

145. Über einige Umwandlungsprodukte des «BLIX-Sulfatids» und die Herstellung von quartären Dihydro-sphingosinium-Salzen¹⁾

von J. Kiss

(13. V. 67)

Eine Anzahl von N-acylierten Sphingosinderivaten, die an der primären Hydroxylgruppe des Sphingosin-Gerüsts mit Hexosen glykosidisch verknüpft sind [1] (Glykosylceramide) wurden aus verschiedenen Körperorganen isoliert. Eine Klasse dieser Verbindungen stellen die Sulfatide dar, welche am Zuckeranteil mit Schwefelsäure verestert sind [2]. Obwohl die physiologische Rolle dieser Substanzen [3] im Säugetierorganismus nicht aufgeklärt ist, wurden sie in den letzten Jahren intensiv bearbeitet. CHARGAFF [4] stellte fest, dass die mit Chlorsulfonsäure hergestellten sulfatierten Glykosylceramide eine beträchtliche gerinnungshemmende Wirkung aufweisen. BERNHARD [5] fand, dass die obigen Lipide in arteriosklerotisch veränderten Aorten vermehrt vorhanden sind als in normalen. Besonders die amidartig gebundenen Fettsäuren an den Glykoceramid-Molekeln variieren beim Menschen, so z. B. in Abhängigkeit vom Lebensalter [5] [6] [7]. JATZKEWITZ [8] beschrieb zwei Sulfatide (Cerebron- und Cerasin-sulfat), die aus krankem Menschengehirn (diffuse leucodystrophy) isoliert wurden.

BLIX [9] beschreibt die Isolierung eines Sulfatides aus Menschengehirn. Nach verschiedenen Forschern [10] ist in dieser Verbindung die Sulfatgruppe der äquatorialen C3-Hydroxylgruppe des Galactopyranosidringes verestert. DAVISON [11], ferner HAKOMORI, ISHIMODA & NAKAMURA [12] fanden, dass man die 3,6-Cyclosulfatstruktur nicht ausschliessen kann. Vor kurzem berichteten ANNO & SENO [13] über die Möglichkeit einer Sulfatwanderung bei Chondroitinschwefelsäuren, wobei über cyclische 4,6-Diester stabile 6-Sulfatester entstehen.

Wir haben aus Ochsen-Rückenmark das BLIX-Sulfatid nach der Methode von LEES und Mitarbeiter [14] in präparativem (50 g) Masstab isoliert und durch Säulenchromatographie fraktioniert [15]. Wir fanden in diesem Sulfatidgemisch auch Dihydrosulfatid. Durch Hydrolyse konnte neben Sphingosin auch Dihydrosphingosin erhalten werden. In den anderen Sphingolipid-Typen wurden auch Verbindungen auf Dihydrosphingosin-Basis neben den mengenmässig dominierenden Sphingosin-Derivaten gefunden: OKUHARA & YASUDA [16] berichteten über die Isolierung eines Dihydrocerebrosids (Dihydrophrenosin) aus Menschenhirn, ferner fanden SAMBASIVARO

¹⁾ Vorgetragen am «4th International Symposium on The Chemistry of Natural Products», Stockholm, 30. Juni 1966. Die Versuche wurden teilweise am MAX-PLANCK-Institut für Medizinische Forschung, Heidelberg, 1964, ausgeführt.

& McCLUER [17] unter den Hydrolyseprodukten der Ganglioside neben Sphingosin auch Dihydrosphingosin. Letzteres wurde schon 1947 von CARTER & NORRIS [18] aus den Hydrolyseprodukten des Sphingosin-Gemisches isoliert. Sie stellten fest, dass das Rückenmark-Sphingolipid an Dihydrosphingosin-Verbindungen reicher ist als das Gehirn-Sphingolipid. Die Frage, ob in jeder Sphingolipid-Klasse auch Lipide auf Dihydrosphingosin-Basis existieren, wurde bisher nur teilweise verfolgt.

Die biologische Rolle der Dihydrosphingolipide ist unbekannt. Es wurde noch nicht untersucht, ob im physiologischen Milieu ein Gleichgewicht zwischen den Verbindungen auf Sphingosin- und Dihydrosphingosin-Basis existiert [19].

Wir haben Sphingosin und Dihydrosphingosin aus dem Hydrolyse-Gemisch in Form der leicht trennbaren kristallinen Triacetyl-Derivate isoliert. Die prozentuelle Zusammensetzung der verschiedenen Triacetylsphingosin-Triacetyldihydrosphingosin-Gemische kann, wie CARTER und Mitarbeiter [18] feststellen, am einfachsten auf Grund der spez. Drehwerte bestimmt werden. Triacetylsphingosin, frei von der Dihydro-Verbindung wurde durch wiederholte Chromatographie an einer Florisil-Säule erhalten. Es hat einen spez. Drehwert von $-13,7^\circ$, die Dihydro-Verbindung einen solchen von $+18,1^\circ$ [15]. Der bei der Methanolyse entstandene Sphingosin-methyläther kann durch Methoxylbestimmung des Basengemisches erfasst werden [20].

