

wurde nach *Van Slyke & Folch*¹⁾ nass verbrannt und das gebildete Kohlendioxyd ebenfalls als Bariumcarbonat gefällt. Aktivitätsbestimmungen wurden mit Hilfe eines Gasstromzählers (Tracerlab) ausgeführt. Die Fehlergrenze der in Tabelle I angegebenen Werte liegt bei $\pm 5\%$.

Tabelle I.

¹⁴C-Gehalt (spezifische Aktivität) von C-Atom 7 in biosynthetischem Cholesterin.

Radioaktive Vorstufe	CH ₃ ¹⁴ COOH		¹⁴ CH ₃ COOH	
	gef.	Theorie ²⁾	gef.	Theorie ²⁾
Cholesterin	37,0	—	32,5	—
C-Atom 7	a) 1,5; b) < 1	0	a) 43,0; b) 46,0	58,5

SUMMARY.

Carbon atom 7 in biosynthetic cholesterol is shown to be derived from a methyl carbon of acetic acid. This result is discussed in relation to current hypotheses regarding the biological conversion of squalene to cholesterol.

Organisch-chemisches Laboratorium
der Eidg. Technischen Hochschule, Zürich.

200. Synthèses d'esters phosphoriques d'intérêt biologique III³⁾.

Synthèse des acides α -D-mannose-1-phosphorique, D-mannose-6-phosphorique et α -D-mannose-1,6-diphosphorique. Action de la phosphoglucomutase

par Th. Posternak et J. P. Rosselet.

(27 VIII 53)

Certains acides α -aldose-1-phosphoriques présentent, comme on sait, un intérêt biochimique considérable.

C'est par l'intermédiaire de l'acide α -glucose-1-phosphorique que s'effectuent la dégradation et la synthèse enzymatiques de l'amidon et du glycogène. L'acide α -galactose-1-phosphorique intervient dans la transformation biologique réversible du galactose en glucose. L'acide α -glucose-1,6-diphosphorique agit comme coferment de la phosphoglucomutase.

La synthèse d'acides α -aldose-1-phosphoriques peut s'effectuer par deux méthodes.

¹⁾ D. D. Van Slyke & J. Folch, J. Biol. Chem. **136**, 509 (1940).

²⁾ Berechnet auf Grund der Annahme, dass von den 27 C-Atomen des Cholesterins 15 von Methyl- und 12 von Carboxyl-C-Atomen der Essigsäure stammen (*H. N. Little & K. Bloch*, J. Biol. Chem. **183**, 33 (1950)).

³⁾ Communication I: *Th. Posternak*, J. Biol. Chem. **180**, 1269 (1949); communication II: *Th. Posternak*, Am. Soc. **72**, 4824 (1950).

1. D'après *Cori, Colowick & Cori*¹⁾, un α -acétobromoaldose est traité par le phosphate triargentique. Le produit de condensation qui consiste, semble-t-il, essentiellement en un triester est ensuite soumis à une hydrolyse acide partielle (ce qui a pour effet d'éliminer deux restes d'aldose) et enfin désacétylé. Les rendements sont très médiocres, car cette méthode comporte la perte des deux tiers de l'aldose de départ.

2. Un α -acétobromoaldose est condensé avec le diphénylphosphate d'argent. Les restes phényle sont ensuite éliminés par hydrogénation catalytique et les restes acétyle par traitement au moyen des alcalis. Il se forme ainsi un ester aldose-1-phosphorique qui est en quantité prépondérante sous forme α . Cette méthode qui fournit des rendements bien supérieurs à la précédente a permis la préparation des dérivés suivants du glucose et du galactose: acides α -D-glucose-1-phosphorique²⁾, α -D-galactose-1-phosphorique²⁾, α -D-glucose-1,6-diphosphorique³⁾ et α -lactose-1-phosphorique⁴⁾. Il est intéressant de constater que la condensation des mêmes α -acétobromo-aldoses avec le dibenzylphosphate d'argent⁵⁾ ou avec le mélange désigné sous le nom de «phosphate monoargentique»⁶⁾ s'accompagne par contre d'une inversion de *Walden* et conduit ainsi à la formation de dérivés d'esters β -aldose-1-phosphoriques.

Dans le présent travail, nous avons cherché à préparer des esters α -1-phosphoriques dérivant du mannose.

Nous sommes partis de l' α -acétochloromannose (I)⁷⁾. Sa condensation avec le diphénylphosphate d'argent⁸⁾ suivie d'hydrogénolyse et de désacétylation conduit essentiellement à un acide mannose-1-phosphorique dextrogyre transformable, comme nous le verrons, par la phosphoglucomutase et qui ne peut représenter que la forme α (IV)⁹⁾.

