

Horst Jatzkewitz und Gisbert Nowoczek

## Synthese [<sup>35</sup>S]-markierter D-Galaktose-sulfate und Ceramid-galaktose-sulfate (= Cerebrosid-sulfate)

Aus der Biochemischen Abteilung des Max-Planck-Institutes für Psychiatrie München  
(Eingegangen am 5. Dezember 1966)

■  
D-Galaktose-6-sulfat wird aus 1.2;3.4-Di-O-isopropyliden-D-galaktose, D-Galaktose-3-sulfat aus 4.6-O-Äthyliden-1.2-O-isopropyliden-D-galaktose mit Pyridin-[<sup>35</sup>SO<sub>3</sub>]-Komplex dargestellt. — Käufliches Cerebrosidgemisch aus Rinderhirn wird bei Behandlung mit [<sup>35</sup>S]Chlor-sulfonsäure in Pyridin in ein Cerebrosid-schwefelsäureester-Gemisch übergeführt, aus dem säulenchromatographisch als Hauptbestandteil Cerebron-6-sulfat isoliert wird. Durch Partialhydrolyse daraus freigesetzter Galaktose-schwefelsäureester ist dünnschichtchromatographisch mit Galaktose-6-sulfat identisch, während aus Gehirn isolierter Cerebron-schwefelsäureester bei Partialhydrolyse einen Galaktose-schwefelsäureester liefert, der den gleichen R<sub>F</sub>-Wert wie Galaktose-3-sulfat hat. Das Ergebnis der Partialhydrolyse liefert demnach einen weiteren Strukturbeweis für die Stellung der Sulfatester-Bindung in den natürlichen und künstlichen Cerebrosid-sulfaten.

■  
Kürzlich konnte über die Anreicherung einer Cerebrosid-Sulfatase aus Schweinen berichtet werden<sup>1)</sup>, welche die Hydrolyse von Cerebrosid-schwefelsäureestern in Cerebroside und freies Sulfat katalysiert.

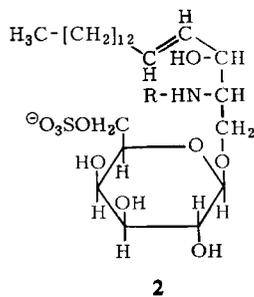
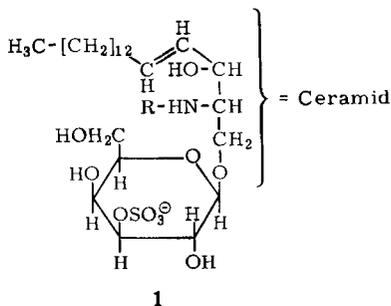
Der Ausfall dieser enzymatischen Aktivität auf Grund eines genetischen Mangels führt beim Menschen zu einer Anhäufung von Cerebrosid-schwefelsäureestern<sup>2)</sup> in der Markscheide der Nerven, welche ihren Ausdruck in einer tödlich verlaufenden neuralen Erkrankung, der Metachromatischen Leukodystrophie, Typ Scholz, findet.

Zur Überprüfung der Substratspezifität des Enzyms, dessen natürliche Substrate die in der Markscheide vorkommenden Cerebrosid-3-sulfate (**1a**, **b**) sind, wurde das analoge D-Galaktose-3-sulfat (**3**) sowie die ähnlichen Verbindungen D-Galaktose-6-sulfat (**4**) und Cerebron-6-sulfat (**2a**) benötigt, über deren Darstellung berichtet wird.

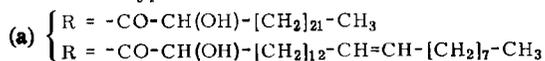
Die Cerebroside bzw. ihre Schwefelsäureester mit dem Cerebronsäure- und Hydroxynervonsäure-Rest werden als Substanzen vom Cerebron-Typ (**1a**, **2a**), die mit dem Lignocerin säure- und Nervonsäure-Rest als Substanzen vom Kerasin-Typ (**1b**, **2b**) zusammengefaßt. Die zusammengefaßten Gruppen haben in Dünnschichtchromatogrammen den gleichen R<sub>F</sub>-Wert.

<sup>1)</sup> E. Mehl und H. Jatzkewitz, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **331**, 292 (1963).

