

composed of olefin + $H^+ \cdot OH_2$ or olefin + $D^+ \cdot OD_2$. Tunneling corrections are calculated with the aid of BELL's formula. A semiempirical value is used for Q_{D_2O}/Q_{H_2O} . It is shown that for the four center transition state the isotope effect k_H/k_D may be in the order of 1.1–1.6.

Neubrückestrasse 92, Bern und Universität Bern

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Vorläufige Mitteilung: A. V. WILLI, Z. Naturforsch. 16a, 838 (1961).
- [2] J. B. LEVY, R. W. TAFT & L. P. HAMMETT, J. Amer. chem. Soc. 75, 1253 (1953).
- [3] E. L. PURLEE & R. W. TAFT, J. Amer. chem. Soc. 78, 5807 (1956).
- [4] A. V. WILLI, Z. Naturforsch. 16a, 162 (1961).
- [5] A. V. WILLI, Säurekatalytische Reaktionen der organischen Chemie – Kinetik und Mechanismen. Verlag Friedr. Vieweg & Sohn, Braunschweig (im Druck).
- [6] J. MANASSEN & F. S. KLEIN, J. chem. Soc. 1960, 4203.
- [7] A. V. WILLI, Helv. 47, 647 (1964).
- [8] A. V. WILLI, Z. Naturforsch. (im Druck).
- [9] S. GLASSTONE, K. J. LAIDLER & H. EYRING, The Theory of Rate Processes, McGraw-Hill Book Company, New York 1941.
- [10] R. P. BELL, The Proton in Chemistry, Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 1959, S. 205–210. Trans. Faraday Soc. 55, 1 (1959).
- [11] H. S. JOHNSTON, Science 728, 1145 (1958); T. E. SHARP & H. S. JOHNSTON, J. chem. Physics 37, 1541 (1962).
- [12] J. BIGELEISEN & M. WOLFSBERG, J. chem. Physics 21, 1972 (1953).
- [13] C. G. SWAIN & R. F. W. BADER, Tetrahedron 10, 182 (1960). C. G. SWAIN, R.F.W. BADER & E. R. THORNTON, Tetrahedron 10, 200 (1960).
- [14] Siehe hierzu: R. W. TAFT, J. B. LEVY, D. AARON & L. P. HAMMETT, J. Amer. chem. Soc. 74, 4735 (1952).
- [15] P. RIESZ, R. W. TAFT & R. H. BOYD, J. Amer. chem. Soc. 79, 3724 (1957).

74. Sur la saramycétine (= X-5079 C), polypeptide antibiotique de *Streptomyces saraceticus*

I. Premières données concernant sa structure

par P. Baudet et E. Cherbuliez

Dédié au Professeur D. MONNIER pour son 60^e anniversaire

(9 I 64)

BERGER et coll. [1]¹⁾ ont annoncé en 1961 l'isolement d'un nouvel antibiotique X-5079C (ou Ro 2-7758) extrait du mycelium de *Streptomyces saraceticus* nov. sp. (NRRL 2831) [1], dont l'action inhibitrice *in vitro* sur la croissance de *Paecilomyces varioti* et *in vivo* contre le développement de *Histoplasma capsulatum* [2] est remarquable. Nous utiliserons le nom de saramycétine pour cet antibiotique²⁾.

Son hydrolyse chlorhydrique libère des acides aminés connus: ac. aspartique, glycine, proline, thréonine et cystine, et en plus, des constituants inconnus parmi lesquels encore des acides aminés. A priori on serait donc tenté de considérer la

¹⁾ Les chiffres entre crochets renvoient à la bibliographie, p. 683.

saramycétine comme un polypeptide; la trypsine, la papaïne et la TAKAMINE-protéase ne la dégradent pourtant pas²⁾.

Nous apportons ici quelques données nouvelles concernant cet antibiotique.

Tableau I. *Caractéristiques analytiques de la saramycétine*

$[\alpha]_{20}^D = -28,4^\circ \pm 0,2^\circ$ ($c = 2$, H_2O , $l = 1$ dm)	
$[\alpha]_{20}^D = -32,0^\circ \pm 0,2^\circ$ ($c = 2$, urée 8M, $l = 1$ dm)	
F.:	décomposition dès 220°
Poids moléculaire ³⁾ :	14000 \pm 2000
Constante de Svedberg ³⁾ :	$2,3 \cdot 10^{-23} \pm 0,2 \cdot 10^{-3}$
Constante de diffusion ³⁾ :	$10 \cdot 10^{-7} \pm 2 \cdot 10^{-7}$ cm ² · s ⁻¹
Volume spécifique partiel ³⁾ :	0,60 \pm 0,05
Coefficients d'extinction (dans l'eau):	$E_{227,5}^{1\%} = 440$; $E_{270}^{1\%} = 275$; $E_{305}^{1\%} = 205$
Spectre UV., voir fig. 1	
Spectre IR. (pastille de KBr) (cm ⁻¹):	3320, 1689, 1668, 1610, 1506, 1280, 1170, 1036
Mobilité électrophorétique à pH 6,5: (mobilité de l'acide aspartique \equiv 1)	0,12
Activité biologique ⁴⁾ :	240 unités <i>Paecilomyces varioti</i> par mg
Analyses élémentaires ⁵⁾ :	C 41,75%; H 5,06%; N 14,54%; S 12,78%; Na 1,58%
Acides aminés ⁶⁾ :	ac. aspartique 8,50 restes glycine 8,18 restes thréonine 7,30 restes proline 8,33 restes cystine 23,09 restes
Solubilités à 25°:	dans l'éthanol absolu 0,39% dans l'eau à pH 3,72 1,22% à pH 3,60 1,08% à pH 2,90 0,40% dans l'acide acétique 0,1N (pH = 3,62) 10,9 % précipité par CCl ₃ COOH
<i>Réactions colorées:</i>	
ninhydrine	négative
naphtoquinone-1,2-sulfonate-4 [4]	négative
amido-schwarz [5]	négative
bromo-phénol [6]	négative
biuret [7]	positive
chloration [3]	positive
ac. iodoplattinique [7]	positive
nitroprussiate de Na/KCN	négative
dinitro-2,4-phénylhydrazine [9]	négative
hydroxamate ferrique [10]	positive
chlorure de benzoyle [11]	négative

²⁾ Communications personnelles; nom proposé par la Maison F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, Bâle.

³⁾ Ces déterminations ont été faites par le Dr K. H. BERNEIS du département de physico-chimie (direction: Dr M. KOFLER) de F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE à Bâle. Nous lui adressons nos vifs remerciements.

⁴⁾ Déterminé par le département de chimiothérapie, HOFFMANN-LA ROCHE, Nutley, New Jersey.

⁵⁾ La saramycétine est séchée 4 h à 78°, sous $5 \cdot 10^{-2}$ Torr. Les analyses élémentaires ont été faites par le Dr A. DIRSCHERL au Laboratoire de micro-analyse de F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, à Bâle.

⁶⁾ Analyses effectuées par les soins des FOOD AND DRUG RESEARCH LABORATORIES, Maurice Avenue 58th Street Maspeth 78, New York.

1) *Généralités*. La saramycétine (v. tableau I) se présente comme une poudre blanche, amorphe, riche en soufre (S 12,8%) et contenant du sodium (Na 1,6%), sans point de fusion, très soluble dans l'eau, sauf aux pH inférieurs à 4. Son caractère d'acide est mis en évidence par sa très grande solubilité en milieu alcalin et par sa migration anodique en électrophorèse à pH 6,5. Elle ne réagit pas avec les réactifs des amines primaires ou secondaires comme le naphthoquinone-1,2-sulfonate-4 de sodium, le fluoro-2,4-dinitrobenzène ou la ninhydrine. Traité par HCl 0,1N en excès, la saramycétine telle qu'elle a été obtenue par BERGER et coll. [1] neutralise une certaine quantité de HCl, mais seulement en une quantité correspondant à la teneur en sodium de l'antibiotique. La saramycétine ne possède donc pas non plus de fonction amino tertiaire. Par ailleurs, la saramycétine donne la réaction du biuret, mais la coloration est faible et de nuance non usuelle. Le groupe NH de la liaison peptidique est aussi mis en évidence par la réaction au chlore [3]. Voilà pourquoi nous considérons la saramycétine comme un polypeptide.

Il se comporte comme une substance homogène à l'ultracentrifugation qui fixe le poids moléculaire de l'antibiotique à environ 14000. La vitesse de dialyse du polypeptide est donc très petite. Cependant, lorsqu'on prolonge le temps de dialyse, on trouve une certaine quantité de produit dans le dialysat. Mais ce qui a traversé la membrane est constitué par des fragments de la molécule primitive, résultant d'une dégradation qu'elle subit à la longue au cours de la dialyse. Cette dégradation s'accompagne de la perte de l'activité biologique.

