

Untersuchungen über die Cerebroside des Gehirns.

II. Mitteilung.

Von

Hermann Loening und H. Thierfelder.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen.)

(Der Redaktion zugegangen am 7. Februar 1912.)

Vor kurzem¹⁾ veröffentlichten wir ein Verfahren zur Isolierung der Cerebroside aus Protagon, welches auf der Widerstandsfähigkeit dieser Substanzen gegen Baryt und ihrer Löslichkeit in heißem Aceton beruht. Inzwischen haben wir gefunden, daß von J. Lorrain Smith und W. Mair²⁾ in einer vor der unsrigen erschienenen Arbeit eine auf dem gleichen Prinzip beruhende Methode zur Gewinnung der Cerebroside beschrieben worden ist.

Smith und Mair lösen den Chloroformextrakt des getrockneten Gehirns in heißem Methylalkohol, fügen heiß gesättigte methylalkoholische Barytlösung hinzu, kochen drei Stunden, dampfen nach nahezu vollständiger Neutralisation mit Essigsäure ein und erschöpfen den Trockenrückstand mit heißem Aceton, aus dem sich beim Erkalten die Cerebroside abscheiden, während das gleichzeitig extrahierte Cholesterin in Lösung bleibt.

Wir wollen nicht verfehlen, auf diese Arbeit nachträglich aufmerksam zu machen.

Im folgenden soll über Versuche berichtet werden, welche zur weiteren Prüfung der Widerstandsfähigkeit der Cerebroside

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 74, S. 282 (1911).

²⁾ J. Lorrain Smith and W. Mair. On a method of isolating Cholesterin and Cerebroside from brain by means of saponification with bariumhydrate in methylalcohol. Proc. of the pathological society. The journal of Pathology and Bacteriology, Vol. 15, p. 122 (1910).

gegen Ätzbaryt und Ätzalkali angestellt wurden, ferner über die quantitative Ausbeute an Cerebroside bei dem Barytacetoneverfahren und über den Verbleib des nicht isolierten Restes, sowie über die Verteilung der Cerebroside auf die einzelnen Fraktionen bei dem von uns benutzten Verfahren zur Aufarbeitung des Gehirns.

Verhalten der Cerebroside gegenüber Barytwasser in der Hitze.

In unserer letzten Veröffentlichung¹⁾ teilten wir einen Versuch mit, bei dem von reinem krystallisierten Cerebron, welches 1 Stunde mit Barytwasser in kochendem Wasserbad erhitzt worden war, 90,4% in krystallisiertem Zustande wieder erhalten wurden. Diese Menge hatte sich aus dem Alkohol, mit dem die abfiltrierte und ausgewaschene Masse ausgekocht worden war, beim Erkalten abgeschieden. Als wir den Versuch wiederholten, nur mit dem Unterschiede, daß zum Auskochen nicht Alkohol, sondern Aceton verwendet wurde, gewannen wir von 0,3244 g Cerebron nur 0,2471 g (ebenfalls krystallisiert), d. h. 76,17% wieder, obwohl das Auskochen viele Stunden mit mehrfach erneuertem Aceton (im ganzen 12 Stunden) und so lange fortgesetzt worden war, bis das Filtrat beim Erkalten völlig klar blieb. Diese geringere Ausbeute kann wohl nur dadurch verursacht sein, daß das Cerebron mit Baryum eine Verbindung eingegangen ist, welche durch Kochen mit Aceton nur langsam und nicht ganz vollständig zerlegt wird.

Um zu entscheiden, ob auch der bei der Alkoholextraktion erhaltene (wenn auch viel geringere) Fehlbetrag auf eine unvollständige Isolierung (sei es, daß die Cerebron-Baryumverbindung auch durch Alkohol nicht völlig zerlegt wird, sei es, daß etwas Cerebron in Alkohol gelöst bleibt) oder auf eine geringe Zerstörung von Cerebron durch Barytwasser zurückzuführen ist, haben wir folgende weitere Versuche angestellt. Wir verzichteten bei ihnen auf eine Isolierung der Cerebroside und bestimmten nur das Reduktionsvermögen der hydrolysierten Substanz einerseits vor, andererseits nach dem Erhitzen mit

¹⁾ a. a. O., S. 282.

Barytwasser.¹⁾ Ferner benutzten wir nicht Cerebron, sondern Protagon, um die Prüfung gleich auf die Gesamtheit der Cerebroside auszudehnen.