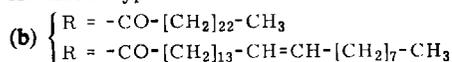
<sup>2)</sup> H. Jatzkewitz, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. **311**, 279 (1958); **318**, 265 (1960); **320**, 134 (1960).



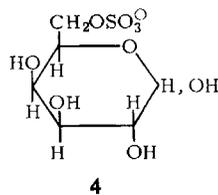
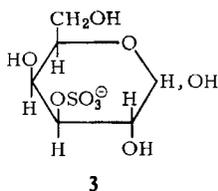
Cerebron-Typ

Cerebronsäure-  
Hydroxynervensäure-

Kerasin-Typ

Lignocerinsäure-  
Nervensäure-

Rest



In Anlehnung an Arbeiten früherer Autoren<sup>3,4)</sup> wird Galaktose-6-sulfat (4) durch Sulfurieren von 1,2;3,4-Di-*O*-isopropyliden-*D*-galaktose<sup>5)</sup> mit Pyridin-[<sup>35</sup>S]Schwefeltrioxid-Komplex<sup>6)</sup> in Pyridin und Abspaltung der Schutzgruppen mit verd. Essigsäure dargestellt. Das isomere 3-Sulfat (3) wird hier zum ersten Mal in strukturbeweisender Synthese dargestellt; seine Bildung als Nebenprodukt der direkten Sulfurierung freier *D*-Galaktose mit überschüssigem Pyridin-Schwefeltrioxid-Komplex konnte bisher nur wahrscheinlich gemacht werden<sup>7)</sup>. Es wird analog der Darstellung von 4 aus 4,6-*O*-Äthyliden-1,2-*O*-isopropyliden-*D*-galaktose<sup>8)</sup> erhalten.

Die Sulfurierung von Cerebrosiden mit Chlorsulfonsäure in Pyridin im Molverhältnis 1 : 1 bei 0° liefert die Cerebrosid-6-sulfate<sup>9)</sup>. Die natürlichen Cerebrosid-sulfate dagegen sind Cerebrosid-3-sulfate<sup>9-11)</sup>. Da beide Substanzen nach Partialhydrolyse dünnschichtchromatographisch faßbares Galaktose-6- bzw. -3-sulfat liefern, ergibt

3) E. G. Percival und T. H. Soutar, J. chem. Soc. [London] 1940, 1475.

4) S. Peat, J. R. Turvey, M. J. Clancy und T. P. Williams, J. chem. Soc. [London] 1960, 4761.

5) A. L. Raymond und E. F. Schroeder, J. Amer. chem. Soc. 70, 2785 (1948).

6) P. Baumgarten, Ber. dtsch. chem. Ges. 59, 1166 (1926).

7) J. R. Turvey und T. P. Williams, J. chem. Soc. [London] 1963, 2242.

8) A. B. Foster, W. G. Overend und M. Stacey, J. chem. Soc. [London] 1951, 980.

9) T. Taketomi und T. Yamakawa, J. Biochemistry [Tokyo] 55, 87 (1964).

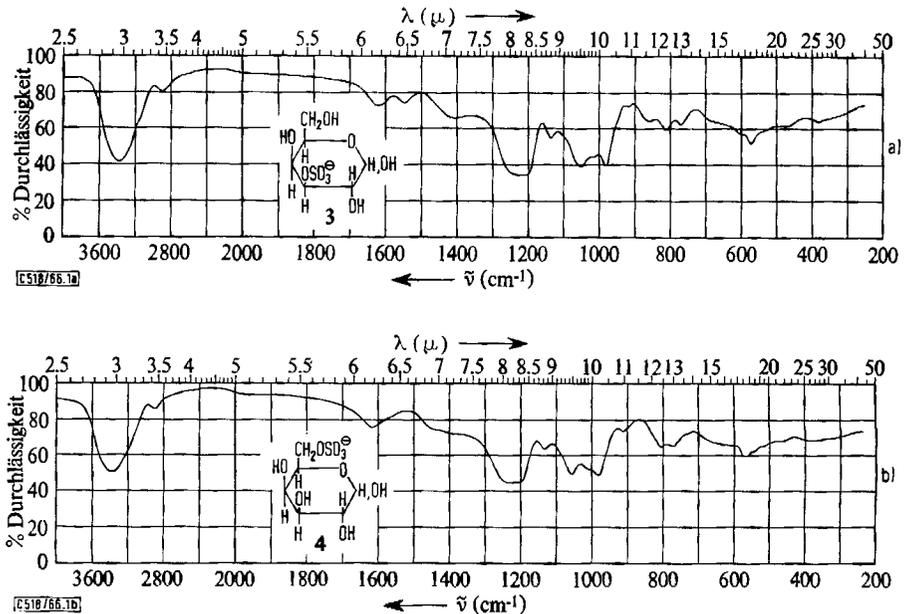
10) T. Yamakawa, N. Kiso, S. Handa, A. Makita und S. Yokoyama, J. Biochemistry [Tokyo] 52, 226 (1962).

