

22. Recherches dans la série des cyclitols XXI.

Sur la configuration de cyclohexane-tétrols et -triols optiquement actifs. Sur l'oxydation biochimique du cyclohexane-tétrol-1,4/2,3 (dihydro-conduritol)

par Th. Posternak et D. Reymond.

(9 XII 54)

Dans une communication précédente¹⁾, nous avons indiqué les consommations maximum en oxygène observées lors de l'action d'*Ace-tobacter suboxydans* sur un grand nombre de cyclitols, cyclohexane-tétrols entre autres. Nous nous occupons, dans le présent mémoire, de l'emplacement d'oxydation de l'un d'entre eux, le cyclohexane-tétrol-1,4/2,3 (IV). Cette substance se forme par hydrogénation du conduritol naturel, et nous en avons décrit récemment la synthèse²⁾.

Comme nous l'avons indiqué, on observe, en présence du micro-organisme, la consommation d'un atome d'oxygène par molécule de dihydro-conduritol, ce qui rend probable le formation d'une monocétone. Pour établir sa constitution, *Anderson* et coll.³⁾ ont soumis récemment le produit brut d'oxydation biochimique à l'hydrogénation catalytique en milieu fortement acide, ce qui permet dans la série des cyclitols la réduction directe d'un groupe carbonyle en méthylène⁴⁾. Ils obtinrent ainsi du cyclohexane-triol-1,3/2 (IX). Comme la configuration correspondante de 3 hydroxyles voisins n'existe pas dans le dihydro-conduritol, les auteurs américains considèrent ce triol comme un « artefact ».

Le produit d'oxydation biochimique du dihydro-conduritol étant facilement altérable, nous avons dû renoncer à son isolement et nous contenter de l'étudier en solution.

Par traitement prolongé au moyen de la phénylhydrazine à froid, on obtient avec un rendement de 47 % une osazone cristallisée $C_{18}H_{20}O_2N_4$ de F. 202–204°; $[\alpha]_D = -230^\circ$ (pyridine + alcool).

Au cours de premières expériences, nous avons hydrogéné le produit brut d'oxydation en présence d'oxyde de platine en milieu neutre. Il se forme ainsi un mélange dont nous avons pu isoler les 3 substances suivantes:

¹⁾ *Th. Posternak & D. Reymond*, *Helv.* **36**, 260 (1953).

²⁾ *Th. Posternak & H. Friedli*, *Helv.* **36**, 251 (1953).

³⁾ *L. Anderson, K. Tomita, P. Kussi & S. Kirkwood*, *J. biol. Chemistry* **204**, 769 (1953).

⁴⁾ *Th. Posternak*, *Helv.* **24**, 1045 (1941); **33**, 1594 (1950); *Th. Posternak & F. Ravenna*, *Helv.* **30**, 442 (1947); *B. Magasanik, R. E. Franzl & E. Chargaff*, *J. Amer. chem. Soc.* **74**, 2618 (1952).

1. (-)-Cyclohexane-tétrol-1,2,3/4¹); cette substance est identique au tétrol résiduel²) obtenu après oxydation biochimique ménagée du DL-cyclohexane-tétrol-1,2,3/4.

2. (+)-Cyclohexane-tétrol-1,2,4/3¹), antipode optique du tétrol résiduel²) obtenu après oxydation biochimique ménagée du DL-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3.

3. Un cyclohexane-tétrol lévogyre (F. 146—148°; $[\alpha]_D^{17} = -28,8^\circ \pm 1,8^\circ$) isolé par l'intermédiaire de son tétrabenzate de F. 244—246° et $[\alpha]_D^{21} = -26,3^\circ \pm 2,1^\circ$.

La troisième substance représente le (-)-cyclohexane-tétrol-1,3/2,4 (VIII), ainsi qu'il résulte du mode de préparation suivant. Le (-)-viburnitol (XI) donne sous l'action d'*Acetobacter suboxydans* la cétone XII³). Cette dernière, soumise à l'hydrogénation catalytique en milieu acide, fournit un composé C₆H₁₂O₄ qui consomme 3 mol. d'ac. périodique et ne peut représenter que le tétrol VIII; il est identique au produit formé à partir du dihydro-conduritol. Le tétrol optiquement actif ainsi obtenu était à l'origine le seul dont la configuration, dans notre système stéréochimique, était établie. C'est à cette configuration que nous avons pu rattacher celle des autres substances. L'obtention du tétrol VIII à partir du dihydro-conduritol (IV) ne peut résulter que d'un changement d'orientation de deux hydroxyles voisins, ce qui indique une transposition intermédiaire de la monocétone formée par oxydation biochimique. D'autre part, le fait que par hydrogénation on obtient au moins 3 cyclohexane-tétrols, indique la présence, après action des bactéries, d'un mélange de cétones.

La chromatographie sur papier, dans divers systèmes de dissolvants, du produit brut d'oxydation biochimique nous a montré qu'il contient effectivement 2 composants que nous avons pu séparer sur une plus grande échelle par la même technique. L'un d'eux qui migre plus rapidement dans les divers systèmes de dissolvants employés sera désigné par α , l'autre par β . Comme l'indiquent leurs réactions et leurs spectres d'absorption UV., les produits α et β sont des trihydroxycétones. Ils fournissent tous deux la même osazone obtenue déjà à partir du produit brut d'oxydation.