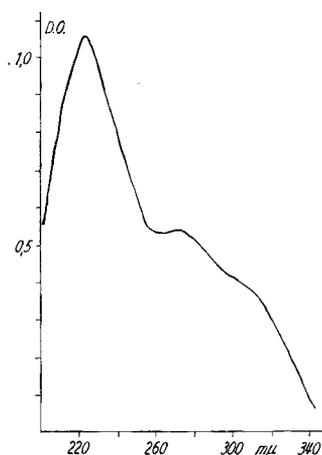


Fig. 1. Spectre ultra-violet de la saramycétine (concentration 0,002%, pH 6,8)

Après l'hydrolyse chlorhydrique (HCl 6N, 105°, 18 h) de la saramycétine, une partie importante du soufre se trouve sous forme de cystine, qui cristallise de la fraction neutre de l'hydrolysate. On pouvait donc supposer que le polypeptide possédait de nombreuses liaisons disulfure. L'oxydation de la saramycétine par l'acide performique devrait alors dégrader l'antibiotique par rupture oxydative de ces liaisons -S-S-. En effet, le polypeptide ainsi traité fournit un mélange dont les composants

7) Communication personnelle de M. J. C. JATON et du Prof. ISLIKER, Laboratoire de chimie biologique de l'Université de Lausanne.

ont à l'ultracentrifugation des vitesses de sédimentation très voisines. Cependant, l'existence de liaisons disulfure ou de fonctions thiol n'est confirmée ni par le titrage au chloromercuri-benzoate de sodium [12] avant ou après traitement réducteur approprié, ni par titrage ampérométrique⁷⁾. La saramycétine ne réagit pas non plus au nitroprussiate de sodium en présence de cyanure de potassium. Le nickel RANEY (de haute activité) ne provoque qu'une désulfuration très incomplète, puisqu'on retrouve encore beaucoup de cystine dans l'hydrolysats chlorhydrique du produit désulfuré. Après action réductrice de l'acide thioglycolique sur la saramycétine, suivie d'un traitement alcoylant par l'acide iodacétique, l'hydrolysats chlorhydrique ne fournit pas de S-carboxyméthyl-cystéine. Ces observations signifient que la saramycétine ne contient pas de cystine ou de cystéine préformées. La cystine présente dans l'hydrolysats doit donc provenir d'une transformation plus compliquée qu'une hydrolyse de liaisons peptidiques. Dès lors, nous avons supposé l'existence, dans cet antibiotique, de cycles thiazolidiniques substitués en 2, dont on sait qu'ils fournissent de la cystéine (oxydée ultérieurement en cystine) à l'hydrolyse acide. En fait, après hydrolyse chlorhydrique énergique (6N, 105°, 18 h) ou plus ménagée (HCl, 12N, 37°, 24 h) de la saramycétine, nous avons trouvé dans les produits de réaction, des fractions qui tout en ne possédant aucune des réactions sus-mentionnées de la cystine ou de la cystéine, fournissent de la cystine durant une nouvelle hydrolyse chlorhydrique à 105°. La plupart de ces constituants cystinogènes peuvent être isolés des hydrolysats chlorhydriques par électrophorèse sur papier à pH 6,5. Nous présentons dans le tableau II quelques-unes de leurs propriétés. La saramycétine est attaquée en milieu tamponné (par ex. à pH 4,5 ou à pH 6) par des sels de Hg^{2+} (acétate ou chlorure) pour donner un précipité, qui se forme en quelques minutes et augmente avec l'élévation de la température. Or, on sait que les thiazolidines sont facilement scindées par Hg^{2+} , en milieux aqueux, pour donner des mercaptides insolubles (les hydrolysats chlorhydriques de la saramycétine donnent des précipités immédiats avec Hg^{2+} ; la cystine ne réagit pas dans ces conditions). L'hydrolyse d'une thiazolidine substituée en 2 implique la formation d'un aldéhyde; effectivement, la liqueur d'hydrolyse contient des composés qui forment des dinitro-2,4-phénylhydrazones cristallisées. En effet, après trempage des chromatophérogrammes dans KOH alcoolique, les produits des taches 6 et 10 réduisent le nitrate d'argent préalablement dispersé sur le papier. Par ailleurs, la substance 6 (isolée des hydrolysats chlorhydriques par électrophorèse sur papier à pH 2 et purifiée par chromatographie sur papier suivie d'une nouvelle électrophorèse à pH 2) montre la bande caractéristique du carbonyle des aldéhydes saturés à 1730 cm^{-1} . Il s'agit très certainement d'aldéhydes qui ont pris naissance au cours des hydrolyses chlorhydriques de la saramycétine.

Toutes ces constatations sont en accord avec l'hypothèse de la présence de groupements thiazolidine dans la saramycétine.

2) *Hydrolyses chlorhydriques.* — $\text{HCl } 9\text{N}$, 105°, 18 h. Après hydrolyse sous azote, on élimine l'acide chlorhydrique par distillation azéotrope. Des prises du résidu sont fractionnées par chromato-électrophorèse au pH 2 sur papier. Ainsi, 14 taches sont mises en évidence (voir fig. 2). Les unes réagissent à l'acide iodoplatinique [8] (IP) (réactif des composés renfermant les fonctions $-\text{S}-\text{H}$, $-\text{S}-\text{S}-$ ou $=\text{C}-\text{S}-\text{C}=\text{C}$) et à la ninhydrine (N) (réactif des amines primaires et secondaires); d'autres réagissent

au nitroprussiate + KCN (NP) (pour les fonctions $-SH$ ou $-S-S-$) et à la ninhydrine; d'autres encore seulement à ce dernier réactif. Certaines taches, enfin, ne sont révélables que par absorption ou fluorescence en lumière ultra-violette (taches sombres ou fluorescentes) (resp. Ab et Fl). Les taches 6 et 8 sont aussi révélables par le nitrate d'argent, après traitement alcalin (Ag); ces produits sont réducteurs.

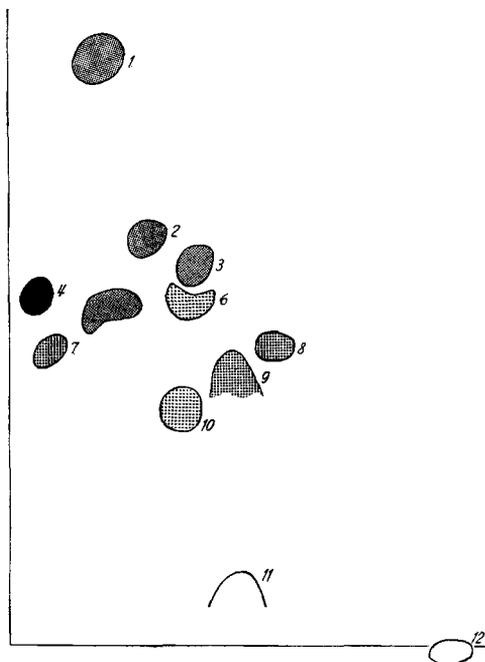


Fig. 2. Chromato-phérogramme de l'hydrolysât chlorhydrique (HCl 6N, 105°, 18 h) de la saramycétine
 1 glycine (N), 2 thréonine (N),
 3 proline (N), 4 cystine (N, IP, NP), 5 ac. aspartique (N), 6 (N, IP, Ag), 7 (N, NP, IP), 8 (N, IP), 9 (N, IP, Fl), 10 (N, IP, Ag), 11 (Ab), 12 (Fl).
 Réactifs: N = ninhydrine;
 IP = Ac. iodoplatinique;
 NP = nitroprussiate de sodium (KCN); Ag = nitrate d'argent;
 Ab = absorption en UV.;
 Fl = fluorescence en UV.

Les taches 6, 8, 9, 10 et 12 (IP et N) contiennent donc du soufre alcoylé, alors que les taches 4 et 7 (NP et N) renferment une fonction disulfure; la tache 4 est celle de la cystine qui est particulièrement abondante dans cet hydrolysât. Les taches 9 et 12 sont fluorescentes en bleu (Fl) en lumière UV.

Le spectre UV. de cet hydrolysât est très différent de celui de la saramycétine; il a 2 maximums, l'un à 220 $m\mu$ et l'autre à 300 $m\mu$ (solution aqueuse de pH 4), tandis que la bande d'absorption entre 260 et 270 $m\mu$ du polypeptide natif a disparu.

Pour un fractionnement des produits à caractère acide de l'hydrolysât et la mise en évidence des fractions cystinogènes de la saramycétine, l'hydrolysât est soumis à une électrophorèse sur papier à pH 6,5. Les constituants acides se déplacent vers l'anode tandis que la fraction neutre demeure immobile (voir fig. 3). L'analyse de ce phérogramme montre que la bande d'électrophorèse A-2 (fluorescente) contient les produits caractérisés dans le chromatophérogramme de la figure 2 par les taches 9 et 12 tandis que les fractions A-1, A-3 et A-4, bien que ne contenant pas de cystine préformée, en libèrent pourtant après une hydrolyse chlorhydrique de 18 h à 105° (voir tableau II).

HCl 6N, 105°, 5 h. Lorsque la durée de l'hydrolyse chlorhydrique est réduite à 5 heures (fig. 4), l'image chromato-électrophorétique de l'hydrolysats est un peu différente de l'image précédente (voir fig. 2); des taches nouvelles apparaissent et la quantité de cystine est diminuée.

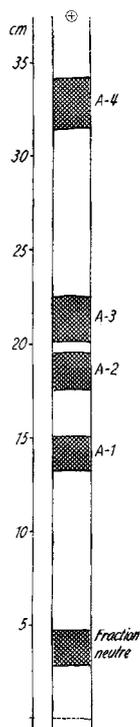


Tableau II.

Propriétés des fractions acides cystinogènes de l'hydrolysats chlorhydrique

Constituant	Mobilité à pH 6,5 *)	Produits de l'hydrolyse chlorhydrique (HCl 6N, 105° 18 h)
A-1	0,36	cystine
A-3	0,58	cystine, 7
A-4	1	cystine **)

*) Par rapport à la mobilité de l'acide aspartique.
**) Contaminé par l'acide aspartique de l'hydrolysats.

Fig. 3. Phérogramme (pH 6,5; 1800 volts) de la fraction soluble dans l'eau de l'hydrolysats chlorhydrique (HCl 6N, 105°, 18 h) de la saramycétine (révélation par la ninhydrine)

Tableau III. Propriétés de fractions cystinogènes de l'hydrolysats chlorhydrique après 5 h d'hydrolyse

Constituant	Caractère électrochimique	Mobilité à pH 2*)	Rf**)	Produits d'hydrolyse chlorhydrique (HCl 6N, 105° 18 h)
13	neutre	0,81	0,21	cystine, glycine
14	acide	0,53	0,43	cystine, 7

*) Par rapport à la mobilité de la glycine.