11) P. Stoffyn und A. Stoffyn, Biochim. biophysica Acta [Amsterdam] 70, 218 (1963).

sich durch Vergleich dieser Spaltprodukte mit den eingangs erwähnten synthetisierten ein weiterer Strukturbeweis für die Stellung der Sulfatester-Bindung in den natürlichen und künstlichen Cerebrosid-sulfaten.

Die Aufarbeitung geschieht in allen Fällen säulenchromatographisch, vor allem mit Ionenaustauschern. So wird das bei der Sulfurierung der geschützten Galaktose erhaltene Rohprodukt nach Entfernen des Pyridins in äthanolischer Lösung an Kieselgel chromatographiert und so von radioaktivem Sulfat und Galaktose befreit.

Die durch die Markierung sehr gesteigerte Nachweisempfindlichkeit in Verbindung mit der Dünnschichtchromatographie läßt erkennen, daß während der Abspaltung der Acetonidreste in verdünnter Essigsäure bereits eine geringe Hydrolyse der Schwefelsäureester-Bindungen (3-Sulfat > 6-Sulfat) stattfindet. Es gelang uns nicht, die Galaktose und das Sulfat nach der von Peat et al.<sup>4)</sup> empfohlenen Verteilungschromatographie an Zellulosepulver von Galaktose-sulfat zu trennen. Zur Entfernung der Galaktose mußten Ionenaustauschersäulen verwendet werden. Die Eliminierung des Sulfats gelang nach Zusatz eines Ballasts von „kaltem“ Sulfat und dessen Entfernung durch Eluieren über eine mit Barium-Ionen beladene Kationenaustauschersäule. Man erhält so die stabilen Bariumsalze der Galaktose-sulfate. Aus ihnen können die hygroskopischen Natriumsalze (vor Gebrauch im enzymatischen Test) über mit Natrium-Ionen beladene Kationenaustauscher erhalten werden.



Abbild. 1. IR-Spektren der Bariumsalze in KBr von a) D-Galaktose-3-sulfat (3); b) D-Galaktose-6-sulfat (4)

Die IR-Spektren beider Bariumsalze unterscheiden sich nur durch eine einzige Bande bei  $1540\text{ cm}^{-1}$ , die bei 3 gegenüber 4 zusätzlich auftritt, und weisen sonst die für

den Galaktopyranosering<sup>12,13</sup>) und Hexose-schwefelsäureester<sup>14</sup>) beschriebenen Merkmale auf (Abbild. 1). Neben den O—H- und C—H-Banden bei 3340 und 2900/cm erkennt man die breite Bande der S=O-Valenzschwingung mit dem Schwerpunkt bei 1225/cm. Die entsprechende, dem C—O—S-System zugeschriebene Absorption bei 820/cm tritt in beiden Spektren auf (vgl. l. c.<sup>15-17</sup>) und entspricht damit den IR-Spektren von natürlichen und synthetischen Cerebrosid-schwefelsäureestern, für die die 3- bzw. 6-Stellung der Schwefelsäureester-Gruppierung am Galaktopyranosering gesichert ist<sup>9-11</sup>). Die kleine Bande in der Region 917—920/cm wird dem Galaktopyranosering selbst zugeschrieben. Die geringe Intensität spricht für die  $\beta$ -Form, worauf auch die Bande bei 983/cm hindeutet. Die Absorption bei 770/cm dürfte den Pulsationsschwingungen des Ringes entsprechen.

Bei der Perjodatspaltung<sup>18</sup>) verbraucht 3 2 Mol, 4 3 Mol Oxydans je Mol Zuckerderivat.