L'hydrogénation catalytique en milieu neutre de la cétone β fournit du (+)-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3 et du (-)-cyclohexane-tétrol-1,3/2,4 (VIII). L'hydrogénation catalytique en milieu acide donne

¹) Les configurations des deux tétrols racémiques 1, 2, 3/4 et 1, 2, 4/3 étaient connues (Th. Posternak & H. Friedli, Helv. **36**, 251 (1953)), mais on ignorait à laquelle des deux formules énantiomorphes possibles correspond chacune des variétés optiquement actives.

²) Th. Posternak & H. Friedli, Helv. **36**, 251 (1953).

³) Th. Posternak, Helv. **33**, 350 (1950).

naissance au *cyclohexane-triol-1, 3/2* (IX) qu'*Anderson* et coll.¹⁾ avaient obtenu à partir du produit brut d'oxydation biochimique. Il en résulte pour la cétone β la constitution VII. D'autre part, le (+)-cyclohexane-tétrol-1, 2, 4/3 doit alors répondre à la formule X.

Le produit α fournit par hydrogénation en milieu neutre du (-)-*cyclohexane-tétrol-1, 2, 3/4*. Il ne nous a pas été possible d'isoler le deuxième tétrol qui, théoriquement, devrait se former également. Par hydrogénation catalytique en milieu acide, nous avons obtenu par contre du (-)-*cyclohexane-triol-1, 2/3* caractérisé comme dérivé benzoylé. Sa formation indique que la cétone α est une 2, 3, 4-trihydroxycyclohexanone, tout comme la cétone β . Comme les deux composés donnent la même osazone III, la configuration de leurs carbonés 3 et 4 doit être identique. Il faut alors attribuer à la cétone α la configuration V. Il en résulte que le (-)-cyclohexane-tétrol-1, 2, 3/4 est représenté par la formule II. Il faut d'autre part en déduire pour le (-)-cyclohexane-triol-1, 2/3 la configuration I. *Posternak & Ravenna*²⁾, supposant que le cyclohexane-triol-1, 2, 3 *cis* est oxydé par *Acetobacter suboxydans* conformément à la règle de *Bertrand-Hudson*, avaient déjà attribué au cyclohexane-triol lévogyre la formule I qui se trouve ainsi confirmée³⁾.

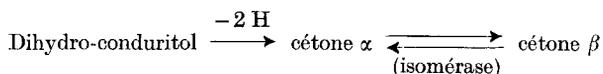
La présence des deux composés α et β dans le produit brut d'oxydation s'explique aisément à la suite de l'observation suivante: les deux produits se transforment l'un dans l'autre en présence de bactéries, comme on peut le constater par chromatographie sur papier. En l'absence du microorganisme ou sous l'action de bactéries tuées par la chaleur, on n'observe par contre aucune transformation. Il s'agit donc très probablement d'une action enzymatique. Par traitement prolongé au moyen de bactéries, le composé α se transforme presque complètement en β ; par contre, le composé β traité dans les mêmes conditions ne fournit que peu de α . Il devient probable que l'interconversion des deux hydroxycétones est due à une réaction enzymatique réversible dont l'équilibre favorise la formation de β . D'autre part, lors de l'oxydation du dihydro-conduritol, on constate que les proportions des deux hydroxycétones, évaluées, après séparation par chromatographie sur papier, par absorption UV., varient avec la durée de contact avec les bactéries. Au bout de 2 h., la consommation d'oxygène est pratiquement terminée et les composés α et β sont en quantités à peu près égales. Lors d'une expérience au cours de laquelle on avait prolongé de 16 h. le traitement par les bactéries, la cétone β était par contre en quantité 2,2 fois plus forte que la cétone α . On peut en déduire que cette dernière est le produit primaire d'oxydation biochimique du

¹⁾ L. c.

²⁾ Helv. 30, 441 (1947).

³⁾ Cette configuration a été confirmée encore par une méthode purement chimique qui sera décrite ultérieurement.

dihydro-conduritol; le composé β prend ensuite naissance à ses dépens par une réaction enzymatique réversible.



Il est possible que l'interconversion enzymatique de α et β se fasse par l'intermédiaire d'un énoI VI. Ajoutons que les composés α et β ne s'énoIisent pas spontanément en milieu neutre; en particulier, ils ne donnent pas de réaction avec le chlorure ferrique.

Des recherches sont en cours pour caractériser l'isomérase qui provoque la transformation $\alpha \rightleftharpoons \beta$.

L'existence d'un tel ferment chez *Acetobacter suboxydans* montre que les polyhydroxycétone isolées après oxydation biochimique des cyclitols peuvent différer de ces derniers par la configuration de carbones porteurs de groupes hydroxyles; d'autre part, il n'est pas certain que le groupe carbonyle y occupe toujours le même emplacement que dans le produit primaire d'oxydation. Ce doute subsistera dans certains cas tant que la spécificité de ce ferment n'aura pas été éclaircie¹⁾.

Pour terminer, nous discuterons encore, en ce qui concerne les cyclohexane-tétrols et -triols mentionnés dans le présent mémoire, la validité des deux règles d'oxydation de cyclitols sous l'action d'*Acetobacter suboxydans* énoncées par *Magasanik & Chargaff*²⁾.

Utilisant la même notation que dans un mémoire antérieur³⁾, nous indiquons dans les formules XIII–XX par un cercle plein les carbones portant les hydroxyles axiaux⁴⁾ dans les conformations «chaise» préférentielles du noyau cyclohexanique. Ces carbones sont en outre marqués d'une croix lorsque la deuxième règle admet leur attaque par le microorganisme: présence d'un hydroxyle équatorial en méta dans le sens des aiguilles d'une montre lorsque l'hydroxyle axial considéré est sud-axial, dans le sens contraire s'il est nord-axial.

