

219. Recherches sur la formation et les transformations des esters X¹).

Facteurs structuraux de labilisation alcaline de fonctions monoalcoyl(monoaryl)-phosphoriques

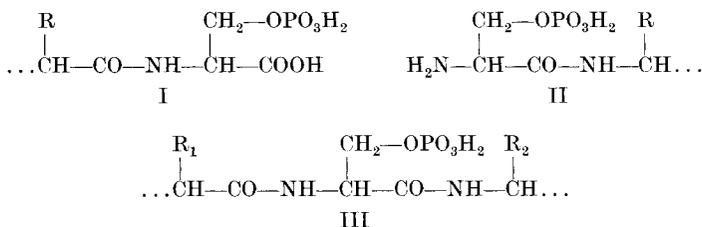
par Emile Cherbuliez et J. Rabinowitz.

(6 VIII 56)

I. Généralités.

D'une manière générale les monoesters de l'acide phosphorique opposent à l'hydrolyse en milieu alcalin une résistance frappante. Font exception notamment les groupements ester phosphorique de la caséine et des peptides résultant d'une dégradation hydrolytique partielle des protéines caséiniques, ainsi que les acides α -cétoalcoyl-phosphoriques (p. ex. acide glucose-phosphorique-2 ou ester de *Hatano*). Il existe donc des facteurs de structure des molécules qui provoquent une labilisation, en milieu alcalin, de la fonction ester phosphorique. Nous nous sommes proposé de rechercher quels pouvaient être ces facteurs, et ceci surtout dans l'espoir d'élucider les causes de l'alcalino-labilité du phosphore de certains protides. Dans cette étude, nous ferons abstraction des hydrolyses catalysées soit par des enzymes, soit par des catalyseurs minéraux tels que les hydroxydes de certains métaux polyvalents²).

Dans la caséine et dans les polypeptides issus des protéines caséiniques par hydrolyse partielle, le phosphore est présent sous forme de fonction monoester phosphorique, avant tout sur des restes de sérine engagés dans une chaîne polypeptidique, le reste de sérine pouvant être terminal (I ou II) ou inséré dans la chaîne (III).



¹) IX: Helv. **39**, 1461 (1956).

²) D'après les travaux d'E. Bamann, cette catalyse rappelle considérablement l'action des phosphatases; voir p. ex. E. Bamann, H. Trapmann & A. Schuegraf, Chem. Ber. **88**, 1726 (1955).

Nous avons dès lors examiné si la présence d'une unique fonction amino, acylée ou non, ou d'une unique fonction carboxyle, libre ou transformée en amide, dans le voisinage d'un groupement monoester phosphorique avait un effet marqué sur l'hydrolysabilité de ce dernier, et ceci à plusieurs pH. En effet, la relation entre vitesse d'hydrolyse des monoesters phosphoriques et le pH est particulièrement compliquée. Cette vitesse est généralement assez grande en milieu très acide, passe par un minimum à un pH de l'ordre de 0 pour atteindre un maximum à pH 4,5; ensuite elle diminue de nouveau avec l'augmentation du pH (un deuxième minimum du côté alcalin n'a guère été observé jusqu'à présent; nous en avons trouvé par contre au moins deux exemples dans les dérivés étudiés dans ce mémoire; nous reviendrons ultérieurement sur ce point). Cette relation si compliquée entre vitesse d'hydrolyse et pH nous semble devoir être rattachée à l'existence de plusieurs types de réactions de scission à effet hydrolytique: acidolyse, hydrolyse proprement dite, basolyse et halolyse, types qui ont été mis en évidence antérieurement³). Dans ces conditions, il est à prévoir que l'effet inhibiteur ou accélérateur de facteurs structuraux sur l'hydrolyse de groupements esters phosphoriques peut varier en fonction du pH; voici pourquoi nous avons en principe étudié les vitesses d'hydrolyse de nos dérivés à trois pH: en milieu acide (ClH n.), au pH 4,5 (pH de neutralisation de la première fonction acide d'un reste phosphorique monoestérifié et en même temps pH où la courbe des vitesses d'hydrolyse en fonction du pH passe généralement par un maximum) et en milieu alcalin (NaOH n.).

