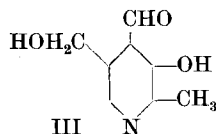
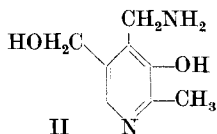
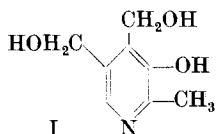


## 8. Synthetische krystallisierte Codecarboxylase

von P. Karrer und M. Viscontini.

(25. IX. 46.)

Nachdem durch *Snell, Guirard* und *Williams*<sup>1)</sup>, *Snell*<sup>2)</sup> sowie *Harris, Heyl* und *Folkers*<sup>3)</sup> gezeigt worden war, dass Pyridoxamin (II) und Pyridoxal (III), Derivate des Vitamins B<sub>6</sub> oder Pyridoxins (I),



als natürliche Wachstumsfaktoren für Mikroorganismen wirksam sind und in der Natur vorkommen<sup>4)</sup>, und nachdem die Verbindungen II und III von *Harris, Heyl* und *Folkers*<sup>5)</sup> synthetisch erhalten worden sind, konnten *Gunsalus* und *Bellamy*<sup>6)</sup> nachweisen, dass ein Phosphorsäure-ester des Pyridoxals als Coferment von Aminosäure-decarboxylasen wirkt, die verschiedene *l*-Aminosäuren aus Eiweiss, wie Tyrosin, Ornithin, Lysin, Arginin, Glutaminsäure, ferner Dopa, in die zugehörigen biogenen Amine überführt.

*Gunsalus, Bellamy* und *Umbreit*<sup>7)</sup> haben daraufhin die künstliche Darstellung dieses Cofermentes versucht. Bei der Einwirkung von Phosphoroxychlorid auf eine wässrige Lösung von Pyridoxal erhielten *Gunsalus, Umbreit, Bellamy* und *Foust*<sup>8)</sup> Präparate, welche bei Gegenwart des zugehörigen Apofermentes Tyrosin decarboxylierten. Diese Präparate waren indessen nicht einheitlich; sie enthielten nach spektroskopischer Bestimmung 32% Pyridoxal, ferner 6,2% organ. Phosphor und ca. 50% Barium. Die Darstellungsmethode lässt auch keinen Schluss auf die Konstitution der Verbindung zu. Immerhin geben *Gunsalus* und Mitarbeiter an, dass die Substanz keine Phenolreaktionen zeigte, woraus man folgern könnte, dass das phenolische Hydroxyl des Pyridoxals verestert worden ist.

<sup>1)</sup> J. Biol. Chem. **143**, 519 (1942); Am. Soc. **66**, 2082 (1944).

<sup>2)</sup> Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. **51**, 356 (1942); J. Biol. Chem. **154**, 313 (1944).

<sup>3)</sup> J. Biol. Chem. **154**, 315 (1944).

<sup>4)</sup> *Snell*, J. Biol. Chem. **157**, 491 (1945).

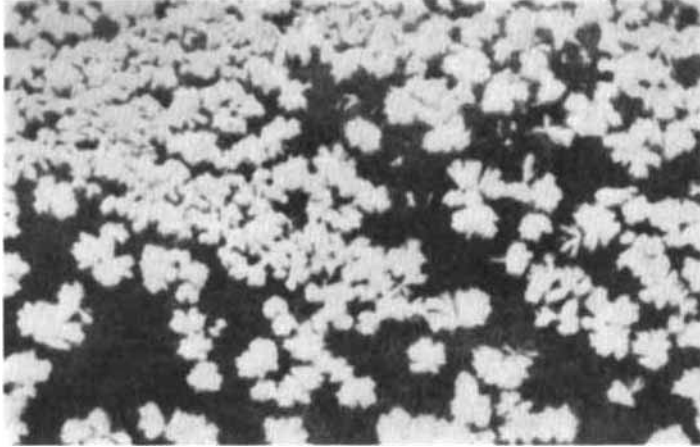
<sup>5)</sup> Am. Soc. **66**, 2088 (1944).

