

Semicarbazone de l' ω -benzoyl-bornéol. La semicarbazone préparée au moyen d'acétate de semicarbazide, recristallisée dans l'alcool éthylique à 30% d'eau, F. 213-214°; $[\alpha]_D^{22} = -80,0^\circ$ (méthanol; $c = 1\%$). Spectre IR.: 1689 (FF); 1650 (m); 1577 (FF); 1479 (m); 1466-1453-1441 (crén., F); 1374 (F); 1333 (f); 1305 (mF); 1263 (m); 1205 (f); 1171 (f); 1144 (mF); 1101 (F avec sh 1124); 1078 (F); 1053 (f); 1026 (f); 1006 (f); 978 (f); 956 (f); 942 (f); 917-905 (crén., f); 846 (mf); 803 (f); 769 (F); 746 (m); 724 (mf); 695 (m avec sh 709).

$C_{18}H_{25}O_2N_3$ (315,40) Calc. C 68,54 H 7,99 N 13,32% Tr. C 68,63 H 8,17 N 13,30%

(-)- et (+)- α -pinène. La fraction de terpènes la plus légère a livré par chromatographie de vapeurs préparative 0,9 g de produit renfermant d'après la chromatographie analytique des vapeurs 75% d' α -pinène.

0,7 g de fraction ont été oxydés selon DELÉPINE¹⁴⁾ par 1,6 g de permanganate de potassium en présence de 3,5 g de sulfate d'ammonium dissous dans 16 ml d'eau glacée. Les acides résultant de l'oxydation (0,5 g), d'apparence huileuse, ont été traités par l'acétate de semicarbazide. Il a été obtenu 0,3 g de semicarbazones F. 204,5-205,5°; $[\alpha]_D^{19} = +23,26^\circ$ (lessive aqueuse à 5% d'hydroxyde de sodium; $c = 2\%$). Spectre IR.: 1706-1661 (crén., FF); 1577 (F); 1484-1458-1437 (crén., FF); 1362 (mF); 1295 (F); 1237 (m); 1207 (m); 1185 (mf); 1126 (m); 1096-1087 (crén., m); 1020 (f); 1002 (ff); 982 (f); 938 (m); 922 (m); 902 (f); 763 (m); 750 (m).

$C_{11}H_{19}O_3N_3$ (241,29) Calc. C 54,75 H 7,94 N 17,42% Tr. C 54,94 H 8,18 N 17,52%

SUMMARY

An authentic oil of lavender of french origin does not contain α -ocimene as previously announced by us, but contains β -ocimene and approximately 0,01% α -pinene and 0,02% camphene.

Laboratoires de Recherches de
L. GIVAUDAN & CIE S. A., Vernier-Genève

¹⁴⁾ M. DELÉPINE, Bull. Institut du Pin, août 1936, p. 181.

41. Etude de structures peptidiques à l'aide de phénylthiocyanate III¹⁾.

Sur la formation des phénylthiohydantoïnes-[³⁵S] et sur leur chromatographie sur papier

par Emile Cherbuliez, A. R. Sussmann et J. Rabinowitz

(23 XII 60)

Dans un précédent mémoire²⁾, nous avons montré les avantages que présente l'emploi de phénylthiocyanate-[³⁵S], au lieu du réactif non marqué, pour la détermination de la séquence des acides aminés de peptides selon EDMAN³⁾. En effet, la sensibilité de cette méthode qui consiste à dégrader le peptide par enlèvements successifs des restes d'acides aminés du côté N-terminal, s'en trouve augmentée considé-

¹⁾ 2e communication: Helv. 43, 1871 (1960).

²⁾ E. CHERBULIEZ, BR. BAEHLER, H. C. LEBEAU, A. R. SUSSMANN & J. RABINOWITZ, Helv. 43, 896 (1960).

³⁾ P. EDMAN, Acta chem. scand. 4, 283 (1950).

ablement puisque nous avons pu déterminer des séquences avec 0,005 micromoles de dipeptides et 0,01 de tripeptides à l'aide d'un réactif marqué, d'une activité de 10 à 15 mc/mmole.

