

Authentischer 3,11-Diketo-ätiocholansäure-methylester<sup>d)</sup> schmolz nach starkem Verreiben bei 187—189° (Sintern ab 185°). Er zeigt nach Lit. <sup>d)</sup> die spez. Drehung von  $[\alpha]_D^{16} = +92,8^\circ \pm 2^\circ$  ( $c = 1,250$  in Aceton). Die Mischprobe schmolz bei 186—188° (Sintern bei 183°).

Die Mikroanalysen und die Aufnahme des Ultraviolett-Absorptionsspektrums wurden im mikroanalytischen Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule, Zürich (Leitung W. Manser) ausgeführt.

### Zusammenfassung der Ergebnisse.

Sarmentogenin wurde zu 3 $\beta$ ,11 $\alpha$ -Diacetoxy-ätiocholansäure-methylester abgebaut, wodurch die Konstitution und Konfiguration bis auf die Stellung der tertiären HO-Gruppe bewiesen wurde.

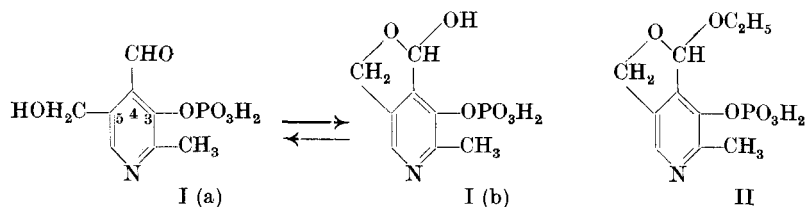
Pharmazeutische Anstalt der Universität Basel.

## 138. Pyridoxal-3-phosphat als Coferment der L-Aminosäure-decarboxylase

von P. Karrer, M. Viscontini und O. Forster.

(14. IV. 48.)

J. C. Gunsalus und W. W. Umbreit haben kürzlich<sup>1)</sup> die Ansicht ausgesprochen, dass Pyridoxal-3-phosphat (I), welches wir als Acetal (II) in reiner krystallisierter Form synthetisiert hatten<sup>2)</sup>, mit dem Coferment der L-Aminosäuredecarboxylase, der Codecarboxylase, nicht identisch ist.



Wir sind daher genötigt, diese ganze Frage etwas eingehender zu diskutieren.

### 1. Die Konstitution der Codecarboxylase.

Dass das Coferment der L-Tyrosin-decarboxylase ein Pyridoxal-phosphorsäureester ist, ergibt sich mit grösster Wahrscheinlichkeit aus der Tatsache, dass eine Mischung von Pyridoxal und Adenosin-triphosphat (A.T.P.) diese Cofermentwirkung besitzt, während Pyri-

<sup>1)</sup> J. C. Gunsalus, W. W. Umbreit, J. Biol. Chem. **170**, 415 (1947).

<sup>2)</sup> P. Karrer, M. Viscontini, Helv. **30**, 52, 524 (1947).

doxal allein sehr wenig aktiv ist<sup>1)</sup>. *Gunsalus* und Mitarbeiter haben hierauf versucht, diese Codecarboxylase synthetisch herzustellen, indem sie auf die wässrige Lösung von Pyridoxal  $\text{POCl}_3$  einwirken liessen oder zur Veresterung die *Schotten-Baumann'sche* Methode anwandten. Ihre Präparate waren ganz uneinheitlich; nach der Herstellungsmethode könnten sie eine Reihe verschiedener Ester enthalten: Pyridoxal-3-phosphorsäureester (Ia), Pyridoxal-5-phosphorsäureester, eine Verbindung, welche sich vom Pyridoxalacetal durch Phosphorylierung des Acetalhydroxyls ableitet, und schliesslich evtl. verschiedene Diphosphorsäureester. Trotz dieser Uneinheitlichkeit scheinen sie gegenüber Tyrosin Codecarboxylasewirkung zu besitzen.

Bei Versuchen, in die Konstitution dieses biologisch wirksamen Phosphorsäureesters Einblick zu erhalten, stellten *Gunsalus*, *Umbreit*, *Bellamy* und *Foust*<sup>2)</sup> zunächst folgendes fest:

a) Das Absorptionsspektrum ihrer „synthetischen Codecarboxylase“ unterschied sich von jenem des Pyridoxals durch das Fehlen der Bande bei 3000 Å (in alkalischer Lösung).

b) Ihre Wirksamkeit als Coferment war ca. 18mal grösser als diejenige des verwendeten Pyridoxal-Adenosintriphosphat-Standards.

c) Die „synthetische Codecarboxylase“ gab keine Phenolreaktion<sup>3)</sup>.

d) Wenn man aus ihr durch Erhitzen mit Salzsäure den Phosphorsäurerest hydrolytisch abspaltete, so ging in demselben Mass die biologische Aktivität verloren, während die Phenolreaktion in genau derselben Stärke zunahm, ebenso die Bande 3000 Å (bei  $\text{pH}$  13):

Min.	Menge zerstört. Coenzym	Menge der freigesetzten P	Phenolreaktion	Bande 3000 Å ( $\text{pH} = 13$ )
0	0	0	0	0
30	49	42	42	48
90	79	78	81	81
180	99	99,7	100	100

Der Parallelismus zwischen den Mengen zerstörten Fermentes, des freigesetzten Phosphors, der auftretenden Phenolreaktion und des Erscheinens der Bande 3000 Å scheint hier vollkommen zu sein. Umso erstaunlicher ist es, dass später *J. C. Gunsalus* und *W. W. Umbreit*<sup>4)</sup> der Meinung Ausdruck geben, in der Codecarboxylase befinde sich die Phosphorsäuregruppe nicht am phenolischen Hydroxyl 3; ihr Ar-

<sup>1)</sup> *J. C. Gunsalus*, *W. D. Bellamy*, *W. W. Umbreit*, *J. Biol. Chem.* **155**, 685 (1944); *W. W. Umbreit*, *W. D. Bellamy*, *J. C. Gunsalus*, *Arch. Bioch.* **7**, 185 (1945).

<sup>2)</sup> *J. Biol. Chem.* **161**, 743 (1945).

<sup>3)</sup> *J. V. Scudi*, *J. Biol. Chem.* **139**, 707 (1941).

<sup>4)</sup> Abstracts Americ. Chem. Soc. 110th meeting, Chicago **34 B** (1946).

gument besteht darin, dass im Spektrum des Pyridoxal-3-phosphorsäureesters in alkalischer Lösung die Bande von 3000 Å nicht verschoben werden oder verschwinden dürfte, da dies bei anderen Pyridoxinderivaten, in denen die Phenolgruppe verschlossen (z. B. veräthert) vorliegt, auch nicht der Fall ist<sup>1)</sup>.

