

La Structure d'un Isomère du Raffinose Isolé des Racines de l'*Angélica archangélica* L. subsp. *norvégica* (Rupr.) Nordh

ALF WICKSTRØM et ANDERS BÆRHEIM SVENDSEN

Universitetets farmasøytiske institutt, Blindern-Oslo, Norvège

A non-reducing trisaccharide occurring in the roots of some *Umbelliferae* has been isolated on a preparative scale from *Angelica archangelica* L. subsp. *norvegica* (Rupr.) Nordh. The trisaccharide ($[\alpha]_D^{20} = +125^\circ$; water; on anhydrous basis) contains D-fructose, D-glucose and D-galactose, linked together in the same order as in raffinose, and, like raffinose, it yields sucrose on hydrolysis with α -galactosidase. One molecule of the trisaccharide reduces under standard experimental conditions four molecules of periodate, and one molecule of formic acid is simultaneously formed. The fully methylated trisaccharide gives by acid hydrolysis equimolecular amounts of tetramethyl-D-fructofuranose, tetramethyl-D-galactopyranose and 3,4,6-trimethyl-D-glucose. All experimental results obtained agree with the structure of a 2'- α -D-galactopyranosyl-2- α -D-glucopyranosyl- β -D-fructofuranoside. According to this structure the trisaccharide studied is an isoraffinose, in the present paper, however, denoted as *umbelliferose*.

Au cours de ses recherches phytochimiques sur des ombellifères de Norvège l'un de nous¹ a trouvé dans les racines de certaines espèces de cette famille un trisaccharide qui, par quelques unes de ses propriétés, se distingue nettement des trisaccharides naturels décrits dans la littérature antérieure.

Ce sucre a été trouvé dans les racines de *Pimpinella saxifraga* L. et d'*Angélica archangélica* L. subsp. *norvégica* (Rupr.) Nordh., et il est probablement présent dans les racines de quelques autres ombellifères¹.

Le trisaccharide a été isolé en petites quantités à l'aide de chromatographie sur papier épais. Il est composé de fructose, de glucose et de galactose, arrangés dans le même ordre que dans le raffinose: fructose-glucose-galactose.

Cependant, l'auteur cité¹ a trouvé à ce trisaccharide certaines propriétés permettant de conclure qu'il n'est pas identique au trisaccharide le plus répandu dans les plantes, le raffinose: 1) Après hydrolyse partielle on a isolé du fructose ainsi qu'un disaccharide qui, aux chromatogrammes, se sépare nettement du mélibiose, disaccharide isolé du raffinose par le même procédé. 2) Le trisaccharide nouveau est beaucoup plus résistant vis-à-vis de l'invertase que n'est le raffinose dans les mêmes conditions.

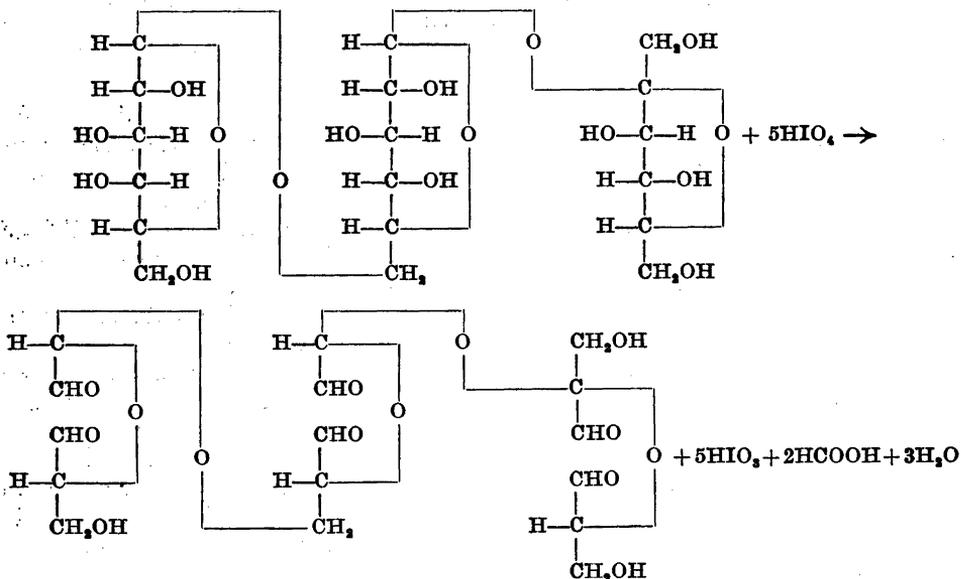
Dans le mémoire présent nous décrivons une technique améliorée pour l'isolement du trisaccharide des racines d'*Angélica archangélica* L. subsp. *norvégica* (Rupr.) Nordh. et nous présentons les résultats d'une étude de la structure moléculaire du sucre ainsi isolé. Nous adopterons, pour ce trisaccharide, la dénomination d'umbelliférose.

