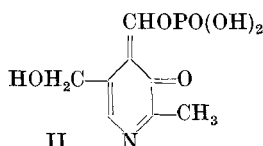
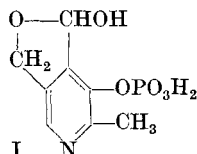


## 218. Konstitution und Synthese der Codecarboxylase

von M. Viscontini, C. Ebnöther und P. Karrer.

(21. VII. 51.)

Von Pyridoxal ist bisher ein einziger einheitlicher Phosphorsäureester, das kristallisierte Pyridoxal-3-phosphat (I), bekannt, das wir vor längerer Zeit herstellten<sup>1)</sup>. Dieses besitzt eine gewisse Wirksamkeit als Codecarboxylase<sup>1) 2)</sup>. Ein anderes phosphoryliertes Pyridoxal-Derivat haben *J. C. Gunsalus & W. W. Umbreit* erwähnt<sup>3)</sup>, welches sie durch Einwirkung von  $\text{POCl}_3$  auf Pyridoxal oder durch Veresterung des letzteren nach der *Schotten-Baumann'schen* Methode erhielten. Diese *Gunsalus-Umbreit'schen* Präparate könnten nach ihrer Herstellungsweise verschiedene Phosphorsäureester enthalten. Es sind denn auch für die darin enthaltene Phosphorverbindung verschiedene Formeln diskutiert worden. Während *J. C. Gunsalus & W. W. Umbreit*<sup>4)</sup> sowie *D. Heyl, St. A. Harris & K. Folkers*<sup>5)</sup> die Ansicht aussprachen, dass für die Stellung des Phosphorsäurerestes in ihren Präparaten die Acetalhydroxylgruppe der Acetalform des Pyridoxals nicht in Frage komme, sind *J. Baddiley, E. M. Thain & A. W. Rodwell*<sup>6)</sup> der Meinung, dass gerade diese Acetalhydroxylgruppe der Sitz des Phosphorsäurerestes sei; sie schlagen für den Ester das Formelbild II vor, das auch die gelbe Farbe der alkalischen Lösungen der Verbindung erklären soll.



Obwohl das kristallisierte Pyridoxal-3-phosphat (I) eine gewisse Codecarboxylasewirkung erkennen lässt, ist diese, wie *W. W. Umbreit & J. C. Gunsalus*<sup>7)</sup> zeigten und wie wir bestätigen müssen, geringer als diejenige der Präparate, die aus Pyridoxal und  $\text{POCl}_3$  dargestellt wurden. Die natürliche Codecarboxylase ist daher verschieden vom Pyridoxal-3-phosphat.

<sup>1)</sup> P. Karrer & M. Viscontini, *Helv.* **30**, 52, 524 (1947).

<sup>2)</sup> P. Karrer, M. Viscontini & O. Forster, *Helv.* **31**, 1004 (1948).

<sup>3)</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>4)</sup> Abstracts American Chem. Soc. 110th meeting Chicago 34B (1946).

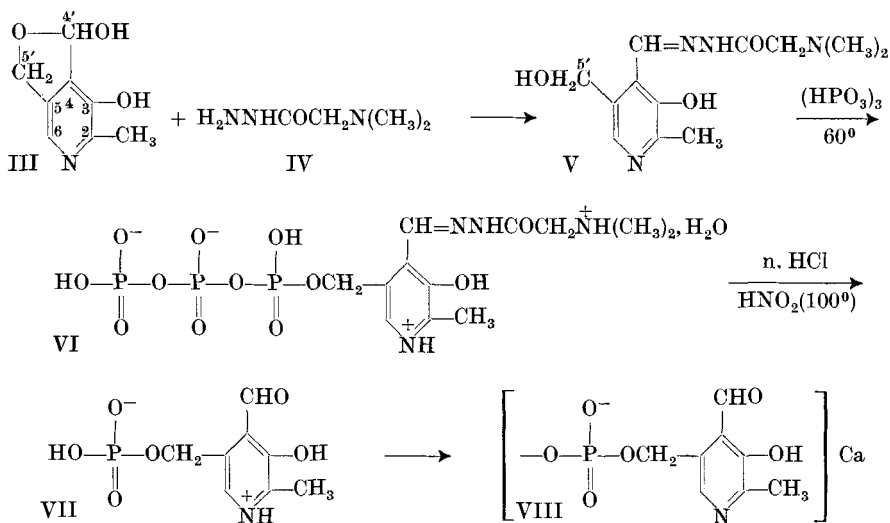
<sup>5)</sup> Abstracts American Chem. Soc. 110th meeting Chicago 35B (1946).