Nous avons cherché en outre à préparer l'isomère β (V) par condensation de l'acétochloromannose avec le dibenzylphosphate d'argent suivi d'hydrogénolyse et de désacétylation ou encore par condensation avec le «phosphate monoargentique»¹⁰⁾ suivie de désacétylation. Comme nous l'avons constaté, c'est de nouveau l'isomère α qui se forme es-

1) J. Biol. Chem. **121**, 465 (1937).

2) *Th. Posternak*, Am. Soc. **72**, 4824 (1950).

3) *Th. Posternak*, J. Biol. Chem. **180**, 1269 (1949).

4) *Reithel*, Am. Soc. **74**, 4211 (1952).

5) *Wolfrom, Smith, Pletcher & Brown*, Am. Soc. **64**, 23 (1942).

6) *Reithel*, Am. Soc. **67**, 1056 (1945); **74**, 4211 (1952).

7) Cette substance cristallise beaucoup plus facilement que le dérivé bromé correspondant.

8) Le produit de condensation II n'a pas été isolé.

9) Ce composé avait déjà été préparé par la méthode au phosphate triargentique par *Colowick*, J. Biol. Chem. **124**, 557 (1938).

10) Nous opérons cette dernière condensation dans des conditions différentes de celles indiquées par *Reithel* (loc. cit.). Elles seront décrites en détail dans un mémoire ultérieur.

sentiellement, contrairement aux observations faites dans la série du glucose et du galactose. Le mannose diffère de ces deux sucres par la configuration du carbone 2 qui semble ainsi exercer une influence prépondérante sur la marche stérique de ces condensations. Dans le même ordre d'idées, rappelons que le mannose et d'autres aldoses stériquement apparentés donnent lieu parfois à la formation de petites quantités de glucosides α lors de la réaction de *Königs & Knorr*¹).

La préparation de l'acide α -D-mannose-1,6-diphosphorique (X) a été effectuée par une suite de réactions utilisée déjà lors de la synthèse de l'acide α -glucose-1,6-diphosphorique. Le tétracétyl-1,2,3,4- β -D-mannose (VI)²) a fourni par traitement au moyen du chlorophosphate de phényle, dans la pyridine, du tétracétyl-1,2,3,4-diphénylphosphoryl-6- β -D-mannose (VII). Ce dernier a été transformé sous l'action du tétrachlorure de titane, d'après la méthode de *Pacsu*³), en chlorure de triacétyl-2,3,4-diphénylphosphoryl-6- α -mannosyle (VIII). Les composés VII et VIII ont été obtenus à l'état cristallisé. Par condensation de VIII avec le diphénylphosphate d'argent⁴), suivie d'hydrogénolyse et de désacétylation, nous avons obtenu un acide mannose-1,6-diphosphorique dextrogyre qui a été purifié par l'intermédiaire de son sel de brucine cristallisé. Par analogie avec les observations antérieures relatives aux condensations avec le diphénylphosphate d'argent, nous devons lui attribuer la forme α (X). Il nous a été impossible de déceler la formation, comme produit accessoire, de l'isomère β ⁵).

Le composé VII soumis à l'hydrogénolyse puis à une désacétylation au moyen de l'acide bromhydrique nous a fourni de l'acide mannose-6-phosphorique (IX)⁶) qui a été purifié par l'intermédiaire du sel cristallin de phénylhydrazine de sa phénylhydrazone. Il est identique au produit intermédiaire de la fermentation alcoolique isolé par *Robison*⁷). A notre connaissance la preuve définitive par synthèse chimique de la constitution de ce composé n'avait pas encore été apportée.

Le tableau I indique les constantes d'hydrolyse dans H_2SO_4 0,95-n., à 30°, des restes 1-phosphoryle acidolabiles présents dans les acides α -D-glucose-1-phosphorique, α -D-mannose-1-phosphorique (IV) et α -D-mannose-1,6-diphosphorique (X). On voit que l'ester α -1-phosphorique du glucose s'hydrolyse un peu plus facilement que celui du mannose.

¹) Cf. *Howard*, Soc. **1950**, 1045.

²) *Reynold & Evans*, Am. Soc. **62**, 66 (1940).

³) B. **61**, 1508 (1928).

⁴) Le produit de condensation XI n'a pas été isolé.

⁵) Dans la série du glucose la même réaction fournit par contre à côté de la forme α , une petite quantité de forme β (*Th. Posternak*, J. Biol. Chem. **180**, 1269 (1949)).