Für die Hydrolyse wurde eine 15—16%ige Schwefelsäure, welche nach ausgedehnten Vorversuchen die Abspaltung während 3stündigen Erhitzens in kochendem Wasserbad bewirkt, verwendet. Wir zerrieben die abgewogene Substanzmenge mit einem Teil der abgemessenen Schwefelsäure und brachten sie mit Hilfe des Restes quantitativ in ein kleines Rundkölbchen von ca. 9 ccm Inhalt aus ganz dünnem Glas. Dieses wurde zugeschmolzen und unter fortwährendem Schütteln²⁾ (mittels einer Wasserturbine) im siedenden Wasserbad 3 Stunden erhitzt. Nach dem Erkalten brachten wir das Kölbchen in eine mit Schnauze versehene gläserne Rundschale, in der es gut Platz hatte, zertrümmerten es durch einen kurzen Stoß mit dem Pistill, filtrierten die klare Flüssigkeit durch ein kleines Filter in einen Meßzylinder für 20 ccm, zerrieben die zurückgebliebenen bröckeligen Massen zusammen mit den Glasscherben mit Wasser, filtrierten durch dasselbe Filter und wuschen aus. Darauf brachten wir das Filter mit Inhalt in die Glasschale zurück, zerrieben es wieder mit Wasser und filtrierten durch ein neues Filter in den Meßzylinder. Das Waschen mit kleinen Mengen Wasser wurde so lange fortgesetzt, bis das Filtrat um so viel weniger als 20 ccm betrug, als Kubikzentimeter starker Natronlauge zu seiner Neutralisation nötig waren. Da wir gewöhnlich 5 ccm einer 15,3%igen Schwefelsäure verwendeten, deren Neutralisation 1,6 ccm starker Natronlauge erforderten, so betrug die Menge des Filtrats in den meisten Fällen 18,4 ccm.

¹⁾ Wir halten uns für berechtigt, eine Zersetzung der Cerebroside als nicht erfolgt anzusehen, wenn nach der Hydrolyse dieselbe Menge Galaktose gefunden wird. Rosenheim und Tebb (Journ. of Physiol., Vol. 36, p. 15 [1907]) sind zwar geneigt, anzunehmen, daß ein Teil des Sphingosins, welches sie in beträchtlicher Menge unter den Zersetzungsprodukten des Protagons mit Barytwasser fanden, aus dem Phrenosinanteil des Protagons stamme. Wir vermuten, daß alles aus dem Sphingomyelinanteil abgespalten ist, in dem ja Thudichum diese Base nachgewiesen hat. Unter den von uns eingehaltenen Bedingungen entsteht durch Baryt aus Cerebron jedenfalls kein Sphingosin. Indessen machen Rosenheim und Tebb keine näheren Angaben über die Dauer ihres Spaltungsversuches. Vielleicht haben sie sehr lange erhitzt. «Beim Erhitzen mit kaustischem Baryt namentlich unter Druck» wird das Phrenosin auch nach Thudichum (Die chemische Konstitution des Gehirns, S. 184) schnell zersetzt und je nach der Dauer des Erhitzens werden drei, vier oder fünf Produkte erhalten, deren zwei Alkaloide, zwei Säuren sind, während eines ein Zucker (?) ist.

²⁾ Spätere Versuche haben ergeben, daß auch ohne Schütteln die Hydrolyse in der angegebenen Zeit eine vollständige ist.

Wir fanden das beschriebene Verfahren sehr bequem; es gestattet ein sehr genaues quantitatives Arbeiten und besonders wird durch das Zerreiben der hydrolysierten Masse mit dem Glaspulver leicht ein völliges Auswaschen erreicht.

Die Bestimmung der Galaktose nahmen wir nach Bertrand¹⁾ vor. Die abfiltrierte Flüssigkeit wurde aus dem Meßzylinder in einen Erlenmeyerschen Kolben aus Jenaer Glas von 150 ccm Inhalt gegossen. Mit demselben Meßzylinder geschahen die Abmessungen der Kupfersulfatlösung und der Seignettesalz enthaltenden Natronlauge, welche also zugleich als Spüllüssigkeiten dienten. Vor der Lauge wurde die für die Neutralisation der Schwefelsäure nötige Menge starker Natronlauge zugefügt. Im übrigen verfahren wir genau nach Bertrand.

Vom Protagonpulver, dessen Galaktosegehalt bekannt war, wurde eine bestimmte Menge abgewogen, mit gesättigtem Barytwasser fein zerrieben und mit der etwa 60 fachen Menge Barytwasser in einem mit Steigrohr versehenen Rundkolben unter häufigem Umschütteln eine bestimmte Zeit im kochenden Wasserbad erhitzt. Die Masse wurde dann quantitativ auf eine Nutsche gebracht, abgesaugt, je einmal mit Wasser und mit Aceton ausgewaschen und nun quantitativ in eine kleine Glasschale überführt, welche vorher zusammen mit einem verschließbaren Wägegefäß, in dem sie Platz hatte, und einem kleinen Glasstab gewogen worden war. Nachdem sie getrocknet und mit dem Glasstab fein zerteilt und gemischt worden, wurde die Glasschale in das Wägegefäß gebracht und die Wägung wiederholt. Von der nun ihrem Gewicht nach bekannten Masse wogen wir kleine Portionen für die Hydrolyse und Zuckerbestimmung ab.

