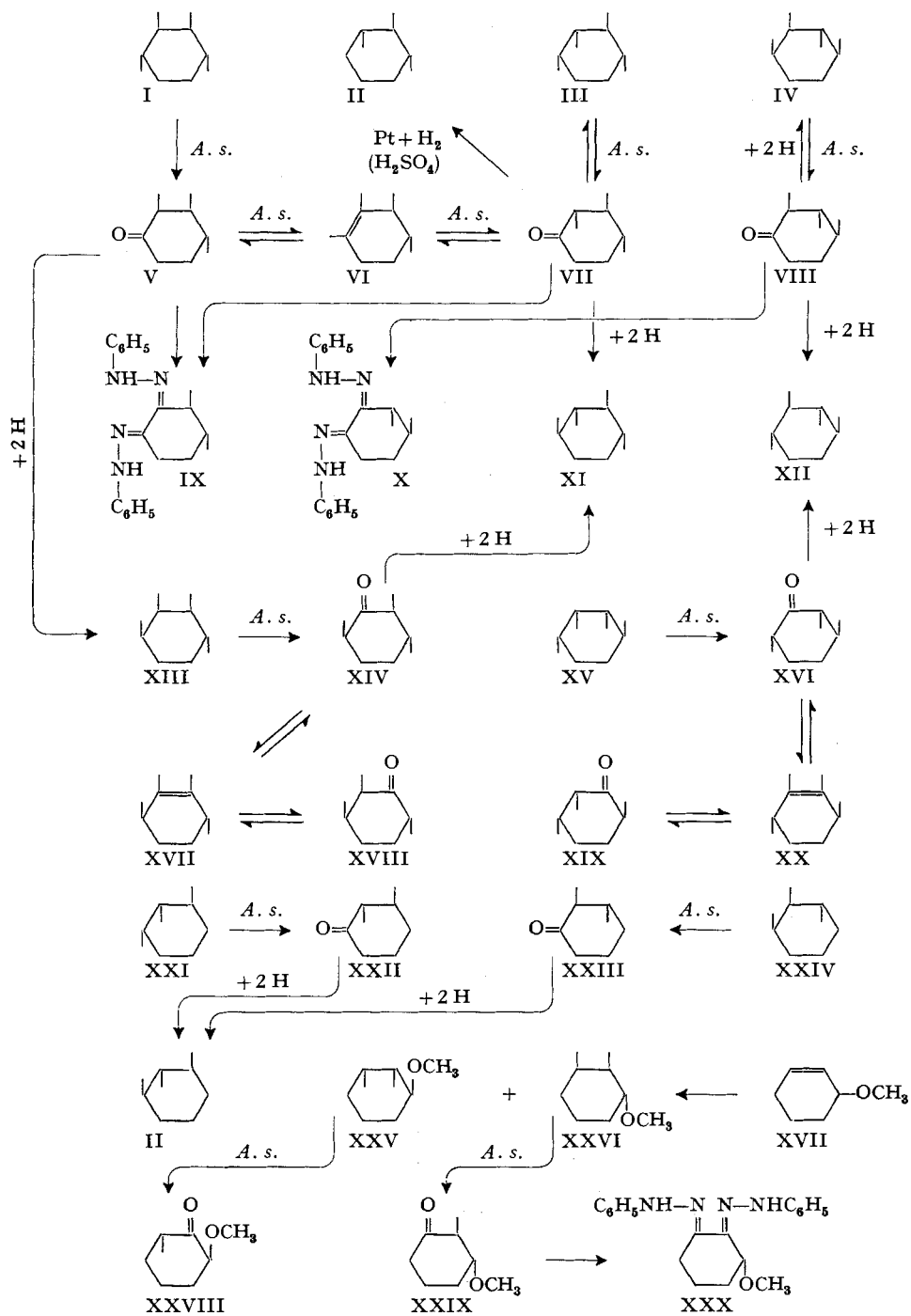
L'oxydation bactérienne du (+)-cyclohexanetétrol-2,3,4/1 (XV) ou celle à 50% de la forme racémique XIII + XV donne naissance de nouveau à deux cétooses γ et δ de Rf 0,50 et 0,72 resp. dans le système acétone-eau (85:15 en vol.). C'est le cétose γ qui représente le produit primaire d'oxydation. Par hydrogénation, on obtient à ses dépens essentiellement du (+)-tétrol-2,3,4/1 XV et du (+)-tétrol-2,4/1,3 XII. Lorsque le produit de départ de l'oxydation est le (-)-cyclohexanetétrol-1,2,3/4 (XIII), on observe de nouveau deux cétooses γ et δ ; l'hydrogénation de γ , qui est le produit primaire, fournit, à côté du tétrol de départ, du (-)-cyclohexanetétrol-1,3/2,4 (XI). Les cétooses γ formés comme produits primaires répondent donc aux formules XVI et XIV resp. Quant aux cétooses δ de Rf 0,72, ils ne sont formés qu'en faible quantité; par hydrogénation ils ne nous ont fourni que du cyclohexanetétrol-1,2,3/4 partiellement racémisé. N'ayant pu saisir le deuxième produit d'hydrogénation prévu par la théorie, nous ne pouvons attribuer à ces cétooses δ une formule de structure définitive. La forme énolique VI est toutefois exclue comme produit intermédiaire, sinon on aurait dû s'attendre à la formation des cétooses α et β . Des structures à envisager nous paraissent être XVIII et XIX; elles prendraient naissance par l'intermédiaire des formes énoliques XVII et XX.