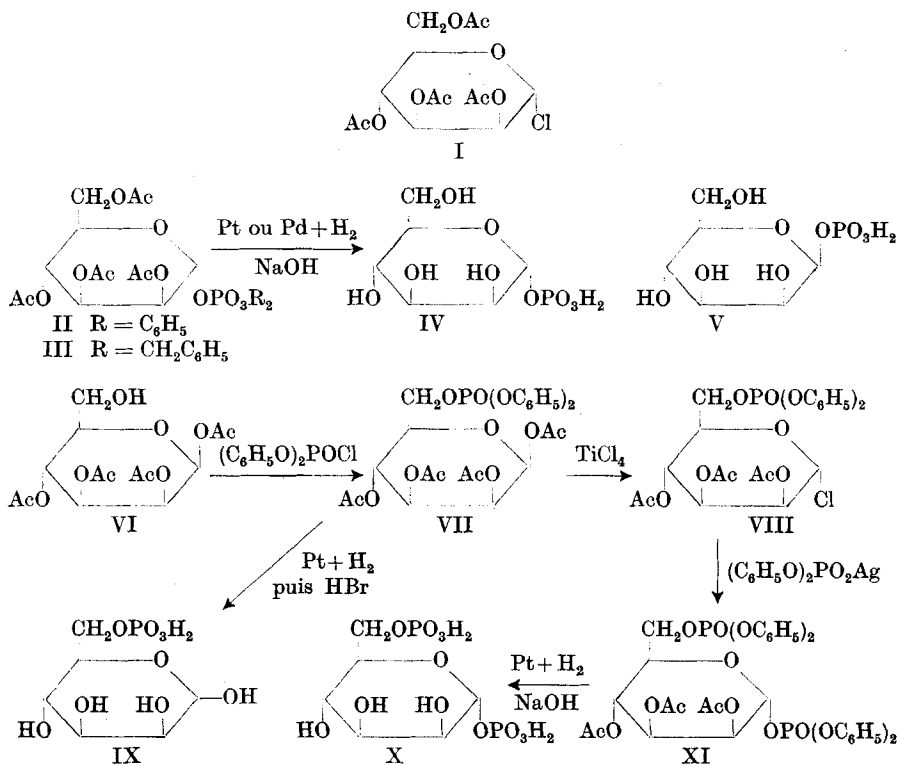
⁶) Cf. la synthèse de l'acide glucose-6-phosphorique de *Lardy & Fischer*, J. Biol. Chem. **164**, 513 (1946).

⁷) *Robison*, Biochem. J. **26**, 2191 (1932); *Jephcott & Robison*, Biochem. J. **28**, 1844 (1934).

Tableau I.

Constantes de vitesses d'hydrolyse K, dans H₂SO₄ 0,95-n. à 30°, en sol. ~ 2 · 10⁻⁴-m.
 K = (2,3/t) log₁₀ (A/A - x).

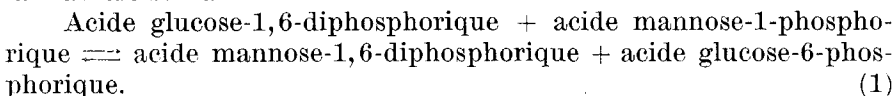
Temps en minutes	Acide α-glucose-1-phosphorique		Acide α-mannose-1-phosphorique		Acide α-mannose-1,6-diphosphorique	
	P hydrolysé en %	K × 10 ³	P hydrolysé en %	K × 10 ³	P hydrolysé en %	K × 10 ³
60	14,6	2,62	10,1	1,77	—	—
120	27,2	2,65	21,0	1,96	—	—
180	40,3	2,60	29,9	1,97	—	—
270	52,7	2,78	40,7	1,93	12,1	0,476
390	63,7	2,60	52,1	1,89	—	—
575	—	—	—	—	24,3	0,483
810	—	—	—	—	32,2	0,478
1380	—	—	—	—	48,1	0,474
Moyennes:		2,65		1,90		0,478



D'autre part la constante d'hydrolyse du diphosphate du mannose est 4,0 fois plus petite que celle du monophosphate. Nous avons constaté que, dans des conditions analogues, la constante d'hydrolyse de l'acide

α -D-glucose-1,6-diphosphorique est 4,30 fois plus petite que celle de l'acide α -glucose-1-phosphorique¹).