Das Protagon enthielt 10,57% Galaktose.

Substanz g	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose mg	Galaktose %	
0.1995	4.06	39,91	21,06	10.56	} 10.57
0.2212	4.46	43.84	23.24	10.51	
0.2306	4.7	46,20	24,56	10.65	

22,76 ccm der Kaliumpermanganatlösung entsprachen 223,775 mg Cu.

¹⁾ Bull. de la société chim. de Paris (3), Vol. 35, p. 1285 (1906). Eine genaue Beschreibung findet sich in Hoppe-Seylers Handbuch der phys. u. path.-chem. Anal., 8. Aufl., S. 658 u. 782.

1. Versuch. 1,0420 g Protagon werden 30 Minuten mit Barytwasser erhitzt. Gewicht der abgesaugten Masse 1,1491 g.

Substanz g	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose mg	Galaktose %
0,2253	4,03	39,61	20,95	9,3

22,76 ccm der KMnO₄-Lösung entsprachen 223,775 mg Cu.

Es sind also 0,1101 g Galaktose in den Versuch eingeführt und 0,1069 g oder 97,1% wiedererhalten.

2. Versuch. 1,0323 g Protagon werden 70 Minuten mit Barytwasser erhitzt. Gewicht der abgesaugten Masse 1,1329 g.

Substanz g	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose mg	Galaktose %	
0,2071	3,75	36,86	19,45	9,39	} 9,42
0,2426	4,4	43,25	22,92	9,45	

Wirkungswert der Kaliumpermanganatlösung wie bei Versuch 1.

Es sind also 0,1091 g Galaktose in den Versuch eingeführt und 0,1067 g oder 97,8% wiedererhalten.

3. Versuch. 0,9898 g Protagon werden 125 Minuten mit Barytwasser erhitzt. Gewicht der abgesaugten Masse 1,0689 g.

Substanz g	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose mg	Galaktose %	
0,2178	3,89	36,16	20,14	9,25	} 9,18
0,2198	3,87	37,96	20,03	9,11	

22,80 ccm der Kaliumpermanganatlösung entsprachen 223,775 mg Cu.

Es sind also 0,1046 g Galaktose in den Versuch eingeführt und 0,0981 g oder 93,8% wiedererhalten.

Aus diesen Versuchen ergibt sich die fast völlige Widerstandsfähigkeit der Cerebroside bei einstündigem Erhitzen mit gesättigtem Barytwasser; auch bei zweistündigem ist der Verlust ein geringer. Höchstwahrscheinlich dürfte der ganze Fehlbetrag nicht auf einer Zerstörung beruhen, sondern auf einer geringen Löslichkeit der Substanz in Barytwasser. Bei der geringeren Protagonmenge, die in Versuch 3 benutzt wurde,

hat natürlich dieser durch die Löslichkeit bedingte Verlust einen größeren Einfluß auf den Prozentgehalt.

Verhalten der Cerebroside gegenüber methylalkoholischer Kalilauge in der Hitze.

Über das Verhalten eines Cerebroside, des von Parkus dargestellten Cerebrins, gegen alkoholische Kalilauge liegt eine Angabe vor. Parkus¹⁾ schreibt: «Die geringen Veränderungen, welche es nach mehrstündigem Kochen am Rückflußkühler mit alkoholischer Kalilauge zeigte, beweisen seine außerordentliche Widerstandsfähigkeit gegen die Einwirkung dieses Reagens.» Wir haben diese Angabe einer Prüfung unterzogen und verfahren in folgender Weise:

Von einer etwa 10% Protogon enthaltenden Chloroformlösung brachten wir je 10 ccm in kleine Erlenmeyersche Kölbchen, verdunsteten das Chloroform und lösten den Rückstand in 8 ccm Methylalkohol. Während nun die einen Kölbchen nach Zusatz von 2 ccm 14% Ätznatron enthaltenden Methylalkohols bestimmte (in den einzelnen Fällen wechselnde) Zeiten unter beständigem Umschütteln und darauf nach Zusatz von 12,1 ccm 20% Schwefelsäure enthaltenden Methylalkohols 3 Stunden am Rückflußkühler im kochenden Wasserbad erhitzt wurden, erhielten die andern beide Zusätze gleich nacheinander und wurden nur bei saurer Reaktion drei Stunden gekocht. Darauf brachten wir in jedes Kölbchen 40 ccm Wasser, erhitzten sie, während sie offen im kochenden Wasserbad hingen, um das Methylgalaktosid zu spalten, drei Stunden, führten nach dem Erkalten den Inhalt quantitativ mit Hilfe von Wasser in besonders geeichte Meßzylinder von 50 ccm über, füllten bis zur Marke auf und mischten. Die gröberen Partikelchen setzten sich nach einigem Stehen an der Oberfläche ab und ließen sich durch eine kippende Bewegung fast vollständig in eine Reibschale bringen. Nachdem sie fein zerrieben, wurde die Flüssigkeit ebenfalls in die Reibschale gebracht und nach nochmaligem Zerreiben filtriert. Von dem Filtrat, welches sofort oder nach mehrmaligem Zurückgießen klar war, maßen wir

¹⁾ Journ. f. prakt. Chem. (2), Bd. 24, S. 329 (1881).

