

112. Recherches sur la formation et la transformation des esters XXI¹⁾
Sur la phosphorylation des hydroxynitriles et sur
la vitesse d'hydrolyse des dérivés phosphorylés obtenus

par **Emile Cherbuliez, G. Cordahi et J. Rabinowitz**

(7 III 60)

On sait que la phosphorylation des hydroxy-acides ne peut pas se faire directement avec les agents phosphorylants usuels tels que l'acide polyphosphorique²⁾, l'oxychlorure de phosphore³⁾, etc., étant donné que dans ce cas le réactif phosphorylant réagit presque exclusivement comme agent déshydratant, favorisant ainsi l'estérification inter- ou intra-moléculaire des groupes $-\text{COOH}$ avec les groupements hydroxyle.

Par contre, si l'on fait réagir ces mêmes agents phosphorylants sur les hydroxy-esters, les hydroxynitriles et les hydroxy-amides correspondants, la phosphorylation se fait en général avec un bon rendement et il ne reste plus qu'à soumettre les dérivés phosphorylés obtenus à une hydrolyse sélective, à un pH tel que l'hydrolyse des groupements $-\text{COOR}$, $\text{C}\equiv\text{N}$ et $-\text{CO}-\text{NH}_2$ s'accompagne d'un minimum d'altération de la fonction ester phosphorique. Cette dernière étant en général stable en milieu alcalin, c'est donc ce milieu qui convient le mieux à cette hydrolyse sélective, sauf lorsque le groupement $-\text{COOR}$, $-\text{C}\equiv\text{N}$ ou $-\text{CO}-\text{NH}_2$ se trouve en β par rapport au C porteur de la fonction ester phosphorique, ces fonctions étant alors particulièrement labiles en milieu alcalin (dans ce cas on fait cette hydrolyse en milieu acide, ce qui attaque légèrement la fonction ester phosphorique également).

Quant à la phosphorylation des esters, amides ou nitriles d'hydroxy-acides par l'acide polyphosphorique en général, deux réserves doivent être faites: 1° les esters d'hydroxy-acides $\text{HO}-\text{X}-\text{COOR}$ subissent parfois une phosphorolyse de la fonction ester carboxylique (formation de $\text{R}-\text{OPO}_3\text{H}_2$ et de l'acide carboxylique correspondant $\text{HO}-\text{X}-\text{COOH}$ ou de son anhydride⁴⁾) à un degré tel que le rendement en dérivé phosphorylé $\text{H}_2\text{PO}_4-\text{X}-\text{COOR}$ devient dérisoire voire nul; 2° dans les dérivés phosphorylés obtenus à partir des hydroxynitriles, la fonction nitrile est hydratée en groupe amide $-\text{CO}-\text{NH}_2$. C'est à l'étude de ce dernier phénomène et de la possibilité de l'éviter par l'emploi d'oxychlorure de P comme agent phosphorylant qu'est consacré ce mémoire, dans lequel nous décrivons en outre un acide alcoylphosphorique avec une triple liaison $\text{C}\equiv\text{C}$ à la place de $\text{C}\equiv\text{N}$, en l'espèce l'acide propargylphosphorique.

Lorsque nous avons traité les hydroxynitriles par l'acide polyphosphorique²⁾⁵⁾, nous n'avons pas examiné de près les produits de phosphorylation, qui ont été soumis à l'hydrolyse sélective en vue de la préparation des acides carboxy-alcoylphosphoriques. D'ailleurs, on peut même soumettre le mélange réactionnel (acide polyphos-

¹⁾ XX: *Helv.* **43**, 464 (1960).

²⁾ E. CHERBULIEZ & J. RABINOWITZ, *Helv.* **39**, 1461 (1956).

³⁾ Bibliographie voir p. ex. ²⁾.

⁴⁾ E. CHERBULIEZ, CL. GANDILLON, A. DE PICCIOTTO & J. RABINOWITZ, *Helv.* **42**, 2277 (1959); E. CHERBULIEZ, H. PROBST & J. RABINOWITZ, *Helv.* **43**, 458 (1960).