Was die chemische Konstitution der Codecarboxylase anbetrifft, so sind *J. C. Gunsalus* und *W. W. Umbreit*<sup>2)</sup>, sowie *D. Heyl*, *St. A. Harris* und *K. Folkers*<sup>3)</sup> der Meinung, dass für die Stellung des Phosphorsäureesters auch die Acetalhydroxylgruppe der Acetalform des Pyridoxals nicht in Frage kommt, weil sie ein Oxim des phosphorylierten Pyridoxals gewinnen konnten. So bliebe als letzte Möglichkeit die Stellung am primären Hydroxyl (in Stellung 5 des Pyridoxals) als Sitz der Phosphorgruppe übrig; die genannten Autoren sprechen dies allerdings nicht expressis verbis aus.

## 2. Die biologische Aktivität der synthetischen Codecarboxylasepräparate.

Zunächst muss nochmals festgestellt werden, dass alle von *Gunsalus* et al. bisher verwendeten Präparate von „synthetischer Codecarboxylase“ unreine, uneinheitliche Substanzen waren und sich deren Angaben daher auf diese, nicht genauer definierten Präparate bezogen. Ihre biologische Aktivität wurde jeweils mit jener der Mischung von Pyridoxal + A.T.P. verglichen.

Dazu ist zu sagen, dass die Angabe der amerikanischen Autoren<sup>4)</sup>, ihre synthetischen Produkte hätten eine 18mal stärkere Wirkung als die Mischung von Pyridoxal + A.T.P., in ihren später veröffentlichten Versuchen keine Stütze findet. Wenn man die Resultate, welche *Umbreit*, *Bellamy* und *Gunsalus*<sup>5)</sup> mit Pyridoxal + A.T.P. gewonnen haben, zusammen mit jenen, welche *Gunsalus* und *Umbreit*<sup>6)</sup> mit „synthetischer Codecarboxylase“ beobachteten, in das gleiche Koordinatensystem einzeichnet, so findet man zwischen beiden Kurven weitgehend Übereinstimmung, insbesondere bei Verwendung von Codecarboxylase-Dosen von 1  $\gamma$  und darüber (Fig. 1). Dies erscheint

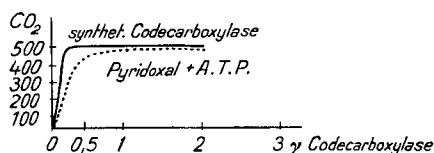


Fig. 1.

<sup>1)</sup> *E. T. Stiller*, *J. C. Keresztesy*, *J. R. Stevens*, *Am. Soc.* **61**, 1239 (1939).

<sup>2)</sup> Abstracts Americ. Chem. Soc. 110th meeting, Chicago 34 B (1946).

<sup>3)</sup> Abstracts Americ. Chem. Soc. 110th meeting, Chicago 35 B (1946).

<sup>4)</sup> *Gunsalus*, *Umbreit*, *Bellamy*, *Foust*, *J. Biol. Chem.* **161**, 743 (1945).

<sup>5)</sup> *Arch. Biochem.* **7**, 185 (1945).

<sup>6)</sup> *J. Biol. Chem.* **170**, 415 (1947).

durchaus verständlich, wenn Adenosintriphosphat Pyridoxal zum Coferment phosphoryliert. Übrigens scheinen die amerikanischen Autoren früher<sup>1)</sup> zu derselben Auffassung gelangt zu sein, indem sie sagen: „the use of a pyridoxal standard introduces the assumption that both natural and synthetic codecarboxylase have the same activity as pyridoxal + A.T.P.“.

*Gunsalus* und Mitarbeiter verwendeten zu ihren Versuchen je 1 mg Trockenpulver des Stammes *Streptococcus faecalis* R der American Type Culture Collection No. 8043, der auf Vitamin-B<sub>6</sub>-freiem Medium kultiviert worden war. Die beim Decarboxylierungsversuch gemessene Menge CO<sub>2</sub> (Q<sub>CO<sub>2</sub></sub>) bedeutet die Gasmenge in mm<sup>3</sup>, die nach fünf Minuten durch 1 mg des Bakterientrockenpulvers entwickelt wurde, multipliziert mit 12 (Entwicklung innerhalb einer Stunde). Für den Blindversuch, d. h. mit 1 mg Trockenpulver allein, ohne Cofermentzusatz, variiert die entwickelte Gasmenge von 0,0 bis 16,8 mm<sup>3</sup><sup>2)</sup>. Wir haben mit demselben Stamm gearbeitet, allerdings stets etwas grössere „Blindwerte“ gehabt, so dass anzunehmen ist, dass unsere Kulturen weniger Decarboxylase-frei waren. Für die Prüfung der synthetischen Codecarboxylase-präparate auf ihre Wirksamkeit ist dies im Prinzip belanglos; es müssen sich lediglich etwas geringere Wirksamkeitsunterschiede ergeben.

### 3. Eigene Versuche.

Wir haben die Absorptionsspektren von Pyridoxal-acetal in 1/100 n. HCl und 1/100 n. NaOH, sowie von krystallisiertem Pyridoxal-acetal-phosphat<sup>3)</sup> in 1/100 n. HCl, 1/100 n. und n. NaOH aufgenommen (Fig. 2 und 3). Diese zeigen folgendes:

Pyridoxal-acetal in 0,01-n. HCl	Absorpt.-Max. bei 288 mμ
„ „ „ 0,01-n. NaOH	„ „ „ 302 mμ
Pyridoxal-acetal-phosphat in 0,01-n. HCl	„ „ „ 280 mμ
„ „ „ 0,01-n. NaOH	„ „ „ 274 und 304 mμ
„ „ „ 1-n. NaOH	„ „ „ 274 und 302 mμ

Wie diesen Messungen zu entnehmen ist, wirkt sich die Änderung des p<sub>H</sub> sowohl beim Pyridoxal-acetal wie beim Pyridoxal-acetal-phosphat im Spektrum aus, was zu erwarten war, da beide Substanzen in saurer Lösung als Kation, in alkalischer als Anion vorliegen. Die Meinung von *Gunsalus* et al.<sup>4)</sup>, der 3-Phosphorsäureester des Pyridoxals müsste in saurem und alkalischem Medium dieselbe Absorptionsbande besitzen, ist somit unrichtig und die daran geknüpften Schluss-

<sup>1)</sup> Arch. Bioch. **7**, 191 (1945).