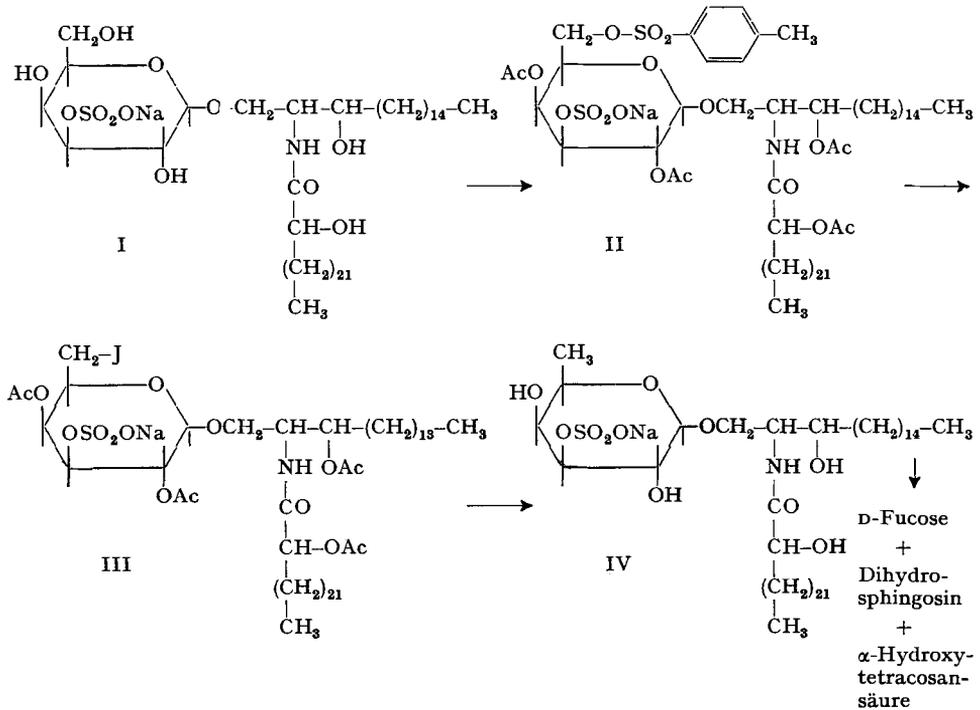
Das reine Dihydrosulfatid wurde durch katalytische Hydrierung aus dem Sulfatid-Dihydrosulfatid-Gemisch hergestellt. Führt man die Hydrierung in Gegenwart von RANEY-Nickel durch, so findet im Allyl-System keine hydrogenolytische Spaltung statt. Unter den angewandten Bedingungen wurde auch kein Sulfatverlust beobachtet. Das chromatographisch gereinigte Sulfatid wurde mit dem Dihydrosulfatid in verschiedenen Mengenverhältnissen vermischt: bei diesen Gemischen konnte keine Smp.-Depression festgestellt werden, da die *trans*-Olefine mit ihren Dihydro-Derivaten ein gemeinsames Kristallgitter bilden können. Auf Grund der BRUNI-Regel [21] kann diese Beobachtung als Hinweis für die *trans*-Olefin-Struktur in den Sulfatid-Molekeln angenommen werden.

Die Sulfatester-Gruppe des «BLIX»-Sulfatids und seines Dihydroderivates kann durch verdünnte Säure nach STOFFYN [10a] oder mit einem sauren Ionenaustauscher (Amberlite IRC-120) selektiv abgespalten werden. Auf diesem Wege wurden Phrenosin bzw. Dihydrophrenosin erhalten. Da die Struktur der letzteren Verbindungen weitgehend gesichert ist [22], kann man annehmen, dass die Lage der Doppelbindung und die Konfiguration beider asymmetrischer Kohlenstoffatome im Sphingosingerüst des Sulfatids mit denjenigen des natürlichen *D-erythro*-Sphingosins übereinstimmt.

Das nicht chromatographierte Sulfatid, hergestellt nach der Methode von BLIX [9], wurde mit Schwefelsäure hydrolytisch gespalten, und die Fettsäurefraktion mit Diazomethan methyliert und gas-chromatographisch analysiert; im Einklang mit den Untersuchungen von O'BRIEN, FILLERUP & MEAD [23] sind neben dem dominierenden α -Hydroxytetracosansäure-methylester in geringem Masse auch andere (C_{12} - C_{26}) Monocarbonsäure- und α -Hydroxymonocarbonsäureester (etwa 16% ungesättigte) vorhanden.

