

Untersuchungen über die Cerebroside des Gehirns.

Von

Hermann Loening und H. Thierfelder.

(Aus dem Physiologisch-chemischen Institut in Tübingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 12. August 1911.)

Nach Parkus¹⁾ werden die von ihm dargestellten Cerebroside durch einmaliges Aufkochen mit gesättigtem Barytwasser nicht angegriffen, durch fortgesetztes (mehrständiges) Kochen mit dieser Flüssigkeit aber vollständig zersetzt. Über das Verhalten der Cerebroside gegen Barytwasser im kochenden Wasserbad finden sich in der Literatur keine Angaben. Ein Versuch, den wir nach dieser Richtung mit Cerebron anstellten, ergab dessen Widerstandsfähigkeit gegenüber dieser Behandlung. Wir verfahren so: 0,4926 g krystallisiertes Cerebron wurden mit gesättigtem Barytwasser fein zerrieben und mit im ganzen 50 ccm dieser Lauge im Rundkölbchen am Rückflußkühler eine Stunde im kochenden Wasserbad erhitzt. Es trat nicht die geringste Verfärbung ein, weder der Lösung noch der ungelösten Substanz. Die nach dem Erkalten abfiltrierte und ausgewaschene Masse wurde mit absolutem Alkohol ausgekocht. Aus dem heißen Filtrat schied sich beim Erkalten ein weißer Niederschlag ab, welcher abgesaugt und getrocknet 0,4451 g wog und bei der Krystallisationsprobe²⁾ völlig krystallisierte. Es waren also 90,4% unverändertes Cerebron wieder erhalten worden.

Da anzunehmen ist, daß die übrigen Cerebroside dieselbe Widerstandsfähigkeit besitzen, unterwarfen wir das sog. Protagon der gleichen Behandlung in der Hoffnung, mit Hilfe eines solchen Verfahrens, bei dem die Phosphatide eine weitgehende

¹⁾ Journ. f. prakt. Ch., N. F., Bd. 24, S. 310 (1881).

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 464 (1910).

Spaltung erleiden, die Cerebroside in besserer Ausbeute und mit geringerer Mühe zu gewinnen. Der Weg führte zum Ziel, aber erst nachdem zur Isolierung der Cerebroside aus dem Reaktionsprodukt statt des üblichen Alkohols Aceton verwendet wurde.

Die Ausführung der einzelnen Versuche war folgende: Eine abgewogene Menge Protagon (worunter die Abscheidungen zu verstehen sind, welche sich in den bei 45° gewonnenen alkoholischen Auszügen von getrocknetem und mit Äther extrahiertem Gehirnpulver beim Abkühlen bilden) wurde mit gesättigtem Barytwasser fein zerrieben, in einen Rundkolben übergeführt und mit der etwa sechzigfachen Menge dieser Flüssigkeit bei aufgesetztem Steigrohr 1 oder 1½ oder 2 Stunden lang in kochendem Wasserbad erhitzt. Währenddessen bildete sich ein Bodensatz, über dem eine klare gelbe Flüssigkeit stand. Der Niederschlag wurde abgesaugt, ausgewaschen und wiederholt mit Aceton ausgekocht, zunächst minuten-, dann stundenlang. Aus den ersten Filtraten fiel beim Abkühlen ein reichlicher Niederschlag aus, aus den späteren nur ein geringer und auch erst beim Stehen in Eiswasser. Die Gesamtkochdauer betrug in den einzelnen Versuchen 4—12 Stunden, ohne daß eine völlige Erschöpfung eingetreten wäre, doch waren die Abscheidungen zuletzt so gering, daß sie auf die Ausbeute keinen nennenswerten Einfluß mehr hatten. Die Niederschläge waren vielleicht mit Ausnahme des ersten, welcher eine ganz leicht gelbliche Farbe hatte, rein weiß. Sie wurden zusammen abgesaugt, getrocknet und gewogen, die Mutterlaugen wurden gemeinsam eingeeengt, ebenfalls getrocknet und gewogen. Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Versuche.

Nr. der Versuche	Protagon in g	Zeit des Erhitzens mit Barytwasser in Std.	Zeit des Auskochens mit Aceton in Std.	Abscheidung aus der Acetonlösung beim Erkalten		In kaltem Aceton löslich	
				in g	in % des Protagons	in g	in % des Protagons
1	3,3597	1	12	1,2271	36.5	0,2659	7.9
2	1,3029	1	10	0,4202	32.2	0,1352	10.4
3	1,3056	1	3½	0,4793	36.7	0,1400	10.7
4	1,3071	1½	7½	0,4351	33.3	0,1628	12.5
5	1,3066	2	5	0,4350	33,3	0,1679	12.8

Die Abscheidungen erwiesen sich als ganz frei von Phosphor und Baryum. Die Rückstände der Acetonlösungen waren zum Teil auch phosphorfrei, zum Teil gaben sie in einer Menge von 0,03—0,04 g nach dem Veraschen mit Soda und Salpeter bei der Ammoniummolybdatreaktion eine ganz leichte Gelbfärbung.

