

Es ist zu erwarten, dass die Benutzung der Sporopollenine, gleichsam als chemische Leitfossilien, weiteren Einblick in den Inkohlungsprozess gewinnen lässt, da sie uns das einzige Material zu sein scheinen, das während der Inkohlung langsam genug verändert wird und durch die dabei gewährte Formerhaltung keinen Zweifel über seine Abstammung aufkommen lässt.

Bern, Institut für organische Chemie.

Recherches sur la graine de croton.

I. Sur le crotonoside (2-oxy-6-amino-purine-d-riboside)

par Emile Cherbuliez et Karl Bernhard.

(17. II. 32.)

Lors d'une étude de la graine de croton¹⁾, nous avons constaté la présence, dans cette drogue, d'un glucoside nouveau, pour lequel nous proposerons le nom de crotonoside. Ce glucoside est intéressant parce qu'il dérive d'une oxy-amino-purine isomère de la guanine, isomère qu'on n'avait pas encore rencontré dans la nature: il s'agit de la 2-oxy-6-amino-purine, que nous désignerons par le terme d'isoguanine (la guanine étant la 2-amino-6-oxy-purine).

Le crotonoside.

Le crotonoside est assez facilement soluble dans l'eau chaude, et très peu soluble dans l'alcool, même à l'ébullition. Malgré ces solubilités, l'extraction du glucoside de la graine se fait très mal par l'eau; elle se fait par contre très bien par épuisement avec de l'alcool méthylique chaud. Comme la présence de l'écorce, qui ne contient pas de glucoside, ne gêne aucunement les opérations, il n'est pas nécessaire de décortiquer les graines, opération toujours assez désagréable avec cette denrée toxique et irritante.

On l'épuise par l'alcool méthylique au bain-marie dans un grand appareil du type *Soxhlet*. L'extraction de 1 kg de graine passée dans une machine à hâcher, par 1,5 l. d'alcool méthylique dure à peu près trois jours. A ce moment, le marc contient encore un peu d'huile grasse, mais ne fournit plus de glucoside.

L'extract est constitué par un liquide foncé qui se sépare en deux couches (l'huile de croton peu soluble dans l'alcool méthylique, et le dissolvant), tenant en suspension un abondant précipité floconneux. On filtre, et on lave le précipité à l'alcool, puis à l'éther par digestions répétées, jusqu'à ce que l'éther ne se colore plus.

¹⁾ Graine de Croton Tiglium L.

A partir de 1 kg. de graine, on obtient de la sorte 20 à 30 gr. d'une masse brune, insoluble dans l'eau froide et les dissolvants organiques, soluble dans l'eau chaude; la solution aqueuse chaude gélatinise par refroidissement lorsqu'elle n'est pas très diluée. Au point de vue chimique, c'est un mélange très complexe, fournissant par hydrolyse entre autres du glucose et de l'acide phosphorique.

Pour en retirer le crotonoside, le mieux est d'éliminer la majeure partie des produits qui l'accompagnent, par précipitation d'une solution du produit brut dans de l'eau chaude, par l'acétate de cuivre ou le sous-acétate de plomb en excès. On filtre à chaud, précipite le métal lourd resté en solution par l'hydrogène sulfuré, et concentre dans le vide la solution très peu colorée obtenue de la sorte. Le glucoside se dépose alors généralement sous forme de dépôts granuleux, blancs, qui, vus au microscope, présentent une structure cristalline. Pour obtenir le produit tout à fait pur, il suffit alors de le recrystalliser dans environ 35 parties d'eau chaude, en présence d'un peu de noir animal. Quelquefois on n'obtient que des dépôts gélatineux qui ne cristallisent que mal et incomplètement lors de la recrystallisation; nous ne pouvons pas indiquer la cause de ces difficultés accidentelles.

La séparation du glucoside est très complète, comme le montre l'hydrolyse sulfurique de la fraction précipitée par le plomb ou par le cuivre. On n'y trouve pas, ou on n'y trouve que de très petites quantités, d'isoguanine, malgré la facilité avec laquelle on peut isoler le sulfate de cette base.