<sup>6)</sup> *Nature* **167**, 556 (1951).

<sup>7)</sup> *J. biol. Chem.* **179**, 259 (1949).

Wir haben daher schon seit längerer Zeit Versuche durchgeführt, die bezweckten, Codecarboxylase auf einem die Konstitution beweisenden Weg und in besserer Ausbeute zugänglich zu machen.

Es ist gelungen, eine Methode auszuarbeiten, die diesen Anforderungen entspricht. Sie beruht darauf, dass man Pyridoxal (III) mit (N-Dimethylglycyl)-hydrazin (IV) (Reagens D)<sup>1)</sup> zum Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon (V) kondensiert, das als Hydrochlorid in reiner, gut kristallisierter Form und guter Ausbeute erhalten wird. Dieses Hydrazon haben wir mit Metaphosphorsäure in den 5'-Triphosphorsäureester des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazons (VI) verwandelt, der ebenfalls in guter Ausbeute entsteht. Bei der Hydrolyse mit n. Salzsäure in Gegenwart von salpetriger Säure bei 100° werden der Hydrazonrest sowie 2 Mol Phosphorsäure abgespalten. Es entsteht eine Lösung des Pyridoxal-5'-phosphates (VII), aus der man mit Ca(OH)<sub>2</sub> das schwer lösliche, gelbe Calciumsalz VIII ausfällt<sup>2)</sup>. Die Ausbeute ist gut.



Der Zusatz von salpetriger Säure bei der Hydrolyse des Hydrazons VI ist notwendig, um das während der hydrolytischen Spaltung entstehende (N-Dimethylglycyl)-hydrazin zu zerstören; anderenfalls bildet sich ein Gleichgewicht zwischen VI und VII, und die Ausbeuten an VII werden verschlechtert.

Das Calciumsalz des Pyridoxal-5'-phosphorsäureesters (VIII) besitzt eine ausserordentlich hohe Wirksamkeit als Codecarboxylase.

<sup>1)</sup> M. Viscontini & J. Meier, Helv. **33**, 1773 (1950).

<sup>2)</sup> Die gelbe Farbe alkalischer Lösungen und der Erdalkalisalze des Pyridoxals und des Pyridoxal-5'-phosphates ist nicht überraschend, da sich auch Salicylaldehyd in Alkalien mit gelber Farbe löst.

Tabelle I enthält die Ergebnisse einiger Prüfungen des Präparates als Codecarboxylase für die Decarboxylierung des Tyrosins. Sie lässt erkennen, dass die Wirkung von 0,03  $\gamma$  der Verbindung ungefähr derjenigen von 2  $\gamma$  Pyridoxal bei Gegenwart von 500  $\gamma$  Adenosintri-phosphat entspricht.

**Tabelle 1.**

Wirkung des Pyridoxal-5'-phosphats (Calciumsalz) in Gegenwart von 3 mg Tyrosin und 1 mg Aceton-Trockenpulver von *Streptococcus faecalis* (an Pyridoxin verarmt). Gemessen durch Bestimmung des entwickelten  $\text{CO}_2$  (in  $\text{mm}^3$ ).

Reak.- Dauer in Min.	Tempe- ratur in $^{\circ}\text{C}$	2 $\gamma$ Pyridoxal	500 $\gamma$ ATP + 2 $\gamma$ Pyridoxal	Pyridoxal-5'-phosphat, Ca-Salz					
				1 $\gamma$	0,5 $\gamma$	0,1 $\gamma$	0,05 $\gamma$	0,03 $\gamma$	0,01 $\gamma$
10	37,1	6	16	18	17	15	14	15	14
20	37,1	20	42	47	45	45	41	39	31
30	37,1	22	52	62	60	56	52	48	37
10	36,6	12	25	27	27	27	24	25	21
20	36,6	22	46	51	51	50	44	45	36
30	36,6	26	60	58	67	64	59	57	45

Demgegenüber besitzt der 5'-Triphosphorsäureester des (N-Dimethylglycyl)-hydrazons des Pyridoxals unter denselben Versuchsbedingungen eine viel geringere Wirkung als Codecarboxylase:

**Tabelle 2.**

Reakt.- Dauer in Min.	Tempe- ratur in $^{\circ}\text{C}$	2 $\gamma$ Pyridoxal	500 $\gamma$ ATP + 2 $\gamma$ Pyridoxal	5'-Triphosphat d. (N-Dimethylglycyl)- hydrazons					
				10 $\gamma$	3 $\gamma$	1 $\gamma$	0,3 $\gamma$	0,1 $\gamma$	0,03 $\gamma$
10	38,0	15	35	28	26	17	12	14	12
20	38,0	25	51	53	45	32	24	25	32
30	38,0	34	70	75	65	44	35	35	34
10	38,0	19	26	25	23	18	15	15	16
20	38,0	25	41	47	39	23	19	19	20
30	38,0	25	53	64	49	26	17	21	22

In Figur 1 sind die Wirksamkeiten des Pyridoxal-5'-phosphates (Ca-Salz) und des 5'-Triphosphorsäureesters des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazons in graphischer Darstellung verglichen. Es geht daraus hervor, dass erstere Verbindung etwa 100mal stärker wirksam ist als die zweitgenannte.

Die analysierten Präparate des Calciumsalzes des Pyridoxal-5'-phosphates enthielten ca. 6%  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  und ca. 3 Mol  $\text{H}_2\text{O}$ . Ihr Gehalt an Pyridoxal entsprach 46,5% (der Pyridoxalgehalt der von *Gunsalus & Umbreit* beschriebenen Präparate war 32%).

Auf dem Umweg über das Magnesiumsalz gelang es, ein an Phosphationen freies Calciumsalz des Pyridoxal-5'-phosphates zu gewinnen, das die Zusammensetzung  $C_8H_8O_6NPCa \cdot 3H_2O$  besass.

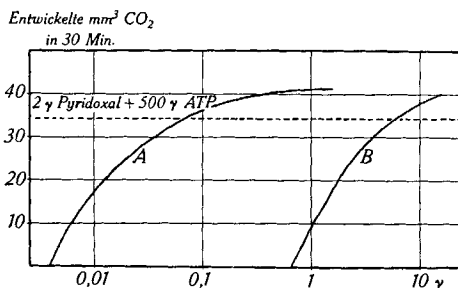


Fig. 1.

Kurve A: Pyridoxal-5'-phosphat (Ca-Salz).

Kurve B: (N-Dimethylglycyl)-hydrazon des Pyridoxal-5'-triphosphates.

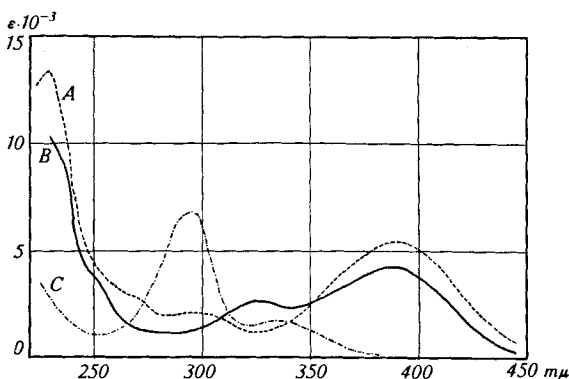


Fig. 2.

Pyridoxal-5'-phosphat: A: in 0,1-n. NaOH.

B: in 1-proz. Natriumacetat (pH = 6,0).

C: in 0,1-n. HCl.

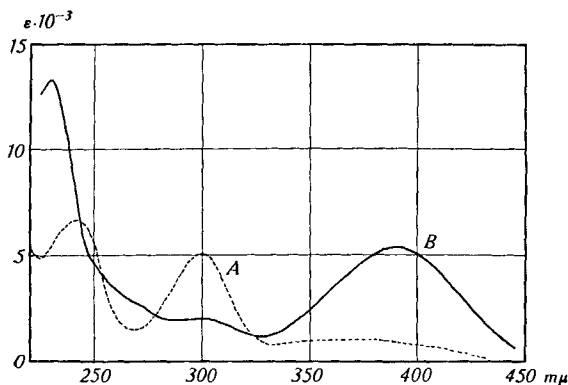


Fig. 3.

Kurve A: Pyridoxal in 0,1-n. NaOH.

Kurve B: Pyridoxal-5'-phosphat in 0,1-n. NaOH.

