

MIHOVIL PROŠTENIK und NIKOLA Ž. STANAČEV

Studien in der Reihe der Spingolipoide, X¹⁾

Über die Struktur der Cerebrin-Base aus Hefe^{2,3)}

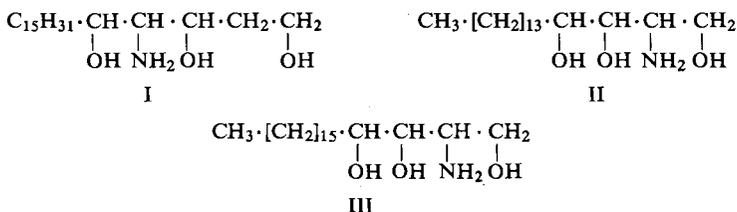
Aus dem Chemischen Institut der Medizinischen Fakultät der Universität Zagreb und Institut „Ruder Bošković“, Biochemische Abteilung, Zagreb, Kroatien, Jugoslawien

(Eingegangen am 20. Januar 1958)

Auf Grund der Elementaranalysen und der Oxydationsversuche mit Perjod-säure wird der Cerebrin-Base aus Hefe abweichend von der Literatur^{4,7)} die Struktur des 2-Amino-1.3.4-trihydroxy-n-eikosans (III) zugewiesen.

Es ist schon längere Zeit bekannt, daß bei der Hydrolyse von Pilzcerebrin aus Hefe eine basische Komponente entsteht, die Cerebrin-Base mit der Summenformel $C_{20}H_{43}NO_3$ (C_{20} -Base), für welche von F. REINDEL und Mitarbb.⁴⁾ die Struktur I (4-Amino-1.3.5-trihydroxy-eikosan) aufgestellt worden war. Diese Autoren waren der Meinung, daß der Kohlenwasserstoffrest $C_{15}H_{31}$ eine verzweigte Kette darstellt. Die gleiche oder eine ähnliche Base wurde auch aus anderen Naturstoffen von verschiedenen Autoren mehrmals isoliert⁵⁻⁸⁾. So haben z. B. N. BOHONOS und W. H. PETERSON⁶⁾ der Base aus dem Mycelium von *Aspergillus sydowi* auch die Struktur I zugeschrieben.

Die neueren Untersuchungen von H. E. CARTER und Mitarbb.⁷⁾ über die Base aus Maiskeimen — Phytosphingosin genannt — und zur gleichen Zeit die Untersuchungen von T. ODA⁸⁾ über die Base aus dem *Penicillium*-Stamm Q 176 haben zur Summenformel $C_{18}H_{39}NO_3$ (C_{18} -Base) und der Struktur II (2-Amino-1.3.4-trihydroxy-n-octadecan) geführt.



1) IX. Mitteil.: N. Ž. STANAČEV und M. PROŠTENIK, *Croat. chem. Acta* **29**, 107 [1957].

2) Vorgetragen auf dem XVI. Internationalen Kongreß für reine und angewandte Chemie, Paris, Juli 1957, Referatenband II, S. 251.

3) Auszug aus der Dissertat. N. Ž. STANAČEV, Univ. Zagreb 1957.

4) F. REINDEL, *Liebigs Ann. Chem.* **480**, 76 [1930]; F. REINDEL, A. WEICKMANN, S. PICARD, K. LUBER und P. TURULA, ebenda **544**, 116 [1940].

5) E. RUPPOL, *Bull. Soc. Chim. biol.* **19**, 1164 [1937]; **25**, 57 [1943]; *J. Pharmac. Belgique* **19**, 63 [1937]; **25**, 26 [1943]; *J. Pharmac. Belgique (N. S.)* **4**, 55, 59 [1949] und ältere Arbeiten.

6) *J. biol. Chemistry* **149**, 295 [1943].

7) H. E. CARTER, W. D. CELMER, W. E. M. LANDS, K. L. MUELLER und H. H. TOMIZAWA, *J. biol. Chemistry* **206**, 613 [1954].

