

164. De la protection contre l'hydrolyse enzymatique exercée
par les groupes phosphoryles II.

Sur la préparation de quelques peptides dérivés de la phosphotyrosine
et sur leur dégradation enzymatique

par Théodore Posternak et Sigrid Grafl.

(11 IX 45)

Dans la communication I¹), nous avons montré que la présence de groupes phosphoryles dans le voisinage de liaisons peptidiques ou glucosidiques protège ces dernières contre l'action des hydrolases. Cette action protectrice explique la formation des fragments riches en phosphore et résistants à l'action des ferments (phosphopeptones, phosphopolyoses) qu'on observe lors de la dégradation enzymatique des phosphoprotéides ou de certaines espèces d'amidon. Les substances phosphorylées simples que nous avons étudiées à l'époque étaient, d'une part, le phosphotétraose obtenu à partir de l'amidon de pomme de terre, d'autre part, l'acide phosphoséryl-glutamique formé par hydrolyse acide ménagée des phosphopeptones de la caséine. Ces substances résistent à l'action respectivement de l'amylase et de la dipeptidase, mais se laissent, par contre, dégrader dès que leur phosphore a été éliminé sous l'action d'une phosphatase.

Il nous a paru intéressant d'étendre ces recherches à d'autres substances phosphorylées de constitution simple et bien déterminée. Nous avons donc préparé quelques peptides dérivés du glycolle et d'un oxyamino-acide phosphorylé qui, jusqu'à présent à vrai dire, n'a pas été décelé dans la nature: la *l*-phosphotyrosine (I).

Si l'on ne connaissait pas encore des peptides dérivés de la phosphotyrosine, cette dernière, par contre, avait déjà été préparée par deux méthodes différentes. *Levene* et *Schormüller*²) l'obtinrent par l'action de l'oxychlorure de phosphore sur la formyl-tyrosine en milieu aqueux, en présence de magnésie. *Plimmer*³) la synthétisa avec un bien meilleur rendement en traitant la tyrosine à chaud par l'anhydride phosphorique en solution dans l'acide phosphorique. Les produits obtenus par les deux méthodes diffèrent d'ailleurs considérablement par leur point de fusion et leur rotation spécifique.

Dans nos premiers essais de synthèse de peptides phosphorylés nous nous sommes adressés à la phosphotyrosine préparée d'après *Plimmer* et nous avons essayé de la transformer en glycyl-phosphotyrosine par les méthodes classiques. Ces essais ont échoué en raison de l'inertie remarquable qu'oppose la substance: par exemple, elle ne se laisse pas condenser, du moins dans les conditions habituelles, avec le chlorure de chloracétyle ou le chlorure de carbobenzoxyle.

¹) *Th. Posternak et H. Pollaczek, Helv. 24, 921 (1941).*

²) *J. Biol. Chem. 100, 583 (1933).*

³) *Biochem. J. 35, 461 (1941).*

Des essais de phosphorylation directe de la glycyl-*l*-tyrosine par l'anhydride phosphorique en solution dans l'acide phosphorique échouèrent également. A froid, il ne se produit aucune réaction; à chaud, on obtient seulement de la phosphotyrosine par suite d'une dégradation du dipeptide résultant sans doute d'une phosphorolyse.

Nous avons élaboré finalement la méthode suivante:

Nous nous adressons à l'ester méthylique ou éthylique d'un N-carbobenzoxy-peptide dérivé de la tyrosine et nous le phosphorylons d'après la méthode classique d'*Emil Fischer* par l'oxychlorure de phosphore en solution pyridique. Le produit phosphorylé est ensuite saponifié par la soude caustique avec formation d'un N-carbobenzoxy-phosphopeptide, dont il s'agit alors d'éliminer par réduction le reste carbobenzoxy pour obtenir le phosphopeptide libre.

Cette dernière opération nous a réservé quelques difficultés. L'hydrogénation catalytique à laquelle on recourt habituellement, n'ayant pas donné de bons résultats, pas plus que l'emploi du sodium dans l'ammoniac liquide¹⁾, nous avons employé finalement, avec succès, l'iodure de phosphonium dans l'acide acétique glacial²⁾.

C'est ainsi qu'à partir de l'ester éthylique de la N-carbobenzoxy-*l*-tyrosine³⁾ nous avons obtenu de la *l*-phosphotyrosine; notre produit avait un point de fusion (227°) et une rotation spécifique ($[\alpha]_D = -8,8^{\circ}$) analogues à ceux du produit de *Plimmer*⁴⁾ (224—225°; $[\alpha]_D = -9,2^{\circ}$); nous n'avons donc pu confirmer les données de *Levene* et *Schormüller*⁴⁾ qui indiquent un p. de f. de 253° et $[\alpha]_D = -2,0^{\circ}$.

Nous avons obtenu également la phosphotyrosine en phosphorylant d'après *E. Fischer* l'ester éthylique de la *l*-tyrosine sans protéger le groupe amino et en saponifiant ensuite par la soude caustique. Lorsque l'oxychlorure de phosphore se trouve en excès, il se forme, en outre, un produit de rapport at. P/N = 3 qui consiste probablement, avant tout, en acide tyrosine-triphosphorique II. Il perd facilement sous l'action ménagée des acides minéraux deux restes phosphoryles; nous pensons qu'il s'agit de ceux qui sont fixés à l'azote.

Nous avons préparé, d'autre part, les deux phospho-dipeptides VI et X et les deux phospho-tripeptides XIII et XVI.

Glycyl-l-phosphotyrosine VI. Elle a été obtenue à partir de l'ester éthylique de la carbobenzoxy-glycyl-*l*-tyrosine III⁵⁾ par l'intermédiaire de la carbobenzoxy-glycyl-*l*-phosphotyrosine (IV).

l-Phosphotyrosyl-glycine X. Nous sommes partis de l'ester méthylique de la N-carbobenzoxy-O-acétyl-tyrosyl-glycine (VII)⁵⁾. Par désacétylation au moyen de l'acide chlorhydrique en solution dans l'alcool méthylique, on obtient facilement l'ester méthylique de la N-carbobenzoxy-tyrosyl-glycine (VIII). Ce dernier peut encore être préparé par une autre méthode en faisant réagir l'azide de la N-carbo-

¹⁾ *Harington* et *Mead*, *Biochem. J.* **29**, 1602 (1935); **30**, 1598 (1936).

²⁾ *Harington* et *Mead*, loc. cit.

³⁾ *Bergmann* et *Zervas*, *B.* **65**, 1199 (1932).

⁴⁾ Loc. cit.