<sup>6)</sup> J. Biol. Chem. **155**, 357, 557, 685 (1944).

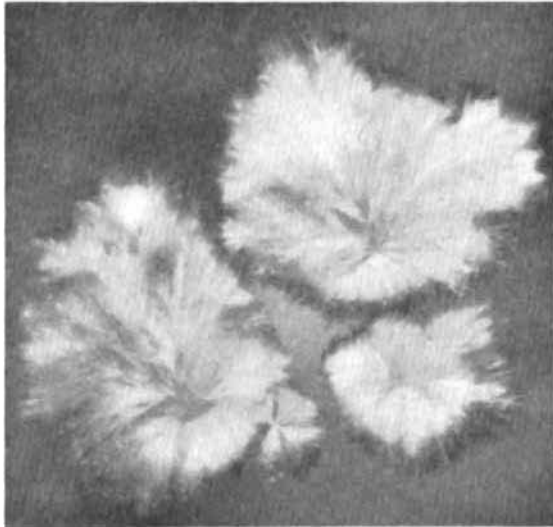
<sup>7)</sup> J. Biol. Chem. **155**, 685 (1944).

<sup>8)</sup> J. Biol. Chem. **161**, 743 (1945).

Tafel I.



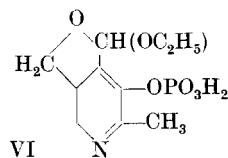
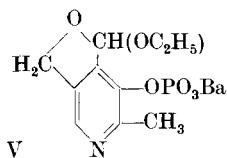
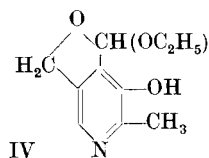
Pyridoxal-acetal-phosphorsäure-ester  
(6× vergrößert).



Pyridoxal-acetal-phosphorsäure-ester  
(30× vergrößert).

Wir haben versucht, die Aminosäure-codecarboxylase in reinerem Zustand zu gewinnen. Wir gingen dabei vom Pyridoxal-acetal (IV) aus, das wir in Pyridin mit Phosphoroxychlorid umsetzten. Dabei kann nur das phenolische Hydroxyl in Reaktion treten. Bei der schonenden Aufarbeitung des Reaktionsgemisches wurde etwas Bariumsalz des Pyridoxal-acetal-phosphorsäure-esters erhalten, dem nach der Herstellungsweise die Formel V zukommen muss. Auch dieses Bariumsalz war amorph, besass aber gute Codecarboxylase-wirkung für Tyrosin und gab annähernd richtige Analysenwerte.

Aus einer bei der Aufarbeitung erhaltenen Fraktion (vgl. experimentellen Teil) gelang es hierauf, nach Behandlung mit absolutem Alkohol und Chlorwasserstoff in bedeutender Menge eine prachtvoll in langen Nadelbüscheln krystallisierte Verbindung zu gewinnen (vgl. Tafel I), die nach der Analyse, den übrigen Eigenschaften und der gewählten Herstellungsmethode der Phosphorsäure-ester des Pyridoxal-acetals der Formel VI ist. Die Verbindung besitzt ausgezeichnete Codecarboxylasewirkung und zeigte im *in vitro*-Versuch bei der Decarboxylierung von Tyrosin eine noch grössere Wirksamkeit als ein Gemisch von Pyridoxal und Adenosin-triphosphorsäure, aus welcher die Codecarboxylase unter natürlichen Bedingungen entsteht.



Die Herstellung des krystallisierten Cofermentes VI ist mehrmals mit dem gleichen Erfolg ausgeführt worden.

Das krystallisierte Derivat VI der Codecarboxylase ist das dritte Coferment, das künstlich hergestellt werden konnte. Die beiden früher erhaltenen sind die Lactoflavin-phosphorsäure, die man bisher allerdings nur in amorphem und nicht völlig reinem Zustand gewonnen hat, sowie die Cocarboxylase, die sich zwar analysenrein, aber nur in mikrokrystalliner Form darstellen liess.

