

Δ^4 -Androsten-3,17-dion aus Testosteron. Eine Lösung von 200 mg Testosteron in 28 ml Aceton-Wasser (9:5) wurde mit Platinkatalysator (hergestellt durch Hydrieren von 100 mg PtO_2 , H_2O in 6 ml Wasser) versetzt und 22 Std. unter Sauerstoff geschüttelt. Eine anfänglich beobachtete kristallisierte Ausscheidung ging später wieder in Lösung. Man filtrierte vom Katalysator ab und dampfte das Filtrat im Vakuum ein. Den Rückstand chromatographierte man an Aluminiumoxid. Die kristallisierten Spitzenfraktionen wurden vereinigt (155 mg) und aus Äther-Pentan umkristallisiert. Δ^4 -Androsten-3,17-dion bildet farblose Polyeder vom Smp. 174–176°; $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +187,2^\circ$ ($c = 0,505$ in abs. Alkohol)³³). IR.-Spektrum: 1730 (Fünfringketon), 1660, 1614 (α, β -ungesätt. Sechsringketon) cm^{-1} ; keine OH-Bande.

$\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{O}_2$ (286,40) Ber. C 79,7 H 9,2 O 11,2% Gef. C 79,6 H 9,0 O 11,4%

SUMMARY

By systematic degradation 10 β -hydroxy-19-norperiplogenin (I), a rearrangement product of strophanthidin, has been transformed into 10 β -hydroxy-19-norandrostane derivatives (XII and XIV) and estrone (XIII). The correlation with these steroid hormones of well known structure confirms the exact position and the β -orientation of the tertiary OH group at C-10 in 10 β -hydroxy-19-norperiplogenin (I).

Pharmazeutisch-chemische Forschungslaboratorien
SANDOZ AG., Basel

³³) L. RUZICKA & A. WETTSTEIN, Helv. 35, 986 (1935).

62. Ein Verfahren zur quantitativen Isolierung reiner Sphingomyeline aus Menschen- und Rattenhirn

von L. Hausheer, W. Pedersen und Karl Bernhard

(18. I. 63)

Die zahlreichen zur Gewinnung von Sphingomyelinen angegebenen Verfahren beschränken sich zumeist auf eine präparative Abtrennung und weitgehende Reindarstellung, erlauben aber keine quantitative Isolierung dieser Lipidfraktionen. ROSENHEIM & TEBB¹⁾, LEVENE²⁾ und KLENK & RENNKAMP³⁾ erhielten unter Ausnützung von Löslichkeitsunterschieden aus menschlichen und tierischen Gehirnen Sphingomyeline. Verschiedene Autoren berechneten aus der Differenz des lipidlöslichen Phosphors und des nach alkalischer Hydrolyse vorliegenden anorganischen Phosphors den Sphingomyelingehalt. Chromatographische Phosphatidtrennungen auf Silikagel⁴⁾ lieferten keine reinen Sphingomyeline. SCHMIDT u. Mitarb.⁵⁾ trennten diese von den Monoamino-Phosphatiden durch alkalische Hydrolyse letzterer. In diesem Sinne verfahren auch BIETH, REBEL & MANDEL⁶⁾, welche die Phosphatide mit Aceton

1) O. ROSENHEIM & M. C. TEBB, J. Physiol., Proc. 1910/11, 1.

2) P. A. LEVENE, J. biol. Chemistry 78, 453 (1914); 24, 69 (1916).

3) E. KLENK & F. RENNKAMP, Z. physiol. Chem. 267, 145 (1941).

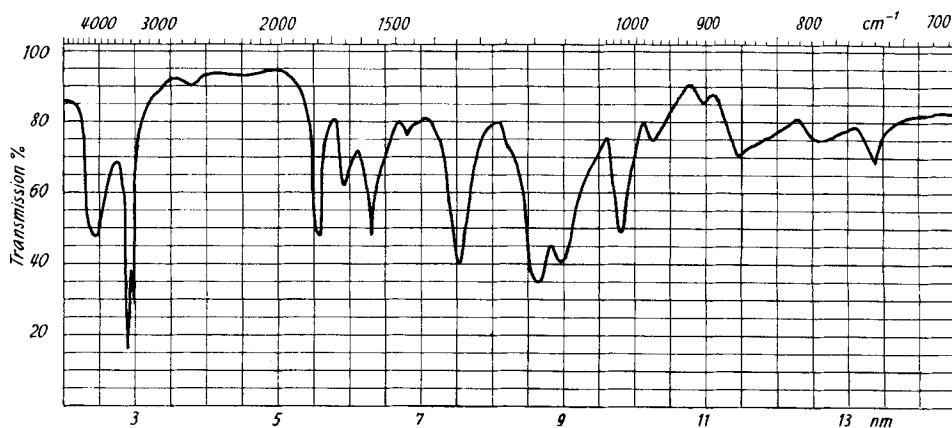
4) B. WEISS, J. biol. Chemistry 223, 523 (1956); G. M. GRAY & M. G. McFARLANE, Biochem. J. 70, 409 (1958).