Les vitesses d'hydrolyse ont été déterminées à 100°, en solution décimolaire en ester phosphorique, sans addition de tampon. En effet, les ions apportés par les substances tampon peuvent avoir une action assez marquée sur la vitesse d'hydrolyse⁴). Dans les limites de précision de nos mesures, nous pouvions d'ailleurs renoncer à l'emploi de substances tampons, comme le montrent les considérations suivantes. Le pH 4,5 correspond à la neutralisation d'un premier équivalent acide du reste phosphorique présent. A ce pH, la mise en liberté d'une troisième fonction acide de la molécule PO_4H_3 n'a pratiquement aucun effet sur la concentration en ions H^+ , la constante de dissociation k_3 de l'acide orthophosphorique étant de $4,8 \times 10^{-13}$. Des mesures du pH avant et après hydrolyse ont confirmé cette prévision. *A fortiori*, il en sera de même en milieu chlorhydrique n. Quant au pH en milieu NaOH n., la concentration molaire de la soude caustique était 10 fois plus élevée que celle de l'ester phosphorique. Même si après hydrolyse intégrale la totalité des fonctions acides libérées était neutralisée — ce qui n'est pas le cas vu la très faible acidité de la troisième fonction acide de PO_4H_3 — cela n'aurait fait disparaître au maximum que $\frac{1}{10}$ des ions OH' présents au début, ce qui correspond à une diminution théorique maximum du pH de 0,05 unités. D'ailleurs, dans le cas des dérivés phosphorylés ne comportant aucun autre groupement hydrolysable, la marche de l'hydrolyse a effectivement présenté toujours l'allure d'une réaction du premier ordre si l'on fait abstraction d'une légère inhibition de l'hydrolyse à partir d'environ 80% de scission, due à l'apparition en concentration croissante d'ions orthophosphoriques.

³) E. Cherbuliez & J.-P. Leber, Helv. **35**, 2589 (1952).

⁴) Dans le cas des esters phosphoriques, v. p. ex. E. Cherbuliez & Cl. Gandillon, Arch. Sci. **9**, 103 (1956).

A titre d'exemple, nous donnerons dans la fig. 1 la représentation graphique de la marche de l'hydrolyse de l'acide amino-éthyl-phosphorique 0,1-n. au pH 4,5, selon l'équation $\log [a/(a-x)] = k \cdot t$. La droite représente la courbe théorique. On constate d'un côté que, aux très faibles pourcentages d'hydrolyse, il y a de légers écarts dus à l'imprécision des déterminations de l'acide phosphorique mis en liberté en très petite quantité; mais on

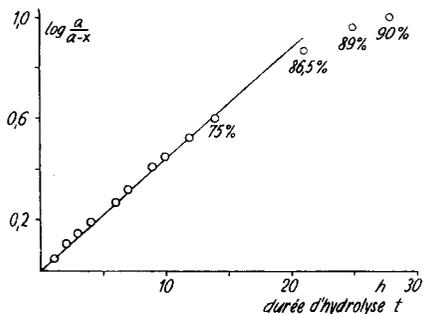


Fig. 1.

Hydrolyse de l'acide amino-2-éthyl-phosphorique

—— droite correspondant à $t_1 = 6,9$ h.

Chiffres en % : Degrés respectifs d'hydrolyse atteints aux temps t.

constate aussi, aux degrés d'hydrolyse élevés, un écart systématique vers des valeurs trop faibles, écart qui va en croissant. Cet écart est effectivement dû à l'intervention d'ions orthophosphoriques comme le montre le tableau 1 dans lequel sont consignés les degrés d'hydrolyse observés, toujours au pH 4,5, avec de l'acide amino-éthyl-phosphorique 0,1-m. additionné ou non de colamine, de colamine + acide orthophosphorique, et finalement de phosphate primaire de sodium, toujours à la concentration de 0,1-m. La colamine est sans effet mais l'addition d'ions phosphoriques provoque une diminution perceptible de la vitesse d'hydrolyse.

Tableau 1.

Hydrolyse de $H_2N-CH_2-CH_2-OPO_3H_2$ 0,1-m. au pH 4,5,
avec et sans produits ajoutés, en 7 h à 100°.

Produit ajouté	—	Colamine 0,1-m.	Colamine 0,1-m. + PO_4H_3 0,1-m.	PO_4H_2Na 0,1-m.
% hydrolyse . . .	51	50	48	48

Mode opératoire.

a) *Préparation des solutions*: Dans le cas des acides aminoalcoyl-phosphoriques libres, on a dissous dans un ballon jaugé de 25 ml 0,0025 moles de l'acide, respectivement dans ClH n., H_2O (puisque une fonction acide est bloquée par le groupe $-NH_2$) et $NaOH$ n. Cette quantité de solution permet de remplir, à l'aide d'une pipette, 12 ampoules en verre neutre (Iéna) de 2 ml de capacité, qu'on scelle ensuite.

A partir des sels de baryum des dérivés phosphorylés à fonction NH_2 acylée, nous avons procédé comme suit: solution dans ClH n.: 0,002 moles de sel sont dissous dans 10 ml ClH 2-n., additionnés d'une quantité équivalente de SO_4H_2 2-n. (élimination de l'ion baryum), centrifugés pour la séparation du sulfate de baryum et ramenés au volume de 20 ml avec l'eau de lavage du culot de sulfate de baryum. Solutions de pH 4,5: 0,002 moles de sels sont suspendus dans quelques ml d'eau, on ajoute de nouveau la quantité calculée de SO_4H_2 2-n., centrifuge pour séparer du sulfate de baryum, ajoute la quantité de $NaOH$ n. nécessaire pour neutraliser la première fonction acide de ces esters et porte le volume de la solution à 20 ml par addition d'eau. Solutions dans $NaOH$ n.: on prépare une solution

de 0,002 moles de l'acide libre comme on vient de le décrire, puis ajoute 10 ml NaOH 2-n. et amène le volume à 20 ml avec de l'eau. La mise en ampoules de ces solutions s'est faite comme décrit plus haut.

b) *Mesures cinétiques*. Les ampoules étaient chauffées dans un bain d'huile thermostaté à $100^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$. La détermination de l'acide phosphorique libéré était faite dans des ampoules prélevées à des intervalles de temps appropriés, par l'une des méthodes suivantes.