Da für den zweiten Fall in der Literatur sowohl ein Wert von 3 Mol<sup>19</sup>) als auch von 4 Mol<sup>7</sup>) angegeben ist, wurde die Oxydation über 24 Stunden ausgedehnt. Dabei erhöht sich jedoch der Verbrauch an Perjodat nicht, sondern bleibt konstant bei 3 Mol in Übereinstimmung mit dem Ergebnis von *Grant und Holt*<sup>19</sup>).

Die schon in der Literatur<sup>2,9</sup>) beschriebene Sulfurierung von Cerebrosiden mit Chlorsulfonsäure im Molverhältnis 1 : 1 bei 0° sollte nach Abtrennung der Ausgangssubstanz an einer Kieselgelsäule zu einem dünn-schichtchromatographisch einheitlichen Produkt, dem Cerebrosid-6-sulfat, führen<sup>9</sup>). Ausgehend von käuflichem Cerebrosidgemisch aus Rinderhirn (Hauptbestandteil: Cerebroside vom Cerebron-Typ neben wenig vom Kerasin-Typ) erhält man jedoch — abgesehen von den Ausgangssubstanzen — das erwähnte Hauptprodukt neben sechs sulfurierten Verbindungen. Zwei davon hatten dünn-schichtchromatographisch die gleichen  $R_F$ -Werte wie die natürlichen Cerebrosid-schwefelsäureester **1a** und **b**.

Das Hauptprodukt **2a** wurde durch Säulenchromatographie an Florisil<sup>20</sup>) rein gewonnen. Sein IR-Spektrum zeigt im Vergleich zu dem zugrundeliegenden Cerebron (Abbild. 2) die der Schwefelsäureester-Gruppierung entsprechenden Banden: Die S=O-Schwingung, die in diesem Falle in 2 Maxima bei 1220 bzw. 1255/cm aufgelöst ist, und die des C—O—S-Systems bei 820/cm.

Durch Partialhydrolyse mit  $n/10$  wäßrig-propanolischer Salzsäure kann man aus **2a**, wie aus der direkt aus Gehirn isolierten Substanz **1a** die Galaktose-schwefelsäureester freisetzen und dünn-schichtchromatographisch mit den synthetisierten Verbindungen **3** und **4** vergleichen. Dabei zeigt sich (Abbild. 3), daß — in Bestätigung der von zwei Arbeitsgruppen<sup>9-11</sup>) auf anderem Wege erhaltenen Ergebnisse — aus dem

<sup>12</sup>) *L. J. Bellamy* in *M. Florkin* und *E. H. Stotz*, *Comprehensive Biochemistry*, Bd. 3, S. 146f., Elsevier Publ. Comp., New York 1956.

<sup>13</sup>) *S. A. Baker*, *E. J. Bourne* und *D. H. Whiffen* in *D. Glick*, *Methods in Biochemical Analysis*, Bd. 3, S. 213f., Interscience Publishers Inc., New York 1956.

<sup>14</sup>) *J. R. Turvey*, *Advances Carbohydrate Chem.* **20**, 193f (1965).

<sup>15</sup>) *A. G. Lloyd* und *K. S. Dodgson*, *Nature [London]* **184**, 548 (1959).

<sup>16</sup>) *V. P. Bhavanandan* und *K. Meyer*, *Science [Washington]* **151**, 1404 (1966).

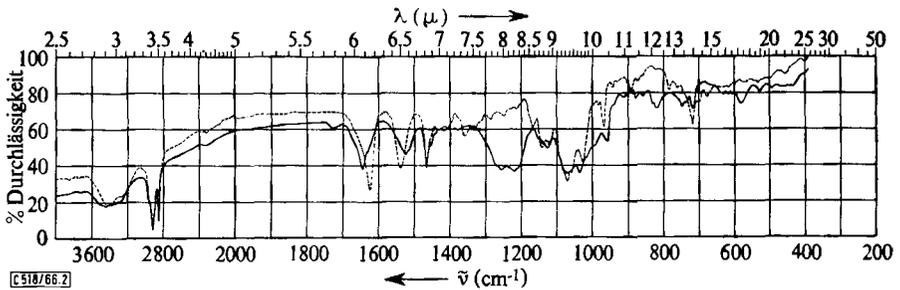
<sup>17</sup>) *A. G. Lloyd* und *K. S. Dodgson*, *Biochim. biophysica Acta [Amsterdam]* **46**, 116 (1961).

