

## SUCRES PHOSPHORYLÉS—XI

### SYNTHÈSES DE L'ACIDE 6-PHOSPHO D-ISOSACCHARINIQUE ET DES ACIDES 3-DÉSOXY 5-PHOSPHO D-PENTONIQUES PAR DÉGRADATION ALCALINE DE PHOSPHATES CYCLIQUES D'OSSES\*

W. JACHYMCZYK, L. MÉNAGER et L. SZABÓ

Laboratoire de Chimie Organique, Centre de Recherches sur la Cellule Normale et Cancéreuse du C.N.R.S., Villejuif, Seine, France

(Received 19 August 1964)

**Résumé**—La dégradation alcaline du D-arabinose 3,5-(hydrogène phosphate) ou celle du D-xylose 3,5-(hydrogène phosphate) fournit un mélange des acides 3-désoxy 5-phospho D-erythro- et D-threo-pentoniques. Le même traitement transforme le D-glucose 4,6-(hydrogène phosphate) en un mélange des acides 3-désoxy 2-C-(hydroxyméthyl) 5-phospho D-erythro- et D-threo-pentoniques (acide 6-phospho D-isosaccharinique). La réaction de cet acide avec un équivalent molaire de periodate le transforme en acide 3-désoxy 5-phospho D-glycero-pentulosonique, mis en évidence en solution mais non isolé. Une synthèse facile du D-glucose 4,6-(hydrogène phosphate) et sa transformation en acide gluconique 4,6-(hydrogène phosphate) sont également décrites.

**Abstract**—Alkaline degradation of D-arabinose 3,5-(hydrogen phosphate) or of D-xylose 3,5-(hydrogen phosphate) gives a mixture of 3-deoxy 5-phospho D-erythro- and D-threo-pentonic acids. A similar treatment of D-glucose 4,6-(hydrogen phosphate) transforms it into a mixture of 3-deoxy 2-C-(hydroxymethyl) 5-phospho D-erythro- and D-threo-pentonic acids (6-phospho D-isosaccharinic acid). By reaction with one molar equivalent of periodate, this acid is transformed into 3-deoxy 5-phospho D-glycero-pentulosonic acid, which was obtained in solution but not isolated. An easy synthesis of D-glucose 4,6-(hydrogen phosphate) and its conversion to gluconic acid 4,6-(hydrogen phosphate) are also described.

DANS le 8ème Mémoire de cette série<sup>1</sup> nous avons démontré qu'il était possible de préparer des acides glucometasacchariniques phosphorylés par la dégradation alcaline de certains phosphates cycliques du glucose, facilement accessibles.<sup>2</sup> Les phosphates en 5 et en 6 de l'acide glucometasaccharinique ont été ainsi obtenus à partir de glucose 3,5- et 3,6-phosphates, respectivement. Dès lors il était intéressant à déterminer si d'autres phosphates cycliques pouvaient subir ce même type de transformation, d'autant plus que nous savons que les acides 3-désoxy aldoniques phosphorylés peuvent être transformés pour donner des  $\alpha$ -cétacides phosphorylés,<sup>3</sup> dont l'intérêt biologique est bien connu.<sup>4</sup>

\* Mémoire précédent dans la série: P. Szabó et L. Szabó, *J. Chem. Soc.* 2944 (1965). Une partie des résultats décrits a été présentée lors du Vème Congrès International de Biochimie; Résumé No. 1.85. Moscou (1961).

<sup>1</sup> S. Lewak et L. Szabó, *J. Chem. Soc.* 3975 (1963).

<sup>2</sup> P. Szabó et L. Szabó, *J. Chem. Soc.* 448 (1961).

<sup>3</sup> W. Jachymczyk, J. C. Young, A. Dowgiallo, S. Lewak et L. Szabó, *Vème Congrès International de Biochimie*, Résumé des Communiqués, No. 1.85. Moscou (1961).

<sup>4</sup> N. Entner et M. Doudoroff, *J. Biol. Chem.* 196, 853 (1952); J. MacGee et M. Doudoroff, *Ibid* 210, 617 (1954); J. de Ley et M. Doudoroff, *Ibid* 227, 745 (1957); A. Weissbach et J. Hurwitz, *Ibid*, 234, 705 (1959); D. H. Levin et E. Racker, *Ibid*, 234, 2532 (1959); N. J. Palleroni et M. Doudoroff, *Ibid*, 223, 499 (1956).