Als Apoferment verwendeten wir ein Trockenpulver von *Streptococcus faecalis* Typ R (American type Culture Collection No. 8043), den wir durch die freundliche Vermittlung von Herrn Prof. H. Mooser (Zürich) von Herrn Prof. K. F. Meyer (San Francisco) erhielten. Wir sind Herrn Prof. K. F. Meyer sowie Herrn Prof. H. Mooser, letzterem auch für die Kultivierung des Streptokokkenstammes, zu grossem Dank verpflichtet. Ebenso danken wir der Firma *F. Hoffmann-La Roche & Co.* (Basel) für die Überlassung von Pyridoxin.

Derselbe Streptokokken-Stamm ist uns später auch durch die freundlichen Bemühungen von Herrn Prof. I. C. Gunsalus, Ithaca (N.Y.) übermittelt worden, wofür wir hier ebenfalls unseren besten Dank aussprechen.

## Experimenteller Teil.

### Darstellung von Pyridoxal-oxim aus Pyridoxin.

Die Oxydation des Pyridoxins zu Pyridoxal führten wir nach der Vorschrift von *Harris, Heyl und Folkers*<sup>1)</sup> aus und verbesserten die Ausbeuten an dem Oxydationsprodukt durch Zurückgewinnung des nicht in Reaktion getretenen Pyridoxins.

Man löste 5,0 g Pyridoxin in 100 cm<sup>3</sup> Wasser, setzte 2,050 g Natriumhydrogencarbonat hinzu und hierauf tropfenweise innerhalb einer Stunde eine Lösung von 1,050 g Kaliumpermanganat in 75 cm<sup>3</sup> Wasser. Sodann wurde durch Zusatz von Salzsäure die Flüssigkeit auf  $p_H$  2 gebracht und im Vakuum auf 50 cm<sup>3</sup> konzentriert. Durch Zugabe von Natriumhydrogencarbonat wurde sie wieder bis  $p_H$  6 neutralisiert und mit 6,0 g Natriumacetat und 5,0 g Hydroxylaminhydrochlorid versetzt. Schon nach wenigen Augenblicken begann Pyridoxal-oxim auszufallen, dessen Bildung durch 5 Minuten langes Erwärmen der Reaktionsmischung auf dem Wasserbad vervollständigt wurde. Das nach dem Abkühlen und mehrstündigem Aufbewahren im Eisschrank ausgeschiedene Pyridoxal-oxim wog in trockenem Zustand 0,840 g, entsprechend 19% der Theorie.

Die Mutterlaugen von der Pyridoxal-oxim-Herstellung wurden mit einer gesättigten Lösung von Ammonium-Reineckat versetzt, bis keine weitere Fällung mehr entstand (3,0 g Ammoniumsalz der Reinecke-Säure). Nach mehrstündigem Stehen der Flüssigkeit in der Kälte haben wir den Niederschlag von Pyridoxin-Reineckat abgenutscht, mit Wasser ausgewaschen und getrocknet. Ausbeute 4,70 g. — Die Überführung dieses Salzes in kristallisiertes Pyridoxin-hydrochlorid erfolgte in folgender Weise. Man löste die Verbindung (0,0098 Mol Pyridoxin-Reineckat) in 50 cm<sup>3</sup> Aceton und 1,550 g Silbersulfat (0,005 Mol) in 250 cm<sup>3</sup> kochendem Wasser und trug die erstere Lösung allmählich in die letztere ein. Das Silbersalz der Reinecke-Säure fiel sofort aus, wurde abgenutscht und das farblose Filtrat, das neben Pyridoxinsulfat noch Spuren Silbersulfat enthielt, mit 40 cm<sup>3</sup> einer 3-proz. BaCl<sub>2</sub>-Lösung (0,005 Mol) vereinigt. Dabei bildete sich ein Niederschlag von Bariumsulfat und Silberchlorid, den man durch Filtration entfernte. Die Lösung brachten wir durch Eindampfen im Vakuum zur Trockene, digerierten den trockenen Rückstand zwecks Entfernung geringer Mengen dunkel gefärbter Verunreinigungen mit 5 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol, nutschten das so gereinigte, kristalline Pyridoxinhydrochlorid ab und wuschen es mit absolutem Alkohol, hierauf mit Äther aus.