Or, à côté des taches radioactives correspondant aux diverses phénylhydantoïnes, nous avons constaté sur les chromatogrammes sur papier des phénylthiohydantoïnes- ^{35}S (PTH) obtenues, des pics parasites. Nous nous sommes proposé de déterminer, sinon la nature des substances responsables de ce phénomène gênant, tout au moins les moyens de l'éviter.

Tableau I. Dégradation de peptides avec le phénylthiocyanate- ^{35}S ^{a)} en solution alcoolique

Peptide	Quantité		PTH des acides aminés N-terminaux						Age de la solution de réactif	Remarques
	μmole	γ	1er stade			2e stade				
			Rf _c ^{b)}	Rf _r ^{c)}	cpm	Rf _c	Rf _r	cpm		
Glycyl-proline	0,01	1,72		0,24	450		0,46	400	3 jours	Pic inconnu à Rf _r \approx 0,82 (200 cpm)
	0,005	0,86	0,23	0,23	150	0,45	0,46	140		
	0,005	0,86	0,25	0,23	\sim 80 ^{d)}	0,45	0,46	\sim 200	8 jours	d)
	0,005	0,86	0,28	0,27	\sim 140	0,51	0,53	\sim 200	18 jours	Pic inconnu à Rf _r \approx 0,85 (120 cpm)
Leucyl-glycine	0,01	1,88		tracé à 0,55*	100*		0,25	\sim 350	8 jours	* Traînée avec maximum à Rf _r \approx 0,84 (\sim 200 cpm)
	0,005	0,94	0,52	/ ^{d)}	/ ^{d)}	0,26	0,26	\sim 150		
Glycyl-phényl-alanine	0,01	2,22		0,26	180		/ ^{d)}	/ ^{d)}	18 jours	Pic inconnu à Rf _r \approx 0,83 (200 cpm)
	0,005	1,11	0,27	/ ^{d)}	/ ^{d)}	0,47	/ ^{d)}	/ ^{d)}		
Valyl-tyrosine	0,01	2,80		0,53	750		0,22	650	Solution fraîche	Pas de pic parasite
	0,005	1,40	0,53	0,53	350	0,23	0,23	200		

a) L'activité spécifique du réactif a passé de \sim 30 mc/mmole (1er stade du premier peptide mentionné) à \sim 23 mc/mmole (2e stade de l'avant-dernier peptide mentionné).
b) Rf_c = chimique (PTH de référence).
c) Rf_r = Rf des pics mesurés à l'aide de la radioactivité.
d) Pics non significatifs, le bruit de fond atteignant 60–80 cpm.

Lorsque le phénylthiocyanate- ^{35}S a été employé en solution dans la pyridine ou dans l'alcool absolu, nous avons toujours observé ces taches parasites, à Rf 0,82 à 0,85 (voir tableau I), taches dont l'intensité augmentait avec le vieillissement de la solution du réactif. En fait, au bout d'un mois de conservation, la solution alcoolique du réactif n'est plus utilisable. Les essais de conservation du réactif dans le dioxanne ont donné des résultats décevants également. En effectuant des essais à blanc, c'est-à-dire en absence de peptide, nous avons retrouvé ces mêmes taches parasites; il s'agit donc évidemment de produits de décomposition du phénylthiocyanate- ^{35}S .

Tableau II

Dégradation de peptides avec le phénylthiocyanate- ^{35}S ^{a)} en solution dans le *N,N*-diméthylformamide