On voit que les deux conformations possibles XIII et XIV du dihydro-conduritol contiennent chacune deux hydroxyles axiaux et on ne peut décider ici laquelle est préférentielle; d'autre part, dans chacune de ces conformations il y a un hydroxyle axial qui, d'après les règles, serait susceptible d'attaque par *Acetobacter suboxydans*. La constitution de la cétone α (V), produit primaire d'oxydation, indiquerait que le microorganisme s'attaque de préférence à la conformation XIII⁵⁾.

¹⁾ Sous l'action d'*Acetobacter suboxydans*, les cyclitols suivants donnent des produits d'oxydation de configuration bien établie: ms-inositol, (+)- et (-)-inositol, épi-inositol, (+)- et (-)-viburnitol, (+)-quercitol. Dans le cas de ces substances, on constate que les carbones asymétriques des polyhydroxy-cétone formées ont la même configuration que dans les cyclitols de départ.

²⁾ J. biol. Chemistry, **174**, 173 (1948); J. Amer. chem. Soc. **74**, 2618 (1952).

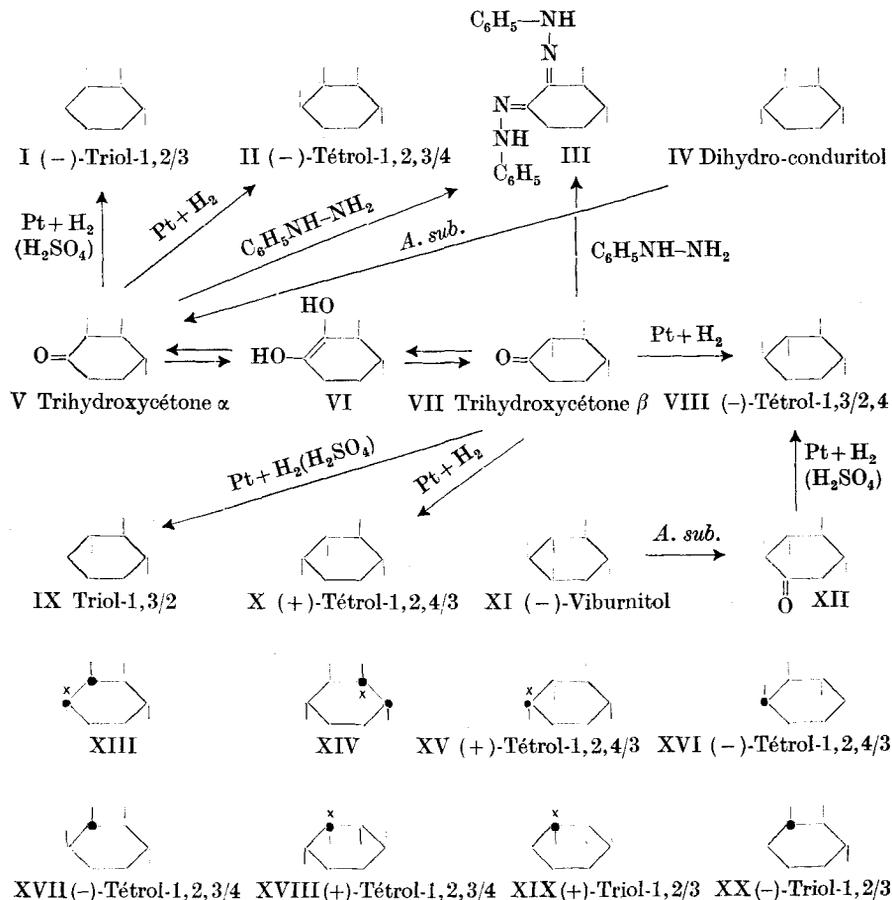
³⁾ Th. Posternak & D. Reymond, Helv. **36**, 265 (1953).

⁴⁾ Axial = polaire de l'ancienne terminologie (Nature **172**, 1096 (1953)).

⁵⁾ Cette conformation XIII contient en para par rapport à l'hydroxyle axial attaqué, un hydroxyle équatorial, ce qui, d'après Anderson et coll. (l. c.), est peut-être une condition nécessaire qui serait à ajouter à celles énoncées par *Magasanik & Chargaff*.

En ce qui concerne les cyclohexane-tétrols-1,2,4/3 et 1,2,3/4 et le cyclohexane-triol-1,2/3, il faut noter que le (+)-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3, le (+)-cyclohexane-tétrol-1,2,3/4 et le (+)-cyclohexane-triol-1,2/3, dont les conformations préférentielles XV, XVIII et XIX contiennent un hydroxyle «attaquable» d'après les règles, sont oxydés plus rapidement que leurs antipodes XVI, XVII et XX¹). Ces derniers subissent toutefois une oxydation complète, «interdite» par les mêmes règles²). Dans un mémoire ultérieur, nous nous occuperons des emplacements d'oxydation de ces cyclitols ainsi que des ferments qui interviennent.

Nous remercions la *Foundation Rockefeller*, New York, de l'aide qu'elle nous a apportée.



¹) Th. Posternak & H. Friedli, *Helv.* **36**, 251 (1953); Th. Posternak & F. Ravenna, *Helv.* **30**, 441 (1947).

²) Th. Posternak & D. Reymond, *Helv.* **36**, 260 (1953).

Partie expérimentale.