Rappelons que c'est l'antipode dextrogyre XXI du cyclohexanetriol-1,2/3 qui est oxydé le plus rapidement par les bactéries [3]. Après oxydation complète du racémique, les dihydroxycétones formées fournissent par hydrogénation un mélange de (\pm)-cyclohexanetriol-1,2/3 et de cyclohexanetriol-1,3/2 (II). Ceci indique que les deux antipodes XXI et XXIV ont fourni resp. les cétones XXII et XXIII.

On voit que dans le cas des (\pm)-cyclohexanetétrols-1,2,4/3 et -1,2,3/4, et du (\pm)-cyclohexanetriol-1,2/3 chacun des deux antipodes est attaqué à l'emplacement de l'hydroxyle axial de la forme chaise préférentielle, par action, sans doute, des enzymes particulières qui oxydent entre autres le *méso*-inositol [6]. La représentation que ces mêmes enzymes oxydent le triol-1,2/3 est encore confirmée par le fait que la souche *A. sub.* HL I, qui ne contient pas ces ferments, n'attaque ce triol que beaucoup plus lentement que la souche KLUYVER-DE LEEUW. Rappelons que le triol-1,2,3/0 est oxydé par contre par les enzymes des cyclitols inférieurs particulières ou solubles, ces derniers à base de NAD ou de NADP, présents dans les deux souches [6]; après action des cellules intactes en milieu acide, on a isolé de la dihydroxy-2,3-cyclohexanone [3] [6].

Nous avons étudié d'autre part l'oxydation bactérienne d'un dérivé de triol, le (\pm)-O-méthyl-3-cyclohexanetriol-1,2/3 (XXV + XXVI). Il a été préparé par oxydation osmique du méthoxy-3-cyclohexène (XXVII)¹⁾ et fournit par déméthylation par l'ac. bromhydrique du (\pm)-cyclohexanetriol-1,2/3, ce qui démontre sa con-

¹⁾ Cette méthode est plus simple et fournit de meilleurs rendements qu'un autre procédé décrit antérieurement [7].



A. s. = *Acetobacter suboxydans*

figuration. Ce méthoxy-diol est oxydé par les deux souches de bactéries avec consommation finale de 1 at. O par mol. de substrat. Ici encore, l'un des antipodes est oxydé plus rapidement, et le substrat résiduel fournit par déméthylation du (+)-cyclohexanetriol-2,3/1 (XXI): c'est donc ici le dérivé de l'antipode lévogyre qui est attaqué plus facilement, alors que dans le cas du triol libre c'est la forme dextrogyre qui est oxydée préférentiellement. L'oxydation du méthoxy-diol est due très probablement aux déshydrogénases particulières des cyclitols inférieurs de stéréospécificité *R*, puisque le substrat est attaqué à pH 6,0 par la souche HL I dépourvue de déshydrogénase des cyclitols supérieurs [6]. Le cétose dérivé du méthoxy-diol XXVI répondrait alors à la formule XXIX; il fournit une osazone cristallisée (XXX). Le produit d'oxydation de l'énantiomère XXV aurait par contre la structure XXVIII; dans les conditions employées, il ne fournit pas d'osazone cristallisée énantiomère de la précédente: après oxydation complète du méthoxy-diol racémique, on n'obtient donc que le produit cristallisé XXX.

Les micro-analyses ont été effectuées par M. le Dr K. EDER. Ecole de Chimie, Université de Genève.

Partie expérimentale

Microorganismes. Pour la conservation par repiquage de la souche *A. sub.* KLUYVER-DE LEEUW, les cultures et les récoltes des cellules, voir nos indications antérieures [1] [4] [5].

Oxydations bactériennes. Elles ont été effectuées à 35–38° dans une atmosphère de O₂ médical, dans une poire à hydrogéner reliée à une burette à gaz. Sauf indications contraires, les autres conditions étaient identiques à celles décrites précédemment [1] [5].