⁵⁾ *Bergmann* et *Fru-ton*, *J. Biol. Chem.* **118**, 405 (1937).

benzoxy-*l*-tyrosine avec l'ester méthylique du glyocolle. La substance, après phosphorylation suivie de saponification et de décarboxylation, nous a fourni le phosphodipeptide X cherché.

l-Phosphotyrosyl-glycyl-glycine XIII. Elle a été préparée à partir de l'ester éthylique de la N-carbobenzoxy-tyrosyl-glycyl-glycine XI qui était déjà connu¹).

Glycyl-*l*-phosphotyrosyl-glycine XVI. L'ester de la carbobenzoxy-glycyl-*l*-tyrosine (III) a été transformé en hydrazide (V) puis en azide. Ce composé traité par l'ester éthylique du glyocolle nous a donné l'ester éthylique de la N-carbobenzoxy-glycyl-*l*-tyrosyl-glycine (XIV). Ce dernier produit nous a fourni enfin, par application de notre méthode, la glycyl-*l*-phosphotyrosyl-glycine (XVI).

Les N-carbobenzoxy-phosphopeptides obtenus intermédiairement dans ces synthèses sont des substances amorphes, mais ils ont été préparés, dans certains cas, à l'état analytiquement pur. Les phosphopeptides obtenus comme produits finaux sont, à l'état pur, des substances microcristallines. Ils ne donnent pas la réaction de *Millon* et sont tous dextrogyres en solution acide. Ils se laissent titrer nettement à la soude caustique, en solution aqueuse en présence de phénolphtaléine, comme des acides bibasiques. Leurs sels alcalino-terreux sont solubles dans l'eau, leurs sels de métaux lourds sont insolubles.

Chez les phosphopeptides, dont le groupe amino libre ne fait pas partie d'un reste de glycine (phosphotyrosyl-glycine X, phosphotyrosyl-glycyl-glycine XIII), les teneurs en azote aminé déterminées d'après *van Slyke* sont en accord satisfaisant avec la théorie. Chez les deux autres phosphopeptides, on observe, par contre, comme on devait s'y attendre, des teneurs en azote aminé trop fortes²). Après hydrolyse acide énergique tout l'azote des phosphopeptides passe à l'état aminé; à côté de l'acide phosphorique, on peut alors isoler de la tyrosine et du glyocolle.

Essais biochimiques. Nous avons soumis nos substances à l'action des peptidases contenues dans l'extrait glyciné de la muqueuse intestinale de porc, en présence et en l'absence de phosphatase des reins de porc. Pour mesurer la dégradation enzymatique, nous avons recouru principalement à la méthode de *van Slyke*, et parfois, avec des résultats d'ailleurs analogues, à celle de *Willstaetter* et *Waldschmidt-Leitz*.

Dans les 4 figures, la formation de P min. en % de P total est représentée: en l'absence de phosphatase des reins par les courbes I; en présence de cette phosphatase par les courbes II. L'augmentation de N aminé en % de N aminé primitif est donnée: en l'absence de phosphatase des reins par les courbes III, en présence de cette phosphatase par les courbes IV.

¹) *Bergmann* et *Fruton*, loc. cit.

²) *Abderhalden* et *van Slyke*, Z. physiol. Ch. 74, 505 (1911).

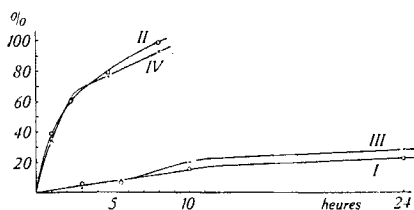


Fig. 1
Phosphotyrosyl-glycine

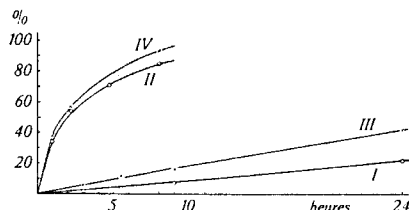


Fig. 2
Glycyl-phosphotyrosine

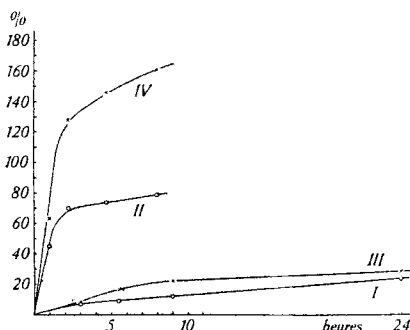


Fig. 3
Phosphotyrosyl-glycyl-glycine

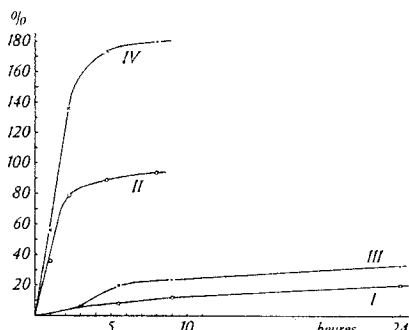
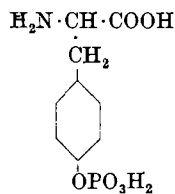


Fig. 4
Glycyl-phosphotyrosyl-glycine

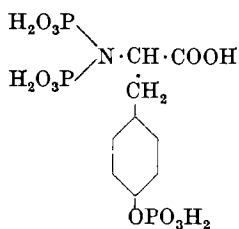
Les courbes III des fig. 1–4 montrent qu'en l'absence de phosphatase des reins, nos substances résistent ou tout au moins ne se laissent dégrader que très lentement par les peptidases. Il faut noter qu'il se produit toujours dans ces expériences une légère minéralisation du phosphore (courbes I) due à la présence de petites quantités de phosphatase dans l'extrait glycéринé de muqueuse intestinale; il est très probable que c'est cette faible déphosphorylation qui permet une dégradation lente par la peptidase et que les substances se montreraient encore plus résistantes si on les soumettait à l'action d'une peptidase rigoureusement exempte de phosphatase.

En présence de phosphatase des reins, par contre, la déphosphorylation rapide qui se produit (courbes II) s'accompagne parallèlement d'une dégradation rapide (courbes IV): l'azote aminé tend, comme on devait s'y attendre, à doubler dans le cas des dipeptides et à tripler dans celui des tripeptides.

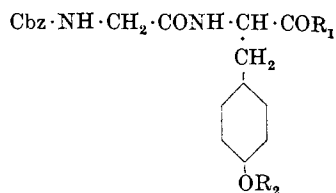
Les peptides de la phosphotyrosine se comportent donc comme l'acide phosphoséryl-glutamique étudié autrefois. Le groupe phosphoryle fixé à l'hydroxyle de la tyrosine protège contre l'hydrolyse enzymatique la liaison peptidique voisine, bien que cette dernière soit plus éloignée que chez le peptide de la phosphosérine.