<sup>2)</sup> Arch. Bioch. **7**, 185 (1945).

<sup>3)</sup> P. Karrer, M. Viscontini, Helv. **30**, 52 (1947).

<sup>4)</sup> Abstracts American Chem. Soc. 110th meeting, Chicago 34 B (1946); J. Biol. Chem. **170**, 415 (1947).

folgerungen sind wertlos. Der Phosphorsäureester verhält sich anders als der Pyridoxin-3-methyläther<sup>1)</sup>, was auch a priori zu erwarten war.

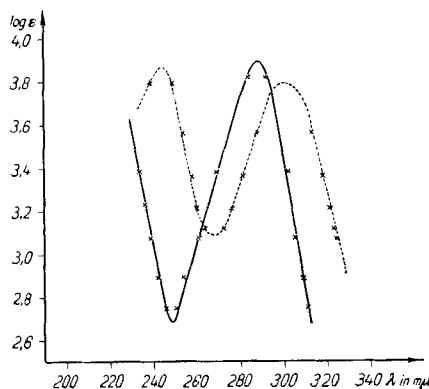


Fig. 2.

- Spektrum von Pyridoxal-acetal  
in 0,01-n. HCl.  
..... Spektrum von Pyridoxal-acetal  
in 0,01-n. NaOH.

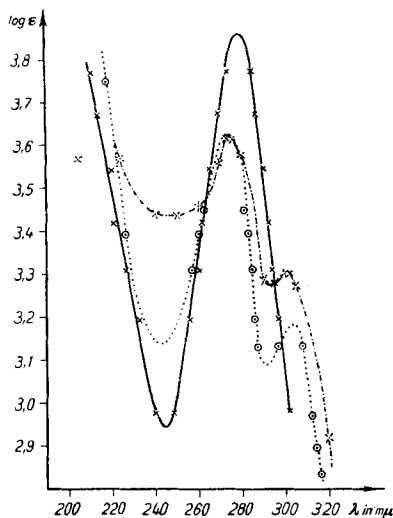


Fig. 3.

- Spektrum von Pyridoxal-acetal-  
phosphat in 0,01-n. HCl.  
..... Spektrum von Pyridoxal-acetal-  
phosphat in 0,01-n. NaOH.  
- · - · - Spektrum von Pyridoxal-acetal-  
phosphat in 1-n. NaOH.

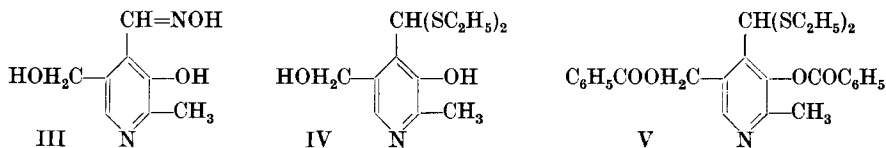
Es wäre zur Beurteilung der Konstitutionsfrage der Code-carboxylase wichtig gewesen, wenn es gelungen wäre, auch denjenigen Phosphorsäureester des Pyridoxals herzustellen, welcher die Phosphorsäuregruppe am primären Hydroxyl des Pyridoxals enthält (Stellung 5). Zahlreiche Versuche, die wir zur Synthese dieser Verbindung ausführten, haben das gewünschte Resultat bisher nicht zeitigt. Sie sind trotzdem von einiger Bedeutung, weil sie über die Möglichkeit der Bildung dieses Phosphorsäureesters bei direkter Phosphorylierung der Pyridoxals gewisse Rückschlüsse erlauben.

Zunächst versuchten wir, Pyridoxal-oxim (III) in Pyridin mit  $\text{POCl}_3$  zu phosphorylieren. Es bildete sich dabei nur eine äusserst geringe Menge eines amorphen Produktes mit 2—3% Phosphorgehalt, aus dem keine einheitliche Verbindung gewonnen werden konnte. Ebenso wenig gelang es, Pyridoxal-oxim in der primären Alkoholgruppe zu tritylieren.

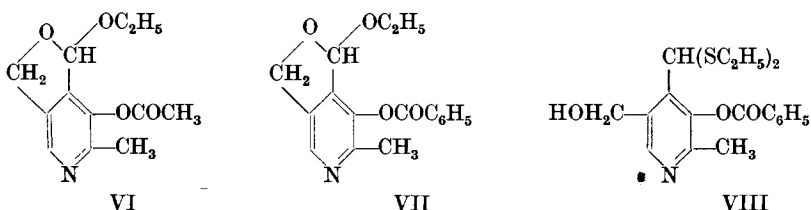
Hierauf stellten wir aus Pyridoxal und Äthylmercaptan Pyridoxal-diäthyl-mercaptopal (IV) her, eine gut kristallisierte Substanz, die

<sup>1)</sup> E. T. Stiller, J. C. Keresztesy, J. R. Stevens, Am. Soc. **61**, 1239 (1939).

sich indessen mit Tritylchlorid auch nicht umsetzen liess. Die Phosphorylierung dieser Verbindung verlief unbefriedigend, indem sich ein uneinheitliches Reaktionsprodukt in kleiner Menge bildete, welches wenig Phosphor enthielt. Dagegen war es möglich, aus Pyridoxal-diäthylmercaptal (IV) das Dibenzoyl-derivat V in krystallisierter Form zu gewinnen. Versuche, es partiell zu einem Monobenzoyl-derivat zu verseifen, waren aber bisher erfolglos.



In der Absicht, ein geeignetes Derivat zur Veresterung der primären Alkoholgruppe des Pyridoxals mit Phosphorsäure zu gewinnen, synthetisierten wir das Pyridoxal-äthylacetal-acetat (VI) und das Pyridoxal-äthylacetal-benzoat (VII) und versuchten, die Acetalgruppe ohne Abspaltung der Acylgruppen hydrolytisch zu spalten. Wir konnten dieses Ziel nicht erreichen, da in allen Fällen, in denen die Acetalgruppe verseift wurde, auch eine weitgehende Abspaltung der Säurereste (Acetyl-, Benzoyl-) stattfand. Schliesslich ist es gelungen durch Umsatz des Pyridoxal-äthylacetal-benzoates (VII) mit Äthylmercaptan das Pyridoxal-diäthylmercaptal-3-benzoat (VIII) zu gewinnen.