Chromatographies sur papier. Elles ont été effectuées généralement sur papier WHATMAN 1, dans les systèmes suivants: 1) *n*-butanol-ac. acétique-eau (4:1:5 en vol.) en chromatographie descendante durant 38–40 h, à température ordinaire; 2) acétone-eau (85:15 en vol.) à 4°, en chromatographie ascendante, durant 10–15 h.

Pour séparer des quantités plus élevées de produit d'oxydation, on les porte en bandes sur des feuilles de papier WHATMAN 1 à raison de 4 feuilles pour 100 mg de substrat primitif, et procède comme indiqué antérieurement [5]. Les polyhydroxycétones formées se révèlent à froid par pulvérisation du réactif de TOLLENS [8]. Les solutions obtenues par élution à l'eau des bandes sont concentrées à un volume convenable par distillation dans le vide à basse température, ou mieux encore, par séjour dans un dessiccateur à vide sur H₂SO₄ à +4°.

Osazones. Les osazones des trihydroxycétones formées à partir du cyclohexanétrol-1,2,4/3 ont été préparées, dans les conditions indiquées antérieurement [5], soit à partir de la solution du produit brut d'oxydation, soit à partir des trihydroxycétooses séparés par chromatographie sur papier.

Hydrogénations. – a) *Catalytiques.* Elles ont été effectuées à température ordinaire, en solution aqueuse, à 2–5%, soit en milieu neutre, soit dans H₂SO₄ 1 N en présence de 0,1–0,2 partie d'oxyde de platine pour 1 partie de substrat.

b) *Par l'amalgame de sodium.* 8 ml d'une solution aqueuse à 2–3% du cétoose sont additionnés d'abord de 0,7 ml H₂SO₄ 2 N, puis de 0,5 g d'amalgame de sodium à 5%. On agite à la main dans un poudrier de verre épais jusqu'à consommation complète de l'amalgame. Cette opération est répétée 15–20 fois jusqu'à absence de réduction de la liqueur de FEHLING. Il est important que le milieu reste continuellement acide. On alcalinise ensuite légèrement au moyen d'hydroxyde de baryum et essore sur charbon les sels de baryum, puis on fait passer le filtrat sur une colonne de 100 g d'Amberlite IR 50 et évapore à sec. Le résidu est ensuite séché plusieurs heures dans le vide sur P₂O₅ à 60°.

Benzoylations. Les produits d'hydrogénation des cétooses ont été caractérisés généralement sous forme de dérivés benzoylés. Les *tétrools* sont suspendus dans 7 parties de chlorure de benzoyle en présence d'un peu de chlorure de zinc anhydre. On élève la température progressivement jusqu'à

130° (durée totale 45 min). Après refroidissement, on jette dans l'eau glacée. Les *triols* sont dissous dans 6 parties de pyridine anhydre; on ajoute goutte à goutte à 0°, en agitant continuellement, 5 parties de chlorure de benzoyle. Après un séjour de 15 h à température ordinaire, on jette dans l'eau glacée. Les produits bruts, repris éventuellement par du chlorure de méthylène, sont lavés à la soude caustique et à l'ac. chlorhydrique dilués, puis à l'eau, et soigneusement desséchés après évaporation du solvant.

Oxydations du cyclohexanététrol-1,2,4/3 (III et IV). – (\pm)-Cyclohexanététrol-1,2,4/3. 400 mg de (\pm)-cyclohexanététrol-1,2,4/3 dissous dans 9 ml de tampon phosphate m/15, de pH 6,0, sont traités à 38° par 4 ml d'une suspension de bactéries provenant de 1 l de milieu de culture [5]. Consommé en 6 h 1,1 at. O par mol. de substrat. On sépare par chromatographie sur papier (butanol – ac. acétique – eau 4:1:5) les deux cétooses β (Rf 0,28) et α (Rf 0,44) dont les solutions aqueuses, obtenues par élution, sont soumises à l'hydrogénation catalytique. La solution de β consomme 2,3 fois plus d'hydrogène que celle de α . Les produits d'hydrogénation sont ensuite convertis en dérivés benzoylés.

Les dérivés obtenus à partir du *cétoose* β sont extraits à l'éther anhydre; l'insoluble est dissous dans du chlorure de méthylène. La solution étherée, lavée au carbonate de sodium, puis à l'eau, et séchée sur sulfate de sodium, est évaporée à sec. Le résidu (136 mg) présente, après recristallisation dans l'alcool, F. 134–135°, identique au F. du mélange avec le (\pm)-*tétra-O-benzoyl-cyclohexanététrol-1,2,4/3*. La solution dans le chlorure de méthylène dépose, après concentration à 0,1 ml suivie d'addition d'éther de pétrole, 76 mg de cristaux optiquement inactifs; F. après recristallisation dans l'ac. acétique glacial 256–258°, identique au F. du mélange avec le (\pm)-*tétra-O-benzoyl-cyclohexanététrol-1,3/2,4*.