Die Absorptionsspektren des Pyridoxal-5'-phosphats in Lösungen von verschiedenen pH wird durch Figur 2 dargestellt. Figur 3 vergleicht die Absorptionskurven von Pyridoxal und Pyridoxal-5'-phosphat in 0,1-n. Natronlauge, Figur 4 bei pH 6,0 und Figur 5 in 0,1-n. Salzsäure.

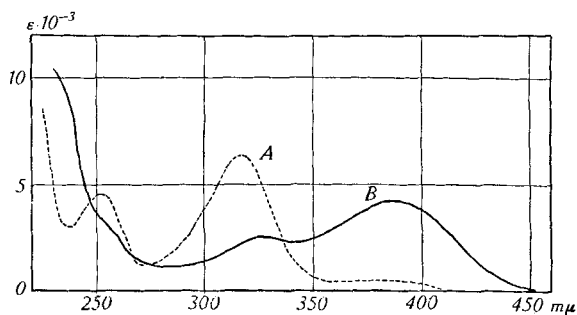


Fig. 4.

Kurve A: Pyridoxal in Natriumacetat 1-proz., pH = 6,0.

Kurve B: Pyridoxal-5'-phosphat in Natriumacetat, 1-proz. pH = 6,0.

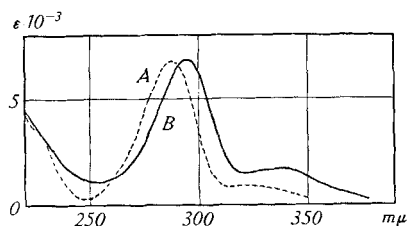


Fig. 5.

Kurve A: Pyridoxal in 0,1-n. HCl.

Kurve B: Pyridoxal-5'-phosphat in 0,1-n. HCl.

Nachtrag bei der Korrektur: Während die vorliegende Abhandlung im Druck war, erschienen Mitteilungen von *Heyl, Luz, Harris, und Folkers* sowie von *Heyl und Harris*<sup>1)</sup>, in welchen die Synthese der Codecarboxylase durch Einwirkung von Phosphoroxychlorid auf Pyridoxal beschrieben wurde. Bezüglich der Struktur der Verbindung kommen die Autoren zum selben Ergebnis wie wir. Die Ausbeuten an Pyridoxal-5'-phosphat sind nach ihrer Methode aber fast eine 10er-Potenz niedriger als nach dem von uns entwickelten Verfahren.

Diese Arbeit wurde durch Mittel aus den *Arbeitsbeschaffungskrediten des Bundes* und der *Stiftung für wissenschaftliche Forschung an der Universität Zürich* unterstützt, wofür wir unseren besten Dank aussprechen.

### Experimenteller Teil.

Darstellung von Pyridoxal. Nach *D. Heyl*<sup>2)</sup> lässt sich die Oxydation des freien Pyridoxins oder des Sulfats in schwefelsaurer Lösung bei 80° mit Hilfe von käuflichem Mangandioxyd ausführen, wobei Pyridoxal in Ausbeuten von 60–70% erhalten wird. Wir haben uns bei der Darstellung des Pyridoxals aus Pyridoxin dieser Methode bedient,

<sup>1)</sup> Am. Soc. **73**, 3430, 3434 (1951).

<sup>2)</sup> Am. Soc. **70**, 3434 (1948).

dabei aber kolloidales Mangandioxyd verwendet. Unter diesen Bedingungen verläuft die Oxydation des Pyridoxins in Gegenwart der berechneten, stöchiometrischen Menge Schwefelsäure bei mittleren Temperaturen sehr glatt und liefert Ausbeuten von 70–80% Pyridoxal.

