

SUMMARY

Lactam formation from glutamic acid diesters is subject to catalysis by carboxylic acids in general and to base catalysis in alcohols. Kinetic measurements prove that catalysis by carboxylic acids is based on a push-pull mechanism provoked by the undissociated acid molecule and that the base catalysed reaction is due to the alcoholate anion and is therefore absent in aprotic solvents. Carboxylic acids exhibit catalysis as well as – at higher concentration – inhibition.

The effects are analysed and a self-consistent picture of the mechanism is presented. For the acids, the catalyst concentration of maximum activity depends on their strength, on the basicity of the substrate and on the solvent.

Union Carbide European Research Associates
95, rue Gatti de Gamond, Bruxelles 18

160. Etude de structures peptidiques à l'aide de phénylthiocyanate IV¹)
Note sur la préparation et la purification des phénylthiohydantoïnes
dérivées de divers acides aminés

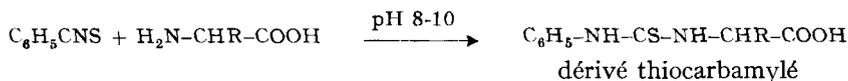
par **Emile Cherbuliez, J. Marszalek et J. Rabinowitz**

(18. IV. 63)

Une des méthodes de détermination de la séquence des acides aminés d'une molécule peptidique consiste à la mettre en réaction avec l'isothiocyanate de phényle selon EDMAN²)³), ce qui permet de détacher à chaque cycle d'opérations l'acide aminé N-terminal sous forme d'une phénylthiohydantoïne substituée, que l'on identifie facilement à l'échelle micro par chromatographie⁴) (soit sur papier⁵), soit sur couche mince de silice⁶)), surtout si on dispose de substances de référence.

Toutes les phénylthiohydantoïnes dérivées d'acides α -aminés décrites dans la littérature ont été préparées précisément selon la méthode d'EDMAN²)³), applicable aussi aux acides aminés eux-mêmes; elle comporte les deux étapes suivantes qu'on peut parcourir sans isoler le produit intermédiaire:

1) thiocarbamylation:



¹) IIIe Communication: *Helv.* 44, 319 (1961).

²) G. EDMAN, *Acta chem. scand.* 4, 283 (1950).

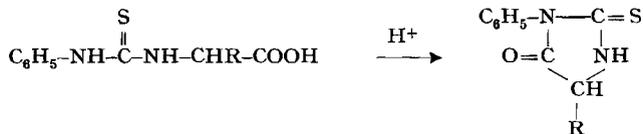
³) *Methods of biochemical analysis*, Vol. 2, 391.

⁴) Voir p. ex. E. CHERBULIEZ, BR. BAEHLER, M. C. LEBEAU, A. R. SUSSMANN & J. RABINOWITZ, *Helv.* 43, 896 (1960).

⁵) J. SJÖQUIST, *Acta chem. scand.* 7, 447 (1953).

⁶) Voir E. CHERBULIEZ, BR. BAEHLER & J. RABINOWITZ, *Helv.* 43, 1871 (1960).

2) cyclisation en phénylthiohydantoïnes 5-substituées (PTH)



Cette méthode est tout à fait générale, mais il est nécessaire de faire varier ou de modérer les conditions de réaction dans le cas de certains acides aminés sensibles, notamment ceux qui possèdent un groupement $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$ ou $-\text{SS}-$.

Pour diminuer sensiblement la quantité de peptide nécessaire à cette dégradation par étape, nous avons utilisé un réactif radioactif¹⁾⁴⁾: le phénylisothiocyanate- ^{35}S . La phénylthiohydantoïne- ^{35}S de l'acide aminé ainsi détaché est révélée, après chromatographie, par la mesure de sa radioactivité, et afin d'éviter des erreurs d'interprétation dues aux variations possibles du Rf d'une chromatographie à l'autre, nous chromatographions simultanément, sur la même feuille ou la même plaque, des phénylthiohydantoïnes d'acides aminés connus (références) en des quantités permettant leur révélation chimique. Ces phénylthiohydantoïnes d'acides aminés (références) doivent être très pures de manière à ne donner qu'une seule tache à la chromatographie.