L'extraction et la purification de l'umbelliférose se trouvent décrites dans la partie expérimentale. 1 000 g de racines desséchées donnent 10 g environ de trisaccharide. Celui-ci se présente sous forme de poudre blanche, amorphe, non réductrice vis-à-vis le réactif cupro-alkalin. Son pouvoir rotatoire spécifique, déterminé sur des échantillons anhydres est de $+125^\circ$ ($c = 2$; eau). Ce chiffre est très voisin de celui indiqué dans la littérature² pour le raffinose anhydre, $+123^\circ$.

La vitesse d'hydrolyse de l'umbelliférose par l' α -galactosidase des graines de café est à peu près pareille à celle du raffinose (voir Tableau 1). Une molécule d'umbelliférose, par cette hydrolyse, donne naissance à une molécule de galactose et une molécule d'un disaccharide se composant de fructose et de glucose. Ce disaccharide a été isolé en état cristallin. Toutes ses propriétés chimiques et physiques, y compris le diagramme de diffraction aux rayons X, sont identiques à celles du saccharose (recristallisé de la même manière que le disaccharide inconnu). On en peut conclure que l'umbelliférose est un α -galactoside du saccharose. La présence dans l'umbelliférose de D-galactose sous forme pyranique étant prouvée par des études de méthylation auxquelles nous reviendrons plus bas, nous sommes en droit de conclure que l'umbelli-

SCHEMA I.

Oxydation du raffinose par l'acide periodique.



férose est un α -D-galactopyranoside du saccharose avec son galactose lié au glucose. Toutefois, cette description ne le distingue en rien du raffinose.

Cependant, l'étude quantitative de l'oxydation de l'umbelliférose par le periodate de sodium a révélé une différence de structure nette entre ce sucre et le raffinose. Le raffinose, étudié par Courtois et Wickström³, réduit cinq molécules d'acide periodique en donnant naissance à deux molécules d'acide formique au cours de la réaction présentée ci-dessous dans le schéma I. L'umbelliférose, par contre, réduit dans des conditions expérimentales semblables quatre molécules d'acide periodique, ne produisant qu'une seule molécule d'acide formique. Ces résultats, qui se trouvent exposés dans le Tableau 2, sont interprétés de la façon suivante.

L'acide formique est libéré par l'attaque de l'acide periodique sur les trois hydroxyles libres se trouvant dans l'anneau D-galactopyranosique, qui, par conséquent, pour son ouverture, exige la réduction de deux molécules d'acide periodique. Une troisième molécule d'acide periodique est réduite par le D-fructofuranose appartenant à la partie du trisaccharide possédant la configuration du saccharose. Il s'en suit que la quatrième molécule d'acide periodique est réduite, sans libération simultanée d'acide formique, par l'unité centrale du trisaccharide: le D-glucopyranose. Celui-ci, par conséquent, doit posséder deux fonctions alcooliques libres attachées à deux atomes de carbone contigus. La réaction entre l'umbelliférose et l'acide periodique permet d'envisager, pour l'umbelliférose, deux structures différentes: 1) celle d'un α -D-galactopyranoside du saccharose avec le pont galactosidique lié au carbone 4 du glucose ou 2) celle d'un α -D-galactopyranoside du saccharose avec le pont galactosidique attaché au carbone 2 du glucose.

Pour nous permettre de choisir entre ces deux possibilités, l'umbelliférose, après méthylation complète, a été soumis à l'hydrolyse et les oses méthoxylés ainsi formés ont été identifiés. Par ce procédé ont été obtenus, en quantités pratiquement égales, le tétraméthyl-D-fructofuranose, le tétraméthyl-D-galactopyranose et le triméthyl-3,4,6-D-glucose. Ce dernier a été identifié par sa réaction caractéristique, décrite par Greville et Northcote⁴, avec le periodate de sodium, réaction qui permet de distinguer ce dérivé de tous les triméthyl-D-glucoses ne possédant pas, comme le triméthyl-3,4,6-D-glucose, un groupement hydroxyle libre en position 2.

