

*Dithiocarbamat VII.* Die nach STOLL, RENZ & BRACK<sup>2)</sup> hergestellte Verbindung bildete nach Umkristallisieren aus heissem Wasser schwach gelbliche Blättchen, die sich bei 130–140° unter Gasentwicklung zersetzten (*l. c.*<sup>2)</sup> 130–131°, unter Aufschäumen).

$C_6H_{14}ON_2S_2$  Ber. C 37,11 H 7,27 S 33,00% Gef. C 37,02 H 7,42 S 32,73%

*Dithiocarbamat aus 1,5-Diaminopentan.* 810 mg 1,5-Diaminopentan in 2 ml Alkohol wurden zu 1 ml Schwefelkohlenstoff in 2 ml Alkohol getropft. Nach 16 Std. Stehen bei Zimmertemperatur wurde das ausgeschiedene zähe Öl von der Mutterlauge abgetrennt und mit Ammoniak verrieben, wobei es kristallin erstarrte. Smp. nach zweimaligem Umlösen aus wässrigem Alkohol 150–157°.

$C_6H_{14}N_2S_2$  Ber. C 40,44 H 7,92% Gef. C 40,60 H 8,27%

#### ZUSAMMENFASSUNG

Das stickstoffhaltige Spaltprodukt des Antibioticums *Nocardamin*<sup>1)2)</sup> wurde als 1-Amino-5-hydroxylamino-pentan identifiziert. Für das Nocardamin folgt daraus die neue Konstitution IV. Es wurde eine zweite Synthese des 1-Amino-5-hydroxylamino-pentans ausgeführt.

Massachusetts Institute of Technology,  
Cambridge, Mass., USA.,  
Organisch-chemisches Laboratorium der  
Eidg. Technischen Hochschule, Zürich  
und  
Pharmazeutisch-chemisches Laboratorium  
SANDOZ, Basel

### 229. Etude de structures peptidiques à l'aide du phénylthiocyanate II<sup>1)</sup>.

#### Sur l'emploi de la microchromatographie d'adsorption sur couches minces des phénylthiohydantoïnes

par Emile Cherbuliez, Br. Baehler et J. Rabinowitz

(6 IX 60)

Dans un précédent mémoire<sup>1)</sup>, nous avons décrit l'application d'un réactif d'EDMAN<sup>2)</sup> (isothiocyanate de phényle), marqué au <sup>35</sup>S, à la détermination de la séquence des acides aminés dans un polypeptide, ce qui permet d'augmenter considérablement la sensibilité de cette méthode. A cette occasion, nous avons indiqué que les méthodes chromatographiques ordinaires (p. ex. sur papier avec révélation chimique subséquente) permettent de travailler avec des quantités de peptides de l'ordre du  $\mu$ mole (quelquefois 0,1 à 0,2  $\mu$ mole). Or, la microchromatographie d'adsorption sur couches minces n'a pas encore, à notre connaissance, été appliquée à cette étude. Grâce à ce type de chromatographie, nous avons pu abaisser la limite de sensibilité de la méthode d'EDMAN (*sans marquage radioactif*) à l'ordre du 1/100 de  $\mu$ mole.

<sup>1)</sup> Le premier mémoire de cette série sera constitué par: EMILE CHERBULIEZ, BR. BAEHLER, M. C. LEBEAU, A. R. SUSSMANN & J. RABINOWITZ, *Helv.* 43, 896 (1960).

<sup>2)</sup> P. EDMAN, *Acta chem. scand.* 4, 283 (1950).

I. *Appareillage utilisé.* — A) Pour la dégradation des polypeptides: celui décrit dans le mémoire précédent<sup>1)</sup>.

B) Pour la chromatographie sur couches minces: le matériel (fourni par C. DESAGA G.m.b.H., Heidelberg) mis au point par E. STAHL<sup>3)</sup>. Il permet d'obtenir une couche régulière de gel de silice de 250  $\mu$  d'épaisseur sur des plaques de verre de 250  $\times$  50 mm.

II. *Mode opératoire.* — A) La synthèse du phénylthiocarbamylpeptide et sa cyclisation subséquente en phénylthiohydantoïne (avec libération du peptide raccourci ayant perdu son acide aminé N-terminal) se font de la manière déjà décrite<sup>1)</sup>, sauf que l'on utilise du phénylthiocyanate ordinaire au lieu du réactif marqué au <sup>35</sup>S.

B) La chromatographie ascendante des phénylthiohydantoïnes se fait dans les conditions suivantes:

La silice étalée sur plaque est activée par séjour de 2 h à l'étuve à 140°. On laisse les plaques se refroidir dans un dessiccateur à vide. Les dépôts de substance se font à 15 mm du bord intérieur de la plaque et à 10 mm les uns des autres. Un trait horizontal coupe la couche de silice à 100 mm exactement de la ligne de départ. C'est la distance la plus favorable pour avoir une bonne résolution sans étalement exagéré des taches.

La chromatographie proprement dite s'effectue dans un cylindre de verre muni d'un couvercle rodé, et dont le fond est recouvert d'une couche d'env. 1 cm de solvant (heptane 5 vol., pyridine 3 vol. et acétate d'éthyle 2 vol.) dans laquelle plonge la plaque. L'ascension à 100 mm se fait en 30 min env. La plaque est ensuite séchée 10 min à température ordinaire, puis 5 min à 105°.