Notons encore que nous avons obtenu le crotonoside aussi par dialyse: la solution aqueuse du produit brut est dialysée dans un sac en collodion, au bain-marie; après quelques jours, il suffit de concentrer le dialysat pour obtenir une cristallisation de crotonoside déjà très pur; c'est donc un corps de poids moléculaire relativement faible. — La dialyse à travers une membrane en parchemin a fourni un corps beaucoup moins pur, qui n'a pas cristallisé et qui n'a pu être identifié que par ses produits d'hydrolyse.

Le glucoside constitue moins de un dixième du produit brut obtenu par extraction méthylrique. Le rendement en crotonoside rapporté à la graine entière est assez variable; nos chiffres extrêmes ont été 0,7 et 2,65‰. Rapportés à la graine décortiquée (qui forme en moyenne 69% de la graine entière), ces chiffres correspondent à des rendements de 1—3,8‰.

Le crotonoside obtenu par cristallisation dans l'eau se présente sous forme d'aiguilles soyeuses incolores. Il fond en se décomposant entre 237° et 241°; chauffé très rapidement, il ne se décompose que vers 244° (248° corr.). Il contient 2 molécules d'eau qu'il perd facilement dans le vide à 100°. Il est peu soluble dans l'eau froide (moins de

0,5 %), mais assez soluble dans l'eau chaude (au moins 3 % à 90°). Il est insoluble dans les dissolvants organiques usuels, mais il est soluble dans le phénol, la résorcine et l'acétamide. Il se dissout dans les bases et les acides minéraux dilués. Sa solution aqueuse chauffée en présence d'acide donne les réactions des pentoses.

Picrate. D'une solution du glucoside dans de l'eau chaude additionnée d'acide picrique en solution aqueuse, le picrate cristallise par refroidissement en petites aiguilles jaunes, se décomposant lentement sans fondre, à partir de 210°

0,1973 gr., 0,1830 gr., 0,3245 gr. de subst. séchée à l'air ont perdu à 100°, dans le vide, 0,0215 gr., 0,0190 gr., 0,0370 gr.

3,661 mgr. de subst. anhydre ont donné 5,68 mgr. CO₂ et 1,63 mgr. H₂O

1,493 mgr., 1,005 mgr. de subst. anhydre ont donné 0,335 cm³ N₂ (23°, 726 mm.), 0,225 cm³ N₂ (23°, 726 mm.).

0,1169 gr. de subst. anhydre ont neutralisé 20,65 cm³ acide 0,1-n.

Calculé pour C₁₀H₁₃O₅N₅ + 2 H₂O H₂O 11,28%

Trouvé „ 10,21; 10,38; 11,40%

Calculé pour C₁₀H₁₃O₅N₅ C 42,40 H 4,59 N 24,73%

Trouvé „ 42,32 „ 4,98 „ 24,71; 24,66; 24,75%

0,4057 gr. de subst. anhydre dans NaOH 0,1-n. à 20 cm³

$$[\alpha]_{D,25} = \frac{-1^{\circ},225 \times 100}{1 \times 2,0285} = -60,39$$

0,2617 gr. de subst. anhydre dans NaOH 0,1-n. à 10 cm³

$$[\alpha]_{D,25} = \frac{-1^{\circ},58 \times 100}{1 \times 2,617} = -60,37$$

Comme le montre le petit tableau suivant, les propriétés générales du crotonoside le rapprochent énormément de la guanosine ou vernine, dont il possède la composition centésimale.