***) Dans le solvant *n*-butanol/ac. acétique/eau (4:1:5).

Les taches nouvelles désignées dans la figure 4 par 13 et 14 ne donnent aucune des réactions de la cystine et de la cystéine, mais pourtant ces produits engendrent de la cystine après hydrolyse chlorhydrique à 105° et 18 h. La substance de la tache 14 est spécialement résistante à cette hydrolyse puisque à côté de la cystine on en trouve encore une partie à la fin de l'hydrolyse. Ces nouvelles fractions appar-

tiennent donc également aux constituants de la saramycétine que nous appelons cystinogènes, et que nous considérons comme étant thiazolidiniques (voir tableau III).

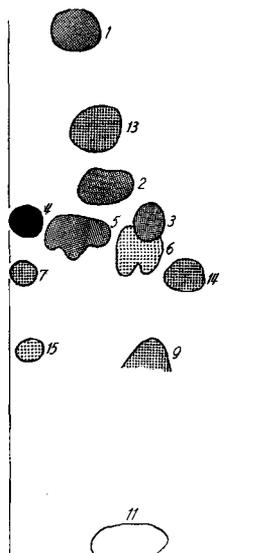


Fig. 4. Chromato-phérogramme de l'hydrolysât chlorhydrique (HCl 6N, 105°, 5 h) de la saramycétine.

(Pour les abréviations, voir fig. 2)
 1 glycine (N), 2 thréonine (N),
 3 proline (N), 4 cystine (N, T, NP),
 5 ac. aspartique (N), 6 (N, IP, Ag),
 7 (N, IP), 9 (N, NP, IP, Fl),
 13 (N, IP; fraction cystinogène),
 14 (N, IP; fraction cystinogène),
 11 (Ab)

HCl 12N, 37°. Nous avons suivi la marche de cette hydrolyse relativement ménagée pendant 232 heures par l'analyse chromato-électrophorétique de prises. L'apparition, le renforcement, voire la disparition des fractions peuvent ainsi être

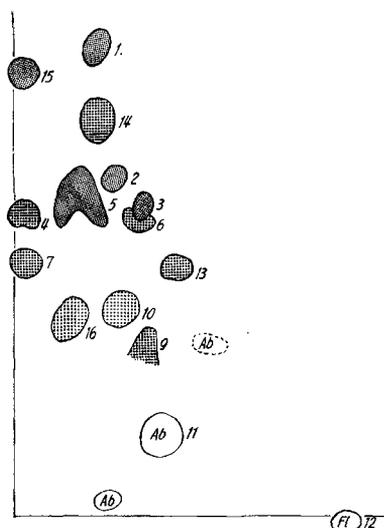


Fig. 5. Chromatophérogramme de l'hydrolysât chlorhydrique (HCl 12N, 37°, 108 h) de la saramycétine. (Pour les abréviations, voir fig. 2)

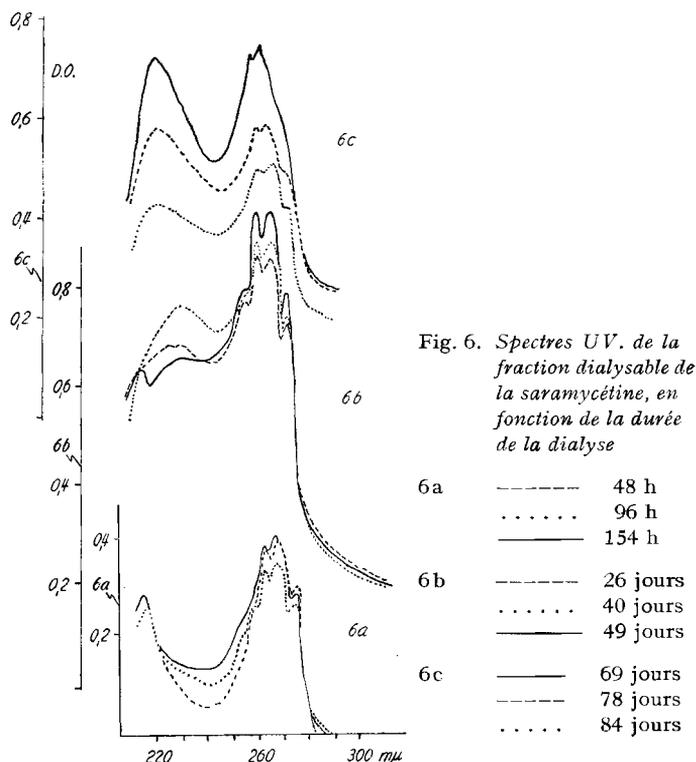
1 glycine (N), 2 thréonine (N),
 3 proline (N), 4 cystine (N, IP, NP),
 5 ac. aspartique (N), 6 (N, IP, Ag),
 7 (N, NP, IP), 8 (N, IP),
 9 (N, IP, Fl), 10 (N, IP, Ag),
 11 (Ab), 12 (Fl), 13 (N, IP; fraction cystinogène),
 14 (N, IP; fraction cystinogène), 15 (N).

observés (voir tableau IV). Nous remarquons que les produits des taches 13 et 14 (voir fig. 4 et tableau III), déjà mis en évidence au cours de l'hydrolyse précé-

dente, se sont fortement renforcés et qu'une fraction nouvelle (tache désignée par 15; voir fig. 5) est apparue dès la 16e heure de cette hydrolyse. Cette fraction libère seulement de la glycine et de la thréonine après hydrolyse chlorhydrique intégrale.

Tableau IV. *Caractéristiques des hydrolysats en fonction de la durée de l'hydrolyse (HCl 12N, 37°)*

Durée de l'hydrolyse heures	Constituants		
	Apparition	Renforcement	Disparition
16	6, 13, 15, thr, pro		
24		6, 13, 15, thr, pro	
40	8, cys, asp	6, 13, 15	
48	7, 8, 9, 14, gly	cys	
64		6, 14, 15, cys, pro	
72	10		
96		cys, gly	
160		7, 9, cys, gly	
168		7, 9, cys, gly	
184		cys, gly	
232			6, 15



Tous les constituants de la saramycétine libérés durant l'hydrolyse chlorhydrique de 18 h à 105° sont présents déjà après 78 h d'hydrolyse ménagée, la glycine n'ap-

paraît qu'à la 48e heure; la teneur en cystine (déjà visible sur le chromatophérogramme à la 40e heure) a augmenté continuellement pendant toute la durée de l'observation (232 h).

Pour l'isolement des produits caractérisés par les taches 13, 14 et 15, il y a avantage à arrêter l'hydrolyse ménagée après 78 h.

Cette hydrolyse ménagée, aussi bien que l'hydrolyse par HCl 6N à 105° de 5 h, aboutit à la formation des mêmes constituants acides et cystinogènes que ceux qui sont issus de l'hydrolyse de 18 h par HCl 6N (voir tableau II); leur teneur y est cependant plus élevée du fait de la diminution de leur vitesse de décomposition.

3) *Comportement de la saramycétine en milieu aqueux: dialyse.* Une solution aqueuse de la saramycétine, amenée au pH 7, est mise à dialyser contre de l'eau distillée, à 4°. Le tube de cellophane tourne autour de son axe (voir partie exp. II-1a), ce qui favorise la diffusion. Le liquide extérieur est renouvelé d'abord toutes les 24 h, puis après des périodes plus espacées (voir partie exp. II-1a); dans le même temps le spectre ultra-violet du dialysat est établi à partir d'un volume aliquote, entre 200 et 350 m μ . Ces spectres sont pris du premier au 6e jour, du 25e au 43e jour et du 44e au 84e jour du temps de dialyse (voir fig. 6); ils sont très différents du spectre UV. de la saramycétine (fig. 1), étant caractérisés par un maximum très prononcé à 250 et 258 m μ et, vers la fin de la dialyse, par l'apparition d'une nouvelle bande d'absorption à 220 m μ .

Le spectre UV. de la fraction non dialysable et celui du polypeptide natif sont semblables sauf à 250 m μ où l'absorption de la première est nettement plus basse.

Après 61 jours de dialyse, le 24% du poids de la saramycétine engagée dans l'expérience a dialysé.

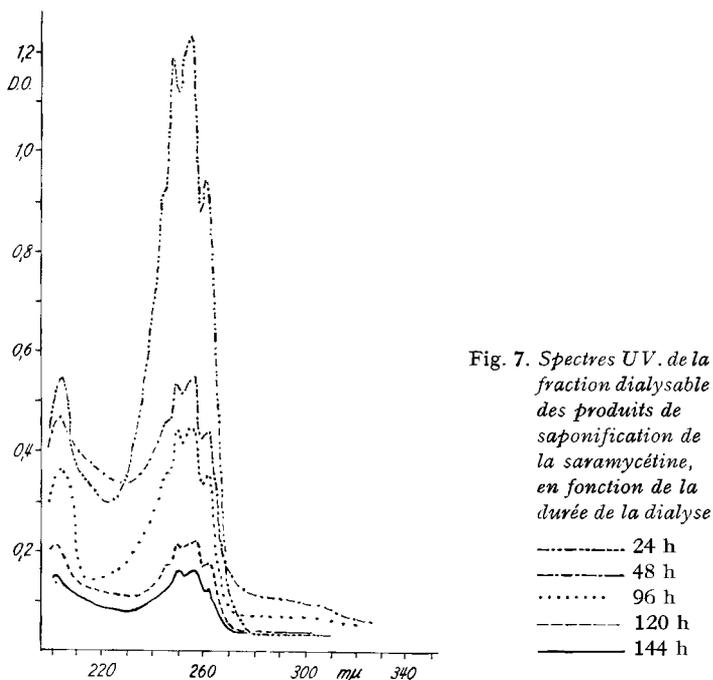
Alors que la partie dialysable est très soluble dans l'eau, le matériel demeuré dans le sac de dialyse, une fois ramené à sec, ne se redissout plus que difficilement dans l'eau, même ammoniacale. L'activité antibiotique de cette fraction envers *Paecilomyces varioti*⁸⁾ est environ 100 fois plus faible que l'activité de la saramycétine.