5) G. SCHMIDT, J. BENOTTI, B. HERSHMAN & S. J. THANNHAUSER, J. biol. Chemistry 166, 505 (1946).

6) R. BIETH, G. REBEL & P. MANDEL, Bull. Soc. Chim. Biol. 47, 1027 (1959).

aus einer Lösung der Totallipide in Benzol ausfällen und eine quantitative Bestimmungsmethode mitteilen. Wir haben jedoch nach deren Angaben weder quantitative Ausbeuten noch reine Sphingomyeline erhalten. Die plattenchromatographische Prüfung liess stets freie Fettsäuren erkennen, die N-Gehalte betragen z. B. nur 2,42, die P-Gehalte 2,21%.

Wir berichten im folgenden über ein Verfahren zur annähernd quantitativen Isolierung von Sphingomyelinen aus Menschen- und Rattenhirnen. Es beruht auf einer Anreicherung der Lecithine und Sphingomyeline aus den Gesamtlipiden auf einer Silikagelkolonne. Darauf werden die Lecithine dieses Gemisches durch alkalische Umesterung gespalten, wobei die Sphingomyeline unverändert bleiben. Wir umgehen nun die Neutralisation des Alkaliüberschusses durch Säure und das Ausschütteln der Spaltprodukte, indem wir das umgeesterte Gemisch erneut auf eine Silikagelkolonne bringen. Mit Chloroform-Methanol werden zuerst die Lecithin-Fettsäuremethylester eliminiert, dann wird mit Methanol das rohe Sphingomyelin eluiert. Eine anschließende Chromatographie auf einer Aluminiumoxidkolonne liefert das Reinprodukt in Ausbeuten von rund 87%.



Durchführung des Verfahrens. – Alle Lösungen müssen im Vakuum bei Temperaturen, die 50° nicht übersteigen, eingengt werden. Sphingomyelin zeigt ein sehr grosses Quellungsvermögen und lässt sich nur schlecht von Methanol trennen. Es kommt leicht zu einem Zerspritzen des Rückstandes, wobei Verluste eintreten können. Wenn man indessen vor dem völligen Eindampfen 5 ml Benzol zufügt, kann man den Rückstand ohne Verluste durch Abdampfen des Lösungsmittels im Vakuum erhalten. Alle Trockenrückstände sind im Hinblick auf die Sauerstoffempfindlichkeit im Vakuum-Exsikkator aufzubewahren. Eine Verfärbung darf nicht eintreten, da sie die weitere Verarbeitung und Reinigung ausschliesst.

1. *Adsorbentien.* – a) *Kieselgel* 0,05–0,2 mm (MERCK) wird in konz. Salzsäure aufgeschlämmt, auf eine Nutsche gebracht, zuerst mit Leitungswasser, anschliessend mit destilliertem Wasser gewaschen und dann getrocknet. Darauf bringen wir es in Chloroform-Methanol 2:1, rühren durch, saugen auf der Nutsche ab und trocknen das so vorbereitete Kieselgel 24 Std. bei 120° im Trockenschrank.

b) *Silikagel* muss zur Aktivierung vor Gebrauch 12 Std. auf 120° erwärmt werden. Man lässt es im Exsikkator abkühlen.

c) *Aluminiumoxid* (RIEDEL) für Chromatographie glühen wir vor Gebrauch eine Stunde im Nickeltiegel aus.

2. *Natriummethylalösung*: 2,70 g reines Natriummethylat werden in 100 ml abs. Methanol gelöst. Wir filtrieren diese trübe 0,5N Natriummethylatlösung und bewahren sie in einer gut verschlossenen Flasche auf.

3. *Gewinnung der Totallipide aus dem Gehirn*: Die Extraktion des homogenisierten Gewebematerials erfolgt nach den Angaben von FOLCH und Mitarb.⁷⁾ Wir erhitzen die so erhaltenen Gesamtlipide zur Abtrennung restlicher Eiweiss-Beimengungen 2 Min. in einem Gemisch Chloroform-Methanol 2:1 und filtrieren über eine Nutsche. Der Rückstand ist mit dem Lösungsmittelgemisch auszuwaschen. Die vereinigten Filtrate werden eingedampft.