1^o Titrage direct de l'acide phosphorique selon *Brunisholz*⁵⁾: on neutralise la solution à l'orangé de méthyle (neutralisation de la première fonction acide, soit de l'acide orthophosphorique libre, soit du reste ester orthophosphorique); on ajoute un excès de nitrate d'argent et on neutralise au rouge de chlorophénol (pH = 7) l'acidité qui correspond à la deuxième fonction acide des groupes phosphoriques estérifiés ou libres, ainsi qu'à l'acidité résultant de la transformation de l'acide orthophosphorique en phosphate triargentique insoluble. Comme on connaît la quantité de groupements phosphoriques présents dans la prise, on peut calculer la part afférente à l'acide orthophosphorique libéré dans ce titrage. Comme ici la première neutralisation au pH 4,6 se fait à un pH différent de celui de la deuxième neutralisation (pH 7), et que l'on travaille en présence d'acides alcoylphosphoriques dont les sels restent en solution, il faut tenir compte du fait qu'à ce deuxième pH, la totalité de la deuxième fonction acide des restes monoesters phosphoriques n'est pas complètement neutralisée (effet tampon). Il faut donc établir des courbes d'étalonnage en titrant de la manière décrite des mélanges en proportions connues d'acide alcoylphosphorique et d'acide orthophosphorique⁶⁾.

2^o Titrage de l'acide orthophosphorique libéré, isolé sous forme de phosphomolybdate d'ammonium. Cette séparation a été réalisée dans la plupart des cas par précipitation à la mixture magnésienne, les vitesses d'hydrolyse en milieu alcalin étant généralement petites. Le précipité ammoniacomagnésien a été transformé en phosphomolybdate d'ammonium pour sa détermination acidimétrique (dissolution dans un excès connu de soude caustique et titrage de l'excès d'alcali en présence de formol neutralisé bloquant l'ammoniaque). Lorsque la vitesse d'hydrolyse alcaline était appréciable, nous avons précipité d'emblée l'acide phosphorique libéré, comme phosphomolybdate d'ammonium en milieu nitrique. Comme les prises étaient portées au moins au décuple de leur volume pour cette opération, la concentration en ions Cl⁻ n'était pas gênante dans le cas des solutions chlorhydriques.

Pour le contrôle de l'allure de la réaction et pour la détermination du temps de demi-hydrolyse, constant pour une réaction de premier ordre, nous avons tracé la courbe du logarithme de la concentration de l'ester en fonction du temps, qui donne une droite pour une réaction de premier ordre. La pente de cette droite permet de calculer k et le temps de demi-réaction $t_{\frac{1}{2}} = 0,693/k$. Les temps de demi-hydrolyse sont exprimés sauf indication spéciale en heures. Sauf pour les hydrolyses en milieu alcalin, où à de rares exceptions près cette vitesse est très faible, nous avons suivi l'hydrolyse jusqu'à disparition de 90 à 95% des fonctions ester.

Dans le cas des dérivés acylés des acides aminoalcoyl-phosphoriques, nous avons suivi en outre l'hydrolyse de la fonction acylamine par titrage au formol des fonctions amino mises en liberté.

II. Effets d'une fonction amino, libre ou acylée, sur l'hydrolysabilité des acides monoalcoyl-phosphoriques.

La préparation des acides aminoalcoyl-phosphoriques et de leurs dérivés respectivement acétylés, benzoylés et tosylés a été décrite antérieurement⁷⁾.

⁵⁾ G. Brunisholz, *Helv.* **30**, 2028 (1947).

⁶⁾ Du fait que *Cherbuliez & Bowvier*, *Helv.* **36**, 1200 (1953), n'ont pas tenu compte de cette circonstance, leurs données numériques concernant les vitesses d'hydrolyse des acides amino-2-éthyl-phosphoriques et amino-3-propyl-phosphoriques sont entachées d'erreurs systématiques (degrés d'hydrolyse trouvés trop forts).

⁷⁾ E. Cherbuliez & J. Rabinowitz, *Helv.* **39**, 1455 (1956).

Les acides propyl- à hexyl-phosphoriques non substitués que nous avons examinés à titre de comparaison, ont été préparés comme suit.