Pour l'obtention d'un acide phosphorylé du type métrasaccharinique ayant cinq atomes de carbone (un mélange des acides 3-désoxy 5-phospho D-threo et D-erythro-pentoniques) selon la méthode décrite,<sup>1</sup> il était nécessaire d'avoir un phosphate cyclique en 3,5 d'un pentose. Un tel phosphate cyclique, le D-arabinose 3,5-(hydrogène phosphate) (VII), nous semblait au premier abord accessible, en utilisant comme matière première le glucose 4,6-(hydrogène phosphate) (V). La synthèse de ce phosphate cyclique selon Baddiley *et al.*<sup>5</sup> n'est pas sans inconvénients, car, lors de l'hydrogénation du phényl glucoside 4,6-(phényl phosphate), il se forme toujours, à côté du glucose 4,6-(hydrogène phosphate) (V) désiré, une quantité appréciable de cyclohexyl glucoside 4,6-(hydrogène phosphate); la séparation de ces deux composés est difficile si l'on veut éviter des pertes considérables. Afin d'obvier à cet inconvénient, nous avons préparé le benzyl  $\beta$ -D-glucoside 4,6-(phényl phosphate) (II), en faisant réagir sur l'oside<sup>6</sup> (I) le dichlorure de phénylphosphoryle. Si l'on traite ce triester par une base, le groupe phényle est sélectivement hydrolysé et donne le benzyl  $\beta$ -D-glucoside 4,6-(hydrogène phosphate) (III), dont l'hydrogénolyse en présence d'un catalyseur de palladium<sup>8</sup> fournit le D-glucose 4,6-(hydrogène phosphate) (V). D'autre part, on peut enlever d'abord le groupe benzyle sélectivement et quantitativement<sup>7</sup> par hydrogénolyse en présence de palladium: on obtient le D-glucose 4,6-(phényl phosphate). L'anomère  $\beta$  (IV) est obtenu par cristallisation dans de l'eau. Une deuxième hydrogénolyse en présence d'un catalyseur de platine<sup>9</sup> élimine ensuite le groupe phényle et donne le D-glucose 4,6-(hydrogène phosphate) (V), avec un bon rendement. Nous avons transformé ce phosphate cyclique par oxydation avec du brome en acide gluconique 4,6-(hydrogène phosphate) (VI) dans le dessein de lui faire subir une dégradation de Ruff pour former l'arabinose 3,5-(hydrogène phosphate) (VII) cherché. Au terme de ces réactions nous avons effectivement pu démontrer la formation d'un sucre réducteur contenant du phosphate et, d'après sa valeur  $R_f$  et son mode de formation, il s'agissait en toute probabilité de l'arabinose 3,5-(hydrogène phosphate), mais malgré de très nombreux essais nous n'avons jamais pu obtenir un échantillon analytiquement pur de ce composé qui, par surcroit, n'était formé qu'avec un fort mauvais rendement. Nous expliquons ces résultats par le fait que la seule forme annulaire que peut assumer le 3,5-phosphate cyclique de l'arabinose est la forme furanoïde; dans cette conformation presque plane le groupe hydroxyle en 3 et le groupe alcool primaire (carbone 5) sont opposés par rapport au plan formé par le cycle furanoïde. Cette conformation ne semble pas favoriser la stabilité des phosphates cycliques en 3,5 des pento-furanoses. Ainsi, Lipkin et ses collaborateurs<sup>10</sup> ont trouvé qu'en milieu alcalin le temps de demihydrolyse de l'adénosine 3',5'-(hydrogène phosphate), composé dans lequel le cycle phosphorique possède la même structure stérique qu'aurait l'arabofuranose 3,5-(hydrogène phosphate), est sept fois plus court que le temps de demi-hydrolyse de l'isopropylidène D-xylofuranose 3,5-(hydrogène phosphate)<sup>11</sup> qui, lui, a le groupe hydroxyle en 3 et le groupe alcool primaire du même

<sup>5</sup> J. Baddiley, J. G. Buchanan et L. Szabó, *J. Chem. Soc.* 3826 (1954).

<sup>6</sup> K. H. Slotta et H. Heller, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 63, 1024 (1930).

<sup>7</sup> N. K. Richtmyer, *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 1633 (1934).

<sup>8</sup> *Synthèses Organiques* p. 425. Masson et Cie., Paris (1935).

<sup>9</sup> *Synthèses Organiques* p. 420. Masson et Cie., Paris (1935).

<sup>10</sup> D. Lipkin, W. H. Cook et R. Markham, *J. Amer. Chem. Soc.* 81, 6198 (1959).

<sup>11</sup> H. G. Khorana, G. M. Tener, R. S. Wright et J. G. Moffatt, *J. Amer. Chem. Soc.* 79, 430 (1957).

côté du plan formé par le cycle furanoïde. Lorsque le phosphate cyclique occupe ainsi une position stérique défavorable, les autres sites de la molécule peuvent être également affectés: ainsi la liaison osidique de la thymidine 3',5'-(hydrogène phosphate) est complètement hydrolysée par l'acide chlorhydrique décinnormal à 100° en moins de 5 minutes, alors que la thymidine 5'-(di-hydrogène phosphate) n'est pratiquement pas affectée dans ces conditions.<sup>12</sup>

Renonçant alors à l'isolement de l'arabinose 3,5-(hydrogène phosphate) (VII), nous avons transformé le phosphate cyclique du sucre *in situ*,—c'est à dire contenu dans le mélange réactionnel résultant de la dégradation du phosphate cyclique de l'acide gluconique (VI) selon Ruff—par un traitement alcalin,<sup>1</sup> le résultat de ce traitement devant être la formation d'un mélange d'acides 3-désoxy 5-phospho D-*threo*- et 3-désoxy 5-phospho D-*erythro*-pentoniques (VIII). Le mélange des acides pentoniques phosphorylés a été ensuite séparé de la matière de départ, c'est à dire du phosphate cyclique de l'acide gluconique (VI) par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. Bien que le grand nombre d'étapes et les rendements extrêmement faibles rendent cette voie impraticable pour l'obtention de quantités appréciables des acides pentoniques phosphorylés, elle nous a permis de vérifier que la dégradation des phosphates cycliques en 3,5 des pentoses s'effectuait selon le même schéma que celui des phosphates cycliques du glucose.<sup>1</sup>