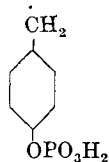
I



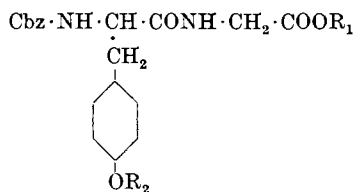
II



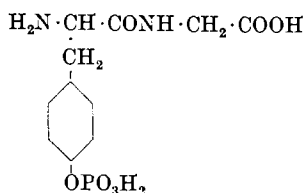
III $R_1 = \text{OC}_2\text{H}_5$; $R_2 = \text{H}$
 IV $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{PO}_3\text{H}_2$
 V $R_1 = \text{NH}-\text{NH}_2$; $R_2 = \text{H}$



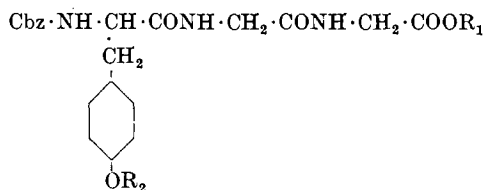
VI



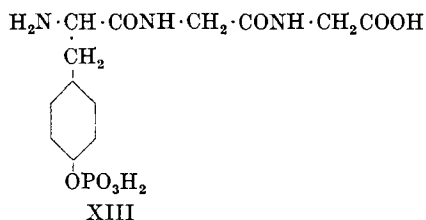
VII $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{Ac}$
 VIII $R_1 = \text{CH}_3$; $R_2 = \text{H}$
 IX $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{PO}_3\text{H}_2$



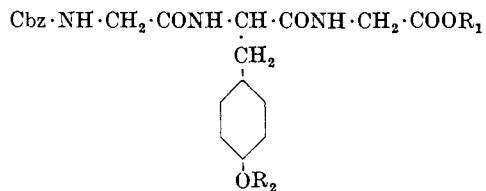
X



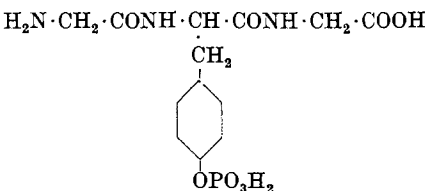
XI $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$; $R_2 = \text{H}$
 XII $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{PO}_3\text{H}_2$



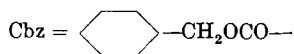
XIII



XIV $R_1 = \text{C}_2\text{H}_5$; $R_2 = \text{H}$
 XV $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{PO}_3\text{H}_2$



XVI



PARTIE EXPÉRIMENTALE¹⁾.

Préparation de la l-phosphotyrosine I à partir de l'ester éthylique de la carbobenzoxy-l-tyrosine.

500 mgr. d'ester éthylique de la carbobenzoxy-l-tyrosine²⁾ sont dissous dans 1 cm³ de pyridine anhydre. On refroidit à -15° et ajoute peu à peu, en agitant, une solution de 245 mgr. d'oxychlorure de phosphore (1,1 mol.) dans 2,5 cm³ de pyridine anhydre et abandonne, pendant 30 minutes, en maintenant à -15°. On laisse encore 2½ h. à température ordinaire et ajoute ensuite en refroidissant environ 10 gr. de glace. Par addition d'acide sulfurique dilué jusqu'à réaction acide au congo, on précipite un produit huileux qui représente l'ester éthylique de la carbobenzoxy-phosphotyrosine. Il est extrait au chloroforme; après évaporation du dissolvant à température ordinaire, on le soumet directement à la décarboxylation.

Le produit (300 mgr.) est dissous dans 16 cm³ d'acide acétique anhydre. On ajoute 0,4 gr. d'iode de phosphonium et on fait passer durant 75 min., à raison de 1—2 bulles par seconde, un courant d'hydrogène sec, en maintenant la température à 35°. A leur sortie, les gaz sont dirigés dans une solution d'hydroxyde de baryum; au bout de 45 min. déjà le dégagement de CO₂ a considérablement diminué. On évapore ensuite à sec dans le vide, reprend par l'eau, neutralise à l'ammoniaque et évapore de nouveau. Cette opération est répétée trois fois de suite, de manière à éliminer complètement l'iode de benzyle. Pour finir, on reprend encore par l'eau, filtre et ajoute, après avoir neutralisé éventuellement par l'ammoniaque, 2,5 cm³ d'acétate de baryum à 10%. Après filtration, on concentre dans le vide à 5 cm³ et précipite par 3 vol. d'alcool. Le sel de baryum est redissous dans 4 cm³ d'eau; on précipite par 2 cm³ d'acétate de plomb à 20%. Le sel plombique est ensuite décomposé par l'hydrogène sulfuré et le filtrat du sulfure de plomb est concentré dans le vide à 2 cm³ environ. On neutralise alors, à la phénolphtaléine, par NaOH n, puis on ajoute encore le double du volume de soude caustique employée et on laisse séjourner 15 minutes à température ordinaire, afin de saponifier l'ester éthylique évent. présent. Après introduction de la quantité de HCl n correspondant à la soude et addition d'alcool (2 vol.), il cristallise un produit identique à la phosphotyrosine de *Plimmer*³⁾. P. de f. et p. de f. de mélange 227°.

12,83; 10,31 mgr. subst. ont donné 0,634; 0,500 cm³ N₂ (20°, 713 mm.; 19°, 712 mm.)
11,9; 6,35 mgr. subst. ont donné 0,1893; 0,1037 gr. SPBa⁴⁾

23,9 mgr. subst. ont consommé (phénolphtaléine) 1,86 cm³ NaOH 0,1-n.

| | | | |
|--|---------------------|-----------------|-------------------|
| C ₉ H ₁₂ O ₆ NP | Calculé N 5,32 | P 11,84% | Pds. equiv. 130,5 |
| | Trouvé „ 5,40; 5,31 | „ 11,76; 12,06% | „ 128,5 |

Polarimétrie: a) après neutralisation à la phénolphtaléine par NaOH.

c = 0,928; l = 2 dm.; $\alpha_D^{20} = -0,10^\circ \pm 0,02^\circ$; $[\alpha]_D^{20} = -5,5^\circ \pm 1^\circ$

b) dans HCl 2 n.:

c = 1,017; l = 2 dm.; $\alpha_D^{20} = -0,18^\circ \pm 0,02^\circ$; $[\alpha]_D^{20} = -8,8^\circ \pm 1^\circ$

Plimmer indique pour la phosphotyrosine, en accord avec nos propre observations: p. de f. 224—225°; $[\alpha]_D$ (dans HCl 2 n) = -9,19°. *Levene* et *Schormüller* donnent: p. de f. 253°; $[\alpha]_D = -2,0^\circ$. Les produits de *Levene* et de *Plimmer* avaient été préparés par des méthodes différentes de la nôtre.