Sauf indications contraires, les F. sont corrigés et ont été déterminés au microscope à platine chauffante *Kofler*. — Les spectres d'absorption UV. ont été déterminés au spectrophotomètre *Beckman* modèle DU.

Obtention des bactéries. Les cultures de 3 jours d'*Acetobacter suboxydans*¹⁾ sur eau de levure-sorbitol, leur centrifugation et le lavage des microorganismes ont, sauf indications contraires, été effectuées comme nous l'avons décrit précédemment²⁾.

Préparation du (-)-cyclohexane-tétrol-1,3/2,4 (VIII) à partir du (-)-viburnitol (XI). 460 mg de (-)-viburnitol³⁾ sont dissous dans 15 cm³ de tampon phosphate 0,022-m. de pH 6,0. On agit à 35° dans une atmosphère d'oxygène médical, en présence de bactéries provenant de 660 cm³ de milieu de culture. Consommation d'oxygène: 0,50 mol. par mol. de substrat en 2 h. On centrifuge et lave par centrifugation. Les liquides réunis sont additionnés de H₂SO₄ à 50% de manière à avoir une concentration finale 1-n.; puis on agit 18 h. dans une atmosphère d'hydrogène, en présence de 102 mg d'oxyde de platine. Consommé 2,03 mol. H₂ par mol. de substance. Les ions SO₄⁻⁻⁻ et PO₄⁻⁻⁻ sont précipités par la quantité nécessaire d'hydroxyde de baryum. On évapore à sec, puis on reprend par 2—3 cm³ d'alcool absolu et obtient après 4 h. de repos 114 mg de F. 145—148°. Par cristallisation fractionnée dans l'alcool, on sépare 11 mg d'un produit peu soluble de F. 194—200° qui représente probablement du désoxy-scyllitol impur⁴⁾ et qui n'a pas été examiné de plus près. A partir de la solution-mère, on obtient après plusieurs recristallisations dans l'alcool des plaquettes (50 mg) de F. 146—148°⁵⁾.

$$c = 1,11 \text{ (eau)}; l = 1 \text{ dm}; \alpha_D^{17} = -0,32^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{17} = -28,8^0 \pm 1,8^0$$

$$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4 \quad \text{Calculé C 48,62 H 8,16\%} \quad \text{Trouvé C 48,49 H 8,16\%}$$

Traité en solution 0,00345-m. dans H₂SO₄ 0,17-n. par 6 mol. NaIO₄, le produit consomme en 18 h., à 25°, 3,3 mol. NaIO₄; calculé pour un cyclohexane-tétrol-1,2,3,4: 3,0 mol.

Tétrabenzoate: 10 mg de tétrol VIII suspendus dans 0,1 cm³ de chlorure de benzoyle en présence d'un peu de chlorure de zinc anhydre sont chauffés 30 min. à 120°. Après destruction de l'excès de chlorure de benzoyle au moyen de soude caustique, le dérivé benzoyle est traité à l'éther; l'insoluble (16 mg) est recristallisé dans l'acide acétique: 11 mg (fines aiguilles), F. 244—246°.

$$c = 0,95 \text{ (CHCl}_3\text{)}; l = 1 \text{ dm}; \alpha_D^{21} = -0,25^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{21} = -26,3^0 \pm 2,1^0$$

$$\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_8 \quad \text{Calculé C 72,33 H 5,00\%} \quad \text{Trouvé C 72,29 H 4,96\%}$$

Expériences avec le produit brut d'oxydation biochimique du dihydro-conduritol.

Osazone III. 106 mg de dihydro-conduritol ont été oxydés, dans les conditions déjà décrites, par des bactéries provenant de 300 cm³ de liquide de culture. L'oxydation est terminée au bout de 200 min. après consommation de 0,5 mol. O₂. Après centrifugation, le liquide qui réduit fortement la liqueur de *Fehling* a $[\alpha]_D^{20} = +1,0^0$ (rapporté au tétrol de départ). La solution (5 cm³) est additionnée de 2 cm³ d'un mélange, à parties égales, de phénylhydrazine, d'acide acétique glacial et d'eau. L'osazone se sépare graduellement à température ordinaire. On recueille, en 4 fractions séparées successivement, en l'espace de 10 jours, au total 108 mg de produit. Ces diverses fractions fournissent par recristallisation dans 4 parties d'alcool des produits de même F. 202—204° n. c. (chauffe rapide, en tube capillaire, déc.) et de même $[\alpha]_D$.

$$c = 0,46 \text{ (pyridine-alcool 1:1)}; l = 1 \text{ dm}; \alpha_D^{21} = -1,06^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{21} = -230^0 \pm 5^0$$

$$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{O}_2\text{N}_4 \quad \text{Calculé N 17,28\%} \quad \text{Trouvé N 16,93; 17,44\%}$$

¹⁾ Souche d'*Acetobacter suboxydans Kluyver & de Leeuw*, reçue en 1945 de M. le Prof. *Kluyver* (Delft).

²⁾ *Th. Posternak & D. Reymond*, *Helv.* **36**, 260 (1953).

³⁾ Le produit contenait comme impureté env. 4% de ms-inositol.

⁴⁾ Son Rf est d'ailleurs analogue à celui d'un cyclohexane-pentol.

⁵⁾ On a obtenu une fois un produit (purifié par l'intermédiaire de son tétrabenzoate de F. 246°) F. 160—162°. Il s'agit probablement d'un cas de dimorphisme.

Spectre d'absorption UV. (alcool): λ_{\max} : 260; 307; 387 μ ($\log \epsilon_{\max}$: 4,33; 4,08; 4,28); λ_{\min} : 280; 342 μ ($\log \epsilon_{\min}$: 3,85; 3,87).