On sait que, sous l'action de la phosphoglucomutase, l'acide α -glucose-1-phosphorique est converti d'une manière réversible en acide glucose-6-phosphorique. Cette réaction nécessite un coferment, l'acide α -glucose-1,6-diphosphorique, dont le mode d'action a pu être précisé²). *Leloir*³) a indiqué très succinctement que, d'une manière analogue, l'acide mannose-1-phosphorique est transformé en acide mannose-6-phosphorique en présence de phosphoglucomutase et de quantités catalytiques d'acide glucose-1,6-diphosphorique. Cette réaction serait 40 fois plus lente qu'avec l'acide glucose-1-phosphorique. On pouvait penser que le coferment nécessaire devrait être ici l'acide mannose-1,6-diphosphorique. *Leloir* suppose qu'il prend naissance de la manière suivante:



Nous avons constaté que des préparations de phosphoglucomutase de muscle de lapin ou de levure agissent effectivement sur l'acide mannose-1-phosphorique. Comme coferment, on peut utiliser soit l'acide glucose-1,6-diphosphorique, soit l'acide mannose-1,6-diphosphorique (fig. 1). Les vitesses de réaction relatives que nous trouvons sont par

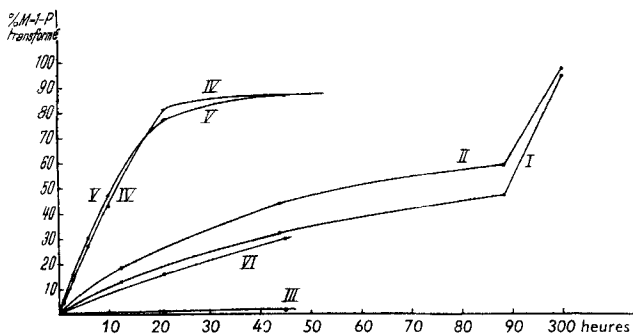


Fig. 1.

Action des phosphoglucomutases sur l'acide mannose-1-phosphorique (M-1-P).

- Courbes: I. Ferment de la levure en présence d'ac. glucose-1,6-diphosphorique $3,5 \cdot 10^{-5}$ -m.
 II. Ferment de la levure en présence d'ac. mannose-1,6-diphosphorique $3,5 \cdot 10^{-5}$ -m.
 III. Ferment de la levure en l'absence de coferment.
 IV. Ferment du muscle en présence d'ac. glucose-1,6-diphosphorique $4,3 \cdot 10^{-6}$ -m.
 V. Ferment du muscle en présence d'ac. mannose-1,6-diphosphorique $4,3 \cdot 10^{-6}$ -m.
 VI. Ferment du muscle en l'absence de coferment.

Concentrations des autres composants du mélange: acide mannose-1-phosphorique $4,9 \cdot 10^{-3}$ -m.; $MgSO_4$ $1,5 \cdot 10^{-3}$ -m.; hydroxyquinoléine $2,4 \cdot 10^{-3}$ -m. Température 30° ; pH=7,5.

¹) *Th. Posternak*, *J. Biol. Chem.* **180**, 1272 (1949).

²) *Leloir, Trucco, Cardini, Paladini & Caputto*, *Arch. Biochem.* **19**, 339 (1948); *Sutherland, Cohn, Posternak & Cori*, *J. Biol. Chem.* **180**, 1285 (1949).

³) *Phosphorus Metabolism*, The John Hopkins Press, Baltimore, **1**, 75 (1951).

contre beaucoup plus faibles que celle qu'indique *Leloir*. Dans nos conditions opératoires, en présence d'acide glucose-1,6-diphosphorique les ferments du muscle et de la levure transforment l'acide mannose-1-phosphorique resp. 200 et 7000 fois plus lentement que l'acide glucose-1-phosphorique. En présence d'acide mannose-1,6-diphosphorique leur action sur l'acide mannose-1-phosphorique est resp. 200 et 5000 fois plus lente que sur l'acide glucose-1-phosphorique en présence d'acide glucose-1,6-diphosphorique.

L'acide mannose-1,6-diphosphorique peut d'autre part remplacer l'acide glucose-1,6-diphosphorique comme coferment des deux phosphoglucomutases dans leur action sur l'acide glucose-1-phosphorique (fig. 2 et 3). Les deux substances produisent à concentrations égales des activations du ferment du muscle qui ne sont pas très différentes (fig. 3). Le ferment de la levure (fig. 2) est activé par contre 2,5 fois plus fortement par l'acide glucose-1,6-diphosphorique que par l'acide

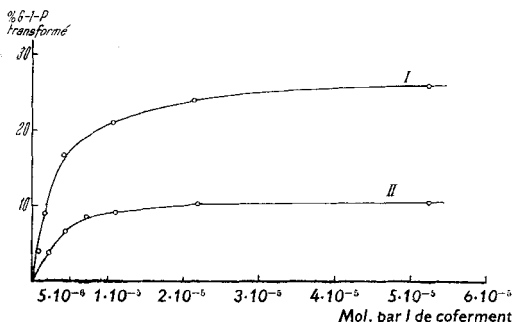


Fig. 2.

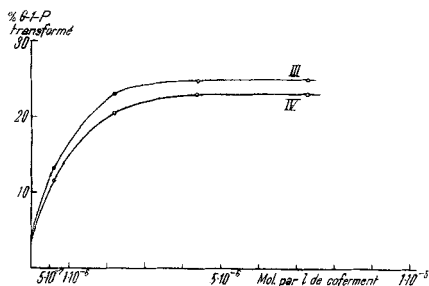


Fig. 3.