Phosphorylation de l'ester de la l-tyrosine

l-Phosphotyrosine. On dissout 300 mgr. de chlorhydrate de l'ester éthylique de la l-tyrosine dans 1 cm³ de pyridine anhydre, puis on ajoute lentement, en agitant et en refroidissant à -15°, 190 mgr. d'oxychlorure de phosphore (1 mol.) dissous dans 1 cm³ de pyridine. Après un séjour d'une demi-heure dans un mélange réfrigérant, on laisse pendant

¹⁾ Tous les produits ont été séchés à 110° avant l'analyse, dans le vide, sur l'anhydride phosphorique.

²⁾ *Bergmann* et *Zervas*, B. 65, 1199 (1932). ³⁾ Loc. cit.

⁴⁾ SPBa = sulfo-phosphomolybdate de baryum; voir Bl. [4] 27, 507 et 564 (1920).

4 h. à température ordinaire. On ajoute ensuite, en refroidissant extérieurement, 6—7 gr. de glace et on abandonne à la glacière durant la nuit. Le lendemain, on introduit de la baryte cristallisée jusqu'à réaction fortement alcaline à la phénolphthaléine et on filtre. On concentre ensuite fortement dans le vide, on ajoute de l'eau et on répète cette opération jusqu'à élimination complète de la pyridine. La solution est ensuite filtrée et additionnée de quelques vol. d'alcool. Le précipité formé (400 mgr.) est débarrassé des ions Cl' par plusieurs dissolutions dans l'eau suivies de reprecipitations par l'alcool.

Les sels de baryum sont ensuite redissous dans 10 parties d'eau; le produit phosphorylé est reprecipité comme sel de plomb par addition d'acétate de plomb à 20%. Après décomposition de ce sel de plomb par l'hydrogène sulfuré et concentration de la solution, on traite 15 min. par la soude caustique de la manière indiquée précédemment, afin de saponifier l'ester éthylique. On ajoute ensuite la quantité d'acide chlorhydrique correspondant à la soude caustique introduite. Après concentration dans le vide à 2—3 cm³ et addition de 2 vol. d'alcool, il cristallise 150 mgr. de *l*-phosphotyrosine pure (p. de f. du produit et p. de f. du mélange avec un échantillon préparé d'après *Plümmer*: 224°).

Acide triphosphorique. Si le chlorhydrate de l'ester de la tyrosine est phosphorylé en solution pyridique par 2—3 mol. d'oxychlorure de phosphore, les composés phosphoorganiques donnent en majeure partie des sels de baryum insolubles dans l'eau. Après alcalinisation par la baryte (phénolphthaléine) de la solution pyridique aqueuse, on essore le précipité qu'on lave à l'eau; le filtrat contient une certaine quantité de phosphotyrosine qu'on isole comme il a été indiqué précédemment. Les sels de baryum insolubles sont redissous dans HCl 2,5 n et reprecipités par l'alcool; cette opération est répétée plusieurs fois dans le but d'éliminer les phosphates minéraux. Il faut éviter de laisser la substance trop longtemps en solution dans l'acide minéral, en raison de la facilité avec laquelle elle se déphosphoryle. On obtient ainsi un produit de composition assez variable (N 1,8—2,4%; P 13—15%; Ba 38—42%; calculé pour l'acide libre: P 22,5—24,0%; N 3,2—3,8%) mais chez lequel le rapport at. P/N est toujours voisin de 3. La formule la plus probable est celle de l'acide tyrosine-triphosphorique II (C₉H₁₄O₁₂NP₃ calculé: N 3,33%; P 22,1%), bien que les chiffres trouvés soient systématiquement trop élevés. La substance semble optiquement inactive. Par titrage au formol (*Sørensen*), on ne peut déceler de groupe amino libre. La méthode de *van Slyke* est inapplicable, car l'action de l'acide nitreux s'accompagne d'une minéralisation importante du phosphore. En solution dans HCl n à 37°, la substance perd rapidement $\frac{2}{3}$ de son phosphore.

| Durée en h. | P min. en % de P total |
|-------------|------------------------|
| 2 | 47,1 |
| 4 | 61,6 |
| 8 | 66,1 |
| 24 | 68,5 |

Glycyl-l-phosphotyrosine VI.

Carbobenzoxy-glycyl-l-phosphotyrosine IV. 200 mgr. d'ester éthylique de la carbobenzoxy-glycyl-*l*-tyrosine III¹⁾ sont dissous dans 1 cm³ de pyridine anhydre. On ajoute, à -15°, une solution de 77 mgr. d'oxychlorure de phosphore dans 1 cm³ de pyridine. Après un séjour de 30 minutes à -15° et de 2½ h. à température ordinaire, on additionne le liquide brun clair, en refroidissant extérieurement, de 6 gr. de glace concassée. Après un séjour de 15 h. à la glacière, la solution est fortement concentrée dans le vide. Par acidification au congo par l'acide sulfurique, on précipite une huile qu'on extrait au chloroforme. La solution chloroformique est lavée à l'acide dilué, puis à l'eau et ensuite séchée sur du sulfate de sodium anhydre et évaporée à sec. Le résidu huileux qui représente l'ester

¹⁾ *Bergmann et Fruton, J. Biol. Chem. 118, 405 (1937).*

éthylque brut de la carbobenzoxy-glycyl-phosphotyrosine, ne doit pas donner de réaction de *Millon*. On saponifie par la soude caustique de la manière décrite précédemment. Après acidification par l'acide chlorhydrique, la carbobenzoxy-glycyl-phosphotyrosine IV précipite sous forme d'une huile qui, contrairement à son ester, est peu soluble dans le chloroforme. L'analyse a été effectuée sur le sel de baryum qu'on a préparé comme suit: on dissout le produit huileux par addition de soude caustique jusqu'à début de réaction alcaline (phénolphtaléine); par addition d'acétate de baryum, le sel de baryum précipite en flocons qu'on lave à l'alcool et sèche.

48,9 mgr. subst. ont consommé (*Kjeldahl*) 1,61 cm³ H₂SO₄ 0,1-n.