Traitée par l'hydroxylamine dans les conditions fixées par FEIGL [10], la saramycétine donne un hydroxamate (coloration rose-violette avec Fe³⁺). Nous en concluons à la présence probable de fonctions ester. Pour confirmer leur existence, nous avons vérifié si par hydrolyse alcaline ménagée ou par hydrazinolyse, on provoquait une scission de l'antibiotique.

4) *Hydrolyse alcaline ménagée.* La saramycétine est dissoute dans de la soude caustique 0,04N et cette solution est conservée à 25° \pm 0,1°, 3 h. Après neutralisation et acidification à pH 3,5, un précipité se forme qui est recueilli, lavé et remis en solution aqueuse à pH 7. Cette solution est dialysée 6 jours à 4°, contre de l'eau distillée. L'eau de dialyse est renouvelée toutes les 24 heures et dans le même temps le spectre ultra-violet de la fraction dialysable (fig. 7) est mesuré sur un volume aliquote. En 6 jours, le 16% de la quantité mise en œuvre a dialysé; la vitesse de dialyse est donc ici relativement considérable.

⁸⁾ Déterminé par le Dr H. SCHOLER du département de médecine de F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, à Bâle, à qui nous adressons nos remerciements.

La fraction dialysable se distingue de la saramycétine par son spectre UV. (voir fig. 7) et son poids moléculaire réduit, mais elle lui ressemble par la composition chromatophérogaphique de ses hydrolysats chlorhydriques.



Nous constatons une parfaite concordance entre le spectre UV. de la partie dialysable de la saramycétine (voir fig. 6) et le spectre UV. du dialysable de ses produits de saponification alcaline (voir fig. 7). Il est donc probable que l'antibiotique subit en solution aqueuse, dans le sac de dialyse, une hydrolyse de fonctions ester libérant un fragment dialysable identique à celui qui prend naissance au cours de sa saponification alcaline.

5) *Hydrazinolyse*. Une suspension de saramycétine dans l'éthanol absolu contenant de l'hydrate d'hydrazine est chauffée à reflux durant 6 heures. Au cours de l'opération, le polypeptide se dissout puis un précipité de plus en plus abondant apparaît. A la fin, on l'isole par centrifugation et évapore le surnageant. Les deux fractions sont alors extraites par l'eau, où elles se subdivisent en de nouvelles fractions (voir tableau V).

Le 90 et le 95% resp. des fractions A_1 et B_1 (solubles dans l'eau) sont dialysables. Le spectre UV. des produits qui ont dialysé montre des bandes d'absorption à 250 et 258 $m\mu$ (fig. 8), comme le spectre de la fraction dialysable des produits de saponification de la saramycétine, mais il marque en plus une absorption considérable entre 216 et 220 $m\mu$. Cette dernière bande d'absorption ne devient visible qu'après une longue dialyse (44 jours), dans le spectre UV. de la partie dialysable de la saramycétine.

Tableau V. *Fractionnement des produits d'hydrazinolyse de la saramycétine*

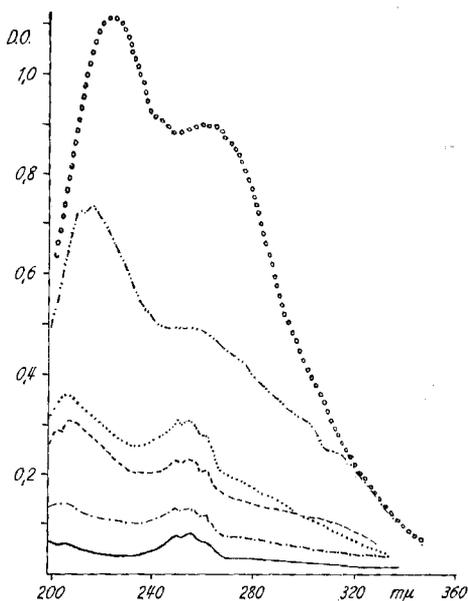
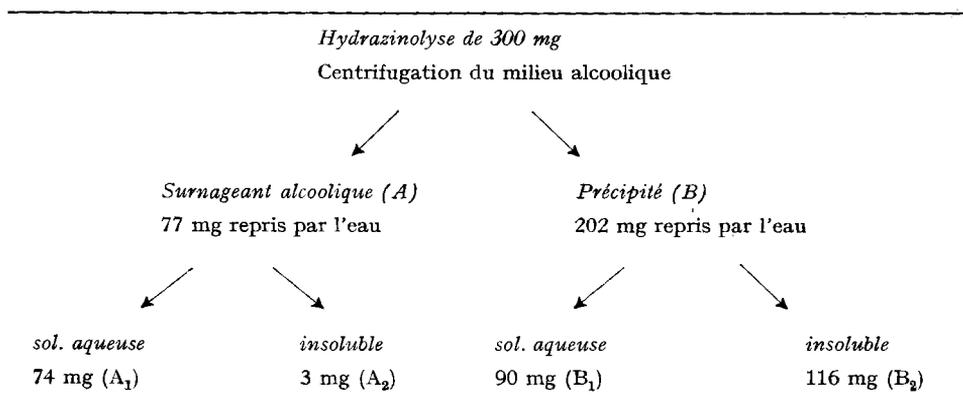


Fig. 8. *Spectres UV. de fractions dialysables de la saramycétine hydrazinolyse, en fonction de la durée de la dialyse*

Fraction A₁
 ————— 45 h
 - - - - - 117 h
 - - - - - 141 h

Fraction B₁
 - - - - - 45 h
 117 h
 ○○○○○○○○ 141 h

Tableau VI. *Produits révélés après chromato-électrophorèse des hydrolysats de diverses fractions d'hydrazinolyse de la saramycétine*

Fractions	Produits d'hydrolyse						
	Cys	thr	gly	pro	asp	9	6
dialysable de A ₁	+	+	+			+	+
dialysable de B ₁	+	+	+			+	
A ₂	+	+	+	+	+	+	+
B ₂	+	+		+	+	+	+

La composition en produits d'hydrolyse (HCl 6N, 105°, 18 h) des dialysables des fractions A₁ et B₁ et des fractions insolubles dans l'eau (fractions A₂ et B₂) est indiquée dans le tableau VI (p. 671).

On remarque la relative simplicité des hydrolysats des fractions dialysables de A₁ et B₁.

L'hydrazine rompt vraisemblablement des liaisons esters pour donner des hydrazides et libérer des alcools. Il n'est pas exclu que les fractions A₁ ou B₁ soient les produits porteurs de la fonction alcoolique – en effet elles contiennent de la thréonine, mais sont exemptes d'acide aspartique – et que les fractions A₂ et B₂ représentent les parties carboxyliques; elles renferment en effet de l'acide aspartique.

6) *Oxydation*. Etudiant le comportement de la saramycétine à l'oxydation dans les conditions où la cystine et les thiazolidines sont déjà oxydées, nous traitons l'antibiotique par de l'acide performique à -10°. Nous observons alors que le polypeptide est fortement altéré. Tous les produits d'oxydation obtenus sont très solubles dans l'eau à tous les pH. Leur spectre IR. met en évidence des fonctions sulfoniques, ce que confirme l'isolement d'acide cystéique dans leur hydrolysat chlorhydrique (fig. 9) (HCl 6N, 105°, 18 h). Cette oxydation rompt la saramycétine en au moins

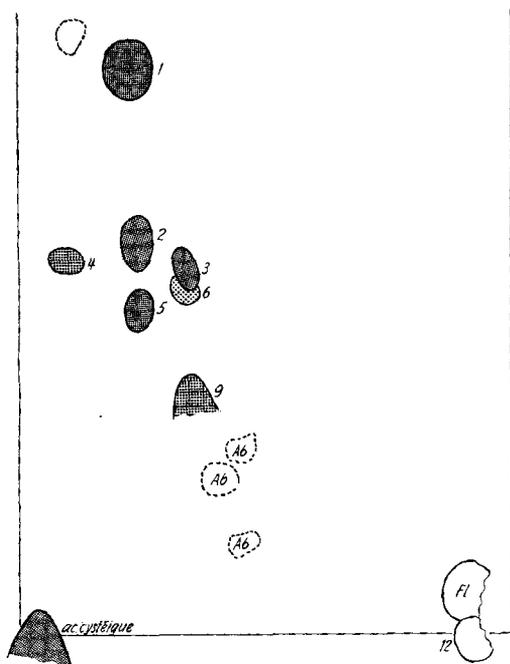


Fig. 9. Chromatophérogramme de l'hydrolysat chlorhydrique (HCl, 6N, 105°, 18 h) des produits d'oxydation de la saramycétine. (Pour les abréviations, voir fig. 2)

- 1 glycine (N),
- 2 thréonine (N),
- 3 proline (N),
- 4 cystine (N, IP, NP),
- 5 ac. aspartique (N),
- 9 (N, IP, FI),
- 12 (FI),
- ac. cystéique (N)

8 fragments (v. fractionnement par électrophorèse à pH 6,5; fig. 10) qui sont facilement dialysables. Toutes ces fractions possèdent des poids moléculaires moyens très voisins (1500 ± 300)³). L'oxydation semble donc scinder une liaison entre des tronçons de chaîne de grandeurs moléculaires assez voisines.

Le spectre UV. de l'ensemble des produits d'oxydation ressemble beaucoup à celui de l'antibiotique natif; toutefois le maximum à 300 m μ se marque davantage.

Nous savons que celui-ci est attribuable au produit d'hydrolyse de la saramycétine désigné par 9 dans le chromatophérogramme (voir fig. 2). La purification et l'analyse de cette fraction seront décrites ultérieurement [13].