Un autre phosphate cyclique donnant accès aux acides désoxy pentoniques phosphorylés est le D-xylose 3,5-(hydrogène phosphate)<sup>13</sup> (IX). C'est un composé stable, dans lequel le groupe alcool primaire et le groupe hydroxyle du carbone 3 sont en position *cis*. Sa dégradation par la baryte fournit, avec un excellent rendement le même mélange des acides 3-désoxy D-*erythro*- et D-*threo*-pentoniques phosphorylés (VIII) que l'on obtient à partir du phosphate cyclique du D-arabinose. La suite de réactions que nous proposons est entièrement en accord avec l'observation que le traitement du 3-O-méthyl D-xylose avec l'eau de chaux donne un mélange d'acides D-*threo*- et D-*erythro*-1, 3, 4-trihydroxy valériques.<sup>14</sup>

L'obtention facile du glucose 4,6-(hydrogène phosphate) nous a permis d'accéder à un acide isosaccharinique phosphorylé, c'est à dire de préparer un mélange des acides 3-désoxy 2-C-(hydroxyméthyl) 5-phospho D-*erythro*- et D-*threo*-pentoniques (X). En effet, on sait d'une part que le traitement alcalin d'un 4-alcoyl ou 4-glycosyl D-hexose fournit un mélange des acides D-isosacchariniques épimères.<sup>15</sup> D'autre part il a été démontré que le groupe phosphate se comporte, lors de la dégradation alcaline des oses phosphorylés, comme un radical alcoyl: le glucose 3-phosphate donne de l'acide glucometasaccharinique,<sup>16</sup> tandis que le glucose 3,5-(hydrogène phosphate) et le glucose 3,6-(hydrogène phosphate) fournissent, respectivement, de l'acide 5-phospho et 6-phospho glucometasaccharinique.<sup>1</sup> Il était donc à prévoir que le glucose 4,6-(hydrogène phosphate) subirait une réaction analogue pour donner de l'acide

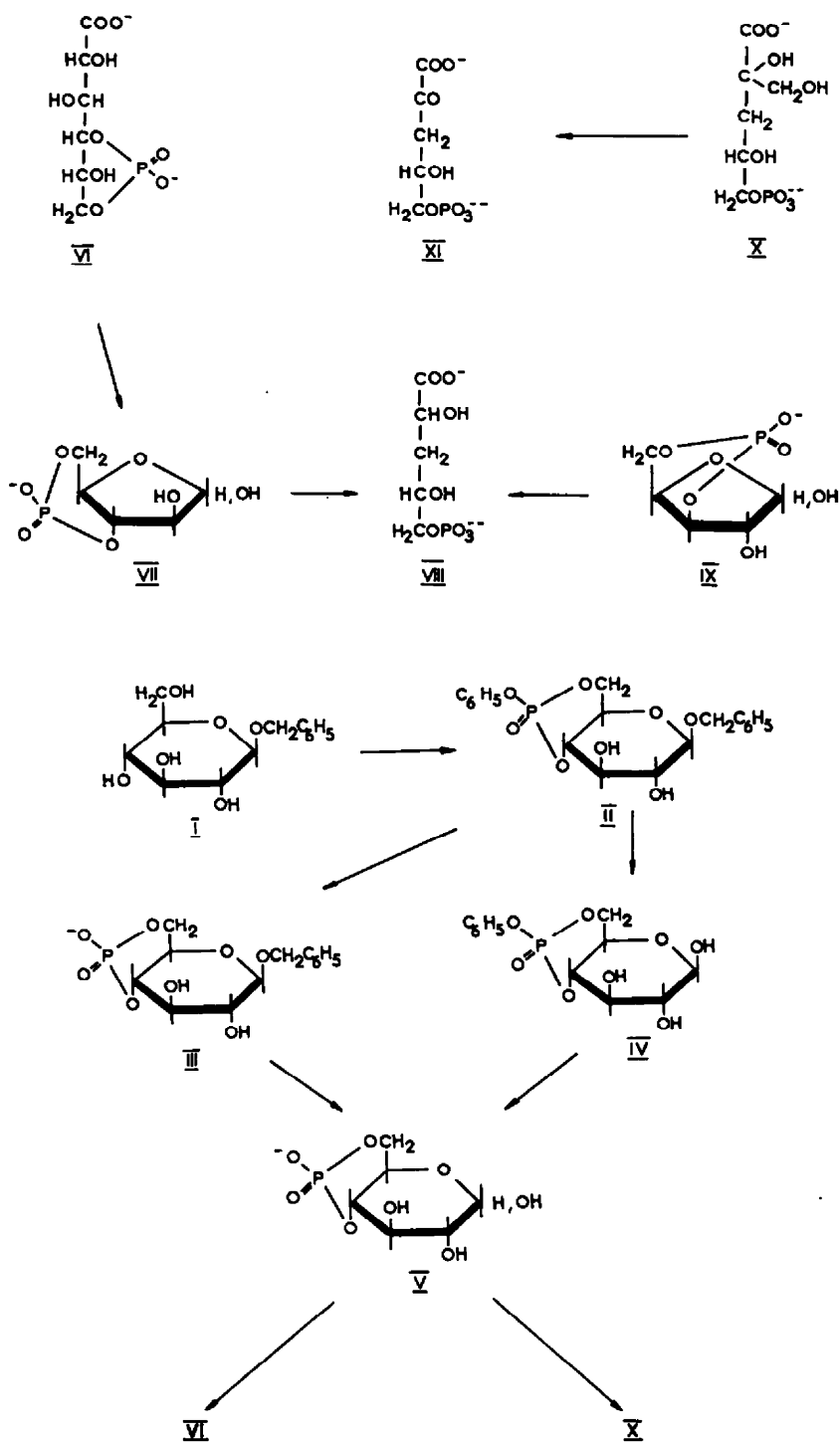
<sup>12</sup> G. M. Tener, H. G. Khorana, R. Markham et E. H. Pol, *J. Amer. Chem. Soc.* **80**, 6223 (1958).

