

Anteile liess sich als vierter krist. Stoff (0,019 %) Digitalinum-verum-hexacetat (XXIII) isolieren.

Echujin erwies sich als Triglykosid der Formel I. Enzymatischer Abbau mit Strophanthobiase oder Enzym aus den Samen von *Adenium multiflorum* gab Somalin (V), während mit Glucosidase aus Hefe oder mit Takadiastase Echubiosid (III) entstand. Echujin wurde bei milder saurer Hydrolyse in Digitoxigenin (VII) und Strophanthotriose (IX) gespalten, die mit dem Zucker aus *k*-Strophanthosid identisch war. Acetolyse von Strophanthotriose-octacetat gab α -Gentiobiose-octacetat (XI). Aus den Drehungen von Echujin, Echubiosid, Somalin und Digitoxigenin lässt sich schliessen, dass sämtliche glykosidischen Bindungen im Echujin in der β -Form vorliegen.

Abobiosid gab bei Einwirkung von Enzym aus den Samen von *Adenium multiflorum* Abomonosid. Letzteres lieferte bei milder saurer Hydrolyse *D*-Cymarose und ein Gemisch von Abogenin und Anhydro-abogenin, deren Struktur noch nicht aufgeklärt wurde.

Organisch-chemische Anstalt der Universität Basel.

276. Dégradation des peptides neutres à partir de leur extrémité carboxylique

par R. A. Boissonnas.

(25 IX 52)

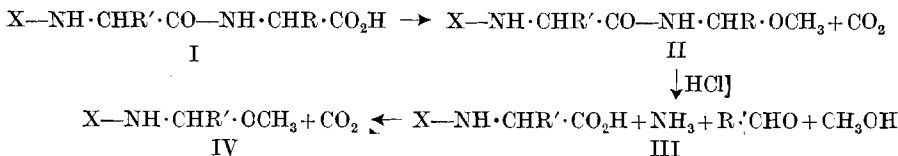
Plusieurs méthodes ont déjà été décrites pour la dégradation des peptides à partir de leur extrémité carboxylique¹). Cependant les différentes réactions chimiques nécessaires pour effectuer ces dégradations ne permettent pas de les appliquer facilement à la détermination de structure de faibles quantités des peptides.

*Linstead, Shephard & Weedon*²) ont publié récemment une étude sur la décarboxylation des dérivés *N*-acylés d'acides α -aminés en solution alcoolique par une oxydation anodique, qui fournit les alcoxyalcoylamides (acylaminoéthers) correspondants avec des rendements de 74—91 %. Nous avons utilisé cette oxydation anodique pour déterminer la séquence des acides aminés dans des peptides composés de restes d'acides aminés neutres.

¹) *M. Bergmann & L. Zervas*, J. Biol. Chem. **113**, 341 (1936); *F. Bettzieche & R. Menger*, Z. physiol. Chem. **161**, 37 (1926); *A. C. Chibnall & M. Rees*, Biochem. J. **3**, XLVII, (1951); *C. Fromageot et coll.*, Biochem. Biophys. Acta **6**, 283 (1950); *P. Schlack & W. Kumpf*, Z. physiol. Ch. **154**, 125 (1926); *J. Tibbs*, Nature **168**, 910 (1951); *H. G. Khorana*, Soc. **1952**, 2081; *S. G. Watson & J. Waley*, Soc. **1951**, 2394.

²) *R. P. Linstead, B. R. Shephard & B. C. L. Weedon*, Soc. **1951**, 2854.

Lorsque le dérivé N-acylé (N-carbobenzoxy) ou N-arylé (DNP) d'un peptide, I, est soumis à l'électrolyse en solution méthanolique on obtient la méthoxyalcoylamide II.



Le reste d'acide aminé de l'extrémité carboxylique a donc été décarboxylé et méthoxylé en α . Par hydrolyse du peptide ainsi oxydé, le reste d'acide aminé initial donne naissance à un aldéhyde. Sur un chromatogramme de cet hydrolysats le spot correspondant à l'acide aminé initial a donc disparu.

Cette oxydation pouvant être facilement effectuée sur de petites quantités de solution diluée, il est ainsi possible de déterminer l'acide aminé initial du peptide, en comparant les chromatogrammes d'hydrolysats faits avant et après l'oxydation anodique.

Si la méthoxyalcoylamide II est soumise à une hydrolyse ménagée par l'acide chlorhydrique, l'aldéhyde provenant du reste d'acide aminé initial est libéré immédiatement, et la fonction amide se transforme par hydrolyse en fonction carboxylique (III). Après éloignement de l'acide chlorhydrique et dissolution dans le méthanol, il est possible de procéder à une seconde oxydation anodique, transformant le second reste d'acide aminé du peptide initial et donnant une nouvelle méthoxyalcoylamide IV. Un chromatogramme de l'hydrolysats de celle-ci ne laissera plus apparaître le second acide aminé composant la chaîne peptidique.