<sup>18</sup>) *G. O. Aspinall* und *R. J. Ferrier*, *Chem. and Ind.* **1957**, 1219.

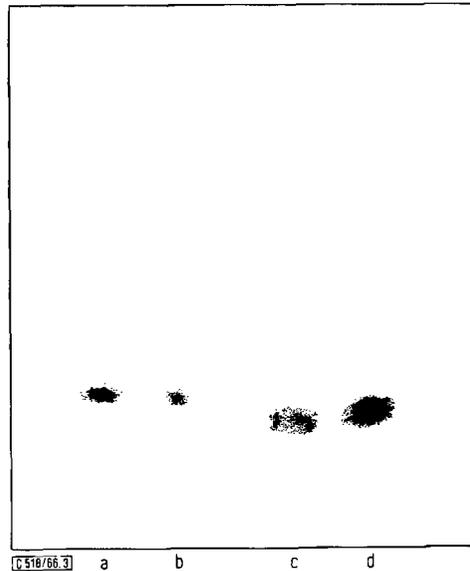
<sup>19</sup>) *D. Grant* und *A. Holt*, *J. chem. Soc. [London]* **1960**, 5026.

<sup>20</sup>) *E. Mehl* und *H. Jatzkewitz*, *Naturwissenschaften* **50**, 227 (1963).

aus Gehirn isolierten Schwefelsäureester vom Cerebron-Typ (1a) die Verbindung 3 und aus dem als Hauptreaktionsprodukt der in-vitro-Sulfurierung gewonnenen Ester 2a die Verbindung 4 erhalten wird.



Abbild. 2. IR-Spektren von Cerebron (obere Kurve) und K-Cerebron-6-sulfat (untere Kurve) in KBr



Abbild. 3. Dünnschichtchromatographie von Galaktose-3-sulfat (a) und Galaktose-6-sulfat (d) mit den hydrophilen Anteilen der Partialhydrolysate von natürlichem (b) und synthetischem (c) Cerebron-sulfat. Sorptionsmittel: Cellulose. Lösungsmittelsystem: Butanol-(1) (4) : Äthanol (1) : Wasser (5) (Oberphase, im Durchlauf); Sprühreagenz: Anilinphtalat

Fräulein Antje Hartmann danken wir für technische Unterstützung, Fräulein Elke Seifert und Herrn Dr. Hans-Günter Neumann vom Max-Planck-Institut für Biochemie, München, für ihre Hilfe bei der Anfertigung und Auswertung der IR-Spektren.

## Beschreibung der Versuche

**Dünnschichtchromatographie:** Als Adsorbentien werden Kieselgel G (Fa. Merck, Darmstadt Nr. 7731) zur Identifizierung von Cerebrosid-sulfaten mit Lösungsmittel A oder MN-Cellulosepulver 300 (bindemittelfrei, Fa. Macherey, Nagel & Co., Düren) zur Identifizierung von Galaktose-sulfaten mit Lösungsmittel B verwendet.

System A: Chloroform (14) : Methanol (6) : Wasser (1)

System B: Butanol-(1) (4) : Äthanol (1) : Wasser (5) (Oberphase)

Reduzierende Zucker und Zuckerderivate werden mit Anilinchthalat-Reagenz<sup>21)</sup>, Cerebroside und ihre Derivate mit dem Anisaldehyd-Schwefelsäure-Reagenz nach Kägi-Miescher<sup>21)</sup> angefärbt, wobei die Wärmebehandlung auf 15–20 Min. bei 130° auszudehnen ist. Das schwefelsäurehaltige Reagenz ist nur für Kieselgel-, nicht für Cellulose-Schichten anwendbar.

**Papierchromatogramme** werden mit Whatman Nr. 3 Papier im System C: Essigsäure-äthylester (6) : Eisessig (3) : Wasser (2)<sup>7)</sup> absteigend entwickelt und die Radioaktivitätsverteilung auf den Chromatogrammen bestimmt.

**Radioaktivitätsmessungen:** Spezif. Aktivitäten werden mit dem Methandurchflußzähler FH 407, radioaktive Substanzen auf Papierchromatogrammen mit dem Radiopapierchromatographen FH 452 (Fa. Frieseke & Hoepfner, Erlangen-Bruck) bestimmt. Zur Prüfung der Radioaktivitätsverteilung auf Dünnschichtplatten dient der ebenfalls mit Methandurchflußzählrohr arbeitende Dünnschicht-Scanner der Fa. Prof. Dr. Berthold, Wildbad. Die Angaben der spezif. Aktivität sind hinsichtlich Nullwert und Selbstabsorption korrigiert.