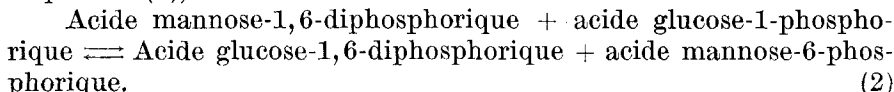
Transformation de l'acide glucose-1-phosphorique (G-1-P) en présence de quantités variables de coferment introduit.

- Courbes: I. Ferment de la levure en présence d'acide glucose-1,6-diphosphorique.
 II. Ferment de la levure en présence d'acide mannose-1,6-diphosphorique.
 III. Ferment du muscle en présence d'acide glucose-1,6-diphosphorique.
 IV. Ferment du muscle en présence d'acide mannose-1,6-diphosphorique.

Concentrations des autres composants du mélange: ac. glucose-1-phosphorique $5 \cdot 10^{-3}$ -m.; cystéine $2,5 \cdot 10^{-2}$ -m.; MgSO_4 $1,5 \cdot 10^{-3}$ -m. Température 30° ; pH = 7,5. Durée d'incubation 5 min.

mannose-1,6-diphosphorique¹). Les concentrations des deux cofermements nécessaires pour la demi-activation sont environ $5 \cdot 10^{-7}$ -m. pour le ferment du muscle²) et $3 \cdot 10^{-6}$ -m. pour celui de la levure. L'activation maximum du ferment du muscle nécessite une concentration environ $4 \cdot 10^{-6}$ -m. en cofermement, celle du ferment de la levure une concentration environ $4 \cdot 10^{-5}$ -m.

Il résulte de ce qui précède qu'il faut admettre, par analogie avec l'équation (1), une réaction:



Dans nos conditions expérimentales, en présence du ferment du muscle, les équilibres favorisent considérablement les membres de droite des équations (1) et (2).

*Klenow & Larsen*³) ont montré récemment que l'acide glucose-1,6-diphosphorique active également la transformation, par la phosphoglucomutase, de l'acide ribose-1-phosphorique en acide ribose-5-phosphorique. Il est très probable que, par une réaction analogue à celle exprimée par les équations (1) et (2), il se forme comme cofermement de l'acide ribose-1,5-diphosphorique.

Partie expérimentale.

Méthodes analytiques.

Les dosages de phosphore ont été effectués d'après *Fiske & Subbarow*⁴). Nous entendons par phosphore labile les restes phosphoryles hydrolysables par 5 min. de chauffe au bain-marie bouillant dans H_2SO_4 -n. Les sucres réducteurs ont été dosés par la méthode de *Nelson*⁵) en employant le «réactif 60» de *Shaffer & Somogyi*⁶).

Acide α -D-mannose-1-phosphorique (IV).

a) *Par condensation avec le diphénylphosphate d'argent*. 0,534 g d' α -acétochloromanose⁷) (I) sont dissous dans 2 cm³ de benzène desséché sur du sodium. On chauffe 30 min. à l'ébullition à reflux avec 0,53 g (1 mol.) de diphénylphosphate d'argent desséché et finement pulvérisé. On ajoute encore à deux reprises 0,25 g de sel d'argent en chauffant 20 min. à reflux après chaque addition puis on centrifuge et lave les sels d'argent à fond au benzène sec. Les solutions benzéniques réunies sont filtrées et évaporées à sec sous pression réduite. On élimine les dernières traces de benzène dans le vide poussé. Le sirop résiduel est dissous dans 8 cm³ d'alcool absolu. On hydrogène en présence de 142 mg d'oxyde de platine. La vitesse d'hydrogénation ayant tendance à diminuer avant la fin de la réaction, il est nécessaire de réactiver à 2 reprises le catalyseur par 7 min. d'agitation en présence d'air. La quantité théorique (8 mol.) est consommée en 5 h. On ajoute 1 cm³ NaOH 10-n., chauffe une min. à l'ébullition, ajoute après refroidissement 10 cm³ d'eau et neutralise à l'acide acétique. On chasse l'alcool par distillation dans le vide et introduit

¹) Il faut noter que le ferment de la levure est beaucoup moins purifié que celui du muscle.

²) Cf. *Sutherland, Cohn, Posternak & Cori*, J. Biol. Chem. **180**, 1272 (1949).

³) Arch. Biochem. **37**, 488 (1952).

⁴) J. Biol. Chem. **66**, 375 (1925).

⁵) J. Biol. Chem. **153**, 375 (1944).

⁶) J. Biol. Chem. **100**, 695 (1933).