⁵⁾ E. CHERBULIEZ, H. PROBST, J. RABINOWITZ & S. SANDRIN, *Helv.* **41**, 1163 (1958).

On peut isoler leurs sels de Ba si l'on prend les précautions décrites plus loin. Les acides β -cyanalcoyl-phosphoriques s'hydrolysent en milieu alcalin encore plus rapidement que les acides β -carbamido-alcoyl-phosphoriques ainsi que nous le verrons dans la partie consacrée à l'étude de l'hydrolyse de ces produits.

La phosphorylation de l'alcool propargylique par l'acide polyphosphorique n'a pas présenté de difficultés.

I. Phosphorylations par l'acide polyphosphorique

A) *Hydroxynitriles transformés en acides carbamido-alcoyl-phosphoriques*. Nous avons repris la phosphorylation des hydroxynitriles déjà décrite dans de précédents mémoires²⁾⁵⁾, pour déterminer la constitution exacte des produits obtenus. Le mode opératoire reste le même:

1 mole d'hydroxynitrile et 1 mole (ou davantage) d'acide pyrophosphorique (ou la quantité correspondante d'acide polyphosphorique) sont bien mélangées et chauffées à 55–110° (selon la stabilité du produit de départ) pendant quelques heures (si le mélange ne devient pas tout de suite homogène, on effectue cette phosphorylation sous agitation). Après refroidissement, on reprend la masse réactionnelle par H₂O, extrait éventuellement à l'éther le produit de départ non transformé et neutralise au carbonate de Ba d'abord et à la baryte ensuite jusqu'au pH de virage de la phénolphaléine. On filtre (élimination des phosphate et polyphosphates de Ba), concentre le filtrat sous vide, si nécessaire, et y précipite par addition de 1 volume d'alcool, le carbamido-alcoylphosphate de Ba que l'on filtre et sèche à l'étuve. Le filtrat aquo-alcoolique, évaporé sous vide à sec, donne une certaine quantité d'ester secondaire (di-(carbamido-alcoyl)-phosphate de Ba). Si le produit de la première précipitation à l'alcool contient déjà de l'ester secondaire, on purifie l'ester primaire par précipitation fractionnée⁷⁾ (les sels barytiques des esters secondaires sont beaucoup plus solubles dans un mélange aquo-alcoolique que les sels barytiques des esters primaires).

Les résultats obtenus figurent dans le tableau I et corrigent en même temps ceux déjà publiés²⁾⁵⁾.

B) *Alcool propargylique transformé en acide propyne-2-yl-phosphorique*. 10 g d'alcool propargylique et 18 g d'acide polyphosphorique ($n = 3$ env.) sont chauffés 20 h à 55°. Après refroidissement, on reprend la masse brunâtre par H₂O et traite la solution aqueuse par du noir animal. Après filtration, on neutralise par CO₃Ba et Ba(OH)₂ jusqu'au pH de virage de la phénolphaléine, filtre (élimination des phosphate et polyphosphates de Ba) et précipite le propargylphosphate de Ba par addition de 2 volumes d'alcool: 22,2 g de produit (rendement 45%) sans eau de cristallisation après séchage d'une nuit à 70°. Le spectre infra-rouge confirme la présence du groupement $-C\equiv C-$ (bande à 2120 cm⁻¹).

C ₃ H ₃ O ₄ PBa	Calc. C 13,3	H 1,1	P 11,4	Ba 50,8%	P.M. 271,3
	Tr. „ 13,1 ⁸⁾	H 1,24	„ 11,9	„ 49,0%	P.M. 266

II. Phosphorylations des hydroxy-nitriles par l'oxychlorure de phosphore.

– L'acide polyphosphorique agissant sur la fonction nitrile également, nous nous sommes adressés à d'autres agents phosphorylants en vue de transformer les hydroxynitriles en acides cyanalcoyl-phosphoriques correspondants.