Nach der Hydrolyse mit Schwefelsäure reduzierten alle Abscheidungen und Rückstände Fehlingsche Lösung. In den Abscheidungen der Versuche 1 und 3 wurde das Reduktionsvermögen bestimmt: es fanden sich, auf Galactose berechnet, in Versuch 1 17,7%, in Versuch 3 18,7% Galactose.

Während die Verlängerung der Erhitzung mit Barytwasser von einer Stunde bis auf zwei die Resultate nicht wesentlich veränderte, wie aus der Tabelle hervorgeht, genügte ein kürzeres Erhitzen nicht. In Versuchen, bei denen das Barytwasser ¹/₄, ¹/₂ und ³/₄ Stunden einwirkte, im übrigen aber genau so verfahren wurde, enthielten die Abscheidungen aus dem Aceton Phosphor. Nach ³/₄ stündigem Erhitzen war die Molybdänsäurereaktion, welche 0,03 g der Substanz nach dem Veraschen gab, zwar nur ganz minimal, aber eine ganz schwache Gelbfärbung trat doch auf.

Der Gedanke, Baryt zur Gewinnung von Cerebrosiden aus dem Gehirn zu verwenden, ist gewiß nicht neu. Schon Müller¹⁾ und später Parkus²⁾ haben das Gehirn mit Barytwasser aufgeköcht und aus dem abfiltrierten und ausgewaschenen Koagulum durch heißen Alkohol die Cerebroside extrahiert. Indessen kommt man nach unsern Erfahrungen mit dieser Methode keineswegs ohne weiteres zu phosphorfreien Substanzen. Kossel und Freytag³⁾ haben Protagon in Methylalkohol gelöst, die Lösung bei Wasserbadtemperatur mit einer methylalkoholischen Lösung von Ätzbaryt versetzt, den entstehenden Niederschlag nach kurzer Behandlung auf dem Wasserbad abfiltriert und aus ihm die Cerebroside gewonnen. Auch bei diesem so eleganten Verfahren machte uns die vollständige Entfernung der phosphorhaltigen Beimengungen Schwierigkeiten.

Nachdem so eine befriedigende Methode gefunden worden war, wandten wir sie auf größere Mengen von Protagon an.

¹⁾ Ann. d. Chem. u. Pharm., Bd. 105, S. 361 (1858).

²⁾ a. a. O.

³⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 17, S. 431 (1893).

30 g Protagon¹⁾ wurden mit gesättigtem Barytwasser zu einer feinsten Emulsion, die frei war von jedem größeren Partikelchen, verrieben, mit im ganzen 1100 ccm dieser Flüssigkeit in einem Rundkolben von zwei Litern, der ein Steigrohr trug, unter beständigem Umschütteln im Wasserbad erhitzt und 70 Minuten unter häufigem Umschütteln in dem stark kochenden Wasser belassen. Nach dem Erkalten saugten wir den Niederschlag auf der Nutsche ab, befreiten ihn durch Auswaschen mit Wasser völlig von Ätzbaryt und dann durch Aceton von Wasser. Zwei solcher Portionen, die also 60 g Protagon entsprachen, wurden nun vereinigt, mit Aceton fein zerrieben, in einem Kolben von zwei Litern mit etwa einem Liter Aceton am Rückflußkühler erhitzt und nach einigen Minuten durch Heißwassertrichter filtriert. Den Filtrerrückstand brachten wir in den Kolben zurück, erhitzen mit neuem Aceton, filtrierten und wiederholten das Verfahren, bis die Ausbeute nur noch gering war. Zur vollständigen Erschöpfung mit heißem Aceton wurden dann mehrere solcher schon weitgehend extrahierter Portionen vereinigt. Die ersten Auskochungen liefen zunächst trübe durch das Filter, sodaß ein mehrmaliges Zurückgießen erforderlich war, und gaben beim Erkalten reichliche Abscheidungen, die späteren lieferten gleich ein klares Filtrat und trübten sich erst allmählich oder in Eiswasser. Bei dieser Darstellung war ein längeres Auskochen erforderlich als bei den Vorversuchen, offenbar deshalb, weil die Cerebroside wenigstens zum Teil als Baryumverbindungen vorliegen, welche beim Erhitzen um so leichter zerfallen, je größer die relative Menge des Acetons ist. Bei den Vorversuchen war im Verhältnis zur Substanz sehr viel mehr Aceton vorhanden.²⁾ Die Gewichtsmengen der Ab-