Les dérivés benzoylés, obtenus à partir du *cétoose* α , sont entièrement solubles dans l'éther. Après évaporation à sec et reprise par un peu de méthanol, on obtient 40 mg de cristaux (aiguilles); après recristallisation dans l'alcool absolu: $[\alpha]_D^{23} = -88,8^\circ \pm 8^\circ$ ($c = 0,25\%$ dans CHCl_3); F. 134–136°, de même que le F. du mélange avec le *tétra-O-benzoyl-(-)-cyclohexanététrol-1,2,3/4* (dérivé de XIII).

Lors d'une autre expérience, la solution de *cétoose* β avait été soumise à l'hydrogénation catalytique dans H_2SO_4 1N, ce qui permet le remplacement du carbonyle par un méthylène. Après élimination de H_2SO_4 par la quantité strictement nécessaire d'hydroxyde de baryum, on évapore à sec et extrait à chaud à l'acétate d'éthyle. Par évaporation lente, on obtient des aiguilles qui fondent à 100–102° de même que leur mélange avec du *cyclohexanetriol-1,3/2 (II)*. – Après un traitement analogue de la solution du *cétoose* α , on décèle par chromatographie sur papier un produit de même Rf que les *cyclohexanetriols-1,2/3* ou *1,3/2*.

(–)-Cyclohexanététrol-1,2,4/3 (IV). 140 mg de (–)-cyclohexanététrol-1,2,4/3, dissous dans 2 ml de tampon phosphate m/15 de pH 6,0, sont oxydés à 38° par 3 ml d'une suspension de bactéries provenant de 800 ml de milieu de culture. Consommé, au bout de 18 h, 1,07 at. O par mol. de substrat. Par chromatographie sur papier, on ne décèle qu'une seule bande de *cétoose* de Rf 0,28 dans le système butanol-ac. acétique-eau. Après traitement par NaHg et déionisation suivis de benzylation, les dérivés benzoylés sont traités par l'éther anhydre. L'insoluble (20 mg) fournit, après recristallisation dans l'ac. acétique, des aiguilles de F. 244–245°, $[\alpha]_D^{22} = +26,5^\circ \pm 3,1^\circ$ ($c = 0,64\%$ dans CHCl_3). Pour caractériser davantage le produit, on le mélange avec un poids égal de *tétra-O-benzoyl-(-)-cyclohexanététrol-1,3/2,4* et on recristallise dans l'ac. acétique glacial, ce qui fournit du (\pm)-*tétra-O-benzoyl-cyclohexanététrol-1,3/2,4* de F. et F. de mélange 256–258° [4].

Après hydrogénation catalytique en milieu neutre du produit d'oxydation, on peut isoler par cristallisation directe, du (–)-*cyclohexanététrol-1,2,4/3* de F. 158–160°. Le résidu des eaux-mères méthanoliques a fourni, après benzylation, une petite quantité de *tétra-O-benzoyl-(+)-cyclohexanététrol-2,4/1,3*.

Osazones. Après oxydation biochimique du (\pm)-cyclohexanététrol-1,2,4/3, les solutions convenablement concentrées des produits bruts ou des *cétooses* α et β séparés par chromatographie sur papier, ont fourni des osazones; elles sont purifiées par extraction au moyen de benzène froid, suivie de recristallisation dans le même solvant. Le tableau suivant indique leurs propriétés.

On a indiqué [5] pour l'osazone IX obtenue par oxydation du cyclohexanététrol-2,3/1,4: F. 202–204°, $[\alpha]_D = -228^\circ \pm 6^\circ$ (pyridine-alcool 1:1 en vol.). Le spectre IR. est identique à celui des osazones obtenues dans le présent travail. Les rotations de ces dernières s'expliquent par les considérations exposées dans la partie théorique.