Das Nichtvorhandensein einer 3,6-cyclischen Sulfatgruppe im Galactopyranosidring [11] [12], entsprechend der Regel von OLDHAM & RUTHERFORD [24] haben wir wie folgt festgestellt. Die voraussichtlich freie C6-Hydroxylgruppe des Galactopyra-

nosid-Restes im Dihydrosulfatid²⁾ wurde mit *p*-Toluolsulfonsäurechlorid verestert, anschliessend wurden die übrigen freien Hydroxyle acetyliert (\rightarrow II). In der nächsten Stufe wurde der acetylierte 6-*p*-Toluolsulfonylester mittels Natriumjodid in die 6-J-Verbindung III übergeführt, die durch Reduktion das entsprechende 6-Desoxy-Derivat lieferte. Ammonolytische Abspaltung der Acetylgruppe führte zum 6-Desoxy-sulfatid IV, letzteres wurde hydrolysiert, worauf neben Dihydrosphingosin und α -Hydroxytetracosansäure nur D-Fucose isoliert und in Form ihres Phenylsazons charakterisiert werden konnte.

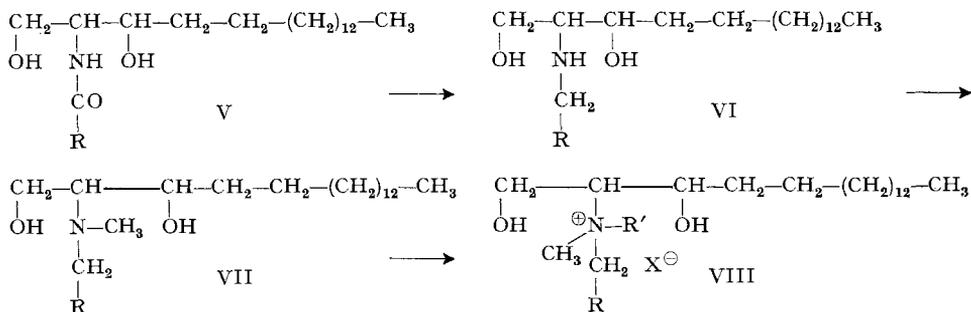


Dadurch ist bewiesen, dass die Hydroxylgruppe am Kohlenstoffatom 6 des Galactopyranosidrestes in den Sulfatiden und Dihydrosulfatiden frei ist; das schliesst eindeutig die Existenz eines 3,6-cyclischen Sulfatesters [11] [12] aus. Die Tatsache,

²⁾ TANNHAUSER und Mitarbeiter [25] und auch NAKAYAMA [26] haben festgestellt, dass weder die Sulfatide noch die Cerebroside einen Trityläther geben. Die Tritylierung erwies sich in der Glycolipid-Gruppe als ungeeignet zum Nachweis der primären alkoholischen Hydroxylgruppe im Hexopyranosid-Rest. Mit der klassischen Methylierungsmethode kann die Lage der Sulfatgruppe am Hexopyranosid-Ring nicht eindeutig bewiesen werden, weil die Rf-Werte des 2,4,6-Tri-O-methyl-D-galactopyranosids und des 2,3,4-Isomeren fast identisch sind (FLOWERS [27], YAMAKAWA [10 b]). Die gas-chromatographische Charakterisierung der methylierten D-Galactopyranosid-Abbauprodukte [8] bestätigt die Annahme der 3-Stellung für die Sulfatestergruppe. BRADY und BROWN [28] (s. auch TANNHAUSER *et al.* [25], die irrtümlich auf eine 6-Sulfatester-Struktur schlossen) bezweifeln aber diese Beweisführung, weil obige Methode bei sulfateterhaltigen Zuckern nicht einwandfrei ist. Bei den Sulfatestern sowie bei den Phosphatestern kann man eine O \rightarrow O Sulfat- (bzw. Phosphat)-Wanderung unter den Bedingungen, die für die Methylierung verwendet wurden, nicht ausschliessen.

dass die Sulfatide und Dihydrosulfatide von Perjodsäure nicht oxydiert werden, ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der Sulfatrest mit der äquatorialen Hydroxylgruppe [10] am C-3 des D-Galactopyranosidringes verknüpft ist³⁾.

Nir haben weiterhin aus N-acylierten Dihydrosphingosin-Derivaten Vertreter eines bisher nicht beschriebenen Typs von quartären Dihydrosphingosinium-Salzen VIII auf folgendem Wege hergestellt: Durch Reduktion der Amidgruppierung mit Lithiumaluminiumhydrid wird das sekundäre Amin VI erhalten. Dieses wird in das tertiäre Amin VII übergeführt, welches durch Alkylhalogenide zu VIII quaternisiert wird.



R = Alkyl-, R' = niederes Alkyl, X = Br, J

Im Gegensatz zu den meisten Sphingosin-Derivaten kristallisieren diese quartären Halogenide leicht und rasch. Sie sind in Wasser löslich und bilden mit Mucopolysacchariden, wie Heparin, Chondroitinschwefelsäuren usw. Quartärsalze, deren Wasserlöslichkeit gering und Lipidlöslichkeit gut ist. Darauf lässt sich ein einfaches und selektives Trennungsverfahren der Mucopolysaccharide⁴⁾ basieren, entsprechend der Methode von KUHN [29], SCOTT [30], VELLUZ und Mitarbeiter [31].

