

153. Cerebrosid-Gehalte verschiedener Bezirke alter menschlicher Gehirne

Ein Beitrag zur quantitativen Isolierung reiner Cerebroside¹⁾

von **K. Bernhard, A. Hany, L. Hausheer** und **W. Pedersen**

(17. IV. 62)

Reine Cerebroside wurden vor allem durch KLENK u. Mitarbeiter²⁾ aus Gehirnen und durch CHARGAFF³⁾ aus der Milz gewonnen. Gehaltsangaben bestimmter Organe an solchen Lipiden beruhen aber meistens auf der Bestimmung des Kohlenhydratanteiles nach erfolgter Hydrolyse. Erst in letzter Zeit wurden Verfahren mitgeteilt, die auch aus kleinen Mengen Ausgangsmaterial eine Isolierung reiner Cerebroside erlauben.

In Anlehnung an die Angaben von LONG & STAPLES⁴⁾ haben wir aus Menschen- und Ratten-Gehirn reine Cerebroside isoliert und eine Methode ausgearbeitet, die in quantitativ befriedigender Weise zu diesen Komponenten führt. Die Extraktion der Gesamtlipide aus dem Ausgangsmaterial, von dem mindestens 2–3 g vorliegen sollte, erfolgt nach den Angaben von FOLCH⁵⁾. Die Rohcerebroside werden dann durch Chromatographie an Aluminiumoxid abgetrennt. Ihre weitere Reinigung gelingt auf einer Silicagelkolonne. Man erhält in einer Ausbeute von mindestens 85 % reine Cerebroside. Ihr Galactosegehalt entspricht den berechneten Werten. Der Stickstoffgehalt beträgt im Mittel 1,65%. Sie sind Phosphor- und Schwefel-frei und enthalten keine Neuraminsäure. Verunreinigungen durch Phospholipide und Ganglioside sind also auszuschliessen.

Gestützt auf dieses Verfahren untersuchten wir alte menschliche Gehirne. Angaben über den Cerebrosidgehalt menschlicher Gehirne existieren von verschiedenen Autoren und wurden vor kurzem von PLUM & HANSEN⁶⁾ übersichtlich dargestellt. Da es sich aber durchwegs um Resultate handelt, die auf Grund der Zuckerwerte errechnet wurden, kommt ihnen nur eine begrenzte Bedeutung zu. Wir versuchten vor allem festzustellen, ob Unterschiede im Cerebrosidgehalt einzelner Hirnbezirke bestehen.

Unsere Resultate sind in der Tabelle 1 dargestellt und wurden einerseits auf Feuchtgewicht, andererseits auf die vorhandenen Gesamtlipide berechnet. Das letztere Vorgehen ermöglicht eine sinngemässere Beurteilung unabhängig vom veränderlichen Wassergehalt des Organes. Grosshirn- und Kleinhirn-Mark, Medulla

1) Vorgetragen anlässlich der Herbsttagung des Schweiz. Vereins für Physiologie, physiologische Chemie u. Pharmakologie, 18. November 1961 in Basel. Vgl. *Helv. physiol. Acta* 19, C75 (1961).

2) E. KLENK & R. HÄRLE, *Z. physiol. Chem.* 189, 243 (1930).

3) A. ROSENBERG & E. CHARGAFF, *J. biol. Chemistry* 233, 1323 (1958).

4) C. LONG & D. A. STAPLES, *Biochem. J.* 73, 7P (1959); 78, 179 (1961).

5) J. FOLCH, M. LEES & S. G. H. STANLEY, *J. biol. Chemistry* 226, 497 (1957).

6) C. M. PLUM & S. E. HANSEN, *Acta psychiatr. neurol. scand.* 35, Supplementum 141, 42 (1960).

oblongata und Pons zeigen eine bemerkenswerte Übereinstimmung in ihren Cerebrosidgehalten, die sich in allen vier untersuchten Fällen deutlich herausstellt. Wir haben nur Gehirne im hohen Senium Verstorbener untersucht. Bei III waren die Gesamtlipid-Gehalte (vgl. Tab. 4) ausgesprochen tiefer, so dass offenbar eine Atrophie des Gehirnes vorlag. Aber auch hier ergaben sich bezogen auf die Gesamtlipide keine Änderungen der Cerebrosidgehalte gegenüber der Norm.

