

Mihovil Proštenik und Nada Gerenčević

Studien in der Reihe der Sphingolipoide, XXVIII¹⁾

Über die Umwandlung der Cerebroside in die Phytosphingolaktoside und in C₁₈-Phytosphingosin^{*})

Aus dem Institut für Chemie und Biochemie der Medizinischen Fakultät, Universität Zagreb, Kroatien, Jugoslawien

(Eingegangen am 10. Juni 1966)



Die acetylierten Cerebroside (Penta- und Hexaacetylverbindung **4**) bilden mit Perbenzoesäure die entsprechenden Oxirane (**5**), die bei katalytischer Hydrierung und nachfolgender Verseifung in die *N*-acylierten Phytosphingolaktoside (**10**) übergeführt werden können. Die saure Methanolyse von **10** liefert das natürliche Stereoisomere des 1.3.4-Trihydroxy-2-amino-octadecans (C₁₈-Phytosphingosin) (**2**).



Das C₁₈-Sphingosin — *D*(+)-*erythro*-1.3-Dihydroxy-2-amino-*trans*-octadecen-(**4**) (**1**) — und ähnliche trifunktionelle Basen wurden bis vor kurzem als Bestandteile der Sphingolipoide nur tierischer Herkunft erkannt. Im Gegensatz dazu wurden das C₁₈-Phytosphingosin — *D*(+)-*ribo*-1.3.4-Trihydroxy-2-amino-octadecan (**2**) — und die anderen Basen mit vier funktionellen Gruppen zu den pflanzlichen Basen eingereiht. Neuerdings ist aber das Vorkommen der Sphingosinbasen auch in der Pflanzenwelt²⁻⁷⁾ und der Phytosphingosinbasen in der Tierwelt⁸⁾ nachgewiesen worden. Diese Befunde werfen die Frage über das Bestehen der gegenseitigen Umwandlung der Sphingolipoide und Phytosphingolipoide in der Natur auf.

Unlängst wurde in unserem Laboratorium die erste Synthese des natürlichen C₁₈-Phytosphingosins (**2**), eines der acht möglichen Konfigurationsisomeren des 1.3.4-Trihydroxy-2-amino-octadecans, ausgehend von synthetischem C₁₈-Sphingosin (**1**)

^{*}) Auszugsweise vorgetragen auf der 2. Tagung der Föderation Europäischer Biochemischer Gesellschaften in Wien 21. — 24. April 1965, Referatenband A 238, S. 163.

1) XXVII. Mitteil.: M. Proštenik und Lj. Gospočić, Naturwissenschaften, im Druck; XXVI. Mitteil.: M. Proštenik und Lj. Gospočić, Bull. sci. [Zagreb] Sect. A, 10, 317 (1965).

2) H. E. Carter, K. Ohno, S. Nojima, C. L. Tipton und N. Ž. Stanačev, J. Lipid Res. 2, 215 (1961).

3) H. E. Carter, R. A. Hendry, S. Nojima und N. Ž. Stanačev, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 45, 402 (1960).

4) H. E. Carter, R. A. Hendry, S. Nojima, N. Ž. Stanačev und K. Ohno, J. biol. Chemistry 236, 1912 (1961).

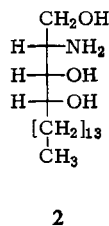
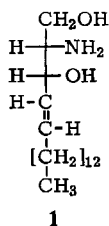
5) F. H. Stodola, L. J. Wickerham, C. R. Scholfield und H. J. Dutton, Arch. Biochem. Biophysics 98, 176 (1962).

6) P. S. Sastry und M. Kates, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 84, 231 (1964); Biochemistry 3, 1271 (1964).