Peptide	Quantité		PTH des acides aminés N-terminaux									Age de la solution de réactif
	μmole	γ	1er stade			2e stade			3e stade			
			Rf _c ^{b)}	Rf _r ^{c)}	cpm	Rf _c	Rf _r	cpm	Rf _c	Rf _r	cpm	
Glycyl-proline	0,01	1,72	0,25	0,25	950	0,47	0,48	1000	—	—	—	frais (0 jour)
	0,005	0,86		0,26	500		0,48	600	—	—	—	
Prolyl-leucyl-glycine	0,01	2,85	0,52	0,52	1100	0,60	0,60	350	0,29	0,30	400	5 jours
	0,005	1,43		0,52	600		0,60	200		0,29	200	
	0,01	2,85	0,49	0,50	1300	0,61	0,61	400	0,30	0,30	300	15 jours
	0,005	1,43		0,51	700		0,61	180		0,31	200	
Valyl-tyrosine	0,01	2,80	0,54	0,55	900	0,22	0,22	1200	—	—	—	11 jours
	0,005	1,40		0,54	600		0,22	600	—	—	—	
Prolyl-tyrosyl-(N ^ε -tosyl)-lysine	0,01	5,60	0,50	0,50	1300	0,23	0,22	800	0,24	0,24	500	25 jours
	0,005	2,80		0,50	750		0,23	500		0,24	300	
Prolyl-(N ^ε -tosyl)-lysyl-ac. aspart.	0,01	5,12	0,49	0,49	1200	0,22	0,22	1000	0,08	0,10	650	41 jours
	0,005	2,56		0,49	750		0,22	650		0,10	400	
Leucyl-leucyl-leucyl-phénylalanine	0,01	6,00	0,55	0,56	550	0,55	0,56	500	0,56	0,56	400	3 mois
	0,005	3,00		0,55	300		0,56	300		0,55	250	
	0,01		0,38	0,38	350	0,43	0,42	300				
	0,005			0,38	220		0,42	200				
Glycyl-phénylalanine	0,01	2,22	0,25	0,25	450	0,42	0,42	400				5 mois

^{a)} L'activité spécifique du réactif a passé de ~ 20 mc/mmole (1er stade du premier peptide mentionné) à ~ 8,5 mc/mmole (dernier stade du dernier peptide mentionné).
^{b)} Rf_c = Rf chimique (PTH de référence).
^{c)} Rf_r = Rf des pics mesurés à l'aide de la radioactivité (bruit de fond ~ 80 cpm).

Comme ce phénomène est plus marqué avec la pyridine comme solvant qu'avec l'alcool, il ne saurait être dû uniquement à la formation de thio-uréthanes par addition de l'alcool au réactif. De plus, le niveau radioactif des phénylhydantoïnes obtenues successivement, toujours dans les mêmes conditions, diminue beaucoup plus rapidement avec le temps que ne l'expliquerait le simple vieillissement du réactif (période du ^{35}S : 87,1 jours): le réactif doit donc subir une altération chimique.

Nous avons finalement trouvé dans le N, N-diméthylformamide un solvant dans lequel le phénylthiocyanate- ^{35}S se conserve très bien et ne subit aucune altération chimique même au bout de plusieurs mois: les chromatogrammes des phénylthiohydantoïnes- ^{35}S ainsi obtenues ne présentent plus de taches parasites. Comme le montre le tableau II, avec une solution diméthylformamidique d'un réactif titrant initialement 40 mc/mmole, nous avons pu dégrader avec de bons résultats plusieurs di- et tri-peptides ainsi qu'un pentapeptide, avec des quantités de 0,005 et de 0,01 micromole au départ.

Soulignons en outre que malgré l'abaissement du niveau radioactif à chaque étape de la dégradation d'un peptide, aucune trace de la phénylthiohydantoïne du stade précédent n'est perceptible dans le chromatogramme du stade suivant. Ceci semble indiquer que, si la thiocarbamylation du peptide se fait quantitativement, la cyclisation subséquente, avec scission, en phénylthiohydantoïne du reste d'acide aminé détaché et en peptide raccourci ne se fait pas toujours avec un bon rendement; mais comme l'intensité radioactive de la tache de départ ($R_f = 0$) augmente à mesure du progrès de la dégradation du peptide, on peut penser que si les produits échappant à la cyclisation-scission sont extraits en même temps que la phénylthiohydantoïne- ^{35}S formée, ils ne migrent pas lors de la chromatographie sur papier de la phénylthiohydantoïne. Cette interprétation n'est pas encore tout à fait certaine, mais le fait empirique reste que les produits échappant à la cyclisation-scission ne gênent aucunement la suite des opérations jusqu'à la dégradation totale du peptide.