Osazones obtenues après oxydation biochimique des tétrols III + IV

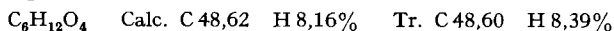
At. O cons. par mol. de substrat	produit d'oxydation employé	Propriétés des osazones				
		F.	$[\alpha]_D$	% trouvé ^{c)} C H N		
0,58	produit brut	202-204°	- 185,5° ± 4,2° (<i>c</i> = 0,47%) ^{a)} + 395,4° ± 4,5° (<i>c</i> = 0,44%) ^{b)}	66,65	6,17	17,37
1,4	produit brut	183-185°	+ 12,5° ± 6,4° (<i>c</i> = 0,31%) ^{a)} - 17,9° ± 4,4° (<i>c</i> = 0,44%) ^{b)}	66,60	6,18	17,20
1,2	cétose α	196°	- 211,2° ± 12,5° (<i>c</i> = 0,16%) ^{a)} + 435° ± 17° (<i>c</i> = 0,12%) ^{b)}	-	-	-
	cétose β	182-184°	+ 56,3° ± 18,1° <i>c</i> = 0,11%) ^{a)}	-	-	-

a) solvant: pyridine-alcool (1:1 en vol.)
 b) solvant: CHCl₃
 c) C₁₈H₂₀O₂N₄ Calc. C 66,66 H 6,17 N 17,28%

Formation en fonction du temps des cétooses α et β . Une solution à 3% de (\pm)-cyclohexanététrol-1,2,4/3 dans du tampon phosphate m/15 de pH 6,0 est agitée en éprouvette ouverte en présence de bactéries. De temps à autre, des échantillons de liquide sont prélevés et analysés par chromatographie sur papier dans le système acétone-eau (85:15 en vol.), où les Rf sont les suivants: cétose β 0,46; cétose α 0,72; tétrol de départ 0,31. Les deux premières substances se révèlent à froid par le réactif de TOLLENS. Au bout de 10 min on constate déjà la formation de β ; α commence à apparaître après 20 min. Au bout de 16 h le tétrol a complètement disparu; on observe une forte tache de β et une tache plus faible de α . Si l'expérience est faite avec du (-)-tétrol-1,2,4/3, on n'observe que la formation de β .

Oxydations du cyclohexanététrol-1,2,3/4 (XIII et XV). - (\pm)-Cyclohexanététrol-1,2,3/4. 800 mg de tétrol racémique dissous dans 16 ml de tampon phosphate m/15 de pH 6,0 sont traités par 10 ml d'une suspension bactérienne provenant de 2,2 l de milieu de culture. Consommé en 2¹/₄ h, à 38°: 0,58 at. O par mol. de substrat. Par chromatographie sur papier, dans le système acétone-eau (85:15 en vol.), on sépare le (-)-tétrol résiduel de F. 154-155°, $[\alpha]_D^{20} = -28,1^\circ \pm 1,8^\circ$ (*c* = 1,1% dans l'eau), ainsi que les deux cétooses γ et δ . Ces derniers sont hydrogénés en solution aqueuse neutre en présence de PtO₂; les consommations d'hydrogène de γ et δ sont dans le rapport de 3,4 à 1.

A partir de la fraction γ , on isole ensuite, par cristallisation directe, 57 mg de (+)-cyclohexane-tétrol-2,3,4/1 (XV). F. après recristallisation dans l'alcool: 158-159°; $[\alpha]_D^{20} = +37,5^\circ \pm 1,9^\circ$ (*c* = 1,04% dans H₂O).



Par recristallisation dans l'alcool du mélange à parties égales avec du (-)-cyclohexanététrol-1,2,3/4, on obtient du (\pm)-tétrol-1,2,3/4 de F. et F. de mélange 155-156°.

Les eaux-mères du (+)-tétrol fournissent, après benzylation, du tétra-O-benzoyl-(+)-cyclohexanététrol-2,4/1,3, peu soluble dans l'éther (10 mg). F. (après recristallisation dans l'ac. acétique glacial) 244-246°; $[\alpha]_D^{20} = +21,2^\circ \pm 6^\circ$ (*c* = 0,33% dans CHCl₃). Indiqué [5] pour la forme lévogyre: F. 244-246°; $[\alpha]_D = -26,3^\circ \pm 2,1^\circ$.

Nous n'avons pu retirer de la fraction δ , après hydrogénation, qu'une petite quantité de cyclohexanétrol-1, 2, 3/4 racémique, accompagné de sa forme dextrogyre.

(-)-Cyclohexanétrol-1, 2, 3/4 (XIII). 220 mg de (-)-cyclohexanétrol-1, 2, 3/4 ($[\alpha]_D = -27,6^\circ \pm 1,7^\circ$) dissous dans 4 ml de tampon phosphate M/15, de pH 6,0, sont oxydés par 5 ml de bactéries provenant de 900 ml de milieu de culture. Consommé à 38° durant $10\frac{1}{2}$ h: 0,9 at. O par mol. de substrat. Après hydrogénation catalytique suivie de benzylation, on obtient 39 mg de tétra-O-benzoyl-(-)-cyclohexanétrol-1, 3/2, 4 (XI) insoluble dans l'éther. F. après recristallisation dans l'ac. acétique glacial: $243-245^\circ$; $[\alpha]_D^{25} = -17,7^\circ \pm 1,7^\circ$ ($c = 1,13\%$ dans CHCl_3).

