

Dans le tableau II figurent les $t_{\frac{1}{2}}$ (temps de demission) des esters (cités sous B) à ces différents pH, ainsi que ceux de l'acide carbamido-1-fluoro-3-propyl-2-phosphorique dont la préparation a été déjà décrite⁷⁾.

Remarquons à nouveau que le groupe $-C\equiv N$ fixé sur le C voisin (β) du carbone porteur de la liaison phosphorique, labilise fortement cette dernière en milieu alcalin (NaOH 1N), sauf dans le cas où les deux H en β sont substitués par des restes alcoyles. Nous reviendrons sur le mécanisme de cette déphosphorylation dans notre prochain mémoire.

Quant au F de ces monoesters, il est uniquement scindé en milieu alcalin, bien que rendu relativement plus stable par la présence dans son voisinage du groupement monoester phosphorique; sa vitesse de scission ne peut être suivie que dans le cas d'esters alcalinostables.

Le groupe $-C\equiv N$ en α (donc sur le C portant la liaison $-OPO_3H_2$) ne labilise pas la fonction monoester phosphorique en milieu alcalin en dépit de la présence d'hydrogène en β .

SUMMARY

The synthesis and the rate of scission of some new cyanoalkyl-phosphoric monoesters are described. In the case of β -cyanoalkyl-phosphoric monoesters, the monoester group is no more dephosphorylated in alkaline medium when the two H in the β position are substituted by alkyl groups.

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

126. Recherches sur la formation et les transformations des esters XXXIII¹⁾

Etude du mécanisme de la scission alcaline des monoesters phosphoriques à l'aide de $H_2^{18}O$

par E. Cherbuliez²⁾, H. Dahn³⁾, H. Moll³⁾, H. Probst²⁾, et J. Rabinowitz²⁾

(15 III 62)

Dans de précédents mémoires de cette série⁴⁾, CHERBULIEZ et coll. ont décrit toute une série de monoesters phosphoriques labiles en milieu alcalin.

Ils ont constaté que cette alcalino-labilité du groupement monoester phosphorique était due à la présence de certains groupements fonctionnels tels que $-C\equiv N$, $-CONH_2$, $-COOR$, $-COOH$, $-SO_3H$, $\equiv CH$ dans la molécule du monoester, mais cela uniquement lorsque ces fonctions se trouvent sur le C voisin du carbone porteur de la liaison ester phosphorique.

¹⁾ XXXII* communication: *Helv.* 45, 1071 (1962).

²⁾ Laboratoires de chimie organique et pharmaceutique de l'Université de Genève.

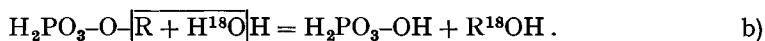
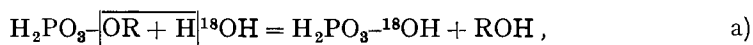
³⁾ Laboratoire de chimie organique de l'Université de Lausanne.

⁴⁾ Voir p. ex. E. CHERBULIEZ & J. RABINOWITZ, *Helv.* 39, 1844 (1956).

Jusqu'à présent, ces auteurs ne se sont pas occupés du mécanisme de cette scission alcaline du groupement monoester phosphorique, et notamment de la question de savoir s'il s'agit là d'une hydrolyse avec formation d'alcool et de phosphate (réaction intermoléculaire) ou d'une β -élimination, c'est-à-dire de l'arrachement du reste $-\text{OPO}_3\text{H}_2$ avec un H d'un carbone voisin, avec formation d'un dérivé non saturé à côté du phosphate (réaction intramoléculaire).

Dans le cas de l'acide sérinephosphorique et des phosphopeptides résultant d'une dégradation hydrolytique partielle des protéines caséiniques et contenant le reste sérinephosphorique, plusieurs auteurs ont déjà prouvé, soit en isolant les produits de scission, soit en utilisant de l'eau marquée au ^{18}O , que la déphosphorylation alcaline de ces produits était due à une β -élimination⁵⁾.