Aber die Versuche, die primäre alkoholische Hydroxylgruppe dieser Verbindung VIII zu phosphorylieren, verliefen bisher ohne das gewünschte Resultat. Warum die Veresterung dieser Gruppe durch Phosphorsäure in den verschiedenen genannten Derivaten solche Schwierigkeiten macht, lässt sich vorläufig nicht erklären. Diese Tatsache lässt es aber nicht als sehr wahrscheinlich erscheinen, dass unter den Einwirkungsprodukten von  $\text{POCl}_3$  auf Pyridoxal, die *Gunsalus* et al. als „synthetische Decarboxylase“ bezeichneten, der 5-Phosphorsäureester, d. h. die Verbindung mit phosphorylierter primärer Hydroxylgruppe, als einziger Phosphorsäureester vorhanden sein wird.

Mit unserem krystallisierten Pyridoxal-acetal-phosphat<sup>1)</sup> haben wir eine Reihe neuer Decarboxylierungen von L-Tyrosin ausgeführt,

<sup>1)</sup> P. Karrer, M. Viscontini, *Helv.* **30**, 52 (1947).

wobei als Apoferment wiederum das Trockenpulver von *Streptococcus faecalis* R der American Type Culture Collection No. 8043 diene. Das Pulver wurde durch Trocknen der *Streptococcus faecalis*-Fällung bei niedriger Temperatur im Hochvakuum bereitet. Die Versuchsergebnisse sind graphisch in Fig. 4—6 dargestellt. Sie bestätigen unsere früheren<sup>1)</sup> Versuchsergebnisse in jeder Hinsicht. Insbesondere

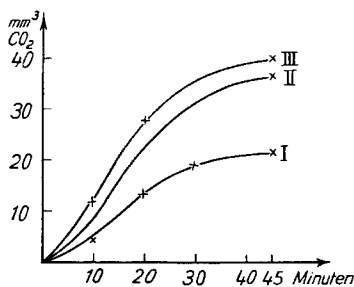


Fig. 4.

- I. 23  $\gamma$  Pyridoxal-acetal und Kurve des Blindversuches (ohne Zusatz einer Pyridoxal-verbindung).  
 II. 23  $\gamma$  Pyridoxal-acetal + 500  $\gamma$  A.T.P.  
 III. 29  $\gamma$  Pyridoxal-acetal-phosphat.  
 Apoferment: 4 mg Trockenpulver von *Strept. faecalis* (auf B<sub>6</sub>-freiem Medium gewachsen).

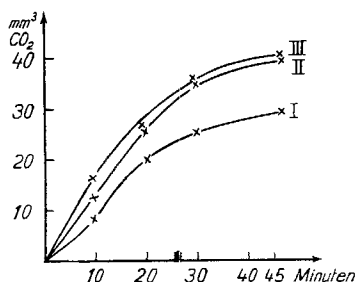


Fig. 5.

- I. 2,3  $\gamma$  Pyridoxal-acetal und Blind-versuch.  
 II. 2,3  $\gamma$  Pyridoxal-acetal + 500  $\gamma$  A.T.P.  
 III. 2,9  $\gamma$  Pyridoxal-acetal-phosphat.  
 Apoferment: 4 mg Trockenpulver von *Strept. faecalis*.

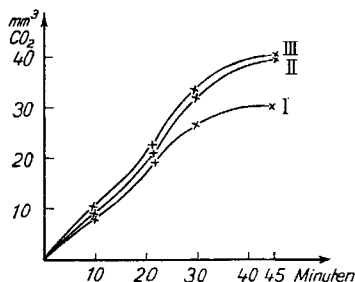


Fig. 6.

- I. 0,46  $\gamma$  Pyridoxal-acetal und Blind-versuch.  
 II. 0,46  $\gamma$  Pyridoxal-acetal + 500  $\gamma$  A.T.P.  
 III. 0,58  $\gamma$  Pyridoxal-acetal-phosphat.  
 Apoferment: 4 mg Trockenpulver von *Strept. faecalis*.

ist den Kurven zu entnehmen, dass krystallisiertes Pyridoxal-acetal-3-phosphat sowie dessen Bariumsals<sup>2)</sup> als Coferment der L-Tyrosindecaboxylase aktiv ist, und dass dessen Wirksamkeit in der Grössenordnung durchaus derjenigen von Pyridoxal + A.T.P. entspricht. Die Angabe

<sup>1)</sup> P. Karrer, M. Viscontini, Helv. **30**, 52 (1947).

<sup>2)</sup> Gunsalus und Umbreit, J. Biol. Chem. **170**, 415 (1947).

von *Gunsalus* und *Umbreit*<sup>1)</sup>, dass die Wirksamkeit des Pyridoxal-acetal-phosphats tausend Mal geringer sei als diejenige des Pyridoxals + A.T.P. ist daher unverständlich und unrichtig. Wir haben auch die „synthetische Codecarboxylase“, die wir nach den Angaben von *Gunsalus* und Mitarbeitern herstellten, mit krystallisiertem Pyridoxal-acetal-phosphat verglichen und konnten mit ihr jedenfalls keine stärkere Cofermentwirkung erzielen.

Wir halten daher unsere früheren Angaben, dass Pyridoxal-acetal-phosphat bzw. Pyridoxal-3-phosphorsäureester starke Wirkung als Tyrosin-codecarboxylase besitzt und darin von der Mischung Pyridoxal + A.T.P. nicht übertroffen wird, aufrecht. Damit ist zwar die Frage, ob natürliche Codecarboxylase mit Pyridoxal-3-phosphat identisch ist, nicht entschieden, sie hat aber einen hohen Grad von Wahrscheinlichkeit.

Im übrigen möchten wir darauf hinweisen, dass sich nicht alle Stämme von *Streptococcus faecalis* für die fermentativen Versuche in gleicher Weise eignen. Wir haben z. B. auch solche Stämme in Händen gehabt, bei denen auch Pyridoxal in unphosphorylierter Form eine deutliche Codecarboxylasewirkung aufwies<sup>2)</sup>, wenn man als Apoferment lebende Zellen des Mikroorganismus benutzte.

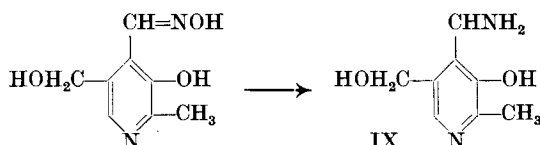
Schliesslich haben wir noch eine neue Darstellungsmethode für Pyridoxamin (IX) ausgearbeitet, die viel bessere Ausbeuten als die in der Literatur beschriebene gibt. Sie besteht in der katalytischen Reduktion von Pyridoxal-oxim in Eisessig und liefert Pyridoxamin in Ausbeuten von ca. 87 %.