6,75 g (0,04 Mol) Pyridoxin wurden in 50 cm<sup>3</sup> destilliertem Wasser gelöst; andererseits bereitete man eine Lösung von 6,5 g (0,041 Mol) KMnO<sub>4</sub> in 200 cm<sup>3</sup> Wasser, zu der man allmählich eine konz. Lösung von Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> hinzufügte, bis das gesamte Permanganat zu MnO<sub>2</sub> reduziert war. Das ausgefallene Mangandioxyd wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und so lange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis es keine Spuren von Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> mehr enthielt. Man erhielt so eine Suspension von kolloidalem Mangandioxyd, die man mit der Lösung des Pyridoxins vereinigte. Zu der so erhaltenen Suspension wurden langsam und ohne Erwärmen 5,98 g (0,06 Mol) konz. Schwefelsäure, die vorher mit wenig Wasser verdünnt worden war, hinzugefügt. Man liess dieses Gemisch 3–5 Std. bei Zimmertemperatur stehen und konzentrierte es hierauf durch Destillation im Vakuum. Nachdem die Flüssigkeit auf 50–75 cm<sup>3</sup> eingedampft war, wurde sie mit wenig Adsorptionskohle entfärbt und filtriert. Dann gab man zu ihr eine wässrige konz. Lösung von 4 g Hydroxylamin-hydrochlorid und 10 g Natriumacetat, worauf sich beim Stehen das Oxim des Pyridoxals ausschied. Ausbeute 5,75 g (79% der Theorie). Smp. 225–226°.

(N-Dimethylglycyl)-hydrazon des Pyridoxals. Diese Verbindung kann in verschiedener Weise hergestellt werden, entweder ausgehend von Pyridoxal oder von Pyridoxal-oxim. Die besten Resultate erzielten wir, wenn wir N-Dimethylglycyl-hydrazin (Reagens D<sup>1</sup>) direkt auf das durch Oxydation mittels MnO<sub>2</sub> dargestellte Pyridoxal einwirken liessen.

a) Darstellung des (N-Dimethylglycyl)-hydrazons des Pyridoxals, ausgehend von Pyridoxal. Die Lösung von Pyridoxal, die nach der vorstehenden Vorschrift gewonnen und nicht mit Hydroxylamin behandelt worden war, haben wir im Vakuum auf ca. 30 cm<sup>3</sup> eingengt. Hierauf wurde in sie 10 g Natriumacetat und 7,75 g (0,05 Mol) des Reagens D eingetragen, wobei das pH der Lösung zwischen 4 und 6 zu halten ist. Hierauf liess man dieses Reaktionsgemisch bei Zimmertemperatur stehen, wobei sich allmählich gelbe Kristalle eines Hydrochlorids des Pyridoxal-N-dimethylglycyl-hydrazons ausschieden; hat man Impfkristalle zur Verfügung, so beginnt die Kristallisation schneller. Nach 2–3tägigem Stehen wurde das Hydrazon abgenutscht; aus den Mutterlaugen schied sich bei weiterem Aufbewahren noch eine zweite Fraktion derselben Substanz aus. Die Ausbeuten erreichten 80–90% der Theorie.

Das (N-Dimethylglycyl)-hydrazon-hydrochlorid des Pyridoxals kann aus wenig heissem Wasser umkristallisiert werden. Es enthält 1 Mol Salzsäure und 2 Mol Kristallwasser. Smp. 208–212°. Die Verbindung löst sich in kaltem Wasser und in Alkohol wenig, dagegen leicht in heissem Wasser und ist in Äther unlöslich.

C <sub>12</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub> N <sub>4</sub> · HCl, 2H <sub>2</sub> O	Ber.	C 42,57	H 6,84	N 16,51	Cl 10,46	H <sub>2</sub> O 10,6%
(338,8)	Gef.	„ 43,07	„ 7,12	„ 16,69	„ 10,63	„ 10,0%

b) Darstellung des (N-Dimethylglycyl)-hydrazons des Pyridoxals, ausgehend von Pyridoxal-oxim. Man hydrolysierte das Oxim des Pyridoxals mittels n. Salzsäure und salpetriger Säure nach der früher beschriebenen Methode<sup>2</sup>). Nachdem die Hydrolyse beendet war, wurde die Lösung im Vakuum vollständig zur Trockene verdampft, der Rückstand in einigen cm<sup>3</sup> Wasser gelöst und diese Lösung, wie im vorigen Beispiel beschrieben, mit Natriumacetat und Reagens D<sup>1</sup>) versetzt. Beim Stehen dieses Reaktionsgemisches scheidet sich das Hydrochlorid des (N-Dimethylglycyl)-hydrazons des Pyridoxals in schönen, gelben Kristallen aus. In neutraler Lösung besitzt die Verbindung eine intensive grüne Fluoreszenz, welche in alkalischen und sauren Lösungen verschwindet. Die alkalischen Lösungen der Verbindung sehen gelb aus, die sauren Lösungen farblos. Das Spektrum der Verbindung in saurer Lösung wird durch Fig. 6 wiedergegeben.