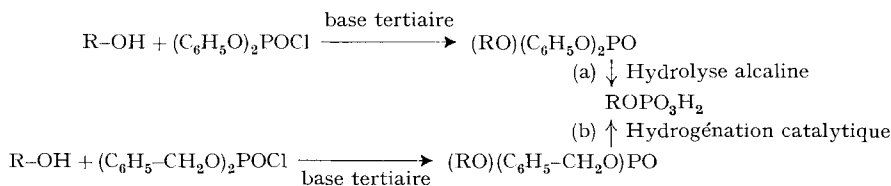
Nous n'avons retenu pour cette phosphorylation ni le chlorure de l'acide diphenylphosphorique ni le chlorure de l'acide dibenzylphosphorique qui permettent d'obtenir les esters phosphoriques primaires exclusivement, lorsqu'on soumet le produit de la réaction (alcoyl-diphénylphosphate ou alcoyl-dibenzylphosphate) soit à une hydrolyse en milieu alcalin (a), soit à une hydrogénation catalytique (b).

⁷⁾ E. CHERBULIEZ, H. PROBST & J. RABINOWITZ, *Helv.* 42, 1377 (1959).

⁸⁾ Pour le microdosage du carbone, il faut mélanger le produit avec un oxydant (le dichromate de K par exemple), sinon le résidu de la combustion retient du C élémentaire et on trouve trop peu de carbone.

En effet, les opérations (a) et (b) transformeraient le groupe $-C \equiv N$ également, en dehors du fait déjà mentionné que les esters β -cyanalcoylphosphoriques sont très labiles en milieu alcalin.

Par contre, la phosphorylation des hydroxynitriles par 1 mole ou davantage d'oxychlorure de phosphore nous a fourni les acides cyanalcoylphosphoriques.

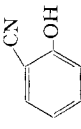
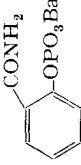
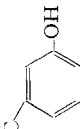
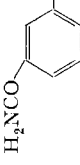
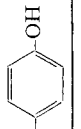
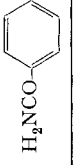


Dans un ballon à trois cols avec agitateur, réfrigérant à reflux et ampoule à robinet, on introduit 1,1 mole de POCl_3 (excès de 10%), 1 mole de base tertiaire (triéthylamine ou pyridine) et 50 à 100 ml d'éther anhydre. On plonge le ballon dans un bain de glace et introduit goutte à goutte et sous bonne agitation 1 mole d'hydroxynitrile dissoute dans 50 à 100 ml d'éther. Après adjonction de la totalité de l'hydroxynitrile on chauffe 30 min. à 30° afin d'achever la réaction, et abandonne le tout pendant une nuit à température ambiante. On filtre le chlorhydrate de la base tertiaire qui s'est déposé, et le filtrat (soit tel quel, soit, s'il présente deux couches, la couche inférieure) est introduit petit à petit dans de l'eau glacée (1 à 2 l). La solution aqueuse est extraite à l'éther (élimination de l'hydroxynitrile qui n'aurait pas réagi), puis neutralisée par du carbonate de Ba d'abord et par de la baryte ensuite jusqu'au pH de neutralisation de la phénolphthaléine. Comme l'hydrolyse du dichlorure de l'acide cyanalcoylphosphorique en acide cyanalcoylphosphorique est lente, on effectue la neutralisation sous agitation, en introduisant la baryte (on une solution saturée de baryte) petit à petit, en ayant soin de ne pas trop dépasser le pH de virage de la phénolphthaléine (afin d'éviter l'hydrolyse soit du groupement ester phosphorique, soit du groupement nitrile); dès qu'il y a décoloration de la phénolphthaléine on rajoute un peu de baryte et ainsi de suite, jusqu'à persistance d'une légère coloration rose⁹⁾ (pH 8,4 env.). A ce moment, on filtre (élimination de phosphate de Ba) et précipite le cyanalcoylphosphate dibarytique par addition de 0,5 à 1 volume d'alcool au filtrat; dans ces conditions le chlorure de Ba formé reste en solution. Le précipité est filtré et séché à l'étuve à 70° . Tous les produits ainsi isolés sont exempts de P minéral et de chlorure. Les rendements sont de l'ordre de 15 à 30% par rapport à l'hydroxynitrile de départ (sans tenir compte de la quantité d'hydroxynitrile récupérée). Les spectres IR. de ces esters phosphoriques présentent tous le pic caractéristique du groupement $-C \equiv N$ à $2240\text{--}2280\text{ cm}^{-1}$. Les résultats sont consignés dans le tableau II.