Nous nous sommes proposé d'étudier le mécanisme de la scission alcaline de nos esters phosphoriques à l'aide d'eau enrichie en ^{18}O . Mais une différenciation entre β -élimination – qui fournit évidemment des molécules H_3PO_4 exemptes de l'oxygène de l'eau utilisée – et véritable hydrolyse n'est possible par ce moyen que lorsque cette hydrolyse introduit sur le phosphore l'oxygène de l'eau d'hydrolyse, c'est-à-dire s'il se produit une scission O–P. Il fallait donc d'abord nous assurer que, dans le cas d'une hydrolyse alcaline du groupement ester phosphorique primaire, c'est la rupture de la liaison O–P selon l'équation a) qui serait prédominante et non une rupture selon b):

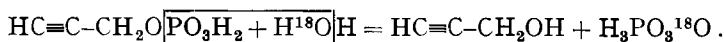


Dans le cas a), le ^{18}O se retrouve dans le phosphate libéré que l'on isole facilement, et non dans l'alcool.

Or, si l'on sait que la scission alcaline des esters phosphoriques secondaires $(\text{RO})_2\text{PO}_2\text{H}$ et tertiaires $(\text{RO})_3\text{PO}$ se fait selon une hydrolyse du type a)⁶⁾, nous n'avons pas trouvé d'indication concernant le cas des esters phosphoriques primaires dérivés d'alcools simples.

L'étude de l'hydrolyse alcaline d'un acide monoalcoylphosphorique est délicate à réaliser en raison de la lenteur extrême de cette réaction (temps de demi-hydrolyse à 100° en milieu alcalin 1 N, p. ex. de $\text{C}_2\text{H}_5\text{OPO}_2\text{H}_2$, de l'ordre de 20000 h, soit plus de 2 ans!). Pour élucider ce point, nous avons besoin d'un ester phosphorique primaire qui devait être d'un côté hydrolysable en milieu alcalin dans un laps de temps raisonnable, et de l'autre, incapable de subir une scission par β -élimination. Nous avons trouvé cet ester dans l'acide propargylphosphorique $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{OPO}_3\text{H}_2$ (temps de demi-hydrolyse $t_{1/2}$ en milieu NaOH 1 N env. 30 h).

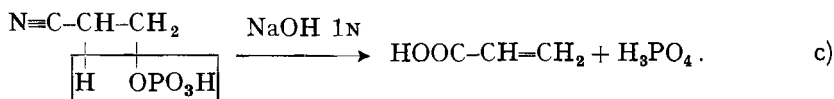
Soumettant l'acide propargylphosphorique à l'hydrolyse alcaline dans de l'eau contenant H_2^{18}O , nous avons retrouvé la majeure partie de ^{18}O dans le phosphate libéré (voir tableau II), selon le schéma:



⁵⁾ Voir p. ex. TH. POSTERNAK & H. POLLACZEK, *Helv.* **24**, 1190 (1941).

⁶⁾ Voir p. ex. E. BLUMENTHAL & J. B. M. HERBERT, *Trans. Faraday Soc.* **41**, 611 (1945).

Nous avons déjà des raisons de penser que la déphosphorylation alcaline de l'acide cyano-2-éthyl-1-phosphorique (ou acide β -cyano-éthyl-phosphorique) était due à une β -élimination selon c) et non à une hydrolyse :



En effet, dans les produits de scission on retrouve des corps non saturés (révélés par la décoloration de l'eau de brome, du permanganate de K, etc.). De plus, si on

Tableau I. Temps de demi-scission ($t_{1/2}$), en h, à 100°, en solution 0,1M, de quelques monoesters phosphoriques à divers pH

Acide	Milieu		
	HCl 1N $t_{1/2}$ ester	pH 4,5 $t_{1/2}$ ester	NaOH 1N $t_{1/2}$ ester
β -cyanoéthyl-phosphorique $\text{N}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	31	13	0,017 (1 min)
(β -cyano- β -méthyl-éthyl)-phosphorique $\text{N}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	40	12	0,017 (1 min)
(β -cyano- β , β -diméthyl-éthyl)-phosphorique $\text{N}\equiv\text{C}-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	29	6	1000
carbamido-2-éthyl-1-phosphorique $\text{H}_2\text{N}-\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OPO}_3\text{H}_2$	25	18	0,07 (4 min)
carboxy-2-éthyl-1-phosphorique $\text{HOOC}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	23	18	4
propargylphosphorique $\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	18	7,5	28
(sulfo-2-éthyl-1)-phosphorique $\text{HO}_3\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	48	13	82