Les plaques sont révélées par aspersion avec une solution aqueuse d'amidon à 0,5%, puis avec la solution d'iode et azide de sodium décrite précédemment<sup>1)</sup>. Les phénylthiohydantoïnes apparaissent en blanc sur fond brun.

III. *Peptides étudiés.* Pour le moment nous n'avons appliqué la méthode décrite qu'à un dipeptide et à un tripeptide. Les phénylthiohydantoïnes de référence sont toujours chromatographiées sur la même plaque que la phénylthiohydantoïne étudiée. En effet, si l'on ne prend pas de précautions spéciales pour éviter que la couche de silice n'absorbe l'humidité de l'air, l'activité de la silice diminue plus ou moins selon l'état hygrométrique de l'air et selon le temps mis pour déposer la substance, ce qui entraîne des variations imprévisibles du Rf.

Nous avons travaillé avec des quantités de peptides de 0,02 à 0,01  $\mu$ mole. Les taches correspondant aux phénylthiohydantoïnes sont encore très nettement révélé-

*Détermination de la séquence d'un di- et d'un tri-peptide par microchromatographie sur silice des phénylthiohydantoïnes (PTH) obtenues par la réaction d'EDMAN*

Peptide	Quantité utilisée		PTH des acides aminés N-terminaux						Remarques
			1 <sup>er</sup>		2 <sup>e</sup>		3 <sup>e</sup>		
	$\mu M$	$\gamma$	Rf réf.	Rf obs.	Rf réf.	Rf obs.	Rf réf.	Rf obs.	
glycyl-L-proline	0,02	3,44	0,370	0,365	0,515	0,515	—	—	Traces de PTH la glycine au 2 <sup>e</sup> stade
glycyl-L-proline	0,01	1,72	0,375	0,375	0,495	0,495	—	—	
L-prolyl-L-leucyl-glycine	0,02	6,42	0,490	0,490	0,615	0,615	0,385	0,390	
L-prolyl-L-leucyl-glycine	0,01	3,21	0,480	0,480	0,580	0,585	0,465	0,475	

<sup>3)</sup> E. STAHL, Chemiker-Ztg. 82, 324 (1958); Pharmaz. Rundschau 2 (1959).

lables par les réactifs amidon-iode-azide avec 0,01  $\mu$ mole de peptides au départ. Par contre, la révélation habituelle des taches par l'acide sulfurique concentré exige des quantités plus appréciables de matière.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau.

L'application de cette méthode à des peptides plus longs, ainsi que l'utilisation de phénylthiocyanate marqué au  $^{35}\text{S}$  pour augmenter la sensibilité de cette méthode, sont à l'étude et feront l'objet d'une prochaine publication.

Les auteurs remercient sincèrement la COMMISSION POUR LA SCIENCE ATOMIQUE du FONDS NATIONAL SUISSE DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE de l'aide financière accordée pour ce travail.

#### SUMMARY

The microchromatography of phenylthiohydantoins on thin layers of silica (solvent: heptane, pyridine, ethyl acetate 5:3:2 vol.; revelation by starch-iodine-azide) is described. This method is 10 to 20 times more sensitive than that of classic paper chromatography. Good results are obtained in the EDMAN degradation of 0,01  $\mu$ mole of di- or tri-peptides.

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

---

### 230. Interaction de films de protéine et de poly-amino-acides avec la trypsine à travers de minces écrans

par A. Rothen

(16 VIII 60)

Nous avons publié ici même, il y a quelques années, le résultat d'expériences sur l'interaction de films de protéine avec des anticorps et des enzymes<sup>1</sup>). Ces études ont été depuis lors considérablement étendues et cet article résume l'état actuel de la question.

Nous nous bornerons aux interactions de la trypsine et d'un substrat approprié, à l'état de couches monomoléculaires.

Rappelons brièvement les *conditions expérimentales*. Des couches monomoléculaires de protéine formées à la surface d'une cuve de LANGMUIR, sont transférées sur une plaque de verre métallisée (Rh ou Cr) par immersions ( $\downarrow$ ) et émergences ( $\uparrow$ ) successives. L'épaisseur d'une monocouche est d'environ 6 à 8 Å. Les épaisseurs sont déterminées optiquement par un appareil appelé ellipsomètre<sup>2</sup>) qui permet d'apprécier une fraction d'Å. Ces couches de protéine sont capables d'adsorber spécifiquement des anticorps homologues. En quelques minutes une couche de 30 à 40 Å peut être adsorbée. Dans le cas, exceptionnel, de couches d'albumine de sérum de bœuf, l'épaisseur de la couche d'anticorps adsorbés est plus ou moins proportionnelle au nombre de couches d'albumine présentes (maximum d'épaisseur de la couche d'anticorps environ 300 Å).

Ces couches de protéine transférées sur plaque sont extrêmement sensibles à l'action de solutions diluées d'enzymes protéolytiques. En quelques secondes, elles

<sup>1</sup>) A. ROTHEN, Helv. 33, 834 (1950).

<sup>2</sup>) A. ROTHEN, J. physic. Chemistry 63, 1929 (1960).