8) *J. pharmac. Soc. Japan* **72**, 136, 139, 142 [1952].

Auf Grund der engen Übereinstimmung der Eigenschaften (Schmelzpunkte und spezif. Drehungen) des Phytosphingosins und seiner Derivate mit jenen der Cerebrin-Base aus Hefe, haben H. E. CARTER und Mitarbb.⁷⁾ die beiden Substanzen für identisch gehalten. Demnach wurde der Cerebrin-Base auch die Struktur II zugeschrieben.

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die Konfiguration des Phytosphingosins haben wir die Bearbeitung der Cerebrin-Base aus Hefe aufgenommen und sind zu abweichenden Resultaten gekommen, weshalb wir hier unsere Ergebnisse mitteilen wollen.

Die für die oben erwähnten Versuche benötigte Cerebrin-Base haben wir ausgehend von krist. Pilzcerebrin hergestellt⁹⁾.

Wir haben gefunden, daß der Hefe-Base die Struktur des 2-Amino-1.3.4-trihydroxy-n-eikosans (III) zukommt, und zwar aus folgenden Gründen.

Schon die ersten Elementaranalysen gaben Werte, die mit der C₁₈-Formel nicht genügend übereinstimmten. Deshalb haben wir eine Reihe von Derivaten hergestellt, sorgfältig gereinigt und analysiert. Alle diese Analysen, d. h. diejenigen der Anhydrocerebrin-Base, des Oxalats, des *N*-Benzoyl-, *O,N*-Dibenzoyl- und *N*-Benzyl-Derivats sowie diejenigen der Cerebrin-Base in Form des Oxalats, der Aceton- und der *N*-Benzoyl-Verbindung passen gut auf die C₂₀-Formel (s. Tab. 1). Auf diese Weise konnte die von F. REINDEL hergeleitete C₂₀-Summenformel bestätigt werden.

Tab. 1. Elementaranalysen der Basen und ihrer Derivate

Verbindung	Berechnet						Gefunden								
	für C ₁₈ -Base			für C ₂₀ -Base			REINDEL u. Mitarbb. ⁴⁾			CARTER u. Mitarbb. ⁷⁾			Diese Arbeit		
	C	H	N	C	H	N	C	H	N	C	H	N	C	H	N
Anhydrocerebrin-Base	72.19	12.45	4.68	73.33	12.62	4.28	73.1	12.5	4.2				72.95	12.36	4.52
Oxalat	66.24	11.12	4.07	67.70	11.37	3.75							67.15	11.17	4.07
<i>N</i> -Benzoyl-	74.40	10.24	3.47	75.13	10.51	3.25	75.0	10.7	3.3	74.25	10.14	3.60	75.27	10.54	3.76
<i>O,N</i> -Dibenzoyl-	75.70	8.93	2.76	76.22	9.22	2.61	76.0	9.6	2.5				76.22	9.24	2.65
<i>N</i> -Benzyl-oxalat	71.85	10.20	3.22	72.68	10.46	3.03							72.49	10.41	2.96
Cerebrin-Base															
Oxalat	62.94	11.12	3.86	64.58	11.36	3.59							64.62	11.26	3.57
<i>N</i> -Benzoyl-	71.22	10.28	3.32	72.12	10.54	3.12	72.0	10.4	3.6	71.14	10.34	3.24	72.02	10.46	3.13
<i>N</i> -Benzyl-oxalat	65.16	9.52		66.07	9.75								66.24	9.92	
Aceton-Verb.	69.39	12.25	4.15	70.63	12.41	3.83	70.5	12.1	4.0	70.55	12.03	3.73	71.16	12.11	3.70

Es blieb nun die Lage der Aminogruppe und der drei Hydroxygruppen im polaren Teil des Moleküls sowie die Natur des Kohlenwasserstoffteils zu bestimmen. Zu diesem Zwecke wurde die Cerebrin-Base und ihre *N*-Benzoyl-Verbindung mit Perjodsäure oxydiert. Die Oxydationen wurden hauptsächlich nach den Angaben von CARTER durchgeführt. Unter den Oxydationsprodukten der freien Base konnten wir *n*-Heptadecanal feststellen. Die *N*-Benzoyl-Verbindung lieferte ebenfalls *n*-Heptadecanal neben *N*-Benzoyl-serinal. *N*-Benzoyl-serinal gab bei der Oxydation mit Kaliumpermanganat und nachfolgender Hydrolyse Serin, welches papierchromatographisch eindeutig identifiziert werden konnte.

