Über das Cerebron.

Von

H. Thierfelder.

(Aus der chemischen Abteilung des physiologischen Instituts zu Berlin.).
(Der Redaktion zugegangen am 19. August 1904.)

Pseudocerebrin und Cerebron.

Vor einigen Jahren beschrieben Emil Woerner und ich 1) unter dem Namen Cerebron einen Körper, den wir mit Hilfe von indifferenten Lösungsmitteln und unter Benutzung von Temperaturen, die 50° nicht überschritten, aus menschlichen Gehirnen isoliert hatten.

Ehe ich auf die Resultate, welche die weitere Untersuchung dieser Substanz ergeben hat, eingehe, möchte ich nicht unterlassen, mitzuteilen, daß das Cerebron bereits im Jahre 1880 von A. Gamgee beschrieben worden ist. Herr Professor Gamgee teilte mir im Anschluß an eine mündliche Unterhaltung gelegentlich eines Besuches in Berlin im Herbst vorigen Jahres den Wortlaut seiner diesbezüglichen Veröffentlichung mit. Es heißt auf Seite 441 seines Textbook of the Physiological Chemistry of the Animal Body, London, Macmillan and Co. 1880: In addition to protagon and other phosphorised matters, there is always extracted from brain by alcohol at 450 a very considerable quantity of a body, which, in order to distinguish it, the author provisionally termed Pseudo-cerebrin. This body is less soluble in 80% alcohol at 45% than protagon, so that on subjecting impure protagon to repeated crystallisation from 80% alcohol there accumulated residues of the cerebrin-like body. The latter is a white pulverulent body very

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. XXX, S. 542.

unlike protagon to the naked eye and separating under the microscope in the form of very large nodular masses. After repeated crystallisation from alcohol it was found to be practically free from phosphorus (containing only 0.08%)...

Analyses of pseudo-cérebrin found by the author to accompany protagon.

	1	2	3	4	Mean
C	68,97	68,95	69,01	68,67	68,89
H	11,7	11.17	11,60	12.10	11.87
N	1.76	1,95	1.64	2.01	1,83
0					17,41
					100,00

From the above analyses the author deduces for epseudo-cerebrine the empirical formule $C_{44}H_{92}NO_8$.

Herr Gamgee fügte hinzu, daß er bei der Durchsicht seines Laboratoriumjournals Zeichnungen des mikroskopischen Bildes des Pseudocerebrins, welche mit den von uns veröffentlichten völlig übereinstimmen, gefunden habe, und ferner unter dem 11. Juli 1879 die Eintragung, daß das Pseudocerebrin beim Erhitzen in der Kapillare bei 197° sich leicht orange färbt und bei 210° schmilzt.

Wir hatten für das Cerebron im Mittel 69.16% C, 11,54% H und 1,76% N gefunden und den Schmelzpunkt bei langsamem Erhitzen bei 209%, bei schnellem Erhitzen bei 212%.

Darnach kann es nicht zweifelhaft sein, daß Pseudocerebrin und Cerebron identische Körper sind und daß die Priorität der Entdeckung A. Gamgee zukommt.

Da es nicht üblich ist, neue Beobachtungen nur in einem Lehrbuch zu veröffentlichen, und da das Pseudocerebrin unseres Wissens sich sonst nirgends in der Literatur erwähnt fand, so dürfte uns ein Vorwurf für dieses Übersehen nicht treffen.

Mit Rücksicht darauf, daß die in Rede stehende Substanz als im Gehirn vorgebildet anzusehen ist, während unter Cerebrinen im allgemeinen Spaltungsprodukte höher zusammengesetzter Gehirnstoffe verstanden werden, halten wir den Namen Cerebron für zweckmäßiger und schlagen vor, ihn beizubehalten.

Spaltung des Cerebrons.

Ich teile zunächst noch einige Kohlen- und Wasserstoffanalysen des Cerebrons mit, aus denen die Einheitlichkeit des Körpers weiterhin hervorgeht. Sie betreffen Präparate verschiedener Darstellung bezw. verschiedene Kristallisationen derselben Präparate.

