

zoylderivat vom Smp. 99°; Mischprobe mit Benzoyl-dibenzylamin (Smp. 101–102°) ohne Depression.

N-Benzyl-di- β -menaphtylamin (XIII). 780 mg XIII (2 mMol), 50 cm³ Alkohol, 200 mg Pd-C. Aufnahme 52 cm³ H₂ (1,16 Mol.) in 35 Std. — Basenteil: 540 mg Hydrochlorid (95%), Smp. 237,5–238°; Mischprobe mit N-Benzyl- β -menaphtylamin-hydrochlorid (Smp. 239°) ohne Depression.

Zusammenfassung.

Durch Hydrierung von gemischten tertiären Aminen wurde die folgende Reihe steigender Leichtigkeit der hydrogenolytischen Abspaltung von benzylähnlichen Gruppen gefunden:

Methyl < Benzyl < p-Phenylbenzyl < Benzhydryl < 9-Fluorenyl < β , α -Menaphtyl.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

268. Nature et purification partielle de l'ocytocine.

Sur les hormones hypophysaires I

par C. H. Haselbach et A. R. Piguet.

(27 VIII 52)

En 1942, *Van Dyke* et coll.¹⁾ isolaient de la post-hypophyse de bœuf une protéine présentant une activité ocytocique, vasopressive et antidiurétique dans un rapport identique à celui trouvé dans la glande. Sans être parvenus à cristalliser cette protéine à triple activité, ils en démontraient l'homogénéité par électrophorèses, ultracentrifugations et par des mesures de solubilité.

Plus tard, *Du Vigneaud* et coll.²⁾ réussissaient à isoler deux polypeptides composés de huit acides aminés et responsables des actions ocytociques et vasopressives de la post-hypophyse. Dans un récent travail, consacré à la détermination des acides aminés composant la protéine isolée en 1942, *Block & Van Dyke*³⁾ admettent que les peptides isolés par *Du Vigneaud* et coll. ne seraient que des fragments de la molécule mère, vraisemblablement fixés à celle-ci par des ponts S—S, ou encore, par des liaisons peptidiques.

En effet, toutes les méthodes qui ont abouti à la séparation de l'ocytocine et de la vasopressine sous forme de polypeptides actifs ont fait appel à des traitements extrêmement drastiques, telles des

¹⁾ H. B. Van Dyke, B. F. Chow & R. O. Greep, J. Pharmacol. **74**, 190 (1942).

²⁾ J. G. Pierce & V. du Vigneaud, J. Biol. Chem. **186**, 77 (1950); R. A. Turner, J. G. Pierce & V. du Vigneaud, *ibid.* **193**, 363 (1951).

³⁾ R. J. Block & H. B. Van Dyke, Arch. Biochem. and Biophys. **36**, 1 (1952).

extractions en milieu acide, en général à l'ébullition. Or ces traitements peuvent évidemment provoquer la scission hydrolytique de certaines liaisons peptidiques, notamment celles voisines de la sérine ou de la thréonine¹). Que de telles scissions fussent nécessaires pour «libérer» ces polypeptides semblait être confirmé par le fait qu'il est impossible de les extraire par des solvants organiques à partir de solutions hormonales obtenues par des méthodes douces. La question de la nature protéique ou polypeptidique de ces hormones dans la glande restait donc ouverte.

Dans ce présent travail, limité pour l'instant à l'étude de l'ocytocine, nous montrons qu'il est parfaitement possible, par électrodialyse, de séparer cette hormone sous forme d'un polypeptide à poids moléculaire bas, dans des conditions ne provoquant, en aucun cas, la scission de liaisons peptidiques ou S—S. Nous décrivons en outre l'utilisation de ce procédé pour la purification partielle de l'ocytocine.

I. Nature de l'ocytocine native.

Les essais ont été effectués sur une solution d'ocytocine obtenue par extraction à froid (NaCl 0,5-m., pH 5,5) d'une poudre sèche de la post-hypophyse de bœuf²).

Essais de dialyse de l'ocytocine: En soumettant un extrait brut d'ocytocine à une dialyse de 24 h. à température ordinaire contre 100 fois son volume d'eau distillée, on retrouve moins de 2% de son activité à l'extérieur de la membrane. Par contre, toute l'activité reste à l'intérieur. La quantité d'azote protéique (*Kjeldahl*) qui dialyse est d'environ 16%; en revanche, l'élimination des sels consécutive à cette dialyse entraîne la précipitation, à l'intérieur du sac, de protéines qui représentent 31% de l'azote et qui contiennent environ 20% de l'activité.

Electrodialyse de l'ocytocine: Si l'on soumet l'extrait brut à l'électrodialyse à travers des membranes de «Cellux», on constate immédiatement qu'une quantité appréciable de substance active migre dans le compartiment cathodique, à un pH de 5,5. Après un temps suffisamment long, la totalité de l'activité passe dans le compartiment cathodique.