Formation en fonction du temps des cétoles γ et δ . Cette formation a été étudiée (dans les conditions indiquées plus haut pour les substances α et β) à partir du (+)- et du (-)-cyclohexanétrol-1, 2, 3/4. Aux dépens des deux tétrols, il se forme deux taches réduisant à froid le réactif de TOLLENS: substance γ de Rf 0,50; substance δ de Rf 0,72; le tétrol de départ a un Rf de 0,31. La tache γ apparaît la première: dans les conditions employées, elle est visible après 15 min dans le cas du tétrol dextrogyre, et après 60 min. dans celui du tétrol lévogyre.

Oxydations du (\pm)-cyclohexanetriol-1, 2/3 (XXI et XXIV). – Préparation²). 4,8 g de cyclohexénol-3 [11] sont traités dans 60 ml d'eau par 3,09 g de chlorate d'argent en présence de 22 mg de OsO_4 . Au bout de 2 jours, on ajoute encore 49 mg de OsO_4 . Après une durée d'agitation totale de 7 jours (à l'obscurité), la solution qui ne contient plus d'ions Ag^+ est évaporée à sec. Par recristallisation dans l'acétate d'éthyle, on obtient 3,6 g de (\pm)-triol-1, 2/3, qui est encore purifié par l'intermédiaire de son dérivé tribenzoylé de F. 182° , peu soluble dans l'alcool. F. du triol: $123-124^\circ$.

Le dérivé tridinitro-3, 5-benzoylé, préparé de la manière habituelle au moyen du chlorure d'acide dans la pyridine, fond après recristallisation dans l'alcool à $245-247^\circ$ (déc.).

$\text{C}_{27}\text{H}_{18}\text{O}_{18}\text{N}_6$ Calc. C 45,37 H 2,52 N 11,77% Tr. C 45,30 H 2,59 N 11,48%

Oxydation. 300 mg de (\pm)-triol-1, 2/3, dissous dans 5 ml de tampon phosphate M/15 de pH 6,0, sont traités par 4 ml d'une suspension de bactéries provenant de 600 ml de milieu de culture. Consommé en $3\frac{1}{4}$ h à 38° : 1,0 at. O par mol. de substrat. Après hydrogénation catalytique suivie de benzylation, on fractionne les dérivés benzoylés (0,9 g) par traitement avec 10 ml d'alcool absolu à $35-40^\circ$. La partie insoluble (0,41 g) fournit, après recristallisation dans l'ac. acétique glacial, du tri-O-benzoyl-(\pm)-cyclohexanetriol-1, 2/3 de F. $181-182^\circ$. A partir de la fraction soluble, on isole finalement après cristallisations fractionnées dans l'alcool, 16 mg de tri-O-benzoyl-cyclohexanetriol-1, 3/2 de F. et F. de mélange 139° ; aucune des fractions intermédiaires n'a montré d'activité optique. – Des résultats analogues ont été obtenus après hydrogénation au moyen de l'amalgame de sodium.

Oxydations du (\pm)-O-méthyl-3-cyclohexanetriol-1, 2/3 (XXV et XXVI). – Préparation³). Une solution de 8 g de méthoxy-1-cyclohexène-2 [10] et de 4,5 g de chlorate d'argent dans 100 ml de H_2O est agitée à l'abri de la lumière. En l'espace de 72 h, on ajoute par portions de 25 mg en tout 200 mg de OsO_4 . Après filtration, on concentre dans le vide à 60 ml. La solution contient des substances réductrices qui sont éliminées sous forme de dinitro-2, 4-phénylhydrazones. Dans ce but, on ajoute un mélange de 5 g de dinitro-2, 4-phénylhydrazine, 37,5 ml de H_2O , 125 ml d'alcool absolu et 37,5 ml de H_2SO_4 conc. Après un séjour de 3 jours à l'obscurité, on filtre et chasse l'alcool par distillation dans le vide. La solution, dont le pH doit être inférieur à 1, est épuisée au chlorure de méthylène par extraction continue durant 40 h. Après dessiccation sur K_2CO_3 solide et élimination du solvant organique, on fractionne à 3 reprises dans le vide: on obtient finalement 4,5 g de méthoxydiol- de Eb. $115-115,5^\circ/8$ Torr. Le produit se prend en masse à 5° ; il est encore purifié par étalement sur une assiette poreuse à $+4^\circ$.

$\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_3$ Calc. C 57,53 H 9,58 OCH_3 21,23% Tr. C 57,85 H 9,52 OCH_3 21,36%

Le dérivé bis-dinitro-3, 5-benzoylé a été préparé par chauffe à reflux durant 10 h de 100 mg de méthoxy-di-ol avec 650 mg de chlorure de dinitro-3, 5-benzoylé dans 3,0 ml de benzène anhydre.