Diese Verbindung wurde schon von *Harris*, *Heyl* und *Folkers*<sup>3)</sup> nach verschiedenen Methoden dargestellt:

a) Durch Einwirkung von alkoholischem Ammoniak auf Pyridoxindiacetat während 3 Stunden bei 110°. Ausbeute aus 2 g Pyridoxin einige Milligramme Pyridoxamin-hydrochlorid.

b) Durch Einwirkung von flüssigem Ammoniak auf Pyridoxindiacetat in einer Stahlbombe, die man während 15 Stunden auf 140° erhitzt. Ausbeute an Pyridoxamin (Rohprodukt) ca. 7%.

c) Durch Reduktion von Pyridoxal-oxim in Methanol mit Wasserstoff und Platin-oxyd unter 2 Atm. Druck während 3 Stunden. Ausbeute aus 0,145 g Pyridoxal-oxim einige Milligramme Pyridoxamin.



<sup>1)</sup> *Gunsalus* und *Umbreit*, *J. Biol. Chem.* **170**, 415 (1947).

<sup>2)</sup> Vgl. betreffs Wirksamkeit von Pyridoxal auch *J. C. Gunsalus*, *W. D. Bellamy*, *J. Biol. Chem.* **155**, 357 (1944).

<sup>3)</sup> *Am. Soc.* **66**, 2088 (1946).



Die Figuren 7 und 8 zeigen die Absorptionsspektren von Pyridoxamin in saurer, neutraler und alkalischer Lösung und jene des Pyridoxamin-N-kohlensäureäthylesters in neutralem und saurem Medium.

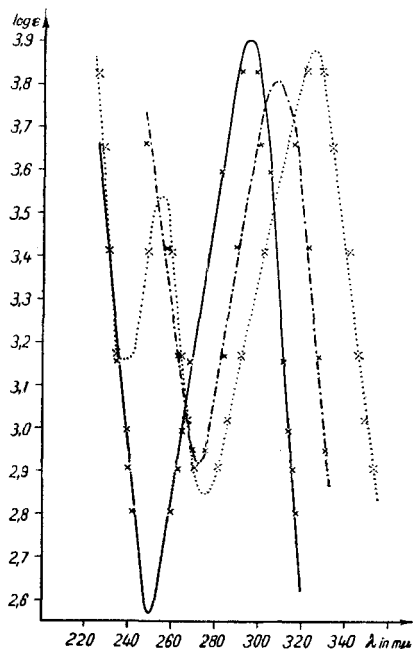


Fig. 7.

- Spektrum von Pyridoxamin in 0,01-n. HCl.  
 ..... Spektrum von Pyridoxamin in neutraler Lösung ( $H_2O$ ).  
 - · - · - Spektrum von Pyridoxamin in alkalischer Lösung (0,01-n. NaOH).

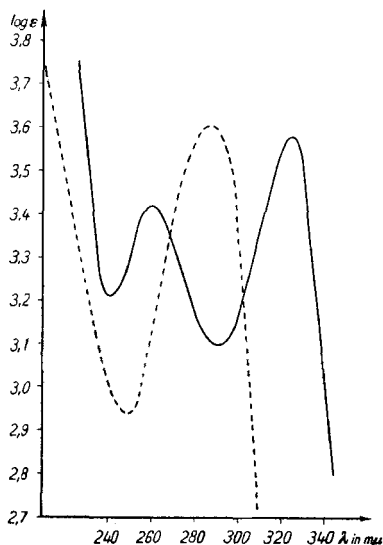


Fig. 8.

- Spektrum von Pyridoxamin-kohlensäure-ester in neutraler Lösung ( $H_2O$ ).  
 --- Spektrum von Pyridoxamin-kohlensäure-ester in 0,01-n. HCl.

Die vorstehende Arbeit wurde durch Mittel unterstützt, die uns aus den Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes zur Verfügung gestellt worden sind. Wir sprechen dafür unseren besten Dank aus.

### Experimenteller Teil.

#### Darstellung von Pyridoxal-diäthylmercaptal (IV).

100 mg Pyridoxal-oxim wurden nach *Harris, Heyl und Folders*<sup>1)</sup> mit  $NaNO_2$  in salzsaurer Lösung in das Hydrochlorid des Pyridoxals übergeführt.

Das so erhaltene Gemisch von Pyridoxal-hydrochlorid und NaCl wurde in 0,3 cm<sup>3</sup> konz. HCl gelöst. Zu dieser Lösung haben wir ca. 90 mg Äthylmercaptan in drei Portionen einpipettiert, wobei der Kolben nach jeder Zugabe verschlossen und kräftig geschüttelt wurde. Nach beendeter Zugabe blieb das Reaktionsgemisch verschlossen über Nacht stehen.

Zur Isolierung des Mercaptals wurde zunächst die Salzsäure im Vakuum bei einer Badtemperatur von 30° abdestilliert, wobei die Vorlage mit Kaliumhydroxyd beschickt war. Es blieb ein gelb-brauner Rückstand, das Hydrochlorid des Mercaptals, zurück.

<sup>1)</sup> Am. Soc. **66**, 2088 (1946).

Um daraus die Base in Freiheit zu setzen, wurde es in 4–5 cm<sup>3</sup> Wasser aufgenommen und die wässrige Lösung mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert, wobei die Base ausfiel. Nach dem Abnutschen und Waschen mit wenig kaltem Wasser wurde der Rückstand in 10 cm<sup>3</sup> kochendem Wasser gelöst und zur Krystallisation gestellt.

Das auskrystallisierte Pyridoxal-mercaptopal wurde während 2 Stunden bei 70° im Hochvakuum getrocknet. Der Schmelzpunkt der Krystalle lag bei 126°, die Analyse ergab folgende Resultate:

$C_{12}H_{19}O_2NS_2$	Ber. C 52,71	H 7,00%
(273,18)	Gef. „ 52,74	„ 6,96%

Ausbeute: 56 mg Pyridoxal-diäthylmercaptopal aus 100 mg Pyridoxal-oxim. Die Mercaptalgruppe ist gegenüber Säuren sehr beständig; in schwach alkalischer Lösung tritt aber schon bei Zimmertemperatur rasch Abspaltung ein.

