

jede gemessene Wellenlänge in einem besonderen Versuch, gemessen. Die gefundenen Extinktionsmaxima wurden in den Diagrammen als Messpunkte eingesetzt<sup>1)</sup>.

Erhitzt man die mit Natriummethylat versetzte, alkoholische, gelbrote Lösung von  $\alpha$ -Ionon mit Jodmethyl, so verschwindet die Farbe allmählich, ein Zeichen, dass alles  $\alpha$ -Ionon umgesetzt wurde. Das Reaktionsprodukt ist ein Gemisch, das unter anderem  $\beta$ -Ionon enthält (isoliert als Semicarbazon vom Smp. 147°), ferner Methylierungsprodukte des  $\alpha$ -Ionons, die noch weiter bearbeitet werden.

### Zusammenfassung.

$\alpha$ -Ionon und 5-Oxo- $\alpha$ -ionon geben bei Zusatz von Alkalilauge zur alkoholischen Lösung rote, nicht sehr beständige Farbreaktionen, die auf der Bildung von Alkalisalzen dieser beiden Verbindungen beruhen. Die Absorptionsspektren der beiden roten Salze zeigen ein Absorptionsmaximum bei 510 m $\mu$ . Da  $\beta$ -Ionon keine ähnliche Farbreaktion aufweist, kann diese zur annähernden Bestimmung kleiner Mengen  $\alpha$ -Ionon in  $\beta$ -Ionon dienen.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

## 58. La phosphorylation du glucose par l'acide métaphosphorique

par M. Viscontini et C. Olivier.

(26 I 53)

Au cours de précédentes synthèses d'esters phosphoriques, l'acide métaphosphorique s'est montré un excellent agent phosphorylant des alcools primaires à l'exclusion des alcools secondaires, des phénols et des amines<sup>2)</sup>. On pouvait donc penser que l'acide métaphosphorique réagirait avec la fonction alcoolique primaire du glucose pour former comme à l'ordinaire un ester triphosphorique et, après hydrolyse partielle, du glucose-6-phosphate (ester de *Robison*) dont de nombreuses autres synthèses ont déjà été décrites<sup>3)</sup>. L'expérience réalisée n'a pas entièrement répondu à notre attente en ce sens que le glucose-

<sup>1)</sup> Herr Dr. Y. R. Naves (Genève), dem wir von den vorstehenden Beobachtungen Mitteilung machten, hat daraufhin einige weitere Ionon-ähnliche Substanzen auf ihr Verhalten gegenüber NaOH in Äthanol geprüft und folgende Feststellung gemacht: Keine Farbreaktion tritt ein mit  $\beta$ -Ionon, n-Methyl- $\beta$ -ionon (2<sup>4</sup>-Methyl- $\beta$ -ionon), Iso-methyl- $\beta$ -ionon (2<sup>2</sup>-Methyl- $\beta$ -ionon),  $\beta$ -Iron und Iso-methyl- $\alpha$ -ionon. — Gelbrot-Färbungen von verschiedener Intensität und Beständigkeit werden erhalten mit  $\alpha$ -Ionon, n-Methyl- $\alpha$ -ionon,  $\alpha$ -Iron, Iso- $\alpha$ -iron, Neo- $\alpha$ -iron, Neo- $\gamma$ -iron.

<sup>2)</sup> P. Karrer & M. Viscontini, Helv. **29**, 711 (1946); M. Viscontini, G. Bonetti & P. Karrer, Helv. **32**, 1478 (1949); M. Viscontini, C. Ebnöther & P. Karrer, Helv. **34**, 1834 (1951); **34**, 2199 (1951); **35**, 457 (1952).

<sup>3)</sup> P. A. Levene & A. L. Raymond, J. Biol. Chem. **89**, 479 (1930); H. A. Lardy & H. O. L. Fischer, J. Biol. Chem. **164**, 513 (1946); F. R. Atherton, G. A. Howard & A. R. Todd, Soc. **1948**, 1106.

6-phosphate isolé à l'état pur ne l'a jamais été avec des rendements supérieurs à 15%. Néanmoins la synthèse est facile à conduire et à effectuer. Tandis que nous poursuivions nos recherches, *J. E. Seegmiller & B. L. Horecker* ont publié une méthode de préparation du glucose-6-phosphate à partir de glucose, d'acide tétraphosphorique et d'eau<sup>1</sup>). Leur ester phosphorique isolé comme sel de baryum est relativement impur (80 à 90% de pureté selon les essais biologiques). Là aussi les rendements ne sont pas satisfaisants (7,5%).