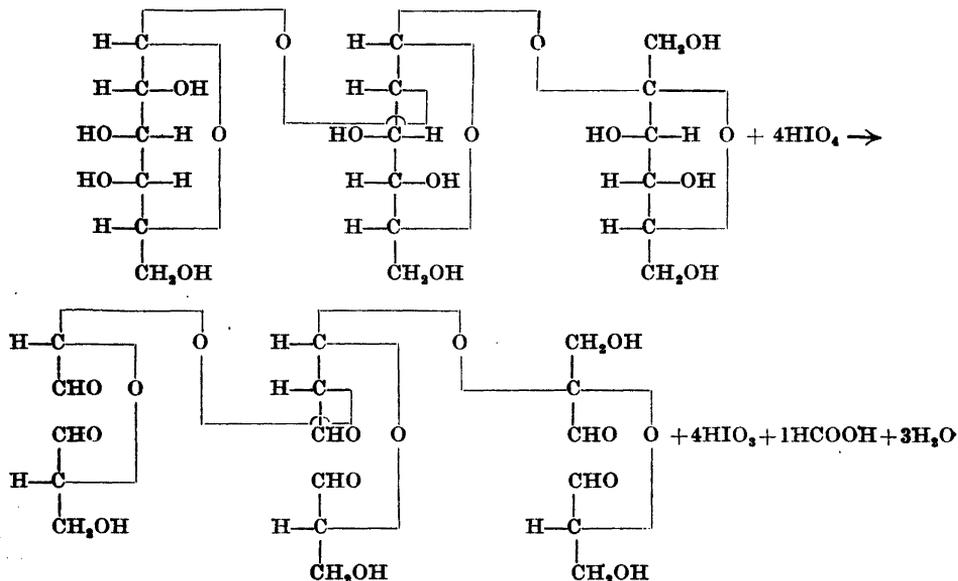
La réaction entre l'umbelliférose et l'acide periodique est représentée par le schéma II.

Il convient de noter que l'observation du changement du pouvoir rotatoire pendant l'oxydation de l'umbelliférose par l'acide periodique nous a fourni d'un argument supplémentaire en faveur de la configuration α du carbone 1 du groupement galactopyranosique. Ce changement du pouvoir rotatoire est dû à l'élimination partielle des centres optiquement actifs, principe déjà devenue classique dans les recherches sur les hétérosides simples⁵.

Herrisey, Wickström et Courtois⁶, étudiant l'oxydation periodique du raffinose, du gentianose et du stachyose, on démontré que la déviation au polarimètre pendant l'oxydation du raffinose et du stachyose, oligosaccharides possédant des liaisons osidiques sous forme α , est toujours positive. Le gentianose, au contraire, qui possède une liaison osidique sous forme β , est transformé par oxydation en substance lévogyre. Or, nous avons trouvé à l'umbelli-

SCHÉMA II.

Oxydation de l'umbelliférose par l'acide périodique.



férose pendant son oxydation une déviation au polarimètre positive et du même ordre de grandeur que celle du raffinose dans les mêmes conditions.

L'ensemble de nos résultats expérimentaux sont en accord avec la structure présentée ci-dessous pour l'umbelliférose:

α -D galactopyranosyl-2'- α -D glucopyranosyl-2 β -D-fructofuranoside.

D'après cette structure la seule différence entre l'umbelliférose et le raffinose se trouve dans la position du pont oxydique reliant le D-galactose au carbone 2 du D-glucose dans l'umbelliférose tandis que dans le raffinose il est lié au carbone 6; voir schéma I et II. L'umbelliférose se classe donc comme un *isoraffinose*.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Isolement et purification de l'umbelliférose

Des racines d'*Angelica archangelica* L. subsp. *norvégica* (Rupr.) Nordh. furent cultivées par Vinmonopolet A/S, Oslo, et récoltées en Septembre - Octobre de la première année de végétation.