Tableau II. Scission alcaline de quelques esters phosphoriques en présence de H_2^{18}O

Ester scindé	Teneur en traceur (excès de ^{18}O , en at.-%)		Proportion d'échange %	Mécanisme de la scission
	de l'eau utilisée	de KH_2PO_4 isolé (calc. pour 1 O)		
$\text{N}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	5,9	0,060	1	β -élimination
$\text{N}\equiv\text{C}-\text{CH}(\text{CH}_3)\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$. .	5,13	0,02	0,4	β -élimination
$\text{HC}\equiv\text{C}-\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	5,13	2,69	52	hydrolyse
$\text{HO}_3\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}_2$	5,13	0,02	0,4	β -élimination

remplace les 2 H en β de cet acide par des restes alcoyle, p. ex. méthyle, l'esther primaire obtenu n'est plus alcalinolabile (v. tableau I).

Nous avons voulu confirmer ce point en étudiant la scission alcaline de cet acide dans de l'eau marquée au ^{18}O .

Dans le tableau I, nous indiquons les $t_{1/2}$ (temps de demi-scission) de quelque monoesters phosphoriques (choisis surtout parmi les alcalinolabiles) à différents pH (chiffres tirés de précédents mémoires⁷⁾).

La plupart de ces esters ont été soumis maintenant à une scission alcaline dans de l'eau contenant env. 5 at.-% de ^{18}O ; pour la détermination de la teneur en ^{18}O du phosphate libéré, ce dernier a été isolé comme KH_2PO_4 (sel qui n'a pas d'eau de cristallisation).

A) Scission alcaline de quelques monoesters phosphoriques et isolement de KH_2PO_4 .

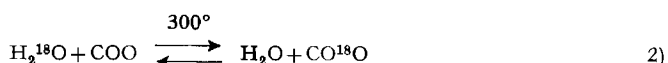
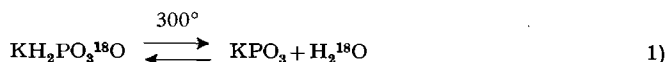
a) *Préparation des esters phosphoriques*: tous les esters utilisés ont déjà été décrits¹⁾⁷⁾. Comme ils ont été obtenus pour la plupart sous forme de leurs sels barytiques, on les dissout dans H_2O , ajoute la quantité calculée de H_2SO_4 , centrifuge BaSO_4 formé et évapore la solution à sec sous vide. L'acide libre est encore séché dans un dessiccateur sur P_2O_5 .

b) *Préparation d'une solution de NaOH de normalité voulue, dans de l'eau marquée*: afin de ne pas diluer l'eau enrichie en ^{18}O , on prépare la solution de NaOH de la normalité voulue, en chauffant à reflux pendant 3 à 4 h la quantité calculée d'amalgame de Na avec une quantité connue de $\text{H}_2[^{18}\text{O}]$, décante du Hg formé la solution et vérifie son titre par acidimétrie.

c) *Scission du monoester phosphorique et isolement du KH_2PO_4* : 1,5 mmole de l'acide monoalcoylphosphorique et 15 ml de NaOH de normalité voulue (généralement 1N) dans $\text{H}_2[^{18}\text{O}]$ sont chauffés à reflux pendant le temps nécessaire pour une dégradation presque complète du monoester (au moins 4 fois $t_{1/2}$). Ensuite, on ajoute 0,6 g de BaCl_2 anhydre et chauffe 10 min à reflux. Après refroidissement, on filtre le phosphate de Ba formé. Comme ce dernier contient passablement d'ions Na (sel double), on le dissout dans HCl dilué et neutralise cette solution à pH 8,2 par de la baryte. Le phosphate de Ba précipité (mélange de phosphates di- et tri-barytique) ne contient plus de Na. Après dosage de l'ion baryum, on élimine cet ion par la quantité calculée de H_2SO_4 (ou bien on procède par tâtonnement avec H_2SO_4 dilué et de l'eau de baryte diluée, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus en solution ni Ba^{2+} ni SO_4^{2-}). On centrifuge BaSO_4 formé, rajuste le volume de la solution à 10 ml env., et amène par KOH dilué au pH 4,5 (neutralisation d'une fonction acide de H_3PO_4). On concentre cette solution à 2-3 ml et précipite KH_2PO_4 par addition de 3 à 4 vol. d'éthanol. Si le KH_2PO_4 n'est pas pur, on le dissout dans le minimum d'eau et le reprécipite par addition de 3 à 4 vol. d'alcool.