Die Rinde enthält weniger Cerebroside, wobei zwischen Grosshirn- und Kleinhirn-Rinde Unterschiede bestehen. Indessen ist zu bedenken, dass die Abtrennung der Rinde vom Mark nur makroskopisch erfolgte.

Es lagen somit in der *weissen Substanz* bezogen auf das Frischgewicht im Mittel 2,82% Cerebroside vor, d. h. wesentlich weniger als früher (4,14–4,6%; 4,78; 5,8; 5,25%) festgestellt wurde⁶⁾. Bezogen auf die Gesamtlipide ergibt sich ein Mittelwert von 22,7%. RADIN & AKAHORI⁷⁾ stellten in der weissen Substanz des Grosshirns 3,36 und 2,99% Cerebroside fest.

Tabelle 1. Cerebrosid-Gehalte menschlicher Gehirne (I–IV) in Prozenten bezogen auf das Frischgewicht (A) und die Gesamtlipide (B)*)

Bezeichnung	I: 72jähr. Mann		II: 82jähr. Frau		III: 91jähr. Frau		IV: 75jähr. Frau	
	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Graue Substanz</i>								
Rinde, Grosshirn . . .	0,31	6,4	0,57	11,4	0,31	6,1	—	—
Rinde, Kleinhirn . . .	0,86	9,7	0,84	13,6	0,41	10,6	—	—
Nucleus caudatus . . .	0,96	14,5	—	—	0,21	8,9	—	—
<i>Weisse Substanz</i>								
Mark, Grosshirn . . .	3,37	23,1	3,80	24,7	2,57	22,7	3,08	24,0
Mark, Kleinhirn . . .	3,40	22,5	3,28	21,8	2,01	21,9	3,42	23,8
Medulla oblongata . . .	2,75	23,6	3,37	23,0	1,88	21,6	2,87	21,2
Pons	2,63	22,3	3,39	23,7	2,43	25,1	2,32	21,2
*) Korrigierte Werte unter Berücksichtigung eines Isolierungs-Verlustes von im Mittel 15%.								

Experimentelles: Verfahren zur Isolierung reiner Cerebroside⁸⁾.

1. *Extraktion der Gesamtlipide⁶⁾.* Gehirn-Proben werden mit dem 17fachen Volumen (1 g Hirnmasse = 1 ml) Chloroform-Methanol-Mischung 2:1 drei Min. homogenisiert, am besten in einem hochtourigen Homogenisator. Man filtriert und wäscht den Rückstand mit demselben Lösungsgemisch, bis das Filtrat das 20fache Volumen der eingesetzten Probe erreicht. Zur Abtrennung wasserlöslicher Substanzen aus diesem Filtrat verwendet man eine wie folgt herzustellende Salzlösung: Chloroform, Methanol und Wasser werden im Verhältnis von 8:4:3 gemischt und der sich abtrennenden oberen Phase 0,02% Calciumchlorid, 0,017% Magnesiumchlorid und 0,2% Kochsalz hinzugefügt. Die Salzlösung gibt man im Ausmasse von einem Fünftel seines Volumens zum Filtrat, schüttelt kurz und lässt im Scheidetrichter bis zur Phasentrennung stehen. Die obere Phase wird eliminiert, der verbleibende Anteil dreimal mit dem Chloroform-Methanol-Wassergemisch, dem indessen kein Salz mehr beigegeben wird, ausgewaschen. Man lässt über

⁷⁾ N. S. RADIN & Y. AKAHORI, J. Lipid Research 2, 335 (1961).

⁸⁾ A. HANY, Diss. med., Basel 1961.

Nacht über etwas geglähtem Natriumsulfat stehen und erhält nach dem Eindampfen die Gesamtlipide als weisslichen Rückstand.