¹⁾ Das Ausgangsmaterial für die Darstellung des Protagens bildete getrocknetes, pulverisiertes und mit Äther extrahiertes Rindergehirn, welches mir ebenso wie der Ätherextrakt von der Direktion der Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co. in Elberfeld in freigebigster Weise zur Verfügung gestellt wurde. Ich benütze gern auch diese Gelegenheit, um der Direktion für diese so wertvolle Förderung meiner Arbeiten herzlichen Dank auszusprechen.

H. Thierfelder.

²⁾ Dieses langsame und allmähliche Inlösungsgehen des Cerebrosides haben wir auch beobachtet, als wir mit Barytwasser eine Stunde erhitztes

scheidungen aus Aceton, welche aus 60 g Protagon in einem Versuch erhalten wurden, und die zugehörigen Kochzeiten finden sich in folgender Zusammenstellung.

Kochdauer	3 Min.	15 Min.	½ Std.	1 Std.	1½ Std.	3 Std.	5 Std.	8 Std.	9 Std.
Ausbeute in g	4,6	3,1	2,8	2,7	2,3	1,5	1,2	0,6	0,4

Die Summe der einzelnen Abscheidungen beträgt 19,2 g = 32% des Protagens.

Um festzustellen, ob in den einzelnen Fraktionen vielleicht schon verschiedene Substanzen vorlagen, haben wir je 0,2 g in Kölbchen gleicher Form und Größe gebracht, in 10 ccm 10% Chloroform enthaltendem Methylalkohol in der Wärme gelöst und Zeit und Art der Abscheidung bei langsamem Abkühlen beobachtet. Da zeigte sich, daß die 4.—9. Fraktion sich untereinander ähnlich verhielten, während die ersten beiden länger klar blieben und die 3. ein mittleres Verhalten zeigte. Nach beendeter Abscheidung fand sich in allen unter einer klaren Flüssigkeit eine den Boden bedeckende, weiche Gallerte, die in den ersten Fraktionen fest am Glas haftete, in den spätern beim Schütteln sich leicht ablöste. Mikroskopisch handelte es sich überall um ein dichtes fädiges Gewebe, in welchem Gebilde eingebettet waren, deren Form, Größe und Zahl in den einzelnen Fraktionen wechselte. Da sich also wesentliche Unterschiede bei dieser Prüfung nicht ergaben, vereinigten wir alle Fraktionen, lösten sie in der Wärme in absolutem Alkohol und trennten nach dem Vorgang von Thudichum¹⁾ die beim Erkalten oberhalb 28° erfolgenden Abscheidungen von den unterhalb dieser Temperatur sich bildenden.

Das oberhalb 28° Abgeschiedene zeigte nach Um-

krystallisiertes Cerebron nach dem Abfiltrieren mit Aceton auskochen. Die Menge, welche nach wiederholtem (im ganzen 12 stündigem) Auskochen wiedergewonnen wurde, betrug nur 76,1% des angewendeten Cerebrons. Es krystallisierte bei dem Krystallisationsversuch vollständig.

¹⁾ Die chemische Konstitution des Gehirns. Tübingen, Pletzker. 1901, S. 181.

krystallisieren aus absolutem Alkohol die Eigenschaften des Cerebrons und wir zweifelten nicht, daß bei der Krystallisationsprobe ein Teil krystallisieren würde. Das war aber nicht der Fall, die Krystallisation blieb gänzlich aus. Sie erfolgte aber reichlich, nachdem die Substanz eine Zeitlang mit Methylalkohol in einer zur Lösung unzureichenden Menge im Kolben mit Steigrohr gekocht worden war. Diese Beobachtung legte aufs neue¹⁾ den Gedanken nahe, daß das krystallisierende Cerebron erst während seiner Darstellung entstanden sein möchte, etwa durch Eintritt von Methylgruppen. Indessen fiel die Prüfung krystallisierten Cerebrons auf Oxalkylgruppen nach Zeisl völlig negativ aus und auch bei der Prüfung auf an Stickstoff gebundenes Alkyl nach H. Meyer ergab das krystallisierte Cerebron keinen größeren Jodsilberwert als das amorphe. Ferner gelang die Krystallisationsprobe mit Methylalkohol auch, nachdem statt mit Methyl- mit Äthylalkohol längere Zeit gekocht worden war. Man könnte auch daran denken, daß das Auftreten der krystallisierenden Substanz das Resultat einer Spaltung sei. Die Untersuchung dieser Verhältnisse wird eine unserer nächsten Aufgaben sein.