20 ccm ab und benutzten sie nach Zufügen der zur Herstellung neutraler Reaktion nötigen geringen Menge starker Natronlauge für die Galaktosebestimmung nach Bertrand.

Die Ergebnisse dieser Versuche finden sich in folgender Tabelle zusammengestellt.

	Mit NaOH erhitzt Min.	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose mg in 20 ccm	Galaktose mg in 50 ccm	Galaktose %
1	0	5,25	48,96	26,0	65,0	6,5
2	0	5,25	48,96	26,0	65,0	6,5
3	5	5,40	50,36	26,8	67,0	6,7
4	10	5,50	51,29	27,3	68,25	6,85
5	10	5,48	51,1	27,2	68,0	6,8
6	20	5,22	48,68	25,9	64,75	6,47
7	20	5,40	50,36	26,8	67,0	6,7
8	30	5,36	49,98	26,6	66,5	6,65
9	60	5,30	49,63	26,4	66,0	6,6

In den Versuchen 1—8 entsprachen 24,0 ccm, in Versuch 9 23,9 ccm Kaliumpermanganatlösung 223,8 mg Cu.

Es geht aus den Versuchen die völlige Widerstandsfähigkeit der Cerebroside gegen einstündiges Erhitzen in einer 2,8% Ätznatron enthaltenden methylalkoholischen Lösung hervor (natürlich wieder unter der Voraussetzung, daß eine Zersetzung der Cerebroside sich durch eine Zerstörung von Galaktose zu erkennen gibt).

Der niedrige Prozentgehalt an Galaktose erklärt sich daraus, daß dem für den Versuch benutzten Protagon schon Cerebron entzogen worden war.

Über die Menge Cerebroside, welche mit Hilfe des Baryt-Acetonverfahrens aus Protagon erhalten werden, und über den Verbleib des nicht isolierten Restes.

1. Versuch. In unserer früheren Mitteilung haben wir schon angegeben, daß die Menge Cerebroside, welche sich aus dem heißen Aceton beim Erkalten abscheiden, etwa 33% des verwendeten Protagons beträgt, und daß das Cerebrosidgemenge etwa 18—19% Galaktose enthält. Wir teilen jetzt einen Versuch mit, in dem nicht nur bestimmt wurde, wieviel Cerebrosid sich aus dem Aceton abscheidet, sondern auch wieviel im Aceton

gelöst bleibt, ferner wieviel nach der Acetonextraktion noch durch Alkohol erhalten wird, und wieviel auch durch Alkohol nicht extrahiert werden kann, also im Rückstand bleibt. Die Bestimmung der Cerebroside geschah durch Wägung der einzelnen Fraktionen und durch Ermittlung der in ihnen enthaltenen Galaktose. (In manchen Fällen war nur die letztere Bestimmungsart möglich, da es sich um Gemenge handelte.)

Das für den Versuch benutzte, im Vakuum bis zum konstanten Gewicht getrocknete Protagon enthielt 11,55% Galaktose.

	Substanz g	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose mg	Galaktose %
1	0,2045	4,6	45,22	24,01	11,74
2	0,2040	4,5	44,23	23,46	11,50
3	0,2333	5,0	50,30	26,78	11,48
4	0,2228	4,78	48,09	25,57	11,48

} 11,55

In den Bestimmungen 1 und 2 entsprachen 22,76 ccm, in den Bestimmungen 3 und 4 22,24 ccm Kaliumpermanganatlösung 223,775 mg Cu.

Es wurden 4,9145 g dieses Protagon, welches also 0,5676 g Galaktose enthielt, mit Barytwasser feinst zerrieben und mit 300 ccm Barytwasser in einem Jenaer Rundkolben von 500 ccm in kochendem Wasserbad 2 Stunden erhitzt. Die abgesaugte, mit Wasser und zuletzt mit Aceton gewaschene Masse wurde in denselben Kolben zurückgebracht, mit 250 ccm Aceton am Rückflußkühler ausgekocht und im Heißwassertrichter durch doppeltes Filter filtriert und zwar unter Zurückgießen der filtrierten Flüssigkeit, bis diese ganz klar abfloß. Das Filtrat wurde auf 0° abgekühlt. Der Rückstand wurde in den Kolben zurückgebracht und abermals mit 250 ccm Aceton ausgekocht. Diese Operation wurde wiederholt, bis das Filtrat auf 0° abgekühlt keinen Niederschlag mehr gab. Nun folgten Auskochungen mit je 250 ccm Alkohol in derselben Weise. Der schließlich hinterbleibende unlösliche Rückstand (U. R.) wog nach dem Trocknen 2,0112 g. Er gab starke Phosphorsäure- und starke Baryumreaktion. Die Abscheidungen verschiedener Auskochungen wurden gemeinsam abgesaugt, getrocknet und gewogen. Deren Mengen und die Dauer der einzelnen Auskochungen sind in der Tabelle zusammengestellt. Über die Verarbeitung der Mutterlaugen siehe weiter unten.

