

Untersuchungen über die Cerebroside des Gehirns.

VI. Mitteilung.

Von

H. Thierfelder.

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

(Der Redaktion zugegangen am 10. April 1914.)

Phrenosin.

In der Cerebronfraktion der Cerebroside, wie man sie aus dem Cerebrosidgemenge mit Hilfe von 75% Chloroform enthaltendem Methylalkohol erhält,¹⁾ findet sich neben dem die Hauptmenge darstellenden Cerebron ein Cerebrosid, welches in seiner elementaren Zusammensetzung und der Art seiner Abscheidung (makroskopisch und mikroskopisch) mit dem Cerebron übereinstimmt, sich aber von ihm durch sein Unvermögen zu krystallisieren unterscheidet und darin, daß es eine etwas leichtere und größere Löslichkeit in Methylalkohol besitzt, und daß seine Lösungen in schwefelsäurehaltigem Methylalkohol bei mehrstündigem Kochen nicht völlig farblos bleiben, sondern einen leicht gelblichen Farbenton annehmen.²⁾

Ich habe für diese Substanz vorläufig den Namen Phrenosin vorgeschlagen, mit dem Thudichum die ganze Fraktion bezeichnete, es aber offen gelassen, ob nicht vielleicht in ihr nur ein mit Beimengungen behaftetes Cerebron vorliegt.

Die spezifische Drehung 5%iger Lösungen in 75% Chloroform enthaltendem Methylalkohol bei 50° und Natriumlicht wurde bei zwei Präparaten verschiedener Darstellung übereinstimmend zu +7,4° gefunden, während die des völlig

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 85, S. 40 (1913).

²⁾ Ebenda, Bd. 68, S. 464 (1910); Bd. 85, S. 42 (1913).

krystallisierenden Cerebrons¹⁾ in 3,96%iger Lösung unter sonst gleichen Bedingungen $+ 8,1^\circ$ betrug.²⁾ Da nach den Beobachtungen von Levene³⁾ die spezifische Drehung der Cerebroside mit steigender Konzentration zunimmt, so dürfte das Phrenosin ein geringeres Drehungsvermögen besitzen als das Cerebron.

Acetylverbindung. Sie gleicht durchaus dem Acetylcerebron, zeigt auch dieselbe leichte Löslichkeit in allen Flüssigkeiten, die versucht wurden, außer in Wasser. Eine Acetylbestimmung ergab die Anwesenheit von 6 Acetylgruppen. Es wurden 32,54% Essigsäure erhalten, statt der für eine sechsfach acetylierte Verbindung verlangten 33,36.

0,1721 g erforderten 9,33 ccm n_{10} -Lauge = 56,01 mg Essigsäure = 32,54%

Eine 10,06%ige Lösung in 75% Chloroform enthaltendem Methylalkohol drehte im 20 cm-Rohr bei 17° und Natriumlicht $-1,09^\circ$. $[\alpha]_D$ also = $-5,4^\circ$. Auch hier ein Unterschied gegenüber dem Acetylcerebron, dessen spezifische Drehung unter denselben Bedingungen zu -3° gefunden wurde.⁴⁾

Spaltung. Zur weiteren Charakterisierung des Phrenosins, welches nur in geringer Menge zur Verfügung stand, erschien es mir angezeigt, vergleichende Spaltungsversuche unter genau denselben Bedingungen mit ihm und dem Cerebron auszuführen. Für diesen Zweck dienten vor einigen Jahren von H. Loening und mir dargestellte und analysierte Präparate, über welche in dieser Zeitschrift, Bd. 68, S. 464 berichtet worden ist (Fraktion A = Phrenosin, Fraktion D³ = Cerebron).

Das Phrenosin hatte einen Zuckergehalt von 20,32% (Bestimmung nach Bertrand).