Die Ausbeute an zurückgewonnenem Pyridoxinhydrochlorid betrug 1,520 g. Eine neue Oxydation dieses Produktes lieferte 0,360 g Pyridoxal-oxim und aus dessen Mutterlaugen wurden 0,20 g Pyridoxinhydrochlorid zurückgewonnen.

Insgesamt erhielt man somit aus 4,80 g Pyridoxin 1,20 g Pyridoxal-oxim, was einer Ausbeute von 28,5% entspricht. Bei einem zweiten Oxydationsversuch betrug die Ausbeute 30,0%.

### Phosphorylierung des Pyridoxal-acetals.

Pyridoxal-acetal wurde nach der Vorschrift von *Harris, Heyl und Folkers* (l. c.) dargestellt.

Wir bereiteten eine Lösung von 0,50 g Pyridoxal-acetal in 3 cm<sup>3</sup> wasserfreiem Pyridin und eine solche von 0,50 cm<sup>3</sup> POCl<sub>3</sub> in 2 cm<sup>3</sup> Pyridin und liessen letztere in die Pyridoxallösung tropfenweise einfließen. Hierauf blieb die Mischung über Nacht bei Zimmertemperatur stehen. Man goss sie nachher tropfenweise auf zerstoßenes Eis und trug in die Lösung bei 0° allmählich pulverisiertes Bariumhydroxyd ein, bis das  $p_H$  der Lösung ca. 7,0 geworden war. Nachdem man den gebildeten Niederschlag von Bariumphosphat abfiltriert hatte, gab man zum Filtrat nach und nach festes, fein pulverisiertes Bariumhydroxyd, bis die Flüssigkeit deutlich alkalisch geworden war ( $p_H > 11$ , Universalindikatorpapier). Um den Vorgang der Alkalisierung der Lösung genau verfolgen zu können, brachten wir während des Eintragens des Baryts von Zeit zu Zeit einen Tropfen der Lösung auf ein Universalindikatorpapier; man muss hierauf vor Feststellung des  $p_H$

<sup>1)</sup> Am. Soc. **66**, 2088 (1944).

einige Zeit warten, bis sich das Pyridin, welches in der Lösung enthalten war, verflüchtigt hat. Jetzt wurde der neu gebildete Niederschlag von Bariumphosphat wiederum abfiltriert und das Filtrat im Vakuum zur Trockene verdampft. Den Rückstand trocknete man im Vakuum während 2 Stunden bei 70°, wodurch sich die letzten Spuren von freiem Pyridin entfernen liessen. Nun behandelte man ihn mit absolutem Alkohol, wobei ein Teil in Lösung ging, während sich ein anderer Teil nicht auflöste. Diesen letzteren Niederschlag bezeichnen wir mit A.

Die alkoholische Lösung wurde im Vakuum konzentriert und hierauf mit Äther versetzt, wobei sich eine Fällung bildete. Diese wurde nach 12-stündigem Stehen abfiltriert, in absolutem Alkohol gelöst, durch Zusatz von sehr wenig Tierkohle die Lösung weitgehend entfärbt, filtriert und die in der Lösung befindliche Verbindung erneut mit Äther ausgefällt. Diese wog in trockenem Zustand bei verschiedenen Versuchen 0,1 – 0,2 g, war amorph und nicht ganz einheitlich, enthielt aber nach der Analyse als Hauptanteil das Bariumsalz des Pyridoxal-acetal-phosphorsäure-esters der Formel V. Im Fermentversuch erwies es sich als stark aktiv (vgl. theoretischen Teil).