	Extraktionsmittel	Kochdauer	Abscheidung	Menge der Abscheidung	Bemerkungen
1	Aceton	einige Min.	reichlich	1,3827 g (1)	
2	„	„	weniger	0,3479 g (2—4)	schwache Reaktion auf Baryum.
3	„	„	reichlich		
4	„	3 Stunden	gering		
5	„	4 1/4 „	Spuren		
6	„	8 „	„	0,0445 g (5—9)	
7	„	5 1/2 „	„		
8	„	6 1/2 „	unwägbar		
9	„	5 1/2 „	Spuren		
10	Alkohol	1/2 „	gering	0,2992 g (10—11)	
11	„	1 1/4 „	„		
12	„	6 „	nicht	0,0	
13	„	6 „	wägbar		
14	„	7 1/4 „	Spuren		
15	„	7 1/4 „	„		

Aus den vereinigten Mutterlaugen 1—9 schied sich nach dem Einengen auf 100 ccm ein Niederschlag ab, welcher abgesaugt und getrocknet ein helles Pulver darstellte und 0,2013 g wog (M. 1—9a). Das Filtrat davon hinterließ bei niedriger Temperatur eingedampft einen Rückstand in Form schmieriger öliger Tropfen, welcher sich in wenig Äther löste, dessen ätherische Lösung sich aber auf Zusatz von mehr Äther trübte. Getrocknet wog er 0,4383 (M. 1—9b). M. 1—9a und M. 1—9b sind frei von Baryum.

Die vereinigten Mutterlaugen 10—11 hinterließen beim Verdunsten einen Rückstand, welcher getrocknet 0,2214 g wog, schwache Phosphorsäurereaktion und deutliche Baryumreaktion gab (M. 10—11).

Die vereinigten Flüssigkeiten 12—15 wurden mit ihren geringen Abscheidungen eingengt und hinterließen einen Rückstand, welcher nach dem Trocknen ein hellgelbes Pulver darstellte, das schwache Phosphorsäurereaktion und deutliche Baryumreaktion gab und 0,3803 g wog (M. 12—15).

Über den Galaktosegehalt der einzelnen Fraktionen, welcher

in der beschriebenen Weise bestimmt wurde, gibt die folgende Tabelle Auskunft.

Fraktion	Gesamtmenge g	Für Bestimmung benützte Menge g	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose		Gesamtmenge g	Galaktose % der	
					mg	%		einge- führten	wieder- erhaltenen
1	1,3827	0,1214	3,8	37,35	19,71	16,24	0,2306	40,63	50,25
		0,1515	4,95	48,66	25,87	17,08			
2—4	0,3479	0,1040	3,73	36,67	19,35	18,6	0,06433	11,33	14,02
		0,1062	3,76	36,96	19,5	18,37			
5—9	0,0445	—	—	—	—	18,49 ¹⁾	0,00822	1,45	1,79
10—11	0,2992	0,2490	6,5	63,89	34,35	13,8	0,04129	7,27	9,00
M. 1—9a	0,2013	0,1509	3,81	37,45	19,76	12,4	0,02496	4,40	5,44
M. 1—9b	0,4383	0,1678	1,7	16,71	8,66	5,16	0,02262	3,99	4,93
M. 10—11	0,2214	0,1771	3,3	32,44	17,07	9,64	0,02134	3,76	4,65
M. 12—15	0,3803	0,1155	1,1	10,8	5,6	4,8	0,01711	3,01	3,73
		0,1805	1,5	14,7	7,6	4,2			
U. R.	2,0112	0,2389	0,67	6,59	3,4	1,42	0,02846	5,02	6,20
		0,2955	0,82	8,06	4,18	1,41			
	5,3268						0,4589	80,86	100,00

In allen Bestimmungen entsprachen 22,77 ccm Kaliumpermanganatlösung 223.775 mg Cu.