Experimenteller Teil⁵⁾

1. *Isolierung des Rohsulfatids aus Ochsen-Rückenmark-Sphingolipid-Gemisch.* Das Sphingolipid-Gemisch wurde aus tiefgekühltem Ochsen-Rückenmark nach CARTER und Mitarb. [32] hergestellt: 20 kg tiefgekühltes Ochsen-Rückenmark werden in Brunnenwasser (12–15°) aufgetaut (24 Std.), von Fett- und Blutrückständen gereinigt und in einer Fleisch-Hackmaschine zerkleinert. Die Entwässerung erfolgt unter mechan. Rühren durch 4malige Behandlung mit je 15–20 l Aceton bei 22–24°. Der abzentrifugierte Rückstand wird durch ähnliche 3malige Behandlung mit je 10–12 l Äther oder Diisopropyläther entfettet. Das abzentrifugierte weisse, pulverförmige Material wird im Vakuum (12–20 Torr) vom Lösungsmittel befreit und in 2 Ansätzen 2mal mit je 5–6 l 95-proz. Alkohol unter mechan. Rühren 1–1,5 Std. unter Rückfluss extrahiert. Die vereinigten Lösungen werden in Eis gekühlt. Die ausgeschiedenen Sphingolipide werden auf einer G3-Nutsche gesammelt, mit Alkohol (2mal 300 ml) gewaschen und im Vakuum (12–15 Torr) bei 45° getrocknet. Man erhält so 450–500 g weisse, pulverförmige Substanz. Beim Einengen der Mutterlauge bei ca. 40° auf 1/5 des Originalvolumens können noch weitere 50–80 g Substanz erhalten werden.

Aus dem so erhaltenen Sphingolipidgemisch wird das Rohsulfatid nach BLIX [9] wie folgt isoliert: 300 g fein pulverisiertes Material werden 2mal in je 1,5 l abs. Pyridin bei 60° ausgerührt,

³⁾ FLOWERS [27] stellte vor kurzem synthetische Dihydrocerasin-3- und 6-Sulfate dar. Beide Produkte besitzen ähnliche physikalisch-chemische Eigenschaften.

⁴⁾ Über diese Ergebnisse wird später berichtet.

⁵⁾ Die Smp. sind nicht korrigiert.

die Suspension wird auf 0° abgekühlt und die ausgeschiedene Substanz abgenutscht. Letztere wird mit 20 Volumenteilen Eisessig bei 60° behandelt, das Gemisch auf 16° abgekühlt und die ausgeschiedene Substanz abgenutscht. Auf diese Weise werden 27 g weisses, kristallines Rohsulfatid erhalten. Die weitere Reinigung erfolgt chromatographisch an einer Florisil-Säule.

2. *Chromatographische Auftrennung des Rohsulfatids*: 1,2 kg Florisil (60–100 Mesh) werden in 3 l Methanol-Chloroform-(1:1) aufgeschlämmt und in ein Chromatographierohr (6 × 150 cm) eingefüllt. Die Säule wird mit 3 l des gleichen Lösungsmittel-Gemisches und mit 3 l Methanol-Chloroform-(1:3) gewaschen. 50 g Rohsulfatid, in 1000 ml Methanol-Chloroform-(1:3) gelöst, werden auf die Säule gegeben. Dann wird mit demselben Gemisch bei 22° eluiert. Durchlaufgeschwindigkeit: 100 ml pro 15–20 Min.; Fraktionen zu 600 ml. Alle Fraktionen werden an Kieselgel-F-Dünnschichtplatten geprüft, Laufmittel: Chloroform-Methanol-2N Ammoniumhydroxid (40:10:1); Laufzeit ca. 1 Std.; Entwicklung der Platten durch Besprühen mit konz. Schwefelsäure und Erwärmen auf 80–100°. In den ersten drei Fraktionen befinden sich neben Sulfatid noch Cerebroside. Die 4. Fraktion erwies sich als reines, einheitliches Cerebrosulfatid. Ausbeute: 7,2 g, Smp. 212–213° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = +1,83^\circ$ ($c = 0,60$ in Dimethylformamid). Rf: 0,80 (Chloroform-Methanol-2N Ammoniumhydroxid, 40:10:1). IR.: Hydroxyl-, Amid-, Sulfatester-, C–O–C-, Olefin-Banden. Kaliumpermanganat- und Tetranitromethan-Reaktion sind positiv.