**IR-Spektren** werden in KBr mit den Gitterspektrographen der Fa. Perkin-Elmer Mod. 521 (Galaktose-sulfate) bzw. Mod. 225 (Cerebron und Cerebron-sulfat) gemessen.

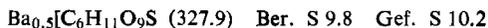
**Optische Drehwerte** werden mit dem lichtelektrischen Polarimeter A1 der Fa. Carl Zeiss, Oberkochen/Württ., bestimmt.

**Elementaranalysen** wurden vom mikroanalytischen Laboratorium A. Bernhardt, am Max-Planck-Institut für Kohlenforschung, Mülheim (Ruhr) ausgeführt.

**D-Galaktose-6-sulfat (4):** 417.5 mg trockene 1,2:3,4-Di-O-isopropyliden-D-galaktose<sup>5)</sup> (dreifacher Überschuß) werden in 10 ccm wasserfreiem Pyridin mit einer Lösung von 82.4 mg Pyridin-[<sup>35</sup>S]Schwefeltrioxid-Komplex (2.7 mC, The Radiochemical Centre, Amersham, England) in 5 ccm absol. Pyridin versetzt und unter Feuchtigkeitsausschluß 4 Stdn. auf 70° erhitzt. Nach Abkühlen auf Raumtemp. setzt man 10 ccm Wasser zu, rührt 1 Stde., bringt das Gemisch mit *n* NaOH auf pH 9 und entfernt die Lösungsmittel am Rotationsverdampfer bei 35° Badtemp. Der Rückstand wird bei Raumtemp. mit je dreimal 2 ccm Äthanol extrahiert und der vereinigte Extrakt nach dem Einengen mit Äthanol als Lösungsmittel an einer 2×20-cm-Säule von Kieselgel (Merck Nr. 7729, mit 15% Wasser entaktiviert) chromatographiert. Nr. 4–9 der geschnittenen 10-ccm-Fractionen enthalten die Radioaktivität. Sie werden vereinigt und zur Trockne gebracht (70.3 mg). Der Rückstand wird in 20 ccm 1-proz. Essigsäure aufgenommen und 3 Stdn. unter Rückfluß gekocht. Nach Entfernen der verd. Essigsäure am Rotationsverdampfer und i. Vak. über KOH nimmt man den Rückstand in 4 ccm Wasser auf, überführt den Schwefelsäureester an einer 2×20-cm-Säule von Dowex 50W-X2 (H<sup>+</sup>-Form) in die freie Säure und bringt das gesammelte saure Eluat unmittelbar anschließend auf eine 2×20-cm-Säule von Amberlite XE-58 (–OH-Form), die dann mit 500 ccm Wasser gewaschen wird. (Im eingengten Waschwasser ist keine Radioaktivität, jedoch dünn-schichtchromatographisch D-Galaktose nachweisbar.) Anschließend eluiert man

<sup>21)</sup> Anfärbereagenzien für Dünnschicht- und Papierchromatographie, S. 3, E. Merck AG, Darmstadt 1965.

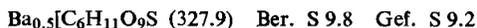
mit 5-proz. Ammoniaklösung und findet die Aktivität in Nr. 5 -- 18 der 10-ccm-Fractionen des Eluats wieder. Vereinigt und zur Trockene gebracht, ergeben sie eine (Roh-)Ausbeute von 47.5 mg *Ammonium-galaktose-6-sulfat* (16% d. Th.). Man löst die Substanz zusammen mit 68.9 mg nicht markiertem Galaktose-6-sulfat ( $\text{Ba}^{2+}$ -Salz; molares Verdünnungsverhältnis 1 : 1.2) und 200 mg Ammoniumsulfat in etwa 5 ccm Wasser und bringt das Gemisch ungeachtet des entstehenden  $\text{BaSO}_4$ -Niederschlages auf eine  $\text{Ba}^{2+}$ -beladene  $2 \times 15$ -cm-Säule von Dowex 50W-X2. Nach Übersichten des beladenen Harzes mit Wasser verschließt man die Säule, läßt sie zur Kornvergrößerung des  $\text{BaSO}_4$ -Niederschlages 48 Stdn. bei 20° stehen und eluiert dann langsam mit Wasser das sulfatfreie Bariumsalz des im angegebenen Molverhältnis mit inaktivem Träger verdünnten Galaktose-6-sulfats. Man erhält 121.2 mg *Ba-Salz* mit einer spezif. Aktivität von  $8.3 \times 10^5$  ipm/mg.  $[\alpha]_D^{25}$ : +30.0° (*Ba-Salz* in Wasser).