Daß die Summe der einzelnen Fraktionen (5,3268) die Menge des angewendeten Protogons übersteigt, ist ja natürlich, denn es haben sich organische Baryumverbindungen und Baryumcarbonat gebildet. Die Menge der wiedergefundenen Galaktose (0,4589 g) beträgt nur 80,86% derjenigen, welche in dem benutzten Protogon enthalten war (0,5676 g). Auf ein Defizit waren wir gefaßt. Daß dasselbe so groß sein würde, hatten wir nicht erwartet. Es erklärt sich indessen einerseits aus der großen Zahl der einzelnen Operationen, bei denen sich trotz sorgfältigen Arbeitens Verluste nicht ganz vermeiden lassen.

¹⁾ Nicht bestimmt, sondern nach Fraktion 2—4 angenommen.

und andererseits aus der Ungenauigkeit der Methode bei den Bestimmungen von weniger als 10 mg Galaktose. Um solche geringe Galaktosemengen handelte es sich bei verschiedenen Fraktionen, besonders bei der Verarbeitung des unlöslichen Restes. Diese letztere Fraktion ist natürlich auch von den Verlusten am stärksten betroffen worden. So dürfte wohl das Defizit im wesentlichen auf Rechnung dieser Fraktion zu setzen sein.

Die Menge der aus den heißen Acetonauszügen sich abscheidenden Cerebroside war hier wieder ungefähr ebenso groß wie in den früheren Versuchen, d. h. 36,1%. In diesen Abscheidungen sind 53,41% der in den Versuch eingeführten und 67,79% der wiedergewonnenen Galaktose enthalten. Die übrige Galaktose verteilt sich auf die anderen Fraktionen. Der Prozentgehalt dieser Fraktionen an Galaktose ist aber verschieden, bei einigen (10—11, M. 1—9a) noch ziemlich hoch, bei den anderen niedriger. Man ist aber gewiß nicht berechtigt, hieraus auf die Existenz galaktoseärmerer Cerebroside zu schließen. Der niedrige Gehalt dürfte sich vielmehr aus dem Vorhandensein von Beimengungen erklären. In einigen ist ja auch Phosphorsäure und Baryum nachgewiesen worden.

2. Versuch. Im Anschluß an diesen Versuch sei noch aus einem zweiten, der in seinem weiteren Verlauf anderen Zwecken diene, einiges mitgeteilt, welches in guter Übereinstimmung mit den eben besprochenen Ergebnissen steht.

Das bis zum konstanten Gewicht getrocknete Protagon enthielt 12,7% Galaktose.

Substanz g	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose mg	Galaktose %
0,2633	6,0	62,46	33,53	12,7

21,5 ccm Kaliumpermanganatlösung entsprachen 223,775 mg Cu.

Von diesem wurden 3,2876 g, welche also 0,4175 g Galaktose enthielten, mit 300 ccm ges. Barytwasser 1 Stunde wie beschrieben erhitzt. Die weitere Behandlung geschah in bekannter Weise. Für die Extraktion wurde nur Aceton benutzt. Alles Weitere ergibt sich aus der Tabelle.

Fraktion	Kochdauer	Gesamtmenge g	Für die Bestimmung benützte Menge g	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose		Galaktose		
						mg	%	Gesamtmenge g	% der eingeführten	wiedergewonnenen
1	einige Minuten	0,5711	0,1461	4,41	44,96	23,87	16,34	0,09332	22,35	26,26
2-4	je einige Minuten	0,2991	0,1483	5,15	52,50	28,00	18,88	0,05647	13,53	15,90
5-8	im ganzen 12 Stund.	0,3569	0,1508	5,2	53,01	28,27	18,75	0,06692	16,03	18,83
9-11	im ganzen 18 Stund.	0,0550	—	—	—	—	18,75 ²⁾	0,0103	2,47	2,90

21,95 ccm der Kaliumpermanganatlösung entsprechen 223,775 mg Cu.

Die Menge der aus der heißen Acetonlösung sich abscheidenden Cerebroside betrug 39,0%. In diesen Abscheidungen sind 54,38% der in den Versuch eingeführten Galaktose (0,4175 g) und 63,89% der wiedergewonnenen Galaktose, welche 0,3553 g¹⁾ betrug, enthalten. Die Zahlen liegen den entsprechenden des vorigen Versuches nahe.

Über die Verteilung der Cerebroside auf die einzelnen Fraktionen bei dem von uns benützten Verfahren zur Aufarbeitung des Gehirns.

Das Verfahren war folgendes. Der bei 40—50° in dünner Schicht und bei starker Ventilation getrocknete Gehirnbrei (Rindergehirn) wurde mit großen Mengen Äther erschöpft und zwar wurde die Extraktion so lange fortgesetzt, bis bei einer Menge von 3—4 kg nur noch 5 g Ätherextrakt hinterblieben. Die abgegossenen und durch Zentrifugieren geklärten Ätherauszüge wurden, zuletzt bei Zimmertemperatur im Vakuum, zu einer zähen schneidbaren Masse von heller Honigfarbe eingeeengt. Das

¹⁾ Diese Zahl ist durch Addition der Werte, welche bei Einzelbestimmungen in den verschiedenen Fraktionen gewonnen wurden, erhalten. Da aber im weiteren Verlauf dieses Versuches die Art der Fraktionierung eine andere war, so lassen sich nur die in der Tabelle angeführten Werte mit den entsprechenden des vorigen Versuchs vergleichen und es interessiert hier nur die Gesamtmenge der wiedergewonnenen Galaktose, welche 0,3553 g betrug.