Les racines, soigneusement lavées, puis grossièrement découpées, ont été stabilisées par l'alcool à 96 % bouillant additionné de carbonate de calcium. Après ce traitement les racines séchées à la température ordinaire sont découpées et pulvérisées. Un kg de racines pulvérisées est extrait par dix litres d'eau distillée, saturée de toluène, pendant 24 heures à environ 20°. L'extrait aqueux est filtré; ensuite on le fait passer par des colonnes d'échangeurs d'ions, d'abord l'Amberlite IR 120 (H) et ensuite l'Amberlite IRA 400 (OH).

Il est avantageux de soumettre la solution ainsi obtenue à une purification ultérieure par la méthode classique de précipitation des acides par l'acétate de plomb.

On obtient finalement une solution jaune renfermant de l'umbelliférose, du saccharose, des traces d'hexoses et des impuretés colorées. Cette solution est concentrée sous pression réduite. Le résidu est un sirop de couleur jaune très foncé, presque solide. Rendement: 100 g.

Pour le fractionnement du sirop nous avons eu recours à la technique chromatographique de Whistler et Durso⁷; emploi d'une colonne de charbon actif et de celite, élution par l'éthanol à titre croissant. Avec le "Carbo activatus siccus Merck, p.a. No. 2186" nous avons obtenu une séparation des sucres aussi satisfaisante qu'avec le charbon "Darco-G-60", utilisé par Whistler et Durso.

L'adsorbant est introduit sur une hauteur d'environ 18 cm dans une colonne de 3,5 cm de diamètre, puis on ajoute 30 ml d'une solution aqueuse à 10 % du mélange saccharique. Ensuite la colonne est lavée, d'abord avec de l'eau distillée (environ 1 litre), puis avec de l'eau renfermant 5 % d'éthanol (1,5 à 2 litres) pour éliminer le saccharose. Vers la fin de l'élution la solution sortant de la colonne contient des traces d'umbelliférose. Il est naturellement indispensable de contrôler, par chromatographie sur papier, que toute trace de saccharose est éliminée avant de commencer l'élution de l'umbelliférose avec de l'éthanol à 15 % (0,75 litre).

L'éluate contenant l'umbelliférose est concentré sous pression réduite. Le résidu est repris dans 5-10 ml d'eau distillée, traité par du charbon actif, filtré et concentré de nouveau sous pression réduite. On obtient finalement environ 300 mg d'umbelliférose chromatographiquement homogène, se présentant sous forme de poudre blanche, floconneuse et amorphe. Nous n'avons pas réussi à faire cristalliser l'umbelliférose.

Le pouvoir rotatoire du trisaccharide a été déterminé avec des échantillons séchés jusqu'au poids constant dans le vide en présence d'anhydride phosphorique à 60°. Le pouvoir rotatoire spécifique en solution aqueuse, observé sur plusieurs échantillons provenant de préparations différentes, a toujours été trouvé entre +121° et +125° ($c = 2$). Il nous paraît probable que le pouvoir rotatoire le plus élevé, $[\alpha]_D^{20} = +125,3^\circ$, corresponde au produit le plus pur.

Il convient à noter que l'umbelliférose est facilement séparé du raffinose par chromatographie sur papier, avec le même système solvant que nous avons utilisé pour contrôler, par chromatographie sur papier, le fractionnement sur colonne du saccharose et le l'umbelliférose. Aux chromatogrammes, réalisés par la technique descendante à 20°-22° avec le système monophasique: isopentanol: 7 vol./pyridine: 7 vol./eau: 6 vol., le cheminement du saccharose au cours de 24 heures est de 24 à 28 cm. Les distances parcourues (R_S) par les trisaccharides par rapport à la migration du saccharose ($R_S = 1,00$) sont pour le raffinose 0,62 et pour l'umbelliférose 0,70.