12,2 mgr. subst. ont donné 0,0802 gr. SPBa

61,1 mgr. subst. ont donné 0,0256 gr. BaSO₄

| | | | | | | |
|---|-----------|------|------|------|------|-----------|
| C ₁₉ H ₁₉ O ₉ N ₂ PBa | Calculé N | 4,77 | P | 5,28 | Ba | 23,38% |
| | Trouvé | ,, | 4,61 | ,, | 4,86 | ,, 24,65% |

Glycyl-l-phosphotyrosine VI. 400 mgr. de carbobenzoxy-glycyl-phosphotyrosine (acide libre) et 0,4 gr. d'iodure de phosphonium sont dissous dans 18 cm³ d'acide acétique anhydre. On chauffe à 50° dans un courant d'hydrogène sec; le dégagement d'anhydride carbonique est terminé au bout de 30 minutes. Le produit phosphorylé est ensuite isolé par l'intermédiaire de son sel de baryum puis de son sel de plomb dans les conditions décrites plus haut (voir préparation de la phosphotyrosine, à partir du dérivé carbobenzoxy). Après décomposition du sel de plomb par l'hydrogène sulfuré, le filtrat du sulfure de plomb est concentré dans le vide à 3 cm³ environ. Par addition de 7 cm³ d'alcool, la glycyl-phosphotyrosine cristallise (150 mgr.). On la purifie par dissolution dans l'eau suivie d'addition d'alcool. Poudre micro-cristalline fondant avec décomposition à 224—225° (chauffé rapide). Le mélange avec la phosphotyrosine de p. de f. 225—227° fond vers 214°. Réaction de *Millon* négative.

3,89; 4,31 mgr. subst. ont donné 0,304; 0,343 cm³ N₂ (18°, 716 mm.; 18,5°, 731 mm.)

8,40; 5,89 mgr. subst. ont donné 0,1086; 0,0785 gr. SPBa

62,72 mgr. subst. ont donné (*van Slyke*) 6,50 cm³ N₂ (21°, 697 mm.)

0,1043 gr. subst. ont consommé (phénolphtaléine) 0,66 cm³ NaOH n.

| | | | | | | | | |
|---|-----------|------|------------|------|--------------------|-------|-------------|-----------|
| C ₁₁ H ₁₅ O ₇ N ₂ P | Calculé N | 8,81 | P | 9,76 | NH ₂ —N | 4,40% | Pds. équiv. | 159 |
| | Trouvé | ,, | 8,64; 8,96 | ,, | 9,55; 9,85 | ,, | 5,50% | ,, ,, 158 |

$c = 0,860$ (dans H₂SO₄ n); $l = 2$ dm.; $\alpha_D^{20} = +0,48 \pm 0,02$; $[\alpha]_D^{20} = +27,9 \pm 1$ °

Le sel neutre de sodium de la substance ne présente pas de rotation optique appréciable.

Hydrolyse acide. La substance est chauffée 20 h. à l'ébullition à reflux avec 20 parties d'acide sulfurique à 25%. Tout l'azote se trouve alors sous forme aminée et le phosphore est quantitativement minéralisé. Après élimination quantitative des acides sulfurique et phosphorique par addition d'hydroxyde de baryum, le filtrat, qui ne doit pas contenir d'ions Ba⁺⁺, est concentré dans le vide, ce qui amène la cristallisation de la tyrosine (p. de f. 320°). Les eaux-mères fortement concentrées fournissent, par addition d'alcool méthylique, du glyocolle; on le débarrasse des traces de tyrosine entraînées par dissolution dans un peu d'eau suivie de filtration et de précipitation par l'alcool méthylique (p. de f. 285°).

l-Phosphotyrosyl-glycine X.

Ester méthylique de la N-carbobenzoxy-O-acétyl-l-tyrosyl-glycine VII. La N-carbobenzoxy-O-acétyl-l-tyrosine a été préparée d'après *Bergmann* et *Zervas*¹⁾. Par recristallisation dans l'alcool méthylique dilué, nous avons obtenu un produit fondant nettement à 128—129°, alors que les auteurs cités indiquent une fusion peu nette vers 120—121°. Le produit a été transformé en chlorure d'acide et condensé avec l'ester méthylique du glyocolle d'après la méthode de *Bergmann* et *Fruton*²⁾ qui ont effectué la même réaction avec

¹⁾ Z. physiol. Ch. **224**, 17 (1934).

²⁾ J. Biol. Chem. **118**, 405 (1937).

l'ester éthylique du glycocolle; nous avons, toutefois, laissé les réactifs deux fois plus longtemps en présence que ne l'indiquent les auteurs. P. de f. 137—138°.

6,86 mgr. subst. ont donné 0,420 cm³ N₂ (19°, 718 mm.)

C₂₂H₂₄O₇N₂ Calculé N 6,54 Trouvé N 6,76%

Ester méthylique de la N-carbobenzoxy-l-tyrosyl-glycine VIII. a) On chauffe 20 min. à l'ébullition à reflux 2 gr. du produit précédent avec 28 cm³ d'une solution 0,6 n de gaz chlorhydrique dans l'alcool méthylique absolu. Après refroidissement, on évapore rapidement à sec dans le dessiccateur à vide sur l'acide sulfurique et la potasse en pastilles. Le résidu est recristallisé dans l'ester acétique. Rendement 90%; p. de f. 139°.

6,40 mgr. subst. ont donné 0,430 cm³ N₂ (20°, 713 mm.)

C₂₀H₂₂O₆N₂ Calculé N 7,25 Trouvé N 7,34%

b) On fait réagir l'azide de la carbobenzoxy-tyrosine avec l'ester méthylique du glycocolle dans les conditions décrites par *Bergmann et Fruton*¹⁾ qui ont traité la même azide par l'ester éthylique de la glycyl-glycine. On obtient ainsi un produit identique à celui que fournit le procédé a).

Carbobenzoxy-l-phosphotyrosyl-glycine IX. — On dissout 2,3 gr. d'ester méthylique de la carbobenzoxy-l-tyrosyl-glycine VIII dans 10 cm³ de pyridine anhydre, et on introduit peu à peu, en refroidissant à -15°, une solution de 1,8 gr. (2 mol.) d'oxychlorure de phosphore dans 10 cm³ de pyridine anhydre. Après un séjour de 30 minutes à -15° et de 2½ h. à température ordinaire, on ajoute, en refroidissant extérieurement, 60 gr. de glace concassée, puis on abandonne pendant 15 h. à la glacière. Après acidification au congo par l'acide nitrique, on élimine les ions Cl⁻ par l'oxyde d'argent puis les ions Ag⁺ par l'hydrogène sulfuré. La solution filtrée, aérée et neutralisée à l'ammoniaque est additionnée de 15 cm³ d'acétate de plomb à 20%. Le précipité est essoré et lavé avec de petites quantités d'eau; on le remet ensuite en suspension dans un peu d'eau. Ce sel plombique est ensuite transformé de la manière suivante en sel de sodium: on ajoute peu à peu, en triturant continuellement, une solution de carbonate de sodium à 10%, jusqu'à coloration rose persistante du papier à la phénolphtaléine, et on essore. Dans ces conditions, seuls les sels de plomb phospho-organiques sont décomposés, le phosphate minéral de plomb reste, par contre, inaltéré. A ce moment, le produit phosphorylé peut être précipité, si l'on acidifie au congo par l'acide chlorhydrique (éviter tout excès) la solution du sel sodique et si l'on sature ensuite de sel marin. Il est, toutefois, préférable de reprécipiter le produit sous forme de son sel de plomb qu'on décompose ensuite par l'hydrogène sulfuré. Après concentration dans le vide, suivie de saponification par la soude caustique, dans les conditions déjà décrites, on précipite la carbobenzoxy-phosphotyrosyl-glycine comme sel de plomb qu'on décompose par l'hydrogène sulfuré. Le filtrat du sulfure de plomb, dans lequel le rapport at. N/P = 2,056 (calculé N/P = 2,00), laisse par évaporation à sec dans le vide, un résidu solide amorphe suffisamment pur pour la suite. Réaction de *Millon* négative.