²⁾ Nicht bestimmt, sondern nach Fraktion 5—8 angenommen.

trockene Gehirn verlor durch die erschöpfende Ätherbehandlung 35,5% (im Mittel aus zwei Bestimmungen, welche 34,5 und 36,4% ergaben). Es besteht also aus 35,5% ätherlöslichen Stoffen (Ätherextrakt) und 64,5% ätherunlöslichen (mit Äther extrahiertes Gehirnpulver).

Behandlung des Ätherextraktes. Eine Menge von 100 g wurde in einer Glasflasche mit Äther übergossen, schnell geschüttelt, die trübe ätherische Flüssigkeit in Zentrifugiergläser abgossen, der Rückstand in der Flasche mit neuen Mengen Äther übergossen, wieder schnell geschüttelt usw., bis der ganze Ätherextrakt sich in Lösung oder feiner Verteilung in den Zentrifugiergläsern befand. Die beim Zentrifugieren sich abscheidenden Bodensätze wurden nach ihrer Vereinigung und Verteilung in neuem Äther nochmals zentrifugiert und dann getrocknet und gewogen (Protagon 1). Die abgossene ätherische Flüssigkeit wurde wieder eingengt und der Rückstand nach dem Trocknen im Vakuum derselben Ätherbehandlung unterworfen. Er lieferte noch eine kleine Menge ätherunlöslicher Substanz, die ebenfalls getrocknet und gewogen wurde (Protagon 2). Wegen der geringen Ausbeute wurde von einer nochmaligen Wiederholung abgesehen und zunächst die etwas eingengte ätherische Lösung mit Aceton gefällt, der Niederschlag in Äther gelöst und die Fällung mit Aceton wiederholt. Während die Mutterlaugen zur Gewinnung von Cholesterin dienten und nach Entfernung der Hauptmenge einen mit Cholesterinkristallen durchsetzten Sirup hinterließen (Mutterlauge 1), wurde der Niederschlag nach dem Trocknen im Vakuum wiederum in der oben beschriebenen Weise mit Äther geschüttelt. Es gelang jetzt (nach Entfernung des Cholesterins) nochmals eine Abtrennung in Äther unlöslicher Substanz, welche getrocknet und gewogen wurde (Protagon 3). Die eingengte ätherische Lösung wurde wieder mit Aceton gefällt, die Fällung erwies sich aber nun als in Äther nahezu völlig löslich. Nach noch zweimaliger Wiederholung von Lösung und Fällung wurde der Acetonniederschlag getrocknet und gewogen (Phosphatid), die Mutterlaugen wurden vereinigt. Aus ihnen ließ sich noch etwas Cholesterin gewinnen. Zuletzt blieb ein Sirup zurück (Mutterlauge 2). Protagon 1 und 2 wurden

vereinigt und wogen nach dem Trocknen 6,050 g, Protagon 3 wog nach dem Trocknen 1,309 g und das Phosphatid nach dem Trocknen 38,6 g. Sie wurden ebenso wie die Mutterlaugen 1 und 2 der Galaktosebestimmung unterworfen mit folgenden Resultaten.

Substanz	Gesamtmenge g	Für Bestimmung benützte Menge g	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose mg	Galaktose %	Galaktose Gesamtmenge g	
Protagon 1 und 2	6,050	0,2245 0,2139	3,87 3,55	37,98 34,84	20,04 18,36	8,93 8,58	8,75 0,5294	
Protagon 3	1,309	—	—	—	—	8,75 ¹⁾	0,1145	
Phosphatid	38,6	1,2529 1,4074	6,05 6,57	59,38 64,48	31,81 34,71	2,54 2,47	2,5 0,9650	
Mutterlaug 1 und 2	Auch bei Benützung großer Mengen nach Hydrolysieren keine Reduktion						0,0	1,6089

22,8 ccm der Kaliumpermanganatlösung entsprachen 223,775 mg Cu.

Das Ätherextrakt enthielt 1,68% Galaktose.

0,5588 g verbrauchen 1,85 ccm KMnO₄-Lösung, entsprechend 18,16 mg Cu und 9,4 mg Galaktose = 1,68%.

Es sind also 95,7% wiedererhalten worden.