4. *Isolierung des Lecithin-Sphingomyelin-Anteils der Totallipide*: 1,00 g der Totallipide, in wenig Chloroform-Methanol (3:1) gelöst, bringen wir auf eine Silikagelkolonne (90 g Silikagel in Chloroform-Methanol (3:1) aufgeschlämmt) von 3 cm Durchmesser. Nun eluiert man mit 1200 ml Chloroform-Methanol (3:1) Cholesterin, Neutralfett, Cerebroside, Sulfatide und Kephaline und darauf mit 600 ml Methanol Lecithine und Sphingomyeline. Die ersten durchlaufenden 25 ml Methanol werden verworfen, die nachfolgenden Methanolvolumen enthalten je nach Ausgangsmaterial 170–320 mg Lecithin-Sphingomyelin-Gemisch.

5. *Abtrennung der Lecithine durch Umesterung*: 200 mg dieses Gemisches löst man in 37 ml wasserfreiem Chloroform-Methanol (1:1) und fügt 4,2 ml 0,5N Natriummethylatlösung zu. Nach 15stündigem Stehen bei Zimmertemperatur wird mit 27 ml wasserfreiem Chloroform verdünnt, damit sich ein Verhältnis Chloroform-Methanol von 2:1 ergibt, und diese Lösung auf eine Silikagelkolonne von 1,6 cm Durchmesser gebracht. Letztere ist mit 35 g in Chloroform-Methanol (2:1) aufgeschlämmt Silikagel gefüllt. Nach beendetem Durchfluss wird die Kolonne mit 250 ml Chloroform-Methanol 2:1 zur Entfernung der Fettsäuremethylester ausgewaschen. Anschließend erfolgt mit 200 ml Methanol die Eluierung der Sphingomyelinfraktion. Sie wird in einer Ausbeute von 10–50% des eingesetzten Sphingomyelin-Lecithingemisches erhalten, enthält aber noch etwas Glycerin und Verbindungen mit freien NH_2 -Gruppen. Die erwähnte Silikagelkolonne erlaubt die Trennung von 170–320 mg Sphingomyelin-Lecithingemisch. 74 mg reines Sphingomyelin, in der oben geschilderten Weise mit Natriummethylat behandelt, wurden unverändert zurückgehalten; das Plattenchromatogramm des wiedergewonnenen Produktes unterschied sich in nichts von dem des Ausgangsmaterials.

6. *Reinigung der Rohsphingomyeline*: In eine Kolonne von 1,5 cm Durchmesser werden 8 g geglähtes, in Chloroform aufgeschlämmtes Aluminiumoxyd eingefüllt und mit 50 ml Chloroform ausgewaschen. Darauf bringt man 75–125 mg in Chloroform gelöste Rohsphingomyeline auf die Kolonne und wäscht mit 50 ml Chloroform noch vorhandene geringe Mengen von Spaltprodukten aus. Die Eluierung der Sphingomyeline gelingt mit 200 ml Chloroform-Methanol 1:1. Sie machen 3–8% der eingesetzten Totallipide aus.

7. *Prüfung der Reinheit*. – *Schmelzpunkt*: 188–190°, nach THIERFELDER & KLENK⁸⁾ 196–198°. Bestimmungen des *Phosphorgehaltes* mit *p*-Amino-diphenylamin-hydrochlorid⁹⁾ ergaben für aus Mark isoliertes Sphingomyelin 3,62 und 3,65, für solches aus Rinde 4,02% P; der *Stickstoffgehalt* (Mikro-KJELDAHL) betrug für dieselben Präparate 3,39, 3,35 und 3,62%; Stickstoff-Phosphor-Atomverhältnis 2,00:0,99. Unter Annahme eines mittleren Mol.-Gew. von 800 errechnen sich 3,87% P und 3,5% N (Atomverhältnis N:P = 2:1).

Die Präparate sind *Zucker-frei* (Prüfung mit Anthron¹⁰⁾).

Ester-Bindungen sind nicht vorhanden; mit Hydroxylamin-hydrochlorid¹¹⁾ tritt keine Färbung auf. Zugabe von 2% Lecithin zu reinem Sphingomyelin bewirkt deutliche Färbung mit diesem Reagens. Das *Infrarot-Spektrum* (vgl. Fig.) in KBr gemessen entspricht den Angaben von SHAPIRO u. Mitarb.¹²⁾.