B) Détermination de la teneur en ^{18}O de KH_2PO_4 ; interprétation des résultats.

a) La détermination de la teneur en ^{18}O du phosphate est basée sur les réactions suivantes⁸⁾:



b) Dans l'interprétation des résultats, les considérations sont simplifiées si on discute les variations non pas de la teneur en ^{18}O , mais de l'excès de ^{18}O sur la teneur normale de l'eau et du phosphate en ^{18}O (environ 0,2 at.-% ^{18}O), excédent que nous appellerons *teneur en traceur*.

Comme la déshydratation du dihydrogénophosphate et l'équilibrage de $\text{H}_2[^{18}\text{O}]$ avec CO_2 se font simultanément en une seule opération en vase clos⁹⁾, KPO_3 intervient également dans cet équilibre; dans le cas d'une hydrolyse avec 100% de rupture O-P, l'eau ainsi obtenue devrait

⁷⁾ Voir p. ex. E. CHERBULIEZ, G. CORDAHI & J. RABINOWITZ, *Helv.* **43**, 863 (1960).

⁸⁾ M. COHN, *J. biol. Chemistry* **180**, 771 (1949); **201**, 735 (1953); **216**, 831 (1955).

⁹⁾ Appareillage décrit par H. DAHN, H. MOLL & R. MENASSÉ, *Helv.* **42**, 1225 (1959).

présenter le quart de la teneur en traceur de l'eau qui a servi à la scission. On vérifie cela en chauffant KH_2PO_4 non marqué à 300° avec CO^{18}O . La diminution de la teneur en traceur du gaz carbonique correspond bien à l'intervention des quatre O de KH_2PO_4 .

La teneur en ^{18}O du gaz carbonique (qui, diminuée de la teneur normale d'env. 0,2 at-% ^{18}O du gaz carbonique ordinaire, donne la teneur en traceur) a été déterminée au spectrographe de masse¹⁰⁾.

C) Discussion des résultats. – Les monoesters étudiés, les teneurs en traceur resp. de l'eau utilisée pour l'hydrolyse et de KH_2PO_4 isolé (rapporté à un atome d'oxygène) figurent dans le tableau II.

Dans le cas de l'acide β -cyanoéthyl-phosphorique, le KH_2PO_4 isolé ne contient pratiquement pas de traceur; il s'agit donc bien d'une β -élimination (la molécule possède 2 H sur le carbone β). Il en est de même dans le cas de l'acide β -cyano- β -méthyl-éthyl-phosphorique (un seul H sur le carbone β). On constate donc une fois de plus que le groupe $-\text{CN}$ (fixé ici sur le carbone β) active les H qui l'accompagnent sur le même carbone; en effet, dès que ces H sont remplacés par des alcoyles (exemple acide $(\beta$ -cyano- β , β -diméthyl-éthyl)-phosphorique), la β -élimination ne peut plus intervenir et l'ester devient alcalinostable, comme le sont du reste la plupart des monoesters phosphoriques.

Dans le cas de l'acide propargylphosphorique, il s'agit d'une hydrolyse car on retrouve environ 50% du ^{18}O dans le KH_2PO_4 isolé, calculé pour une hydrolyse avec rupture de la liaison O-P. Comme on ne retrouve que 50% du traceur calculé pour ce type de scission, il se pourrait donc que l'hydrolyse alcaline d'un ester phosphorique primaire se fit aussi en partie par rupture de la liaison C-O; cette question reste à l'étude car nous n'avons encore examiné ni l'alcool obtenu par cette hydrolyse, ni la possibilité d'échanges isotopiques entre ^{18}O contenu dans le phosphate de baryum isolé, avec l'oxygène des divers milieux non alcalins où ce sel est traité pour sa transformation en KH_2PO_4 , échanges qui pourraient abaisser sa teneur en traceur (nous savons déjà qu'en milieu alcalin cet échange n'a pas lieu car KH_2PO_4 isolé lors d'une scission par β -élimination ne contient pas de traceur). Quoi qu'il en soit, cette méthode d'investigation permet de distinguer une hydrolyse d'une β -élimination, pourvu que l'hydrolyse se fasse pour une part appréciable par scission O-P.