Si on suit fidèlement les données de nos précédentes publications<sup>2</sup>), la phosphorylation du glucose se heurte à trois difficultés inattendues:

1. Le glucose chauffé avec l'acide métaphosphorique caramélise rapidement. Après quelques essais nous avons trouvé qu'en présence d'acétonitrile cette caramélisation pouvait être sinon supprimée, du moins fortement atténuée.

2. L'isolement du produit de phosphorylation à l'aide d'éthanol conduit à des composés renfermant des groupes éthoxylés. Pour y remédier, nous avons remplacé l'éthanol par l'isopropanol.

3. Le mélange polyphosphorylé isolé dans ces conditions renferme beaucoup moins de phosphore que n'en prévoit la théorie et ne possède pas de chaînes triphosphoriques contrairement à tous les produits obtenus jusqu'ici; de plus il ne réduit pas la liqueur de *Fehling*. Sans aucun doute le groupe aldéhydique du glucose réagit lui aussi pendant la phosphorylation. La chromatographie sur papier, les titrages potentiométriques et les hydrolyses acides du produit brut montrent qu'une partie du glucose est bien phosphorylée en position 6 tandis que l'autre subit vraisemblablement une déshydratation par perte d'une molécule d'eau entre les deux hydroxyles 1 et 6 (formation de lévoglucosane ou de polyholosides?) échappant ainsi à toute phosphorylation ultérieure<sup>3</sup>). En particulier l'hydrolyse à l'acide chlorhydrique dilué donne naissance à du glucose en excès, du glucose-6-phosphate et de l'acide phosphorique libre (fig. 1).

Pour séparer le glucose-6-phosphate du gros excès de glucose qui l'accompagne après l'hydrolyse acide, deux procédés s'offraient à notre disposition: ou bien un isolement sous forme de sel de baryum ou bien une séparation à l'aide d'un échangeur d'ions. Nous avons utilisé avec succès ces deux procédés et le deuxième nous a conduit à du glucose-6-phosphate pur que nous avons caractérisé par son analyse, son pouvoir rotatoire, sa chromatographie sur papier, sa courbe d'hydrolyse, sa courbe de titrage potentiométrique (fig. 2) et son activité biologique.

<sup>1</sup>) *J. Biol. Chem.* **192**, 175 (1951).

<sup>2</sup>) Voir note 2, p. 466.

<sup>3</sup>) Pour tous les détails expérimentaux voir *C. Olivier*, Dissertation Université de Zurich, 1953.

Le glucose-6-phosphate possède deux fonctions acides dont les  $pK$  calculés à l'aide de la courbe de titrage précédente sont respectivement 1,4 et 6,3, inférieurs par conséquent à ceux de l'acide phospho-

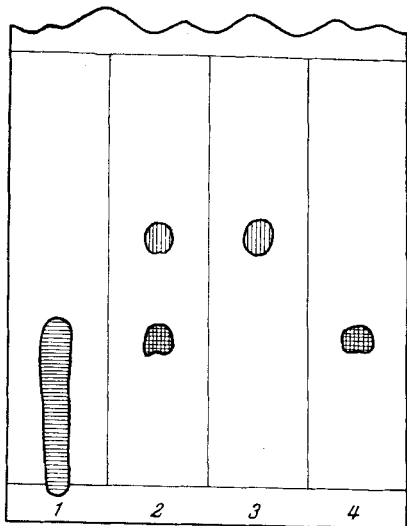


Fig. 1.

Chromatogrammes sur papier, ascendants; solvant: butanol/pyridine/eau (1:1:1).

1. Produit de phosphorylation du glucose, brut.  
Seul le phosphore peut être détecté.
2. Même produit après hydrolyse acide.
3. Glucose.
4. Glucose-6-phosphate, naturel.

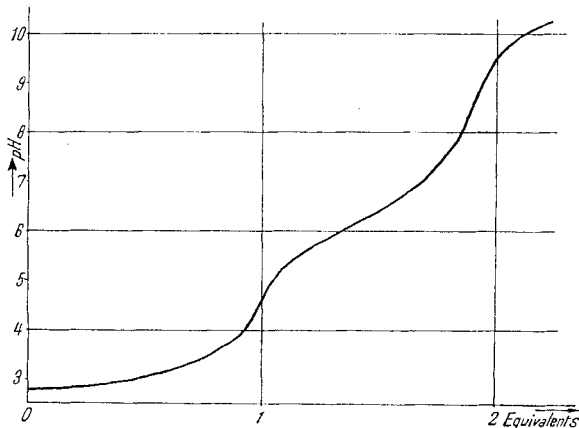


Fig. 2.