- 1. 0,1482 g Substanz liefern 0,3755 g CO₂ und 0.1487 g H₂O, das ist 69,10 ° a C und 11.15 ° a H.
- 2. 0.1455 g Substanz liefern 0.3695 g CO₂ und 0.1502 g H₂O, das ist 69.26 ° ° C und 11.47 ° ° H.
- 3. 0,1420 g Substanz liefern 0,3603 g CO₂ und 0,1450 g H₂O, das ist 69,20% C und 11,34% H.
- 4. 0.1439 g Substanz liefern 0.3650 g CO₂ und 0.1466 g H₂O, das ist 69.18° C und 11.32° H.
- 5. 0,1423 g Substanz liefern 0,3613 g CO₂ und 0.1442 g H₂O, das ist 69.25% C und 11.26% H.

	1	2	3	4	5	Mittel der	früheren Analy	se
C	69.10	69,26	69.20	69,18	69,25)	69,16	
H	11,15	11.47	11,34	11.32	11,26	,	11.54	
N							1.76	

Für die Spaltung wurde Cerebron in einer Reibschale mit 7% iger Schwefelsäure fein zerrieben und in einer Druckflasche im kochenden Wasserbad unter beständiger starker Bewegung mittels eines Heißluftmotors eine Stunde oder mehrere Stunden erhitzt. Auf 2 g Cerebron kamen etwa 50 ccm Schwefelsäure. Nach dem Abkühlen wurde abfiltriert und ausgewaschen und ein aliquoter Teil des Filtrats für die Titration mit Fehlingscher Lösung benutzt. Der Filterrückstand wurde wieder mit 7% iger Schwefelsäure in die Druckflasche gebracht, in derselben Weise erhitzt und so fortgefahren, bis das Filtrat auch nach dem Einengen die Trommersche Probe nicht mehr gab.

Filtrat.

Die vereinigten leicht gelblich gefärbten Filtrate wurden nach Entfernung der Schwefelsäure durch Barytwasser und des überschüssigen Baryums durch Kohlensäure eingeengt. Es schieden sich beim Stehen Kristalle ab, welche durch Umkristallisieren aus Wasser mit Leichtigkeit farblos erhalten werden konnten. Sie gaben mit Phenylhydrazin ein Osazon vom Schmelzpunkt 190° und bei der Oxydation mit Salpetersäure Schleimsäure, bestanden also aus Galaktose, wie das von vornherein zu vermuten war. Außer diesem Zucker ist in diesen Filtraten nichts enthalten, auch Ammoniak ließ sich nicht nachweisen.

Über den Verlauf der Spaltung und die Menge der abgespaltenen Galaktose gibt folgende Tabelle Auskunft. Die Zahlen geben die Gesamtmenge der Galaktose in Grammen an, welche in verschiedenen Versuchen aus je 2 g Cerebron während einer bestimmten Zeit abgegeben wurde.

Erhitzungs- dauer in Stunden	Versuch 1	Versuch 2	Versuch 3	Versuch 4
1 2	0,27	0,32		
3 4	0,37	0.38		
5	0,39	0,39	0,40	0,39
6	0,39 + Spuren	0.39 + Spuren	0.40 + Spuren	0,39 + Spure

Der größte Teil der Galaktose wurde also schon in der ersten Stunde abgespalten und nach 4 Stunden war die Abspaltung fast ganz vollendet. Filtriert man nach vier- oder fünfstündigem Kochen ab, wäscht den Niederschlag gründlich aus und erhitzt ihn dann abermals mit Schwefelsäure, so kann man in dem Filtrat entweder direkt oder nach dem Eindampfen immer noch ein schwaches Reduktionsvermögen feststellen und man muß den ausgewaschenen Niederschlag oft noch mehrmals mit Schwefelsäure kochen, bis schließlich auch das auf ein kleines Volumen eingeengte Filtrat die Trommersche Probe nicht mehr gibt. Der Grund dafür, daß die letzten Reste der Galaktose erst so außerordentlich langsam abgespalten werden, liegt vermutlich darin, daß neben dem Zucker Körper auftreten, welche bei Wasserbadtemperatur schmelzen, in geschmolzenem Zustand ungespaltenes Cerebron einschließen und der Einwirkung der Schwefelsäure entziehen.