Conclusion: Deux faits ont été nettement observés: l'ocytocine extraite de la post-hypophyse par des méthodes douces ne dialyse pratiquement pas entre pH 5 et 6, alors qu'elle traverse parfaitement les membranes à l'électrodialyse. Dans ces conditions, il paraît difficile d'admettre que l'hormone soit fixée à une protéine de poids molé-

¹) P. Desnuelle & A. Casal, *Biochim. et biophys. acta* **2**, 64 (1948).

²) Fournie par la Maison *Armour & Co.* à Londres. Cette préparation est obtenue par «freeze drying» des lobes postérieurs.

culaire élevé par une liaison peptidique ou par un pont S—S. Il est beaucoup plus vraisemblable de penser que l'on se trouve en présence d'une liaison électrostatique, qui n'est pas modifiée par une dialyse, mais facilement rompue sous l'action du champ électrique. L'ocytocine est donc, dès l'origine, un polypeptide de poids moléculaire relativement bas, lié par des forces électrostatiques à une protéine d'un poids moléculaire beaucoup supérieur. On comprend dès lors que l'on puisse, en traitant les produits à des pH extrêmes, séparer ou déplacer les polypeptides biologiquement actifs de la protéine mère.

II. Purification partielle de l'ocytocine.

Il nous a semblé intéressant d'utiliser l'électrodialyse en vue d'une purification de l'hormone. Tant que l'hormone reste adsorbée, on pourra la traiter comme une protéine (précipitations salines, etc.) et la débarrasser ainsi d'autres polypeptides non-adsorbés, opération qui serait beaucoup plus compliquée si l'on séparait immédiatement tous les polypeptides des protéines, comme l'ont fait la plupart des auteurs par l'extraction acide à chaud.

Nous avons tout d'abord précipité la solution de départ par un volume égal de sulfate d'ammonium saturé. L'ocytocine précipite avec les protéines, alors que de nombreux polypeptides sont rejetés avec la solution surnageante; on obtient un enrichissement de 1,5 fois par rapport à l'azote protéique (*Kjeldahl*) avec un rendement de 80 %. Le précipité dissous est dialysé pendant 24 h. contre de l'eau pour éliminer l'excès des sels. Ici, par contre, les protéines qui précipitent lors de la dialyse ne contiennent plus d'activité ocytocique. Une courte ébullition augmente considérablement ce précipité inactif qu'on élimine. Toute l'opération se fait sans aucune perte d'activité ce qui montre bien que le polypeptide est encore lié. La solution active (pH 5,5) est alors soumise à l'électrodialyse dans une cellule à 3 compartiments. La totalité de l'activité est recueillie à la cathode. Il est nécessaire de changer souvent la membrane entre les compartiments central et cathodique, sinon celle-ci se colmate par la déposition de protéines chargées positivement qui arrêtent totalement le passage de la substance active.

Le rendement de cette électrodialyse est pratiquement quantitatif; l'enrichissement est d'environ 10 fois par rapport à la solution bouillie du stade précédent. Cette solution cathodique peut très bien être concentrée sous vide sans perte d'activité et conservée ensuite à froid; elle supporte également l'ébullition à 100°. Son activité opécifique est d'environ 1200 unités par mg d'azote protéique. Le tableau suivant rapporte les activités, degrés de pureté et rendements obtenus au cours de notre purification, effectuée à partir de 30 g de poudre sèche:

Opération	Activité totale	Azote total	Activité mg azote	Rendement du stade
Extraction NaCl 0,5-m. . .	24000 U.I.	640 mg	37	—
Précipitation $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	19000 U.I.	340 mg	56	80%
Dialyse+ébullition . . .	19000 U.I.	150 mg	140	100%
Electrodialyse	18000 U.I.	15 mg	1200	95%

Partie expérimentale.

Purification partielle de l'ocytocine.

Dosages d'activité: L'activité ocytocique a été mesurée in vitro selon la méthode usuelle sur l'utérus isolé du Cobaye. Nous avons utilisé comme substance de référence la *Pitocine Parke-Davis*.

Extraction: 30 g de poudre sèche de post-hypophyse (*Armour & Co.*, Londres), 11,8 g NaCl et 200 cm³ d'eau distillée sont secoués 20 h, à température ordinaire. La suspension ainsi obtenue est centrifugée 10' à la super-centrifugeuse «Sharples». Le culot est rejeté et la solution surnageante (extrait brut) conservée: volume = 320 cm³; activité/cm³ = 75 U.I.; azote/cm³ = 2 mg.

Précipitation au sulfate d'ammonium: L'extrait brut est additionné d'un volume égal d'une solution saturée de sulfate d'ammonium. L'opération se fait dans un bécher, à température ordinaire et sous agitation modérée. L'addition du sulfate se fait d'un coup et la précipitation peut être considérée comme complète après 30'. La suspension est centrifugée 10' à la super-centrifugeuse «Sharples». Le liquide surnageant est rejeté. Le culot qui se dissout très facilement dans l'eau distillée est porté à 100 cm³: volume = 100 cm³; activité/cm³ = 190 U.I.; azote/cm³ = 3,4 mg.