Zur Anwendung in enzymatischen Ansätzen wird das Bariumsalz über Dowex 50W-X2 ( $\text{Na}^+$ -Form) in das *Natriumsalz* übergeführt.

|                                  |          |                 |      |      |      |      |
|----------------------------------|----------|-----------------|------|------|------|------|
| <i>Perjodatspaltung:</i>         | Einwaage | 6.73 mg Na-Salz |      |      |      |      |
| Zeit (Stdn.):                    |          | 0.5             | 1    | 2    | 3    | 24   |
| Verbrauch an Perjodat (pro Mol): |          | 1.89            | 2.55 | 2.80 | 3.05 | 3.05 |

*D-Galaktose-3-sulfat* (3): 370.9 mg sirupöse *4,6-O-Äthyliden-1,2-O-isopropyliden-D-galaktose*<sup>8)</sup> (1.9facher Überschuß) werden zur vollständigen Entfernung von Wasser in 50 ccm absol. Pyridin gelöst und am Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Nach Wiederholen der Prozedur wird der Rückstand in 10 ccm absol. Pyridin aufgenommen und mit einer Lösung von 126.3 mg *Pyridin-[<sup>35</sup>S]Schwefeltrioxid-Komplex* (3.2 mC) in 5 ccm absol. Pyridin versetzt. Das Verfahren wird fortgeführt wie bei 4 beschrieben. Man erhält 34.25 mg *Ammonium-galaktose-3-sulfat* (16% d. Th.), das nach Beladen mit 30.0 mg nicht markiertem Bariumsalz (molares Verdünnungsverhältnis 1 : 0.7) und 200 mg Ammoniumsulfat 58.27 mg *Ba-Salz* der spezif. Aktivität  $4.5 \times 10^5$  ipm/mg ergibt.  $[\alpha]_D^{25}$ : +51.1° (*Ba-Salz* in Wasser).



|                                  |          |                  |      |      |      |
|----------------------------------|----------|------------------|------|------|------|
| <i>Perjodatspaltung:</i>         | Einwaage | 13.34 mg Na-Salz |      |      |      |
| Zeit (Stdn.):                    |          | 1                | 2    | 6    | 8    |
| Verbrauch an Perjodat (pro Mol): |          | 1.72             | 1.89 | 2.14 | 2.19 |

[<sup>35</sup>S]*Cerebron-6-sulfat* (2a): 64 mg [<sup>35</sup>S]*Chlorsulfonsäure* (10.8 mC; The Radiochemical Centre, Amersham, England) werden in einem 250-ccm-Schliff-Erlenmeyerkolben in 10 ccm absol. Pyridin bei 0° unter Rühren langsam mit einer ebenfalls auf 0° gekühlten Lösung von 403.6 mg *Cerebrosidgemisch aus Rinderhirn* (Koch-Light, Colnbrook, Bucks, England) in 5 ccm absol. Pyridin versetzt. Nach Beendigung der Zugabe wird noch 1/2 Stde. bei 0° und 2 Stdn. bei 38° gerührt. Dann kühlt man auf Raumtemp., fällt das Reaktionsgemisch mit 150 ccm Aceton und überführt den Kolbeninhalt unter mehrmaligem Nachspülen mit Aceton (Endvol. 250 ccm) in einen 300-ccm-Zentrifugenbecher. Nach Zentrifugation dekantiert man den klaren, stark radioaktiven Überstand und wäscht den Niederschlag nochmals mit 250 ccm Aceton. Den gewaschenen, noch acetonfeuchten Niederschlag löst man in 100 ccm Chloroform/Methanol (2 : 1), überführt die Lösung in einen 500-ccm-Scheidetrichter und spült den Zentrifugenbecher mit weiterem Lösungsmittelgemisch nach, so daß die Substanz schließlich in 200 ccm gelöst ist. Man versetzt mit 40 ccm Wasser, schüttelt und bringt nach Trennung der Schichten (etwa 15 Stdn.) die Unterphase zur Trockene; die Oberphase wird verworfen. Den Rückstand der Unterphase nimmt man in wenig Chloroform/Methanol (2 : 1) auf und bringt ihn auf eine  $1.5 \times 43$ -cm-Säule (Säulenvol. 76 ccm) aus Magnesiumsilicat Akt. II—III