Die Gesamtmenge der Galaktose, welche erhalten wird, beträgt mindestens 19-20% des Cerebrons.

Rückstand.

Der nach völliger Entfernung der Galaktose erhaltene Rückstand stellte eine graue bis leicht gelbliche Masse dar, welche so lange mit kaltem und heißem Wasser zerrieben und gewaschen wurde, bis das Filtrat nicht mehr sauer reagierte, d. h. bis die freie Schwefelsäure wenigstens bis auf Spuren entfernt worden war. Ein Auswaschen, bis das Filtrat keinen Niederschlag. mit Baryumchlorid mehr gibt, gelingt nicht, da stets kleine Mengen eines organischen Sulfats in Lösung gehen. Die Masse wurde nun abgesaugt, im Vacuum getrocknet und gewogen. Ihre Menge betrug in verschiedenen Versuchen 75-79% des Cerebrons. Fein zerrieben erwärmte ich sie jetzt ganz allmählich und unter fortwährendem Umschütteln mit einer großen Menge 96% igen Alkohols. Eine langsame Steigerung der Temperatur ist durchaus nötig, da bei schnellem Erhitzen leicht ein Teil der Substanz schmilzt und in eine auch in kochendem Alkohol unlösliche Form übergeht. Es löste sich fast alles auf, kleine Mengen eines unlöslichen Rückstandes (hauptsächlich Papierfasern) blieben bei der Filtration zurück. Das etwas abgekühlte, aber noch völlig klare Filtrat wurde nun unter Umschütteln mit warmer alkoholischer Natronlauge versetzt, solange als ein Niederschlag entstand, und nach dem Erkalten wieder filtriert.

1. Niederschlag. Er besteht im wesentlichen aus Natronsalzen höherer Fettsäuren. In heißem Alkohol löste er sich bis auf einen kleinen Rest, welcher sich als anorganisch erwies und von dem abfiltriert wurde. Beim Erkalten kristallisierte die Hauptmenge aus, aus der eingeengten Mutterlauge wurden weitere Abscheidungen erhalten. Die auf diese Weise gewonnene Gesamtquantität betrug 29% des galaktosefreien Cerebrons oder etwa 22—23% des Cerebrons, Werte, welche nur als Minimalwerte anzusehen sind, da die Substanzen auch in kaltem Alkohol nicht ganz unlöslich sind. Nach wiederholtem Umkristallisieren aus heißem Methylalkohol wurde der Körper

mit Wasser fein zerrieben und im Scheidetrichter nach Zusatz von Salzsäure mit Äther geschüttelt. Es trat völlige Lösung ein. Der Äther wurde verdunstet und der Rückstand aus warmem Alkohol umkristallisiert. Es ergab sich, daß es sich im wesentlichen um eine einheitlicher Substanz handelte, eine Säure, für die ich den Namen Cerebronsäure vorschlage.

Cerebronsäure. Schneeweiß, leicht pulverisierbar, nicht hygroskopisch, in Äther löslich, in warmem Alkohol löslich, beim Erkalten der alkoholischen Lösung sich abscheidend in runden oder mehr ovalen, auch leicht gelappten dicht aneinander liegenden Gebilden, welche eine deutliche feine radiäre Streifung erkennen lassen und manchmal gelblich gefärbt erscheinen. Sie ist stickstofffrei, verbrennt unter Entwicklung eines Geruchs nach verbrennendem Fett. Langsam in der Kapillare erhitzt, schmilzt sie bei 99%.

Analysiert wurden 4 Präparate, von denen 1 und 3 verschiedenen Darstellungen entstammen, 2 und 4 durch Reinigen der Präparate 1 und 3 über die Natronsalze gewonnen wurden. Das Trocknen geschah im Vacuum über Schwefelsäure bis zum konstänten Gewicht.

Präparat 1... 0.1751 g lieferten 0.4847 g $\dot{C}O_2$ und 0.1990 g H_2O_3 das ist 75.49% C und 12.63% H.

Präparat 2. 0.1538 g hieferten 0.4250 g CO₂ und 0.1723 g H₂O, das ist 75.36% C und 12.45% H.

Präparat 3. 0.1798 g fieferten 0,4975 g CO_2 und 0,2013 g H_2O_2 das ist 75.46% C und 12.44% H.