Dialyse: La solution précédente est dialysée 10 h. contre un courant d'eau ordinaire, puis 20 h. contre 30—40 fois son volume d'eau distillée. La liqueur intérieure de dialyse est portée quelques min. à ébullition, puis filtrée à chaud pour la débarrasser des protéines qui ont précipité au cours de ces deux traitements. Cette opération n'entraîne aucune perte d'activité. Volume = 100 cm³; activité/cm³ = 190 U.I.; azote/cm³ = 1,5 mg.

Electrodialyse: La solution du stade précédent (pH 5,5) est soumise à l'électrodialyse à travers des membranes de «Cellux». Nous avons utilisé un bac à trois éléments en plexiglas, avec électrodes de platine. Il est nécessaire de refroidir les compartiments central et cathodique, afin que la température ne dépasse pas 25°, tout en maintenant une agitation dans le compartiment central contenant la solution à séparer. Les compartiments anodique et cathodique sont remplis d'eau distillée.

Lors de l'enclenchement du courant, l'intensité croît très rapidement et s'établit après quelques min. à 250 V et 150 mA. La tension et l'intensité du courant dépendant surtout des dimensions de l'appareil, nous ne donnerons les valeurs avec lesquelles nous avons travaillé qu'à titre d'indication. Après 10', le courant est interrompu et la solution du compartiment cathodique, pratiquement inactive, est rejetée (élimination des derniers sels) et remplacée par de l'eau distillée. On poursuit alors l'électrodialyse, le courant s'établissant à 400 V/150 mA. On observe une précipitation abondante dans le compartiment central. Après 30', on recueille séparément les solutions du centre et de la cathode. L'appareil est rincé et la membrane centre/cathode changée.

On réintroduit le liquide du compartiment central, centrifuge 5' à la super-centrifugeuse «Sharples», et renouvelle les deux autres avec de l'eau distillée. La solution retirée à la cathode est conservée (10—15% de l'activité).

En recommençant l'électrodialyse, le courant s'établit vers 450 V/140 mA et ne varie pratiquement plus. Il suffit alors de vider le compartiment cathodique et de changer la membrane centre/cathode toutes les heures pour éviter qu'il ne se forme sur cette dernière

une «barrière» électropositive. Si le compartiment central continue de se troubler, on le centrifugera par la même occasion.

Une dialyse de 6–7 h. suffit à faire passer la quasi-totalité de l'activité de départ (19000 U.I.) du centre à la cathode. Les fractions recueillies à la cathode sont alors réunies, neutralisées, et concentrées à un volume convenable au vide à une température de 30°. La solution concentrée est filtrée sur «filter-cel»; elle se conserve parfaitement à froid. Volume = 8 cm³; activité/cm³ = 2250 U.I.; azote protéique/cm³ = 1,9 mg.

Ces recherches ont pu être effectuées grâce au *Fonds pour l'encouragement des recherches scientifiques*. Notre reconnaissance va également à M. le Prof. K. H. Meyer † pour les conseils et l'intérêt qu'il a porté à ce travail.

SUMMARY.

Electrodialysis of a crude extract of beef postpituitary gland have shown that the oxytocic principle could be obtained in a 100% yield in the cathode compartment.

As this treatment can by no means involve the rupture of a peptide or —S—S— bond, it is concluded that this hormone is, in the native state, a polypeptide linked by electrostatic forces to a high molecular protein.

A partial purification of oxytocin using electrodialysis has been described. The active solution (1200 I.U. per mg nitrogen) obtained with a 75% yield showed to contain a mixture of basic polypeptides of low molecular weight.

Laboratoires de chimie organique et
inorganique de l'Université de Genève.

269. Über Colchiceinamide¹⁾

von A. Uffer.

(5. IX. 52.)

Seit den Untersuchungen von *Fernholz & Lettré*²⁾ besitzen die Colchiceinamide einiges Interesse als Mitose-Inhibitoren. *Zeisel*³⁾ erhielt das unsubstituierte Amid durch Umsetzen des Colchicins mit

¹⁾ In einer kürzlich erschienenen Arbeit von J. L. Hartwell, M. V. Naikarni & J. Leitner, Am. Soc. **74**, 3180 (1952), wird vorgeschlagen, für die bisher üblichen Bezeichnungen Colchicamid oder Colchicinamid, wie sie für die Umsetzungsprodukte des Colchicins mit Aminen verwendet wurden, den Namen Colchiceinamide einzuführen, um damit der zugrunde liegenden Säure Colchicein Ausdruck zu geben. Wir schliessen uns dieser Auffassung an.

²⁾ H. Lettré, Die Chemie **55**, 265 (1942); H. Lettré & H. Fernholz, Z. physiol. Ch. **278**, 175 (1943); H. Lettré, Angew. Ch. **63**, 421 (1952); Deutsche Patentanmeldung: M 4475/12p, 15: 24. 3. 1942. E. Merck; Brit. Pat. 577606 (1944); May & Baker, Dagenham.

³⁾ S. Zeisel, M. **9**, 1 (1888).