l-Phosphotyrosyl-glycine X. 300 mgr. du produit précédent bien sec et 0,3 gr. d'iodure de phosphonium sont dissous dans 15 cm³ d'acide acétique anhydre. On maintient la température à 55° durant 1 h. en faisant passer un courant d'hydrogène sec. Après distillation dans le vide et neutralisation à l'ammoniaque suivies de plusieurs évaporations dans le vide, on isole le produit de la manière habituelle, en passant par ses sels de baryum et de plomb. La substance (150 mgr.) est purifiée par dissolution dans 14 parties d'eau suivie d'addition de 2 vol. d'alcool. Après 3 ou 4 reprécipitations, la phosphotyrosyl-glycine se sépare à l'état micro-cristallin. Le produit est assez hygroscopique et fond en se décomposant à 178°; réaction de *Millon* négative.

9,39; 10,69 mgr. subst. ont donné 0,750; 0,850 cm³ N₂ (19°, 708 mm.; 19°, 713 mm.)

5,17; 6,32 mgr. subst. ont donné 0,0676; 0,0835 gr. SPBa

49,9 mgr. subst. ont donné (*van Slyke*) 4,30 cm³ N₂ (19°, 696 mm.)

0,1500 gr. subst. ont consommé (phénolphtaléine) 0,95 cm³ NaOH n.

| | | | | |
|---|----------------|--------------|--------------------------|-----------------|
| C ₁₁ H ₁₅ O ₇ N ₂ P | Calculé N 8,81 | P 9,76 | NH ₂ -N 4,40% | Pds. équiv. 159 |
| Trouvé „ | 8,70; 8,72 | „ 9,66; 9,76 | „ 4,61% | „ „ 158 |

¹⁾ Loc. cit.

- Polarimétrie: a) après neutralisation (phénolphtaléine) par NaOH:
 $c = 1,25; l = 2 \text{ dm.}; \alpha_D^{25} = +0,50^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{25} = +20,0^0 \pm 1^0$
 b) dans H_2SO_4 n:
 $c = 0,500; l = 2 \text{ dm.}; \alpha_D^{23} = +0,20^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{23} = +20,0^0 \pm 2^0$

Après 20 h. d'ébullition en présence de H_2SO_4 à 25%, on peut isoler, de la manière décrite plus haut, du glycocole et de la tyrosine.

l-Phosphotyrosyl-glycyl-glycine XIII.

Carbobenzoxy-l-phosphotyrosyl-glycyl-glycine XII. On prépare d'après *Bergmann et Fruton*¹⁾ l'ester éthylique de la carbobenzoxy-tyrosyl-glycyl-glycine XI. 1,2 gr. de ce produit sont dissous dans 6 cm³ de pyridine anhydre. On ajoute peu à peu, en refroidissant à -15°, une solution de 800 mgr. d'oxychlorure de phosphore dans 6 cm³ de pyridine anhydre. Après un séjour de 30 minutes à -15° et de 2 h. à température ordinaire, on ajoute 40 gr. de glace concassée et on abandonne 15 h. à la glacière. Par acidification au congo à l'acide nitrique, on précipite une huile peu soluble dans les dissolvants organiques habituels, qui représente une partie seulement du produit phosphorylé. On laisse se déposer, décante la solution et lave l'huile avec de petites quantités d'acide nitrique dilué, puis d'eau froide. Le reste du produit phosphorylé est isolé de la manière suivante: on débarrasse la solution des ions Cl' par l'oxyde d'argent; après élimination des ions Ag en excès par l'hydrogène sulfuré suivie d'aération et de neutralisation à l'ammoniaque, on précipite par 10 cm³ d'acétate de plomb à 20%. Le sel plombique est essoré, lavé soigneusement et suspendu dans un peu d'eau. On le décompose par le carbonate de sodium à 10%, dans les conditions déjà décrites. On acidifie ensuite la solution du sel sodique par l'acide chlorhydrique et sature de sel marin. L'huile ainsi précipitée est réunie à la première et le tout est saponifié par la soude caustique normale de la manière habituelle. Après acidification à l'acide chlorhydrique, on sature de sel marin pour précipiter le produit phosphorylé. On le purifie par dissolution dans l'alcool absolu ou dans l'acide acétique glacial suivie de filtration et de concentration du filtrat. On obtient ainsi le carbobenzoxy-phosphopeptide sous forme d'un solide amorphe (0,9—1 gr.). Réaction de *Millon* négative.

66,4 mgr. subst. ont consommé (*Kjeldahl*) 3,90 cm³ H_2SO_4 0,1 n

5,83 mgr. subst. ont donné 46,7 mgr. SPBa

$\text{C}_{21}\text{H}_{24}\text{O}_{10}\text{N}_3\text{P}$ Calculé N 8,25 P 6,10%
 Trouvé ,, 8,22 ,, 5,92%

l-Phosphotyrosyl-glycyl-glycine XIII. Une solution de 800 mgr. du produit précédent et de 800 mgr. d'iodure de phosphonium dans 8 cm³ d'acide acétique anhydre est chauffée 45 minutes à 65° dans un courant d'hydrogène sec. Le composé phosphorylé est ensuite isolé comme d'habitude par l'intermédiaire de son sel de baryum puis de son sel de plomb. La substance (300 mgr.), purifiée par précipitation par l'alcool de sa solution aqueuse concentrée, est une poudre indistinctement cristalline et hygroscopique fondant à 182°; réaction de *Millon* négative.

2,41 mgr. subst. ont donné 0,245 cm³ N_2 (18°, 714 mm.)

5,37; 5,35 mgr. subst. ont donné 61,0; 61,2 mgr. SPBa

61,88 mgr. subst. ont donné (*van Slyke*) 4,15 cm³ N_2 (18°, 700 mm.)