²) Cette méthode est plus simple et fournit de meilleurs rendements que celles indiquées antérieurement [9] [10].

³) Cette méthode est plus simple et fournit de meilleurs rendements que celle [7] indiquée précédemment.

Après évaporation et reprise par l'eau glacée, le précipité formé est lavé avec HCl et NaOH, puis séché (346 mg). Après recristallisation dans un mélange d'acétone et d'alcool absolu (1:5 en vol.), F. 132°. $C_{21}H_{18}O_{13}N_4$ Calc. N 10,49 OCH_3 5,80% Tr. N 10,50 OCH_3 5,70%

Le méthoxy-di-ol a fourni, par déméthylation au moyen de HBr [9] du (\pm)-*cyclohexanetriol-1,2/3*, caractérisé par son dérivé tribenzoylé de F. et F. de mélange 182°.

Oxydation partielle. 700 mg de (\pm)-O-méthyl-3-cyclohexanetriol-1,2/3, dissous dans 6 ml de tampon phosphate M/15 de pH 6,0, sont traités par 17 ml de suspension de bactéries provenant de 2,1 l de milieu de culture. Consommé à 38° en 3 h 0,55 at. O. par mol. de substrat. La solution est concentrée dans le vide à 5 ml; on ajoute en deux portions à 2 jours d'intervalle 0,8 ml de phénylhydrazine dissous dans 2 vol. d'ac. acétique à 50% et abandonne 6 jours à l'obscurité. L'*osazone* séparée (552 mg) fond après recristallisation dans l'alcool à 160–162°; $[\alpha]_D^{20} = +407,7 \pm 1,9^\circ$ ($c = 1,03\%$ dans pyridine-alcool 1:1); $[\alpha]_D^{20} = +374,7 \pm 1,8^\circ$ (rotation initiale; $c = 1,11\%$ dans $CHCl_3$).

$C_{19}H_{22}ON_4$ Calc. C 70,80 H 6,83 N 17,39% Tr. C 70,98 H 6,79 N 17,40%

Les eaux-mères de l'*osazone* sont agitées avec 2 ml de benzaldéhyde; après filtration, on concentre à $1/3$ dans le vide et extrait de façon continue durant 6 h au chlorure de méthylène. Le résidu de l'extrait est fractionné dans un tube à boules. Obtenu: 0,213 g de Eb. 120°/10–12 Torr; $[\alpha]_D^{24} = +37,6 \pm 0,6^\circ$ ($c = 3,0\%$ dans H_2O). Le produit (105 mg) est déméthylé et benzoylé; le dérivé benzoylé (248 mg) fournit une fraction (65 mg) peu soluble dans 12 ml d'alcool bouillant, qui représente du *tri-O-benzoyl-(\pm)-cyclohexanetriol-1,2/3* de F. et F. de mélange 181–183°. Par cristallisations fractionnées de la fraction soluble, on isole 45 mg de *tri-O-benzoyl-(+)\-cyclohexanetriol-2,3/1* de F. et F. de mélange 142–143° et $[\alpha]_D^{20} = +185 \pm 1,8^\circ$ ($c = 1,06\%$ dans $CHCl_3$). Indiqué F. 142–143°, $[\alpha]_D = +192,5 \pm 1,0^\circ$ [3].

Oxydation complète. 300 mg de (\pm)-méthoxy-di-ol, dissous dans 5 ml de tampon phosphate M/15, de pH 6,0, sont traités par 15 ml de suspension de bactéries provenant de 1,8 l de milieu de culture. Consommé en 17 h à 38°: 1,3 at. O par mol. de substrat. L'*osazone*, précipitée, comme indiqué précédemment (360 mg), fournit après recristallisation dans l'alcool un produit identique à celui obtenu après oxydation partielle: F. et F. de mélange 160–162°; $[\alpha]_D^{22} = +404 \pm 4^\circ$ ($c = 0,5\%$ dans pyridine-alcool 1:1); $[\alpha]_D^{22} = +378 \pm 4^\circ$ (rotation initiale; $c = 0,5\%$ dans $CHCl_3$). – De la manière indiquée plus haut, on isole des eaux-mères aqueuses 8 mg de *méthoxy-di-ol résiduel* de Eb. 120°/12 Torr. et $[\alpha]_D^{22} = +47,1 \pm 3,7^\circ$ ($c = 0,53\%$ dans H_2O).