	Composition	$[\alpha]_D$ dans NaOH 0,1-n.	P. de f.	Picrate
Crotonoside	C ₁₀ H ₁₃ O ₅ N ₅ · 2 H ₂ O déshydraté à 100° dans le vide	- 60°,38	244° déc.	aig. jaunes déc. au-dessus 210°
Guanosine	idem ¹⁾	- 60°,52 ¹⁾	237° déc. ¹⁾ 241° déc. ²⁾	aig. jaunes p. f. 185° avec déc. ²⁾

Mais un examen attentif des produits d'hydrolyse montre qu'il ne s'agit pas du d-riboside de la guanine ou 2-amino-6-oxy-purine, mais bien du d-riboside de l'isoguanine, c'est-à-dire de la 2-oxy-6-amino-purine, base qui n'a pas été identifiée jusqu'à présent dans des produits naturels. Il est très intéressant de rappeler ici une opinion qu'*Emil Fischer* a émise il y a plus de trente ans, lors de la

¹⁾ P. A. Levene, W. A. Jacobs, B. 42, 2469 (1909).

²⁾ E. Schulze, G. Trier, Z. physiol. Ch. 70, 143 (1910—1911).

préparation synthétique de cet isomère de la guanine¹). *E. Fischer* fait remarquer que la 2-oxy-6-amino-purine peut être considérée comme un produit d'oxydation de la 6-amino-purine ou adénine, et qu'il lui semble très probable qu'elle se trouvera parmi les bases puriques naturelles; rappelons aussi qu'il a mis en garde à ce moment contre les confusions possibles — et peut-être déjà commises — de cet isomère de la guanine avec cette dernière, à laquelle elle ressemble beaucoup. En confirmant ces vues si perspicaces, nous pouvons ajouter que le danger d'une confusion est encore beaucoup plus grand pour les ribosides de ces deux purines que pour les bases elles-mêmes, et qu'il est fort possible que le crotonoside ait déjà été isolé, mais pris pour la guanosine.

Le sucre: d-ribose.

Pour étudier le sucre, nous avons fait une hydrolyse quantitative du crotonoside avec 100 parties d'acide sulfurique 0,1-n., pendant 4 heures, au bain-marie. Après refroidissement, le sulfate d'isoguanine cristallise presque quantitativement en beaux prismes. La solution filtrée est débarrassée des derniers restes de base purique par addition de sulfate d'argent et filtration après 48 heures à la glacière; la solution est débarrassée de l'argent par l'hydrogène sulfuré, et de l'acide sulfurique par le carbonate de baryum. La solution du sucre est concentrée dans le vide à un volume convenable, et polarisée; par évaporation et dessiccation à 50° sous 1 mm., on obtient le sucre comme un résidu presque incolore qui n'a pas encore cristallisé. Le pouvoir rotatoire est celui du d-ribose qu'on pouvait s'attendre à obtenir; les points de fusion de la phénylosazone et de la p-bromophényl-hydrazone confirment cette hypothèse. Si jusqu'à présent, le sucre n'a pas encore été identifié avec une certitude absolue, nous pensons néanmoins que ces données suffisent pour faire admettre comme extrêmement probable qu'il s'agit bien du d-ribose qui, associé aux dérivés puriques, joue un rôle biochimique si important.

1,520 gr. de crotonoside anhydre ont donné une solution de sucre, dont le pouvoir rotatoire, après décoloration au noir animal et concentration à 10 cm³, à 20°, dans un tube de 1 dm., a été de $\alpha_D = -1^{\circ}39$. Le résidu sec de cette solution a pesé 0,6552 gr. (théorie 0,8026 gr.).

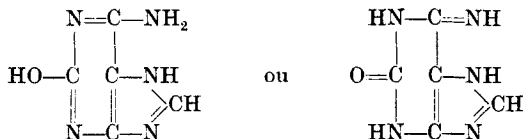
0,2 gr. de sucre, dans 4 cm³ d'eau, transformés en osazone avec 0,4 gr. de chlorhydrate de phénylhydrazine et 0,65 gr. d'acétate de sodium cristallisé au bain-marie, ont donné une osazone, qui recristallisée dans de l'eau, puis dans de l'alcool dilué, fond à 159—160°.