0,1537 gr. subst. ont consommé (phénolphtaléine) 0,83 cm³ NaOH n

$\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{O}_8\text{N}_3\text{P}$ Calculé N 11,20 P 8,27 $\text{NH}_2\text{—N}$ 3,73% Pds. équiv. 188
 Trouvé ,, 11,20 ,, 8,39; 8,45 ,, 3,62% ,, ,, 185

- Polarimétrie: a) après neutralisation (phénolphtaléine) par NaOH:
 $c = 1,655; l = 2 \text{ dm.}; \alpha_D^{23} = +0,19^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{23} = +5,7^0 \pm 0,6^0$
 b) dans H_2SO_4 n:
 $c = 1,00; l = 2 \text{ dm.}; \alpha_D^{23} = +0,15^0 \pm 0,02^0; [\alpha]_D^{23} = +7,5^0 \pm 1^0$

¹⁾ Loc. cit.

Après 20 h. de traitement à l'ébullition par H_2SO_4 à 25%, on isole de la tyrosine et du glycocolle.

Glycyl-l-phosphotyrosyl-glycine XVI.

Hydrazide de la carbobenzoxy-glycyl-l-tyrosine V. 1,5 gr. d'ester éthylique de la carbobenzoxy-glycyl-l-tyrosine III sont dissous dans 10 cm³ d'alcool absolu chaud. On ajoute 0,45 cm³ d'hydrate d'hydrazine et abandonne la solution pendant 24 h. à la température ordinaire. Le précipité gélatineux est essoré et recristallisé dans l'alcool chaud. Aiguilles très fines (1,5 gr.) fondant à 176°.

3,23 mgr. subst. ont donné 0,431 cm³ N₂ (20°, 714 mm.)

C₁₉H₂₂O₅N₄ Calculé N 14,51% Trouvé 14,61%

Ester éthylique de la carbobenzoxy-glycyl-l-tyrosyl-glycine XIV. 1,8 gr. du produit précédent sont suspendus dans 25 cm³ d'eau. On dissout la substance par addition de 8 cm³ d'acide chlorhydrique concentré. On ajoute alors à 0°, en agitant, du nitrite de sodium à 10% (3,2 cm³) jusqu'à réaction bleue du papier iodo-amidonné. L'azide formée est extraite en deux fois par l'ester acétique (20 cm³ au total); on lave la solution successivement à l'eau, à l'hydrogénéocarbonate et de nouveau à l'eau et on la sèche rapidement sur du sulfate de sodium anhydre. On la mélange ensuite à une solution de 0,70 gr. (1,5 mol.) d'ester éthylique du glycocolle dans 10 cm³ d'éther acétique. Après 15 heures de séjour à température ordinaire, on lave la solution à l'acide chlorhydrique dilué, puis à l'hydrogénéocarbonate et enfin à l'eau; ensuite on la sèche et on l'évapore dans le vide. Le résidu (600 mgr.) est recristallisé dans un mélange d'éther acétique et d'éther de pétrole. P. de f. 169°.

8,66 mgr. subst. ont donné 0,732 cm³ N₂ (18°, 718 mm.)

C₂₃H₂₇O₇N₃ Calculé N 9,19 Trouvé N 9,37%

Carbobenzoxy-glycyl-l-phosphotyrosyl-glycine XV. On dissout 1,5 gr. du produit précédent dans 7,5 cm³ de pyridine anhydre et traite à -15° par une solution de 1 gr. d'oxychlorure de phosphore dans 7,5 cm³ de pyridine anhydre. Après un séjour de 30 min. à -15° et de 2 ½ h. à température ordinaire, on ajoute 40—50 gr. de glace concassée et on laisse 15 h. à la glacière. Par acidification à l'acide nitrique une partie de la substance phosphorylée précipite en flocons huileux qu'on lave à l'acide très dilué. Le reste est isolé de la manière suivante: on élimine les ions Cl' par l'oxyde d'argent et les ions Ag' en excès par l'hydrogène sulfuré et on précipite, après aération et neutralisation à l'ammoniaque, par l'acétate de plomb. Le sel plombique est décomposé par le carbonate de sodium dans les conditions déjà indiquées. On acidifie la solution sodique par l'acide chlorhydrique et sature de sel marin. Le produit précipité est centrifugé et réuni aux flocons huileux obtenus précédemment. On saponifie alors dans les conditions habituelles par la soude caustique, puis on acidifie et sature de sel marin. Après centrifugation, on reprend le produit brut par l'alcool ou l'acide acétique glacial, on filtre et on évapore à sec. On obtient ainsi env. 1,5 gr. de produit phosphorylé sous forme d'un solide amorphe; réaction de *Millon* négative.

9,85 mgr. subst. ont donné 0,725 cm³ N₂ (21°, 713 mm.)

10,40 mgr. subst. ont donné 83,4 mgr. SPBa

C₂₁H₂₄O₁₀N₃P Calculé N 8,25 P 6,10%

Trouvé „ 8,02 „ 5,93%

Glycyl-l-phosphotyrosyl-glycine XVI. 1 gr. du produit précédent et 1 gr. d'iodure de phosphonium sont dissous dans 10 cm³ d'acide acétique anhydre et sont chauffés 1 ½ h. à 65° dans un courant d'hydrogène sec. Le produit phosphorylé est isolé comme d'habitude par l'intermédiaire de son sel de baryum puis de son sel de plomb. On le purifie par précipitation en additionnant la solution aqueuse concentrée de quelques volumes d'alcool. Rendement 300 mgr.; poudre indistinctement cristalline, fondant en se décomposant vers 198° (chauffe rapide); réaction de *Millon* négative.

7,02 mgr. subst. ont donné 0,739 cm³ N₂ (20°, 714 mm.)
 4,25 mgr. subst. ont donné 46,8 mgr. SPBa
 55,84 mgr. subst. ont donné (*van Slyke*) 4,37 cm³ N₂ (18°, 700 mm.)
 0,1555 mgr. subst. ont consommé (phénolphtaléine) 0,83 cm³ NaOH n
 C₁₃H₁₈O₈N₃P Calculé N 11,20 P 8,27 NH₂-N 3,73% Pds. équiv. 188
 Trouvé „ 11,52 „ 8,14 „ 4,22% „ „ 187

Polarimétrie: a) après neutralisation (phénolphtaléine) par NaOH:
 pas de rotation appréciable (c = 10; l = 2 dm.)
 b) dans H₂SO₄ n:
 c = 1,01; l = 2 dm.; α_D²³ = +0,16° ± 0,02°; [α]_D²³ = +8,0° ± 1°

Après 20 h. d'ébullition, en présence de H₂SO₄ à 25%, on a isolé, comme dans le cas des autres phosphopeptides, du glycocole et de la tyrosine.