2. *Chromatographie auf einer Al_2O_3 -Säule.* Bereits 1944 benutzten KLENK & LEUPOLD⁹⁾ zur Abtrennung der P-haltigen Lipide bei der Gewinnung der Cerebroside Al_2O_3 . LONG & STAPLES⁴⁾ isolierten Cerebroside und Sulfatide aus den Totallipiden des Gehirnes, indem sie dieselben auf eine Al_2O_3 -Kolonnen brachten und mit einem Gradientensystem ansteigender Wasserkonzentration behandelten.

Für etwa 300 mg Gesamtlipide nimmt man 13 g geglähtes Aluminiumoxid, das in Methanol-Chloroform 1:1 aufgeschwemmt in eine ca. 1 cm Durchmesser aufweisende Kolonne gefüllt und mit 50 ccm des gleichen Lösungsmittelgemisches nachgewaschen wird. Man versetzt die Totallipide mit wenig Chloroform-Methanol (1:1) und bringt sie auf die Kolonne. Mitunter gelingt die Lösung nicht völlig, eine Filtration ist aber nicht notwendig. Mit 100 ml des gleichen Lösungsmittelgemisches werden unpolare Lipide, vor allem Cholesterin, herausgelöst. Man eluiert darauf mit ansteigender Wasserkonzentration in Chloroform-Methanol (1:1) die Rohcerebroside. Die zur Anwendung gelangende Apparatur entspricht im wesentlichen den Angaben von SCHWAB, RIEMAN & VAUGHAN¹⁰⁾. Im Reservoir befinden sich 67,5 ml Chloroform, 67,5 ml Methanol und 15 ml Wasser, die in ein Mischgefäss eintropfen, das seinerseits 62,5 ml Chloroform und 62,5 ml Methanol enthält. Ein Magnetrührer sorgt für eine gute Durchmischung. Die eintropfende Menge entspricht der aus dem Mischgefäss auf die Kolonne ausfliessenden und beträgt ca. 100 ml pro Stunde. Die ersten 45 ml, die nach Beginn der Gradienteneluiierung anfallen, enthalten nur Spuren von Lipiden und werden verworfen. Die Cerebroside sind in der folgenden Fraktion von etwa 220 ml enthalten. Sie wird nach Filtration eingedampft.

3. *Chromatographie der Rohcerebroside auf Kieselgel.* Eine Reindarstellung der Cerebroside nur mit Hilfe der Al_2O_3 -Chromatographie gelingt nicht. Die anfallende Fraktion muss weiter gereinigt werden, wobei sich Kieselgel eignet. Auf 100 mg Rohcerebroside werden 20 g gewaschenes Kieselgel verwendet, die in Chloroform aufgeschwemmt in eine Kolonne mit Durchmesser ca. 1,5 cm gelangen. Die Rohcerebroside werden in wenig warmem Chloroform gelöst auf die Kolonne gebracht. Nach Temperaturengleich eliminiert man mit 50 ml Chloroform noch kleinste Mengen unpolarer Lipide. Anschliessend erfolgt die Eluierung der Reincerebroside mit 200 ml eines Chloroform-Methanol-Gemisches 4:1. Auf der Kolonne verbleiben Lecithin und andere Phospholipide.

4. *Prüfung auf Reinheit.* - a) *Zucker:* Die quantitative Zuckerbestimmung erfolgte nach RADIN u. Mitarb.¹¹⁾ mit Anthron. Als Vergleichssubstanz diente reine D-Galaktose. Unsere festgestellten Zuckerwerte stimmten mit der Theorie überein. Die papierchromatographische qualitative Analyse³⁾ nach Hydrolyse mit 3N HCl liess bei Rattengehirn ausschliesslich Galaktose, bei menschlichem Gehirn auch noch geringe Mengen von Glucose erkennen. Mit Phenol¹²⁾ als mobiler Phase fanden wir für die Test-Galaktose und den Cerebrosidezucker einen Rf-Wert von 0,41, für Glucose einen solchen von 0,36. Auch mit einem anderen Laufmittel (Butanol:Äthanol:Eisessig: $H_2O = 180:20:4:80$) ergaben sich bei der Papier- und Silicat-Dünnschicht-Chromatographie diese Befunde. Die Chromatogramme wurden mit Anilin-Phthalat entwickelt.