Exemples d'oxydations anodiques et de dégradations sélectives.

Spots du chromatogramme de l'hydrolysats.

<i>CBO-phénylalaninyl-alanine</i>	phénylalanine + alanine
Après oxydation anodique	phénylalanine
Après hydrolyse ménagée et ox. anodique	—
<i>CBO-alanyl-phénylalanine</i>	alanine + phénylalanine
Après oxydation anodique	alanine
Après hydrolyse ménagée et ox.	—
<i>CBO-leucyl-phénylalaninyl-proline</i>	leucine + phénylalanine + proline
Après oxydation anodique	leucine + phénylalanine
Après hydrolyse ménagée et ox. anodique	leucine
<i>DNP-glycyl-leucine</i>	leucine
Après ox. anodique	—
<i>DNP-valyl-alanyl-phénylalanine</i>	alanine + phénylalanine
Après ox. anodique	alanine
Après hydrolyse ménagée et ox. anodique	—
<i>DNP-valyl-alanyl-phénylalaninyl-leucine</i>	alanine + phénylalanine + leucine
Après ox. anodique	alanine + phénylalanine
Après hydrolyse ménagée et ox. anodique	alanine

Comme cette oxydation anodique et cette dégradation par étapes peuvent être effectuées sur les dérivés DNP des peptides, on peut combiner la méthode de *Sanger*, pour la détermination de l'acide aminé de l'extrémité amino de la chaîne, avec cette nouvelle méthode pour la détermination du ou des premiers acides aminés de l'extrémité carboxylique.

Le tableau donne quelques exemples d'oxydations anodiques et de dégradations sélectives effectuées sur les dérivés carbobenzoxylés (CBO) ou dinitrophénylés (DNP) de di-, de tri- et de tetrapeptides.

Nous remercions vivement le *Fonds pour l'encouragement des recherches scientifiques* (Berne) ainsi que la *Rockefeller Foundation* (New-York) pour l'aide qu'ils nous ont accordée.

Partie expérimentale.

Oxydation anodique. Quelques mg du dérivé N-carbobenzoxylé ou N-dinitrophénylé du peptide à étudier sont dissous dans 1 à 2 cm³ de méthanol anhydre. La solution est placée dans une éprouvette courte, refroidie dans un bain de glace et munie de 2 électrodes en platine distantes de 3 à 5 mm, ayant chacune env. 1 cm² de surface. On fait passer un courant de 50 à 150 milliampères sous 200 à 600 volts pendant 1 à 3 h.

Hydrolyse et chromatographie. Des prises des solutions initiales et des solutions résultant des oxydations anodiques, contenant chacune env. 0,5 micromoles, sont évaporées à sec et chauffées 18 h. avec 0,5 cm³ d'acide chlorhydrique 20% en ampoules scellées au bain-marie. Après évaporation à sec, reprise par l'eau, évaporation à sec et reprise par 0,1 cm³ d'eau, les solutions sont chromatographiées sur papier en même temps que des solutions étalons de même concentration et de concentration 10 fois plus faible (le mélange alcool butylique secondaire-acide formique-eau 75—15—10 donne généralement de bonnes séparations même si des traces d'acide sont encore présentes). Les acides aminés oxydés n'apparaissent plus sur le chromatogramme après révélation à la ninhydrine.

Dégradation par étapes. La solution résultant de l'oxydation anodique est concentrée à sec, dissoute dans 1 à 2 cm³ d'acide chlorhydrique 20% et chauffée 15 min. à 100°. Une odeur d'aldéhyde caractéristique de l'acide aminé oxydé se dégage immédiatement. La solution est évaporée au vide, reprise par l'eau, évaporée, reprise par l'eau, évaporée, redissoute dans le méthanol anhydre et soumise à une nouvelle oxydation anodique.

SUMMARY.

A method has been described for the determination of the first and the second amino acids from the carboxylic extremity of neutral oligopeptides.

The CBO or DNP derivative of the peptide is anodically oxydized. A sample is hydrolysed and analysed by paper chromatography: the first amino acid does no more appear on the chromatogram.

The product of the first anodic oxydation is submitted to a limited hydrolysis, to a new anodic oxydation, and hydrolyzed: the second amino acid does no longer appear on a paper chromatogram.

Laboratoires de Chimie organique
de l'Université de Genève.