$C_{10}H_{12}O_6NPBa$	Ber. N 3,42	P 7,56	$OC_2H_5$ 11,0%
(410)	Gef. „ 3,69	„ 6,27	„ 10,30%

Den oben erwähnten Niederschlag A suspendierten wir in 5 cm<sup>3</sup> absolutem Alkohol und leiteten in die Aufschlämmung während einigen Minuten trockenen Chlorwasserstoff, wobei sich ein Niederschlag von Bariumchlorid bildete. Nach 12-stündigem Stehen wurde dieser abfiltriert und zum klaren Filtrat absoluter Äther zugesetzt. Nach einigen Stunden hatten sich an den Wänden und am Boden des Gefässes prachtvolle Krystalle gebildet, die aus zu Rosetten vereinigten Nadeln bestanden und deren Menge in trockenem Zustand 0,16 g betrug. Es handelte sich um den Phosphorsäure-ester des Pyridoxal-acetals (Formel VI), dem allerdings noch kleine Mengen von Pyridinhydrochlorid beigemischt waren.

Zur Entfernung des letzteren wurde die im Vakuum bei 75° getrocknete Substanz mit absolutem Alkohol und hierauf mit Äther gewaschen. Dabei ging das Pyridinhydrochlorid in Lösung, während der Phosphorsäure-ester des Pyridoxal-acetals von kaltem Alkohol wenig aufgenommen wird und daher grösstenteils ungelöst zurückblieb. Die Verbindung besitzt ausgezeichnete Codecarboxylasewirkung.

$C_{10}H_{14}O_6NP$	Ber. C 43,5	H 5,2	N 5,1	P 11,3	$OC_2H_5$ 16,35%
(275,2)	Gef. „ 42,9	„ 5,4	„ 5,2	„ 11,3	„ 16,67%

Die Substanz enthält weder Barium noch Chlor.

#### Prüfung der synthetischen Phosphorsäure-ester auf Codecarboxylasewirkung.

Die beiden synthetisierten Phosphorsäure-ester — das rohe Bariumsalz des Pyridoxal-phosphorsäure-esters V und der Phosphorsäure-ester des Pyridoxal-acetals VI — wurden nach der Methode, die *Umbreit, Bellamy* und *Gunsalus*<sup>1)</sup> beschrieben haben, auf Codecarboxylasewirkung an Tyrosin geprüft. Als Quelle für das Apoferment diente ein Stamm *Streptococcus faecalis*, Typ R (American Type Culture Collection No. 8043). In diesem Stamm war durch Anzucht in einer Pyridoxin-freien Kulturflüssigkeit der Codecarboxylasegehalt herabgesetzt<sup>2)</sup>, doch waren, wie die Kurven in Fig. 1 und 2 erkennen lassen, immer noch gewisse Mengen des Cofermentes vorhanden. Die Wirksamkeit unserer synthetischen Codecarboxylasepräparate ergibt sich daher aus der Differenz der CO<sub>2</sub>-Entwicklungskurven 1, Fig. 1, bzw. 1 und 2, Fig. 2 (Zusatz der Verbindung V oder VI) und Kurve 4 (ohne jeden Zusatz). Die Kurven 2, Fig. 1, und Kurve 3, Fig. 2, stellen die CO<sub>2</sub>-Entwicklung dar, wenn zu den das Apoferment liefernden Mikroorganismen gleichzeitig Pyridoxal und Adenosin-triphosphorsäure (A.T.P.) gesetzt werden, aus denen die Codecarboxylase unter natürlichen Bedingungen gebildet wird

<sup>1)</sup> Arch. Biochem. 7, 185 (1945).