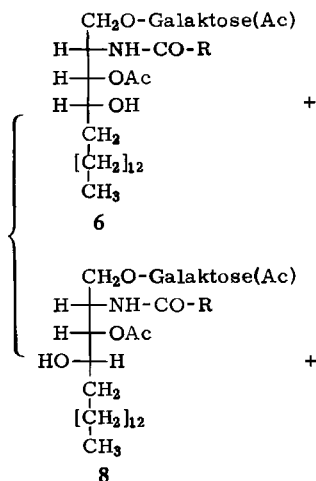
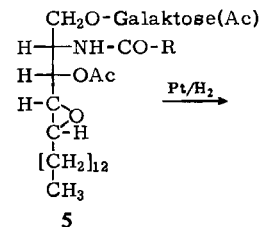
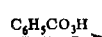
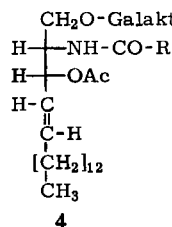
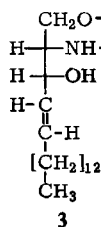
7) K.-A. Karlsson und G. A. L. Holm, Acta chem. scand. 19, 2423 (1965).

8) K.-A. Karlsson, Acta chem. scand. 18, 2397 (1964).

ausgeführt⁹⁾. Die Grundreaktionen waren die Epoxydierung des Tribenzoyl-C₁₈-sphingosins und die reduktive Ringspaltung des gebildeten Oxirans¹⁰⁾.



Die vorliegende Arbeit befaßt sich mit den Versuchen über die chemische Einführung einer dritten Hydroxygruppe in den Sphingosinanteil der Cerebroside unter Bildung der *N*-acylierten Phytosphingogalaktoside. Die Reaktionsfolge besteht aus folgenden Stufen: 1. Acetylierung des Cerebroside (ein Gemisch von Cerebron und Kerasin), 2. Epoxydierung des acetylierten Cerebroside mit Perbenzoesäure, 3. katalytische Reduktion des Oxirans mit Platinkatalysator, 4. alkalische Hydrolyse des teil-



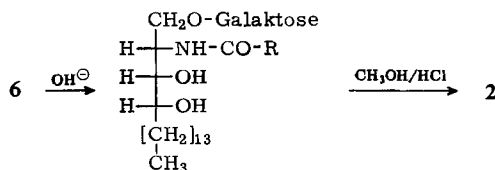
⁹⁾ M. Proštenik, B. Majhofer-Orešćanin, B. Ries-Lešić und N. Ž. Stanačev, Tetrahedron [London] 21, 651 (1965).

¹⁰⁾ Für die erstmalige Beschreibung analoger Reaktionen mit Tribenzoylsphingosin s. M. Proštenik und B. Majhofer-Orešćanin, Naturwissenschaften 47, 399 (1960); Croat. chem. Acta 33, 219 (1961).

weise acetylierten *N*-Acyl-phytosphingogalaktosids, 5. Methanolyse des *N*-acylierten Phytosphingogalaktosids in das C₁₈-Phytosphingosin.

Die Oxydation von **4** mit Perbenzoesäure stellt eine *cis*-Addition dar. Indem der Sphingosinanteil in den Cerebrosiden eine *trans*-Doppelbindung und eine Hydroxygruppe in der Allylstellung (C-3-OH, *D*-Konfiguration) enthält, erwartet man bei der Reaktion die Bildung von zwei *trans*-Epoxiden. Nachzuweisen war unter den Produkten der katalytischen Reduktion von **5** nur eine Verbindung mit der neu gebildeten Hydroxygruppe an C-4. Theoretisch sind vier Isomere (**6**, **7**, **8** und **9**) möglich. Demnach kann man annehmen, daß die Ringöffnung überwiegend am weniger substituierten C-5 erfolgt, analog der Beobachtung von *Elie* und *Delmonte*¹¹⁾, welche unsymmetrisch substituierte Oxirane mit Lithiumalanat reduziert hatten.

Die alkalische Hydrolyse von **6** lieferte das *N*-acylierte Phytosphingogalaktosid (**10**). Bei dessen Oxydation wurden 2.85 Mol Perjodsäure/Mol **10** (ber. 2 Mol zur Spaltung des Galaktoseanteils und 1 Mol zur Spaltung der 3.4-Diolgruppierung im Basenteil) verbraucht. Der erhaltene langkettige Aldehyd wurde gaschromatographisch als Pentadecanal-dimethylacetal identifiziert. Diese Daten unterstützen die Struktur der Base mit neuer Hydroxygruppe an C-4 und schließen die Isomeren **7** und **9** aus.