<sup>13</sup> J. G. Moffatt et H. G. Khorana, *J. Amer. Chem. Soc.* **79**, 1194 (1957).

<sup>14</sup> W. M. Corbett, G. N. Richards et R. L. Whistler, *J. Chem. Soc.* **11** (1957).

<sup>15</sup> A. P. Dubrunfaut, *Monit. Sci. Docteur Quesneville* [3], **12**, 520 (1882); L. Cuisinier, *Ibid.* p. 521; L. Cuisinier, *Bull. Soc. Chim. Fr.* [2], **38**, 512 (1882); H. Kiliani, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **42**, 3903 (1909); S. V. Hintikka, *Ann. Acad. Sci Fennicae Ser. A, II*, No. 9 (1922); M. W. Corbett et J. Kenner, *J. Chem. Soc.* 2245 (1953); J. Kenner et G. N. Richards, *Ibid* 1810 (1955).

<sup>16</sup> D. M. Brown, F. Hayes et A. R. Todd, *Chem. Ber.* **90**, 936 (1957).



6-phospho isosaccharinique (X). En effet, la dégradation alcaline du glucose 4,6- (hydrogène phosphate) donne un ester phosphorique qui a trois dissociations acides (que l'on peut mettre en évidence par titrage conductométrique) dont une doit provenir d'un group carboxyle, car le composé forme une lactone et un anilide; les deux autres dissociations sont dûes au radical phosphoryle. Le composé réagit instantanément avec une mole de periodate pour former un  $\alpha$ -cétoacide phosphorylé (XI), l'acide 2-céto 3-désoxy 5-phospho D-pentonique (acide 3-désoxy 5-phospho D-glycero-pentulosonique), dont la présence peut être révélée soit à l'aide de semi-carbazide<sup>17</sup> soit avec de l'o-phénylènediamine.<sup>18</sup> Lorsque l'on traite l'acide isosaccharinique phosphorylé avec un excès de periodate, un peu moins de deux moles de l'oxydant sont consommés en environ deux jours, ce qui est en accord avec la structure proposée. Il est intéressant de remarquer que l'acide isosaccharinique non-phosphorylé est complètement détruit par le periodate en quelques heures.<sup>19</sup>

On peut donc considérer que la dégradation alcaline des phosphates cycliques des oses est une réaction générale qui donne, selon les groupes hydroxyles esterifiés, des acides méta- ou iso-sacchariniques phosphorylés.

#### PARTIE EXPÉRIMENTALE.

Chromatographie sur papier: technique ascendante sur Whatman No 1. Les chromatogrammes n'ayant été faits ni à durée ni à température constantes, les valeurs  $R_f$  ne sont données qu'à titre indicatif. Solvants: (a) n-propanol: ammoniacque conc. (d:0,91):eau = 7:1:2; (b) pyridine: n-propanol:eau:1:1:1; (c) n-propanol:ethanol:acide acétique = 50:50:0-8; (d) n-propanol:eau: acide acétique = 50:50:0-8.

##### *Benzyl $\beta$ -D-glucoside 4,6-(phényl phosphate) (II)*

Une solution de 5 g de benzylglucoside dans 100 ml de pyridine anhydre est traitée par une solution de 4-1 g de dichlorure de phénylphosphoryle<sup>20</sup> dans 20 ml de pyridine anhydre et refroidie dans de l'eau froide. Au bout d'une heure, le mélange est placé dans une étuve à 70° et abandonné pendant 5 jours. La solution claire est refroidie et additionnée de 10 ml d'eau. Deux heures plus tard les solvants sont distillés sous vide (t. <25°). On ajoute 50 ml d'eau et les solvants sont évaporés. Cette dernière opération est répétée plusieurs fois: le phénylphosphate du benzylglucoside cristallise pendant cette opération lorsque toute la pyridine a été chassée. On ajoute alors 200 ml d'eau et après quelques minutes de repos le mélange est décanté. Ce lavage est répété plusieurs fois. Le mélange est filtré, puis le solide est séché sous vide en présence de pentoxyde de phosphore.