Präparat 4. 0,1557 g hieferten 0,4283 g CO₂ und 0,1747 g H₂O, das ist 75.02% C und 12.47% H.

1 2 3 4 Mittel Berechnet für C. H50O3 75,38 75,49 75,36 75,46 75,33 75:02 C 12.14 12.17 12.50 12.56 H 12.63 12.45

Natronsalz der Cerebronsäure. Es wurde erhalten durch Fällen einer warmen alkoholischen Lösung der Säure mit alkoholischer Natronlauge und Umkristallisieren des abfiltrierten Niederschlags aus heißem Alkohol. Schneeweiße, stark elektrische Substanz, in Wasser unlöslich, in heißem Alkohol schwer löslich. Aus der heißen alkoholischen Lösung scheidet es sich beim Erkalten in zu Sternen vereinigten Nadeln oder auch in einzeln liegenden, langen, stark gebogenen Nadeln ab, auch knollenartige Formen kommen vor.

Zur Analyse wurden 2 verschiedene Präparate benutzt. Das Natrium kam als Natriumsulfat zur Wägung.

Präparat 1. 0,1951 g lieferten 0,0361 g Na₂SO₄, das ist 5,25 ° 0 Na 2. 0,2070 * * 0,0356 * * 5,63 ° * C₂₅H₄₉NaO₃ verlangt 5,48 ° 0 Na.

Acetylverbindung der Cerebronsäure. Zu ihrer Darstellung wurde die Säure auf dem Wasserbad am Rückflußkühler mit überschüssigem Acetylchlorid erhitzt. Es trat völlige Lösung ein. Nach Verdunstung des Acetylchlorids erstarrte der Rückstand beim Erkalten zu einer festweichen Masse, welche nun so lange mit Wasser verrieben und filtriert wurde, bis das Filtrat völlig chlorfrei war. Sie quoll dabei etwas auf und verteilte sich so fein im Wasser, daß die Filtration zuletzt nur sehr langsam von Statten ging. Warmer Alkohol löste sie sehr leicht: die sehr konzentrierte alkoholische Lösung erstarrte beim Erkalten zu einer Gallerte, welche sich im Ganzen aus dem Gefäß herausheben ließ. Mikroskopisch bestand sie aus einem dichten Filzwerk langer feiner Fäden. Eine Filtration war unmöglich. Andere Lösungsmittel wie wässeriger Alkohol, Methylalkohol, Äther, Chloroform, in denen die Substanz ebenfalls leicht löslich war, eigneten sich auch nicht zum Umkristallisieren.

In gut analysierbarer Form wurde das Natronsalz erhalten. Es schied sich aus einer warmen alkoholischen Lösung der Substanz auf Zusatz von alkoholischer Natronlauge ab und wurde nach dem Abfiltrieren aus heißem Alkohol umkristallisiert. Die Abscheidung erfolgte in Form feinster Nädelchen und Prismen.

Zur Analyse wurde die Substanz über Schwefelsäure im Vacuum getrocknet. Die Kohlenwasserstoffbestimmung wurde mit Bleichromat und Kaliumbichromat ausgeführt.

- 1. 0.1151 g lieferten 0.2954 g CO₂ und 0.1171 g H₂O, das ist 70.00% C und 11.30% H.
 - 2. 0.1953 g lieferten 0.0310 g Na₂SO₄, das ist 5.14% Na.

	Berechnet für	C ₂₅ H ₄₉ O ₃ Na(CH ₃ CO)
C 70.00		70,13
Н 11,30		11,04
Na 5,14		4.98

Darnach hat also die Cerebronsäure die Zusammensetzung $C_{25}H_{50}O_3$ und ist das Hydroxylderivat einer Säure von der Formel $C_{25}H_{50}O_2$.

Neben der Cerebronsäure gewann ich aus dem Ätherrückstand in geringer Menge noch eine stickstofffreie Säure, welche in jeder Beziehung, auch im Schmelzpunkt (101°), sich der Cerebronsäure sehr ähnlich verhielt, aber einen etwas niedrigeren Kohlenstoffgehalt (74,73°/° C und 12,54°/° H im Mittel mehrerer gut übereinstimmender Analysen) zeigte. Ob es sich hier um eine zweite bei der Spaltung des Cerebrons auftretende Oxysäure handelt, oder nur um eine nicht ganz reine Cerebronsäure, muß vorläufig unentschieden bleiben.