Behandlung des mit Äther extrahierten Gehirnpulvers. 100 g wurden mit 1000 ccm 85%igem Alkohol verrieben und unter beständigem Umschütteln auf dem Wasserbad allmählich zum Sieden erhitzt, einige Minuten im Sieden erhalten und dann durch Heißwassertrichter abfiltriert. Das Filtrat wurde nach dem Erkalten von dem entstandenen Niederschlag abgesaugt und mit dem Pulver in den Kolben zurückgebracht. Dieses Verfahren wurde mehrmals wiederholt. Nach jedem Filtrieren zerrieben wir das Pulver in der Reibschale aufs neue, so daß es schließlich ganz mehlig war. Für das quantitative Zurückbringen des Pulvers in den Kolben bedurfte es jedesmal etwas neuen Alkohols, der gleichzeitig den verdunsteten ersetzte. Es wurden so vier Auszüge hergestellt, von

¹⁾ Nicht bestimmt, sondern nach Protagon 1 und 2 angenommen, da die Bestimmungen verunglückten.

denen der 2. und 3. noch Abscheidungen gaben, der 4. nur im Eisschrank noch eine geringe Trübung, die bei Zimmertemperatur wieder verschwand. Die Mutterlauge wurde abdestilliert und zuletzt im Vakuum zur Trockne gebracht (Trockenrückstand 1). Das Hirnpulver wurde nun noch zweimal mit je 1000 ccm Alkohol je 7 Stunden ausgekocht. Die Filtrate, welche auch im Eisschrank keine Trübung zeigten, wurden abdestilliert und ebenfalls im Vakuum zur Trockne gebracht (Trockenrückstand 2 und 3). Über die Menge der einzelnen Protagonabscheidungen und Trockenrückstände, die alle bis zum konstanten Gewicht im Vakuum getrocknet worden waren, und über die in ihnen enthaltenen Galaktosemengen gibt die nachstehende Tabelle Auskunft.

Substanz	Gesamtmenge g	Für Bestimmung benützte Menge g	KMnO ₄ ccm	Cu mg	Galaktose mg	Galaktose, %	Galaktose Gesamtmenge g
Protagon 1	12,443	0,2250	5,48	53,79	28,68	12,75	1,5815
		0,2360	5,71	56,04	29,91	12,67	
Protagon 2	4,6324	0,3390	8,2	80,48	43,81	12,92	0,5957
		0,3597	8,6	84,41	46,06	12,80	
Protagon 3	2,6605	0,2352	4,0	39,26	20,75	8,82	0,2360
		0,2264	3,9	38,28	20,2	8,92	
Protagon 4	0,1	—	—	—	—	8,86 ¹⁾	0,0089
Trockenrückstand 1	8,730	} reduzieren nach der Hydrolyse nicht.					
Trockenrückstand 2	1,4						
Trockenrückstand 3	0,76						2,4221

22,8 ccm der Kaliumpermanganatlösung entsprachen 223,775 mg Cu.

Der folgende Versuch, den wir in derselben Weise mit 100 g mit Äther extrahierten Gehirnpulvers durchführten, nur mit dem Unterschied, daß nur eine dreimalige Auskochung mit Alkohol erfolgte, und daß die Untersuchung des Filtrates, sowie

¹⁾ Nach Protagon 3 angenommen.

die Behandlung mit neuem Alkohol unterblieb, führte zu demselben Ergebnis. Er sei in abgekürzter Form mitgeteilt.

Substanz	Gesamtmenge in g	Galaktose %	Galaktose Gesamtmenge g
Protagon 1	11,84	13,7	1,622
Protagon 2	5,76	12,23	0,703
Protagon 3	2,45	9,3	0,228
	20,05		2,553

In dem Ätherextrakt sind also 1,6089% und in dem mit Äther extrahierten Gehirnpulver 2,4221% (unter Benutzung der Resultate des ersten der beiden angeführten Versuche) Galaktose enthalten. Aus diesen Zahlen und aus dem relativen Verhältnis von ätherlöslichen und ätherunlöslichen Stoffen im trockenen Gehirnpulver ergibt sich, daß 100 g trocknes Gehirnpulver 2,1334 g Galaktose enthalten,¹⁾ und daß von diesen 0,5711 g (26,76%) in den Ätherextrakt übergehen, während 1,5622 g (73,24%) zurückbleiben und in den Alkoholauszug übergehen. Dem Ätherextrakt lassen sich noch 0,2286 g (10,71%) entziehen.

Daß Protagon in den Ätherauszug mit eingeht, ist eine seit langem bekannte Tatsache. Wir hatten aber nicht erwartet, daß die Menge eine so große sein würde.

Auch das für diese Untersuchungen benutzte Ausgangsmaterial verdanken wir der Freigebigkeit der Direktion der Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co. in Elberfeld.

¹⁾ Es ist dabei angenommen, daß durch 85%igen Alkohol alle Cerebroside dem Gehirnpulver entzogen werden.