#### Versuch zur Phosphorylierung des Pyridoxal-mercaptopals.

350 mg Pyridoxal-mercaptopal wurden in 2,5 cm<sup>3</sup> trockenem Pyridin gelöst und die Flüssigkeit auf 0° abgekühlt. Weiterhin haben wir 850 mg frisch destilliertes POCl<sub>3</sub> in 2,5 cm<sup>3</sup> Pyridin gelöst und ebenfalls gekühlt. Nun wurde die POCl<sub>3</sub>-Lösung innerhalb von 10 Minuten in die Pyridoxal-mercaptopal-Lösung getropft.

Das zunächst goldgelbe Reaktionsgemisch hatte sich nach 24-stündigem Stehen bei Zimmertemperatur gelbbraun gefärbt.

Zur Aufarbeitung wurde das Pyridin durch Vakuumdestillation grösstenteils entfernt; es blieb eine braune Masse zurück. Diese wurde nun auf 0° abgekühlt. Dann wurde langsam Eiswasser eingetropft, wobei bis auf einen geringen Teil (ca. 20 mg, die durch Filtration entfernt wurden) alles in Lösung ging. In die klare Lösung wurde so lange feinst gepulvertes Bariummethyolat eingetragen, bis das p<sub>H</sub> der Lösung 6,5–7 betrug. Beim Stehen über Nacht hatte sich Bariumphosphat abgeschieden; es wurde auf einer Glasfilternutsche abgesaugt und das Filtrat weiter bis p<sub>H</sub> 8,5 mit Bariummethyolat versetzt. Nach Entfernung einer weiteren geringen Bariumphosphatmenge haben wir zur wässrigen Lösung so lange 0,2-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tropfenweise zugefügt, bis sie neutral reagierte, und das ausgeschiedene BaSO<sub>4</sub> durch Absaugen entfernt.

Nachdem die freie Phosphorsäure so aus der Lösung abgetrennt worden war, wurde letztere im Vakuum bei 35° zur Trockne verdampft und der Rückstand getrocknet. Durch Behandlung mit absolutem Alkohol bei 40° liess sich ein farbloser, aus BaCl<sub>2</sub> bestehender Rückstand abscheiden.

Diese alkoholische Lösung wurde zur Trockne verdampft; es blieb ein brauner Rückstand zurück, der neben Stickstoff und Phosphor noch geringe Mengen Chlor enthielt. Zur Entfernung des Halogens haben wir die Substanz in 5 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O gelöst, Silbercarbonat im Überschuss dazugegeben, und 6 Stunden geschüttelt. Nach Entfernung des Bodenkörpers wurde durch Einleiten von H<sub>2</sub>S wenig gelöstes Silber abgetrennt, das Filtrat zur Trockne verdampft und der im Hochvakuum getrocknete Rückstand analysiert:

Gef. N 6,01% P 5,46% S 11,45%.

Die dunkelbraune, amorphe Substanz konnte nicht krystallisiert werden. Falls nicht ein Gemisch verschiedener Stoffe vorliegt, könnte es sich, wie das Verhältnis von S:P = 2:1 und der hohe Stickstoffwert erkennen lassen, vielleicht um unreines, mono-phosphoryliertes Pyridin-Salz des Pyridoxal-mercaptopals handeln.

Bei einem Ansatz zur Tritylierung des Pyridoxal-mercaptopals konnte kein Tritylierungsprodukt, sondern nur Pyridoxal-mercaptopal und Triphenylcarbinol zurückerhalten werden.

#### Darstellung von Dibenzoyl-pyridoxal-diäthylmercaptopal (V).

170 mg Pyridoxal-mercaptopal wurden in 5 cm<sup>3</sup> absolutem Pyridin gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Eiskühlung 360 mg Benzoylchlorid, in 3 cm<sup>3</sup> Pyridin gelöst, eingetropft. Zur Aufarbeitung hat man das Reaktionsgemisch auf 0° abgekühlt und tropfenweise vorsichtig mit ca. 5 cm<sup>3</sup> Eiswasser versetzt. Durch Eintragen von Natriumhydrogencarbonat wurde die Lösung schwach alkalisch gemacht und dreimal mit Äther ausgezogen.

Die vereinigten, mit Wasser gewaschenen Ätherextrakte wurden über Natriumsulfat getrocknet und hierauf der Äther verdampft. Der Rückstand enthielt noch Spuren Pyridin, die sich durch 2-stündiges Erwärmen bei 35° im Hochvakuum entfernen liessen. Der trockene, gelbbraune Rückstand wurde in 3—4 cm<sup>3</sup> Alkohol in der Wärme gelöst, die Lösung filtriert und zur Krystallisation gestellt. Nach dreimaligem Umkrystallisieren lag der Schmelzpunkt des Dibenzoylpyridoxal-diäthylmercaptals bei 93°. Ausbeute 250 mg.

Die Analyse ergab folgende Resultate:

$C_{26}H_{27}O_4NS_2$	Ber. C 64,83	H 5,65%
(481,2)	Gef. „ 65,03	„ 5,62%

#### Acetyl-pyridoxal-äthylacetal (VI).

1 g Pyridoxal-äthylacetal wurde in 7 cm<sup>3</sup> absolutem Pyridin gelöst und auf 0° abgekühlt. Hierauf hat man eine Lösung von 900 mg Essigsäureanhydrid in 4 cm<sup>3</sup> Pyridin tropfenweise unter Schütteln des Kolbens zu der gekühlten Lösung gefügt. Das Reaktionsgemisch wurde über Nacht stehen gelassen.

Zur Aufarbeitung wurden ca.  $\frac{2}{3}$  des Pyridins bei 50° Badtemperatur im Vakuum entfernt und der Rückstand auf -5° abgekühlt, worauf man allmählich 1 cm<sup>3</sup> H<sub>2</sub>O eintropfte. Nach einigem Stehen haben wir diese wässrige Pyridinlösung in einem Scheidetrichter mit weitem 15 cm<sup>3</sup> Wasser versetzt, bis zur deutlich alkalischen Reaktion Natriumhydrogencarbonat zugefügt und viermal mit je 15 cm<sup>3</sup> Äther ausgezogen. Die vereinigten, mit Wasser gewaschenen Ätherauszüge haben wir getrocknet, filtriert, den Äther abdestilliert und so ein schwach gelbes Öl erhalten, das man zweimal im Kugelrohr bei 0,005 mm Druck destillierte. Es ging bei 125—127° über. Wie die Analyse zeigt, handelt es sich um das Acetylpyridoxal-äthylacetal:

$C_{12}H_{15}O_4N$	Ber. C 60,73	H 6,37	N 5,90%
(237,1)	Gef. „ 59,84	„ 6,14	„ 5,89%

Das viskose Öl konnte nicht zur Krystallisation gebracht werden.