¹⁾ Die Entfernung der amorphen Substanz aus dem Cerebron ist schwierig. Extrahiert man ein Präparat, das bei der mikroskopischen Untersuchung keine amorphe Formen mehr erkennen läßt, bei 50° mit 20% Chloroform enthaltendem Methylalkohol, filtriert nach dem Erkalten und destilliert bis auf ein kleines Volumen, so entsteht eine Abscheidung, welche nicht zu krystallisieren vermag. Erst nach mehrfacher Wiederholung dieses Verfahrens erhält man eine Abscheidung, welche fast völlig in Krystalle verwandelt werden kann.

²⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 85, S. 44 (1913).

³⁾ Journ. of Biol. Chem., Vol. 15, p. 361 (1913).

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 248 (1914).

0,1265 g, 5,00 ccm KMnO_4 ,¹⁾ 48,33 mg Cu, 25,7 mg Galaktose.

Je 1 g wurden in der früher beschriebenen Weise mit 50 ccm 10% Schwefelsäure enthaltendem Methylalkohol 7 Stunden am Rückflußkühler gekocht. Nach dem Erkalten und Abkühlen in Eiswasser saugte ich den Niederschlag ab, wusch mit wenig eiskalter methylalkoholischer Schwefelsäure derselben Konzentration aus, löste ihn in Äther, befreite die ätherische Lösung durch Schütteln mit Wasser im Scheidetrichter von der Schwefelsäure, filtrierte, verdunstete den Äther und wog den bis zum konstanten Gewicht getrockneten Rückstand (ätherlösliche Substanz 1). Das Filtrat wurde in einem Scheidetrichter mit der doppelten Menge Wasser versetzt und dreimal mit der doppelten Menge Äther geschüttelt. Die klare wässrige Lösung, welche nichts außer dem Zucker, diesen aber vollständig oder nahezu vollständig enthält, wurde in einem weithalsigen Erlenmeyer-Kolben auf dem Wasserbad auf etwa $\frac{1}{3}$ eingedampft, die klare ätherische Lösung im Scheidetrichter mit Wasser geschüttelt. Dabei traten in der wässrigen Schicht Trübungen und Ausscheidungen auf. Sie wurde abgelassen und die zurückbleibende Ätherlösung, welche ebenfalls trübe ist, so oft mit Wasser geschüttelt, bis sie völlig klar geworden und das Waschwasser keine Spur einer Schwefelsäurereaktion mehr zeigte. Die Ätherlösung filtrierte ich, verdunstete sie und wog den bis zum konstanten Gewicht getrockneten Rückstand (ätherlösliche Substanz 2). Die Waschwässer wurden in einem weithalsigen Erlenmeyer-Kolben vereinigt, auf dem Wasserbad eingeeengt (wobei alsbald völlige Klarheit der Lösung eintrat) und dann zusammen mit der andern wässrigen Flüssigkeit in einer Schale eingedampft, bis Ausscheidung eintrat. Diese filtrierte ich ab, wusch sie mit Wasser aus und trocknete sie bis zum konstanten Gewicht (äther- und wasserunlösliche Substanz). Das Filtrat enthielt nur Zucker.

Bei dieser Spaltung, die, wie gesagt, in ganz gleicher Weise mit beiden Substanzen ausgeführt wurde, ergab sich ein wesentlicher Unterschied insofern, als das Hinzufügen von Wasser zu der Spaltungsflüssigkeit bei dem Cerebronversuch

¹⁾ Faktor 9,666.

nur eine vorübergehende Trübung hervorrief, die bei weiterem Zusatz sich völlig verlor, während sie bei dem Phrenosinversuch bestehen blieb und erst beim Schütteln mit Äther verschwand.

Folgende Zusammenstellung zeigt die Resultate in Prozenten.

	Ätherlösliche Substanz 1	Ätherlösliche Substanz 2	Äther- und wasser- unlösliche Substanz
Cerebron	47,24	3,91	44,52
Phrenosin	24,75	18,52	45,04

Die geringere Menge ätherlöslicher Substanz 1, welche bei der Phrenosinspaltung gewonnen wurde, beruht nicht etwa auf einem Versuchsfehler, denn bei der Hydrolyse eines andern Präparates, und zwar eines nach dem Barytacetoneverfahren dargestellten, wurde das gleiche Resultat erhalten. 1,5 g dieses Phrenosins, mit 75 ccm 10% Schwefelsäure enthaltendem Methylalkohol 7 $\frac{1}{4}$ Stunden gekocht, gaben 0,3230 g ätherlösliche Substanz 1 = 21,5%.