2. Dosage quantitatif des hexoses libérés par hydrolyse acide de l'umbelliférose

a) *Hydrolyse complète*: Environ 50 mg de l'umbelliférose anhydre, exactement pesés, ont été dissous dans 1 ml d'acide sulfurique N/1 et chauffés en ampoule scellée à 100° pendant une heure. Neutraliser avec le carbonate de baryum, centrifuger et séparer les hexoses par chromatographie sur papier avec la phase organique du système solvant: acétate d'éthyle: 2 vol./pyridine: 1 vol./eau: 2 vol. Les hexoses séparés ont été élués à froid⁸ et dosés par titration, d'après le protocole de Hirst et Jones⁹, de l'acide formique libéré par oxydation avec le metaperiodate de sodium. Les chiffres suivants, représentant des moyennes de plusieurs chromatogrammes, expriment les proportions moléculaires des hexoses dans l'hydrolysate: glucose: 1,00; galactose: 0,96; fructose: 0,89.

b) *Hydrolyse partielle*: Une solution à 1,874 % d'umbelliférose anhydre dans de l'acide sulfurique 0,01 N (3 ml) est introduite dans une ampoule scellée et chauffée à 100° pendant 40 minutes. Par ce traitement le fructose est sélectivement et complètement détaché de la molécule d'umbelliférose. Pendant l'hydrolyse le pouvoir rotatoire change: $\Delta(\alpha)_D^{20}$: -58,3°, ce qui correspond à un changement du pouvoir rotatoire moléculaire ($\Delta(\alpha)_D^{20} \times P.M.$ du trisaccharide) de -29 410. Ce dernier chiffre est très voisin à ceux

indiqués dans la littérature pour le changement du pouvoir rotatoire moléculaire de certains oligosaccharides, changement provoqué par la rupture d'une liaison β -D-fructofuranosidique ¹⁰.

L'hydrolysat a été neutralisé par le carbonate de baryum, puis centrifugé. Le fructose libre a été dosé, sur volumes exactement mesurés avec une micropipette, après séparation chromatographique suivant la méthode décrite ci-dessus. Analyse: Anhydrofructose, $C_6H_{12}O_6$, calc. pour $C_{12}H_{22}O_{11}$: 32,15 %, tr: 31,0 % (moyenne de plusieurs analyses).

3. Hydrolyse de l'umbelliférose par l' α -galactosidase des graines de café

a) *Vitesse d'hydrolyse comparée avec celle du raffinose dans les mêmes conditions:* Mélanger 2 ml d'une solution M/20 du sucre à analyser, avec 0,5 ml d'un tampon contenant de l'acide acétique M/1 neutralisé avec de la soude jusqu'à pH 4,8 et 0,1 ml d'une suspension à 2 % de l' α -galactosidase. Laisser en contact à 37°. Les sucres reducteurs libérés par l'hydrolyse enzymatique sont dosés par leur action réductrice sur le réactif cupro-alcalin d'après la méthode de Lehmann, mise au point par Fleury et Boutot ¹¹. Nos résultats sont exposés dans le Tableau 1.

b) *Isolement et identification du saccharose après l'hydrolyse enzymatique de l'umbelliférose:* 2,3 g du trisaccharide, dissous dans 10 ml du tampon acétique de pH 4,8, furent additionnés de 5 ml d'une suspension à 1 % de l' α -galactosidase dans l'eau. L'hydrolyse à 37°, en présence d'un peu de toluène, est contrôlée tous les 4 jours au moyen de chromatographie sur papier. Après 16 jours le mélange est filtré et transféré à une colonne de charbon actif-cellite (diamètre: 3,5 cm, hauteur de l'adsorbant: 20 cm). Le galactose et les sels minéraux sont élués par de l'eau distillée (3 litres). Ensuite le disaccharide est récupéré par élution avec de l'éthanol à 5 %. La solution alcoolique fut concentrée sous pression réduite en un sirop visqueux et incolore (1 g). Cette substance, après avoir été séchée dans le vide en présence d'anhydride phosphorique, fut obtenu en état cristallin en suivant le procédé décrit par Courtois, Anagnostopoulos et Petek ¹². Rendement 0,47 g.

Un échantillon témoin de saccharose a été recristallisé dans un mélange d'éthanol et d'éther suivant le même protocole. Le disaccharide formé par détachement de galactose de l'umbelliférose fournit le même diagramme de diffraction aux rayons X que l'échantillon témoin de saccharose. Il est dédoublé par l'invertase d'une vitesse voisine de celle du dédoublement du saccharose. Son point de fusion: 185–188° (déterminé au microscope avec l'appareil de Kofler) n'est pas modifié par mélange avec l'échantillon témoin du saccharose. Son pouvoir rotatoire, $(\alpha)_D^{20} = +66,8^\circ$ ($c = 2$; eau), donc, pareil à celui du saccharose.