(Fa. Woelm, Eschwege), die anschließend mit folgenden Gemischen von Chloroform/Methanol/Wasser eluiert wird: I 15 Säulenvolumina (95:5:0.25), II 10 Säulenvolumina (92:8:0.5), III 15 Säulenvolumina (88:12:1.4), IV 5 Säulenvolumina (87:13:1.5), V 10 Säulenvolumina (86:14:1.7), VI 10 Säulenvolumina (80:20:3.1), VII 10 Säulenvolumina (77:33:3.8). Das Eluat jedes Lösungsmittelgemisches wird zu einer Fraktion vereinigt und dünnschichtchromatographisch (Kieselgel G; System A) überprüft. Fraktion VI enthält die Hauptmenge der Radioaktivität in einer Hauptbande neben 3 schwächeren (insgesamt 69.3 mg) und Fraktion VII markierte Substanzen mit etwa dem halben  $R_F$ -Wert der Sulfatide, vermutlich ein Gemisch disulfurierter Produkte. Die in Fraktion VI enthaltene Substanz wird in n-Propanol/Wasser (1:4) aufgenommen, über eine  $1 \times 15$ -cm-Säule von Dowex 50W-X2 ( $H^+$ -Form) in die Säure übergeführt und mit  $n/10$  KOH neutralisiert. Die Kaliumsalze werden an entaktiviertem Florisil rechromatographiert<sup>20</sup>. Die Substanzen der geschnittenen 15-ccm-Fractionen werden dünnschichtchromatographisch überprüft und entsprechend vereinigt. In den Fraktionen 316–349 befinden sich Gemische mit den  $R_F$ -Werten der Substanzen **1b**, **1a**, **2b** und **2a**. In den Fraktionen 350–384 erscheint reines **2a** (Cerebron-6-sulfat). Man erhält insgesamt 26.26 mg (12% d. Th.) als radio-dünnschichtchromatographisch einheitliche Substanz mit der spezif. Aktivität  $3.46 \times 10^6$  ipm/mg.

*Vergleich der hydrolytisch aus Gehirn-Cerebron-sulfat (1a) und synthetischem Cerebron-schwefelsäureester (2a) gewonnenen D-Galaktose-schwefelsäureester:* Je 10 mg aus Gehirn isolierter<sup>20</sup> bzw. synthetisierter Cerebron-schwefelsäureester werden in je 1 ccm n-Propanol mit je 3 ccm so verdünnter wäbr. Salzsäure versetzt, daß das Endvolumen  $n/10$  an HCl ist. Die beiden Lösungen werden 20 bzw. 40 Min. unter Rückfluß gekocht, abgekühlt, mit einem geringen Überschuß an Pyridin neutralisiert und 48 Stdn. gefriergetrocknet. Die Rückstände werden im System Chloroform(27):Methanol(13):Wasser(10) verteilt. Von den Rückständen der wäbr. Oberphasen (2.2 bzw. 1.5 mg) trägt man je 30  $\mu$ g neben **3** bzw. **4** als Vergleichssubstanzen auf eine cellulose-beschichtete Platte auf, an deren oberes Ende mit Hilfe eines beiderseits festgeklemmten Glasstreifens ein über die Plattenbreite reichendes, etwa 15 cm langes Stück eines Chromatographierpapieres gepreßt wird. Beim Einstellen in das Lösungsmittelsystem B klemmt man das überstehende Papier zwischen Deckel und Trennkammer so ein, daß das Lösungsmittelgemisch nach Aufsteigen in der Celluloseschicht im Papier nach außen wandert und dort verdampft. Nach 48stdg. Laufzeit färbt man mit Anilinchthalat an. Man erkennt (Abbild. 3), daß das Spaltprodukt aus **1a** mit Galaktose-3-sulfat (**3**), das aus **2a** mit Galaktose-6-sulfat (**4**) identisch wandert.

[518/66]