Courbe de titrage potentiométrique du glucose-6-phosphate synthétique à l'aide de NaOH 0,1-n. 48,3 mg dans 100  $\text{cm}^3$  KCl 0,1-n.;  $c = 1,86 \cdot 10^{-3}$ .

rique (2,1 et 7,22)<sup>1)</sup>, mais correspondant approximativement à ceux des deux premières fonctions acides forte et moyenne de l'acide pyrophosphorique (1 et 6,08)<sup>2)</sup>.

Ces chiffres confirment les résultats déjà obtenus par l'étude de l'ester de *Robison* naturel<sup>3)</sup>.

Nous tenons à remercier la *Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich* pour l'aide matérielle apportée à ce travail.

### Partie expérimentale.

*Techniques*: Les dosages de phosphore ont été effectués selon la méthode de *Berenblum & Chain*<sup>4)</sup>.

Les chromatographies sur papier (procédé ascendant) ont été effectuées selon les directives de *A. Jeanes, C. S. Wise & R. J. Dimler*<sup>5)</sup>; solvant: n-butanol/pyridine/eau (1:1:1).

Recherche de la fonction ester phosphorique: réactif à l'acide perchlorique et au molybdate d'ammonium<sup>6)</sup>.

Recherche de la fonction aldéhydique du glucose: à l'aide du phtalate d'aniline<sup>7)</sup>.

*Phosphorylation du glucose*: On prépare l'acide métaphosphorique à partir de 7,5 cm<sup>3</sup> d'acide orthophosphorique commercial. Après refroidissement on le recouvre de 20 cm<sup>3</sup> d'acétonitrile anhydre puis on y ajoute 5 g de glucose pur et finement pulvérisé. Le mélange homogénéisé est porté progressivement à la température de 80°. Il faut prendre soin de bien agiter le tout de temps en temps. Lorsque le glucose est passé en solution et que l'acide métaphosphorique a pris une teinte brune plus ou moins foncée (après 30 à 40 min. de chauffage), l'acétonitrile est décanté. Après refroidissement, la masse réactionnelle est reprise dans 40 à 60 cm<sup>3</sup> d'isopropanol qui laisse insoluble les esters polyphosphoriques du glucose. On peut y ajouter ensuite un égal volume d'éther pour parachever la précipitation. On recueille l'insoluble par centrifugation et on le sèche sous vide après l'avoir lavé à l'isopropanol puis à l'éther anhydre. On recueille ainsi de 6 à 7 g d'un produit dont voici une analyse:

|   | C     | H    | P libr. | P hydr. | P total |
|---|-------|------|---------|---------|---------|
| Trouvé  | 23,15 | 4,75 | 3,6     | 7,8     | 14,1%   |
| Glucose-6-phosphate C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> O <sub>9</sub> P (260) calc.                 | 27,7  | 5,0  | 0       | 0       | 11,9%   |
| Glucose-6-diphosphate C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>12</sub> P <sub>2</sub> (340) calc. | 21,2  | 4,12 | 0       | 0       | 18,2%   |

Le produit brut ne réagit pas la liqueur de *Fehling*. Son chromatogramme sur papier est reproduit dans la fig. 1.

*Hydrolyse acide*: 5 g de ce produit brut sont portés à 100° pendant 20 min. dans 100 cm<sup>3</sup> d'acide chlorhydrique n. La solution acquiert aussitôt un fort pouvoir réducteur et la chromatographie sur papier y montre la présence de glucose et de glucose-6-phosphate à l'exclusion de toute autre substance (fig. 1).

*Isolement du sel de baryum du glucose-6-phosphate*: On concentre sous vide la solution hydrolysée précédemment obtenue; le résidu sirupeux d'abord lavé à l'isopropanol, pour éliminer la plus grande partie de l'acide phosphorique et de l'acide chlorhydrique présents,

<sup>1)</sup> *H. S. Harned & B. B. Owen*, The Physical Chemistry of Electrolytic Solutions, New York 1943, p. 580.

<sup>2)</sup> *G. Schwarzenbach & J. Zurc*, M. **81**, 202 (1950).

<sup>3)</sup> Voir par ex. *W. D. Kumler & J. J. Eiler*, Am. Soc. **65**, 2355 (1943).

<sup>4)</sup> *Biochem. J.* **32**, 295 (1938).

<sup>5)</sup> *Analyt. Chem.* **23**, 415 (1951).