$C_{48}H_{92}O_{12}NSNa$	Ber. C 61,97	H 9,97	N 1,51	S 3,44	Na 2,47%
(930,29)	Gef. „ 61,88	„ 10,05	„ 1,68	„ 3,36	„ 2,58%

BLIX [9] beschreibt sein Cerebrosulfatid als K-Salz mit Spuren von Na, Ca und Cu, er konnte keine optische Aktivität feststellen. Unser Produkt gibt durch Spaltung mit konz. Schwefelsäure in Methanol (mit 5% Wasserzusatz) Dihydrosphingosin-freies Sphingosin (charakterisiert in Form seines Triacetats: Smp. 101–102°; $[\alpha]_D^{25} = -13,7^\circ$ (in Chloroform)). Als Fettsäurekomponente wurde ein Gemisch von α -Hydroxytetracosansäure und ihrem Methylester isoliert; nach Behandlung der petrolätherlöslichen Fraktion des Hydrolyse-Gemisches mit Diazomethan wurde chromatographisch einheitlicher α -Hydroxytetracosansäure-methylester erhalten.

Die weiteren Methanol-Chloroform-Eluate der Florisil-Säule enthalten neben dem Cerebrosulfatid auch sein Dihydro-Derivat. Die Menge des Dihydro-sulfatids kann bis auf 25–30% steigen. Der Gehalt an Dihydro-Derivat wurde auf folgende Weise bestimmt: Nach hydrolytischer Spaltung werden die Basen acetyliert und die Zusammensetzung des erhaltenen Gemisches von Triacetyl-sphingosin und Triacetyldihydro-sphingosin durch Bestimmung der optischen Aktivität ermittelt.

3. *Hydrierung des Sulfatids mit RANEY-Ni und Wasserstoff*: 4,0 g chromatographisch einheitliches Sulfatid (Fr. 4 aus dem oben beschriebenen Versuch) werden in 400 ml Methanol in Gegenwart von 4,0 g RANEY-Ni bei 60°/60 Atü 6 Std. hydriert (V_{2A} -Autoklav mit Duranglas-Einsatz). Die Lösung wird heiss filtriert und eingedampft. Die hydrierte Substanz kristallisiert rasch aus. Laut Dünnschichtchromatogramm tritt nur geringfügige Desulfatierung während der Hydrierung ein. Das hydrierte Produkt wird aus 80 ml heissem Methanol umkristallisiert: 2,2 g schneeweisse, mikrokristalline Substanz. Smp. 217–220° (Zers.); keine Farbreaktion mit Kaliumpermanganat oder Tetranitromethan. $[\alpha]_D^{25} = +6,67^\circ$ ($c = 0,68$ in Dimethylformamid). Rf = 0,87 (Chloroform-Methanol-2N NH_4OH 40:10:1). IR.: Hydroxyl-, Amid-, Sulfatester- aber keine Olefin-Banden.

$C_{48}H_{94}O_{12}NSNa$	Ber. C 61,82	H 10,16	N 1,50	S 3,43%
(932,30)	Gef. „ 61,66	„ 10,23	„ 1,44	„ 3,52%

Durch hydrolytische Spaltung und anschliessende Acetylierung wird chromatographisch reines Triacetyldihydro-sphingosin (Smp. 101–102°, $[\alpha]_D^{25} = +18^\circ$) isoliert.

Das Cerebro-sulfatid wurde mit dem Cerebro-dihydro-sulfatid in verschiedenen Mengenverhältnissen vermischt. Alle diese Gemische schmelzen zwischen 212° und 218°, sie geben keine Smp.-Depression.

4. *Methanolyse des Cerebro-dihydro-sulfatids in Gegenwart von Amberlite IRC-120*: 1,0 g Dihydro-sulfatid wird mit 10 ml Amberlite IRC-120 (H^+ -Form) in 50 ml Methanol 10 Std. unter Rückfluss gekocht. Die heisse Lösung wird genutscht, der Nutschrückstand mit Methanol gewaschen und die Methanollösung auf etwa 20 ml eingedampft. Die ausgeschiedene weisse Substanz wird abgenutscht und mit wenig Methanol gewaschen: S-Probe negativ; Smp. 190–192° (Zers.); $[\alpha]_D^{25} =$

+ 5,37° ($c = 0,54$ in Dimethylformamid). Sie erwies sich als identisch mit Dihydrophrenosin (Misch-Smp.; IR.: Hydroxyl-, Amid-, C–O–C-Banden).

$C_{48}H_{95}O_9N$ (830,25) Ber. C 69,43 H 11,55 N 1,69% Gef. C 69,22 H 11,71 N 1,75%

5. *Herstellung von 6-Desoxy-dihydrosulfatid*. Die nachstehenden Versuche wurden mit dem gleichen Erfolg mit Dihydrosulfatid ausgeführt, das aus Rohsulfatid oder aus chromatographisch gereinigtem Sulfatid erhalten wurde.