Hydrogénation catalytique. 392 mg de dihydro-conduritol ont été oxydés par des bactéries provenant de 600 cm^3 de milieu de culture. Le substrat avait été dissous dans de l'eau distillée (pas de mélange tampon). Consommé 1,06 atomes-g oxygène en 2 h. Après centrifugation le pH (qui est de 4,5) est ajusté à 6,7 au moyen d'hydrogénocarbonate de sodium solide. On transvase dans une poire à hydrogénation et hydrogène en présence de 50 mg d'oxyde de platine. Consommé en 18 h. 1,10 mol. H_2 . La solution est déionisée par passage sur des colonnes d'Amberlites IR 100 et IR 4 B; elle donne par chromatographie sur papier 2 taches de Rf correspondant à celles de tétrols 1,2,3/4 et 1,4/2,3 de référence. Après évaporation à sec, on reprend plusieurs fois le résidu par l'acétate d'éthyle, puis par un mélange alcool-acétate d'éthyle, en évaporant chaque fois rapidement à sec. Après séjour sous 2 cm^3 de mélange alcool-acétate d'éthyle 1:1, on recueille 97 mg d'une substance non dissoute (produit A) de F. 120–148° qu'on recristallise dans l'alcool absolu. Obtenu 30 mg de (-)-cyclohexane-tétrol-1,2,3/4 (II) de F. 159–160°; fines et longues aiguilles.

$$c = 2,0 \text{ (eau)}; l = 1 \text{ dm}; \alpha_D^{20} = -0,665^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{20} = -33,2^0 \pm 1,0^0$$

Le mélange avec un échantillon de F. 159° et $[\alpha]_D^{18} = -35,8^0$ préparé d'après Posternak & Friedli¹⁾ fond à 159°.

Le tétrabenzate (26 mg) préparé par benzoylation de 13,5 mg dans la pyridine anhydre et recristallisé dans l'alcool (aiguilles allongées) fond à 139–140°. F. du mélange avec le tétrabenzate du (-)-cyclohexane-tétrol-1,2,3/4 préparé selon Posternak & Friedli (F. 140°; $[\alpha]_D^{21} = -108,5^0 \pm 3,0^0$) sans dépression.

$$c = 0,71 \text{ (CHCl}_3\text{)}; l = 1 \text{ dm}; \alpha_D^{17} = -0,72^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{17} = -101,4^0 \pm 2,8^0$$

$$\text{C}_{34}\text{H}_{28}\text{O}_8 \quad \text{Calculé C 72,33 H 5,00\%} \quad \text{Trouvé C 72,21 H 4,91\%}$$

La solution-mère du produit A est évaporée à sec; on reprend par la quantité minimum d'alcool et ajoute 10 vol. d'acétate d'éthyle. Au bout de 48 h., il s'est séparé 130 mg de cristaux grenus de F. 125–134° (produit B) qu'on recristallise 2 fois dans l'alcool absolu: obtenu 100 mg (courtes aiguilles plates groupées en rosettes) de F. 138–139°.

$$c = 0,76 \text{ (eau)}; l = 1 \text{ dm}; \alpha_D^{20} = +0,295^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{20} = +38,8^0 \pm 3,3^0$$

Posternak & Friedli¹⁾ avaient indiqué pour le (-)-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3: F. 161° et $[\alpha]_D^{21} = -38,5^0$. Le produit qui vient d'être décrit représente du (+)-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3 (X) impur. Vu les difficultés que présente sa purification complète, il a été caractérisé sous forme de combinaison racémique moins soluble et plus facilement purifiable. Un mélange de 8,5 mg de produit et de 8,5 mg de (-)-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3 est recristallisé dans 0,4 cm^3 d'alcool: microprismes de F. 139–141° et $[\alpha]_D = 0^0$; le mélange avec du DL-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3 de F. 140°, préparé d'après Posternak & Friedli, fond à la même température. Le tétrabenzate fond après recristallisation dans l'alcool à 138–139°; son mélange avec du tétrabenzate du DL-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3 de F. 135–136°, préparé d'après Posternak & Friedli²⁾, fond à 137°.

La première solution-mère du produit B fournit par évaporation une gomme dont nous n'avons rien pu retirer de cristallisé. Après dessiccation et benzoylation par le chlorure de benzoyle en présence de pyridine anhydre, on obtient par contre un dérivé cristallisé peu soluble dans l'éther (40 mg; F. 232–237°) qui, après recristallation dans l'ac. acétique, fond à 249–250°.

$$c = 2,75 \text{ (CHCl}_3\text{)}; l = 1 \text{ dm}; \alpha_D^{17} = -0,755^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{17} = -27,4^0 \pm 0,8^0$$

Le mélange avec le tétrabenzate de (-)-cyclohexane-tétrol-1,3/2,4 de F. 244–246° obtenu à partir du (-)-viburnitol fond à 245–247°.

¹⁾ Helv. **36**, 251 (1953).

²⁾ Posternak & Friedli indiquent F. 154–155°; il s'agit sans doute d'un cas de dimorphisme.