⁷) *Pacsu*, B. **61**, 1508 (1928).

une solution concentrée de 500 mg d'acétate de baryum. Le précipité qui consiste essentiellement en phosphate de baryum est éloigné par centrifugation. Par addition de 3 vol. d'alcool absolu, on précipite le mannose-1-phosphate de baryum qu'on lave à l'alcool et à l'éther. Obtenu 540 mg séchés dans le vide sulfurique contenant 6,54% de phosphore total et 6,41% de phosphore acidolabile. Le produit a été purifié par l'intermédiaire du sel de brucine. 0,460 g du sel de baryum sont dissous dans 3 cm³ d'eau et traités à chaud par 0,965 g de sulfate de brucine. Le sulfate de baryum est éliminé par centrifugation de la suspension chaude et la solution est évaporée à sec dans le vide. Le résidu cristallin est recristallisé d'abord dans 1 cm³ d'eau chaude puis par dissolution dans 2 cm³ d'eau suivie d'addition graduelle de 5 cm³ d'acétone. Aiguilles (0,75 g) F. 179—182° (déc. 190°).

$C_6H_{13}O_9P(C_{23}H_{26}N_2O_4)_2 \cdot 6 H_2O$ Calculé H_2O 9,5% Trouvé H_2O 9,9%

$C_6H_{13}O_9P(C_{23}H_{26}N_2O_4)_2$ Calculé N 5,34 P 2,96% Trouvé N 5,28 P 2,93%

Le sel de brucine (0,70 g) suspendu dans 3 cm³ d'eau est additionné de KOH à 10% jusqu'à réaction rose permanente à la phénolphtaléine. On élimine la brucine par extraction répétée au chloroforme. Le mannose-1-phosphate de baryum a été ensuite précipité par addition, d'abord d'acétate de baryum en excès, puis de 3 vol. d'alcool. Le sel est essoré et lavé à l'alcool et à l'éther; après dessiccation dans le vide sulfurique: 240 mg. $[\alpha]_D^{23} = +33,7^\circ \pm 0,6^\circ$ ($c = 3,01$ dans l'eau calculé comme sel de baryum anhydre $C_6H_{11}O_9PBa$). *Colowick*¹⁾ indique $[\alpha]_D = +36^\circ$. Pour l'analyse, le produit a été desséché dans le vide à 110° sur P_2O_5 .

$C_6H_{11}O_9PBa, 2 H_2O$ Calculé C 16,70 H 3,53 P total 7,18 P labile 7,18 mannose²⁾ 41,7%
Trouvé ,, 16,61 ,, 3,47 ,, ,, 7,04 ,, ,, 7,02 ,, 43,0%

Le produit est non réducteur; il le devient après hydrolyse acide. Son sel de brucine a été fractionné par addition graduelle d'acétone à sa solution aqueuse. Les sels de baryum obtenus à partir des diverses fractions ont tous donné le même $[\alpha]_D$.

b) *Par condensation avec le dibenzylphosphate d'argent*. 440 mg d'acétochloromannose sont condensés avec du dibenzylphosphate d'argent dans les conditions décrites plus haut pour la réaction avec le diphenylphosphate d'argent. Le produit de condensation est ensuite traité de la manière indiquée à cette différence près que l'hydrogénation catalytique est effectuée en présence d'oxyde de palladium (150 mg). Consommé en 30 min. 2,0 mol. H_2 . Le produit est isolé comme précédemment sous forme de sel de baryum et purifié par l'intermédiaire de son sel de brucine. Obtenu: 300 mg de sel de baryum. $[\alpha]_D^{20} = +32,3^\circ \pm 0,6^\circ$ ($c = 3,19$ dans l'eau calculé comme sel de baryum anhydre $C_6H_{11}O_9PBa$). Pour l'analyse le produit a été desséché dans le vide, à 110°, sur P_2O_5 .

$C_6H_{11}O_9PBa, 2 H_2O$ Calculé P total 7,18 P labile 7,18%

Trouvé ,, ,, 7,28 ,, ,, 7,30%

Tétra-acétyl-1,2,3,4-diphénylphosphoryl-6-β-D-mannose (VII). 1,18 g de tétra-acétyl-1,2,3,4-β-D-mannose³⁾ (VI) sont dissous dans 3,8 cm³ de pyridine anhydre. On refroidit dans la glace et laisse couler goutte à goutte, en l'espace de 15 min., 0,80 cm³ de chlorure de diphenylphosphoryle. On abandonne durant 18 h. à 10° et verse ensuite en agitant dans 100 cm³ d'eau glacée. Le produit résineux est essoré et dissous dans du chloroforme. La solution est lavée à l'acide chlorhydrique normal puis à l'eau et séchée sur du sulfate de sodium anhydre. Le sirop restant après distillation du chloroforme dans le vide est repris par un peu d'éther acétique. Après addition d'éther de pétrole jusqu'à début de trouble et séjour à la glacière, le produit se sépare en cristaux (1,7 g) fondant à 113—115°. $[\alpha]_D^{20} = -9,0^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 1,00$ dans le chloroforme).