<sup>1</sup>) M. Viscontini & J. Meier, *Helv.* **33**, 1773 (1950).

<sup>2</sup>) S. A. Harris, D. Heyl & K. Folkers, *Am. Soc.* **66**, 2088 (1944).

Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon unterliegt schon in sehr verdünnten Mineralsäuren bei Zimmertemperatur der Hydrolyse und wird dabei in Pyridoxal und (N-Dimethylglycyl)-hydrazin gespalten. Dieser Vorgang lässt sich durch Beobachtung der Absorptionsspektren verfolgen (Fig. 6, Kurven B, C). Eine Hydrolyse von 10 Min. in kochender n. Salzsäure oder von 30 Min. in 0,1-n. Salzsäure genügt, um die Spaltung zu vollenden (Fig. 1, Kurve D).

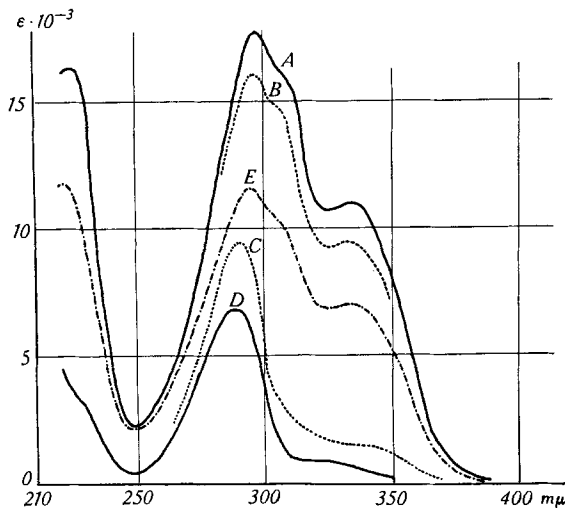


Fig. 6.

Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon:

Kurve A: in 0,1-n.-HCl.

Kurve B: id., nach 2 Std.

Kurve C: id., nach 24 Std.

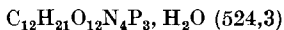
Kurve D: nach 30' Hydrolyse bei 100° und reines Pyridoxal.

Kurve E: Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon-5'-triphosphat in 0,1-n.-HCl.

Triphosphat des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazons. Die für die Phosphorylierung notwendige meta-Phosphorsäure wird durch Erhitzen von 1 cm<sup>3</sup> 85-proz. Phosphorsäure dargestellt<sup>1)</sup>. Nachdem sich die so gebildete meta-Phosphorsäure wieder auf mittlere Temperatur abgekühlt hat, wird das Gefäss, das sie enthält, in ein Ölbad von 60° gebracht, worauf man 200 mg Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon einträgt und durch Rühren homogen verteilt. Die Kristalle des Hydrazons lösen sich allmählich in der viskosen Masse auf, und gleichzeitig entwickelt sich Chlorwasserstoff. Nach Beendigung des Auflösungsvorganges, der etwa 20–30 Min. in Anspruch nimmt, wird die Reaktionsmischung auf 0° abgekühlt und mit 1 cm<sup>3</sup> auf 0° abgekühlten Wassers durchgerührt. Nachdem man in dieser Weise eine homogene Lösung hergestellt hat, werden auf einmal 25–30 cm<sup>3</sup> abs. Alkohol eingegossen, wobei das phosphorylierte Reaktionsprodukt ausfällt. Dieses haben wir durch Zentrifugieren abgetrennt, mit Alkohol, hierauf mit Äther gewaschen und schliesslich im Vakuum getrocknet. Die Reinigung der Verbindung erfolgt dadurch, dass man sie im Minimum der notwendigen Menge Wasser auflöst und durch Zusatz von abs. Äthanol wieder ausfällt. Man erhält in dieser Weise 250–300 mg 5'-Triphosphorsäureester des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazons in Form eines farblosen, etwas hygroskopischen Pulvers. Wie ähnliche Polyphosphorsäureester

<sup>1)</sup> P. Karrer & M. Viscontini, *Helv.* **29**, 711 (1946); M. Viscontini, G. Bonetti & P. Karrer, *Helv.* **32**, 1478 (1949).

zersetzt sich die Verbindung beim Erhitzen, ohne einen scharfen Schmelzpunkt aufzuweisen.