Dihydrosulfatid-tosylat-acetat. Eine Lösung von 3,7 g Dihydrosulfatid in 100 ml Pyridin wird mit 1,0 g *p*-Toluolsulfochlorid versetzt. Nach 15 Std. Stehen bei 22° wird die Lösung mit 10 ml Essigsäureanhydrid versetzt und bei derselben Temperatur noch 8–10 Std. stehengelassen. Anschließend wird bei 35° Badtemperatur i. V. eingedampft, der Rückstand in 300 ml Methylchlorid aufgenommen und diese Lösung mit 5-proz. Natriumhydrogencarbonat-Lösung (4mal 200 ml), 1N Salzsäure (2mal 200 ml) und zuletzt mit dest. Wasser gewaschen. Die über Natriumsulfat getrocknete Lösung wird i. V. eingedampft, und es bleiben 4,5 g Sirup zurück. $[\alpha]_D^{25} = +19,6^\circ$ ($c = 1,42$ in Chloroform). Rf = 0,72 in Petroläther-Aceton-(7:3). IR.: Ester-, Amid-, Sulfatester- und Aromat-Banden.

$C_{63}H_{108}O_{17}NS_2Na$ (1238,63) Ber. S 5,18% Gef. S 4,95%

6-Desoxy-dihydrosulfatid. 2,5 g nicht gereinigtes Dihydrosulfatid-tosylat-acetat und 5,0 g Natriumjodid werden in 40 ml Aceton aufgelöst und in einem Bombenrohr bei 130° 24 Std. [33] erwärmt. Die Lösung wird eingedampft, der Rückstand mit Benzol extrahiert, die Benzollösung mit Wasser gewaschen, über Natriumsulfat getrocknet und eingedampft. Der amorphe Rückstand (2,1 g) wird in einem Autoklaven in 50 ml Methanol in Gegenwart von 2,5 g RANEY-Ni und 2 g Natriumhydrogencarbonat bei 60° und 60 Atü 8 Std. hydriert. Die filtrierte, wasserklare Methanol-Lösung wird bei –10° 2 Std. mit Ammoniakgas behandelt und anschließend im geschlossenen Gefäß 48 Std. bei 22° stehengelassen. Nach Eindampfen der filtrierten Lösung bleiben 1,4 g weisse, amorphe Substanz zurück. 800 mg von diesem Produkt reinigt man chromatographisch an 30 g Florisil. Die Methanol-Chloroform-(1:3)-Elate geben 280 mg weisse, mikrokristalline Substanz. Smp. 208–210° (Zers.). $[\alpha]_D^{25} = +5,12^\circ$ ($c = 0,47$ in Dimethylformamid). IR.: Hydroxyl-, Amid-, Sulfatester-Banden.

$C_{48}H_{94}O_{11}NSNa$ (916,31) Ber. C 62,92 H 10,34 S 3,50% Gef. C 62,89 H 10,53 S 3,36%

Hydrolytische Spaltung des 6-Desoxy-dihydrosulfatids: 500 mg des oben erhaltenen Ammonolyseproduktes werden in einem Gemisch von 30 ml Methanol und 5 ml Wasser mit 6 ml Amberlite IRC-120 (H⁺-Form, wasserfeucht) 48 Std. unter Rückfluss gekocht. Die filtrierte Lösung wird eingedampft und der feste Rückstand mit 2mal 15 ml Wasser extrahiert. Die vereinigten Wasserextrakte werden mit 250 mg Phenylhydrazin-sulfat und 1 g Na-Acetat auf dem Dampfbad 2 Std. erwärmt und anschliessend auf ein kleines Volumen eingedampft. Das ausgeschiedene Produkt wird aus 50-proz. Alkohol umkristallisiert, Smp. 178°; es ist mit authentischem D-Fucose-phenylosazon [34] identisch (Misch-Smp. 178°). Die aus einem zweiten Hydrolyseversuch gewonnene wässrige Lösung wurde papierchromatographisch geprüft: Ausser D-Fucose konnten keine anderen Zucker nachgewiesen werden (Kieselgel-F-Platte in Chloroform-Aceton-Essigsäure-(5:3:1); entwickelt mit 10-proz. AgNO₃ + NH₃).

6. *Herstellung von quartären Dihydrosphingosinium-Salzen*. – *Reduktion von N-Acetyl-dihydrosphingosin mit Lithiumaluminiumhydrid*. Eine Lösung von 3,0 g N-Acetyl-dihydrosphingosin, Smp. 125–126° (hergestellt nach CARTER und Mitarb. [7]) in 180 ml abs. Tetrahydrofuran wird unter mechan. Rühren zu einer Lösung von 1,2 g Lithiumaluminiumhydrid in 30 ml abs. Tetrahydrofuran getropft. Das Gemisch wird 2 Std. unter Rückfluss gekocht, dann wird das überschüssige Lithiumaluminiumhydrid durch Zusatz von 10 ml Essigester und 20 ml Wasser zerstört, die unlöslichen anorg. Salze werden abgenutscht und die Lösung eingedampft. Die letzten Spuren von Wasser werden durch Azeotropdestillation mit Benzol-Alkohol entfernt. Der Rückstand wird 2mal mit je 100 ml Äther extrahiert und eingedampft. Das erhaltene N-Äthyl-dihydrosphingosin wird an 40 g Florisil gereinigt. Die reine Substanz kann mit Essigester oder Essigester-Methanol-(80:20) eluiert werden. Kristalline, wachsartige Verbindung (ähnlich der Dihydrosphingosin-Base). Smp. 52–55° $[\alpha]_D^{25} = -5,7^\circ$ ($c = 0,51$ in Chloroform). Ausbeute 2,2 g.