$C_{26}H_{26}O_{13}P$ Calculé C 53,79 H 5,04 P 5,34%

Trouvé ,, 54,33 ,, 5,28 ,, 5,36%

¹⁾ J. Biol. Chem. **124**, 557 (1938).

²⁾ Dosage effectué après 5 min. de traitement à 100° par H_2SO_4 n. en employant du mannose pur comme substance de référence.

³⁾ *Reynold & Evans*, Am. Soc. **62**, 66 (1940).

Chlorure de triacétyl-2,3,4-diphénylphosphoryl-6-mannosyle- α (VIII). 0,580 g du produit précédent sont dissous dans 4,4 cm³ de chloroforme sec (le dissolvant avait été desséché et distillé sur P₂O₅). On introduit 0,25 cm³ (2,2 mol.) de tétrachlorure de titane et chauffe 4½ h. à l'ébullition à reflux, à l'abri de l'humidité de l'air. La solution brun foncé est lavée trois fois à l'eau glacée et séchée 1 h. sur du chlorure de calcium fondu. On évapore dans le vide. Le résidu repris par 0,5 cm³ de chloroforme cristallise par addition d'éther de pétrole. On le recristallise par dissolution dans un peu d'éther acétique suivie d'addition graduelle de 10 vol. d'éther de pétrole. 335 mg de F. 84—86°.

C₂₄H₂₆O₁₁PCl Calculé Cl 6,37 P 5,57% Trouvé Cl 6,68 P 5,66%

Acide α -D-mannose-1,6-diphosphorique (X). 300 mg du composé précédent sont dissous dans 1,5 cm³ de benzène sec. On chauffe 15 min. à l'ébullition à reflux avec 200 mg (1 mol.) de diphénylphosphate d'argent desséché et finement pulvérisé. On ajoute encore à 2 reprises 100 mg de diphénylphosphate d'argent et chauffe 20 min. à reflux après chaque addition. Après centrifugation et lavage au benzène des sels d'argent, les solutions benzéniques sont évaporées dans le vide. On reprend par 4 cm³ d'alcool absolu, filtre et hydrogène en présence de 76 mg d'oxyde de platine. Au bout de 3 h. on interrompt l'hydrogénation et introduit encore 50 mg de catalyseur. Consommé en 4 h. 16,7 mol. H₂; théorie 16,0 mol. H₂. Après addition de 0,5 cm³ NaOH 10-n. on laisse 12 h. à température ordinaire, puis on reprend par l'eau et neutralise à l'acide acétique. La solution contient 34 mg P dont 19% à l'état minéral. Elle est concentrée dans le vide à 5 cm³; on précipite les phosphates minéraux par un excès de mixture magnésienne préparée au moyen de chlorure de magnésium. Le pH est ajusté à 8,0 au moyen d'acide acétique. On introduit une solution aqueuse concentrée de 400 mg d'acétate de baryum et chauffe à ébullition pour compléter la précipitation du sel de baryum qui est moins soluble à chaud qu'à froid. On centrifuge à chaud et lave à l'eau bouillante puis à l'alcool et à l'éther. Obtenu 153 mg. Le centrifugat est additionné de 2,5 vol. d'alcool ce qui amène la précipitation d'une quantité additionnelle de sel de baryum qui est lavée à l'eau bouillante et jointe à la première fraction. Obtenu en tout 190 mg. La substance est convertie en sel de brucine de la manière indiquée pour l'acide mannose-1-phosphorique. Le produit brut est recristallisé dans 3,5 cm³ d'eau chaude. Pour l'analyse on le sèche à 110° dans le vide sur P₂O₅.

C₆H₁₄O₁₂P₂(C₂₃H₂₆O₄N₂)₄ Calculé N 5,84 P 3,23% Trouvé N 5,80 P 2,97%

Le sel de brucine a été transformé en sel de potassium de la manière indiquée pour l'acide mannose-1-phosphorique. Par addition d'acétate de baryum et d'un vol. d'alcool à la solution de sel de potassium on précipite le sel de baryum de l'acide mannose-diphosphorique. Le produit est non réducteur, mais le devient après hydrolyse acide. Pour l'analyse, on le dessèche à 110° dans le vide sur P₂O₅.