Aus der Quantität der erhaltenen Natronsalze (siehe oben S. 25) läßt sich berechnen, daß das Cerebron mindestens 21—22% Oxyfettsäure enthält.

- 2. Filtrat. Es wurde nach Einleiten von Kohlensäure im Vacuum bei 40—50° eingedampft, der Rückstand mit warmem absoluten Alkohol aufgenommen. Dabei blieb etwas Natriumkarbonat ungelöst zurück. Aus dem klaren Filtrat schieden sich beim Einengen im Vacuum geringe Mengen eines organischen Natronsalzes ab, welches sich als in heißem Alkohol schwerlöslich erwies und wahrscheinlich cerebronsaures Natrium war. Nachdem diese in Alkohol an und für sich schwerlöslichen Beimengungen, welche nur durch die übrigen Bestandteile in Lösung erhalten wurden, allmählich durch Einengen der Flüssigkeit und Aufnehmen des Rückstandes mit Alkohol wenigstens zum Teil entfernt worden waren, wurde die klare, stark alkalisch reagierende alkoholische Lösung mit ganz verdünnter alkoholischer Schwefelsäure unter Umrühren versetzt, solange noch ein Niederschlag entstand. Der Niederschlag wurde abgesaugt.
- a Niederschlag. Aus seiner heißen alkoholischen Lösung schied sich beim Abkühlen eine Substanz ab, welche nach nochmaligem Umkristallisieren rein weiß erhalten wurde, sich als einheitlich erwies und das Sulfat einer Base darstellte.

Dieses Sulfat ist in Wasser und Äther unlöslich, in Chloroform etwas löslich, sehr leicht beim gelinden Erwärmen. In kaltem Alkohol löst es sich nicht oder sehr wenig, sofort aber auf Zusatz einer Spur Schwefelsäure. In heißem Alkohol löst es sich, um beim Erkalten wieder auszufallen, und zwar zum Teil an der Oberfläche, zum Teil am Boden als feines, ziemlich schweres Kristallpulver. Bei der mikroskopischen Untersuchung sieht man kleine Gruppen wirr durcheinander gelagerter spießiger Kristalle oder auch kleine, aus radiär gestellten Nadeln bestehende Rosetten. Bei längerem Absaugen nahm die Kristallmasse (jedenfalls durch Aufnahme von Wasser) eine elastische Beschaffenheit an, wurde aber im Vacuum über. Schwefelsäure wieder hart, kreideartig und ließ sich nun leicht zerschaben und zerreiben. Die Substanz ist sehr hygroskopisch. Im Kapillarrohr erhitzt, zersetzt sie sich, ohne vorher zu schmelzen, bei 240-250° unter Gasentwicklung. Sie addiert Brom. Optisch aktiv scheint sie nicht zu sein, indessen müssen Versuche mit konzentrierteren Lösungen angestellt werden.

Zur Analyse kamen drei Präparate. Präparat 1 und 2 entstammten verschiedenen Darstellungen. Präparat 3 war durch fünfmaliges Umkristallisieren von Präparat 1 erhalten. Das Trocknen geschah im Vacuum über Schwefelsäure.

Präparat 1. 0,1271 g lieferten 0,2845 g CO_2 und 0,1235 g H_2O_3 das ist $61,04\,^{\circ}/_{\circ}$ C und $10,80\,^{\circ}/_{\circ}$ H.

Präparat 2. 0,1520 g lieferten 0,3403 g CO₂ und 0,1495 g H₂O, das ist 61,05 % C und 10,93 % H.

Präparat 3a. 0,1474 g lieferten 0,3306 g CO₂ und 0,1443 g H₂O, das ist 61,17% C und 10,88% H.

Präparat 3b. 0,1963 g lieferten 6,9 ccm N bei 22° und 764 mm B., das ist 4,00°/° N.

Präparat 3c. 0,1992 g lieferten 7.3 ccm N bei 22° und 763 mm B., das ist 4,17°/6 N.