Rdt. = 3-5 g (46%). Afin d'obtenir le produit pur, le solide est recristallisé dans 15 ml d'acide acétique. Rdt. = 2-25 g (29%). F = 202-203°,  $[\alpha]_D^{20} = -7-9^\circ$  (c = 1-02, EtOH). (Trouvé: C, 55-57; H, 5-33. Calc. pour  $C_{15}H_{21}O_8P$ : C, 55-88; H, 5-14%.)

##### *Benzyl $\beta$ -D-glucoside 4,6-(hydrogène phosphate) (III)*

Une solution de 2 g de benzyl  $\beta$ -D-glucoside 4,6-(phénylphosphate) dans 20 ml de dioxanne est traitée par une solution de 2-1 g d'hydroxyde de potassium dans 5 ml d'eau. Le mélange est agité toute une nuit, puis ramené à pH voisin de 4 par addition de résine Amberlite IR 120 H<sup>+</sup>. Après filtration et lavage de la résine avec de l'eau, le filtrat est distillé sous vide pour éliminer le dioxanne tout en maintenant le volume constant par addition d'eau et, finalement, extrait à l'éther. La solution aqueuse est refroidie dans de la glace, additionnée de résine IR 120 H<sup>+</sup>, pour éliminer tous les cations, filtrée et neutralisée immédiatement avec de la cyclohexylamine et concentrée sous vide. Le résidu sec est recristallisé dans l'éthanol. Rdt. = 0-85 g (42%). Une recristallisation dans le

<sup>17</sup> J. MacGee et M. Doudoroff, *J. Biol. Chem.* **210**, 617 (1954).

<sup>18</sup> M. C. Lanning et S. S. Cohen, *J. Biol. Chem.* **189**, 109 (1951).

<sup>19</sup> G. N. Richards et H. H. Sephton, *J. Chem. Soc.* 4492 (1957).

<sup>20</sup> P. Brigl et H. Müller, *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **72**, 2121 (1939).

même solvant donne un produit ayant  $F = 230-234^\circ$  (déc);  $[\alpha]_D^{25} = -53.0^\circ$  ( $c = 2.1$ , eau);  $R_f$ , solvant (a): 0.69. (Trouvé: C, 52.87; H, 6.93; N, 3.46. Calc. pour  $C_{19}H_{20}O_8NP$ : C, 52.9; H, 6.96; N, 3.24%.)

#### $\beta$ -D-Glucose 4,6-(phénylphosphate) (IV)

Une solution de 5 g de benzyl- $\beta$ -D-glucoside 4,6-(phénylphosphate) dans 15 ml de méthanol est hydrogénée en présence d'un catalyseur de palladium.<sup>8</sup> 306 ml d'hydrogène sont consommés (théorie 275 ml) en 45 min. Le filtrat, concentré sous vide sans dépasser  $25^\circ$ , donne un résidu sec (3.6 g, 92%) de phénylphosphate pratiquement pur. Le composé est recristallisé dans de l'eau.  $F = 191-193^\circ$  (déc);  $[\alpha]_D^{25} = +10.5 \rightarrow +26.5^\circ$  équ. en 72 h ( $c = 2$ , méthanol absolu);  $R_f$ , solvant (b): 0.57. (Trouvé: C, 45.05; H, 4.78; P, 10.04. Calc. pour  $C_{18}H_{18}O_8P$ : C, 45.28; H, 4.72; P, 9.75%.)

#### D-Glucose 4,6-(hydrogène phosphate) (V)

(1) Une solution de 3.5 g de sel de cyclohexylammonium de benzyl  $\beta$ -D-glucoside 4,6-(hydrogène phosphate) dans 50 ml d'eau est portée à pH 5 environ par addition de résine IR 120  $H^+$ . La solution filtrée est hydrogénée en présence d'un catalyseur de palladium<sup>8</sup> à la pression et à la température ambiantes. Après l'hydrogénation, le filtrat est débarassé de la cyclohexylamine par addition de résine IR 120  $H^+$  (le pH de la solution tombe à environ 1), filtré et neutralisé par addition de baryte jusqu'à pH 6.5. Après concentration sous vide à petit volume, le pH est ajusté exactement à 7 par addition de baryte, puis le sel de baryum du D-glucose 4,6-(hydrogène phosphate) est précipité par addition lente de plusieurs volumes d'éthanol. Après quelques heures de repos à  $0^\circ$ , on filtre; le sel est lavé avec de l'éthanol puis séché à la température ambiante sous vide sur du pentoxyde de phosphore. Rdt. = 2.1 g (83.5%).