10

Die Substanz **10** sollte ein Strukturanalogen des unlängst im Weizenmehl nachgewiesenen *N*-Acyl-phytosphingoglucosids⁴⁾ darstellen.

Im *N*-acylierten Phytosphingogalaktosid **10** liegen, wie im Ausgangs-Cerebrosid **3**, C-2 und C-3 in der *D*-Konfiguration vor. Offen ist noch die konfigurative Zuordnung an C-4. Die saure Methanolyse von **10** lieferte kristallisiertes C₁₈-Phytosphingosin (**2**) sowie die entsprechende Anhydrobase als Nebenprodukt. Beide Substanzen trennte man durch Behandlung mit heißem Hexan. Die Struktur von **2** wurde folgenderweise bewiesen: 1. Die C,H,N-Analyse war im Einklang mit der Formel C₁₈H₃₉NO₃. 2. Dünnschichtchromatographisch ist die neue Base identisch mit der natürlichen. 3. Bei der Oxydation wurden 2.8 Mol (ber. 3 Mol) Perjodsäure/Mol **2** verbraucht. 4. Der gebildete langkettige Aldehyd wurde gaschromatographisch als Pentadecanal identifiziert; er enthielt jedoch etwas Hexadecanal, aus Dihydrocerebrosiden im Ausgangsmaterial stammend. 5. Die Konfiguration an C-4 folgt daraus, daß das IR-Spektrum der Base in allen Einzelheiten mit dem des natürlichen C₁₈-Phytosphingosins — *D*-(+)-*ribo*-1.3.4-Trihydroxy-2-amino-octadecans — **2** übereinstimmt, und daß die spezif. Drehung der beiden Basen den gleichen Wert ($[\alpha]_D$: +8.2° bzw. +8.3°) zeigt. Die Anwesenheit kleiner Mengen der epimeren *lyxo*-Base ist jedoch nicht ausgeschlossen.

In der beschriebenen Reaktionsfolge ist von besonderer Bedeutung die richtige Ausführung der Oxydation mit Perbenzoesäure. Ungenügende Menge an Oxydations-

¹¹⁾ E. L. *Elie* und D. W. *Delmonte*, J. Amer. chem. Soc. **78**, 3226 (1956).

mittel oder zu kurze Reaktionsdauer führen zu komplizierten Gemischen, die nach der Hydrolyse neben **2** und C₁₈-Dihydrosphingosin auch C₁₈-Sphingin (1-Hydroxy-2-amino-octadecan) und andere, bisher undefinierte Basen enthalten.

Dem *Föderalen Fonds für wissenschaftliche Forschung Jugoslawiens* danken wir für die finanzielle Unterstützung.

Beschreibung der Versuche

Die Schmelzpunkte sind nicht korrigiert. Die C,H,N-Analysen wurden in unserer mikroanalytischen Abteilung unter Leitung von Frau Dr. M. Munk-Weinert angefertigt. Für die Chromatographien verwandte man Al₂O₃ (neutral, „Fluka“) und Florisil (aktiviertes Magnesiumsilicat, 60/100 mesh, Floridin Company, Tallahassee, Florida). Die IR-Spektren wurden mit dem Perkin-Elmer-Infracord-Spectrophotometer Mod. 137 in KBr aufgenommen. Optische Drehungen wurden mit dem Beckman-Spectrophotometer Mod. DU unter Verwendung des Adapters Keston Standard Mod. D gemessen. Die gaschromatographischen Untersuchungen wurden mit dem Aerograph Wilkens A-90 C (1.52-m-Siliconsäule) mit Wasserstoff als Trägergas (50 ccm/Min.) bei Temperaturen zwischen 225 und 240° ausgeführt.

Ausgangsmaterialien

Cerebroside: Die nach Carter und Mitarbb.¹²⁾ aus Rinderhirn gewonnene Sphingolipoidfraktion wurde aus Essigsäure umkristallisiert. Chromatographie der Rohcerebroside auf einer Florisilsäule¹³⁾ und nachfolgendes Umkristallisieren aus Äthanol lieferte ein sulfatidfreies Gemisch von Kerasin (Pentahydroxyverbindung) und Cerebron (Hexahydroxyverbindung) (**3**). Das Reinigungsverfahren wurde dünn-schichtchromatographisch verfolgt (Kieselgel G „Merck“ nach Stahl). Laufmittel Chloroform/Methanol/Wasser (65:25:4)¹⁴⁾. Anfärbung mit Ammoniummolybdat/Perchlorsäure.