Präparat 3d. 0,3456 g lieferten 0,1225 g BaSO₄, das ist 14,89% H₂SO₄. Präparat 3e. 0,2295 g lieferten 0,0809 g BaSO₄, das ist 14,81% H₂SO₄.

	2 3	Mittel Berechnet für (C ₁₇ H ₃₅ NO ₂) ₂ H ₂ SO ₄
C 61,04	61,05 61,17	61,09 61.08
H 10,80	10,93 10,88	10,87
N	4,00 4,	17 4,08 4.19
H ₂ SO ₄	14,89 14,	# [18] [18] [18] [18] [18] [18] [18] [18]

Um die freie Base zu erhalten, wurde das Sulfat in wenig alkoholischer Natronlauge gelöst, die Lösung mit Wasser versetzt, wobei ein reichlicher weißer Niederschlag auftrat, und nun mit Äther geschüttelt. Die freie Base ging mit Leichtigkeit in den Äther und blieb beim Verdunsten des Äthers als stark alkalisch reagierender Sirup zurück, welcher beim Stehen sich in eine weiße, undeutlich kristallinische Masse umwandelte. Auch in Alkohol, Methylalkohol, Aceton, Petroläther löste sich die Base leicht auf, ohne aber aus einem dieser Lösungsmittel in deutlichen Kristallen sich abzuscheiden. In Wasser ist sie unlösiich. In ihrer alkoholischen Lösung ruft Schwefelsäure einen Niederschlag hervor, der aber bei geringstem Überschuß der Schwefelsäure wieder verschwindet. Auf dem Platinblech erhitzt, entwickelt sie einen Geruch nach verbrennendem Fett und hinterläßt keinen Rückstand.

Nachdem die Arbeit bereits druckfertig finde ich, daß Thudichum¹) schon als Spaltungsprodukt seines Phrenosins eine Base von der Zusammensetzung C₁₇H₃₅NO₂ isoliert, beschrieben und Sphingosin benannt hat. Mit diesem Körper ist offenbar die Base aus dem Cerebron identisch. Ich bin mit der genaueren Untersuchung dieser basischen Substanz beschäftigt und werde bei der Mitteilung der Resultate auf die Angaben von Thudichum eingehen.

Aus den eingeengten Mutterlaugen des beschriebenen Sulfats wurde eine Substanz gewonnen, welche sich gleichfalls als das Sulfat einer organischen Base erwies. Es ließ sich aus ihm in derselben Weise die freie Base erhalten, es addierte auch Brom, verhielt sich überhaupt dem beschriebenen sehr ähnlich, unterschied sich aber insofern, als es in Alkohol suspendiert schon beim geringsten Erwärmen schmolz und auch bei fortgesetztem Kochen nicht in Lösung ging. In 20% Chloroform enthaltendem Alkohol löste es sich beim Erhitzen leicht auf.

Manche Beobachtungen sprechen dafür, daß hier nicht das Sulfat einer zweiten, bei der Spaltung des Cerebrons auftretenden Base vorliegt, sondern daß es erst sekundär ent-

¹) Die chemische Konstitution des Gehirns des Menschen und der Tiere, S. 187. Tübingen. Pietzeker, 1901.

standen ist. Nach den Resultaten einer orientierenden Analyse könnte man daran denken, daß es sich lediglich um den Austritt eines Moleküls Wasser handelt. Es wurden gefunden 62,91% C und 10,99% H, während die Formel $[(C_{17}H_{35}NO_2)_2H_2SO_4]$ — H_2O 62,77% C und 10,77% H verlangt.

b) Filtrat. Es war dunkel gefärbt und hinterließ beim Verdunsten einen dunkelbraunen Rückstand. Einheitliche Substanzen aus ihm zu isolieren, ist bisher nicht gelungen. Daß er noch andere primäre Spaltungsprodukte enthält, ist mir nicht wahrscheinlich. Vermutlich stellt er ein Gemenge von sekundären Zersetzungsprodukten und nicht isolierten Resten der Säure und Base dar.

Die Untersuchung wird fortgesetzt. Auch mit der Spaltung anderer primärer Gehirnbestandteile bin ich beschäftigt.