RÉSUMÉ

L'oxydation par *Acetobacter suboxydans* KLUYVER-DE LEEUW des (\pm)-cyclohexanetétrols-1,2,4/3 et -1,2,3/4 et du (\pm)-cyclohexanetriol-1,2/3 comporte une attaque de l'hydroxyle axial de chacun des antipodes des trois substrats. Cette oxydation est due aux déshydrogénases particulières qui s'attaquent aux cyclitols supérieurs. Sous l'action d'une épimérase contenue dans les bactéries, les cétooses dérivés du (+)-cyclohexanetétrol-1,3,4/2 et des (+)- et (–)-cyclohexanetétrols-1,2,3/4 sont convertis en cétooses épimères.

L'oxydation bactérienne des deux antipodes du O-méthyl-3-cyclohexanetriol-1,2/3 s'effectue, en milieu acide, probablement sous l'action des déshydrogénases particulières des cyclitols inférieurs de stéréospécificité R. L'antipode attaqué le plus facilement dérive du (–)-cyclohexanetriol-1,2/3, alors que dans le cas du triol racémique libre c'est la forme (+) qui est oxydée préférentiellement.

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

BIBLIOGRAPHIE

- [1] TH. POSTERNAK & D. REYMOND, *Helv.* **36**, 260 (1953); TH. POSTERNAK, A. RAPIN & A. L. HAENNI, *Helv.* **40**, 1594 (1957).
 [2] B. MAGASANIK & E. CHARGAFF, *J. biol. Chemistry* **174**, 173 (1948); B. MAGASANIK, R. E. FRANZL & E. CHARGAFF, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 2618 (1952).
 [3] TH. POSTERNAK & F. RAVENNA, *Helv.* **30**, 441 (1947).
 [4] TH. POSTERNAK & H. FRIEDLI, *Helv.* **36**, 251 (1953).
 [5] TH. POSTERNAK & D. REYMOND, *Helv.* **38**, 195 (1955).
 [6] A. RAPIN, A. L. HAENNI & TH. POSTERNAK, *Helv.* **50**, 1801 (1967).
 [7] W. R. CHRISTIAN, C. J. GOGEK & C. B. PURVES, *Canad. J. Chemistry* **29**, 911 (1951).
 [8] TH. POSTERNAK, D. REYMOND & W. HAERDI, *Helv.* **38**, 191 (1955).
 [9] L. BRUNEL, *C. r. hebdom. Séances Acad. Sci.* **150**, 986 (1910).
 [10] C. J. GOGEK, R. Y. MOIR, J. A. McRAE & C. B. PURVES, *Canad. J. Chemistry* **29**, 938 (1951).
 [11] A. GUILLEMONAT, *Ann. Chim.* [11], **77**, 143 (1939).

188. Zur Kenntnis des elektrochemischen Verhaltens aufgedampfter Silberschichten

2. Mitteilung

von H. E. Hintermann und G. Trümpler

(4. VIII. 67)

Einleitung. – In einer früheren Mitteilung [1] haben wir über die elektrochemische Potentialentwicklung an dünnen, im Vakuum aufgedampften Silberschichten berichtet. Solche Kondensate zeigen einen gegenüber dem Massivzustand des rekristallisierten und entspannten Metalles erhöhten Gehalt an freier Energie, verursacht durch Gitterstörungen (Fehlstellen, Versetzungen, Stapelfehler u. a.) und kleine Primärteilchengrösse. Nach FRICKE [2] ist die damit verbundene Vermehrung des Wärmeinhaltes ein alle Ursachen der Aktivität umfassender pauschaler Maßstab des aktiven Zustandes, der sich in einer Negativierung der Potentialeinstellung bzw. einer Verschiebung des Elektrodengleichgewichtes in der Richtung des Ionenzustandes des Metalles hin auswirkt. Durch weitgehend variierbare Aufdampfbedingungen, durch die chemische Natur, Oberflächenbeschaffenheit und Temperatur des Substrates kann die Struktur der Schicht beeinflusst werden. An den dünnsten der untersuchten Silberschichten ($\approx 50 \text{ \AA}$) wurden Negativierungen bis zu 35 mV gemessen [1].

In dieser Arbeit soll die durch die Erhöhung der gesamten Energie bewirkte Negativierung des Ruhepotentials mit den das Elektrodenpotential bestimmenden Faktoren in Zusammenhang gebracht werden. Insbesondere wird die Sublimationsenergie aktiver Metalle anhand der KOSSEL-STRANSKI'schen Theorie über die Bindungsfestigkeit von Atomen an Oberflächen diskutiert und mit der Negativierung des reversiblen Elektrodenpotentials in Beziehung gebracht.

Theoretischer Teil

Elektrodenpotential-bestimmende Faktoren. Geht man von der einfachen galvanischen Kette H_2/H^+ , M^{n+}/M aus und betrachtet einen Stromfluss von links nach rechts, so beschreibt die Gleichung