C₆H₁₀O₁₂P₂Ba₂, 4 H₂O Calculé C 10,55 H 2,70 P total 9,08 P labile 4,54 M-6-P¹⁾ 38,1%
 Trouvé „ 10,48 „ 2,53 „ „ 8,90 „ „ 4,50 „ 39,4%

Polarimétrie de la solution du sel neutre de potassium: $[\alpha]_D^{21} = +29,9° \pm 1,3°$
 (c = 1,48 calculé comme acide libre C₆H₁₄O₁₂P₂).

Acide mannose-6-phosphorique (IX). 500 mg de tétracétyl-1,2,3,4-diphénylphosphoryl-6- β -D-mannose (VII) dissous dans 5 cm³ d'alcool méthylique absolu sont hydrogénés en présence de 100 mg d'oxyde de platine. Consommé en 4 h. 8 mol. H₂. Après filtration du platine et évaporation à sec dans le vide on reprend par 5 cm³ d'acide bromhydrique 0,7-n. et chauffe 3 h. au bain-marie bouillant, ce qui a pour effet de désacétyler la substance. On neutralise ensuite à la phénolphtaléine par de l'hydroxyde de baryum solide. La solution filtrée est précipitée par addition de 3 vol. d'alcool. Le sel de baryum (312 mg) est redissous dans 1 cm³ d'eau. On précipite les ions Ba⁺⁺ par la quantité strictement nécessaire de H₂SO₄ n. Le filtrat du sulfate de baryum (4 cm³) est additionné d'un

¹⁾ M-6-P = acide mannose-6-phosphorique formé par 5 min. de traitement à 100° en présence de H₂SO₄ n. Comme substance de référence pour le dosage, on a employé de l'acide mannose-6-phosphorique pur.

mélange de 0,35 cm³ de phénylhydrazine fraîchement distillée et de 0,70 cm³ d'acide acétique à 50%. On laisse 6 h. à 4°. Le sel de phénylhydrazine de la phénylhydrazone est essoré et lavé à l'eau glacée. Obtenu 258 mg (65% du rendement théorique). Pour l'analyse, le produit a été recristallisé dans un mélange de 2 vol. d'alcool et 1 vol. d'eau. F. 144—145°; *Robison*¹⁾ indique F. 144—145°.

C₁₈H₂₇O₈N₄P Calculé N 12,22 P 6,77% Trouvé N 12,00 P 6,80%

Le composé a été transformé en acide mannose-6-phosphorique libre par traitement au moyen du benzaldéhyde à froid d'après les indications de *Robison*. Après neutralisation au moyen d'hydroxyde de baryum, on précipite le sel par addition d'alcool. $[\alpha]_D^{22} = +13,3^\circ \pm 1,3^\circ$ (c = 1,66, acide libre C₆H₁₃O₆P, dans HCl 0,1-n.). *Robison* indique $[\alpha]_{5461} = +17,0^\circ$. Pour l'analyse le produit a été séché à 110° dans le vide sur P₂O₅.

C₆H₁₁O₆PBa Calculé P 7,84% Trouvé P 7,62%

Essais enzymatiques.

La phosphoglucomutase de la levure a été préparée d'après *Sutherland*²⁾; celle du muscle de lapin d'après *Najjar*³⁾. La transformation des acides aldose-1-phosphoriques en acides aldose-6-phosphoriques, qui caractérise l'action du ferment, a été mesurée, comme d'habitude, par la diminution du phosphore acidolabile.

RÉSUMÉ.

L'acide α -D-mannose-1-phosphorique a été préparé par condensation de l'acétochloromannose avec le diphenylphosphate d'argent, suivie d'hydrogénolyse et de désacétylation. Par la même méthode on a obtenu l'acide α -D-mannose-1,6-diphosphorique à partir du chlorure de triacétyl-2,3,4-diphénylphosphoryl-6-mannosyle α .

Contrairement à ce qui a été observé dans la série du glucose et du galactose, la condensation du dibenzylphosphate d'argent ou du «phosphate monoargentique» avec l'acétochloromannose ne s'accompagne pas d'une inversion de *Walden* et permet également la préparation de l'acide α -mannose-1-phosphorique.

Le tétracétyl-1,2,3,4-diphénylphosphoryl-6- β -D-mannose fournit par hydrogénolyse suivie de désacétylation l'acide D-mannose-6-phosphorique.

L'acide α -mannose-1,6-diphosphorique peut remplacer l'acide α -glucose-1,6-diphosphorique comme coferment des phosphoglucomutases du muscle et de la levure dans leur action aussi bien sur l'acide glucose-1-phosphorique que sur l'acide mannose-1-phosphorique.

Bâle, Institut de Pharmacie de l'Université.

¹⁾ Biochem. J. **26**, 2191 (1933).

²⁾ J. Biol. Chem. **180**, 1279 (1949).

³⁾ J. Biol. Chem. **175**, 281 (1948).