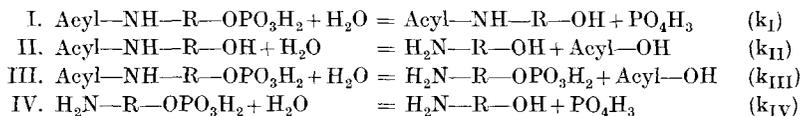
10 g de l'alcool correspondant sont chauffés 5 h dans un bain de 100° sous forte agitation (pour les alcools supérieurs) avec 50 g d'acide polyphosphorique (n env. 2,7). Le produit refroidi est repris par de l'eau, neutralisé au carbonate de baryum et à la baryte au pH 8,5. Le filtrat et les eaux de lavage (600 à 700 ml) sont concentrés à chaud. Les monoalcoylphosphates de baryum, moins solubles à chaud qu'à froid, sont filtrés à chaud et lavés à l'eau bouillante. Sans récupération du produit adsorbé sur le précipité de polyphosphates et de phosphate de baryum, on obtient des rendements qui, de l'acide propyl-phosphorique à l'acide hexyl-phosphorique, tombent de 35 à 15%. Nous avons obtenu ainsi des sels anhydres que nous avons caractérisés par le dosage du phosphore, du baryum et la détermination du poids moléculaire par titrage différentiel entre la neutralisation du premier et celle du deuxième équivalent acide (voir tableau 2).

Tableau 2.
R—OPO₃Ba.

R	P %		Ba %		p. mol.	
	calc.	tr.	calc.	tr.	calc.	tr.
CH ₃ —CH ₂ —CH ₂ — . . .	11,2	11,3	49,9	49,7	275,3	273,8
CH ₃ —(CH ₂) ₂ —CH ₂ — . .	10,7	10,9	47,5	47,3	289,3	287,2
CH ₃ —(CH ₂) ₃ —CH ₂ — . .	10,2	10,0	45,3	45,0	303,3	300,5
CH ₃ —(CH ₂) ₄ —CH ₂ — . .	9,77	9,70	43,3	42,9	317,3	314,0

Le tableau 3 contient les données numériques les plus importantes résultant de nos essais.

Observations concernant les résultats obtenus avec les acides acylaminoalcoyl-phosphoriques. L'hydrolyse de ces substances comporte 4 réactions, soit simultanées, soit successives:



L'étude complète de ce système exigerait la détermination de 4 données indépendantes et poserait un problème mathématique assez compliqué. Comme seule une accélération marquée de la scission de la fonction ester phosphorique selon l'équation I par rapport à la scission selon IV (dont nous connaissons les constantes) nous intéressait ici, nous nous sommes contentés de déterminer, d'un côté la vitesse de l'apparition de PO₄H₃ (réactions I + IV) et, de l'autre, celle de la formation de fonctions NH₂ (réactions II + III). Lorsque $k_I \gg k_{IV}$, et que l'on calcule des constantes de réaction du premier ordre d'après les valeurs observées, on trouvera pour $t_{\frac{1}{2}}$ un chiffre inférieur à $t_{\frac{1}{2}}$ de la réaction IV, et ceci d'une manière d'autant plus marquée que la détermination du degré d'hydrolyse aura été faite après un laps de temps plus court; le chiffre ainsi obtenu constitue évidemment une limite supérieure en-dessous de laquelle se trouvera la valeur vraie de $t_{\frac{1}{2}}$ pour la réaction I. L'inverse est le cas si $k_I \ll k_{IV}$. Ce n'est que lorsque l'hydrolyse de la fonction amide selon III est très rapide par rapport à celle de la scission de la fonction ester phosphorique selon I ($k_{III} \gg k_I$), que l'on ne peut plus tirer de conclusions quant au $t_{\frac{1}{2}}$ de la réaction I, ce qui est indiqué dans le tableau par « pas déterminable ». C'est ce qui se produit notamment en milieu CH n. et surtout NaOH n. pour la plupart des dérivés acétylés, parmi lesquels nous ne donnons des résultats que pour l'acide acétylaminoéthyl-phosphorique.

Tableau 3.

XHN—R—OPO₃H₂, temps de demi-hydrolyse, en h, en solution 0,1-m. à 100°.

Position du groupe XHN— dans R	XHN—R—	Milieu		
		CIH n.	pH = 4,5	NaOH n.
—	CH ₃ —CH ₂ — ^{a)}	46	31	∞ ^{b)}
2	H ₂ N—CH ₂ —CH ₂ —	30	7	~ 20000 ^{c)}
2	CH ₃ —CH ₂ —CH—CH ₂ — NH ₂	31	7	—
2	CH ₂ —CH ₂ — NH—COCH ₃	< 4	13	pas déterminable
2	CH ₂ —CH ₂ — NH—COC ₆ H ₅	1,5	13	pas déterminable
2	CH ₂ —CH ₂ — NH—tosyl	63	13	∞ ^{b)} ^{d)}
—	CH ₃ —CH ₂ —CH ₂ —	69	38	∞ ^{b)}
3	CH ₂ —CH ₂ —CH ₂ — NH ₂	65	16	~ 20000 ^{c)}
—	CH ₃ —(CH ₂) ₂ —CH ₂ —	115	58	∞ ^{b)}
4	CH ₂ —(CH ₂) ₂ —CH ₂ — NH ₂	120	31	3300
4	CH ₂ —(CH ₂) ₂ —CH ₂ — NH—COC ₆ H ₅	< 120	—	pas déterminable
4	CH ₂ —(CH ₂) ₂ —CH ₂ — NH—tosyl	—	—	> 3300 ^{d)}
—	CH ₃ —(CH ₂) ₃ —CH ₂ —	70	40	∞ ^{b)}
5	CH ₂ —(CH ₂) ₃ —CH ₂ — NH ₂	76	25	~ 10000
5	CH ₂ —(CH ₂) ₃ —CH ₂ — NH—COC ₆ H ₅	77	32	pas déterminable
—	CH ₃ —(CH ₂) ₄ —CH ₂ —	90	46	∞ ^{b)}
6	CH ₂ —(CH ₂) ₄ —CH ₂ — NH ₂	82	46	~ 20000