III. Scission des acides cyano-alcoyl-phosphoriques et de l'acide propargylphosphorique. — Ces scissions ont été effectuées à 100° , en solutions 0,1M en ester et aux pH suivants: 0 (HCl 1N), 4,5 et 14 (NaOH 1N). Nous avons suivi d'une part l'hydrolyse du groupement ester phosphorique, et d'autre part l'hydrolyse du groupement $-C \equiv N$ en $-\text{COOH}$. Nous avons étudié à 21° également, la vitesse d'hydrolyse alcaline des esters phosphoriques présentant une très grande labilité dans ce milieu. Dans nos conditions de travail ces scissions se font selon une cinétique du premier ordre. Les temps de demi-réaction de chaque ester étudié figurent dans le tableau III. Il en ressort que le groupement $-C \equiv N$, stable à pH 4,5, s'hydrolyse lentement en milieu HCl 1N et rapidement en milieu NaOH 1N. Cette hydrolyse est activée par la présence du groupement ester phosphorique surtout lorsque le groupe nitrile se trouve en position β par rapport au carbone (α) porteur de la liaison ester phosphorique. Cette activation est donc réciproque, surtout en milieu alcalin.

⁹⁾ On prend toutes ces précautions pendant la neutralisation, uniquement dans le cas d'esters phosphoriques labiles en milieu alcalin ou si le groupe $-C \equiv N$ est très labile dans ce milieu.

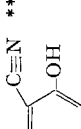
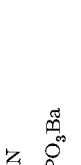
Tableau I. *Phosphorylation d'hydroxynitriles par l'acide polyphosphorique*

Hydroxynitrile	Durée et température de réaction		Produit obtenu	Rendement (en ester primaire) %	N calc. %	N tr. %	P calc. %	P tr. %	Ba calc. %	Ba tr. %	P.M. calc.	P.M. tr.**)
	h	°C										
$N\equiv C-CH_2OH$	20	55	$H_2N-CO-CH_2-OPO_3Ba, 2H_2O$	18	4,3	4,3	9,5	9,4	42,0	42,2	326	325
$N\equiv C-CH_2-CH_2OH$	4	100	$H_2N-CO-CH_2-CH_2-OPO_3Ba, 2H_2O$	25	4,1	4,1	9,1	9,1	40,3	40,0	340	341
$N\equiv C-CH_2-CH_2-CH_2OH$	16	80	$H_2N-CO-CH_2-CH_2-CH_2-OPO_3Ba$	16	4,4	4,3	9,8	10,0	43,2	44,9	318	310
	8	100		20*	3,6	3,5	7,6	7,6	33,8	33,6	406	408
	8	100		34	4,0	4,1	8,8	8,8	39,1	40,3	352	341
	8	100		35	4,0	3,9	8,8	9,3	39,1	36,9	352	342

*) Rendement rapporté à la quantité de produit de départ non récupéré.

***) Par titrage entre les pH de virage resp. de l'orangé de méthyle et de la phénolphtaléine.

Tableau II. *Phosphorylation d'hydroxynitriles par l'oxychlorure de phosphore*

Hydroxynitrile	Produit obtenu	Rdt %	N calc. %	N tr. %	P calc. %	P tr. %	Ba calc. %	Ba tr. %	P.M. calc.	P.M. tr.
$N\equiv C-CH_2-CH_2OH$	$N\equiv C-CH_2-CH_2-OPO_3Ba$	16	4,9	5,0	10,7	10,4	48,0	45,6	286	290
$N\equiv C-CH_2-CH_2-CH_2OH$ *	$N\equiv C-CH_2-CH_2-CH_2-OPO_3Ba$	27	4,4	4,3	9,8	9,9	43,2	41,6	318	314
		20	4,2	4,2	9,3	8,9	41,1	40,0	334	340

*) Obtenu par action de KCN sur la triméthylènechlorhydrine, en milieu aquo-alcoolique¹⁰⁾.