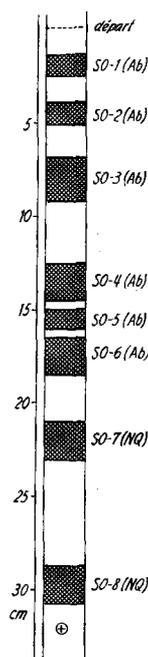


Fig. 10. Phérogramme (pH 6,5; 1800 volts) des produits d'oxydation de la saramycétine
Ab = absorption en UV.
NQ = réaction bleue au naphtoquinone-1,2-sulfonate-4 de sodium [4]

L'électrophorèse à pH 6,5 sépare 8 fractions du mélange des produits d'oxydation (fig. 10); elles sont rendues visibles sur le papier soit par absorption en lumière ultra-violette (taches sombres) (bandes SO-1 à SO-6) soit par réaction avec le naphtoquinone-sulfonate de sodium (bandes SO-7 et SO-8) (couleur bleue). Par hydrolyse (HCl 6 N, 105°, 18 h) elles fournissent les composants énumérés dans le tableau VII.

Tableau VII. Produits d'hydrolyse des fractions des produits d'oxydation de la saramycétine, séparées par électrophorèse à pH 6,5

Fraction	Caractère électrochimique	Produits d'hydrolyse					
		ac. cystéique	thréonine	glycine	proline	ac. aspartique 9	6
SO-1	neutre		+	+			
SO-2	acide		+	+	+	+	+
SO-3	acide	+	+	+	+	+	
SO-5	acide	+	+	+	+	+	
SO-6	acide	+	+	+	+	+	+
SO-7	acide	+	+	+			
SO-8	acide	+		+			

7) *Désulfuration*. L'hydrolysats chlorhydrique du produit de désulfuration au nickel RANEY [14] contient de l'alanine mais aussi de la cystine. Une partie des groupements

Discussion

Le poids moléculaire considérable de la saramycétine (~ 14000) l'apparente aux protéines de petites dimensions. Cette grandeur est tout à fait inusitée dans la classe des antibiotiques de nature peptidique.

La saramycétine est un polyacide dépourvu de fonctions basiques, et pourtant elle est très soluble dans l'eau; cette propriété suggère que la molécule n'est pas linéaire si l'on se réfère au cas des acides polyaspartiques linéaires qui, eux, sont très peu solubles.

La présence de 8 restes de glycine et autant de thréonine, de proline et d'acide aspartique (32 restes au total) laisse prévoir la répétition de motifs où s'insèrent au moins 46 restes cystéinogènes (fournissant 23 restes de cystine) qui d'après leur comportements chimiques (hydrolysabilité, oxydation et réaction avec Hg^{2+}) s'apparentent aux thiazolidines. La somme des résidus identifiés (les fractions cystéinogènes sont reconnues par la cystine qu'elles produisent durant les hydrolyses acides) indique que le 35% du poids moléculaire de la saramycétine est représenté par d'autres constituants. Ceux-ci pour la plus grande partie sont formés des fractions désignées par 9 et 12 dans la figure 2. Nous les avons isolés des hydrolysats chlorhydriques de la saramycétine et purifiés par cristallisation ou par extraction à contre-courant; nous les appelons acides saramycétiques A, B, C et D. Indiquons qu'ils contiennent du soufre mais ne sont pas cystinogènes (ac. saramycétique A: 9,58% S, ac. saramycétique C: 17,12% S). La description de leur purification et de leurs propriétés sera donnée dans un mémoire ultérieur [13]. Nous devons aussi inclure dans les 35% mentionnés plus haut, la fraction carbonylée des hydrolysats chlorhydriques, qui fournit des hydrazones cristallisées.

Les restes cystinogènes représentent le 39% du poids de l'antibiotique et sont avec les acides saramycétiques les éléments caractéristiques de la saramycétine.

Quant aux liaisons caractéristiques, il faut compter, à côté des liaisons peptidiques normales, quelques liaisons esters, saponifiables et hydrazinolyzables.

Le comportement de la saramycétine à la dialyse est intéressant; dès le début et continuellement par très petites quantités, des fragments détachés du polypeptide traversent la paroi semi-perméable (22% après 66 jours de dialyse); or, le spectre UV. et la composition des acides aminés de l'ensemble de ces fragments sont identiques au spectre UV. et à la composition des acides aminés du dialysable (dialyse rapide) des produits de saponification de la saramycétine. On peut donc penser que durant la dialyse, la saramycétine subit une certaine dégradation, probablement par hydrolyse de liaisons ester très labiles. Les raisons de ce phénomène ne sont pas connues, cependant la liaison hydrolysable pourrait être stabilisée par exemple par un cation, qui pourrait être éloigné par la dialyse.

La dégradation oxydative du polypeptide est également instructive; dans des conditions d'oxydation ménagée, le poids moléculaire moyen des fragments de la saramycétine tombe à environ 1500. Une série de fonctions sulfoniques sont alors formées et réparties dans au moins 8 fractions de mobilités différentes. Les ruptures doivent intervenir au niveau de constituants cystinogènes (cystéinogènes à proprement parler) avec formation de groupements cystéyle et aldéhyde (facilement oxydable). L'acide cystéique isolé des hydrolysats chlorhydriques témoigne de cette transformation. Si l'on admet que la scission oxydative s'effectue seulement sur

80°, 10 min; ou b) à fonctions –S–S–, C–S–C, par l'acide iodoplatinique (4 ml d'acide chloroplatinique 0,002M dans 0,25 ml d'une sol. de IK 1M auxquels on ajoute 0,4 ml de HCl 1N); ou c) à groupes –SH et –S–S–, par le nitroprussiate de sodium, après action réductrice du KCN (réactif A: 1,5 g de nitroprussiate de sodium dans 5 ml de SO_4H_2 conc. + 95 ml d'éthanol et 10 ml d'ammoniaque à 28%, on filtre l'insoluble; réactif B: 2 g de KCN dans 5 ml d'eau et 95 ml de méthanol); ou d) à reste de proline, par l'isatine (100 mg d'isatine dans 50 ml de *n*-butanol contenant 5% d'ac. acétique); ou e) à fonction N-monométhylamine, par le chlorure de *p*-nitrobenzoyle (sol. à 0,2% du réactif dans le benzène); avec ce réactif la glycine donne une coloration rose très fugace alors que la thréonine se colore en rose-violet et l'acide cystéique, en violet; ou f) à fonction carbonyle, par la dinitro-2,4-phénylhydrazine (sol. saturée dans HCl 1N); ou g) à groupe réducteur, par trempage dans une solution à 1% de nitrate d'argent dans l'acétone, suivi d'une pulvérisation d'une solution concentrée KOH alcoolique.

2b) *Electrophorèse de la saramycétine*: 10 mg de l'antibiotique sont déposés sur une ligne de 5 cm, sur une feuille de papier WHATMAN no 3 de 15 cm de large. L'électrophorèse est faite à pH 6,5, sous 1800 V, durant 5 h. L'antibiotique est mis en évidence par chloration de ses fonctions imino-peptidiques, d'après la technique de REINDEL & HOPPE⁶) [3]; 0,2 μ moles d'ac. aspartique servant de témoin est déposé, sur la ligne de départ, de part et d'autre à 3 cm d'intervalle du dépôt du polypeptide. Après l'électrophorèse, les deux bandes de cheminement de l'acide aspartique sont découpées et révélées à la ninhydrine, tandis que les bandes de cheminement de la saramycétine sont introduites dans une enceinte chargée de chlore. La saramycétine ne donne lieu qu'à une seule bande; sa mobilité à pH 6,5 est rapportée à celle de l'acide aspartique.

2c) *Electrophorèse des produits d'oxydation performique de la saramycétine*. 12,7 mg du mélange d'oxydation dissous dans 0,5 ml de tampon acétate de pyridinium, pH 6,5, sont déposés sur toute la largeur (15 cm) d'une feuille de papier WHATMAN no 3. L'électrophorèse se fait sous 1800 V (43 mA) durant 4 h. Les fractions sont localisées par leur fluorescence en lumière UV. (voir fig. 10) ou par leur réaction avec le naphtoquinone-1,2-sulfonate-4 de sodium (voir fig. 10 et tableau VII); leur élution par l'eau est précédée de leur concentration dans la partie médiane du papier, *in situ*, puis l'extraction des produits est réalisée à partir de cette zone de concentration par une succion capillaire. L'élueur est conçu pour effectuer plusieurs extractions à la fois et l'éluat ne dépasse pas 0,7 ml. Les fractions sont recueillies à l'état sec après sublimation de l'eau sous 0,07 Torr.

3) *Réaction du biuret* [7]. On dissout 5 mg de saramycétine dans 0,25 ml d'eau et ajoute 0,75 ml de soude caustique 1N et 3 ml d'une solution de sulfate de cuivre à 20%. Après homogénéisation, la suspension est centrifugée et la couleur du surnageant est observée.

4) *Recherche de fonctions ester carboxylique* [10]. Dans un petit creuset de porcelaine, on imprègne 30 mg de saramycétine de 0,15 ml (3 gouttes) d'une solution éthanolique saturée de chlorhydrate d'hydroxylamine, et de 0,15 ml de KOH alcoolique saturé. Le mélange est chauffé sur une très petite flamme jusqu'à début d'ébullition, puis après refroidissement, le milieu est acidifié (contrôle à la touche sur un papier indicateur) par HCl 0,5N. Après l'adjonction de 0,15 ml d'une solution de chlorure ferrique aqueux à 1%, une couleur rose-violet se développe dans le milieu. La saramycétine elle-même ne donne aucune coloration avec le chlorure ferrique.

5) *Recherche des fonctions amino primaires, secondaires et tertiaires*. – 5a) *Groupes primaires et secondaires*. – Par la ninhydrine: 3 mg de saramycétine en solution dans 0,05 ml d'eau sont déposés sur une feuille de papier à chromatographie SCHLEICHER-SCHUELL 2043a lavé. Après dessiccation cette feuille est aspergée du réactif à la ninhydrine (voir I, 2a)) et mise 15 min dans une étuve à 90°. La réaction est négative.