^{a)} Déjà étudié, notamment par *J. Desjobert*, C. r. hebdom. Séances Acad. Sci. **224**, 275 (1947). Nos chiffres pour CIH n. et pH 4,5 sont tirés des observations de *Desjobert*.

^{b)} ∞ signifie qu'après env. 1000 h, il n'y a pas de quantités dosables de PO₄H₃ libéré, ce qui correspond à une hydrolyse de moins de 1%, soit à t_{1/2} > 50000 h.

^{c)} Les indications de *Cherbuliez & Bouvier*, *Helv.* **36**, 1200 (1953), concernant l'hydrolysabilité de ce corps sont erronées (voir⁶⁾); nous avons pu confirmer au contraire la grande stabilité de l'acide aminoéthyl-phosphorique en milieu alcalin, observée déjà par *R. H. A. Plimmer & W. J. N. Burch*, *Biochem. J.* **31**, 398 (1937).

^{d)} En milieu alcalin, la fonction tosylamino est hydrolysée à env. 10% en une semaine.

En milieu chlorhydrique normal, les monoesters phosphoriques des alcools aliphatiques primaires à chaîne non ramifiée présentent une hydrolysabilité faible et qui passe par un minimum pour C_4 suivi d'un faible relèvement pour C_6 ; il est intéressant de noter à ce sujet que selon *Plimmer & Burch*⁸⁾, l'acide cétyl-phosphorique se comporte, en ce qui concerne son hydrolysabilité, à peu près comme les acides propyl- et butyl-phosphoriques. Au pH 4,5, on observe une variation analogue des temps de demi-hydrolyse, d'ailleurs nettement plus courts que pour le milieu chlorhydrique. En milieu NaOH n., on trouve partout une vitesse d'hydrolyse extrêmement petite, en confirmation de ce qui a été observé antérieurement.

L'introduction, dans la chaîne aliphatique, d'une fonction amino en position 2 provoque une nette augmentation de l'hydrolysabilité, que l'on peut chiffrer pour le milieu chlorhydrique et pour le pH 4,5; en milieu alcalin, la vitesse d'hydrolyse, de non mesurable dans nos conditions de travail, devient mesurable. En milieu chlorhydrique, cet effet accélérateur disparaît presque entièrement dès le passage de la position 2 à la position 3 ou à une position plus éloignée; au pH 4,5 l'effet diminue d'intensité avec l'augmentation de la distance entre fonction ester phosphorique et groupe amino, mais se fait sentir encore jusqu'à la position 5; en milieu NaOH n. on constate un maximum d'hydrolysabilité pour l'acide amino-4-butyl-phosphorique. Toutefois les vitesses d'hydrolyse en milieu alcalin restent toujours très faibles.

La substitution de la fonction amino placée en 2, par le reste acétique ou benzoïque se traduit par une augmentation de l'effet labilisant du groupe amino, pour le milieu acide, et par une diminution de ce même effet au pH 4,5; en milieu NaOH n., il n'y a en tous cas pas d'accélération marquée de l'hydrolyse de la fonction ester phosphorique, qui reste toujours très petite par comparaison à celle de la fonction amide carboxylique. Avec l'augmentation de l'écart entre fonction amino acylée et fonction ester phosphorique, ces effets disparaissent. Quant à la tosylation de la fonction amino, elle se traduit par une diminution de l'hydrolysabilité par rapport à celle du dérivé non tosylé.

En résumé, on constate que, si la présence d'une fonction amino en 2 par rapport à une fonction ester phosphorique se traduit par une certaine labilisation de la fonction ester phosphorique et si cette labilisation est accentuée en milieu acide ou au pH 4,5 par la transformation du groupe amino en amide carboxylique, ces effets sont peu marqués en milieu alcalin et ne sauraient expliquer l'alcalino-labilité des fonctions ester phosphorique de certaines phosphoprotéines et phosphopeptides.

⁸⁾ *R. H. A. Plimmer & W. J. N. Burch*, J. chem. Soc. **1929**, 289.