b) *Phosphor:* Mit *p*-Aminodiphenylamin-hydrochlorid¹³⁾ liess sich kein Phosphor nachweisen.

c) *Stickstoff:* Nach dem Mikro-KJELDAHL-Verfahren fanden wir im Mittel 1,65% N. Unter Annahme, dass die Fettsäure 24 C-Atome aufweist, beträgt dieser N-Wert theoretisch 1,7%.

d) *Schwefel:* Um festzustellen, ob die abgetrennten Cerebroside frei von Sulfatiden sind, prüften wir durch Papier- und Dünnschicht-Chromatographie auf solche Anteile. Nach JATZKEWITZ¹⁴⁾ findet man für Sulfatide auf Silicagelplatten mit einem Laufmittel von *n*-Propanol und 12,5-proz. Ammoniak (80:20) Rf-Werte von 0,69 und 0,61. Unsere Cerebroside zeigten unter

⁹⁾ E. KLENK & F. LEUPOLD, *Z. physiol. Chem.* **287**, 208 (1944).

¹⁰⁾ H. SCHWAB, W. RIEMAN & P. A. VAUGHAN, *Analyt. Chemistry* **29**, 1357 (1957).

¹¹⁾ N. S. RADIN, F. B. LAVIN & J. R. BROWN, *J. biol. Chemistry* **217**, 789 (1955).

¹²⁾ S. M. PARTRIDGE, *Biochem. J.* **42**, 238 (1948); E. CHARGAFF, C. LEVINE & C. H. GREEN, *J. biol. Chemistry* **175**, 67 (1948).

¹³⁾ R. L. DRYER, A. R. TAMMES & J. I. ROUTH, *J. biol. Chemistry* **225**, 177 (1957).

¹⁴⁾ H. JATZKEWITZ & E. MEHL, *Z. physiol. Chem.* **320**, 251 (1960).

¹⁵⁾ H. WAGNER, *Fette u. Seifen* **62**, 1115 (1960).

analogen Bedingungen Rf-Werte von 0,41 und 0,47. Auch nach dem Verfahren von WAGNER¹⁵⁾, welcher auf Dünnschichtplatten mit einem Methanol-Chloroform-Wasser-Gemisch Sphingolipide trennte, waren keine Sulfatide nachweisbar. Mittels Papierchromatographie (Isoamylalkohol: *n*-Butanol: Wasser, 27:25:10) liessen sich keine Sulfatide erkennen. Eine Schwefelanalyse ergab ein negatives Resultat.

e) *Neuraminsäure* als charakteristischer Bestandteil der Ganglioside liess sich nach der Methode KLENK's¹⁶⁾ nicht auffinden.

f) *Schmelzpunkt*: Unsere Cerebroside schmolzen zwischen 201 und 205°.

5. *Zusatz-Versuche*. Um Auskunft über das Ausmass der mengenmässigen Erfassung der vorhandenen Cerebroside durch das geschilderte Verfahren zu erhalten, wurden einige Zusatz-Versuche durchgeführt. Wir trennten den Chloroform-Methanol-Extrakt aus je 6 vereinigten Rattenhirnen in zwei gleiche Teile und fügten zu einem derselben eine bekannte Menge reiner Cerebroside. Die Aufarbeitung ergab die in der Tabelle 2 wiedergegebenen Resultate.

Tabelle 2. *Cerebrosideausbeuten nach Zusätzen*

Cerebrosid-Zusatz mg	Totallipide mg	Roh-Cerebroside mg	Rein-Cerebroside mg	Ausbeute %
0	352	50	41	—
55	401	97	88	85
0	349	50	45	—
50	402	91	87	83

Verluste ergeben sich nur bei der Abtrennung der Rohcerebroside aus den Gesamtlipiden auf der Aluminiumoxid-Kolonnen. Auf die Kieselgel-Kolonnen gebrachte Reincerebroside konnten quantitativ wieder erhalten werden.