$C_{20}H_{49}O_2N$ (429,55) Ber. N 4,25% Gef. N 4,16%

Quaternisiertes Derivat VIII: N-Äthyl-N,N-dimethyl-dihydrospingosinium-jodid. Zu 2,6 g 90-proz. Ameisensäure werden 3,0 g nicht chromatographiertes N-Äthyl-dihydrospingosin und 2,0 g 40-proz. wässrige Formaldehydlösung gegeben. Das Gemisch wird in einem Ölbad von 90–100° erwärmt (nach 5 Min. beginnt die CO₂-Entwicklung). Nach 6 Std. wird i. V. eingedampft. Der Rückstand wird durch Destillation mit Benzol-Alkohol-Gemisch wasserfrei gemacht (Rückstand 3,0 g), in 30 ml Äther aufgenommen und die Lösung mit 3,0 g Methyljodid 8 Std. unter Rückfluss gekocht. Beim Abkühlen scheidet sich das quartäre Dihydrospingosiniumsalz ab. Es wird abgenutscht (3,2 g) und aus einem Gemisch von Chloroform und abs. Äther umkristallisiert: Blättchen, die bei 64° durchsichtig werden und bei 180–181° schmelzen. $[\alpha]_D^{25} = -7,18^\circ$ ($c = 1,02$ in Chloroform).

C₂₂H₄₈O₂NJ (485,5) Ber. C 54,42 H 9,95 N 2,89% Gef. C 54,83 H 10,09 N 3,05%

Nach dieser Methode können auch andere quatäre Sphingosinium- und Dihydrospingosinium-Salze hergestellt werden, z. B. das *N-Benzyl-N-äthyl-N-methyl-dihydrospingosinium-bromid*. Kristalle aus Äther. Smp.: wird bei 40° durchsichtig, Niveaubildung bei 83–84°. $[\alpha]_D^{25} = -8,65^\circ$ ($c = 0,52$ in CHCl₃).

C₂₈H₅₂O₂NBr (514,63) Ber. C 65,35 H 10,18 N 2,72% Gef. C 65,18 H 10,03 N 2,81%

Über weitere Versuche wird später, zusammen mit der Fraktionierung der Mucopolysaccharide durch quartäre Sphingosinium- und Dihydrospingosinium-Salze, berichtet.

SUMMARY

In the sulfatide fraction of beef spinal-cord, isolated according to the method of BLIX [9] and LEES [14], there are also sulfatides present derived from 2S,3R-1,3-dihydroxy-2-amino-octadecane.

By catalytic hydrogenation of the BLIX sulfatide the pure dihydro compound was obtained. The sulfate group of this dihydro sulfatide can be split selectively with Amberlite IRC-120, resulting with good yield in the dihydrocerebron.

It is shown that, according to the rule of OLDHAM & RUTHERFORD [24], the C6-hydroxyl group in the sulfatide and in the dihydro sulfatide molecule is free.

On the basis of these results, the sulfatide and the dihydro sulfatide molecules present neither a 3,6-cyclic sulfate [11] [12] nor a 6-sulfate ester group [25].

A simple method for the quaternisation of dihydrospingosine is described. These quaternary compounds can be used for the fractionation of the mucopolysaccharides.

Chemische Forschungsabteilung der
F. HOFFMANN-LA ROCHE & Co. AG., Basel

LITERATURVERZEICHNIS

- [1] H. E. CARTER, P. JOHNSON & E. J. WEBER, *Ann. Rev. Biochemistry*, **34**, 109, (1965); M. STACEY & S. A. BARKER, «Carbohydrate of Living Tissues», Van Nostrand, 1962.
- [2] I. H. GOLDBERG, *J. Lipid Res.* **2**, 103 (1961).
- [3] A. N. DAVISON & N. GREGSON, *Biochem. J.* **85**, 558 (1962); R. O. BRADY & E. G. TRAMS, *Ann. Rev. Biochemistry* **33**, 75 (1964); J. H. AUSTIN, *Proc. Soc. exper. Biol. Med.*, **100**, 361 (1959).
- [4] E. CHARGAFF, *J. biol. Chemistry* **121**, 187 (1937).
- [5] L. HAUSHEER und K. BERNHARD, *Z. physiol. Chem.* **331**, 41 (1963); P. LESCH, S. MEIER & K. BERNHARD, *Helv.* **49**, 791 (1966).
- [6] I. H. MENKES, M. PHILIPPART & M. C. CONCONE, *J. Lipid. Res.* **7**, 479 (1966); Y. KISHIMOTO & N. S. RADIN, *ibid.* **1**, 79 (1959).
- [7] H. E. CARTER & F. L. GREENWOOD, *J. biol. Chemistry* **199**, 283 (1952).