III. Effet d'une fonction carboxyle (ou resp. carbalcoxy, carbamido et nitrile) sur l'hydrolysabilité des acides monoalcoyl (ou aryl)-phosphoriques.

Le tableau 4 résume nos observations faites avec quelques monoesters phosphoriques possédant, en α ou en β par rapport à l'hydroxyle phosphorylé, une des fonctions mentionnées dans le titre. En outre, nous avons examiné l'hydrolyse du dérivé phosphorylé d'un acide hydroxy-sulfonique, soit l'acide iséthionique phosphorylé^{8a}).

Tableau 4.

Acides carboxy-, carbamido-, nitrilo- et sulfoxy-phosphoriques, temps de demi-hydrolyse, en h, en solution 0,1-m., à 100°.

Substance	Milieu		
	ClH n.	pH = 4,5	NaOH n.
H ₂ O ₃ POCH ₂ COOH	13	5	~ 800
H ₂ O ₃ POCH ₂ CN	13 ^{a)}	5	< 20
H ₂ O ₃ POCH ₂ CH ₂ COOH	23	18	4
H ₂ O ₃ POCH ₂ CH ₂ CONHC ₆ H ₅	—	—	< 0,5
H ₂ O ₃ POCH ₂ CH ₂ CN	25	18	~ 0,07 (~ 4 min)
H ₂ O ₃ PO-  -COOH	b)	—	1,25
H ₂ O ₃ PO-  -CONH ₂	b)	—	< 0,3
H ₂ O ₃ PO-  -CN	b)	—	< 0,07 (< 5 min)
H ₂ O ₃ POCH ₂ CH ₂ SO ₃ H	48	13	82

a) En 1 h, 75% de la fonction C≡N sont hydrolysés.
b) Hydrolyse assez rapide.

La préparation des corps en question est décrite dans un mémoire antérieur¹⁾, à l'exception de celle de l'anilide de l'acide β -hydroxypropionique phosphorylé. Pour obtenir cet acide carbanilido-2-éthylphosphorique à partir de l'acide carboxy-2-éthylphosphorique déjà

^{8a)} La description de la préparation de l'acide iséthionique phosphorylé, donnée dans le mémoire cité sous ¹⁾, comporte une erreur: pour obtenir ce produit, on chauffe de l'acide iséthionique 6 h à 100° avec de l'acide polyphosphorique, sans ajouter du méthanol (ce dernier serait également phosphorylé, ce qui compliquerait inutilement l'isolement du produit cherché); l'isolement du produit se fait sous forme de sel sesquibarytique selon notre technique habituelle.

décrit, nous avons tiré profit du fait que, contrairement aux fonctions carboxyle, les fonctions acides à atome central coordinativement saturée (SO_4H_2 , acides sulfoniques, PO_4H_3) ne réagissent que très lentement avec le chlorure de thionyle. En chauffant modérément un acide carboxyalcoyl-phosphorique avec SOCl_2 , on réalise effectivement avant tout la transformation du carboxyle en chlorure d'acide, sans altération du groupe $-\text{PO}_3\text{H}_2$. Le produit brut de cette réaction, traité par de l'aniline, a fourni l'anilide en question. Le rendement très modeste en produit final (7 %) pourrait certainement être amélioré.

Sel de Ba de l'acide carbanilido-2-éthyl-phosphorique, $\text{C}_6\text{H}_5\text{NHCOC}_2\text{H}_5\text{OPO}_3\text{Ba}$. A 3,7 g (0,01 mole) de carboxyéthyl-phosphate sesquibarytique on ajoute 15 ml SO_4H_2 1-n. pour éliminer l'ion Ba^{++} . Après centrifugation, on chasse l'eau sous pression réduite. Le résidu (qui ne contient que des traces de phosphore minéral) est chauffé 3 h à 50° avec 6 ml de SOCl_2 . On chasse ensuite dans le vide l'excès du chlorure de thionyle, dissout le résidu dans du benzène anhydre, ajoute 2 ml d'aniline sèche et chauffe 30 min à reflux. La solution est filtrée du chlorhydrate d'aniline précipité, le filtrat est débarrassé du reste d'aniline par lavages répétés à l'acide chlorhydrique dilué, puis on évapore sous vide la solution benzénique séchée. Le résidu, qui présente en quantités égales deux acidités titrables resp. à l'orangé de méthyle et à la phénolphthaléine, est repris dans peu d'eau et neutralisé à la phénolphthaléine par de l'eau de baryte. On filtre, concentre le filtrat sous vide et précipite le sel barytique cherché, par addition de 4 vol. d'alcool; rdt 0,3 g (6,8%). Le sel contient 4 mol. d'eau de cristallisation.