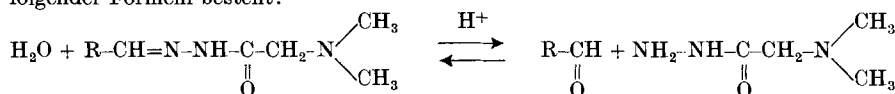
Ber. C 27,49 H 4,42 N 10,69 P in  $\text{PO}_4'''0$  P leicht hydrolysierbar 11,8 P total 17,72%  
 Gef. „ 26,42 „ 5,53 „ 9,83 „ in  $\text{PO}_4'''0,8$  „ leicht hydrolysierbar 11,5 „ total 17,98%

Die Phosphorylierung der alkoholischen Funktion (5'-Stellung) bewirkt eine Erniedrigung der molekularen Extinktion im UV.-Spektrum. Immerhin ist das Absorptionsmaximum 385 m $\mu$  des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazons in den neutralen und alkalischen Lösungen des Phosphorsäureesters auch vorhanden. Neutrale Lösungen des Esters fluoreszieren stark. Bariumhydroxyd spaltet aus dem Triphosphorsäureester 1 Molekel Bariumpyrophosphat ab, ähnlich wie aus dem linearen Triphosphorsäureester des Thiamins<sup>1)</sup>.

Wie aus Figur 1 ersichtlich ist, besitzt der Triphosphorsäureester des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazons in Gegenwart von 1 mg Trockenpulver von *Streptococcus faecalis* nur eine sehr geringe Wirksamkeit als Codecarboxylase. Die Wirkung von 3  $\gamma$  des Triphosphorsäureesters entspricht ungefähr derjenigen, welche 2  $\gamma$  Pyridoxal zusammen mit 500  $\gamma$  Adenosintriphosphat und 1 mg des Trockenpulvers von *Streptococcus faecalis* hervorrufen.

**Pyridoxal-5'-phosphat.** Im Gegensatz zum Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon verliert dessen Triphosphorsäureester bei der Hydrolyse die Hydrazin-Seitenkette weniger leicht. Dies lässt sich schon durch Beobachtung der Absorptionsspektren vor und nach Hydrolyse mit verdünnter Chlorwasserstoffsäure bei mittleren Temperaturen und beim Siedepunkt solcher Lösungen feststellen. Bei vorsichtiger Hydrolyse des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon-triphosphorsäureesters werden 2 Molekeln ortho-Phosphorsäure abgespalten, und es lässt sich hierauf Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon-5'-monophosphat isolieren. Diese letztere Verbindung besitzt keine stärkere Codecarboxylase-Wirkung als der 5'-Triphosphorsäureester des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazons.

Die Unterschiede in der Schnelligkeit der Hydrolyse des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazons einerseits und des Triphosphorsäureesters dieser Verbindung andererseits sind vielleicht so zu erklären, dass in der sauren Lösung ein Gleichgewicht im Sinne folgender Formeln besteht:



Während das nach dieser Gleichung in Freiheit gesetzte Pyridoxal sich sogleich in die cyclische Halbacetal-Form umwandelt und damit der erneuten Reaktion mit (N-Dimethylglycyl)-hydrazin weniger leicht zugänglich wird, müsste aus dem Phosphorsäureester der Hydrazon-Verbindung der freie Aldehyd entstehen, der sich mit dem entsprechenden (N-Dimethylglycyl)-hydrazon in ein Gleichgewicht setzt.

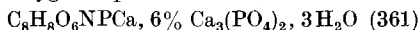
Um dieses Gleichgewicht zugunsten der Spaltstücke (Pyridoxal-5'-phosphorsäure und (N-Dimethylglycyl)-hydrazin) zu verschieben, haben wir es zweckmässig gefunden, das in der Reaktion entstehende (N-Dimethylglycyl)-hydrazin sofort zu zerstören. Dazu eignet sich salpetrige Säure. Die Hydrolyse des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon-5'-triphosphorsäureesters verläuft bei 100° innerhalb 10 Min. bei Gegenwart von salpetriger Säure glatt und liefert Lösungen von hoher Codecarboxylase-Aktivität.