Action des ferments.

Préparation des ferments. La phosphatase des reins de porc a été préparée d'après E. et A. Albers¹⁾.

La solution de peptidase (de p_H 7,8) a été obtenue à partir de l'extrait glyciné de muqueuse intestinale de porc de la manière décrite dans notre communication précédente²⁾.

Activité de l'amino-peptidase³⁾: 2,0 cm³ de *l*-leucyl-glycyl-glycine 0,1-m + 6 cm³ d'enzyme; p_H = 7,0; scission après 45 min. à 36°: 40%.

Activité de la dipeptidase⁴⁾: 41,6 mgr. de *d, l*-leucyl-glycine (0,24 millimol.) + 1 cm³ d'enzyme; p_H 7,8; scission après 1 h. à 40°: 25%. 1 cm³ de solution d'enzyme contient donc 1 DiE.

Méthodes analytiques. Les dosages de P total et de P min. ont été effectués d'après la méthode de S. Posternak⁵⁾.

Pour estimer l'action des peptidases, nous avons employé principalement la méthode de *van Slyke* et parfois, avec des résultats analogues, celle de *Willstaetter* et *Waldschmidt-Leitz*. Les deux méthodes nécessitent des corrections:

En effet, le glycocole et les peptides chez lesquels le glycocole porte le groupe amino libre, donnent, d'après la méthode de *van Slyke*, des teneurs trop fortes en azote aminé. Nous avons observé régulièrement les quantités suivantes d'amino-N en % de la théorie: glycocole 119; glycyl-phosphotyrosine 125; glycyl-phosphotyrosyl-glycine 111. En nous basant sur ces chiffres, nous avons donc corrigé les teneurs en N aminé observées.

D'autre part, l'acide phosphorique minéral titré à la phénol- ou à la thymol-phtaléine consomme, en solution dans l'alcool à 90%, davantage d'alcali (environ 10%) qu'en solution aqueuse, ce qui nécessite des corrections lors de l'emploi de la méthode titrimétrique.

Disposition des expériences. Les peptides phosphorylés étaient sous forme de solutions neutralisées (phénol-phtaléine) par la soude caustique. En voici les concentrations:

| | mgr. P par cm ³ | mgr. N par cm ³ |
|---|-------------------------------|-------------------------------|
| Phosphotyrosyl-glycine | 1,37 | 1,24 |
| Phosphotyrosyl-glycyl-glycine | 1,52 | 2,06 |
| Glycyl-phosphotyrosine | 1,37 | 1,24 |
| Glycyl-phosphotyrosyl-glycine | 1,77 | 2,39 |

¹⁾ Z. physiol. Ch. 237, 193 (1935).

²⁾ Th. Posternak et H. Pollaczek, Helv. 24, 927 (1941).

³⁾ Willstaetter et Grassmann, Z. physiol. Ch. 153, 250 (1926).

⁴⁾ Grassmann et Dickerhoff, Z. physiol. Ch. 179, 41 (1928).

⁵⁾ Bl. [4] 27, 507 et 564 (1920); Helv. 24, 1205 (1941).

Série I. 1) 8 cm³ de solution de peptide phosphorylé + 24 cm³ de solution de peptidase + 416 P.E.¹⁾ p_H = 7,8. 2) 8 cm³ d'eau + 24 cm³ de solution de peptidase + 416 P.E. p_H = 7,8.

Série II. Comme la série I, mais sans phosphatase.

On ajoute partout quelques gouttes de toluène. Température 36°. Le p_H se maintient assez constant pour qu'il soit inutile d'introduire des mélanges-tampons.

Les dosages de P minéral sont effectués dans 2 cm³ de liquide; ceux d'azote aminé (*van Slyke*) et les titrations d'après *Willstaetter* et *Waldschmidt-Leitz* dans 4 cm³.

Les chiffres des essais 2) sont soustraits des chiffres correspondants des essais 1).

Lausanne, Laboratoire de Chimie organique de l'Université.

165. Über die reduktive Spaltung von m-Phenylendiamin-Disazofarbstoffen zu Derivaten des Tetra-aminobenzols

(31. Mitteilung über Azoverbindungen und ihre Zwischenprodukte²⁾)

von Paul Ruggli † und Roland Fischer.

(11. IX. 45.)

Bei unserer Studie über die Struktur des Toluylenbrauns G³⁾ war zur Ergänzung noch eine Prüfung erwünscht, ob die Kupplungs-orte des m-Phenylendiamins (I) als gesichert betrachtet werden können. In diesem 1,3-Diamin kommen prinzipiell die Stellen 2, 4 und 6 als Kupplungs-orte in Betracht, wobei die letzteren beiden Stellen als bevorzugt gelten. Dass die 4-Stellung als erster Kupplungs-ort (II) unter allen Bedingungen feststeht, haben wir durch Einwirkung von einer Molekel Diazo-p-bromanilin bestätigt, wobei in mineralsaurer, essigsaurer und ätzalkalischer Lösung dieselbe Farbbase, nämlich p-Brom-chrysoidin und durch Acetylierung dasselbe Acetylderivat entstand.

Über die Kupplungs-orte des 1,3-Phenylendiamins bei Einwirkung von zwei Mol Diazokomponente gehen die Angaben auseinander⁴⁾. Im allgemeinen wird eine „symmetrische“ 4,6-Kupplung (V) angenommen; in einzelnen Fällen konnte aber auch die „unsymmetrische“ 4,2-Kupplung⁵⁾ (VI) belegt werden, wenn nämlich mit je einem Mol verschiedener Diazoverbindungen je nach der Reihenfolge der Ein-

¹⁾ P.E. = Phosphatase-Einheit, voir *Albers*, loc. cit. La phosphatase a été introduite sous forme de poudre.

²⁾ Letzte Mitteilung *Helv.* **28**, 850 (1945).

³⁾ *Helv.* **28**, 445 (1945).

⁴⁾ *H. E. Fierz-David*, Künstliche organische Farbstoffe (Berlin 1926) S. 103, 194; *Fierz-Blangey*, Grundlegende Operationen der Farbenchemie, 5. Auflage (Wien 1943) S. 271—273; *R. Möhlau* und *H. Th. Bucherer*, Farbenchemisches Praktikum, 3. Auflage (Berlin 1926) S. 134; *A. Brunner*, Analyse der Azofarbstoffe (Berlin 1929) S. 25, 26.

⁵⁾ Wir gebrauchen diese Reihenfolge der Zahlen, weil die 4-Stellung zuerst kuppelt.