Die unterhalb 28° erfolgenden Abscheidungen erinnerten durchaus an die von Thudichum gegebene Beschreibung des Kerasins. Da sie aber mikroskopisch nicht einheitlich waren, wurden sie weiter umkrystallisiert und unter Benutzung verschiedener Temperaturgrenzen (oberhalb 28°, 28—24°, 24—15°, 15—0°) fraktioniert. Bei diesen Operationen erhielten wir eine Fraktion (Präparat 1), welche mikroskopisch lediglich aus langen feinsten Nadeln bestand. Andere, welche reich an diesen Nadeln waren, wurden vereinigt und aus 10% Chloroform enthaltendem Methylalkohol umkrystallisiert. Dabei gelang es, sie auch frei von Beimengungen zu erhalten (Präparat 2). Diese beiden Präparate zeigten die weitgehendste Übereinstimmung unter einander und wir glaubten bestimmt, daß es sich um dieselbe Substanz, und zwar um Kerasin, handele. Die Analysen bestätigten aber diese Vermutung nicht. Für das Präparat 1 erhielten wir in zwei Analysen 70,84 u. 70,60% C

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 68, S. 470, Fußnote 1.

und 11,55 u. 11,50% H, für das Präparat 2 72,76 u. 72,85% C und 10,76 u. 10,86% H.

Bei wiederholter sorgfältiger Prüfung zeigten sich denn auch geringe Unterschiede in den Löslichkeitsverhältnissen und im Schmelzpunkt, nicht aber in der Art der Abscheidung aus den Lösungsmitteln und im mikroskopischen Bilde.

Die Substanz 1 schmilzt bei 176–177°, die Substanz 2 bei 173–174° zu klarer hellbrauner Flüssigkeit.

Aus 10% Chloroform enthaltendem Methylalkohol scheiden sich beide beim Abkühlen völlig gleich aus. Es bilden sich zunächst am Boden vereinzelte gallertige kugelige Klümpchen, an denen man mit bloßem Auge eine radiäre Streifung erkennen kann. Sie vergrößern sich allmählich und platten sich, indem sie zusammenstoßen, aneinander ab. Nach einiger Zeit ist die ganze Flüssigkeit in eine Gallerte verwandelt, welche sich kontrahiert und eine klare Flüssigkeit auspreßt. Die Gallerte bildet nun eine ganz derbe Masse, von der sich nur schwierig kleine Teilchen abtrennen lassen; sie ist allseitig von Flüssigkeit umgeben und haftet nirgends am Glase. Mikroskopisch besteht sie lediglich aus einem Fadenwerk, in dem man hie und da aus parallel verlaufenden Fäden gebildete Strähne, welche auch einen welligen Verlauf haben, erkennt.

Der einzige Unterschied zwischen den beiden Präparaten besteht darin, daß die Abscheidung bei 1 zuweilen etwas später erfolgt, als bei 2.

Aus absolutem Alkohol geschieht die Abscheidung beim Abkühlen zunächst in Form kleiner punktförmiger Gebilde am Boden, welche an Zahl und Größe zunehmen. Schließlich findet sich unter einer klaren Flüssigkeit eine zusammenhängende Schicht, welche an Boden und Wand des Gefäßes haftet und eine etwas gallertige Beschaffenheit zeigt. Mikroskopisch sieht man lediglich feinste büschelförmig gruppierte Nadeln, die in der Gesamtheit ihrer Anordnung an Pfauenfedern erinnern.

Der einzige Unterschied besteht auch hier darin, daß die Abscheidung bei Präparat 1 etwas früher beginnt.

Aus heißem Aceton, in dem beide schwer löslich sind, aber 2 schwerer als 1, erfolgt die Abscheidung in Form einer

lockeren Gallerte. Das mikroskopische Bild ist dasselbe, wie es oben für die chloroformmethyalkoholische Lösung beschrieben ist.

Das Präparat 1 hat annähernd denselben C- und H-Gehalt wie das Kerasin (Homocerebron von Parkus), das nach den übereinstimmenden Bestimmungen von Parkus und von Kossel und Freytag bei 155° (156°) schmilzt und 70,06 (70,00)% C, 11,595 (11,69)% H, 2,23 (2,24)% N enthält. Wir sind keineswegs von der Reinheit unserer Präparate überzeugt und führen die Analysen nur an, um zu zeigen, daß in dem von uns gewonnenen Cerebrosidgemisch mehrere Substanzen von dem charakteristischen Verhalten des Kerasins vorhanden zu sein scheinen. Die Untersuchungen werden fortgesetzt.