⁹⁾ Das Präparat wurde uns von der N. V. Philips-Roxane, Pharmaceutisch-Chemische Industrie DUPHAR, Amsterdam, in freundlicher Weise zur Verfügung gestellt, wofür wir auch an dieser Stelle unseren Dank aussprechen.

Die Identifizierung des höheren Aldehyds stieß anfangs auf Schwierigkeiten. Es war notwendig, eine sorgfältige Untersuchung der drei Aldehyde, die man bei der Oxydation erwarten konnte (I→C₁₆, II→C₁₅, III→C₁₇), durchzuführen. Der erhaltene rohe Aldehyd wurde in das Semicarbazon (Schmp. 105—106°), das 2,4-Dinitrophenylhydrazon (Schmp. 101—103°) und in das Thiosemicarbazon (Schmp. 97 bis 99°) übergeführt. Es ist zu betonen, daß die Identifizierung des Aldehyds durch den bloßen Vergleich der Schmelzpunkte der Semicarbazone mit den in der Literatur angegebenen praktisch nicht gelingt, da die Schmelzpunkte der sechs Semicarbazone (C₁₃ bis C₁₈) sehr nahe beieinander liegen (zwischen 106° und 109°). Auch die verschiedenen Mischkombinationen der erwähnten Semicarbazone zeigen keine Schmelzpunktsdepression. Dagegen konnte man im Falle der 2,4-Dinitrophenylhydrazone eine kleine Depression bemerken. Wir haben gefunden, daß für die Identifizierung der höheren Aldehyde die Thiosemicarbazone am besten geeignet sind. Die Thiosemicarbazone zerfallen in Bezug auf ihre Schmelzpunkte, wie auch manche anderen aliphatischen Verbindungen, in zwei Reihen: eine mit paariger und eine mit unpaariger Kohlenstoffzahl. Die Schmelzpunktsdifferenz zwischen zwei benachbarten Derivaten (paarigen und unpaarigen) ist hier äußerst groß und beträgt im Durchschnitt 10°. Diese Tatsache ermöglicht die ziemlich leichte Identifizierung der Aldehyde durch den Vergleich der Schmelzpunkte und Misch-Schmelzpunkte mit den authent. Präparaten. Auf diese Weise haben wir den Aldehyd aus Hefe mit C₁₅, C₁₆- und C₁₇-Aldehyd verglichen, wie aus Tab. 2 ersichtlich ist. Der Aldehyd erwies sich in Schmelzpunkt und Mischprobe als identisch mit n-Heptadecanal (C₁₇-Aldehyd).

Tab. 2. Schmelzpunkte und Misch-Schmelzpunkte der Derivate der höheren n-Alkanale

Derivat	C ₁₅ -Aldehyd	C ₁₆ -Aldehyd	C ₁₇ -Aldehyd	Aldehyd aus Hefe (HA)
2,4-Dinitro-phenylhydrazon	106—107°	105—106°	105—106°	101—103°
Misch-Schmp. mit HA	95—99°	98—102°	101—106°	—
Semicarbazon	106—107°	105—106,5°	104,5—106°	105—106°
Misch-Schmp. mit HA	keine Depression	keine Depression	keine Depression	—
Thiosemicarbazon	97—98°	107—108°	97—99°	97—99°
Misch-Schmp. mit HA	84—87°	95—102°	96—99°	—

Alle diese Versuche haben eindeutig folgendes gezeigt:

1. die Base enthält 20 Kohlenstoffatome;
2. der Kohlenwasserstoffteil enthält eine unverzweigte Kette;
3. die drei Hydroxygruppen und die Aminogruppe des polaren Teils befinden sich an den Kohlenstoffatomen 1 bis 4, und zwar so, daß die Aminogruppe an C-2 steht.