Préparation de quelques phénylthiohydantoïnes (PTH) dérivées d'acides aminés

Acide aminé de départ	Quantité utilisée en mmoles	Rendement en PTH pure %	Points de fusion des PTH		
			Littérature ⁵⁾ (produits recristallisés à partir d'acides aminés DL) °C	Trouvé après deux recristallisations °C	Trouvé après sublimation °C
L-Alanine	50	77	185	180-181	184
L-Isoleucine	50	78	173-175	176	177-178
L-Leucine	50	70	176-179	177	180-181
L-Méthionine	50	92	132	127	129-132
L-Phénylalanine	50	80	187	184	185
L-Proline	50	65	179	176-177	178-179
L-Tyrosine	50	83	216	216	216
L-Valine	50	86	206-208	167	207-208
L-Sérine	50	81*	176-178 ⁶⁾	162	non sublimable
DL-Thréonine	10	54	194 (212)		194
Glycine	10	61	245-248		240-242
DL-Acide aspartique	10	85	229	225-227	non sublimable
DL-Asparagine	10	49	234	231-233	non sublimable
DL-Acide glutamique	10	69	166-167	165-167	non sublimable
DL-Lysine	10	60	162-164	163-165	non sublimable
DL-Histidine	10	60	200-206	195-198	non sublimable

* Rendement calculé après 1 recristallisation. Après plusieurs recristallisations le rendement tombe à 46%.

C'est en raison de l'intérêt pratique que présente dès lors l'obtention des phénylthiohydantoïnes pures que nous avons mis au point, pour des quantités de l'ordre de quelques centimoles, l'exécution du procédé d'EDMAN ainsi que les variantes proposées dans le cas de la sérine⁷⁾ 8).

On obtient les PTH chromatographiquement pures, soit par recristallisations répétées, soit plus simplement par sublimation.

En effet, les PTH sont sublimables pour la plupart. Font exception celles dont le reste R provenant de l'acide aminé contient encore un groupe fonctionnel tel que $-\text{OH}$, $-\text{COOH}$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{NH}_2$, imidazole; c'est-à-dire celles provenant d'acides aminés tels que la sérine, les acides aspartique et glutamique, l'asparagine, la lysine et l'histidine (voir tableau).

Mode opératoire. – a) *Procédé général:* Dans un ballon muni d'un agitateur, d'un réfrigérant à reflux et d'un barboteur, on introduit 100 ml d'eau, 100 ml de dioxanne et 0,060 mole de phénylisothiocyanate. Dans ce mélange, on dissout sous bonne agitation 0,05 mole d'acide aminé et 0,05 mole de Na_2CO_3 . Sous barbotage d'azote, on porte la température du mélange à 40° et continue l'agitation pendant 4 h à cette température. Après refroidissement, on élimine l'excès de phénylisothiocyanate en l'extrayant par 3 fois 100 ml de benzène et 3 fois 100 ml de cyclohexane. Pour éliminer complètement les hydrocarbures, on fait passer un fort courant d'azote. La solution aqueuse du sel du dérivé thiocarbamylé, est acidifiée petit à petit par HCl conc. (env. 28 ml) jusqu'à obtention d'une solution env. 1N en HCl. On chauffe à nouveau sous azote et sous agitation 4 h à 40° . La phénylthiohydantoïne formée précipite en général d'une façon quantitative, mais dans certains cas (isoleucine, leucine, phénylalanine) il convient de concentrer la solution à froid sous vide afin d'obtenir une deuxième précipitation de produit.

Le précipité de phénylthiohydantoïne ainsi obtenu est filtré et purifié soit par plusieurs cristallisations dans l'alcool (dans l'acide acétique dilué dans le cas de la méthionine), soit par sublimation ($170\text{--}190^\circ/10$ Torr).

b) Dans le cas de la tyrosine, nous avons introduit une mole de NaOH (ou KOH) par mole de tyrosine (en plus du Na_2CO_3) et cela afin de faciliter sa dissolution, les autres opérations étant identiques à celles que nous venons de décrire.

c) Dans le cas de la sérine (dans les conditions décrites plus haut, on obtient un produit très impur avec un très mauvais rendement), on dissout 0,05 mole dans une solution de 0,06 mole de phénylisothiocyanate et de 0,0625 mole de KOH dans 250 ml d'alcool absolu. On agite cette solution 10 h à 0° sous azote et l'abandonne une nuit à $0\text{--}5^\circ$.