<sup>6)</sup> *C. S. Hanes & F. A. Isherwood*, Nature **164**, 1107 (1949).

<sup>7)</sup> *S. M. Partridge*, Nature **158**, 270 (1946); *Bioch. Symposia* **3**, 52 (1950).

est repris dans 100 cm<sup>3</sup> d'eau; on y verse lentement une solution saturée d'acétate de baryum jusqu'à fin de précipitation du phosphate de baryum. Après centrifugation, on achève la précipitation de l'acide phosphorique encore présent à l'aide d'hydroxyde de baryum (ne pas dépasser un pH de 7-8). Ce nouveau précipité est éliminé, la solution claire est concentrée sous vide jusqu'à 40 cm<sup>3</sup> environ et additionnée d'un seul coup de trois volumes d'éthanol. Le sel de baryum du glucose-6-phosphate ainsi obtenu, recueilli par centrifugation, lavé à l'éthanol, puis à l'éther et séché n'est pas absolument pur, mais peut être utilisé tel que pour des essais biologiques. Pour le purifier on le dissout à froid dans le minimum d'eau, filtre l'insoluble et reprécipite le sel par adjonction de trois volumes d'éthanol. Les rendements varient de 10 à 15% suivant les opérations.

|                                 |                   |           |              |
|---------------------------------|-------------------|-----------|--------------|
| $C_6H_{11}O_9P\text{Ba}, 2H_2O$ | Calculé P libre 0 | P hydr. 0 | P tot. 7,19% |
| (431)                           | Trouvé „ 0,71     | „ 1,79    | „ 7,28%      |

*Isolement du glucose-6-phosphate libre:* On hydrolyse comme précédemment 5 g du produit polyphosphorylé et on concentre ensuite la solution sous vide. Le résidu lavé à l'isopropanol est repris dans 250 à 300 cm<sup>3</sup> d'eau. La solution claire obtenue après décoloration au noir animal est passée sur une colonne d'amberlite IRA-400 (50 mm de diamètre, 300 mm de hauteur) qu'on lave ensuite à l'eau distillée. On recherche dans les fractions recueillies la présence de substances réductrices et d'ester phosphorique. Si la colonne a été convenablement utilisée, on ne retrouve que du glucose dans l'éluat, mais il peut arriver qu'une portion d'ester phosphorique accompagne le glucose libre. Dans ce cas l'opération est à recommencer sur une nouvelle colonne. La colonne d'amberlite chargée d'ester phosphorique est ensuite lavée avec de l'acide chlorhydrique n. On recueille les éluats renfermant le glucose-phosphate et on les évapore à sec sous vide. Le résidu se prend en masse sous l'action de l'isopropanol anhydre. Pour purifier le produit, on le redissout dans le minimum d'eau, décolore au noir animal, filtre et recueille dans un mélange d'éther-isopropanol. On obtient ainsi de 0,5 à 1 g de glucose-6-phosphate pur.  $[\alpha]_D^{21} = +32,3^\circ$ . Les rendements dépassent difficilement 15%.

|                 |                |        |           |           |              |
|-----------------|----------------|--------|-----------|-----------|--------------|
| $C_6H_{13}O_9P$ | Calculé C 27,7 | H 5,0  | P libre 0 | P hydr. 0 | P tot. 11,9% |
| (250)           | Trouvé „ 27,81 | „ 5,03 | „ 0,6     | „ 0,9     | „ 12,1%      |

Le glucose-6-phosphate libre se présente sous forme d'une poudre blanche amorphe, non hygroscopique, sans point de fusion caractéristique.

M. le Dr. *Testa* du laboratoire du prof. *Leuthardt* a bien voulu effectuer pour nous l'essai biologique du produit synthétique que nous lui avons soumis et auquel il a attribué une pureté de 100%. Nous tenons à lui exprimer ici nos plus vifs remerciements.

#### RÉSUMÉ.

La phosphorylation du glucose par l'acide métaphosphorique fournit à côté d'un ou plusieurs anhydrides du glucose (lévoglucothane?) une petite quantité d'un ester polyphosphorique qui n'est toutefois pas le glucose-6-triphosphate attendu. Une hydrolyse acide du mélange permet d'isoler cependant le glucose-6-phosphate pur soit sous forme de sel de baryum soit sous forme d'ester libre. Les rendements oscillent entre 10 et 15% de la quantité de glucose mise en œuvre, mais la synthèse se révèle particulièrement courte et simple.

Zurich, Institut de Chimie de l'Université.