

268. Über Pyridoxal-5'-phosphat (Codecarboxylase)

II. Mitteilung

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

(26. IX. 51.)

Im Anschluss an unsere letzte Mitteilung über die Synthese des Pyridoxal-5'-phosphates (Codecarboxylase) geben wir im folgenden eine vereinfachte Vorschrift für deren Herstellung und für die Isolierung als rohes Magnesium- und als gereinigtes Calciumsalz.

Präparate mit 80–90% Pyridoxal-5'-phosphat können leicht in 45–50-proz. Ausbeute (bezogen auf angewandtes Pyridoxal-N-dimethylglycylhydrazon) erhalten werden; bei der weiteren Reinigung der Salze reduziert sich die Ausbeute naturgemäss etwas.

Experimentelles.

Darstellung des Magnesiumsalzes und des gereinigten Calciumsalzes von Pyridoxal-5'-phosphat. Man phosphoryliert 500 mg Pyridoxal-4'-N-dimethylglycylhydrazon mit 3–4 cm³ meta-Phosphorsäure bei 60° während 20 Min. in der gleichen Weise, wie wir sie früher beschrieben haben¹⁾. Hierauf wird die Hydrolyse von 500 mg Pyridoxal-4'-N-dimethylglycylhydrazon-5'-triphosphat mit Hilfe von Salzsäure und Silbernitrit in der früher¹⁾ geschilderten Art durchgeführt. Die besten Resultate erhält man, wenn man das Silbernitrit vor der Hydrolyse des Hydrazons, die beim Erwärmen erfolgt, zu dessen Lösung hinzufügt. Nachdem man das erkaltete Reaktionsgemisch auf 20 cm³ eingengt hat, wird die Flüssigkeit durch langsames Eintragen einer Suspension von kolloidalem Magnesiumhydroxyd, bereitet aus reinem Magnesiumäthylat, neutralisiert. Wenn das Magnesiumhydroxyd auszufallen beginnt (bei ca. pH 4), fügt man 2–3 cm³ konz. wässrige Ammoniaklösung hinzu. Dabei fällt das kristalline Ammoniummagnesiumphosphat aus, das nur geringe Mengen von Pyridoxalphosphat mitreisst. Dieser Niederschlag wird abgenutscht und mit viel Wasser gut ausgewaschen. Die Mutterlaugen der Fällung sowie die Flüssigkeit, die zum Waschen gedient hatte, engt man im Vakuum bei niedriger Temperatur auf 5 cm³ ein, bringt hierauf durch allmählichen Zusatz einer weiteren Menge von kolloidalem Magnesiumhydroxyd das pH der Flüssigkeit auf 8, zentrifugiert den gebildeten Niederschlag ab und versetzt die klare Flüssigkeit mit dem 4–5fachen Volumen Äthanol. Hierbei fällt das Magnesiumsalz des Pyridoxal-5'-phosphates im Rohzustand aus. Es wird abgenutscht und mit Alkohol und Äther gewaschen. Ausbeute ca. 200 mg, d. h. ca. 45%, bezogen auf das angewandte Pyridoxal-4'-N-dimethylglycylhydrazon.

Das Magnesiumsalz des Pyridoxal-5'-phosphates ist in Wasser leicht löslich und kann schon in diesem Rohzustand für fermentative Versuche benutzt werden, da es sich in seiner Wirkung von dem gereinigten Calciumsalz kaum unterscheidet. Die Analyse zeigt, dass es Verunreinigungen mit höherem Stickstoffgehalt enthält, von denen aber nur ein sehr geringer Teil auf Ammonsalze entfällt (Ammoniakbestimmungen zeigten nur geringe Mengen NH₃ an).

Zur Reinigung des Magnesiumsalzes wird dieses in wenig Wasser gelöst, die Lösung durch Zusatz von etwas kolloidalem Magnesiumhydroxyd neutralisiert, der Niederschlag

¹⁾ Helv. **34**, 1834 (1951).

abzentrifugiert und das in Lösung befindliche Salz durch Zusatz von Äthylalkohol fraktioniert gefällt. Aber auch diese umgefällten Präparate besitzen einen etwas zu hohen Stickstoffgehalt.

$C_8H_8O_6NPMg \cdot 3H_2O$	Ber.	C 29,7	H 4,33	N 4,33	P 9,6 %
	Gef.	„ 30,4	„ 4,43	„ 5,49	„ 8,45%

Zur Überführung des Magnesiumsalzes in das Calciumsalz wird ersteres in sehr wenig Wasser gelöst, die Lösung filtriert und hierauf tropfenweise mit einer konz. Lösung von Calciumacetat versetzt, wobei ein Überschuss des Calciumacetats zu vermeiden ist. Das Calciumsalz des Pyridoxal-5'-phosphates fällt sofort aus. Es wird abzentrifugiert, mehrmals mit wenig Wasser ausgewaschen und hierauf durch Waschen mit Alkohol und Äther getrocknet.

Ein so bereitetes Präparat des Calciumsalzes des Pyridoxal-5'-phosphates enthält keine freien Phosphationen. Seine Analyse entspricht ungefähr der Formel $C_8H_8O_6NPCa \cdot 3H_2O$. Die Verbindung ist in Wasser schwer löslich.

$C_8H_8O_6NPCa \cdot 3H_2O$	Ber.	C 28,8	H 4,2	N 4,2	P 9,3%
	Gef.	„ 28,6	„ 4,0	„ 5,0	„ 9,0%

Zusammenfassung.

Es wird eine etwas vereinfachte Darstellung für Pyridoxal-5'-phosphat und dessen Magnesium- und Calciumsalze beschrieben.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.

269. Synthese des Pyridoxamin-5'-triphosphorsäureesters und Pyridoxamin-5'-monophosphorsäureesters

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

(26. IX. 51.)

Pyridoxamin lässt sich mit meta-Phosphorsäure in ähnlicher Weise wie Thiamin¹⁾ und Pyridoxal-N-(1-methyl-glycyl-hydrazon²⁾) verestern, wobei der Pyridoxamin-5'-triphosphorsäureester I erhalten wird. Diese in Wasser sehr leicht lösliche, hygroskopische Substanz unterliegt beim Erhitzen ihre wässrigen Lösung der partiellen Hydrolyse; unter Abspaltung von 2 Mol H_3PO_4 bildet sich Pyridoxamin-5'-monophosphat (II), eine Verbindung, die kürzlich auf anderem Wege von D. Heyl, E. Luz, St. A. Harris & K. Folkers³⁾ erhalten wurde und als Wachstumsfaktor für Milchsäurebakterien bekannt ist⁴⁾. Die Ausbeute nach unserer Synthese übertrifft diejenige, welche die amerikanischen Autoren erzielten, wesentlich.

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

²⁾ M. Viscontini, C. Ebnöther & P. Karrer, *Helv.* **34**, 1834 (1951).

³⁾ D. Heyl, E. Luz, St. A. Harris & K. Folkers, *Am. Soc.* **73**, 3436 (1951).

⁴⁾ McNutt & Snell, *J. Biol. Chem.* **182**, 557 (1950); Hendlin, Caswell, Peters & Wood, *J. Biol. Chem.* **186**, 647 (1950).