0,4 gr. de sucre, dans quelques cm³ d'alcool absolu, sont additionnés de 1 mol. de p-bromophénylhydrazine. Après 24 h. à 35°, on ajoute plusieurs volumes d'éther sec; l'hydrazone cristallise peu à peu à la glacière. Par recristallisation dans de l'alcool absolu, dans lequel l'hydrazone est peu soluble à froid, on obtient 0,22 gr. de très fines aiguilles incolores, dont le p. de f. 164° ne change plus par recristallisation.

¹) B. 30, 2245 (1897).

	$[\alpha]_D$	Phényl-osazone p. de f.	p-Bromophényl-hydrazone p. de f.
Sucre du crotonoside	- 21°,22	159—160°	164°
d-Ribose	- 21°,5 ¹⁾	160° ²⁾ ; 166° ³⁾	164° ¹⁾ ; 164—165° ⁴⁾ ; 170° ⁵⁾

L'aglucone: isoguanine ou 2-oxy-6-amino-purine.



Pour obtenir l'aglucone, l'hydrolyse sulfurique se prête particulièrement bien, à cause de la très faible solubilité du sulfate d'isoguanine, qui cristallise avec un excellent rendement. Il suffit de chauffer quelques heures au bain-marie, avec de l'acide sulfurique à 5%, soit le glucoside, soit le produit brut tel que l'extraction méthylique le fournit, pour obtenir après refroidissement et repos de quelques heures des cristaux prismatiques très bien formés qui peuvent atteindre plusieurs mm. de longueur. On les obtient tout à fait purs par recristallisation dans l'acide sulfurique à 5% à l'ébullition (après décoloration par le noir animal lorsqu'il s'agit du sel obtenu par hydrolyse du produit brut).

La solution du sulfate dans de la soude caustique donne la base par précipitation avec de l'acide acétique dilué, dans lequel l'isoguanine est insoluble. La solubilité de la base dans l'eau, même en présence d'acide acétique dilué, est si faible, que cette opération peut même servir au dosage de la base dans ses sels.

L'isoguanine se présente sous forme d'un précipité blanc, amorphe, à peu près insoluble dans l'eau, même à l'ébullition, soluble dans les acides minéraux pas trop dilués, surtout à chaud, soluble dans la soude ou la potasse caustiques diluées, peu soluble dans l'ammoniaque aqueuse. Par refroidissement des solutions dans les acides minéraux, on obtient facilement les sels correspondants. La base ne présente pas de point de fusion, elle est carbonisée progressivement au-dessus de 250°. Elle est anhydre. Elle correspond d'ailleurs en tout point à la description que donne *E. Fischer*⁶⁾ de la 2-oxy-6-amino-purine.

¹⁾ *v. Ekenstein, Blanksma, Chem. Weekblad* **10**, 664 (1913).

²⁾ *Wohl, B.* **26**, 735 (1893).

³⁾ *Levene, La Forge, J. biol. Ch.* **20**, 429 (1915); point de fusion de l'osazone préparée à partir du l-arabinose.

⁴⁾ *Fischer, Piloty, B.* **24**, 4214 (1891); p. de f. du dérivé du l-ribose.

⁵⁾ *Levene, Jacobs, B.* **42**, 2706 (1909).

⁶⁾ *B.* **30**, 2245 (1897).

3,965 mgr. subst. ont donné 5,72 mgr. CO_2 et 1,32 mgr. H_2O

2,880 mgr. subst. ont donné 1,150 cm^3 N_2 (19°, 761 mm.)

4,630 mgr. subst. ont neutralisé 15,35 cm^3 acide 0,01-n.

Calculé pour $\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_5$ C 39,73 H 3,31 N 46,35%

Trouvé „ 39,35 „ 3,73 „ 45,81; 46,41%

Sulfate. Préparé par l'hydrolyse sulfurique du glucoside ou par dissolution de l'isoguanine dans l'acide sulfurique à 5% chaud. Cristaux prismatiques ou quelques fois tabulaires, se décomposant sans fondre à partir de 230—250°, très peu solubles dans l'eau froide, qui les hydrolyse très lentement. Les cristaux séchés à l'air ne perdent pas de poids, même à 130° dans le vide.