Dans les deux cas de scission alcaline très rapide auxquels nous avons appliqué la méthode à l'oxygène-18, nous avons constaté une β -élimination (réaction intramoléculaire), alors que dans le cas de l'acide propargylphosphorique, où une β -élimination est exclue et où l'on a donc affaire à une hydrolyse (réaction intermoléculaire), la scission alcaline est relativement lente. Il serait erroné toutefois de croire que scission alcaline aisée signifierait β -élimination, et scission alcaline lente, véritable hydrolyse. En effet, nous avons dans le petit nombre (4!) d'esters phosphoriques primaires examinés un cas, celui de l'acide sulfo-2-éthyl-1-phosphorique ($\text{HO}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{OPO}_3\text{H}$) avec $t_{1/2} = 82$ h, à scission par β -élimination où celle-ci est plus lente que la vraie hydrolyse alcaline de l'acide propargylphosphorique ($\text{CH}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{OPO}_3\text{H}$; pas de β -élimination possible) avec $t_{1/2} = 28$ h (v. tableau I). Dans le cas de l'acide sulfoéthyl-phosphorique, le substituant sur le carbone β est un groupement acide fort,

¹⁰⁾ Détermination effectuée par M. THÜRKAUF à l'Institut de chimie physique de l'Université de Bâle.

et il se peut qu'il existe un certain parallélisme entre la stabilité relative en cas de β -élimination et l'acidité du groupement activant en β .

En conclusion nous pouvons dire que l'hydrolyse alcaline de l'acide propargyl-phosphorique, ester phosphorique primaire incapable de subir une scission par β -élimination, se fait principalement par rupture de la liaison O-P. Dans la mesure où ce résultat peut être généralisé, l'emploi d'eau marquée à l'oxygène-18 permet de déterminer si la scission alcaline d'un ester phosphorique primaire est due à une β -élimination (fournissant du phosphate minéral sans traceur) ou à une hydrolyse (fournissant du phosphate marqué).

Les auteurs remercient sincèrement le FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE de l'aide financière accordée pour ce travail. L'eau enrichie en ^{18}O a été obtenue auprès de l'Institut de chimie physique de l'Université de Bâle (Prof. W. KUHN), où M. le D^r M. THÜRKAUF, PD., a exécuté les déterminations de la teneur en ^{18}O . Nous tenons à renouveler ici à MM. KUHN et THÜRKAUF l'expression de nos remerciements.

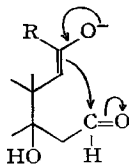
SUMMARY

By use of $\text{H}_2[^{18}\text{O}]$ the alkaline hydrolysis of propargyl-phosphoric acid $\text{CH}\equiv\text{C}-\text{CH}_2-\text{OPO}_3\text{H}_2$ (which cannot undergo splitting by β -elimination: no H on the β carbon atom) is shown to proceed mainly by splitting of the O-P bond. As far as this fact may be extended to the alkaline hydrolysis of monoalkyl-phosphoric acids in general, the use of $\text{H}_2[^{18}\text{O}]$ allows to distinguish true alkaline hydrolysis (yielding marked phosphate) from splitting by β -elimination (yielding unmarked phosphate). β -Elimination is generally much faster than true hydrolysis.

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

Errata

Helv. 45, 159 (1962), Abhandlung Nr. 18 von M. S. RAGAB, H. LINDE & K. MEYER, Formel B muss richtig lauten:



Helv. 45, 241 (1962), Abhandlung Nr. 29 von F. BERNOULLI, H. LINDE & K. MEYER, Formeln XIV, XV und XVI sind an C-16 durch $-\text{OR}_1$ zu ergänzen.