Par le naphtoquinone-1,2-sulfonate-4 de Na: 5 mg de saramycétine sont dissous dans 5 ml de soude caustique 0,1N, et 2 ml de réactif à 2% dans l'eau sont ajoutés. Après homogénéisation, on observe la couleur de la solution qui demeure jaune clair, comme celle du témoin confectionné seulement avec de la soude caustique 0,1N et le réactif: réaction négative.

Par le fluoro-1-dinitro-2,4-benzène: A une solution de 2 mg de saramycétine dans 1 ml de $\text{N}(\text{CH}_3)_3$ à 1% sont ajoutés 3 ml d'éthanol contenant 0,01 ml du réactif fondu. Après 2 h de repos à température ordinaire, à l'obscurité, on contrôle l'alcalinité du milieu qui doit être supérieure à 9, et on l'extrait trois fois par son volume d'éther. La solution aqueuse est ensuite acidifiée, et la suspension résultante, extraite cinq fois par son volume d'acétate d'éthyle. Le précipité est centrifugé, lavé et séché; il est incolore. Après hydrolyse chlorhydrique suivie d'une séparation

chromato-électrophorétique (I 2a)), on ne décèle aucune tache dinitrophénylée (examen du chromatogramme en lumière ultra-violette). L'extrait acétate d'éthyle est amené à sec, le dinitro-phénol qu'il contient est éliminé par sublimation. Le résidu est chromatographié sur couche mince de gel de silice selon STAHL, avec du *n*-butanol saturé par de l'ammoniaque. On n'observe aucune tache dinitrophénylée.

5 b) *Groupes tertiaires*. On introduit 100 mg de saramycétine dans un tube à centrifuger conique contenant 5 ml d'acide chlorhydrique 0,1N. Après avoir homogénéisé la suspension et attendu 30 min à $25^\circ \pm 0,1^\circ$, le milieu est centrifugé à température ordinaire. 1 ml du surnageant, limpide, est prélevé et titré au rouge de méthyle par la soude caustique 0,0098N. Le virage se produit à 8,80 ml ce qui correspond exactement à une consommation de 1 HCl par Na présent dans la saramycétine mise en œuvre (1,58% de sodium). L'antibiotique ne contient donc aucune autre base.

6) *Recherche des fonctions thiol et disulfure*. – 6 a) *Par le p-chloromercuri-benzoate de sodium (PCMB)* [12]. – *Étalonnage par le chlorhydrate de cystéine*: 25,0 mg de chlorhydrate de cystéine sont dissous dans l'eau, le pH est amené à 8,2 par addition de $N(CH_3)_3$ aqueux à 5% et le volume est amené à 100 ml. 12,69 mg PCMB très finement broyé sont dissous dans 100 ml d'eau et le pH de cette solution est ajusté à 7. On prépare un tampon phosphate 0,1M de pH 6,8. Pour le titrage, on réserve deux blancs, l'un constitué par la cystéine sans PCMB et l'autre par le PCMB sans cystéine, et poursuit l'étalonnage à partir de 5, 10 et 15 μ g de chlorhydrate de cystéine dissous dans 2,5 ml de tampon phosphate puis recevant 0,5 ml de la solution de PCMB. Le volume final de chacune de ces solutions est amené à 3 ml. Leur densité optique à 255 $m\mu$ est déterminée dans une cuve de quartz de 1 cm dans le spectrophotomètre BECKMAN DU. La somme de la valeur des deux blancs est soustraite de la densité optique des solutions de concentration croissante de chlorhydrate de cystéine. On peut ainsi établir une courbe d'étalonnage qui se révèle être une droite jusqu'à 20 μ g.

Essais avec la saramycétine: recherche de fonctions –S–H: 4,17 mg de saramycétine sont dissous dans de l'eau et le pH de cette solution est amené à 8,2 par 0,4 ml de $N(CH_3)_3$ à 5%. Le volume final est porté à 20 ml. Le dosage s'effectue sur 4 prises de 0,1 ml de la solution de saramycétine en suivant exactement la méthode décrite plus haut. Les densités optiques des solutions contenant la saramycétine et le PCMB sont identiques aux densités optiques additionnées des blancs PCMB et saramycétine; la saramycétine ne contient donc pas de fonction thiol.

Recherche de fonctions disulfure: 600 mg de saramycétine sont portés dans 30 ml d'eau et le pH est fixé à 8,2 par $N(CH_3)_3$ à 5%. D'autre part, on dissout 0,4 ml d'acide thioglycolique dans peu d'eau, amène le pH à 8,5 par une solution de $N(CH_3)_3$ à 33% et porte le volume à 5 ml par addition d'eau. Les deux solutions sont mélangées. Après 2 h de repos à $25^\circ \pm 0,1^\circ$ sous un courant d'azote exempt d'oxygène, la saramycétine est précipitée à pH 2 par HCl 1N. On laisse la suspension se déposer à 4° sous un courant d'azote exempt d'oxygène. Le culot est isolé par une centrifugation à 18000 tours/min (ultracentrifugeuse SPINCO). Il est lavé 4 fois par une solution de HCl 0,01N préalablement débarrassée d'oxygène et séché sous vide poussé à température ordinaire (560 mg). 10 mg de ce résidu sont dissous dans de l'eau, le pH est porté à 8,5 comme précédemment et le volume final est amené à 50 ml avec de l'eau privée d'oxygène. Le dosage des fonctions thiol ayant pu se former par l'action réductrice de l'acide thioglycolique est effectué sur 4 prises de 0,1 ml, comme indiqué immédiatement plus haut. Là encore, les densités optiques du milieu de réaction avec le PCMB sont égales à la somme des densités optiques des blancs. La saramycétine ne contient donc pas de fonction disulfure.

6 b) *Par S-alcoylation et recherche de la S-carboxy-méthylcystéine*. La saramycétine (600 mg) est d'abord réduite par l'acide thioglycolique comme on vient de le décrire. Le culot sec obtenu finalement (550 mg) est dissout dans l'eau, le pH est amené à 8,0 par $N(CH_3)_3$ à 5%, et 1,95 g d'acide monoiodacétique préalablement neutralisé par $N(CH_3)_3$, dans 15 ml d'eau, sont ajoutés à la solution. L'alcoylation éventuelle se fait à température ordinaire durant 2 h (après 1 h, le pH est réajusté à 8,2). Puis le pH de la solution est abaissé à 2, le précipité formé est recueilli par centrifugation, lavé à l'eau et séché sous vide poussé; on obtient 450 mg de produit.

3 prises de 300 μ g de ce résidu sec sont dissoutes chacune dans 10 μ l de HCl 6N et ces solutions sont introduites dans des tubes capillaires en pyrex qui, après fermeture, sont portés dans une étuve à 105° durant 18 h. L'hydrolysats, après élimination de l'acide chlorhydrique dans le

vide, est fractionné par chromatographie électrophorèse comme sous I 2a). L'examen des chromatogrammes montre l'absence de S-carboxyméthylcystéine dont l'emplacement a été préalablement établi avec un échantillon synthétique.

6c) *Par le nitroprussiate de sodium.* 6 mg de saramycétine dissous dans 0,1 ml d'eau sont déposés sur une feuille de papier SCHLEICHER-SCHUELL 2043a lavé. Un témoin de 0,2 μ mole de chlorhydrate de cystéine est déposé sur la même feuille. On pulvérise sur la totalité de la feuille successivement les réactifs B et A décrits sous I 2a). Le témoin de cystéine donne une intense coloration rouge alors que la saramycétine ne réagit pas, même après une attente très prolongée.

7) *Recherches des fonctions aldéhyde dans les hydrolysats chlorhydriques.* – 7a) *Par la dinitro-2,4-phénylhydrazine.* 28 mg de saramycétine sont hydrolysés 5 h à reflux avec 3 ml de HCl 6N sous courant d'azote. L'hydrolysat débarrassé des acides saramycétiques insolubles est partagé en 2 volumes égaux. On ajoute au premier 0,04 ml d'une solution saturée dans HCl 1N de dinitro-2,4-phénylhydrazine; après quelques secondes, un précipité de dinitro-2,4-phénylhydrazones commence à se former. A l'autre partie de l'hydrolysat, on ajoute 0,06 ml de Cl_2Hg à 5% dans l'eau; un précipité blanc volumineux (mercaptide) se forme, qui est éloigné par centrifugation après attente de 20 min à température ambiante. On ajoute alors 0,04 ml de la solution d'hydrazine au centrifugat clair. Le précipité d'hydrazones apparaît rapidement comme dans l'expérience précédente.

En chromatographie en couche mince sur gel de silice (*n*-butanol-eau-ac. acétique (4:5:1)), le mélange d'hydrazones donne deux taches jaunes (Rf. 0,70 et 0,74).

Ce mélange d'en tout cas 2 dinitro-2,4-phénylhydrazones présente en IR. les bandes d'absorption caractéristiques suivantes: 1620 et 1695 (aromatique dinitré), 1520 et 1337 cm^{-1} ($\text{C}-\text{NO}_2$), 1705 cm^{-1} (COO^-).

7b) *Par le nitrate d'argent.* 300 μ g de saramycétine sont hydrolysés par HCl 6N en tube capillaire, 18 h à 105°. L'hydrolysat est chromatographié comme décrit sous I 2a). Le chromatogramme ainsi obtenu est trempé dans une solution acétonique de nitrate d'argent, puis dans du KOH alcoolique concentré. Après quelques minutes à température ordinaire, on voit apparaître deux taches noir-brun sur fond beige, correspondant aux taches 6 et 10.

8) *Spectrophotométrie.* – 8a) *Dans l'ultraviolet.* On prépare des solutions à 0,002% respectivement de la saramycétine ou de ses produits de transformation, dans un tampon phosphate de sodium 0,067M de pH 6,8. Les déterminations des densités optiques entre 200 et 350 μ sont faites dans des cuves en quartz de 1 cm d'épaisseur dans le spectrophotomètre BECKMAN DU.