6. *Reproduzierbarkeit der Resultate*. Eine bekannte Menge Gesamtlipide wurde in drei gleiche Teile getrennt und in jedem derselben Cerebroside bestimmt. Aus Tabelle 3 geht eine gute Übereinstimmung hervor, d. h. aus jedem der drei gleichen Teile konnten nahezu analoge Cerebroside-mengen mit praktisch identischen Zuckergehalten isoliert werden.

Tabelle 3. *Reproduzierbarkeit der Resultate*

Versuch Nr.	Hirngew. von 8 Ratten g	Totallipide der drei gleichen Teile mg	Roh- Cerebroside mg	Rein-Cerebroside	
				mg	% Galaktose
I	12,4	334	50	43	20,5
		346	50	42	20,5
		332	52	44	20,2
II	10,8	260	36	29	20,8
		268	38	31	19,3
		262	39	30	21,0

*Aufarbeitung menschlicher Gehirne*¹⁷⁾. Die untersuchten Hirne zeigten makroskopisch keine Anomalitäten. Die Diagnose lautete bei I: Coronarsclerose, bei II: Pericarditis, Thrombose der Vena femoralis, bei III: Coronarsclerose und Herzinfarkt, bei IV: Lebercirrhose und Herzhypertrophie. Die Tabelle 4 gibt Auskunft über Frischgewichte der Proben, Menge der erhaltenen Gesamtlipide und prozentualen Gehalt derselben bezogen auf das Frischgewicht, Menge der auf-

¹⁶⁾ E. KLENK & H. LANGERBEIN, Z. physiol. Chem. 270, 185 (1941).

¹⁷⁾ Wir danken Herrn Prof. Dr. A. WERTHEMANN, dem Vorsteher des Pathologisch-Anatomischen Institutes, für das Untersuchungsmaterial.

gearbeiteten Totallipide und Menge Roh- und Reincerebroside. Es geht deutlich hervor, wie durch Chromatographie mit Aluminiumoxid allein nur rohe Fraktionen erhalten werden und erst die weitere Reinigung an der Silicagelkolonne zu reinen Cerebroside führt.

Tabelle 4. *Cerebrosid-Isolierungen aus menschlichen Gehirnen*

Hirn-Region	Alter Jahre	Frisch- gewicht g	Totallipide			Cerebroside	
			g	%	ver- arbeitete Menge mg	roh mg	rein mg
<i>Graue Substanz</i>							
Rinde, Grosshirn . .	72	40,051	1,957	4,9	687,2	41,1	36,8
	82	6,063	0,298	4,9	298,0	31,1	29,1
	91	6,967	0,278	4,0	278,0	24,5	14,5
Rinde, Kleinhirn . .	72	20,719	1,247	6,1	707,5	84,4	58,5
	82	13,102	0,806	6,1	307,0	53,6	35,4
	91	5,086	0,194	3,8	194,0	26,0	17,6
Nucleus caud. . . .	72	26,773	1,767	6,6	646,7	97,2	79,2
	91	3,033	0,074	2,4	73,5	15,3	5,5
<i>Weisse Substanz</i>							
Mark, Grosshirn . .	72	54,899	7,918	14,5	668,3	156,7	131,0
	82	10,016	1,532	15,2	338,2	79,1	70,7
	91	5,970	0,679	11,4	300,8	64,2	57,5
	75	6,212	1,392	12,9	339,4	71,6	69,0
Mark, Kleinhirn . .	72	5,633	0,851	15,1	661,0	147,0	126,0
	82	7,245	1,149	15,9	280,0	62,0	51,5
	91	3,154	0,286	9,1	286,5	59,1	53,4
	75	5,356	1,200	14,4	261,0	55,2	52,6
Medulla oblong. . .	72	7,341	1,046	14,3	654,0	142,0	106,5
	82	6,922	1,020	14,8	305,5	65,0	59,0
	91	2,961	0,256	8,7	256,0	56,9	47,0
	75	4,618	1,030	13,5	356,7	71,9	63,9
Pons	72	23,328	3,396	14,6	707,5	141,4	108,0
	82	7,114	0,985	14,0	315,6	72,0	63,3
	91	5,677	0,547	9,6	332,8	72,4	71,0
	75	7,383	0,819	11,4	291,8	65,4	47,2

Die durch Hydrolyse erhaltenen *Fettsäuren* wurden in gesättigte, ungesättigte und Hydroxy fettsäuren aufgetrennt. Über das methodische Vorgehen werden wir nächstens berichten. Die Gaschromatographie ergab das für Cerebroside charakteristische Bild, wie es von RADIN & АКАНОРИ⁷⁾ ganz kürzlich beschrieben wurde, mit Vorherrschen der C₂₄-Säuren.