4. Oxydation de l'umbelliférose par l'acide périodique; comparaison avec le raffinose

50 ml d'une solution à M/500 du trisaccharide à analyser sont mélangés avec 200 ml d'une solution à M/100 de metaperiodate de sodium ($NaIO_4$). Laisser reposer à 18–20° à l'abri de lumière. Avec des prélèvements de 25 ml on fait a) un dosage de la quantité

Tableau 1. Action de l' α -galactosidase sur l'umbelliférose. Comparaison avec le raffinose.

Durée de contact à 37° (jours)	1	2	4	7
Molécules de galactose libérées par molécule de raffinose	<0,2	0,25	0,36	0,64
Molécules de galactose libérées par molécule d'umbelliférose	0,26	0,46	0,53	0,66

d'acide periodique réduite, dosage effectué d'après la méthode classique à l'anhydride arsénieux-iodure, et b) un dosage de l'acide formique libéré. Ce dosage a été fait par titration avec de la soude M/100 (rouge de méthyle-bleu de méthylène) après addition d'éthylèneglycol neutre (0,5 ml).

Les chiffres trouvés sont présentés dans le Tableau 2. Les résultats obtenus avec le raffinose en suivant la technique décrite ci-dessus sont conformes aux observations antérieures, voir Courtois et Wickstrøm³.

Dans des essais supplémentaires l'oxydation de l'umbelliférose par l'acide periodique libre est suivie au polarimètre. A titre d'exemple nous citerons une des expériences. 116,80 mg d'umbelliférose anhydre, dissous dans 4 ml d'eau distillée, sont mélangés avec 3,6 ml d'une solution d'acide periodique libre M/2. Compléter à 10 ml et suivre l'oxydation au polarimètre à la température de 20–22°. Lectures ($l = 1$ dm): Après 15 min: +0,61°; après 2 h: +0,55°; après 22 h: +0,48°. Après 22 h le pouvoir rotatoire reste constant. Le chiffre de +0,48° correspond à $[M]_D = 20\ 700$, calculé en employant le poids moléculaire du polyaldéhyde résultant en théorie de l'oxydation de l'umbelliférose (schéma II). Le chiffre correspondant pour le raffinose est $[M]_D = 23\ 500$.

Tableau 2. Oxydation de l'umbelliférose et du raffinose par le periodate de sodium.

Sucre	Durée de contact à 18°–20°	24 h	48 h	4 jours	6 jours	8 jours
Umbelliférose	Molécules a) d'acide periodique réduites	3,57	3,90 3,97	4,06 4,02	4,13 4,17	4,16 4,17
	Molécules a) d'acide monovalent libérés	0,68	0,91 0,88	0,95 0,94	0,97 0,88	1,01
Raffinose	Molécules a) d'acide periodique réduites	4,87	4,98	5,03		
	Molécules a) d'acide monovalent libérés	1,58	1,82	1,94		

a) par molécule de trisaccharide.

5. Hydrolyse d'un umbelliférose complètement méthylé et séparation des oses méthylés libérés par l'hydrolyse

3,8 g d'umbelliférose anhydre sont traités trois fois par le diméthylsulfate en présence de soude. Ensuite le produit est traité plusieurs fois par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent. Nous avons suivi sans modifications essentielles le procédé décrit d'une façon détaillée par Laidlaw et Wylam¹³ pour la méthylation complète du stachyose.

L'umbelliférose complètement méthylé se présente sous forme de sirop. Il est légèrement jaune. Rendement: 2,35 g. Analyse: CH_2O calc. pour $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_{11}$: 51,8 %; tr.: 49,5 %.
 $[\alpha]_D^{20}$: +110° ($c = 0,8$; eau); $[\alpha]_D^{25}$: +133° ($c = 1,2$; chloroforme).

2 g du produit méthylé sont dissous dans 100 ml d'acide sulfurique N/1 et chauffés à reflux dans un bain marie bouillant. Lectures du $[\alpha]_D^{25}$: Après 2 h: +52°; après 4 h: +49°. Après chauffage ultérieur le pouvoir rotatoire spécifique reste constant. Après 5 h de chauffage l'hydrolysé est neutralisé par le carbonate de baryum (10 g). La solution est filtrée et ensuite concentrée sous pression réduite. Le résidu est un sirop légèrement jaune. Rendement: 1,5 g.