Réduction par l'amalgame de sodium. Le produit brut obtenu par oxydation biochimique, dans les conditions habituelles, de 200 mg de dihydro-conduritol est réduit par un total de 14 g d'amalgame de sodium à 2%, introduits en 7 portions, la réaction étant maintenue continuellement acide par addition d'acide sulfurique n. La solution est déionisée par passage sur les Amberlites IR-100 et IR-4 B. Le résidu gommeux est un mélange complexe, car la chromatographie sur papier indique la présence d'au moins 5 substances dont 3 différant des cyclohexane-tétrols de référence. Après benzoylation, on obtient toutefois 100 mg de tétrabenzooate de (-)-cyclohexane-tétrol-1,3/2,4, isolé grâce à son insolubilité dans l'éther, de F. 249–250° et $[\alpha]_D^{18} = -25^\circ$, qui a été identifié par son F. de mélange. Le rendement est env. 5 fois plus élevé que dans l'expérience comportant l'hydrogénation catalytique.

Trihydroxy-cyclohexanones α (V) et β (VII).

Séparation par chromatographie sur papier: 252 mg de dihydro-conduritol sont oxydés par des bactéries provenant de 600 cm³ de liquide de culture. Durée d'oxydation: 2 h. Pour diminuer la quantité de matières minérales le dernier lavage par centrifugation des bactéries et la dissolution du substrat sont effectués au moyen d'eau distillée.

A la chromatographie sur papier dans divers systèmes de dissolvants, on observe deux taches correspondant aux Rf suivants (à température ordinaire):

	En volume	Cétone β	Cétone α
Butanol-ac. acétique-eau	4:1:5	0,31	0,45
Acétone-eau	90:10	0,25	0,57
Acétone-eau	85:15	0,43	0,76
Acétone-eau	80:20	0,53	0,74
Ethanol-eau	80:20	0,62	0,74
Dioxanne-eau	80:20	0,78	0,90
Ac. acétique-eau	80:20	0,85	0,85
Phénol-eau		0,72	0,72

Après l'oxydation biochimique, la solution centrifugée est concentrée dans le vide à 7 cm³ environ et reportée en bandes continues dans le sens de la largeur sur 7 feuilles de papier *Whatman* N° 1 (23 × 58 cm). Nous avons effectué la chromatographie le plus fréquemment dans le système butanol-ac. acétique-eau, en chromatographie descendante, durant 2 jours. Plus récemment, nous avons utilisé aussi l'acétone à 85% en chromatographie ascendante, à 4°, durant 8–12 h. On met à sécher les chromatogrammes durant une nuit. De minces bandelettes sont ensuite découpées dans le sens longitudinal. Par pulvérisation du réactif de *Tollens* (AgNO₃ 0,1-n. + NH₃ 5-n. + NaOH 2-n. 1:1:2 en vol.), les deux taches se révèlent à froid¹). Les bandes horizontales correspondantes sont découpées dans les 7 feuilles. Les deux séries de bandes sont finement fragmentées et chacun des deux paquets de fibres est extrait par agitation avec au total 75 cm³ d'eau à 4°. Les deux solutions sont ensuite concentrées sous pression réduite (bain à 30°) à un tiers.

Les spectres des solutions des 2 produits α et β sont pratiquement identiques (λ_{\max} : 265–268 m μ). La courbe d'absorption du produit brut d'oxydation avant chromatographie²) a une forme très voisine, à ce détail près qu'elle est décalée de 15 m μ vers les grandes longueurs d'ondes. Les solutions de α et β réduisent la liqueur de *Fehling* à froid et ne donnent pas de réaction colorée avec le chlorure ferrique. Elles sont facilement altérables, même conservées à 4°.

¹) Cf. *Th. Posternak, D. Reymond & W. Haerdi, Helv.* **38**, 191 (1955).

²) Dans ce cas, on a employé comme solution de référence le liquide obtenu par traitement identique des bactéries en l'absence de substrat.

Osazone III. 2 cm³ de chacune des deux solutions des cétones α et β sont additionnés de 0,5 cm³ du mélange phénylhydrazine-ac. acétique-eau (1:1:1) et abandonnés à froid. La séparation d'osazone se fait beaucoup plus rapidement aux dépens de β que de α . Au bout de 24 h. les deux osazones (4 mg chacune) sont lavées et recristallisées dans un mélange eau-alcool. Osazone à partir de α : F. 204—205°; $[\alpha]_D^{20} = -221^\circ \pm 11^\circ$ (pyridine-alcool 1:1). Osazone à partir de β : F. 204—205°; $[\alpha]_D^{20} = -224^\circ \pm 6^\circ$ (pyridine-alcool 1:1), F. de mélange des deux osazones: 204—205° (tous ces F.: non corr., chauffe rapide, en tube capillaire, avec déc.).

Hydrogénation catalytique de la cétone β en milieu neutre. Le reste de la solution extraite du papier est hydrogéné en présence de 60 mg d'oxyde de platine. Consommé par la cétone: 13 cm³ H₂ (730 mm; 18°). La solution est évaporée à sec; le résidu repris par le méthanol cristallise; on essore au bout de 4 jours: 15 mg; F. 137—157°. Obtenu après recristallisation dans l'alcool 8 mg de (+)-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3 (X) de F. 158—160°.

$$c = 0,46 \text{ (eau); } l = 2 \text{ dm; } \alpha_D^{18} = +0,35^\circ \pm 0,02^\circ; [\alpha]_D^{18} = +38,0^\circ \pm 2,2^\circ$$

Un produit de 1 mg du produit et de 1 mg de (-)-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3¹) (F. 159°; $[\alpha]_D^{21} = -38,5^\circ$) est recristallisé dans l'alcool: F. 138—140° de même que le F. du mélange avec du DL-cyclohexane-tétrol de F. 138—140° préparé d'après Posternak & Friedli.