(2) Une solution de 2.4 g de  $\beta$ -D-glucose 4,6-(phénylphosphate) dans 75 ml de méthanol est hydrogénée en présence d'un catalyseur de platine.<sup>9</sup> Après l'hydrogénation, on filtre. Le filtrat, dilué à l'eau, est porté à pH 7 par addition de baryte. La solution, concentrée sous vide à petit volume, est traitée à l'éthanol pour précipiter le sel de baryum du D-glucose 4,6-(hydrogène phosphate). Rdt. = 2 g (86%). Le même produit est obtenu dans les deux cas. Sur chromatogrammes les préparations ne donnent qu'une seule tache qui contient du phosphore et est révélée par la réaction périodate-benzidine<sup>21</sup> ou par le phtalate d'aniline<sup>22</sup> et qui a la même valeur  $R_f$  (0.56, solvant (b) que le produit préparé selon Baddiley *et al.*<sup>8</sup>

#### Acide D-gluconique 4,6-(hydrogène phosphate) (VI)

Une solution de 3.5 g de sel de baryum de glucose 4,6-(hydrogène phosphate) dans 25 ml d'eau est traitée par 3.8 g de carbonate de baryum et par 0.5 ml de brome. Le mélange réactionnel est agité pendant 2 h à la température ambiante. L'excès de brome est alors éliminé en faisant barboter de l'air ou de l'azote. On filtre et lave le précipité avec 10 ml d'eau. Le filtrat et les eaux de lavage réunis sont portés à pH 3.5 par addition de 0.48 ml d'acide acétique et le sel de baryum acide de l'acide gluconique phosphorylé précipité par addition de 140 ml d'éthanol. Après un repos d'une nuit à  $0^\circ$  on filtre; le précipité est lavé à l'éthanol, puis dissous dans 40 ml d'eau contenant 0.4 ml d'acide acétique; le pH de la solution est porté à 8.5 par addition lente d'une solution diluée de baryte. Le sel neutre de baryum de l'acide gluconique 4,6-(hydrogène phosphate) est obtenu par addition lente de 50 ml d'éthanol à la solution bien agitée. Après un repos d'une heure, on filtre et lave le précipité avec de l'éthanol et le sèche à l'air. Rdt. = 3.12 g (80%). Le composé n'est pas suffisamment soluble dans l'eau pour en déterminer le pouvoir rotatoire. Valeurs  $R_f$ : solvant (a) 0.31; solvant (b) 0.45; solvant (c) 0.63. (Trouvé: C, 17.71; H, 2.91; Ba, 31.56. Calc. pour  $C_6H_8O_8PBa$ .  $H_2O$ : C, 17.51; H, 2.67; Ba, 33.33%.)

#### Acides 3-désoxy 5-phospho D-pentoniques (VIII)

(1) A partir de D-xylose 3,5-(hydrogène phosphate). Une solution de 10 g de sel de baryum de D-xylose 3,5-(hydrogène phosphate)<sup>13</sup> dans 40 ml d'eau est versée dans 400 ml de baryte 0.3N. Après deux jours de repos à la température ambiante, la solution est neutralisée par addition de résine Amberlite IR 120  $H^+$ , filtrée, portée à pH 8 par addition de baryte, concentrée sous vide à petit volume

<sup>21</sup> J. A. Cifonelli et F. Smith, *Analyt. Chem.* **206**, 1132 (1954).

<sup>22</sup> S. M. Partridge, *Nature, London* **164**, 443 (1949).

et additionnée de quelques volumes d'éthanol pour précipiter le mélange des sels de baryum des acides 3-désoxy 5-phospho *D-erythro*- et *D-threo*-pentoniques. Rdt. = 11.4 g. Un échantillon a été recristallisé dans de l'eau chaude pour l'analyse. (Trouvé: C, 13.79; H, 2.48; Ba, 46.05. Calc. pour  $C_8H_{10}O_8P\text{Ba}_{1.5}\cdot H_2O$ : C, 13.36; H, 2.22; Ba, 45.61%) Les sels de dicyclohexylammonium sont obtenus en faisant passer une solution des sels de baryum à travers une colonne de résine IR 120 dicyclohexylammonium. L'effluent est évaporé à sec et le résidu est recristallisé dans de l'éthanol, puis dans un mélange eau-acétone. F = 156–158° (déc). (Trouvé: C, 57.28; H, 9.71; N, 4.88. Calc. pour  $C_{41}H_{50}O_8N_2P\cdot 5H_2O$ : C, 57.01; H, 10.42; N, 4.86%) Valeurs  $R_f$ : solvant (b) 0.38; solvant (d) 0.54. Lactone (formé pendant la décationisation par IR 120  $H^+$  de l'échantillon préparé par la chromatographie), solvant (d) 0.62.

(2) *A partir de l'acide D-gluconique 4,6-(hydrogène phosphate)*. Une suspension de 2 g de sel de baryum de l'acide gluconique 4,6-(hydrogène phosphate) dans 10 ml d'eau est traitée par de la résine IR 120  $H^+$  pour séparer les ions baryum de la solution. Le mélange acide est filtré, la résine est bien lavée à l'eau, puis le filtrat est neutralisé avec une solution de bicarbonate de potassium. Le volume est porté à 30 ml et la solution est additionnée de 400 mg d'acétate de baryum et 200 mg de sulfate ferrique, portée à 40° puis traitée par 2.5 ml d'eau oxygénée à 30%. La température du mélange monte spontanément à 60° (il faut parfois chauffer légèrement le mélange pour amorcer la réaction décelable par un dégagement gazeux) puis après une heure baisse et atteint 20°; on la porte à nouveau à 60° et 2.5 ml d'eau oxygénée sont ajoutés. Le mélange est ensuite abandonné pour 3 h. De la résine IR 120  $H^+$  est ajoutée jusqu'à disparition des ions  $Fe^{3+}$  (réaction négative au sulfocyanure), filtrée et lavée à l'eau. L'excès d'eau oxygénée dans le filtrat est détruit en y faisant barboter de l'anhydride sulfureux. Le pH de la solution est porté à 6.8-7 par addition de baryte et le sulfate de baryum formé est séparé par filtration. La solution obtenue est concentrée sous vide à un volume de 10 à 15 ml, immédiatement versée dans 120 ml de baryte 0.3N et abandonnée pendant 3 jours à la température ambiante (solution jaune). De la résine IR 120  $H^+$  est ajoutée au mélange réactionnel hétérogène jusqu'à ce que tout le précipité formé soit dissous; le mélange est filtré et la résine est lavée à l'eau. Le pH de la solution est ramené à 8 par addition de baryte. La solution, concentrée à 5-6 ml, est traitée par plusieurs volumes d'éthanol pour précipiter un mélange de l'acide gluconique 4,6-(hydrogène phosphate) et des acides 3-désoxy 5-phosphopentoniques sous forme de sels de baryum. Rdt. = 1.89 g. Des chromatogrammes donnent l'image suivante:

	Rf	
	Solvant (b)	Solvant (d)
Acide gluconique 4,6-(hydrogène phosphate)	0.45	0.63
Acides 3-désoxy 5-phospho pentoniques	0.38	0.54
Lactones des acides 3-désoxy 5-phospho pentoniques		0.62

Une suspension des sels de baryum dans 10 ml d'eau est traitée par de la résine IR 120  $H^+$  jusqu'à disparition des ions baryum, puis filtrée et la résine est lavée. Le filtrat et les eaux de lavage sont ensuite neutralisés par addition d'ammoniaque concentrée et réduits, sous vide, à un volume de 20 ml; le pH de la solution est alors ajusté à 8.5 par addition d'ammoniaque. La solution est percolée à travers une colonne de résine DOWEX 2 × 10 (200–400 mesh) (2.0 × 24 cm) sous forme sulfate. La colonne est lavée par 200 ml d'eau, puis éluee par une solution d'acide sulfurique 0.02N à la vitesse de 30 ml par heure. Des fractions de 5 ml sont recueillies et leur teneur en phosphore dosée. L'acide gluconique 4,6-(hydrogène phosphate) est élué dans les fractions comprises entre 960 et 1200 ml; les acides pentoniques phosphorylés se trouvent dans les fractions comprises entre 1250 et 1600 ml. Les fractions comprises entre 1300 et 1600 ml sont réunies et neutralisées à pH 7 par addition de baryte. Après filtration, pour éliminer le sulfate de baryum, le filtrat est concentré sous vide et à froid à environ 3 ml. Le pH de cette solution est alors ajusté à 8. La solution bien agitée est additionnée, goutte à goutte, de 20 ml d'éthanol. Les sels de baryum des acides 3-désoxy 5-phospho pentoniques précipitent. Rdt. = 162 mg. Le produit a les mêmes caractéristiques que les acides 3-désoxy 5-phospho pentoniques, obtenus par la dégradation alcaline du *D*-xylose 3,5-(hydrogène phosphate). (Trouvé: C, 13.19; H, 1.85. Calc. pour  $C_8H_{10}O_8P\text{Ba}_{1.5}\cdot H_2O$ : C, 13.36; H, 2.22%) Les sels acides de baryum, obtenus par neutralisation d'une solution des acides par la baryte à pH 6.5 et précipitation par l'éthanol, donnent les taux suivants: (Trouvé: C, 16.32; H, 2.61; Ba, 34.82. Calc. pour  $C_8H_{10}O_8P\text{Ba}\cdot H_2O$ : C, 15.66; H, 2.87; Ba, 35.15%)  $R_f$ , solvant (b) 0.38; solvant (d) 0.54; lactone, solvant (d) 0.62.

*Acide 6-phospho D-isosaccharinique (X)*

Une solution d'1 g de sel de baryum de D-glucose 4,6-(hydrogène phosphate) dans 5 ml d'eau est traitée par 40 ml de baryte saturée, en atmosphère d'azote. Le mélange est laissé au repos pendant 5 jours à la température ambiante: un précipité jaune se forme. Le pH est ramené à 2-3 par addition de résine IR 120 H<sup>+</sup>: le précipité se dissout. On filtre et lave la résine à l'eau. Le filtrat et les eaux de lavage réunis sont portés à pH 9-10 par addition de baryte. Le mélange est chauffé au bain-marie pendant 1 h, puis laissé au repos pendant une nuit. Le pH est à nouveau ajusté à 8·5 par addition de baryte. La solution est traitée au noir animal, chauffée au bain-marie quelques minutes, filtrée et concentrée sous vide jusqu'à un volume de 20 ml. Le pH est à nouveau ajusté à 8·5 (si la solution se colore ou si un précipité se forme lors de l'ajustement du pH, il suffit d'ajouter du noir animal et de filtrer). La solution est concentrée à 10 ml environ. On ajoute lentement 40 ml d'éthanol et le produit est laissé au repos pendant une nuit. Les sels de baryum des acides 3-désoxy 2-C-(hydroxyméthyl) 5-phospho D-erythro- et D-threo-pentoniques (acide 6-phospho isosaccharinique) sont séparés par filtration et séchés à l'air. Rdt. = 835 mg. Valeurs R<sub>f</sub>: solvant b: 0·47; lactone: 0·61. (Trouvé: C, 15·38; H, 2·67; P, 6·40; Ba, 43·50. Calc. pour C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>9</sub>PBa<sub>1/2</sub>·H<sub>2</sub>O: C, 14·97; H, 2·49; P, 6·44; Ba, 42·76%.)