<sup>2)</sup> Die Kultur von *Strept. faecalis* wurde nach 20-stündigem Wachstum abzentrifugiert, mit Wasser, hierauf bei 0° zweimal mit Aceton gewaschen und im Vakuum getrocknet.

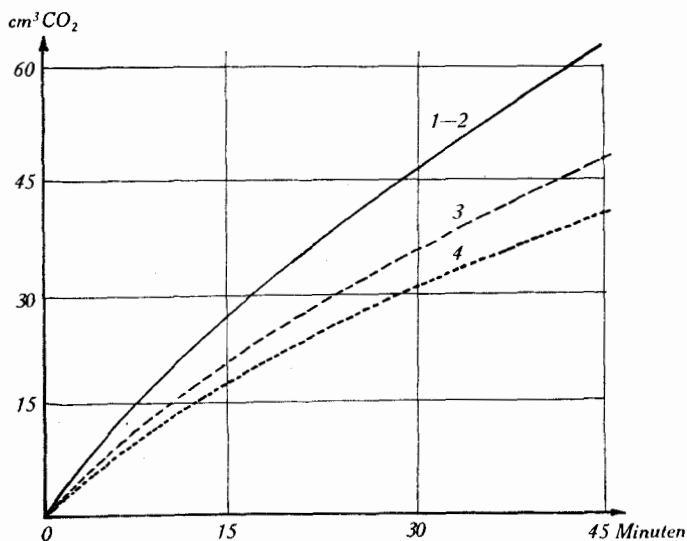


Fig. 1.

20 mg trockenes Mikroorganismenpulver in 1 cm<sup>3</sup> Acetatpuffer (p<sub>H</sub> = 5,5); 0,5 cm<sup>3</sup> 0,1-mol. Suspension von Tyrosin; aufgefüllt mit Wasser auf 3,5 cm<sup>3</sup>.

Kurve 1: Zusatz 80 γ des rohen, synthet. Ba-Salzes des Pyridoxal-phosphorsäure-esters.

Kurve 2: Zusatz 40 γ Pyridoxal + 1 mg A.T.P.

Kurve 3: Zusatz 40 γ Pyridoxal.

Kurve 4: Ohne Zusatz.

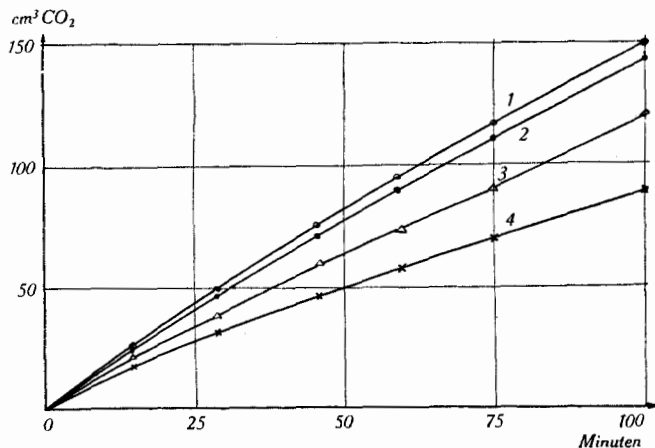


Fig. 2.

20 mg trockenes Pulver von Streptococcus faecalis in 1 cm<sup>3</sup> Acetatpuffer (p<sub>H</sub> = 5,5); 0,5 cm<sup>3</sup> 0,1-mol. Suspension von Tyrosin; aufgefüllt mit Wasser auf 3,5 cm<sup>3</sup>.

Kurve 1: Zusatz 40 γ kryst. Phosphorsäure-ester des Pyridoxal-acetals.

Kurve 2: Zusatz 20 γ kryst. Phosphorsäure-ester des Pyridoxal-acetals.

Kurve 3: Zusatz 40 γ Pyridoxal + 1 mg A.T.P.

Kurve 4: ohne Zusatz.

Zürich, Chemisches Institut der Universität.