$\text{C}_9\text{H}_{10}\text{O}_5\text{NPBa}$, 4 H_2O	Calculé	N 3,10	P 6,85	Ba 30,4%	p. éq. 452,3
	Trouvé	„ 3,02	„ 6,89	„ 30,6%	„ „ 449

Remarques concernant les déterminations des temps de demi-hydrolyse. A titre de comparaison avec les observations consignées au sujet des acides alcoylphosphoriques aminés, nous avons travaillé dans les mêmes conditions, et notamment à 100° , quoique pour certains dérivés étudiés ici, les vitesses d'hydrolyse fussent trop grandes pour pouvoir être mesurées avec précision. Ceci est notamment le cas pour les deux dérivés à fonction nitrile. En outre, lors de l'hydrolyse alcaline, les dérivés phosphorylés possédant en plus une fonction amide ou nitrile subissent relativement rapidement, à côté de la scission de la fonction ester phosphorique, une transformation resp. de CONH_2 en COOH et de CN successivement en CONH_2 et en COOH ; ces transformations aboutissent chaque fois à des dérivés phosphorylés chez lesquels l'hydrolyse du groupe ester phosphorique est plus lente que dans la molécule primitive (voir la discussion de ces cas à la p. 1848). En calculant des « constantes de vitesse de réaction du premier ordre » d'après le taux de libération de PO_4H_3 à partir du temps 0, on trouve donc des valeurs décroissantes — et pour les temps de demi-scission $t_{\frac{1}{2}}$, des valeurs croissantes — avec l'accroissement du temps; $t_{\frac{1}{2}}$ trouvé au temps le plus court est le plus petit et constitue une limite supérieure de la valeur vraie du temps de demi-scission du groupe ester phosphorique.

Dans le cas du phospho-salicylonitrile, qui nous a semblé particulièrement intéressant, nous avons fait un nombre suffisant de mesures après des durées d'hydrolyse comprises entre 9 et 52 min, pour pouvoir procéder à une extrapolation graphique au temps zéro (voir fig. 2).

Quoique l'étude de l'effet des fonctions carboxyle, etc. ait été poussé jusqu'à présent beaucoup moins loin que celle de l'effet d'une fonction amino, les résultats acquis sont assez nets pour qu'on puisse en tirer les conclusions suivantes.

En milieu acide et au pH 4,5, les vitesses d'hydrolyse du groupe ester phosphorique des dérivés aliphatiques comportant encore une fonction carboxyle ou nitrile sont de l'ordre de celles qui ont été constatées pour les dérivés analogues, dans lesquels le groupe resp. COOH et CN est remplacé par NH₂.

En milieu alcalin, il y a accroissement net de la vitesse de scission de l'ester phosphorique, pour les dérivés dans lesquels la fonction COOH ou CN est portée par l'atome de carbone hydroxylé (dérivés d'un acide α -hydroxy-carboxylique), par rapport à la très difficile hydrolyse alcaline des acides alcoyl-phosphoriques non substitués; mais les vitesses d'hydrolyse restent en-dessous de ce qu'elles sont en milieu acide.

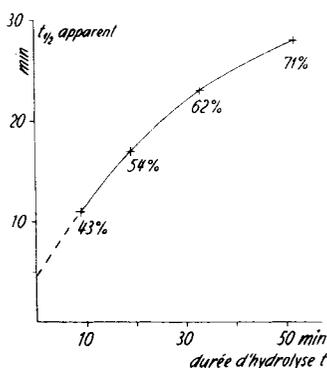


Fig. 2.

Détermination du temps de demi-hydrolyse $t_{1/2}$ de la fonction ester phosphorique du phosphosalicylo-nitrile, par extrapolation graphique (— — —).

Chiffres en %: Degrés respectifs d'hydrolyse atteints aux temps t.

Par contre, l'effet de la fonction COOH devient très marqué quand il s'agit de dérivés d'acides β -hydroxy-carboxyliques, type auquel appartient précisément la phosphosérine: le temps de demi-hydrolyse alcaline de 4 h trouvé pour le dérivé phosphorylé de l'acide β -hydroxypropionique est tout-à-fait de l'ordre de grandeur trouvé pour la phosphosérine dans des conditions analogues⁹). Le remplacement de COOH par une fonction amide (seul exemple étudié: un anilide) se traduit par une augmentation considérable de la vitesse d'hydrolyse — tout comme les phosphoséryl-peptides sont plus hydrolysables que la phosphosérine⁹). Le groupe nitrile finalement a un effet extraordinairement marqué puisque le temps de demi-scission déphosphorylante tombe à environ 4 min dans nos conditions de travail.

⁹) Th. Posternak & H. Pollaczek, Helv. **24**, 1190 (1941); la phosphosérine est hydrolysée de 7% en 24 h en milieu NaOH 0,25-n. à 37°.

C'est intentionnellement que nous employons le terme de scission déphosphorylante dans le cas des dérivés à fonction nitrile en β par rapport au groupe ester phosphorique. En effet, on peut se demander s'il s'agit d'une véritable hydrolyse — suivie éventuellement d'une déshydratation du nitrile β -hydroxypropionique en acrylonitrile — ou si en réalité il y a élimination en α - β avec formation d'un dérivé acrylique; dans l'hydrolyse alcaline de peptides à restes de phosphosérine, il se forme effectivement de l'acide pyruvique et de l'ammoniaque.