Die mitgeteilten Untersuchungen wurden finanziell durch die KOMMISSION FÜR ATOMWISSENSCHAFT des Schweiz. Nationalfonds unterstützt.

SUMMARY

An approximately quantitative method for the isolation of pure brain cerebroside is reported. Crude cerebroside are obtained out of total lipids by chromatography on an alumina column, pure cerebroside are subsequently eluted with chloroform-methanol from a silicagel column. Those are free of phosphatides, sphingomyelins, gangliosides and sulfatides.

Using this method we isolated pure cerebrosides from different parts of old human brains. The content of these substances in white matter (*Cortex, Cerebellum, Medulla oblongata* and *Pons*) in relation to the total lipids is very constant with a mean of 22,7%. The obtained values are a great deal lower than those mentioned by others, who calculated them from the sugar content in the hydrolysate of total brain lipids.

Physiologisch-Chemisches Institut der Universität Basel

154. Metallkomplexe mit Polyaminen XI: Mit 2-Aminomethyl-1, 3-diamino-propan

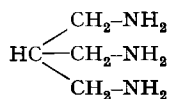
von G. Anderegg

(17. IV. 62)

Vor einigen Jahren erhielt DWYER¹⁾ aus Pyridin-2-aldehyd und 2-Aminomethyl-1,3-diamino-propan im molaren Verhältnis 3:1 eine SCHIFF'sche Base, die mit Fe²⁺ einen tiefvioletten Komplex liefert. Nach dem genannten Autor ist diese Verbindung in Säure beständig und mit einem starken Oxydationsmittel wie Ce⁴⁺, im Gegensatz zum Eisen(II)-Trisphenanthrolin-Komplex, kaum oxydierbar.

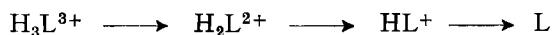
Um die ausserordentliche Stabilität dieses Komplexes zu erklären, wurde die Komplexbildungstendenz des Grundkörpers, d. h. 2-Aminomethyl-1,3-diamino-propan (Tri-(aminomethyl)-methan), genau untersucht²⁾. Modellversuche zeigen nicht deutlich, ob bei diesem Liganden sehr starke Komplexe zu erwarten wären.

Der untersuchte Komplexbildner besitzt drei Stickstoff-Ligandatome, welche durch Methylenketten am gleichen Kohlenstoffatom gebunden sind:



Durch Komplexbildung können dann drei gleiche Chelat-Sechsringe entstehen, was bei oktaedrisch und tetraedrisch koordinierten Metall-Ionen günstig ist.

A. *Die Basizitätskonstanten.* Die Auswertung der Neutralisationskurve des Trihydrochlorids mit Lauge wurde nach zwei Verfahren vorgenommen. Die drei Reaktionsschritte:



erfolgen in drei Stufen mit einer schwachen Überlappung der Puffergebiete, so dass in der Berechnung jeder Konstanten mit einem Extrapolationsverfahren³⁾ der Einfluss der andern Gleichgewichte ausgeschaltet werden muss.

¹⁾ F. P. DWYER, N. S. GILL, E. C. GYARFAS & F. LIONS, J. Amer. chem. Soc. 75, 3834 (1953).

²⁾ Die Komplexe mit Ni²⁺ wurden bereits von T. G. SPIRO & C. J. BALLHAUSEN, Acta chem. scand. 15, 1707 (1961), beschrieben.

³⁾ Das benützte Extrapolationsverfahren wurde erstmals von I. LEDEN, Dissertation, Lund 1943, angewendet.