#### Benzoyl-pyridoxal-äthylacetal (VII).

270 mg Pyridoxal-äthylacetal-hydrochlorid wurden in 2 cm<sup>3</sup> absolutem Pyridin gelöst und die Lösung auf 0° abgekühlt. Nach Eintropfen eines Gemisches von 0,15 cm<sup>3</sup> Benzoylchlorid und 2,5 cm<sup>3</sup> Pyridin wurde das Gemisch nach 8-stündigem Stehen und kurzem Erwärmen auf 50° im Wasserbad vorsichtig in 8 cm<sup>3</sup> Eiswasser getropft, wobei eine milchige Suspension entstand. Durch Eintragen von Natriumhydrogencarbonat wurde alkalisch gemacht und die Flüssigkeit viermal mit Äther ausgezogen. Die vereinigten, mit gesättigter Natriumhydrogencarbonat-Lösung und Wasser gewaschenen und getrockneten Ätherauszüge haben wir eingengt und das zurückbleibende, fast farblose Öl während 2 Stunden bei 65° im Hochvakuum getrocknet. Es gelang nicht, das stark viskose Öl zur Krystallisation zu bringen, weshalb wir es zur weiteren Reinigung mit viel Petroläther auskochten, die Lösung filtrierten und die gelöste Substanz nach Entfernung des Lösungsmittels durch Analyse auf ihre Reinheit prüften.

$C_{17}H_{17}O_4N$	Ber. C 68,20	H 5,72	N 4,7%
(299,1)	Gef. „ 68,45	„ 6,09	„ 5,2%

Das benzoyleierte Pyridoxal-acetal ist in Alkohol und Äther leicht löslich, schwer löslich in Petroläther und unlöslich in Wasser.

#### Versuche zur Aufspaltung des Acetalringes beim Acetyl-pyridoxal-äthylacetal.

395 mg Acetyl-pyridoxal-acetal wurden mit der berechneten Menge 1-n. Salzsäure in das Hydrochlorid übergeführt und zu dieser wässrigen Lösung ein Tropfen 6-n. HCl gefügt. Nachdem diese Lösung während 5 Minuten im Wasserbad auf 50—55° erwärmt worden war und hiernach  $\frac{1}{2}$  Stunde bei Zimmertemperatur gestanden hatte, wurde mit Natriumhydrogencarbonat alkalisch gemacht ( $p_H$  8), und fünfmal mit je 10 cm<sup>3</sup> Äther ausgezogen. Nach dem Trocknen und Verdampfen des Äthers blieben 380 mg eines gelben

Öls zurück, dessen Äthoxyl-Gehalt 18,40% betrug. (Der  $-\text{OC}_2\text{H}_5$ -Gehalt des Ausgangsmaterials beträgt 18,93%).

Der Acetalring war unter den geschilderten Bedingungen also nicht aufgespalten worden.

Die zurückerhaltene Substanz wurde nochmals mit der berechneten Salzsäuremenge in Wasser gelöst und 8 Tropfen 6-n. Salzsäure zugefügt. Nach 10 Minuten Erwärmen auf 60—65° und halbstündigem Stehen haben wir die Flüssigkeit, wie oben geschildert, alkalisch ausgeäthert. Die so zurückgewonnene Substanz zeigte einen unveränderten Äthoxylgehalt.

Bei einem weiteren Versuch zur Aufspaltung des Acetalringes mit derselben Substanz wurde nicht wie vorher ausgeäthert, sondern die salzsaure, wässrige Lösung im Vakuum bei 30—35° zur Trockene eingengt. Nach Umkrystallisation des Rückstandes aus Wasser, Aceton und wenig Äther lag der Schmelzpunkt der Substanz bei 166°. Die Krystalle, deren N-Gehalt 7,11% betrug, enthielten kein  $-\text{OC}_2\text{H}_5$ . Es handelte sich um Pyridoxal-hydrochlorid, dessen N-Gehalt 6,90% beträgt und welches bei 171° schmilzt.

Die gleichen Versuche haben wir mit dem Benzoyl-pyridoxal-äthylacetal wiederholt. Auch hier liess sich durch dieselbe Behandlung mit verdünnter Salzsäure keine Aufspaltung des Acetalringes erreichen, während beim Eindampfen der wässrigen Lösung im Vakuum bei 30—35° neben der Aufspaltung des Acetalringes auch der Benzoylrest abgespalten wurde, so dass sich auch hier nur freies Pyridoxal zurückgewinnen liess. Eine Öffnung des Acetalringes, ohne Verseifung der Acylgruppe, ist also bisher nicht gelungen.

#### Benzoyl-pyridoxal-diäthyl-mercaptal (VIII).

100 mg Benzoyl-pyridoxal-äthylacetal wurden in 4 cm<sup>3</sup> Äthyl-mercaptan gelöst und die Mischung auf –5° abgekühlt, worauf man während 5 Minuten trockenes Chlorwasserstoffgas einleitete. Nach einer Minute fiel ein dicker, gelber Niederschlag aus, der aber bei weiterem Einleiten von Chlorwasserstoff wieder in Lösung ging. Die mit Chlorwasserstoff gesättigte Mercaptan-Lösung stand hiernach während 24 Stunden bei –10° im Kühlschrank.

Zur Aufarbeitung wurde das Mercaptan bei 20° abdestilliert, der Rückstand mit Wasser und Äther überschichtet und zur Bindung der Salzsäure bis  $p_{\text{H}}$  7,5 Natriumhydrogencarbonat zugesetzt und geschüttelt. Nach dreimaligem Ausziehen der schwach alkalischen Lösung mit Äther, Waschen der vereinigten Ätherauszüge mit Wasser und Trocknen, hat man den Äther abdestilliert, wonach ein hellbraunes Öl zurückblieb. Dieses wurde am Rückfluß mehrmals mit tiefsiedendem Petroläther ausgekocht und die Petrolätherlösungen gesammelt. Nach mehrstündigem Stehen hatten sich in der Petrolätherlösung grosse, farblose Krystalle gebildet, deren Schmelzpunkt vor und nach dem Umkrystallisieren bei 116—117° lag. Wie die Analyse zeigt, handelt es sich um das 3-Benzoyl-pyridoxal-diäthylmercaptal.