Die aus Cerebron und die aus Phrenosin erhaltene ätherlösliche Substanz 1 war fast ausschließlich Ester (einige Tröpfchen einer n_{20} -Lauge genügten, um ihre alkoholischen Lösungen alkalisch zu machen) und zwar Cerebronsäureester, denn die durch Verseifung aus ihnen gewonnenen Säuren schieden sich aus Alkohol in den für Cerebronsäure charakteristischen mikroskopischen Formen ab und schmolzen, einmal aus einer Mischung von Äther und Petroläther¹⁾ umkrystallisiert, bei 100° bzw. 100—101°, hatten also denselben Schmelzpunkt, den ich auch früher für diese Säure erhalten hatte. Sie zeigten beide, in Pyridin gelöst, Rechtsdrehung.

Die aus Phrenosin gewonnene äther- und wasserunlösliche Substanz war ebenso wie die aus Cerebron erhaltene Sphingosinsulfat und zwar hauptsächlich, wenn nicht ausschließlich, Dimethylsphingosinsulfat. Sie zeigte die leichtere Löslichkeit des methylierten Sulfats in warmem Alkohol und schied sich in dessen charakteristischen Formen ab. Die aus

¹⁾ Siedepunkt 30—50°.

der Mutterlauge zurückgewonnene Base gab mit alkoholischer Salzsäure die glitzernden Blättchen des Dimethylsphingosinchlorids. Das Sulfat drehte in schwefelsäurehaltigem Alkohol gelöst links. Die den Zucker des Phrenosins enthaltende wässrige Lösung zeigte nach Entfernung der Schwefelsäure und genügender Konzentration Rechtsdrehung. Eine Isolierung des Zuckers zum Zweck seiner Charakterisierung als Galaktose erschien nicht nötig, da es auf Grund früherer Untersuchungen von mir¹⁾ nicht zweifelhaft sein kann, daß der Zucker aller Cerebroside Galaktose ist.

Die ätherlösliche Substanz 2 aus dem Phrenosin (aus dem Cerebron wurde sie ja nur in ganz geringer Menge erhalten) stellte auch im wesentlichen einen Ester dar (auch hier genügten wenige Tropfen einer n_{20} -Lauge, um die Reaktion der alkoholischen Lösung alkalisch zu machen). Sie war bei Zimmertemperatur fest, löste sich leicht in Methylalkohol und in Petroläther bis auf eine ganz geringe Trübung, die durch Filtration beseitigt wurde. Die durch Verseifung gewonnene Säure war ebenfalls bei gewöhnlicher Temperatur fest, in Äther leicht löslich, in Petroläther auch in der Wärme garnicht oder nur wenig löslich. Aus Alkohol schied sie sich erst bei starker Konzentration ab, und das mikroskopische Bild war nicht das für die Cerebronsäure typische. Da für eine weitere Reinigung und genauere Untersuchung die Menge viel zu gering war, habe ich nur eine Titrierung in ätherischer Lösung vorgenommen. Diese ergab das Molekulargewicht 375 (Cerebronsäure = 398).

0,1576 g verbrauchten 4,2 ccm n_{10} -Lauge.