0,4616 gr. ont donné 0,332 gr. de base et 0,2575 gr. BaSO_4

0,2223 gr. ont donné 0,1241 gr. de BaSO_4

Calculé pour $(\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_5)_2\text{SO}_4\text{H}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ base 72,24 SO_4H_2 23,45%

Trouvé „ 72,02 „ 23,40; 23,46%

De la solution de l'isoguanine dans les acides chlorhydrique et bromhydrique dilués bouillants il se dépose par refroidissement de belles aiguilles groupées en houppe, et représentant le mono-chlorhydrate et le mono-bromhydrate. Ces deux sels sont anhydres, et leur composition a été contrôlée par précipitation de la base, comme pour le sulfate, ainsi que par le dosage de l'ion halogène. Les deux sels sont décomposés par l'eau chaude; ils n'ont pas de point de fusion, mais se décomposent sans fondre, le chlorhydrate au-dessus de 250°, le bromhydrate au-dessus de 214°.

Nitrate. La base ne se dissout que difficilement dans l'acide nitrique à 25%, à l'ébullition. Par refroidissement, on obtient des cristaux qui se décomposent sans fondre au-dessus de 250°.

Picrate. Obtenu par précipitation d'une solution de la base dans l'acide chlorhydrique dilué, par l'acide picrique aqueux, le picrate se présente sous forme de flocons jaunes à structure cristalline à peine visible au microscope, se décomposant sans fondre à très haute température (brunissement à partir de 260°).

L'acide métaphosphorique précipite la base, même en présence d'un excès d'acide chlorhydrique dilué.

Malgré les ressemblances considérables de notre base et de ses sels avec la guanine et ses sels, on voit cependant nettement qu'il doit s'agir ici d'un autre corps, comme le montre le petit tableau suivant, dans lequel nous résumons les différences d'avec les sels de la guanine.

	Sulfate	Bromhydrate	Picrate
Isoguanine	$\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_5 \cdot \text{SO}_4\text{H}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ pas déshydraté à 130°, vide	$\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_5 \cdot \text{BrH}$ déc. sans fondre au-dessus 214°	Flocons d'apparence amorphe; déc. au-dessus 260° sans fondre
Guanine	$\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_5 \cdot \text{SO}_4\text{H}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ déshydraté à 100°, vide ¹⁾	$\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_5 \cdot \text{BrH} \cdot 2\frac{1}{3}\text{H}_2\text{O}$ (d'eau) ²⁾ $\text{C}_5\text{H}_5\text{ON}_5 \cdot \text{BrH}$ (d'alcool) p. de f. 218° ³⁾	Aiguilles soyeuses déc. au-dessus 190° ⁴⁾

¹⁾ E. Fischer, loc. cit.

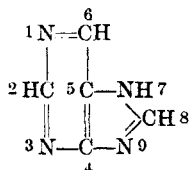
²⁾ Kerner, A. 103, 268 (1857).

³⁾ C. Neuberg, B. 35, 1470, note (1902).

⁴⁾ C. Wulff, Z. physiol. Ch. 17, 468 (1892).

Ce qui exclut absolument l'identité de notre base avec la guanine, c'est son comportement vis-à-vis du chlore naissant et de l'acide nitreux. Traitée par l'acide chlorhydrique et du chlorate, la guanine donne naissance, avec un bon rendement, à la guanidine¹⁾, tandis que notre base, détruite dans les mêmes conditions, ne donne pas de guanidine. La guanine est transformée facilement en xanthine (2,6-dioxy-purine) par action de l'acide nitreux sur sa solution chlorhydrique²⁾; nous n'avons pas pu réaliser une transformation analogue avec l'isoguanine.