- [8] H. JATZKEWITZ, *Z. physiol. Chem.* **320**, 134 (1960); *Ber. deutsch. chem. Ges.* **700**, 1667 (1967).
- [9] G. BLIX, *Z. physiol. Chem.* **279**, 82 (1933).
- [10] a) P. STOFFYN, *Biochim. biophysica Acta* **70**, 218 (1963). – b) T. YAMAKAWA *et al.*, *J. Biochemistry [Tokyo]* **52**, 226 (1963).
- [11] A. N. DAVISON, *Biochem. J.* **97**, 3 P (1964).
- [12] S. HAKOMORI, T. ISHIMODA & K. NAKAMURA, *J. Biochemistry [Tokyo]* **52**, 468 (1962).
- [13] K. ANNO & N. SENO, *Carbohydrate Res.* **2**, 338 (1966).
- [14] M. LEES, F. FOLCH, G. H. SLOANS-STANLEY & S. CARR, *J. Neurochemistry* **4**, 9 (1959); L. SVENNERHOLM & H. THORIN, *J. Lipid Res.* **3**, 483 (1962).
- [15] M. A. WELLS & J. C. DITTMER, *J. Chromatogr.* **78**, 503 (1965).
- [16] E. OKUHARA & M. YASUDA, *J. Neurochemistry* **6**, 112 (1960).
- [17] K. SAMBASIVARAO & R. H. MCCLUER, *J. Lipid Res.* **5**, 103 (1964).
- [18] H. E. CARTER, W. P. NORRIS, D. J. GLICK, G. E. PHILLIPPS & R. HARRIS, *J. biol. Chemistry* **170**, 269 (1947); E. KLENK, *Z. physiol. Chem.* **185**, 169 (1929); C. A. GROB & F. GADIENT, *Helv.* **40**, 1145 (1957).
- [19] N. K. KOCHETKOV, I. G. ZHUKOVA & I. S. GLUKHODED, *Biochim. biophysica Acta* **70**, 716 (1963).
- [20] K. A. KARLSSON & G. A. L. HOLM, *Acta chim. scand.* **79**, 2423 (1965); R. C. GAVER & C. C. SWEELEY, *J. Amer. Oil Chem. Soc.* **42**, 294 (1965); A. MOSCATELLY & J. R. MAYES, *Biochemistry* **4**, 1386 (1965). C. C. SWEELEY & E. A. MOSCATELLY, *J. Lipid Res.* **7**, 40 (1959); G. SCHMID, E. L. HOGAN, N. J. FELDMAN, J. P. JOSEPH, T. TANAKO, K. OKABE, A. K. FYDA, R. A. COLLINS & R. W. KEENAN, *Abstr. Papers*, 152. Meeting of the Amer. Chem. Soc. **1966**, C/21.
- [21] G. BRUNI & F. GORNI, *Atti R. Accad. Lincei* **8**, I 454 (1899); G. FODOR & J. KISS, *Nature* **171**, 651 (1953).
- [22] J. KISS, D. BANFI & F. SIROKMAN, *Helv.* **43**, 2198 (1960).
- [23] J. S. O'BRIEN, D. L. FILLERUP & J. F. MEAD, *J. Lipid Res.* **5**, 109 (1964).
- [24] J. W. H. OLDHAM & J. K. RUTHERFORD, *J. Amer. chem. Soc.* **54**, 366 (1932).
- [25] S. J. TANNHAUSER, J. FELLIS & G. SCHMIDT, *J. biol. Chemistry* **275**, 211 (1955).
- [26] T. NAKAYAMA, *J. Biochemistry [Tokyo]* **38**, 157 (1951).
- [27] H. M. FLOWERS, *Carbohydrate Res.* **2**, 371 (1965).
- [28] R. O. BRADY, *Biosynthesis of Glycolipids*, S. 95, 108, in «*Metabolism and Physiological Significance of Lipids*», ed. by R. M. C. DAWSON & D. N. THODES, *J. Wiley*, London 1964.
- [29] R. KUHN, D. JERSCHEL & O. WESTPHAL, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **73**, 1095 (1940).
- [30] J. E. SCOTT, *Methods biochem. Analysis* **8**, 145 (1960).
- [31] L. VELLUZ, G. NOMINE & J. METHIEU, *Bull. Soc. Chim. biol.* **47**, 415 (1959).
- [32] H. E. CARTER, W. J. HAINES, W. E. LEDYARD & W. P. NORRIS, *J. biol. Chemistry* **169**, 77 (1947).
- [33] CH. TAMM, *Helv.* **32**, 163 (1949).
- [34] E. VOTOČEK, *Ber. deutsch. chem. Ges.* **37**, 3859 (1905).
-