1,2 g de ce sirop qui, aux chromatogrammes, se comporte comme un mélange de trois hexoses méthylés, est fractionné par chromatographie de partage sur une colonne de poudre de cellulose d'après Hough, Jones et Wadman¹⁴. Le diamètre intérieur de la

colonne est de 3 cm et la poudre de cellulose (Whatman Ashless Cellulose powder, Standard grade) est introduite sur une hauteur d'environ 65 cm. La phase mobile utilisée pour l'élution des oses méthylés est un mélange de *n*-butanol et d'éther de pétrole, saturé avec de l'eau: *n*-butanol: 3 vol/light petroleum, Eb: 100–120°, B.D.H. Londres: 7 vol. Nous avons récupéré de la colonne trois fractions distinctes, chromatographiquement homogènes, obtenues, après évaporation complète du solvant sous pression réduite, sous forme de sirops incolores ou légèrement jaunes. Rendements: Fraction I: 0,30 g; Fraction II: 0,30 g; Fraction III: 0,25 g.

6. Identification des trois fractions d'hexoses méthylés

Chaque fraction est d'abord purifiée par dissolution dans l'eau, traitement à environ 60° avec un peu de charbon actif, filtration à chaud et ensuite élimination de l'eau sous pression réduite.

Les valeurs de R_G données ci-dessous pour les différentes fractions sont déterminées par chromatographie sur papier avec la phase organique du système solvant: *n*-butanol: 50 vol/éthanol: 10 vol/eau: 40 vol. R_G exprime¹⁵ la distance parcourue par un ose par rapport à la distance parcourue par le tétraméthyl-D-glucopyranose (pour lequel $R_G = 1,00$), observé sur le même chromatogramme.

Fraction I (0,25 g): Analyse: CH_2O calc. pour $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_6$: 52,5 %; tr.: 52,0 %. $[\alpha]_D^{25}$: +30,5° ($c = 1$; eau) R_G : 1,00. Au chromatogramme la fraction I ne peut être distinguée du tétraméthyl-1,3,4,6-D-fructose, ajouté comme témoin. Les taches sont développées par l'oxalate d'urée et chauffage à 130°. Elles sont de couleur noire ou grise, différente de la couleur brune des taches produites par les méthylfructoses fixés sous forme pyranique^{16,17}. Les propriétés trouvées à la fraction I sont identiques à celles signalées pour le tétraméthyl-1,3,4,6-D-fructose¹⁸.

Fraction II (0,25 g): Analyse: CH_2O calc. pour $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_6$: 52,5 %, tr.: 51,8%. Lectures du $[\alpha]_D^{25}$: ($c = 0,8$; eau) Après 30 min: +122°, après 2 h: +111°, après 3 h: +106°. Ensuite, il reste constant. $R_G = 0,90$. Déméthylation¹⁹ par chauffage avec l'acide bromhydrique à 48 % donne du galactose, caractérisé par chromatographie sur papier. La fraction II, traitée par l'aniline, fournit un anilide qui fond à 196–198° (au microscope avec l'appareil de Kofler). Ce point de fusion n'est pas modifié par mélange avec un échantillon témoin de tétraméthyl-2,3,4,6 N-phényl-D-galactopyranosylamine. Le pouvoir rotatoire spécifique de l'anilide est initialement –70° ($c = 1$; acétone) avec une mutarotation très lente vers le droite. L'ensemble des résultats permet de conclure que la fraction II est identique au tétraméthyl-2,3,4,6-D-galactose²⁰.

Fraction III (0,20 g): Analyse: CH_2O calc. pour $\text{C}_9\text{H}_{18}\text{O}_5$: 41,9 %; tr.: 41,1 %. $R_G = 0,85$. La déméthylation¹⁹ par chauffage avec l'acide bromhydrique à 48 % fournit du glucose. $[\alpha]_D^{25}$: 1) +67°, 2) +73° ($c = 1$; méthanol anhydre avec 2 % d'acide chlorhydrique). Aucune mutarotation ne peut être décelée. Ce résultat élimine la possibilité de la fraction

Tableau 3. Oxydation de la fraction III (triméthyl-3,4,6-D-glucose) par le periodate de sodium.