Die **Acetylierung der Cerebroside** wurde nach Carter und Greenwood¹⁵⁾ ausgeführt und das erhaltene Gemisch von Pentaacetylkerasin und Hexaacetylcerebron (**4**) (Schmp. 37°) für die weiteren Umsetzungen verwendet.

Epoxydierung der acetylierten Cerebroside (4**) mit Perbenzoesäure:** 18.37 g (17.69 mMol) **4** und 150 ccm einer Lösung von Perbenzoesäure in Chloroform (aus 25 g Benzoylperoxid)¹⁶⁾ wurden 5 Tage bei 2° und dann noch 2 Tage bei 20° stehengelassen. Zur Entfernung der überschüss. Perbenzoesäure wurde die klare Lösung mit gesätt. FeSO₄-Lösung (2 × 150 ccm) ausgeschüttelt. Nach dem Waschen mit Wasser und Trocknen über Na₂SO₄ wurde die Chloroformlösung i. Vak. zur Trockne eingeeengt. Der orangegelbe, teils kristallisierte Rückstand, 17.54 g (93.5%) **5**, wurde ohne weitere Reinigung in der nächsten Stufe verwendet.

N-Acyl-phytosphingogalaktosid (10**):** Eine Lösung von 17.54 g (16.64 mMol) **5** in 100 ccm Äthanol wurde über 300 mg Platin (nach Adams) bei 24° unter Normaldruck hydriert, wobei 395 ccm (ber. 416 ccm) Wasserstoff aufgenommen wurden. Nach dem Abfiltrieren des Katalysators wurde i. Vak. eingedampft, der teilweise kristallisierte Rückstand (15.87 g, 90.3%) in 150 ccm methanol. 1 n KOH gelöst und 1 Stde. bei 50° hydrolysiert. Man vertrieb die Hauptmenge des Methanols i. Vak. bei Raumtemp. und versetzte den Rückstand mit 500 ccm

¹²⁾ H. E. Carter, W. J. Haines, W. E. Ledyard und W. P. Norris, J. biol. Chemistry **169**, 77 (1947).

¹³⁾ Y. Kishimoto und N. S. Radin, J. Lipid Res. **1**, 72 (1959).

¹⁴⁾ H. Wagner, L. Hörhammer und P. Wolff, Biochem. Z. **334**, 175 (1961).

¹⁵⁾ H. E. Carter und F. L. Greenwood, J. biol. Chemistry **199**, 283 (1952).

¹⁶⁾ G. Braun, Org. Syntheses, Coll. Vol. **1**, 431 (1941).

Wasser. Die ausgeschiedene, flockige Substanz wurde abzentrifugiert und getrocknet. Ausb. 10.37 g (81.6%) **10**, Schmp. 203–205° (nach Sintern ab 197°). 2.14 g **10** in 30 ccm Chloroform wurden an 100 g Florisil chromatographiert (Elutionsmittel Chloroform/Methanol 95:5). Die Mittelfractionen ergaben 1.72 g Substanz, Schmp. 204–205° (nach Umlösen aus Äthanol), $[\alpha]_D^{20}$: +7.2° ($c = 1$, Pyridin). Die Analysenwerte sind am besten vereinbar mit der Struktur eines *N*-Cerebronyl-phytosphingogalaktosids.

$C_{48}H_{95}NO_{10}$ (846.2) Ber. C 68.12 H 11.32 Gef. C 68.26 H 11.23

Im IR zeigte die Substanz keine *trans*-C=C-Bande bei 970/cm. Im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G nach Stahl, Fließmittel Chloroform/Methanol/Wasser 65:25:4, Anfärbung mit Ammoniummolybdat/Perchlorsäure)¹⁴⁾ wanderte **10** deutlich langsamer (2 Flecke) als das zur Reaktion gebrachte Cerebrosidgemisch **3**.