Demgemäß ist die Cerebrin-Base aus Hefe weder identisch mit Phytosphingosin (II) von CARTER noch besitzt sie die von REINDEL vorgeschlagene Struktur I. Auf Grund dieser Ergebnisse muß man der Base die Struktur des 2-Amino-1,3,4-trihydroxy-n-eikosans (III) zuschreiben. Die Anwesenheit kleiner Mengen homologer Basen (z. B. C₁₈-Base) ist jedoch nicht ausgeschlossen.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE

Die Schmelzpunkte sind unkorrigiert.

Das krist. Pilzcerebrin vom Schmp. 138–140⁹⁾ wurde in Anlehnung an die schon früher angegebenen Vorschriften⁴⁾ zur Cerebrin- und Anhydrocerebrin-Base hydrolysiert und hierauf eine Reihe von Derivaten hergestellt. Hier werden nur die Darstellung von bisher unbekanntem Verbindungen und die Oxydationen mit Perjodsäure⁷⁾ beschrieben. Die Elementaranalysen, welche eine bedeutende Rolle bei der Konstitutionsermittlung der Base spielten, sind in der Tab. 1 zusammengestellt, wo man zum Vergleich auch die Analysen anderer Autoren findet.

N-Benzyl-anhydrocerebrin-Base: 300 mg *O,N-Dibenzoyl-anhydrocerebrin-Base* vom Schmp. 113–115° wurden mit 300 mg Lithiumaluminiumhydrid in 75 ccm absol. Äther 5 Stdn. in schwachem Sieden gehalten. Das überschüss. LiAlH₄ wurde mit einer kleinen Menge Wasser zersetzt, die äther. Lösung vom anorganischen Material dekantiert und mit Na₂SO₄ getrocknet. Nach dem Abdestillieren des Äthers hinterblieb ein mit Kristallen durchsetztes Öl, welches in 5 ccm Äthanol gelöst und mit einer Lösung von Oxalsäure in Äthanol versetzt wurde. Das ausgeschiedene saure Oxalat (130 mg, Schmp. 192–195°) wurde zweimal aus je 30 ccm absol. Äthanol umkristallisiert. Farbl. Nadeln vom Schmp. 197–199° (Zers.).

N-Benzyl-cerebrin-Base: 280 mg *N-Benzoyl-cerebrin-Base* vom Schmp. 131–132° wurden mit 200 mg LiAlH₄ auf übliche Weise reduziert. Die erhaltene krist. Base wurde in Äthanol gelöst und mit Oxalsäure versetzt. Das farbl. saure Oxalat (120 mg) schmolz nach 3 Kristallisationen aus je 4 ccm Methanol bei 180–183° (Zers.).

Oxydation der Aceton-Verbindung der Cerebrin-Base mit Perjodsäure; Nachweis von n-Heptadecanal: 365 mg (0.05 mMol) der Aceton-Verbindung vom Schmp. 108–110° wurden in 50 ccm Methanol gelöst und mit einer Lösung von 460 mg (2 mMol) Kaliumperjodat in 25 ccm *n* H₂SO₄ oxydiert. Der Verbrauch des Perjodats wurde titrimetrisch mit 0.01 *n* Na₃AsO₃ kontrolliert. Nach 18stdg. Stehenlassen bei Zimmertemperatur waren 379.5 mg (ber. 345 mg) Kaliumperjodat verbraucht worden. Das Reaktionsgemisch wurde in Wasser gegossen, mit insgesamt 500 ccm *n*-Hexan ausgeschüttelt, die Hexanphase mit Na₂SO₄ getrocknet und das Lösungsmittel i. Vak. zur Trockne verdampft. Aus dem hinterbliebenen gelblichen Öl wurden das 2.4-Dinitro-phenylhydrazon, das Semicarbazon und das Thiosemicarbazon des *n-Heptadecanals* auf übliche Weise hergestellt.

n-Heptadecanal-2.4-dinitro-phenylhydrazon kristallisierte aus Äthanol unter Zusatz von einem Tropfen konz. Salzsäure in gelben Rosetten vom Schmp. 96–98°. Nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äthanol, Ligroin und zuletzt aus Methanol stieg der Schmp. auf 101 bis 103°.