Triméthyl-D-glucose 0,002 M, 5 ml
Metaperiodate de sodium 0,01 M, 1,5 ml

Durée de contact à 20°–22° à l'abri de lumière	30 min	60 min.	20 h	48 h
Molécules a) de periodate rédit	0,62 b)	0,82	0,95	0,97
Molécules a) d'acide volatil monovalent formées			0,80	0,89

(a) par molécule de triméthyl-D-glucose.

(b) Les chiffres représentent des moyennes de plusieurs expériences.

III étant identique au triméthyl-2,3,6-D-glucose, qui est le plus souvent caractérisé par l'inversion ²¹ de son pouvoir rotatoire dans le méthanol en présence d'acide chlorhydrique. On peut déjà constater celle-ci après 24 h dans les conditions expérimentales précisées ci-dessus ²². Le $[\alpha]_D^{20}$ du triméthyl-3,4,6-D-glucose, au contraire, reste constant à environ +70° (méthanol + HCl) ²².

L'oxydation de la fraction III par le periodate de sodium fut étudiée suivant le procédé de Greville et Northcote ⁴, qui permet de distinguer d'une façon irréfutable le triméthyl-3,4,6-D-glucose des autres triméthyl-D-glucopyranoses. Nos résultats se trouvent exposés dans le Tableau 3. D'après Greville et Northcote ⁴ c'est uniquement le triméthyl-3,4,6-D-glucose qui, par oxydation periodique, donne naissance à une molécule d'acide volatil (formique) et qui d'ailleurs est capable de réduire rapidement le periodate. Le triméthyl-2,3,6-D-glucose ne le réduit point ⁴. L'ensemble de nos résultats permet de conclure que la fraction III est identique au triméthyl-3,4,6-D-glucose.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à Monsieur le professeur J.-E. Courtois, Paris, qui a bien voulu mettre à notre disposition un échantillon purifié d' α -galactosidase des graines de café.

BIBLIOGRAPHIE

1. Børheim Svendsen, A. *Zur Chemie norwegischer Umbelliferen* (Thèse) Université, Oslo 1954.
2. Haworth, W. N., Hirst, E. L. et Ruell, D. A. *J. Chem. Soc.* **123** (1923) 3125.
3. Courtois, J. et Wickstrøm, A. *Bull. soc. chim. biol.* **32** (1950) 759.
4. Greville, G. D. et Northcote, D. H. *J. Chem. Soc.* **1952** 1945.
5. Pigman, W. W. et Goepf, R. M. jr. *Chemistry of the Carbohydrates*, New York 1948.
6. Herrisey, H., Wickstrøm, A. et Courtois, J. *Bull. soc. chim. biol.* **34** (1952) 856.
7. Whistler, R. L. et Durso, D. F. *J. Am. Chem. Soc.* **72** (1950) 677.
8. Laidlaw, R. A. et Reid, S. G. *Nature* **166** (1950) 476.
9. Hirst, E. L. et Jones, J. K. N. *J. Chem. Soc.* **1949** 1659.
10. French, D. *Advances in Carbohydrate Chem.* **9** (1954) 149.
11. Fleury, P. et Boutot, L. *J. pharm. chim.* **26** (1922) 209.
12. Courtois, J.-E., Anagnostopoulos, C. et Petek, F. *Enzymologia* **17** (1954) 69.
13. Laidlaw, R. A. et Wylam, Clare B. *J. Chem. Soc.* **1953** 567.
14. Hough, L., Jones, J. K. N. et Wadman, W. H. *J. Chem. Soc.* **1949** 2511.
15. Hirst, E. L. et Jones, J. K. N. *Discussions Faraday Soc.* **1949** 268.
16. Bell, D. J. et Northcote, D. H. *Chemistry & Industry* **1954** 1328.
17. Mitchell, W. E. A. *Thèse Doct. Phil.*, Université, Edimbourg 1953.
18. Barry, C. P. et Honeyman, J. *Advances in Carbohydrate Chem.* **7** (1952) 53.
19. Hough, L., Jones, J. K. N. et Wadman, W. H. *J. Chem. Soc.* **1950** 1702.
20. Bell, D. J. *Advances in Carbohydrate Chem.* **6** (1951) 11.
21. Irvine, J. C. et Hirst, E. L. *J. Chem. Soc.* **121** (1922) 1213.
22. Gränichstädten, H. et Percival, E. G. V. *J. Chem. Soc.* **1943** 54.

Manuscrit reçu le 11 Mai 1956.