Oxydation von 10 mit Perjodsäure: 50.9 mg (0.060 mMol) **10** in 10 ccm Methanol wurden mit 3 ccm 5-proz. methanol. HJO₄-Lösung versetzt und im Meßkolben auf 25 ccm aufgefüllt. Von Zeit zu Zeit wurden 2 ccm dieser Lösung mit KJ und 20-proz. Schwefelsäure versetzt und das ausgeschiedene Jod mit 0.1 *n* Na₂S₂O₃ zurücktitriert. Nach 2 Stdn. war kein weiterer Verbrauch an Oxydationsmittel feststellbar. Der Verbrauch betrug 2.85 Mol HJO₄/Mol **10**. Sodann wurde das Reaktionsgemisch 3 mal mit je 30 ccm Hexan extrahiert. Man wusch die Hexanextrakte mit Wasser, trocknete mit Na₂SO₄ und engte i. Vak. ein. Der Rückstand wurde mit 5 ccm 10-proz. methanol. Salzsäure 2 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Das nach Abziehen des Methanols i. Vak. verbleibende Öl (Dimethylacetale und Methylester) wurde, zur Entfernung der Ester, mit 0.5 ccm 7 *n* NaOH in 5 ccm Methanol 1 Stde. verseift¹⁷⁾. Man extrahierte das Reaktionsgemisch mit Hexan. Nach gaschromatographischer Analyse bestand das erhaltene Öl aus *Pentadecanal-dimethylacetal*, nebst Spuren von niederen Acetalen.

C₁₈-Phytosphingosin (2): Eine Lösung von 7.12 g (8.41 mMol) **10** in 250 ccm 10-proz. methanol. Salzsäure wurde 6 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Das gekühlte Reaktionsgemisch wurde zur Abtrennung von Fettsäuremethylester mit Hexan ausgeschüttelt und die methanol. Phase mit 2 *n* wäbr. KOH stark alkalisch gemacht. Das ausgeschiedene Basengemisch wurde in Äther aufgenommen, die Ätherlösung mit Wasser gewaschen, mit Na₂SO₄ getrocknet und eingedampft; Ausb. 1.87 g (70%). Im Dünnschichtchromatogramm (Kieselgel G, Fließmittel Chloroform/Methanol/2 *n* Ammoniak 40:10:1, Anfärbung mit Ninhydrinreagens)¹⁸⁾ erwies sich der Extrakt als ein Gemisch von **2** und C₁₈-Phytosphingosin-Anhydrobase. Nach dreimaligem Umkristallisieren aus viel Hexan erhielt man **2**, frei von Anhydrobase. Farblose Kristalle, Schmp. 104–108°, $[\alpha]_D^{20}$: +8.2° ($c = 1.2$, Pyridin) (Lit.: natürliche Base $[\alpha]_D^{20}$: +8.05°⁹⁾, $[\alpha]_D^{25}$: +8.3°¹⁹⁾, synthetische Base $[\alpha]_D^{20}$: +7.9°⁹⁾).

IR: 920, 948, 1065, 1240, 1553, 1630, 3450/cm. Die spektralen Daten stimmen mit denen des Naturstoffes überein.

$C_{18}H_{39}NO_3$ (317.5) Ber. C 68.09 H 12.38 Gef. C 67.95 H 11.87

Oxydation von 2 mit Perjodsäure: 48.2 mg **2** (aus **10** gewonnen) in 10 ccm Methanol wurden mit 3 ccm 5-proz. *Perjodsäure* versetzt und auf 25 ccm aufgefüllt. Nach beendeter Oxydation wurde das Reaktionsgemisch wie oben aufgearbeitet. Der Verbrauch an Oxydationsmittel betrug 2.8 Mol HJO₄/Mol **2**. Die gaschromatographische Analyse ergab *Pentadecanal-dimethylacetal* als Hauptprodukt.

¹⁷⁾ P. S. Sastry und M. Kates, *Biochemistry* **3**, 1271 (1964).

¹⁸⁾ K. Sambasivarao und R. H. McCluer, *J. Lipid Res.* **4**, 106 (1963).

¹⁹⁾ M. Proštenik und Lj. Gospočić, *Bull. sci. [Zagreb] Sect. A*, **10**, 317 (1965).