*Mise en évidence de la fonction carboxyle de l'acide 6-phospho D-isosaccharinique*

(1) *Anilide*. Une suspension aqueuse de 100 mg de sel de baryum de l'acide 6-phospho D-isosaccharinique est traitée par une quantité de résine IR 120 H<sup>+</sup> suffisante pour lier tous les ions baryum présents et filtrée, la résine est lavée à l'eau. Le filtrat et les eaux de lavage réunis sont concentrés sous vide et le sirop épais résiduel est séché sous vide, en présence de pentoxyde de phosphore. 0·3 ml d'aniline fraîchement distillée et quelques gouttes d'éthanol absolu sont ajoutés au produit légèrement jaune pour obtenir une solution homogène qui est chauffée sous reflux au bain-marie pendant 1 h. Les solvants sont chassés sous vide. Le résidu mis en solution dans un peu d'éthanol est additionné d'acétate d'éthyle: il se forme un gel qui cependant ne cristallise pas. La chromatographie sur papier dans le solvant (b), additionné de 40 mg de Rhodamine B/litre,<sup>33</sup> donne une seule tache fluorescente à la lumière ultraviolette, contenant du phosphore et réagissant avec le periodate-benzidine;<sup>31</sup> R<sub>f</sub>: 0·70.

(2) *Lactone*. Une suspension aqueuse de 50 mg de sel de baryum de l'acide 6-phospho isosaccharinique est traitée par une quantité de résine IR 120 H<sup>+</sup> suffisante pour lier tous les ions baryum présents. Le filtrat est concentré sous vide et déshydraté par chauffage à 100° sous vide en présence de pentoxyde de phosphore. La chromatographie du résidu dans le solvant acétique:éthanol: eau = 2:78:20 donne une seule tache, R<sub>f</sub> 0·40, qui contient du phosphore et réagit avec l'hydroxylamine-chlorure de fer.<sup>34</sup>

*Titrage periodique de l'acide 6-phospho D-isosaccharinique*

Dans une fiole jaugée de 25 ml on met successivement 0·1 mM de sel de baryum de l'acide 6-phospho D-isosaccharinique monohydrate, 10 ml d'eau, 0·15 mM de sulfate de sodium dissous dans 2 ml d'eau, 2·5 ml d'un tampon acétate de sodium-acide acétique 1N de pH 3·5, 0·6 mM de métaperiodate de sodium dissous dans 5 ml d'eau puis on complète le volume avec de l'eau. Des échantillons de 1 ml sont prélevés à des intervalles appropriés et le periodate inchangé est dosé par de l'arsénite de sodium.<sup>35</sup> On obtient les résultats suivants:

Temps en heures	0·33	0·66	3·5	18·5	23·5	48·5
Moles de NaIO <sub>4</sub> réduites par mole de substrat	0·39	1·03	1·12	1·68	1·76	1·83

*Mise en évidence et dosage de l'acide 3-désoxy 5-phospho D-glycero-pentulosonique formé par l'action d'un équivalent molaire de periodate de sodium sur l'acide 6-phospho D-isosaccharinique*

Une suspension de 50 mg de sel de baryum de l'acide 6-phospho isosaccharinique est additionnée de résine IR 120 H<sup>+</sup> pour lier les ions baryum et décantée quantitativement dans une fiole

<sup>33</sup> J. W. Green, *J. Amer. Chem. Soc.* **76**, 5791 (1954); **78**, 1894 (1956).

<sup>34</sup> M. Abdel-Akher et F. Smith, *J. Amer. Chem. Soc.* **73**, 5859 (1951).

<sup>35</sup> P. F. Fleury et J. Lange, *J. Pharm. Chim.* [8], **17**, 107 (1933).



jaugée de 50 ml. Le pH de la solution est ajusté à 5 par addition de soude diluée. 22.3 mg de méta-periodate de sodium en solution dans un peu d'eau sont ajoutés et le volume est complété avec de l'eau. Après 16 h de repos, la teneur en  $\alpha$ -céto-acide est déterminée suivant la méthode de MacGee et Doudoroff.<sup>17</sup> A cet effet, 1 ml de la solution est dilué jusqu'à une concentration en acide phosphorylé de 0.5  $\mu$ M/ml et 1 ml de la solution diluée est utilisé pour le dosage. Une solution contenant la même concentration d'iodate de sodium sert de témoin. On trouve une absorption de 0.85 ce qui indique que 80% de l'acide 6-phospho isosaccharinique ont été transformés en  $\alpha$ -céto-acide. La chromatographie sur papier donne une seule tache contenant du phosphore qui donne une fluorescence verte à la lumière ultraviolette avec l'o-phénylènediamine.<sup>18</sup>  $R_f$ : solvant (a) 0.12; dans un solvant méthanol:ammoniaque conc.:eau = 6:1:3 le  $R_f$  est 0.76.