Nous n'avons pas précisé ce point dans le cas du dérivé phosphorylé de l'acide β -hydroxypropionique, car nous avons préféré étudier le comportement d'un acide β -hydroxy-carboxylique phosphorylé, constitué de telle manière qu'une α - β élimination de PO_4H_3 fût impossible, et nous nous sommes adressés aux dérivés phosphorylés resp. de l'acide, de l'amide et du nitrile salicyliques. Nous n'avons pas étudié de plus l'hydrolyse acide ou au pH 4,5, qui sont relativement rapides. Mais la scission alcaline déphosphorylante resp. du dérivé de l'acide, de l'amide et du nitrile est chaque fois encore plus rapide que celle des dérivés correspondants de l'acide β -hydroxypropionique, et il s'agit d'une hydrolyse puisque l'on obtient en fin de compte dans chaque cas intégralement de l'acide salicylique. L'activation considérable de l'hydrolyse alcaline de la fonction ester phosphorique, produite à des degrés croissants par un groupement COOH , CONH_2 et CN en position β , nous semble donc établie.

Quant au mécanisme de cette activation, sur lequel nous nous proposons de revenir dans un prochain mémoire, nous voulons noter ici uniquement ceci que le caractère de non saturation coordinative des fonctions COOH , CONH_2 et CN — particulièrement marqué pour CN qui est le plus activant — semble être un facteur essentiel dans cette activation, l'isostère soufré du dérivé phosphorylé de l'acide β -hydroxypropionique, l'acide phospho-iséthionique $\text{H}_2\text{O}_3\text{POCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, étant hydrolysé en milieu alcalin 20 fois plus lentement que le dérivé phosphorylé de l'acide hydroxypropionique.

SUMMARY.

The hydrolysis of different alkyl phosphoric acids substituted with free or acylated amino functions or with one of the following groups: $-\text{COOH}$, $-\text{CONHR}$, $-\text{CN}$ in N HCl , at pH 4-5 and in N NaOH is studied.

The influence of free or acylated amino functions on the rate of hydrolysis of the phosphoric ester bond is not very pronounced, but the carboxyl group or its derivatives have a marked effect on the ease of hydrolysis in alkaline medium when these groups are situated in β -position to the phosphorylated hydroxyl. This effect increases

in the order $-\text{COOH} < \text{CONHR} < \text{CN}$: the phosphorylated β -hydroxypropionitrile $\text{H}_2\text{PO}_3\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{CN}$ is dephosphorylated to the extent of 50% at 100°C . in N NaOH in about 4 minutes. This dephosphorylation is considered to be a hydrolysis (and not a β -elimination) as phosphosalicylonitrile – which is not capable of undergoing a β -elimination – is hydrolyzed with the same ease.

The possible incidence of these findings on the interpretation of the ease of alkaline dephosphorylation of phosphopeptides is emphasized.

Laboratoire de chimie organique et pharmaceutique
de l'Université de Genève.

220. Über die Papierchromatographie der 4-Aryl-2-hydroxy-tetronimide und der 5,6-Diaryl-3,4,5-trihydroxy-5,6-dihydro-2-pyrimide.

7. Mitteilung über Reduktone¹⁾

von H. Dahn und H. v. Castelmur.

(3. IX. 56.)

In früheren Mitteilungen¹⁾²⁾ berichteten wir, dass aus aromatischen oder heterocyclisch-aromatischen Aldehyden mit Glyoxalhydrogensulfit und Cyanidionen in wässriger Lösung je nach Mengenverhältnis 4-Aryl-2-hydroxy-tetronimide (I) oder 5,6-Diaryl-3,4,5-trihydroxy-5,6-dihydro-2-pyrimide (II) oder Gemische von beiden entstehen. Da diese beiden Reduktonarten einander in Löslichkeit und allgemeinen chemischen Eigenschaften nahe stehen und da die Smp. infolge der begleitenden Zersetzung nicht besonders charakteristisch sind, lag es nahe, eine Unterscheidung von I und II mit Hilfe der Papierchromatographie zu versuchen. Diese war ferner besonders nötig, wenn man unter Variation des Aldehyds R-CHO neue Reduktone vom Typus I oder II herzustellen versuchte und dabei keine direkte Kristallisation erhielt; denn da die gleichzeitig anwesenden Sulfit- und Hydrogensulfitionen die Reduktone dem direkten qualitativen Nachweis in der Lösung entziehen, musste auf andere Weise entschieden werden, ob sich überhaupt ein Redukton gebildet hatte. Das gewählte Verteilungssystem sollte diese Ionen möglichst voll-

¹⁾ 6. Mitteilung: H. Dahn, R. Fischer & Lotte Loewe, *Helv.* **39**, 1774 (1956).

²⁾ H. Dahn, J. S. Lawendel, E. F. Hoegger & E. Schenker, *Helv.* **37**, 1309 (1954).