Le résidu de la solution-mère des 15 mg de F. 137—157° est desséché par plusieurs additions de benzène suivies d'évaporation à sec; on sèche encore sous vide à 100° et traite $\frac{1}{2}$ h. par 0,2 cm³ de chlorure de benzoyle à 120° en présence de chlorure de zinc. Après traitement par de la soude caustique 1-n. en excès, à 0°, l'insoluble est lavé à l'éther et recristallisé dans un mélange de chlorure de méthylène et d'éther de pétrole: 2 mg de F. 243—248°. F. du mélange avec le tétrabenzate de (-)-cyclohexane-tétrol-1,3/2,4 (de F. 244—246° et $[\alpha]_D^{21} = -26,3^\circ$): 244—248°.

$$c = 0,29 \text{ (CHCl}_3\text{); } l = 1 \text{ dm; } \alpha_D^{20} = -0,08^\circ \pm 0,02^\circ; [\alpha]_D^{20} = -27,6^\circ \pm 6,9^\circ$$

Hydrogénation catalytique de la cétone α en milieu neutre. Le reste de la solution extraite du papier est hydrogéné en présence de 62 mg d'oxyde de platine. Consommé par la cétone: 15 cm³ H₂ (730 mm; 18°). Après évaporation à sec, le résidu cristallise sous 2 cm³ d'un mélange méthanol-acétate d'éthyle 1:1; obtenu 14 mg de F. 151—156°. Par recristallisation dans 1 cm³ d'alcool absolu, obtenu 6 mg (houppettes d'aiguilles) de F. 158—160°. Le mélange avec du (-)-cyclohexane-tétrol-1,2,3/4 (II)³) de F. 161° et $[\alpha]_D^{18} = -35,8^\circ$ fond à 159°.

$$c = 0,37 \text{ (eau); } l = 2 \text{ dm; } \alpha_D^{18} = -0,25^\circ \pm 0,02^\circ; [\alpha]_D^{18} = -33,8^\circ \pm 2,7^\circ$$

Hydrogénation des trihydroxy-cyclohexanones α et β en milieu acide. 1,06 g de dihydroconduiritol sont oxydés comme décrit plus haut par des bactéries provenant de 1 litre de liquide de culture. Consommé en 2 h. 0,515 mol. O₂ par mol. de substance. Les cétones α et β sont séparées ainsi qu'il a été indiqué plus haut par chromatographie ascendante sur papier dans le système acétone-eau (85:15 en vol.). Les deux solutions sont évaporées dans le vide à un volume de 25 cm³; elles sont additionnées toutes deux de 3 cm³ H₂SO₄ 10-n. et hydrogénées catalytiquement durant 15 h. en présence de 200 mg d'oxyde de platine. Consommation (28°, 745 mm) après déduction de l'hydrogène consommé par le catalyseur: cétone α : 200 cm³; cétone β : 97 cm³.

Les solutions filtrées sont neutralisées par l'hydroxyde de baryum à la phénolphtaléine. Après filtration du sulfate de baryum on évapore à sec dans le vide. Chacun des deux résidus est extrait au total par 10 cm³ d'acétone bouillant. Les résidus d'évaporation des solutions acétoniques sont traités chacun au total par 10 cm³ d'éther acétique bouillant, ce qui permet de séparer les cyclohexane-triols des cyclohexane-tétrols qui sont beaucoup moins solubles dans ce dernier dissolvant.

a) La substance extraite à l'acétate d'éthyle (88 mg) obtenue à partir de la trihydroxycétone α consiste essentiellement en (-)-cyclohexane-triol-1,2/3 (I). Par de nom-

¹) Th. Posternak & H. Friedli, Helv. 36, 251 (1953).

breuses cristallisations fractionnées dans l'acétate d'éthyle, on a obtenu 7 mg (rosettes) de F. 133—134°.

$$c = 0,675 \text{ (eau); } l = 1 \text{ dm; } \alpha_D^{18} = -0,47^0 \pm 0,02; [\alpha]_D^{18} = -69,6^0 \pm 3,0^0$$

*Posternak & Ravenna*¹⁾ indiquent pour le (+)-cyclohexane-triol-1,2/3 F. 134—135° et $[\alpha]_D^{20} = +70,6^0 \pm 2^0$.

28 mg du produit moins pur contenu dans les eaux-mères ont été benzoylés en solution dans la pyridine anhydre. Le tribenzoate isolé de la manière habituelle est traité par l'alcool méthylique à 4° et enfin recristallisé plusieurs fois dans l'acide acétique: 30 mg, F. 141—142°, de même que le F. de mélange avec du tribenzoate de (-)-cyclohexane-triol-1,2/3¹⁾ de F. 141—142°.

$$c = 0,80 \text{ (CHCl}_3\text{); } l = 1 \text{ dm; } \alpha_D^{21} = -1,51^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{21} = -189^0 \pm 3^0$$

Posternak & Ravenna indiquent pour le tribenzoate de (-)-cyclohexane-triol-1,2/3 $[\alpha]_D^{21} = -190,8^0 \pm 3^0$.

b) La substance extraite à l'acétate d'éthyle (57 mg) provenant de la trihydroxycétone β , consiste essentiellement en cyclohexane-triol-1,3/2. Par recristallisation dans un mélange acétate d'éthyle-hexane, il a été possible, lors d'une expérience, d'isoler du triol pur fondant à 104—106°; F. de mélange avec un échantillon authentique incomplètement purifié de F. 99—103°: 101—104°.