Es ist natürlich nicht ausgeschlossen, daß auch in dieser Säure die gewöhnliche Cerebronsäure vorliegt, die durch Beimengen verunreinigt und dadurch in ihren Eigenschaften verändert ist. Für wahrscheinlich möchte ich es aber nicht halten, da doch nur geringe Beimengungen in Betracht kommen können, welche kaum imstande sein dürften, die Abscheidung des Esters aus der ursprünglichen Spaltungsflüssigkeit zu verhindern. Auf jeden Fall muß es sich um eine Oxysäure handeln, denn es sind ja sechs Acetylgruppen in das Phrenosin eingetreten. Aller-

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 14, 209 (1890).

dings ist der bei der Acetylbestimmung erhaltene Essigsäurewert etwas zu gering (32,54 statt 33,36%), aber doch zu hoch, als daß die Annahme, die unbekannte Säure sei keine Oxysäure, zulässig erscheint. Es hätte dann nicht mehr als 31,46% Essigsäure gefunden werden können. Trotz des niedrigen Titrationswertes ist an die Möglichkeit zu denken, daß wir es mit der inaktiven Cerebronsäure zu tun haben. Eine solche ist von Levene¹⁾ in Form ihres Esters aus Cerebrosiden erhalten worden, sie ist nach Levene²⁾ auch leichter löslich in verschiedenen Lösungsmitteln, als die aktive. Dasselbe wird vermutlich auch für die Ester gelten und würde das Ausbleiben der Ausscheidung erklären. Selbstverständlich ist das nur eine Vermutung, die experimentell zu prüfen sein wird, sobald mir wieder Material für die Spaltung zur Verfügung steht.³⁾ Wenn es sich so verhalten sollte, dann würde in dem von mir untersuchten Phrenosin ein Gemenge von zwei Cerebronen vorliegen, von denen das eine die aktive, das andere die inaktive Cerebronsäure enthält. Das mit der aktiven Säure ist das krystallisierende.

Die Spaltung des Cerebrons hat der Theorie nahekommende Werte geliefert. Sie verlangt 49,82% Cerebronsäuremethylester und 43,78% Dimethylsphingosinsulfat.

Eine dritte Cerebrosidfraktion.

Wie früher beschrieben, erhielt ich aus dem Cerebrosidgemenge nach möglicher Abtrennung von Cerebron und Kerasin zwei weitere Fraktionen, von denen die schwerer lösliche nach Entfernung von zuckerfreier Substanz 18—19% Zucker enthielt und bei der Analyse Werte gab, welche mit den für Kerasin erhaltenen ziemlich übereinstimmten.⁴⁾

Leider ging von dieser Substanz, die nur in wenigen Grammen zur Verfügung stand, für Untersuchungen, die zu keinem Resultat führten, der größere Teil verloren, so daß für die Spaltung nur 1,7 g übrig blieben. Es wurden zwei Ver-

¹⁾ Journ. of Biol. Chem., Vol. 15, p. 360 (1913).

²⁾ Ibidem, Vol. 12, p. 383 (1912).

³⁾ Die erhaltene Säure ging leider durch einen Unfall verloren, so daß sie nicht polarisiert werden konnte.

⁴⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 89, S. 238 (1914).

suche mit 0,7 g (Versuch 1) und 1,0 g (Versuch 2) gemacht, von denen aber nur der erste quantitativ durchgeführt wurde.

Da ebenso wie bei der Kerasinspaltung beim Kochen mit 10% Schwefelsäure enthaltendem Methylalkohol eine Abscheidung öligier Tropfen erfolgte, so wurde 7,5% Schwefelsäure enthaltender (auf 1 g 50 ccm) benutzt und 9 Stunden (Versuch 1) bzw. 14 Stunden (Versuch 2) gekocht. In Versuch 2 kam es unter dieser Bedingung zu keiner Ölbildung, in Versuch 1 trat sie trotzdem auf. Nach dem Abkühlen bestand die Abscheidung in beiden Fällen aus krystallinischen Massen und halb erstarrten Tröpfchen. Die weitere Behandlung geschah in der oben beim Phrenosin beschriebenen Weise. Beim Verdünnen des Filtrats mit Wasser entstand nur vorübergehend eine Trübung, im Gegensatz zum Phrenosin und in Übereinstimmung mit dem Cerebron. In Versuch 1 wurden erhalten: Ätherlösliche Substanz 1: 32,03%, ätherlösliche Substanz 2: 17,9%, äther- und wasserunlösliche Substanz: 38,6%.