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

8) H. THIERFELDER & E. KLENK, Die Chemie der Cerebroside und Phosphatide, Berlin 1930.

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

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

11) M. M. RAPPORT & N. ALONZO, J. biol. Chemistry 217, 193 (1955).

12) D. SHAPIRO, H. M. FLOWERS & S. SPECTOR-SHEFER, J. Amer. chem. Soc. 81, 4360 (1959).

Plattenchromatographie: Zur Anwendung gelangten Silicagelplatten, als Laufmittel ein Chloroform-Methanol-Wasser-Gemisch (5:25:4)¹³⁾. Mit *Bromthymolblau* sind die für Sphingomyelin charakteristischen Flecke bei Rf-Werten von 0,23 und 0,20 sichtbar, ferner erscheint ein sehr schwacher Fleck bei 0,11, möglicherweise durch Lysolecithin bedingt. Diese Verunreinigung macht indessen weniger als 1% aus; eine Ablösung und sichere Identifizierung ist nicht gelungen. Mit *Ninhydrin* treten keine Färbungen auf, d. h. es sind keine Substanzen mit freien NH₂-Gruppen zugegen. *Cholinnachweis* mit DRAGENDORFF-Reagens: orangegefärbte Flecke bei Rf-Werten 0,23 und 0,20, schwacher Fleck bei 0,11.

Fettsäuren: 250 mg reines Sphingomyelin wurden mit 12,5 ml 10-proz. methanolischer Schwefelsäure durch Erwärmen auf 90° während 6 Std. hydrolysiert. Nach Abkühlen haben wir erschöpfend mit Petroläther ausgeschüttelt, diesen mit Wasser gewaschen und gereinigt. Der Rückstand lieferte mit Diazomethan behandelt 88 mg Fettsäuremethylester, die wir in gesättigte und ungesättigte Anteile trennten und gas-chromatographisch analysierten. Sphingomyelin aus dem Mark eines gesunden menschlichen Endhirnes zeigte folgende Fettsäurezusammensetzung: 40% Stearinsäure, 30% Nervonsäure, 10% Lignocerinsäure, 5% Palmitinsäure, je ca. 2,5% Behensäure, Tricosansäure, Pentacosansäure und ungesättigte C₂₅-Säuren, je 1% Ölsäure, Arachidinsäure und ungesättigte C₂₆-Fettsäuren.

8. *Versuche zur Prüfung der Methode. – Reproduzierbarkeit der Ergebnisse*: Wir isolierten nach dem beschriebenen Verfahren aus den aus dem Mark eines normalen menschlichen Endhirns gewonnenen Gesamtlipiden die Sphingomyeline. Die Ergebnisse gehen aus der Tabelle hervor.

Sphingomyelinausbeuten aus je 1000 mg Gesamtlipiden

Versuch Nr.		1	2	3	4
Lecithin und Sphingomyelin	mg	200	203	202	187
Sphingomyelin roh	mg	101	101	103	100
Sphingomyelin rein	mg	73	74	73	72

Zusatzversuche: Einem Gemisch von Cholesterin, Neutralfett, Cerebrosiden, Sulfatiden und Kephalingen im Gewichte von 797 mg setzten wir 101 mg reines Lecithin und 79 mg reines Sphingomyelin zu. Die Aufarbeitung ergab 179 mg Lecithin-Sphingomyelin-Gemisch und daraus 90 mg rohes bzw. 67 mg oder 84,8% reines Sphingomyelin. Aus einem Gemisch von 122 mg reinem Lecithin und 78 mg reinem Sphingomyelin erhielten wir 92 mg rohes bzw. 66 mg oder 84,6% reines Sphingomyelin. Aus einem Gemisch von 127 mg Lecithin und 64 mg Sphingomyelin liessen sich 70 mg rohes bzw. 56 mg oder 87,5% reines Sphingomyelin isolieren.

Wir danken der HANS-BUSS-STIFTUNG für eine finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

SUMMARY

A chromatographic method for the isolation of sphingomyelines from human and rat brain is reported. After isolation of the total lipids we first separate lecithine and sphingomyeline, on a silicagel column. Afterwards lecithine is split by transesterification with sodium methoxide. The cleavage products are separated from sphingomyeline on a silicagel column. Sphingomyeline is then purified on an alumina column. It shows an N : P relation of 2 : 1, is free of carbohydrates and ester linkages and can be obtained in a yield of 87%.

Physiol.-Chem. Institut der Universität Basel

¹³⁾ H. WAGNER, *Fette u. Seifen* 62, 1115 (1960).