$\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{O}_3\text{NS}_2$	Ber. C 60,44	H 6,13	N 3,71	S 16,97%
(377,18)	Gef. „ 60,36	„ 5,95	„ 4,25	„ 17,44%

#### Versuche zur Phosphorylierung des Benzoyl-pyridoxal-diäthyl-mercaptals.

500 mg Benzoyl-pyridoxal-diäthylmercaptal wurden in einem 15 cm<sup>3</sup> Kolben in 3 cm<sup>3</sup> Pyridin gelöst, die Lösung auf 0° abgekühlt und aus einer Pipette 2 Mol. frisch destilliertes  $\text{POCl}_3$  eingetropft. Die Mischung hatte sich nach kurzer Zeit gelb gefärbt und stand danach noch 20 Stunden bei Zimmertemperatur, wonach das Reaktionsgemisch braun geworden war.

Zur Aufarbeitung wurde der Kolben auf –12° gekühlt und langsam Wasser in kleinen Tropfen zugesetzt. Nachdem alles  $\text{POCl}_3$  zersetzt war, haben wir weitere 10 cm<sup>3</sup> Wasser hinzugefügt, wobei die Lösung völlig klar blieb. (Das Ausgangsmaterial ist wasserunlöslich.) Hierauf trug man in die gekühlte Lösung feinst gepulvertes  $\text{Ba}(\text{OH})_2$ , 8 H<sub>2</sub>O so lange ein, bis das  $p_{\text{H}}$  8,5 betrug. Man nutschte das ausgeschiedene Bariumphosphat rasch ab und wusch mit Wasser nach. Das Filtrat wurde sofort mit 0,5-n. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tropfenweise versetzt und die überschlüssigen Bariumionen ausgefällt.

Zur Entfernung der noch in der Lösung vorhandenen Chlorionen wurde mit Silbercarbonat geschüttelt und nach der Filtration die geringe in Lösung gegangene Silber-

menge durch Schwefelwasserstoffabfallung beseitigt. So erhielt man eine klare, hellgelbe Lösung, die jedoch keinen Phosphor enthielt.

#### Darstellung von Pyridoxamin (Dihydrochlorid).

Man löst 1 g Pyridoxal-oxim in 50 cm<sup>3</sup> Eisessig, fügt 0,50 g PtO<sub>2</sub> hinzu und reduziert mit Wasserstoff bei gewöhnlichem Druck. Nach 5 Stunden ist die Reduktion beendet. Man filtriert vom Platin ab, verdampft den Eisessig im Vakuum, nimmt den Rückstand in 20 cm<sup>3</sup> Alkohol auf und setzt dazu 2 cm<sup>3</sup> gesättigte alkoholische Salzsäure. Nach kurzer Zeit ist das Pyridoxamin-dihydrochlorid auskristallisiert. Es wird abgenutscht und mit Alkohol und Äther gewaschen. Smp. 198—200°. Ausbeute 1 g; aus den Mutterlaugen lassen sich durch Konzentrieren der Flüssigkeit weitere 0,150 g Pyridoxamin-dihydrochlorid erhalten. Somit Totalausbeute 1,15 g oder 87% der Theorie.

$C_8H_{12}O_2N_2$ , 2 HCl	Ber. C 39,81	H 5,84	N 11,62%
(241,1)	Gef. „ 39,42	„ 5,78	„ 11,82%

#### 2-Methyl-3-oxy-4-carbäthoxyaminomethyl-5-oxymethyl-pyridin-dihydrochlorid.

1,200 g (0,005 Mol) Pyridoxamin-dihydrochlorid werden in feingepulvertem Zustand in absolutem Alkohol suspendiert und dazu eine Lösung von 0,680 g (0,01 Mol) Natriumäthylat in absolutem Alkohol hinzugesetzt. Nach einiger Zeit kühlt man die Flüssigkeit auf  $-10^{\circ}$  und fügt nach und nach eine Lösung von 1 cm<sup>3</sup> Chlorkohlensäureäthylester in 10 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol, die auf  $-10^{\circ}$  gekühlt ist, hinzu. Hierauf wird eine Lösung von 0,340 g Natriumäthylat (0,005 Mol) in Alkohol eingetropft und die Flüssigkeit durch Kühlung stets unter  $0^{\circ}$  gehalten. Nach ca. 15 Minuten wird noch so viel Natriumäthylatlösung zugesetzt, dass das p<sub>H</sub> der Mischung ca. 7 beträgt; dann bleibt diese über Nacht stehen. Sollte das Reaktionsgemisch nach dieser Zeit nicht neutral reagieren, so wird es genau neutralisiert, das ausgefallene NaCl abfiltriert, das Filtrat mit konzentrierter alkoholischer Salzsäure angesäuert und mit Äther versetzt. Nach 12 Stunden hatten sich aus der im Eisschrank gehaltenen Lösung 1,10 g Krystalle des N-Carbäthoxy-pyridoxaminhydrochlorids ausgeschieden; 0,25 g konnten aus den Mutterlaugen isoliert werden. Gesamtausbeute ca. 95% der Theorie.

Die Verbindung schmilzt erstmals bei 115—118° (Block *Maquenne*); bei weiterem Erhitzen wird sie wieder fest und schmilzt ein zweites Mal unter Dunkelfärbung gegen 158°.

$C_{11}H_{16}O_4N_2$ , HCl	Ber. C 47,72	H 6,18	N 10,12	Cl 12,83%
(276,6)	Gef. „ 47,3	„ 6,10	„ 9,73	„ 13,02%

#### Zusammenfassung.

Es wird erneut gezeigt, dass das Pyridoxal-äthylacetal-3-phosphat bzw. Pyridoxal-3-phosphat als Coferment der L-Tyrosindecaboxylase wirksam ist und quantitativ mindestens gleich starke Wirkung besitzt wie eine Mischung von Pyridoxal und Adenosin-triphosphat.

Fernerhin wurden synthetisiert: Pyridoxal-diäthylmercaptopal, dessen Dibenzoylderivat, Pyridoxal-äthyl-acetal-acetat, Pyridoxal-äthyl-acetal-benzoat und Pyridoxal-diäthyl-mercaptopal-3-benzoat.

Versuche, die primäre Alkoholgruppe des Pyridoxals oder verschiedener Derivate des Pyridoxals zu phosphorylieren, führten bisher zu keinen befriedigenden Ergebnissen.

Schliesslich wurde für die Herstellung von Pyridoxamin eine verbesserte Darstellungsmethode gefunden.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.