Ätherlösliche Substanz 1. Sie war von fester Beschaffenheit. 0,1622 g von Versuch 1 und 0,182 g von Versuch 2, im ganzen also 0,3442 g, wurden, jede für sich, in heißem Äthylalkohol gelöst; die Abscheidungen, glitzernde Plättchen, wurden gemeinsam abgesaugt und stellten eine silberglänzende, nicht zerreibliche Masse dar, welche bei 56 - 57° schmolz. Es handelte sich also um den Methylester der Kerasinsäure (Lignocerinsäure).¹⁾ Die Menge betrug 0,068 g = 19,8% der ätherlöslichen Substanz oder 4% des Cerebroside. Der Rückstand des Filtrats hatte eine ölige Beschaffenheit, reagierte neutral und löste sich in heißem Methylalkohol, um beim Erkalten sich wieder als Öl abzuscheiden. Er wurde durch Kochen mit methylalkoholischer Natronlauge verseift, die Seifenlösung eingeengt, die Abscheidung abgesaugt, mit Methylalkohol verrieben und wiederum abgesaugt. Die aus diesem Natronsalz gewonnene Säure krystallisierte aus Äther in radiär gestellten Nadeln, in Petroläther löste sie sich in der Wärme nicht völlig. Nach Entfernung dieses geringen unlöslichen Teils und Verdunsten des Petroläthers hinterblieben 0,1445 g (= 42% der

¹⁾ Diese Zeitschrift, Bd. 85, S. 55 (1913).

ätherlöslichen Substanz oder 8,5% des Cerebrosides) einer Säure von festweicher Beschaffenheit und dem Molekulargewicht 380.

0,1437 g verbrauchten 3,78 ccm n_{10} -Lauge.

Die aus der Titrationsflüssigkeit wiedergewonnene Säure krystallisierte aus heißem Petroläther und heißem Aceton in Nadelchen, welche unscharf zwischen 80 und 90° schmolzen. Aus dem Filtrat des Natronsalzes wurden noch 0,0665 g (= 19,3% der ätherlöslichen Substanz oder 3,9% des Cerebrosids) einer Säure gewonnen, die sich in warmem Petroläther löste und das Molekulargewicht 400 besaß.

0,0645 g verbrauchten 1,61 ccm n_{10} -Lauge.

Ätherlösliche Substanz 2. 0,1250 g. Sie stellte ein Öl dar, welches dem aus der ätherlöslichen Substanz nach Abtrennung des Methylesters der Säure $C_{24}H_{48}O_2$ erhaltenen durchaus ähnlich sich verhielt: Löslichkeit in Alkohol, Abscheidung aus heißem Methylalkohol als Öl. Die durch Verseifung gewonnene Säure krystallisierte aus Äther und löste sich in warmem Petroläther. Das Molekulargewicht betrug 388.

0,0872 g verbrauchten 2,25 ccm n_{10} -Lauge.

Äther- und wasserunlösliche Substanz. 0,2700 g. Sie löste sich leicht in warmem Alkohol und krystallisierte in den charakteristischen Formen des Dimethylsphingosinsulfats. Einmal umkrystallisiert gab sie bei der Analyse 61,93% C und 11,27% H.

0,0824 g lieferten 0,1871 g CO_2 und 0,0836 g H_2O .

Sphingosinsulfat verlangt 61,08% C und 10,78% H, Dimethylsphingosinsulfat 62,98% C und 11,05% H.

Die wässrige Lösung zeigte nach Entfernung der Schwefelsäure und starker Konzentration Rechtsdrehung.

Die untersuchte Fraktion enthält also Kerasin und, wie es scheint, ein anderes Cerebrosid, dessen Komponenten Sphingosin, Galaktose und eine von den bisher in den Cerebrosiden gefundenen Säuren vermutlich verschiedene Säure sind. Die Natur dieser Säure ist noch aufzuklären.

Das Ausgangsmaterial für diese und die vorangegangenen Arbeiten über die Cerebroside verdanke ich der Liebenswürdigkeit der Direktion der Farbenfabriken vorm. Friedr. Bayer & Co. in Elberfeld.