Données expérimentales. — *Le matériel utilisé* resp. pour la dégradation du peptide et pour la lecture des chromatogrammes radioactifs et l'enregistrement a déjà été décrit²⁾. Il n'a subi que la petite modification suivante: le mélange des deux phases liquides dans le microtube peut se faire avantageusement par un dispositif de vibro-agitation (50 pér./s) au lieu de l'agitation par un fil de platine animé d'un mouvement de rotation rapide par un moteur électrique.

Le mode opératoire est celui décrit précédemment²⁾ sauf qu'on utilise une solution du phénylthiocyanate- ^{35}S dans le N, N-diméthylformamide.

Peptides étudiés: voir tableau II.

Les chiffres des R_f (chimiques et radioactifs) obtenus pour le même reste d'acide-amino dans les divers peptides montrent la nécessité de l'emploi systématique de substance de référence. Pour la phénylthiohydantoïne de la phénylalanine p. ex. les R_f obtenus dans les cas de la glycylophénylalanine (2e stade resp. de l'avant-dernier peptide du tabl. I et du dernier peptide du tabl. II) et de la trileucyl-phénylalaninyl-proline (tabl. II, avant-dernier stade du 4e peptide) varient de 0,38 à 0,47 et recouvrent p. ex. les R_f trouvés dans plusieurs cas pour le dérivé de la proline (0,43 dans le cas du pentapeptide). Avec des substances de référence, nous n'avons pas rencontré de difficultés d'interprétation: v. p. ex. le pentapeptide (tabl. II, avant-dernier peptide) où les R_f des dérivés resp. de la proline (0,43) et de la phénylalanine (0,38) sont suffisamment distincts pour permettre une identification certaine de ces deux acides-amino.

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. Ils remercient également M. le professeur R. SCHWYZER (CIBA SOCIÉTÉ ANONYME) à la grande amabilité duquel ils doivent toute une série de peptides synthétiques, et notamment le pentapeptide mentionné dans ce travail.

SUMMARY

By the analysis of di-, tri-peptides and a pentapeptide of known constitution the authors show that using an N, N-dimethylformamide solution of [^{35}S]-phenylisothiocyanate with a specific activity of 10 to 40 mc/mmole the sequence of amino acids can be determined starting with 0,005 micromole of peptide.

For each peptide none of the consecutive chromatograms was contaminated with the spot of the [^{35}S]-phenylhydantoine corresponding to the preceding step; all the radioactive spots due to migrating substances were significant and did correspond to the expected [^{35}S]-phenylthiohydantoines.

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

Errata

Helv. 43, 1578 (1960), Abh. Nr. 193 von B. FECHTIG, J. v. EUW, O. SCHINDLER & T. REICHSTEIN, bei Fig. 9 soll es heissen: Cy-Be-Thf-(3:2:1), anstatt: Be-Thf-(2:1).

Helv. 43, 1900 (1960), Abh. Nr. 232 von H. HOPFF & M. CAPAUL, erste Gleichung, lies: $\Delta H = 8,088 \text{ kcal} \cdot \text{Mol}^{-1}$, anstatt: $0,088 \text{ kcal} \cdot \text{Mol}^{-1}$; *ibid.*, 2^{te} Gleichung, lies: $d_4^1 = 1,139 - 0,00129 \cdot t$, anstatt: $0,0012 \text{ g} \cdot t$.

Helv. 43, 217 (1960), Abhandlung No. 269 von P. SCHINDLER & A. B. GARRETT, Zeile 12, lies: $\log * \beta_{33} = -8,66$, anstatt: $-9,66$. Ferner sollte durchwegs stehen: $\log * K_{s0} = 6,86$, $\log * K_{s33} = 11,67$, anstatt: $-6,86$ und $-11,67$.

Helv. 44, 78 (1961), Abhandlung Nr. 9 von E. JENNY & F. LEUTHARDT, 1. Zeile des Titels, lies: Glykokoll-[$2\text{-}^{14}\text{C}$], anstatt: Glykokoll-[2^{14}C].