Cette solution ramenée à température ambiante est additionnée de 50 ml d'eau. On effectue alors les extractions (indiquées plus haut) au benzène et au cyclohexane afin d'éliminer l'excès de phénylisothiocyanate. La phase aqueuse est concentrée sous vide à 250 ml. On y ajoute 110 ml de HCl conc. et agite le tout, dans une atmosphère d'azote, 10 h à 0° ; ensuite, on abandonne ce mélange 1 nuit à $0\text{--}5^\circ$. La PTH-sérine précipite partiellement; on la filtre et extrait la PTH encore en solution par de l'éther (par concentration directe, sous vide, de cette solution, il précipite un produit jaune très difficile à purifier) et élimine l'éther sous vide à froid. Les précipités de PTH-sérine réunis sont recristallisés plusieurs fois dans l'alcool.

Les acides aminés traités, les rendements ainsi que les F. des PTH obtenues figurent dans le tableau.

Tous les produits ainsi obtenus donnent une seule tache à la chromatographie sur papier ou sur couche mince de silice.

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.

⁷⁾ V. M. INGRAM, J. chem. Soc. 1953, 3717.

⁸⁾ A. LEVY, Biochim. biophysica Acta 17, 454 (1955).

SUMMARY

The authors describe modified procedures for the synthesis of phenylthiohydantoins derived from α -amino acids, applied to 16 amino acids. With the exception of the phenylthiohydantoins containing a free $-\text{NH}_2$, $-\text{CONH}_2$, $-\text{COOH}$ or heterocyclic group belonging to the starting amino acid, they can be purified by sublimation. The yield of chromatographically pure product vary between 54% (threonine) and 92% (tyrosin); with asparagine, the yield did not exceed 49%.

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

161. Recherches sur la formation et la transformation des esters XLII¹⁾ Sur la phosphorylation de différents types d'alcools, et particulièrement d'alcools non saturés

par Emile Cherbuliez, St. Čolak-Antić, M. Schwarz et J. Rabinowitz

(18 V 63)

Tout en étant fort utile, l'action phosphorylante des acides polyphosphoriques connaît des limites. D'abord, elle ne s'exerce pas vis-à-vis d'amines – ce qui permet précisément de phosphoryler sélectivement la fonction OH d'un aminoalcool²⁾. Ensuite, son application est souvent gênée par l'action déshydratante, condensante ou résinifiante, propre à l'acide orthophosphorique formé en cours de réaction ainsi qu'aux acides polyphosphoriques eux-mêmes. C'est ainsi que, p.ex., les alcools tertiaires (sauf certaines exceptions³⁾) sont déshydratés, les alcools terpéniques⁴⁾ et éthéniques sont soit cyclisés, soit déshydratés, soit polymérisés, etc.

Dans l'espoir de pallier ces inconvénients, nous avons étudié le comportement, en présence de bases, soit des acides polyphosphoriques, soit de l'anhydride phosphorique. Effectivement, le traitement par P_4O_{10} en présence de bases s'est révélé utile, notamment pour la phosphorylation des alcools éthéniques. En outre, il apporte des données qui seront intéressantes pour l'étude ultérieure du mécanisme de ces réactions de phosphorylation.

I. *Comportement de l'anhydride phosphorique en présence de bases organiques*⁵⁾. L'anhydride phosphorique commercial est constitué en majeure partie par le dimère P_4O_{10} , et c'est la structure I de ce dernier que nous envisagerons seule ici.

Lorsqu'on fait réagir l'anhydride phosphorique avec un excès d'alcool (à des températures inférieures à 120° afin d'éviter les interactions des divers esters formés),

1) XLI⁶ Communication: *Helv.* 45, 2669 (1962).

2) Voir p. ex.: E. CHERBULIEZ & J. RABINOWITZ, *Helv.* 39, 1844 (1956).

3) E. CHERBULIEZ, CL. GANDILLON, A. DE PICCIOTTO & J. RABINOWITZ, *Helv.* 42, 2277 (1959).

4) E. CHERBULIEZ, G. WEBER, A. YAZGI & J. RABINOWITZ, *Helv.* 45, 2652 (1962).

5) Voir MEIJER SCHWARZ, Thèse n° 1136, Faculté des Sciences de l'Université de Genève, 1950.