8b) *Dans l'infrarouge.* 1 mg de saramycétine est dispersé dans du KBr pour spectrophotométrie infrarouge, mis aimablement à notre disposition par la Maison MERCK à Darmstadt. La pastille est confectionnée selon la technique habituelle. Le spectrophotomètre est le modèle 21 PERKIN-ELMER⁹⁾.

9) *Détermination du poids moléculaire et de la constante de diffusion par ultracentrifugation⁹⁾.* L'opération a été menée de 3000 à 48000 tours/min avec une optique PHILPOT-SVENSSON et un angle de 26°, à l'aide d'une cellule de Pickels.

10) *Détermination des solubilités.* – 10a) *Dans l'éthanol et l'acide acétique aqueux 0,1M.* Une suspension de 200 mg de saramycétine dans 2 ml de dissolvant dans un flacon avec bouchon rodé est portée dans un thermostat de 25° \pm 0,1° durant 4 h. Le récipient est agité par intermittences durant cette période. Ensuite, on prélève 1 ml de la solution limpide surnageante, évapore cette prise et sèche le résidu à 78° sous 4 \cdot 10⁻² Torr.

9b) *Dans l'eau à divers pH.* La saramycétine est très soluble dans l'eau aux pH supérieurs à 4. Nous déterminons la concentration de la saramycétine par mesure de la densité optique à 225 μ d'une prise de 0,01 ml du surnageant de centrifugation, diluée à 3 ml par une solution de tampon phosphate de sodium 0,1M de pH 6,8. L'étalonnage démontre que la densité optique à ce pH suit la loi de BEER-LAMBERT: densités optiques pour 10 μ g par ml: 0,130; 20 μ g par ml: 0,260; 30 μ g par ml: 0,385; 40 μ g par ml: 0,517.

Quatre ml d'une solution aqueuse contenant 41,25 mg de saramycétine par ml est maintenue 60 min à 25° \pm 0,1°. Lorsqu'on ajoute 0,02 ml de HCl 2N, la solution est tout juste opalescente,

⁹⁾ Nous remercions le Prof. B. Susz (Directeur du Laboratoire de Chimie physique de l'Université de Genève) d'avoir aimablement mis le spectrophotomètre à notre disposition.

mais après introduction de 0,01 ml de cet acide, le pH s'abaisse à 3,72 et on voit un précipité se former. Après 30 min d'attente à $25^{\circ} \pm 0,1^{\circ}$, on centrifuge le précipité à 20000 tours/min (ultra-centrifugeuse SPINCO) et détermine la concentration de la saramycétine sur une prise de 0,01 ml du surnageant limpide. On effectue les mêmes opérations après avoir abaissé le pH à 3,6 et à 2,9,

11) *Détermination de l'activité antibiotique de la saramycétine⁴⁾ et de sa fraction non dialysable obtenue après 66 jours de dialyse dans l'eau⁸⁾*. L'organisme utilisé pour ce test *in vitro* est le *Paecilomyces varioti* [1].

II. Méthodes de transformation

1) *Dialyses.* - 1a) *Procédé général.* 100 mg de l'antibiotique sont dissous dans 10 ml d'eau distillée et le pH est porté à 7 par NaOH 0,1N. Cette solution est introduite dans un tube de cellophane pour dialyse VISKING de 20 mm de large, de 10 cm de long. Le tube est fermé aux extrémités et suspendu par celles-ci à un crochet monté sur un agitateur rotatif qui assure un mouvement circulaire lent, et plongé dans 150 ml d'eau distillée de façon que les extrémités du tube de dialyse ne soient jamais en contact direct avec le liquide. Le mouvement de rotation permet une diffusion plus rapide des fractions éventuellement dialysables. La dialyse s'effectue dans une chambre froide à 4° .

1 b) *Saramycétine.* L'eau de dialyse est renouvelée à la fin des 24^{me}, 48^{me}, 72^{me} et 96^{me} h, puis tous les 6 jours. On prélève 3 ml de l'eau de dialyse pour déterminer le spectre UV. de la fraction dialysés à la fin des 48^{me}, 72^{me}, 96^{me}, 130^{me}, 154^{me}, 178^{me} h, puis toutes les semaines; durée totale de la dialyse: 2 mois. Les solutions de dialyse sont concentrées dans un évaporateur rotatif sous vide à 45° au fur et à mesure de leur réception. Tous les résidus obtenus sont finalement réunis (23,6 mg).

1c) *Saramycétine préalablement traitée par l'acide thioglycolique et l'acide iodacétique.* 100 mg sont dissous dans de l'eau distillée, le pH est fixé à 7 par une solution aqueuse à 5% de $N(CH_3)_3$ et le volume est complété à 10 ml par de l'eau. La dialyse est effectuée comme indiqué en 1a). L'eau de dialyse (150 ml) est changée selon l'horaire indiqué en 1 b). Spectres UV. de la fraction dialysée (voir fig. 12). Le résidu de tous les liquides de dialyse représente 55 mg.

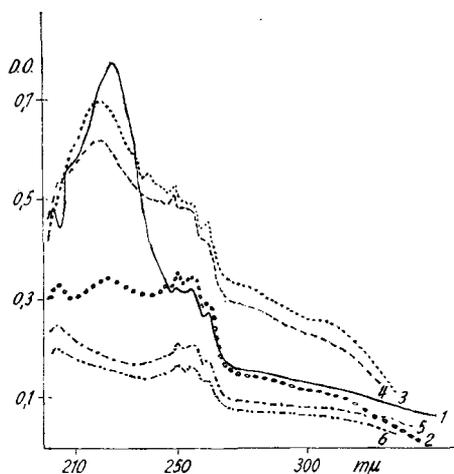


Fig. 12. Spectres UV. du dialysable de la saramycétine après traitement réducteur (ac. thioglycolique), suivi d'un traitement alcoylant (ac. iodacétique)

Durée de la dialyse:

—	27 h	-----	146 h
● ● ●	41 h	- - - - -	164 h
⋯ ⋯ ⋯	75 h	-----	188 h

1d) *Saramycétine hydrolysée par NaOH dilué.* 163 mg du produit obtenu après le traitement de la saramycétine par de la soude caustique diluée (voir page 669) sont dissous dans 16,3 ml d'eau et le pH est fixé à 7. La dialyse se fait contre 225 ml d'eau distillée dans les conditions générales fixées (v. 1a). L'eau de dialyse est renouvelée à la fin des 24^{me}, 48^{me}, 72^{me} et 96^{me} h. Les spectres

UV. de la fraction qui dialyse sont déterminés à partir de 3 ml à la fin des 24^{me}, 48^{me}, 72^{me}, 96^{me}, 120^{me} et 144^{me} h. A la fin de la dialyse (144 h), 28 mg du produit ont dialysé.

1e) *Produits d'hydrazinolyse de la saramycétine*. 29 mg de la fraction A₁ (voir tableau VI) sont dissous dans 14,5 ml d'eau et dialysés contre 50 ml d'eau distillée dans les conditions générales déjà données. Le changement de l'eau de dialyse s'effectue à la fin des 21^{me}, 46^{me}, 118^{me} et 143^{me} h tandis que les prises pour les déterminations spectrophotométriques sont prélevées à la fin des 20^{me}, 45^{me}, 117^{me}, 141^{me} et 165^{me} h. La quantité de produit qui a dialysé représente 27 mg.

84 mg de la fraction B₁ (voir tableau VI) sont dissous dans 21 ml d'eau et dialysés contre 150 ml d'eau distillée selon 1a). Le changement de l'eau de dialyse et les prélèvements en vue des déterminations spectrophotométriques sont effectués comme pour la fraction A₁. A la fin de la dialyse (165 h) 77 mg de B₁ ont traversé la membrane.

1f) *Produits d'hydrogénation de la saramycétine par le nickel RANEY*. 515 mg sont dissous dans 17 ml d'eau distillée et dialysés selon 1a) contre 300 ml d'eau distillée. Après 24 h de dialyse on obtient 165 mg de fraction dialysable, et après 48 h en tout, 29 mg supplémentaires, ce qui représente au total 37,6% du produit engagé.

2) *Hydrolyses*. – 2a) *Chlorhydrique 5,7N, à 105°, 18 h*. 1 g de saramycétine est porté dans 100 ml de HCl 5,7N (préparés à partir de l'acide chlorhydrique concentré, purifié, *pro analysi* MERCK, et d'eau distillée sur quartz). La solution résultante est portée à reflux dans un courant continu d'azote, durant 18 h. Après quoi, l'hydrolysate refroidi à température ordinaire est extrait 2 fois par 100 ml d'acétate d'éthyle. La phase organique contient des acides saramycétiques [13]. La phase aqueuse est amenée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif. Le résidu est repris par 50 ml d'eau distillée et le liquide trouble qui en résulte est conservée à 4° pendant 48h. Une fraction insoluble s'est alors séparée; elle contient les acides saramycétiques insolubles dans l'acétate d'éthyle [13]. Toutefois, l'eau-mère contient encore assez d'acide saramycétique A pour que celui-ci soit visible sur le chromatophérogramme (voir fig. 2 où il est désigné par 9).

2b) *Chlorhydrique 5,7N, à 105°, 5 h*. L'hydrolysate final obtenu selon le mode opératoire décrit sous 2a après 5 h d'hydrolyse (privé de la fraction soluble dans l'acétate d'éthyle et de celle qui cristallise dans l'eau) donne l'image chromatophéographique de la figure 4.

2c) *Chlorhydrique 12N, à 37°, jusqu'à 232 h*. 1 g de saramycétine est introduit dans 100 ml d'acide chlorhydrique 12N (acide chlorhydrique *pro analysi* MERCK). La solution est maintenue en flacon fermé à 37°. Des prises de l'hydrolysate renfermant l'équivalent de 300 µg de saramycétine sont prélevées à la fin des 16^{me}, 24^{me}, 40^{me}, 48^{me}, 64^{me}, 72^{me}, 96^{me}, 160^{me}, 168^{me}, 184^{me} et 232^{me} h, diluées par un volume d'eau et amenées à sec. Chaque résidu est fractionné par chromatographie électrophorèse selon 1 2a) (résultats, voir fig. 5).