***) Obtenu par action de l'anhydride acétique sur la salicylaldoxime¹¹⁾.

¹⁰⁾ YU. K. YUR'EV, G. P. MIKHAILOVSKU & S. Z. SHAPIRO, *Ž. obšč. Chim.* 19, 2217 (1949).

¹¹⁾ E. BECKMANN, *Ber. deutsch. chem. Ges.* 33, 2232 (1900).

Nous avons déjà insisté sur la grande labilité en milieu alcalin des esters β -carboxy- et β -carbamido-alcoyl-phosphoriques; le tableau III montre nettement que les acides β -cyanoalcoylphosphoriques sont encore plus labiles que les acides β -carbamido-alcoylphosphoriques correspondants. En effet, l'acide β -cyano-éthyl-phosphorique présente à 100° en milieu NaOH 1 N, un $t_{1/2}$ de 1 min env., et à 21°, de 1,6 h env. (A titre de comparaison, nous donnons dans le tableau III les $t_{1/2}$ des

Tableau III. Temps de demi-scission, en h, en solution 0,1M, à 100° de divers esters phosphoriques primaires

Substance	$t_{1/2}$ fonction ester phosphorique			$t_{1/2}$ autres fonctions* (-C \equiv N \rightarrow -COOH)	
	HCl 1N	pH 4,5	NaOH 1N	HCl 1N	NaOH 1N
HOOC-CH ₂ -CH ₂ -OPO ₃ H ₂ ¹²⁾	23	18	4	-	-
H ₂ N-CO-CH ₂ -CH ₂ -OPO ₃ H ₂	23	18	~ 0,07** (4 min)	~ 0,3	~ 0,08
N \equiv C-CH ₂ -CH ₂ -OPO ₃ H ₂	31	13	~ 0,017*** (1 min)	~ 17	~ 0,12
HC \equiv C-CH ₂ -OPO ₃ H ₂	18	7,5	28		
HO ₃ S-CH ₂ -CH ₂ -OPO ₃ H ₂ ¹²⁾	48	13	82		
HOOC-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OPO ₃ H ₂ ⁵⁾	40		~ 1500		
H ₂ N-CO-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OPO ₃ H ₂			légère activation au début		< 0,5
N \equiv C-CH ₂ -CH ₂ -CH ₂ -OPO ₃ H ₂	40	29	légère activation au début	~ 17	~ 0,5

* à pH 4,5, -C \equiv N et -C \leq O NH₂ sont stables, tout au moins pendant la durée de l'hydrolyse de la fonction ester phosphorique
 ** à 21°, $t_{1/2}$ = 8,5 h.
 *** à 21°, $t_{1/2}$ = 1,6 h.

acides β -carbamido- et β -carboxy-éthyl-phosphorique, ainsi que de l'acide iséthionique phosphorylé.)

Soulignons en outre l'hydrolysabilité de l'acide propargylphosphorique en milieu alcalin, provoquée selon nous par le groupement \equiv CH- en β par rapport au C (α) porteur de la liaison ester phosphorique. La question de savoir si dans tous ces cas il s'agit d'une hydrolyse du groupement ester phosphorique ou bien d'une β -élimination (où l'hydrogène fixé sur le C (β) serait activé par le voisinage d'un groupement carbonyle) n'a pas encore été étudiée, mais dans le cas de l'acide propargylphosphorique, une β -élimination n'est pas à envisager puisqu'il n'y a pas de H sur le C- β . Les groupements qui provoquent une labilisation de la fonction ester phosphorique en milieu alcalin lorsqu'ils se trouvent en β par rapport au groupement ester phosphorique sont donc les suivants: -C \equiv N, -C \leq O NH₂, -COOH, \equiv CH- et -SO₃H.

¹²⁾ E. CHERBULIEZ & J. RABINOWITZ, Helv. 39, 1844 (1956).