Zur Isolierung des Pyridoxal-5'-phosphates wurden 300 mg Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon-5'-triphosphat während 10 Min. in 30 cm<sup>3</sup> n. Salzsäure unter Zusatz von 300 mg Silbernitrit auf 100° erhitzt. Dann wurde die Lösung abgekühlt und im Vakuum bei niedriger Temperatur zur Trockene eingedampft. Den viskosen Rückstand haben wir mehrere Male mit wasserfreiem Aceton ausgezogen, hierauf im Minimum der notwendigen Menge Wasser gelöst und durch Zusatz von wasserfreiem Aceton wieder ausgefällt. Die Fällung wurde erneut in 30 cm<sup>3</sup> Wasser in Lösung gebracht und diese durch vorsichtigen Zusatz von pulverförmigem Calciumhydroxyd auf pH 2–3 eingestellt; hierauf haben

<sup>1)</sup> M. Viscontini, G. Bonetti, C. Ebnöther & P. Karrer, *Helv.* **34**, 1388 (1951).



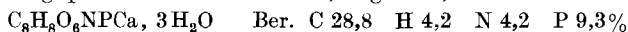
wir tropfenweise Calciumhydroxyd-Lösung zugesetzt, bis das pH 8—9 erreicht hatte. Der hierbei ausgefallene gelbe Niederschlag wurde abzentrifugiert und so oft mit destilliertem Wasser von 20° ausgeschüttelt, als sich die Extrakte noch gelb färbten. Die Mutterlauge des bei pH 8—9 ausgefallenen Niederschlags sowie die wässrigen Auszüge des Niederschlags wurden vereinigt, genau auf pH 7 eingestellt und im Vakuum bei niederer Temperatur eingengt. Während der Konzentration der Lösung beginnt das Calciumsalz des Pyridoxal-5'-phosphates auszufallen. Nachdem das Volumen der Lösung ca. 10 cm<sup>3</sup> erreicht hat, bringt man diese durch Zusatz einiger Tropfen Calciumhydroxyd-Lösung wieder auf pH 8—9 und fügt 40 cm<sup>3</sup> abs. Alkohol hinzu, wodurch das Calciumsalz des Pyridoxal-5'-phosphorsäureesters ausfällt. Dieses wurde durch Zentrifugieren abgetrennt, mit Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet. Es ist ein citronengelbes, nicht wesentlich hygroskopisches Pulver, das sich in kaltem Wasser schwer löst.



Ber. C 26,6 H 3,88 N 3,88 P (als  $\text{PO}_4'''$ ) 1,2 P (total) 9,8 Ca 13,4 %

Gef. „ 25,68 „ 3,90 „ 4,17 „ „ 1,2 „ „ 9,56 „ 14,59%

Wird das Calciumsalz des Pyridoxal-5'-phosphates aus dem Magnesiumsalz, über dessen Darstellung später berichtet werden soll, hergestellt, so ist es frei von Phosphationen.



Gef. „ 28,6 „ 4,0 „ 5,0 „ 9,0%

### Zusammenfassung.

Aus Pyridoxal wurde durch Einwirkung von (N-Dimethylglycyl)-hydrazin das Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazon dargestellt. Aus diesem gewann man mittels meta-Phosphorsäure ( $\text{HPO}_3$ )<sub>3</sub> den 5'-Triphosphorsäureester des Pyridoxal-(N-dimethylglycyl)-hydrazons und durch saure Hydrolyse letzterer Substanz das Pyridoxal-5'-phosphat. Dessen Calciumsalz besitzt ausgezeichnete Codecarboxylase-Wirkung, die derjenigen der natürlichen Codecarboxylase gleicht. Das natürliche Coferment der Aminosäuredecarboxylase ist daher Pyridoxal-5'-phosphat.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

## 219. Introduction à une étude polarographique de la salive

par D. Monnier et Z. Besso.

(21 VII 51)

### Généralités.

*Brdicka*<sup>1)</sup> constate que lorsqu'on polarographie les protéines ou leurs produits de dénaturation, en présence d'un sel de cobalt et d'un tampon constitué de chlorure d'ammonium et d'ammoniaque, on obtient deux vagues dont le potentiel  $E_4$  est un peu plus négatif que celui du cobalt. Ces vagues sont dites *catalytiques*, car leur hauteur est environ 500 fois plus grande que ne le prévoit la théorie (équation de *Ilkovic*). Elles sont dues à la réduction de l'ion hydrogène sur la cathode

<sup>1)</sup> Collection Czechoslov. Chem. Commun. 5, 112, 148, 238 (1933).