2d) *Alcaline*. 200 mg de saramycétine sont dissous dans 50 ml de soude caustique 0,04N. La solution est portée 3 h à 25° ± 0,1°. A la fin de l'hydrolyse, le pH de la solution est abaissé à 2; il se forme une suspension qu'on laisse reposer à 4° pendant 17 h avant de la centrifuger à 4°. Le culot de centrifugation est lavé par 15 ml d'acide chlorhydrique 0,01N puis séché au vide normal et finalement sous 8 · 10⁻² Torr. Ce produit ne donne plus de coloration avec l'hydroxylamine et le chlorure ferrique [10].

3) *Hydrazinolyse*. 200 mg de saramycétine sont portés dans 10 ml d'alcool absolu contenant 0,6 ml d'hydrate d'hydrazine. La suspension est chauffée à 80° durant 5 h. Elle devient d'abord limpide puis un précipité se forme et augmente jusqu'à la fin de l'opération. Il est recueilli à température ordinaire par centrifugation; après 2 lavages par de l'alcool absolu et dessiccation on obtient la fraction A (77,6 mg). La liqueur alcoolique est amenée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif. Son résidu est désigné par B (202,9 mg). La fraction A est reprise par 10 ml d'eau distillée dans un tube à centrifuger conique et la suspension résultante est conservée à 25° ± 0,1° durant 30 min. Après centrifugation à température ordinaire, le culot est lavé à l'eau puis séché sous vide normal puis sous 8 · 10⁻² Torr. Cet insoluble est désigné par A₂ (3 mg). L'eau-mère est évaporée à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif: A₁ (73 mg).

B est repris par 26 ml d'eau distillée dans un tube à centrifuger conique, et la suspension résultante, gardée 30 min à 25° ± 0,1°. Après centrifugation à température ordinaire, la fraction insoluble est lavée et séchée comme indiqué plus haut: B₁ (91 mg). L'eau-mère amenée à sec donne 116 mg d'un résidu B₂.

4) *Oxydation*. — 4a) *Préparation de la solution d'acide performique*. A 475 ml d'acide formique à 99% on ajoute 25 ml d'eau oxygénée à 30 vol.%. Cette solution est laissée 40 min à température ordinaire puis refroidie à -15° .

4b) *Oxydation de la saramycétine*. 500 mg sont dissous dans 36,5 ml d'acide formique à 99%. La solution est refroidie à -10° . On mélange la solution d'acide performique (voir 4a à celle de la saramycétine et conserve le mélange à -10° pendant 4 h. Après quoi son volume est porté à 2,5 l par de l'eau distillée pour détruire l'excès d'acide performique, puis on amène la solution à sec sous pression réduite, à 45° , dans un évaporateur rotatif. La poudre résultante représente 598 mg.

5) *Désulfuration*. Une solution de 1 g de saramycétine dans 80 ml d'eau distillée est additionnée de 7 g de nickel RANEY [14] puis chauffée 6 h à reflux dans un bain d'huile de 150° . Après refroidissement, le catalyseur est filtré et lavé à l'eau. La liqueur-mère et l'eau de lavage réunies sont évaporées à sec sous pression réduite dans un évaporateur rotatif (517 mg; 51,7%).

6) *Comportement de la saramycétine en présence de sels mercuriques*. A une solution de 10 mg de saramycétine dans 5 ml de tampon acétate pH 4,58 (0,2M) ou de tampon phosphate pH 6,40 (0,15M) on ajoute 1 ml d'une solution aqueuse à 2% resp. d'acétate et de chlorure mercurique. Il se forme rapidement un trouble qui se transforme en 15 min en un précipité; celui-ci après quelque temps se prend en gel. Lorsqu'on chauffe le mélange à 50° , l'apparition du précipité est plus rapide.

Ce travail a été rendu possible grâce au soutien généreux de la Maison F. HOFFMANN-LA ROCHE & CIE, à Bâle. Notre gratitude s'adresse aussi au Département de Chimie de HOFFMANN-LA ROCHE, Inc., Nutley, N. J., qui a mis à notre disposition de la saramycétine purifiée.

SUMMARY

Hydrolysis by strong hydrochloric acid degrades the antibiotic Saramycetin (= X-5079 C), discovered by BERGER *et al.* [1], with production of different sulphur-free amino acids and of two types of sulphur containing compounds: (a) large amounts of cystine (23 mol. for a molecular weight of 14000 for saramycetin) originated from at least 46 cysteinogenetic groups which are shown to be probably thiazolidinic; (b) acids containing heterocyclic sulphur, for which the name of saramycetic acids is proposed and which do not yield cystine by hydrolysis.

By performic oxidation at -10°C saramycetin is cleaved into at least 8 fragments. The molecular weight of all these fragments is about 1500 and each fragment yields by hydrolysis appreciable amounts of cysteic acid; therefore it seems probable that the oxidative breakdown occurs at certain cysteinogenetic groups which seem to be approximatively equidistant in the primitive molecule.

By mild alkaline hydrolysis the antibiotic is split into fragments part of which are dialyzable. The dialyzable ones behave like a dialyzable product which is slowly split from saramycetin in aqueous solution. Saramycetin giving a positive hydroxamate- Fe^{3+} test (ester functions) the just mentioned splitting reactions are interpreted as resulting from hydrolysis of ester groups.

Hydrazinolysis (in boiling ethanol) degrades the saramycetin molecule probably by splitting of ester functions).

The association of a large number of peptidic groups with groups containing heterocyclic sulphur (cysteinogenetic groups and residues which do not yield cystine on hydrolysis) seems to be novel.

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

BIBLIOGRAPHIE

- [1] J. BERGER, L. M. STERNBACH, M. MÜLLER, E. R. LASALA, E. GRUNBERG & W. M. GOLDBERG, *Antimicrob. Agents Chemotherapy* 436 (1961); E. GRUNBERG, J. BERGER & E. TITSWORTH, *Amer. Rev. Resp. Dis.* 84, 504 (1961).
- [2] G. W. LONES & C. L. PEACOCK, *Amer. Rev. Resp. Dis.* 84, 529 (1961).
- [3] F. REINDEL & W. HOPPE, *Chem. Ber.* 87, 1103 (1954).
- [4] H. ROSENBLATT, P. HLINKA & J. EPSTEIN, *Analyt. Chemistry* 27, 1296 (1955); N. H. FUSMAN, G. H. MORRISON & A. F. WAGNER, *ibid.* 22, 156 (1950).
- [5] W. GRASSMANN, K. HANNIG & M. KNEDEL, *Dtsch. med. Wschs.* 76, 333 (1951).
- [6] E. DURRUM, *J. Amer. chem. Soc.* 72, 2943 (1950).
- [7] P. BAUDET & CL. GIDDEY, *Helv.* 37, 1879 (1948).
- [8] G. TOENNIES & J. J. KOLB, *Analyt. Chemistry* 23, 823 (1951).
- [9] L. F. FIESER, *Exp. in org. Chemistry*, 3^e éd., chap. 14, p. 84, D. C. Heath & Co., Boston.
- [10] F. FEIGL, V. ANGER & D. EREHDEN, *Mikrochemica Acta* 75, 12 (1934).
- [11] P. A. PLATTNER & U. NAGER, *Helv.* 37, 2203 (1948).
- [12] P. D. BOYER, *J. Amer. chem. Soc.* 76, 4331 (1954).
- [13] P. BAUDET, W. LERGIER & E. CHERBULIEZ, à paraître dans *Helv.*
- [14] R. MOZINGO, D. E. WOLF, S. A. HARRIS & K. FOLKERS, *J. Amer. chem. Soc.* 65, 1013 (1943); H. ADKINS & H. R. BILLICA, *J. Amer. chem. Soc.* 70, 695 (1948); *Org. Syntheses* 29, 24 (1949).
- [15] H. YAMAGUCHI, Y. NAKAYOMA, K. TAKEDA & K. TAWARA, *J. Antibiot. (Japan)* 10 A, 195 (1957).
- [16] D. J. CRAM, O. THEANDER, H. JAGER & M. K. STANFIELD, *J. Amer. chem. Soc.* 85, 1431 (1963).
- [17] S. MOORE, D. H. SPAKMAN & W. M. STEIN, *Analyt. Chemistry* 30, 1185 (1958).

75. Regel zur Abschätzung der Aciditätskonstanten von Cyclohexancarbonsäuren. Teil II [1]¹⁾

von C. Pascual und W. Simon

(11. II. 64)

Wie im Teil I [1] gezeigt wurde, lassen sich die pK_{MCS}^* -Werte²⁾ alicyclischer Monocarbonsäuren unter gewissen Voraussetzungen ausgehend vom pK_{MCS}^* -Wert von Cyclohexancarbonsäure ($pK_{MCS}^* = 7,44$) entsprechend der folgenden als Regel zu bewertenden Gleichung abschätzen:

$$\begin{array}{l}
 pK_{MCS}^* = 7,44 + a \cdot 0,25 + b \cdot 0,22 \\
 a: \text{Anzahl 1:3-Wechselwirkungen} \\
 b: \begin{cases} b = 1: \alpha\text{-Me, Ringverknüpfung in } \alpha \\ b = 0: \alpha\text{-H} \end{cases}
 \end{array} \quad (1)$$

¹⁾ Die Ziffern in eckigen Klammern verweisen auf das Literaturverzeichnis, Seite 688.

²⁾ Die pK_{MCS}^* -Werte sind die negativen dekadischen Logarithmen von scheinbaren Aciditätskonstanten, die nach einem früher ausführlich beschriebenen Standardverfahren im Lösungsmittelsystem 80 Gew.-Proz. Methylcellosolve/20 Gew.-Proz. Wasser bestimmt wurden. Vgl. SIMON [2].