SUMMARY

Hydroxy nitriles when treated with polyphosphoric acid yield the corresponding carbamido-alkyl phosphoric acids; but when treated with POCl_3 in the presence of a tertiary base they yield the corresponding cyano-alkyl phosphoric acids. β -cyanoethyl phosphoric acid is very easily dephosphorylated in $1N$ NaOH . β -X-alkylphosphoric esters are dephosphorylated in alkaline medium when $-X$ is $-\text{C}\equiv\text{N}$, $-\text{C}\begin{smallmatrix} \text{O} \\ \parallel \end{smallmatrix}\text{NH}_2-$, $-\text{COOH}$, $\equiv\text{CH}$ or $-\text{SO}_3\text{H}$.

Laboratoires de chimie organique et pharmaceutique
de l'Université de Genève

113. Macro- et microdosage de traces de cobalt

VI¹⁾. Dosage du cobalt dans le sang

par W. Haerdi, J. Vogel, D. Monnier et P. E. Wenger

(3 III 60)

Introduction. Le dosage de traces de cobalt dans le sang a pris un intérêt particulier depuis que certains auteurs, notamment SMITH²⁾, ont montré que cet élément jouait un rôle important, sous forme ionique comme à l'état complexé dans la vitamine B_{12} , en tant que facteur antianémique. D'autre part, divers auteurs³⁾ ont déterminé la teneur en cobalt du sang dans le cas d'infections hépatiques. Ils affirment avoir trouvé jusqu'à $12,26 \mu\text{g}$ de cobalt pour 100 ml de sang. On peut donc supposer que dans certains cas pathologiques, la vitamine B_{12} stockée dans le foie, se décompose et que le cobalt ionique formé passe dans le sang.

Le premier article important relatif au dosage du cobalt dans le sérum de sang de vache est dû à POHL & DEMMEL⁴⁾. Ils minéralisent 10 ml de sérum au moyen d'acide perchlorique et d'un mélange sulfo-nitrique. Le cuivre est extrait par la dithizone, le fer, au moyen de l'oxine, et le cobalt, avec le diéthyl-dithiocarbamate de sodium. Ce dernier complexe est détruit, et le cobalt, dosé spectrophotométriquement avec le nitroso-sel R (le volume de la solution finale est de 1 ml, et la contamination au cours des opérations, de $0,01 \mu\text{g}$).

THIERS, WILLIAMS & YOE⁵⁾ ont déterminé le cobalt dans le sang humain complet. Un échantillon de 50 à 100 ml est minéralisé par calcination à 450° et le résidu est repris par HCl 9M. Le fer est extrait par l'éther isopropylique chlorhydrique et les dernières traces sont éliminées au moyen de la résine Dowex 1-X8 qui retient le cobalt, le cuivre, le zinc et le fer. Le cobalt est élué par du HCl 4M, et on ajoute un peu de nickel qui servira d'étalon interne. Une goutte de la solution concentrée est spectrographiée sur électrode de carbone. Toutes les pertes subies au cours des opérations sont déterminées par marquage au cobalt 60.

RODIER⁶⁾ dose le cobalt dans le sang pour dépister la cobaltémie des mineurs travaillant dans les mines d'arséniure de cobalt. L'auteur effectue une minéralisation par voie humide d'en-

¹⁾ I, II, III: voir Helv. 42, 1672, 1846, 2334 (1959); IV et V: *ibid.* 43, 217, 675 (1960).

²⁾ E. L. SMITH, *Nature* 162, 144 (1948).

³⁾ E. P. SUSHKO, *Sbornik Nauch. Rabot Minsk. Med. Inst.* 19, 269 (1957).

⁴⁾ F. A. POHL & H. DEMMEL, *Analyt. chim. Acta* 10, 554 (1954).

⁵⁾ R. E. THIERS, J. F. WILLIAMS & J. H. YOE, *Analyt. Chemistry* 27, 1725 (1955).

⁶⁾ J. RODIER, *Ann. Biol. clin. (Paris)* 16, 489 (1958).