Avant d'exposer les arguments qui nous font admettre pour notre isoguanine la formule d'une 2-oxy-6-amino-purine, rappelons le schéma habituel de numérotage de la purine :



Pour des raisons données plus loin, une substitution en 7 est exclue; il reste donc 6 possibilités pour la constitution d'une oxy-amino-purine:

2-oxy-6-amino ³⁾	2-amino-6-oxy (= guanine)
6-oxy-8-amino (inconnue)	6-amino-8-oxy ⁴⁾
2-oxy-8-amino (inconnue)	2-amino-8-oxy (inconnue)

Ce qui permet le mieux de distinguer la guanine de la 2-oxy-6-amino-purine synthétisée par *E. Fischer*, ce sont, d'après cet auteur, les sulfates. Celui de la guanine cristallise avec deux molécules d'eau et se déshydrate à 100° dans le vide, celui de l'autre base cristallise avec une molécule d'eau qu'on ne peut chasser, même à 130° dans le vide. Notre isoguanine présente précisément cette particularité; son comportement vis-à-vis du chlore naissant et de l'acide nitreux correspond également à ce que *E. Fischer* dit de la 2-oxy-6-amino-purine. La comparaison des sulfates permet non seulement de rapprocher notre isoguanine de la 2-oxy-6-amino-purine, mais elle permet d'autre part d'éliminer le troisième isomère connu, la 6-amino-8-oxy-purine, dont le sulfate cristallisé est anhydre. Mais ces arguments ne sauraient suffir à établir la constitution de notre base, puisque il y a encore trois autres oxy-amino-purines qu'on ne connaît pas encore. Ce qui permet d'éliminer ces trois isomères, c'est que notre base copule avec les diazoïques en milieu alcalin. Par réduction d'un colorant azoïque formé ainsi, on obtient une oxy-diamino-purine; cette dernière ne copule plus, mais

¹⁾ *E. Fischer*, loc. cit.

²⁾ *E. Fischer*, A. 215, 309 (1882).

³⁾ *E. Fischer*, loc. cit.

⁴⁾ *E. Fischer*, B. 30, 2215 (1897).

se laisse maintenant diazoter à son tour, en donnant un diazoïque copulant avec les phénols.

Le fait que de nombreux dérivés puriques copulent avec les diazoïques est bien connu; comme l'a montré notamment *H. Fischer*¹⁾, cette réaction se fait dans le noyau imidazolique, en 8; elle fait défaut dès que cette position, ou la position voisine 7, est substituée. Il ne reste donc pour notre base qu'une formule dans laquelle les deux positions 7 et 8 sont libres. Cette limitation conduit immédiatement à la formule de la 2-oxy-6-amino-purine, comme le montre l'inspection du tableau des isomères.

La copulation se faisant en 8, la réduction de l'azoïque doit conduire à la 2-oxy-6,8-diamino-purine; grâce à la fonction amino introduite en 8, cette nouvelle base ne copule plus, mais se laisse diazoter et donne un diazoïque copulant à son tour, comme *H. Fischer* l'a montré pour les 8-amino-purines substituées qu'il a obtenues par copulation et réduction des colorants azoïques de différents dérivés puriques.

En introduisant dans la solution de l'isoguanine dans de la soude caustique de 1,5% le diazoïque de la 2,4-dichloro-aniline, on obtient immédiatement un colorant rouge pourpre, très peu soluble dans l'eau. Le colorant filtré et lavé à l'eau, est suspendu dans de la soude caustique diluée. Cette suspension est réduite au bain-marie par addition d'hydrosulfite jusqu'à décoloration. La liqueur est filtrée et précipitée par l'acide acétique dilué. Le précipité floconneux abondant qui se forme, la 2-oxy-6,8-diamino-purine, est repris dans de l'acide sulfurique à 5% à l'ébullition. La solution sulfurique légèrement colorée est traitée par du noir animal, de la solution décolorée se déposent au repos des cristaux extraordinairement fins du sulfate de la nouvelle base. La 2-oxy-6,8-diamino-purine, que nous décrirons dans une prochaine note, ne copule pas avec les diazoïques, mais se laisse diazoter; son sel diazonium donne instantanément un colorant violet avec du sel R.

Laboratoire de Chimie organique de l'Université,
Genève.

¹⁾ Z. physiol. Ch. **60**, 69 (1909).