C₂₃H₃₈N₄O₄ (434.6) Ber. C 63.56 H 8.81 N 12.89 Gef. C 63.30 H 8.45 N 13.25

n-Heptadecanal-semicarbazon: Farbl. Prismen vom Schmp. 105–106° (aus Dioxan).

C₁₈H₃₇N₃O (311.5) Ber. C 69.40 H 11.97 Gef. C 69.70 H 11.58

n-Heptadecanal-thiosemicarbazon kristallisierte nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Äthanol und zuletzt aus Methanol in farbl. Prismen vom Schmp. 97–99°.

C₁₈H₃₇N₃S (327.6) Ber. C 65.98 H 11.38 N 12.83 Gef. C 65.95 H 11.40 N 12.62

Die Misch-Schmelzpunkte mit den gleichen Derivaten des authent. *n*-Pentadecanals, *n*-Hexadecanals und *n*-Heptadecanals sind in Tab. 2 angegeben. Über die Darstellung der Aldehyd-thiosemicarbazone und über die Eigenschaften der homologen Reihe der Thiosemicarbazone wird an anderem Ort ausführlich berichtet werden.

Oxydation der N-Benzoyl-cerebrin-Base mit Perjodsäure; Nachweis von Serin: 170 mg (0.4 mMol) *N-Benzoyl-cerebrin-Base* vom Schmp. 132–133° wurden in 100 ccm Methanol gelöst und mit einer Lösung von 184 mg (0.8 mMol) Kaliumperjodat in 50 ccm Wasser oxydiert. Innerhalb 2 Stdn. wurden 100 mg Perjodat verbraucht. Der Aldehyd wurde auf übliche Weise mit *n*-Hexan aufgenommen und als *n*-Heptadecanal identifiziert. Die wäßrig-methanolische Lösung wurde filtriert und i. Vak. zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde in 2 ccm Wasser suspendiert und bei Zimmertemperatur mit 2 ccm 5-proz. Kaliumpermanganatlösung oxydiert. Nach 24 Stdn. wurde das überschüss. Permanganat mit Natriumsulfidlösung reduziert und das Gemisch i. Vak. zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde mit 10 ccm 6*n* HCl 3 Stdn. gekocht und wieder zur Trockne verdampft. Der Rückstand wurde in 5 ccm Wasser gelöst und mit *n* NaOH vorsichtig alkalisch gemacht (p_H 7.5–7.6). Die Sulfat- und Perjodationen wurden mit Bariumchloridlösung ausgefällt, das klare Filtrat zur Trockne gebracht und der Rückstand mit 60 ccm 0.5*n* HCl (Lösung in 85-proz. Äthanol) unter Erwärmen auf dem Wasserbade extrahiert. Die Lösung wurde filtriert, zur Trockne verdampft, der Rückstand in 2 ccm Wasser gelöst und parallel mit authent. Serin („Biochimica“-ROCHE) auf Whatman-Papier No. 1 chromatographiert. Die einzige ninhydrin-positive Substanz war *Serin*. R_F -Werte: in *n*-Butanol/Äthanol/Wasser (4:1:1) 0.09¹⁰⁾; in tert.-Butanol/Eisessig/Wasser (2:1:1) 0.46 (0.5 nach H. E. CARTER und Mitarbb. 7)).

Die Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung von Frau M. MUNK-WEINERT ausgeführt.

¹⁰⁾ H. K. BERRY, H. E. SUTTON, L. CAIN und J. S. BERRY, The Univ. of Texas Publ.No. 5109, May 1951, Biochem. Inst. Studies IV, S. 22, geben R_F 0.10 für das gleiche Lösungsmittelsystem an.