Lors d'une autre opération, on n'a pu pousser la purification aussi loin. Le produit (28 mg) de F. 95° a alors été benzoylé en solution pyridinique dans les conditions habituelles. Le tribenzoate traité d'abord par l'alcool méthylique à froid, puis recristallisé dans le même dissolvant, fournit des aiguilles (houpettes; 32 mg) de F. 138—139° optiquement inactives. F. du mélange avec un échantillon authentique incomplètement purifié de F. 135—138°: 137—138°. F. indiqué par *Brunel*²⁾: 141—142°.

Action des bactéries sur les cétones α et β . a) Du dihydro-conduritol est soumis à l'action d'*Acetobacter suboxydans* dans les conditions habituelles. On prélève de temps à autre des échantillons qui, après centrifugation, sont soumis à la chromatographie sur papier, dans le système butanol-ac. acétique-eau (4:1:5 en vol.) dans les conditions déjà décrites. Les deux hydroxycétones α et β ainsi séparées sont dissoutes dans la même quantité d'eau. On détermine les densités optiques des solutions α et β ($D_{\max} \alpha$ et $D_{\max} \beta$) au maximum d'absorption ($\lambda = 263 \text{ m}\mu$) en utilisant comme solution de référence un liquide obtenu à partir de bactéries traitées en l'absence de substrat:

Durée d'actions des bactéries, en heures	3	18
$D_{\max} \beta / D_{\max} \alpha$	1,35	2,2

b) Chacune des solutions des cétones α et β est agitée à 35° avec 2 vol. de suspension de bactéries (1 vol. de suspension dans le mélange tampon phosphate 0,066-m de pH 6 contenant les bactéries présentes dans env. 50 vol. de milieu de culture primitif). Des échantillons sont prélevés de temps à autre. Après centrifugation et chromatographie sur papier, les chromatogrammes sont révélés à froid par le réactif de *Tollens*³⁾. On constate alors une interconversion des deux cétones. Le tableau suivant indique l'intensité des taches observées sur les chromatogrammes.

Durée d'action des bactéries en heures	A partir de la cétone α		A partir de la cétone β	
	cétone α restante	cétone β formée	cétone α formée	cétone β restante
2	++	++	0	++++
8	+	+++	0	++++
18	+	+++	+	+++

¹⁾ *Th. Posternak & F. Ravenna, Helv. 30, 441 (1947).*

²⁾ *C. r. hebd. Séances Acad. Sci. 150, 986 (1910).*

³⁾ *Th. Posternak, D. Reymond & W. Haerdi, Helv. 38, 191 (1955).*

On ne constate par contre aucune interconversion lorsque les solutions d'hydroxycétones sont traitées, dans les mêmes conditions de durée et de température, en l'absence de bactéries ou encore en présence de bactéries tuées préalablement par 15 min. d'ébullition.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Sous l'action d'*Acetobacter suboxydans*, le dihydro-conduritol (IV) donne naissance à deux trihydroxycétones séparables par chromatographie sur papier. Leur constitution a été établie. L'une d'entre elles (V) représente le produit primaire d'oxydation; elle se transforme d'une manière réversible en la deuxième (VII) sous l'action d'un ferment produit par le microorganisme.

Au cours de ce travail, on a établi les configurations des cyclitols suivants dont découlent bien entendu celles de leurs antipodes optiques: (–)-cyclohexane-tétrol-1,3/2,4 (VIII); (–)-cyclohexane-tétrol-1,2,3/4 (II); (+)-cyclohexane-tétrol-1,2,4/3 (X); (–)-cyclohexane-triol-1,2/3 (I).

Bâle, Institut de Pharmacie de l'Université.
Genève, Laboratoire de Chimie biologique et
organique spéciale de l'Université.

23. Recherches dans la série des cyclitols XXII.

Configuration et oxydation biochimique de cyclane-diols-1,2

par Th. Posternak, D. Reymond et H. Friedli.

(9 XII 54)

En 1922, *Derox*¹⁾ montra que le cyclohexane-diol-1,2 de F. 104⁰ se laisse fractionner, par l'intermédiaire du sel de strychnine de son ester disulfurique, en antipodes optiques; il lui attribua, pour cette raison entre autres, la configuration *trans* (V + VI). Jusqu'à présent, à notre connaissance, on n'avait pas encore établi à laquelle des deux formules V et VI correspondent, dans notre système conventionnel de notation stéréochimique, resp. le (+)- et le (–)-cyclohexane-diol-1,2. La présente communication est consacrée en partie à l'étude de cette question.

Acetobacter suboxydans s'attaque au D,L-cyclohexène-3-diol-1,2 *trans* (I + II)²⁾ avec consommation au total de 0,5 mol. O₂ par mol. de substrat³⁾. Le spectre d'absorption du produit brut d'oxydation comporte deux maxima⁴⁾ à $\lambda = 225 \text{ m}\mu$ ($\log \varepsilon = 3,8$) et $\lambda = 273 \text{ m}\mu$ ($\log \varepsilon = 2,4$), ce qui rend très probable la présence de cétones α , β -éthyl-

¹⁾ J. Boeseken & J. van Giffen, Rec. Trav. chim. Pays-Bas **39**, 183 (1920); H. Derox, ibid. **41**, 333 (1922).

²⁾ Th. Posternak & H. Friedli, Helv. **36**, 251 (1953).

³⁾ Th. Posternak & D. Reymond, Helv. **36**, 260 (1953).

⁴⁾ La concentration moléculaire est supposée être la même que celle du substrat de départ.